

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成28年6月16日(2016.6.16)

【公表番号】特表2015-514811(P2015-514811A)

【公表日】平成27年5月21日(2015.5.21)

【年通号数】公開・登録公報2015-034

【出願番号】特願2015-509201(P2015-509201)

【国際特許分類】

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 4 0 B 40/06 Z C C

C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 14/47

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月19日(2016.4.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする組み換えワクシニアライブラリーをワクシニアウイルス感染許容性の宿主細胞集団に導入する工程であって、該組み換えワクシニアライブラリーが、複数の免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする、ワクシニアウイルスベクター内に構築されたポリヌクレオチドの第1のライブラリーを含み、該ワクシニアウイルスベクターが、(1) 重鎖CH1ドメインを含む第1のポリペプチドセグメントをコードする第1のポリヌクレオチド、(2) CH1ドメインの下流に位置する、ワクシニアウイルス細胞外エンベロープウイルス(EEV) 特異的膜タンパク質の膜貫通ドメインを含む第2のポリペプチドセグメントをコードする第2のポリヌクレオチド、および(3) C

H1ドメインの上流に位置する、免疫グロブリン重鎖可変領域またはそのフラグメントをコードする第3のポリヌクレオチドを含む、工程；

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

(c) 宿主細胞からEEVを放出させる工程；

(d) 放出されたEEVを上清から収集する工程；

(e) 放出されたEEVを抗原と接触させる工程；ならびに

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

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

**【請求項 2】**

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

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

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

(j) 放出されたEEVを上清から収集する工程；

(k) 放出されたEEVを抗原と接触させる工程；ならびに

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

をさらに含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

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

**【請求項 4】**

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

**【請求項 5】**

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

**【請求項 6】**

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

**【請求項 7】**

第2のポリペプチドセグメントが、ワクシニアEEV特異的膜タンパク質A33R、A34R、A56R、A36R、F13L、またはB5Rの膜貫通ドメインを含む、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 8】**

ワクシニアEEV特異的膜タンパク質がA56Rである、請求項7記載の方法。

**【請求項 9】**

第2のポリペプチドセグメントが、A56Rタンパク質のストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

第3のポリペプチドセグメントが、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215~421、またはSEQ ID NO:30のアミノ酸番号447~653を含む、請求項9記載の方法。

**【請求項 11】**

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

【請求項 1 2】

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

【請求項 1 3】

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

(b) ワクシニアウイルスA56Rタンパク質のストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインに融合されたヒトIgG1の全定常領域である、SEQ ID NO:30のアミノ酸番号117~653からなるポリペプチドセグメント

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

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

【請求項 1 4】

EEVの表面での融合ポリペプチドの発現を容易にするためのシグナルペプチドをさらに含む、請求項13記載の融合タンパク質。

【請求項 1 5】

請求項13または14記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

請求項15記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 1 7】

請求項15記載のポリヌクレオチドまたは請求項16記載のベクターを含む、組み換えワクシニアウイルス。

【請求項 1 8】

請求項17記載の組み換えワクシニアウイルスに感染している宿主細胞。

【請求項 1 9】

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

【請求項 2 0】

各免疫グロブリン融合ポリペプチドが、EEVの表面での複数の免疫グロブリン融合ポリペプチドの発現を容易にするためのシグナルペプチドをさらに含む、請求項19記載の組み換えワクシニアライブラリー。

【請求項 2 1】

第1のポリペプチドセグメントが、重鎖CH2ドメイン、重鎖CH3ドメイン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項19または20記載の組み換えワクシニアライブラリー。

【請求項 2 2】

第1のポリペプチドセグメントが、ヒトIgG定常領域またはその部分を含む、請求項21記載の組み換えワクシニアライブラリー。

【請求項 2 3】

第2のポリペプチドセグメントが、ワクシニアEEV特異的膜タンパク質A33R、A34R、A56R

、A36R、F13L、またはB5Rの膜貫通ドメインを含む、請求項19または20記載の組み換えワクシニアライブラリー。

**【請求項 2 4】**

ワクシニアEEV特異的膜タンパク質がA56Rである、請求項23記載の組み換えワクシニアライブラリー。

**【請求項 2 5】**

第2のポリペプチドセグメントが、A56Rタンパク質のストーク領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む、請求項24記載の組み換えワクシニアライブラリー。

**【請求項 2 6】**

第3のポリペプチドセグメントが、SEQ ID NO:11のアミノ酸番号215～421、またはSEQ ID NO:30のアミノ酸番号447～653を含む、請求項25記載の組み換えワクシニアライブラリー。

**【手続補正 2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0 0 2 3

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【0 0 2 3】**

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

[本発明1001]

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

[本発明1002]

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

[本発明1003]

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

[本発明1004]

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

[本発明1005]

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

[本発明1006]

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

[本発明1007]

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

[本発明1008]

定常領域がIgG- 重鎖を含む、本発明1001の融合タンパク質。

[本発明1009]

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

[本発明1010]

本発明1001の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[本発明1011]

ウェスタンリザーブワクシニアウイルス株由来A56Rのアミノ酸番号108～314またはSEQ

ID NO:11のアミノ酸番号215～421をコードするSEQ ID NO:10のヌクレオチドを含む、本発明1010のポリヌクレオチド。

[本発明1012]

本発明1010のポリヌクレオチドを含むベクター。

[本発明1013]

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

[本発明1014]

本発明1013の組み換えワクシニアウイルスに感染している宿主細胞。

[本発明1015]

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

[本発明1016]

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

[本発明1017]

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

[本発明1018]

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

[本発明1019]

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

[本発明1020]

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

[本発明1021]

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

[本発明1022]

定常領域が完全長IgGを含む、本発明1015の第1のライブラリー。

[本発明1023]

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

[本発明1024]

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

[本発明1025]

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

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

(c)宿主細胞から細胞外エンベロープウイルス(EEV)を放出させる工程、

(d)放出されたEEVを上清から収集する工程、

(e)放出されたEEVを抗原と接触させる工程、そして

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

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

[本発明1026]

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

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

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

(j) 放出されたEEVを上清から収集する工程、

(k) 放出されたEEVを抗原と接触させる工程、そして

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

をさらに含む、本発明1025の方法。

[本発明1027]

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

[本発明1028]

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