

(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2011-523348

(P2011-523348A)

(43) 公表日 平成23年8月11日(2011.8.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
<b>G O 1 N 33/53</b> (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2010-545417 (P2010-545417)	(71) 出願人 502247787 モルフォシス・アー・ゲー ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2・マルティン スリード／プラネック, レナークリストー シュトラーセ 4 8
(86) (22) 出願日 平成21年2月11日 (2009. 2. 11)	
(85) 翻訳文提出日 平成22年10月1日 (2010. 10. 1)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2009/000953	
(87) 国際公開番号 W02009/100896	
(87) 国際公開日 平成21年8月20日 (2009. 8. 20)	(74) 代理人 100096024 弁理士 柏原 三枝子
(31) 優先権主張番号 08151276.6	(74) 代理人 100125520 弁理士 高橋 剛一
(32) 優先日 平成20年2月11日 (2008. 2. 11)	(74) 代理人 100155310 弁理士 柴田 雅仁
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者 エンツェルベルガー, マルクス ドイツ連邦共和国 プラネック-マルティ ンスリート 8 2 1 5 2, パスツールシュ トラーセ 4 1
(31) 優先権主張番号 61/027, 507	
(32) 優先日 平成20年2月11日 (2008. 2. 11)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 61/045, 039	
(32) 優先日 平成20年4月15日 (2008. 4. 15)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体又は標的の同定のための方法

(57) 【要約】

本開示は、サンプル中の免疫グロブリンのレパートリ配列データを分析することによって、及び前記サンプル中にある最も優性のV H及びV L鎖を決定することによって、抗体、標的分子、又は病原体を同定するための方法、ならびにその方法で用いられる材料に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サンプル中の抗体、標的、又は病原体を同定する方法であって、

a) 前記サンプル中の免疫グロブリンをコード化する mRNA の cDNA を取得するステップであって、これによって前記 cDNA の混合物を取得するステップと；

b) 前記免疫グロブリンの可変重 (VH) 鎖及び可変軽 (VL) 鎖のうち少なくとも代表的なサンプルを直接的に配列決定するステップであって、これによって前記サンプル中にある前記免疫グロブリンの VH 及び VL 鎖の配列データを取得するステップと；

c) コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、前記サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖を決定するステップと；

d) 前記サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖をコード化するポリヌクレオチドを合成し、発現ベクタを用いて前記 VH 及び VL 鎖を含む抗体を産生するステップと；

e) 前記抗体を試験するステップであって、これによって前記抗体又は前記標的を同定するステップと；

を具備することを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプルが生物学的サンプルであることを特徴とする方法。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記生物学的サンプルが哺乳類由来であることを特徴とする方法。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、前記哺乳類がヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマであることを特徴とする方法。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法において、前記ヒトが癌患者であるか、前記ヒトが免疫化されるか、あるいは前記ヒトが病原体又は標的分子に感染することを特徴とする方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法において、前記免疫グロブリンをコード化する mRNA が、前記サンプルから B 細胞を収集又は単離することによって取得されることを特徴とする方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法において、前記免疫グロブリンが IgG クラスであることを特徴とする方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法において、前記免疫グロブリンをコード化する mRNA の cDNA がステップ (a) で、逆転写 PCR によって産生されることを特徴とする方法。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法において、IgG に特異的なプライマーが用いられることを特徴とする方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖が、前記サンプル中にある前記 VH 及び VL 鎖の配列データを分析することによって決定されることを特徴とする方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法において、ステップ (a) ないし (c) がいかなるクローニングステップも要求しないことを特徴とする方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法において、ステップ (d) で合成された前記 VH 及び VL のポリヌクレオチドが発現ベクタに組み込まれることを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

請求項 13 に記載の方法において、前記発現ベクターが哺乳類発現ベクターであることを特徴とする方法。

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の方法において、ステップ (d) で産生される前記抗体が培養基に放出されることを特徴とする方法。

## 【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法において、前記抗体の試験がステップ (e) で、イムノアッセイを用いることによって行われることを特徴とする方法。

## 【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法において、抗体がステップ (e) で同定され、特定の標的分子又は組織に結合することを特徴とする方法。

## 【請求項 17】

請求項 1 に記載の方法において、標的分子がステップ (e) で同定され、特定の抗体に結合することを特徴とする方法。

## 【請求項 18】

抗体、標的、又は病原体を同定する方法であって、

a) 免疫化されるか、病原体又は標的分子に感染するか、あるいは癌を患う哺乳類から生物学的サンプルを提供するステップと；

b) 前記生物学的サンプルから B 細胞を収集するステップと；

c) 収集された前記 B 細胞から mRNA を取得するステップと；

d) 前記 mRNA によってコード化された、免疫グロブリンの cDNA を産生するステップであって、これによって前記 cDNA の混合物を取得するステップと；

e) 前記免疫グロブリンの可変重 (VH) 鎖及び可変軽 (VL) 鎖のうちの少なくとも代表的なサンプルを直接的に配列決定するステップであって、これによって、前記サンプル中にある前記免疫グロブリンの VH 及び VL 鎖の配列データを取得するステップと；

f) コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、前記サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖を決定するステップと；

h) 前記サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖をコード化するポリヌクレオチドを合成するステップと；

i) 合成された VH 及び VL の前記ポリヌクレオチドを、哺乳類発現ベクターに組み込むステップと；

j) VH 及び VL ポリヌクレオチド組み込み型ベクターが前記 VH 及び VL のポリヌクレオチドを発現するのを可能にするステップであって、これによって抗体が産生されるステップと；

k) イムノアッセイを用いることによって前記抗体を試験するステップであって、これによって前記抗体、標的、又は病原体を同定するステップと；

を具えることを特徴とする方法。

## 【請求項 19】

サンプル中の抗体、標的、又は病原体を同定する方法であって、

a) 前記サンプル中にある VH 及び VL 鎖の配列データを分析するステップと；

b) 前記サンプル中にある VH 及び VL 鎖の存在量を決定するステップと；

を具えることを特徴とする方法。

## 【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法が、ステップ b) で同定される豊富な VH 及び VL 鎖を含む 1 又はそれ以上の免疫グロブリンを調製するステップを更に具えることを特徴とする方法。

## 【請求項 21】

請求項 18 ないし 20 のいずれかに記載の方法において、前記サンプルが生物学的サンプルであることを特徴とする方法。

## 【請求項 22】

10

20

30

40

50

請求項 2 1 に記載の方法において、前記生物学的サンプルが哺乳類由来であることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の方法において、前記哺乳類がヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマであることを特徴とする方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法において、前記ヒトが癌患者であるか、前記ヒトが免疫化されるか、あるいは前記ヒトが病原体又は標的分子に感染することを特徴とする方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 8 ないし 2 4 のいずれかに記載の方法において、前記免疫グロブリンが I g G クラスであることを特徴とする方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、生物学的サンプル中の免疫グロブリンの配列データを分析することによって、及び、前記生物学的サンプル中にある最も豊富な V H 及び V L 鎖を決定することによって、抗体、標的分子、又は病原体を同定するための方法に関する。それに用いられる材料も更に提供される。

20

【背景技術】

【0002】

抗体又は標的分子を同定するための従来の方法は、活性化させたヒト B 細胞から抗体を単離する困難なプロセスを含む。例えば、免疫化した、あるいは癌患者の B 細胞からの完全ヒト抗体の単離は、完全ヒト抗体に対する有効な経路と見なされる。いくつかの企業はヒトから単一の B 細胞を単離するための商業上のサービスを提供する。これらの B 細胞は不死化されるか、あるいは単一細胞の免疫グロブリンの遺伝情報が回収されるかである。これらの方法は、困難かつ高価な高処理技術を含み、細胞ごとに遺伝情報を単離し、数千の細胞を不死化し、標的組織でそれらの各出力をスクリーニングするための技術を含む。

【0003】

近年、いくつかの企業が全ゲノム配列決定サービス、あるいは各タスクを実現するために用いることができる機械を提供している。これは Roche 社の 4 5 4 システム、Illumina 社の Solexa システム、及び Helico Biosciences 社の Heliscopes システムを含む。例えば、Helico 社のシステムは、標的配列の定量的分布を更に維持することによって、単一機械で 2 4 時間内に  $2 \times 10^9$  の塩基を配列決定できる。

30

【0004】

米国特許第 7, 288, 249 号は、2 又はそれ以上の別個の細胞集団の表面に特異的に発現される抗原を同定するための方法を開示する。免疫化は B 細胞でトリガされ、増殖（クローン増殖）するために、及び対応する抗体を分泌するために、免疫原に結合する V H - V L の組合せを産生する。しかしながら、米国特許第 7, 288, 249 号によるプロセスは、V H 及び V L 遺伝子のクローン化を含み（V H 及び V L 遺伝子はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって別個にクローン化される）、V H 及び V L 遺伝子はファージライブラリ中でランダムに組換えられ（すなわち、最も豊富な V H 及び V L 遺伝子の選択がない）、その後、Winter ら, Ann. Rev. Immunol., 12: 433 - 455 (1994); に記載のように抗原結合クローンについて検索される。抗体の変型遺伝子セグメント（V H 及び V L セグメントを含む）をコード化した核酸は、対象の細胞から回収されて、増幅される。再配列された V H 及び V L 遺伝子ライブラリの場合においては、所望の DNA がリンパ球からゲノム DNA 又は mRNA を単離することによって取得され、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が後に続き、プライマーが再配列された V

40

50

H及びV L遺伝子の5'及び3'末端と合致する。有用な抗体を見つけるために、未処理の抗体ファージライブラリが実際の癌細胞に対してスクリーニングされる。

【0005】

米国特許第6,897,028号は、タンパク質がリガンドに結合する分子標的の同定方法について記載し、ペプチド又はタンパク質ライブラリに対するリガンドをスクリーニングし、ここでペプチド又はライブラリのタンパク質メンバは、細胞から得られるcDNAライブラリの発現産物、及びその発現産物のフラグメントから選択される。このプロセスは更に、ライブラリから分離されたメンバをコード化する核酸配列を決定するステップと、これらの核酸配列をペプチド配列に翻訳するステップと、タンパク質を同定するステップとを含む。

10

【0006】

米国特許出願公開第20060141532号明細書(出願番号11/286917)は、Iwasakiら, Eur. J. Immunol., 24:2874-2881, 1994;に開示されるように、抗イディオタイプの抗体の特定のVH又はVL領域のアミノ酸配列を決定するためのプロトコルを用いることによって、免疫原性ペプチドを同定及び設計するための方法を開示する。抗原のアミノ酸は標準的なアミノ酸分析技術によって、あるいは化学的配列決定によって決定され、抗イディオタイプの抗体のVH及び/又はVL領域のアミノ酸配列は、当該技術分野で周知の技術による、各領域をコード化するゲノムDNA又はcDNAを配列決定することによって決定される。

【0007】

国際公開第2005/094159号は、不死化リンパ球からの結合ペプチドの単離と、健常組織ではない腫瘍組織に選択的に結合する、これらの結合ペプチド、通常はIgM1免疫グロブリンの試験とについて記載する。結合ペプチドは腫瘍の増殖を阻害できる。

20

【0008】

国際公開第03/052416号は、B細胞からの候補のVH及びVL配列の単離及び配列決定のためのアプローチについて記載する。前記候補のVH及びVL配列によってコード化された免疫グロブリンは感染症の治療に有用な可能性がある。国際公開第03/052416号に記載された方法論、ならびに先行技術で開示された総ての他の方法は、配列決定前の核酸の操作を要求する。特に、時間のかかるクローニングステップが必須であり、本発明に開示のような範囲の方法を実行することを不可能にしている。

30

【0009】

国際公開第03/052416号の場合にあるように、上述の総ての方法は、標的をコード化する核酸を単離する困難なプロセス、及び/又は超高処理によるゲノム配列決定を含む。しかしながら、VH及びVL鎖の配列データを分析することによって、及び最も優性のVH及びVLを決定することによって標的分子を同定する、困難が少なく、対費用効果の高い、及び/又はより簡単な方法は有用である。

【発明の概要】

【0010】

本開示の実施形態は一般的に、生物学的サンプル中にある免疫グロブリンの可変重(VH)鎖及び可変軽(VL)鎖の配列データを分析することによって、抗体、標的分子、又は病原体を同定する方法に関する。この実施形態の一部は、所定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖を決定することと、ベクタにおける発現用に最も豊富なVH及びVL鎖のポリヌクレオチドを合成することと、発現した抗体を試験して標的分子を同定することとに関する。他の実施形態は、所定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖を決定することと、ベクタにおける発現用に最も豊富なVH及びVL鎖のポリヌクレオチドを合成することと、特定の標的分子又は標的組織に結合する発現した抗体のどちらかを試験することとに関する。特定の実施形態においては、サンプルは事前選択又は事前濃縮されない生物学的サンプルである。

40

【0011】

50

一実施形態は、サンプル中の抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、

a) サンプル中の免疫グロブリンをコード化する mRNA の cDNA を取得するステップであって、これによって cDNA の混合物を取得するステップと；

b) 免疫グロブリンの可変重 (VH) 鎖及び可変軽 (VL) 鎖の各々を配列決定するステップであって、これによってサンプル中にある免疫グロブリンの VH 及び VL 鎖の配列データを取得するステップと；

c) 所定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖を決定するステップと；

d) 最も豊富な VH 及び VL 鎖のポリヌクレオチドを合成し、哺乳類発現ベクタを用いて抗体を産生するステップと；

e) 抗体を試験するステップであって、これによって特定の標的分子又は組織に結合する抗体を同定するか、あるいは特定の抗体に結合する標的分子を同定するステップと；  
を具える。

#### 【0012】

別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、

a) ヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマといった、免疫化されるか、あるいは病原体又は標的分子に感染する哺乳類から、生物学的サンプルを提供するステップと；

b) 生物学的サンプルから B 細胞を収集するステップと；

c) 収集された B 細胞中の免疫グロブリンをコード化する mRNA (例えば、IgG) を取得するステップと；

d) 免疫グロブリンの cDNA を産生するステップであって (例えば、逆転写 PCR によって、及び増幅用の IgG に特異的なプライマーを用いることによって)、これによって cDNA の混合物を取得するステップと；

e) 免疫グロブリンの可変重 (VH) 鎖及び可変軽 (VL) 鎖の各々を配列決定するステップであって (例えば、VH 及び VL の別個の配列を取得することによって)、これによってサンプル中にある免疫グロブリンの VH 及び VL 鎖の配列データを取得するステップと；

f) VH 及び VL 鎖の配列データを分析して、サンプル中にある最も優性の VH 及び VL 鎖を決定するステップと；

g) 所定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富な VH 及び VL 鎖を決定するステップと；

h) 最も豊富な VH 及び VL 鎖のポリヌクレオチドを合成するステップと；

i) 合成された VH 及び VL のポリヌクレオチドを、哺乳類発現ベクタに組み込むステップと；

j) VH 及び VL ポリヌクレオチド組み込み型ベクタが培養基中で発現するのを可能にするステップであって、これによって抗体又はそのフラグメントを産生するステップと；

k) イムノアッセイを用いることによって抗体を試験するステップであって、これによって抗体、標的分子、又は標的分子に対する病原体を同定するステップと；  
を具える。特定の実施形態においては、哺乳類は罹患哺乳類である。

#### 【0013】

特定の実施形態においては、免疫グロブリンは IgG、IgM、IgA、IgD、又は IgE の免疫グロブリンクラスのうち少なくとも 1 つ、あるいはそのフラグメントである。いくつかの実施形態においては、免疫グロブリンは IgG クラスである。

#### 【0014】

特定の実施形態においては、免疫グロブリンは IgG1、IgG2、IgG3、又は IgG4 の免疫グロブリン G のサブクラスのいずれか 1 つである。

#### 【0015】

10

20

30

40

50

別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、免疫グロブリンの cDNA は逆転写 PCR によって産生される。

【0016】

別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、IgG に特異的なプライマーは逆転写 PCR 増幅で用いられる。

【0017】

別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、プライマーは IgG 1、IgG 2、IgG 3、又は IgG 4 の免疫グロブリン G のサブクラスのいずれか 1 つに対して特異的な逆転写 PCR 増幅で用いられる。

【0018】

別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、免疫グロブリンの V H 及び V L 鎖に対する別個の配列データが取得される。V H 及び V L 鎖の配列データはデータベースに保存され、最も豊富な V H 及び V L 鎖がコンピュータに実装されるアルゴリズムを介して決定される。

10

【0019】

別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。

【0020】

別の実施形態はサンプル中の抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、  
a) サンプル中にある V H 及び V L 鎖の配列データを分析するステップと；  
b) サンプル中にある V H 及び V L 鎖の存在量を決定するステップと；  
を具える。方法は更に、ステップ b) で同定された豊富な V H 及び V L 鎖を含む 1 又はそれ以上の免疫グロブリンを調製するステップを具える。

20

【0021】

特定の実施形態においては、ヒトは癌患者であるか、あるいは免疫化されるか、あるいは病原体又は標的分子に感染している。

【0022】

更に、本開示の別の実施形態は抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供し、哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。

30

【発明を実施するための形態】

【0023】

本開示は、生物学的サンプル中にある可変重 (V H) 鎖及び可変軽 (V L) 鎖の免疫グロブリンの配列データを分析することによって、抗体、標的分子、又は病原体を同定するための方法、ならびに本明細書中に開示された方法で用いられる材料を提供する。本開示は更に、所定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富な V H 及び V L 鎖を決定し、ベクタにおける発現用に最も豊富な V H 及び V L 鎖のポリヌクレオチドを合成し、発現した抗体を試験して標的分子を同定する方法に関する。

40

【0024】

一態様によると、本開示は「免疫ゲノム (immunome)」の配列決定によって、抗体、標的分子、又は病原体を同定又は検出するため方法を提供し、それは哺乳類サンプル (ヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマなど) 中で免疫グロブリン (IgG など) をコード化する完全な mRNA (あるいは、逆転写 PCR 後の cDNA) のことであり、哺乳類は標的分子で免疫化されるか、癌患者であるか、あるいは特定のウイルス性、細菌性、又は原生動物の種に感染する。特定の実施形態においては、哺乳類 (例えば、ヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モル

50

モット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマ)はワクチンといった標的分子で免疫化される。他の実施形態においては、前記哺乳類は癌患者である。

【0025】

別の態様によると、B細胞は免疫化された哺乳類又は癌患者から単離され、mRNAは各サンプルから抽出され、mRNAによってコード化された免疫グロブリンは逆転写及び配列決定される。いくつかの実施形態においては、少なくとも $10^4$ のB細胞が免疫化された哺乳類又は癌患者から単離され、他の実施形態においては、少なくとも $10^5$ のB細胞、 $10^6$ のB細胞、又は更に $10^7$ のB細胞が免疫化された哺乳類又は癌患者から単離される。免疫グロブリンの可変鎖をコード化する遺伝子は一般的には、約1000ヌクレオチドの長さを有する。従って、配列情報の約 $2 \times 10^9$ の塩基の配列決定は、少なくとも2倍の免疫ゲノム全体を包含する。優性のCDR配列ならびにその(高頻度)変異が同定される。これらの配列は特異的であるか、あるいは免疫刺激に対し少なくとも代表的である。重鎖及び軽鎖配列(相互に回復できない)は、優性の頻度によって、すなわちその存在量によってクラスター形成される。最も豊富なVH及びVLは合成され、哺乳類発現ベクタに(1つごとに、あるいは集団で)導入される。ベクタは好適な培地で発現され、スクリーニングされて、対象の標的に対し特異性の免疫グロブリン、又はそのフラグメントを取得する。得られた結合剤は治療効果について試験され、薬剤として用いるために産生され、新しい抗体又は分子標的を同定するのに用いられる。

10

【0026】

本開示の実施形態は利点を提供し、以下のものを含む。

20

本明細書中に記載の実施形態は、超高処理の従来生物学(wet biology)を情報生物学、及び有意に減少した時系列中の多くの患者からのB細胞を分析する場合に並列化が可能な、単一で広範囲の並列型分子配列決定技術に置換できる(通常、ショットガン配列決定のみが実行され、75ないし500の塩基対の比較的短い伸長を産生し、アセンブリは取得されたフラグメントの配列分析によってなされる)。

免疫グロブリンの定常領域中の高い相同性は、配列分析アルゴリズムと干渉しない。

本明細書中に記載の実施形態はクローニングステップの回避を可能にする。

本明細書中に記載の実施形態は、IgG選択性のプライマー、つまりIgGサブクラスに特異的なプライマーを用いることによって、低品質IgMの単離の問題を克服できる。

30

本明細書中の方法は、診断方法のために免疫ゲノムを用いることを可能にする。例えば、同一のアレルゲンに対するアレルギーを受ける患者はその免疫反応において同様の配列パターンを示しうる。従って、原則的にバイオマーカーとしての免疫ゲノムのプロファイルの使用は更に十分な大きさのデータセットが取得された場合に実現可能である。

免疫ゲノムの情報は更に、合成型のヒト、ネズミ、又はげっ歯類全体の抗体ライブラリの設計を促進できる。

【0027】

本開示の一実施形態によると、サンプル中、例えば、免疫化されるか、あるいは病原体又は標的分子に感染する哺乳類(例えば、ヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマ)由来の生物学的サンプル中の抗体、標的分子、疾病マーカー、病原体、又は標的分子に対する病原体は、

40

a) サンプル中の免疫グロブリンをコード化するmRNAのcDNAを取得するステップであって(例えば、サンプルからB細胞を収集することによって)、これによってcDNAの混合物を取得するステップと;

b) 免疫グロブリンの可変重(VH)鎖及び可変軽(VL)鎖の各々を配列決定するステップであって、これによってサンプル中にある免疫グロブリン(IgG等)のVH及びVL鎖の配列データを取得するステップと;

c) サンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖を決定するステップと(例えば、所

50

定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にあるV H及びV L鎖の配列データを分析することによって)；

d) 最も豊富なV H及びV L鎖のポリヌクレオチドを合成し、哺乳類発現ベクタを用いて抗体を産生するステップと(例えば、合成されたV H及びV Lのポリヌクレオチドを哺乳類発現ベクタに組み込むことによって)；

e) 抗体を試験するステップであって(例えば、イムノアッセイを用いることによって)、これによって、サンプル中の抗体、標的、又は標的分子に対する病原体を同定するステップと；

を具える方法によって、同定、決定、検出又は診断される。

【0028】

本開示の別の実施形態によると、抗体、標的分子、疾病マーカー、病原体、又は標的分子に対する病原体は、

a) 免疫化されるか、あるいは病原体又は標的分子に感染する哺乳類(例えば、ヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマ)由来の生物学的サンプル、あるいは疾病マーカー又は標的分子に対する抗体を含むサンプルを提供するステップと；

b) 生物学的サンプルからB細胞を収集するステップと；

c) 収集されたB細胞中の免疫グロブリンをコード化するmRNAを取得するステップと；

d) 免疫グロブリンのcDNAを産生するステップであって、これによってcDNAの混合物を取得するステップと；

e) 免疫グロブリンの可変重(V H)鎖及び可変軽(V L)鎖の各々(V H及びV Lの配列に好適で、かつ別個に得られる)を配列決定するステップであって、これによってサンプル中にある免疫グロブリン(IgG等)のV H及びV L鎖の配列データを取得するステップと；

f) V H及びV L鎖の配列データを分析して、サンプル中にある最も優性のV H及びV L鎖を決定するステップと；

g) 所定のコンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富なV H及びV L鎖を決定するステップと；

h) 最も豊富なV H及びV L鎖のポリヌクレオチドを合成するステップと；

i) 合成されたV H及びV Lのポリヌクレオチドを哺乳類発現ベクタに組み込むステップと；

j) V H及びV Lポリヌクレオチド組み込み型ベクタが培養基で発現するのを可能にするステップであって、これによって抗体を産生するステップと；

k) イムノアッセイを用いることによって抗体を試験するステップであって、これによって、抗体、標的、標的分子、疾病マーカー、病原体、又は標的分子に対する病原体を同定するステップと；

を具える方法によって、同定、決定、検出又は診断される。

【0029】

本開示の実施形態においては、免疫グロブリンをコード化するmRNAはIgGクラスである。

【0030】

本開示の他の実施形態においては、免疫グロブリンのcDNAは逆転写PCRによって産生される。

【0031】

本開示の他の実施形態によると、IgGに特異的なプライマーは逆転写PCR増幅で用いられる。

【0032】

本開示の他の実施形態においては、免疫グロブリンのV H及びV L鎖に対する別個の配

10

20

30

40

50

列データは、コンピュータに実装されるアルゴリズムを決定するために取得される。

【0033】

本開示の別の実施形態においては、哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。

【0034】

本開示の別の実施形態によると、抗体、標的分子、疾病マーカー、病原体、又は標的分子に対する病原体は、

a) サンプル中にあるVH及びVL鎖の配列データを分析するステップと；

b) サンプル中にあるVH及びVL鎖の存在量を決定するステップと；

を具える方法によって同定、決定、検出又は診断される。

10

【0035】

別の実施形態においては、その方法は更にステップb)で同定された豊富なVH及びVL鎖を含む1又はそれ以上の免疫グロブリンを調製するステップを具える。本開示の他の実施形態においては、サンプルは生物学的サンプルである。他の実施形態においては、生物学的サンプルは哺乳類由来である。更に他の実施形態においては、前記哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。他の実施形態においては、前記ヒトは癌患者であるか、免疫化されるか、あるいは病原体又は標的分子に感染する。他の実施形態においては、免疫グロブリンはIgGクラス

20

【0036】

[定義及び本開示の他の実施形態]

用語「免疫グロブリン(immunoglobulin: Ig)」は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコード化される1又はそれ以上のポリペプチドからなるタンパク質のことである。免疫グロブリンは限定しないが、抗体を含む。免疫グロブリンは多数の構造形態を有してもよく、限定しないが全長型抗体、抗体フラグメント、及び別個の免疫グロブリンドメインを含む。本明細書中の「免疫グロブリン(Ig)ドメイン」は、タンパク質構造の技術分野の当業者によって確認されるような異なる構造主体として存在する免疫グロブリンの領域を意味する。本明細書中で用いられるような用語「IgG」は、認識された免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコード化される抗体のクラスに属するタンパク質を意味する。

30

【0037】

用語「抗体(antibody)」はポリクローナル抗体、アフィニティー精製ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト、ネズミ又はげっ歯類の完全抗体、ならびにF(ab')<sub>2</sub>及びFabタンパク質分解フラグメントといった抗原結合性フラグメントを含む。キメラ抗体、Fvフラグメント、及び単鎖抗体等といった、遺伝子改変された未処理の抗体又はフラグメント、ならびに合成型の抗原結合性ペプチド及びポリペプチドは更に含まれる。本開示による抗体は、抗体クラスのいずれかに属する免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコード化されてもよい。抗体はIgGクラスの抗体に属する配列を含み、ヒトサブクラスのIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む。この抗体は、IgA(ヒトサブクラスのIgA1及びIgA2)、IgD、IgE、IgG、又はIgMクラスの抗体に属する配列を含む。

40

【0038】

本明細書中で用いられるような用語「可変鎖(variable chain)」又は「可変領域(variable region)」は、軽鎖(及びを含む)及び重鎖の免疫グロブリン遺伝子座をそれぞれ構成する、VL(V及びVを含む)、VH、JL(J及びJを含む)、及びJH遺伝子のいずれかによって実質的にコード化される1又はそれ以上のIgドメインを含む免疫グロブリンの領域を意味する。軽鎖又は重鎖の可変領域(VL及びVH)は、「相補性決定領域」又は「CDR」と称される3の超可変

50

領域によって割り込まれる「フレームワーク」又は「FR」領域からなる。フレームワーク領域及びCDRの範囲は正確に規定されてきた(Kabat, 1991, J. Immunol., 147, 915-920.; Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothiaら, 1989, Nature 342: 877-883; Al-Lazikaniら, 1997, J. Mol. Biol. 273: 927-948)。抗体のフレームワーク領域は、構成要素である軽鎖及び重鎖の結合フレームワーク領域であり、CDRを配置及び配列比較するように作用し、主に抗原への結合を担当する。

#### 【0039】

用語「生物学的サンプル(biological sample)」は生物学的起源の任意のサンプルのことであってもよく、組織又は体液、全血、血清又は血漿のサンプル、あるいはタンパク質、ポリペプチド、核酸、又はポリヌクレオチドといった任意の成分を含むサンプルを含んでもよい。特定の実施形態においては、生物学的サンプルは、ヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマ由来といった、哺乳類由来である。他の実施形態においては、生物学的サンプルは哺乳類由来であり、哺乳類(例えばヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマ)は標的分子で免疫化されるか、癌患者であるか、あるいは特定のウイルス性、細菌性、又は原生動物の種に感染する。

#### 【0040】

「標的(target)」又は「標的分子(target molecule)」は、抗体といった免疫グロブリンと反応し、それに結合する分子のことである。標的は既知又は未知であってもよく、及び/あるいは、例えば、免疫沈降、それに続く質量分光分析、N末端タンパク質配列決定などの当該技術分野で周知の方法によって同定できる。

#### 【0041】

用語「哺乳類(mammal)」は、例えばヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、及びウマなどの哺乳類として分類される任意の生物のことである。実施形態においては、哺乳類はマウスである。本開示の他の実施形態においては、哺乳類はヒト又はラットである。

#### 【0042】

配列情報は任意のフォーマットで保存でき、ひいては本明細書中で用いられるような用語「データベース(database)」は、データベースファイル、ルックアップ表、又はExcelのスプレッドシートといった、任意の情報の集合、特に配列情報のことである。特定の実施形態においては、データベースは、コンピュータ可読型の記憶装置といった電子工学的な形態で保存される。これはサーバ、クライアント、ハードディスク、CD、DVD、Palm Pilotといった携帯情報端末、テープ、zipディスク、コンピュータ内部のROM(読み出し専用メモリ)、あるいはインターネット又はワールドワイドウェブといった媒体を含む。コンピュータによりアクセス可能なファイルの保存のための他の媒体は、当該技術分野の当業者にあきらかである。

#### 【0043】

この状況で用いられるような「コンピュータに実装されるアルゴリズム(computer-implemented algorithm)」は、VH及びVL鎖がある特定の生物学的サンプル中で最も豊富であることを決定するのに用いられうる任意の統計学的手段のことである。このようなコンピュータに実装されるアルゴリズムは、より大きなソフトウェアパッケージの一部あるいはスタンドアロン型のソフトウェアパッチ又はアプリケーションであってもよい。コンピュータに実装されるアルゴリズムは一般的に、VH及びVL鎖の変異体の配列データを含むデータベース上で動作する。コンピュータに実装されるアルゴリズムの出力は一般的に、生物学的サンプル中にある最も優性又は豊富な配列

10

20

30

40

50

、例えば別個のVH鎖又はVL鎖のリストである。

【0044】

本開示の実施形態によると、コンピュータに実装されるアルゴリズムを介して同定される最も優性又は豊富な配列は合成され、本明細書中に記載のような発現用の発現ベクタに組み込まれる。

【0045】

用語「(ポリ)ペプチド((poly)peptide)」はペプチド結合を介して連結される、複数、すなわち2又はそれ以上のアミノ酸の1又はそれ以上の鎖からなる分子と関連する。

【0046】

用語「タンパク質(protein)」は、(ポリ)ペプチドの少なくとも一部分が、1又は複数の(ポリ)ペプチド鎖内及び又はその間に二次、三次、又は四次構造を形成することによって規定された三次元配列を有するか、あるいはそれを取得できる(ポリ)ペプチドのことである。この定義は天然型又は少なくとも部分的に人工型のタンパク質といったタンパク質を含み、同様に、すべてのタンパク質のフラグメント又はドメインを、これらのフラグメント又はドメインが上述したような規定された三次元配列を取得できる限りにおいては含む。1の鎖からなる(ポリ)ペプチド/タンパク質の例は単鎖Fv抗体フラグメントであり、2以上の鎖からなる(ポリ)ペプチド/タンパク質の例はFab抗体フラグメントである。

【0047】

特定の実施形態においては、本開示はIgGクラスの免疫グロブリンといった、免疫グロブリンのスーパーファミリの、好適には免疫グロブリンのメンバ又は誘導体の少なくとも一部を含む(ポリ)ペプチドのライブラリを提供する。いくつかの実施形態はヒト抗体のライブラリを提供する。他の実施形態は哺乳類又はげっ歯類の抗体のライブラリを提供する。可変重鎖領域及び可変軽鎖領域は好適には、フレームワーク領域(FR)1、2、3、及び4ならびに相補性決定領域(CDR)1、2、及び3を含む。

【0048】

最も豊富なVH及びVL鎖をコード化するこれらの人工遺伝子は次いで、例えば、遺伝子全体の合成によって、あるいは合成型の遺伝子サブユニットによって構築される。これらの遺伝子サブユニットは(ポリ)ペプチドレベルでの構造的な下位要素に、例えば1又はそれ以上のフレームワーク領域及び/又は1又はそれ以上のフレームワーク領域に対応する。DNAレベルでは、これらの遺伝子サブユニットは各々の下位要素の始点及び終点での切断部位によって規定してもよい。特定の実施形態においては、米国特許第7,264,963号に記載のように、下位要素はHuCAL(Human Combinatorial Antibody Library)と互換性がある。

【0049】

このDNA分子の集合は次いで、Fv、ジスルフィド結合Fv、単鎖Fv(scFv)、又はFabフラグメントといった、抗体又は抗体フラグメントのライブラリを産生するのに用いることができ、新しい標的の抗原に対する特異性の供給源として用いてもよい。更に、抗体の親和性は事前に構築されたライブラリカセット及び周知の成熟化手順を用いて最適化できる。

【0050】

本開示は標的に結合する1又はそれ以上の抗体又は抗体フラグメントをコード化する1又はそれ以上の遺伝子を同定するための方法を提供し、抗体又は抗体フラグメントを発現するステップと、所定の標的分子に結合する1又はそれ以上の抗体又は抗体フラグメントを単離するためにそれらをスクリーニングするステップとを具える。

【0051】

遺伝子発現：用語「遺伝子発現(gene expression)」は生体内又は生体外プロセスのことであり、これによって遺伝子の情報はmRNAに転写され、次いでタンパク質/(ポリ)ペプチドに翻訳される。従って、遺伝子発現という用語は、細胞内部

10

20

30

40

50

に生じるプロセスのことであり、これによって遺伝子の情報は mRNA に転写され、タンパク質に翻訳される。発現という用語は更に、翻訳後の修飾及び輸送の総ての事象を含み、これは(ポリ)ペプチドが機能的であるために必要である。相同遺伝子の分析：2又はそれ以上の遺伝子の対応するアミノ酸配列は、総ての位置での同一又は類似のアミノ酸残基間で相関性を最大化する方法で、相互に配列比較される。これらの配列比較された配列は、同一及び/又は類似の残基の合計の割合が規定されたしきい値を超える場合に、相同的であると称される。

【0052】

用語「ベクタ (vector)」は、異なる遺伝子環境間で、動作可能に結合された別の核酸を輸送することが可能な核酸分子のことである。好適なベクタはそれらが結合される核酸の自律増殖及び/又は発現を可能にするベクタである。動作可能に結合された遺伝子の発現に向かわせることが可能なベクタは、本明細書中で「発現ベクタ (expression vector)」と称される。ベクタの選択は所定のベクタの特異的な要求及び機能的特性に依存する。

10

【0053】

本開示の一実施形態においては、ベクタは原核生物のレプリコン、すなわち、細菌性宿主細胞といった、それとともに形質転換される原核生物の宿主細胞中の染色体的に余分な組換え DNA 分子の自律増殖及び維持に向かう能力を有する DNA 配列を含む。このようなレプリコンは当該技術分野で公知である。加えて、原核生物のレプリコンを含むそれらの実施形態は更に、発現がそれとともに形質転換される細菌性宿主に対する薬物耐性といった選択的な利点を提供する遺伝子を含む。

20

【0054】

原核生物のレプリコンを含むベクタは更に、それとともに形質転換される、大腸菌といった細菌性宿主細胞中で、 $V_H$  及び/又は  $V_L$  でコード化する相同体の発現(転写及び翻訳)に向かわせうる原核生物のプロモーターを含む。プロモーターは RNA ポリメラーゼの結合及び生じさせるべき転写を可能にする、DNA 配列によって形成される発現制御要素である。細菌性宿主で互換性のあるプロモータ配列は一般的には、DNA セグメントの挿入に都合の良い制限部位を含むプラスミドベクタで提供される。このようなベクタプラスミドの例は、pUC8、pUC9、pBR322 及び pBR329、pPL、ならびに pKK223 を含み、商業上利用可能である。このようなベクタは「原核生物の発現ベクタ (prokaryotic expression vector)」と称される。

30

【0055】

それらを含む好適な真核生物の発現ベクタは、脊椎動物細胞と互換性がある。用語「真核生物の発現ベクタ (eucaryotic expression vector)」は、真核生物の宿主細胞中の核酸の発現に有用な任意の発現ベクタのことである。本開示の特定の実施形態においては、真核生物のベクタは哺乳類発現ベクタである。用語「哺乳類発現ベクタ (mammalian expression vector)」は哺乳類宿主細胞中の核酸の発現に有用な任意の発現ベクタのことである。

【0056】

真核生物の発現ベクタは当該技術分野で公知であり、更に商業上利用可能である。一般的には、このようなベクタは所望の DNA 相同体の挿入に都合の良い制限部位を含んで提供される。このようなベクタの例は、pSV<sub>L</sub> 及び pKSV-10、pBPV-1/PM L2d、ならびに pTDT1 (ATCC 寄託番号 31255) を含む。

40

【0057】

本開示の別の実施形態においては、真核生物の発現ベクタは真核細胞に有効な選択マーカ、好適には薬物耐性選択マーカを含む。好適な薬物耐性マーカはネオマイシン耐性を生じさせる遺伝子、すなわちネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(ネオ)遺伝子である。Southernら, J. Mol. Appl. Genet, 1: 327-341 (1982)。

【0058】

50

V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> でコード化する DNA 相同体の遺伝子を発現するためのレトロウイルス性の発現ベクタは更に予期される。用語「レトロウイルス発現ベクタ (retroviral expression vector)」は、レトロウイルスゲノムの末端反復配列 (LTR) 領域から得られるプロモータ配列を含む DNA 分子のことである。

【0059】

1 又はそれ以上の、V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> でコード化する DNA 構造は、個別に、あるいは組合せでのいずれかで、V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> でコード化する DNA 相同体の増幅及び / 又は発現を提供するために好適な宿主に導入される。V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> のポリペプチドが異なる生物で発現する場合、各ポリペプチドは単離され、次いで抗体又はそのフラグメントを形成するために好適な培地に混合される。V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> でコード化する DNA 相同体を含む構成が導入された細胞性宿主は、「形質転換 (transform)」された、あるいは「形質転換体 (transformant)」であると本明細書中で称される。

10

【0060】

宿主細胞は原核生物又は真核生物のもののいずれかにできる。細菌性細胞は好適には原核生物の宿主細胞であり、一般的には例えば、メリーランド州ベセズダの Bethesda Research Laboratories 社から入手可能な、大腸菌株 DH5 といった大腸菌 (E. coli) の菌株である。好適な真核生物の宿主細胞は酵母菌、ならびにネズミ及びげっ歯類を含む哺乳類細胞、好適にはマウス、ラット、サル、又はヒトの細胞株由来のものといった脊椎動物細胞を含む。

20

【0061】

組換え DNA 分子を有する好適な宿主細胞の形質転換は、用いられるベクタの型に一般的に依存する方法によって実現される。原核生物の宿主細胞の形質転換に関しては、例えば、Cohen ら, Proceedings National Academy of Science, USA, Vol. 69, P. 2110 (1972); 及び Maniatis ら, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); を参照。rDNA を含むレトロウイルスベクタを有する脊椎動物細胞の形質転換に関しては、例えば Sorge ら, Mol. Cell. Biol., 4: 1730 - 1737 (1984); Graham ら, Virology, 52: 456 (1973); 及び Wigler ら, Proceedings National Academy of Sciences, USA, Vol. 76, P. 1373 - 1376 (1979); を参照。

30

【0062】

V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> のポリペプチドの発現用のスクリーニング: 正常に形質転換された細胞、すなわち、ベクタに動作可能に結合される、V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> でコード化する DNA 相同体を含む細胞は、受容体のリガンドへの結合、又は、受容体、好適にはその活性部位をコード化するポリヌクレオチドの存在を検出する任意の好適な公知の技術によって同定できる。一実施形態においては、スクリーニングアッセイは、受容体によるリガンドの結合が検出可能なシグナルを、直接的にか、あるいは間接的にかのいずれかで產生するように行われる。このようなシグナルは例えば、複合体の產生、触媒反応産物の形成、及びエネルギーの放出又は取り込み等を含む。対象の組換え DNA とともに形質転換に供される集団からの細胞はクローニングされて、例えばモノクローナルなコロニーを產生する。これらのコロニーを形成する細胞は収集及び溶解され、その DNA 成分は、例えば、Southern, J. Mol. Biol., 98: 503 (1975); 又は、Berent ら, Biotech. 3: 208 (1985); に記載のような当該技術分野に周知の方法を用いて、組換え DNA の存在について試験される。

40

【0063】

V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> でコード化する DNA の存在について直接的にアッセイする他に、正常な形質転換は更に、產生される V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> のポリペプチドが事前選択された

50

エピトープを含む場合に特に、公知の免疫学的方法によって確認できる。形質変換されることとなる細胞のサンプルは、例えばエピトープに対する抗体を用いて事前選択されたエピトープの存在についてアッセイされる。

【0064】

本明細書中で用いられるような「イムノアッセイ (immunoassay)」は、抗原と、抗体のような免疫グロブリンとの間の特異的な結合反応の任意の測定のことである。一般的には、抗原は(ポリ)ペプチド又はタンパク質であるが、核酸、脂質、脂肪酸、又は有機小分子といったその他の物質が抗原として作用してもよい。当業者はイムノアッセイが抗原と免疫グロブリンとの間の特異的な結合を測定するのに最適であることを容易に理解及び決定するであろう。

10

【0065】

本発明の状況で用いられるような用語「代表的なサンプル (representative sample)」は、前記サンプル中にある免疫グロブリンの可変軽 (V L) 鎖及び可変重 (V H) 鎖の概要を得るために、配列決定する必要のある、サンプルの免疫グロブリンの可変軽 (V L) 鎖及び可変重 (V H) 鎖の代表的なサンプルに関する。このような概要を得るのに要求される配列の総数は各サンプルの性質に依存するが、少なくとも大きくすべきであるので、合理的な概算は免疫グロブリンのどの可変軽 (V L) 鎖と、どの可変重 (V H) 鎖とが前記サンプル中で最も豊富であるかでなされる。前記サンプル中にある免疫グロブリンの可変軽 (V L) 鎖及び可変重 (V H) 鎖のうち少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%が配列決定される。更に、好適には前記サンプル中にある免疫グロブリンの可変軽 (V L) 鎖及び可変重 (V H) 鎖のうち、少なくとも1,000、少なくとも10,000、少なくとも50,000、あるいは少なくとも100,000が配列決定される。

20

【0066】

本発明の状況で用いられるような用語「最も豊富な (most abundant)」はサンプルが配列決定される場合に最も頻繁に同定される可変軽 (V L) 鎖及び可変重 (V H) 鎖のことである。最も豊富な可変軽 (V L) 鎖及び可変重 (V H) 鎖は一般的にはあるサンプル中で最も大きい数であるものである。

【0067】

特定の実施形態においては、本発明は、サンプル中の抗体、標的、又は病原体の同定のための方法を提供し、

30

a) サンプル中の免疫グロブリンをコード化するmRNAのcDNAを取得するステップであって、これによってcDNAの混合物を取得するステップと；

b) 免疫グロブリンの可変重 (V H) 鎖及び可変軽 (V L) 鎖のうちの少なくとも代表的なサンプルを配列決定するステップであって、これによって、サンプル中にある免疫グロブリン (IgG) のV H及びV L鎖の配列データを取得するステップと；

c) コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富なV H及びV L鎖を決定するステップと；

d) 最も豊富なV H及びV L鎖のポリヌクレオチドを合成し、哺乳類発現ベクターを用いて前記V H及びV L鎖を含む抗体を産生するステップと；

40

e) 抗体を試験するステップであって、これによって抗体又は標的を同定するステップと；

を具える。好適には、前記サンプルは生物学的サンプルである。好適には、前記生物学的サンプルは哺乳類由来である。好適には、前記哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。好適には、前記ヒトは癌患者であるか、前記ヒトは免疫化されるか、あるいは前記ヒトは病原体又は標的分子に感染する。サンプル中で前記免疫グロブリンをコード化するmRNAは、サンプルからB細胞を収集又は単離することによって取得される。好適には、前記免疫グロブリンはI g

50

Gクラスである。好適には、サンプル中の免疫グロブリンをコード化するmRNAから取得されるcDNAは逆転写PCRによって産生される。好適には、IgGに特異的なプライマーは、免疫グロブリンをコード化するmRNAからのcDNAの産生に用いられる。好適には、サンプル中にあるVH及びVL鎖はサンプル中にあるVH及びVL鎖の配列データを分析することによって決定される。最も好適には、本発明の方法はいずれのクローニングステップも要求しない。特に、コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いてサンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖の決定まで行われる総ての方法ステップは、いずれのクローニングステップも要求しない。好適には、ステップ(d)の最も豊富なVH及びVL鎖のVH及びVLのポリヌクレオチドは哺乳類発現ベクタに組み込まれる。好適には、前記ステップで産生された抗体は培養基に放出される。好適には、本方法のステップ(e)の抗体の試験は、イムノアッセイを用いることによって行われる。好適には、本方法のステップ(e)においては、抗体は同定され、特定の標的分子又は組織に結合する。好適には、本方法のステップ(e)においては、標的分子は同定され、特定の抗体に結合する。

10

20

30

40

50

#### 【0068】

特定の実施形態においては、本発明は、

a) 免疫化され、病原体又は標的分子に感染し、癌に罹患する、哺乳類由来の生物学的サンプルを提供するステップと

b) 生物学的サンプルからB細胞を収集するステップと；

c) 収集されたB細胞からmRNAを取得するステップと；

d) mRNAによってコード化された免疫グロブリンのcDNAを産生するステップであって、これによってcDNAの混合物を取得するステップと；

e) 免疫グロブリンの可変重(VH)鎖及び可変軽(VL)鎖のうち少なくとも代表的なサンプルを配列決定するステップであって、これによってサンプル中にある免疫グロブリンのVH及びVL鎖の配列データを取得するステップと；

f) コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖を決定するステップと；

h) 最も豊富なVH及びVL鎖のポリヌクレオチドを合成するステップと；

i) 合成されたVH及びVLのポリヌクレオチドを哺乳類発現ベクタに組み込むステップと；

j) VH及びVLポリヌクレオチド組み込み型ベクタがVH及びVLのポリヌクレオチドを発現するのを可能にするステップであって、これによって抗体を産生するステップと；

k) イムノアッセイを用いることによって抗体を試験するステップであって、これによって抗体、標的、又は病原体を同定するステップと；

を具える、抗体、標的、又は病原体の同定のための方法を提供する。好適には、前記サンプルは生物学的サンプルである。好適には、前記生物学的サンプルは哺乳類由来である。好適には、前記哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。好適には、前記ヒトは癌患者であるか、前記ヒトは免疫化されるか、あるいは前記ヒトは病原体又は標的分子に感染する。好適には、前記免疫グロブリンはIgGクラスである。

#### 【0069】

特定の実施形態においては、本発明は、

a) サンプル中にあるVH及びVL鎖の配列データを分析するステップと；

b) サンプル中にあるVH及びVL鎖の存在量を決定するステップと；

を具えるサンプル中の抗体、標的、又は病原体の同定のための方法を提供する。好適には、前記方法は更に、ステップb)で同定された豊富なVH及びVL鎖を含む1又はそれ以上の免疫グロブリンを調製するステップを具える。好適には、前記サンプルは生物学的サンプルである。好適には、前記生物学的サンプルは哺乳類由来である。好適には、前記哺乳

乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマである。好適には、前記ヒトは癌患者であるか、前記ヒトは免疫化されるか、あるいは前記ヒトは病原体又は標的分子に感染する。好適には、前記免疫グロブリンは I g G クラスである。

【 0 0 7 0 】

特定の実施形態においては、本発明は、

a) サンプル中の免疫グロブリンをコード化する m R N A の c D N A を取得するステップであって、これによって c D N A の混合物を取得するステップと；

b) 免疫グロブリンの可変重 ( V H ) 鎖及び可変軽 ( V L ) 鎖のうちの少なくとも代表的なサンプルを直接的に配列決定するステップであって、

c) コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富な V H 及び V L 鎖を決定するステップと；

d) サンプル中にある最も豊富な V H 及び V L 鎖をコード化するポリヌクレオチドを合成し、発現ベクタを用いて前記 V H 及び V L 鎖を含む抗体を産生するステップと；

e) 抗体を試験するステップであって、これによって抗体又は標的を同定するステップと；

を具える、サンプル中の抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供する。

【 0 0 7 1 】

上に列挙した方法のステップ ( b ) の状況で用いられるような用語「直接的に配列決定するステップ ( d i r e c t s e q u e n c i n g )」は、ステップ ( a ) で取得される c D N A が、任意の更なる分子生物学的な修飾ステップなしに、配列決定される状況のことである。具体的には、クローニングステップが要求されない。

【 0 0 7 2 】

好適な実施形態においては、サンプルは生物学的サンプルである。更に好適な実施形態においては、生物学的サンプルは哺乳類由来である。前記哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマであってもよい。前記生物学的サンプルは更にヒト由来であってもよく、前記ヒトは癌患者であるか、前記ヒトは免疫化されるか、あるいは前記ヒトは病原体又は標的分子に感染する。

【 0 0 7 3 】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ ( a ) での免疫グロブリンをコード化する m R N A は、サンプルから B 細胞を収集又は単離することによって取得される。免疫グロブリンは I g G クラスである。

【 0 0 7 4 】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ ( a ) での前記免疫グロブリンをコード化する m R N A の c D N A は逆転写 P C R によって産生される。更に好適な実施形態においては、 I g G に特異的なプライマーは前記逆転写 P C R で用いられる。

【 0 0 7 5 】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ ( c ) でのサンプル中にある最も豊富な V H 及び V L 鎖は、サンプル中にある V H 及び V L 鎖の配列データを分析することによって決定される。

【 0 0 7 6 】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ ( a ) ないし ( c ) はいずれのクローニングステップも要求しない。

【 0 0 7 7 】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ ( d ) で合成された V H 及び V L のポリヌクレオチドは、発現ベクタに組み込まれる。更に好適には、前記発現ベクタは哺乳類発現ベクタである。

【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

50

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ(d)で産生された抗体は、培養基に放出される。

【0079】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ(e)での抗体の試験はイムノアッセイを用いることによって実行される。

【0080】

好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ(e)で、抗体は同定され、特定の標的分子又は組織に結合する。好適な実施形態においては、上に列挙した方法のステップ(e)で、標的分子は同定され、特定の抗体に結合する。

【0081】

特定の実施形態においては、本発明は、

a) 免疫化され、病原体又は標的分子に感染し、癌に罹患する、哺乳類由来の生物学的サンプルを提供するステップと；

b) 生物学的サンプルからB細胞を収集するステップと；

c) 収集されたB細胞からmRNAを取得するステップと；

d) mRNAによってコード化された免疫グロブリンのcDNAを産生するステップであって、cDNAの混合物を取得するステップと；

e) 免疫グロブリンの可変重(VH)鎖及び可変軽(VL)鎖のうちの少なくとも代表的なサンプルを直接的に配列決定するステップであって、これによってサンプル中にある免疫グロブリンのVH及びVL鎖の配列データを取得するステップと；

f) コンピュータに実装されるアルゴリズムを用いて、サンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖を決定するステップと；

h) サンプル中にある最も豊富なVH及びVL鎖をコード化するポリヌクレオチドを合成するステップと；

i) 合成されたVH及びVLのポリヌクレオチドを哺乳類発現ベクタに組み込むステップと；

j) VH及びVLポリヌクレオチド組み込み型ベクタがVH及びVLのポリヌクレオチドを発現するのを可能にするステップであって、これによって抗体を産生するステップと；

k) イムノアッセイを用いることによって抗体を試験するステップであって、抗体、標的、又は病原体を同定するステップと；

を具える、抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供する。好適な実施形態においては、前記サンプルは生物学的サンプルである。更に好適な実施形態においては、前記生物学的サンプルは哺乳類由来である。前記哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマにできる。更に好適な実施形態においては、前記ヒトは癌患者であるか、前記ヒトは免疫化されるか、あるいは前記ヒトは病原体又は標的分子に感染する。更に好適な実施形態においては、免疫グロブリンはIgGクラスである。

【0082】

特定の実施形態においては、本発明は、

a) サンプル中にあるVH及びVL鎖の配列データを分析するステップと；

b) サンプル中にあるVH及びVL鎖の存在量を決定するステップと；

を具える、サンプル中の抗体、標的、又は病原体を同定する方法を提供する。更なる実施形態においては、前記方法は更に、ステップb)で同定された豊富なVH及びVL鎖を含む1又はそれ以上の免疫グロブリンを調製するステップを具える。好適な実施形態においては、前記サンプルは生物学的サンプルである。更に好適な実施形態においては、前記生物学的サンプルは哺乳類由来である。前記哺乳類はヒト、ネズミ、げっ歯類、マウス、ラット、リス、シマリス、ホリネズミ、ヤマアラシ、ビーバー、ハムスター、スナネズミ、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、雌ウシ、又はウマにできる。更に好適な実施形態にお

10

20

30

40

50

いては、前記ヒトは癌患者であるか、前記ヒトは免疫化されるか、あるいは前記ヒトは病原体又は標的分子に感染する。更に好適な実施形態においては、免疫グロブリンはI g Gクラスである。

【0083】

本開示は以下の実施例によって更に記載されるが、いかなる方法でも開示の範囲を限定しない。

【実施例】

【0084】

[免疫化/感染した患者からのB細胞の収集]

B細胞は様々な異なる方法で、免疫化あるいは感染した患者から単離でき、このような技術は当業者に周知である。多くのこのような技術において、静止Bリンパ球(B細胞)は、例えば磁気マイクロビーズを介して、抗CD43及び抗Mac-1/CD11bのモノクローナル抗体とともに負の選択を用いて、脾臓から単離される。この戦略は脾細胞の混合集団から非B細胞を枯渇させ、静止脾臓B細胞を除いて、最も成熟した白血球がCD43を発現するという事実に依拠する(実際に、CD43の発現は、顆粒球、単球、マクロファージ、血小板、ナチュラルキラー(NK)細胞、胸腺細胞、ならびに末梢性のCD8陽性T細胞及びほとんどのCD4陽性T細胞に加えて、未成熟のB細胞、形質細胞、及びいくつかの成熟B1細胞に示されていた)。抗Mac-1/CD11bマイクロビーズは負の選択に含まれて、骨髄系細胞の除去を改善する。B細胞の単離は、AutoMACS自動式磁気ビーズセルソータ(Miltenyi Biotec社)を用いて自動化してもよい。B220+細胞の蛍光分析により評価されるように、このような単離は常に、脾臓につき約 $4 \times 10^7$ の、95%より高い純度のB細胞を産生する。更に、Miltenyi S, Muller W, Weichel W, 及びRadbruch A. (1990) Cytometry 11(2), 231-238参照。

10

20

【0085】

[mRNA抽出及び逆転写]

免疫グロブリン、好適にはI g G型の免疫グロブリンは、mRNAの抽出、次いで逆転写を介してB細胞から選択的に増幅できる。

【0086】

B細胞といった真核細胞からのmRNA抽出は公知の技術的手順である。多数のプロトコルが存在し、商用のキットが利用可能である。PolyAtract(登録商標)mRNA Isolation System(米国 Wisconsin州マディソンのPromega社)又は様々なRNeasy及びOligotex Direct mRNAキット(双方が、ドイツ連邦共和国ヒルデンのQiagen社)など。これらの技術の多くは、例えばオリゴチミジンセルロースといったオリゴチミジン基質に対するアフィニティ精製を介して真核生物mRNAのポリA尾部を利用する。

30

【0087】

免疫グロブリンは特異的なプライマーを用いた逆転写、その後の従来のPCRを介して、単離したmRNAから選択的に増幅できる。特異的なプライマーは、免疫グロブリンに対し、あるいは、ある免疫グロブリンクラス、すなわちI g G、I g M、I g A、I g D、又はI g Eのいずれかに対し、あるいは、あるいは、I g G1、I g G2、I g G3、I g G4といった、ある免疫グロブリンサブクラスに対してさえも特異的にできる。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖遺伝子を増幅するために用いられるプライマーは例えば、Cancer Surv 1997; 30: 21-44、J Clin Pathol 1994; 47: 493-6、J Clin Pathol 1990; 43: 888-90、又はMol Pathol. 2002 April; 55(2): 98-101に開示される。

40

【0088】

[cDNAのゲノム配列決定]

免疫グロブリンの全配列が配列決定される。Helicos BioSciences

50

社（米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）といったゲノム全体を配列決定できる様々な企業が存在する。その True Single Molecule Sequencing（登録商標）技術をもって、Helicos社は高速かつ高効率でDNA又はRNAの単一分子を直接的に配列決定することを可能にする。同様の配列の努力を行うことが可能な他の企業は、Illumina社（米国カリフォルニア州サンディエゴ；Solexaシステム）及びRoche社（スイス連邦バーゼル州；454システム）を含む。クローニングステップは配列決定の前に要求されない。

【0089】

免疫グロブリンのVH及びVL鎖の配列が別個に決定される。10<sup>3</sup>より多いVH及びVL鎖の別個の配列が決定され、10<sup>4</sup>より多い別個の配列であることが好ましく、10<sup>5</sup>より多い別個の配列であることが更に好ましく、10<sup>6</sup>より多い別個の配列であることが更に好ましい。

10

【0090】

決定された配列は任意のデータベースシステムに保存してもよい。このようなデータベースシステムは、用いられる配列決定システムの一部であってもよい。代替的に、配列情報はExcelのスプレッドシートの形態、あるいはタブ区切りフォーマットといった他のフォーマットで保存してもよい。

【0091】

[事前決定されたアルゴリズムによる優性/豊富なVH及びVL配列の決定]

配列決定された免疫グロブリンのVH及びVL鎖の存在量は、様々なアルゴリズムによって決定できる。VH鎖及びVL鎖は好適には別個に分析される。

20

【0092】

第1のステップは同一の免疫グロブリンから得られるVH及びVL鎖の配列を同定することであってもよい。同一の免疫グロブリンから得られる配列は、必ずしも完全に同一とは限らない。それらの配列が、各配列について全く同じヌクレオチドで開始又は終了しないために、あるいは、ヌクレオチドが、このような大きな範囲の配列決定配列プロジェクト中に生じうる事象である、決定プロセスで誤読されるために、このようなわずかな差異は生じうる。特定のヌクレオチド、特に特定のヌクレオチド配列が他のもの（例えば、GCリッチなヌクレオチド伸長）よりも誤読を更に起こしやすいことは周知である。生体情報学的なツール及びアルゴリズムは、その多くは各配列決定システムの一部であるが、このような場合を決定でき、あるいは少なくとも実例を示唆でき、そこではこのようなエラーが生じうる。

30

【0093】

VH及びVL鎖の存在量は様々な統計検定によって決定してもよい。最も容易には、別個のVH及びVL鎖が単に計数される。より複雑な統計検定は様々な他のパラメータを考慮する。限定されない例によると、以下の統計検定及び文献はこのような又は同様の分析を為す多数のアプローチの実施例として誘導できる：Bayesian Shrinkage Estimation（例えば、Biometrics 59（2003）：476-486参照）、DADA（Digital Analysis of cDNA Abundance；例えば、BMC Genomics 2002, 3：7参照）、線形モデリング（Pacific Symposium on Biocomputing, 1999, 4：41-52）、及び様々なクラスタリング手法（BMC Bioinformatics 2006, 7：397, Fourth IEEE International Conference on Data Mining（ICDM'04）, pp. 403-406）。

40

【0094】

[VH及びVLの合成]

最も豊富なVH及びVL鎖の遺伝子は従来の方法によって合成される。このような合成は標準的な技術であり、例えば数例を挙げると、Entelechon社（ドイツ共和国レーゲンスブルク）、Geneart社（ドイツ共和国レーゲンスブルク）、又はSlo

50

ning Biotechnology社(ドイツ共和国ブッフハイム)といった多くの企業が、それぞれのサービスを提供している。理想的には、各遺伝子が既に、好適なベクタにクローニングするための好適な制限部位を保有する。

【0095】

[ 優性のVH及びVL鎖のクローニング及び発現 ]

VH及びVL鎖の合成された遺伝子は、各発現ベクタにクローニングされる。そうするために、各発現ベクタは合成された遺伝子と互換性のある好適な制限酵素で消化される。上記のように、合成された遺伝子は好適には既にベクタと互換性がある、すなわち、各制限部位は既に合成された遺伝子中に存在する。例示的なベクタはpcDNA、pMORPH、pUC、pBR、pBAD、及び他のベクタを含む。ベクタによる発現は、合成されたVH及びVL鎖を含む全長免疫グロブリンの産生を引き起こし、更に後のステップで特徴づけられるか、あるいは修飾できる。

10

【0096】

[ 発現されたポリペプチドをスクリーニングするためのイムノアッセイ及びVH及びVLの組合せの選択 ]

pcDNA、pMORPH、pUC、pBR、pBAD、及び他のベクタといった各ベクタによる発現後に産生される全長免疫グロブリンは、様々な型のアッセイで用いられる。例えば、イムノアッセイを行ってもよい。

【0097】

例えば、免疫グロブリンの、抗原といった、ある標的分子への結合をアッセイしてもよい。これはELISA法、ウエスタンブロット法、又はその他の等価的な手段といった標準的な検査法によって取得してもよい。このような実験はある標的分子に結合する免疫グロブリンの同定を引き起こしうる。このような実験は更に、より定量的な方法で行ってもよい、すなわち、各免疫グロブリンがある標的分子に結合するか否かを決定するだけでなく、そのような相互作用がどのくらい強く生じるかを決定する。これは免疫グロブリンの所定の標的分子に対する結合親和性、解離定数、又はその他の等価パラメータの決定を介して得てもよい。代表的な技術は、表面プラズモン共鳴法、溶解平衡滴定、カンチレバー、聴覚バイオセンサ、及び当該技術分野に周知の他の方法を含む。

20

【0098】

所定の免疫グロブリンが結合する標的分子を同定することは更に可能である。そうするために、ある免疫グロブリンが選択され、免疫グロブリンの混合物の少なくとも1の標的分子への結合を可能にする条件下で、結合可能性のあるタンパク質の混合物に供される。代表的な結合条件は、バッファ組成及びストリンジェンシといった好適なパラメータの選択によって調整してもよい。

30

【0099】

[ 標的 / 抗体の同定 ]

所定の標的分子に結合する免疫グロブリンの同定、又は所定の免疫グロブリンに結合する標的分子の同定は、任意の周知の方法論によって実現できる。多くのこのような方法は当業者に周知であり、例示的な文献として以下のものが提供される: Valle RP, Curr Opin Drug Discov Devel. 2003 Mar; 6(2): 197-203, Ackermann BL Expert Rev Proteomics. 2007 Apr; 4(2): 175-86及びAnderson KS J Proteome Res. 2005 Jul-Aug; 4(4): 1123-33。

40

【0100】

説明、特定の実施例、及びデータは例示的な実施形態を示すが、例示のために与えられ、開示を限定することを意図しないことは理解すべきである。本開示にある様々な変形及び変更は、本明細書中に含まれる考察、開示及びデータから当業者に明らかになり、従って、本開示の一部と見なされる。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2009/000953
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/68		
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) G01N C12Q		
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, 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 03/052416 A (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]; MATTHEWS RUTH CHRISTINE []) 26 June 2003 (2003-06-26) page 4 - page 9; claims 1-14,16-22,24,25; examples 1-6	1-25
X	WO 2004/094474 A (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]; MATTHEWS RUTH CHRISTINE []) 4 November 2004 (2004-11-04) page 32 - page 33 page 4 - page 9; claims 4-30	1-25
	-/--	
<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  2 April 2009		Date of mailing of the international search report  07/05/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schindler-Bauer, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/000953

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ANONYMOUS: "Definition: mammalian expression vector" THE ONLINE MEDICAL DICTIONARY, [Online] 20 March 1998 (1998-03-20), XP002478299 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?mammalian+expression+vector">http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?mammalian+expression+vector</a> [retrieved on 2008-04-25] the whole document</p>	13, 18
A	<p>MAECKER B ET AL: "Linking genomics to immunotherapy by reverse immunology--'immunomics' in the new millennium" CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, vol. 1, no. 5, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 609-619, XP009104572 ISSN: 1566-5240 the whole document</p>	1-25
A	<p>SCANLAN M J ET AL: "Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression." CANCER IMMUNITY : A JOURNAL OF THE ACADEMY OF CANCER IMMUNOLOGY 30 MAR 2001, vol. 1, 30 March 2001 (2001-03-30), page 4, XP002520923 ISSN: 1424-9634 abstract page 15 - page 17</p>	1-25
A	<p>WO 2005/094159 A (ONCOMAB GMBH [DE]; VOLLMERS HEINZ PETER [DE]; MUELLER-HERMELINK HANS K) 13 October 2005 (2005-10-13) examples 1-8</p>	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/000953

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03052416 A	26-06-2003	AT 288502 T	15-02-2005
		AU 2002352394 A1	30-06-2003
		CA 2471570 A1	26-06-2003
		DE 60202877 D1	10-03-2005
		DE 60202877 T2	13-04-2006
		EP 1415002 A2	06-05-2004
		ES 2236605 T3	16-07-2005
		PT 1415002 E	31-05-2005
		US 2006233812 A1	19-10-2006
		WO 2004094474 A	04-11-2004
EP 1613655 A1	11-01-2006		
JP 2007527370 T	27-09-2007		
US 2007071763 A1	29-03-2007		
WO 2005094159 A	13-10-2005	AU 2004317819 A1	13-10-2005
		CA 2545512 A1	13-10-2005
		EP 1742969 A2	17-01-2007
		JP 2007521020 T	02-08-2007

## 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, MK, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA13 BA31 BA41 CA04 CA09 DA02 HA12  
4B063 QA18 QA19 QQ05 QQ43 QQ53 QQ79 QR55 QR62 QS05 QS25  
QS33 QS34 QS38

专利名称(译)	鉴定抗体或靶标的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011523348A</a>	公开(公告)日	2011-08-11
申请号	JP2010545417	申请日	2009-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	莫佛塞斯公司		
申请(专利权)人(译)	Morufoshisu ARE游戏		
[标]发明人	エンツェルベルガーマルクス		
发明人	エンツェルベルガー,マルクス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6854 C12N15/1034 C12N15/1089		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.N C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ05 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS38		
代理人(译)	Goichi高桥		
优先权	2008151276 2008-02-11 EP 61/027507 2008-02-11 US 61/045039 2008-04-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本公开涉及通过分析样品中的免疫球蛋白库序列数据并通过测定所述样品中存在的最主要的VH和VL链以及与其一起使用的材料来鉴定抗体，靶分子或试剂的方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2009/000953
INVESTIGATION OF PRIORITY DOCUMENTS Applicant's International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC G01N33/68 G01N33/68 C12Q1/68		
D. FIELD SEARCHED Field(s) searched in the search report (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documents considered other than minimum disclosures to this effect (if such documents are included in the field searched) EPO-internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
E. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with title(s), where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
X	NO 03/062416 A (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]; MATTHEWS RUTH CHRISTINE [ ]) 26 June 2003 (2003-05-26) page 4 - page 9; claims 1-14, 16-22, 24, 25; examples 1-6	1-25
X	NO 2004/094474 A (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]; MATTHEWS RUTH CHRISTINE [ ]) 4 November 2004 (2004-11-04) page 32 - page 33	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> further documents are listed in the continuation of row C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
*X* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. *Y* the document has been modified or is otherwise relevant. *L* document which may have priority, claims or subject matter which is not covered by the document in question. *R* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *E* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *F* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *G* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *H* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *I* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *J* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *K* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *L* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *M* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *N* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *O* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *P* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *Q* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *R* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *S* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *T* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *U* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *V* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *W* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *X* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *Y* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance. *Z* document which is relevant to the search but which is not considered to be of particular relevance.		
Date of the actual completion of the international search 2 Apr 11 2009		Date of mailing of the international search report 07/05/2009
Name and mailing address of the ISA/ International Searching Authority Schindler-Bauer, P		Authorized officer Schindler-Bauer, P