

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 26 日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016782 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 15/70, C12Q 1/02, G01N 33/53
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010386
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 15 日 (15.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-237411 2002 年 8 月 16 日 (16.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東京大学長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF TOKYO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒113-8654 東京都文京区本郷7丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 上田 宏
- (54) 代理人: 杉村 興作 (SUGIMURA, Kosaku); 〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目2番4号霞山ビルディング Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ASSAYING INTERACTION BETWEEN PROTEINS

(54) 発明の名称: 複数の蛋白質の間の相互作用を測定する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a novel method for assaying an interaction between the VH and VL domains of the variable region of an antibody. This method is widely usable to detect an interaction between proteins. According to this method, an amber suppressor strain of *Escherichia coli* is transformed by a phagemid vector having an amber codon to thereby prepare a phage. Thus, both of the VH and VL domains are presented on phage particles. In the case of preparing a phage by transforming a non-amber suppressor strain of *E. coli*, on the other hand, the VH domain alone is presented on phage particles and the VL domain is secreted into the culture supernatant due to the presence of the amber codon, i.e., change-over presentation. The VL domain secreted into the culture supernatant is immobilized on a solid phase and the interaction thereof with the VH domain presented on the phage is quantified. Thus, the interaction between the VH domain and the VL domain can be assayed.

(57) 要約: 本発明により、抗体可変領域のVH断片とVL断片の間の相互作用を測定するための新規な方法が与えられた。本発明の方法は蛋白質の間の相互作用を検出する目的で、広く使用することが可能である。本発明の方法に従って、アンバーコドン有するファージミドベクターによってアンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製すると、VH・VL断片の両者がファージ粒子上に提示される。一方非アンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製した際には、アンバーコドンが存在するために、VH断片のみがファージ粒子上に提示されてVL断片は培養上清中に分泌されるという提示切り替えが起こる。培養上清中に分泌されたVL断片を固相に固定化し、ファージ上に提示されたVH断片との相互作用を定量化することにより、VH断片とVL断片の間の相互作用を測定することが可能である。

WO 2004/016782 A1

明 細 書

複数の蛋白質の間の相互作用を測定する方法

発明の背景

1. 本発明の分野

本発明は、蛋白質の間の相互作用、特に抗体可変領域の VH 断片と VL 断片の間の相互作用を測定するための方法に関する。更に本発明は本方法に使用するために構築されたベクターに関する。

2. 背景技術

本発明者らは、抗体の VH/VL 間の相互作用を測定することで間接的に抗原濃度を測定する新規免疫測定法である、オープンサンドイッチ ELISA 法を開発し、特開平 10-78436 において開示した。抗原・抗体反応の特異性を利用した様々な免疫測定法によって、混合物中の微量の物質を高感度で検出することができるが、このオープンサンドイッチ ELISA 法は、従来のサンドイッチ ELISA 法に比べて操作が簡便であり、また単価抗原の測定が可能であるといったメリットを有する。

図 1 にサンドイッチ ELISA 法 (A) と、本発明者が提案したオープンサンドイッチ ELISA 法 (B) の概念を示す模式図を示す。サンドイッチ ELISA 法 (A) においては、測定対象の抗原に対する 1 次抗体を固相上に固定し、抗原を含む溶液と酵素標識した 2 次抗体を順次添加して洗浄し、酵素活性により抗原濃度を定量する。一方、オープンサンドイッチ ELISA 法 (B) においては、対象の抗原に対する抗体の VL を固定化し、抗原溶液と酵素標識した VH を同時に添加して酵素活性により定量する。本方法においてはサンドイッチ ELISA 法と比較して洗浄操作が一回短縮できる。

オープンサンドイッチ ELISA に用いる抗体断片 VH, VL には、i) 抗原に対して高い親和性を持つ、ii) 抗原非存在下で VH, VL は相互作用が弱い、等の条件が必須である。よって、測定対象の抗原に対してこの条件を満たす抗体断片を調製す

ることが必要となる。将来的にオープンサンドイッチ ELISA を測定法・検出系として確立するには、本方法は広範囲の抗原にわたって測定可能な系である必要がある。よって、あらゆる抗原に対して上に述べた条件を満たすものを、膨大な抗体ライブラリーから迅速・簡便にスクリーニングすることができる系を確立することができるならば、オープンサンドイッチ ELISA を実用化するために役に立つと思われる。

即ち、オープンサンドイッチ ELISA の実用化にあたり、抗体の抗原結合能と、抗原の存在下、非存在下での VH/VL 相互作用を迅速に測定できる系を利用することが極めて望ましく、本発明はこれを可能とする。本発明はまた、ライブラリー中から応答性のより高い抗体の選択を可能にすることも目的としている。

一方、ファージ提示技術がこれまでに複数提案されている。ファージ提示技術は、各種抗体の可変領域の VH 断片と VL 断片を繊維状ファージの粒子上に同時に提示し、これと抗原との結合能をもって抗体の抗原結合能を評価し、さらに結合能の高い抗体を選択する技術である。ファージディスプレイ法において多くの場合には、M13, fd などの繊維状ファージのコートタンパク質である pIII あるいは pVIII の表面にライブラリーを、融合タンパク質として発現・提示させる。

pIII を用いたファージディスプレイ法の概略を図 2 に示す。ファージのコート蛋白質 pIII をコードする geneIII 上流にランダムな配列を導入したファージミドベクターを構築する。大腸菌を形質転換してヘルパーファージでレスキューすることにより、pIII にランダムな配列を含む蛋白質を提示したファージが得られる。この様に作製したファージライブラリーから標的分子のスクリーニングを行い、特異的に結合するものを選択することができる。標的分子を固定化した系についてライブラリーを投入し、結合、洗浄、溶出の操作(パニング, panning)を行うことで高い結合活性を持つファージを選択できる。回収したファージについては大腸菌 (E.coli) に感染させ増幅して次のサイクルに投入する。スクリーニングを繰り返すことにより、ライブラリー中の結合性ファージの比率を効果的に

高めていくことができる。

この選択系のメリットとしては、表現型と遺伝子型がリンクしているために、選択したタンパク質の配列決定が容易であること、スクリーニング中に増幅の過程が入るため効率的に目的タンパク質を濃縮できること、感染宿主を替えることによってタンパク質の切り離しが可能であることなどが挙げられる。また提示されるタンパク質としては、短い数残基のランダムペプチド、抗体断片、プロテアーゼ、ヒト成長ホルモン、核酸結合性タンパク質など多種多様なものが挙げられる。

一般的には、ファージディスプレイにおいて抗体断片を提示する場合には、VH、VL をリンカーで繋げた scFv (一本鎖 Fv: single chain Fv) の形を用いる。ところが近年新たなファージ提示技術として、VH に gVII protein を、VL に gIX protein を提示させることにより、VH 断片と VL 断片を別々に提示させる新規な方法が報告された (Kim D. Janda ら、WO 00/71694 A1)。図 3 に従来の抗体断片を一本鎖の形で提示させる方法 (A) と、上記の VH・VL 断片を別々に提示させる方法 (B) の模式図を示す。

ファージディスプレイに用いられる抗体のライブラリーとして、免疫をしていない動物の V 遺伝子から作製したナイーブ・ライブラリー (Naive library)、ナイーブ・ライブラリーの超可変部領域に人工的に変異を導入した合成ライブラリー (Synthetic library)、そして目的の抗原で免疫した動物を用いて作製した免疫ライブラリー (Immunized library) が主に挙げられる。

ナイーブ・ライブラリーは抗原刺激によって親和成熟 (affinity maturation) が起こる以前の IgM 抗体の V 遺伝子を用いているために、原理的には様々な抗原に対する抗体が選択可能であること、免疫操作を必要としないためヒト型抗体のライブラリーの構築が可能であること、などのメリットがある。一方、アフィニティーを向上させるためにライブラリーのサイズを大きくすることが必要不可欠であるために、作製に手間がかかることや、不要な要素を多く含むなどのデメ

リットがある。合成ライブラリーはナイーブ・ライブラリーの CDR に部位特異的変異導入や PCR の手法により変異を導入したもので、これにより多様性を制御することができる。

免疫ライブラリーはあらかじめ目的の抗原で免疫したマウスから抗体遺伝子を採取するため、非常に抗原特異性・結合活性の高いライブラリーが得られるメリットがある。しかし免疫に長い期間(1~3 ヶ月)を要する、免疫応答が不可能な毒性分子・自己分子に対する抗体の取得が困難である、ヒト型の抗体が調製しにくいなどのデメリットも挙げられる。

上記で述べたように、これまでに、繊維状ファージの粒子上に各種抗体の可変領域の VH 断片と VL 断片を同時に提示させ、抗体断片を提示させた繊維状ファージと抗原の間の結合能によって抗体の抗原結合能を評価することにより、結合能の高い抗体を選択する技術(ファージ提示技術)が複数提案されている。しかしこれらの提示法では、VH 断片と VL 断片の両者を含む抗体可変領域全体の抗原結合能は評価できるが、VH/VL 間の相互作用を評価することはできなかった。また、前記のオープンサンドイッチ ELISA に適した抗体断片を取得するためには、抗原非存在下で相互作用の弱い VH・VL のペアを選択することが必要である。

発明の概要

本発明は上記の課題を解決するための第1の手段として下記の、(1)一の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列、(2)当該一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列、(3)他の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列、(4)ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドン、及び(5)当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列、の少なくとも上記5つの DNA 配列を、当該ベクターの 5'方向から 3'方向にかけて、(1)(2)(3)(4)(5)の順番に又は(3)(4)(5)(1)(2)の順番に備える構造を有し、当該ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドンが存在することにより、当該ベクタ

一をサプレッサー変異体宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片の両者をその上に提示する 2 蛋白質提示型のファージを提供し、かつ、当該ベクターを非サプレッサー株宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示する 1 蛋白質提示型のファージ及び当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該他の蛋白質又はその断片を提供することを特徴とするベクターを提供する。

また本発明は上記の課題を解決するための第 2 の手段として下記の、一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法であって、

(1) 上記のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示した 1 蛋白質提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から分泌された当該他の蛋白質又はその断片を含む培養上清を取得し、

(2) 培養上清中の当該他の蛋白質又はその断片を適切な担体に固定化し、

(3) 固定化された当該他の蛋白質又はその断片と、当該 1 蛋白質提示型のファージ上に提示された当該一の蛋白質又はその断片とを反応させて、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片とを結合させ、

(4) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片との結合能を評価する；

上記の過程よりなる、一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法を提供する。

また本発明は上記の課題を解決するための第 3 の手段として下記の、抗原が存在することにより VH 断片と VL 断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域を得るための方法であって、

(1) 抗体可変領域の VH 断片及び VL 断片をコードする DNA 配列を含む上記

のベクターを用いてサプレッサー変異体宿主の形質転換を行うことにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際には VH 断片と VL 断片の両者をそのファージ上に提示する、VH/VL 提示型のファージを取得し、

(2) 上記 (1) において取得された当該 VH/VL 提示型のファージと抗原との結合能を確認し、

(3) 上記 (2) において VH/VL 提示型のファージを提供することが確認された上記のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、あるいは上記 (1) において取得された VH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行うことにより、当該 VH 断片のみをその上に提示した VH 提示型のファージと当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該 VL 断片を含む培養上清、あるいは当該 VL 断片のみをその上に提示した VL 提示型のファージと当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該 VH 断片を含む培養上清、のいずれかを取得し、

(4) 培養上清中の当該 VL 断片又は当該 VH 断片を適切な担体に固定化し、

(5) 抗原の存在下及び非存在下で、固定化された当該 VL 断片とファージ上に提示された当該 VH 断片、又は固定化された当該 VH とファージ上に提示された当該 VL 断片を反応させ、

(6) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能を評価し；

(7) 抗原の存在下における当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能が、抗原の非存在下における当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能の 2 倍以上である場合に、抗原が存在することにより VH 断片と VL 断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域が得られたと判定する過程よりなる、上記方法を提供する。

以下の記載と図面を用いて本発明を更に詳細に説明するが、いかなる意味でも本発明の範囲を限定するものではない。

図面の簡単な説明

図 1 は、サンドイッチ ELISA と、オープンサンドイッチ ELISA の原理を示す模式図である。

図 2 は、ファージディスプレイ法の原理を示す模式図である。

図 3 は、抗体断片を一本鎖の形で提示させる方法と、VH・VL 断片を別々に提示させる方法の原理を示す模式図である。

図 4 は、ファージミドベクター pKS の配列を示す模式図である。

図 5 は、ELISA により抗体提示の検討を行った結果を示すグラフである。

図 6 は、ELISA により抗原結合活性の検討を行った結果を示すグラフである。

図 7 は、HyHEL10 を提示した scFv 型と splitFv 型のファージにおいて、 10^{10} cfu/ml のファージ濃度で、ELISA により HEL 結合活性の検討を行った結果を示すグラフである。

図 8 は、HyHEL10 を提示した scFv 型と splitFv 型のファージにおいて、 10^9 cfu/ml のファージ濃度で、ELISA により HEL 結合活性の検討を行った結果を示すグラフである。

図 9 は、pKS1(HyHEL10)/sup+ について、オープンサンドイッチ ELISA を行った結果を示すグラフである。

図 10 は、この実験系における提示切り替えのしくみを示す模式図である。

図 11 は、HyHEL10 と D1.3 を用いたオープンサンドイッチ ELISA の結果を示すグラフである。

図 12 は、パニングを行った際の陽性クローンの割合を示すグラフである。

図 13 は、HyHEL-10 型又は D1.3 型の split Fv 断片の作製の過程を示す模式図である。

図 14 は、ファージライブラリーの作製から HEL 結合能の高いクローンの選択までの過程を示す模式図である。

図 15 は、HEL に対する結合能とオープンサンドイッチへの適性の関係を示す図である。

図 16 は、HEL に対する結合能と V_H/V_L 相互作用の関係を示す図である。

好適形態の詳細な説明

本発明は、抗体の V_H/V_L 間の相互作用を測定することを可能とする新規な方法である。本発明の方法は、オープンサンドイッチ ELISA 法に用いる目的により適した抗体の選択を可能とする。本発明は、抗体 cDNA 断片を組み込むためのファージミドベクター、当該ベクターによって形質転換したサプレッサー大腸菌あるいは非サプレッサー大腸菌、これにヘルパーファージを感染させて作製したファージおよび可溶性抗体断片を含む培養上清から構成される。

目的物質（抗原）との結合能を有する抗体可変領域 cDNA と V_H 、 V_L 断片を組み込んだファージミドベクターを作製し、当該ファージミドベクターをアンバーサプレッサー大腸菌に形質転換し、ヘルパーファージで感染させることにより常法でファージを作製する。このファージはその粒子上に V_H 、 V_L の両者を提示しており、可変領域（ $V_H + V_L$ ）の抗原結合能を確認することができる。同じファージを非アンバーサプレッサー大腸菌に形質転換してファージを調製すると、下記において詳細に述べる提示切り替えによって V_L 断片は培養上清に分泌され、 V_H 断片のみがファージ上に提示された形で同様に培養上清に得られる。

菌体培養液を遠心し、培養上清を V_L 断片結合性を持つプロテイン L をコートしたマイクロプレートに注ぐ。このとき、 V_L 断片は固相化されるので V_H/V_L 断片相互作用の強弱に応じて、ファージのマイクロプレートへの固定化量が変わる。これをペルオキシダーゼ標識抗ファージ抗体を用いた酵素免疫測定法（ELISA）で測定すれば、簡単に V_H/V_L 断片間の相互作用を測定することができる。よって本方法により、従来より飛躍的に簡便に抗体 V_H/V_L 相互作用を評価することが可能となる。また本発明の方法によって抗原結合性の高い抗体断片を選択することができる。

また測定の際に抗原を共存させることによって、抗原によって V_H/V_L 間の相互作用が大きく変化するクローンを迅速にスクリーニングすることができる。V

H/VL 間の相互作用が弱い抗体断片においては、担体上に固定化された VL 断片とファージ上に提示された VH 断片が直接に結合することは少なく、そのために担体上ファージが結合することはほとんどない。しかし、一部の抗体では抗原が存在する場合には VH 断片と VL 断片が共に抗原と結合し、複合体が安定化するために、抗原を介してファージが担体に結合することができる。よって、担体に結合しているファージの量を、例えば抗ファージ抗体を用いて定量することにより、抗原の存在によりファージ結合量が大きく変化する抗体断片を選択することができる。その様な抗体断片は VH/VL 間の相互作用が抗原の結合により大きく変化すると考えられ、オープンサンドイッチ ELISA を行うのに際して好適である。なお、抗原の存在により抗体可変領域の VH 断片と VL 断片の間の相互作用が 2 倍以上変化するならば、そのような抗体断片は本目的のために使用することが可能である(Suzuki et al., Anal. Biochem., 286, 238-246 (2000))。

なお本方法を実施するにあたり、ファージミドベクターを使用することは好適である。ファージミドベクターは繊維状ファージゲノムの一部を含むようにして作製されたプラスミドであるために、ファージミドベクターを用いて大腸菌を形質転換した後、更にヘルパーファージに感染させる必要がある。これによって粒子形成のためのコート蛋白質が供給されて、ヘルパーファージ粒子とファージミド粒子が混合したファージが得られる。この際に使用するヘルパーファージは下記の実施例において使用している M13KO7 ヘルパーファージは特に好ましいが、それに限定されるものではない。またより簡便な方法として、必要な DNA 配列を含むファージベクターを利用することもまた可能である。ファージベクターの場合には、当該ファージベクターを大腸菌に感染させることによって直接ファージを得ることが可能であり、ヘルパーファージを使用する必要はない。

本願明細書において「提示切り替え」とは、サプレッサー変異体宿主に導入された時には前記「一の蛋白質」と前記「他の蛋白質」の両蛋白質をファージ上に提示するが、非サプレッサー株宿主に導入された時には一つの蛋白質をファージ

上に提示し、他のもう一つの蛋白質を分泌するという切り替えの現象を意味する。なお本願明細書中において、両蛋白質を提示しているファージを「2蛋白質提示型のファージ」と、一つの蛋白質をファージ上に提示するファージを「1蛋白質提示型のファージ」と称する。「1蛋白質提示型のファージ」が取得された場合には、「1蛋白質提示型のファージ」の上に上記「一の蛋白質」が提示されると共に、上記「他の蛋白質」をコードする遺伝子が大腸菌内で発現して菌体外へ分泌される。

なお上記の蛋白質が抗体可変領域断片である場合には特に、VH断片とVL断片の両者を提示しているファージを「VH/VL提示型のファージ」と称する。また、VH断片をファージ上に提示してVL断片は大腸菌より培養上清中に分泌する場合を「VH提示型の培養上清」と、VL断片をファージ上に提示してVH断片を培養上清中に分泌する場合を「VL提示型の培養上清」と、それぞれ称する。

上記の提示切り替えは、提示切り換えを可能とする終止コドンが存在することによって可能となる。提示切り換えを可能とする終止コドンとして、下記の実施例で使用しているアンバーコドンは特に好ましい。なおアンバーコドンは、タンパク質合成終止コドンの一つであるTAGのコドンである。しかし本発明で使用する終止コドンはそれに限定される訳ではなく、それ以外の終止コドンであるオパールコドン(TGA)やオーカーコドン(TAA)もまた同じ目的において使用することができる。

アンバーコドンを有しているベクターが大腸菌のアンバーサプレッサー株に導入された時には、当該終止コドンの読み違い(アンバーサプレッション)が一定の割合で起こって菌体内で融合蛋白質が発現するために、上記の2蛋白質提示型のファージを得ることができる。一方非サプレッサー株宿主に導入された場合にはアンバーサプレッションを起こさないため、アンバーコドンは正確に終止コドンとして認識されて融合蛋白質は発現せず、アンバーコドンの下流に存在する遺伝子がコードするタンパク質は分泌されて提示切り換えが起こる。なおオパール

コドンをおパールサプレッションを起こすサプレッサー変異体宿主に導入することにより、またオーカーコドンをおカーサプレッションを起こすサプレッサー変異体宿主に導入することによっても、提示切り換えを起こすことが可能である。

本発明の目的でサプレッサー変異体宿主として使用することができるのは sup E あるいは glnV を持つ菌であり、その例としては大腸菌 TG1 株、XL1-Blue 株、DH5α 株、JM109 株および NM522 株などを挙げることができる。なお、非サプレッサー宿主としては大腸菌 JM105 株、NV1184 株や HB2151 株などを挙げることができる。しかし本発明において使用するサプレッサー変異体宿主と非サプレッサー宿主は、繊維状ファージが感染可能な F'プラスミドを保持している必要はあるが、上記に述べたものに限定されるものではなく、同等に機能を有する他の宿主に変更することができる。

本発明の方法において使用するベクターは、(1)一の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列、(2)当該一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列、(3)他の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列、(4)ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドン、及び(5)当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列からなる。当該ベクターは(1)(2)(3)(4)(5)をその順番に、又は(3)(4)(5)(1)(2)の順番に備えることができる。

このような構成を有するベクターは、上記「一の蛋白質」をファージ上に提示する。一方、「他の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列」と「当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための DNA 配列」の間に提示切り替えを可能とする終止コドンが存在するために、非サプレッサー株宿主に導入した際には「他の蛋白質」は融合蛋白質としてファージ上に発現せず、提示切り替えによって培養上清中に分泌される。

上記の「蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列」として使用することが可能な DNA 配列は、好ましくは繊維状フ

ファージの表面蛋白質をコードする DNA 配列である。その例として繊維状ファージの表面蛋白質をコードする DNA 配列である pVII 蛋白質、pIX 蛋白質、pIII および pVIII をコードしている DNA 配列を挙げることができるが、特に好ましいのは下記の実施例で使用している繊維状ファージの pVII 蛋白質あるいは pIX 蛋白質をコードしている DNA 配列である。しかしそれらに限定されるものではなく、他のファージ表面蛋白質をコードする DNA 配列も、当該 DNA 配列が目的とする蛋白質と融合蛋白質を作製することが可能であって本発明の目的のために使用できる蛋白質をコードする限り、適宜選択して使用することができる。

本発明の方法は、抗体の VH 断片と VL 断片の間の相互作用を測定する目的において特に優れている。しかし本発明の方法は理論的には、抗体の可変領域断片以外の、ヘテロダイマーとして存在している多量体蛋白質において、当該多量体蛋白質を繊維状ファージの上に提示してダイマーを構成しているモノマー間の相互作用を評価する目的で使用することが可能である。例えばある特定のモノマーである「一の蛋白質」と、それとは異なるモノマーである「他の蛋白質」の相互作用を測定することは基礎研究の現場のみならず、臨床的な診断の目的においても重要である。本発明において「一の蛋白質」と「他の蛋白質」は限定されるものであるとは解されるべきではなく、本発明の方法は、蛋白質相互間の相互作用を測定することを可能とする新規な技術を提供するものである。

本発明の方法によって得られた、抗原非存在下で VH/VL 相互作用が弱く、かつ抗原存在下で VH/VL 相互作用が強い抗体を用いて、例えば以下のような測定キットを作製することが可能である。

- 1) VL 断片をビオチン・アビジン相互作用を利用して、または物理的吸着を利用してチューブあるいはマイクロプレートに固定化する。
- 2) VH 断片とレポーター酵素（例えばアルカリフォスファターゼ）との融合蛋白質を作製しておき、これをサンプルと共に VL を固定化した固相と一定時間接触させる。

3) 洗浄後、固相化された酵素活性を測定し、サンプル中の抗原濃度の指標とする。

また、以下の測定キットを作製することがもまた可能である。

1) VH 断片と VL 断片を互いに吸収・蛍光スペクトル重なる二種類の蛍光色素（例えばフルオレセインとローダミン）で標識しておく。

2) これらをサンプルと混合し、5分程度おいて短波長側の蛍光色素のみを励起光で励起する。二種類の蛍光色素由来の蛍光強度を測定することで、VH/VL の会合による蛍光エネルギー移動現象を検出することができる。二つの蛍光強度の比をサンプル中の抗原濃度の指標とする。この方法では前の方法に比べて、短時間で洗浄操作なしに抗原濃度が測定できる。

また、以下の測定キットを作製することもまた可能である。

1) VH 断片と VL 断片を、それぞれ単体では活性がないか、低いのが近接させると活性の増大する二種類の酵素断片（例えば LacZ $\Delta\alpha$ および LacZ $\Delta\omega$ ）との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製しておく。

2) 二種類の融合蛋白質とサンプルを混合し、一定時間おいたのち基質（例えば発光基質 Galacton Plus）と混合し、融合蛋白質複合体の活性を測定することでサンプル中の抗原濃度の指標とする。この方法では、前の2つの方法に比べてはるかに高感度に抗原濃度を測定することが可能であり、また洗浄操作を含まない (Yokozeki et al., Anal. Chem. 74 (11), 2500-2504, 2002)。

本発明方法によって測定する対象としては、第一に臨床検査における血清中の特定蛋白質、ペプチド、各種ホルモン、麻薬あるいは治療用薬物等が考えられる。また、環境水中のダイオキシン、ビスフェノールA、ノニルフェノール等の毒性が疑われる化学物資や農薬類もまた本発明によって測定される対象となる。

下記の実施例において、提案した非サプレッサー株による VL 提示切り替えが適切に行われているかどうかについて検討を行った。より具体的には、本発明者らによってオープンサンドイッチ ELISA が可能であることが既に示されている

抗 HEL (Hen Egg-White Lysozyme, ニワトリ卵白リゾチーム) 抗体の HyHEL-10 を用いてスクリーニングのモデル系を構築し、提案した系が機能することを実験的に証明した。構築した gIX protein に VH、gVII protein に VL を別々に提示 (split Fv) させるファージミドベクター pKS1 について、ホストの E.coli の代替による VL 提示の切り替えをオープンサンドイッチ ELISA により確認した。

下記の実施例の選択の第 1 段階において、VH・VL 提示型のファージを用いた。作製したベクターにより E.coli TG1, XL1-Blue などのアンバーサプレッサー株を形質転換した場合には、アンバーコдонは一定の割合で読み違いが起こりグルタミン酸に置換される。菌体内では pIX-VH、pVII-VL の融合タンパク質が発現し、ヘルパーファージの感染によって VH・VL 提示型のファージを得ることができる。

選択の第 2 段階において、上記において得られた結合活性の高いファージを、E.coli HB2151 のような非サプレッサー株に感染させ、ヘルパーファージによるレスキューで、VH 提示のファージと遊離の VL 断片を培養上清に得る。この場合はアンバーコドンが正確に終止コドンとして認識されるため、得られるファージはいずれも VH のみを提示している。VL の上流には分泌シグナルである ompA 配列を配置しており、ファージ粒子と同様に菌体外へ分泌される。

実施例

以下において実施例を示し、さらに詳しくこの発明の実施の形態について説明する。

実施例 1

(a) 抗リゾチーム抗体 HyHEL-10 遺伝子を g7g9 上に提示するファージミドベクターの構築

ポリメラーゼ連鎖増幅(PCR) 法により必要となる断片を作製し、これらを連結させて目的ファージミドベクターを作製した。PCR の条件は下の表 1 にまとめた。なお、表 1 において反応条件はいずれも 94℃で 5min.x1, (94℃ 30sec, 55℃

30sec, -72°C 1min.)x35, 72°C 8min.x1 であり、DNA ポリメラーゼはいずれも 2.5unit/100 μ l KOD ポリメラーゼ(Toyobo, Osaka)である。

表 1

	back primer	forward primer	template
VH	M13RV	VH1for2X	pCANTAB-5E/ HyHEL-10
VL	VK2Back	Reverse SEQ	pCANTAB-5E/ HyHEL-10
g9-ompA(linker)	LinkBack	LinkFor	pHSG397/ g9-ompA
VH-linker	M13RV	LinkFor	VH, linker
linker-VL	LinkBack	Reverse SEQ	linker, VL
VH-linker-VL	M13RV	Reverse SEQ	VH-linker, linker-VL

OmpA-FLAG のクローニング

プラスミド pFLAG-ATS (Sigma-Aldrich) を鋳型とし、VL の N 末端に配置する大腸菌 ompA 分泌シグナル配列および FLAG タグ配列を PCR 法により増幅した。プライマー配列には増幅断片 5' 側および、3' 側にそれぞれ制限酵素部位 Xba I、Sal I が導入されるよう設計した。クローニングベクター pHSG397 (TakaraBio, Otsu, Japan) へクローニングした後、蛍光 DNA シーケンサー SQ-5500 (Hitachi, Tokyo)、Thermosequencing kit (Amersham Bioscience, Tokyo) を用いてシーケンスを確認した (以下 pHSG397/ ompA-FLAG)。

Back: ompXbaRV

5'-CGGGGTCTGACTGTGCACTTTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAG-3'

Forward: ompApaSalFR

5'-CGGGGTCTGACTGTGCACTTTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAG-3'

gene IX, gene VII のクローニング

ヘルパーファージ M13KO7 (TakaraBio) から一本鎖 DNA を調製し、これを鋳

型にしてPCR 法により gene VII ,gene IX の配列を増幅した。それぞれの 5' および 3' 側に、制限酵素切断部位として gene VII では Kpn I および EcoRI 、 gene IX では Xho I および Xba I を導入するため以下のプライマーを用いた。

Back: g7KpnRV

5'-CGGGGGTACCGCAGGTCGCGGATTTTCGAC-3'

Forward: g7EcoFR

5'-CGGGGAATTCTCATCTTTGACCCCCAGCG-3'

Back: g9XhoRV

5'-CGGGCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTC-3'

Forward: g9XbaFR

5'-CGGGTCTAGATCATGAGGAAGTTTCCATTAAAC-3'

増幅された gene VII 断片は EcoRI および KpnI で切断して pBlueScript II KS+ (Toyobo) へ、 gene IX 断片は XhoI および XbaI で切断して pHSG397/ ompA-FLAG へクローニングし、そのシーケンスを確認した(以下 pBS-g7 および pHSG397/ ompA-g9) 。

リンカーの作製

オーバーラップイクステンション (Overlap-extension) PCR による VH-linker-VL (HyHEL-10) の作製

VH, VL, Linker を以下のプライマーを用いてそれぞれPCR 増幅した後、VH-linker、linker-VL の各断片をオーバーラップイクステンションPCR により増幅した。さらに VH-linker、linker-VL のオーバーラップイクステンションPCR により VH-linker-VL の断片を得た。この断片を両端の Nco I、Not I で制限酵素切断した。

Linker の PCR :

Back: LinkBackX

5 '-GGGACCACGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAATG-3 '

Forward: LinkFor

5 '-AGACTGGGTGAGCTCAATGTCCGTCGACTGTGCACTTTTGTC-3 '

VH(HyHEL-10)の PCR :

Back: M13RV

5 '-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Forward: VH1For2X

5 '-GACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC-3 '

VL(HyHEL-10)の PCR :

Back:Vk2Back

5 '-GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3 '

Forward: ReverseSEQ

参考 5 '-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

ファージミドベクター pKS1 の構築

ファージミドベクターpKS1 は pK1 (Kristensen, P., and Winter, G. (1998) *Folding & Design* 3, 321-328) を改変した pScFv3 上に構築した。まず PCR 法により抗ウシ血清アルブミン(BSA) 一本鎖抗体(scFv)をコードするファージミドベクターpIT(13CG2) (de Wildt, R. M., Mundy, C. R., Gorick, B. D., and Tomlinson, I. M. (2000) *Nat Biotechnol* 18, 989-994) をテンプレートとし、プライマーM13RV および MycAKpnFor(5'-CCGGGTACCTATGCGGCCC CATTCAGATC-3') で抗 BSA scFv および His-Myc タグをコードする DNA 断片を増やし、これを Sfi I で切断後 T4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑化したのち Kpn I で処理し精製した。

次にこれをファージミドベクターpK1 を gIII 遺伝子5'近傍の Pst I で処理した後 T4 DNA ポリメラーゼで平滑化し Kpn I で処理した断片とライゲーションさせた。この、抗 BSA scFv 遺伝子-His-Myc タグを持つベクターpScFv3 を Kp

nI、EcoRI で処理し、これに KpnI、EcoRI で処理した pBS-g7 から得た gene VII 断片を挿入した(pScFv/ g7)。続いて Nco I, Not I で処理した VH-linker-VL を pScFv/ g7 へ挿入し、pKS1 を得た。ファージミドベクターpKS1 の配列を図 4 に示す。

ファージの作製 (VH・ VL 提示型、VH 提示型)

構築したファージミド pKS1 (アンピシリン耐性) により形質転換した大腸菌を対数増殖期に達するまで 37℃で 2TYAG 培地(2TY+アンピシリン:100 μ g/ μ L, グルコース:2%)100mL で培養し、O.D.600=0.5 の時点で培養液中の 10 mL へ、菌体量に対し 20 当量のヘルパーファージ M13KO7 を加えた。37℃で 30 min. 静置した後、グルコースを含む培養上清を除去し、100mL の 2TYAK 培地(2TY+アンピシリン:100 μ g/mL, Km:25 μ g/mL) で再懸濁し 30℃で終夜培養した。次に培養液を 4000g,15min 遠心し、上清を回収して 20% PEG6000・ 2.5M NaCl を 1/5 vol.加え氷上で 1 h 静置し、4000g,15min 遠心して沈殿物を 2ml の TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)で再懸濁した。再び遠心して上清を回収し、ファージ溶液を得た。得られたファージについてはタイターを測定(後述) し、ファージ粒子の濃度をコロニー形成能(タイター, cfu, colony forming unit/ mL) により決定した。

i) サプレッサー株

プラスミド pKS1 により大腸菌アンバーサプレッサー株 TG-1 及び XL-1Blue を形質転換し、pIX に VH、pVII に VL を提示した VH,VL 両者提示型のファージを得た。

ii) 非サプレッサー株

pKS1 により大腸菌非サプレッサー株 HB2151 を形質転換し、pIX に VH を提示し VL を提示していないファージ、及び遊離の VL 断片を含むファージ溶液を得た。このファージについては PEG NaCl による沈殿の過程を省き、培養上清をそのまま用いた。

ファージタイターの測定

ファージの濃度の目安としてタイターを測定した。対数増殖期まで 2TY 培地で培養した大腸菌 TG1 100 μ L ~1 mL に、原液を PBS で 1000 倍希釈したファージ溶液 1 μ L を入れ、37℃で 30 min. 静置して感染させた。その後 2TY 培地で希釈し、各希釈溶液から 10 μ L を 2TYAG プレート上にスポッティングした。終夜放置後に各スポットで形成されたコロニー数を数えて、ファージ原液 1 mL から何個のコロニーが形成されたかを計算しファージ濃度の指標とした。

ファージ ELISA

ポリスチレン製 96穴マイクロプレートの各ウェルに 1~10 μ g/mL の一次抗体または抗原の溶液を 100 μ L 入れ、4℃で一晩固定化した。次にウェルの水分を除去した後、各 well に 200 μ L の 1 %スキムミルクを含む PBS (MPBS)を入れ、2 h.室温で静置しブロッキングした。続いてプレートを 0.1% Tween20 を含む PBS(PBST)で 3 回洗浄し、 10^{11} ~ 10^{12} cfu/mL のファージ溶液(MPBS 中) を 100 μ L 入れて 37℃で 1h. 静置した。マイクロプレートを 3 回洗浄し、MPBS で 5000 倍希釈した HRP 標識抗ファージ抗体 (マウス抗-M13 HRP, アマシャムバイオサイエンス) を各ウェルへ 100 μ L ずつ添加し室温で 1h. 静置した。

マイクロプレートを PBST で 3 回洗浄し、あらかじめ調製した酵素反応溶液(50mL 100mM 酢酸ナトリウム pH6.0, TMBZ(in DMSO)500 μ L, H₂O₂ 10 μ L)を各 well へ添加して反応を開始した。暗所で 10~30 min.反応させた後 3.2N H₂SO₄を 50 μ L ずつ添加して反応を止め、プレートリーダーで吸光度を測定した(450 nm,対照は 650 nm)。

オープンサンドイッチ ELISA

基本的な操作は上述のファージ ELISA と同様に行った。タグを付加した VL を固定化する一次抗体(α FLAG-M2 または α myc 9E10) をマイクロプレート上に固定化しブロッキングした後、濃度既知の抗原(HEL, 0.6~10 μ g/mL) をあらかじめ混ぜたファージ溶液(1%MPBS 中) を 100 μ L 入れ 37℃で 1h. 静置した。

以降ファージ ELISA と同様に HRP 標識抗ファージ抗体の酵素活性を吸光度により測定した。

VL 断片提示の確認

ファージに提示された VL の N 末端には myc tag が、C 末端には FLAG tag が組み込まれており、抗体断片の提示を確認するためにこれらの tag に対する抗体を用いてファージ ELISA を行った。この結果、少なくとも VL 断片は十分に提示が行われていることが示唆された。提示の確認の結果を図 5 に示す。

抗原結合活性の確認

抗体断片 VH・VL がファージに充分提示されているか、またファージに提示された VH・VL が充分な結合活性、抗原特異性を保持しているかどうかを確認するため、HEL を固定化したマイクロプレートを用いてファージ ELISA を行った。この結果、ファージ濃度 10^9 (cfu/mL) 以上において抗原に対する特異的な結合が確認でき、このことから VH の提示も充分に行われていることが明らかになった。抗原結合活性の確認の結果を図 6 に示す。

scFv と splitFv の比較

HyHEL-10 を scFv 型及び splitFv 型で提示した各ファージについて、抗原(HEL) を固定化した ELISA を行い抗原結合活性を比較した。SplitFv 型においても scFv と同様に充分な結合活性を示していることから、従来と同様の選択条件により結合性ファージのスクリーニングが可能なが示された。なお図 7 は 10^{10} cfu/ml における結果であり、図 8 は 10^9 cfu/ml における結果である。

VH 提示型ファージの作製

大腸菌 HB2151 : 非サプレッサー株の形質転換

構築したベクター pKS1 について、非サプレッサー株である大腸菌 HB2151 の形質転換を行い、M13KO7 ヘルパーファージでレスキューしてファージを作製した。得られたファージには VH のみが提示され、VL はファージと共に培養上清に分泌される。同様にタイターを測定し以降の実験に用いた。

非サプレッサー株による提示切り替えの確認

非サプレッサー株によって、アンバーによる提示の切り替えが充分に行われているかどうかを確認するため、培養上清を直接用いて抗原(HEL) 濃度 0~10 μ g/mL の範囲においてオープンサンドイッチ ELISA を行った。ファージ濃度 1×10^{11} (cfu/mL)において HEL に特異的な濃度依存的なシグナルの上昇が見られたことから、切り替えは充分に起こっていると考えられた。また VL の分泌についても充分量行われていることが示唆された。結果を図 9 に示す。また、この実験系における提示切り替えのしくみを示す模式図を図 10 に示す。

また実際にスクリーニングを行う時には、VH/VL 提示型のファージライブラリーから選択した抗原に強い結合を示す各クローンについて 96 穴プレートで培養を行いファージを作製するが、96 穴プレートにおける培養上清のファージタイターはウェルのどの位置においてもそれほど差異はなくおよそ 10^{12} のオーダーであることから、直接オープンサンドイッチ ELISA によりスクリーニングが行えることが示唆された。

ファージミドベクター pKS2 の作製

前項で作製した pKS1 は、抗体クローニングのための制限酵素部位として VH 上流に 6 塩基認識 NcoI サイトしか持って居らず、内部に NcoI 切断部位をもつ遺伝子断片の挿入は難しいという欠点があった。これを改良するため、NcoI に加えて 8 塩基認識 SfiI をクローニングに用いることのできるベクター pKS2 を作製した。

具体的には pKS1(HyHEL-10)を NcoI および EcoRI で切断し、0.8 kb の挿入断片を NcoI および EcoRI で切断したファージミドベクター pCantab5E(アマシャムバイオサイエンス) にライゲーションさせ組み込んだ。

ターミネーターを組み込んだファージミドベクターの作製

挿入する抗体遺伝子によっては発現誘導前の融合蛋白質発現が大腸菌の生育に有害となり、挿入した遺伝子が高率で欠損する現象が見受けられた。これを防ぐ

ため、転写開始信号の前と、融合遺伝子下流にグルタミンパーメアーゼ (glutamine permease) オペロン由来の転写終結配列 (ターミネーター tHP, Nohno, T. et al., Mol. Gen. Genet. (1986) 205:260-269) を挿入した。これにより、非誘導時にファージミドベクター中に存在するプロモーター様配列から転写開始される mRNA からの融合蛋白質発現を減少させることが出来ると期待された。

ファージミドベクター pKS2 を Lac プロモーター上流の SapI 部位で切断し、ここに以下の4種のオリゴヌクレオチドをリン酸化後アニールさせて作製したターミネーター遺伝子を挿入した。

tHP1 5'-AGC GGT ACC CGA TAA AAG CGG CTT CCT GAC-3'

tHP2 5'-AGG AGG CCG TTT TGT TTT GCA GCC CAC CTC-3'

tHP3 5'-GCT GAG GTG GGC TGC AAA ACA AAA CGG CCT-3'

tHP4 5'-CCT GTC AGG AAG CCG CTT TTA TCG GGT ACC-3'

組み換えたファージミドは、そのシーケンスを決定し設計通りの配列となっていることを確認した (pKS2T)。

次に、pKS2T を融合遺伝子下流にある EcoRI 部位で切断し、以下の2つのプライマーおよび tHP2, tHP3 をアニールさせて作製したターミネーター遺伝子を挿入した。

tHP7 5'-AAT TGG TAC CCG ATA AAA GCG GCT TCC TGA C-3'

tHP8 5'-AAT TGA GGT GGG CTG CAA AAC AAA ACG GCC T-3'

遺伝子の挿入されたファージミドのシーケンスを決定したところ、EcoRI 部位にターミネーター遺伝子が2個タンデムに挿入されていた。これを pKST2 とした。

オープンサンドイッチ法に適した抗体の判別

このシステムを用いてある抗体がオープンサンドイッチ法に適しているかどうかを判別可能かどうか検討した。抗体遺伝子として、抗ニワトリ卵白リゾチーム抗体 HyHEL-10 および D1.3 を用いた。D1.3 は VH-VL 相互作用が抗原結合の有無にかかわらず強い事が知られている。D1.3 Fv 遺伝子をテンプレートとし、

上記と同様に PCR で split Fv 遺伝子を作製し、pKST2 に組み込んだ。非サブレッサー株である HB2151 を形質転換し、ヘルパーファージ M13K07 を用いて VH 提示ファージおよび分泌型 VL を含む培養上清を調製した。

この上清および抗原を抗 FLAG タグ抗体を固定化したマイクロプレートに注ぎ、ファージ結合の抗原濃度依存性を調べた結果、D1.3 を用いた場合、サンプル中のリゾチーム濃度を変えても VL 断片を介して固相化されるファージの量は殆ど変化しなかった。これに対し、HyHEL-10 を用いた場合、サンプル中のリゾチーム濃度に応じて VL 断片を介して固相化されるファージ量が顕著に増加した。このことから、この系がオープンサンドイッチ法に適した抗体の簡便なスクリーニング法として機能することが確かめられた。結果を図 1 1 に示す。

モデルパニング

このシステムを用いて特異的結合抗体を提示するファージの選択が可能であることを証明するため、二種の特異性の異なるファージ抗体の混合液から目的の特異性を持ったファージ抗体をパニング法で濃縮することを試みた。

ファージミドとして、HyHEL-10 をコードする split Fv を提示可能な pKST2-H10 (H 1 0) および抗フルオレセイン split Fv を提示可能な pKST2-31IJ3 (I J 3) を用いた。これらを形質転換した大腸菌 TG-1 にヘルパーファージ M13K07 を感染させ、split Fv 提示ファージを作製した。これらを MPBS 100 μ l 中の titer が H10:IJ3=10⁵:10¹¹ あるいは 10⁹:10¹¹ となる様に混合したファージ液を調製し、ニワトリ卵白リゾチーム HEL を固定化したマイクロプレートに注いで 37℃ 1 時間置き、PBS-T で 2 回、PBS で 2 回洗浄し 100 μ L の 0.2 M Glycine-HCl (pH 2.2), 1 mg/ml ウシ血清アルブミンを注ぎ溶出されたファージを 6 μ l の 2M Tris で中和し対数増殖期の大腸菌 TG-1 に感染させた (一回目のパニング)。これを YTAG プレートにまいて 37℃ 一晩おき、コロニーを 48 個回収してそれぞれを培養し、ファージを調製した (モノクローナルファージ)。これと共に残りのコロニーを集めてこれから同様にファージを調製し、再度 HE

L を固定化したマイクロプレートを用いたパニングを行った。そして48クローンからモノクローナルファージを調製し、それぞれについて、HEL への結合能をELISA 法で測定した。

この結果、 $1:10^6$ および $1:10^2$ のどちらの混合比でも1回目のパニングで顕著なHEL 結合クローンの濃縮が見られ、全クローン中結合クローンの割合はそれぞれ37.5%および50%となった。また2回目のパニングにより、どちらの混合比の場合も80% 以上が陽性クローンとなることがわかった（図12）。

実施例2

同じHELに対する抗体でもHyHEL-10はオープンサンドイッチ法に適するが、VH/VL 相互作用の強いD1.3は適していない。VH/VL 相互作用に関与する残基を特定することができれば、その残基をオープンサンドイッチ法が適用可能な抗体のアミノ酸に置換することにより、オープンサンドイッチ法をより多くの抗体に適用することが可能となると期待される。また、これまでに、VH/VL 相互作用および抗原結合能と抗体フレームワーク領域の配列との関係が系統的に調べられた例はない。そこで、VH/VL 界面に存在する2番目のフレームワーク領域 (FR2) に着目し、HyHEL-10のVHおよびVLのFR2領域の各残基をD1.3型のものにしたとき、オープンサンドイッチ法による測定が可能であるか、また、VH/VL 相互作用がそれぞれの野生型 (WT) と比較してどのように変化するか、検討した。またそれにより、オープンサンドイッチ法が適用可能なクローンの割合を調べ、オープンサンドイッチ法の適用に必要な2つの条件を満たすには、どの残基が重要なのか検討した。

split Fv 断片の作製

HyHEL-10を鋳型とし、以下の方法でPCRを行った。プライマーに混合塩基を入れることでFR2領域をHyHEL-10型か、D1.3型にした、VHのN末端からVLのCDR2領域に位置する55番目のGly (H55) までのDNA断片（以下：VH FR2と称し、リバープライマーにMH2BackSfi、フォワードプライマーに

H10VHframe2 を使用)、VL の CDR1 領域に位置する 30 番目の Gly (L30) から VL の N 末端、g^{VII}までの DNA 断片 (以下: VL FR2) (リバースプライマーに H10VLframe2、フォワードプライマーに g7EcoFR を使用) を増幅した。

PCR 反応の鋳型には、pKST2 の FLAG tag を VL の N 末端から VH の C 末端に移動させた HyHEL-10 の split Fv 断片を持つファージミド (pKST2 HyHEL-10 A) を用いた。また、同様にこの 2 つの DNA 断片を split Fv 断片にするためのリンカーも増幅した。この場合も pKST2 HyHEL-10 A をテンプレートにし、VH の CDR2 領域に位置する 49 番目の Gly (H49) から VH の C 末端、FLAG、g^{IX}、OmpA、VL の CDR1 領域に位置する 37 番目の Gln (L39) までの DNA 断片 (以下: linker (FR2)) (リバースプライマーに H10linkRV、フォワードプライマーに H10linkFR を使用) を増幅した。いずれの場合も、DNA ポリメラーゼとして *Ex Taq* (宝バイオ) を用い、反応は 94℃、5 分間で開始し、94℃30 秒間、55℃30 秒間、72℃1 分間を 35 サイクル行い、72℃5 分間反応させた後、4℃で終了した。

次に、VH FR2、VL FR2、リンカー (FR2) をオーバーラップエクステンション PCR により 1 つの DNA 断片にアセンブリーさせた。まず、プライマーを加えず、VH FR2、VL FR2、リンカー (FR2) を PCR 反応液に入れ、94℃、5 分間で開始し、94℃30 秒間、55℃30 秒間、72℃1 分間を 7 サイクル行い、4℃で反応を終了させた。次に、MH2BackSfi をリバースプライマー、g7EcoFR をフォワードプライマーとして加え、94℃30 秒間、55℃30 秒間、72℃1 分間を 30 サイクル行い、4℃で反応を終了させた。ポリメラーゼは、*Ex Taq* を用いた。

H10VHframe2:

5'-ACCACTGTAGCTTACGTACCCCAWSYACTCCAGACSKTTACCTGGARRTTKACGAAYCC
AGCTCCAATAATCACTGGT-3'

H10VLframe2:

5'-GGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAAYMGSRCAATCTCCTCRGCTCCTGRTCW
AKTATGCTTCCCAGTCCATCTCT-3'

H10linkRV:

5'-GGGTACGTAAGCTACAGTG-3'

H10linkFR:

5'-GATACCAGTGTAGGTTG-3'

(K=G or T, M=A or C, R=A or G, Y=C or T, S=C or G, W=A or T)

FR2 領域のランダム化の確認

このようにして増幅した split Fv 断片を *Nco* I、*Not* I で処理し、*Nco* I、*Not* I で処理されたベクター pKST2 に組み込み、大腸菌 TG-1^{sup+} に形質転換した。反応溶液を YTAG プレート (Ap: 100 μ g/mL, Glucose: 1%) に塗布し、30°C で一晚培養した。生じたコロニーからコロニーPCR を行った。split Fv 断片の挿入が確認されたクローンをレプリカプレートから植菌し、37°C で一晚振盪培養した。得られた菌体溶液からアルカリ-SDS 法でプラスミド精製を行った。ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) で配列の確認を行った。プライマーは、M13RV、OmpARV (OmpA signal 配列の一部に相補的なリバースプライマー) を用いた。また、ファージディスプレイ、続いて抗原の HEL、blank、VH、および、VL の提示を確認するため、それぞれ、anti FLAG M2、9E10 を固定化し、ファージ ELISA を行った。なお、HyHEL-10 の FR2 領域の各残基を HyHEL-10 型か、D1.3 型にした split Fv 断片の作製を示す模式図を図 1 3 に示す。

OmpARV:

5'-ACAGCTATCGCGATTGCAGTG-3'

ライブラリーの作製

まず上記の split Fv 断片を大量に調製した。その後、ベクター (pKST2) 2.13 pmol と挿入 DNA 断片 (HyHEL-10 の FR2 領域に変異を導入した split Fv 断片) 21.3 pmol を混合し、そこへ全量の 1/2 vol. の Ligation High (Toyobo) を加え、16°C で 2 時間静置し、ライゲーションを行った。次に、エレクトロポレーション法により形質転

換を行う前に、エタノール沈殿により脱塩を行った。具体的には、ライゲーション反応液の全量の 1/10vol. の 3M 酢酸ナトリウム、2 μ L の Pellet Paint Co-Precipitant (メルク、東京)、2vol. の 100%エタノールを加え、ボルテックスミキサーにより混合し、室温で 2 分間静置した。静置後、15000rpm、室温で 5 分間遠心し、上清を除去した。70%エタノール、続いて 100%エタノールでリンスし、15000rpm、室温で 5 分間遠心し、上清を除去、遠心乾燥した後、沈殿を 20 μ L の milli-Q 水に溶解し、2 等分した。

脱塩を行った DNA 溶液 10 μ L と大腸菌 100 μ L (TG-1^{sup+}) を混合し、キュベットに移し、Easyject (EquiBio) を用いて電圧を加えた。その後、2YT 液体培地 900 μ L をキュベットに加え、懸濁し、マイクロチューブに移し、37°C で 30 分間培養した。残りの脱塩を行った DNA 溶液 10 μ L についても、同様の操作を行った。培養を行った後に、培養液 1 μ L を 2YT 液体培地 99 μ L で希釈し、このうち 10 μ L を 2YT 液体培地 90 μ L で 10 倍希釈、この操作を 2 回繰り返した。それぞれの希釈液のうち 10 μ L ずつを YTAG (Ap: 100 μ g/mL、グルコース: 1%) プレートにスポッティングし、30°C で一晩培養した。それぞれのスポットに生じたコロニーの数を数え、ライブラリのサイズを算出した。残りの培養液は、YTAG (Ap: 100 μ g/mL、グルコース: 1%) プレート (バイオトレイ) (住友ベークライト) に塗布し、30°C で一晩培養した。

ファージライブラリーの調製

コロニーの生えたバイオトレイに 2YT 液体培地 5ml を注ぎ、コンラージ棒を用いてコロニーを回収し、1/2vol. の 50% グリセロールを加えグリセロールストックを作製し、-80°C で保存した。回収した菌体溶液 50 μ L を 2YT 液体培地 (Ap: 100 μ g/mL、グルコース: 1%) 100mL に添加し、37°C で振盪培養した。O.D.600=0.5 に達したとき、培養液 10mL に菌体の 20 当量のヘルパーファージ M13K07 を加え、37°C で 30 分間静置した。その後、2000rpm、15 分間遠心、培養上清を除去し、2YT 液体培地 (Ap: 100 μ g/mL、Km: 50 μ g/mL) 5mL で再懸濁した。これを 2YT

液体培地 (Ap: 100 μ g/mL、Km: 50 μ g/mL) 45mL の入ったバツフル付三角フラスコに加え、30℃で 20 時間、毎分 250 回転で振盪培養した。培養後、培養液を 6500g、10 分間遠心し、培養上清を回収、そこへ 20% PEG6000、2.5M NaCl を 1/5vol. 加え、氷上で 1 時間静置した。その後、6500g、4℃、30 分間遠心し、沈殿物として得られたファージを 1mL の TE (10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0) で再懸濁し、再度 15000rpm、4℃、20 分間遠心し、上清を回収、ファージライブラリーを得た。

バイオパニングとモノクローナルファージ ELISA

抗原の HEL に対してバイオパニングを 1 回もしくは 2 回行った。バイオパニングによって得られた HEL に対する結合能の高いファージ集団から、HEL に特異的に結合するクローンを取得するため、モノクローナルファージ ELISA を行った。合計 1536 クローンにつき、ファージ培養上清を用いて ELISA を行い、HEL を固定化したウェルの吸光度が 0.3 以上でかつ、その吸光度がブランクの吸光度の 5 倍以上である 72 クローンを、HEL への結合が特異的であるか更に検討することにした。

上記においてライブラリーを作製する際に、約 7×10^7 個のコロニーが生じた。コロニー PCR によりインサートが挿入されていないもの、また、PCR の際、遺伝子の過不足が起こっているものの割合を差し引くと、ライブラリーの多様性は約 5×10^7 と推定される。1 回、バイオパニングを行い、得られた 1536 クローンにつき、96 穴プレートで調製したファージ培養上清を用い、ELISA を行った。HEL を固定化したウェルの吸光度が 0.3 以上でかつ、その吸光度がブランクの吸光度の 5 倍以上である 72 クローンにつき、5mL スケールでファージを再度調製し、ELISA を行い、HEL への結合が特異的であるか、VH、VL が提示されているか、検討を行った。

ファージクローンの HEL に対する特異性

モノクローナルファージ ELISA で HEL への結合能があると判断したクローンの特異性を確認するため、それぞれのクローンについて、グリセロールストック

から植菌し、5mL スケールでファージディスプレイをし、ファージ ELISA を行った。このとき、抗原の HEL、ブランク、VH、および、VL の提示を確認するため、それぞれ、anti FLAG M2、9E10 を固定化したウェルを用意した。VH、VL の両方が提示されていて、HEL に充分特異的に結合すると判断されるクローンが得られたので、これらのクローンにつき、グリセロールストックから植菌し、37℃で一晩振盪培養した。得られた菌体溶液からアルカリ SDS 法でプラスミド精製を行った。ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit で配列の確認を行った。プライマーは、M13RV、OmpARV を用いた。

anti FLAG M2、9E10 を固定化したウェルで、十分に大きな吸光度が示され VH、VL 共に提示されていることが確認され、かつ、HEL を固定化したウェルの吸光度がブランクの吸光度の 8 倍以上で、充分特異的に結合していると判断される 64 クローンを得た。本来保存されているフレームワーク領域に変異を加えたために、非特異的な結合を示すクローンが多くなったと考えられる。これらのクローンにつき、提示されている VH、および VL のアミノ酸配列を調べ、アンバーコドンに置換されているクローン、VH、VL 両方とも WT と全く同じアミノ酸配列を持つクローンを除いた 36 クローンにつき、更に解析することにした。なお図 14 に、ファージライブラリの作製から、HEL への結合能の高いクローンの選択までの流れを示す。

この 36 クローンにつき、ファージのタイターを 2.5×10^8 、 1×10^9 、 4×10^9 (cfu/ml) にそろえ、HEL、ブランクに対し ELISA を行ったところ、いずれのクローンも HEL に特異的に結合していて、その結合能は WT と比較して、弱いものから、同等、強いものまで多種多様であった。HEL への結合能の指標に、 1×10^9 cfu/ml で ELISA を行ったときの、HEL を固定したウェルでの吸光度からブランクの吸光度を引き、WT のその値で割った値を用いることにした。

オープンサンドイッチ ELISA による VH/VL 相互作用の測定

HEL に充分特異的に結合すると判断され、かつ、アンバーコドンによる置換が

起こっていなかった 36 クローンにつき、ファージを HB2151^{sup} に感染させ、VH のみが提示されたファージと可溶性 VL 断片を含む上清を調製した。VL に結合させた tag の myc tag に対する抗体 9E10 を固定化したプレートに、この培養上清をアプライし、いくつかの抗原濃度で (HEL=0, 0.1, 1, 10 μ g/mL)、Open Sandwich ELISA を行った。この際、プレートへの非特異的吸着による吸光度上昇がどの程度であるか検討するため、ブランクのウェルも用意した。その他の操作は、実施例 1 において述べたオープンサンドイッチ ELISA と同様の方法で行った。

HEL=10 μ g/mL での吸光度を HEL=0 μ g/mL での吸光度で割った値をオープンサンドイッチ法による測定への適性の指標として用いた。この値が 1.2 未満のものをオープンサンドイッチ法による測定が不可能である、1.2 以上のものをオープンサンドイッチ法による測定が可能であると分類した。すると、VH の 39 番目の残基である H39 がオープンサンドイッチ法による測定が可能であった 14 クローン中、13 クローンで K であり、オープンサンドイッチ法による測定が不可能であった 22 クローン中、20 クローンで Q であった。

次に HB2151^{sup} を宿主とし調製した VH のみが提示されたファージと可溶性 VL 断片を含む上清を用い、抗原非存在下での VH/VL 相互作用の測定を行った。VL 側の tag の myc tag に対する抗体 9E10 を 4℃、一晚静置、固定化したプレートを 2% MPBS 200 μ L を加え、室温で 2 時間静置した。ブロッキング後、プレートを PBS-Tween (0.1% Tween20) で 3 回洗い、この培養上清 10 μ L と 1% MPBS 90 μ L を混合した溶液 100 μ L を加え、37℃で 1 時間静置した。プレートを PBS-Tween (0.1% Tween20) で 3 回洗い、5000 倍希釈したマウス由来 HRP 標識抗ファージ抗体 100 μ L を各ウェルへ加え、室温で 1 時間静置した。プレートを PBS-Tween (0.1% Tween20) で 3 回洗い酵素反応を行った。

9E10 を固定したウェルの吸光度からブランクの吸光度を引いた値を VH/VL 相互作用の強弱の指標として用い、この値の小さいクローンから順に並び替え、その FR2 領域のアミノ酸配列と比較した。この値が 0.5 以上のものを VH/VL 相互

作用が強い、0.5 未満のものを VH/VL 相互作用が弱いと分類した。この場合でも、H39 のアミノ酸配列が大きな影響を及ぼしていて、H39 が、VH/VL 相互作用が強いと判断された 19 クローン中、17 クローンで D1.3 型の Q であり、VH/VL 相互作用が弱いと判断された 17 クローン中、13 クローンで HyHEL-10 型の K であった。すなわちこの実験により、VH39 位のアミノ酸残基(H39)がオープンサンドイッチ法による測定の可否、および VH/VL 相互作用の強弱決定に深く関与していることが示唆された。

HEL への結合能とオープンサンドイッチ法による測定への適性、次に VH/VL 相互作用の強弱との関係をプロットした。HEL に対する結合能とオープンサンドイッチへの適性の関係を図 15 に示す。また、HEL に対する結合能と VH/VL 相互作用の関係を図 16 に示す。なお図 15 と図 16 において、黒丸は H39 が HyHEL-10 型 (K) のものを、白四角は D1.3 型 (Q) のものを、黒三角は野生型 (WT) を、それぞれ示す。36 クローンについてプロットを行い、H39 が K、Q で分類した。

この結果、やはり VH の 39 番目が VH/VL 相互作用の強弱、オープンサンドイッチ法による測定への適性に深く関与していて、HyHEL-10 型の K では、VH/VL 相互作用が弱く、オープンサンドイッチ法による測定に適していて、D1.3 型の Q では、VH/VL 相互作用が強く、オープンサンドイッチ法による測定に適さない傾向があることが示された。これは、主に VL の 38 番目 (L38) の Q との間に水素結合を形成できるか否かによるものと考えられる。

実際に、H39 が K の HyHEL-10、H39 が Q の D1.3 について H39 近傍の立体構造を調べた。すると、HyHEL-10 では、H39 の K と L38 の Q の間には、水素結合が形成されないが、D1.3 では、H39 の Q と L38 の Q の間に 2 本の水素結合が形成されることがわかった。それゆえ、H39 が K の場合、L38 の Q と水素結合を形成することができないため、VH/VL 相互作用が弱く、一方、H39 が Q の場合、L38 の Q と 2 本の水素結合を形成するため、VH/VL 相互作用が強くなる傾向があ

るものと考えられる。

以上のことから、split Fv システムを用いてランダム化した抗体 Fv ライブラリの選択を行い、野生型より抗原親和性の高いもの、オープンサンドイッチ法により適したものを含めた多数のクローンを得られることが示された。また、この結果からオープンサンドイッチ法に適した抗体の特徴が明らかになった。

本発明により、抗体可変領域の VH 断片と VL 断片の間の相互作用を測定するための新規な方法が与えられた。本発明の方法は蛋白質の間の相互作用を検出する目的で、広く使用することが可能である。本発明の方法に従って、アンバーコドンを含むファージミドベクターによってアンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製すると、VH・VL 断片の両者がファージ粒子上に提示される。一方非アンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製した際には、アンバーコドンが存在するために、VH 断片のみがファージ粒子上に提示されて、VL 断片は培養上清中に分泌されるという提示切り替えが起こる。培養上清中に分泌された VL 断片を固相に固定化し、ファージ上に提示された VH 断片との相互作用を定量化することにより、VH 断片と VL 断片の間の相互作用を測定することが可能である。

請 求 の 範 囲

1. ベクターであって、(1) 一の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列、(2) 当該一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列、(3) 他の蛋白質又はその断片をコードする DNA 配列、(4) ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドン、及び(5) 当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列、の少なくとも上記5つの DNA 配列を、当該ベクターの5'方向から3'方向にかけて、(1)(2)(3)(4)(5)の順番に又は(3)(4)(5)(1)(2)の順番に備える構造を有し、当該ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドンが存在することにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片の両者をその上に提示する2蛋白質提示型のファージを提供し、かつ、当該ベクターを非サプレッサー株宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示する1蛋白質提示型のファージ及び当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該他の蛋白質又はその断片を提供することを特徴とする、ベクター。
2. 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVH断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVL断片である、請求項1記載のベクター。
3. 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVL断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVH断片である、請求項1記載のベクター。
4. 前記ベクターが大腸菌のファージベクター又はファージミドベクターである、請求項1ないし請求項3のいずれか1つの請求項記載のベ

クター。

5. 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pIX 蛋白質をコードする DNA 配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pVII 蛋白質をコードする DNA 配列である、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか 1 つの請求項記載のベクター。

6. 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pVII 蛋白質をコードする DNA 配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pIX 蛋白質をコードする DNA 配列である、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか 1 つの請求項記載のベクター。

7. 前記ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドンがアンバーコドンである、請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか 1 つの請求項記載のベクター。

8. 一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法であって、

(1) 請求項 1 ないし請求項 7 のいずれか 1 つの請求項記載のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示した 1 蛋白質提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から分泌された当該他の蛋白質又はその断片を含む培養上清を取得し、

(2) 培養上清中の当該他の蛋白質又はその断片を適切な担体に固定化し、

(3) 固定化された当該他の蛋白質又はその断片と、当該 1 蛋白質提示

型のファージ上に提示された当該一の蛋白質又はその断片とを反応させて、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片とを結合させ、

(4) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片との結合能を評価する；

上記の過程よりなる、一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法。

9. 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域の VH 断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域の VL 断片である、請求項 8 記載の方法。

10. 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域の VL 断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域の VH 断片である、請求項 8 記載の方法。

11. 前記ベクターが大腸菌のファージベクター又はファージミドベクターである、請求項 8 ないし請求項 10 のいずれか 1 つの請求項記載の方法。

12. 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pIX 蛋白質をコードする DNA 配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pVI I 蛋白質をコードする DNA 配列である、請求項 8 ないし請求項 11 のいずれか 1 つの請求項記載の方法。

13. 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pVII 蛋白質をコードする DNA 配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に

提示するための蛋白質をコードする DNA 配列が繊維状ファージの pIX 蛋白質をコードする DNA 配列である、請求項 8 ないし請求項 11 のいずれか 1 つの請求項記載の方法。

14. 前記ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドンがアンバーコドンである、請求項 8 ないし請求項 13 のいずれか 1 つの請求項記載の方法。

15. 前記サプレッサー変異体宿主が、大腸菌アンバーサプレッサー株である、請求項 8 ないし請求項 14 のいずれか 1 つの請求項記載の方法。

16. 前記大腸菌アンバーサプレッサー株が大腸菌 TG1 株であり、かつ前記非サプレッサー株宿主が大腸菌 HB2151 株である、請求項 15 記載の方法。

17. 抗原が存在することにより VH 断片と VL 断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域を得るための方法であって、

(1) 請求項 2 記載のベクターを用いてサプレッサー変異体宿主の形質転換を行うことにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際には VH 断片と VL 断片の両者をそのファージ上に提示する、VH/VL 提示型のファージを取得し、

(2) 上記 (1) において取得された当該 VH/VL 提示型のファージと抗原との結合能を確認し、

(3) 上記 (2) において VH/VL 提示型のファージを提供することが確認された請求項 2 記載のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、あるいは上記 (1) において取得された VH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行うことにより、当該 VH 断片のみをその上に提示する VH 提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該

VL 断片を含む培養上清を取得し、

(4) 培養上清中の当該 VL 断片を適切な担体に固定化し、

(5) 抗原の存在下及び非存在下で、固定化された当該 VL 断片とファージ上に提示された当該 VH 断片を反応させ、

(6) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能を評価し；

(7) 抗原の存在下における当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能が、抗原の非存在下における当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能の 2 倍以上である場合に、抗原が存在することにより VH 断片と VL 断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域が得られたと判定する過程よりなる、上記方法。

18. 抗原が存在することにより VH 断片と VL 断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域を得るための方法であって、

(1) 請求項 3 のベクターを用いてサプレッサー変異体宿主の形質転換を行うことにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際には VH 断片と VL 断片の両者をそのファージ上に提示する、VH/VL 提示型のファージを取得し、

(2) 上記 (1) において取得された当該 VH/VL 提示型のファージと抗原との結合能を確認し、

(3) 上記 (2) において VH/VL 提示型のファージを提供することが確認された請求項 3 記載のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、あるいは上記 (1) において取得された VH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行うことにより、当該 VL 断片のみをその上に提示する VL 提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該

VH 断片を含む培養上清を取得し、

(4) 培養上清中の当該 VH 断片を適切な担体に固定化し、

(5) 抗原の存在下及び非存在下で、固定化された当該 VH 断片とファージ上に提示された当該 VL 断片を反応させ、

(6) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能を評価し、

(7) 抗原の存在下における当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能が、抗原の非存在下における当該 VH 断片と当該 VL 断片の間の結合能の2倍以上である場合に、抗原が存在することにより VH 断片と VL 断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域が得られたと判定する過程よりなる、上記方法。

19. 抗体可変領域の VL 断片を得る方法であって、

(1) 請求項2記載のベクターを用いて非サプレッサー宿主の形質転換を行うか、あるいは当該ベクターを有する VH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行い、

(2) 当該非サプレッサー株宿主から当該 VL 断片を培養上清に分泌させ、

(3) 当該培養上清から当該 VL 断片を精製する、

上記過程よりなる、抗体可変領域の VL 断片を得る方法。

20. 抗体可変領域の VH 断片を得る方法であって、

(1) 請求項3記載のベクターを用いて非サプレッサー宿主の形質転換を行うか、あるいは当該ベクターを有する VH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行い、

(2) 当該非サプレッサー株宿主から当該 VH 断片を培養上清に分泌させ、

(3) 当該培養上清から当該 VH 断片を精製する、
上記過程よりなる、抗体可変領域の VH 断片を得る方法。

FIG. 1

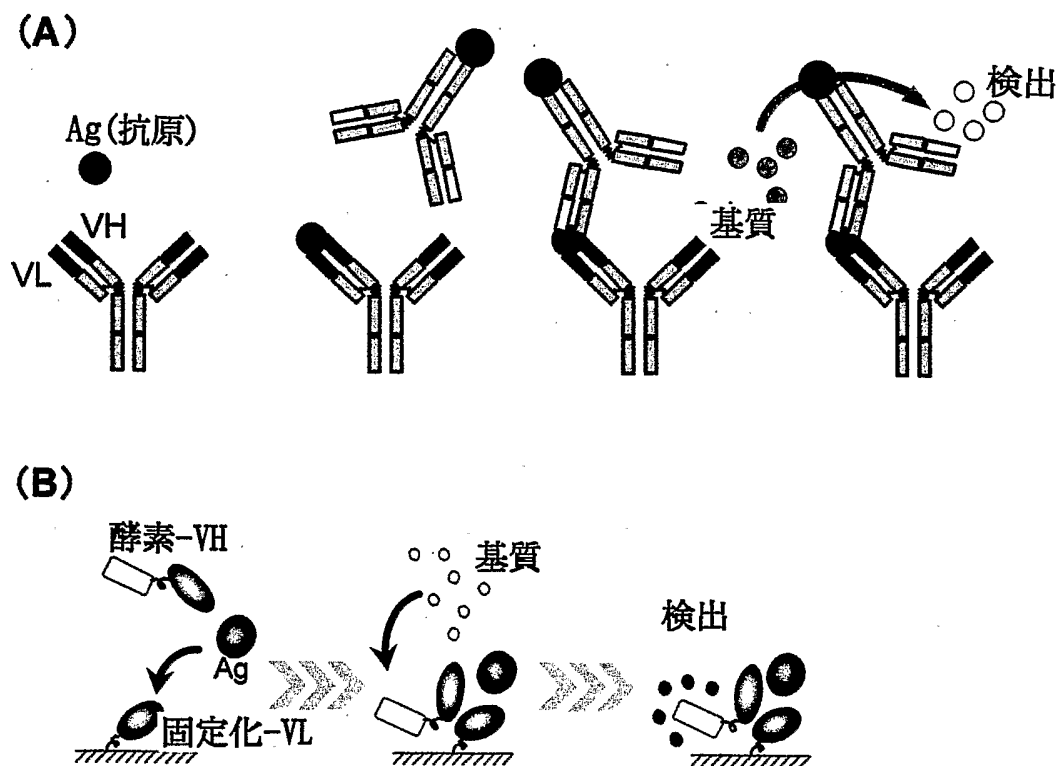


FIG. 2

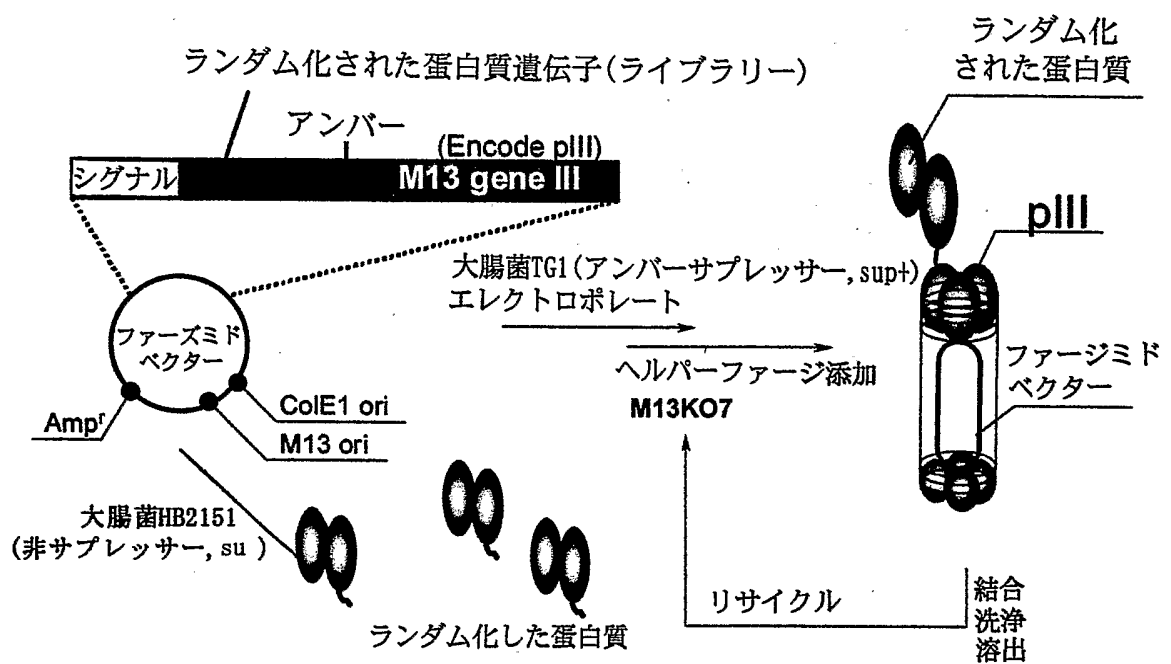


FIG. 3

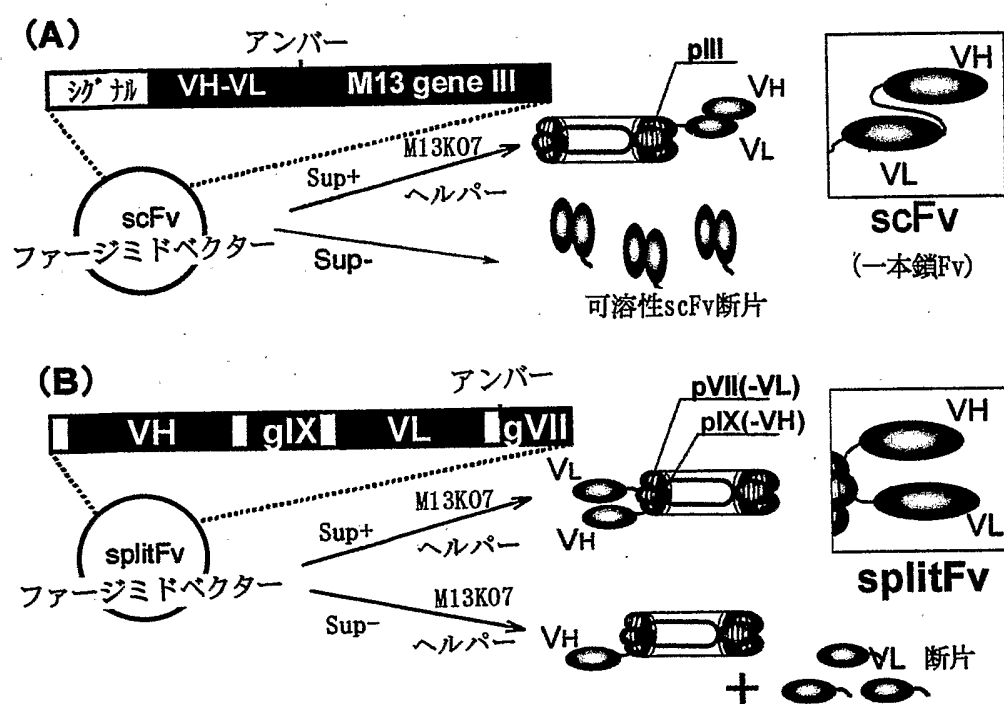


FIG. 4

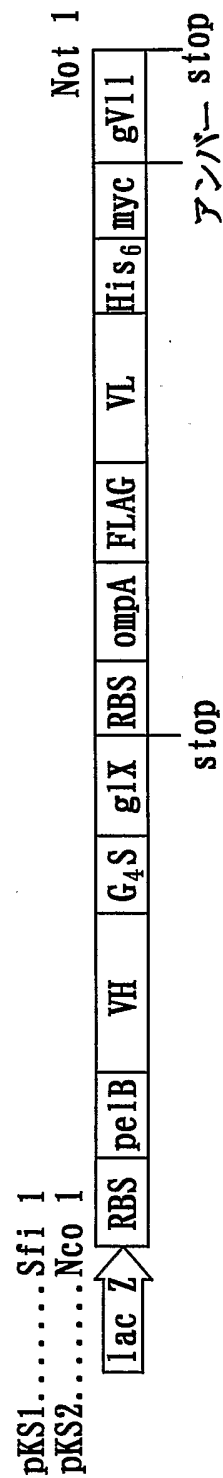


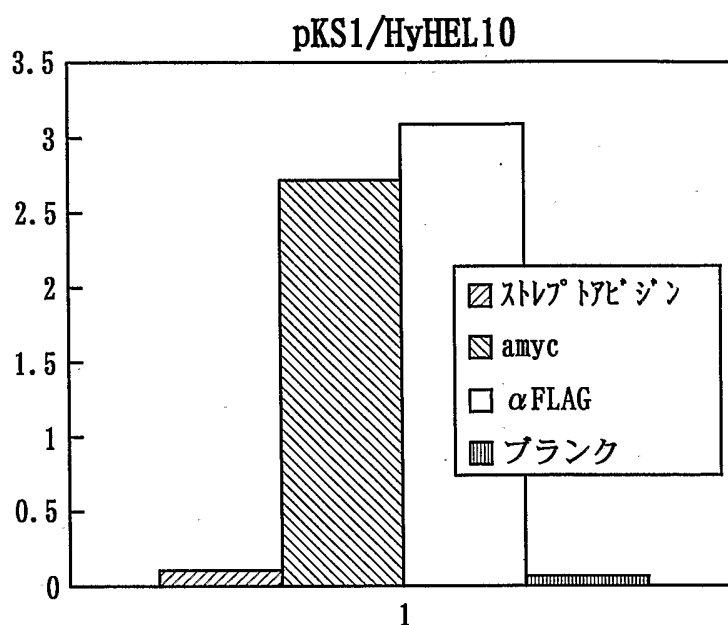
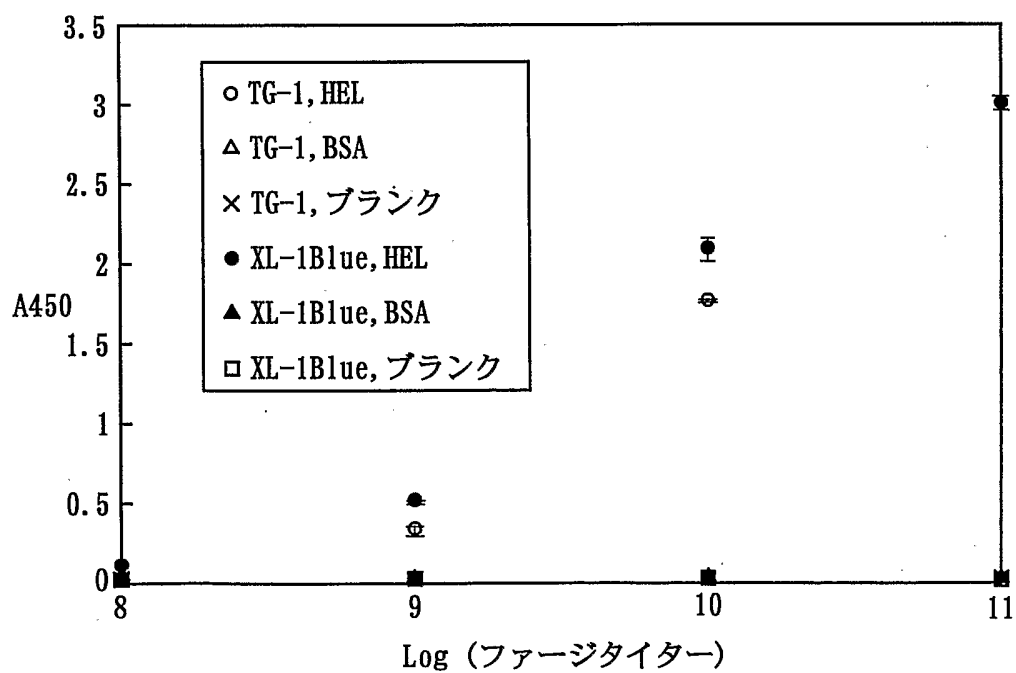
FIG. 5**FIG. 6**

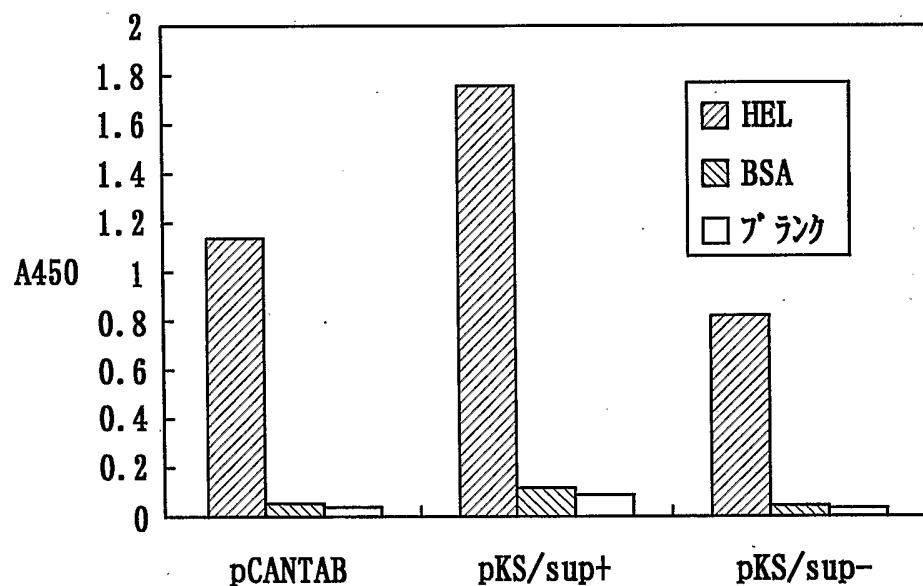
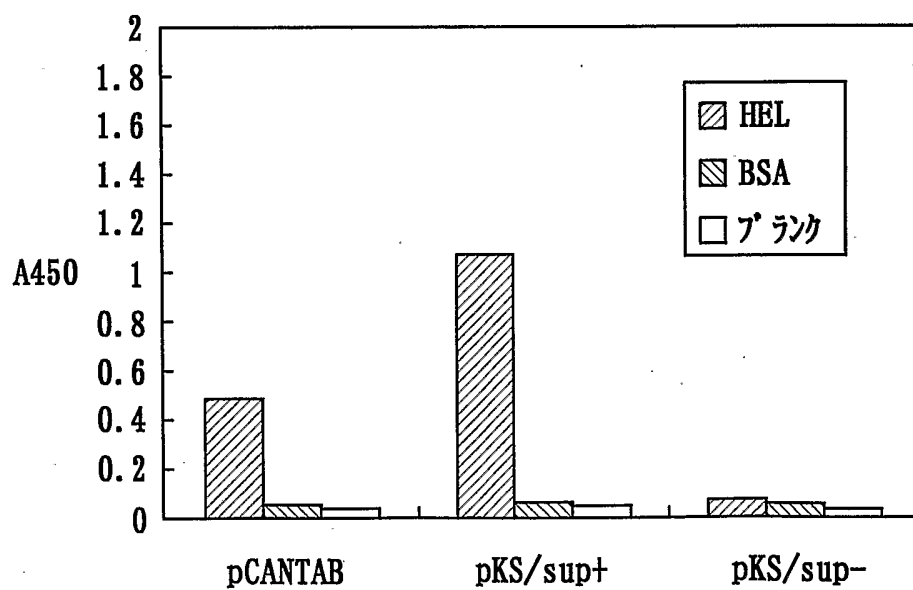
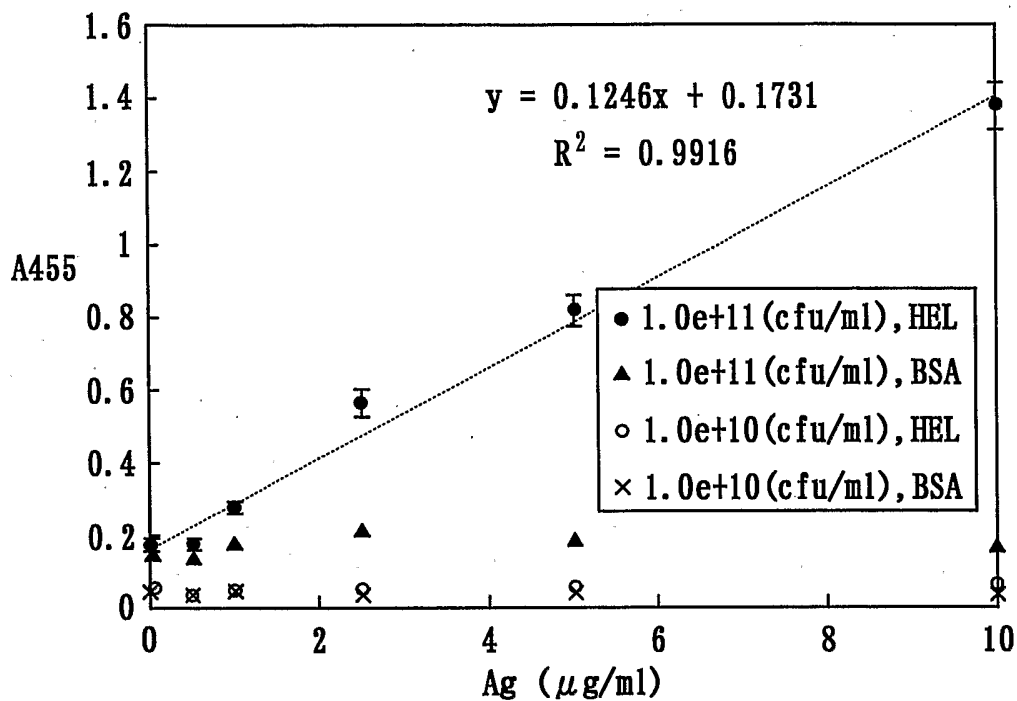
FIG. 7*FIG. 8*

FIG. 9

(A)



(B)

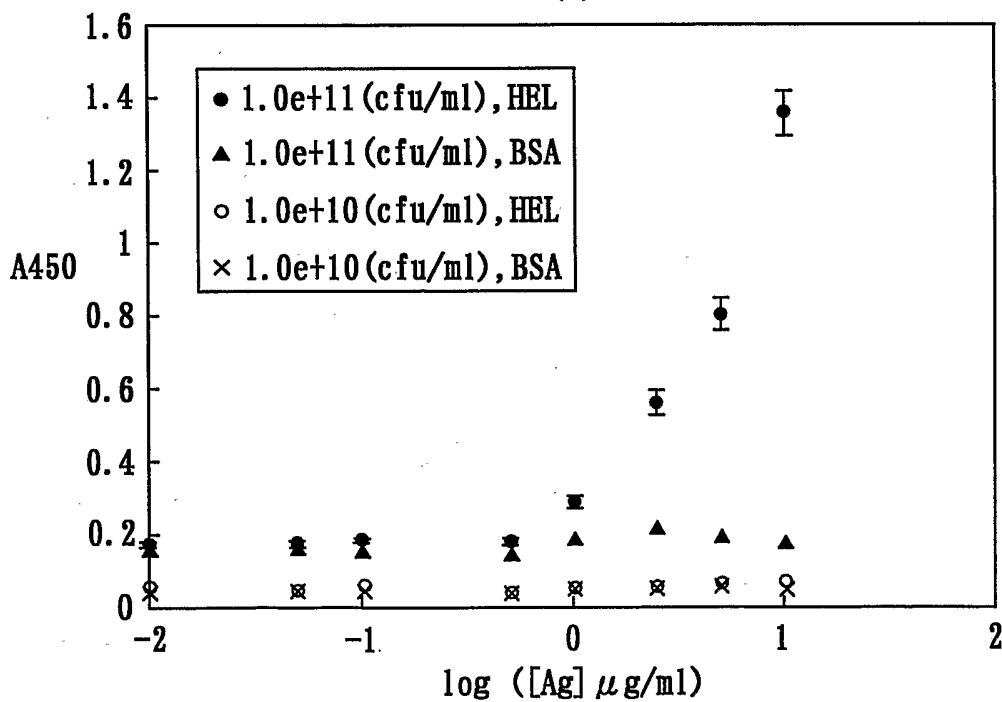


FIG. 10

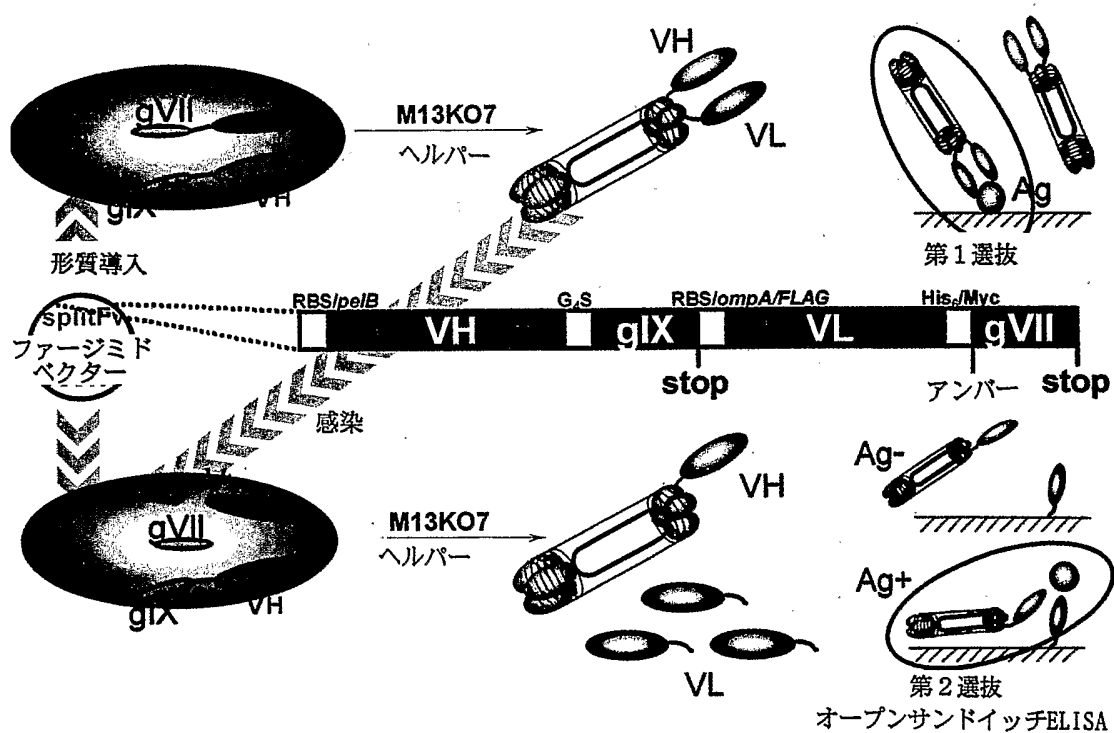


FIG. 11

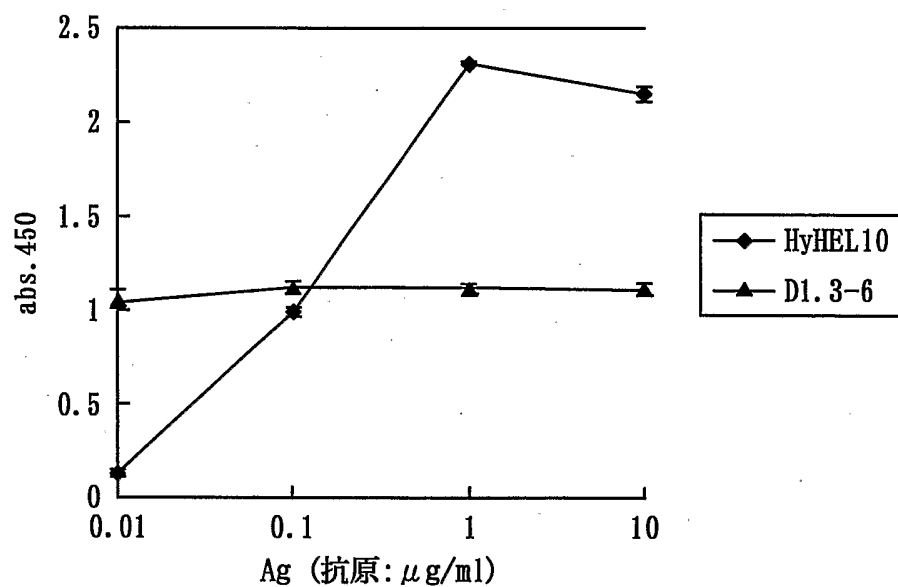


FIG. 12

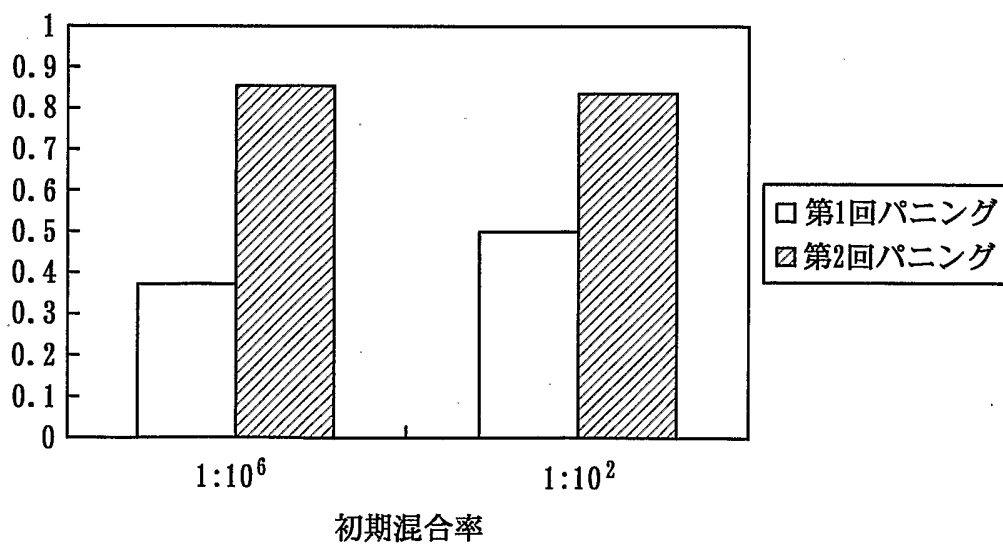


FIG. 13

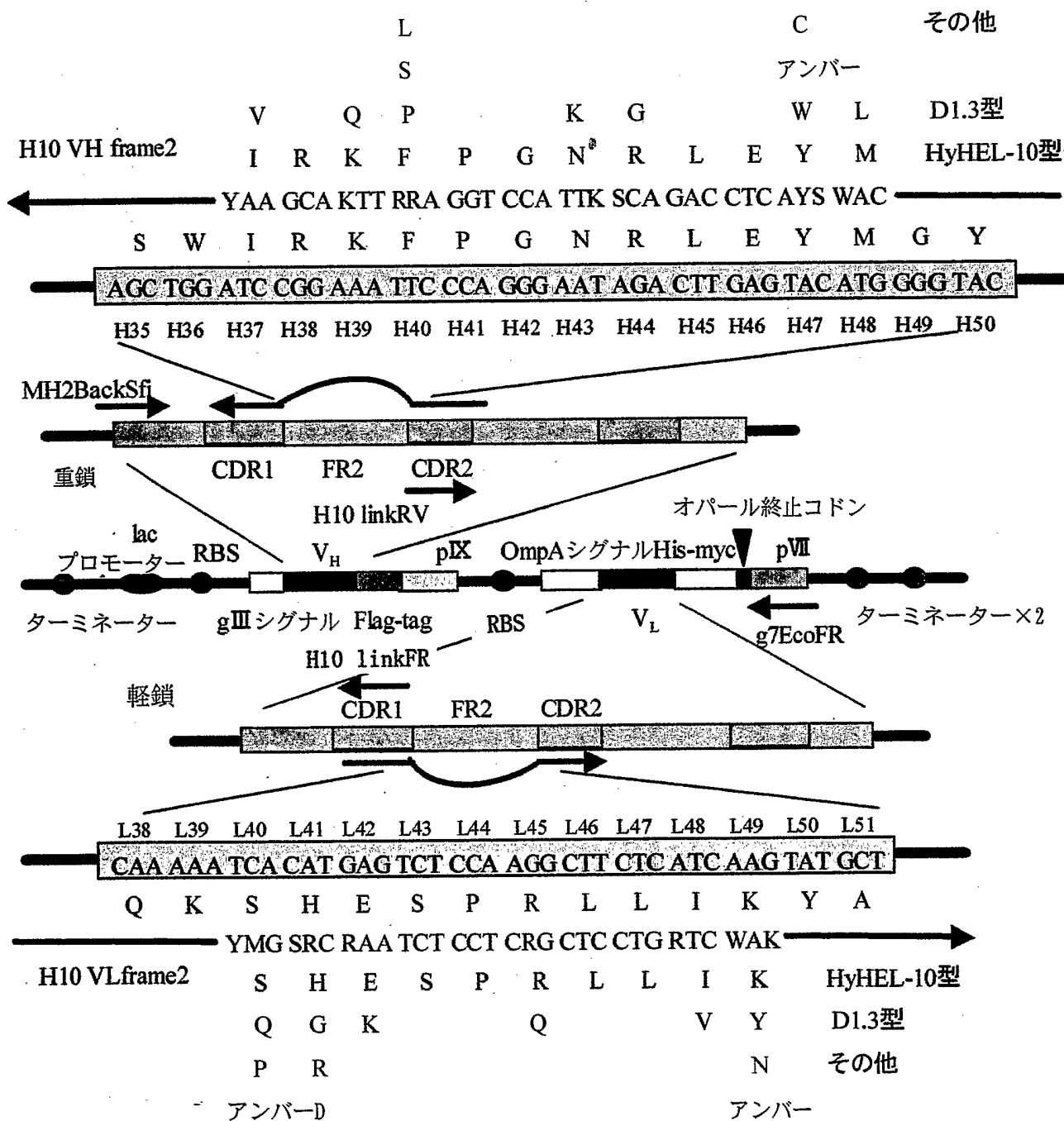


FIG. 14

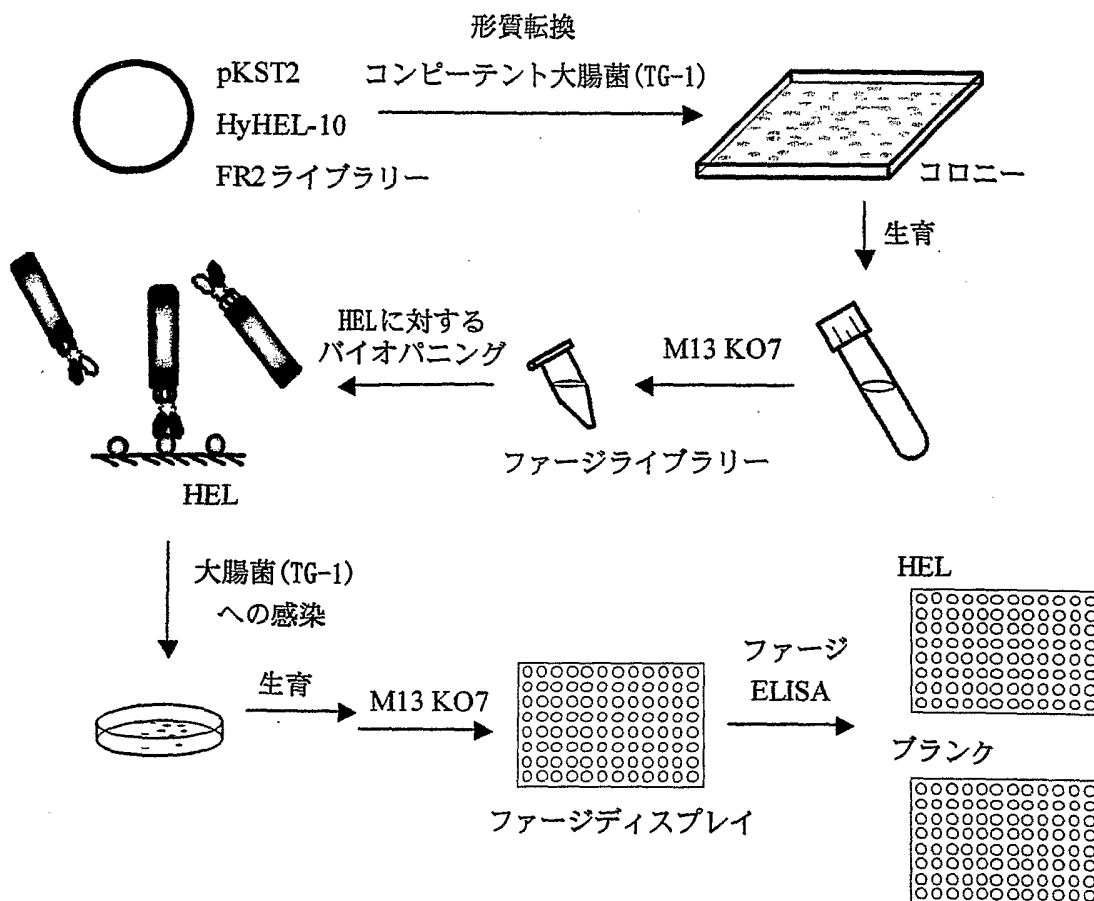


FIG. 15

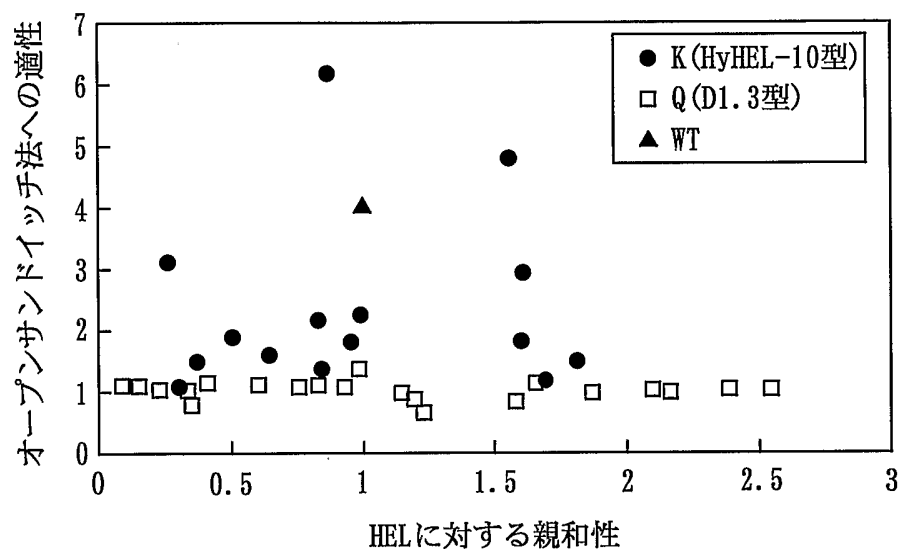
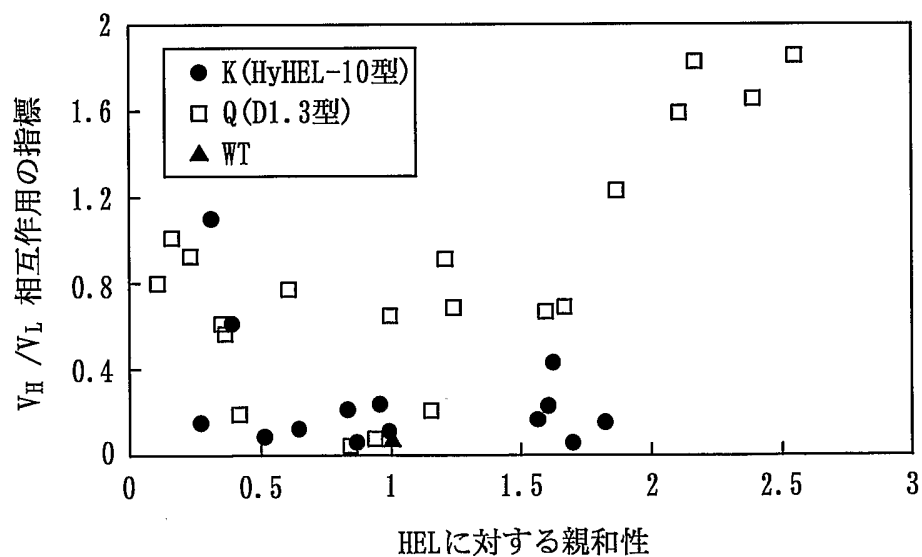


FIG. 16



SEQUENCE LISTING

<110> Japan as represented by president of Tokyo university

<120> A method to determine interaction between plural proteins

<160> 26

<210> 1

<211> 4301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of phagemid vector pKS1-HyHel10

<400>

```

AGCTTTGGAG CCTTTTTTTT GGAGATTTTC AACGTGAAAA AATTATTATT CGCAATTCCT   60
TTAGTTGTTC CTTTCTATTC TCACAGTGCA CAGGTCCAAC CGGCCATGGC CGAGGTGCAG  120
CTGCAGGAGT CAGGACCTAG CCTCGTGAAA CCTTCTCAGA CTCTGTCCCT CACCTGTTCT  180
GTCACTGGCG ACTCCATCAC CAGTGATTAT TGGAGCTGGA TCCGGAAATT CCCAGGGAAT  240
AGACTTGAGT ACATGGGGTA CGTAAGCTAC AGTGGTAGCA CGTACTACAA TCCATCTCTC  300
AAAAGTCGAA TCTCCATCAC TCGAGACACA TCCAAGAATC AGTACTATCT GGACCTGAAT  360
TCTGTGACTA CTGAGGACAC AGCCACATAT TACTGTGCAA ACTGGGACGG TGATTACTGG  420
GGCCAAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCGAGC GGTGGAGGCG GTTCAATGAG TGTTTTAGTG  480
TATTCCTTCG CCTCTTTCGT TTTAGGTTGG TGCCTTCGTA GTGGCATTAC GTATTTTACC  540
CGTTTAATGG AAACCTCCTC ATGATCTAGA AGGAGATATC ATATGAAAAA GACAGCTATC  600
GCGATTGCAG TGGCACTGGC TGGTTTCGCT ACCGTTGCGC AAGCTGACTA CAAGGACGAC  660
GATGACAAAA GTGCACAGTC GACGGACATT GAGCTACCC AGTCTCCAGC CACCTGTCT  720
GTGACTCCAG GAAATAGCGT CAGTCTTTCC TGCAGGGCCA GCCAAAGTAT TGGCAACAAC  780
CTACACTGGT ATCAACAAAA ATCACATGAG TCTCCAAGGC TTCTCATCAA GTATGCTTCC  840
CAGTCCATCT CTGGGATCCC CTCCAGGTTC AGTGGCAGTG GATCAGGGAC AGATTTCACT  900
CTCAGTATCA ACAGTGTGGA GACTGAAGAT TTTGGAATGT ATTTCTGTCA ACAGAGTAAC  960
AGCTGGCCGT ACACGTTTCG AGGGGGGACC AAGCTGGAAA TCAAACGGGC GGCCGCACAT 1020
CATCATCACC ATCACGGGGC CGCAGAACAA AAACCTATCT CAGAAGAGGA TCTGAATGGG 1080
GCCGCATAGG TACCGCAGGT CGCGGATTTT GACACAATTT ATCAGGCGAT GATACAAATC 1140
TCCGTTGTAC TTTGTTTCGC GCTTGGTATA ATCGCTGGGG GTCAAAGATG AGAATTCACT 1200
GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT 1260
TGCAGCACAT CCCCCTTTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC 1320
TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC 1380

```

GCATCTGTGC GGTATTTTCAC ACCGCATATA AATTGTAAAC GTTAATATTT TGTAAAAATT 1440
CGCGTTAAAT TTTTGTAAAT TCAGCTCATT TTTTAACCAA TAGGCCGAAA TCGGCAAAAT 1500
CCCTTATAAA TCAAAAGAAT AGCCCGAGAT AGGGTTGAGT GTTGTTCAG TTTGGAACAA 1560
GAGTCCACTA TTAAAGAACG TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG 1620
CGATGGCCCA CTACGTGAAC CATCACCCAA ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA GGTGCCGTAA 1680
AGCACTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG GAAAGCCGGC 1740
GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG 1800
TG TAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC ACCCGCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG 1860
CGCGTACTAT GGTGTGCTTTG ACGGGTGCAC TCTCAGTACA ATCTGCTCTG ATGCCGCATA 1920
GTTAAGCCAG CCCCAGACAC CGCCAACACC CGCTGACGCG CCCTGACGGG CTTGTCTGCT 1980
CCCGGCATCC GCTTACAGAC AAGCTGTGAC CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTCAGAGGTT 2040
TTCACCGTCA TCACCGAAAC GCGCGAGACG AAAGGGCCTC GTGATACGCC TATTTTTTATA 2100
GGTTAATGTC ATGATAATAA TGGTTTCTTA GACGTCAGGT GGCACTTTTT GGGGAAATGT 2160
GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG 2220
ACAATAACCC TGATAAATGC TTCAATAATA TTGAAAAAGG AAGAGTATGA GTATTCAACA 2280
TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CCTTTTTTGC GGCATTTTGC CTTCTGTGTT TTGCTCACCC 2340
AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG TGGGTTACAT 2400
CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT CGCCCCGAAG AACGTTTTTCC 2460
AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG TGGCGCGGTA TTATCCCGTA TTGACGCCGG 2520
GCAAGAGCAA CTCGGTCGCC GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGGTTG AGTACTCACC 2580
AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTATGCA GTGCTGCCAT 2640
AACCATGAGT GATAACACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG GACCGAAGGA 2700
GCTAACCGCT TTTTTCACAA ACATGGGGGA TCATGTAAC TCGCCTTGATC GTTGGGAACC 2760
GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA GCGTGACACC ACGATGCCTG TAGCAATGGC 2820
AACAACGTTG CGCAAACTAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC GGCAACAATT 2880
AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCTTCCGGC 2940
TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTTG 3000
AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACACGA CGGGGAGTCA 3060
GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCTCAC TGATTAAGCA 3120
TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA AACTTCATTT 3180
TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA AAATCCCTTA 3240
ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG GATCTTCTTG 3300
AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC 3360
GGTGGTTTGT TTGCCGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG 3420

CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTCCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA 3480
 GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACCTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC 3540
 CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA CGATAGTTAC CGGATAAGGC 3600
 GCAGCGGTCTG GGCTGAACGG GGGGTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGGAGC GAACGACCTA 3660
 CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCA TTGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG 3720
 AAAGGCGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCGGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT 3780
 TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTTATAG TCCTGTCGGG TTTCGCCACC TCTGACTTGA 3840
 GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG CCAGCAACGC 3900
 GGCCTTTTTTA CGGTTCTTGG CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCTTGCGTT 3960
 ATCCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA CCGCTCGCCG 4020
 CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCCAATACG 4080
 CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCACG ACAGGTTTCC 4140
 CGACTGGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC 4200
 ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA 4260
 ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA TGATTACGCC A 4301

<210> 2

<211> 4294

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of phagemid vector pKS2-HyHel10

<400>

AGCTTGCAATG CAAATTCTAT TTCAAGGAGA CAGTCATAAT GAAATACCTA TTGCCTACGG 60
 CAGCCGCTGG ATTGTTATTA CTCGCGGCCC AGCCGGCCAT GGCCGAGGTG CAGCTGCAGG 120
 AGTCAGGACC TAGCCTCGTG AAACCTTCTC AGACTCTGTC CCTCACCTGT TCTGTCACTG 180
 GCGACTCCAT CACCAGTGAT TATTGGAGCT GGATCCGGAA ATTCCCAGGG AATAGACTTG 240
 AGTACATGGG GTACGTAAGC TACAGTGGTA GCACGTACTA CAATCCATCT CTCAAAAGTC 300
 GAATCTCCAT CACTCGAGAC ACATCCAAGA ATCAGTACTA TCTGGACCTG AATTCTGTGA 360
 CTACTGAGGA CACAGCCACA TATTACTGTG CAAACTGGGA CCGTGATTAC TGGGGCCAAG 420
 GGACCACGGT CACCGTCTCG AGCGGTGGAG GCGGTTCAAT GAGTGTTTTA GTGTATTCTT 480
 TCGCCTCTTT CGTTTTAGGT TGGTGCCTTC GTAGTGGCAT TACGTATTTT ACCCGTTTAA 540
 TGGAAACTTC CTCATGATCT AGAAGGAGAT ATCATATGAA AAAGACAGCT ATCGCGATTG 600
 CAGTGGCACT GGCTGGTTTT GCTACCGTTG CGCAAGCTGA CTACAAGGAC GACGATGACA 660

AAAGTGCACA GTCGACGGAC ATTGAGCTCA CCCAGTCTCC AGCCACCCTG TCTGTGACTC 720
 CAGGAAATAG CGTCAGTCTT TCCTGCAGGG CCAGCCAAAG TATTGGCAAC AACCTACACT 780
 GGTATCAACA AAAATCACAT GAGTCTCCAA GGCTTCTCAT CAAGTATGCT TCCCAGTCCA 840
 TCTCTGGGAT CCCCTCCAGG TTCAGTGGCA GTGGATCAGG GACAGATTTT ACTCTCAGTA 900
 TCAACAGTGT GGAGACTGAA GATTTTGGAA TGTATTTCTG TCAACAGAGT AACAGCTGGC 960
 CGTACACGTT CGGAGGGGGG ACCAAGCTGG AAATCAAACG GGCGGCCGCA CATCATCATC 1020
 ACCATCACGG GGCCGCAGAA CAAAACTCA TCTCAGAAGA GGATCTGAAT GGGGCCGCAT 1080
 AGGTACCGCA GGTCGCGGAT TTCGACACAA TTTATCAGGC GATGATACAA ATCTCCGTTG 1140
 TACTTTGTTT CGCGCTTGGT ATAATCGCTG GGGGTCAAAG ATGAGAATTC ACTGGCCGTC 1200
 GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCTT GCGTTACCC AACTTAATCG CCTTGCAGCA 1260
 CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCC GCACCGATCG CCTTCCCAA 1320
 CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGCGC CTGATGCGGT ATTTTCTCCT TACGCATCTG 1380
 TGCGGTATTT CACACCGCAT ATAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTAAA ATTGCGGTTA 1440
 AATTTTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT 1500
 AAATCAAAAG AATAGCCCGA GATAGGGTTG AGTGTTGTTT CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA 1560
 CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC 1620
 CCACTACGTG AACCATCACC CAAATCAAGT TTTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA 1680
 AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GGCGAACGTG 1740
 GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG 1800
 GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTAC 1860
 TATGGTTGCT TTGACGGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC 1920
 CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA 1980
 TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG 2040
 TCATCACCGA AACGCGCGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT 2100
 GTCATGATAA TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA 2160
 ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA 2220
 CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT 2280
 GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TGCGGCATTT TGCTTCCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG 2340
 CTGGTGAAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG 2400
 GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG 2460
 AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG 2520
 CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA 2580
 GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG 2640
 AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC 2700

GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG 2760
 AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG 2820
 TTGCGCAAAC TATTAAGTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC 2880
 TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG 2940
 TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG 3000
 GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT 3060
 ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA 3120
 CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTTAATTT 3180
 AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG 3240
 TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT 3300
 TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT 3360
 TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG 3420
 CAGATACCAA ATACTGTCTT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT 3480
 GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC 3540
 GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG 3600
 TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA 3660
 CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG 3720
 GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG 3780
 GGAAACGCC TGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA 3840
 TTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT 3900
 TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC GTTATCCCCCT 3960
 GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCCGA 4020
 ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCCAAT ACGCAAACCG 4080
 CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCAATTA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG 4140
 AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAT GTGAGTTAGC TCACTCATTA GGCACCCAG 4200
 GCTTTACACT TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT 4260
 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCA 4294

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for ompA secretion signal sequence and FLAG tag sequence (Back:omp

XbaRV)

<400>

CGGGGTCGAC TGTGCACTTT TGTCATCGTC GTCCTTGTAG

40

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for ompA secretion signal sequence and FLAG tag sequence (Forward: ompApaSalFR)

<400>

CGGGGTCGAC TGTGCACTTT TGTCATCGTC GTCCTTGTAG

40

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for KpnI site of gene VII (Back: g7KpnRV)

<400>

CGGGGGTACC GCAGGTCGCG GATTTTCGAC

29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for EcoRI site of gene VII (Forward: g7EcoFR)

<400>

CGGGGAATTC TCATCTTTGA CCCCCAGCG

29

<210> 7

<211> 50

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer for XhoI site of gene IX (Back: g9XhoRV)	
<400>	
CGGGCTCGAG CGGTGGAGGC GGTTC AATGA GTGTTTTAGT GTATTCTTTC	50
<210> 8	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer for XbaI site of gene IX (Forward: g9XbaFR)	
<400>	
CGGGTCTAGA TCATGAGGAA GTTTC CATTA AAC	33
<210> 9	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer for split Fv linker (Back:LinkBackX)	
<400>	
GGGACCACGG TCACCGTCTC GAGCGGTGGA GGC GGTTCAA TG	42
<210> 10	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer for split Fv linker (Forward: LinkFor)	
<400>	
AGACTGGGTG AGCTCAATGT CCGTCGACTG TGCACTTTTG TC	42

<210> 11
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for LacZ (Back: M13RV)
<400>
CAGGAAACAG CTATGAC 17

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for mouse VH (Forward: VH1For2X)
<400>
GACGGTGACC GTGGTCCCTT GGCCCC 26

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for mouse VL (Back: V κ 2Back)
<400>
GACATTGAGC TCACCCAGTC TCCA 24

<210> 14
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for M13 gene III (Forward: ReverseSEQ)
<400>

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MycAKpnFor

<400>

CCGGGTACCT ATGCGGCCCC ATTCAGATC 29

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP1)

<400>

AGCGGTACCC GATAAAGCG GCTTCCTGAC 30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP2)

<400>

AGGAGGCCGT TTTGTTTTGC AGCCACCTC 30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP3)

<400>

GCTGAGGTGG GCTGCAAAAC AAAACGGCCT

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP4)

<400>

CCTGTCAGGA AGCCGCTTTT ATCGGGTACC

30

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP7)

<400>

AATTGGTACC CGATAAAAGC GGCTTCCTGA C

31

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP8)

<400>

AATTGAGGTG GGCTGCAAAA CAAAACGGCC T

31

<210> 22

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> K=G or T, M=A or C, R=A or G, Y=C or T, S=C or G, W=A or T

<223> Forward primer for FR2 of V_H (H10VHframe2)

<400>

ACCACTGTAG CTTACGTACC CCAWSYACTC CAGACSKTTA CCTGGARRTT KACGAAYCCA
GCTCCAATAA TCACTGGT 78

<210> 23

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> K=G or T, M=A or C, R=A or G, Y=C or T, S=C or G, W=A or T

<223> Reverse primer for FR2 of V_L (H10VLframe2)

<400>

GGCAACAACC TACTACTGGTA TCAACAAAAA YMGSRCRAAT CTCCTCRGCT CCTGRTCWAK
TATGCTTCCC AGTCCATCTC T 81

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for linker (H10linkRV)

<400>

GGGTACGTAA GCTACAGTG

19

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for linker (H10linkFR)

<400>

GATACCAGTG TAGGTTG

17

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer complimentary for OmpA signal sequence (OmpARV)

<400>

ACAGCTATCG CGATTGCAGT G

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/70, C12Q1/02, G01N33/53

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)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/70, C12Q1/02, G01N33/53

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)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UEDA, H. et al., Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region, Nat.Biotechnol., 1996, Vol.14, No.13, pages 1714 to 1718	1-20
A	TSUMOTO, K. et al., Novel selection method for engineered antibodies using the mechanism of Fv fragment stabilization in the presence of antigen, Protein Eng, 1997, Vol.10, No.11, pp.1311-8	1-20
A	WO 00/71694 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE), 30 November, 2000 (30.11.00), & AU 200052900 A & EP 1185636 A1 & US 6472147 B1	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 September, 2003 (09.09.03)	Date of mailing of the international search report 24 September, 2003 (24.09.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10386

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUZUKI, C. et al., Open sandwich ELISA with V(H)-/V(L)-alkaline phosphatase fusion proteins, J.Immunol.Methods, 1999, Vol.224, Nos.1 to 2, pages 171 to 184	1-20
A	LUCIC, M.R. et al., Secretion in Escherichia coli and phagedisplay of recombinant insulin-like growth factor binding protein-2, J.Biotechnol., 1998, Vol.61, No.2, pages 95 to 108	1-20
A	Hiroshi UEDA et al., 'Arata na Men'eki Sokuteiho', 'Gene & Medicine', 1999, Vol.3, No.1, pages 170 to 175	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁷ C12N15/09, C12N15/70, C12Q1/02, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁷ C12N15/09, C12N15/70, C12Q1/02, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	UEDA, H. et al., Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region, Nat Biotechnol, 1996, Vol.14, No.13, pp.1714-1718	1-20
A	TSUMOTO, K. et al., Novel selection method for engineered antibodies using the mechanism of Fv fragment stabilization in the presence of antigen, Protein Eng, 1997, Vol.10, No.11, pp.1311-8.	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
09.09.03

国際調査報告の発送日
24.09.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
七條 里美



4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/71694 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 2000. 11. 30 & AU 200052900 A & EP 1185636 A1 & US 6472147 B1	1-20
A	SUZUKI, C. et al., Open sandwich ELISA with V(H)-/V(L)- alkaline phosphatase fusion proteins, J Immunol Methods, 1999, Vol. 224, No. 1-2, pp. 171-184	1-20
A	LUCIC, M. R. et al., Secretion in Escherichia coli and phage- display of recombinant insulin-like growth factor binding protein-2, J Biotechnol, 1998, Vol. 61, No. 2, pp. 95-108	1-20
A	上田宏他, 新たな免疫測定法, 遺伝子医学, 1999, Vol. 3, No. 1, pp. 170-175	1-20