

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-535150

(P2010-535150A)

(43) 公表日 平成22年11月18日(2010.11.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 4 O B 40/08 (2006.01)</b>	C 4 O B 40/08 Z N A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁)

(21) 出願番号 特願2009-551103 (P2009-551103)  
 (86) (22) 出願日 平成20年2月27日 (2008.2.27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月29日 (2009.10.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2008/050048  
 (87) 国際公開番号 W02008/104184  
 (87) 国際公開日 平成20年9月4日 (2008.9.4)  
 (31) 優先権主張番号 PA200700316  
 (32) 優先日 平成19年3月1日 (2007.3.1)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)  
 (31) 優先権主張番号 60/904,772  
 (32) 優先日 平成19年3月5日 (2007.3.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505257682  
 シムフォゲン・アクティーゼルスカプ  
 SYMPHOGEN A/S  
 デンマーク、デーコーー2800コンゲン  
 ス・リングビー、ビルディング375、エ  
 レクトロヴァイ  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 同族抗体をクローニングするための方法

(57) 【要約】

本発明は、特定の表面抗原マーカーにおいて富化された細胞の集団由来のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする配列の同族対を連結するための手順に関する。連結手順は、増幅、特に、ポリメラーゼ連鎖反応(多重PCR)に関連して、目的のヌクレオチド配列を連結することが可能な多重分子増幅手順に参与する。本方法は、同族対ライブラリー、ならびに免疫グロブリン由来の変領域をコードする配列のコンビナトリアルライブラリーの作製に特に有利である。本発明はまた、キメラヒト/非ヒト抗体の作製のための方法、およびそのような方法によって作製される発現ライブラリーに関する。

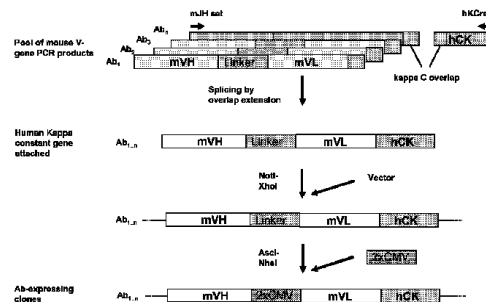


Fig. 2

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

連結された可変領域をコードする配列を含んでなる同族対のライブラリーを生成する方法であって、

- a) ドナー由来のリンパ球を含んでなる細胞画分を提供すること、
  - b) 単離された単一細胞の集団を入手すること、該入手は、前記細胞画分由来の細胞を、個々に複数の容器に分配することを含んでなり、細胞の少なくともサブ集団は、CD43 および CD138 抗原または MHCII および B220 抗原を発現するものであり、次いで、
  - c) 単離された単一細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、多重分子増幅手順で目的のヌクレオチド配列を増幅し、そして増幅された目的のヌクレオチド配列の連結を行うことによって、単離された単一細胞の前記集団に含有される可変領域をコードする配列の増幅および連結を行うこと
- を含んでなる、方法。

10

**【請求項 2】**

増幅および連結（工程 1 . c））を実施する前に、単一細胞の集団における個々の単離された単一細胞が、同遺伝子型細胞の集団に拡大培養される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

リンパ球を含有する細胞画分が、脾細胞、全血液、骨髓、単核細胞、または白血球細胞を含んでなる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

リンパ球を含有する細胞画分が、脾細胞または骨髓、好ましくは、脾細胞を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

リンパ球を含有する細胞画分または B リンパ球系統が、形質細胞または形質芽細胞について富化される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

目的のヌクレオチド配列が、免疫グロブリン可変領域をコードする配列を含んでなり、そして連結が、重鎖可変領域をコードする配列と会合した軽鎖可変領域をコードする配列の同族対を生じるものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 7】**

- 複数の目的の非隣接ヌクレオチド配列を無作為に連結する方法であって、
- a) 遺伝的に多様な細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、多重分子増幅手順でヌクレオチド配列を増幅すること、
  - b) 遺伝的に多様な細胞は、ドナー由来のリンパ球を含んでなる細胞画分に由来するものであり、
  - c) 細胞の少なくともサブ集団は、CD43 および CD138 抗原または MHCII および B220 抗原を発現するものであり、次いで、
  - d) 工程 a) において増幅した目的のヌクレオチド配列の連結を行うこと
- を含んでなる、方法。

40

**【請求項 8】**

前記細胞の集団が溶解される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記目的のヌクレオチド配列が、可変領域をコードする配列を含んでなり、そして連結が、可変領域をコードする配列の対のコンビナトリアルライブラリーを生じるものである、請求項 7 または 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記目的のヌクレオチド配列が、免疫グロブリン可変領域をコードする配列を含んでなり、そして連結が、軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする配列の対のコンビナトリアルライブラリーを生じるものである、請求項 9 に記載の方法。

50

## 【請求項 1 1】

多重分子増幅の前に、リンパ球を含んでなる細胞の集団が、CD 4 3 および CD 1 3 8 抗原または M H C I I および B 2 2 0 抗原、好ましくは、CD 4 3 および CD 1 3 8 を発現する細胞を含んでなることを評価することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

多重分子増幅の前に、前記リンパ球を含んでなる細胞画分を、CD 4 3 および CD 1 3 8 抗原または M H C I I および B 2 2 0 を発現するリンパ球集団について富化することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

多重分子増幅の前に、前記リンパ球を含んでなる集団から、CD 4 3 および CD 1 3 8 抗原または M H C I I および B 2 2 0 抗原を発現する細胞を単離することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 1 4】

単離された細胞または細胞のサブ集団が、リンパ球を含んでなる細胞画分に関して CD 1 3 8 高 / CD 4 3 高または CD 1 3 8 中 / CD 4 3 高である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

単離された細胞または細胞のサブ集団が、リンパ球を含んでなる細胞画分に関して CD 1 3 8 高 / CD 4 3 高である、請求項 1 4 に記載の方法。

20

## 【請求項 1 6】

富化または単離が、自動選別手順を含んでなる請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

自動選別手順が M A C S または F A C S である、請求項 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

細胞が哺乳動物に由来する、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

哺乳動物が非ヒトである、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

非ヒト哺乳動物がトランスジェニックであり、そしてヒトイムノグロブリンを発現する、請求項 1 9 に記載の方法。

30

## 【請求項 2 1】

ドナーがげっ歯類である、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

ドナーがマウスである、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

ドナーが霊長類である、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

ドナーがウサギである、請求項 1 8 に記載の方法。

40

## 【請求項 2 5】

前記多重分子増幅手順が多重 R T - P C R 増幅である、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

前記多重 R T - P C R 増幅が、多重 P C R 増幅の前の個別の逆転写 ( R T ) 工程を含んでなる 2 工程プロセスである、請求項 2 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 7】

前記多重 R T - P C R 増幅が、最初に、逆転写 ( R T ) および多重 P C R 増幅の両方を実施するのに必要なすべての成分を単一の容器に添加することを含んでなる単一の工程において実施される、請求項 2 5 に記載の方法。

50

## 【請求項 28】

目的のヌクレオチド配列の前記連結が、多重分子増幅として同じ容器において実施される、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

目的のヌクレオチド配列の前記連結が、多重重複伸長プライマー混合物を利用して、多重 PCR 増幅に関連して行われる、請求項 25 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 30】

目的のヌクレオチド配列の前記連結がライゲーションによって行われる、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 31】

連結された目的の核酸配列を増幅するために適応されたプライマー混合物を利用して、さらなる分子増幅が実施される、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 32】

多重重複伸長プライマー混合物がプライマーセットを含んでなり、各プライマーセットの少なくとも 1 つのプライマーセットメンバーが、第 2 のプライマーセットのプライマーセットメンバーの重複伸長テイルにハイブリダイズすることが可能な重複伸長テイルを含んでなる、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 33】

多重重複伸長プライマー混合物が、

- a) 免疫グロブリン軽鎖領域をコードする配列のセンス鎖に相補的な少なくとも 1 つの m K a p p a r 1 または h m J K プライマー、
  - b) 免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列または軽鎖可変領域リーダー配列のアンチセンス鎖に相補的であり、かつ工程 a) においてプライマーと共にプライマーセットを形成することが可能な少なくとも 1 つの m V K プライマー、
  - c) 免疫グロブリン重鎖ドメインをコードする配列のセンス鎖に相補的な少なくとも 1 つの m C H r e v 1、m H C r e v 1 - e x t、または m J H プライマー、
  - d) 免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列または重鎖可変領域リーダー配列のアンチセンス鎖に相補的であり、かつ工程 c) においてプライマーと共にプライマーセットを形成することが可能な少なくとも 1 つの m V H プライマー
- を含んでなる、請求項 29 または 32 に記載の方法。

## 【請求項 34】

連結されたヌクレオチド配列または同族対のライブラリーをベクターに挿入することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 35】

前記ベクターが、クローニングベクター、シャトルベクター、ディスプレイベクターまたは発現ベクターの中から選択される、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

連結されたヌクレオチド配列または同族対のライブラリーの個々のメンバーが、軽鎖可変領域をコードする配列と会合した免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列を含んでなり、そして前記配列が、1 つもしくはそれ以上の免疫グロブリン定常ドメインまたはそれらのフラグメントをコードする配列を既に含有するベクターにインフレームで挿入される、請求項 34 または 35 に記載の方法。

## 【請求項 37】

所望される標的特異性を伴う結合タンパク質をコードする連結された可変領域配列の同族対のサブセットを選択することによってサブライブラリーを作製し、可変領域をコードする配列の標的特異的同族対のライブラリーを作製することをさらに含んでなる、請求項 34 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記同族対または可変領域をコードする配列の標的特異的同族対のライブラリーを、哺乳動物発現ベクターに移行させることをさらに含んでなる、請求項 36 ~ 37 のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の方法。

【請求項 39】

哺乳動物発現ベクターが、ヒト免疫グロブリンクラス I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、軽鎖または軽鎖から選択された 1 つもしくはそれ以上の定常領域ドメインをコードする、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

以下の工程、

a) 連結されたヌクレオチド配列のセグメントをコードするベクターを宿主細胞に導入すること

b) 発現のために適応された条件下で、前記宿主細胞を培養すること、

c) 前記宿主細胞に挿入されたベクターから発現されるタンパク質産物を入手することをさらに含んでなる、請求項 34 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記タンパク質産物が、重鎖可変領域と会合した軽鎖可変領域の同族対を含んでなる抗体である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

大部分のウェルにおいて、

・リンパ球細胞を含んでなる細胞画分に由来する 1 つの細胞であって、C D 4 3 および C D 1 3 8 抗原または M H C I I および B 2 2 0 抗原を発現する細胞と、

・m R N A の逆転写を行うため、ならびに重鎖および軽鎖可変コーディング領域を増幅するために必要な緩衝液ならびに試薬とを含んでなる、マルチウェルプレート。

【請求項 43】

ヒト定常領域および非ヒト可変領域を伴うキメラ抗体をコードするベクターを作製するための方法であって、

a) 非ヒト動物由来のリンパ球を含んでなる細胞画分を提供すること、

b) 単離された単一細胞の集団を入手すること、該入手は、前記細胞画分由来の細胞を、個々に複数の容器に分配することを含んでなり、

c) 単離された単一細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、前記核酸を多重分子増幅手順で増幅し、そして重鎖および軽鎖の可変領域をコードする増幅された核酸の連結を行うことによって、単離された単一細胞の前記集団に含有される可変領域をコードする核酸の増幅および連結を行うこと、

d) 増幅された可変領域のヒト定常領域への連結を行うこと、次いで、

e) 得られた核酸をベクターに挿入すること

を含んでなる、方法。

【請求項 44】

前記多重分子増幅手順が多重 R T - P C R 増幅である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記多重 R T - P C R 増幅が、多重 P C R 増幅の前の個別の逆転写 ( R T ) 工程を含んでなる 2 工程プロセスである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記多重 R T - P C R 増幅が、最初に、逆転写 ( R T ) および多重 P C R 増幅の両方を実施するのに必要なすべての成分を単一の容器に添加することを含んでなる単一の工程において実施される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

目的のヌクレオチド配列の前記連結が、多重分子増幅として同じ容器において実施される、請求項 43 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

目的のヌクレオチド配列の前記連結が、多重重複伸長プライマー混合物を利用して、多

10

20

30

40

50

重PCR増幅に関連して行われる、請求項44～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

目的のヌクレオチド配列の前記連結がライゲーションによって行われる、請求項43～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

連結された目的の核酸配列を増幅するために適応されたプライマー混合物を利用して、さらなる分子増幅が実施される、請求項43～49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

多重重複伸長プライマー混合物がプライマーセットを含んでなり、各プライマーセットの少なくとも1つのプライマーセットメンバーが、第2のプライマーセットのプライマーセットメンバーの重複伸長テイルにハイブリダイズすることが可能な重複伸長テイルを含んでなる、請求項48に記載の方法。

10

【請求項52】

多重重複伸長プライマー混合物が、

a) 免疫グロブリン軽鎖領域をコードする配列のセンス鎖に相補的な少なくとも1つのmKappa1またはhmJKプライマー、

b) 免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列または軽鎖可変領域リーダー配列のアンチセンス鎖に相補的であり、かつ工程a)においてプライマーと共にプライマーセットを形成することが可能な少なくとも1つのmVKプライマー、

c) 免疫グロブリン重鎖ドメインをコードする配列のセンス鎖に相補的な少なくとも1つのmCHrev1、mHCrex1-ext、またはmJHプライマー、

d) 免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列または重鎖可変領域リーダー配列のアンチセンス鎖に相補的であり、かつ工程c)においてプライマーと共にプライマーセットを形成することが可能な少なくとも1つのmVHプライマー

20

を含んでなる、請求項48または51に記載の方法。

【請求項53】

PCR産物が発現ベクターに挿入される、請求項44に記載の方法。

【請求項54】

二重プロモーターカセットが発現構築物に挿入され、二重プロモーターカセットが、重鎖および軽鎖の同時発現を指令することが可能であり、好ましくは、二重プロモーターカセットが両方向性である、請求項53に記載の方法。

30

【請求項55】

二重プロモーターカセットが、二重シグナルペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

発現ベクター骨格が、ヒト定常軽鎖をコードする配列もしくはそのフラグメントおよび/またはヒト定常重鎖をコードする配列もしくはそのフラグメントを含んでなる、請求項53に記載の方法。

【請求項57】

可変軽鎖への連結を提供することが可能な重複を伴うヒト定常軽鎖またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが、マウスVH鎖、リンカー、マウスVL鎖、およびヒト定常軽鎖をこの順序で含んでなる構築物の増幅が可能なプライマーセットと共に、PCR混合物に添加されるさらなる増幅工程を含んでなる、請求項43～56のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項58】

可変重鎖への連結を提供することが可能な重複を伴うヒト定常重鎖またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが、ヒト定常重鎖、マウスVH鎖、リンカー、およびマウスVL鎖をこの順序で含んでなる構築物の増幅が可能なプライマーセットと共に、PCR混合物に添加されるさらなる増幅工程を含んでなる、請求項43～56のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 59】

キメラ抗体をコードするベクターのライブラリーであって、各抗体メンバーが、非ヒト免疫グロブリン可変領域をコードする配列、ならびにヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖定常領域からなる、ライブラリー。

## 【請求項 60】

前記ベクターが、請求項 1 ~ 41 に記載の方法または請求項 43 ~ 58 に記載の方法によって得られる、請求項 59 に記載のライブラリー。

## 【請求項 61】

軽鎖定常領域が 定常領域である、請求項 59 に記載のライブラリー。

## 【請求項 62】

非ヒト配列がげっ歯類、好ましくは、マウス由来である、請求項 59 に記載のライブラリー。

10

## 【請求項 63】

非ヒト配列がウサギ配列である、請求項 59 に記載のライブラリー。

## 【請求項 64】

ベクターが発現ベクターである、請求項 59 に記載のライブラリー。

## 【請求項 65】

可変領域は同族対である、請求項 59 に記載のライブラリー。

## 【請求項 66】

ヒト免疫グロブリン定常領域が、ヒト免疫グロブリンクラス I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 または I g M から選択される、請求項 59 に記載のライブラリー。

20

## 【請求項 67】

定常領域が I g G 1 および I g G 2 から選択される、請求項 66 に記載のライブラリー。

## 【請求項 68】

請求項 59 ~ 67 のいずれか一項に記載のライブラリーから選択される特定の標的に対する所望の結合特異性を示す抗体をコードするサブライブラリー。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0001】

本発明は、特定の表面抗原マーカーにおいて富化された細胞の集団由来の  $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の同族対を連結するための手順に関する。連結手順は、増幅、特に、ポリメラーゼ連鎖反応（多重 PCR）に関連して、目的のヌクレオチド配列を連結することが可能な多重分子増幅手順に関与する。本方法は、同族対ライブラリー、ならびに免疫グロブリン由来の可変領域をコードする配列のコンビナトリアルライブラリーの作製に特に有利である。本発明はまた、キメラヒト/非ヒト抗体の作製のための方法、およびそのような方法によって作製される発現ライブラリーに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

40

特許文献 1 (Symphogen) は、重複分子手順を使用して、目的のヌクレオチド配列、特に、 $V_H$  および  $V_L$  をコードする配列の同族対を連結するための方法について開示している。目的の配列は、好ましくは、制限希釈または他の細胞分離技術に従って、単離された単一細胞から増幅および連結される。参考文献は、リンパ球を含有する細胞集団を富化して、多重分子増幅手順に特に安定な形質細胞の細胞集団を入手する様々な方法を開示している。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0003】

【特許文献 1】WO 2005/042774

50

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本発明は、非ヒト動物から免疫グロブリンをコードする配列のライブラリーを作製するための方法、ならびにハイスループットクローニングおよびスクリーニングのために適応された少数の工程で、ヒト定常領域および非ヒト可変領域を含んでなるキメラ抗体をコードするベクターのライブラリーを作製するための方法に焦点を当てている。

## 【0005】

第1の態様では、本発明は連結された可変領域をコードするコーディング配列を含んでなる同族対のライブラリーを生成する方法に関し、前記方法は、

a) ドナー由来のリンパ球を含んでなる細胞画分を提供すること、  
b) 単離された単一細胞の集団を入手すること、該入手は、前記細胞画分由来の細胞を、個々に複数の容器に分配することを含んでなり、細胞の少なくともサブ集団は、CD43およびCD138抗原またはMHCIIおよびB220抗原を発現するものであり、次いで、

c) 単離された単一細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、多重分子増幅手順で目的のヌクレオチド配列を増幅し、そして増幅された目的のヌクレオチド配列の連結を行うことによって、単離された単一細胞の前記集団に含有される可変領域をコードする配列の増幅および連結を行うこと

を含んでなる。

## 【0006】

この方法は、同族対抗体または抗体フラグメントのライブラリーを提供する。

## 【0007】

別の態様では、本発明は、複数の目的の非隣接ヌクレオチド配列を無作為に連結する方法に関し、前記方法は、

a) 遺伝的に多様な細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、多重分子増幅手順でヌクレオチド配列を増幅すること、

b) 遺伝的に多様な細胞は、ドナー由来のリンパ球を含んでなる細胞画分に由来するものであり、

c) 細胞の少なくともサブ集団は、CD43およびCD138抗原またはMHCIIおよびB220抗原を発現するものであり、次いで、

d) 工程a)において増幅した目的のヌクレオチド配列の連結を行うこと

を含んでなる。

## 【0008】

この方法は、無作為に組み合わせられた重鎖および軽鎖可変ドメインのコンビナトリアルライブラリーを提供する。

## 【0009】

本出願において提供される実験的証拠は、マウス脾細胞から単離され、そして列挙した表面抗原についてポジティブである細胞集団が、多重分子増幅方法を使用する抗体をコードする配列のクローニングのための良好な出発物質を提供することを確立する。本発明の方法は、CD43およびCD138またはMHCIIおよびB220のオーソログを発現する他の種に容易に適用することができ、特に、本方法は、ラットのような他のげっ歯類に適用することができる。

## 【0010】

本方法は、代替物、換言すると、ハイブリドーマの作製に優るいくつかの利点を提供する。免疫したマウスからハイブリドーマを調製する場合、樹立された細胞系統は、異なる抗体アイソタイプのレパートリーをコードする。ハイブリドーマ細胞系統は、続いて、機能(例えば、特異的抗原への結合性、病原体を中和する効力)および抗体アイソタイプの両方についてスクリーニングしなければならない。それ故、それは、特定の抗体アイソタイプおよび機能アッセイにおける特定の効果を伴うハイブリドーマを選択するための2工

10

20

30

40

50



程スクリーニング手順を必要とする。最終的に、産生細胞系統を作製するために、選択されるハイブリドーマによって分泌される抗体は、それを産生細胞系統に移行し得る前に、クローニングおよび配列決定する必要がある。

【0011】

本発明の方法を使用すれば、抗体アイソタイプは、多重分子増幅に使用したプライマーによって決定されるため、従って、この先これを決定する必要がない。抗体アイソタイプはまた、定常ドメインのクローニングされた可変配列への以後の連結またはスプライシングによって、決定してもよい（そして変更することができる）。さらに加えて、本発明の方法は、一旦、特定の抗体が選択されたら、それは既にクローニングされており、その配列は既に既知であり、そしてそれは抗体の産生のために適切な発現ベクターに容易に移行させることができるような、容易に配列決定し、および/または発現、移行、ディスプレイもしくはシャトルベクターのようなベクターに挿入することができるポリヌクレオチドのライブラリーを提供する。

10

【0012】

提供されたプロトコルに従って選別された細胞は、ピコモル範囲のアフィニティーを伴う高アフィニティー抗体の供給源を提供することが予想される。ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体は、ピコモル範囲のアフィニティーを所有せず、そしてこれらのアフィニティーに到達するように、合成的にアフィニティー変異させる必要がある。

【0013】

一実施形態に従えば、これらの方法は、多重分子増幅の前に、リンパ球を含んでなる細胞の集団が、CD43およびCD138抗原またはMHCI IおよびB220抗原、好ましくは、CD43およびCD138を発現することを評価することをさらに含んでなる。また、本方法は、多重分子増幅の前に、前記リンパ球を含んでなる細胞画分を、CD43およびCD138抗原またはMHCI IおよびB220を発現するリンパ球集団について富化することを含んでもよい。

20

【0014】

好ましくは、本方法は、多重分子増幅の前に、前記リンパ球を含んでなる集団から、CD43およびCD138抗原またはMHCI IおよびB220抗原を発現する細胞を単離することをさらに含んでなる。好適な実施形態では、単離された細胞または細胞のサブ集団は、リンパ球を含んでなる細胞画分に関してCD138高/CD43高またはCD138中/CD43高である。より好ましくは、単離された細胞または細胞のサブ集団は、リンパ球を含んでなる細胞画分に関してCD138高/CD43高である。

30

【0015】

富化または単離は、好ましくは、MACSもしくはFACSのような自動選別手順を含んでなる。

【0016】

さらなる態様では、本発明は、ヒト定常領域および非ヒト可変領域を伴うキメラ抗体をコードするベクターを作製するための方法に関し、前記方法は、

- a) 非ヒト動物由来のリンパ球を含んでなる細胞画分を提供すること、
  - b) 単離された単一細胞の集団を入手すること、該入手は、前記細胞画分由来の細胞を、個々に複数の容器に分配することを含んでなること、
  - c) 単離された単一細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、前記核酸を多重分子増幅手順で増幅し、そして重鎖および軽鎖の可変領域をコードする増幅された核酸の連結を行うことによって、単離された単一細胞の前記集団に含有される可変領域をコードする核酸の増幅および連結を行うこと、
  - d) 増幅された可変領域のヒト定常領域への連結を行うこと、次いで、
  - e) 得られた核酸をベクターに挿入すること
- を含んでなる。

40

【0017】

好ましくは、非ヒト動物はマウスである。本発明の方法がマウス細胞に適用される点で

50

、本方法は、マウス - Symplex<sup>TM</sup>またはmSymplex<sup>TM</sup>と命名される。

【0018】

本発明のこの態様によって、キメラヒト/非ヒト抗体のライブラリーの作製のための新規の方法が提供される。これは、多重分子増幅、ならびにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのライゲーションおよび/またはスプライシングを伴うベクター骨格への後のクローニングを組み合わせることによって、可能にされる。伝統的に、キメラヒト/非ヒト抗体を作製するための方法では、キメラ化は、ハイブリドーマが樹立およびスクリーニングされ、そしてコードされた抗体がクローニングされた後の最後の工程であった。キメラ化は、結合特異性および/または抗体のアフィニティーに影響を及ぼし得、それ故、良好なモノクローナルマウス抗体がヒト/マウス抗体にキメラ化される場合、その効力を消失する危険性が存在する。

10

【0019】

キメラ抗体の抗体を直接作製する方法によれば、前臨床および臨床開発前に、さらに改変する必要がない産物に対するスクリーニングを行うことができる。

【0020】

定常ヒト領域は、分子増幅工程で提供することができるか、またはそれらは、分子増幅後に可変領域がクローニングされるベクター骨格として提供することができる。好適な実施形態では、本方法は、可変軽鎖への連結を提供することが可能な重複を伴うヒト定常軽鎖またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが、マウスVH鎖、リンカー、マウスVL鎖、およびヒト定常軽鎖をこの順序で含んでなる構築物の増幅が可能なプライマーセットと共に、PCR混合物に添加されるさらなる増幅工程を含んでなる。

20

【0021】

別の実施形態では、本方法は、可変重鎖への連結を提供することが可能な重複を伴うヒト定常重鎖またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが、ヒト定常重鎖、マウスVH鎖、リンカー、およびマウスVL鎖をこの順序で含んでなる構築物の増幅が可能なプライマーセットと共に、PCR混合物に添加されるさらなる増幅工程を含んでなる。

【0022】

結果的に、キメラ抗体をコードするベクターのライブラリーであって、各抗体メンバーは、非ヒト免疫グロブリン可変領域をコードする配列、ならびにヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖定常領域からなる、ライブラリーもまた提供される。

30

【0023】

好ましくは、ベクターは、以後のスクリーニングのためのライブラリーの抗体メンバーの発現を可能にする発現ベクターである。より好ましくは、発現ベクターは、哺乳動物発現のためのものである。

【0024】

ライブラリーのベクターは、本発明の方法によって入手してもよい。

【0025】

一実施形態では、軽鎖定常領域は 定常領域である。

【0026】

非ヒト配列は、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモット、または免疫プロトコルが説明されている、適切なプライマーの設計を可能にするための配列情報が入手可能である、および可変領域配列の同族対を連結するために、適切な細胞選別技術が、単一細胞超分子増幅のための形質細胞の選別を可能にする他の適切な動物由来であってもよい。一実施形態では、非ヒト配列は、カニクイザル、アカゲザル、チンパンジー、またはマクアク(maque)のような非ヒト霊長類由来である。好ましくは、非ヒト配列は、マウスまたはラットのようなげっ歯類である。別の実施形態では、非ヒト配列はウサギ配列である。

40

【0027】

好ましくは、抗体の可変領域は同族対である。

【0028】

50

もう一つの態様では、本発明は、本発明に従うライブラリーから選択される特定の標的に対する所望の結合特性を示す抗体をコードするサブライブラリーに関連する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】マウス - mSymplex™ PCR : 単一細胞由来の重鎖および軽鎖抗体遺伝子の増幅ならびに同族連結のための多重重複伸長 RT - PCR。RT - PCR およびネステッド PCR に使用される例示的プライマーについては、表2および表3 (または表5) において詳細に説明する。

【図2】マウスレパートリークローニング : 重複伸長によるスプライシングによって、単一の形質細胞由来の V H / V L 遺伝子対をコードする mSymplex™ PCR 産物のプールをスプライシングして、ヒト 定常軽鎖をコードする遺伝子を得た。完全なヒト - マウスキメラ抗体をコードする遺伝子のプールを、発現ベクターに挿入し、続いて、両方向性プロモーターカセット ( 2 × C M V ) を挿入した。ヒト スプライシングに使用されるプライマー混合物については、表6において詳細に説明する。

【図3A】マウス脾細胞の選別。(A) C D 4 3 高、C D 1 3 8 高として定義された形質細胞を単離するために、P I (ヨウ化プロピジウム) ポジティブまたは死細胞を、左下パネルにおいて排除した (非 P 1)。次いで、形質細胞を、右下パネルにおいて、C D 4 3 高、C D 1 3 8 高としてゲートした (P 2)。最後に、右上パネルの S S C - H、S S C - W プロットにおいて、ダブレットを排除した (P 3)。3つのすべてのゲートについてポジティブな細胞を、E L I S P O T プレートに選別した。

【図3B】マウス脾細胞の選別。(B) M H C I I 中、B 2 2 0 中として定義された形質芽細胞を単離するために、P I (ヨウ化プロピジウム) ポジティブまたは死細胞を、左下パネルにおいて排除した (非 P 1)。次いで、形質芽細胞を、M H C I I 中、B 2 2 0 中としてゲートした、右下パネル (P 2)。右上パネルの S S C - H、S S C - W プロットにおいて、ダブレットを排除し (P 3)、最後に、左上パネルにおいて、細胞をサイズについてゲートした (P 4)。4つのすべてのゲートについてポジティブな細胞を、E L I S P O T プレートに選別した。

【図4】マウス脾細胞の選別。最初に、左下パネルにおいて、P I ポジティブまたは死細胞を排除した (P 1)。右上のドットプロットでは、C D 1 3 8 P E および C D 4 3 F I T C を示す。4つのゲートを、異なる表現型の細胞集団に対して設定した。P 2 は、C D 1 3 8 中、C D 4 3 高である。P 3 は C D 1 3 8 高、C D 4 3 高である。P 4 は C D 1 3 8 高、C d 4 3 ネガティブである。P 5 は、C D 1 3 8 中、C D 4 3 低である。P 1 および 4 つのゲートのそれぞれについてポジティブな 1 0 , 0 0 0 個の細胞を、試験チューブに選別し、そして symplex による評価のために凍結した。

【図5】4つの選別された画分由来の細胞ライセートの Symplex PCR 滴定由来の PCR 産物のゲル電気泳動。P 2、P 3、P 4 および P 5 を、図4に従ってゲート選別する。M は分子量マーカーである。

【図6】哺乳動物の全長抗体発現ベクター 0 0 - V P - 0 0 2 の略図。A m p および A m p p r o、アンピシリン耐性遺伝子およびそのプロモーター ; p U C 起点、p U C の複製開始点 ; C M V、軽鎖および重鎖の発現を誘導する哺乳動物プロモーター ; I G H V リーダー、ゲノムヒト重鎖リーダー、H スタッファー、重鎖可変領域をコードする配列のために交換される挿入物 ; I G H G 1、ゲノム免疫グロブリンアイソタイプ G 1 重鎖定常領域 (配列を、付録1に示す) をコードする配列 ; ウサギ - グロビン A、ウサギ - グロビンポリ A 配列 ; I G K V リーダー、マウス リーダー ; L スタッファー、軽鎖をコードする配列のために交換される挿入物 ; S V 4 0 t e r m、シミアンウイルス 4 0 ターミネーター配列 ; F R T、F l p 認識標的的部位 ; N e o、ネオマイシン耐性遺伝子 ; S V 4 0 ポリ A、シミアンウイルス 4 0 ポリ A シグナル配列。

【図7】キメラ抗 - h E G F R 抗体のレパートリーの解析。4 5 0 ~ 6 2 0 n m における吸光度差のクラスター分析。クローン番号の後の数字 ( 1 ~ 4 ) によって示される反応性によって、上清をクラスター化する。暗灰色は、代謝活性細胞の数の増加を示すが、一方

10

20

30

40

50

、明灰色は、代謝活性細胞の数の増加を示す。黒色は、代謝活性細胞の数に影響を及ぼさない上清を示す。

【0030】

本発明は、非ヒト動物由来の抗体ベクターのコレクションを提供するためにWO 2005/04 2774において開示された増幅および連結方法を使用するさらなる可能性を提供する。これらの改善は、ハイスループット形式に適合すべき可変領域の同族対を伴うヒト/非ヒトキメラ抗体をコードする配列のクローニングを可能にする。これは、増幅および連結プロセスのための新たな出発物質を提供することによって、および可変領域の同族対を伴うキメラヒト/非ヒト抗体のライブラリーの作製のための方法を提供することによって、基本的に達成される。

10

【0031】

本発明の一態様は、単離された単一細胞、同遺伝子型細胞の集団または遺伝的に多様な細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、多重分子増幅手順で関連ヌクレオチド配列を増幅し、そして増幅された配列の以後の連結を行うことを含んでなる、重鎖および軽鎖可変配列を連結する方法である。

【0032】

定義

用語「同族対」(cognate pair)は、単一細胞内に含有されるか、またはそれに由来する目的の非隣接核酸の本来の対をいう。好適な実施形態では、同族対は、結合タンパク質可変ドメインを共にコードする可変領域をコードする2つの配列を含んでなり、そしてその遺伝子配列は、同じ細胞に由来する。それ故、完全な結合タンパク質またはその安定なフラグメントとして発現される場合、それらは、この細胞から本来発現される結合タンパク質の結合アフィニティーおよび特異性を保存する。同族対は、例えば、同じ細胞由来の可変軽鎖をコードする配列と会合した抗体可変重鎖をコードする配列、または同じ細胞由来の鎖をコードする配列と会合したT細胞受容体鎖をコードする配列からなり得る。同族対のライブラリーは、そのような同族対のコレクションである。

20

【0033】

用語「ホットスタートポリメラーゼ」は、不活性であるか、または逆転写に使用される温度において極めて低い活性を有するポリメラーゼをいう。そのようなポリメラーゼは、機能的にするために高温(90~95)で活性化する必要がある。これは、逆転写酵素反応によるポリメラーゼの干渉を阻止するため、これは、例えば、単一工程RT-PCR手順において有利である。

30

【0034】

用語「細胞の同遺伝子型集団」は、遺伝的に同一な細胞の集団をいう。特に、単離された単一細胞のクローンの拡大によって誘導される細胞の同遺伝子型集団は、本発明において興味深い。

【0035】

用語「単離された単一細胞」は、「単一の容器において単一の細胞」に対応する細胞の集団から物理的に分離されている細胞をいう。複数の容器の間で細胞の集団を個々に分配する場合、単離された単一細胞の集団が得られる。表題「テンプレート供給源」のセクションにおいて指摘するように、単一細胞を伴う容器の割合は、単一細胞の集団と呼ばれるためには必ずしも100%である必要はない。

40

【0036】

増幅に関して「連結(link)」または「連結(linkage)」から派生する用語は、目的の核酸配列をコードする増幅された核酸配列の単一セグメントへの会合をいう。同族対に関して、セグメントは、可変ドメイン、例えば、同じ細胞から誘導された抗体軽鎖可変領域をコードする配列と会合した抗体重鎖可変領域をコードする核酸配列を含んでなる。連結は、増幅と同時に、または増幅直後の工程のいずれかとして、達成することができる。セグメントの形態または機能性に対する要件はなく、それは、線状、環状、一本鎖または二本鎖であってもよい。連結は必ずしも恒久的でなくてもよく、所望であれば

50

、目的の核酸配列の1つは、セグメントから単離してもよく、可変領域をコードする配列の1つは、例えば、同族対セグメントから単離してもよい。しかし、同族対を構成する本来の可変領域が、他の可変領域とスクランピングされない限り、共に単一のセグメントに連結されていないなくても、それらはなお同族対と考えられる。連結は、好ましくは、ヌクレオチドホスホジエステル連結である。しかし、連結はまた、異なる化学交差連結手順によって得ることができる。

**【0037】**

用語「多重分子増幅」は、同じ反応における2つもしくはそれ以上の標的配列の同時増幅をいう。適切な増幅方法として、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(U.S. 4,683,202)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、(Wu and Wallace, 1989, Genomics 4, 560-9)、鎖置換増幅(SDA)技術(Walker et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20, 1691-6)、自己支持配列複製(Guatelli et al., 1990, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 87, 1874-8)および核酸に基づく配列増幅(NASBA)(Compton J., 1991, Nature 350, 91-2)が挙げられる。後者の2つの増幅方法は、一本鎖RNA(ssRNA)および二本鎖DNA(dsDNA)の両方を産生する等温転写に基づく等温反応に参与する。

10

**【0038】**

用語「多重PCR」は、同じ反応におけるプライマーの2つ以上のセット、例えば、同じPCR反応における重鎖可変領域の増幅に適応された1つのプライマーセットおよび鎖可変領域の増幅に適応された1つのプライマーセットを含むことによって、2つもしくはそれ以上の標的配列が同時に増幅されるPCRの変種をいう。さらに、または代替的に、鎖可変領域の増幅に適応されるプライマーセットを、これらのプライマーと組み合わせてもよい。

20

**【0039】**

用語「多重RT-PCR」は、逆転写(RT)工程より先に行われる多重PCR反応をいう。多重RT-PCRは、多重PCRの前の個別のRT工程による2工程プロセスとしてか、または単一工程プロセスのいずれかとして実施することができ、RTおよび多重PCRの両方のすべての成分が単一のチューブに組み合わせられる。

**【0040】**

用語「多重重複伸長PCR」および「多重重複伸長RT-PCR」は、多重PCRまたは多重RT-PCRを、多重重複伸長プライマー混合物を利用して行い、標的配列を増幅し、それによって、標的配列の同時増幅および連結を可能にすることを意味する。

30

**【0041】**

用語「複数の容器」は、細胞の集団からの単一細胞の物理的分離を可能にする任意の物体(または物体のコレクション)をいう。これは、チューブ、マルチウェルプレート(例えば、96ウェル、384ウェル、マイクロタイプレートまたは他のマルチウェルプレート)、アレイ、マイクロアレイ、マイクロチップ、ゲル、またはゲルマトリックスであってもよい。好ましくは、物体はPCR増幅に適用可能である。

**【0042】**

本明細書において使用する用語「ポリクローナルタンパク質」または「多クローン性」は、異なるが相同なタンパク質分子を含んでなるタンパク質組成物を指し、好ましくは、免疫グロブリンスーパーファミリーから選択される。それ故、それぞれのタンパク質分子は、組成物の他の分子に相同であるが、しかしまた、ポリクローナルタンパク質の個々のメンバー間のアミノ酸配列の差異によって特徴付けられる可変ポリペプチド配列の1つもしくはそれ以上のストレッチを含有する。そのようなポリクローナルタンパク質の既知の例として、抗体または免疫グロブリン分子、T細胞受容体およびB細胞受容体が挙げられる。ポリクローナルタンパク質は、所望される標的に対する共有された結合活性、例えば、所望される標的抗原に対して結合特異性を示すポリクローナル抗体のような共通の特徴によって定義されているタンパク質分子の定義されたサブセットよりなり得る。

40

**【0043】**

本明細書において使用する用語「遺伝的に多様な細胞」は、集団における個々の細胞が

50

、ゲノムレベルで相互に異なる細胞集団を指す。そのような遺伝的に多様な細胞の集団は、例えば、ドナーに由来する細胞の集団、またはそのような細胞の画分、例えば、Bリンパ球もしくはTリンパ球を含有する細胞画分である。

【0044】

用語「プライマーセット」は、用語「プライマー対」と交換可能に使用され、そして共に、目的のヌクレオチド配列（即ち、同族対の一方のメンバー）の増幅をプライムすることが可能である2つもしくはそれ以上のプライマーをいう。本発明のプライマーセットは、可変領域をコードする配列を含有するヌクレオチド配列のファミリーをプライムするために設計され得る。異なるファミリーの例には、抗体 軽鎖、 軽鎖、重鎖可変領域、および、 または - T細胞受容体可変領域がある。可変領域をコードする配列を含有するヌクレオチド配列のファミリーの増幅のためのプライマーセットは、しばしば、複数のプライマーを構成し、いくらかのプライマーは縮重プライマーであり得る。

10

【0045】

用語「配列同一性」は、2つの配列の最も短い長さにおける核酸配列間の同一性の程度を示す百分率として表される。それは、 $(N_{ref} - N_{dif}) \times 100\% / N_{ref}$  [式中、 $N_{ref}$  は、短い方の配列の残基数であり、そして式中、 $N_{dif}$  は、2つの配列間で最適に整列された  $N_{ref}$  長における非同一致残基の合計数である]として計算することができる。従って、DNA配列 AGTCAGTC（配列番号32）は、配列 TAATCAATCGG（配列番号33）（ $N_{dif} = 2$  および  $N_{ref} = 8$ ）（下線は、最適なアラインメントを示し、そして太字は8残基のうちの非同一致残基を示す）と75%の配列同一性を有する。

20

【0046】

連結に関する用語「無作為に」または「無作為」は、同じ細胞から誘導されてはいないが、遺伝的に多様な細胞の集団の間を横切って連結されるヌクレオチド配列の連結を指す。目的のヌクレオチド配列が可変領域をコードする配列である場合、これは、連結された配列のコンビナトリアルライブラリーを生じる。これに対し、目的のヌクレオチド配列が非多様性ヘテロマータンパク質をコードする場合、無作為に連結された配列は、単一細胞から連結された配列に類似するようである。

【0047】

逆転写に関する用語「単離された単一細胞に由来するテンプレート」は、そのような単離された細胞内の核酸に関する。核酸は、例えば、RNA、mRNA、DNAまたはゲノムDNAの形態であり得る。核酸は、細胞から単離してもよく、または細胞の残りの含有物と共になお存在し得、細胞は、無傷（*intact*）な形態または溶解された形態である。

30

【0048】

用語「CD43」は、3E8抗原、A630014B01Rik、B細胞分化抗原LP-3、Cd43、CD43抗原、Galgp、白血球シアロ糖タンパク質、ロイコシアリン、ロイコシアリン前駆体、Ly48、Ly-48、シアロホリンを含む多数の同義語下で公知のマウス表面抗原、ならびに他の動物由来のオーソロガスな表面マーカーを指す。

【0049】

用語「CD138」は、シンデカン-1、AA408134、AA409076、CD138、syn-1、SynD、SynD1、SYND1、SynD-1、シンデカン-1前駆体を含む多数の同義語下で公知のマウス表面抗原、ならびに他の動物由来のオーソロガスな表面マーカーを指す。

40

【0050】

用語「MHCII」は、CD74抗原、CLIP、DHLAG、H-2クラスII組織適合性抗原鎖、HLADG、HLA-DR-、Ia抗原関連インバリエント鎖、Ia-、Ii、MHCクラスII関連インバリエント鎖を含む多数の同義語下で公知のマウス表面抗原、ならびに他の動物由来のオーソロガスな表面マーカーを指す。

【0051】

50

用語「B220」は、B220、Cd45、CD45、CD45抗原、CD45R、L-C A、白血球共通抗原前駆体、loc、Ly-5、リンパ球共通抗原Ly-5、Ly t-4、T200を含む多数の同義語下で公知のマウス表面抗原、ならびに他の動物由来のオーソロガスな表面マーカーを指す。

【発明を実施するための形態】

【0052】

増幅および連結プロセス

本発明の1つの特徴は、プライマーの2つ以上のセット、例えば、同じ反応において可変領域をコードする配列を増幅するのに必要なすべてのプライマーを含むことによって、同じチューブにおいて2つもしくはそれ以上の標的配列が同時に増幅されるPCRの変種を利用して、目的のヌクレオチド配列を増幅するのに必要なチューブの数を減少する。一般的に、このアプローチは、多重ポリメラーゼ連鎖反応（多重PCR）として公知である。

10

【0053】

本発明のさらなる特徴は、多重PCRによって増幅される2つもしくはそれ以上の標的配列が増幅プロセスの極近傍で連結されることである。特に、可変領域をコードする配列の同族対が、このプロセスによって連結される。

【0054】

本発明の一実施形態は、多重プライマー混合物を、多重伸長PCR手順において作用するように設計し、目的のヌクレオチド配列の同時増幅および連結を生じ得ることを活用する。この多重重複伸長PCR技術は、目的のヌクレオチド配列、特に、連結された可変領域の同族対を単離および連結するのに必要な反応の数を減少する役割を果たす。

20

【0055】

本発明の他の実施形態は、多重重複伸長PCRによる連結に対する代替物として、ライゲーションまたは組み換えによる連結を適用する。これらの手順では、連結は、多重PCR増幅と同時に実施されないが、増幅直後の工程として実施される。しかし、連結は、多重PCRが実施された同じチューブにおいてやはり実施することができる。

【0056】

多重重複伸長PCRは、2つもしくはそれ以上のプライマーセット（多重プライマー混合物）の存在を必要とし、各セットの少なくとも1つのプライマーに重複伸長テイルが備え付けられる。重複伸長テイルは、増幅中のプライマーセットのそれぞれによって作製される産物の連結を可能にする。そのようなプライマー混合物は、多重重複伸長プライマー混合物と呼ばれる。多重重複伸長PCRは、連結しようとする配列が同じチューブにおいて同時に作製され、それによって、何ら中間的精製を伴わずに、増幅中に標的配列の即時連結を提供する点で、従来の重複伸長PCRと異なる。

30

【0057】

本発明のさらなる特徴は、単離された細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを利用する多重PCRまたは多重重複伸長PCR増幅より前の逆転写（RT）工程である。

【0058】

本発明のさらなる特徴は、多重PCR増幅のためのテンプレートとして単離された細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するヌクレオチド配列の使用である。好ましくは、単一細胞由来のRNAが、多重PCRの前にcDNAに逆転写される。目的のいくつかの核酸配列の増幅のために、ゲノムDNAを、mRNAの代替物として使用してもよい。テンプレートの供給源として、単離された単一細胞のクローンの拡大によって誘導される単離された単一細胞または同遺伝子型細胞の集団を使用することによって、細胞の集団内の異なる細胞に由来するヌクレオチド配列による目的のヘテロマータンパク質をコードするヌクレオチド配列のスクランピングを回避することが可能である。目的の配列の本来の組成物を入手することを所望する場合、これは重要である。特に、可変領域をコードする配列の同族対の作製では、テンプレートの供給源としての単離された細胞または同遺伝子型

40

50

細胞の集団の使用は、重要な特徴である。

【0059】

さらに、本発明は、目的の連結された核酸配列のライブラリー、特に、コンビナトリアルライブラリー、および可変領域の同族対のライブラリーの作製を容易にする。さらに、本発明は、好ましくは、それをテンプレートとして利用し得る前に、残存する細胞内容物から単離する必要がないRNAの形態で、単一細胞に由来する核酸を利用する。

【0060】

本発明の一実施形態は、目的の複数の非隣接ヌクレオチド配列の連結を包含する。本方法は、単離された細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、多重PCRまたは多重RT-PCR増幅手順で目的のヌクレオチド配列を増幅し、そして目的の増幅されたヌクレオチド配列の連結を行うことを含んでなる。さらに、本方法は、連結された産物のさらなる増幅を実施する随意的工程を含んでなる。

10

【0061】

本発明のさらなる実施形態は、連結された可変領域をコードする配列を含んでなる同族対のライブラリーを生成する方法を包含する。本方法は、場合により、前記細胞画分から特定のリンパ球集団について富化されているか、または特定のリンパ球集団が前記細胞画分から単離されているドナー由来のリンパ球を含有する細胞画分を提供することを含んでなる。さらに、単離された単一細胞の集団は、リンパ球を含有する細胞画分、または富化された細胞画分由来の細胞を複数の容器の間で個々に分配することによって得られる。単離された単一細胞の集団に含有される可変領域をコードする配列の多重分子増幅（多重RT-PCR増幅）が実施され、そして可変領域をコードする配列の対の連結が行われ、可変領域配列の個々の対は、単離された単一細胞の集団内の単一細胞に由来する。さらに、技術は、2つの随意的工程を含んでなる。第1の工程では、単一細胞の集団における個々の単離された単一細胞を、多重RT-PCR増幅を実施する前に、同遺伝子型細胞の集団に拡大培養する。それによって、同遺伝子型細胞の多様な集団を伴う複数の容器（1つの容器に1つの同遺伝子型細胞の集団）を入手する。第2の随意的工程は、連結された可変領域をコードする配列のさらなる増幅を実施することを含んでなる。

20

【0062】

本発明の好適な実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列からなる同族対の前記ライブラリーの個々のメンバーは、鎖可変領域と会合した鎖可変領域、もしくは鎖可変領域と会合した鎖可変領域から構成される、同じ細胞由来、またはT細胞受容体結合ドメインをコードする配列の免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列と会合され、会合された可変領域は同じ細胞由来である。

30

【0063】

本発明の多重RT-PCR増幅は、2工程プロセス（ここで、逆転写（RT）は、多重PCR増幅（もしくは代替的多重分子増幅）から個別に実施される）としてか、または単一工程プロセス（ここで、RTおよび多重PCR増幅工程は、1つのチューブにおいて同じプライマーで実施される）のいずれかとして実施することができる。

【0064】

逆転写（RT）は、逆転写酵素活性を含有する酵素によって実施され、単離された単一細胞由来の全RNA、mRNAまたは標的特異的RNAのcDNAの作製を生じる。逆転写に利用することができるプライマーは、例えば、オリゴdTプライマー、ランダムヘキサマー、ランダムデカマー、他のランダムプライマー、または目的のヌクレオチド配列に特異的なプライマーである。

40

【0065】

2工程多重RT-PCR増幅手順は、RT工程において作製されたcDNAが2つ以上の容器に分配されることを可能にし、増幅が進行する前のテンプレート画分の貯蔵を許容する。さらに、cDNAの2つ以上のチューブへの分配は、同じテンプレートに由来する核酸の1回を超える多重PCR増幅の実施を可能にする。これは、個別の反応の増加を生じるが、これを所望すべきである場合、それは、多重プライマー混合物の複雑性を減少す

50



る可能性を開く。この2つの工程アプローチは、例えば、同じテンプレートを利用して、1つのチューブにおける重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする配列、ならびに異なるチューブにおける重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする配列を増幅および連結ために適用することができる。単一の細胞は、通常、軽鎖のうちの1つのみを発現する。しかし、しばしば、一方の反応の結果を待ってから他方を実施するのではなく、反応を同時に実施する方が容易である。さらに、またはのみが単一細胞から増幅することが予想されるため、およびの両方の増幅は、内部ネガティブコントロールとして役立つ。

#### 【0066】

単一工程多重RT-PCR手順では、逆転写および多重PCR増幅は、同じ容器において行われる。最初に、単一工程において逆転写および多重PCRの両方を実施するのに必要なすべての成分を容器に添加し、そして反応を実施する。一般的に、一旦、反応が開始したら、さらなる成分を添加する必要はない。単一工程多重RT-PCR増幅の利点は、それが、本発明の連結されたヌクレオチド配列をなおさらに作製するのに必要な工程の数を減少することである。単一細胞のアレイにおいて多重RT-PCRを実施する場合、これは特に有用であり、同じ反応を複数の容器において行う必要がある。単一工程多重RT-PCRは、逆転写のためのプライマーとして多重PCR増幅に必要な多重プライマー混合物に存在する逆方向プライマーによっても実施される。一般的に、単一工程多重RT-PCRに必要な組成物は、核酸テンプレート、逆転写酵素活性を伴う酵素、DNAポリメラーゼ活性を伴う酵素、デオキシヌクレオシド三リン酸混合物(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを含んでなるdNTP混合物)ならびに多重プライマー混合物を含んでなる。核酸テンプレートは、好ましくは、精製された形態で、細胞のライセートとして、またはなお無傷な細胞内のいずれかにおける単離された単一細胞に由来する全RNAまたはmRNAである。一般的に、反応混合物の正確な組成は、本発明によって使用すべき各多重プライマー混合物に対するいくつかの最適化を必要とする。これは、2工程および単一工程多重RT-PCR手順の両方に当てはまる。

#### 【0067】

いくつかの単一工程多重RT-PCR反応では、反応中にさらなる成分を添加することは有利であり得る。例えば、RT工程後のポリメラーゼの添加。他の成分は、例えば、dNTP混合物、またはおそらく異なるプライマー組成を伴う多重プライマー混合物であり得る。次いで、これは、1チューブ多重RT-PCRと考えることができ、それはまた、所望される連結された産物を得るのに必要なチューブの数を制限するため、一般的に、単一工程多重RT-PCRと同じ利点を有する。

#### 【0068】

多重RT-PCRによって増幅される目的のヌクレオチド配列は、異なる多重プライマー混合物を使用する多重重複伸長RT-PCR、ライゲーションまたは組み換えのようないくらかの方法によって、相互に連結させることができる。好ましくは、多重RT-PCR増幅および連結プロセスは、単一工程または2工程プロセスである。しかし、連結プロセスはまた、例えば、PCR、ライゲーションまたは組み換えのいずれかによって目的の核酸配列を連結させるためのスタッファースラグメントを使用して、多工程プロセスとして実施してもよい。そのようなスタッファースラグメントは、cis-エレメント、プロモーターエレメントまたは関連コーディング配列もしくは認識配列を含んでもよい。好適な実施形態では、プロセスの連結は、多重RT-PCR増幅として同じ容器において実施される。

#### 【0069】

本発明の一実施形態では、目的の複数の非隣接ヌクレオチド配列の連結は、多重重複伸長プライマー混合物を利用する多重PCR増幅と関連して実施される。これは、標的配列の組み合わせられた増幅および連結を生じる。一般的に、多重重複伸長PCRに必要な組成物は、核酸テンプレート、DNAポリメラーゼ活性を伴う酵素、デオキシヌクレオシド三リン酸混合物(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを含んでなるdNTP混合

10

20

30

40

50

物)ならびに多重重複伸長プライマー混合物を含んでなる。

【0070】

本発明の特定の実施形態では、目的の複数の非隣接ヌクレオチド配列の連結は、単離された細胞または同遺伝子型細胞の集団に由来するテンプレートを使用する多重重複伸長RT-PCRを使用することによって、実施される。さらに、本方法は、連結された産物のさらなる分子増幅を実施する随意的工程を含んでなる。好ましくは、多重重複伸長RT-PCRは、単一工程/1チューブ反応として実施される。

【0071】

本発明の多重重複伸長プライマー混合物は、少なくとも2つの可変領域をコードする配列の増幅および連結、例えば、または軽鎖可変領域ファミリーを伴う免疫グロブリン重鎖可変領域ファミリー由来の配列の増幅および連結、またはT細胞受容体ファミリー、もしくは由来の配列の増幅および連結を許容することが可能な少なくとも2つのプライマーセットを含んでなる。

10

【0072】

本発明の別の実施形態では、多重RT-PCRによって増幅される目的の複数のヌクレオチド配列は、ライゲーションによって連結される。これを達成するために、多重RT-PCRに使用される多重プライマー混合物は、増幅された標的配列を適切な制限酵素で切断することができ、そしてDNAライゲーションによる共有結合を実施することができるように設計される(プライマーの設計については、「プライマー混合物および設計」のセクションで説明する)。そのような多重プライマー混合物による多重RT-PCR増幅後、標的配列の適合可能な末端を形成するのに必要な制限酵素を、リガーゼと共に混合物を添加する。この工程の前にPCR産物を精製する必要はないが、精製を実施してもよい。組み合わせられた制限切断およびライゲーションのための反応温度は、約0~40の間である。しかし、多重PCR反応由来のポリメラーゼがなお混合物に存在する場合、室温未満のインキュベーション温度が好適であり、4~16の間の温度が最も好適である。

20

【0073】

本発明のなお別の実施形態では、多重RT-PCRによって増幅される目的の複数のヌクレオチド配列は、組み換えによって連結される。このアプローチでは、増幅される標的配列は、同一の組み換え部位を使用して、接続することができる。次いで、連結は、組み換えを容易にするリコンビナーゼを添加することによって実施される。いくつかの適切なリコンビナーゼ系は、多様なFRT部位を伴うFlpリコンビナーゼ、多様なlox部位を伴うCreリコンビナーゼ、attP部位とattB部位との間の組み換えを行うインテグラーゼC31、リコンビナーゼ-シックス(six)システム、ならびにGingixシステムである。組み換えによる連結については、2つのヌクレオチド配列( $V_L$ と連結した $V_H$ )が例示されている(Chapal, N. et al. 1997 BioTechniques 23, 518-524)。

30

【0074】

本発明の好適な実施形態では、目的のヌクレオチド配列は、可変領域をコードする配列を含んでなり、そして連結は可変領域をコードする配列の同族対を生じる。そのような同族対は、可変領域に加えて、1つもしくはそれ以上の定常領域をコードする配列を含んでなり得る。好ましくは、定常領域はヒト由来であり、そして可変領域同族対は、マウス、ラット、またはウサギのような異なる起源由来である。

40

【0075】

本発明のなおさらに好適な実施形態では、目的のヌクレオチド配列は、免疫グロブリン可変領域をコードする配列を含んでなり、そして連結は軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする配列の同族対を生じる。そのような同族対は、可変領域に加えて、1つもしくはそれ以上の定常領域をコードする配列を含んでなり得る。さらに、そのような同族対は、全血、単核細胞または白血球細胞のようなリンパ球を含有する細胞画分から富化されるBリンパ球系統の細胞に由来するテンプレートから単離してもよい。

【0076】

50

本発明の別の実施形態では、目的のヌクレオチド配列は、T c R可変領域をコードする配列を含んでなり、そして連結は、鎖可変領域および鎖可変領域をコードする配列または鎖可変領域および鎖可変領域をコードする配列の同族対を生じる。そのような同族対は、可変領域に加えて、1つもしくはそれ以上の定常領域をコードする配列を含んでなり得る。さらに、そのような同族対は、全血、単核細胞または白血球細胞のようなリンパ球を含有する細胞画分から富化されるTリンパ球系統の細胞に由来するテンプレートから単離してもよい。

#### 【0077】

本発明の別の態様は、テンプレートの供給源として遺伝的に多様な細胞の集団を伴う多重RT-PCRを利用することである。ヘテロマータンパク質をコードする配列の大部分は、結合タンパク質由来の可変領域をコードする配列の場合と同様に、細胞によって変動しない。それ故、そのような非可変ヘテロマータンパク質をコードする配列のコーディングのために本発明を利用する場合、単一細胞の最初の単離を実施する必要はない。

10

#### 【0078】

本発明のこの実施形態では、目的の複数の非隣接ヌクレオチド配列は、遺伝的に多様な細胞の集団に由来するテンプレートを使用して、目的のヌクレオチド配列の多重RT-PCR増幅を実施し、そして目的の増幅されたヌクレオチド配列の連結を行うことを含んでなる方法によって、無作為に連結される。さらに、本方法は、連結された産物のさらなる増幅を実施する工程の随意的工程を含んでなる。単一細胞アプローチの場合と同様に、連結は、増幅のための多重重複伸長プライマー混合物を利用するか、あるいはライゲーションまたは組み換えのいずれかによって、実施することができる。好ましくは、細胞の集団に由来するテンプレートは、厳密には細胞内に含有されない。細胞の集団は、例えば、溶解してもよい。

20

#### 【0079】

変種の結合タンパク質を発現する細胞の集団に対する無作為連結のプロセスの応用は、可変領域をコードする配列のコンビナトリアルライブラリーの単純化された作製を可能にする。好ましくは、細胞の集団は、Bリンパ球、Tリンパ球、ハイブリドーマ細胞、形質細胞、形質芽細胞、またはこれらの細胞の混合物のような可変領域結合タンパク質を発現する細胞を構成する。

#### 【0080】

上記の実施形態における細胞の集団は、例えば、さらなる精製を伴わずに透過性にするか、もしくは溶解することができ、またはテンプレート核酸は、標準的な手順によって細胞から単離することができる。単一工程重複RT-PCR手順が好適である。しかし、2工程手順もまた、実施形態において使用され得る。

30

#### 【0081】

多重RT-PCR-連結プロセスの特異性、感度、および収量を増加するための効率的な方法は、多重RT-PCRから得られる連結されたヌクレオチド配列のさらなる分子増幅、続いて、ライゲーションもしくは組み換えによる連結、または多重重複伸長RT-PCRを使用する連結を実施することによる。このさらなる増幅は、好ましくは、目的の連結された核酸配列を増幅するために適応されたプライマー混合物を利用して、PCR増幅によって実施される。利用されるプライマー混合物は、多重プライマー混合物または多重重複伸長プライマー混合物のアウトプライマーであってもよく、これは、連結された可変領域をコードする配列のセンス鎖の最も外側の5'末端および3'末端にアニールし、それによって連結された産物全体の増幅を可能にするプライマーを意味する。アウトプライマーはまた、重複伸長テイルを含有しない多重重複伸長プライマー混合物のプライマーとして説明することができる。あるいは、ネステッドまたはセミネステッドプライマーセットを、連結されたヌクレオチド配列のさらなる増幅のために使用することができる。そのようなネステッドPCRは、特に、方法の特異性を増加する、ならびに連結された産物の量を増加する役割を果たす。本発明では、セミネステッドPCR（プライマー混合物および設計と表題されたセクションにおいて説明している）は、ネステッドPCRと同程度

40

50

に良好に機能すると考える。それ故、本発明のために必ずしも必要というわけではないが、多重重複伸長 R T - P C R 由来の連結された産物、またはライゲーションもしくは組み換えによって、好ましくは、ネステッド P C R もしくはセミネステッド P C R を使用して連結された産物のさらなる P C R 増幅を実施することが所望される。

#### 【 0 0 8 2 】

さらなる増幅は、直接、画分もしくは多重重複伸長 R T - P C R 反応産物全体もしくはライゲーション産物もしくは組み換え産物、もしくはこれらの産物のいずれか 1 つの画分を使用してか、またはこれらの反応のうちのいずれか 1 つから部分的に精製された連結された産物を使用するかのいずれかで、例えば、連結された産物のアガロースゲル電気泳動を実施し、そして連結された可変領域をコードする配列の予想されるサイズに対応するフラグメントを切り出すことによって、実施することができる。多重重複伸長 R T - P C R によって連結された産物では、これは、第 1 の反応において連結しなかった個々の標的配列の連結を支援するため、さらなる増幅は、好ましくは、多重重複伸長 R T - P C R 反応由来の画分に対して直接実施される。

10

#### 【 0 0 8 3 】

##### 目的の配列

本発明の目的のヌクレオチド配列は、発現される場合、タンパク質もしくはタンパク質の部分形成する異なるサブユニットまたはドメインをコードする配列から選択することができる。少なくとも 2 つの同一でないサブユニットからなるそのようなタンパク質は、ヘテロマータンパク質として公知である。ヘテロマータンパク質は、すべての種類の種において共通である。そのようなタンパク質が属するクラスのいくつかは、例えば、酵素、インヒビター、構造タンパク質、毒素、チャンネルタンパク質、G タンパク質、受容体タンパク質、免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質、輸送タンパク質などである。そのようなヘテロマータンパク質をコードするヌクレオチド配列は非隣接的であり、これは、例えば、それらが異なる遺伝子、または異なる m R N A 分子由来であることを意味する。しかし、本発明において使用する非隣接はまた、同じタンパク質のドメインをコードするヌクレオチド配列を意味してもよく、ドメインは、興味の対象ではないヌクレオチド配列によって分離される。

20

#### 【 0 0 8 4 】

本発明の一実施形態では、目的のヌクレオチド配列は、免疫グロブリン（抗体）、B 細胞受容体および T 細胞受容体（T c R）のような免疫グロブリンスーパーファミリー由来の可変領域をコードする配列を含有する。特に、免疫グロブリン由来の可変領域をコードする配列は興味深い。そのような可変領域をコードする配列は、全長抗体、ならびに F a b '、F v '、s c F v ' および可変領域をコードする配列のフラグメントの組み合わせ、例えば、相補性決定領域（C D R）、連結（j o i n i n g）遺伝子もしくは V - 遺伝子またはこれらの組み合わせを含んでなる。一般的に、本発明は、可変領域をコードする配列およびそれらのフラグメントの任意の組み合わせで適用することができる。本出願は、F v または s c F v をコードする配列を生じる重鎖および軽鎖の可変ドメインのみの連結を可能にする。または、F a b、F a b ' または F ( a b )<sub>2</sub> を生じる重鎖可変領域 + 定常領域ドメイン C<sub>H</sub>1 + ヒンジ領域の部分に伴う軽鎖全体の連結。さらに、重鎖定常領域ドメインの任意の領域を可変重鎖に付加し、それによって、全長抗体をコードする配列または短縮された抗体をコードする配列を生じさせることが可能である。本発明の一態様では、非ヒト可変配列は、ヒト定常領域に連結されて、完全なキメラヒト/非ヒト抗体、好ましくは、ヒト定常領域に伴うキメラ抗体が作製される。

30

40

#### 【 0 0 8 5 】

本発明のさらなる実施形態では、可変領域をコードする配列は、1 つのタイプの免疫グロブリン軽鎖（または）をコードする配列および 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列を含んでなる。これは、軽鎖および重鎖のただ 1 つのアイソタイプを増幅するプライマーを選択することによって、達成される。アイソタイプはまた、重鎖および軽鎖の 1 つもしくはそれ以上の特定のアイソタイプ由来のヒト定常領域を連結またはス

50

プライシングすることによっても決定することができる。

【0086】

T細胞受容体(TcR)に由来する可変領域をコードする配列もまた興味深い。そのようなTcRをコードするコーディング配列は、全長 および 鎖または および 鎖、ならびに可溶性TcRまたはこれらの鎖の唯一の可変ドメインまたはそれらの単鎖融合タンパク質(例えば、単鎖 もしくは単鎖 )のコーディング配列を含んでなる。

【0087】

テンプレート供給源

本発明の1つの特徴は、単離された単一細胞、同遺伝子型細胞の集団、または単一の容器に分離されていない細胞の遺伝的に多様な集団から誘導されたヌクレオチド配列に連結する能力である。

10

【0088】

本発明の好適な特徴は、目的の核酸配列、特に、可変領域をコードするコーディング配列のスクランピングが回避されるため、テンプレート供給源としての単離された単一細胞または同遺伝子型細胞の集団の使用である。例えば、可変領域をコードする配列の本来の対を入手することを所望する場合、これは重要である。

【0089】

本発明の別の好適な特徴は、リンパ球、例えば、Bリンパ球、Tリンパ球、形質細胞および/または様々な発達段階のこれらの細胞系統を含んでなる細胞画分から単一細胞または単一細胞の集団を得ることである。免疫グロブリンスーパーファミリー由来の結合タンパク質を発現する細胞の1つ集団もまた、単一細胞を獲るために使用され得る。ハイブリドーマ細胞のような細胞系統、Bリンパ球もしくはTリンパ球系統の細胞系統またはウイルス不死化細胞系統、または免疫応答に参加するドナー由来の細胞もまた、本発明に適用可能である。ドナー由来のリンパ球を含有する細胞画分は、天然の組織もしくはそのような細胞において富化される液体、例えば、血液、骨髄、リンパ節、脾臓組織、扁桃組織、または腫瘍中および周辺の浸潤もしくは炎症組織浸潤から入手され得る。好ましくは、非ヒト動物の場合、脾臓組織または骨髄が使用される。ドナーは、所望される標的に関して生来または高度免疫のいずれかであり得る。所望される標的に対して結合特異性を伴う抗原結合タンパク質の単離では、高度免疫性ドナーが好適である。そのような高度免疫性ドナーは、標的、もしくは標的のフラグメントで免疫されたドナーのいずれかであり得、あるいはそれは、回復期の患者、または標的、例えば、自己免疫患者、癌患者、感染性疾患を伴う患者、例えば、HIV患者、A、BもしくはC型肝炎患者、SARS患者など、または慢性疾患を伴う患者に対して天然の免疫応答を稼働している非健康個体であり得る。しかし、特に好適な実施形態では、ドナーは、EGFRのような癌に関するヒトタンパク質のようなヒト自己抗原で免疫されている非ヒト動物である。

20

30

【0090】

本発明に使用するために、細胞ドナーは、本発明の連結されたヌクレオチド配列から入手可能な産物で処置しようとする種と同じ種であってもよい。好ましくは、細胞ドナーは、家畜、ペット、ヒトである。本発明の特定の特徴は、それが、ヒトの治療に使用するためのキメラ抗体の作製のためのキメラヒト/非ヒト抗体ライブラリーの作製を可能にすることである。抗体がいわゆる自己抗原、即ち、ヒト抗原に対する場合、そのようなアプローチが好適である。

40

【0091】

ドナーはまた、トランスジェニック動物、特に、トランスジェニックマウスであってもよい。ヒト免疫グロブリン遺伝子座を担持するトランスジェニック動物については、U.S. Patent No. 6,111,166およびKuroiwa, Y. et al. Nature Biotechnology; 2002; 20: 889-893に記載されている。そのようなトランスジェニック動物は、ヒト免疫グロブリンを産生することが可能である。それ故、特定の標的に対する完全なヒト抗体を、そのようなトランスジェニック動物の通常の免疫化技術によって惹起させることができる。これは、天然のヒト抗体応答の存在が認められないか、または制限されているヒト抗原のようなよ

50

り困難な標的に対して特異性を伴う結合タンパク質をコードするライブラリーの作製を可能にする。同様に、そのようなトランスジェニック動物を開発して、ヒトT細胞受容体を産生させることもできる。

#### 【0092】

本発明のさらなる実施形態では、リンパ球を含有する細胞画分は、ドナーから得られる全血、骨髄、単核細胞、または白血球細胞より構成される。単核細胞は、血液、骨髄、リンパ節、脾臓、癌細胞周辺の浸潤、および炎症性浸潤から単離することができる。単核細胞は、密度遠心分離技術、例えば、F i c o l l 勾配によって単離することができる。単核細胞が組織からなるサンプルから単離される場合、組織は、勾配遠心分離が実施される前に崩壊される。崩壊は、例えば、粉碎、エレクトロポレーションのような機械的方法によっておよび/または酵素処置のような化学的方法によって実施することができる。白血球細胞の単離は、白血球除去を使用して、ドナーから直接実施することができる。例えば、リンパ球を含有する骨髄または組織の生の調製物もまた、本発明において使用することができる。そのような調製物は、単一細胞分布を容易にするために、例えば、上記のように崩壊させる必要がある。

10

#### 【0093】

本発明のさらなる特徴は、Bリンパ球もしくはTリンパ球系統由来の細胞のような特定のリンパ球集団に関するリンパ球を含有する細胞画分、例えば、全血、単核細胞、白血球細胞または骨髄の富化である。Bリンパ球の富化は、例えば、磁気ビーズ細胞選別(MACS)または蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用し、CD19のような系統特異的細胞表面マーカータンパク質、またはB220のような他のB細胞系統 - 特異的マーカーを利用して、実施することができる。Tリンパ球の富化は、例えば、CD3または他のT細胞系統 - 特異的マーカーのような細胞表面マーカーを利用して、実施することができる。

20

#### 【0094】

本発明の好適な特徴は、細胞を複数の容器の間で個々に分配する前に、形質細胞を獲得するために、富化されたBリンパ球にさらに選別することである。形質細胞の単離は、一般的に、MACS選別またはFACS選別によって、CD19のような表面マーカーを利用して、実施される。他の形質細胞 - 特異的表面マーカーまたはそれらの組み合わせ、例えば、CD138、CD43、CD19、MHC - I Iも利用することができ、マーカーの正確な選択は、形質細胞供給源、例えば、脾臓、扁桃、血液または骨髄に依存する。もちろん、表面マーカーの正確な選択はまた、細胞が単離される種に依存する。

30

#### 【0095】

本発明の一態様では、細胞の選別および/または選択に使用されるマーカーは、CD43およびCD138もしくはMHC I IおよびB220またはオーソログである。好ましくは、マーカーの組み合わせはCD43およびCD138であり、そして好ましくは、選択された細胞は、それらが選択または単離されるリンパ球を含んでなる細胞集団と比べてこれらのマーカーの中程度もしくは高い発現を有する。より好ましくは、CD43およびCD138の発現のレベルは、それらが選択または単離されるリンパ球を含んでなる細胞集団と比べて高い。

40

#### 【0096】

形質細胞はまた、これらの供給源のいずれかから単離された富化されていないリンパ球を含有する細胞集団から入手することができる。血液から単離される形質細胞は、時々、前駆形質細胞または形質芽細胞と呼ばれる。本発明では、これらの細胞はまた、形質細胞とも称される。より高い頻度のこれらの細胞は、所望される抗原に対して獲得された免疫を反映する抗原 - 特異的抗体を産生し、そして細胞のほとんどは、体細胞超変異を経験し、従って、高いアフィニティー抗体をコードするため、形質細胞は、免疫グロブリンをコードする配列の同族対の単離に所望される。さらに、形質細胞のmRNAレベルは残留するBリンパ球集団と比較して高く、それ故、逆転写産生は、単一の形質細胞を使用する場合より効率的である。形質細胞単離に対する代替物として、メモリーB細胞を、CD27

50

および I g G のような細胞表面マーカーを利用して、リンパ球を含有する細胞画分から単離してもよい。

【 0 0 9 7 】

本発明の代替的特徴は、細胞を複数の容器の間で分配する前に、抗原特異性について富化された B リンパ球を選択することである。抗原 - 特異的 B リンパ球の単離は、富化された B リンパ球と、抗原の表面暴露免疫グロブリンへの結合を可能にする所望される抗原または抗原とを接触させ、続いて、バインダーを単離することによって、実施される。これは、例えば、所望される抗原または抗原のビオチン化、それに続く適切な細胞選別技術によって行うことができる。抗原特異性に関して、これを所望するのであれば、形質細胞ならびに B リンパ球、富化されていない単核細胞、白血球細胞、全血、骨髄または組織調製物を、単離に供することができる。

10

【 0 0 9 8 】

本発明の別の特徴は、メモリー T 細胞の機能入手するために、例えば、C D 2 7 のような表面マーカーを使用して、富化された T リンパ球（例えば、C D 3 ポジティブ細胞）を選別することである。T リンパ球はまた、M H C - ペプチド複合体を使用して、M H C - 抗原特異性について選択することができる（例えば、Callan, M.F. et al. 1998. J. Exp. Med. 187, 1395-1402 ; Novak, E.J. et al. 1999. J. Clin. Invest 104, R63-R67）。

【 0 0 9 9 】

所定の表面マーカーを発現する細胞を選別するための代替物、即ち、ポジティブ選択として、マーカーを発現しない細胞を細胞の組成物から枯渇させ、実際にマーカーを発現する細胞を後に残すことが考えられる。

20

【 0 1 0 0 】

本発明のさらなる特徴は、上記の単離された細胞画分（例えば、B リンパ球、形質細胞、メモリー細胞または T リンパ球）のいずれかの不死化である。不死化は、細胞分配の前に、例えば、エプスタイン・パール（Epstein-Barr）ウイルスで実施してもよい（Traggi ai, E., et al., 2004. Nat Med 10, 871-875）。あるいは、単離された単一細胞を、逆転写の前に不死化および拡大培養してもよい。Traggi ai et al., Nat Med. 2004 Aug;10(8):871-5。

【 0 1 0 1 】

本発明のさらなる特徴は、単離された単一細胞の集団を得るための所望される細胞（例えば、ハイブリドーマ細胞、B リンパ球もしくは T リンパ球系統の細胞系統、全血細胞、骨髄細胞、単核細胞、白血球細胞、B リンパ球、形質細胞、抗原 - 特異的 B リンパ球、メモリー B 細胞、T リンパ球、ペプチド / M H C - 特異的 T リンパ球、またはメモリー T 細胞）の個々の集団の複数の容器への分配である。単一細胞のこのような単離は、単一の容器が単一細胞を含有するか、またはマイクロアレイ、チップ、もしくはゲルマトリックスが、単一細胞を生じる様式で充填されるような様式での細胞の集団からの細胞の物理的分離を指す。細胞は、限界希釈による単一の容器のアレイのような多数の容器に直接分配してもよい。本発明において利用した単一の容器は、好ましくは、P C R において利用可能なもの（例えば、P C R チューブおよび 9 6 ウェルもしくは 3 8 4 ウェル P C R プレートまたは容器のより大きなアレイ）である。しかしまた、他の容器を使用してもよい。単一細胞を多数の単一の容器（例えば、3 8 4 ウェルプレート）に分配する場合、単一細胞の集団が得られる。例えば、平均で 1、0 . 5 もしくは 0 . 3 個の細胞の細胞濃度を包含する単一の容器に容積を分配し、それにより、平均で単一の細胞もしくはそれ未満を含有する容器を入手することによって、そのような分配を達成してもよい。限界希釈による細胞の分配は統計的事象であるため、容器の画分は空であり、大部分の画分は単一の細胞を含有し、そして少数の画分は 2 つもしくはそれ以上の細胞を含有する。2 つもしくはそれ以上の細胞が容器に存在する場合、可変領域をコードする配列のいくつかのスクランプリングが、容器に存在する細胞間で生じ得る。しかし、それは少数の事象であるため、それは本発明の全体的な有用性に影響を及ぼさない。さらに、所望される結合アフィニティーお

30

40

50

よび特異性を所有しない可変領域をコードする配列の組み合わせは、おそらく選択されず、従って、スクリーニングプロセス中に排除される。従って、スクランプリングの少数の事象は、本発明の最終的ライブラリーに有意には影響を及ぼさない。

【0102】

例えば、単一細胞を単一の容器に正確に分配するようにプログラムすることができる FACS 機器またはロボットのようなセルソーターを使用する限界希釈による細胞分配に対する代替物が存在する。それらは、単一細胞の単一の容器への分配を一様に入手するのに労力が少なくかつより効率的であるため、これらの代替物は好適である。

【0103】

上記の富化、選別および単離手順は、大部分の細胞が無傷を保持されるように実施される。富化および選別中の細胞の破壊は、可変領域をコードする配列のスクランプリングを生じ得る。しかし、破壊の頻度は低いと予想されるため、これは問題ではないと予想される。単一の容器への分配の前の細胞の洗浄および可能な RNAse 処置は、プロセス中に漏出した RNA を取り出す。

10

【0104】

さらに、単一の容器の集団において単一細胞の集団を入手するために細胞を分配する仕方について上記の説明を考慮すると、すべての容器が単一細胞を含有しなければならないことが絶対的に必要な特徴として解釈されるべきではない。むしろ、それは、大部分の容器が単一の細胞を含有し、例えば、2 つもしくはそれ以上の細胞を伴う容器の数が分配された細胞の合計数の 25% 未満であるか、またはなお良好には、それは 10% 未満であることを示す。

20

【0105】

本発明のさらなる特徴は、複数の容器の間に個々に分配された細胞に由来するテンプレートを使用する逆転写の実施である。

【0106】

逆転写 (RT) の目的のために、本発明に従って、RT のテンプレート供給源として役割を果たすべき単一細胞内の核酸は、単一細胞に由来すると考えられるが、それらは、単一細胞の残りの内容物から必ずしも分離されている必要はない。

【0107】

単一細胞のそれらの単一の容器への最終的分配が実施された場合、逆転写の前に同遺伝子型細胞の集団を得るために、単一細胞を拡大培養してもよい。このプロセスは、稀な標的を増幅および連結すべきである場合、重要であり得るテンプレートとして使用すべきより多くの mRNA を産出する。しかし、細胞は、拡大培養中の標的遺伝子に関して遺伝的同一を保持すべきである。単離された細胞または同遺伝子型細胞の集団は、逆転写のためのテンプレートが設計されない限り、無傷を保持するかまたは溶解されるかのいずれかであり得る。好適には、以下の逆転写および PCR 増幅を容易にするために、細胞が溶解される。

30

【0108】

本発明の異なる実施形態では、開示された多重重複伸長 RT-PCR 方法または多重 RT-PCR、それに続く、ライゲーションもしくは組み換えによる連結もまた、単一の容器に分離されていないが、すべて細胞のプールとして共に残存する細胞の遺伝的に多様な集団に由来するテンプレートに対して利用してもよい。この方法は、コンビナトリアルライブラリーの作製のために使用してもよい。そのようなアプローチは、単一細胞の分配を必要としない。しかし、このアプローチにおいて使用され得る細胞は、単一細胞アプローチについて記載のもの、例えば、選別された B リンパ球または T リンパ球の集団 (プール) と同じである。単一工程多重重複伸長 RT-PCR または単一工程重複 RT-PCR、それに続く、細胞のそのような集団に対するライゲーションまたは組み換えによる連結を実施する場合、反応の前に細胞を溶解することが好適であり、そして所望であれば、全 RNA もしくは mRNA をライセートから単離してもよい。

40

【0109】

50



本発明の単一工程多重重複伸長 R T - P C R の感度は、極めて低い量のテンプレート、例えば、単一細胞のライセートに対応するテンプレートの量の使用を可能にする。

【 0 1 1 0 】

プライマー混合物および設計

本発明のプライマー混合物は、少なくとも2つの異なる目的の標的配列を増幅することが可能なプライマーセットを2×2で形成する少なくとも4つのプライマーを含んでなる。2つもしくはそれ以上のそのようなプライマーセットの混合物は、多重プライマー混合物を構成する。好ましくは、多重混合物は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140もしくは150のプライマーセット(プライマー対)を含んでなる。特に、可変領域をコードする配列の増幅では、多重プライマー混合物内の個々のプライマーセットは、2を超えるいくらかのプライマーを構成し得る。好ましくは、個々のプライマーセットは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280もしくは300のプライマーを含んでなる。好ましくは、多重プライマー混合物におけるプライマーの合計数は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、45、50、60、70、80、90、100、125、150もしくは200および多くても225、250、275、300、325、350、375もしくは400のプライマーである。

10

20

【 0 1 1 1 】

本発明のすべてのプライマーは、遺伝子特異的領域を含んでなり、そして好ましくは、すべてのプライマーには、プライマーの5'末端にプライマーテイルがさらに備え付けられ、即ち、5'非コーディング配列が遺伝子特異的プライマー部の3'末端に融合される。そのようなプライマーテイルは約6~50ヌクレオチド長であるが、所望であれば、それはまたより長くてもよい。増幅時、プライマーテイルは、標的配列に付加される。

【 0 1 1 2 】

本発明のプライマーテイルは、例えば、ライゲーションによる連結に適応されたテイル、組み換えによる連結に適応されたテイルまたは重複伸長テイルのようなクローニングおよび連結テイルである。

30

【 0 1 1 3 】

クローニングテイルは、6~20ヌクレオチド長かもしくはそれより長くてもよく、そして制限部位および/または組み換え部位を含んでなり、それらは、連結された産物の適切なベクターへの挿入に有用である。

【 0 1 1 4 】

ライゲーションによる連結を可能にするために、第1のプライマーセットの1つの部分(順方向もしくは逆方向プライマー)に、切断時に第2のプライマーセットの一方の部の連結テイルに局在する制限部位と適合可能な制限部位を含有する連結テイルが備え付けられるように、多重プライマー混合物のプライマーセットが設計される。2つを超える標的配列の連結のために、第2のプライマーセットの第2の部分に、切断時に第3のプライマーセットの1つの部分に局在する制限部位と適合可能な制限部位が備え付けられる。第2のプライマーセットに局在するこの第2の制限部位は、第1のプライマーセットのそれに適合可能であるべきではない。この方法でプライマーセットを設計することによって、かなりの数の標的配列を連結することができる。標的配列において低い頻度でまたは全く認められない制限部位を選択すべきである。さらに、ライゲーションの部位が使用する特定の制限酵素に対して切断耐性になるように、適合可能な制限部位が同一ではないことが好ましい。同一の標的配列間の連結が制限酵素によって切断可能であるため、これは、標的配列1と標的配列2の連結に対する反応を誘導する。制限部位の適切な対は、例えば、S p e I と X b a I (代替的に、N h e I または A v r I I がこれらのうちの一方もしくはは

40

50

両方の代わりになり得る)、NcoIとBspHI、EcoRIとMfeIあるいはPstIとNsiIである。連結について、SpeIは、例えば、標的配列1に局在することができ、XbaIは、標的配列2に局在することができ、NcoIは、標的配列2の他の末端に局在することができ、そして標的配列3におけるBspHIなどである。プロセスをさらに簡単にするために、制限酵素が同じ緩衝液において機能する場合が有利である。

#### 【0115】

組み換えによる連結を可能にするために、多重プライマー混合物のプライマーセットは、例えば、Chapal (1997 BioTechniques 23, 518-524) (本明細書において参考として援用される)による記事において例示されるように、設計することができる。

#### 【0116】

多重PCR増幅と同じ工程における目的のヌクレオチド配列の連結を可能にするために、重複伸長PCRに適応されたテイルが、多重プライマー混合物の各プライマーセットの少なくとも1つのプライマーに付加され、それによって、多重重複伸長プライマー混合物を生じる。

#### 【0117】

重複伸長テイルは、典型的に、さらに長く、8~75ヌクレオチド長の範囲であり、そしてプロモーターのような調節エレメント、リボソーム結合部位、終結配列、またはscFvにおけるようなリンカー配列の以後の挿入を可能にする制限部位または組み換え部位を含有してもよい。重複伸長テイルはまた、それが所望される場合、終止コドンを含んでもよい。一般的に、WO 2005/042774の図1に例示されるような3つのタイプの重複伸長テイルが存在する。タイプIでは、2つのプライマーセットの重複伸長テイルは、相互にのみ重複する。2つの重複伸長テイルのすべてのヌクレオチドが必ずしも相互に相補的である必要はない。本発明の一態様では、相補的ヌクレオチドは、重複伸長テイルのうちの60~85%の間を表す。タイプIIの重複伸長テイルでは、5'ヌクレオチドの4~6が、隣接する標的配列の遺伝子特異的領域に相補的である。タイプIIIの重複伸長テイルでは、重複全体が、隣接する標的配列に相補的である。調節エレメントなどが後に連結された標的配列の間に挿入される場合、タイプIおよびIIの重複伸長テイルが好適である。scFvにおいて認められるような定義されたリンカーによって標的配列を連結しようとする場合、タイプIIの重複伸長テイルが好適である。標的配列をインフレームで相互に連結しようとする場合、タイプIIIの重複伸長テイルが好適である。

#### 【0118】

重複伸長テイルの設計は、長さ、相対的GC含有量(GC%)、制限部位の存在、回文構造、融解温度、それらが結合する前の遺伝子特異的部分などのような配列特徴に依存する。重複伸長テイルの長さは、8~75ヌクレオチド長の間であるべきであり、好ましくは、それらは15~40ヌクレオチド長である。なおより好適には、それらは22~28ヌクレオチド長である。極めて長い重複伸長テイル(50~75ヌクレオチド)の使用は、各プライマーセットによって産生される産物の連結に好都合であり得る。しかし、重複伸長テイルの長さとの間の割合は、極めて長い重複伸長テイルを使用する場合、おそらく、調整する必要がある。GC%の選好は、重複伸長テイルの長さに依存する。テイルが短いほど、それらが相補的である領域は短いため、より長いテイルよりも相互作用を強化するために、それらはより高いGC%を必要とする。プライマー設計の他の原理も同様に観察すべきであり、例えば、プライマーの二量体化およびヘアピン形成を最小限にすべきである。それらはいずれも誤ったプライミングに係わるべきではない。さらに、Taq DNAポリメラーゼは、しばしば、新たに合成されたDNA鎖の3'末端においてアデノシン(A)を付加し、そしてこれは重複伸長テイルが3'非テンプレートA付加を収容することを可能にすることによって、重複伸長テイル設計に収容され得ることが公知である。

#### 【0119】

連結テイル、例えば、重複伸長テイル、ライゲーションによる連結に適応されたテイルまたは組み換えによる連結に適応されたテイルを担持するプライマーの選択は、標的配列

10

20

30

40

50

の連結の順序および方向を定義する。結合テイルが備え付けられるのは、プライマーセットの順方向プライマーであるのか、もしくは逆方向プライマーであるのか、またはそれとも順方向および逆方向プライマーの両方であるのかという問題は、本発明には必須ではない。しかし、いずれにせよ、最終産物における標的配列の順序および方向は、例えば、プロモーターおよび終結配列のような調節エレメントの挿入または個々の標的配列のインプレームにおける連結に関連し得るため、これについてはいくつかが考慮すべきである。

**【0120】**

目的の2つのヌクレオチド配列の連結では、連結テイルは、各標的配列のPCR増幅に使用される各プライマーセットの逆方向プライマーまたは順方向プライマーのいずれかに付加され得る。

10

**【0121】**

本発明は、重複伸長テイルおよびライゲーションによる連結に適応されたテイルの各セットのmVHおよびmVK順方向プライマーへの付加を例示する。これは、5' - 5'型(頭-頭型および両方向性)である産物の結合方向を生じる。しかし、結合テイルは、各セットの逆方向プライマーにも付加され得る。これは、3' - 3'型(尾-尾型および両方向性)である産物の結合方向を生じる。第3の選択肢は、連結テイルを、第1のプライマーセットの逆方向プライマーおよび第2のプライマーセットの順方向プライマーに付加することか、またはその逆である。これは、3' - 5'配向(頭-尾型および片方向性)を生じる。

**【0122】**

20

2つを超える目的のヌクレオチド配列を連結する場合、プライマーセットのいくつかは、一方のテイルが前方のプライマーセットのテイルに相補的であり、そして他方のテイルが後方のプライマーセットのプライマーのうち1つに相補的であるような順方向および逆方向プライマーの両方に対して連結テイルを有する必要がある。この原理は、他の2つの標的配列の間で連結しようとする標的配列を増幅するすべてのプライマーセットで保たれる。

**【0123】**

遺伝子特異的プライマー部分の設計は、一般的に、プライマー二量体化、ヘアピン形成、および非特異的アニーリングを最小限にするような既知のプライマー設計規則を守るべきである。さらに、可能であれば、3'塩基としての複数のGまたはCヌクレオチドを回避すべきである。プライマーセットにおける遺伝子特異領域の融解温度( $T_m$ )は、好ましくは、相互に等しい $\pm 5$ であるべきである。本発明では、45 ~ 75の間の $T_m$ 値が望ましく、そして約60の $T_m$ 値がほとんどのアプリケーションについて最適である。有利なことに、初期のプライマー設計は、この作業のために開発されたコンピュータプログラムによって支援され得る。しかし、プライマー設計は、一般的に、研究室での試験および日常的な最適化を必要とする。これは、例えば、サイズ、制限酵素断片長多型(RFLP)を分析し、そしてプライマーセットを使用する、得られた増幅産物の配列決定によって、行われ得る。可変領域を伴う配列を増幅する場合、またはタンパク質の指定されたクラスに属する新たなファミリーのメンバーを検索する場合、プライマー内の縮重位置(degenerate position)の使用は、有用なアプローチである。縮重位置の数もまた、最適化を必要とし得る。

30

40

**【0124】**

本発明の1つの特徴は、増幅をプライムし、そして目的の少なくとも2つのヌクレオチド配列の連結を促進することが可能な少なくとも2つのプライマーセットからなるプライマー混合物である。本発明のプライマー混合物は、例えば、酵素、インヒビター、構造タンパク質、毒素、チャンネルタンパク質、Gタンパク質、受容体タンパク質、免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質、輸送タンパク質など、好ましくは、免疫グロブリンのクラスに属するヘテロマータンパク質由来の少なくとも2つのサブユニットまたはドメインの増幅をプライムすることが可能である。

**【0125】**

50

本発明のさらなる特徴は、プライマーセットを含んでなる多重重複伸長プライマー混合物であって、各プライマーセットの少なくとも1つのプライマーセットメンバーは、第2のプライマーセットのプライマーセットメンバーの重複伸長テイルにハイブリダイズすることが可能な重複伸長テイルを含んでなる。

【0126】

重複伸長テイルは、プライマーセットから生じる各個々の産物に、相接する産物に相補的であるテイルを備え付けることによって、多重重複伸長PCR増幅中の目的のヌクレオチドの即時連結を可能にする。しかし、これは、この第1のPCR増幅中に連結が必ずしも生じることを意味するものではない。反応設定に依存して、大部分の実際の連結は、第1のPCR増幅(多重PCR増幅)のアウトプライマーによるさらなる増幅中に実施され得る。

10

【0127】

本発明のさらなる特徴は、可変領域をコードする配列を含有するヌクレオチド配列のファミリーを増幅するように設計されたプライマーセットである。そのようなファミリーの例には、免疫グロブリン由来の軽鎖(例えば、マウスのVK1-19)、軽鎖(例えば、マウスのVL1-8)および可変重鎖(例えば、マウスのVH1-15)、ならびに、またはTCR可変領域がある。可変領域をコードする配列を含有するヌクレオチド配列のファミリーの増幅のためのプライマーセットは、しばしば、複数のプライマーを含んでなり、いくらかのプライマーは縮重プライマーであり得る。免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列のファミリーの増幅は、例えば、鎖(mVKプライマー)の可変領域もしくはリーダー配列および/または鎖もしくは定常領域(mKappaプライマー)を伴うリーダー配列(順方向プライマー)、ならびに/あるいはプライマー(逆方向プライマー)もしくはそのような複数のプライマーの5'末端に相補的な複数のプライマーからなるプライマーセットを使用して、実施される。あるいは、軽鎖連結領域プライマーを、定常領域プライマー代わりに逆方向プライマーとして使用してもよい。あるいは、可変軽鎖のリーダー配列の前方にあるUTR領域においてアニーリングする順方向プライマーを使用してもよい。同様に、免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列のファミリーを、様々なプライマーの組み合わせを利用して、1つのプライマーセットで増幅することができる。例えば、重鎖可変領域(mVHプライマー)または複数の重鎖連結領域プライマーを伴うこの領域(順方向プライマー)のリーダー配列または重鎖定常領域プライマー(逆方向プライマー)の5'末端に相補的な複数のプライマー。mCHプライマーはアイソタイプ-特異的であってもよく、そして特に、任意のmCHプライマーを利用することができ、また、それは全長重鎖を生じる。好ましくは、ヒト重鎖定常領域の付加を可能にするために完全長重鎖を増幅しないmCHプライマーが使用される。あるいは、可変重鎖のリーダー配列の前方にあるUTR領域においてアニーリングする順方向プライマーを使用してもよい。

20

30

【0128】

可変領域プライマーについて、高い程度の配列類似性によるクロスハイブリダイゼーションが観察される場合、可変領域の5'末端の代わりにリーダー配列においてアニーリングする順方向プライマーの使用は、特に有用である。リーダー配列は、細胞内のタンパク質プロセッシング中に切断除去されるため、リーダープライマーを使用するクロスハイブリダイゼーションによる変異は、最終タンパク質から排除される。

40

【0129】

本発明の1つの特徴は、可変領域をコードする配列より前方にあるリーダーをコードする配列の3'末端においてアニールするプライマー、および可変領域をコードする配列の増幅のためのそれらの使用である。

【0130】

本発明の一実施形態では、多重重複伸長PCRおよび逆転写工程にも利用され得る多重重複伸長プライマー混合物は、

a) 免疫グロブリン軽鎖領域をコードする配列のセンス鎖に相補的な少なくとも1つのm

50

K a p p a r 1 または h m J K プライマー、  
 b ) 免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列または軽鎖可変領域リーダー配列のアンチセンス鎖に相補的であり、かつ工程 a ) においてプライマーと共にプライマーセットを形成することが可能な少なくとも1つの m V K プライマー、  
 c ) 免疫グロブリン重鎖ドメインをコードする配列のセンス鎖に相補的な少なくとも1つの m C H r e v 1、m H C r e v 1 - e x t、または m J H プライマー、  
 d ) 免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列または重鎖可変領域リーダー配列のアンチセンス鎖に相補的であり、かつ工程 c ) においてプライマーと共にプライマーセットを形成することが可能な少なくとも1つの m V H プライマー  
 を含んでなる。

10

## 【 0 1 3 1 】

本発明の一実施形態では、軽鎖プライマーは、 および 軽鎖可変領域をコードする配列の両方を増幅するために適応される。

## 【 0 1 3 2 】

本発明のさらなる実施形態では、免疫グロブリン m V K プライマーは、好ましくは、相補的重複伸長テイルの形態で連結テイルを担持する。これは、頭 - 頭型様式で連結される可変領域をコードする配列を生じる。頭 - 尾型様式における可変領域をコードする配列の連結では、m K a p p a r 1 および m V H プライマーのいずれかは、連結テイルを含有するか、または m V K および m C H r e v 1 プライマーは、好ましくは、相補的重複伸長テイルの形態で連結テイルを含有する。尾 - 尾型様式における可変領域をコードする配列の連結では、m C H および m K a p p a r 1 プライマーは、好ましくは、相補的重複伸長テイルの形態で連結テイルを含有する。

20

## 【 0 1 3 3 】

好適には、本発明の多重重複伸長プライマー混合物を含む多重プライマー混合物は、2つのプライマーセットを含んでなる。それ故、多重プライマー混合物は、少なくとも4つの異なるプライマーを含んでなる。本発明のさらなる態様では、多重プライマー混合物は、4つを超える異なるプライマーを含んでなる。本発明の多重プライマー混合物は、単一の容器における標的配列の増幅に使用される。例えば、 および重鎖可変領域は、同じ容器において増幅され得る。

## 【 0 1 3 4 】

本発明はまた、多重 R T - P C R、それに続く、ライゲーションもしくは組み換えによる連結、または多重重複伸長 R T - P C R によって得られる連結された産物のさらなる P C R 増幅のためのプライマーを包含する。このさらなる P C R 増幅は、連結された標的配列を増幅するために適応されたプライマー混合物を使用して、実施することができる。そのようなプライマー混合物は、多重プライマー混合物または多重重複伸長プライマー混合物のアウトプライマーを含んでなり、これは、連結されたヌクレオチド配列のセンス鎖の最も外側の 5 ' 末端および 3 ' 末端にアニールし、それによって連結された産物全体の増幅を選択的に可能にするプライマーを意味する。このプロセスは、一般的に、多重 R T - P C R、それに続く、ライゲーションもしくは組み換えによる連結からか、または多重重複伸長 R T - P C R から得られる連結された産物の量を増加するのに役立つ。

30

40

## 【 0 1 3 5 】

あるいは、一次多重 R T - P C R または多重重複伸長 R T - P C R 反応で使用されるアウトプライマーと比較して、ネステッドされるプライマーセットは、連結されたヌクレオチド配列のさらなる増幅に使用することができる。本発明では、そのようなプライマーセットは、ネステッドプライマーセットと称される。ネステッドプライマーの設計は、一般的に、多重 R T - P C R または多重重複伸長 R T - P C R において使用されるアウトプライマーのアニリング位置の 3 ' 側から部分的もしくは全体的にプライムすることを除き、先に記載の遺伝子特異的プライマーに対するものと同じ設計規則を守る。従って、ネステッド P C R から生じる産物は、多重 R T - P C R、それに続く、ライゲーションもしくは組み換えによる連結、または多重重複伸長 R T - P C R によって得られる連結され

50

た産物より短くてもよい。連結された産物の量を増加することに加えて、ネステッドPCRは、特に、多重重複伸長RT-PCR技術の全体的な特異性を増加させるのにさらに役立つ。しかし、さらなる増幅実施する場合、先に記載されているすべての多重プライマー混合物/多重重複伸長プライマー混合物が、ネステッドプライマーセットとの組み合わせに適切であるわけではないことに留意すべきである。そのような場合には、多重プライマー混合物/多重重複伸長プライマー混合物のアウトプライマーをさらなる増幅に使用することができるか、またはセミネステッドPCRを、後に記載のように適用することができる。

#### 【0136】

本発明の一実施形態では、 $J_L$  および  $J_H$  プライマーの混合物が、連結された免疫グロブリン可変領域をコードする配列のさらなる増幅のためのネステッドプライマーとして使用される。

#### 【0137】

本発明のネステッドプライマーセットはまた、第1の多重プライマー混合物/多重重複伸長プライマー混合物由来の逆方向（または順方向）アウトプライマー、および第1の多重プライマー混合物/多重重複伸長プライマー混合物の順方向（または逆方向）アウトプライマーのアニーリング位置の3'側からプライムする第2のネステッドプライマーからなり得る。さらなるPCR増幅のためのそのようなプライマーセットの使用は、一般的に、セミネステッドPCRとして公知である。そのようなプライマーは、相補性決定領域(CDR)においてアニールする必要があるため、例えば、可変領域配列のための1つの特異敵領域におけるネステッドプライマーを設計することが困難である場合、例えば、セミネステッドPCRを適用することができる。さらに、例えば、クローニング目的のために、連結された配列の1つの末端を無傷の状態で保持することが所望される場合、セミネステッドPCRを使用することができる。

#### 【0138】

##### 多重重複伸長PCRの最適化

2工程および単一工程手順の両方の多重重複伸長PCR工程のパラメータは、いくらかのパラメータに対して最適化することができる（例えば、Henegariu, O. et al. 1997. *BioTechniques* 23, 504-511; Markoulatos, P. et al. 2002. *J. Clin. Lab. Anal.* 16, 47-51を参照のこと）。一般的に、同じ最適化パラメータが多重RT-PCRに当てはまるが、アウトプライマーとインナープライマーとの間の比は、そのような反応にそれほど重要ではない。

#### 【0139】

##### a. プライマー濃度

重複伸長テイルを担持するプライマー（例えば、 $V_H$  および  $V_L$  プライマー）の濃度は、好ましくは、重複伸長テイルを伴わないアウトプライマー（例えば  $J_H$  および プライマー）の濃度より低い。

#### 【0140】

標的配列の1つが、他より低い効率で、例えば、より高いGC%の結果として増幅する場合、増幅効率を均一にすることが可能であり得る。これは、低い効率で増幅を仲介するより高い濃度のプライマーセットを使用するか、または他のプライマーの濃度を低下させることによって行われ得る。例えば、重鎖可変領域をコードする配列は、より高いGC%を有する、従って、軽鎖可変領域より低い増幅効率を有する傾向がある。これは、 $V_H$  プライマーより低い濃度で  $V_L$  プライマーを使用することを指摘している。

#### 【0141】

さらに、多数のプライマーを使用する場合、全プライマー濃度は問題となり得る。上限は、滴定実験によって実験的に決定される。Applied Biosystemsの「AmpliTaq Gold」PCRシステムでは、上限は、 $1.1 \mu\text{M}$  全オリゴヌクレオチド濃度であることが見出されたが、しかし、他のシステムでは、 $2.4 \mu\text{M}$  という高さであり得る。全オリゴヌクレオチド濃度のそのような上限は、個々のプライマーの最大濃度に影響を及ぼす。個々のプラ

10

20

30

40

50

イマー濃度が低すぎる場合、不十分なPCR感度を生じる可能性がある。

【0142】

オリゴヌクレオチドプライマーの品質はまた、多重重複伸長PCRにも重要であることが見出されている。HPLC精製オリゴヌクレオチドは最良の結果を生じている。

【0143】

b. PCRサイクリング条件：

好適には、サイクリング条件は以下のとおりである。

【0144】

【表1】

変性：	10～30秒間	94℃		10
アニーリング：	30～60秒間	50～70℃	プライマーのTmより約5℃低い。	
伸長：	1分間×EPL	65～72℃	EPLは、予想された産物の長さ(kb)である。	
サイクル数：	30～80			
最終伸長：	10分間	65～72℃		

【0145】

単一工程多重重複伸長RT-PCRでは、上記で概説した増幅サイクリングの前に、以下の工程をサイクリングプログラムに組み入れた。

【0146】

【表2】

逆転写：	30分間	42～60℃	これらの条件もまた使用され、ここで、個別の逆転写が実施される。	
ポリメラーゼ活性化：	10～15分間	95℃	ホットスターとポリメラーゼが単一工程RT-PCRに好適である。製造者に従う活性化。	

30

【0147】

これらのすべてのパラメータを最適化することが可能である。特に、アニーリング温度は重要である。それ故、最適アニーリング温度および時間、ならびに伸長および変性時間を同定するために、最初に、最終プライマー混合物を構成しようとするすべての個々のプライマーセットを、個別に試験すべきである。これにより、これらのパラメータを多重重複伸長プライマー混合物について最適化し得る時間枠(window)についての得策が得られる。

【0148】

例えば、低いプライマー濃度またはテンプレート濃度による不十分なPCR感度の問題は、多数回の熱サイクルを使用することによって、克服することができる。多数回の熱サイクルは、35～80サイクル、好ましくは、約40サイクルである。

【0149】

さらに、伸長時間を長くすることによって、多重重複伸長PCRプロセスを改善することができる。長い伸長時間は、通常の1分間の伸長と比較して、1.5～5分間×EPLである。

【0150】

c. 補助剤の使用

多重PCR反応は、DNAを弛緩し、それ故、テンプレート変性を容易にするDMSO、グリセロール、ホルムアミド、またはベタインのようなPCR添加剤を使用することによって、有意に改善することができる。

50

## 【0151】

d. dNTPおよびMgCl<sub>2</sub>

デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)の品質および濃度は、多重重複伸長PCRにとって重要である。最良のdNTP濃度は、200~400μMの各dNTP(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP)であり、それを超えると、増幅は迅速に阻害される。より低いdNTP濃度(100μMの各dNTP)は、PCR増幅を達成するのに十分である。dNTPストックは、融解/凍結サイクルに敏感である。3~5回のそのようなサイクル後、多重PCRは、しばしば、十分に機能しない。そのような問題を回避するために、小さなアリコートでdNTPを作製し、-20℃で凍結保存することができる。

10

## 【0152】

Mg<sup>2+</sup>濃度の最適化は、ほとんどのDNAポリメラーゼがマグネシウム依存性酵素であるため、極めて重要である。DNAポリメラーゼに加えて、テンプレートDNAプライマーおよびdNTPがMg<sup>2+</sup>に結合する。従って、最適Mg<sup>2+</sup>濃度は、dNTP濃度、テンプレートDNA、およびサンプル緩衝液の組成に依存する。プライマーおよび/またはテンプレートDNA緩衝液がEDTAまたはEGTAのようなキレート剤を含有する場合、見かけのMg<sup>2+</sup>最適条件は、変更され得る。過剰のMg<sup>2+</sup>濃度は、DNA二本鎖を安定化し、そして収量を減少するDNAの完全な変性を防止する。過剰のMg<sup>2+</sup>はまた、不正確なテンプレート部位へのプライマーの擬似的アニーリングを安定化して、それによって特異性を減少することができる。これに対し、不適切なMg<sup>2+</sup>濃度は産物の量を減少させる。

20

## 【0153】

dNTPとMgCl<sub>2</sub>との間の良好な均衡は、1.5~3mMのMgCl<sub>2</sub>に対して約200~400μMの(それぞれの)dNTPである。

## 【0154】

e. PCR緩衝液濃度

一般的に、KClに基づく緩衝液は、多重重複伸長PCRに十分であるが、しかし、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、Tris-HCl、またはそれらの組み合わせのような他の成分に基づく緩衝液もまた、多重重複伸長PCRによる機能に最適化することができる。より長い産物の増幅に参与するプライマー対はより低い塩濃度(例えば、20~50mMのKCl)でより良好に作用するが、一方、短い産物の増幅に参与するプライマー対は、より高い塩濃度(例えば、80~100mMのKCl)でより良好に作用する。緩衝液濃度を1倍の代わりに2倍に上昇させることにより、多重反応の効率を改善することができる。

30

## 【0155】

f. DNAポリメラーゼ

本発明は、Taqポリメラーゼによって例示される。あるいは、例えば、Pfu、Phusion、Pwo、Tgo、Tth、Vent、Deep-ventを含む他のタイプの耐熱性DNAポリメラーゼを使用してもよい。3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を伴わないまたは伴うポリメラーゼを、単独で、または相互に組み合わせて使用してもよい。

40

## 【0156】

ベクターおよびライブラリー

本発明に従う目的のヌクレオチド配列の連結は、免疫グロブリンの可変領域をコードする連結されたヌクレオチド配列を含んでなるヌクレオチドセグメントを生成する。さらに、そのような連結された核酸配列のライブラリー、特に、ヒト定常領域(重鎖および軽鎖)配列に連結またはスプライシングされた非ヒト可変領域をコードする配列のライブラリーが、本発明の方法によって生成される。

## 【0157】

本発明の1つの特徴は、本発明の方法によって作製される目的の連結されたヌクレオチド配列または目的の連結されたヌクレオチド配列のライブラリーを含有するセグメントの

50



適切なベクターへの挿入である。ライブラリーは、コンビナトリアルライブラリー、またはより好ましくは、可変領域をコードする配列の同族対のライブラリーであり得る。アウトプライマー、ネステッドプライマーまたはセミネステッドプライマーによって作製される制限部位は、好ましくは、選好されるベクターの適切な制限部位に一致するように設計される。セミネステッド、ネステッドプライマーまたはアウトプライマーの1つに適切な組み換え部位が備え付けられており、そして選好されるベクターがなおそれを含有する場合、目的の連結された核酸配列はまた、組み換えによってベクターに挿入することができる。

#### 【0158】

基本的に、本発明の多重RT-PCR連結方法の1つによって作製される産物のキャリアとして使用することができるベクターに制限はない。選好されるベクターは、例えば、細菌、酵母、他の真菌、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞を含む細胞における増幅および発現に適切なものであってよい。そのようなベクターを使用して、さらなるクローニング工程、ベクター系間のシャトリング、ベクターに挿入される産物のディスプレイ、挿入された産物の発現を容易にし、および/または宿主細胞のゲノムに組み込むことができる。

10

#### 【0159】

クローニングおよびシャトルベクターは、好ましくは、細菌ベクターである。しかし、他のタイプのベクターもまた、クローニングおよびシャトル手順に適用され得る。

#### 【0160】

ディスプレイベクターは、例えば、ファージベクター、またはfd、M13、もしくはf1系状バクテリオファージのクラス由来のファージミドベクターであり得る。そのようなベクターは、例えば、結合タンパク質またはそのフラグメントを含むタンパク質の系状バクテリオファージの表面上のディスプレイを容易にすることが可能である。リボソーム、DNA、酵母細菌、または哺乳動物細胞でのディスプレイに適切なディスプレイベクターもまた、当該分野において公知である。これらは、例えば、ウイルスベクター、またはキメラタンパク質をコードするベクターを含んでなる。

20

#### 【0161】

発現ベクターは、言及された種のすべてに存在し、選択すべきベクターは、発現されるタンパク質に完全に依存する。いくつかの発現ベクターは、さらに、適切な組み換え部位を利用する、無作為組み込み、または部位特異的組み込みのいずれかによって宿主細胞のゲノムへ組込むことが可能である。発現ベクターは、連結された産物がインフレイムでこれらの配列に挿入される場合、適切な宿主細胞に導入された場合により大きなタンパク質、例えば、全長モノクローナル抗体の発現を可能にするさらなるコーディング配列を提供するように、設計してもよい、このインフレイム挿入はまた、系状バクテリオファージまたは細胞の表面上でのディスプレイを容易にするキメラタンパク質の発現も容易にする。バクテリオファージディスプレイ系では、目的の連結されたヌクレオチド配列を、pI I IまたはpV I I Iのようなコートタンパク質をコードする配列にインフレイムで挿入してもよい(Barbas, C.F. et al. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982; Kang, A.S. et al. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4363-4366)。

30

40

#### 【0162】

本発明の一実施形態では、目的の連結されたヌクレオチド配列の個々のセグメントは、1つの主由来の軽鎖可変領域をコードする配列と会合した免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする配列からなり、1つもしくはそれ以上のヒト免疫グロブリン定常ドメイン、好ましくは、ヒト軽鎖および重鎖定常領域の両方をコードする配列を含有するベクターに挿入される。挿入は、連結された重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域をコードする配列がインフレイムで定常領域をコードする配列に挿入されるように操作される。そのような挿入により、例えば、FabもしくはF(ab')<sub>2</sub>発現ベクター、全長抗体発現ベクターまたは全長抗体のフラグメントをコードする発現ベクターを作製することができる。好ましくは、そのようなベクターは、発現に適切な発現ベクター(例えば、大腸菌(E.co

50

li)、ファージミド、または哺乳動物ベクター)であり、そして定常領域重鎖をコードする配列は、ヒト免疫グロブリンクラス I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D、または I g E から選択され、それによって F a b または完全長組み換え抗体の発現を可能にする。定常重鎖をコードする配列に加えて、ベクターはまた、ヒト または 鎖から選択される定常軽鎖をコードする配列を含有してもよい。これは、非ヒト種由来の免疫グロブリン可変領域をコードする配列 ( F v ' ) のみをコードするこれらの場合において、連結されたヌクレオチド配列としてのキメラ抗体の作製に好適である。

【 0 1 6 3 】

代替的实施形態では、非ヒト配列との重複を提供するヒト定常領域、ならびに可変および定常領域の両方のインフレイムにおける増幅を保証する適切なプライマーを容器に添加することによって、ヒト定常領域は、分子増幅手順の工程において非ヒト可変領域にスプライシングまたは連結される。この方法では、ヒト定常 または 鎖を添加してもよく、および/またはヒト定常重鎖を添加してもよい。この手順を使用することによって、コーディング配列内に制限部位を提供する必要がないという利点がある。

10

【 0 1 6 4 】

本発明の別の実施形態において、連結されたヌクレオチド配列の個々のセグメントは、鎖可変領域をコードする配列と会合した T c R 鎖可変領域をコードする配列、または鎖可変領域をコードする配列と会合した 鎖可変領域をコードする配列でからなる。好ましくは、これらの連結された配列は、1つもしくはそれ以上の T c R 定常ドメインをコードする配列を含有するベクターに挿入される。挿入は、挿入される連結された可変領域をコードする配列が、対応する T c R 定常領域をコードする配列にインフレイムであるように操作される。さらなる実施形態では、そのようなベクターは、T c R 定常領域にインフレイムでロイシンジッパーをコードする配列を含んでなるキメラ発現ベクターである。そのような構築物は、可溶性 T c R の安定性を増加することが示されている (Willcox, B .E. et al. 1999. Protein Sci 8, 2418-2423)。

20

【 0 1 6 5 】

本発明の同族対のライブラリーは、2つの異なるアプローチによってベクターに導入され得る。第1のアプローチでは、単一の同族対が個々に適切なベクターへ挿入される。次いで、ベクターのライブラリーは、個別に保持してもよく、またはプールしてもよい。第2のアプローチでは、すべての同族対を、ベクター挿入の前にプールし、続いて、適切なベクターに一括して ( i n - m a s s ) 挿入して、ベクターのプールされたライブラリーを作製する。ベクターのそのようなライブラリーは、かなり多様な可変領域をコードする配列の対を含んでなる。

30

【 0 1 6 6 】

本発明の一態様は、連結された可変領域をコードする配列の同族対を伴う抗体のライブラリーである。好ましくは、ライブラリーの個々の抗体は、1つの種およびヒト定常領域由来の重鎖可変領域をコードする配列と会合した免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列を含んでなる。

【 0 1 6 7 】

同族対の別の好適なライブラリーは、連結された T c R 領域をコードする配列を含んでなり、各個々の T c R 領域をコードする配列は、鎖可変領域をコードする配列と会合した鎖可変領域をコードする配列、および/または鎖可変領域をコードする配列と会合した T c R 鎖可変領域をコードする配列を含んでなる。

40

【 0 1 6 8 】

本発明の実施形態は、特定の標的に対して指向された所望される結合特異性をコードする連結された可変領域をコードする配列の同族対のサブライブラリーである。好ましくは、これらの同族対は、連結された免疫グロブリン軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする配列、T c R 鎖可変領域、および鎖可変領域をコードする配列、ならびに/あるいは T c R 鎖可変領域、および鎖可変領域をコードする配列を含んでなる。

50

## 【0169】

さらなる実施形態は、本発明の全体を通じて記載された可変領域をコードする配列の同族対の親ライブラリーから選択されるサブライブラリーである。

## 【0170】

本発明の好適な実施形態は、ヒト免疫グロブリンクラス I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、または I g M から選択される全長キメラ免疫グロブリンの同族対をコードするライブラリーまたはサブライブラリーである。

## 【0171】

本発明の別の好適な特徴は、T c R の可溶性または安定な同族対をコードするライブラリーまたはサブライブラリーである。

10

## 【0172】

本発明の特徴は、少なくとも 5、10、20、50、100、1000、 $10^4$ 、 $10^5$ 、または  $10^6$  の異なる同族対抗体からなる多様な前記ライブラリーである。

## 【0173】

本発明のさらなる実施形態では、連結された可変領域をコードする配列の同族対の前記ライブラリーは、本明細書に記載の工程を含んでなる方法によって得ることが可能である。このライブラリーは、親ライブラリーとも称される。

## 【0174】

スクリーニングおよび選択

本発明の方法の1つを利用するドナーから単離された連結された可変領域をコードする配列の対の親ライブラリーは、いくつかは関連性がない、すなわち、所望される標的、特にコンビナトリアルライブラリーに結合していない多様な結合タンパク質を示すことが予想される。従って、本発明は、特定の標的に対して指向された多様な結合特異性のサブセットをコードするサブライブラリーに対する富化およびスクリーニングを包含する。

20

## 【0175】

同族対のライブラリーについて、ライブラリーの多様性は、極少数の無作為に連結された可変領域を伴うドナー物質に存在する多様性を示すことが予想される。それ故、富化工程は、同族対からなるライブラリーにおける標的特異的結合アフィニティーのスクリーニング前に必ずしも必要としなくてよい。

## 【0176】

本発明のさらなる実施形態では、連結された可変領域をコードする配列の対のライブラリーを作製する方法は、所望される標的特異性を伴う結合タンパク質をコードする連結された可変領域配列の対のサブセットを選択することによってサブライブラリーを作製することをさらに含んでなる。連結された可変領域をコードする配列のそのような選択はまた、標的特異的同族対のライブラリーとも称される。

30

## 【0177】

本発明の好適な実施形態では、可変領域をコードする配列の標的特異的同族対のライブラリーは、発現ベクターに移行される。発現ベクターは、哺乳動物発現ベクター、酵母発現ベクター、真菌発現ベクター、植物発現ベクター、細菌発現ベクターであってもよく、スクリーニングに使用される細胞のタイプに依存する。好ましくは、発現ベクターは哺乳動物由来である。

40

## 【0178】

免疫学的アッセイは、一般的に、標的特異的免疫グロブリン可変領域をコードする配列の選択に適切である。そのようなアッセイは当該分野において周知であり、そして例えば、F M A T、F L I S A、E L I S P O T、E L I S A、膜アッセイ（例えば、ウエスタンブロット）、フィルター上のアッセイ、および F A C S を構成する。アッセイは、免疫グロブリン可変領域をコードする配列から産生されるポリペプチドを利用する直接的な様式でいずれも実行され得る。あるいは、イムノアッセイは、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌表面ディスプレイ、酵母ディスプレイ、真核生物ウイルスディスプレイ、RNAディスプレイもしくは共有結合ディスプレイのような富化方法と組み合

50

わせて、またはそれらの後に実施され得る (FitzGerald, K., 2000. Drug Discov. Today 5, 253-258においてレビューされた)。同族 F a b 発現ライブラリーおよび同族全長抗体発現ライブラリーは両方とも、スクリーニングに供され、それによってポジティブなクローンのサブライブラリーを作製することができる。そのようなスクリーニングアッセイおよび富化手順はまた、連結された可変領域の F v もしくは s c F v フラグメントまたはコンビナトリアルライブラリーにも適切である。

#### 【 0 1 7 9 】

免疫学的スクリーニングに加えて、特定の発明の特徴は、それが、所望される特性を伴う抗体分泌クローンを選択するための様々なタイプの機能的スクリーニングの使用を可能にすることである。そのようなスクリーニングアッセイとして、増殖アッセイ、ウイル  
10 ス不活化アッセイ、細胞死滅アッセイなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、機能アッセイは、本発明の発現ベクターでトランスフェクトされた細胞由来の上清を使用して、ハイスループット形式で行うことができる。

#### 【 0 1 8 0 】

本発明の好適な実施形態では、可変領域をコードする配列の標的特異的同族対またはコンビナトリアル対のサブライブラリーの選択は、ハイスループットスクリーニングアッセイを使用することによって実行される。ハイスループットスクリーニングアッセイは、半  
20 自動または完全自動装置で実施される E L I S A アッセイであり得るが、これに限定されない。それはまた、細菌を無人操縦で選び出し、そして抗原結合分子を発現するコロニーのアレイを生じる寒天プレートの上部の適切な膜上で格子状に並べる ( g r i d d e d ) 膜アッセイでもあり得る。分子は、膜を介して第 2 の基本抗原被覆膜へ分泌され、これらは個別に展開され、所望される標的に対する抗原結合分子を分泌するクローンを同定するために使用され得る (de Wildt, R.M., et al. 2000. Nat. Biotechnol. 18, 989-994 )

#### 【 0 1 8 1 】

抗原結合クローンの同族対またはコンビナトリアル対のサブライブラリーが適切な技術によって選択されている場合、連結された免疫グロブリン軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする配列の D N A 配列決定によってさらなる分析を実施することが可能である。まず第一に、そのような D N A 配列決定は、C D R 領域内の生殖細胞系起源、ファミリ  
30 ー分布、および成熟のようなライブラリーの多様性に関する情報を提供する。そのような分析は、広範な多様性を示すクローンの選択、および反復するクローンを取り除くことを可能にする。第 2 に、D N A 配列決定は単離プロセス中に導入された変異を示す。

#### 【 0 1 8 2 】

可変領域をコードする配列を分析する場合、変異が許容されるかどうか評価する際に考慮する 3 つのタイプの変異がある。i ) 最も多いタイプの変異はクロスプライミングから生じ、配列類似性のため、V 遺伝子プライマーが全体的に相同でない生殖細胞系配列をブ  
40 ライムする。導入される変更は、主に特定の位置での天然に存在するコドンの置換である。V 遺伝子配列間の高い程度の配列相同性による。これらの変更のいくつかは有意であり得、時々、天然の対応物を伴わない。そのような変更は、新たなエピトープを作製することによって、潜在的に、可変領域の免疫原性に影響を及ぼし得る。そのような変更は容易に同定され、そしてその後標準分子生物学的技術を使用して修復されるか、またはクローンがライブラリーから除外され得る、i i ) T a q D N A ポリメラーゼによって生じるエラーは定常領域をコードする配列で最も容易に同定され、かつ容易に排除され得る。しかし、T a q 誘導性変異は、もちろん可変領域をコードする配列にも存在し得、それらは、可変領域をコードする配列におけるランダム変異の結果でもある天然に存在する体細胞変異と区別ができない。変異が非系統的であり、かつ明確な方法で特定の対にのみ影響を及ぼすことを考慮すると、そのような変更を無視することは合理的であるようである。

#### 【 0 1 8 3 】

本発明のさらなる実施形態では、標的特異的かつおそらく配列分析された連結された免疫グロブリン軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする配列の対のサブライブラリー  
50

は、哺乳動物発現ベクターに移行される。そのような移行は、前のセクションに記載されたベクターのいずれかへ実施することができ、全長組み換え抗体の発現を可能にする。スクリーニングが哺乳動物の同族全長抗体発現ライブラリーで実施される場合、そのような移行は必要でない場合がある。

#### 【0184】

本発明の別の実施形態では、親ライブラリーは、Tリンパ球について富化されているリンパ球を含有する細胞分画から作製される。親ライブラリーを構成する連結された可変領域をコードする配列の対が、同族対またはコンビナトリアル対のサブライブラリーを作製する所望される標的特異性を伴う結合タンパク質をコードする および ならびに / ある いは および 鎖からなる連結された可変領域配列の対のサブセットをコードすることについて、選択され得る。抗原特異的T細胞受容体はその後に、四量体MHCペプチド複合体による染色（例えば、Callan, M.F. et al. 1998. J. Exp. Med. 187, 1395-1402 ; Novak, E.J. et al. 1999. J. Clin. Invest 104, R63-R67）のような標準的方法を使用するトランスフェクトされた細胞のプールから、IL-2放出の形で細胞応答を測定することによって、または酵母またはレトロウイルスディスプレイ技術のようなより洗練された手段によって同定され得る。

10

#### 【0185】

##### 宿主細胞および発現

本発明のライブラリーは、目的の連結された核酸配列、特に結合タンパク質またはそのフラグメントを含有する可変領域からコードされたタンパク質の発現および産生に適したベクターに移行させることができる。そのようなベクターは、ベクターおよびライブラリーのセクションに記載されており、例えば、選好される種の全長抗体、Fabフラグメント、Fvフラグメント、scFv、膜結合もしくは可溶性TCR、またはTCRフラグメントの発現を提供する。

20

#### 【0186】

本発明の1つの特徴は、増幅および / または発現のための、連結された可変領域をコードする配列の同族対のベクターまたは連結された可変領域をコードする配列の同族対をコードする単クローンのライブラリーあるいはサブライブラリーの宿主細胞への導入である。宿主細胞は、細菌、酵母、他の真菌、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞から選択することができる。発現の目的のために、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞のような哺乳動物細胞、COS細胞、BHK細胞、骨髄腫細胞（例えば、Sp2/0細胞もしくはNS0細胞）、NIH3T3、繊維芽細胞あるいはHeLa細胞、HEK293細胞、またはPER.C6のような不死化ヒト細胞が好適である。

30

#### 【0187】

ベクターの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合、RBCゴースト融合、プロトプラスト融合、ウイルス感染などを含む、当業者に公知の多くの形質転換またはトランスフェクション法によって達成され得る。モノクローナル全長抗体、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvフラグメントの産生は周知である。

#### 【0188】

治療に使用されるべき組み換えポリクローナル抗体の製造は極めて新しい分野である。組み換えポリクローナル製造技術については、WO 2004/061104に記載されている。簡単に説明すると、この技術は、細胞系統の製造として適した細胞のコレクションの作製を含む。技術の以下の説明は、同族対のライブラリーのために行われているが、しかし、当然、コンビナトリアルライブラリーに適用可能である。細胞のコレクションにおける個々の細胞は、例えば、同族対のライブラリーから組み換えポリクローナル結合タンパク質の個別のメンバーを発現することが可能である。個々の細胞が、単一同族対を発現し、ポリクローナル結合タンパク質のいくらかの同族対を発現しないことを確実にするために、同族対をコードする核酸配列を、各個々の細胞のゲノムにおける単一部分特異的部位に導入する。これは、各細胞から発現される重鎖および軽鎖のスクランプリングを防止するが、但し

40

50

さらに、個々の同族対合の可変領域における小さな差異は例外として、互いに実質的に同一である細胞を作製するため、細胞のコレクションの重要な特徴である。この特質は、産生に必要な期間にわたって細胞のコレクションの不偏の増殖を可能にする。単一部位特異的組み込みを確実にするために、1つのみ組み込み部位を伴う宿主細胞系統が使用されるべきであり、これらは市販されており、例えば、単一FRT部位を含有するInvitrogenのCHO Flp-In細胞である。この細胞系統のための適切なベクターは、対応するFRT部位を含有し、Flpリコンビナーゼを使用してゲノムへ導入される。いくらかの他の公知のリコンビナーゼ、例えば、それらの対応する組み換え部位と組み合わせで使用され得るCre、 $\phi$ -リコンビナーゼ、Gin、Pin、PinB、PinD、R/R<sub>S</sub>、インテグラーゼ、またはファージC31インテグラーゼがある。さらに、適切なベクターは、部位特異的組み込み体の選択を可能にする選択マーカーを含有する。

10

## 【0189】

ポリクローナル製造細胞系統の作製およびそのような細胞系統からの組み換えポリクローナルタンパク質の産生は、いくらかの異なるトランスフェクションおよび製造ストラテジーによって得ることができる。

## 【0190】

1つの方法は、細胞ごとに単一の組み込み部位を伴う宿主細胞系統のトランスフェクションのために単一組成物へ混合されたベクターのライブラリーを使用することである。この方法は、バルクトランスフェクションまたは一括トランスフェクション(transfection in bulk)と称される。一般的に、先に記載のベクターおよび宿主細胞の設計は、不偏増殖が可能なポリクローナル細胞系統が適切な選択次第で得られることを確実にする。ポリクローナル細胞系統の凍結ストックが、組み換えポリクローナルタンパク質製造の開始前に作製される。

20

## 【0191】

別の方法は、トランスフェクションのために組成物中ライブラリーの約5~50の個々のベクターを含有する分画に分割されたベクターのライブラリーを使用することである。好ましくは、ライブラリーの分画は、10~20の個々のベクターを構成する。次いで、各組成物は宿主細胞のアリコートへトランスフェクトされる。この方法は半バルクトランスフェクション(semi-bulk transfection)と称される。トランスフェクトされるアリコートの数は、ライブラリーのサイズおよび各分画中の個々のベクターの数に依存する。ライブラリーが、例えば、100の個別の同族対を構成し、これらが組成物中に20の個別のメンバーを含有する分画へ分割される場合、宿主細胞の5つのアリコートは、本来のライブラリーの個別の分画を構成するライブラリー組成物でトランスフェクトされる必要がある。宿主細胞のアリコートは、部位特異的組み込みについて選択される。好ましくは、個別のアリコートが別々に選択される。しかし、それらはまた、選択前にプールすることができる。アリコートを、それらのクローン多様性について分析することができ、そして十分な多様性を有するもののみを使用して、ポリクローナル同族対ライブラリーストックを作成する。製造のための所望されるポリクローナル細胞系統を得るために、アリコートは、凍結ストックを作製する前、それらがストックから回収された直後、または短い増殖および順応時間後に混合することができる。場合により、細胞のアリコートは産生の全体を通じて別々に保存され、そしてポリクローナルタンパク質組成物は、産生前の細胞のアリコートではなく各アリコートの産物を合わせることによって集成される。

30

40

## 【0192】

第3の方法は、同族対のライブラリーを構成する個々のベクターを使用して、宿主細胞が別々にトランスフェクトされるハイスループット法である。この方法は個別バルクトランスフェクション(individual transfection)と称される。個々にトランスフェクトされた宿主細胞は、好ましくは、部位特異的組み込みについて別々に選択される。選択時に作製される個々の細胞クローンが増殖時間に関して分析され得、そして好ましくは、同様の増殖速度を伴うものを使用して、ポリクローナル同族対ライブ

50

ラリーストックを作製する。ストックを作製する前、それらがストックから回収された直後、または短い増殖および順応時間後に、個々の細胞クローンを混合して、所望される細胞系統を得ることができる。このアプローチは、トランスフェクション、組み込み、および選択中の可能な残留配列の偏りを除去し得る。あるいは、個々のトランスフェクト宿主細胞は、選択が実施される前に混合され、これはトランスフェクションによる配列の偏りの制御を可能にする。

【0193】

上記で概説した製造ストラテジーにおける共通の特徴は、組み換えポリクローナルタンパク質を構成する個々の同族対のすべてが、1つの、または限定された数のバイオリクターにおいて産生され得ることである。唯一の差異は、ポリクローナル製造細胞系統を構成する細胞のコレクションを作製するために選択される段階である。

10

【0194】

本発明の一実施形態は、可変領域をコードする配列の連結対の同族ライブラリーまたはサブライブラリーを含んでなる宿主細胞の集団である。

【0195】

さらなる実施形態では、宿主細胞の集団が、リンパ球を構成する単離された単一細胞の集団から得られるライブラリーを含んでなり、多重RT-PCR増幅、それに続く、ライゲーションもしくは組み換えまたは本発明の多重重複伸長RT-PCR技術による連結を利用して、同族対を連結する。

20

【0196】

本発明の別の実施形態は、可変領域をコードする配列の連結対のコンビナトリアルライブラリーまたはサブライブラリーを含んでなる宿主細胞の集団である。

【0197】

本発明に従う宿主細胞の集団は、細胞が形質転換/トランスフェクトされている多様なライブラリーに対応する細胞の多様な細胞を含む。好ましくは、細胞の集団の各細胞は、同族対の全ライブラリーの1つの同族対のみを構成し、そして同族対のライブラリーの個々のメンバーが、宿主細胞の集団から発現される個々のメンバーの総数の50%、より好ましくは25%、または最も好ましくは10%を超えることはない。

【0198】

本発明の好適な実施形態では、宿主細胞の集団は哺乳動物細胞である。

30

【0199】

上記の宿主細胞の集団は、集団の個々の細胞が異なる多様性の可変領域をコードする配列を構成するため、組み換えポリクローナル結合タンパク質の発現に利用することができる。

【0200】

本発明の一実施形態は、連結された可変領域をコードする配列の多様な同族対をコードするベクターのライブラリーを含んでなる宿主細胞の集団から発現される組み換えポリクローナルタンパク質であり、そのようなライブラリーは、本発明の方法によって得ることが可能である。典型的に、本発明の組み換えポリクローナルタンパク質は、異なる同族対からなる少なくとも2、5、10、20、50、100、1000、 $10^4$ 、 $10^5$ 、または $10^6$ のタンパク質からなる。

40

【0201】

本発明の好適な実施形態は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする配列の多様な同族対をコードするベクターのライブラリーを含んでなる宿主細胞の集団から発現される組み換えポリクローナル免疫グロブリンである。

【0202】

本発明の別の好適な実施形態は、鎖可変領域をコードする配列と連結されたTCR鎖可変領域および/または鎖可変領域をコードする配列と連結されたTCR鎖可変領域の多様な同族対をコードするベクターのライブラリーを含んでなる宿主細胞の集団から発現される組み換えポリクローナルTCRである。

50

## 【0203】

本発明の別の実施形態は、モノクローナルタンパク質の集団に適切な宿主細胞である。特に、重鎖可変領域を伴う軽鎖可変領域の同族対合からなるモノクローナル抗体、または可変領域を伴う可変領域もしくは可変領域を伴う可変領域の同族対からなるモノクローナルTcRである。好ましくは、そのようなモノクローナル産生細胞系統は、ハイブリドーマ細胞系統ではない。

## 【0204】

そのようなモノクローナル抗体またはTcRは、目的の複数の非隣接ヌクレオチド配列を連結する方法に、次の工程、a)前記連結された核酸配列をベクターへ挿入すること、b)前記ベクターを宿主細胞へ導入すること、c)前記宿主細胞を発現に適切な条件下で培養すること、およびd)前記宿主細胞へ挿入されたベクターから発現されるタンパク質産物を得ること、を追加することによって作製することができる。好ましくは、宿主細胞に誘導されるベクターは、可変領域をコードする配列の個々の同族対をコードする。

10

## 【0205】

発明の用途

本発明の主な用途の1つは、同族対のライブラリーを作製するためのハイスループット法による、可変領域をコードする配列、特に、免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域をコードする配列またはTcR および 鎖または および 鎖可変領域をコードする配列の同族対の連結である。同族対ライブラリーの作製に加えて、多重RT-PCR、それに続く、ライゲーションまたは組換えまたは本発明の多重重複伸長RT-PCR技術による連結が、遺伝的に多様な細胞の集団、そのような細胞の集団からの細胞ライセート、または細胞のそのような集団から精製されたRNAに対して技術を実施することによって、コンビナトリアルライブラリーの作製において利用され得る。ライブラリー、サブライブラリー、またはこれらのライブラリーの1つからの単一クローンは、ポリクローナルまたはモノクローナルタンパク質の発現を容易にする。特に、モノクローナルまたはポリクローナル抗体は、本発明のライブラリーから入手され得る。

20

## 【0206】

診断、治療、および予防における組み換えモノクローナル抗体の使用は、周知である。本発明によって作製される組み換えモノクローナルおよびポリクローナル抗体は、現存の技術によって作製される抗体産物と同じ用途を有する。特に、有効成分としてポリクローナル組み換え免疫グロブリンを含んでなる医薬組成物が、少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤と組み合わされて、本発明の手段によって生成され得る。ポリクローナル組み換え免疫グロブリンが可変領域をコードする配列の同族対からなる医薬組成物がより好適である。ポリクローナル組み換え免疫グロブリンのそのような医薬組成物は、医薬品として使用することができる。組成物のポリクローナル組み換え免疫グロブリンは、所定の疾患標的に対して特異的またはこれに対して反応性であり、それ故、組成物は、ヒト、家畜、またはペットのような哺乳動物における癌、感染、炎症性疾患、アレルギー、喘息および他の呼吸器系疾患、自己免疫疾患、免疫異常、循環器系疾患、中枢神経系の疾患、代謝および内分泌疾患、移植による拒絶反応、または望ましくない妊娠のような疾患の治療、改善、または防止に使用することができる。

30

40

## 【実施例】

## 【0207】

実施例1:

Balb/cマウスを、完全フロイントアジュバント中50μg破傷風トキソイド(TT)で皮下において免疫した。マウスに対し、14日目に、フロイント不完全アジュバント中50μgのTTでブーストした。さらに30日間後、マウスに対し、フロイント不完全アジュバント中50μgのTTでブーストした。最後のブーストの3日後、マウスを屠殺し、そして脾臓を取り出し、そして4において30mlのRPMI 1640w/10%FCSを含有するチューブに移した。組織を、10cmディッシュ中74μmセルストレーナー(Corning、136350-3479)に移した。シリンジプランジャーの背

50



面により、脾臓を、フィルターを介して液体に浸した。フィルターを、10 mlのRPMI 1640、10% FCS溶液で濯いだ。フィルターを取り出し、そしてディッシュを20 ml冷RPMI 1640、10% FCSで満たした。細胞を、50 mlチューブに移し、そして300 × g、2 ~ 8 で、5分間、遠心分離した。細胞を、5 ~ 10 mlの4 のRPMI 1640 w / 1% FCSに再懸濁し、そして50 μmシリンジフィルター (Becton Dickinson、340603) を介してろ過した。細胞をペレット化し、そしてFCS ; 10% DMSOに再懸濁して、 $2 \times 10^7$  個の細胞 / アンプルの細胞密度を得、そして凍結した。

#### 【0208】

破傷風トキソイドで免疫したBalb / cマウス由来の単一の細胞懸濁液中に脾細胞を伴う凍結バイアルを、37 で融解し、そしてなお存在する氷を伴う15 mlチューブに移した。10 mlの氷冷RPMI、10% FCSを、巡回させながら滴下でチューブに添加した。10 mlのFACS PBSにおいて1回洗浄後、50 μmのFilcon (Becton Dickinsonカタログ番号340603) を介して細胞をろ過する前に、5 mlのPBS、2% FCSを添加した。細胞をペレット化し、そして1 mlのPBS、2% FCS (最終容積) に再懸濁し、続いて、1 mlのPBS、2% FCS中1 : 100希釈した抗CD43 FITC (BDカタログ番号553270) および1 : 40希釈した抗CD138 PE (BDカタログ番号553714) か、または1 : 40希釈した抗B220 APC (BDカタログ番号553092) および1 : 200希釈した抗MHCII FITC (BDカタログ番号553547) のいずれかで染色した。細胞を、4 で、20分間、暗所でインキュベートした。最後に、細胞を、2 mlのPBS、2% FCSで2回洗浄し、そして15 mlまでのPBS、2% FCS (ウシ胎児血清) に添加した。選別の直前、PIを1 : 100で添加し、そして細胞を、約1000 ~ 2000個の細胞 / 秒の事象計数で選別した。両方の染色に対するゲーティングを図3に示す。

#### 【0209】

図3A : 左下パネルにおいて、PIポジティブ (死) 細胞を排除した (P1)。次いで、形質細胞を、右下パネルにおいて、CD43高、CD138高としてゲートした (P2)。最後に、右上パネルのSSC-H、SSC-Wプロットにおいて、ダブレットを排除した (P3)。表1に従って、3つのすべてのゲートについてポジティブな細胞を、ELISPOTプレートに分別した。

#### 【0210】

##### ELISPOT :

PBS中100 μlの25 μg / ml破傷風トキソイド (TT) またはヒツジ抗マウスIgG (Jackson Immuno Research、カタログ番号515 - 005 - 062) で被覆する前に、ニトロセルロース底96ウェルプレート (HA plates, Millipore, Bedford, MA) を、予めPBSで湿潤させた (ブロッキングウェルもまた同様)。同じ容積のPBSがコントロールウェルに存在した。プレートを4 で放置した。翌日、200 μlのRPMI + 2% 脱脂乳でブロッキングする前に、ウェルをPBSにおいて3回洗浄し、そして4 で放置した。細胞の添加の1時間前に、プレートをインキュベータ (37、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度) に移した。完全RPMI中100 μlの細胞をTT -、抗IgG被覆ウェルおよびブロッキングのみを施したウェルに添加した。細胞を伴わない培地をコントロールとして含めた。プレートを、インキュベータ (37、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度) に移した。翌日、プレートを6回洗浄して、細胞を取り出した (緩衝液 : PBS + 0.01% Tween20において3 × およびPBSにおいて3 ×)。続いて、ウェルに、RPMI + 2% 脱脂乳 (100 μl / ウェル) 中1 : 3000で希釈したHRP - コンジュゲートヤギ抗マウスIgG (カタログ番号M30007) を添加した。37 で2時間のインキュベーション後、ウェルをPBS + 0.01% tween 20において3回、続いて、PBSのみで3回洗浄した。次いで、スポットを、0.1 M酢酸ナトリウム、pH 5.1中0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および0.3 mg / mlの3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾールからなる100 μlの発色基質で展開させた。5分間後、流水 (tap water) で洗浄するこ

とによって、発色を停止させた。

【0211】

表1の結果を判定すると、TTに特異的な形質細胞(PC; CD43高、CD138高、図3AにおけるゲートP3)が約2%認められるが、一方、TT特異的な形質芽細胞(PB; B220およびMHCIIPozitiv、図3BにおけるゲートP4)が約4%認められる。これは、TT免疫後の特異的な抗体の産生においてPCの方がPBより優位であることを例示する。

【0212】

【表3】

表1

		スポットの数(選別された細胞の数)		
被覆: PB S	PC	0 (1,001)	ND	ND
	PB	0 (13,976)	0 (1500)	0 (150)
被覆: TT	PC	22 (1,002)	2 (250)	0 (50)
	PB	54 (13,257)	0 (1500)	0 (150)
被覆: α-Ig G	PC	55 (1,000)	6 (250)	1 (50)
	PB	48 (5000)	8 (1500)	0 (150)

10

20

【0213】

実施例2

脾細胞の凍結バイアルを、実施例1に記載のように染色した。

【0214】

4つの異なる表現型を4つの経路で選別した。選別ゲートを図4に示す。最初に、左下パネルにおいて、PIポジティブまたは死細胞を排除した(P1)。P2は、CD138中、CD43高である。P3はCD138高、CD43高である。P4はCD138高、CD43ネガティブである。P5は、CD138中、CD43低である。P1および4つのゲートのそれぞれについてポジティブな10,000個の細胞を、試験チューブに選別し、そしてマウスsymplexによる評価のために凍結した。

30

【0215】

画分P2、P3、P4およびP5を、それぞれ10,000個の細胞を含有するチューブにバルク選別(bulk sorted)した。チューブを遠心分離し、そして2U/μlのRNaseインヒビター(RNasin, Promegaカタログ番号N2511)を含有するダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium)に、250個の細胞/μlの濃度、1チューブあたり10μlで再懸濁し、そして-80で凍結した。

【0216】

マウスSymplex増幅を、4組の選別されたリンパ球のそれぞれの希釈系列に対して実施して、IgG-抗体mRNAの含有量を比較した。反応の基本原理は以下のとおりである。

40

・第1に、RT反応が実施され、重鎖および軽鎖は、特異的な定常領域プライマーによってプライムされる

・第2に、すべての可変領域を含み、そして重複バンドの形成を容易にする相補的オーバーハングが備え付けられたVHおよびVK 5'領域プライマーを使用して、多重反応が実施される。3'プライマーは、重鎖および軽鎖の定常領域に局在する。

最後に、JHおよびJKプライマーを使用して、コンジュゲートされたVHおよびVKのみを増幅するネステッド反応が実施される。

最終反応産物は、5'末端-5'末端型でコンジュゲートされ、そしてリンカーに接続されたVHおよびVKからなる。サイズは、約700bpであるべきである。

50

## 【0217】

組み合わせられた多重RT-PCR反応では、本質的に製造者の指示に従い、Qiagen One Step RT-PCRキットを用いて、表2に示すプライマーの組を使用した。凍結細胞を表情で融解し、再懸濁し、そして遠心分離した。各希釈系列において、100、32、10、3.2、1、0.32、0.1および0個の細胞に対応する細胞ライセートを使用した。全反応容積は20 $\mu$ lであった。サイクリング条件は以下のとおりである。

- ・ 55、30分間。
- ・ 95、15分間。

## 【数1】

- 94°C、30秒間
  - 60°C、30秒間
- } 35サイクル

10

- ・ 72°C、5分間。
- ・ 72°C、10分間。

## 【0218】

本質的に製造者の指示に従い、FastStartポリメラーゼ (Roche) を使用する表3に示すプライマーの組および補充された試薬によって、ネステッド反応を実施した。20 $\mu$ lの全容積中、1回のネステッド反応あたり1 $\mu$ lのRT-PCR反応産物を使用した。反応条件は以下のとおりである。

20

## 【数2】

- 95°C、30秒間
  - 60°C、30秒間
- } 35サイクル

- ・ 72°C、90秒間。
- ・ 72°C、10分間。

30

## 【0219】

各最終反応産物の10 $\mu$ lを、最終的に1%アガロースゲル上で分析した。

## 【0220】

滴定された細胞ライセートに対するSymplexの結果(図5)から、本発明者らは、重鎖および軽鎖可変領域と、P3(約0.1個の細胞まで降下)由来、およびP2(約3.2個の細胞から開始)由来の細胞とを連結することができることが明らかである。他のゲートでは、効率がより低く、連結は、約32個の細胞およびそれを超える場合にのみ可能であった。結果として、CD43高CD138高(P3)が、単一細胞レベルでのSymplex<sup>T</sup><sub>M</sub>で最も有用である一方、CD43高CD138中は、使用し得るが、効率は低い。

40

## 【0221】

## 【表 4】

表 2 : 組み合わされた R T および多重反応に使用したマウス Symplex プライマーセット

プライマー	Conc (nM)	配列	配列番号
mHCrev1	0.2	GACSGATGGGCCCTTGGTGG	1
mKappar1	0.2	GCTGTAGGTGCTGTCTTTGC	2
mVH セット			
mVH A	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCARCTGCAR	3
mVH B	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGMAGCTKGTK	4
mVH C	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTKMAG	5
mVH 8	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGGTTACTCTGAAAG	6
mVH 9	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCAGATCCAGTTGGTG	7
mVK セット			
mVK D	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAYATCCA	8
mVK E	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCRACATTGT	9
mVK F	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCSAMATTGT	10
mVK 1-2	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATRITTGT	11

W=A/T, R=A/G, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, H=ACT, B=GCT; Conc. - 最終濃度。

【 0 2 2 2 】

10

20

## 【表 5】

表 3 : マウス Symplex ネステッド PCR のためのプライマー

プライマー	Conc. nM	配列	配列番号
mJH セット			
mJH1	200	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	12
mJH2	200	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	13
mJH3	200	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAGTCCC	14
mJH4	200	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC	15
mJK セット			
mJK1	200	GATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGGATTTCCAGCTTGGTG	16
mJK2	200	GATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAGCTTGGTC	30
mJK4	200	GATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAAC TTTGTC	31
mJK5	200	GATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTC	17

10

20

## 【 0 2 2 3 】

## 実施例 3 抗 E G F R 抗体のクローニング

## 免疫化

雌性 B A L B / c、株 A、または C 5 7 B 1 6 マウス ( 8 ~ 1 0 週齢 ) を、 E G F R を過剰発現する細胞に加えて、精製された異なるタンパク質の注入による免疫化に使用した。

30

## 【 0 2 2 4 】

市販の E G F R タンパク質 ( R & D systems カタログ番号 1 0 9 5 - E R または S i g m a 番号 E 3 6 4 1 ) を、免疫化のいくつかで使用した。免疫化の他方では、 E G F R の E C D または E G F R v I I I およびヒト成長ホルモン ( h G H ) よりなり、また、 H i s - タグに加えてタバコ E t c h ウイルス ( T E V ) - 切断部位を含む融合タンパク質として産生される組み換えヒト E G F R および E G F R v I I I を使用した。いくつかの場合、 E G F R の E C D を、 T E V - プロテアーゼ切断およびニッケルカラム上でのその後の精製によって単離した。

40

## 【 0 2 2 5 】

約  $10^7$  の受容体 / 細胞を発現するヒト頭頸部癌細胞系統、 H N 5 ( Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Butler LJ. Br J Cancer. 1981 Jun;43(6):772-85. Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck. ) を、細胞に基づく免疫化に使用した。細胞を、 1 0 % F B S ( ウシ胎児血清 )、 3 m M グリセロール、 5 m M ビルビン酸ナトリウムおよび 1 % ペニシリン - ストレプトマイシンを補充した D M E M 培地において培養した。各免疫化の前に、細胞を、 P B S 中で洗浄し、 TrypLE でトリプシン処理し、そして増殖培地に再懸濁した。その後、細胞懸濁液を、 2

50

50 × g、5分間の遠心分離によって、PBS中で2回洗浄し、取り出し、そして15 mlの滅菌PBSに再懸濁した。

#### 【0226】

細胞または抗原を、PBS中に希釈し、次いで、フロイントのアジュバントと1:1で混合した。アジュバントを使用して、免疫応答を増強およびモジュレートした。一次免疫化のために、完全フロイントアジュバント(CFA)を使用した。一方、不完全フロイントアジュバント(IFA)を、以後の免疫化に使用した。IFAは、鉱油からなる水中油型エマルジョンであり、そしてCFAは、熱処理で死滅させ、乾燥したマイコバクテリウム(Mycobacterium)種が添加されるIFAである。両方のアジュバントともデポー効果を有する。CFAは、免疫応答の長期間の持続を生じ、そして免疫応答をブーストするための一次免疫化に使用され、そしてIFAは、以後の免疫化に使用される。水を伴うガラスの表面上に滴下することによって、エマルジョンを試験した。滴が1滴として保持される場合、エマルジョンは安定であり、そして注入を実施することができる。安定なエマルジョンのみを、マウスに投与した。

10

#### 【0227】

スケジュール(表4を参照のこと)により、25~100 μgの抗原または10<sup>7</sup>個の細胞を、各注入に使用した。合計で、マウスに4回の注入を行った。すべてのマウスに、300 μlまたは200 μlのエマルジョンのいずれかを注入した。スケジュールにより、皮下(s.c.)、腹腔内(i.p.)または静脈内(i.v.)に注入を実施した。

#### 【0228】

終了時、頸椎脱臼によりマウスを屠殺し、そして脾臓を取り出し、そして74 μmのセルストレーナー(Corning番号136350-3479)に移した。細胞を、フィルターを介して液体に浸し、10% FBSを伴う冷RPMI 1640に再懸濁し、そして300 × gで5分間、遠心分離した。細胞ペレットを、1% FBSを伴うRPMI 1640に再懸濁し、50 μmシリンジフィルター(BD番号340603)を介してろ過し、そして遠心分離により回収した。細胞ペレットを、10% DMSOを伴うFCSへの再懸濁後、冷凍保存し、そして凍結した細胞を、FACS選別まで-80 で保存した。

20

#### 【0229】

##### マウス形質細胞のFACS選別

凍結した脾細胞をバイアルを37 で融解し、そしてなお存在する氷と共に15 mlチューブに移した。10 mlの氷冷RPMI、10% FBS(ウシ胎児血清)を、旋回させながら滴下でチューブに添加した。10 mlのFACS PBSにおいて1回洗浄後、50 μmのFilonを介して細胞をろ過する前に、5 mlのFCS PBSを添加する。次いで、細胞をペレット化し、そして2% FBSを伴う1 mlのPBS(最終容積)に再懸濁し、そして約5 μg/mlの最終濃度までの特定の希釈に従って、抗-CD43-FITCおよび抗-CD138-PEで染色した。細胞を、4 で、20分間、暗所でインキュベートした。続いて、細胞を、2 mlのFACS緩衝液で2回洗浄した。15 mlまでFACS PBSを添加した。ヨウ化プロピジウム(PI)を、1:100で添加し、そして続いて、細胞を、PCR反応緩衝液を含有する96ウェルのPCRプレートに選別し(下記を参照のこと)、そしてプレートを-80 で凍結する前に、2分間、40 × gでスピンした。形質細胞をCD43-ポジティブ/CD-138ポジティブとしてゲートした。

30

40

#### 【0230】

##### 同族V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>対の連結

V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>コーディング配列の連結を、形質細胞としてゲートした単一細胞に対して実施し、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>コーディング配列の同族対形成を容易にした。手順は、1工程の多重重複-伸長RT-PCR、それに続く、ネステッドPCRに基づく2工程PCR手順を利用した。本実施例で使用したプライマー混合物のみが、軽鎖を増幅した。しかし、軽鎖を増幅することが可能なプライマーは、所望であれば、多重プライマー混合物およびネステッドPCRプライマーに添加し得る。プライマーを添加する場合、選別手順

50

は、 ポジティブ細胞が排除されないように適応されるべきである。同族  $V_H$  および  $V_L$  配列の連結の原理を図 1 に示す。

【 0 2 3 1 】

生成された 96 ウェル PCR プレート を融解し、そして選別した細胞は、多重重複 - 伸長 RT - PCR のテンプレートとしての役割を果たした。単一細胞選別前に各ウェルに添加した選別用緩衝液は、反応緩衝液 (OneStep RT-PCR Buffer ; Qiagen)、RT - PCR のためのプライマー (上記の表 2 を参照のこと) および RNase インヒビター (RNasin、Promega) を含有した。これに、OneStep RT-PCR Enzyme Mix (25 x 希釈 ; Qiagen) および dNTP 混合物 (各 200  $\mu$ M) を補充して、20  $\mu$ l 反応容積において所定の最終濃度を得た。プレートを、30 分間、55 でインキュベートして、各細胞由来の RNA の逆転写を可能にした。RT 後、プレートを、次の PCR サイクルに供した : 94 で 10 分間、35 x (94 で 40 秒間、60 で 40 秒間、72 で 5 分間)、72 で 10 分間。

10

【 0 2 3 2 】

PCR 反応を、24 枚の 96 - ウェルプレート (ABgene) について、Peel Seal Basket を伴う H20BIT Thermal cycler において実施して、ハイ - スループットを容易にした。サイクリング後、PCR プレートを -20 で貯蔵した。

【 0 2 3 3 】

ネステッド PCR 工程では、96 - ウェル PCR プレートを、各ウェル中次の混合物 (20  $\mu$ l 反応液) で調製して、所定の最終濃度を得た : 1 x FastStart buffer (Roche)、dNTP 混合物 (各 200  $\mu$ M)、ネステッドプライマー混合物 (表 5 を参照のこと)、Phusion DNA Polymerase (0.08 U ; Finnzymes) および FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0.8 U ; Roche)。ネステッド PCR のテンプレートとして、1  $\mu$ l を、多重重複 - 伸長 PCR 反応から移した。ネステッド PCR プレートを、次のサーモサイクリング (thermocycling) に供した : 35 x (95 で 30 秒間、60 で 30 秒間、72 で 90 秒間)、72 で 10 分間。

20

【 0 2 3 4 】

無作為に選択された反応物を、1% アガロースゲル上で分析して、約 890 塩基対 (bp) の重複 - 伸長フラグメントの存在について確かめた。

【 0 2 3 5 】

PCR フラグメントのさらなるプロセッシングまで、プレートを -20 で貯蔵した。

30

【 0 2 3 6 】

ネステッド PCR からの連結された  $V_H$  および  $V_L$  コーディング対のレパートリーを、異なるドナー由来の対を混合せずにプールし、そして調製用 1% アガロースゲル電気泳動によって精製した。ヒト 定常軽鎖をコードする配列を、連結された  $V_H$  および  $V_L$  コーディング対のプールされた PCR 産物の  $V_L$  コーディング領域に対する重複伸長によってスプライスした (図 2)。ヒト 定常軽鎖をコードする配列を、軽鎖を伴うヒト抗体のコーディング配列を含有するプラスミドから、次のものを含有する反応物において、増幅させた : 50  $\mu$ l の全容積中 Phusion Enzyme (2 U ; Finnzymes)、1 x Phusion buffer、dNTP 混合物 (各 200  $\mu$ M)、hKcforw - v2 プライマー および 3' プライマー (表 6)、ならびにプラスミドテンプレート pLL138 (10 ng /  $\mu$ l)。反応物を、次のサーモサイクリングに供した : 25 x (95 で 30 秒間、55 で 30 秒間、72 で 45 秒間)、72 で 10 分間。得られた PCR フラグメントを、調製用 1% アガロースゲル電気泳動によって精製した。

40

【 0 2 3 7 】

各レパートリーのプールした精製された PCR フラグメントを、次のものを含有する重複伸長 PCR (50  $\mu$ l の全容積) による次のスプライシングによってスプライスして、ヒト 定常部をコードする領域の増幅および精製された PCR フラグメント (付録 1) とした : ヒト 定常部をコードする領域フラグメント (1.4 ng /  $\mu$ l)、プールした精製された PCR フラグメント (1.4 ng /  $\mu$ l)、Phusion DNA Polymerase (0.5 U

50

; Finnzymes) および FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0.2 U; Roche)、1 × FastStart buffer (Roche)、dNTP 混合物 (各 200 μM)、m h K C r e v プライマーおよび m J H セットプライマー (表 6 を参照のこと)。反応物を、次のサーモサイクリングに供した: 95 で 2 分間、25 × (95 で 30 秒間、55 で 30 秒間、72 で 1 分間)、72 で 10 分間。得られた PCR フラグメント (約 1070 bp) を、調製用 1% アガロースゲル電気泳動によって精製した。

#### 【0238】

同族 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> コーディング対のスクリーニングベクターへの挿入

E G F R に対する結合特異性を伴う抗体を同定するために、得られた V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> コーディング配列を、全長抗体として発現させた。これは、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> コーディング対のレポトリの発現ベクターへの挿入および宿主細胞へのトランスフェクションに関与した。

10

#### 【0239】

2 段階のクローニング手順を、連結された V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> コーディング対を含有する発現ベクターのレポトリの作製に用いた。統計的に、発現ベクターのレポトリが、スクリーニングレポトリの作製のために使用された同族の対形成した V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> PCR 産物の数の 10 倍の数の組み換えプラスミドを含有する場合、すべての独特な遺伝子対が示される可能性は 99% である。それ故、400 の重複 - 伸長 V - 遺伝子フラグメントが入手された場合、少なくとも 4000 個のクローンのレポトリを、スクリーニングのために作製した。

20

#### 【0240】

簡単に説明すると、ヒト 定常コーディング領域にスプライスされた連結された V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> コーディング対のレポトリの精製された PCR 産物を、PCR 産物の末端に導入された認識部位において、X h o I および N o t I DNA エンドヌクレアーゼによって切断した。切断および精製されたフラグメントを、標準的な連結手順によって、X h o I / N o t I 消化した哺乳動物 I g G 発現ベクター、O O - V P - 0 0 2 に連結した (図 6)。連結混合物を、大腸菌 (E.coli) にエレクトロポレートし、そして適切な抗生物質を含有する 2 × Y T プレートに添加し、そして 37 で 1 晩、インキュベートした。ベクターの増幅されたレポトリを、標準的な DNA 精製方法 (Qiagen) を使用して、プレートから回収した細胞から精製した。プラスミドを、A s c I および N h e I エンドヌクレアーゼを使用する切断によって、プロモーター - リーダーフラグメントのために調製した。これらの酵素のための制限部位は、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> コーディング遺伝子対の間に局在した。ベクターの精製後、A s c I - N h e I 消化した両方向性哺乳動物プロモーター - リーダーフラグメントを、標準的な連結手順によって、A s c I および N h e I 制限部位に挿入した。連結されたベクターを、大腸菌 (E.coli) において増幅させ、そして標準的な方法を使用して、プラスミドを精製した。スクリーニングベクターの作製されたレポトリを、従来の手順によって大腸菌 (E.coli) に形質転換した。得られたコロニーを 384 - ウェルマスタープレートに固化し、そして貯蔵した。整列されたコロニーの数は、インプット PCR (input PCR) 産物の数の少なくとも 3 倍を超え、それ故、得られたすべての独特な V - 遺伝子対の存在について、95% パーセントの可能性を示した。

30

40

#### 【0241】

上記の選択されたクローンおよび FreeStyle CHO-S 細胞 (Invitrogen) から調製した DNA プラスミドを、(製造者の指示に従って) 抗体の発現のために 2 ml スケールでトランスフェクトした。上清を、トランスフェクションの 96 時間後に回収した。

#### 【0242】

E G F R 細胞外ドメインへの結合のためのスクリーニング

一般に、スクリーニングを、2 段階の手順として作製した。抗体 - ライブラリーを、E L I S A における組み換え E G F R タンパク質に対する反応性についてスクリーニングし、その後、F M A T (F L I S A) を、細胞表面に発現された E G F R に結合する E G F

50



R - 抗体の検出のために、NR6wtEGFR細胞系統 (Batra et al, 1995, Cell Growth Differ, 6(10):1251-9) による細胞に基づくアプローチとして使用した。101および108/109ライブラリー (表4) について、EGFRの細胞外ドメインを示す組み換えEGFRによって、ELISAを実施した。

#### 【0243】

簡単に説明すると、ELISAでは、Nunc maxisorb plate (カタログ番号464718) を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  タンパク質 (施設内で生成した) で被覆し、PBSに、4で1晩、希釈した。 $50 \mu\text{l}$  の2% - ミルク - PBS - Tにおける遮断の前に、プレートを、PBS + 0.05% Tween 20 (PBS - T) で1回洗浄した。プレートを、PBS - T、 $20 \mu\text{l}$  の2% - ミルク - PBS - Tで1回洗浄し、そしてFreeStyle CHO-ストランスフェクタント由来の $5 \mu\text{l}$  上清 (上記を参照のこと) を添加し、そしてR・Tで1時間半インキュベートし、その後、プレートを、PBS - T (1ウェルあたり $20 \mu\text{l}$ ) で1回洗浄した。2% ミルク - PBS - Tにおいて1:10000希釈した第2の抗体 (HRP - ヤギ - 抗ヒトIgG、Jackson、カタログ番号109-035-097) を添加して、ウェルに結合した抗体を検出し、そして1時間、室温でインキュベートした。5分間インキュベートした $25 \mu\text{l}$  基質 (Kem-en-tec Diagnostics、カタログ番号4390) の添加の前に、PBS - Tにおいて、プレートを1回洗浄した。インキュベーション後、 $25 \mu\text{l}$  の1M硫酸を添加して、反応を停止した。ELISAリーダー上、 $450 \text{nm}$  において、特定のシグナルを検出した。

10

#### 【0244】

抗EGFR抗体の細胞に基づくFMAT検出では、SKBR-3 (ATCC番号HTB-30) またはNR6wtEGFR細胞を、増殖培地において保持した。細胞を計数し、そして1:40,000に希釈したAlexa-647コンジュゲートヤギ - 抗ヒトIgG (H-L) 抗体 (Molecular probes No. A21445、ロット番号34686A) で125,000個の細胞/mlに希釈した。合計で $20 \mu\text{l}$  のこの上清を、384ウェルの透明底Nuncプレートに移した。続いて、 $10 \mu\text{l}$  トランスフェクション上清を細胞に添加した。反応物由来のFMATシグナルを、6~10時間のインキュベーション後に測定した。

20

#### 【0245】

スクリーニングからのデータは、全クローンのうち221個 (4.8%) がELISAにおいてポジティブであったことを示す。また、それらのクローンのうち93個 (2.0%) がFMATにおいてポジティブであった。全体で、クローンのうち220個 (4.8%) が、FMATにおいてポジティブであり、そしてそれらのうち127個 (220-93) が、細胞表面抗原について独自にポジティブであった。111のライブラリーを類似の様式でスクリーニングしたが、免疫化手順を行って、欠失変異EGFR受容体EGFRvIIIに特異的な抗体を作製したため、ELISAスクリーニングは、野生型EGFRおよびEGFRvIIIの両方を検出するためのアッセイを含んだ。ELISAでは、7個のクローンが、EGFRvIIIに特異的であると同定され、そして、興味深いことに、それらのクローンは、FMATにおいてwtEGFRを発現する細胞の染色についてネガティブであった。13個のコロニーが、FMATおよびELISAにおいてwtEGFRについてポジティブであると同定されたが、EGFRvIIIについてはポジティブでなく、これは、101および108/109のライブラリーと比較して、このライブラリーに独特であった。すべてのELISAポジティブクローンを、さらなる分析のために選択した。

30

40

#### 【0246】

##### 配列分析およびクローン選択

ELISAにおいてEGFR特異的として同定されたクローンを、本来のマスタープレート (384ウェル形式) から回収し、そして新たなプレートに固化した。DNAをクローンから単離し、そしてV - 遺伝子のDNA配列決定のために提出した。配列を整列しそしてすべての独特なクローンを選択した。得られた配列の複数のアラインメントは、各特定のクローンの独自性を表し、そして独特の抗体の同定を可能にした。220個のクロー

50

ンの配列分析後、70の一般的に個別の抗体配列クラスターを同定した。関連する配列の各クラスターは、おそらく、共通の前駆体クローンの体細胞超変異を介して誘導された。全体的に、配列および特異性のバリデーションのために、各クラスターから1~2個のクローンを選択した。

#### 【0247】

##### 配列および特異性バリデーション

抗体をコードするクローンをバリデートするために、DNAプラスミドを調製し、そして2mlスケールのFreeStyle CHO-S細胞 (Invitrogen) のトランスフェクションを、発現のために実施した。上清を、トランスフェクションの96時間後に回収した。発現レベルを、標準的な抗IgG ELISAで評価し、そして特異性を、EGFR-およびEGFRvIII-特異的ELISAによって決定した。クローンの85%が、正確な特異性および配列を有することが示された。

10

#### 【0248】

##### 抗増殖効果のスクリーニング

細胞損傷は、必然的に、代謝細胞機能および増殖のためのエネルギーを維持および提供するための細胞の能力の消失を生じる。代謝活動アッセイは、この前提に基づく。通常、それらは、ミトコンドリア活性を測定する。Cell Proliferation Reagent WST-1 (Rocheカタログ番号11644807001)は、生細胞の代謝活動を測定する即使用可能な (ready-to-use) 基質である。次いで、代謝活動は、生細胞の数に相関すると想定される。本実施例では、WST-1アッセイを使用して、異なる抗EGFR抗体を含有する細胞培養上清による処置後の代謝活性細胞の数を測定した。

20

#### 【0249】

WST-1アッセイを実施する前に、異なる容積の2ml上清 (0、10、25、50および150µl) を、96ウェルプレート中の適切なウェルに移した。

#### 【0250】

次いで、HN5細胞を、1xPBSで洗浄し、そして3mlトリプシン溶液によるトリプシン処理によって、脱離した。次いで、17mlの完全培地を添加し、そして細胞を、300xg (1200rcf) で5分間、スピントした。上清を取り出し、そして細胞を、DMEM+0.5%FBSに再懸濁した。細胞を計数し、そしてそれらの濃度を調整し、そして各ウェルが合計で200µlの培地を含有するように、1500個の細胞を添加した。プレートを、4日間、加湿インキュベータにおいて37°Cでインキュベートした。次いで、20µlのWST-1試薬を、1ウェルあたり (per well) に添加し、そしてプレートを1時間、37°Cでインキュベートした。次いで、プレートを、オービタルプレートシェーカーに移し、そしてさらに1時間、放置した。吸光度を、450および620nm (対照波長) において、ELISAリーダー上で測定した。代謝活性細胞 (MAC) のレベルの差異を、以下のように、コントロール上清のパーセントとして計算した：

30

#### 【数3】

$$\%MAC = \left( 1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

40

exp. → 実験値

media → 培地

untreat. → 非処置

#### 【0251】

次いで、これらの値を、フリーソフトウェアClusterおよびTreeViewを使用して実施される管理下の階層的クラスター分析 (ELISAにおける反応性に基づいてクラスター化される) の基礎として使用した。

#### 【0252】

抗体選択プロセスの初期の段階において、機能的抗体についてスクリーニングすること

50

が可能であることが好適である。83の2mlトランスフェクションからの培養上清を使用して、0.5% FBSにおいてHN5細胞を使用して実施した増殖アッセイにおける増殖阻害機能についてスクリーニングした。結果を、簡単な階層的クラスター分析によって可視化した。クラスター分析(図7)において認められ得るように、多くの上清は、濃度依存的様式で代謝活性HN5細胞(暗灰色)の数を減少することが見出された(クラスター2)。同様に、いくつかの上清は、濃度依存的様式で代謝活性細胞HN5細胞(明灰色)の数を増加した(クラスター1、3および4)。代謝活性HN5細胞の数を減少した上清が反応性2(黒色矢印)を有したが、一方、代謝活性HN5細胞の数を増加した上清が反応性1(灰色矢印)を有したことは、興味深い観察である。反応性2を伴う上清は、wtEGFRおよびEGFRvIIIの両方のELISAにおいてポジティブであった一方、反応性1を伴う上清は、wtEGFRに対する反応性のみを有した。それ故、そのようなアッセイは、ELISAにおける抗体反応性と細胞アッセイにおける機能性との間の関係を提供し得る。

10

#### 【0253】

##### クローン修復

多重PCRアプローチを使用する場合、プライマー縮重および高程度の相同性のため、所定の程度のV-遺伝子ファミリー内およびV-遺伝子ファミリー間のクロスプライミングが予想される。クロスプライミングは、免疫グロブリンフレームワークにおいて天然に存在しないアミノ酸を導入し、いくらかの潜在的結果、例えば、構造変化および免疫原性の増加(すべて治療活性の減少を生じる)を伴う。

20

#### 【0254】

これらの欠点を排除し、そして選択されたクローンが天然の体液性免疫応答を反映することを確実にするために、そのようなクロスプライミング変異は、クローン修復と呼ばれるプロセスで補正される。

#### 【0255】

クローン修復手順の第1の工程では、目的のクローンの起源である $V_H$ -遺伝子に対応する配列を含有するプライマーセットで、 $V_H$ 配列をPCR増幅し、それによって、クロスプライミングによって誘導される任意の変異を補正した。PCRフラグメントをXhoIおよびAscIで消化し、そして従来 of 連結手順を使用して、XhoI/AscI消化哺乳動物発現ベクターに連結して戻した(図6)。連結されたベクターを、大腸菌(E.coli)において増幅させ、そして標準的な方法によって、プラスミドを精製した。 $V_H$ 配列を、配列決定して、補正を確かめ、そしてベクターを、NheI/NotIで消化して、軽鎖の挿入のために、それを調製した。

30

#### 【0256】

クローン修復手順の第2の工程では、目的のクローンの起源である $V_L$ -遺伝子に対応する配列を含有するプライマーセットで、完全な軽鎖をPCR増幅し、それによって、クロスプライミングによって誘導される任意の変異を補正した。PCRフラグメントをNheI/NotIで消化し、そして上記で調製したベクターを含有する $V_H$ に連結した。連結産物を、大腸菌(E.coli)において増幅させ、そして標準的な方法によって、プラスミドを精製した。続いて、軽鎖を配列決定して、補正を確かめた。

40

#### 【0257】

選択されたクローンの定常領域が、遺伝子の増幅中に導入された変異を含有する場合、それは、非変異型定常領域によって置き換えられる。これは、修復された $V_L$ -遺伝子(定常領域を伴わずに増幅された)が、正確な配列(個別のPCRにおいて得られた)を伴う定常領域に融合された重複PCRにおいて行われる。配列全体を増幅し、そして上記のベクターを含有する $V_H$ にクローニングし、そして修復された軽鎖を配列決定して、補正を確かめる。

#### 【0258】

【表6】

表4 抗EGFRクローニングのための出発物質を作製するために使用される免疫化スケジュール

スケジュール、マウスグループ	株	注入1	注入2	注入3	注入4	終了
101	Balb/c	1日目 25 µg rhE GFR (R&D systems 1095-ER) CFA s.c.	35日目 25 µg rhG H-EGFR (Symphogen) IFA s.c	56日目 25 µg rhE GFR* (Symphogen) IFA s.c	70日目 25 µg rhE GFR* (Symphogen) IFA s.c	73日目
108	Balb/c	1日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 CFA i.p.	28日目 25 µg rhE GFR* (Symphogen) IFA s.c.	42日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 IFA i.p.	56日目 25 µg rhE GFR*, (Symphogen) IFA s.c.	59日目
109	Balb/c	1日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 CFA i.p.	28日目 25 µg rhE GFR* (Symphogen) IFA s.c.	42日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 IFA i.p.	56日目 25 µg rhE GFR* (Symphogen) PBS i.v.	59日目
111	Balb/c	1日目 25 µg rhE GFR* (Symphogen) CFA s.c.	28日目 25 µg rhE GFR+ rhE GFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	42日目 25 µg rhE GFR+ rhE GFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	56日目 25 µg rhE GFR+ rhE GFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	59日目
118	Balb/c	1日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 CFA i.p.	29日目 100 µg rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	44日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 IFA i.p.	58日目 25 µg rhE GFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	61日目
119	C57B	1日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 CFA i.p.	29日目 100 µg rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	44日目 1x10 <sup>7</sup> 個のHN5細胞 IFA i.p.	58日目 25 µg rhE GFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	61日目

10

20

30

40

## 【表 7】

表 5 ネステッドプライマーセット

プライマー 名称	Conc. (nM)	配列	配列 番号
mHCrev1-	0.2	GGACAGGGMTCCA KAGTTCCADKT	18
hmJKセット			
hmJK1-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTGATTTTC	19
hmJK2-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCC	20
hmJK4-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCC	21
hmJK5-v2	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTCAGCTC	22

K=G/T, M=A/C, D=AGT; Conc. - 最終濃度。

## 【 0 2 6 0 】

## 【表 8】

表 6  $\kappa$  定常スプライシングプライマーセット

プライマー	Conc. (n)	配列	配列 番号
ヒト $\kappa$ 定常増幅			
hKCforw-v	0.2	GAACTGTGGCTGCACCATCTGTC	23
Kappa3'	0.2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG	24
重複伸長によるスプライシング			
mhKCrev	0.2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGA	25
mJHセット			
mJH1	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	12
mJH2	0.2	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	13
mJH3	0.2	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAGTCCC	14
mJH4	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC	15

## 【 0 2 6 1 】

【表9】

付録1、抗体定常領域配列

```

>Human IGKC region (Seq. no. 26)
5  ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgtaataact
   tctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgcoctccaatcgggtaactcccaggagag
   tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacagac
   tacgagaaacacaaagtctacgcctcgaagtaccocatcagggcctgagctcgccctgcacaaagagct
   tcaacaggggagagtgttaataagcggccgctggagcggt

10 >Human IGKC region (Seq. no. 27)
   TVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
   KDSYSTLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

   Exon1 1..298
15  Intron 299..689
   Exon2 690..734
   Intron 735..852
   Exon3 853..1182
   Intron 1183..1279
20  Exon4 1280..1602

>human IGHG1 constant domain genomic sequence (Seq. no. 28)
25  agtgcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcacag
   cggccctgggctgctgctggaagcagcacttccccgaaccggtgacgggtgctgctggaactcaggcgcct
   gaccagcggcgtgacacacttccccgctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtg
   accgtgccctccagcagcttgggcaccacagcctacatctgcaacgtgaatcacaagccagcaacacca
   aggtggacaagagagttggtgagagccagcacagggaggagggtgtctgctggaagccaggctcagcg
   ctctgctggacgcatcccggctatgcaagtcaccagtcagggcagcaagggcagcccgctgctgctctt
   caccggaggcctctgccccgccactcctgctcagggagagggtcttctggctttttcccaggctctg
30  ggcagggcaccaggtagggtgccctaaaccaggccctgcacacaaagggcaggtgctgggctcagacctg
   ccaagagccatccgggagggaccctgccctgacctaaagcccccaagggcaaacctctccactccc
   tcagctcggacaccttctctctcccagattccagtaactcccaatctctctctgagagcccaaatct
   tgtgacaaaactcacacatgccaccggtgccaggtaaagccagccaggcctcgcctccagctcaaggc
   gggacaggtgacctagatagctgcctccaggacagggccccagcgggtgctgacacgtccacctcca
35  tctcttctcagcactgaaactcctgggggaccgtcagctctctcttcccccaaaacccaaggcac
   cctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggtggtggagctgagccacgaagaccctgaggtc
   aagttcaactggtaactggaagcggctggaggtgcataatgccaagacaaagccgggaggagcagta
   acagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca
   gtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaacatctccaaagccaaaggtgggacc
40  cgtggggtgcagggccacatggacagagggcggctcggccccctctgcccctgagagtgaccgctgta
   ccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccctcccgggaggaga
   tgccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggctctatcccagcagatcgcctggagtg
   ggagagcaatgggagccggagagaactacaagaccagcctccgctgctggaactccgacggtccttc
   ttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctatgctccgtg
45  tgcatgaggtctgcacaaccaactacacgcagaagacctctcctgtccccgggtaaatga

>IGHG1 (Seq. no. 29)
50  SASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
   VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTRKRVKPKSCDKTHCTCPPELLEGGFVSFLFPPPKDTLMISRTPE
   EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
   LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEVESNGQPENNYKTPPV
   LDSGGSFFLYSKRLTVDKSRWQOQGNVPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

10

20

【 図 1 】

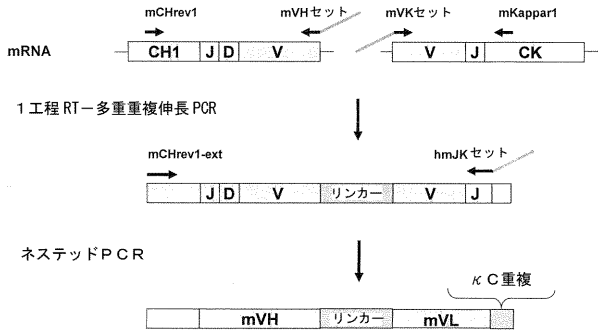


Fig. 1

【 図 2 】

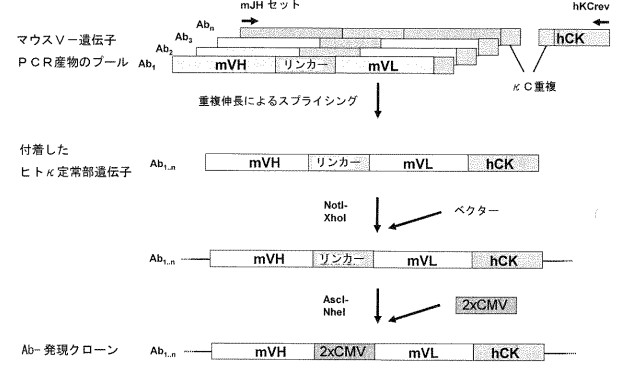


Fig. 2

【 図 3 A 】

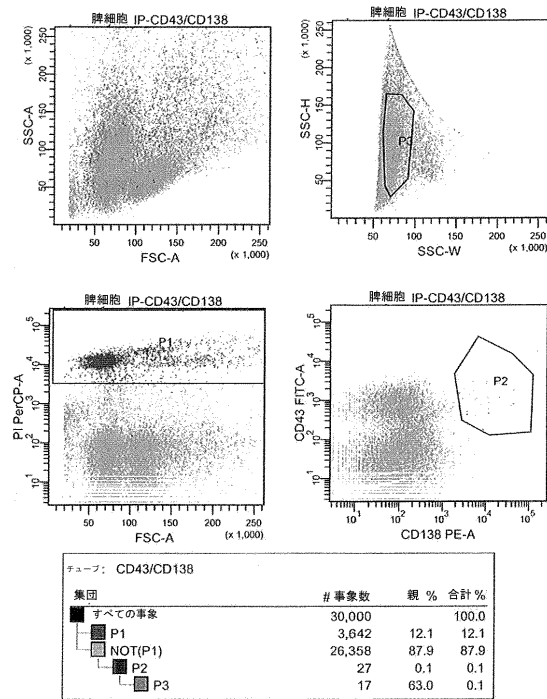


Fig. 3 A

【 図 3 B 】

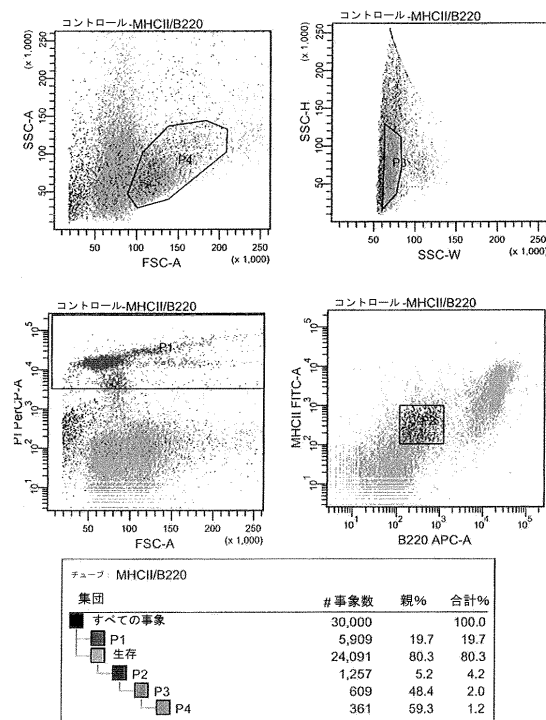


Fig.3 B

【 図 4 】

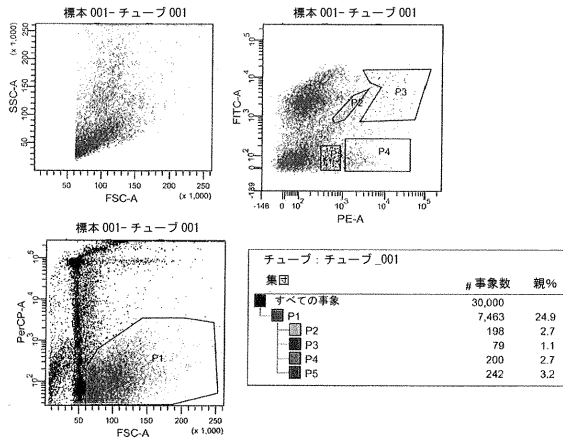


Fig. 4

【 図 6 】

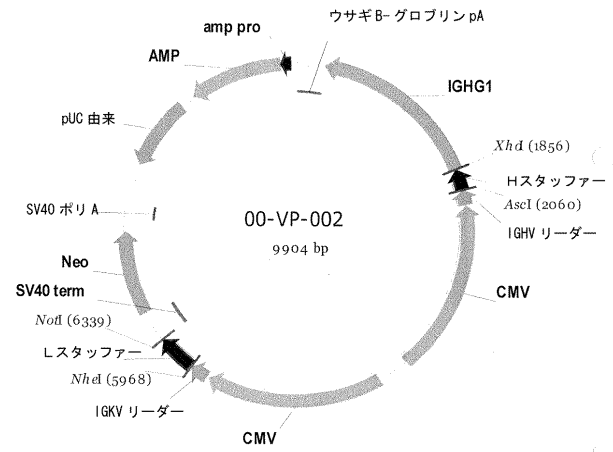


Fig. 6

【 図 5 】

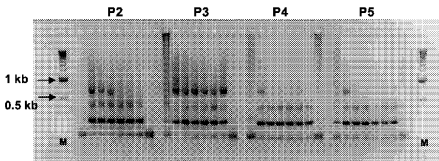


Fig. 5

【 図 7 】

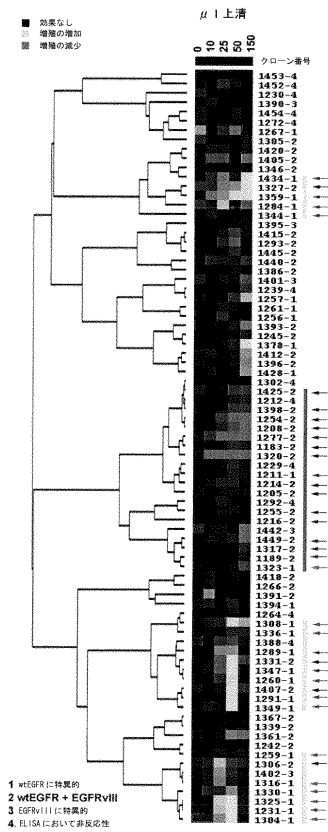


Fig. 7



【配列表】

2010535150000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年11月4日(2009.11.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2010535150000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/DK2008/050048
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/10 C07K16/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CAB Data, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/042774 A (SYMPHOGEN AS [DK]; OLEKSIEWICZ MARTIN B [DK]; NIELSEN LARS S [DK]; AND) 12 May 2005 (2005-05-12) cited in the application page 57, line 13 - line 17	1-10, 16-32, 34-41, 59-68
Y	page 89, line 17 - page 91, line 18  claims 21-58	43-58, 60-68
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  22 August 2008		Date of mailing of the international search report  01/09/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hornig, Horst

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/DK2008/050048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BABCOOK J S ET AL: "A NOVEL STRATEGY FOR GENERATING MONOCLONAL ANTIBODIES FROM SINGLE, ISOLATED LYMPHOCYTES PRODUCING ANTIBODIES OF DEFINED SPECIFICITIES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 93, no. 15, 23 July 1996 (1996-07-23), pages 7843-7848, XP000608647 ISSN: 0027-8424	59
Y	the whole document	43-58, 60-68
X	ORLANDI R ET AL: "CLONING IMMUNOGLOBULIN VARIABLE DOMAINS FOR EXPRESSION BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 86, no. 10, 1 May 1989 (1989-05-01), pages 3833-3837, XP000026475 ISSN: 0027-8424	59
Y	the whole document	43-58, 60-68
X	WO 2007/003041 A (SCHRADER JOHN [CA]) 11 January 2007 (2007-01-11) claim 34	59
X	WO 99/29888 A (SCRIPPS RESEARCH INST [US]) 17 June 1999 (1999-06-17) claims 1-15	59
A	LIU A Y ET AL: "Expression of mouse:human immunoglobulin heavy-chain cDNA in lymphoid cells." GENE 1987, vol. 54, no. 1, 1987, pages 33-40, XP002454700 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-42
A	WEISSENHORN W ET AL: "Chimerization of antibodies by isolation of rearranged genomic variable regions by the polymerase chain reaction." GENE 15 OCT 1991, vol. 106, no. 2, 15 October 1991 (1991-10-15), pages 273-277, XP002454701 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-42

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DK2008/050048

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/228350 A1 (WU HERREN [US] ET AL) 12 October 2006 (2006-10-12) the whole document	43-68
A	FR 2 724 393 A (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 15 March 1996 (1996-03-15) the whole document	43-68
A	US 2004/067532 A1 (ZHU LI [US] ET AL) 8 April 2004 (2004-04-08) the whole document	43-68
A	WO 98/57994 A (JACKSON H M FOUND MILITARY MED [US]) 23 December 1998 (1998-12-23) the whole document	43-68
A	US 2001/027249 A1 (LE JUNMING [US] ET AL) 4 October 2001 (2001-10-04) the whole document	43-68
A	US 2003/175837 A1 (LE JUNMING [US] ET AL LE JUNMING [US] ET AL) 18 September 2003 (2003-09-18) the whole document	43-68

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2008/050048**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/DK2008 /050048

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-42, (59-68) partially

A method for producing a library of cognate pairs comprising linked variable region encoding sequences; said method comprising: a) providing a lymphocyte-comprising cell fraction from the donor; b) obtaining a population of isolated single cells, comprising distributing cells from said cell fraction individually into a plurality of vessels, wherein at least a subpopulation of the cells express CD43 and CD138 antigen; and c) amplifying and effecting linkage of the variable region encoding sequences contained in said population of isolated single cells by amplifying, in a multiplex molecular amplification procedure, nucleotide sequences of interest using a template derived from an isolated single cell, or a population of isogenic cells; and effecting linkage of the nucleotide sequences of interest amplified, a library of vectors encoding chimeric antibodies each antibody member consisting of a non-human immunoglobulin variable region encoding sequences, and human immunoglobulin heavy and light chain constant regions or fragments thereof, wherein said vectors are obtained by said method above.

1.1. claims: 1-42, (59-68) partially

Idem as subject 1, but limited to: wherein at least a subpopulation of the cells express B220 and MHCII antigen;

2. claims: 43-58, (59-68) partially

International Application No. PCT/DK2008 /050048

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method for generating a vector encoding a chimeric antibody with human constant regions and non-human variable regions, said method comprising: a) providing a lymphocyte-comprising cell fraction from a non-human animal; b) obtaining a population of isolated single cells, comprising distributing cells from said cell fraction individually into a plurality of vessels; c) amplifying and effecting linkage of the variable region encoding nucleic acids contained in said population of isolated single cells by amplifying, in a multiplex molecular amplification procedure, said nucleic acids using a template derived from an isolated single cell, or a population of isogenic cells; and effecting linkage of the amplified nucleic acids encoding variable regions of heavy and light chains; d) effecting linkage of the amplified variable regions to human constant regions; and e) inserting the obtained nucleic acid into a vector; a library of vectors encoding chimeric antibodies each antibody member consisting of a non-human immunoglobulin variable region encoding sequences, and human immunoglobulin heavy and light chain constant regions or fragments thereof, wherein said vectors are obtained by said method above.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2008/050048

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005042774 A	12-05-2005	AT 388228 T	15-03-2008
		AU 2004286019 A1	12-05-2005
		BR PI0414282 A	21-11-2006
		CA 2539576 A1	12-05-2005
		DK 1670912 T3	23-06-2008
		EP 1516929 A2	23-03-2005
		EP 1670912 A2	21-06-2006
		ES 2302542 T3	16-07-2008
		HR 20080197 T3	31-05-2008
		IS 8415 A	12-04-2006
		JP 2007505611 T	15-03-2007
KR 20060092218 A	22-08-2006		
WO 2007003041 A	11-01-2007	EP 1910513 A1	16-04-2008
WO 9929888 A	17-06-1999	AU 760562 B2	15-05-2003
		AU 1628099 A	28-06-1999
		BR 9813365 A	15-06-2004
		CA 2312208 A1	17-06-1999
		EP 1034298 A1	13-09-2000
		JP 2001526044 T	18-12-2001
		US 2003166871 A1	04-09-2003
US 2006228350 A1	12-10-2006	NONE	
FR 2724393 A	15-03-1996	CA 2199749 A1	21-03-1996
		EP 0781337 A1	02-07-1997
		WO 9608564 A1	21-03-1996
US 2004067532 A1	08-04-2004	US 2006246515 A1	02-11-2006
WO 9857994 A	23-12-1998	AU 8144098 A	04-01-1999
		CA 2293732 A1	23-12-1998
		EP 0986577 A2	22-03-2000
		JP 2002503966 T	05-02-2002
		US 2006002939 A1	05-01-2006
US 2001027249 A1	04-10-2001	US 2003017584 A1	23-01-2003
		US 2002106372 A1	08-08-2002
US 2003175837 A1	18-09-2003	NONE	



## フロントページの続き

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

(74)代理人 100156100

弁理士 西野 満

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 ペール - ヨハン・メイヤー

デンマーク、デーコー - 2 8 0 0 コンゲンス・リングビー、クルスヴィエルトフテン 3 アー番

(72)発明者 ラース・セゴ - ニールセン

デンマーク、デーコー - 2 9 9 0 ニヴォー、ニヴォーパーク 5 8 番

(72)発明者 イェスパー・カストルプ

デンマーク、デーコー - 3 6 6 0 ガンレセ、モーレヴヴァイ 9 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44

4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA74