

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-531597

(P2015-531597A)

(43) 公表日 平成27年11月5日(2015.11.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4B024
C4OB 40/10 (2006.01)	C4OB 40/10	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z	4B065
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-528372 (P2015-528372)  
 (86) (22) 出願日 平成24年8月22日 (2012. 8. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月17日 (2015. 4. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/006680  
 (87) 国際公開番号 WO2014/030780  
 (87) 国際公開日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)

(71) 出願人 515047781  
 モガム バイオテクノロジー リサーチ  
 インスティテュート  
 大韓民国 446-799 キョンギード  
 , ヨンインーシ, ギフンーグ, ポジ  
 ユンードン 341  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

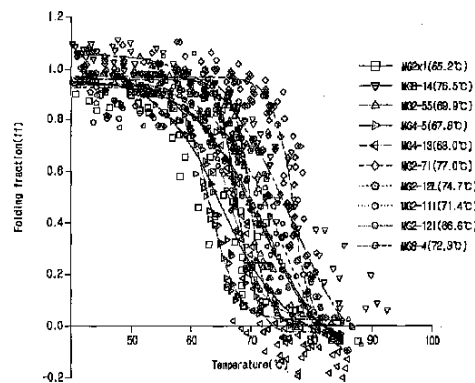
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化された免疫グロブリン可変ドメイン選別方法及び選別されたドメインの応用

(57) 【要約】

本発明はTat信号配列に目的蛋白質と抗生剤耐性蛋白質を結合させた融合蛋白質をコードする遺伝子構造体(construct)を製造して、これを大腸菌で発現させて水溶性(soluble)であり熱力学的安定性が優れた目的蛋白質、特にヒト生殖細胞由来免疫グロブリン可変ドメイン(Immunoglobulin variable domain、VHまたはVL)の目的蛋白質を選別するTat-経路基盤蛋白質水溶性スクリーニング(TAPE:Tat-Associated Protein Engineering)と命名された方法及び前記TAPE方法によって選別された水溶性であり熱力学的安定性が優れたヒトVH及びVLドメイン抗体及びヒトVH及びVLドメイン抗体骨格(scaffold)に関する。

【選択図】 図11



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

目的蛋白質のN-末端にTat-信号配列が結合され、C-末端には抗生剤耐性付与蛋白質が結合された融合蛋白質をコードする遺伝子構造体。

## 【請求項 2】

前記目的蛋白質は、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体断片、受容体または受容体リガンドであることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝子構造体。

## 【請求項 3】

前記遺伝子構造体は、免疫グロブリンの重鎖可変ドメインであることを特徴とする請求項 2 に記載の遺伝子構造体。

## 【請求項 4】

追加的に分離精製または検出のためのアミノ酸タグ(Tag)が結合されていることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝子構造体。

## 【請求項 5】

前記アミノ酸タグは、6xHisタグ、フラグタグ及びc-mycタグからなる群から選択されたことを特徴とする請求項 4 に記載の遺伝子構造体。

## 【請求項 6】

前記Tat-信号配列は、TorA、Cuo0、DmsA、FdnG、FdoG、HyaA、NapA、Suf1、WcaM、TagT、YcbK、YcdB、YdhX及びYnfEからなる群から選択されたことを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝子構造体。

## 【請求項 7】

前記抗生剤耐性付与蛋白質は、TEM-1ベータ-ラクタマーゼであり、前記Tat-信号配列は、TorAであることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝子構造体。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の遺伝子構造体を含むベクター。

## 【請求項 9】

前記ベクターは、pET22b、pAE34、pET9a及び pMKから選択されたいずれか一つのベクターに遺伝子構造体が挿入されたことを特徴とする請求項 8 に記載のベクター。

## 【請求項 10】

前記ベクターは、pET-TAPEであることを特徴とする請求項 8 に記載のベクター。

## 【請求項 11】

請求項 8 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

## 【請求項 12】

前記宿主細胞は、大腸菌であることを特徴とする請求項 11 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の遺伝子構造体で形質転換された一つ以上の宿主細胞で構成された宿主細胞群。

## 【請求項 14】

前記宿主細胞群に含まれた各宿主細胞は、互いに異なる目的蛋白質を含む融合蛋白質をコードする遺伝子構造体に形質転換されたことを特徴とする請求項 13 に記載の宿主細胞群。

## 【請求項 15】

前記宿主細胞は、グラム-陰性(gram-negative)菌であることを特徴とする請求項 13 に記載の宿主細胞群。

## 【請求項 16】

下記の工程を含んで構成される水溶性目的蛋白質の選別方法：

(1) 請求項 13 に記載の宿主細胞群を抗生剤が含まれた液状培地で培養する工程；

宿主細胞群を抗生剤が含まれた液状培地で培養する工程；

(2) 生存した宿主細胞を回収してプラスミド(plasmid) DNAを回収する工程；

(3) 回収されたプラスミドDNAで目的蛋白質をコードする核酸配列を回収する工程； 及

10

20

30

40

50

び

(4)回収された核酸配列から目的蛋白質の配列を確認して選別する工程。

【請求項17】

工程(3)以後、

(3′)回収された核酸配列を再びTat-信号配列をコードする遺伝子及び抗生剤耐性付与遺伝子に作動可能に連結させた遺伝子構造体を製作して、これを再び宿主細胞群に形質転換させる工程;及び

(3′′)別途の遺伝子構造体製作なしに回収された核酸配列を含むプラズミドを直ちに宿主細胞群に形質転換させる工程;のうち選択された一つの工程を追加的に含み、

工程(1)乃至工程(3′)または工程(1)乃至(3″)は、2ラウンド(round)以上繰り返すことを特徴とする請求項16に記載の水溶性目的蛋白質の選別方法。 10

【請求項18】

前記抗生剤は、アンピシリン(ampicillin)またはカルベニシリン(carbenicillin)であることを特徴とする請求項16または請求項17に記載の水溶性目的蛋白質の選別方法。

【請求項19】

前記抗生剤は、ラウンドが繰り返されるにつれ少しずつ高い濃度で添加されることを特徴とする請求項17に記載の水溶性目的蛋白質の選別方法。

【請求項20】

最初ラウンドでの抗生剤の濃度は、0.05~0.2μg/mlであることを特徴とする請求項16に記載の水溶性目的蛋白質の選別方法。。 20

【請求項21】

下記FR1乃至FR4のアミノ酸配列を持つ水溶性VHドメイン抗体骨格:

1) FR1:  $X_0VQLX_1X_2X_3GX_4X_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}CX_{14}X_{15}X_{16}GX_{17}X_{18}X_{19}$

前記FR1のアミノ酸配列において、

$X_0$ は、Eまたは、Qであり、

$X_1$ は、Vまたは、Lであり、

$X_2$ は、Eまたは、Qであり、

$X_3$ は、Sまたは、Aであり、

$X_4$ は、Gまたは、Aであり、

$X_5$ は、G、M、N、Vまたは、Eであり、 30

$X_6$ は、L、Vまたは、Wであり、

$X_7$ は、V、K、Aまたは、Iであり、

$X_8$ は、Q、Kまたは、Hであり、

$X_9$ は、G、T、A、R、E、Sまたは、Tであり、

$X_{10}$ は、L、V、Rまたは、Mであり、

$X_{11}$ は、Rまたは、Kであり、

$X_{12}$ は、L、Iまたは、Vであり、

$X_{13}$ は、S、Aまたは、Tであり、

$X_{14}$ は、A、E、V、R、I、K、Tまたは、Sであり、

$X_{15}$ は、A、G、P、Vまたは、Tであり、 40

$X_{16}$ は、S、F、または、Yであり、

$X_{17}$ は、F、Y、R、Gまたは、Lであり、

$X_{18}$ は、T、A、S、N、T、P、I、N、Hまたは、Aであり、

$X_{19}$ は、F、L、Vまたは、Cであり、

2) FR2:  $WX_{20}RX_{21}X_{22}PGX_{23}GX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$

前記FR2のアミノ酸配列において、

$X_{20}$ は、V、Aまたは、Lであり、

$X_{21}$ は、Q、N、R、I、K、Y、V、M、S、Q、W、F、L、Vまたは、Cであり、

$X_{22}$ は、A、G、K、S、V、Mまたは、Tであり、

$X_{23}$ は、K、Q、E、Rまたは、Tであり、 50

$X_{24}$  は、L、N、I、P、Y、T、V、W、A、R、Mまたは、Sであり、

$X_{25}$  は、Vまたは、Eであり、

$X_{26}$  は、W、I、V、P、F、H、M、Y、L、Cまたは、Rであり、

$X_{27}$  は、V、M、Iまたは、Lであり、

$X_{28}$  は、S、Aまたは、Gであり、

3) FR3:  $X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}D$   
 $X_{52}X_{53}X_{54}YX_{55}C X_{56}X_{57}$

前記FR3のアミノ酸配列において、

$X_{29}$  は、R、H、Qまたは、Tであり、

$X_{30}$  は、F、V、Lまたは、Iであり、

$X_{31}$  は、T、Sまたは、Iであり、

$X_{32}$  は、I、L、V、Mまたは、Rであり、

$X_{33}$  は、S、Tまたは、Dであり、

$X_{34}$  は、R、A、V、Nまたは、Iであり、

$X_{35}$  は、D、Nまたは、Aであり、

$X_{36}$  は、N、T、D、I、R、K、Yまたは、Eであり、

$X_{37}$  は、A、S、Vまたは、Tであり、

$X_{38}$  は、K、R、T、Q、V、E、M、Nまたは、Iであり、

$X_{39}$  は、N、R、T、K、S、Dまたは、Vであり、

$X_{40}$  は、T、M、S、V、I、Yまたは、Aであり、

$X_{41}$  は、L、V、Aまたは、Mであり、

$X_{42}$  は、F、Y、N、D、Hまたは、Sであり

$X_{43}$  は、Lまたは、Mであり、

$X_{44}$  は、Q、E、Hまたは、Nであり、

$X_{45}$  は、M、L、V、Iまたは、Wであり、

$X_{46}$  は、N、T、K、D、Y、Iまたは、Sであり、

$X_{47}$  は、Sまたは、Nであり、

$X_{48}$  は、Lまたは、Vであり、

$X_{49}$  は、R、Kまたは、Tであり

$X_{50}$  は、D、A、S、P、T、V、Iまたは、Sであり、

$X_{51}$  は、E、A、Dまたは、Sであり、

$X_{52}$  は、T、Nまたは、Sであり、

$X_{53}$  は、S、Aまたは、Gであり、

$X_{54}$  は、V、I、Lまたは、Mであり、

$X_{55}$  は、Yまたは、Fであり、

$X_{56}$  は、A、G、Vまたは、Sであり、

$X_{57}$  は、R、S、K、T、L、Nまたは、Fであり、

4) FR4:  $X_{58}GX_{59}GX_{60}X_{61}VTVSS$

前記FR4のミノ酸配列において、

$X_{58}$  は、W、C、Y、G、Sまたは、Aであり、

$X_{59}$  は、Q、Rまたは、Lであり、

$X_{60}$  は、A、T、Iまたは、Vであり、

$X_{61}$  は、L、M、P、Vまたは、Tである。

#### 【請求項 2 2】

前記FR1乃至FR4は、下記アミノ酸配列を持つことを特徴とする請求項 2 1 に記載のVHドメイン抗体骨格：

1) FR1:  $X_0VQLX_1X_2SGGX_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}RX_{12}SCX_{14}X_{15}SGX_{17}X_{18}X_{19}$

前記FR1のアミノ酸配列において、

$X_0$  は、Eまたは、Qであり、

$X_1$  は、Vまたは、Lであり、

10

20

30

40

50

$X_2$  は、Eまたは、Qであり、  
 $X_5$  は、G、M、N、Vまたは、Eであり、  
 $X_6$  は、Lまたは、Vであり、  
 $X_7$  は、V、または、Kであり、  
 $X_8$  は、Q、Kまたは、Hであり、  
 $X_9$  は、G、T、A、R、E、または、Tであり、  
 $X_{10}$  は、L、または、Vであり、  
 $X_{12}$  は、L、または、Vであり、  
 $X_{14}$  は、A、E、V、I、Kまたは、Sであり、  
 $X_{15}$  は、A、Gまたは、Vであり、  
 $X_{17}$  は、F、Y、R、Gまたは、Lであり、  
 $X_{18}$  は、T、A、S、N、T、P、I、N、Hまたは、Aであり、  
 $X_{19}$  は、F、L、Vまたは、Cであり、

10

2) FR2: WVRX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>PGX<sub>23</sub>GX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>

前記FR2のアミノ酸配列において、

$X_{21}$  は、Q、N、R、I、K、Y、V、M、S、Q、W、F、L、Vまたは、Cであり、  
 $X_{22}$  は、A、G、K、Sまたは、Mであり、  
 $X_{23}$  は、K、Q、E、Rまたは、Tであり、  
 $X_{24}$  は、L、N、I、P、Y、T、V、W、A、R、Mまたは、Sであり、  
 $X_{25}$  は、Vまたは、Eであり、  
 $X_{26}$  は、W、I、V、P、F、H、M、Y、L、Cまたは、Rであり、  
 $X_{27}$  は、V、M、Iまたは、Lであり、  
 $X_{28}$  は、S、Aまたは、Gであり、

20

3) FR3: RX<sub>30</sub>TX<sub>32</sub>SX<sub>34</sub>DX<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>X<sub>41</sub>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub>X<sub>47</sub>X<sub>48</sub>X<sub>49</sub>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>DTAX<sub>54</sub>YX<sub>5</sub>

<sup>5</sup>CX<sub>56</sub>X<sub>57</sub>

前記FR3のアミノ酸配列において、

$X_{30}$  は、F、V、Lまたは、Iであり、  
 $X_{32}$  は、I、L、Vまたは、Mであり、  
 $X_{34}$  は、R、A、V、Nまたは、Iであり、  
 $X_{36}$  は、N、T、D、I、R、K、Yまたは、Eであり、  
 $X_{37}$  は、A、S、Vまたは、Tであり、  
 $X_{38}$  は、K、R、T、Q、V、E、M、Nまたは、Iであり、  
 $X_{39}$  は、N、R、T、K、S、Dまたは、Vであり、  
 $X_{40}$  は、T、M、S、V、I、Yまたは、Aであり、  
 $X_{41}$  は、L、V、Aまたは、Mであり、  
 $X_{42}$  は、F、Y、N、D、Hまたは、Sであり、  
 $X_{43}$  は、Lまたは、Mであり、  
 $X_{44}$  は、Q、E、Hまたは、Nであり、  
 $X_{45}$  は、M、L、V、Iまたは、Wであり、  
 $X_{46}$  は、N、T、K、D、Y、Iまたは、Sであり、  
 $X_{47}$  は、Sまたは、Nであり、  
 $X_{48}$  は、Lまたは、Vであり、  
 $X_{49}$  は、R、Kまたは、Tであり、  
 $X_{50}$  は、D、A、S、P、T、V、Iまたは、Sであり、  
 $X_{51}$  は、E、A、Dまたは、Sであり、  
 $X_{54}$  は、V、I、Lまたは、Mであり、  
 $X_{55}$  は、Yまたは、Fであり、  
 $X_{56}$  は、A、G、Vまたは、Sであり、  
 $X_{57}$  は、R、S、K、T、L、Nまたは、Fであり、

30

40

4) FR4: X<sub>58</sub>GQGX<sub>60</sub>X<sub>61</sub>VTVSS

50

前記FR4のアミノ酸配列において、  
 X<sub>58</sub>は、W、C、Y、G、Sまたは、Aであり、  
 X<sub>60</sub>は、A、T、Iまたは、Vであり、  
 X<sub>61</sub>は、L、M、Vまたは、Tである。

## 【請求項 2 3】

下記FR1乃至FR4のアミノ酸配列を持つ骨格中から選択されることを特徴とする請求項 2  
 1に記載のVHドメイン抗体骨格：

## 【表 9 - 1】

骨格名	FR1	FR2	FR3	FR4
M1X8	QVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDNKNTLFLQMNSLR	WGQGAL
	LRLSCAASGFTF	GLVWVS	DEDTSVYYCAR	VTVSS
M2X1	EVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDNKNTLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCAS	VTVSS
M2X1- 34	QVQLVESGGNVVQPGTS	WVRQAPGK	RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLR	WGQGILV
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	AEDTAVYYCGR	TVSS
M2X2- 12	QVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQ	RVTLTRDTSTRTVYMELKNLR	WGQGTL
	VKISCEASGYAF	GLEWVG	SADTGVYYCAR	VTVSS
M2X2- 13	EVQLLESAGGAVVQPGKS	WVRQAPGK	RFTISRDNKNTMVLNQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCVGSQFSF	GLEWLA	PDDTAVYFCAR	VTVSS
M3X1	QVQLVESGGGVVQPGRS	WLRQAPGK	RFTISRDNKNTLYLEMNSLR	CGQGTL
	LRLSCVASGFNF	GLEWVA	PEDTAVYYCAK	VTVSS
M3X10	EVQLVESGGGLVKPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDDSKNMVYLQMNSLK	YGQGTLV
	LRVSCAASGFTF	GLEWVG	TEDTAVYYGTT	TVSS
M4X1-8	EVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQGPGE	RFTISRDNKNTVYLEMNSVR	WGQGAL
	LRLSCAASGFSF	GLVWLS	VDDTAVYYCVS	VTVSS
M4X1- 33	QVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDDSTNTLYLQVNSLR	WGRGTL
	LRLSCEASGFPF	GLEWVS	AEDTAVYYCAK	VTVSS
M4X1- 35	EVQLLESAGGGLVKPGGG	WVRQAPGK	RFTVSRDNVQKSLDLQMDSL	WGQGTT
	LRLSCVGSERSF	GLEWVA	RAEDTAVYFCAR	VTVSS
M4X3- 27	EVQLLESAGGLAQSGGS	WVRQAPGK	RFTISRDIKNSLYLQMNSLRD	WGQGAL
	LRLSCAASGFTF	GLEWIS	EDTAVYYCAK	VTVSS
M4X4-2	EVQLVQSGAEVKKPGES	WARDKPGK	HVTISSDRSVSVAYLQWDSLK	WGQGTL
	LRISCRGSGYRF	GLEWIG	ASDNGIYYCAL	VTVSS

10

20

30

40

【表 9 - 2】

M4X4-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVPSGFTF	WVRQAPGKGLVWVS	RFTISRDN AEDTLFLQMNSLRVDDTAVYYCVR	WGQGVLVTVSS
M4X4-25	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFSL	WVRRSPGKGLEWVA	RFTVSRDN AKNSLFLQMNNV RPEDTALYFCAR	WGQGTMTVTVSS
M4X4-44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWVA	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYFCAR	WGQGTMTVTVSS
M4X5-30	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWLS	RFTISRNN AKNSLYLQMNSLRVDDTAVYYCAR	WGQGTMTVTVSS
M4X6-27	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQGP GKGLEWVA	RFTISRDN AENSLYLQVNSLRAEDTAIYYCAK	WGQGGALVTVSS
M4X6-48	EVQLLES GGGVVQPGRSLRLSCEVFGFTL	WVRQAPGR RLEWVA	RFTISRDIATNRLYLQMRSLRAEDTALYFCAR	WGQGTMTVTVSS
M4X7-15	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF SF	WVRQAPGKGLEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAV	WGQGTMTVTVSS
M4X8-24	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWVS	RFTISRDN SNNTLYLQMNSLRADDTAVYFCAK	WGQGTMTVTVSS
M0.5X-1	QVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQVP GKGLEWVA	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN	WGQGTMTVTVSS
M0.5X-3	QVQLVES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFTF	WVRQAPGT GLLWLS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGXXGTMTVTVSX
M0.5X-4	EVQLLES GGMLVKPGESLRLSCVGSGLIF	WVRHAPGKGLEWVG	RLSISRDDS MNTVYLDIYNLKI DDTGVYYCTF	WGQGTPTVTVSS
M0.5X-14	EVQLLES GGGLVHAGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWVA	RFTISRDN SKNSMYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGQGTMTVTVSS
M0.75X-4	QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF	WLRQAPGK GPEYVA	RFIISRDDS NDMLYLEMISLKS EDTAVYYCSD	GSQGTMTVTVSS

10

20

30

40

【表 9 - 3】

M2X-5	EVQLLESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLHMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCVK	VTVSS
M2X-15	QVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCAK	VTVSS
M4X-5	QVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTVSRDN SRNTLYLQMKSL	WGQGT
	LRLSCEASGLHF	GLEWVA	AEDTAVYYCAK	VTVSS
M1-4	QVQLVEAGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDN SQNSLFLQMNSLR	WGQGT
	LRLACAASGFTF	GLEWIS	AEDTAVYYCAT	VTVSS
M1-6	EVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGK	HVTISVDK SISTAYLQWSSLK	WGQGTL
	LRKSCKGSGYSF	GLEWVG	SDSAMYFL	VTVSS
M1-7	QVQLVESGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	DEDTAVYYCAR	VTVSS
M1-8	EVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQ	RVTMTRDT SSTAYMELNRL	WGQGTL
	VKVSCKASGYTF	GLEWVG	SDDTAVYFCAR	VTVSS
M1-9	EVQLVEAGGGLVQPGGG	WVRQAPGK	RFTISRDN AQNSLFLQMNSLR	WGQGT
	LRLACAASGFTF	GLEWIS	AEDTAVYYCAT	VTVSS
M1-10	EVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGR	QVTMSANR SISTAYLQWSSLK	WGQGT
	LKISCKGSGYSF	GLEWLG	ASDTGIYYCAT	VTVSS
M5-1	QVQLVESGGGLIQPGESL	WVRQAPGK	RFTISRDN STQNTVHLQMNSLT	WGQGTL
	RLSCEAFGFTV	GLEWVS	AEDTAVYYCAR	VTVSS
M5-2	EVQLVQSGAELKKPGSS	WVRQAPGQ	RLILSVDEP TRTVYMELTSLRS	WGQGT
	VKVSCTSSGGSF	GLEWVG	DDTAMYCAR	VTVSS
M5-4	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDN AKDSLFLQMNSLR	WGQGT
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	PEDTALYYCAR	VTVSS
M5-5	EVQLLESGGGVVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDN YSNKIVHLEMDSLRA	WGQGTL
	LRLSCVASGFTF	GLEWVS	EDTAVYFCVR	VTVSS

10

20

30

40

【表 9 - 4】

M5-6	EVQLLESGGGLVKPGGS	WVRQAPGK	RFTISRDDSRDMLYLQMNNLK	SSQGTLV
	LRLSCAASGFTF	GLECVA	TEDTAVYYGSD	TVSS
M5-7	EVQLVESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDDSKSIVYLQMSSLQT	WGRGTL
	LRLSCTTSGFSF	GLEWVS	EDTAVYYCSR	VTVSS
M5-9	EVQLLESGGGLVLRPGGS	WVRQAPGK	TISRDNAKNSVYLMNSLRAE	WGQGTL
	LRLSCSASGFAF	GLEWVS	DSAVYFCAR	VTVSS
M10-1	QVQLVESGGNVVQPGTS	WVRQAPGK	RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLR	WGQGILV
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	AEDTAVYYCGR	TVSS
M10-2	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDNAKDSLYLQMDSLRL	APQGTLV
	LRLTCVGYGFTF	GPEWVA	PEDTAVYYCAR	TVSS
M10-4	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	QFTISRDNAKNTLYLQMNSLR	WGQGTML
	LRLSCAASGFIL	GLVWVS	VEDTAVYYCAR	VTVSS
M10-5	EVQLLESGGGVVHPGRS	WVRQAPDK	RFTVSRDISKNTVYLMNSLR	WGQGTML
	LRLSCAVSGFSL	GLEWVA	AEDTALYYCAR	VTVSS
M10-6	EVQLLESGGGLVQPGRS	WFRQGPVK	RFTISRDDSKNSLSLQMDSLRL	WGQGTV
	RRLSCAASGFTF	GLEWVA	TEDTAVYYCVR	VTVSS
M10-8	QVQLVESGGGVVQPGRS	WVRQTPGR	RFTISRDNNSNNTVYLEMNSLR	WGLGTV
	LRLSCVASGFAF	GLEWLA	PEDSAIYYCAK	VTVSS
M10-10	QVQLVESGGVVVQPGGS	WVRQAPGK	RFTISRDNKNSLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	TDETALYYCV	VTVSS
M2	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR	WGQGTTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	TDETAVYYCAR	VTVSS
M5	EVQLLQSGGGWVKPGGS	WVRQAPGK	RFTISIDESRNALFLHMNSLTT	WGQGTL
	LRLSCAASGFIC	GLEWVG	DDTAVYYCST	VTVSS
M6	EVQLLESGGGVVVQPGRS	WVRQAPGK	RFTVSRDTSTNTLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	VEDTAVYYCAR	VTVSS

10

20

30

40

【表 9 - 5】

M7	QMQLVQSEAEVKKPGAS	WVRQATGQ	RVTMTRNTSISTAYMELSSLT	WGQGTL
	MKVSCKASGYTF	GLEWMG	SADTAVYYCAR	VTVSS
M10	QVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGK	QVTISADKSISTAFLQWNSLKA	WGLGLTLV
	LKISCKGSGYSF	GLEWMG	SDTAMYYCAR	TVSS

10

## 【請求項 2 4】

下記FR1乃至FR4のアミノ酸配列を持つ骨格中から選択されることを特徴とする請求項 2 1 に記載のVHドメイン抗体骨格：

【表 10 - 1】

骨格名	FR1	FR2	FR3	FR4
M8-21	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKG NEIVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-12L	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRRAPGKG IEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-7I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKG PEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-9I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRKAPGKG YEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-10I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKG YEIVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-11I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKG YEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-12I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKG IEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-32	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRMAPGK GPEHVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-34	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRSAPGKG VEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-40	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRTAPGKG TEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-46	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRCAPGKG YEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-47	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKG LEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS

10

20

30

40

【表 10 - 2】

M2-48	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRMAPGK GLEYS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-51	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKG TEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-53	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GVEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-55	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRWAPGK GPEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-57	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG REWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-58	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG CELVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-59	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRKAPGKG LETVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-60	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKG LECVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-64	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRCAPGKG WEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-12	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRLAPGKG VELVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-13	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG AEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-17	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRLAPGKG REWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-18	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKG VEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS

10

20

30

40

【表 10 - 3】

M4-20	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG LEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-28	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKG TERVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-2	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKG MEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-32	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRAAPGKG PELVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-33	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKG YEHVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-34	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKG LECVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-5	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKG PETVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-6	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRMAPGK GSEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-7	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRLAPGKG TEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M8-11	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRTAPGKG AEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M8-12	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRWAPGK GKEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M8-13	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GIEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M8-14	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GPEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS

10

20

30

40

【表 10 - 4】

M8-4	EVQLVESGGGLVQPG	WVRQAPGK	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	GPEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-5	EVQLVESGGGLVQPG	WVRTAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	IEIVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-6	EVQLVESGGGLVQPG	WVRIAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	VEIVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-8	EVQLVESGGGLVQPG	WVRAAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	LEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS

10

## 【請求項 25】

請求項 21 から 24 のいずれかに記載の VH ドメイン抗体骨格をコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 26】

請求項 21 から 24 のいずれかに記載の VH ドメイン抗体骨格を持つ VH ドメイン抗体。

20

## 【請求項 27】

請求項 26 に記載の VH ドメイン抗体をコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 28】

請求項 21 から 24 のいずれかに記載の VH ドメイン抗体骨格にヒト由来無作為 (random) CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 が挿入された VH ドメイン抗体ライブラリー。

## 【請求項 29】

前記挿入された CDRH3 のアミノ酸残基の個数は、5 ~15 であることを特徴とする請求項 28 に記載の VH ドメイン抗体ライブラリー。

## 【請求項 30】

前記挿入された CDRH3 のアミノ酸残基の個数は、7 ~13 であることを特徴とする請求項 28 に記載の VH ドメイン抗体ライブラリー。

30

## 【請求項 31】

前記ヒト由来無作為 (random) CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 は、突然変異が誘発されたことを特徴とする請求項 28 に記載の VH ドメイン抗体ライブラリー。

## 【請求項 32】

カバット (Kabat) 配列順番体系を基準に、CDRH1 の 30 番及び 31 番、CDRH2 の 53 番及び CDRH3 の 97 番、99 番、100 番、100a 番位置で選択された一つ以上の位置で突然変異が誘発されたことを特徴とする請求項 31 に記載の VH ドメイン抗体ライブラリー。

## 【請求項 33】

前記ライブラリーは天然、合成または免疫ライブラリーであることを特徴とする請求項 28 に記載の VH ドメイン抗体ライブラリー。

40

## 【請求項 34】

請求項 28 に記載の VH ドメイン抗体ライブラリーを利用した目的とする抗原に対する結合能を持つ VH ドメイン抗体の選別方法。

## 【請求項 35】

前記目的とする抗原に対する結合能を持つ VH ドメイン抗体の選別は、固定された目的とする抗原に結合した VH ドメイン抗体を除いた残りの結合しない VH ドメイン抗体を湧出 (elution) して選別することを特徴とする請求項 33 に記載の VH ドメイン抗体の選別方法。

## 【請求項 36】

50

前記固定された目的とする抗原に結合しないVHドメイン抗体を湧出する過程を二回以上繰り返すことを特徴とする請求項34に記載のVHドメイン抗体の選別方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Tat信号配列に目的蛋白質と抗生剤耐性蛋白質を結合させて、これを大腸菌で発現させて、水溶性(soluble)であり熱力学的安定性が優れた目的蛋白質、特にヒト生殖細胞由来免疫グロブリン可変ドメイン(Immunoglobulin variable domain、VHまたはVL)の目的蛋白質を選別するTat経路基盤蛋白質水溶性スクリーニング(TAPE:Tat-Associated Protein Engineering)と命名された方法及びTAPE方法によって選別された水溶性であり熱力学的安定性が優れたヒトVH及びVLドメイン抗体及びヒトVH及びVLドメイン抗体骨格(scaffold)に関し、そのようなVH及びVLドメイン抗体及びそのような抗体骨格(scaffold)のアミノ酸配列及びこれをエンコードするポリヌクレオチドに関する。

【0002】

本発明により選別されたヒトVHまたはVL骨格(scaffold)を含むVHまたはVLドメイン抗体は、CDR配列と関係なく該当ヒトVH及びVLドメイン抗体骨格を持つ場合、依然として水溶性であり熱力学的安定性を維持する。

【0003】

また本発明は、TAPE方法によって選別されたヒトVHまたはVLドメイン抗体骨格に無作為的(random) CDR配列を含むライブラリー及びその製造方法に関する。

【0004】

本発明は、そのようなライブラリーを利用して選別された目的蛋白質に結合能を持つVHまたはVLドメイン抗体、そのようなドメイン抗体のアミノ酸配列及びこれをエンコードするポリヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0005】

断片化された小さい大きさの抗体は、既存のモノクローナル抗体(monoclonal antibody、mAb)とは違った差別性によって既存の抗体治療剤の限界を克服できる抗体形態で有望である。一般的な断片化抗体は、一本鎖抗体(single chain antibody:scFv)、Fab(Fragment antibody-binding)、VHやVLのようなイムノグロブリン可変領域抗体(Immunoglobulin variable domain antibody)等があって、これらの変形形態であるタンデム(tandem) scFv、二重特異性抗体(diabody)、低分子抗体(minibody)等がある(Better et al., Science 1988 240(4855):1041-3; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1988 85(16):5879-83; Bird et al., Science 1988 242(4877):423-6; Pei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997 94(18):9637-42; Iliades et al.,FEBS Lett. 1997 409(3):437-41; Ward et al., Nature 1989 341(6242):544-6)。

【0006】

従来のモノクローナル抗体と比較すると、断片または小型抗体の場合は、Fc(crystallizable fragment)の機能が喪失された場合が多いので、Fcの存在による血中半減期(hALFLife)増大及び細胞殺害機能(effector function)等の効果が期待できないとの短所がある。

【0007】

しかし、小さい大きさの断片化抗体は、既存の全抗体(whole antibody)の大きい大きさによる短所である構造的に隠されているエピトープ(epitope)接近の限界性、薬の浸透性(penetration)及び分布(biodistribution)、形態の変性(format flexibility)、高生産費用などの限界を克服できる次世代抗体の形態として浮上している(Zhao et al., Blood 2007 110(7):2569-77; Holliger et al., Nat. Biotechnol. 2005 23(9):1126-36; Hudson et al., Med. Microbiol. Immunol. 2009 198(3):157-74; Enev 50

er et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009 20(4):405-11)。

【0008】

さらには、各種断片及び小型抗体は、化学的または、組換え蛋白質融合の方法で連結して二重または多重特異性を簡単に実現することができる長所がある。

【0009】

このような長所を活用して、最近既存抗体のFc機能をモジュール(module)化された形態で多重特異性を導入すると短所と指摘されてきたエフェクター(effector)機能及び短い血中半減期の補完が可能な形態に発展している。例えば、ヒト血漿アルブミン(Human Serum Albumin)に対する結合特異性を持つ断片または小型抗体をモジュールとして導入して、二重特異性抗体を実現して血中半減期を伸ばしたり、自然殺害細胞(Natural Killer)やT細胞のような免疫機能の細胞に特異的に親和的な小型抗体をモジュールとして導入して抗体に細胞殺害機能を与えることができる(Els et al., *J Biol Chem.* 2001 9; 276(10):7346-50; Bargou et al., *Science* 2008 321(5891):974-7; et al., *Mol. Cancer Ther.* 2008 7(8):2288-97)。そして、それぞれ異なる作用モードを期待する二つ以上の分子ターゲットに対して、一つの抗体に特異性を与えることができる形態で設計が可能であるため、抗体の効能と経済性を画期的に改善させる可能性を広げることができる。

【0010】

ヒト抗体の構造で抗原特異的結合の機能を有した最小限の単位は、軽鎖または重鎖のN-末端に位置する可変ドメインである重鎖可変領域ドメイン(VH:heavy chain variable domain)と軽鎖可変領域ドメイン(VL:light chain variable domain)である。各二つのN-末端は、互いに相補的な構造に進化したので、プラズマB細胞からモノクローナル抗体が生産される時、軽鎖と重鎖が合体される過程で $V_H$ と $V_L$ は、非共有結合形態の複合体を成してこれを介して構造的安定性を維持する。ヒト抗体可変ドメインVHセグメント(segment)の場合、エピトープに結合するCDR (Complementary Determinant Region)部分を除いたフレームの部分のアミノ酸配列の相同性により七つのファミリー(family)で区分(VH1、VH2、VH3、VH4、VH5、VH6、VH7)され、各ファミリーは、三つで22種類の固有のアミノ酸配列が含まれている。軽鎖のVLの場合は、 $V_{\kappa}$ と $V_{\lambda}$ に区分されて、それぞれ $V_{\kappa}$ は6種類、 $V_{\lambda}$ は10種類のファミリーに分類される(Chothia et al., 1992 *J. Mol. Biol.* 227, 799-917; Tomlinson et al., 1995 *EMBO J.* 14, 4628-4638; Williams et al., *J. Mol. Biol.* 264, 220-232)。数多くのVH及びVLは、互いの相互親和程度により好まれるVH/VL組み合わせがあると知られてね抗体レパートリー(repertoire)の多様性を増大させるのにこのような遺伝子の組み合わせによる再配列(combinatorial rearrangement)が重要な役割をすると知られている(Ruud et al., *J. Mol. Biol.* 1999, 285, 895-901)。

【0011】

結合された形態のVH/VLは、6個のCDR組み合わせにより互いに相補的に特定抗原に対する結合特異性を与える。軽鎖の可変ドメインに3個(light chain CDR1、2、及び3)、重鎖の可変ドメインに3個(heavy chain CDR1、2、及び3)、合計6個のCDRが抗原の結合に参加している。ヒト生殖系列塩基配列分析を介した研究結果によると、それぞれのCDRの多様性は、多くは重鎖可変ドメインのCDR3によって決定されることが明らかになった。従って、このような分析結果は、抗原の結合特異性も、重鎖のCDR3の可変性によって大部分決定することができるという点を示唆する。(J. Mol. Recogni. 2000, 13, 167-187)。

【0012】

これとは異なって、ラクダとラマのような系列の動物及びサメのような軟骨構造を持つ魚類の場合、軽鎖構造が存在しなかった単一重鎖構造の抗体を有している。従って、このような抗体の可変ドメインは、ひたすら重鎖単一可変ドメイン(Camelid及びSharkそれぞれ $V_{HH}$ 及び $V_{NAR}$ )からなり、抗原結合及び中和能力においては、軽鎖の可変ドメインと重鎖の可変ドメインが同時に抗原の結合に参加するヒト抗体に比べて何ら不足がないと知られ

ている。ヒトの場合重鎖疾患(heavy chain diseases)を持つ患者(Hendershot et al., J. Cell. Biol. 1987 104(3):761-7; Prelli et al., J. Immunol. 1992 148(3): 949-52)以外には、VHまたはVLが単独で存在する場合は非常に珍しい。なぜならばVHまたはVLの構造的相補性によって単独で分離する場合、構造的に不安定で蛋白質凝集(aggregation)現象が起き易いからである。部分的にこのような蛋白質凝集現象は、VHとVLが接する部位は主に疎水性のアミノ酸残基(hydrophobic patch)が分布して、これによる疎水性相互親和作用(hydrophobic interaction)に起因すると知られている。ラクダ抗体の場合は、特異的にVH/VL隣接表面に位置するアミノ酸の場合、ヒト抗体とは異なり親水性特性を持つアミノ酸残基が露出していることが分かるが、特にラクダ抗体と最も類似するアミノ酸配列を持つヒトVH3ファミリーと特異的に他の四地点のアミノ酸をテトラド(tetrad)と称し、カバットナンバリングシステム(Kabat numbering system, Kabat et al., 1991 J. Immunol. 147(5)、1709-1719)で37、44、45、及び47番アミノ酸を称する。このようなアミノ酸配列の差で、単一可変ドメイン抗体(VHH)の安定性を説明することもある。時々ヒト可変ドメイン抗体にテトラド位置のアミノ酸をラクダ抗体の親水性アミノ酸で交替(G44E/L45R/W47G)して改良されたラクダ化(camelized)抗体を作ろうとする試みがあった。

10

#### 【0013】

その結果、物理化学的特性においてある程度水溶性が改善されたが(Coppieters et al., Arthritis Rheum. 2006 54(6):1856-66; Dolk et al., Proteins. 2005 59(3):555-64; Ewert et al., Biochem. 2002 41(11):3628-36; Kortt et al., J. Protein Chem. 1995 14(3):167-78; Martin et al., Protein Eng. 1997 10(5):607-14)、返って蛋白質発現収率が落ちて熱安定性が減少するなど、ラクダ抗体ほどの安定性を確保することは難しかった。(Davies et al., FEBS Lett. 1994 Feb 21;339(3):285-90; Aires et al., J. Mol. Biol. 2004 340(3):525-42)。これに対する原因としては、ヒト抗体のVH/VL隣接部位のアミノ酸を変形させた場合、該当部位のベータシート(beta-sheet)構造に変形が誘発されるためであると明らかになった(Riechmann et al., J. Mol. Biol. 1996 259(5):957-69)。ラクダ抗体でCDR3部分はヒト抗体に比べて異常に長いループ(loop)構造を有している。構造学的分析によると、このループ構造が、ヒト抗体のV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>隣接部位に該当する位置まで折りたたまれて入っていることが明らかになり、このような特異的構造が隣接部分に位置している一部疎水性パッチ(patch)を塞ぐことによって保護膜効果を示してラクダ抗体の安定化を助けるとの理論が提示された(Joost et al., 2010 Drug Discovery Today: Technologies 7(2), 139-146)。

20

30

#### 【0014】

このような保護膜効果は、ヒト抗体では相対的に短いCDR3ループ構造によって期待するのが難しい。結論的にヒト単一可変ドメインはそれ自体ではラクダドメイン抗体に比べて不足する物理化学的特性を持つので、特定抗原に対する結合リガンドの骨格構造(scaffold)として活用するには不十分である。これを克服するための方法として、単にラクダ抗体のシグネチャ(signature)であるテトラド(tetrad)アミノ酸を交替することでは不十分であり、追加的に蛋白質構造的な設計と分子進化的スクリーニング方法が必要である。

40

#### 【0015】

自然界に存在するヒト免疫グロブリン可変ドメイン(VHまたはVL)は、抗原結合特性を維持できる最小の大きさの抗体(モノクロナール抗体の1/12の大きさ)であるため、既存のモノクロナール抗体と比較して治療蛋白質としての物性と治療効果において差別性を期待できる点で、可変ドメイン中一つだけを持つヒト抗体の開発に対する需要は高まっているが、それにもかかわらずVHまたはVLが単独で存在する時、自らの蛋白質の凝集(aggregation)現象及び不安定性向は、特定抗原に対する結合骨格構造(binding scaffold)と開発するに当たり克服しなければならない主要な障害物として残っている。

#### 【0016】

従って、抗体断片及び小型抗体の場合、一般的なモノクロナール抗体が提供できない長

50

所を提供して、自らの競争力を持つためには物質自体の強固な(robust)製薬学的及び物理化学的特性の確保が重要である。

【0017】

ヒト重鎖は軽鎖の可変ドメインを自主的に安定させるために従来にもいくつかの分子進化的蛋白質工学手法が試みられた(Barthelemy et al., J. Biol. Chem. 2008 283(6):3639-54)。VHのCDR変形ライブラリーからファージディスプレイ(phage display)システムを構築した後、選別段階で熱変形ストレスを加えた後、プロテインA(protein A)結合活性が生きているVHを選別した。このような方法を介して、ラクダのドメイン抗体のように物理的に水溶性が増大して、蛋白質熱変性後、可逆的再フォールディング(reversible folding)が可能なCDR変形ヒトVHを選別した報告があって(Jespers et al., Nat. Biotechnol. 2004 22(9):1161-5)、熱変性処理なしにCDR3部位とフレームの部分に突然変異を誘導した多様なライブラリーを製作して、同じ方法でファージディスプレイ後、高いプロテインA結合活性を示すVHを選別して、選別されたVHをヒト生殖細胞系列の野生型(wild type) VHと比較した時、熱力学的に安定で水溶性発現が増大した突然変異VHを得ることができたことを確認したとの報告もある(Barthelemy et al., J Biol Chem. 2008 283(6):3639-54)。ファージディスプレイシステムでは、目的蛋白質のN-末端に融合されたpelB蛋白質のSec信号(signal)配列によって目的蛋白質がSec経路に誘導される。しかし、この場合、内在的な蛋白質移動経路の限界によって大腸菌細胞質(cytoplasm)内ですでにフォールディングされた蛋白質は、経路を通過できない。なぜなら、一般的なファージディスプレイの場合、大腸菌の代表的な蛋白質移動経路であるSec経路を利用して、この経路の特性上目的蛋白質は、細胞質内のシャペロン(chaperon)の助けを借りて三次構造を成さない線形(linear)構造の形態で細胞膜を通過するためである。自然界上で存在するSec経路特異的蛋白質は、特徴的に蛋白質転写直後SecBといったシャペロンの助けでフォールディングされない線形状態で細胞質に存在する。SecBの案内により細胞内膜に存在するSec A、SecYEG、及びSecDFYajCからなるトランスロカーゼ(translocase)複合体に移動したSec経路対象蛋白質は、三次構造を成さない線形状態で膜を通過することになり、通過したアミノ酸鎖は細胞膜間(periplasm)に達してはじめてDsbAとDsbBの酸化、還元作用によって二硫化結合を含む完ぺきな三次構造を作る(Baneyx and Mujacic Nature Biotech. 2004,22,1399~1408)。従って、もしある蛋白質が自らの特性上細胞質でフォールディングと三次構造の形成が早く起きるならば、この蛋白質は、Sec経路でデザインされたファージディスプレイスクリーニングシステムとは互いに互換性がない。

10

20

30

【0018】

また、バクテリアじゅうたんが敷かれたプレートでプラーク(plaque)サイズの大きさを基準としてクローンを直接選別した時、物理化学的改善された野生型VHを選び出すことができたとの報告もある(To et al., J. Biol. Chem. 2005 280(50):41395-403)。しかし、プレート基盤スクリーニングは大規模処理が不可能であるため、ライブラリーの大きさを減らすために生体外(in vitro)でプロテインA選別過程を経たVH3ファミリーだけを対象に最初開始ライブラリーを製作した。

【0019】

一方、組換え蛋白質のフォールディング(folding)特性を改善するために、遺伝的進化方法が試みられたが(Maxwell et al., Protein Sci. 1999 8(9):1908-11; Wigley et al., Nat. Biotechnol. 2001 19(2):131-6; Cabantous et al., Nat Biotechnol. 2005 23(1):102-7; Waldo GS. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003 7(1):33-8)、組換え蛋白質のフォールディング特性改善のための代表的な方法の一つは、関心蛋白質と遺伝子組換え技術で融合しているリポーター蛋白質(reporter protein)の活性度を測定することによって、間接的に関心蛋白質のフォールディング程度を測定することができる。しかし、実際の関心蛋白質が単独形態で存在する際にフォールディングを正確に反映できない限界がある。

40

【0020】

また、蛋白質の水溶性を増大させるために、バクテリア固有のフォールディング品質検

50

査機能を有した蛋白質移動経路であるTat(Twin-arginine translocation)経路を蛋白質フォールディングの有無を区別する生物学的境界膜(filter)で活用した分子進化方法も開発された。具体的に、大腸菌内で関心蛋白質をリポーター遺伝子とTat信号配列(Tat signal sequence)と融合させてTat経路に発現させた後、蛋白質のフォールディングと水溶性の有無によりTat ABCトランスロカーゼ複合体(translocase complex)の蛋白質フォールディング検証機能を経るようにする。もし目的蛋白質が十分に水溶性を有している場合、目的蛋白質とリポーター蛋白質からなる融合蛋白質は、大腸菌の内壁を通過して周辺細胞質(periplasm)に到達することになる。周辺細胞質に到達した融合蛋白質は、抗生剤耐性測定などの方法で検出することで所望の水溶性特性を持つ蛋白質をスクリーニングすることができる(Fisher et al., Protein Sci. 2006 15(3):449-58)。自然界のTat経路気質蛋白質でない組換え蛋白質をTat経路に応用した場合も、有意に蛋白質の水溶性及び安定性に比例してTat経路を通過することがわかる(Lim et al., Protein Sci. 2009 18(12):2537-49)。また、Tat経路を利用して大腸菌細胞質内で蛋白質フォールディングが起きる一本鎖抗体(single chain antibody:scFv)を効果的に選別できるとの報告がある(Fisher AC and DeLisa MP. J Mol Biol. 2009 385(1): 299-311)。前記文献によれば、非水溶性で大腸菌で発現するscFv13を鋳型塩基配列にして、実験室的に分子進化に成功することができた。scFv内に存在する二重硫化結合(disulfide bond)は、約4-6 kcal/molの水準で蛋白質分子の安定化に寄与する。この結合は、バクテリアの周辺細胞質や真核細胞の細胞質網状構造(endoplasmic reticulum:ER)と同じ酸化環境(oxidized environment)で行われる。バクテリアの周辺細胞質は、DsbAと細胞内膜(inner membrane)に存在するDsbBの間の電子の流れを介して常に酸化条件を維持している。従って、scFv13変形ライブラリーからTat経路を人為的に通過して選別されたscFv13変形蛋白質の場合は、酸性条件の周辺細胞質でない還元条件の細胞質内で二重硫化結合形成することなく自主的にセルフフォールディング(self-folding)されたイントラボディ(intrabody)が優先的に選別される。具体的に、蛋白質をTat経路に導く核心的な経路信号配列(signal sequence)を目的蛋白質のN-末端(terminal)に融合させて、目的蛋白質のC-末端にリポーター蛋白質(reporter gene)機能ができるようにTEM-1 -ラクタマーゼ(beta lactamase)を融合させた遺伝子で大腸菌で発現させると、三重機能融合蛋白質(Tripartite)が発現する。

#### 【0021】

発現した三重機能蛋白質は、Tat経路へ向かうようになり、細胞内膜に存在するトランスロカーゼ(Translocase)複合体であるTat ABC作用機序(machinery)により蛋白質フォールディング検証を経る。多くの組換え蛋白質のうちひたすら水溶性があるものだけTat経路の特異的な作用機序(machinery)と互換性が(compatible)維持されることが様々な研究結果から明らかになった。(Sanders et al., Mol. Microbiol. 2001 41(1):241-6; DeLisa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003 100(10):6115-20; Matos et al., EMBO J. 2008 27(15):2055-63; Fisher AC and DeLisa MP. J. Mol. Biol. 2009 385(1): 299-311; Lim et al., Protein Sci. 2009 18(12): 2537-49)。

#### 【0022】

しかし、前記のような蛋白質のフォールディング特性改善のための方法が、ドメイン抗体、特にVHまたはVLドメイン抗体などの選別に適用された場合はない。

結論から、今までのヒトVHドメイン抗体の工学的変形及びスクリーニングは例外なしでファージディスプレイ及びプロテインA結合(binding)活性に基づいた方法から成ってきた(Kristensen P and Winter G. Fold. Des. 1998 3(5):321-8; Sieber et al., Nat. Biotechnol. 1998 16(10):955-60; Jung et al., J. Mol. Biol. 1999 294(1):163-80; Woern A and Pluckthun A. J. Mol. Biol. 2001 305(5): 989-1010)。

従って、現状は、より効率的に水溶性で、熱力学的安定性が高いVHドメイン抗体を選別する方法に対する開発の必要性が切実で、さらに選別されたドメイン抗体の特性を活用し

10

20

30

40

50

て効能が向上した最小単位の次世代抗体開発が緊急である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0023】

【非特許文献1】Better et al., Science 1988 240(4855):1041-3

【非特許文献2】Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1988 85(16):5879-83

【非特許文献3】Bird et al., Science 1988 242(4877):423-6

【非特許文献4】Pei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997 94(18):9637-42

【非特許文献5】Iliades et al., FEBS Lett. 1997 409(3):437-41

【非特許文献6】Ward et al., Nature 1989 341(6242):544-6

【非特許文献7】Zhao et al., Blood 2007 110(7):2569-77

【非特許文献8】Holliger et al., Nat. Biotechnol. 2005 23(9):1126-36

【非特許文献9】Hudson et al., Med. Microbiol. Immunol. 2009 198(3):157-74

【非特許文献10】Enever et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2009 20(4):405-1

1

【非特許文献11】Els et al., J Biol Chem. 2001 9; 276(10):7346-50

【非特許文献12】Bargou et al., Science 2008 321(5891):974-7

【非特許文献13】Chothia et al., 1992 J. Mol. Biol. 227、 799-917

【非特許文献14】Tomlinson et al., 1995 EMBO J. 14、 4628-4638

【非特許文献15】Williams et al., J. Mol. Biol. 264、 220-232

【非特許文献16】Ruud et al., J. Mol. Biol. 1999、 285、 895-901

【非特許文献17】J. Mol. Recogni. 2000, 13, 167-187

【非特許文献18】Hendershot et al., J. Cell. Biol. 1987 104(3):761-7

【非特許文献19】Prelli et al., J. Immunol. 1992 148(3): 949-52

【非特許文献20】Kabat et al., 1991 J. Immunol. 147(5)、1709-1719

【非特許文献21】Coppieters et al., Arthritis Rheum. 2006 54(6):1856-66

【非特許文献22】Dolk et al., Proteins. 2005 59(3):555-64

【非特許文献23】Ewert et al., Biochem. 2002 41(11):3628-36

【非特許文献24】Kortt et al., J. Protein Chem. 1995 14(3):167-78

【非特許文献25】Martin et al., Protein Eng. 1997 10(5):607-14

【非特許文献26】Davies et al., FEBS Lett. 1994 Feb 21;339(3):285-90

【非特許文献27】Aires et al., J. Mol. Biol. 2004 340(3):525-42

【非特許文献28】Riechmann et al., J. Mol. Biol. 1996 259(5):957-69

【非特許文献29】Joost et al., 2010 Drug Discovery Today: Tehcnologies 7(2), 139-146

【非特許文献30】Barthelemy et al., J. Biol. Chem. 2008 283(6):3639-54

【非特許文献31】Jespers et al., Nat. Biotechnol. 2004 22(9):1161-5

【非特許文献32】Baneyx and Mujacic Nature Biotech. 2004,22,1399~1408

【非特許文献33】To et al., J. Biol. Chem. 2005 280(50):41395-403

【非特許文献34】Maxwell et al., Protein Sci. 1999 8(9):1908-11

【非特許文献35】Wigley et al., Nat. Biotechnol. 2001 19(2):131-6

【非特許文献36】Cabantous et al., Nat Biotechnol. 2005 23(1):102-7

【非特許文献37】Waldo GS. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003 7(1):33-8

【非特許文献38】Fisher et al., Protein Sci. 2006 15(3):449-58

【非特許文献39】Lim et al., Protein Sci. 2009 18(12):2537-49

【非特許文献40】Fisher AC and DeLisa MP. J Mol Biol. 2009 385(1): 299-311

【非特許文献41】Sanders et al., Mol. Microbiol. 2001 41(1):241-6

50

10

20

30

40

【非特許文献 4 2】DeLisa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003 100(10):6115-20

【非特許文献 4 3】Matos et al., EMBO J. 2008 27(15):2055-63

【非特許文献 4 4】Kristensen P and Winter G. Fold. Des. 1998 3(5):321-8

【非特許文献 4 5】Sieber et al., Nat. Biotechnol. 1998 16(10):955-60

【非特許文献 4 6】Jung et al., J. Mol. Biol. 1999 294(1):163-80

【非特許文献 4 7】Woern A and Pluckthun A. J. Mol. Biol. 2001 305(5):989-1010

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

本発明は、前記のような問題を解決しようと、水溶性で、熱力学的安定性が高いVHまたはVLドメイン抗体を効率的に選別できるTAPE(Tat-Associated Protein Engineering)と命名された方法を提供する。

【0025】

さらに本発明は、TAPE方法によって選別された水溶性であり熱力学的安定性が優れたヒトVH及びVLドメイン抗体及びヒトVH及びVLドメイン抗体骨格(scaffold)を提供して、そのようなVH及びVLドメイン抗体及びそのような抗体骨格(scaffold)のアミノ酸配列及びこれをエンコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0026】

本発明により選別されたヒトVHまたはVL骨格(scaffold)を含むVHまたはVLドメイン抗体は、CDR配列と関係なく該当ヒトVH及びVLドメイン抗体骨格を持つ場合、依然として水溶性であり熱力学的安定性を維持する。

【0027】

さらに本発明は、TAPE方法によって選別されたヒトVHまたはVLドメイン抗体骨格に無作為的(random) CDR配列を含むライブラリー及びその製造方法を提供する。

本発明は、そのようなライブラリーを利用して、選別された目的蛋白質に結合能を持つVHまたはVLドメイン抗体、そのようなドメイン抗体のアミノ酸配列及びこれをエンコードするポリヌクレオチドに関する。

【課題を解決するための手段】

【0028】

本発明では、ヒト免疫グロブリン可変ドメインライブラリー(library)または、組み合わせ(combinatorial)ライブラリーから高水溶性を持って、熱力学的安定性が高いリガンド、特にVH及びVLドメイン抗体を効率的に選別できるTAPE(Tat-Associated Protein Engineering)と命名された方法を提供する。

【0029】

また、本発明では、前記リガンドを選別するためのシステム、ベクター及び宿主細胞を提供して、前記TAPE方法によって選別されたリガンド、特にVH及びVLドメイン抗体を提供する。

【0030】

特に、驚くべきことに、本発明に係るTAPE方法によって選別されたVHドメイン抗体は、高い水溶性と熱安定性を有しているだけでなく、VHドメイン抗体骨格、すなわち、FR1乃至FR4のフレームが維持される限り、挿入されるCDR配列、すなわちCDR1乃至CDR3の配列と関係なく高い水溶性と熱安定性が維持される可能性があることを発見した。

【0031】

このような観点から本発明は、本発明のTAPE方法によって選別されたVHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレーム及びこのようなVHドメイン抗体の骨格に無作為的(randomized)のヒト由来CDR配列、すなわちCDR1乃至CDR3の配列が挿入されたVHドメイン抗体のライブラリー及びこれの構築方法を提供する。

【0032】

10

20

30

40

50

また、前記構築されたライブラリーから目的とするターゲットに対する結合能を持つVHドメイン抗体を選別する方法を提供する。

【0033】

本発明で提供される高い水溶性と熱安定性を持つVHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームは次のようなアミノ酸配列を持つ。

FR1のアミノ酸配列:

$X_0VQLX_1X_2X_3GX_4X_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}CX_{14}X_{15}X_{16}GX_{17}X_{18}X_{19}$  - 式1)

前記式1) において、

$X_0$  は、Eまたは、Qであり、

$X_1$  は、Vまたは、Lであり、

$X_2$  は、Eまたは、Qであり、

$X_3$  は、Sまたは、Aであり、

$X_4$  は、Gまたは、Aであり、

$X_5$  は、G、M、N、Vまたは、Eであり、

$X_6$  は、L、Vまたは、Wであり、

$X_7$  は、V、K、Aまたは、Iであり、

$X_8$  は、Q、Kまたは、Hであり、

$X_9$  は、G、T、A、R、E、Sまたは、Tであり、

$X_{10}$  は、L、V、Rまたは、Mであり、

$X_{11}$  は、Rまたは、Kであり、

$X_{12}$  は、L、Iまたは、Vであり、

$X_{13}$  は、S、Aまたは、Tであり、

$X_{14}$  は、A、E、V、R、I、K、Tまたは、Sであり、

$X_{15}$  は、A、G、P、Vまたは、Tであり、

$X_{16}$  は、S、F、または、Yであり、

$X_{17}$  は、F、Y、R、Gまたは、Lであり、

$X_{18}$  は、T、A、S、N、T、P、I、N、Hまたは、Aであり、

$X_{19}$  は、F、L、Vまたは、Cである。

10

20

30

40

50

【0034】

FR2のアミノ酸配列:

$WX_{20}RX_{21}X_{22}PGX_{23}GX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$  - 式2)

前記式2) において、

$X_{20}$  は、V、Aまたは、Lであり、

$X_{21}$  は、Q、N、R、I、K、Y、V、M、S、Q、W、F、L、Vまたは、Cであり、

$X_{22}$  は、A、G、K、S、V、Mまたは、Tであり、

$X_{23}$  は、K、Q、E、Rまたは、Tであり、

$X_{24}$  は、L、N、I、P、Y、T、V、W、A、R、Mまたは、Sであり、

$X_{25}$  は、Vまたは、Eであり、

$X_{26}$  は、W、I、V、P、F、H、M、Y、L、Cまたは、Rであり、

$X_{27}$  は、V、M、Iまたは、Lであり、

$X_{28}$  は、S、Aまたは、Gである。

【0035】

FR3のアミノ酸配列:

$X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}DX_{52}X_{53}X_{54}YX_{55}CX_{56}X_{57}$  - 式3)

前記式3) において、

$X_{29}$  は、R、H、Qまたは、Tであり、

$X_{30}$  は、F、V、Lまたは、Iであり、

$X_{31}$  は、T、Sまたは、Iであり、

$X_{32}$  は、I、L、V、Mまたは、Rであり、

$X_{33}$  は、S、Tまたは、Dであり、  
 $X_{34}$  は、R、A、V、Nまたは、Iであり、  
 $X_{35}$  は、D、Nまたは、Aであり、  
 $X_{36}$  は、N、T、D、I、R、K、Yまたは、Eであり、  
 $X_{37}$  は、A、S、Vまたは、Tであり、  
 $X_{38}$  は、K、R、T、Q、V、E、M、Nまたは、Iであり、  
 $X_{39}$  は、N、R、T、K、S、Dまたは、Vであり、  
 $X_{40}$  は、T、M、S、V、I、Yまたは、Aであり、  
 $X_{41}$  は、L、V、Aまたは、Mであり、  
 $X_{42}$  は、F、Y、N、D、Hまたは、Sであり、  
 $X_{43}$  は、Lまたは、Mであり、  
 $X_{44}$  は、Q、E、Hまたは、Nであり、  
 $X_{45}$  は、M、L、V、Iまたは、Wであり、  
 $X_{46}$  は、N、T、K、D、Y、Iまたは、Sであり、  
 $X_{47}$  は、Sまたは、Nであり、  
 $X_{48}$  は、Lまたは、Vであり、  
 $X_{49}$  は、R、Kまたは、Tであり、  
 $X_{50}$  は、D、A、S、P、T、V、Iまたは、Sであり、  
 $X_{51}$  は、E、A、Dまたは、Sであり、  
 $X_{52}$  は、T、Nまたは、Sであり、  
 $X_{53}$  は、S、Aまたは、Gであり、  
 $X_{54}$  は、V、I、Lまたは、Mであり、  
 $X_{55}$  は、Yまたは、Fであり、  
 $X_{56}$  は、A、G、Vまたは、Sであり、  
 $X_{57}$  は、R、S、K、T、L、Nまたは、Fである。

10

20

## 【0036】

FR4のアミノ酸配列：

 $X_{58}GX_{59}GX_{60}X_{61}VTVSS$  - 式4)

前記式4) において、

$X_{58}$  は、W、C、Y、G、Sまたは、Aであり、  
 $X_{59}$  は、Q、Rまたは、Lであり、  
 $X_{60}$  は、A、T、Iまたは、Vであり、  
 $X_{61}$  は、L、M、P、Vまたは、Tである。

30

## 【0037】

また、本発明は、前記VHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【0038】

より好ましくは、本発明で提供される高い水溶性と熱安定性を持つVHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームは次のようなアミノ酸配列を持つ。

FR1のアミノ酸配列：

 $X_0VQLX_1X_2SGGX_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}RX_{12}SCX_{14}X_{15}SGX_{17}X_{18}X_{19}$  - 式5)

前記式5) において、

$X_0$  は、Eまたは、Qであり、  
 $X_1$  は、Vまたは、Lであり、  
 $X_2$  は、Eまたは、Qであり、  
 $X_5$  は、G、M、N、Vまたは、Eであり、  
 $X_6$  は、Lまたは、Vであり、  
 $X_7$  は、V、または、Kであり、  
 $X_8$  は、Q、Kまたは、Hであり、  
 $X_9$  は、G、T、A、R、E、または、Tであり、

40

50

$X_{10}$  は、L、または、Vであり、  
 $X_{12}$  は、L、または、Vであり、  
 $X_{14}$  は、A、E、V、I、Kまたは、Sであり、  
 $X_{15}$  は、A、Gまたは、Vであり、  
 $X_{17}$  は、F、Y、R、Gまたは、Lであり、  
 $X_{18}$  は、T、A、S、N、T、P、I、N、Hまたは、Aであり、  
 $X_{19}$  は、F、L、Vまたは、Cである。

## 【0039】

FR2のアミノ酸配列:

 $WVRX_{21}X_{22}PGX_{23}GX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$  - 式6)

10

前記式6) において、

$X_{21}$  は、Q、N、R、I、K、Y、V、M、S、Q、W、F、L、Vまたは、Cであり、  
 $X_{22}$  は、A、G、K、Sまたは、Mであり、  
 $X_{23}$  は、K、Q、E、Rまたは、Tであり、  
 $X_{24}$  は、L、N、I、P、Y、T、V、W、A、R、Mまたは、Sであり、  
 $X_{25}$  は、Vまたは、Eであり、  
 $X_{26}$  は、W、I、V、P、F、H、M、Y、L、Cまたは、Rであり、  
 $X_{27}$  は、V、M、Iまたは、Lであり、  
 $X_{28}$  は、S、Aまたは、Gである。

## 【0040】

20

FR3のアミノ酸配列:

 $RX_{30}TX_{32}SX_{34}DX_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}DTAX_{54}YX_{55}CX_{56}X_{57}$   
 - 式7)

前記式7) において、

$X_{30}$  は、F、V、Lまたは、Iであり、  
 $X_{32}$  は、I、L、Vまたは、Mであり、  
 $X_{34}$  は、R、A、V、Nまたは、Iであり、  
 $X_{36}$  は、N、T、D、I、R、K、Yまたは、Eであり、  
 $X_{37}$  は、A、S、Vまたは、Tであり、  
 $X_{38}$  は、K、R、T、Q、V、E、M、Nまたは、Iであり、  
 $X_{39}$  は、N、R、T、K、S、Dまたは、Vであり、  
 $X_{40}$  は、T、M、S、V、I、Yまたは、Aであり、  
 $X_{41}$  は、L、V、Aまたは、Mであり、  
 $X_{42}$  は、F、Y、N、D、Hまたは、Sであり、  
 $X_{43}$  は、Lまたは、Mであり、  
 $X_{44}$  は、Q、E、Hまたは、Nであり、  
 $X_{45}$  は、M、L、V、Iまたは、Wであり、  
 $X_{46}$  は、N、T、K、D、Y、Iまたは、Sであり、  
 $X_{47}$  は、Sまたは、Nであり、  
 $X_{48}$  は、Lまたは、Vであり、  
 $X_{49}$  は、R、Kまたは、Tであり、  
 $X_{50}$  は、D、A、S、P、T、V、Iまたは、Sであり、  
 $X_{51}$  は、E、A、Dまたは、Sであり、  
 $X_{54}$  は、V、I、Lまたは、Mであり、  
 $X_{55}$  は、Yまたは、Fであり、  
 $X_{56}$  は、A、G、Vまたは、Sであり、  
 $X_{57}$  は、R、S、K、T、L、Nまたは、Fである。

30

40

## 【0041】

FR4のアミノ酸配列:

 $X_{58}GQGX_{60}X_{61}VTVSS$  - 式8)

50

前記式8) において、

X<sub>58</sub>は、W、C、Y、G、Sまたは、Aであり、

X<sub>60</sub>は、A、T、Iまたは、Vであり、

X<sub>61</sub>は、L、M、Vまたは、Tである。

【0042】

また、本発明は、前記VHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0043】

より好ましくは、本発明で提供される高い水溶性と熱安定性を持つVHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームは表1に記載されたアミノ酸配列を持つ。

【0044】

【表 1 - 1】

[表1]

選別されたVHDメイン抗体骨格のFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列

骨格名	FR1	FR2	FR3	FR4
M1X8	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLVWVS	RFTISRDNKNTLFLQMNSLR DEDTSVYYCAR	WGQGAL VTVSS
M2X1	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAS	WGQGTL VTVSS
M2X1- 34	QVQLVESGGNVVQPGTS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLR AEDTAVYYCGR	WGQGILV TVSS
M2X2- 12	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKISCEASGYAF	WVRQAPGQ GLEWVG	RVTLTRDTSTRVYEMELKNLR SADTGVYYCAR	WGQGTL VTVSS
M2X2- 13	EVQLLESGGGVVQPGKS LRLSCVGSF	WVRQAPGK GLEWLA	RFTISRDNKNTMVLQMNSLR PDDTAVYFCAR	WGQGTL VTVSS
M3X1	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCVASGFNF	WLRQAPGK GLEWVA	RFTISRDNKNTLYLEMNSLR PEDTAVYYCAK	CGQGTL VTVSS
M3X10	EVQLVESGGGLVKPGGG LRVSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVG	RFTISRDDSKNMVYLQMNSLK TEDTAVYYCTT	YGQGTLV TVSS
M4X1-8	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGF	WVRQGPGE GLVWLS	RFTISRDNKNTVYLEMNSVR VDDTAVYYCVS	WGQGAL VTVSS
M4X1- 33	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCEASGFPF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDDSTNTLYLQVNSLR AEDTAVYYCAK	WGRGTL VTVSS
M4X1- 35	EVQLLESGGGLVKPGGG LRLSCVGSERSF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTVSRDNVQKSLDLQMDSL RAEDTAVYFCAR	WGQGTT VTVSS
M4X3- 27	EVQLLESGGGLAQSGGS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWIS	RFTISRDIKNSLYLQMNSLRD EDTAVYYCAK	WGQGAL VTVSS
M4X4-2	EVQLVQSGAEVKKPGES LRISCRGSGYRF	WARDKPGK GLEWIG	HVTISSDRSVSVAYLQWDSLK ASDNGIYYCAL	WGQGTL VTVSS

10

20

30

40

【表 1 - 2】

M4X4-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVPSGFTF	WVRQAPGKGLVWVS	RFTISRDN AEDTLFLQMNSLRVDDTAVYYCVR	WGQGVLVTVSS	
M4X4-25	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFSL	WVRRSPGKGLEWVA	RFTVSRDN AKNSLFLQMNNV RPEDTALYFCAR	WGQGTMTVSS	
M4X4-44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWVA	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAR	WGQGTMTVSS	10
M4X5-30	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWLS	RFTISRNN AKNSLYLQMNSLRVDDTAVYYCAR	WGQGTMTVSS	
M4X6-27	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQGP GKGLEWVA	RFTISRDN AENSLYLQVNSLRAEDTAIYYCAK	WGQGALTVSS	
M4X6-48	EVQLLES GGGVVQPGRSLRLSCEVFGFTL	WVRQAPGR RLEWVA	RFTISRDI ATNRLYLQMRSLRAEDTALYYCAR	WGQGTMTVSS	20
M4X7-15	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF SF	WVRQAPGKGLEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAV	WGQGTMTVSS	
M4X8-24	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWVS	RFTISRDN SNNTLYLQMNSLRADDTAVYFCAK	WGQGTMTVSS	
M0.5X-1	QVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF	WVRQVP GKGLEWVA	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN	WGQGTMTVSS	30
M0.5X-3	QVQLVES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFTF	WVRQAPGT GLLWLS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	WGXXGTMTVVSX	
M0.5X-4	EVQLLES GGMLVKPGESLRLSCVGSGLIF	WVRHAPGKGLEWVG	RLSISRDD SMNTVYLDIYNLKI DDTGVYYCTF	WGQGTMTVSS	
M0.5X-14	EVQLLES GGGLVHAGGSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGKGLEWVA	RFTISRDN SKNSMYLQMNSLRVEDTAVYYCAR	WGQGTMTVSS	40
M0.75X-4	QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF	WLRQAPGKGPEYVA	RFIISRDD SNDMLYLEMISLKS EDTAVYYCSD	GSQGTMTVSS	

【表 1 - 3】

M2X-5	EVQLLES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLHMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCVK	VTVSS
M2X-15	QVQLVES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCAK	VTVSS
M4X-5	QVQLVES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTVSRDN SRNTLYLQMKSLS	WGQGTM
	LRLSCEASGLHF	GLEWVA	AEDTAVYYCAK	VTVSS
M1-4	QVQLVEAGGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN SQNSLFLQMNSLR	WGQGTM
	LRLACAASGFTF	GLEWIS	AEDTAVYYCAT	VTVSS
M1-6	EVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGK	HVTISVDK SISTAYLQWSSLKA	WGQGTL
	LRKSCKGSGYSF	GLEWMG	SDSAMYFL	VTVSS
M1-7	QVQLVES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	DEDTAVYYCAR	VTVSS
M1-8	EVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQ	RVTMTRDTSSTTAYMELNRLT	WGQGTL
	VKVSCKASGYTF	GLEWMG	SDDTAVYFCAR	VTVSS
M1-9	EVQLVEAGGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN AQNSLFLQMNSLR	WGQGTM
	LRLACAASGFTF	GLEWIS	AEDTAVYYCAT	VTVSS
M1-10	EVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGR	QVTMSANRSISTAYLQWSSLK	WGQGTT
	LKISCKGSGYSF	GLEWLG	ASDTGIYYCAT	VTVSS
M5-1	QVQLVES GGGLIQPGESL	WVRQAPGK	RFTISRDN STQNTVHLQMNSLT	WGQGTL
	RLSCEAFGFTV	GLEWVS	AEDTAVYYCAR	VTVSS
M5-2	EVQLVQSGAELKKPGSS	WVRQAPGQ	RLILSVDEPTRTVYMELTSLRS	WGQGTT
	VKV SCTSSGGSF	GLEWMG	DDTAMYCAR	VTVSS
M5-4	EVQLLES GGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDN AKDSL YLQMNSLR	WGQGTM
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	PEDTALYYCAR	VTVSS
M5-5	EVQLLES GGGVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDN YSNKIVHLEMDSLRA	WGQGTL
	LRLSCVASGFTF	GLEWVS	EDTAVYFCVR	VTVSS

10

20

30

40

【表 1 - 4】

M5-6	EVQLLESGGGLVKPGGS	WVRQAPGK	RFTISRDDSRDMLYLQMNNLK	SSQGTLV
	LRLSCAASGFTF	GLECVA	TEDTAVYYCSD	TVSS
M5-7	EVQLVESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDDSKSIVYLQMSSLQT	WGRGTL
	LRLSCTTSGFSF	GLEWVS	EDTAVYYCSR	VTVSS
M5-9	EVQLLESGGGLVLRPGGS	WVRQAPGK	TISRDNKNSVYLYQMNSLRAE	WGQGTL
	LRLSCSASGFAF	GLEWVS	DSAVYFCAR	VTVSS
M10-1	QVQLVESGGNVVQPGTS	WVRQAPGK	RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLR	WGQGILV
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	AEDTAVYYCGR	TVSS
M10-2	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDNKDSLYLQMDSLR	APQGTLV
	LRLTCVGYGFTF	GPEWVA	PEDTAVYYCAR	TVSS
M10-4	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	QFTISRDNKNTLYLQMNSLR	WGQGTM
	LRLSCAASGFIL	GLVWVS	VEDTAVYYCAR	VTVSS
M10-5	EVQLLESGGGVVHPGRS	WVRQAPDK	RFTVSRDISKNTVYLYQMNSLR	WGQGTM
	LRLSCAVSGFSL	GLEWVA	AEDTALYYCAR	VTVSS
M10-6	EVQLLESGGGLVQPGRS	WFRQGPVK	RFTISRDDSKNSLSLQMDSLR	WGQGTV
	RRLSCAASGFTF	GLEWVA	TEDTAVYYCVR	VTVSS
M10-8	QVQLVESGGGVVQPGRS	WVRQTPGR	RFTISRDNNSNNTVYLEMNSLR	WGLGTV
	LRLSCVASGFAF	GLEWLA	PEDSAIYYCAK	VTVSS
M10-10	QVQLVESGGVVVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDNKNSLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	TDETALYYCV	VTVSS
M2	EVQLLESGGGLVQPGRS	WVRQAPGK	RFTISRDNKNSLYLQMNSLR	WGQGTT
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	TDETAVYYCAR	VTVSS
M5	EVQLLQSGGGWVKPGGS	WVRQAPGK	RFTISIDESRNALFLHMNSLTT	WGQGTL
	LRLSCAASGFIC	GLEWVG	DDTAVYYCST	VTVSS
M6	EVQLLESGGVVVQPGRS	WVRQAPGK	RFTVSRDTSTNTLYLQMNSLR	WGQGTL
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	VEDTAVYYCAR	VTVSS

10

20

30

40

【表 1 - 5】

M7	QMQLVQSEAEVKKPGAS	WVRQATGQ	RVTMTRNTSISTAYMELSSLT	WGQGTL
	MKVSCKASGYTF	GLEWMG	SADTAVYYCAR	VTVSS
M10	QVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGK	QVTISADKSISTAFLQWNSLKA	WGLGTLV
	LKISCKGSGYSF	GLEWMG	SDTAMYYCAR	TVSS

## 【0045】

10

また、本発明は、前記VHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【0046】

特に、前記フレームの一部アミノ酸配列の変異を通して改良されたVHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームは、表2に記載されたアミノ酸配列を持つ。

## 【0047】

【表 2 - 1】

[表2]

アミノ酸変異されたVHドメイン抗体骨格のFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列

骨格名	FR1	FR2	FR3	FR4
M8-21	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKGR NEIVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-12L	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRRAPGKGR IEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-7I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKGR PEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-9I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRKAPGKGR YEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-10I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKGR YEIVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-11I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKGR YEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-12I	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKGR IEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-32	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRMAPGKGR GPEHVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-34	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRSAPGKGR VEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-40	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRTAPGKGR TEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-46	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRCAPGKGR YEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS
M2-47	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKGR LEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA TVSS

10

20

30

40

【表 2 - 2】

M2-48	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRMAPGK GLEYS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-51	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKG TEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-53	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GVEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-55	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRWAPGK GPEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-57	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG REWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-58	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG CELVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-59	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRKAPGKG LETVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-60	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKG LECVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M2-64	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRCAPGKG WEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-12	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRLAPGKG VELVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-13	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRFAPGKG AEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-17	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRLAPGKG REWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS
M4-18	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKG VEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAS	WGQGTLV TVSS

10

20

30

40

【表 2 - 3】

M4-20	EVQLVESGGGLVQPG	WVRFAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	LEMVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-28	EVQLVESGGGLVQPG	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	TERVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-2	EVQLVESGGGLVQPG	WVRIAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	MEMVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-32	EVQLVESGGGLVQPG	WVRAAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	PELVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-33	EVQLVESGGGLVQPG	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	YEHVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-34	EVQLVESGGGLVQPG	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	LECVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-5	EVQLVESGGGLVQPG	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	PETVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-6	EVQLVESGGGLVQPG	WVRMAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	GSEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-7	EVQLVESGGGLVQPG	WVRLAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	TEMVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-11	EVQLVESGGGLVQPG	WVRTAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	AEWVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-12	EVQLVESGGGLVQPG	WVRWAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	GKEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-13	EVQLVESGGGLVQPG	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	GIEPVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-14	EVQLVESGGGLVQPG	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	GPEWVS	EDTAVYYCAS	TVSS

10

20

30

40

【表 2 - 4】

M8-4	EVQLVESGGGLVQPG	WVRQAPGK	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	GPEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-5	EVQLVESGGGLVQPG	WVRTAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	IEIVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-6	EVQLVESGGGLVQPG	WVRIAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	VEIVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-8	EVQLVESGGGLVQPG	WVRAAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GSLRLSCAASGFTF	LEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS

10

## 【 0 0 4 8 】

本発明に係るVHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列を含むVH領域は

FR1-X-FR2-X-FR3-X-FR4 - 式9)

で表示されるアミノ酸配列を持つ。前記式9)でXは、左側から順にCDR1、CDR2及びCDR3を意味する。

20

具体的に、本発明に係るFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列を含むVH領域は、表3及び表4に記載された通り、配列番号37乃至89及び配列番号90乃至131によるアミノ酸配列を持つ。

## 【 0 0 4 9 】

【表 3 - 1】

[表3]

選別されたVHドメイン抗体骨格のFR1乃至FR4のフレームを含むVH領域のアミノ酸配列

骨格名	配列 番号	VH領域のアミノ酸配列 (Xは左側からCDR1、CDR2及びCDR3を意味する)
M1X8	37	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLVWVS-X- RFTISRDNKNTLFLQMNSLRDEDTSVYYCAR-X-WGQGALVTVSS
M2X1	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2X1-34	39	QVQLVESGGNVVQPGTSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNKNTVFLQMTSLRAEDTAVYYCGR-X-WGQGILVTVSS
M2X2-12	40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCEASGYAF-X-WVRQAPGQGLEWMG-X- RVTLTRDTSTRTVYEMELKNLRSADTGVYYCAR-X-WGQGTLVTVSS
M2X2-13	41	EVQLLESGGGVVQPGKSLRLSCVSGFSF-X-WVRQAPGKGLEWLA-X- RFTISRDNKTMVNLQMNSLRPDDTAVYFCAR-X-WGQGTLVTVSS
M3X1	42	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFNF-X-WLRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNKNTLYLEMNSLRPEDTAVYYCAK-X-CGQGTLVTVSS
M3X10	43	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVG-X- RFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDTAVYYCTT-X-YGQGTLVTVSS
M4X1-8	44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF-X-WVRQGPGEGLVWLS-X- RFTISRDNKNTVYLEMNSVRVDDTAVYYCVS-X-WGQGALVTVSS
M4X1-33	45	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFPF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDDSTNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK-X-WGRGTLVTVSS
M4X1-35	46	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCVGSERSF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTVSRDNVQKSLDLQMDSLRAEDTAVYFCAR-X-WGQGTTVTVSS
M4X3-27	47	EVQLLESGGGLAQSGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWIS-X-R FTISRDIAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAK-X-WGQGALVTVSS
M4X4-2	48	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCRGSGYRF-X-WARDKPGKGLEWIG-X-H VTISSDRSVSVAYLQWDSLKASDNGIYYCAL-X-WGQGTLVTVSS

10

20

30

40

【表 3 - 2】

M4X4-4	49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVPSGFTF-X-WVRQAPGKGLVWVS-X- RFTISRDN AEDTLFLQMNSLRVDDTAVYYCVR-X-WGQGV LTVSS	
M4X4-25	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFSL-X-WVRRSPGKGLEWVA-X-R FTVSRDNAKNSLFLQMNNVRPEDTALYFCAR-X-WGQGT MVTVSS	
M4X4-44	51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAR-X-WGQGT LTVSS	10
M4X5-30	52	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWLS-X- RFTISRNN AKNSLYLQMNSLRVDDTAVYYCAR-X-WGQGT LTVSS	
M4X6-27	53	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQGP GKGLEWVA-X- RFTISRDN AENSLYLQVNSLRAEDTAIYYCAK-X-WGQGA LTVSS	
M4X6-48	54	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCEVFGFTL-X-WVRQAPGR RLEWVA-X- RFTISRDI ATNRLYLQMRSLRAEDTALYYCAR-X-WGQGT LTVSS	20
M4X7-15	55	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAV-X-WGQGT TVTVSS	
M4X8-24	56	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDN SNNTLYLQMNSLRADDTAVYFCAK-X-WGQGT LTVSS	
M0.5X-1	57	QVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQVP GKGLEWVA-X- RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN-X-WGQGT LTVSS	30
M0.5X-3	58	QVQLVES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFTF-X-WVRQAPGT GLLWLS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-X-WGXGT MVTVSX	
M0.5X-4	59	EVQLLES GGMLVKPGESLRLSCVGSGLIF-X-WVRHAP GKGLEWVG-X-R LSISRDDS MNTVYLDIYNLKIDDTGVYYCTF-X-WGQGT PVTVSS	
M0.5X-14	60	EVQLLES GGGLVHAGGSVRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDN SKNSMYLQMNSLRVEDTAVYYCAR-X-WGQGT VVTVSS	40
M0.75X-4	61	QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF-X-WLRQAPGKGPEYVA-X- RFIISRDDS NDMLYLEMISLKSED TAVYYCSD-X-GSQGT LTVSS	

【表 3 - 3】

M2X-5	62	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRLS</del> CAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISR <del>DNSKNTLYLHMNSL</del> RAEDTAVYYCVK-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	
M2X-15	63	QVQLVES <del>GGGLVQPGGSLRLS</del> CAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISR <del>DNSKNTLYLQMNSL</del> RAEDTAVYYCAK-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	
M4X-5	64	QVQLVES <del>GGGLVQPGGSLRLS</del> CEASGLHF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTVSR <del>DNSRNTLYLQMKSL</del> SAEDTAVYYCAK-X-WGQGT <del>MVTVSS</del>	10
M1-4	65	QVQLVEA <del>GGGLVQPGGSLRLA</del> CAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWIS-X- RFTISR <del>DNSQNSLFLQMNSL</del> RAEDTAVYYCAT-X-WGQGT <del>MVTVSS</del>	
M1-6	66	EVQLVQSGAEVKKPGESLRK <del>SCKGSGYSF</del> -X-WVRQMPGKGLEWMG-X- HVTISV <del>DKSISTAYLQWSSL</del> KASDSAMYFL-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	
M1-7	67	QVQLVES <del>GGGLVQPGGSLRLS</del> CAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISR <del>DNAKNSLYLQMNSL</del> RDEDTAVYYCAR-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	20
M1-8	68	EVQLVQSGAEVKKPGASVK <del>VSKASGYTF</del> -X-WVRQAPGQGLEWMG-X- RVTMTR <del>DTSSTTAYMELNRLT</del> SDDTAVYFCAR-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	
M1-9	69	EVQLVEA <del>GGGLVQPGGSLRLA</del> CAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWIS-X- RFTISR <del>DNAQNSLFLQMNSL</del> RAEDTAVYYCAT-X-WGQGT <del>MVTVSS</del>	
M1-10	70	EVQLVQSGAEVKKPGESL <del>KISCKGSGYSF</del> -X-WVRQMPGRGLEWLG-X- QVTMSA <del>NRSISTAYLQWSSL</del> KASDTGIYYCAT-X-WGQGT <del>TVTVSS</del>	30
M5-1	71	QVQLVES <del>GGGLIQPGESLRLS</del> CEAFGFTV-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISR <del>DSTQNTVHLQMNSL</del> TAEDTAVYYCAR-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	
M5-2	72	EVQLVQSGAELKKPGSSV <del>KVSCTSSGGSF</del> -X-WVRQAPGQGLEWMG-X- RLILSV <del>DEPTRTVYMELTSLR</del> SDDTAMYYCAR-X-WGQGT <del>TVTVSS</del>	
M5-4	73	EVQLLES <del>GGGLVQPGRSLRLS</del> CAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISR <del>DNAKDSL</del> LYLQMNSLRPEDTALYYCAR-X-WGQGT <del>MVTVSS</del>	
M5-5	74	EVQLLES <del>GGGVVQPGRSLRLS</del> CVASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISR <del>DYSNKIVHLEMDSL</del> RAEDTAVYFCVR-X-WGQGT <del>LVTVSS</del>	40

【表 3 - 4】

M5-6	75	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLECVA-X- RFTISRDDSRDMLYLQMNNLKTEDTAVYYCSD-X-SSQGTLVTVSS	
M5-7	76	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTTSGFSF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDDSKSIVYLMSSLQTEDTAVYYCSR-X-WGRGTLVTVSS	
M5-9	77	EVQLLESGGGLVRPGGSLRLSCSASGFAF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- TISRDNKNSVYLMNSLRAEDSAVYFCAR-X-WGQGTLVTVSS	10
M10-1	78	QVQLVESGGNVVQPGTSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLRAEDTAVYYCGR-X-WGQGILVTVSS	
M10-2	79	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLTCVGYGFTF-X-WVRQAPGKGPWVA-X- RFTISRDNKDSLQMDSLRPEDTAVYYCAR-X-APQGTLVTVSS	
M10-4	80	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIL-X-WVRQAPGKGLVWVS-X-Q FTISRDNKNTLYLQMNLSLVEDTAVYYCAR-X-WGQGTMTVTVSS	20
M10-5	81	EVQLLESGGGVHPGRSLRLSCAVSGFSL-X-WVRQAPDKGLEWVA-X- RFTVSRDISKNTVYLMNSLRAEDTALYYCAR-X-WGQGTMTVTVSS	
M10-6	82	EVQLLESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTF-X-WFRQGPQKGLEWVA-X- RFTISRDDSKNSLSLQMDSLRTEDTAVYYCVR-X-WGQGTVTVTVSS	
M10-8	83	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFAF-X-WVRQTPGRGLEWLA-X- RFTISRDNNSNNTVYLEMNSLRPEDSAIYYCAK-X-WGLGTVTVTVSS	30
M10-10	84	QVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRTDETALYYCV-X-WGQGTTLVTVSS	
M2	85	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRTDETAVYYCAR-X-WGQGTTVTVTVSS	
M5	86	EVQLLQSGGGWVKPGGSLRLSCAASGFIC-X-WVRQAPGKGLEWVG-X- RFTISIDESRNALFLHMNSLTTDDTAVYYCST-X-WGQGTTLVTVSS	40
M6	87	EVQLLESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTVSRDTSTNTLYLQMNLSLVEDTAVYYCAR-X-WGQGTTLVTVSS	

【表 3 - 5】

M7	88	QMQLVQSEAEVKKPGASMKVSCKASGYTF-X-WVRQATGQGLEWMG-X -RVTMTRNTSISTAYMELSSLTSADTAVYYCAR-X-WGQGTLLTVSS
M10	89	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSF-X-WVRQMPGKGLEWMG-X QVTISADKSISTAFLLQWNSLKASDTAMYYCAR-X-WGLGTLTVSS

【 0 0 5 0 】

【表 4 - 1】

[表4]

アミノ酸変異されたVHドメイン抗体骨格のFR1乃至FR4のフレームを含むVH領域のアミノ酸配列

骨格名	配列 番号	VH 領域のアミノ酸配列 (X は左側から CDR1、CDR2 及び CDR3 を意味する)
M8-21	90	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRNAPGKKGNEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-12L	91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRRAPGKKGIEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-7I	92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRIAPGKGPEPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-9I	93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRKAPGKGYEPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-10I	94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRNAPGKGYEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-11I	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRYAPGKGYEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-12I	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRVAPGKGIPEVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-32	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRMAPGKGPEHVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-34	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRSAPGKGVEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-40	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRTAPGKGTEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS
M2-46	100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRCAPGKGYEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS

10

20

30

40

【表 4 - 2】

M2-47	101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRIAPGKGLEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M2-48	102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRMAPGKGLEYVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M2-51	103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRYAPGKGTEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	10
M2-53	104	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGVEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M2-55	105	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRWAPGKGPEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M2-57	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRFAPGKGREWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	20
M2-58	107	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRFAPGKGCELVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M2-59	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRKAPGKGLETVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M2-60	109	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRNAPGKGLECVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	30
M2-64	110	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRCAPGKGWEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M4-12	111	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRLAPGKGVELVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	
M4-13	112	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRFAPGKGAEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	40
M4-17	113	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRLAPGKGREWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLVTVSS	

【表 4 - 3】

M4-18	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRYAPGKGVFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M4-20	115	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRFAPGKGLEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M4-28	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRVAPGKGTERVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	10
M4-2	117	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRIAPGKGMEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M4-32	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRAAPGKGPELVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M4-33	119	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRVAPGKGYEHVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	20
M4-34	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRVAPGKGLECVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M4-5	121	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRVAPGKGPETVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M4-6	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRMAPGKGSEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	30
M4-7	123	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRLAPGKGTEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M8-11	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRTAPGKGAEWS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	
M8-12	125	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRWAPGKGKEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	40
M8-13	126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGIEPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS	

【表 4 - 4】

M8-14	127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGPEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS
M8-4	128	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRQAPGKGPEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS
M8-5	129	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRTAPGKGIEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS
M8-6	130	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRIAPGKGVEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS
M8-8	131	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X-WVRAAPGKGLEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X-WGQGTLTVSS

10

## 【0051】

また、本発明は、前記VHドメイン抗体骨格、すなわちFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチドを提供する。

20

## 【0052】

本発明を詳細に説明する前に、本発明で用いられた用語及び略語を先に定義して本発明の理解を助けることにする。

## 【0053】

ヒト免疫グロブリン可変ドメイン:ヒトの免疫グロブリンとG(Immunoglobulin G)の構造を成して12個のドメイン(VH、CH1、CH2、CH3、VL、CLそれぞれ一対)のうち抗原の結合に直接参加する可変ドメインである重鎖可変ドメイン(Heavy chain variable domain、VH)または軽鎖可変ドメイン(Light chain variable domain、VL)を意味する。VHまたはVLは、9個のベータ-シート鎖(beta-sheet strand)が交差している構造を有している。VHの場合、N-末端から始まって二番目と三番目のベータ-シートとの間、四番目と五番目との間、八番目と九番目との間に可変区間(variable region)が存在するが、これをそれぞれCDR (Complementary Determinant Region)1、CDR2、CDR3と称する。VHのN-末端からCDR1区間を除いた一番目と二番目のベータ-シート(beta-sheet)区間全体をフレーム1(Frame 1、FR1)といて、三番目と四番目のベータ-シート区間を含むCDR1とCDR2との間の区間をフレーム2(Frame 2、FR2)といて、CDR2とCDR3との間の区間をフレーム3(Frame 3、FR3)といて、CDR3以後の区間をフレーム4(Frame 4、FR4)という。それぞれのフレームは、可変ドメインにもかかわらず抗原との結合には直接参加しなく、この区間は、ヒト免疫グロブリン上で大部分のアミノ酸配列が一定に保存されている。フレーム区間のアミノ酸配列の相同性(homology)により、VHは合計7種類ファミリー(family)に区分されて(VH1、2、3、4、5、6及び7)、VLはVkappaとVlamdaに区分されて、VKappaは6種類、Vlamdaは10種類familyに分類される(Chothia et al., 1992 J Mol Biol 227,799-917; Tomlinson et al.,1995 EMBO J 14,4628-4638; Williams et al., J Mol Biol 264,220-232)。

30

40

## 【0054】

CDR(Complementary Determinant Region):超可変領域(hypervariable region)ともいい、抗体の構造のうち重鎖または軽鎖の可変ドメイン内に位置して、抗原のエピトープとの直接的な結合に参加する区間を意味する。各可変ドメインは、3個のCDR区間があつて種々の長さのアミノ酸で構成されている。

## 【0055】

50

抗体骨格(scaffold): 抗体の構造のうち抗原に直接結合する超可変領域(hypervariable region)、すなわちCDRを除いた残りの構造であり、CDR変形ライブラリー製作時アミノ酸塩基配列が維持される部分を意味する。すなわち、抗体のアミノ酸配列のうち超可変領域であるCDR1、CDR2及びCDR3を除いた残りのアミノ酸配列を意味する。本発明では、ヒト免疫グロブリン可変ドメインのうちCDR1、CDR2及びCDR3を除いた残りの領域であるフレーム(FR:frame) 1乃至フレーム4を全部合わせた領域を意味する。

【0056】

すなわち、本発明でのVHドメイン抗体骨格は、VHドメイン抗体のうちCDR1乃至CDR3を除いたフレーム(FR:frame) 1乃至フレーム4を全部合わせた領域を意味する。

このような抗体骨格は、目的とするターゲット(target)に結合する蛋白質、特にVHドメイン抗体選別のためのCDR変形ライブラリー製作のための骨格として活用することができる。

【0057】

ドメイン抗体(Domain antibody): 広い意味でヒト免疫グロブリンと構造を成しているドメインのうち一部を含む特定の抗原に結合できる変形された形態の蛋白質を意味する。狭い意味ではヒト免疫グロブリン可変ドメイン(VHまたはVL)を治療用抗体で用いるのに適合した形態で変形した形態を意味する。

【0058】

特に単ドメイン抗体(single domain antibody)の場合には、一般的に重鎖でだけなく単重鎖抗体(single heavy chain antibody)から由来した可変ドメインを意味する。ヒトコブラクダ(dromedary)由来の単ドメイン抗体は、VHH(heavy chain variable domain from single heavy chain antibody)といい、サメのような軟骨魚類由来の単ドメイン抗体はVNAR(Variable new antigen receptor)と称する。

【0059】

本発明での単ドメイン抗体、例えばVHドメイン抗体またはVLドメイン抗体は、特別な限定がない限り、ヒト由来の可変ドメインのうち重鎖または軽鎖一つだけで構成された抗体を意味する。

【0060】

目的蛋白質:TAPE方法において、ライブラリーで蛋白質特性向上のために選別しようとする対象関心蛋白質(protein of interest)を意味する。本発明では、pET-TAPE発現ベクターのTat信号配列とTEM-1ベータラクタマーゼ遺伝子との間に機能的に連結される遺伝子によってエンコードされる蛋白質を意味する。水溶性特性が求められる蛋白質ならいずれも制限なしに使用可能であるが、ヒト抗体及びその断片、受容体または受容体リガンドなどを含み、特にヒト生殖細胞由来自然型(natural)ヒト免疫グロブリン可変ドメイン及びその人為的突然変異蛋白質を共に含む。

【0061】

リガンド:ライブラリーで選別された目的蛋白質のうち特定レセプターまたはターゲットとする蛋白質に結合能力がある蛋白質を意味する。

【0062】

多重特異性(multi-specific): 一つ以上のエピトープに対して特異的結合ができる抗体の特性を意味する。一つの対象物質に二つ以上のエピトープを認知する特性を意味してもよく、二つ以上の対象物質に結合する特性を意味してもよい。

【0063】

融合蛋白質: 核酸でエンコードされた少なくとも二つ以上の機能が異なる蛋白質またはペプチドが互いに機能的に連結されている蛋白質であり、例えば、Tat信号配列と目的蛋白質が機能的に連結されているものなどを意味する。ここに追加的にTEM-1ベータ-ラクタマーゼのようなレポーター遺伝子(reporter gene)または、6xHis及びフラグ(Flag)のようなタグ(Tag)等が連結されてもよい。機能的に互いに連結された蛋白質の遺伝子は、発現ベクター上で一つのプロモーター(誘導型、持続型、その他)により発現が調節される。

【0064】

10

20

30

40

50

自然型または野生型(wild type):自然界上で得られる遺伝子またはその遺伝子の産物(例えば蛋白質)を意味する。これは、人為的または自然的に遺伝子の配列が変わって産物が他の特性に変わる突然変異(mutant)、多重性(polymorphism)、変異(variant)とは相反する概念である。

【0065】

前記のような用語及び略語の定義に基づいて本発明を詳細に説明する。

前記説明した通り、本発明に係るTAPE方法及びこれのためのTAPEシステムは、Tat信号配列に目的蛋白質と抗生剤耐性蛋白質が結合された遺伝子構造体(construct)を製造して、これを含むベクターを宿主細胞、特に大腸菌に形質転換させることによって、融合蛋白質を大腸菌で発現させて、水溶性(soluble)であり熱力学的安定性が優れたヒト生殖細胞由来免疫グロブリン可変ドメイン(Immunoglobulin variable domain、VHまたはVL)やりガンドなどの目的蛋白質を選別できる方法及びそのような方法を行うためのシステムである。

10

【0066】

「Tat信号配列(Tat signal sequence)」とは、Tat(Twin-arginine translocation)経路によって認知される配列である。バクテリアでは、細胞質で細胞内膜を通過する経路に蛋白質を誘導して、葉緑体(chloroplast)では、ストロマ(stroma)からチラコイド(thylakoid)に移動する経路を誘導する。一般にTat信号配列は、次の三つのモチーフ(motif)に区分される。プラスの電位を示すN-末端モチーフであるn-領域(region)、中間の疎水性(hydrophobic)アミノ酸からなるh-領域、C-末端モチーフであるc-領域からなっている。多くのTat信号配列を分析した結果、n-領域とh-領域にかけてTat信号配列の特徴的な保存配列であるS/T-R-R-x-F-L-Kが存在することが明らかになった。この中二つのアルギニン(arginine:R)は、すべてのTat信号配列において変わりがない理由からツイン-アルギニン(Twin-arginine)と名付けられた。

20

【0067】

Tat信号配列は、TorA、CuoO、DmsA、FdnG、FdoG、HyaA、NapA、Suf1、WcaM、TagT、YcbK、YcdB、YdhX及びYnfEなどから選択されるが、これらに限定されない。細胞質内で、シャペロン等または種々の補助因子(cofactor)等と結合を介して完全な三次構造をなす蛋白質は、Tat経路を介して細胞膜を移動してバクテリアの一般的な細胞膜移動経路であるSec信号とは互いに符合しない。すなわち、Tat ABCからなるトランスロカーゼ(translocase)複合体によって細胞質でフォールディングが行われて完ぺきな三次構造が形成された蛋白質だけ認知するので、Sec経路とは異なった特性の蛋白質の移動経路に關与する(Baneyx and Mujacic, Nat. Biotech. 2004, 22, 1399-1408)。

30

【0068】

本発明に係るTAPE方法は、前記のようなTat-信号経路の特性を利用したもので、ライブラリー(例えば、ヒトVHドメインライブラリー)由来の目的蛋白質が、TAPEスクリーニングシステム経路を通過するには、胞質内で完全にフォールディングされてTat ABCトランスロカーゼ複合体によって認知されなければならないので、従って、細胞内膜に存在するこの複合体は、Tat経路に適合した気質だけを取り除く適合性フィルター(fitness filter)の役割を果たすといえる。従って、他の様々な研究によって明らかになったように、蛋白質が概ね細胞質で正確にフォールディングが行われた時だけTat経路を通過し、概ね蛋白質の水溶性及びはやいフォールディングの可否に従属的な特徴を示す点を利用した(DeLis a et al., 2003 PNAS 100(10): 6115-6120; Snaders et al., 2001 Mol Mic robiol 41(1): 241-246; Matos et al., 2008 EMBO J 27(15): 2055-2063; Fisher et al., 2006 Protein Sci 15(3): 449-458; Lim et al., 2009 Protein Sci 18(12): 2537-2549)。本発明で用いることができるTat経路信号配列は、前記考察した通り、TorA、CueO、DmsA、FdnG、FdoG、HyaA、NapA、Suf1、WcaM、YagT、TcbK、YcdB、YdhX及びYnfE蛋白質の信号配列のうち選択されることが好ましいが、これらに限定されない。

40

【0069】

50

すなわち、Tat経路の特性上蛋白質フォールディングが行われる大腸菌の細胞質は、二硫化結合を行うことができない還元条件であるため、VHドメイン抗体ライブラリー中特異的に二硫化結合の助けがなく自発的に(autonomously)速くかつ正確なフォールディングが行われるVHドメインを取り除くことができる。還元環境内で機能を有した抗体で自発的にフォールディングする抗体を探すのは、還元環境の細胞質内に存在する特定ターゲット抗原に作用する抗体、すなわちイントラボディー(intrabody)の開発において核心的な要素である。本願発明のスクリーニングシステムを介して選別を経た生殖細胞のヒトVHドメインまたは変形された(engineered) VHドメインが、どのような物理化学的特性を見せるかは、選別されたVHドメインの特性分析を介してだけで知ることが出来る。このように細胞質内での自発的なフォールディングを成す目的蛋白質の特性が、さらに抗体治療剤としてのどんな物理化学的特性(例えば、蛋白質水溶性、蛋白質熱力学的安定性、長期保管安定性、及び蛋白質構造的安定性等)に寄与するのかは、単純には予測し難い。本願発明の目的は、前記のようなTAPE方法を導入及び開発して、これを蛋白質工学に適用させることであり、より具体的にこのスクリーニング方法を介して改良されたヒト免疫グロブリン可変ドメイン抗体(VHまたはVL)の選別に応用して、これから出てきた向上した物性の可変ドメイン抗体を新規治療用抗体の開発のための骨格構造(scaffold)に応用することである。

10

## 【0070】

本発明に係るTAPE方法は、従来の方法と比較すると次のような長所を持つ。

従来のファージディスプレイ(phage display)技術を利用してドメイン抗体ライブラリーに温度のような一定のストレスを与えた後、プロテインA(protein A)に付く活性を測定して、パニングを行う方法(Jepsers L. et al., Nat. Biotechnol. 2004 22(9): 1161-5; Barthelemy P. A. et al., J. Biol. Chem. 2008 283(6): 3639-54)等により、NIHグループの場合は特別な選別を経ないで実験的に偶然にドメイン形態で安定したm0というドメインを発見したことがある(J. Biol. Chem. 2009 May 22; 284(21): 14203-14210)。

20

## 【0071】

しかし、本発明では、大腸菌のTat経路を利用したTAPE方法を利用して、高い水溶性及び熱的安定性を持つヒト免疫グロブリン可変ドメインを容易に選別することができる。

## 【0072】

また、プレート基盤のスクリーニング方法を利用してTat信号配列が含まれたライブラリーから水溶性の蛋白質を発掘する方法も知られている。しかし、この方法は、抗生剤が含まれた固形培地(プレート)に一定倍率で希釈された発現菌株を塗抹して抗生剤耐性で生き残った個別クローンを確保する過程を経なければならないので(Fisher A. C. et al., Protein Sci. 2006 Mar. 15(3): 449-58) Fisher A. C. et al., J. Mol. Biol. 2009 385(1): 299-311)、プレート基盤のスクリーニング方法の特性上一つのプレートに $10^5$ 個以上の個別クローンを分離し難い。一般的な結合活性を選別するための目的の抗体ライブラリーの大きさが、 $10^9$ 乃至 $10^{10}$ 個であることを勘案すると、普通の大きさのライブラリーを前記のような方法で全部処理することは、物理的にかなり難しいのでスクリーニングにおいてハイスルプット(high throughput)形態を実現するのが実質的に難しい結果を招く。また、従来の方法(例えばISELATE)を用いた場合、多くの場合においてプレートで抗生剤耐性で選別された個別菌株のプラスミド構造遺伝子塩基配列を確認してみると、目的遺伝子が断片化された形態でクローニングされて短い形態の蛋白質が発現される場合、または、目的遺伝子がなしでレポーター(reporter)遺伝子(例えばTEM 1-1  $\beta$ -lactamase)だけ存在する場合がしばしば発見される(Fisher A. C. et al., J.

30

40

Mol. Biol. 2009 385(1): 299-311)。このようにペプチド水準(10~20個のアミノ酸で構成)の短い蛋白質は二次三次構造に影響を多くは受けないうえに、それ自体で非常に水溶性が高い場合が多くて、結果的に偽陽性(false positive)で示されることになる。既存のTat基盤蛋白質フォールディング選別方法(例えばISELATE、Fisher JMB 2009)では、このような偽陽性の比が、抗生剤耐性を利用した選別回数が増えるほど増幅される傾向があって、蛋白質水溶性スクリーニングを不可能にさせる実質的な障害として作用す

50

る。従って、このような多くの方法は、大規模なライブラリーを検査するよりは、水溶性を確保しにくい目的蛋白質の小規模の大きさの突然変異ライブラリーから(10<sup>5</sup>乃至10<sup>6</sup>の大きさ)蛋白質変形を介して水溶性発現を確保して結晶構造を研究するための目的で利用する(Pedelacq et al., Nat Biotechnol. 2002 20(9):927-32; Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2003 100(2): 455-60)。

#### 【0073】

しかし、本発明に係るTAPE方法は、既存の固形培地(プレート)を基盤にする蛋白質水溶性選別方法の代わりにライブラリー全体を選別抗生剤(例えば、アンピシリン)が含まれた液体培地に接種する方式で、培地の体積を増やす場合、一度にスクリーニングに適用できるライブラリー(大腸菌)の大きさに対する制限がなくなるので、ハイスルットスクリーニング(high throughput screening)が可能になる。そして、すでに説明した通り、従来の方法においては、抗生剤が含まれた液体培地でライブラリーを選別した後、ライブラリーの発現ベクター(例えばpET-TAPE)へのクローニング過程での自己連結(self-ligation)さらた空ベクター(mockベクター)と上で言及したペプチド水準の遺伝子断片が入ったクローンが偽陽性で存在する確率が非常に高い。このようなりガーゼ(ligase)を利用したクローニング方法の内在的問題によって引き起こされるペプチド水準の大きさの遺伝子断片による偽陽性問題を解決するための方法として、回収された大腸菌から全てのプラスミドを回収して、すでにデザインされた目的蛋白質とTEM-1ベータ-ラクタマーゼ融合蛋白質発現遺伝子の両側終端に制限酵素を処理して完全な大きさの選別遺伝子をゲル電気泳動(gel electrophoresis)及びゲル溶出(gel elution)方法で分離すると、TAPE方法によって一次選別されたすべての真陽性(true positive) VHドメイン遺伝子だけをもれなく回収することができる。従って、本発明に係るTAPE方法は、反復的な抗生剤耐性選別回数が増えるにも関わらず偽陽性が増幅されず完全な目的蛋白質の遺伝子構造体(construct)だけ含まれた真陽性(true positive)クローンだけ抗生剤耐性の程度により選別できるという長所も持っている。

10

20

#### 【0074】

具体的に、本発明に係るTAPEシステムは、目的蛋白質、特に重鎖可変ドメインのN-末端にTat-信号配列が機能的に連結されており、C-末端には、抗生剤耐性蛋白質、特に成熟した(自体Sec経路信号配列が除外された) TEM-1ベータ-ラクタマーゼ(beta lactamase)等の抗生剤耐性を与える蛋白質が機能的に結合された融合蛋白質をコードする遺伝子構造体を利用する。

30

#### 【0075】

TAPEシステムまたはこれを利用したTAPE方法は、前記遺伝子構造体が、宿主細胞、特に大腸菌に形質転換された後、抗生剤を添加した培養条件で、Tat-信号配列によって抗生剤耐性蛋白質が水溶性形態に良好にフォールディングされて発現した大腸菌だけが生存できる原理を利用する。

#### 【0076】

一つの宿主細胞には一つの遺伝子構造体だけを形質転換させることによって、生存した宿主細胞に含まれた目的蛋白質は、水溶性形態に良好にフォールディングされたと見なすことができる。

40

#### 【0077】

また、異なる目的蛋白質をコードする遺伝子構造体が形質転換された多数の宿主細胞群、特に大腸菌群を利用して本発明に係るTAPE方法を通して大規模ハイスルット(high throughput)方式で水溶性目的蛋白質を選別することができる。

#### 【0078】

TAPE方法は、

(1)目的蛋白質、特に重鎖可変ドメインのN-末端にTat-信号配列が機能的に連結されており、C-末端には抗生剤耐性蛋白質が機能的に連結されている融合蛋白質をコードする遺伝子構造体に形質転換された宿主細胞群を抗生剤が含まれた液状培地で培養する工程;

(2)生存した宿主細胞を回収してプラスミド(plasmid) DNAを回収する工程;

50

(3)回収されたプラスミドDNAで目的蛋白質をコードする核酸配列を回収する工程；  
 (4)回収された核酸配列から目的蛋白質の配列を確認して選別する工程；を含んで構成されて、

特に、工程(3)以後、

(3′)回収された核酸配列を再びTat-信号配列をコードする遺伝子及び抗生剤耐性付与遺伝子に作動可能に連結させた遺伝子構造体を製作して、これを再び宿主細胞群に形質転換させる工程；及び

(3′′)別途の遺伝子構造体製作なしに回収された核酸配列を含むプラスミドを直ちに宿主細胞群に形質転換させる工程；のうち選択された一つの工程を追加的に含んでも良い。

10

(3′′)工程は、(3′)工程に比べてより迅速に次の工程が進行できるとの長所がある。

#### 【0079】

工程(1)乃至工程(3′)または工程(1)乃至(3′′)は、2ラウンド(round)以上繰り返すことができるが、このような繰り返し過程によって水溶性であり安定化水準が高い目的蛋白質を選別することができる。

(1)工程乃至(3′)工程または(3′′)工程が、2回以上繰り返される場合、最終的に(3′)工程または(3′′)工程以後(4)工程で目的蛋白質の配列を確認して選別する工程を行って、目的蛋白質を同定(identification)することができる。

#### 【0080】

TAPE方法をより具体的に考察すると、

20

(1)宿主細胞、特に大腸菌細胞質で目的蛋白質、特にヒト可変ドメインライブラリーを融合蛋白質形態で発現する。ここで、それぞれの宿主細胞、特に大腸菌は、一つの特定融合蛋白質だけ発現する。ここで融合蛋白質は、Tat経路信号配列が目的蛋白質、例えば、ヒト免疫グロブリン可変ドメイン、特にVHのN-末端に機能的に連結されておりC-末端には成熟した(自体Sec経路信号配列が除外された)TEM-1ベータ-ラクタマーゼ(beta lactamase)等の抗生剤耐性を与える蛋白質が機能的に連結されている。

#### 【0081】

(2)融合蛋白質が発現されたライブラリーを抗生剤が含まれた液体選別培地に接種して選別圧力(selection pressure)を加える。この時、液体選別培地に含まれる抗生剤の濃度は、0.1 ug/mlを基準(1x)に最初ラウンドでの濃度が1x、2x、3x、4xまたは、5x、8xまたは、10xになってもよい。この時用いられる抗生剤は、アンピシリン(ampicillin)またはカルベニシリン(carbenicillin)等を用いても良いが、これらに制限されるのではなく、前記工程(1)で用いられる抗生剤耐性蛋白質に応じて用いられることができる適切な抗生剤ならばいずれも制限なしに使用可能である。発現した融合蛋白質は、目的蛋白質の特性に応じてTat経路を経て細胞膜間に移動するか、目的蛋白質の特性上移動に失敗した、すなわち水溶性を持たない融合蛋白質は、封入体(inclusion body)を形成するか、またはTatプルーフリーディング(proof reading)機序によって細胞質内で消滅(degradation)される。Tat経路のフォールディング検索機能を通じて周辺細胞質(periplasm)に融合蛋白質が移動した大腸菌だけが目的蛋白質のC-末端に機能的に連結されたTEM-1ベータ-ラクタマーゼなどの抗生剤耐性付与蛋白質の作用によって抗生剤が含まれた液体選別培地で耐性を獲得することができる。

30

40

#### 【0082】

(3)液体選別培地で生き残った大腸菌を回収してプラスミド(plasmid) DNAを回収した後、すでにデザインされた制限酵素を処理して、全体融合蛋白質のうち目的蛋白質とベータ-ラクタマーゼなどの抗生剤耐性付与蛋白質の融合の部分だけをエンコードする核酸だけを電気泳動及びゲル抽出方法などで回収するか、または

(3′)液体選別培地で生き残った大腸菌を回収してプラスミドDNAを回収した後、これを実施例5で記述した通り直ちに大腸菌に形質転換して、次のラウンドに進行する。

(4)回収された核酸を再びTat経路信号配列の部分と再び機能的に連結するためにモック(mock)ベクター(pET-TAPE)にクローニングする。

50

## 【0083】

以後、1)~3)の過程を繰り返して、ライブラリーから所望の特性の蛋白質を発現する遺伝子の比を強化(enrichment)することができる。この時、次のラウンド(round)の液体培地選別は、以前のラウンドよりさらに高い抗生剤濃度で実施してもよい。

## 【0084】

本発明での目的蛋白質、特にTAPE方法によって選別することができる目的蛋白質は、目的とする機能を有するいかなる形態の蛋白質も利用可能で、好ましくは特定ターゲットに対する結合能力がある蛋白質(scFv、イントラボディー、ドメイン抗体、Fab)、受容体蛋白質、特にTCR(T-cell receptor)または受容体リガンドなどが利用されるが、これらに限定されるのではなく、特に好ましくはドメイン抗体、例えばVHドメイン抗体またはVLドメイン抗体である。

10

## 【0085】

本発明での目的蛋白質は、突然変異を有するものであってもよい。目的蛋白質の突然変異誘発のために特定部位のアミノ酸が無作為に変異されるようにデザインされたオリゴマーを合成してこれを利用したオーバーラッピング(over-lapping)重合連鎖反応(PCR)を利用するかDNAポリメラーゼ(polymerase)のエラー(error)比を人為的に増加させた重合反応条件で無作為部位の無作為変異を誘発する方法(error-prone PCR)のような増幅を基盤とする突然変異方法が利用されるが、これらに限定されない。

## 【0086】

本発明での目的蛋白質を含む融合蛋白質は、分離精製または検出(detection)を容易にするために、C-末端に特定のアミノ酸配列からなるタグ(Tag)を含んでも良い。このようなタグは、本発明が属する技術分野で通常用いられるタグを制限なしに使用可能であるが、例えば6xHisタグ、フラグタグ(Flag tag)、c-mycタグなどから選択されるが、これらに限定されない。

20

## 【0087】

融合蛋白質発現のためのベクターとしては、大腸菌で発現可能になるもので、本発明が属する技術分野で知られるいかなるベクターでも制限なしに使用可能であるが、このようなベクターの非制限的な例としては、pET22b(Novagen)、pAE34(AthenaES)、pET9a (Novagen)または pMK (Lim HK et al. Production Characteristics of Interferon- $\alpha$  Using an L-arabinose Promoter System in a High-cell-density Culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(2): 201-208.)等がある。プロモーターとしては、lacプロモーター(promoter)、T7プロモーター、アラビノース(arabinose)プロモーターなどが融合蛋白質の発現誘導のために用いられてもよい。

30

## 【0088】

TAPE方法を用いて選別されたライブラリーから目的遺伝子だけを回収して新しい発現ベクターでクローニングしてN-末端とC-末端にそれぞれあったTat信号(signal)とTEM-1ベクター-ラクタマーゼなしに目的蛋白質だけを単独で発現させた後、個別hitの精製過程を経る。この時、目的蛋白質のC-末端に精製及び分析を容易に行うために、タグを含ませて精製過程を容易に行うことができるが、用いられるタグは、前記説明した通り本発明が属する技術分野で通常用いられるタグを制限なしに使用可能であるが、例えば6xHisタグ、フラグタグ(Flag tag)、c-mycタグなどから選択されるが、これらに限定されない。

40

## 【0089】

本発明に係るTAPE方法によって用いられたライブラリーの種類によって所望の特性を持つリガンドを選別してもよい。このようなリガンドには免疫グロブリン可変ドメイン、特にドメイン抗体と受容体及び受容体リガンドなどがあるが、これらに限定されない。特に前記リガンドは、野生型(wild type)だけでなく、前記説明した通りライブラリーなどに突然変異を誘発して、リガンドに突然変異が誘導されたものであってもよい。

## 【0090】

また、選別されたりガンドは、常法によってそのようなリガンドをコードする遺伝子配列、すなわち塩基配列を収得してもよい。

50

本発明のTAPE方法を通して取得されたりガンド、例えば、生殖ライン塩基配列で選別した野生型リガンドまたは突然変異リガンドは、結合蛋白質として好ましい物理化学的特性を示すことを確認した。特に、水溶性、長期保存安定性、還元環境の細胞質内で自主的にフォールディングできる能力、熱力学的安定性が向上されることを確認することができた。

#### 【0091】

特に好ましいリガンドは、例えばヒト免疫細胞cDNAライブラリーから取得されたヒト免疫グロブリン可変ドメイン及びその突然変異体が挙げられる。前記突然変異は、特定野生型ヒト免疫グロブリン可変ドメインのフレーム(frame)部分の特定の位置にNNKプライマー(primer)等を利用してアミノ酸を変形させたライブラリーを用いて選別、取得されてもよい。

10

#### 【0092】

本発明に係るTAPE方法によって選別されたヒト免疫グロブリンの重鎖または軽鎖可変領域ドメイン、すなわちVHまたはVLドメイン抗体は、CDR配列と関係なく該当ヒトVH及びVLドメイン抗体の骨格を持つ場合、依然として水溶性であり熱力学的安定性を維持する。

#### 【0093】

従って、前記のような特性を利用して、本発明を通じて選別された高い水溶性と熱力学的安定性などを持つ優れた物性のVH骨格は、目的とするターゲット、すなわち抗原を標的にする特定リガンド、すなわちドメイン抗体を取得するためのライブラリーの骨格構造(scaffolding)として活用することができる。具体的に、選別された突然変異VHドメイン抗体の骨格を維持しながら、無作為CDR配列を挿入して、ライブラリーを構築して、これからパニング(panning)等の常法を用いて目的とするターゲット、すなわち抗原に結合能を持つ抗体を選別することができる。

20

#### 【0094】

具体的には、通常ファージディスプレイ方法などと類似して固定された目的とする抗原に結合したVHドメイン抗体を除いた残りの結合しないVHドメイン抗体を湧出(elution)して選別することができ、前記固定された目的とする抗原に結合しないVHドメイン抗体を湧出する過程を二回以上繰り返してより高い目的とする抗原に対する結合能を持つVHドメイン抗体を選別することができる。

#### 【0095】

前記説明した通り、本発明で取得されたVHドメイン抗体の骨格を利用してCDR突然変異ライブラリーを構築するために、該当可変区間(ヒト免疫グロブリン可変ドメインである場合、該当ドメインのCDR)を種々の長さ、すなわちアミノ酸残基の個数を変化させるか、特定アミノ酸残基を他の無作為アミノ酸に変えるか、CDR内の超可変領域(hyper variable region)のいくつかの特定部位だけを無作為に変形してもよい。

30

#### 【0096】

従って、本発明は、TAPE方法によって選別されたVHまたはVLドメイン抗体の骨格に無作為的(random)に CDR配列を含むライブラリー及びその製造方法を提供して、そのようなライブラリーを利用して所望のターゲット蛋白質に結合能を持つVHまたはVLドメイン抗体を選別する方法及びそのような方法によって選別されたVHまたはVLドメイン抗体を提供して、選別されたドメイン抗体のアミノ酸配列及びこれをエンコードするポリヌクレオチドを提供する。

40

このような方法により、ヒト単一可変ドメイン抗体、特にVHドメイン抗体の物性を改善させて既存の自然界上では得ることはできない程度の水溶性と熱力学的安定性が確保されたヒト単一可変ドメイン抗体、特にVHドメイン抗体を取得することができる。

#### 【発明の効果】

#### 【0097】

本発明で提供されるTAPE方法は、高い水溶性、熱的安定性、長期保存安定性を持つ目的蛋白質を容易に選別でき、

特にTAPE方法を通して選別されたヒトVH及びVLドメイン抗体骨格の場合、様々なCDR変

50

形、すなわちCDR配列と関係なく高い水溶性及び熱的安定性を維持する優れた特性を示した。

従って、選別されたヒトVHまたはVLドメイン抗体の骨格を利用してCDR配列を無作為または論理的(rational)に突然変異させたライブラリー構築が可能で、構築されたライブラリーから治療用薬品に利用することができる優れた特性を持ったドメイン抗体を選別することができる。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】TAPE方法による選別された水溶性蛋白質の選別能力を示す図面。

【図2】TAPE方法で水溶性蛋白質を選別する方法に関する模式図。(a)宿主細胞群を抗生剤が含まれた液状培地で培養する工程(b)宿主細胞群の成長曲線を抗生剤の濃度に応じて確認する工程(c)プラスミドを回収して目的蛋白質をコードする核酸の有無を確認する工程(d)回収された核酸配列を再びTat-信号配列をコードする遺伝子及び抗生剤耐性付与遺伝子に作動可能に連結させた遺伝子構造体を製作して、これを再び宿主細胞群に形質転換させる工程あるいは回収されたプラスミドを直接宿主細胞群に形質転換させる工程

【図3】ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン遺伝子ライブラリーからTAPE方法を利用して選別されたヒトVHドメインのアミノ酸配列を示す図面。(a)選別されたヒトVHドメインのFR1、CDR H1、FR2、及びCDR H2配列(b)選別されたヒトVHドメインのFR3、CDR H3及びFR4配列

【図4】ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン遺伝子ライブラリーからTAPE方法を利用して選別されたヒトVHドメインの大腸菌での発現様子をSDS-PAGEを利用して分析した結果を示す図面。solは、細胞破碎後水溶性画分(soluble fraction)を、Inclは細胞破碎後非水溶性画分(insoluble fraction)を意味して、矢印は、該当VH分子量位置のバンドを表示。(a)既に水溶性が良いと知られたVHドメインの発現様子(b)左側ボックスは、ヒト生殖細胞から由来したヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインライブラリーから無作為に選別したVH、右側ボックスは、TAPE方法によって選別されたVHドメインの発現様子

【図5】TAPE方法によって1次選別されたVHドメイン抗体骨格の変形ライブラリーの製造方法を示す図面。

【図6】VHドメイン抗体骨格の変形ライブラリーを利用してTAPE方法によって選別されたヒトVHドメインのアミノ酸配列を示す図面。(a)選別されたヒトVHドメインのFR1、CDR H1、FR2、及びCDR H2配列(b)選別されたヒトVHドメインのFR3、CDR H3及びFR4配列

【図7】VHドメイン抗体骨格の変形ライブラリーを利用してTAPE方法によって選別されたヒトVHドメインの大腸菌での発現様子をSDS-PAGEを利用して分析した結果を示す図面。Total fractionは、全細胞破碎液(Total cell lysate)のSDS-PAGE結果を示して、Soluble fractionは、細胞破碎後水溶性画分(soluble fraction)に対するSDS-PAGE結果を、Insoluble fractionは、非水溶性画分に対するSDS-PAGE結果を示して、Mはマーカー、1レーンは比較群を意味する。

【図8】VHドメイン抗体骨格の変形ライブラリーを利用してTAPE方法によって選別されたヒトVHドメインの大腸菌での発現様子をSDS-PAGEを利用して分析した結果を示す図面。1レーンは、ラクダドメイン抗体VHH、2レーンは、CDR合成ヒトドメイン抗体HEL4、3レーンは、M2X1、4レーンは、M2-12Iであり、5~26レーンは、フレーム変形ライブラリーから選別されたVH骨格の発現様子を示す。各レーン別フレームは、5レーン:M2-47、6レーン:M2-55、7レーン:M2-57、8レーン:M2-59、9レーン:M4-2、10レーン:M4-5、11レーン:M4-6、12レーン:M4-7、13レーン:M4-12、14レーン:M4-13、15レーン:M4-17、16レーン:M4-20、17レーン:M4-28、18レーン:M4-32、19レーン:M4-33、20レーン:M8-4、21レーン:M8-5、22レーン:M8-6、23レーン:M8-8、24レーン:M8-11、25レーン:M8-12、26レーン:M8-13

【図9】TAPE方法によって選別されたVHドメインの円偏光二色性分光計(CD)比較結果を示す図面。

【図10】VHドメイン抗体骨格の変形ライブラリーを利用してTAPE方法によって選別されたヒトVHドメインの円偏光二色性分光計(CD)比較結果を示す図面。

10

20

30

40

50

【図11】VHドメイン抗体骨格の変形ライブラリーを利用してTAPE方法によって選別されたヒトVHドメインの円偏光二色性分光計(CD)比較結果を示す図面。

【図12】TAPE方法によって選別されたVHドメインの大きさ-排除クロマトグラフィー(size-exclusion chromatography)分析結果を示す図面。

【図13】TAPE方法によって選別されたVHドメインの長期保管安定性を示す図面。

【図14】M8-4 VH骨格の35番及び47番位置アミノ酸の復帰突然変異(back mutation)によるTmの変化を示す図面。

【図15】M8-4 VH骨格の35番及び47番位置アミノ酸の復帰突然変異(back mutation)による水溶性変化を示す図面。

【図16】変形されたCDR長さを持つ変形ライブラリー製作方法を示す図面。

【図17】抗原結合力を向上させるための戦略的ライブラリー突然変異位置を示す図面。  
(a)FR1、CDR H1、及びFR2配列(b)CDR H2及びFR3配列(c)CDR H3及びFR4配列

【図18】選択的CDR突然変異ライブラリー製作方法を示す図面。

【図19】CDRH3変形時、CDRH3のアミノ酸残基の個数に応じたVH骨格の大腸菌での発現様子をSDS-PAGEで分析した結果を示す図面。(a)CDRH3のアミノ酸残基の個数が7である場合(b)CDRH3のアミノ酸残基の個数が8である場合(c)CDRH3のアミノ酸残基の個数が9である場合(d)CDRH3のアミノ酸残基の個数が10である場合(e)CDRH3のアミノ酸残基の個数が11である場合(f)CDRH3のアミノ酸残基の個数が12である場合(g)CDRH3のアミノ酸残基の個数が13である場合(h)CDRH3のアミノ酸残基の個数変化がない場合

【発明を実施するための形態】

【0099】

以下、実施例を通して、本発明をより一層詳細に説明する。この実施例は単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこの実施例によって制限されると解釈されないことは当業界の通常の知識を有する者には自明である。

【実施例】

【0100】

実施例1.TAPEシステム構築のためのpET-TAPEの製造

Tat(Twin-arginine transport)システム基盤蛋白質水溶性スクリーニングシステムを構築するために、pET9aベクターに目的蛋白質N-末端にTat気質蛋白質であるTorA (E.coli trimethylamine N-oxide reductase)の経路信号配列(signal sequence)のssTorAを連結してC-末端にTEM-1ベータ-ラクタマーゼを連結してpET-TAPEを製作した。

【0101】

但し、Tat経路に誘導する信号配列は、上で言及した通りssTorAに限定されず全Tat経路蛋白質の信号配列が利用できることは、通常の技術者には自明である。また用いられるベクターは、pET9a (New England Biolab)だけでなくアラビノース誘導プロモーター(Arabinose induction promoter)を用いるDpMA (韓国特許1996-007784)、ラック(lac)プロモーターを用いるpAE34等本発明の目的に合ういかなるベクターでも利用可能であることも通常の技術者には自明である。

【0102】

pET9aをベクターとして用いる場合、最適化された培養条件で、IPTGによってssTorA、目的蛋白質、及びTEM-1ベータ-ラクタマーゼからなる融合蛋白質の発現が誘導されると、信号配列(signal sequence)のガイドにより融合蛋白質はTat移動経路を経ることになる。この時、Tat機序(machinery) (Tat A、B、C)によって水溶性でありフォールディングが完成された融合蛋白質だけ細胞内膜を通過することになり、結果的に目的蛋白質のフォールディング特性によって目的蛋白質に連結されたTEM-1ベータ-ラクタマーゼは、大腸菌の細胞周辺質(periplasm)に移動することになる。細胞周辺質のTEM-1ベータ-ラクタマーゼの存在の可否により大腸菌の抗生剤耐性が決定される。

【0103】

本発明では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの選別のためのスクリーニングのシステムとして、pET-TAPEベクターのssTorAとTEM-1ベータ-ラクタマーゼとの間に目的遺伝

10

20

30

40

50

子であるヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ライブラリーを挿入した。

【0104】

より詳しく実験過程を説明すると、次のとおりである。ssTorA遺伝子とヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインVHファミリータイプ(Family type) 2の代表的な遺伝子(Stefan Ewert et al., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. Methods 34 (2004) 184-199)の融合遺伝子は、DNAオリゴマー合成と重複連鎖重合反応(Overlapping polymerase chain reaction)を介して合成した(Genscript USA Inc., US)。合成されたssTorA-VH2遺伝子を鋳型にしてNdeI塩基配列を含む5'方向プライマー(配列番号1)とNotI、6Xhis、BamHI塩基配列を含む3'方向プライマー(配列番号2)を利用して連鎖重合反応を誘導した。

10

【0105】

PCR反応は前記二つのプライマーと1 mM、0.5 U l-pfu DNA重合酵素(iNtRON)、各2.5 mMの4種類のdNTP、及び5 µLの10X反応バッファーで構成し、蒸留水で最終体積が50 µlになるべく補充した。PCR反応は、95 °Cで2分露出後、94 °Cで15秒、56 °Cで15秒、72 °Cで30秒露出を30回繰り返して、最後に72 °Cで5分間反応させた。増幅されたDNAは、1%アガロースゲルにロードして電気泳動を行った後、QIAquickゲル抽出キット(QIAGEN、Valencia、CA、USA)で分離した。

【0106】

PCRを通して増幅されたNdeI-ssTorA-VH2-NotI-6xHis-BamHI遺伝子は、pET9aベクターのマルチクローニングサイト(Multi-Cloning Site:MCS)に存在するNdeIとBamHI切断位置に挿入してpET9a-ssTorA-VH2プラスミドを製作した。TEM-1 β-lactamase (bla)遺伝子を鋳型にして5'プライマー(配列番号3)、3'プライマー(配列番号4)でPCR反応を行って分離したNotI-TEM-1ベータ-ラクタマーゼ-BamHI切片をpET9a-ssTorA-VH2のNotIとBamHI切断位置に挿入して、pET-TAPEと命名した。以後、ライブラリー製作は、pET-TAPEでVH2部分を除去してライブラリー遺伝子を挿入する方法で行った。構築したTAPEシステムが、該当蛋白質の水溶性(solubility)に依存的であるか否かを確認するために、すでに大腸菌で水溶性発現(soluble expression)程度が知られた代表的な自然型ヒト免疫グロブリンドメイン抗体(Dp47d、VH2、VH3)及び陰性(VH3-Bla、no signal sequence)、陽性(ssTorA-Bla)対照群遺伝子をpET-TAPEに導入した後、TEM-1ベータ-ラクタマーゼの抗生剤耐性程度を測定した。VHファミリータイプ2は、概ね大腸菌発現時水溶性発現が非常に不利であると知られており、VH3とDP47dは、大腸菌で水溶性発現が相対的に良好であると知られている(Ewert et al., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. Methods 34 (2004) 184-199)。

20

30

【0107】

具体的には、すでに蛋白質の水溶性程度が知られた対照群ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインと陰性(pET-TAPE)にVHファミリータイプ3の代表的遺伝子を挿入してssTorAを除去してTEM-1ベータ-ラクタマーゼが細胞周辺質で到達できなくした構造体(construct)及び陽性(pET-TAPE)自体にVH遺伝子を挿入しないでssTorAと連結してTEM-1ベータ-ラクタマーゼマンを発現させる構造体対照群をTAPEシステムに装着した後、抗生剤含培養液に接種して、水溶性程度に応じた抗生剤耐性程度を生菌数を測定した。用いられた培地は、アンピシリン50 µg/mlが含まれたLB培地が用いられ、IPTGで3時間誘導して生きている細胞数を計算した。

40

【0108】

その結果、該当遺伝子の知られた水溶性は、pET-TAPEシステム下で抗生剤耐性の程度と比例する結果を示した(図1参照)。図1で単位細胞濃度当たりカウント(count)が多いほど抗生剤耐性が強いことを意味する。

【0109】

実施例2. ヒト生殖細胞由来免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(VH)ライブラリー製造

50

ヒト肝(Liver)、末梢血液単核細胞(peripheral blood mononuclear cell:PBMC)、脾臓(Spleen)、甲状腺(Thyroid)で得たmRNAから逆転写(reverse transcription)を介してcDNAライブラリーを確保した。

#### 【0110】

これからヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのDNA配列を確保するために、配列番号5乃至配列番号13に記載された混合プライマーをデザインして、ヒト生殖細胞系列で可用するすべてのヒト重鎖可変ドメイン遺伝子を確保した。確保したヒト重鎖可変ドメイン遺伝子ライブラリーは、pET-TAPEのNdeI/BamHIサイトに挿入して、約 $10^8$ の大きさのライブラリーを完成した。

#### 【0111】

具体的には、ヒト脾臓、末梢血液単核細胞、肝、胸腺で抽出したRNA (Clontech, Madison, WI, US)から逆転写反応を介してcDNAを製造した。AMV逆転写酵素とRNase抑制剤は、プロメガ(Madison, WI, USA)から購入した。それぞれのRNAを $1\mu\text{L}$ のdNTP混合物( $0.2\text{ mM}$ )と $1\mu\text{L}$ のオリゴdTプライマーと混合して、ヌクレアーゼが除去された水を総体積が $12\mu\text{L}$ になるべく投与した。RNAを変成させるために、混合物を $65^\circ\text{C}$ で培養した後、 $4\mu\text{L}$ の5Xストランドバッファー、 $1\mu\text{L}$ のRNase抑制剤、 $2\mu\text{L}$ の $0.1\text{ M}$  DTTを投与した。逆転写反応を $42^\circ\text{C}$ 、15分間進行させて、 $70^\circ\text{C}$ で15分間放置した。PCRに用いられたプライマーは、各ファミリータイプ別VHドメインを得るためにいくつかの縮退(degenerative)プライマーを同時に用いた。

#### 【0112】

配列番号5から13まで(表5参照)と記載される順方向(Forward) NcoI配列含プライマー及び配列番号14及び15 (表5参照)と記載される逆方向(Reverse) NotI配列含プライマー(Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, US)を用いた。鑄型として逆転写反応を介して製作されたcDNA、前記プライマーそれぞれ $10\text{ pmolar}$ 、 $0.5\text{ U}$ のI-pfu DNA重合酵素(Interon、韓国)、4種類のdNTP各 $2.5\text{ mM}$ 、 $5\mu\text{L}$ の10Xバッファーを利用してDNAを増幅した。PCR条件は、 $95^\circ\text{C}$ で2分露出後、 $94^\circ\text{C}$ で20秒、 $56^\circ\text{C}$ で20秒、 $72^\circ\text{C}$ で2分露出を30回繰り返して、最後に $72^\circ\text{C}$ で7分間反応させた。PCR以後反応混合物を1%アガロースゲルを利用した電気泳動で分離して、続いてゲル抽出キット(QIAGEN, Valencia, CA, USA)で精製した。増幅されたPCR産物とpET9a-TAPEプラスミドは、NcoIとNotI制限酵素で切断して、PCR精製キット(QIAGEN)とゲル抽出キットでそれぞれ精製した。増幅されたVH遺伝子をpET9a-TAPEのNcoIとNotI切断位置に挿入することによって、ヒト生殖細胞由来VHライブラリープラスミドを製作した。製作されたライブラリーは、エタノール沈殿法を利用して濃縮した。

#### 【0113】

大腸菌ElectroMAX™ DH5 -E™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)は、electrophorator (BTX model ECM630, Holliston, MA, USA)を通して $1\mu\text{g}$ のDNAに形質転換した。ライブラリーの大きさを検証するために、形質転換された大腸菌を $10^{-4} \sim 10^{-8}$ で順次希釈してカナマイシンが含まれたLB寒天培地に培養後、コロニー数を計算した。

#### 【0114】

その結果、VH1ファミリーのライブラリーの大きさが $9.1 \times 10^6$ 、VH3の大きさが $1.56 \times 10^9$ 、VH5の大きさが $6.05 \times 10^8$ 個であることを確認した。この中50個の単一コロニーを無作為に分離してカナマイシンが含まれたLB液状培養液に培養後、それぞれのプラスミドをDNA精製キット(QIAGEN, Valencia, CA, USA)を利用して分離した後、確保したVH遺伝子の塩基配列を確認した結果、90%以上の遺伝子が転写可能な形態で維持されていることを確認した。

#### 【0115】

10

20

30

40



【表 5 - 2】

12	GCGCTAGCCAGGTGCAGCTGGTGGAG	
13	GCGCTAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAG	
14	GCCTCGAGTGAGGAGACGGTGAC	10
15	GCCTCGAGTGAAGAGACGGTGAC	
16	GCCCATGGGAAGTCCAACCTGGTTGAATCTGGTGGCGGTTTAGTT	
17	AGTTGAACCGCCAGAGCCGAAATMNNTGAGACMNNTTCMNACCTTTGCCTGG CGCMNNACGCACCCAGCCCATAGCATAAGAAGAAAAGGTAAAGCCACTTGCAGC ACAGCT	20
18	ATTTCCGGCTCTGGCGGTTCAACTNKTACNNKGATAGCGTTAAAGGTCGTTTCA CAATCTCC	
19	GCGCGGCCGCACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTG	30

## 【 0 1 1 6 】

本発明での「抗体配列順番システム」とは、免疫グロブリン可変ドメインであるVHまたはVLのアミノ酸配列に番号を与えるシステムを意味する。抗体のCDRは、そのアミノ酸の個数が抗体毎に異なるので、多くの種類の個別VHまたはVLに対して保存アミノ酸配列(例えば、フレームの部分)と可変部分に一定に定めた規則でN-末端を始め順番を与える必要がある。代表的には、Kabat、Chotia、及びIMGT順番付与(numbering)システムがあって、それぞれはCDR部分のアミノ酸にどの順序で番号を与えるかにより異なる。本発明においては、カバット(Kabat)順番付与システムを利用する。例えば、カバットシステムでは、CDR1部分のアミノ酸の番号を指定する際に、次のような原則に指定する。基本的な前提は、抗体の可変区間(CDR)内でもアミノ酸変異の程度により超可変区間(hypervariable region)とこれを構造的に支えている基本構造(canonical structure)で区分できるという点である。例えば、VHの最初の保存フレームであるフレーム1が30番目に終わって、最初の可変区間(CDR1)中基本構造(canonical structure)である31番目のアミノ酸から35番目のアミノ酸を各31番から35番でまず指定した後、もし35番目以上のアミノ酸がフレーム2部分と一致しない可変アミノ酸と判断されると、その次からは35a、35b、35c...のように極可変区間が終る時まで順に番号を与える。従って、カバットシステムによると、フレーム2区間は必ず36番から始まるようになっている。カバット順番付与システムによるCDR2部分の順番付与の場合も同様にCDR2で必ず存在する基本構造である50番から52番までアミノ酸に対し先に番号が付与されて、その次からは52a、52b、52c...と順に指定した後、引き続き出てくる後ろの部分のCDR2の基本構造に対しては53番から65番まで順に番号を与える

10

20

30

40

50

。従って、フレーム3のアミノ酸は必ず66番から始まる。CDR3の場合も同様にCDR3が始まる基本構造95番から100番まで番号をまず付与して、次の順序の極可変区間のアミノ酸を順番どおり100a、100b、100c...の順に与える。引き続きCDR3の後ろの部分の基本構造に101番から102番まで番号を与える。従って、以後連結される最後のフレーム4部分は、必ず103番から始まるようになっている。

#### 【0117】

実施例3.TAPE (Tat-associated protein engineering)を介したヒト生殖細胞由来VHライブラリースクリーニング

##### (1)ヒト生殖細胞由来VHライブラリー構築

大腸菌T7 Express LysY/I<sup>q</sup>を電気穿孔法(electroporation)方法でpET-TAPEライブラリーで形質転換した。以後SOC培養液で37℃、一時間培養後、50 µg/ml (1X)カバニシリンが含まれたLB培養液に接種、培養した。大腸菌のOD値が0.6になった時遠心分離を利用して大腸菌を回収して、プラスミドDNA精製キット(QIAGEN、Valencia、CA、USA)を利用して分離後、制限酵素NcoIとBamHIで切断した。切断された遺伝子は、VHライブラリーとβ-lactamase遺伝子を含んでおり、これは以後液状パニング過程で誘発される可能性がある肯定的エラー(false positive)を排除するためである。pET-TAPEプラスミドも制限酵素NcoIとBamHIで切断した。切断後、各DNAは、ゲル抽出キット(QIAGEN)で精製した。カバニシリンLB培養液で選別されたpET9a-TAPEライブラリーから収得したVH遺伝子をpET-TAPEのNcoIとBamHI切断位置に挿入して、これを再び大腸菌T7 Express LysY/I<sup>q</sup>に電気トランスフォーメーションした。以後、液状パニングは、培養液上のカバニシリン濃度を250 µg/ml (5X)、500 µg/ml (10X)で高めながら前記過程を繰り返し実行した。各過程の模式図は、図2に示された通りである。

#### 【0118】

最終的に、各カバニシリン濃度別液状パニングを経た後、アンピシリンが含まれたLB寒天プレートで単コロニーを50個選んで液状培養して、プラスミドを回収して塩基配列を分析した。選別されたクローンのVHドメイン特性を分析するための培養方法は次の通りである。大腸菌DH5αとT7 Express LysY/I<sup>q</sup>は、NEB(New England BioLabs, INC., Beverly, MA, US)から購入した。大腸菌は、pET-TAPEプラスミド系列を含んでいる場合、50 µg/ml濃度のカナマイシンが含まれたLB培養液で培養して、pET22bベクターを含んでいる場合は、50 µg/mlアンピシリンあるいはカバニシリンを添加した。Seed培養のために、LB固形培地で単コロニー形態で分離したクローンを前記の抗生剤が含まれたLB液状培養液に接種した後、これから37℃、200rpmで12時間以上培養した。蛋白質発現を誘導するために、Seed培養液の細胞濃度が1:100に希釈されるように培養培地に接種した。

#### 【0119】

##### (2)ヒト生殖細胞由来VHライブラリースクリーニング結果

前記記述した通り作ったヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン遺伝子ライブラリーから前記TAPEシステムを利用してスクリーニングされた自然型ヒトVHドメイン抗体のアミノ酸配列を図3に示して、表1にスクリーニングされた自然型ヒトVHドメイン抗体の骨格、すなわち、FR1乃至FR4の配列を記載した。

その結果、最終3次液状パニングから分離した合計154個のVH配列のうち繰り返し出てきた同じ配列は、一度だけ表示した場合、合計54個の独特(unique)配列を確保することができた。合計154個の配列のうち96%に該当する148の配列がVH3ファミリータイプと判明した。VH3ファミリーは、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン7個のファミリーのうち最も水溶性が相対的に高いと知られてきたので、これは本発明のTAPEシステムを利用したスクリーニングが統計的に有意に水溶性に基づいた選別能力を見せることを証明する結果である。

#### 【0120】

そして、個別54個の配列のうち19個の配列のフレーム配列が独特であることが明らかになり、そのうち13種類がさらにVH3ファミリータイプに分類された。

選別された個別VH遺伝子をレポーター遺伝子であるTEM-1β-ラクタマーゼなしに単

独で大腸菌で発現させた時、果たして水溶性発現水準がどの程度になるのか調べるために、VH発現誘導後水溶性画分(soluble fraction)と非水溶性画分(insoluble fraction)を分離した後、SDS-PAGEを介して各種対照群VHドメインと比較してみた(図4参照)。

【 0 1 2 1 】

該当遺伝子を発現ベクターは、pET-22b(+)にクローニングして、宿主細胞としてE.coli NEBT7に形質転換(transformation)させて発現した。骨格(scaffold)の発現条件としては、37℃、200rpm条件で培養をした後、ODが0.6~0.8になった時、1mM IPTGで誘導(induction)して、25℃、180rpm条件で3.5時間後細胞を回収した。

【 0 1 2 2 】

【表 1 A - 1】

[表1]

選別されたVHドメイン抗体骨格のFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列

骨格名	FR1	FR2	FR3	FR4
M1X8	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLVWVS	RFTISRDNKNTLFLQMNSLR DEDTSVYYCAR	WGQGAL VTVSS
M2X1	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAS	WGQGTL VTVSS
M2X1- 34	QVQLVESGGNVVQPGTS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTISRDNKRNTVFLQMTSLR AEDTAVYYCGR	WGQGILV TVSS
M2X2- 12	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKISCEASGYAF	WVRQAPGQ GLEWMG	RVTLTRDTSTRTVYMEKLNLR SADTGVYYCAR	WGQGTL VTVSS
M2X2- 13	EVQLLESGGGVVQPGKS LRLSCVGSQFSF	WVRQAPGK GLEWLA	RFTISRDNKTMVNLQMNSLR PDDTAVYFCAR	WGQGTL VTVSS
M3X1	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCVASGFNF	WLRQAPGK GLEWVA	RFTISRDNKNTLYLEMNSLR PEDTAVYYCAK	CGQGTL VTVSS
M3X10	EVQLVESGGGLVKPGGS LRVSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVG	RFTISRDDSKNMVYLQMNSLK TEDTAVYYCTT	YGQGTLV TVSS
M4X1-8	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFSF	WVRQGPGE GLVWLS	RFTISRDNKNTVYLEMNSVR VDDTAVYYCVS	WGQGAL VTVSS
M4X1- 33	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCEASGFPF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDDSTNTLYLQVNSLR AEDTAVYYCAK	WGRGTL VTVSS
M4X1- 35	EVQLLESGGGLVKPGGS LRLSCVGSERSF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTVSRDNVQKSLDLQMDSL RAEDTAVYFCAR	WGQGTT VTVSS
M4X3- 27	EVQLLESGGGLAQSGGS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWIS	RFTISRDIKNSLYLQMNSLRD EDTAVYYCAK	WGQGAL VTVSS
M4X4-2	EVQLVQSGAEVKKPGES LRISCRGSGYRF	WARDKPGK GLEWIG	HVTISSDRSVSVAYLQWDSLK ASDNGIYYCAL	WGQGTL VTVSS

10

20

30

40

【表 1 A - 2】

M4X4-4	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCVPSGFTF	WVRQAPGK GLVWVS	RFTISRDN AEDTLFLQMNSLR VDDTAVYYCVR	WGQGV L VTVSS	
M4X4-25	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCIASGFSL	WVRRSPGK GLEWVA	RFTVSRDN AKNSLFLQMNNV RPEDTALYFCAR	WGQGT M VTVSS	
M4X4-44	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCAR	WGQGT L VTVSS	10
M4X5-30	EVQLLES GGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWLS	RFTISRNN AKNSLYLQMNSLR VDDTAVYYCAR	WGQGT L VTVSS	
M4X6-27	EVQLLES GGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQGPGK GLEWVA	RFTISRDN AENSLYLQVNSLR AEDTAIYYCAK	WGQGA L VTVSS	
M4X6-48	EVQLLES GGGVVQPGRS LRLSCEVFGFTL	WVRQAPGR RLEWVA	RFTISRDI ATNRLYLQMRSLRA EDTALYYCAR	WGQGT L VTVSS	20
M4X7-15	EVQLLES GGGLVQPGGG LRLSCAASGFSF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR VEDTAVYYCAV	WGQGT T VTVSS	
M4X8-24	EVQLLES GGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDN SNNTLYLQMNSLR ADDTAVYFCAK	WGQGT L VTVSS	
M0.5X-1	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF	WVRQVPGK GLEWVA	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAN	WGQGT L VTVSS	30
M0.5X-3	QVQLVESGGGLVQPGGG LTLSCAASGFTF	WVRQAPGT GLLWLS	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR	WGXGT M VTVSX	
M0.5X-4	EVQLLES GGMLVKPGES LRLSCVGSGLIF	WVRHAPGK GLEWVG	RLSISRDD SMNTVYLDIYNLKI DDTGVYYCTF	WGQGT P VTVSS	
M0.5X-14	EVQLLES GGGLVHAGGS VRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTISRDN SKNSMYLQMNSLR VEDTAVYYCAR	WGQGT V VTVSS	40
M0.75X-4	QVQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFTF	WLRQAPGK GPEYVA	RFIISRDD SNDMLYLEMISLKS EDTAVYYGSD	GSQGT LV TVSS	

【表 1 A - 3】

M2X-5	EVQLLES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLHMNSLR	WGQGTL	
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCVK	VTVSS	
M2X-15	QVQLVES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR	WGQGTL	
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	AEDTAVYYCAK	VTVSS	
M4X-5	QVQLVES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTVSRDN SRNTLYLQMKSL	WGQGTM	10
	LRLSCEASGLHF	GLEWVA	AEDTAVYYCAK	VTVSS	
M1-4	QVQLVEAG GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN SQNSLFLQMNSLR	WGQGTM	
	LRLACAASGFTF	GLEWIS	AEDTAVYYCAT	VTVSS	
M1-6	EVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGK	HVTISVDK S ISTAYLQWSSLKA	WGQGTL	
	LRKSCKGSGYSF	GLEWVG	SDSAMYFL	VTVSS	
M1-7	QVQLVES GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLR	WGQGTL	20
	LRLSCAASGFTF	GLEWVA	DEDTAVYYCAR	VTVSS	
M1-8	EVQLVQSGAEVKKPGAS	WVRQAPGQ	RVTMTRDT S STTAYMELNRLT	WGQGTL	
	VKVSCKASGYTF	GLEWVG	SDDTAVYFCAR	VTVSS	
M1-9	EVQLVEAG GGGLVQP GGS	WVRQAPGK	RFTISRDN AQNSLFLQMNSLR	WGQGTM	
	LRLACAASGFTF	GLEWIS	AEDTAVYYCAT	VTVSS	
M1-10	EVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGR	QVTMSANR S ISTAYLQWSSLK	WGQGTT	30
	LKISCKKGSGYSF	GLEWLG	ASDTGIYYCAT	VTVSS	
M5-1	QVQLVES GGGLIQPGESL	WVRQAPGK	RFTISRDN STQNTVHLQMNSLT	WGQGTL	
	RLSCEAFGFTV	GLEWVS	AEDTAVYYCAR	VTVSS	
M5-2	EVQLVQSGAELKKPGSS	WVRQAPGQ	RLILSVDEP TRTVYME L TSLRS	WGQGTT	
	VKVSCTSSGGSF	GLEWVG	DDTAMYCAR	VTVSS	
M5-4	EVQLLES GGGLVQP GRS	WVRQAPGK	RFTISRDN AKDSL YLQMNSLR	WGQGTM	
	LRLSCAASGFTF	GLEWVS	PEDTALYYCAR	VTVSS	40
M5-5	EVQLLES GGGVVQP GRS	WVRQAPGK	RFTISRDN YSNKIVHLEMDSLRA	WGQGTL	
	LRLSCVASGFTF	GLEWVS	EDTAVYFCVR	VTVSS	

【表 1 A - 4】

M5-6	EVQLLES GGGLVKPGGS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLECVA	RFTISRDDSRDMLYLQMNNLK TEDTAVYYCSD	SSQGTLV TVSS	
M5-7	EVQLVES GGGLVQPGRS LRLSCTTSGFSF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDDSKSIVYLMSSSLQT EDTAVYYCSR	WGRGTL VTVSS	
M5-9	EVQLLES GGGLVVRPGRS LRLSCSASGFAF	WVRQAPGK GLEWVS	TISRDNAKNSVYLMNSLRAE DSAVYFCAR	WGQGTL VTVSS	10
M10-1	QVQLVES GGNVVQPGRS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLR AEDTAVYYCGR	WGQGILV TVSS	
M10-2	EVQLLES GGGLVQPGRS LRLTCVGYGFTF	WVRQAPGK GPEWVA	RFTISRDNAKDSLQMDSLR PEDTAVYYCAR	APQGTLV TVSS	
M10-4	EVQLLES GGGLVQPGRS LRLSCAASGFIL	WVRQAPGK GLVWVS	QFTISRDNAKNTLYLQMNSLR VEDTAVYYCAR	WGQGTML VTVSS	20
M10-5	EVQLLES GGGVVHPGRS LRLSCAVSGFSL	WVRQAPDK GLEWVA	RFTVSRDISKNTVYLMNSLR AEDTALYYCAR	WGQGTML VTVSS	
M10-6	EVQLLES GGGLVQPGRS RRLSCAASGFTF	WFRQGPBK GLEWVA	RFTISRDDSKNSLSLQMDSLR TEDTAVYYCVR	WGQGTVL VTVSS	
M10-8	QVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCVASGFAF	WVRQTPGR GLEWLA	RFTISRDNNSNTVYLEMNSLR PEDSAIYYCAK	WGLGTV VTVSS	30
M10-10	QVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDNKNSLYLQMNSLR TDETALYYCV	WGQGTLL VTVSS	
M2	EVQLLES GGGLVQPGRS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVS	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR TDETAVYYCAR	WGQGTTL VTVSS	
M5	EVQLLQSGGGWVKPGGS LRLSCAASGFIC	WVRQAPGK GLEWVG	RFTISIDESRNALFLHMNSLTT DDTAVYYCST	WGQGTLL VTVSS	40
M6	EVQLLES GGGVVQPGRS LRLSCAASGFTF	WVRQAPGK GLEWVA	RFTVSRDTSTNTLYLQMNSLR VEDTAVYYCAR	WGQGTLL VTVSS	

【表 1 A - 5】

M7	QMQLVQSEAEVKKPGAS	WVRQATGQ	RVTMTRNTSISTAYMELSSLT	WGQGTL
	MKVSCKASGYTF	GLEWMG	SADTAVYYCAR	VTVSS
M10	QVQLVQSGAEVKKPGES	WVRQMPGK	QVTISADKSISTAFLQWNSLKA	WGLGTLV
	LKISCKGSGYSF	GLEWMG	SDTAMYYCAR	TVSS

## 【 0 1 2 3 】

10

蛋白質の水溶性及び非水溶性画分分離は、B-PER Reagent (Thermo scientific) を利用した。細胞を破碎した後、細胞浸漬 (cell down) を介して、水溶性画分 (上澄み液の部分) を得ることができ、沈殿物 (pellet) を PBS で洗浄した後、溶解バッファー (solubilization buffer、pH 7.4、50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、6M UREA、0.5M NaCl、4mM DTT) で再懸濁 (resuspension) して非水溶性画分を得た。これらの発現は、SDS-PAGE を利用して分析した。

## 【 0 1 2 4 】

その結果、ライブラリーで選別過程を経ないで無作為に選択した VH ドメインの場合 (M1-33、M8-24、M10-5)、多くは、蛋白質発現誘導後、水溶性画分に該当の大きさの VH が殆どないことが分かり、TAPE 選別過程を経た VH ドメインの場合 (M4x4-44、M4x4-25、M10-10、M2x1)、水溶性発現が明らかに増加していることがわかる (図 4(b) 参照)。一般的に、水溶性発現程度が優れると知られた VH ドメイン (VH2、VH3、VH6、DP47d、HEL4) と比較した場合も TAPE システム選別を経た VH の場合が相対的に水溶性発現率が非常に優れることがわかる。

20

## 【 0 1 2 5 】

実施例 4. M2x1 VH 骨格基盤フレーム変形合成ライブラリーの製造

TAPE 方法によって選別された最適な自然型ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン (VH) 候補群のうち M2X1 VH 骨格を基盤に追加的な溶解性と安定性を与えるために、VH の構造的な分析に基づいて戦略的 (rational) に選択された特定 7ヶ所のアミノ酸部位に突然変異を導入する「フレーム変形合成ライブラリー」を構築した。

## 【 0 1 2 6 】

M2X1 VH 骨格でのアミノ酸突然変異位置は、カバットナンバリング (Kabat numbering) システムを基準に図 6 の四角ボックス ( ) と表示された部位である。

30

具体的に、TAPE 方法で 1 次選別した M2X1 骨格を基盤として、M2X1 VH 骨格配列に突然変異を誘発したが、具体的に突然変異を誘発するための連鎖重合反応戦略は次のとおりである。

## 【 0 1 2 7 】

全遺伝子配列を二つの切片に分けて、連鎖重合反応ができるプライマーを製作した。最初の切片の 3' プライマーと二番目の切片の 5' プライマーに突然変異を誘導するプライマーを製作してそれぞれの遺伝子切片を PCR を介して作った後 (表 5 の配列 17 及び 18 参照)、二つの遺伝子切片の重複 (overlapping) PCR を介して最終 M2X1 基盤フレーム変形合成ライブラリーを構築した (表 5 の配列 16 及び 19 参照; 図 5 参照)。増幅された DNA は、アガロースゲルから分離して、NcoI と NotI 制限酵素を処理した後 pET-TAPE ベクターに挿入して、pET-TAPE フレーム変形重鎖可変ドメイン合成ライブラリーを製作した。

40

## 【 0 1 2 8 】

実施例 5. TAPE (Tat-associated protein engineering) システムを通した M2X1 VH 骨格基盤変形 VH ドメインの選別

前記記述した通り、本発明の TAPE システムを利用して溶解性と安定性を向上した新しい合成 VH 骨格を選別した。TAPE を行う際に、ラクタム系抗生剤カバニシリン (Carbenicillin) は、50 µg/ml (以下「1X TAPE」という)、100 µg/ml (以下「2X TAPE」という)、200 µg/ml (以下「4X TAPE」という)、400 µg/ml (以下「8X TAPE」という) の順に濃度を高めながら各工程を行った。

50

## 【 0 1 2 9 】

1X TAPEを経た後、20個の単独コロニーの塩基配列を分析した結果、TEM-1 -ラクタマーゼ遺伝子だけ含むpET-TAPEライブラリーは発見されないことを確認することによって、窮極的に本発明のTAPEシステムによって偽陽性(false positive)をスクリーニング初期工程で排除できることを確認した。以後、2X、4X、8X TAPEを進行する際に、NcoI、BamHI制限酵素反応後VH遺伝子だけ回収して再びTAPEシステムに導入する方法と、このようなクローニング作業なしに細胞培養液から分離したpET-TAPE VHプラスミドライブラリーをそのまま大腸菌に形質転換する方法を同時に行った。二つの方法で共に偽陽性(false positive)コロニーは発見されなかった。最終的に8X液状パニングを経た後、アンピシリンが含まれたLB固形培地で単独コロニーを50個選んで液状培養して、これからプラスミドを回収してアミノ酸配列を分析した。

10

## 【 0 1 3 0 】

その結果、7ヶ所の変形位置のうちカバット順番付与システムを基準に50番及び58番の位置が特定アミノ酸に偏って選択される現象を発見した。具体的に、41個中16個のクローンで50番アラニン(Alanine)がトリプトファン(Tryptophan)に、41個中24個のクローンで58番チロシン(tyrosine)がトリプトファン(Tryptophan)に変形されたことを確認した。残りの位置のアミノ酸は、特別な偏り現象が観察されなかった。

## 【 0 1 3 1 】

【表 2 A - 1】

[表2]

アミノ酸変異されたVHドメイン抗体骨格のFR1乃至FR4のフレームのアミノ酸配列

骨格名	FR1	FR2	FR3	FR4
M8-21	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKGG NEIVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-12L	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRRAPGKGG IEVVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-7I	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKGG PEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-9I	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRKAPGKGG YEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-10I	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRNAPGKGG YEIVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-11I	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRYAPGKGG YEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-12I	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRVAPGKGG IEPVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-32	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRMAPGKGG GPEHVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-34	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRSAPGKGG VEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-40	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRTAPGKGG TEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-46	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRCAPGKGG YEFVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS
M2-47	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF	WVRIAPGKGG LEMVS	RFTISRDN SKNTLYLQMN EDTAVYYCAS	SLRA WGQGT TVSS

10

20

30

40

【表 2 A - 2】

M2-48	EVQLVESGGGLVQP	WVRMAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GLEYS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-51	EVQLVESGGGLVQP	WVRYAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	TEFVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-53	EVQLVESGGGLVQP	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GVEWVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-55	EVQLVESGGGLVQP	WVRWAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GPEFVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-57	EVQLVESGGGLVQP	WVRFAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	REWVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-58	EVQLVESGGGLVQP	WVRFAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	CELVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-59	EVQLVESGGGLVQP	WVRKAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	LETVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-60	EVQLVESGGGLVQP	WVRNAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	LECVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M2-64	EVQLVESGGGLVQP	WVRCAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	WEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-12	EVQLVESGGGLVQP	WVRLAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	VELVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-13	EVQLVESGGGLVQP	WVRFAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	AEWVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-17	EVQLVESGGGLVQP	WVRLAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	REWVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-18	EVQLVESGGGLVQP	WVRYAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	VEFVS	EDTAVYYCAS	TVSS

10

20

30

40

【表 2 A - 3】

M4-20	EVQLVESGGGLVQP	WVRFAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	LEMVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-28	EVQLVESGGGLVQP	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	TERVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-2	EVQLVESGGGLVQP	WVRIAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	MEMVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-32	EVQLVESGGGLVQP	WVRAAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	PELVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-33	EVQLVESGGGLVQP	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	YEHVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-34	EVQLVESGGGLVQP	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	LECVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-5	EVQLVESGGGLVQP	WVRVAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	PETVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-6	EVQLVESGGGLVQP	WVRMAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GSEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M4-7	EVQLVESGGGLVQP	WVRLAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	TEMVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-11	EVQLVESGGGLVQP	WVRTAPGKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	AEWVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-12	EVQLVESGGGLVQP	WVRWAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GKEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-13	EVQLVESGGGLVQP	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GIEPVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-14	EVQLVESGGGLVQP	WVRQAPGK	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GPEWVS	EDTAVYYCAS	TVSS

10

20

30

40

【表 2 A - 4】

M8-4	EVQLVESGGGLVQP	WVRQAPGK	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	GPEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-5	EVQLVESGGGLVQP	WVRTAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	IEIVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-6	EVQLVESGGGLVQP	WVRIAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	VEIVS	EDTAVYYCAS	TVSS
M8-8	EVQLVESGGGLVQP	WVRAAPGKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA	WGQGTLV
	GGSLRLSCAASGFTF	LEVVS	EDTAVYYCAS	TVSS

10

## 【0132】

実施例6. スクリーニングされたVH骨格候補群の分離精製及び物理化学的性質分析  
選別したヒト由来のVH骨格候補群(図3参照)と合成突然変異を介したVH骨格候補群(図6参照)の物理化学的性質を調べるために三種類の分析を実施した。

## 【0133】

一番目は、VH骨格候補群の水溶性程度を確認するために大腸菌での単独発現時水溶性発現率を確認し、二番目は、各骨格候補の熱力学的安定性を確認するために円偏光二色性分光測定法(Circular Dichroism, CD)を行い、三番目は、単独で分離精製した骨格候補の蛋白質の凝集現象回避(aggregation free)特性をゲルろ過クロマトグラフィー(gel filtration chromatography)を介した単量体(monomer)の比と長期保存安定性で確認した。

20

## 【0134】

## (1) スクリーニングされた候補VH骨格候補群の分離精製

選別された遺伝子を大腸菌発現ベクターに移して単独で発現した。NcoI制限酵素塩基配列を含む5'プライマー(表6の配列20)とXhoIを含む3'プライマー(表6の配列21)を利用して、pET-TAPE-VH候補群プラスミドを鋳型でPCRを行った。PCRで増幅して分離したDNAの断片をNcoIとXhoI制限酵素で処理した後、pET22b(+)プラスミドベクターのNcoIとXhoI切断位置に挿入することによって、pET22b-VHプラスミドを製作した。製作されたプラスミドは、大腸菌T7 Express LysY/1<sup>q</sup>に形質転換した後、単一コロニーを分離して、それぞれ100 µg/mLアンピシリン、20mM MgCl<sub>2</sub>、2%(w/v)グルコースが含まれたSB培養液に接種した。培養液の吸光度(Optical Density)が0.6になった時、1mM IPTGを添加して、蛋白質発現のために25 °Cで4時間培養した。培養液は遠心分離して大腸菌を回収した後、リン酸塩緩衝食塩水(Phosphate-buffered Saline、PBS)に再懸濁(resuspension)した。浮遊された大腸菌は細胞壁粉碎のために4回凍らせて溶かす過程を経て、遠心分離を行って上澄み液を回収した。回収した上澄み液にNaClを0.5Mになるべく添加して、5N NaOHを利用してpHを7.4にした後、0.22 µmフィルターでろ過した。蛋白質の分離は、Ni-NTA親和クロマトグラフィーを利用して行って、洗浄過程は100 mMイミダゾール(imidazole)で、溶離は300 mMイミダゾールで実施した。精製された蛋白質は、インビトロゼンから購入したNuPAGE 4-12% Bis-Trisゲルで電気泳動した後、クマシーブルー(Coomassie blue)染色を通して分離した蛋白質を確認した。溶離された蛋白質は、PD-10脱塩(desalting)コラム(GE Healthcare Life Science、Piscataway、NJ、USA)を介してリン酸塩緩衝食塩水(PBS)で緩衝液交換を行った。

30

40

## 【0135】

## 【表 6 - 1】

## [表6]

本発明で用いられたプライマー配列

配 列 番 号	プライマー配列
20	GCCCATGGGAAGTCCAACCTGGTTGAATCTGGTGGC
21	GCCTCGAGACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCT
22	GCGCTAGCGAAGTCCAACCTGGTTGAATCTGGTGGC
23	ACTGGCGCAGTAATACACTGCGGTATC
24	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM
25	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM
26	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM
27	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM AG

10

20

30

40

【表 6 - 2】

28	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM CGCAG	
29	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM GCACGCAG	10
30	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM TCAGCACGCAG	20
31	CGGTTGACGCACCCAAGACATAGCATANNNNNNAAANNNAAGCCACTTGCAGCA CAGCTTAAGCG	
32	TATGCTATGGGCTGGGTGCGTAATGCGCCA	
33	GCTATCATTGTACCAAGTTGAACCGCCNNGCCGAAATAATTGAGACAATTTTCAT TACC	30
34	GGCGGTTCAACTTATTACGCTGATAGCGTTAAAGGTCGT	
35	CTGGCCCCAGAAACCCAACGGNNNNNNNNNTGGNNNTAACGCACTGGCGCAGTAA TACACTGC	
36	GCAGATCTACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTGGCCCCAGAAACCCAACGG	40

## 【 0 1 3 6 】

## (2)スクリーニングされたVH候補群の大腸菌で水溶性発現程度分析

M2X1 VH骨格を基盤としたフレーム変形ライブラリーからTAPEを介して一次に選別したVHの大腸菌での水溶性発現様子を確認するために、前記実施例3の(2)のような方法で該当VHを単独で発現した後、水溶性画分と非水溶性画分を分離して、SDS-PAGEで分析した。その結果、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインライブラリーから分離した自然型M2X1と比較して水溶性発現が向上したVH骨格候補を得ることができた。図7に示された通り、多く

の選別されたVHは、大腸菌で水溶性として発現した(約13 kDaの位置)。特に、M2-71、M2-111、M2-121、M2-12Lの場合、水溶性発現が相対的に優秀であった。

【0137】

尚、M2x1 VH骨格を基盤としたフレーム変形ライブラリーから一次と同じ方法で TAPE を介して二次に選別したVHの大腸菌での水溶性発現様子を確認して、一次スクリーニングに続き追加でVH骨格候補を確保した。図8に示された通り、大腸菌発現後水溶性画分の場合、誘導(Induction)前(U)と比較すると、誘導後約13 kDa位置で選別されたVH骨格がよく発現することを確認することができた。

【0138】

特に、自然型ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインライブラリーから分離したM2X1とフレーム変形ライブラリーから一次に分離したM2-121と水溶性発現程度を比較すると、二次に分離したM2-55、M4-5、M4-13、M8-4、M8-14骨格の水溶性発現が優秀であることを確認することができた。水溶性発現が優秀だったVHは、非水溶性画分においてVHの発現率を分析した結果、非水溶性発現率が減少することを確認することができた(図8参照)。

10

【0139】

(3)熱力学的安定性分析

VH骨格候補群に対する二次元蛋白質構造を分析を介した熱力学的安定性を調べるために、TAPE過程を経て選別した後精製したVH骨格候補群に対して円偏光二色性分光測定法(Circular Dichroism, CD)でTm(Temperature melting; 全水溶液状蛋白質の50%が熱変性を起こす温度)を計算した。

20

【0140】

Tmは温度による蛋白質吸光度を235nm波長で観測した後、加熱前に対する加熱後の吸光度比(folding fraction)を温度に応じて表現した。これから得たシグモイド曲線(sigmoidal curve)からフォールディング比率(folding fraction)が50%に減る時点での温度を示す。

【0141】

自然型ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインライブラリーとM2x1 VH骨格基盤フレーム変形合成ライブラリーから選別した骨格候補VHを精製して、0.2~0.3 mg/ml濃度で希釈した後、CD (Jasco J-715 model, Jascoinc, Easton, MD, USA)を測定した。25~85の温度範囲で1分に1 ずつ上げながら235 nm波長でCD信号を記録して測定した。一般に自然型ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(VH)は、単独で水溶液上に存在する場合、多くは蛋白質凝集現象が起きるので、水溶液上の蛋白質を分析するCD分析特性から測定が不可能である。凝集現象が起きない特異なVH、例えば、M3-10 (表7参照)のような自然型VHの場合、一般にCD分析によるTm値は、約45 を示す。これを基準として比較した時、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインライブラリーからTAPEシステムを経て選別された自然型M4x4-44、M4x4-25、M10-10、及びM2x1の場合、Tm値が55 ~ 60 の間で測定されて、平均的な自然型VHと比較すると、約10 以上熱力学的安定性が向上したことを確認した(図9及び表7参照)。

30

【0142】

M2x1 VH骨格基盤フレーム変形合成ライブラリーからTAPEシステムを経て選別されたVH (例えば、M2-121、M2-12L、M4-13、M8-4、M8-14等)のTmの場合、平均60 ~ 70 水準で測定されて、平均20 以上熱力学的安定性が向上したことを確認した(図10、図11及び表7参照)。

40

【0143】

【表7】

[表7]

ヒト免疫グロブリン可変ドメインライブラリーからTAPEを経て分離したドメイン抗体のT<sub>m</sub>値

ドメイン抗体	T <sub>m</sub> 値(°C)	ドメイン抗体	T <sub>m</sub> 値(°C)
M4x4-44	55.6	M4-5	59.0
HEL4	61.1	M8-4	68.4
DP47d	56.2	M8-14	71.2
M3x10	46.5	M4-28	67.0
M4x4-25	61.8	M8-6	64.0
M10-10	55.4	M2-57	67.0
M2x1	63.5	Rational 10	56.5
M8-21	62.6	CDR13-2	61.3
M2-12I	61.3	CDR10-7	56.1
M2-7I	62.6	Rational 14	56.7
M2-11I	63.3	CDR 7-1	57.2
M2-12L	64.4	CDR 8-3	61.1
M2-10I	66.3	CDR 9-6	56.4
M4-13	59.0	CDR 12-8	54.3
M2-55	53.0	M8-4 (V-W、G-S)	54.9
		M8-4 (G-S)	62.5

10

20

30

## 【0144】

## (4)蛋白質凝集(aggregation)程度分析

TAPE方法を介して選別後精製された候補VH骨格を対象に水溶液上で単量体(monomer)と多量体(multimer)の比を確認するために、大きさ排除クロマトグラフィー(Size exclusion chromatography、Superdex-75 HR 10/30コラム(GE Healthcare Life Science、Piscataway、NJ、USA)を行った。

40

## 【0145】

コラムの平衡は、リン酸塩緩衝食塩水(PBS)、500mM NaCl、pH 7.4で実施して、クロマトグラフィーはWaters 2695/2489高圧液状クロマトグラフィー装置を利用した。移動相としてリン酸塩緩衝食塩水(PBS)、500mM NaCl、pH 7.4を用いて、流速(flow rate)は、0.5 ml/minであった。VH蛋白質を~0.5 mg/ml濃度で総体積100 µLをロードした。その結果、TAPEを介して選別した骨格候補VH蛋白質は、90%以上単量体(monomer)形態で存在することが分かった(図12参照)。

## 【0146】

長期保管(long-term incubation)による候補VHフレームの凝集(aggregation)を測定することによって蛋白質安定性を調べた。0.2~0.8 mg/mLの濃度で精製されたVH骨格候補

50

群を37℃で60%の湿度で保管した。約60日間の保管中一定間隔でサンプルを取って遠心分離して凝集した蛋白質を除去した後、水溶液状態として残っている蛋白質の濃度を測定してその比を計算した。

【0147】

また、NuPAGE 4-12% Bis-Trisゲルで電気泳動した後、クマシーブルー(Coomassie blue)染色を通して残っている蛋白質の品質を確認した。その結果、リン酸塩緩衝食塩水(PBS)に溶けられている蛋白質の多くが加速条件(37℃)で60日以上蛋白質凝集なしに安定的に維持されることが分かった。それぞれのデータ点等は、初期蛋白量を1にした時、水溶液上で凝集しないで残っている蛋白量の比を示す(図13参照)。

【0148】

実施例7. フレーム変形合成ライブラリーからTAPEで選別したM8-4の復帰突然変異(Back mutation)分析

M2X1 VH骨格を基盤としたフレーム変形合成ライブラリーからTAPEで選別されたM8-4の変形されたアミノ酸のうちどのようなアミノ酸配列がM8-4の向上した物性(水溶性発現と熱安定性)に影響を及ぼすのかを調べるために、カバット配列順番システム基準に35番目グリシン(glycine:G)をフレーム変形が起きる前の元アミノ酸であるセリン(Serine:S)に変換させるか、35番目グリシン(glycine:G)をフレーム変形が起きる前の元アミノ酸であるセリン(Serine:S)に変換させて同時に47番目バリン(Valine:V)をフレーム変形が起きる前の元トリプトファン(Tryptophan:W)に同時に変換させて、その特性を比較した(復帰突然変異蛋白質M8-4 G-S、または、M8-4 G-S V-W)。復帰突然変異蛋白質の発現のために、該当遺伝子をpET22bベクターにクローニングした後、NEBT7細胞で発現した。該当復帰突然変異蛋白質の水溶性変化を確認するために、IPTGで誘導後発現程度を水溶性蛋白質画分と非水溶性蛋白質画分に分けてSDS-PAGEを実施した後、クマシー(coomassie)染色を行った。また、復帰突然変異蛋白質の熱力学的安定性を調べるために発現後精製された蛋白質のCDを分析して、Tm値を計算した。その結果、いずれの復帰突然変異蛋白質において水溶性発現収率の変化はなかったが、復帰蛋白質の熱力学的安定性は、35番グリシンの復帰突然変異(35G S)により62.5℃にTm値が減少して、35番及び47番の同時復帰突然変異(35G S、47V W)によりTm値が54.9℃に減少した(図14及び図15参照)。M8-4 VH骨格VH候補に対する復帰突然変異は、蛋白質の熱力学的安定性に不利なことが明らかになったことから、変形されたアミノ酸が蛋白質の熱力学的安定性に寄与していることがわかる。

【0149】

実施例8. 候補VH骨格に抗原結合力を与えるためのCDRH3長さ別変形ライブラリー構築

ヒト生殖細胞由来VHライブラリーからTAPE方法で選別されたM2x1と、フレーム変形ライブラリーからTAPEで選別されたM8-4の骨格構造に抗原結合力の多様性を与えるために、該当骨格のCDRH3部分にアミノ酸の長さ別(7個～13個) CDR3変形ライブラリーを構築した。これは従来の研究を通して、ヒトVHドメインの安定性に最も適して標的蛋白質との結合能を有しているVHドメインのCDR3長さが7個～13個とことから類推した(Christopher J Bond, et al., J. Mol. Biol. 2005 348: 699-709)。また、アミノ酸をNNKヌクレオチド(nucleotide)でコードすることによって、NNNとNNSより終止コドンの比を低くしながらも20個すべてのアミノ酸をコードできるようにした。

【0150】

重合酵素連鎖反応エラーを最小化するために、先に突然変異が入らない鋳型断片をPCRで構築した。鋳型としてM2x1及びM8-4 cDNAにそれぞれ10 pmolarの5'プライマー(表6の配列番号22)と3'プライマー(配列番号23)、0.5 UのI-pfu DNA重合酵素、各2.5 mMの4種類dNTP、5 µLの10Xバッファーを利用してDNAを増幅した。PCRは、94℃で2分露出後、94℃で20秒、56℃で20秒、72℃で25秒露出を25回繰り返して、最後に72℃で5分間反応させる条件で25回繰り返した

【0151】

前記の鋳型DNAに抗原結合力の多様性を与えるために、CDRH3の長さが7個から13個までになるようにする突然変異が入ったプライマー(配列番号24乃至配列番号30)を製作して構

10

20

30

40

50

築された鋳型断片と5'プライマー、長さ別突然変異誘発3'プライマー(配列番号24乃至配列番号30)を利用して、PCRを介して「長さ別CDR3変形ライブラリー」を構築した。PCRは次の条件で25回繰り返した:94 で2分露出後、94 で20秒、56 で20秒、72 で40秒露出を25回繰り返して、最後に72 で5分間反応させた。図16は、抗原結合力の多様性を与えるための長さ別CDRH3変形ライブラリーを構築模式図を示す。

#### 【0152】

実施例9.候補VH骨格に抗原結合力多様性を与えるための戦略的(rational) CDR変形ライブラリー構築

実施例8と同じ目的でM2x1またはM8-4基盤骨格VHに抗原結合力多様性を与えるためのCDR変形ライブラリーを構築した。実施例8でCDRH3長さ別多様性を与えたのとは異なって、CDR R長さは維持したまま突然変異を誘発させた時、抗原結合力を持つようになると予想される配列だけを戦略的(rational)に選択して該当遺伝子に無作為突然変異を導入した。三つのCDRの長さは、固定したまま、構造分析を通して抗原と結合する可能性を示す位置(SDRs: Specific Determining Residues)にだけ選択的に突然変異を誘導した。これは、CDR中最小限の位置にだけ突然変異を誘導させることによって、CDR変形による安定性変化と免疫原性(immunogenicity)問題を最小化させることができる長所がある。SDRは、先にCDR1とCDR2はカノニカル(canonical)構造の把握を通して選定して、カノニカル構造が知られていないCDR3の場合には配列整列(sequence alignment)を介して同じCDR3を持っているHEL4蛋白質(PDBコード:10HQ)のCDR3構造を利用して選定した。また、アミノ酸を抗原結合力が他のアミノ酸より高いと知られるチロシン(tyrosine)とセリン(serine)の比を相対的に上げた偏りヌクレオチドを導入して、同じライブラリーの大きさでもつく可能性があるクローンの比が高いようにデザインした(Akiko Koide et al. et al., PNAS 2007 104(16):6632-6637)。突然変異誘発位置は、図17に示した。図17に示した通り、CDR1、CDR2及びCDR3それぞれに突然変異を誘発させるために、遺伝子を三つの部分に分けて突然変異を導入した。フレームM2x1またはフレームM8-4 cDNAを鋳型にして次のような方法でそれぞれの切片をPCR方法で確保した。

#### 【0153】

最初のDNAの切片は、5'プライマー(配列番号22)と3'プライマー(配列番号31)、二番目のDNAの切片は、5'プライマー(配列番号32)と3'プライマー(配列番号33)、三番目のDNAの切片は、5'プライマー(配列番号34)と3'プライマー(配列番号35)をそれぞれ10 pmolar、0.5 Uのvent DNA重合酵素、各10 mMの4種類dNTP、5 µLの10Xバッファーを利用してPCRを通して合成した。PCRは、94 で2分露出後、94 で15秒、56 で20秒、72 で25秒露出を25回繰り返して、最後に72 で5分間反応させた。前記反応を介して得られた鋳型断片3個と5'プライマー(配列番号22)と3'プライマー(配列番号36)を利用した重複PCR(Overlapping PCR)を通して全体の大きさの戦略的CDR変形ライブラリーを完成した。PCRは、94 で2分露出後、94 で20秒、56 で20秒、72 で40秒露出を25回繰り返して、最後に72 で5分間反応条件で行った。図18は、抗原結合力の多様性を与えるための戦略的(rational) CDR変形ライブラリー構築模式図を示す。

#### 【0154】

実施例10.TAPEで選別したVH骨格基盤ライブラリー(CDR3長さ別変形ライブラリー及び戦略的CDR変形ライブラリー)のCDR変形が蛋白質安定性に及ぼす影響を調べる

CDR変形がVH骨格構造の安定性に及ぼす影響の確認のために、CDRH3長さ7~13個の合成ライブラリー及びCDRH1、CDRH2及びCDRH3の特定位置に戦略的に突然変異を導入したライブラリーで無作為に遺伝子を選別して(各CDR変形ライブラリー当たり約8個の遺伝子を選別)、単独発現ベクターにクローニングした。発現ベクターは、pET-22b(+)を利用して、これを宿主細胞であるE.coli DH5aに形質転換(transformation)した。形質転換されたコロニー(colony)を無作為に選別した後、配列を分析して、終止コドン(Stop codon)なしに全体の遺伝子を良好に保存しているプラスミドを分離して、宿主細胞であるE.coli NEBT7に再び形質転換させて該当遺伝子の発現を誘導した。発現条件としては、37 、200rpm条件で培養をした後、ODが0.6~0.8になった時1 mM IPTGに誘導して、25 、180rpm条

件で3.5時間後収穫した。蛋白質の水溶性及び非水溶性の部分の分離は、実施例3と同じ方法で行った。

【 0 1 5 5 】

それぞれのCDR変形ライブラリーで無作為に選別したVHを単独発現した後、水溶性及び非水溶性の部分に分けてSDS-PAGEで分析した結果、CDRH3の長さが7個である場合、一つの試料を除いて全部水溶性に発現することを確認することができた(図19(a)参照)。

【 0 1 5 6 】

CDRH3の長さが8個である場合、8個の試料のうち7個の試料が水溶性に発現することを確認した(図19(b)参照)。CDRH3の長さが9個である場合、すべての試料が水溶性に発現することを確認した(図19(c)参照)。CDRH3の長さが10個である場合、9個の試料のうち8個が水溶性に発現することを確認した(図19(d)参照)。CDRH3の長さが11個である場合、9個の試料全部水溶性に発現することを確認した(図19(e)参照)。CDRH3の長さが12個である場合、8個のうち6個の試料で水溶性に発現することを確認した(図19(f)参照)。CDRH3の長さが13個である場合、7個のうち6個の試料で水溶性に発現することを確認した(図19(g)参照)。戦略的CDR変形ライブラリーの場合、すべての試料が水溶性に発現することを確認した。まとめると、TAPE方法で選別したVHドメイン抗体のフレームを基盤に作ったCDR変形ライブラリーでCDR変形にもかかわらず、一般的に水溶性発現が安定することを確認した(図19及び表8参照)。

10

【 0 1 5 7 】

【表8】

20

[表8]

CDR変形導入に伴うVHの水溶性発現変化

ライブラリー種類	CDR3 長さ(a/a)	水溶性発現頻度 (% out of clones tested)
CDRH3 長さ別 変形タイプライブラリー	7	88 (7/8)
	8	87 (7/8)
	9	100 (8/8)
	10	89 (8/9)
	11	100 (9/9)
	12	75 (6/8)
13	86 (6/7)	
全体		89 (51/57)
戦略的 CDR 変形 ライブラリー	11	100 (11/11)

30

40

【 0 1 5 8 】

実施例11.TAPE方法で選別されたVH骨格を持つVHドメイン抗体ライブラリーを利用したディスプレイ技術基盤VHドメイン抗体候補群の選別

本発明でTAPE方法で選別されたVH骨格を持つVHドメイン抗体ライブラリーを利用してVHドメイン抗体候補群の選別するために用いることができるディスプレイ技術は、ファージディスプレイ(Phage Display)、イーストディスプレイ(Yeast Display)、及びリボソ-

50

ムディスプレイ(Ribosome Display)等が好ましいが、これらに制限されない。

【0159】

ファージディスプレイとは、バクテリオファージのカプシド蛋白質に外来ペプチドと蛋白質を挿入、融合させてファージの表面に外来蛋白質を発現するようにする技術である(Smith et al., Science 1985 228(4705):1315-1317)。本発明では固定されたファージの表面に発現する融合蛋白質に目標とする抗原を結合して強い結合力を持ったドメイン抗体を選別した。

【0160】

本発明ではまた酵母(yeast)の表面発現ベクターにVHライブラリー(実施例8及び9)をクローニングした後、酵母の表面にVHドメインを発現させた後、標的蛋白質と結合させて結合能が良いドメインだけを選別して湧出するイーストディスプレイ(Yeast display)技法を用いた(Ginger Chao. et al., Nature Protocol 2006 1(2): 755-768)。標的蛋白質にタグ(tag)を付着したりビオチンを標識させて、これをディスプレイされたVHドメインと反応させた後、結合された蛋白質を標的する蛍光蛋白質とディスプレイされたVHドメインを標的する蛍光蛋白質をそれぞれ標識した。FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting)を利用して所望の領域に現れる標識された酵母-標的蛋白質複合体だけを湧出させて、標的蛋白質に特異的なVHドメインをディスプレイした酵母細胞だけを回収した。

10

【0161】

本発明ではまた、特定抗原に結合力を持つVHを選別するために選別したVH骨格をコードするmRNAに終止コドン(termination codon)を除去してin vitro蛋白質合成を行って、蛋白質と共にそれに相応するmRNAと一緒に連結されたりボソーム複合体を形成させるリボソームディスプレイ(ribosome display)技法を用いた(Mingyue H. et al., Nature Protocol 2007 4(3):281-288)。目標抗原に対するパニング(panning)を行って所望の抗体を持っている複合体を選別して、結果的に目的とする複合体を濃縮することができた。選別されたmRNAは、DNAに逆転写されて目標に到達する時までこの過程を3~4回繰り返した。実施例8及び9によって作られた抗原結合ライブラリーを前記方法によってスクリーニングを行った場合、目標抗原に強く結合して、安定した物性を持ったVHドメイン抗体を選別することができた。

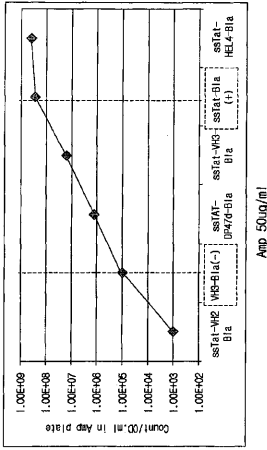
20

【0162】

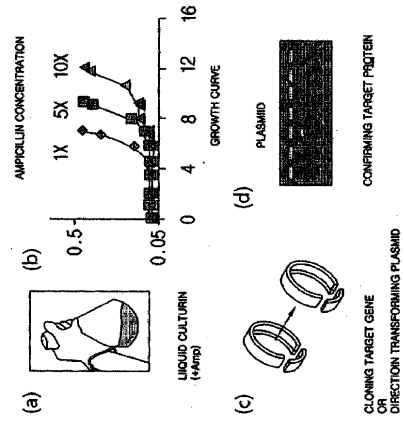
具体的ば構成を参照して本発明を詳細に記載したが、このような記載は、好ましい具現例に関しており、発明の範囲を制限しないことは、当業者にとっては自明である。よって、本発明の実質的範囲は、出願された請求項及びその等価物によって定義される。

30

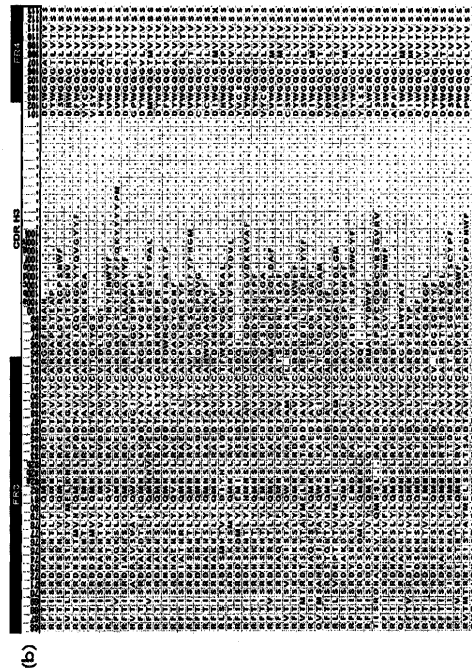
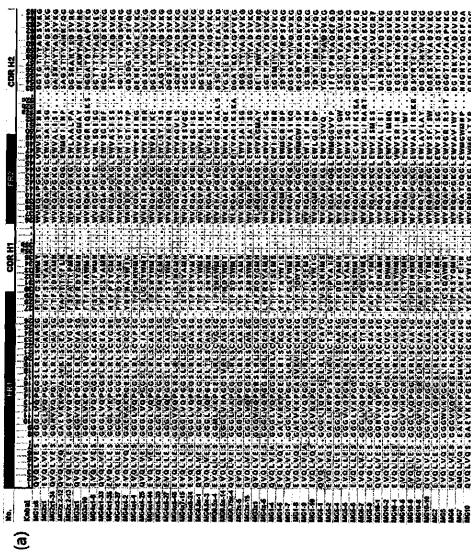
[FIG. 1]



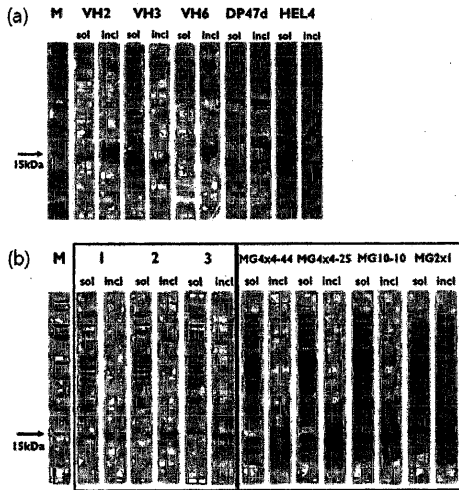
[FIG. 2]



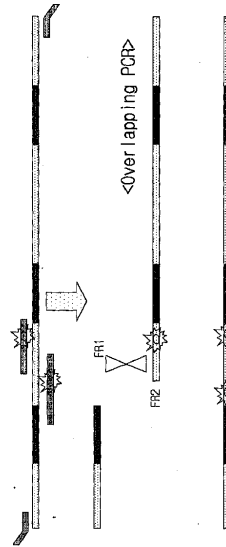
[FIG. 3]



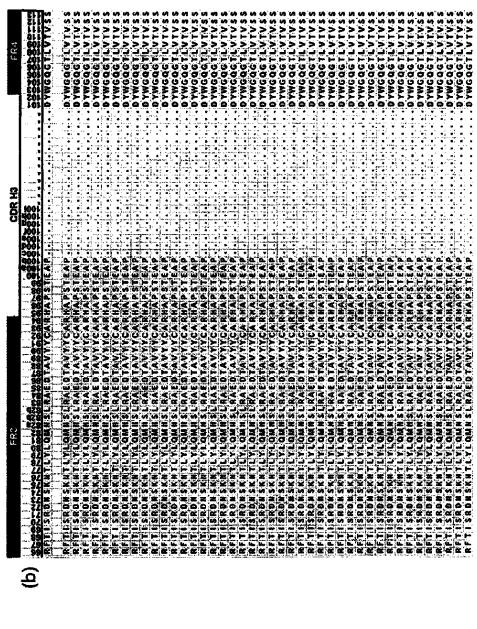
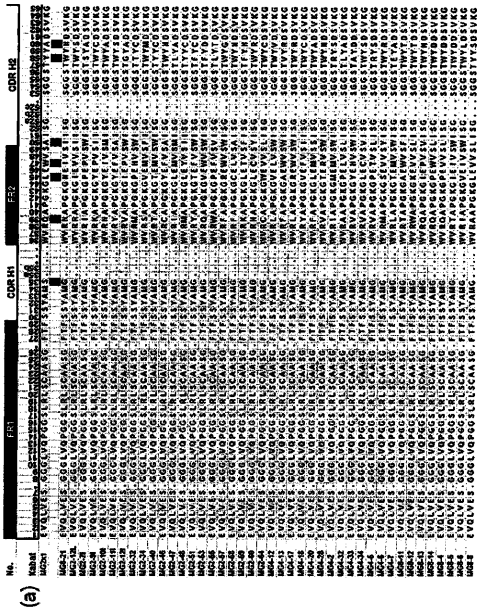
[FIG. 4]



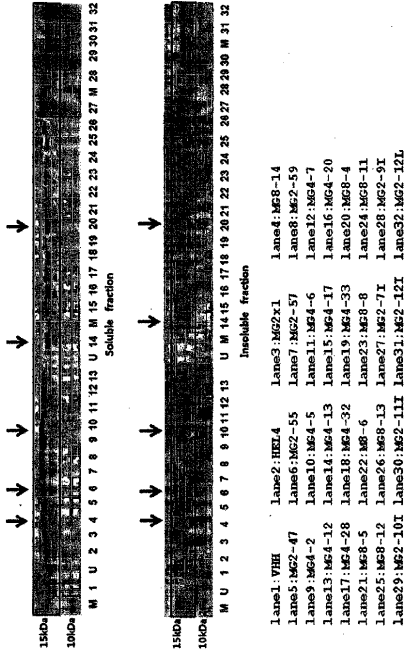
[FIG. 5]



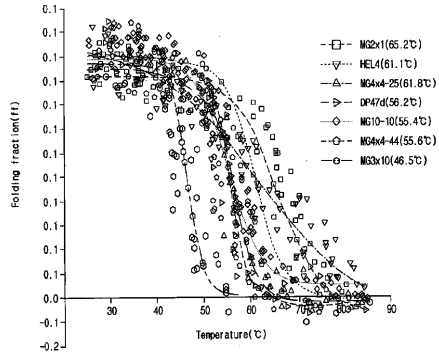
[FIG. 6]



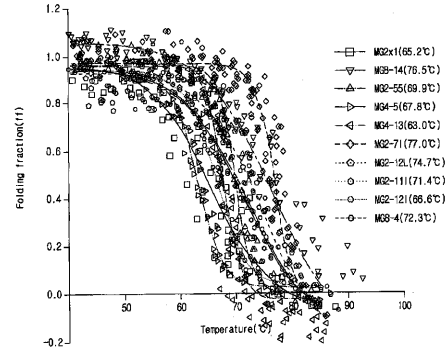
[FIG. 7]



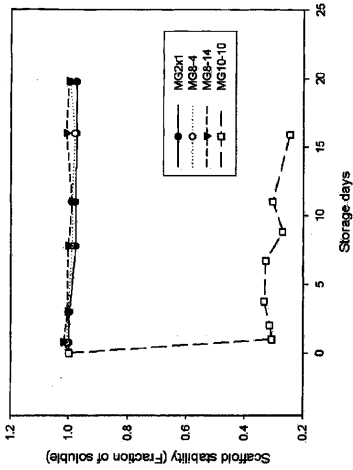
[FIG. 8]



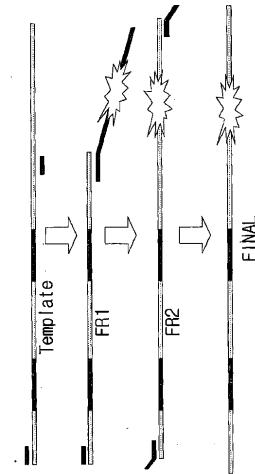
[FIG. 9]



[FIG. 10]



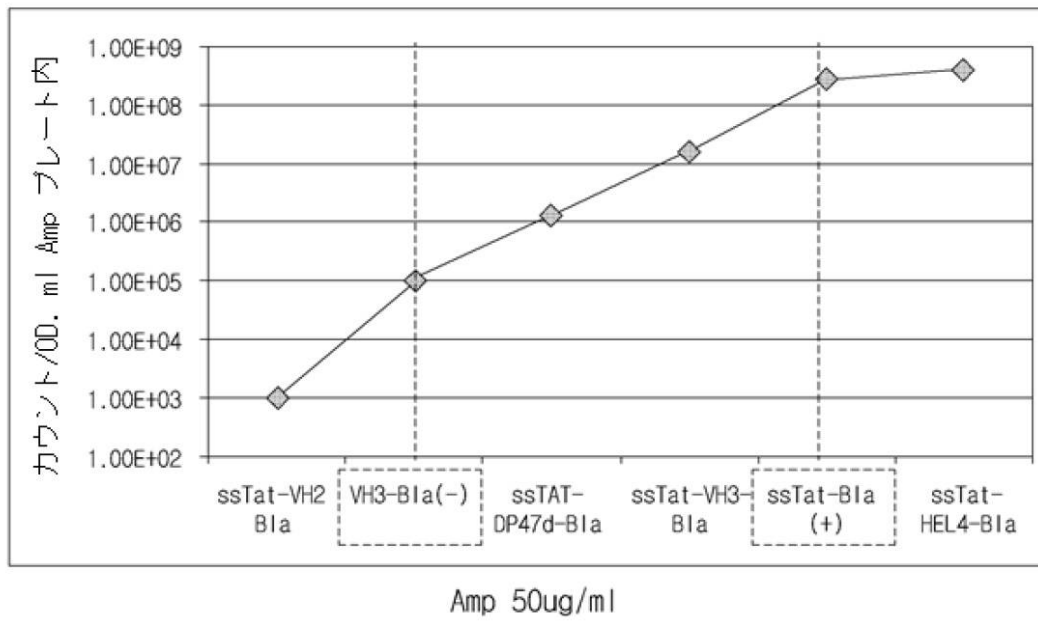
[FIG. 11]





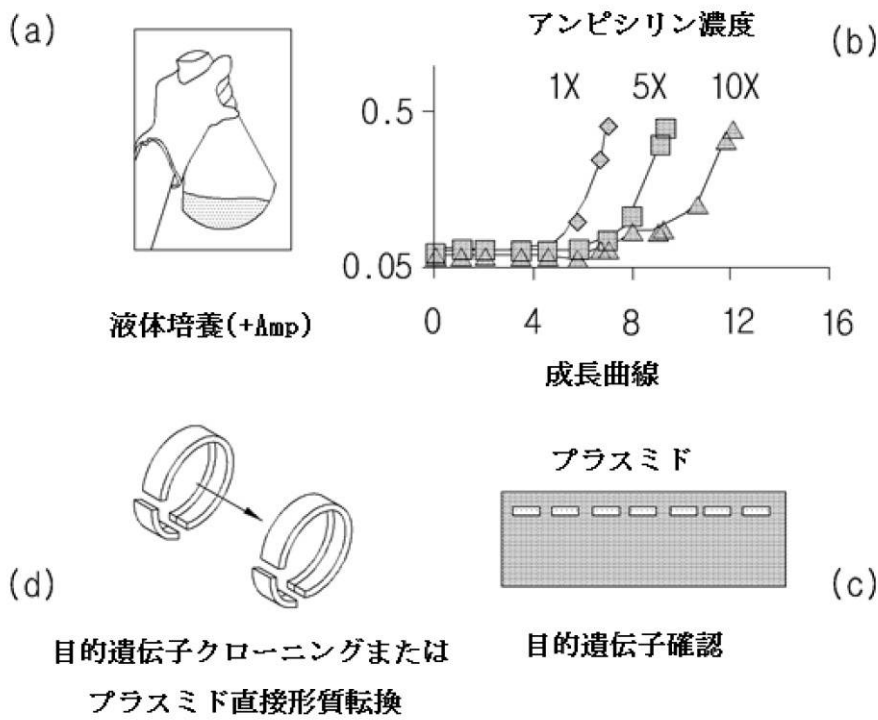
【図1】

【図1】



【図2】

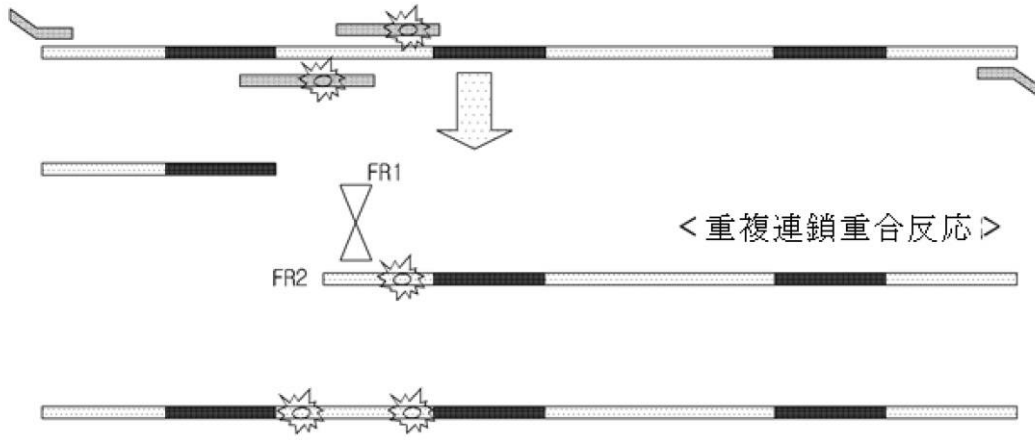
【図2】





【図5】

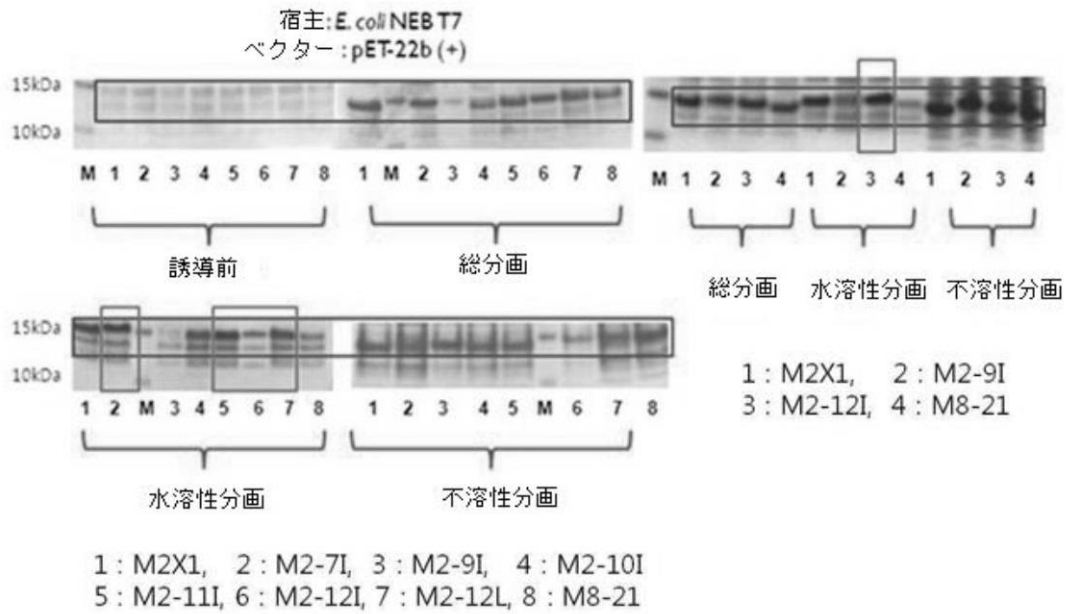
【図5】





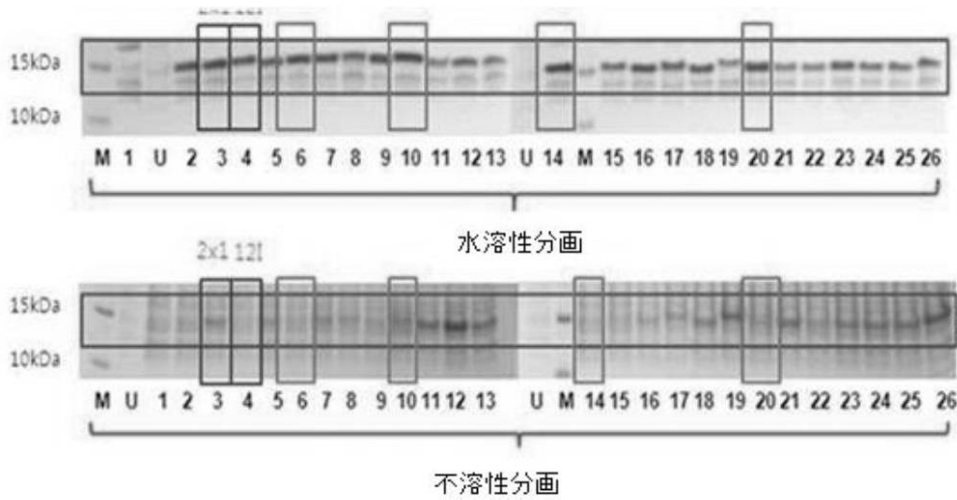
【 図 7 】

【 図 7 】



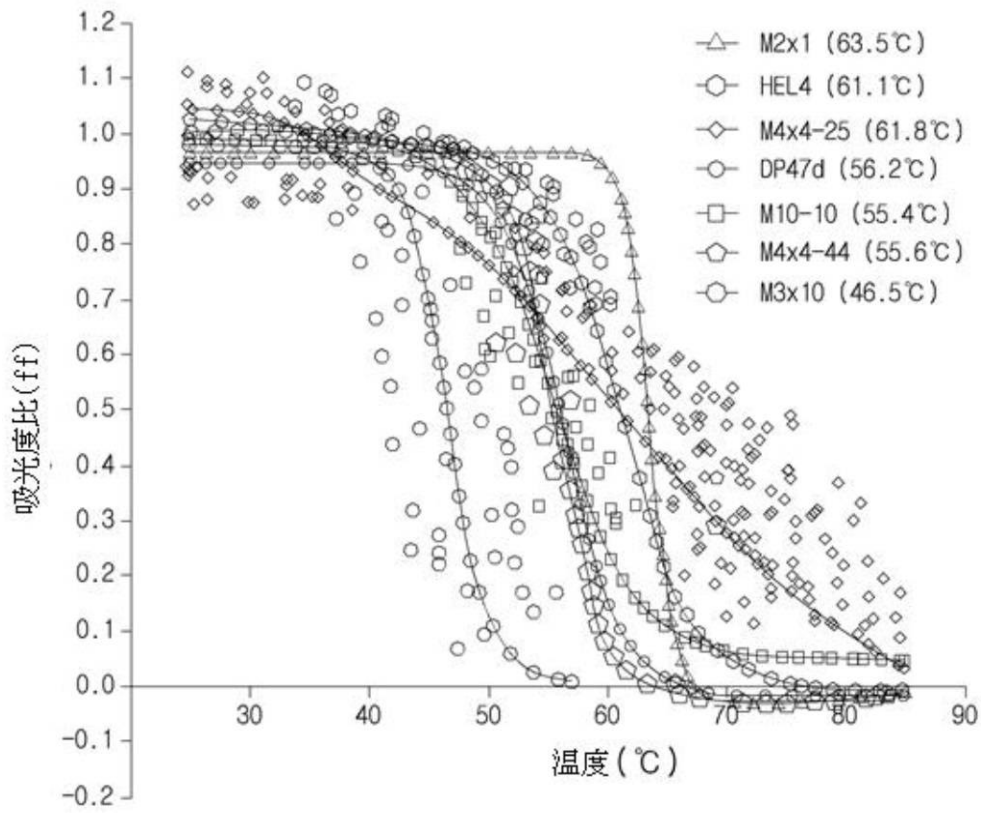
【 図 8 】

【 図 8 】



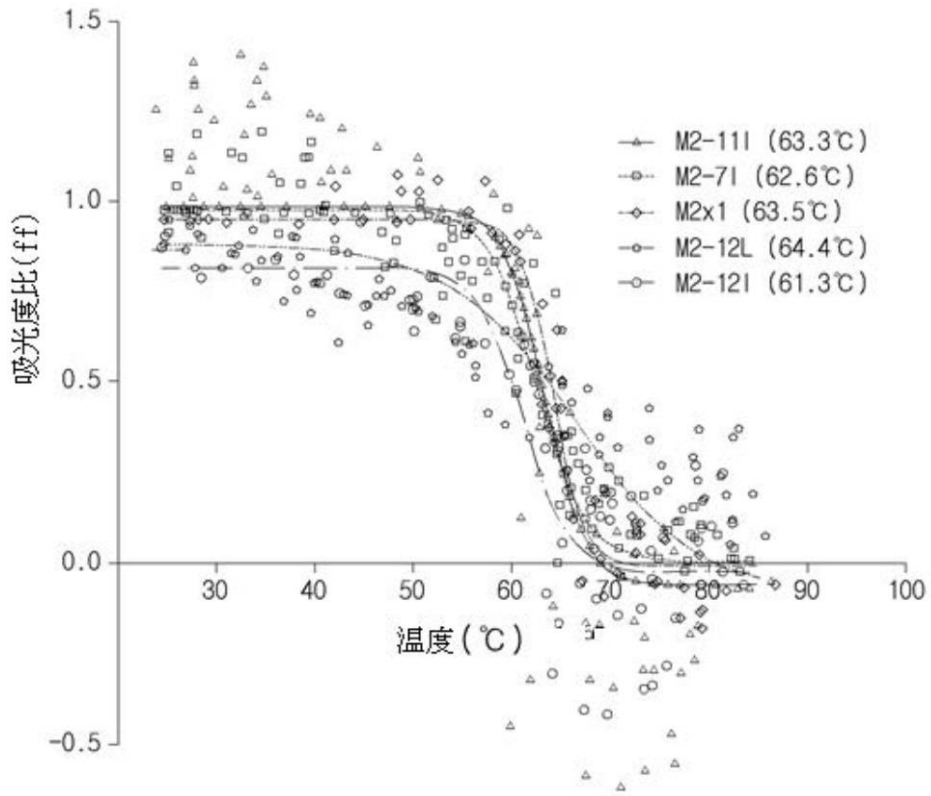
【図 9】

【図 9】



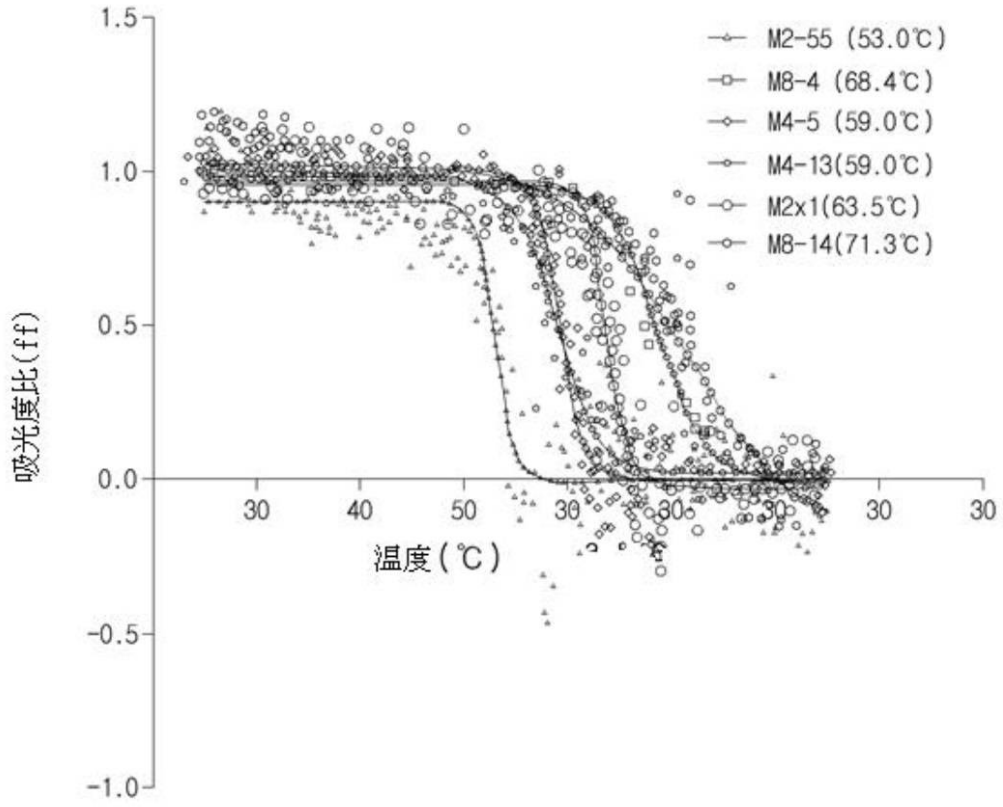
【図10】

【図10】



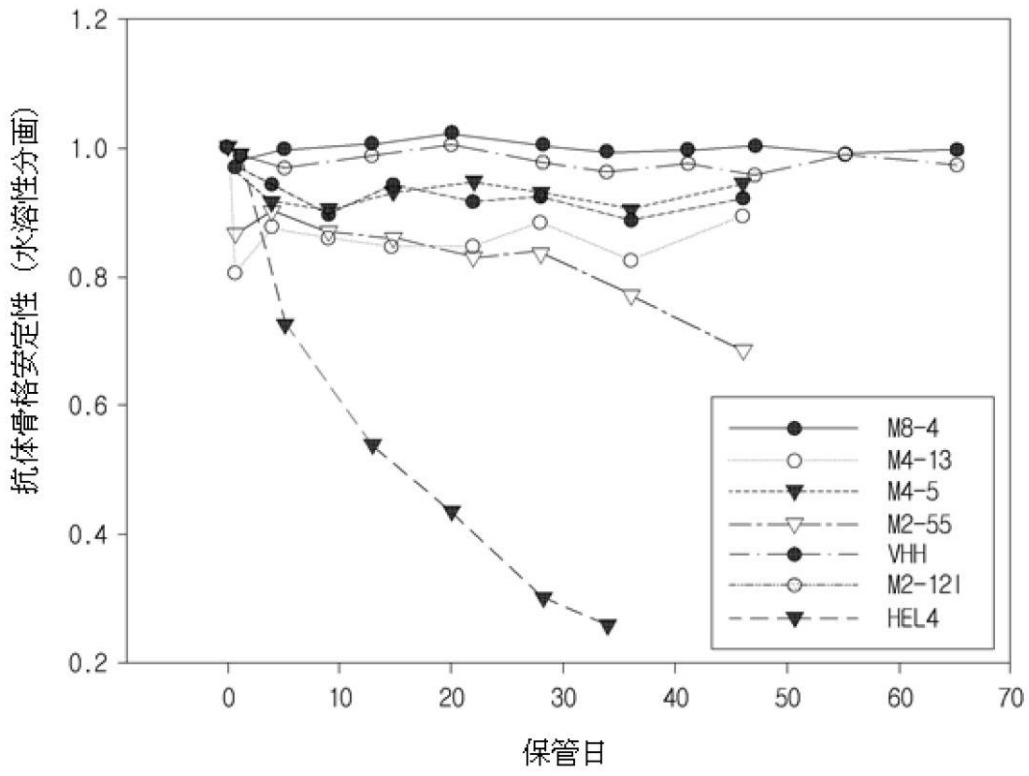
【図 1 1】

【図 1 1】



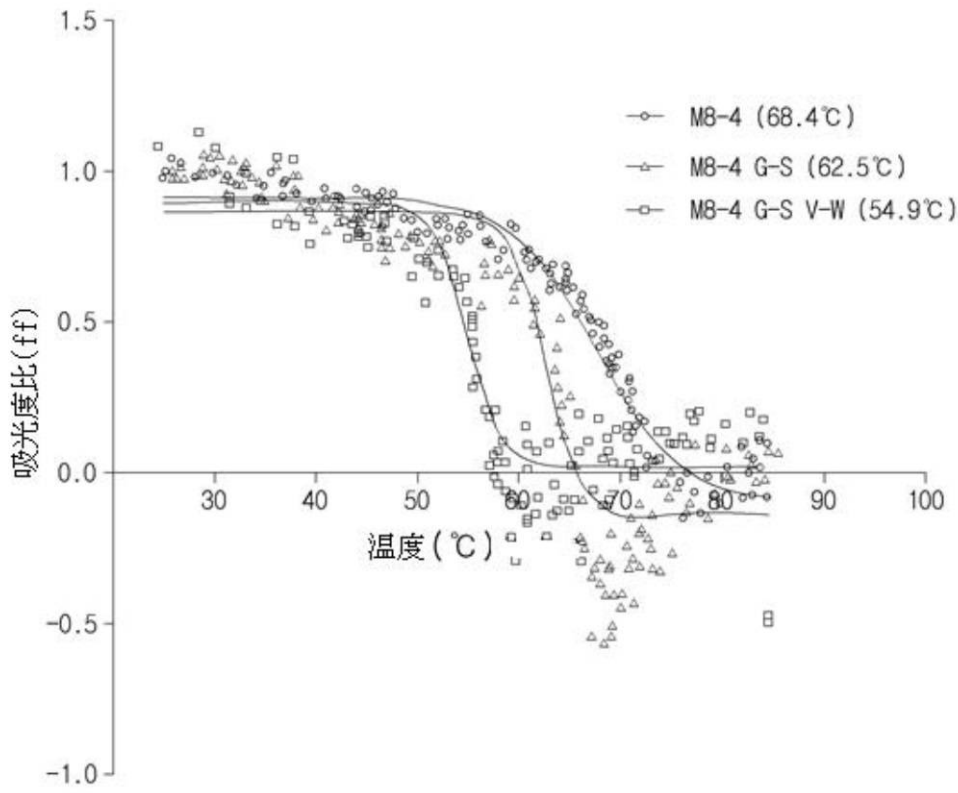
【图 13】

【图 13】



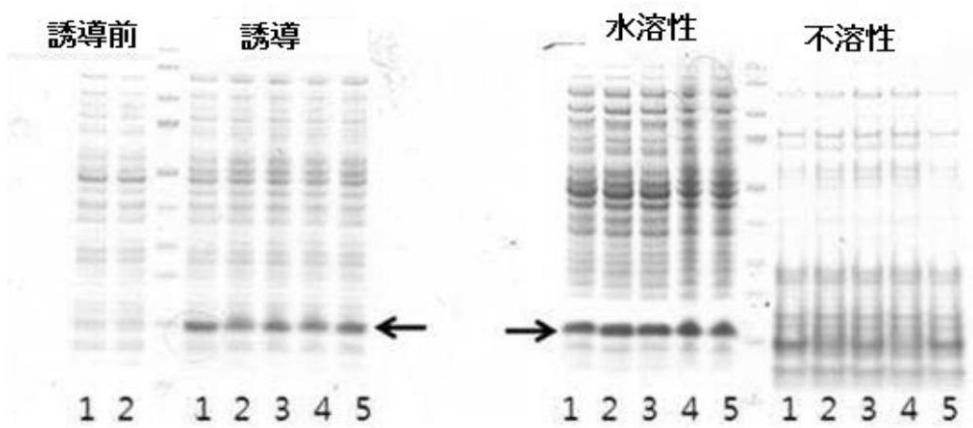
【図14】

【図14】



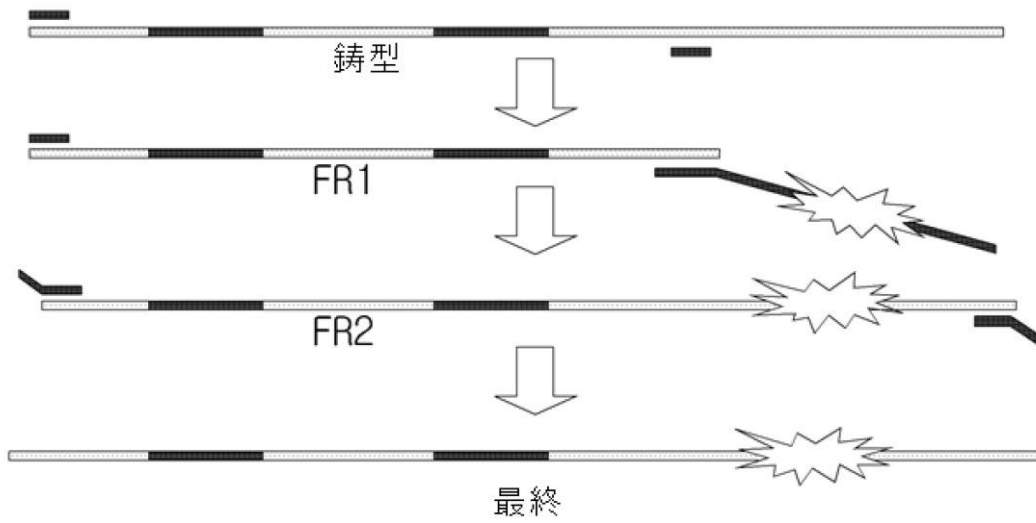
【図15】

【図15】



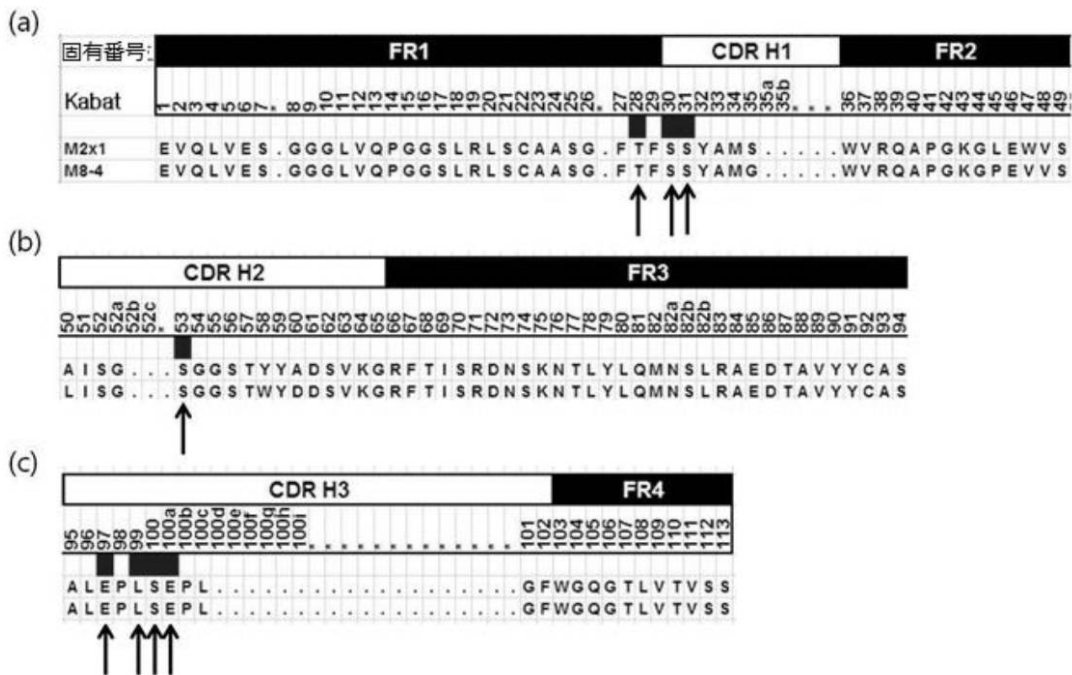
【図 1 6】

【図 1 6】



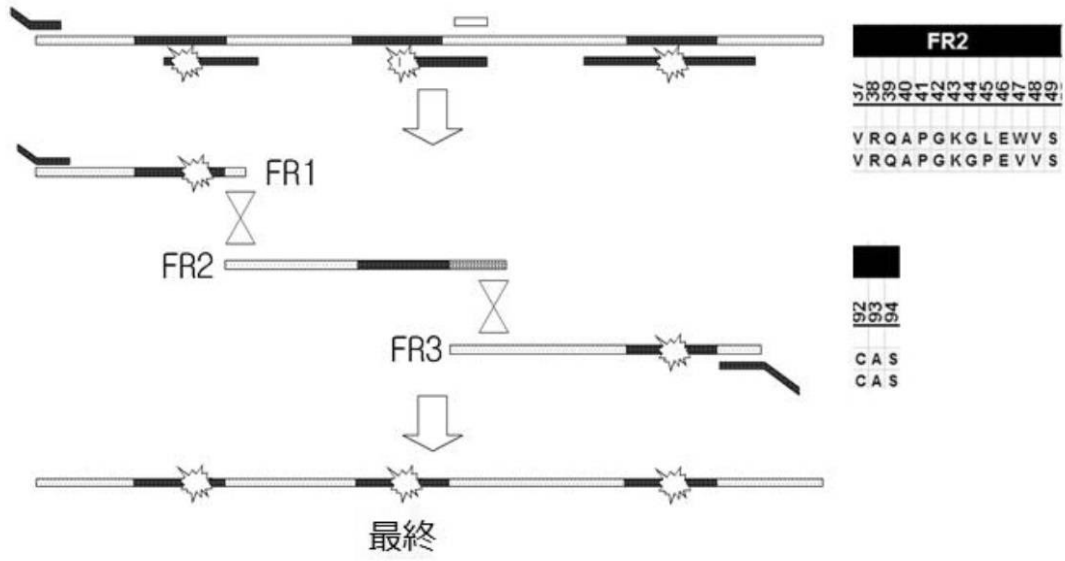
【図 1 7】

【図 1 7】



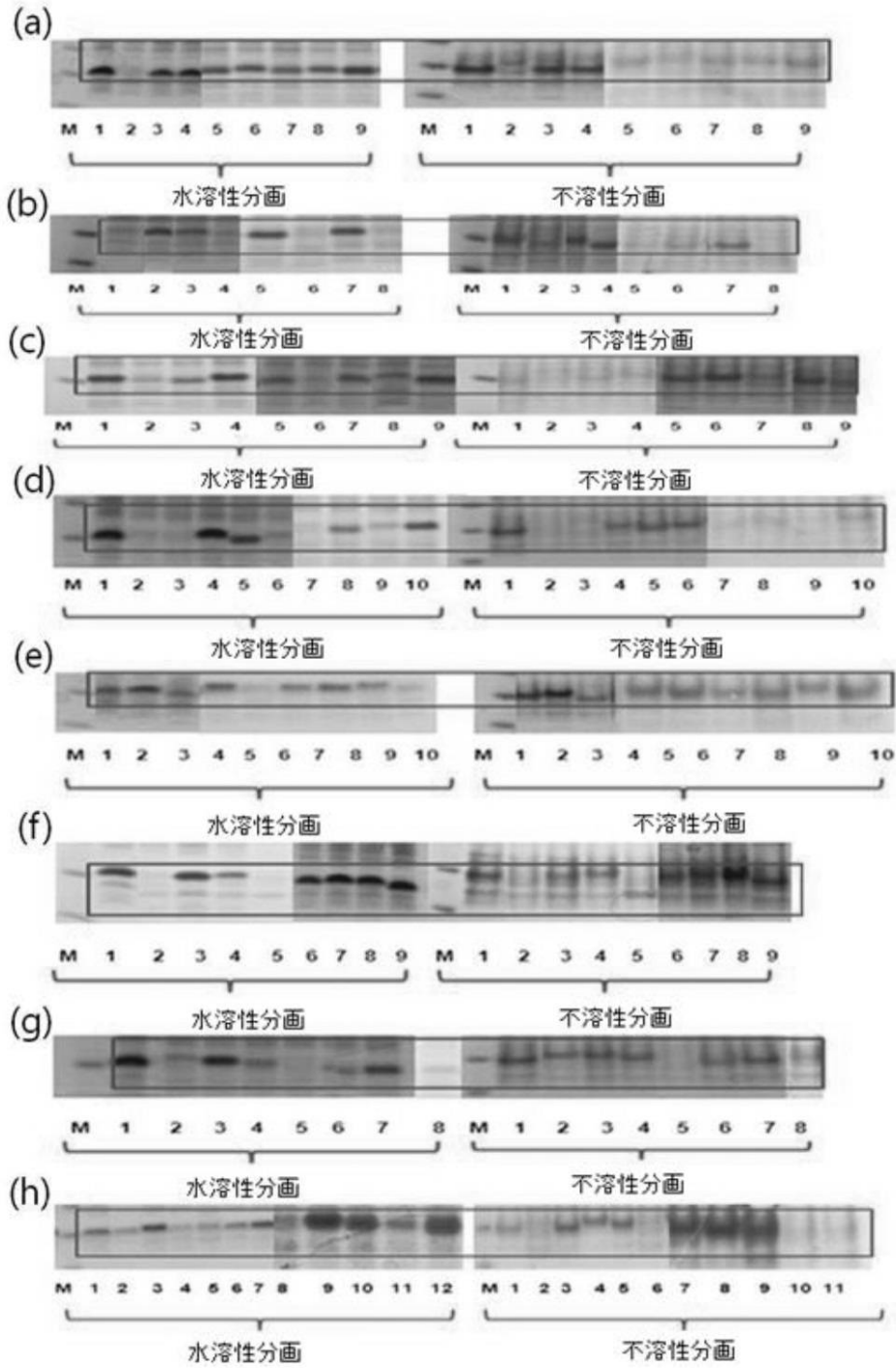
【図18】

【図18】



【図 19】



【図 19】



【配列表】

[201553159700001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2012/006680</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/62; C07H 21/04; A61K 39/395; C40B 30/06; A61K 39/02; C12N 9/14; C12N 1/21; C07K 14/00; C12Q 1/70; C07K; A61K 38/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Tat, Tat-signal, TAPE, screening, solubility, thermostability, gene construct, vector, fusion protein, antibiotic, etc.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2007-016591 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.) 8 February 2007 See claims 1-6, 13 and 14.	1-17, 19, 20 21-36
A	US 2010-0285567 A1 (BAO, KAI et al.) 11 November 2010 See claims 1, 7 and 8; paragraph [0039].	1-17, 19-36
A	US 2002-0012909 A1 (PLAKSIN, DANIEL) 31 January 2002 See claims 1 and 21; paragraph [0096].	1-17, 19-36
A	US 2009-0011995 A1 (LEE, SANG JUN et al) 8 January 2009 See claims 1, 9 and 61.	1-17, 19-36
A	WO 00-34308 A2 (WASHINGTON UNIVERSITY) 15 June 2000 See claims 1 and 13.	1-17, 19-36
A	WO 2007-024877 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. et al.) 1 March 2007 See claims 1, 10, 16 and 17.	1-17, 19-36
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 27 March 2013 (27.03.2013)		Date of mailing of the international search report <b>28 March 2013 (28.03.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. 82-42-481-8150 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2012/006680****Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper  
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/006680

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 18  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/006680**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-016591 A2	08.02.2007	AU 2006-275415 A1	08.02.2007
		AU 2006-275415 B2	21.07.2011
		CA 2617792 A1	08.02.2007
		EP 1915390 A2	30.04.2008
		EP 1915390 A4	03.06.2009
		EP 2418280 A1	15.02.2012
		US 2007-0026012 A1	01.02.2007
		US 2008-287315 A1	20.11.2008
		WO 2007-016591 A3	02.10.2008
US 2010-0285567 A1	11.11.2010	AU 2008-267059 A1	24.12.2008
		CA 2691109 A1	24.12.2008
		CN 101679958 A	24.03.2010
		EP 2164956 A2	24.03.2010
		IL 202399 D0	01.08.2011
		JP 2010-530242 A	09.09.2010
		KR 10-2010-0024943 A	08.03.2010
		RU 2010101206 A	27.07.2011
		WO 2008-156551 A2	24.12.2008
		WO 2008-156551 A3	19.03.2009
		US 2002-0012909 A1	31.01.2002
AU 1999-64869 B2	11.09.2003		
AU 765201 C	03.03.2005		
CA 2351669 A1	25.05.2000		
EP 1131079 A1	12.09.2001		
EP 1131079 A4	07.08.2002		
IL 127127 D0	22.09.1999		
NZ 511466 A	29.04.2003		
WO 00-29004 A1	25.05.2000		
US 2009-0011995 A1	08.01.2009		
		AU 2007-210396 B2	29.09.2011
		CA 2637881 A1	09.08.2007
		CN 101374949 A	25.02.2009
		EP 1981979 A1	22.10.2008
		EP 1981979 A4	29.07.2009
		JP 2009-525042 A	09.07.2009
		KR 10-0981356 B1	14.09.2010
		KR 10-2007-0079025A	03.08.2007
		WO 2007-089093 A1	09.08.2007
WO 2007-089093 A8	05.11.2009		
WO 00-34308 A2	15.06.2000	AU 2000-21728 A1	26.06.2000
		CA 2354044 A1	15.06.2000
		EP 1137664 A2	04.10.2001
		JP 2002-531113 A	24.09.2002
		WO 00-34308 A3	19.10.2000

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/006680**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-024877 A2	01.03.2007	AU 2006-283130 A1	01.03.2007
		AU 2006-283130 B2	09.02.2012
		CA 2620934 A1	01.03.2007
		EP 1917347 A2	07.05.2008
		EP 1917347 A4	12.11.2008
		EP 2360473 A1	24.08.2011
		IL 189685 D0	05.06.2008
		US 2009-0220952 A	03.09.2009
		WO 2007-024877 A3	21.06.2007

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 1/22 (2006.01)</b>	C 0 7 K	1/22	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	N
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	Z
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/15	Z
<b>C 4 0 B 30/04 (2006.01)</b>	C 4 0 B	30/04	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リム, ヒュン-クォン

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

(72)発明者 キム, サン グン

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

(72)発明者 パク, ヨン ソブ

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

(72)発明者 ナム, ヒョ ジュン

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

(72)発明者 キム, ドン-シク

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

(72)発明者 パク, ジェ チャン

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

(72)発明者 ユン, ヨブ

大韓民国 4 4 6 - 7 9 9 キョンギ-ド, ヨンイン-シ, ギフン-グ, ポジュン-ドン  
3 4 1

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA37

4B024 BA53 CA02 CA04 CA12 CA20 DA06 DA12 EA04 FA10 GA14

GA19 HA01 HA06

4B063 QA13 QA18 QQ06 QQ13 QQ42

4B065 AA26X AA72X AA93Y AB01 AC14 BA03 BA25 BB03 BB15 BB37

BC03 BC09 BC26 BD14 CA25

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 DA89 EA65 FA74 GA26 HA31

专利名称(译)	稳定的免疫球蛋白可变域选择方法及所选域的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015531597A5</a>	公开(公告)日	2016-09-29
申请号	JP2015528372	申请日	2012-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人牧岩生命工学研究所		
申请(专利权)人(译)	Mogamu 生物技术研究所		
[标]发明人	リムヒユンクオン キムサンゲン パクヨンソブ ナムヒヨジュン キムドンシク パクジェチャン ユンヨブ		
发明人	リム, ヒユン-クオン キム, サン ゲン パク, ヨン ソブ ナム, ヒヨ ジュン キム, ドン-シク パク, ジェ チャン ユン, ヨブ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/21 C40B40/10 C12Q1/68 C07K16/00 C07K1/22 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C40B30/04		
CPC分类号	G01N33/6857 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/32 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/94 C07K2319/00 C07K2319/10 C40B40/10 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 C40B40/10 C12Q1/68.Z C07K16/00 C07K1/22 G01N33/53.N G01N33/50.Z G01N33/15.Z C40B30/04		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA37 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA14 4B024/GA19 4B024/HA01 4B024/HA06 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/BA25 4B065/BB03 4B065/BB15 4B065/BB37 4B065/BC03 4B065/BC09 4B065/BC26 4B065/BD14 4B065/CA25 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA65 4H045/FA74 4H045/GA26 4H045/HA31		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
其他公开文献	JP2015531597A JP6073038B2		

摘要(译)

本发明产生编码融合蛋白的基因构建体 ( 构建体 ) , 其中靶蛋白和抗生素抗性蛋白与Tat信号序列连接, 该信号序列在大肠杆菌中表达并且是可溶的并且是热力学的。 - 基于通路的蛋白质水溶性筛选 ( TAPE : Tat相关蛋白质工程 ) , 用于筛选具有优异稳定性的靶蛋白的靶蛋白, 特别是人生殖细胞衍生的免疫球蛋白可变结构域 ( VH或VL ) 本发明涉及通过上述方法和TAPE方法选择的水溶性且热力学稳定性优异的人VH和VL结构域抗体和人VH和VL结构域抗体支架。 [选定图]图11

