

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年3月27日 (27.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/025020 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 16/18, C12N 15/09 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09448 (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 本多 俊生 (HONDA, Toshio) [JP/JP]; 〒470-1121 愛知県 豊明市 西川町島原 2-2-302 Aichi (JP). 赤堀 泰 (AKAHORI, Yasushi) [JP/JP]; 〒468-0056 愛知県 名古屋市 天白区島田 5-1508 Aichi (JP). 黒澤 良和 (KUROSAWA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒465-0075 愛知県 名古屋市 名東区藤巻町 3-2-1271 Aichi (JP).
(22) 国際出願日: 2002年9月13日 (13.09.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2001-277765 2001年9月13日 (13.09.2001) JP (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6階 Ibaraki (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社抗体研究所 (INSTITUTE FOR ANTIBODIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県 名古屋市 中区丸の内 3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5階 Aichi (JP). (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING CAMEL ANTIBODY LIBRARY

(54) 発明の名称: ラクダ抗体ライブラリーの作製方法

(57) Abstract: It is intended to provide a camel antibody library sustaining the multiplicity in the antibody variable region genes *in vivo* in animals belonging to the family *Camelidae*. The multiplicity in the variable region genes *in vivo* can be achieved by, for example, mixing genes originating in a plural number of individuals or elaborating gene amplification conditions. Although VHH with restricted multiplicity repertory can be merely obtained by known methods, a library containing genes encoding functional VHH in a sufficiently large repertory size can be successfully provided. Thus, a library whereby VHH against an arbitrary antigen can be freely obtained is provided. VHH is excellent in solubility and stability and shows a reactivity which cannot be expected in case of conventional tetramer IgG.

(57) 要約:

本発明は、ラクダ科動物の生体における抗体可変領域遺伝子の多様性を維持したラクダ抗体ライブラリーを提供する。生体における抗体可変領域遺伝子の多様性は、たとえば複数の個体に由来する遺伝子の混合、遺伝子増幅条件の工夫により実現することができる。公知の方法ではレパートリーの多様性の限られた VHH しか取得できなかったが、本発明によって、機能的な VHH をコードする遺伝子を十分なレパートリーサイズで含むライブラリーが提供された。本発明のライブラリーにより、任意の抗原に対する VHH を自由に取得することができるライブラリーが提供された。VHH は溶解性や安定性に優れ、かつ通常の 4 量体 IgG では期待できない反応性を示す。



WO 03/025020 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特

許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

ラクダ抗体ライブラリーの作製方法

技術分野

本発明は、ラクダ抗体ライブラリーの作製方法に関する。

背景技術

ラクダ科の動物の免疫グロブリン（抗体分子）を構成する IgG には、重鎖と軽鎖を有するヘテロ 4 量体の構造と、重鎖の 2 量体からなる構造とが存在することが知られている（Isr. J. Vet. Med. 43 No3 198 (1987)、Nature, 363, 446 (1993)）。4 量体構造はヒトをはじめとする多くの動物に共通の特徴である。一方、後者の重鎖 2 量体構造からなる IgG は、ラクダ科動物に特徴的な IgG とされている。ラクダ科動物における、重鎖の 2 量体からなる IgG は、病的な状態に起因する偶発的なものではない。

アジアやアフリカのラクダ科動物である *Camelus bactrianus* や *Camelus dromedarius*、並びに南アメリカのラクダ科動物の全ての種において、軽鎖を欠く免疫グロブリンが見出されている。南アメリカのラクダ科動物としては、たとえば *Lama Pacos*、*Lama Glama*、あるいは *Lama Vicugna* 等を示すことができる。動物種によって 2 量体 IgG の分子量は異なっている。これらの免疫グロブリンを構成する重鎖の分子量は、約 43 kDa から約 47 kDa、通常 45 kDa である。

重鎖 2 量体 IgG のもうひとつの特徴は、この抗体が Roitt らの定義による CH 1 と呼ばれる定常領域の最初のドメインを欠く点である。また、ヒンジ部分も通常のヘテロ 4 量体抗体（重鎖+軽鎖）とは異なるアミノ酸配列を有している。アミノ酸配列の違いに基づいて、ヒトコブラクダの IgG は次のように分類されている（Nature 363 446(1993)）。

- 2 -

IgG2 : 長いヒンジ配列 (配列番号 : 8) を持つ

IgG3 : 短いヒンジ配列 (配列番号 : 9) を持つ

IgG1 : ヘテロ 4 量体抗体

重鎖 2 量体 IgG の VH 領域は、軽鎖との疎水的相互作用が必要ないため、重鎖における軽鎖と接触する部分が親水性のアミノ酸残基に変異している。通常のヘテロ 4 量体 IgG の VH との構造的な違いによって、重鎖 2 量体 IgG の VH 領域は VHH (Variable domain of the heavy-chain of heavy-chain antibody) と呼ばれている。

VHH は、その親水性アミノ酸残基のため溶解性が優れる。VHH におけるアミノ酸置換は、一次構造 (アミノ酸配列) のいたるところに分散している。そしてこれら親水性アミノ酸残基は、VH における VL ドメインと相互作用する位置に相当する三次構造空間内にクラスターを形成する。ここで、前記の三次構造空間を、特に前部 VL サイドと呼ぶ。これらのアミノ酸置換は、例えば V37F または V37Y、G44E、L45R または L45C であり、W47 の多くも Gly に置換されている。このような置換は、VHH の前部 VL サイドの親水性を高める。

したがって、VHH の溶解度は、ヒトまたはマウスから単離精製された VH (シングルドメイン抗体 ; Ward ら、Nature, 341, 544(1989)) の溶解度よりもはるかに大きい。VHH は、通常の緩衝液に対してどのような凝集の徴候も見せることなく、10 mg/ml にまで容易に濃縮することができる。この濃度は、たとえばマウスの VH の溶解度の約 100 倍に匹敵する。

また、ラクダやラマに由来する VHH の熱安定性は、マウスのヘテロ 4 量体抗体と比較して非常に高い。これらの種に由来する VHH を利用すれば、たとえば 90°C でも抗原結合能を維持している分子の提供が可能である (Biochim Biophys Acta 1431 (1) 37, 1999)。

さてラクダ科動物の抗体レパトリーの多様性は、VH または VHH 領域中の CDR (complementary determining region) 1、2、3 によって決定される。3つの CD

Rを有する点は、他の動物種のIgGと共通する。しかし、ラクダVHH領域中のCD R3は、平均16アミノ酸と相対的に長いという特徴を有する(Protein Engineering 7(9)1129, 1994)。たとえばマウスのVHのCD R3が平均9アミノ酸であることと比較すると、ラクダのIgGにおけるCD R3が相対的に非常に長いことがよくわかる。

ところで、これまでに構造がわかっている重鎖+軽鎖ヘテロ4量体抗体の抗原結合部位の多くは、groove(溝)またはcavity(くぼみ)またはflat(平坦)といった抗原結合面を形成することが知られている[Websterら、Current Opinion in Structural Biology, 4, 23, 1994]。したがって、もし結合対象物質のエピトープもまたgrooveまたはcavityであった場合、抗体の抗原結合部位は、うまく結合できない可能性がある。たとえば、酵素等のタンパク質の触媒性または機能的残基あるいは毒性部分は、多くの場合、cleft(裂け目)の内側に位置している。この構造が、酵素の基質や受容体が、タンパク質と非常に特異的に相互作用することを容易にしている。しかし、cavityやcleftといった構造はヘテロ4量体抗体にとっては認識が難しいため、大きな免疫原性はない。

これに対してラクダ科動物のVHHは、上述したその特徴的な構造によりcleftおよびcavityを特異的に認識できることが報告されている。例えば、酵素を抗原として免疫したラクダの末梢血から抗体を分離した実験では、ラクダIgG2、IgG3のみに酵素活性中心を塞ぐ抗体が存在し、IgG1には活性中心を塞ぐ抗体が得られなかったと報告された(EMBO J 17(13):3512, 1998)。更に、Lysozyme活性阻害作用を有するVHHが、Lysozymeで免疫したラクダに由来するライブラリーからファージディスプレイ法によって分離された(FEBS Letters (414) 521, 1997)。そして分離されたVHHの構造が、LysozymeとのX線結晶解析(Nature Structural Biology, 2, 803, 1996)によって示された。その結果は、ラクダ抗体のIgG2あるいはIgG3においては、CD R3領域が長く突き出して酵素の基質結合部位に入り込んで活性中心を塞ぐように結合することにより、拮抗阻害を起こしている

ことを示していた。

ラクダ科動物に由来する VHH には、このように溶解性が高い、4 量体構造の I gG では期待できない新たな活性を有する可能性がある、といった産業上有用な特徴を見出すことができる。抗体可変領域の取得には、目的とする抗原による動物の免疫と、抗体の分離が必要である。しかし、このような古典的な手法は、大量の抗原を精製しなければならないことや、非特異的な抗体の生成といった問題を伴う。そこで抗体可変領域をより容易に取得する手法として、rgdp ライブラリーを用いたスクリーニング方法が提案されている。rgdp ライブラリーとは、抗体可変領域のような結合親和性物質をコードする遺伝子が、その発現産物を提示した遺伝的表示パッケージで構成されたライブラリーを言う。抗体可変領域を提示したファージライブラリーは、rgdp ライブラリーの代表的な例である。

抗体可変領域を提示したファージライブラリーを用いた、抗体の取得方法は、労働集約的な古典的な抗体の作製手法に代わる新たな抗体の取得方法として注目されている。本発明者らも、抗体可変領域を効率的に取得することができる新規な抗体ライブラリーを作製し、既に特許出願している (WO 01/62907)。VHH についてもそのライブラリーを作製し、ライブラリーから任意の抗原に対する結合親和性を有する VHH を自由に選択することができれば有用である。しかし、ラクダ科動物の VHH のライブラリーの作製には、いくつかの問題点が指摘されている。

ラクダ科動物の VHH 構造のもうひとつの特徴として、通常可変領域に存在する 22 番目と 92 番目のシステインの他に、CDR3 にシステイン残基が存在することが多いことが挙げられる。CDR3 のシステイン残基は CDR1 あるいは CDR2 近傍にあるもうひとつのシステインと、ジスルフィド結合すると考えられている (Protein Engineering 7(9)1129, 1994、J. Mol. Recognit. 12 : 131, 1999)。CDR1 および CDR2 は、germline (生殖系列) の V 遺伝子によって決定される。そしてそれらは、CDR3 とともに抗原結合に関して重要な役割を果たしている。(Nature Structural Biology, 2, 803, 1996、Structure 7(4)1999、J Mol Biol 311(1):123, 2001)。

一般に germline (生殖系列) とは、生殖細胞などで維持される染色体遺伝子、すなわちリアレンジメントを生じていない染色体遺伝子を意味している。本出願では、染色体遺伝子の中でも特に抗体遺伝子を構成する部分を germline と言う。

最近、ラクダ科動物であるヒトコブラクダおよびラマの germline が調査された。その結果ヒトコブラクダおよびラマの IgG は、CDR2 の長さ と V 領域のシステインの位置によって分類されている (EMBO J. 19 (5) 921, 2000、Mol. Immunol 37 579, 2000)。

しかし、従来取得されている抗体遺伝子は、ヒトコブラクダの germline 全体に由来する抗体遺伝子を十分にカバーしているとは考えにくいことが指摘されている。たとえば、これまでに得られた抗体の cDNA の塩基配列の分類が一部のクラスに集中していることから、これらの抗体が由来する germline は偏っていることが明らかである (EMBO J. 19 (5) 921, 2000)。また方法論的にも、次のような問題点が考えられた。すなわち公知のライブラリー構築には、N 末端側のプライマーは 1 種しか用いられていなかった。そのため、特異性の問題から VHH 遺伝子が由来する germline の漏れの可能性、あるいは増幅産物が偏る可能性があった (FEBS Letters 414 521, 1997)。

構成遺伝子に偏りがあるライブラリーは、レパートリーに乏しい。したがって、このようなライブラリーをスクリーニングしても、目的の抗原に対する抗体を得られない可能性がある。このことが、非免疫ラクダ由来ファージライブラリーから酵素活性を阻害する、あるいは促進する抗体が取得できない原因となっている可能性がある。

従来技術では、ラクダやラマの免疫グロブリン重鎖の可変領域を取得するために、十分量の抗原を用いて予めラクダやラマを免疫する方法が提唱されている (特表平 11-503918、EMBO J 17(13):3512, 1998、FEBS Letters (414) 521, 1997)。この方法は、ラクダやラマの免疫系が、それ自身の重鎖抗体を in vivo で成熟させることを利用している (特表 2000-515002、J. Immuno. Methods (240)

185, 2000)。この方法に基づいて、Lysozyme、破傷風トキソイド、カルボニックアンヒドラーゼ、アミラーゼ、RNaseA、あるいはアゾ色素などを認識する抗体が得られている。

しかしながら、この方法は、免疫感作を要するために次のような様々な制約を受ける。

免疫感作期間が必要であること、

ラクダ科動物への免疫原の毒性の影響、

免疫原性が低い物質の抗体の取得が難しいこと、そして

免疫感作のために相対的に多量の抗原が必要であること

更に、免疫感作の問題を回避する方法として、以下のステップを特徴とする方法が提唱された（特表 2000-515002）。

- 1) ラクダ科重鎖抗体をランダムに選択し；
- 2) コーディング配列を単離し、ファージディスプレイベクターにおいてクローニングし；
- 3) そのコーディング配列を少なくともひとつのコドンにおいてランダムに置換することにより修飾し；
- 4) ファージディスプレイベクターにおいてランダムに突然変異したコーディング配列のライブラリを作製し；
- 5) そのベクターを導入したファージにおいて該コーディング配列を発現し；
- 6) 次いで、ファージを固定抗原で選り分けることによって抗原に特異的な認識分子を選択する、

またこれに類する解決法として、ラクダ抗体のフレームワークを利用する方法も提案されている。この方法は、VHH および VH の CDR1、CDR2、および CDR3 を、ラクダ抗体のフレームワークに組み込んでラクダ抗体を再構築する方法である。この手法は、マウスの VH をヒト化するために考え出された手法を応用している。各 CDR のループをランダムに突然変異させて、レパートリーサイズを大きくする

ことができる。その結果、親和性と特異性を調整することができる（特表 2000-515002）。

これらの解決法は、いずれもコーディング配列に人為的な変異を導入することによって多様性を獲得しようという原理に基づいている。しかしながら、こういった試みの多くは変異の導入の際に多大な労力、煩雑な手順を経ており、多大な時間を費やしていた。また、こういった試みの多くは、活性な抗体の生成に伴って、遥かに多くの不活性な抗体を多く生み出す非効率性を伴っていた。

一方、免疫していないラクダの組織や血液から得た VHH の遺伝子をファージディスプレイベクターに組み込んでファージライブラリーを作製し、このライブラリーから結合能のあるファージを固定抗原で選り分けることによって抗原に特異的な認識分子を選択する方法も考えられる。しかしこの方法では、けっきょく免疫原性が十分なものに対する VHH しか得られないと考えられていた。そのため、VHH の遺伝子を組み込んだファージライブラリーを用いる方法については、十分な検討は行われてこなかった（特表 2000-515002）。したがって、酵素の活性を阻害あるいは促進する抗体が得られるほど多様なレパートリーを含む非免疫ラクダ由来 VHH 抗体ファージライブラリーはこれまで存在しなかった。

発明の開示

本発明の課題は、十分なレパートリーサイズを有する VHH ライブラリーの提供である。また本発明は、不活性な VHH の生成を伴わない VHH ライブラリーの提供を課題とする。

本発明は、従来の VHH 可変領域単離プロセスを改善することによって非常に大きいレパートリーの広がりをもつ VHH ライブラリーを提供する。すなわち、遺伝子を増幅するプライマーの工夫によって、より生体における多様性を忠実に再現した germline VHH 遺伝子を増幅することができた。

また、VHH はラクダ科の動物に発達した、補完的な意味合いの大きい抗体分子

であり、VH 遺伝子とは抗体の成熟プロセス等が全く異なる集団であることを我々は明らかにした。そこで、VHH 遺伝子の多様性を最大限とするため、これまでのライブラリーでは重視されていなかった個体数を増加させることによる多様性の確保を試みた。その結果、1 個体を越える数のラクダの遺伝子を用いて多様性の大きいライブラリーを作製することに成功した。

また、我々は PCR 法を用いて遺伝子を増幅する際に失われる多様性を最小限とするため、PCR で増幅させる遺伝子是对数増殖期で回収し、一部の遺伝子が飽和することを防いだ。更に、我々は IgM クラスの可変領域遺伝子も取得した。一般に IgM クラスの免疫グロブリンはナイーブなレパートリーを有するとされている。そのため IgG は、ラクダ生体に生じた自然な免疫感作によるクローンの偏りを伴っている可能性がある。一方 IgM ではこのような偏りが起こっていないと考えられる。

以上のプロセスを経て、非免疫抗体可変領域ライブラリーとしては非常に大きな多様性を確保したライブラリーを作製することが可能となった。すなわち本発明は、以下の抗体可変領域のライブラリー、その作製方法、およびその用途に関する。

- [1] ラクダ科動物生体における可変領域の多様性を維持した、ラクダ科動物由来 VHH のライブラリー。
- [2] ライブラリーを構成するクローンの任意の 33 クローンを取り出して調べたときに、少なくとも 8 個以上のクラスが含まれる、[1] に記載のライブラリー。
- [3] ライブラリーを構成するクローンから無作為に十分量のクローンを取り出して調べたときに、少なくとも 6 つの VHH サブファミリーが含まれ、かつ 15 個以上のクラスが含まれる、[2] に記載のライブラリー。
- [4] 少なくとも、105 以上の VHH 遺伝子クローンを含む、[1] に記載のライブラリー

- [5] IgG2、および/または IgG3 のイムノグロブリン遺伝子に由来する VHH 遺伝子クローンで構成された、[1] に記載のライブラリー。
- [6] VHH 遺伝子の構成比率が 60%以上である [5] に記載のライブラリー。
- [7] rgdp ライブラリーである [1] に記載のライブラリー
- [8] 以下の工程を含む、目的とする物質に対する親和性を有する VHH をコードする遺伝子の取得方法。
- (1) [7] に記載のライブラリーを、目的とする物質に接触させる工程、および
 - (2) 目的とする物質に結合する VHH を有するクローンを選択する工程
- [9] 目的とする物質が酵素分子またはその断片である [8] に記載の方法。
- [10] 次の工程を含む、酵素活性を調節する作用を有する VHH を取得する方法。
- (1) [9] に記載の方法によって、酵素に結合する VHH を取得する工程、
 - (2) 工程 (1) で取得された VHH を当該酵素と接触させる工程、および
 - (3) VHH を接触させない場合と比較して、当該酵素の酵素活性を変化させる作用を有する VHH を選択する工程
- [11] [8] または [10] に記載の方法によって選択された VHH をコードする遺伝子。
- [12] 次の工程を含む、ラクダ科動物由来 VHH を可変領域として有するイムノグロブリンまたはその断片の製造方法。
- (1) [8] に記載の方法によって目的とする物質に対する結合活性を有する VHH をコードする遺伝子を取得する工程、
 - (2) 得られた VHH をコードする遺伝子を、宿主細胞において発現可能なベクターに組み込んで VHH 発現ベクターとする工程、および
 - (3) VHH 発現ベクターを宿主細胞に導入し、その培養物から VHH を含む蛋白質を回収する工程
- [13] 次の工程を含む、VHH ライブラリーの作製方法。

- 1 0 -

(1) ラクダ科動物に属する動物種の複数の個体から VHH 遺伝子を取得する工程、および

(2) 工程 (1) で取得した VHH 遺伝子を混合してライブラリーとする工程
〔14〕 工程 (1) で取得した VHH 遺伝子を増幅する工程を含む〔13〕に記載の方法。

〔15〕 PCR 法によって増幅する〔14〕に記載の方法。

〔16〕 増幅産物が指数増殖を示しているときに PCR 法の増幅産物を回収する工程を含む〔15〕に記載の方法。

〔17〕 ラクダ科動物がヒトコブラクダであり、配列番号：1～配列番号：6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの5'側プライマー、および配列番号：10に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる3'側プライマーからなるプライマーセットを用い、各プライマーセットによる増幅産物を混合する工程を含む〔15〕に記載の方法。

〔18〕 ラクダ科動物がヒトコブラクダであり、配列番号：1～配列番号：6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの5'側プライマー、および配列番号：11に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる3'側プライマーからなるプライマーセットを用い、各プライマーセットによる増幅産物を混合する工程を含む〔15〕に記載の方法。

〔19〕制限酵素 SfiI および AscI で消化した増幅産物を次の性状(i)および(ii)を有するベクターにライゲーションする工程を含む〔17〕または〔18〕に記載の方法。

(i) SfiI サイトおよび AscI サイトを有する、および

(ii) 適当な宿主に形質転換することによって上記サイトに挿入された外来性遺伝子がコードする蛋白質をファージを構成する蛋白質との融合蛋白質として発現する

〔20〕〔17〕または〔18〕に記載の方法によって作製することができる VH

H ライブラリー。

[2 1] 配列番号：1～配列番号：6 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択された 5' 側プライマーと、配列番号：10 または配列番号：11、に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択された 3' 側プライマーからなるラクダの VHH 遺伝子増幅用のプライマーセット。

[2 2] 次の工程を含む、VH ライブラリーの製造方法。

(1) ラクダ科動物に属する動物種の複数の個体から VH 遺伝子を取得する工程、および

(2) 工程 (1) で取得した VH 遺伝子を混合してライブラリーとする工程

[2 3] 工程 (1) で取得した VH 遺伝子を増幅する工程を含む [2 2] に記載の方法。

[2 4] PCR 法によって増幅する [2 3] に記載の方法。

[2 5] 増幅産物が指数増殖を示しているときに PCR 法の増幅産物を回収する工程を含む [2 4] に記載の方法。

[2 6] ラクダ科動物がヒトコブラクダであり、配列番号：1～配列番号：6 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの 5' 側プライマー、および配列番号：41 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる 3' 側プライマーからなるプライマーセットを用い、各プライマーセットによる増幅産物を混合する工程を含む [2 4] に記載の方法。

[2 7] 制限酵素 SfiI および AscI で消化した増幅産物を次の性状 (i) および (ii) を有するベクターにライゲーションする工程を含む [2 6] に記載の方法。

(i) SfiI サイトおよび AscI サイトを有する、および

(ii) 適当な宿主に形質転換することによって上記サイトに挿入された外来性遺伝子がコードする蛋白質をファージを構成する蛋白質との融合蛋白質として発現する

[2 8] ラクダ科動物の IgM 由来の VH のライブラリー。

[29] [22] に記載の方法によって得ることができる VH のライブラリー。

[30] rgdp ライブラリーである [28] または [29] に記載のライブラリー。

[31] 以下の工程を含む、目的とする物質に対する親和性を有する VH をコードする遺伝子の取得方法。

(1) [30] に記載のライブラリーを、目的とする物質に接触させる工程、および

(2) 目的とする物質に結合する VH を有するクローンを選択する工程

[32] 目的とする物質が酵素分子またはその断片である [31] に記載の方法。

[33] 次の工程を含む、酵素活性を調節する作用を有する VH を取得する方法。

(1) [31] に記載の方法によって、酵素に結合する VH を取得する工程、

(2) 工程 (1) で取得された VH を当該酵素と接触させる工程、および

(3) VH を接触させない場合と比較して、当該酵素の酵素活性を変化させる作用を有する VH を選択する工程

[34] [31] に記載の方法によって選択された VH をコードする遺伝子。

[35] 次の工程を含む、ヒトコブラクダ由来 VH を可変領域として有するイムノグロブリンまたはその断片の製造方法。

(1) [31] に記載の方法によって目的とする物質に対する結合活性を有する VH をコードする遺伝子を取得する工程、

(2) 得られた VH をコードする遺伝子を、宿主細胞において発現可能なベクターに組み込んで VH 発現ベクターとする工程、および

(3) VH 発現ベクターを宿主細胞に導入し、その培養物から VH を含む蛋白質を回収する工程

[36] 配列番号：1～配列番号：6 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの 5' 側プライマー、および配列番号：41 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる 3' 側プライマーからなるヒトコブラクダ VH 遺伝子増幅用プライマーセット。

本発明は、ラクダ科動物生体における可変領域の多様性を維持した、ラクダ科動物由来抗体可変領域のライブラリーに関する。可変領域遺伝子として VHH 遺伝子からなる VHH ライブラリーが生体における多様性を維持していることは、例えば次のようにして確認することができる。すなわち、ライブラリーを構成するクローンの任意の 33 クロームを取り出して調べたときに、少なくとも 8 個以上のクラスが含まれるライブラリーは、生体における多様性を維持していると言う事ができる。より具体的には、ライブラリーを構成するクローンから無作為に十分量のクローンを取り出して調べたときに、望ましくは 6 つの VHH サブファミリーが含まれ、かつ 15 個以上のクラスが含まれる場合に、当該ライブラリーは生体における VHH の多様性を維持していると言うことができる。

本発明において、VHH のサブファミリーはシステイン残基の位置に基づく分類である。またクラスは、システイン残基の位置、CDR2 の長さ、および CDR1 の長さに基づく分類である。実施例 2 に示した表 1 の中で、1 つの枠が 1 つのクラスに相当する。

VHH の公知のサブファミリー分類 (EMBO J. 19 (5) 921, 2000、Mol Immuno 127 (10) 2000) は、システイン残基の位置と CDR2 の長さに基づく分類となっている。これに対して本発明者らの解析によれば、公知の分類ではカバーすることができないシステイン残基や CDR2 の長さが確認された。また CDR1 を構成するアミノ酸残基の数も、本発明者らの解析結果では複数種の長さが見出されているのに対して、これまでは 1 種類とされていた。したがって、公知の分類に基づいて VHH を分類することは、事実上不可能である。

さて、公知のライブラリーの解析結果 (EMBO J. 19 (5) 921, 2000) に上記本発明におけるサブファミリー、およびクラスのカテゴリを適用すると、サブファミリー数：5、クラス数：7 (72 クローム中) となる。一方、本発明による VHH ライブラリーでは、たとえば後に述べる実施例において作製した VHH ライブラリーを構成するクローンの解析結果に先の分類方法を適用すると、次のような結

果になる。

IgG2 由来の VHH ライブラリー中、任意の 89 クローンの解析結果：

サブファミリー数：7 クラス数：31

IgG3 由来の VHH ライブラリー中、任意の 59 クローンの解析結果：

サブファミリー数：7 クラス数：20

本発明者らは、これらの知見に基づいて、ライブラリーを構成する任意の 50 クローン以上を調べ、先の分類に基づくサブファミリー数が 6 以上、そしてクラス数が 15 以上である場合に、当該ライブラリーが十分な多様性を維持していると判断することができると考えた。

本発明の VHH ライブラリーは、具体的にはたとえば 10^5 以上のクローン数を有していることが望ましい。したがって、非免疫ラクダ抗体ライブラリーでは、少なくともそれ以上のクローン数を有することが望まれる。本発明の抗体ライブラリーは、より望ましくは 10^6 以上、通常 10^7 以上、あるいは 10^8 以上、更に望ましくは 10^9 以上、また理想的には 10^{10} 以上のクローン数とすることにより、実用的なライブラリーとすることができる。

たとえば後に述べるような方法によって得ることができる本発明のラクダ抗体ライブラリーは、 10^{10} 以上のクローン数を有する。これほど多様性に富む VHH 遺伝子ライブラリーは、これまでに報告は無い。更に重要なことは、本発明のライブラリーを構成する VHH 遺伝子に占める、正常な遺伝子の割合が極めて高いことである。VHH 遺伝子が正常であることは、VHH 遺伝子の塩基配列を決定し、以下のような条件について解析することにより確認することができる。

フレームワーク (frame work) において公知のラクダ抗体のフレームワークと相同性の高い塩基配列を有していること、

翻訳アミノ酸配列にフレームシフトが無いこと、そして

ストップコドンを生じていないこと

更に好ましくは、ヒンジ領域において VHH の特徴である親水性のアミノ酸が位

置する部位において、親水性のアミノ酸残基を有していることも、正常な VHH 遺伝子の条件として重要である。

本発明のライブラリーを構成する VHH 遺伝子の好ましくは 80%以上、より好ましくは 85%以上、更に好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上が正常である。更に具体的には、本発明は 90%以上の正常な IgG2 由来 VHH 遺伝子を含む VHH ライブラリーに関する。あるいは本発明は、95%以上の正常な IgG3 由来 VHH 遺伝子を含む VHH ライブラリーに関する。先に述べたような高度な多様性を有し、しかもこのような高い割合で正常な VHH 遺伝子を含むライブラリーは、公知の方法で得ることはできない。

本発明において、VHH とはラクダ科動物の血中に見られる 2 量体構造の免疫グロブリンを構成する可変領域を言う。本発明のライブラリーを構成する VHH 遺伝子は、可変領域のみならず定常領域を含むことができる。したがって、VHH 遺伝子がヒンジ領域の塩基配列を伴っていてもよい。VHH と VH は、ヒンジ領域に構造的な違いが見られることが多いので、ヒンジ領域にプライマーを設定してヒンジ領域を伴った VHH 遺伝子を取得することにより、VHH 遺伝子を特異的に集めることができる。

後に述べる実施例においては、この考えかたにしたがってヒンジ領域において 3' 側 (C 末端側) のプライマーを設定している。その結果、実施例において使用したプライマーによって増幅された VHH 遺伝子は、それぞれ次のような高い割合で目的とするクラスの VHH で占められていた。

IgG2 (配列番号 : 10) VH : VHH = 7 : 91 (93% VHH)

IgG3 (配列番号 : 11) VH : VHH = 1 : 167 (99% VHH)

IgM (配列番号 : 41) VH : VHH = 189 : 3 (1.6% VHH)

本発明の VHH ライブラリーは、たとえば次のような手法を利用することによって作製することができる。以下に述べる手法は、いずれも VHH のレパートリーサイズの不足を補うために有用である。

- 16 -

(1) 複数の個体に由来する VHH 遺伝子を利用する

(2) より幅広い遺伝子を増幅できるプライマーを使って、VHH 遺伝子を増幅する

(3) VHH 遺伝子を増幅にあたっては、指数的な増幅が進行しつつあるときに増幅産物を回収する

続けて、これらの手法をより具体的に説明する。

(1) 複数の個体に由来する VHH 遺伝子を利用する

本発明者らの知見によれば、ラクダ科動物の VHH 遺伝子のレパートリーサイズは限られ、偏っている場合が多い。そのため、1 個体の VHH 遺伝子のみでは、任意の抗原に対する抗体を自由に取得できるほどのレパートリーサイズを有するライブラリーを作製することは難しい。そこで、1 個体を越える数の VHH 遺伝子を利用して、ライブラリーを作製することによって、レパートリーサイズを有効に拡大することができる。

1 個体を越える数の VHH 遺伝子とは、遺伝的に異なる複数の個体から取得された VHH 遺伝子を含むことを意味する。本発明において遺伝的に異なる複数の個体とは、ゲノムレベルで遺伝的な相違を有する個体を言う。したがって、たとえ同腹仔であっても、それが 1 卵性でなければ遺伝的には異なる個体である。しかし、レパートリーサイズを広げるという目的のためには、より遺伝的に遠い関係にある個体を組み合わせるほうが有利である。

本発明において、1 個体を越える数の VHH 遺伝子は、1 個体分の VHH 遺伝子に、その個体とは異なる個体に由来する VHH 遺伝子を加えることによって得ることができる。加える VHH 遺伝子は限定されない。したがって、たとえば他の個体由来する VHH 遺伝子の、部分的な集団を加えた場合も、本発明に含まれる。

加えるべき VHH 遺伝子は、1 個体あたり 10^5 個以上の細胞から回収するのが好ましく、各個体から取得した VHH 遺伝子集団の全体とするのが望ましい。全体を利用することによって遺伝子の偏りを防ぐことができる。遺伝子の偏りは、レパ

ートリーサイズを小さくする原因となることから、できるだけ VHH 遺伝子集団の全体を加えるようにすることは有効である。なお VHH 遺伝子集団の全体とは、取得することができた VHH 遺伝子の全体を言う。つまり本発明は、ある個体の VHH 遺伝子集団を漏れなく加える場合のみならず、取得可能な VHH 遺伝子の全てを加える場合を含む。

また本発明において、ある個体に由来する VHH 遺伝子に対して添加する他の個体に由来する VHH 遺伝子は、個体間の偏りを避けるために、均等に添加するのが望ましい。VHH 遺伝子を混合する目的は、レパートリーサイズを大きくすることである。個体間の VHH 遺伝子に偏りがある場合には、そのライブラリーを使ったスクリーニングにおいて、特定の個体に由来する VHH 遺伝子が優先的に選択される可能性が高まる。このような状況では、レパートリーサイズを大きくした効果は小さくなる。したがって、個体間の偏りを小さくすることは重要である。つまり、ある個体に由来する VHH 遺伝子に他の個体の VHH 遺伝子を加える場合には、等量の VHH 遺伝子の添加が望ましい。更に複数の個体に由来する VHH 遺伝子を混合する場合にも、等量の VHH 遺伝子を利用するようにすることが望まれる。

(2) より幅広い遺伝子を増幅できるプライマーを使って、VHH 遺伝子を増幅する

個体からライブラリーの構築に必要な量の mRNA を得ることができれば、そのままライブラリーを作製することができる。しかし通常は個体から取得した mRNA は微量であることから、VHH 遺伝子ライブラリーの構築にあたっては、この mRNA を増幅する。このとき、VHH 遺伝子を漏れなく増幅しなければ、ライブラリーのレパートリーサイズを大きくすることはできない。

本発明において、遺伝子の増幅方法は限定されない。VHH 遺伝子集団を、できるだけ漏れなく増幅することができる方法であれば、任意の方法を利用することができる。遺伝子の増幅方法として、PCR 法を利用するときには、幅広い VHH 遺伝子の増幅を期待できるプライマーを利用する。ラクダやラマの VHH 遺伝子の取

得のためのプライマーは公知である。しかし、本発明者らの知見によれば、公知のプライマーを単独で用いたのでは、VHH 遺伝子を偏り無く増幅することは難しい。

そこで本発明者らは、VHH 遺伝子をより偏り無く増幅することができるプライマーを新たにデザインした。本発明者らがデザインした、ヒトコブラクダ VHH 遺伝子を増幅するための N 末端側 (5' 側) のプライマーの塩基配列を配列番号：1 ~ 配列番号：6 に記載した。また C 末端側 (3' 側) は、ヒンジ領域から CH3 の間でアニールすることができるプライマーを用いれば良い。このようなプライマーは公知である。例えば本発明者らは、ヒンジ領域のアミノ酸配列を解析し、IgG2 と IgG3 のヒンジ領域に対して、それぞれ配列番号：10 および配列番号：11 に記載の塩基配列からなるプライマーをデザインした。これらのプライマーは、6 種類の 5' 側プライマーのそれぞれについて、2 種類の 3' 側プライマーを組み合わせた、12 とおりの組み合わせのプライマーセットとして用いられる。

ヒトコブラクダ以外のラクダ科動物の VHH 遺伝子を増幅するには、実施例に記載したような解析方法によって目的とする VHH 遺伝子の塩基配列を解析し、プライマーをデザインすることができる。

更に本発明者らは、VH 構造を持つ抗体でも、酵素活性を調節する抗体が得られる場合があることから、IgM の抗原認識レパートリーに注目した。IgM は、IgG の VHH の抗原認識レパートリーを補完する上で抗原刺激がない段階での可変領域の原型と考えることができる。免疫による重鎖の *in vivo* における成熟において、IgM はあらゆる抗原に対しての可変領域の原型を保持しており、クラスチェンジによって抗原に最適な IgG 可変領域を作り出す設計図を保持していると考えた。そこで、本発明者らはラクダの μ 鎖認識配列 (配列番号：41) を新たに利用して IgM の可変領域を単離することに成功した。この IgM 由来重鎖可変領域ライブラリーはレパートリーの多様性をさらに広げ、認識分子、酵素活性調節分子単離に役立つ。本発明において、IgM 由来の VH からなるライブラリーの構築において

も、そのレパートリーの多様性を高く維持するために、複数の個体に由来する mRNA を用いることは有効である。

IgM 由来の VH ライブラリーは、IgG2 や IgG3 に由来する VHH レパートリーに対して、補完的な意味合いを持つ。補完的とは、VHH からでは選択することができない、あるいはポピュレーションが少ないために選択が困難な機能を有する抗体可変領域を補うことを言う。これらのライブラリーを組み合わせることによって、より広範囲な分子を認識しうる抗体可変領域を取得することができる。より具体的には、より多様な酵素に対して酵素活性を調節する機能を有する抗体可変領域の単離が可能である。

これらのプライマーを組み合わせ、ラクダの抗体産生細胞から取得した mRNA を鋳型として PCR 法により VHH 遺伝子 (IgM の場合は主に VH 遺伝子を含む) を増幅する。抗体産生細胞としては、脾細胞や末梢血 B 細胞等を用いることができる。増幅した VHH 遺伝子を回収してライブラリーとして構築することにより、本発明の VHH ライブラリーとすることができる。

本発明においては、ある個体に由来する VHH 遺伝子に、他の個体の VHH 遺伝子を加えることによって、レパートリーサイズの大きさを獲得している。そのためには、増幅産物を混合するか、あるいは予め複数の個体に由来する mRNA を混合したものを鋳型として遺伝子を増幅すれば良い。複数の個体から一定量の mRNA を集め、mRNA の混合物を鋳型として遺伝子を増幅することによって、個体間の遺伝子の偏りを小さくすることができる。また遺伝子を増幅や回収の操作も 1 度で済むので合理的である。

より具体的には、複数のラクダ個体から mRNA を集め、その等量を混合して mRNA プールとする。この mRNA プールからランダムプライマー、オリゴ dT プライマー、あるいは定常領域と相同なプライマー等を用いて cDNA を合成し、PCR の鋳型とする。PCR においては、(3) として述べるように指数増幅期において増幅産物を回収するようにする。

- 20 -

本発明の VHH ライブラリーは、IgG2 と IgG3 を別々にライブラリーとすることもできるし、あるいは各ライブラリーを混合して単一のライブラリーとすることもできる。更に IgM の VH ライブラリーを組み合わせる場合においても、各ライブラリーを別のライブラリーとすることもできるし、あるいは各ライブラリーを混合して単一のライブラリーとすることもできる。個別にライブラリー化する場合には、前記プライマーのうち、3' 側プライマーを共有している増幅産物どうしを混合することによって、IgG2、IgG3、および IgM のライブラリーとすることができる。

IgG2、または IgG3 に由来する VHH、若しくは IgM に由来する VH を、それぞれのクラス毎にライブラリー化することにより、他のクラスの VHH (または VH) の影響を受けないスクリーニングが可能となる。たとえば、本発明者らの知見によれば、IgG2 と IgG3 とを混合してスクリーニングすると、IgG2 が優先的に選択される傾向が観察される場合があった。その原因としては、各クラスの発現レベルの違い、構成クローン数の違い等が考えられた。クラス別のライブラリーとすれば、このようなクラス間の VHH の干渉を受けることなく、各クラスから目的とする機能を有する抗体を偏り無く取得できる可能性が高まる。

あるいは個体ごとに VHH 遺伝子を増幅し、その増幅産物を混合するときには、個体間の遺伝子の割合を一定に保つことにより遺伝子の偏りを防ぐ。具体的には、鋳型の量やプライマーの組み合わせ、PCR の反応回数などの、遺伝子増幅の条件を個体間で厳密に一致させる。更に、増幅産物を均等に混合することによって、偏りを防止することができる。ライブラリーに偏りが無いことは、VHH 遺伝子発現産物の生体における germline (生殖系列) 比率が、ライブラリーにおいて維持されていることを意味する。

germline 中の VH-D-JH 遺伝子のリアレンジメントにより、VHH 遺伝子が形成される。VHH 遺伝子発現産物を構成するクローンを調べることにより、その VHH 遺伝子中の VH、D、および JH が germline 中のどの遺伝子セグメントに由来するか

- 2 1 -

を調べることが理論上可能である。さらに複数のクローンを調べることにより、各遺伝子セグメントの生体中の発現産物全体における使用頻度を推定することができる。このようにして推定された発現産物全体における各遺伝子セグメントの使用頻度をここでは germline 比率と呼ぶ。

実際には各遺伝子セグメントの遺伝子配列は完全に明らかになっているわけではないので、後述する「サブファミリー」あるいは「クラス」分類に基づいて germline 比率を分析した。各遺伝子セグメントは、CDR 配列の長さ、Cys の位置等の特徴によって「サブファミリー」あるいは「クラス」に分類することができる。偏りの生じているライブラリーでは特定の遺伝子セグメントに由来するクローンの発現頻度は生体中の発現頻度と異なると言える。そこで germline 比率をライブラリーの評価に用いることができる。

本発明者らが利用した 1 2 通りのプライマーセットは、VHH 遺伝子を構成する可能性があるあらゆる germline の遺伝子を増幅することができる。つまり、上記プライマーを用いれば、VHH が由来する germline の in vivo における存在比を維持したライブラリーを作製することができる。

VHH の多様性は、抗体遺伝子を構成する VH-D-JH の 3 つの遺伝子セグメントの組み合わせ、これらの遺伝子セグメントの再編成過程における塩基の付加や欠損、あるいは抗体産生細胞の変異によってもたらされていると考えられている。これらの機構は、通常の哺乳動物における抗体の多様性獲得のための機構と同様と考えられている。

VHH の多様性を支える機構の内、VH-D-JH の各セグメントが選択され再編成される工程は、B 細胞の成熟にともなって染色体において生じる遺伝的な変化である。B 細胞分化途上に抗体遺伝子座で起こる重鎖の VH-D-JH 遺伝子の再編成は、抗原の有無に関係なく起こる。1 個の B 細胞は、1 組の VH-D-JH 遺伝子を発現する。同じ germline に由来することは、同じ VHH を産生することを意味しない。

さて、抗体産生細胞は、互いに異なる VH-D-JH 遺伝子の組み合わせを有する細胞

- 2 2 -

集団である。VHH 遺伝子をライブラリー化する過程で一部の germline 由来の抗体遺伝子（すなわち VH-D-JH 遺伝子の組み合わせ）が失われることは、ライブラリーに偏りを生じさせる原因となる。VHH 遺伝子の多様性を支える機構は、VH-D-JH 遺伝子の再編成のみではない。しかし失われた一部の germline 由来の抗体遺伝子を変異によって再生することが極めて困難であることから考えると、germline 由来の抗体遺伝子の比を維持したライブラリーを構成することの重要性は容易に理解できる。したがって、VHH 遺伝子に人為的に変異を導入してレパートリーサイズを拡張する試みによって、失われた一部の germline 由来の遺伝子を補うことができるかどうかは疑問である。

本発明において、ライブラリーが生体における多様性を維持していることは、たとえば次のようにして確認することができる。すなわち、ライブラリーを構成するクローンから無作為に十分量のクローンを取り出して調べたときに、望ましくは6つのVHHサブファミリーが含まれ、かつ15個以上のクラスが含まれるとき、当該ライブラリーは生体内における多様性を維持していると見なすことができる。なお解析に用いる十分量のクローンとは、たとえば50クローン以上を言う。

ところで本発明のVHHライブラリーは、VHH遺伝子以外の遺伝子の混入が許容される。特に、VHでは認識が難しい抗原決定基に対して結合するVHHの取得においては、VHH取得の障害とはなりにくい。たとえライブラリー中にVHが共存していても、VHが抗原を占有する可能性が低いためである。しかし、VHHライブラリーがVHHに固有の利点を期待してスクリーニングされるものであることを考慮すると、VHH遺伝子以外の遺伝子の混入は避けるのが望ましい。本発明のVHHライブラリーは、通常60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上がVHH遺伝子で構成されるものとする。VHなどのVHH遺伝子以外の遺伝子の構成が高まると、場合によりVHH遺伝子のスクリーニング効率を低下させる原因となる恐れがある。

- 23 -

たとえば本発明者らが見出した前記 VHH 遺伝子増幅用のプライマーを用いた PCR 法によって VHH 遺伝子を増幅することにより、VHH 遺伝子を選択的に取得することができる。このようにして構築された本発明の VHH ライブラリーは、VHH 遺伝子の構成比率が著しく高い。本発明の望ましい VHH ライブラリーは、たとえば 70%以上、好ましくは 80%以上、より好ましくは 90%以上の VHH を含む。より具体的には、本発明は、90%以上、たとえば 93%以上の IgG2 由来の VHH を含む VHH ライブラリーに関する。あるいは本発明は、95%以上、好ましくは 95%以上、より好ましくは 99%以上の IgG3 由来の VHH を含む VHH ライブラリーに関する。

(3) VHH 遺伝子の増幅にあたっては、指数的な増幅が進行しつつあるときに増幅産物を回収する

PCR に代表される遺伝子の増幅反応によって得ることができる産物の量には、通常、上限がある。つまり、反応がある水準に達すると、増幅反応が進まなくなる。このことは、鋳型の量にかかわらず、増幅反応の結果として得ることができる増幅産物の量が一定であることを意味している。生体内における抗体遺伝子は、多様な遺伝子の複雑な集合体として存在している。このような集合体を鋳型として人為的に増幅すると、その産物は、しばしば数的に優位な遺伝子によって占められてしまう。優位な遺伝子が増幅反応の上限に達した時点で、増幅反応が停止してしまうためである。このような現象が起きると、遺伝子増幅によって多くのレパートリーが失われてしまうことになる。

本発明者らは、遺伝子増幅反応の指数的な増幅が起きている間に増幅産物を回収することにより、遺伝子増幅を通じてレパートリーを失う危険性を小さくすることができることを見出した。指数的な増幅が起きている間は、全ての鋳型がほぼ同じ確率で増幅されていると見なすことができる。したがって、その間に増幅産物を回収すれば、増幅反応の間に失われるレパートリーを最小限度にとどめることができる。

- 24 -

指数的な増幅が起きていることは、遺伝子増幅産物の量をモニターすることによって確認することができる。特に、PCRのように反応サイクルの数によって反応の進行が制御されている場合には、各反応サイクルごとに増幅産物の量をモニターし、反応が上限に達するのに必要なサイクル数を明らかにすることができる。サイバークリーン等のインターカレーター存在下で増幅反応を行えば、増幅産物の量を蛍光強度の変化によってモニターすることができる。あるいは反応液を分取して電気泳動を行えば、増幅産物を視覚的に確認することもできる。

たとえば実施例に示した条件では、PCR法を17サイクル以下とすることにより、指数的な増幅が起きている間に増幅産物を回収することができる。PCR法において、指数的な増幅が起きている状態は、種々の条件によって決定される。たとえば、鋳型となる遺伝子の量、プライマーの量、DNAポリメラーゼの種類や使用量は、指数的な増幅が起きている状態に対して影響を与える要因となる。したがって実施例とは異なる条件においては、17サイクル以上であっても、指数的な増幅が継続する場合もある。ある条件のもとで指数的な増幅が起きている状態にあることは、上記のようにして確認することができる。

このような条件でVIII遺伝子を増幅すれば、増幅産物における遺伝子間のバランスは、鋳型における各遺伝子の数的なバランスを反映している。その結果、数的に優位な遺伝子とともに、少数の遺伝子も取得できる可能性が高まる。

上記のような条件で取得されたVIII遺伝子は、任意の方法によってライブラリーとすることができる。本発明のライブラリーは、rgdpライブラリーとすると、結合親和性に基づくスクリーニングに有利である。rgdpライブラリーとは、複製可能な遺伝的表示パッケージのライブラリー (replicable genetic display package library) を言う。すなわち、遺伝子を保持するとともに、その遺伝子の発現生成物を表面に提示したもの (遺伝的表示パッケージ) で構成されるライブラリーを呼ぶ。代表的なrgdpライブラリーとしては、ファージディスプレイ法を利用したファージライブラリーが挙げられる。rgdpライブラリーには、ファージ

- 25 -

ライブラリーのほか、外来タンパク質をその表面に発現している形質転換細胞やリボゾームからなるライブラリーを示すことができる。

ファージディスプレイ法はSmithにより1985年(Smith GP Science 1985 228: 4075 1315-7)に考案されたもので、M13 ファージのような一本鎖環状 DNA を持つ線状のバクテリオファージが用いられる。ファージ粒子は DNA の周囲を取り囲んでファージ粒子の大部分を構成する cp8 というタンパクと、ファージが大腸菌に感染する時に機能する 5 個の cp3 と呼ばれるタンパクからなっている。この cp3 もしくは cp8 と融合した形でポリペプチドをコードするように遺伝子を構築し、ファージ粒子表面にそのタンパクを発現させるシステムがファージディスプレイシステムである。結合性のタンパク質を表面に保持したファージ粒子は、そのリガンドとの結合活性を利用して濃縮することができる。こうして目的とする DNA を濃縮する方法は、パニング法と呼ばれている。濃縮されたファージ粒子には、必要な結合活性を持つタンパク質をコードする DNA がパッケージングされている。このように繊維状ファージの利用によって、結合活性に基づくスクリーニングと、DNA のクローニングとをきわめて効率的に行うことができるシステムが実現した(特表平 5-508076)。繊維状ファージを使ったライブラリーには、Fab 分子として発現が可能な方法も報告された(特表平 6-506836)。この報告において、cp3 等の N 末端を欠損させて可変領域を融合させる方法が試みられた。

上記のようにして得られた VHH 遺伝子は、たとえば以下のようにしてファージライブラリーとすることができる。まず、VHH 遺伝子の増幅産物を制限酵素で処理する。実施例に示した 5' 側プライマーである配列番号：1～配列番号：6 の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドには、SfiI サイトが含まれている。得られた断片を、ファージ蛋白質との融合蛋白質を発現することができる VHH 遺伝子導入用の発現ベクターに挿入する。VHH 遺伝子との融合パートナーとするファージ蛋白質には、cp3 や cp8 が利用される。発現ベクターには、VHH 遺伝子断片を導入するための制限酵素サイトを用意しておく。たとえば実施例に用いたベクターの

- 26 -

SfiI-AscI サイトには、VHH 遺伝子の増幅産物の SfiI-AscI 処理断片を導入することができる。

VHH 遺伝子の組み込みには、Cre リコンビナーゼを利用することもできる。すなわち、LoxP 配列を付加したプライマーを利用して両端に LoxP 配列を有する VHH 遺伝子の増幅産物を得る。一方、発現ベクターの組み込み部位にも LoxP 配列を配置しておけば、両者を Cre リコンビナーゼの作用で組み換えることができる。

VHH 遺伝子導入用の発現ベクターとしては、cp3 や cp8 等のファージ表面蛋白質をコードする遺伝子を有し、当該蛋白質との融合蛋白質として VHH 遺伝子を発現するように、VHH 遺伝子組み込み用の部位を配置したベクターを用いる。VHH 遺伝子組み込み用の部位には、例えば実施例に示したような SfiI/AscI サイトを用いることができる。この制限酵素の認識配列は、本発明者らが解析した範囲では、ラクダ VHH 遺伝子に見出すことができなかつた。したがって SfiI/AscI という制限酵素の組み合わせは、ラクダ VHH 遺伝子ライブラリーの構築に有用である。

更に、ファージミドを感染させた宿主微生物の培養上清をスクリーニングのための試料とするためには、宿主微生物において動作可能なプロモーターと、シグナル配列とを備えた発現ベクターを用いる。たとえば大腸菌を宿主とする場合には、シグナル配列として pelB 配列などを挿入した繊維状ファージ用のファージミドベクターを利用することができる。本発明のライブラリーの構築に有用な発現ベクターとして、たとえば実施例に示した発現ベクター pFCA-10 を示すことができる。

VHH 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを、ヘルパーファージとともに宿主に導入し、両者を発現させることによって VHH を表面に発現したファージ粒子とすることができる。このファージ粒子を回収すれば、本発明によるファージライブラリーを得ることができる。

ヘルパーファージとは、前記発現ベクターが導入された菌に感染して、ファージ成分を供給することにより、前記発現ベクターがコードするファージ表面蛋白質

- 27 -

質を有するファージを生じさせるものをいう。このとき、発現ベクターに由来する融合蛋白質が利用されるため、ファージ粒子の表面には VHH が存在することになる。

本発明の VHH ファージライブラリーは、パニング法による VHH のスクリーニングに有用である。パニング法とは、目的とする物質に対する VHH の結合親和性を利用して、VHH を発現するファージを選択するための方法である。具体的には、まず目的とする物質に VHH を発現したファージライブラリーを接触させ、この物質に結合したファージを集める。回収したファージを必要に応じて増幅し、再び目的物質への接触と回収を繰り返す。パニング法を利用して、当該物質に対する結合親和性を有する VHH を発現したファージ取得することができる。ファージには、VHH をコードする遺伝子がパッケージングされている。したがって、ファージを取得することは、同時に VHH をコードする遺伝子を取得することに他ならない。

本発明の VHH ライブラリーは、*in vivo* における VHH の多様性を越える、極めてレパートリーサイズの大きなライブラリーである。したがって、本発明の VHH ライブラリーを利用することによって、通常の免疫操作では取得することが困難な機能を有する VHH でさえ、容易に選択することができる。たとえば酵素の活性を調節する 4 量体 IgG タイプの抗体を取得することは、困難な場合が多いことは既に述べた。これに対して、2 量体免疫グロブリンを構成する VHH では、酵素活性を調節する抗体も容易に取得できる可能性がある。たとえば、実施例においては、本発明の VHH ライブラリーを用いることによって、任意の酵素に対して、その酵素活性を調節する機能を有する複数の VHH を取得することができることを示した。このように非免疫ラクダに由来する VHH または VH のライブラリーから任意の酵素に対する酵素活性を調節する機能を有する複数の VHH 遺伝子を取得することは、当該ライブラリーの多様性を評価するための指標の一つである。

上記のように、本発明の VHH ライブラリーまたは VH ライブラリーは、酵素活

性を調節する機能を有する VHH の取得に有用である。すなわち前記目的とする物質として酵素分子またはその断片を用いることにより、酵素活性を調節する機能を有する VHH または VH を取得することができる。酵素分子の断片は、当該酵素を断片化することによって得ることができる。この目的に用いる酵素分子またはその断片は、他の蛋白質との融合蛋白質とすることもできる。あるいは酵素をコードする遺伝子の部分配列を発現させ、その発現産物を断片として利用しても良い。酵素活性を調節する機能を有する VHH または VH の取得を目的とするとき、酵素の活性部位を含む断片を用いるのが有利である。酵素の活性部位を明らかにする方法は公知である。パニング法によって選択された VHH または VH は、更に酵素分子に対する作用を確認することによって、最終的に酵素活性を調節する機能を評価することができる。より具体的には、酵素分子に評価すべき VHH または VH を接触させ、接触させない場合と比較して酵素活性が変化した場合には、その VHH または VH が酵素活性を調節する機能を有すると確認することができる。本発明において、酵素活性を調節する機能には、酵素活性の阻害または促進が含まれる。

本発明に基づいて取得された VHH または VH をコードする遺伝子は、適当な発現系を利用することによって、イムノグロブリンまたはイムノグロブリン断片に翻訳することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、ラクダ科動物由来 VHH を可変領域として有するイムノグロブリンまたはその断片の製造方法に関する。あるいは VHH の代わりに VH を利用して、同様の手法によって VH を有するイムノグロブリンを製造することができる。

- (1) 上記方法によって目的とする物質に対する結合活性を有する VHH をコードする遺伝子を取得する工程、
- (2) 得られた VHH をコードする遺伝子を、宿主細胞において発現可能なベクターに組み込んで VHH 発現ベクターとする工程、および
- (3) VHH 発現ベクターを宿主細胞に導入し、その培養物から VHH を含む蛋白質

を回収する工程

本発明に基づいて rgdp ライブラリーから取得された VHH をコードする遺伝子は、VHH 発現ベクターから回収することができる。たとえば、ライブラリーの構築に用いたプライマーを用いて、発現ベクターを鋳型として PCR を行えば、目的とする VHH 遺伝子を増幅することができる。あるいは取得すべき VHH クローンが大量に得ることができる場合には、制限酵素処理によって VHH 遺伝子断片を切り出すこともできる。

選択された VHH 遺伝子は、定常領域をコードする遺伝子と連結すれば、完全な 2 量体免疫グロブリンとすることもできる。たとえば、IgG の細胞やウイルスに対する障害作用を利用する場合には、定常領域を有する IgG の方が有利である。このとき、ヒトの定常領域を組み合わせてキメラ抗体とすることにより、安全な製剤とすることができる。あるいは、*in vitro* における診断薬や工業的な用途においては、VHH のまま用いることもできる。あるいは VHH に適当なタグを付加した融合蛋白質とすることもできる。タグには、His タグなどを用いることができる。His タグを付加した VHH は、ニッケルカラムなどを利用して容易に精製することができる。あるいは VHH は、GFP または RFP などの異種蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる (J. Immunol. Methods 257, 175-184, 2001)。

VHH 遺伝子を、VHH、あるいは VHH を含む融合蛋白質として発現させるための発現ベクターには、任意のベクターを利用することができる。たとえば、*pCANTAB 5E (Amasham)*、*pTZ19R*、*pTZ18R* 等のベクターはイムノグロブリンの発現に有用である。これらのベクターの構築方法は公知である。VHH 遺伝子を導入した発現ベクターは、各ベクターに応じた宿主に形質転換することができる。たとえば先に例示した発現ベクターであれば、*DH12S*、*TG1*、*HB2151* 等に形質転換することにより、VHH を発現させることができる。本発明に基づいて得られた VHH、あるいは VHH を含む免疫グロブリンにはさまざまな用途が考えられる

例えば、ウイルス、細菌、寄生虫またはその他の病原因子に由来する疾患は、

- 30 -

多くの場合、免疫グロブリンの結合による、病原因子の酵素活性の妨害、または病原因子による標的分子の認識の妨害によって疾患の発生を回避することができる。さらに、免疫グロブリンを毒性物質の活性(毒性)部位に結合させることによってその有害な影響を無効にすることができる。

本発明によって取得されたラクダ抗体 VH、VHH には、酵素活性の阻害作用のみならず、酵素活性を増強する作用も期待できる。このような作用を有するラクダ抗体 VH、VHH によって、酵素機能の不調またはタンパク質認識の不調を由来とする、複合した酵素的または生理的プロセスの機能不全に対して、症状の悪化を抑えたり、病的苦痛の緩和、あるいは治癒も期待できる。

また本発明によって得られた酵素阻害抗体は、その酵素活性の評価に利用することができる。すなわち、ある酵素活性が酵素阻害抗体によって阻害されれば、その試料中には酵素阻害抗体によって阻害される酵素が存在することを明らかにすることができる。酵素阻害抗体の添加量と阻害のレベルを関連付けることによって、試料中に含まれる酵素活性レベルを定量的に評価することもできる。

その他に、本発明によって得られた酵素作用を増強する作用を有する抗体は、当該酵素活性の検出に有用である。具体的には、酵素作用を増強する作用を有する抗体によって、微量な酵素活性を増幅して検出する系を構築することができる。本発明によって得られた抗体を利用した、酵素活性の試験測定キット、診断技術を提供することができる。

更に本発明によって得られた酵素活性を調節する作用を有する抗体を、工業的な酵素反応に利用することができる。たとえば酵素活性を促進する抗体を酵素反応系に共存させることによって、目的とする生産物の収量を向上させることができる。あるいは逆に、目的とする生産物を消費する酵素活性を抑制する抗体を酵素反応系に共存させて、生産物の生産量を向上させることもできる。更に、望ましくない副生物を生じる酵素活性を抑制することにより、生産物の純度の向上を期待することもできる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、ラクダ抗体ライブラリー用ベクター (pFCA-10)、およびその構築に利用した公知のベクター (pscFvCA-E8VHd ベクターと scNcopFCAH9-E8VHdVLd ベクター) の構造を示す図である。

図 2 は、ラクダ VHH 組み込み用発現ベクター pFCA-10 の塩基配列、および蛋白質コード領域によってコードされるアミノ酸配列を示す図である。

図 3 は、PCR の各反応サイクルにおける増幅産物の量をモニターした結果を示す図である。鋳型としてはコントロール DNA 原液、その 10 倍希釈、あるいは 100 倍希釈を用いた。縦軸は、DNA の量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を対数で表し、横軸は PCR のサイクル数を示す。

図 4 は、ラクダ抗体 cDNA を鋳型とする PCR の、各反応サイクルにおける増幅産物を電気泳動した結果を示す写真である。写真の下に 5' 側プライマーの名称を記載した。各プライマーについて左から順に、15、17、19、および 21 サイクル目の増幅産物を泳動した。上の写真は 3' 側プライマーとして IgG2 用の、そして下の写真は IgG3 用のプライマーを用いたときの結果である。

図 5 は、ラクダ VHH 遺伝子 (IgG2) を組み込んだ発現ベクターを導入した ElectroMAX™ DH12S (GIBCOBRL) における、VHH-cp3 の発現を確認した結果を示す図である。図中、縦軸は吸光度 (OD492nm) を、横軸はサンプル番号を示す。

図 6 は、ラクダ VHH 遺伝子 (IgG3) を組み込んだ発現ベクターを導入した ElectroMAX™ DH12S (GIBCOBRL) における、VHH-cp3 の発現を確認した結果を示す図である。図中、縦軸は吸光度 (OD492nm) を、横軸はサンプル番号を示す。

図 7 は、VHH (IgG2) クローンの GST に対する反応性を、ELISA 法によって確認した結果を示す図である。図中、縦軸は吸光度 (OD492nm) を、横軸はサンプル番号

を示す。

図 8 は、VHH(IgG3) クローンの GST に対する反応性を、ELISA 法によって確認した結果を示す図である。図中、縦軸は吸光度 (OD492nm) を、横軸はサンプル番号を示す。

図 9 は、抗 GST VHH による GST 活性阻害作用を測定した結果を示す図である。図中、縦軸は VHH を作用させないときの酵素活性を 100 とする GST の残存活性 (%) を、横軸は VHH の添加濃度 (μ M) を示す。

図 10 は、抗 GST VHH の、グルタチオンに対する拮抗性の検討結果を示す図である。図中、縦軸は時間当たりの吸光度変化量の逆数、横軸は CDNB 濃度の逆数を示す。

図 11 は、抗 GST VHH の、CDNB に対する拮抗性の検討結果を示す図である。図中、縦軸は時間当たりの吸光度変化量の逆数、横軸はグルタチオン濃度の逆数を示す。

図 12 は、スクリーニング 3 サイクル目における、LDH に対する VHH クローンの反応性を ELISA 法によって確認した結果を示す図である。図中、縦軸は ELISA の測定値 OD492nm を、横軸はサンプル番号を示す。

図 13 は、スクリーニング 4 サイクル目における、LDH に対する VHH クローンの反応性を ELISA 法によって確認した結果を示す図である。図中、縦軸は ELISA の測定値 OD492nm を、横軸はサンプル番号を示す。

図 14 は、抗 LDH VHH が LDH 活性に与える影響を測定した結果を示す図である。図中、縦軸は ELISA の測定値 OD492nm を、横軸は酵素反応開始後の経過時間 (分) を示す。

図 15 は、抗 LDH VHH による LDH 活性阻害作用の、VHH 濃度依存性を測定した結果を示す図である。図中、縦軸は VHH を作用させないときの酵素活性を 100 とする LDH の残存活性 (%) を、横軸は VHH の添加濃度 (μ M) を示す。

図 16 は、scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコード

- 3 3 -

されるアミノ酸配列を示す図である（図 1 7 に続く）。

図 1 7 は、scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示す図である（図 1 6 の続き）。

図 1 8 は、VHH(IgM)クローンの β -Gal に対する反応性を、ELISA 法によって確認した結果を示す図である。図中、縦軸は吸光度(OD492nm)を、横軸はサンプル番号を示す。

図 1 9 は、pscFvCA-E8VHd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示す図である（図 2 0 に続く）。

図 2 0 は、pscFvCA-E8VHd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示す図である（図 1 9 の続き）。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

[実施例 1] ラクダ抗体ライブラリーの作製

1-1. ラクダ germline 中の制限酵素部位の確認、プライマー設計

以下の実施例において、New England biolabs あるいは同社製のバッファーを NEB と記載する。ラクダ VH あるいは VHH の germline に関して、参考文献(EMBO. J. 19(5) 921, 2000)より、ベクターへのサブクローニングに使用する制限酵素 Sfi I、Asc I による切断部位が無いことを確認し、VH および VHH の germline を網羅する V 領域の N 末端 6 種のプライマーを設計した。プライマーの塩基配列を配列番号：1～配列番号：6 に示す。

(1)VHH3a (配列番号：1)

GTCCTCGCAACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

(2)VHH-germF1 (配列番号：2)

GTCCTCGCAACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTR CAG CTG GTG GAG TCT GG

(3)VHH-germF2 (配列番号：3)

- 3 4 -

GTCCTCGCAACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA AAG CTG GAG GAG TCT GG

(4) VHH-germF4 (配列番号 : 4)

GTCCTCGCAACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

(5) VHH-germF5 (配列番号 : 5)

GTCCTCGCAACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GCC GTG CAG CTG GTG GAT TCT GG

(6) VHH-germF6 (配列番号 : 6)

GTCCTCGCAACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GCG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG

*下線は、SfiI 部位を示す。

次に V 領域の C 末端のプライマーを設計した。

今回作製したラクダライブラリーはスクリーニングの利便を考慮して、凝集を起こす可能性のある VH(IgG1)をできるだけ除くこととした。このため IgG1 を除き IgG2 および IgG3 を選択的にライブラリーに含めることとした。そのためには、IgG1 には存在せず、IgG2 あるいは IgG3 にのみ存在する配列をプライマーとして使用すればよい。

そこで、本発明者らは V 領域のさらに C 末端側に存在するヒンジ領域の配列の差異に着目した。以前取得したラクダ IgG1 遺伝子のヒンジ領域 (PCR 産物 800bp) を解析し IgG2、IgG3 と比較した。その結果、この領域におけるアミノ酸配列には以下に示すような差異が見られた。

4 量体ラクダ抗体 :

IgG1 hinge EPHGG CPCPKCP (配列番号 : 7)

2 量体ラクダ抗体 :

IgG2 hinge EP KI PQQPKPQQPQQPQQPKPQQKPEPE CTCPKCP (配列番号 : 8)

IgG3 hinge GT N EV CKCPKCP (配列番号 : 9)

この結果を元に、IgG2、IgG3 を選択的に増幅するプライマーを、V 領域のさら

- 3 5 -

に C 末端側に存在するヒンジ領域 N 末端塩基配列を決定して設計した。こうして決定した C 末端側 (3' 側) のプライマーの塩基配列を配列番号 : 1 0 (IgG2LB1) および配列番号 : 1 1 (IgG3LB2) に示した。

IgG2-LB1 (配列番号 : 1 0) :

AA G GCG CGC CCC TTG GGG TAT CTT GGG TTC TG

IgG3-LB2 (配列番号 : 1 1) :

AA G GCG CGC CCC TGA TAC TTC ATT CGT TCC TGA VG AG

1-2. ライブラリー用クローニングベクター

まず VHH 遺伝子を組み込む SfiI-AscI サイトに stuffer 配列が入った発現用ベクターを構築した。ベクターの構築に用いた pscFvCA-E8VHd ベクター、scNcopFCAH9-E8VHdVLD ベクター、およびラクダ VHH 組み込み用発現ベクター pFCA-10 の構造を図 1 に、また pFCA-10 の塩基配列と蛋白質コード領域によってコードされるアミノ酸配列を図 2 に示した。ベクターが制限酵素によって切断されなかった場合、あるいは抗体遺伝子が組み込まれなかった場合に cp3 が発現しないように工夫した。scNcopFCAH9-E8VHdVLD および pFCA-10 は、以下のようにして構築した。

1-2-1. scNcopFCAH9-E8VHdVLD の作製

pFCAH9-E8d 3 μ g (3 μ L) (WO 01/62907 を参照) を BstPI (3U/ μ L) 3 μ L、10 \times H buffer 5 μ L、DW39 μ L と混合し、37°C で 2 時間、制限酵素処理を行った。処理後、エタノール沈殿して得られた沈殿を 10 μ L の TE バッファーに溶解した。これに、SacI (10 U/ μ L) 1 μ L、10 \times L buffer 5 μ L、DW34 μ L を混合して 37°C で 2 時間、制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動して、4.7kb 断片を回収した。回収物をエタノール沈殿して 10 μ L とした (pFCAH9-E8d BstPI- SacI 断片)。

一方、プライマー linF (100pmol/ μ L) 5 μ L とプライマー linR (100pmol/ μ L) 5

- 36 -

μL を混合し、 94°C で5分加熱した後、 80°C 5分、 70°C 5分、室温放置30分によりアニールさせた。このうち、 $2\mu\text{L}$ と上記で得られた pFCAH9-E8d BstPI- SacI 断片 $1\mu\text{L}$ 、 $10\times$ ligation buffer $1.5\mu\text{L}$ 、DW $9.5\mu\text{L}$ 、T4DNAligase $1\mu\text{L}$ を混合し、 16°C で16時間反応させた。反応後、エタノール沈殿して $3\mu\text{L}$ に濃縮し、そのうち $1.5\mu\text{L}$ を用いて、大腸菌 DH12S コンピテントセル $20\mu\text{L}$ をエレクトロポレーションにより形質転換した。得られたクローンのプラスミドを抽出し、塩基配列を確認して、scNcopFCAH9-E8VHdVLd と名づけた。図1(上)に scNcopFCAH9-E8VHdVLd の構造を模式的に示した。また、図16および図17に scNcopFCAH9-E8VHdVLd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示した。そして図19および図20に、pscFvCA-E8VHd のインサート部の塩基配列及びそれにコードされるアミノ酸配列を示した。

プライマーlinF (配列番号: 36)

```
GTCACCGTCTCGAGAGGCGGTGGCGGATCAGGTGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCCATGGCCGACAT  
CGAGCT
```

プライマーlinR (配列番号: 37)

```
CGATGTCGGCCATGGACCCACCACCGCCACTTCCACCGCCACCTGATCCGCCACCGCCTCTCGAGACG
```

1-2-2. ラクダ抗体ライブラリー用ベクター (pFCA-10) の作製

scNcopFCAH9-E8VHdVLd ベクター $2\mu\text{g}$ ($10\mu\text{L}$) と、 $10\times\text{M}$ buffer $10\mu\text{L}$ 、DW $78\mu\text{L}$ 、HindIII ($12\text{u}/\mu\text{L}$; 宝酒造社製) $2\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で2時間インキュベートしたのち、エタノール沈殿して濃縮し、 $10\mu\text{L}$ のTEに溶解した。続いて、これに $10\times\text{NEB4}$ buffer (AscI に添付) $10\mu\text{L}$ 、DW $78\mu\text{L}$ 、AscI ($10\text{u}/\mu\text{L}$; NEB 社製) $2\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で2時間インキュベートしたのち、エタノール沈殿して濃縮しアガロースゲル電気泳動して目的の断片 (3.7kb)を回収し、ジーンクリーン II キット (フナコシ株式会社) で精製した。エタノール沈殿して濃縮し、 $10\mu\text{L}$ の $1/10\text{TE}$ に溶解した。

- 37 -

次に、pscFvCA-E8VHd ベクター $0.1\mu\text{g}$ ($5\mu\text{L}$)、M13RV プライマー ($100\text{pmol}/\mu\text{L}$ 、 $5'$ -AACAGCTATGACCATG- $3'$;配列番号: 12/サワデーテクノロジー社製) $1\mu\text{L}$ 、XhoAsc プライマー ($100\text{pmol}/\mu\text{L}$ 、 $5'$ -CGACTGAAGGCGCGCCCCTCTCGAGACCCTGACCGTGGTGCC- $3'$;配列番号: 13/サワデーテクノロジー社製) $1\mu\text{L}$ 、 $10\times$ buffer #1(KOD に添付) $10\mu\text{L}$ 、dNTPmix(KOD に添付) $10\mu\text{L}$ 、 25mM MgCl_2 $4\mu\text{L}$ 、DW $68\mu\text{L}$ 、KOD polymerase($2.5\text{u}/\mu\text{L}$;東洋紡社製) $1\mu\text{L}$ を氷上で混合し、ミネラルオイルを2滴添加して、 94°C で2分保温した。次いで、 94°C で1分、 55°C で2分、 72°C で1分を25サイクル繰り返した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認後、 400bp 付近のバンドを切り出し、ジーンクリーン II キット (フナコシ株式会社) で精製して、エタノール沈殿後、TE $10\mu\text{L}$ に懸濁した。

これに、 $10\times$ M buffer $10\mu\text{L}$ 、DW $78\mu\text{L}$ 、HindIII ($12\text{u}/\mu\text{L}$;宝酒造社製) $2\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で2時間インキュベートしたのち、エタノール沈殿して濃縮し、 $10\mu\text{L}$ のTEに溶解した。続いて、これに $10\times$ NEB4 buffer (AscI に添付) $10\mu\text{L}$ 、DW $78\mu\text{L}$ 、AscI ($10\text{u}/\mu\text{L}$;NEB社製) $2\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で2時間インキュベートしたのち、エタノール沈殿して濃縮しアガロースゲル電気泳動した。 340bp 付近のバンドを回収し、ジーンクリーン II キット (フナコシ株式会社) で精製したのち、エタノール沈殿して濃縮し、 $10\mu\text{L}$ の $1/10\text{TE}$ に溶解した。このうち半分の $5\mu\text{L}$ に、scNcopFCAH9-E8VHdVLD ベクターのHindIII-AscI断片 $2\mu\text{L}$ 、 $10\times$ ligation buffer $2\mu\text{L}$ 、 10mM ATP $2\mu\text{L}$ 、DW $8\mu\text{L}$ 、およびT4 DNA ligase $1\mu\text{L}$ を加えて混合し、 16°C で16時間インキュベートした。エタノール沈殿して $3\mu\text{L}$ の $1/5\text{TE}$ に溶解し、その半分を用いてコンピテントセル ElectroMAX™ DH12S (GIBCO BRL製) $20\mu\text{L}$ に懸濁し、以下の条件でエレクトロポレーションを行うことにより、形質転換した。

エレクトロポレーター

BRL社 Cell-Porator (Cat. series 1600)

設定条件; voltage booster $4\text{k}\Omega$

- 3 8 -

capacitance	330 μ F
DC volts	Low Ω
charge rate	Fast

得られた形質転換体 12 個について、LBGA 中で 30°C18 時間培養した後、倉敷紡績社製 DNA 分離装置 PI-50 を用いてプラスミドを抽出し、その塩基配列を確認した。配列は、蛍光プライマー M13 Reverse (cat.No. LIC-4000-21B アロカ社製) を用いて、サーモシークエンスキット (アマシヤム・ファルマシア製) とアロカ社製 L1-COR4200L(S)-2 を使用したジデオキシ法によって決定した。その結果、いずれも設計したとおりの配列であった。このうちのひとつ (No.1) を 400mL の培養液からアルカリ法にて調製し、CsCl 密度勾配超遠心法で精製して、210 μ g 得た。これを、pFCA-10 と名づけ、ラクダ抗体ライブラリー用ベクターとした。

1-3. 凍結脾臓からの total RNA の調製 (グアニジン-超遠心法)

ヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*) の凍結脾臓約 9 g を凍結したままハンマーで細かく砕いた。重量を測定した後、すぐに GTC 溶液 (4.0M グアニジンチオシアネート、0.1M Tris-HCl (pH4.5)、使用直前に 2-メルカプトエタノール 450 μ L 加える) 45ml を加え、氷冷した nissei Excel Auto Homogenizer で 17000rpm、2 min でさらに断片化した。次にテフロンホモジェナイザーで、結合組織かすのみが残るよう完全にホモジェネートした。ホモジェネート液をガーゼでろ過した。

ろ過した液に N-Lauroylsarcosin Sodium Salt を 0.23g 粉末で加えよく溶かした。注射筒に注射針 18G をつけ 3 回、21G で 5 回、22G で 5 回溶液を出し入れし DNA をせん弾力で断片化した。

室温で 5000rpm、10min 遠心分離して沈殿を除いた。溶液は約 36ml であった。H I T A C H I Centrifuge Ware 13PA チューブを DEPC 水で洗い、CsCl 溶液 (5.7M CsCl, 0.01M EDTA) 4 ml 入れ、界面を乱さぬよう上清 6 ml を重層した。超遠心は日立 HIMAC55P-72、ローター RP40T-740 を用いて 30,000 rpm、20 時

間行った。

(以下の工程に用いる試薬は TES 溶液 (10mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1% SDS) を除きすべて DEPC 処理したものを用い、RNA 分解酵素の混入を極力防ぐように注意して作業した。)

遠心後、上層を注意深く除き (パスツールピペットは頻繁に交換する)、約 0.5ml になったらチューブをひっくり返して液を捨てた。熱したカッターで底から 1 cm 程度の RNA 沈殿部を切り取り、75%エタノールで沈殿をすすぎ風乾した。TES 溶液で沈殿を溶かし、1/10 容量の 3M 酢酸ナトリウム pH 5.2、2.5 体積のエタノールを添加して沈殿させ、使用時まで -80°C に保存した。

上記と同様の工程により 22 頭のラクダ脾臓からグアニジン-超遠心法によって total RNA を取得した。この total RNA から市販のオリゴ dT カラムキット (ファルマシア mRNA Purification Kit (oligo-dT カラム法) を用いて mRNA を調製した。収量は Total RNA の 1%程度であった。

1-4. VHH 型選択重鎖可変部抗体ライブラリー作製

1-4-1. cDNA 調製

各ラクダに由来する mRNA 1 μg ずつを混合し、ライブラリーテンプレートとした。この mRNA をランダムプライマー (N6, GibcoBRL) を用いて、Superscript (GibcoBRL) のマニュアルに従って逆転写酵素反応させ cDNA を作製した。

この際に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP の取り込みを測定したところ 2.4%の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP が取り込まれ、転写率は 15.8%であることが分かった。取り込み率から計算して 22 μg の mRNA から 3.3 μg の cDNA を得た。

1-4-2. ライブラリー用 PCR、VHH 遺伝子断片回収

VHH 型選択重鎖可変部抗体ライブラリーとして IgG2 と IgG3 のそれぞれについて、別々にライブラリーを作製した。ラクダ 22 頭で発現されている germline

- 40 -

比率を反映したライブラリーを作製するため、PCR の増幅プロセスをモニターして指数増幅期における増幅産物を回収した。PCR の増幅プロセスは、反応を数サイクル毎に止め、DNA 量を定量することによってモニターした。指数的に遺伝子が増幅されている間であれば、多様な断片であっても増殖前のレパートリーを正確に反映した遺伝子断片集団を得られるはずである。

ラクダ抗体遺伝子を Bluescript ベクターにライゲーションして作製したコントロール DNA の原液、10 倍希釈、および 100 倍希釈をテンプレートとして遺伝子の増幅を確認した(図 3)。このとき N 末端プライマーとして V_H3a プライマー(配列番号: 1) を用い、C 末端プライマーとして J 遺伝子を元に作製した、” J プライマー”(5'-AA GGCGCGCCCC TGA VGA GRY GGT GAC YHG-3' ;ただし、V:ACG、R:AG、Y:CT、H:ACT の混合塩基を示す。配列番号: 4 2) を用いた。N 末端プライマーを V_HH-germF1(配列番号: 2) あるいは V_HH-germF2(配列番号: 3) に変えて、コントロール DNA 原液をテンプレートとして同様の実験を行ったものも図 3 の primer1、primer2 としてそれぞれ示した。

いくつかのサイクル数で反応を止め、反応液の一部を取り出し、Picogreen(GI BcoBRL)で染色したのち蛍光光度計を用いて DNA を定量した。10 倍希釈あるいは 100 倍希釈の 20 サイクル目までのように DNA 濃度が低い段階では、測定ノイズのために見かけ上増幅率が低くみえる場合もあるが、おおむね 27 サイクル程度までは、指数的な増幅を確認できた。

次に実際に 1-4-1 で得られた cDNA を用いて、配列番号: 1 - 配列番号: 6 のプライマーを用いて遺伝子を増幅した。15、17、19、21 サイクルで反応を止め、反応液 2 μ L を電気泳動した。その結果少なくとも 19 サイクルまでに反応が飽和状態に達することはなかった(図 4)。

以上の結果より等量の cDNA に対して、6 種類の 5' プライマーに対して、2 種類の 3' プライマー(IgG2 LB1 あるいは IgG3 LB2) の全ての組み合わせについて、17 サイクルの PCR 反応を実施した。

- 4 1 -

PCR の条件は以下の通りである。

LA Taq (宝酒造)	0.5 μ l
10x LA バッファー (宝 LA Taq 添付)	10 μ l
25mM MgCl ₂ (宝 LA Taq 添付)	10 μ l
dNTP (宝 LA Taq 添付)	16 μ l
滅菌 MilliQ	61.5 μ l
Template cDNA	1 μ l
5' 側プライマー (100pmol/ μ l)	0.5 μ l
3' 側プライマー (100pmol/ μ l)	0.5 μ l

5' 側プライマーには、VH3a (配列番号 : 1)、VHH-germF1 (配列番号 : 2)、VH H-germF2 (配列番号 : 3)、VHH-germF4 (配列番号 : 4)、VHH-germF5 (配列番号 : 5)、および VHH-germF6 (配列番号 : 6) のいずれかを用いた。また 3' 側プライマーには、IgG2LB1 (配列番号 : 10)、または IgG3LB2 (配列番号 : 11) のいずれかを用いた。これらのプライマーの全ての組み合わせで (5' 側 6 種 \times 3' 側 2 種 = 12 とおり)、PCR を行った。

5' 側プライマーに VHH-germF1 を用いたときは 110 本、他は 55 本の上記反応液が入った 0.5ml チューブにミネラルオイル (SIGMA) を 50 μ L 重層し 94°C で 3min の後、94°C で 1min、61°C で 2min (IgG3LB2 を用いたときは 59°C)、72°C で 1min を 17 サイクル増幅させた。IgG2 の 6 種、あるいは IgG3 の 6 種の PCR 増幅断片をそれぞれ混ぜて、電気泳動した。目的の断片を含むバンドを切り出し、QIAEXII (QIAGEN) で回収した。IgG3 に対し 48 μ g、IgG2 に対し 25 μ g の PCR 断片を回収した。

1-4-3. PCR 増幅遺伝子断片のライブラリーベクターへの挿入

酵素切断とライゲーションの条件を以下に示す。

(1) ライブラリー用ベクター pFCA-10 SfiI (NEB) 切断、TsAP (GibcoBRL) 処理

- 4 2 -

ベクター	100 μ g
NEB No. 2	200 μ L
10xBSA (宝酒造)	200 μ L
SfiI 10U/ μ L	100 μ L
TsAP 1U/ μ L	20 μ L

滅菌 MilliQ で 2000 μ L に調整した。

上記組成の反応液をミネラルオイルで重層し 50°C、5 時間切断した。引き続き、更に以下のものを加え TsAP 処理した。

NEB No. 2	10 μ L
10xBSA (宝酒造)	10 μ L
Dw	40 μ L
TsAP 1U/ μ L	40 μ L

65°C で 30min 反応後、stop 液を加えて 65°C、20min で失活させた。フェノールクロロホルム処理を 2 回行いクロロホルム処理し、ブタノール濃縮で 1ml まで濃縮後、210 μ g のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿した。105 μ g のベクターを回収した。

次に、以下の操作により IgG2、または IgG3 の PCR 増幅産物を SfiI で切断した。

PCR フラグメント	25.0 μ g
NEB No. 2	50 μ L
10xBSA (宝酒造)	50 μ L
SfiI 10U/ μ L	25 μ L

滅菌 MilliQ で 200 μ L に調整した。

反応液をミネラルオイルで上層し 50°C、3 時間切断した。フェノールクロロホルム処理しクロロホルム処理、エタノール沈殿した。22 μ g の IgG2、および 23.8 μ g の IgG3 を回収した。

(2) SfiI 部分ライゲーション

- 4 3 -

IgG2 または IgG3 PCR 増幅産物の SfiI 切断断片	8 μ g
ライブラリー用ベクター-pFCA-10 sfiI 切断 DNA	40 μ g
10 mM DTT	40 μ L
10 mM ATP	40 μ L
10 x Ligase バッファー (宝酒造 T4 DNA Ligase 添付)	40 μ L
T4 DNA Ligase (宝酒造) 350U/ μ L	40 μ L
滅菌 MilliQ で	400 μ L に調整した。

反応液を 16°C、13 時間処理した時点で以下のものを追加添加した。

Dw	120 μ L
10 mM DTT	20 μ L
10 mM ATP	20 μ L
10 x Ligase バッファー	20 μ L
T4 DNA Ligase (宝酒造) 350U/ μ L	20 μ L

さらに 16°C、6.5 時間反応後、フェノールクロロホルム処理し 230 μ L までブタノール濃縮して 70 μ g のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿した。34.1 μ g の IgG2 ライゲーション DNA、および 29.7 μ g の IgG3 ライゲーション DNA を得た。

(3) AscI 切断

回収した IgG2 ライゲーション DNA (34.1 μ g)、または IgG3 ライゲーション DNA (29.7 μ g) を、以下の組成の反応液で 37°C、3 時間処理した。

NEB No. 4	61 μ L
AscI (NEB) 10U/ μ L	50 μ L

滅菌 MilliQ で 610 μ L に調整した。

反応後、フェノールクロロホルム処理し 200 μ L までブタノール濃縮した。70 μ g のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿し、25 μ g の IgG2 ライゲーション、および 29 μ g の IgG3 ライゲーションを得た。

- 4 4 -

(4) AscI 部分ライゲーション

回収した 25 μ g DNA の IgG2 ライゲーション、または 29 μ g DNA の IgG3 ライゲーションを、以下の組成の反応液で処理した。

10 mM DTT 750 μ L

10 mM ATP 750 μ L

10 x Ligase バッファー 750 μ L

T4 DNA Ligase (宝酒造) 350U/ μ L 375 μ L

滅菌 MilliQ で 7500 μ L に調整した。

16°C、16 時間処理した時点で、CENTRICON YM-10 (分画分子量 10000, amicon) で各 600 μ L まで濃縮し、フェノールクロロホルム処理し 70 μ g のグリコーゲンを加えてエタノール沈殿させた。23.7 μ g の IgG2 ライゲーション、および 27.8 μ g の IgG3 ライゲーションを得た。

1-4-4. ライブラリー発現確認

上述の通り作製した、ラクダ VHH 遺伝子を組み込んだ発現ベクター 0.2 μ g を 20 μ L の ElectroMAX™ DH12S (GIBCOBRL) に形質転換し、培養上清をとって VHH-cp3 の発現を確認した。pFCA-10 は分泌シグナル PelB 配列を含んでいるので、このベクターで形質転換した大腸菌の培養上清には、微量ながらファージの VHH-cp3 蛋白質が産生される。したがって、培養上清を ELISA によってモニターすることにより、VHH-cp3 の発現を確認することができる。ELISA によって培養上清中の VHH-cp3 の発現をモニターした結果、9 割が発現していた。ELISA によるモニターの結果を図 5 (IgG2)、および図 6 (IgG3) に示した。ELISA の具体的な操作は以下に述べるとおりである。

対数増殖期初期に 1 mM IPTG を添加することにより発現を誘導し、21 時間後に遠心、回収した培養上清を MAXISORP に感作した。1 次抗体はウサギ抗 cp3 抗体の 500 倍希釈を、2 次抗体は HRP 結合抗ウサギ IgG (H+L 鎖) ヤギ Fab' 1 万倍

- 4 5 -

希釈を用いた。HRP 活性の測定のために、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の溶液 100 μ L を加えて 10 分間反応させた後、2N 硫酸 100 μ L を加えて反応を停止し、波長 492nm における吸光度を測定した。図 5 および図 6 の右端の 3a-li b1-4、Sfi36 は、frame shift mutation (ネガティブコントロール) の結果である。

1-4-5. VHH 型選択重鎖可変部抗体ライブラリー (IgG2、IgG3 ライブラリー) の形質転換

以下の条件でエレクトロポレーションを行うことにより、大腸菌を形質転換し、ファージ遺伝子を導入した。

エレクトロポレーター

BRL 社 Cell-Porator (Cat. series 1600)

設定条件 ; voltage booster	4k Ω
capacitance	330 μ F
DC volts	Low Ω
charge rate	Fast

IgG2 についてはライゲーションによって得られた 23.7 μ gDNA を DH12S 2ml に対し形質転換 (各 0.2 μ g を 20 μ L の ElectroMAX™ DH12S (GIBCOBRL) にエレクトロポレーション) し、その一部をサンプリングし全体の形質転換菌の数を見積もったところ、 1.7×10^{10} であった。これをグリセロールストックし、20L スケールでファージを調製した。

滅菌した 4.8L の 2x TY (DIFCO) 培地に 100 μ g/ml のアンピシリンを加え、グリセロールストックを加えて波長 600nm における吸光度 0.3 付近になるようにした。これを 16 等分し 300mL を滅菌済み 5L のフラスコで 37°C で振とう培養し、600nm 吸光度 1.0 に達するまで増殖させた。培養液にヘルパーファージ (M13K07) をフラスコあたり 3ml 加えて 37°C、1 時間培養した。これに滅菌 2x TY 培地 900

- 46 -

mL と $100 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリン 0.9mL 、 $50 \mu\text{g/ml}$ のカナマイシン 1.2mL を各フラスコに加えて 17 時間、 37°C で振とう培養した。

培養時のヘルパーファージ感染時の菌数は 5.66×10^{11} でありヘルパーファージ感染率は 75% (ヘルパーファージ感染時アンピシリン耐性菌 $4.06 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ 、アンピシリンおよびカナマイシン耐性菌 $3.05 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$) であった。目標とする 10^{10} 以上の独立クローンが得られた。

ファージを回収するため、菌液を 4°C で 10000rpm 、 10min 遠心し上清を集めた。上清に 20% ポリエチレングリコール/2.5M NaCl を 4L 加えて約 20min 静かに攪拌した。

4°C で 10000rpm 、 10min 遠心して沈殿を 1L の PBS に溶解し、20% ポリエチレングリコール/2.5M NaCl 200mL を加えて約 20min 静かに攪拌した。 4°C で 10000rpm 、 5min 遠心し上清を捨ててさらに 4°C で 10000rpm 、 1min 遠心、沈殿を回収した。沈殿は 0.05% NaN_3 含有 PBS 20mL に溶解し、ライブラリーファージ溶液とした。

次に回収したファージの力価を以下のようにチェックした。具体的には、ファージ溶液を PBS で 10^6 、 10^7 、 10^8 希釈し、その $10 \mu\text{L}$ を DH12S $990 \mu\text{L}$ に感染させ、 37°C で 1 時間培養した。これを LBGA プレートに $100 \mu\text{L}$ まいて 30°C で 18 時間培養し、コロニーカウントで原液力価を見積もった。その結果、力価 $3.73 \times 10^{13} \text{ CFU/ml}$ のライブラリーファージが 20 ml 得られた。

IgG3 についてはライゲーションによって得られた $27.8 \mu\text{g DNA}$ を、 2ml の ElectroMAX™ DH12S (GIBCOBRL) に対してエレクトロポレーションによって形質転換した (各 $0.2 \mu\text{g}$ を $20 \mu\text{L}$ の ElectroMAX™ DH12S (GIBCOBRL) に導入)。その一部をサンプリングし全体の形質転換菌の数を見積もったところ、 1.1×10^{10} であった。調製については IgG2 の場合と同様である。

培養時のヘルパーファージ感染時の菌数は 8.64×10^{11} でありヘルパーファージ感染率は 78% (ヘルパーファージ感染時アンピシリン耐性 $4.64 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ 、アンピシリンおよびカナマイシン耐性 $3.63 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$) であった。目標とする 10^{10}

- 47 -

以上の独立クローンが得られた。

これをグリセロールストックし、グリセロールストックから 20L スケールでファージを調製し、力価 4.26×10^{13} cfu/ml のライブラリーファージが 20ml 得られた。

1-4-6. ライブラリーの遺伝子配列確認

ライブラリーを構成する VHH クローンをランダムに選択し、その塩基配列を決定した。塩基配列は 2-6-2 に述べる方法にしたがって決定した。決定された塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を解析し、in frame でかつフレームワークのアミノ酸配列に公知の VHH 遺伝子と有為な相同性が認められれば正常と判定した。実際にはフレームワークの相同性が著しく低いものは確認できず、フレームシフトやストップコドンの挿入が起きたものを異常と判定した。その結果 IgG2 については 87% のクローンの遺伝子配列が正常であった。シーケンスが正常であったもののうち、L 鎖と相互作用する 44、45 番目アミノ酸が親水性、すなわち VHH であるのは 92.3% であった。

IgG3 については 95.8% のクローンのシーケンスが正常であった。L 鎖と相互作用する 44、45 番目アミノ酸は 96% が親水性、すなわち VHH であった。VH と VH の germline 遺伝子における比率が約 1 : 1 であることを考えると、非常に高い選択性で VHH がライブラリー化されていることが分かった。

このようにして、良好な発現率かつ高 VHH 比率のライブラリーが作製できた。

[実施例 2]

VHH 遺伝子の解析

実施例 1 では、以下の配列番号に記載された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。各組み合わせによって増幅される VHH の由来を改めてまとめると、以下のとおりとなる。

5' 側 (N 末端側) 3' 側 (C 末端側) 増幅される VHH の由来

- 48 -

配列番号：1～6 配列番号：10 IgG2

配列番号：1～6 配列番号：11 IgG3

各ライブラリーからそれぞれ無作為に50クローン以上を取り出し、遺伝子の塩基配列を解析した結果の一例を表1に示す。表中の一つのセルが一つのクラスに対応する。表1において、システイン残基の位置に基づいてサブファミリーが、そして更にサブファミリー内でCDR2とCDR1の長さに基づいてクラスが分類されている。CDRの決定方法は公知の方法(Kabat et al. Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., US Public Health Service, NIH Bethesda, MD, Publication(1991) No. 91-3242)にしたがった。分類の指標とする構造的な特徴は次の基準にしたがって特定された。

CDR1の長さ：

N末端から31番目のアミノ酸からKabatにしたがって定義される36番目のW(トリプトファン)の1つ手前のアミノ酸までのアミノ酸の個数

CDR2の長さ：

Kabatにしたがって定義される50番目のアミノ酸から66番目のR(アルギニン)の1つ手前のアミノ酸までのアミノ酸の個数

Cys位置番号：

36番目のW(トリプトファン)よりN末端側にあるときはN末端から数えた位置を示す番号をCys位置番号とした。また36番目のW(トリプトファン)よりC末端側にあるときは、36番目のWを36としてCys位置まで数えた番号をCys位置番号とした。

- 49 -

表 1

サブファミリー	システム残基位置	CDR2の長さ(aa)	CDR1の長さ(aa)	既存の発表*によるgermline数	プライマー(配列番号10)によるライブラリ(主にIgG2由来)	プライマー(配列番号11)によるライブラリ(主にIgG3由来)
1	-	21	5		1	
		20	2		1	
		18	5		1	
		17	4		1	
			5	1	4	7
			6			1
		16	7		1	
			2		1	
2	33	5		1	2	
		21	5		1	
		20	5		1	1
		19	7		1	
		18	5		3	3
		17	2		1	1
			4		2	1
			5	5	23	19
			6		3	2
			7			1
		16	8			1
			10			1
			5	1	8	
15	6					
	5		1	1		
14	5		1			
	5		1			
3	30	22	3		1	
		17	2		3	
			5			
		16	6			
			5	2	9	3
4	45	6				
		17	5			
			6			
			2		1	
		16	5	3	7	9
			6		1	
7			1			
5	32	17	8		1	
			4		1	
		16	5	2	2	
			6			
6	50	17	5			2
			6			
		16	7		1	
			5			
7	32, 33	17	6			1
			5			
		16	5			
			6			
8	30, 32	17	4		1	
合計				33	89	59

*(EMBO J. 19 (5) 921, 2000)

- 50 -

文献 (EMBO J. 19 (5) 921, 2000) によれば、

- 1) システイン残基の位置、および
- 2) CDR2 配列の長さ、

により VHH 遺伝子を 7つのサブファミリーに分類する試みがなされている。すなわち、システイン残基の位置 (30, 32, 33, 45) と CDR2 配列の長さ 16 または 17 アミノ酸から表 2 のように分類する方法を提唱している。

表 2

CDR2 長さ (aa)	システイン残基位置				
	なし	33	30	45	32
17	1a	2a			5a
16		2b	3b	4b	5b

表中の空欄は、それに該当するクローンを上記文献の報告者が見出しえなかったものである。これに対して、本発明者らによる解析の結果、表 1 に示すとおり、表 2 に示されたサブファミリー分類以上の多様性があることが判明した。例えば CDR2 の長さにしても 16、17 以外の長さを持つものが多数存在しており、またシステイン残基の位置にも 50 の位置のものあるいは上記のシステイン残基の位置の組み合わせのものなどが存在していた。

さらに、上記文献では CDR1 の長さは 5 アミノ酸のもののみが報告されているが、当発明者らの解析結果である表 1 に明らかなように、これにも多くの多様性があることが明らかとなった。CDR1 の長さや CDR2 の長さは CDR3 と異なり抗体遺伝子の再編成(リアレンジメント)においても変化しない位置であるから germline においても mRNA においても基本的に長さに変化はないと考えられる。

以上をふまえて、当発明者は表 1 に示すとおり、1) システインの位置において 8つのサブファミリーに分類した。さらに、2) CDR2 配列の長さ、および 3) CDR1 配列の長さの指標を加えた新たなクラス分類を試みた。表 1 においては、各クラスごとに分類されているが、文献において報告されている germline の多様

- 5 1 -

性よりもはるかに大きい多様性を持つことが明らかである。このことから、新たに本発明者らがデザインしたプライマーにより増幅された VHH 遺伝子は、ラクダ生体における多様性をより忠実に再現したものであると言える。

また本発明者らが新たに見出した VHH のサブファミリーは、ライブラリーの VHH 遺伝子の多様性の指標として有用である。すなわち、ライブラリーを構成するクローンの任意の 33 クローンを取り出して VHH の構造を解析し、本発明者らによる分類方法に基づいて分類したとき、少なくとも 8 個以上のクラスを含んでいれば、そのライブラリーは、生体における多様性を維持していると言うことができる。本発明における生体における多様性を維持している望ましいライブラリーは、ライブラリーを構成するクローンから無作為に十分量のクローンを取り出して調べたときに、6 以上の VHH サブファミリーを含み、かつ 15 個以上のクラスを含む。

〔実施例 3〕

VHH 型抗体ライブラリーを用いた GST に対する VHH の作製

3-1. スクリーニング条件の決定

WO 01/62907 に記載のスクリーニング方法に基づいて、グルタチオン S 転移酵素 (GST) に対する結合親和性を有する VHH を選択した。

GST を終濃度 0.1mg/ml に PBS で調製し、試験管 (Nunc 社 Maxisorp) 1 本 (1 回目) または 2 本 (2, 3 回目) に 3.8ml ずつ入れ、4℃で 18 時間インキュベートして GST を試験管内壁に吸着させた。吸着後、液を捨て 2% スキムミルク含有 PBS 3.8ml ずつを加えて 25℃で 1 時間反応させ、ブロッキングした。

IgG2 と IgG3 ライブラリーは混合せずに独立にスクリーニングすることとした。使用ファージ量は表 3 の Input phage (cfu) 量に示した。2% スキムミルク含有 PBS に浮遊したファージ液を 3.8ml ずつ試験管に添加し、室温で 2 時間反応させた後、PBS-0.05% Tween20 で 8 回洗浄した。

- 5 2 -

つぎに、0.1M トリエチルアミン (pH12.3) を試験管 1 本につき 3.5mL ずつ添加し、ローテーターを用いて室温で 20 分間反応させ乖離させた後、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8) 0.875mL/試験管を加えて中和することによって、抗原結合マキシソープチューブに結合したファージを回収した。

3-2. 回収したファージの増幅

回収した液は (ファージの大腸菌への感染) (ヘルパーファージの感染) (ファージの回収) の処理を行い、含まれているファージを精製・増幅した。

1) ファージの大腸菌への感染

大腸菌 (DH12S) を 2×YT 培地 50 mL で培養し、波長 600 nm の吸光度が 0.5 になったとき、3-1 で乖離させたファージ液を加えて 37°C で 1 時間振とう培養した。

2) ヘルパーファージの感染

上記 1) の培養液 54mL に、2×YT 培地 433mL、40% グルコース 12.5mL、および 100mg/mL アンピシリン 0.5mL を加えて 37°C で波長 600nm における吸光度が 0.5 になるまで培養した後、4°C、5000rpm で 10 分間遠心して菌体を沈殿させ、回収して 100mg/mL アンピシリン 0.15mL を加えた 2×YT 培地 150mL に懸濁した。これにヘルパーファージ M13K07 を 1/100 量 (1.5mL) 加え、37°C で 1 時間振とう培養した。

培養液を予め 37°C に暖めた培地 (2×YT 培地に 100 μg/mL アンピシリンと 70 μg/mL のカナマイシンを加えた液) 450mL に加えて 37°C で一晩培養した。

3) ファージの回収

上記 2) の培養液を 4°C で 8000rpm、10 分間遠心し、その上清に 2.5M の塩化ナトリウムを加えた 20% のポリエチレングリコールを 1/5 量加えて室温で 20 分間静置した後、4°C で 8000rpm、15 分間遠心して沈殿を回収した。沈殿に培養液の 1/10 量の滅菌 PBS を加えて溶解し、再度 2.5M の塩化ナトリウムを加えた 20% のポリエチレングリコールを 1/5 量加えて 4°C で 10000rpm、20 分間遠心して上清を

捨て、さらにスピンドウンして4°Cで10000rpm、2分間遠心した。これに0.05%の NaN_3 を加えたPBSを培養液の1/100量加えて沈殿を溶解し、VHHファージを回収した。

3-3. 増幅したファージによる再スクリーニング

増幅したファージを用いて、抗原結合試験管を用いて同様のスクリーニングを繰り返した。スクリーニングでの洗浄は、非特異に吸着したファージを乖離し、結合力の高いファージを選択する上で重要なステップであることから、洗浄条件は2回目のスクリーニング30回、3回目のスクリーニング35回にした。

3-4. ファージのスクリーニングの評価法

以上の方法でスクリーニングを繰り返すとき、(抗原吸着済試験管に投入したファージの総数) ÷ (抗原吸着済試験管から回収したファージの総数) が前回のスクリーニングに比べて明らかに小さくなれば、目的のVHHを提示しているファージが濃縮されつつあると推測できる。溶液に含まれるファージ数の計算は以下のように行った。

1) ファージの希釈系列を以下のように作製した。

- [1] 1×10^{-2} 希釈 : ファージ液 $10 \mu\text{L}$ + PBS $990 \mu\text{L}$
- [2] 1×10^{-4} 希釈 : [1]の希釈液 $10 \mu\text{L}$ + PBS $990 \mu\text{L}$
- [3] 1×10^{-6} 希釈 : [2]の希釈液 $10 \mu\text{L}$ + PBS $990 \mu\text{L}$
- [4] 1×10^{-8} 希釈 : [3]の希釈液 $10 \mu\text{L}$ + PBS $990 \mu\text{L}$
- [5] 1×10^{-9} 希釈 : [4]の希釈液 $100 \mu\text{L}$ + PBS $900 \mu\text{L}$
- [6] 1×10^{-10} 希釈 : [5]の希釈液 $100 \mu\text{L}$ + PBS $900 \mu\text{L}$

[4]、[5]、および[6]の希釈系列 $10 \mu\text{L}$ に DH12S $990 \mu\text{L}$ を加えたものを作り、37°Cで1時間感染させ、これをLBGAプレートに $100 \mu\text{L}$ まいて30°Cで18~24時間培養し、コロニーを計数した。上記希釈系列のうち、通常[4]のプレートが50

- 5 4 -

個以上のプラークを作る。mL 当たりのファージ数は[4]のプレートのプラーク数に基づいて、以下のように算出される。

$$\text{原液のファージ数} = (\text{コロニー数/プレート}) \times (1 \times 10^8) \times 10^3 \text{ cfu/mL}$$

3-5. GST スクリーニング結果

回収されたファージ数も同様に計算し、本抗原に対する VHH を提示するファージの数をスクリーニングごとに求めたところ、表 3 のようになった。3rdスクリーニングで回収ファージ比率 (Input/output) の上昇が見られたため、この段階で特異的な VHH が濃縮されていることが予測された。

表 3

IgG2 ライブラリー

	Wash	Input phage (cfu)	Output phage (cfu)	Input/output
1st	8	1.00×10^{14}	1.30×10^9	7.69×10^4
2nd	30	3.60×10^{14}	2.20×10^6	1.64×10^8
3rd	35	2.00×10^{13}	4.70×10^7	4.26×10^5

IgG3 ライブラリー

	Wash	Input phage (cfu)	Output phage (cfu)	Input/output
1st	8	1.00×10^{14}	1.40×10^9	7.14×10^4
2nd	30	3.90×10^{14}	2.60×10^6	1.50×10^8
3rd	35	2.00×10^{13}	1.20×10^7	1.67×10^6

3-6 スクリーニングによって得られた VHH の抗原結合活性の測定

3-6-1. 得られたファージ VHH の ELISA 法による活性の確認

上記のスクリーニングによって選択された VHH について、抗原結合活性 (アフィニティー) を 96 ウェルマイクロタイタープレートを用いた ELISA 法で測定した。サンプルはファージ型の VHH ではなく、VHH-cp3 型の VHH を用いた。

まず、VHH-cp3 を発現させるために、ファージの感染した大腸菌を 1%Glucose

- 5 5 -

と 100 μ g/mL のアンピシリンを加えた 2×YT で 30°C 18 時間培養した後、0.1% グルコースと 100 μ g/mL のアンピシリンを加えた 2×YT 1.5mL に上記培養液を 5 μ L 加えて 30°C で 4 時間培養した。このときの大腸菌の濃度は波長 600nm の吸光度を測定するとき、約 0.5 であった。

これに 1mM になるよう IPTG (イソプロピル- β -D-ガラクトシド) を加えてさらに 30°C で 18 時間培養した後、培養液 1.5mL をエッペンドルフチューブにとり、10000rpm, 4°C で 5 分間遠心してその培養上清をとり、0.1% となるよう アジ化ナトリウムを添加して試料とした。

次に GST を結合した ELISA プレートを用意した。GST を終濃度 100 μ g/mL に希釈し、96 ウェルマイクロタイタープレート (Nunc 社製 Maxisorp) の各ウェルに 100 μ L 添加して 4°C で 18 時間結合させたのち、5% BSA (ブロッキング液) を各ウェルに 200 μ L 添加して 37°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を捨てた後、PBS で 1 回洗浄して、アフィニティーの測定に用いた。

試料を各ウェルに 100 μ L 加え、25°C 1 時間反応させた。反応後、PBS で 4 回洗浄し、250 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗 cp3 抗体 ((株) 医学生物学研究所製) を 100 μ L 加えて 25°C で 1 時間反応させた。再度 PBS で 4 回洗浄し、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の溶液 100 μ L を加えて暫時反応させた後、2N 硫酸 100 μ L を加えて反応を停止し、波長 492nm における吸光度を測定した。その結果 192 クローン中 71 クローンに結合活性が確認された。IgG2 で 46 クローン (図 7)、IgG3 で 25 クローン (図 8) の結合活性を有するクローンを選択することができた。

3-6-2. 得られた抗 GST VHH の配列解析

抗原結合活性を示した 71 個のクローンを選択し、LBGA 中で 30°C 18 時間培養した後、倉敷紡績社製 DNA 分離装置 PI-50 を用いてファージミドを精製した。これを用いて、その遺伝子の塩基配列を確認した。塩基配列は、蛍光プライマー T7 (ア

- 56 -

ロカ社製)を用いて、サーモシークエンスキット(アマシャム・ファルマシア製)とアロカ社製 L1-COR4200L(S)-2 を使用したジデオキシ法によって決定した。

CDR3 の配列から IgG3 は 1 種類、IgG2 は 6 種類であることがわかった。スクリーニングによって得られたクローンの CDR3 のアミノ酸配列を表 4 にまとめた。IgG3 の 1 種の CDR3 は IgG2 にも見られサブクラスの切り替わるメカニズムがある可能性があると考えられた。

表 4

由来	アミノ酸配列	クローン数
IgG2 CDR3	VFKSWCSDGLGTTLPNY	13
IgG2 CDR3	DFKPWCSDGLGTTLPNY	26
IgG2 CDR3	VSGRAYCSGMSIYGDS	2
IgG2 CDR3	TDESPLRRRFSLDRRRYD	1
IgG2 CDR3	DGGYYSCGVGEE	1
IgG2 CDR3	KSYMCGSTLWRRIDOYND	1
IgG2 CDR3	DISAPPGIGGTCAFLGDY	1
IgG3 CDR3	VFKSWCSDGLGTTLPNY	25

3-7. 抗 GST VHH 精製 (ProteinA 融合型への変換、発現確認 ELISA、大量精製)

3 種類の抗 GST VHH を cp3 融合蛋白質から proteinA 融合蛋白質に変換した。

抗 GST VHH として、次の 3 クローンをを用いた。

No21 : 2 クローン単離されたクローン

No29 : 最も ELISA 値が高かったクローン

No75 : 最もメジャーな CDR3 (38 クローン) を持つクローン

各クローンの塩基配列とアミノ酸配列は、次の配列番号に示す。

クローン No.	塩基配列	アミノ酸配列
No21	配列番号 : 1 4	配列番号 : 1 5
No29	配列番号 : 1 6	配列番号 : 1 7

- 57 -

No75 配列番号：18 配列番号：19

操作は次のとおりである。まず cp3 領域を SalI のセルフライゲーションによって除き、transformant を得た。No21, No. 29, No75 の各クローン DNA について以下の方法で SalI 切断した。

1 μ g DNA (各 cp3 発現型 VHH 発現ベクター) /33 μ L 滅菌 MILLIQ 水4 μ L 10 \times High Buffer(宝酒造、SalI に添付)3 μ L SalI (宝酒造)

上記組成の反応液を 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。これを 0.8% agarose gel で 100mA、約 1 時間電気泳動し、4kB 付近に見えるバンドをカッターナイフで切りだした。QIAEXII (QIAGEN) で DNA を抽出し、エタノール沈殿させた。こうして得た DNA を以下の条件でセルフライゲーションした。

回収 DNA を 62 μ L の滅菌 MILLIQ 水に溶解10mM DTT 10 μ L10mM ATP 10 μ L10 \times Ligase バッファー 10 μ LT4 DNA Ligase (宝酒造) 350U/ μ L 8 μ L

反応液を 16 $^{\circ}$ C、15 時間インキュベートした後、エタノール沈殿して DNA を回収した。これを滅菌 MILLIQ 水で 10 倍希釈した 3 μ l の TE (10mM Tris、1mM EDTA pH8.0) に溶解した。このうち、1.5 μ L を 20 μ LDH12S にエレクトロポレーションで形質転換した。形質転換の条件は、前記 1-4-5. 「VHH 型選択重鎖可変部抗体ライブラリー (IgG2、IgG3 ライブラリー) 形質転換」に記載したとおりである。得られた菌株をグルコース 0.1% 存在 2 \times TY500ml、100 μ g/ml アンピシリンで培養し、対数増殖前期 (OD_{660nm}=0.5) に 1mM の IPTG で発現を誘導した。発現誘導後、20 時間で集菌し上清を回収し proteinA 型 VHH 含有培養上清を得た。

次に、proteinA 型 VHH を以下のようにして精製した。まず得られた培養上清 100ml に対し、36 g の割合で硫酸を加え (60%硫酸)、4 $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌して蛋白質

- 58 -

を沈殿させた。次いで、8000rpmで10min遠心して上清を捨てた。

500mlの培養上清あたり、1粒のプロテアーゼインヒビター (Complete™、ロシユ社製) を30mLのPBSで溶解して添加し、10000rpmで15min遠心して沈殿物を除いた。上清30mLに0.05%NaN₃、およびIgG Sepharose 6Fast Flow (pharmacia) 1.5ml樹脂を加えて1時間攪拌した。カラム (10mlpoly-prep、Bio RAD) に樹脂液を入れ自由落下により詰め、0.1%Tween-PBSを10mLずつ2回流した。次に10mLのPBSを2回流した。更に50mlのPBSで同様に流した。最後に10倍希釈した5mlのPBSを流した後、以下の条件でproteinA型VHHを溶出した。

50mMクエン酸(pH 2.4)3mlを流し、溶出液を回収した。

次に0.1Mグリシン(pH3.0)4mlを流し、溶出液を回収した。

最後に50mMクエン酸(pH2.4)5mlを流し、溶出液を回収した。

回収した溶出液を3MのTris 350μLで中和し、pH試験紙で中性を確認した。各溶出液を、3500MW CO透析膜 (PIERCE) で3LのPBSに対して4℃で一晩透析した。透析後、0.05%となるようNaN₃を添加した。280nmの吸光度を測定することによって、得られた精製蛋白質の濃度を決定した。蛋白質濃度は、OD280nmの値を1.4で割った値をμg/mLで示した。更に回収された蛋白質の分子量を、SDS-PAGEで確認した。結果は以下に示すとおりである。

	蛋白質濃度	分子量
No. 21	445 μg/15ml	Mw. 30KD
No. 29	494 μg/15ml	Mw. 30KD
No. 75	649 μg/15ml	Mw. 28KD

proteinA型VHHの分子量は、理論値では28KDである。したがって、SDS-PAGEの結果は、これらの蛋白質が目的とする構造を有していることを裏付けているといえる。

次に、形質転換体の上清を用いて、proteinA型VHHのGSTに対する結合活性を確認した。まず形質転換体16クローンずつを少量で発現させ、そのproteinA型

VHH 含有培養上清を 1 次抗体として、GST をコートしたマイクロカップ (MAXISOR P) に分注した。更に 2 次抗体は ProteinA と親和性のある rabbit 抗 mouse Fab 抗体 (4000 倍希釈) を、そして 3 次抗体は 4000 倍希釈 goat 抗 rabbit IgG-HRP (医学生物学研究所) を用い、proteinA 型 VHH の発現、並びにその結合能を確認した。

その結果、いずれの形質転換体の培養上清においても、GST に対して結合活性を有する proteinA 型 VHH が検出された。

3-4. 精製抗 GST VHH の結合定数測定

本発明のライブラリーから選択された VHH の、GST との相互作用について解析した。具体的には、親和性測定および動力学的分析によって、クローン No. 75、No. 29 と GST との相互作用の k_a (結合速度定数)、 k_d (解離速度定数)、および KD (解離定数 ; k_d/k_a) を決定した。解析には、BIACORE1000 バイオセンサー装置を利用した。

カルボキシメチルデキストラン (Sensor Chip CM5、Research grade、BIACORE) センサーチップを用いた。CM5 マトリックスへの静電吸着および、CM5 上のリシル基と活性化したカルボキシル基とを共有結合させ、抗原 (GST) をチップに固定した。EDC/NHS カップリング化学反応 (Johnson ら) によって、カルボキシル基を活性化した。

流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ HBS-EP (BIACORE) の条件下、EDC/NHS (アミンカップリングキット、BIACORE を EDC、NHS を当量混合) で CM5 上のリシル基の活性化後 (コンタクトタイム 2.4min) に、HBS-EP (BIACORE) でチップを洗浄した。続いて GST20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma 製、0.6 mg protein/ml を 10mM 酢酸 (pH4.0) で希釈) をチップに加えた。チップを HBS-EP 洗浄した後、続いて、1 M のエタノールアミン、pH 8.5 を加えて、残っている活性化カルボキシル基を不活性化した。不活性化した後、50mM の NaOH で洗浄して、共有結合していないすべての GST を除去した。固定化された抗原の量は、2252 RU であると算出された。飽和量のクローン NO. 75 をセ

- 6 0 -

ンサーに加えることによって結合を評価したところ、300 RU 付近であった。

すべての解析実験は、HBS-EP 流速 $35 \mu\text{l}/\text{min}$ HBS-EP (BIAcore) 中 25°C にて行い、再生は 50mM の NaOH で 1 分間行った。

クローン No. 75 の濃度を変化させて ($5 \times 10^{-8}\text{M}$ - $4.0 \times 10^{-7}\text{M}$) 結合を追跡した。曲線は (Langmuir) binding (BIAevaluationVer. 3) を用いると、良好にフィットした。ベースライン補正も考慮に入れた。Global fitting (BIAevaluationVer. 3) により、 k_a ($1/\text{Ms}$) を決定したところ、 $3.81 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ の値が得られた。 k_d ($1/\text{S}$) を決定したところ、 $9.15 \times 10^{-4} \text{S}^{-1}$ であり、マストランSPORT制限が生じるので、この値を下限として用いる。動力的分析に基づいて KD を算出した値は、 24nM であった。

クローン No. 29 の評価の際、固定化された抗原の量は 1750 RU、飽和量のクローン No. 29 をセンサーに加えることによって結合を評価したところ、460 RU 付近であった。他は同様な条件で評価したところ、 k_a ($1/\text{Ms}$) $2.54 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 、 k_d ($1/\text{S}$) $2.55 \times 10^{-3} \text{S}^{-1}$ であり、動力的分析に基づいて KD を算出した値は、 100nM であった。クローン No. 75 は k_d が低く、そのため結合定数が高くなっていた。従ってクローン No. 75 は解離しにくい VHH であると考えられた。

実施例 4

4. 精製抗 GST VHH を用いた酵素活性阻害実験

4-1. 酵素活性測定条件設定

GST はグルタチオン、CDNB の両方を基質とすることができる、2 基質系酵素である。文献 (Habig WH, et al. J. Biol. Chem. Nov. 25, 249 (22) : 7130, 1974) で報告されている条件 : CDMB 1mM 、グルタチオン 1mM 、GST 濃度 $1.5 \mu\text{M}$ に基づいて、本発明の VHH ライブラリーから選択された VHH の酵素活性に与える影響を評価した。また、酵素反応 3 分までは直線的だがそれ以降はやや傾きが低くなっているため、3 分までの各 1 分ごとの値から傾きを算出し、酵素反応速度を求めた。

- 6 1 -

この測定法で、CDNB を 1 mM の条件で固定しグルタチオン濃度を 2-0.0625mM の間で変化させて、Edie のプロットで結合定数を求めたところ、報告されているものと同様であった。(測定値 $K_m=0.48$ mM) さらに、同じ酵素濃度で CDNB を変化させたときに吸光度計で測定可能な範囲 (水ブランクに対し 1.5 付近まで) に入るようにグルタチオン濃度を決定すると 0.25 mM が適当であった。

4-2. VHH による酵素阻害性確認

CDNB 1 mM、グルタチオン 1 mM、酵素濃度 1.42 μ M、の酵素反応測定条件で測定するため、VHH をセントリコン YM-10(amicon)で濃縮した。その結果、3.8-5 μ M で VHH (クローン: No21, No29, No75) を共存させられるようになった。そこで 4-1 と同様に酵素反応速度を測定した。

MILLIQ 水	220 μ L
1M リン酸カリウム (pH6.5)	25 μ L
100mM CDNB	2.5 μ L
100mM グルタチオン	2.5 μ L

1.0 μ g GST/25 μ L PBS、および各 VHH (0-5 μ M) の混合液を室温で 1 時間インキュベートした後に、上記組成に加えた。添加後、25°C で 340nm の吸光度を測定した。

その結果、No. 21 および No. 29 は、最も高い VHH 濃度でも酵素阻害性は見られないと思われた。No. 75 については、VHH 濃度依存的な酵素阻害活性があると考えられた。その阻害は 1.5 μ M 以上で顕著であった。No. 75 の測定結果を図 9 に示した。

さらに、見かけ上の K_m が変化しているかどうかを確認するため、CDNB 1 mM で固定しグルタチオン濃度を 2-0.0625 mM の間で変化させた。以下の条件で反応を実施した。

MILLIQ 水	220 μ L
----------	-------------

- 6 2 -

1M リン酸カリウム (pH6.5)	25 μ L
100mM CDNB	2.5 μ L
200mM-6.25mM グルタチオン	2.5 μ L

1.0 μ gGST/25 μ L PBS 及び各 VHH (2 μ M) の混合液を室温で1時間インキュベートした後に、上記組成に加えた。添加後、25°Cで340nmの吸光度を測定した。

結果の一部をまとめたのが図10である。No. 29については、最も高いVHH濃度でも、VHHを添加しない場合とほぼ同じ結果となった。一方No. 75は、VHH濃度2 μ Mで大きく傾きが異なり、見かけ上のVmaxが小さく、見かけ上のKmは変化していなかった。この結果は、No. 75のVHHがグルタチオンに対して非拮抗的にGSTを阻害したことを示している。

次に、グルタチオン0.25 mMでCDNBを4-0.25 mM間で変化させた場合、Lineweaver-burgのプロットで直線になることをまず確認した。以下の条件で測定を実施した。

1M リン酸カリウム (pH6.5)	25 μ L
100mM CDNB	10-1.25 μ L
25mM グルタチオン	2.5 μ L
MILLIQ 水で	250 μ L に反応液を調整した。

1.0 μ gGST/25 μ L PBS 及び各 VHH (2 μ M) の混合液を室温で1時間インキュベートした後に、上記組成に加えた。添加後、25°Cで340nmの吸光度を測定した。

結果の一部を図11にまとめた。この系にNo. 75 VHHを用いた場合は、大きく傾きが異なり、みかけ上のVmaxが小さく、みかけ上のKmは変化していなかった。これはVHHがCDNBに対して非拮抗的にGSTを阻害したことを示している。

以上のことからNo. 75 VHHは2つの基質いずれに対しても非拮抗に作用する。したがって、GSTにおけるこれらの基質の結合領域とは違う部位をエピトープとして持ち、VHHの結合によって中間体である酵素基質複合体(ESC)の立体構造が変化する結果、反応産物を作れなくなると考えられた。

〔実施例 5〕

VHH 型抗体ライブラリーによる乳酸デヒドロゲナーゼ VHH スクリーニング5-1. LDH スクリーニング

乳酸脱水素酵素に対して結合親和性を有する VHH をスクリーニングした。スクリーニングには、大腸菌で発現させた *Bacillus stearothermophilus* 由来の乳酸脱水素酵素 (L-LACTIC DEHYDROGENASE; LDH、SIGMA 製、250units) を抗原として用いた。

市販の LDH には、活性単位が 123 units/mg solid、586 units/mg protein と記載されていた。この市販品の純度を SDS-PAGE で確認した。その結果、純度 80% 程度と考えられた。(35KD のモノマーが 2 つ会合したダイマーと、4 つ会合したテトラマーを形成している)

スクリーニングの操作は以下のとおりである。LDH 濃度は 0.2 mg/ml に PBS で調製し、MICROSORP LOOSE (NUNC 社 IMMUNO MODULE) に 25 μ l/well 分注した。1 回目のスクリーニング用に 4 Well、2 ~ 4 回目のスクリーニングには 1 well を使った。4 $^{\circ}$ C で 18 時間インキュベートして LDH をウェル内壁に吸着させた。吸着後、液を捨て 1 %BSA 含有 PBS 150 μ l/well を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、ブロッキングした。

ライブラリーを表 5 の Input phage (cfu) 量 (緩衝液は 1 %BSA 含有 PBS) を 50 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、PBS で表 5 の wash の回数洗浄した。続いて抗原に結合したファージを以下のように回収した。すなわち、0.1 M HCl-グリシン (pH2.2) を 50 μ l/well 添加し、室温で 10 分間反応させ乖離させた後、2M Tris 3 μ l /well を加えて中和し、この液を回収した。

5-2. 回収したファージの増幅

回収した液は (ファージの大腸菌への感染) (ヘルパーファージの感染) (ファ

- 6 4 -

ージの回収) の処理を行い、含まれているファージを精製・増幅した。

1) ファージの大腸菌への感染

大腸菌(DH12S)を2×YT培地2 mLで培養し、波長600nmの吸光度が0.5になるよう増殖させ、5-2で乖離させたファージ液を加えて37°Cで1時間振とう培養した。

2) ヘルパーファージの感染

1)の培養液に、SuperBroth培地(30g Triptone (DIFCO)、20gの yeast extract (DIFCO)、10g MOPS (ナカライテスク)を蒸留水で1 Lにし、pH7.0に調整して121°Cで20分間蒸気滅菌したもの)6mL、100 mg/mL アンピシリンをFinal 1/1000倍量加えて37°Cで2時間160 rpm振とう培養した。その後、ヘルパーファージM13K07を 10^{12} CFU (1.0mL)加え、SuperBroth培地を92mL、100mg/mL アンピシリンをFinal 1/1000倍量加え、37°Cで2時間160rpm振とう培養した。その後70 μ g/mLになるよう、カナマイシンを加え37°Cで一晩培養した。

ファージの回収、増幅したファージによる再スクリーニング、ファージのスクリーニングの評価法は抗GST VHHで述べた方法に従った。ただし、洗浄にはPBSを用い、2、3回目のスクリーニングでは15回、4回目のスクリーニングでは20回洗浄した。

5-3. LDHスクリーニング結果

スクリーニング経過を表5に示した。表5から明らかのように、4thで回収率(output/input)が上昇し、LDHに対するVHHが単離されたと考えられた。

- 6 5 -

表 5

スクリーニング回数	input phage (cfu)	洗浄回数	output phage (cfu)	output/ input
1	4×10^{12}	7	1.2×10^7	1/ (3.3×10^5)
2	1.1×10^{12}	15	2.1×10^6	1/ (5.2×10^5)
3	2.3×10^{12}	15	1.6×10^6	1/ (1.4×10^6)
4	2.3×10^{11}	20	4.5×10^6	1/ (5.1×10^4)

抗 GST VHH の場合と同様な方法でスクリーニング 3 回目から 60 クローン、4 回目から 36 クローンモノクローン化した。次に、抗 GST VHH の場合と同様な方法で ELISA を行った。

200 μ g/ml で PBS に溶かした LDH を MAXISORP に感作した。この抗原感作プレートに、1 次抗体として培養上清、2 次抗体としてマウス抗 cp3 モノクローナル 3 G3A8H1 10 倍希釈、そして 3 次抗体としてヤギ抗マウス IgG (H+L) -POD 1000 倍希釈を加えた。ネガティブコントロールは、抗原感作に代えて PBS を添加した。

ELISA の結果を図 1 2 (スクリーニング 3 回目)、および図 1 3 (スクリーニング 4 回目) に示す。4 回目のスクリーニングでは 29 クローンが ELISA 陽性であった。

次に抗 GST VHH の場合と同様な方法で遺伝子の塩基配列を解析した結果、CDR3 の配列から判断して 1 1 種類の VHH が単離できた (VH 型が 2 種類存在)。

5-4. 抗 LDH VHH の ProteinA 融合型への変換

実施例 3 (GST) で記述した方法に準じて、SalI 切断 self-ligation により 8 クローンを proteinA 型に変換した。

VHH クローンを導入した形質転換体を 800ml スケールで培養し、IgG Sepharose により精製したところ、各クローンについて 200-800 μ g の精製 VHH を得た。実験に用いた 8 つのクローンの塩基配列と、その塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を以下の配列番号に示した。

- 6 6 -

クローン No.	塩基配列	アミノ酸配列
No. 407	配列番号 : 2 0	配列番号 : 2 1
No. 415	配列番号 : 2 2	配列番号 : 2 3
No. 418	配列番号 : 2 4	配列番号 : 2 5
No. 421	配列番号 : 2 6	配列番号 : 2 7
No. 426	配列番号 : 2 8	配列番号 : 2 9
No. 428	配列番号 : 3 0	配列番号 : 3 1
No. 430	配列番号 : 3 2	配列番号 : 3 3
No. 434	配列番号 : 3 4	配列番号 : 3 5

5-5. 乳酸デヒドロゲナーゼ VHH の阻害活性

ピルビン酸から乳酸を生成する反応の阻害活性をクローン No. 407、415、421、426、428、430、434、およびコントロールについて実施した。コントロールには先の実施例で得られた抗 GST VHH (クローン No. 29) を用いた。

まず、SDS-PAGE で VHH 濃度を見積もり、LDH (1.4 μ M) に対して VHH 8 μ M で 1 時間インキュベートし残存酵素活性を測定した。活性検出条件は以下のとおりである。

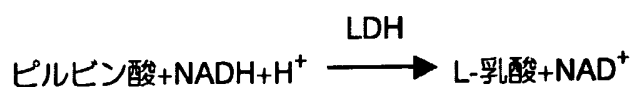
66mM リン酸ナトリウムバッファー pH7.0

1mM ピルビン酸

120 μ M NADH

280nM LDH、1.6 μ M VHH (final)、26°C (室温)

LDH が触媒する反応 :



酵素活性は、340nm の吸光度を測定することによって検出した。測定結果を図 1 4 に示す。その結果、クローン No. 418、No. 421、および No. 428 についてはむ

- 67 -

しる酵素反応を促進していた。No. 430 は阻害した。No. 407、No. 415、No. 426、および No. 434 は、コントロールとして用いた抗 GST VHH(クローン No. 29)添加と同じ反応速度であり、LDH の酵素活性に影響を及ぼさないと考えられた。

次に、基質混入の可能性や低分子の反応促進物質の存在も考え、VHH 溶液を Mw 3000 の限外ろ過 (MicroconYM-3) でろ液のみでの結果も確認してみた。その結果、ろ液には促進効果、阻害効果認められなかった。したがって、図 14 で確認された酵素活性の調節作用は、高分子であるタンパクすなわち VHH による活性調節によるものと考えられた。ここで用いた反応条件下では乳酸生成方向の反応速度を 10 倍高める VHH (No. 418、および No. 421)、5 倍高める VHH (No. 428) と、乳酸生成方向の反応速度を阻害する VHH (No. 430) が得られた。

ピルビン酸濃度を変更して感度を上げ、使用酵素と VHH の使用量を抑制した条件で酵素活性を検出するため、予備実験を行った。予備実験の結果、使用酵素濃度 22.4 nM で酵素活性を測定できることがわかった。そこでクローン No. 430 について、VHH 濃度依存性を確認してみた。(酵素 56 nM と VHH をインキュベート)

酵素活性の測定条件を以下に示す。

66mM リン酸ナトリウムバッファー pH7.0

10mM ピルビン酸

120 μ M NADH

22.4nM LDH (final)、26°C

測定結果を図 15 に示した。5 倍量(278nM)の VHH から阻害効果が出始め、20 倍では残存活性 20%までに阻害した。

5-6. 乳酸デヒドロゲナーゼ VHH の BIACORE による結合定数測定

GST の場合同様の操作で、LDH を CM-センサーチップ (Sensor Chip CM5、Research grade、BIACORE) にアミノカップリング法により固定化した。

EDC/NHS (アミノカップリングキット (BIACORE) の EDC、NHS を当量混合) で CM

- 6 8 -

5 上のリシル基の活性化後（コンタクトタイム 8min）に、HBS-EP（BIAcore）でチップを洗浄した。続いて LDH $20\mu\text{g/ml}$ （Sigma, $0.2\mu\text{g protein/ml}$ を 10mM の酢酸（ $\text{pH}5.0$ ）で希釈）をチップに加えた。チップを HBS-EP 洗浄した後、続いて、 1M のエタノールアミン、 $\text{pH}8.5$ を加えて、残っている活性化カルボキシル基を不活性化した。不活性化した後、HBS-EP で洗浄して、共有的に結合していないすべての LDH を除去した。固定化された抗原の量は、 5653RU と算出された。飽和量のクローン No. 430 をセンサーに加えることによって結合を評価したところ、 800RU 付近、クローン No. 428 では 500RU 付近、クローン No. 421 では 1400RU 付近であった。

すべての実験は、HBS-EP 中 25°C にて行い、再生条件は最適条件で実施した。洗浄は 50mM のクエン酸（ $\text{pH}2.5$ ）で 1 分間行った。

LDH の濃度を変化させて（ $5\times 10^{-8}\text{M}$ – $4.0\times 10^{-7}\text{M}$ ）結合を追跡した。曲線は（Langmuir）binding あるいは $1:1$ binding with mass transfer（BIAevaluationVer. 3）を用いると、良好にフィットした。ベースライン補正も考慮に入れた。Global fitting（BIAevaluationVer. 3）により、 $k_a(1/\text{Ms})$ 、 $k_d(1/\text{S})$ 、動力学的分析に基づいて K_D を算出した値は、表 6 に示すとおりであった。

酵素阻害実験では No. 430 は、 IC_{50} がおよそ 400nM 程度であり、これは K_D が 250nM 程度の測定値と近い値である。結合により阻害が起こっている証拠であると考えられた。

- 69 -

表 6

(Langmuir) binding モデル

クローン No.	k_a ($M^{-1}S^{-1}$)	k_d (S^{-1})	$K_D \times 10^{-7}$ (M)	$K_A \times 10^6$ (1/M)
421	2.39×10^4	4.09×10^{-3}	1.72	5.83
428	1.44×10^4	5.13×10^{-3}	3.56	2.81
430	9.82×10^3	2.58×10^{-3}	2.63	3.80

1 : 1 binding with mass transfer モデル

クローン No.	k_a ($M^{-1}S^{-1}$)	k_d (S^{-1})	$K_D \times 10^{-7}$ (M)	$K_A \times 10^6$ (1/M)
421	2.39×10^4	4.09×10^{-3}	1.71	5.83
428	1.48×10^4	5.16×10^{-3}	3.50	2.86
430	1.15×10^4	2.85×10^{-3}	2.48	4.04

〔実施例 6〕

6. IgM の重鎖可変領域ライブラリーの作製

6-1. IgM の定常領域 $C\mu$ (constant μ) のクローニング

ラクダ 2 2 頭分の mRNA からランダムプライマーを用いて実施例 1 と同様にして cDNA を作製した。

ヒト、マウス間で保存されていた IgM の定常領域 $C\mu$ (constant μ) C 末端部分の配列を元に以下のプライマーを作製し、重鎖可変領域の N 末端側のプライマーとラクダ cDNA を用いて PCR を行い、ラクダ $C\mu$ をクローニングした。

AACGTAGGCGCGCCGACTTGTCCACGGTCCTCTC/配列番号 : 38

下線部は AscI 切断部位

PCR 断片を制限酵素 SfiI、AscI によって切断し、SfiI、AscI 切断したベクター-pFCA-10 にクローニングし、前述の方法によって形質転換した。形質転換体から前述のように DNA を調製し、 $C\mu$ の N 末端部分の塩基配列を決定した。ラクダ $C\mu$ N 末端の塩基配列とアミノ酸配列は以下の通りであった。

E S S S A P T L Y P L /配列番号 : 40

GAG AGC TCA TCT GCC CCG ACA CTC TTC CCC CTC /配列番号 : 39

6-2. IgMの重鎖可変領域作製

新規にクローニングしたラクダC μ 配列から、IgM重鎖可変領域を選択的に取り出すことができるプライマーとして、次の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをデザインした。

ACATTAATCTGGCGCGCCGAGAGTGTCGGGGCAGATGAGCTCTC/配列番号：41

前述したIgG VHHライブラリー作製の項と同様な手法で、取得したラクダ22頭分のmRNA 20 μ gを鋳型としてランダムプライマーによりcDNAを取得した。

得られたcDNAの1/40量を鋳型として、V領域のN末端部分プライマー6種（配列番号：1～6）それぞれと上記プライマーを対にして組み合わせ、6種類のプライマーセットでPCRを行った。

PCR条件は95 $^{\circ}$ C、3minの後、94 $^{\circ}$ C、1min、72 $^{\circ}$ C 2min、72 $^{\circ}$ C 1minを19サイクル行った。各プライマーの組み合わせから得られたPCR産物をすべて混合し、0.8%アガロースゲルで泳動し約0.5 kbpのバンドをカッターナイフで切り出した。DNAの抽出はQIAEX II (QIAGEN) を用いた。DAPIを用い、回収DNA量を見積もったところ178 μ gであった。

6-3. ベクターへのIgMの重鎖可変領域のクローニング

実施例1で記述した方法に準じて、混合した回収PCR断片を制限酵素Sfi I切断し、Sfi I切断したベクターpFCA-10にライゲーションし、フェノール処理とエタノール沈殿を行いDNA断片を回収した。さらに制限酵素Asc Iによって切断を行い、フェノール処理とエタノール沈殿を行いDNA断片を回収してライゲーションを行った。DAPI染色により、回収DNA量を測定すると66 μ gであった。

6-4. 形質転換

実施例1で記述した方法に準じて上記で得られたDNAをtotal 7.5mlのDH12Sに対

- 7 1 -

して形質転換した。(0.17 μ gDNAを20 μ lのElectroMAX™ DH12Sにエレクトロポレーション法によって形質転換する作業を繰り返した) その一部をサンプリングし全体の形質転換菌の数を見積もったところ、 6.6×10^{10} であった。

6-5. IgMの重鎖可変領域ライブラリーファージ作製

形質転換した大腸菌の一部を 終夜培養したところ、 2.5×10^{11} DH12S /87.5mlになっていた。これに滅菌2 x TY培地2L、グルコース最終濃度1%、アンピシリン最終濃度100 μ g/ml加え、37°CでO. D. 600nm 0.8となるまで培養した。これを8000 rpm x 10min, 4°C遠心し、沈殿の菌体を滅菌2 x TY培地2L、アンピシリン最終濃度100 μ g/mlで溶解、ヘルパーファージK07 20mLを加えて37°C 1時間培養した。

これに滅菌2 x TY培地4L、アンピシリン最終濃度100 μ g/ml、カナマイシン最終濃度50 μ g/ml加えて終夜培養した。実施例1で記述した方法に準じて終夜培養液からファージを回収し 2.4×10^{14} cfu/mlのファージライブラリー溶液50mLが得られた。

実施例7

7. IgMの重鎖可変領域ライブラリーによる β -galに対する抗体のスクリーニング

7-1. β -galに対する抗体のスクリーニング条件

スクリーニング方法は、WO 01/62907及び実施例3のGSTのスクリーニングに準じた。ただし、 β -gal濃度は0.1mg/mlにPBSで調製し、試験管(Nunc社Maxisorp)2本(1回目)または1本(2, 3回目)に3.8 mlずつ4°Cで18時間インキュベートして β -galを試験管内壁に吸着させた。吸着後、液を捨て2%スキムミルク含有PBS 3.8mlずつを加えて25°Cで1時間反応させ、ブロッキングした。

IgMの重鎖可変領域ライブラリーライブラリーを下表のInput phage (cfu)量、2%スキムミルク含有PBSを3.8mlずつ試験管に添加しスクリーニングした。(表7)

7-2. β -gal に対する抗体のスクリーニング結果

3rdで回収率 (output/input) が上昇し、 β -galに対する抗体が濃縮されていると考えられた。

表 7

スクリーニング回数	Input phage (cfu)	洗浄回数	Output phage (cfu)	Output/ Input
1	1.0×10^{13}	8	4.0×10^9	$1/(3.0 \times 10^4)$
2	3.5×10^{12}	31	4.7×10^5	$1/(7.4 \times 10^6)$
3	1.4×10^{12}	31	7.8×10^9	$1/(180)$

7-3. 抗 β -gal抗体モノクローンELISA

実施例3のGST抗体の場合と同様な方法で3回目のスクリーニングの結果得られたファージクローンからモノクローン化を実施した。実施例3のGST抗体の場合と同様な方法でELISAを行ったところ、48クローン中、43クローンがELISA陽性であった。(図18)

産業上の利用の可能性

本発明によって、生体におけるVHH領域の多様性を維持した、VHHライブラリーが提供された。しかも本発明のライブラリーを構成するVHHは、正常な塩基配列を多く含み、発現率が高い。つまり本発明のVHHライブラリーは、活性なVHHによって構成されているとすることができる。したがって、本発明のVHHライブラリーを用いることによって、任意の抗原に対する結合親和性を有するVHHを自由に得ることができる。

一般に免疫感作しないラクダ科動物からは、強い免疫原性を有する抗原に対する結合親和性を有するVHHしか得られないと考えられていた。しかし本発明者らは、ライブラリーのレパートリーサイズを大きくすることによって、幅広い機能を有するVHHを自由に得ることができるVHHライブラリーを実現した。免疫感作を必要とせず、しかも公知のライブラリーよりもはるかに多様性に富むライブラリーを実現し

た点で、本発明はVHHの産業的な利用に大きく貢献する。

一方、公知のライブラリーの作製方法は、1個体における*in vivo*のVHHレパートリーサイズが制限、あるいは偏ることがまったく考慮されていなかった。その結果、公知の方法によって構築されたVHHライブラリーの多様性は、生体におけるVHH領域の多様性を反映していなかった。このことは、表1に分類した多くのVHHのクラスが、本発明のライブラリーから見出された新規な構造的特徴を有していることから明らかである。人為的に変異を導入してライブラリーの多様性を増す方法は公知である。しかし人為的に変異を導入する方法は、活性な抗体の生成に伴って、遥かに多くの不活性な抗体を多く生み出す非効率性を伴っていた。結局公知の方法に基づくVHHライブラリーは、活性なVHHからなり、かつ多様性に富んでいなければならないという、VHHライブラリーに求められる特性を満たしていなかった。

VHHは、一般に用いられているIgGを構成するVHに比べて、溶解性や安定性などの点において、優れた特性を有している。更にVHHには、VHで構成されたIgGでは得ることが難しい結合活性を期待することができる。しかし本発明者らの知見によれば、VHHの1個体における*in vivo*のレパートリーサイズは制限されている。したがって、公知のライブラリーの作製手法に基づいてライブラリーを作製している限り、VHHのライブラリーのレパートリーサイズは、1個体における*in vivo*のレパートリーサイズを越えられない。つまり、VHHには様々な有用性が期待されつつも、公知のVHHライブラリーを利用した場合には、希望する機能を有するVHHを得られる可能性は極めて低いといわざるを得なかった。

本発明は、1個体における*in vivo*のレパートリーサイズを超える多様性を持つVHHライブラリーの提供を通じて、産業上有用なVHHを自由に取得することを可能とした。言い換えれば、本発明のライブラリーによって、はじめて希望する機能を有するVHHの取得が可能となった。

このことは、実施例において、酵素活性を調節する機能を有するVHHが容易に選択されていることから明らかである。しかも実施例においては、複数の酵素に対

- 74 -

して多様な影響を与える複数のVHHが選択されている。このような多様な機能を有するVHHを容易に選択できるのは、VHHがVHとは異なる活性を有していることに加えて、本発明のライブラリーが高度な多様性を有しているからに他ならない。

更に本発明によって提供された、IgM由来のVHからなるライブラリーは、上記のような多様性を有するVHHライブラリーを更に補完するライブラリーとして有用である。したがって、本発明のIgM由来のVHライブラリーを利用することによって、VHHからでは選択することができない、あるいはポピュレーションが少ないために選択が困難な機能を有する抗体可変領域を選択することができる。

請求の範囲

1. ラクダ科動物生体における可変領域の多様性を維持した、ラクダ科動物由来 VHH のライブラリー。
2. ライブラリーを構成するクローンの任意の 33 クローンを取り出して調べたときに、少なくとも 8 個以上のクラスが含まれる、請求項 1 に記載のライブラリー。
3. ライブラリーを構成するクローンから無作為に十分量のクローンを取り出して調べたときに、少なくとも 6 つの VHH サブファミリーが含まれ、かつ 15 個以上のクラスが含まれる、請求項 2 に記載のライブラリー。
4. 少なくとも、 10^5 以上の VHH 遺伝子クローンを含む、請求項 1 に記載のライブラリー
5. IgG2、および/または IgG3 のイムノグロブリン遺伝子に由来する VHH 遺伝子クローンで構成された、請求項 1 に記載のライブラリー。
6. VHH 遺伝子の構成比率が 60%以上である請求項 5 に記載のライブラリー。
7. rgdp ライブラリーである請求項 1 に記載のライブラリー
8. 以下の工程を含む、目的とする物質に対する親和性を有する VHH をコードする遺伝子の取得方法。
 - (1) 請求項 7 に記載のライブラリーを、目的とする物質に接触させる工程、および
 - (2) 目的とする物質に結合する VHH を有するクローンを選択する工程
9. 目的とする物質が酵素分子またはその断片である請求項 8 に記載の方法。
10. 次の工程を含む、酵素活性を調節する作用を有する VHH を取得する方法。
 - (1) 請求項 9 に記載の方法によって、酵素に結合する VHH を取得する工程、
 - (2) 工程 (1) で取得された VHH を当該酵素と接触させる工程、および
 - (3) VHH を接触させない場合と比較して、当該酵素の酵素活性を変化させ

る作用を有する VHH を選択する工程

- 1 1. 請求項 8 または請求項 1 0 に記載の方法によって選択された VHH をコードする遺伝子。
- 1 2. 次の工程を含む、ラクダ科動物由来 VHH を可変領域として有するイムノグロブリンまたはその断片の製造方法。
 - (1) 請求項 8 に記載の方法によって目的とする物質に対する結合活性を有する VHH をコードする遺伝子を取得する工程、
 - (2) 得られた VHH をコードする遺伝子を、宿主細胞において発現可能なベクターに組み込んで VHH 発現ベクターとする工程、および
 - (3) VHH 発現ベクターを宿主細胞に導入し、その培養物から VHH を含む蛋白質を回収する工程
- 1 3. 次の工程を含む、VHH ライブラリーの作製方法。
 - (1) ラクダ科動物に属する動物種の複数の個体から VHH 遺伝子を取得する工程、および
 - (2) 工程 (1) で取得した VHH 遺伝子を混合してライブラリーとする工程
- 1 4. 工程 (1) で取得した VHH 遺伝子を増幅する工程を含む請求項 1 3 に記載の方法。
- 1 5. PCR 法によって増幅する請求項 1 4 に記載の方法。
- 1 6. 増幅産物が指数増殖を示しているときに PCR 法の増幅産物を回収する工程を含む請求項 1 5 に記載の方法。
- 1 7. ラクダ科動物がヒトコブラクダであり、配列番号：1～配列番号：6 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの 5' 側プライマー、および配列番号：1 0 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる 3' 側プライマーからなるプライマーセットを用い、各プライマーセットによる増幅産物を混合する工程を含む請求項 1 5 に記載の方法。
- 1 8. ラクダ科動物がヒトコブラクダであり、配列番号：1～配列番号：6 に記

- 77 -

- 載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの 5' 側プライマー、および配列番号：11に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる 3' 側プライマーからなるプライマーセットを用い、各プライマーセットによる増幅産物を混合する工程を含む請求項15に記載の方法。
19. 制限酵素 SfiI および AscI で消化した増幅産物を次の性状(i)および(ii)を有するベクターにライゲーションする工程を含む請求項17または請求項18に記載の方法。
- (i) SfiI サイトおよび AscI サイトを有する、および
- (ii) 適当な宿主に形質転換することによって上記サイトに挿入された外来性遺伝子がコードする蛋白質をファージを構成する蛋白質との融合蛋白質として発現する
20. 請求項17または請求項18に記載の方法によって作製することができる VHH ライブラリー。
21. 配列番号：1～配列番号：6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択された 5' 側プライマーと、配列番号：10または配列番号：11、に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択された 3' 側プライマーからなるラクダの VHH 遺伝子増幅用のプライマーセット。
22. 次の工程を含む、VH ライブラリーの製造方法。
- (1) ラクダ科動物に属する動物種の複数の個体から VH 遺伝子を取得する工程、および
- (2) 工程(1)で取得した VH 遺伝子を混合してライブラリーとする工程
23. 工程(1)で取得した VH 遺伝子を増幅する工程を含む請求項22に記載の方法。
24. PCR 法によって増幅する請求項23に記載の方法。
25. 増幅産物が指数増殖を示しているときに PCR 法の増幅産物を回収する工程を含む請求項24に記載の方法。

- 78 -

26. ラクダ科動物がヒトコブラクダであり、配列番号：1～配列番号：6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの5'側プライマー、および配列番号：41に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる3'側プライマーからなるプライマーセットを用い、各プライマーセットによる増幅産物を混合する工程を含む請求項24に記載の方法。
27. 制限酵素 SfiI および AscI で消化した増幅産物を次の性状(i)および(ii)を有するベクターにライゲーションする工程を含む請求項26に記載の方法。
- (i) SfiI サイトおよび AscI サイトを有する、および
 - (ii) 適当な宿主に形質転換することによって上記サイトに挿入された外来性遺伝子がコードする蛋白質をファージを構成する蛋白質との融合蛋白質として発現する
28. ラクダ科動物の IgM 由来の VH のライブラリー。
29. 請求項22に記載の方法によって得ることができる VH のライブラリー。
30. rgdp ライブラリーである請求項28または請求項29に記載のライブラリー。
31. 以下の工程を含む、目的とする物質に対する親和性を有する VH をコードする遺伝子の取得方法。
- (1) 請求項30に記載のライブラリーを、目的とする物質に接触させる工程、および
 - (2) 目的とする物質に結合する VH を有するクローンを選択する工程
32. 目的とする物質が酵素分子またはその断片である請求項31に記載の方法。
33. 次の工程を含む、酵素活性を調節する作用を有する VH を取得する方法。
- (1) 請求項31に記載の方法によって、酵素に結合する VH を取得する工程、
 - (2) 工程(1)で取得された VH を当該酵素と接触させる工程、および

(3) VH を接触させない場合と比較して、当該酵素の酵素活性を変化させる作用を有する VH を選択する工程

34. 請求項31に記載の方法によって選択された VH をコードする遺伝子。

35. 次の工程を含む、ヒトコブラクダ由来 VH を可変領域として有するイムノグロブリンまたはその断片の製造方法。

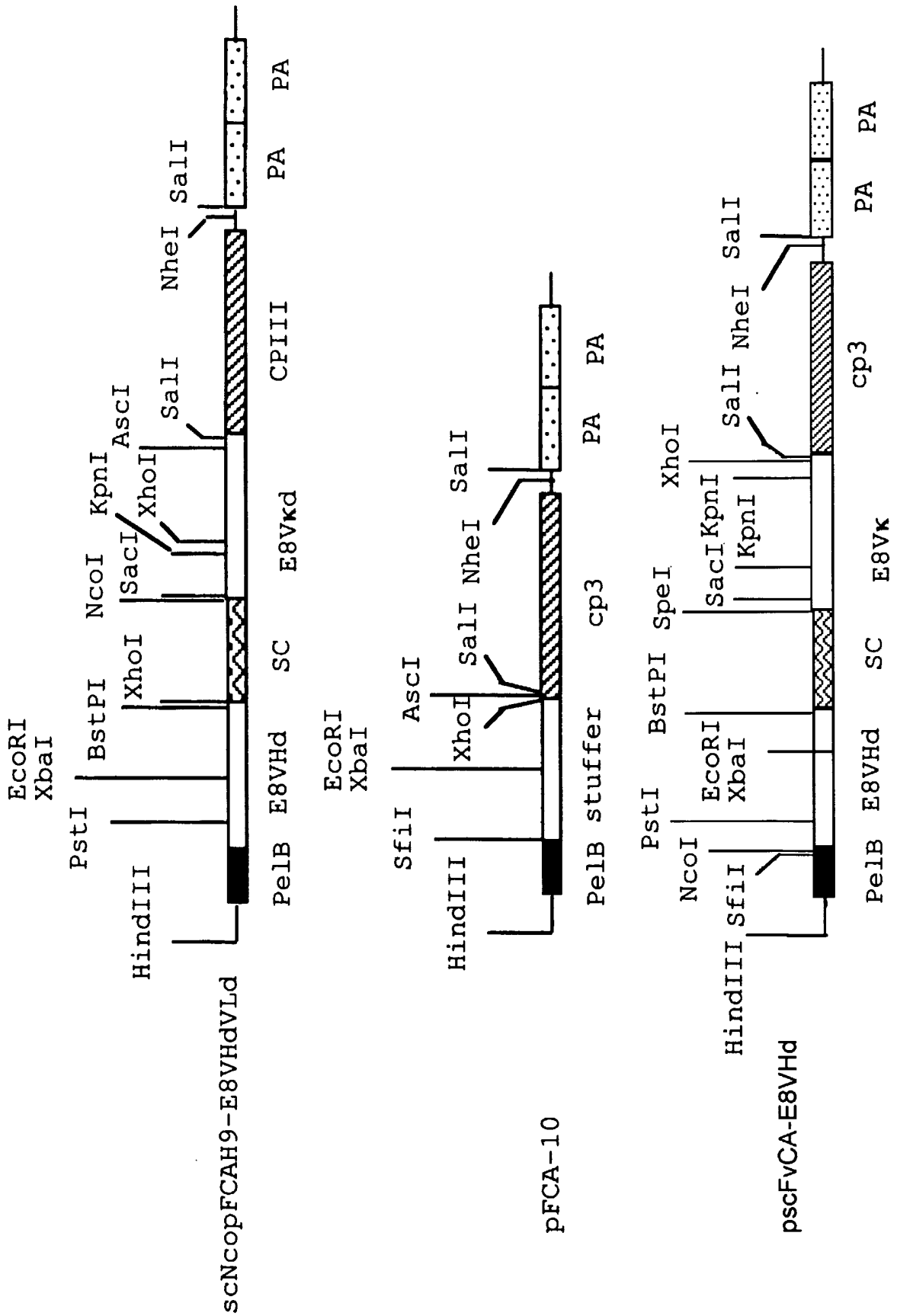
(1) 請求項31に記載の方法によって目的とする物質に対する結合活性を有する VH をコードする遺伝子を取得する工程、

(2) 得られた VH をコードする遺伝子を、宿主細胞において発現可能なベクターに組み込んで VH 発現ベクターとする工程、および

(3) VH 発現ベクターを宿主細胞に導入し、その培養物から VH を含む蛋白質を回収する工程

36. 配列番号：1～配列番号：6に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから選択されたいずれかの5'側プライマー、および配列番号：41に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる3'側プライマーからなるヒトコブラクダ VH 遺伝子増幅用プライマーセット。

☒ 1



☒ 2

M K Y L L P T A A A G
AAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
HindIII
L L L L A A Q P A M A E V Q L Q Q S G A E L V K
TTGTTACTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG
SfiI PstI
P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V
CCAGGGCCTCAGTCAAGTTGCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTG
K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGTCTAGAATTCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA
XbaI EcoRI
D Y G N F D Y W G Q G T T V R V S R G A R Q S T
TGATTACGGCACTTTGACTACTGGGGCAAGGCACCACGGTCAGGGTCTCGAGAGGGGCGCGCCAGTCGAC
XhoI AscI SalI
P F V C E Y Q G Q S S D
TCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTG
L P Q P P V N A G G G S G G G S G G G S E G G G
ACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTG
S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G D
GCTCTGAGGGTGGCGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTG
F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L Q
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTAC
S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G D
AGTCAGACGCTAAAGGCCAACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGATGGTTTCATTGGTG
V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q V
ACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTACTGGTGATTTTGGTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAG
G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V E
TCGGTGACGGTGATAATCACCTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTCCCTCCCTCAATCGGTTG
C R P F V F G A G K P Y E F S I D C D K I N L F
AATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAATTAT
R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I L
TCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGATTTTCTACGTTTGCTAACATAC
R N K E S * S T A Q H D E A
TGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTCTTTTTGGGTGCTAGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCC
NheI SalI
V D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E
GTAGACAACAAATCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAA
E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A
GAACAACGAAACGCTTCATCCAAAGTTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCT
K K L N D A Q A P K V D N K F N K E Q Q N A F Y
AAAAAGCTAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTAT
E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCTTCATCCAAAGTTTAAAGATGACCCA
S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D A N
AGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAGCTAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAAT
*
TAGCTGGGAATTAATTC

図 3

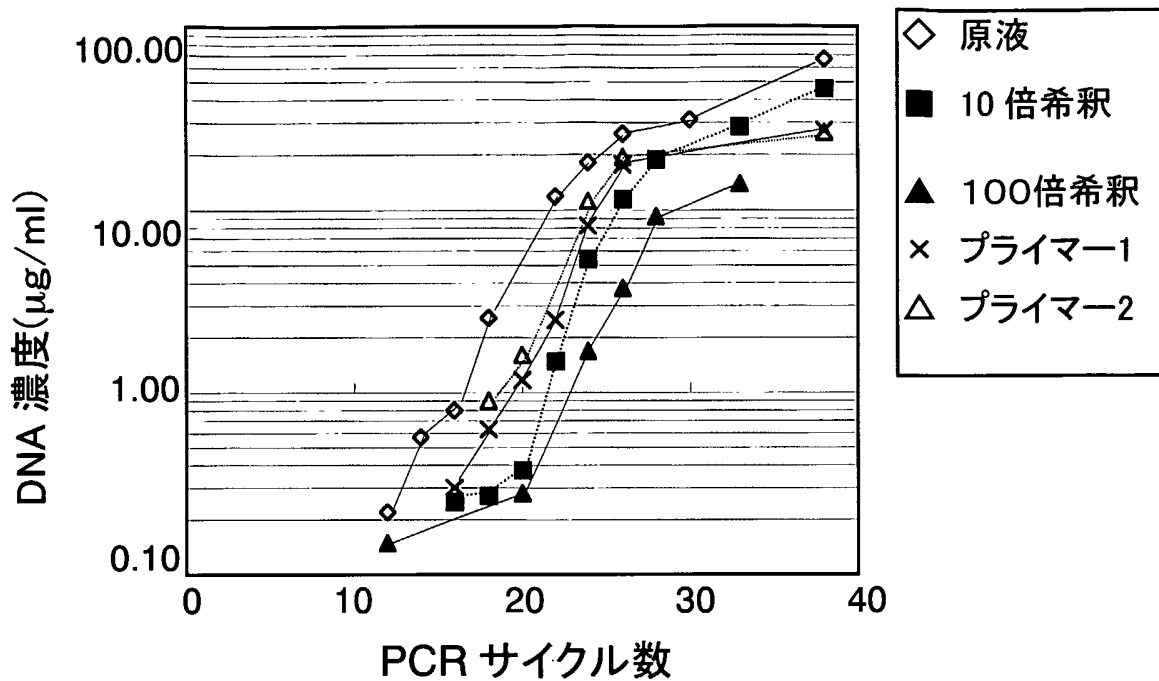
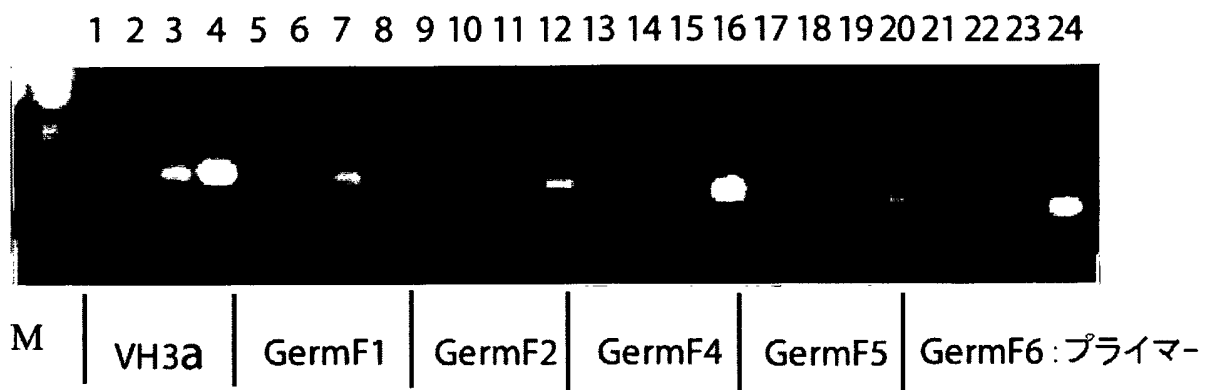
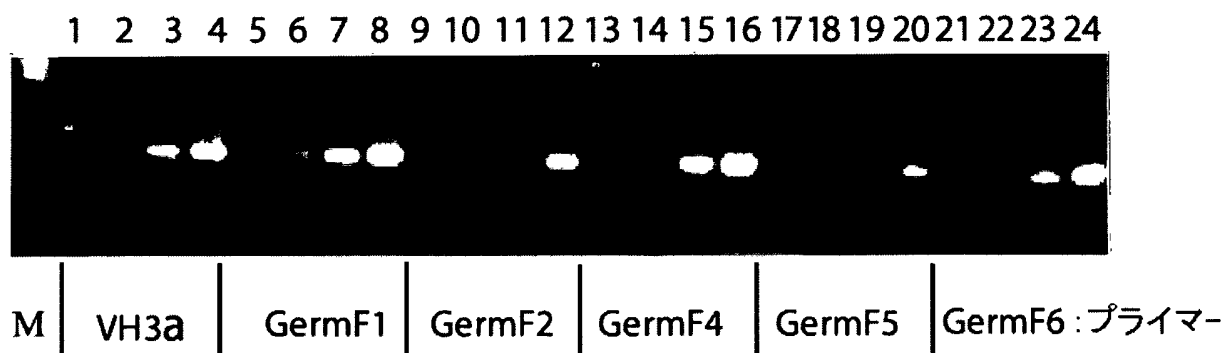


図 4

IgG2



IgG3



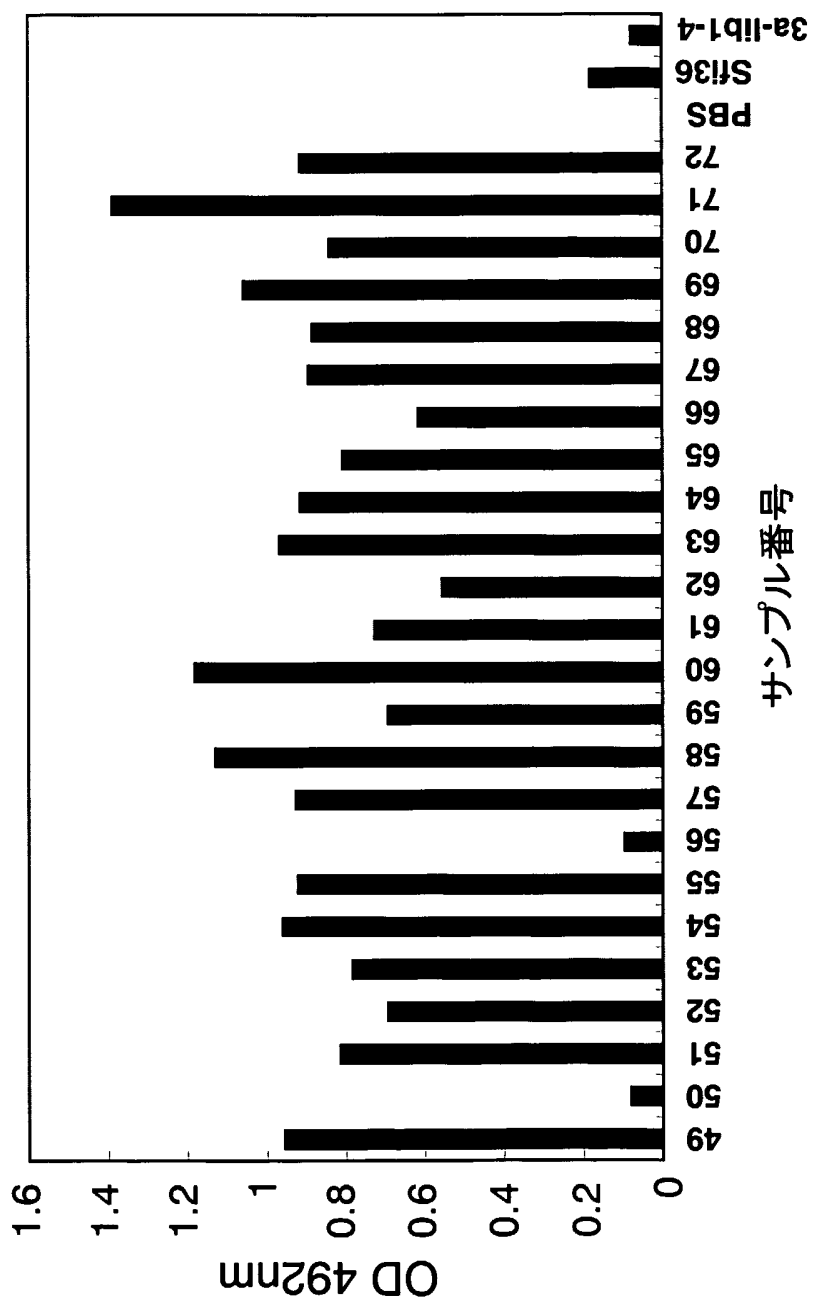
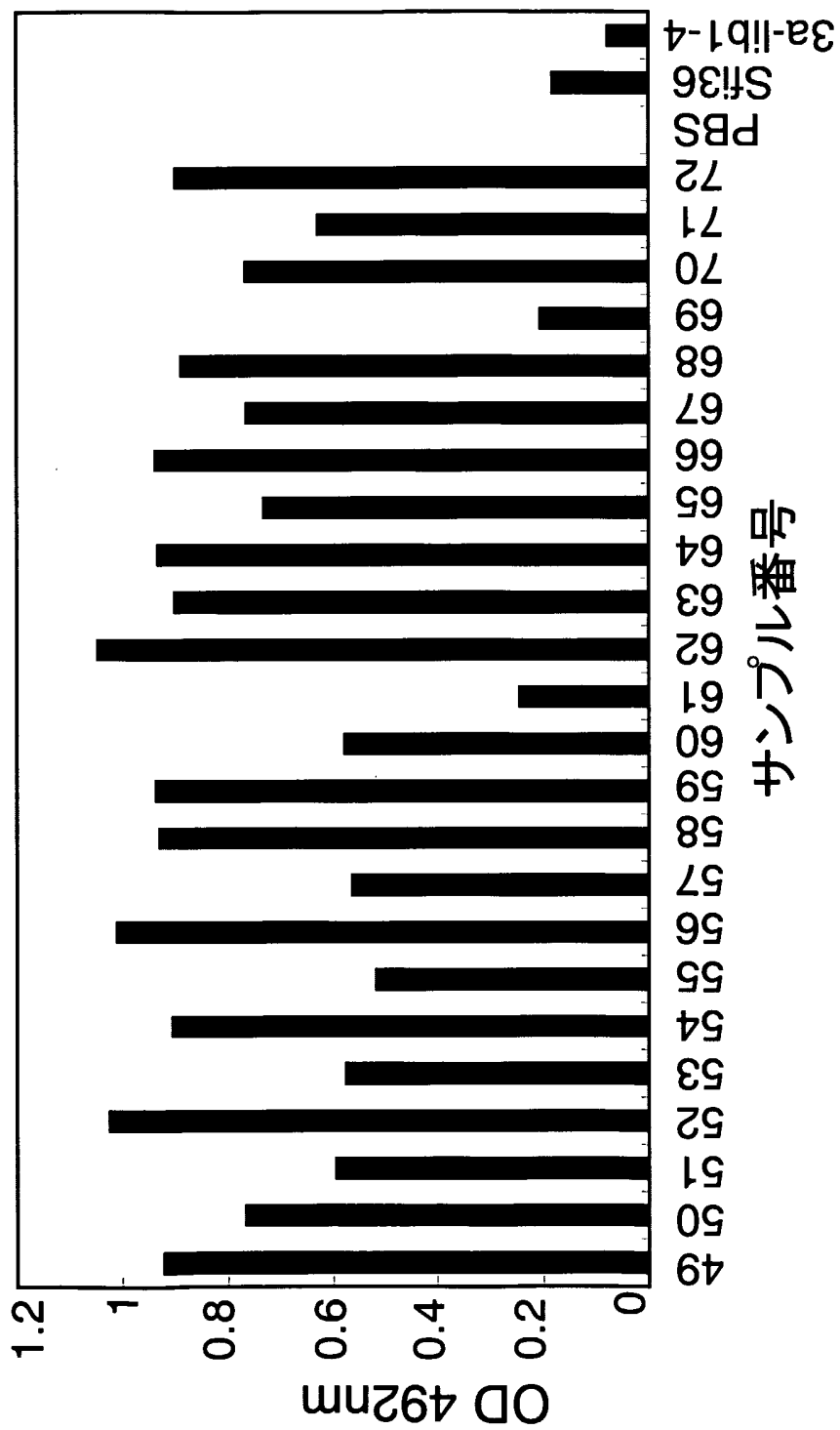
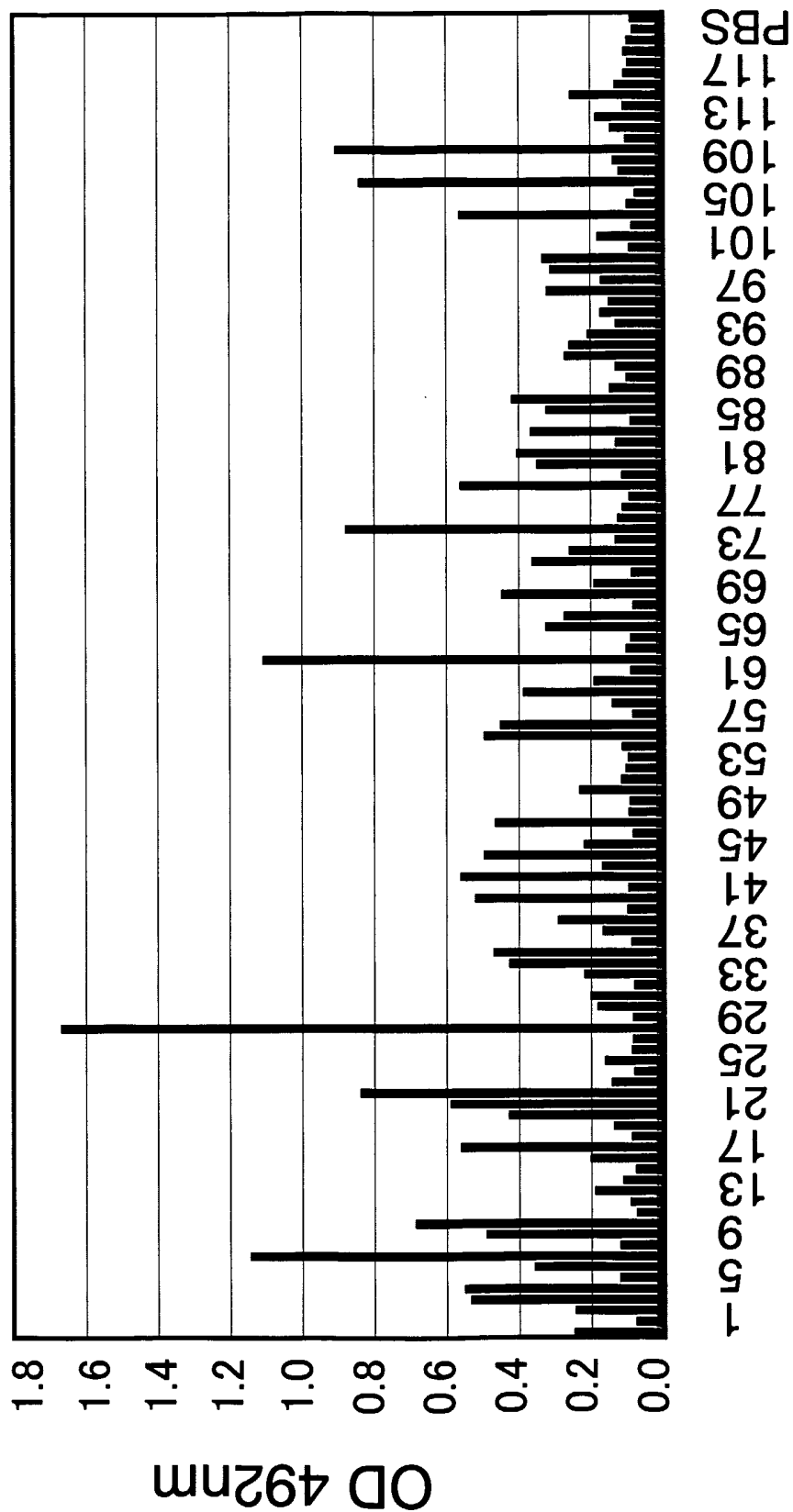


図 5





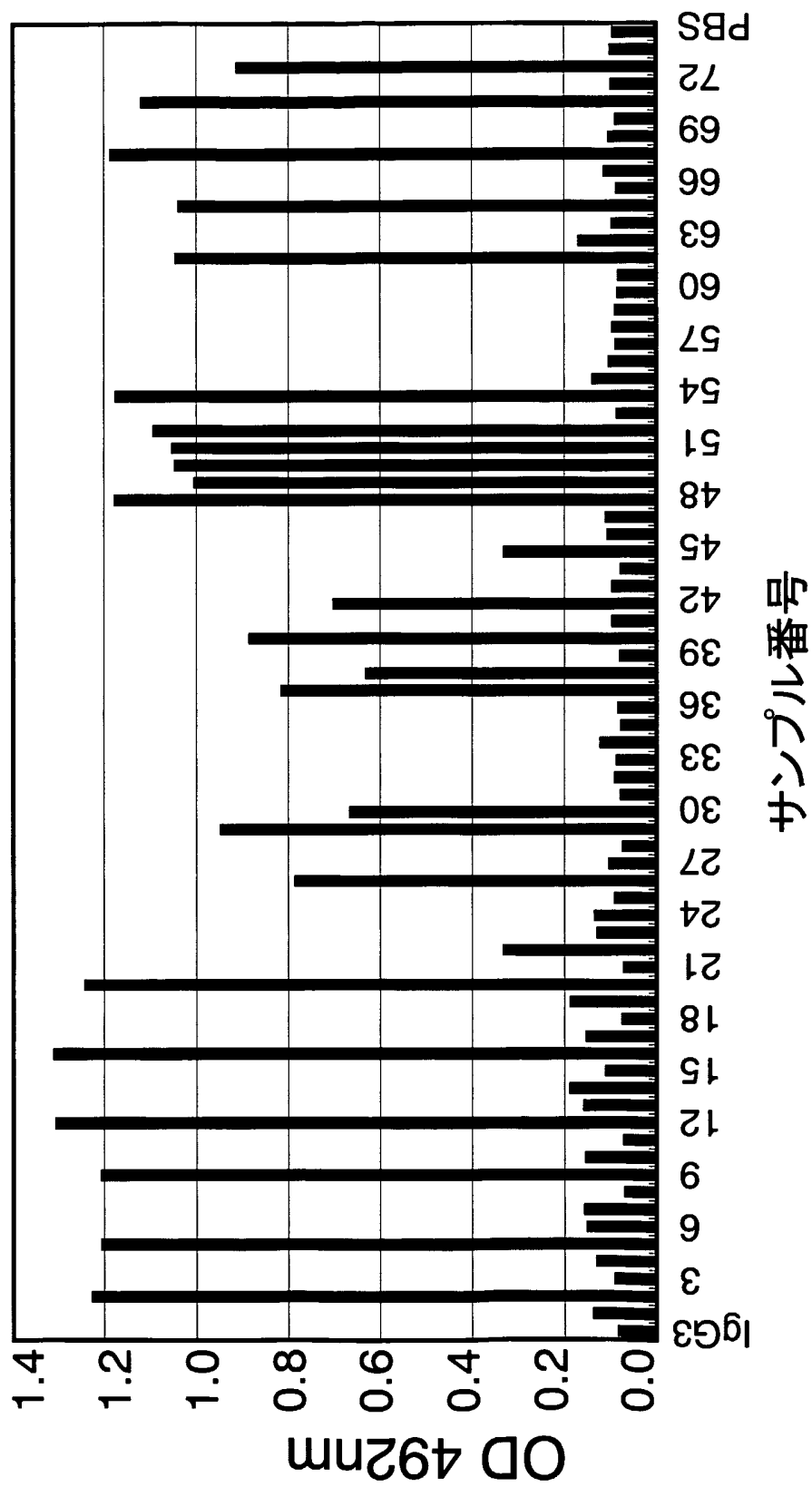


図 9

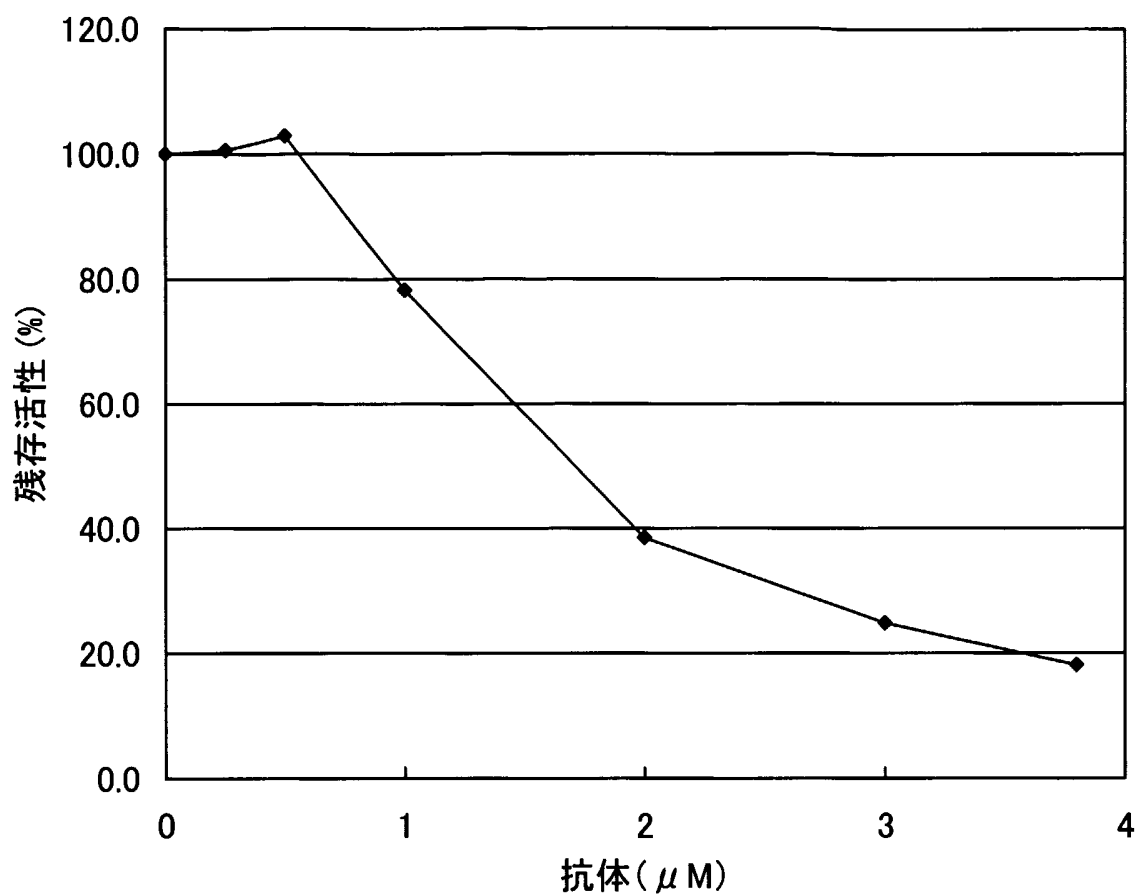
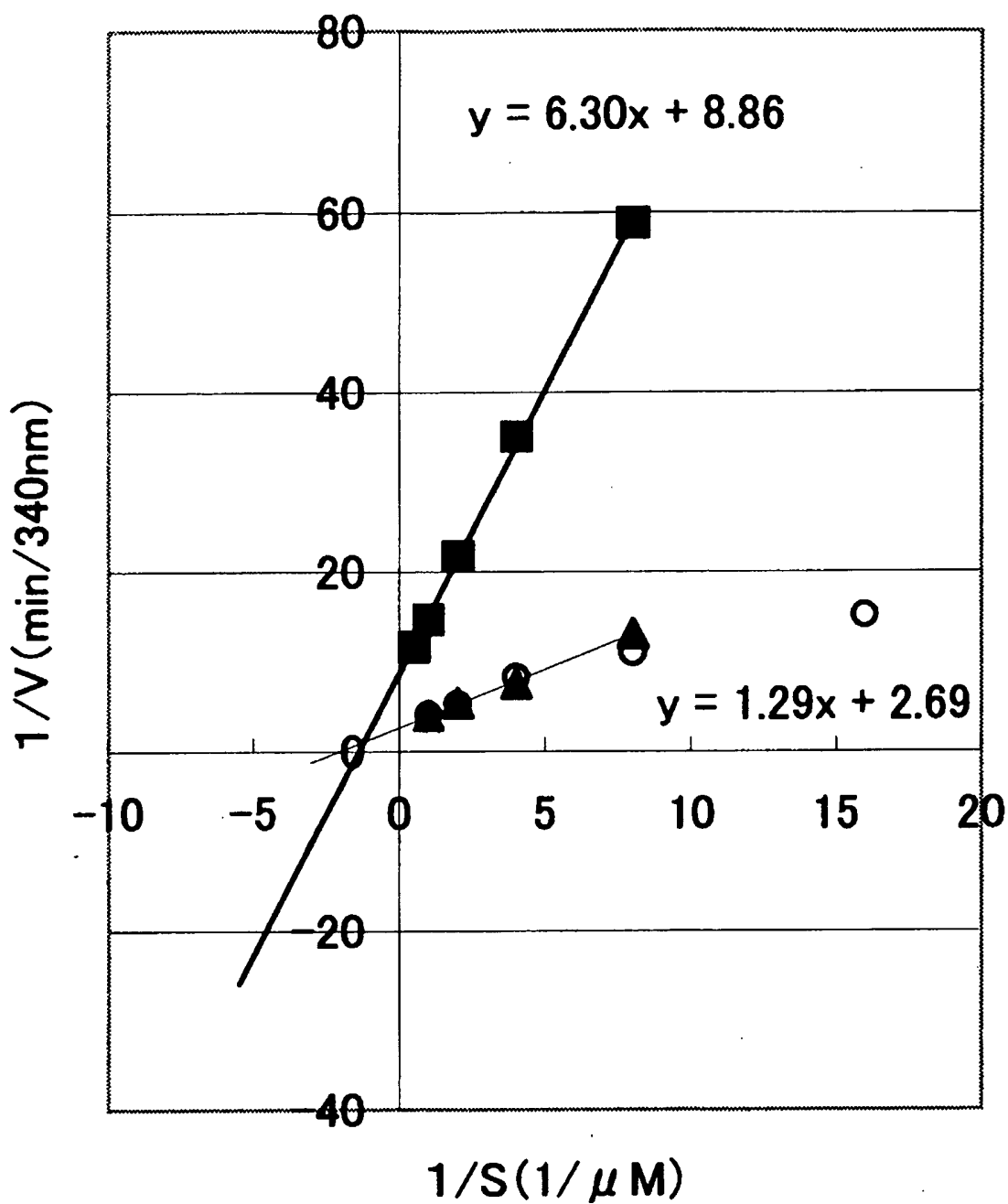
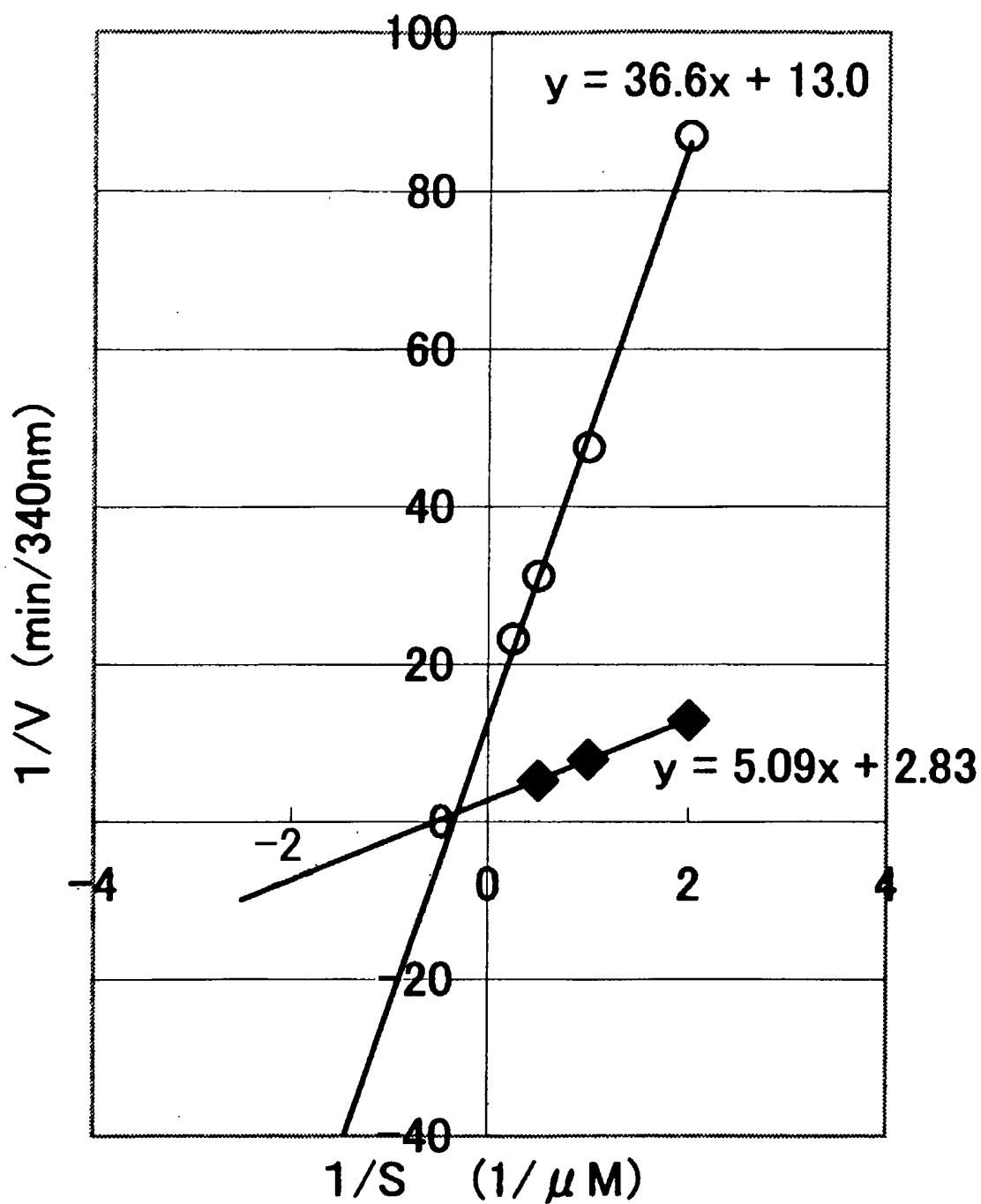


図 10



- 酵素1 μg 、No.75抗体2 μM / 反応液
- ▲ 酵素のみ1 μg / 反応液
- 酵素1 μg 、No.29抗体5.3 μM / 反応液

図 1 1



◆ 酵素1 μg のみ / 反応液
 ○ 酵素1 μg 、抗体2 μM / 反応液

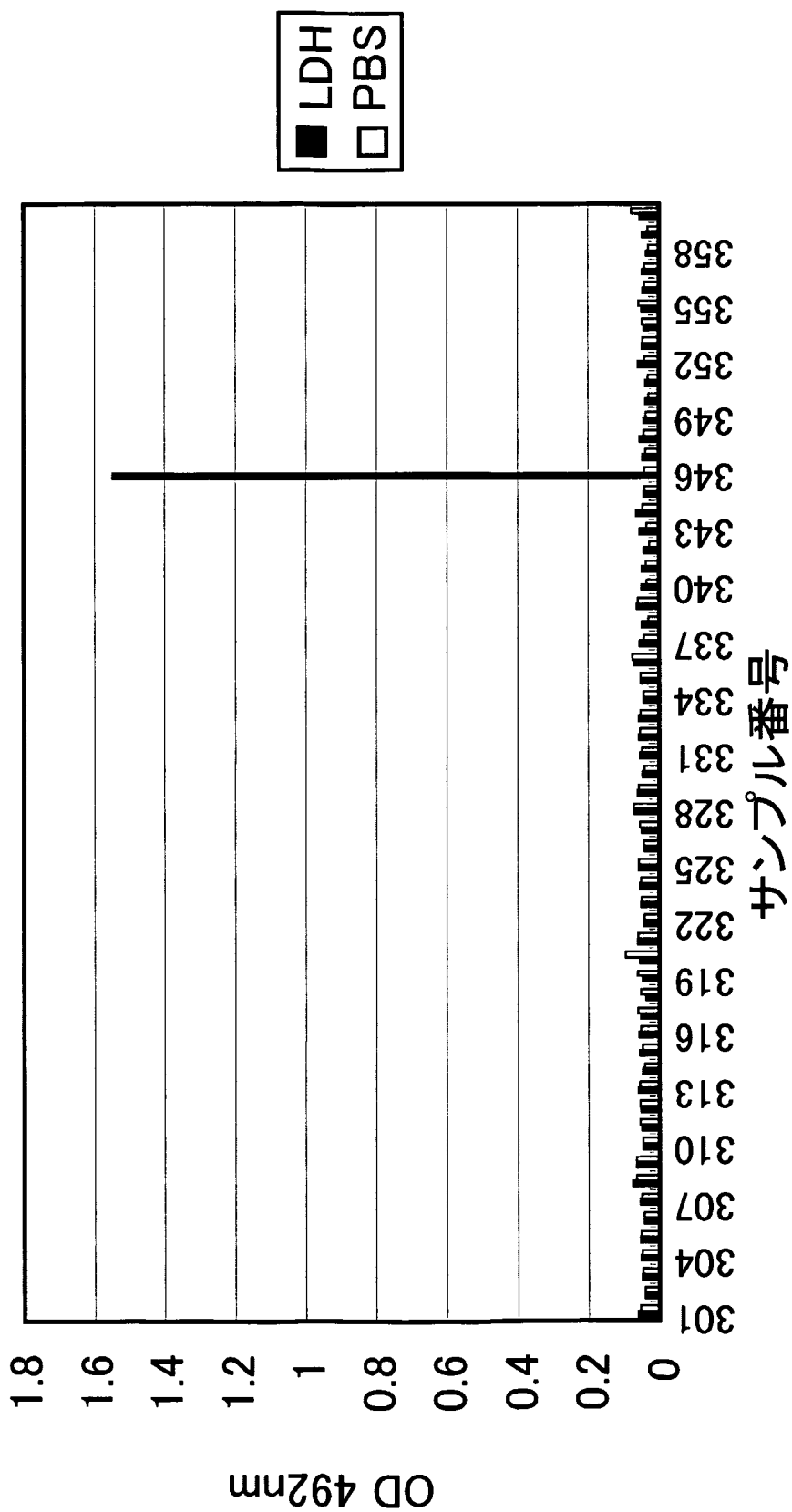


図12

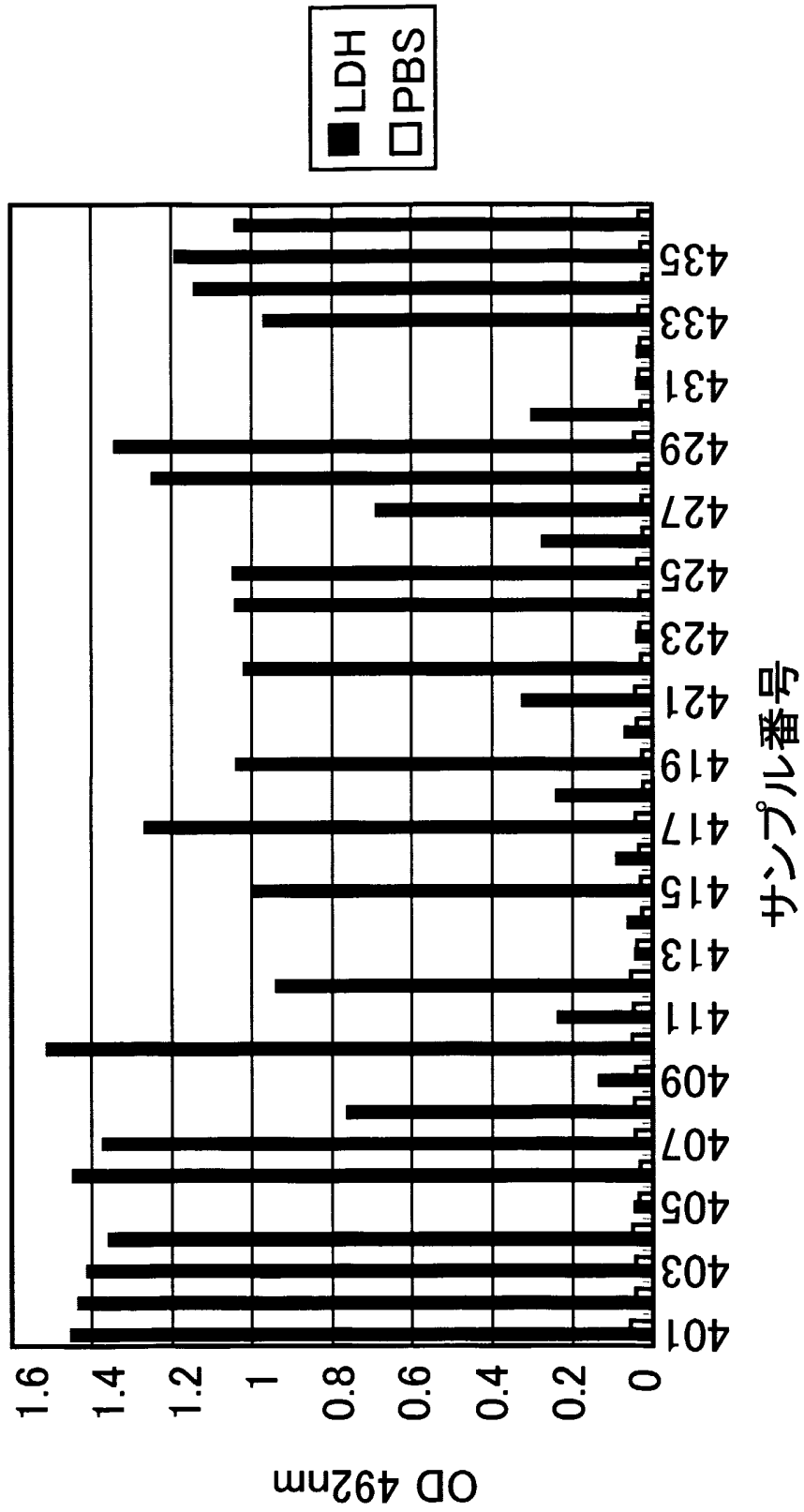
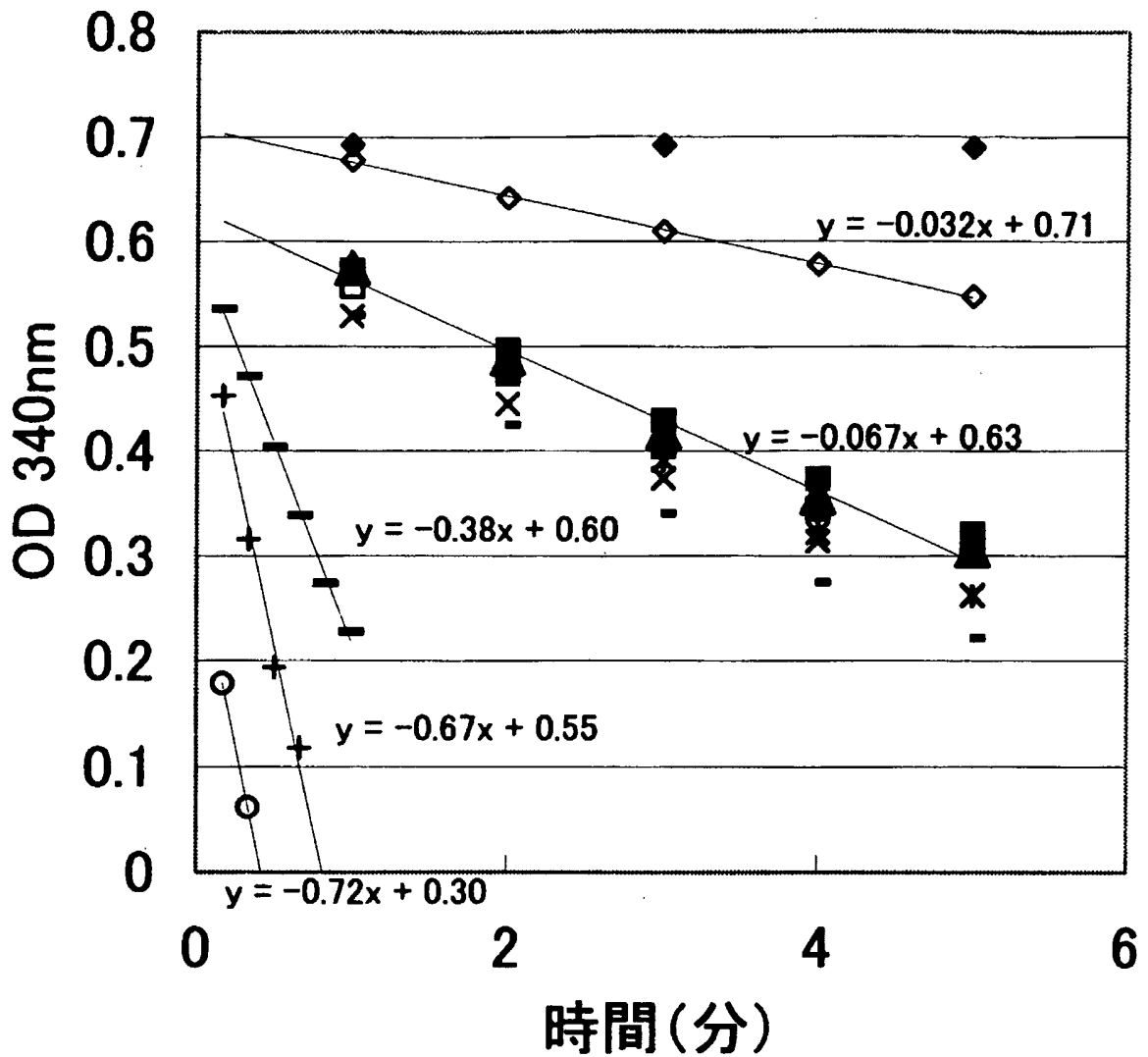
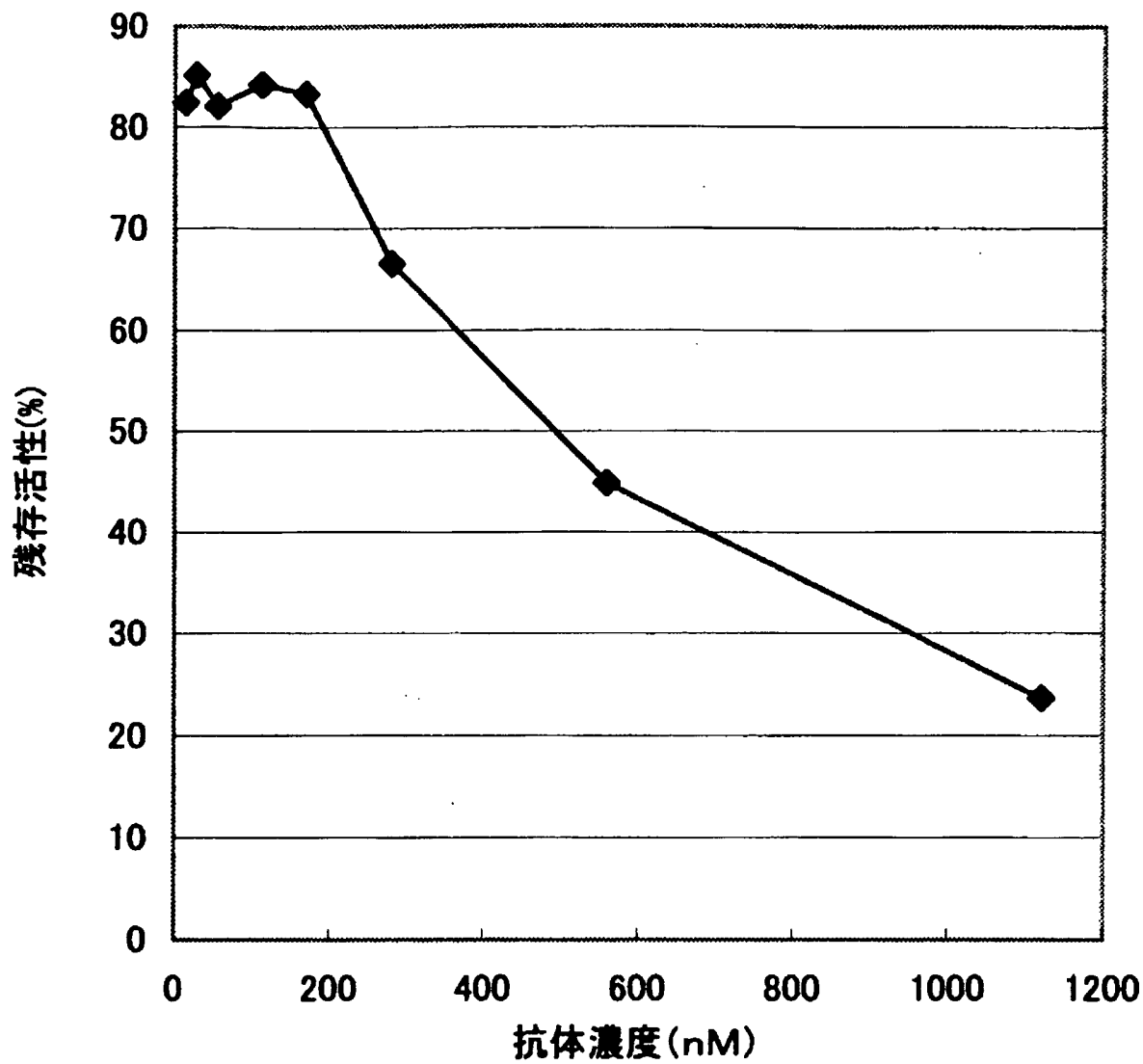


図 14



◆ blank	+ 421
■ 酵素のみ	- 426
▲ GST No.29	— 428
× 407	◇ 430
* 415	□ 434
○ 418	

図 15



☒ 16

M K Y L L P T A A A G

AAGCTTGCATGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGG
HindIII

L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K
 TTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAA
PstI

P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V
 CCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT

K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y
 AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTT
XbaI EcoRI

D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G
 TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCGAGAGGGCGGTGGCGGATCAG
BstPI XhoI

G G G S G G G G S M A
 TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGGTCCATGGCC
NcoI

D I E L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T
 GACATCGAGCTCACCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCA
SacI

C R A S G N I H N Y L A ----- K L E I K R A D A
 ATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTACCAAGCTCGAGATCAAACGGGCTGATGCT
KpnI XhoI

P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F
 CACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTC

N S F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V
 TGAACAGCTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTC

N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K
 TGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAG

E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K
 ACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAG

☒ 17

F N R N E C S A R Q S T P F V C E Y Q G Q S S
GCTTCAACAGGAATGAGTGTTCGGCGCGCCAGTCGACTCCATTTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCT

AscI SalI

L P Q P P V N A G G G S G G G S G G G S E G G
ACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGT

S E G G G S E G G G S E G G G S G G G S G S G
GCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCGGT

F D Y E K M A N A N K G A M T E N A D E N A L
ATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTA

S D A K G K L D S V A T D Y G A A I D G F I G
AGTCAGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCTGCTACTGATTACGGTGTCTATCGATGGTTTCATTGGT

V S G L A N G N G A T G D F A G S N S Q M A Q
ACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGTACTGGTGAATTTGCTGGCTCTAATTCCAAATGGCTCAA

G D G D N S P L M N N F R Q Y L P S L P Q S V
TCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTCCCTCCCTCAATCGGTT

C R P F V F G A G K P Y E F S I D C D K I N L
AATGTGCGCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTA

R G V F A F L L Y V A T F M Y V F S T F A N I
TCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATA

R N K E S * S T A Q H D E A
TGC GTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCCTTTTGGGTGCTAGCTGTCTGACTGCGCAACACGATGAAGC

NheI SalI

V D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E
GTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGA

E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A
GAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGC

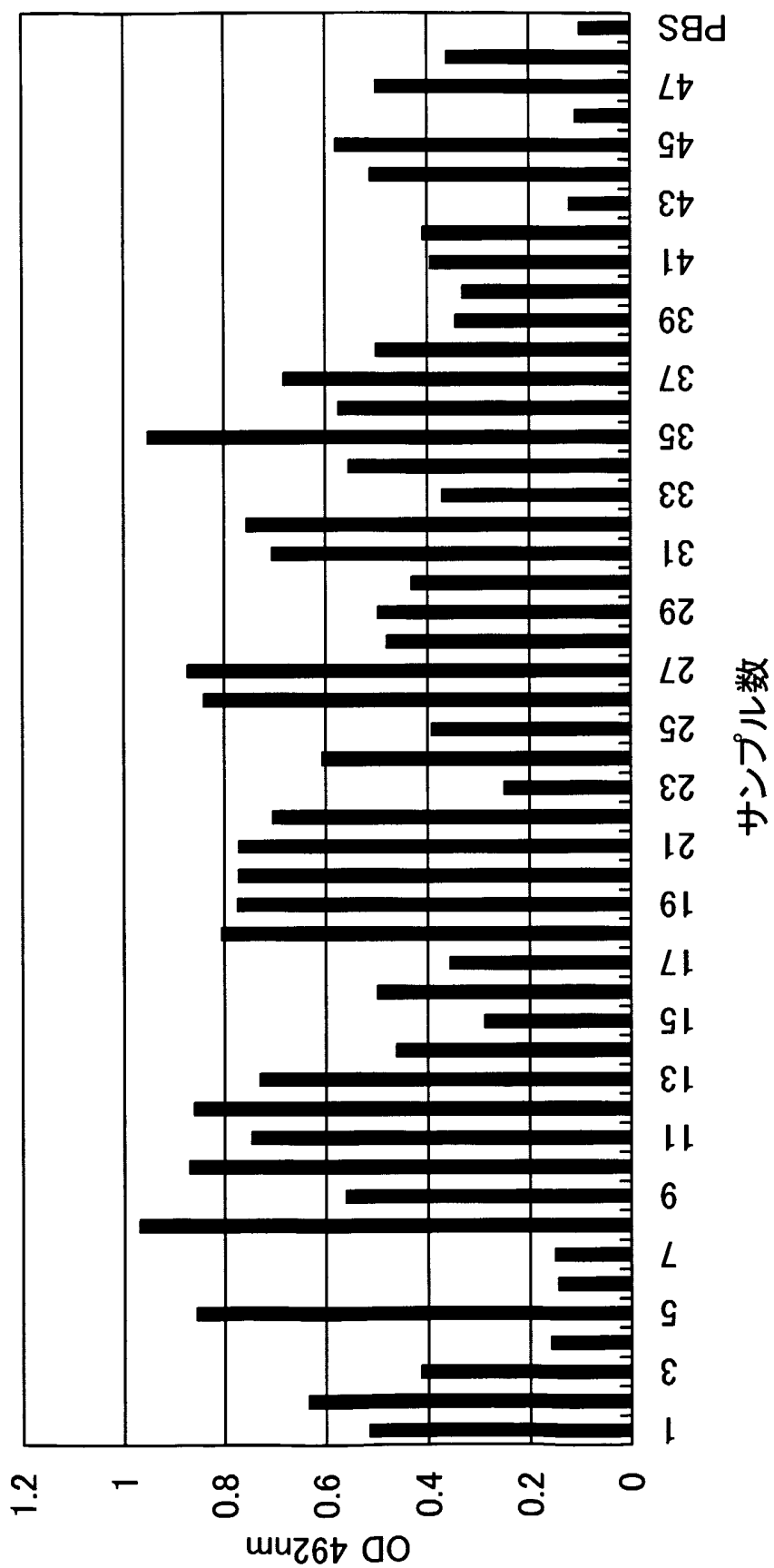
K K L N D A Q A P K V D N K F N K E Q Q N A F Y
AAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTA

E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCC

S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D A N
AGCCAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAA

*
TAGCTGGGAATTAATTC

図 18



☒ 19

M K Y L L P T A A A G

AAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA
HindIII

L L L L A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E L V K
TTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG
SfiI NcoI PstI

P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y M H W V
 CCAGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTG

K Q R P E K G ----- L T S E D T A V Y Y C A G Y
AAGCAGAGGCCTGAAAAGGGTCTAGAATTCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTGGTTA
XbaI EcoRI

D Y G N F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G
 TGATTACGGCAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGCGGATCAGG
BstPI

G G G S G G G G S T S D I E L T Q S P A S L S A
TGGCGGTGGAAGTGGCGGTGGTGGTCTACTAGTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGC
SpeI SacI

S V G E T V T I T C R A S G N I H N Y L A W Y Q
 GTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTACCA
KpnI

Q K P G K S P Q L L V Y N A K T L A D G V P S R
 GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG

F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G S
GTTCAGTGGCAGTGGATCCGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAG
BamHI

Y Y C Q H F W S T P W T F G G G T K I E S T P F
 TTATTACTGTCAACATTTTGGAGTACTCCGTGGACGTTGGTGGAGGTACCAAGCTCGAGTCGACTCCATT
KpnI XhoI SalI

V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G S G G
 CGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGGCTCTGGTGG

G S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G
 TGGTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG

☒ 20

G S G G G S G S G D F D Y E K M A N A N K G A M
 CGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTAT
 T E N A D E N A L Q S D A K G K L D S V A T D Y
 GACCGAAAATGCCGATGAAAACGCCCTACAGTCAGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTGCTACTGATTA
 G A A I D G F I G D V S G L A N G N G A T G D F
 CGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATT
 A G S N S Q M A Q V G D G D N S P L M N N F R Q
 TGCTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTC
 Y L P S L P Q S V E C R P F V F G A G K P Y E F
 ATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTGCGCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATT
 S I D C D K I N L F R G V F A F L L Y V A T F M
 TTCTATTGATTGTGACAAAATAAECTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTAT
 Y V F S T F A N I L R N K E S *
 GTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTGCT

NheI

S T A Q H D E A V D N K F N K E Q Q N A F Y E
AGCTGTCGACTGCGCAACACGATGAAGCCGTAGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATG

SaI

I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D P S
 AGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCAAAGTTTAAAGATGACCCAA

Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D N K F
 GCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAT

N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R N A
 GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCAAAGTTTAAAGATGACCCA

F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A K K L N D
 TCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATG

A Q A P K V D A N *
 ATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTAGCTGGGAATTAATT

1 / 3 2

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUTE FOR ANTIBODIES CO., LTD.

<120> A method for preparing of camel antibody library.

<130> M3-A0102P

<140>

<141>

<150> JP 2001-277765

<151> 2001-09-13

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

2 / 3 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (18)

<223> SfiI site

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (27)

<223> SfiI site

<400> 1

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaggtgc agctggtgga gtctgg 56

<210> 2

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (18)

3 / 3 2

<223> SfiI site

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (27)

<223> SfiI site

<400> 2

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtc agctggtgga gtctgg 56

<210> 3

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (18)

<223> SfiI site

<220>

4 / 3 2

<221> misc_feature

<222> (24).. (27)

<223> SfiI site

<400> 3

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccaggtaa agctggagga gtctgg 56

<210> 4

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (18)

<223> SfiI site

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (27)

<223> SfiI site

5 / 3 2

<400> 4

gtcctcgcaa ctgcgggccca gccggccatg gccgatgtgc agctggtgga gtctgg 56

<210> 5

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (18)

<223> SfiI site

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (27)

<223> SfiI site

<400> 5

gtcctcgcaa ctgcgggccca gccggccatg gccgccgtgc agctggtgga ttctgg 56

6 / 3 2

<210> 6

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (18)

<223> SfiI site

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (27)

<223> SfiI site

<400> 6

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgcggtgc agctggtgga gtctgg

56

<210> 7

7 / 3 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 7

Glu Pro His Gly Gly Cys Pro Cys Pro Lys Cys Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 35

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 8

Glu Pro Lys Ile Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln

1 5 10 15

Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu Cys Thr Cys Pro

20 25 30

Lys Cys Pro

35

<210> 9

8 / 3 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 9

Gly Thr Asn Glu Val Cys Lys Cys Pro Lys Cys Pro

1

5

10

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

aaggcgcgcc ccttgggta tcttgggttc tg

32

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

9 / 3 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

aaggcgcgcc cctgatactt cattcggtcc tgavgag

37

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

aacagctatg accatg

16

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10 / 32

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

cgactgaagg cgcgcccctc tcgagaccct gaccgtggtg cc 42

<210> 14

<211> 378

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 14

gcggtgcagt tggtggagtc tgggggaggc tcggtgcaga cgggagggtc tctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggaga cacctccagt accaactgca tggcctggtt gcgccagcgt 120
ccaggggaagg agcgcgaggg ggtcgccat atttatactc gtgacggtag aatatactat 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca aggccaagaa tgaggtgtat 240
ttgcaaatga acggcctgaa acctgaggac actgcatgt actactgtgc agcagttagt 300
ggtcgtgcat attgtagtgg aatgtcaata tatggggata gcgatttggg ccaggggacc 360
caggtcaccg tctcctca 378

<210> 15

<211> 126

1 1 / 3 2

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 15

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Thr Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Ser Ser Thr Asn

20 25 30

Cys Met Ala Trp Leu Arg Gln Arg Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ala His Ile Tyr Thr Arg Asp Gly Arg Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Glu Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Val Ser Gly Arg Ala Tyr Cys Ser Gly Met Ser Ile Tyr Gly

100 105 110

Asp Ser Asp Leu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 2 / 3 2

115

120

125

<210> 16

<211> 384

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 16

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ccggagggtc tctgaaactc 60
 tcctgtggac tctctggata caccagcagt atgaacgcca tgggctggtt ccgccaggct 120
 ccagggaagg agcgtgaggg ggtcgccgct gttagtcgtg gtgtaaggc atactacgcc 180
 gactccgtga agggccggtt caccgtctcc cgcgacaatg tcaagaatac agtggatcta 240
 caaatgaagg gcctgaaagc tgaggacacg gccacctatt actgcgcggc aactgacgag 300
 tctcctttac gacgaagatt cagcctcttg gatcggaggc gctatgactg gtggggccgg 360
 gggacccagg tcttcgtctc ttca 384

<210> 17

<211> 128

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1

5

10

15

1 3 / 3 2

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Gly Leu Ser Gly Tyr Thr Ser Ser Met Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Gly Gly Lys Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Val Asp Leu
 65 70 75 80

Gln Met Lys Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ala Thr Asp Glu Ser Pro Leu Arg Arg Arg Phe Ser Leu Leu Asp Arg
 100 105 110

Arg Arg Tyr Asp Trp Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Phe Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 18

<211> 375

<212> DNA

1 4 / 3 2

<213> Camelus dromedarius

<400> 18

gccgtgcagc tgggtggattc tggggggagge tgggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgggac cacatattgt acgtacgaca tagcctggta ccgccaggct 120
 ccagagaagg actacgagtt cgtctcagtt attgatagtg atggtagtac aaggtaacgca 180
 gactccgtga agggccgatt taccatctcc cgagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
 caaatgaaca gtttgaaacc tgaggacacg gcgatgtatt actgtaaac agtttttaag 300
 tcttggtgta gtgacggctt gggtagcagc ttgcetaact actggggcca ggggaccag 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 19

<211> 125

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 19

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Tyr Cys Thr Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Glu Lys Asp Tyr Glu Phe Val
 35 40 45

1 5 / 3 2

Ser Val Ile Asp Ser Asp Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Lys

85

90

95

Thr Val Phe Lys Ser Trp Cys Ser Asp Gly Leu Gly Thr Thr Leu Pro

100

105

110

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 20

<211> 378

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 20

gcgggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcgggtgcaga ctggagggtc tctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggata cacctacagt agcgcgcgca tcggctggtt ccgccaggct 120

ccaggggaagg agcgcgaggg ggtcgcagct atcttgactg atggtgtaac cacatactat 180

16 / 32

gccgacgccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc aatccggact 300
 tccccctaca gtggtgggtg gtttcgcgtt agtcagtata acggctgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 21

<211> 126

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 21

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Ala
 20 25 30

Arg Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Leu Thr Asp Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

17 / 32

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ile Arg Thr Ser Pro Tyr Ser Gly Gly Trp Phe Arg Val Ser Gln

100

105

110

Tyr Asn Gly Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 22

<211> 372

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 22

gatgtgcagc tggaggagtc tgggggaggc tgggagcagg ctggaggttc tctgagactc 60
tcctgtgcag cccctaatat aacctactgt accggcgaca ggagctggta ccgccaggct 120
ccaggaagg agcgcgagtt cgtctcatcg attaataatg atggtacagc aagctacgca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacattg ttaagaaatc ggtctatctg 240
cggatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gcgatgtatt actgtaaaac agacttcgtc 300
gatgttacct ggtgcgcgat aaagttcggg cgtactcact ggggccaggg gaccaggctc 360
accgtctcct ca 372

18 / 32

<210> 23

<211> 124

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 23

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gln Ala Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Pro Asn Ile Thr Tyr Cys Thr Gly

20

25

30

Asp Arg Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35

40

45

Ser Ser Ile Asn Asn Asp Gly Thr Ala Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Ile Val Lys Lys Ser Val Tyr Leu

65

70

75

80

Arg Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Lys

85

90

95

Thr Asp Phe Val Asp Gly Thr Trp Cys Ala Ile Lys Phe Gly Arg Thr

100

105

110

19 / 32

His Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 24

<211> 375

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 24

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tgggtgcagg ctggagattc tctgagactc 60
tcttgtaaaa cctctggatt cacttttgcg aactctgtca tgggtctgga ccgccagggt 120
tcaggaaacg agtgtaaatt ggtctcaagt ataagtactg acggtactac atactattca 180
acttccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtctatttg 240
caaatgaaca atctgaaagc cgaggacacg gccatgtatt actgtgcggc agatttccag 300
gcttctacgg tggggcggtg cgacggatat ggatatgcta aatggggcca ggggaccag 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 25

20 / 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asn Ser

20 25 30

Val Met Val Trp Tyr Arg Gln Gly Ser Gly Asn Glu Cys Lys Leu Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ser Thr Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Ala Asp Phe Gln Ala Ser Thr Val Gly Arg Cys Asp Gly Tyr Gly Tyr

100 105 110

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

2 1 / 3 2

<211> 369

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 26

```

gcggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg caggaggatt tctgagactc 60
tctgtgtag cctctgttaa ttactgcatg gcttggttcc gccaggctcc agggaaggag 120
cgtgaggggg tcgcagcaat taatagagac ggtcgtacta ctgcctacgc cgactccgtg 180
aaggccgat tcaccatctc ccgaggcaac gagaagaaca cgggtgtatct actaatgaac 240
aacctgaaag ccgaggacac ggccacctat tactgtgcgg cctacgtcgg tggtagttac 300
tctgcggta ctttggagaa cgatggatat aagtactggg gccaggggac ccaggtcacc 360
gtctcctca

```

<210> 27

<211> 123

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 27

```

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
  1           5           10          15

Phe Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Val Asn Tyr Cys Met Ala Trp
          20           25           30

```

2 2 / 3 2

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile Asn

35

40

45

Arg Asp Gly Arg Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

50

55

60

Thr Ile Ser Arg Gly Asn Glu Lys Asn Thr Val Tyr Leu Leu Met Asn

65

70

75

80

Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Val

85

90

95

Gly Gly Ser Tyr Ser Cys Gly Thr Leu Glu Asn Asp Gly Tyr Lys Tyr

100

105

110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 28

<211> 372

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 28

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctaagactc 60

2 3 / 3 2

tcctgtgcag cgcctggaaa tacctatagt accaacttga tgggctggtt ccgccaggct 120
 ccaggaagg agcgcgaggg ggtcgcagct atttgctgtg gtcgtggtac cacattctac 180
 gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca acgccaagaa gatggtgtat 240
 ctgcaaatgg agctcctgag gcctgaggac actggcatct actactgtgc aagtgggtca 300
 gtccgcggaa tttggtcggg cacaagtcag tataagtact ggggccaggg gaccaggctc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 29

<211> 124

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly Asn Thr Tyr Ser Thr Asn

20

25

30

Leu Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35

40

45

Ala Ala Ile Cys Cys Gly Arg Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

2 4 / 3 2

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Lys Met Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Glu Leu Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Ser Val Arg Gly Ile Trp Ser Gly Thr Ser Gln Tyr Lys

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 348

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 30

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ccggggggtc tctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt cagcttcagt agaagtggca tgagctgggg ccgccaggct 120
ccaggaagg ggttcgagtg ggtctcgcgt atcagtagtg gtggagccac atggtacgca 180
gattccgtga agggccgatt cagcatttcc agagacaacg ccaagaatac tgtgtatttg 240
caattggaca gcctgaaaac tgaggacacg ggcatgtatt actgtgcagc aagcgatcgg 300
tctggctcga cttaccgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348

25 / 32

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser

20

25

30

Gly Met Ser Trp Gly Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Glu Trp Val

35

40

45

Ser Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Leu Asp Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Ala Ser Asp Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val

2 6 / 3 2

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 381

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 32

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
tcctgtgtag cctcgtcaag cacctacagt ggcaactgca tggcctggtt ccgccaggct 120
ccaggggaagg agcgcgaggg ggtcgcagtt gtttatactg acgatgatac cacatactat 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tccaagaca ccgccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga atagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc aacaagggac 300
gcttggcgac ggattgggtc ctggagagac gtttgcgatt atgactactg gggccagggg 360
accaggtca ccgtctcctc a 381

<210> 33

<211> 127

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

27 / 32

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Ser Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Gly Asn

20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ala Val Val Tyr Thr Asp Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Thr Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Arg Asp Ala Trp Arg Arg Ile Gly Ser Trp Arg Asp Val Ala

100 105 110

Ile Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

28 / 32

<210> 34

<211> 372

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 34

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggata caccagcggc cgcaactaca tggcctggtt ccgccaggct 120
ccaggaagg agcgcgaggg ggtcggacgt atttattcta ccggtggtag cgcgcgctat 180
gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tccaagacc tgtccaacga cacgatgtat 240
ctgcaaatga acaacctgaa acctgaggac actggcatgt actactgtgc agccgggaaa 300
ccctacggtg atatgcttga tgcacgcggg tataagtact ggggccacgg gaccaggtc 360
accgtctcct ca 372
    
```

<210> 35

<211> 124

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 35

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1           5           10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ser Gly Arg Asn
          20           25           30
    
```

29 / 32

Tyr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35

40

45

Gly Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Gly Ser Ala Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Leu Ser Asn Asp Thr Met Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ala Gly Lys Pro Tyr Gly Asp Met Leu Asp Ala Arg Gly Tyr Lys

100

105

110

Tyr Trp Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 36

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30 / 32

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 36

gtcaccgtct cgagaggcgg tggcggatca ggtggcggtg gaagtggcgg tggtaggtcc 60
atggccgaca tcgagct 77

<210> 37

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 37

cgatgtcggc catggacca ccaccgccac ttccaccgcc acctgatccg ccaccgcctc 60
tcgagacg 68

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 1 / 3 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 38

aacgtaggcg cgccggactt gtccacggtc ctctc

35

<210> 39

<211> 33

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 39

gagagctcat ctgccccgac actcttcccc etc

33

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Camelus dromedarius

<400> 40

Glu Ser Ser Ser Ala Pro Thr Leu Tyr Pro Leu

1

5

10

3 2 / 3 2

<210> 41

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 41

acattaatct ggcgcgccga gagggtcggg gcagatgagc tctc

44

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 42

aaggcgcgcc cctgavgagr ygggtgacyhg

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/09448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/09

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 practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 97/49805 A (Vlaams Interuniversitair Instituut Voor Biotechnologie VZW), 27 June, 1997 (27.06.97), & JP 2000-515002 A	1, 6-16, 22-25/ 2-5, 17-21, 26-36
A	WO 01/62907 A1 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), 30 August, 2001 (30.08.01), (Family: none)	1-36
A	WO 00/43507 A1 (Hindustan Lever Ltd.), 27 July, 2000 (27.07.00), (Family: none)	1-36

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search 06 December, 2002 (06.12.02)	Date of mailing of the international search report 24 December, 2002 (24.12.02)
-------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09448

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Richard H.J. van der Linden et al., Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution., Journal of Biotechnology (2000), Vol.80, No.3, pages 261 to 270	1-36
P,A	WO 02/84193 A2 (Hindustan Lever Ltd.), 20 June, 2002 (20.06.02), & AU 200229639 A	1-36
P,A	Jamshid Tanha et al., Selection by phage display of llama conventional V _H fragments with heavy chain antibody V _H H properties., Journal of Immunological Methods (2002), Vol.263, pages 97 to 109	1-36

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/09</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p style="text-align: center;">Int.Cl⁷ C07K16/18, C12N15/09</p>														
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>														
<p>国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p style="text-align: center;">Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X/A</td> <td>WO 97/49805 A (フラムス・インテルユニフェルジゲ・テール・インスティテュート・フォル・ビオテクノロジー・ヴェーゼットウエー) 1997.06.27 & JP 2000-515002 A</td> <td style="text-align: center;">1, 6-16, 22-25 /2-5, 17-21, 26-36</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 01/62907 A1 (株式会社 医学生物学研究所) 2001.08.30 (ファミリーなし)</td> <td style="text-align: center;">1-36</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 00/43507 A1 (HINDUSTAN LEVER LIMITED) 2000.07.27 (ファミリーなし)</td> <td style="text-align: center;">1-36</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X/A	WO 97/49805 A (フラムス・インテルユニフェルジゲ・テール・インスティテュート・フォル・ビオテクノロジー・ヴェーゼットウエー) 1997.06.27 & JP 2000-515002 A	1, 6-16, 22-25 /2-5, 17-21, 26-36	A	WO 01/62907 A1 (株式会社 医学生物学研究所) 2001.08.30 (ファミリーなし)	1-36	A	WO 00/43507 A1 (HINDUSTAN LEVER LIMITED) 2000.07.27 (ファミリーなし)	1-36
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号												
X/A	WO 97/49805 A (フラムス・インテルユニフェルジゲ・テール・インスティテュート・フォル・ビオテクノロジー・ヴェーゼットウエー) 1997.06.27 & JP 2000-515002 A	1, 6-16, 22-25 /2-5, 17-21, 26-36												
A	WO 01/62907 A1 (株式会社 医学生物学研究所) 2001.08.30 (ファミリーなし)	1-36												
A	WO 00/43507 A1 (HINDUSTAN LEVER LIMITED) 2000.07.27 (ファミリーなし)	1-36												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>													
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">06.12.02</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">24.12.02</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">本間 夏子 </p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>													

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Richard H.J. van der Linden et al., Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution., Journal of Biotechnology (2000), Vol.80, No.3, p.261-270	1-36
PA	WO 02/84193 A2 (HINDUSTAN LEVER LTD.,) 2002.06.20 & AU 200229639 A	1-36
PA	Jamshid Tanha et al., Selection by phage display of llama conventional V _H fragments with heavy chain antibody V _H H properties., Journal of Immunological Methods (2002), Vol.263, p.97-109	1-36