

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7650802号
(P7650802)

(45)発行日 令和7年3月25日(2025.3.25)

(24)登録日 令和7年3月14日(2025.3.14)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		

請求項の数 16 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-538206(P2021-538206)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	令和1年12月27日(2019.12.27)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(65)公表番号	特表2022-515543(P2022-515543 A)		F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(43)公表日	令和4年2月18日(2022.2.18)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/087064		・グレンツァーヘルストラツセ 1 2 4
(87)国際公開番号	WO2020/141145	(74)代理人	100102978
(87)国際公開日	令和2年7月9日(2020.7.9)		弁理士 清水 初志
審査請求日	令和4年12月13日(2022.12.13)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	18215920.2		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	平成30年12月30日(2018.12.30)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗ウサギCD19抗体および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ウサギCD19に結合する抗体であって、

- (a) 配列番号32または33または34のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (b) 配列番号35または36のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (c) 配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (d) 配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (e) 配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および
- (f) 配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3

を含む、抗体。

【請求項2】

モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号30の重鎖可変ドメインと配列番号26の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項5】

全長抗体、またはFab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)2、Fv、scFv断片、およびダイアボディからなる群より選択される抗体断片である、請求項1から4のい

ずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記検出可能な標識が、蛍光色素である、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

ウサギ B 細胞を選択するための方法であって、

a) 多数のウサギ細胞を、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体とインキュベートする工程、および

b) 請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体が結合している 1 つまたは複数の B 細胞を選択し、それによって、ウサギ B 細胞を選択する工程

を含む、方法。

【請求項 9】

工程 b) の後かつ工程 c) の前における、前記ウサギ B 細胞を共培養培地中で 37 で 1 時間インキュベートする工程、および / または

c) 請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体が結合している 1 つもしくは複数のウサギ B 細胞を単一細胞として置く工程、および / または

d) 前記単一細胞として置かれたウサギ B 細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、および / または

e) 工程 d) で増殖しているウサギ B 細胞を選択し、それによって、ウサギ B 細胞を選択する工程

のうちの 1 つまたは複数を含み、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ウサギ細胞の培養物からウサギ非 B 細胞を除去するための方法であって、

a) 単一細胞または細胞のプールのいずれかとして置かれたウサギ B 細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの前記細胞を、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体とインキュベートする工程、および

c) 請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体が結合している 1 つまたは複数のウサギ B 細胞を選択し、それによって、ウサギ非 B 細胞を除去する工程

を含む、方法。

【請求項 11】

単一細胞として置かれたウサギ B 細胞とフィーダー細胞との共培養物中のウサギ B 細胞の数を決定するための方法であって、

a) 単一細胞として置かれたウサギ B 細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの前記細胞を、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体とインキュベートする工程、および

c) 請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体が結合している細胞の数を数えることによって、前記培養物中のウサギ B 細胞の数を決定する工程

を含む、方法。

【請求項 12】

1 つまたは複数のウサギ B 細胞を共培養するための方法であって、

- 多数のウサギ B 細胞を、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体とインキュベートする工程、または多数のウサギ B 細胞の個々のウサギ B 細胞を、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体で標識する工程、

- 請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体がその表面に結合している、または個々のウサギ B 細胞 (単一細胞として置かれたウサギ B 細胞) またはウサギ B 細胞のプールのいずれかとして標識されている、1 つまたは複数のウサギ B 細胞を選択するまたは置く工程、および

10

20

30

40

50

- 前記単一細胞として置かれたウサギ B 細胞または前記ウサギ B 細胞のプールを、フィーダー細胞と共培養する工程を含む、方法。

【請求項 13】

前記共培養が、IL-1、TNF、IL-10、ならびに IL-21、SAC、BAFF、IL-2、IL-4、および IL-6 から選択される 1 種または複数種を含む合成フィーダー混合物の存在下で行われる、請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

a) ウサギの血液から B 細胞を得る工程、
 b) 前記 B 細胞を、ビーズに結合している請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体とインキュベートする工程、
 c) 結合していない B 細胞を除去する工程、および
 d) 結合した B 細胞を前記ビーズから回収し、それによって、1 つまたは複数の B 細胞を選択する工程を含む、B 細胞を選択するための方法。

10

【請求項 15】

e) 1 つまたは複数の回収された B 細胞を、個々の容器に置く工程、
 f) 前記置かれた細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、および
 g) 工程 f) で増殖している B 細胞を選択し、それによって、B 細胞を選択する工程をさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 16】

工程 e) の前に、前記回収された B 細胞を、共培養培地中で 37 で 1 時間インキュベートする工程をさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウサギ CD19 に対する抗体（抗ウサギ CD19 抗体）、その産生方法およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

B 細胞は、プロ B 細胞およびプレ B 細胞から発生し、骨髄において成熟して抗原特異的細胞表面抗体分子を発現し、次いで、リンパ系組織内で未成熟 B 細胞発生の移行期 T1 および T2 段階を経て進む。脾臓では、B 細胞の大部分は、成熟濾胞区画に、または少数は、辺縁帯、B1a、および制御性 B10 細胞サブセットに分配される。外来抗原によって活性化された抗原特異的成熟 B 細胞は、クローン増殖し、短寿命の形質細胞に分化する。濾胞 B 細胞はまた、抗原選択 B 細胞が増殖する胚中心に入ることができ、それらの抗原受容体は親和性成熟およびクラススイッチ組換え（CSR）を受ける。B 細胞は、メモリー B 細胞として胚中心を離れるか、または骨髄に遊走する長寿命の形質芽球に分化する。B 細胞はまた、インターロイキン-10 を産生することができる制御性 B10 細胞サブセット、大部分の天然 Ab を産生する B1a サブセット、および TI 抗原に対する適応抗体応答を生じる B1b サブセットを含む、腹腔内に見出される。大部分の成熟 B 細胞は CD20 を発現するのに対し、CD19 は、成熟 B 細胞、ならびにいくつかのプレ B 細胞、形質芽球、ならびに短寿命および長寿命形質細胞によって発現される。CD19 は、腹膜 B1a および B1b 細胞によって、より高い密度で発現される（Tedder, T. F., Nat Rev Rheumatol. 5 (2009) 572 ~ 577 (非特許文献1)、LeBien, T. W. および Tedder, T. F., Blood 112 (2008) 1570 ~ 1580 (非特許文献2))。

30

【0003】

CD19 は、膜貫通タンパク質（B 細胞共受容体）である。ヒト CD19 構造遺伝子は、抗原受容体依存性刺激の閾値を低下させるために、B 細胞受容体と集合する細胞表面分

40

50

子をコードする。CD19は、主にCD21およびCD81と共に、B細胞共受容体として作用する。CD19およびCD21は、正常なB細胞分化に必要である(Carter, R. H.ら、Immunol. Res. 26(2002)45~54(非特許文献3))。活性化すると、CD19の細胞質尾部はリン酸化され、Srcファミリーキナーゼによる結合およびPI-3キナーゼの動員をもたらす。

【0004】

ヒトCD19に対する抗体は、例えば、国際公開第2004/106381号(特許文献1)、国際公開第2005/012493号(特許文献2)、国際公開第2006/089133号(特許文献3)、国際公開第2007/002223号(特許文献4)、国際公開第2006/133450号(特許文献5)、国際公開第2006/121852号(特許文献6)、国際公開第2003/048209号(特許文献7)、米国特許第7,109,304号(特許文献8)、米国特許出願公開第2006/0233791号(特許文献9)、米国特許出願公開第2006/0280738号(特許文献10)、米国特許出願公開第2006/0263357号(特許文献11)、米国特許出願公開第2006/0257398号(特許文献12)、欧州特許出願公開第1648512号(特許文献13)、欧州特許出願公開第1629012号(特許文献14)、米国特許出願公開第2008/0138336号(特許文献15)、国際公開第2008/022152号(特許文献16)、国際公開第2011/147834号(特許文献17)、およびBruenke, J.ら、Br. J. Hematol. 130(2005)218~228(非特許文献4)、Vallera, D. A.ら、Cancer Biother. Radiopharm. 19(2004)11~23(非特許文献5)、Ghetie, M. A.ら、Blood 104(2004)178~183(非特許文献6)、Lang, P.ら、Blood 103(2004)3982~3985(非特許文献7)、Loeffler, A.ら、Blood 95(2000)2098~2103(非特許文献8)、Le Gall, F.ら、FEBS Lett. 453(1999)164~168(非特許文献9)、Li, Q.ら、Cancer Immunol. Immunother. 47(1998)121~130(非特許文献10)、Eberl, G.ら、Clin. Exp. Immunol. 114(1998)173~178(非特許文献11)、Pietersz, G. A.ら、Cancer Immunol. Immunother. 41(1995)53~60(非特許文献12)、Myers, D. E.ら、Leuk. Lymphoma. 18(1995)93~102(非特許文献13)、Bejcek, B. E.ら、Cancer Res. 55(1995)2346~2351(非特許文献14)、Hagen, I. A.ら、Blood 85(1995)3208~3212(非特許文献15)、Vlasfeld, L. T.ら、Cancer Immunol. Immunother. 40(1995)37~47(非特許文献16)、Rhodes, E. G.ら、Bone Marrow Transplant. 10(1992)485~489(非特許文献17)、Zola, H.ら、Immunol. Cell Biol. 69(1991)411~422(非特許文献18)、Watanabe, M.ら、Cancer Res. 50(1990)3245~3248(非特許文献19)、Uckun, F. M.ら、Blood 71(1988)13~29(非特許文献20)、Pezzutto, A.ら、J Immunol. 138(1987)2793~2799(非特許文献21)に記載されている。モノクローナル抗体SJ25-C1は市販されている(製品番号4737、Sigma-Aldrich Co. USA、配列番号21~24)。Fc RIIIAに対する親和性が増加した抗体は、国際公開第2008/022152号(特許文献16)に記載されている。

【0005】

ウサギゲノムは配列決定されており、2009年に6.51の冗長性でアセンブルされた(<http://www.broadinstitute.org/science/projects/mammals-models/rabbit/rabbit-genome-sequencing-project>(非特許文献22)を参照されたい)。

【0006】

10

20

30

40

50

モノクローナル抗ウサギCD19抗体は、これまで報告されていない。いくつかのポリクローナル抗体によって主張されているが、抗ヒトCD19抗体または抗マウスCD19抗体と、ウサギCD19との交差反応性は証明することができなかった。

【0007】

したがって、モノクローナル抗ウサギCD19抗体を提供する必要がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】国際公開第2004/106381号

【文献】国際公開第2005/012493号

10

【文献】国際公開第2006/089133号

【文献】国際公開第2007/002223号

【文献】国際公開第2006/133450号

【文献】国際公開第2006/121852号

【文献】国際公開第2003/048209号

【文献】米国特許第7,109,304号

【文献】米国特許出願公開第2006/0233791号

【文献】米国特許出願公開第2006/0280738号

【文献】米国特許出願公開第2006/0263357号

【文献】米国特許出願公開第2006/0257398号

20

【文献】欧州特許出願公開第1648512号

【文献】欧州特許出願公開第1629012号

【文献】米国特許出願公開第2008/0138336号

【文献】国際公開第2008/022152号

【文献】国際公開第2011/147834号

【非特許文献】

【0009】

【文献】Tedder, T. F., Nat Rev Rheumatol. 5 (2009) 572 ~ 577

【文献】LeBien, T. W. および Tedder, T. F., Blood 112 (2008) 1570 ~ 1580

30

【文献】Carter, R. H. ほか, Immunol. Res. 26 (2002) 45 ~ 54

【文献】Bruenke, J. ほか, Br. J. Hematol. 130 (2005) 218 ~ 228

【文献】Vallera, D. A. ほか, Cancer Biother. Radiopharm. 19 (2004) 11 ~ 23

【文献】Ghetie, M. A. ほか, Blood 104 (2004) 178 ~ 183

【文献】Lang, P. ほか, Blood 103 (2004) 3982 ~ 3985

【文献】Loeffler, A. ほか, Blood 95 (2000) 2098 ~ 2103

40

【文献】Le Gall, F. ほか, FEBS Lett. 453 (1999) 164 ~ 168

【文献】Li, Q. ほか, Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 121 ~ 130

【文献】Eberl, G. ほか, Clin. Exp. Immunol. 114 (1998) 173 ~ 178

【文献】Pietersz, G. A. ほか, Cancer Immunol. Immunother. 41 (1995) 53 ~ 60

【文献】Myers, D. E. ほか, Leuk. Lymphoma. 18 (1995) 93 ~ 102

【文献】Bejcek, B. E. ほか, Cancer Res. 55 (1995) 2346

50

~ 2351

【文献】Hagen, I. A. ら、Blood 85 (1995) 3208 ~ 3212

【文献】Vlasfeld, L. T. ら、Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 37 ~ 47

【文献】Rhodes, E. G. ら、Bone Marrow Transplant. 10 (1992) 485 ~ 489

【文献】Zola, H. ら、Immunol. Cell Biol. 69 (1991) 411 ~ 422

【文献】Watanabe, M. ら、Cancer Res. 50 (1990) 3245 ~ 3248

【文献】Uckun, F. M. ら、Blood 71 (1988) 13 ~ 29

【文献】Pezzutto, A. ら、J Immunol. 138 (1987) 2793 ~ 2799

【文献】<http://www.broadinstitute.org/science/projects/mammals-models/rabbit/rabbit-genome-sequencing-project>

【発明の概要】

【0010】

本発明は、抗ウサギCD19抗体、およびウサギB細胞の標識におけるその使用に関する。

【0011】

本発明による抗体は、とりわけ、

- ウサギPBMCまたは脾細胞中のB細胞を特徴付けすること、
- 抗原パニングの前または後のいずれかで、マクロファージ枯渇後に抗原特異的B細胞を濃縮すること、
- フィーダー細胞（フィーダー細胞は、B細胞を桁違いに増殖させる）との共培養後に、B細胞を選択的に染色すること、ならびに
- （任意で、1種または複数のさらなるマーカーと組み合わせて）改善された収率および品質で、B細胞を選別および選択することを少なくとも可能にする。

【0012】

本発明の一態様は、(a) 配列番号32または33または34のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号35または36のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) 配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) 配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) 配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f) 配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、ウサギCD19に特異的に結合する単離された抗体である。

【0013】

一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0014】

一実施形態では、抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体である。

【0015】

一実施形態では、抗体は、配列番号30の重鎖可変ドメインおよび配列番号26の軽鎖可変ドメインを含む。

【0016】

一態様は、

- a) ウサギの血液からB細胞を得る工程、
- b) B細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および
- c) 本発明による抗体が結合している1つまたは複数のB細胞を選択する工程を含む、B細胞を選択するための方法である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、方法は、

工程 b) の後かつ工程 c) の前における、B 細胞を共培養培地中で 3 7 で 1 時間インキュベートする工程、

c) 本発明による抗体が結合している 1 つまたは複数の B 細胞を、個々の容器に (単一で) 置く工程、

d) (単一で) 置かれた細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、

e) 工程 d) で増殖している B 細胞を選択し、それによって、B 細胞を選択する工程のうちの一つまたは複数をさらに含む。

【 0 0 1 8 】

本明細書に記載の一態様は、

a) 本発明による標識された抗体の結合に基づいて、FACS によって単一細胞として置かれた B 細胞の集団の B 細胞のそれぞれを、フィーダー細胞としてのマウス E L - 4 B 5 細胞と共培養する工程、および

b) 工程 a) において、増殖し、かつ抗体を分泌する B 細胞クローンを選択する工程を含む、B 細胞を選択するための方法である。

【 0 0 1 9 】

一実施形態では、共培養は、I L - 1 、T N F 、I L - 1 0、ならびに I L - 2 1、S A C、B A F F、I L - 2、I L - 4、および I L - 6 から選択される 1 種または複数種を含む合成フィーダー混合物の存在下で行われる。

【 0 0 2 0 】

一実施形態では、B 細胞は、ウサギ B 細胞である。

【 0 0 2 1 】

本明細書に記載の一態様は、

a) 本発明による標識された抗体の結合に基づいて、FACS によって個々の容器に置かれた B 細胞の集団の一つまたは複数の B 細胞を、任意で、フィーダー細胞としてのマウス E L - 4 B 5 細胞、ならびにフィーダー混合物としての I L - 1 、T N F 、I L - 1 0、ならびに I L - 2 1、S A C、B A F F、I L - 2、I L - 4、および I L - 6 から選択される 1 種または複数の存在下で、共培養する工程、

b) 標的抗原に特異的に結合する抗体を産生する、B 細胞クローンを選択する工程と、
b 1) 逆転写 P C R によって該抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を決定する工程、

b 2) 該抗体軽鎖可変ドメインおよび該重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を含む核酸で、細胞をトランスフェクトする工程、ならびに

c) 工程 b) で選択された B 細胞クローンによって産生される抗体またはそのヒト化バリエーションをコードする核酸を含有する細胞を培養し、細胞または培養上清から抗体を回収することによって、抗体を産生する工程

を含む、標的抗原に結合する抗体を産生するための方法である。

【 0 0 2 2 】

一実施形態では、B 細胞は、ウサギ B 細胞である。

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載の一態様は、

- 多数のウサギ B 細胞を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体とインキュベートする工程 / 多数のウサギ B 細胞の個々の B 細胞を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体で標識する工程、

- 本発明による抗体がその表面上に結合している / 個々の B 細胞 (単一細胞として置かれた B 細胞) または B 細胞のプール (個々の容器中) のいずれかとして標識されている、1 つまたは複数のウサギ B 細胞を選択する / 置く工程、および

- 該単一細胞として置かれたウサギ B 細胞または該ウサギ B 細胞のプールを、フィーダー細胞と共培養する工程、

10

20

30

40

50

- 任意で、共培養後に、得られた細胞混合物を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体とインキュベートし、本発明による抗体がその表面上に結合している / 標識されている、ウサギ B 細胞を選択する / 置く / 計数する工程を含む、1 つまたは複数のウサギ B 細胞を共培養するための方法である。

【0024】

本明細書に記載の一態様は、

a) 単一細胞または細胞のプールのいずれかとして置かれた B 細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している 1 つまたは複数の B 細胞を選択することによって、非 B 細胞を除去する工程

を含む、培養物について B 細胞を選択する / 非 B 細胞を除去するための方法である。

【0025】

一実施形態では、B 細胞は、ウサギ B 細胞である。

【0026】

本明細書に記載の一態様は、

a) 単一細胞として置かれた B 細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している細胞の数を数えることによって、培養物中の B 細胞の数を決定する工程

を含む、単一細胞として置かれた B 細胞の培養後に、B 細胞の数を決定する方法である。

【0027】

一実施形態では、B 細胞は、ウサギ B 細胞である。

【0028】

本発明の一態様は、

a) 単一細胞として置かれた B 細胞または B 細胞のプールを、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している 1 つまたは複数の細胞を選択し、それによって B 細胞を選択し、細胞の混合物から非 B 細胞を除去する工程

を含む、細胞の混合物 (例えば、培養物) について非 B 細胞を除去する方法である。

【0029】

一実施形態では、B 細胞は、ウサギ B 細胞である。

【0030】

本発明による一態様は、

a) 単一細胞として置かれた B 細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している細胞の数を数えることによって、培養物中の B 細胞の数を決定する工程

を含む、単一細胞として置かれた B 細胞とフィーダー細胞との共培養物中の B 細胞の数を決定するための方法である。

【0031】

一実施形態では、B 細胞は、ウサギ B 細胞である。

[本発明1001]

ウサギ CD19 に結合する抗体であって、

(a) 配列番号 32 または 33 または 34 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、

10

20

30

40

50

(b) 配列番号35または36のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、
(c) 配列番号37のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、
(d) 配列番号38のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、
(e) 配列番号39のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、および
(f) 配列番号40のアミノ酸配列を含むH V R - L 3
を含む、抗体。

[本発明1002]

モノクローナル抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

キメラ抗体またはヒト化抗体である、本発明1001または1002の抗体。

10

[本発明1004]

配列番号30の重鎖可変ドメインと配列番号26の軽鎖可変ドメインとを含む、本発明1001または1002の抗体。

[本発明1005]

全長抗体または抗体断片である、本発明1001から1004のいずれかの抗体。

[本発明1006]

検出可能な標識にコンジュゲートされている、本発明1001から1005のいずれかの抗体。

[本発明1007]

前記検出可能な標識が、蛍光色素である、本発明1006の抗体。

[本発明1008]

20

ウサギB細胞を選択するための方法であって、

a) 多数のウサギB細胞を、本発明1001から1007のいずれかの抗体とインキュベートする工程、および

b) 本発明1001から1007のいずれかの抗体が結合している1つまたは複数のB細胞を選択し、それによって、ウサギB細胞を選択する工程を含む、方法。

[本発明1009]

工程 b) の後かつ工程 c) の前における、前記ウサギB細胞を共培養培地中で37 で1時間インキュベートする工程、および/または

c) 本発明1001から1007のいずれかの抗体が結合している1つもしくは複数のウサギB細胞を単一細胞として置く工程、および/または

30

d) 前記単一細胞として置かれたウサギB細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、および/または

e) 工程 d) で増殖しているウサギB細胞を選択し、それによって、ウサギB細胞を選択する工程

のうちの1つまたは複数を含み、本発明1008の方法。

[本発明1010]

培養物について非B細胞を除去するための方法であって、

a) 単一細胞または細胞のプールのいずれかとして置かれたウサギB細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

40

b) 工程 a) で得られた共培養物からの前記細胞を、本発明1001から1007のいずれかの抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明1001から1007のいずれかの抗体が結合している1つまたは複数のウサギB細胞を選択し、それによって、非B細胞を除去する工程を含む、方法。

[本発明1011]

単一細胞として置かれたB細胞とフィーダー細胞との共培養物中のB細胞の数を決定するための方法であって、

a) 単一細胞として置かれたウサギB細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程 a) で得られた共培養物からの前記細胞を、本発明1001から1007のいずれか

50

の抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明1001から1007のいずれかの抗体が結合している細胞の数を数えることによって、前記培養物中のB細胞の数を決定する工程を含む、方法。

[本発明1012]

1つまたは複数のウサギB細胞を共培養するための方法であって、

- 多数のウサギB細胞を、本発明1001から1007のいずれかの抗体とインキュベートする工程 / 多数のウサギB細胞の個々のB細胞を、本発明1001から1007のいずれかの抗体で標識する工程、

- 本発明1001から1007のいずれかの抗体がその表面に結合している / 個々のB細胞 (単一細胞として置かれたB細胞) またはB細胞のプールのいずれかとして標識されている、1つまたは複数のウサギB細胞を選択する / 置く工程、および

- 前記単一細胞として置かれたウサギB細胞または前記ウサギB細胞のプールを、フィーダー細胞と共培養する工程

を含む、方法。

[本発明1013]

前記共培養が、IL-1、TNF、IL-10、ならびにIL-21、SAC、BAFF、IL-2、IL-4、およびIL-6から選択される1種または複数種を含む合成フィーダー混合物の存在下で行われる、本発明1009から1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

a) ウサギの血液からB細胞を得る工程、

b) 前記B細胞を、ビーズに結合している本発明1001から1005のいずれかの抗体とインキュベートする工程、

c) 結合していないB細胞を除去する工程、および

d) 結合したB細胞を前記ビーズから回収し、それによって、1つまたは複数のB細胞を選択する工程

を含む、B細胞を選択するための方法。

[本発明1015]

e) 任意で、前記回収されたB細胞を、共培養培地中で37℃で1時間インキュベートする工程、

f) 1つまたは複数の回収されたB細胞を、個々の容器に置く工程、

g) 前記置かれた細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、および

h) 工程g) で増殖しているB細胞を選択し、それによって、B細胞を選択する工程をさらに含む、本発明1014の方法。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の態様の詳細な説明

CD19は、形質細胞への最終分化までのB細胞発生のほとんどすべての段階で発現されるので、最適な汎B細胞マーカーである(例えば、上記のTedderを参照されたい)。

【0033】

I. 定義

ヒト免疫グロブリンの軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関連する一般的な情報は、Kabata, E. A.ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991)において提供されている。重鎖および軽鎖のすべての定常領域およびドメインのアミノ酸位置は、Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health

10

20

30

40

50

h、Bethesda、MD(1991)において記載されているKabata付番システムにより付番することができ、本明細書では「Kabataによる付番」と呼ばれる。具体的には、Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991)のKabata付番システム(647~660頁を参照)は、カップアイソタイプおよびラムダアイソタイプの軽鎖定常ドメインCLに使用され、Kabata EUインデックス付番システム(661~723頁を参照)は、定常重鎖ドメイン(CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3、本明細書では、この場合には、「Kabata EUインデックスによる付番」と呼ぶことによってさらに明確にしている)に使用される。

10

【0034】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、「およびthe」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数のものを含む。したがって、例えば、「細胞(acell)」への言及は、複数のこのような細胞および当業者に公知なそれらの均等物などを含む。同様に、「a」(または「an」)、「1つまたは複数」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。

【0035】

また、「含む(comprising)」、「含む(including)」、および「有する」という用語は、互換的に使用され得ることに留意されたい。

20

【0036】

当業者にとって、例えば、ペプチドリンカーまたは融合ポリペプチドのアミノ酸配列を、対応するコード核酸配列へと変換する手順および方法は周知である。したがって、核酸は、個々のヌクレオチドからなるその核酸配列によって、同様に、該核酸配列によってコードされるペプチドリンカーまたは融合ポリペプチドのアミノ酸配列によって特徴付けられる。

【0037】

組換えDNA技術の使用は、核酸の誘導体生成を可能にする。このような誘導体を、例えば、置換、改変、交換、欠失、または挿入によって、個々のまたはいくつかのヌクレオチド位置で修飾することができる。修飾または誘導体化を、例えば、部位特異的変異導入によって行うことができる。このような修飾は、当業者によって容易に行うことができる(例えば、Sambrook、J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、USA、Hames、B.D.およびHiggins、S.G.、Nucleic acid hybridization - a practical approach(1985) IRL Press、Oxford、Englandを参照されたい)。

30

【0038】

本発明を実施するための有用な方法および技法は、例えば、Ausubel、F.M.(編)、Current Protocols in Molecular Biology、第I~III巻(1997)、Glover、N.D.およびHames、B.D.編、DNA Cloning: A Practical Approach、第I~II巻(1985)、Oxford University Press、Freshney、R.I.(編)、Animal Cell Culture - a practical approach、IRL Press Limited(1986)、Watson、J.D.ら、Recombinant DNA、第2版、CHSL Press(1992)、Winnacker、E.L.、From Genes to Clones、N.Y.、VCH Publishers(1987)、Celis、J.編、Cell Biology、第2版、Academic Press(1998)、Freshney、R.I.、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic

40

50

Technique、第2版、Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987)に記載されている。

【0039】

「約」という用語は、その後続く数値の $\pm 20\%$ の範囲を表す。一実施形態では、約という用語は、その後続く数値の $\pm 10\%$ の範囲を表す。一実施形態では、約という用語は、その後続く数値の $\pm 5\%$ の範囲を表す。

【0040】

本明細書の目的のための「アクセプタ・ヒト・フレームワーク」は、以下に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒト・コンセンサス・フレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワークまたは重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒト・コンセンサス・フレームワーク「由来の」アクセプタ・ヒト・フレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでいてもよく、またはアミノ酸配列の変更を含んでいてもよい。いくつかの態様では、アミノ酸変更の数は、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、または2個以下である。いくつかの態様では、VLアクセプタ・ヒト・フレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒト・コンセンサス・フレームワーク配列に対して、配列が同一である。

10

【0041】

「親和性」は、分子(例えば、抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の、非共有性相互作用の合計の強度を指す。別途示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合ペアのメンバー(例えば、抗体および抗原)間の1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性を、一般に、解離定数(k_d)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載のものを含め、当技術分野で公知の一般的な方法によって、測定され得る。

20

【0042】

「抗ウサギCD19抗体」および「ウサギCD19に特異的に結合する抗体」という用語は、十分な親和性でウサギCD19に結合することができる抗体を指し、抗体がウサギCD19を標的とする際に診断剤として有用である。

30

【0043】

本明細書の「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、様々な抗体構造を包含し、所望のウサギCD19結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および抗体断片を含むが、これらに限定されない。

【0044】

「抗体断片」は、ウサギCD19に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアポディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子(例えば、scFv)、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0045】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の源または種に由来する一方で、重鎖および/または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【0046】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。抗体の5種類の主要なクラスには、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂にさらに分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、

50

、 、 、 および μ と呼ばれる。

【0047】

「Fc領域」という用語は、本明細書で、少なくとも一部分の定常領域を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域断片を定義するために使用される。この用語は、天然配列Fc領域とバリエーションFc領域とを含む。一実施形態では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで及ぶ。しかしながら、Fc領域の、それぞれ、C末端リジン(Lys447)またはグリシン-リジンのジペプチド(Gly446-Lys447)は、存在していてもよく、または存在していなくてもよい。Kabata EUインデックスによる付番。

【0048】

「(抗体の)定常領域」という用語は、本明細書で、可変ドメインを除く免疫グロブリン重鎖の部分を定義するために使用される。この用語は、天然配列定常領域とバリエーション定常領域とを含む。一実施形態では、ヒトIgG重鎖定常領域は、Ala114から重鎖のカルボキシル末端に及ぶ。しかしながら、Fc領域の、それぞれ、C末端リジン(Lys447)またはグリシン-リジンのジペプチド(Gly446-Lys447)は、存在していてもよく、または存在していなくてもよい。Kabata EUインデックスによる付番。

【0049】

本発明による抗体は、Fc領域として、一実施形態では、ヒト起源に由来するFc領域を含む。一実施形態では、Fc領域は、ヒト定常領域のすべての部分を含む。抗体のFc領域は、補体活性化、C1q結合、C3活性化、およびFc受容体結合に直接関与する。補体系に対する抗体の影響は、ある特定の条件に依存し、C1qへの結合は、Fc領域における規定の結合部位によって引き起こされる。このような結合部位は、先行技術で公知であり、例えば、Lukas, T. J. ら、J. Immunol. 127 (1981) 2555~2560、Brunhouse, R. および Cebrá, J. J.、Mol. Immunol. 16 (1979) 907~917、Burton, D. R. ら、Nature 288 (1980) 338~344、Thommesen, J. E. ら、Mol. Immunol. 37 (2000) 995~1004、Idusogie, E. E. ら、J. Immunol. 164 (2000) 4178~4184、Hezareh, M. ら、J. Virol. 75 (2001) 12161~12168、Morgan, A. ら、Immunology 86 (1995) 319~324、および欧州特許出願公開第0307434号において記載されている。このような結合部位は、例えば、L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、およびP329 (KabataのEUインデックスによる付番) である。ヒトサブクラスIgG1、IgG2、およびIgG3の抗体は通常、補体活性化、C1q結合、およびC3活性化を示すのに対し、IgG4は、補体系を活性化せず、C1qと結合せず、C3を活性化しない。「抗体のFc領域」は、当業者に周知の用語であり、抗体のパパイン切断に基づいて規定される。一実施形態では、Fc領域は、ヒトFc領域である。一実施形態では、Fc領域は、ヒトIgG1またはIgG4サブクラスのものである。一実施形態では、Fc領域は、変異S228Pおよび/またはL235E (KabataのEUインデックスによる付番) を含むヒトIgG4サブクラスのものである。一実施形態では、Fc領域は、変異L234A、L235A、および任意でP329G (KabataのEUインデックスによる付番) を含むヒトIgG1サブクラスのものである。

【0050】

本明細書で使用される「検出可能な標識」という用語は、色素原(蛍光または発光基、および色素)、酵素、NMR活性基、金属粒子、またはジゴキシゲニンなどのハプテンを包含する。一実施形態では、検出可能な標識は、蛍光色素である。電気化学発光によって検出することができる金属キレートもまた、一実施形態では、シグナル放出基であり、例えば、ルテニウム(ビスピリジル) $_3^{2+}$ キレートなどのルテニウムキレートが特に好ましい。好適なルテニウム標識基は、例えば、欧州特許出願公開第0580979号、国際公

10

20

30

40

50

開第90/05301号、国際公開第90/11511号、および国際公開第92/14138号に記載されている。

【0051】

「ヒト・コンセンサス・フレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列のサブグループは、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH Publication 91-3242、Bethesda、MD(1991)、第1~3巻にあるようなサブグループである。一態様では、VLに関して、サブグループは、上記のKabatらにあるように、サブグループカッパIまたはIIIである。一態様では、VHに関して、サブグループは、上記のKabatらにあるように、サブグループカッパIIIである。

10

【0052】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、FR1、FR2、FR3、およびFR4の4つのFRドメインからなる。したがって、HVR配列およびFR配列は、一般に、VH(またはVL)における次の配列において表される: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0053】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」、および「全抗体」という用語は、本明細書では互換的に使用され、天然抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、または本明細書で定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

20

【0054】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞(このような細胞の子孫を含む)を指す。宿主細胞は、「形質転換体」および「形質転換された細胞」を含み、これらは、継代の数にかかわらず、初代の形質転換された細胞、および初代の形質転換された細胞に由来する子孫を含む。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよく、変異を含有していてもよい。元々の形質転換された細胞についてスクリーニングされるか、または選択されるのと同じ機能または生物学的活性を有する変異型の子孫は、本発明に含まれる。

30

【0055】

「ヒト・コンセンサス・フレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列のサブグループは、Kabat, E.A.ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Bethesda MD(1991)、NIH Publication 91-3242、第1~3巻にあるように、サブグループである。一実施形態では、VLに関して、サブグループは、上記のKabatらにあるように、サブグループカッパIである。一実施形態では、VHに関して、サブグループは、上記のKabatらにあるように、サブグループIIIである。

40

【0056】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基およびヒトFR由来のアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、それにおいて、HVR(例えば、CDR)のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト抗体のものに相当し、FRのすべてまたは実質的にすべてが、ヒト抗体のものに相当する。ヒト化抗体は、任意で、少なくとも一部分のヒト抗体に由来する抗体定常領域を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

50

【 0 0 5 7 】

「超可変領域」または「HVR」という用語は、本明細書で使用される場合、超可変的な配列（「相補性決定領域」または「CDR」）であり、かつ/または構造的に定義されるループ（「超可変ループ」）を形成し、かつ/または抗原接触残基（「抗原接触」）を含有する、アミノ酸残基ストレッチを含む、抗体可変ドメインのそれぞれの領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、3つがVH（H1、H2、H3）にあり、3つがVL（L1、L2、L3）にある。

【 0 0 5 8 】

HVRは、

(a) アミノ酸残基 26 ~ 32 (L1)、50 ~ 52 (L2)、91 ~ 96 (L3)、
26 ~ 32 (H1)、53 ~ 55 (H2)、および 96 ~ 101 (H3) で生じる超可変ループ (Chothia, C. および Lesk, A. M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901 ~ 917)、

10

(b) アミノ酸残基 24 ~ 34 (L1)、50 ~ 56 (L2)、89 ~ 97 (L3)、
31 ~ 35 b (H1)、50 ~ 65 (H2)、および 95 ~ 102 (H3) で生じるCDR (Kabat, E. A.ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD (1991)、NIH Publication 91 ~ 3242)、

(c) アミノ酸残基 27c ~ 36 (L1)、46 ~ 55 (L2)、89 ~ 96 (L3)、
30 ~ 35 b (H1)、47 ~ 58 (H2)、および 93 ~ 101 (H3) で生じる抗原接触 (MacCallumら、J. Mol. Biol. 262 : 732 ~ 745 (1996))、ならびに

20

(d) アミノ酸残基 46 ~ 56 (L2)、47 ~ 56 (L2)、48 ~ 56 (L2)、
49 ~ 56 (L2)、26 ~ 35 (H1)、26 ~ 35 b (H1)、49 ~ 65 (H2)、
93 ~ 102 (H3)、および 94 ~ 102 (H3) を含む、(a)、(b)、および/または (c) の組合せ

を含む。

【 0 0 5 9 】

別途示されない限り、可変ドメイン中のHVR残基および他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書で、上記のKabatらによって付番される。

30

【 0 0 6 0 】

「単離された」抗体は、その自然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ（例えば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定される、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法のレビューについては、例えば、Flatman, S.ら、J. Chromatogr. B 848 (2007) 79 ~ 87を参照されたい。

【 0 0 6 1 】

「単離された」核酸は、その自然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、元々その核酸分子を含有する細胞に含まれているが、その核酸分子が、染色体外に存在するか、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する、核酸分子を含む。

40

【 0 0 6 2 】

「抗ウサギCD19抗体をコードする単離された核酸」とは、抗体重鎖および軽鎖（またはそれらの断片）をコードする1つまたは複数の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター中のこのような核酸分子（複数可）を含み、このような核酸分子（複数可）は、宿主細胞中の1つまたは複数の場所に存在する。

【 0 0 6 3 】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集

50

団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。ただし、例えば、自然発生の変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の生産中に生じる、起こり得るバリエーション抗体（このようなバリエーションは一般的に少量で存在する）は除く。一般に、様々な決定基（エピトープ）に対して指向する様々な抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、1つの抗原上の単一の決定基に対して指向する。したがって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするようには解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む、多様な技法によって作製することができるが、これらに限定されず、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法および他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

10

【0064】

「裸抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射性標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。

【0065】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖からなる約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向けて、各重鎖は、可変領域（VH）（可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる）と、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）とを有し、第1と第2の定常ドメインの間にヒンジ領域が位置する。同様に、N末端からC末端に向けて、各軽鎖は、可変領域（VL）（可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる）と、続いて定常軽（CL）ドメインとを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2種類のうちの一方に分けられ得る。

20

【0066】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列の同一性パーセント（％）」は、配列をアラインメントし、最大の配列同一性パーセントを達成するために、必要ならばギャップを導入した後、アラインメントの目的では保存的置換を配列同一性の一部としては考慮せずに、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当技術分野の技術の範囲内にある様々な様式で、例えば、一般に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ClustalW、Megalign（DNASTAR）ソフトウェア、またはFASTAプログラムパッケージを使用して、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大整列度を達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含め、配列をアラインメントさせるために適切なパラメータを決定することができる。あるいは、同一性パーセントの値を、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して、生成することができる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって作成されており、ソースコードは、U.S. Copyright Office（Washington D.C., 20559）にユーザマニュアルと共に提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下に登録されており、かつ国際公開第2001/007611号に記載されている。

30

40

【0067】

別途示されない限り、本明細書での目的に対して、アミノ酸配列同一性パーセントの値は、FASTAパッケージバージョン36.3.8cまたはそれ以降のggsearchプログラムを、BLOSUM50比較マトリックスと共に使用して、生成される。FASTAプログラムパッケージは、W.R. PearsonおよびD.J. Lipman（1

50

988), 「Improved Tools for Biological Sequence Analysis」、PNAS 85:2444~2448、W.R.Pearson(1996)「Effective protein sequence comparison」Meth.Enzymol.266:227~258、ならびにPearsonら(1997)Genomics 46:24~36によって記載されており、www.fasta.bioch.virginia.edu/fastawww2/fastadown.shtmlまたはwww.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastaから一般に利用可能である。あるいは、fasta.bioch.virginia.edu/fastawww2/index.cgiでアクセス可能な公的なサーバーを使用して、ggsearch(global protein:protein)プログラムおよびデフォルトオプション(BLOSUM50;オープン:-10;ext:-2;Ktup=2)を使用して、ローカルではなくグローバルのアラインメントを行うことを保証し、配列を比較することができる。アミノ酸同一性パーセントは、出力アラインメントヘッダーで与えられる。

10

【0068】

「CD19」という用語は、本明細書で使用される場合、ウサギBリンパ球抗原CD19(代替名:分化抗原CD19、Bリンパ球表面抗原B4、T細胞表面抗原Leu-12)を指す。この用語は、本明細書に記載の抗体が、例えば、配列番号01およびその断片などに、結合する限り、「全長」のプロセッシングされていないウサギCD19(配列番号02)ならびに細胞におけるプロセッシングから(例えば、シグナルペプチドの切断によつて)生じる、ウサギCD19の任意の形態を包含する。

20

【0069】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗体の結合に關与する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VHおよびVL)は、一般に、類似の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と、3つの超可変領域(HVR)とを含む。(例えば、Kindt,T.J.ら、Kuby Immunology、第6版、W.H.Freeman and Co., N.Y.(2007)、91頁を参照されたい。)単一のVHまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するために充分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体のVHまたはVLドメインを使用し、それぞれ、相補的VLまたはVHドメインのライブラリをスクリーニングして、単離され得る。例えば、Portolano,S.ら、J.Immunol.150(1993)880~887、Clackson,T.ら、Nature 352(1991)624~628を参照されたい。

30

【0070】

「ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、連結されている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、およびベクターが導入された宿主細胞のゲノム内へと組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、作動可能に連結されている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターを、本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。

40

【0071】

II. 組成物および方法

本発明は、ウサギCD19が、非常に価値のある汎ウサギB細胞マーカーである、という知見に少なくとも部分的に基づく。

【0072】

より詳細には、ウサギCD19は、ウサギB細胞の分析および特徴付けのために有利な細胞表面マーカーであることが見出された。表面に提示されたCD19を介したウサギB細胞の標識化は、B細胞の濃縮または選別さえも改善できる。改善は、とりわけ、より特異的な標識化、それによる濃縮/選別/単一細胞として置くこと、または/および処理されるB細胞の数が減少し、同時に抗原特異的抗体を産生するB細胞の数が増加する、易化

50

したプロセスである。

【 0 0 7 3 】

本発明は、本発明による抗ウサギCD19抗体が、抗ウサギCD20抗体と比較して、細胞表面マーカーとして使用された場合に、B細胞のアポトーシスをもたらさない、という知見に少なくとも部分的に基づく。

【 0 0 7 4 】

本発明がなされるまで、ウサギB細胞を特異的に染色するために有用であった唯一の抗体は、ヒトトランスジェニックウサギにおけるIgG、IgM、IgA、またはヒト軽鎖のような、細胞表面免疫グロブリンに対する抗体であった。B細胞集団全体を特異的に染色するために利用可能な特異的B細胞マーカーはなかった。本発明による抗ウサギCD19抗体により、ウサギB細胞集団全体を同定し、特異的に染色することが初めて可能になる。

10

【 0 0 7 5 】

ウサギCD19配列は、他の非げっ歯類哺乳動物種と比較して、エクソン#3に伸長したギャップを含む(アラインメントを参照されたい)。

ハムスター	RDLDCGLENR	SSGSHRPSSG	SHNSSWLYVW	AKDHPEVVG	169
マウス	RDLDCDLRNR	SSGSHRSTSGSQLYVW	AKDHPKVWG	165
ラット	GDLDCDLGNR	SSGSHRSTSGSQLYVW	ATDHPEVWKT	165
リス	EALKCSRGNM	SSGGTGLSSA	PNNTSQLYVW	AKDHPKIWNT	136
ウサギ	GGPGCGLGNE	SS	SSQPYVW	DRDHPKEWDM	157
マーモセット	SGQCGLENR	SSEDPSSPSG	NLMSSQLYVW	AKDRPKIWEG	170
アカゲザル	GGLGCGLKNR	SSEGPPSSPSG	KLNSSQLYVW	AKDRPEMWEG	169
ヒト	GGLGCGLKNR	SSEGPPSSPSG	KLMSPKLYVW	AKDRPEIWEG	169
ネコ	NDPGCGLGNR	SSEGPKPSSG	YPTSSQLYVW	AKGHPEIWET	165
ハダカデバネズミ	GDLSCGPGNG	SSGRPRLAPH	HRNNSQLYVW	NKGHPEIWEA	169
モルモット	GDFSCGPGNG	SSEGPTPSSQ	HPNSSQLYVW	DKRDSPSWEP	45

20

(上から下への順に配列番号: 04, 05, 06, 07, 02, 08, 09, 10, 11, 12, 13 であり、それぞれ以下に対応する: TR_ROD:G3I7M5_CRIGR[1039:], SW:CD19_MOUSE, TR_ROD:F1LNH2_RAT, TR_ROD:I3MSE7_SPETR[38:], TR_VRT:G1TWR4_RABIT, SW:CD19_CALJA, TR_VRT:F7F486_MACMU, SW:CD19_HUMAN, TR_VRT:M3VZQ6_FELCA, TR_ROD:G5BRD9_HETGA, SW:CD19_CAVPO, SW_ROD:CD19_CAVPO, TR_ROD:HOUXI6_CAVPO)

30

【 0 0 7 6 】

ウサギゲノムからの遺伝子の単離のために、5' / 3' - UTR領域をウサギ、ヒト、およびマウスから抽出し、比較して、PCRプライマーを配置できる領域を得た(rb__5UTR__primer__region1(配列番号17)、rb__5UTR__primer__region2(配列番号18)、rb__3UTR__primer__region(配列番号19))。例示的なプライマーは、配列番号53(3'UTRで結合)および配列番号54(5'UTRで結合)の配列を有する。

【 0 0 7 7 】

ウサギCD19ゲノムDNAの単離のために、rbCD19UTRフォワードプライマーとrbCD19UTRリバープライマーとのプライマー組合せ(ウサギCD19構造遺伝子の5' / 3' - UTR配列で結合: 配列番号20および21)またはrbCD19CDSフォワードプライマーとrbCD19CDSリバープライマーとのプライマー組合せ(ウサギCD19構造遺伝子の開始コドンおよび停止コドンで結合: 配列番号22および23)のいずれかを使用することができる。それぞれの増幅産物は、それぞれ、1831bpまたは1663bpの長さを有する。

40

【 0 0 7 8 】

ウサギCD19の発現プラスミドでマウスを免疫することによって、本発明による抗体を生成した。B細胞を採取する前に、ウサギCD19DNAでトランスフェクトされたウサギCD19提示細胞で免疫マウスをブーストした。採取したB細胞を、骨髄腫細胞と

50

融合させて、ハイブリドーマ細胞を生成した。

【 0 0 7 9 】

ブーストに使用されるウサギCD19発現細胞は、ウサギCD19 - GPIアンカー - FLAGタグ融合ポリペプチドでトランスフェクトされたNIH/3T3 (ATCC (登録商標) CRL - 1658 (商標)) マウス胚線維芽細胞である。細胞表面上のウサギCD19の発現は、NIH/3T3細胞 (24時間後に約40%のFITC陽性細胞) において良好に機能し、細胞内染色により高いシグナルが得られる。予想外なことに、密接に関連するC2C12 (ATCC (登録商標) CRL - 1772 (商標)) マウス筋芽細胞を使用した場合、前記構築物の発現を検出することはできなかった (検出可能なウサギCD19陽性細胞がほとんどなし、24時間後に約9%のFITC陽性細胞)。ウサギCD19の発現のさらなる改善は、逆トランスフェクションアプローチを使用することによって、達成することができた (図1を参照されたい)。CHO細胞およびHEK細胞について、FLAGタグを細胞表面に発現されたウサギCD19の検出の代用として使用できることが示されている (以下の表を参照されたい)。

10

【 0 0 8 0 】

細胞株	総細胞数 [n]	抗Flagタグ抗体- Alexa488コンジュゲート
		染色された細胞 絶対数[n] / 総数 に対する[%]
CHO wt	25354	1 / 0.0
CD19発現プラスミド でトランスフェクト されたCHO-S	21142	719 / 3.4
HEK wt	24156	7 / 0.0
CD19発現プラスミド でトランスフェクト されたHEK293F	20052	7333 / 36.6

20

細胞株	総細胞数 [n]	ポリクローナル抗mIgG抗体 -APCコンジュゲート
		染色された細胞 絶対数[n] / 総数 に対する[%]
CHO wt	25414	4 / 0.0
CD19発現プラスミド でトランスフェクト されたCHO-S	21266	975 / 4.6
HEK wt	24409	2 / 0.0
CD19発現プラスミド でトランスフェクト されたHEK293F	20303	7293 / 35.9

30

40

抗Flagタグ抗体 - Alexa488コンジュゲート = Alexa488で標識された抗Flagタグ抗体によるFLAGタグの検出

ポリクローナル抗mIgG抗体 - APCコンジュゲート = APCで標識された抗マウスIgG抗体による抗ウサギCD19抗体の検出

【 0 0 8 1 】

生成された356個のハイブリドーマ細胞のうち、単一の細胞であるクローン1H2の

50

みが、B細胞表面の天然ウサギCD19に対する(十分に良い)親和性を有する抗ウサギCD19抗体を発現した(図2および以下の表を参照されたい)。

【0082】

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
1-A1	12970	10135	4268	14	4	9	5337	4376	0.21
1-A2	12943	10127	3981	10	1	9	5658	4096	0.23
1-A3	12919	10103	4177	12	1	8	5471	4274	0.19
1-A4	12988	10136	4404	9	0	5	5185	4510	0.11
1-A5	13176	10133	4344	10	3	3	5298	4435	0.07
1-A6	13086	10128	4211	10	1	7	5371	4339	0.17
1-A7	12984	10118	4117	7	0	4	5461	4254	0.10
1-A8	13006	10114	4151	8	0	7	5392	4298	0.17
1-A9	13333	10134	4186	4	0	4	5466	4298	0.10
1-A10	12872	10098	4150	7	0	6	5468	4257	0.14
1-A11	15661	10165	3983	5	0	4	5765	4096	0.10
1-A12	12972	10118	4095	12	0	9	5562	4218	0.22
1-B1	12819	10116	4168	5	2	3	5442	4287	0.07
1-B2	12876	10096	4314	11	3	5	5320	4382	0.12
1-B3	12933	10107	4103	11	1	7	5438	4268	0.17
1-B4	12826	10113	4277	10	0	8	5362	4369	0.19
1-B5	12712	10113	4177	5	1	4	5459	4272	0.10
1-B6	12799	10132	4234	9	1	7	5435	4330	0.17
1-B7	12823	10124	4104	19	2	14	5580	4198	0.34
1-B8	12743	10118	4155	6	0	5	5480	4255	0.12
1-B9	13202	10139	4024	9	0	5	5679	4142	0.12
1-B10	12713	10130	4069	14	2	9	5581	4219	0.22
1-B11	12744	10116	4242	7	1	3	5449	4349	0.07
1-B12	12769	10128	4083	3	1	2	5588	4208	0.05
1-C1	12651	10100	4171	9	0	8	5474	4287	0.19
1-C2	13540	10134	4265	47	4	34	5390	4364	0.80
1-C3	12711	10102	4142	8	1	6	5478	4269	0.14
1-C4	12804	10112	4172	6	0	3	5454	4273	0.07
1-C5	12678	10153	3959	15	0	9	5763	4072	0.23
1-C6	12709	10125	3974	6	1	3	5721	4068	0.08
1-C7	12582	10141	3887	10	1	7	5849	4010	0.18
1-C8	12915	10119	4081	12	2	8	5531	4212	0.20
1-C9	12651	10132	3938	8	1	5	5714	4072	0.13

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
1-C10	13517	10115	3874	6	4	0	5781	4043	0.00
1-C11	12860	10141	4102	6	2	3	5597	4235	0.07
1-C12	12823	10132	3939	3	1	2	5756	4069	0.05
1-D1	12710	10098	4067	6	2	4	5625	4147	0.10
1-D2	12675	10119	4026	6	1	4	5628	4182	0.10
1-D3	12599	10141	3853	2341	1	2020	5893	1952	52.43
1-D4	12599	10123	3954	15	1	10	5703	4074	0.25
1-D5	12500	10112	4043	11	2	9	5607	4158	0.22
1-D6	12648	10131	3941	10	0	7	5716	4077	0.18
1-D7	12679	10121	3877	6	0	4	5767	4050	0.10
1-D8	12969	10118	3803	14	3	7	5836	3959	0.18
1-D9	12630	10173	3574	6	0	4	6264	3749	0.11
1-D10	12863	10138	3791	5	1	4	5794	3996	0.11
1-D11	12888	10143	4089	14	0	12	5622	4215	0.29
1-D12	12881	10142	3914	18	2	11	5772	4091	0.28
1-E1	12557	10117	4023	9	2	6	5611	4163	0.15
1-E2	12837	10133	3930	23	2	17	5641	4128	0.43
1-E3	12768	10127	3963	8	1	5	5709	4109	0.13
1-E4	12585	10159	3668	9	2	5	6130	3800	0.14
1-E5	14898	10208	3458	19	2	9	6290	3708	0.26
1-E6	12830	10183	3545	11	2	7	6354	3656	0.20
1-E7	13233	10143	3660	14	4	7	5960	3871	0.19
1-E8	12706	10161	3553	8	1	7	6182	3742	0.20
1-E9	12648	10155	3793	8	1	5	5908	3941	0.13
1-E10	12828	10170	3375	10	2	7	6305	3623	0.21
1-E11	12735	10194	3533	3	1	2	6188	3739	0.06
1-E12	15157	10226	3978	247	5	171	5670	4095	4.30
1-F1	12722	10131	4046	10	3	7	5636	4192	0.17
1-F2	12664	10145	3503	9	0	7	6092	3743	0.20
1-F3	13391	10172	3330	3	0	3	6373	3563	0.09
1-F4	12662	10129	3802	12	1	8	5840	3963	0.21
1-F5	12716	10140	3684	9	2	6	5967	3894	0.16
1-F6	15065	10136	3431	9	1	7	6114	3694	0.20
1-F7	12789	10124	3786	8	1	6	5762	3986	0.16
1-F8	12753	10147	3690	7	1	4	5958	3881	0.11
1-F9	12728	10141	3841	10	0	7	5766	4053	0.18
1-F10	12970	10155	3831	4	1	2	5744	4083	0.05

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
1-F11	13382	10222	3493	10	1	9	6304	3758	0.26
1-F12	12748	10151	3586	6	2	4	6074	3801	0.11
1-G1	12713	10108	3954	18	2	10	5647	4137	0.25
1-G2	12587	10124	3569	5	2	1	5982	3845	0.03
1-G3	12772	10140	3384	7	1	3	6120	3684	0.09
1-G4	12731	10193	3364	11	2	7	6459	3534	0.21
1-G5	12548	10177	3471	17	3	13	6372	3601	0.37
1-G6	13090	10198	3623	6	2	2	6266	3786	0.06
1-G7	15347	10229	4109	543	23	370	5524	3991	9.00
1-G8	12787	10137	3745	6	0	5	5824	3974	0.13
1-G9	12897	10148	3775	5	2	2	5925	3948	0.05
1-G10	12776	10141	3570	8	3	4	5943	3872	0.11
1-G11	12861	10129	3726	4	1	2	5759	4051	0.05
1-G12	12818	10135	3811	6	1	4	5740	4043	0.10
1-H1	12904	10120	3592	31	3	18	5907	3823	0.50
1-H2	12588	10142	3516	4857	1458	3276	4775	411	93.17
1-H3	12676	10126	3753	21	6	15	5755	3954	0.40
1-H4	12626	10115	3413	11	4	7	6132	3651	0.21
1-H5	12658	10159	3628	2	1	1	6028	3842	0.03
1-H6	12783	10149	3614	3	2	1	5862	3886	0.03
1-H7	14697	10229	3841	650	25	418	5540	3811	10.88
1-H8	12847	10140	3569	10	2	5	5900	3870	0.14
1-H9	12704	10147	3330	13	2	6	6247	3631	0.18
1-H10	12746	10105	3422	5	1	3	5944	3797	0.09
1-H11	12771	10146	3574	14	1	10	5989	3790	0.28
1-H12	315	138	57	2	0	2	70	59	3.51
2-A1	12516	10000	3806	4	0	3	5849	3906	0.08
2-A2	12680	10000	3758	5	0	3	5970	3875	0.08
2-A3	12987	10000	3716	9	2	6	6081	3817	0.16
2-A4	13822	10000	3541	43	5	32	6189	3637	0.90
2-A5	12964	10000	3675	15	0	7	6087	3797	0.19
2-A6	14786	10000	3960	582	68	394	5433	3777	9.95
2-A7	15245	10000	3811	309	16	190	5679	3834	4.99
2-A8	15379	10000	4088	641	50	390	5367	3970	9.54
2-A9	13968	10000	3689	419	80	226	5772	3702	6.13
2-A10	13058	10000	3556	12	0	8	6149	3715	0.22
2-A11	14999	10000	3942	334	33	177	5653	3980	4.49

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
2-A12	13517	10000	3675	11	0	11	6076	3797	0.30
2-B1	12656	10000	3943	12	2	9	5614	4106	0.23
2-B2	12631	10000	3530	5	2	1	6053	3718	0.03
2-B3	13039	10000	3594	8	1	7	6123	3729	0.19
2-B4	12549	10000	3487	9	2	6	6183	3653	0.17
2-B5	12541	10000	3443	7	0	5	6214	3574	0.15
2-B6	14887	10000	3944	717	64	469	5271	3812	11.89
2-B7	12727	10000	3278	8	0	7	6369	3509	0.21
2-B8	15115	10000	4012	542	84	377	5272	3835	9.40
2-B9	15122	10000	3930	529	55	372	5469	3847	9.47
2-B10	12861	10000	3578	10	1	6	6046	3778	0.17
2-B11	12781	10000	3480	12	2	7	6191	3661	0.20
2-B12	12643	10000	3493	5	0	3	6210	3648	0.09
2-C1	12677	10000	3776	4	1	3	5812	3950	0.08
2-C2	12676	10000	4055	8	0	8	5485	4228	0.20
2-C3	12879	10000	3471	13	4	8	6116	3662	0.23
2-C4	12769	10000	3343	14	2	8	6359	3502	0.24
2-C5	12593	10000	3550	7	2	4	6048	3718	0.11
2-C6	12876	10000	3413	14	0	14	6245	3618	0.41
2-C7	12527	10000	3313	10	3	5	6278	3576	0.15
2-C8	14229	10000	3637	7	0	6	6089	3802	0.16
2-C9	13222	10000	3638	32	2	15	6057	3815	0.41
2-C10	13066	10000	3424	10	1	8	6252	3620	0.23
2-C11	13085	10000	3592	9	1	7	6120	3762	0.19
2-C12	13267	10000	3434	7	0	7	6263	3654	0.20
2-D1	12623	10000	3820	2	0	2	5673	4054	0.05
2-D2	12543	10000	3386	7	1	4	6241	3599	0.12
2-D3	12686	10000	3795	8	0	5	5754	3987	0.13
2-D4	12772	10000	3323	4	1	2	6289	3556	0.06
2-D5	12727	10000	3396	7	0	7	6232	3618	0.21
2-D6	12812	10000	3426	10	0	8	6256	3628	0.23
2-D7	12780	10000	3248	6	0	5	6358	3506	0.15
2-D8	12701	10000	3216	12	3	7	6335	3488	0.22
2-D9	12895	10000	3421	7	0	5	6236	3637	0.15
2-D10	12824	10000	3418	10	4	4	6243	3617	0.12
2-D11	12953	10000	3575	33	2	11	6131	3744	0.31
2-D12	12948	10000	3205	4	1	3	6411	3458	0.09

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
2-E1	12600	10000	3706	10	0	7	5767	3941	0.19
2-E2	12767	10000	3741	4	0	4	5829	3925	0.11
2-E3	13422	10000	3704	14	2	7	6032	3847	0.19
2-E4	12674	10000	3495	7	1	6	6121	3686	0.17
2-E5	12842	10000	3614	6	0	5	5993	3821	0.14
2-E6	12699	10000	3230	11	0	8	6380	3471	0.25
2-E7	13468	10000	3426	337	25	181	6025	3576	5.28
2-E8	12804	10000	3658	11	2	5	5900	3892	0.14
2-E9	12617	10000	3229	9	0	6	6345	3479	0.19
2-E10	12975	10000	3305	5	1	2	6312	3571	0.06
2-E11	12773	10000	3568	7	0	5	5998	3801	0.14
2-E12	12649	10000	3581	13	1	9	5899	3823	0.25
2-F1	12812	10000	3773	8	3	4	5726	3968	0.11
2-F2	14086	10000	3567	111	2	55	5979	3743	1.54
2-F3	12747	10000	3671	10	0	7	5780	3925	0.19
2-F4	12758	10000	3672	10	1	7	5803	3920	0.19
2-F5	12513	10000	3430	10	2	8	6005	3734	0.23
2-F6	12633	10000	3647	12	3	7	5821	3876	0.19
2-F7	12698	10000	3297	5	0	5	6149	3616	0.15
2-F8	12671	10000	3386	4	1	3	6213	3585	0.09
2-F9	12635	10000	3121	4	2	1	6405	3402	0.03
2-F10	12661	10000	3525	10	1	9	5917	3784	0.26
2-F11	12928	10000	3227	6	1	5	6410	3473	0.15
2-F12	12751	10000	3357	4	0	3	6154	3636	0.09
2-G1	12732	10000	3716	12	2	10	5759	3935	0.27
2-G2	12696	10000	3537	11	1	10	6117	3745	0.28
2-G3	12593	10000	3362	7	1	4	6221	3591	0.12
2-G4	12967	10000	3349	4	0	2	6282	3590	0.06
2-G5	12737	10000	3073	6	0	4	6459	3384	0.13
2-G6	12724	10000	3447	9	2	2	6126	3684	0.06
2-G7	12606	10000	3428	7	2	3	6185	3628	0.09
2-G8	12568	10000	3613	8	0	5	5964	3803	0.14
2-G9	15153	10000	4221	522	43	352	5125	4103	8.34
2-G10	12799	10000	3712	8	0	7	5772	3952	0.19
2-G11	12966	10000	3699	8	1	5	5837	3920	0.14
2-G12	12984	10000	3563	77	6	47	5830	3844	1.32
2-H1	12954	10000	3640	5	0	4	5844	3869	0.11

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
2-H2	12704	10000	3852	4	2	2	5646	4077	0.05
2-H3	12935	10000	3848	12	2	5	5637	4076	0.13
2-H4	12546	10000	3729	5	1	4	5823	3912	0.11
2-H5	12486	10000	3667	6	1	5	5790	3871	0.14
2-H6	12461	10000	3357	6	0	6	6194	3586	0.18
2-H7	12606	10000	3575	10	0	7	5926	3820	0.20
2-H8	13023	10000	3172	21	3	10	6416	3464	0.32
2-H9	13646	10000	3461	291	42	162	5964	3601	4.68
2-H10	12696	10000	3218	7	2	5	6200	3512	0.16
2-H11	12616	10000	3593	8	1	4	6005	3794	0.11
2-H12	12894	10000	3569	8	1	3	5915	3805	0.08
3-A1	13246	10000	3811	5	0	5	5999	3903	0.13
3-A2	12834	10000	3971	9	1	7	5738	4081	0.18
3-A3	12732	10000	4061	2	0	1	5613	4168	0.02
3-A4	12757	10000	3865	8	1	3	5788	3997	0.08
3-A5	13132	10000	3774	11	3	7	5955	3922	0.19
3-A6	12878	10000	3441	11	0	6	6028	3744	0.17
3-A7	12721	10000	3622	6	1	4	5983	3815	0.11
3-A8	12880	10000	3813	9	1	6	5921	3932	0.16
3-A9	12916	10000	4189	15	1	12	5443	4306	0.29
3-A10	12832	10000	3908	2	0	2	5780	4028	0.05
3-A11	12794	10000	4168	4	0	4	5474	4296	0.10
3-A12	12868	10000	4260	2	0	2	5346	4390	0.05
3-B1	13068	10000	4099	14	1	7	5483	4243	0.17
3-B2	12890	10000	4027	6	0	6	5582	4174	0.15
3-B3	13005	10000	4125	16	2	9	5474	4264	0.22
3-B4	12851	10000	4072	10	1	5	5539	4206	0.12
3-B5	12931	10000	3747	9	0	8	6031	3846	0.21
3-B6	13233	10000	3538	22	4	13	6126	3723	0.37
3-B7	12961	10000	4189	3	0	3	5400	4355	0.07
3-B8	12911	10000	3989	9	3	5	5527	4192	0.13
3-B9	13924	10000	3849	16	7	6	5770	4016	0.16
3-B10	12770	10000	4238	11	0	8	5369	4363	0.19
3-B11	13013	10000	4087	6	0	4	5488	4257	0.10
3-B12	12908	10000	4023	10	0	8	5549	4197	0.20
3-C1	13369	10000	4092	3	1	1	5447	4282	0.02
3-C2	14017	10000	4064	15	7	5	5455	4250	0.12

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
3-C3	13045	10000	4067	9	1	6	5591	4192	0.15
3-C4	12857	10000	4145	9	4	5	5433	4281	0.12
3-C5	13725	10000	3895	10	0	7	5661	4067	0.18
3-C6	13443	10000	3726	36	11	18	5789	3907	0.48
3-C7	13149	10000	4191	16	1	10	5358	4364	0.24
3-C8	12981	10000	4291	7	0	6	5275	4465	0.14
3-C9	13575	10000	3885	99	14	23	5557	4074	0.59
3-C10	13131	10000	4178	11	0	7	5431	4326	0.17
3-C11	12940	10000	3988	8	0	8	5575	4162	0.20
3-C12	13046	10000	4159	4	1	3	5456	4291	0.07
3-D1	12927	10000	4046	6	1	4	5477	4218	0.10
3-D2	12926	10000	4171	14	0	9	5412	4329	0.22
3-D3	12933	10000	4120	6	3	2	5429	4293	0.05
3-D4	13279	10000	4191	15	2	10	5424	4318	0.24
3-D5	13270	10000	4037	8	0	6	5478	4251	0.15
3-D6	12937	10000	3984	8	2	3	5590	4166	0.08
3-D7	12958	10000	4002	9	1	4	5506	4209	0.10
3-D8	13248	10000	3938	12	2	7	5568	4125	0.18
3-D9	13147	10000	3921	8	2	4	5582	4133	0.10
3-D10	13342	10000	4227	12	2	6	5359	4372	0.14
3-D11	12776	10000	4108	7	0	5	5419	4275	0.12
3-D12	12997	10000	4118	8	2	6	5428	4297	0.15
3-E1	12877	10000	3911	8	0	6	5693	4077	0.15
3-E2	12900	10000	4058	7	0	4	5515	4222	0.10
3-E3	12853	10000	4023	8	0	5	5534	4191	0.12
3-E4	12816	10000	3876	18	7	11	5646	4069	0.28
3-E5	12781	10000	3616	11	2	6	5941	3851	0.17
3-E6	13107	10000	3972	12	2	3	5614	4168	0.08
3-E7	12733	10000	4090	8	2	4	5544	4231	0.10
3-E8	13177	10000	3792	9	3	5	5685	4026	0.13
3-E9	13098	10000	3955	10	1	6	5633	4106	0.15
3-E10	12983	10000	4129	5	1	4	5412	4306	0.10
3-E11	12970	10000	3891	10	0	9	5674	4077	0.23
3-E12	13186	10000	4022	9	2	7	5542	4202	0.17
3-F1	12596	10000	3638	8	0	6	5948	3835	0.16
3-F2	12824	10000	3550	8	0	7	6080	3773	0.20
3-F3	15475	10000	4156	861	42	581	5026	3883	13.98

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
3-F4	12932	10000	3995	3	0	3	5528	4162	0.08
3-F5	13000	10000	3988	7	1	5	5550	4203	0.13
3-F6	12785	10000	3998	10	1	5	5496	4202	0.13
3-F7	12930	10000	4280	10	1	7	5271	4439	0.16
3-F8	13355	10000	3862	22	3	15	5632	4060	0.39
3-F9	13150	10000	4209	10	1	7	5359	4381	0.17
3-F10	13082	10000	4179	10	1	8	5374	4346	0.19
3-F11	12845	10000	3998	10	0	9	5487	4198	0.23
3-F12	13592	10000	3963	27	11	10	5520	4191	0.25
3-G1	12926	10000	4060	5	0	5	5429	4270	0.12
3-G2	12923	10000	3705	7	1	6	6012	3854	0.16
3-G3	12961	10000	4055	3	0	2	5486	4241	0.05
3-G4	12895	10000	3866	7	0	6	5701	4064	0.16
3-G5	12996	10000	3665	10	2	7	6001	3819	0.19
3-G6	12719	10000	3741	3	0	3	5831	3941	0.08
3-G7	13154	10000	3884	7	2	5	5857	4026	0.13
3-G8	13109	10000	4061	8	1	4	5462	4230	0.10
3-G9	12987	10000	4034	15	0	12	5563	4153	0.30
3-G10	13082	10000	4233	11	1	7	5360	4360	0.17
3-G11	13014	10000	3999	4	1	2	5503	4226	0.05
3-G12	13122	10000	4147	6	2	4	5396	4335	0.10
3-H1	12983	10000	4143	5	1	4	5373	4335	0.10
3-H2	12850	10000	3802	6	1	4	5889	3912	0.11
3-H3	13306	10000	4037	21	2	13	5502	4198	0.32
3-H4	12865	10000	3931	9	1	5	5627	4111	0.13
3-H5	12843	10000	3931	3	0	2	5631	4097	0.05
3-H6	13079	10000	3949	8	1	7	5530	4178	0.18
3-H7	13344	10000	3691	10	1	6	5993	3853	0.16
3-H8	12976	10000	3992	23	3	16	5620	4119	0.40
3-H9	13000	10000	3862	6	2	1	5791	4007	0.03
3-H10	12967	10000	3823	10	1	5	5781	3996	0.13
3-H11	12942	10000	3649	6	1	3	5895	3859	0.08
3-H12	13082	10000	4153	10	0	9	5425	4307	0.22
4-A1	12898	10000	4468	7	0	4	5087	4609	0.09
4-A2	12732	10000	4621	4	0	3	4927	4809	0.06
4-A3	12620	10000	4211	3	0	0	5278	4459	0.00
4-A4	12932	10000	4137	11	3	6	5375	4304	0.15

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
4-A5	12694	10000	4310	2	0	2	5214	4498	0.05
4-A6	12774	10000	4360	11	1	8	5194	4504	0.18
4-A7	12951	10000	4185	3	0	1	5329	4416	0.02
4-A8	12852	10000	4079	8	2	4	5512	4245	0.10
4-A9	13933	10000	4337	8	1	5	5165	4546	0.12
4-B1	12765	10000	4541	7	1	3	4989	4719	0.07
4-B2	12824	10000	4567	8	0	7	4982	4720	0.15
4-B3	12839	10000	4347	6	2	2	5142	4571	0.05
4-B4	12887	10000	4466	3	1	2	5057	4659	0.04
4-B5	13267	10000	4454	10	1	9	5112	4608	0.20
4-B6	12863	10000	4462	5	1	3	5035	4640	0.07
4-B7	12878	10000	4456	5	0	5	5118	4614	0.11
4-B8	13274	10000	4409	12	1	6	5102	4621	0.14
4-B9	12977	10000	4457	22	2	10	4998	4681	0.22
4-C1	12890	10000	4475	5	0	5	5048	4647	0.11
4-C2	12809	10000	4421	19	3	9	5073	4617	0.20
4-C3	12981	10000	4313	8	0	6	5177	4508	0.14
4-C4	13060	10000	4303	18	3	8	5144	4535	0.19
4-C5	12772	10000	4368	5	0	4	5100	4599	0.09
4-C6	13067	10000	4412	6	0	6	5072	4593	0.14
4-C7	12905	10000	4316	4	0	3	5165	4530	0.07
4-C8	12935	10000	4456	7	1	3	5054	4627	0.07
4-C9	12913	10000	4330	7	1	4	5197	4497	0.09
4-D1	12994	10000	4348	4	1	2	5112	4566	0.05
4-D2	12784	10000	4358	2	1	1	5123	4580	0.02
4-D3	12965	10000	4368	5	2	2	5160	4541	0.05
4-D4	12907	10000	4164	6	2	4	5217	4475	0.10
4-D5	12808	10000	4456	3	0	3	5033	4670	0.07
4-D6	12874	10000	4297	11	2	9	5182	4498	0.21
4-D7	13028	10000	4494	3	0	3	5026	4702	0.07
4-D8	13115	10000	4473	11	4	5	5020	4672	0.11
4-D9	12943	10000	4128	4	2	1	5399	4324	0.02
4-E1	12848	10000	4388	9	3	6	5129	4580	0.14
4-E2	12857	10000	4316	7	3	2	5191	4481	0.05
4-E3	13069	10000	4215	7	0	7	5242	4426	0.17
4-E4	12806	10000	3628	5	0	4	5879	3896	0.11
4-E5	13017	10000	4111	6	1	5	5370	4314	0.12

10

20

30

40

50

プレート- ウェル	全イベント イベント数	PBL イベント数	rbIgM イベント数	抗マウス- PE イベント数	Q1 イベント数	Q2 イベント数	Q3 イベント数	Q4 イベント数	比率 Q2/IgM (%)
4-E6	12819	10000	4059	8	0	6	5466	4249	0.15
4-E7	14819	10000	4172	67	0	26	5434	4370	0.62
4-E8	12956	10000	3806	9	0	8	5834	3957	0.21
4-E9	12876	10000	3739	9	0	8	6016	3869	0.21
4-F1	12800	10000	4371	8	1	7	5116	4529	0.16
4-F2	12973	10000	4180	8	0	8	5309	4396	0.19
4-F3	12991	10000	4256	5	1	3	5185	4489	0.07
4-F4	12997	10000	4089	11	1	6	5335	4323	0.15
4-F5	12936	10000	4236	8	2	4	5269	4418	0.09
4-F6	12940	10000	4244	8	1	3	5266	4441	0.07
4-F7	13035	10000	4125	9	1	7	5352	4320	0.17
4-F8	12882	10000	3876	6	1	5	5620	4098	0.13
4-F9	12622	10000	3644	4	1	3	5996	3812	0.08
4-G1	13075	10000	4332	54	1	25	5176	4487	0.58
4-G2	12861	10000	4301	7	1	5	5177	4471	0.12
4-G3	12762	10000	3976	5	1	3	5637	4121	0.08
4-G4	12636	10000	3666	8	0	6	6007	3814	0.16
4-G5	12574	10000	3771	4	0	3	5898	3931	0.08
4-G6	12858	10000	3864	2	0	1	5832	4015	0.03
4-G7	12841	10000	3731	5	0	3	5839	3957	0.08
4-H1	12964	10000	4150	4	1	2	5346	4321	0.05
4-H2	13080	10000	4247	24	0	7	5169	4479	0.16
4-H3	12963	10000	4440	5	0	4	5052	4621	0.09
4-H4	12653	10000	3928	6	1	4	5529	4136	0.10
4-H5	13038	10000	4096	9	2	5	5381	4303	0.12
4-H6	12987	10000	3918	3	0	2	5514	4181	0.05
4-H7	12894	10000	4068	4	1	3	5414	4266	0.07

10

20

30

【 0 0 8 3 】

本発明は、抗ウサギCD19抗体を発現するB細胞またはハイブリドーマを、それぞれ得るために、特定の免疫化プロトコルに従う必要がある、という知見に少なくとも部分的に基づく。DNA免疫化と、採取前にその表面にウサギCD19を発現する細胞によるブーストとの組合せにより、ウサギCD19特異的抗体を発現するB細胞を得ることができることを見出された。

40

【 0 0 8 4 】

この理論に拘束されるものではないが、モノクローナル抗体はもちろんのこと、抗ウサギCD19抗体は、このような抗体を生成することが実に困難であるため、これまで利用可能ではなかったと考えられる。例えば、経験から、組換えタンパク質としての、または組換え細胞株としてのみのCD19による免疫化は、B細胞上の天然CD19に結合する抗体をもたらさないことが明らかになった。したがって、CD19が天然の確認として動物中に存在すると仮定して、最終的な細胞ブーストを含むDNAのみの免疫化を行った。

50

【 0 0 8 5 】

本明細書では、ウサギ B 細胞の標識化および濃縮 / 選択のためのツールとして有用な、ウサギ CD 19 に対する抗体が提供される。

【 0 0 8 6 】

この理論に拘束されるものではないが、これらの抗体を、とりわけ、マクロファージ枯渇後および / または Ig M - Ig G + CD 19 + - B 細胞の染色のために、有益に使用することができると思定される。

【 0 0 8 7 】

本発明は、CD 19 を利用して、単一細胞を置くことまたはプール選別のために B 細胞を標識できる、という知見に少なくとも部分的に基づく。抗原特異的 Ig G を産生するすべての B 細胞は、それぞれ置く日または選別する日に、CD 19 陽性であることが見出された。したがって、ウサギ細胞上の CD 19 を利用して、抗原特異的抗体産生 B 細胞を選択することができる (図 3 および以下の表を参照されたい) 。

【 0 0 8 8 】

プレート	数[n]	種類
8	14	抗原特異的
	48	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
7	16	抗原特異的
	59	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
6	19	抗原特異的
	57	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
5	13	抗原特異的
	56	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
4	17	抗原特異的
	55	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
3	13	抗原特異的
	44	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
2	18	抗原特異的
	56	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞
1	18	抗原特異的
	47	IgG陽性ウエル
	84	選別された細胞

【 0 0 8 9 】

本発明による抗ウサギ CD 19 抗体は、Ig G 陽性および Ig M 陽性の B 細胞を検出するために使用することができる (すべての抗原特異的 Ig G 陽性 B 細胞は高レベルの CD 19 を有する) 。本発明による抗体を用いて、脾臓中の B 細胞の全細胞の約 5 . 4 % が CD 19 陽性であり、末梢血単核細胞 (P B M C) 中の B 細胞の全細胞の平均 3 8 . 7 % が CD 19 陽性であることを初めて決定することができた。血液から新たに単離されたウサギ P B M C 中のウサギ CD 19 陽性細胞の割合は、免疫グロブリン染色された B 細胞の合計よりも高く、抗ウサギ CD 19 抗体が、すべてのウサギ B 細胞を標識するための優れたマーカーであることを意味することを指摘しなければならない。結果を下の表に示す。

【 0 0 9 0 】

血液から 集団	合計	%	全体に 対する%
全イベント	13826		100.0
リンパ球	9330	67.5 (親に対する)	67.5
CD19-陽性	5787	64.5 (親に対する)	41.9
IgG-陽性	102	1.1 (CD19 ⁺ に対する)	0.7
IgM-陽性	3818	42.6 (CD19 ⁺ に対する)	27.6

10

脾臓から 集団	合計	%	全体に 対する%
全イベント	27654		100.0
リンパ球	9177	33.2 (親に対する)	33.2
生存単一細胞	7474	81.4 (親に対する)	27.0
CD19-陽性	1817	24.3 (親に対する)	6.6
IgG-陽性	46	0.6 (CD19 ⁺ に対する)	0.2
IgM-陽性	1126	15.1 (CD19 ⁺ に対する)	4.1

20

30

【 0 0 9 1 】

特に、I g Gで選別されたB細胞集団では、すべてのI g G陽性細胞が高レベルのC D 1 9を有することは重要である（以下の表のデータを参照されたい）。

【 0 0 9 2 】

血液から 集団	合計	%	全体に 対する%
全イベント	14460		100.0
リンパ球	8486	58.69 (親に対する)	58.69
生存単一細胞	8087	95.30 (親に対する)	
CD19-陽性	5404	66.82 (親に対する)	37.37
IgG-陽性	79	0.98 (CD19 ⁺ に対する)	0.55
CD19および IgG二重陽性	79	0.98 (CD19 ⁺ に対する)	0.55

40

50

【0093】

本発明は、CD19を利用して、B細胞の共培養物においてB細胞をフィーダー細胞から区別することができる、という知見に少なくとも部分的に基づく。単一細胞として置かれたB細胞は、増殖および細胞分裂のために、培養物中のフィーダー細胞の存在を必要とする。フィーダー細胞は、その増殖および細胞分裂を減少させるために、B細胞との共培養の前に放射線照射されるが、その総数および細胞サイズは、共培養後に得られるB細胞の数および細胞サイズと同程度である。本発明による抗ウサギCD19抗体により、共培養後の単純なFACS解析によって、フィーダー細胞とB細胞とを区別することが今や可能である。これによって、B細胞の総数を特定することができる。このことは、抗体産生速度または収率などの他の培養パラメータの正規化を可能にする（図4および図5を参照されたい）。

10

【0094】

本発明の前には、細胞表面B細胞マーカーとしてのウサギIgGは、その発現が培養中に低下するために適切ではなく、したがってB細胞マーカーとして使用することができないために、培養後に、B細胞数に関して、増殖したB細胞クローンのサイズを推定することができなかった。本発明による抗ウサギCD19抗体の使用は、ウサギCD19が培養後のB細胞上に依然として発現され、それによって培養後のB細胞を計数することを可能にするので、この問題を解決する（ $B細胞/ウェル = CD19 + ゲート中のイベント数 / FACSされた体積 \times 試料体積$ ）。

【0095】

以下の表では、培養後の36個の単一ウェルのB細胞のカウント数（CD19陽性PI-細胞）を示す。B細胞のカウント数は、広範囲にわたっていた。CD19陽性B細胞のカウント数の計算を、以下のように行った： $FACSゲート中のカウント数 / 150 (FACSされた体積) \times 200 (全試料体積)$ 。

20

【0096】

30

40

50

試料 ID	FSC-SSC 中のリンパ球集団	CD19+B細胞 FACSゲート中のカウント数	CD19+ B細胞の絶対数、計算値	生存CD19+ 平均値 (Alexa Fluor 647-A)	IgG 濃度 [µg/ml]	抗原結合 OD
C3	11266	10822	14429	7290	7.50	-0.01
C4	309	62	83	4764	0.77	0.00
C5	450	247	329	5726	2.73	0.00
C6	6396	5782	7709	11085	4.24	0.00
C7	514	239	319	5713	4.29	2.46
C8	454	135	180	6424	2.11	1.91
C9	535	188	251	5864	4.18	-0.01
C10	3293	2684	3579	7400	3.08	-0.01
C11	261	8	11	3753	0.57	0.75
D3	166	3	4	4712	0.01	-0.01
D4	355	138	184	6336	1.27	0.01
D5	7524	6921	9228	10148	6.31	0.00
D6	3391	2807	3743	4844	7.50	-0.01
D7	137	0	0	n/a	0.01	0.00
D8	25411	24404	32539	10873	7.50	2.80
D9	2034	1298	1731	9104	7.50	-0.01
D10	1119	638	851	5851	7.50	-0.01
D11	417	5	7	6100	0.19	-0.01
E3	13550	12504	16672	7804	7.50	2.69
E4	6136	5402	7203	6152	7.50	0.02
E5	343	160	213	5470	3.82	0.02
E6	10228	8379	11172	10324	7.50	0.06
E7	209	0	0	n/a	0.01	0.01
E8	475	254	339	6318	5.44	0.02
E9	4719	3873	5164	17049	0.48	0.01
E10	5436	4948	6597	8346	6.80	2.27
E11	6928	5791	7721	5301	7.50	2.52
F3	3908	3627	4836	8155	7.50	0.01
F4	3382	2773	3697	8696	5.78	0.01
F5	584	284	379	5625	1.22	0.00
F6	1294	664	885	3806	7.50	0.00
F7	3164	2514	3352	6052	7.50	0.00
F8	2514	1992	2656	9539	7.40	0.00
F9	8436	7602	10136	6443	7.50	2.98
F10	1568	985	1313	5174	7.50	-0.01
F11	271	6	8	4936	0.01	0.00

10

20

30

40

【 0 0 9 7 】

B細胞クローンが存在するたびに、CD19陽性B細胞を検出し、生きているフィーダー細胞を除外して計数することができた。B細胞クローンの細胞カウント数 (= 細胞の総数) は、広範囲にわたって非常に不均一であることが分かる。

【 0 0 9 8 】

B細胞クローンのサイズは、B細胞増殖の成功のための非常に好適な代用マーカーである。さらに、B細胞クローンのサイズは、事前に選別されたB細胞集団と関連させることができ、ELISA結果は、システムのより良好な特徴付けを可能にする。

【 0 0 9 9 】

50

さらに、特に大過剰のフィーダー細胞において、増殖が遅い、ならびに産生性が低いB細胞を同定することが可能である。同時に、死んだフィーダー細胞は、染色および分析/選択プロセスを妨害しない。この特異的標識化により、(死んだまたは生きている)フィーダー細胞の存在下でのB細胞の計数を、培養物中(例えば、マルチウェルプレートのウェル中)で直接行うことが可能である。

【0100】

本発明は、置く時の細胞の表面上のCD19レベルが、培養後に得られたIgG力価と正の相関がある、という知見に少なくとも部分的に基づく。この相関を、ウサギから単離した直後に、共培養を行う必要なしに、高産生B細胞を選択するために利用することができる。

10

【0101】

本発明は、CD19を利用して、ウサギB細胞を濃縮し、それによって、単一細胞選別のためのB細胞集団、例えばIgG+B細胞集団を増加させ、それによって、望ましくない細胞の数を減少させることができる、という知見に少なくとも部分的に基づく。この理論に拘束されるものではないが、この特性は、とりわけ、改善された選別結果をもたらし得る。

【0102】

本発明は、本発明による抗ウサギCD19抗体が、ウサギ初代B細胞の同定に使用できる、という知見に少なくとも部分的に基づく。

【0103】

本発明による抗体を用いて、例えば、ウサギPBMCまたはウサギ脾細胞などの試料中のCD19陽性B細胞の割合を決定することが可能であった。PBMCに関する結果を、下表に示す。

20

集団	数 [n]	全体に対する 割合 [%]
全細胞	21,510	100
CD19 陽性	7,904	36.7
IgM 陽性	6,835	31.8
IgG 陽性	71	0.3

30

【0104】

0.2%~2%のウサギPBMCでFITC標識にコンジュゲートされた市販のヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体(AbD Serotec STAR121F)(図6)。

【0105】

細胞を、FITC標識された抗IgG抗体、およびAPCで標識された本発明による抗ウサギCD19抗体で、二重染色した。続いて、細胞をFSCおよびIgGについて、インデックス選別した。結果は、CD19およびIgG陽性細胞のみが、その後のELISAにおいて、IgGを産生したことを示す。次いで、選別されたCD19陽性細胞の割合についてチェックした。これを、本発明による抗体を使用することによって、どの程度の選別効率が改善され得るかを推定するための尺度として使用した。平均して、効率は、IgGおよびCD19二重陽性細胞のみを選別する場合に、約14%改善することができ、最良の場合には、IgG陽性細胞または抗原特異的細胞の有意な損失なしに、20%超改善することができる。結果を下表に示す。

40

【0106】

50

試料	IgG/CD19二重陽性細胞 における抗原特異的IgG 産生細胞の割合
1	90.9 %
2	97.7 %
3	77.3 %
4	80.9 %

【0107】

ビーズベースの選択 / 抽出プロセスのために、様々な条件を以下のように試験した：

- ビオチン化抗原およびストレプトアビジンビーズによる磁気ビーズベースのパニング、その後のFSC、ならびにIgG (FITC) およびCD19 (APC) 二重染色細胞の選別ゲーティング、ならびに

- 本発明によるビオチン化抗CD19抗体およびストレプトアビジンビーズによる磁気ビーズベースのパニング、その後のFCS、ならびにIgG (FITC) および抗原 (APC) 二重染色細胞の選別ゲーティング。

【0108】

どちらの場合も、7AADを用いて、生死に関する染色を行った。

【0109】

本発明による抗CD19抗体によるパニングは、B細胞の生存率の(4倍高い)増加をもたらすことが見出された。この理論に拘束されるものではないが、架橋および活性化の減少のために、生存率の増加が引き起こされ得ると想定される。

【0110】

本発明は、細胞の集団からB細胞を濃縮するためのパニング工程において、本発明による抗CD19抗体を使用することによって、より高い割合の選別されたB細胞が、その後のELISAに示されるように、抗原に特異的な抗体を産生している、という知見に少なくとも部分的に基づく。さらに、交差反応性アッセイで陽性の細胞も少なく、使用できるクローンの数が多くなる。これは、細胞の生存率の増加に関連し得る。

【0111】

様々な免疫化キャンペーン(様々な抗原)からのB細胞を用いて得られた結果を、以下の表に示す。

【0112】

抗原1	パニング後の IgG陽性細胞	パニング後の 抗原特異的 IgG産生細胞
抗原パニング	55.8 %	45.6 %
抗CD19抗体 パニング	69.9 %	61.8 %

抗原2	パニング後の IgG陽性細胞	パニング後の 抗原特異的 IgG産生細胞	交差反応性抗体 を産生する 細胞
抗原 パニング	21.5 %	16.8 %	29.1 %
抗CD19抗体 パニング	33.9 %	15.3 %	14.9 %

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

A . 例示的な抗ウサギ C D 1 9 抗体およびその使用

A . 1 例示的な抗体

ウサギ C D 1 9 は、ウサギ B 細胞の分析および特徴付けのために有利な細胞表面マーカーであることが見出された。表面提示された C D 1 9 を介したウサギ B 細胞の標識化は、改善された B 細胞選別を可能にする。改善は、とりわけ、より特異的な標識化、それによる選別 / 単一細胞として置くこと、または / および処理される B 細胞の数が減少し、同時に抗原特異的抗体を産生する B 細胞の数が増加する、易化したプロセスである。

【 0 1 1 4 】

一態様では、本明細書で、(a) 配列番号 3 2 または 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 5 または 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの H V R を含む、ウサギ C D 1 9 に特異的に結合する単離された抗体が提供される。

10

【 0 1 1 5 】

一態様では、本明細書で、(a) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの H V R を含む、抗ウサギ C D 1 9 抗体が提供される。

20

【 0 1 1 6 】

一態様では、本明細書で、(a) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの H V R を含む、抗ウサギ C D 1 9 抗体が提供される。

30

【 0 1 1 7 】

一態様では、本明細書で、(a) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの H V R を含む、抗ウサギ C D 1 9 抗体が提供される。

【 0 1 1 8 】

一態様では、本明細書で、(a) 配列番号 3 2 または 3 3 または 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 5 または 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、ウサギ C D 1 9 に特異的に結合する単離された抗体が提供される。

40

【 0 1 1 9 】

一態様では、本明細書で、(a) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、抗ウサギ C D 1 9 抗体が提供される。

50

【0120】

一態様では、本明細書で、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗ウサギCD19抗体が提供される。

【0121】

一態様では、本明細書で、(a)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗ウサギCD19抗体が提供される。

10

【0122】

別の態様では、本明細書に記載の抗ウサギCD19抗体は、(i)(a)配列番号32または33または34のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号35または36のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、ならびに(ii)(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

20

【0123】

別の態様では、本明細書に記載の抗ウサギCD19抗体は、(i)(a)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、ならびに(ii)(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

30

【0124】

別の態様では、本明細書に記載の抗ウサギCD19抗体は、(i)(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、ならびに(ii)(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0125】

別の態様では、本明細書に記載の抗ウサギCD19抗体は、(i)(a)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、ならびに(ii)(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0126】

別の態様では、ヒト化抗体である抗ウサギCD19抗体が提供される。一実施形態では

50

、ヒト化抗ウサギCD19抗体は、上述の実施形態のうちのいずれかにあるようなHVRを含み、アクセプタ・ヒト・フレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリン（生殖細胞系列）フレームワークまたはヒト・コンセンサス・フレームワークをさらに含む。

【0127】

さらなる態様では、本明細書で、本明細書に記載の抗ウサギCD19抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態では、配列番号30のVH配列および配列番号26のVL配列を含む抗ウサギCD19抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【0128】

一実施形態では、上記の実施形態のいずれかによる抗ウサギCD19抗体は、モノクローナル抗体である。一実施形態では、抗ウサギCD19抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')₂断片である。別の実施形態では、抗体は、全長抗体、例えば、本明細書で定義されるインタクトなIgG1抗体もしくはIgG4抗体、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0129】

すべての態様の一実施形態では、抗体は、

i) 任意で、変異P329G、L234A、およびL235Aを有する、ヒトIgG1サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

ii) 任意で、変異P329G、S228P、およびL235Eを有する、ヒトIgG4サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

iii) 変異(P329G、L234A、L235A)I253A、H310A、およびH435A、もしくは変異(P329G、L234A、L235A)H310A、H433A、およびY436Aを有する、ヒトIgG1サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

iv)

a) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366Wを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、およびY407Vを含むか、もしくは

b) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366WおよびY349Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、Y407V、およびS354Cを含むか、もしくは

c) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366WおよびS354Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含む、ヘテロ二量体Fc領域、

または

v) 両方のFc領域ポリペプチドが変異P329G、L234A、およびL235Aを含む、ヒトIgG1サブクラスのヘテロ二量体Fc領域、ならびに

a) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366Wを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、およびY407Vを含むか、もしくは

b) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366WおよびY349Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、Y407V、およびS354Cを含むか、もしくは

c) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366WおよびS354Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含み、

または

vi) 両方のFc領域ポリペプチドが変異P329G、S228P、およびL235Eを含む、ヒトIgG4サブクラスのヘテロ二量体Fc領域、ならびに

a) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366Wを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、およびY407Vを含むか、もしくは

b) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366WおよびY349Cを含み、他方のF

10

20

30

40

50

c領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、Y407V、およびS354Cを含むか、もしくは

c) 一方のFc領域ポリペプチドが変異T366WおよびS354Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含み、

または

vii) iii)のうちの1つと、vi)、v)、およびvi)のうちの1つとの組合せを含む(すべての位置は、KabattのEUインデックスによる)。

【0130】

さらなる態様では、上記の実施形態のいずれかによる抗ウサギCD19抗体は、以下のセクションに記載される特徴のうちのいずれかを、単独で、または組合せで、組み込むことができる。

【0131】

1. 抗体断片

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab₂)Fv、およびscFv断片、ならびに以下に記載の他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片のレビューについては、Hudson, P. J.ら、Nat. Med. 9(2003)129~134を参照されたい。scFv断片のレビューについては、例えば、Plueckthun, A., The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、RosenburgおよびMoore(編)、Springer-Verlag、New York(1994)、269~315頁を参照されたく、また国際公開第93/16185号、米国特許第5,571,894号、および米国特許第5,587,458号も参照されたい。エピトープ残基に結合し、増加したインビボ半減期を有するサルベージ受容体を含む、FabおよびF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

【0132】

ダイアボディは、二価または二重特異性であることができる、2つの抗原結合部位を伴う抗体断片である。例えば、欧州特許出願公開第0404097号、国際公開第1993/01161号、Hudson, P. J.ら、Nat. Med. 9(2003)129~134、およびHollinger, P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993)6444~6448を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディはまた、Hudson, P. J.ら、Nat. Med. 9(2003)129~134)にも記載されている。

【0133】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltherham, MA、例えば、米国特許第6,248,516号を参照されたい)。

【0134】

抗体断片は、本明細書に記載されるように、インタクテナ抗体のタンパク質分解、および組換え宿主細胞(例えば、大腸菌(E. coli)またはファージ)による産生を含むが、これらに限定されない、様々な技法によって作られてもよい。

【0135】

2. キメラ抗体およびヒト化抗体

本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、およびMorrisson, S. L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984)6851~6855)に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または非ヒト霊長類、例えば、サル由来の可変領域)およびヒト定常領域を

10

20

30

40

50

含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のそれから変更されている「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0136】

ヒト化抗体は、キメラ抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減する一方で、親の非ヒト抗体の特異性および親和性は保持するようにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはその部分）が非ヒト抗体由来であり、かつFR（またはその部分）がヒト抗体配列由来である、1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意で、少なくとも一部分のヒト定常領域も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復または改善するように、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

10

【0137】

ヒト化抗体およびその作成方法は、例えば、Almagro, J. C. および Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619~1633 でレビューされ、例えば、Riechmann, I. ら、*Nature* 332 (1988) 323~329、Queen, C. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029~10033、米国特許第5,821,337号、米国特許第7,527,791号、米国特許第6,982,321号、および米国特許第7,087,409号、Kashmiri, S. V. ら、*Methods* 36 (2005) 25~34（特異性決定領域（SDR）グラフトの記述）、Padlan, E. A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489~498（「表面再構成」の記述）、Dall'Acqua, W. F. ら、*Methods* 36 (2005) 43~60（「FRシャッフリング」の記述）、ならびに Osbourn, J. ら、*Methods* 36 (2005) 61~68 および Klimka, A. ら、*Br. J. Cancer* 83 (2000) 252~260（FRシャッフリングの「ガイド付き選択」アプローチの記述）に、さらに記載されている。

20

【0138】

ヒト化のために使用され得るヒトフレームワーク領域としては、これらに限定されないが、「ベストフィット」方法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims, M. J. ら、*J. Immunol.* 151 (1993) 2296~2308を参照）、軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter, P. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285~4289、および Presta, L. G. ら、*J. Immunol.*、151 (1993) 2623~2632を参照）、ヒト成熟（体細胞性変異を受けた）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系列フレームワーク領域（例えば、Almagro, J. C. および Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619~1633を参照）、およびFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca, M. ら、*J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678~10684 および Rosok, M. J. ら、*J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611~22618を参照）が挙げられる。

30

40

【0139】

3. 抗体バリエーション

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列バリエーションが企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましいことがある。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適正な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって、調製されてもよい。このような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、および/または挿入、および/または置換を含む。欠失、挿入、および置換の任意の組合せを、最終構築物が、所望の特徴（例えば、抗原結合）を有するという条件で、最終構築物に到達するよ

50

うに行うことができる。

【 0 1 4 0 】

a) 置換、挿入、および欠失バリエント

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体バリエントが提供される。置換による変異導入に関して、目的の部位には、HVRおよびFRが含まれる。保存的置換を、以下の表の「好ましい置換」という見出しの下に示す。より実質的な変化を表1に「例示的な置換」の見出しの下に示し、またアミノ酸側鎖クラスに関して下にさらに記載する。アミノ酸置換が目的の抗体に導入され、生成物は所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低減、またはADCCまたはCDCの改善についてスクリーニングされ得る。

【 0 1 4 1 】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【 0 1 4 2 】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従ってグループ化され得る。

(1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、

(2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、

(3) 酸性: Asp、Glu、

(4) 塩基性: His、Lys、Arg、

(5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro、

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0143】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うことになる。

【0144】

ある種類の置換バリエーションは、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなるの研究のために選択される、結果として生じるバリエーション（複数可）は、親抗体と比較して、ある特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の低減）の修飾（例えば、改善）を有し、かつ/または実質的に保持された親抗体のある特定の生物学的特性を有する。例示的な置換バリエーションは、親和性成熟した抗体であり、例えば、本明細書に記載のファージディスプレイに基づく親和性成熟技法などを使用して、簡便に生成されてもよい。簡潔には、1つまたは複数のHVR残基が変異を受け、バリエーション抗体がファージ上にディスプレイされ、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

10

【0145】

改変（例えば、置換）をHVRに行い、例えば、抗体親和性を改善することができる。このような改変は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, P. S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179~196を参照）、および/または抗原と接触する残基で行われ得、結果として得られるバリエーションVHまたはVLが、結合親和性について試験される。二次ライブラリの構築およびそれからの再選択による親和性成熟については、例えば、Hoogenboom, H. R.ら、*Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1~37に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態では、多様性が、様々な方法（例えば、エラープロンプPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性変異導入）のうちのいずれかによって、成熟のために選択された可変遺伝子に導入される。次いで、二次ライブラリが作製される。次いで、このライブラリがスクリーニングされて、所望の親和性を有する任意の抗体バリエーションを特定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4~6個の残基）をランダム化する、HVR指向性アプローチを含む。抗原結合に關与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異導入またはモデリングを使用して、具体的に特定され得る。特に、CDR-H3およびCDR-L3が、標的にされることが多い。

20

30

【0146】

ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、このような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つまたは複数のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書で提供される保存的置換）が、HVR中に行われてもよい。このような改変は、例えば、HVR中の抗原接触残基の外側であり得る。上に提供されるバリエーションVHおよびVL配列のある特定の実施形態では、各HVRは、改変されていないか、または1つ以下、2つ以下、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

40

【0147】

変異導入のために標的にされ得る、抗体の残基または領域の同定のための有用な方法は、Cunningham, B. C. およびWells, J. A., *Science* 244 (1989) 1081~1085によって記載されるように、「アラニンスキャニング変異導入」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基群（例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電残基）が同定され、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けたかどうかを判定する。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入されてもよい。あるいは、または加えて、抗体と

50

抗原との間の接点を特定するための抗原 - 抗体複合体の結晶構造。このような接触残基および隣接残基は、置換の候補として標的とされるか、または取り除かれてもよい。バリエーションは、所望の特性を有するかどうかを判定するためにスクリーニングされてもよい。

【0148】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100残基以上を含むポリペプチドまでの長さ範囲のアミノ末端および/またはカルボキシル末端の融合、ならびに1個または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入型バリエーションには、抗体のN末端もしくはC末端に、酵素（例えば、ADEPTのための）または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドを融合させたものが含まれる。

10

【0149】

b) グリコシル化バリエーション

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つまたは複数のグリコシル化部位が創出されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を改変させることによって、簡便に達成され得る。

【0150】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合した炭水化物が改変され得る。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、一般にN結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される分岐状の二分岐型オリゴ糖を含む。例えば、Wright, A. および Morrison, S. L., TIBTECH 15 (1997) 26~32を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐型オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体中のオリゴ糖の修飾は、ある特定の改善された特性を有する抗体バリエーションを作成するために行われてもよい。

20

【0151】

一実施形態では、Fc領域に（直接的または間接的に）結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体バリエーションが提供される。例えば、このような抗体中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定される場合、Asn297に結合したすべての糖鎖構造（例えば、複合体、ハイブリッド、および高マンノース構造）の合計に対して、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。Asn297は、Fc領域の約297位（KabattによるFc領域残基のEU付番）に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体のマイナーな配列変化に起因して、297位の上流または下流、すなわち294位と300位との間の約±3個のアミノ酸に位置していてもよい。このようなフコシル化バリエーションは、改善されたADC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号、米国特許出願公開第2004/0093621号を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体バリエーションに関する出版物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2002/0164328号、米国特許出願公開第2004/0093621号、米国特許出願公開第2004/01322140号、米国特許出願公開第2004/0110704号、米国特許出願公開第2004/0110282号、米国特許出願公開第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazaki, A.ら、J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239~1249、Yamane

30

40

50

- Ohnuki, N.ら、Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614~622が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損するLec13 CHO細胞 (Ripka, J.ら、Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533~545、米国特許出願公開第2003/0157108号、および国際公開第2004/056312、特に実施例11)、および - 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞 (例えば、Yamane-Ohnuki, N.ら、Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614~622、Kanda, Y.ら、Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680~688、および国際公開第2003/085107号)などのノックアウト細胞株を挙げることができる。

10

【0152】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐型オリゴ糖がGlcNAcによって二分される、二分されたオリゴ糖を有する抗体バリエーションがさらに提供される。このような抗体バリエーションは、低減されたフコシル化および/または改善されたADCC機能を有し得る。このような抗体バリエーションの例は、例えば国際公開第2003/011878号、米国特許第6,602,684号、および米国特許出願公開第2005/0123546号に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する、抗体バリエーションも提供される。このような抗体バリエーションは、改善されたCDC機能を有し得る。このような抗体バリエーションは、例えば、国際公開第1997/30087号、国際公開第1998/58964号、および国際公開第1999/22764号に記載されている。

20

【0153】

c) Fc領域バリエーション

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸修飾が、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入され、それによって、Fc領域バリエーションが生成され得る。Fc領域バリエーションは、1つまたは複数のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含む、ヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域) を含んでいてもよい。

【0154】

ある特定の実施形態では、本明細書で、すべてではないが、いくつかのエフェクター機能を保有する抗体バリエーションが提供され、該抗体バリエーションは、インビボでの抗体の半減期が重要であり、その上、ある特定のエフェクター機能 (補体およびADCCなど) が不要または有害である用途に望ましい候補となる。インビトロおよび/またはインビボ細胞毒性アッセイを行うことにより、CDCおよび/またはADCC活性の低減/欠乏を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを行うことにより、抗体がFcR結合を欠いている (そのため、ADCC活性を欠いている可能性がある) が、FcRn結合能力を保持することを確実にすることができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、FcRIIのみを発現するが、一方で単球は、FcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch, J. V. およびKinet, J. P.、Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457~492の464頁、表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059~7063、およびHellstrom, I.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499~1502を参照)、米国特許第5,821,337号 (Bruggemann, M.ら、J. Exp. Med. 166 (1987) 1351~1361を参照)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい (例えば、フローサイトメトリー (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA) のためのACTI (商標) 非放射性細胞毒性アッセイ、およびCytotox96 (登録商標) 非放射

30

40

50

性細胞毒性アッセイ (Promega, Madison, WI) を参照されたい)。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が挙げられる。あるいは、または加えて、目的の分子のADCC活性は、例えば、Clynes, R.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652~656に開示されているものなどの動物モデルにおいて、インビボで評価することができる。C1q結合アッセイを行い、抗体がC1qに結合することができないために、CDC活性を欠くことを確認してもよい。例えば、国際公開第2006/029879号および国際公開第2005/100402号における、C1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい (例えば、Gazzano-Santorio, H.ら、J. Immunol. Methods 202 (1996) 163~171、Cragg, M. S.ら、Blood 101 (2003) 1045~1052、ならびにCragg, M. S. およびM. J. Glennie、Blood 103 (2004) 2738~2743を参照されたい)。FcRn結合およびインビボでのクリアランス/半減期の決定はまた、当技術分野で公知の方法を使用することができる (例えば、Petkova, S. B.ら、Int. Immunol. 18 (2006): 1759~1769を参照されたい)。

10

【0155】

低減したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329のうちの1つまたは複数の置換を有する抗体が挙げられる (米国特許第6,737,056号)。このようなFc変異体としては、残基265および297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸265位、269位、270位、297位、および327位のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体が挙げられる (米国特許第7,332,581号)。

20

【0156】

FcRに対する結合が、向上または減少したある特定の抗体バリエーションが記載されている。(例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312号、およびShields, R. L.ら、J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591~6604を参照されたい。)

【0157】

ある特定の実施形態では、抗体バリエーションは、ADCCを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、および/または334位 (残基のEU付番) での置換を有するFc領域を含む。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、およびIdusogie, E. E.ら、J. Immunol. 164 (2000) 4178~4184に記載されているように、C1q結合および/または補体依存性細胞傷害性 (CDC) の変化 (すなわち、向上または減少のいずれか) をもたらずFc領域中で改変が行われる。

【0159】

半減期が長くなり、母体のIgGの胎児への移行を担う、新生児Fc受容体 (FcRn) への結合が向上した抗体 (Guyer, R. L.ら、J. Immunol. 117 (1976) 587~593、およびKim, J. K.ら、J. Immunol. 24 (1994) 2429~2434) は、米国特許出願公開第2005/0014934号に記載されている。これらの抗体は、Fc領域の、FcRnへの結合を改善する、1つまたは複数の置換を有するFc領域を含む。このようなFcバリエーションには、Fc領域残基: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434のうちの1つまたは複数での置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するバリエーションが含まれる (米国特許第7,371,826号)。

40

50

【0160】

Fc領域バリエーションの他の例に関して、Duncan, A. R. および Winter, G., Nature 322 (1988) 738~740、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、ならびに国際公開第94/29351号も参照されたい。

【0161】

d) システインが改変された抗体バリエーション

ある特定の実施形態では、抗体の1つまたは複数の残基がシステイン残基で置換されているシステイン改変抗体、例えば、「thioMAb」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換残基は、抗体のアクセス可能な部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基が抗体のアクセス可能な部位に位置付けられ、それを使用して、薬物部分またはリンカー-薬物部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートして、本明細書にさらに記載されているように、イムノコンジュゲートを作製することができる。ある特定の実施形態では、以下の残基のうちの任意の1つまたは複数、システインで置換してもよい：軽鎖のV205 (Kabab付番)、重鎖のA118 (EU付番)、および重鎖Fc領域のS400 (EU付番)。システイン改変抗体を、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されているように、生成することができる。

10

【0162】

A. 2つの例示的な使用

本発明による抗ウサギCD-19抗体を、ウサギB細胞の特異的標識化および検出を必要とする任意の方法で使用することができる。

20

【0163】

個々の方法は、

i) B細胞またはB細胞クローンを、B-細胞または他の細胞の集団から単離し、それによって単離されたB細胞またはB細胞クローンが標的に特異的に結合する抗体を産生するため、

ii) 単一細胞として置かれたB細胞の共培養をするため、

iii) 計数するおよび選択する/置くために、B細胞を標識化するため、ならびに

iv) 抗体を産生するため

30

の方法である。

【0164】

方法と同時に、対応する使用も包含され、開示される。

【0165】

一態様は、

a) ウサギの血液からB細胞を得る工程、

b) B細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している1つまたは複数のB細胞を選択する工程

を含む、B細胞を選択するための方法である。

【0166】

一実施形態では、方法は、

工程b)の後かつ工程c)の前における、B細胞を共培養培地中で37で1時間インキュベートする工程、

c) 本発明による抗体が結合している1つまたは複数のB細胞を(個々の容器に)置く工程、

d) 該置かれた細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、

e) 工程d)で増殖しているB細胞を選択し、それによって、B細胞を選択する工程のうちの一つまたは複数を含む。

40

【0167】

本明細書に記載の一態様は、

50

a) 本発明による標識抗体の結合に基づいて、FACSによって単一細胞として置かれたB細胞の集団のB細胞のそれぞれを、フィーダー細胞としてのマウスEL-4 B5細胞と共培養する工程、および

b) 工程a)において、増殖し、かつ抗体を分泌するB細胞クローンを選択する工程を含む、B細胞を選択するための方法である。

【0168】

本明細書に記載の一態様は、

a) 本発明による標識抗体の結合に基づいて、FACSによって、個々の容器に置かれたB細胞の集団の1つまたは複数のB細胞を、任意で、フィーダー細胞としてのマウスEL-4 B5細胞、ならびにフィーダー混合物としてのIL-1、TNF、IL-10、ならびにIL-21、SAC、BAFF、IL-2、IL-4、およびIL-6から選択される1種または複数の存在下で、共培養する工程、

b) 標的抗原に特異的に結合する抗体を産生する、B細胞クローンを選択する工程、

b1) 逆転写PCRによって該抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を決定する工程、

b2) 該抗体軽鎖可変ドメインおよび該重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を含む核酸で、細胞をトランスフェクトする工程、ならびに

c) 工程b)で選択されたB細胞クローンによって産生される抗体またはそのヒト化バリエーションをコードする核酸を含有する細胞を培養し、細胞または培養上清から抗体を回収することによって、抗体を産生する工程

を含む、標的抗原に結合する抗体を産生するための方法である。

【0169】

本明細書に記載の一態様は、

- 多数のウサギB細胞を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体とインキュベートする工程 / 多数のウサギB細胞の個々のB細胞を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体で標識する工程、

- 本発明による抗体が表面上に結合している / 個々のB細胞(単一細胞として置かれたB細胞)またはB細胞のプールのいずれかとして標識されている、1つまたは複数のウサギB細胞を選択する / 置く工程、および

- 該単一細胞として置かれたウサギB細胞または該ウサギB細胞のプールの、フィーダー細胞と共培養する工程、

- 任意で、共培養後に、得られた細胞混合物を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体とインキュベートし、本発明による抗体がその表面上に結合している / 標識されている、ウサギB細胞を選択する / 置く / 計数する工程

を含む、1つまたは複数のウサギB細胞を共培養するための方法である。

【0170】

本発明の一態様は、

a) 単一細胞として置かれたB細胞またはB細胞のプールの、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程a)で得られた共培養物からの細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している1つまたは複数の細胞を選択し、それによってB細胞を選択し、細胞の混合物から非B細胞を除去する工程

を含む、細胞の混合物(例えば、培養物)について非B細胞を除去する方法である。

【0171】

本発明による一態様は、

a) 単一細胞として置かれたB細胞を、フィーダー細胞と共培養する工程、

b) 工程a)で得られた共培養物からの細胞を、本発明による抗体とインキュベートする工程、および

c) 本発明による抗体が結合している細胞の数を数えることによって、培養物中のB細胞

胞の数を決定する工程

を含む、単一細胞として置かれたB細胞とフィーダー細胞との共培養物中のB細胞の数を決定するための方法である。

【0172】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、共培養は、IL-1、TNF、IL-10、ならびにIL-21、SAC、BAFF、IL-2、IL-4およびIL-6から選択される1種または複数種を含む合成フィーダー混合物の存在下で行われる。

【0173】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー細胞は、EL-4 B5細胞である。

10

【0174】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー細胞の数（共培養の開始時）は、B細胞あたり 5×10^4 個未満である。

【0175】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー細胞は、共培養の前に放射線照射されている。一実施形態では、放射線照射は、約50 Gy以下の線量によるものである。一実施形態では、放射線照射は、9.5 Gy以下および0 Gy超の線量によるものである。

【0176】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、EL-4 B5細胞の数は、B細胞あたり 1×10^4 個未満のEL-4 B5細胞である（これによって、この実施形態では、放射線照射は0 Gyである）。一実施形態では、EL-4 B5細胞の数は、B細胞あたり 7.5×10^3 個未満のEL-4 B5細胞である。

20

【0177】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、共培養は、追加でフィーダー混合物の存在下で行われる。

【0178】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物（サイトカイン混合物、CM）は、

30

- i) インターロイキン-1 および腫瘍壊死因子、
- ii) インターロイキン-2 (IL-2) および/またはインターロイキン-10 (IL-10)、
- iii) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cowan株の細胞 (SAC)、
- iv) インターロイキン-21 (IL-21)、および任意で、インターロイキン-2 (IL-2)、
- v) 腫瘍壊死因子ファミリーのB細胞活性化因子 (BAFF)、
- vi) インターロイキン-6 (IL-6)、
- vii) インターロイキン-4 (IL-4)、ならびに
- viii) 胸腺細胞培養上清のうちの一つまたは複数を含む。

40

【0179】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、最大約2 ng/mlの(マウス)IL-1、最大約2 ng/mlの(マウス)TNF、最大約50 ng/mlの(マウス)IL-2、最大約10 ng/mlの(マウス)IL-10、および最大約10 ng/mlの(マウス)IL-6、またはその一部を含む。

【0180】

50

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、
 $5.5 \sim 14 \times 10^8$ IU/mg を有する最大約 2 ng/ml の(マウス) IL-1、
 $2.3 \sim 2.9 \times 10^8$ U/mg を有する最大約 2 ng/ml の(マウス) TNF、
 $6 \sim 7$ (好ましくは 6.3) $\times 10^6$ IU/mg を有する最大約 50 ng/ml の(マウス) IL-2、
 $6 \sim 7.5 \times 10^5$ IU/mg を有する最大約 10 ng/ml の(マウス) IL-10
 および
 $9.2 \sim 16.1 \times 10^8$ U/mg を有する最大約 10 ng/ml の(マウス) IL-6、
 またはその一部を含む。

10

【0181】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物の割合は、前記 IL-1、TNF、IL-2、IL-10、および IL-6 の各濃度の 1.0 ~ 0.015 倍の範囲である。

【0182】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物の割合は、前記 IL-1、TNF、IL-2、IL-10、および IL-6 の各濃度の 0.75 倍、0.5 倍、0.32 倍、0.25 倍、0.1 倍、0.066 倍、0.032 倍、0.015 倍、0.01 倍、0.0075 倍、および 0.0038 倍からなる割合の群から選択される。

20

【0183】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、約 0.01 ng/ml ~ 1.0 ng/ml のホルボールミリスレートアセテート(PMA)をさらに含む。一実施形態では、フィーダー混合物は、約 0.01 ng/ml ~ 0.5 ng/ml のホルボールミリスレートアセテートをさらに含む。

【0184】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、1つまたは複数の B 細胞の(共)培養は、

- フィーダー混合物の存在下で、1つまたは複数の B 細胞を、EL-4 B5 細胞と共培養する工程を含み、

30

該共培養の前に、該 EL-4 B5 細胞に 9.5 Gy 以下の線量で放射線照射し、(共培養の開始時の) EL-4 B5 細胞の数が、B 細胞あたり 4×10^4 個未満の EL-4 B5 細胞であり、

該フィーダー混合物は、

$5.5 \sim 14 \times 10^8$ IU/mg を有する最大約 2 ng/ml の(マウス) IL-1、
 $2.3 \sim 2.9 \times 10^8$ U/mg を有する最大約 2 ng/ml の(マウス) TNF、
 $6 \sim 7$ (好ましくは 6.3) $\times 10^6$ IU/mg を有する最大約 50 ng/ml の(マウス) IL-2、
 $6 \sim 7.5 \times 10^5$ IU/mg を有する最大約 10 ng/ml の(マウス) IL-10
 および

40

$9.2 \sim 16.1 \times 10^8$ U/mg を有する最大約 10 ng/ml の(マウス) IL-6、

または前記 IL-1、TNF、IL-2、IL-10、および IL-6 の各濃度の 0.75 倍、0.5 倍、0.32 倍、0.25 倍、0.1 倍、0.066 倍、0.032 倍、0.015 倍、0.01 倍、0.0075 倍、または 0.0038 倍の割合を含み、

該フィーダー混合物は、約 0.01 ng/ml ~ 1.0 ng/ml のホルボールミリスレートアセテートをさらに含む。

【0185】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、黄色ブドウ球菌 Cowan 株の細胞(SAC)および胸腺細胞培養上清を含む。

50

【0186】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、方法は、1つのB細胞の共培養のためのものである。1つの好ましい実施形態では、1つのB細胞は、単一細胞として置かれたB細胞である。

【0187】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、共培養は、5～10日間である。1つの好ましい実施形態では、共培養は約7日間である。

【0188】

本明細書に記載の一態様は、本明細書に記載の共培養法を含む、抗体を産生するための方法である。

【0189】

本明細書に記載のすべての方法および使用は、

- フィーダー混合物が補充された共培養培地中で、フィーダー細胞とB細胞（単一細胞として置かれた各B細胞、またはプールされたB細胞）を（個々に）共培養する工程を含む。

【0190】

共培養の結果は、B細胞クローン、すなわち、単一のB細胞の子孫であるB細胞の集団である。

【0191】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、本明細書に記載の方法は、共培養工程の前に、

- 本発明による標識抗体と接触させ、それによって、B細胞にフルオロフォアが結合したおよび/または結合していない、B細胞の集団のそれらのB細胞を、1つまたは複数の個々の容器に置く工程

をさらに含む。

【0192】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、本明細書に記載の方法は、共培養工程の前に、

- 本発明による標識抗体と接触させ、それによって、フルオロフォアがB細胞に結合したおよび/または結合していない、B細胞の集団のそれらのB細胞を、単一B細胞として置く工程

をさらに含む。

【0193】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、本明細書に記載の方法は、共培養工程の前に、

- 本発明による抗体、および異なるB細胞表面抗原にそれぞれ特異的に結合する1～4個の追加の抗体（これらの抗体は、単一細胞として1～5個の蛍光色素で標識され、それによって、各抗体が異なる蛍光色素にコンジュゲートされている）と接触させたB細胞の集団のこれらのB細胞を置く工程

をさらに含む。

【0194】

標識化は、B細胞集団を（順次または同時に）蛍光標識抗体と接触させることによる。これによって、標識されたB細胞の調製物が得られる。蛍光標識された抗体のそれぞれは、異なるB細胞表面マーカー/標的に結合する。

【0195】

置くことは、標識されたB細胞調製物をフローサイトメーターに導入し、それらの細胞を1～3個の蛍光標識で標識された単一細胞として置くことによる。セルソーターにおいて細胞を選択するために使用されるものと同様に、より多くの蛍光色素と細胞をインキュベートすることが可能であるので、細胞を、特定の表面マーカーの存在について選択することができ、（任意で）同時に他の表面マーカーの非存在について選択することができる。

10

20

30

40

50

【0196】

標識化および単一細胞を置くことは、意図された特徴を有する抗体を産生する可能性が低いB細胞を枯渇させることによって、B細胞集団の複雑性を低減するために行われる。標識された抗体は、B細胞の表面上にディスプレイされた特定のポリペプチドに結合し、したがって、陽性選択標識を提供する。同様に、例えば、2つのうちの1つの蛍光標識を有する細胞（すなわち、2つの蛍光標識抗体とのインキュベーションが行われたが、そのうちの1つのみがB細胞に結合する）など、B細胞がインキュベートされた標識抗体の数と比較して、減少した数の蛍光色素でのみ標識された細胞を選択することも可能である。B細胞集団の個々のB細胞への蛍光標識抗体の結合/非結合に基づいて、マイクロ流体選別装置を使用して、標的B細胞を同定および分離することが可能である。選択と同時に、標識の量も決定することができる。

10

【0197】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、本明細書に記載の方法は、単一細胞を置く間/前に、共培養培地中でフィーダー細胞なしで/フィーダー細胞の非存在下で、B細胞の集団をインキュベートする工程をさらに含む。一実施形態では、インキュベーションは、約37である。一実施形態では、インキュベーションは、約0.5~約2時間である。一実施形態では、インキュベーションは、約1時間である。1つの好ましい実施形態では、インキュベーションは、約37で約1時間である。

【0198】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、本明細書に記載の方法は、置く工程の後かつ共培養工程の前であるが、EL-4 B5フィーダー細胞の添加後に、単一細胞を置くことB細胞を遠心分離する工程をさらに含む。この理論に拘束されるものではないが、それによって、フィーダー細胞とB細胞との間の物理的接触が増加すると想定される。一実施形態では、遠心分離は、約1分~約30分間である。一実施形態では、遠心分離は、約5分間である。一実施形態では、遠心分離は、約100×g~約1,000×gである。一実施形態では、遠心分離は、約300×gである。1つの好ましい実施形態では、遠心分離は、約300×gで約5分間である。

20

【0199】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、B細胞（クローン）を選択する/得るための方法は、以下の工程をさらに含む：

30

a) B細胞の集団のB細胞を、(1~5つの)蛍光色素で(任意で、2~5つの異なる所定のB細胞表面マーカーに特異的に結合する2~5つの蛍光標識抗体とB細胞集団をインキュベートすることによって)標識する工程であって、そのうちの1つが本発明による抗体(にコンジュゲートされたもの)である、標識する工程、

b) 任意で、共培養培地中で標識された細胞をインキュベートする工程、

c) 9.5 Gy以下の線量で放射線照射されたEL-4 B5フィーダー細胞上の単一細胞として、少なくとも1つ(1つから5つ)の蛍光色素で標識された(および、任意で、他の蛍光色素で標識されていない)B細胞の集団のそれらのB細胞を置く工程、

d) 任意で、単一細胞として置かれたB細胞/フィーダー細胞混合物を遠心分離する工程、

40

e) フィーダー混合物が補充された共培養培地中で、単一細胞として置かれた各B細胞をフィーダー細胞(個々に)共培養する工程、

f) 工程e)において抗体を増殖および分泌するB細胞クローンを選択する工程。

【0200】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、標的に特異的に結合する抗体を産生するための方法は、以下の工程をさらに含む：

a) B細胞の集団のB細胞を(1~5つの)蛍光色素で(任意で、2~5つの異なる所定のB細胞表面マーカーに特異的に結合する2~5つの蛍光標識抗体とB細胞集団をインキュベートすることによって)標識する工程であって、そのうちの1つが本発明による抗体(にコンジュゲートされたもの)である、標識する工程、

50

- b) 任意で、共培養培地中で細胞をインキュベートする工程、
- c) 9.5 Gy 以下の線量で放射線照射された単一細胞 EL-4 B5 フィーダー細胞として、少なくとも1つ(1つから5つ)の蛍光色素で標識された(および、任意で、他の蛍光色素で標識されていない) B細胞の集団のそれらの B細胞を置く工程、
- d) 任意で、単一細胞として置かれた B細胞/フィーダー細胞混合物を遠心分離する工程、
- e) フィーダー混合物が補充された共培養培地中で、単一細胞として置かれた各 B細胞をフィーダー細胞と(個々に)共培養する工程、
- f) 抗体を分泌する工程 e) の B細胞クローンを選択する工程、
- g) i) 工程 g) で選択された B細胞クローンから分泌された抗体の可変ドメインをコードする、1つまたは複数の核酸を得る工程、
- ii) B細胞クローンが可変ドメインをヒト化するヒト B細胞クローンではない場合、それぞれをコードする核酸を提供する工程、および
- iii) 定常領域をコードする核酸配列とインフレームで、1つまたは複数の発現ベクターに、1つまたは複数の核酸を導入する工程、
- h) 工程 g) の1つまたは複数の発現ベクターでトランスフェクトされた細胞(任意で、CHO および BHK細胞から選択される)を培養し、細胞または培養上清から抗体を回収し、それによって、抗体を産生する工程。

10

【0201】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、抗体を産生するための方法は、以下の工程をさらに含む：

20

- a) B細胞の集団の B細胞を(1~5つの)蛍光色素で(任意で、2~5つの異なる所定の B細胞表面マーカーに特異的に結合する2~5つの蛍光標識抗体と B細胞集団をインキュベートすることによって)標識する工程であって、そのうちの1つが本発明による抗体に(にコンジュゲートされたもの)である、標識する工程、
- b) 任意で、共培養培地中で細胞をインキュベートする工程、
- c) 9.5 Gy 以下の線量で放射線照射された EL-4 B5 フィーダー細胞上の単一細胞として、少なくとも1つ(1つから5つ)の蛍光色素で標識された(および、任意で、他の蛍光色素で標識されていない) B細胞の集団のそれらの B細胞を置く工程、
- d) 任意で、単一細胞として置かれた B細胞/フィーダー細胞混合物を遠心分離する工程、
- e) フィーダー混合物が補充された共培養培地中で、単一細胞として置かれた各 B細胞をフィーダー細胞と(個々に)共培養する工程、
- f) 共培養された B細胞の培養培地中に分泌された抗体の結合特異性を、各上清について個別に決定する工程、
- g) 分泌された抗体の結合特性に基づいて、工程 f) の B細胞クローンを選択する工程、
- h) 逆転写 PCR およびヌクレオチド配列決定によって、工程 g) で選択された B細胞クローンから分泌された抗体の可変ドメインをコードする、1つまたは複数の核酸を得る工程(および、それによって、モノクローナル抗体可変軽鎖および重鎖ドメインをコードする核酸を得る工程)、
- i) B細胞が、可変軽鎖および重鎖可変ドメインをヒト化する非ヒト B細胞である場合、ヒト化可変ドメインをコードする核酸を提供する工程、
- j) モノクローナル抗体可変軽鎖および重鎖可変ドメインをコードする核酸を、(ヒトまたはヒト化)抗体を発現させるために、1つまたは複数の発現ベクターに、(抗体定常ドメインをコードする核酸とインフレームで)導入する工程、
- k) (任意で、CHO細胞および BHK細胞から選択される)哺乳動物細胞に発現ベクター(複数可)を導入する工程、
- l) 細胞を培養し、細胞または細胞培養上清から抗体を回収し、それによって、抗体を産生する工程。

30

40

【0202】

50

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、B細胞クローンから分泌抗体の可変ドメインをコードする、1つまたは複数の核酸を得ることは、以下の工程をさらに含む：

- 抗体産生B細胞クローンから全RNAを抽出する工程、
- 抽出されたポリA⁺mRNAの一本鎖cDNA合成/逆転写を行う工程、
- 種特異的プライマーのセットを用いてPCRを行う工程、
- 任意で、PCRプライマーの除去/PCR産物の精製工程、
- 任意で、該PCR産物の配列決定をする工程。

【0203】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、核酸をコードするモノクローナル抗体可変軽および/または重鎖可変ドメインを、(ヒトまたはヒト化)抗体の発現のために、発現ベクターに導入することは、以下の工程をさらに含む：

- 可変軽および重鎖可変ドメインのT4ポリメラーゼインキュベーション工程、
- 発現ベクターの線形化および増幅工程、
- 増幅された発現ベクターのT4ポリメラーゼインキュベーション工程、
- 増幅された発現ベクターへ、可変ドメインをコードする核酸を、配列およびライゲーション非依存的にクローニングする工程、ならびに
- ベクターで形質転換された大腸菌細胞のプールからのベクター(複数可)の調製工程。

【0204】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、方法は、標識化工程の直前に、

- B細胞の集団を、可溶性、蛍光標識された、または固体表面上に固定化された(標的)抗原とインキュベートし、(固定化された)抗原に結合したB細胞(のみ)を回収する工程

をさらに含む。

【0205】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、B細胞の集団は、免疫化の少なくとも4日後に、ウサギの血液から得られる。一実施形態では、B細胞の集団は、免疫化の4日後から最大で13日後までに、ウサギの血液から得られる。

【0206】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、B細胞の集団は、密度勾配遠心分離によって、血液から得られる。

【0207】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、B細胞は、成熟B細胞である。

【0208】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、単一細胞は、マルチウェルプレート(個別に)置かれる。

【0209】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、天然胸腺細胞培養上清(TSN)または定義されたおよび/もしくは合成フィーダー混合物である。一実施形態では、胸腺細胞培養上清は、若齢動物の胸腺の胸腺細胞から得られる。

【0210】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、定義されたおよび/または合成フィーダー混合物である。一実施形態では、定義されたおよび/または合成フィーダー混合物は、

- i) インターロイキン-1 および腫瘍壊死因子、ならびに/または
- ii) インターロイキン-2(IL-2)および/もしくはインターロイキン-10(IL-10)、ならびに/または
- iii) 黄色ブドウ球菌Cowan株の細胞(SAC)、ならびに/または
- iv) インターロイキン-21(IL-21)および、任意で、インターロイキン-2

10

20

30

40

50

(I L - 2)、ならびに / または

v) 腫瘍壊死因子ファミリーの B 細胞活性化因子 (B A F F)、ならびに / または

v i) インターロイキン - 6 (I L - 6)、ならびに / または

v i i) インターロイキン - 4 (I L - 4)

を含む。

【 0 2 1 1 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、 I L - 1 および T N F - 、ならびに I L - 1 0、 I L - 2 1、 S A C、 B A F F、 I L - 2、 I L - 4、および I L - 6 から選択される 1 種または複数種を含む。

【 0 2 1 2 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、フィーダー混合物は、 I L - 1、 T N F -、 I L - 1 0、 S A C、および I L - 2 を含む。

【 0 2 1 3 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、 B 細胞集団はウサギ B 細胞集団であり、フィーダー混合物は胸腺細胞培養上清である。

【 0 2 1 4 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、 B 細胞集団はウサギ B 細胞集団であり、フィーダー混合物は I L - 1、 T N F -、ならびに I L - 2、 I L - 6、および I L - 1 0 のうちのいずれか 2 つからなる。

【 0 2 1 5 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、 B 細胞集団はウサギ B 細胞集団であり、フィーダー混合物は I L - 1、 T N F -、 I L - 6、および I L - 1 0 からなる。

【 0 2 1 6 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、 B 細胞集団はウサギ B 細胞集団であり、フィーダー混合物は I L - 1、 T N F -、 I L - 1 0、 S A C、および I L - 2 または I L - 6 を含む。

【 0 2 1 7 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、 B 細胞集団はウサギ B 細胞集団であり、フィーダー混合物は I L - 1、 T N F -、 I L - 2 1、ならびに少なくとも 1 つの I L - 2、 I L - 1 0、および I L - 6 を含む。

【 0 2 1 8 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【 0 2 1 9 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、標識化は、 B 細胞表面 I g G の標識である。

【 0 2 2 0 】

すべての対応する態様または実施形態の 1 つの好ましい実施形態では、インキュベーションは、本発明による蛍光標識抗体、蛍光標識抗 I g G 抗体、および蛍光標識抗 I g M 抗体 (標識化は、細胞表面 I g G および細胞表面 I g M のものである) とのインキュベーションであり、選択は、細胞表面 C D 1 9、細胞表面 I g G に対して陽性、および細胞表面 I g M に対して陰性の細胞の選択である (C D 1 9 ⁺ I g G ⁺ I g M ⁻ B 細胞を単一細胞として置くことをもたらす) 。

【 0 2 2 1 】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、インキュベーションは、本発明による蛍光標識抗体、蛍光標識抗 I g G 抗体、および蛍光標識抗軽鎖抗体 (標識化は、細胞表面 I g G および細胞表面抗体軽鎖のものである) とのインキュベーションであり、選択は、細胞表面 C D 1 9、細胞表面 I g G、および細胞表面抗体軽鎖に対して陽性の細胞の選択である (I g G + L C + B 細胞を単一細胞として置くことをもたらす) 。

10

20

30

40

50

【0222】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、インキュベーションは、蛍光標識抗軽鎖抗体（標識化は、他の2つの標識に加えて、細胞表面抗体軽鎖のものである）に加えて行われ、選択は、細胞表面抗体軽鎖に対して陽性の細胞の選択である（LC+B細胞を単一細胞として置くことをもたらす）。

【0223】

すべての対応する態様または実施形態の1つの好ましい実施形態では、インキュベーションは、本発明による蛍光標識抗体、蛍光標識抗IgG抗体、および蛍光標識抗IgM抗体（標識化は、細胞表面CD19、細胞表面IgG、および細胞表面IgMのものである）とのインキュベーションであり、選択は、細胞表面CD19およびIgGに対して陽性であり、細胞表面IgMに対して陰性である細胞の選択であり（ $CD19^+IgG^+IgM^-$ B細胞を単一細胞として置くことをもたらす）、それによって、B細胞の集団は、固体表面上に固定化された（標的）抗原とインキュベートされており、固定化された抗原に結合したB細胞（のみ）が回収され、蛍光標識抗体とのインキュベーションに供された。

10

【0224】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、共培養は、10%（v/v）FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む1%（w/v）の200mMグルタミン溶液、2%（v/v）の100mMピルビン酸ナトリウム溶液、および1%（v/v）の1Mの2-（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジン）-エタンサルホン酸（HEPES）緩衝液を補充したRPMI1640培地を含む共培養培地中で行われる。一実施形態では、共培養培地は、0.05mMのβ-メルカプトエタノールをさらに含む。

20

【0225】

さらなる方法では、本発明による抗体またはそのウサギCD19結合断片を固相に固定化し、ウサギCD19陽性B細胞を捕捉するために使用する。固体表面は、マルチウェルプレートまたはビーズ、特に磁気ビーズのウェルを含む、任意の表面によるものであり得る。本発明によるこれらの固定化抗体は、本発明による標識抗体と同様の様式で、すなわちウサギCD19陽性B細胞に選択的に結合するために使用することができる。当業者は、上記の方法におけるFACSベースの工程をビーズベースのアプローチに置き換える方法を知っている。

【0226】

例えば、本発明の一態様は、
 a) ウサギの血液からB細胞を得る工程、
 b) ビーズに固定化された本発明による抗体と、B細胞をインキュベートする工程、
 c) 結合していないB細胞を除去するために、ビーズを洗浄する工程、および
 d) 任意で、ビーズからB細胞を回収し、それによって、本発明による抗体が結合している1つまたは複数のB細胞を選択する工程
 を含む、B細胞を選択するための方法である。

30

【0227】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、ビーズは、磁気ビーズである。さらなる実施形態では、方法は、工程b)の後かつ工程c)の前に、ビーズを磁石に結合させるbc)の工程を含む。

40

【0228】

すべての対応する態様または実施形態の一実施形態では、方法は、
 d) 任意で、B細胞を共培養培地中で37°Cで1時間インキュベートする工程、
 e) 1つまたは複数のB細胞またはビーズを、個々の容器に置く工程、
 f) 該置かれた細胞を、共培養培地中でフィーダー細胞と共培養する工程、
 g) 工程f)で増殖しているB細胞を選択し、それによってB細胞を選択する工程
 のうちの1つまたは複数を含む。

【0229】

本明細書に記載の一態様は、

50

a) それ自体が固体表面に結合された本発明による抗体に結合することによって、B細胞の元々の集団から得られたB細胞の濃縮集団の各B細胞を、フィーダー細胞としてマウスE L - 4 B 5細胞と共培養する工程、および

b) 工程a)において、増殖し、かつ抗体を分泌するB細胞クローンを選択する工程を含む、B細胞を選択するための方法である。

【0230】

本明細書に記載の一態様は、

a) それ自体が固体表面に結合された本発明による抗体に結合することによって、B細胞の元々の集団から得られた、B細胞の濃縮集団の1つまたは複数のB細胞を、任意で、フィーダー細胞としてのマウスE L - 4 B 5細胞、ならびにフィーダー混合物としてのI L - 1、T N F、I L - 10、ならびにI L - 21、S A C、B A F F、I L - 2、I L - 4、およびI L - 6から選択される1種または複数の存在下で、共培養する工程と、

b) 標的抗原に特異的に結合する抗体を産生する、B細胞クローンを選択する工程と、
b1) 逆転写P C Rによって該抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を決定する工程と、

b2) 該抗体軽鎖可変ドメインおよび該重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を含む核酸で、細胞をトランスフェクトする工程と、

c) 工程b)で選択されたB細胞クローンによって産生される抗体またはそのヒト化バリエーションをコードする核酸を含有する細胞を培養し、細胞または培養上清から抗体を回収することによって、抗体を産生する工程と
を含む、標的抗原に結合する抗体を産生するための方法である。

【0231】

本明細書に記載の一態様は、

- 多数のウサギB細胞を、固体表面に結合された本発明による抗体とインキュベートする工程 / 多数のウサギB細胞の個々のB細胞を、固体表面に結合された本発明による抗体で標識する工程、

- 個々のB細胞(単一細胞として置かれたB細胞)またはB細胞のプールのいずれかとして、本発明による抗体が表面上に結合している、1つまたは複数のウサギB細胞を選択する / 置く工程、および

- 該単一細胞として置かれたウサギB細胞または該ウサギB細胞のプールを、フィーダー細胞と共培養する工程、

- 任意で、共培養後に、得られた細胞混合物を、検出可能な標識にコンジュゲートされた本発明による抗体とインキュベートし、本発明による抗体がその表面上に結合している / 標識されている、ウサギB細胞を選択する / 置く / 計数する工程
を含む、1つまたは複数のウサギB細胞を共培養するための方法である。

【0232】

B. 組換え方法および組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているように、組換え方法および組成物を使用して生産されてもよい。一実施形態では、本明細書に記載の抗ヒトC D 19抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のV Lを含むアミノ酸配列および / またはV Hを含むアミノ酸配列(例えば、抗体の軽鎖および / または重鎖)をコードし得る。さらなる実施形態では、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。さらなる実施形態では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのこのような実施形態では、宿主細胞は、(1)抗体のV Lを含むアミノ酸配列および抗体のV Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2)抗体のV Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、および抗体のV Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む(例えば、これらベクターで形質転換されている)。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞またはリンパ

10

20

30

40

50

球細胞（例えば、Y0、NS0、Sp2/0細胞）である。一実施形態では、抗ウサギCD19抗体を作成する方法が提供され、該方法は、上に提供されるように、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養すること、および、任意で、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回収することを含む。

【0233】

抗ウサギCD19抗体の組換え産生のために、例えば、上述のものなどの抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞中でさらなるクローニングおよび/または発現のために、1つまたは複数のベクターに挿入される。このような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離し、配列決定することができる。

10

【0234】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされていない場合には、細菌中で産生されてもよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、米国特許第5,789,199号、および米国特許第5,840,523号を参照されたい。（また、大腸菌（*E. coli*）における抗体断片の発現を記載しているCharlton, K. A., *Methods in Molecular Biology*, 第248巻, Lo, B. K. C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2003), 245~254頁も参照されたい。）発現後、抗体は、可溶性画分中で細菌細胞ペーストから単離され得、さらに精製され得る。

20

【0235】

原核生物に加え、真核生物の微生物、例えば、糸状菌または酵母は、抗体をコードするベクターに適切なクローニングまたは発現宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌株および酵母株を含み、部分的または完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす。Gerngross, T. U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409~1414、およびLi, H. 5, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210~215を参照されたい。

【0236】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。数多くのバキュロウイルス株が同定されており、これを昆虫細胞と共に、特に、スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションのために、使用され得る。

30

【0237】

植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、米国特許第6,040,498号、米国特許第6,420,548号、米国特許第7,125,978号、および米国特許第6,417,429号（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記述）を参照されたい。

40

【0238】

脊椎動物細胞も、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合した哺乳動物細胞株が有用な場合がある。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40（COS-7）によって形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胎児腎細胞株（例えば、Graham, F. L. 5, *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59~74）に記載されるような、293または293細胞）、ベビーハムスター腎細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, J. P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243~252に記載されるような、TM4細胞）、サル腎細胞（CV1）、アフリカミドリサル腎細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸癌腫細胞（HELA）、イヌ

50

腎細胞 (MDCK)、バッファローラット肝細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138)、ヒト肝細胞 (Hep G2)、マウス乳腺腫瘍 (MMT060562)、例えば、Mather, J. P.ら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44~68に記載されるようなTRI細胞、MRC5細胞、およびFS4細胞がある。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR⁻CHO細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub, G.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216~4220)、ならびに骨髓腫細胞株、例えば、Y0、NS0、およびSp2/0が挙げられる。抗体産生に適したある特定の哺乳動物宿主細胞のレビューについては、例えば、Yazaki, P.およびWu, A. M.、Methods in Molecular Biology、第248巻、Lo, B. K. C. (編)、Humana Press、Totowa, NJ (2004)、255-268頁を参照されたい。

10

【0239】

C. 診断および検出のための方法および組成物

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗ウサギCD19抗体はいずれも、生物学的試料中のウサギCD19提示細胞の存在の検出に有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量的または定性的検出を包含する。ある特定の実施形態では、生物学的試料は、細胞または組織、例えば、血液、血清または血漿などを含む。

【0240】

一実施形態では、診断または検出の方法で使用するための抗ウサギCD19抗体が提供される。これらの態様は、上で概説されている。

20

【0241】

ある特定の実施形態では、標識された抗ウサギCD19抗体が提供される。標識には、直接的に検出される標識または部分 (蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、および放射性標識など)、ならびに例えば、酵素的反応または分子相互作用を介して間接的に検出される部分 (酵素またはリガンドなど) が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない: 放射性同位元素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および¹³¹I、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体などのフルオロフォア、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌性ルシフェラーゼ (米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなどの複素環オキシダーゼ、HRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を用いる酵素、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどとカップリングしたもの。

30

【0242】

III. 配列表の説明

- 配列番号01 シグナルペプチドを伴わないウサギCD19アミノ酸配列
- 配列番号02 シグナルペプチドを伴うウサギCD19アミノ酸配列
- 配列番号03 ウサギCD19 cDNA
- 配列番号04 ハムスターCD19アミノ酸配列
- 配列番号05 マウスCD19アミノ酸配列
- 配列番号06 ラットCD19アミノ酸配列
- 配列番号07 リスCD19アミノ酸配列
- 配列番号08 マーモセットCD19アミノ酸配列
- 配列番号09 アカゲザルCD19アミノ酸配列
- 配列番号10 ヒトCD19アミノ酸配列

40

50

配列番号 1 1	ネコ C D 1 9 アミノ酸配列	
配列番号 1 2	ハダカデバネズミ C D 1 9 アミノ酸配列	
配列番号 1 3	モルモット C D 1 9 アミノ酸配列	
配列番号 1 4	ブタ C D 1 9 アミノ酸配列	
配列番号 1 5	イヌ C D 1 9 アミノ酸配列	
配列番号 1 6	ギャップコンセンサスアミノ酸配列	
配列番号 1 7	プライマー	
配列番号 1 8	プライマー	
配列番号 1 9	プライマー	
配列番号 2 0	プライマー	10
配列番号 2 1	プライマー	
配列番号 2 2	プライマー	
配列番号 2 3	プライマー	
配列番号 2 4	抗体 1 H 2 軽鎖アミノ酸配列	
配列番号 2 5	抗体 1 H 2 軽鎖リーダーペプチドアミノ酸配列	
配列番号 2 6	抗体 1 H 2 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列	
配列番号 2 7	抗体 1 H 2 軽鎖定常領域アミノ酸配列	
配列番号 2 8	抗体 1 H 2 重鎖アミノ酸配列	
配列番号 2 9	抗体 1 H 2 重鎖リーダーペプチドアミノ酸配列	
配列番号 3 0	抗体 1 H 2 重鎖可変ドメインアミノ酸配列	20
配列番号 3 1	抗体 1 H 2 重鎖定常領域アミノ酸配列	
配列番号 3 2	抗体 1 H 2 重鎖 H V R - 1 バリエーション 1	
配列番号 3 3	抗体 1 H 2 重鎖 H V R - 1 バリエーション 2	
配列番号 3 4	抗体 1 H 2 重鎖 H V R - 1 バリエーション 3	
配列番号 3 5	抗体 1 H 2 重鎖 H V R - 2 バリエーション 1	
配列番号 3 6	抗体 1 H 2 重鎖 H V R - 2 バリエーション 2	
配列番号 3 7	抗体 1 H 2 重鎖 H V R - 3	
配列番号 3 8	抗体 1 H 2 軽鎖 H V R - 1	
配列番号 3 9	抗体 1 H 2 軽鎖 H V R - 2	
配列番号 4 0	抗体 1 H 2 軽鎖 H V R - 3	30
配列番号 4 1	ヒトカッパ軽鎖定常領域アミノ酸配列	
配列番号 4 2	ヒトラムダ軽鎖定常領域アミノ酸配列	
配列番号 4 3	ヒト I g G 1 重鎖定常領域アミノ酸配列 : コーカサスアロタイプ	
配列番号 4 4	ヒト I g G 1 重鎖定常領域アミノ酸配列 : アフロアメリカンアロタイプ	
配列番号 4 5	ヒト I g G 1 重鎖定常領域アミノ酸配列 : L A L A バリエーション	
配列番号 4 6	ヒト I g G 1 重鎖定常領域アミノ酸配列 : L A L A P G バリエーション	
配列番号 4 7	ヒト I g G 4 重鎖定常領域アミノ酸配列	
配列番号 4 8	ヒト I g G 4 重鎖定常領域アミノ酸配列 : S P L E バリエーション	
配列番号 4 9	ヒト I g G 4 重鎖定常領域アミノ酸配列 : S P L E P G バリエーション	
配列番号 5 0	マウスカッパ軽鎖定常領域アミノ酸配列	40
配列番号 5 1	ヒトラムダ軽鎖定常領域アミノ酸配列	
配列番号 5 2	G P I アンカーアミノ酸配列	
配列番号 5 3	3' U T R プライマー	
配列番号 5 4	5' U T R プライマー	

【図面の簡単な説明】

【 0 2 4 3 】

I V . 図面の説明

【図 1 A】図 1 : F L A G タグに融合したウサギ C D 1 9 の発現プラスミドでトランスフェクトされた組換えマウス細胞の F A C S 解析。ウサギ C D 1 9 の発現を、F I T C 標識抗 F L A G タグ抗体を使用した細胞表面染色によって、間接的に確認した。 A : N I H

ノ 3 T 3、リポフェクタミンを使用した通常のトランスフェクション、トランスフェクションの 24 時間後； B：C 2 C 1 2、リポフェクタミンを使用した通常のトランスフェクション、トランスフェクションの 24 時間後； C：N I H / 3 T 3、リポフェクタミンを使用した逆トランスフェクション、トランスフェクションの 48 時間後。

【図 1 B】図 1 A の説明を参照。

【図 1 C】図 1 A の説明を参照。

【図 2 A】図 2：ウサギ C D 1 9 に結合するハイブリドーマ上清を同定するためのウサギ P B M C の F A C S 解析。ウサギ P B M C を、F I T C 標識抗ウサギ I g M 抗体およびハイブリドーマ上清で二重染色した。個々のハイブリドーマ上清の非標識マウス抗体を、P E 標識抗マウス I g G 抗体によって発色させた。 A：r b I g M 陽性 B 細胞上のウサギ C D 1 9 に結合する陽性ハイブリドーマ上清； B：例示的に、ウサギ I g M 陽性 B 細胞への結合を示さない陰性ハイブリドーマ上清。

10

【図 2 B】図 2 A の説明を参照。

【図 3 A】図 3：精製され、かつ A l e x a 6 4 7 標識された抗ウサギ C D 1 9 抗体を使用した B 細胞マーカーとしてのウサギ C D 1 9 の使用。単一 B 細胞選別中に使用したゲートの F A C S プロットとインデックス・ソート・アプローチによって生成されたプロットとの比較により、抗原特異的および I g G 分泌 B 細胞が、高度にウサギ C D 1 9 陽性であることが明らかになった。 A：単一細胞選別のために使用したウサギ I g G - F I T C 標識 B 細胞（ゲート P 8）の F A C S プロット。ウサギ B 細胞のウサギ I g M - P E 標識を、対比染色として使用した； B：選別された B 細胞の特徴付けのための抗ウサギ C D 1 9 抗体に基づく標識（ゲート P 5）の使用； C：ウサギ I g G ゲートを示す、ウサギ I g G および抗原特異的 E L I S A のデータを含むインデックス・ソート・アプローチによって生成された F A C S プロット； D：ウサギ C D 1 9 ゲートを示す、ウサギ I g G および抗原特異的 E L I S A のデータを含むインデックス・ソート・アプローチによって生成された F A C S プロット。

20

【図 3 B】図 3 A の説明を参照。

【図 3 C】図 3 A の説明を参照。

【図 3 D】図 3 A の説明を参照。

【図 4 A】図 4：B 細胞培養の 7 日後の B 細胞およびフィーダー細胞の F A C S 解析。 A：細胞サイズ（F S C、前方散乱）および細胞複雑性（S S C、側方散乱）を介して、分布したすべての細胞を示す F A C S プロット； B：ウサギ C D 1 9 染色（A l e x a 6 4 7）および死細胞（ヨウ化プロピジウム）を介して、分布したすべての細胞を示す F A C S プロット； C：B 細胞をほとんど含有しないウェルの B 細胞の正確な数。

30

【図 4 B】図 4 A の説明を参照。

【図 4 C】図 4 A の説明を参照。

【図 5 A】図 5：B 細胞培養の 7 日後の B 細胞およびフィーダー細胞の F A C S 解析。 A：細胞サイズ（F S C）および細胞複雑性（S S C）を介して、分布したすべての細胞を示す F A C S プロット； B：ウサギ C D 1 9 染色（A l e x a 6 4 7）および死細胞（ヨウ化プロピジウム）を介して、分布したすべての細胞を示す F A C S プロット； C：多数の B 細胞を含有するウェルの B 細胞の正確な数。

40

【図 5 B】図 5 A の説明を参照。

【図 5 C】図 5 A の説明を参照。

【図 6】図 6：A：細胞サイズ（F S C）および細胞複雑性（S S C）を示す、ウサギ由来の末梢血リンパ球（P B L）の F A C S プロット。 B：F I T C チャネルにおける細胞サイズ（F S C）およびウサギ I g G 染色細胞集団（=ゲート P 5）を示す、ウサギ由来の P B L の F A C S プロット。

【図 7 A】図 7：A：磁気ビーズによる抗原濃縮後の B 細胞の生存率を示す F A C S プロット。 B：C D 1 9 + B 細胞濃縮後の B 細胞の生存率を示す F A C S プロット。

【図 7 B】図 7 A の説明を参照。

【実施例】

50

【 0 2 4 4 】

V . 実施例

以下は、本発明の方法および組成物の例である。上に提供される一般的な記載を考慮すると、様々な他の実施形態が実施されてもよいことが理解される。

【 0 2 4 5 】

上述の発明を、理解を明確にする目的で、説明および例によって、ある程度詳細に説明してきたが、その記載および例は、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。本明細書で引用されるすべての特許および科学文献の開示は、その全体が参照により明示的に組み込まれる。

【 0 2 4 6 】

実施例 1

マウス抗ウサギCD19抗体(ハイブリドーマ)の免疫化および生成

Charles River Laboratories International, Inc. から入手したNMR1マウスを、免疫化に使用した。動物は、付録A「動物の施設と飼育に関するガイドライン」に従って、AAALACi認定の動物施設に収容された。すべての動物免疫化プロトコルおよび実験は、上部バイエルン州政府(許可番号AZ55.2-1-54-2531-83-13)によって承認され、ドイツ動物福祉法および欧州議会および理事会の指令2010/63に従って実施された。

【 0 2 4 7 】

6~8週齢のNMR1マウス(n=5)に、3ヶ月間にわたってプラスミドDNAに基づく免疫化を行った。この目的のために、ウサギCD19を一本鎖分子としてコードするプラスミドDNAを使用した。ハイブリドーマ融合のための脾臓採取の前に、ウサギCD19の発現のために同じベクターで一過性トランスフェクトされたNIH/3T3細胞(ATCC CRL-1658)によりブーストした。

【 0 2 4 8 】

第1の免疫化のために、動物をイソフルラン麻酔し、動物の尾部近位の剃毛した背中の一箇所に、滅菌H₂O中100μgのプラスミドDNAで、皮内(i.d.)に免疫化した。i.d.適用後、ECM830エレクトロポレーションシステム(BTX Harvard Apparatus)上で、以下のパラメータを使用してスポットをエレクトロポレートした:それぞれ、125msの間隔をあげ、1000V/cm、0.1ms間を2回、続いて、また125msの間隔をあげ、287.5V/cm、10ms間を4回。同様の様式で、14、28、49、63、および77日目に、ブースター免疫化を行った。最終免疫化の6週間後、ウサギCD19の発現のために一過性トランスフェクトされ、滅菌PBSに溶解された0.9×10⁶ NIH/3T3細胞を、静脈内(i.v.)および腹腔内(i.p.)のそれぞれをマウスに注射した。72時間後、脾臓を無菌的に採取し、ハイブリドーマ生成のために調製した。

【 0 2 4 9 】

免疫化マウスからの脾臓細胞の融合を、標準プロトコルに従って行った:骨髄腫細胞株P3X63-Ag8653を、5%(v/v)FCSおよび8-アザグアニンを含有するRPMI1640培地で、3×10⁵細胞/mLの細胞密度まで培養した。次いで、細胞を採取し(1,000rpm、10分、37)、50mLのRPMI(37)で洗浄した。同じ条件下での2回目の遠心分離工程の後、細胞を50mLのRPMI(37)に再懸濁し、その後氷上で保存した。免疫化マウスから摘出した無菌の脾臓を、セルストレーナー(70μm)を通して、単一細胞をふるい分けした。単一細胞培養物を15mLチューブに移し、氷上で10分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞懸濁液上清を50mLチューブに移し、採取し(250×g、10分、4)、15mLのRPMI培地に再懸濁した。

【 0 2 5 0 】

細胞密度の検出後、脾臓細胞および骨髄腫細胞を5:1の比で混合し、遠心分離した(250×g、10分、37)。脾臓細胞10⁸個あたり1mLのポリエチレングリコー

10

20

30

40

50

ル(PEG)を穏やかに振盪しながら添加し、試料を37 °Cおよび6%CO₂の雰囲気ですななくとも30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を250×g(37 °C)で10分間採取し、20mLのRPMI培地に再懸濁した。最終的に、全融合試料をマイクロタイタープレート(MTP、200μL/ウェル)に移し、インキュベートし(37 °C、6%CO₂)、さらなる解析のために使用した。

【0251】

実施例2

抗CD19抗体のハイブリドーマスクリーニングおよび細胞生物学的機能評価

ウサギCD19に対する抗体をスクリーニングするためのハイスループットFACS解析

ハイブリドーマ上清を、マウスIgG ELISAによって特徴付けした。IgG含有培養上清の一次スクリーニングを、標準プロトコルを使用してELISAによって行った：ストレプトアビジンをコートした384ウェルMTPを、ビオチン化ポリクロノール抗マウスFcγ領域抗体(pAK<MFcγ>S-IgH-(IS)-Bi(XOSu))とインキュベートした。50μL/ウェルの上清(1:600に希釈)を利用し、室温で60分間インキュベートした。その後、試料を、0.9%(w/v)NaCl、0.05%(v/v)Tween20、0.2%(v/v)BronidoxLで、3回洗浄した。IgGの検出のために、試料を、ペルオキシダーゼをコンジュゲートしたAffiniPureヤギ抗マウスF(ab')₂断片(1:15,000希釈、50μL/ウェル)とインキュベートし、室温で60分間インキュベートした。上記のように洗浄した後、ABTS溶液(1mg/mL、50μL/ウェル)を添加し、さらに20分間インキュベートした。X Read Plus Reader(Tecan)で、405/492nmの波長で読み出しを行った。IgG陽性ハイブリドーマ上清のみを、抗原特異的ハイスループットFACS解析に供した。

【0252】

FACS解析をハイブリドーマのスクリーニングに適用し、ウサギCD19に対する抗体を分泌するハイブリドーマを同定した。B細胞同定のために、ウサギIgM結合抗体で二重染色したウサギ末梢血単核細胞(PBMC)のFACS解析によって、すべてのIgG産生ハイブリドーマをスクリーニングした。

【0253】

新たに単離したウサギ(PBMC)を、氷上でFITC標識抗ウサギIgM抗体(Southern Biotech)およびIgG陽性ハイブリドーマ上清とインキュベートした。45分間のインキュベーション後、PBMCを氷冷PBSで一回洗浄し、ハイブリドーマ上清のマウスIgGに結合するPE標識抗マウスIgG抗体(Invitrogen)に再懸濁した。氷上でさらに45分間インキュベーションした後、細胞を氷冷PBSで再度一回洗浄した。最後に、PBMCを氷冷PBSに再懸濁し、直ちにFACS解析に供した。2μg/mLの濃度のDAPI-HCl(Cayman)をFACS解析の前に添加して、死細胞と生細胞とを識別した。コンピュータを備えたBecton Dickinson FACS Canto IIデバイスおよびFACS Divaソフトウェア(BD Biosciences)を解析に使用した。

【0254】

ウサギIgM陽性B細胞に結合するハイブリドーマ上清を同定した後、rbCD19発現プラスミドでトランスフェクトされた、CHOまたはHEK293細胞のFACS解析によって、ウサギCD19特異性を確認した。ウサギCD19でトランスフェクトされた細胞を陽性細胞として使用し、トランスフェクトされていないCHOまたはHEK293細胞を陰性対照細胞として使用した。実施例7に記載のように、ウサギCD19の染色を行った。

【0255】

実施例3

CD19結合抗体の発現

抗体可変ドメインをコードする配列は、遺伝子合成によって生成される。

【0256】

すべての配列を、配列決定によって検証する。すべての配列を、大腸菌（例えば、ベクター pUC18 からの複製起点、アンピシリン耐性のための β -ラクタマーゼ）における選択および増殖を可能にするベクターにクローニングする。これらのベクターは、哺乳動物細胞（例えば、エプスタイン・バー・ウイルス（EBV）の複製起点（oriP）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、ならびにポリアデニル化配列）における発現を可能にするカセットを追加で含有する。

【0257】

抗体の軽鎖および重鎖をコードするすべての遺伝子セグメントには、シグナルペプチドをコードする DNA 配列

(例えば、MGWSCILFLVATATGVHS; 配列番号 55

または MPPPLLLAFL LFLTTLGRVRP; 配列番号 56)

10

が先行する。タンパク質は、懸濁液中の一過性トランスフェクションヒト胎児腎臓 HEK 293 細胞によって発現される。これらの細胞を、37 °C および 8% CO₂ で培養する。トランスフェクションの当日に、細胞を、1 ~ 2 × 10⁶ 生存細胞/mL の密度で、新鮮な培地に播種する。等モル量の重鎖および軽鎖プラスミド DNA の両方を、同時にトランスフェクトする。細胞培養上清をトランスフェクションの 7 日後に採取し、遠心分離し (4 °C で 45 分間 14,000 × g)、続いて 0.22 μm フィルタにかけて濾過する。これらの上清を凍結し、精製前に -20 °C で保存することができた。

20

【0258】

実施例 4

CD19 結合抗体の精製

無細胞ハイブリドーマ上清を、5 分間の接触時間で、事前に平衡化した（リン酸緩衝生理食塩水、PBS）プロテイン A アフィニティーカラム（Mab Select (商標) Sure, GE Healthcare、8 × 100 mm）にロードする。洗浄（PBS、5 カラム体積）後、抗体を、25 mM のクエン酸 / NaOH (pH 3.0) で溶出する。溶出液を、1 M Tris で pH 5.5 に調整し、4 °C で一晩インキュベートする。その後、最終濾過（0.45 μm）を行う。

30

【0259】

実施例 5

CD19 ECD 発現細胞の提供およびそれに対する抗体の結合

細胞外提示のために、ヒト PSCA GPI アンカー配列 (DTDLCNASGA HALQPAAAIL ALLPALGLLL WPGQL; 配列番号 52)

に融合したウサギ CD19 (配列番号 01) 細胞外ドメイン (ECD) をコードするプラスミドで、細胞をトランスフェクトした。免疫化のための NIH/3T3 細胞のトランスフェクションのために、1 × 10⁷ 細胞を、3 つの T175 フラスコに播種した。続いて、リポフェクタミンを使用して、細胞を溶液中で逆トランスフェクトした。トランスフェクションの効率を、FITC 抗 FLAG 抗体 (abcam) および FACS を使用して、48 時間後に 40% 陽性細胞になるように決定した (図 1C)。FACS 解析によって CD19 特異性を確認するために、CHO または HEK 293 細胞を、rbCD19 でトランスフェクトした。3 × 10⁵ HEK 293 および 1 × 10⁵ CHO 細胞を、リポフェクタミンを使用して、トランスフェクトした。48 時間後、FITC 抗 FLAG 抗体 (abcam) を用いた FACS により、発現を確認した。

40

【0260】

実施例 6

抗ウサギ CD19 抗体を検出可能な標識にコンジュゲート

リン酸緩衝液 (pH 8.5) 中の抗ウサギ CD19 抗体を、約 5 mg/mL のタンパク

50

質濃度に調整した。D - ビオチノイル - アミノカプロン酸 - N - ヒドロキシスクシンイミドをDMSOに溶解し、1 : 5のモル比で抗体溶液に添加した。60分後、L - リジンを添加することによって反応を停止させ、標識試薬の余剰分を、150mMのNaCl、pH7.5を含む50mMのリン酸カリウム緩衝液に対する透析によって除去した。

【0261】

実施例7

インデックス・ソート・アプローチを含む、標識抗ウサギCD19抗体によるB細胞の標識化

B細胞を、暗所(4)で30分間、正常マウス血清(1 : 20、Southern Biotech)を補充したDPBS中の抗IgG FITC(1 : 200、AbD Serotec)、抗IgM PE(1 : 200 BD Pharmingen)、および抗CD19 A647(1 : 200、Roche)抗体で染色した。続いて、細胞を洗浄し、氷冷DPBSに再懸濁した。コンピュータおよびFACS Divaソフトウェア(BD Biosciences)を備えたBecton Dickinson FACS Aria上での単一細胞選別の少し前に、0.5 μg/mlの濃度のヨウ化プロピジウム(PI)(BD Pharmingen)を添加することによって、生/死識別を達成した。単一のIgG+およびIgG+IgM+細胞を、96ウェルプレートに選別した。FACS Ariaのインデックス・ソート・ツールを適用して、選別された各細胞のCD19発現を保存した。実施例9に記載のように、細胞を培養した。培養の7日後、上清を使用して、ELISAによって、IgG産生および抗原特異的クローンの数を決定した。ELISAデータとFACSインデックス・ソート・データを組み合わせたプラグインを、Flow Joで開発した。このプラグインは、ELISAからのIgG陽性および抗原特異的ウェルを、抗ウサギIgG、抗ウサギIgM、および抗ウサギCD19染色からの蛍光データに追加し、したがって、IgG産生および抗原特異的クローンを、Flow Joで視覚化することができる。結果は、すべてのIgG産生およびすべての抗原特異的クローンが、IgGおよびCD19二重陽性であることを示す。さらに、選別された二重陽性細胞の割合を確認することにより、選別効率(より特異的に選別された細胞)を約14~20%向上させることができる。

【0262】

実施例8

B細胞培養前の免疫蛍光染色およびフローサイトメトリー

抗IgG FITC(AbD Serotec)および抗hucK PE(BD Bioscience)抗体を、単一細胞選別のために使用した。表面染色のために、枯渴および濃縮工程からの細胞を、PBS中の抗IgG FITCおよび抗hucK PE抗体と、4の暗所で45分間インキュベートした。染色後、PBMCを氷冷PBSで2回洗浄した。最後に、PBMCを氷冷したPBSに再懸濁し、直ちにFACS解析に供した。死細胞と生細胞とを識別するためのFACS解析の前に、0.5 μg/mlの濃度のヨウ化プロピジウム(BD Pharmingen)を添加した。コンピュータおよびFACS Divaソフトウェア(BD Biosciences)を備えたBecton Dickinson FACS Ariaを、単一細胞選別のために使用した。

【0263】

実施例9

B細胞培養

ウサギB細胞の培養は、Seeberら(2014)に記載の方法により行った。簡潔には、単一細胞選別ウサギB細胞を、この表に記載のように、Pansorb in細胞(1 : 100000)(Calbiochem)および合成サイトカイン混合物を含有する200 μl/ウェルのEL-4 B5培地を含む96ウェルプレート中でインキュベートした：

10

20

30

40

50

化合物	終濃度
mIL-1b	0.063 ng/ml
mTNF α	0.063 ng/ml
mIL-2	1.58 ng/ml
mIL-6	0.32 ng/ml
mIL-10	0.32 ng/ml

【0264】

さらに、0.35 ng/ μ lのホルボールミリスレートアセテートおよびガンマ線照射(4 Gy)されたマウスEL-4 B5胸腺腫細胞(2 \times 10⁵細胞/ウェル)を使用し、細胞をインキュベータ中で37^oで7日間培養した。B細胞培養の上清をスクリーニングのために除去し、残りの細胞を、直ちに100 μ lのRLT緩衝液(Qiagen)に溶解し、-80^oで凍結した。

10

【0265】

実施例10

血液および脾臓中のCD19陽性B細胞の測定

血液を、PBMCの単離のために、密度勾配遠心分離に供した。脾臓をすり潰し、製造業者の指示に従って、通常の赤血球溶解緩衝液で赤血球を溶解する前に遠心分離した。血液または脾臓からの細胞を、滅菌6ウェルプレート上の1ml培地中に、最大6 \times 10⁶ PBMC/ウェルの濃度で播種した。マクロファージの枯渇は、インキュベータ内で37^oでの1時間のインキュベーション中に、細胞培養プレートへの非特異的接着によって起こる。実施例7に記載のように、単離されたPBMCを、染色し、洗浄した。コンピュータおよびFACSDivaソフトウェア(BD Biosciences)を備えたBecton Dickinson FACSCanto上での細胞集団の分析の少し前に、0.1 μ g/mlの濃度のDAPI(Biomol)によって生/死識別を達成した。FlowJo v10.0.7を用いて、血液および脾臓中のCD19陽性B細胞の解析を行った。

20

【0266】

実施例11

共培養後のB細胞の計数

B細胞を選別し、実施例7および実施例9に記載のように、フィーダー細胞と共培養した。7日間の培養後、96ウェル培養プレートを300 \times gで5分間遠心分離し、培地を除去し、ペレットを、暗所(4^o)で30分間インキュベーションするために、抗CD19 A647抗体(1:400、Roche)を含有し、正常マウス血清(1:20、Southern Biotech)を補充した氷冷DPBSに再懸濁した。続いて、細胞を洗浄し、規定量の氷冷DPBSに再懸濁した。コンピュータおよびFACSDivaソフトウェア(BD Biosciences)を備えたBecton Dickinson FACSCanto上での細胞集団の分析の少し前に、0.1 μ g/mlの濃度でDAPI(Biomol)を添加することによって、生/死識別を達成した。1ウェルあたりの総B細胞数の正確な計算のために、FACSCantoで、規定の解析体積を設定し、総試料体積を考慮することが重要である。FlowJo v10.0.7を用いて解析を行い、総試料体積を考慮して、CD19+細胞の数を用いて、B細胞の細胞数を計算した。この方法では、例えば細胞表面IgGが培養中に減少するため、インハウスのB細胞クローニングアプローチ後に、B細胞クローン内のB細胞の計数が初めて可能になる。

30

40

【0267】

実施例12

本発明による抗体を使用した、CD19陽性B細胞の濃縮

免疫化ウサギからのPBMCを、実施例10に記載のように、血液から単離し、実施例8および実施例9に記載のように、染色および培養した。細胞の半分を以下のように処理した：ビオチン化抗ウサギCD19を、PBMCと共に、4^oで1:500希釈で15分

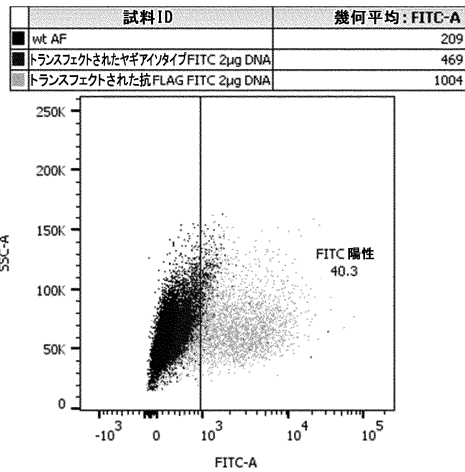
50

間インキュベートした。P B M Cを、冷M A C S緩衝液(M i l t e n y i)で洗浄し、次いで、製造業者の指示に従って、ストレプトアビジンM A C Sビーズ(M i l t e n y i)とインキュベートした。細胞をM A C S緩衝液で洗浄し、続いて、M i l t e n y i L Sカラムを製造業者の指示に従って使用して精製した。精製した細胞を、蛍光標識抗原および抗ウサギI g G F I T C抗体(S o u t h e r n B i o t e c h)と、4で15分間インキュベートし、続いて洗浄した。細胞の残りの半分を、最初にビオチン化抗原(1:10000)と、4で15分間インキュベートした。細胞を洗浄し、次いで、製造業者の指示に従って、ストレプトアビジンM A C Sビーズとインキュベートした。細胞を洗浄し、L Sカラムに供した。続いて、細胞を、蛍光標識抗ウサギC D 19および抗ウサギI g G抗体とインキュベートした。最後に、P B M Cを氷冷P B Sに再懸濁し、直ちにB D A r i a I I Iで選別した。7 - A A D(B D P h a r m i n g e n)を、製造業者の指示に従って添加して、死細胞と生細胞とを識別した。細胞の前半は、サイズ、抗原陽性、およびI g G陽性でゲーティングした。細胞の後半は、サイズ、C D 19陽性、およびI g G陽性でゲーティングした。細胞を単一細胞で選別し、実施例9に記載のように培養した。1週間のインキュベーション後、E L I S Aを使用して、I g G陽性クローン、特異的クローン、および交差反応性クローンの数を決定した。抗ウサギC D 19による濃縮は、細胞の生存率の増加(図7)、I g G産生クローンの数の増加、および抗原特異的クローンの数の増加をもたらした。さらに、交差反応性クローンの数が減少した。

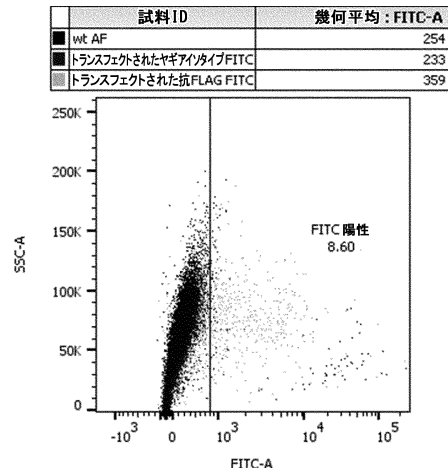
10

【図面】

【図1A】



【図1B】



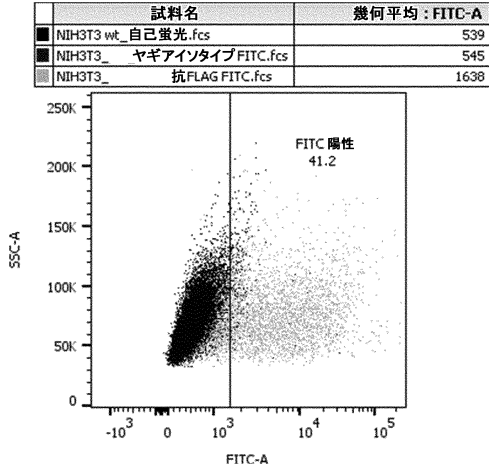
20

30

40

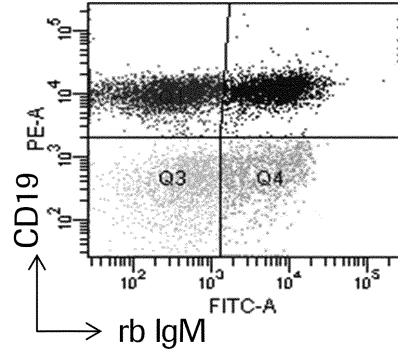
50

【図 1 C】



【図 2 A】

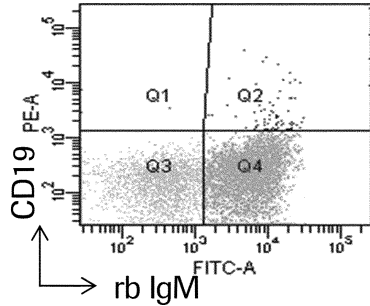
陽性ウェル
- 1H2



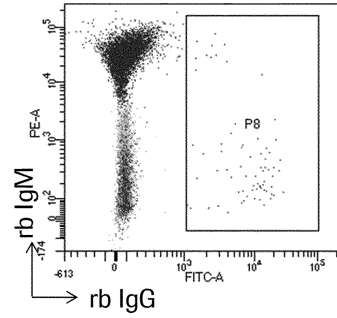
10

【図 2 B】

陰性ウェル
1G5

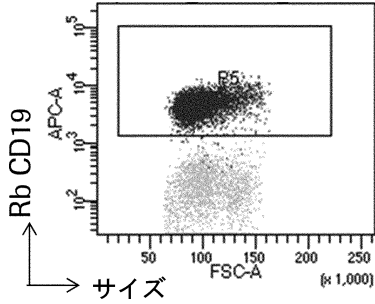


【図 3 A】

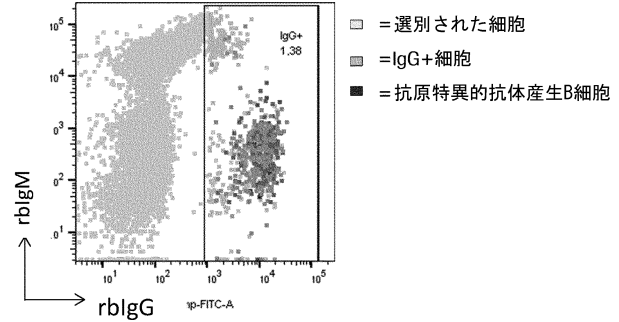


20

【図 3 B】



【図 3 C】

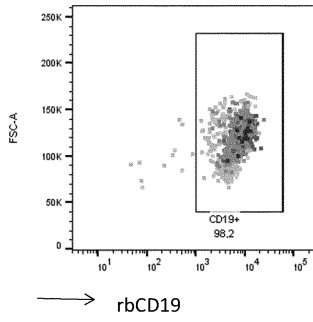


30

40

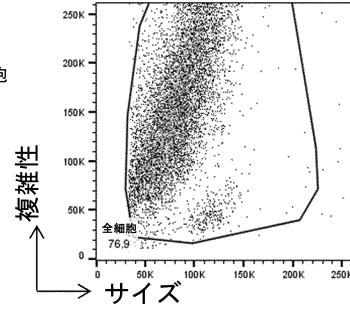
50

【図 3 D】



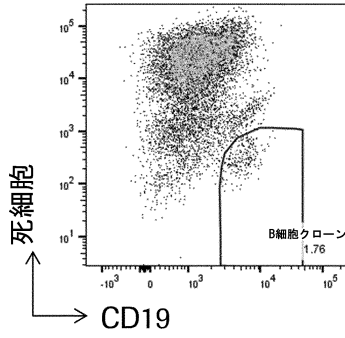
- = 選別された細胞
- = IgG+ 細胞
- = 抗原特異的抗体産生B細胞

【図 4 A】

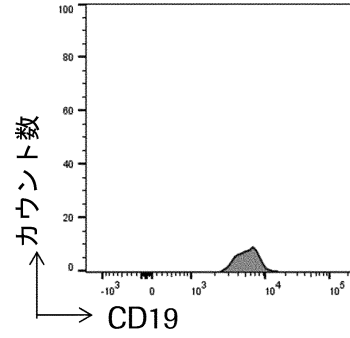


10

【図 4 B】



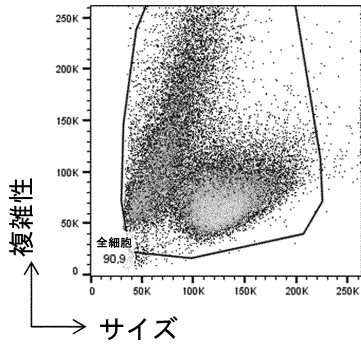
【図 4 C】



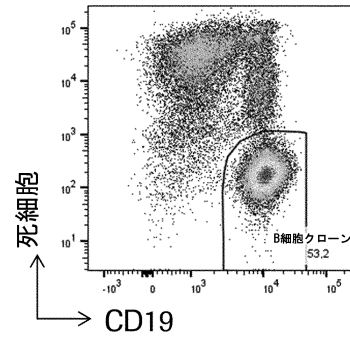
→ 約350細胞

20

【図 5 A】



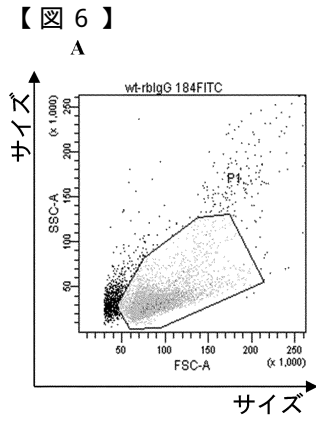
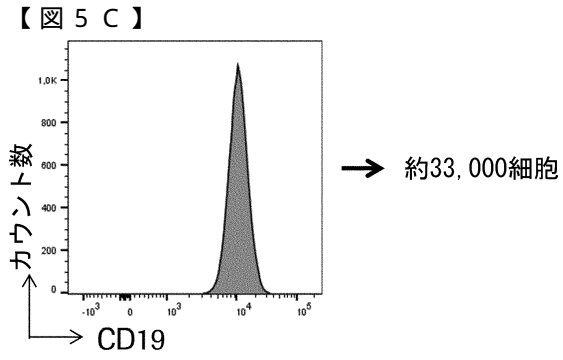
【図 5 B】



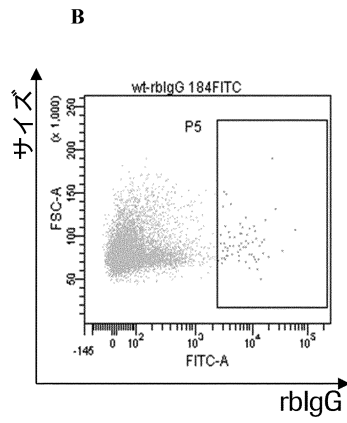
30

40

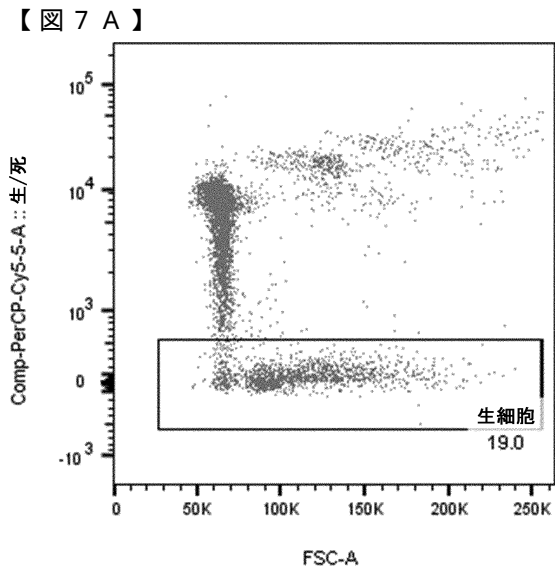
50



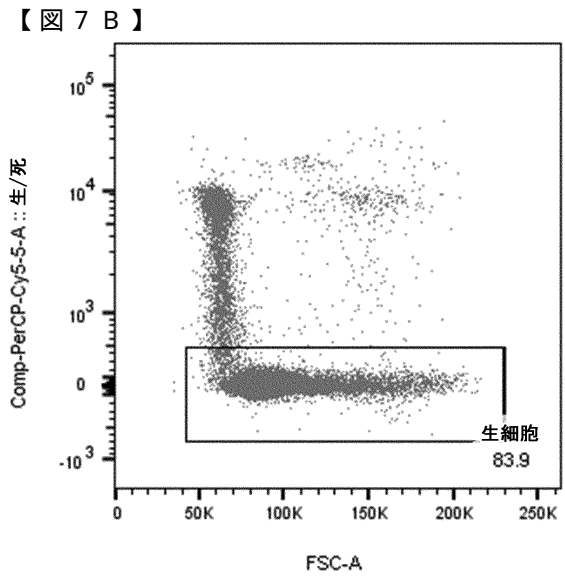
10



20



30



40

50

【配列表】

0007650802000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/0781(2010.01)

F I

C 1 2 N 5/0781

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハース アレキサンダー

ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ロシュ ダイアグノスティック
クス ゲーエムベーハー内

(72)発明者 ユング フリーデリケ

ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ロシュ ダイアグノスティック
クス ゲーエムベーハー内

(72)発明者 クロスターマン シュテファン

ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ロシュ ダイアグノスティック
クス ゲーエムベーハー内

(72)発明者 オフナー ソニア

ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ロシュ ダイアグノスティック
クス ゲーエムベーハー内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表2018-529733(JP,A)

特表2013-526286(JP,A)

特開2017-113027(JP,A)

国際公開第2017/195749(WO,A1)

国際公開第2016/092315(WO,A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 1

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

G 0 1 N 3 3 / 5 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST
N)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq