

(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2008-505642

(P2008-505642A)

(43) 公表日 平成20年2月28日 (2008. 2. 28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z C C A	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A	4 H 0 4 5
G O 1 N 37/00 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-520506 (P2007-520506)	(71) 出願人	306048616
(86) (22) 出願日	平成17年7月6日 (2005. 7. 6)		バイオレン, インク.
(85) 翻訳文提出日	平成19年3月9日 (2007. 3. 9)		アメリカ合衆国 9 4 0 7 0 - 6 2 6 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/024140		カリフォルニア州 サン カルロス、 ス
(87) 国際公開番号	W02006/023144		イート # 1、グレン ウェイ 1 0 0
(87) 国際公開日	平成18年3月2日 (2006. 3. 2)	(74) 代理人	100096666
(31) 優先権主張番号	60/585, 918		弁理士 室伏 良信
(32) 優先日	平成16年7月6日 (2004. 7. 6)	(72) 発明者	ロベルト クレア
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 9 4 4 0 2 カリフォル
			ニア州 サン・マテオ市 オキシデンタル
			・アヴェニュー 7 0 0
		F ターム (参考)	4B024 AA11 AA20 CA02 CA07 CA11
			HA01 HA11 HA19
			4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03
			FA15 HA09
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 強化された特性を持つ変性ポリペプチドを発生させるためのルックスルー変異誘発

(57) 【要約】

所定のアミノ酸を、ポリペプチドの事前選択された領域（またはいくつかの異なる領域）内の選択された一組の位置のそれぞれおよび全ての位置に導入して、ポリペプチド類似体のライブラリーを生成する、変異誘発の方法を開示する。この方法は、あるアミノ酸が、タンパク質の構造および機能で極めて重要な役割を演ずるという前提に基づいており、したがって、ポリペプチド内の非機能的アミノ酸残基（「コールドスポット」）またはその部分から、機能的アミノ酸残基（「ホットスポット」）を特定し区別することが可能である。ライブラリーは、所望のポリペプチド類似体のみ含有しかつスクリーニングに適切なサイズのもの生成することができる。このライブラリーを使用して、ポリペプチドの構造および機能における特定のアミノ酸の役割を研究することができ、また抗体や抗体断片、単鎖抗体、酵素、およびリガンドなどの、新しくまたは改善されたポリペプチドを開発することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

あるポリペプチド内で、1つまたは複数の機能的アミノ酸残基を、非機能的アミノ酸残基と区別する方法であって、

該ポリペプチドのアミノ酸配列内の1つまたは複数のアミノ酸残基を選択するステップと、

選択された1つまたは複数のアミノ酸残基から置換されるあるアミノ酸残基を決定するステップと、

選択されたアミノ酸残基を含む該ポリペプチドまたはその部分をコードするポリヌクレオチドを合成するステップであって、該ポリヌクレオチドは1つにまとまって、下記の基準、すなわち

i) 各ポリヌクレオチドは、規定の領域内の各コドン位置に、該ポリペプチドのアミノ酸残基の合成に必要なコドンまたは該所定のアミノ酸残基の1つに対するコドンを含むこと、および

i i) 各ポリヌクレオチドは、該所定のアミノ酸残基に対するただ1つのコドンを含むこと

という基準に従う可能な変種アミノ酸置換を示すものであり、それによって、該ポリヌクレオチドを含む発現ライブラリーを生成するステップと、

発現ライブラリーを発現させて、ポリヌクレオチド類似体を生成するステップと、

該ポリペプチドまたはその部分内の1つまたは複数のアミノ酸残基が、測定可能な特性に寄与することが確認され、したがって非機能的アミノ酸残基と区別されるように、測定可能な特性の変化に関してポリペプチド類似体をスクリーニングするステップと

を含む方法。

【請求項 2】

測定可能な特性に寄与することが確認されたアミノ酸残基が、変異誘発に適切であると決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

非機能的残基が、変異誘発には不適當であると決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

1つまたは複数の機能的アミノ酸残基だけが変異誘発される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

変異誘発が、ルックスルー変異誘発 (L T M)、ウォークスルー変異誘発 (W T M)、またはこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

ポリペプチドが、抗体またはその断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

測定可能な特性が、結合特異性、結合活性、結合親和性、F c 受容体結合、グリコシル化、補体結合、半減期安定性、溶解性、熱安定性、触媒活性、および酵素活性からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

測定可能な特性に変化のある、選択されたポリペプチド類似体をコードするポリヌクレオチドを特定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

測定可能な特性の変化が、強化された特性である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

強化された特性が、高親和性抗原結合である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

強化された特性が、改善されたエフェクター機能である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

抗原が、ヒトの疾患または障害の治療標的である、請求項 10 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

スクリーニングするステップが、ポリペプチドと標的基質とを接触させることを含み、該ポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに結び付いており、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、標的基質に結合することが可能な変種ポリペプチドが検出されるように、かつそれによってポリヌクレオチドによりコードされることが確認されるように、検出可能な部分に結び付いている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

検出可能な部分が、蛍光部分、UV 部分、および可視光吸収部分からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

検出可能な部分が、ビオチン部分、GST 部分、myc 免疫タグ部分、および His タグ部分からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

ポリヌクレオチドが、リボソームディスプレイ、ポリソームディスプレイ、ファージディスプレイ、原核（細菌）ディスプレイ、酵母ディスプレイ、真核細胞ディスプレイ、およびアレイライブラリーディスプレイからなる群から選択された発現ディスプレイを使用してポリペプチド類似体に結び付いている、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

ポリペプチドが、単鎖抗体 (scFvs) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

規定の領域が、ポリペプチドの機能的ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

規定の領域が、CDR 1、CDR 2、CDR 3、CDR 4、CDR 5、CDR 6、およびこれらの組合せからなる群から選択された CDR またはその部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

規定の領域が、FR 1、FR 2、FR 3、FR 4、およびこれらの組合せからなる群から選択されたドメインを含む抗体フレームワーク領域である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

規定の領域が、補体結合部位および Fc 受容体結合領域からなる群から選択されたドメインを含む抗体エフェクター領域である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

所定のアミノ酸残基が、Ser、Thr、Asn、Gln、Tyr、Cys、His、Glu、Asp、Lys、Arg、Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、および Val からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

所定のアミノ酸残基がポリペプチドの規定の領域内の 1 つまたは複数の機能的アミノ酸位置に現れる、ポリペプチド類似体のライブラリーを生成する方法であって、

該ポリペプチドのアミノ酸配列の規定の領域内の、1 つまたは複数の機能的アミノ酸位置を選択するステップと、

規定の領域内の各機能的アミノ酸位置で置換されるアミノ酸残基を決定するステップと、

規定の領域をコードする個々のポリヌクレオチドを合成するステップであって、該ポリヌクレオチドは 1 つにまとまって、下記の基準、すなわち

i) 各ポリヌクレオチドは、規定の領域内の各機能的アミノ酸コドン位置に、該ポリペプチドのアミノ酸残基に必要なコドンまたは該所定のアミノ酸残基に対するコドンを含むこと、および

ii) 各ポリヌクレオチドは、所定のアミノ酸残基に対するただ 1 つのコドンを含むこと

という基準に従う可能な変種ポリヌクレオチドを表すものであり、それによって、所定

10

20

30

40

50

のアミノ酸残基が規定の領域内の各機能的アミノ酸位置に現れる、ポリヌクレオチドのライブラリーを生成するステップと

を含む方法。

【請求項 24】

ポリヌクレオチドと一緒にプールされる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

ポリペプチド内の規定の領域内の 2 つ以上の機能的アミノ酸位置が変異誘発される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

同じ所定のアミノ酸が、2 つ以上の機能的アミノ酸位置のそれぞれにおける置換のために選択される、請求項 25 に記載の方法。

10

【請求項 27】

異なる所定のアミノ酸が、2 つ以上の機能的アミノ酸位置のそれぞれにおける置換のためにそれぞれ選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

1 つまたは複数の規定の領域が、ポリペプチドの機能的ドメインを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

機能的ドメインが、抗体結合部位、抗体フレームワーク領域、抗体エフェクター領域、受容体結合部位、および触媒部位からなる群から選択される、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 30】

抗体結合部位またはその部分が、CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、CDR6、およびこれらの組合せからなる群から選択された CDR ドメインを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

抗体フレームワーク領域が、FR1、FR2、FR3、FR4、およびこれらの組合せからなる群から選択されたドメインを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

抗体エフェクター領域が、補体結合部位および Fc 結合領域からなる群から選択されたドメインを含む、請求項 28 に記載の方法。

30

【請求項 33】

所定のアミノ酸残基が、Ser、Thr、Asn、Gln、Tyr、Cys、His、Glu、Asp、Lys、Arg、Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、および Val からなる群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 34】

規定の領域が、少なくとも約 3 から 60 個のアミノ酸を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 35】

ポリヌクレオチドを発現ライブラリーとして合成する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 36】

ポリヌクレオチドを、酵素手段を使用して合成する、請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 37】

ポリヌクレオチドを、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して合成する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 38】

ライブラリーが、リボソームディスプレイライブラリー、ポリソームディスプレイライブラリー、原核（細菌）ディスプレイライブラリー、酵母ディスプレイライブラリー、真核細胞ディスプレイライブラリー、およびアレイディスプレイライブラリーからなる群から選択された発現ライブラリーである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 39】

50

1 つまたは複数の機能的アミノ酸残基だけが変異誘発される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 2 3 に記載の方法によって調製されたポリペプチド類似体のライブラリー。

【請求項 4 1】

規定の領域内に 1 つまたは複数の機能的アミノ酸残基を含むポリペプチド類似体をコードするポリヌクレオチドノライブラリーであって、所定のアミノ酸残基が規定の領域内の各機能的アミノ酸位置で置換され、該ポリヌクレオチドは 1 つにまとまって、下記の基準、すなわち

i) 各ポリヌクレオチドは、規定の領域内の各コドン位置に、該ポリペプチドのアミノ酸残基に必要なコドンまたは所定のアミノ酸残基に対するコドンを含むこと、および

i i) 各ポリヌクレオチドは、該所定のアミノ酸残基に対するただ 1 つのコドンを含むこと

という基準に従う全ての可能な変種を表すものである、ライブラリー。

【請求項 4 2】

1 つまたは複数の機能的アミノ酸残基だけが変異誘発される、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 4 3】

ライブラリーが、ファージディスプレイライブラリー、リボソームノポリソームディスプレイライブラリー、酵母ディスプレイライブラリー、原核（細菌）ディスプレイライブラリー、およびアレイライブラリーからなる群から選択された発現ライブラリーである、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 4 4】

ポリヌクレオチドが、1 つまたは複数の転写調節要素をさらに含む、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 4 5】

ポリヌクレオチドが、生体外で転写され翻訳されるとき、対応するポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドに結び付いている、請求項 4 4 に記載のライブラリー。

【請求項 4 6】

ポリヌクレオチドが、リボソームディスプレイライブラリー、ポリソームディスプレイライブラリー、原核（細菌）ディスプレイライブラリー、酵母ディスプレイライブラリー、真核細胞ディスプレイライブラリー、およびアレイディスプレイライブラリーからなる群から選択されたディスプレイライブラリーを使用してポリペプチドに結び付いている、請求項 4 5 に記載のライブラリー。

【請求項 4 7】

ポリヌクレオチドが RNA を含む、請求項 4 6 に記載のライブラリー。

【請求項 4 8】

ポリヌクレオチドが、検出可能な部分をさらに含む、請求項 4 7 に記載のライブラリー。

【請求項 4 9】

検出可能な部分が蛍光部分を含む、請求項 4 8 に記載のライブラリー。

【請求項 5 0】

ライブラリーが、少なくとも 4 5 から 10^{12} の異なるポリヌクレオチドを含む、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 5 1】

ポリペプチドが、結合ポリペプチドをコードする、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 5 2】

結合ポリペプチドが、重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、および単鎖抗体 ($scFv$) からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 5 3】

10

20

30

40

50

ライブラリーが固体支持体に固定化される、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 5 4】

固体支持体がマイクロチップである、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 5 5】

ライブラリーがアレイライブラリーである、請求項 4 1 に記載のライブラリー。

【請求項 5 6】

請求項 4 1 に記載のライブラリーにより固定化されたポリヌクレオチドのアレイを含むマイクロチップ。

【請求項 5 7】

ポリペプチドが、標的分子に結合し、かつ重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、および単鎖抗体 (scFv) からなる群から選択された結合領域を含む、請求項 4 1 に記載のライブラリーを使用して特定されたポリペプチド類似体。

10

【請求項 5 8】

所望の特性を有するポリペプチド類似体のサブセットを特定する方法であって、
該ポリペプチドのアミノ酸配列の規定の領域内の、1つまたは複数の機能的アミノ酸を選択するステップと、

規定の領域内の各機能的アミノ酸位置で置換されるアミノ酸残基を決定するステップと、

規定の領域をコードするポリヌクレオチドを合成するステップであって、該ポリヌクレオチドは1つにまとまって、下記の基準、すなわち

20

i) 各ポリヌクレオチドは、規定の領域内の各コドン位置に、該ポリペプチドのアミノ酸残基の合成に必要なコドンまたは所定のアミノ酸残基に対するコドンを含むこと、および

ii) 各ポリヌクレオチドは、該所定のアミノ酸残基に対するただ1つのコドンを含むこと

という基準に従う可能な変種ポリヌクレオチドを表すものであり、それによって、ポリヌクレオチドを含む発現ライブラリーを生成するステップと、

発現ライブラリーを、該ライブラリーが発現する条件にさらすステップと、

該発現ライブラリーをスクリーニングして、所望の特性を有するポリペプチドを特定するステップと、

30

対照基準と比べてポリペプチドの特性を比較するステップであって、対照基準に相当しまたは超えるポリペプチドが応答物として分類され、対照基準に達しないポリペプチドが非応答物として分類されるステップと、

応答物および非応答物をデータベース内で分類するステップと、

該データベースに照会して、合成されるサブセットのポリペプチドの配列を決定するステップと

を含む方法。

【請求項 5 9】

上記ステップの1つまたは複数がコンピュータにより支援される、請求項 5 8 に記載の方法。

40

【請求項 6 0】

特性が、変化した結合特異性、変化した結合オンレート (k_{on})、変化した結合オフレート (k_{off})、およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

対照基準が、結合特異性、結合活性、結合親和性、エフェクター機能、Fc 受容体結合、グリコシル化、補体結合、半減期安定性、溶解性、熱安定性、触媒活性、および酵素活性からなる群から選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

ポリペプチドが、重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、および単鎖抗体 (s

50

c F v) からなる群から選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

請求項 5 9 に記載の方法の 1 つまたは複数のステップを実施するための取扱説明書を有する電子機器で使用するのに適切な培地。

【請求項 6 4】

請求項 5 9 に記載の方法の 1 つまたは複数のステップを実施するための機器。

【請求項 6 5】

1 つまたは複数の機能的アミノ酸残基で所定のアミノ酸置換をコードするポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドは 1 つにまとまって、変化した結合特異性、変化した結合活性、変化した結合親和性、変化した F c 結合活性、変化した結合オンレート (k_{on})、変化した結合オフレート (k_{off})、およびこれらの組合せからなる群から選択された特性を強化するための変異誘発に適切な全ての可能な変種を表すものである、抗体またはその結合部位をコードするポリヌクレオチドのライブラリー。

10

【請求項 6 6】

請求項 6 5 に記載のライブラリーから得られた抗体またはその結合部分。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連情報

20

下記の明細書全体を通して引用されるその他の特許、特許出願、および参考文献の全ての内容全体も、参照によりその全体を本明細書に援用する。

【背景技術】

【0002】

変異誘発は、タンパク質の構造および機能の研究において、強力な手段である。変異誘発は、興味あるタンパク質をコードするクローンされた遺伝子のヌクレオチド配列中で行うことができ、修飾された遺伝子を発現、タンパク質の変異体を生成することができる。野生型タンパク質と、生成した変異体とを特性について比較することにより、結合活性および/または触媒活性などのタンパク質の構造的完全性および/または生化学的機能に本質的な、個々のアミノ酸またはアミノ酸のドメインを同定することがしばしば可能である。しかし、単一のタンパク質から生成することができる変異体の数は、その変異を包含する選択された変異体が単に推定上重要なタンパク質の領域 (例えば、タンパク質の活性部位を構成する領域) であるとしても、情報価値がありまたは所望の特性を有する変異体の選択を困難にする。例えば、特定のアミノ酸の置換、欠失、または挿入は、タンパク質に対して局所的または全体的な効果を及ぼす可能性がある。

30

【0003】

ポリペプチドを変異誘発するための以前の方法は、非常に制限的であり、非常に包括的であり、あるいは、機能を増大させまたは改善するのではなくてタンパク質の機能をノックアウトすることに限定されていた。例えば、非常に制限的な手法は、特定機能部位の存在を確認しまたは機能部位内に非常に特異的な変化を生じさせた結果を理解するのに使用される、選択的または部位特異的変異誘発である。部位特異的変異誘発の一般的な適用例は、通常はリン酸化されてポリペプチドにその機能を発揮させるアミノ酸残基を変化させて、リン酸化と機能的活性との関連を確認するリンタンパク質の研究におけるものである。この手法は、ポリペプチドおよび研究される残基に非常に特異的である。

40

【0004】

反対に、非常に包括的な手法は、遺伝子またはタンパク質の画定された領域内で可能な全ての変化を包含する、多数の変異をもたらすように設計された、飽和またはランダム変異誘発である。これは、関連あるタンパク質ドメインの本質的に全ての可能な変種を発生させることによって、適正なアミノ酸配列が、ランダムに発生した変異体の 1 つとして生成され易くなるという原理に基づいている。しかし実際には、非常に多くの望ましくない

50

候補のいわゆる「ノイズ」が存在するので、発生した変異の膨大な数のランダムな組合せによって所望の候補を有意に選択する能力が妨げられる可能性がある。

【 0 0 0 5 】

「ウォークスルー」変異誘発とも呼ばれる別の手法（例えば、米国特許第 5 8 3 0 6 5 0 号、第 5 7 9 8 2 0 8 号参照）は、統計的に所望の組の変異を含む変性オリゴヌクレオチドの混合物を合成することによって、ポリペプチドの規定の領域を変異誘発させるのに使用されている。しかし、変性ポリヌクレオチド合成が用いられるので、ウォークスルー変異誘発は、所望の組の変異の他にいくつかの望ましくない変化をもたらす。例えば、わずか 5 つのアミノ酸部位の規定の領域全体にわたって変異を順次導入するには、1 0 0 個を上回るポリヌクレオチドのセットを作製し、（そしてスクリーニングし）なければならない（例えば図 6 参照）。したがって、例えば 2 つまたは 3 つの領域を作製しスクリーニングすることは徐々に複雑になり、すなわちわずか 1 0 から 1 5 の変異の存在のためには、それぞれ 2 0 0 から 3 0 0 を上回るポリヌクレオチドを作製しスクリーニングすることが必要になる。

10

【 0 0 0 6 】

タンパク質の変異誘発に使用されてきたさらに別の手法には、アラニンスキャンニング変異誘発があり、タンパク質の機能が妨げられる部位を特定するために、タンパク質の一部を通してアラニン残基を「スキャン」する。しかしこの手法は、機能を増大させまたは改善するのではなく、所与の部位の中性アラニン残基の置換によるタンパク質機能の損失しか見ない。したがって、改善された構造および機能を有するタンパク質を生成するのに有用な手法ではない。

20

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

したがって、新しいまたは改善された機能を目的としてタンパク質を変異誘発させる系統立った方法が、依然として求められている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、新規なまたは改善されたタンパク質（またはポリペプチド）を生成するための変異誘発の方法と、この方法によって生成されたポリペプチド類似体および特異的ポリペプチドのライブラリーに関する。変異誘発を目標にしたポリペプチドは、断片、類似体、およびこれらの変異体形態を含めた天然、合成、または設計製作されたポリペプチドにすることができる。

30

【 0 0 0 9 】

一実施形態では、この方法は、ポリペプチドのアミノ酸配列の規定の領域（またはいくつかの異なる領域）内の本質的に全ての位置に、所定のアミノ酸を導入するステップを含む。個別には 1 個の所定のアミノ酸しか持たないが、一まとめにした場合は規定の領域内の全ての位置に所定のアミノ酸を有するポリペプチド類似体を含んだポリペプチドライブラリーを生成する。事実上、単一の所定のアミノ酸（および所定のアミノ酸だけ）は、ポリペプチドの 1 つまたは複数の規定の領域全体を通して位置ごとに置換されるので、単にこの方法を「ルックスルー」変異誘発と呼ぶことができる。

40

【 0 0 1 0 】

しかし、好ましい実施形態では、この L T M 法は、ポリペプチド内の所望の特性をスクリーニングしかつ得るために変化させる残基の数をさらに減少させるため、ポリペプチドまたはその一部の機能的アミノ酸（またはいわゆる「ホットスポット」）を非機能的アミノ酸（またはいわゆる「コールドスポット」）から識別するのに使用することにより改善される。したがって、改善されたルックスルー変異誘発（L T M）の方法（以下、改善された L T M を L T M 2 と呼ぶ）によれば、後にいかなる「ノイズ」もなく効率的にスクリーニングすることができるポリペプチド内の、最も関連ある機能的変化だけを表す候補分子の一部を、特定し構築することが可能になる。重要なことは、L T M 2 は、この方法が

50

ポリペプチドの機能に対して最も効果を発揮すると考えられるポリペプチドのアミノ酸配列の変化だけを含むように設計されており、したがってスクリーニングによって、強化された特性を有する変性ポリペプチドが得られるので、伝統的なライブラリーを凌ぐ優れた利点を有する L T M 2 ライブラリーの構成を可能にすることである。したがって、L T M 2 は、ポリペプチドの規定の領域内の各機能的アミノ酸部位で、所定のアミノ酸を別々に置換する構造的および機能的結果を「ルックスルー」することを可能とし、それによって、規定の領域に特異的なタンパク質の化学的特性は、望ましくないポリペプチド類似体（すなわち、L T M 2 スキームに従うもの以外のアミノ酸置換を含有する類似体）の生成からのいかなる干渉や「ノイズ」からも切り離される（例えば、図 1 参照）。

【 0 0 1 1 】

したがって本発明は、ポリペプチドの 1 つまたは複数の規定の領域における特異的アミノ酸変化の役割の、非常に効率的かつ正確な系統的評価が可能とする。これは、必要とされるポリペプチド類似体の数が大幅に増加するように、したがって望ましくない類似体の存在も増加するように、2 つ以上の規定の領域を（変異させることによって）評価する場合に特に重要になる。本発明は、この問題を、望ましくない類似体を完全になくすことによって、したがって観察されるタンパク質構造または機能のあらゆる変化が所定のアミノ酸の置換以外の結果であるという可能性をなくすことによって、未然に防ぐ。このように、タンパク質の同等の多数の領域に、特異的なタンパク質の化学的特性を切り離す効果は、高い精度および効率で研究されることができる。これは、変異誘発がそのような領域の相互作用にどのように影響するのか研究し、それによってタンパク質の全体的な構造および機能を改善することを含むことが重要である。

【 0 0 1 2 】

本発明の特定の実施形態では、本発明の方法は、1 つまたは複数の機能的アミノ酸残基または位置にマッピングされる特定の化学モチーフを特定するのに適切である。そのような化学モチーフに寄与するアミノ酸残基は、1 つまたは複数の C D R 領域内にかつ／あるいは 1 つまたは複数のポリペプチド内で、例えば抗体重鎖および軽鎖内で、近接したまたは近接していない 1 つまたは複数の位置で生ずることができる。本発明の方法は、選択されたアミノ酸位置または規定の領域での関連あるアミノ酸の化学的特性の系統的試験（または化学的プロファイリング）を可能にするので、化学モチーフをさらに探索することを可能にする。したがって、一実施形態では、本発明は、所望の化学的特性を特定し、次いで強化された特性を実現するためにまたは有害な特性を除去するために、関連したまたは関連していない化学的特性を組み込んだ結果を検討するための方法を提供する。本発明の方法によるプロファイリングに適した典型的なアミノ酸側鎖の化学的特性は、極性である、正に帯電した、負に帯電した、疎水性であるアミノ酸側鎖の化学的特性である。一実施形態では、荷電化学物質は、選択されたアミノ酸残基、位置、または規定の領域での定住物であることが確認され、その他の荷電アミノ酸は、測定可能な特性の変化が実現されるように、親アミノ酸の代わりに使用する。好ましい実施形態では、測定可能な特性の変化は、抗体の強化された特性であり、例えば、改善された抗原結合またはエフェクター機能である。

【 0 0 1 3 】

したがって、本発明は、改善された特性を持つ抗体の効率的なスクリーニングのために、例えば関連する化学的特性を有する選択されたアミノ酸位置 / 規定の領域に導入された、関連するアミノ酸側基の化学的特性を含んだ抗体ライブラリーも提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の実施形態では、ポリペプチド類似体のライブラリーは、ポリペプチドの 1 つまたは複数の規定の領域をコードする個々のポリヌクレオチドを最初に合成することによって、生成され、スクリーニングされるが、この場合ポリヌクレオチドは、一まとめにした場合、本明細書に記述するルックスルー基準に従う全ての可能な変種ポリヌクレオチドを表す。この方法は、機能的アミノ酸残基（位置）を特定し、非機能的アミノ酸残基（位置）と区別するのに使用する。変種ポリヌクレオチドの一部は、例えば生体外転写およ

10

20

30

40

50

び翻訳を使用して、かつ／あるいはリボソームディスプレイやファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、アレイ化ディスプレイ、または当技術分野で知られている任意のその他の適切なディスプレイ系などのディスプレイ技術を使用して発現させる。

【 0 0 1 5 】

次いで発現したポリペプチドを、結合アッセイまたは酵素／触媒アッセイなどの機能的アッセイを使用して、スクリーニングし選択する。一実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関して発現し、それによって、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の特定が可能になる。さらに別の実施形態では、ポリペプチドを、タンパク質の化学的特性を使用して直接合成する。

10

【 0 0 1 6 】

本発明のさらに別の実施形態では、 V_L および V_H C D R アミノ酸配列変種のコンビナトリアルベネフィシャルライブラリーを構成する。この第2のライブラリーは、各アミノ酸変種位置に、野生型アミノ酸に対するコドンおよびその位置に前に特定された有益な変種アミノ酸のそれぞれに対するコドンを有するコード配列を生成することによって構成される。

【 0 0 1 7 】

したがって本発明は、一部にはこのライブラリーが、任意の望ましくない類似体ポリペプチドまたはいわゆるノイズを含まないので、スクリーニングに実用的なサイズのポリペプチド類似体のライブラリーを生成するのに使用することができる、インテリジェント変異誘発の方法を提供する。この方法は、ポリペプチドの構造および機能における特異的なアミノ酸の役割について研究するのに、また、抗体や結合断片またはその類似体、単鎖抗体、触媒抗体、酵素、およびリガンドなどの、新しいまたは改善されたポリペプチドを開発するのに使用することができる。さらにこの方法は、L T M 2 を使用して生成され研究されるポリペプチド類似体の初期サブセットを選択することに用いることができる、先験的情報の利益、例えばコンピュータモデリングとともに実施されることができる。

20

【 0 0 1 8 】

本発明のその他の利点および態様は、下記の説明および実施例から容易に明らかにされる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

30

【 0 0 1 9 】

明細書および特許請求の範囲を明確に理解するために、以下の定義を次に示す。

【 0 0 2 0 】

定義

本明細書で使用する「類似体」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する変種または変異体ポリペプチド（またはそのようなポリペプチドをコードする核酸）を指す。

【 0 0 2 1 】

「結合分子」という用語は、基質または標的に結合するタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを含めた任意の結合分子を指す。一実施形態では、結合分子は、抗体またはその結合断片（例えば F a b 断片）、単ドメイン抗体、単鎖抗体（例えば s c F v ）、またはリガンドに結合することが可能なペプチドである。別の実施形態では、結合分子、特に C D R 領域を含む結合分子は、その他の抗体、免疫グロブリン、または免疫グロブリン様分子（例えばフィブロネクチン）から得られ、あるいは部分的にまたは全体が合成して得られたものである、非伝統的な足場またはフレームワーク領域を含むことができる。

40

【 0 0 2 2 】

「規定の領域」という用語は、ポリペプチドの選択された領域を指す。典型的な場合、規定の領域は、機能的部位、例えばリガンドの結合部位、結合分子もしくは受容体の結合部位、または触媒部位の、全てまたは一部を含む。規定の領域は、機能的部位の複数の部分を含んでもよい。例えば規定の領域は、相補性決定領域（C D R ）、例えば単ドメイン

50

ン結合領域、または抗体の完全重鎖および／もしくは軽鎖可変領域（F_v）の、全て、一部、または複数の部分を含むことができる。したがって、機能的部位は、分子の機能的活性に寄与する単一または複数の規定の領域を含むことができる。

【0023】

「機能的アミノ酸」および「非機能的アミノ酸」という用語は、それぞれ、ポリペプチドの測定可能な特性または活性に寄与することが決定される（例えば本発明の方法を使用して）、ポリペプチド（またはその一部）内のアミノ酸残基（または対応するアミノ酸残基部分）を指す。したがって、ポリペプチドの活性に影響を与えないことから「コールドスポット」と呼ばれる非機能的残基または部分に比べ、機能的アミノ酸残基（または対応する部分）は、ポリペプチドの活性に影響を及ぼす残基または残基部分であるので、「ホットスポット」と呼ばれる。機能的アミノ酸残基（または部分）は、変異誘発に適切であるとして、非機能的アミノ酸残基（または部分）と区別される。典型的には、本発明の方法を抗体分子の調査に利用する場合、例えば抗原結合を変化させるアミノ酸残基を機能的残基／位置（すなわち、ホットスポット）と見なし、一方、そのような結合を変化させない残基を非機能的残基／位置（すなわち、コールドスポット）と呼ぶ。

10

【0024】

「測定可能な特性」という用語は、標準的な技法を使用して測定し、決定し、またはアッセイを行うことができる、ポリペプチド（またはその部分）の機能的な特性または活性を指し、結合活性、キナーゼ活性、触媒活性、熱安定性、または酵素活性が含まれる。抗原結合ポリペプチド、例えば抗体であるポリペプチドの測定可能な特性には、典型的な場合、結合特異性、結合活性、結合親和性、Fc受容体結合、グリコシル化、補体結合、半減期安定性、可溶性、熱安定性、触媒活性、および酵素活性が含まれる。

20

【0025】

「ルックスルー変異誘発」または「LTM」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列の規定の領域（またはいくつかの異なる領域）内の、本質的に全ての位置に、所定のアミノ酸を導入するための方法を指す。個々には所定のアミノ酸を1つしか持たないが、一まとめにした場合は規定の領域内の全ての位置に所定のアミノ酸を持つポリペプチド類似体を含んだポリペプチドライブラリーを生成する。

【0026】

「改善されたルックスルー変異誘発」または「LTM2」という用語は、機能的アミノ酸残基（ホットスポット）と非機能的アミノ酸残基（コールドスポット）とが識別または区別されるように行われたLTMを指す。したがってLTM2法によれば、ポリペプチド（またはその部分）内の機能的アミノ酸残基に、所定のアミノ酸を選択的に導入することが可能になる。対応するLTM2ライブラリーは、変化しまたは強化された特性を最も与え易いアミノ酸変化を有するポリペプチド類似体に富んでいる。LTM2は、LTMの後に、あるいは所与のアミノ酸残基または残基部分の機能性に関する先験的情報に基づいて、実施することができる。

30

【0027】

「ライブラリー」という用語は、本発明の方法により変異誘発された2個以上の分子を指す。ライブラリーの分子は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド、無細胞抽出物中のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの形で、またはファージ、原核細胞、もしくは真核細胞におけるポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチドとしての形をとることができる。本発明のライブラリーは、2個以上の分子またはポリペプチド類似体を含むことができ、例えば約2から10個、約10から50個、約50から10²個、約10³個、約10⁴個、約10⁵個、約10⁶個、約10⁷個、約10⁸個、約10⁹個、約10¹⁰個、約10¹¹個、約10¹²個、約10¹³個、またはそれ以上、または前述のいずれかの間隔もしくは範囲を含む。

40

【0028】

「変異誘発」という用語は、アミノ酸配列の変化を指す。これは、変化したアミノ酸配列をコードすることが可能な核酸（ポリヌクレオチド）を変化させまたは生成することに

50

よって、あるいはタンパク質の化学的特性を使用した変性ポリペプチドの直接的な合成によって、実現することができる。

【0029】

「変異誘発」という用語は、他に特に指示しない限り、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を変化させるための当技術分野で認識される任意の技法を指す。好ましいタイプの変異誘発には、ウォークスルー変異誘発（WTM）、ベネフィシャルウォークスルー変異誘発、ルックスルー変異誘発（LTM）、改善されたルックスルー変異誘発（LTM2）、またはこれらの組合せが含まれる。

【0030】

「コンビナトリアルベネフィシャル変異誘発」という用語は、最初に所定のLTMアミノ酸変異誘発によって測定可能な特性に変化があることが確認された、V_Lおよび/またはV_HCDRアミノ酸配列変種の変性混合物をコードするコード配列の組合せライブラリーを指す。コンビナトリアルベネフィシャル変異の手法では、LTMによって確認されたこれら有益な変異の組合せであるオリゴヌクレオチドコード配列を生成する。これらの組合せは、単一CDR内での種々の有益な変異、単一抗体鎖内の2つ以上のCDRでの変異、または種々の抗体鎖内のCDRでの変異の組合せでよい。

【0031】

「ポリヌクレオチド」という用語は、DNA分子やRNA分子などの核酸、およびその類似体を指す（例えば、ヌクレオチド類似体を使用して、または核酸の化学的特性を使用して生成された、DNAまたはRNA）。望みに応じて、ポリヌクレオチドは、例えば当技術分野で理解されている核酸の化学的特性を使用して合成的に、または例えばポリメラーゼを使用して酵素的に、作製することができる。典型的な修飾には、メチル化、ビオチン化、およびその他の当技術分野で知られている修飾が含まれる。さらに、核酸分子を1本鎖または2本鎖であることができ、望む場合には、検出可能な部分にリンクされまたは結合されることができる（例えば共有または非共有）。

【0032】

「変種ポリヌクレオチド」という用語は、本発明の対応するポリペプチド類似体（またはその部分）をコードするポリヌクレオチドを指す。したがって、変種ポリヌクレオチドは、異なるアミノ酸の発現をもたらすように変化している1つまたは複数のコドンを含む。

【0033】

「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって接合された2つ以上のアミノ酸、例えばペプチド（例えば、2～50のアミノ酸残基）、ならびにより長いペプチド配列、例えば、典型的には50程度の少ないアミノ酸残基から1000を超えるアミノ酸残基のアミノ酸配列を含む、タンパク質配列を指す。

【0034】

「プーリング」という用語は、ポリペプチド領域全体のルックスルー変異誘発（LTM）または改善されたルックスルー変異誘発（LTM2）を表すライブラリーを形成するための、ポリヌクレオチド変種またはポリペプチド類似体の組合せを指す。分子は、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの形をとることができ、サブライブラリーの形で、固体支持体上の分子として、溶液中の分子として、かつ/または1つまたは複数の生物体（例えばファージ、原核細胞、または真核細胞）中の分子として共存することができる。

【0035】

「所定のアミノ酸」という用語は、変異誘発させるポリペプチドの規定の領域内の各位置で、置換のために選択されたアミノ酸残基を指す。これは、所定のアミノ酸を既に（例えば生来）含有する領域、したがって所定のアミノ酸で置換する必要のない領域内の位置を含まない。したがって、本発明により生成された各ポリペプチド類似体は、所与の規定の領域内に「所定のアミノ酸」残基を1つしか含有しない。しかしまとめにすると、生成されたポリペプチド類似体のライブラリーは、変異誘発される領域内の各位置に所定の

アミノ酸を含有し、好ましい実施形態では、機能的であることが決定されたアミノ酸位置（ホットスポット）である。典型的な場合、所定のアミノ酸は、通常ならアミノ酸の側基に関連する特定のサイズまたは化学的特性に合わせて選択される。適切な所定のアミノ酸には、例えば、グリシンおよびアラニン（立体的に小さい）；セリン、トレオニン、およびシステイン（求核性）；バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、およびプロリン（疎水性）；フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン（芳香性）；アスパラギン酸およびグルタミン酸（酸性）；アスパラギン、グルタミン、およびヒスチジン（アミド）；ならびにリジンおよびアルギニン（塩基性）が含まれる。非伝統的アミノ酸残基（例えばホモシステイン）の使用も本発明の範囲内であり、当技術分野で理解される任意の技法を使用して導入することができる。

10

【0036】

詳細な説明

タンパク質の研究では、その構造および機能において、あるアミノ酸が極めて重要な役割を演ずることが明らかにされた。例えば、不連続な数のアミノ酸だけが抗体と抗原との結合に寄与し、または酵素の触媒現象に関与するようである。

【0037】

あるアミノ酸は、タンパク質の活性または機能に極めて重要なことが明らかであるが、どのアミノ酸が関与し、それらがどのように関与しているのか、またどの置換がタンパク質の構造または機能を改善することができるのか、明らかにすることは難しい。1つには、これはポリペプチド内のアミノ酸側鎖の空間配置の複雑さと、機能的部位の形成に寄与するポリペプチドの異なる部分の相互関係とに起因する。例えば、抗体の可変重鎖および軽鎖領域の6つのCDR間の相互関係は、抗原またはリガンド結合ポケットに寄与する。

20

【0038】

選択的（部位特異的）変異誘発や飽和変異誘発などの以前の変異誘発法は、複雑なポリペプチド中の膨大な数の可能性ある変種に鑑みて、タンパク質の構造および機能の研究にその利用が限定されている。これは特に、大量の望ましくない組合せ、いわゆるノイズの存在が、所望の組合せにしばしば付随することを考えれば、もっともなことである。

【0039】

本発明の方法は、ポリペプチドの構造または機能における、特定のアミノ酸の役割と、ポリペプチドの規定の領域内での特定のアミノ酸の位置とを評価するための、したがって改善されたポリペプチドを生成するための、系統的、実用的、および非常に正確な手法を提供する。

30

【0040】

1. 規定の領域の選択

本発明によれば、タンパク質内の1つまたは複数の規定の領域を、変異誘発を目的として選択する。典型的な場合、これらの領域は、タンパク質の構造または機能に重要と考えられる。これは例えば、構造的および/または機能的態様が知られているものから推論することができるが、または、規定の領域とその他のタンパク質の研究からわかっていることを比較することから推論することができるが、情報のモデリングにより助けることができる。例えば規定の領域は、機能的部位、例えば結合、触媒、または別の機能において、役割を有するものにすることができる。一実施形態では、規定の領域は、抗原結合分子の超可変領域または相補性決定領域（CDR）である（図1参照）。別の実施形態では、規定の領域は、相補性決定領域（CDR）の一部である。その他の実施形態では、2つ以上の規定の領域、例えばCDRまたはその一部を、変異誘発を目的に選択する。

40

【0041】

2. 所定のアミノ酸残基の選択

規定の領域内の置換を目的に選択されたアミノ酸残基は、一般に、問題にされる構造または機能に関与することで知られているものから選択される。20個の天然のアミノ酸は、その側鎖が異なっている。それぞれの側鎖は、それぞれのアミノ酸を独特のものにする化学的特性の一因となる。結合を変化させまたは新たな結合親和性を生成する目的で、こ

50

れら 20 個の天然のアミノ酸のいずれかまたは全てを選択することができ、非伝統的アミノ酸残基（例えばホモシステイン）も同様である。したがって、置換ごとに膨大な数の類似体を生成した以前の変異誘発方法は、20 個のアミノ酸それぞれの置換のタンパク質結合に及ぼす影響を評価するのに非現実的であった。対照的に本発明の方法は、各アミノ酸置換ごとに現実的な数の類似体を生成し、したがって、タンパク質の 1 つまたは複数の分離領域内で、より様々なタンパク質の化学的特性を評価することが可能になる。

【0042】

タンパク質結合とは対照的に、ごく一部のアミノ酸残基だけが、典型的には酵素または触媒現象に寄与する。例えば側鎖の化学的特性から、選択された数の天然アミノ酸だけが、優先的に触媒現象に寄与する。アミノ酸側鎖の化学的特性の、そのようなグループ分けは、特定のアミノ酸残基または位置の化学的プロファイリングに使用するのに適切なアミノ酸残基を選択するのに有用である。これらのアミノ酸は、Ser や Thr、Asn、Gln、Tyr、Cys などの極性および中性アミノ酸のグループ、荷電アミノ酸、Asp および Glu、Lys および Arg、ならびに、特にアミノ酸 His に属する。その他の極性および中性の側鎖は、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、および Tyr のものである。Gly も、このグループの境界線上にある要素と見なされる。Ser および Thr は、水素結合の形成に重要な役割を演ずる。Thr は、 β 炭素に追加の非対称を有し、したがって立体異性体の 1 つだけが使用される。酸アミド Gln および Asn も水素結合を形成することができ、アミド基が水素供与体として機能し、カルボニル基が受容体として機能する。Gln は、Asn よりも 1 つ多い CH₂ 基を有し、そのため極性基がより柔軟になり、主鎖との相互作用を低下させる。Tyr は、高い pH 値で解離することができる、非常に極性の高いヒドロキシル基（フェノール OH）を有する。Tyr は、いくらか荷電側鎖のように振る舞い、その水素結合はかなり強力である。

【0043】

中立極性酸は、タンパク質分子の内部のみならず表面にも見られる。内部残基として、これらは通常、互いにまたはポリペプチド主鎖と共に水素結合を形成する。Cys は、ジスルフィド架橋を形成することができる。

【0044】

ヒスチジン（His）は、pK 値が 6.0 の複素環芳香族側鎖を有する。生理学的 pH 範囲では、溶液から水素イオンをとった後に、そのイミダゾール環を帯電させずまたは帯電させることができる。これら 2 つの状態は、容易に得ることが可能であるので、His は、化学反応を触媒するのに実に適している。酵素の活性中心には概ね見られ、例えばセリンプロテアーゼに見られる。

【0045】

Asp および Glu は、生理学的 pH で負に帯電している。その短い側鎖により、Asp のカルボキシル基は、主鎖に対してかなり強固である。これは、多くの触媒部位にあるカルボキシル基が、なぜ Glu によってではなく Asp によって提供されるのかの理由になり得る。帯電した酸は、一般に、ポリペプチドの表面に見られる。

【0046】

さらに、Lys および Arg が表面に見られる。これらは、類似したエネルギーの複数の回転異性体を提示する、長く柔軟な側鎖を有する。いくつかの例では、Lys および Arg が、内部塩橋の形成に寄与し、または触媒を助ける。これらはポリペプチドの表面にさらされるので、Lys は、側鎖を修飾しまたは Lys 残基のカルボニル末端でペプチド鎖を切断する酵素によって、より頻繁に認識される残基である。

【0047】

アミノ酸側基の化学的特性に応じて、所定のアミノ酸残基を選択することができるが、所望の側基の化学的特性の欠如は、所定のアミノ酸として使用するためにアミノ酸残基を除外するための基準にすることができる。例えばアラニンなどの、立体的に小さくかつ化学的に中性のアミノ酸は、所望の化学的特性をなくすためにルックスルー変異誘発から除外することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

3. ポリペプチド類似体ライブラリーの合成

一実施形態では、ポリペプチド類似体のライブラリーは、ポリペプチドの規定の領域をコードしかつ所定のアミノ酸に対して1つのコドンしか持たない個々のオリゴヌクレオチドを合成することによって、スクリーニングを目的に生成する。これは、オリゴヌクレオチド内の各コドン位置に、野生型ポリペプチドの合成に必要とされるコドンまたは所定のアミノ酸に対するコドンを組み込むことによって、実現される。これは、各オリゴヌクレオチドごとに、複数の変異ではなく1つの変異だけが形成される点が、飽和変異誘発、ランダム変異誘発、またはウォークスルー変異誘発で生成されたオリゴヌクレオチドとは異なっている。

10

【 0 0 4 9 】

オリゴヌクレオチドを個々に生成し、次いで望みに応じて混合しまたはプールすることができる。野生型配列のコドンと所定のアミノ酸に対するコドンとが同じである場合、置換は行われない。

【 0 0 5 0 】

したがって、規定の領域内のアミノ酸位置の数は、作製されるオリゴヌクレオチドの最大数を決定することになる。例えば、5つのコドン位置が所定のアミノ酸と共に変化する場合、野生型アミノ酸配列を表す5つのポリヌクレオチドと1つのポリヌクレオチドを合わせたものが合成される。2つ以上の領域を、同時に変化させることができる。一実施形態では、変異誘発された規定の領域内のアミノ酸残基（位置）は、機能的アミノ酸残基（位置）である。別の実施形態では、機能的アミノ酸残基（位置）だけが変異誘発される。

20

【 0 0 5 1 】

ライブラリーを生成するためのオリゴヌクレオチドの混合物は、DNA合成の既知の方法によって、容易に合成することができる。好ましい方法では、固相βシアノエチルホスホラミダイトの化学的特性を使用する。米国特許第4725677号を参照されたい。便宜上、ヌクレオチドの指定試薬容器を含んだ自動DNA合成のための機器を使用することができる。ポリヌクレオチドは、より大きい遺伝子コンテキストへの、例えば規定の領域を表すポリヌクレオチドの導入またはアセンブリを促進させる、制限部位またはプライマーハイブリダイゼーション部位を含有するように合成してもよい。

【 0 0 5 2 】

合成されたポリヌクレオチドは、標準的な遺伝子工学技法を使用することによって、変異誘発されているポリペプチドのより大きい遺伝子コンテキストに挿入することができる。例えばポリヌクレオチドは、制限酵素のフランキング認識部位を含有するように作製することができる。Cre, R.の米国特許第4888286号を参照されたい。認識部位は、天然に存在する認識部位に対応するように設計され、またはその領域をコードするDNAに近接する遺伝子に導入される。2本鎖形態に変換させた後、ポリヌクレオチドを、標準的な技法によって遺伝子にライゲーションする。適切なベクター（例えば、ファージベクター、プラスミドを含む）を用いることにより、遺伝子を、変異体ポリペプチドの発現に適した無細胞抽出物、ファージ、原核細胞、または真核細胞に導入することができる。

30

40

【 0 0 5 3 】

変異誘発されるポリペプチドのアミノ酸配列がわかっている場合、またはDNA配列がわかっている場合は、遺伝子合成が、可能性ある手法である。例えば部分的に重なり合っているポリヌクレオチド、典型的にはその長さが約20～60のヌクレオチドを設計することができる。次いで内部ポリヌクレオチドを、その相補的パートナーにリン酸化しアニールすることにより、さらなるアニールングに有用な、1本鎖伸長部を持った2本鎖DNA分子が与えられる。次いで、アニールされた対を一緒に混合し、ライゲーションして、完全長2本鎖分子を形成する（例えば、図8参照）。都合のよい制限部位を、適切なベクターにクローニングするために、合成遺伝子の端部付近に設計することができる。完全長分子は、これらの酵素で切断され、適切なベクターにライゲーションすることができる。

50

都合のよい制限部位は、変異誘発性カセットの導入を促進させるために、合成遺伝子の配列に組み込むこともできる。

【0054】

完全長2本鎖遺伝子を表すポリヌクレオチドを合成する代替例として、その3'末端で部分的に重なり合うポリヌクレオチド(すなわち相補的3'末端を持つ)をギャップ構造に組み立て、次いで適切なポリメラーゼを充填して、完全長2本鎖遺伝子を作製することができる。典型的な場合、重複ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド40~90個の長さである。次いで伸長したポリヌクレオチドのライゲーションを行う。都合のよい制限部位を、クローニングの目的で端部および/または内部に導入することができる。適切な1種または複数の制限酵素による消化の後、遺伝子断片を適切なベクターにライゲーションする。あるいは、遺伝子断片を、適切なベクターにブラントエンドライゲーションする。

10

【0055】

これらの手法では、遺伝子アセンブリの後に、都合のよい制限部位が利用可能である場合(天然のまま、または設計製作して)、カセットを適切なベクターにクローニングすることによって、変性ポリヌクレオチドを順次導入することができる。あるいは、変性ポリヌクレオチドを遺伝子アセンブリ段階に組み込むことができる。例えば、遺伝子の両方の鎖を完全に化学的に合成する場合、重複および相補的変性ポリヌクレオチドを生成することができる。相補対は、互いにアニールされる。

【0056】

部分的に重複するポリヌクレオチドを遺伝子アセンブリに使用する場合、一組の変性ヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの一方の代わりに直接組み込むこともできる。適切な相補鎖は、ポリメラーゼによる酵素伸長によって、他方の鎖からの一部相補的なポリヌクレオチドから、伸長反応中に合成する。合成段階での変性ポリヌクレオチドの組み込みは、遺伝子の複数のドメインまたは規定の領域が変異誘発される部位におけるクローニングも簡略化する。

20

【0057】

別の手法では、興味ある遺伝子が、1本鎖プラスミド上に存在する。例えば遺伝子は、ヘルパーファージの使用とともに1本鎖分子の増殖を可能とするファージベクターまたは線維状ファージ複製開始点を持つベクターにクローニングすることができる。1本鎖鋳型を、所望の変異を示す一組の変性ポリヌクレオチドと共にアニールし、伸長し、ライゲーションすることができ、したがって、各類似体の鎖が、適切な宿主に導入することができる分子集団に組み込まれる(Sayers, J. R. 他, *Nucleic Acids Res.* 16: 791~802 (1988))。この手法は、複数のドメインが変異誘発を目的に選択される、複数のクローニングステップを回避することができる。

30

【0058】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法も、ポリヌクレオチドを遺伝子に組み込むのに使用することができる。例えばポリヌクレオチドそのものを、伸長のためのプライマーとして使用することができる。この手法では、規定の領域(またはその一部)に対応する変異誘発性カセットをコードするポリヌクレオチドが、少なくとも部分的に互いに相補的であり、ポリメラーゼを使用して、例えばPCR増幅を使用して、大きい遺伝子カセットが形成されるように伸長させることができる(例えば、図2参照)。

40

【0059】

ライブラリーのサイズは、変異誘発される領域の長さおよび数と、変異誘発される領域内のアミノ酸に応じて様々に異なる。好ましくはライブラリーは、 10^{15} 、 10^{14} 、 10^{13} 、 10^{12} 、 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 未満、そしてより好ましくは 10^6 以下のポリペプチド類似体を含むように設計される。

【0060】

上記の説明は、対応するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを変化させることによる、ポリペプチドおよびポリペプチドのライブラリーの変異誘発を中心とした。しかし本発明の範囲は、タンパク質の化学的特性を使用して所望のポリペプチド類似体を直接

50

合成することによる、ポリペプチドを変異誘発させる方法も包含することが理解される。この手法を実施する際、得られるポリペプチドは、ポリヌクレオチド中間体の使用をなくした以外、本発明の特徴を依然として包含したままである。

【0061】

上述のライブラリーの場合、ポリヌクレオチドおよび/または対応するポリペプチドの形をとろうととらなかりと、ライブラリーを、当技術分野で理解されている技法を使用して、マイクロチップなどの固体支持体に結合してもよく、好ましくは配列できることが理解される。

【0062】

4. 発現およびスクリーニング系

上記の技法またはその他適切な技法のいずれによっても生成されたポリヌクレオチドのライブラリーは、所望の構造および/または活性を有するポリペプチド類似体が特定されるように、発現されスクリーニングされることができる。ポリペプチド類似体の発現は、無細胞抽出物ディスプレイ系（例えばリボソームディスプレイおよびアレイ（例えばマイクロアレイまたはマクロアレイ）ディスプレイ系）、細菌ディスプレイ系、ファージディスプレイ系、原核細胞、および/または真核細胞（例えば酵母ディスプレイ系）を含むがこれらに限定することのない、当技術分野で知られている任意の適切な発現ディスプレイ系を使用して、実施することができる。

【0063】

一実施形態では、無細胞抽出物中で発現することができる鑄型として働くように、ポリヌクレオチドを設計製作する。例えば、米国特許第5324637号、第5492817号、第5665563号に記載されるベクターおよび抽出物を使用することができ、多くは市販されている。ポリヌクレオチド（すなわち遺伝子型）をポリペプチド（すなわち表現型）に結合するリボソームディスプレイおよびその他の無細胞技法、例えばProfusion（商標）を使用することができる（例えば、米国特許第6348315号、第6261804号、第6258558号、および第6214553号参照）。

【0064】

あるいは、本発明のポリヌクレオチドは、PluckthunおよびSkerraにより記述されるように（Pluckthun, A. および Skerra, A. Meth. Enzymol. 178: 476~515 (1989); Skerra, A. 他, Biotechnology 9: 273~278 (1991)）、細菌性のE. coli 発現系などの都合のよい原核生物の発現系で発現させることができる。変異体タンパク質は、M. Better および A. Horwitz, Meth. Enzymol. 178: 476 (1989) に記載されるように、培地中および/または細菌の細胞質中での分泌を目的に、発現させることができる。一実施形態では、VH および VL をコードする単ドメインが、シグナル配列、例えばompA や phoA、または pelB シグナル配列などをコードする配列の3' 末端に、それぞれ結合する（Lei, S. P. 他, J. Bacteriol. 169: 4379 (1987)）。これらの遺伝子融合は、ジシストロニックな構成に組み立てられ、したがって遺伝子融合は、単一のベクターから発現することができ、大腸菌（E. coli）の細胞膜周辺腔に分泌され、そこでリフォールディングし、活性な形で回収することができる（Skerra, A. 他, Biotechnology 9: 273~278 (1991)）。例えば抗体重鎖遺伝子は、抗体軽鎖遺伝子と同時に発現して、抗体または抗体断片を生成することができる。

【0065】

さらに別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば米国特許第6423538号、第6331391号、および第6300065号に記載されるように、例えば酵母ディスプレイを使用して、酵母などの真核細胞内で発現することができる。この手法では、ライブラリーのポリペプチド類似体を、酵母表面に発現し表示されるポリペプチドに融合させる。哺乳動物細胞、例えば骨髄腫細胞やハイブリドーマ細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞など、本発明のポリペプチドを発現させるその他の真核細胞も、

10

20

30

40

50

使用することができる。典型的な場合、哺乳動物細胞中に発現させるときのポリペプチド類似体は、培地中に発現するように、またはそのような細胞の表面に発現するように設計される。抗体または抗体断片は、例えば、抗体分子全体として、または個々のVHおよびVL断片、Fab断片、単ドメインとして、または単鎖抗体(scFV)として生成することができる(Huston, J. S. 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879~5883 (1988) 参照)。

【0066】

発現したポリペプチド類似体(または直接合成によって生成されたポリペプチド)のスクリーニングは、任意の適切な手段によって行うことができる。例えば結合活性は、標準的な免疫アッセイおよび/または親和性クロマトグラフィにより評価することができ、触媒活性は、基質変換に適したアッセイにより確認することができる。タンパク質分解機能に関する本発明のポリペプチド類似体のスクリーニングは、例えば米国特許第5798208号に記載されている標準的なヘモグロビンブランクアッセイを使用して、実現することができる。

10

【0067】

5. コンピュータモデリングにより支援される、改善されたルックスルー変異誘発

本発明のルックスルー変異誘発は、所望の改善された機能を有する類似体が生成される可能性が増すように、ポリペプチド類似体に関する構造的またはモデリング情報を利用して実施してもよい。構造的またはモデリング情報は、規定の領域内に導入されるように所定のアミノ酸の選択を導くのに使用することもできる。さらに、本発明のポリペプチド類似体で得られた実際の結果は、繰り返し作製されスクリーニングされる後続のポリペプチドの選択(または排除)を導くことができる。したがって、構造またはモデリング情報は、本発明で使用されるポリペプチド類似体の初期サブセットを生成するのに使用することができ、それによって、改善されたポリペプチドの生成効率が高まる。

20

【0068】

特定の実施形態では、in silicoモデリングを使用して、不十分なまたは望ましくない構造および/または機能を有することが予測される、任意のポリペプチド類似体が生成されないようにする。この方法では、生成されるポリペプチド類似体の数を急激に減少させることができ、それによって、後続のスクリーニングアッセイの信号対雑音比が高まる。特定の実施形態では、機能的アミノ酸残基(位置)またはホットスポットが、変異誘発に適切であるとされるのに対し、非機能的アミノ酸残基(位置)またはコールドスポットは、排除される。別の特定の実施形態では、in silicoモデリングが、関連あるソースから、例えば遺伝子およびタンパク質配列、3次元データベースから、かつ/または前に試験をした類似体結果からの、追加のモデリング情報によって継続的に更新され、したがってin silicoデータベースは、その予測能力がより正確になる。

30

【0069】

さらに別の実施形態では、in silicoデータベースに、前に試験をしたポリペプチド類似体のアッセイの結果が提供され、アッセイの1つまたは複数の基準に基づいて、その類似体を応答物または非応答物に分類し、例えば、十分に結合しもしくはそれほど十分には結合していないポリペプチド類似体、または酵素的/触媒的でありもしくはそれほど酵素的/触媒的ではないものとして分類する。この方法では、本発明の変異誘発は、機能的応答の範囲を特定の構造情報と同一視することができ、そのような情報を使用して、試験がなされる将来のポリペプチド類似体の生成を誘導することができる。したがって、この方法は、ホットスポットを変異誘発の目標とすることによって、結合親和性(例えば特異性)、安定性(例えば半減期)、および/またはエフェクター機能(例えば補体活性化およびADC)などの特定の機能に関して抗体または抗体断片をスクリーニングするのに特に適している。したがって、ある領域内の非隣接残基の変異誘発は、例えばin silicoモデリングを通して、その領域のある残基が所望の機能に寄与しないことがわかっている場合、望ましいものとして行うことができる。規定の領域間の等位構造および空間相互関係、例えばポリペプチドの規定の領域内の機能的アミノ酸残基、例えば導入さ

40

50

れた所定のアミノ酸を考えることができ、モデリングすることができる。そのようなモデリング基準には、例えば、アミノ酸残基側基の化学的特性、原子間距離、結晶学的データなどが含まれる。したがって、生成されるポリペプチド類似体の数を、情報処理により最小限に抑えることができる。

【0070】

好ましい実施形態では、上記ステップの1つまたは複数が、コンピュータにより支援される。この方法も、部分的にまたは全体的に、デバイス、例えばコンピュータ駆動型デバイスにより実施するのに適している。したがって、部分的にまたは全体的に、この方法を実施するための指示を、この指示を実行する電子デバイスでの使用に適した媒体に付与することができる。つまり本発明の方法は、ソフトウェア（例えばコンピュータで読取り可能な指示）およびハードウェア（例えばコンピュータ、ロボティクス、およびチップ）を含む高スループット手法に修正可能である。

10

【0071】

6．複数の規定の領域のコンビナトリアルケミストリーの調査

本発明は、ポリペプチドのいくつかの異なる領域またはドメインの変異誘発による評価を同時に可能にする、重要な利点を提供する。これは、各領域内の同じかまたは異なる所定のアミノ酸を使用して行うことができ、ポリペプチドの折り畳みによって機能部位（例えば、抗体の結合部位または酵素の触媒部位）が構成されるように関連付けられる領域など、高次構造的に関係ある領域でのアミノ酸置換の評価が可能になる。このため、新たなまたは改善された機能的部位を生成する、効率的な方法が提供される。

20

【0072】

例えば、抗原結合部位（Fv領域）の独自の態様を構成する抗体の6つのCDRを、VHまたはVL鎖内で、同時にまたは別々に変異誘発させることができ、それによって、この部位で選択されたアミノ酸の3次元相互関係を調査する。一実施形態では、3つ以上の規定の領域、好ましくは6つの規定の領域、例えば、抗体重鎖および軽鎖可変領域の6つのCDRのコンビナトリアルケミストリーを、ルックスルー変異誘発を使用して体系的に調査する。CDR上でルックスルー変異誘発を行うには、典型的には3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、またはそれ以上のアミノ酸位置を変化させる。次いで機能的アミノ酸残基を非機能的アミノ酸残基と区別し、さらなる変異誘発に適切であることを確認する。

30

【0073】

したがって本発明は、多くの異なるタイプの新規なおよび改善されたポリペプチドの設計に関して、新たな可能性を開くものである。この方法は、タンパク質の既存の構造または機能を改善するのに使用することができる。例えば、抗体もしくは抗体断片の結合部位を導入することができ、または、前から存在する抗原との親和性、エフェクター機能、および/もしくは安定性が改善される。あるいは、追加の「触媒的に重要な」アミノ酸を、酵素の触媒ドメインに導入することができ、その結果、基質に対して修正されまたは強化された触媒活性が得られる。あるいは、完全に新しい構造、特異性、または活性を、ポリペプチドに導入することができる。酵素活性の新規の合成も、実現することができる。新しい構造は、本発明の方法により、関係ある領域（例えば機能的アミノ酸残基（位置））だけを変異させることによって、既存のタンパク質の天然のまたはコンセンサスな「足場」上に構築されることができる。

40

【0074】

7．新たなまたは改善された抗体を作製するための、改善されたルックスルー変異誘発（LTM2）

本発明の方法は、抗体分子を修飾するのに特に有用である。本明細書で使用する抗体分子または抗体は、完全長抗体、Fv分子、またはその他の抗体断片、個々の鎖またはその断片（例えば、Fvの単鎖）、単鎖抗体（例えばscFv）、およびキメラ抗体などの、抗体またはその部分を指す。変性は、抗体の可変領域および/またはフレームワーク（定

50

常)領域に導入される。可変領域の修飾は、より良好な抗原結合特性、望む場合には触媒特性を持つ抗体を生成することができる。フレームワーク領域の修飾は、化学-物理学的特性、例えば商業生産で特に有用な溶解度または安定性(例えば半減期)、生物学的利用能、エフェクター機能(例えば補体活性化および/またはADCC)、および抗原に対する結合親和性(例えば特異性)などの改善ももたらすことができる。典型的な場合、変異誘発は、抗体分子のFv領域、すなわち2つの鎖であってその1つが重鎖(VH)からのものであり、1つが軽鎖(VL)からのものである可変領域で構成された、抗原結合活性に寄与する構造を標的にする。特に、変異誘発は、抗体の測定可能な特性(例えば抗原結合、Fc受容体結合など)に寄与することが決定された機能的アミノ酸残基(位置)を標的にする。所望の抗原結合特性が確認されたら、可変領域を、IgGやIgM、IgA、IgD、またはIgEなどの、適切な抗体クラスに設計製作することができる。

10

【0075】

8. 触媒/酵素ポリペプチドを作製し/改善するための、改善されたルックスルー変異誘発(LTM2)

本発明の方法は、触媒タンパク質、特に触媒抗体の設計にも、特に適している。現在、触媒抗体は、標準的な体細胞融合技法を適用することによって調製することができる。このプロセスでは、遷移状態に結合しかつ反応を触媒する抗体の生成を誘発させる、所望の基質の遷移状態に似た抗原で、動物が免疫化される。抗体生成細胞は動物から収集され、不死化細胞に融合され、ハイブリッド細胞を生成する。次いでこれらの細胞を、反応を触媒する抗体の分泌に関してスクリーニングする。このプロセスは、基質の遷移状態の類似体の利用可能性に依存する。このプロセスは、ほとんどの場合、そのような類似体を特定しまたは合成することが困難になり易いので、制約を受ける可能性がある。

20

【0076】

本発明の方法は、遷移状態の類似体の必要性をなくす、異なる手法を提供する。本発明の方法によれば、抗体は、適切なアミノ酸を免疫グロブリンの結合部位(Fv領域)に導入することによって、触媒作用により作製することができる。抗原結合部位(Fv)領域は、6つの超可変(CDR)ループ、すなわち免疫グロブリン重鎖(H)から得られた3つと軽鎖(L)から得られた3つで構成され、これらは各サブユニット内でβ鎖を接続している。CDRループのアミノ酸残基は、各特異的モノクローナル抗体の結合特性に、ほぼ完全に寄与している。例えば、セリンプロテアーゼの後にモデル化された触媒の3要素(アミノ酸残基セリン、ヒスチジン、およびアスパラギン酸を含む)は、基質分子との親和性がわかっておりかつ基質のタンパク質分解活性に関してスクリーニングされる抗体の、Fv領域の超可変セグメント内で生成することができる。好ましい実施形態では、抗体の測定可能な特性、例えば触媒活性に寄与することが決定された、機能的アミノ酸残基(位置)を標的とする。

30

【0077】

特に本発明の方法は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、およびリガーゼを含めた多くの異なる酵素または触媒抗体を生成するのに使用することができる。これらの種類の中で、特に重要なのは、改善されたプロテアーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、ジオキシゲナーゼ、およびペルオキシダーゼである。本発明の方法によって調製することができる、これらおよびその他の酵素は、保健医療、化粧品、食品、醸造、洗浄剤、環境(例えば廃水処理)、農業、なめし、織物、およびその他の化学プロセスにおける、酵素変換という重要な商業的用途がある。これらには、診断および治療の用途、脂肪、炭水化物、およびタンパク質の変換、有機汚染物質の分解、および化学物質の合成が含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、線維素溶解活性、またはウイルスコートタンパク質などの感染力に必要なウイルス構造に対する活性を持つプロテアーゼが、設計製作されうる。そのようなプロテアーゼは、有用な抗血栓剤、または例えばHIV、ライノウイルス、インフルエンザまたは肝炎などのウイルスに対する抗ウイルス剤になり得る。オキシゲナーゼ(例えばジオキシゲナーゼ)、すなわち芳香環およびその他の二重結合の酸化のための補助因子が必要な種類の酵素の場

40

50

合、バイオパルピングプロセスでの工業的用途、バイオマスから燃料またはその他の化学物質への変換、廃水汚染物質の変換、石炭のバイオプロセッシング、および有害な有機化合物の無毒化が、新規なタンパク質の可能性ある適用例である。前述の事項に関する改善点の確認は、これらの改善点が求めている所望の活性または特性に寄与する傾向が強い、機能的アミノ酸残基（位置）を優先的に標的とすることによって、本発明により迅速になされる。

【 0 0 7 8 】

9. コンビナトリアル変異誘発法

コンビナトリアルベネフィシャル変異法では、L T Mによって確認される有益な変異の組合せを表すコード配列を生成する。これらの組合せは、単一C D R内の種々の有益な変異、単一抗体鎖内の2つ以上のC D Rでの変異、または種々の抗体鎖のC D Rでの変異の組合せでよい。

10

【 0 0 7 9 】

あるコンビナトリアル法は、C D R内で選択されたコドン置換が、L T Mによって確認された種々の有益なアミノ酸置換であることを除き、W T M法に似ている。したがって、抗体C D R内の全ての残基位置が変異を有するとは限らず、いくつかの位置は、その位置で置換された複数の異なるアミノ酸を有することになる。全体的に、C D Rまたは抗体鎖内の有益な変異の組み合わせは、全てではないとしてもその多くが、ライブラリー中のコード配列の少なくとも1つによって表されることになる。表1に示すように、このコード配列ライブラリーは、可変コード領域内の異なる位置のそれぞれに単一のアミノ酸に対する複数のコドンを配置する代わりに、導入されるコドンがL T M法で検出される有益な変異の全てに対応するものであること以外、W T M法を修正することによって作成することができる。このライブラリーのサイズを管理可能に維持するために、変異を、2つの重鎖または軽鎖の一方のみに限定することができる。

20

【 0 0 8 0 】

第2の手法では、単一のC D R領域を含有し、かつC D R内の有益な変異の組合せ全てをコードするコドン変種を有する個々の遺伝子断片が、例えば遺伝子シャッフリング法により再構成されて、所与の鎖の全てのC D R内または両方の鎖の全てのC D R内に有益な変異の組合せを有するV_LおよびV_H鎖コード配列を提供する。

【 0 0 8 1 】

変異のコンビナトリアルライブラリーは、参照によりその全てが本明細書に援用される、米国特許出願2003/005439A1および米国特許第6368861号、および(S temmer W P (1994) P r o c N a t l A c a d S c i 91 (22) : 10747 - 51)に詳述されているような、既知の遺伝子シャッフリング法によって生成してもよい。この方法では、収集され混合された変異クローンの限定されたD N a s e I消化が行われ、それによって、様々な所定サイズ(例えば50~250塩基対)の一群のランダム遺伝子断片を生成する。次いでこれらの断片を、最初に変性させ、次いで様々な個別の断片を、相同的相補領域をベースにして再び結合させる。この手法において、復元された断片は、種々の混合された変異C D Rを、再結合されたセグメントに組み込むことができ、次いでこれを上述のS O E - P C Rにより伸長させ、次いで再結合させたキメラは、最低限でも少なくとも、親D N Aソースドナーのそれぞれから二組の有益なC D R混合変異を組み込むことができる。

30

40

【 0 0 8 2 】

本発明を、限定するものと解釈すべきでない下記の実施例において、さらに例示する。

【 実施例 】

【 0 0 8 3 】

この実施例全体を通し、他に特に指示しない限り、下記の材料および方法を使用した。

【 0 0 8 4 】

材料および方法

一般に、本発明の実施に際しては、他に特に指示しない限り、当業者の範囲内でありか

50

つ文献で説明されている従来の化学、分子生物学、組換えDNA技術、PCR技術、免疫学（特に、例えば抗体技術）、発現系（例えば無細胞発現、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、およびProfusion（商標））、および任意の必要な細胞培養の技法を用いる。例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); DNA Cloning, 第1および2巻 (D.N. Glover 編, 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 編, 1984); PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucage 編, John Wiley & Sons (1999) (編者); Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure, Neidle 編, Oxford Univ Press (1999); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis 他, Academic Press (1990); PCR Essential Techniques: Essential Techniques, Burke 編, John Wiley & Son Ltd (1996); The PCR Technique: RT-PCR, Siebert 編, Eaton Pub. Co. (1998); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169) McCafferty 編, Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow 他, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); Current Protocols in Molecular Biology 編. Ausubel 他, John Wiley & Sons (1992); Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology, Lubiniecki, A. 編, Marcel Dekker, Pub., (1990) Phage Display: A Laboratory Manual. C. Barbas (編), CSHL Press (2001); Antibody Phage Display, PO' Brien (編), Humana Press (2001); Border 他, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nature Biotechnology, 15(6): 553-7 (1997); Border 他, Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol., 328: 430-44 (2000); Pluckthun 他, 米国特許第6348315号に記載されているリボソームディスプレイ、およびSzostak 他, 米国特許第6258558号; 第6261804号; および第6214553号に記載されているProfusion（商標）を参照されたい。

【0085】

試験遺伝子の構成

オポアルブミン野生型Fab配列を、PCRおよび適切なプライマー（配列番号11および12）およびV_Hオリゴヌクレオチド（配列番号13～14）を使用してscFvを構成するために、V_LおよびV_H部分（それぞれ配列番号1および2）の鋳型として使用した。PCR反応は、10μMオリゴヌクレオチドストックをそれぞれ2μl、Pfx DNAポリメラーゼ（2.5U/μl）0.5μl、Pfx緩衝液5μl、10mM dNTP 1μl、50mM MgSO₄ 1μl、ここで37.5μlのdH₂Oを用い94℃で2分、その後、94℃で30秒、50℃で30秒、68℃で1分を24サイクル、その後、68℃で5分間インキュベーション、からなった。オリゴヌクレオチドは、

Syngen Inc. (San Carlos, CA) 製の 3900 オリゴシンセサイザで合成された。

【0086】

次いで上記 V_L および V_H PCR 反応混合物を、個別に抽出し、精製し (Qiagen PCR 精製キット、製造元の取扱説明書に従う)、各反応混合物の一定分量 ($1\mu l$) を合わせて新しい試験管に入れた。 V_H 逆方向オリゴヌクレオチド (配列番号 14) の 3' 末端および V_L 順方向オリゴヌクレオチド (配列番号 11) の 5' 末端にリンカー配列を用いて、相補的結合は単一重複伸長 PCR (SOE-PCR) アセンブリ反応を可能とし、それにより、完全長オボアルブミン scFv を生成した。オボアルブミン scFv PCR 反応混合物を抽出し、精製して (Qiagen)、引き続き EcoRI および NotI エンドヌクレアーゼ消化を行った (New England Biolabs、製造業者の指示に従う)。完全長オボアルブミン scFv を pYD1 ベクターにサブクローニングし、配列決定して、上記 PCR から変異、欠失、または挿入が導入されていない (配列暗号 18) ことを確認する。配列が確認された後、完全長 V_H および V_L オボアルブミンは、LTM ライブラリーを構築する後続の戦略のため、野生型鋳型としての働きをする。

10

【0087】

追加の PCR 条件およびプライマーの設計

T1 および T2 PCR に関する反応条件は、 $10\mu M$ オリゴヌクレオチド混合物を $5\mu l$ 、Pfx DNA ポリメラーゼ ($2.5U/\mu l$) を $0.5\mu l$ 、Pfx 緩衝液 (Invitrogen) を $5\mu l$ 、 $10mM$ dNTP を $1\mu l$ 、 $50mM$ $MgSO_4$ を $1\mu l$ 、および $37.5\mu l$ の dH₂O を $94^\circ C$ で 2 分、その後、 $94^\circ C$ で 30 秒、 $50^\circ C$ で 30 秒、 $68^\circ C$ で 1 分を 24 サイクル実施し、次いで $68^\circ C$ で 5 分間インキュベートする。反応は、プログラム可能なサーモサイクラー (MJ Research) を使用して行う。T1 および T2 PCR 反応をゲル精製し (Qiagen)、両方からの等モルの一定分量を合わせて、SOE-PCR にかけた。

20

【0088】

SOE-PCR は、制限部位、制限エンドヌクレアーゼ、または DNA リガーゼを必要としない、DNA 断片を組み合わせるための迅速で簡単な方法である。T1 および T2 PCR 産物は、ハイブリダイズし完全長 LTM オボアルブミン scFv 遺伝子を生成する (図 2 および 4) PCR 伸長を可能にする末端重複相補配列を共有するように設計される (図 4)。scFv PCR 伸長反応は、T1 および T2 の一定分量 (それぞれ約 $2\mu l$) と共に、Pfx DNA ポリメラーゼ ($2.5U/\mu l$) を $0.5\mu l$ 、Pfx 緩衝液 (Invitrogen) を $5\mu l$ 、 $10mM$ dNTP を $1\mu l$ 、 $50mM$ $MgSO_4$ を $1\mu l$ 、および $37.5\mu l$ の dH₂O を用い $94^\circ C$ で 2 分、その後、 $94^\circ C$ で 30 秒、 $50^\circ C$ で 30 秒、 $68^\circ C$ で 1 分を 20 サイクル実施し、次いで $68^\circ C$ で 5 分間インキュベートした。

30

【0089】

オボアルブミン末端特異的 5' EcoRI センス (配列番号 18) とオボアルブミン 3' NotI アンチセンスプライマー (配列番号 19) との組を添加して、LTM オボアルブミン増幅と、制限酵素部位の PCR 単位複製配列への取り込みとを促進させる (図 4)。PCR 伸長反応は、 $10\mu M$ オリゴヌクレオチドストックを $4\mu l$ 、Pfx DNA ポリメラーゼ ($2.5U/\mu l$) を $0.5\mu l$ 、Pfx 緩衝液 (Invitrogen) を $5\mu l$ 、 $10mM$ dNTP を $1\mu l$ 、 $50mM$ $MgSO_4$ を $1\mu l$ 、および $37.5\mu l$ の dH₂O を $94^\circ C$ で 2 分、その後、 $94^\circ C$ で 30 秒、 $50^\circ C$ で 30 秒、 $68^\circ C$ で 1 分を 24 サイクル実施し、次いで $68^\circ C$ で 5 分間インキュベートした。

40

【0090】

酵母細胞発現ベクター pYD1 への PCR 産物クローニング

抗オボアルブミン scFv 発現用の受容プラスミド pYD1 (図 6) を、プラスミド精製 (Qiagen) により E. coli 宿主から調製し、制限酵素 EcoRI および No

50

t Iで消化し、最後に、子ウシ腸管アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。p Y D 1ベクターと上記S O E - P C R産物 (E c o R IおよびN o t Iにより消化された) とのライゲーションを、後続のE . c o l i (D H 5 α) 形質転換の前に、標準的な技法を使用して行った。

【 0 0 9 1 】

酵母細胞発現系

p Y D 1 (図 6) は、サッカロミセスセレビジエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) の細胞外表面に、興味のあるタンパク質を表示するように設計された発現ベクターである。s c F v遺伝子をp Y D 1にサブクローニングすることによって、s c F vは、A G A 2凝集素受容体との融合タンパク質になり、細胞表面の分泌および表示が可能になる。

10

【 0 0 9 2 】

p Y D 1 A G A 2 - s c F v 構成体による酵母宿主細胞の形質転換

コンピテント酵母宿主細胞 (5 0 0 μ l) を、製造業者の取扱説明書に従って (Z y m o R e s e a r c h F r o z e n - E Z Y e a s t K i t) 調製した。手短に言うと、コンピテント細胞 5 0 0 μ l を、1 0 ~ 1 5 μ g の p Y D 1 s c F v ライブラリーDNAと混合し、その後、E Z 3 溶液 5 m l を添加した。次いで細胞混合物を、時々 (3 回) 混合しながら、3 0 ° で 4 5 分間インキュベートした。形質転換した細胞を遠心分離にかけ、グルコース選択培地 (I n v i t r o g e n) 中に再懸濁した。

20

【 0 0 9 3 】

A G A 2 - s c F v の誘導

細胞を、O D ₆₀₀ = 7 (O D ₆₀₀ = 1 は、1 0 ⁷ 細胞 / m l を表す) になるまで 4 8 時間、振盪および脱気の条件下、3 0 ° のグルコース選択培地中で成長させた後に誘導した。詳細には、細胞を収集し、2 0 ° で 4 8 時間経過後に O D ₆₀₀ = 0 . 9 に達するまで、ガラクトース選択 / 誘導培地 (I n v i t r o g e n) 中に再懸濁した。p Y D 1 からの A g a 2 - s c F v 融合タンパク質の発現は、G A L 1 プロモーターによって厳密に調節され、これは、G A L 1 プロモーター誘導用の培地中で利用可能なガラクトースに依存された。

【 0 0 9 4 】

ビオチニル化オボアルブミン調製

標的抗原オボアルブミンのビオチニル化を、製造業者の取扱説明書 (M o l e c u l a r P r o b e s F l u o R e p o r t e r B i o t i n - X X L a b e l i n g K i t (カタログ # F - 2 6 1 0)) に従って実施した。簡単に言うと、1 m g / m l ストック (S i g m a) のオボアルブミン 3 0 0 μ l を、p H 8 . 3 の 1 M 重炭酸ナトリウム緩衝液 3 0 μ l およびビオチン - X X 溶液 5 . 8 μ l (2 0 m g / m l 、D M S O 中ビオチン - X X 溶液) に添加した。次いで混合物を、2 5 ° で 1 時間インキュベートし、ミクロンフィルター管に移し、遠心分離にかけ、タンパク質濃度を O D ₂₈₀ での吸光度により決定した。

30

【 0 0 9 5 】

A G A 2 - s c F v 発現およびオボアルブミン結合の F A C S モニタリング

s c F v 構成体の誘導および発現をモニタするために、培地からの一定分量の酵母細胞 (4 0 μ l 中、8 × 1 0 ⁵ 細胞) を、2 3 0 0 r p m で 5 分間遠心分離することによって収集した。上澄み液を吸引し、次いで細胞ペレットを、2 0 0 μ l の氷冷 P B S / B S A 緩衝液 (P B S / B S A 0 . 5 % w / v) で洗浄した。細胞を再びペレット化し、上澄みを除去し、その後、ビオチニル化オボアルブミンを含有する (2 0 0 n M) 緩衝液 1 0 0 μ l 中に再懸濁した。細胞を、2 0 ° の 4 5 分間放置してオボアルブミンを結合させ、その後、P B S / B S A 緩衝液で 2 回洗浄し、その後、ストレプトアビジン - F I T C (2 m g / L) を添加して、これと共に氷上で 3 0 分間インキュベートした。緩衝液中で洗浄する別のステップを実施し、その後 P B S / B S A 中に 4 0 0 μ l の体積で最後に再懸濁させた。次いで細胞を、C e l l Q u e s t ソフトウェアパッケージを使用して F A C

40

50

S スキャン (B e c t o n D i c k i n s o n) で分析した。

【 0 0 9 6 】

(実施例 1)

高親和性抗体の開発のための改善されたルックスルー変異誘発

この実施例では、例示的な s c F v 抗体の、改善されたルックスルー変異誘発について述べる。

【 0 0 9 7 】

簡単に言うと、改善されたルックスルー変異誘発 (L T M) を使用して、選択された抗原との結合親和性を強化する抗体の V_H および V_L C D R 領域内の V_H および V_L C D R 変異を特定し、すなわち結合活性を与える機能的アミノ酸残基 (位置) またはホットスポットを特定した。改善されたルックスルー変異誘発 (L T M 2) の目的は、ポリペプチドのある領域、例えば可変抗体鎖の C D R 領域において、標的位置で選択された置換を導入することである。最初に、 V_H および V_L 鎖の両方に関するコーディングライブラリーを構成した。参照抗オボアルブミン抗体 V_L および V_H 鎖のアミノ酸配列が特定され (配列番号 3 ~ 4 参照)、配列番号 5、6 および 7 によってそれぞれ特定された抗オボアルブミン V_H 鎖の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域に関する開始配列のライブラリーと、配列番号 8、9、および 10 によって特定された V_L 鎖の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域に関する開始配列ライブラリーを選択した。さらに、 V_H または V_L コード配列ライブラリーのそれぞれは、選択された鎖において 1 つ、2 つ、または 3 つ全ての C D R で選択された代表的な機能的アミノ酸に関する変異を含む。

10

20

【 0 0 9 8 】

オボアルブミン野生型 V_H セクション S L E W I G - D I N P S N G Y T I Y N Q K F K G - F K G K A T L からの、 V_H C D R 2 セグメントの所定のアミノ酸 D I N P S N G Y T I Y N Q K F K G (位置 56 ~ 69) が、分析用に選択された。ポリペプチド配列 S L E W I G および K A T L T V D は、それぞれ V_H C D R 2 に隣接する V_H フレームワーク 2 および 3 の部分である。 V_H および V_L C D R L T M オリゴヌクレオチドの設計および合成では、隣接するフレームワーク配列の長さが約 21 塩基対であることが、相補的重複および S O E - P C R を可能にする。フランキング V_H 2 および V_H 3 部分 (下記の小文字) を含んだ上記 C D R - H 2 野生型配列 (太字) (配列番号 16) をコードする参照オリゴヌクレオチドを、以下に示す。

30

```
5' - a g c   c t t   g a g   t g g   a t t   g g a - G A T   A T T   A A T   C
C T   A G C   A A T   G G T   T A T   A C T   A T C   T A C   A A C   C A G   A
A G   T T C   A A G   G G C - t t c   a a g   g g c   a a g   g c c   a c a   t
t g - 3'
```

【 0 0 9 9 】

V_H C D R 2 のロイシン L T M では、C D R 2 位置の全てまたは複数において、一度に 1 つのロイシンだけを逐次置換する。図 3 は、抗オボアルブミン s c F v の V_H C D R 2 領域内の 14 残基 (位置 56 ~ 69) のそれぞれに、ロイシンアミノ酸を導入するための、L T M の適用例を示す。ロイシン L T M を実施する際、全ての可能な V_H C D R 2 ロイシン位置的変種をコードする 14 の個別のオリゴヌクレオチド、このそれぞれが、抗オボアルブミン野生型配列に隣接した 1 つのロイシン置換コドン (太字) だけを有するものを、合成した (配列番号 17 ~ 33)。次いで合計で 14 の異なるペプチドを生成し、「望ましくない」かまたは複数の置換を持つ配列は生成しない。

40

【 0 1 0 0 】

「複数の位置」にロイシンを導入することに対する代わりで、上記 C D R 2 L T M オリゴヌクレオチドの 1 つまたは複数を含まないことを選択することができる。したがって、例えば位置 59 および 60 のそれぞれに関する L T M オリゴヌクレオチド (配列番号 20 および 21) を除外することができ、そのため改善されたルックスルー変異誘発 (L T M 2) は、位置 56 ~ 58 および 61 ~ 69 でのみ行うことができる。「複数の位置」を使用する種々の組合せに基づいて、L T M 2 の置換を、必ずしも C D R 内のそれぞれおよ

50

び全ての位置に制限することなく、実施することができる。

【0101】

L T M C D R 2 ライブラリーを作成する手法を、図 2 および 4 にまとめる。個別の P C R 反応、T 1 および T 2 は、プライマー対、F R 1 センス（配列番号 3 4）および F R 2 アンチセンス（配列番号 3 5）と、F R 4 アンチセンスプライマー（配列番号 3 6）を持つ上記プールされた C D R - 2 L T M ロイシンオリゴヌクレオチド（配列番号 1 8 ~ 3 3）をそれぞれ使用して実施する。プライマー F R 1 センスは、オボアルブミン遺伝子の 5' 末端からの配列を含有し、F R 2 アンチセンスは、オボアルブミンフレームワーク 2 の 3' 末端からのアンチセンス配列を含有し、その結果、オボアルブミン C D R 1、フレームワーク領域 1 および 2 は、T 1 P C R 反応で増幅されるようになった（図 2 A および 2 B）。プライマー F R 4 A S は、オボアルブミン遺伝子の 3' 末端からのアンチセンス配列を含有し、C D R 2 L T M オリゴヌクレオチドは、組み込まれた C D R 2 L T M コドン変異を持つオボアルブミン C D R 2 領域の 5' 末端からの配列を含有し、それにより、オボアルブミンの残りの部分（断片 C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4、および全 V_L セグメント）を増幅し、それと同時に変異誘発性コドンを組み込む。

10

【0102】

2 重および 3 重の C D R 変異（C D R 1、2、および 3 の種々の組合せ）を、P C R 鋳型として野生型オボアルブミン遺伝子を使用する代わりに上述のように生成し、前もって生成された L T M オボアルブミンライブラリーを選択した。例えば、C D R 1 と C D R 2 の両方が野生型 C D R 3 および V_L セグメントにより変異している V_H 鎖を生成するために、前もって構成された L T M C D R 2 変異体遺伝子を鋳型として使用し、次いで S O E - P C R を実施して C D R 1 オリゴヌクレオチドを取り込み、それによって 2 重 L T M 変異を生成した（図 2 および 4 にまとめた）。

20

【0103】

この実施例では、T 3 P C R 反応で、プライマー対 F R 1 センス（配列番号 3 4）および F R 5 アンチセンス（配列番号 3 7）を使用して、フレームワーク領域 1（F R 1）を増幅させた。T 4 P C R 反応では、プールされた C D R 1 L T M ヒスチジンオリゴヌクレオチド（配列番号 3 8 ~ 4 1）を F R 4 アンチセンスプライマー（配列番号 3 6）と共に使用して、オボアルブミンの残りの F R 2、C D R 2 L T M、F R 3、C D R 3、F R 4、および V_L 部分を増幅した（図 4）。次いで T 3 および T 4 P C R 反応混合物を精製し、両方からの等モルの一定分量を合わせて S O E - P C R につけ（図 4）、それによって、オボアルブミン s c F v H i s C D R 1 および L e u C D R 2 2 重 L T M ライブラリーを生成した。次いでオボアルブミン末端特異的 5' E c o R I センス（配列番号 1 3）およびオボアルブミン 3' N o t I アンチセンスプライマー（配列番号 1 2）の組を添加して、L T M オボアルブミン増幅および p Y P D 1 発現ベクターへのクローニングを促進させた。

30

【0104】

次いで H i s C D R 1 および L e u C D R 2 の 2 重 L T M ライブラリーを鋳型として使用して、さらに L T M C D R 3 オリゴヌクレオチドを組み込み、それによって 3 重 C D R L T M ライブラリーを作成した。開始単一および 2 重 L T M ライブラリーを漸進的に利用することにより、V_H および V_L C D R の両方における L T M ライブラリーの組合せのより複雑な配列を発生させた。例えば、図 5 の最上段の 1 1 1 ライブラリー鋳型として設計されるように、V_H 3 重 L T M C D R 1、C D R 2、および C D R 3 ライブラリーを構成したら、L T M V_L C D R 1 を V_H 1 1 1 鋳型に導入することによって、4 つの L T M C D R のライブラリーが生成される（図 5）。

40

【0105】

図 7 に示される F A C S プロットは、オボアルブミン s c F v 結合分子が、前述のライブラリーの構成中に生成されたことを示す。特に、ビオチニル化オボアルブミンとストレプトアビジン F I T C の分子は（「グリーン」の線）、ビオチニル化オボアルブミンおよびストレプトアビジン F I T C を持つ空のベクター p Y D 1 からのシグナル（濃い斜線部

50

分) に比べて一桁大きいピークシグナル応答をもたらした。

【0106】

(実施例2)

強化された特性を持つ抗体の開発に関する、高スループットライブラリースクリーニング

この実施例では、強化された特性を持つ例示的な単鎖抗体の、高スループットスクリーニングについて述べる。

【0107】

図9は、不均一なLT M2 s c F vライブラリーからのオボアルブミン特異的高親和性結合クローンを豊富にするための、一般化したスキームを示す。ガラクトース培地に導入した後、酵母細胞ライブラリー(10^7)をPBS/B SA緩衝液(合計で500 μ l)中に再懸濁した。ビオチニル化オボアルブミンを、酵母懸濁液に添加して、最終濃度を50 nMにし、振盪させながら2~3時間、25℃でインキュベートした。酵母細胞をペレット化し、3回洗浄し、300 μ lの氷冷PBS/B SA緩衝液で再懸濁し、そこに 1×10^8 のストレプトアビジンで被覆した磁気ビーズを添加した。ビーズ細胞混合物を、逆さにすることによって穏かに混合しながら2分間、氷上でインキュベートし、それによって、酵母高親和性s c F v発現細胞と、ビオチニル化オボアルブミンと、ストレプトアビジンで被覆された磁気ビーズとからなる結合複合体を形成した。次いで結合複合体を入れたカラム(試験管)を磁気カラムホルダに2分間装着し、その後、吸引によって上澄みを除去した。カラムを磁気ホルダから取り外し、300 μ lの氷冷PBS/B SAを添加して、結合体を再懸濁した。低親和性のこれらs c F vクローンおよびその他の非特異的結合細胞を除去するために、結合複合体を再び洗浄した。

10

20

【0108】

次いでカラムを磁気ホルダから取り外し、その後すぐに、グルコース選択培地1 mlを回収された酵母細胞に添加し、30℃で4時間インキュベートした。次いで磁気ホルダを、培養管に再び装着して、残りの磁気ビーズを全て除去した。次いで酵母培養物を、グルコース選択培地中で、30℃で48時間成長させた後、s c F vをガラクトース選択培地に導入した。2回目の選択ステップでは、次いでオボアルブミン濃度を10 nMから0.5 nMに低下させた。オボアルブミン結合、複合体形成、酵母細胞の濃縮および再成長を、上述のように行った。最終的な3回目の選択ステップでは、オボアルブミン濃度をさらに0.1 nMまで低下させた。

30

【0109】

上記漸進的な濃縮ステップからのオボアルブミンEC₅₀結合または「適応度」を、FACSによって評価した(図8参照)。図8に示される結果は、前もって選択がなされていない(閉じた円)、最初に形質転換されたV_HLT M CDR2酵母ライブラリー、ならびに結合剤のパーセントで表された全適応度(y軸)を示している。機能的抗オボアルブミンs c F vを発現するクローンおよびそれらの親和性は、オボアルブミンEC₅₀(x軸)により測定されるように、抗オボアルブミン野生型抗体に比べて劣っていた。しかし、1回目の選択ステップの後(10 nM)、「適応度」曲線(薄い三角形)は、その結合剤のパーセントが改善しており、オボアルブミン結合のEC₅₀は、オボアルブミン野生型と同じnM範囲内であった。2回目の選択ステップの後(0.1 nM)、濃縮された集団(濃い三角形)は、その全「適応度」が、オボアルブミン野生型の場合(ベタ塗りの四角形)に近付いていることを示した(図10)。次いで個々の結合分析および配列決定の単一のクローンを単離するために、第2の濃縮ステップから回収された酵母細胞を、固体培地上に置いた。

40

【0110】

代替の方法では、LT M2酵母細胞ライブラリーを、FACSによって、高親和性抗オボアルブミンs c F vクローン用に濃縮した。ライブラリーの構成、形質変換、液体培地増殖、および誘導は、上述のように実施した。s c F v誘導の後、細胞を、飽和濃度(400 nM)のビオチニル化オボアルブミンと共に、25℃で3時間インキュベートした。

50

細胞を洗浄した後、25 の非標識のオボアルブミン (1 μ M) を使用して、40 時間の低温追跡を行った。次いで細胞を、PBS / BSA 緩衝液で2回洗浄し、ストレプトアビジン PE (2 mg / ml) 抗 - HIS - FITC (25 nM) で30分間、氷上で標識し、洗浄し、FACS 分析に関して既に述べたように再懸濁した。

【0111】

野生型抗オボアルブミンを、最初にFACS 分析して、酵母 LTM ライブラリーの FACS 選別用に参照シグナルパターンを生成した (図8、左パネル)。オボアルブミン FACS プロットから、選択ゲート (R1 台形) は、scFv 融合を発現し (抗 - HIS - FITC により検出される) かつそれに付随して野生型抗オボアルブミンよりもオボアルブミンに対して高い親和性を表示する (より強力な PE シグナル) クローンだけが得られるように描かれた。図8 (中央パネル) は、スクリーニングされた全 LTM ライブラリーの約5%が、R1ゲートによって選択されることを明示する。これらの高抗アルブミン scFv クローンを FACS により収集した後、選別後 FACS 分析 (図8、右パネル) を実施して、プレスクリーン抗オボアルブミン scFv クローンの > 80% が所定の基準以内であることを確認した。次いで FACS により選別された scFv クローンを、30 のグルコース選択培地中で48時間成長させ、固体培地上に蒔いて、個々のクローンを単離した。次いでクローンを、グルコース選択培地中で成長させ、ガラクトース選択培地中に再懸濁し、EC₅₀ および / または k_{off} 特性に関して分析した。

【0112】

(実施例3)

改善された K_{off} 率を持つ抗体の開発のための、高スループットライブラリースクリーニング

この実施例では、強化された K_{off} 率を持つ、例示的な単鎖抗体の高スループットスクリーニングについて述べる。

【0113】

簡単に言うと、上記実施例から事前に選別されたクローンを、グルコース選択培地中で一晩成長させ、次いで固体培地上に置いて、単コロニーを単離した。単コロニーから、48時間振盪させながら30 のグルコース選択培地中でクローンの液体培養物を成長させ、その後ペレット化し、ガラクトース選択培地中に適切な OD 時間にわたり再懸濁させた。FACS による事前選別では濃度が高まるが (約80%)、全ての望ましくないクローンはなくならないので、単離されたクローンの EC₅₀ は、抗オボアルブミン野生型参照抗体 (上述の) よりも劣る結合値を表示するものをなくすと特徴付けられた。次いで、同等のまたは優れた EC₅₀ 値を持つ単離物だけを、さらなる K_{off} 分析用に選択した。

【0114】

候補分子の動態を分析するためのスキームを、図11に示す。具体的には、ガラクトース選択培地中に誘導後の酵母細胞 (約 5×10^6) をペレット化し、PBS / BSA 緩衝液 (1 ml) 中に再懸濁した。次いでビオチニル化したオボアルブミン (400 nM 最終濃度) を、再懸濁した細胞に添加し、連続して穏かに混合しながら25 で2時間インキュベートした。次いでビオチニル化オボアルブミンと酵母細胞との複合体を洗浄し、PBS / BSA 緩衝液中に再懸濁し、次いで非標識のオボアルブミンを酵母細胞混合物に添加して (最終濃度 1 μ M に)、これをさらに25 で24時間インキュベートした。次いで次の24時間では、2時間ごとに、定期的にサンプルの一定分量を採取した。次いで細胞混合物を洗浄し、冷却した PBS / BSA 緩衝液中に再懸濁し、抗体 α - SAPE (2 μ g / ml) を染色した。定期的に混合しながら氷上で30分間インキュベートした後、細胞混合物を2回洗浄し、上述のように FACS により分析した。

【0115】

K_{off} アッセイからの結果 (図12) は、2種のクローン (すなわち 3ss - 35 ; 3ss - 30) が、野生型抗オボアルブミン抗体に比べてより高い相対 K_{off} を有することを実証した。言い換えると、結合したビオチニル化オボアルブミンを、24時間のサンプリング期間中に非標識オボアルブミンと交換する場合、3ss - 35 および 3ss -

30は、最初の8時間にわたってMFI（平均蛍光強度）が非常に急激に低下することを示す抗オボアルブミン野生型（四角、図12）に比べて、前に結合したビオチニル化オボアルブミンを非常に遅い速度で放出した（図12中、それぞれ円および三角形）。

【0116】

（実施例4）

改善されたEC₅₀結合を持つ抗体の開発に関する、高スループットライブラリースクリーニング

この実施例では、強化されたEC₅₀結合活性を持つ、例示的な単鎖抗体の高スループットスクリーニングについて述べる。

【0117】

簡単に言うと、所定量の酵母細胞（40μl中、8×10⁵細胞）抗オボアルブミンscFv（野生型およびLTMライブラリー）を、1：4の連続希釈のビオチニル化オボアルブミン（200nM、50nM、12.5nM、3.1nM、0.78nM、および0.19nM最終濃度、合計体積は80μl）と共に、20で45分間インキュベートした後、氷上に5～10分間置いた。次いで酵母細胞を洗浄し、5mlのPBS/BSA緩衝液中に再懸濁し、その後、ストレプトアビジン-PE（2mg/ml）およびαHIS-FITC（25nM）を添加して、氷上での30分間のインキュベーション中に細胞を標識した。もう1回洗浄を行った後、400μlのPBS/BSA緩衝液中に再懸濁し、CellQuestソフトウェアを使用したFACSスキャンで分析をした。

【0118】

図13は、より低いEC₅₀値を有する、抗オボアルブミンに比べて改善されたクローンの一部を例示する（結合曲線は、野生型よりも左にシフトしている）。抗オボアルブミン野生型と比べたときの、これらの相対EC₅₀値と、何倍増加したかが示されている。例えばクローンH3 S101Qは、オボアルブミン結合が2.1倍改善されたことを示した。このクローンH3 S101Qの名称表示は、V_HCDR3グルタミンLTM単一ライブラリーから得たものであることを示している。

【0119】

生成された、結果的に得られる強化された結合親和性抗体は、強化された結合活性に関連付けられた抗オボアルブミン抗体のV_HおよびV_LCDRにおける有益なアミノ酸変異のマップを提供する。強化型親和性scFv抗体に関連した推定上の個々のアミノ酸V_HおよびV_LCDR変異を、図13に示す。変異は、V_HおよびV_LCDR、単一、2重、および3重CDR変異のそれぞれに見出され、試験がなされた9種の異なるアミノ酸のそれぞれを含む。図13は、上記EC₅₀および/または動態（K_{off}）スクリーンから特定された4種の独立のV_HCDR-H3 H3 G102Kクローンを回収できることを例示する。EC₅₀スクリーン（図14）からの2重LTM V_LL1L2 S166H S193H変異体も、これら2種のCDR1 S166H置換とCDR2 S193H置換との間に相乗効果があるときに、強化されたオボアルブミン結合が生ずることを示している。

【0120】

結果は、V_HまたはV_L鎖の1つ、2つ、または3つ全てのCDRに単一変異を含有するコード配列を使用して上記EC₅₀および/またはK_{off}法に基づき選択された、scFv抗オボアルブミン抗体の独自の配列を得ることができることも示す（図14参照）。アミノ酸置換のいくつかは、あるCDR内では、より高い優位性で回収されることがわかった。例えばV_HCDR1の場合、7つの独立した単一Lys置換が、D30K、Y31K、M33K、およびW35Kの位置にあった。CDR1内でのLysの高い優位性は、抗原接触中にCDR1から与えられる正電荷の純増があるときに、強化されたオボアルブミン結合が生ずることを示している。回復されたアミノ酸置換の試験は、V_HCDR2およびCDR3に好ましい置換が生ずることも明らかにした。例えば、複数の散乱したLys置換はCDR2に生ずるが、CDR3は、濃度が高められたG102KおよびG104K置換を表示することが観察された。結果はさらに、複数のGln置換、別の極性アミ

ノ酸が、位置 107、108、109、および 111 で CDR3 に存在したことも明らかにしている。これらの結果は、これらの置換された CDR 残基に接触するオボアルブミン上に、対応する負および / または親水性電荷の独自の「化学モチーフ」があることを示す。

【0121】

したがって、試験がなされた 9 種の異なるアミノ酸のそれぞれによる、全ての CDR の変異誘発後に各 CDR 内で回復された強化型抗原結合変異を配列し、結果を図 14 に示す。各 CDR は、変異が見出されない少なくとも 1 つの位置、例えば V_H CDR2 内の Ile57、Asn58、および Gly62 の位置、 V_H CDR3 領域の位置 Tyr103、Ser105、Arg106、および Ala121 を表示することも決定した。 V_L 位置の場合、CDR1 の R164、A165、V169、および N174、CDR2 の N194、CDR3 の E208 および D209 は、大規模なスクリーニングの後に置換されないことがわかった。これらの結果は、「ホットスポット」置換位置および上述のように回復された任意のタイプの好ましいアミノ酸に加え、「コールドスポット」CDR 位置もあることを示している。「コールドスポット」位置は、置換のいずれかが、抗原結合の利点を与えずまたは劣っている結合特性を与えることを示す。

【0122】

(実施例 5)

コンビナトリアルベネフィシャル変異誘発を実施するための方法

この実施例では、コンビナトリアルベネフィシャル変異誘発を実施するための方法について述べる。

【0123】

簡単に言うと、この方法は、LTM を使用して見出された有益な変異を取り込み、これらを一緒に組み合わせて単一のライブラリーにする。したがって、複数の変異の相乗効果をこのプロセスで模索することができる。このコンビナトリアル手法は、CDR 内で選択されたコドン置換が、LTM によって特定された種々の有益なアミノ酸置換であること以外、WTM 法に似ている。したがって、抗体 CDR 内の全ての残基位置が変異を含有するわけではなく、いくつかの位置が、その位置で置換された複数の異なるアミノ酸を有することになる。全体として、CDR または抗体鎖中の、全てではないとしても多くの有益な変異の組合せは、ライブラリー内のコード配列の少なくとも 1 つにより表されることになる。以下に示すように、このコード配列ライブラリーは、可変コード領域内のそれぞれの異なる位置で単一アミノ酸に複数のコドンを配置する代わりに、導入されたコドンが LTM 法で検出された全ての有益な変異に対応するものであること以外、WTM 法の修正によって作成することができる。

【0124】

この実施例では、コンビナトリアルベネフィシャル重鎖 CDR1 ライブラリーを、図 14 に記載される改善された抗オボアルブミン変種を使用して構成する。第 1 のアミノ酸位置 30 は、Asp (野生型) および Lys を (最低でも) コードし、位置 31 は Tyr および Lys を、位置 32 は Asn および Tyr を、位置 33 は Met、His、および Lys を、位置 34 は Asp および Pro を、位置 35 は Trp および Lys をコードする。DNA 配列は、LTM 分析により特定されたコンビナトリアルベネフィシャル変異を取り込む変性 CDR1 オリゴヌクレオチドによって表される (表 1)。

【0125】

【表 1】

表 1 5' から 3' までのヌクレオチド塩基の可能性

5'	G	A	C	T	A	C	A	A	C	A	T	G	G	A	C	T	G	G	3'
	A		G	A		G	T			C	A	C	C	C		A	A	G	

10

20

30

40

【 0 1 2 6 】

同様のプロセスを、全ての C D R ループで実施して、6 - C D R ベネフィシャルライブラリーを生成することができ、またはサブライブラリーを生成し、これらを組み合わせてスクリーニングすることができる。例えばライブラリーのサイズが、単一のライブラリー内でスクリーニングするには大きすぎる場合、より小さいサブライブラリーを生成することができる。例えば、3 - C D R 重鎖ライブラリーおよび 3 - C D R 軽鎖ライブラリーを、より高い効率のために生成することができる。スクリーニング後、重鎖および軽鎖ライブラリーの有益な変異をさらに組み合わせて、適切なループ内に変異を取り込んだ単一ライブラリーにすることができる。

【 0 1 2 7 】

均等物

当業者なら、本明細書に記述される本発明の特定の実施形態に関する多くの均等物を理解するであろうし、またはこれら均等物を、日常的な試験しか使用せずに確認することができる。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものとする。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 2 8 】

【 図 1 】より有益な一部の候補分子が得られかつスクリーニングされるように、機能的アミノ酸が非機能的アミノ酸とは区別される、L T M にも勝って改善された L T M (L T M 2) の利点を示す図である。

【 図 2 】より大きい遺伝子のコンテキストに、機能的アミノ酸残基を特定する抗体重鎖および軽鎖の規定の領域を構築するために、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を使用するための概略的手法を示す図である。

【 図 3 】合成単鎖抗体 (s c F v) 抗オボアルブミン遺伝子コンテキスト内の、可変軽鎖 (V_L) および可変重鎖 (V_H) C D R の配列を示す図である。L T M の適用例では、ロイシンアミノ酸を、抗体の V_H C D R 2 内の 1 4 の残基 5 6 ~ 6 9 のそれぞれに導入する。L T M 2 の適用例に関しては、機能的であることが確認されたものだけを、変異誘発によってさらに探索する。

【 図 4 】L T M V_H C D R 2 ライブラリーの生成、多数の L T M V_H C D R ライブラリーの生成、V_H および V_L C D R の両方を含む L T M ライブラリーの組合せのアレイのための、単一オーバーラップ伸長ポリメラーゼ連鎖反応 (S O E - P C R) を示す図である。

【 図 5 】本発明のライブラリーの多様性を示す図であり、この行列の x 軸および y 軸は、軽鎖および重鎖のそれぞれの C D R を表し、ただし「 0 」は野生型 C D R を示し、「 1 」は変異した C D R を示し、交差点にある数は、得られるサブセットライブラリーの複雑さを表す (例えば 4 は、4 つの C D R が同時に変異することを意味する)。

【 図 6 】機能 (表現型) および対応するコード配列 (遺伝子型) の効率的な特定のため、酵母表面の対象のタンパク質、例えば本発明のポリペプチド類似体を表示するための、酵母発現ベクターの概略を示す図である。

【 図 7 】ピオチニル化オボアルブミンおよびストレプトアビジン F I T C と野生型抗オボアルブミン s c F v との結合 (灰色の線)、p Y D 1 ベクター単独 (忠実な灰色領域)、および対照 s c F v (黒線) の、蛍光活性化セルソータ (F A C S (商標)) によるプロットを示す図である。

【 図 8 】プレスクリーン抗オボアルブミン s c F v クローンの > 8 0 % が所定の基準内にあることを確認するための、抗オボアルブミン野生型抗体 (左パネル)、全 L T M ライブラリーの結合親和性の分布 (中央パネル)、および選別後 F A C S 分析 (右パネル) よりも、オボアルブミンに対してより高い結合親和性を持つ s c F v 融合を発現するこれら L T M クローンのみを特定するための選択ゲート (R 1 台形) を示す、蛍光活性化セルソータ (F A C S (商標)) によるプロットを示す図である。

【 図 9 】平衡結合動態に基づいて改善される結合親和性のために (例えばオボアルブミンに対して)、本発明に従って形成される s c F v 抗体 (例えば抗オボアルブミン) をスク

10

20

30

40

50

リーニングするステップを示す図である。

【図 10】選択前（円）、選択の一巡後（薄い三角形）、選択の二巡後（濃い三角形）の、抗オボアルブミン s c F v 発現細胞と、抗オボアルブミン野生型参照抗体（黒い四角）とに関する平衡結合曲線を示す図である。

【図 11】試験抗原オボアルブミンを使用して、特定の結合動態、例えば抗体 K_{off} 定数に基づく高い結合親和性に関して本発明により形成された抗体をスクリーニングするための、典型的なステップを示す図である。

【図 12】本発明の方法を使用する、2つのクローンにおいて強化された特性（すなわち、参照抗体（四角）に比べてより高い相対 K_{off} ）の確認を示す図である。

【図 13】抗オボアルブミン野生型参照抗体対照（四角）よりも低い EC_{50} 値を有する、改善されたクローンのサブセットの、強化された特性（野生型よりも良好な倍率参照）を示す図である。

【図 14】例示的な抗体の機能的（ホットスポット）および非機能的（コールドスポット）アミノ酸位置を表すマトリックスを示す図である。平衡結合（ EC_{50} ）および/または動態結合実験に基づき強化された親和性（参照野生型抗体に比べて）に伴う変異は、 V_H および V_L CDR 位置のそれぞれの下に示されている。

10

【図 1】

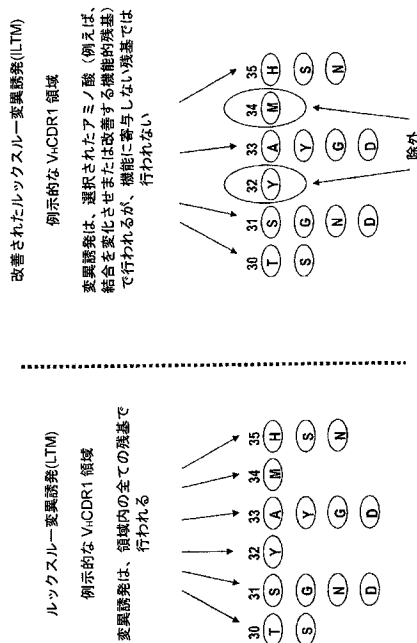


図 1

【図 2】

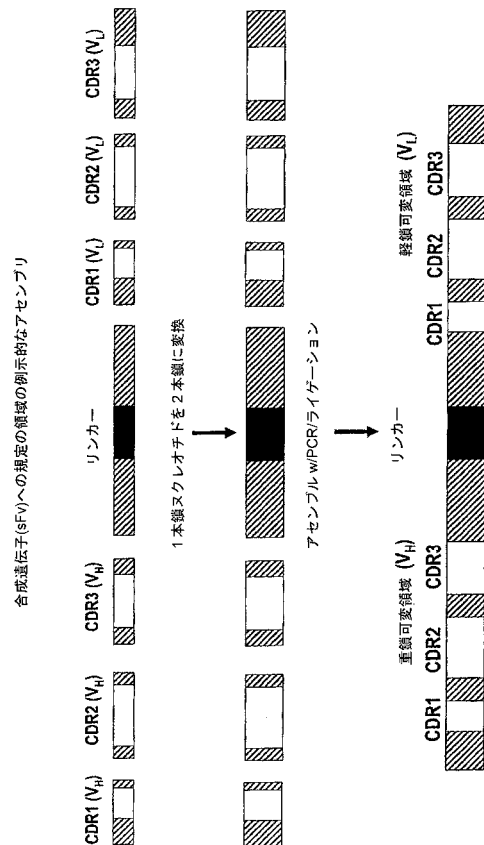
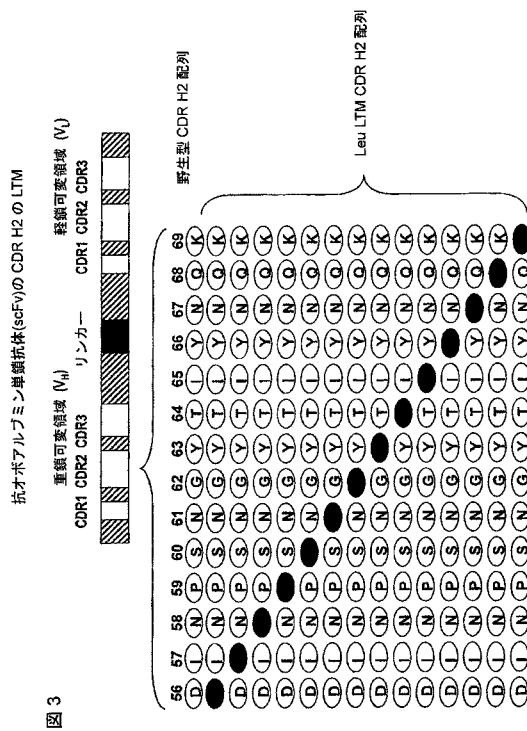


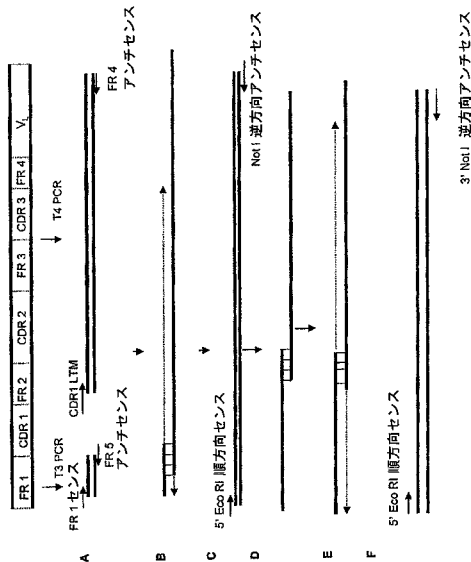
図 2

【 図 3 】

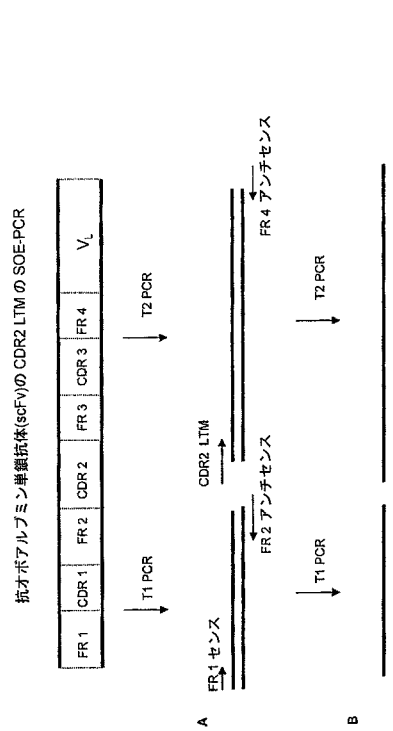


【 図 4 B 】

2重 CDR1 および CDR2 LTM ライブラリーを作成するための、scFv 鎖型の CDR2 LTM への CDR1 LTM の SOE-PCR



【 図 4 A 】



【 図 5 】

経緯 CDR 変異誘発と重鎖 CDR 変異誘発とを組み合わせた順序を示すマトリックス

		重鎖 CDR															
		000	100	010	001	110	101	011	111								
軽鎖 CDR	000	1	1	1	1	2	2	2	3								
	100	1	2	2	2	3	3	3	4								
	010	1	2	2	2	3	3	3	4								
	001	1	2	2	2	3	3	3	4								
	110	2	3	3	3	4	4	4	5								
	101	2	3	3	3	4	4	4	5								
	011	2	3	3	3	4	4	4	5								
	111	3	4	4	4	5	5	5	6								

図 5

5'-----FR 2 -----cat ctc acc aga cga cgc tct----->3'
3'<-----gta gag tgg gtt tet gcg ata----- CDR2 LTM ----5'

【 図 6 】

単鎖抗体(scFv)酵母の発現、ディスプレイ、およびスクリーニングカセットの概略図



【 図 7 】

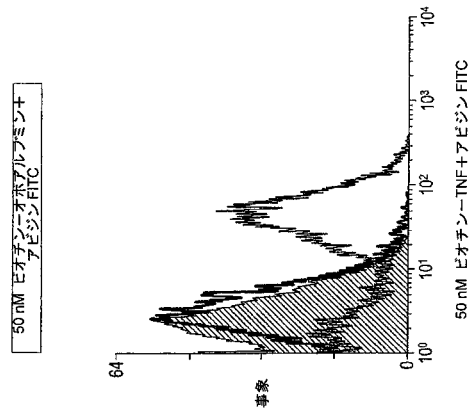


図 7

【 図 8 】

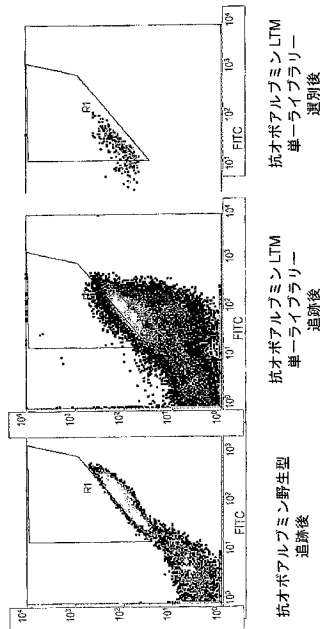


図 8

【 図 9 】

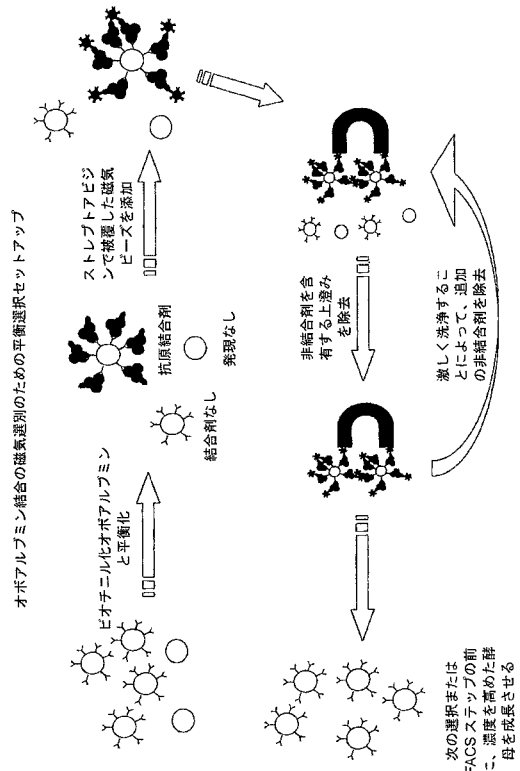


図 9

【図 1 0】

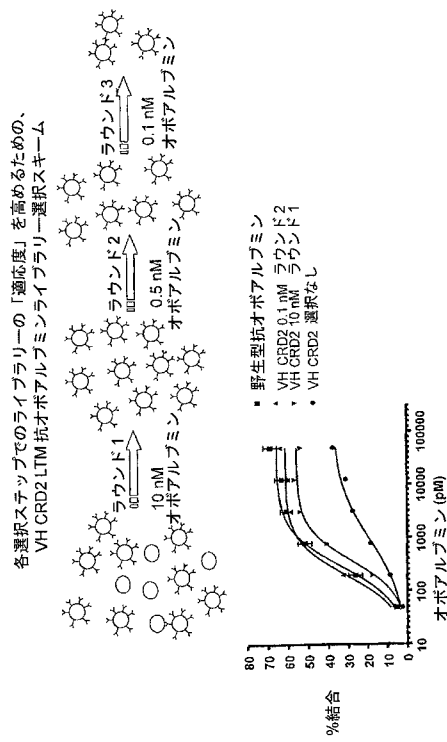


図 10

【図 1 1】

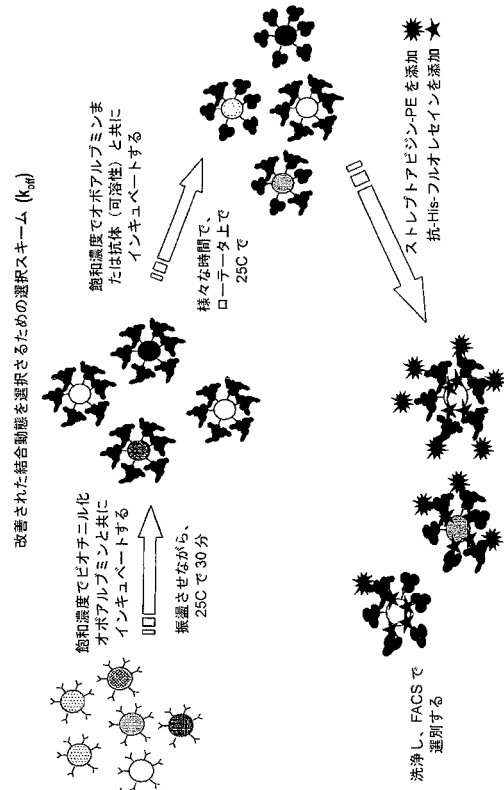


図 11

【図 1 2】

酵母ディスプレイを使用して改善された抗体変種の動態(k_{on})アッセイ結果

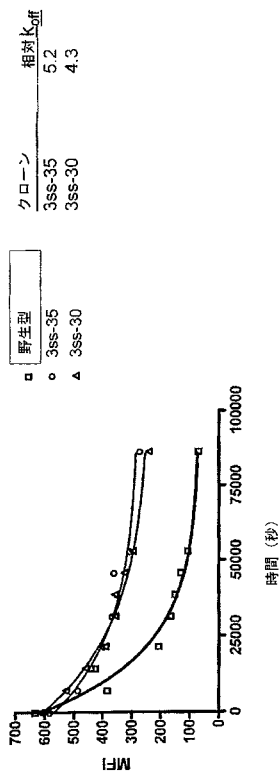


図 12

【図 1 3】

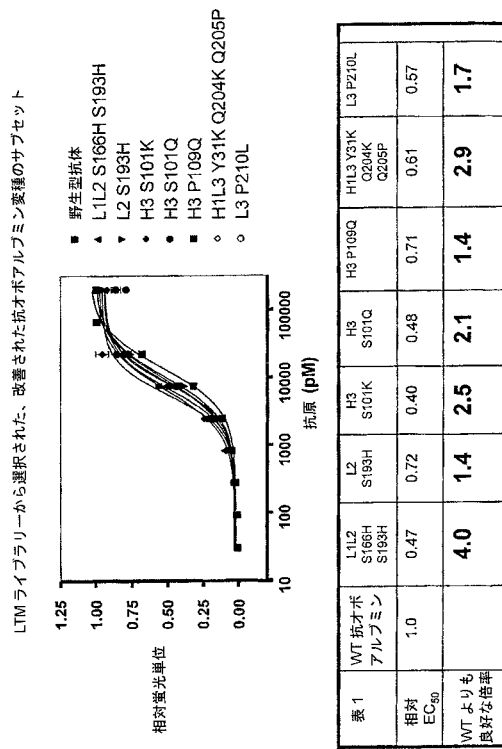


図 13

【図 14】

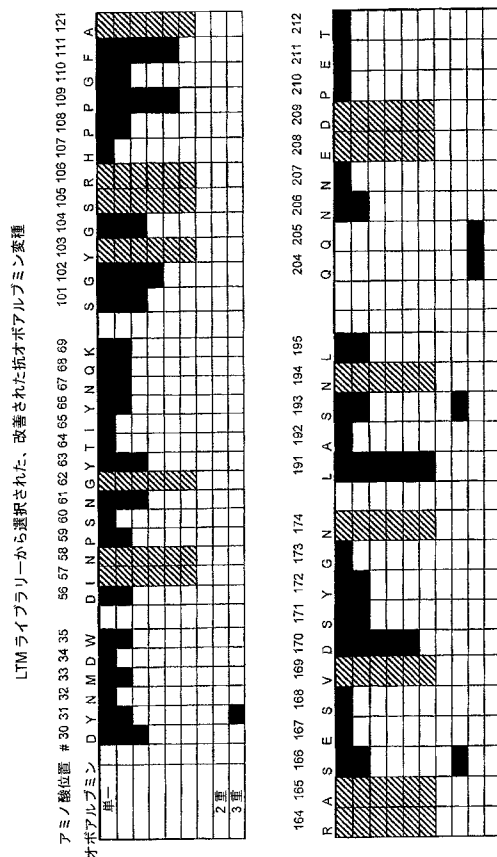


図 14

【配列表】

2008505642000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年9月25日(2007.9.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0128

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0128】

【図1】より有益な一部の候補分子が得られかつスクリーニングされるように、機能的アミノ酸が非機能的アミノ酸とは区別される、LTMにも勝って改善されたLTM(LTM2)の利点を示す図である。

【図2】より大きい遺伝子のコンテキストに、機能的アミノ酸残基を特定する抗体重鎖および軽鎖の規定の領域を構築するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用するための概略的手法を示す図である。

【図3】合成単鎖抗体(scFv)抗オボアルブミン遺伝子コンテキスト内の、可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)CDRの配列を示す図である。LTMの適用例では、ロイシンアミノ酸を、抗体のVHCDR2内の14の残基56~69のそれぞれに導入する(配列番号47~61、それぞれ順にまたは表示されるとおり)。LTM2の適用例に関しては、機能的であることが確認されたものだけを、変異誘発によってさらに探索する。

【図4】LTM VHC DR2ライブラリーの生成、多数のLTM VHC DRライブラリーの生成、VHおよびVLC DRの両方を含むLTMライブラリーの組合せのアレイのための、単一オーバーラップ伸長ポリメラーゼ連鎖反応(SOE-PCR)を示す図である。図4Aは配列番号62を開示している。

【図 5】本発明のライブラリーの多様性を示す図であり、この行列の x 軸および y 軸は、軽鎖および重鎖のそれぞれの C D R を表し、ただし「0」は野生型 C D R を示し、「1」は変異した C D R を示し、交差点にある数は、得られるサブセットライブラリーの複雑さを表す（例えば 4 は、4 つの C D R が同時に変異することを意味する）。

【図 6】機能（表現型）および対応するコード配列（遺伝子型）の効率的な特定のため、酵母表面の対象のタンパク質、例えば本発明のポリペプチド類似体を表示するための、酵母発現ベクターの概略を示す図である。6 × H i s タグは配列番号 63 として開示されている。

【図 7】ピオチニル化オボアルブミンおよびストレプトアビジン F I T C と野生型抗オボアルブミン s c F v との結合（灰色の線）、p Y D 1 ベクター単独（忠実な灰色領域）、および対照 s c F v （黒線）の、蛍光活性化セルソータ（F A C S（商標））によるプロットを示す図である。

【図 8】プレスクリーン抗オボアルブミン s c F v クローンの > 80 % が所定の基準内にあることを確認するための、抗オボアルブミン野生型抗体（左パネル）、全 L T M ライブラリーの結合親和性の分布（中央パネル）、および選別後 F A C S 分析（右パネル）よりも、オボアルブミンに対してより高い結合親和性を持つ s c F v 融合を発現するこれら L T M クローンのみを特定するための選択ゲート（R 1 台形）を示す、蛍光活性化セルソータ（F A C S（商標））によるプロットを示す図である。

【図 9】平衡結合動態に基づいて改善される結合親和性のために（例えばオボアルブミンに対して）、本発明に従って形成される s c F v 抗体（例えば抗オボアルブミン）をスクリーニングするステップを示す図である。

【図 10】選択前（円）、選択の一巡後（薄い三角形）、選択の二巡後（濃い三角形）の、抗オボアルブミン s c F v 発現細胞と、抗オボアルブミン野生型参照抗体（黒い四角）とに関する平衡結合曲線を示す図である。

【図 11】試験抗原オボアルブミンを使用して、特定の結合動態、例えば抗体 K o f f 定数に基づく高い結合親和性に関して本発明により形成された抗体をスクリーニングするための、典型的なステップを示す図である。

【図 12】本発明の方法を使用する、2 つのクローンにおいて強化された特性（すなわち、参照抗体（四角）に比べてより高い相対 K o f f）の確認を示す図である。

【図 13】抗オボアルブミン野生型参照抗体対照（四角）よりも低い E C 50 値を有する、改善されたクローンのサブセットの、強化された特性（野生型よりも良好な倍率参照）を示す図である。

【図 14】例示的な抗体の機能的（ホットスポット）および非機能的（コールドスポット）アミノ酸位置を表すマトリックスを示す図である。平衡結合（E C 50）および / または動態結合実験に基づき強化された親和性（参照野生型抗体に比べて）に伴う変異は、V H および V L C D R 位置のそれぞれよりも下にあることが示されている。図は配列番号 64 ~ 133 を、それぞれ順にまたは表示されるとおり開示している。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

オボアルブミン野生型 V H セクション S L E W I G - D I N P S N G Y T I Y N Q K F K G - F K G K A T L（配列番号 42）からの、V H C D R 2 セグメントの所定のアミノ酸 D I N P S N G Y T I Y N Q K F K G（配列番号 9）（位置 56 ~ 69）が、分析用に選択された。ポリペプチド配列 S L E W I G（配列番号 43）および K A T L T V D（配列番号 44）は、それぞれ V H C D R 2 に隣接する V H フレームワーク 2 および 3 の部分である。V H および V L C D R L T M オリゴヌクレオチドの設計および合成では、隣接するフレームワーク配列の長さが約 21 塩基対であることが、相補的重複および S O E -

P C Rを可能にする。フランキングV H 2 およびV H 3 部分（下記の小文字）を含んだ上記C D R - H 2 野生型配列（太字）（配列番号1 6）をコードする参照オリゴヌクレオチドを、以下に示す。

5' - a g c c t t g a g t g g a t t g g a - G A T A T T A A T C
 C T A G C A A T G G T T A T A C T A T C T A C A A C C A G A
 A G T T C A A G G G C - t t c a a g g g c a a g g c c a c a t
 t g - 3'（配列番号4 5）

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 5】

表1 5' から3' までのヌクレオチド塩基の可能性（配列番号4 6）

5'	G	A	C	T	A	C	A	A	C	A	T	G	G	A	C	T	G	G	3'
	A		G	A		G	T			C	A	C	C	C		A	A	G	

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

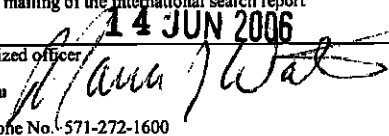
2008505642000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/24140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07H 21/02(2006.01);C07K 16/00(2006.01) USPC: 530/387.1;536/23.1 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) U.S. : 530/387.1; 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, WEST/EAST														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Adams, G. P. et al., Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. Journal of Immunological Methods. Vol. 231: 249-260. 1999. See Entire Doc.</td> <td>1-52, 57, 58, 60-62, 65, 66</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Wang, J. Survey and Summary from DNA biosensors to gene chips. Nucleic Acids Research. 2000. Vol. 28: 3011-3016. See Entire Doc.</td> <td>41, 53-56</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Glokler, J. et al., Protein and antibody microarray technology. Journal of Chromatography B. Vol. 797: 229-240. 2003. See Entire Doc.</td> <td>58, 59, 63, 64</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Adams, G. P. et al., Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. Journal of Immunological Methods. Vol. 231: 249-260. 1999. See Entire Doc.	1-52, 57, 58, 60-62, 65, 66	X	Wang, J. Survey and Summary from DNA biosensors to gene chips. Nucleic Acids Research. 2000. Vol. 28: 3011-3016. See Entire Doc.	41, 53-56	X	Glokler, J. et al., Protein and antibody microarray technology. Journal of Chromatography B. Vol. 797: 229-240. 2003. See Entire Doc.	58, 59, 63, 64
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	Adams, G. P. et al., Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. Journal of Immunological Methods. Vol. 231: 249-260. 1999. See Entire Doc.	1-52, 57, 58, 60-62, 65, 66												
X	Wang, J. Survey and Summary from DNA biosensors to gene chips. Nucleic Acids Research. 2000. Vol. 28: 3011-3016. See Entire Doc.	41, 53-56												
X	Glokler, J. et al., Protein and antibody microarray technology. Journal of Chromatography B. Vol. 797: 229-240. 2003. See Entire Doc.	58, 59, 63, 64												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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													
"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)	"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													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family													
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 12 May 2006 (12.05.2006)		Date of mailing of the international search report 14 JUN 2006												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Sue Liu  Telephone No. 571-272-1600												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/24140

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

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
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

International application No. PCT/US05/24140

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-22, drawn to a method of distinguishing amino acid residues within a polypeptide.

Group 2, claim(s) 23-39, drawn to a method of generating a library of polypeptide analogs.

Group 3, claim(s) 40, drawn to a library of polypeptide analogs.

Group 4, claim(s) 41-55, drawn to a library of polynucleotides.

Group 5, claim(s) 56, drawn to a microchip.

Group 6, claim(s) 57, drawn to a polypeptide analog.

Group 7, claim(s) 58-62, drawn to a method of identifying a subset of polypeptide.

Group 8, claim(s) 63, drawn to a medium suitable for use in an electronic device.

Group 9, claim(s) 64, drawn to a device.

Group 10, claim(s) 65, drawn to a library of polynucleotides encoding antibodies.

Group 11, claim(s) 66, drawn to an antibody.

The inventions listed as Groups 1-11 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The linking features of Group 1-11 are structurally and functionally different from one another. For examples, the technical feature of Group 1 is a method distinguishing amino acid residues within a polypeptide; the technical feature of Group 2 is a method of generating mutations for a polypeptide; the linking feature of Group 5 is a microchip. Therefore, Groups 1-11 are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single inventive concept. In addition, the special technical feature of Group 1 is known in the prior art. For example, Adams et al (Journal of Immunological Methods. Vol. 231: 249-260. 1999), throughout the reference, teach methods of generating single-chain Fv molecules using various amino acid mutagenesis techniques and screening methods, which reads on method distinguishing amino acid residues within a polypeptide of Claim 1. Thus, the inventions lack unity.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53		D
		G 0 1 N 37/00	1 0 2	
		C 0 7 K 16/00		

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

F ターム (参考) 4B063 QA08 QA13 QA20 QQ43 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR79 QR80
 QR82 QS25
 4H045 AA11 AA20 DA75 FA74

专利名称(译)	通过观察诱变以产生具有增强特性的变性多肽		
公开(公告)号	JP2008505642A	公开(公告)日	2008-02-28
申请号	JP2007520506	申请日	2005-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	生物墨仁		
申请(专利权)人(译)	Baiores, 油墨.		
[标]发明人	ロベルト クレア		
发明人	ロベルト クレア		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 G01N33/53 G01N37/00 C07K16/00		
CPC分类号	C12N15/102 C07K16/00 C07K16/18 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/92 C12N15/1093 G01N33/6854 G01N33/6857		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.ZCC.A C12N15/00.F C12M1/00.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 C07K16/00		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B029/HA09 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA20 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS25 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/DA75 4H045/FA74		
代理人(译)	枸杞庆喜		
优先权	60/585918 2004-07-06 US		
其他公开文献	JP4939410B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

将给定的氨基酸引入多肽的预选区域（或几个不同区域）内的一组选定位置的每个位置，以产生多肽类似物的文库。并公开了一种诱变方法。这种方法具有的氨基酸具有以下结构和蛋白质的功能是基于播放多肽内举足轻重的作用，因此，非功能性的氨基酸残基（“冷点”），或其部分的前提下，可以鉴定和区分功能性氨基酸残基（“热点”）。该文库仅含有所需的多肽类似物，并且可以适当筛选。使用该库，也可以研究在多肽的结构和功能的特定氨基酸中的作用，也抗体或抗体片段，如单链抗体，酶，和配体，新的或改进的聚可以开发肽。

