

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5' から 3' に向かって少なくとも 4 つの制限部位を含む単離されたポリヌクレオチドであって、一番 5' 側の制限部位(「部位 1」)が S f i I、B s s H I I、A p a L I、または M f e I を含み、部位 1 の 3' 側に位置する制限部位(「部位 2」)が X h o I、S a l I、B c l I、B s t E I I、M l u I、S m a I、または X b a I を含み、部位 2 の 3' 側に位置する制限部位(「部位 3」)が X h o I、S a l I、B s p E I、A p a L I、B s s H I I、または E c o R V を含み、一番 3' 側の制限部位(「部位 4」)が S f i I、B c l I、A v r I I、B s i W I、または B a m H I を含む、単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

部位 1 が B s s H I I を含み、部位 2 が X h o I を含み、部位 3 が B s p E I を含み、部位 4 が A v r I I または B s i W I を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

部位 1 と部位 2 の間に挿入された V H ポリヌクレオチドおよび部位 3 と部位 4 の間に挿入された V L ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 または 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

5' から 3' に向かって少なくとも 4 つの制限部位を含む単離されたポリヌクレオチドであって、一番 5' 側の制限部位(「部位 1」)が S f i I、B s s H I I、または A p a L I を含み、部位 1 の 3' 側に位置する制限部位(「部位 2」)が X h o I、S a l I、B c l I、S a c I、A v r I I、B s i W I、または M l u I を含み、部位 2 の 3' 側に位置する制限部位(「部位 3」)が M f e I、B s p E I、A p a L I、B s s H I I、X h o I、または S a l I を含み、一番 3' 側の制限部位(「部位 4」)が S f i I、B c l I、X h o I、S a l I、または B s t E I I を含む、単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 5】

部位 1 が B s s H I I を含み、部位 2 が A v r I I または B s i W I を含み、部位 3 が B s p E I を含み、部位 4 が X h o I を含む、請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 6】

部位 1 と部位 2 の間に挿入された V L ポリヌクレオチドおよび部位 3 と部位 4 の間に挿入された V H ポリヌクレオチドを含む、請求項 4 または 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

部位 2 と部位 3 の間に位置するリンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

5' から 3' に向かって、A p a L I 部位、S a c I 部位、X h o I 部位、および S f i 1 部位を含む制限酵素認識部位を含むヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

40

【請求項 9】

前記制限酵素認識部位が、X h o I 部位の 3' 側かつ S f i I 部位の 5' 側に位置する B s t E I I 部位をさらに含む、請求項 8 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記制限酵素認識部位が、5' から 3' に向かって、(a) A p a L I 部位の 5' 側に位置する A s c I 部位、P c i I 部位、および H i n d I I I 部位、(b) S a c I 部位の 3' 側かつ X h o I 部位の 5' 側に位置する A v a I 部位、(c) B s t E I I 部位の 5' 側に位置する M f e I 部位、X m a I 部位、および S m a I 部位、ならびに (d) B

50

s t E I I 部位の 3' 側かつ S f i I 部位の 5' 側に位置する B c l I 部位をさらに含む、請求項 9 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 またはその相補物と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 8 から 10 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 12】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 またはその相補物を含む、請求項 8 から 11 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 61 またはその相補物と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 8 から 12 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 14】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 61 またはその相補物を含む、請求項 8 から 13 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 15】

前記制限酵素認識部位が、5' から 3' に向かって、(a) A p a L I 部位の 5' 側に位置する P c i I 部位および H i n d I I I 部位、(b) S a c I 部位の 3' 側かつ X h o I 部位の 5' 側に位置する A s c I 部位、(c) X h o I 部位の 3' 側かつ B s t E I I 部位の 5' 側に位置する A v a I 部位および M f e I 部位をさらに含む、請求項 9 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 16】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 2 またはその相補物と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 15 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 17】

ポリヌクレオチド配列が、配列番号 2 またはその相補物を含む、請求項 15 または 16 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 62 またはその相補物と少なくとも 95% 同一の配列を含む、請求項 15 から 17 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 19】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 62 またはその相補物を含む、請求項 15 から 18 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 20】

V H 遺伝子、V L 遺伝子、前記 V H 遺伝子の 5' 末端に配置された X h o I 制限部位、前記 V H 遺伝子の 3' 末端に配置された S f i I 制限部位または B s t E I I 制限部位、前記 V L 遺伝子の 5' 末端に配置された A p a L 1 制限部位、および前記 V L 遺伝子の 3' 末端に配置された S a c 1 制限部位を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 21】

前記 V H 遺伝子と前記 V L 遺伝子の間のリンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 20 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

40

【請求項 22】

前記リンカーが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 または 21 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 23】

複数の単離されたポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドが、請求項 1 から 22 にのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドである、単鎖 F v (S c F v) ポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 24】

単鎖 F v (S c F v) ポリヌクレオチドライブラリーを構築するための方法であって、

50

(a) V H 遺伝子のコレクションの 5' 末端に第 1 の制限部位を、3' 末端に第 2 の制限部位を導入するステップと、

(b) 前記第 1 の制限部位と適合性がある制限部位および前記第 2 の制限部位と適合性がある制限部位を用いて、複数のポリヌクレオチドベクター中に前記 V H 遺伝子のコレクションをクローニングするステップと、

(c) V L 遺伝子のコレクションの 5' 末端に第 3 の制限部位を、3' 末端に第 4 の制限部位を導入するステップと、

(d) 前記第 3 の制限部位および前記第 4 の制限部位と適合性がある制限部位を用いて、複数のポリヌクレオチドベクター中に前記 V L 遺伝子のコレクションをクローニングするステップとを含み、

(i) 前記第 1、第 2、第 3、および第 4 の制限部位は互いに適合性ではなく、

(ii) 前記第 1 の制限部位は、X h o I、S f i I、B s s H I I、A p a L I、M f e I、B s p E I、および S a l I からなる群から選択され、

(iii) 前記第 2 の制限部位は、B s t E I I、S f i I、X h o I、S a l I、B c l I、M l u I、S m a I、および X b a I からなる群から選択され、

(iv) 前記第 3 の制限部位は、A p a L I、X h o I、S a l I、B s p E I、B s s H I I、E c o R V、および S f i I からなる群から選択され、

(v) 前記第 4 の制限部位は、S a c I、S f i I、B c l I、A v r I I、B s i W I、B a m H I、X h o I、S a l I、および M l u I からなる群から選択される、
方法。

【請求項 25】

ステップ (a) が、単離された全 RNA から第 1 の鎖 cDNA を合成するステップと、前記第 1 の制限部位を含むフォワードプライマーおよび前記第 2 の制限部位を含むリバースプライマーを含む 1 つまたは複数のプライマーセットを用いた PCR 増幅によって V H 遺伝子を増幅するステップとを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

ステップ (c) が、単離された RNA から第 1 の鎖 cDNA を合成するステップと、前記第 3 の制限部位を含むフォワードプライマーおよび前記第 4 の制限部位を含むリバースプライマーを含む 1 つまたは複数のプライマーセットを用いた PCR 増幅によって V L 遺伝子を増幅するステップとを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記複数のベクターの各ポリヌクレオチドベクターが、配列番号 1 と少なくとも 95% 同一のヌクレオチド配列を含む、請求項 24 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記複数のベクターの各ポリヌクレオチドベクターが、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 24 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記複数のベクターの各ポリヌクレオチドベクターが、配列番号 61 と少なくとも 95% 同一のヌクレオチド配列を含む、請求項 24 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記複数のベクターの各ポリヌクレオチドベクターが、配列番号 61 のヌクレオチド配列を含む、請求項 24 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 24 から 30 のいずれか一項に記載の方法を用いて構築した単鎖 Fv (S c F v) ポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 32】

単鎖 Fv (S c F v) ポリヌクレオチドライブラリーを F a b ポリヌクレオチドベクター発現系に再編成するための方法であって、

(a) 請求項 23 または 31 に記載の S c F v ポリヌクレオチドライブラリーを提供するステップと、

10

20

30

40

50

(b) 1つまたは複数の制限酵素を用いて前記 S c F v ポリヌクレオチドライブラリーを消化することによって、V H 遺伝子および V L 遺伝子をそれぞれが含む複数のポリヌクレオチド断片を作製するステップと、

(c) ステップ (b) で作製した前記複数のポリヌクレオチド断片の各ポリヌクレオチド断片を、適合性制限部位を含む F a b ポリヌクレオチド発現ベクター中にクローニングするステップと

を含む、方法。

【請求項 33】

前記 1つまたは複数の制限酵素が、請求項 24 に記載の 1つまたは複数の第 1、第 2、第 3、および第 4 の制限部位を含む、請求項 32 に記載の方法。

10

【請求項 34】

前記複数の断片のそれぞれが、前記 V H 遺伝子と前記 V L 遺伝子の間のリンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記リンカーが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

リンカーをコードする前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部分を、C k 配列、リボソーム結合部位 (r b s)、およびシグナルペプチド配列を含むヌクレオチド配列で置き換えるステップをさらに含む、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記シグナルペプチド配列が P e l B リーダー配列を含む、請求項 36 に記載の方法。

20

【請求項 38】

前記複数の F a b ポリヌクレオチド発現ベクターの各 F a b ポリヌクレオチド発現ベクターが、配列番号 2 と少なくとも 95% 同一のヌクレオチド配列を含む、請求項 32 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記複数の F a b ポリヌクレオチド発現ベクターの各 F a b ポリヌクレオチド発現ベクターが、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 32 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記複数の F a b ポリヌクレオチド発現ベクターの各 F a b ポリヌクレオチド発現ベクターが、配列番号 62 と少なくとも 95% 同一のヌクレオチド配列を含む、請求項 32 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 41】

前記複数の F a b ポリヌクレオチド発現ベクターの各 F a b ポリヌクレオチド発現ベクターが、配列番号 62 のヌクレオチド配列を含む、請求項 32 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

複数の F a b ポリヌクレオチド発現ベクター中に複数の S c F v ポリヌクレオチドを含む、請求項 32 から 41 のいずれか一項に従って構築したポリヌクレオチドライブラリー

40

【請求項 43】

単鎖 F v (S c F v) ポリヌクレオチドライブラリーを I g G 発現系に再編成するための方法であって、

(a) 請求項 23 または 31 に記載の S c F v ポリヌクレオチドライブラリーを提供するステップと、

(b) 1つまたは複数の制限酵素を用いて前記 S c F v ライブラリーを消化することによって、V H 遺伝子および V L 遺伝子をそれぞれが含む複数のポリヌクレオチド断片を作製するステップと、

(c) ステップ (b) で作製した前記複数のポリヌクレオチド断片の各ポリヌクレオチド

50

断片を、適合性制限部位を含む I g G ポリヌクレオチド発現ベクターにクローニングするステップと
を含む、方法。

【請求項 4 4】

前記 1 つまたは複数の制限酵素が、請求項 2 4 に記載の 1 つまたは複数の第 1、第 2、第 3、および第 4 の制限部位を含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記複数のポリヌクレオチド断片の各ポリヌクレオチドが、前記 V H 遺伝子と前記 V L 遺伝子の間のリンカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 4 3 または 4 4 に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

前記リンカーが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

リンカーをコードする前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部分を、C k 配列、配列内リボソーム進入部位 (I R E S)、およびシグナルペプチド配列を含む配列で置き換えるステップをさらに含む、請求項 4 5 または 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 I g G ポリヌクレオチド発現ベクターが、配列番号 2 と少なくとも 9 5 % 同一のヌクレオチド配列を含む、請求項 4 3 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 I g G ポリヌクレオチド発現ベクターが、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 4 3 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

複数の I g G ポリヌクレオチド発現ベクター中に複数の S c F v ポリヌクレオチドを含む、請求項 4 3 から 4 9 のいずれか一項に従って構築したポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 5 1】

V H ポリペプチドおよび V L ポリペプチドを作製するための方法であって、

(a) 前記第 2 の制限部位を認識する第 2 の制限酵素および前記第 3 の制限部位を認識する第 3 の制限酵素を用いて、請求項 4 2 または 5 0 に記載のポリペプチドライブラリーを消化するステップであって、前記ポリペプチドライブラリーの各ポリヌクレオチドが、前記第 2 の制限部位と前記第 3 の制限部位の間に位置するリンカーをコードするポリヌクレオチドを含み、その結果、前記リンカーをコードするポリヌクレオチドが、前記 F a b 発現ベクターまたは前記 I g G 発現ベクターから遊離され、それによって、(i) V H ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび V L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む直線状ベクターポリヌクレオチド断片 (「直線状ベクターポリヌクレオチド」) ならびに (i i) 前記リンカーをコードする直線状ポリヌクレオチド断片 (「直線状リンカーポリヌクレオチド」) を作り出すステップと、

30

(b) 前記直線状ベクターポリヌクレオチドを単離するステップと、

(c) 調節配列を含むポリヌクレオチドを、前記直線状ベクターポリヌクレオチドの前記第 2 の制限部位と前記第 3 の制限部位にライゲーションして、V H ポリペプチドおよび V L ポリペプチドを別々にコードするポリヌクレオチド (「V H および V L 発現ベクターポリヌクレオチド」) を形成させるステップと、

40

(d) 前記 V H および V L 発現ベクターポリヌクレオチドからの V H ポリペプチドおよび V L ポリペプチドの発現を誘導するステップと

を含み、

V H ポリペプチドおよび V L ポリペプチドが作製される、方法。

【請求項 5 2】

前記 V H ポリペプチドが重鎖定常領域 1 に融合され、前記 V L ポリペプチドが鎖定常領域または鎖定常領域に融合される、請求項 5 1 に記載の方法。

50

【請求項 5 3】

前記 V H ポリペプチドが重鎖定常領域 1、2、および 3 に融合され、前記 V L ポリペプチドが鎖定常領域または鎖定常領域に融合される、請求項 5 1 または 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ハイスループットなスクリーニングにおける、請求項 5 0 に記載のポリヌクレオチドライブラリーの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単鎖 F v (S c F v) ライブラリーならびにそれらのライブラリーをスクリーニングおよび再編成するためのベクターおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質治療物質は、創薬の重要な部分である。タンパク質変種の大型ライブラリーのハイスループットなスクリーニングにより、結合親和性、安定性、および特異性などの望ましい特性に関してタンパク質治療物質を効率的に発見または最適化することが可能になる。

【0003】

治療的抗体は、抗原に対する親和性および特異性が高く、かつインビトロおよびインビボでの安定性が比較的高いため、特に魅力的である。抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖からできており、これらは N 末端に可変領域を含有し、ジスルフィド架橋によって連結されている。単鎖抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の断片 (S c F v) を連結することによって人工的に作り出される。

【0004】

S c F v を作るための典型的な手順は、一般に、抗体の可変領域をコードする遺伝子領域の増幅、S c F v 遺伝子配列の組立て、および宿主細胞における S c F v 遺伝子配列の発現を伴う。これらの宿主細胞は、抗原に結合し、したがって、所望の特異性を有する機能的な S c F v を発現する細胞を同定するための標的抗原を用いてスクリーニングされる。

【0005】

特異的抗原に結合する単鎖抗体を同定するために最もよく使用される技術は、ファージディスプレイおよびその変形法によるものである (H o o g e n b o o m ら、1998 を参照されたい)。一般に、ファージディスプレイ法は、ランダムなオリゴヌクレオチドをファージゲノム中に挿入することを伴い、その結果、ファージコートタンパク質 (例えば、繊維状ファージ p I I I、p V I、または p V I I I) に融合されたペプチドライブラリーを細菌宿主が発現するようにそれらが指示する。最高 10^{10} 個の個別メンバーからなるライブラリーが、このようにしてごく普通に調製され得る。成熟ファージコート配列中に S c F v 配列を組み入れることにより、異種配列にコードされた S c F v 抗体が生じ、ファージの外表面に提示される。関連する (1つまたは複数の) 抗原標的を表面に固定化することにより、他のものは洗浄によって除去されるのに対し、表面上のそれらの標的の内の 1 つに結合する S c F v を提示するファージは残ると考えられる。

【0006】

しかし、S c F v は、二量体化する傾向を有する場合があります、これは、選択されたクローンの定量的区別が望まれる場合に特に、スクリーニングアッセイを複雑にする場合がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、他の免疫グロブリン形態、例えば、F a b、I g G、S c F v - F c 融合物

10

20

30

40

50

へのScFv抗体の「大量(bulk)」再編成を容易にする一般的制限部位を用いた、タンパク質発現またはディスプレイのための単鎖抗体(ScFv)ライブラリー設計を提供する。すなわち、本発明は、薬物の発見または最適化プロセスの早い段階における望ましい分子形態のScFvの大型プールの移送(トランスファー)およびスクリーニングを可能にし、それによって、薬物発見の予定表を短縮する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

1つの態様において、本発明は、抗体重鎖可変領域(「VH」)ポリヌクレオチド断片および抗体軽鎖可変領域(「VL」)のクローニング(挿入およびライゲーション)を受け入れるための少なくとも4つの制限酵素認識部位を含む、マルチクローニング部位またはリンカー(以下、ポリヌクレオチドリンカー、ポリリンカー、またはMCSとも呼ぶ)としての機能を果たすポリヌクレオチドを提供する。

10

【0009】

1つの実施形態において、VHポリヌクレオチドをクローニングするための部位は、VLポリヌクレオチドをクローニングするための部位の5プライム(5')側に位置している。この特定の実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、VHポリヌクレオチドのための部位の5'末端に位置した第1の制限部位(「部位1」)、VHポリヌクレオチドのための部位の3プライム(3')末端に位置した第2の制限部位(「部位2」)、部位2の3'側かつVLポリヌクレオチドのための部位の5'末端に位置した第3の制限部位(「部位3」)、およびVLポリヌクレオチドのための部位の3プライム(3')末端に位置した第4の制限部位(「部位4」)を含む。いくつかの実施形態において、部位1は、SfiI、BssHII、ApaLI、およびMfeIを含む群から選択され、部位2は、XhoI、SalI、BclI、BstEII、MluI、SmaI、およびXbaIを含む群から選択され、部位3は、XhoI、SalI、BspEI、ApaLI、BssHII、およびEcoRVからなる群から選択され、部位4は、SfiI、BclI、AvrII、BsiWI、およびBamHIを含む群から選択される。いくつかの態様において、部位1はBssHIIであり、部位2はXhoIであり、部位3はBspEIであり、部位4は、VLポリヌクレオチドが軽鎖ポリペプチドをコードする場合、AvrIIであり、VLポリヌクレオチドが軽鎖ポリペプチドをコードする場合、BsiWIである。

20

30

【0010】

別の実施形態において、VLポリヌクレオチドをクローニングするための部位は、VHポリヌクレオチドをクローニングするための部位の5プライム(5')側に位置している。この特定の実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、VLポリヌクレオチドのための部位の5'末端に位置した第1の制限部位(「部位1」)、VLポリヌクレオチドのための部位の3プライム(3')末端に位置した第2の制限部位(「部位2」)、部位2の3'側かつVHポリヌクレオチドのための部位の5'末端に位置した第3の制限部位(「部位3」)、およびVHポリヌクレオチドのための部位の3プライム(3')末端に位置した第4の制限部位(「部位4」)を含む。いくつかの実施形態において、部位1は、SfiI、BssHII、およびApaLIを含む群から選択され、部位2は、XhoI、SalI、BclI、SacI、AvrII、BsiWI、およびMluIを含む群から選択され、部位3は、MfeI、BspEI、ApaLI、BssHII、XhoI、およびSalIからなる群から選択され、部位4は、SfiI、BclI、XhoI、SalI、およびBstEIIを含む群から選択される。いくつかの実施形態において、部位1はBssHIIであり、部位2は、VLポリヌクレオチドが軽鎖ポリペプチドをコードする場合、AvrIIであり、VLポリヌクレオチドが軽鎖ポリペプチドをコードする場合、BsiWIであり、部位3はBspEIであり、部位4はXhoIである。

40

【0011】

別の態様において、本発明は、二本鎖となった場合、例えば、5'から3'に向かって、ApaLI部位、SacI部位、XhoI部位、およびSfiI部位を含む制限酵素認

50

識部位を形成するヌクレオチド配列を含有する、マルチクローニング部位またはリンカー（以下、ポリヌクレオチドリンカー、ポリリンカー、またはMCSとも呼ぶ）としての機能を果たすポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、XhoI部位の3'側かつSfiI部位の5'側にBstEII部位をさらに含む。

【0012】

別の態様において、本発明は、二本鎖となった場合、例えば、5'から3'に向かって、AscI部位、PciI部位、HindIII部位、ApaLI部位、SacI部位、AvaI部位、XhoI部位、MfeI部位、XmaI部位、SmaI部位、BstEII部位、BclI部位、およびSfiI部位を含む制限酵素認識部位を形成するポリヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドリンカーを提供する。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド配列を含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、本発明のこの態様のポリヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む。

20

【0015】

さらに別の態様において、本発明は、二本鎖となった場合、例えば、5'から3'に向かって、PciI部位、HindIII部位、ApaLI部位、SacI部位、AscI部位、XhoI部位、AvaI部位、MfeI部位、BstEII部位、およびSfiI部位を含む制限酵素認識部位を形成するポリヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドリンカーを提供する。

【0016】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号2のヌクレオチド配列を含有する。

【0017】

いくつかの実施形態において、本発明のこの態様のポリヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む。

30

【0018】

本発明はさらに、上記の様々な実施形態において説明したようなポリヌクレオチドリンカーを含有するベクターも提供する。

【0019】

1つの態様において、本発明は、可変重鎖（VH）遺伝子および可変軽鎖（VL）遺伝子を含有する核酸構築物を提供する。この核酸構築物はさらに、VH遺伝子の5'末端のXhoI制限部位、VH遺伝子の3'末端のSfiI制限部位またはBstEII制限部位、VL遺伝子の5'末端のApaLI制限部位、およびVL遺伝子の3'末端のSacI制限部位を含有する。

40

【0020】

いくつかの実施形態において、VL遺伝子およびVH遺伝子は、VL-VH形態で存在する。他の実施形態において、核酸構築物は、VH遺伝子とVL遺伝子の間にリンカーを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、DGGGSGGGGSGGGGSS（配列番号3）などの配列を含む。

【0021】

50

別の態様において、本発明は、複数の核酸構築物を含む単鎖 F v (S c F v) ライブラリーを提供し、各核酸構築物は、V H 遺伝子および V L 遺伝子、V H 遺伝子の 5' 末端の X h o I 制限部位、V H 遺伝子の 3' 末端の S f i I 制限部位または B s t E I I 制限部位、V L 遺伝子の 5' 末端の A p a L 1 制限部位、ならびに V L 遺伝子の 3' 末端の S a c 1 制限部位を含有する。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、V L 遺伝子および V H 遺伝子は、各核酸構築物において V L - V H 形態で存在する。いくつかの実施形態において、複数の核酸構築物はそれぞれ、V H 遺伝子と V L 遺伝子の間にリンカーを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、D G G G S G G G S G G G S S (配列番号 3) などの配列を含む。

10

【 0 0 2 3 】

別の態様において、本発明は、単鎖 F v (s c F v) ライブラリーを構築するための方法を提供する。この方法は、(1) V H 遺伝子のコレクションの 5' 末端に X h o I 制限部位を、3' 末端に S f i I 制限部位または B s t E I I 制限部位を導入するステップと、(2) X h o I と適合性がある第 1 の制限部位および S f i 1 または B s t E I I と適合性がある第 2 の制限部位を用いて、複数のベクター中に V H 遺伝子のコレクションをクローニングするステップと、(3) V L 遺伝子のコレクションの 5' 末端に S a c I 制限部位を、3' 末端に A p a L I 制限部位を導入するステップと、(4) A p a L 1 および S a c 1 と適合性がある制限部位を用いて、複数のベクター中に V L 遺伝子のコレクションをクローニングするステップとを含む。

20

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態において、単鎖 F v (S c F v) ライブラリーを構築するための方法は、単離された全 R N A から第 1 の鎖 c D N A を合成するステップと、X h o I 制限部位を含有するフォワードプライマーおよび S f i I 制限部位または B s t E I I 制限部位を含有するリバースプライマーを含む 1 つまたは複数のプライマーセットを用いた P C R 増幅によって V H 遺伝子を増幅するステップとを含んでよい。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、単鎖 F v (S c F v) ライブラリーを構築するための方法は、単離された全 R N A から第 1 の鎖 c D N A を合成するステップと、A p a L 1 制限部位を含有するフォワードプライマーおよび S a c 1 制限部位を含有するリバースプライマーを含む 1 つまたは複数のプライマーセットを用いた P C R 増幅によって V L 遺伝子を増幅するステップとを含んでよい。

30

【 0 0 2 6 】

本発明はさらに、本発明のこの態様の方法を用いて構築した単鎖 F v (S c F v) ライブラリーも提供する。

【 0 0 2 7 】

さらに別の態様において、本発明は、単鎖 F v (S c F v) ライブラリーを F a b 発現系に再編成するための方法を提供する。この方法は、(1) 本発明の S c F v ライブラリーを提供するステップと、(2) 1 つまたは複数の制限酵素を用いて S c F v ライブラリーを消化することによって、V H 遺伝子および V L 遺伝子をそれぞれが含む複数の断片を作製するステップと、(3) ステップ (2) で作製した複数の断片を、適合性制限部位を有する複数の F a b 発現ベクターにクローニングするステップとを含む。

40

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態において、1 つまたは複数の制限酵素としては、A p a L I および B s t E I I が挙げられる。いくつかの実施形態において、V H 遺伝子および V L 遺伝子は、V L - V H 形態で存在する。いくつかの実施形態において、複数の断片はそれぞれ、V H 遺伝子と V L 遺伝子の間にリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、リンカーの少なくとも一部分を、C k 配列、リボソーム結合部位 (r b s) 、およびシグナルペプチド配列を含有する配列で置き換えるステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、シグナルペプチド配列は、P e l B リーダー配列を含有する。

50

【0029】

さらに別の態様において、本発明は、単鎖 F v (S c F v) ライブラリーを I g G 発現系に再編成するための方法を提供する。この方法は、(1) 本発明の S c F v ライブラリーを提供するステップと、(2) 1 つまたは複数の制限酵素を用いて S c F v ライブラリーを消化することによって、V H 遺伝子および V L 遺伝子をそれぞれが含む複数の断片を作製するステップと、(3) ステップ (2) で作製した複数の断片を、適合性制限部位を有する複数の I g G 発現ベクターにクローニングするステップとを含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、1 つまたは複数の制限酵素としては、A p a L 1 および B s t E I I が挙げられる。いくつかの実施形態において、V H 遺伝子および V L 遺伝子は、V L - V H 形態で存在する。いくつかの実施形態において、複数の断片はそれぞれ、V H 遺伝子と V L 遺伝子の間にリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、リンカーの少なくとも一部分を、C k 配列、配列内リボソーム進入部位 (I R E S)、およびシグナルペプチド配列を含有する配列で置き換えるステップをさらに含む。

10

【0031】

本発明のその他の特徴、目的、および利点は、以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲において明らかである。しかし、詳細な説明、図面、および特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示すが、限定としてではなく、例証として与えられるにすぎないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更および修正は、当業者に明らかになると考えられる。

20

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】例示的な V 遺伝子増幅戦略を示す図である。

【図2】S c F v ダミー構築物を含有する例示的なベクターを示す図である。

【図3】S c F v ライブラリーを構築するための、制限に基づいた例示的なクローニング戦略を示す図である。

【図4】ハイスループットなタンパク質発現のために S c F v ライブラリーを F a b ライブラリーに大量に再編成する、例示的な 2 ステップの手順を示す図である。F a b ベクターの例示的なポリリンカーも示す。

30

【図5】ハイスループットなタンパク質発現のために S c F v ライブラリーを I g G 発現系に大量に再編成する、例示的な 2 ステップの手順を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明は、ハイスループットな発現およびライブラリーディスプレイの両方のために、異なる分子形態、例えば、F a b、I g G、または F c 融合物への S c F v ポリペプチドのプールのスムーズにつながった変換を可能にする、適合性制限部位を用いた単鎖 F v (S c F v) ライブラリー設計を提供する。特に、本発明は、適合性制限部位に基づいて S c F v ライブラリーを作製するためのベクターおよび方法、ならびに適合性制限部位を用いて、F a b、I g G、または他の免疫グロブリン形態に本発明の S c F v ライブラリーを再編成する方法を提供する。

40

【0034】

本発明の様々な態様を、以下のセクションにおいて詳細に説明する。セクションの使用は、本発明を限定することを意図していない。各セクションは、本発明の任意の態様に当てはまり得る。

【0035】

単鎖可変 (S c F v) ポリペプチド

典型的な単鎖可変断片 (S c F v) は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域を含有し、リンカーによって 1 つに連結された組換えポリペプチドである。典型的には、リンカーは短く柔軟である。いくつかの実施形態において、リンカーは、V L のカルボキシ

50

ル末端をVH配列のアミノ末端に連結する(VL-VH配置)。他の実施形態において、リンカーは、VHのカルボキシル末端をVL配列のアミノ末端に連結する(VH-VL配置)。他の実施形態において、ScFvポリペプチドは、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。ScFvポリペプチドをコードするDNAを構築するための一般的な方法は公知である。ScFvポリペプチドは、ScFvポリヌクレオチドにコードされる。

【0036】

本出願において使用される場合、ScFvポリペプチドは、ディスプレイもしくは発現されるポリペプチド、関心対象のポリペプチド、または異種ポリペプチドとも呼ばれる。さらに、「ポリペプチド」、「ペプチド」、または「タンパク質」という用語は、本出願において同義的に使用される。

10

【0037】

ベクター

本明細書において使用される場合、「ベクター」または「ポリヌクレオチドベクター」という用語は、連結されている別の核酸断片または配列をある場所(例えば、宿主、系)から別の場所に運搬および移送することができる核酸分子を意味する。この用語は、例えばポリヌクレオチド発現ベクターなどのインビボまたはインビトロの発現系用のベクターを含む。例えば、本発明のベクターは、「プラスミド」の形態でよく、これは、典型的にはエピソームによって維持されている、環状二本鎖DNAループを意味する。本発明のベクターは、直線状形態でもよい。さらに、本発明は、等価な機能を果たし、かつ本明細書の後に当技術分野において公知になる他の形態のベクターも含むと意図される。

20

【0038】

本発明のベクターは、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現のために使用され得る。一般に、本発明のベクターは、発現しようとするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたシス作用性調節領域を含む。調節領域は、構成的でも誘導性でもよい。適切なトランス作用性因子は、インビトロの翻訳系により、宿主によって、補完的(complementing)ベクターによって、または宿主中に導入される際にベクターそれ自体によって、供給される。

【0039】

本発明のベクターは、細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム、酵母染色体エレメント、哺乳動物ウイルス、哺乳動物染色体、およびそれらの組合せに由来してよく、例えば、限定されるわけではないがコスミドおよびファージミドを含めて、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝子エレメントに由来するものでよい。

30

【0040】

本発明のベクターは、発現ベクターまたはディスプレイベクターに典型的に含まれる任意のエレメントを含んでよく、これらとしては、限定されるわけではないが、複製起点配列、抗生物質耐性遺伝子、リーダー配列またはシグナルペプチド配列、様々なタグ配列、スタッパー配列および制限部位が挙げられる。

【0041】

本発明のベクターを構築するための一般的な方法は、当技術分野において周知である。例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、第2版、Sambrookら、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press。例えば、核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、細胞中へのDNAの導入、および遺伝子発現における核酸の操作ならびにタンパク質の解析のための多くの公知の技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology、第2版、Ausubelら編、John Wiley & Sons、1992に詳細に記載されている。SambrookらおよびAusubelらの開示内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0042】

本発明はまた、本発明のベクターを含有する、宿主細胞または他の生物も提供する。例えば、本発明は、本発明のベクターを含有する細菌、哺乳動物細胞、酵母、および他の細

50

胞系を提供する。適切な哺乳動物細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、H e L a細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、N S Oマウス黒色腫細胞、ならびにその他の多くのものが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。例示的な一般的細菌宿主は、大腸菌 (E . c o l i) である。

【 0 0 4 3 】

ポリヌクレオチドリンカー

典型的には、本発明のベクターは、制限部位に基づいたクローニング戦略を用いたライブラリー間での抗体重鎖可変 (V H) 遺伝子および抗体軽鎖可変 (V L) 遺伝子の移送を容易にする1つまたは複数の適合性制限部位を含有するポリヌクレオチドリンカーを含む。本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチドリンカー」または「ポリリンカー」という用語は、少なくとも1つの制限酵素認識部位を含有するポリヌクレオチド配列、または、二本鎖となった場合、少なくとも1つの制限酵素認識部位を形成する一本鎖ポリヌクレオチド配列を意味する。

10

【 0 0 4 4 】

本明細書において使用される場合、「適合性制限部位」という用語は、異なる分子形態 (例えば、F a b形態またはI g G形態) を有するベクター上の少なくとも1つの制限部位と適合性がある、1つの形態のベクター (例えば、S c F vファージディスプレイベクター) 上の制限部位を意味する。本明細書において使用される場合、制限部位は、適切な制限酵素によって切断された後に、D N Aリガーゼによってライゲーションできる場合は、「適合性がある」。いくつかの実施形態において、適合性制限部位としては、適切な制限酵素によって切断された後に、D N Aリガーゼによって結合できる相補的オーバーハング配列を有する「粘着末端」を生じるような二本鎖配列が挙げられる。粘着末端断片は、元来切断された元の断片だけでなく、適合性粘着末端を有する他の任意の断片にもライゲーションされ得る。粘着末端は、付着末端または相補的末端とも呼ばれる。制限酵素が、変性していない (n o n - d e g e n e r a t e) パリンドローム切断部位を有する場合、それによって産生される末端はすべて適合性である。また、異なる酵素によって産生される末端が適合性である場合もある。本明細書において使用される場合、適合性制限部位としては、適切な制限酵素によって切断された後に、D N Aリガーゼによって結合できる「平滑末端」を生じるような二本鎖配列も挙げられる。本出願において使用される場合、適合性制限部位は、一般的制限部位または普遍的制限部位とも呼ばれる。本明細書において使用される場合、「制限部位」とは、制限エンドヌクレアーゼによって認識される特定のヌクレオチド配列を意味する。制限エンドヌクレアーゼ (制限酵素) は、一般に、パリンドロームであり二本鎖である制限部位を認識する。本出願の文脈において、制限部位配列は、一本鎖または二本鎖と呼ばれてよい。

20

30

【 0 0 4 5 】

一般に、1型、2型、または3型の任意の制限酵素によって切断可能な任意の制限部位が、本発明のために使用され得る。いくつかの実施形態において、2型制限酵素によって切断可能な任意の制限部位が使用され得る。制限酵素およびそれらの認識配列は、当技術分野において周知である。例示的な制限認識部位を表1に列挙する。適切な制限部位の配列は、標準的な組換え技術を用いてポリヌクレオチドリンカー配列中に組み入れることができる。

40

【 0 0 4 6 】

適合性制限部位の使用により、配列情報に依存せずに、S c F vのプールを他の分子形態に再編成することが可能になる。これは、抗体のV H遺伝子配列もV L遺伝子配列も切断しないか、もしくは頻繁には切断せず、V L遺伝子およびV H遺伝子の5'末端もしくは3'末端に位置するか、またはV H遺伝子とV L遺伝子の間に置かれた柔軟なリンカーをコードするポリヌクレオチド内に組み入れられた一般的制限部位を用いて実現することができる。したがって、選択されたS c F vのプールを発現またはディスプレイのために移送し、この移送の間、V LとV Hの連結を維持することができる。移送中のV LとV Hの連結の保持は、再編成期間中のV遺伝子のシャッフリングおよび選択された結合対の損

50

失を防ぐために重要な選択肢である。コンビナトリアルシャッフリング（VHおよびVLの連結されていない移送）を可能にする代替のクローニング手順は、移送中に余分な多様性が望まれる場合、使用してよい。

【0047】

いくつかの実施形態において、本発明に適した適合性制限部位としては、抗原VHまたはVL遺伝子配列を切断しないか、または頻繁には切断しない制限酵素によって切断可能な制限部位が挙げられる。例えば、適切な適合性制限部位は、平均で、VHまたはVL遺伝子集団の30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.08%、0.06%、0.04%、0.02%、0.01%、または0.005%未満を切断する制限酵素によって切断可能な任意の部位でよい。制限酵素の切断頻度は、コード領域のヌクレオチド組成またはDNA供給源に依存する。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドリンカーは、限定されるわけではないが、ApaLI、AscI、AvaI、AvaII、MfeI、BamHI、BclI、BsiWI、BspEI、BssHII、BstEII、EcoRV、HindIII、MluI、NcoI、NotI、XbaI、XhoI、XmaI、PciI、PstI、NheI、SacI、SaiI、SfiI、およびSmaIを含めて、抗体VHまたはVL遺伝子を切断しないか、または頻繁には切断しない制限酵素によって切断可能な1つまたは複数の適合性制限部位を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、上記の酵素のいずれか1つによって切断可能な制限部位を含有してよい。例えば、ポリヌクレオチドリンカーは、SfiIによって切断可能な1つまたは複数の適合性制限部位を含有してよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、SfiIによって切断可能な第1の適合性制限部位およびSfiIによって切断可能な第2の適合性制限部位を含有してよく、その際、第1の適合性制限部位および第2の適合性制限部位は互いに適合性ではない。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、AscIおよびMfeI、AscIおよびSfiI、ApaLIおよびNotI、ApaLIおよびNheI、またはApaLIおよびBstEIIなど、上記の酵素のいずれかによって切断可能な制限部位の組合せを含有してよい。他の実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、SfiI、BssHII、ApaLI、またはMfeI、XhoI、SalI、BclI、BstEII、MluI、SmaI、またはXbaI、XhoI、SalI、BspEI、ApaLI、BssHII、またはEcoRV、およびSfiI、BclI、AvaII、BsiWI、またはBamHIなどの上記の酵素のいずれかによって切断可能な制限部位の組合せを含有してよい。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、SfiI、BssHII、またはApaLI、XhoI、SalI、BclI、SacI、AvaII、BsiWI、またはMluI、MfeI、BspEI、ApaLI、BssHII、XhoI、またはSalI、およびSfiI、BclI、XhoI、SalI、またはBstEIIなどの上記の酵素のいずれかによって切断可能な制限部位の組合せを含有してよい。

【0048】

いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドリンカーは、決まった相対的位置に存在する制限部位の組合せを含有する。例えば、ポリヌクレオチドリンカーは、5'から3'に向かって、ApaLI部位、SacI部位、XhoI部位、およびSfiI部位を含む、適合性制限部位の組合せを含んでよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、5'から3'に向かって、ApaLI部位、SacI部位、XhoI部位、BstEII、およびSfiI部位を含む、適合性制限部位の組合せを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、5'から3'に向かって、AscI部位、PciI部位、HindIII部位、ApaLI部位、SacI部位、AvaI部位、XhoI部位、MfeI部位、XmaI部位、SmaI部位、BstEII部位、BclI部位、およびSfiI部位を含む、適合性制限部位の組合せを含む。1つのこのような例示的なポリリンカーを実施例3において説明し、この例示的なポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。いくつかの実施形態において、ポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドリンカーは、5'から3'に向かって、SfiI、BssHII、ApaLI、またはMfeI部位、XhoI、SalI、BclI、BstEII、MluI、SmaI、またはXbaI部位、XhoI、SalI、BspEI、ApaLI、BssHII、またはEcoRV部位、およびSfiI、BclI、AvrII、BsiWI、またはBamHI部位を含む、適合性制限部位の組合せを含む。1つの例示的なポリリンカーは、5'から3'に向かって、BssHII、XhoI、BspEI、およびAvrIIまたはBsiWIを含む。他の実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、5'から3'に向かって、SfiI、BssHII、またはApaLI部位、XhoI、SalI、BclI、SacI、AvrII、BsiWI、またはMluI部位、MfeI、BspEI、ApaLI、BssHII、XhoI、またはSalI部位、およびSfiI、BclI、XhoI、SalI、またはBstEII部位を含む、適合性制限部位の組合せを含む。1つの例示的なポリリンカーは、5'から3'に向かって、BssHII、AvrIIまたはBsiWI、BspEI、およびXhoIを含む。

10

20

30

40

50

【0049】

適合性制限部位間のヌクレオチド配列は変更されてよい。したがって、いくつかの実施形態において、制限部位の同じ組合せ（すなわち、5'から3'に向かって、AscI部位、PciI部位、HindIII部位、ApaLI部位、SacI部位、AvaI部位、XhoI部位、MfeI部位、XmaI部位、SmaI部位、BstEII部位、BclI部位、およびSfiI部位）を含有するポリヌクレオチドリンカーは、配列番号1と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一のポリヌクレオチド配列を有してよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドリンカーは、5'から3'に向かって、PciI部位、HindIII部位、ApaLI部位、SacI部位、AscI部位、XhoI部位、AvaI部位、MfeI部位、BstEII部位、およびSfiI部位を含む、適合性制限部位の組合せを含む。1つのこのような例示的なポリリンカーを実施例5において説明し、この例示的なポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を配列番号2に示す。

【0051】

適合性制限部位間のヌクレオチド配列は変更されてよい。したがって、いくつかの実施形態において、制限部位の同じ組合せ（すなわち、5'から3'に向かって、PciI部位、HindIII部位、ApaLI部位、SacI部位、AscI部位、XhoI部位、AvaI部位、MfeI部位、BstEII部位、およびSfiI部位）を含有するポリヌクレオチドリンカーは、配列番号2と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一のポリヌクレオチド配列を有してよい。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、ダミー-VL遺伝子またはダミー-VH遺伝子を適合性制限部位の間に組み入れてよい。ダミー-VL遺伝子またはダミー-VH遺伝子は、既存のVL遺伝子またはVH遺伝子のそれぞれに、典型的には3つのフレームすべてに停止コドンを導入することによって構築することができる。適合性制限部位は、ダミー-VL遺伝子およびダミー-VH遺伝子の5'末端および3'末端に導入し、適合性制限部位を用いて、ポリヌクレオチドリンカー中にクローニングすることができる。ダミー-VH遺伝子およびダミー-VL遺伝子は、後述するように適合性制限部位を用いて、関心対象のVH遺伝子およびVL遺伝子でそれぞれ置き換えることができる。例示的なScFvダミー構築物を実施例3において説明し、図2に示す。

【 0 0 5 3 】

したがって、本発明は、決まった位置に存在する適合性制限部位を用いて、異なるエレメント（例えば、V H 遺伝子またはV L 遺伝子）を独立にクローニングおよび交換できる、モジュール式ポリリンカー設計を提供する。また、このポリリンカー設計により、配列情報に依存せずに、制限に基づいたクローニング手順を用いて、連結された形態のV H およびV L の大きなプールを異なる形態（例えば、F a b およびI g G）のベクターに移動することが容易になる。後述するように、典型的には、再編成は、外部の制限部位を最初に用いた両V 遺伝子の移送、続いて、F a b 発現またはI g G 発現のいずれかのための適切な配列断片によるS c F v リンカー配列の置換を含む、2ステップのクローニング手順を伴う。

【 0 0 5 4 】

【表 1 - 1】

表1 例示的な制限酵素および対応する認識部位（一本鎖5'から3'を示す）

酵素	認識部位
<i>Aat II</i>	GACGI▼C
<i>AccI</i>	GT▼ (A/T)(T/G)AC
<i>AccIII</i>	T▼CCGGA
<i>Acc65 I</i>	G▼ GTACC
<i>AccB7 I</i>	CCANNNN▼ NTGG (配列番号 4)
<i>AcyI</i>	G(A/G)▼ CG(T/C)C
<i>Age I</i>	A▼ CCGGT
<i>Alu I</i>	AG▼ CT
<i>A/w26 I</i>	G▼ TCTC(1/5)
<i>A/w441</i>	G▼ TGCAC
<i>Apa I</i>	GGGCC▼ C
<i>Ava I</i>	C▼ (T/C)CG(A/G)G
<i>Ava II</i>	G▼ G(A/T)CC
<i>BaI I</i>	TGG▼ CCA
<i>BamH I</i>	G▼ GATCC
<i>Ban I</i>	G▼ G (T/C)(A/G)CC
<i>Ban II</i>	G(A/G)GC(T/C)▼ C
<i>Bbu I</i>	GCATG▼ C
<i>BcI I</i>	T▼ GATCA
<i>Bgl I</i>	GCCNNNN▼ NGGC (配列番号 5)
<i>Bgl II</i>	A▼ GATCT
<i>BsaM I</i>	GATTGCN▼

10

20

30

40

【表 1 - 2】

酵素	認識部位
<i>BsaO I</i>	CG(A/G)(T/C)▼ CG
<i>Bsp1286 I</i>	G(G/A/T)GC(C/A/T)▼ C
<i>BsrBR I</i>	GATNN▼ NNATC (配列番号 6)
<i>BsrS I</i>	ACTGGN▼
<i>BssH II</i>	G▼ CGCGC
<i>Bst71 I</i>	GCAGC(8/12)
<i>Bst98 I</i>	C▼ TTAAG
<i>Bst E II</i>	G▼ GTNACC
<i>Bst O I</i>	CC▼ (A/T)GG
<i>Bst X I</i>	CCANNNN▼NTGG (配列番号 7)
<i>Bst Z I</i>	C▼ GGCCG
<i>Bsu36 I</i>	CC▼ TNAGG
<i>Cfo I</i>	GCG▼ C
<i>Cla I</i>	AT▼ CGAT
<i>Csp I</i>	CG▼ G(A/T)CCG
<i>Csp 45 I</i>	TT▼ CGAA
<i>Dde I</i>	C▼ TNAG
<i>Dpn I</i>	G ^{me} A▼ TC
<i>Dra I</i>	TTT▼ AAA
<i>EclHK I</i>	GACNNN▼ NNGTC (配列番号 8)
<i>Eco47 III</i>	ACG▼ GCT
<i>Eco52 I</i>	C▼ GGCCG
<i>Eco72 I</i>	CAC▼ GTG
<i>EcoI CR I</i>	GAG▼ CJC

10

20

30

40

【表 1 - 3】

酵素	認識部位
<i>EcoR I</i>	G▼ AATTC
<i>EcoR V</i>	GAT▼ ATC
<i>Fok I</i>	GGATG(9/13)
<i>Hae II</i>	(A/G)GCGC▼ (T/C)
<i>HaellI</i>	GG▼ CC
<i>Hha I</i>	GCG▼ C
<i>Hinc II</i>	GT(T/C)▼ (A/G)AC
<i>Hind III</i>	A▼ AGCTT
<i>Hinf I</i>	G▼ ANTC
<i>Hpa I</i>	GTT▼ AAC
<i>Hpa II</i>	C▼ CGG
<i>Hsp92 I</i>	G(A/G)▼ CG(T/C)C
<i>Hsp92 II</i>	CATG▼
<i>I-Ppo I</i>	CTCTCTTAA▼ GGTAGC (配列番号 9)
<i>Kpn I</i>	GGTAC▼ C
<i>Mbo I</i>	▼GATC
<i>Mbo II</i>	GAAGA(8/7)
<i>Mlu I</i>	A▼ CGCGT
<i>Msp I</i>	C▼ CGG
<i>MspA I</i>	C(A/C)G▼ C(G/T)G
<i>Nae I</i>	GCC▼ GGC
<i>Nar</i>	GG▼ CGCC
<i>Nci I</i>	CC▼ (G/C)GG
<i>Nco I</i>	C▼ CATGG

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

酵素	認識部位
<i>Nde I</i>	CA▼ TATG
<i>NgoM I</i>	G▼ CCGGC
<i>Nhe I</i>	G▼ CTAGC
<i>Not I</i>	GC▼ GGCCGC
<i>Nru I</i>	TCG▼ CGA
<i>Nsi I</i>	ATGCA▼ T
<i>Pst I</i>	CTGCA▼ G
<i>Pvu I</i>	CGAT▼ CG
<i>Rvu II</i>	CAG▼ CTG
<i>Rsa I</i>	GT▼ AC
<i>Sac I</i>	GAGGCT▼ C
<i>Sac II</i>	CCGC▼ GG
<i>Sal I</i>	G▼ TCGAC
<i>Sau3A I</i>	▼GATC
<i>Sau96 I</i>	G▼ GNCC
<i>Sca I</i>	AGT▼ ACT
<i>Sfi I</i>	GGCCNNNN▼NGGCC (配列番号 10)
<i>Sgf I</i>	GCGAT▼ CGC
<i>Sin I</i>	G▼ G(AT)CC
<i>Sma I</i>	CCC▼ GGG
<i>SnaB I</i>	TAC▼ GTA
<i>Spe I</i>	A▼ CTAGT
<i>Sph I</i>	GCATG▼ C
<i>Ssp I</i>	AAT▼ ATT

10

20

30

40

【表 1 - 5】

酵素	認識部位
<i>Stu I</i>	AGG▼ CCT
<i>Sty I</i>	C▼ C(A/T)(T/A)GG
<i>Taq I</i>	T▼ CGA
<i>Tru9 I</i>	T▼ TAA
<i>TthIII I</i>	GACN▼ NNGTC
<i>Vsp I</i>	A▼ TAAT
<i>Xba I</i>	T▼ CTAGA
<i>Xho I</i>	C▼ TCGAG
<i>Xho II</i>	(A/G)▼ GATC(T/C)
<i>Xma I</i>	C▼ CCGGG
<i>Xmn I</i>	GAANN▼ NNTTC (配列番号11)

10

【0059】

ファージディスプレイベクター

20

典型的には、本発明のファージディスプレイベクターは、例えば、ファージタンパク質（例えばファージ表面タンパク質）との融合タンパク質として、異種ポリペプチドを発現または条件付きで発現することができるファージ由来核酸配列を含有するベクターである。いくつかの実施形態において、本発明のファージディスプレイベクターは、繊維状ファージ（例えば、ファージ f 1、f d、および M 1 3）またはバクテリオファージ（例えば、T 7 バクテリオファージおよび 型ファージ）に由来するベクターである。繊維状ファージおよびバクテリオファージは、例えば、Santini (1998) J. Mol. Biol. 282: 125 ~ 135、Rosenbergら (1996) Innovations 6: 1 ~ 6、Houshmandら (1999) Anal Biochem 268: 363 ~ 370) に記載されている。

30

【0060】

特に、本発明のファージディスプレイベクターは、次のエレメントを含んでよい：（１）構成的発現または誘導性発現に適したプロモーター（例えば、lac プロモーター）、（２）ディスプレイされるペプチドをコードする配列の前のリボソーム結合部位およびシグナル配列、ならびに（３）前述したような適合性制限部位を含有するポリヌクレオチドリンカー、（４）任意選択により、ヒスチジン 5 ~ 6 個のストレッチまたは抗体によって認識されるエピトープなどのタグ配列、（５）抑制可能なコドン (suppressible) (例えば、終止コドン)、ならびに（６）ディスプレイしようとするペプチドとの融合物を形成するようにインフレームに位置する、ファージ表面タンパク質をコードする配列。

40

【0061】

一般に、本発明のファージディスプレイベクターは、異種ポリペプチドをコードする核酸配列およびファージ表面タンパク質をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターおよび/または調節領域を含有する。「作動可能に連結される」という用語は、連結されたプロモーターおよび/または調節領域がコード配列の発現を機能的に制御するような、核酸配列間の機能的連結を意味する。また、これは、同じ連結されたプロモーターおよび/または調節領域にコード配列が制御され得るような、コード配列間の連結も意味する。コード配列間のこのような連結は、それらのコード配列にコードされるアミノ酸を含む融合タンパク質が発現され得るように、インフレームで、または同じコーディングフレーム中で連結されていると呼ぶこともできる。

50

【0062】

本発明の他の実施形態において、融合タンパク質を発現する能力は、調節的プロモーターまたは他の調節領域（例えば、誘導がない場合、それらによって制御される発現が低い、または検出不可能である、誘導性プロモーター）の使用によってある程度調節される。誘導性プロモーターの非限定的な例としては、lacプロモーター、lac UV5プロモーター、アラビノースプロモーター、およびtetプロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態において、リプレッサー（例えば、lacI）またはターミネーター（例えば、tHPターミネーター）を組み入れることによって、誘導性プロモーターをさらに拘束することができる。例えば、リプレッサーlacIは、lacプロモーターと共に使用される。いくつかの実施形態において、lacI遺伝子とlacプロモーターの間に強力なtHPターミネーターをさらに挿入することができる。

10

【0063】

本明細書において使用される場合、「ファージ表面タンパク質」という用語は、繊維状ファージ（例えば、ファージf1、fd、およびM13）またはバクテリオファージ（例えば、T4、およびT7）の表面に通常存在し、異種ポリペプチドとの融合タンパク質として発現されるように適合され、それでもなお、集合してファージ粒子を構築することができ、その結果、そのポリペプチドがファージ表面にディスプレイされる、任意のタンパク質を意味する。繊維状ファージに由来する適切な表面タンパク質としては、遺伝子IIIタンパク質および遺伝子VIIタンパク質など繊維状ファージに由来するマイナーコートタンパク質、遺伝子VIタンパク質、遺伝子VIIタンパク質、遺伝子IXタンパク質、T7由来の遺伝子10タンパク質、およびバクテリオファージのカプシドDタンパク質(gpD)など繊維状ファージに由来する主要コートタンパク質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの実施形態において、適切なファージ表面タンパク質は、天然に存在する表面タンパク質のドメイン、切断型変種、断片、または機能的変種である。例えば、適切なファージ表面タンパク質は、遺伝子IIIタンパク質のドメイン、例えば、アンカードメインまたは「断端(stump)」でよい。その他の例示的なファージ表面タンパク質は、その開示内容が参照により本明細書に組み入れられるWO00/71694に記載されている。当業者は認識するように、ファージ表面タンパク質は、ファージディスプレイベクターおよびその増殖のために使用する細胞の考慮と組み合わせて、選択するべきである。

20

30

【0064】

ディスプレイされるポリペプチドは、典型的には、ファージ表面タンパク質に共有結合されている。この連結は、表面タンパク質に融合されるポリペプチド構成要素をコードする核酸の翻訳の結果、生じる。この連結は、柔軟なペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、または停止コドンの抑制の結果として組み入れられるアミノ酸を含んでよい。

【0065】

抑制可能なコドンは、当技術分野において公知である。例えば、抑制可能なコドンは、UAG（アンバーコドンと呼ばれる）、UAA（オーカーコドンと呼ばれる）、およびUGAを含めて、終始コドンでよい。UAG、UAA、およびUGAは、mRNAコドンを示す。ベクター中に存在する対応するヌクレオチド配列は、それぞれ、TAG、TAA、およびTGAである。また、終止コドンの選択は、コドンの周囲に特定の配列を導入することによって強化することもできる。

40

【0066】

コード配列の翻訳をさらに調節するために、特殊な開始シグナルを組み入れてもよい。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンまたは隣接配列が挙げられる。ATG開始コドンを含めて、外因性翻訳制御シグナルが提供される必要がある場合がある。当業者は、これを判定し、必要なシグナルを提供することが容易にできるはずである。開始コドンは、挿入配列全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことは周知である。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然でも合成でもよい。誘導なしでのタンパク質産生をさらに

50

減少させるために、低効率のリボソーム結合配列または翻訳開始シグナルが使用され得る。

【0067】

発現されたタンパク質またはポリペプチドの分泌を推進または指示することができる任意のペプチド配列が、ファージディスプレイベクター用のリーダー配列として使用され得る。例示的なリーダー配列としては、PelBリーダー配列およびOmpAリーダー配列が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0068】

さらに、任意選択により、融合ポリペプチドは、精製、検出、および/またはスクリーニングにおいて有用であり得るタグを含んでもよい。適切なタグとしては、FLAG、ポリhis、gDタグ、c-myc、蛍光タンパク質、または α -ガラクトシダーゼが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0069】

ファージディスプレイベクター、ファージディスプレイライブラリーを構築するための一般的な方法、および使用方法は、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号、Smith(1985)Science 228:1315~1317、WO92/18619、WO91/17271、WO92/20791;WO92/15679、WO93/01288、WO92/01047、WO92/09690、WO90/02809、de Haardら(1999)J. Biol. Chem. 274:18218~30、Hoogenboomら(1998)Immunotechnology 4: 1-20、Hoogenboomら(2000)Immunol. Today 2:371~8、Fuchsら(1991)Bio/Technology 9:1370~1372、Hayら(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81~85、Huseら(1989)Science 246:1275~1281、Griffithsら(1993)EMBO J 12:725~734、Hawkinsら(1992)J. Mol. Biol. 226:889~896、Clacksonら(1991)Nature 352:624~628、Gramら(1992)PNAS 89:3576~3580、Garrardら(1991)Bio/Technology 9:1373~1377、Rebarら(1996)Methods Enzymol. 267:129~49、Hoogenboomら(1991)Nuc. Acid Res. 19:4133~4137、およびBarbasら(1991)PNAS 88:7978~7982において説明されている。

20

30

【0070】

例示的な本発明のファージディスプレイベクターは、以下の実施例のセクションにおいて説明する。

【0071】

リボソームディスプレイベクター

本発明のリボソームディスプレイベクターとしては、原核生物ディスプレイ系または真核生物ディスプレイ系に適したベクターが挙げられる。原核生物リボソームディスプレイ系は、ポリソームディスプレイ系とも呼ばれる。

40

【0072】

本発明のリボソームディスプレイベクターは、典型的には、プロモーターまたはRNAポリメラーゼ結合配列、リボソーム結合部位、翻訳開始配列、ディスプレイされるペプチドをリボソームから離してペプチドの正確なフォールディングを補助するアミノ酸スペーサー配列、および前述の1つまたは複数の適合性制限部位を含有するポリヌクレオチドリンカーを含む。任意選択により、リボソームディスプレイベクターは、検出タグをコードする1つもしくは複数の配列、合成されたmRNAを保護するための3'ステムループ構造および/もしくは5'ステムループ構造、翻訳エンハンサー、または「アクチベーター」配列(複数可)も含んでよい。典型的には、本発明のリボソームディスプレイベクターは、ディスプレイされるポリペプチドのインフレームの停止コドンに欠いている。

50

【0073】

本発明に適したプロモーターまたはRNAポリメラーゼ結合配列としては、インビトロでの翻訳に適した任意のプロモーターを挙げることができる。例示的なプロモーターとしては、T7プロモーター、T3プロモーター、もしくはSP6プロモーター、またはRNAポリメラーゼT7、T3、もしくはSP6によって認識される任意の配列が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの実施形態において、本発明のリボソームディスプレイベクターは、T7プロモーターとSP6プロモーターの双方など、2つのプロモーターを含んでよい。

【0074】

リボソーム結合部位は、プロモーター領域の下流、または内部に位置してよい。このリボソーム結合部位は、原核生物翻訳手順が使用される場合には、原核生物リボソーム複合体(シャイン・ダルガノ配列など)に特異的でよい。適切な原核生物翻訳系としては、大腸菌(*E. coli*) S30系が挙げられるが、それに限定されるわけではない。また、リボソーム結合部位は、真核生物翻訳手順が使用される場合、真核生物翻訳系(コザックコンセンサス配列など)に特異的でよい。適切な真核生物翻訳系としては、ウサギ網状赤血球系(Krawetzら、*Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61: 274~286、1983、Merrick、*Meth. Enzymol.* 101: 38、1983)が挙げられるが、それに限定されるわけではない。1つの例示的なコザックコンセンサス配列は、GCCGCCACCATGG(配列番号12)である。

【0075】

また、その他の翻訳エンハンサーまたは「アクチベーター」配列も含まれてよい。例えば、アフリカツメガエルグロビン遺伝子の翻訳エンハンサーを、プロモーターと翻訳開始部位の間に挿入してよい。他の例示的な翻訳エンハンサーまたはアクチベーター配列としては、タバコモザイクウイルスに由来する非翻訳「リーダー配列」(Joblingら *Nucleic Acids Res.* 16: 4483~4498、1988)、アルファルファモザイクウイルスRNA4(JoblingおよびGehrke、*Nature* 325: 622~625、1987)、ゴキブリウイルス(ノダウイルス(*Nodavirus*))RNA2(FriesenおよびRueckert、*J. Virol.* 37: 876~886、1981)、ならびにカブモザイクウイルスおよびプロモザイクウイルスのコートタンパク質mRNA(Zagorskiら、*Biochimie* 65: 127~133、1983)に由来する5'非翻訳領域が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0076】

アミノ酸スペーサー配列をC末端に人工的に作り出して、ディスプレイされるペプチドをリボソームから離すことができる。いかなる理論にも拘泥するものではないが、スペーサー配列は、ディスプレイされるポリペプチドがリボソーム「トンネル」から完全に出て行き、正確にフォールディングするのを可能にすると予想される。典型的には、適切なスペーサー配列は、少なくとも20アミノ酸長をコードする。特に、スペーサーの適切な長さとしては、少なくとも30アミノ酸、40アミノ酸、50アミノ酸、60アミノ酸、70アミノ酸、80アミノ酸、90アミノ酸、100アミノ酸を挙げることができる。いくつかの実施形態において、スペーサーは、23個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、スペーサーは、69個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、スペーサーは、116個のアミノ酸を含む。適切なスペーサー配列は、任意の公知のタンパク質に由来してよく、例えば、免疫グロブリン鎖の定常領域(C1c)、繊維状ファージM13の遺伝子III、およびヒトIgMのCH3ドメインなどに由来してよい。

【0077】

本発明のリボソームベクター中にタグ配列を組み入れてもよい。典型的には、タグ配列は、ディスプレイされるペプチドのN末端またはC末端に組み入れられる。適切なタグとしては、ヒスチジンのストレッチ(例えば、5~6個のヒスチジン)、抗体によって認識されるエピトープ(例えば、サブスタンスPまたはFlag)が挙げられるが、それらに

10

20

30

40

50

限定されるわけではない。

【0078】

また、リボソームディスプレイベクターは、ステムループ構造を形成することができるパンドローム配列を有する3'領域も含んでよい。いかなる理論にも拘泥するものではないが、ステムループ構造は、転座(translocation)を妨害することができ、したがって、パンドローム配列は、翻訳期間中のリボソームの移動を減速させ、リボソームがmRNAから「脱落する」のを防ぎ、それによって、インビトロの翻訳ステップにおいて、合成されたmRNAを保護し、ポリソームの数を増加させる。同様に、リボソームディスプレイベクターは、5'ステムループ構造を含んでもよい。

【0079】

さらに、3'領域は、相補的なホモポリマー配列へのハイブリダイゼーションによるインビトロ翻訳反応に由来するmRNAを後で精製するために、ポリAまたは他のポリヌクレオチドストレッチを含有してもよい。

【0080】

リボソームディスプレイベクターは、当業者に周知のプロトコールによって化学合成することができる。あるいは、上記の各エレメントは、1つまたは複数のプラスミド中に組み入れ、微生物中で増幅させ、標準手順によって精製し、制限酵素で切断して適切な断片にした後で、ベクターに組み立ててもよい。リボソームディスプレイベクター、リボソームディスプレイライブラリーを構築するための一般的方法、および使用方法は、米国特許第5,643,768号、第5,658,754号、および第7,074,557号、ならびにMattheakisら、(1994)PNAS USA 91,9022-9026、Mattheakisら、(1996)Methods Enzymol. 267、195-207、Gersukら、(1997)Biotech and Biophys. Res. Com. 232,578-582、HanesおよびPluckthun(1997)PNAS USA 94,4937-4942、Hanesら、(1998)PNAS USA 95,14130-50、HeおよびTauszig(1997)NAR 5132-5234において説明されており、これらすべての文献の教示は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0081】

コレクション

本明細書において使用される場合、例えば、VH遺伝子のコレクションまたはVL遺伝子のコレクションのような「遺伝子のコレクション」、「核酸のコレクション」、「ポリヌクレオチドのコレクション」、および「ポリペプチドのコレクション」という語句は、多様な変種、例えば、ヌクレオチド配列が異なる核酸変種またはアミノ酸配列が異なるポリペプチド変種の集団である。

【0082】

ライブラリー

本明細書において使用される場合、「ライブラリー」という用語は、異種ポリペプチドまたは異種核酸の混合物を意味する。典型的には、ライブラリーは、それぞれがポリペプチド配列または核酸配列を含有する複数のメンバーを含む。典型的には、各ポリペプチド配列または核酸配列は、ベクター中に組み入れられる。本発明によるライブラリーは、典型的には、ポリペプチドまたは核酸のコレクションを包含する。ライブラリーメンバー間の配列の相違は、ライブラリーに存在する多様性の原因である。ライブラリーは、ポリペプチドもしくは核酸の単純な混合物の形態をとってもよく、または、核酸ライブラリーを用いて形質転換された生物もしくは細胞、例えば、細菌、ウイルス、および動物細胞もしくは植物細胞などの形態であってもよい。本明細書において使用される場合、「生物」という用語は、原核生物および真核生物など細胞性のあらゆる生き物、ならびにバクテリオファージおよびウイルスなど非細胞性の核酸含有実体を意味する。

【0083】

特に、抗体ライブラリーは、合成核酸、未処置の核酸、患者(例えば、免疫化されたヒ

10

20

30

40

50

ト対象または病気にかかったヒト対象)、および動物(例えば、免疫化された動物)からのものを含めて、様々な供給源からの多様性を組み入れることができる。

【0084】

いくつかの実施形態において、免疫細胞は、抗体、MHC複合体、およびT細胞受容体の差異に対する多様性の天然供給源として使用され得る。免疫細胞のいくつかの例は、B細胞およびT細胞である。免疫細胞は、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ウサギ、ラクダ、またはげっ歯動物から得ることができる。これらの細胞は、特定の特性に関して選択することができる。例えば、CD4+およびCD8-であるT細胞を選択することができる。様々な成熟度段階のB細胞を選択することができる。

【0085】

天然に多様な配列は、対象から得られた細胞および試料、例えば、末梢血白血球(PBL)より単離された全RNAから作製されたcDNAとして得ることができる。第1の(アンチセンス)鎖の逆転写は、任意の適切なプライマーを用いて任意の様式で実施することができる。例えば、de Haardら(1999) J. Biol. Chem. 274:18218~30を参照されたい。プライマー結合領域は、例えば、免疫グロブリンの異なるアイソタイプを逆転写するために、異なる免疫グロブリンにおいて不変であってよい。また、プライマー結合領域は、免疫グロブリンの特定のアイソタイプに対して特異的であってもよい。典型的には、プライマーは、少なくとも1つのCDRをコードする配列の3'側にある領域に特異的である。ポリdTプライマー(例えば、重鎖遺伝子に対する)またはmRNA鎖にライゲーションされた合成配列にハイブリダイズする合成プライマーもまた、使用することができる。cDNAを増幅し、改変し、断片化し、またはベクター中にクローニングして、抗体ライブラリーを形成させることができる。例えば、前記のde Haardら(1999)を参照されたい。

【0086】

S c F vライブラリーの構築

典型的には、S c F vライブラリーの構築は2つのステップを含む。第1のステップは、前述したように関心対象の対象より単離されたRNA試料からVH遺伝子およびVL遺伝子を別々に単離およびクローニングするステップを含む。当技術分野において周知の方法を用いた適切なプライマー設計によって、所望の適合性制限部位を組み入れることができる。複数回のPCR反応を用いて、VH遺伝子およびVL遺伝子を増幅するか、または所望の制限部位を導入することができる。適切な制限部位を用いて、VH遺伝子およびVL遺伝子を各自のダミーベクター中にクローニングして、VH遺伝子またはVL遺伝子のみのコレクションを構築することができる。第2のステップは、適合性制限酵素を用いた消化によりVL遺伝子のコレクションを単離するステップ、およびそのVLコレクションをVH遺伝子のみのコレクション中に移送してS c F vライブラリーを構築するステップを含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、本発明の単鎖Fv(S c F v)ライブラリーを構築するための方法は、(1)VH遺伝子のコレクションの5'末端にX h o I制限部位を、3'末端にS f i I制限部位またはB s t E I I制限部位を導入するステップと、(2)X h o Iと適合性がある第1の制限部位およびS f i IまたはB s t E I Iと適合性がある第2の制限部位を用いて、複数のベクター中にVH遺伝子のコレクションをクローニングするステップと、(3)VL遺伝子のコレクションの5'末端にS a c I制限部位を、3'末端にA p a L I制限部位を導入するステップと、(4)A p a L IおよびS a c Iと適合性がある制限部位を用いて、複数のベクター中にVL遺伝子のコレクションをクローニングするステップとを含む。

【0088】

いくつかの実施形態において、ステップ(1)は、単離された全RNAから第1の鎖cDNAを合成するステップと、X h o I制限部位を含有するフォワードプライマーおよびS f i I制限部位またはB s t E I I制限部位を含有するリバースプライマーを含む1つ

10

20

30

40

50

または複数のプライマーセットを用いたPCR増幅によってVH遺伝子を増幅するステップとを含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、ステップ(3)は、単離された全RNAから第1の鎖cDNAを合成するステップと、ApaI制限部位を含有するフォワードプライマーおよびSacI制限部位を含有するリバースプライマーを含む1つまたは複数のプライマーセットを用いたPCR増幅によってVL遺伝子を増幅するステップとを含む。

【0090】

ScFvライブラリーを構築するための例示的なプライマーおよび方法は、実施例のセクションにおいて説明する。

【0091】

標的

標的は、コレクションの1つまたは複数の特異的結合メンバーがそれに対して同定され得るリガンドである。コレクションのメンバーが抗体分子である場合、標的は、抗原またはエピトープでよく、コレクションのメンバーが酵素である場合、標的は基質でよい。

【0092】

選択

選択プロセスは、手動で、または自動化方法を用いて実施することができる。一部の場
合において、非特異的結合および他の理想的ではない特性は、複数回の選択サイクルを必
要とする。選択サイクルを追加することにより、候補ライブラリーメンバーが豊富になる
。選択ステップを繰り返すために、溶出されたライブラリーメンバーを増幅し、次いで、
標的に再度加える。実施に応じて、異なる回数を選択サイクルが、膨大な多様性を有する
ライブラリーから候補ライブラリーメンバーのプールを同定するために十分となり得る。
例えば、1回または2回の選択が十分である場合がある。

【0093】

いくつかの例示的な選択プロセスは、以下のとおりである。

【0094】

パンニング法。標的分子が、マイクロタイターウェル、基材、粒子、またはビーズの表
面などの固体支持体に固定される。ディスプレイライブラリーが、この支持体に接触させ
られる。標的に対する親和性を有するライブラリーメンバーは、結合することが可能であ
る。非特異的にまたは弱く結合したメンバーは、支持体から洗い流される。次いで、結合
されたライブラリーメンバーが、(例えば溶出によって)支持体から回収される。回収さ
れたライブラリーメンバーは、さらなる解析(例えば、スクリーニング)のために集めら
れるか、またはさらにもう1回選択するためにプールされる。

【0095】

磁性粒子プロセッサ。自動選択の1つの例では、磁性粒子および磁性粒子プロセッサを
使用する。この場合、標的は磁性粒子上に固定される。King Fisher(商標)シ
ステム、すなわち、Thermo Lab Systems(ヘルシンキ、フィンランド)
社製の磁性粒子プロセッサが、標的に対してディスプレイライブラリーメンバーを選択す
るために使用される。ディスプレイライブラリーは、試験管中で磁性粒子と接触させられ
る。ビーズおよびライブラリーは混合される。次いで、使い捨ての鞘に覆われた磁性ピン
が磁性粒子を回収し、洗浄液を含む別の試験管にそれらを移送する。粒子は、洗浄液と混
合される。この様式により、磁性粒子プロセッサを用いて、磁性粒子を複数の試験管に順
次移送して、非特異的にまたは弱く結合したライブラリーメンバーを粒子から洗い流すこ
とができる。洗浄後、溶離緩衝液を含む試験管にこれらの粒子を移送して、特異的にかつ
/または強く結合したライブラリーメンバーを粒子から除去する。次いで、溶離されたこ
れらのライブラリーメンバーは、解析のために個別に単離されるか、またはさらにもう1
回選択するためにプールされる。詳細な磁性粒子プロセッサ選択プロセスは、米国特許出
願公開第20030224408号に記載されている。

【0096】

10

20

30

40

50

細胞ベースの選択。この選択は、ディスプレイライブラリーを標的細胞に結合させ、次いで、それらの細胞が結合したライブラリーメンバーを選択することによって、実施することができる。細胞ベースの選択により、例えば、翻訳後修飾を含む天然環境においてディスプレイされる標的分子、関連するタンパク質および因子、ならびに競合因子を認識するリガンドを同定することが可能になる。さらに、細胞ベースの選択は、特定の唯一の標的分子を対象としないため、標的に関する前もっての情報は必要とされない。もっと正確に言えば、細胞それ自体が決定因子である。その後のステップ、すなわち特定の機能アッセイを用いて、同定されたりガンドが、エフェクター機能を細胞に向ける際に活性であるかを確認することができる。詳細な細胞ベースの選択プロセスは、米国特許出願公開第20030224408号に記載されている。

10

【0097】

インビボでの選択。例えば、Koloninら(2001) *Current Opinion in Chemical Biology* 5:308~313、PasqualiniおよびRuoslahti(1996) *Nature* 380:364~366、ならびにPaqualinら(2000)「*In vivo Selection of Phage-Display Libraries*」、*Phage Display: A Laboratory Manual* Barbasら編、Cold Spring Harbor Press 22.1~22.24において説明されているように、この選択をインビボで実施して、標的組織または標的器官に結合するライブラリーメンバーを同定することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーは、対象(例えば、ヒトまたは他の哺乳動物)中に注入される。適切な間隔をあげた後、対象から標的組織または標的器官が摘出され、標的部位に結合するディスプレイライブラリーメンバーが回収され、特徴付けられる。

20

【0098】

親和性成熟/最適化

いくつかの実施形態において、第1のライブラリーを用いた最初の選択の後、ライブラリーメンバーの選択された集団を変異誘発して、選択されたメンバーの結合親和性または他の任意の特性を改善することができる。例えば、第1のディスプレイライブラリーは、標的に対する1つまたは複数のリガンドを同定するために使用される(リード同定としても公知である)。次いで、これらの同定されたりガンドを変異させて、第2のディスプレイライブラリーを形成させる。さらなる多様性が、変異誘発によって導入される。次いで、例えば、厳密性がより高いまたはより競合的な結合条件および洗浄条件を用いることによって、親和性が高いリガンドが第2のライブラリーから選択される。このプロセスは、親和性成熟または最適化として公知である。

30

【0099】

いくつかの実施形態において、本発明のファージディスプレイライブラリーは、標的に結合するポリペプチドの最初の同定のために使用される。標的に結合するポリペプチドをコードする核酸断片の選択されたプールは、1つまたは複数の適合性制限部位を切断する制限酵素を用いた消化によって、回収され得る。次いで、回収された断片は、1つまたは複数の適合性制限部位を利用して、本発明のリボソームディスプレイベクター中に「まとめて」クローニングされ得る。ファージディスプレイライブラリーから移送された選択された核酸を含有するリボソームディスプレイベクターをさらに変異誘発して、第2のライブラリー、例えば、リボソームディスプレイライブラリーを形成させることができる。リボソームディスプレイライブラリーの多様性は、最高で 10^{12} を超えることができる。

40

【0100】

同定された最初のリガンドを変異させてさらなる多様性を導入するために、多数の技術が使用され得る。これらの技術としては、エラープローンPCR(Leungら(1989) *Technique* 1:11~15)、組換え、ランダム切断を用いたDNAシャッフリング(Stemmer(1994) *Nature* 389~391)、RACHITT(商標)(Cocoら(2001) *Nature Biotech.* 19:354)

50

、部位特異的変異誘発 (Zollerら (1987) *Methods Enzymol.* 1987, 154: 329~50、Zollerら (1982) *Nucl. Acids Res.* 10: 6487~6504)、カセット変異誘発 (Reidhaar-Olson (1991) *Methods Enzymol.* 208: 564~586)、および縮重オリゴヌクレオチドの組入れ (Griffithsら (1994) *EMBO J.* 13: 3245) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0101】

抗原の場合、変異誘発は、重鎖または軽鎖のCDR領域を対象としてよい。いくつかの実施形態において、変異誘発は、CDRの近くまたはCDRに隣接したフレームワーク領域を対象としてよい。

10

【0102】

望ましい結合親和性または他の特性を有するリボソームディスプレイライブラリーのメンバーを同定するための方法、および選択されたポリペプチドをコードする核酸配列を回収するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、例示的な方法は、米国特許第5,643,768号、第5,658,754号、および第7,074,557号に記載されている。

【0103】

再編成 (reformatting)

望ましい特性を有するディスプレイされるポリペプチドをコードする核酸配列を含有するライブラリーメンバーを選択および同定した後、核酸をディスプレイベクターから回収し、産生またはさらなる解析のために発現ベクターに移送することができる。このプロセスは、典型的には、再編成として公知である。したがって、再編成プロセスは、例えば、核酸をディスプレイベクターから細菌細胞または哺乳動物細胞における産生に適したベクターに移送するために使用される。1つの実施形態において、選択された各ライブラリーメンバーは、個別に再編成される。別の実施形態において、ライブラリーメンバーは集められ、まとめて再編成される。

20

【0104】

再編成プロセスは、ディスプレイのために最初に使用される発現系および第2の発現系に合わせて仕立てることができる。典型的なリボソームベクターは細菌発現系または哺乳動物発現系に適合性ではないのに対し、同じファージディスプレイベクターは、細菌発現系において、選択されたディスプレイされるポリペプチドを発現させるために使用され得るため、例えば、再編成プロセスは、リボソームディスプレイ産物の解析のために特に重要である。

30

【0105】

いくつかの実施形態において、選択されたScFvポリペプチドは、限定されるわけではないが、IgG、ScFv-Fc融合物、F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、ダイアボディ、トリアボディまたはテトラボディを含めて、他の免疫グロブリン形態に再編成され得る。まとめて再編成する1つの例において、ScFvの再編成は、二段階のプロセスを伴う。第1のサイクルは、例えば、適合性制限部位を用いてディスプレイベクターを消化して、軽鎖可変コード領域および重鎖可変コード領域を最小限含む核酸断片を放出させるステップを含む。これらの断片は、哺乳動物において発現させるためのベクター中にクローニングされる。このステップの間、VH遺伝子およびVL遺伝子の双方をコードする核酸断片の移送により、ディスプレイベクター中に存在する重鎖および軽鎖の組合せが発現ベクターにおいて維持されることが確実になる。さらに、移送プロセスを用いて、コード鎖の5'末端において原核生物プロモーターを哺乳動物プロモーターに切り替え、また、コード鎖の3'末端においてバクテリオファージコートタンパク質(またはその断片)をコードする配列をFcドメインをコードする配列に切り替えることができる。クローニングのための一般的な方法は、標準的な実験室マニュアル、例えば、Sambrookら (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版)、Cold Spring Harbor Labora

40

50

tory Press において説明されている。

【0106】

第2のステップにおいて、軽鎖コード領域と重鎖コード領域の間に介在する領域が、置換される。例えば、VH遺伝子とVL遺伝子の間のリンカー領域は、原核生物リボソーム結合部位(RBS)を含む配列、または配列内リボソーム進入部位(IRES)を有する配列もしくは真核生物プロモーターを含む配列で置換され得る。また、このプロセスにおいて、分泌のためのシグナル(例えば、原核生物または真核生物の分泌シグナル)および免疫グロブリン分子の定常領域に由来する配列(例えば、Ck、CH1)も挿入され得る。いくつかの実施において、介在領域は、細胞において組換えによって置換される。さらに他の実施において、介在領域は置換されず、もっと正確に言えば(例えば、部位特異的組換えによって)例えば原核生物発現のために設計された配列を切除することなく、配列が挿入される。

10

【0107】

原核細胞および真核細胞の双方において機能的であるハイブリッドシグナル配列は、シグナル配列の一部(例えば、シグナル配列の少なくとも3'領域、例えば、-3、-2、および-1位置)またはすべての再編成を回避するために使用され得る。一部の場合において、シグナル配列は、複数の発現系(例えば、原核生物系および真核生物系の双方)において機能的である。例えば、いくつかの細菌 - ラクタマーゼのシグナル配列は、真核細胞および原核細胞において機能的である。例えば、Kronenbergら、1983、*J. Cell Biol.* 96、1117~9、Al-Qahtaniら、1998、*Biochem. J.* 331、521~529を参照されたい。また、複数の宿主において機能するシグナル配列は、各発現宿主におけるそのようなシグナル配列の要件(共通規則)に基づいて選択することができ、または経験に基づいて選択することができる。

20

【0108】

いくつかの実施形態において、本発明の選択されたScFvポリペプチドは、同様のクローニング戦略を用いて、小モジュール免疫薬剤(SMIP(商標))の薬形態(Trubion Pharmaceuticals、シアトル、ワシントン州)に再編成することができる。SMIPは、抗原または対抗受容体などの同族構造体に対する結合ドメイン、1つのシステイン残基を有するかまたは1つもシステイン残基を有さないヒンジ領域ポリペプチド、ならびに免疫グロブリンのCH2ドメインおよびCH3ドメインから構成される単鎖ポリペプチドである(www.trubion.comも参照されたい)。SMIP薬物設計は、例えば、米国特許出願公開第2003/0118592号、第2003/0133939号、第2004/0058445号、第2005/0136049号、第2005/0175614号、第2005/0180970号、第2005/0186216号、第2005/0202012号、第2005/0202023号、第2005/0202028号、第2005/0202534号、および第2005/0238646号、ならびにその関連する特許ファミリーメンバーにおいて開示されており、これらの文献はすべて、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0109】

コード核酸は、再編成されたものであれ再編成されてないものであれ、組換え発現のための当技術分野において利用可能な任意の技術を用いてコードされたポリペプチドまたはペプチドを産生させる際に使用され得る。

40

【0110】

様々な異なる宿主細胞においてポリペプチドをクローニングおよび発現させるための系は周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母系、およびバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドを発現させるために当技術分野において利用可能な哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、仔ハムスター腎臓細胞、NSOマウス黒色腫細胞、および他多数が挙げられる。一般的な好ましい細菌宿主は大腸菌(E. coli)である。

【0111】

50

大腸菌 (E. coli) のような原核細胞における抗体および抗体断片の発現は、当技術分野において十分に確立されている。概説については、例えば、Pluckthun, A. Bio/Technology 9:545-551 (1991) を参照されたい。また、培養状態の真核細胞における発現も、特異的結合メンバーを産生させるための選択肢として当業者は利用可能である。最近の概説については、例えば、Ref, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576、Trill J. J. ら (1995) Curr. Opinion Biotech. 6:553-560 を参照されたい。

【0112】

必要に応じて、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、および他の配列を含めて、適切な調節配列を含有する適切なベクターを選択または構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス、例えば、ファージ、またはファージミドでよい。さらなる詳細については、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第2版、Sambrookら、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照されたい。例えば、核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、細胞中へのDNAの導入および遺伝子発現における核酸の操作ならびにタンパク質の解析のための多くの公知の技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology、第2版、Ausubelら編、John Wiley & Sons、1992 に詳細に記載されている。SambrookらおよびAusubelらの開示内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

【0113】

したがって、本発明の方法を用いて選択された特異的ポリペプチド、またはそのような特異的ポリペプチドの構成要素 (例えば、VHドメインおよび/もしくはVLドメイン) をコードする核酸が、産生用の発現系において提供され得る。これは、そのような核酸を宿主細胞中に導入するステップを含んでもよい。この導入には、任意の利用可能な技術を使用してよい。真核細胞の場合、適切な技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソームを介したトランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス、例えば、ワクシニア、または昆虫細胞の場合、バキュロウイルスを使用する形質導入を挙げることができる。細菌細胞の場合、適切な技術としては、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを用いたトランスフェクションを挙げることができる。

30

【0114】

導入に続いて、例えば、コードされる産生物を産生させるための条件下で宿主細胞を培養することによって、核酸からの発現を引き起こすか、または可能にさせることができる。本発明はまた、前述の特異的結合メンバーまたはポリペプチドを発現させるために、発現系において前述の構築物を使用するステップを含む方法も提供する。

【0115】

発現による産生に続いて、産生物を単離および/または精製してよく、また、少なくとも1つの付加的な成分を含む組成物に調製してよい。このような組成物は、薬学的に許容できる賦形剤、ビヒクル、または担体を含んでよい。

40

【0116】

本発明の別の態様および実施形態は、本発明の開示に照らして、当業者に明らかになると考えられる。本明細書において任意の箇所而言及される文書はすべて、参照により組み入れられることにさらに留意すべきである。

【0117】

以下の実験的な実施例を参照して、本発明を以下にさらに例示する。

【実施例】

【0118】

(実施例1)

50

S c F vライブラリー設計

他の免疫グロブリン形態、例えば、I g G、F a b、S c F v - F c融合物、小モジュール免疫薬剤（S M I P（商標））、ならびに他の短鎖抗体、例えば、ナノボディおよびサメ抗体など（それぞれ、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20080107601号および国際特許出願公開W O 0 3 / 0 1 4 1 6 1を参照されたい）へのS c F v抗体の「大量」再編成を容易にする一般的制限部位を用いて、S c F vライブラリーを設計した。

【0119】

他の免疫グロブリン形態、例えば、I g G、F a b、S c F v - F c融合物、小モジュール免疫薬剤（S M I P（商標））などへのS c F v抗体の「大量」再編成を容易にする一般的制限部位を用いて、S c F vライブラリーを設計した。

10

【0120】

この実験において、ベクター設計および再編成手順は、以下の因子を考慮に入れた：

- (1) 選択されたV LおよびV Hの対形成の保持を可能にすること、
- (2) V遺伝子配列を改変せずに再編成を可能にすること、
- (3) 生殖系列V遺伝子中でまれな制限部位を使用すること、
- (4) 配列情報に依存しない再編成を可能にすること、
- (5) 様々なエレメントを独立に交換できるように、モジュラー式設計を有すること。

【0121】

S c F v形態に適し、F a b、I g G、S M I P（商標）、および他の哺乳動物発現/ディスプレイベクターと適合性があるベクターを設計した。S c F vベクターの重要な特徴を下記に考察する。

20

【0122】

第1に、V L - V H形態がS c F v - F c融合物またはS M I Pにとって好ましい形態であるため、V L - V H形態でS c F v抗体を発現するようにベクターを設計した。このようなS c F v設計により、ハイスループットなタンパク質発現のためのS M I Pへの直接的再編成が可能になる（すなわち、S c F vを適合性S M I Pベクターに直接移送することができる）。

【0123】

第2に、生殖系列V遺伝子において切断しないか、またはめったに切断しない制限部位を、V H遺伝子およびV L遺伝子の5'末端および3'末端に導入した。例えば、X h o 1は、いかなるヒト生殖系列V H遺伝子も切断せず、生殖系列V k遺伝子40個の内の3個（すなわち、7.5%）において切断するため、X h o 1制限部位をV H遺伝子の5'末端に導入した。X h o 1部位は、柔軟なリンカー（D G G G S G G G G S G G G G S S [配列番号3]）の3'末端に組み入れることができる。リンカー設計を以下に説明する。S a c 1部位は、V L遺伝子の3'末端（すなわち、J kセグメント）に組み入れることができる。S a c 1部位は、生殖系列V k遺伝子40個の内の1個のみ（すなわち、2.5%）に存在する。

30

【0124】

V L遺伝子とV H遺伝子の間の柔軟なリンカーを下記に示すようにして設計した：

40

XhoI

~~~~~

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser (配列番号3)  
GAT GGC GGT GGA TCG GGC GGT GGT GGA TCT GGA GGA GGT GGC TCG AGC (配列番号13)

## 【0125】

示したように、このリンカーは、3'末端の2つのセリンを含めて16個のアミノ酸（D G G G S G G G G S G G G G S S [配列番号3]）をコードし、X h o 1部位を組み入

50

れている。このリンカーは、S M I Pと適合性がある。

【0126】

(実施例2)

V遺伝子増幅戦略

V遺伝子増幅戦略を図1に例示する。VH遺伝子およびVL遺伝子の5'末端および3'末端に普遍的制限部位を導入するために、所望の制限部位を組み入れたプライマーセットを用いたPCR増幅を使用した。典型的には、複数回のPCR反応を行った。例えば、VHコレクションは、一次PCRおよび二次PCRによって増幅することができる。一次PCRでは、Xho1部位を含有するVHフォワードプライマーおよびIgM特異的リバープライマーを使用する。二次PCRでは、Xho1部位を含有するVHフォワードプライマーならびにSfi1部位および/またはBstEII部位を含有するJHリバープライマーを使用する。

10

【0127】

上述したように、Xho1は、いかなるヒト生殖系列VH遺伝子も切断せず、生殖系列Vk遺伝子40個の内の3個において切断するだけである。3'末端にXhoI部位を組み入れたリンカー配列の例示的な設計は、上記に示した。

【0128】

BstEIIは、生殖系列VH遺伝子51個の内の4個(すなわち、7.8%)において、また、生殖系列Vk遺伝子40個の内の0個において切断する。VH遺伝子のFW4領域におけるBstEII部位の例示的な設計を下記に例示する：

20

|                                         |          |
|-----------------------------------------|----------|
| T L V T V S S                           | (配列番号14) |
| ACC CTG <u>GTC ACC</u> GTC TCC TAC Vh末端 | (配列番号15) |
| BstEII                                  |          |

【0129】

JH1~5領域を網羅するために、少なくとも5個の異なるプライマーを設計した。

【0130】

同様に、VLコレクションも、一次PCRおよび二次PCRによって増幅することができる。一次PCRでは、ApaL1部位を含有するVkフォワードプライマーおよびCk特異的リバープライマーを使用し、二次PCRでは、ApaL1部位を含有するVkフォワードプライマーおよびSac1部位を組み入れたJkリバープライマーを使用する。リンカー配列は、二次PCR用のリバープライマー中に組み入れることができる。

30

【0131】

ApaL1は、生殖系列Vk遺伝子において切断せず、生殖系列VH遺伝子51個の内の2個(すなわち、3.9%)において切断するだけである。どのようにして5'ApaL1部位をVL遺伝子の5'に導入できるかを示すために、VL遺伝子の5'の例示的な設計を下記に示す。

40

|                                             |          |
|---------------------------------------------|----------|
| Ser His Ser Ala Gln                         | (配列番号16) |
| …Sig配列の末端..TCT CAC <u>AGT GCA</u> CAG…VL開始部 | (配列番号17) |
| ApaL1                                       |          |

【0132】

すべてのVk遺伝子ファミリーを網羅するために、少なくとも6個の異なるプライマーを設計した(表2を参照されたい)。

【0133】

SacIは、生殖系列Vk遺伝子40個の内の1個において(すなわち、2.5%)、

50

また、生殖系列 V H 遺伝子 5 1 個の内の 1 1 個において (すなわち、2 1 . 6 %) 切断する。下記に示すように、S a c I 部位は、F W 4 領域において生殖系列 J k 配列 T K V E I K R (配列番号 1 8 ) を T K V E L K R (配列番号 1 9 ) に変換することによって導入することができる。

変換前 : T K V E I K R (配列番号 1 8 : 生殖系列 J k 配列)

変換後 : T K V E L K R (配列番号 1 9 : I から L への保存的変更)

T K V E L K R (配列番号19)  
ACC AAG CTG GAG CTC AAA CGT (配列番号20)  
SacI

10

【 0 1 3 4 】

J k 1 ~ 5 領域を網羅するために、少なくとも 5 個の異なるプライマーを設計した。

【 0 1 3 5 】

V H 遺伝子および V L 遺伝子の増幅に適したその他の例示的なプライマーを表 2 に示す。

【 0 1 3 6 】

表 2

一次 P C R のプライマー

HuIgM-Rev

(配列番号21)

5' TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT

HuCk-Rev

(配列番号22)

5' ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT

V H フォワードプライマー ( X h o 1 部位に下線を引いている )

HuVH1b/7A-For (配列番号23)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC CAG

RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG

HuVH1C-For

(配列番号24)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC SAG

GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG

HuVH2-For

(配列番号25)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC CAG

RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG

HuVH3B-For

(配列番号26)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC SAG

GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

HuVH3C-For

(配列番号27)

20

30

40

50

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC GAG  
GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG

HuVH4B-For  
(配列番号28)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC CAG  
GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG

HuVH4C-For  
(配列番号29)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC CAG  
STG CAG CTG CAG GAG TCS GG

10

HuVH5B-For  
(配列番号30)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC GAR  
GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG

HuVH6A-For  
(配列番号31)

5' ggc tat ggt tgc GGC TCG AGC CAG  
GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG

20

V k フォワードプライマー ( A p a L 1 部位に下線を引いている )

HuVK1-For  
(配列番号32)

ggc tat ggt tgc AGT GCA CTT GAC ATC  
CAG WTG ACC CAG TCT CC

HuVK2-For  
(配列番号33)

ggc tat ggt tgc AGT GCA CTT GAT GTT  
GTG ATG ACT CAG TCT CC

30

HuVK3-For  
(配列番号34)

ggc tat ggt tgc AGT GCA CTT GAA ATT  
GTG WTG ACR CAG TCT CC

HuVK4-For  
(配列番号35)

ggc tat ggt tgc AGT GCA CTT GAT ATT  
GTG ATG ACC CAC ACT CC

40

HuVK5-For  
(配列番号36)

ggc tat ggt tgc AGT GCA CTT GAA ACG  
ACA CTC ACG CAG TCT CC

HuVK6-For  
(配列番号37)

50

ggc tat ggt tgc AGT GCA CTT GAA ATT  
 GTG CTG ACT CAG TCT CC

二次PCRのプライマー

JHリバースプライマー (Sfi1部位およびBstEII部位に下線を引いている)

Hu JH1/2-Sfi1 (配列番号38)

ggc tat ggt tgc ggccccctgaggcc  
 tgatca TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC

Hu JH3-Sfi1 (配列番号39)

ggc tat ggt tgc ggccccctgaggcc  
 tgatca TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC

10

Hu JH4/5-Sfi1 (配列番号40)

ggc tat ggt tgc ggccccctgaggcc  
 tgatca TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC

Hu JH6 -Sfi1 (配列番号41)

ggc tat ggt tgc ggccccctgaggcc  
 tgatca TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC

Jkリバースプライマー (Fw4にSac1部位を追加する) (Sac1部位に下線を引いている)

20

Hu Jk1/4-Sac1 (配列番号42)

ggc tat ggt tgc ACG TTT GAG CTC CAC  
 CTT GGT CCC

Hu Jk2-Sac1  
 (配列番号43)

ggc tat ggt tgc ACG TTT GAG CTC CAG  
 CTT GGT CCC

30

Hu Jk3-Sac1  
 (配列番号44)

ggc tat ggt tgc ACG TTT GAG CTC CAC  
 TTT GGT CCC

Hu Jk5-Sac1  
 (配列番号45)

ggc tat ggt tgc ACG TTT GAG CTC CAG  
 TCG TGT CCC

PCRに基づいたクローニングのためのJHフォワードプライマー (Xho1部位に下線を引いている)

40

HuVH1b/7A-For +リンカー  
 (配列番号46)

5' gat ggc ggt gga tgc ggc ggt ggt gga tct  
 gga gga ggt GGC TCG AGC CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG

HuVH1C-For +リンカー  
 (配列番号47)

5' gat ggc ggt gga tgc ggc ggt ggt gga tct  
 gga gga ggt GGC TCG AGC SAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG

50

HuVH2B-For +リンカー

(配列番号48)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG

HuVH3B-For +リンカー

(配列番号49)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC SAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

10

HuVH3C-For +リンカー

(配列番号50)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG

HuVH4B-For +リンカー

(配列番号51)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG

20

HuVH4C-For +リンカー

(配列番号52)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG

HuVH5B-For +リンカー

(配列番号53)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG

30

HuVH6A-For +リンカー

(配列番号54)

5' gat ggc ggt gga tcg ggc ggt ggt gga tct  
gga gga ggt GGC TCG AGC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG

PCRに基づいたクローニングのためのJkリバースプライマー(SacI部位に下線を引いている)

Hu Jk1-リンカー

(配列番号55)

5' gct cga gcc acc tcc tcc aga tcc  
acc acc gcc cga tcc acc gcc atc ACG TTT GAG CTC CAC CTT GGT CCC 3'

40

Hu Jk2-リンカー

(配列番号56)

5' gct cga gcc acc tcc tcc aga tcc  
acc acc gcc cga tcc acc gcc atc ACG TTT GAG CTC CAG CTT GGT CCC 3'

Hu Jk3-リンカー

(配列番号57)

5' gct cga gcc acc tcc tcc aga tcc

50

acc acc gcc cga tcc acc gcc atc ACG TTT GAG CTC CAC TTT GGT CCC 3'

Hu Jk4-リンカー

(配列番号58)

5' gct cga gcc acc tcc tcc aga tcc

acc acc gcc cga tcc acc gcc atc ACG TTT GAG CTC CAC CTT GGT CCC 3'

Hu Jk5-リンカー

(配列番号59)

5' gct cga gcc acc tcc tcc aga tcc

acc acc gcc cga tcc acc gcc atc ACG TTT GAG CTC CAC TCG TGT CCC 3'

10

【0137】

(実施例3)

pWRIL-5ファージディスプレイベクターの構築

VL-VH形態の抗RAGE ScFv抗体を含有するXT-H2 ScFv構築物を以下のようにして改変して、ダミーScFv構築物(配列番号61)を有するpWRIL-5ファージディスプレイポリヌクレオチドベクターを構築した。

【0138】

第1に、前述したようにXho1部位をリンカー中に組み入れた。第2に、前述したようにSacI部位をJk配列中に組み入れた。第3に、標準的な変異誘発によって5'のSfi1部位をApa1部位に変更した。さらに、2つのApa1部位をpWRIL-1ベクターバックボーンから除去し、標準的な組換え技術によってXT-H2抗RAGE ScFv配列のVL遺伝子およびVH遺伝子の3つのフレーム中に停止コドンを入れて、クローニングステップの間に、機能的に発現されるが重要ではないv領域配列が持ち越されるのを防止した。ダミーScFv構築物(配列番号61)を加えたpWRIL-5ファージディスプレイポリヌクレオチドベクターを図2に示す。ダミーScFv構築物を含有する、pWRIL-5の設計されたリンカー配列を配列番号1に示す。

20

【0139】

このリンカー配列をファージディスプレイベクターpWRIL-1中にPci1/Sfi1断片としてクローニングすることによって、pWRIL-5を構築した。pWRIL-1のリーディング鎖の完全なヌクレオチド配列を配列番号60に示す。プロモーター配列は、配列番号60のヌクレオチド番号2361~2706を含む。

30

【0140】

(実施例4)

ScFvライブラリー構築

ScFvライブラリー構築は、2ステップのクローニング手順である。第1のステップは、実施例2で説明した増幅戦略を用いて、VHコレクションおよびVLコレクションを別々に単離およびクローニングするステップを含む。第2のステップは、制限に基づいたクローニングを用いて、VLコレクションをVHコレクションに移送するステップを含む(図3)。

40

【0141】

VHコレクションをクローニングするために、正常な末梢血リンパ球(PBL)(約 $10^9$ 個のB細胞)から全RNAを単離した。オリゴdTプライミングによるcDNA合成によって、第1の鎖cDNAを合成した。Xho1部位を含有するVHフォワードプライマーおよびIgM特異的リバープライマーを用いた一次PCR、ならびにXho1部位を含有するVHフォワードプライマーならびにSfi1部位および/またはBstEII部位を組み入れたJHリバープライマーを用いた二次PCRによって、VHコレクションを増幅した。図3に示すように、VH遺伝子プールをXho1/Sfi1制限酵素またはXho1/BstE11制限酵素で消化し、ダミーベクター中にクローニングして、VH遺伝子のみコレクションを構築した。

50

## 【0142】

A p a L 1 部位を含有する V k フォワードプライマーおよび C k 特異的リバースプライマーを用いた一次 P C R、ならびに A p a L 1 部位を含有する V k フォワードプライマーならびにリンカー配列および S a c 1 部位を組み入れた J k リバースプライマーを用いた二次 P C R によって、V L コレクションを増幅した。図 3 に示すように、V L 遺伝子プールを A p a L 1 / S a c 1 酵素で消化し、ダミーベクター中にクローニングして、V k のみのコレクションを構築した。

## 【0143】

S c F v ライブラリーを構築するために、V k ライブラリーを A p a L 1 / S a c 1 酵素で消化することによって、V k 遺伝子を含有する断片を単離した。V H のみのライブラリーを A p a L 1 / S a c 1 酵素で消化して V L ダミー鎖を除去し、適合性制限部位を用いて、V H のみのライブラリー中に V k 断片をクローニングした ( 図 3 )。この方法を用いて構築した S c F v ライブラリーのサイズは、典型的には  $10^9$  個である。

10

## 【0144】

( 実施例 5 )

F a b ファージディスプレイ / 発現ベクターへの再編成

適合性制限部位を含有する F a b 発現 / ファージディスプレイポリヌクレオチドベクター p W R I L - 6 ( 配列番号 6 2 ) を、S c F v を F a b に再編成するために使用する。C k、C H 1、およびリボソーム結合部位を含有する設計されたリンカー配列 ( 配列番号 2 ) を P c i 1 / S f i I 断片としてベクター p W R I L - 1 中にクローニングすることによって、ベクター p W R I L - 6 を構築した ( 実施例 3 を参照されたい )。設計されたリンカー配列は、配列番号 2 に示す。

20

## 【0145】

図 4 に示すように、本発明によって構築された S c F v ライブラリーは、配列情報に依存しない 2 ステップのクローニング手順において F a b 発現系に再編成することができ、再編成する間、選択された V L - V H 対形成を保持し、これにより、F a b のハイスループットな発現およびスクリーニングが可能になる。第 1 のステップは、A p a L 1 / B s t E I I 酵素消化を用いて、連結された V L - V H 断片を S c F v ライブラリーから回収するステップを含み、適合性制限部位を用いて、A p a L 1 / B s t E I I 断片を p W R I L - 6 中にクローニングする ( 図 4 )。第 2 のステップにおいて、C k - r b s - P e l B リーダー配列を含有する S a c 1 / X h o 1 断片で、V L 遺伝子と V H 遺伝子の間のリンカーを置き換える ( 図 4 )。合成 V H 遺伝子を使用する場合、X h o 1 の代わりに M f e 1 部位を使用することができる。結果として得られる F a b プールを発現させ、( 例えば、B I A c o r e アッセイを用いることによって ) 力価を指標にしてスクリーニングしてよく、または、ファージディスプレイを用いて特異的結合に関してさらに選択してもよい。

30

## 【0146】

( 実施例 6 )

I g G 発現系への再編成

適合性制限部位を含有する I g G 発現 / ファージディスプレイを、S c F v を I g G 抗体に再編成するために使用する。I g G 発現ベクターは、典型的には、F c に加えて C k - I R E S シグナル配列を含有する。図 5 に示すように、S c F v ライブラリーは、配列情報に依存しない 2 ステップのクローニング手順において I g G ライブラリーに再編成することができ、再編成する間、V L - V H 対形成を保持し、これにより、一過性発現による I g G のハイスループットな産生が可能になる。

40

## 【0147】

実施例 5 で考察したように、第 1 のステップにおいて、S c F v ライブラリーは A p a L 1 / B s t E I I 断片として I g G 発現ベクター中に移送される。第 2 のステップにおいて、C k - I R E S - シグナル配列を含有する S a c 1 / X h o 1 断片で、V L 遺伝子と V H 遺伝子の間のリンカーを置き換える ( 図 5 )。合成 V H 遺伝子を使用する場合、X

50

h o 1の代わりにM f e 1部位を使用することができる。結果として得られるI g Gプー  
ルを発現させ、(例えば、B I A c o r eアッセイを用いることによって)力価を指標に  
してスクリーニングしてよく、または、ファージディスプレイを用いて特異的結合に関し  
てさらに選択してもよい。

【 0 1 4 8 】

前述の内容は、本発明のいくつかの非限定的な実施形態の説明であった。当業者は、ご  
く普通の実験法だけを用いて、本明細書において説明した本発明の個々の実施形態に対す  
る多くの等価物を認識するか、または確認することができる。当業者は、以下の特許請求  
の範囲において定義する本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に対す  
る様々な変更および修正を加え得ることを理解するであろう。

10

【 0 1 4 9 】

特許請求の範囲において、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」などの冠詞は、反対の記載がない限り、またはそうでなければ文脈から明らか  
ではない限り、1つまたは複数を意味してよい。あるグループの1つまたは複数のメンバー  
の間に「または(or)」を含む特許請求の範囲または記載は、反対の記載がない限り、  
またはそうでなければ文脈から明らかではない限り、1つ、複数、またはすべてのグル  
ープメンバーが所与の産生物またはプロセス中に存在するか、それらにおいて使用されるか  
、またはそうでなければそれらに関連している場合に満たされるとみなされる。

【 0 1 5 0 】

本出願において引用する刊行物および特許文書はすべて、その全体が参照により組み入  
れられる。

20

【 図 1 】

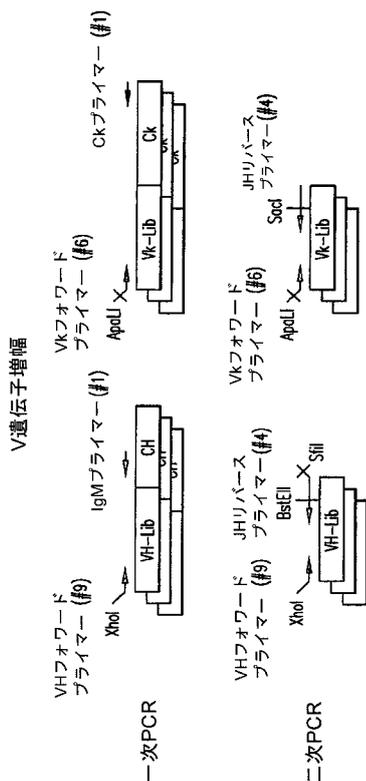


図 1

【 図 2 】

別々のVHライブラリーおよびVLライブラリーを構築するためのダミー-ScFvベクター

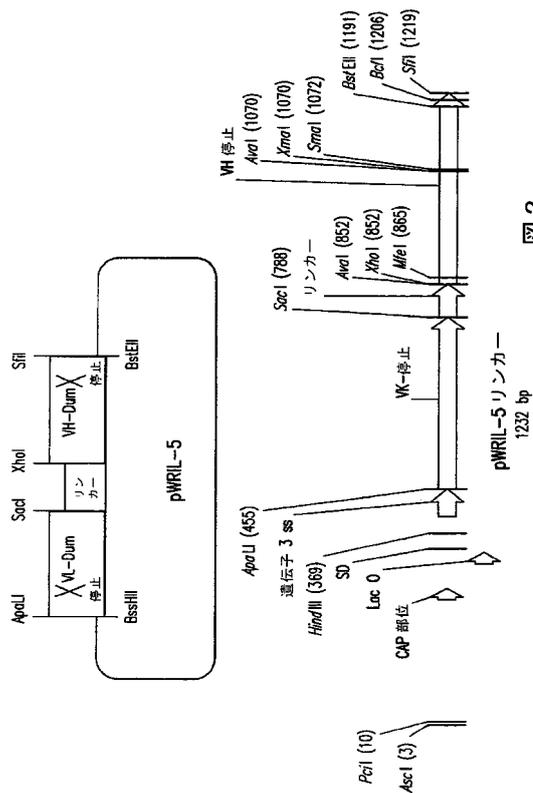
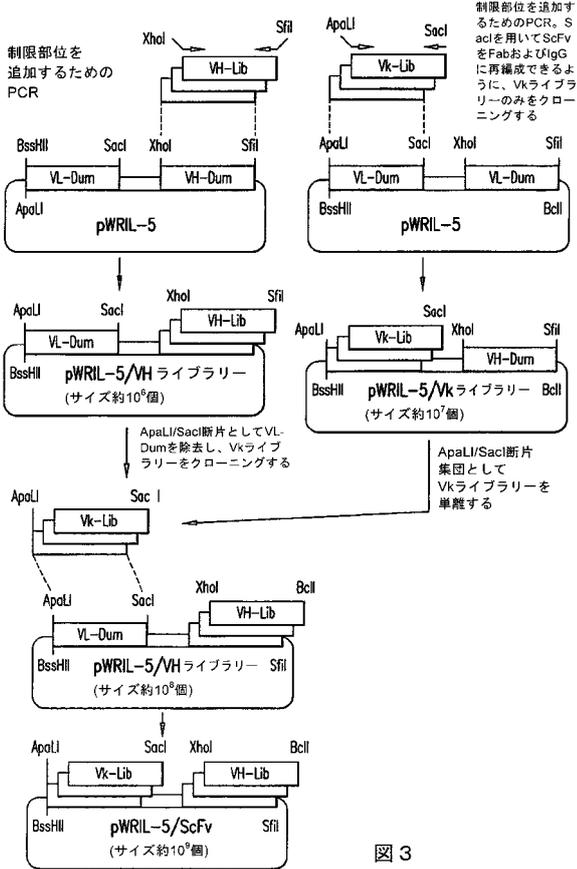


図 2

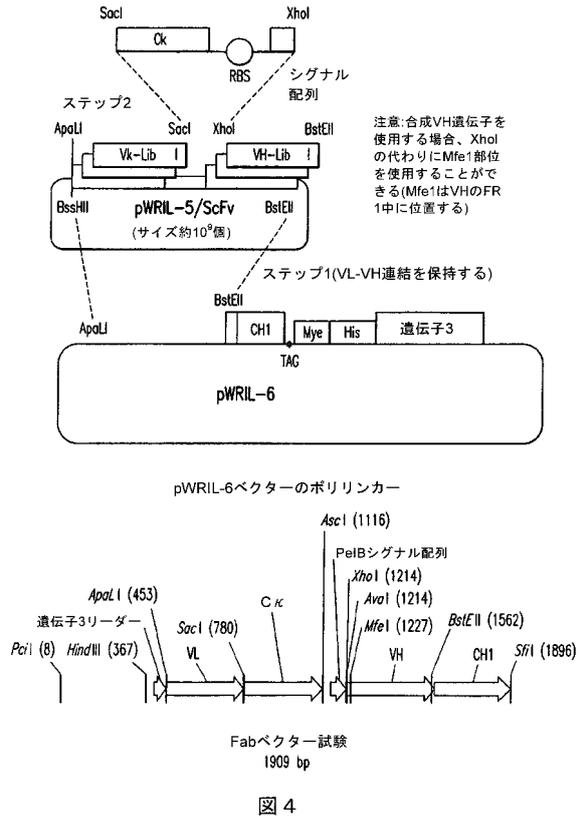
【 図 3 】

制限に基づいたクローニング戦略—ScFvライブラリー



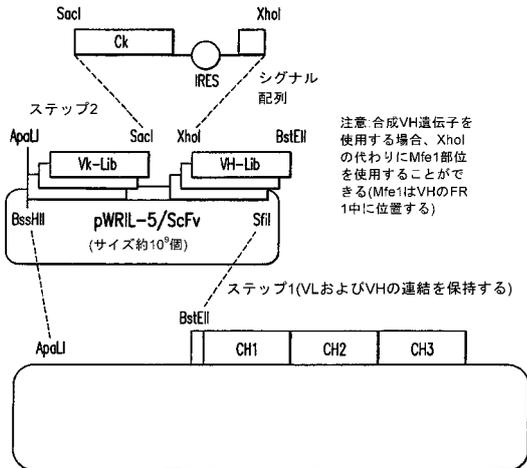
【 図 4 】

ハイスループットなタンパク質発現のための、ファージディスプレイされたFabライブラリーへの大量/ライブラリー再編成



【 図 5 】

ハイスループットなタンパク質発現のための、IgG発現ベクターへの再編成



【配列表】

2012503490000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                   |
|---------------------------------------------------|
| International application No<br>PCT/US2009/058302 |
|---------------------------------------------------|

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C07K16/00 C12N15/10<br>ADD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K C12N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
| 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)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | LIU Z-X ET AL: "Identification of single-chain antibody fragments specific against SARS-associated coronavirus from phage-displayed antibody library"<br>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC.<br>ORLANDO, FL, US,<br>vol. 329, no. 2, 8 April 2005 (2005-04-08)<br>, pages 437-444, XP004767115<br>ISSN: 0006-291X<br>figure 3<br>-----<br>-/-- | 1-7,<br>22-54         |
| <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<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*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<br>*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<br>*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.<br>*B* document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                       |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Date of mailing of the international search report                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                       |
| 9 September 2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 16/09/2010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040.<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Authorized officer<br>Cilensek, Zoran                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                       |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                   |
|---------------------------------------------------|
| International application No<br>PCT/US2009/058302 |
|---------------------------------------------------|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                       |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
| X                                                    | VOLKEL T ET AL: "Isolation of endothelial cell-specific human antibodies from a novel fully synthetic scFv library" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 317, no. 2, 30 April 2004 (2004-04-30), pages 515-521, XP004500241 ISSN: 0006-291X figure 1               | 1-7,<br>22-54         |
| X                                                    | US 2005/196755 A1 (ZAUDERER MAURICE [US] ET AL) 8 September 2005 (2005-09-08) figure 10; example 13                                                                                                                                                                                                                          | 1-7,<br>22-54         |
| X                                                    | WO 03/051311 A2 (BAYER AG [US]; TAKEUCHI TOSHIHIKO [US]; TOMKINSON ADRIAN [US]; NEBEN S) 26 June 2003 (2003-06-26) tables 1,2                                                                                                                                                                                                | 1-7,<br>22-54         |
| X                                                    | US 2003/224408 A1 (HOOGENBOOM HENRICUS RENERUS JA [NL] ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0368] - [0370]; claims 8,9                                                                                                                                                                                            | 1-7,<br>22-54         |
| X                                                    | WO 93/12232 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; NEW ENGLAND DEACONNESS HOSPITA [US]) 24 June 1993 (1993-06-24) example 3                                                                                                                                                                                                   | 1-7,<br>22-54         |
| X                                                    | WO 2008/019061 A2 (VACCINEX INC [US]; SMITH ERNEST S [US]; WANG WEI [US]) 14 February 2008 (2008-02-14) figure 9; example 3                                                                                                                                                                                                  | 4-7,<br>22-54         |
| X                                                    | PERSIC L ET AL: "An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD-DOI:10.1016/S0378-1119(96)00628-2, vol. 187, no. 1, 10 March 1997 (1997-03-10), pages 9-18, XP004093234 ISSN: 0378-1119 page 12 | 4-7,<br>22-54         |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                   |
|---------------------------------------------------|
| International application No<br>PCT/US2009/058302 |
|---------------------------------------------------|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                       |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
| X,P                                                  | FINLAY W J ET AL: "Affinity Maturation of a Humanized Rat Antibody for Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals a High Level of Mutational Plasticity Both Inside and Outside the Complementarity-Determining Regions" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 388, no. 3, 8 May 2009 (2009-05-08), pages 541-558, XP026046499<br>ISSN: 0022-2836<br>[retrieved on 2009-03-13]<br>the whole document | 1-7,<br>22-54         |
| A                                                    | WO 96/23071 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; SIADAK ANTHONY W [US]; HOLLENBAUGH DIANE) 1 August 1996 (1996-08-01)<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1-7,<br>22-54         |
| A                                                    | WO 2007/146968 A2 (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; THOMPSON PETER ARMSTRONG [US]; LEDBETTER) 21 December 2007 (2007-12-21)<br>examples 2-5                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1-7,<br>22-54         |
| A                                                    | KNAPPIK A ET AL: "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1006/JMBI.1999.3444, vol. 296, no. 1, 11 February 2000 (2000-02-11), pages 57-86, XP004461525<br>ISSN: 0022-2836<br>page 80                                                                       | 4-7,<br>22-54         |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2009/058302**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-7(completely); 22-54(partially)
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US2009 /058302

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-3(completely); 7, 22-54(partially)

An isolated polynucleotide comprising at least four restriction sites oriented 5' to 3', wherein the 5' most restriction site ("site 1") comprises SfiI, BssHII, ApaI or MfeI; the restriction site located 3' of site 1 ("site 2") comprises XhoI, SalI, BclI, BstEII, MluI, SmaI or XbaI; the restriction site located 3' of site 2 ("site 3") comprises XhoI, SalI, BspEI, ApaI, BssHII or EcoRV; and the 3' most restriction site ("site 4") comprises SfiI, BclI, AvrII, BsiWI or BamHI. Subject-matter related thereto.

2. claims: 4-6(completely); 7, 22-54(partially)

An isolated polynucleotide comprising at least four restriction sites oriented 5' to 3', wherein the 5' most restriction site ("site 1") comprises SfiI, BssHI or ApaI; the restriction site located 3' of site 1 ("site 2") comprises XhoI, SalI, BclI, SacI, AvrII, BsiWI or MluI; the restriction site located 3' of site 2 ("site 3") comprises MfeI, BspEI, ApaI, BssHII, XhoI or SalI; and the 3' most restriction site ("site 4") comprises SfiI, BclI, XhoI, SalI or BstEII. Subject-matter related thereto.

3. claims: 8-19(completely); 23-54(partially)

An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence, which comprises restriction enzyme recognition sites, which comprise from 5' to 3' an ApaI site, a Sad site, an XhoI site and a SfiI site. Subject-matter related thereto.

4. claims: 20, 21(completely); 22-54(partially)

An isolated polynucleotide comprising a VH gene, a VL gene, a XhoI restriction site positioned at the 5' end of the VH gene, a SfiI or BstEII restriction site positioned at the 3' end of the VH gene, an ApaI restriction site positioned at the 5' end of the VL gene, and a SacI restriction site positioned at the 3' end of the VL gene. Subject-matter related thereto.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/058302

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 2005196755                          | A1               | 08-09-2005              | NONE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| WO 03051311                            | A2               | 26-06-2003              | AR 037756 A1 01-12-2004<br>AU 2002361720 A1 30-06-2003<br>UY 27583 A1 30-06-2003                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| US 2003224408                          | A1               | 04-12-2003              | US 2009105083 A1 23-04-2009                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| WO 9312232                             | A1               | 24-06-1993              | AU 668374 B2 02-05-1996<br>AU 3325993 A 19-07-1993<br>CA 2125396 A1 24-06-1993<br>EP 0618970 A1 12-10-1994<br>JP 8503121 T 09-04-1996                                                                                                                                                                                                                        |
| WO 2008019061                          | A2               | 14-02-2008              | AU 2007282023 A1 14-02-2008<br>CA 2657763 A1 14-02-2008<br>CN 101563365 A 21-10-2009<br>CR 10563 A 14-04-2009<br>EA 200900037 A1 30-10-2009<br>EP 2064241 A2 03-06-2009<br>JP 2009545319 T 24-12-2009<br>KR 20090039801 A 22-04-2009<br>US 2008075726 A1 27-03-2008<br>ZA 200900514 A 28-04-2010                                                             |
| WO 9623071                             | A2               | 01-08-1996              | AU 692074 B2 28-05-1998<br>AU 4966996 A 14-08-1996<br>CA 2210419 A1 01-08-1996<br>CZ 9702339 A3 12-11-1997<br>EP 0807175 A2 19-11-1997<br>FI 973120 A 25-07-1997<br>HU 9802401 A2 28-01-1999<br>IL 116882 A 13-09-2001<br>JP 10513348 T 22-12-1998<br>NO 973447 A 26-09-1997<br>NZ 303375 A 28-01-2000<br>PL 323565 A1 14-04-1998<br>US 5876950 A 02-03-1999 |
| WO 2007146968                          | A2               | 21-12-2007              | AU 2007257692 A1 21-12-2007<br>CA 2654317 A1 21-12-2007<br>CL 36232007 A1 08-08-2008<br>EC SP099058 A 27-02-2009<br>EP 2041178 A2 01-04-2009<br>JP 2009539413 T 19-11-2009<br>KR 20090059104 A 10-06-2009                                                                                                                                                    |
| WO 2007146968                          | A2               |                         | PE 14882009 A1 01-10-2009<br>US 2009175867 A1 09-07-2009                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## 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, SM, 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, CL, 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

(72)発明者 シモン エヴァン ハフトン

アイルランド国 ディ 18 ダブリン ワン・ベルモント・グループ

(72)発明者 ウィリアム ジェームス ジョナサン フィンレイ

アイルランド国 ディ 4 ダブリン バーリントン・ロード バーレイ・コート アpartment  
2

(72)発明者 イアン デイヴィッド ブロードベント

グレート・ブリテン エイビー 15 9 ジェイディ アバーディーンシャイアー カルツ アボット  
トシャル・ドライブ 18

(72)発明者 レアード ブルーム

アメリカ合衆国 02492 マサチューセッツ州 ニードハム ファルコン・ストリート 82

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 CA04 CA09 CA10 CA11 CA20 EA03 FA01

GA11 HA01 HA11

【要約の続き】

ハイスループットなタンパク質発現のための、  
IgG発現ベクターへの再編成

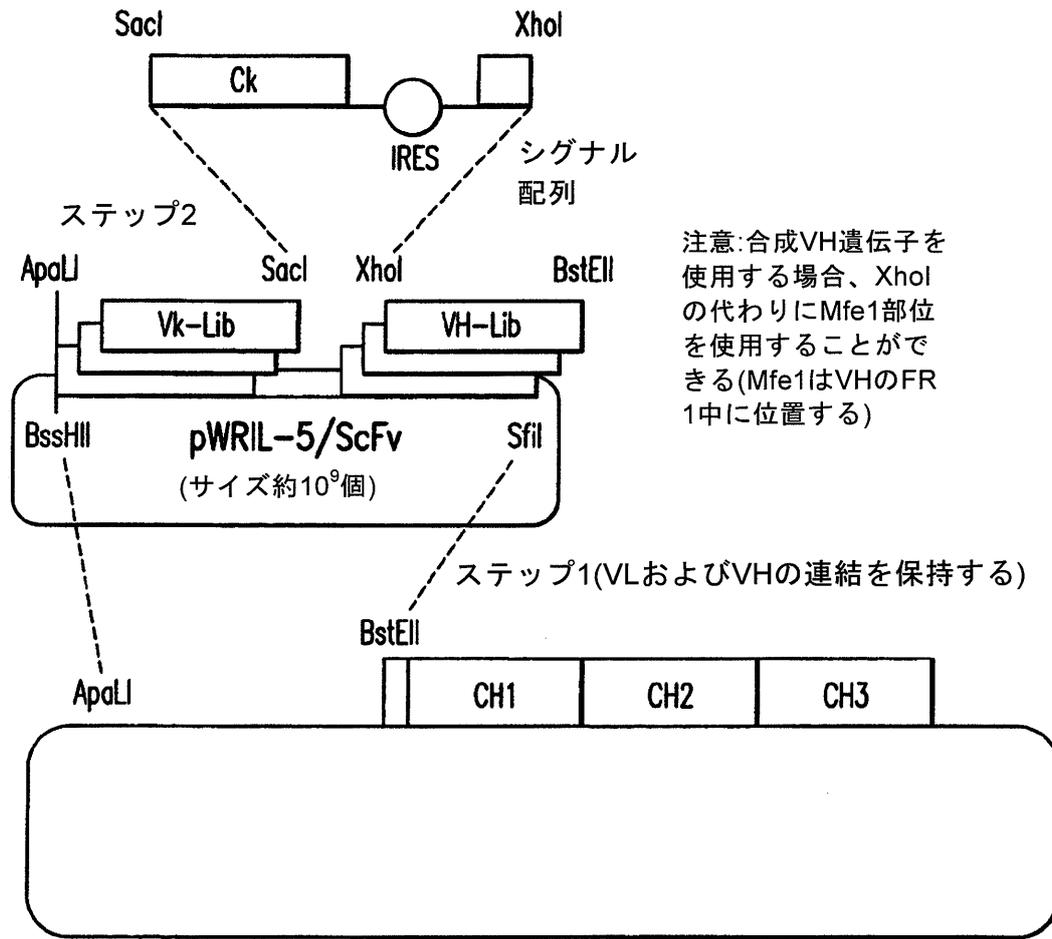


図 5