

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3703499号
(P3703499)

(45) 発行日 平成17年10月5日(2005.10.5)

(24) 登録日 平成17年7月29日(2005.7.29)

(51) Int. Cl.⁷

C12N 15/09

F I

C12N 15/00 Z N A A

請求項の数 18 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平10-531742	(73) 特許権者	バイオインヴェント インターナショナル アーバー
(86) (22) 出願日	平成10年1月26日(1998.1.26)		スウェーデン国 S-223 70 ルント (番地なし)
(65) 公表番号	特表2001-508660(P2001-508660A)	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(43) 公表日	平成13年7月3日(2001.7.3)	(74) 代理人	弁理士 渡邊 隆
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/000219	(72) 発明者	セダーリント, ウルフ ハンス エスキル スウェーデン国 S-247 35 センドラ サンドビー スピナレフェーゲン 5
(87) 国際公開番号	W01998/032845		
(87) 国際公開日	平成10年7月30日(1998.7.30)		
審査請求日	平成14年4月23日(2002.4.23)		
(31) 優先権主張番号	9701425.2		
(32) 優先日	平成9年1月24日(1997.1.24)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質機能のインビトロ分子進化の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

変異ペプチド領域(変異モチーフ)を確定したペプチド領域(スカフォード配列)に組み込むことにより所定の特徴を持つタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を得る方法において、

a) 1又はそれ以上のタンパク質モチーフをコードする親ポリヌクレオチド配列に突然変異誘発を施して、異なる変異を有する複数の誘導体を生成し、

b) 介在している変異タンパク質モチーフに隣接する部位であって、親ポリヌクレオチド配列上の離れた部位に存在する、複数のオリゴヌクレオチドの対を提供して、オリゴヌクレオチドの各対を、PCRの増幅プライマーとして用いて介在モチーフを増幅し、

c) 前記増幅ヌクレオチド配列から一本鎖ヌクレオチド配列を得て、

d) スカフォード配列をコードするヌクレオチド配列と、前記工程c)から誘導されたヌクレオチド配列を組み込むことによりタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を組み立てる工程を具備してなる方法。

【請求項2】

親ポリヌクレオチド配列が、エラー・プローンPCRを施される請求項1記載の方法。

【請求項3】

変異ペプチド領域(変異モチーフ)を確定したペプチド領域(スカフォード配列)に組み込むことにより所定の特徴を持つタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を得る方法において、

10

20

a) 1 又はそれ以上の変異タンパク質モチーフをコードする親ポリヌクレオチドを得て、
 b) 介在している変異タンパク質モチーフに隣接する部位であって、親ポリヌクレオチド配列上の離れた部位に存在する、複数のオリゴヌクレオチドの対を提供して、オリゴヌクレオチドの各対を、PCRの増幅プライマーとして用いて介在モチーフを増幅し、
 c) 前記増幅ヌクレオチド配列から一本鎖ヌクレオチド配列を得て、
 d) スcafford配列をコードするヌクレオチド配列と、前記工程c)から誘導されたヌクレオチド配列を組み込むことによりタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を組み立てる工程を具備してなる方法。

【請求項4】

組み立てられたポリヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質を発現させ、所定の特性をスクリーニングする工程をさらに具備する請求項1から3のいずれかに記載の方法。

10

【請求項5】

オリゴヌクレオチドが一本鎖である請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記オリゴヌクレオチド対の1つが、特異的結合対の成員(MSBP)に結合している請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

MSBPを、その特異的結合パートナーに結合させることにより、増幅した変異モチーフを単離する工程をさらに具備する請求項6記載の方法。

20

【請求項8】

MSBPが、ビオチンである請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

特異的結合パートナーが、ストレプトアビジンである請求項8記載の方法。

【請求項10】

親ポリヌクレオチド配列が、抗体またはその一部をコードする請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法において、1 又はそれ以上のタンパク質モチーフをコードする親ポリヌクレオチド配列に突然変異誘発を施して、異なる変異を有する複数の誘導体を生成し、

30

a) 介在している変異タンパク質モチーフに隣接する部位であって、親ポリヌクレオチド配列上の離れた部位に存在する、複数のオリゴヌクレオチドの対を提供して、オリゴヌクレオチドの各対を、PCRの増幅プライマーとして用いて介在モチーフを増幅し、

b) 前記増幅ヌクレオチド配列から一本鎖ヌクレオチド配列を得て、

c) スcafford配列をコードするヌクレオチド配列と、前記工程b)から誘導されたヌクレオチド配列を組み込むことによりポリヌクレオチド配列を組み立て、

d) 前記ポリヌクレオチド配列を適当なベクターに挿入する工程を具備してなる方法。

【請求項12】

親ポリヌクレオチド配列が、エラー・プローンPCRを施される請求項11記載の方法。

40

【請求項13】

ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法において、1 又はそれ以上の変異タンパク質モチーフをコードする親ポリヌクレオチドを得て、

a) 介在している変異タンパク質モチーフに隣接する部位であって、親ポリヌクレオチド配列上の離れた部位に存在する、複数のオリゴヌクレオチドの対を提供して、オリゴヌクレオチドの各対を、PCRの増幅プライマーとして用いて介在モチーフを増幅し、

b) 前記増幅ヌクレオチド配列から一本鎖ヌクレオチド配列を得て、

c) スcafford配列をコードするヌクレオチド配列と、前記工程b)から誘導されたヌクレオチド配列を組み込むことによりポリヌクレオチド配列を組み立て、

d) 前記ポリヌクレオチド配列を適当なベクターに挿入する工程を具備してなる方法。

50

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチド配列を選択して発現させ、対応するポリペプチド配列ライブラリーを得る工程をさらに具備する請求項 11 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

所定の特徴のポリペプチドについて、ライブラリーをスクリーニングする工程をさらに具備する請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

請求項 11 から 13 のいずれかに記載の方法でのポリヌクレオチドライブラリーの生成に続いて、前記ポリヌクレオチド配列を選択して発現させ、所定の特徴を持つポリペプチドを得ることをさらに含む方法。

10

【請求項 17】

前記オリゴヌクレオチド対の 1 つが、特異的結合対の成員 (MSBP) に結合している請求項 11 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

MSBP を、その特異的結合パートナーに結合させることにより、増幅した変異モチーフを単離する工程をさらに具備する請求項 17 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、タンパク質機能のインビトロ分子進化の方法に関する。

特に、それに限られるわけではないが、コード配列内のポリヌクレオチド配列を入れ換えること (shuffling) に関する。

20

発明の背景

タンパク質機能は、インビトロにおいて、位置指向性突然変異 (Moore, 等, 1987)、組み合わせクローニング (Huse 等 1989; Marks 等, 1992)、及び、適当な選択系と組み合わせたランダム突然変異 (Barbas 等, 1992) を含む種々の方法で変性及び改善され得る。

選択を伴うランダム突然変異の方法は、タンパク質機能の改善のための多くの場合に用いられてきているが、異なる 2 つの方法が存在する。第 1 に、所定の特徴を有する変異体 (突然変異体) の選択と組み合わせた全遺伝子配列のランダム化 (randomisation)、それに次ぐランダム突然変異及び選択の新たなラウンドである。この方法は、最適と思われるタンパク質変異体が見つかるまで繰り返される (Moore 等, 1996)。ここで、突然変異を誘導する伝統的な経路は、エラー・ブローン (error prone) PCR (Leung 等, 1989) であり、約 0.7% の突然変異比率を有する。

30

第 2 に、遺伝子の決定された領域を変質 (degenerate) プライマーで突然変異させることができ、それは突然変異比率を 100% までにすることができる (Griffiths 等, 1994; Yang 等, 1995)。用いる突然変異比率が高くなると、突然変異を受ける遺伝子の領域がより制限される。

ランダム突然変異は、抗体工学の分野で広く用いられてきた。インビトロで生成された抗体遺伝子はインビトロでクローニングされ (Larrick 等, 1989)、種々の重い及び軽い遺伝子をコードする遺伝子のランダムな組み合わせに選択を施すことができる (Marks 等, 1992)。選択された機能的抗体フラグメントは、ランダム突然変異及び付加的選択のラウンドを用いてさらに改善することができる (Hoogenboom 等, 1992)。

40

ランダム突然変異の方法は選択へと続く。興味深い特徴を持つ変異体を選択することができ、各々が興味深い特徴を持つ異なる変異体からの突然変異した DNA 領域が、1 つのコード配列に組み合わせられる (Yang 等, 1995)。これは、多段階連続プロセスであり、異なる領域の異なる突然変異は、組み合わせで選択されないため、それらの潜在的な相乗効果を失い得る。即ち、これら 2 つの方法では、決定された領域の突然変異と、これらの領域の組み合わせの選択が同時に起こることはない。他のプロセスは、例えば抗体親和性を改善するのに用いられる遺伝子の組み合わせ対形成を含む (Marks 等, 1992)。ここでは、各々が可変遺伝子である 3 つの CDR - 領域が固定されており、この技術では、クローン間の個々の CDR 領域の入れ換えはできない。

50

分子ライブラリーからの機能的タンパク質の選択は、ファージ表示技術の開発によって大変革された(Parmley等,1987; McCafferty等,1990; Barbas等,1991)。ここで、表現型(タンパク質)は、その対応する遺伝子型(DNA)に直接結合し、これにより、遺伝子物質の直接クローニングが可能になり、それは次いで、さらなる修飾を施されてタンパク質機能が改善される。ファージ表示は、 10^{11} までのサイズの形質転換体を持つ種々の分子ライブラリーからの機能的バインダーをクローニングするのに用いられていた(Griffiths等,1994)。よって、ファージ表示は、分子ライブラリーからの機能的バインダーの直接クローニングに用いることができ、最初に選択されたクローンをさらに改善するために用いることもできる。

異なる突然変異をしたクローンからのDNAのランダムな組み合わせは、配列空間を通じた探索のための、より有効な方法である。DNA入れ換え(Stemmer, 1994)の概念は、DNAのランダムな断片化、及び断片の機能的コード領域への組み込みを利用する。このプロセスにおいては、化学的に合成されたDNA配列の導入が可能であり、このようにして、DNA配列が知られた遺伝子の決定された位置に目的とする変異を導入することが可能である(Cramer等,1995)。理論上、あらゆるクローン間でのDNA入れ換えが可能である。しかし、得られる入れ換えられた遺伝子が、発現及び活性について機能的であるとするならば、入れ換えられるクローンは、低レベルのランダム突然変異の例外と関連または同一でなければならない。遺伝子的に異なるクローン間のDNA入れ換えは、一般的に、非機能的遺伝子を生成する。

発明の概要

最も一般的には、本発明は、少なくとも1つの変異ヌクレオチド領域(変異モチーフ)を、親ポリヌクレオチド配列から誘導された決定されたヌクレオチド領域(スカフォード配列)に組み込む工程を具備してなる、所定の特徴を持つタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を得る方法を提供する。次いで、新たに組み立てられたポリヌクレオチド配列は、発現され、得られたタンパク質は、その特徴を測定するためにスクリーニングされる。

この方法によれば、タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を特異的な方法で変更することにより、タンパク質の特徴を変えることを可能にする。これは、a)ヌクレオチド配列の特定の領域を異なるヌクレオチド配列で置換するか、b)特定の領域を突然変異させてヌクレオチド配列を変更するかのいずれかによって達成される。これらの特定の領域(変異モチーフ)は、最初のポリヌクレオチド配列(親ポリヌクレオチド配列)のスカフォードまたはフレームワーク領域(スカフォード配列)内に組み込まれ、それは、再配列されたとき、変更された特徴のタンパク質をコードする。コードされたタンパク質の特徴は、コードするポリヌクレオチド配列の変化に対応して変化したアミノ酸配列によって変更される。

本発明者らは、配列をランダムに修飾し、次いで、所定のコードされたタンパク質のための膨大なスクリーニングに依存するよりも、タンパク質の選択されたセグメント(変異モチーフ)は修飾するが他は維持する方法が望ましいことを見出した。

変異モチーフは、タンパク質の特定領域をコードするヌクレオチド配列であってよい。例えば、タンパク質の機能的領域(例えば、ループ)または抗体のCDR領域。

スカフォード配列は、維持するのが望ましいヌクレオチド配列であり、例えば、タンパク質のより構造的な領域、例えば、抗体のフレームワーク領域をコードすることもできる。変異モチーフは、スカフォード配列としての同じポリヌクレオチド配列、即ち親ポリヌクレオチドを起源とするヌクレオチド配列であってもよいが、それは、コード配列が親におけるものとは変化するように突然変異している。例えば、親ポリヌクレオチド配列は抗体をコードしてもよい。抗体のCDR領域をコードするヌクレオチド配列(変異モチーフ)は、親ポリヌクレオチドの残ったコード配列から選択してもよく、突然変異され、次いで、残ったコード配列から誘導されたスカフォード配列とともに再配列される。発現される抗体は、親ポリヌクレオチドによってCDR領域で発現される野生型の抗体とは異なるであろう。

10

20

30

40

50

あるいは、変異モチーフは、親ポリヌクレオチド配列にコードされるタンパク質と順序的に関連したタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列から誘導してもよい。例えば、1つの抗体(抗体A)からのCDR領域は、他の抗体(抗体B)のCDR領域で置換してもよい。

各場合において、得られる発現されたタンパク質は、所定の特徴についてスクリーニングされる。好ましい特徴は、タンパク質の生物学的特性における変化であってもよい。例えば、タンパク質の3次元構造を変化させてもよい。これは、その結合特性、細胞へ又は細胞から分泌される能力、あるいは、例えば酵素の場合、その触媒特性に影響し得る。タンパク質が、抗体またはその一部であるとき、抗原に対する特異的結合能力を変化させる、即ち、親抗体に比較して結合特性を向上させるのが望ましい。

10

本発明の一態様では、変異ペプチド領域(変異モチーフ)を決定された領域(スカフォード配列)に組み込むことにより、所定の特徴を持つタンパク質を得る方法が提供され、その方法は、

(a) 1又はそれ以上のタンパク質モチーフをコードする親ポリヌクレオチド配列に突然変異誘発を施して、複数の異なる変異をしたその誘導体を生成し、または、1又はそれ以上の変異タンパク質モチーフをコードする親ポリヌクレオチドを得て、

(b) 各対が、変異タンパク質モチーフを結合した親ポリヌクレオチド配列の離間した位置に存在する、複数のオリゴヌクレオチドの対を提供して、オリゴヌクレオチドの各対を、増幅プライマーとして用いて介在モチーフを増幅し、

(c) このように単離された増幅ヌクレオチド配列から一本鎖ヌクレオチド配列を得て、そして、

20

(d) スカフォード配列をコードするヌクレオチド配列を持つ前記工程(c)から誘導されたヌクレオチドを組み込むことによりタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を組み立てる工程を具備する。

この方法は、組み立てられたポリヌクレオチド配列によってコードされて得られるタンパク質を発現させ、所定の特徴をスクリーニングする工程をさらに具備していてもよい。

好ましくは、親ポリヌクレオチド配列はDNAであり、それから変異モチーフ及びスカフォード配列をコードするDNAが誘導される。

好ましくは、オリゴヌクレオチド対は一本鎖のオリゴヌクレオチドプライマーである。当該対の1又はそれ以上は、特異的結合対(MSBP)の成員に結合していてもよい。MSBPは、好ましくはビオチンであり、その特異的結合パートナーは、例えばストレプトアビジンとすることができる。特異的結合対を用いることにより、増幅されたヌクレオチド配列を単離することができる。

30

ランダム突然変異は、任意の従来法によって実施することができるが、好ましい方法は、エラー・プロンプPCRである。

問題とするタンパク質は、例えば、所定の特徴を有する抗体または抗体フラグメントである。抗原または他の結合パートナーと結合できる抗体フラグメントの例は、VL, VH, CI及びCH1ドメインからなるFabフラグメント; VH, 及びCH1ドメインからなるFdフラグメント; 抗体の単一腕(single arm)のVL及びVHドメインからなるFvフラグメント; VHドメインからなるdAbフラグメント; 単離されたCDR領域及びF(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFabフラグメントを含む2価フラグメントである。一本差Fvフラグメントも含まれる。

40

一つの方法において、抗体をコードするDNA、またはそのDNAの一部(例えば、Fab領域または可変領域をコードする部分)をランダムに突然変異させた後、CDRに結合した配列(変異モチーフ)に対応するオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、CDRにおいて起こった全ての変異とともに、CDRをコードするDNAを増幅することができる。これらは、増幅されたCDR DNA配列及び変異していないスカフォードフレームワーク(FR) DNA配列を用いて、抗体コード配列の再配列に組み込むことができ、その結果、新たなCDRの組み合わせを持ち、潜在的に変化した特性を有する抗体が発現され、それは従来の方法で選択またはスクリーニングされ得る。

50

他の方法では、CDRを突然変異させ、それらを抗体に戻して再配列させて、CDRが誘導された親抗体に極めて近いものとするのではなく、CDRを、存在するが配列が知られていない1又はそれ以上の抗体から取り出してもよい。種々のCDRに結合した配列を表現するオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、個々のCDRを増幅し、単離し、予め決定されたスカフォードに組み込むことができる。

当然のことながら、前記の方法の組み合わせを用いることもでき、1又はそれ以上の親抗体から取ったCDRを、スカフォードに組み込み、完全に新規な、二次抗体を生成し、次いで、スクリーニングの後、所定の特徴を持つ二次抗体を得、それをコードするDNAを変異させ、CDRを増幅して単離し、次いで、二次抗体からの変異していない非-CDR(スカフォード)DNAとともに再配列させて、CDRが変異していない二次抗体の変異

10

体を生成し、それに、最初に分泌された二次抗体に対して改善された特性についてスクリーニングを施す。
本発明は、機能的には異なるが遺伝子的に関連したクローンからDNA配列を単離する新規な方法を可能にする。遺伝子的に関連したクローンは、特別な構造分類、例えば、免疫グロブリンまたはβ-β-パレルに属する。本発明は、単離、及びこれらの関連するクローンからの機能的配列の与えられたDNA配列へのランダムな組み合わせの両方を可能にする。

本発明の概念は、異なる生殖細胞系配列からのCDR領域が単離され、決定されたフレームワーク配列にランダムに組み込まれるような抗体分子を用いて説明される。本発明は、ファージ表示を用いて選択される分子ライブラリーの複雑さを増大させる。また、本発明

20

の概念は、変異したCDR-領域の単離及びランダムな組み合わせによる抗体フラグメントの親和性突然変異によっても示される。
特定の配列を単離し、これらを与えられた遺伝子配列にランダムに組み込むために、DNA入れ換えの考え方(Stemmer, 1994)を使用することはできないが、これは、インピボで形成された個々のDNA領域をDNA入れ換えを用いて増幅することができないからである。全遺伝子配列の組み合わせが可能であるが、ここで、決定された領域の入れ換えはできない。むしろ全てのDNAが入れ換えられてしまう。即ち、遺伝子的に関連するクローンからのDNA配列であって、機能的に相違するもの、例えば、免疫グロブリンまたはβ-β-パレルのような構造分類に属するタンパク質は、特定領域が一定に保持され、他の領域が入れ換えられるような方法で入れ換えることはできない。

30

本発明で提供されるシステムは、タンパク質の機能的領域(例えばループ)を決定された(特に選択された)スカフォードに組み込むための、即ち、与えられたタンパク質の3次元構造のループを入れ換えて新たなタンパク質機能を見出すための簡単な方法を提供する。さらに、DNA入れ換え技術は、0.7%の比率の突然変異を誘導する(Stemmer, 1994)。即ち、周知のDNA入れ換え技術(Stemmer, 1994)は、そのプロセス自体がスカフォード領域を含むランダムな位置に突然変異を誘導するので、変異していない領域の入れ換えをすることはできない。

それに対して、本発明は、決定されたDNA-配列の突然変異を、これらのDNA断片の入れ換え及びコード配列への組み込みとともに可能にし、決定された領域の突然変異とともに、それに続くこれらの領域の選択をも可能にするであろう。

40

本発明は、異なる配列(クローン)からのDNAの異なる領域を、入れ換えかつランダムに組み合わせることを可能にする。これにより、遺伝子的変化が増大し、そこから機能的抗体フラグメントが選択され、よって、所定の特徴を有するタンパク質の選択の可能性が増大する。これは、フラグメントのVH及びVLにおける各位置で100程度の少ないCDRをランダムに入れ換えることによって、 10^{12} 程度の多数の組み合わせが得られ、それにより、免疫系に通常見られる変異性を拡張することにより達成される。

本発明は、例えばcDNAライブラリーからの決定された領域の、一方がビオチニル化されている(biotinylated)2つのプライマーを用いた増幅を提供する。MSBP基、例えばビオチンを用いて、一本差DNAを単離し、遺伝子組み換えプロセスに用いることができる。本発明者らは、このことを、抗体遺伝子ライブラリーからの多様CDR領域の増幅、

50

及びこれらのCDR領域の与えられたフレームワーク領域へのランダムな組み込みによって示す。即ち、DNAの決定された領域(フレームワーク領域)は、DNAのランダム領域(CDR領域)の間に置くことができ、それはインビボ起源または化学合成されたものである。

また、本発明は、上記の方法で生成されコードされたポリヌクレオチド及びタンパク質も提供する。また、そのポリヌクレオチド配列を組み入れたベクター、及びそのベクターで形質転換された宿主細胞も提供する。

本発明はまた、上記の方法で生成され、ファージ表示に使用することのできるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリーも提供する。

ここで、本発明の態様及び実施態様を、添付図面を参照しつつ実施例として示す。さらなる態様及び実施態様は当業者には明らかであろう。この本文で述べた全ての文献は、参考としてここに取り入れるものとする。

【図面の簡単な説明】

図1は、1段階PCRプロトコールに従い、重複するオリゴヌクレオチドの組からの遺伝子配列の組み換えに基づく、異なるクローン間での特異的DNA配列の入れ換えを示す。

図2は、種々のCDR-入れ換えクローンについての異なる解離速度定数を示す。低いバーは遅い解離速度を示し、高いバーは速い解離速度を示す。クローン36は、最初(original)の非-突然変異抗体フラグメントである。

図3は、HPLC, Superose S-200 FPLC-カラム(Pharmacia)上で、PBSバッファー中でアッセイされた、親和性精製されたscFv抗体フラグメントの結果を示す。ピーク1は、抗体フラグメントのモノマー体であり、ピーク2は、少量の不純物であり、ピーク3は、保存剤として用いられたNaN₃(アジ化ナトリウム)である。

図4は、DNAの決定された配列の増幅、及びそれらのマスターフレームワークへの入れ換えの図式的表示である。CDR領域のみが増幅される。図4A: VH-ドメインについての遺伝子の組み立て。個々のCDRを、特定のCDRに隣接する2つのプライマーであって、その一方が5'末端でビオチニル化されたプライマーを用いて増幅する。個々のCDRを増幅し、2つの増幅プライマーは突然変異を含まないので、二本鎖DNA(dsDNA)をCDRに集束した突然変異で精製する。このDNAを2つの一本鎖DNA分子に分離する。遺伝子組立にはビオチンを持たない分子を用いる。プライマー725,729,730,728,727をDNAシンセサイザーで合成し、プライマーH2,H3,H5は、変異したCDRを含まず、上記のように増幅した。図4B: VL-ドメインについての遺伝子の組み立て。CDRは、Aと同様の方法で増幅した。プライマー759,738,745,744,880は、DNAシンセサイザーで合成し、プライマーL2,L3,L5は変異したCDRを含まず、上記のように増幅した。

図5は、クローン3, 11及び31についてのペプチドのアライメントを、最初の非-突然変異抗体フラグメント(wt)とともに示す。CDR領域に印を付けた。クローン3, 11及び31における突然変異には下線を付した。

図6は、決定されたDNA領域の入れ換えのための一本鎖DNAの単離の概念を示す。

図7は、異なるクローンからのCDR重鎖の長さを示す。これらのCDR領域は、異なる生殖細胞系から増幅し、(DP-47配列からの)決定されたフレームワーク領域にランダムにクローニングされる。

図8は、DNAの決定された領域の増幅、及びそれらのマスターフレームワークへの入れ換えの図式的表示である。遺伝子組立に用いられた全てのオリゴヌクレオチドはPCRで増幅したが、CDR領域のみが任意の遺伝子的変異を含んでいる。図8A: VH-ドメインについての遺伝子の組み立て。フレームワーク領域の増幅のためのテンプレートはscFv-B11であるが、CDRは、末梢血液リンパ球、扁桃腺及び脾臓から調製したcDNAから増幅した。個々のCDRは、増幅すべきフラグメントの両末端に位置する2つのプライマーを増幅し、そのプライマーの一方は5'末端でビオチニル化されている。個々のDNAフラグメントを増幅し、二本鎖DNA(dsDNA)を生成する。このDNAを、2つの一本鎖DNA分子に分離する。遺伝子組立にはビオチンを持たない分子を用いる、即ち、プライマーH1, H4, H6であり、これらのプライマーは変異を含まない。プライマーHCDR1, HCD

10

20

30

40

50

R2, HCDR3は異なる C D R を含み、特定の C D R に隣接する 2 つのプライマーであって、その一方が 5' 末端でビオチニル化されたプライマーを用いて増幅する。個々の C D R を増幅し、2 つの増幅プライマーは突然変異を含まないので、二本鎖 D N A (dsDNA) を C D R に集束した突然変異で精製する。この D N A を 2 つの一本鎖 D N A 分子に分離し、ライブラリーフォーマットの V H ドメインの遺伝子組み立てに用いた、即ち、C D R における変異は、異なる生殖細胞系配列から誘導される。プライマー BT25 及び BT26 を D N A 合成機で合成する。図 8 B : V L - ドメインについての遺伝子の組み立て。原理的には A と同じ手法である。プライマー L1, L4, L6 が増幅され、P C R によって生成され、変異を含まない。LCDR1, LCDR2, LCDR3 は異なる C D R を含む。プライマー BT7 及び BT12 は D N A 合成機で合成した。

10

図 9 は、図 8 に従って構築したライブラリーにおける変異を示す。F I T C (フルオレセイン-イソ-チオシアネート) に結合したライブラリークローンの scFv 領域及び最初の scFv-B11 は P C R で合成した。精製した P C R 産物を BstNI で切断し、2.5% 寒天ゲル上で分離した。クローン 1 - 15 はレーン 2 - 16、クローン 16 - 29 はレーン 18 - 31 である。最初の scFv-B11 はレーン 32 である。分析により、制限パターン及びフラグメントサイズに従って、28 クローンが 13 の異なる群に分けられることが明らかとなった。8 つのクローン (1, 2, 8, 10, 12, 16, 26, 27) は独特であり、2 つのクローン (17, 24) は類似しており、クローンの 1 群 (18, 23, 29) は 3 つの類似した成員を有し、2 群 (5, 15, 14, 19) 及び (3, 4, 6, 11) は 4 つの成員、そして 1 群 (7, 9, 13, 20, 21, 22, 25) は 7 つの類似した成員を有していた。

20

この実験は、BstNI が配列変異のフラクシヨンのみを検出するので、ライブラリーの変異を低く見積もる。さらに、ゲル分解能がサイズの小さな相違を可能にせず、100bp 未満のフラグメントを分析できない。

図 9 B は、上記図 9 A に例示した実験において類似の制限パターンを示すクローンを示すが、BstNI 及び BamHI の両方で切断し、3% 寒天ゲルで分離したものである。比較しやすくするために、実験 A において記載した類似のクローンの群をゲル上に一緒に配置した。実験 A からのクローン 8 及び 28 は、空間的制限によって排除した。

ゲル I) レーン 1 - 8 ; 各々、標準、クローン 5、15、14、19、2、27、最初の scFv-B11。

ゲル I I) レーン 1 - 8 ; 各々、標準、クローン 16、17、24、18、23、29、

30

26。

ゲル I I I) レーン 1 - 8 ; 各々、標準、クローン 7、9、13、20、21、22、25。

ゲル V I) レーン 1 - 8 ; 各々、標準、クローン 3、4、6、11、1、10、12。

これらの改良した実験条件下では、実質的に全てのクローンが異なる制限パターン / フラグメントサイズを有していた。全てのクローンが最初の scFv-B11 遺伝子 (レーン 8、ゲル I) とは異なる。さらに、図 9 A で類似して見えたクローンの群は、図 9 B で分析すると異なっていることが解った。クローン 5, 15, 14, 19 (レーン 2 - 5、ゲル I)、クローン 17, 24 (レーン 3 - 4、ゲル I I)、クローン 18, 23, 29 (レーン 5 - 7、ゲル I I)、クローン 7, 9, 13, 20, 21, 22, 25 (レーン 2 - 8、ゲル I I I)、及びクローン 3, 4, 6, 11 (レーン 2 - 5、ゲル I V) 参照。

40

結論として、これらの実験は、ライブラリーが高度な変異性を含有することを示唆している。

詳細な説明及び発明の実例

D N A 入れ換え方法の一態様は、図 1 の以下の工程 1 に従って例示することができる。

A : 目的とするタンパク質をコードする遺伝子を重複オリゴヌクレオチドに分割する。

B : オリゴヌクレオチドを P C R を用いて全長遺伝子配列に組み立てる。

C : 遺伝子配列に、例えばエラー・ブローン P C R によって突然変異を施す。

D : 各対が上記工程 A におけるオリゴヌクレオチドの 1 つで決定される領域であって、工程 A オリゴヌクレオチドの中間領域以外の領域をカバーするオリゴヌクレオチド対を合成

50

する。このカバーされていない領域は、PCR増幅の後に入れ換えることのできるDNA配列である。これら2つの合成オリゴヌクレオチドは、カバーされていない領域を増幅するための増幅プライマーとして用いられる。

E：これらの増幅プライマーの1つはピオチニル化され、二本鎖PCR産物は、次いで、周知のストレプトアビジン系を用いて単離される。

F：このように単離された増幅されたオリゴヌクレオチドから、上記のカバーされていない領域からのDNAを含む一本鎖DNA配列が得られ、次いで、工程Aに記載した遺伝子配列の新規な組立体において、オリゴ-ヌクレオチドとして用いられる。

G：異なるクローンから、及び突然変異した遺伝子配列の異なる領域からのDNA配列が増幅され、一本鎖からなる場合、それらは、遺伝子組み換えのPCRプロセスにおいてランダムに組み合わせられる。このランダムな組み合わせが、インビトロの分子進化の基礎となる。

10

実施例

本発明者らは、異なる実験的設定における決定されたDNAの入れ換えの概念を示してきた。第1に、親和性突然変異を目的とする抗体フラグメントのインビトロで突然変異したCDR領域における入れ換えが例示され(実施例1及び2)、第2に、高度に変異した抗体ライブラリーの製造のためのインビボで形成されたCDRの入れ換えが例示される(実施例3及び4)。

1. 親和性突然変異

FITCに結合したscFv-B11抗体フラグメントに基づいて、モデル系が開発された。このscFvをコードする全長遺伝子は、scFv-B11の周知のDNA配列を発現する12のオリゴヌクレオチドの組(図4A及び図4B)から組み立てられ、遺伝子産物のFITCへの機能的結合が確認される。この遺伝子配列は、次いで、エラー・プローンPCRを用いて突然変異され、CDR領域をコードするDNAが、一方がピオチニル化された増幅プライマーを用いて上記のように増幅される。(CDR領域は、抗原、この場合はFITCの結合に含まれる抗体分子の対である。)

20

6つのCDR領域全てが増幅され、新たな遺伝子が、12のオリゴヌクレオチド(上記参照)の第1の組立体から選択される6つ、そして突然変異したCDR領域の増幅からの6つのオリゴヌクレオチドを用いて組み立てられる。FITCに結合した機能的抗体フラグメントの選択は、ファージ表示(phage display)を用いて行った。50%のクローンが、BIAcoreバイオセンサーで測定したところ、最初のscFv-B11とは異なる解離速度でFITCに結合した(図2)。このことは、クローンがFITCを認識する方法で変化したことを示している。

30

BIAcoreにおいてFITCに結合すると同定された16クローンのうち(図2)、クローン3、11、27及び31を選び、これらのクローンが解離速度(off-rates)において大きな変化を示したので、さらに詳細に分析した。これらのクローンを発現させ、FITC-BSAで共役したカラム上で親和性精製し、低pHバッファーで溶離した。精製したscFv-抗体フラグメントは、抗体のモノマー及びダイマー形態を分離する能力を持つPharmacia Superdex 200 FLPCカラムを用いたHPLCでさらに精製して分析した。全てのクローンにおいて、モノマー形態が優勢であった(典型的なサイズプロフィールを図3に示す)。次いで、これを精製し、BIAcoreバイオセンサーを用いた親和性の詳細な分析に使用した。

40

表 1

選択物の親和性測定

クローン	$k_{\text{ass}}(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_{\text{diss}}(\text{s}^{-1})$	$k_{\text{a}}(\text{M}^{-1})$
# 3	2.0×10^5	4.3×10^{-3}	4.8×10^7
# 1 1	2.6×10^5	3.3×10^{-3}	7.8×10^7
# 2 7	5.0×10^5	16.0×10^{-3}	3.1×10^7
# 3 1	1.2×10^5	5.4×10^{-3}	2.1×10^7
(最初の FITC-B11)	2.7×10^5	9.7×10^{-3}	2.8×10^7

10

クローン # 1 1 は、最初の scFv-B11 抗体フラグメントの 2 . 8 倍の親和性を示した。この増加は、より遅い解離速度に基づいている。あるクローン (# 2 7) は、結合速度が 2 倍に増加した。しかし、このクローン全体の親和性は、速い解離速度のために最初の FITC-B11 クローンと類似していた。クローン間の異なる結合及び解離速度の分布は、親和性のさらなる改良のための CDR 再入れ換えの基となった。

3 つのクローンを配列分析した。VH 領域 (即ち、scFv-B11 の半分及び 3 つの CDR 領域を具備) において見出された突然変異は、これらが唯一の変異した領域であり、増幅プライマーを用いて増幅されたので、予想通り全て CDR 領域にあった。興味深いことに、全ての CDR 領域は相違し、異なる突然変異を有していた (図 5) 。しかしながら、CDR 領域 2 の場合は、3 つのクローン全てにおいて同じ突然変異 (チロシンからヒスチジンへの置換) が見られた (残りの CDR 領域はクローン間で異なっていた) 。

20

さらに、突然変異比率は、3 つの CDR 領域をともに構成している 90bp 長の配列における塩基変化から測定したところ、2 % から 4 % の間であることが解った。これは、エラー・ブローン PCR 突然変異比率より高く、異なるクローンからの個々の CDR 領域の組み合わせがあることを示している。

2 . 親和性突然変異 - 再入れ換え

第 2 の入れ換え (再入れ換え) を実施するために、CDR 増幅及びライブラリー構築のさらなるラウンドにおいて、FITC に対する結合親和性で選択されたクローンを用いた。理論的には、再入れ換えしたライブラリーは、FITC に対する向上した結合で選択された、突然変異した入れ換え CDR 領域を含む。このようにして、結合性の向上した新たな CDR 領域の組み合わせが構築され、このライブラリーは、向上した親和性を持つバインダーで選択される。

30

選択手法から得られた全てのクローンのプール (実施例 1 に詳述) は、CDR 増幅のためのテンプレートとして用いた。各 CDR について 1 つの増幅を、表 2 に掲げたプライマーを用いて行った。

表 2

CDR入れ換えに用いたプライマーの配列。

B = ビオチン標識した 5' プライマー

CDR再増幅プライマー

764 5' B-GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AGC CTC TGG ATT CAC CTT T 3'
 875 5' TCC CTG GAG CCT GGC GGA CCC A 3'
 876 5' CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA 3'
 765 5' B-GGA ATT GTC TCT GGA GAT GGT GAA 3' 10
 799 5' GAG CCG AGG ACA CGG CCG TGT ATT ACT GTG CAA GA 3'
 766 5' B-GCG CTG CTC ACG GTG ACC AGG GTA CCT TGG CCC CA 3'
 767 5' B-AGC GTC TGG GAC CCC CGG GCA GAG GGT CAC CAT CTC TTG T 3'
 800 5' GGG CCG TTC CTG GGA GCT GCT GGT ACC A 3'
 801 5' GCT CCC AGG AAC GGC CCC CAA ACT CCT CAT CTA T 3'
 768 5' B-GAC TTG GAG CCA GAG AAT CGG TCA GGG ACC CC 3'
 802 5' CTC CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT 3'
 769 5' B-CGT CAG CTT GGT TCC TCC GCC GAA 3'

フレームワークVH 20

727 5' CCG CCG GAT CCA CCT CCG CCT GAA CCG CCT CCA CCG CTG CTC
 ACG GTG ACC A 3'
 728 5' GAC CGA TGG ACC TTT GGT ACC GGC GCT GCT CAC GGT GAC CA 3'
 729 5' GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT
 GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT 3'
 730 5' GGC CGT GTC CTC GGC TCT CAG GCT GTT CAT TTG CAG ATA CAG
 CGT GTT CTT GGA ATT GTC TCT GGA GAT GGT 3'

フレームワークVL 30

738 5' CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCA GCG TCT GGG ACC CCC
 G 3'
 744 5' ACT AGT TGG ACT AGC CAC AGT CCG TGG TTG ACC TAG GAC CGT
 CAG CTT GGT TCC TCC GC 3'
 745 5' CTC ATC CTC GGA CCG GAG CCC ACT GAT GGC CAG GGA GGC TGA
 GGT GCC AGA CTT GGA GCC AGA GAA TCG 3'
 1129 5' CAG GCG GAG GTG GAT CCG GCG GTG GCG GAT CGC AGT CTG TGC
 TGA CTC AGC CAC CCT CAG CGT CTG GGA CCC CCG 3' 40

増幅プライマーVH/VL組立体

1125 5' ACT CGC GGC CCA ACC GGC CAT GGC CGA GGT GCA GCT GTT GGA
 G 3'
 1126 5' CAA CTT TCT TGT CGA CTT TAT CAT CAT CAT CTT TAT AAT CAC
 CTA GGA CCG TCA GCT TGG T 3'

菌成長)、各プライマー60pmol、5ユニットPFUポリメラーゼ(Stratagene)、1 x PFUバッファー、500 μ M dNTPs、反応容積100 μ l、予備加熱96 10分間、96 1分間：68 1分間：72 1分間を25サイクル、72 10分間、この方法は、実施例1のCDR増幅と実質的に同じである。増幅されたCDRは、図1、4A、4B及び表3に従って、VH及びVLコード配列に組み込むために使用した。

表3

CDR入れ換えにおけるVH及びVL遺伝子配列の組立のためのPCR
パラメーター

VL	VH		10
プライマー-759	プライマー-725	30 pmol	
プライマー-738	プライマー-729	0.6 pmol	
プライマー-L2	プライマー-H2	0.6 pmol	
プライマー-L3	プライマー-H3	0.6 pmol	
プライマー-745	プライマー-730	0.6 pmol	
プライマー-L5	プライマー-H5	0.6 pmol	
プライマー-744	プライマー-728	0.6 pmol	
プライマー-880	プライマー-727	30 pmol	
Taq	Taq	10 単位	
dNTPs	dNTPs	200 μ M	20
1 x Taq バッファー	1 x Taq バッファー	100 μ l まで	

予備加熱 95 ° 10 分間、20 サイクル：95 ° 1 分間、68 ° 1 分間、72 ° 1 分間 72 ° 10 分間。

次いで、VH及びVLを、scFvコード配列に、標準的な方法に従って組み込んだ(Griffiths等, 1994)。得られたライブラリーにパンニングを施し、FITCに対する向上した親和性を持つバインダーを選択した。再入れ換えしたライブラリーについての選択手法は、最初に入れ換えしたライブラリーに対するものと同じである。選択後に得られたクローンの総数は510であった。6つのクローン(B)を、この新たなプールから選択し、試験し、そして入れ換えライブラリーを基とする最初のプールからの6つのクローン(A)と比較した(表4)。

表 4

入れ換えライブラリーから（クローンA）及び再入れ換えライブラリーから（クローンB）選択した各クローンの解離速度

クローン	$K_{DISs}(s^{-1} \times 10^3)$
scFv-B11（最初）	12.9
1A	6.3
12A	5.7
13A	9.0
14A	9.7
16A	1.8
17A	7.9
22B	0.2
31B	0.3
32B	9.8
33B	6.8
34B	7.3
35B	8.7

10

20

再入れ換え実験からの2つのクローン（22B及び31B）は、有意に遅い解離速度を示し、再入れ換えプロセスが、親和性の向上したバインダーを生成することを示している。

3. 決定されたDNA領域のクローニング及び入れ換え

我々の系では、一方がビオチニル化された2つのプライマーを用いて、cDNAライブラリーからの決定された領域を増幅することができる。ビオチン基を用いて、遺伝子組立プロセスによって一本鎖DNAが単離できる（図6）。我々は、このことを、抗体遺伝子ライブラリーからの多様なCDR領域の増幅、及びこれらのCDR領域の与えられたフレームワーク領域へのランダムな組み合わせで示した。即ち、DNAの決定された領域（フレームワーク領域）は、インビトロ起源のDNAのランダム領域（CDR領域）によって離間され得る（表5）。CDR3領域はサイズが変化する（図7）。あるいは、これらの領域は化学的に合成される。

30

表 5

異なる生殖細胞系配列からのCDR領域はの組み合わせが、可変重鎖ドメインをコードするDP-47フレームワークに移植された。CDR1及びCDR2については、示唆された生殖細胞系起源を示す。CDR3については、CDR領域の残基の数を記す。N.D. = 検出不能。

クローン	CDR 1	CDR 2	CDR 3
1	DP-35	DP-42	12
2	DP-49	DP-53	13
3	N.D.	DP-51	11
4	DP-32	DP-47	10
5	DP-41	DP-47	8
6	DP-32	DP-77	9
7	DP-31	DP-47	7
8	DP-49	DP-35	5
9	DP-49	DP-35	N.D.
10	DP-48	DP-48	N.D.
11	DP-51	DP-47	10
12	DP-34	DP-31	N.D.
13	DP-85	DP-53	4
14	DP-31	DP-77	10
15	DP-34	DP-53	4

4. ライブラリー構築

scFv抗体フラグメントをコードする遺伝子ライブラリーが構築された。このライブラリーのために用いた方法は、オリゴヌクレオチドの組の、VH及びVL抗体ドメインをコードする配列への組み込みに基づく(図8A、8B)。無傷のインビボ形成されたCDR領域は、入れ換えられ、与えられたマスターフレームワークに組み込まれる。この実施例において、我々は、この概念をさらに発展させ、VH及びVL両方をコードする遺伝子配列を、無傷のCDR領域とともに与えられたマスターフレームワークに組み込んだ。即ち、6つのCDR位置全てが入れ換えられた。CDR増幅のためのテンプレート起源は、末梢血液B細胞、脾臓、扁桃腺及びリンパ腺からのcDNAであった。フレームワーク領域をコードするオリゴヌクレオチドも、一方がビオチニル化された2つのフランキングプライマーの方法を用いて増幅した(プライマーL1,H1,L4,H4,L6,H6)。用いたプライマーは、表6及び図8A、8Bに示す。

表 6

ライブラリー構築に用いたプライマーの配列

B = ビオチン標識した 5' プライマー

フレームワークフラグメントの増幅

BT1. 5' ACA GTC ATA ATG AAA TAC CTA TTG C 3'
 BT2. 5' B-GC ACA GGA GAG TCT CA 3'
 BT3. 5' B-CA CCA TCT CCA GAG ACA ATT CC 3'
 BT4. 5' GGC CGT GTC CTC GGC TCT 3'
 BT5. 5' B-TG GTC ACC GTG AGC AGC 3'
 BT6. 5' CCG CCG GAT CCA CCT 3'
 BT7. 5' CAG GCG GAG GTG GAT CCG GC 3'
 BT8. 5' B-CG GGG GTC CCA GAC GCT 3'
 BT9. 5' B-CG ATT CTC TGG CTC CAA GT 3'
 BT10. 5' CTC ATC CTC GGA CCG GA 3'
 BT11. 5' B-TC GGC GGA GGA ACC AAG CT 3'
 BT12. 5' TGG CCT TGA TAT TCA CAA ACG AAT 3'

10

20

インビボ CDR の増幅

BT13. 5' B-TC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AGC CTC TGG ATT CAC CTT 3'
 BT14. 5' TTC CCT GGA GCC TGG CGG ACC CA 3'
 BT15. 5' B-GG AAT TGT CTC TGG AGA TGG TGA A 3'
 BT16. 5' GTC CGC CAG GCT CCA 3'
 BT17. 5' B-CG CTG CTC ACG GTG ACC AGT GTA CCT TGG CCC CA 3'
 BT18. 5' AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT 3'
 BT19. 5' B-AG CGT CTG GGA CCC CCG GGC AGA GGG TCA CCA TCT CTT 3'
 BT20. 5' GGG CCG TTC CTG GGA GCT GCT GAT ACC A 3'
 BT21. 5' GCT CCC AGG AAC GGC CCC CAA ACT CCT CAT CTA T 3'
 BT22. 5' B-GA CTT GGA GCC AGA GAA TCG GTC AGG GAC CCC 3'
 BT23. 5' B-GT CAG CTT GGT TCC TCC GCC GAA 3'
 BT24. 5' CTC CGG TCC GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC T 3'

30

VH 及び VL の組立体

BT25. 5' B-TA CCT ATT GCC TAC GGC AGC CGC TGG ATT GTT ATT ACT CGC GGC
 CCA GCC GGC CAT GGC CGA 3'
 BT26. 5' CCG CCG GAT CCA CCT CCG CCT GAA CCG CCT CCA CCG CTG CTC ACG
 GTG ACC A 3'

40

増幅プライマー第 2 の組立体

BT27. 5' B-TGG CCT TGA TAT TCA CAA ACG AAT 3'
 BT28. 5' B-ACG GCA GCC GCT GGA TTG 3'

たものと実質的に同じであった。V H及びV Lをコードする遺伝子の組立体についてのP C Rパラメーターは表7に記載する。

表7

ライブラリー構築のためのV H及びV L遺伝子配列の組立体のための
P C Rパラメーター

V H	V L	
プライマー-BT25	プライマー-BT7	30 pmol
プライマー-H1	プライマー-L1	0.6 pmol
プライマー-HCDR1	プライマー-LCDR1	0.6 pmol
プライマー-HCDR2	プライマー-LCDR2	0.6 pmol
プライマー-H4	プライマー-L4	0.6 pmol
プライマー-HCDR5	プライマー-LCDR3	0.6 pmol
プライマー-H6	プライマー-L6	0.6 pmol
プライマー-BT26	プライマー-BT12	30 pmol
Taq	Taq	10 単位
dNTPs	dNTPs	200 μ M
1 x Taq ホットスタート	1 x Taq ホットスタート	100 μ l まで

予備加熱 95 ° 10 分間、20 サイクル : 95 ° 1 分間、68 ° 1 分間、
72 ° 1 分間 及び 72 ° 10 分間。

組み立てられたV H及びV L遺伝子配列は、scFvコード配列に、標準的な方法でを用いて組み込まれた(Griffiths等, 1994)。試験した40のクローンから成員1.1 x 10⁹のライブラリーが構築されたが、それら40のクローン全てが、P C R寒天ゲル電気泳動で測定して正しいサイズの挿入を含んでいた。ライブラリーの変異性を試験するために、P C R増幅し精製した挿入物を、BsTN1及びBamH1で切断した。クローンは、寒天ゲル電気泳動によって測定したコントロールscFv-B11と比較したところ、異なる制限パターンを有していた(図9)。

scFv抗体フラグメントを発現できるクローンの頻度を見積もるために、FLAG配列(Hopp等, 1989)を含むライブラリーからのクローン、並びにFLAG配列有りまたは無しのコントロール細菌を、100 μ g/mlのアンプシリン、25 μ g/mlのテトラサイクリン及び1%のグルコースを含むルリアの肉汁プレートに低密度でプレートした。このプレートを、37 ° で終夜成長させ、標準的な方法によってニトロセルロースフィルターに移した(Sambrook等, 1989)。細菌内でのscFv遺伝子の合成を誘発するため、フィルターを、0.5mMイソプロピル-チオ-D-ガラクトシド(IPTG)を含むがグルコースは含まないプレート上で4時間インキュベーションした。次いで、細菌をリゾチーム/クロロホルム処理で溶解し、フィルターを洗浄し、抗-FLAG M2抗体(Kodak)、次いで抗-マウスペルオキシダーゼ共役二次抗体(P260 Dakopatts)とともにインキュベーションし、DAB 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド(Sigma)によって検出した(表8)。

表 8
ライブラリーにおける無傷の抗体遺伝子の頻度

ライブラリー フォール	試験したクローン	FLAG 陽性クローン	陽性クローン割合
A	145	88	60
B	77	52	67
C	158	105	66
D	68	48	70
全ライブラリーフォール	448	293	65.4
正のコントロール pFAB5His scFvB11	64	64	100
負のコントロール pFAB5His	30	0	0

抗-FLAG抗体は、ライブラリー構築物並びにコントロールベクターpFAB5His scFv-B11におけるscFv遺伝子の下流側に位置するFLAG配列を検出したが、最初のベクターpFAB5cHisでは検出しなかった。従って、抗-FLAG抗体が結合するクローンは、scFv遺伝子の無傷のオープンリーディングフレームを含む。

参考文献

- Barbas, C F et al: Proc Natl Acad Sci USA, 88:7978-82 (1991)
- Barbas, C F et al: Proc Natl Acad Sci USA, 89:4457-61 (1992)
- Cramer, A et al: Biotechniques, 18:194-196 (1995)
- Griffiths, A D et al: EMBO J, 13:3245-3260 (1994)
- Hoogenboom, H R et al: J Mol Biol, 227:381-8 (1992)
- Hopp, T.P. et al: Biotechniques 7: 580-589 (1989)
- Huse, W D et al: Science, 246:1275-81 (1989)
- Larrick, J W et al: Biochem Biophys Res Commun, 160:1250-6 (1989)
- Leung, D W et al: Technique, 1:11-15 (1989)
- Marks, J D et al: Biotechnology, 10:779-83 (1992)
- McCafferty, J et al: Nature, 348:552-4 (1990)
- Moore, J C et al: Nature Biotechnology, 14:458-467 (1996)
- Parmley, S F et al: Gene, 73:305-318 (1988)
- Roberts, S et al: Nature, 328:731-4 (1987)
- Sambrook, J et al: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Stemmer, W P: Nature, 370:389-391 (1994).
- Yang, W P et al: J Mol Biol, 254:392-403 (1995)

10

20

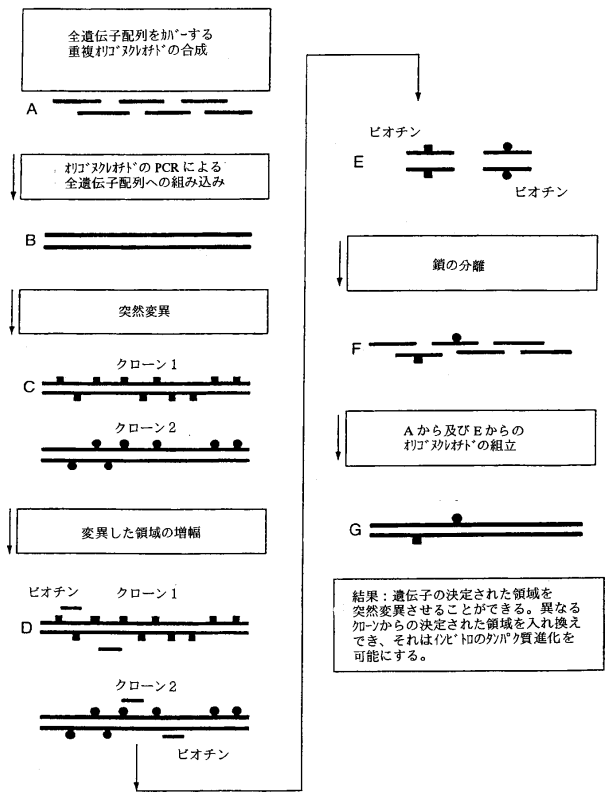
30

40

【 図 1 】

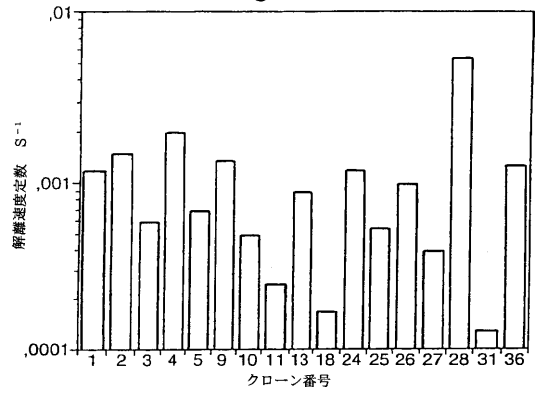
Fig.1.

DNAの決定された領域の入れ換え



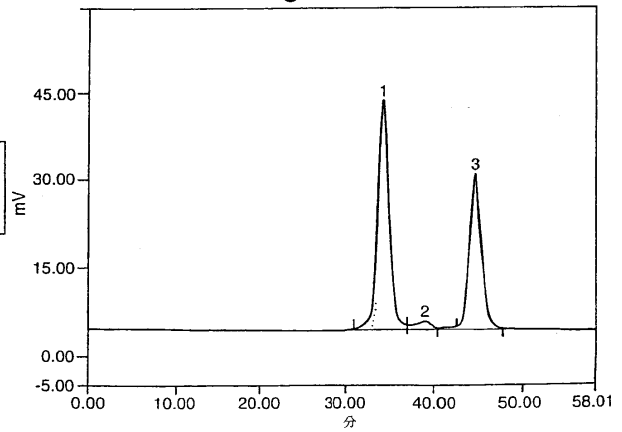
【 図 2 】

Fig.2.



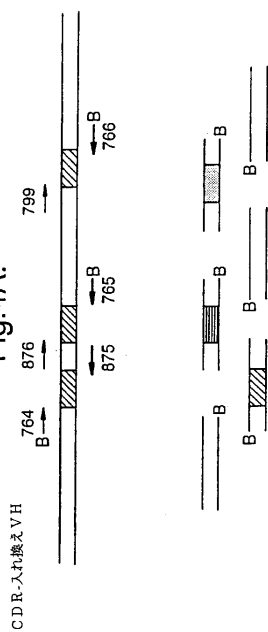
【 図 3 】

Fig.3.



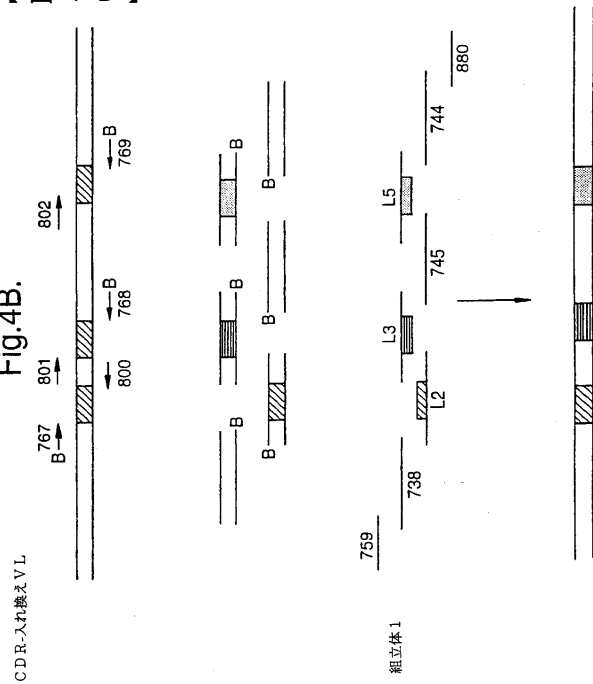
【 図 4 A 】

Fig.4A.



【 図 4 B 】

Fig.4B.



【 図 5 】

CDR1
 クローン 3 1 LAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRRYAMSWVRQAPG
 クローン 3 LAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRRYAMSWVRQAPG
 クローン 1 1 LAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRRYAMSWVRQAPG
 最初 LAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRRYAMSWVRQAPG

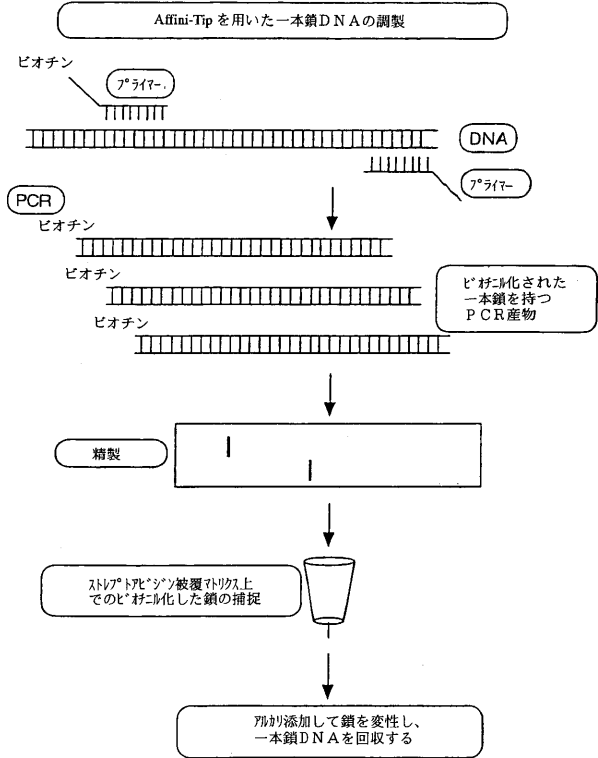
CDR2
 クローン 3 1 KGLEWVSAISGGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTA
 クローン 3 KGLEWVSAISGGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTA
 クローン 1 1 KGLEWVSAISGGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTA
 最初 KGLEWVSAISGGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNISLRAEDTA

CDR3
 クローン 3 1 VYYCARIGQFMGQGTLLVTVSSGGGGGGSSQ
 クローン 3 VYYCARIGQFMGQGTLLVTVSSGGGGGGSSQ
 クローン 1 1 VYYCARIGQFMGQGTLLVTVSSGGGGGGSSQ
 最初 VYYCARIGQFMGQGTLLVTVSSGGGGGGSSQ

Fig.5.

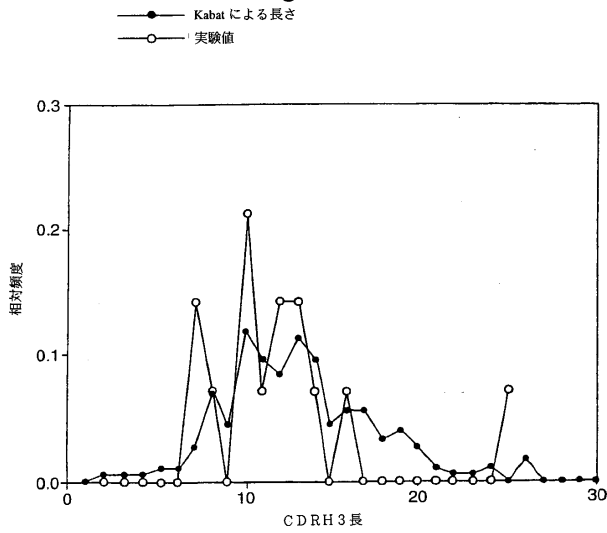
【 図 6 】

Fig.6.

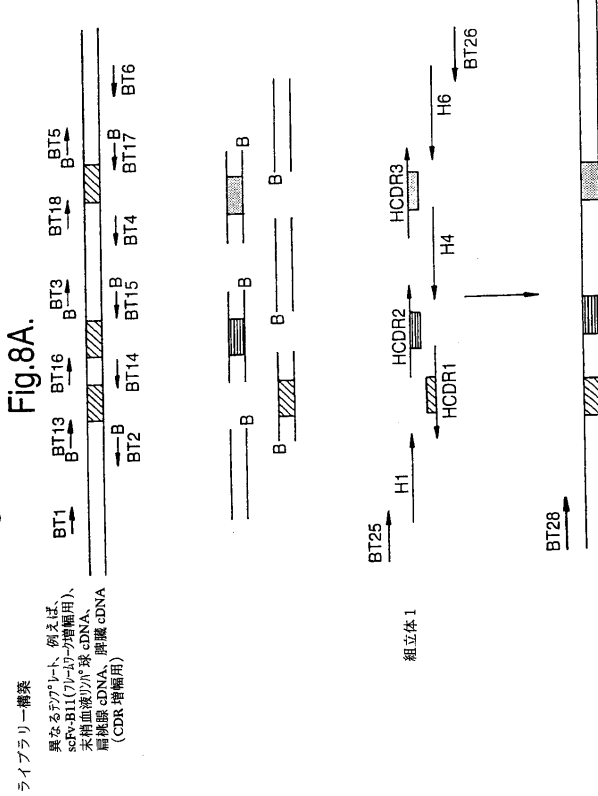


【 図 7 】

Fig.7.



【 図 8 A 】

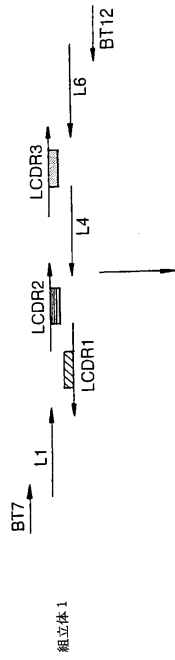
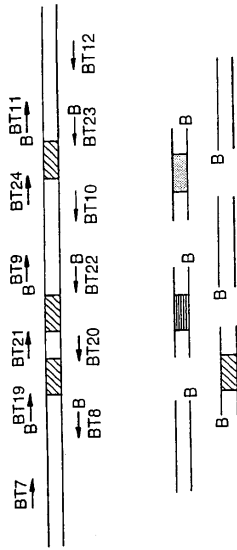


【 8 B 】

Fig.8B.

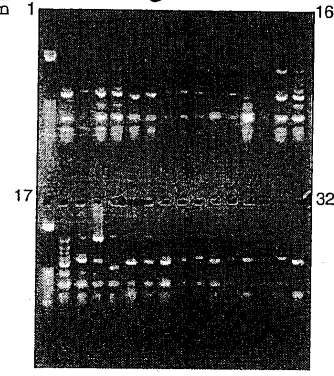
ライブラリー構築

異なるサブクローン、例えば scFv-BT11(CDR1-2)を増幅し、 未標識DNA/標識cDNA、 標識cDNA、 制限cDNA (CDR増幅用)



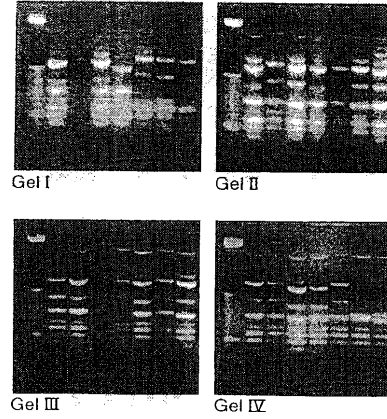
【 9 A 】

Fig.9A.



【 9 B 】

Fig.9B.



フロントページの続き

(72)発明者 ボレバエック, カール アルネ クリスター
スウェーデン国 S 2 4 5 6 2 ヒェールプ アテフェーゲン 8エー

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第96/07754(WO, A1)
国際公開第94/18219(WO, A1)
特開平6-121696(JP, A)
国際公開第94/03627(WO, A1)
特表2001-519643(JP, A)
Gene, Vol. 160, No. 2(1995)p. 269-272
Biotechniques, Vol. 17, No. 2(1994)p. 310, 312, 314-315
Technique, Vol. 1, No. 1(1989)p. 11-15
BioTechniques, Vol. 15, No. 1(1993)p. 68-70, 72-74
Anal. Biochem., Vol. 214, No. (1993)p. 571-579
Biotechniques, Vol. 23, No. 3(1997. Sep.)p. 500-503
Curr. Opin. Immunol., Vol. 9, No. 2(1997. Apr.)p. 201-212
Biotechniques, Vol. 18, No. 2(1995)p. 194-196
Mol. Immunol., Vol. 33, No. 1(1996)p. 47-56

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed