

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6498599号  
(P6498599)

(45) 発行日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(24) 登録日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z N A Z

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/39 (2006.01)

C 1 2 N 15/39

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 19 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-509201 (P2015-509201)  
 (86) (22) 出願日 平成25年4月26日(2013.4.26)  
 (65) 公表番号 特表2015-514811 (P2015-514811A)  
 (43) 公表日 平成27年5月21日(2015.5.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/038497  
 (87) 国際公開番号 W02013/163602  
 (87) 国際公開日 平成25年10月31日(2013.10.31)  
 審査請求日 平成28年4月19日(2016.4.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/639,046  
 (32) 優先日 平成24年4月26日(2012.4.26)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/732,776  
 (32) 優先日 平成24年12月3日(2012.12.3)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504455148  
 バクシネックス インコーポレーティッド  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェ  
 スター マウント ホープ アベニュー  
 1 8 9 5  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 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】 特異的免疫グロブリン遺伝子組み換えワクシニアウイルスに感染している細胞の選択を容易にするための融合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドをコードする組み換えワクシニアウイルスライブラリーをワクシニアウイルス感染許容性の宿主細胞集団に導入する工程であって、該組み換えワクシニアウイルスライブラリーが、複数の免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドをコードする、ワクシニアウイルスベクター内に構築されたポリヌクレオチドの第1のライブラリーを含み、該ワクシニアウイルスベクターが、(1) 免疫グロブリン重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチド、(2) 第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチドの下流に位置する、ワクシニアウイルスA56R細胞外エンベロープウイルス(EEV) 特異的膜タンパク質のスト

10

ーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2のポリヌクレオチド、(3) 第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチドの上流に位置する、免疫グロブリン重鎖可変領域またはそのフラグメントをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；

(b) 免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合フラグメントをコードする1または複数のポリヌクレオチドを宿主細胞集団に導入する工程であって、前記免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合フラグメントと組み合わせさせて免疫グロブリン分子の抗原結合ドメインを形成することが可能である、工程；

(c) 宿主細胞からEEVを放出させる工程；

(d) 放出されたEEVを上清から収集する工程；

20

(e) 放出されたEEVを抗原と接触させる工程；ならびに  
(f) EEVの膜表面に発現された、抗原に特異的な免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する工程を含む、抗原特異的な免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択する方法。

【請求項2】

(g) (f)において回収されたポリヌクレオチドをワクシニアウイルス感染許容性の第2の宿主細胞集団に導入する工程；

(h) 免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドを宿主細胞集団に導入する工程；

(i) 宿主細胞から細胞外エンベロープウイルス (EEV) を放出させる工程、

(j) 放出されたEEVを上清から収集する工程；

(k) 放出されたEEVを抗原と接触させる工程；ならびに

(l) EEVの膜表面で発現された、抗原に特異的な免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

工程(g)～(l)を1回または複数回繰り返し、それにより抗原と特異的に結合する免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドの部分として免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原特異的なフラグメントをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮する工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】

第1のライブラリーから回収されたポリヌクレオチドを単離する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

第1のポリペプチドセグメントが、重鎖CH2ドメイン、重鎖CH3ドメイン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

第1のポリペプチドセグメントが、ヒトIgG定常領域またはその部分を含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】

工程(b)における免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドが、それぞれワクシニアウイルスベクターに含まれる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

工程(b)における免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドが、プラスミドベクターに含まれる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

(a) ワクシニアウイルスA56Rタンパク質のストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインに融合されたヒトIgG1のCH1ドメインである、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号17～421からなるポリペプチドセグメント、または

(b) ワクシニアウイルスA56Rタンパク質のストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインに融合されたヒトIgG1の全定常領域である、SEQ ID NO:30のアミノ酸番号17～653からなるポリペプチドセグメント

のN末端に融合された、免疫グロブリン重鎖可変領域を含む融合タンパク質であって、

ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) ウイルス粒子の表面で発現されることが可能であり、且つ軽鎖可変ドメインと組み合わされた場合に、機能的抗体またはその抗原結合フラグメントを形成することが可能である、融合タンパク質。

【請求項10】

EEVの表面での融合タンパク質の発現を容易にするためのシグナルペプチドをさらに含

10

20

30

40

50

む、請求項9記載の融合タンパク質。

【請求項 1 1】

請求項9または10記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 1 2】

請求項11記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 1 3】

請求項11記載のポリヌクレオチドまたは請求項12記載のベクターを含む、組み換えワクシニアウイルス。

【請求項 1 4】

請求項13記載の組み換えワクシニアウイルスに感染している宿主細胞。

10

【請求項 1 5】

異なる免疫グロブリン重鎖可変領域を含む複数の免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドのライブラリーを含む、組み換えワクシニアウイルスライブラリーであって、各免疫グロブリン融合ポリペプチドは、N-からC-末端の順に、EEV特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントに融合されたCH1定常ドメインに融合された重鎖可変ドメインを含み、ここで、該ポリヌクレオチドのライブラリーはワクシニアウイルスベクター中に構築されており、且つ、該ライブラリー中の各ポリヌクレオチドが以下の要素、

(a) 重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチド、

20

(b) 第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチドの下流に位置する、ワクシニアウイルスA56R EEV特異的膜タンパク質のストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2のポリヌクレオチド、並びに

(c) 第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチドの上流に位置する、免疫グロブリン重鎖可変領域 (VH) またはそのフラグメントをコードする第3のポリヌクレオチド

を含み、該免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドがワクシニアEEV粒子の表面上に発現されることが可能であり、そして、該融合ポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖と組み合わさって免疫グロブリン分子の抗原結合ドメインを形成することが可能である、組み換えワクシニアウイルスライブラリー。

30

【請求項 1 6】

各免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドが、EEVの表面での複数の免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドの発現を容易にするためのシグナルペプチドをさらに含む、請求項15記載の組み換えワクシニアウイルスライブラリー。

【請求項 1 7】

第1のポリペプチドセグメントが、重鎖CH2ドメイン、重鎖CH3ドメイン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項15記載の組み換えワクシニアウイルスライブラリー。

【請求項 1 8】

(a) の第1のポリヌクレオチドが、全長IgG定常領域を含む第1のポリペプチドセグメントをコードする、請求項17記載の組み換えワクシニアウイルスライブラリー。

40

【請求項 1 9】

3分子組み換えにより生成される、請求項15記載の組み換えワクシニアウイルスライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年4月26日に出願された米国仮出願第61/639,046号、2012年12月3日に出願された米国仮出願第61/732,776号、および2013年3月15日に出願された米国非仮出願第1

50

3/844,388号の優先の恩典を主張し、各出願の内容は、これによって、参照によりその全体が組み入れられる。

【0002】

電子的に提出された配列リストへの参照

本明細書と共に出願されたASCIIテキストファイル（名称："1843...071PC02\_Sequence Listing\_ascii.txt"、サイズ：30,863バイト、作成日：2013年4月25日）内の電子的に提出された配列表の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

発明の分野

本発明は、ワクシニアウイルス粒子上、例えばEEVビリオン上、および/または宿主細胞上に免疫グロブリン分子を発現させる効率の高い方法、ワクシニアウイルス粒子、例えばEEVビリオン、および/または真核細胞における発現のための免疫グロブリン重鎖ライブラリーおよび軽鎖ライブラリーを産生する方法、特異的抗原と結合する免疫グロブリンを単離する方法、ならびにこれらの方法のいずれかによって産生された免疫グロブリンに関する。本発明は、また、ワクシニアウイルス粒子上、例えばEEVビリオン上、または宿主細胞上に免疫グロブリン分子を発現させるために使用される融合タンパク質に関する。

10

【背景技術】

【0004】

関連技術

免疫グロブリンの産生

20

確定した特異性の抗体は、ますます多くの多様な治療応用に利用されつつある。ヒトの治療的使用に有用な抗体を得るために、いくつかの方法が用いられている。これらには、キメラ抗体およびヒト化抗体、ならびにライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーより選択された、またはトランスジェニック動物由来の完全ヒト抗体が含まれる。バクテリオファージにおいて構築された免疫グロブリンライブラリーは、ナイーブな個体または特異的に免疫処置された個体の抗体産生細胞から得ることができ、原則として、ヒト免疫グロブリン重鎖と軽鎖が新しく多様に対形成したものを含む。この戦略は、内因性レパートリーの制限を受けないものの、発現された免疫グロブリンフラグメントの相補性決定領域（CDR）が細菌細胞内で合成され、正しくフォールディングされる必要がある。しかし、多くの抗原結合領域は、細菌細胞内で融合タンパク質として正確に集合することが困難である。加えて、そのタンパク質は、通常の真核生物性翻訳後修飾を受けない。結果として、この方法は、得ることができる抗体の特異性に異なる選択フィルターを課するものである。あるいは、完全ヒト抗体は、真核細胞系、例えば酵母ディスプレイ、レトロウイルスディスプレイでのライブラリー、またはボックスウイルスなどのDNAウイルスでの発現から単離することができる。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,858,559号（特許文献1）を参照されたい。

30

【0005】

本発明は、哺乳類エンベロープウイルスであるワクシニアウイルスの表面に完全ヒト抗体ライブラリーの効率的な発現を可能にする。ファージディスプレイと同様に、各ワクシニアビリオンがその表面に単一の免疫グロブリン、例えば抗体またはscFVを発現する条件が利用される。

40

【0006】

しかし、本発明において、ワクシニア-MAbビリオンのライブラリーをスクリーニングして特異的抗体をコードする組み換えウイルスを選択するために、様々なパンニングおよび磁気ビーズに基づく方法が開発された。哺乳動物細胞が感染すると、抗体は新たに産生されたウイルスに組み入れられるだけでなく、宿主細胞の表面にもディスプレイされる。これにより、無細胞パンニング系でのワクシニア-MAbビリオン選択に続く、高特異性および抗体の最適化についての細胞に基づくスクリーニングの利益を合わせもつ、効率的な選択戦略が可能になる。

【0007】

50

これは、単一のscFVを発現するがライブラリーを発現しない、当分野における他の技術と異なるものである。そのうえ、他の技術は、scFVを経てワクシニア感染を遺伝子治療に向け直すように設計されており、抗体発見のために使用されない。追加的に、本技術は、IMVの代わりにEEVを使用すること、および異なる融合タンパク質（例えばA56R）を使用することにより、以前の技術と異なる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第7,858,559号

【発明の概要】

10

【0009】

ある局面において、本開示は、(a) 重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメント、および(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) 特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントを含む、融合タンパク質に関する。

【0010】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、さらに、免疫グロブリン重鎖可変領域またはそのフラグメントを含む第3のポリペプチドセグメントを含む。別の態様において、ワクシニアEEV特異的膜タンパク質はA56Rである。

【0011】

ある局面において、本開示は、(a) ヒト重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントおよび(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) 特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。ある態様において、ポリヌクレオチドは、ウエスタンリザーブ (Western Reserve) ワクシニアウイルス株由来A56Rのアミノ酸番号108~314をコードするSEQ ID NO:10のヌクレオチドを含む。ある態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215~421をコードする。ある態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215~421をコードするSEQ ID NO:10のヌクレオチドを含む。

20

【0012】

ある局面において、本開示は、(a) ヒト重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントおよび(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) 特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

30

【0013】

ある局面において、本開示は、(a) ヒト重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントおよび(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) 特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組み換えワクシニアウイルスに関する。別の局面において、本開示は、組み換えワクシニアウイルスに感染している宿主細胞に関する。

【0014】

40

別の局面において、本開示は、複数の免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする、ワクシニアウイルスベクター内に構築されたポリヌクレオチドの第1のライブラリーを含む組み換えワクシニアライブラリーであって、ワクシニアウイルスベクターが、(a) 重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチド、(b) CH1ドメインの下流に位置する、ワクシニアウイルスEEV特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2のポリヌクレオチド、および(c) CH1ドメインの上流に位置する、免疫グロブリン重鎖可変領域またはそのフラグメントをコードする第3のポリヌクレオチドを含む組み換えワクシニアライブラリーに関する。一つの態様において、第1のライブラリーは、EEV表面での融合ポリペプチドの発現を促進するためのシグナルペプチドをさらに含む。別の態様において、EEV特異的膜タ

50

ンパク質はA56Rである。別の態様において、ワクシニアEEV特異的膜タンパク質はA56Rである。別の態様において、第2のポリペプチドセグメントは、EEV特異的膜タンパク質の細胞外ドメインまたはその部分をさらに含む。別の態様において、第2のポリペプチドセグメントは、EEV特異的膜タンパク質の細胞内ドメインまたはその部分をさらに含む。ある態様において、融合タンパク質は、ウエスタンリザーブワクシニアウイルス株由来A56Rのポリペプチド配列のアミノ酸番号108～314に対応するSEQ ID NO:11のアミノ酸を含む。ある態様において、融合タンパク質は、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215～421を含む。ある態様において、融合タンパク質は、ウエスタンリザーブワクシニアウイルス株由来A56Rのポリペプチド配列のアミノ酸番号108～314であるSEQ ID NO:11のアミノ酸番号215～421を含む。

10

**【0015】**

別の局面において、本開示は、抗原特異的免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択するための方法であって、(a)免疫グロブリン融合タンパク質をコードする請求項13～18のいずれか一項記載の第1のライブラリーをワクシニアウイルス感染許容性の宿主細胞集団に導入し、(b)免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドを宿主細胞集団に導入し(ここで、免疫グロブリン融合タンパク質は、免疫グロブリン軽鎖と組み合わさって免疫グロブリン分子の抗原結合ドメインを形成することが可能である)、(c)宿主細胞から細胞外エンベロープウイルス(EEV)を放出させ、(d)放出されたEEVを上清から収集し、(e)放出されたEEVを抗原と接触させ、そして(f)EEVの膜表面に発現された、抗原に特異的な免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収することを含む方法に関する。

20

**【0016】**

一態様において、抗原特異的な免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択するための方法は、さらに、(g)(f)において回収されたポリヌクレオチドをワクシニアウイルス感染許容性の第2の宿主細胞集団に導入し、(h)免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドを宿主細胞集団に導入し、(i)宿主細胞から細胞外エンベロープウイルス(EEV)を放出させ、(j)放出されたEEVを上清から収集し、(k)放出されたEEVを抗原と接触させ、そして(l)EEVの膜表面に発現された、抗原に特異的な免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収することを含む。

30

**【0017】**

ある態様において、工程(g)～(l)を1回または複数回繰り返し、それによって、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン融合ポリペプチドの部分として免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原特異的フラグメントをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドが濃縮される。

**【0018】**

ある態様において、第1のライブラリーから回収されたポリヌクレオチドが単離される。

**【0019】**

別の局面において、本開示は、抗原特異的免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択するための方法に関し、(a)第1のライブラリーをワクシニアウイルス感染許容性の宿主細胞集団に導入し、(b)第2のライブラリーを宿主細胞集団に導入し(ここで、第2のライブラリーは、免疫グロブリン軽鎖をコードする複数のポリヌクレオチドを含み、

40

**【0020】**

ここで、免疫グロブリン融合ポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖と組み合わさって、免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントを形成することが可能である)、(c)宿主細胞から免疫グロブリン融合ポリペプチドを発現させ、(d)宿主細胞から免疫グロブリン融合ポリペプチドを収集し、(e)収集された免疫グロブリン融合ポリペプチド

50

を抗原と接触させ、そして(f)抗原に特異的である免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収することを含む方法に関する。

【0021】

一つの態様において、抗原特異的免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択するための方法は、さらに、(g)(f)において回収されたポリヌクレオチドをワクシニアウイルス感染許容性の第2の宿主細胞集団に導入し、(h)ポリヌクレオチドの第2のライブラリーを第2の宿主細胞集団に導入し、(i)宿主細胞から免疫グロブリン融合ポリペプチドを発現させ、(j)宿主細胞から免疫グロブリン融合ポリペプチドを収集し、(k)収集された免疫グロブリン融合ポリペプチドを抗原と接触させ、そして(l)抗原に特異的である免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収することを含む。

10

【0022】

ある態様において、工程(g)~(l)を1回または複数回繰り返し、それによって、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン融合ポリペプチドの部分として免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原特異的フラグメントをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドが濃縮される。

【0023】

一つの態様において、抗原特異的免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択するための方法は、さらに、第1のライブラリーから回収された第3のポリヌクレオチドを単離することを含む。

20

[本発明1001]

(a) 重鎖定常領域ドメインを含む第1のポリペプチドセグメント、および(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス(EEV) 特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントを含む、融合タンパク質。

[本発明1002]

免疫グロブリン重鎖可変領域またはそのフラグメントを含む第3のポリペプチドセグメントをさらに含む、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1003]

EEVの表面での融合ポリペプチドの発現を容易にするためのシグナルペプチドをさらに含む、本発明1002の融合タンパク質。

30

[本発明1004]

ワクシニアEEV特異的膜タンパク質がA56Rである、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1005]

第2のポリペプチドセグメントが、EEV特異的膜タンパク質の細胞外ドメインまたはその部分をさらに含む、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1006]

第2のポリペプチドセグメントが、EEV特異的膜タンパク質の細胞内ドメインまたはその部分をさらに含む、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1007]

定常領域がCH1ドメインまたはその部分を含む、本発明1001の融合タンパク質。

40

[本発明1008]

定常領域がIgG- 重鎖を含む、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1009]

融合タンパク質がSEQ ID NO:11のアミノ酸番号215~421を含む、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1010]

本発明1001の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[本発明1011]

ウエスタンリザーブワクシニアウイルス株由来A56Rのアミノ酸番号108~314またはSEQ ID NO:11のアミノ酸番号215~421をコードするSEQ ID NO:10のヌクレオチドを含む、本発

50

明1010のポリヌクレオチド。

[本発明1012]

本発明1010のポリヌクレオチドを含むベクター。

[本発明1013]

本発明1010のポリヌクレオチドまたは本発明1012のベクターを含む組み換えワクシニアウイルス。

[本発明1014]

本発明1013の組み換えワクシニアウイルスに感染している宿主細胞。

[本発明1015]

複数の免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする、ワクシニアウイルスベクター内に構築されたポリヌクレオチドの第1のライブラリーを含む組み換えワクシニアライブラリーであって、ワクシニアウイルスベクターが、(a)重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチド、(b)CH1ドメインの下流に位置する、ワクシニアウイルスEEV特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2のポリヌクレオチド、および(c)CH1ドメインの上流に位置する、免疫グロブリン重鎖可変領域またはそのフラグメントをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、組み換えワクシニアライブラリー。

[本発明1016]

EEVの表面での融合ポリペプチドの発現を容易にするためのシグナルペプチドをさらに含む、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1017]

EEV特異的膜タンパク質がA56Rである、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1018]

ワクシニアEEV特異的膜タンパク質がA56Rである、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1019]

第2のポリペプチドセグメントが、EEV特異的膜タンパク質の細胞外ドメインまたはその部分をさらに含む、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1020]

第2のポリペプチドセグメントが、EEV特異的膜タンパク質の細胞内ドメインまたはその部分をさらに含む、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1021]

定常領域がCH1ドメインまたはその部分を含む、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1022]

定常領域が完全長IgGを含む、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1023]

第1のポリペプチドセグメントが、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215～421を含む、本発明1001の融合タンパク質または本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1024]

第2のポリペプチドセグメントが、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215～421を含む、本発明1001の融合タンパク質または本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1025]

(a)免疫グロブリン融合タンパク質をコードする本発明1015の第1のライブラリーをワクシニアウイルス感染許容性の宿主細胞集団に導入する工程、

(b)免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドを宿主細胞集団に導入する工程であって、免疫グロブリン融合タンパク質は、免疫グロブリン軽鎖と組み合わせることで免疫グロブリン分子の抗原結合ドメインを形成することが可能である、工程、

(c)宿主細胞から細胞外エンベロープウイルス(EEV)を放出させる工程、

(d)放出されたEEVを上清から収集する工程、

(e)放出されたEEVを抗原と接触させる工程、そして

(f)EEVの膜表面に発現された、抗原に特異的な免疫グロブリン融合ポリペプチドをコ

10

20

30

40

50



ードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する工程

を含む、抗原特異的免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドを選択するための方法。

[本発明1026]

(g) (f)において回収されたポリヌクレオチドをワクシニアウイルス感染許容性の第2の宿主細胞集団に導入する工程、

(h) 免疫グロブリン軽鎖をコードする1または複数のポリヌクレオチドを宿主細胞集団に導入する工程、

(i) 宿主細胞から細胞外エンベロープウイルス (EEV) を放出させる工程、

(j) 放出されたEEVを上清から収集する工程、

(k) 放出されたEEVを抗原と接触させる工程、そして

(l) EEVの膜表面に発現された、抗原に特異的な免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを回収する工程

をさらに含む、本発明1025の方法。

[本発明1027]

工程 (g) ~ (l) を1回または複数回繰り返し、それにより抗原と特異的に結合する免疫グロブリン融合ポリペプチドの部分として免疫グロブリン重鎖可変領域またはその抗原特異的フラグメントをコードする第1のライブラリーのポリヌクレオチドを濃縮する工程  
をさらに含む、本発明1026の方法。

[本発明1028]

第1のライブラリーから回収されたポリヌクレオチドを単離する工程をさらに含む、本発明1025の方法。

**【図面の簡単な説明】**

**【 0 0 2 4 】**

**【図 1】** pJEMI プラスミドの要素およびそれらのそれぞれの配列 (SEQ ID NO:1) を示す。

**【図 2】** 組み換えワクシニアウイルスを用いたライブラリー選択のための一般戦略の説明を示す。

**【図 3】** H2124-A56R + L517を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞 (B) または2408-A56R-scFVを発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞 (C) のC35およびCD100染色の蛍光活性化細胞分類 (FACS) 分析のデータを野生型 (WT) 感染細胞 (A) と比較して示す。

**【図 4】** C35/抗Vac HRP (A) およびC35/抗Fab (B) を用いた、C35特異的融合タンパク質を含有するEEV (「A56R EEV」と表示)、対照 (「L517 + G7000-A56R EEV」)、および標準的な膜結合型IgG1形式のC35特異的抗体を含有するEEV (「mbg EEV」) についてのELISA結合結果を示す。

**【図 5 - 1】** 2時間後 (A) および一晩後 (B) のC35結合についてのブラークアッセイプレートの結果を示す。

**【図 5 - 2】** 2時間後 (C) および一晩後 (D) のVEGF結合についてのブラークアッセイプレートの結果を示す。

**【図 6】** CD100抗体選択戦略の説明を示す。

**【図 7】** CD100クローンC20のVH配列 (SEQ ID NO:19) および組み換えワクシニアライブラリー選択によって同定された同一のVHクローンのアライメントを示す。

**【図 8】** 軽鎖L48、L116、およびL9021を用いたHer2.3.2およびHer2.3.3選択についてのフローサイトメトリーのC35およびHer2染色の結果を示す。

**【図 9】** Her2抗体選択戦略の説明を示す。

**【図 10】** Her2.3.2およびHer2.3.3選択のためのC35+抗HisおよびHer2+抗Hisについてのフローサイトメトリーの結果を示す。

**【図 11】** Her2クローンB10のVH配列 (SEQ ID NO:20) および組み換えワクシニアライブラリーの選択によって同定された同一のVHクローンのアライメントを示す。

10

20

30

40

50

【図 1 2】「Fab」、「TR」、および「IgG- 重鎖」構築物の図を示す。

【図 1 3】8000-Fab L8000を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のC35染色およびHer2染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータを示す。

【図 1 4】（A）8000-IgG L8000および（B）8000-TR L8000を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のC35染色およびHer2染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータを示す。

【図 1 5】（A）H2124-IgGおよび（B）H2124-TR L517を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のC35染色およびHer2染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータを示す。

10

【図 1 6】CD100 Lib 10.3 FLOW分析についての対照を示す。（A）2368および（B）8000を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 1 7】トシル選択CD100 Lib 10.3 FLOW分析の結果を示す。（A）L223、（B）L151、および（C）L9021を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 1 8】トシル選択CD100 Lib 10.3 FLOW分析の結果を示す。（A）L48、（B）L7110、および（C）L122を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 1 9】トシル選択CD100 Lib 10.3 FLOW分析の結果を示す。（A）L116、（B）L214、および（C）L3-1を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

20

【図 2 0】ProG選択CD100 Lib 10.3 FLOW分析の結果を示す。（A）L223、（B）L151、および（C）L9021を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 2 1】ProG選択CD100 Lib 10.3 FLOW分析の結果を示す。（A）L48、（B）L7110、および（C）L122を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 2 2】ProG選択CD100 Lib 10.3 FLOW分析の結果を示す。（A）L116、（B）L214、および（C）L3-1を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のHer2染色およびCD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

30

【図 2 3】CD100 Lib 10.3/L3-1 FLOW分析についての対照を示す。（A）8000および（B）2368を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞の前複合体（Precomplex）Her2染色、2工程CD100染色、および前複合体CD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 2 4】CD100 Lib 10.3トシル/L3-1 FLOW分析の結果を示す。（A）予備選別されトシル選択されたCD100 Lib 10.3および（B）選別されトシル選択されたCD100 Lib 10.3を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞の前複合体Her2染色、2工程CD100染色、および前複合体CD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

40

【図 2 5】CD100 Lib 10.3ProtG/L3-1 FLOW分析の結果を示す。（A）予備選別されProtG選択されたCD100 Lib 10.3および（B）選別されProtG選択されたCD100 Lib 10.3を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞の前複合体Her2染色、2工程CD100染色、および前複合体CD100染色についての蛍光活性化細胞分類（FACS）分析のデータ。

【図 2 6】mAb2050、2063、および2110についてJurkat細胞（CD100+）およびBxPC3細胞上のCD100に対して特異性を示すフローサイトメトリーの結果を示す。

【図 2 7】3つのCD100特異的抗体（Mab2050、MabC2063、およびMabC2110）を用いた（A）huCD100-His被覆プレートおよび（B）ヘモグロビン被覆プレート上でのELISAの結果を陽性対照および陰性対照と比較して示す。

50

【図28】ワクシニアディスプレイ法による特異的Ig-H/Ig-Lの同定についての模式図を示す。

【図29】Her2特異的クローン(A)D5、(B)D8、および(C)H2を発現しているEEV組み換えワクシニアウイルスに感染しているHeLa細胞のC35およびHer2染色についての蛍光活性化細胞分類(FACS)分析のデータ。

【図30】3つのHer2特異的抗体(Mab8287、Mab8290、およびMab9298)についてのELISAの結果を示す。

【図31】Mab8289、Mab8293、およびMab8297についてSKBR3細胞(Her2+++ )上のHer2に対する特異性を示すフローサイトメトリーの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

詳細な説明

本発明は、広く、細胞外エンベロープワクシニアウイルス(EEV)特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントとの融合体としてEEVの表面にディスプレイされた、真核細胞系において機能的な抗原特異的免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメント(すなわち抗原結合フラグメント)を同定および/または産生する方法に関する。加えて、本発明は、抗原特異的免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントをコードするポリヌクレオチドの複合発現ライブラリーから、そのような免疫グロブリン分子またはフラグメントをコードするポリヌクレオチドを同定する方法に関し、ここで、ライブラリーは、細胞外エンベロープワクシニアウイルス(EEV)特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントとの融合体としてEEVの表面にディスプレイされた真核細胞系において構築およびスクリーニングされる。さらなる態様には、(a)ヒト重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメント、および(b)ワクシニア細胞外エンベロープウイルス(EEV)特異的膜タンパク質の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントを含む融合タンパク質が含まれる。さらなる態様において、本明細書に開示される融合タンパク質は、結合分子、例えば免疫グロブリンの抗原特異的部分またはその部分、例えば適切な免疫グロブリン軽鎖と対形成したときに関心のある抗原に結合する重鎖可変領域を含みうる。

【0026】

本発明の一局面は、細胞外エンベロープワクシニアウイルス(EEV)特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントとの融合体としての、EEVの表面にディスプレイされた真核細胞系における複合免疫グロブリンライブラリーの構築である。

【0027】

用語「a」または「an」実体は、その実体の1つまたは複数を表すことに留意すべきであり、例えば「(an)免疫グロブリン分子」は、1つまたは複数の免疫グロブリン分子を表すと理解される。このように、用語「a」(または「an」)、「1つまたは複数」、および「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。

【0028】

用語「真核生物(eukaryote)」または「真核性生物(eukaryotic organism)」は、原生動物、真菌、酵母、緑藻、単細胞植物、多細胞植物、ならびに脊椎動物および無脊椎動物の両方の全ての動物を含む、動物界、植物界および原生生物界における全ての生物を包含することが意図される。この用語は、細菌またはウイルスを包含しない。「真核細胞」は、1つの「真核細胞」および複数の「真核細胞」を包含することが意図され、真核生物由来の細胞を含む。

【0029】

用語「脊椎動物」は、単数の「脊椎動物」および複数の「脊椎動物」を包含することが意図され、哺乳類および鳥類、ならびに魚類、爬虫類、および両生類を含む。

【0030】

用語「哺乳類」は、単数の「哺乳類」および複数の「哺乳類」を包含することが意図され、この用語には、ヒト；類人猿、サル、オランウータン、およびチンパンジーなどの霊

10

20

30

40

50

長類；イヌおよびオオカミなどのイヌ科動物；ネコ、ライオン、およびトラなどのネコ科動物；ウマ、ロバ、およびシマウマなどのウマ科動物、ウシ、ブタ、およびヒツジなどの食用動物；シカおよびキリンなどの有蹄動物；マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどのげっ歯類；ならびにクマが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、哺乳類はヒト対象である。

#### 【0031】

用語「組織培養」または「細胞培養」または「培養」または「培養すること」は、細胞の構造の保存、細胞機能の保存、さらなる分化、またはこれら3つ全てを可能にする条件下での植物または動物の組織または細胞のインビトロでの維持または成長を表す。「初代組織細胞」は、組織から直接獲得された細胞、すなわち生体内と同じ機能を果たす、同じ種類の細胞集団である。そのような組織細胞を例えばタンパク質分解酵素トリプシンで処理すると、細胞は個々の初代組織細胞に解離し、その初代組織細胞は、培養プレート上に播かれたときに成長するか、または細胞構造を維持する。

10

#### 【0032】

用語「ポリヌクレオチド」は、核酸または構築物中に存在する任意の1つまたは複数の核酸セグメントまたは核酸分子、例えばDNAまたはRNAフラグメントを表す。「免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、そのようなポリペプチドのコード領域を含むポリヌクレオチドを表す。加えて、ポリヌクレオチドは、プロモーターもしくは転写ターミネーターなどの調節エレメントをコードすることができ、または分泌シグナルペプチドもしくは機能的ドメインなどのポリペプチドもしくはタンパク質の特異的エレメントをコードすることができる。

20

#### 【0033】

本明細書において使用されるように、用語「同定する」は、所望の分子、例えば所望の特異性または機能を有する免疫グロブリン分子をコードするポリヌクレオチドが、複数のそのような分子またはそのような分子のライブラリーから区別される方法を表す。同定方法には、「選択」および「スクリーニング」が含まれる。本明細書において使用されるように、「選択」方法は、所望の分子がライブラリーから直接分離される方法である。例えば、本明細書に記載される一選択方法では、所望のポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、溶解事象を受けることにより残りの宿主細胞が付着している基材から放出されることによって、ライブラリーの残りをを含む宿主細胞から直接分離される。本明細書において使用されるように、「スクリーニング」方法は、所望の分子を含むプールが、所望の分子が検出されうるアッセイに付される方法である。次に、分子が検出されるプールのアリコートがより小さいプールに順次分割され、それらのプールは、所望の分子が高濃縮されたプールが得られるまで同様にアッセイされる。

30

#### 【0034】

##### 免疫グロブリン

本明細書において使用されるように、「免疫グロブリン分子」は、完全な2分子免疫グロブリンとして、すなわち一般に4個の「サブユニットポリペプチド」、すなわち2個の同一な重鎖および2個の同一な軽鎖を含む免疫グロブリンとして定義される。いくつかの場合、例えば、ラクダ科種由来の免疫グロブリン分子またはラクダ免疫グロブリンに基づき加工された免疫グロブリン分子では、完全免疫グロブリン分子は重鎖のみからなり、軽鎖を有さないことができる。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)を参照。したがって、「免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」は、一本鎖重鎖ポリペプチドまたは一本鎖軽鎖ポリペプチドを意味する。免疫グロブリン分子は、「抗体」とも呼ばれ、これらの用語は、本明細書において互換的に使用される。「単離された免疫グロブリン」は、タンパク質および他の物質の環境から実質的に取り出された、特異的抗原と結合する1つの免疫グロブリン分子、または2つ以上の免疫グロブリン分子を表す。

40

#### 【0035】

免疫グロブリン分子の「クラス」を決定する重鎖は、2つのサブユニットポリペプチドの大型の方であり、可変領域および定常領域を含む。「重鎖」は、完全長分泌型重鎖形態

50

、すなわち細胞から放出された形態、または膜結合型重鎖形態、すなわち膜貫通ドメインを含む形態、例えば、EEV特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントとの融合体のいずれかを意味する。免疫グロブリンの「クラス」は、宿主の種々の機能に役立つ免疫グロブリンの広い群を表す。例えば、ヒト免疫グロブリンは、5つのクラス、すなわち 重鎖を含むIgG、 $\mu$ 重鎖を含むIgM、 $\gamma$ 重鎖を含むIgA、 $\delta$ 重鎖を含むIgE、および  $\delta$ 重鎖を含むIgDに分類される。

【0036】

「軽鎖」は、重鎖のアミノ末端領域と結合するより小さい免疫グロブリンサブユニットを意味する。重鎖と同様に、軽鎖は、可変領域および定常領域を含む。異なる2種の軽鎖、 $\kappa$ および $\lambda$ があり、これらの対は、様々な重鎖のいずれかの対と結合して免疫グロブリン分子を形成することができる。

10

【0037】

免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、典型的には定常領域および可変領域を含む。大部分の種において、重鎖可変領域または $V_H$ ドメインと軽鎖可変領域または $V_L$ ドメインとが組み合わさって、抗原エпитープを特異的に認識する免疫グロブリン分子の部分である「相補性決定領域」、すなわちCDRを形成する。重鎖定常領域および軽鎖定常領域と結合している可変領域の大きいレパートリーは、動物における抗体産生細胞の分化時に、所与の可変領域をコードする遺伝子の形成を生じる一連の生殖細胞系DNAセグメントの再編成を経て産生される。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のさらなる変異は、分化した細胞における体細胞突然変異を経て起こる。免疫グロブリン分子の構造およびインビボ形成は、免疫学の分野の技術者に十分に理解されている。免疫グロブリンの多様性発生の簡潔な総説は、例えばHarlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988) (以下「Harlow」)、およびRoitt, et al., *Immunology* Gower Medical Publishing, Ltd., London (1985) (以下「Roitt」)に見出すことができる。HarlowおよびRoittは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0038】

本明細書に使用されるように、免疫グロブリン分子の「抗原特異的フラグメント」は、抗原と依然として結合することが可能な、免疫グロブリンの任意のフラグメントまたは変異体である。抗原特異的フラグメントには、Fab、Fab'および $F(ab')_2$ 、Fd、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖免疫グロブリン(例えば、重鎖またはその部分と軽鎖またはその部分とが融合したもの)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、scFvミニボディー(minibody)、Fabミニボディー、および二量体性scFv、ならびに特異的CDRが形成されるようにコンフォメーションで $V_L$ ドメインおよび $V_H$ ドメインを含む任意の他のフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0039】

抗原特異的免疫グロブリンフラグメントは、可変領域(1つまたは複数)を、単独で、または全体もしくは部分定常領域、例えば重鎖のCH1、CH2、CH3ドメイン、および軽鎖定常ドメイン、例えば、軽鎖のC $\kappa$ もしくはC $\lambda$ ドメインまたはその部分と組み合わせて含む。ある局面において、本明細書において開示された融合タンパク質は、EEV特異的膜タンパク質、例えばA56Rの膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントに融合されたCH1定常ドメインに融合された重鎖可変ドメインを含む。

40

【0040】

ある態様において、本発明は、抗原特異的免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントを単独または集合的にコードするポリヌクレオチドを同定する、すなわち選択またはスクリーニングする方法に関する。ある態様において、免疫グロブリンまたは抗体がEEVの表面にディスプレイされ、EEVが単離され、免疫グロブリンの部分、例えば $V_H$ 領域をコードするポリヌクレオチドが単離される、関心のある抗原特異性を有する免疫グロブリン分子を選択する方法が提供される。

【0041】

50

20

## 30

## 50

る。任意の1つのライブラリーの各メンバーは、同じ重鎖定常領域または軽鎖定常領域をコードしうるものの、ライブラリーは、少なくとも2つ、または少なくとも10、100、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、もしくは $10^9$ 個の異なる可変領域、すなわち共通の定常領域に関連している「複数の」可変領域を集合的に含みうる。

【0044】

他の態様において、ライブラリーは、軽鎖可変領域もしくは重鎖可変領域などの可変領域を含む、または軽鎖可変領域および重鎖可変領域の両方を含みうる、複数の免疫グロブリン単鎖フラグメントをコードしうる。

【0045】

一局面において、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのライブラリーを産生する方法が本明細書において提供される。真核細胞発現ベクター、例えばEEVにおいて融合タンパク質として構築された免疫グロブリンサブユニットポリペプチドのライブラリーがさらに提供され、ここで、免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、EEV特異的膜タンパク質、例えばA56Rの膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントに融合されている。

【0046】

「レシピエント細胞」または「宿主細胞」または「細胞」は、本明細書に記載のポリヌクレオチドライブラリーが導入される細胞または細胞の集団を意味する。本明細書に記載のライブラリーに適切な宿主細胞は、ワクシニアウイルス感染許容性の真核細胞である。適切な細胞系は、脊椎動物、哺乳動物、げっ歯動物、マウス、霊長類、またはヒトの細胞または細胞系でありうる。

【0047】

「宿主細胞の集団」は、本明細書において提供される「ライブラリー」を導入および発現することができる培養細胞の群を意味する。本明細書に記載のEEVライブラリー用の宿主細胞は、ワクシニアウイルス感染許容性でありうる。本発明の宿主細胞は、接着性、すなわち固体基材に付着して成長する宿主細胞の場合があり、あるいは宿主細胞は懸濁状態でありうる。

【0048】

上述のように、免疫グロブリン分子を同定するためのある方法は、宿主細胞の集団へのポリヌクレオチドの「第1」のライブラリー（例えばVH-CH1-A56R融合タンパク質をコードする）、ならびに同じ宿主細胞の集団へのポリヌクレオチドの「第2」のライブラリー（例えばVL領域をコードする）の導入を含む。第1のライブラリーおよび第2のライブラリーは相補的であり、すなわち、「第1」のライブラリーが免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするならば、「第2」のライブラリーは、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードすることにより、宿主細胞の集団内での免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントの集合が可能になり、その結果、EEVの表面に免疫グロブリンが発現されるか、またはディスプレイされる。

【0049】

本明細書に記載のライブラリー中に含有されるポリヌクレオチドは、「転写調節領域との機能的な関連」により免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードしうる。所与のポリヌクレオチド中の1つまたは複数の核酸分子は、機能的関係に置かれた場合に「機能的に関連」される。この関係は、ポリペプチドコード領域と調節配列（1つまたは複数）との間の場合があり、それらは、適切な分子（例えば転写活性化因子タンパク質、ポリメラーゼなど）が調節配列（1つまたは複数）に結合されるとコード領域の発現が可能になるように連結されている。「転写調節領域」には、非限定的にプロモーター、エンハンサー、オペレーター、および転写終結シグナルが挙げられ、転写調節領域は、ポリヌクレオチドの転写を指令するためにそのポリヌクレオチドと共に含まれる。例えば、プロモーターが免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードする核酸分子の転写を行うことが可能であったならば、そのプロモーターはその核酸分子と機能的に関連されたであろう。一般に、「機能的に関連される」は、ポリヌクレオチド内でDNA配列が連続的であるか

、または緊密に連結していることを意味する。しかし、いくつかの転写調節領域、例えばエンハンサーは、連続的である必要はない。

【 0 0 5 0 】

「調節配列」または「調節領域」は、特定の宿主生物における機能的に関連されるコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、および/またはエンハンサーを利用することが公知である。

【 0 0 5 1 】

多様な転写調節領域が当業者に公知である。下記にさらに詳細に考察されるように、適切な転写調節領域には、ポックスウイルス感染細胞の細胞質中で機能することが可能なプロモーターが含まれる。

【 0 0 5 2 】

ある態様において、本明細書に記載の融合タンパク質は、リンカー、例えば免疫グロブリン可変ドメインを定常ドメイン、例えばCH1、C-、もしくはC-ドメインに結合する、および/または定常ドメインをEEV特異的膜タンパク質、例えばA56Rの膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントに結合するリンカーを含みうる。リンカーは、例えば少なくとも約5個、少なくとも約10個、または少なくとも約15個のアミノ酸を含みうる。適切なリンカーは、当業者が同定することができる。

【 0 0 5 3 】

本明細書に記載の融合タンパク質が、重鎖定常領域、例えばCH1ドメインを含む場合、非限定的に鳥類、魚類、または哺乳類などの脊椎動物由来の免疫グロブリン重鎖、例えばヒト免疫グロブリン重鎖を含む任意の重鎖定常領域を利用することができる。例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖またはその部分、例えばCH1ドメインは、 $\mu$ 重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgM免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma$ -1重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgG1免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma$ -2重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgG2免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma$ -3重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgG3免疫グロブリンの重鎖、 $\gamma$ -4重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgG4免疫グロブリンの重鎖、 $\alpha$ -1重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgA1免疫グロブリンの重鎖、 $\alpha$ -2重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgA2免疫グロブリンの重鎖、 $\delta$ 重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgE免疫グロブリンの重鎖、または $\epsilon$ 重鎖もしくはそのフラグメント、すなわちIgD免疫グロブリンの重鎖でありうる。

【 0 0 5 4 】

本明細書に記載の膜結合型融合タンパク質は、重鎖ポリペプチドに融合した膜貫通ドメインによって、粒子、例えばワクシニアウイルス粒子（またはビリオン）、例えばEEV粒子（またはビリオン）の表面に係留することができる。ある態様において、膜貫通ドメインは、EEV特異的膜タンパク質の、すなわち細胞内ワクシニアウイルス粒子ではなく細胞外エンベロープワクシニアウイルス粒子の表面に発現されるタンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントの部分である。ある態様において、EEV特異的膜タンパク質は、ワクシニアHAタンパク質であるA56Rである。本明細書において互換的に使用される「細胞内ドメイン」、「細胞質ドメイン」、「サイトゾル領域」または関連する用語は、細胞内部である融合ポリペプチドの部分を意味する。

【 0 0 5 5 】

融合タンパク質または他のライブラリータンパク質が免疫グロブリン軽鎖またはそのフラグメントを含む態様において、任意の動物種由来の任意の免疫グロブリン軽鎖、例えば鳥類、魚類、または哺乳類などの脊椎動物由来の免疫グロブリン軽鎖、例えばヒト軽鎖、例えばヒト軽鎖および $\kappa$ 軽鎖を使用することができる。軽鎖は、重鎖と結合して、免疫グロブリン分子の抗原結合タンパク質を産生することができる。

【 0 0 5 6 】

本明細書に記載の重鎖融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのライブラリーの各メンバーは、(a) そのライブラリーの全メンバーに共通の免疫グロブリン定常領域、例えばCH1ドメイン、例えばCH1ドメインまたは $\mu$ CH1ドメインを含む第1のポリペプチド

10

20

30

40

50



セグメントをコードする第1の核酸分子、(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) 特異的膜タンパク質 (例えばA56R) の細胞外および膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2の核酸分子であって、第1の核酸分子の直接下流でフレーム内である第2の核酸分子 (直接融合しているか、またはリンカーによって結合しているかのいずれか)、および(c) 免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第3のポリペプチドセグメントをコードする第3の核酸分子であって、第1の核酸分子の直接上流でフレーム内である第3の核酸分子 (直接融合しているか、またはリンカーによって結合しているかのいずれか) を含む。

【0057】

本明細書に記載の軽鎖融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドライブラリーの各メンバーは、(a) ライブラリーの全メンバーに共通の免疫グロブリン定常領域、例えばC-ドメインまたはC-ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントをコードする第1の核酸分子、(b) ワクシニア細胞外エンベロープウイルス (EEV) 特異的膜タンパク質 (例えばA56R) の細胞外および膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2の核酸分子であって、第1の核酸分子の直接下流でフレーム内である第2の核酸分子 (直接融合しているか、またはリンカーによって結合しているかのいずれか)、および(c) 免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第3のポリペプチドセグメントをコードする第3の核酸分子であって、第1の核酸分子の直接上流でフレーム内である第3の核酸分子 (直接融合しているか、またはリンカーによって結合しているかのいずれか) を含む。

【0058】

EEV特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントに融合していない免疫グロブリン重鎖または免疫グロブリン軽鎖のライブラリーを、宿主細胞に同時感染させるために使用して、機能的抗原結合免疫グロブリンフラグメントを産生するための「相補的」免疫グロブリン鎖を提供することができる。そのようなライブラリーは、例えば米国特許第7,858,559号に詳細に記載されている。

【0059】

重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドのライブラリーは、複数の、すなわち少なくとも2の、または少なくとも10、100、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、または $10^9$ の異なる可変領域を含有する。当業者に周知のように、軽鎖可変領域は、それぞれ軽鎖 $V_L$ 領域、具体的には $V_L$ 領域または $V_L$ 領域、および軽鎖J領域、具体的にはJまたはJ領域を含む再配列された核酸分子によってコードされる。同様に、重鎖可変領域は、それぞれ重鎖 $V_H$ 領域、D領域およびJ領域を含む再配列された核酸分子によってコードされる。これらの再配列は、細胞分化時にDNAレベルで起こる。重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする核酸分子は、例えば、特定のエピトープに対して特異性を有する抗体を発現するように最終分化した成熟B細胞および形質細胞からのPCRによって得ることができる。そのうえ、特異的抗原に対する抗体が望ましいならば、可変領域は、その抗原を免疫処置され、それによって抗原と相互作用する抗体可変領域の広範なレパートリーを産生した動物の成熟B細胞および形質細胞から単離することができる。あるいは、より多様なライブラリーが望ましいならば、可変領域は、免疫グロブリン遺伝子の再配列を受けたが、自己および非自己のどちらの抗原にも曝露されていない前駆細胞、例えばプレB細胞および未熟B細胞から単離することができる。例えば、可変領域は、複数のドナーからプールされた正常ヒト骨髄からのRT-PCRによって単離することができる。あるいは、可変領域は、例えば合成オリゴヌクレオチドの生成により実験室内で製造された合成性の場合があり、または免疫グロブリン遺伝子の再配列を生じる生殖細胞系DNAのインビトロ操作を経て得ることもできる。

【0060】

免疫グロブリン定常領域および可変領域をそれぞれコードする第1の核酸分子および第2の核酸分子に加えて、上記の本発明のポリヌクレオチドライブラリーの各メンバーは、さらに、可変領域をコードする核酸分子の直接上流でフレーム内に、シグナルペプチドをコードする追加的な核酸分子を含む。

## 【0061】

「シグナルペプチド」は、例えば、宿主細胞の表面への新生免疫グロブリンポリペプチドサブユニットの輸送を指令するポリペプチド配列を意味する。シグナルペプチドは、また、当技術分野において「シグナル配列」、「リーダー配列」、「分泌シグナルペプチド」、または「分泌シグナル配列」と呼ばれる。シグナルペプチドは、通常、完全または「未熟」ポリペプチドの部分として発現され、通常、N末端に位置する。

## 【0062】

本発明の宿主細胞を含む全ての細胞は、排出されるよう運命づけられた分泌型免疫グロブリンサブユニットポリペプチドを含むタンパク質が細胞から分泌される構成的分泌経路をもつ。これらのタンパク質は、修飾が起こりうるER-ゴルジプロセッシング経路を通過する。さらなるシグナルがタンパク質上に検出されないならば、そのタンパク質は、宿主細胞またはウイルス粒子、例えばEEVビリオンの表面に発現された内在性膜成分として、分泌または挿入のために細胞表面に方向付けられる。膜結合型の免疫グロブリンサブユニットポリペプチドは、輸送停止シグナルまたは「膜貫通ドメイン」の存在によってER膜内に保持されることを除いて、最初ER内腔を通過して分泌型と同じ経路をたどる。膜貫通ドメインは、膜を横断するときにヘリックスコンフォメーションを採用するアミノ酸残基約20個の疎水性ストレッチである。膜包埋タンパク質は、形質膜のリン脂質二重層内に係留される。分泌型タンパク質と同様に、膜貫通タンパク質のN末端領域は、膜を通過するシグナルペプチドを有し、そのシグナルペプチドはER内腔に出ていくときに切断される。

## 【0063】

新たに合成された免疫グロブリン重鎖は、BiP (Hsp70分子シャペロンファミリーのメンバー) と呼ばれるシャペロンタンパク質によってER内での滞留を続ける。重鎖CH1ドメインとそのパートナーである軽鎖のCLドメインとの対形成は、BiPの解離、最終フォールディングおよびジスルフィド結合形成、ならびに集合した抗体のERからの放出を誘導する。次に、抗体は、細胞の通常の分泌経路を利用し、ゴルジを経由して細胞表面に輸送され、細胞表面で分泌されるか、または細胞表面に保持されるか(抗体が膜貫通ドメインを有する場合)のいずれかである。Daniel et al., Molecular Cell 34:635-36 (2009)を参照。

## 【0064】

本明細書において提供される適切なシグナルペプチドは、天然に生じる免疫グロブリンシグナルペプチド、すなわち天然に生じる重鎖または軽鎖転写物の部分である配列によってコードされるシグナルペプチド、またはそれと機能的に関連される免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの分泌を指令する能力を保持する、その配列の機能的誘導体のいずれかでありうる。あるいは、異種シグナルペプチド、またはその機能的誘導体を使用することができる。ある局面において、シグナルペプチドは、ワクシニアウイルスA56Rタンパク質またはその機能的誘導体のシグナルペプチドでありうる。

## 【0065】

他の局面において、本明細書に記載のポリヌクレオチドのライブラリーのメンバーは、さらに、異種ポリペプチドをコードする追加の核酸分子を含みうる。そのような異種ポリペプチドをコードする追加の核酸分子は、免疫グロブリン可変ドメインもしくは免疫グロブリン定常ドメイン、またはEEV特異的膜タンパク質をコードする核酸分子の上流または下流でありうる。

## 【0066】

追加の核酸分子によってコードされる異種ポリペプチドは、レスキュー配列でありうる。レスキュー配列は、免疫グロブリンもしくはそのフラグメントまたはそれをコードするポリヌクレオチドのいずれかを精製または単離するために使用することができる配列である。したがって、例えば、ペプチドレスキュー配列には、Niアフィニティーカラムで使用するための6-Hisタグ、および検出、免疫沈降、またはFACS(蛍光活性化細胞分類)用のエピトープタグなどの精製配列が含まれる。適切なエピトープタグには、myc(市販の9E10抗体と共に使用するため)、細菌酵素BirAのBSPビオチン化標的配列、fluタグ、LacZ、およびGSTが含まれる。追加の核酸分子は、また、ペプチドリッカーをコードしうる。

## 【0067】

本明細書に記載の様々なライブラリーに含まれるポリヌクレオチドは、適切な宿主細胞に導入することができる。適切な宿主細胞は、例えば、表面に付着した免疫グロブリン分子を発現することが可能であることによって、またはワクシニアウイルス感染に許容性であることによって特徴づけることができる。ポリヌクレオチドは、当業者に周知の方法によって宿主細胞に導入することができる。ポリヌクレオチドがウイルスベクター、例えばワクシニアウイルスの部分である場合、宿主細胞への導入は、標準的な感染によって好都合に実施される。

## 【0068】

ポリヌクレオチドの第1および第2のライブラリーは、任意の順序で、または同時に宿主細胞に導入することができる。例えば、ポリヌクレオチドの第1および第2のライブラリーの両方が、感染性または不活性化のどちらであれワクシニアウイルスベクター内に構築される場合、そのベクターは、混合物として同時感染により導入することができるか、または連続感染で導入することもできる。一方のライブラリーがワクシニアウイルスベクター内に構築され、他方がプラスミドベクター内に構築される場合、導入は、一方のライブラリーを他方の前に導入することによって実施することができる。

## 【0069】

ポリヌクレオチドの第1および第2のライブラリーを宿主細胞に導入した後に、EEV表面での免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントの発現を起こさせる。「発現させる」は、宿主細胞に導入されたベクターに免疫グロブリンサブユニットポリペプチドの転写および翻訳を受けさせること、および宿主細胞が、完全に集合した免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントを、EEV特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含むポリペプチドセグメントとの融合体として膜表面に輸送させることを可能にすることを意味する。典型的には、発現させることは、ポリヌクレオチドが適切な条件で導入された宿主細胞を、発現させるためにインキュベーションすることを必要とする。当業者に周知であるように、それらの条件および発現させるために必要な時間は、宿主細胞の選択およびベクターの選択に基づき変動するであろう。

## 【0070】

ある態様において、表面に免疫グロブリン分子を発現させた宿主細胞および/もしくはワクシニアビリオン、または細胞培地中に分泌された可溶性免疫グロブリン分子が、次に、抗原と接触される。本明細書において使用されるように、「抗原」は、抗体、免疫グロブリン分子、またはその抗原特異的フラグメントに特異的に結合することができる任意の分子である。「特異的に結合する」は、抗原が抗体のCDRに結合することを意味する。CDRと特異的に相互作用する抗原の部分は、「エピトープ」または「抗原決定基」である。抗原は、単一のエピトープを含みうるが、典型的には抗原は、少なくとも2つのエピトープを含み、抗原の大きさ、コンフォメーション、および種類に応じて任意の数のエピトープを含みうる。

## 【0071】

抗原は、典型的にはペプチドまたはポリペプチドであるが、任意の分子または化合物でありうる。例えば、有機化合物、例えばジニトロフェノールもしくはDNP、核酸、糖質、または任意のこれらの化合物の混合物（ペプチドもしくはポリペプチドを有するもしくは有さない）が適切な抗原でありうる。ペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、アミノ酸約4~5個と考えられる。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも7個、少なくとも9個、または少なくとも約15個から約30個の間のアミノ酸を含有しうる。CDRは、抗原ペプチドまたは抗原ポリペプチドをその三次形態で認識することができるので、エピトープを含むアミノ酸は、連続的である必要はなく、ある場合には同じペプチド鎖でさえあってもよい。本発明において、ペプチド抗原またはポリペプチド抗原は、アミノ酸が少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、および約15個から約30個の間の配列を含有しうる。ある態様において、抗原エピト

ープを含むまたは抗原エプトープからなるペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個のアミノ酸残基長である。抗原は任意の形態であることができ、例えば溶液に溶解した遊離であることができ、または任意の基材に付着しうる。適切な基材は、本明細書に開示されている。ある態様において、抗原は、以下でより詳細に記載される抗原発現ワクシニアウイルスの部分、例えばEEVビリオンでありうる。

#### 【0072】

任意の抗原に特異的な免疫グロブリン分子は、本明細書に開示される方法に従って產生することができる。ある態様において、抗原は、「自己」抗原、すなわち產生される免疫グロブリン分子と同じ種由来の抗原である。一例として、ヒト腫瘍抗原に対するヒト抗体を產生することが望ましい場合がある。他の望ましい「自己」抗原には、サイトカイン、受容体、リガンド、糖タンパク質、およびホルモンが含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0073】

感染因子上の抗原に対する抗体もまた、開示された方法によって同定および選択することができる。そのような抗原の例には、細菌抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原、および真菌抗原が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0074】

免疫グロブリン分子がEEVの表面に発現される、ある選択スキームおよびスクリーニングスキームでは、上記のように產生された組み換えEEVビリオンは、EEV表面に発現された免疫グロブリン分子のCDRを特異的に認識する抗原を、CDRに結合することを可能にし、それにより、抗原と特異的に結合する組み換えEEVビリオンを、抗原と結合しないEEVビリオンと区別することを可能にする方法によって、抗原と「接触」される。抗体の抗原特異的結合ドメインを発現している組み換えEEVビリオンを、抗原と相互作用することを可能にする任意の方法が含まれる。例えば、EEVビリオンが懸濁状態であって、抗原が固体基材に付着している場合、抗原に特異的に結合する組み換えEEVビリオンは固体基材上に捕捉され、抗原と結合しないこれらのビリオンを洗浄除去することを可能にし、続いて結合している組み換えEEVビリオンを回収することが可能になる。組み換えEEVビリオンを抗原に接触させる方法は、本明細書に開示されている。

20

#### 【0075】

抗原と特異的に結合する組み換えEEVビリオンを回収した後、第1のライブラリーのポリヌクレオチドをそれらのEEVビリオンから回収することができる。「回収」は、望ましくない成分からの望ましい成分の粗製分離を意味する。例えば、抗原と結合する組み換えEEVビリオンは、抗原が被覆された固体基材、例えば磁気ビーズへの付着に基づき「回収」ことができ、次に磁石で磁気ビーズを分離することができる。

30

#### 【0076】

ポリヌクレオチドの回収は、当業者に公知の任意の標準方法によって達成することができる。ある態様において、ポリヌクレオチドは、抗原と結合した感染性EEVビリオンを採取することによって回収される。

#### 【0077】

当業者によって容易に認識されるように、免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの同定は、上記のように、2ラウンド以上の選択を要しうるし、そして2ラウンド以上の上記のスクリーニングを必然的に要する。単一ラウンドの選択は、所望の第1の免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする純粋なセットのポリヌクレオチドの単離を必ずしも生じないかもしれず、第1のラウンドの後に得られる混合物は所望のポリヌクレオチドが濃縮されている可能性があるが、非標的挿入配列が混入しているかもしれない。したがって、記載されるように、第1の選択工程を、1回または複数回繰り返すことができ、または繰り返さなければならず、それにより、所望の免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが濃縮される。この態様の第1の工程を繰り返すために、上記のように回収されたポリヌクレオチドを含むEEVは、感染を介して宿主細胞

40

50

胞集団に導入することができる。ポリヌクレオチドの第2のライブラリーも、例えばそのライブラリー中のポリヌクレオチドによってコードされる相補的免疫グロブリン分子（例えば軽鎖）を発現することが可能なワクシニアウイルスを感染させることによって、これらの宿主細胞に導入され、組み換えEEVビリオンの膜表面での免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントの発現が可能になる。組み換えEEVビリオンも同様に抗原と接触され、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子を発現するEEVビリオンから第1のライブラリーのポリヌクレオチドが再び回収される。これらの工程を1回または複数回繰り返すと、免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントの部分として抗原と特異的に結合する、かつ/または所望の機能的特徴を有する、免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする第1のライブラリー由来ポリヌクレオチドの濃縮が生じる。

10

#### 【0078】

上記の第1のライブラリーから所望のポリヌクレオチドを適切に濃縮した後、回収されたポリヌクレオチドが「単離」される、すなわちそれらがその自然環境から実質的に取り出され、抗原特異的免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードしない、ライブラリー中のポリヌクレオチドから大部分分離される。例えば、ベクター内に含有されるクローニング済みポリヌクレオチドは、単離されたと見なされる。例えば軽鎖と組み合わせたときに同じ抗原と特異的に結合する、2種以上の異なる免疫グロブリン融合ポリペプチドを本明細書に記載の方法によって回収することができることが理解される。したがって、同じ抗原に結合するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの混合物も、「単離された」と見なされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞もしくは組み換えワクシニア内に、例えばEEVビリオン内に維持されているポリヌクレオチド、または溶液状態の（部分的もしくは実質的に）精製されたDNA分子が含まれる。しかし、混合ライブラリーのメンバーであるクローン内に含有され、例えば抗原特異的免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードすることによってライブラリーの他のクローンから単離されていないポリヌクレオチドは、本発明の目的のための「単離」が行われていない。例えば、ウイルスベクター内に含有されるポリヌクレオチドは、回収され、場合によりブランク精製された後に「単離」されている。

20

#### 【0079】

抗原が2以上のエピトープを含む場合があり、いくつかの異なる免疫グロブリン分子が任意の所与のエピトープに結合できるとすると、いくつかの適切なポリヌクレオチド、例えば2、3、4、5、10、100またはそれ以上のポリヌクレオチドがこの態様の第1工程から回収され、その全てが免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードすることができ、その融合ポリペプチドは、予備選択されたポリヌクレオチドまたは第2のライブラリーのポリヌクレオチドによってコードされる適切な免疫グロブリンサブユニットポリペプチドと組み合わせると、関心のある抗原と特異的に結合することが可能な免疫グロブリン分子またはその抗原結合フラグメントを形成することが考えられている。第1のライブラリーから回収された異なるポリヌクレオチドのそれぞれは、別々に単離されることが考えられている。

30

#### 【0080】

第1のライブラリーから1または複数の適切なポリヌクレオチドが単離された後、この態様の第2工程において、第1のライブラリーから単離されたポリヌクレオチドによってコードされる免疫グロブリン融合ポリペプチド（1または複数）と結合して、関心のある抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子またはその抗原結合フラグメントを形成することが可能な免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードする1または複数のポリヌクレオチドが第2のライブラリーで同定される。

40

#### 【0081】

本明細書において、抗原結合分子の発現のためのワクシニアウイルスベクターが提供され、ここで、抗原結合分子、例えば免疫グロブリン重鎖可変領域およびCH1は、EEV特異的膜タンパク質との融合体として発現される。ある態様において、重鎖は、EEV融合タンパク質として回収することができ、そして軽鎖のライブラリーまたは個別の予備選択された軽鎖は、ワクシニアウイルスまたは他のベクター、例えばプラスミドベクターから可溶性

50

タンパク質として発現させることができる。

【0082】

ある局面において、可溶性相補鎖、例えば軽鎖を発現しているウイルスの不活性化は、4'-アミノメチル-トリオキサレン（ソラレン）を用い、次にウイルスベクターを紫外線（UV）に曝露して実施することができる。ウイルスのソラレンおよびUV不活性化は、当業者に周知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるTsung, K., et al., J Virol. 70:165-171 (1996)を参照。

【0083】

真核細胞において免疫グロブリンサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの2つのライブラリー（ここで、一方のサブユニットはEEV特異的膜タンパク質との融合体として発現される）から免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントを集合および発現できることは、細菌系において単鎖抗体を産生する方法に比べて、2工程選択プロセスが多様な特異性を有する免疫グロブリン分子またはその抗原特異的フラグメントの選択のための基礎となりうる点で、顕著な改善をもたらす。

【0084】

ワクシニアEEVベクター

ボックスウイルスは、核外である宿主細胞の細胞質中でのみ複製するので、DNAウイルスの中でユニークである。ワクシニアウイルスは、その複製サイクルの間に、その外膜が異なる4つの感染形態、すなわち細胞内成熟ビリオン（IMV）、細胞内エンベロープビリオン（IEV）、細胞関連エンベロープビリオン（CEV）および細胞外エンベロープビリオン（EEV）を産生する。一般的な見解は、IMVは単一のリボタンパク質膜からなり、一方CEVおよびEEVは2つの膜層によって囲まれ、IEVは3つのエンベロープを有するというものである。EEVは、宿主細胞の形質膜から排出され、EEV膜はトランスゴルジ由来である。

【0085】

感染後、ウイルスはその膜（1つまたは複数）を失い、DNA/タンパク質コアは微小管に沿って細胞内に輸送される。初期（early）ワクシニアmRNA（「初期」はDNA前の複製として定義される）によってコードされるタンパク質は、ワクシニアコアのアンコーティングおよびその後のDNA複製に繋がる。この複製は、本質的にERの最上部に位置する「ウイルス工場（viral factory）」と名付けられたところで起こる。ウイルス工場内で未熟ビリオン（IV）は集合し、プロセッシングされてIMV（細胞内成熟ウイルス）を形成する。IMVはER由来の膜を含有する。大部分のIMVは細胞溶解によって細胞から放出される。一部のIMVは微小管に載ってトランスゴルジネットワークまたは初期エンドソームの膜によって包まれる部位まで輸送される。二重膜によるIMV粒子のラッピングは、IEV（細胞内エンベロープウイルス）と呼ばれるワクシニアの形態を創出する。次に、IEVは微小管に載って細胞表面まで輸送される。IEV外膜は、形質膜と融合して細胞表面にCEV（細胞関連エンベロープウイルス）を露出する。宿主細胞からのアクチン重合は、CEVが隣接細胞に感染することを推進することがあり、あるいはウイルスはEEVとして放出されうる。例えば、Kim L. Roberts and Geoffrey L. Smith. Trends in Microbiology 16(10):472-479 (2008); Geoffrey L. Smith, et al., Journal of General Virology 83:2915-2931 (2002)を参照。

【0086】

少なくとも6つのウイルスコードタンパク質がEEVエンベロープの成分として報告されている。これらのうち、4つのタンパク質（A33R、A34R、A56R、およびB5R）は糖タンパク質であり、1つ（A36R）は非グリコシル化膜貫通タンパク質であり、1つ（F13L）はパルミチル化表在性膜タンパク質である。例えば、Lorenzo et al., Journal of Virology 74(22):10535 (2000)を参照。感染の間に、これらのタンパク質はゴルジ複合体に局在し、そこで感染性ウイルスに組み入れられ、そのウイルスは次に細胞外媒質中に輸送および放出される。本明細書において提供されるように、免疫グロブリン融合ポリペプチド、例えば可変重鎖は、例えばEEV特異的膜タンパク質、例えばA56Rとの融合タンパク質としてEEV膜に結合される。

【0087】

本明細書において提供されるEEV融合タンパク質は、任意の適切なワクシニアウイルス内に発現させることができる。ある態様において、感染性ウイルスが産生されるように、EEV融合タンパク質をコードするDNAをベクターの成長および複製に必須ではないワクシニアウイルスゲノム領域に挿入することができる。ワクシニアウイルスゲノムの多様な必須ではない領域が特徴づけられているものの、外来遺伝子の挿入のために最も広く使用される遺伝子座は、ゲノム内のHindIII Jフラグメント内に位置するチミジンキナーゼ遺伝子座である。

#### 【0088】

免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのライブラリーは、ボックスウイルス感染細胞の細胞質中で機能する転写調節領域と機能的な関連下でワクシニアウイルスベクターに挿入される。

10

#### 【0089】

ボックスウイルスの転写調節領域は、プロモーターおよび転写終結シグナルを含む。ボックスウイルスにおける遺伝子発現は、時間的に調節され、初期、中期、および後期遺伝子用のプロモーターは、様々な構造を有する。ある種のボックスウイルス遺伝子は構成的に発現され、これらの「初期-後期」遺伝子用のプロモーターは、ハイブリッド構造を有する。合成初期-後期プロモーターも開発されている。Hammond J.M., et al., J. Virol. Methods 66: 135-8 (1997); Chakrabarti S., et al., Biotechniques 23:1094-7 (1997)を参照。本明細書において開示される態様について、任意のボックスウイルスプロモーターを使用することができるが、選択された宿主細胞および/または選択スキームに基づき、初期、後期、または構成的プロモーターの使用が望ましい場合がある。ある態様において、構成的プロモーターが使用される。本明細書に記載の方法において使用するために適切なプロモーターは、初期/後期7.5kDプロモーター、または初期/後期H5プロモーター（またはその変異体）である。

20

#### 【0090】

##### 3分子組み換え法

伝統的に、ワクシニアウイルスなどのボックスウイルスベクターは、複合ライブラリーからこれまで未知の関心のある遺伝子を同定するために使用されていない。その理由は、ワクシニアに関してライブラリーを構築およびスクリーニングする高効率で高力価の産生方法が存在しなかったからである。ワクシニアウイルスにおける異種タンパク質発現の標準方法は、インビボ相同組み換えおよびインビトロ直接連結反応を含む。相同組み換えを用いたとき、組み換えウイルスの産生効率は約0.1%以下の範囲である。直接連結反応を用いた組み換えウイルスの産生効率の方が高いものの、得られる力価は相対的に低い。したがって、ワクシニアウイルスベクターの使用は、タンパク質発現およびワクチン開発のための予め単離されたDNAのクローニングに限定されてきた。

30

#### 【0091】

Zauderer、PCT公報W000/028016および米国特許第7,858,559号に開示されたように、3分子組み換えは、ワクシニアウイルスにおいてライブラリーを産生するための高効率で高力価の産生方法である。3分子組み換え方法を用いて、本発明者は、少なくとも90%の効率および直接連結反応で得られる力価の少なくとも100倍の力価で組み換えウイルスの生成を達成した。

40

#### 【0092】

ある態様において、本明細書に記載の免疫グロブリン融合ポリペプチドを発現することが可能なポリヌクレオチドのライブラリーは、3分子組み換えによってボックスウイルスベクター、例えばワクシニアウイルスベクター内に構築することができる。

#### 【0093】

ある態様において、ワクシニアウイルスH5プロモーターとの機能的関連により、免疫グロブリン重鎖CH1およびワクシニアウイルスA56Rタンパク質の少なくとも膜貫通部分をコードするポリヌクレオチドを含む融合ポリペプチドのライブラリーを産生するための転移プラスミドが提供される。プロモーターを有する例示的なベクターは、本明細書において

50

SEQ ID NO:1と呼ばれる配列:

AAAAAATGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCAT  
AAATTCCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAG**GCGCGC**ACTCCG  
AGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGCAGCCTGGCGAGACCGTGAGGATCAGCTGC  
AAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAAGTGGGTGAAGCAGGCCCTGGCAAGGG  
CCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCTACCTACGCCGCCGACTTCAAGA  
GGAGGTTACCTTCAGCCTGGAGACCAGCGCCAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAACCTGAAG  
AACGACGACACCGCCACCTACTTCTGCGCCAAGTACCCTCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTA  
CTTCGACGTGTGGGGCGCCGGCACCAC**GGTCACCG**TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC  
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGGCCCTGACCAGCGGCGTGCA  
CACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCT  
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  
GACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGA  
GTTGATTGTAAATACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTCAC  
CGGAAACTAGTTCTAAGAAACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCTGGTATTCGAAATC  
GCGACTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATACAGACACCGTCACATACACTAGTGA  
TAGCATTAATACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATTA  
CTGATAAAGAAGATCATACAGTTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGA  
ATTGTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATAC  
AGTACCACCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGACTTTG  
TAGAAATATTTGGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGGCCGTGGCAATTTTCTGTATTACATAT  
TATATATATAATAAACGTTACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGTCTAG

10

20

二重下線 - H5プロモーター

一重下線 - リーダーペプチド

波下線 - 代表的重鎖可変領域

太下線 - IgG CH1ドメイン

下線なし - ワクシニアA56R

太斜体 - BssHIIおよびBstEII可変遺伝子クローニング部位

30

を含むpJEM1である。PCR増幅された様々な異なる重鎖可変領域は、上記に太斜体字で表示されるBssHIIおよびBstEIIユニーク部位にフレーム内挿入することができる。

【0094】

プラスミドpJEM1は、米国特許第7,858,559号に記載のp7.5/tkの誘導体である。pJEM1は、米国特許第7,858,559号に記載のように組み換えを可能にするワクシニアゲノムと同一性の隣接領域を保持する。しかし、p7.5/tk中の発現カセット（プロモーターおよび発現配列）の代わりに、pJEM1は以下の要素を含有する：

ワクシニアウイルスH5プロモーター

リーダーペプチド

可変重鎖をクローニングするための5'BssHIIクローニング部位

40

重鎖可変領域

可変重鎖をクローニングするための3'BstEIIクローニング部位

IgG CH1ドメイン

ワクシニアA56R

【0095】

これらの要素は、図1およびSEQ ID NO:1にリストされている。このカセットは、合成的に創出することができる。

【0096】

別の態様において、ワクシニアウイルスp7.5プロモーターとの機能的関連により免疫グロブリン 軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む本発明の転移プラスミ

50



ドは、本明細書においてSEQ ID NO:2と呼ばれる配列：

GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCCCATGGGA  
TGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC**GTGCACTT**GAC  
**TCGAG**ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT  
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT  
CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG  
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC  
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA  
GCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGTCGAC

10

を含むpVKEである。PCR増幅された 軽鎖可変領域は、上に太字で表示されるユニークApaLI)およびXhoI部位にフレーム内挿入することができる。

【0097】

さらに、pVKEは、上記第1のライブラリーのポリヌクレオチドを選択する際に、プラスミドベクター内に第2のライブラリーのポリヌクレオチドを有することが望ましい態様に使用することができる。

【0098】

別の態様において、ワクシニアウイルスp7.5プロモーターとの機能的関連により免疫グロブリン 軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む本発明の転移プラスミドは、本明細書においてSEQ ID NO:3と呼ばれる配列：

20

GGCCAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCCCATGGGA  
TGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC**GTGCACTT**GAC  
CTCGAGA**AAGCTT**ACCGTCCTACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT  
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC  
TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC  
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC  
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA  
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT  
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGTCGAC

を含むpVLEである。PCR増幅された 軽鎖可変領域は、上に太字で表示されるユニークApaLIおよびHindIII部位にフレーム内挿入することができる。

30

【0099】

さらに、pVLEは、上記第1のライブラリーのポリヌクレオチドを選択する際に、プラスミドベクター内に第2のライブラリーのポリヌクレオチドを有することが望ましい態様で使用することができる。

【0100】

本発明の実施は、特に示さない限り、当業者の技能の範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組み換えDNA、および免疫学の従来技法を使用する。そのような技法は、文献に十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al., 米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 論文、Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols.

40

50

154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); および Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) を参照。

#### 【 0 1 0 1 】

抗体工学の一般原理は、*Antibody Engineering*, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995) に示されている。タンパク質工学の一般原理は、*Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., et al., Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995) に示されている。抗体および抗体-ハプテン結合の一般原理は、Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); および Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, New York, NY (1984) に示されている。追加的に、当技術分野において公知で、具体的に説明されていない免疫学の標準方法は、概して *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al. (eds), *Basic and Clinical-Immunology* (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) および Mishell and Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., New York (1980) に準拠する。

#### 【 0 1 0 2 】

免疫学の一般原理を示している標準的な参考著作物には、*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., et al., eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., et al., eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984) が挙げられる。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 0 3 】

##### 実施例1

##### CH1-A56R融合タンパク質の調製

重鎖融合タンパク質を、組み換えワクシニアウイルスの細胞表面に発現された特異的免疫グロブリンセグメントの選択を容易にするように構築した。

#### 【 0 1 0 4 】

ウエスタンリザーブワクシニアウイルス由来A56Rの細胞外および膜貫通ドメインに融合されたC のヒト重鎖CH1ドメイン（本明細書においてCH1-A56Rと称する）ならびにC35特異的VH（H2124）を含む融合タンパク質をコードする発現ベクターを以下の方法によって構築した。

#### 【 0 1 0 5 】

##### pJEM1

本明細書において「pJEM1」と称する、ヒト免疫グロブリン定常領域（CH1）、ワクシニアA56Rのフラグメントおよびヒト重鎖可変領域（例えばH2124）の挿入用カセットをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを構築した。簡潔に言うと、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPCT公報W000/028016に記載のように産生されたp7.5/tkを以下の方法によってpJEM1に変換した。

#### 【 0 1 0 6 】

##### IgG CH1

ヒトIgG重鎖をコードするcDNAは、骨髄RNAから、Clontech, Palo Alto, CAから入手可能なSMART（商標）RACE cDNA Amplification Kitを使用して単離した。PCRは、5'プライマー

huCyl-5B: 5' ATTAGGATCC GGTCACCGTC TCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO:4)

および3' プライマー

huCyl-3S: 5' ATTAGTCGAC TCATTTACCC GGAGACAGGG AGAG 3' (SEQ ID NO:5)

を使用して実施した。PCR産物は以下の要素を含んでいた:BamHI-BstEII-(VHのアミノ酸番号111~113をコードするヌクレオチド)-(C 1のアミノ酸番号114~478をコードするヌクレオチド)-TGA-SaII。この産物をBamHIおよびSaII部位でpBluescriptII/KS内にサブクローニングし、C 1のCH1ドメイン内のアミノ酸番号191および192に対応する第2のBstEII部位を、アミノ酸配列に変化を加えずに部位特異的突然変異誘発によって除去した。プラスミドpBluescriptII/KSをBstEIIおよびSaIIで消化し、小さい方の約1KbのDNAフラグメントをゲル精製した。次に、この小さい方のフラグメントを、フォワードプライマー

CH1(F)-5'-CAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC-3' (SEQ ID NO:6)

(BstEII制限部位を斜体および下線付きで示す) およびリバースプライマー

CH1(R) 5'-AACTTTCTTGTCCACCTTGTTGTTG-3' (SEQ ID NO:7)

を使用するPCR反応でのテンプレートとして使用した。得られた約320塩基対のPCR産物をゲル精製した。

【0107】

完全長IgG

ヒトIgG重鎖をコードするcDNAは、Clontech, Palo Alto, CAから入手可能なSMART (商標) RACE cDNA Amplification Kitを使用して骨髄RNAから単離した。PCRは、5' プライマー-huC 1-5B: (SEQ ID NO:4) および3' プライマー-huC 1-3S: (SEQ ID NO:5) を使用して実施した。PCR産物は以下の要素を含んでいた: BamHI-BstEII-(VHのアミノ酸番号111~113をコードするヌクレオチド)-(C 1のアミノ酸番号114~478をコードするヌクレオチド)-TGA-SaII。この産物をBamHIおよびSaII部位でpBluescriptII/KS内にサブクローニングし、C 1のCH1ドメイン内のアミノ酸番号191および192に対応する第2のBstEII部位を、アミノ酸配列に変化を加えずに部位特異的突然変異誘発によって除去した。プラスミドpBluescriptII/KSをBstEIIおよびSaIIで消化し、完全長IgG1に対応する993塩基対のDNAフラグメントをゲル精製した。

【0108】

A56R (より長い形態)

ストック、膜貫通、および細胞内ドメイン (Genbank受託番号YP\_233063) を含むワクシニアウイルス (ウエスタンリザーブ) 由来A56Rヘマグルチニンタンパク質のアミノ酸番号108~314をコードするDNAフラグメントは、単離後のウエスタンリザーブワクシニアウイルスDNAからフォワードプライマー

A56R(F)

5'-CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAG-3' (SEQ ID NO:8)

およびリバースプライマー

A56R(R)

5'-TATAGTCGACCTAGACTTTGTTCTCTGTTTTGTATTTACG-3' (SEQ ID NO:9)

(SaII制限部位を斜体および下線付きで示す) を用いて増幅した。得られた約660塩基対のPCR産物をゲル精製した。

【0109】

A56R (より短い形態)

10

20

30

40

50

ストーク、膜貫通、および細胞内ドメイン (Genbank受託番号YP\_233063) を含むワクシニアウイルス (ウエスタンリザーブ) 由来A56Rヘマグルチニンタンパク質のアミノ酸番号240~314をコードするDNAフラグメントは、単離後のウエスタンリザーブワクシニアウイルスDNAからフォワードプライマー

A56R(F2):

5'-CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACCACCGATGATGCGGATCTTTATG

A-3' (SEQ ID NO:21)

およびリバースプライマーA56R(R) (SEQ ID NO:9) を用いて増幅した。得られた約263塩基対のPCR産物をゲル精製した。

【0110】

Fab構築物 (A56Rのより長い形態を有するIgG CH1)

次に、5'産物についてフォワードプライマーCH1(F) (SEQ ID NO:6) およびリバースプライマー

CH1 (R2):

5'-ACAAAAGTATTGGTAATCGTGTTCATAACTTTCTTGTCCACCTTGGTGTTG-3'

(SEQ ID NO:22)

ならびに3'産物についてA56R(F) (SEQ ID NO:8) をA56R(R) (SEQ ID NO:9) と組み合わせて使用して、320および660塩基対フラグメントとをSOE PCRによって組み合わせた。次に、これらの2つの産物を組み合わせて約980塩基対の融合フラグメントを産生した。このフラグメントをBstEIIおよびSalIで消化し、得られた934塩基対のフラグメントをゲル精製した。

【0111】

TR構築物 (A56Rのより短い形態を有する完全長IgG1)

5'産物についてフォワードプライマーCH1(F) : (SEQ ID NO:6) およびリバースプライマー

A56R(R2):

5'-TCATAAAGATCCGCATCATCGGTGGTTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT

C-3' (SEQ ID NO:23)

ならびに3'産物について

A56R(F3):

5'-GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGA-

3' (SEQ ID NO:24)

をA56R(R) : (SEQ ID NO:9) と組み合わせて使用して、993および263塩基対フラグメントとをSOE PCRによって組み合わせた。次に、これらの2つ産物を組み合わせて約1256塩基対の融合フラグメントを産生した。このフラグメントをBstEIIおよびSalIで消化し、得られた1235塩基対のフラグメントをゲル精製した。

【0112】

FL構築物 (A56Rのより長い形態を有する完全長IgG1)

5'産物についてフォワードプライマー

CH1(F): (SEQ ID NO:6)

およびリバースプライマー

10

20

30

40

50

A56R(R3):

5'-TATCAGTGTTCATTTGTAGTTGATGTTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC-3'  
' (SEQ ID NO:25)

ならびに3'産物について

A56R (F4): 5'-  
GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAACATCAACTACAAATGACACTGATA-3'  
(SEQ ID NO:26)

10

をA56R(R) (SEQ ID NO:9) と組み合わせて使用して、993および660塩基対フラグメントとをSOE PCRによって組み合わせた。次に、これらの2つの産物を組み合わせて約1653塩基対の融合フラグメントを産生した。このフラグメントをBstEIIおよびSalIで消化し、得られた1632塩基対のフラグメントをゲル精製した。

【0113】

プラスミドp7.5/tkもBstEIIおよびSalIで消化し、得られた約5.7Kbのより大きいフラグメントをゲル精製した。次に、これらの2つのBstEII/SalIフラグメントを連結してpJEM1プラスミドを産生した。

【0114】

20

pJEM1は組み換えを可能にするワクシニアゲノムと相同性の隣接領域を保持する。しかし、p7.5/tk内の発現カセット（プロモーターおよび発現配列）の代わりに、pJEM1は以下の要素を含有する：ワクシニアウイルスH5プロモーター、リーダーペプチド、可変重鎖をクローニングするための5'BssHIIクローニング部位、重鎖可変領域、可変重鎖をクローニングするための3'BstEIIクローニング部位、IgG CH1ドメイン、およびワクシニアA56R。pJEM1のこれらのエレメントの配列を図1およびSEQ ID NO:1に示す。

【0115】

C35に特異的な重鎖可変領域（H2124）を、pJEM1のBssHIIおよびBstEII部位に挿入し、VH（H2124）-CH1-A56R融合構築物を産生する。pJEM1内に調製したVH（H2124）-CH1-A56R融合構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

30

【0116】

VH（H2124）-CH1-A56R Fab産物融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列（SEQ ID NO:10）：

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA  
GACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT  
TCTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA  
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC  
ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG  
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAATAACGGGTTT  
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG  
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA  
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT  
CGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC  
CAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGAT  
TATGAAGAATACTCCACAGAGTTGATTGTAAATACAGATAGTGAATCGACTA  
TAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTCACCGGAAACTAGTTCTAAGAA  
ACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCGGTATTCGAAATCGCGACTC  
CGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATAACAGACACCGTCACATACAC  
TAGTGATAGCATTAAATACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGAC  
GAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAGAAGATCATAACAGTTACAGACACTG  
TCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGAATTGTCACTACTAAATCAACC  
ACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATACAGTACCAC  
CAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAAACCAAGGA  
CTTTGTAGAAATATTTGGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGGCCGTGGCAA  
TTTTCTGTATTACATATTATATATAATAAACGTTACGTAAATACAAAACA  
GAGAACAAAGTCTAG

10

20

30

## 【 0 1 1 7 】

VH (H2124) およびCH1ドメインをコードするヌクレオチド配列に下線を付け、A56Rドメインをコードするヌクレオチド配列に二重下線を付ける。

## 【 0 1 1 8 】

VH (H2124)-CH1-A56R Fab産物融合タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:11) :

40

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYSITSGYFWNWIQPPGKGLEWI  
GYISYDGSSNSNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA  
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
TSTTNDTDKVDYEEYSTEIVNTDSESTIDIILSGSTHSPETSSKKPDYIDNSNCSSV  
FEIATPEPITDNVEDHTDVTYISDSINTVSASSGESTTDETPEPITDKEDHTVTD  
VSYTTVSTSSGIVTTKSTTDDADLYDTYNDNDTVPPTTVGGSTTSISNYKTKDFVE  
IFGITALIILSAVAIFCITYYIYNKRSRKYKTENKV

10

## 【 0 1 1 9 】

VH (H2124) およびCH1ドメインのアミノ酸配列に下線を付け、A56Rドメインのアミノ酸配列に二重下線を付ける。

## 【 0 1 2 0 】

VH (H2124)-IgG-A56R TR構築物融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:27) :

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA  
GACCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT  
TCTGGAAGTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA  
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC  
ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG  
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACTACCGGGTTT  
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG  
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA  
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT  
CGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC  
CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAGTCAACATGC  
CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC  
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG  
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC  
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG  
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC  
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA  
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC  
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG  
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC  
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAACCACCGATGATG  
CGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATACAGTACCACCAACTACTGTA  
GGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAA  
TATTTGGTATTACCGCATTAATTATATTGTICGGCCGTGGCAATTTTCTGTATTA  
CATATTATATATATAATAAACGTTACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGT  
CTAG

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

VH (H2124) および完全長Igドメインをコードするヌクレオチド配列に下線を付け、より短い形態のA56Rドメインをコードするヌクレオチド配列に二重下線を付ける。

【 0 1 2 2 】

VH (H2124)-IgG-A56R TR構築物融合タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:28) :



QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYSITSGYFWNWIRPPGKGLEWI  
GYISYDGSSNSNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA  
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGKTTDDADLYDTYNDNDTVPPTTVGGSTTSISNYKTKDFVEI  
FGITALIILSAVAIFCITYYIYNKRSRK YKTENKV

10

## 【 0 1 2 3 】

VH (H2124) および完全長Igドメインのアミノ酸配列に下線を付け、より短い形態のA56Rドメインのアミノ酸配列に二重下線を付ける。

## 【 0 1 2 4 】

VH (H2124)-IgG-A56R FL構築物融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:29) :

20

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA  
GACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT  
TCTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA  
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC

ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG  
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACTACCGGGTTT  
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG  
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA  
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT  
CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC  
CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC  
CCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC  
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG  
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC  
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG  
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC  
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA  
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC  
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG  
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC  
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAACATCAACTACAA  
ATGACACTGATAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGAGTTGATTGTAAA  
TACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTAC  
CGGAACTAGTTCTAAGAAACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCG  
GTATTCGAAATCGCGACTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATA  
CAGACACCGTCACATACACTAGTGATAGCATTAAATACAGTAAGTGCATCATC  
TGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAGAAGAT  
CATACAGTTACAGACACTGTCTCATACTACAGTAAGTACATCATCTGGAAT  
TGTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATG  
ATAATGATACAGTACCACCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAG  
CAATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAATATTTGGTATTACCGCATTAATTA  
TATTGTCGGCCGTGGCAATTTTCTGTATTACATATTATATATAATAAACGTT  
CACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGTCTAG

10

20

30

40

VH (H2124) および完全長Igドメインをコードするヌクレオチド配列に下線を付け、そしてより長い形態のA56Rドメインをコードするヌクレオチド配列に二重下線を付ける。

【 0 1 2 6 】

VH (H2124)-IgG-A56R FL構築物融合タンパク質のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:30) :

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYSITSGYFWNWIROPPGKGLEW  
GYISYDGSSNSNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA  
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGKTSTTNDTDKVDYEEYSTELIVNTDSESTIDIILSGSTHSPETS  
SKKPDYIDNSNCSSVFEIATPEPITDNVEDHTDTVTYTSDSINTVSASSGESTTDET  
PEPITDKEDHTVTDTVSYTTVSTSSGIVTTKSTTDDADLYDTYNDNDTPPTTVG  
GSTTSISNYKTKDFVEIFGITALILSAVAIFCITYIYNKRSRKYKTENKV

10

20

【 0 1 2 7 】

VH (H2124) および完全長Igドメインのアミノ酸配列に下線を付け、より長い形態のA56Rドメインのアミノ酸配列に二重下線を付ける。

【 0 1 2 8 】

#### 実施例2

HeLa細胞の表面でのA56R融合タンパク質の発現

HeLa細胞に免疫グロブリン融合構築物である可変重鎖 (H2124) CH1-A56R (上記実施例に記載) およびIg-K (「A56R H + L」) またはscFv-A56R (「A56R scFv」) を発現している組み換えEEVワクシニアウイルスを感染または同時感染させた。細胞に組み換えEEVワクシニアウイルスを感染させるための一般戦略およびその後のライブラリー選択工程の説明を図2に示す。本実施例において、ライブラリーを使用する代わりに、HeLa細胞にVH (H2124) CH1-A56R融合体を発現している組み換えワクシニアウイルスおよびIg-K (A56R H + L) を発現している組み換えワクシニアウイルスを同時感染させるか、またはscFv-A56Rを発現している組み換えワクシニアウイルスを感染させた。EEV組み換えワクシニアウイルスに感染している細胞のC35染色およびCD100染色について蛍光活性化細胞分類 (FACS) 分析を行った。簡潔に言うと、1 µg/ml CD100-Hisまたは1 µg/ml C35-Hisを試料に加え、氷上で30分間インキュベーションした。次に、細胞を洗浄し、抗his APCを加え、試料を氷上で30分間インキュベーションし、次に試料を洗浄し、固定し、分析した。FACSのデータを図3A~Cに示す。これらの結果は、A56R融合タンパク質が細胞表面に発現されたことを示している。

30

40

【 0 1 2 9 】

EEV形態のクローンもELISAによってテストした。精製C35タンパク質 (炭酸塩緩衝液中に1 µg/mL) を96ウェルELISAプレート (Nunc -MaxiSorp 96ウェル平底免疫プレート、カタログ番号439454) 上に被覆した。プレートを洗浄し、次に1 × PBS、10% FBSでブロッキングし、次にソラレン不活性化EEVをプレートに加え、1 × PBS/10% FBS/0.05% Tween-20中に希釈して指定のウェルに入れ、結合させた。ウサギ抗ワクシニア-HRPコンジュゲーション抗体 (AbCamカタログ番号28250) を用いてウイルス粒子を検出し、抗体を1 × PBS/10% FBS/0.05% Tween-20で1:2000に希釈した。次に、TMB基質 (ホースラディッシュペルオキシ

50

ダーゼ (HRP) 活性を検出するため) をプレートに加え、発色させ、次に等体積の2N  $H_2SO_4$  で反応を終了させた。ELISAプレートリーダーでプレートを読み取り、結果を図4Aに示す。二次抗体が、希釈緩衝液としての1×PBS/10% FBS/0.05% Tween-20でストック抗体を1:10,000希釈して使用したヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>-HRPコンジュゲーション型 (Jackson ImmunoResearchカタログ番号109-036-097) であったこと以外は上記と同じ条件を用いた第2のELISAでFABを検出することによって結合を確認した。結果を図4Bに示す。両プレートで陽性であったウェルは、抗体構築物がワクシニアウイルスビリオンの存在下で発現されたことを示した。図3A~Bに示すように、C35特異的融合タンパク質を含有するEEV (「A56R EEV」と表示) はC35に結合したが、対照 (「L517 + G7000-A56R EEV」) であるC35非結合性EEVは結合せず、かつ標準的な膜結合型IgG1形態のC35特異的抗体 (「mbg EEV」) も結合しなかった。このデータにより、抗体がA56Rと共に発現された場合のEEVの抗原特異的結合が実証された。

10

【0130】

### 実施例3

プレートに基づく、および溶液に基づく融合タンパク質の選択

パンニングに基づくアッセイを用いて、公知のC35とのA56R融合体およびVEGF結合分子を発現している組み換えワクシニアウイルスを標的分子への結合についてテストした。C35 (scFv2408-A56R、H2124-L517-A56R二重遺伝子、およびL517 + H2124-A56R同時感染) またはVEGF (L7000 + H7000-A56R) に特異的であることが知られている免疫グロブリン分子を発現している組み換えEEVをBSC1細胞において産生させた (約24時間)。同じウイルスが二重遺伝子からIg-HおよびIg-K遺伝子をコードし、H2124-A56R同時感染のために使用した別々のウイルスがIg-HおよびIg-K遺伝子をコードしたことを除いて、H2124-L517-A56R二重遺伝子は、L517 + H2124-A56Rと同じ抗体を産生した。

20

【0131】

EEV形態のクローンをブランクアッセイによってテストした。無菌96ウェルELISAプレートに1μg/ml C35または1μg/ml VEGFを被覆した。「ニート」(未希釈)の上清を含有するEEVを、系列希釈によって希釈して1:10~1:10<sup>6</sup>希釈液を作成した。様々なウイルス構築物100μlを指定のウェルに加え、室温で2時間または一晩結合を進行させた。細胞をPBSで10回洗浄し、未結合のEEVを除去し、次に約25,000個のBSC1細胞を各ウェルに加え、プレートを37℃で一晩インキュベーションした。ウェルをクリスタルバイオレットで染色することによってブランク形成を検出した。図5A~Dに、それぞれ2時間および一晩後のC35結合および2時間および一晩後のVEGF結合についてのブランクアッセイプレートの結果を示す。これらの結果により、A56R融合タンパク質がワクシニアビリオンの表面に発現されたことが示された。さらに、これらの結果により、EEV上に発現されたA56R融合体を使用して産生された公知の結合セグメントが、それらの特異的標的に結合することができたことが示された。

30

【0132】

次に、ストレプトアビジンビーズ、プロテインGビーズまたはトシル活性化ビーズを使用して、ビーズに基づく選択を行った。

【0133】

40

### ストレプトアビジン (SAV) ビーズ選択

MAB2408 (H2124-A56R + L517 (C35特異的)) またはMAB7000 (H7000-A56R + L7000 (VEGF特異的)) を発現している組み換えEEVを使用して、磁気ビーズに基づく選択をテストした。2つのT175フラスコ中でHeLa細胞に様々なウイルス構築物を2日間感染させ、上清を収集し、細胞をペレットにした。SA-600ローターに入れて15,000RPMで1時間回転させることによってEEVをペレットにした。10% FBSを補充したDMEM、1ml中にEEVのペレットを再懸濁した。各組み換えウイルスについて上清500μl (約10<sup>7</sup>pfu) を使用した。次に、1μgのビオチン-C35を含有するDMEM、500μlを各試料に加えた (濃度1μg/mlの溶液、体積1mlが生じる)。低温室内の回転装置上で溶液を2時間インキュベーションした。M280ストレプトアビジン (SAV) 磁気ビーズ200μlをEEV/C35溶液に加えた (SAVビーズ濃度はビオチン-

50

C35の全てと結合するには十分高く、したがって洗浄工程は必要なかった)。溶液を室温で20分間回転させ、ビーズをビオチン-C35に結合させた。上記のように調製したウイルス構築物をビーズに加えた。磁石を使用してビーズを収集し、未結合のウイルスを別個に収集した。ビーズをPBS、1mlで5回洗浄した。未結合ウイルスを有する洗浄液の全てをプールした(「未結合物」)。ビーズを磁石から取り出した。2.5% FBSを補充したDMEM、1mlを加え、その溶液を新しいチューブに移した(「結合物」)。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。結果を表1に示す。これらの結果は、C35特異的2408抗体を発現しているEEVはビーズに結合したが、VEGF特異的7000抗体を発現しているEEVは結合しなかったことを示している。

#### 【 0 1 3 4 】

(表1) ビオチン-C35ビーズおよびSAV磁気ビーズを使用したC35特異的mAbの選択

ウイルス	力価	結合 (%)
MAb 7000 未結合物	$1.45 \times 10^7$	
MAb 7000 結合物	$1.2 \times 10^4$	0.1%
MAb 2408 未結合物	$7.6 \times 10^6$	
MAb 2408 結合物	$7.7 \times 10^6$	50%

#### 【 0 1 3 5 】

EEV発現L517をmoi=1に調整し、H2124-A56Rを発現しているEEVをH7000-A56Rで $1:10^4$ および $1:10^5$ 希釈した混合物をHelaに同時感染させた添加実験を行った(1添加条件あたり1つのT175 Hela)。つまり、EEVを採取し、各添加あたりEEVを含有する上清500  $\mu$ l ( $5 \times 10^6$  pfu)を使用した。1  $\mu$ gのビオチン-hC35を含有するDMEM 500  $\mu$ lを各試料に加えた(体積1ml、濃度1  $\mu$ g/ml)。上記SAV-ビーズ(M280)選択方法を用いて結合物溶液および未結合物溶液を収集した。結合しているウイルスをT75フラスコ中のBSC1で増幅させた。

#### 【 0 1 3 6 】

各添加実験について収集された結合物試料および未結合物試料を、フローサイトメトリーによって濃縮についてテストした。添加実験からの結果から、ビーズを用いた $10^{-4}$ および $10^{-5}$ の明らかな濃縮、ならびにビーズ選択がプレート選択方法よりも効率的なことが示された(データは示さず)。

#### 【 0 1 3 7 】

SAVビーズについて上記と類似の方法を用いて、異なるビーズ、すなわちプロテインGビーズ(Dynal)およびトシル活性化ビーズ(Dynal)もテストした。選択アッセイ時に以下の予備同定された抗体を使用した: MAb2408(C35特異的抗体、H2124 + L517を含むヒト化1F2抗体)、MAb2368(米国特許出願第2010/0285036号に開示されたCD100特異的抗体)、mAb7000(ペバシズマブのVEGF特異的親抗体)、およびmAb8000(トラスツズマブのHer2特異的親抗体)。

#### 【 0 1 3 8 】

#### プロテインGビーズ選択

6ウェルプレート中でHela細胞の小規模感染で産生されたEEV(力価約 $5 \times 10^5$ /ml)を使用した。プロテインGビーズ選択は、2368-A56R(H2090-A56R + L512、VHおよびVLの両方がワクシニアにおいて発現)を発現しているEEV、ウイルス1ml(約 $5 \times 10^5$  pfu)および2408-A56R(H2124-A56R + L517、VHおよびVLの両方がワクシニアにおいて発現)を発現しているEEV、ウイルス1ml( $5 \times 10^5$  pfu)を使用してテストした。プロテインGビーズに結合しているCD100は以下のように調製した: プロテインGビーズ300  $\mu$ l(2 $\times$ 標準量/試料)を使用し、磁石でプルダウンを行った。PBS 600  $\mu$ l + CD100-Fc 18  $\mu$ l(=36  $\mu$ g)をビーズに加え、それを室温で20分間(回転装置上で)インキュベーションし、CD100-FcをプロテインGビーズと結合させた。磁石でビーズをプルダウンし、PBS 1mlで1回洗浄した。次に、10%補充したDMEM 300  $\mu$ l中にビーズを再懸濁した。CD100-Fc/ProGビーズ100  $\mu$ lを各ウ

ウイルス試料に加えた（Pro-Gビーズの標準量の約2倍）。これは、約12 µg/ml CD100-Fcであった。この溶液を室温で2時間インキュベーションした。ビーズ550 µl（約50%）を取り出し、標準的な5×PBS 1ml洗浄後に未結合物を収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlを加え、この溶液を新しいチューブに移した（「結合物」）。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。残りの550 µlに、室温でさらに1.5時間（合計3.5時間）、次に4度で18時間インキュベーションを続けさせ、その後上記のように採取した。

【0139】

#### トシル活性化ビーズ選択

上記プロテインGビーズ選択実験に使用されたものと同じ2408（C35特異的）抗体および2368（CD100特異的）抗体を発現しているEEVを、トシル活性化磁気ビーズ選択のために使用した。PBSまたはELISAコーティング緩衝液（CB）中でトシル活性化磁気ビーズに100 µgのC35-Hisをコンジュゲーションさせた。この溶液を37度で一晩インキュベーションし、PBS、10% FBS、0.5% BSAで37で1時間ブロッキングした。ビーズを1回洗浄し、10%補充したDMEM 160 µl中に再懸濁した。各ビーズ試料50 µlを各ウイルス試料に加え、室温で5時間インキュベーションした。標準的な5×PBS 1ml洗浄後に未結合物を収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlを加え、ビーズを新しいチューブに移した（「結合物」）。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。

【0140】

C35抗体選択アッセイについて上記と同じ方法を用いて、2368-A56R（ウイルス1ml（約5×10<sup>5</sup> pfu））および2408-A56R（ウイルス1ml（5×10<sup>5</sup> pfu））を用いたCD100抗体選択アッセイのために、PBS中で100 µgのCD100-Hisをトシル活性化磁気ビーズとコンジュゲーションさせた。

【0141】

プロテインGビーズ選択を用いた結果を表2に示し、トシル活性化ビーズ選択を用いた結果を表3および4に示す。

【0142】

（表2）CD100-FcおよびプロテインGビーズを使用したCD100特異的mAbの選択

ウイルス/結合時間	試料	力価	結合 (%)
MAb 2408 – 2 時間	未結合物	100,000	
MAb 2408 – 2 時間	結合物	360	0.36%
MAb 2368 – 2 時間	未結合物	64,000	
MAb 2368 – 2 時間	結合物	88,000	58%
MAb 2368 – 一晩	未結合物	130,000	
MAb 2368 – 一晩	結合物	90,000	41%
MAb 2408 – 一晩	未結合物	320,000	
MAb 2408 – 一晩	結合物	160	0.05%

【0143】

（表3）C35トシル活性化ビーズを使用したC35特異的mAbの選択

ウイルス	試料	力価	結合 (%)
MAb 2408	未結合物	96,000	
MAb 2408	結合物	160,000	61%
MAb 2368	未結合物	240,000	
MAb 2368	結合物	1,600	0.6%
MAb 2408	未結合物	97,000	
MAb 2408	結合物	140,000	59%

10

## 【 0 1 4 4 】

(表4) CD100-Hisトシル活性化ビーズを使用したCD100特異的mAbの選択

ウイルス	試料	力価	結合 (%)
MAb 2408	未結合物	384,000	
MAb 2408	結合物	480	0.1%
MAb 2368	未結合物	264,000	
MAb 2368	結合物	232,000	46.7%

20

## 【 0 1 4 5 】

## 実施例4

## CH1-A56融合タンパク質ライブラリーの創出

免疫グロブリンセグメントをコードするポリヌクレオチドのライブラリーは、以下のよう  
に產生された。「ナイーブ重鎖-A56R融合体」と呼ばれる組み換えワクシニアライブラ  
リーは、商業的供給業者 (Life Technologies) から購入した、100人を超えるドナーを表  
現する骨髓RNAを使用して創出した。ヒト免疫グロブリン または  $\mu$  のいずれかの定常領  
域に特異的なアンチセンスプライマーを使用して逆転写を行った。得られたcDNAをPCR用  
のテンプレートとして使用し、そのPCRには、様々な生殖細胞系列ヒトJセグメントに結合  
しBstEII制限部位を導入したアンチセンスプライマーのプールと組み合わせて、ヒト可変  
重鎖フレームワーク領域1の開始部に結合しBssHII制限部位を導入した2つのセンスプライ  
マーの一方を用いた。これらのプライマーの配列は、以下のとおりであった：

30

Sense VH 3: AATATGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG  
(SEQ ID NO:12)

Sense VH 3a: AATATGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG  
(SEQ ID NO:13)

Antisense JH 1: GAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCA (SEQ ID  
NO:14)

10

Antisense JH 2: GAGACGGTGACCAGGGTGCCACGGCCCCA (SEQ ID  
NO:15)

Antisense JH 3: GAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCCCCA (SEQ ID NO:16)

Antisense JH 4/5: GAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA (SEQ ID  
NO:17)

20

Antisense JH 6: GAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCA (SEQ ID  
NO:18)

#### 【 0 1 4 6 】

得られたPCR産物は、組み換えワクシニアウイルス創出のために上記に開示のpJEM1プラスミド内にクローニングした。特に、本明細書に記載のヒト免疫グロブリン可変重鎖発現カセットは、ヒト免疫グロブリン定常ドメイン領域CH1およびワクシニアウイルス内在性膜タンパク質A56R cDNAを有するフレーム内にクローニングした。得られた、ライブラリーの発現から創出されたタンパク質は、免疫グロブリン重鎖可変セグメント、重鎖CH1、およびワクシニアEEVの表面に発現されたA56Rタンパク質の部分を含む融合タンパク

30

#### 【 0 1 4 7 】

図2に説明されるワクシニアパンニングのために、ナイーブ重鎖-A56R融合ライブラリーを、公知のIg-Lを発現しているワクシニアまたはワクシニアウイルスに発現されたIg-Lライブラリー（参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第7,858,559号に以前に開示されている）と一緒に使用した。

#### 【 0 1 4 8 】

##### 実施例5

##### CD100抗体選択のためのCH1-A56R融合タンパク質ライブラリーのスクリーニング

前の実施例に記載のナイーブ重鎖-A56Rライブラリー（「ライブラリー3」とも呼ぶ）+ 軽鎖クローン（L48、L116およびL9021）からの約1,200,000のクローンを使用して、新しいCD100抗体の選択を行った。

40

#### 【 0 1 4 9 】

T-175 HeLa細胞に、上記の融合ライブラリー+軽鎖を発現しているEEVを2日間感染させ、その後上清を採取し、2回の低速回転でペレットにし、EEVを15,000RPMで1時間ペレットにした。EEVを10%FBS補充DMEM 3ml中に再懸濁した。

#### 【 0 1 5 0 】

##### ラウンド1の選択

2368-A56Rを発現しているEEV（ウイルス1ml（約 $5 \times 10^5$  pfu））および2408-A56Rを発現しているEEV（ウイルス1ml（ $5 \times 10^5$  pfu））を対照として使用し、ライブラリー3（ウイル

50



ス1ml (約 $10^8$ pfu) ) を選択アッセイのために使用した。最初に、プロテインGビーズ300  $\mu$ l (2×標準量/試料) を磁石でプルダウンし、PBS 600  $\mu$ l + CD100-Fc 18  $\mu$ l (=36  $\mu$ g) をビーズに加えた。溶液を室温で20分間インキュベーションして(回転装置上)、CD100-FcをプロテインGビーズと結合させた。ビーズを磁石でプルダウンし、PBS 1mlで1回洗浄し、10%補充したDMEM 300  $\mu$ l中に再懸濁した。

#### 【0151】

次に、試料1個あたりCD100-Fc/ProG 100  $\mu$ l (約12  $\mu$ g/ml CD100-Fc) をEEV (2408および2368対照、ならびにライブラリー3) に加え、室温で2時間インキュベーションした。ビーズ550  $\mu$ l (約50%) を取り出し、5回のPBS 1mlの標準洗浄後に未結合のウイルスを収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlを加え、この溶液を新しいチューブに移した(「結合物」)。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。45分後にメチルセルロースを加えてこれらの「2時間インキュベーション」試料を力価検定した。結合物ライブラリーから回収されたビーズをT75中のBSC1で増幅した(このラウンド1の2時間の選択物を「CD100 3.1A」と名付けた)。他方のビーズ550  $\mu$ l (約50%) は、室温でさらに1.5時間インキュベーションを続けさせ(合計3.5時間)、次に4 で18時間インキュベーションした(「一晚」)。5回のPBS 1mlの標準洗浄後に未結合のウイルスを収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlを加え、この溶液を新しいチューブに移した(「結合物」)。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した(このラウンド1の一晚の選択物を「CD100 3.1B」と名付けた)。結果を表5に示す。

#### 【0152】

(表5) CD100Abのラウンド1の選択

ウイルス/結合時間	試料	力価	結合 (%)
2408-2 時間	未結合物	100,000	
2408-2 時間	結合物	360	0.36%
2368-2 時間	未結合物	64,000	
2368-2 時間	結合物	88,000	58%
ライブラリー3.1A-2時間	未結合物	22,000,000	
ライブラリー3.1A-2時間	結合物	20,000	~0.1%
2408-一晚	未結合物	130,000	
2408-一晚	結合物	90,000	41%
2368-一晚	未結合物	320,000	
2368-一晚	結合物	160	0.05%
ライブラリー 3.1B-一晚	未結合物	56,000,000	
ライブラリー 3.1B-一晚	結合物	17,000	0.03%

#### 【0153】

ライブラリー3.1Aおよび3.1Bは、BSC1での良好な増幅、採取量および力価(それぞれ約 $2 \times 10^7$ /ml)を与えた。

#### 【0154】

## ラウンド2の選択

6ウェルプレート中でHelaの小規模感染によって産生されたEEV（力価約 $5 \times 10^5$ /ml）を使用した。ライブラリー3.1Aおよび3.1Bを1つの試料中に一緒にプールした。2368-A56Rを発現しているEEV（ウイルス1ml（約 $5 \times 10^5$ pfu））、2408-A56Rを発現しているEEV（ウイルス1ml（ $5 \times 10^5$ pfu））および3.1A/Bライブラリー（ウイルス1ml（約 $5 \times 10^5$ pfu））をそれぞれプロテインGビーズ300  $\mu$ l（標準量の2倍/試料）と組み合わせた。PBS 600  $\mu$ l + CD100-Fc 18  $\mu$ l（=36g）をビーズに加えた。この溶液を室温で20分間（回転装置上で）インキュベーションし、CD100-FcにプロテインGビーズと結合させた。ビーズを洗浄し、ラウンド1について上に記載したように再懸濁した。1つの試料あたりCD100-Fc/ProG 100  $\mu$ l（約12  $\mu$ g/ml CD100-Fc）をウイルス試料に加え、室温で4.5時間インキュベーションした。

「未結合物」および「結合物」を収集し、力価検定した。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド2の選択を「CD100 3.2」と名付けた）。ラウンド2の選択の結果を表6に示す。

【0155】

(表6) CD100 Abについてのラウンド2の選択

ウイルス抗原	試料	力価	結合 (%)
2408-CD100-Fc	未結合物	384,000	
2408- CD100-Fc	結合物	780	0.2%
2368- CD100-Fc	未結合物	264,000	
2368- CD100-Fc	結合物	224,000	46%
ライブラリー 3.2-CD100-Fc	未結合物	780,000	
ライブラリー 3.2-CD100-Fc	結合物	5,000	0.6%

【0156】

ライブラリー3.2は、BSC1で良好な増幅、採取量および力価（約 $3 \times 10^7$ /ml）を与え、陽性細胞の小集団を生じた。第3のラウンドの選択を行った。

【0157】

## ラウンド3の選択

第3のラウンドの選択は、「ライブラリー3.2A」を使用して上記と同じ方法を用いて行った（ラウンド1および2=CD100-Fc/ProG）。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド3の選択物を「CD100 3.3A」と名付けた）。ラウンド3Aの選択の結果をフローサイトメトリーによってテストした。第2のラウンド3の選択を、上に開示された方法を用いて、PBS中でトシル活性化磁気ビーズにコンジュゲーションしたCD100-His 100  $\mu$ gで行った。CD100 3.3A（2368-A56R（ウイルス1ml（約 $5 \times 10^5$ pfu））、2408-A56R（ウイルス1ml（ $5 \times 10^5$ pfu））および3.2A（ウイルス1ml（約 $5 \times 10^5$ pfu））のために使用したウイルスと同じロットのウイルスを使用して、選択のために1試料あたり50  $\mu$ lを加えた。この溶液を室温で4時間インキュベーションした。「未結合物」および「結合物」を収集し、力価検定した。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド3のトシル活性化選択物を「CD100 3.3B」と名付けた）。ラウンド3Bの選択の結果をフローサイトメトリーによってテストした。CD100抗体の選択戦略を要約する図を図6に示す。

【0158】

フローサイトメトリー染色によって、L116と対形成したときにCD100 3.3A/B中におそらく陽性集団があったことが示唆された。3.3A（n=27）および3.3B（n=30）からのプラークを釣り上げ、24ウェルプレート中のBSC1で3日間増幅した（ウェル1個あたりプラーク1個

)。24ウェルプレート中でHeLa細胞に増幅後の各ブランクの1/3を感染させた。細胞にL116をmoi=1で同時感染させた（対照：2368、2408および未感染HeLa上清）。EEVを2日間産生させ、採取し、ソラレンおよび長波長UV線照射（PLWUV）で不活性化した。ウェル1個あたりEEV 50  $\mu$ l + ELISAブロッキング緩衝液50  $\mu$ lを使用して、CD100（2  $\mu$ g/ml）被覆プレートおよびC35（2  $\mu$ g/ml）被覆プレートにウイルスをO/N結合させた。

#### 【0159】

抗体の結合は、抗Fab-HRPを加えることによって検出した。2つのクローン（3.3.C20および3.3C27）はCD100に対して良好な結合性を有したので、これらのクローンを配列決定した。フローサイトメトリーによって特異性および親和性についてこれらのクローンをさらに特徴づけた。T75中のBSC1でクローンを増幅し、力価検定した。（L116と共に）3.3A/Bに感染している細胞をCD100で選別した。選別後の細胞（150個）からのウイルスを増幅し、力価検定し、フローによってテストした（100  $\mu$ g/ml CD100-His:氷上30分、5mlで洗浄、続いて抗His-APC+抗Fab-FITC:氷上30分）。フローサイトメトリーによって決定されたように、クローン20および27の両方がCD100に結合した。

#### 【0160】

L116と対形成したときの2つの高親和性CD100VHクローン（3.3.C20および3.3C27）の配列は同一であった。2つのクローンの配列アライメントを図7に示す。可変重鎖のアミノ酸配列は以下のとおりである（VH CDR1～3に下線を付す）：

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFITDYYLSWIRQAPGKGPEWLSYI  
SSYSRYTNYADSVKGRFTISRDNTRNSIYLQMNNLRVEDTAVYYCARAGSYGY  
 WGQGTTLT (SEQ ID NO:19)

#### 【0161】

##### 実施例6

Her2抗体の選択のためのCH1-A56R融合タンパク質ライブラリーのスクリーニング

ナীব重鎖A56R融合ライブラリー（「ライブラリー3」とも呼ぶ）からのクローン1,200,000+軽鎖クローン（L48、L116およびL9021）を使用して、新しいHer2抗体のための選択を行った。このライブラリーは、上述のCD100選択のために使用したものと同じである。

#### 【0162】

##### ラウンド1の選択

ライブラリー3（ウイルス1ml（約 $10^8$  pfu））をこの選択のために使用した。最初に、PBS 100  $\mu$ l + Her2-Fc（R&D Systems）100  $\mu$ l（=10  $\mu$ g）をプロテインGビーズに加えた。この溶液を室温で25分間（回転装置上で）インキュベーションして、Her2-FcをプロテインGビーズに結合させた。磁石でビーズをプルダウンし、PBS 1mlで1回洗浄し、10%補充したDMEM 100  $\mu$ l中に再懸濁した。

#### 【0163】

次に、Her2-Fc/ProG（約10  $\mu$ g/ml Her2-Fc）100  $\mu$ lをライブラリー3 1mlに加え、室温で4時間インキュベーションした。ビーズを取り出し、標準的な5回のPBS 1mlの洗浄後に未結合のウイルスを収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlに加え、この溶液を新しいチューブに移した（「結合物」）。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。結合物ライブラリーから回収したビーズをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド1の選択を「Her2.3.1」と名付けた）。

#### 【0164】

##### ラウンド2の選択

増幅後のHer2.3.1を力価検定し、6ウェルプレート形式で増幅し（L48、L116およびL9021と同時感染）、上記方法を用いてHer2-Fc/ProG選択の追加的なサイクルを行った。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド2の選択を「Her2.3.2」と名付けた）。

10

20

30

40

50

## 【0165】

## ラウンド3の選択

増幅後のHer2.3.2を力価検定し、6ウェルプレート形式で再増幅し（L48、L116およびL9021と同時感染）、上記の方法を用いて追加的なサイクルのHer2-Fc/ProG選択を行った。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド3の選択を「Her2.3.3」と名付けた）。Her2.3.2およびHer2.3.3選択の結果をフローサイトメトリーによってテストした。この実験において、3 µg/ml C35-Hisまたは10 µg/ml Her2-Hisを抗His-APC MABと共に氷上で30分間インキュベーションして複合体を形成させた。次に、抗Fab-FITCを加え、氷上で抗原-抗His複合体を細胞に30分間加えた。次に、細胞をPBS、0.5% BSA、2nM EDTA 2mlで洗浄した。次に、氷上で抗his-APCおよび抗Fab-FITCを30分間加え、次に細胞を洗浄し、固定し、フローサイトメトリーアッセイを行った。図8に示すように、3種の軽鎖の全てはHer2特異的抗体が濃縮されていた。

10

## 【0166】

## ラウンド4の選択

6ウェルプレート形式のHela細胞にHer2.3.3およびL116のみを同時感染させ、上記のようにEEVを単離し、上記の方法を用いてHer2-Fc/ProG選択の追加的なサイクルを行った。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅した（ラウンド4の選択を「Her2.3.4」と名付けた）。Her2抗体の選択戦略を要約する図を図9に示す。

## 【0167】

上記染色方法を用いて、Her2.3.3およびHer2.3.4選択の結果をフローサイトメトリーによってテストした。対照H8000-A56R + L8000を使用した（8000=キメラ4D5、トラスツズマブのマウス親）。

20

## 【0168】

フローサイトメトリーの結果は、3.3および3.4試料中に2つの集団を示した。Her2 3.4試料をHela細胞中に同時感染させ、試料をHer2結合について染色し、陽性細胞を選別した。選別後の試料からクローンを釣り上げ、スクリーニングされた30個のブラックを1回の選別あたりHer2.3.4から釣り上げ、24ウェルプレート中のBSC1で2日間増幅した（ウェル1個あたりブラック1個）。24ウェルプレート中でHela細胞に増幅後の各ブラックの1/3を感染させた。細胞にL116をmoi=1で同時感染させた（対照:8000、2368、2408および未感染Hela上清）。EEVを3日間産生させ、採取し、PLWUVで不活性化した。ウェル1個あたりEEV 50 µl + ELISAブロッキング緩衝液50 µlを使用して、CD100（2 µg/ml）およびHer2（2 µg/ml）を被覆したプレートにウイルスをO/N結合させた。結果を図10に示す。

30

## 【0169】

抗Fab-HRPを加えることによって抗体結合を検出した。Her2に対して良好な結合性を有する5つの陽性クローンを同定し、配列決定した。5つのクローン全てが同じ配列を有した（図11参照）。クローンB10のVH配列を以下に示す。

## 【0170】

Her2 B10クローンの配列:

EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFAFNNTYALSWVRQAPGRGLKWVS  
AISP DGDYIYYADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCARQNNVR  
DGAVAGPLDHWGQGTLVT (SEQ ID NO:20)

40

## 【0171】

## 実施例7

## C35抗体選択のためのCH1-A56R融合タンパク質ライブラリーのスクリーニング

ナীব重鎖A56R融合ライブラリー（「ライブラリー3」とも呼ばれる）+軽鎖クローン（L48、L116およびL9021）からの約1,200,000のクローンを使用して新しいC35抗体のための選択を行った。ライブラリーは、上述のCD100およびHer2選択のために使用したのと同じである。

50

## 【 0 1 7 2 】

## ラウンド1の選択

100  $\mu$ gのC35をPBSまたはELISA被覆緩衝液（CB）中でトシル活性化磁気ビーズにコンジュゲーションさせた。溶液を37℃で一晩インキュベーションし、PBS、10% FBS、0.5% BSAで37℃で1時間ブロッキングした。ビーズを1回洗浄し10%補充したDMEM 160  $\mu$ l中に再懸濁した。各ビーズ試料50  $\mu$ lを各ウイルス試料に加え、室温で3.5時間インキュベーションした。標準的な5回のPBS 1ml洗浄後に未結合物を収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充DMEM 1mlを加え、ビーズを新しいチューブに移した（「結合物」）。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。

## 【 0 1 7 3 】

結合物ライブラリーをT75中のHeLaで増幅した（ラウンド1の選択を「C35 3.1」と名付けた）。ラウンドC35 3.1の結果をフローサイトメトリーによってテストした。C35 3.1は結合したが、低値であった（データは示さず）。

## 【 0 1 7 4 】

## ラウンド2の選択

増幅後のC35 3.1を力価検定し、L48、L116およびL9021と共にC35 3.1を同時感染することによって6ウェルプレート形式で組み換えEEV（力価約 $5 \times 10^5$ /ml）を産生させるためにそれを使用し、上記方法を用いてトシル活性化C35選択の追加的なサイクルを行った。ラウンド1の3.5時間の代わりに、溶液を室温で3.0時間インキュベーションした。結合物および未結合のウイルスの力価を表7に示す。結合物ライブラリーをT75中のHeLaで増幅し（ラウンド2の選択を「C35 3.2」と名付けた）、結合を上記のフローサイトメトリーによってテストした。

## 【 0 1 7 5 】

（表7）C35Abのためのラウンド2のC35-His/トシル活性化選択

ウイルス	試料	力価	結合 (%)
2368	未結合物	684,000	
2368	結合物	1600	0.2%
2408	未結合物	600,000	
2408	結合物	168,000	28%
ライブラリー C35 3.2	未結合物	972,000	
ライブラリー C35 3.2	結合物	10,400	1%

## 【 0 1 7 6 】

## ラウンド3の選択

増幅後のC35 3.2を力価検定し、L48、L116およびL9021を同時感染させることによって6ウェルプレート形式で組み換えEEVを産生するために使用し（力価約 $5 \times 10^5$ /ml）、ラウンド2について上記の方法を用いてトシル活性化C35選択の追加的なサイクルを行った。結合物および未結合のウイルスの力価を表8に示す。結合物ライブラリーをT75中のHeLaで増幅し、上記フローサイトメトリーによってC35結合についてテストした（ラウンド3の選択を「C35 3.3」と名付けた）。

## 【 0 1 7 7 】

（表8）C35Abについてのラウンド3のC35-His/トシル活性化選択

ウイルス	試料	力価	結合 (%)
2368	未結合物	400,000	
2368	結合物	480	0.1%
2408	未結合物	228,000	
2408	結合物	108,000	47%
ライブラリー C35 3.3	未結合物	540,000	
ライブラリー C35 3.3	結合物	2600	0.5%

10

## 【 0 1 7 8 】

起こりうる第4ラウンドの選択でC35 3.3からクローンを同様にスクリーニングする。フローサイトメトリーによって陽性クローンを特徴づけ、特異性、親和性、および機能についてテストする。

## 【 0 1 7 9 】

## 実施例8

重鎖または軽鎖を発現しているワクシニアウイルスの選択的増幅

重鎖または軽鎖免疫グロブリンのいずれかを内部にもつ別々の組み換えワクシニアウイルスによる組み合わせ感染は、選択用の抗体を発現させる効果的な方法である。しかし、選択後、増幅および採取の間に重鎖含有ウイルスと軽鎖含有ウイルスを分離するためのメカニズムは今のところない。したがって、重鎖感染および軽鎖感染の両方が1よりも大きな複雑度 (complexity) で行われ、デコンボリューションポスト選択 (deconvolution post-selection) が必要な場合のように、重鎖含有ワクシニアウイルスおよび軽鎖含有ワクシニアウイルスを別々に増幅できることが有利であろう。この理由から、薬物選択マーカーと結合している重鎖または軽鎖のいずれかを発現している組み換えワクシニアウイルス (ネオマイシン耐性を有する重鎖およびハイグロマイシン耐性を有する軽鎖) が産生された。以下の実験は、重鎖または軽鎖を含有する組み換えワクシニアウイルスを独立して選択的に増幅する有用性を実証するものである。

20

## 【 0 1 8 0 】

ウェル1個あたり細胞 $1.25 \times 10^6$ 個およびウェル1個あたり2.5mlとなるようにBSC1細胞を6ウェルプレートのウェル15個に播いた。翌日、表9にしたがって選択用にハイグロマイシンまたはG418の一連の希釈液を作成した。DMEM-2.5は、2.5%FBSを含有するDMEMを表す。

30

## 【 0 1 8 1 】

(表9A) ハイグロマイシン希釈液の調製

ハイグロマイシン希釈液						
[原液]=50mg/ml						
	1	2	3	4	5	6
	0.2 mg/ml	0.1 mg/ml	0.08 mg/ml	0.04 mg/ml	0.02 mg/ml	0.01 mg/ml
必要な 培養体積 (ml):	6	6	12	0.5 X 系列	0.5 X 系列	0.5 X 系列
加える ハイグロマイシン( $\mu$ l):	24	12	19.2	DMEM-2.5 6mlに 3を6ml	DMEM-2.5 6mlに 4を6ml	DMEM-2.5 6mlに 5を6ml
DMEM-2.5に (ml):	5.976	5.988	5.9808			

10

## 【 0 1 8 2 】

(表9B) G418希釈液の調製

20

G418希釈液						
[原液]=100mg/ml						
	1	2	3	4	5	6
	2.0 mg/ml	1.0 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0 mg/ml
必要な 培養体積 (ml):	5	5	5	5	5	5
加えるG418 ( $\mu$ l):	200	DMEM-2.5 5mlに 1を5ml	DMEM-2.5 5mlに 2を5ml	DMEM-2.5 5mlに 3を5ml	DMEM-2.5 5mlに 4を5ml	DMEM-2.5 5ml
DMEM-2.5に (ml):	10					

30

## 【 0 1 8 3 】

3日目に、BSC1細胞にそれぞれの選択マーカーを含有する野生型ワクシニアウイルスまたはワクシニアウイルス (VHE H5 LX-IRES-HYGROまたはVHE H5 HX-A56R NEO) のいずれかをMOI=3で感染させた。次に、ハイグロマイシンおよびG418希釈液を同時にプレートのウェルに適用した。抗生物質を含有しないDMEM-2.5を対照ウェルに加えた。感染は、ウェル1個あたり体積0.65mlで実施し、細胞を37℃でインキュベーションした。2時間後、培地体積をウェル1個あたり2.65mlに調整し、追加的なハイグロマイシンまたはG418を補充して、薬物含有ウェル中に意図する濃度を維持した。その一方で、感染後の力価決定のために12ウェルプレートにウェル1個あたり細胞 $2 \times 10^5$ 個となるように新しいBSC1細胞を播いた。

40

## 【 0 1 8 4 】

感染の24時間後に、全ての試料を15mlコニカル遠心チューブ内に採取し、凍結-融解を3

50

回行い、ボルテックス攪拌し、穏やかにボルテックス攪拌することによってDMEM-2.5 1.8 ml中に再懸濁した。試料を最大強度で2分間超音波処理し、次に2.0ml Sarstedtチューブに移した。各試料について7.5mlポリプロピレンチューブ内に一連の希釈物を調製した。最初に、各試料から原液30  $\mu$ lを抜き取り、抗生物質不含DMEM-2.5と混合し、最終体積3000  $\mu$ lにした(1:10<sup>2</sup>希釈液)。次に、1:10<sup>2</sup>希釈液30  $\mu$ lを第2の最終体積3000  $\mu$ lに加えて1:10<sup>4</sup>希釈液を調製した。次に、一連の1:10希釈を行って、1:10<sup>5</sup>~1:10<sup>9</sup>希釈液を調製した。5mlチューブを使用してバイオセーフティーキャビネット内で全ての希釈液をボルテックス攪拌した。

【0185】

次に、力価プレート中のBSC1細胞に、各試料からの6つの希釈液(1:10<sup>4</sup>~1:10<sup>9</sup>)を使用してアッセイウェル1個あたり各力価の希釈液0.333mlを2つの組で分注することによって感染させた。したがって、力価を計算するための係数は、2個の2つの組のウェル中の合計プラーク数を0.66mlで割ったものに等しい。感染物を37℃で少なくとも2時間インキュベーションした。最初に2時間吸着および感染させた後に、DMEM-2.5の追加の1.0mlを各ウェルに加えた。

10

【0186】

感染の48時間後に、クリスタルバイオレットを12ウェルタイタープレートに加えた。直径1mmよりも大きなプラークだけを計数した。娘プラークは計数から除外した。

【0187】

結果を表10に示す。ハイグロマイシン耐性実験で、0.01~0.08mg/mlハイグロマイシンは、ネオマイシン耐性マーカーと連結した重鎖を発現しているワクシニアウイルスの増幅を有意に阻害したが、ハイグロマイシン濃度が0.1~0.2mg/mlに増加するまでハイグロマイシン耐性マーカーと連結した軽鎖を発現しているワクシニアウイルスの増幅にほとんどまたは全く阻害効果を有さなかった(0.04mg/mlのデータ点を除く)。同様に、ネオマイシン耐性実験において、0.125~2mg/ml G418は、野生型ワクシニアウイルスの増幅を有意に阻害したが、ネオマイシン耐性マーカーと連結した重鎖を発現しているワクシニアウイルスの増幅に阻害効果を有さなかった。

20

【0188】

(表10A) ハイグロマイシン耐性実験の結果



ハイグロマイシン耐性		
試料のID	力価	阻害 (%)
ハイグロマイシン 0.2mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	2.20E+07	53.0
ハイグロマイシン 0.1mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	1.70E+07	63.6
ハイグロマイシン 0.08mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	4.47E+07	4.5
ハイグロマイシン 0.04mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	2.77E+07	40.9
ハイグロマイシン 0.02mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	4.66E+07	0.4
ハイグロマイシン 0.01mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	5.98E+07	-27.9
ハイグロマイシン 0.08mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.43E+06	89.1
ハイグロマイシン 0.04mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.66E+06	88.1
ハイグロマイシン 0.02mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.70E+06	87.9
ハイグロマイシン 0.01mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	6.86E+06	69.3
[抗生物質なし] VKE H5 LX-IRES-HYGRO	3.86E+07	ハイグロマイシン対照#1
[抗生物質なし] VKE H5 LX-IRES-HYGRO	5.49E+07	ハイグロマイシン対照#2
[抗生物質なし] VHE H5 HX-A56R NEO	2.23E+07	ネオマイシン対照

【 0 1 8 9 】

(表10B) ネオマイシン耐性実験の結果

10

20

30

ネオマイシン耐性		
試料のID	力価	阻害 (%)
G418 0.125 mg/ml 野生型	1.58E+07	60.8
G418 0.25 mg/ml 野生型	8.26E+06	79.4
G418 0.5 mg/ml 野生型	2.54E+06	93.7
G418 1 mg/ml 野生型	1.36E+06	96.6
G418 2 mg/ml 野生型	1.59E+05	99.6
G418 0.125 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.88E+07	-26.7
G418 0.25 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.11E+07	-36.7
G418 0.5 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.41E+07	-50.0
G418 1 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.18E+07	-40.0
G418 2 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.03E+07	-33.3
G418 0 mg/ml 野生型	4.02E+07	ネオマイシン対照#1
G418 0 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.27E+07	ネオマイシン対照#2

## 【 0 1 9 0 】

したがって、配列内リボソーム進入部位 (IRES) を介して連結した免疫グロブリンおよび薬物耐性マーカーを発現している組み換えワクシニアウイルスは、その薬物を用いた処理のもとで宿主細胞死滅に対する防御を提供する。これは、ウイルスでの鎖特異的繁殖および組み換え時の野生型ワクシニアウイルスに対抗する選択を可能にする。

## 【 0 1 9 1 】

## 実施例9

HeLa細胞の表面でのA56R融合タンパク質の発現

HeLa細胞に免疫グロブリン融合構築物を発現している組み換えEEVワクシニアウイルスを12ウェルプレート中で同時感染させた。融合構築物は、一緒になって抗体のFabフラグメント (「Fab」) をコードする可変重鎖 (H8000) CH1-A56RおよびL8000 Ig-K、一緒になって完全長 (「FL」) IgGをコードする可変重鎖 (H8000) FL-A56RおよびL8000 Ig-K、一緒になって完全長IgGおよび短鎖A56R (「TR」) をコードする可変重鎖 (H8000) FL-短縮型A56RおよびL8000 Ig-K、可変重鎖 (H2124) FL-A56RおよびL517 Ig-K (2408「FL」)、ならびに可変重鎖 (H2124) FL-短縮型A56RおよびL517 Ig-K (2408「TR」) であった。「Fab」、「TR」および「IgG」構築物を示す略図を図12に示す。組み換えワクシニアウイルスに感染している細胞のC35染色およびHer2染色のための蛍光活性化細胞分類 (FACS) 分析を行った。約18時間後に、細胞をC35-His/His-APCおよびHer2-His/His-APC、ならびに抗Fab-FITCで染色し、CantoのFLOW分析によって検出した。簡潔には、細胞をトリプシン処理し、試料毎に2群に分け、洗浄緩衝液2mLで洗浄し、10 µg/ml Her2-Hisまたは4 µg/ml C35-Hisを2つの試料の一方に加え、氷上で30分間インキュベーションした。次に細胞を洗浄し、抗His APCを加え、試料を氷上で30分間インキュベーションし、二次検出試薬である抗Fab-FITCで染色し、次に試料を洗浄し、固定し (1:100PIを有する0.5%パラホルムアルデヒドで氷上20分間)、CantoのFLOWによって分析した。FACSデータを図13~15に示

す。これらの結果は、Fabまたは完全長IgGのいずれかを発現しているA56R融合タンパク質が細胞表面に発現されたこと、およびA56Rの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインだけがIgGの表面発現に必要であることを示している。

#### 【0192】

##### 実施例10

溶液に基づくVac-Ig選択

トシル活性化ビーズ選択

C35特異的(H2124)「Fab」、「FL」および「TR」VHを発現しているEEVをL517と共に6ウェルプレート中のHeLa細胞に同時感染させ、感染約48時間後に1200rpmで回転させ、上清(EEV)を収集することによって、EEVを上清から採取した。対照としてHer2特異的H8000-Fab + L8000を同様に産生した。ビーズ選択のために、100  $\mu$ g C35-HisをPBS中でトシル活性化磁気ビーズにコンジュゲーションした。溶液を37℃で一晩インキュベーションし、37℃のPBS、10% FBS、0.5% BSAで1時間ブロッキングした。ビーズを1回洗浄し、10%補充したDMEM 160  $\mu$ l中に再懸濁した。各ビーズ試料50  $\mu$ lを各ウイルス試料に加え、室温で2時間インキュベーションした。未結合のEEVを標準的な5回のPBS 1mlの洗浄で収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充DMEM 1mlを加え、ビーズを新しいチューブに移した(「結合物」)。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。

#### 【0193】

表11に示すように、FabおよびFL融合タンパク質の両方のC35特異的構築物を発現しているワクシニアウイルスは選択されたが、一方でTR融合タンパク質を有する構築物は選択されなかった。このデータは、EEVへの組み込みのために、いくつかの細胞外A56R配列が必要であることを示唆している。

#### 【0194】

(表11) トシル活性化ビーズ選択の結果

ウイルス	結合 (%)
MAb 2408-Fab	24%
Mab 2408-FL	18%
Mab 2408-TR	2.3%
Mab 8000-Fab	0.8%

#### 【0195】

##### 実施例11

CD100抗体選択のためのCH1-A56R融合タンパク質ライブラリーのスクリーニング

ナীবVH配列および合成VH配列の組み合わせを含有する約7,000,000個のクローンからなる重鎖ライブラリーを用いた新しいCD100抗体の選択を、A56R-Fabベクターにおいて産生させた。EEV表面にIgのライブラリーを発現しているワクシニアを産生するために、A56R融合ライブラリー(「ライブラリー10」とも呼ばれる)を、9つの軽鎖クローンのカクテルと共に $1 \times 10^9$ 個のHeLa細胞に同時感染させた(重鎖:L48、L116、L122、L7110、およびL9021;ならびに軽鎖:L3-1、L151、L214、およびL223)。重鎖ウイルスの合計moiは1であり、軽鎖ウイルスの合計moiは1であり、各軽鎖は、加えた軽鎖ウイルスの合計の約1/9を含んでいた。

#### 【0196】

懸濁状態で成長しているHeLa-S細胞を2日間感染させ、その後上清を採取し、2回低速回転でペレットにし、F16/F250ローターに入れて13,000RPMで1時間EEVをペレットにした。1

0% FBSを補充したDMEM 3ml中にEEVを再懸濁し、CD100特異的抗体を選択するために1mlを使用した。

#### 【0197】

##### ラウンド1の選択

2368-A56Rを発現しているEEV (約 $5 \times 10^5$ pfuを有するウイルス1ml) および2408-A56Rを発現しているEEV (約 $5 \times 10^5$ pfuを有するウイルス1ml) を対照として使用し、ライブラリー10 (約 $10^8$ pfuを有するウイルス1ml) を選択アッセイのために使用した。最初に、プロテインGビーズ300  $\mu$ l (2 $\times$ 標準量/試料) を磁石でプルダウンし、PBS 600  $\mu$ l + CD100-Fc 18  $\mu$ l (=36  $\mu$ g) をビーズに加えた。溶液を室温で20分間 (回転装置上で) インキュベーションし、CD100-FcにプロテインGビーズに結合させた。ビーズを磁石でプルダウンし、PBS 1mlで1回洗浄し、10% FBSを補充したDMEM 300  $\mu$ l中に再懸濁した。

#### 【0198】

次に、1試料あたりCD100-Fc/ProG 100  $\mu$ l (約12  $\mu$ g/ml CD100-Fc) をEEVに加え (2408対照および2368対照、ならびにライブラリー10)、室温で2時間インキュベーションした。標準的な5回のPBS 1mlの洗浄後に、未結合のウイルスを取り出した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlを加え、この溶液を新しいチューブに移した (「結合物」)。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。結果を表12に示す。結合したウイルスをT175フラスコ中のBSC1細胞で3日間増幅した。

#### 【0199】

(表12) トシル活性化ビーズ選択の結果

ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
ライブラリー_10	CD100-Fc	$1.5 \times 10^8$	$2.2 \times 10^6$	0.15
2368	CD100-Fc	72,000	37,000	34
2408	CD100-Fc	338,400	80	0.12

#### 【0200】

これらの結果は、ライブラリー10.1がBSC1で良好な増幅、採取量および力価を与えたことを示している。

#### 【0201】

##### ラウンド2の選択

10.1+9個の軽鎖の新鮮なアリコートからのEEVは、細胞スタッカー中のHeLa細胞にmoi=1でそれぞれ2日間感染させ、上記のように採取することによって産生した。採取されたウイルスを半分に分け、50%をProGビーズで選択し、50%をCD100被覆トシル活性化ビーズで選択した。

#### 【0202】

ProGビーズ選択を使用しているラウンド2。2368-A56Rを発現しているEEV (ウイルス1ml (約 $5 \times 10^5$ pfu))、2408-A56Rを発現しているEEV (ウイルス1ml ( $5 \times 10^5$ pfu)) および10.1ライブラリー (ウイルス1ml ( $5 \times 10^5$ pfu)) を選択のために使用した。PBS 600  $\mu$ l + CD100-Fc 18  $\mu$ l (=36  $\mu$ g) をPro-Gビーズに加えた。この溶液を室温で20分間 (回転装置上で) インキュベーションして、CD100-FcをプロテインGビーズに結合させた。ビーズを洗浄し、ラウンド1について上に記載したように再懸濁した。1試料あたりCD100-Fc/ProG 100  $\mu$ l (約12  $\mu$ g/ml CD100-Fc) をウイルス試料に加え、室温で2時間インキュベーションした。「未結合物」および「結合物」を収集し、力価検定した。結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅させた (ラウンド2の選択を「CD100 10.2/ProG」と名付けた)。ラウンド2の選択の結果を表13Aに示す。結合したウイルスをT175フラスコ中のBSC1で3日間増幅

させた。

# 【 0 2 0 3 】

トシル活性化ビーズ選択を使用しているラウンド2。上記プロテインGビーズ選択実験に使用したのと同じ2408 (C35特異的)、2368 (CD100特異的) およびライブラリー10抗体を発現しているEEVを、トシル活性化磁気ビーズ選択のために使用した。CD100-His 100  $\mu$ g をPBS中でトシル活性化磁気ビーズにコンジュゲーションした。この溶液を37 で一晩インキュベーションし、37でPBS、10% FBS、0.5% BSAで1時間ブロッキングした。ビーズをDMEM、10% FBSで1回洗浄し、10% FBSを補充したDMEM 160  $\mu$ l中に再懸濁した。各ビーズ試料50  $\mu$ lを各ウイルス試料に加え、室温で2時間インキュベーションした。未結合のウイルスを標準的な5回のPBS 1ml洗浄で収集した。ビーズを磁石から取り出し、2.5%補充したDMEM 1mlを加え、ビーズを新しいチューブに移した(「結合物」)。「未結合物」および「結合物」を力価検定した。結合したウイルスをT175フラスコ中のBSC1で3日間増幅した。ラウンド2の選択の結果を表13Bに示す。

# 【 0 2 0 4 】

(表13A) CD100Abについてのラウンド2の選択(プロテインGビーズ選択)

ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
ライブラリー10.1 プロテインG	CD100-Fc	4.4x10 <sup>7</sup>	67,000	0.15
2368	CD100-Fc	104,400	66,000	38.7
2408	CD100-Fc	240,000	80	0.03

# 【 0 2 0 5 】

(表13B) CD100Abについてのラウンド2の選択(トシル活性化ビーズ選択)

ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
ライブラリー10.1トシル	CD100-His	2.4x10 <sup>7</sup>	113,000	0.47
2368	CD100-His	56,400	106,000	34.4
2408	CD100-His	354,000	0	0

# 【 0 2 0 6 】

これらの第2ラウンドの結果は、ライブラリー10.2/ProGおよび10.2/トシルが両方ともBSC1で良好な増幅を与えたことを示している。

# 【 0 2 0 7 】

ラウンド3の選択

上記と同じ方法を用いて第3ラウンドの選択を行った。第3ラウンドについてCD100-Fc/ProGを用いて10.2/ProGを選択し、第3ラウンドについてCD100-His/トシルを用いて10.2/トシルを選択した。10.2/ProG+9つの軽鎖の新鮮なアリコートからのEEVは、全部の重鎖組み換えウイルスおよび全部の軽鎖組み換えウイルスのそれぞれについてT175中でHeLa細胞にmoi=1で2日間感染させ、上記のように採取することによって産生した。10.2/トシル+9つの軽鎖の新鮮なアリコートからのEEVは、全部の重鎖組み換えウイルスおよび全部の軽鎖組み換えウイルスのそれぞれについてT175フラスコ中でHeLa細胞にmoi=1で2日間感染させ、上記のように採取することによって産生した。力価を表14A~Bに示す。

## 【 0 2 0 8 】

(表14A) CD100Abについてのラウンド3の選択 (プロテインGビーズ選択)

ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
ライブラリー10.2 プロテインG	CD100-Fc	2.5x10 <sup>7</sup>	364,000	1.44
2368	CD100-Fc	84,000	58,000	48.5
2408	CD100-Fc	99,600	0	0

10

## 【 0 2 0 9 】

(表13B) CD100Abについてのラウンド3の選択 (トシル活性化ビーズ選択)

ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
ライブラリー10.2トシル	CD100-His	8.2x10 <sup>6</sup>	6,100	0.074
2368	CD100-His	69,600	108,000	60.8
2408	CD100-His	121,000	0	0

20

## 【 0 2 1 0 】

結合物ライブラリーをT75中のBSC1で増幅させた (ラウンド3の選択を「CD100 10.3ProG およびCD100 10.3/トシル」と呼ぶ)。ラウンド3選択の結果をフローサイトメトリーによってテストした。

30

## 【 0 2 1 1 】

この実験で、10.3選択物のアリコートを各軽鎖と共に個別に同時感染させ、次に、CD100およびHer2への結合性についてテストした。Hela細胞をmoi=1で感染させた。一晚感染後に、細胞を採取し、CD100結合および対照としてのHer2結合について染色した。細胞をトリプシン処理し、氷冷したフロー緩衝液 (FB 1×PBS、0.5%BSA、2mM EDTA) で洗浄し、3つの異なる検出方法のそれぞれを用いて検出した。第1の検出方法 (2段階) において、細胞を氷上のFB中の10 µg/mL huCD100-Hisと共に30分間インキュベーションし、次にFB 2mLで洗浄し、1:500 (2 µg/mL) FITC標識ヤギFab抗ヒトFabと混合した1:50 (2 µg/mL) マウス抗6×His-APCと共に氷上で30分間インキュベーションした。第2および第3の検出方法 (前複合体形成) において、10 µg/mL huCD100-Hisまたは10 µg/mL huHer2-HisのいずれかをFB中の1:50 (2 µg/mL) マウス抗6×His-APCと共に氷上で30分間予備インキュベーションし、次に、この混合物を1:500 (2 µg/mL) GtFab抗huFab-FITCを有する細胞に加え、氷上で30分間インキュベーションした。検出試薬と共にインキュベーション後、細胞をFB 2mLで1回洗浄し、0.5%パラホルムアルデヒド中で再構成し、氷上で20分間インキュベーションした。FACS Cantoで20,000イベントを読み取った。結果を図16~22に示す。

40

## 【 0 2 1 2 】

フローサイトメトリー染色によって、大部分の軽鎖と対形成したときに、CD100 10.3/ProGおよびCD100 10.3/トシル中にCD100結合陽性細胞集団があったことが示された。特に、L3-1と同時感染しているときに、強い陽性集団が観察された。

## 【 0 2 1 3 】

50

特異的VHを単離するために、Hela細胞に10.3/ProGまたは10.3/トシルを別々に感染させ、L3-1と同時感染させた。一晚感染後、細胞を採取し、上記の前複合体形成方法でCD100結合について染色した。次に、抗原結合細胞を細胞選別によって単離した。選別後、凍結/融解によってウイルスを細胞から放出させ、次にBSC1細胞でウイルスを増幅した。単離されたEEV-VH鎖の増幅試料を分析用フローアッセイによって濃縮についてテストした。このアッセイにおいて、増幅された選別後のCD100 10.3試料のアリコートにL3-1軽鎖と共に同時感染させ、次に上記の2工程および前複合体形成方法でCD100およびHer2への結合性についてテストした。結果を図23～25に示す。

#### 【0214】

増幅後、ウイルスを採取し、Qiagen DNA血液ミニキット（カタログ番号51104）を使用してウイルスのアリコートからDNAを抽出した。精製DNAを、重鎖特異的プライマー428;

5'-GATATATTAAAGTCGAATAAAGTG-3' (SEQ ID NO:31) および 430;  
5'-GACATCACATAGTTTAGTTGC-3' (SEQ ID NO:32)

を用いてPCR増幅した。得られたPCR産物を、分泌型完全長ヒトIgG1を含有するプラスミドベクター（EFVH）にクローニングし、次に、得られたコロニー中に含有されるV遺伝子を配列決定した。配列決定の結果の概要を表15に示す。10.3/ProGから188個のクローンを配列決定後、44個のユニークなクローンを同定し、10.3/トシルから188個のクローンを配列決定後、46個のユニークなクローンを同定した。

#### 【0215】

（表15）ユニークなクローンの概要

スクリーニング	配列決定された クローン	ユニーク 配列	ELISAによる 結合
10.3/ProG	188	44	56.8%
10.3/トシル	188	46	60.9%

#### 【0216】

Lipofectamine 2000を使用して、ユニークな重鎖それぞれについてのプラスミドDNAを、VL3-1をコードするプラスミドベクターと共にCHO細胞に3日間同時トランスフェクションし、次に、培地中に含有される抗体を、CD100に対する特異性についてCD100+Jurkat細胞を用いたフローサイトメトリーによって、およびELISAによってテストした（それぞれ図26および27A～B）。フローサイトメトリーアッセイのために、フロー緩衝液（1×PBS、0.5% BSA、2mM EDTA）中で1μg/mL実験用抗体を、1:400または[2.5μg/mL] Gt抗Hu Fc-Dylight 649二次抗体と共に予備インキュベーションした。Jurkat細胞を96ウェルプレート中に250,000個/ウェルとなるように播き、前形成したAb複合体と共に氷上で30分間インキュベーションした。次に、細胞をフロー緩衝液200μLで2回洗浄し、1×ヨウ化プロピジウム（PI）を有する0.5%パラホルムアルデヒドと共に20分間インキュベーションした。生細胞集団にゲート設定して10,000イベントを読み取るFACS Cantoで細胞を検出した。全体で少なくとも75のユニークな抗体がELISAまたはフローサイトメトリーによってCD100に特異的であることが示された。

#### 【0217】

##### 実施例12

Her2抗体選択のためのCH1-A56R融合タンパク質ライブラリーのスクリーニング

ナীবVH配列および合成VH配列の組み合わせを含有する約3,000,000のクローンからなる重鎖ライブラリーを、IRES-ネオマイシンとの融合体としてA56R-Fabベクターにおいて産生させた。EEV表面にIgのライブラリーを発現しているワクシニアを産生するために、A56R融合ライブラリー（「ライブラリー9」とも呼ぶ）を、ハイグロマイシン耐性遺伝

子を含む1,000の 軽鎖クローンのライブラリーと共に $5 \times 10^9$ 個のHeLa細胞に同時感染させた。軽鎖ライブラリーは、ヒト骨髄（ナイブ）から単離されたVK配列からなっていた。重鎖ウイルスの合計moiは1で、軽鎖ウイルスの合計moiは1であった。

#### 【0218】

懸濁状態で成長しているHeLa-S細胞に2日間感染させ、その後上清を採取し、低速回転2回でペレットにし、F16/F250ローターに入れて13,000RPMで1時間かけてEEVをペレットにした。10% FBSを補充したDMEM 3ml中にEEVを再懸濁し、1mlを使用してHer2/neu特異的抗体を選択した。

#### 【0219】

ラウンド1の選択

この選択のためにライブラリー9を使用した。最初に、PBS 100  $\mu$ l + 24  $\mu$ g Her2-FcをプロテインGビーズ600  $\mu$ lに加えた。この溶液を室温で20分間（回転装置上で）インキュベーションし、Her2-FcをプロテインGビーズに結合させた。磁石でビーズをプルダウンし、PBS 1mlで1回洗浄し、10% FBSを補充したDMEM 400  $\mu$ l中に再懸濁した。

#### 【0220】

次に、Her2-Fc/ProG 100  $\mu$ l（約6  $\mu$ g/ml Her2-Fc）をライブラリー9 1mlに加え、室温で2時間インキュベーションした。同様の量のビーズを陽性対照Mab8000 EEVおよび陰性対照Mab2408 EEVに加えた。ビーズを取り出し、未結合のウイルスを標準的な5回のPBS 1mlの洗浄で収集した。磁石からビーズを取り出し、2.5%FBSを補充したDMEM 1mlを加え、この溶液を新しいチューブに移した（「結合物」）。「未結合物」および「結合物」を力価検定した（表16参照）。結合物ライブラリーから回収されたビーズを、1mg/ml G418の存在下で3つのT175フラスコ中のBSC1で増幅した。この増幅から、重鎖組み換えウイルスが選択された（ラウンド1の選択を「Her.9.1」と名付けた）。

#### 【0221】

（表16）Her2 Abについてのラウンド1の選択

ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
ライブラリー9	Her2-Fc	$1.4 \times 10^9$	$4.6 \times 10^6$	0.32
2408	Her2-Fc	$1.2 \times 10^5$	180	0.14
8000	Her2-Fc	$3 \times 10^5$	$7.2 \times 10^4$	19.3

#### 【0222】

ラウンド2の選択

増幅したHer.9.1を力価検定し、2つのCellStacker中でHeLa細胞にHer.9.1VHおよびVK1000ライブラリーの新鮮なアリコートに2日間同時感染させることによって第2ラウンドの選択を行った。上記のようにウイルスを採取し、上記方法を用いて追加的なサイクルのHer2-Fc/ProG選択を行った。結合したウイルスの50%を、1mg/ml G418（重鎖の選択用）を有する2個のT175フラスコ中のBSC1で増幅し、結合したウイルスの50%を、0.030mg/mlハイグロマイシン（軽鎖の選択用）を有する2個のT175フラスコ中のBSC1で増幅した。力価の結果を表17に示す。増幅したウイルスをHer.9.2/VHおよびHer9.2/VKと名付けた。

#### 【0223】

（表17）Her2 Abについてのラウンド2の選択



ウイルス	選択	未結合物の 力価	結合物の 力価	結合率 (%)
Her2.9.Rd1 +VK	Her2-Fc	$1.76 \times 10^8$	$1.910^5$	0.1
2408	Her2-Fc	$1.4 \times 10^5$	80	0.1
8000	Her2-Fc	$3.3 \times 10^5$	$6.2 \times 10^4$	16

## 【 0 2 2 4 】

## ラウンド3の選択

増幅したHer.9.2/VHおよびHer9.2/VKを力価検定し、CellStacker中のHela細胞に2日間同時感染させ、上記のようにEEVを精製し、上記の方法を用いて追加的なサイクルのHer2-Fc/ProG選択を行った。

## 【 0 2 2 5 】

結合したウイルスの50%を、1mg/ml G418（重鎖の選択用）を有するT175フラスコ中のBS C1で増幅し、結合したウイルスの50%を、0.030mg/mlハイグロマイシン（軽鎖の選択用）を有するT175フラスコ中のBSC1で増幅した。増幅したウイルスをHer.9.3/VHおよびHer9.3/VKと名付けた。

## 【 0 2 2 6 】

Her.9.3/VHおよびHer9.3/VKにおけるHer2特異的抗体の選択は、フローサイトメトリーによってテストした。Hela細胞にHer9.3/VHおよびHer9.3/VKをmoi=1で一晩同時感染させ、次に、対照抗原（C35）への結合の不在下でのHer2への結合について染色した。この実験で、 $3 \mu\text{g/ml}$  C35-Hisまたは $6 \mu\text{g/ml}$  Her2-Hisを抗His-APC抗体と共に氷上で30分間インキュベーションして複合体を形成させた。次に、抗Fab-FITCを加え、抗原-抗His複合体を氷上で細胞に30分間加えた。次に、細胞をPBS、0.5% BSA、2nM EDTA 2mlで洗浄した。細胞を固定し、フローサイトメトリーアッセイを行った。データは、VHおよびVKの両方の濃縮を示した。

## 【 0 2 2 7 】

さらに濃縮するために、新鮮Hela細胞に9.3VHおよびVKをそれぞれmoi=1で感染させ、細胞を上記のように染色し、次に抗原結合細胞を選別した。3サイクルの凍結/解凍によって選別された細胞からウイルスを放出させ、次に、ウイルスの50%を、1mg/ml G418（重鎖の選択用）を有するT75フラスコ中のBSC1で増幅し、ウイルスの50%を、0.030mg/mlハイグロマイシン（軽鎖の選択用）を有するT75フラスコ中のBSC1で増幅した。増幅したウイルスを力価検定し、Her.9.3VH/SortおよびHer9.3/VK/sortと名付けた。

## 【 0 2 2 8 】

Her.9.3/VH/選別およびHer9.3/VK/選別におけるHer2特異的抗体の選択をフローサイトメトリーによってテストした。Hela細胞にHer9.3/VH/選別およびHer9.3/VK/選別をmoi=1で一晩同時感染させ、次に対照抗原（C35）への結合の不在下でHer2への結合について染色した。この実験において、 $3 \mu\text{g/ml}$  C35-Hisまたは $6 \mu\text{g/ml}$  Her2-Hisを抗His-APC抗体と共に氷上で30分間インキュベーションして複合体を形成させた。次に、抗Fab-FITCを加え、抗原-抗His複合体を氷上で細胞に30分間加えた。次に、細胞をPBS、0.5% BSA、2nM EDTA 2mlで洗浄した。次に細胞を固定し、フローサイトメトリーアッセイを行った。データは、VHおよびVKの両方の濃縮を示した。

## 【 0 2 2 9 】

VHおよびVKの抗原特異的対形成を固定するために、Her.9.3/VH/選別およびHer9.3/VK/選別をそれぞれmoi=0.1でHela細胞に同時感染させ、次にHer2結合について上記のように染色した。細胞を再び選別したが、今回は個別の感染細胞を96ウェルプレートの個別のウェルに選別した。選別された抗原結合細胞のそれぞれは、特異的VHと特異的VKとが抗原特異的に対形成して固定されたものを含むはずである。選別後に、細胞を凍結/融解に供し

10

20

30

40

50

、次に、1個の細胞からのウイルスが1個のレシピエントウェル中で増幅される条件でウイルスを96ウェルプレート中のBSC1で増幅した。5日後に、プレートを凍結/融解に付し、次に各ウェル中のウイルスのアリコート96ウェルプレート中でHeLa細胞に感染させた。各ウェル中のウイルスは、VHとVKとの混合物を含有するはずであり、HeLa細胞の感染の結果、表面のIgG発現および抗原結合が生じるはずである。一晚結合後に細胞を採取し、上記のようにHer2結合について染色した(図28)。

【0230】

スクリーニング1のプレートから、26の特異的クローンを同定した。これらのクローンの繰り返しテストにより、それらがフローサイトメトリーによってHer2に結合するが、C35に結合しないことが実証された。3つの代表的なクローン(D5、D8、およびH2)を図29A~Cに示す。次に、DNAをウイルスから抽出し、これらのウイルスに含有されるVHおよびVK遺伝子を、VHおよびVK特異的プライマーを用いてPCR増幅し、それらの遺伝子が完全長IgG1および完全長として発現するように哺乳類発現ベクターにクローニングした。次に、VH遺伝子およびVK遺伝子の配列を決定した。配列決定によって、これらの26のクローンは15のユニークな抗体を含有した。次に、IgG発現プラスミドおよび発現プラスミドの同時トランスフェクションによってこれらの抗体をCHO細胞に発現させ、3日後に細胞上清から抗体を採取した。抗体をELISAによって定量し、次に、ELISAおよびSKBR3細胞(Her2+++ )を用いたフローサイトメトリーによって特異性についてテストした。ELISAおよびフローサイトメトリーによって特異性を有することが示された抗体についての代表的なデータをそれぞれ図30および31に示す。

【0231】

本明細書中の方法により単一細胞選別および追加的なクローンのスクリーニングの繰り返しの結果として、追加的な新規な抗Her2抗体が同定された。

【0232】

本発明は、本発明の個別の局面の単一の例示として意図されている記載された具体的な態様によって範囲が限定されるべきではなく、機能的に等価である任意の構築物、ウイルスまたは酵素は、本発明の範囲内にある。実際、本明細書に示され、かつ記載されるものの他、本発明の様々な改変が、前述の説明および添付の図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

【0233】

本明細書に言及される全ての刊行物および特許出願は、各個別の刊行物または特許出願が具体的かつ個別に参照により組み入れられると示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。1997年9月22日に出願された米国特許出願第08/935,377号および2000年3月28日に提出された米国特許出願第60/192,586号の開示および特許請求の範囲は、参照により本明細書に組み入れられる。

【図 1】

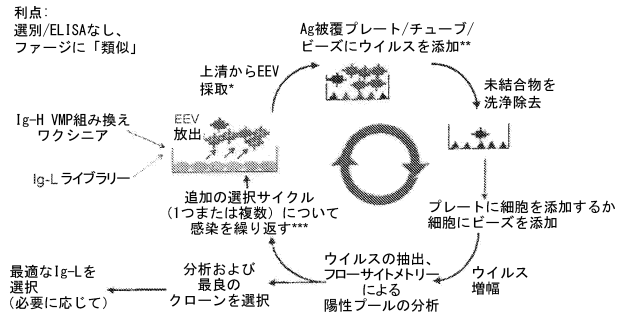
"pJEM1"

```

AAAAATGAAATAAATACAAAGGTTCTTGGGGTGTGGTTAAATGAAAGCGAGAAATATCATAAAT
TCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTGGTACGACAGCTACAGGCGGACCTCCGAGATCCAG
CTGGTGCAGAGCGGCTTGTAGTGAAGCAGCTGGCGAGACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGC
TACACCTTCAACCACTACGGCATGAAGTGGGTGAAGCAGCGCCCTGGCAAGGGCTGAAGTGGATGGGC
TGGATCAACACCTACACGGCGAGCTACCTAGCGCGCGACTTCAAGAGGAGGTTCACTTCAAGCTTG
GAGACCGCGCGCAGCAGCGCTTACCTGAGATCAGCAACCTGAAGAAGCAGCAGCAGCGCGACCTACTTC
TGCSCCAAGTACCTCACTACAGCGCAGCAGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCGCGCACCTCAG
GTACCGCTCTCTCTCAGGCTCCACCAAGGGCGCATCGGTCTTCCCTGGGACCGCTCTCCGAAGAGCAGC
TCTGGGGCAGCAGCGGCTTGGCTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCGGACCGGTGACGGTGTCTGGG
AATCAGGGCGCTTACCGAGCGGCTGACACCTTCCCGCTGTCTCTACAGTCTCTCAGGCTCTACTCC
CTCAGCAGCGCTGTGACCGCTGCGCTCCAGCAGCTTGGGACCGCAGACCTACATCTGCAAGCTGATCAC
AAGCGCAGCAACACCAAGGTGGCAGCAAGGATTACATCACTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTAT
GAAGAATACCTCCAGAGTGTATTGTAATACAGATAGTGAATGACATAGACATATATCTATCTGGA
TCTACACATTACCGGAACTAGTCTAAGAACTGATTATATAGATATTCTAATTGCTCGTGGTA
TTCGAATTCGAGCTCCGGAACCAATTACTGATATGAGAAGATCATACAGACCGCTCACATACACT
AGTGATAGCATTAATACAGTAAGTGCATCTTGGAGAAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATT
ACTGATAAAGAGATCATACAGTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCTCTGGAAT
CTCCTACTATATACACCAACGATGATGCGGATCTTTATGATACCTACAAATGATAATGATACAGTACCA
CCAACTACTGAGCGGTATGACACCTCTATTAGCAATATATAAACCAAGGACTTTCAGAAATATT
GGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGCGCTGGCAATTTTCTGTATTACATATTATATATATATAA
CGTTACAGTAAATCAAAAACAGAGCAACAGCTCTAG
(SEQ ID NO: 1)
    
```

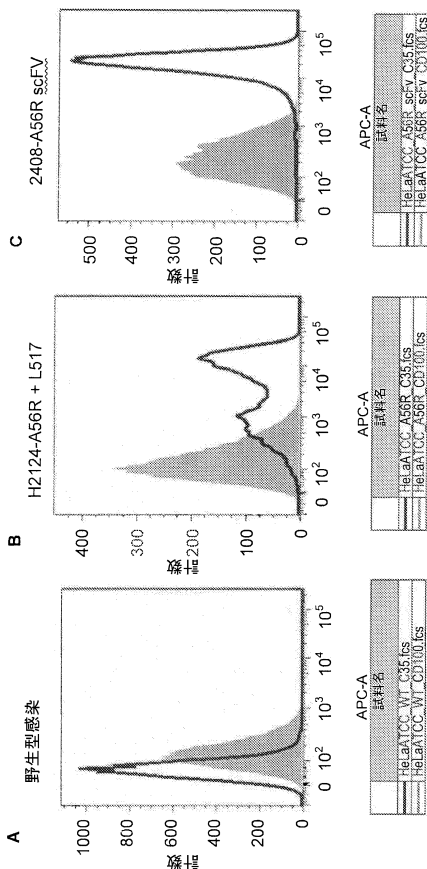
二重下線 - H5 プロモーター  
 二重下線 - リーダーペプチド  
 波線下線 - 代表的な重鎖可変領域  
 太下線 - IgG CH1 ドメイン  
 下線なし - ワクシニア A56R  
 太斜体字 - Bss HII および BstEII 可変遺伝子クローニング部位

【図 2】

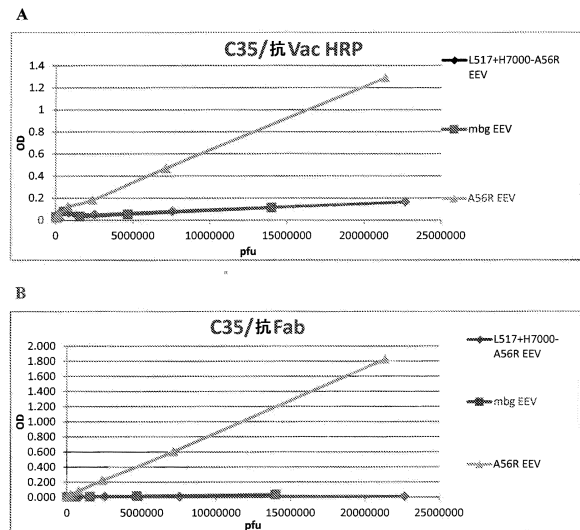


\*IMVについて：細胞を採取し、ホモジナイズし、破片を遠心除去して進む  
 \*\*枯渇工程を採用することができる  
 \*\*\*最終工程として細胞選別を加えることができる

【図 3】

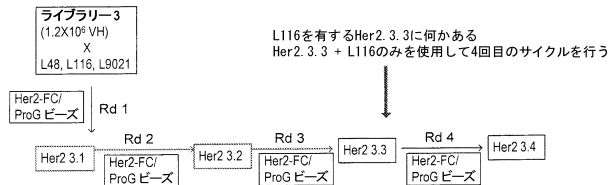


【図 4】

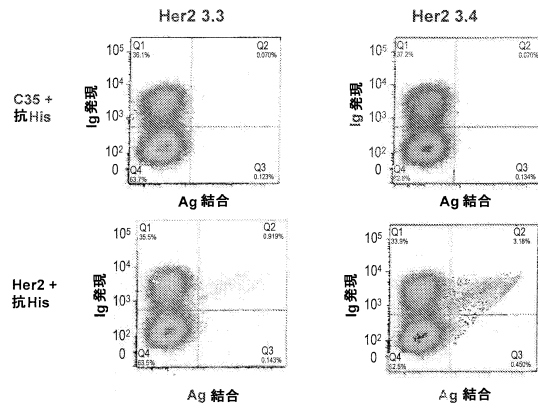




【図 9】



【図 10】



【図 11】

Her2 B10クローンの配列

EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFAFNYYALSWVRQAPGRGLKWVSAISPDGD  
YIYYADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCARQNNVRDGAAGPLD  
HWGQGTTLVT

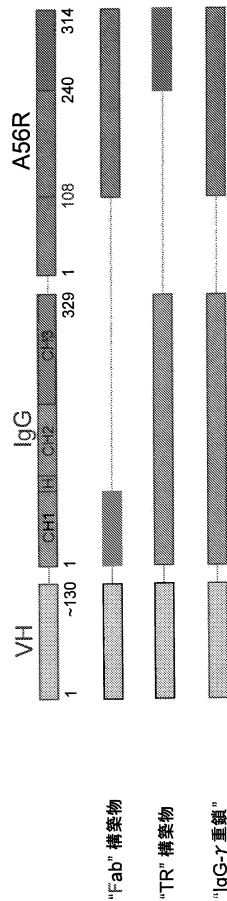
>IGHV3-23\*01

Identities = 77/98 (78%), Positives = 85/98 (86%)

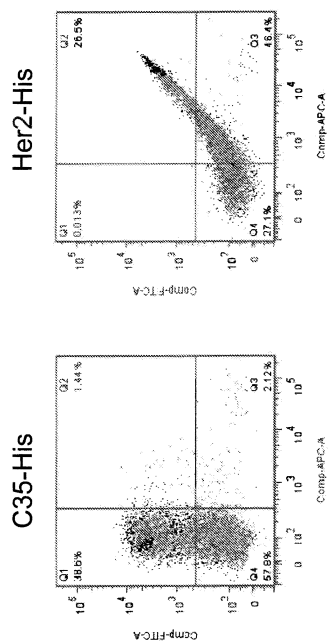
B10 : 1 EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFAFNYYALSWVRQAPGRGLKWVSAISPDGYIYY 60  
EVQLLESGGG VQPGGSLRLSCAASGF F++YA+SWVRQAPG+GL+VWSAIS G YY  
VH323: 1 EVQLLESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISSGGSTYY 60

B10 : 61 ADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCAR 98 (SEQ ID NO:20)  
ADSVKGRF SRDNS+N L LQM SL AEDTA+YYCA+  
VH323: 61 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLR AEDTAVYYCAR 98

【図 12】

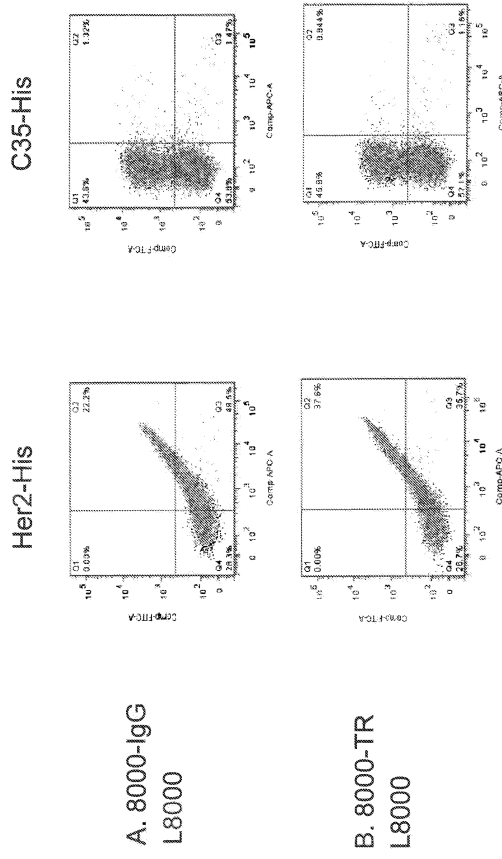


【図 13】

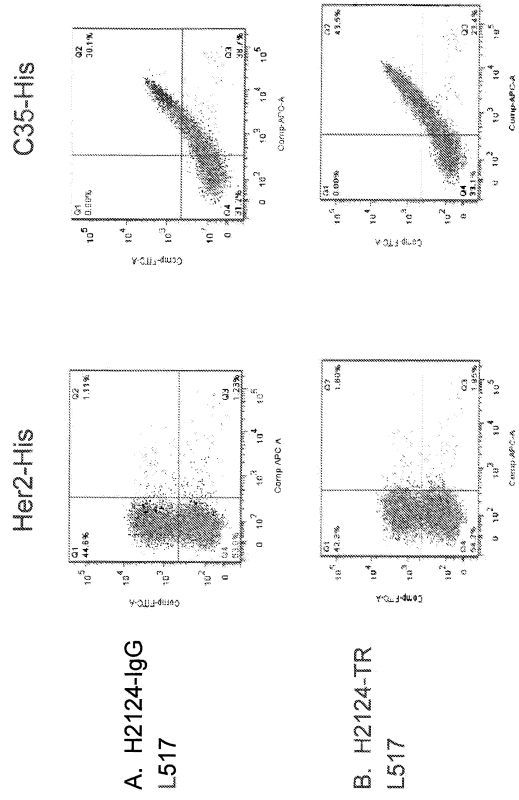


8000-Fab  
L8000

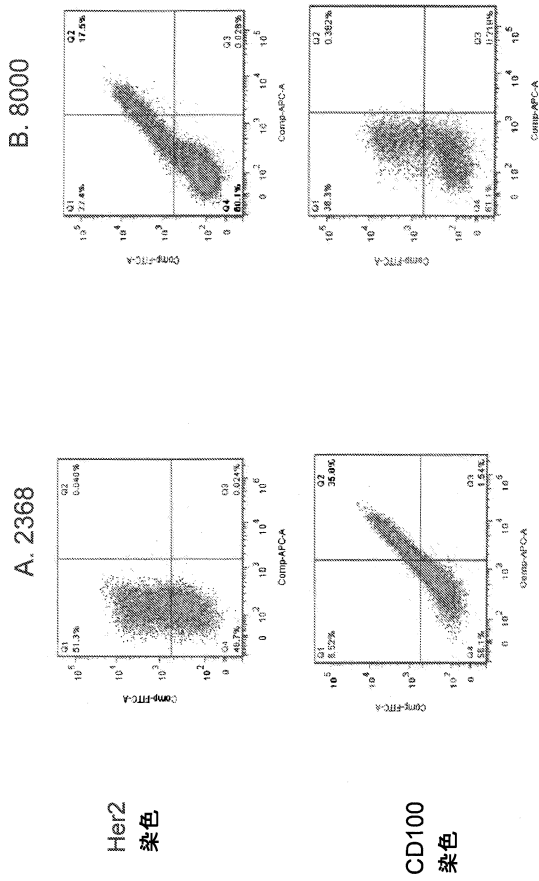
【図 14】



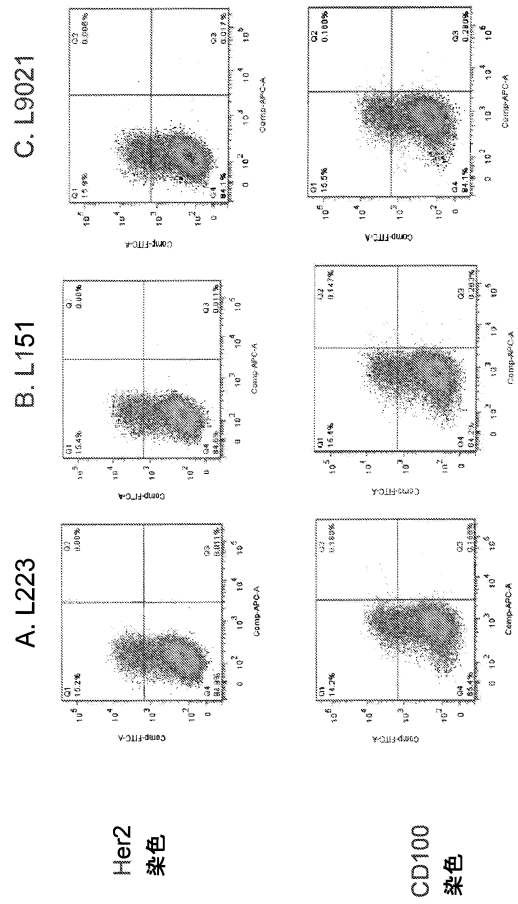
【図 15】



【図 16】

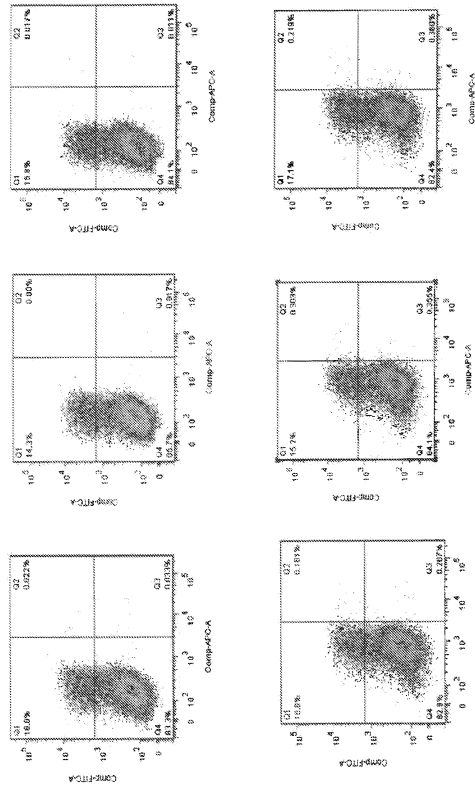


【図 17】

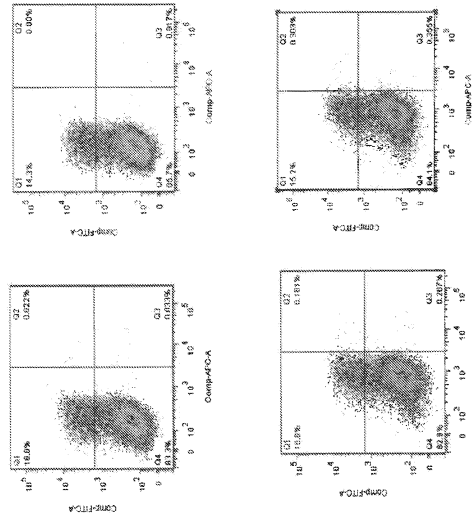


【図 18】

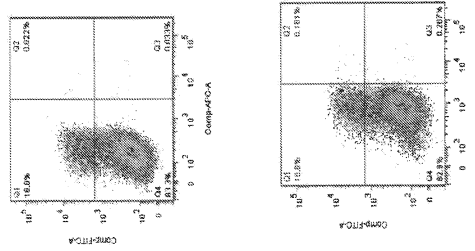
C. L122



B. L7110

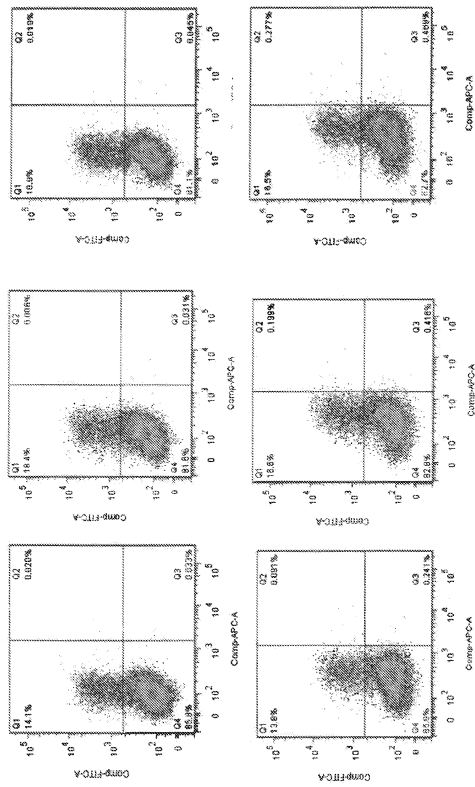


A. L48

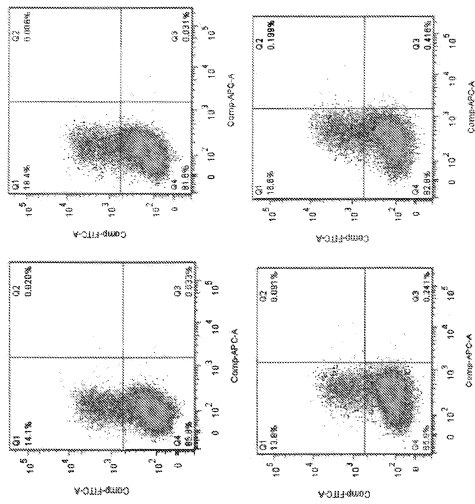


【図 20】

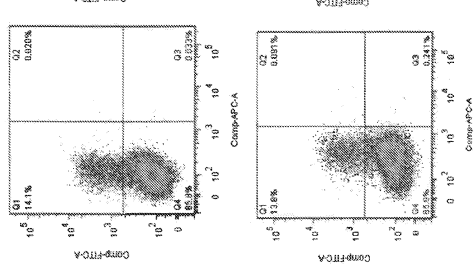
C. L9021



B. L151

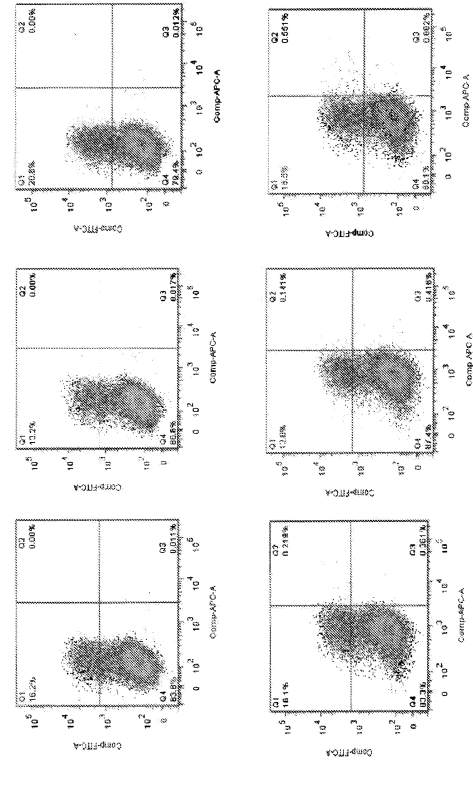


A. L223

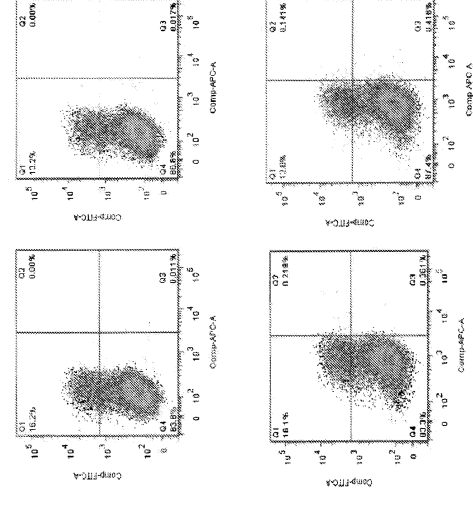


【図 19】

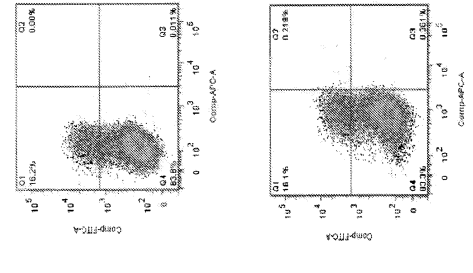
C. L3-1



B. L214

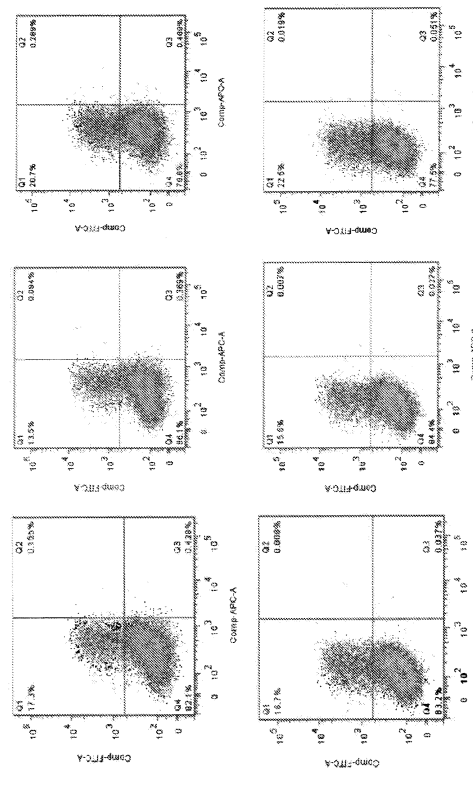


A. L116

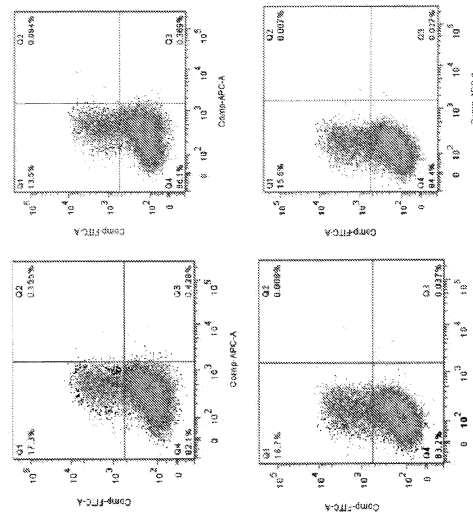


【図 21】

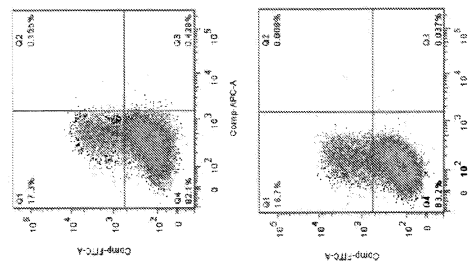
C. L122

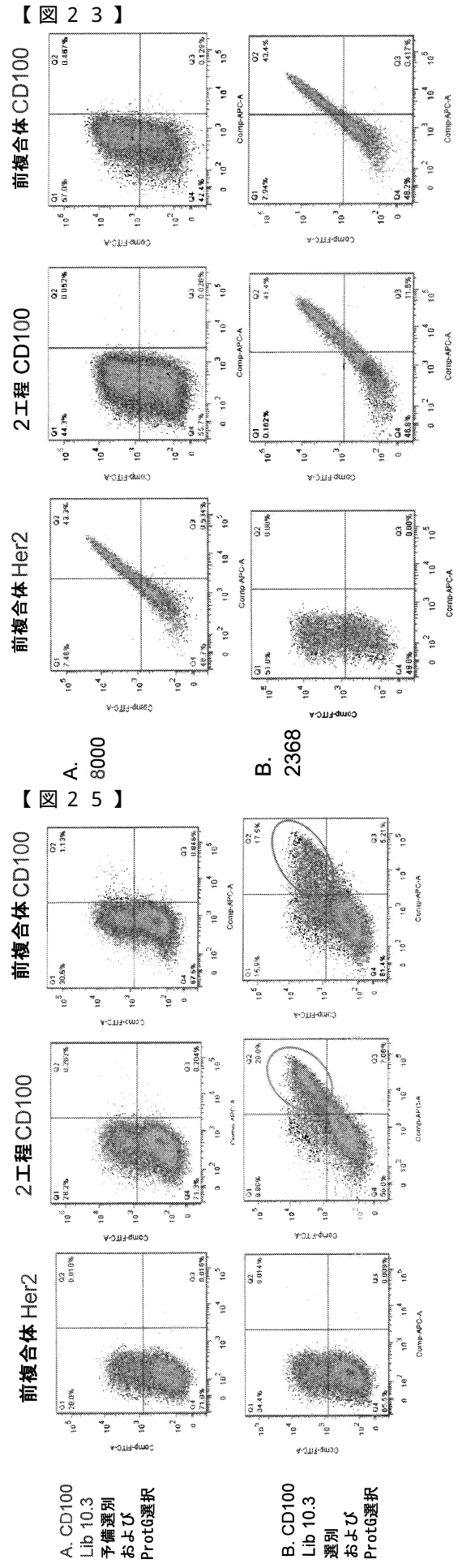
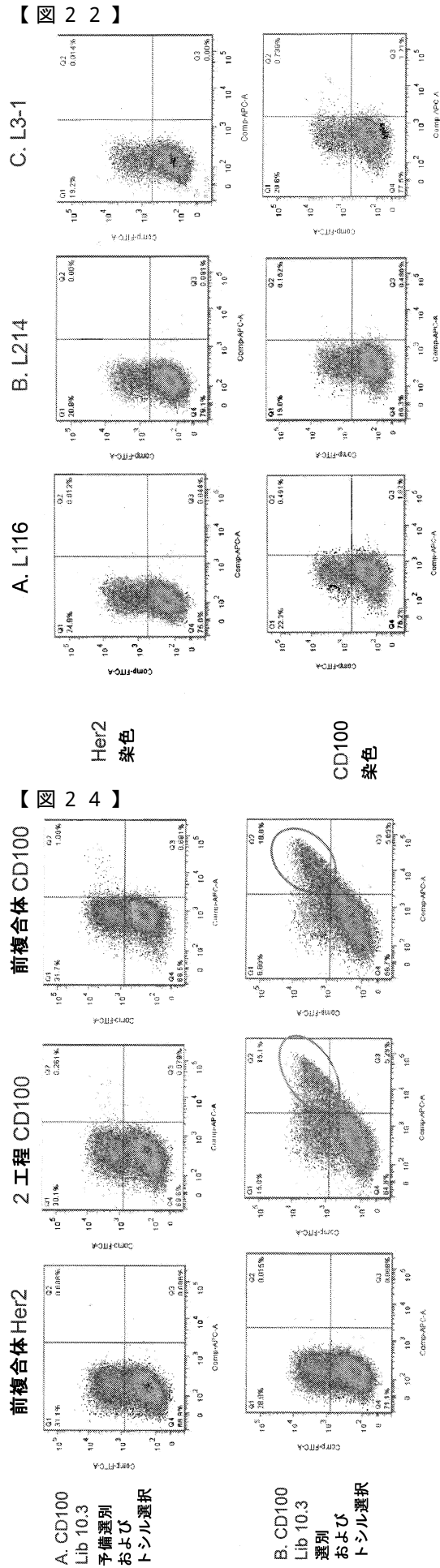


B. L7110



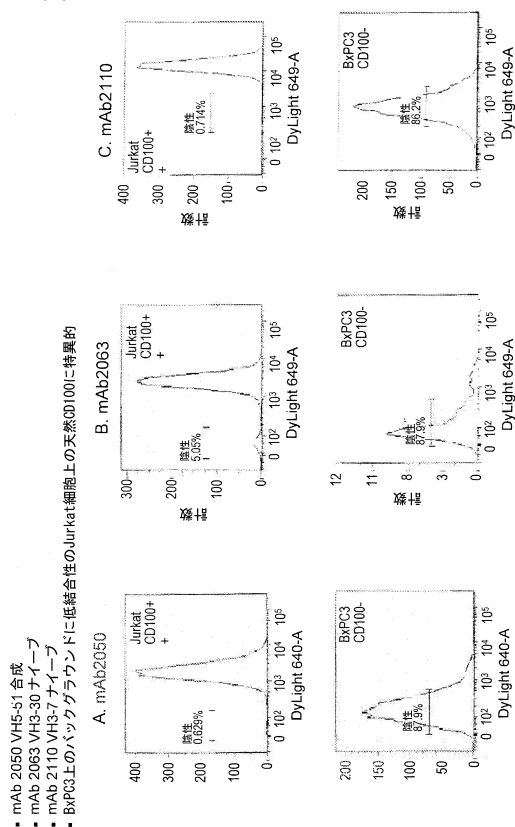
A. L48



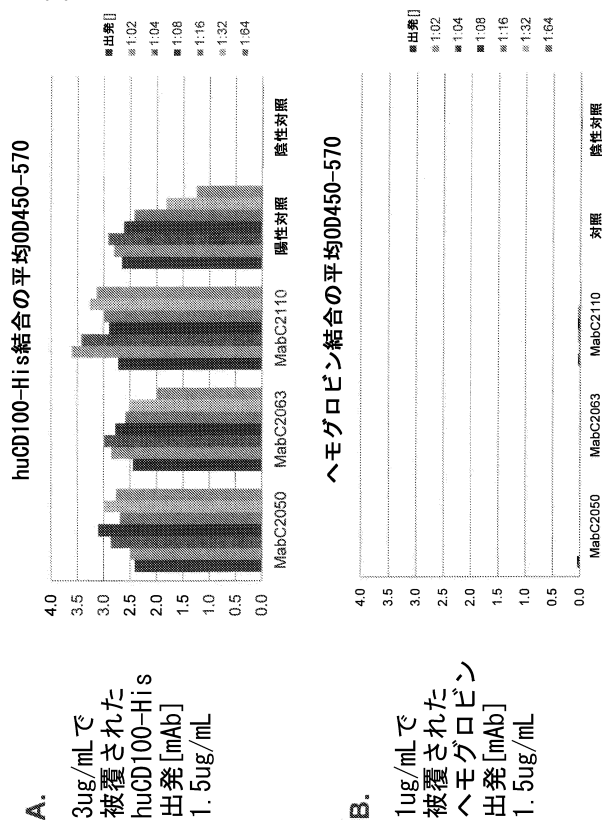




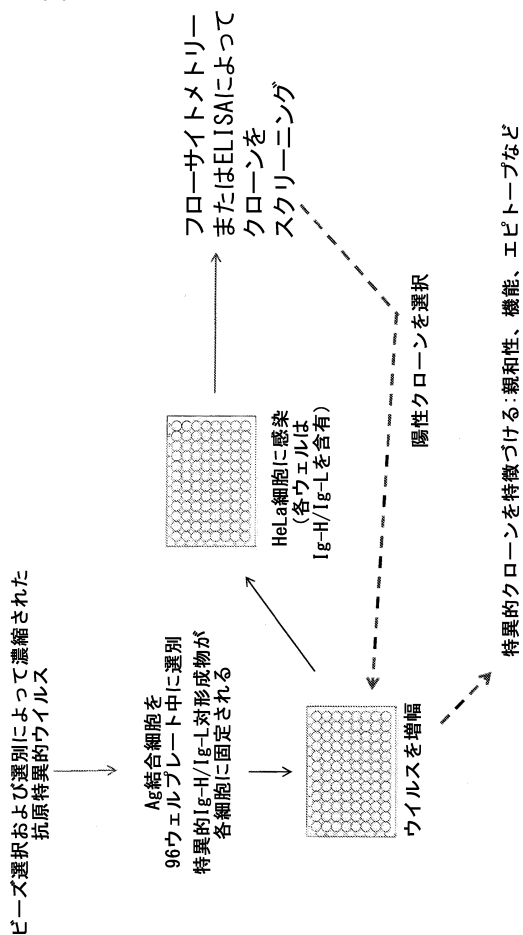
【 ㊦ 2 6 】



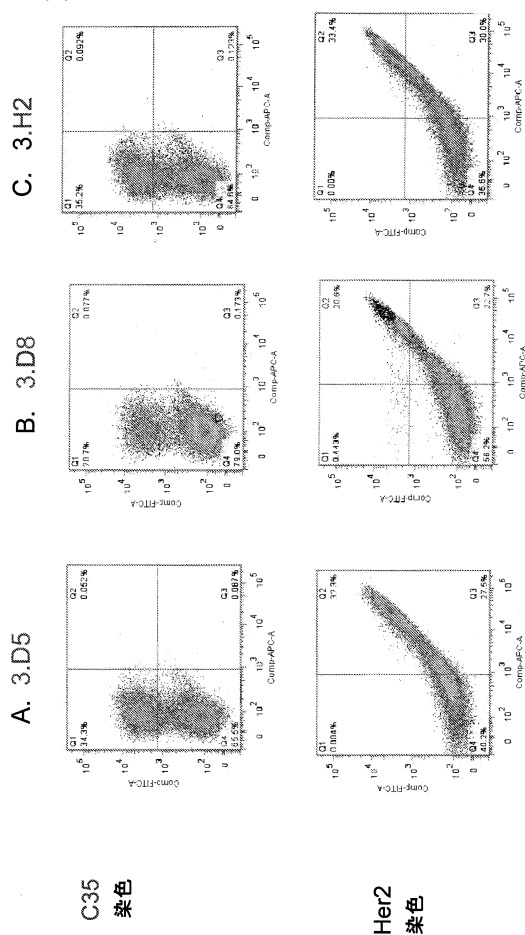
【 ㊦ 27 】

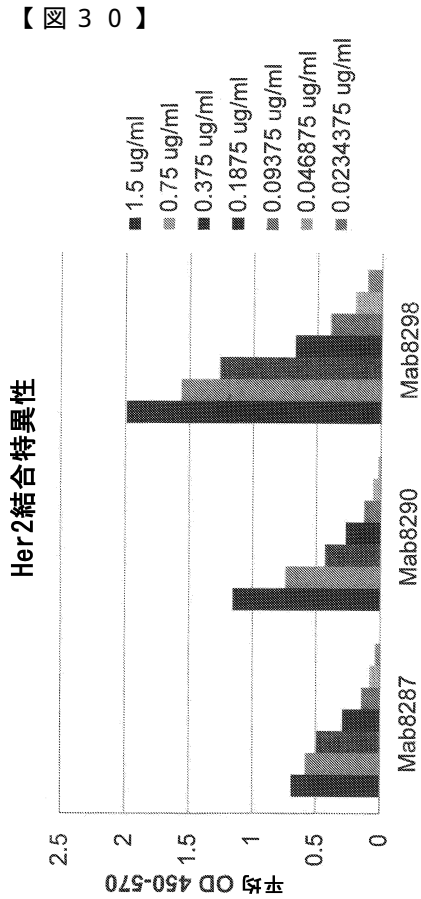


【 図 2 8 】

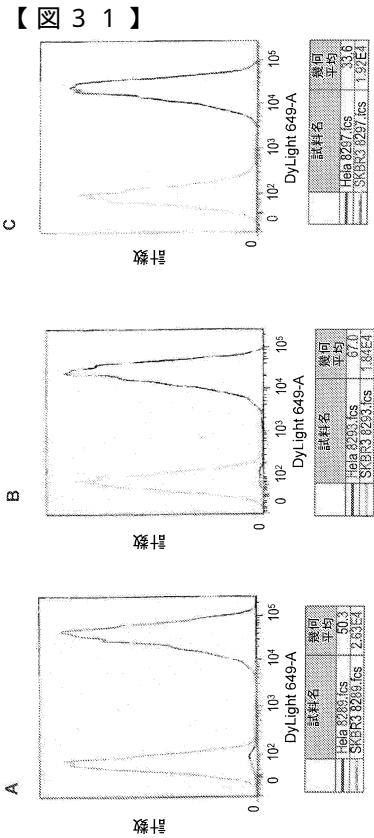


【 図 2 9 】





【配列表】  
0006498599000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 4 0 B 40/02 (2006.01)		C 4 0 B 40/02
C 0 7 K 16/00 (2006.01)		C 0 7 K 16/00
C 0 7 K 14/07 (2006.01)		C 0 7 K 14/07
C 1 2 N 7/01 (2006.01)		C 1 2 N 7/01
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21

(31)優先権主張番号 13/844,388

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

## 前置審査

- (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 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 スミス アーネスト エス.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 オンタリオ ボストン ロード 3 2 8
- (72)発明者 パンディーナ トレイシー  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ロチェスター ティマロン トレイル 1 1 5
- (72)発明者 クロイ レスリー エイ.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 レークビル ストーン ヒル ロード 5 8 9 9
- (72)発明者 パリス マーク  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ウェスト ヘンリエッタ フィッツパトリック トレイル 9  
4
- (72)発明者 ツァオデラー モーリス  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ピッツフォード ウッドランド ロード 4 4
- (72)発明者 モクサ アンゲリカ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ピッツフォード レインブルック ドライブ 1 4
- (72)発明者 カーク レネ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ブルームフィールド パプテスト ヒル ロード 7 4 7 4

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 特開2002-320475(JP,A)

国際公開第2012/006341(WO,A1)

国際公開第2012/003956(WO,A1)

国際公開第2011/143318(WO,A1)

Accession No. Q01218, Protein A56, [online], 掲載日: 1993/4/1, 検索日: 2017/2/22, Data

base UniProt, インターネット<URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q01218>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )