

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報

(A) (11)特許出願公表番号

特表2003－515745

(P2003－515745A)

(43)公表日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 2 G 0 4 2
			M 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	B 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		1/68	A
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 68数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001－542214(P2001－542214)

(86)(22)出願日 平成12年12月4日(2000.12.4)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月3日(2002.6.3)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/04638

(87)国際公開番号 W001/040803

(87)国際公開日 平成13年6月7日(2001.6.7)

(31)優先権主張番号 9928787.2

(32)優先日 平成11年12月3日(1999.12.3)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ドマンティス リミテッド
イギリス国 シービー1 6ジーエス ケンブリッジ,アピントン,グランタ パーク(番地なし)

(72)発明者 ホルト, ルーシー, ジェシカ
イギリス国 シービー2 2ジェーイー ケンブリッジ,トランピントン,アンスティウェイ 9ビー

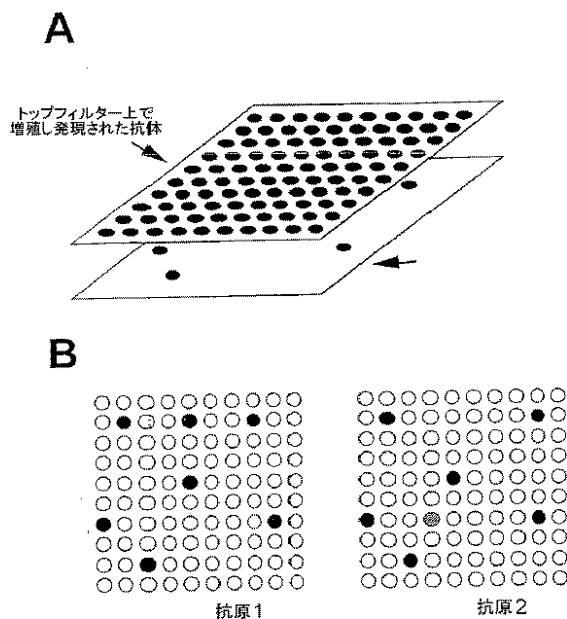
(72)発明者 デ ウィルツ, ルドルフ, マリア, セオドラ
イギリス国 シービー3 9エーユー ケンブリッジ,グランジェ ロード 27

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 直接的スクリーニング法

(57)【要約】

本発明はポリペプチドのレパートリーをスクリーニングして1種以上の標的分子と相互作用する1個以上のメンバーを同定するための方法であって、a)標的分子を支持体上に固定化し、b)該ポリペプチドレパートリーをコードする多数の核酸分子をアレイ状に配置し、c)標的分子をアレイさせた核酸分子と並置させ、d)該ポリペプチドが支持体上の標的分子と接触して該ポリペプチドのあるサブセットが該標的分子と相互作用するように、アレイさせた核酸分子を発現させてポリペプチドを産生させ、e)支持体上の該標的分子と該ポリペプチドの相互作用を検出する、ことを含んでなる方法に関する。本発明はまた、種々の標的リガンドに対してスクリーニングするために固体支持体上に空間的に配置させ、何千もの異なるポリペプチドからなる高濃度の抗体のアレイをも提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 1種以上の標的分子と相互作用するポリペプチドレパートリーの1個以上のメンバーを同定するための該ポリペプチドレパートリーをスクリーニングする方法であって：

- a) 該標的分子を支持体上に固定化し；
- b) 該ポリペプチドレパートリーをコードする多数の核酸分子をアレイさせ；
- c) そのアレイさせた核酸分子と該標的分子を並置し；
- d) 該ポリペプチドが該標的分子と支持体上で接触してそのポリペプチドのあるサブセットが該標的分子と相互作用することとなるように、そのアレイさせた核酸分子を発現させて該ポリペプチドを産生させ；
- e) 該ポリペプチドと該標的分子の支持体上での相互作用を検出する、ことを含んでなる方法。

【請求項2】 該核酸分子が該ポリペプチドレパートリーの該メンバーをコードする発現ベクターの形態であって、その転写を指令するために十分な制御配列に機能しうる形で連結されているものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 該発現ベクターがバクテリオファージである、請求項2記載の方法。

【請求項4】 該発現ベクターがプラスミドである、請求項2記載の方法。

【請求項5】 該発現ベクターが直鎖状の核酸分子である、請求項2記載の方法。

【請求項6】 該相互作用が、結合による相互作用、シグナル伝達イベント、触媒反応、酵素反応、リン酸化イベント、糖付加イベント、タンパク分解酵素による切断、および化学反応からなる群から選択されるものである、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 該ポリペプチドレパートリーが免疫グロブリン分子のレパートリーである、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 該核酸が細胞内に含まれ細胞内で発現される、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 該細胞が、細菌細胞、下等な真核細胞、および高等な真核細

胞からなる群から選択されたものである、請求項8記載の方法。

【請求項10】 該核酸分子が裸の、もしくは複合体化された核酸の形態で固定化されたものである、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 該ポリペプチドレパートリーをコードする核酸分子が、標的分子を含有する支持体とは異なる支持体上にアレイさせられており、その2つの支持体がそのアレイさせた核酸分子の発現に先だって並置される、上記の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 該ポリペプチドレパートリーをコードする核酸分子のアレイを含んでいる支持体が、該ポリペプチドレパートリーに対して透過性である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 該ポリペプチドレパートリーをコードする核酸分子が、固定化された該標的分子を含んでいる支持体と同一の支持体上に、該核酸分子の発現に先立ってアレイさせられている、請求項1から10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】 該支持体がフィルターメンブレンである、請求項1から13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】 該標的分子が、精製タンパク質、組換えタンパク質、ポリペプチド、酵素、酵素の基質、アミノ酸、細胞全体、細胞抽出物、小さな有機分子、および金属イオンからなる群から選択されたものである、請求項1から14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】 該ポリペプチドレパートリーが2種以上の標的分子に対して別個にスクリーニングされる、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】 全く同じ核酸分子のアレイが2つ以上作成され、その各々が異なる標的分子と並置される、請求項1から16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 1種以上の標的分子と結合する抗体ポリペプチドレパートリーの1個以上のメンバーを同定するために該抗体ポリペプチドレパートリーをスクリーニングする請求項1記載の方法であって：

- a) 該標的分子を第1の支持体上に固定化し；
- b) 該抗体ポリペプチドレパートリーをコードする核酸分子を用いて多数の細胞を形質転換し、および該細菌細胞を第2の支持体上にアレイさせ；
- c) 第1の支持体と第2の支持体を並置させ；
- d) 該ポリペプチドが第2の支持体上の細胞から分泌され、第1の支持体上の該標的分子と接触し、該ポリペプチドのあるサブセットが該標的分子と結合することとなるように該核酸分子を発現させて該抗体ポリペプチドを産生させ；
- e) 該抗体ポリペプチドと第1の支持体上の該標的分子との結合を検出する、ことを含んでなる方法。

【請求項19】 2つのポリペプチドレパートリーのお互いに対してスクリーニングして特異的結合ペアを単離するための方法であって：

- a) 第1のレパートリーのメンバーの全て、もしくは実質的に全てと結合することのできるジェネリックな第1のリガンドを支持体上に固定化し；
- b) 核酸分子のアレイの各ポイントが第1および第2のレパートリーのポリペプチドをそれぞれコードする第1のレパートリーの1メンバーおよび第2のレパートリーの1メンバーを含むこととなるように多数の核酸分子をアレイさせ；
- c) 第1のジェネリックなリガンドとアレイさせた核酸分子を並置させ；
- d) 第1のレパートリーのポリペプチドが第1のジェネリックなリガンドに結合し第2のレパートリーのポリペプチドのあるサブセットが第1のレパートリーのポリペプチドと結合するように、そのアレイさせた核酸を発現させてポリペプチドのアレイを作成し；
- e) 該支持体上の第2のポリペプチドと第1のポリペプチドの相互作用を第2のレパートリーのメンバーの実質的に全てと結合しうる第2のジェネリックなリガンドを用いて検出する、ことを含んでなる方法。

【請求項20】 ある基質分子を産物分子に転換する酵素のレパートリーの1個以上のメンバーを同定するためにその酵素のレパートリーをスクリーニングする方法であって：

- a) 産物分子とのみ結合しうるリガンドを第1の支持体上に固定化し；

- b) 核酸分子のアレイの各ポイントが該酵素レパートリーおよび基質分子の1核酸メンバーを含むこととなるように、多数の核酸分子を第2の支持体上にアレイさせ；
- c) 第1の支持体と第2の支持体を並置させ；
- d) 該産物分子が第1の支持体上に固定化された特異的リガンドと結合しうるように酵素ポリペプチドが該基質分子を該産物分子に転換するが、その転換が行われることとなるようにアレイさせた該核酸分子を発現させて酵素ポリペプチドのアレイを作成し；
- e) 第1の支持体上の該産物分子の存在を検出する、ことを含んでなる方法。

【請求項21】 該方法によって、該基質分子があるポリペプチドレパートリーでコードされ、該アレイの各ポイントが酵素と基質のレパートリーのメンバーの種々の組み合わせを含んでいる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 ある酵素分子によって転換されて産物のポリペプチドを形成させる、基質のレパートリーの1個以上のメンバーを同定するために、その基質のレパートリーをスクリーニングする方法であって：

- a) 産物ポリペプチドとのみ結合しうるリガンドを第1の支持体上に固定化し；
- b) 核酸分子のアレイの各ポイントが該基質レパートリーおよび該酵素分子の1核酸メンバーを含むこととなるように、多数の核酸分子を第2の支持体上にアレイさせ；
- c) 第1の支持体と第2の支持体を並置させ；
- d) 該産物ポリペプチドが第1の支持体上に固定化された特異的リガンドと結合しうるように酵素分子が該基質ポリペプチドを産物ポリペプチドに転換するが、その転換が行われることとなるようにアレイさせた該核酸分子を発現させて基質ポリペプチドのアレイを作成し；
- e) 第1の支持体上の該産物ポリペプチドの存在を検出する、ことを含んでなる方法。

【請求項23】 該方法によって、該酵素分子があるポリペプチドレパート

リーによりコードされ、該アレイの各ポイントが基質と酵素のレパートリーのメンバーの種々の組み合わせを含んでいる、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 該方法によって第1の支持体上に固定化されたりガンドが基質および産物分子の双方と結合し、次いで産物および/もしくは基質特異的検出法が基質もしくは産物の存在を区別するために用いられる、請求項20から23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】 1種以上の標的分子と相互作用するあるポリペプチドレパートリーの1個以上のメンバーを同定するためにそのポリペプチドレパートリーをスクリーニングするための装置であって：

- a) 該ポリペプチドレパートリーをコードする核酸分子のアレイ；
- b) 支持体上に該標的分子が固定化された支持体；
- c) 該ポリペプチドと該支持体との間の相互作用を検出するための試薬、を含んでなる装置。

【請求項26】 該核酸分子が透過性のフィルター支持体上にアレイされている、請求項25に記載の装置。

【請求項27】 複数の標的リガンドに対して抗体のアレイを作成しスクリーニングするための方法であって、それによって抗体もしくは抗体フラグメントをあらかじめ定められた固体支持体上の位置にアレイせしめ、次いで種々の標的リガンドに対して探索される方法。

【請求項28】 該方法によってある単一の抗体のアレイが1000種以上の異なる抗体もしくは抗体フラグメントを含有することとなる、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 1000種以上の種々の抗体もしくは抗体フラグメントからなり、単一の固体支持体上に空間的に配置された抗体のアレイ。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の説明**

本発明はポリペプチドのレパートリーをスクリーニングする方法に関し、その方法によって、そのレパートリーのメンバーが標的分子もしくは同定される分子と相互作用することとなるように、そのポリペプチドは標的分子の近傍で翻訳される。特に、本発明は、ポリペプチドレパートリーをin situでアレイ状に発現させ、それらと固定化された標的分子との相互作用を検出することに関する。本発明はまた、種々の標的リガンドに対してスクリーニングするために固体支持体上に空間的に配置させ、何千もの異なるポリペプチドからなる高濃度の抗体のアレイをも提供する。

【0002】**緒言**

多量の抗体フラグメントを抗原との結合性についてスクリーニングする方法についての初めての報告は溶菌プラークを用いた方法であった(Huseら, 1989; Mullinaxら, 1990)。これらのライブラリーは免疫したマウスもしくは追加免疫を受けたヒトから作成したもので、それには標的抗原の各々に対して新たなライブラリーを作成しなければならず、再現性のある結果の得られる、同じフィルターが得られないという欠点があった。従って、抗体フラグメントのファージディスプレイライブラリーを無処置の(免疫していない)ドナーから(Marksら, (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Vaughanら, (1996) Nature Biotech. 14:309; Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnem, R., Sargent, P., Lindqvist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C. とMarks, J.D.(1998) 「大規模な非免疫ファージ抗体ライブラリーの効率的な構築：タンパク質抗原に対する高アフィニティー1本鎖抗体の産生」 "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:6157-62)、もしくは合成によって導入された補体決定領域(CDRs)を有するクローン化された可変(V)領域遺伝子(Griffithsら, (1994) EMBO J. 13:3245)から構築され

てきたが、これらは非常に多様な抗体を含んでいるはずである。事実、抗原の選択およびアフィニティーによる精製を何ラウンドか繰り返すと、例えば自己抗原 (Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes Jones, N.C.ら, (1993), 「ファージディスプレイライブラリーから得た高い特異性を有するヒト抗自己抗体」 "Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries", EMBO J. 12:725-734; Griffithsら, 1994; De Wildt, R.M.T., Finnern, R., Ouwchand, W.H., Griffiths, A.D., Van Venrooij, W.J.とHoet, R.M.A., (1996), 「合成および患者由来のコンビナトリアルV遺伝子ライブラリーから選択したUI-RNA関連 Aタンパク質に対するヒト可変ドメイン抗体フラグメントの特徴」 "Characterization of human variable domain antibody fragments against the U1-RNA-associated A protein, selected from a synthetic and a patient derived combinatorial V gene library" Eur. J.Immunol. 26, 629-639)およびMHC-ペプチド複合体(Andersenら, 1996)などのある範囲の抗原に対する抗体フラグメントが単離されるが、そのようなことは困難であると以前は考えられていた。

【0003】

ファージディスプレイの実験方法はファージ増殖のラウンドの反復、パニング、及び感染を含んでおり、この方法ではしばしばイムノドミナントなエピトープおよびドミナントタンパク質(タンパク質の混合物中で)に対してのバイアスがかかる結果となる。従って、結合クローンである可能性のあるクローンの多様なものの大部分を保持するためには、出来る限り早期にクローンを分析することが有用である。

【0004】

このことは抗原に対する抗体の結合の大規模なスクリーニングを必要とする。それは96ウェルのフォーマットで組換え抗体を増殖および誘導させ、その後抗原をコートした別のプレートに発現した抗体を移し、従来法のELISAで行いうるが、1000種を超える種々の抗体をこの方法でスクリーニングすることは实际的でない。発現された個々の抗体をロボットを用いてピペッティングすることによって

より大規模なスクリーニングを行うことができるが、その抗体は誘導の際にコンパートメント化することが依然として必要である。しかし、それにより現行のプレートフォーマットおよび現在の液体取り扱いのスピードの制限の下でのスクリーニングしうる抗体の数を限定する。 10^3 から 10^5 のレンジのより大規模なスクリーニングを行うためには、抗体を含有する細菌をin situで発現させ、次いで標識抗原を用いて探索するために、フィルター上で捕捉した。Skerraら(Anal. Biochem. 196:151-155)は結合抗体と非結合抗体とを区別するために発現した抗体フラグメントを2枚のフィルターを用いるアプローチで捕捉したが、その第2のフィルターの使用によって細菌の細片によるバックグラウンド値が低減される。捕捉剤はまた、入ファージのプラーク中に発現された抗体フラグメントの捕捉にも用いられた(Watkins, J.D., Beuerlein, G., Wu, H., McFadden, P.R., Pancook, J. D. とHuse, W.D. (1998) 「ファージによって発現させた抗体ライブラリーの捕捉リフトスクリーニングによる細胞表面抗原に対するヒト抗体の発見」 "Discovery of human antibodies to cell surface antigens by capture lift screening of phage-expressed antibody libraries" Anal. Biochem. 256:169-77) 。これらの技法のどちらも抗体の無差別の捕捉、およびその後の抗原特異的クローンを検出するための標識抗原の使用に依存している。このことにはスクリーニングしようとする各抗原の標識を必要とするばかりでなく、低アフィニティーの包括的な捕捉剤の使用によって、特異的な相互作用が検出可能となる前に抗体がフィルター上から離れてしまうこととなる可能性がある。

【0005】

これらの問題点に対処するために、我々は新たなアプローチを考案し、それによれば、標的分子それ自体が固相支持体上に固定化され、結合するポリペプチドがその標識分子を含有する固相支持体上で直接的に捕捉されうるように、ポリペプチドレパートリーはその近傍で発現される。さらに我々は個々の標的分子の全てではないがいくつかと相互作用するポリペプチド、全ての標的分子と相互作用するポリペプチド、もしくは標的分子とは全く相互作用しないポリペプチドを同定することができるように、同一のポリペプチドレパートリーを含有する全く同じ2つのフィルターを作成して2種以上の異なる標的分子を用いてスクリーニング

できるようなシステムを考案した。さらに、結合の相互作用のスクリーニング用いられる他、この直接的発現/相互作用アッセイ法は、生物学的機能を有するポリペプチドが関与するいかなる生物学的スクリーニングにも用いることができる。

【0006】

発明の要旨

我々は、抗体ポリペプチドを含むポリペプチドレパートリーを1種以上の標的分子との反応性についてスクリーニングするために用いる方法論を開発した。我々はポリペプチドの発現と相互作用のスクリーニングを組み合わせ、ポリペプチドをコードするアレイさせた核酸と対応するポリペプチドのアレイを作った。このことは、従来の技法ではポリペプチドは発現させた後、標的分子とのスクリーニングをその後に行うために保存もしくは捕捉しておかねばならないが、そのような技法と比べると、発現されたポリペプチドが標的分子と直接的に相互作用できるという点で好都合である。そのようなアレイを作成すると同じレパートリーのメンバーを異なる標的分子に対して平行してスクリーニングすることが可能となる。本発明はまた、多数の種々のポリペプチドからなる抗体のアレイをも提供し、それは種々の標的リガンドに対してスクリーニングするために固相支持体上に空間的に配置されている。

【0007】

従って、本発明の第1の態様においては、ポリペプチドレパートリーをスクリーニングする方法が提供され、それは1種以上の標的分子と相互作用するそのポリペプチドの1つ以上のメンバーを同定するための方法であり：

- a) 標的分子を支持体上に固定化し；
- b) ポリペプチドレパートリーをコードする多数の核酸分子をアレイさせ；
- c) そのアレイさせた核酸分子と標的分子を並置し；
- d) 該ポリペプチドが該標的分子と支持体上で接触してそのポリペプチドのあるサブセットが標的分子と相互作用することとなるように、そのアレイさせた核酸分子を発現させて該ポリペプチドを産生させ；
- e) 該ポリペプチドと該標的分子の支持体上での相互作用を検出すること、

を含んでなる方法である。

【0008】

本発明はファージディスプレイおよびその他の発現ディスプレイ技法の重要な利点を取り入れており、すなわち、あるポリペプチドレパートリーのメンバーをコードする核酸は、それによってコードされる個々のポリペプチドと会合し、それによって個々のポリペプチドの機能的特徴に基づいて選択されうる。しかし、この会合が外表にポリペプチドをディスプレイし、内部に対応するヌクレオチド前駆体を含有しているバクテリオファージを用いて、核酸とポリペプチドを連結することにより行われるファージディスプレイとは異なり、本発明ではこの会合を提供するための新規のアレイ技法を開発している。核酸とポリペプチドが細菌細胞中もしくは外表上に保持されているか、または発現の際にコンパートメント化されていなければならない(例えば96ウエルのプレート、もしくはその他のコンパートメント化策を用いて)、という要求事項を排除することによって、本発明では、非常に多数のポリペプチドを同時にスクリーニングすることが可能となっている。このように、核酸、その対応するポリペプチド産物、およびこのポリペプチド産物の標的分子との相互作用は全てが非常に近い距離の範囲内の位置で行われる。ある特定の相互作用が認められれば、それに対応する核酸のメンバーは容易に同定することができる。このように、本発明は結合活性の選択にとどまらず酵素活性、コンホメーションもしくはその他の検出可能な特性のいかなるものをも含むポリペプチドの機能的性質に基づいたポリペプチドレパートリーの選択をも行うことができる。

【0009】

標的分子は例えばメンブレンフィルター支持体などの固相支持体上に固定化され核酸分子のアレイに並置される。このことは標的分子のみをアレイさせることをも含み、それは例えば、他の分子との複雑な混合物、例えば細胞全体もしくは細胞抽出物中にある精製されたタンパク質もしくは標的分子で支持体をコートした場合などである。事実、ある種のスクリーンでは標的分子の性質が正確には知られていないこともあり、そのような場合にはスクリーンで相互作用を起こすようないかなるポリペプチドをも標的分子をさらに特徴づけるために用いることが

できる。該核酸分子の発現によって産生されたポリペプチドは標的分子に対して並置されるので、それらのポリペプチドは標的分子と相互作用する可能性がある。検出しようとしている相互作用に基づいて選択される適切な検出システムを用いて、その相互作用を検出することができる。

【0010】

レパートリーのポリペプチドと標的分子との相互作用の検出は多数の方法で行うことができ、それは相互作用それ自体の性質の如何による。例えば、そのポリペプチドレパートリーが抗体分子レパートリーで標的分子が抗原である場合には、抗体と抗原との間の結合は、適切な標識抗免疫グロブリン、もしくはプロテインAもしくはプロテインLなどの標識スーパー抗原を用いて標的分子支持体を探索することによって検出することができる。また別の1実施形態においては、ポリペプチドレパートリーを選択するために用いられる標的分子は正しく折り畳まれ発現されたポリペプチドとジェネリックな相互作用をすることができる。例えば、標的分子がプロテインAもしくはプロテインLの場合には、機能を有する免疫グロブリン分子の全てを含んでいるサブセットがある免疫グロブリン分子レパートリーから選択されることとなろう。あるいはまた、該レパートリーのポリペプチドと標的分子との相互作用は、標的分子もしくはその他の分子でポリペプチドと標的分子の相互作用がそれを用いて行われるような分子の性質の何らかの物理的な変化によって検出することができる。従って、例えば、その標的分子がアポトーシスの引き金を引くレセプターであり、その標的分子を含んでいる細胞が固相支持体上に固定化されている場合には、そのポリペプチドレパートリー中の相互作用するメンバーは細胞を殺すことができ、そのことは顕微鏡下で、もしくはアポトーシスの他の何らかの分子性マーカーを用いて検出することができる。あるいはまた、該ポリペプチドレパートリーの相互作用するメンバーは標的分子で色の変化をもたらさう。

【0011】

特定の1実施形態においては、本発明は抗体ポリペプチドのレパートリーをスクリーニングして1種以上の標的分子と結合する1つ以上のレパートリーのメンバーを同定する方法を含んでなり、その方法は：

- a) 第1の支持体に標的分子を固定化し；
- b) 抗体ポリペプチドのレパートリーをコードする核酸を用いて多数の細胞を形質転換させその細菌細胞を第2の支持体上にアレイさせ；
- c) 第1および第2の支持体を並置させ；
- d) 該ポリペプチドが第2の支持体上の細胞から分泌されて第1の支持体上の標的分子と接触しそのポリペプチドのあるサブセットが標的分子と結合するようにその核酸分子を発現させて該抗体ポリペプチドを産生させ；
- e) 第1の支持体上での該抗体ポリペプチドと該標的分子との結合を検出する、ことを含んでなる方法である。

【0012】

細胞は大腸菌などの細菌細胞、酵母細胞などの低級な真核細胞、および哺乳類細胞などの高級な真核細胞などの原核細胞もしくは真核細胞とすることができる。本発明のこの実施形態においては、アレイはロボットを用いてコロニーをつまみ上げ培養プレート中に移すことによって行うことが好都合であり、その方法で全く同じ2つのフィルターを多数作成しうる。標的分子を最初にフィルターに付着させ、次いで細菌を標的分子フィルター上でアレイ、増殖および発現させた第1のフィルターと第2のフィルターは同じものであるが、標的分子が固定化された第1のフィルターと同じものの上にアレイさせたコロニーを含ませた第2のフィルターを置いて第1のフィルターを第2のフィルターの下側に接触させ、コロニーそのものとは接触しないようにすることは好都合である。

【0013】

従って、本発明の第1と第2の支持体はフィルターであることが好都合である。少なくとも第2のフィルターは有孔性のまたは微小な孔を持つフィルターであることが好都合であり、それによって細胞から分泌されるポリペプチドがそのフィルターを通過して第1のフィルターと接触することができる。好ましいフィルター材料としてはニトロセルロース、PVDF、およびその他の当業界で既知の人工膜が含まれる。

【0014】

細胞によって発現され分泌されるポリペプチドは第2のフィルターを通過して

第1のフィルター上の固定化された標的分子と結合することによって相互作用することができる。結合した免疫グロブリンは標識スーパー抗原などの抗免疫グロブリン試薬を用いて検出することができる。

【0015】

第2の態様では、本発明はポリペプチドレパートリーのうち1種以上の標的分子と相互作用する1つ以上のメンバーを同定するスクリーニングのための装置を提供し、その装置は：

該レパートリーをコードする核酸分子のアレイさせたもの；および
支持体上に標的分子を固定化した支持体、
を含んでなる。

【0016】

その装置は、上述のポリペプチドと標的分子の相互作用を検出するための試薬もしくは道具と共に供給することができる。

【0017】

発明の詳細な説明

定義

アレイ 本明細書で用いているアレイとはレパートリー中の核酸のメンバーの空間的配置であって、それによって種々の核酸メンバーが固相支持体上で別々のあらかじめ規定された位置に配置される。そのように配置されたアレイは、ロボットによるピッキング(picking)などの格子配置技法を用いてそのメンバーを所望の位置に配置して作製することができる。このタイプのアレイは各クローンがその独自の位置にあり、多数の二重のフィルターを作製して種々の標的分子に対してのスクリーニングを行うことができるという利点を有する。さらに好ましいアレイ技法は下記でさらに説明する。

【0018】

本発明の核酸分子は所望のいかなる形態にもアレイさせることができる。例えば、核酸分子は裸の核酸、つまりRNA、DNA、もしくは核酸の他のいかなる形態のものとして配置させることができる。しかし、本発明の好ましい1態様においては、それらの核酸で形質転換させた細胞もしくは細胞の凝集物の形態でそれらの

核酸をアレイさせることができる。適切な細胞としては細菌細胞、真核細胞、および哺乳動物細胞などの高等真核細胞が含まれる。

【0019】

好ましくは、該核酸分子は発現ベクターの形態であり、そのベクターはポリペプチドのレパートリーのメンバーをコードし、そのメンバーの転写および/もしくは翻訳を指令するために十分な制御配列と機能しうる形で連結されたものである。例えば、そのような制御配列としては、当業者であれば既知であるとおり、プロモーター配列およびエンハンサーを挙げることができ、それらはDNA分子の転写のために必要である。

【0020】

例えば、該核酸分子は、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、直鎖状核酸分子(それは裸の形態でも複合体化した形態のどちらでもよいが)の形態であってよい。次いでその核酸分子は転写され(それがDNAをベースとしたものである場合)および/もしくは翻訳されてそのアレイ上にin situでポリペプチドを産生する。

【0021】

あるアレイは適切な数であればメンバーの数はいかなる数も含むことができ、例えば10、100、もしくは500のメンバーを含むことができる。好ましくは本発明のアレイは少なくとも1000のメンバーを含み、 10^4 、 10^5 、 10^6 もしくはそれ以上のメンバーを含むことが有利である。

【0022】

本発明はさらに抗体分子のアレイを提供し、それは上述の固相支持体上にアレイさせることが有利である。好ましくは、その抗体アレイは 10^3 個以上の抗体分子を含んでいる高密度のアレイである。その抗体はIgGもしくはIgAなどの抗体の全体、Fv、scFv、Fab、および一価の抗体ドメインなどの抗体フラグメント、ならびにラマ(Llama)もしくはラクダ(Camelid)抗体などの天然の1本鎖抗体とすることができる。

【0023】

ジェネリックなりガンド ジェネリックなりガンドとは、所定のポリペプチドの

レパートリー中の機能的メンバーのかかなりの割合と結合するリガンドである。従って、この同一のジェネリックなりガンドがそのレパートリーの多数のメンバーとそれらのメンバーの標的リガンドの特異性と無関係に結合することができる(下記参照)。通常は、機能的なジェネリックなりガンド結合部位が存在することはそのレパートリーのメンバーが発現され正しく折り畳まれていることを示している。従ってジェネリックなりガンドの結合部位への結合を利用することによって、あるポリペプチドのレパートリーから機能的ポリペプチドをあらかじめ選択するための方法が得られる。標的分子もまたその標的分子の機能性を示すために用いることのできるジェネリックなりガンドを有していてもよい。

【0024】

相互作用 本発明の文脈においては、「相互作用」とはポリペプチドと標的分子間の何らかの検出可能な相互作用を意味する。例えば、scFvなどの抗体ポリペプチドの場合には相互作用とは結合性の相互作用で、標的ポリペプチドは抗原とすることができる。あるいはまた、相互作用は酵素的に触媒された反応とすることもでき、その反応ではポリペプチドは酵素で標的分子はその酵素の基質とすることができる。しばしば、酵素もしくは細胞シグナル伝達に参与する分子などのポリペプチドの結合には、結合事象と測定可能な生化学的活性、例えばキナーゼ活性またはホスファターゼ活性における変化が含まれる。そのような活性は当業界で公知の標準的なアッセイ方法を用いて測定することができる。

【0025】

並置 本発明の文脈においては、「並置」には限定はされないが物理的接触が含まれる。レパートリーと標的分子は、アレイ上で発現したポリペプチドが支持体上の標的分子と相互作用できるように、そのレパートリーの各々個々のメンバーと標的分子との相互作用部位が列上の位置と相関しうるような様式で並置される。好ましい1態様においては、標的分子を固定化させてある支持体は、ポリペプチドのレパートリーをコードする核酸がアレイされている支持体と接触するように置かれる。

【0026】

ポリペプチド 「ポリペプチド」という用語は、ペプチド、ヒトタンパク質、ヒ

トタンパク質の断片、もしくはヒト以外の供給源に由来するタンパク質もしくはタンパク質の断片、操作された形のタンパク質もしくはタンパク質の断片、酵素、抗原、薬剤、受容体分子などの細胞シグナル伝達に関与する分子、抗体ポリペプチドもしくはT細胞受容体ポリペプチドなどの免疫グロブリンスーパーファミリーのポリペプチドを含む抗体などの、いかなる種類のポリペプチドをも意味する。本発明ではそのような「ポリペプチド」は全て標的分子と相互作用することができ(もしくはできる可能性があり)、その標的分子とは結合による相互作用の場合には標的リガンドとなるであろう。

【0027】

抗体ポリペプチドは、有利には重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)ポリペプチドの双方を含むか、もしくは重鎖(V_H)もしくは軽鎖(V_L)のいずれかのポリペプチドを含んでいる単ドメイン抗体レパートリーを含むことができる。本明細書で用いている抗体ポリペプチドは、改変された、もしくは改変されていない抗体、または抗体の一部であるポリペプチドである。従って、抗体ポリペプチドという用語には、重鎖、軽鎖、重鎖-軽鎖二量体、Fabフラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、重鎖単ドメイン、軽鎖単ドメイン、Dabフラグメント、または1本鎖Fv(scFv)を含むFvフラグメントが含まれる。このような抗体分子およびそれらをコードする核酸の構築方法は当業界では周知である。

【0028】

レパートリー 「レパートリー」とは、例えばヌクレオチド配列が異なる核酸変異体、またはアミノ酸配列が異なるポリペプチド変異体などの多様な変異体の集団である。通常は、あるレパートリーには非常に多数の変異体が含まれ、その数は時には 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} もしくはそれ以上となる。大規模なレパートリーは生じうる変異体を最大限の数、選択のために含んでいる。より小規模なレパートリーを構築することができ、それは特に望ましくないメンバー、例えば停止コドンを含んでいるもの、正しい折り畳みのできないもの、もしくは他の点で不活性なものなどを除去するためにあらかじめ選択する場合には非常に有用である。そのようなより小規模のレパートリーは 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、もしくはそれ以上の核酸もしくはポリペプチドを含むものとすることができる。より小規模

なレパートリーは、 10^2 から 10^5 個の間の核酸もしくはポリペプチドを含んでいることが有利である。本発明では、ヌクレオチドのレパートリーは対応するポリペプチドのレパートリーをコードするように設計されることが好ましい。

【0029】

サブセット 「サブセット」はレパートリーの一部である。本発明に関しては、レパートリーのあるサブセットのみが標的分子と相互作用することができ、従ってレパートリーのあるサブセットのみがアレイ上で検出可能な相互作用を生ずることとなるだろう。例えば、標的分子がある抗体に対する特異的なリガンドである場合には、その標的リガンドに結合することのできる、抗体のサブセットが分離される。

【0030】

標的分子 標的分子はそのレパートリーの1つ以上のメンバーとの相互作用が探索される分子である。従って「標的分子」という用語には、抗原、抗体、酵素、酵素の基質、脂質、いずれの細胞もしくは細胞内器官の中もしくは表面上に発現されるいずれの分子、いずれの有機もしくは無機小分子、およびそのポリペプチドレパートリーのメンバーと相互作用しうるその他のいかなる分子が含まれる。標的分子はそれ自体がポリペプチドであってもよく、その場合にはレパートリーと標的が双方ともポリペプチドとなる。そのような場合にはレパートリーが抗原もしくは酵素の基質のレパートリーであることができ、そのレパートリーが1つ以上の抗体もしくは酵素分子に対してスクリーニングされる、またはその逆である。相互作用が結合による相互作用である場合には、標的分子は標的リガンドとすることができる(下記参照)。

【0031】

標的リガンド 標的リガンドは、特異的結合活性を有するポリペプチドレパートリーのメンバーが同定されることとなる分子である。そのポリペプチドレパートリーのメンバーが抗体分子である場合には、標的リガンドは抗原とすることができ、レパートリーのメンバーが酵素である場合には、標的リガンドは基質とすることができる。ポリペプチドレパートリーのメンバーがcDNAが発現されたものである場合には、標的リガンドはそれ自体を抗体もしくは何らかのその他のポリペ

プチド分子とすることができる。

【0032】

ポリペプチドレパートリーをコードする核酸の構築

一般的には、本発明のポリペプチドのレパートリーをコードする核酸ライブラリーは、ファージディスプレイのライブラリーを構築するために用いられる方法と類似の方法を用いて構築することができる。そのような方法は当業界では周知である(McCaffertyら, (1990) Nature, 348:552; Kangら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:4363; Clacksonら, (1991) Nature, 352:624; Lowmanら, (1991) Biochemistry, 30:10832; Burtonら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:10134; Hoogenboomら, (1991) Nucleic Acids Res., 19:4133; Changら, (1991) J. Immunol., 147:3610; Breitlingら, (1991) Gene, 104:147; Marksら, (1991) 前掲; Barbasら, (1992) 前掲; HawkinsとWinter, (1992) J. Immunol., 22:867; Marksら, (1992) J. Biol. Chem., 267:16007; Lernerら, (1992) Science, 258:1313, これらは本明細書に参照により組み入れることとする)。

【0033】

特に有利な1アプローチはscFvファージライブラリーの構築である(Hustonら, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5883; Chaudharyら, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:1066-1070; McCaffertyら, (1990) 前掲; Clacksonら, (1991) 前掲; Marksら, (1991) 前掲; Chiswellら, (1992) Trends Biotech., 10:80; Marksら, (1992) 前掲)。

【0034】

本発明のライブラリーは、有利にはあらかじめ規定された主鎖のコンホメーションに基づいて設計することができる。そのようなライブラリーは国際特許出願W0 99/20749に記載されているように構築することができ、この出願の内容は本明細書に参照により組み入れることとする。

【0035】

しかし、ファージディスプレイに用いられるアプローチとは異なり、本発明の核酸のライブラリーは、ファージのコートタンパク質遺伝子との融合体として構

築されるものではなく、また、必ずしもバクテリオファージベクター中に構築されない。ファージもしくはファージミドベクターが用いられる場合には、ポリペプチドはコートタンパク質に融合されずにそれから分離されていることが有利である。例えば、停止コドンを配列中に導入してそのポリペプチドが融合体として発現されないことを確実にすることができる。その点で、組換えポリペプチドを発現することができるいかなるベクターも好適である。そのポリペプチドは宿主細胞から分泌されることが有利である。

【0036】

一般的には、本発明の実施に必要な核酸分子とベクター構築物は当業界では入手可能であり、標準的な実験室マニュアル、例えばSambrookら、(1989)「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor, USAなどに示されている方法で構築および操作することができる。

【0037】

本発明の核酸の操作は典型的には組換えベクターで行われる。本明細書で用いているベクターとは、異種DNAを細胞中に発現および/もしくは複製のために導入するために用いられる独立のエLEMENTを意味する。そのようなベクターを選択もしくは構築し、次いでそれを用いるための方法は当業者には周知である。非常に多数のベクターが一般に入手可能であり、そのようなものとしては細菌プラスミド、バクテリオファージ、人工染色体、およびエピソームベクターが含まれる。そのようなベクターは単純クローニングおよび突然変異誘発に用いることができる：あるいはまた、本発明のレパトリのメンバー(もしくはプレレパトリのメンバー)を中に有しているベクターに典型的に見られるとおり、遺伝子発現ベクターが用いられる。本発明で使用するベクターは、所望のサイズ、典型的には0.25キロベース(kb)～40kbの長さのポリペプチドコード配列を収めるために選択することができる。適切な宿主細胞が、in vitroのクローニング操作後そのベクターを用いて形質転換される。各ベクターは種々の機能的コンポーネントを含んでおり、それは通常はクローニング(もしくはポリリンカー)部位、複製起点、および少なくとも1つの選択マーカー遺伝子を含んでいる。所定のベクター

が発現ベクターである場合には、そのベクターは次のものの1つ以上をさらに有している：エンハンサーエレメント、プロモーター、転写終結およびシグナル配列。各々は、それらが本発明のポリペプチドレパートリーのメンバーをコードする遺伝子に機能しうる形で連結されることとなるようにクローニング部位の近傍に位置している。

【0038】

クローニングベクターおよび発現ベクターは双方とも通常はそのベクターが1種以上の選択した宿主細胞中で複製できるような核酸配列を含んでいる。典型的には、クローニングベクター中では、この配列はそのベクターが宿主の染色体DNAとは独立に複製することを可能とするもので、複製起点、もしくは自己複製配列が含まれる。そのような配列は種々の細菌、酵母、およびウイルスで周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は大多数のグラム陰性細菌に適したもので、2ミクロンプラスミドの複製起点は酵母に適しており、種々のウイルスの複製起点(たとえば、SV40、アデノウイルス)は哺乳動物細胞でのクローニングベクターに有用である。通常は哺乳動物の発現ベクターには、そのベクターをCOS細胞などの高レベルのDNAを複製することのできる哺乳動物細胞中で用いるのでない限りは複製起点は必要ではない。

【0039】

クローニングベクターもしくは発現ベクターは、有利には選択遺伝子(これは選択マーカーとも呼ばれる)を含むことができる。この遺伝子は選択培地中で増殖させる形質転換された宿主細胞の生存もしくは増殖に必要なタンパク質をコードする。従って、選択遺伝子を含有するベクターで形質転換がなされていない宿主細胞はその培地中で生存できないだろう。典型的な選択遺伝子は、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンなどの抗生物質およびその他の毒素に対する耐性を付与するか、栄養要求性欠損を補足するか、または増殖培地からは得ることのできない不可欠な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0040】

本発明のベクターの複製は大腸菌(*E.coli*)中で最も都合よく行われるので、大

腸菌の選択マーカー、例えば抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与する β -ラクタマーゼ遺伝子が有用である。それらは大腸菌プラスミド、例えばpBR322、またはpUC18もしくはpUC19などのpUCプラスミドから得ることができる。

【0041】

発現ベクターは通常は宿主生物に認識され、対象のコード配列に機能しうる形で連結されたプロモーターを含んでいる。そのようなプロモーターは誘導性のももしくは構成性のものであることができる。「機能しうる形で連結された」という用語は、記載されたコンポーネントがそれらの意図された様式で機能することができるような関係を取る並置を意味する。あるコード配列に「機能しうる形で連結された」制御配列は、そのコード配列の発現がその制御配列と適合した条件下で成し遂げられるように連結される。

【0042】

原核生物宿主で用いるのに適したプロモーターは、例えば β -ラクタマーゼとラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが挙げられる。また細菌系で用いられるプロモーターは、通常はコード配列に機能しうる形で連結されたシャイン・ダルガーノ配列を含んでいるだろう。

【0043】

本発明の核酸分子のライブラリーでは、好ましいベクターはポリペプチドレパートリーのメンバーをコードする核酸配列の発現を可能とする発現ベクターである。本発明のベクターの構築には従来の連結技法を用いる。単離したベクターもしくはDNA断片を切断し、目的に合わせて作り変え、必要とするベクターを生成するために望ましい形態に再連結する。所望により、その構築されたベクター中に正しい配列が存在することを確認するための分析は既知の様式で行うことができる。発現ベクターを構築し、in vitroで転写産物を調製し、宿主細胞中にDNAを導入し、発現と機能を評価するための分析を行うための好適な方法は当業者には公知である。サザンもしくはノーザン分析法、ウエスタンブロッティング、DNA、RNA、もしくはタンパク質のドットブロッティング、in situハイブリダイゼーション、免疫細胞化学的方法、または、核酸分子もしくはタンパク質分子の配

列決定分析などの従来法によって、あるサンプル中のある遺伝子配列の存在が検出されるか、またはその遺伝子配列の増幅および/もしくは発現が定量される。当業者であれば、これらの方法を所望により改変する方法は容易に考えうるであろう。

【0044】

ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を用いた突然変異誘発

いったんベクター系が選択され、ポリペプチドレパートリーのメンバーをコードする1つ以上の核酸配列がベクター中にクローニングされれば、発現に先だって突然変異誘発を行うことによって、そのクローニングされた分子内に多様性を与えることができる。ポリペプチドレパートリーをコードする核酸配列の突然変異誘発は、標準的な分子的方法で行われる。特に有用なのはポリメラーゼ連鎖反応、すなわちPCRである(MullisおよびFaloona(1987) Methods Enzymol., 155:335、これは本明細書に参照により組み入れることとする)。PCRは熱安定性のDNA依存性DNAポリメラーゼによって触媒されるDNA複製の多数回のサイクルを用いて対象の標的配列を増幅するもので、当業界では周知である。

【0045】

本発明で有用なオリゴヌクレオチドプライマーは、1本鎖のDNAもしくはRNA分子で、核酸鋳型とハイブリダイズして第2の核酸の鎖の酵素的合成をプライミングさせるものである。プライマーは本発明のアレイのセットの調製に用いられる核酸分子のプール中に存在する標的分子の一部に対して相補的である。そのような分子が化学的もしくは酵素的に合成方法によって調製されることは意図されている。あるいはまた、そのような分子もしくはその断片は天然のものであり、その天然の供給源から単離されるかまたは商業的供給者から購入したものである。突然変異誘発性オリゴヌクレオチドプライマーは、長さが15～100個のヌクレオチドで、異なる長さのオリゴヌクレオチドも有用ではあるが、理想的には20～40個のヌクレオチドである。

【0046】

典型的には、2つの核酸配列が実質的に相補的である(少なくとも14～25個のヌクレオチドの一続きにわたって少なくとも約65%相補的であり、好ましくは少な

くとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%相補的なことである)場合に選択的ハイブリダイゼーションが起こる。Kanehisa (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12:203を参照されたいが、これは本明細書に参照により組み入れることとする。この結果として、プライミング部位でのある程度のミスマッチが許容されるものと考えられる。そのようなミスマッチはおそらく小さなもので、モノ、ジ、もしくはトリヌクレオチドの大きさであろう。あるいはまた、ミスマッチはヌクレオチドのループを含む場合があり、それを本発明者らはミスマッチが4個以上のヌクレオチドが連続した一連を包含する領域と定義する。

【0047】

全体として、プライマーと第2の核酸分子とのハイブリダイゼーションの効率と選択性に影響を及ぼす5つの要素がある。それらの要素とは、(i)プライマーの長さ、(ii)ヌクレオチド配列および/もしくは組成、(iii)ハイブリダイゼーション温度、(iv)バッファの化学的特性、および(v)プライマーがハイブリダイズするために必要な領域における立体障害の可能性であるが、これらはランダムでないプライミング配列を設計する際には重要な検討項目である。

【0048】

プライマーの長さとプライマーが標的配列とアニーリングする効率および正確性の双方との間には正の相関がある；配列がより長くなれば、短いものより融解温度(T_m)が高くなり、その長い配列が所定の標的配列中で繰り返して存在する可能性は低くなるが、そのことによって乱雑なハイブリダイゼーションを最小限とする。G-C含量の高いプライマー配列、もしくはパリンドロームの配列を含んでいるプライマー配列はそれが意図された標的部位とハイブリダイズするのと同様に自己ハイブリダイズする傾向があるが、それは2分子性のものよりも単分子性のハイブリダイゼーションは反応速度論的に見て溶液中では通常起こりやすいためである；同時に、標的配列に強固に結合するためにはG-Cヌクレオチド対の数が十分含まれているプライマーを設計することが重要であるが、それはそのような対の各々が、AとTの塩基対の場合に見られる2個ではなく、3個の水素結合で結合するためである。ハイブリダイゼーションの温度の変動はプライマーのアニーリング効率に反比例するが、それはハイブリダイゼーション混合物中に含まれう

る有機溶媒、例えばホルムアミドの濃度についても同様であるが、一方、塩濃度が高くなれば結合しやすくなる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では、より長いプローブは短いもの(それはより許容性のある条件下では十分なものではある)よりも効率的にハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては典型的には、塩濃度が約1M未満、より通常には約500mM未満、好ましくは約200mM未満であることが挙げられる。ハイブリダイゼーション温度は、0°Cから22°Cを超え、約30°Cを超え、(最も多くの場合)約37°Cを超えた範囲である。断片の長さが長ければ長いほど特異的ハイブリダイゼーションにはより高いハイブリダイゼーション温度が必要となりうる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーにはいくつかの要素が影響を及ぼすので、そのうちのいずれか1つのみの絶対値よりも各パラメーターの組み合わせがより重要である。

【0049】

プライマーはこれらの考慮すべき事項を念頭に置いて設計される。当業者であれば非常に多数の配列の相対的な利点を頭で推測することができるであろうが、これらのいくつかのパラメーターの評価とプライマー配列の最適化を助けるためのコンピュータプログラムが設計されている。そのようなプログラムの例としては、DNASTM ソフトウェアパッケージの「PrimerSelect」(DNAS, Inc., Madison, WI)およびOLIGO 4.0(National Biosciences, Inc.)が挙げられる。いったん設計されれば、適切なオリゴヌクレオチドは、例えば、BeaucageおよびCaruthers (1981) Tetrahedron Lett., 22:1859に記載されたホスホロアミダイト法、もしくはMatteucciおよびCaruthers (1981) J. Am. Chem. Soc., 103:3185に従ったトリエステル法(この2つの文献は本明細書に参照により組み入れることとする)などの適切な方法によって、または市販の自動オリゴヌクレオチド合成器もしくはVLSIPSTM技法のいずれかを用いる他の化学的方法によって調製される。

【0050】

PCRは鋳型DNA(少なくとも1fg:1~1000ngがより有用)と少なくとも25ピコモルのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われる。プライマープールが非常に

不均質である場合には、各配列はそのプールの分子の小さな部分を表しているにすぎないので、より多量のプライマーを用いることが有利である場合があり、その量が後の増幅サイクルを限定することとなる。典型的な反応物中には、2 μ LのDNA、25ピコモルのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5 μ Lの10X PCRバッファー1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)、0.4 μ Lの1.25 μ M dNTP、0.15 μ L(もしくは2.5ユニット)のTaq DNA ポリメラーゼ(Perkin-Elmer, Foster City, CA)が含まれ、脱イオン水を加えて総容量を25 μ Lとする。鉱物油を重層し、プログラムできる熱サイクラーを用いてPCRを行う。

【0051】

PCRサイクルの各ステップの長さおよび温度ならびにサイクル数は、実際のストリンジェンシーの要求性に従って調整される。アニーリング温度とタイミングは、プライマーが鋳型とアニーリングする際に期待される効率、および許容するミスマッチの程度の双方によって決定される：明らかなことは、核酸分子が同時に増幅および突然変異誘発される場合には、ミスマッチが少なくとも第1ラウンドの合成の際には必要なことである。突然変異誘発性のプライマーの混合プールを用いて分子の集団の増幅を試みる際に、ストリンジェントな(高温)アニーリング条件下で、低い融解温度の時のみ得られる可能性のある変異体産物が失われることを、標的部位以外の配列に対するプライマーの雑然としたアニーリングと比較して評価する。プライマーのアニーリング条件のストリンジェンシーを最適化する能力は、当業者であればその知識の範囲内で十分行えることである。30 $^{\circ}$ C～72 $^{\circ}$ Cの間のアニーリング温度が用いられる。鋳型分子の初回の変性は通常は92 $^{\circ}$ C～99 $^{\circ}$ C、4分間で生じ、次いで変性(94～99 $^{\circ}$ Cで15秒間～1分間)、アニーリング(上記で論じたように決定した温度：1～2分間)、および伸長(72 $^{\circ}$ Cで1～5分間だが、増幅産物の長さに依存する)からなる20～40サイクルが行われる。最終伸長操作は通常は72 $^{\circ}$ Cで4分間で、その後不定の(0～24時間)のステップを4 $^{\circ}$ Cで行うことができる。

【0052】

核酸の発現

本発明のポリペプチドレパートリーをコードする核酸分子は当業界で公知の多

数の技法に従って発現させることができる。本明細書で用いている「発現」とは核酸からタンパク質への転写および/もしくは翻訳を意味する。

【0053】

核酸が、裸の核酸の形態でアレイされている場合、または細胞の環境外で複合体化された核酸の形態でアレイされている場合、その核酸を発現するためにin vitroの生物系のコンポーネントが必要である。これらのコンポーネントは特定の系の要求に沿って以下のものから選択される：適切なバッファー、必要な成分の全てを含んでいるin vitroの転写/複製系、および/もしくはin vitro翻訳系、酵素と補因子、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、核酸(天然もしくは合成の)、転移RNA、リボソームおよびアミノ酸、ならびに改変された遺伝子産物の選択ができるようにするための対象の反応の基質。

【0054】

適切なバッファーとは、その生物系の所望のコンポーネントの全てがそのバッファー中で活性な状態とするものであり、それ故に特定の反応系の各々の要求に依存するものとなろう。生物学的反応に適したバッファーは当業界では公知であり、その配合表は種々の実験室テキスト、例えばSambrookら、1989などに記されている。

【0055】

in vitroの翻訳系は通常は細胞抽出物、典型的には、細菌(Zubay, 1973; Zubay, 1980; Lesleyら, 1991; Lesley, 1995)、ウサギ網状赤血球(PelhamおよびJackson, 1976)、もしくはコムギ胚芽(Andersonら, 1983)から得たものを含んでいるだろう。適切な系の多くが市販されており(例えばPromegaから)、そのようなものとしては連結した転写/翻訳のできるもの(細菌系の全てならびにPromegaから市販されている網状赤血球およびコムギ胚芽TNT™抽出物系)が含まれる。用いられるアミノ酸の混合物は、所望によりライブラリー中に産生されるタンパク質の数もしくは多様性の可能性を増加させるために合成アミノ酸を含むことができる。このことはtRNAに人工のアミノ酸を負荷させ、そのようなtRNAを選択しようとしているタンパク質のin vitroでの翻訳に用いることによって行うことができる(Ellmanら, 1991; Benner, 1994; Mendelら, 1995)。

【0056】

核酸が細胞もしくは細胞のコロニーの形態中でアレイされている場合には、発現は細胞それ自体の内部で起こる。適切な宿主細胞は当業界では公知である。原核生物、酵母、および高等真核生物細胞などの宿主細胞を、DNAを複製してポリペプチドレパートリーを産生するために用いることができる。適切な原核生物としては、グラム陰性もしくはグラム陽性生物、例えば大腸菌K-12株、DH5αおよびHB101などの大腸菌、または桿菌などの真正細菌が挙げられる。さらにポリペプチドレパートリーをコードするベクターに適した宿主としては、真核生物の微生物、例えば糸状菌、もしくは例えばサッカロミセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの酵母が挙げられる。高等真核細胞としては、昆虫および脊椎動物の細胞、特にヒトの細胞を含む哺乳動物細胞、またはその他の多細胞生物から得た有核細胞が挙げられる。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は日常的な方法である。有用な哺乳動物宿主細胞系の例としては、上皮細胞もしくは線維芽細胞系、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NIH 3T3細胞、HeLa細胞、もしくは293T細胞などが挙げられる。本開示では宿主細胞とは*in vitro*の培養物中の細胞ならびに宿主動物の体内にある細胞を含んでいる。

【0057】

DNAは当業界で公知の方法を用いて細胞中に安定的に組み込むことができ、または一過性に発現させることができる。安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞は、選択マーカー遺伝子を有する発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクトし、そのトランスフェクトされた細胞をそのマーカー遺伝子を発現する細胞に対する選択的な条件下で増殖させることによって調製することができる。一過性のトランスフェクタントを調製するためには、トランスフェクションの効率をモニターするためのリポーター遺伝子を用いて哺乳動物細胞をトランスフェクトする。

【0058】

このような安定的にもしくは一過性にトランスフェクトされた細胞を産生させるためには、細胞を十分な量の核酸を用いてトランスフェクトしなければならない。必要とされるポリペプチドレパートリーのメンバーをコードするDNAの正確

な量は経験的に決定することができ、特定の細胞およびアッセイに対して最適化することができる。

【0059】

宿主細胞は上述の本発明の発現ベクターもしくはクローニングベクターでトランスフェクトもしくは形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適切に改変された従来の栄養培地中で培養する。当業界で公知のいずれの方法、例えば異種DNAをコードするベクターを用いたリン酸カルシウム共沈法もしくはエレクトロポレーション法によるトランスフェクションによって異種DNAを宿主細胞中に導入することができる。非常に多数のトランスフェクション法が当業者には知られている。通常は宿主細胞内でこのベクターが機能していることを示すいずれのものが見られたときにトランスフェクションの成功は認識される。形質転換は用いている特定の宿主細胞に対して適切な標準的な技法を用いて行われる。

【0060】

クローニングされたDNAの適切な発現ベクター中への組み込み、プラスミドベクター、もしくは組み合わせの各々が1種以上の個別の遺伝子をコードしているプラスミドベクターの組み合わせ、または直鎖状DNAを用いる真核細胞のトランスフェクション、およびトランスフェクトされた細胞の選択の方法は当業界では周知である(例えば、Sambrookら、(1989)「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照せよ)。

【0061】

トランスフェクトされた、もしくは形質転換された細胞は当業界で公知の培地および培養方法を用いて培養することができるが、好ましくは該核酸分子によってコードされるポリペプチドレパートリーが発現される条件下で培養される。適切な培地の組成は当業者には知られており、容易に調製することができる。また適切な培地は市販されている。

【0062】

核酸のアレイ配列

本発明によれば、核酸は核酸としてアレイさせるかまたは細胞中に含有させるかに依るが、様々な方法のいずれによりアレイさせてもよい。

【0063】

(a) 核酸アレイの合成

核酸アレイは、核酸分子の直接化学合成により調製することができる。化学合成では、それぞれ異なる核酸（例えばユニークな核酸配列）をアレイ内の区切られて予め規定された位置に配置するやり方で、ある表面上に核酸のアレイを合成する。それぞれの核酸の同一性は、アレイ内のその空間位置により決定される。これらの方法は、米国特許第5,143,854号；W090/15070およびW092/10092；Fodorら（1991）Science, 251:767；DowerおよびFodor（1991）Ann. Rep. Med. Chem., 26:271に記載の方法を適用することができる。

【0064】

(b) 細胞のアレイ

本発明の好ましい態様においては、核酸のアレイは細胞をアレイさせて調製することができる。細胞を単純に細菌増殖培地上に置かれたフィルター上にまいて増殖するとよいが、ロボット技術を使うと細胞コロニーの最も精密でかつ高密度の格子配置が可能になるので、ロボット・ピッキング（robotic picking）により細胞をアレイさせるのが有利である；しかし、マニュアルの技術を含め、細胞または細胞コロニーを支持体上の区切られた位置に配置するいずれの適当な技術を利用してよい。

【0065】

細胞の格子配置は、規則的で、例えば各コロニーは次のコロニーから所与の距離にあってもよいしまたは無作為であってもよい。もしコロニーを無作為に配置するのであれば、選んだ支持体上でコロニーがオーバーラップする確率を統計的に減少させるかまたは無くするようにその密度を調節してもよい。

【0066】

細胞コロニーをアレイさせる方法は米国特許第5,326,691号に詳細に記載されており、この特許の内容は本明細書に参照により組み入れられる。

【0067】

(c) 抗体のアレイ

抗体は、ロボット・グリidding (robotic gridding) により当業界で通常利用しうる市販技術を使ってアレイさせるか、または例えば上記のようにアレイさせた抗体産生細胞アレイからin situで発現させてもよい。ロボット・アレイング (robotic arraying) は当業界で周知であり、その機械はGenetix、Genetic MicroSystemsおよびBioRoboticsなどの会社から市販されており、高速度かつ高精度で狭いまたは広い表面全体にアレイさせることができる。そのような機械は、精製タンパク質、上清または細胞を多孔質または非多孔質表面上にスポットし、もし安定したアレイを作る必要があれば、次いでそれらをそこに固定することができる。アレイは、もし必要があれば、複製することができ、複数の標的リガンドを用いる同時スクリーニングが可能になる。細胞に基づくアレイを溶解してポリペプチドをin situで放出させてもよいし、および／または発現したポリペプチドを固体支持体に公知の方法により固定してもよい。

【0068】

標的分子に結合されたポリペプチドの選択

以上説明したように、標的分子はポリペプチドレパートリーのメンバーと特異的相互作用をする能力があるか、またはジェネリック相互作用をする能力がある。特異的相互作用をする能力のある標的分子は、レパートリーから選択されるべき所望の活性を有するポリペプチドとだけ相互作用する能力がある。そのような標的分子は、抗体に対する特異的抗原、または酵素に対する基質が挙げられる。ジェネリック相互作用をする能力のある標的分子は一般的に、所望の特性をもつよりいくらか大きなレパートリーのサブセット、例えば正確にフォールドされているかそうでなければ理論的に機能する能力のある機能性メンバーと相互作用しうる。特に抗体ポリペプチドに対する特異的およびジェネリックリガンドの利用は、国際特許出願W099/20749に詳細に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0069】

抗体ポリペプチドが標的分子と一旦結合すると、それらは使用された標的分子の性質によって様々なジェネリックリガンドを用いて検出することができる。従

って、もし標的分子が抗原であれば、レパートリーの特異的結合メンバーの検出に標識したプロテインLを使ってもよいし、あるいはもし標的分子がプロテインLであれば、レパートリーの機能性メンバーの検出に標識したプロテインAを使ってもよい。

【0070】

ジェネリックリガンドは、プロテインAまたはプロテインLのようなスーパー抗原、または適当な抗体分子の形態をとってもよい。もし適当な抗体が公けに利用できなければ、ファージディスプレイ手法によりまたは次のように作ることができる。

【0071】

組換えタンパク質または天然供給源由来のタンパク質を使い、当業界で周知の標準技術を利用して抗体を作製することができる。例えば、タンパク質（または「免疫原」）を、サル、ヤギ、ウサギまたはマウスなどの哺乳類に投与してチャレンジする。得られる抗体をポリクローナル血清として回収してもよいし、またはチャレンジ動物からの抗体産生細胞を不死化して（例えば、不死化融合パートナーとの融合によりハイブリドーマを作って）、それらの細胞がその後モノクローナル抗体を産生するようにしてもよい。

【0072】

a. ポリクローナル抗体

抗原タンパク質を単独でまたはその免疫原性を増加するために通常の担体とコンジュゲートして使用し、ペプチド-担体コンジュゲートに対する抗血清を上記のように動物に産生させる。ペプチドと担体タンパク質のカップリングおよび免疫感作は記載されたように実施することができる（Dymeckiら, (1992) J Biol. Chem. 267:4815）。血清はタンパク質抗原に対してELISAによりまたは代わりにドットもしくはスポットブロッキングにより滴定する（BoersmaおよびVan Leeuwen (1994) J. Neurosci. Methods, 51:317）。血清が適当なペプチドと強く反応することはELISAにより、例えばGreenら, (1982) Cell. 28:477の方法によって示されている。

【0073】

b. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を調製する技術は周知であり、モノクローナル抗体は好ましくは担体と結合した任意の候補抗原を用いて、Arnheiterら, (1981) Nature, 294,278に記載のように調製することができる。モノクローナル抗体は典型的には、ハイブリドーマ組織培養からまたはハイブリドーマ組織を導入した動物から得た腹水液から取得される。それでも、モノクローナル抗体はあるタンパク質「に対して産生された」または「より誘導された」と記載することができる。

【0074】

産生された後、モノクローナル抗体は複数の手法のいずれかによって機能と特異性について試験する。ファージディスプレイまたは他のin vitro選択技術により作られた組換え抗体を試験するのと同様な方法も使うことができる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ（またはポリクローナル血清）を免疫原と結合する抗体についてスクリーニングすることもできる。特に好ましい免疫学的試験は、酵素結合イムノアッセイ (ELISA)、免疫ブロットおよび免疫沈降 (Voller, (1978) Diagnostic Horizons. 2:1, Microbiological Associates Quarterly Publication. Walkersville, MD; Vollerら, (1978), J. Clin. Pathol., 31:507; 米国再発行特許第31,006号; 英国特許第2,019,408号; Butler (1981) Methods Enzymol., 73:482; Maggio. E.(編), (1980) 「酵素イムノアッセイ (Enzyme Immunoassay)」, CRC Press, Boca Raton, FLを参照)、またはラジオイムノアッセイ (RIA) (Weintraub, B., 「ラジオイムノアッセイの原理、放射性リガンドアッセイ技術に関する第7回訓練コース (Principles of radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques)」, The Endocrine Society, March 1986, pp. 1-5, 46-49および68-78) が挙げられ、全て、抗体とその抗体を産生させた免疫原との結合を検出する試験である。当業者であれば、抗体分子または免疫原はその検出を容易にするために標識しなければならないことは明白であろう。抗体分子を標識するための技術は当業者には周知である (Harlour and Lane (1989), 「抗体 (antibodies)」, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.1-726を参照)。

【0075】

あるいは、他の技術を利用して免疫原との結合を検出し、それにより抗体の純度を確認することもできる。これらの技術は、SDS PAGE、等電点電気泳動、ウェスタンブロット、HPLCおよびキャピラリー電気泳動が挙げられる。

【0076】

「抗体」は本明細書では、そのような抗体およびその他の改変抗体の結合領域（可変部）を利用する構築物として定義される。従って、本発明に利用しうる抗体は、全抗体、抗体フラグメント、多機能性抗体集合体、または一般的に抗体由来の1以上の特異的結合部位を含んでなるいずれの物質であってもよい。抗体フラグメントはフラグメント、例えばFv、FabおよびF(ab')₂フラグメント、またはそれらのいずれかの誘導体、例えば一本鎖Fvフラグメントであってもよい。抗体または抗体フラグメントは非組換え体、組換え体またはヒト化抗体であってもよい。抗体はいずれの免疫グロブリンアイソタイプ、例えばIgG、IgMなどであってもよい。さらに、適当な場合には、免疫グロブリンまたはそれらのフラグメントの集合体、ポリマー、誘導体およびコンジュゲートを使ってもよい。

【0077】

結合された免疫グロブリンを検出するためのプローブは、ジェネリックリガンドであるか特異的抗原であるかを問わず、当業界で周知の技術によって標識することができる。プローブを標識する方法は、例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989)「分子クローニング、実験マニュアル (Molecular Cloning. A Laboratory Manual)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.)、またはAusubelら編、(1990)「分子生物学の現行プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley & Sons Inc.に記述されている。

【0078】

本発明により選択されたポリペプチドの利用

本発明の方法によって選択されたポリペプチドは実質的にいずれのプロセスにおいて使用することもできる。ポリペプチドが抗体ポリペプチドである場合、これらをリガンド-ポリペプチド結合に関わるいずれの方法に使用してもよく、in vivo治療および予防の応用、in vitroおよびin vivo診断の応用、in vitroアッ

セイおよび試薬の応用、その他が挙げられる。例えば、抗体の場合、抗体分子を、当業者が周知する方法によってELISA技術などの抗体に基づくアッセイ技術に利用してもよい。

【0079】

以上言及したように、本発明により選択された分子は診断、予防および治療方法において利用しうる。例えば、酵素変異体を作製し本発明の方法により選択し、当業界で周知の技術を使ってin vitroもしくはin vivoで活性について検定してもよく、その場合、それらを候補基質分子とともにインキュベートして基質の産物への転化を分析する。選択された細胞表面受容体もしくは接着分子を培養細胞中に発現させ、次に、それらの生化学的刺激に対する応答能力についてまたは未多様化接着分子が結合すると予想される細胞表面分子を発現する他の細胞型との親和性について、それぞれ試験してもよい。本発明により選択される抗体は診断としてウェスタン分析におよび標準免疫組織化学的方法によるin situタンパク質検出に利用され；これらの応用に使用するに当たって、選択されたレポーターの抗体を当業界で周知の技術によって標識してもよい。さらに、そのような抗体ポリペプチドは、樹脂などのクロマトグラフィー支持体と複合化して分取用のアフィニティクロマトグラフィーに利用してもよい。これらの技術は全て当業者には周知である。

【0080】

本発明により調製されたタンパク質の治療および予防の利用は、本発明により選択されたポリペプチドのヒトなどの受給哺乳類動物への投与に関わる。これに関して特に使われるのは、抗体、他の受容体（限定されるものでないが、T細胞受容体を含む）および、抗体または受容体をジェネリックまたは標的リガンドとして使う場合は、それらと結合するタンパク質である。

【0081】

哺乳類動物への投与については、少なくとも90～95%の均質性の実質的に純粋な抗体またはそれらの結合タンパク質が好ましく、製薬用途については、特に哺乳類動物がヒトであるとき、98～99%以上の均質性が最も好ましい。部分的にまたは所望の均質性に精製されれば、選択されたポリペプチドを診断にまたは治療

に（体外を含めて）またはアッセイ手順、免疫蛍光染色などを開発しかつ実施するのに利用することができる（LefkoviteおよびPernis. (1979および1981) 「免疫学的方法（Immunological Methods）」, Volumes IおよびII. Academic Press . NY）。

【0082】

本発明の選択された抗体またはそれらの結合タンパク質は、典型的には、炎症症状、アレルギー過敏症、癌、細菌もしくはウイルス感染および自己免疫傷害（限定されるものでないが、I型糖尿病、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病および重症筋無力症が挙げられる）を予防し、抑制または治療するのに用途を見出さうる。

【0083】

本特許出願において、用語「予防」は、疾患の誘導に先行した保護組成物の投与に関わる。「抑制」は疾患の誘導事象後であるが臨床外観に先行した組成物の投与を意味する。「治療」は疾患症候が明白になった後の保護組成物の投与に関わる。

【0084】

疾患に対する保護または疾患の治療における抗体またはその結合タンパク質の有効性をスクリーニングするために使う動物モデル系を利用できる。感受性マウスにおける全身性エリテマトーデス（SLE）の試験方法は当業界で周知である（Knightら, (1978) J. Exp. Med., 147:1653; Reinerstenら, (1978) New Eng. J. Med., 299:515）。重症筋無力症（MG）はSJL/J雌マウスにおいて他の種由来の可溶性AChRタンパク質を用いて疾患を誘導することによって試験される（Lindstromら, (1988) Adv. Immunol., 42:233）。関節炎はマウスの感受性株においてI型コラーゲンの注射により誘導される（Stuartら, (1984) Ann. Rev. Immunol., 42:233）。アジュバント関節炎は感受性ラットにおいて放線菌熱ショックタンパク質の注射によって誘導されたモデルが記載されている（Van Edenら, (1988) Nature, 331:171）。甲状腺炎は記載されたようにマウスにおいてチログロブリンの投与によって誘導される（Maronら, (1980) J. Exp. Med. 152:1115）。インスリン依存性糖尿病（IDDM）は自然に生じるかまたはKanasawaら, (1984) Dia

betologia, 27:113に記載されたマウスのある特定の株において誘導し得る。マウスおよびラットのEAEはヒトのMSに対するモデルの役割を果たす。このモデルにおいては、脱髄性疾患がミエリン塩基性タンパク質の投与により誘導される (Paterson (1986) 「免疫病理学教科書 (Textbook of Immunopathology)」, Mischerら編, GruneおよびStratton. New York, pp.179-213; McFarlinら, (1973) Science. 179:478; およびSatohら, (1987) J. Immunol., 138:179を参照)。

【0085】

本発明の選択された抗体、受容体 (限定されるものでないがT細胞受容体を含む) またはそれらの結合タンパク質はまた、疾患の原因となるヒト細胞上の他のマーカーと反応性のある他の抗体、特にモノクローナル抗体 (MAb) と組合せて使ってもよい。例えば、適当なT細胞マーカーは、第1国際白血球分化作業会 (Bernhardら, (1984) 「白血球分類 (Leukocyte Typing)」, Springer Verlag. NY) により名付けられたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」に分類されたマーカーが挙げられる。

【0086】

一般的に、本発明で選択された抗体、受容体または結合タンパク質は、精製された形態で薬理学的に適当な担体と一緒に利用し得る。典型的には、これらの担体として、塩類および／または緩衝化媒質などを含む水溶液もしくはアルコール／水溶液、乳化液または懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとして、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖入りリンゲル液、ブドウ糖および塩化ナトリウム入りリンゲル液ならびに乳酸加リンゲル液が挙げられる。もしポリペプチド複合体を懸濁液で保持する必要がある場合は、生理学的に許容される適当なアジュバントを、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリジン、ゼラチンおよびアルギン酸塩などの濃厚剤から選択してもよい。

【0087】

静脈内ビヒクルとして、ブドウ糖入りリンゲル液に基づく液および栄養補充剤および電解質補充剤が挙げられる。抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤が存在してもよい (Mack (1982) 「レミントンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」, 第16版)。

【0088】

本発明の選択されたポリペプチドは、分離して投与する組成物としてまたは他の薬剤と一緒に使用することができる。これらには、シクロスポリン、メトトレキセート、アドリマイシンまたはシスプラチン、および免疫毒素などの様々な免疫治療薬が含まれる。製薬組成物は、本発明の選択された抗体、受容体もしくはそれらの結合タンパク質と一緒に、または異なる標的リガンドを使って選択したポリペプチドなどの異なる特異性を有する本発明により選択されたポリペプチドの組合せとすら一緒に、様々な細胞傷害性または他の薬剤の「カクテル」を含んでなくてもよく、それらが投与前にプールされてもまたはされなくてもよい。

【0089】

本発明による製薬組成物の投与経路は当業者に知られたいずれであってもよい。限定されるものでないが免疫治療を含む治療のために、本発明の選択された抗体、受容体またはその結合タンパク質を、いずれの患者に標準技術によって投与してもよい。投与は適当ないずれの方式によってもよく、非経口、静脈内、筋内、腹腔内、経皮、肺経路経由、または適当であればカテーテルを用いる直接注入が挙げられる。投与の用量と頻度は、患者の年齢、性および症状、他の薬物の併用投与、反対症状および臨床医が考慮に入れるべき他のパラメーターに依存する。

【0090】

本発明の選択されたポリペプチドを保存するために凍結乾燥し、使用に先立って適当な担体中で再構成してもよい。この技術は通常の免疫グロブリンについて効果的であることが示されており、当業界で知られる凍結乾燥および再構築技術を利用することができる。当業者であれば、凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性損失（例えば、通常の免疫グロブリンについては、IgM抗体はIgG抗体より大きな活性損失を伴いがちである）をもたらすので、補償するために使用レベルを上方調節すべきであることを理解するであろう。

【0091】

本発明の選択されたポリペプチドまたはそれらのカクテルを含有する組成物は

予防および／または治療処置用に投与することができる。ある特定の治療応用における、選択された細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、死滅、または複数の他の測定可能なパラメーターを達成するための十分な量を「治療上有効な用量」として定義する。この用量を達成するために必要な量は、疾患の重篤度および患者自身の免疫系の総合的状态に依存するが、一般的に体重1キログラム当たり選択された抗体、受容体（例えばT細胞受容体）またはそれらの結合タンパク質の0.005～5.0mgの範囲であり、さらに通常は0.05～2.0mg/kg/用量が使用される。予防の応用に対しては、本発明の選択されたポリペプチドまたはそれらのカクテルを含有する組成物を類似したまたは若干低い用量で投与してもよい。

【0092】

本発明により選択されたポリペプチドを含有する組成物は、哺乳類動物の選ばれた標的細胞集団の改変、不活性化、死滅または除去を促進する予防および治療設定において利用することができる。さらに、本明細書に記載の選択されたレパートリーのポリペプチドは、体外またはin vitroで、細胞の不均一なコレクションから標的細胞集団を選択的に死滅するかまたは効果的に除去するために使ってもよい。哺乳類動物からの血液を、選択された抗体、細胞表面受容体またはそれらの結合タンパク質と体外で組合せ、それによって望ましくない細胞を死滅させるかまたは血液から除去し、そして標準技術によって哺乳類動物に戻してもよい。

【0093】

説明だけを目的として、本発明をさらに以下の実施例において記載する。

【0094】

実施例

実施例1

scFvポリペプチドの選択

本発明者らは、BSA、未精製組換えタンパク質の混合物、または全HeLa細胞溶解物のいずれかに対して1ラウンドのファージ選択により標的リガンドとの結合について濃縮した単一フォールドに基づくscFvライブラリーを利用した。この抗

体フォールドは両方のジェネリックリガンド、プロテインLおよびAと結合する。本発明者らはツーフィルター (two-filter) 法を使用した。この方法では細菌を1つのフィルター上で増殖し、分泌されたscFvを他のフィルター上に捕捉する。フィルター上の標的分子は、選択に使われる抗原、他の（恐らく関係する）抗原またはプロテインLのいずれかであった。従って、スクリーニングは、特異的標的結合抗体（この場合、結合した抗体の検出はプロテインL-HRPを使った）または、後者の場合、機能性でかつよく発現された抗体（この場合、結合した抗体の検出はプロテインA-HRPを使った）のいずれかに対して実施した。全事例でライブラリーの0.1-1%に当たる特異的抗体結合分子が同定され、かつジェネリックリガンドを標的分子として用いて確認すると、5-50%が機能性として検出されかつよく発現されたことが同定された。

【0095】

方法

タンパク質

5クローン、すなわち未知機能をもつ2クローン（CおよびM）、ヒト塩素イオン電流インデューサータンパク質（D）、 α -2グロビン（H）およびユビキチン（T）をヒト脳cDNAライブラリーhEX1（Bussowら,1998）から取り、（Luekingら,1999）に記載のように発現した。粗細胞溶解物を収穫して選択に使った。各クロンの発現レベルは、各溶解物の連続希釈物をドット-ブロット装置に移し、ニトロセルロース膜上に固定して測定した。このフィルターを2%スキムミルク粉PBS（MPBS）中で30分間ブロックし、PBSを用いて3回洗浄した。組換えタンパク質を抗RGS-His抗体（Qiagen；2% MPBS中に1/2000）と続いて抗マウスHRP抗体（Dako；2% MPBS中に1/2000）を用いて検出し、そして化学発光検出試薬（ECL, Amersham）を用いて発色させた。各タンパク質の等モル量を各選択物中およびその10、100および1000倍希釈物と混合した。

【0096】

ファージライブラリー

本発明者らが使用したライブラリーは側鎖多様性（NNKまたはDVTがコードされた）をもつ V_H （V3-23/DP-47および J_H 4b）および V_K （012/02/DPK9および J_K 1）に

対する単一ヒトフレームワークに基づき、 V_H および V_K は既知構造の抗原と接触しかつ成熟レパートリーが高度に多様である抗原結合部位の位置に組込まれている。使用したフォールドは頻度高く *in vivo* で発現してジェネリック結合リガンドプロテインLおよびAと結合するので、scFvの捕捉と検出が容易でありかつ抗原結合部位を妨害しない。ライブラリーはファージミド/scFvフォーマットでプロテインAおよびプロテインLとの結合についてプレスクリーニングしておいたので、未選択ライブラリー中の大多数のクローンは機能性であった (Tomlinsonら, 未開示の結果)。このライブラリーを、KM13ヘルパーファージ (プロテアーゼ切断部位をもつ遺伝子3タンパク質 (gene 3 protein) を含有する) を使用しかつファージをトリプシンで溶出したことを除くと、本質的に (Marksら, 1991) に記載された通り選択した。この選択はscFv融合を有しない全ての遺伝子3タンパク質を切断し、バックグラウンドファージ感染の除去をもたらし、c-mycタグにおけるタンパク質分解切断によってscFv融合をもつファージを溶出する (KristensenおよびWinter, 1998)。1ラウンドの選択を、BSA (10 μ g/ml PBS)、5つの未精製組換えタンパク質 (C、D、H、MまたはT、それぞれ100 μ g/ml またはその10倍希釈物) 混合物またはHeLa細胞 (100 μ g/ml) をコートした免疫チューブ (Nunc, Maxisorp) 上で実施した (Verheijenら, 1990)。

【0097】

格子配置／ピッキング

選択したライブラリーを大きな正方形プレート (230 x 230mm、Nuncプレート、TYE、100 μ g/mlアンピシリン、1%グルコースを含有する) 上に 10^4 コロニー/プレートをプレーティングし、一夜、30°Cで増殖した。コロニーを拾って (BioRoboticsコロニーピッカー)、384ウェルプレート (Genetix、2xTY、100 μ g/mlアンピシリン、1%グルコース、8%グリセロールを含有する) 中に入れ、一夜37°Cにて増殖した。プレートは直接使用するかまたは凍結して-70°Cで保存した。384ウェルプレートを二重クロンの4x4パターンで大きな正方形プレート (Genetix Qトレイ、TYE、100 μ g/mlアンピシリン、1%グルコースを含有する) 上に格子配置し (Genetix、Q-bot)、ニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell) を用いて覆った。プレートに移す前に、このフィルターを2%スキムミルク粉PBS (M

PBS) 中で30分間室温 (RT) でブロックし、簡単にPBSを用いて洗浄し、2 x TYに浸漬した。格子配置したプレートを一夜37°Cにて増殖した。その間に、他のニトロセルロースフィルターを、0.5 µg/ml プロテインL (Actigen)、100 µg/ml ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HSA)、細菌タンパク質C、D、H、MもしくはT、またはHeLa細胞タンパク質 (10⁷細胞から (Verheijenら, 1990)) を含む100ml PBSを用いて一夜、4°Cでコートした。このフィルターを2% MPBS中で1時間ブロックし、3 x PBS中で洗浄し、2 x TY中に浸漬し、次いで大きな正方形プレート (230 x 230mm、Nuncプレート、TYE、100 µg/ml アンピシリン、1mM イソプロピル β-D-チオガラクトシド (IPTG) を含有する) 上に移した。コロニーを含有する第2のフィルターを、第1の標的分子フィルターで覆ったプレート上に移した。これらのプレートを3時間30°Cにてインキュベートした。この方法の模式図による概要を掲げる (図1)。

【0098】

フィルターのプロービング

トップフィルターを取り除き、ボトムフィルターを3 x PBS/0.05% Tween (PBS T) を用いて洗浄し、そして2% MBPSを用いて30分間室温でブロックした。フィルターを3 x PBSTを用いて洗浄した。特異的抗原結合の場合には、フィルターをプロテインL HRPコンジュゲート (Actigen、1/4000) を含む2% MPBSを用いて1時間室温にてインキュベートした。ジェネリックアッセイの場合には、ブロッキング後にフィルターをプロテインA HRPコンジュゲート (Amersham、1/5000) を用いてインキュベートしたことを除いて、フィルターを上記のように処理した。フィルターを3 x PBSTを用いて洗浄し、ストレプトアビジン-HRP (Pierce) 1/5000を含むPBSTを用いて15分間室温でインキュベートした。フィルターを洗浄し、そしてECL試薬を用いて発色させた。全てのインキュベーションは静かに攪拌するシェーカー上の50mlのバッファー中で実施した。

【0099】

ELISA

直接捕捉スクリーニングを使って同定したクローンが通常のELISAにおいてBSAと結合するかどうかを確認するため、2 x TY (100 µg/ml アンピシリンおよび0.1

%グルコースを含有する) に一夜培養からの1/100容積を接種した。これらを37℃でOD₆₀₀がほぼ0.9になるまで増殖した。1mM IPTGを加え、培養を30℃にて一夜振とうした。培養をスピンにかけ、上清をELISAに使った。96ウェルEISAプレートに10 µg/ml BSAを用いて一夜4℃にてコートした。プレートを3回PBSを用いて洗浄し、2% Tween/PBSを用いて2時間室温にてブロックした。プレートを3回PBSを用いて洗浄し、50 µlの上清を50 µlの2%Tween/PBSを用いて1.5時間室温にてインキュベートした。プレートを5回PBSTを用いて洗浄し、プロテインL HRPコンジュゲート (2% Tween PBS中に1/4000) を用いて1時間室温にてインキュベートした。プレートを5回PBSTを用いて洗浄し、反応物を3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを用いて発色させ、硫酸を用いて停止した。

【0100】

配列決定

LMB3 (CAG GAA ACA GCT ATG AC) およびpHEN配列 (CTA TGC GGC CCC ATT CA) を用いて増幅しかつPCR精製カラム (Qiagen, CA) を使って精製したPCR産物を配列決定のテンプレートとして使用した。配列決定反応は、重鎖に対してプライマーLMB3をそして軽鎖に対してpHENを用いて、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycleシーケンシングキット (Perkin Elmer, CA) を使って実施した。反応は自動シーケンサー (Applied Biosystems 373A, Perkin Elmer) 上で実施した。

【0101】

結果

1ラウンドのファージ選択により標的リガンドに対する結合体について富化されたscFvファージミドライブラリーを得る目的で、1つの精製抗原 (BSA) について選択されたライブラリーを使用した。ロボットを使って8448クローン (22 x 384ウェルプレート) をピッキングして格子配置したが、この数は1ラウンドの選択後 (約10⁴ファージを溶出した) に存在するほとんど全ての回収クローンを含む。機能的scFvを発現するクローンの画分を決定するため、プロテインLをコーティングしたフィルター上でscFvを捕捉し、プロテインA HRPコンジュゲートを用いて検出した。この結果は、クローンの約50%が機能的で、よく発現されたことを示した (図2)。特異的に結合するとともに交差反応性のあるクローンを同

定するため、スクリーニングをBSA、HSAおよび無関係なタンパク質（HeLa細胞タンパク質）の混合物について実施した。BSA、HSAまたはHeLa細胞タンパク質をフィルター上にコーティングし、結合性のscFvをプロテインLコンジュゲートを用いて検出した。アレイしたscFvとBSAおよびHSAとの反応性の典型的なパネルをそれぞれ図2Bおよび2Cにそれぞれ示す。本発明者らはアレイされた8448クローンのうち50クローンがBSAを認識することを見出した。これら50クローンのうちの1つはまたHSAを認識し、そして1つのクローンはHeLa細胞のタンパク質と反応した（データは示してない）。BSAまたはHSAを認識しなかった大多数のクローンはHeLa細胞抽出物中に存在するタンパク質を認識し（データは示してない）、「粘着性」クローンの選択を示した。このように、異なる標的分子についての平行した直接スクリーニングを利用すると、BSA特異的抗体、BSAおよびHSAの両方と結合するが広い交差反応性のない抗体、交差反応性（粘着性）抗体、ならびに標的分子と結合しない抗体の同定が可能になる。

【0102】

BSA陽性クローンが特異的であるかどうかをさらに確証するために、これらをELISAでBSAとの結合について試験した。これらのクローンのほとんどはELISAで確かに陽性であったので、これらの中の16クローンをさらに配列決定分析により特性を決定した。ELISAでBSAを認識しなかったクローンはscFvを低レベルで発現したかまたは全長インサートを有していなかった。単一ドメインを発現するクローンの最初のスクリーニングにおける陽性同定は、恐らく通常 V_H/V_L インターフェースに埋められた疎水性残基による。BSA特異的な16クローンの V_H および V_L の配列決定分析により、異なる5クローンが存在することが示された（表1）。2クローンは複数回存在した。クローン29IJ11は2回、またクローン29IJ7は11回見出された。他の3クローンは1回だけであった。これらの抗BSA scFvの V_H CDR3領域の配列は、無作為化残基におけるコンセンサスを示す。コンセンサスCDR残基は他抗原に対して特異的なAbにおいて典型的に見出されるので、この結果はこれらのクローンが特異的であることを確証する（Clacksonら,1991；De Wildtら,1997）。

【0103】

次に、5つの未精製組換えタンパク質C、D、H、MもしくはTまたはそれらの10倍希釈物の混合物について選択されたscFvライブラリーをスクリーニングした。12288クローン（32 x 384）を格子配置し、このライブラリーの多重コピーを5つの組換えタンパク質との結合について別々にスクリーニングした。最初のスクリーニングにおける潜在特異的scFvクローンを、組換えタンパク質との結合についてELISAで試験した。D（15クローン）、M（12クローン）およびT（20クローン）について特異的scFvを同定したので、タンパク質混合物の1000倍希釈物を使ってこれらのscFvのいくつかを単離した。これらのクローンの配列を表1に記述したが、抗ユビキチンクローンの大部分はそれらのV_HCDR3残基にコンセンサス配列を示す。複数のクローンは異なるヌクレオチド配列を有するが、同じCDR3アミノ酸残基をコードする。

【0104】

最後に、HeLa細胞の溶解物について選択したscFvライブラリーをスクリーニングした。18,342クローンを格子配置し、HeLa細胞溶解物、酵母細胞溶解物または無関係なタンパク質（FITC-BSA）でコーティングしたフィルターとの結合について試験した。数個の潜在scFvクローンを、HeLa細胞または酵母細胞のウェスタンブロットにおいて試験した。5クローンがHeLa細胞に存在するタンパク質を認識するが、酵母細胞に存在するタンパク質を認識しないことを見出した。

【0105】

【表1】

クローン ライブラリー	CDRI1	CDRI2	CDRI3	CDRI1	CDRI2	CDRI3	数 ²	突然変異 ³
29IJ1 DVT	SYAMS	NIYASGDSYAYADSVKG	GYTTFDY	RASQSISSYLN	YASELQS	QQAGYSPTT	1	H66 CGG (R)→AGG (R)
29IJ6 NNK	SYAMS	HISPYGANTRYADSVKG	GLRAFDY	RASQSISSYLN	RASLLQS	QQGRDRPAT	1	
29IJ7 DVT	SYAMS	SIYDGDSTSYADSVKG	SYTTFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQNDSSPTT	11	
29IJ11 DVT	SYAMS	SITNGSYTAYADSVKG	NSGTFDY	RASQSISSYLN	YASDLQS	QQNTAYPTT	3	
29IJ12 DVT	SYAMS	TIYNGTSTGYADSVKG	GYTTFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQNDYGPTT	1	

表1. 単一ヒトフレームワークに基づくライブラリーから選択したクローン由来のV_HおよびV_L CDR配列。下線を引いた残基はライブラリーで無作為化されている。¹クローンが誘導されたライブラリー (NNK/DVT多様性)。²同じ配列が観察された度数。³V_H (V3-23/DP-47およびJ_H4b) およびV_K (012/02/DPK9およびJ_K1) 生殖細胞系遺伝子と異なる全ヌクレオチド (アミノ酸) 変化、なおこの変化は特定して無作為化された位置にてではない。

【0106】

以上の実施例において、組換え抗体を直接アレイスクリーニングに使用し得ることを実証している。本発明者らは2つのアプローチを用いた：第1のアプローチ、すなわち抗原のフィルター上のコーティングおよび特異的に結合したscFvだけの直接検出は、標的分子のビオチン化またはタグ付けを必要としない利点を有す

る。このフォーマットは2回のインキュベーション工程（ブロッキングと検出）しか含まず、scFvが二量化して多重プロテインLコンジュゲートの結合を生じがちであることを考慮すると、感度の増加をもたらす。このアプローチはまた、対応核酸配列を宿す細菌を同じまたは異なるフィルター上に二重スポットできるので、大多数のscFvを同時に1以上の抗原についてスクリーニングする可能性も提供する：一般に、18,342コロニーを1つのマクロアレイ上に二重スポットすると、38496ウエルELISAプレートと等価である。またこれらのアプローチは示差特異的scFvおよび交差反応性scFvの同定を可能にするのであって、これをBSAだけを認識するクローン、BSAとHSAの両方を認識するクローン、およびHeLa細胞中のタンパク質を認識するが酵母のタンパク質を認識しないクローンによって示す。BSAとHSAは75%を上回る相同性があるので、複数の抗体が両方のタンパク質に存在するエピトープを認識することは驚くに足りない。さらにこれらのアレイを用いて不純な抗原をスクリーニングすることができ、これを組換えタンパク質D、MおよびTに対して特異的なscFvを同定して実証する。他のタンパク質アレイとは対照的に（Busowら、1998）、これらの抗体アレイはタンパク質を固定するためのいずれの変性工程も必要としない。実際、標的分子は未変性であっても、変性されていても、タンパク質分解されていてもまたは底部のフィルターにコーティングするに先立っていずれか他の方法で前処理されていてもよい。

【0107】

比較実施例2

従来のファージディスプレイとの比較

本発明者らの結果を、複数ラウンドの従来のファージディスプレイ選択により得た結果と比較すると、ここで同定した3つのscFvは3～4ラウンドのファージ選択後でも単離されることが示される。しかし、ただ1回のファージ選択後に直接アレイスクリーニングを実施することによって、本発明者らは2つのさらなるクローン（クローン29IJ11および29IJ12）を見出したが、これらはラウンド3およびラウンド4選択の広範なスクリーニング後に見られないものであった。このことは、3または3ラウンドのファージ選択に関わる多重感染、増殖およびファージ産生ステップ期間に、異なるクローン間の競合によってこれらが失われたことを

示す。陽性50クローンのうち16だけしか配列決定してないので、これらの陽性50クローン中にはさらにユニークなBSA特異的scFvが存在したと思われる。これらの2つのユニークなクローンのアレイ上のECLシグナルは、例えばナノモル親和性を有するクローン29IJ1と比較しうる強度である。このことは、複数ラウンドのファージディスプレイを実施することによって潜在的に有用なscFvが失われ、従って、結合クローンの最も多様なコレクションを単離するには、本明細書に記載した形式のハイスループットスクリーニングが必須であることを示す。

【0108】

抗体の二重アレイを使用して、所定のタンパク質の微かな改変（単一アミノ酸突然変異もしくは転写後改変など）を認識する抗体をスクリーニングするか、または細胞表面上に発現された分子などの不純な抗原に対する結合体をスクリーニングすることができる。複数ラウンドのファージ選択はしばしば他の免疫優性なエピトープもしくは他の細胞表面分子に対する結合体を生じる（Hoogenboomら，1999）。これを避けるため、不純な抗原に対する選択は、枯渇もしくはサブトラクションストラテジー（De Kruifら，1995；Cai & Garen，1996）、または「パスファインダー（Pathfinder）」と呼ばれるリガンド指向技術（Osbourneら，1998）を使って実施されている。本明細書に記載した直接ハイスループットスクリーニングはこれらの技術のいずれにも応用できる。スクリーニング方法はまた、複数の標的リガンドを用いて実施してもよい。標的リガンドは、お互いに混合した異なるタンパク質であってもまたは細胞タンパク質の抽出物であってもよい。混合物中にそれぞれの標的タンパク質が存在しかつ十分な量が固定されていれば、特異的scFvの検出は可能である。

【0109】

このスクリーニングを使って、チェーンシャッフリング（chain shuffling）（Marksら，1992）またはCDR多様化（Schierら，1996）のいずれかにより作製した所定の抗体の突然変異体のライブラリーからより高い親和性結合体を同定することができる。ヒト化またはより高い親和性抗体フラグメントを作製するために、抗体フラグメントのライブラリーを、オリゴヌクレオチドまたは誤りがちなポリメラーゼを用いて指定または無作為突然変異誘発により生成することができる。

。これらのライブラリーまたはこれらのライブラリーの部分をアレイフォーマットで容易に増殖しかつ発現することができ、その後、それらの標的リガンドとの結合のまたは結合の改善についてスクリーニングすることができる。

【0110】

組換え抗体のアレイは、プロテオミックス (proteomics) として知られる分野においてこれらのタンパク質の改変を含めたタンパク質の発現の特性決定に有用な用途がある。cDNAアレイを通してmRNA発現レベルを研究するゲノミックス (genomics) とは対照的に、プロテオミックスはタンパク質機能性を直接、取り扱う。この領域では現在、2D電気泳動が主に使用されている。組換え抗体のアレイを使うことで、タンパク質混合物 (例えば、細胞抽出物) 中の1以上のタンパク質の発現を分析する既存技術を補うことができる。

【0111】

一般的に、この方法によって、細菌周辺質に発現される組換え抗体または他の組換えタンパク質のリガンド結合についてハイスループット分析をすることが可能になる。特に、ヒット率が従来のELISAを用いて検出するにはあまりに低いアレイを用いて同定できるだけ十分高い ($>10^{-4}$) 場合、およびファージ選択のラウンドの繰り返しが有利でない場合である。しかし、このアプローチは抗体-抗原相互作用に制限されるものでなく、活性酵素のスクリーニングを含む他の機能的タンパク質-リガンド相互作用を研究するために使うことができる。例えば、転写因子変異体または他のDNA結合タンパク質のライブラリーを、特定のDNA配列と結合する能力について試験することができる。例えば、ジンクフィンガーは、多数の真核生物転写因子に存在することが著名な小さいDNA結合モジュールであり、ある特定数のDNA配列と結合する。過去に、BCR-ABL融合発癌遺伝子のユニークな9塩基対領域と特異的に結合するジンクフィンガーが遺伝子工学的に作製されており、このジンクフィンガーはこの発癌遺伝子の転写を妨害する (Chooら, 1994)。アレイスクリーニングは、腫瘍増殖に必要な因子の産生を阻害しうるこのような配列特異的DNA結合ペプチドまたはタンパク質を同定するために有用であることができる。

【0112】

活性触媒を選択するストラテジーは、1つのフィルター上のアレイフォーマットの酵素ライブラリーの増殖および発現を、他のフィルター上に固定した標的リガンドに密接した近位において行うことを含む。次に、転化した基質を、標的リガンドフィルター上の特定の抗産物親和性試薬を用いて検出する。酵素とその基質が数時間、密接した近位に存在するので、これにより高い代謝回転率をもつ酵素だけでなくもっと低い代謝回転率をもつ酵素の検出も可能になると期待される。この方法において、本発明者らは、産物結合に基づく既存の触媒のファージ選択技術、例えばアルドラーゼの選択（Barbasら，1997）などを改善することができる。

【0113】

また全細胞をアレイスクリーニングの標的リガンドとして利用することもできる。例えば、HeLaなどの真核生物細胞系を増殖してフィルター上に固定してもよい。次いで接着分子のライブラリーを、細胞表面分子CD95（APO-1、FAS）を介するアポトーシスの誘導などの機能的相互作用についてスクリーニングしてもよい。読み出し（readout）はホスファチジルセリンの転位またはp53の発現などの下流事象であってもよい。CD95受容体を認識するCD95リガンドの無作為化ライブラリーをスクリーニングし、細胞表面ホスファチジルセリンのアネキシン-V検出（Boehringer Mannheim）またはp53検出（Boehringer Mannheim）によりアッセイしてもよい。

【0114】

実施例3

相互作用タンパク質対の検出

フィルタースクリーニングを使って2つの相互作用タンパク質を検出し得るかを決定するため、本発明者らは相互作用することが知られるタンパク質の対、すなわち、プロテインMと抗M scFv M12、プロテインTと抗T scFv T15、ならびにFKBP-ラパマイシン付随タンパク質（FRAP）のFKBP 12ラパマイシン結合（FRB）ドメインとヒトイムノフィリンFKBP12（12 kD FK506 結合ドメイン）について研究した。FRB-FKBP12相互作用は小分子ラパマイシンの存在に依存する。M、TまたはFKBP12をコードする遺伝子は、pACYC（クロラムフェニコール耐性）中にグ

ルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) とのC末端融合体としてクローニングした。M12 (抗M scFv) およびT15 (抗T scFv) を、pHEN誘導体pIT2 (アンピシリン耐性) 中にクローニングした。FRBおよびFKBP12を、pIT2中にVκ単ドメインとのC末端融合体としてクローニングした。

【0115】

1つのコロニーを新鮮な寒天プレートからピッキングして一夜、37℃にて液体培養 (TYE、100 µg/mlアンピシリンまたは10 µg/mlクロラムフェニコール、1%グルコース) で増殖した。これらの培養の複数の組合せを一緒に混合して (相互作用するパートナーまたは対照)、寒天プレート (TYE、1%グルコース) 上にスポットし、ニトロセルロースフィルターで覆った (SchleicherおよびSchuell) 。プレート上に移す前に、このフィルターを2%スキムミルク粉末PBS (MPBS) 中で30分間、室温 (RT) にてブロッキングし、PBS中で簡単に洗浄し、そして2 x TYに浸漬した。格子配置したプレートを一晩37℃にて増殖した。その間に、別のニトロセルロースフィルターを、2 µg/mlの抗GST抗体 (Pharmacia Biotech) を含むPBSを用いて一夜4℃にてコーティングした。このフィルターを2% MPBS中で1時間、室温にてブロッキングし、PBSで3回洗浄し、2 x TYに浸漬し、そして寒天プレート (TYE、1mMイソプロピルβ-D-チオガラクトシド (IPTG)) 上に移した。FRB-FKBP12相互作用の検出については、プレートに0.1 µg/mlのラパマイシンを加えるかまたは加えなかった。細菌クローンを含有する第2のフィルターを抗GSTをコーティングしたフィルターで覆ったプレート上に移した。これらのプレートを5時間、30℃にてインキュベートした。

【0116】

フィルターのプロービング

上部のフィルターを取り除き、底部のフィルターをPBS/0.05% Tween (PBST) を用いて3回洗浄し、そして2% MPBSを用いて30分間室温でブロッキングした。フィルターをPBSTを用いて3回洗浄し、プロテインL HRPコンジュゲート (Actigen、1/4000) を含む2% MPBSを用いて1時間室温にてインキュベートした。フィルターを洗浄し、ECL試薬 (Amersham) を用いて顕色した。全てのインキュベーションは静かに攪拌するシェーカー上で実施した。

【0117】

ELISA

直接捕捉スクリーニングを用いて同定したクローンがELISAにおいても結合するか否かを確認するため、2 x TY (100 µg/mlのアンピシリンまたは10 µg/mlのクロラムフェニコールおよび0.1%グルコースを含有する) に一夜培養からの1/100容積を接種した。これらを37°CでOD₆₀₀が約0.9になるまで増殖した。1mM IPTGを加え、培養を25°Cまたは30°C (scFv) にて一夜、振とうした。培養をスピンにかけ、上清をELISAに使った。96ウェルEISAプレートに抗GST 2 µg/mlを含むPBSを用いて一夜4°Cにてコーティングした。プレートをPBSを用いて3回洗浄し、2% Tween/PBS (scFv-抗原対に対して) または2% BSA/PBS (FRB-FKBP12対に対して) を用いて2時間室温にてブロッキングした。プレートをPBSを用いて3回洗浄した。pACYC-GSTクローンからの上清50 µlおよびpIT2クローンからの上清50 µlを2% Tween/PBSまたは2% BSA/PBSの50 µlと混合し、1.5時間室温にてインキュベートした。FRB-FKBP12対の検出には、アッセイを0.1ng/mlのラパマイシンの存在またはラパマイシンの非存在下で実施した。プレートをPBSTを用いて5回洗浄し、プロテインL HRPコンジュゲート (1/4000) を用いて1時間、室温にてインキュベートした。プレートをPBSTを用いて5回洗浄し、反応物を3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを用いて顕色し、硫酸を用いて停止した。

【0118】

結果

直接スクリーニングストラテジーは、Mと抗MおよびTと抗Tの特異的結合 (図3) ならびにラパマイシンの存在下でのFRB-FKBP12の特異的結合 (図4) を明白に示す。

【0119】

参考文献

1. Andersen, P. S., Stryhn, A., Hansen, B. E., Fugger, L., Engberg, J. & Buus, S. (1996). 「T細胞の抗原特異的、主要組織適合遺伝子複合体に制限される特異性をもつ組換え抗体 (A recombinant antibody with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells

-)」. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93, 1820-1824。
2. Bussow, K., Cahill, D., Nietfeld, W., Bancroft, D., Scherzinger, E., Lehrach, H. & Walter, G. (1998). 「アレイされたcDNAライブラリーの高密度フィルター上における全体的タンパク質発現および抗体スクリーニングの方法 (A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library)」. Nucleic Acids Res 26, 5007-8。
3. Cai, X. & Garen, A. (1996). 「ワクチン接種した黒色腫患者の融合ファージライブラリーからクローニングした黒色腫特異的VH抗体 (A melanoma-specific VH antibody cloned from a fusion phage library of a vaccinated melanoma patient)」. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6280-6285。
4. Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J. & Davis, R. W. (1998). 「有糸分裂細胞周期のゲノム全体にわたる転写分析 (A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle)」. Mol Cell 2, 65-73。
5. Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. & Herskowitz, I. (1998). 「出芽酵母における孢子形成の転写プログラム (The transcriptional program of sporulation in budding yeast)」. Science 282, 699-705。
6. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). 「ファージディスプレイライブラリーを用いる抗体フラグメントの作製 (Making antibody fragments using phage display libraries)」. Nature 352, 624-628。
7. De Kruif, J., Terstappen, L., Boel, E. & Logtenberg, T. (1995). 「合成ファージ抗体ライブラリーから細胞サブ集団特異的ヒトモノクローナル抗体の迅速な選択 (Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library)」. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92, 3938-3942。

8. De Wildt, R. M. T., Finnern, R., Ouwehand, W. H., Griffiths, A. D., Van Venrooij, W. J. & Hoet, R. M. A. (1996). 「合成および患者由来のコンビナトリアルV遺伝子ライブラリーから選択された、U1 RNA結合Aタンパク質に対するヒト可変ドメイン抗体フラグメントの特性決定 (Characterization of human variable domain antibody fragments against the U1 RNA-associated A protein, selected from a synthetic and a patient-derived combinatorial V gene library)」. *Eur. J.Immunol.* 26, 629-639。
9. De Wildt, R. M. T., Ruytenbeek, R., Van Venrooij, W. J. & Hoet, R. M. A. (1997). 「U1Aタンパク質と結合する素因を与えられた、生殖細胞系にコードされる組換え抗体フラグメントの重鎖CDR3最適化 (Heavy chain CDR3 optimisation of a germline encoded recombinant antibody fragment predisposed to bind the U1A protein)」. *Protein Eng.* 10, 835-841。
10. DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. & Trent, J. M. (1996). 「ヒト癌における遺伝子発現パターンを分析するためのcDNAマイクロアレイの利用 [コメント参照] (Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer [see comments])」. *Nat Genet* 14, 457-60。
11. DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. (1997). 「ゲノム規模における遺伝子発現の代謝および遺伝子制御の研究 (Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale)」. *Science* 278, 680-6。
12. Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes Jones, N. C.ら (1993). 「ファージディスプレイライブラリーからの高い特異性をもつヒト抗自己抗体 (Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries)」. *EMBO J.* 12, 725-734。
13. Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., Prospero, T. D., Hoogenboom, H. R., Nissim, A., Cox, J

. P. L., Harrison, J. L., Zaccolo, M., Gherardi, E. & Winter, G. (1994).

「大きな合成レパートリーからの高親和性ヒト抗体の直接単離 (Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires)」. EMBO J. 13. 3245-3260。

14. Hoogenboom, H. R., Lutgerink, J. T., Pelsers, M. M., Rousch, M. J., Coote, J., Van Neer, N., De Bruine, A., Van Nieuwenhoven, F. A., Glatz, J. F. & Arends, J. W. (1999). 「大きなファージ抗体ライブラリーを用いた細胞パンニングにより明らかにされた細胞表面受容体上の選択優性かつ非アクセス性エピトープ (Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library)」. Eur J Biochem 260, 774-84。

15. Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S. A., Kang, A. S., Alting-Mees, M., Burton, D. R., Benkovic, S. J. & Lerner, R. A. (1989). 「ファージλにおける免疫グロブリンレパートリーの大きなコンビナトリアルライブラリーの作製 [コメント参照] (Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [see comments])」. Science 246, 1275-81。

16. Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C. F., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J.. Jr., Boguski, M. S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D. & Brown, P. O. (1999). 「血清に対するヒト繊維芽細胞の応答における転写プログラム (The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum [see comments])」. Science 283, 83-7。

17. Kristensen, P. & Winter, G. (1998). 「糸状バクテリオファージを用いるタンパク質フォールディングのタンパク質分解選択 (Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages)」. Fold Des 3, 321-8。

18. Lashkari, D. A., DeRisi, J. L., McCusker, J. H., Namath, A. F., Gentile, C., Hwang, S. Y., Brown, P. O. & Davis, R. W. (1997). 「ゲノム全体

にわたる平行した遺伝学および遺伝子発現分析用の酵母マイクロアレイ (Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis) 」. Proc Natl Acad Sci USA 94. 13057-62。

19. Lueking, A., Horn, M., Eickhoff, H., Bussow, K., Lehrach, H. & Walter, G. (1999). 「遺伝子発現および抗体スクリーニング用のタンパク質マイクロアレイ [方法における引用] (Protein microarrays for gene expression and antibody screening [In Process Citation]) 」. Anal Biochem 270, 103-11。

20. Marks, J. D., Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Clackson, T. P., Bye, J. M. & Winter, G. (1992). 「バイパス免疫感作：チェーンシャッフリングによる高親和性ヒト抗体の構築 (By-passing immunization : building high affinity human antibodies by chain shuffling) 」. Biotechnology N. Y. 10, 779-783。

21. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). 「バイパス免疫感作、ファージに提示されたV遺伝子ライブラリーからのヒト抗体 (By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage) 」. J.Mol.Biol. 222, 581-597。

22. Mullinax, R. L., Gross, E. A., Amberg, J. R., Hay, B. N., Hogrefe, H. H., Kubitz, M. M., Greener, A., Alting-Mees, M., Ardourel, D., Short, J. M.ら (1990). 「バクテリオファージλ免疫発現ライブラリー中の破傷風トキソイドに対する特異的なヒト抗体フラグメントクローンの同定 (Identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxoid in a bacteriophage lambda immunoexpression library) 」. Proc Natl Acad Sei USA 87 . 8095-9。

23. Osbourn, J. K., Derbyshire, E. J., Vaughan, T. J., Field, A. W. & Johnson, K. S. (1998). 「パスファインダー選択：新規抗体のin situにおける単離 (Pathfinder selection : in situ isolation of novel antibodies) 」. Immunotechnology. 3. 293-302。

24. Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. & Marks, J. D. (1996). 「親和性駆動選択を用いる高親和性単量体ヒト抗c-erbB-2一本鎖Fvの単離 (Isolation of high-affinity monomeric human Anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection)」. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43。
25. Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996). 「二色蛍光プローブハイブリダイゼーションを用いて複合DNAサンプルを分析するためのDNAマイクロアレイ系 (A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridisation)」. *Genome Res* 6. 639-45。
26. Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindqvist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C. & Marks, J. D. (1998). 「大きな非免疫ファージ抗体ライブラリーの効率的な構築：タンパク質抗原に対する高親和性ヒト一本鎖抗体の産生 (Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library : the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens)」. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6157-62。
27. Skerra, A., Dreher, M. L. & Winter, G. (1991). 「個々の細菌コロニーから分泌される抗体Fabフラグメントのフィルタースクリーニング：ツーメンブロン系を用いた抗原結合の特異的検出 (Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies : specific detection of antigen binding with a two-membrane system)」. *Anal. Biochem.* 196. 151-155。
28. Trent, J. M., Bittner, M., Zhang, J., Wiltshire, R., Ray, M., Su, Y., Gracia, E., Meltzer, P., De Risi, J., Penland, L. & Brown, P. (1997). 「悪性黒色腫におけるDNAコピー数および遺伝子発現の変化を分析するためのマイクロゲノム技術の利用 (Use of microgenomic technology for analysis of alterations in DNA copy number and gene expression in malignant melanoma)」. *Clin Exp Immunol* 107 Suppl 1, 33-40。
29. Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope,

A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J. & Johnson, K. S. (1996). 「大きな非免疫化ファージディスプレイライブラリーから単離されたサブナノモル親和性をもつヒト抗体 (Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library)」. *Nat. Biotechnol.* 14, 309-314。

30. Verheijen, R., Van den Hoogen, F., Beijer, R., Richter, A., Penner, E., Habets, W. J. & van Venrooij, W. J. (1990). 「全身性硬化症患者からの血清中の自己抗体検出に利用される組換えトポイソメラーゼI (A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis)」. *Clin Exp Immunol* 80, 38-43。

31. Watkins, J. D., Beuerlein, G., Wu, H., McFadden, P. R., Pancook, J. D. & Huse, W. D. (1998). 「ファージ発現抗体ライブラリーの捕捉リフトスクリーニングによる、細胞表面抗原に対するヒト抗体の発見 (Discovery of human antibodies to cell surface antigens by capture lift screening of phage-expressed antibody libraries)」. *Anal Biochem* 256, 169-77。

32. Welford, S. M., Gregg, J., Chen, E., Garrison, D., Sorensen, P. H., Denny, C. T. & Nelson, S. F. (1998). 「マイクロアレイハイブリダイゼーションと連結した増幅示差分析を用いる、一次腫瘍組織中の示差的発現遺伝子の検出 (Detection of differentially expressed genes in primary tumour tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridisation)」. *Nucleic Acids Res* 26, 3059-65。

33. Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H. & Lockhart, D. J. (1997). 「サッカロミセス・セレビシアエのゲノム全域にわたる発現モニタリング (Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*)」. *Nat Biotechnol* 15, 1359-67。

【0120】

以上の本明細書に述べた全ての刊行物および前記刊行物中に引用した参考文献は本明細書に参照により組み入れられる。

【0121】

当業者であれば、本発明の範囲と精神から逸脱することのなく、記載した本発明の方法およびシステムの様々な改正と変法は明白であろう。本発明は特定の好ましい実施形態と関係づけて記載されているが、特許請求の範囲に記載された本発明がそのような特定の実施形態に過度に限定されてはならないことは理解されなければならない。実に、本発明を実施するための分子生物学または関連分野の当業者に明白である記載された様式の様々な改変は、以下の特許請求の範囲内に包含されることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、細菌で発現させたscFvをスクリーニングするための方法の概要を示す。

(A) クローニングされた抗体遺伝子を含んでいる細菌をフィルター上にアレイさせて、一晚、scFvの産生がない状態で増殖させる。標的抗原でコーティングしたフィルターを調製し、scFvを誘導するためのIPTGを含有する第2のプレート上に置き、次いで、それを格子配置した細菌を含有するフィルターで覆う。誘導の間に抗体は上部のフィルターを通過し、抗原特異的であれば底部のフィルター上のその抗原と結合するだろう。数時間誘導させた後、底部のフィルターを取り出し、結合したscFvを二次試薬を用いて検出する。(B) ロボットによるピッキングと格子配置を適用することによって二重の順序づけられたアレイが作製され、それを2種以上の異なる標的分子に対してスクリーニングすることで、(この実施例では)抗原1および抗原2と結合する(黒色の丸印)、抗原1とは結合するが抗原2とはしない(影つきの丸印)、抗原2とは結合するが抗原1とはしない(斜線入り丸印)、どちらの抗原とも結合しない(白丸)レパートリーのメンバーを同定することができる。

【図2】

図2は、マクロアレイ上のBSA特異的scFvの分析を示す。

A) プロテインLを標的分子として、プロテインA-HRPを検出試薬として用いた機能的scFvのサンドイッチ検出。B) BSA結合性scFvを結合させるために固定化BSAを用いた、BSA結合性scFvについてのスクリーニング。C) HSA結合性scFvを結合

させるために固定化HSAを用いた、HSA結合性scFvについてのスクリーニング。ここに示したパネルは6144個のクローンからなる。クローンは8個の384ウェルのマイクロタイタープレートから二重のクローンの4x4のパターンでアレイさせた(384x8x2)。

【図3】

図3は、相互作用しているタンパク質対のフィルターによるスクリーニングを示す。

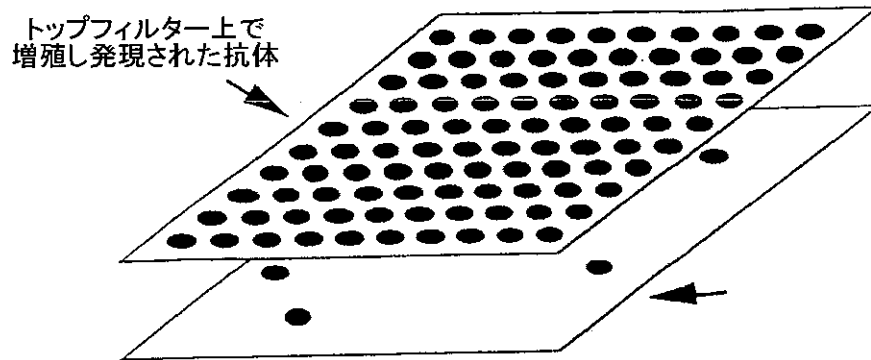
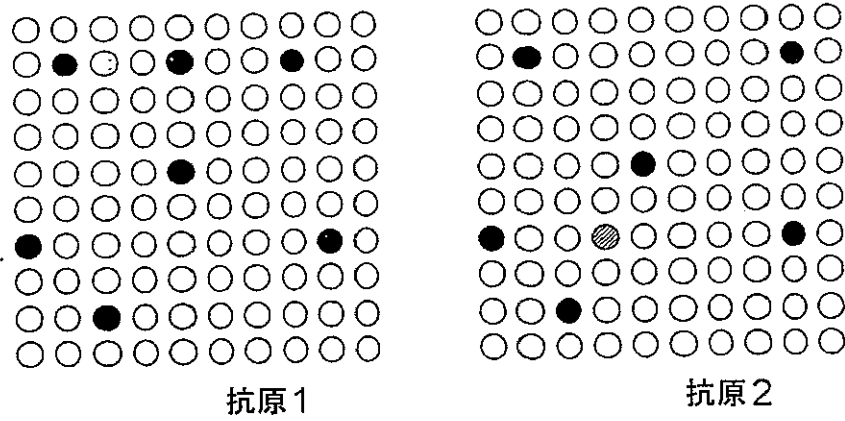
(A) 抗M scFv-抗原M、および抗T scFv-抗原M対の検出。(B) FRB-FKBP12対の検出。相互作用している対は発現されたGST-融合体を抗GST抗体で捕捉することによって検出し、相互作用しているリガンドはプロテインL HRPを用いて検出する。FRB-FKBP12相互作用はラパマイシンが存在する場合にのみ観察された。

【図4】

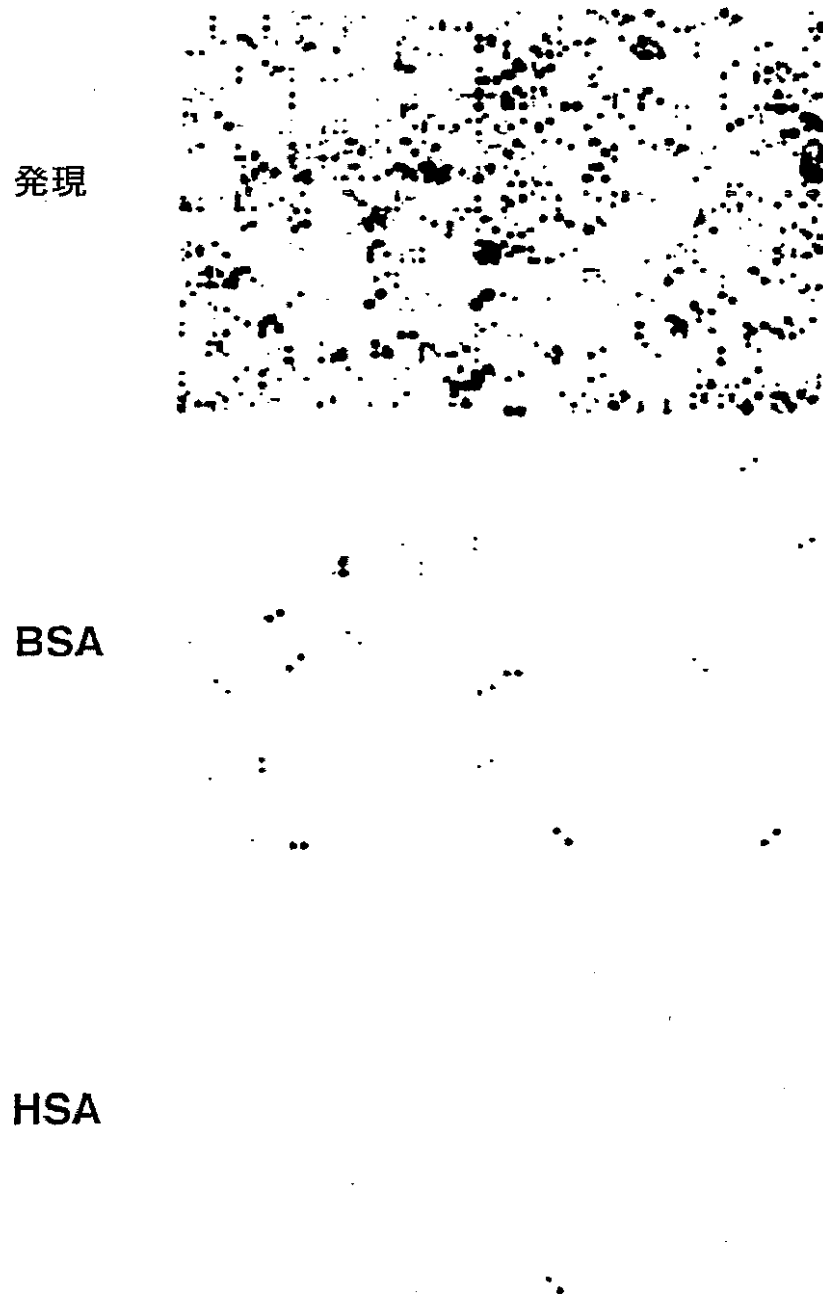
図4は、相互作用しているタンパク質対のELISAによる検出を示す。

(A) scFv-抗原MおよびscFv-抗原T対の検出。(B) FRB-FKBP12対の検出。相互作用している対は発現されたGST-融合体を抗GST抗体で捕捉することによって検出し、相互作用しているリガンドはプロテインL HRPを用いて検出される。FRB-FKBP12相互作用はラパマイシンが存在する場合にのみ観察された。

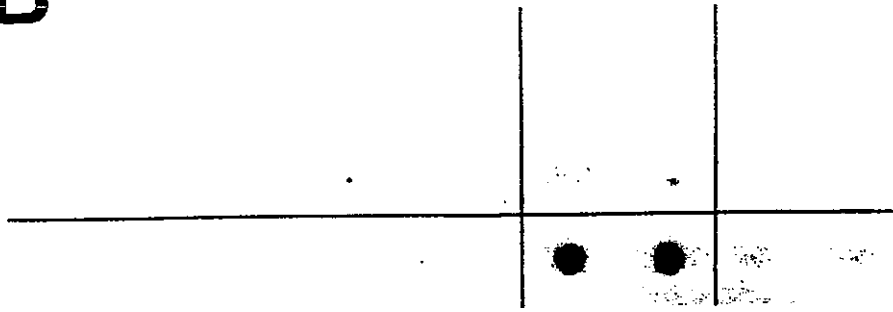
【図1】

A**B**

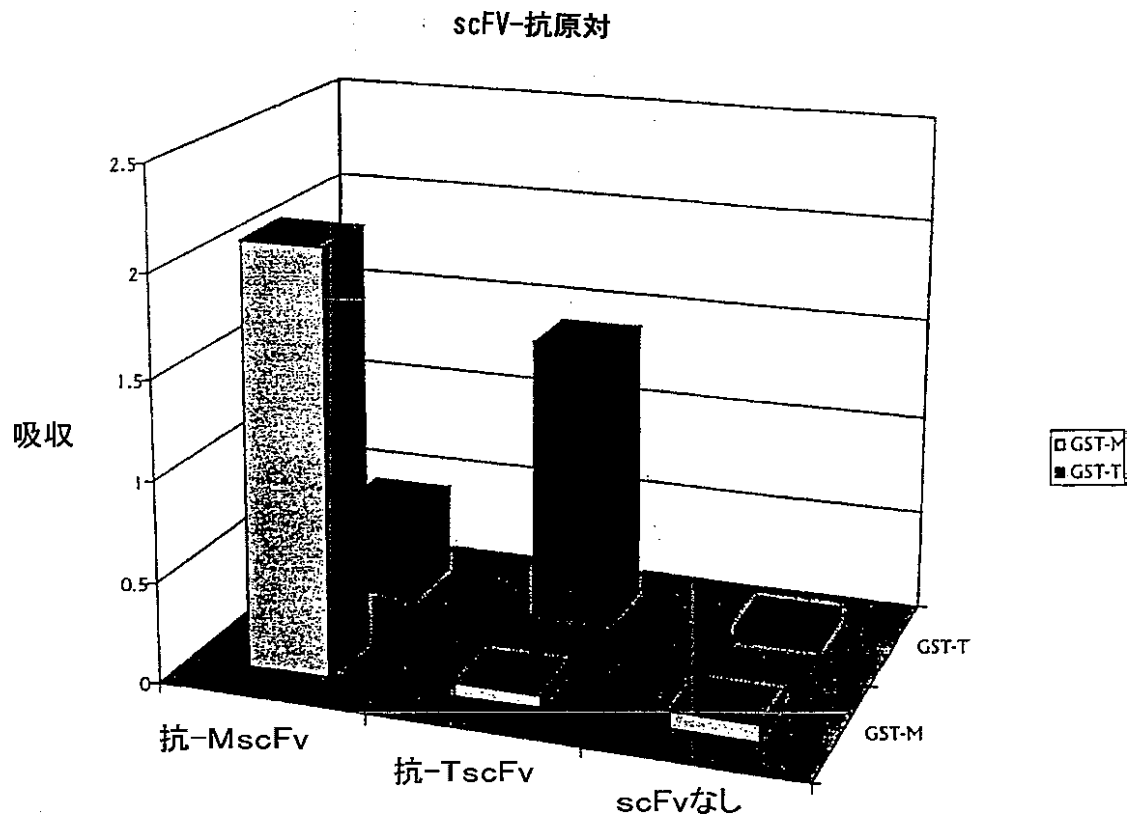
【図2】



【図3】

A**B**

【図4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. nat. Application No.

PCT/GB 00/04638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DE WILDT RUUD M T ET AL: "Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 18, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 989-994, XP002162316 ISSN: 1087-0156 abstract page 992, left-hand column, last paragraph -page 993, last paragraph ---	1-29
X	WO 99 39210 A (MILLER SAMUEL ; HUMPHERY SMITH IAN (AU)) 5 August 1999 (1999-08-05) page 22, line 1 - line 20 page 32, line 19 -page 34, paragraph 1 page 36, line 24 -page 37, line 9; claims 58,60 --- -/-	27-29
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 March 2001		12/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luis Alves, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 00/04638

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 41383 A (MAXYGEN INC) 19 August 1999 (1999-08-19) page 53, line 23 -page 54, line 16 page 72, line 24 -page 73, line 10 -----	1-10, 14-17, 19,25,26
A	HOOGENBOOM H R ET AL: "Antibody phage display technology and its applications" IMMUNOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, vol. 4, no. 1, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 1-20, XP004127382 ISSN: 1380-2933 page 13, right-hand column, last paragraph -page 16, right-hand column, paragraph 1 -----	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Patent Application No.

PCT/GB 00/04638

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9939210 A	05-08-1999	AU 2259799 A EP 1051624 A	16-08-1999 15-11-2000
WO 9941383 A	19-08-1999	AU 2674199 A AU 2674299 A AU 3289199 A AU 3291099 A EP 1053312 A EP 1053343 A EP 1056842 A EP 1054973 A WO 9941368 A WO 9941369 A WO 9941402 A	30-08-1999 30-08-1999 30-08-1999 30-08-1999 22-11-2000 22-11-2000 06-12-2000 29-11-2000 19-08-1999 19-08-1999 19-08-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 31/22	1 2 1 P
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/566	
33/566		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	Z N A F
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者 トムリンソン, イアン			
イギリス国 シービー 2 5エルジェー			
ケンブリッジ, グレート シェルフォード, タンウェルス レーン 13			
Fターム(参考) 2G042 AA01 BD19 CA10 CB03 FB05			
HA02			
4B024 AA11 CA01 EA03 EA04 HA11			
4B029 AA07 BB15 BB20 CC11 FA03			
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ79 QQ96			
QR32 QR48 QR55 QR71 QS05			
QS28 QS32 QX01			

专利名称(译)	直接筛选方法		
公开(公告)号	JP2003515745A	公开(公告)日	2003-05-07
申请号	JP2001542214	申请日	2000-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	多曼提斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	德螳螂有限公司		
[标]发明人	ホルトルーシー、ジェシカ デウィルツ、ルドルフ、マリア、セオドラ トムリンソン、イアン		
发明人	ホルト、ルーシー、ジェシカ デウィルツ、ルドルフ、マリア、セオドラ トムリンソン、イアン		
IPC分类号	G01N31/22 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C40B30/04 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 G01N33/6842 G01N33/6845 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12M1/34.B C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N31/22.121.P G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.F		
F-TERM分类号	2G042/AA01 2G042/BD19 2G042/CA10 2G042/CB03 2G042/FB05 2G042/HA02 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/HA11 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC11 4B029/FA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR71 4B063/QS05 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QX01		
优先权	1999028787 1999-12-03 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种筛选多肽库以鉴定与一个或多个靶分子相互作用的一个或多个成员的方法，该方法包括：a) 将靶分子固定在支持物上；b) 多个编码多肽库的核酸分子排列成阵列，c) 目标分子与阵列的核酸分子并列，d) 多肽在支持物上与靶分子接触 表达阵列的核酸分子以产生多肽，以使一部分肽与靶分子相互作用，并且e) 检测靶分子与支持物上多肽的相互作用，一种方法，包括： 本发明还提供了在空间上排列在固体支持物上的高浓缩抗体的阵列，用于针对各种靶配体进行筛选并且由数千种不同的多肽组成。

