(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-289483
(P2008-289483A)
(43)公開日　平成20年12月4日(2008.12.4)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q 1/68	Z	4B063
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q 1/02		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08		

審査請求 未請求　請求項の数 27　ＯＬ　外国語出願　（全 25 頁）

(21)出願番号　特願2008-134696 (P2008-134696)
(22)出願日　平成20年5月22日 (2008.5.22)
(31)優先権主張番号　PA200700765
(32)優先日　平成19年5月25日 (2007.5.25)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)

(71)出願人　508153648
シンフォジェン　アクティーゼルスカブ
デンマーク国，デーコー－２８００　コンジェンス　リンビュー，ビュンニン　３７５，エレクトロバイ
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100108903
弁理士　中村　和広

最終頁に続く

(54)【発明の名称】真核生物系において発現可能な形質転換体のスクリーニング

(57)【要約】
【課題】分子クローニングの分野及び高等真核生物細胞における発現クローニングの分野において、真核宿主細胞がベクターDNAでトランスフェクトされた場合に所望の発現産物を提供することのできるベクター及びベクターDNAの迅速かつ信頼性のある同定方法を提供する。
【解決手段】マルチウエルプレート中に整列化されたcDNAライブラリーの自動化DNA増幅を可能とすることによって、分泌型タンパク質のハイスループット発現クローニングを実施するための複雑性及び時間消費を顕著に減少させる。原則として、増幅されたDNAのトランスフェクションのための使用は、マルチウエルフォーマット中の哺乳動物細胞の目録化又は整列化されたライブラリーによるトランスフェクションを含む手順を単純化し、それによってスループットを増加させるであろう。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
それぞれが、少なくとも１つの所定の機能性を有する発現産物（EPPF）をコードし、かつ、該EPPFを真核細胞中で発現させるための十分な遺伝因子を含むベクター核酸を同定及び／又は単離するための方法であって、以下のステップ：
ａ）ベクター核酸の複数のサンプルを提供し、ここで、該サンプルのそれぞれは単一のベクター核酸種を含み、
ｂ）各異なるサンプルからの核酸を、分子増幅法において増幅して、前記ベクター核酸種のコンカテマーである増幅産物を生成し、
ｃ）前記各増幅産物を、別個の真核細胞集団中へトランスフェクトし、
ｄ）前記増幅産物の発現を促進する条件下で、前記別個の真核細胞集団をそれぞれ培養し、
ｅ）続いて、前記真核細胞培養中の前記EPPFの存在について試験し、そして
ｆ）ステップｅ）において存在が見出されたEPPFがそれに由来する、ステップａ）のベクターを同定及び／又は単離する、
を含む、前記方法。
【請求項２】
それぞれが、少なくとも１つの所定の機能性を有する発現産物（EPPF）をコードし、かつ、該EPPFを真核細胞中で発現させるための十分な遺伝因子を含むベクター核酸を同定及び／又は単離するための方法であって、以下のステップ：
Ａ）EPPFをコードすると推定されるヌクレオチド配列をそれぞれが含む、複数の核酸を提供し、
Ｂ）前記複数の核酸の各メンバーのうち、少なくともEPPFをコードすると推定される核酸を分子増幅法において増幅して、真核細胞中で上記核酸配列を発現させるための十分な遺伝因子と作動可能に連結した上記ヌクレオチド配列をそれぞれが含むコンカテマーである増幅産物を生成し、
Ｃ）前記増幅産物のそれぞれを真核細胞中にトランスフェクトし、
Ｄ）前記増幅産物の発現を促進する条件下で前記真核細胞を培養し、
Ｅ）続いて、前記真核細胞中の前記EPPFの存在について試験し、そして、
Ｆ）ステップＥ）においてその存在が見出されたEPPFをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを同定及び／又は単離する、
を含む、前記方法。
【請求項３】
ステップE）において見出された前記EPPFのコード配列が、前記真核細胞中に存在する前記増幅産物を切除しそして配列決定することによって決定される、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ベクター核酸が、ステップE）において見出された前記EPPFのコード配列を、真核細胞中での前記EPPFの発現を達成するために十分な残りの必須遺伝因子と組み合わせることによって同定される、請求項２又は３に記載の方法。
【請求項５】
前記少なくとも１つの所定の機能性が、以下の：
前記発現産物による物理的効果の発揮；
前記発現産物のリガンド又は抗原への結合；
前記発現産物による、酵素活性などの触媒活性の発揮；
触媒活性、例えば酵素活性、に対する前記発現産物の感受性；
前記発現産物による、生体膜を横切る作用物質の輸送の変更の促進；
前記発現産物による、細胞内コンパートメント中の作用物質の転位の変更の促進；
前記発現産物の、真核細胞集団中での少なくとも１つの遺伝子の発現に対する影響；
前記発現産物の、真核細胞集団の増殖又は代謝に対する影響；

前記発現産物の、標的細胞への影響；
前記発現産物の、病原性の作用物質に対する影響；及び
前記発現産物の、二次免疫効果への影響、
からなる群から選ばれる、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記発現産物が、RNA、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、単量体タンパク質及び多量体タンパク質から選択される、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
ステップｅ）における試験が、前記培養上清中の前記ＥＰＰＦの存在及び／又は活性についてのアッセイを含む、請求項１並びに請求項1に従属する請求項５及び６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
ステップｅ）において前記EPPFの存在が見出された真核細胞集団が明らかにステップａ）の１つのベクター核酸種に由来することを、ステップａ）～ｅ）が保証する、請求項１並びに請求項１に従属する請求項５～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
ステップａ）中の前記ベクター核酸種並びにそれらの派生産物が、各ステップにおいてお互いに物理的に分離されるか、又はステップａ）の前記ベクター核酸並びにそれらの派生産物が独自に標識される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
ステップｆ）における同定を容易化するように、ステップａ）の前記複数のサンプル及び／又はベクター核酸並びにそれらの派生産物が整列化及び／又は目録化される、請求項８に記載の方法。
【請求項１１】
ステップａ）のベクター核酸又はステップＡ）の核酸が、細菌プラスミド又は細菌染色体などの環状ＤＮＡから選ばれる、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記分子増幅法が、ローリングサークル型増幅を含む、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ローリングサークル型増幅が、実質的に５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠く、鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼを利用する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片、エキソヌクレアーゼ活性を除去したＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片、Bstポリメラーゼ由来の断片、SEQUENASE 1.0、SEQUENASE 2.0、T5 DNAポリメラーゼ、$Vent_R$(exo-)ポリメラーゼ、ThermoPhi及びバクテリオファージPhi29 DNAポリメラーゼから選ばれる、請求項１２又は１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記増幅産物が、前記ベクター核酸種の分岐した二重鎖コンカテマーである、請求項１３又は１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記DNAポリメラーゼが、バクテリオファージphi29DNAポリメラーゼ、又は切断型phi29ポリメラーゼなどの機能的に等価なポリメラーゼ、及びphi29若しくはその機能的切断型に対して少なくとも８０％配列同一性を有するphi29ポリメラーゼ突然変異体である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記分子増幅法が、ランダムヘキサマープライマーなどのランダムオリゴヌクレオチドプライマーによって開始される、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】

前記分子増幅法が等温である、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記分子増幅法の間の温度が、２０℃～４５℃などの１５～５０℃の範囲に保たれる、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
ステップｃ）及びＣ）の前記真核細胞が、糸状菌及び酵母などの真菌細胞；植物細胞；及び動物細胞からなる群から選ばれる、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
ステップｅ）及びＥ）が、培地中に分泌されたEPPFの存在についての試験を含む、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記EPPFが、所定の抗原に結合する、抗体、抗体断片、又は合成若しくは半合成の抗体若しくは抗体アナログである、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
ステップａ）及びＡ）中の核酸が、その中の少なくともいくつかがEPPFをコードすると予想される核酸でトランスフェクトされた細菌から得られる、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
EPPFをコードする複数のベクター核酸種が、単離された単一細胞に由来する別個のテンプレートを用いるマルチプレックス分子増幅法を介して得られ、ここで、該分子増幅法は、可変領域をコードする配列の同系の対を、可変領域をコードするヌクレオチド配列を連結することによって生成することを含み、各同系の対は単離された単一細胞に由来する、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
ステップａ）の二重鎖ベクター又はステップＡ）の二重鎖核酸が塩基による変性に供される、先の請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
真核細胞中でEPPFを生産するための方法であって、該方法は、先の請求項のいずれか１項に記載の方法によってベクター核酸を同定し、そして、該ベクター核酸が由来するベクターで好適な真核宿主細胞をトランスフェクト又は形質導入し、該トランスフェクト又は形質導入された真核細胞を、前記EPPFをコードする核酸の発現を促進する条件下で培養し、そして該培養から前記EPPFを回収することを含む、前記方法。
【請求項２７】
前記EPPFが、抗体、抗体断片又は抗体アナログである、請求項２６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、分子クローニングの分野及び高等真核生物細胞における発現クローニングの分野に関する。特に、本発明は、真核宿主細胞がベクターDNAでトランスフェクトされた場合に所望の発現産物を提供することのできるベクター及びベクターDNAの、迅速かつ信頼性のある同定方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
機能的スクリーニング
発現クローニング及び機能的ゲノミクスアプローチは、選択可能又は検出可能な活性を与えるか又はそれに寄与するタンパク質を同定することを目的とする。これは、（Durick K, Mendlein J and Xanthopoulos KG. Hunting with traps: genome-wide strategies for gene discovery and functional analysis. Genome Res, 1999; 9:1019-1025中に概説されている）生物体における高度な遺伝子トラップ分析法からハイスループット相互作用試験（Pearlberg J and LaBaer J. Protein expression clone repositories for functi

onal proteomics. Curr Opin Chem Biol, 2004; 8:98-102）にわたるいくつかの異なる方法によって取り組まれてきた。

【０００３】

タンパク質の同定及び遺伝子機能の割り当てのための１つの成功したアプローチは、哺乳動物細胞に基づく発現クローニングであった。この方法においては、異なる細胞系又は組織由来のcDNAがライブラリーとしてウイルス又はプラスミドに基づく発現ベクター中にクローニングされ、そして適切な哺乳動物細胞株中に一過性又は永久的にトランスフェクトされる。アポトーシスの誘導に対する耐性、増殖の誘導、細胞表面受容体を発現する細胞のパニング又は活性の誘導などの着目の細胞内機能のいずれかを発揮する遺伝子をコードするcDNAについての選択又はスクリーニングが実施可能である（Seed B and Aruffo A. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84:3365-3369；Stark GR and Gudkov AV. Forward genetics in mammalian cells: functional approaches to gene discovery. Hum Mol Genet, 1999; 8: 1925-1938）。所望の特徴を有する細胞株を単離した後、一過性のトランスフェクションが使用される場合にはプラスミド分離技術により、又はトランスフェクトされたDNAがゲノム中に挿入される場合にはPCR技術などによりDNAが回収され、そして着目のゲノムが同定される。DNAが着目の表現型と物理的に組み合わされるため、このアプローチは単一容器での（single-vessel）トランスフェクションを可能とする。さらに、cDNAライブラリーは、哺乳動物細胞、すなわち、ヒトの遺伝子又はタンパク質のための自然の環境にできるだけ近い環境中で発現される。これらの利益はまた、タンパク質がそれを発現する細胞の表面に結合することを確認するために、（抗体などの）分泌型タンパク質が受容体断片などの表面タンパク質に結合される哺乳動物ディスプレイ系にもあてはまる。抗体を提示する哺乳動物細胞は、抗原への結合についてスクリーニングされることができる。例えば、陽性とされたものがFACSなどを用いて単離されることができ、cDNAが同定された細胞から上記のように得られることができる。

【０００４】

哺乳動物細胞のために採用された、化学又は物理学を介するDNAトランスフェクション法は、典型的には、細胞あたり数個のプラスミドを取り込む結果となり、これがスクリーニングの間のバックグラウンドを形成し、そして結果として感度を低下させる。さらに、エフェクタータンパク質が（抗体の重鎖及び軽鎖などの）２つ以上のサブユニットから成る状況では、異なるライブラリーメンバーをコードする複数のプラスミドの存在は、かかるタンパク質サブユニット間の組換えを生じさせ、それによって効率的な選択を妨げる。単一遺伝子－単一細胞状態を確立するためのレトロウイルス遺伝子導入の利用は、ある程度これらの問題を解消する（Whitehead I, Kirk H and Kay R. Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. Mol Cell Biol, 1995; 15: 704-710；Kitamura T. New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening. Int J Hematol, 1998, 67: 351-359）。細胞当たりの組込み部位が1つのみの部位特異的組込み法を採用する別の方法の可能性もあった。

【０００５】

或いは、スクリーニングの目的がサイトカイン又は抗体などの分泌型タンパク質を同定することである場合、cDNAと表現型の間の物理的関連はなく、所望の反応性を有するタンパク質を同定するためのさらなるアッセイが必要であろう。かかる発現クローニング実験は、マルチウエルプレート中の目録化された又は整列化されたcDNAライブラリー及び各独自のライブラリークローンによる個別のトランスフェクションを必要とするが；これは劇的に作業負荷を増加させ、そしてDNA調製のための自動化された又は半自動化されたリキッドハンドリングシステムを必要とする（Michiels F, van EH, van RL, Merchiers P, Francken B, Pittois K, van der SJ, Brys R, Vandersmissen J, Beirinckx F, Herman S, Dokic K, Klaassen H, Narinx E, Hagers A, Laenen W, Piest I, Pavliska H, Rombout Y, Langemeijer E, Ma L, Schipper C, Raeymaeker MD, Schweicher S, Jans M, van B K, Tsang IR, van de SO, Tomme P, Arts GJ and Donker J. Arrayed adenoviral expres

sion libraries for functional screening. Nature Biotechnol, 2002; 20: 1154-1157；Meijer PJ, Andersen PS, Haahr HM, Steinaa L, Jensen A, Lantto J, Oleksiewicz MB, Tengbjerg K, Poulsen TR, Coljee VW, Bregenholt S, Haurum JS and Nielsen LS. Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. J Mol Biol, 2006; 358: 764-772、抗体の同定に関するPCT国際特許出願公開第WO2005/042774号も参照のこと)。以前には、これは、連続的なスクリーニングと組み合わせてライブラリーをサブプールに分割し、活性遺伝子の単離及び同定に導くことによって達成されていた。このアプローチは、細胞成長因子の同定を含む数件のクローニングプロジェクトのために成功裏に使用された（Lee F, Yokota T, Otsuka T, Gemmell L, Larson N, Luh J, Arai K and Rennick D. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82:4360-4364；Yokota T, Lee F, Rennick D, Hall C, Arai N, Mosmann T, Nabel G, Cantor H and Arai K. Isolation and characterization of a mouse cDNA clone that expresses mast-cell growth-factor activity in monkey cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 1070-1074）。しかしながら、ライブラリーをサブプールに分けることは、所望の遺伝子産物を希釈することとなり、これは場合によっては方法にとって不利益となるであろう。

【０００６】

発現クローニングにおける現在の問題

生物学的アッセイにおける現代技術の実施は、化合物ライブラリーのスクリーニングのための生物学的反応のハイスループット性能を促進した。反応をよりロバストかつ単純とし、アッセイをより自動化に応用できるものとした。cDNAライブラリーのスクリーニングに関しては、発現ステップは宿主細胞のトランスフェクションのためのDNAの調製を必要とする。DNAの調製は、成功率に直接影響する重要ステップである。通常、プラスミドDNAは、原核細胞及び真核細胞の両方のトランスフェクションに用いられる。E.コリからのプラスミド抽出についての現代の標準的方法は、細菌ライセートからのプラスミド精製のためのDNA結合樹脂を利用する。手順全体は自動化され、そして９６ウエルプレート中で実施可能であるが、手順は、遠心分離及び／又は真空吸引及び／又は磁性ビーズによる分離などの複数のステップからなる。自動化の観点からは、これはスループットを制限し、よりロバスト性の低い手順となる、複雑な方法である。

【０００７】

スクリーニングにおけるローリングサークル型増幅の使用

PCT国際特許出願公開第WO2004/013350号（Novozymes）は、新しい生物からの関連する分泌型または表層提示型ポリペプチドの迅速かつ効率的な工業的開発のための方法に関する。該方法は、ローリングサークル型増幅及びライブラリーのシグナルタッピングを含み、ここで、ローリングサークル型増幅は、微生物種などから単離されたcDNAプールを増幅するために使用される。コンカテマーからなる増幅されたDNAは、モノマーを分離するために制限酵素で切断されて、これは精製した後、スクリーニングのために細菌細胞中に挿入されることができる。実施例は、リゾムコール・プシラスからのcDNAライブラリーがPhi29（Templiphi（商標））を用いて増幅され、制限酵素で切断され、そしてその後更なるスクリーニングのためにE.コリ中へ挿入されることができることを示している。

【０００８】

PCT国際特許出願公開第WO2005/003389号（Royal Holloway and Bedford New College）は、いくつかのDNA配列が、標準的なPCRに基づく方法を用いて”クローン化不可能”であると思われるという問題に関する。この参考文献は、かかるクローン化不可能なDNAは、ローリングサークル型増幅を用いて増幅されて、DNAフラグメントのタンデムリピートを作ることができことを示唆する。増幅された断片のモノマーを単離するために、増幅されたDNAは宿主細胞へのトランスフェクションの前に制限酵素で切断されてよい。

【０００９】

引用文献中で用いられるDNAポリメラーゼは、Phi29である。Phi29は、Amershamから商

品名TempliPhi（登録商標）で入手可能であり、米国特許第US5,198,543号（Consejo Superior Investigaciones Cientificas）中に記載されている。

【発明の開示】

【００１０】

発明の目的

機能性発現産物の発現を達成することのできる発現ベクターを同定するための改善された方法を提供することが本発明の目的である。

【００１１】

発明の要約

本発明は、商業的に入手可能なTempliphi（登録商標）（PHI29 DNAポリメラーゼ、米国特許第US5,198,543号）DNAテンプレート調製法によって得られた増幅されたプラスミドDNAからなるコンカテマーを、真核細胞における発現クローニング様の設定において利用することが可能であるという驚くべき発見にあり、ここで、細胞が該コンカテマーで直接トランスフェクトされ、その後、所望の発現産物の存在についてスクリーニングされる。これは、今度は、シリカ膜又は磁性ビーズに基づく方法などの慣用の労働集約的な方法によって先ずプラスミドDNAを精製しなくてはならないという欠点のない、真核細胞の複数の形質転換体によって生成された発現産物の有効なスクリーニングを可能とした。

【００１２】

本開示においては、われわれは、哺乳動物細胞のトランスフェクション用のDNAを生成するための、ポリメラーゼを介するDNA増幅を利用した単純なシングルステップの方法を記載する。本発明は、マルチウエルプレート中に整列化されたcDNAライブラリーの自動化DNA増幅を可能とする。該方法は、分泌型タンパク質のハイスループットな発現クローニングの実施に関する複雑性及び時間消費を顕著に減少させる。原則として、増幅されたDNAのトランスフェクションのための使用は、マルチウエルフォーマットにおける、目録化又は整列化されたライブラリーによる哺乳動物細胞のトランスフェクションを含む手順を単純化し、そしてそれによってスループットを増加させるであろう。

【００１３】

したがって、1つの側面において本発明は、それぞれが、少なくとも１つの所定の機能性を有する発現産物（EPPF）をコードし、かつ、該EPPFを真核細胞中で発現させるための十分な遺伝因子を含むベクター核酸を同定及び／又は単離する方法に関し、該方法は、以下のステップ：

ａ）ベクター核酸の複数のサンプルを提供し、ここで、該サンプルのそれぞれは単一のベクター核酸種を含み、

ｂ）各異なるサンプルからの核酸を、分子増幅法において増幅して、上記ベクター核酸種のコンカテマーである増幅産物を生成し、

ｃ）上記各増幅産物を、別個の真核細胞集団中へトランスフェクトし、

ｄ）増幅産物の発現を促進する条件下で、各別個の真核細胞集団を培養し、

ｅ）続いて、上記真核細胞培養中の上記EPPFの存在について試験し、そして

ｆ）ステップｅ）において存在が見出されたEPPFがそれに由来する、ステップａ）のベクターを同定し及び／又は単離する、

を含む。

【００１４】

より広い側面において本発明は、それぞれが、少なくとも１つの所定の機能性を有する発現産物（EPPF）をコードし、かつ、該EPPFを真核細胞中で発現させるのに十分な遺伝因子を含むベクター核酸を同定及び／又は単離する方法に関し、該方法は、以下のステップ：

Ａ）EPPFをコードすると推定されるヌクレオチド配列をそれぞれが含む複数の核酸を提供し、

Ｂ）上記複数の核酸の各メンバーのうち、少なくともEPPFをコードすると推定される核酸を分子増幅法において増幅して、真核細胞中で上記核酸配列を発現させるための十分な

遺伝因子と作動可能に連結した上記ヌクレオチド配列をそれぞれが含むコンカテマーである増幅産物を生成し、
Ｃ）上記増幅産物のそれぞれを真核細胞中にトランスフェクトし、
Ｄ）上記増幅産物の発現を促進する条件下で上記真核細胞を培養し、
Ｅ）続いて、真核細胞の培養中のEPPFの存在について試験し、そして、
Ｆ）ステップＥ）においてその存在が見出されたEPPFをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを同定及び／又は単離する、
を含む。

【００１５】

第３の側面において本発明は、真核細胞中でEPPFを生産する方法に関し、該方法は、本発明の同定方法によってベクター核酸を同定し、そして続いて該ベクター核酸がそこに由来するベクターで好適な真核宿主細胞をトランスフェクト又は形質導入し、該トランスフェクトされた又は形質導入された真核細胞を、EPPFをコードする核酸の発現を促進する条件下で培養し、そして、EPPFを培養から回収すること、を含む。

【００１６】

発明の詳細な説明

本明細書及び請求の範囲の目的のために、以下の用語及び表現がより詳細に説明される。

【００１７】

EPPFとも呼ばれる、「少なくとも１つの所定の機能性を有する発現産物」は、本明細書に照らして、核酸の真核生物発現の産物であて、ここで、該発現産物はアッセイ可能な機能性を示す。典型的には、EPPFは、ポリペプチド又はタンパク質であるが、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）又はリボザイムなどの生理活性を有するRNA分子であってもよい。

【００１８】

「ベクター核酸」は、クローニングベクター又は発現ベクターなどのベクターを構成するか又はベクターの一部を形成する核酸である。本発明において試験されるベクター核酸は、真核細胞によるベクター核酸の発現を可能とし、それによってEPPFが発現産物となる遺伝因子を含むものである。

【００１９】

サンプルが「単一のベクター核酸種」を含む場合、これは、本質的に、サンプル中に存在するすべてのベクター核酸が同じヌクレオチド配列を有することを意味する。

【００２０】

「分子増幅法において核酸を増幅する」とは、単一のアミノ酸配列（「テンプレート」）が生きた細胞を必要としないインビトロの系において増幅されることを意味する。本分野において知られた典型的な増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及び核酸配列に基づく増幅（NASBA）であるが、本発明の目的のためには、多数の他の方法が好ましく、以下を参照のこと。

【００２１】

「ローリングサークル型増幅」は、環状DNAが増幅される、分子増幅方法である。

【００２２】

「増幅産物」は、分子増幅法の結果である核酸である。

【００２３】

ベクター核酸種の「コンカテマー」は、端と端で連結されたベクター核酸種の複数の繰り返しを含む分子である。

【００２４】

「トランスフェクション」は、核酸の宿主細胞中への導入方法をさすために一般的に使用される用語である。トランスフェクションは、トランスフェクトされたDNAが宿主細胞ゲノム中に導入されず、したがって有糸分裂による細胞分裂の間に親細胞から娘細胞へ安定に伝えられないという、一過性の意味であることができる。トランスフェクションは、

トランスフェクトされた核酸が宿主細胞ゲノム中に導入されて有糸分裂による細胞分裂の間に親細胞から娘細胞に安定に伝えられる、「安定な」又は「永久的な」ものであってもよい。

【００２５】

増幅産物による「別個の細胞集団」のトランスフェクションは、宿主細胞の識別可能な集団又はその亜集団が同じ増幅産物でトランスフェクトされることを意味する。これは、例えば、宿主細胞を別個のコンパートメント内に維持し、各コンパートメントの細胞が同一の増幅産物のみによりトランスフェクトされることによって行われることができる。

【００２６】

「真核細胞」は、核を含む細胞である。例は、植物細胞、そして（糸状菌及び酵母を含む）真菌細胞、原虫、昆虫などの無脊椎動物並びに哺乳動物、魚類及び鳥類などの脊椎動物からの動物細胞である。

【００２７】

「培養」は、細胞がそれらの代謝を維持し、それらが増殖し及び／又は（自己の又は異種の）遺伝子を発現することを可能とするように、細胞をインビトロで維持する技術を意味する。本発明に照らせば、培養は典型的には、選ばれた宿主のための遺伝子の発現を促進する条件を用いて実施され、これは、例えば、当業者に知られた特殊な培地及び物理的培養条件の使用を伴うが、（宿主細胞中に導入された組換え遺伝子を制御する誘導性プロモーターを誘導するためなどの）発現誘導物質の使用も伴う。

【００２８】

「リガンド」は、（受容体などの）特定の結合パートナーへの結合を示す分子である。「抗原」は、抗体又はT細胞受容体に特異的に結合するリガンドの種類である。

【００２９】

「抗体」という用語は、血清の機能性成分を表現し、そしてしばしば（抗体又はイムノグロブリン、断片などの）分子の集まり、又は１つの分子（抗体分子又はイムノグロブリン分子）をさす。抗体分子は、特定の抗原決定基（抗原または抗原エピトープ）に結合又はそれと反応することができ、次にこれが免疫エフェクター機構の誘導に導きうる。個々の抗体分子は、通常、単一特異性であると考えられ、抗体分子の組成物はモノクローナル（すなわち、同一の抗体分子からなる）又はポリクローナル（すなわち、同じ抗原又は異なる別の抗原上の同じ又は異なるエピトープと反応する異なる抗体分子からなる）であってよい。ポリクローナル抗体を構成する異なる別の抗体分子は、「膜」とよばれてもよい。各抗体分子は、その対応する抗原にそれが特異的に結合することを可能とする独特の構造を有し、そしてすべての天然の抗体分子は、２つの同一の軽鎖及び２つの同一の重鎖からなる、同じ全体的基本構造を有する。抗体は総称的にイムノグロブリンとしても知られる。本明細書中で使用される抗体（単数又は複数）という用語は、最も広い意味で使用され、そして、無傷の抗体、マウス又はウサギなどの非ヒト、キメラ、ヒト化、完全なヒトの抗体、そして単鎖抗体、並びにFab、Fv断片またはscFv断片などの抗体の結合断片、並びにIgA分子二量体又は五価IgMなどの多価形態にわたる。

【００３０】

「ポリクローナル抗体」という用語は、同じまたは異なる抗原上のいくつかの異なる特異的抗原決定基に結合するか又はそれと反応することのできる、異なる（様々な）抗体分子の組成物を表現する。通常、ポリクローナル抗体の多様性は、ポリクローナル抗体の所謂可変領域中、特にCDR領域中にある。本発明においては、２つ以上のポリクローナル抗体の混合物（ポリ組成物（polycomposition））は、それぞれが異なる標的に結合可能な抗体を発現する２つ以上の親ポリクローナル細胞系から作製される、ポリクローナルポリ組成物細胞系から1つのポット（pot）中で生成されることが好ましいが、それは別々に産生された２つ以上のポリクローナル抗体の混合物であってもよい。本発明のポリクローナル抗体と同じ抗原／エピトープを網羅するモノクローナル抗体の混合物は、ポリクローナル抗体の等価物と考えられる。ポリクローナル抗体のメンバーが抗原に結合すると述べた場合、本明細書中では、それは少なくとも１μM未満、そして１００nM未満、好ましくは

１０nM未満、さらにより好ましくは１nM未満の結合定数をもって結合することを意味する。

【００３１】

「組換え抗体」という用語は、自然に細胞と関連していない抗体のコード配列を含む発現ベクターでトランスフェクトされた細胞又は細胞株から発現された抗体分子（単数又は数個）を表現するために使用される。「組換え抗体」中の「抗体分子」が多様であるか又は異なる場合、「組換えポリクローナル抗体」という用語は「ポリクローナル抗体」の定義にしたがって適用される。

【００３２】

「イムノグロブリン」という用語は、血液又は血清中に見出される抗体混合物の総称として一般に使用されるが、他の供給源に由来する抗体混合物をさすために使用されても、又は「抗体」という用語の同義語として使用されてもよい。

【００３３】

ヒト抗体分子のクラスは、以下の：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMである。各クラスのメンバーは、同じアイソタイプのものであるといわれる。IgA及びIgGアイソタイプはさらにサブタイプに細分化される。IgA及びIgGのサブタイプは、一般的にIgA_1、IgA_2、及びIgG_1、IgG_2、IgG_3、及びIgG_4とそれぞれ呼ばれる。

【００３４】

「同系のV_H及びV_Lをコードする対」又は「V_H及びV_L配列の同系の対」という用語は、同じ細胞内に含まれるか又は同じ細胞に由来する、V_H及びV_Lをコードする配列の本来の対を表現する。したがって、同系のV_H及びV_L対は、かかる細胞が由来するドナー中にもともと存在したV_H及びV_Lの対を表す。「V_H及びV_Lをコードする対から発現された抗体」という用語は、抗体又は抗体断片が、V_H及びV_Lコードする対を含むベクター、プラスミドなどから産生されることを示す。同系のV_H及びV_Lコードする対が完全な抗体又はその安定な断片として発現されると、それらは、それらが由来する細胞によりもともと発現される抗体の結合親和性及び特異性を保存している。同系の対の組成物は、同系の対のレパートリーとも呼ばれ、そして個々に保存されるか又はプールされることができる。

【００３５】

「組換えポリクローナル細胞系」又は「ポリクローナル細胞系」という用語は、個々の細胞が一緒になって組換えポリクローナル細胞系を構成し、それぞれが着目の組換えポリクローナル抗体の1つのメンバーをコードする着目の異なる核酸配列の転写活性を有する少なくとも１つのコピーを担持するような、変種の核酸配列のレパートリーによってトランスフェクト又は形質導入されているタンパク質発現細胞の混合物／集団をさす。本発明の１つの実施態様においては、異なる核酸配列のただ1つのコピーがそれぞれの細胞のゲノム内の特定部位に組み込まれる。組換えポリクローナル細胞系を構成する細胞は、例えば、抗生物質選択により、着目の異なる核酸配列の組み込まれたコピーを保持する能力に関して選択される。かかるポリクローナル細胞系を構成することのできる細胞は、例えば、細菌、真菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞又は哺乳動物細胞などの真核細胞、特に、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、（Sp2/0細胞、NS0、YB2/0などの）骨髄細胞、NIH 3T3などの不死化哺乳動物細胞株、及びHeLa細胞、HEK 293細胞又はPER.C6などの不死化ヒト細胞であることができる。

【００３６】

「V_H及びV_L対をコードする配列」又は「V_H及びV_Lをコードする配列対」という用語は、核酸分子であって、好適なプロモーター及び／又はIRES領域が存在しそして配列に作動可能に連結された場合、可変重鎖及び可変軽鎖が核酸分子から対として発現されることができるように、各分子が可変重鎖及び可変軽鎖の発現をコードする配列を含むものをさす。核酸分子は、重鎖及び／又は軽鎖の定常領域の一部又は完全な定常領域もコードし、好適なプロモーター及び／又はIRES領域が存在しそして配列に作動可能に連結された場合、Fab断片、完全長抗体又は他の抗体断片の発現を可能としてもよい。

【００３７】

「ポリペプチド」という用語は、本明細書に照らして、ペプチド結合を介して共有結合した複数のアミノ酸を含む分子を意味することを意図され、そして該用語は、２～１０アミノ酸残基の短いペプチド、１１～１００アミノ酸残基のオリゴペプチド、そして１００アミノ酸残基超のポリペプチドを包含する。さらに、該用語は、タンパク質、すなわち、少なくとも１つのポリペプチドを含む機能性生体分子も含むことを意図され、少なくとも２つのポリペプチドを含む場合、これらは共有結合で、又は非共有結合で連結して複合体を形成することができる。タンパク質中のポリペプチドは、グリコシル化及び／又は脂質付加及び／又はアセチル化及び／又はリン酸化され、及び／又は補欠分子族を含むことができる。したがって、該用語は、酵素、抗体、抗原、転写因子、DNA結合タンパク質などの結合タンパク質、或いはタンパク質のタンパクドメイン又は断片、或いはアミノ酸に基づく他の任意の物質を含む。

【００３８】

「ポリアミノ酸」という用語は、少なくとも３つの共有結合したアミノ酸残基により構成される分子をさす。

【００３９】

「部分配列」という用語は、天然の完全なアミノ酸配列又は核酸配列にそれぞれ直接由来する、任意の連続した少なくとも３つのアミノ酸、または関連する場合には少なくとも３つのヌクレオチドのつながりを意味する。

【００４０】

DNAポリメラーゼなどの（生体）分子の「機能性部分」は、本明細書に照らせば、該分子によってもたらされる生化学的又は生理学的効果の少なくとも１つに関与する分子の部分を意味することを意図される。本分野では、多くの酵素及び他のエフェクター分子が問題の分子によってもたらされる効果に関与する活性部位を有することは周知である。該分子の他の部分は、安定化又は溶解性促進の役割を果たし、そしてしたがって、これらの目的が所望の機能と無関係である場合には除外されうる。生体分子のかかる機能性部分の例は、DNAポリメラーゼIのクレノー断片である。

【００４１】

本明細書中で「派生産物」という表現を用いる場合、これは、（すべて出発核酸から調製された、増幅産物、ベクター又は宿主細胞などの）問題の産物がすべて、少なくとも（推定の）EPPFのコード配列を含むという特徴を共有することを示す。

【００４２】

好ましい実施態様の詳細な検討

本発明は、機能性発現産物をコードし、それを真核細胞中で発現させることのできる（典型的には、ベクターのライブラリー及び／又はそのうちの少なくともいくつかがEPPFをコードすると予想される核酸でトランスフェクトされた細菌細胞に由来する）ベクターの単純で簡便でかつ迅速な同定を可能とする。図３（本発明の方法）に示すように、所与のベクターの有用性に関する確認結果を得るために必要なステップ数及び時間が本発明の方法においては低減され、それは、本発明の方法においては、機能的スクリーニングのために十分な材料を得るステップがかなりより単純でかつより資源消費が少ないからである。本発明の方法の特別な利益は、それらが標準的な実験ロボットを用いる自動化に供されることができるということである。

【００４３】

特定の結合及び中和特性を有する抗体を同定することによって、本発明の概念を実証することに焦点をあててきたとしても、本発明の方法によって試験可能な機能性は数多くある。

【００４４】

本発明は、EPPFの同定を可能とし、ここで、該機能性は以下の群：

発現産物による物理的効果の発揮－これは、蛍光又はルミネセンスの発光、あるいは光又は他の電磁放射の吸収であることができ；

発現産物のリガンド又は抗原への結合－典型例は、受容体分子／抗体の結合であり；

発現産物による触媒活性、例えば酵素活性、の発揮；
触媒活性、例えば酵素活性、に対する発現産物の感受性；
発現産物による、生体膜を横切る作用物質の輸送の変更の促進；
発現産物による、細胞内コンパートメント中の作用物質の転位の変更の促進；
発現産物の、真核細胞集団中での少なくとも１つの遺伝子の発現に対する影響－すなわち、（転写レベルなどでの）発現制御因子としての発現産物の機能がアッセイ可能であり；
発現産物の、真核細胞集団の増殖又は代謝に対する影響－増殖制御因子の突然変異形をコードするライブラリーがスクリーニングされる場合に便利であり；
発現産物の標的細胞に対する影響－これは、例えば、抗癌剤などとして機能することのできる発現産物のスクリーニングなどの場合に、増殖、増殖阻害、分化、アポトーシス、代謝、薬物に対する感受性に対する発現産物の効果を試験することが可能であり；
病原性の作用物質に対する発現産物の影響－ウイルス中和、ウイルスへの結合、ウイルスの死滅などについてアッセイすることが可能であり、同様に、細菌への結合、細菌の死滅などについてアッセイすることが可能であり；及び
発現産物による二次免疫効果への影響、
からなる。

【００４５】

これらのアッセイのいくつかについては、アッセイを実施する前に発現産物を部分的に精製することが有利であるかもしれない。分泌型タンパク質などの分泌型発現産物の場合、これは、発現産物に対する親和性を有する、ビーズ、カラム、スティック、又は他の固相表面などの固相を用いるハイスループットの様式で行われることができる。その後、分泌型タンパク質は、表面から溶出されることができる。マルチウエルディッシュでの使用に適合したカラムを用いるハイスループット精製法も可能である。

【００４６】

これらの上記機能性のすべては例示であり、本発明の方法は、（本発明の側面に依存して）ステップｅ）又はＥ）において利用されるアッセイ又は試験を正確に選択することに依存せず、それは、細胞中又は細胞由来の機能性発現産物の存在を決定するための当業者に知られた任意の試験／アッセイであることができる。

【００４７】

その存在又は活性が同定／定量される発現産物は、任意の発現産物であることができ、典型的には（リボソーム、miRNA又はsiRNAなどの）RNA、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、単量体タンパク質及び多量体タンパク質から選択される。本発明はまた、特徴的なグリコシル化パターン又は他の翻訳後修飾を含むタンパク質発現産物の同定も可能とする。

【００４８】

本明細書中に示されるとおり、本発明の非常に便利な特徴は、ステップｄ）又はＤ）からの培養上清が、それぞれステップｅ）又はＥ）において直接アッセイ可能であることである。もちろん、これは、発現産物が真核細胞から分泌されることを必要とするが、これは、多くの発現産物については、真核細胞からの排出を可能とするように、好適な分泌シグナルをコードする遺伝情報を組み込むことによって容易に達成される。したがって、本発明の方法は、その中のステップｅ）又はＥ）における試験が培養上清中のEPPFの存在及び／又は活性についてのアッセイを含む、簡便なものである。これは、発現産物を発現した細胞の存在なしに、該産物が所定の機能について試験されることができるという利益を提供する。これは、表現型（発現産物）が遺伝型（細胞）に直接結びつけられる知られたディスプレイシステムに比べて、機能性アッセイ実施の可能性を広げるものである。

【００４９】

本発明の第一の実施態様の実施においては、ステップｅ）における試験がステップａ）におけるベクター核酸のサンプルのうちの1つに容易に関連付けられるということが重要である。言い換えれば、本発明の実施においては、本発明の第一の側面のステップａ）～

ｅ）が、ステップｅ）においてEPPFの存在が見出された真核細胞集団が明らかにステップａ）のベクター核酸種のひとつに由来することを保証するということが便利である。

【００５０】

しかしながら、サンプルを試験ステップからの「陽性のヒット」に関連付けることが可能であることは常に必要条件ではない。発現ベクターカセットの必須遺伝因子に関する正確な配列情報が存在するため、発現宿主からの発現産物についてのコード配列を切除又は増幅し、そして配列決定すること、或いはEPPFをコードする遺伝子のコード配列を決定することが可能である。

【００５１】

したがって、本発明はまた、それぞれが少なくとも１つの所定の機能性を有する発現産物（EPPF）をコードし、該EPPFを真核細胞中で発現させるのに十分な遺伝因子を含むベクター核酸を同定及び／又は単離するための別法の形態である、本発明の上記第二の側面も構想し、該方法は、以下のステップ：

Ａ）それぞれがEPPFをコードすると推定される核酸配列を含む複数の核酸を提供し；

Ｂ）上記複数の核酸の各メンバーのうち、少なくともEPPFをコードすると推定されるヌクレオチド配列を分子増幅法において増幅して、真核細胞中で該ヌクレオチド配列を発現するための十分な遺伝因子と作動可能に連結した上記ヌクレオチド配列をそれぞれが含むコンカテマーである増幅産物を生成し；

Ｃ）上記各増幅産物を真核細胞中にトランスフェクトし；

Ｄ）上記真核細胞を、上記増幅産物の発現を促進する条件下で培養し；

Ｅ）続いて、上記真核細胞中の上記EPPFの存在について試験し；そして、

Ｆ）ステップＥ）において存在することが見出されたEPPFをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを同定及び／又は単離する、

を含む。

【００５２】

ステップＥ）において見出されたEPPFのコード配列が、真核細胞中に存在する増幅産物から切除又は増幅によって、そして場合により配列決定することによって回収されうることは明らかであろう。これは例えば、EPPFが細胞内部又は細胞表面に位置する場合、表現型（EPPF）及び遺伝子型（発現ベクター）が直接関連させられるように実施されることができる。

【００５３】

当然、同定されたベクターはコンカテマー増幅産物の単一の機能性発現単位であることができるが、その代わりに、ベクター核酸は、ステップＥ）において見出されたEPPFのコード配列をEPPFの真核細胞中での発現をもたらすのに十分な残りの必須遺伝因子と単純に組み合わせることによって産生又は同定されてもよい。したがって、EPPFのコード配列は、続いて、真核細胞において有用な任意の便利な発現カセットと組み合わされることができる。

【００５４】

しかしながら、本発明の好ましい実施態様は、以下の：第一の実施態様のステップａ）中のベクター核酸種並びにそれらの派生産物が、各ステップにおいてお互いに物理的に分離されているか、又はステップａ）中のベクター核酸並びにそれらの派生産物が独自に標識されているものであり、本発明のこれらの様式はどちらも、試験ステップにおいて使用される真核細胞からの物質を単離及び／又は配列決定する更なるステップを必要とせずに、直接ステップｅ）の試験結果に基づいてステップａ）中のベクター核酸を同定することに何の問題もないことを保証するものである。したがって、本発明の第一の側面は、ステップｆ）における同定を容易化するように、ステップａ）中の複数のサンプル及び／又はベクター核酸並びにそれらの派生産物が整列化され及び／又は目録化されることを伴うことが好ましい。ベクター核酸種を物理的に分離するための便利な方法は、９６又は３８４ウエルフォーマットの標準的なマルチウエルディッシュを使用することである。

【００５５】

本発明の実際の実施態様においては、ステップａ）中のベクター核酸又はステップＡ）中の核酸は、細菌プラスミド又は細菌染色体などの環状ＤＮＡから選択される。このフォーマットでクローニングベクターを用いて核酸の多くのライブラリーが調製され、従来は、これらのクローニングベクターはその後、関連する真核細胞中での試験にそれらが使用される前にいくつかの時間のかかるステップにおいて他のＤＮＡから分離される。本発明は、発現クローニングプロセスにおけるこの特定の部分を容易化し、なぜなら、ＤＮＡを含む細菌細胞は、（熱又は塩基による変性、一般に、後者は本発明の方法の好ましい特徴である、などの）変性条件に直接供され、そして続いて、分子増幅に直接供されることができるからである。塩基による変性を使用できることは、塩基の添加の制御のほうが正確に温度を制御することよりも容易であるため、該方法をより自動化に適合可能なものとする。

【００５６】

分子増幅法が、ローリングサークル型増幅を含むことが好ましい。ローリングサークル型増幅は、テンプレート核酸分子のコンカテマーを生成し、これは本発明における一般的に好ましい特徴である。

【００５７】

本発明の方法において有用なポリメラーゼは、５’－３’重合を開始するものを含む。ポリメラーゼはまた、開始部位よりも下流の重合化された鎖を置換しなくてはならず、そして、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を持ってはならないことも重要である。ＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片及びエキソヌクレアーゼ活性を除去したＤＮＡポリメラーゼＩのクレノー断片及びBstポリメラーゼ由来の類似の断片（Bio-Rad, Richmond, Calf.）などのポリメラーゼが有用である。SEQUENASE 1.0及びSEQUENASE 2.0（U.S. Biochemical）、T5 DNAポリメラーゼ、$Vent_R$(exo-)（New England Biolabs）、ThermoPhi（Prokaria, Iceland）、及びPhi29 DNAポリメラーゼ（Templiphi（登録商標）GE Healthcare）でもうまくいく。或いは、発現カセット全体をPCR増幅することも可能である。

【００５８】

特に好ましいポリメラーゼは、バクテリオファージphi29DNAポリメラーゼ、又は切断型phi29ポリメラーゼなどの機能的に等価なポリメラーゼ及びphi29若しくはその機能性切断型に対して少なくとも８０％配列同一性を有するphi29ポリメラーゼ突然変異体である。この配列同一性は、少なくとも８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％など、より高いものであってよい。基準アミノ酸配列及び変異形アミノ酸配列の間の配列同一性は、Clustal W (1.82)のデフォルト設定を用いて配列を整列化することによって求められる。完全に保存された残基の数が計数され、そして基準配列中の全残基数で割られる。

【００５９】

ローリングサークル型増幅のさらなる特徴は、温度サイクリングを必要としない、すなわち、等温である（これも本発明の好ましい特徴である）、ということである。（従来のPCRなどの）多くの増幅法は、標的を合成された鎖から解離させるために、温度サイクリングを必要とする。ローリングサークル型増幅においては、変性が起こった後は、単一の温度が使用されてよい。温度サイクリングがないということは、該方法がより単純かつロバストで自動化が容易であることを意味する。さらに、２０～４５℃又は１５～３０℃などの典型的には１５～５０℃である、主に酵素の最適温度によって決定された適切な温度は、効率的な酵素活性を支援するはずである。TempliPhi酵素については、約３０℃の温度が有効であるとわかっている。本発明に照らして、ポリメラーゼ及び核酸の変性を確実に回避することは重要な考慮事項である。

【００６０】

本発明の方法における試験ステップは、当業者に知られた任意のプロトコールにしたがって設計されることができる。それらは、（分泌型産物又は脱落した膜タンパク質としての）培地中のEPPF、真核細胞表面上に存在するEPPF及び／又は細胞内EPPFの存在又は活性についての試験を含んでよい。好ましくは、培地は、EPPFの存在又は活性について試験さ

れる。本発明は、知られたディスプレイシステムとは反対に、ウイルス中和又は抗増殖活性などについて培地を試験することを可能とする。

【００６１】

好ましくは、EPPFは、所定の抗原に結合する抗体、抗体断片、又は合成若しくは半合成の抗体若しくは抗体アナログである。本願の実施例の組に示すように、抗体は、TempliPhiで増幅したDNAでトランスフェクトされた細胞から容易に発現されそして分泌され、トランスフェクトされた細胞からの培養上清中で抗体を直接検出することを可能とする。したがって、本発明は、関連する生物系における所定の結合及び他の機能的基準を満たす、興味深く／有用な抗体種の同定を可能とするように、抗体をコードするDNAの大きなライブラリーのスクリーニングを容易化する。

【００６２】

EPPFをコードする核酸が同定／単離されたら、このDNAを真核細胞中でのEPPFの組換え生産に利用することが可能である－核酸が真核細胞系において発現可能であることを確認した、本発明の最初の２つの側面における方法。したがって、本発明はまた、EPPFの真核細胞中での生産方法にも関し、該方法は、本発明の方法によってベクター核酸を同定し、そして該ベクター核酸が由来するベクターで好適な真核宿主細胞をトランスフェクト又は形質導入し、トランスフェクト又は形質導入された真核細胞を、EPPFをコードする核酸の発現を促進する条件下で培養し、そして培養からEPPFを回収することを含む。好ましくは、EPPFは、抗体、抗体断片又は抗体アナログである。

【００６３】

EPPFをコードする複数のベクター核酸種が、単離された単一細胞に由来する別々のテンプレートを用いるマルチプレックス分子増幅法を介して得られることが好ましく、該分子増幅法は可変領域をコードする配列の同系の対を、可変領域をコードするヌクレオチド配列を連結することによって生成することを含み、各同系の対は単離された単一細胞に由来する。可変領域をコードする配列の同系の対の形成方法（Symplex（商標）テクノロジー）がPCT国際特許出願公開第WO2005/042774号に記載されている。Symplex（商標）テクノロジーは、V_H及びV_L鎖の同系の対をコードする、本発明の方法を用いるスクリーニングに適したフォーマットで整列化された又は目録化されたベクターを提供する。

【００６４】

かかる組換え生産は、当業者に一般に知られた方法－Sambrook J et al. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Third Edition)及び対応するオンラインマニュアル：www.MolecularCloning. com.などにおいて示された多数の有用な方法－を用いて達成される。

【００６５】

本発明の他の用途

Symplex（商標）抗体レパートリースクリーニングに加えて、TempliPhiで増幅したDNAは、ｃＤＮＡライブラリー又はインビトロで生成された変異形タンパク質組成物を操作する他のアプローチに適用可能である。特にスクリーニングの間の陽性反応を調べるために、被験クローンの目録化されたアレイを必要とする状況下ではそうである。１つの例は、生物学的相互作用又は反応及びそれを介してアッセイされた活性のために重要なアミノ酸残基を同定するための、活性ノックアウトに関する分泌タンパク質のアラニンスキャニングである。着目のタンパク質が成長刺激タンパクである場合、ライブラリーは、エラープローンPCR又は別の突然変異誘発技術によって構築されてよく（Ling MM and Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. Anal Biochem, 1997; 254:157-178; Wang TW, Zhu H, Ma XY, Zhang T, Ma YS and Wei DZ. Mutant library construction in directed molecular evolution: casting a wider net. Mol Biotechnol, 2006; 34:55-68）そして、作り出されたライブラリーは整列化されそして機能に関して試験される。活性を喪失したクローンについてのスクリーニングが実施されることができ、そして必須の残基が同定される。着目のタンパク質がアポトーシスを誘導するか又は標的細胞系の細胞増殖を阻害し、スクリーニングパラメータが細胞増殖の欠如又は細胞死であるという他の

シナリオの場合、目録化されたライブラリーが必要であろう。TempliPhiで増幅したライブラリーのDNAは、かかる活性を有するタンパク質についての、整列化された目録化cDNAライブラリーの効率的なスクリーニングを可能とするであろう。同様に、本発明は、改善された機能についての突然変異ライブラリーのスクリーニングのために有用であろう。1つの例は、改善された親和性及び／又は特異性などの改善された機能を有する突然変異体についての、CDR領域内に（エラープローンPCR又は別の突然変異誘発法により）突然変異を有する所望の活性を有する抗体ライブラリーのスクリーニングである。

【実施例】

【００６６】

実施例１

２つの異なるDNA変性スキームを用いるTempliPhi（登録商標）反応

TempliPhi DNAの調製：

以下において使用する１２のプラスミド（図１）は、抗－テタヌスポリクローナル抗体の提供を目的とするプロジェクトから得た。これらのプラスミドのうちの１つ（no.11、2-B9）は、プロモーター断片を含まないため、サイズが小さかった。

【００６７】

反応は、TempliPhi（登録商標）増幅キット、Amersham Biosciencesカタログ番号25-6400-10によって実施した。

【００６８】

１２のプラスミドを含む細菌コロニーを、１００μg/mlのカルベニシリンを含む１５０μlの２×YT培地を入れた３８４ウエルプレート中に分けていれ、そして３７℃で一夜振とうした。

【００６９】

熱変性：

１μlの細菌培養を２５μlのH_2Oと混合し、そして得られた混合物の０．５μlを５μlの（TempliPhi増幅キットからの）サンプルバッファーと混合した。プラスミドDNAを含む細菌DNAの変性を、９５℃で３分間実施した。５μlの（TempliPhi増幅キットからの）反応バッファー及び０．２μlのTempliPhi酵素（バクテリオファージphi29 DNAポリメラーゼ）を加え、そして３０℃で一夜、増幅を実施した。

【００７０】

NaOHによる変性：

１μlの細菌培養を、２５μlの０．１M NaOHと混合し、そして室温で５分間インキュベートした。この化学的に変性したDNAの０．５μlに、５μlのサンプルバッファー、５μlの反応バッファー及び０．２μlのTempliPhi酵素を加え、３０℃で一夜、増幅を実施した。

【００７１】

評価：

すべての増幅産物を６５℃で１０分間、その後のDNAエンドヌクレアーゼPvuIとのインキュベーションによるDNAの直線化によって変性させ、そしてアガロースゲル電気泳動によって分析した。

【００７２】

ゲル分析は、２つの変性スキームを用いて増幅は等しく上手く作動したことを示した（図２）。1つのプラスミド（no.7）は、抗体可変領域内に内部PvuI部位を有する一方、プロモーター断片を含まないプラスミド（no.11）は、明らかにサイズが小さい。化学反応を介する変性は、熱変性と同様に効率的に働くと結論した。

【００７３】

実施例２

１２の異なるプラスミド（図１）を表すTempliPhi DNAを、熱変性を用いて実施例１に記載したように調製した。増幅後、反応混合物を４容のH_2Oで希釈した。CHO Flp-In細胞（Invitrogen）を３８４ウエルプレート（Applied Biosystems,カタログ番号4307723）に

、１０％牛胎児血清を含むHam-F12培地２０μl中、２０００細胞／ウエルの密度で播いた。各TempliPhi調製物で、全部で４つのトランスフェクションを平行して行った。

【００７４】

トランスフェクションを次の日（シーディングの翌日）に実施した。トランスフェクションミックスを以下のように調製した：

・１．５μlのFuGENE６（Roche）及び２８．５μlのダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を室温で５分間インキュベートした。

・FuGENE-DMEMを１０μlのTempliPhiで増幅したDNAと混合し、そして室温で１５分間インキュベートした（トランスフェクションミックス）。

・２μlの各FuGENE-DMEM-DNAミックスを、細胞を含む３８４ウエルプレートの各ウエルに加え、そして細胞を４８時間培養した。

【００７５】

FMAT技術（蛍光応用技術（fluorometric microvolume assay technology））を用いる直接結合アッセイによって、テタヌス特異的抗体の存在について細胞上清を分析した。これらのFMATアッセイのために、以下の試薬を使用した：

・FACSバッファー（PBS； 1%ウシ血清アルブミン（BSA））

・FACSバッファー中に懸濁した、テタヌストキソイド（Statens Serum Institut, Denmark）でコーティングしたポリスチレンビーズ

・FACSバッファー中に懸濁した、ヤギ抗ヒトκ抗体（Serotec STAR100）でコーティングしたポリスチレンビーズ

・蛍光検出抗体： Alexa Fluor 647（Molecular Probes カタログ番号A-21445）と結合したヤギ抗ヒトIgG抗体

【００７６】

４８時間後、上清を吸引し、蛍光検出抗体及び（テタヌストキソイド又は抗－κ抗体で）コーティングされたビーズと混合した。上清の最終希釈率は１：１０であった。３時間のインキュベーション後、ABI8200細胞検出システム上で蛍光を読み取った。５０の蛍光事象をカットオフ値とし、これ未満の蛍光読み値に０を与えた。結果を表１に示す。

【００７７】

【表１】

クローン名	蛍光読み値、テタヌストキソイドビーズ	蛍光読み値、抗－カッパビーズ
１－Ａ７	3003	679
１－Ａ10	397	128
１－Ｂ６	0	278
１－Ｆ４	0	0
１－Ｈ４	1866	1065
２－Ｂ９	0	0
２－Ｃ３	0	0
２－Ｇ９	0	0
２－Ｈ10	0	292
３－Ｈ６	983	569
４－Ｈ５	0	0
４－Ｈ６	1018	396

表１：TempliPhiトランスフェクション後の上清に対するFMATアッセイ。１：10に希釈した上清を、テタヌストキソイド又は抗－カッパ抗体でコーティングしたビーズに対して試験した。プロモーターを含まないプラスミドを２－Ｂ９と名づけた。結果は４つの測定の平均として示す。

【００７８】
１２の増幅産物のうちの７つがIgGに関して陽性のシグナルを与えた。プロモーターを含まないプラスミドは予想どおり陰性であった。シグナルの見られない残りの４つのトランスフェクションにおいては、値は陽性かもしれないが、検出限界未満であった。１２のTempliPhi調製物のうちの５つが、テタヌストキソイドでコーティングしたビーズへの結合を示し、これらのすべてがIgGに関して陽性であった。
【００７９】
上記のように実施したTempliPhiトランスフェクションから得られた上清を、ヒトIgG含量について、抗ヒトκ抗体を捕捉抗体として、そしてペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体を検出抗体として用いるサンドイッチELISAにおいて分析した。FMAT-IgG-陽性のウエルにおけるIgG濃度は、平均７０ng/mlであった。
【００８０】
実施例３
TempliPhi反応セットアップ、３８４ウエルフォーマットにおけるトランスフェクション及びスクリーニングのための自動化手順を、Aquarius 96（TECAN）リキッドハンドラーを用いて開発した。特異的な抗－テタヌス抗体の頻度が約１０％のテタヌス特異的抗体をコードする哺乳動物発現ベクターのプラスミドライブラリーを含むE.coliをテンプレートとして用いた。
【００８１】
TempliPhi DNAの自動化された調製：
２５μlの０．１M NaOHを、ScreenMate 384深型ウエル（Matrix）の各ウエルに分注した。抗－テタヌスライブラリー由来のランダムな単一のE.coliコロニーからの一夜の培養０．５μlを分注し、プレートの各ウエル中で３回吸引及び排出を繰り返して混合した。ScreenMate 384ウエルの深型ウエルプレート中で培養を実施例１のように調製し、第１列は空のままにした。したがって、全部で３６８のコロニーをインキュベートした。E.coli培養と０．１M NaOHの混合物を１５分間インキュベートした。
【００８２】
TempliPhi(TempliPhiキット25-6400-01)の１０μlのTempliPhi反応ミックス（５μlの酵素バッファー＋５μlの変性バッファー）を、AB-1111３８４ウエルプレート中に分注した。０．５μlのE.coli／NaOH懸濁液を、TempliPhi反応ミックスを入れたプレートに移し、そして３回吸引及び排出を繰り返して混合した。プレートを密封し、３０℃で一夜インキュベートした。
【００８３】
CHO細胞の自動化されたトランスフェクション：
実施例２のとおりに、CHO細胞を調製し、３つの384ウエルプレート中に播いた。FuGene及びDMEMを１：１９の比で混合してミックスを調製することによって、翌日、三連でトランスフェクションを実施した。６μlのFuGene／DMEMミックスをAB-1111 384ウエルプレート（ABgene）の各ウエルに分注する。２μlのTempliPhiで増幅したDNAを上記のTempliPhiプレートから、このFuGene／DMEMミックスプレートへ移した。吸引と排出を３回繰り返して反応物を混合し、そして室温で１５分間インキュベートした。そして、２μlのFuGene／DMEM／DNAミックスをCHO細胞プレートの各ウエルに移した。吸引と排出によって穏やかに混合した。トランスフェクトされたCHO細胞のプレートを、５％CO_2大気中、３７℃で２日間インキュベートした。
【００８４】
上清の収集：
２日後、先ず、２０μlのPBS＋１％BSAをトランスフェクトされた細胞に加え、そして希釈された上清を空の384ウエルプレートの同位置に移すことによって、CHO細胞の上清を収集した。さらなる分析の前に、上清を－２０℃で凍結した。
【００８５】
TT-特異的抗体のFMATアッセイ：

上清を入れた384ウエルプレートを融解し、そして３０μｌの上清をとって４５μｌのPBS＋１％BSAを加えることによって希釈した。上清の最終的な希釈率は、１：５であった。実施例２のテタヌストキソイドでコーティングしたビーズを用いるFMATによって上清を分析した。（実施例２のとおり、５０カウントをカットオフとして用いて）陽性のFMATシグナルを発するすべてのウエルを陽性とスコアリングした（図４参照）。陽性ウエルの７６％が、３つのプレートすべてにおいて同一であり、１７％のウエルは、３つのうちの２つのプレートで陽性とスコアリングし、そして７％のウエルは３つのうちの１つのプレートで陽性とスコアリングした。３つのプレートすべてにおいて陽性であるウエルの位置を数えると、全部で７１の陽性ウエルを同定した。

【００８６】

実施例４

EGFR細胞外ドメインへの結合についてのスクリーニング

次に、ヒトκ定常コード領域までスプライシングされた、ヒトEGFRに反応性である抗体からの連結されたV_H及びV_Lをコードする対のマウスレパートリーを用いて、本発明の方法を試験した。すなわち、ヒトEGFR又はヒトEGFRの細胞外ドメインでマウスを免疫化し、B細胞を収集し、そしてSymplex（商標）（Meijer et al, 2006, J. Mol. Biol, 358:764-772；WO2005/042774）によって同系V_H及びV_L配列の連結を実施した。続いて、PCR断片を図１に示すものと類似の発現ベクターに移した。

【００８７】

その後、トランスフェクトしたCHO細胞の産生及び培養並びに上清の収集を、実施例３に記載のとおりに実施した。

【００８８】

一般に、上清のスクリーニングは、２ステップの方法として行った。ELISAにおいて、抗体ライブラリーを含む上清を、組換えEGFRタンパク質との反応性について試験し、その後、細胞表面で発現されたEGFRへのEGFR抗体の結合を検出するために、細胞ベースのアプローチとしてNR6wtEGFR細胞系を用いるFMAT（FLISA）を用いた。

【００８９】

いくつかのライブラリーについては、EGFRの細胞外ドメインのみを表す組換えEGFRを用いてELISAを実施した。

【００９０】

ELISAについて簡単に述べると、PBSで希釈した１μg/mlのタンパク質（自家製）で、Nunc maxisorbプレート（カタログ番号464718）を４℃で一夜コーティングした。５０μｌの２% Milk-PBS-Tでブロッキングする前に、プレートをPBS+０．０５%Tween 20（PBS-T）で1回洗浄した。プレートをPBS-Tで1回洗浄後、２０μｌの２% Milk-PBS-T及び５μｌの上清を加え、室温で１．５時間インキュベートし、その後、プレートをウエルあたり２０μｌのPBS-Tで1回洗浄した。上清中に存在する抗体を検出するために、２% Milk-PBS-Tで１：10000に希釈した二次抗体（HRP-ヤギ抗ヒトIgG、Jackson、 カタログ番号109-035-097）を加えて、そして室温で１時間インキュベートした。PBS-Tで1回プレートを洗浄した後、２５μｌの基質（Kem-en-tec Diagnostics、カタログ番号4390）を加え、これを５分間インキュベートした後、２５μｌの1M H_2SO_4を加えて反応停止した。特異的シグナルを４５０nmにおける吸収として検出した。

【００９１】

抗－EGFR抗体の細胞ベースのFMATによる検出については、上記のとおり、SKBR-3（ATCC #HTB-30）又はNR6wtEGFR（Welsh et al, 1991, J Cell Biol, 114, 3, 533-543）細胞を増殖培地中に維持した。細胞を計数し、そして、１：40,000に希釈したalexa-647結合ヤギ抗ヒトIgG（H-L）抗体（Molecular probes No. A21445、ロット番号34686A）で１．２５×10^5細胞／mlとなるように希釈した。全部で２０μｌのこの懸濁液を３８４ウエルクリアボトムNuncプレートに移した。続いて、１０μｌのトランスフェクション上清を細胞に加えた。反応物からのFMATシグナルを、６～１０時間のインキュベーション後に測定した。

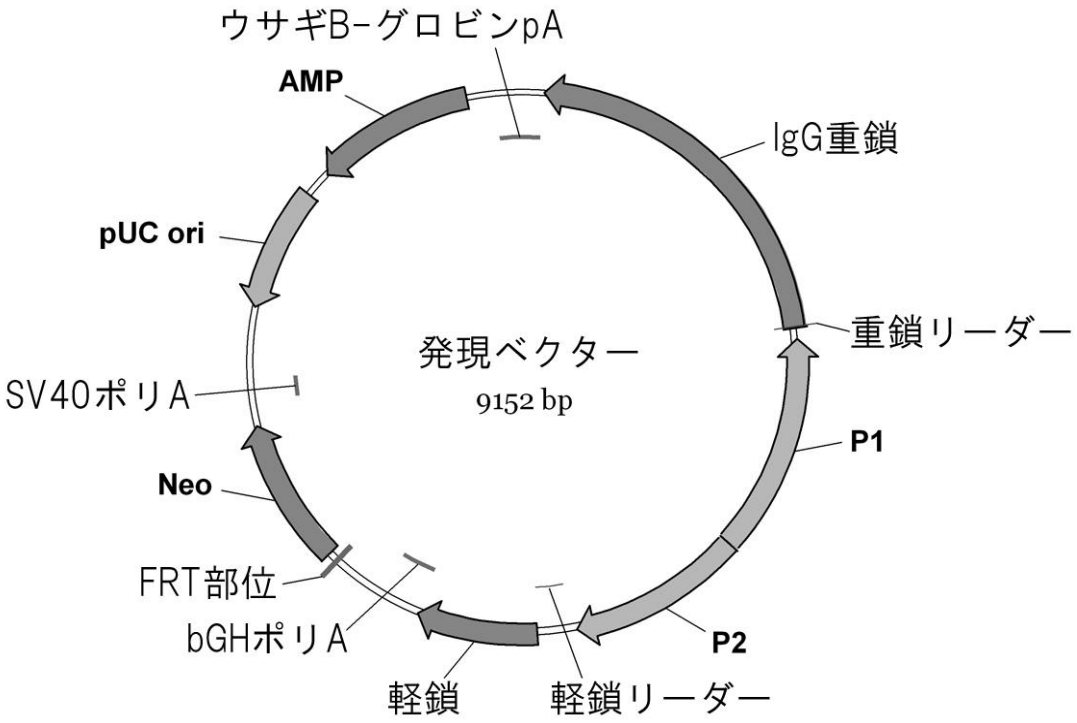
【００９２】
スクリーニングからのデータは、全クローンのうちの２２１（４．８％）がELISAにおいて陽性であったことを示した。これらのクローンのうちの９３（２．０％）は、FMATにおいても陽性であった。クローンのうちの全部で２２０（４．８％）がFMATにおいて陽性であり、そしてこれらのうち、１２７（２２０－９３）が、細胞表面抗原特異的に陽性であった。類似の様式で１つのライブラリーをスクリーニングしたが、EGFR受容体の欠損変異体、EGFRvIIIに特異的な抗体を作り出すために免疫化手順が実施されたため、ELISAスクリーニングは、野生型EGFR及びEGFRvIIIの両方を検出するためのアッセイを含んだ。７つのクローンがEGFRvIIIに対して特異的であるとELISAにおいて同定され、興味深いことに、これらのクローンは、FMATにおけるwtEGFR発現細胞の染色については陰性であった。１３のクローンが、wtEGFRについて陽性であるとFMAT及びELISAにおいて同定されたが、EGFRvIIIについては陽性でなく、これは、このライブラリー独特のものであった。ELISAにおいて陽性であるすべてのクローンを、さらなる分析のために選択した。

【図面の簡単な説明】

【００９３】
【図１】図１は、実施例において用いた抗体発現プラスミドのタイプを示す制限地図である。２つのプロモーター（P1及びP2）が、抗体重鎖及び軽鎖それぞれの発現を推進する。リーダーペプチドは、重鎖及び軽鎖の両方並びにポリアデニル化領域－重鎖についてはウサギβグロビンポリA及び軽鎖についてはウシ成長ホルモン（bGHポリA）－の効率的な分泌のために存在する。以下の因子：アンピシリン耐性（AMP）のためのβ－ラクタマーゼ、E.コリ複製開始点（pUCori）及び細菌ネオマイシン耐性遺伝子（FRT部位、Neo、SV40ポリA）をコードする哺乳動物細胞のゲノム中に位置するFRT部位への部位特異的組込みのためのカセットも存在する。
【図２】図２は、２つの異なる変性スキームを用いる、TempliPhi（登録商標）増幅の結果である。下線を引いた左側のレーンは、NaOH変性した材料から得られた増幅産物を示し、下線を引いた右側のレーンは、熱変性した材料から得られた増幅産物を示す。Mと印をしたレーンは、分子量マーカーである。
【図３】図３は、本願の請求項に記載の技術を用いる真核細胞系中での陽性クローンのスクリーニングのための発明にかかるセットアップである。
【図４】図４は、テタヌス特異的FMATアッセイを示す。３連のCHOトランスフェクションにおける陽性ウエルのパーセンテージを示す。

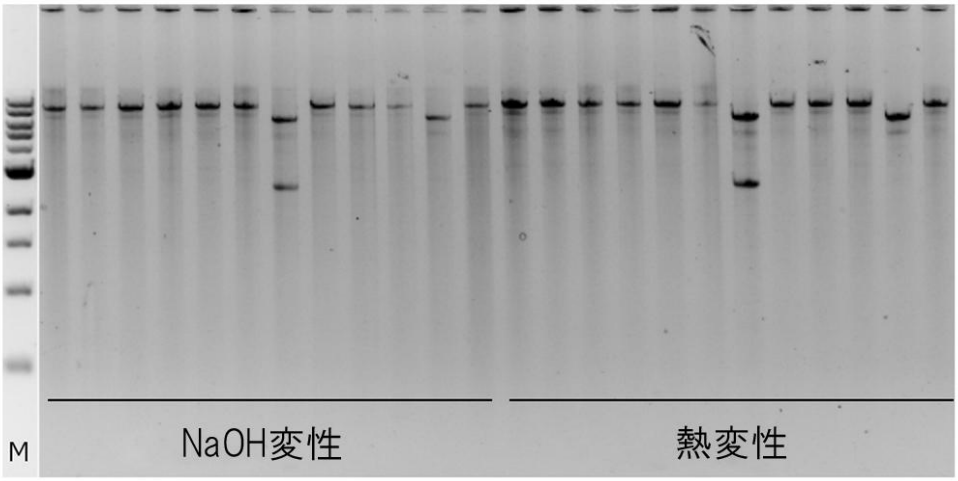
【図１】

図1


ウサギB-グロビンpA
AMP
IgG重鎖
pUC ori
発現ベクター
9152 bp
重鎖リーダー
SV40ポリA
P1
Neo
FRT部位
bGHポリA
P2
軽鎖
軽鎖リーダー

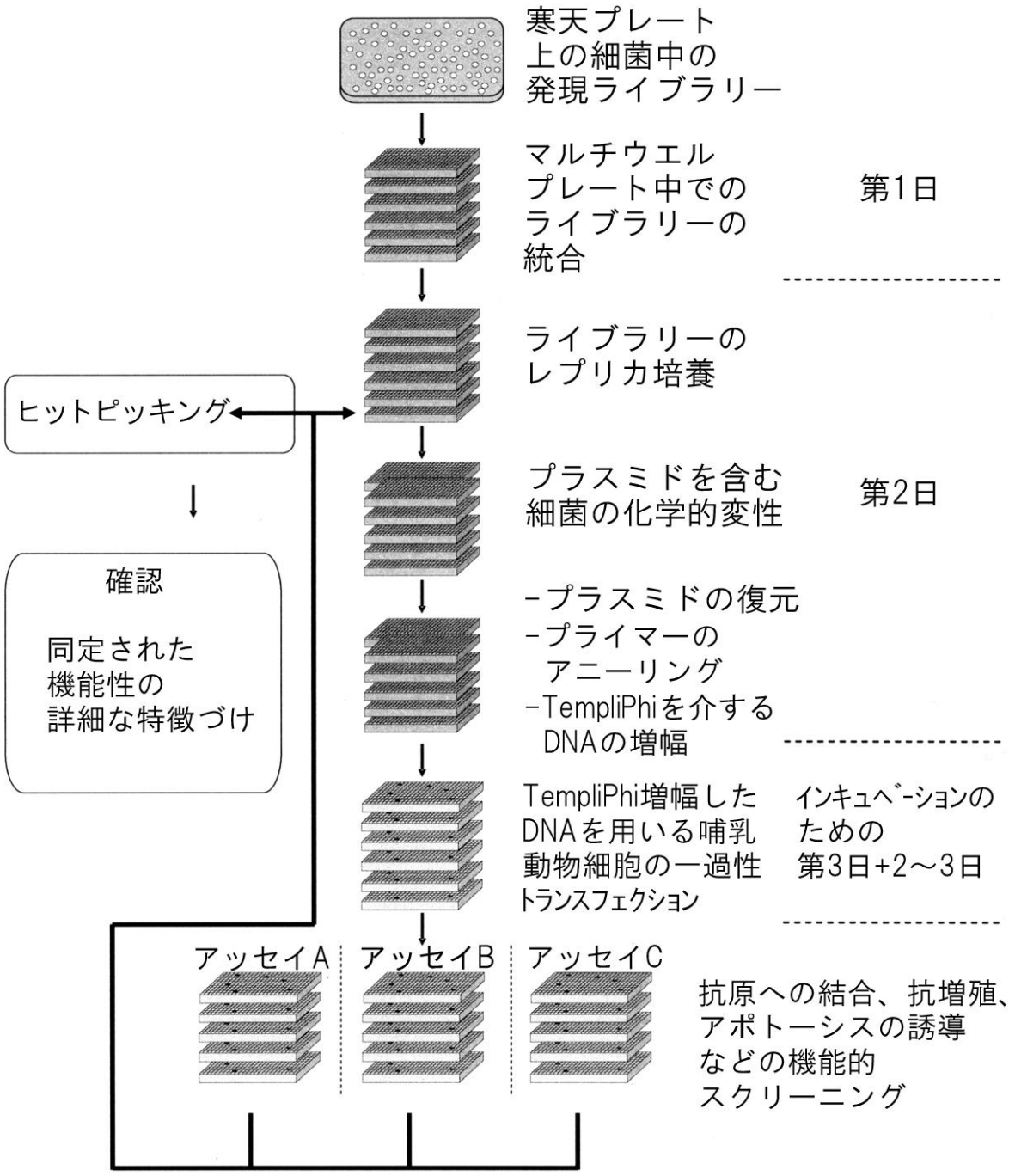
【図２】

図2


M
NaOH変性
熱変性

【図３】

図3


寒天プレート
上の細菌中の
発現ライブラリー
マルチウエル
プレート中での
ライブラリーの
統合
第1日
ライブラリーの
レプリカ培養
ヒットピッキング
プラスミドを含む
細菌の化学的変性
第2日
確認
同定された
機能性の
詳細な特徴づけ
-プラスミドの復元
-プライマーの
アニーリング
-TempliPhiを介する
DNAの増幅
TempliPhi増幅した
DNAを用いる哺乳
動物細胞の一過性
トランスフェクション
インキュベーションの
ための
第3日+2～3日
アッセイA
アッセイB
アッセイC
抗原への結合、抗増殖、
アポトーシスの誘導
などの機能的
スクリーニング

【図４】

図4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33
B	0	0	0	0	0	0	67	0	0	0	100	0
C	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0
D	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	100
E	0	100	0	0	67	0	0	0	100	0	100	0
F	0	100	0	0	0	0	0	0	100	100	33	33
G	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100
H	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	100	33	0	67	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
L	0	100	0	100	0	0	0	0	0	33	0	0
M	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
N	0	100	33	100	0	0	0	0	0	0	0	0
O	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	33
D	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
E	0	100	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0
F	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100
G	67	0	0	0	0	67	0	0	0	0	0	0
H	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
I	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	0
J	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
O	0	0	0	0	0	0	100	0	33	100	0	0
P	0	100	0	0	0	100	33	0	0	0	100	0

フロントページの続き

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100127085
弁理士 越阪部 倫子
(72)発明者 ラルス セガールド ニールセン
デンマーク国, デーコー－２９９０ ニーバー, ニーバーパルク ５８
(72)発明者 ペルーヨハン メイヤー
デンマーク国, デーコー－２８００, コゲエス. リンビュー, クルスビーエルトフテン ３アェ

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 CA01 DA02 EA04 GA11 HA11
4B063 QA18 QQ08 QQ13 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR62
QR77 QR80 QS25 QS38 QX01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA13

【外国語明細書】
2008289483000001.pdf