(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3574135号
(P3574135)
(45)発行日　平成16年10月6日(2004.10.6)　(24)登録日　平成16年7月9日(2004.7.9)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C12N 15/09	C12N 15/00	A
C07K 14/005	C07K 14/005	
C07K 16/00	C07K 16/00	
C12N 7/00	C12N 7/00	

請求項の数 4　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願平7-516141
(86)(22)出願日　平成6年12月5日(1994.12.5)
(65)公表番号　特表平9-506000
(43)公表日　平成9年6月17日(1997.6.17)
(86)国際出願番号　PCT/SE1994/001166
(87)国際公開番号　WO1995/016027
(87)国際公開日　平成7年6月15日(1995.6.15)
審査請求日　平成13年10月30日(2001.10.30)
(31)優先権主張番号　9304060-8
(32)優先日　平成5年12月6日(1993.12.6)
(33)優先権主張国　スウェーデン(SE)

(73)特許権者
バイオインベント　インターナショナル　アクティエボラーグ
スウェーデン国，エス－２２３　７０　ルンド，セールベガタン　４１
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　吉田　維夫
(74)代理人
弁理士　西山　雅也
(72)発明者　ボーレベック，カール　アー．コー．
スウェーデン国、エス－２４５　６２　ハイエールプ，オートベーゲン　８アー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】特異的バクテリオファージの選択方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ファージの表面上にファージ・コート・タンパク質と共に発現される特異的リガンドＩの選択方法であって、以下の：
ａ）ヘルパー・ファージ・ストックを、クローン化されたリガンドＩをもつファージミド・ベクターを含むバクテリアに感染させ、ここで、当該ヘルパー・ファージ・ストックのヘルパー・ファージは、遺伝子３をもたないが、そのファージ・コード上にプロテイン３をもち；
ｂ）プロテイン３又はプロテイン３の一部と、上記リガンドＩと特異的に相互作用するリガンドIIとを含む融合タンパク質を、リガンドＩとリガンドIIが互いに特異的に結合するように、添加し、それによって、リガンドＩを担持する上記特異的ヘルパー・ファージに、プロテイン３を、付加し；及び
ｃ）そのファージ表面上にリガンドＩ、リガンドII、及びプロテイン３を担持する上記特異的ヘルパー・ファージを、バクテリアに感染させ、それにより複製及び増幅せしめる、により、特異的ファージの複製と、そのファージ表面上のリガンドＩの認識とを関連付けることを特徴とする前記方法。
【請求項２】
前記ファージ表面上のリガンドＩとして、ペプチド、タンパク質、抗体、抗原又はその断片を使用することを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

リガンドＩと特異的に相互作用し、かつ、前記融合タンパク質内のプロテイン３に結合するリガンドIIとして、ペプチド、タンパク質又はその断片、有機分子又はホルモンを使用することを特徴とする、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記ファージ表面上のリガンドＩとしてヒト抗体又はその断片を使用することを特徴とする、請求項１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の技術分野

本発明は、分子、例えば抗体、抗原、ペプチド、タンパク質又はその断片であって、ファージ表面上のファージ・コート・タンパク質と共に発現されるものの選択方法に関する。

発明の背景

モノクローナル抗体は、

George Köhler

とCesar Milsteinにより1975年に紹介された。この概念は、マウス由来の免疫Ｂリンパ球と腫瘍セルライン、例えば、ミエローマ／プラスマ細胞腫とを融合させることを含んで成る。得られたハイブリッド・ミエローマ（＝ハイブリドーマ）は、以下の２つの明確な特性を有するであろう:1.特異的抗体を産生し；そして2.細胞培養において永久に生存する。これらの特性の１番目は、免疫マウス細胞由来であり、一方、２番目のものは腫瘍セルラインから生じたものである。先に概説したように調製されたハイブリドーマは、高い特異性をもち、そして無限量のいわゆるモノクローナル抗体を産生するであろう；その特性は、それを、生物医学用途における使用に特に好適なものにする。

しかしながら、モノクローナル抗体を使用するヒトの治療は、とりわけ、ヒト抗体を必要とする。なぜなら、不所望の糖添加がマウス抗体上に現われ、それは、これらの抗体をヒトの治療に直接的には好適でないものにするからである（Borrebaeck et al.,1993）。しかしながら、ヒト・モノクローナル抗体は、それらが、マウス抗体よりも作るのがかなり困難であることを示されている。なぜなら、人間は論理的な考慮のために免疫感作されることができないからである。これは、出発材料、すなわち、免疫Ｂリンパ球が最適になっていないということを意味する。主な問題は、Ｂリンパ球の数が非免疫感作個体においてはひじょうに低く、それが、そのＢリンパ球から特異的抗体を選択することをきわめて困難にしている。

1985年に、Smith（Smith,1985）は、抗体そして特にヒト抗体が産生されることができるであろう方法を劇的に変更する方法について公表した。Smithは、小さなペプチドが、糸状ファージ（バクテリアに感染するウィルス）上のファージ・コート・タンパク質と共にどのように発現されることができるのかを示した。糸状ファージは、それら自身のコート・タンパク質のいくつか、例えばプロティン３又はプロティン８上に、外来タンパク質さえも発現されることを許容するので、これらのファージは、さらに比較的大きな抗体断片、例えば、FvのFabの発現にもひじょうに好適である。（McCaffery et al.,1990;Barbas et al.,1991;Huse 1991）。

ファージ表面上に抗体断片を配置する方法は以下のようなものである:Bリンパ球を含んで成る出発材料、例えば、血液、リンパ球様組織その他から、Ｂリンパ球を分離し、そしてそのＢリンパ球により産生される抗体の遺伝子ライブラリーを選び出す。可変重及び軽抗体ドメイン（V_HとV_L）をコードする遺伝子を、Larrick et al.,（1989）により抗体に対する適用が最初に記載されたいわゆるPCR－法（PCR＝ポリメラーゼ連鎖反応）を通じて増幅する。これらの増幅された遺伝子セグメントであって、使用される出発材料中にある全ての異なる抗体特異性をコードするものを、その後、異なるV_H/V_L遺伝子のランダムな組合せ（Huse et al.,1989）を用いていわゆるファージミド・ベクター内にクローン化する。このクローニングの結果は、全ての利用可能な特異性が１の単一段階において不死化されることができ、そしてその後の段階において、それらが、例えば、コート・プロティン３と共に糸状ファージの表面上に発現されることができるということである。特異性を探索される抗体断片を発現するこれらのファージはその後、抗原レセプター、すなわち抗体

断片を提示する表面を利用することにより選択されることができる。要するに、ある出発材料内の全ての抗体特異性は、PCR増幅により直接的に不死化され、そしてその後ファージの表面上に発現されることができると言うことができる。
理論的には，この方法は、免疫系内にある抗体の完全なプールへのアクセスを与える。このプールは、10^{14}までの異なる抗体特異性から成り、そして人間の寿命における所定の時に、約$10^{8}-10^{9}$の異なる特異性が利用されることができるであろう。例えば10^{9}のプールの中から１の抗体特異性の選択は、ひじょうに困難な仕事であり、所望の特異性をもつ１以下又は数個のコピーが存在する場合には、多くの場合、不可能である。
さまざまな選択モードが公表されており、これらの全てが、例えば、ファージの慣用のアフィニティー・クロマトグラフィーに又は単に、特異的に結合されたファージ、すなわち特異的抗体断片を含むものがそれから単離されることができる抗原被覆プラスチック表面にファージを結合させるパニング手順に依存する。抗原特異的パニング及びアフィニティー・クロマトグラフィーは、最良の場合には、1000倍の精製係数だけを与えるであろうし、そしてほとんどの場合には、ステップ当り50～100倍の係数だけを与えるであろう。
発明の定義
今般、驚ろくべきことに、それらの表面上に所望の特異性をもつ抗体又は抗体断片を発現するより簡単かつより効率的な選択が、そのファージ表面上でのその抗体又は抗体断片の抗原認識に、特異的ファージ複製を関連付けることにより達成されることができることが、発見された。
さらに、本発明に係る選択は、ヒト抗体の選択に特に好適であるけれども、ファージ・コート・プロティン３と共にファージの表面上に発現されることができる、いずれの分子の選択のためにも使用されることができる。
このような分子の例は、ペプチド、タンパク質、抗原、抗体、及びそれらの断片であり、本明細書及びクレーム中、用語“リガンドI"を、これらの分子を命名するために使用する。
さらに、用語“リガンドII"を、本明細書及びクレーム中、ファージの表面上の上記リガンドＩと特異的に相互作用し、すなわちそれに結合し、又はそれにより結合されることができるいずれかの基又は分子を命名するために使用する。リガンドIIとして働くことができる基又は分子の例は、ペプチド、タンパク質又はそれらの断片、有機分子、ホルモン又はそれらの断片である。
発明の詳細な説明
本発明に係る方法の目的は、ファージの特異的な認識が、その表面上のリガンドＩを通じて、複製及び増幅するための能力を導くということに基づく効率的な選択方法を利用することができるようにすることである。
本発明は、ファージ上に担持されるリガンドの認識とファージの複製を関連付ける。これは、抗原特異的Ｂリンパ球だけが増幅し、そして抗原駆動プロセスにおいて分化するクローン選択の体液性免疫系理論の直接疑似である。リガンド認識が、ファージ複製に関連付けられるので、これは、特異的ファージだけが複製し、すなわち増幅することを意味し、そしてこれが、たとえこのファージが何十万もの非特異的ファージに取り囲まれた場合にさえも、リガンドを担持するファージの容易な選択を可能にする。
特異的ファージ複製とそのファージ表面上のリガンドＩの認識とを関連付けることを含んで成る本発明に係る方法は、以下の、
ａ）そのファージが遺伝子３をもたないが、それらのコート内にプロティン３を担持するヘルパー・ファージ・ストックをして、クローン化されたリガンドＩをもつファージミド・ベクターを担持するバクテリアに感染せしめ；
ｂ）リガンドＩとリガンドIIが特異的に互いに結合するように、プロティン３又はその断片を含んで成る融合タンパク質、及び上記リガンドＩと特異的に相互作用するリガンドIIを添加し；
ｃ）それらの表面上にリガンドＩ、リガンドIIとプロティン３を担持する上記特異的ファージを、バクテリアに感染せしめ、そしてそれにより複製及び増幅せしめる。

遺伝子３の除去によりヘルパー・ファージとしていずれかの糸状ファージを使用することができる。なぜなら、これは、そのファージを非感染にするからであり、遺伝子３により発現されるプロティン３がバクテリアの繊毛（pili）に結合し、そしてそれにより、ファージによるバクテリアの感染を仲介するからである。本発明において使用することができるヘルパー・ファージに形質転換されることができる糸状ファージの例は、M13、fd及びf1である。M13ヘルパー・ファージを使用することが望ましく、これを、遺伝子３の除去後にM13MDΔ３と命名した。

融合タンパク質は、真の融合タンパク質又は、プロティン３とリガンドIIの組合せを利用することができる同様に結合された分子であることができる。本明細書及びクレーム中、用語“融合タンパク質”は、遺伝子工学により作り出された融合タンパク質及びプロティン３とリガンドIIとの化学的に結合された分子を包含する意味において使用され、そしてさらに、用語“融合タンパク質”は、プロティン３とリガンドIIとの間のレセプター－リガンド対を用いて構築された分子構造を包含することをも意味する。このようなレセプター－リガンド対の例は、ビオチン－アビジンであるが、他のこのようなレセプター－リガンド対も本分野においてよく知られている。従って、“融合タンパク質”は、プロティン３とリガンドIIとを、直接又は間接的に連結するいずれかの組合せであることができる。

上記融合タンパク内のリガンドII、例えば抗原は、それらの表面上に特異的リガンドＩ、抗体又は抗体断片をもつようなファージと特異的に相互作用するであろうし、これらのファージは今度は、バクテリア、例えば大腸菌（E.coli）を感染させることができる。なぜなら、リガンドIIが感染を仲介するプロティン３に結合するからである。それにより、複製及び増幅が生じることができ、そしてそのリガンド認識が、特異的ファージ複製に関連付けられる。融合タンパク質内のリガンドIIに非特異的である他の全てのファージは、感染能力を受容せず、選択プロセスの間バックグラウンドとして留まる。

切断感染ファージ、例えばM13MDΔ３のヘルパー・ファージ・ストックを作り出すために、これを、プラスミド、例えばpUC19プラスミド上に遺伝子３を既に含んでいるバクテリア、例えば大腸菌（E.coli）に、感染させる。得られた押し出されたファージは、遺伝子３を含まないがプロティン３を含むであろうし、そしてこれ故に、バクテリア、例えば大腸菌（E.coli）をもつ一回だけ感染させることができる。このように作り出されたヘルパー・ファージ・ストックは、今度は、さまざまなリガンド、例えば抗体由来のクローン化領域をもつファージミドを含む大腸菌（E.coli）を感染させるために使用される。その結果物は、それらのファージが、そのファージミド・ベクター由来の切断プロティン３に結合されたそれらの表面上のリガンドＩを発現するような新規ファージ・ストックである。これらのファージは、再度感染することができず、そしてこれ故、それらは複製及び増幅することができない。

プラスミドpUC19以外にも、バクテリア内に遺伝子３をクローニングするためにいずれかの他のバクテリア発現ベクターを使用することができる。

ファージの複製を特異的認識に関連付ける本発明に係る方法は、ひじょうに少ないコピーだけを含む、抗体の生成のための出発材料の使用を最初に許容する。なぜなら、それは、その特異的ファージの増幅を、何百万倍にもすることができるからである。このやり方で、その抗体特異的Ｂ細胞を選択するために体が使用するのと同一の原理に従って、所望の抗体特異性へのアクセスを与える方法を作り出す。

リガンドＩとして上記ヒト抗体の使用によって、ヒト抗体の選択のために本発明に係る方法を使用することが特に好ましい。

図面の説明

図１は、本発明に係る特異的ファージの選択によりリガンド認識とファージ複製を関連付けるための原理の説明を与える（M13MDデルタ３は、遺伝子３を欠いた、すなわち、それ自体感染性でないヘルパー・ファージである。）。

図２は、選択プロセスの特異性と選択性を表す、実験結果を示す。

実施例

ヘルパー・ファージ・ストック、M13MDΔ３の調製

突然変異体ファージM13MDΔ３（遺伝子３を欠くもの）の構築を、Wezenbeek et、al.,（Wezenbeek,P.M.G.F.,Huselbos,T.J.M.and Schoenmarkers,G.G.1980のナンバリングに従う）残基1299と2646の間の間を断片を除去するために、Bsp H IとXmn IによりM13KO7（Viera,J.and Messing,J.1987）の複製型（RF）DNAの消化により行った。遺伝子VIIIと遺伝子IXの一部を含む残基1299～1525の断片を再取り込みするために、この配列を、プライマー1299（Bsp H I）:5′－ACTTCCTCATGAAAAAGTC－３′と1525（Xmn I）:5′－GGGAAATTATTCTTATCAGCTTGC－３′を使用してM13KO7からPCR増幅した。消化後、そのPCR断片を、M13KO7由来の7.3kb RF DNA1にクローン化した。ヘルパー・ファージ・ストックを記載されたように調製した（Hoogenboom,H.R.,Griffiths.A.D.,Johnson,K.S.,Chiswell,D.J.,Hudson,P.and Winter,G.1991）、但し、M13からの無傷のプロティン３を作り出す遺伝子３を含むpUC19ベクターにより形質転換されたTG1を使用した。従って、得られたファージは、野生型と同一タンパク質をもっていたが遺伝子３を含んでいなかった。このファージは、１回雄性宿主細胞を感染させることができたが、その後に押し出された粒子は非感染性であった。

実施例１

３つの異なるファージ・ストックであって、各々が、それぞれ、ニワトリ卵白リゾチーム（hen egg lysozyme（HEL））、フェニルオキサゾロン（phenyloxazolon（phox））、又はヒト免疫不全ウィルス（LTC）に対するgp120に特異的な抗体断片を発現するファージを含むものを別々に調製した。これらの３つの異なるファージミドをXL1Blueバクテリア内に形質転換し、そしてアンピシリン選択により収獲した。その後、これらのバクテリアを、それ自体遺伝子３を含まないヘルパー・ファージ、M13MDΔ３により感染させ、それにより、非感染性ファージ・ストックを作り出した。なぜなら、感染を仲介するプロティン３が含まれていないからである。これらの３つの異なるファージを遠心分離により調製し、そして切断プロティン３（98N－末端アミノ酸だけ）とHEL（dp3－HEL）の間の融合タンパク質の異なる量と共に混合し、その間に、それを一夜インキュベートする。翌日、XL1Blueバクテリアをこれらの３つのファージ・ストックにより感染させ、そして図２は、それらの表面上に正しいレセプター、すなわちHELに特異的な抗体断片を担持するファージだけが、複製及び増幅能力を与えられたことを示している。リガンド認識と複製との間の関連は、10^2のバックグラウンド・レベルから10^8cfu/mlを上廻るまで特異的ファージ・タイター（これは、100万倍を超える増加である）を増加させた。さらに、（図２から明らかなように）、非特異的ファージは、全く複製せず、10^2cfu/mlのバックグラウンド・タイター上に留った。

実施例２

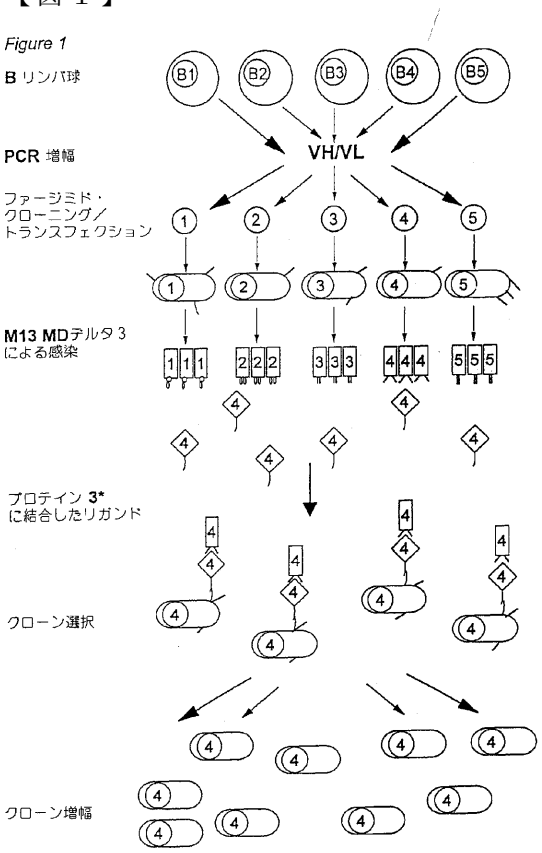
ニワトリ卵白リゾチーム（HEL）又はフェニルオキサゾロン（phox）又はヒト免疫不全ウィルス（LTC）に対するgp120に特異的な抗体断片を発現する３つの異なるファージミドを、1:1500:1500の関係で混合した。この混合物をXL1Blueバクテリアに形質転換し、そしてアンピシリン選択をもって培養する。その後、これらのバクテリアを、それ自体遺伝子３を含まないヘルパー・ファージ、M13MDΔ３により感染させ、それにより非感染性ファージを作り出す。これらのファージを遠心分離及び濾過により調製し、そして30重量％の、切断プロティン３（98だけのＮ－末端アミノ酸）とHEL（dp3－HEL）の融合タンパク質と混合し、これを一夜インキュベートする。翌日、XL1Blue標示薬バクテリアを、このファージ・ストックにより感染させ、そしてアンピシリン選択により一夜培養する。100を少し上廻るコロニーを選択し、そしてそれらが、遺伝子３を担持するヘルパー・ファージM13KO7の野生型により感染されるところの96穴培養ブレード内でさらに培養する。これは、各々のコロニーからのファージの生産をもたらし、これを、ファージ－ELISAを使用して検出することができる。表１は、第１の抗原特異的段階における濃縮係数は＞10^5倍であり、そして第２選択段階後約10^{10}倍であることを示している。これは、その融合タンパク質（dp3－HEL）がHEL特異的ファージ、すなわち、それらの表面上にHELに対して特異的な抗体断片を発現するファージの特異的複製と抗原認識とを関連付けたために生じたものである。

文　献
Barbas,C.F.,Kang,A.S.,Lemer,R.A.& Benkovic,S.J.Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 88,7978 (1991) .
Borrebaeck,C.A.K.,Malmborg,A.& Ohlin,M.Immunol.Today 14,477 (1993) .
Huse,W.D.,Sastty,L.,Iverson,S.A.,Kang,S.A.,Alring,M.M.,Burton,D.R.,Benkovic,S.J.& Lerner,R.A.Science 246,1275 (1989) .
Huse,W.D.In Anribody Engineering;A Practical Approach (Borrebaeck.C.A.K.,ed.) p.103,W.H.Freeman and Co.,New York (1991) .
Larrick,J.W.,Danielsson,L.,Brenner,C.A.,Abrahamsson,M.,Fry,K.E.& Borrebaeck,C.A.K.Biochem.Biophys.Res.Commun.160,1250 (1989) .
McCaffetty,J.,Griffiths,A.D.,Winter,G.& Chiswell,D.J.Nature 348,552 (1990) .
Smith,G.P.Scinece 228,1315 (1985) .
Viera,J.and Messing,J.1987.Production of single strand plasmid DNA.1987.Meth.Enzymol.153:3－11
Wezenbeek,P.M.G.F.,Huselbos,T.J.M.and Schoenmarkers,G.G.1980.Nucleotide sequence of filamentous bacteriophage M13 DNA genome:comparison with phage fd.Gene 11:129－148.
Hoogenboom,H.R.,Griffiths,A.D.,Johnson,K.S.,Chiswell,D.J.,Hudson,P.and Winter,G.1991.Multi－subunit proteins on the surface of filamentous phage:Methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains.Nucleic Acid.Res.19:4133－4137.

表　1

クローン混合物	開始比	終了比	濃縮率
		濃縮第１ラウンド	
pEXmide HEL／pEXmide Phox＋pEXmide LTC	$1／3\times10^{4}$	82／20	1.2×10^{5}
	$1／3\times10^{5}$	49／59	2.5×10^{5}
	$1／3\times10^{6}$	4／104	1.1×10^{5}
	$1／3\times10^{7}$	0／108	－
		濃縮第２ラウンド	
	$1／3\times10^{8}$	103／5	6.1×10^{9}
	$1／3\times10^{9}$	55／53	3.1×10^{9}
	$1／3\times10^{10}$	16／92	5.2×10^{8}
	$1／3\times10^{11}$	2／106	5.6×10^{8}
	$1／3\times10^{12}$	0／108	－

【図１】



【図２】

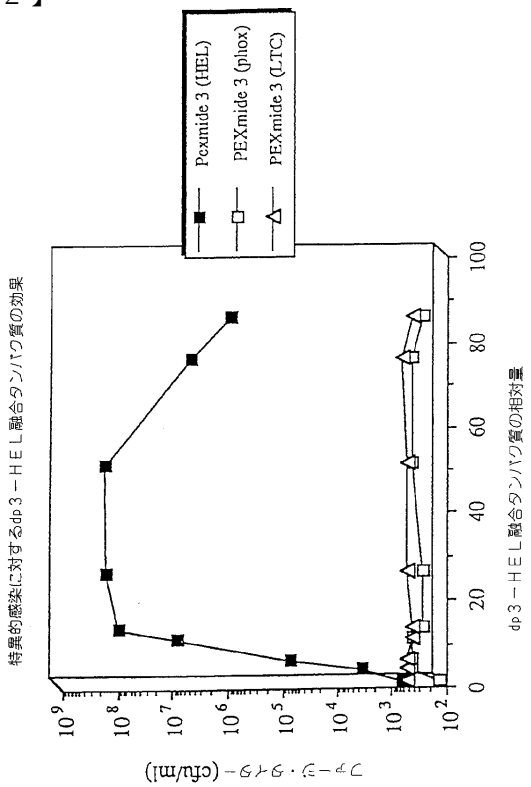


Figure 2

フロントページの続き

(72)発明者　デュエナス，マルタ
キューバ国、シウダット　ハバナ，１０　デ　オクタブア，ストス　スエア，エントル　１０　デ　オクタブア　ワイラビ，パサジェ　グラル　リー＃　１９

審査官　六笠　紀子

(56)参考文献　特開平７－３９３８１（ＪＰ，Ａ）
特表平５－５０８０７６（ＪＰ，Ａ）
特表平７－５０３６００（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)