(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6929877号
(P6929877)

(45)発行日　令和3年9月1日(2021.9.1)　(24)登録日　令和3年8月13日(2021.8.13)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/85	(2006.01)	C12N	15/85	ZNAZ
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
A01K 67/027	(2006.01)	A01K	67/027	
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	100Z

請求項の数 28　(全 33 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-560448(P2018-560448)
(86)(22)出願日　平成29年2月3日(2017.2.3)
(65)公表番号　特表2019-508065(P2019-508065A)
(43)公表日　平成31年3月28日(2019.3.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/016521
(87)国際公開番号　WO2017/136734
(87)国際公開日　平成29年8月10日(2017.8.10)
審査請求日　令和1年5月13日(2019.5.13)
(31)優先権主張番号　62/291,217
(32)優先日　平成28年2月4日(2016.2.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　518278007
トリアニ・インコーポレイテッド
Ｔｒｉａｎｎｉ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９４１２２カリフォルニア州サンフランシスコ、フィフス・アベニュー１５１５番
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾　憲人
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井　陽子
(74)代理人　100165892
弁理士　坂田　啓司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫グロブリン産生の増強

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
シグナルペプチドならびに細胞表面テザー部分および免疫グロブリン結合部分を含む免疫グロブリン捕捉分子をコードする外来性核酸配列を含む形質細胞を含む遺伝子組換えマウス：
ここで外来性核酸配列は、シグナルペプチドならびに免疫グロブリン捕捉分子の細胞表面テザー部分および免疫グロブリン結合部分をコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターを含み、プロモーターは形質細胞において免疫グロブリン捕捉分子の発現を駆動するが、未熟Ｂ細胞、成熟Ｂ細胞または活性化Ｂ細胞においては駆動しない；
細胞表面テザー部分は膜貫通ドメインまたはグリコシルフォスファチジルイノシトールにより翻訳後修飾され得るＣ末端ペプチド配列を含み、免疫グロブリン結合部分は、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＨ、プロテインＬもしくはそれらの組合せから選択される細菌タンパク質由来の１以上の免疫グロブリン結合ドメイン、または免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖定常領域の保存されたエピトープに特異的に結合する免疫グロブリンの可変ドメインを含む；および
遺伝子組換えマウスの形質細胞は、形質細胞の細胞表面に、内因的に産生された免疫グロブリン分子を、結合、保持、および提示し得る免疫グロブリン捕捉分子を産生できる。
【請求項２】
形質細胞が、インビボまたはエクスビボで免疫グロブリン捕捉分子を発現する、請求項１に記載の遺伝子組換えマウス。

【請求項３】
細菌タンパク質が、黄色ブドウ球菌由来のプロテインＡ、Ｃ群およびＧ群連鎖球菌由来のプロテインＧ、化膿性連鎖球菌由来のプロテインＨ、またはペプトストレプトコッカス・マグヌス由来のプロテインＬから選択される、請求項１または２に記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項４】
免疫グロブリン結合部分が、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の定常領域の保存されたエピトープに特異的に結合する単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む、請求項１～３のいずれかに記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項５】
細胞表面テザー部分が、ヒトリンパ球活性化遺伝子３、ヒトＣＤ５８、ラットＣＤ２、または、ヒトＣＤ７由来の膜貫通ドメインを含む、請求項１～４のいずれかに記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項６】
プロモーターが、Ｂリンパ球誘導成熟タンパク質１、シンデカン１、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１７、またはフコシルトランスフェラーゼ１遺伝子から選択される遺伝子の発現を駆動するプロモーターから選択される、請求項１～５のいずれかに記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項７】
プロモーターが、誘導性プロモーターである、請求項１～６のいずれかに記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項８】
誘導性プロモーターが、テトラサイクリン応答性プロモーター、または、タモキシフェン応答性プロモーターである、請求項７に記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項９】
細胞表面テザー部分が、膜貫通ドメインを含む、請求項１～８のいずれかに記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項１０】
細胞表面テザー部分が、グリコシルフォスファチジルイノシトールにより翻訳後修飾され得るＣ末端ペプチド配列を含む、請求項１～８のいずれかに記載の遺伝子組換えマウス。
【請求項１１】
細胞表面に、内因的に産生された免疫グロブリン分子を、結合、保持、および提示し得る膜結合型免疫グロブリン捕捉分子を発現することができる形質細胞を生成する方法：
ここで該方法は、形質細胞、または、形質細胞の前駆細胞に、シグナルペプチドならびに細胞表面テザー部分および免疫グロブリン結合部分を含む免疫グロブリン捕捉分子をコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターを含む核酸ベクターを導入することを含み、プロモーターは形質細胞において免疫グロブリン捕捉分子の発現を駆動するが、未熟Ｂ細胞、成熟Ｂ細胞または活性化Ｂ細胞においては駆動しない；および
細胞表面テザー部分は膜貫通ドメインまたはグリコシルフォスファチジルイノシトールにより翻訳後修飾され得るＣ末端ペプチド配列を含み、免疫グロブリン結合部分は、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＨ、プロテインＬもしくはそれらの組合せから選択される細菌タンパク質由来の１以上の免疫グロブリン結合ドメイン、または免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖定常領域の保存されたエピトープに特異的に結合する免疫グロブリンの可変ドメインを含む。
【請求項１２】
プロモーターが、Ｂリンパ球誘導成熟タンパク質１、シンデカン１、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１７、またはフコシルトランスフェラーゼ１から選択される遺伝子の発現を駆動するプロモーターから選択される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】

プロモーターが、誘導性プロモーターである、請求項１１または１２に記載の方法。
【請求項１４】
誘導性プロモーターが、テトラサイクリン応答性プロモーター、または、タモキシフェン応答性プロモーターである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
細胞表面テザー部分が、ヒトリンパ球活性化遺伝子３、ヒトＣＤ５８、ラットＣＤ２、または、ヒトＣＤ７由来の膜貫通ドメインを含む、請求項１１～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
細胞表面テザー部分が、グリコシルフォスファチジルイノシトールにより翻訳後修飾され得るＣ末端ペプチド配列を含む、請求項１１～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
細胞表面テザー部分が、膜貫通ドメインを含む、請求項１１～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
核酸ベクターが、ストーク構造をコードする核酸配列をさらに含む、請求項１１～１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
核酸ベクターが、レポーターペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項１１～１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
レポーターペプチドが蛍光ペプチドである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
核酸ベクターが、ＩＲＥＳ配列、または、ピコルナウイルス２Ａリボソームスキップ配列をさらに含む、請求項１９または２０に記載の方法。
【請求項２２】
核酸ベクターが、ＩＲＥＳ配列またはピコルナウイルス２Ａリボソームスキップ配列に連結したストーク構造およびレポーターペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項１１～２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
細胞表面に免疫グロブリン分子を、結合、保持、および提示し得る膜結合型免疫グロブリン捕捉分子を発現できる形質細胞：
ここで該形質細胞は、シグナルペプチドならびに細胞表面テザー部分および免疫グロブリン結合部分を含む免疫グロブリン捕捉分子をコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターを含む核酸ベクターを含み、プロモーターは形質細胞において免疫グロブリン捕捉分子の発現を駆動するが、未熟Ｂ細胞、成熟Ｂ細胞または活性化Ｂ細胞においては駆動しない；および
細胞表面テザー部分は膜貫通ドメインまたはグリコシルフォスファチジルイノシトールにより翻訳後修飾され得るＣ末端ペプチド配列を含み、免疫グロブリン結合部分は、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＨ、プロテインＬもしくはそれらの組合せから選択される細菌タンパク質由来の１以上の免疫グロブリン結合ドメイン、または免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖定常領域の保存されたエピトープに特異的に結合する免疫グロブリンの可変ドメインを含む。
【請求項２４】
形質細胞が、抗体の大規模産生に用いられる、請求項１１～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
形質細胞の細胞表面に免疫グロブリン分子を、結合、保持、および提示し得る膜結合型免疫グロブリン捕捉分子を発現させるためのベクター：
ここで該ベクターは、シグナルペプチドならびに免疫グロブリン捕捉分子の細胞表面テ

ザー部分および免疫グロブリン結合部分をコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターを含み、プロモーターは形質細胞において免疫グロブリン捕捉分子の発現を駆動するが、未熟Ｂ細胞、成熟Ｂ細胞または活性化Ｂ細胞においては駆動しない；および

細胞表面テザー部分は膜貫通ドメインまたはグリコシルフォスファチジルイノシトールにより翻訳後修飾され得るＣ末端ペプチド配列を含み、免疫グロブリン結合部分は、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＨ、プロテインＬもしくはそれらの組合せから選択される細菌タンパク質由来の１以上の免疫グロブリン結合ドメイン、または免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖定常領域の保存されたエピトープに特異的に結合する免疫グロブリンの可変ドメインを含む。

【請求項２６】

ＩＲＥＳ配列またはピコルナウイルス２Ａリボソームスキップ配列に連結したストーク構造、および、レポーターペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項２５に記載のベクター。

【請求項２７】

シグナルペプチドが免疫グロブリン重鎖または軽鎖タンパク質のシグナルペプチドに由来する、請求項２５に記載のベクター。

【請求項２８】

シグナルペプチドが配列番号１～３または５～７の配列を有する、請求項２７に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本願は、２０１６年2月４日に出願された、ＵＳＳＮ６２／２９１，２１７の優先権を主張するものである。

【０００２】

本発明の技術分野

本発明は、モノクローナル抗体を生成するための抗原特異的抗体分泌細胞の迅速なスクリーニング方法を含む、免疫グロブリン分子の産生に関する。

【背景技術】

【０００３】

本発明の背景

以下の説明では、いくつかの文献および方法が、背景および導入目的のために記載されている。本明細書に含まれるものは、先行技術の「承認」と解釈されるものではない。出願人は、本明細書で参照されている文献および方法が、該当する法律の規定に基づく先行技術を構成していないことを、必要に応じて証明する権利を明示的に留保する。

【０００４】

モノクローナル抗体は、多様な分子形態の抗原に結合するその精巧な能力のために、生物医学研究において、臨床診断において、および治療薬として広く使用されている重要な生物製剤である。医薬品開発において、モノクローナル抗体は、感染性病原体を排除するのに通常関与する強力な免疫学的機能に関連する所望の薬物動態を示すので、しばしば選択される分子である。さらに、実験動物は、体内に本来存在しない標的分子に対して特異的な抗体応答を容易に開始することができ、よって、代替的な戦略と比較して、抗体生成が比較的低リスクかつ費用効率の高い手法になり得る。

【０００５】

ハイブリドーマ技術は、４０年よりも前に開発されたが、今日、依然として、抗原特異的モノクローナル抗体を生成するために最も広く用いられている技術である。本手法では、動物（典型的には、げっ歯類またはウサギ）を、目的の抗原で最初に免疫化する。抗原に対して特異性のある受容体を有する免疫化した動物のＢリンパ球は、次に活性化され、クローン的に増殖し、抗体分泌細胞（ＡＳＣ）に分化する。免疫化した動物は屠殺され、

そして、これらの動物から単離したＡＳＣは培養において永久に生存することができないために、しばしば悪性の形質細胞（骨髄腫、または、形質細胞腫の細胞など）との融合により不死化され、ハイブリドーマと呼ばれるハイブリッド細胞を生成する。次いで、ハイブリドーマ細胞を、目的の抗原に対する反応性を有する抗体を分泌する能力についてスクリーニングおよび選択し、これはしばしば、複数回の限界希釈および培養での増殖を含む。

【０００６】

あるいは、ＡＳＣを個別に選別し、インビトロでＡＳＣを増殖させる必要なく、重鎖および軽鎖可変ドメイン（それぞれ、V_HおよびV_L）をコードする遺伝子を直接クローン化させることができる。次に、V_HおよびV_LをコードするＤＮＡフラグメントを、所望の重鎖および軽鎖定常領域のエクソン配列を含有する発現ベクターに、それぞれサブクローニングする。次いで、V_HおよびV_Lの一対の発現ベクターを細胞株にトランスフェクトしてモノクローナル抗体を発現させ、続いて目的の抗原を認識する能力についてスクリーニングする。

【０００７】

ハイブリドーマまたは単一細胞クローニング技術のいずれかを使用して、目的の抗原に対するモノクローナル抗体を産生することにおける最終的な成功にもかかわらず、両技術の効率は、スクリーニングおよび選択という多大な労力を必要とするプロセスによって妨げられる。これは、骨髄腫細胞との融合のために、または、単一細胞のクローニングのために、抗原特異的ＡＳＣのみを予め選択することが実現可能ではなかったからである。Ｂリンパ球が抗原との遭遇に応答してＡＳＣに分化する際に、抗原受容体の膜結合型形態は、分泌型形態を支持してダウンレギュレートされる。従って、抗原受容体の細胞表面発現に基づく選択方法、例えば、磁気による選別、または、フローサイトメトリーによる選別は、抗原特異的ＡＳＣを選択するツールとしてはうまく機能しない。ＡＳＣを予め選択することができないために、ハイブドーマおよび単一細胞クローニング技術の両方でスクリーニングされた細胞のほんの一部しか、目的の抗原に対して特異性を有するモノクローナル抗体を産生しない。

【０００８】

米国特許第７，１４８，０４０Ｂ２号は、抗原受容体の細胞表面発現に基づく選択技術によるハイブリドーマスクリーニングの効率を改善するために、ハイブリドーマ細胞上の抗原受容体の膜結合型形態を発現させる方法を提供する。本手法において、骨髄腫細胞に、それぞれＩｇαおよびＩｇβとしても知られる、ＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂをコードする発現構築物をトランスフェクトする。ＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂは、Ｂ細胞上の抗原受容体の細胞表面発現およびシグナル伝達機能の両方に必要なヘテロ二量体として発現される。Ｂリンパ球がＡＳＣに分化すると、それらはＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂの発現をダウンレギュレートさせ、細胞表面上での抗原受容体の発現の喪失に寄与する。従って、ＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂの発現を再導入すると、ハイブリドーマ上の抗原受容体の膜結合型形態の提示を増加させることができる。この戦略は、ハイブリドーマスクリーニングおよび選択の労力を軽減するのに役立つが、骨髄腫細胞との融合のために抗原特異的ＡＳＣのみを予め選択することが実現可能であれば、その効率を大幅に改善することができるであろう。さらに、選別された単一細胞からの直接のV_HおよびV_Lのクローニング技術を用いた、モノクローナル抗体生成の効率を高めるための戦略を提供する特定の方法はない。

【０００９】

インビボでのＡＳＣによるＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂ発現の再導入はいずれも、細胞表面上の抗原受容体の発現を増加させる実行可能な戦略を提供しない可能性がある。ＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂの発現はＢリンパ球発生中に厳密に調節されるので、インビボでのそれらの発現レベルの変化は、Ｂリンパ球の生存、機能および／または抗原受容体の選択に大きな影響を及ぼし得る。さらに、ＡＳＣ上の抗原受容体は、マウスを安楽死させたときに免疫応答がまだ進行しているので、免疫原との積極的結合のためにＡＳＣ単離時に

内在化される可能性がある。代わりにシグナル伝達欠損変異体ＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９ＢがＡＳＣ上で発現されて抗原受容体の内在化を防止する場合、これらの分子の変異形態が、インビボでのＡＳＣの生存および機能に悪影響を与えるドミナントネガティブ効果を示すか否かは未だ解明されていない。最後に、インビボでのそれらの強制発現に関連する前述の問題を回避するために、ＡＳＣ上のＣＤ７９ＡおよびＣＤ７９Ｂをエクスビボで発現させることは、現時点で利用可能なほとんどの方法による遺伝子導入をＡＳＣが受け入れられないため、実用的な戦略ではない。

【００１０】

したがって、抗原特異的ＡＳＣのためのより効率的なスクリーニングの方法は、満たされていない重要なニーズである。本明細書によって提供される方法および組成物は、この重要なニーズを満たす。

【発明の概要】

【００１１】

本発明の概要

本概要は、以下の詳細な説明でさらに説明する概念のうち選択したものを簡略化した形で紹介するために提供される。本概要は、特許請求された主題の鍵となる特徴、または、本質的な特徴を特定することを意図するものではなく、特許請求された主題の範囲を限定するために使用されることも意図していない。特許請求された主題の他の特徴、詳細、有用性、および利点は、添付の図面に例示された局面および添付の請求項に規定された局面を含む、以下に記載された詳細な説明から明らかであろう。

【００１２】

本発明は、免疫グロブリン分子の産生を増強するための方法および組成物を提供する。特に、本発明は、ＡＳＣの表面で、分泌型免疫グロブリン分子（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥおよびＩｇＭアイソタイプのものを含む）を捕捉するための方法および組成物を提供する。本発明はまた、ＡＳＣ内から内因的に産生された免疫グロブリン分子を、その細胞表面上に捕捉して表示することができる操作されたＡＳＣを含む、トランスジェニック哺乳動物を含むトランスジェニック動物を含む。

【００１３】

ある実施形態において、本発明は、ＡＳＣ上に免疫グロブリン捕捉分子を優先的に発現し、抗原誘発性の分化前のＢ細胞発生の段階では最小限の発現である発現系を使用して、プロテインＡおよび／またはプロテインＧなどの細菌タンパク質に由来する１つ以上の免疫グロブリン結合部分またはドメインを含む、操作された免疫グロブリン捕捉分子の制限された構成的発現を提供する。

【００１４】

別の実施形態において、本発明は、ＡＳＣ上に免疫グロブリン捕捉分子を優先的に発現し、抗原誘発性の分化前のＢ細胞発生の段階では最小限の発現である発現系を使用して、免疫グロブリンに特異性を有する単鎖抗体を含む、操作された免疫グロブリン捕捉分子の制限された構成的発現を提供する。

【００１５】

操作されたＡＳＣは、細胞表面につなぎ止められ、かつ、細胞膜に免疫グロブリン分子を固定化するのに十分な親和性で免疫グロブリン分子に（本明細書で用いられる「免疫グロブリン」または「抗体」にもまた）選択的に結合する能力を有する、免疫グロブリン捕捉分子を発現する。ＡＳＣは毎秒何千もの免疫グロブリン分子を分泌するので、所与のＡＳＣ上の免疫グロブリン捕捉分子は、他のＡＳＣによって分泌される免疫グロブリンではなく、そのＡＳＣによって分泌される免疫グロブリン分子によって主に飽和される。細胞表面免疫グロブリン捕捉分子をコードする遺伝子の発現は、発現される特定のモノクローナル免疫グロブリン分子に基づくＡＳＣの同定手段を提供する。

【００１６】

特定の局面において、免疫グロブリン捕捉分子は、限定されるものではないがヒトリンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）などの膜貫通タンパク質由来のペプチド配列により、細

胞膜につなぎ止められている。他の局面において、免疫グロブリン捕捉分子は、例えばグリコシルフォスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）による翻訳後修飾を介して、細胞につなぎ止められている。これらの局面のいくつかにおいて、免疫グロブリン捕捉分子はさらに、支持、可動性、および細胞外空間への突出の延長のための長いストーク（ｓｔａｌｋ）を含む。

【００１７】

特定の局面において、免疫グロブリン捕捉分子の発現は、インビボまたはインビトロで発生させたＡＳＣにおいて高度に発現されるヒトまたはマウス遺伝子に由来するプロモーターによって駆動される。他の局面において、免疫グロブリン捕捉分子は、インビボまたはインビトロで、テトラサイクリン系などの誘導系により発現される。いくつかの局面において、免疫グロブリン捕捉分子の発現は、発現ベクター中の内部リボソーム導入部位（ＩＲＥＳ）またはピコルナウイルス２Ａリボソームスキップ配列を介した、緑色蛍光蛋白質（ＧＦＰ）などのレポーター遺伝子の発現と連結される。

【００１８】

本発明はまた、免疫グロブリン捕捉分子をＡＳＣ上に発現する非ヒトのトランスジェニック動物を生成する方法を提供する。該方法は、非ヒト脊椎動物のゲノムに免疫グロブリン捕捉分子をコードする遺伝子を導入することを含み、導入された遺伝子は宿主のＡＳＣ上の免疫グロブリン捕捉分子の構成的発現または誘導性発現を提供する。いくつかの局面において、トランスジェニック動物はげっ歯類であり、好ましくはマウスである。他の局面において、トランスジェニック動物はトリであり、好ましくはニワトリである。特に好ましい局面において、トランスジェニック動物は、重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードするヒト遺伝子を発現し、これらの遺伝子のマウスバージョンを欠いているマウスである；例えば、米国出願公開第２０１３／０２１９５３５号に記載されており、その全体が参照により組み込まれる。

【００１９】

本発明はさらに、ＡＳＣの表面上に捕捉された特定の免疫グロブリンを提示するＡＳＣから、特定の特異性を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子を単離するためのプロセスを提供する。

【００２０】

本発明はまた、本発明の操作された細胞から目的の抗体を同定するためのライブラリーを提供する。本発明の方法および組成物を用いて作製された抗体ライブラリーは、目的の標的に選択的に結合する抗体のスクリーニングおよび産生を促進させる手段を提供する。したがって、これらのライブラリーは、臨床、診断、および研究の場において使用するためのモノクローナル抗体の単離を向上させる。

【００２１】

本発明の利点は、免疫グロブリン特異性の測定を、蛍光標識抗原への結合およびフローサイトメトリーまたは顕微鏡による手順などの、確立された技術を用いて行うことができることである。これらの手順は、数の少ない抗原特異的細胞の同定および単離における効率の向上、および単離された細胞由来の再編成された免疫グロブリン遺伝子のクローニングにおける効率の向上を可能にする。

【００２２】

これらの、および他の、局面、対象、および特徴が、以下に、より詳細に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】図１Ａ、図１Ｂおよび図１Ｃは、細胞表面上に免疫グロブリン捕捉分子を有さない分泌型ＡＳＣ（図１Ａ）、免疫グロブリン捕捉分子を有するＡＳＣと、ＡＳＣの表面上に捕捉された免疫グロブリン分子（すなわち、抗体）（図１Ｂ）、および、ＡＳＣ上に発現した免疫グロブリン捕捉分子によって保持された抗体と、標識された抗原との結合（図１Ｃ）の図である。

【００２４】
【図２】図２Ａは、免疫グロブリン捕捉分子の一実施形態をコードするＤＮＡベクターの一部を示す模式図である。図２Ｂは、ＡＳＣ表面上に免疫グロブリン捕捉分子として発現した、図２Ａの実施形態の簡略図である。
【００２５】
【図３】図３Ａは、免疫グロブリン捕捉分子の別の実施形態をコードするＤＮＡベクターの一部を示す模式図である。図３Ｂは、ＡＳＣ表面上に免疫グロブリン捕捉分子として発現した、図３Ａの実施形態の簡略図である。
【００２６】
【図４】図４Ａ、図４Ｂ、および図４Ｃは、細胞表面上に免疫グロブリン捕捉分子を有さない分泌型ＡＳＣ（図１Ａ）、免疫グロブリン捕捉分子を有するＡＳＣと、ＡＳＣの表面上の免疫グロブリン（すなわち、抗体）（図４Ｂ：図３Ｂにもまた詳細を示す）、および、ＡＳＣ上に発現した免疫グロブリン捕捉分子と、標識された抗原との結合（図４Ｃ）の図である。
【００２７】
【図５】図５Ａは、免疫グロブリン捕捉分子の例示的な実施形態をコードするＤＮＡベクターの一部を示す模式図である。図５Ｂは、本発明の方法によりトランスフェクトされたＲＰＭＩ８２２６（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＣＬ－１５５ＴＭ）ヒト細胞の、細胞表面上の分泌型免疫グロブリン分子の保持の結果を示す２つのフローサイトメトリー散布図を提供する。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
定義
本明細書で用いられる用語は、当業者によって理解される、平易で通常の意味を有することが意図されている。以下の定義は、読み手が本発明を理解することを助けることを意図するものであるが、具体的に示されていない限り、それらの用語の意味を変更または限定することを意図するものではない。
【００２９】
「抗体分泌細胞」または「ＡＳＣ」は、抗原経験のあるＢ細胞から分化し、大量の免疫グロブリン分子を発現、並びに、分泌する能力を獲得した細胞を指す。ＡＳＣには、動物の体内の形質芽細胞および短命または長命の形質細胞、並びに、Ｂ細胞培養物からインビトロで発生した形質芽細胞および形質細胞が含まれる。
【００３０】
「捕捉分子」は、目的の分子の一部または全体に、選択的に結合する領域を含有する任意の部分である。
【００３１】
「捕捉」は、ある分子と膜結合型捕捉分子との間の耐久性のある相互作用による、細胞表面における分子の選択的結合および固定化を指す。
【００３２】
「細胞表面」は、細胞の細胞膜、すなわち、細胞外空間に最も直接的に曝され、細胞外（細胞間を含む）空間において細胞およびタンパク質の両方と接触することが可能な細胞の部分を指す。
【００３３】
「未熟Ｂ細胞」は、造血幹細胞が、成熟しているが抗原経験のないＢ細胞になるように遺伝的プログラミングを受ける、Ｂ細胞分化の中間期にある細胞を指す。「成熟」Ｂ細胞は、抗原による活性化の際に、クローン増殖並びに免疫記憶細胞または抗体分泌細胞への分化が可能な、抗原経験のないＢ細胞を指す。
【００３４】
「免疫グロブリン」は、抗体分子の一部または全部を問わず、抗体を指す。ヒトを含むたいていの脊椎動物において、抗体は、通常、それぞれが同一の軽鎖（Ｌ）と対になって

いる、２つの同一の重鎖（Ｈ）の二量体として存在する。Ｈ鎖およびＬ鎖の両方のＮ末端は、特有の抗原結合特異性を有するＨ－Ｌ対を共に提供する可変ドメイン（それぞれ$Ｖ_{Ｈ}$および$Ｖ_{Ｌ}$）からなる。Ｈ鎖の定常領域は、アイソタイプ（または抗体クラス）により、ヒンジの有無を問わず、３～４個の免疫グロブリンドメイン（$Ｃ_{Ｈ}１$～$Ｃ_{Ｈ}４$と呼ばれる）から成る。マウスにおいて、アイソタイプは、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ３、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ２ａまたはＩｇＧ２ｃ、ＩｇＥ、およびＩｇＡである。軽鎖定常領域は、κ免疫グロブリンドメインまたはλ免疫グロブリンドメイン（ＣκまたはＣλと呼ばれる）のいずれかから成る。マウスおよびヒトの両方において、個体内の免疫グロブリンの全プール中のλ軽鎖の存在よりもκ軽鎖の存在が優勢である。ラクダ科の動物または軽鎖発現が欠損した動物などの特定の哺乳動物では、免疫グロブリンは重鎖のみから成ることがある。軽鎖の欠如にもかかわらず、これらの免疫グロブリンはまた、本発明に記載の免疫グロブリン重鎖に結合するように設計された免疫グロブリン捕捉分子によって、細胞表面上に効率的に保持される。さらに、免疫グロブリンは、２つ以上の$Ｖ_{Ｈ}$および／または$Ｖ_{Ｌ}$ドメインからなる二重特異性抗体などの特殊な抗体を、部分的または全体的であるかどうかに関わらず指すことができ、これは、例えば、２０１６年８月２４日に出願されたＵＳＳＮ１５／２４６，１８１に記載されており、その全体が参照により組み込まれる。最後に、免疫グロブリンはまた、抗体の一部（特に抗体の定常領域）および、別のタンパク質から成る、ハイブリッド分子を指す。本発明に記載される免疫グロブリン捕捉分子はまた、細胞表面に提示するハイブリッド免疫グロブリン分子を保持するように、設計および操作されてもよい。

【００３５】

「免疫グロブリン捕捉分子」は、免疫グロブリン分子（すなわち、免疫グロブリンまたは抗体）を、細胞表面に結合、保持、および提示できる、原形質膜結合型分子を指す。

【００３６】

「免疫グロブリンスーパーファミリー」または「ＩｇＳＦ」分子は、抗体分子中に見出される免疫グロブリンドメインと構造的に類似する免疫グロブリンフォールド（Ｉｇフォールド）を有する分子を指す。

【００３７】

「トランスジーン」という用語は、本明細書において、細胞のゲノムに人工的に挿入されている、または挿入しようとしている遺伝物質を説明するために使用される。

【００３８】

「トランスジェニック動物」は、他の動物も想定されているが、通常はげっ歯類などの哺乳動物、特にマウスまたはラットである非ヒト動物であって、一部の細胞に染色体因子または染色体外因子として存在するか、あるいは、生殖細胞系ＤＮＡ（すなわち、大部分または全部の細胞のゲノム配列）に安定して組み込まれている、外因性の核酸配列を有する非ヒト動物を指す。

【００３９】

「ベクター」または「発現構築物」は、細胞の形質転換、形質導入、またはトランスフェクトに使用することができる、プラスミドおよびウイルスおよび任意のＤＮＡまたはＲＮＡ分子を含み、それらが自己複製であるかどうかは問わない。

【００４０】

本発明の詳細な説明

本明細書に記載される技術の実施は、特に断りのない限り、当業者の技能の範囲内である、有機化学、ポリマー技術、分子生物学（組換え技術を含む）、細胞生物学、生化学および配列決定技術の従来の技術および説明を利用することができる。これらの従来の技術には、ポリマーアレイ合成、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびライゲーション、および標識を用いたハイブリダイゼーションの検出が含まれる。好適な技術の特定の例は、本明細書の実施例を参照することにより得ることができる。しかしながら、他の同等の従来の手順を使用することも、当然可能である。これらの従来の技術および説明は、Green, et al., Eds. (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols

. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), Genetic Variation: A Laboratory Manual; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2007), PCR Primer: A Laboratory Manual; Sambrook and Russell (2006), Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual; and Green and Sambrook (2012), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (全て Cold Spring Harbor Laboratory Pressによる); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; and Berg et al. (2002) Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.; Nagy, et al., Eds. (2003) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); Gene Therapy Techniques, Applications and Regulations From Laboratory to Clinic (Meager, ed., John Wiley & Sons 1999); M. Giacca, Gene Therapy (Springer 2010); Gene Therapy Protocols (LeDoux, ed., Springer 2008); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, eds., John Wiley & Sons 1998); およびMammalian Chromosome Engineering - Methods and Protocols (G. Hadlaczky, ed., Humana Press 2011)などの標準的な実験室マニュアルで見つけることができ、これらは全て、全ての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００４１】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。従って、例えば、「ある免疫グロブリン（ａｎ　ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）」の言及は、１つ以上のこれらの免疫グロブリンを指し、「一方法（ｔｈｅ　ｍｅｔｈｏｄ）」の言及は、当業者に周知の同等の複数のステップおよび方法の言及を含む。

【００４２】

他に規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で言及される全ての刊行物は、本発明に関連して使用され得るデバイス、処方および方法論を記載および開示する目的で、参照により本明細書に組み込まれる。

【００４３】

ある値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限の間に介在する各値、および、記載された範囲内の、任意の他の記載された値または介在する値は、本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、独立してより小さい範囲に含まれてもよく、また本発明に包含され、記載された範囲内の特定的に除外された任意の限界値を対象とする。記載された範囲が該限界値の一方または両方を含む場合、含まれる限界値の一方または両方を除く範囲もまた本発明に含まれる。

【００４４】

以下の説明では、本発明のより完全な理解を提供するために、多数の具体的な詳細が述べられている。しかしながら、本発明は、これらの具体的な詳細の１つ以上が無くとも実施できることは、当業者には明らかであろう。他の例では、当業者によく知られた、周知の特徴および手順は、本発明を不明瞭にすることを避けるために記載されていない。

【００４５】

一般的な本発明

抗体分泌細胞（ＡＳＣ）は、通常、発現して分泌する免疫グロブリンを、細胞膜上に提示しないため、磁気選別およびフローサイトメトリー選別などの細胞表面標識に基づく高度な技術を、抗原特異的ＡＳＣを選択する方法としては適用できない。本発明は、分泌型免疫グロブリン分子（本明細書では「免疫グロブリン」または「抗体」とも呼ばれる）の細胞表面提示に基づくＡＳＣの効率的なスクリーニングを可能にする系の必要性から生まれた。具体的には、本発明は、通常、高レベルの膜結合型免疫グロブリンを発現しない、あるいは、天然に、細胞表面上に免疫グロブリンを保持する能力を有さない、ＡＳＣまた

はハイブリドーマなどの分泌細胞の表面に、免疫グロブリンを保持および固定することができる免疫グロブリン捕捉分子を発現させるための手段を提供する。ＡＳＣは、大量の免疫グロブリン（毎秒数千個の分子）を発現して放出する（例えば、Mitchell, Advances in Immunology 28:451-511 (1979)参照）。それゆえ、これらの細胞上に発現する免疫グロブリン捕捉分子は、他の細胞から分泌される免疫グロブリンよりも、該細胞内から産生される免疫グロブリンによって主に飽和される。従って、免疫グロブリン捕捉分子は、それらが捕捉する免疫グロブリン分子に対して、高い親和性および低い解離速度を有さなければならない。本発明は、これらの、低い解離速度を有し、高い親和性を持つ免疫グロブリン捕捉分子を発現する方法および組成物を提供する。

【００４６】

内因的に産生された免疫グロブリンをその細胞表面上に捕捉するためにＡＳＣを操作することは、各ＡＳＣが産生する抗体の抗原特異性を識別し、所望の免疫グロブリンを分泌するＡＳＣを分泌しないＡＳＣから分離するための容易な手段を提供する。識別は、例えば、当業界で知られる十分に確立された手順により、細胞の同定および精製を容易にする物質（例えば、磁気、ビオチン化、蛍光、放射性、または酵素分子）で標識された抗原を使用することによって達成することができる。

【００４７】

図１Ａ、図１Ｂおよび図１Ｃは、１つの例示的実施形態における、本発明の原理を図示する。図１Ａに示されるように、抗体分泌細胞（ＡＳＣ）（１０１）は、通常、免疫グロブリン分子の膜結合型形態を発現せず、また、細胞表面上に免疫グロブリン分子（すなわち、抗体）の分泌型形態（１０２）も保持しない。本発明は、ＡＳＣの細胞表面上に、免疫グロブリン捕捉分子（１０３）を発現するための、方法および組成物を提供する。本発明によれば、小胞体中の免疫グロブリン分子の合成およびその後の分泌のためのベシクルへのパッケージングの間に、またはそれらの分泌の直後に、図１Ｂに示されるように、いくつかの免疫グロブリン分子（１０２）が、免疫グロブリン捕捉分子（１０３）によって細胞表面上に保持される。次いで、図１Ｃに示されるように、ＡＳＣの細胞表面上の免疫グロブリン捕捉分子（１０３）の免疫グロブリン結合部分に結合した免疫グロブリン分子（抗体）（１０２）に、標識された抗原（１０４）（例えば、蛍光標識された抗原）を結合させる。次いで、細胞表面上に捕捉された免疫グロブリン捕捉分子（１０２）の免疫グロブリン結合部分に結合した標識された抗原（１０４）によって、抗原特異的ＡＳＣが特定される。ＡＳＣ上の抗原結合の検出は、例えば、フルオロフォアまたは他のレポーター分子で直接標識された抗原を使用することによって達成される。次いで、標識された抗原に結合するＡＳＣは、例えば当業界で知られる細胞選別技術により、精製される。

【００４８】

特定の抗原に特異的な抗体を発現する精製されたＡＳＣは、その後、免疫グロブリンをコードする配列のライブラリーの作製のために、骨髄腫または形質細胞腫細胞との融合によって不死化され得るか、または核酸源（ＤＮＡまたはｍＲＮＡ）として直接用いられ得る。

【００４９】

精製されたＡＳＣ由来のライブラリーは、規定の特異性（すなわち、精製プロセスで使用される抗原に対する特異性）を有する抗体をコードする再編成された免疫グロブリン遺伝子を含有する。V_HおよびV_L遺伝子は、バイオインフォマティクスデータマイニングと組み合わせたディープシーケンシングによって、抗原特異的ＡＳＣから特定することができる（例えば、Haessler and Reddy, Methods in Molecular Biology 1131:191-203 (2014)参照）。あるいは、抗原特異的ＡＳＣを、個別に選別することができる。次いで、各ＡＳＣに固有のV_HおよびV_Lドメインを、単一細胞クローニングに適合した、確立されたＲＴ－ＰＣＲまたはｃＤＮＡ末端の５’迅速増幅（５’ＲＡＣＥ）技術を介してクローニングする（概観するために、例えば、Tiller, et al., New Biotechnology 5:453-7 (2011)を参照されたい）。さらに別の選択肢では、V_HおよびV_L配列は、米国特許第９，３２８，１７２号；第８，３０９，０３５号；および第８，３０９，３１７号に記載され

る方法および材料を用いて、特定することができる。

【００５０】

免疫グロブリン捕捉分子

細胞表面で発現された、本発明の免疫捕捉分子は、以下に詳細に記載されている通り、少なくとも２つの構成成分を含み、また、好ましい実施形態において、さらなる構成成分を含んでよい。シンプルな形態において、免疫グロブリン捕捉分子は、細胞表面テザー構成成分と、免疫グロブリン結合構成成分とを含む。細胞表面テザー構成成分は、発現された免疫グロブリン結合構成成分を細胞表面膜につなぎ止めるか、または固定する膜貫通ペプチドドメインを含んでよく、あるいは、細胞表面テザー構成成分は、免疫グロブリン結合構成成分が細胞表面膜に化学結合を介してつなぎ止められることを可能にする化学的部分（例えば、グリコシルフォスファチジルイノシトール）を含んでもよい。これらの構成成分に加えて、本発明の免疫グロブリン捕捉分子は、ストーク構成成分、１つ以上のリンカー構成成分、および／またはレポーターペプチドを含んでよい。

【００５１】

ある実施形態において、免疫グロブリン捕捉分子は、免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域に天然に親和性を有する１つ以上の免疫グロブリン結合ドメインまたは部分から成る。これらの免疫グロブリン結合タンパク質には、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）由来のプロテインＡ、Ｃ群およびＧ群連鎖球菌（ｇｒｏｕｐ　Ｃ　ａｎｄ　Ｇ　Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ）由来のプロテインＧ、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のプロテインＨ、または、ペプトストレプトコッカス・マグヌス（Ｐｅｐｔｏｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍａｇｎｕｓ）由来のプロテインＬが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、免疫グロブリン捕捉分子は、２つ以上の異なる細菌タンパク質由来の２つ以上の免疫グロブリン結合ドメインを含む、ハイブリッド分子として発現される。一例として、該捕捉分子は、プロテインＧ由来の２つの免疫グロブリン結合ドメインと、プロテインＡ由来の２つの免疫グロブリン結合ドメインとを含有する、融合タンパク質として発現されてよい。この実施形態のいくつかの局面において、細菌の免疫グロブリン結合タンパク質ドメインの１つ以上が、例えば、真核細胞でのグリコシル化もしくは他の翻訳後修飾を受ける可能性のある部位を除去するように、またはある種の免疫グロブリンアイソタイプに対する親和性を改善するために、またはコドン最適化によって哺乳類細胞での翻訳効率を改善するために、改変される。

【００５２】

別の実施形態において、免疫グロブリン捕捉分子は、単鎖可変領域フラグメント（ｓｃＦｖ）から成る。ｓｃＦｖは、別の免疫グロブリン分子の重鎖または軽鎖定常領域（例えば、全てのマウスＩｇＧアイソタイプに存在する共通のエピトープ）に対してモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株由来の、V_HおよびV_Lドメインの融合タンパク質として発現される。いくつかの局面において、ｓｃＦｖ捕捉分子は、グリシン／セリンリッチリンカー配列によって、いずれかの順序でV_Lドメインにタンデムに連結されたV_Hドメインを含む。グリシン／セリンリッチリンカー配列には、［配列番号２９に示す］（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）ｎまたは［配列番号２８に示す］（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）ｎの繰り返しが含まれるが、これらに限定されない。

【００５３】

いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインをコードするポリペプチド配列は、免疫グロブリン捕捉分子を細胞表面につなぎ止めるために、免疫グロブリン結合ドメインに融合している。この実施形態において、好ましくは、膜貫通ドメインは不活性であり（細胞シグナル伝達機能を欠く）、内在化されにくい。この膜貫通ドメインは、人工配列、または主要組織適合クラスＩ（ＭＨＣ　Ｉ）由来のモチーフ、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３またはＣＤ２２３）などのＩｇＳＦ分子、または任意の種の任意の他の膜貫通タンパク質であることができ、タンパク質翻訳時に細胞膜に天然に挿入される。

【００５４】

他の実施形態において、免疫グロブリン捕捉分子は、免疫グロブリン結合ドメインに加えて、グリコシルフォスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）などによる翻訳後修飾のためのＣ末端ペプチド配列を含み、ここでＧＰＩは免疫グロブリン捕捉分子のテザー部分として機能する。ＧＰＩは、ホスホエタノールアミン基、トリマンノシル－非アセチル化グルコサミン（Ｍａｎ３－ＧｌｃＮ）コア、およびタンパク質を細胞膜につなぐホスファチジルイノシトール基を含む正常な翻訳後部分である。ＧＰＩのホスホエタノールアミン基は、ホスホジエステル結合を介して、タンパク質Ｃ末端に連結している。ＧＰＩテザー配列は、この翻訳後プロセスによって天然にＡＳＣ細胞膜に固定されるタンパク質のＣ末端から構成され得る。表３は、免疫グロブリン捕捉分子を構築するのに用いられ得る、例示的なＧＰＩテザー配列またはＧＰＩアンカー配列を列挙している。

【００５５】

特定の実施形態において、免疫グロブリン捕捉分子は、構造的可動性および支持のために、並びに細胞外空間への曝露を増加させるために、「ストーク」構造を含有する。細胞表面は様々な分子が遍在しているため、免疫グロブリンの捕捉分子上に捕捉された免疫グロブリンは、ＡＳＣ表面上の他の分子によって、細胞外空間内のそれらの同種抗原へのアクセスが妨げられ得る。従って、免疫グロブリン捕捉分子内に長いストークを含むことにより、提示された免疫グロブリンによる抗原結合を損なう立体障害を緩和することができる。本発明の好ましい局面において、免疫グロブリン捕捉分子のストークは、１つ以上のＩｇＳＦタンパク質由来の１つ以上の免疫グロブリンドメインを含む。これらのドメインの実施例には、ＣＤ２、ＣＤ４またはＣＤ２２の免疫グロブリンドメインが含まれるが、これらに限定されない。さらに、免疫グロブリン捕捉分子のストークは、２つ以上のサブユニットの巨大分子複合体として発現されてよい。例えば、ＳｃＦｖ含有捕捉分子のストークは、ＩｇＧ分子のC_H2およびC_H3ドメイン、並びにヒンジ領域から成ってよい；従って、免疫グロブリン捕捉分子はホモダイマーとして発現される。

【００５６】

免疫グロブリン捕捉分子の発現

本発明のいくつかの局面において、免疫グロブリン捕捉分子の発現は、ＡＳＣにおいて高度に発現されるが、未熟Ｂ細胞または抗原未経験の成熟Ｂ細胞においては発現されない遺伝子由来のプロモーターにより、駆動される。これらの遺伝子には、Ｂリンパ球誘導成熟タンパク質１（Ｂｌｉｍｐ１）、シンデカン１（Ｓｄｃ１）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１７（Ｔｎｆｒｓｆ１７）、およびフコシルトランスフェラーゼ１（Ｆｕｔ１）が含まれるが、これらに限定されない。ＡＳＣ発現のために選ばれる遺伝子は、マウス起源であってもよく、あるいは、遺伝子が適切に保存された発現パターンを示す別の種由来であってもよい。

【００５７】

いくつかの他の局面において、免疫グロブリン捕捉分子の発現は、テトラサイクリン誘導系またはタモキシフェン誘導系などの、誘導性プロモーターによって駆動される。誘導性プロモーターは、Ｃｒｅなどのリコンビナーゼの発現を介して、直接的または間接的に免疫グロブリン捕捉分子の発現を駆動するために用いられる（例えば、Albanese, et al., Seminars in Cell & Developmental Biology, 13:129-141 (2002); Sakai, Methods in Molecular Biology, 1142:33-40 (2014)参照）。ＡＳＣにおけるこの誘導性発現は、トラスジェニック動物において、またはＡＳＣの培養中、並びにハイブリドーマ培養の段階においてインビトロで達成される。

【００５８】

細胞表面で免疫グロブリン捕捉分子を発現するために、小胞体におけるタンパク質翻訳のためのシグナルペプチドが含まれる。シグナルペプチドは、コンセンサス配列であってよく、あるいは、細胞表面タンパク質または分泌タンパク質の一部として天然に存在する配列であってもよい。本発明の好ましい局面において、シグナルペプチドは、免疫グロブリン重鎖タンパク質［配列番号５～７に示す］または軽鎖タンパク質［配列番号１～３に示す］のものに由来する。

【００５９】
いくつかの局面において、免疫グロブリン捕捉分子に加えて、発現ベクターには、ＧＦＰ、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）などのレポータータンパク質のためのオープンリーディングフレームが含まれていてもよい。発現構築物中のレポーター遺伝子は、例えば、ＩＲＥＳ配列またはピコルナウイルス２Ａリボソームスキップ配列を介して、免疫グロブリン捕捉分子に連結している。レポーター遺伝子の発現は、抗原特異的ＡＳＣの選別のために、抗原選択と組み合わせて使用すると、純度を向上させることができる。
【００６０】
免疫グロブリン捕捉分子のコード配列を、ＡＳＣにおいて高度に発現される遺伝子（例えば、Ｂｌｉｍｐ１またはＴｎｆｒｓｆ１７）を含有するゲノムＤＮＡの大きな断片に挿入することにより、免疫グロブリン捕捉分子の発現を提供するトランスジーンが生成される。該挿入は、コードフラグメントの末端に付加された配列によって媒介される相同組換えによって、または他の標準的な分子生物学的手法によって達成することができる。ゲノムＤＮＡの大きな断片は、細菌性の人工染色体ベクターに含有され得、例えば商業的または公的に入手可能なゲノムＤＮＡライブラリーから得ることができるこれらのベクター中のＤＮＡ断片などが挙げられる。
【００６１】
免疫グロブリン捕捉分子を発現するトランスジェニックマウス（または他の動物）は、本開示を読むことにより当業者に理解されるように、必要な技能を有する任意の施設によって、既知の技術を使用して生成され得る。トランスジーンを保有する動物の分析は、免疫蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリーおよび／またはイムノブロッティングなどの標準的方法を用いて行う。
【００６２】
図２Ａおよび図２Ｂには、１つの実施形態による免疫グロブリン捕捉分子のトランスジーン（２０１）および発現構造（２０２）が図示されている。トランスジーン（２０１）は、１つの介在イントロンを有する２つのエクソン（２０３）［配列番号５～７］を含む。第１エクソンと、第２エクソンの始まりは、リーダーペプチド（例えば、V_Hリーダーペプチド）をコードする。リーダーペプチドコード配列と隣接して、以下の構成成分をコードする配列が存在する：１つ以上の細菌タンパク質に由来する１つ以上の免疫グロブリン結合ドメイン（２０４）［例えば、配列番号８～１１から選択される配列］、グリシン／セリンリッチリンカー（２０５）［例えば、配列番号１２または１３から選択される配列］、「ストーク」構造または領域（２０６）［例えば、配列番号１４～１６から選択される配列］、および膜貫通ドメイン（２０７）［例えば、配列番号１７～２０から選択される配列］。タンパク質翻訳に続いて、リーダーペプチドは、細胞膜（２１２）につなぎ止められた細胞表面タンパク質として発現される、免疫グロブリン捕捉分子（２０２）から切除される。図示されている、免疫グロブリン捕捉分子（２０２）のそれぞれの構成成分（２０８～２１１）は、免疫グロブリン結合ドメイン（２０８）［例えば、配列番号２４～２７から選択される配列］、グリシン／セリンリッチリンカー（２０９）［例えば、配列番号２８または２９から選択される配列］、ストーク（２１０）［例えば、配列番号３０～３２から選択される配列］、および膜貫通ドメイン（２１１）［例えば、配列番号３３～３５から選択される配列］である。
【００６３】
図２Ａに図示されている（発現構造は図２Ｂに図示されている）、免疫グロブリン捕捉分子の構成成分の例示的な核酸配列が、表１に列挙されている。免疫グロブリン捕捉分子は、図２Ａに示す順序で（すなわち、Ｎ末端からＣ末端に）、表１からの各構成成分についてのいくつかの可能なオプションの１つの配列を一緒に組み合わせることによって組み立てることができる。例えば、小さな免疫グロブリン捕捉分子は、たった２つのプロテインＧ免疫グロブリン結合ドメイン、$(グリシン－セリン)_3$リンカー、およびストークを有さない膜貫通ドメインから成り得る；一方、大きな免疫グロブリン捕捉分子は、５つのプロテインＡ免疫グロブリン結合ドメイン、並びに、４つのプロテインＧ免疫グロブリン

結合ドメイン、（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_3$リンカー、６つの免疫グロブリンフォールドで構成されるヒトＣＤ２２ストーク、および長いヒトＣＤ７膜貫通ドメインを含有し得る。

【００６４】

免疫グロブリン捕捉分子の別の実施形態の、発現構築物および分子構造が、図３Ａおよび図３Ｂに図示されている。本発明の該実施形態において、トランスジーン（３０１）は同様に、１つの介在イントロンを有する２つのエクソンによりコードされたリーダー配列（３０３）、続いて、免疫グロブリン分子の一部に対して特異性を有するｓｃＦｖの構成成分をコードする配列（例えば、重鎖または軽鎖定常領域の保存部分）：V_H（３０４）、グリシン／セリンリッチリンカー（３０５）、およびV_L（３０６）を含む。免疫グロブリン捕捉分子を細胞外空間に延長して突出させるために、ｓｃＦｖをコードする配列に、免疫グロブリン分子のヒンジ（３０７）およびＦｃフラグメント（３０８）を含むストークをコードする配列が付加されている。最後に、１つの膜貫通ドメインをコードする１つ以上のエクソン（３０９）もまた、発現構築物（３０１）に含まれる。図３Ｂに示すのは、免疫グロブリン分子のヒンジ（３１３）およびＦｃ（３１４）に結合する、それぞれｓｃＦｖのV_L（３１０）ドメイン、グリシン／セリンリッチリンカー（３１１）、およびV_H（３１２）ドメインからなる２つのサブユニットのホモダイマーとして発現される、免疫グロブリン捕捉分子（３０２）である。免疫グロブリン捕捉分子の免疫グロブリン結合部分の２つのサブユニットは、各鎖のヒンジ領域（３１３）におけるジスルフィド結合を介して共有結合している。発現された免疫グロブリン捕捉分子は、膜貫通ドメイン（３１５）によって、細胞膜（３１６）につなぎ止められるか、あるいは、固定されている。

【００６５】

図４は、免疫グロブリン捕捉分子のｓｃＦＶの実施形態による細胞表面上の免疫グロブリン捕捉分子の提示を図示している。すでに実証されたように、抗体分泌細胞（４０１）は、通常、抗原受容体の膜結合型形態を発現せず、それらが分泌する免疫グロブリン分子（４０２）を細胞表面に提示する能力を欠いている。免疫グロブリン捕捉分子（４０３）のｓｃＦｖバージョンの発現は、免疫グロブリン分子（４０２）のいくつかが小胞体中で合成され、続いて分泌のためにベシクルにパッケージングされるときに、あるいは、それらの分泌の直後に、細胞表面上に保持されることを可能にする。次いで、細胞表面上の捕捉された免疫グロブリン分子（４０２）への抗原（４０４）の結合によって、抗原特異的ＡＳＣが特定される。ＡＳＣ上の抗原結合の検出は、フルオロフォアまたは他の任意のレポーター分子で直接標識された抗原を用いて、達成される。

【００６６】

トランスジェニック細胞ライブラリー

本発明のトランスジェニック細胞はまた、ＡＳＣ表面上の目的の抗体を特定するための発現ライブラリー、好ましくは低複雑性のライブラリーを作製するために用いられる。従って、本発明はまた、ＡＳＣ上に発現された抗原特異的抗体を特定するための、本発明の細胞技術を用いて作製された抗体ライブラリーを含む。

【００６７】

トランスジェニック動物

本発明はまた、ＡＳＣの細胞表面上に免疫グロブリン捕捉分子を発現するように遺伝子組換えしたトランスジェニック動物を提供する。

【００６８】

好ましい局面において、本発明のトランスジェニック動物はさらに、ヒト免疫グロブリン領域を含む。内因性マウス免疫グロブリン領域をヒト免疫グロブリン配列と置換して、創薬目的のために部分的または完全なヒト抗体を作製するための多くの方法が開発されている。これらのマウスの例には、例えば、米国特許番号第７，１４５，０５６号；第７，０６４，２４４号；第７，０４１，８７１号；第６，６７３，９８６号；第６，５９６，５４１号；第６，５７０，０６１号；第６，１６２，９６３号；第６，１３０，３６４号

；第６，０９１，００１号；第６，０２３，０１０号；第５，５９３，５９８号；第５，８７７，３９７号；第５，８７４，２９９号；第５，８１４，３１８号；第５，７８９，６５０号；第５，６６１，０１６号；第５，６１２，２０５号；第および５，５９１，６６９号に記載されるものが含まれる。

【００６９】

抗体のＶ$_H$およびＶ$_L$ドメインをコードするエクソンは、生殖細胞系ＤＮＡに存在しない。代わりに、各Ｖ$_H$またはＶ$_L$エクソンは、Ｈ鎖遺伝子座に存在するランダムに選択されるＶ、ＤおよびＪ遺伝子の組換えによって、または軽鎖遺伝子座におけるランダムに選択されるＶおよびＪ遺伝子の組換えによって、それぞれ生成される。Ｈ鎖遺伝子座には複数のＶ、Ｄ、およびＪ遺伝子が存在し、並びに、各Ｌ鎖遺伝子座には複数のＶおよびＪ遺伝子が存在し、よって、Ｈ鎖ＶＤＪ再編成の順列が、Ｌ鎖ＶＪ遺伝子再配列の順列と組み合わせられた場合に、個体ごとに広範な抗体多様性レパートリーを生成することが可能である。

【００７０】

特に好ましい局面において、本発明のトランスジェニック動物は、同時係属出願である米国出願公開第２０１３／０２１９５３５号に記載されており、本明細書にその全体が参照により組み込まれる。これらのトランスジェニック動物は、内因性非コード配列を変更することなく、内因性非ヒトＶ、Ｄ、およびＪ遺伝子コード配列がヒト起源のものに置換された、部分的に導入されたヒト免疫グロブリン領域を含むゲノムを有する。好ましくは、本発明のトランスジェニック細胞および動物は、内因性免疫グロブリン遺伝子の一部または全部が除去されたゲノムを有する。

【００７１】

他の局面において、本発明のトランスジェニック動物はトリであり、好ましくはニワトリである。

【００７２】

抗体産生における使用

インビトロで細胞を培養することは、多数の治療用バイオテクノロジー産物の産生の基礎となっており、細胞中のタンパク質産物の産生および支持培地への放出を伴う。培養中の増殖する細胞からの経時的なタンパク質産生の量および質は、例えば細胞密度、細胞周期、タンパク質の細胞生合成速度、細胞の生存率および増殖を支持するために用いられる培地の条件、並びに、培養中の細胞の寿命などの、多くの因子に依存する（例えば、Fresney, Culture of Animal Cells, Wiley, Blackwell (2010);および Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Ozturk and Ha, Eds., CRC Press, (2006) 参照）。

【００７３】

モノクローナル抗体などの特定の産物では、実際に該産物を産生する細胞の存在およびタンパク質発現効率を増強することが、効率的なタンパク質産生の重要な局面である。抗体を分泌するＡＳＣの表面上でそれらの抗体を捕捉することは、それらの免疫グロブリン特異性に基づいてＡＳＣを識別する機会を提供し、このことは次に、様々な用途のための抗体の産生を最適化および増強する機会を提供する。

【実施例】

【００７４】

以下の実施例は、当業者に、本発明の実施方法および使用方法の完全な開示および説明を提供するために提示されるものであり、発明者が発明と見なすものの範囲を限定することを意図するものではなく、また、以下の実験が実施された実験の全てであるか、または、実施された唯一の実験であることを、表すか、または、示唆することを意図したものではない。当業者であれば、特定の実施形態に示されるように、広範に記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、本発明に対して多くの変形および／または修正を行うことができることは理解されるであろう。本実施形態は、従って、全ての点で例示的であって、限定的ではないと考えられるべきである。

【００７５】
使用される用語および数字（例えば、ベクター、量、温度など）に関する正確さを保証するための努力がなされているが、いくらかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。他に示さない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧またはそれに近い。
【００７６】
実施例１：最小プロテインＧ含有膜結合型免疫グロブリン捕捉分子の発現
ストークを有さない免疫グロブリン捕捉分子の小さな膜結合型形態をコードする発現ベクターは、直接的なＤＮＡ合成、または、標準的な分子クローニング技術によって生成される。このベクターのタンパク質コード部分（５０１）の図が、図５Ａに示されている。該発現ベクターは、ヒトＬＡＧ３（またはＣＤ２２３）タンパク質由来の膜貫通ドメイン（５０６）［配列番号１７］によって細胞表面につなぎ止められる、連鎖球菌のプロテインＧの２つの免疫グロブリン結合ドメイン（５０４）［配列番号８］をコードする。Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ配列からなる短いリンカー（５０５）（配列番号２８）をコードするＤＮＡのフラグメントは、発現されたタンパク質に構造的可動性を提供するために、プロテインＧ免疫グロブリン結合ドメイン（５０４）をコードするＤＮＡフラグメントと、膜貫通ドメイン（５０６）をコードするＤＮＡフラグメントとの間に配置されている。最後に、シグナルペプチド（リーダーペプチド）（５０３）をコードする配列が該構築物に含まれ、生合成中の小胞体の内腔への免疫グロブリン捕捉分子の押し出しを可能にする。本実施例におけるシグナルペプチド配列は、免疫グロブリン軽鎖可変（V_L）遺伝子セグメントに由来し、その天然のイントロン（５０３）［配列番号１～３］を含む。プロモーターは、（５０２）で示されている。本実施例の免疫グロブリン捕捉分子を含む様々な構成成分のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、表１および表２に明記されている。
【００７７】
発現ベクターを、エレクトロポレーションのなどの通常の利用可能な方法を用いて、様々な骨髄腫、ハイブリドーマまたは他の細胞株にトランスフェクトする。次いで、トランスフェクトされた細胞を、免疫蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、および／または膜タンパク質画分のイムノブロッティングなどの手順を用いて、免疫グロブリン捕捉分子の表面発現について調べる。細胞表面免疫グロブリン捕捉分子が、トランスフェクトされた細胞によって産生された免疫グロブリン、またはそれらに加えられた免疫グロブリンを保持する能力について、これらの手順のサブセットを用いて、細胞をさらに分析する。
【００７８】
図５Ｂは、形状細胞腫細胞株における小さな免疫グロブリン捕捉分子の発現、および、該細胞株が細胞表面上に免疫グロブリン分子を保持する能力を図示する。ヒトＲＰＭＩ８２２６（ＡＴＣＣ（登録商標）　ＣＣＬ－１５５（商標））細胞を、Ｂｌｉｍｐ１プロモーター（５０２）の制御下で免疫グロブリン捕捉分子（５０１）をコードするＤＮＡプラスミドでトランスフェクトした。該細胞を、マウスＩｇＧをコードするプラスミドで、同時トランスフェクトした。トランスフェクトされていない細胞（上図、５０７）と比較して、トランスフェクトされた細胞（下図、５０８）は、細胞表面上に捕捉された免疫グロブリンを示す。
【００７９】
次いで、トランスジェニック動物を生成して、ＡＳＣ上にプロテインＧを含有する膜結合型免疫グロブリン捕捉分子を発現させ、トランスジーンによりコードされた分子がＡＳＣ上で免疫グロブリンを捕捉する能力を、トランスジェニックマウスより取得したＡＳＣ上で、標準的なフローサイトメトリーにより直接決定した。
【００８０】
実施例２：ストークを含有する、プロテインＧ含有膜結合型免疫グロブリン捕捉分子の発現
長いストークを含有する免疫グロブリン捕捉分子の膜結合型形態をコードする発現ベク

ターを、直接的なＤＮＡ合成、または、標準的な分子クローニング技術によって生成する。該発現ベクターは、連鎖球菌のプロテインＧのＣ末端側半分に由来する３つの免疫グロブリン結合ドメイン［配列番号９］をコードする。Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ［配列番号２８］配列からなる短いリンカーをコードするＤＮＡフラグメント、ヒトＣＤ２２タンパク質由来の６つの免疫グロブリンドメインからなるストーク［配列番号１６］、およびヒトＣＤ５８に由来する膜貫通ドメイン［配列番号１８］を、該ベクターの免疫グロブリン結合ドメインをコードするＤＮＡ断片に付加する。最後に、免疫グロブリン捕捉分子のオープンリーディングフレーム全体の前に、シグナルペプチド（リーダーペプチド）をコードする配列を配置して、生合成中の小胞体の内腔への翻訳タンパク質の押し出しを可能にする。本実施例のシグナルペプチドをコードする配列は、免疫グロブリン重鎖可変（V_H）遺伝子セグメントに由来し、天然のイントロンを含む［配列番号５～７］。本実施例の免疫グロブリン捕捉分子を含む構成成分の、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、表１および表２に明記されている。

【００８１】

発現ベクターを、エレクトロポレーションのなどの通常の利用可能な方法を用いて、様々な骨髄腫、ハイブリドーマまたは他の細胞株にトランスフェクトする。次いで、トランスフェクトされた細胞を、免疫蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、および細胞膜タンパク質画分のイムノブロッティングなどの手順を用いて、プロテインＧ分子の表面発現について調べる。細胞表面免疫プロテインＧが、トランスフェクトされた細胞によって産生された免疫グロブリン、またはそれらに加えられた免疫グロブリンを保持する能力について、これらの手順のサブセットを用いて、細胞をさらに分析する。

【００８２】

次いで、トランスジェニック動物を生成して、ＡＳＣ内でプロテインＧ、ＣＤ２２およびＣＤ５８融合体から成る膜結合型免疫グロブリン捕捉分子を発現させ、トランスジーンによりコードされた分子がＡＳＣ上で免疫グロブリンを捕捉する能力を、トランスジェニックマウスより取得したＡＳＣ上で、標準的なフローサイトメトリーにより直接決定する。

【００８３】

実施例３：ＧＰＩ翻訳後修飾により細胞膜に固定されたプロテインＧ含有免疫グロブリン捕捉分子の発現

連鎖球菌のプロテインＧに由来する２つの免疫グロブリン結合ドメインをコードする発現ベクターを合成する。該発現ベクターのプロテインＧをコードする配列の下流には、以下をコードするＤＮＡフラグメントが含まれる：グリシン／セリンリッチリンカー配列、ヒトＣＤ４の２つの免疫グロブリンドメインから成るストーク、およびＧＰＩアンカー配列。最後に、シグナルペプチド配列（リーダー配列）が該構築物に含まれ、生合成中の小胞体の内腔への翻訳タンパク質の押し出しを可能にする。本実施例のシグナルペプチドをコードする配列は、免疫グロブリン軽鎖可変（V_L）遺伝子セグメントに由来し、天然のイントロンを含む。本実施例の免疫グロブリン捕捉分子を含む構成成分の、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、表１および表２に明記されている。ＧＰＩアンカー配列は、表３に明記されている。

【００８４】

発現ベクターを、エレクトロポレーションのなどの通常の利用可能な方法を用いて、様々な骨髄腫、ハイブリドーマまたは他の細胞株にトランスフェクトする。次いで、トランスフェクトされた細胞を、免疫蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、および細胞膜タンパク質画分のイムノブロッティングなどの手順を用いて、プロテインＧ分子の表面発現について調べる。細胞表面プロテインＧが、トランスフェクトされた細胞によって産生された免疫グロブリン、またはそれらに加えられた免疫グロブリンを保持する能力について、これらの手順のサブセットを用いて、細胞をさらに分析する。

【００８５】

次いで、トランスジェニック動物を生成して、ＡＳＣ内でＧＰＩアンカー免疫グロブリ

ン捕捉分子を発現させ、トランスジーンによりコードされた分子がＡＳＣ表面上で免疫グロブリンを捕捉する能力をトランスジェニックマウスより取得したＡＳＣ上で、標準的なフローサイトメトリーにより直接決定する。

【００８６】

実施例４：免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体由来の膜結合型ｓｃＦｖの発現

免疫グロブリンの定常ドメインに特異的なｓｃＦＶをコードする発現ベクターを、標準的な分子クローニングまたは、直接的なＤＮＡ合成によって生成する。本実施例において、単鎖抗体は、正常マウスに見られる抗体のうち９０％を超える抗体に存在する、マウスκ軽鎖の定常ドメインに特異的である。$Ｖ_{Ｌ}$、リンカー、および$Ｖ_{Ｈ}$配列を含むｓｃＦｖをコードするエクソンは、それぞれ、［配列番号４３～４８］に明記されている。該発現ベクターのｓｃＦｖをコードする配列の下流には、以下から成るラットＩｇＧ１のＦｃ部分をコードする連続した配列が含まれる：分泌型形態のヒンジ領域、$Ｃ_{Ｈ}２$ドメイン、および$Ｃ_{Ｈ}３$ドメイン。ラットＩｇＧ１のＦｃをコードする配列は、［配列番号４９］に明記されている。該ベクターはまた、マウスの主要組織適合抗原クラスＩタンパク質（ハプロタイプｂ由来のマウスＫ分子）の膜貫通ドメインをコードする配列を含み、これらは［配列番号５０～５４］に明記されている。

【００８７】

発現ベクターを、エレクトロポレーションのなどの通常の利用可能な方法を用いて、様々な骨髄腫、ハイブリドーマ、および他の細胞株にトランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞を、免疫蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、および細胞膜タンパク質画分のイムノブロッティングなどの手順を用いて、単鎖抗体分子の表面発現について調べる。細胞表面単鎖抗体分子が、トランスフェクトされた細胞によって産生された免疫グロブリン、またはそれらに加えられた免疫グロブリンを保持する能力について、これらの手順のサブセットを用いて、細胞をさらに分析する。

【００８８】

次いで、トランスジェニック動物を生成して、ＡＳＣ上にｓｃＦｖ含有免疫グロブリン捕捉分子を発現させ、トランスジーンによりコードされた分子がＡＳＣ表面上で免疫グロブリンを捕捉する能力を、該マウスより取得したＡＳＣ上で、標準的なフローサイトメトリーにより直接決定する。

【００８９】

実施例５：目的の抗原に対してモノクローナル抗体を産生するＡＳＣを単離するための、免疫グロブリン捕捉分子を発現するトランスジェニック動物の使用

トランスジェニックマウスは、ヒトＴＮＦＲＳＦ１７遺伝子のプロモーター、例えば実施例１～４に示す免疫グロブリン捕捉分子のコード配列、ＩＲＥＳ配列、およびＧＦＰを含有する細菌性の人工染色体ベクターを用いて生成される。いくつかのトランスジェニック樹立系統（ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　ｆｏｕｎｄｅｒ　ｌｉｎｅ）由来の、脾臓、リンパ節、および骨髄を採取して処理し、ＧＦＰ並びに免疫グロブリン捕捉分子の発現を標準的なフローサイトメトリーで解析する。その後、トランスジェニックマウス由来のＧＦＰ陽性細胞をプールし、選別し、免疫グロブリンを分泌する能力について、酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）によって確認する。検出可能なレベルのＧＦＰおよび免疫グロブリン捕捉分子を安定的に発現するトランスジェニック系統を増殖のために選択する。

【００９０】

成体トランスジェニックマウスを、目的の抗原で免疫化する。脾臓並びに関連するリンパ節を、免疫化したマウスから単離し、処理して、フローサイトメトリー解析のために染色する。さらに、単離した細胞を、フローサイトメトリー染色の間に抗原結合に供する。抗原を、標識されたアビジン、ストレプトアビジンまたは類似の系と一緒に使用するために、フルオロフォアまたはビオチンのいずれかで直接標識する。ＡＳＣを、ＧＦＰ陽性染色並びに抗原陽性染色に基づいて選別する。

【００９１】

次いで、当業者によく知られている確立された方法を用いて、精製したＡＳＣを骨髄腫

細胞に融合させて、ハイブリドーマ細胞を生成する。本発明において、免疫グロブリン捕捉分子を発現させるために提供される方法はまた、ＧＦＰ発現に基づく、並びに、細胞表面上に捕捉された抗原の陽性染色に基づく、ハイブリドーマ細胞のスクリーニングを可能にする。

【００９２】

あるいは、精製したＡＳＣを個々に選別し、それらのV_HおよびV_Lドメインをコードする遺伝子を、単一細胞に適合したＲＴ－ＰＣＲまたは５’ＲＡＣＥ技術によってクローニングする。クローニングされたV_HおよびV_Lコード配列は、重鎖および軽鎖の所望の定常領域をコードする配列を含有する発現ベクターに、それぞれサブクローニングする。V_HおよびV_L発現ベクターを、ＨＥＫ－２９３ＴまたはＣＨＯ細胞株にトランスフェクトし、分泌されたモノクローナル抗体をさらに、抗原結合およびその他の機能について試験する。

【表１－１】

表１－例示的な核酸配列

配列番号	説明	対応する構造	配列
1	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Lリーダーエクソン１	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	ATGGACATCAGGGCTCCTGCTCAGTTTCTTG GCATCTTGTTGCTCTGGTTTCCAG
2	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Lイントロン	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	GTAAAATGAACTAAAATGGGAATTTCACTGT AAGTGTTGACAGGCATTTGGGGACTGTGTTC TTTTATCATGCTTACCTTTGTAGATATTCAT TATGTCTCCACTCCTAG
3	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Lリーダーエクソン２	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	GTGCCAGATGTGACATCCAGATG
4	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ ＦＬＡＧ＋Ｍｙｃタグ	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	GACTACAAGGATGACGACGACAAGGGCAGCG GCGAACAGAAGCTGATTTCGGAGGAGGACCT G
5	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Hリーダーエクソン１	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	ATGGGATGGAGCTGTATCATGCTCTTCTTGG CAGCAACAGCTACAG
6	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Hイントロン	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	GTAAGGGGCTCACAGTAGCAGGCTTGAGGTC TGGACATATACATGGGTGACAATGACATCCA CTTTGCCTTTCTCTCCACAG
7	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_H	図２Ａ、２０３ 図３Ａ、３０３ 図５Ａ、５０３	GTGTCCACTCCCAGGTCCAACTG
8	免疫グロブリン結合ドメイン プロテインＧの２つのドメイン	図２Ａ、２０４ 図５Ａ、５０４	GGTACCCCAGCCGTGACCACCTACAAGCTCG TCATCAACGGAAAGACGCTCAAGGGCGAAAC CACTACCAAGGCGGTGGATGCCGAAACCGCC GAAAAGGCCTTCAAGCAGTACGCTAACGACA ATGGGGTGGACGGAGTCTGGACGTACGATGA TGCCACCAAGACTTTCACCGTGACCGAAGTG AACACTCCGGCCGTCACCACTTATAAGCTCG TGATCAACGGGAAAACCCTGAAGGGAGAGAC TACCACAAAGGCCGTGGATGCTGAGACTGCA GAGAAGGCGTTCAAACAGTACGCCAACGACA ACGGCGTGGACGGCGTCTGGACCTACGATGA CGCCACTAAGACCTTCACTGTGACCGAA
9	免疫グロブリン結合ドメイン プロテインＧの３つのドメイン	図２Ａ、２０４ 図５Ａ、５０４	ATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTAAGA CTGACACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAA AACATTGAAAGGCGAAACAACTACTGAAGCT

【表１－２】

配列番号	説明	対応する構造	配列
			GTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCA AACAATACGCTAACGACAACGGTGTTGACGG TGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACC TTTACAGTTACTGAAAAACCAGAAGTGATCG ATGCGTCTGAATTAACACCAGCCGTGACAAC TTACAAACTTGTTATTAATGGTAAAACATTG AAAGGCGAAACAACTACTGAAGCTGTTGATG CTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATA CGCTAACGACAACGGTGTTGACGGTGAATGG ACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAG TTACTGAAAAACCAGAAGTGATCGATGCGTC TGAATTAACACCAGCCGTGACAACTTACAAA CTTGTTATTAATGGTAAAACATTGAAAGGCG AAACAACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAAAC TGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAAC GACAACGGTGTTGATGGTGTTTGGACTTATG ATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGA A
１０	免疫グロブリン結合ドメインプロテインＡの２つのドメイン＋プロテインＧの２つのドメイン	図２Ａ、２０４ 図５Ａ、５０４	GTGGATAACAAGTTCAACAAGGAACAGCAGA ACGCCTTTTACGAGATTCTGCATCTGCCCAA CCTGAATGAGGAACAGCGGAACGCATTCATT CAGTCTCTGAAGGATGATCCTAGCCAGTCGG CCAACCTCCTGGCTGAAGCAAAGAAGCTGAA CGATGCCCAAGCGCCCAAAGTGGACAACAAG TTTAACAAGGAGCAGCAGAATGCTTTCTACG AGATCCTGCACCTCCCGAATCTGAACGAGGA GCAGAGAAACGCCTTCATCCAATCACTGAAG GACGACCCGTCACAGTCCGCCAACCTTCTGG CGGAAGCCAAGAAACTGAACGACGCCCAGGC GCCAAAGGTGGACGGATCCGGGTCCGGCAGC GGTACCCCAGCCGTGACCACCTACAAGCTCG TCATCAACGGAAAGACGCTCAAGGGCGAAAC CACTACCAAGGCGGTGGATGCCGAAACCGCC GAAAAGGCCTTCAAGCAGTACGCTAACGACA ATGGGGTGGACGGAGTCTGGACGTACGATGA TGCCACCAAGACTTTCACCGTGACCGAAGTG AACACTCCGGCCGTCACCACTTATAAGCTCG TGATCAACGGGAAAACCCTGAAGGGAGAGAC TACCACAAAGGCCGTGGATGCTGAGACTGCA GAGAAGGCGTTCAAACAGTACGCCAACGACA ACGGCGTGGACGGCGTCTGGACCTACGATGA CGCCACTAAGACCTTCACTGTGACCGAA
１１	免疫グロブリン結合ドメインプロテインＡの５つのドメイ	図２Ａ、２０４ 図５Ａ、５０４	GCCAATGCCGCCCAGCACGACGAGGCTCAGC AGAACGCATTCTACCAGGTGCTGAACATGCC

【表１－３】

配列番号	説明	対応する構造	配列
	ン＋プロテインＧの４つのドメイン		AAACCTCAACGCCGATCAGCGCAATGGTTTC ATTCAGTCCCTGAAGGACGATCCGAGCCAGT CAGCTAACGTGCTCGGGGAGGCCCAAAAGCT GAATGACTCCCAGGCGCCGAAGGCCGACGCC CAGCAAAACAACTTCAACAAGGATCAGCAAT CCGCCTTCTATGAAATCCTGAATATGCCTAA CCTGAACGAAGCTCAGCGGAACGGGTTCATC CAGAGCCTTAAGGACGACCCTAGCCAGTCCA CCAACGTGCTGGGGGAGGCCAAGAAACTTAA CGAATCCCAGGCCCCGAAGGCGGACAACAAC TTTAACAAGGAACAGCAGAACGCCTTTTACG AGATCCTCAACATGCCGAACCTCAACGAGGA ACAGCGCAACGGTTTCATCCAGTCCCTGAAG GACGATCCATCCCAGTCCGCCAACCTGTTGA GCGAGGCGAAGAAGCTGAATGAGTCCCAAGC CCCCAAGGCTGACAACAAGTTCAATAAGGAA CAACAGAATGCCTTCTACGAAATTCTGCACT TGCCCAATCTGAACGAGGAGCAGCGCAACGG CTTCATCCAATCTCTGAAAGACGACCCGTCG CAGTCGGCCAACTTGCTGGCCGAAGCCAAGA AGCTCAACGACGCTCAGGCCCCTAAGGCCGA CAACAAGTTCAACAAAGAGCAACAGAACGCG TTCTACGAGATTCTCCACTTGCCGAACCTGA CCGAAGAACAACGGAACGGATTCATTCAGAG CCTGAAGGATGACCCTTCGGTGTCAAAGGAG ATCCTGGCAGAAGCCAAAAAGCTGAACGATG CCCAGGCACCAAAGGAAGAGGACAACAACAA GCCGGGCGACCCGAGGATCTCCGAAGCCACT GATGGGCTGTCCGATTTTCTGAAGTCACAGA CTCCTGCTGAGGACACCGTGAAGTCCATCGA GCTCGCCGAGGCCAAGGTGCTGGCCAACCGG GAGCTGGATAAGTACGGAGTGTCCGACTACT ACAAAAACCTGATTAACAACGCCAAGACTGT GGAAGGAGTGAAGGCATTGATCGATGAAATC CTGGCGGCGCTCCCAAAAACCGACACCTACA AACTGATTCTCAACGGAAAGACGCTGAAGGG GGAAACTACCACCGAAGCGGTGGACGCCGCC ACCGCCGAAAAGGTGTTTAAGCAGTATGCTA ACGACAACGGTGTCGACGGAGAGTGGACCTA CGACGACGCCACTAAGACTTTCACCGTGACC GAGAAGCCCGAGGTCATCGACGCGAGCGAGC TCACTCCCGCCGTGACCACCTACAAGCTGGT CATCAATGGAAAGACTCTGAAGGGCGAAACT ACTACTGAAGCCGTGGATGCGGCAACCGCCG AGAAAGTGTTCAAGCAATACGCAAACGATAA

【表１－４】

配列番号	説明	対応する構造	配列
			CGGGGTGGACGGAGAGTGGACCTACGACGAT GCCACAAAGACCTTCACCGTCACCGAAAAGC CCGAAGTGATCGACGCTTCCGAACTGACGCC GGCCGTGACAACTTACAAGCTCGTCATTAAC GGAAAGACCCTTAAGGGCGAAACCACGACCA AGGCAGTGGACGCCGAAACTGCCGAGAAGGC GTTCAAGCAGTACGCCAACGACAACGGCGTG GACGGAGTGTGGACTTACGATGATGCGACCA AGACGTTCACTGTGACCGAGATGGTCACCGA AGTGCCG
１２	グリシン／セリンリンカー	図２Ａ、２０５ 図３Ａ、３０５ 図５Ａ、５０５	GGATCCGGCTCCGGATCC
１３	グリシン／セリンリンカー	図２Ａ、２０５ 図３Ａ、３０５ 図５Ａ、５０５	GGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGG GAGGCGGAGGCTCG
１４	ストーク ラットＣＤ２	図２Ａ、２０６ 図５Ａ、５０６	GAGATGGTGTCCAAGCCGATGATCTACTGGG AGTGTTCCAACGCGACTCTGACCTGTGAAGT GCTGGAGGGAACCGACGTGGAACTGAAGCTG TACCAGGGTAAAGAACATCTGCGGTCGTTGC GCCAAAAGACCATGAGCTACCAGTGGACCAA CTTGCGGGCGCCTTTCAAGTGCAAAGCCGTC AATAGAGTGTCCCAGGAGAGCGAAATGGAGG TCGTGAACTGCCCCGAAAAGGGACTG
１５	ストーク ラットＣＤ４	図２Ａ、２０６ 図５Ａ、５０６	TCAACTTCCATCACCGCCTACAAGAGCGAGG GAGAGAGCGCCGAGTTTTCCTTCCCCCTGAA CCTGGGCGAAGAAAGCCTCCAGGGAGAACTG CGCTGGAAGGCAGAAAAGGCCCCAAGCTCTC AGTCCTGGATCACCTTCAGCCTGAAGAACCA GAAGGTGTCCGTGCAGAAGTCCACTTCAAAC CCGAAGTTCCAGCTCTCCGAAACCCTCCCTC TGACCCTGCAAATCCCTCAAGTGTCGCTGCA ATTCGCGGGGAGCGGAAATCTGACTCTGACT CTTGACCGGGGCATCTTGTACCAGGAGGTGA ACCTGGTGGTCATGAAGGTGACCCAGCCCGA TAGCAACACCCTGACCTGTGAAGTGATGGGA CCCACGTCCCCGAAGATGCGGCTCATTCTGA AGCAGGAGAACCAGGAGGCTCGGGTGTCCAG ACAGGAAAAGGTCATCCAAGTGCAGGCCCCG GAAGCCGGCGTGTGGCAGTGCCTGCTGTCCG AGGGAGAGGAAGTCAAGATGGACTCGAAAAT CCAGGTGCTGTCCAAAGGGCTGAACCAGACT ATG
１６	ストーク	図２Ａ、２０６	GAAAGGCCTTTTCCACCTCATATCCAGCTCC

【表１－５】

配列番号	説明	対応する構造	配列
	ヒトＣＤ２２	図５Ａ、５０６	CTCCAGAAATTCAAGAGTCCCAGGAAGTCAC TCTGACCTGCTTGCTGAATTTCTCCTGCTAT GGGTATCCGATCCAATTGCAGTGGCTCCTAG AGGGGGTTCCAATGAGGCAGGCTGCTGTCAC CTCGACCTCCTTGACCATCAAGTCTGTCTTC ACCCGGAGCGAGCTCAAGTTCTCCCCACAGT GGAGTCACCATGGGAAGATTGTGACCTGCCA GCTTCAGGATGCAGATGGGAAGTTCCTCTCC AATGACACGGTGCAGCTGAACGTGAAGCACA CCCCGAAGTTGGAGATCAAGGTCACTCCCAG TGATGCCATAGTGAGGGAGGGGGACTCTGTG ACCATGACCTGCGAGGTCAGCAGCAGCAACC CGGAGTACACGACGGTATCCTGGCTCAAGGA TGGGACCTCGCTGAAGAAGCAGAATACATTC ACGCTAAACCTGCGCGAAGTGACCAAGGACC AGAGTGGGAAGTACTGCTGTCAGGTCTCCAA TGACGTGGGCCCGGGAAGGTCGGAAGAAGTG TTCCTGCAAGTGCAGTATGCCCCGGAACCTT CCACGGTTCAGATCCTCCACTCACCGGCTGT GGAGGGAAGTCAAGTCGAGTTTCTTTGCATG TCACTGGCCAATCCTCTTCCAACAAATTACA CGTGGTACCACAATGGGAAAGAAATGCAGGG AAGGACAGAGGAGAAAGTCCACATCCCAAAG ATCCTCCCCTGGCACGCTGGGACTTATTCCT GTGTGGCAGAAAACATTCTTGGTACTGGACA GAGGGGCCCGGGAGCTGAGCTGGATGTCCAG TATCCTCCCAAGAAGGTGACCACAGTGATTC AAAACCCCATGCCGATTCGAGAAGGAGACAC AGTGACCCTTTCCTGTAACTACAATTCCAGT AACCCCAGTGTTACCCGGTATGAATGGAAAC CCCATGGCGCCTGGGAGGAGCCATCGCTTGG GGTGCTGAAGATCCAAAACGTTGGCTGGGAC AACACAACCATCGCCTGCGCAGCTTGTAATA GTTGGTGCTCGTGGGCCTCCCCTGTCGCCCT GAATGTCCAGTATGCCCCCCGAGACGTGAGG GTCCGGAAAATCAAGCCCCTTTCCGAGATTC ACTCTGGAAACTCGGTCAGCCTCCAATGTGA CTTCTCAAGCAGCCACCCCAAAGAAGTCCAG TTCTTCTGGGAGAAAAATGGCAGGCTTCTGG GGAAAGAAAGCCAGCTGAATTTTGACTCCAT CTCCCCAGAAGATGCTGGGAGTTACAGCTGC TGGGTGAACAACTCCATAGGACAGACAGCGT CCAAGGCCTGGACACTTGAAGTGCTGTATGC ACCCAGGAGGCTGCGTGTGTCCATGAGCCCG GGGGACCAAGTGATGGAGGGGAAGAGTGCAA

【表１－６】

配列番号	説明	対応する構造	配列
			CCCTGACCTGTGAGAGCGACGCCAACCCTCC CGTCTCCCACTACACCTGGTTTGACTGGAAT AACCAAAGCCTCCCCTACCACAGCCAGAAGC TGAGATTGGAGCCGGTGAAGGTCCAGCACTC GGGTGCCTACTGGTGCCAGGGGACCAACAGT GTGGGCAAGGGCCGTTCGCCTCTCAGCACCC TCACCGTCTACTATAGCCCGGAGACC
１７	膜貫通ドメイン ヒトＬＡＧ３	図２Ａ、２０７ 図５Ａ、５０７	GCGCCTGGAGCGCTGCCGGCCGGTCATCTGT TGTTGTTCCTGACCCTGGGGGTGCTGTCACT GCTGCTGCTCGTGACCGGGGCATTCGGTTTC CACCTGTGGAGAAGGCAGTGGCGGTAG
１８	膜貫通ドメイン ヒトＣＤ５８	図２Ａ、２０７ 図５Ａ、５０７	CATTCCCGGCACCGCTACGCGCTGATTCCGA TTCCTCTGGCCGTGATCACCACCTGTATCGT GCTCTACATGAACGGTATCCTGAAATGCGAC AGAAAGCCCGACAGGACTAACAGCAATTAG
１９	膜貫通ドメイン ラットＣＤ２	図２Ａ、２０７ 図５Ａ、５０７	CCGCTGTACCTGATCGTGGGGGTGTCAGCCG GCGGTCTGCTGCTCGTGTTCTTCGGGGCACT GTTCATCTTCTGCATTTGCAAGAGGAAGAAG CGGTAG
２０	膜貫通ドメイン ヒトＣＤ７	図２Ａ、２０７ 図５Ａ、５０７	CCACCCCGGGCGTCCGCACTGCCGGCGCCCC CTACCGGAAGCGCGCTGCCCGATCCGCAAAC CGCCAGCGCCCTGCCTGACCCGCCCGCGGCT AGCGCCTTGCCTGCCGCACTGGCCGTGATTT CATTCCTGCTGGGTCTGGGGCTCGGGGTGGC CTGCGTGTTGGCACGGACTCAGATCAAGAAG CTGTGCTCCTGGAGAGACAAAAACTCCGCCG CCTGTGTGGTGTACGAGGACATGTCACACTC GAGGTGCAATACCCTGTCCTCGCCGAACCAG TACCAGTAG

【表２－１】

表２－例示的なペプチド配列

配列番号	説明	対応する構造	配列
２１	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Lリーダーエクソン		MGWSCIMLFLAATATGVHSQVQL
２２	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ ＦＬＡＧ＋Ｍｙｃタグ		DYKDDDDKGSGEQKLISEEDL
２３	リーダー エクソン１／イントロン／ エクソン２／タグ V_Hリーダーエクソン		MDIRAPAQFLGILLLWFPGARCDIQM
２４	免疫グロブリン結合ドメイン プロテインＧの２つのドメイン	図２Ｂ、２０８	GTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTEV NTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTE
２５	免疫グロブリン結合ドメイン プロテインＧの３つのドメイン	図２Ｂ、２０８	IDEILAALPKTDTYKLILNGKTLKGETTTEA VDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKT FTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTL KGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEW TYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYK LVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYAN DNGVDGVWTYDDATKTFTVTE
２６	免疫グロブリン結合ドメイン プロテインＡの２つのドメイン＋プロテインＧの２つのドメイン	図２Ｂ、２０８	VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFI QSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKVDNK FNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLK DDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKVDGSGSGS GTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTEV NTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTE
２７	免疫グロブリン結合ドメイン プロテインＡの５つのドメイン＋プロテインＧの４つのドメイン	図２Ｂ、２０８	ANAAQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGF IQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPKADA QQNNFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFI QSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKADNN FNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLK DDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKE QQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPS QSANLLAEAKKLNDAQAPKADNKFNKEQQNA FYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKE ILAEAKKLNDAQAPKEEDNNKPGDPRISEAT DGLSDFLKSQTPAEDTVKSIELAEAKVLANR

【表２－２】

配列番号	説明	対応する構造	配列
			ELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEI LAALPKTDTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAA TAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVT EKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGET TTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDD ATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVIN GKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGV DGVWTYDDATKTFTVTEMVTEVP
２８	グリシン／セリンリンカー	図２Ｂ、２０９	GSGSGS
２９	グリシン／セリンリンカー	図２Ｂ、２０９	GGGGSGGGGSGGGGS
３０	ストーク ラットＣＤ２	図２Ｂ、２１０	EMVSKPMIYWECSNATLTCEVLEGTDVELKL YQGKEHLRSLRQKTMSYQWTNLRAPFKCKAV NRVSQESEMEVVNCPEKGL
３１	ストーク ラットＣＤ４	図２Ｂ、２１０	STSITAYKSEGESAEFSFPLNLGEESLQGEL RWKAEKAPSSQSWITFSLKNQKVSVQKSTSN PKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGSGNLTLT LDRGILYQEVNLVVMKVTQPDSNTLTCEVMG PTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAP EAGVWQCLLSEGEEVKMDSKIQVLSKGLNQT M
３２	ストーク ヒトＣＤ２２	図２Ｂ、２１０	MKVTQPDSNTLTCEVMGPTSPKMRLILKQEN QEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEE VKMDSKIQVLSKGLNQTM
３３	膜貫通ドメイン ヒトＬＡＧ３	図２Ｂ、２１１	APGALPAGHLLLFLTLGVLSLLLLVTGAFGF HLWRRQWR
３４	膜貫通ドメイン ヒトＣＤ５８	図２Ｂ、２１１	HSRHRYALIPIPLAVITTCIVLYMNGILKCD RKPDRTNSN
３５	膜貫通ドメイン ラットＣＤ２	図２Ｂ、２１１	PLYLIVGVSAGGLLLVFFGALFIFCICKRKK R
３６	膜貫通ドメイン ヒトＣＤ７	図２Ｂ、２１１	PPRASALPAPPTGSALPDPQTASALPDPPAA SALPAALAVISFLLGLGLGVACVLARTQIKK LCSWRDKNSAACVVYEDMSHSRCNTLSSPNQ YQ

【表３】

表３－ＧＰＩアンカー配列

配列番号	説明	配列
３７	ヒトＣＤ５９	GAATTCCTTGAAAATGGTGGGACATCCTTATCAGAGAAAACAGTTCTT CTGCTGGTGACTCCATTTCTGGCAGCAGCCTGGAGCCTTCATCCC
３８	ヒトＣＤ５９	EFLENGGTSLSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP
３９	ヒトＣＤ２４	ACCAATGCCACAACAAAGGCAGCAGGGGGAGCACTCCAGTCAACAGCA AGTTTGTTTGTCGTGTCACTGAGTCTCTTGCATCTTTATTCA
４０	ヒトＣＤ２４	TNATTKAAGGALQSTASLFVVSLSLLHLYS
４１	ヒトＣＮＴＮ１ （コンタクチン１）	GTCTCCCAGGTGAAAATTTCAGGAGCCCCTACCCTCTCCCCATCCCTC CTGGGTTTGCTGCTGCCCGCCTTTGGCATTCTCGTGTATCTGGAGTTC
４２	ヒトＣＮＴＮ１ （コンタクチン１）	VSQVKISGAPTLSPSLLGLLLPAFGILVYLEF

【表４－１】

表４－実施例４の配列

配列番号	説明	配列
４３	V_Lリーダーエクソン１	ATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTG
４４	V_Lイントロン	GTAAGAAATTTAAAGTATTAAAACCTTTTCAAAGTTTCATCTTTGTGGTAAGAAATTTGCAATATGTGCCAGTGTGTAATATTTCTTACATAATAAATTTGTGACAGTATGATAAGGACATTTAAATGAAAAATTTCGACTGTTGTTATAATCTATGTCTGTGTATCTATGAATTTTCACTGCCTATTAATTATTACAG
４５	ＶＬリーダー配列のV_Lエクソン２末端	GTGCCTGTGCA
４６	V_Lエクソン２	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTGTGTCTCTGGGAGACACAGTCACTATTACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTTGGGATTTATGTAAACTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTATCGTGCAACGAACTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTAGGTCTGGATCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGATGTGGCAGACTATCACTGTCTACAGTATGATGAGTATCCATTCACGTTCGGATCCGGGACGAAGTTGGAAATAAAACGG
４７	V_Lエクソン２リンカー	GGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCG
４８	V_Hエクソン２	CAGGTACAGCTGAAAGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCCCTCACAGACCCTGTCTCTCACCTGCACTGTCTCTGGACTCTCATTAATCAGTTATGGTGTAAGTTGGGCTCGCCAGCCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGCAGCAATATCAAGTGGTGGAAGCACATATTATAATTCAGTTCTCACATCTCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGAAGACACAGCCATTTACTTCTGTACCAGAGAACTCTGGGACTACTATGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA
４９	エクソン２－ラットＩｇＧ１Ｆｃ	GCTGAAACAACAGCCCCCAGAAACCCGGGAGGTGATTGCAAGCCTTGTATATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTAGCCAGGACGATCCCGAGGTCCATTTCAGCTGGTTTGTAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCGACCACCAGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTCCCCATCCTGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAGGACGTTCAGATGCAAGGTCACCAGTGCAGCTTTCCCATCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCCGAAGGCAGAACACAAGTTCCGCATGTATACACCATGTCACCTACCAAGGAAGAGATGACCCAGAATGAAGTCAGTATCACCTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCCAGACATTTATGTGGAGTGGCAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAAACTACAAGAACACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTTACTTCCTCTACAGCAAGCTCAATGTGAAGAAGGAAAAATGGCAGCAGGGAAACACGTTCACGTGTTCTGTGCTGCATGAAGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGTCTCTCCCACTCCCCCGGT
５０	マウスMHＣＩ（Ｈ２Ｋᵇ）膜貫通ドメインの	AAAGAGCCTCCTCCATCCACTGTCTCCAACATGGCGACCGTTGCTGTTCTGGTTGTCCTTGGAGCTGCAATAGTCACTGGAGCTGTGGTGGCTTTT

【表４－２】

配列番号	説明	配列
	エクソン２部分	GTGATGAAGATGAGAAGGAGAAACACAG
５１	イントロン	GTAGGAAAGGGCAGAGTCTGAGTTTTCTCTCAGCCTCCTTTAGAGTGT GCTCTGCTCATCAATGGGGAACACAGGCACACCCCACATTGCTACTGT CTCTAACTGGGTCTGCTGTCAGTTCTGGGAACTTCCTAGTGTCAAGAT CTTCCTGGAACTCTCACAGCTTTTCTTCTCACAG
５２	マウスMHCＩ（H２K^{b}）膜貫通ドメインのエクソン３部分	GTGGAAAAGGAGGGGACTATGCTCTGGCTCCAG
５３	イントロン	GTTAGTGTGGGGACAGAGTTGTCCTGGGGACATTGGAGTGAAGTTGGA GATGATGGGAGCTCTGGGAATCCATAATAGCTCCTCCAGAGAAATCTT CTAGGTGCCTGAGTTGTGCCATGAAATGAATATGTACATGTACATATG CATATACATTTGTTTTGTTTTACCCTAG
５４	マウスMHCＩ（H２K^{b}）膜貫通ドメインのエクソン４末端	GCTCCCAGACCTCTGATCTGTCTCTCCCAGATTGTAAAGGTGACACTC TAGGGTCTGATTGGGGAGGGGCAATGTGGACATGA
５５	V_Lリーダー	MESQTQVLMFLLLWVSGACA
５６	V_L	DIQMTQSPSSMSVSLGDTVTITCRASQDVGIYVNWFQQKPGKSPRRMI YRATNLADGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDVADYHCLQYDEYPF TFGSGTKLEIKR
２９	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGS
５７	V_H	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGLSLISYGVSWARQPPGKGLEWI AAISSGGSTYYNSVLTSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCT RELWDYYDYWGQGVMVTVSS
５８	ラットＩｇＧ１Ｆｃ	AETTAPRNPGGDCKPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCV VVDISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRSVSELPILH QDWLNGRTFRCKVTSAAFPSPIEKTISKPEGRTQVPHVYTMSPTKEEM TQNEVSITCMVKGFYPPDIYVEWQMNGQPQENYKNTPPTMDTDGSYFL YSKLNVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG
５９	マウスMHCＩ（H２K^{b}）膜貫通ドメイン	KEPPPSTVSNMATVAVLVVLGAAIVTGAVVAFVMKMRRRNTGGKGGDY ALAPGSQTSDLSLPDCKGDTLGSDWGGAMWT

【００９３】

以上の記載は単に本発明の原理を例示するにすぎない。当業者であれば、本明細書に明示的に記載または図示していないが、本発明の原理を具体化し、その精神および範囲内に含まれる様々な構成を考案できることが理解されるであろう。さらに、本明細書に記載されているすべての例および条件の言い回しは、主として、本発明の原理および発明者が当該技術を促進することに貢献する概念を理解する上で読み手を助けることを意図しているものであり、これらの具体的に記載された例および条件に限定されるものではないと解釈されるべきである。その上、本発明の原理、局面、および実施形態ならびにそれらの具体例を記載する本明細書におけるすべての記述は、それらの構造的および機能的等価物の両方を包含することが意図されている。加えて、これらの等価物には、現在知られている等価物と将来開発される等価物の両方、すなわち、構造にかかわらず同じ機能を実行する任意の開発される要素が含まれることが意図されている。従って、本発明の範囲は、本明細書で示された、および、記載された例示的実施形態に限定されることを意図していない。むしろ、本発明の範囲および精神は、添付の特許請求の範囲によって具体化される。以下の特許請求の範囲において、「手段」という用語が使用されていない限り、そこに列挙された特徴または要素のいずれも、米国特許法第１１２条第６項に基づくミーンズ・プラス・ファンクションの限定として解釈されるべきではない。

【図１】

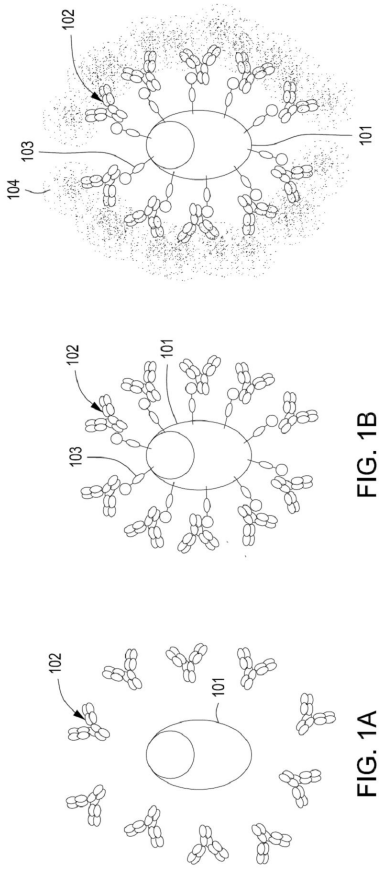

FIG. 1C

FIG. 1B

FIG. 1A

【図２】

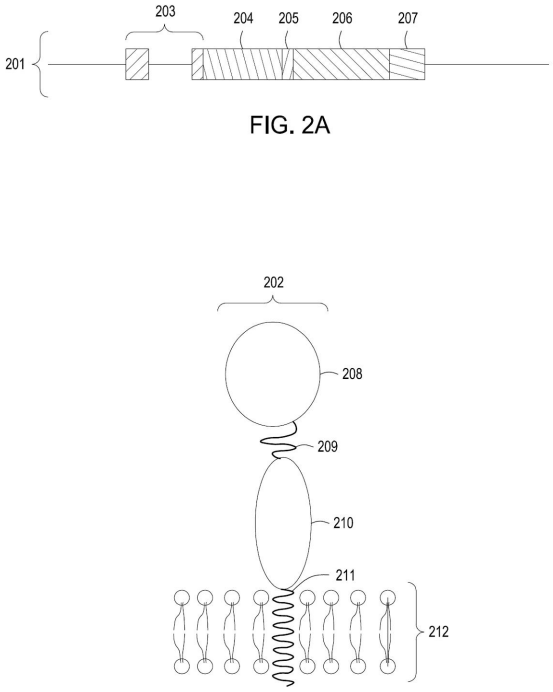

FIG. 2A

FIG. 2B

【図３】

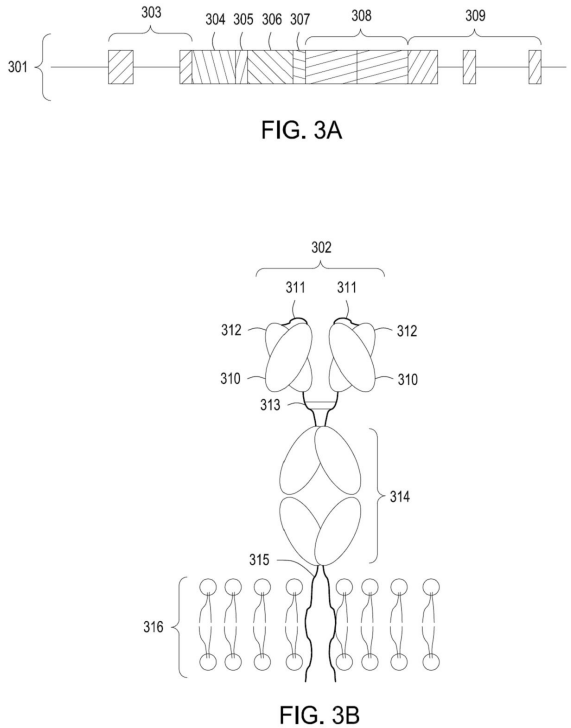

FIG. 3A

FIG. 3B

【図４】

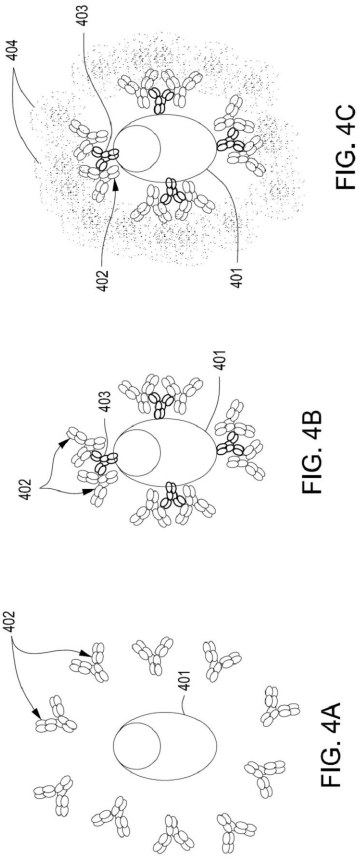

FIG. 4C

FIG. 4B

FIG. 4A

【図５】

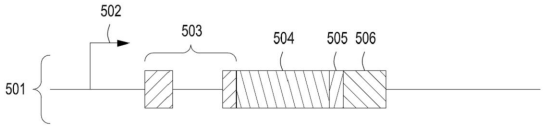

FIG. 5A

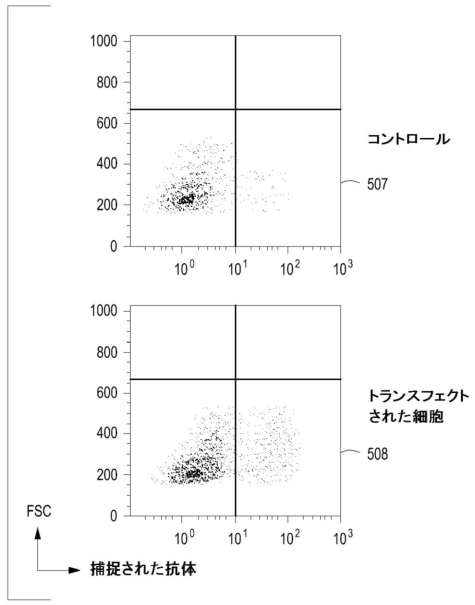

FIG. 5B

【配列表】

0006929877000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C12N 5/0781 (2010.01) C12N 5/0781
C12P 21/08 (2006.01) C12P 21/08

(72)発明者 ナイジェル・キリーン
アメリカ合衆国９４１２２カリフォルニア州サンフランシスコ、フィフス・アベニュー１５１５番
(72)発明者 クリストフ・ハーゼンヒンドル
アメリカ合衆国９４１２２カリフォルニア州サンフランシスコ、フィフス・アベニュー１５１５番
(72)発明者 バオ・ドゥオン
アメリカ合衆国９４１２２カリフォルニア州サンフランシスコ、フィフス・アベニュー１５１５番

審査官 林 康子

(56)参考文献 特表２００４－５２５６２７（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５２００３７（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５２７５７６（ＪＰ，Ａ）
Ｊ Immunol Methods, ２００９年, 343, 28-41

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／８５
Ｃ０７Ｋ １６／００