(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-518362
(P2017-518362A)
(43)公表日　平成29年7月6日(2017.7.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C40B 40/02	(2006.01)	C40B	40/02		4B029
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B050
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B063
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	4B065
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 142 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-508772 (P2017-508772)
(86)(22)出願日　平成27年5月1日 (2015.5.1)
(85)翻訳文提出日　平成28年12月26日 (2016.12.26)
(86)国際出願番号　PCT/GB2015/051287
(87)国際公開番号　WO2015/166272
(87)国際公開日　平成27年11月5日 (2015.11.5)
(31)優先権主張番号　1407852.1
(32)優先日　平成26年5月2日 (2014.5.2)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(71)出願人　516327158
イオンタス　リミテッド
イギリス国，ケンブリッジシャー州　シービー２２　３エーティー，ケンブリッジ，バブラハム　リサーチ　キャンパス
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口　昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤　和彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】真核細胞において発現されるタンパク質変異体のライブラリーの調製、及び結合性分子の選択に向けた使用

(57)【要約】
本発明は、結合性分子（「結合体（ｂｉｎｄｅｒ）」）のレパートリーをコードする真核細胞ライブラリーの産生方法に関し、当該方法は、細胞ＤＮＡの標的切断に向けて部位特異的ヌクレアーゼを使用することで、内在性の細胞修復機構を介した結合体遺伝子の部位特異的組込みを増進する。産生される真核細胞集団に、結合体をコードする遺伝子のレパートリーが細胞ＤＮＡの所望の遺伝子座（例えば、ゲノム遺伝子座）へと組込まれることで、コードされる結合性分子の発現が可能であり、それによって、異なる結合体を発現する細胞集団を創出する。

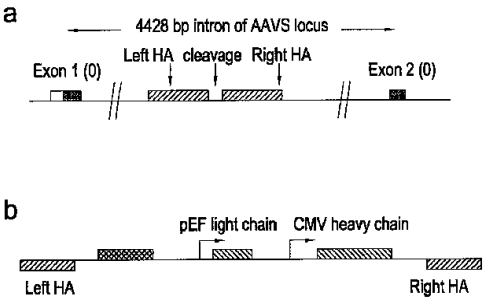


Fig. 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
多様な結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの産生方法であって、
前記結合体をコードするドナーＤＮＡ分子、及び真核細胞の提供と、
前記細胞への前記ドナーＤＮＡの導入、及び前記細胞内での部位特異的なヌクレアーゼの提供であって、前記ヌクレアーゼが細胞ＤＮＡの認識配列を切断することで、前記ドナーＤＮＡが前記細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、前記細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じ、それによって前記細胞ＤＮＡに組込まれたドナーＤＮＡを含む組換え細胞を創出する前記導入及び提供と、
クローン産生のための前記組換え細胞の培養と、
それによる、前記結合体レパートリーをコードするドナーＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの提供と、
を含む前記方法。
【請求項２】
前記結合体が、抗体分子である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記抗体分子が、全長免疫グロブリン、ＩｇＧ、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、またはｓｃＦｖである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記結合体が、少なくとも第１サブユニット及び第２サブユニットを含む多量体である、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項５】
多量体である結合体の多様なレパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの産生方法であって、それぞれの結合体が、第１サブユニット及び第２サブユニットを含み、前記方法が、
前記第１サブユニットをコードするＤＮＡを含む真核細胞の提供、及び前記第２結合体サブユニットをコードするドナーＤＮＡ分子の提供と、
前記細胞への前記ドナーＤＮＡの導入、及び前記細胞内での部位特異的ヌクレアーゼの提供であって、前記ヌクレアーゼが細胞ＤＮＡの認識配列を切断することで、前記ドナーＤＮＡが前記細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、前記細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じ、それによって、前記細胞ＤＮＡに組込まれたドナーＤＮＡを含む組換え細胞を創出する前記導入及び提供と、
前記多量体である結合体の前記第１サブユニット及び前記第２サブユニットをコードするＤＮＡを含むクローンを産生するための前記組換え細胞の培養と、
それによる、前記多量体である結合体のレパートリーをコードするドナーＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの提供と、
を含む前記方法。
【請求項６】
多量体である結合体の多様なレパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの産生方法であって、それぞれの結合体が、少なくとも第１サブユニット及び第２サブユニットを含み、前記方法が、
前記第１サブユニットをコードする第１ドナーＤＮＡ分子の提供、及び真核細胞の提供と、
前記細胞への前記第１ドナーＤＮＡの導入、及び前記細胞内での部位特異的ヌクレアーゼの提供であって、前記ヌクレアーゼが細胞ＤＮＡの認識配列を切断することで、前記ドナーＤＮＡが前記細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、前記細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じ、それによって、前記細胞ＤＮＡに組込まれた第１ドナーＤＮＡを含む、第１セットの組換え細胞を創出する前記導入及び提供と、

前記第１サブユニットをコードするＤＮＡを含む、第１セットのクローンを産生するための前記第１セットの組換え細胞の培養と、
前記第１セットのクローンの細胞への、前記第２サブユニットをコードする第２ドナーＤＮＡ分子を導入であって、前記第１セットのクローンの細胞ＤＮＡへと前記第２ドナーＤＮＡを組込み、それによって、前記細胞ＤＮＡへと組込まれた第１ドナーＤＮＡ及び第２ドナーＤＮＡを含む、第２セットの組換え細胞を創出する前記導入と、
第２セットのクローンを産生するための、第２セットの組換え細胞の培養であって、こうしたクローンが、前記多量体である結合体の前記第１サブユニット及び前記第２サブユニットをコードするＤＮＡを含む前記培養と、
それによる、前記多量体である結合体のレパートリーをコードするドナーＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの提供と、
を含む前記方法。
【請求項７】
前記細胞内での部位特異的ヌクレアーゼの提供であって、前記ヌクレアーゼが細胞ＤＮＡの認識配列を切断することで、前記ドナーＤＮＡが前記細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、前記細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じる前記提供を含む方法によって、前記第２ドナーＤＮＡ分子が組込まれる、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記結合体レパートリーが、共通構造を共有し、かつ１つまたは複数のアミノ酸配列多様性領域を有する複数のポリペプチドである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
前記結合体レパートリーが、１つまたは複数の相補性決定領域が異なる抗体分子のレパートリーである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
前記多量体である結合体が、別々のサブユニットとして、重鎖可変（ＶＨ）ドメインと、軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと、を含む抗体分子である、請求項３～９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記多量体である結合体が、全免疫グロブリンである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記多量体である結合体が、ＩｇＧである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記多量体である結合体が、Ｆａｂである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
前記第１サブユニットが、前記ＶＨドメインを含み、前記第２サブユニットが、前記ＶＬドメインを含む、請求項１０～１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
前記第１サブユニットが、前記ＶＬドメインを含み、前記第２サブユニットが、前記ＶＨドメインを含む、請求項１０～１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
前記抗体分子が、１つまたは複数の追加サブユニットをさらに含み、前記１つまたは複数の追加サブユニットが、前記第１サブユニットもしくは前記第２サブユニットと同一のドナーＤＮＡ上に導入され得るか、または前記細胞ＤＮＡの別々の部位に組込まれ得る、請求項１０～１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
前記細胞が、2×10^7 塩基対を超えるサイズのゲノムを有する高等真核細胞である、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
前記細胞が、哺乳類細胞、トリ細胞、昆虫細胞、または植物細胞である、先行請求項の

いずれかに記載の方法。
【請求項１９】
前記細胞が、哺乳類のものである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記細胞が、ＨＥＫ２９３細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、Ｔリンパ球系譜細胞もしくはＢリンパ球系譜細胞、または「Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ」もしくは「ＣＯＳＭＩＣ ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ ｓｏｍａｔｉｃ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ」に記載の細胞株のいずれかである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記細胞が、初代Ｔ細胞またはＴ細胞株である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記細胞が、初代Ｂ細胞、Ｂ細胞株、プレＢ細胞株、またはプロＢ細胞株である、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
前記細胞が、マウスプレＢ細胞株１６２４－５、ＩＬ－３依存性プロＢ細胞株Ｂａ／Ｆ３、またはニワトリＤＴ４０Ｂ細胞である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記認識配列が、前記細胞のゲノムＤＮＡに存在する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
前記認識配列が、前記細胞内のエピソームＤＮＡに存在する、請求項１～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記部位特異的ヌクレアーゼに向けた前記認識配列が、前記細胞ＤＮＡにおいて１回または２回のみ生じる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
前記部位特異的ヌクレアーゼが、細胞ＤＮＡを切断し、組込み部位として働く二本鎖切断を創出する、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
前記ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼである、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）である、請求項１～２７のいずれかに記載の方法。
【請求項３０】
前記ヌクレアーゼが、ＴＡＬＥヌクレアーゼである、請求項１～２７のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
前記ヌクレアーゼが、核酸によってガイドされるヌクレアーゼである、請求項１～２７のいずれかに記載の方法。
【請求項３２】
ＤＮＡ切断が、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムによって指示される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ドナーＤＮＡが、相同組換えによって前記細胞ＤＮＡへと組込まれる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３４】
前記ドナーＤＮＡが、非相同末端結合またはマイクロホモロジー指向型末端結合によって、前記ゲノムＤＮＡへと組込まれる、請求項１～３２のいずれかに記載の方法。
【請求項３５】

前記ドナーＤＮＡが、前記ドナーＤＮＡが組込まれた細胞の選択に向けた遺伝子要素を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞ＤＮＡへの前記ドナーＤＮＡの組込みが、前記細胞ＤＮＡ内に存在するプロモーター制御下での、前記結合体の発現及び／または遺伝子選択要素の発現を引き起こす、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項３７】
前記ドナーＤＮＡが、動作可能な形でプロモーターに連結された結合体をコードする配列を含む、請求項１～３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３８】
前記ライブラリーが、少なくとも、１００、10^3、10^4、10^5、または10^6個のクローンを含み、それぞれのクローンが、ドナーＤＮＡの組込みによって産生した個々の組換え細胞から得られる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項３９】
前記ライブラリーが、少なくとも１００、10^3、10^4、10^5、または10^6個の異なる結合体をコードする、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４０】
それぞれのクローンが、前記結合体レパートリーの１つまたは２つのメンバーのみをコードする組込みドナーＤＮＡを含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
前記真核細胞が、二倍体であり、前記細胞ＤＮＡにおける二重の固定遺伝子座に、前記部位特異的ヌクレアーゼに向けた認識配列を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４２】
それぞれのクローンが、前記結合体レパートリーの単一メンバーをコードする組込みドナーＤＮＡを含む、請求項１～３９のいずれかに記載の方法。
【請求項４３】
前記ドナーＤＮＡ分子のそれぞれが、単一の結合体または結合体サブユニットをコードする、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４４】
前記結合体が、前記細胞表面にディスプレイされる、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４５】
前記結合体が、前記細胞から分泌される、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４６】
前記結合体を発現させるための、前記ライブラリーの培養と、
関心結合体を発現する１つまたは複数のクローンの回収と、
前記１つまたは複数の回収クローンからの派生ライブラリーの生成であって、前記派生ライブラリーが、第２の結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む前記生成と、
をさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項４７】
前記派生ライブラリーの生成が、前記１つまたは複数の回収クローンからのドナーＤＮＡの単離と、第２の結合体レパートリーをコードするドナーＤＮＡ分子の派生集団を提供するための、前記ＤＮＡへの変異導入と、前記第２の結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む細胞の派生ライブラリーを創出するための、細胞へのドナーＤＮＡ分子の前記派生集団の導入と、を含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記派生ライブラリーの生成が、前記クローン内の前記ＤＮＡの変異導入による、前記１つまたは複数の回収クローンの前記ドナーＤＮＡへの変異導入を含む、請求項４６に記載の方法。

【請求項４９】
多様な結合体レパートリーの産生方法であって、請求項１～４８のいずれかに記載の方法によるライブラリー産生と、前記結合体を発現させるための、前記ライブラリー細胞の培養と、を含む前記産生方法。
【請求項５０】
所望の表現型の細胞の選別方法であって、前記表現型が、前記細胞による結合体の発現に起因し、前記選別方法が、
請求項１～４８のいずれかに記載の方法によるライブラリーの産生と、
前記結合体を発現させるための、前記ライブラリー細胞の培養と、
前記所望の表現型が示されているかどうかの検出と、
を含む前記選別方法。
【請求項５１】
前記表現型が、前記結合体を発現する細胞におけるレポーター遺伝子の発現である、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記所望の表現型を産生する結合体を発現するクローンの細胞の回収をさらに含む、請求項５０または請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記回収クローンからの、前記結合体をコードするＤＮＡの単離と、それによる前記所望の表現型を産生する結合体をコードするＤＮＡの取得と、をさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
標的を認識する結合体の選別方法であって、
請求項１～４８のいずれかに記載の方法によるライブラリーの産生と、
前記結合体を発現させるための、前記ライブラリーの細胞の培養と、
前記標的に対する前記結合体の曝露であって、存在するのであれば、１つまたは複数の同種結合体による前記標的の認識が可能になる前記曝露と、
前記標的が同種結合体によって認識されたかどうかの検出と、
を含む、前記選別方法。
【請求項５５】
前記標的が、可溶性形態において提供される、請求項５０または請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記標的が、標的細胞集団の表面でディスプレイされ、かつ前記結合体が、前記ライブラリー細胞の表面でディスプレイされ、前記方法が、前記ライブラリー細胞の、前記標的細胞への接触による、前記標的に対する前記結合体の曝露を含む、請求項５０または請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
前記結合体が、抗体分子であり、前記標的が、抗原である、請求項５０～５６のいずれかに記載の方法。
【請求項５８】
前記結合体が、ＴＣＲであり、前記標的が、ＭＨＣ：ペプチド複合体である、請求項５０～５６のいずれかに記載の方法。
【請求項５９】
同種結合体による標的認識の検出と、前記同種結合体をコードするＤＮＡを含むクローン細胞の回収と、をさらに含む、請求項５４～５８のいずれかに記載の方法。
【請求項６０】
前記回収クローンからの、前記結合体をコードするＤＮＡの単離と、それによる前記標的を認識する結合体をコードするＤＮＡの取得と、をさらに含む、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】
変異導入または前記ＤＮＡの、再構造化された結合体をコードする修飾ＤＮＡへの変換を含む、請求項５３または請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記結合体が、ｓｃＦｖであり、前記方法が、前記ｓｃＦｖをコードするＤＮＡの、Ｉｇまたはその断片をコードするＤＮＡへの変換であって、可変ＶＨ鎖及び可変ＶＬ鎖の元のペアが維持される前記変換を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
宿主細胞への、前記ＤＮＡの導入をさらに含む、請求項５３、６０、６１、または６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記細胞の培養と、細胞ペレットまたは濃縮細胞懸濁液の提供のための、前記細胞の濃縮と、をさらに含む、請求項５２、５９、または６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記結合体の発現のための前記細胞の培養と、前記結合体の精製と、をさらに含む、請求項５２、５９、または６３に記載の方法。
【請求項６６】
請求項１～４８のいずれかに記載の方法によって産生するライブラリー。
【請求項６７】
少なくとも10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、または10^9個の異なる結合体の多様なレパートリーを発現する真核細胞クローンの試験管内ライブラリーであって、それぞれの細胞が、組換えＤＮＡを含み、結合体または結合体のサブユニットをコードするドナーＤＮＡが、前記細胞ＤＮＡの少なくとも第１固定遺伝子座及び／または第２固定遺伝子座に組込まれている、前記ライブラリー。
【請求項６８】
前記クローンが、前記コードされる結合体を発現する細胞の選択に向けた遺伝子要素を含むＤＮＡも含む、請求項６７に記載のライブラリー。
【請求項６９】
前記結合体が、抗体分子である、請求項６７または請求項６８に記載のライブラリー。
【請求項７０】
前記抗体分子が、全長免疫グロブリン、ＩｇＧ、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、またはｓｃＦｖ－Ｆｃである、請求項６９に記載のライブラリー。
【請求項７１】
請求項６６～７０のいずれかに記載のライブラリーを含む真核細胞を含む容器。
【請求項７２】
前記ライブラリーが、前記容器において、前記真核細胞の少なくとも７５％、８０％、８５％、または９０％を構成する、請求項７１に記載の容器。
【請求項７３】
前記容器が、培養培地に懸濁された前記ライブラリーの細胞を含む細胞培養フラスコである、請求項７１または請求項７２に記載の容器。
【請求項７４】
前記ライブラリーを含む真核細胞のペレットまたは濃縮懸濁液を含む、請求項７１または請求項７２に記載の容器。
【請求項７５】
結合体のレパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞のライブラリー構築における、細胞ＤＮＡの標的切断に向けた部位特異的ヌクレアーゼの使用であって、ヌクレアーゼ媒介性ＤＮＡ切断が、内在性の細胞ＤＮＡ修復機構を介する結合体遺伝子の部位特異的組込みを増進する前記使用。
【請求項７６】

所望の標的に対する結合体の選択に向けたディスプレイライブラリーとしての、請求項６６～７０のいずれかに記載のライブラリーの使用。
【請求項７７】
所望の細胞表現型をディスプレイする細胞の選別であって、前記表現型が、細胞による結合体の発現に起因する前記選別に向けた、請求項６６～７０のいずれかに記載のライブラリーの使用。
【請求項７８】
単鎖抗体（ｓｃＦｖ）集団の、免疫グロブリン（Ｉｇ）形式または断片形式、抗原結合（Ｆａｂ）形式への変換方法であって、その結果、可変重（ＶＨ）鎖及び可変軽（ＶＬ）鎖の元のペアが維持される前記方法。
【請求項７９】
非複製「小環（ｍｉｎｉ－ｃｉｒｃｌｅ）」ＤＮＡを介して進行する、請求項７８に記載の、ｓｃＦｖからＩｇまたはＦａｂへの変換方法。
【請求項８０】
ＩｇまたはＦａｂのＤＮＡをコードするプラスミドを保有する細菌形質転換体の直接的な生成に向けた、Ｅ．ｃｏｌｉの単回の形質転換を必要とする、請求項７８に記載の、ｓｃＦｖからのＩｇまたはＦａｂへの変換方法。
【請求項８１】
モノクローナルクローンの再編成、オリゴクローナルクローンの再編成、またはポリクローナルクローンの再編成のいずれかに使用することができる、請求項７８～８０のいずれかに記載の、ｓｃＦｖからのＩｇまたはＦａｂへの変換方法。
【請求項８２】
ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイを含む、一般に使用されるディスプレイ技術のいずれかに由来する全体アウトプット集団の「一斉（ｅｎ ｍａｓｓｅ）」変換に使用することができる、請求項７８～８０に記載の、ｓｃＦｖからのＩｇまたはＦａｂへの変換方法。
【請求項８３】
任意の２つの結合したＤＮＡ要素の、ベクターへの再編成を可能にする方法であって、前記ＤＮＡ要素が、別々のプロモーターの制御下にクローン化されるか、または代替の制御要素によって分離されるが、元のＤＮＡペアは維持される前記方法。
【請求項８４】
非複製「小環（ｍｉｎｉ－ｃｉｒｃｌｅ）」ＤＮＡを介して進行する、請求項８３に記載の、２つの結合したＤＮＡ要素の再編成方法。
【請求項８５】
別々のプロモーターの制御下であるか、または代替の制御要素によって分離されたＤＮＡ要素をコードするプラスミドを保有する細菌形質転換体の直接的な生成に向けた、Ｅ．ｃｏｌｉの単回の形質転換を必要とする、請求項８３に記載の、２つの結合したＤＮＡ要素の再編成方法。
【請求項８６】
モノクローナルクローンの再編成、オリゴクローナルクローンの再編成、またはポリクローナルクローンの再編成のいずれかに使用することができる、請求項８３～８５のいずれかに記載の、２つの結合したＤＮＡ要素の再編成方法。
【請求項８７】
ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはリボソームディスプレイを含む、一般に使用されるディスプレイ技術のいずれかに由来する全体アウトプット集団の「一斉（ｅｎ ｍａｓｓｅ）」変換に使用することができる、請求項８３～８５に記載の、２つの結合したＤＮＡ要素の再編成方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、抗体などの結合性分子の選別及び／または選択にむけた、真核（例えば、哺乳類）細胞ライブラリーの産生方法に関する。ライブラリーを使用することで、結合体の多様なレパートリーを含有及びディスプレイすることができ、標的分子に向けた特異性などの所望の特性を有する１つまたは複数の結合体を選択するための、結合体の選別が可能になる。本発明は、特に、所望の数のドナーＤＮＡ分子が、細胞における１つまたは複数の所望の遺伝子座に正確に組込まれた細胞ライブラリーを提供するための、結合体をコードするドナーＤＮＡの、真核細胞への導入方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

タンパク質工学の手法によって、関連分子（例えば、抗体、タンパク質、ペプチド）の広く多様な集団の創出が可能であり、そこから結合特性または触媒特性が新規であるか、または改善した個々の変異体を単離することができる。それぞれの細胞が、個々の抗体、ペプチド、または操作されたタンパク質を発現する真核細胞、具体的には、哺乳類細胞の大集団を構築する能力があれば、所望の特性を有した結合体の同定において有する価値は大きいであろう。

【０００３】

ディスプレイ技術の基礎原理は、結合性分子の、その分子をコードする遺伝子情報への結びつきに依存するものである。結合性分子の結合特性を使用して、結合性分子をコードする遺伝子を単離する。根底に存在するこの同一原理は、すべての形態のディスプレイ技術に適用されており、当該ディスプレイ技術には、バクテリオファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、バキュロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、酵母ディスプレイ、及び哺乳類細胞などの高等真核生物上でのディスプレイが含まれる［１、２、３、４］。

【０００４】

ディスプレイ技術は、糸状バクテリオファージ上での抗体ディスプレイ（抗体ファージディスプレイ）によって例示されており、過去２４年間にわたって、ヒト治療抗体の生成を含む、新規結合性分子の発見及び操作に向けた重要なツールを提供してきた。ファージディスプレイを使用し、抗体または抗体断片をコードする遺伝子をインフレームに、ファージ被覆タンパク質をコードする遺伝子と共にクローン化することによって、抗体分子が糸状バクテリオファージの粒子表面に提示される。抗体遺伝子は、最初は、Ｅ．ｃｏｌｉへとクローン化され、その結果、それぞれの細菌が単一抗体をコードする。標準法を使用して、細菌からバクテリオファージを生成させると、その表面に抗体断片をディスプレイするバクテリオファージ粒子を生成すると共に、コードしている抗体遺伝子がバクテリオファージ内に被包化される。細菌またはそれに由来するバクテリオファージの集合体（ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）は、「抗体ライブラリー」と称される。抗体ファージディスプレイを使用して、抗体を提示するバクテリオファージを標的関心分子に対して曝露することによって、集団内の抗体及びその関連遺伝子を濃縮することができる。

【０００５】

関心標的を認識する結合体をディスプレイするバクテリオファージの回収を可能にするために、標的分子は、選択用容器表面に固定化されているか、または二次試薬によって溶液から回収可能である必要があり、例えば、ビオチン化標的タンパク質の場合は、ストレプトアビジン被覆ビーズを使用して溶液から回収される。結合体をディスプレイするバクテリオファージのライブラリーは、標的分子と共にインキュベートされ、その後、未結合のファージは除去される。未結合のバクテリオファージを除去するために、これには、標的（及び関連バクテリオファージ）が結合しているマトリックスの洗浄を伴う。結合したバクテリオファージは、その関連抗体遺伝子を有しており、回収及び／または宿主細菌細胞へと感染させることができる。上に概要を記載した手法を使用することで、選択標的分子に結合可能なバクテリオファージクローンのサブセットを濃縮することが可能になる。ファージディスプレイライブラリーは、抗体多様性の豊富な供給源を提供することが示されており、単一標的に対して何百もの特有の抗体を提供するものである［５、６、７］。

【０００６】
歴史的に、新規の抗体結合特異性の単離に向けたディスプレイシステムは、原核生物システム、具体的には、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）のディスプレイに基づいてきており、バクテリオファージ上でのＦａｂとしてのディスプレイの程度は少ない。細菌表面での結合体のディスプレイについては、説明されてはいるが、広くは使用されておらず、応用は、ペプチドのディスプレイ、または免疫化を介して結合体に向けて事前濃縮された抗体断片のディスプレイ、に大部分が制限されている［８］。ファージディスプレイを含む、原核生物のディスプレイシステムは、能力を有しているにもかかわらず、制限が存在する。ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイによる選択の後に、細菌への選択遺伝子集団の導入、細菌集団の播種、コロニーの選定、上清またはペリプラズムへの結合性分子の発現、及び酵素結合免疫吸着測定法または蛍光結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）などの結合アッセイにおける陽性クローンの同定によって、個々の結合性分子をコードするが同定される。結合性分子は同定されるものの、この手法は、結果として得られるクローンの発現の程度及び結合親和性に関する情報を分離して与えるものではない。従って、何千もの結合体を生成させることは潜在的に可能ではあるものの、相対的な発現レベル及び親和性に関する一次情報が限定されることに加え、アウトプットを選別する能力は、コロニー選定、液体操作等が必要となることで限定されるものである。

【０００７】
真核細胞表面での結合性分子のディスプレイは、こうした問題のいくつかを克服する可能性を有している。フローサイトメトリーと併せることで、真核生物ディスプレイは、迅速かつハイスループットな選択を可能にするものである。その表面に異なる結合性分子を発現する数百万もの細胞クローンを調べることが可能となる。細胞表面ディスプレイは、ｓｃＦｖとして編成された抗体断片の、酵母細胞表面でのディスプレイで最もよく例示されてきた。酵母表面ディスプレイに向けて一般に使用される様式は、酵母凝集素タンパク質（Ａｇａ１ｐ及びＡｇａ２ｐ）を利用するものである。Ｃｈａｏら［９］によって説明されるように、ｓｃＦｖのレパートリーをコードする遺伝子は、酵母凝集素タンパク質Ａｇａ２ｐのサブユニットと遺伝子学的に融合している。そして、Ａｇａ２ｐサブユニットは、細胞壁に存在するＡｇａ１ｐサブユニットに、ジスルフィド結合を介して結合する。標的特異的結合性分子を発現する酵母細胞は、直接的または間接的に標識された標的分子を使用して、フローサイトメトリーによって同定することができる。例えば、細胞に対してビオチン化標的を添加でき、ストレプトアビジン－フィコエリトリンで細胞表面に対する結合を検出することができる。標的濃度を限定して使用することで、親和性が上昇した結合性分子を発現するクローンを集団内で区別することが可能になり、これは、こうしたクローンが、より多くの標的分子を捕捉し、それによって、より明るい蛍光を示すことになるためである。典型的には、それぞれの酵母細胞は、細胞表面に、単一ｓｃＦｖの１０，０００～１００，０００個のコピーをディスプレイすることになる。異なる細胞において、ｓｃＦｖの表面発現の多様性を制御するために、Ｃｈａｏらは、蛍光標識された抗タグ抗体を使用して、それぞれの細胞表面の抗体発現レベルを測定することで、発現レベルの多様性を標準化することを可能にした。したがって、この手法は、親和性が低下した抗体を高レベルで発現する細胞から、高親和性結合性分子をディスプレイしている酵母細胞を区別することを可能にするものである。したがって、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）を使用することで、コードされる結合性分子の親和性及び／または発現レベルによる細胞クローンの分離が可能である。

【０００８】
原核生物システムと比較して、真核生物システムは、複数鎖の抗体断片のディスプレイに、より有効であることも証明されており、具体的には、完全ＩｇＧ、ＦＡｂ、またはｓｃＦｖとＦｃドメインとの融合体（ｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体）などの、より大きな断片に関して有効である。上記のような、酵母細胞に向けた、ビーズに基づく方法または流動選別に基づく方法を使用して、哺乳類細胞などの高等真核生物に基づくディスプレイライブラリーから抗体を選択することもできる。哺乳類細胞において、ディスプレイライブラリー

の編成し、ＩｇＧ、Ｆａｂ、またはｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体として直接的に選択する能力があれば、酵母ディスプレイに勝るさらなる有意性があるであろう。細菌細胞及び酵母細胞のグリコシル化、発現、及び分泌の機構は、高等真核生物とは異なっており、これによって、哺乳類細胞において産生するものと比較した際に、異なる翻訳後修飾を有した抗体が生じる。研究、診断、及び治療の用途に向けた抗体の製造は、典型的には、哺乳類細胞において実施されるため、哺乳類細胞（または無脊椎動物、トリ、もしくは植物の細胞株などの他の高等真核細胞）上でのディスプレイは、例えば、最適な発現特性を有するクローンの同定といった、製造の下流で生じる潜在的な問題または優位性を、より良く示すことができるものである。さらに、高等真核生物、及び具体的には哺乳類細胞上でのディスプレイの関連内で発見される抗体であれば、広範な精製をすること無く、細菌及び酵母の細胞に由来する混入物の複雑な影響無しに、細胞に基づくレポーターアッセイに直接適用することができる。さらに、結合体ライブラリーを哺乳類細胞などの真核生物レポーター細胞において直接的に発現して、細胞表現型に直接的に影響を与えるクローンを同定することができる。

【０００９】

真核生物ディスプレイライブラリーによって約束される上記の優位性が存在するにもかかわらず、真核細胞、特に高等真核細胞における結合体ライブラリーの創出には、依然としてかなりの問題が存在する。高等真核生物における発現に向けた、外来性遺伝子（「導入遺伝子」）のレパートリーの導入は、酵母及び細菌におけるものと比較して、難易度が高い。高等真核生物の細胞は、取り扱い及びスケールアップの難易度が高く、形質転換効率が低いものである。達成される典型的なライブラリーサイズは、はるかに小さい。さらに、導入されたＤＮＡは、ゲノム内に無作為に組込まれ、斑入り位置効果を引き起こす。さらに、標準的な遺伝子導入法または電気穿孔法によって哺乳類細胞へと導入されたドナーＤＮＡは、遺伝子導入された導入遺伝子のコピー数が可変である直鎖アレイとして組込まれる。したがって、抗体遺伝子のレパートリーをコードするＤＮＡを導入すると、複数の抗体遺伝子がそれぞれの細胞へと導入され、その結果、１つの細胞が複数の異なる抗体を発現する可能性がある。さらに、複数の抗体遺伝子が存在すれば、任意の所与の抗体の相対的な発現量を減少させることになると共に、多くのパッセンジャー抗体遺伝子の単離につながり、特定クローンの濃縮率が低下することになる。

【００１０】

高等真核生物表面での結合体ライブラリーのディスプレイは、より挑戦的ではあるが、これまでに説明された例がいくつかある。初期の論文では、ヒト免疫化から得られたＩｇＧの哺乳類ディスプレイを使用しており、抗原特異的な細胞の４５０倍濃縮を達成するために、選択（一過性の遺伝子導入、細胞選別、ＤＮＡ回収、及び再遺伝子導入を伴う）を３ラウンド実施する必要であり、これは、１ラウンド当たり、平均７．６倍の濃縮にあたるものであった［１０］。同様に、エピソーム的に複製するベクター内で発現された免疫化ライブラリーからの一過性発現が、ｓｃＦｖ［１１、１２］またはＩｇＧ［１３］として編成された抗体に関して説明された。

【００１１】

単一または限定数の抗体遺伝子をそれぞれの細胞へと導入するために、数多くの手法が説明されてきた。これには、ＤＮＡの希釈または担体ＤＮＡとの混合［１３］が含まれるが、これは、導入遺伝子のコピー数を相対的に制御しない管理方法であり、ＤＮＡインプットの減少が、ライブラリーサイズに対して不利な影響を与えることになる。１つの細胞に複数の抗体遺伝子が導入されることを制御するための別の解決策が、ウイルスベクターによる抗体遺伝子の導入によって提供された。この方法で、免疫化によって生成した数百ものヒトＢリンパ球から細胞表面ディスプレイライブラリーが生成され、抗原特異的Ｂ細胞の流動選別によってさらに濃縮された［１４］。この濃縮プールに由来する抗体遺伝子は、ｓｃＦｖとして編成されたものであり、シンドビスアルファウイルス発現システムへとクローン化され、低い感染多重度を使用して、ＢＨＫ細胞へと導入された。

【００１２】

Ｂｒｅｏｕｓ－Ｎｙｓｔｒｏｍら［１５］は、連続的なレトロウイルス感染を使用して、マウスのプレＢ細胞株（１６２４－５）へ、９１Ｖカッパ抗体遺伝子のレパートリーを限定して導入した後、６人の健康なドナーに由来する重鎖遺伝子レパートリーを導入した。感染性レトロウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に基づくＶ－Ｐａｃｋシステムを使用して生成された。単一コピーの挿入に偏らせるために、細胞の約５％に感染を引き起こす感染多重度が選択された。こうした手法の主要な不利益は、ゲノム内での組込みが無作為であるため、転写レベルが組込み部位の転写活性に基づき、変動が生じる可能性に繋がることである。こうした場合のすべてに生じる別の不利益は、抗体遺伝子の組込みが、感染または遺伝子導入を限定することによって制御されており、これは、ライブラリーサイズに影響を与えるということである。

【００１３】

リコンビナーゼによって指示される導入遺伝子の部位特異的組込みについて、これまでに説明されている。リコンビナーゼは、酵素特異的認識配列を含むＤＮＡ分子間の交換反応を触媒する酵素である。例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼ（Ｅ．ｃｏｌｉの部位特異的組換えシステムから得られた）またはＦｌｐリコンビナーゼ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの組換えシステムを利用している）は、その特異的な、３４ｂｐのｌｏｘＰ認識部位及び３４ｂｐのＦｌｐ組換え標的（Ｆｌｐ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ Ｔａｒｇｅｔ）（ＦＲＴ）部位に対して、それぞれ働く［１６］。リコンビナーゼは、部位特異的組込みを触媒するために、細胞工学において主に使用されてきた。Ｃｈｅｎ Ｚｈｏｕの仕事による数多くの研究［１７、１８、ＵＳ７，８８４，０５４］によって、「Ｆｌｐ－Ｉｎ」システム（ｈｔｔｐ：／／ｔｏｏｌｓ．ｌｉｆｅｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ．ｃｏｍ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｓｆｓ／ｍａｎｕａｌｓ／ｆｌｐｉｎｓｙｓｔｅｍ＿ｍａｎ．ｐｄｆ）内のＦｌｐリコンビナーゼを使用した、哺乳類細胞ゲノムへの、リコンビナーゼ媒介性である、抗体遺伝子の部位特異的組込みに対する説明がなされた。Ｆｌｐ－Ｉｎシステムは、多様な細胞株を利用し、当該細胞株は、そのゲノム内に予め導入された単一のＦＲＴ部位を有するものである。酵素であるＦｌｐリコンビナーゼを発現することによって、標的細胞に存在するこの事前組込みＦＲＴ部位への、発現プラスミドの組込みを指示することが可能であり、当該発現プラスミドには、ＦＲＴ組換え部位が組込まれている。

【００１４】

Ｆｌｐ－ｌｎシステムを使用して、Ｚｈｏｕら［１７］は、ＦＲＴ部位が組込まれたチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞株（ＣＨＯＦ細胞）へ、ＦＲＴ部位を含む、新規の抗体発現プラスミドを導入した。その研究では、ディプレイライブラリーの構築について説明されており、存在する抗ＯＸ４０リガンド抗体内の４残基が変異誘発されたものである。ライブラリーは、ＦＡＣＳを使用して選別され、細胞表面で抗リガンド親和性を有する抗体が同定された。改善抗体の産生における全体的な成功は、単一の改善抗体の単離に限られたものであった。達成した特有哺乳類細胞クローンの数は、報告されなかった。

【００１５】

２０１２年のＬｉらによる後続の論文［１８］では、Ｂ型肝炎患者に由来するリンパ球を利用し、抗体ディスプレイライブラリーが構築された。ＨＢｓＡｇで免疫化されたドナーから得られた重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子を有する別々のライブラリーが産生され、ライブラリーのサイズは、それぞれ１．０２ｘ１０^{6}及び１．７８ｘ１０^{5}であったと個々に報告された。その後、重鎖及び軽鎖の両方を含む二次ライブラリーが産生され、報告によれば、４．３２ｘ１０^{5}のサイズを有していた。報告によれば、ＦＡＣＳ分析によって、細胞の約４０％が細胞表面に検出可能な全長抗体をディスプレイしたことが示された。ライブラリーのＦＡＣＳ選別によって、ＨＢｓＡｇに結合する抗体が同定された。抗原に結合した、ライブラリーから選択された８つのメンバーの試料の内の６つが、同一抗体を有することが明らかとなったため、同定された特有な抗ＨＢｓＡｇクローンは、全部で３つであった。

【００１６】
この研究の成功が、幾分か限定されたことは、Ｆｌｐ－Ｉｎシステムが、大きなライブラリーの構築というよりは、むしろクローン数を限定した正確な組込みに向けて設計されたという事実に起因し得るものである。したがって、組込み忠実度の達成と、最大ライブラリーサイズの達成と、の間に潜在的な相反が存在する。Ｆｌｐ－Ｉｎシステムは、プラスミドｐＯＧ４４における変異体Ｆｌｐリコンビナーゼを利用しており、当該リコンビナーゼは、天然Ｆｌｐリコンビナーゼの３７℃での活性の僅か１０％しか有さないものである［１９］。野生型と比較して、熱安定性が向上すると共に活性が上昇したＦｌｐリコンビナーゼの変異体（Ｆｌｐｅ）が同定された［１９、２０］。これは、コドンの最適化によってさらに改善し、プラスミドｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐ。内にコードされたＦｌｐ。が創出された（Ｇｅｎｅｂｒｉｄｇｅｓ　カタログ番号Ａ２０３）。しかしながら、Ｆｌｐ－Ｉｎマニュアルによると、
「Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）発現細胞株を産生する際は、相対的に稀な組換え事象を選択していることを銘記することが重要あり、これは、ご自身のｐｃＤＮＡ（商標）５／ＦＲＴ構築物の組換え及び組込みが、ＦＲＴ部位のみを介して、限られた時間で生じることを意図されているためです。この場合、高度に非効率的なＦｌｐリコンビナーゼを使用することが有利であり、これにより、他の望ましくない組換え事象の発生を低減することができます。。。
。。。単一の組込み体を得る可能性を上げるために、ご自身が遺伝子導入するプラスミドＤＮＡの量を限定することによって、遺伝子導入効率を低下させることが必要となります」
これは、Ｂｕｃｈｈｏｌｚら１９９６［１９］によって、繰り返し述べられている。
「ＦＬＰは、効率に依存せず、厳格な制御に依存する用途向けに、特に有用であり得る」

【００１７】
モデル実験において、「マニュアルに記載の説明」を使用し、Ｚｈｏｕら（２０１０）［１７］は、クローンの＞９０％において、単一コピーの挿入が生じたことを実際に示した。しかしながら、ライブラリー構築では、相対的に高い量の発現プラスミド（10^6個細胞当たり２．５～３．２μｇ）と、ｐＯＧ４４リコンビナーゼをコードするプラスミドを超える過剰量のドナーと、が使用された［１７、１８］。Ｆｌｐ－Ｉｎシステムは、リコンビナーゼをコードするプラスミドと、発現プラスミドと、の比を少なくとも９：１にして使用することが有利であると推奨している。しかしながら、より多くの量のＤＮＡを遺伝子導入することによって、ライブラリーのサイズを増加させようとすると、新規プラスミドの無作為組換えが生じる可能性がある［２１］。すべての研究において、「ライブラリー構築」条件下での、組込みの正確性及び細胞当たりの組込み体の数に関する報告は無かった。

【００１８】
ヌクレアーゼ指向型の遺伝子組込みでは、部位特異的ヌクレアーゼは、特定位置で細胞ＤＮＡを切断するために使用される。これは、相同組換えの速度を少なくとも４０，０００倍増進し、非相同末端結合機構による修復も可能にすることがこれまでに報告された。この部位特異的組込みの増進が、結合体ライブラリーの創出に関連した問題の解決に、使用またはそれが企図されたことは、これまで無かった。

【００１９】
ＵＳ２０１００２１２０３５では、ドナーＤＮＡの組込みを指示するために、メガヌクレアーゼを使用して、哺乳類胚の免疫グロブリンの遺伝子座を標的とすることによって、外来性抗体の発現を可能にするげっ歯類を生成する方法について説明されている。新しいＤＮＡ切断特異性を創出するための、メガヌクレアーゼの変異体ライブラリーの創出の可能性については説明されたが、メガヌクレアーゼの、結合体ライブラリーの生成に対する使用は、企図されていない。

【００２０】

ＷＯ２０１３／１９００３２Ａ１では、リコンビナーゼ媒介性の部位特異的遺伝子導入に向けたｌｏｘＰ部位及びＦＲＴ部位などのリコンビナーゼ部位を組込むための、外来性ＤＮＡで事前修飾された特定遺伝子座（Ｆｅｒ１Ｌ４）への遺伝子組込み（「部位特異的組込み」ＳＳＩ宿主細胞）について説明されている。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２１】

ＷＯ２０１２／１６７１９２Ａ２では、遺伝子座に対する遺伝子の標的化について説明されており、当該遺伝子は、増幅で後に選択することができる。ヌクレアーゼ指向型の方法は、遺伝子座を標的とするために用いられている。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２２】

ＵＳ２００９／０２６３９００Ａ１では、ホモロジーアームを含むＤＮＡ分子、及び相同組換えの方法におけるその使用について説明されている。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２３】

ＷＯ２０１１／１０００５８では、ゲノムへの核酸の組込み方法について説明されており、当該組み込みは、長いホモロジーアームを必要とせず、代わりに、ゲノム及びドナー上のマイクロホモロジーまたは「粘着末端（ｓｔｉｃｋｙ－ｅｎｄ）」に依存して、直接的な組込みに役立てるものである。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２４】

ＷＯ２０１２２／０９０８０４では、連続ラウンドにおいて、異なるジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を使用する、複数遺伝子または同一遺伝子の複数のコピーの組込み方法について説明されている。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２５】

ＷＯ２０１４／０３９８７２では、部位指向型ヌクレアーゼを使用して、ドナーＤＮＡが相同組換えまたは非相同末端結合によって組込まれる「ランディング部位（ｌａｎｄｉｎｇ　ｓｉｔｅ）」が組込まれた植物細胞の操作方法について説明されている。細菌人工染色体（ＢＡＣ）ライブラリーが、ドナーＤＮＡの初期クローン化に使用されている。ライブラリーについては、Ｉｌｌｕｍｉｎａ配列決定方法に関連して言及されている。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２６】

ＷＯ２００７／０４７８５９Ａ２では、メガヌクレアーゼ特異性の操作方法、及びゲノム遺伝子座を標的とするためのその使用について説明されている。新規のヌクレアーゼ特異性を有したメガヌクレアーゼを含み得る変異体メガヌクレアーゼライブラリーについて説明されている。ヌクレアーゼ指向型のライブラリー生成については、説明されていない。

【００２７】

ＵＳ２０１４／０１１３３７５Ａ１では、標的ゲノム配列に対して相同性を有する一本鎖ＤＮＡ配列の生成に向けた一過性発現システムについて説明されており、当該一本鎖ＤＮＡは、核に運ばれ、ＤＮＡ修復経路または相同組換えを介して標的ゲノム配列の遺伝子情報を変えることができるものである。変異の「ライブラリー」が、導入された（非ライブラリー）ＤＮＡの、忠実性が低い逆転写によって産生できることが示唆されている。哺乳類ディスプレイ及び結合活性を有する分子の選択については、説明されていない。

【００２８】

ＵＳ２０１２／０２７７１２０では、複数の外来性である核酸の同時組込みに向けた方法及び組成物について説明されており、当該組み込みは、酵母における天然の相同組換え機構を使用した単一の形質転換反応におけるものであり、当該組換えは、宿主細胞のゲノムにおいて、意図する組込み部位に標的二本鎖切断を含めることによって、さらに増進し

得るものである。方法では、例えば、酵母などの産業的微生物における機能性代謝経路の構築といった、複数のＤＮＡ集合の組み込みに、複数ラウンドが必要となることを打開することが意図されている。結合性分子ライブラリーのディスプレイまたは発現、高等真核生物の使用、及び結合活性を有する分子の選択については、説明されていない。

【００２９】

哺乳類細胞及び他の高等真核生物上での抗体ディスプレイの可能性を完全に実現するために、大きなライブラリーの構築を可能にする効率と、前定義部位への正確な組込みと、を兼ね備える大きなライブラリーを創出するシステムが必要である。

【発明の概要】

【００３０】

我々は、結合体をコードする遺伝子集団の、ヌクレアーゼ指向型組込みを使用することによって、細胞当たり１つまたは２つの結合体遺伝子を包含する大きな結合体ライブラリーを創出するという問題を克服した。したがって、本発明は、真核細胞集団の調製を可能にし、結合体をコードするレパートリーがゲノムにおける固定遺伝子座へと組込まれることで、コードされる結合性分子の発現を可能にし、それによって、異なる結合体を発現する細胞集団を創出する。

【００３１】

本発明は、結合性分子（「結合体（ｂｉｎｄｅｒ）」）のレパートリーをコードする真核細胞ライブラリーの産生方法に関し、当該方法は、細胞ＤＮＡの標的切断に向けて部位特異的ヌクレアーゼを使用することで、内在性の細胞修復機構を介した、結合体遺伝子の部位特異的組込みを増進する。部位特異的ヌクレアーゼによって、真核生物ゲノムまたは他の真核細胞ＤＮＡ内の１つまたは複数の定義遺伝子座への、結合体分子をコードするドナーＤＮＡの正確な導入が可能になる。本発明は、結合体をコードする遺伝子のレパートリーが、細胞ＤＮＡの所望の遺伝子座（例えば、ゲノム遺伝子座）へと組込まれた真核細胞集団の調製方法を提供し、これにより、コードされる結合性分子の発現が可能になり、それによって、異なる結合体を発現する細胞集団が創出される。

【００３２】

本発明による、真核細胞内での結合体のライブラリー構築は、発現構築物の部位指向型組込みに向けたリコンビナーゼ指向型の手法に勝る優位性を有する。本発明は、部位特異的ヌクレアーゼによる細胞ＤＮＡの切断を使用して、真核細胞細胞、及び具体的には高等真核生物における結合遺伝子の大きなレパートリーの構築に関して、これまで存在していた問題を解決するものである。本発明によって、細胞ＤＮＡにおける固定遺伝子座に組込まれた個々の結合体をそれぞれが発現する細胞クローンの大集団を効率的に創出することが可能である。細胞クローンのこうしたライブラリーから、新規の結合体または機能修飾タンパク質及び機能修飾ペプチドをコードする遺伝子を単離することが可能となる。

【００３３】

本発明の手法は、リコンビナーゼ指向型のＤＮＡ交換ではなく、細胞（例えば、ゲノム）ＤＮＡの部位特異的切断を利用し、その後に天然の修復機構を使用して、結合体をコードするドナーＤＮＡを組込むものである。部位特異的ヌクレアーゼによって認識される配列（「認識配列」）での細胞ＤＮＡの切断の後に、細胞ＤＮＡの切断は、相同組換えまた非相同末端結合（ＮＨＥＪ）などの機構を使用して修復される。細胞ＤＮＡの部位特異的切断の創出が、外来性ドナーＤＮＡの組込みを増進することで、固定遺伝子座に組込まれた結合体遺伝子を有した細胞の大集団の構築を可能にする。

【００３４】

今日まで、メガヌクレアーゼ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥヌクレアーゼ、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムなどの部位特異的ヌクレアーゼは、内在性遺伝子に対する修飾、または細胞機能の研究向けのレポーター遺伝子の導入に向けた修飾、を有する細胞の効率的な創出を対象にしてきた。ヌクレアーゼ指向型のゲノム標的化が、抗体生産（培養培地からの精製による）に向けて、単一の分泌抗体をコードする遺伝子を組込むために使用されたという実例も存在する［２１、２２、］。

【００３５】
本発明は、単一または限定数の定義遺伝子座に対する組込みを指示しながら、大きなライブラリーの構築を単純化する。１つまたは複数の固定遺伝子座でのドナーＤＮＡの組込みは、導入遺伝子数が可変である無作為組込みと比較して、転写を正常化し、結合体自体の転写特性及び安定特性に基づく抗体クローンの選択を可能にする。細胞ＤＮＡの１つの所定位置または複数の所定位置でのドナーＤＮＡの忠実な組込みは、ライブラリーにおける相対的に均一なレベルの結合体転写と、高効率なドナーＤＮＡの導入と、をもたらし、本発明の方法によって創出される細胞集団を、結合体のディスプレイ及び選択に向けたライブラリーとして、特に有用なものとする。したがって、本発明の方法は、真核細胞における結合体の高品質ライブラリーを提供し、当該ライブラリーを選別することで、関心標的に特異的な結合体をコード及び発現する細胞を同定することができる。

【００３６】
様々な態様では、本発明は、結合性分子の発現及び選別、ならびに結合性分子の効果の選別などに向けた、真核細胞ライブラリーの調製、ライブラリー自体、ライブラリーからの所望の結合体の単離、所望のコード核酸の単離、及び所望の細胞の単離、ならびにライブラリーの使用、の新規かつ改善された方法に関する。試験管内でのライブラリーの産生、及び試験管内または生体内でのライブラリーの使用に向けて、様々な方法が説明されることになる。

【００３７】
本発明は、多様な結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの産生方法を提供し、当該方法は、真核細胞ＤＮＡの切断を標的とする部位特異的ヌクレアーゼを使用することで、内在性の細胞ＤＮＡ修復機構を介した、細胞ＤＮＡへの結合体遺伝子の部位特異的組込みを増進する。

【００３８】
多様な結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの産生方法は、
結合体をコードするドナーＤＮＡ分子、及び真核細胞の提供と、
細胞へのドナーＤＮＡの導入、及び細胞内での部位特異的なヌクレアーゼの提供であって、ヌクレアーゼが細胞ＤＮＡを切断することで、ドナーＤＮＡが細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じる当該導入及び提供と、
を含んでよい。

【００３９】
少なくとも第１及サブユニット及び第２サブユニット（すなわち、Ｆａｂ形式またはＩｇＧ形式中に存在する抗体ＶＨドメイン及び抗体ＶＬドメインなどの別々のポリペプチド鎖）を含む、多量体である結合体に向けては、複数サブユニットは、ドナーＤＮＡの同一分子上にコードされていてよい。しかしながら、別々の遺伝子座へ、異なるサブユニットを組込むことが望ましくあり得、その場合、サブユニットは、別々のドナーＤＮＡ分子上で供給することができる。こうしたものは、ヌクレアーゼ指向型組込みの同一サイクル内で組み込むか、または一方または両方の組込み段階で、ヌクレアーゼ指向型組込みを順次使用して組込んでよい。

【００４０】
多量体である結合体をコードする真核細胞クローンのライブラリーの産生方法は、
第１サブユニットをコードするＤＮＡを含む真核細胞の提供、及び第２結合体サブユニットをコードするドナーＤＮＡ分子の提供と、
細胞へのドナーＤＮＡの導入、及び細胞内での部位特異的ヌクレアーゼの提供であって、ヌクレアーゼが細胞ＤＮＡの認識配列を切断することで、ドナーＤＮＡが細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じ、それによって、細胞ＤＮＡに組込まれたドナーＤＮＡを含む組換え細胞を創出する当該導入及び提供と、

を含んでよい。こうした組換え細胞は、多量体である結合体の第１サブユニット及び第２サブユニットをコードするＤＮＡを含むことになり、培養されて、両方のサブユニットを発現し得る。多量体である結合体は、別々にコードされるサブユニットの発現及び会合によって得られる。

【００４１】

上記実施例において、ヌクレアーゼ指向型組込みは、第１サブユニットをコードするＤＮＡをすでに含む細胞へ、第２サブユニットをコードするＤＮＡを組込むために使用される。第１サブユニットは、本発明の手法または他の適した任意のＤＮＡ組込み方法を使用して、予め導入しておくことができる。代替の手法は、ドナーＤＮＡを導入する第１サイクルにおいてヌクレアーゼ指向型組込みを使用して第１サブユニットを組込み、その後、同一手法または他の適した任意の方法のいずれかによって、第２サブユニットを導入することである。ヌクレアーゼ指向型手法が、組込みの複数サイクルにおいて使用されるのであれば、異なる部位特異的ヌクレアーゼを任意選択で使用して、異なる認識部位での、ヌクレアーゼ指向型ドナーＤＮＡの組込みを推進してもよい。ライブラリーの産生方法は、

第１サブユニットをコードする第１ドナーＤＮＡ分子の提供、及び真核細胞の提供と、

細胞への第１ドナーＤＮＡの導入、及び細胞内での部位特異的ヌクレアーゼの提供であって、ヌクレアーゼが、細胞ＤＮＡの認識配列を切断することで、ドナーＤＮＡが細胞ＤＮＡへと組込まれる組込み部位が創出され、組込みが、細胞に対して内在性であるＤＮＡ修復機構を介して生じ、それによって、細胞ＤＮＡに組み込まれた第１ドナーＤＮＡを含む、第１セットの組換え細胞を創出する当該導入及び提供と、

第１サブユニットをコードするＤＮＡを含む、第１セットのクローンを産生するための第１セットの組換え細胞の培養と、

第１セットのクローン細胞への、第２サブユニットをコードする第２ドナーＤＮＡ分子を導入であって、第１セットのクローンの細胞ＤＮＡへと第２ドナーＤＮＡを組込み、それによって、細胞ＤＮＡへ組込まれた第１ドナーＤＮＡ及び第２ドナーＤＮＡを含む、第２セットの組換え細胞を創出する当該導入と、

第２セットのクローンを産生するための第２セットの組換え細胞の培養であって、こうしたクローンが、多量体である結合体の第１サブユニット及び第２サブユニットをコードするＤＮＡを含む当該培養と、

それによる、多量体である結合体のレパートリーをコードするドナーＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーの提供と、

を含んでよい。

【００４２】

細胞ＤＮＡへの、ドナーＤＮＡの部位特異的組込みは、培養してクローンを産生することができる組換え細胞を創出する。したがって、ドナーＤＮＡが組込まれた個々の組換え細胞は、複製して細胞のクローン集団、すなわち「クローン」を生成し、それぞれのクローンは、１つの元の組換え細胞に由来するものである。したがって、方法によって、ドナーＤＮＡの組込みに成功した細胞の数に対応する数多くのクローンが生成する。クローンの集合体は、結合体のレパートリーをコードするライブラリーを形成する（または結合体サブユニットが、別々のラウンドで組込まれる中間段階では、クローンは、１つのセットの結合体サブユニットをコードし得る）。したがって、本発明の方法は、結合体のレパートリーをコードするドナーＤＮＡを含む真核細胞クローンのライブラリーを提供することができる。

【００４３】

本発明の方法によって、細胞ＤＮＡにおける１つの固定遺伝子座または複数の固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含むクローンのライブラリーを生成させることができる。「固定（ｆｉｘｅｄ）」は、遺伝子座が、細胞間で同一であることを意味する。したがって、ライブラリーの創出に使用する細胞は、固定遺伝子座にヌクレアーゼ認識配列を含み得、当該認識部位は、そこにドナーＤＮＡを組込むことができる、細胞ＤＮＡにおける普遍的なランディング部位に相当するものである。部位特異的ヌクレアーゼ向けの認識配

列は、細胞ＤＮＡにおいて１つ以上の位置に存在し得る。

【００４４】

本発明によって産生するライブラリーは、多様な形で用いてよい。ライブラリーは、培養して結合体を発現してよく、それによって、結合体の多様なレパートリーが産生する。ライブラリーにおいて所望の表現型の細胞を選別してよく、表現型は、細胞による結合体の発現からもたらされるものである。ライブラリーの細胞を培養して結合体を発現させ、その後、所望の表現型がライブラリーのクローンにおいて示されているかどうかを検出する表現型の選別が可能である。細胞の読出し情報は、内在性もしくは外来性のレポーター遺伝子の発現変化、分化状態、増殖、生存、細胞サイズ、代謝、または他の細胞との相互作用変化などの細胞挙動の変化に基づき得る。所望の表現型が検出されると、その後、所望の表現型を示すクローンの細胞が回収される。任意選択で、その後、回収されたクローンから、結合体をコードするＤＮＡが単離され、結合体をコードするＤＮＡが得られる。当該ＤＮＡは、細胞において発現されると、所望の表現型を産生するものである。

【００４５】

真核細胞ライブラリーが使用されてきた重要な目的は、関心標的を認識する結合体の選別方法にある。そのような方法では、ライブラリーを培養して結合体を発現させ、結合体を標的に対して曝露して、１つまたは複数の同種結合体による標的の認識を可能にし、もし存在するのであれば、標的が、同種結合体によって認識されたかが検出される。そのような方法では、結合体は、細胞表面にディスプレイされてよく、所望の特性を有する結合体をディスプレイする、ライブラリーのそうしたクローンを単離することができる。したがって、所望の機能特性または結合特性を有した結合体をコードする遺伝子が組込まれた細胞を、ライブラリー内で同定することができる。遺伝子を回収し、結合体の産生に使用するか、またはさらなる操作に使用して、特性が改善された結合体を得るために、結合体の派生ライブラリーを創出することができる。

【００４６】

本発明は、高等真核生物におけるライブラリー構築に向けて、これまでの手法に勝る優位性を提供する。いくつかの研究では、レンチウイルスの感染を使用して、哺乳類レポーター細胞へ抗体遺伝子が導入された［１０６］。これは、大きなライブラリーを生成できるという優位性を有するが、組込み部位の制御が存在せず、コピー数は、低感染多重度を使用することによって制御されている（上記のとおり）。代替の手法では、抗体遺伝子は、ヌクレアーゼ指向型組込みを利用せず、１０ｋｂのホモロジーアームを使用して、相同組換えを介して導入されたが、標的効率は、相対的に低く、これは、潜在的なライブラリーサイズが限定されていたことを示している［１０５］。対照的に、配列指向型ヌクレアーゼの使用は、大きなライブラリーの効率的な構築を可能にしながら、１つまたは少数の選択遺伝子座を標的にして組込むという優位性を保持するものである。ヌクレアーゼ指向型組込みは、導入遺伝子の標的が、細胞ＤＮＡ内の１つの遺伝子座または複数の遺伝子座であるという優位性を有している。これは、すべてのクローンにおいて、結合体遺伝子の転写を推進するプロモーター活性が同一であることになり、それぞれの結合体の機能性が、組込み部位に関連する変動に起因するものではなく、むしろその固有の効力、翻訳効率、及び安定性を反映するであろうことを意味する。単一または限定数の遺伝子座を標的とすることによって、必要であれば、例えば、誘導性プロモーターを使用した、より良い発現制御も可能となるであろう。

【００４７】

以下に、本発明の様々な特徴を記載する。本明細書にわたって使用される表題は、ナビゲーション支援のみが目的であり、限定的なものであると解釈されるべきはなく、異なるセクションに記載の実施例は、必要に応じて組み合わせてもよいことに留意されたい。

【００４８】

詳細な説明

真核細胞

多様な結合体レパートリーを発現する真核細胞集団の可能性が、本明細書の実施例にお

いて、哺乳類細胞表面での抗体レパートリーの発現に関連して、例示及び考察される。本発明の優位性は、哺乳類細胞に限定されず、すべての真核生物を含むものである。

【００４９】

酵母（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）は、哺乳類細胞と比較して、小さなゲノムを有していると共に、（ヌクレアーゼ指向型の切断無しに）ホモロジーアームによって指示される相同組換えは、高等真核生物と比較して、外来性ＤＮＡを導入する有効な方法である。したがって、本発明のヌクレアーゼ指向型組込みの特定の優位性の１つは、ヌクレアーゼによる切断無しでは相同組換えの効率が低い、より大きなゲノムを有した高等真核細胞への結合体遺伝子の組込みに関するものである。ヌクレアーゼ指向型の組込みは、酵母細胞において使用されており、個々の酵母細胞へ複数遺伝子を効率的に組込むという問題を解決するものであり、例えば、代謝経路の操作に向けて使用されたが（ＵＳ２０１２／０２７７１２０）、この研究は、結合体ライブラリーの導入を実施しておらず、高等真核生物におけるライブラリー構築の問題にも対処していないものである。

【００５０】

本発明による真核細胞ライブラリーは、好ましくは高等真核細胞であり、本明細書で、$12x10^6$塩基対（ｂｐ）のゲノムサイズを有するＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのもの超えるゲノムを有する細胞であると定義される。例えば、高等真核細胞は、$2x10^7$塩基対を超えるゲノムサイズを有していてよい。これには、例えば、哺乳類、トリ、昆虫、または植物の細胞が含まれる。好ましくは、細胞は、例えば、マウスまたはヒトの哺乳類細胞である。細胞は、初代細胞であるか、または細胞株であってよい。チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞は、一般に、抗体及びタンパク質の発現に使用されるが、本発明では、任意の代替安定細胞株を使用してよい。本明細書の実施例では、ＨＥＫ２９３細胞を使用している。方法は、外来性ＤＮＡの、初代細胞への効率的な導入に利用可能であり、これにより、こうした細胞が使用可能となる（例えば、電気穿孔によってであり、最大で９５％の効率及び生存率が達成された。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍａｘｃｙｔｅ．ｃｏｍ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ／ｐｒｉｍａｒｙ－ｃｅｌｌｓ－ｓｔｅｍ－ｃｅｌｌｓ．ｐｈｐ）。

【００５１】

好ましい細胞型には、Ｔリンパ球系譜の細胞（例えば、初代Ｔ細胞もしくはＴ細胞株）またはＢリンパ球系譜の細胞が含まれる。ＴＣＲ発現を欠いた細胞株を含む、ＴＣＲライブラリーにおいて使用する初代Ｔ細胞またはＴ細胞に由来する細胞株は、特に興味深いものである［２３、２４、２５］。Ｂリンパ球系譜の細胞の例には、Ｂ細胞、プレＢ細胞またはプロＢ細胞、及びこうした細胞のいずれかから得られる細胞が含まれる。

【００５２】

初代Ｂ細胞またはＢ細胞株におけるライブラリーの構築は、抗体ライブラリーの構築に特に有用性があるであろう。Ｂｒｅｏｕｓ－Ｎｙｓｔｒｏｍら［１５］は、マウスのプレＢ細胞株（１６２４－５）においてライブラリーを生成させた。ニワトリＢ細胞に由来する細胞株であるＤＴ４０（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２１１１）は、結合体のライブラリー構築に特に有望である。ＤＴ４０は、細胞増殖速度が相対的に速い小さな細胞株である。内在性配列を標的とするＺＦＮ、ＴＡＬＥヌクレアーゼ、もしくはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用するか、またはメガヌクレアーゼ認識部位を含めることができる、事前に組込まれた異種性部位を標的とすることによって、結合体レパートリーの標的を特定遺伝子座にすることができる。ＤＴ４０細胞は、抗体を発現しているため、内在性のニワトリ抗体可変ドメインを破壊して、または破壊せずに、抗体遺伝子座内の抗体遺伝子を標的とするために有利であろう。ＤＴ４０細胞は、ニワトリ抗体遺伝子座で生じる内因性の多様化を利用した自律多様化ライブラリーシステム（ＡＤＬｉｂシステム）と命名された、試験管内でのニワトリＩｇＭ生成システムの基礎としても使用されてきた。この内在性の多様化の結果として、新規の特異性を生成することが可能である。本明細書に記載のヌクレアーゼ指向型の手法は、ＡＤＬｉｂと組み合わせて使用することで、異種性供給源（例えば、ヒト抗

体可変領域レパートリーまたは合成的に得られた代替骨格）に由来する結合体の多様なライブラリーと、ニワトリＩｇＧ遺伝子座のさらなる多様化に向けた潜在力と、を組み合わせることができる。類似の優位性をＮａｌｍ６［２６］などのヒトＢ細胞株に適用することができる。他のＢ細胞系譜の関心細胞株には、マウスのプレＢ細胞株１６２４－５及びプロＢ細胞株Ｂａ／Ｆ３などの株が含まれる。Ｂａ／Ｆ３は、ＩＬ－３依存性であり［２７］、その使用については、本明細書の他の箇所において考察されている。最終的に、「Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐａｅｄｉａ」［２８］、または「ＣＯＳＭＩＣ ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ ｓｏｍａｔｉｃ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ」［２９］において記載されているものを含む、数多くのヒト細胞株を使用することができる。

【００５３】

典型的には、ライブラリーは、例えば、ドナーＤＮＡの、特定細胞株の細胞への導入といった、ドナーＤＮＡの、クローン真核細胞集団への導入によって産生した単一型の細胞からなることになる。異なるライブラリークローン間で主要かつ顕著な差異があれば、ドナーＤＮＡの組込みに起因するものであることになる。

【００５４】

真核生物ウイルスシステム

真核細胞での結合体ライブラリーの創出におけるシステムの優位性は、例えば、バキュロウイルスディスプレイまたはレトロウイルスディスプレイ［１、２、３、４］といった、真核生物発現システムに基づくウイルスディスプレイシステムに適用することができる。この手法では、それぞれの細胞は、ウイルス粒子へと組込むことが可能な結合体をコードすることになる。レトロウイルスシステムの場合では、コードするｍＲＮＡは、内包されるであろうし、コードされる結合体は、細胞表面に提示されるであろう。バキュロウイルスシステムの場合では、結合体をコードする遺伝子は、遺伝子と、コードされるタンパク質と、の関連性を維持するために、バキュロウイルス粒子へと被包される必要があるであろう。これは、バキュロウイルスゲノムのエピソームコピーを保有する宿主細胞を使用して達成することができる。あるいは、組込まれたコピーは、特異的ヌクレアーゼ（部位特異的組込みを推進するために使用されるものとは異なる）の作用を経て遊離させることができる。多量体である結合体分子の場合では、ウイルスに内包されている１つまたは複数のパートナーの遺伝子と共に、細胞ＤＮＡ内にパートナーをいくつかコードさせることができる。

【００５５】

部位特異的ヌクレアーゼ

本発明は、結合体のレパートリーをコードするＤＮＡを含む真核細胞ライブラリーの構築における、細胞ＤＮＡの標的切断に向けた、部位特異的ヌクレアーゼの使用を含み、ヌクレアーゼ媒介性のＤＮＡ切断は、内在性の細胞ＤＮＡ修復機構を介して、結合体遺伝子の部位特異的組込みを増進する。部位特異的ヌクレアーゼは、認識配列に対して特異的に結合した後に細胞ＤＮＡを切断し、それによって、ドナーＤＮＡ向けの組込み部位が創出される。ヌクレアーゼによって、二本鎖切断または一本鎖切断（切れ目）が生じてよい。ライブラリーの創出に使用する細胞は、部位特異的ヌクレアーゼによって認識される内在性配列を含んでよく、または認識配列は、細胞ＤＮＡへと操作導入されてよい。

【００５６】

部位特異的ヌクレアーゼは、細胞に対して外来性であってよい。すなわち、選択した型の細胞において自然発生しなくてよい。

【００５７】

部位特異的ヌクレアーゼは、結合体をコードするドナーＤＮＡの導入の前、後、または同時に導入することができる。ドナーＤＮＡは、結合体に加えてヌクレアーゼをコードするか、または別々の核酸上に存在するものが同時導入されるか、もしくはそうでなければドナーＤＮＡとして同時に導入されることが、簡便であり得る。ライブラリーのクローンは、部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸を任意選択で保持してよく、またはそのよ

うな核酸は、細胞へと一過性に遺伝子導入されるだけであってよい。

【００５８】

本発明では、任意の適した部位特異的ヌクレアーゼを使用してよい。天然起源の酵素、または操作された変異体であってよい。細胞ＤＮＡにおいて稀にしか生じない配列を認識または認識するように操作することができるヌクレアーゼなどの、特に適したヌクレアーゼが、数多く知られている。ヌクレアーゼは、１つまたは２つの部位のみを切断することが有利であり、これは、細胞当たり、１つまたは２つのドナーＤＮＡ分子のみが組込まれることを保証することになるためである。認識配列が、相対的に長ければ、部位特異的ヌクレアーゼによって認識される配列が稀にしか存在しない可能性が高い。ヌクレアーゼによって特異的に認識される配列特異性は、例えば、少なくとも１０、１５、２０、２５、または３０個のヌクレオチドの配列であってよい。

【００５９】

適したヌクレアーゼの例には、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬＥヌクレアーゼ、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムなどの核酸でガイドされる（例えば、ＲＮＡでガイドされる）ヌクレアーゼが含まれる。操作された形態では、一本鎖切断を生成することが知られているものの、こうしたヌクレアーゼのそれぞれが、二本鎖切断を生成するものである。

【００６０】

メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼとしても知られる）は、すべての生命界にわたって生じるヌクレアーゼであり、相対的に長い配列（１２～４０ｂｐ）を認識する。認識配列が長いことを考慮すれば、当該認識配列は、真核生物ゲノムにおいて、存在しないか、または生じることは相対的に稀である。メガヌクレアーゼは、配列／構造に基づいて５つのファミリーへと分類される。（ＬＡＧＬＩＤＡＤＧ、ＧＩＹ－ＹＩＧ、ＨＮＨ、Ｈｉｓ－Ｃｙｓ　ｂｏｘ、及びＰＤ－（Ｄ／Ｅ）ＸＫ）。最も研究されたファミリーは、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリーであり、当該ファミリーは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅに由来する、よく特徴づけられたＩ－ＳｃｅＩメガヌクレアーゼを含む。Ｉ－ＳｃｅＩは、４ｂｐの３’突出部を残し、１８ｂｐの認識配列（５’ＴＡＧＧＧＡＴＡＡＣＡＧＧＧＴＡＡＴ）を認識して切断する。一般に使用される別の例は、Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉの単細胞緑藻の葉緑体を起源とするＩ－Ｃｒｅ１であり、２２ｂｐの配列を認識する［３０］。認識配列が変化するように操作され、数多くの変異体が創出された［３１］。メガヌクレアーゼは、ゲノム工学において、部位特異的ヌクレアーゼが使用された最初の例である［４９、５０］。リコンビナーゼに基づく手法と同様に、Ｉ－Ｓｃｅ１及び他のメガヌクレアーゼを使用する場合は、ゲノム内に、標的となる適切な認識部位を事前に挿入するか、または内在性部位を認識するように、メガヌクレアーゼを操作する必要がある［３０］。ＨＥＫ２９３細胞における、この手法による標的化効率（組込まれた不完全ＧＦＰ遺伝子の相同性指向型「修復（ｒｅｐａｉｒ）」によって判断）は、細胞の１０～２０％であり、Ｉ－Ｓｃｅ１の使用を介して達成されたものである［３２］。

【００６１】

本発明における使用に好ましいメガヌクレアーゼのクラスは、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧエンドヌクレアーゼである。こうしたものには、Ｉ－Ｓｃｅ　Ｉ、Ｉ－Ｃｈｕ　Ｉ、Ｉ－Ｃｒｅ　Ｉ、Ｃｓｍ　Ｉ、ＰＩ－Ｓｃｅ　Ｉ、ＰＩ－Ｔｌｉ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｔｕ　Ｉ、Ｉ－Ｃｅｕ　Ｉ、Ｉ－Ｓｃｅ　ＩＩ、Ｉ－Ｓｃｅ　ＩＩＩ、ＨＯ、Ｐｉ－Ｃｉｖ　Ｉ、ＰＩ－Ｃｔｒ　Ｉ、ＰＩ－Ａａｅ　Ｉ、ＰＩ－Ｂｓｕ　Ｉ、ＰＩ－Ｄｈａ　Ｉ、ＰＩ－Ｄｒａ　Ｉ、ＰＩ－Ｍａｖ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｃｈ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｆｕ　ＰＩ－Ｍｆｌ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｇａ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｇｏ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｉｎ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｋａ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｌｅ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｍａ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｓｈ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｓｍ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｔｈ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｔｕ　ＰＩ－Ｍｘｅ　Ｉ、ＰＩ－Ｎｐｕ　Ｉ、ＰＩ－Ｐｆｕ　Ｉ、ＰＩ－Ｒｍａ　Ｉ、ＰＩ－Ｓｐｂ　Ｉ、ＰＩ－Ｓｓｐ　Ｉ、ＰＩ－Ｆａｃ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｊａ　Ｉ、ＰＩ－Ｐｈｏ　Ｉ、Ｐｉ－Ｔａｇ　Ｉ、ＰＩ－Ｔｈｙ　Ｉ、ＰＩ－Ｔｋｏ　Ｉ、Ｉ－Ｍｓｏ　Ｉ、及

びＰＩ－Ｔｓｐ　Ｉが含まれ、好ましくは、Ｉ－Ｓｃｅ　Ｉ、Ｉ－Ｃｒｅ　Ｉ、Ｉ－Ｃｈｕ　Ｉ、Ｉ－Ｄｍｏ　Ｉ、Ｉ－Ｃｓｍ　Ｉ、ＰＩ－Ｓｃｅ　Ｉ、ＰＩ－Ｐｆｕ　Ｉ、ＰＩ－Ｔｌｉ　Ｉ、ＰＩ－Ｍｔｕ　Ｉ、及びＩ－Ｃｅｕ　Ｉである。

【００６２】

近年、数多くの方法が開発されたことで、新規の配列特異的ヌクレアーゼを設計することが可能であり、これは、非特異的ヌクレアーゼに対して配列特異的ＤＮＡ結合ドメインを融合することによって実施され、これにより、特別に作成されたＤＮＡ結合ドメインを介して指示される、設計された配列特異的ヌクレアーゼが創出される。結合特異性は、ジンクフィンガードメインなどの結合ドメインを操作することによって指示することができる。こうしたものは、亜鉛イオンによって安定化された小さなモジュラードメインであり、当該ドメインは、分子認識に関与し、ＤＮＡ配列を認識する性質において使用される。ジンクフィンガードメインのアレイは、配列特異的な結合に向けて操作され、ＩＩ型制限酵素であるＦｏｋ１の非特異的ＤＮＡ切断ドメインに対して連結されることで、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）が創出された。ＺＦＮは、ゲノム内の特異的部位に、二本鎖切断を創出するために使用することができる。Ｆｏｋ１は、偏性２量体であり、切断を起こすために、２つのＺＦＮが、近接して結合する必要がある。操作されたヌクレアーゼの特異性は、増進しており、お互いのヘテロ２量体のみを形成するように操作された２つの異なるＦｏｋ１変異体を創出することによって、その毒性は低減された［３３］。そのような偏性ヘテロ２量体であるＺＦＮは、薬物での選択を必要とせずに、標的細胞の５～１８％において、相同性指向型組込みを達成することが明らかとなった［２１、３４、３５］。選択を実施すること無く、＞５％の頻度で最大８ｋｂの挿入断片の組込みが示された。

【００６３】

ＺＦＮなどのヌクレアーゼによって創出される一本鎖の５’突出部が、切断部位への導入遺伝子の効率的な組込みの推進に役立つことが、最近示された［４５］。これはさらに拡張され、ドナーＤＮＡの生体内での切断（ドナープラスミド内に特異的なヌクレアーゼ認識部位を含めることを介して）が、非相同組込みの際の効率を増進することが示された。当該機構は、完全に明らかでないが、生体内での直鎖化を介したことで、細胞ヌクレアーゼに対する曝露が減少したことが、増進に寄与し得た可能性がある［４５］と共に、ヌクレアーゼによって生成したドナーＤＮＡ及びアクセプターＤＮＡの５’突出部が適合することにより、ライゲーションを推進した可能性もある。しかしながら、接合部の配列を調べると、欠失が生じていることが明らかとなった。完全に適合した結合部は、認識配列の欠失が生じるまで、部位指向型ヌクレアーゼの基質として働き続ける可能性がある。この潜在的な問題を克服するために、Ｍａｒｅｓｃａら［３６］は、ゲノム遺伝子座へドナーＤＮＡがライゲーションすると、一方の組込み隣接位置での２つの左側ＺＦＮによる重複と、もう一方の隣接位置での２つの右側ＺＦＮによる重複と、が引き起こされるように、ドナーＤＮＡ内の左右のＺＦＮの認識部位を反転させた。偏性ヘテロ２量体ヌクレアーゼを使用することは（Ｆｏｋ１向けに記載したように）、こうした新しく創出された隣接配列のどちらも、標的ヌクレアーゼによって切断できないことを意味している。

【００６４】

定義された特異性を有するＤＮＡ結合ドメインの操作能力は、Ｘａｎａｔｈｏｍｏｎａｓ細菌において、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）分子が発見されたことによって、さらに単純化された。こうしたＴＡＬＥ分子は、３３～３５個のアミノ酸である単量体のアレイからなり、それぞれの単量体が、標的配列内の単一塩基を認識する［３７］。１：１であるこのモジュラーの関係性が、任意の関心ＤＮＡ標的に結合する、操作されたＴＡＬＥ分子の設計を相対的に容易なものとした。こうした設計ＴＡＬＥと、Ｆｏｋ１とを結合させることによって、新規の配列特異的ＴＡＬＥヌクレアーゼを創出することが可能となった。ＴＡＬＥヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮとしても知られ、今日までに、非常に多くの部位に対して設計されており、高い成功率で、効率的な遺伝子修飾活性を示すものである［３８］。本明細書の実施例では、我々は、ＴＡＬＥヌクレアーゼの使用を介し

て、ドナーＤＮＡの組込みが増進することを示している。その他にも、ＴＡＬＥヌクレアーゼ技術を変更したもの及び強化したものが開発されており、ヌクレアーゼ指向型組込みを介した、結合体ライブラリーの生成に使用することができる。こうしたものには、ＴＡＬＥヌクレアーゼ結合ドメインが、メガヌクレアーゼに融合した「メガＴＡＬＥＮ（ｍｅｇａ－ＴＡＬＥＮ）」［３９］、及び単一ＴＡＬＥヌクレアーゼ認識ドメインが、切断を引き起こすために使用される「コンパクトＴＡＬＥＮ（ｃｏｍｐａｃｔ　ＴＡＬＥＮ）」［４０］が含まれる。

【００６５】

近年、ゲノム内の特定配列に対する二本鎖切断または一本鎖切断の指示に向けた別のシステムについて、説明された。このシステムは、「クラスター化して規則的な間隙を含む短い回文配列の繰り返し（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔ）（ＣＲＩＳＰＲ）及びＣＲＩＳＰＲ関連（ＣＲＩＳＰＲ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）（Ｃａｓ）」システムと呼ばれ、細菌の防衛機構に基づくものである［４１］。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、短い回文配列の繰り返しと隣接する、短い相補一本鎖ＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡまたはｃｒＲＮＡ）を介した切断に向けて、ＤＮＡを標的としている。一般に使用される「ＩＩ型」システムでは、標的ＲＮＡのプロセシングは、回文配列の繰り返しに相補的な配列を有するトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）の存在に依存している。回文繰り返し配列に対するｔｒａｃｒＲＮＡのハイブリッド形成が、プロセシングを引き起こす。プロセシングされたＲＮＡは、Ｃａｓ９ドメインを活性化し、ＤＮＡ内の相補的な配列に対してその活性を指示する。システムは、単一ＲＮＡ転写物に由来するＣａｓ９による切断を指示するために単純化されており、ゲノム内の多くの異なる配列を対象としてきた［４２、４３］。ゲノム切断に対するこの手法は、短いＲＮＡ配列を介して指示されるという優位性を有し、これによって、切断特異性の操作が相対的に単純化されている。このように、ゲノムＤＮＡの部位特異的切断を達成する方法は、様々であり、数多く存在する。上記のとおり、これは、内在性である細胞のＤＮＡ修復機構を介した、ドナープラスミドの組込み率を増進するものである。

【００６６】

メガヌクレアーゼ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥヌクレアーゼ、またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムなどの核酸ガイドシステムを使用することで、ゲノム内の内在性遺伝子座を標的とすることが可能になるであろう。本明細書の実施例では、我々は、ＡＡＶＳ遺伝子座を標的とすることを示しているが、代替の遺伝子座を標的とすることができる。例えば、導入遺伝子を効率的に発現するために、Ｉ型コラーゲンの遺伝子座が使用された［４４］。

【００６７】

あるいは、その後のライブラリー標的化に向けて、メガヌクレアーゼ、ＺＦＮ、及びＴＡＬＥヌクレアーゼを含む標的ヌクレアーゼの異種性の認識部位を事前に導入することができる。本明細書の実施例では、我々は、相同組換えによる導入のための、ＡＡＶＳ遺伝子座内のＴＡＬＥヌクレアーゼ認識配列、ＡＡＶＳ遺伝子座内のＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ認識配列、及び異種性のＴＡＬＥヌクレアーゼ認識部位の使用について説明している。ヌクレアーゼ指向型標的化は、ベクターＤＮＡまたは二本鎖オリゴヌクレオチドさえも使用して、相同組換えまたはＮＨＥＪによる、標的配列の挿入を推進するために使用することができる［４５］。代替として、非特異的標的化方法を使用することで、トランスポゾン指向型組込み［４６］の使用を介して、標的化部位を導入して、部位特異的ヌクレアーゼの認識部位を導入することができる。低力価で適用される、レンチウイルスなどのウイルスに基づくシステムも標的化部位の導入に使用することができる。単一コピーの挿入に向けた選別と組み合わせた、ＤＮＡの遺伝子導入も特有の組込み部位の同定に使用することができる［１７］。そのような非特異的手法は、細胞が、標的とするための明白な部位を有さない場合、またはゲノム配列が決定されていない場合、またはゲノムに対してＴＡＬＥヌクレアーゼ、ＺＦＮ、もしくはＣａｓ９／ＣＲＩＳＰＲシステムが利用できない場合、に特に有用であろう。ヌクレアーゼ認識部位を無作為に挿入した後に、細胞株が

一旦確立すると、続いて細胞株は、ヌクレアーゼ指向型組込みを使用した結合体ライブラリーの創出に使用することができ、当該結合体ライブラリーは、ライブラリーのすべてのクローンが、固定遺伝子座に導入遺伝子を含むものである。

【００６８】

記載の実施例では、ドナーＤＮＡ向けの別のプラスミドと共に使用する個々のプラスミド上に存在するＴＡＬＥヌクレアーゼまたはＺＦＮのペアを含む、３種の異なるプラスミドを使用している。メガヌクレアーゼの場合は、部位特異的ヌクレアーゼは、単一遺伝子によってコードされ、これは、１つのプラスミド上に導入されており、ドナーＤＮＡは、第２のプラスミド上に存在する。当然のことながら、同一プラスミド上に２つ以上のこうした要素を組込んで、組み合わせて使用することができ、これは、導入することになるプラスミド数を低減することによって標的化効率を増進することができる。さらに、トランスポサーゼで示されたように［４６］、ヌクレアーゼ活性の時間的制御を可能にするために、誘導性でもあり得るヌクレアーゼを事前に組み込むことが可能であり得る。最終的には、ヌクレアーゼは、組換えタンパク質またはタンパク質：ＲＮＡ複合体（例えば、ＣＲＩＳＰＲ：Ｃａｓ９などのＲＮＡ指向型ヌクレアーゼの場合）として導入することができる。

【００６９】

遺伝子座

部位特異的ヌクレアーゼに向けた認識配列は、ゲノムＤＮＡ、または細胞において安定的に受け継がれているエピソームＤＮＡに存在していてもよい。したがって、ドナーＤＮＡは、細胞ＤＮＡのゲノムまたはエピソームの遺伝子座に組込まれてよい。

【００７０】

その最も単純な形態では、結合体をコードする単一遺伝子（結合体の遺伝子）は、真核生物ゲノム内の単一部位を標的とする。特定の結合活性または細胞表現型を示す細胞を同定すれば、所望の特性をコードする遺伝子の直接的な単離が可能となるであろう（例えば、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡからのＰＣＲによって）。これは、部位特異的ヌクレアーゼに向けた特有の認識配列であって、細胞ＤＮＡに１度しか生じない特有の認識配列を使用することによって促進される。したがって、ライブラリーの創出に使用される細胞は、単一の固定遺伝子座、すなわち、すべての細胞において同一である１つの遺伝子座、に１つのヌクレアーゼ認識配列を含んでよい。そのような細胞から産生するライブラリーは、固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含むことになり、すなわち、これが、ライブラリー中のすべてのクローンの細胞ＤＮＡにおける同一遺伝子座で起こるということである。

【００７１】

任意選択で、認識配列は、細胞ＤＮＡにおいて複数回生じてよく、その結果、細胞は、複数の潜在的な、ドナーＤＮＡの組込み部位を有する。これは、認識配列が、染色体のペア、すなわち、反復遺伝子座、における対応する位置に存在する二倍体または倍数体の細胞では典型的な状況であろう。そのような細胞から産生するライブラリーは、反復固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含み得る。たとえば、二倍体細胞から産生したライブラリーは、二重の固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを有し得、三倍体細胞から産生したライブラリーは、三重の固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを有し得る。適した哺乳類細胞の多くは、二倍体であり、本発明による哺乳類細胞ライブラリーのクローンは、二重の固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを有し得る。

【００７２】

部位特異的ヌクレアーゼによる認識配列は、細胞ＤＮＡにおける複数の独立した遺伝子座に生じ得る。したがって、ドナーＤＮＡは、複数の独立した遺伝子座に組込まれ得る。二倍体または倍数体の細胞のライブラリーは、複数の独立した固定遺伝子座及び／または反復固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含み得る。

【００７３】

複数の遺伝子座（反復遺伝子座または独立遺伝子座を問わず）に認識配列を含む細胞で

は、それぞれの遺伝子座は、ドナーＤＮＡ分子に向けた潜在的な組込み部位に相当するものである。細胞へのドナーＤＮＡの導入は、細胞に存在するすべての数のヌクレアーゼ認識配列での組込みをもたらし得るか、またはドナーＤＮＡは、いくつかのヌクレアーゼ認識配列では組込まれ得るが、こうした潜在的な部位のすべてにではない。例えば、第１遺伝子座及び第２遺伝子座（例えば、二重の固定遺伝子座）に認識配列を含む二倍体細胞に由来するライブラリーを産生すると、得られるライブラリーは、ドナーＤＮＡが第１固定遺伝子座に組込まれたクローンと、ドナーＤＮＡが第２固定遺伝子座に組込まれたクローンと、ドナーＤＮＡが第１固定遺伝子座及び第２固定遺伝子座の両方に組込まれたクローンと、を含み得る。

【００７４】

したがって、ライブラリーの産生方法は、１つの細胞における複数の遺伝子座の、部位特異的ヌクレアーゼによる切断と、複数の固定遺伝子座へのドナーＤＮＡの組込みと、を伴い得る。上記のとおり、同一認識配列の複数コピーが存在する場合（例えば、二倍体または倍数体の細胞における内在性遺伝子座を標的とするときに生じる）であり、特に、効率的な標的化機構を使用すると、２つの結合体遺伝子が組込まれることになり、その際、１つの遺伝子のみが、標的に対して特異的である可能性がある。これは、結合体遺伝子が単離されると、その後の選別の間に解決することができる。

【００７５】

いくつかの実例では、細胞当たり、複数の結合体を導入することが望ましくあり得る。例えば、一体となる異なる２つの抗体から二重特異性である結合体を生成することができ、こうしたものは、個々の結合体には無い特性を有し得る［４７］。これは、二重の固定遺伝子座の両方の対立遺伝子へ異なる抗体遺伝子を導入するか、または本明細書に記載の方法を使用して、独立した固定遺伝子座へ、標的とする異なる抗体集団を導入することによって達成できる。さらに、結合体自体が、複数鎖からなってよい（例えば、Ｆａｂ形式またはＩｇＧ形式内に存在する抗体のＶＨドメイン及びＶＬドメイン）。この場合、異なる遺伝子座へ異なるサブユニットを組込むことが望ましくあり得る。こうしたものは、ヌクレアーゼ指向型組込みの同一サイクル内で組込むことができ、そうしたものは、一方または両方の組込み段階で、ヌクレアーゼ指向型組込みを使用して順次組込むことができる。

【００７６】

ドナーＤＮＡの導入

遺伝子導入、感染、または電気穿孔を含む、多数の方法が、真核細胞へのドナーＤＮＡの導入に向けて説明されてきた。本明細書に記載のポリエチレンイミン媒介性の遺伝子導入を含む、標準方法による遺伝子導入が可能な細胞の数は非常に多い。さらに、方法は、５分間で10^{10}個の細胞を処理する高効率な電気穿孔に利用可能であり、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍａｘｃｙｔｅ．ｃｏｍである。

【００７７】

コンビナトリアルライブラリーを創出することができ、ここで、多量体の結合ペアのメンバー（例えば、抗体遺伝子のＶＨ遺伝子及びＶＬ遺伝子）は、異なるプラスミドに導入されるか、または同一結合体分子の異なる部分でさえも、異なるプラスミドに導入される。別々の結合体または結合体サブユニットをコードする別々のドナーＤＮＡ分子の導入を同時または順次実施してよい。例えば、抗体軽鎖を遺伝子導入または感染によって導入し、必要であれば、細胞を増殖させて選択することができる。そして、その後の感染または遺伝子導入の段階で、他の成分を導入することができる。一方または両方の段階が、特定ゲノム遺伝子座に対するヌクレアーゼ指向型の組込みを伴い得る。

【００７８】

ドナーＤＮＡの組込み

ドナーＤＮＡは、細胞ＤＮＡへと組込まれて、組込み部位にドナーＤＮＡが挿入された近接ＤＮＡ配列を有する組換えＤＮＡを形成する。本発明では、組込みは、細胞に対して内在性である天然のＤＮＡ修復機構によって媒介される。したがって、細胞へのドナーＤ

ＮＡの導入によって、組込みを簡単に生じさせることが可能となり得、これにより、部位特異的ヌクレアーゼによる組込み部位の創出が可能になると共に、ドナーＤＮＡの組込みが可能となる。細胞は、ＤＮＡが組込まれる間、十分な時間、培養で保持してよい。これは、通常、細胞集団の混合をもたらし、当該細胞には、（ｉ）部位特異的ヌクレアーゼによって創出された組込み部位に、ドナーＤＮＡが組込まれた組換え細胞、ならびに任意選択で、（ｉｉ）ドナーＤＮＡが、所望の組込み部位以外の部位に組込まれた細胞、及び／または任意選択で、（ｉｉｉ）ドナーＤＮＡが、組込まれなかった細胞、が含まれる。したがって、ライブラリーの所望の組換え細胞及び得られるクローンは、他の真核細胞との混合集団において提供されてよい。ライブラリーの細胞を濃縮するために、本明細書の他の箇所に記載の選択方法を使用してよい。

【００７９】

真核細胞における内在性のＤＮＡ修復機構には、相同組換え、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）、及びマイクロホモロジー指向型末端結合（ｍｉｃｒｏｈｏｍｏｌｏｇｙ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｅｎｄ　ｊｏｉｎｉｎｇ）が含まれる。そのようなプロセスによるＤＮＡ修飾の効率は、ＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入することによって増加させることができ、Ｉ－Ｓｃｅ１などのレアカッターエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）を使用することで、効率が、４０，０００倍に上昇することが報告された［４８、４９、５０］。

【００８０】

Ｆｌｐ－Ｉｎシステムなどのシステムで生じる部位特異的組換え［１６］とは異なり、本発明は、外来性リコンビナーゼまたは操作されたリコンビナーゼ認識部位を必要とするものではない。したがって、任意選択で、本発明は、ライブラリーの創出において、リコンビナーゼ媒介性のＤＮＡ組込みの段階を含まず、及び／または任意選択で、ドナーＤＮＡが導入される真核細胞は、部位特異的リコンビナーゼ向けの組換え部位を欠いている。リコンビナーゼと、ヌクレアーゼとが、細胞ＤＮＡへとドナーＤＮＡを指示して挿入する機構及び実用性は、非常に異なるものである。これは、Ｊａｓｉｎ　１９９６［５０］によって、以下に考察されているとおりである。

【００８１】

「。。。部位特異的リコンビナーゼによって触媒される反応は、ＤＳＢの細胞修復とは完全に異なるものである。ｃｒｅなどの部位特異的リコンビナーゼは、２つの認識部位を対合させ、部位内に一本鎖切断を創出することで、ホリデイ（Ｈｏｌｉｄａｙ）中間体を形成する。この中間体は、解消され、欠失、反転、及び挿入（同時組込み体（ｃｏｉｎｔｅｇｒａｎｔ））を産生し、これらのすべてで、２つの認識部位は回復される。反応は、絶対的に正確であり、それ故に可逆的である。切断が細胞修復機構に対して曝露されることは決してない。」

【００８２】

対照的に、部位特異的ヌクレアーゼは、細胞ＤＮＡ（例えば、ゲノムまたはエピソーム）内に切断または切れ目を生じさせるために働き、当該切断または切れ目は、相同組換えまたはＮＨＥＪなどの内在性の細胞修復機構に曝露されて修復される。リコンビナーゼに基づく手法では、その認識部位を事前に組込むことが絶対要件であるため、そのような方法は、予備段階として、「ホットスポット」組込み部位の細胞ＤＮＡへの導入操作が必要になる。ヌクレアーゼ指向型の組込みでは、ヌクレアーゼを操作するか、またはＣＲＩＳＰＲ：Ｃａｓ９の場合は、ガイドＲＮＡを介して指示し、内在性遺伝子座、すなわち、細胞ＤＮＡにおいて自然発生する核酸配列を認識させることが可能である。最終的に、ヌクレアーゼ指向型の手法は、結合体の大きなライブラリーを作成するために必要なレベルで、導入遺伝子を直接組込むために、実践的なレベルにおいて、より効率的なものである。

【００８３】

本発明の方法において、ドナーＤＮＡが組込まれるＤＮＡ修復機構は、ドナーＤＮＡの設計及び／または部位特異的ヌクレアーゼの選択によって、事前に決定、または幾分か偏らせることができる。

【００８４】

相同組換えは、修復用鋳型として相同配列（例えば、別の対立遺伝子由来）を使用する、二本鎖切断修復のための、細胞が使用する天然の機構である。相同組換えは、ゲノムへの、挿入（導入遺伝子を含む）、欠失、及び点変異の導入のために、細胞工学において利用されてきた。相同組換えは、ドナーＤＮＡ上にホモロジーアームを与えることによって促進される。高等真核生物を操作するための元の手法では、典型的には、ドナープラスミド内の５～１０ｋｂのホモロジーアームを使用して、関心部位への標的組込みの効率を増加させるものであった。これにもかかわらず、長いホモロジーアームによって純粋に推進される相同組換えは、Ｆｌｐ及びＣｒｅ指向型の組換えと比較して、特に大きなゲノムを有する高等真核性物において、効率が低いものである。相同組換えは、ゲノムサイズが僅か１２．５ｘ１０^{6}ｂｐである酵母などの真核生物に特に適しており、例えば、３０００ｘ１０^{6}ｂｐを有する哺乳類細胞といった、より大きなゲノムを有する高等真核生物と比較して、より効率的である。

【００８５】

相同組換えは、ゲノムＤＮＡの切れ目を介して指示することもでき［５２］、これは、ゲノムＤＮＡへの、ヌクレアーゼ指向型の組込みに向けた経路としても働くことができる。２つの異なる経路が、切れ目の入ったＤＮＡにおける相同組換えを促進することが示された。一方は、Ｒａｄ５１／Ｂｒｃａ２を利用した、二本鎖切断の修復に本質的に類似しているが、もう一方は、Ｒａｄ５１／Ｂｒｃａ２によって阻害され、一本鎖ＤＮＡまたは切れ目の入った二本鎖ドナーＤＮＡを優先的に使用するものである［５１］。

【００８６】

非相同末端結合（ＮＨＥＪ）は、ゲノムにおける二本鎖切断を修復する代替の機構であり、ＤＮＡの末端は、相同性の鋳型を必要とすることなく、直接的に再連結される。ゲノムＤＮＡのヌクレアーゼ指向型の切断は、非相同性に基づく機構を介した導入遺伝子の組込みを増進することもできる。ＤＮＡ修復に対するこの手法は、正確性が低く、挿入または欠失を引き起こし得る。それにもかかわらず、ＮＨＥＪは、インフレームエクソンをイントロンへと組込む簡便な手段を提供するか、またはプロモーター：遺伝子カセットの、ゲノムへの組込みを可能にするものである。非相同性の方法を使用することで、ホモロジーアームを欠いたドナーベクターを使用することが可能になり、それによって、ドナーＤＮＡの構築が単純化される。

【００８７】

ＤＮＡ末端の再連結に、短い末端相同性領域が使用されることが指摘されており、二本鎖切断の修復指示に、４ｂｐのマイクロホモロジーを利用し得るとの仮説が立てられ、これは、マイクロホモロジー指向型末端結合と称される［５０］。

【００８８】

ドナーＤＮＡ

ドナーＤＮＡは、通常は、環状化ＤＮＡであり、プラスミドまたはベクターとして提供してよい。別の可能性としては、直鎖状ＤＮＡである。ドナーＤＮＡ分子は、細胞ＤＮＡへと組込まれる１つまたは複数のドナーＤＮＡ配列に加えて、細胞ＤＮＡへと組込まれない領域を含んでよい。ＤＮＡは、典型的には二本鎖であるが、場合によっては、一本鎖ＤＮＡを使用してよい。ドナーＤＮＡは、結合体をコードする１つまたは複数の導入遺伝子を含み、例えば、プロモーター：遺伝子カセットを含んでよい。

【００８９】

最も単純な形式の二本鎖では、相同組換えを推進するために、環状プラスミドＤＮＡを使用することができる。これには、導入遺伝子と隣接するＤＮＡ領域が必要であり、当該隣接ＤＮＡ領域は、ゲノムＤＮＡの切断部位と隣接するＤＮＡ配列に対して相同性を有するものである。直鎖化された二本鎖プラスミドＤＮＡまたはＰＣＲ産物または合成遺伝子を使用して、相同組換え経路及びＮＨＥＪ修復経路の両方を推進することができる。二本鎖ＤＮＡに対する代替として、一本鎖ＤＮＡを使用して、相同組換えを推進することが可能である［５２］。一本鎖ＤＮＡを生成するための一般的な手法は、糸状バクテリオファージに由来する一本鎖の複製起点をプラスミドへと含めるものである。

【００９０】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などの一本鎖ＤＮＡのウイルスは、効率的な相同組換えを推進するために使用され、効率が桁違いに改善することが示された［５３、５４］。ＡＡＶシステムなどのシステムは、大きな結合体ライブラリーの構築に向けて、ヌクレアーゼ指向型の切断と併せて使用することができる。両システムの優位性は、結合体ライブラリーの標的化に適用することができる。ＡＡＶベクターのパッケージング限界は、４．７ｋｂであるが、標的ゲノムＤＮＡのヌクレアーゼ消化を使用すれば、この制限を減らすことになり、より大きな導入遺伝子構築物を組込むことが可能となる。
【００９１】
ドナーＤＮＡ分子は、単一の結合体または複数の結合体をコードしてよい。任意選択で、ドナーＤＮＡ分子当たり、結合体の複数サブユニットをコードしてよい。いくつかの実施形態では、ドナーＤＮＡは、多量体である結合体の１つのサブユニットをコードする。
【００９２】
選択に向けたプロモーター及び遺伝子要素
コードするドナーＤＮＡからの、結合体の転写は、通常、プロモーター及び任意選択で、１つまたは複数の転写促進因子である要素の制御下に、結合体をコードする配列を設置することによって達成されることになる。ドナーＤＮＡ分子自体に、プロモーター（及び任意選択で、他の遺伝子制御要素）を含めてよい。あるいは、結合体をコードする配列は、ドナーＤＮＡ上でプロモーターを欠いていてよく、代わりに、細胞ＤＮＡ上のプロモーターと動作可能な結合で設置してもよく、当該プロモーターは、例えば、内在性プロモーター、または部位特異的ヌクレアーゼによって創出された組込み部位での、その挿入の結果として事前に組込まれた外来性プロモーターである。
【００９３】
ドナーＤＮＡを含む細胞、またはドナーＤＮＡを発現する細胞、の選択を可能にする遺伝子要素などの、１つまたは複数のさらなるコード配列を、ドナーＤＮＡはさらに含んでよい。上で考察した、結合体をコードする配列と同様に、そのような要素は、ドナーＤＮＡ上のプロモーターと関連させてよく、または固定遺伝子座でのドナーＤＮＡの組込みの結果として、プロモーターの制御下に設置してよい。後者の配置は、特に、所望の部位に組込まれたドナーＤＮＡを有する細胞の簡便な選択手段を提供し、これは、こうした細胞が、選択に向けた遺伝子的要素を発現することになるためである。これは、例えば、ブラストサイジンまたはピューロマイシンなどの、陰性の選択剤に対する耐性を与える遺伝子であってよい。１つまたは複数の選択段階を適用して、ドナーＤＮＡを欠いている細胞、または正しい位置にドナーＤＮＡが組込まれなかった細胞などの、不必要な細胞を除去してよい。あるいは、こうした細胞は、ライブラリーのクローンと混ざったままにしておいてよい。
【００９４】
膜に繋留された結合体の発現は、それ自体を選択可能マーカーの形態として使用することができる。例えば、ＩｇＧまたはｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体として編成された抗体遺伝子のライブラリーが導入されるのであれば、抗体を発現する細胞は、本明細書に記載の方法を使用して表面に発現したＦｃを認識する二次試薬を使用して選択することができる。外来性プロモーターの制御下にある導入遺伝子をコードするドナーＤＮＡの初回遺伝子導入の際は、結合体の一過性発現（及び細胞表面発現）が生じることになり、（例えば、１～２個の抗体遺伝子／細胞の標的組込みを達成するために）一過性発現の減少を待つことが必要となるであろう。
【００９５】
代替として、膜繋留要素（例えば、ＰＤＧＦ受容体膜貫通ドメインに融合した、本発明の実施例のＦｃドメイン）をコードする構築物を、結合体のライブラリーを導入する前に、事前に組込むことができる。この膜繋留要素が、プロモーターを欠いているか、またはフレームの外にあるエクソン内に、当該エクソンと共にコードされているのであれば、表面発現は損なわれることになる。新規ドナー分子の標的組込みを実施すれば、この欠損を

修正することができる（例えば、プロモーター、または「インフレーム」エクソンの、欠損膜繋留要素の上流にあるイントロンへの標的化導入によって）。フレーム「修正エクソン」が、結合体もコードしているのであれば、結合体と、膜繋留要素と、の融合体が産生することになり、両方の表面発現がもたらされる。したがって、正しく標的化された組込みは、膜繋留要素単独のインフレーム発現、または新規結合体との融合体の一部としての膜繋留要素のインフレーム発現をもたらすことになる。さらに、新規結合体のライブラリーが、膜繋留要素を欠いており、こうしたものが誤って組込まれているのであれば、それは、選択されないことになる。したがって、細胞表面での結合体自体の発現は、正しく標的化されて組込まれた細胞集団を選択するために使用することができる。

【００９６】

クローン数及びライブラリーの多様性

１０^{7}～１０^{10}の酵母ディスプレイライブラリーが、これまでに構築され、集団の免疫化または事前選択無しで結合体が得られることが示された［９、５５、５６、５７］。これまでに発表された哺乳類ディスプレイライブラリーの多くが、免疫化ドナーから得られた抗体遺伝子を使用したものか、または濃縮された抗原特異的Ｂリンパ球から得られた抗体遺伝子でさえも使用したものであり、高等真核生物に由来する細胞を使用すると、ライブラリーのサイズ及び可変性が限定されるものであった。本発明において説明される遺伝子標的化の効率の結果、哺乳類細胞などの高等真核生物において、大きなナイーブライブラリーを構築することができ、これは、酵母などの、より単純な真核生物に向けて説明されるものに適合するものである。

【００９７】

ドナーＤＮＡを細胞ＤＮＡへ組込んだ後、得られる組換え細胞を培養することで、その複製が可能になり、初期に産生したそれぞれの組換え細胞に由来して、細胞のクローンを生成する。したがって、それぞれのクローンは、部位特異的ヌクレアーゼによって創出された組込み部位に、ドナーＤＮＡが組込まれた元の１つの細胞に由来するものである。本発明による方法は、ドナーＤＮＡの高効率かつ高忠実度である組込みと関連しており、本発明によるライブラリーは、少なくとも１００、１０^{3}、１０^{4}、１０^{5}、１０^{6}、１０^{7}、１０^{8}、１０^{9}、または１０^{10}個のクローンを含み得る。

【００９８】

ヌクレアーゼ指向型組込みを使用することで、遺伝子導入された哺乳類細胞の１０％またはそれより多くの細胞を標的とすることが可能である。細胞を増殖させ、＞１０^{10}個の細胞（例えば、２ｘ１０^{6}個の細胞／ｍｌで増殖している５リットルの細胞由来）を形質転換することも実用的である。そのような大きな数の細胞の遺伝子導入は、本明細書に記載のようなポリエチレンイミン媒介性の遺伝子導入を含む標準方法を使用して実施することができる。さらに、方法は、５分間で１０^{10}個の細胞を処理する高効率な電気穿孔に利用可能であり、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍａｘｃｙｔｅ．ｃｏｍである。したがって、本発明の手法を使用することで、１０^{9}個のクローンを超えるライブラリーの創出が可能である。

【００９９】

ライブラリーの創出に使用されるドナーＤＮＡ分子の集団が、同一配列の複数のコピーを含んでいると、同一の結合体をコードするＤＮＡを含む２つ以上のクローンを取得し得る。例えば、本明細書の他の箇所に詳細に記載されるように、部位特異的ヌクレアーゼ向けの、複数の認識配列が存在するのであれば、クローンが、複数の異なる結合体をコードするドナーＤＮＡを含み得る場合もあり得る。したがって、ライブラリーの多様性は、コードまたは発現する異なる結合体の数に関して、得られるクローンの数とは異なり得る。

【０１００】

ライブラリーのクローンは、好ましくは、結合体レパートリーの１つまたは２つのメンバーをコードするドナーＤＮＡを含み、及び／または好ましくは、結合体レパートリーの１つまたは２つのメンバーのみを発現する。所与の標的に対するライブラリーの選別時に同定される特定の結合体をコードするクローン及び／またはＤＮＡの同定となれば、異な

る結合体の数が細胞当たりで限定されていることは利点である。これは、クローンが、結合体レパートリーの単一メンバーをコードしていると、最も単純である。しかしながら、ライブラリーから選択されたクローンが、少数の異なる結合体をコードするのであれば、所望の結合体をコードする関連ＤＮＡを同定することも直接的であり、例えば、クローンが、結合体レパートリーの２つメンバーをコードし得る場合である。本明細書の他の箇所で考察されているように、１つまたは２つの結合体をコードするクローンは、二倍体ゲノムにおいて染色体コピー当たりに１度生じる、部位特異的ヌクレアーゼ向けの認識配列を選択することよって生成させることが特に簡便であり、これは、二倍体細胞は、１つの固定遺伝子座がそれぞれの染色体コピー上に存在する二重の固定遺伝子座を含み、ドナーＤＮＡが、一方または両方の固定遺伝子座に組込まれ得るためである。したがって、ライブラリーのクローンは、それぞれが、結合体レパートリーの１つまたは２つメンバーのみを発現し得る。

【０１０１】

ライブラリーの細胞表面でディスプレイされる結合体は、同一細胞上でディスプレイされる他の結合体と同一（他の結合体と同一のアミノ酸配列を有する）であり得る。ライブラリーは、それぞれが、結合体レパートリーの単一メンバーをディスプレイする細胞のクローンからなり得るか、または細胞当たり、結合体レパートリーの複数メンバーをディスプレイするクローンからなり得る。あるいは、ライブラリーは、結合体レパートリーの単一メンバーをディスプレイするいくつかのクローン、及び結合体レパートリーの複数メンバー（例えば、２つ）をディスプレイするいくつかのクローンを含んでいてよい。

【０１０２】

したがって、本発明によるライブラリーは、結合体レパートリーの複数メンバーをコードするクローンを含み得、ドナーＤＮＡは、二重の固定遺伝子座または複数の独立した固定遺伝子座に組込まれる。

【０１０３】

上に記載したとおり、対応するクローンが、１つの結合体のみを発現するのであれば、対応する結合体コード遺伝子を同定することは、最も簡単なことである。典型的には、ドナーＤＮＡ分子は、単一の結合体をコードすることになる。結合体は、多量体であってよく、その結果、ドナーＤＮＡ分子は、複数遺伝子を含むか、または多量体である結合体の多様なサブユニットに対応する翻訳領域を含む。

【０１０４】

本発明によるライブラリーは、少なくとも１００、10^3、10^4、10^5、または10^6、10^7、10^8、10^9、もしくは10^{10}個の異なる結合体をコードし得る。結合体が、多量体である場合、多様性は、結合体の１つまたは複数のサブユニットによって提供され得る。多量体である結合体は、１つまたは複数の可変サブユニットと、１つまたは複数の定常サブユニットと、を組み合わせていてよく、ここで、定常サブユニットは、ライブラリーのすべてのクローンにわたって同一（または多様性が、より限定されている）である。多量体である結合体のライブラリー生成において、組み合わせによる多様性が可能であり、結合体サブユニットの第１レパートリーは、結合体サブユニットの第２レパートリーのいずれともペアになり得る。

【０１０５】

結合体

本発明による「結合体（ｂｉｎｄｅｒ）」は、結合性分子であり、別の分子に向けた特異的結合性パートナーに相当する。特異的結合性パートナーの典型的な例は、抗体－抗原及び受容体－リガンドである。

【０１０６】

ライブラリーによってコードされる結合体のレパートリーは、通常、共通構造を共有し、１つまたは複数の多様性領域を有することになる。したがって、ライブラリーによって、ペプチドまたはｓｃＦｖ抗体分子などの、分子の所望の構造クラスのメンバーを選択することが可能となる。例えば、結合体は、共通構造を共有し、かつ１つまたは複数のアミ

ノ酸配列多様性領域を有するポリペプチドであってよい。

【０１０７】

これは、抗体分子のレパートリーについて考えることによって例証することができる。こうしたものは、一般的な構造クラスの抗体分子であってよく、例えば、その配列の１つまたは複数の領域が異なるＩｇＧ、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、またはｓｃＦｖである。抗体分子は、典型的には、その相補性決定領域（ＣＤＲ）において、配列可変性を有し、相補性決定領域は、抗原認識に第１に関与する領域である。本発明における結合体のレパートリーは、１つまたは複数のＣＤＲが異なる抗体分子のレパートリーであってよく、例えば、６つすべてのＣＤＲに配列多様性が存在してよく、または重鎖ＣＤＲ３及び／もしくは軽鎖ＣＤＲ３などの１つもしくは複数の特定のＣＤＲに配列多様性が存在してよい。

【０１０８】

抗体分子及び他の結合体については、本明細書の他の箇所に、より詳細に記載されている。しかしながら、本発明の可能性は、抗体ディスプレイを超えて広がり、受容体、リガンド、個々のタンパク質ドメイン、及び代替のタンパク質骨格［５８、５９］を含むペプチドまたは操作されたタンパク質のライブラリーのディスプレイを含むものである。ヌクレアーゼ指向型の部位特異的組込みは、他のディスプレイシステムを使用して、予め操作された他の型の結合体のライブラリーを作成するために使用することができる。こうしたものの多くが、ＤＡＲＰｉｎ及びリポカリン、ａｆｆｉｂｏｄｙ及びａｄｈｉｒｏｎ［５８、５９、１５２］などの単量体結合ドメインを含む。真核生物上、特に哺乳類細胞上でのディスプレイも、より複雑かつ多量体である標的が関与する、結合体または標的の単離及び操作の可能性を広げるものである。例えば、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、Ｔ細胞上に発現し、抗原提示細胞上のＭＨＣ分子との複合体において提示されるペプチドを認識するために進化してきた。ＴＣＲのレパートリーをコード及び発現するライブラリーを生成させてよく、本明細書の他の箇所にさらに記載されるように、ＭＨＣペプチド複合体に対する結合を同定するために選別してよい。

【０１０９】

多量体である結合体に向けては、結合体をコードするドナーＤＮＡは、１つまたは複数のＤＮＡ分子として提供されてよい。例えば、個々の抗体のＶＨドメイン及びＶＬドメインが、別々に発現されることになる場合、こうしたものは、ドナーＤＮＡの別々の分子上にコードされていてよい。ドナーＤＮＡは、複数の組込み部位で、細胞ＤＮＡへと組込まれ、例えば、１つの遺伝子座で、ＶＨ向けの結合体遺伝子が組込まれ、第２の遺伝子座で、ＶＬ向けの結合体遺伝子が組込まれる。別々の結合体サブユニットをコードするドナーＤＮＡの導入方法は、本明細書の他の箇所に、より詳細に記載されている。あるいは、多量体である結合体のサブユニットまたは部分の両方が、固定遺伝子座に組込まれる同一ドナーＤＮＡ分子上にコードされていてよい。

【０１１０】

結合体は、抗体分子または抗原結合部位を含む非抗体タンパク質であってよい。抗原結合部位は、フィブロネクチンまたはチトクロム等などの非抗体タンパク質骨格上のペプチドループを配置することによって提供されてよく、またはタンパク質骨格内のループのアミノ酸残基を無作為化またはそれに変異導入して、所望の標的に対する結合性を付与する［６０、６１、６２］ことによって提供されてよい。抗体模倣物向けのタンパク質骨格については、ＷＯ／００３４７８４において開示されており、その中で、発明者らは、少なくとも１つの無作為化ループを有するフィブロネクチンＩＩＩ型ドメインを含むタンパク質（抗体模倣物）について説明している。例えば、抗体ＶＨのＣＤＲループのセットといった、１つまたは複数のペプチドループの移植に適した骨格は、免疫グロブリン遺伝子のスーパーファミリーの任意のドメインメンバーによって提供されてよい。骨格は、ヒトタンパク質または非ヒトタンパク質であってよい。

【０１１１】

非抗体タンパク質骨格における抗原結合部位の使用については、以前に概説されている［６３］。典型的には、タンパク質は、安定骨格及び１つまたは複数の可変ループを有し

、当該タンパク質においては、１つまたは複数のループのアミノ酸配列に、特異的または無作為に変異が導入され、標的抗原に向けた結合性を有する抗原結合部位が創出されている。そのようなタンパク質には、Ｓ．ａｕｒｅｕｓに由来するプロテインＡのＩｇＧ結合ドメイン、トランスフェリン、テトラネクチン、フィブロネクチン（例えば、第１０フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン）、及びリポカリンが含まれる。他の手法には、例えば、「ノッチン」骨格及びサイクロチド骨格を基礎とする小さな拘束ペプチド（ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ　ｐｅｐｔｉｄｅ）が含まれる［６４］。特にジスルフィド結合の正確な形成に関して、そのサイズの小ささ及び複雑性を考慮すれば、こうした骨格に基づく新規結合体の選択に真核細胞を使用することに対して優位性が存在し得る。天然におけるこうしたペプチドの一般的な機能を考慮すれば、こうした骨格に基づく結合体のライブラリーは、イオンチャネル及びプロテアーゼの遮断における特定用途を有した小さな高親和性の結合体の産生において有利であり得る。

【０１１２】

抗体配列及び／または抗原結合部位に加えて、結合体は、他のアミノ酸を含んでいてよく、これによって、例えば、折り畳まれたドメインなどのペプチドもしくはポリペプチドが形成されるか、または当該分子に対して、抗原結合能に加えて別の機能特性が付与される。結合体は、検出可能な標識を保有してよく、あるいは毒素または標的化部分もしくは標的化酵素と複合化していてよい（例えば、ペプチド結合またはペプチドリンカーを介して）。例えば、結合体は、触媒部位（例えば、酵素ドメイン中）ならびに抗原結合部位を含んでよく、抗原結合部位は、抗原に結合し、それによって、抗原を触媒部位の標的とする。触媒部位は、例えば、切断によって、抗原の生物学的機能を阻害してよい。

【０１１３】

抗体分子

抗体分子は、望ましい結合体である。抗体分子は、４つのポリペプチド鎖を有する全抗体または全免疫グロブリン（Ｉｇ）であってよく、当該４つのポリペプチド鎖は、すなわち、２つの同一重鎖及び２つの同一軽鎖である。重鎖及び軽鎖は、ペアを形成し、それぞれが、抗原結合部位を含むＶＨ－ＶＬドメインのペアを含む。重鎖及び軽鎖は、定常領域も含む。定常領域は、すなわち、軽鎖のＣＬ、ならびに重鎖のＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、及び場合によってはＣＨ４（第５ドメインであるＣＨ４は、ヒトのＩｇＭ及びＩｇＥに存在する）である。２つの重鎖は、可動性のヒンジ領域で、ジスルフィド架橋によって結合する。抗体分子は、ＶＨドメイン及び／またはＶＬドメインを含んでよい。

【０１１４】

抗体分子の最も一般的な天然の形式は、ＩｇＧであり、ＩｇＧは、２つの同一重鎖及び２つの同一軽鎖からなるヘテロ４量体である。重鎖及び軽鎖は、四本鎖逆並行ベータシート及び三本鎖逆並行ベータシートからなる保存された二次構造を有するモジュラードメインから構成されており、単一のジスルフィド結合によって安定化されている。抗体重鎖のそれぞれが、Ｎ末端可変ドメイン（ＶＨ）及び３つの相対的に保存された「定常」免疫グロブリンドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３）を有し、一方、軽鎖は、１つのＮ末端可変ドメイン（ＶＬ）及び１つの定常ドメイン（ＣＬ）を有する。安定複合体において、ジスルフィド結合は、個々のドメインを安定化し、共有結合を形成して、４つの鎖を結合している。軽鎖のＶＬ及びＣＬは、重鎖のＶＨ及びＣＨ１と結びついていると共に、こうした要素は、単独で発現させて、Ｆａｂ断片を形成することができる。ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメイン（「Ｆｃドメイン」とも呼ばれる）は、別のＣＨ２：ＣＨ３のペアと結びついて、４量体であるＹ字の分子を与え、当該分子は、「Ｙ」の先端に、重鎖及び軽鎖に由来する可変ドメインを有する。ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメインは、免疫システム内での、エフェクター細胞と、補体成分との相互作用に関与している。組換え抗体は、ＩｇＧ形式においてか、またはＦａｂ（ＶＨ：ＣＨ１と、軽鎖との２量体からなる）としてこれまで発現されてきた。さらに、可変性のリンカーをコードするＤＮＡと遺伝子学的に融合したＶＨ断片及びＶＬ断片をコードするＤＮＡからなる、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）と呼ばれる人工構築物を使用することができる。

【０１１５】
結合体は、ヒト抗体分子であってよい。したがって、定常ドメインが存在する場合は、好ましくは、ヒト定常ドメインである。
【０１１６】
結合体は、単鎖抗体分子などの抗体断片、またはより小さな分子形式であってよい。例えば、抗体分子は、リンカーペプチドによって結合されたＶＨドメイン及びＶＬドメインからなるｓｃＦｖ分子であってよい。ｓｃＦｖ分子では、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、ＶＨ－ＶＬのペアを形成し、当該ペアにおいて、ＶＨ及びＶＬの相補性決定領域が一緒になって、抗原結合部位を形成する。
【０１１７】
抗体の抗原結合部位を含む他の抗体断片には、限定はされないが、（ｉ）ＶＬドメイン、ＶＨドメイン、ＣＬドメイン、及びＣＨ１ドメインからなるＦａｂ断片と、（ｉｉ）ＶＨドメイン及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片と、（ｉｉｉ）単一抗体のＶＬドメイン及びＶＨドメインからなるＦｖ断片と、（ｉｖ）ＶＨドメインまたはＶＬドメインからなるｄＡｂ断片［６５、６６、６７］と、（ｖ）単離されたＣＤＲ領域と、（ｖｉ）２つが連結されたＦａｂ断片を含む２価断片であるＦ（ａｂ’）２断片と、（ｖｉｉ）２つのドメインを結び付けて抗原結合部位の形成を可能にするペプチドリンカーによって、ＶＨドメイン及びＶＬドメインが連結されているｓｃＦｖ［６８、６９］と、（ｖｉｉｉ）二重特異性単鎖Ｆｖ２量体（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０９９６５）と、（ｉｘ）遺伝子融合によって構築された多価断片または多特異性断片である「ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）」（ＷＯ９４／１３８０４、［７０］）と、が含まれる。Ｆｖ分子、ｓｃＦｖ分子、またはダイアボディ分子は、ＶＨドメイン及びＶＬドメインを連結するジスルフィド架橋を組込むことによって安定化してよい［７１］。
【０１１８】
１つまたは複数の抗体抗原結合部位を含む、様々な他の抗体分子が、操作されており、例えば、Fab_2、Fab_3、ダイアボディ、トリアボディ（ｔｒｉａｂｏｄｙ）、テトラボディ（ｔｅｔｒａｂｏｄｙ）、及びミニボディ（ｍｉｎｉｂｏｄｙ）（小さな免疫タンパク質）が含まれる。抗体分子及びその構築及び使用に向けた方法は、説明されている［７２］。
【０１１９】
結合断片の他の例は、Ｆａｂ’であり、Ｆａｂ’は、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシル末端に、抗体ヒンジ領域に由来する１つまたは複数のシステインを含む数残基が付加していることによって、Ｆａｂ断片とは異なるものであり、Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が、遊離のチオール基を有しているＦａｂ’断片である。
【０１２０】
ｄＡｂ（ドメイン抗体）は、小さな単量体である、抗体の抗原結合断片であり、すなわち、抗体重鎖または抗体軽鎖の可変領域である。ＶＨ　ｄＡｂは、ラクダ科の動物（例えば、ラクダ、ラマ）において、自然に生じ、標的抗原でラクダ科の動物を免疫化し、抗原特異的Ｂ細胞を単離して、個々のＢ細胞に由来するｄＡｂ遺伝子を直接クローン化することによって産生させてよい。ｄＡｂは、細胞培養において産生させることも可能である。そのサイズの小ささ、溶解性及び温度安定性の良さによって、ｄＡｂは、選択及び親和性成熟に向けて、特に生理学的に有用かつ適したものとなっている。ラクダ科の動物のＶＨ　ｄＡｂは、「ｎａｎｏｂｏｄｙ（商標）」という名前で、治療用途に向けて開発されているところである。
【０１２１】
例えば、Ｋｎａｐｐｉｋら［７３］またはＫｒｅｂｓら［７４］によって説明されるように、合成して、適した発現ベクター内に組み入れたオリゴヌクレオチドを用いて生成させた遺伝子から発現させることによって、合成抗体分子を創出してよい。
【０１２２】
二重特異性または二機能性である抗体は、２つの異なる可変領域が同一分子内で結合し

た第２世代のモノクローナル抗体を形成するものである［７５］。新しいエフェクター機能を補充するその能力、または腫瘍細胞表面の数個の分子を標的とする能力から、診断分野及び治療分野の両方においてそうしたものが使用されてきた。二重特異性抗体が使用されることになる場合、こうしたものは、例えば、化学的な調製もしくはハイブリッドハイブリドーマからの調製といった多様な方法[７６]で製造することができる通常の二重特異性抗体であってよく、または上記の二重特異性抗体断片のいずれかであってよい。こうした抗体は、化学的な方法［７７、７８］、または体細胞による方法［７９、８０］によって得ることができるが、強制ヘテロ２量体形成を可能し、それによって、探索対象である抗体の精製プロセスを促進する遺伝子工学手法によって同様かつ選択的に得ることができる［８１］。二重特異性抗体の例には、ＢｉＴＥ（商標）技術のものが含まれ、当該技術では、異なる特異性を有する２つの抗体の結合ドメインを使用し、短い可動性ペプチドを介して直接連結することができる。これにより、短い単一ポリペプチド鎖上で、２つの抗体が結合される。ダイアボディ及びｓｃＦｖは、可変ドメインのみを使用して、Ｆｃ領域無しで構築することができ、これによって、抗イディオタイプ反応の影響を潜在的に低減されている。

【０１２３】

二重特異性抗体は、全ＩｇＧ、二重特異性Ｆａｂ’２、Ｆａｂ’ＰＥＧ、ダイアボディ、あるいは二重特異性ｓｃＦｖとして構築することができる。さらに、当該技術領域において知られる日常的な方法を使用して、２つの二重特異性抗体を連結して、四価の抗体を形成することができる。

【０１２４】

二重特異性である全抗体とは対照的に、二重特異性ダイアボディも特に有用であり得る。適切な特異性を有するダイアボディ（及び抗体断片などの多くの他のポリペプチド）を容易に選択することができる。抗体の一方のアームが、例えば、関心抗原を対象にした特異性と共に、定常性を保持することになるのであれば、もう一方のアームが多様であるライブラリーを作成することができ、適切な特異性を有する抗体が選択される。二重特異性である全抗体は、Ｒｉｄｇｅｗａｙら１９９６［８２］によって説明されるように、代替の操作方法を使用して作成してよい。

【０１２５】

本発明によるライブラリーは、１つまたは複数の関心抗原に結合する抗体分子を選択するために使用してよい。ライブラリーからの選択は、以下に詳細に記載されている。選択の後、抗体分子を操作して、異なる形式とし、及び／または追加の特徴を含めてよい。例えば、選択した抗体分子を、上記の抗体形式の内の１つなどの、異なる形式に変換してよい。選択した抗体分子、ならびに選択した抗体分子のＶＨ及び／またはＶＬのＣＤＲを含む抗体分子は、本発明の態様である。抗体分子及びそれをコードする核酸は、単離された形態で提供されてよい。

【０１２６】

抗体断片は、抗体分子を出発物質として、例えばペプシンもしくはパパインといった酵素による消化などの方法によって、及び／または化学的な還元によるジスルフィド架橋の切断によって得ることができる。別の様式では、抗体断片は、当業者によく知られる遺伝子組換え手法によって、あるいは例えば、自動ペプチド合成機を用いたペプチド合成によって、または核酸を合成して発現させることによって得ることができる。

【０１２７】

モノクローナル抗体及び他の抗体を利用し、組換えＤＮＡ技術の手法を使用して、標的抗原に結合する他の抗体またはキメラ分子を産生することが可能である。そのような手法は、異なる免疫グロブリンの定常領域または異なる免疫グロブリンの定常領域に異なる免疫グロブリンのフレームワーク領域が加わったものに対する、抗体の免疫グロブリン可変領域または抗体のＣＤＲをコードするＤＮＡの導入を伴うものであってよい。例えば、ＥＰ－Ａ－１８４１８７、ＧＢ２１８８６３８Ａ、またはＥＰ－Ａ－２３９４００、及び数ある後続文献を参照のこと。

【０１２８】
抗体分子をライブラリーから選択し、その後に修飾してよく、例えば、生体内での抗体分子の半減期を、例えば、ＰＥＧ化といった化学的修飾、またはリポソーム内への封入によって延長することができる。
【０１２９】
結合体遺伝子の供給源
モノクローナル抗体の生成に向けた伝統的な経路は、マウス及びウサギのような実験動物の免疫システムを利用して、高親和性抗体のプールを生成させてから、当該高親和性抗体を、ハイブリドーマ技術を使用することによって単離するものである。本発明は、免疫化から生じた抗体を特定するための代替経路を提供する。ＶＨ及びＶＬの遺伝子を、免疫化動物のＢ細胞から増幅し、真核生物ライブラリーへの導入に向けた適切なベクターへとクローン化した後、こうしたライブラリーから選択することができる。ファージディスプレイ及びリボソームディスプレイによって、非常に大きなライブラリー（＞10^9クローン）を構築することが可能であり、これによって、免疫化無しにヒト抗体を単離することが可能となる。本発明は、そのような方法と併せて使用することもできる。ファージディスプレイでの選択ラウンドの後に、本明細書に記載のように、ヌクレアーゼ指向型の組込みによって、選択した結合体集団を真核細胞へと導入することができる。これによって、他のシステム（例えば、ファージディスプレイ）に基づく非常に大きなライブラリーを最初に使用して、結合体集団を濃縮することが可能になると同時に、上記のように真核細胞を使用したその効率的な選別が可能になるであろう。したがって、本発明は、ファージディスプレイ及び真核生物ディスプレイの両方の最良の特徴を組み合わせて、定量的スクリーニング及びソーティングが可能な高処理システムを提供することができる。
【０１３０】
十分なサイズのディスプレイライブリーが使用されることを条件であるが、ファージディスプレイ及び酵母ディスプレイを使用して、免疫化に頼ることなく、結合体を生成させることも可能であることをこれまでに示した。例えば、複数の結合体を＞10^7個のクローンを有する非免疫の抗体ライブラリーから生成させた［８３］。同様にして、これにより、伝統的な免疫化経路によっては標的とすることが困難である標的に対する結合体を生成させることが可能となり、例えば、「自己抗原（ｓｅｌｆ－ａｎｔｉｇｅｎ）」または種間で保存されているエピトープに対する抗体を生成させることが可能になる。例えば、ヒト／マウス交差反応性である結合体を、ヒトで連続的に選択してから、同一標的のマウス版で選択することによって濃縮することができる。関心標識のほとんどに対して、ヒトを特異的に免疫化することは不可能であるので、治療手法に好ましいヒト抗体の生成を可能にすることにおいて、この容易さは、特に重要である。
【０１３１】
今日までの哺乳類ディスプレイの例では、ライブラリーのサイズ及び質が限定されている場合、結合体は、例えば、免疫化、または既存結合体を操作して得られる結合体を事前に濃縮したレパートリーを使用して生成されたにすぎなかった。真核細胞、及び具体的には高等真核生物において大きなライブラリーを作成する能力は、非免疫結合体、または別のシステム内でこれまで選択されたことのない結合体、から出発するこうしたライブラリーから結合体を直接単離する可能性を創出するものである。本発明により、非免疫源から結合体を生成させることが可能である。次いでは、これにより、複数の供給源に由来する結合体遺伝子の使用に向けた可能性が開かれる。結合体遺伝子は、抗体遺伝子などの天然源を使用したＰＣＲから得ることができる。結合体の遺伝子は、抗体のファージディスプレイライブラリーなどの現存ライブラリーから再クローン化し、標的細胞へのヌクレアーゼ指向型の組込みに向けた最適なドナーベクターへとクローン化することもできる。結合体の起源は、完全合成または部分合成のものであってよい。さらに、多様な型の結合体が、本明細書の他の箇所に記載されており、例えば、結合体遺伝子は、抗体をコードするか、あるいは代替骨格［５８、５９］、ペプチド、または操作されたタンパク質もしくはタンパク質ドメインをコードすることができる。

【０１３２】
結合体ディスプレイ
関心標的に対する選別に向けて、結合体レパートリーを提供するために、ライブラリーを培養し、可溶性の分泌形態または膜貫通形態のいずれかにおいて、結合体を発現させてよい。細胞表面ディスプレイに向けては、結合体をコードする細胞の表面に、発現した結合体を保定する必要がある。結合体は、細胞表面での結合体の細胞外ディスプレイに向けて、膜貫通ドメインなどの膜アンカーを含むか、またはそれに連結されていてよい。これには、ＧＰＩ認識配列などの膜局在シグナルに対する結合体の直接的な融合、またはＰＤＧＦ受容体［８４］の膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインに対する結合体の直接的な融合が伴ってよい。細胞表面での結合体の保定は、同一細胞内で発現される別の細胞表面保定分子との会合によって間接的に実施することもできる。この結合される分子は、それ自体がヘテロ２量体である結合体の一部となることができ、当該結合される分子は、例えば、直接的に繋留されていない軽鎖パートナーと会合状態にある、繋留された抗体重鎖などである。

【０１３３】
細胞表面への固定化は、結合体の選択を促進するものの、多くの用途において、細胞を含まない分泌結合体を調製する必要がある。分泌結合体を細胞表面受容体に結合する再捕捉方法を使用して、膜繋留と、可溶性分泌とを組み合わせることが可能となる。１つの手法は、分泌結合体を捕捉するために機能できる、同一細胞内で発現する膜繋留分子と結合することができる分泌分子として、結合体ライブラリーを編成するものである。例えば、抗体または抗体Ｆｃ領域に融合した結合体分子の場合は、膜に繋留されたＦｃが、同一細胞において発現している分泌結合体分子を「試料採取（ｓａｍｐｌｅ）」できることで、発現している結合体分子の単量体画分のディスプレイをもたらすと同時に、残りは２価の形態として分泌される（ＵＳ８，５５１，７１５）。代替手法としては、プロテインＡなどのＩｇＧ結合ドメインを繋留して使用することである。

【０１３４】
分泌抗体を、その産生細胞に保定する他の方法［８５］は、Ｋｕｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１２）において概説されており、微小滴内への細胞封入、マトリックスに支援される捕捉、親和性捕捉表面ディスプレイ（ａｆｆｉｎｉｔｙ ｃａｐｔｕｒｅ ｓｕｒｆａｃｅ ｄｉｓｐｌａｙ）（ＡＣＳＤ）、分泌及び捕捉技術（ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ ａｎｄ ｃａｐｔｕｒｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）（ＳＥＣＡＮＴ）、ならびに「コールド捕捉（ｃｏｌｄ ｃａｐｔｕｒｅ）」［８５］が含まれる。ＡＣＳＤ及びＳＥＣＡＮＴ［８５］の例では、ビオチン化を使用して、細胞上での、ストレプトアビジンの固体化または抗体捕捉を促進する。捕捉された分子は、次に、分泌抗体を捕捉する。ＳＥＣＡＮＴの例では、分泌分子のビオチン化が生体内で起こる。「コールド捕捉」手法を使用することで、分泌分子を対象とする抗体を使用して、産生細胞上で、分泌抗体を検出することができる。これは、分泌抗体と、細胞の多糖外被との結合に起因するものであると提唱されている［８６］。あるいは、分泌産物が、形質膜陥入する前に、細胞表面で、染色抗体によって捕捉されることが示唆されている［８７］。上記の方法は、集団内の高発現クローンの同定に使用されてきたが、細胞表面での会合が十分に長寿命であることを条件として、結合特異性の同定に適応させることができる可能性がある。

【０１３５】
結合体が、細胞表面に直接的に繋留されるときでさえ、可溶性産物を生成させることが可能である。例えば、分泌結合体をコードする遺伝子を回収し、膜繋留配列を欠いた発現ベクターへとクローン化することができる。あるいは、実施例において示されているように、リコンビナーゼ部位と隣接するエクソン内に膜貫通ドメインをコードする発現用構築物を使用することができ、当該リコンビナーゼ部位は、例えば、Ｄｒｅリコンビナーゼ向けのＲＯＸ認識部位である［８８］。この例では、Ｄｒｅリコンビナーゼをコードする遺伝子を遺伝子導入することによって、膜貫通ドメインをコードするエクソンを除去して、発現を分泌型に切り替えることができる。本明細書で示されるように、リコンビナーゼの

作用を必要とすることなく、分泌抗体をこの方法によって産生させた。これは、選択的スプライシングの結果であると推定される［８９］。

【０１３６】

上記方法のいずれかまたは他の適した手法を使用して、ライブラリーのクローンが発現する結合体を、その発現細胞の表面に確実にディスプレイすることができる。

【０１３７】

関心標的に対する結合体を同定するための選別

記載のように、標的を認識する結合体の選別方法において、真核細胞ライブラリーを使用してよい。そのような方法は、

本明細書に記載のライブラリーの提供と、

結合体を発現させるための、ライブラリーの細胞の培養と、

標的に対する結合体の曝露であって、それによって、存在するのであれば１つまたは複数の同種結合体による標的の認識が可能になる当該曝露と、

標的が、同種結合体によって認識されたかどうかの検出と、

を含んでよい。

【０１３８】

選択は、広範な標的分子クラスを使用して実施することができ、標的分子クラスは、例えば、タンパク質、核酸、糖質、脂質、小分子である。標的は、可溶性の形態において提供されてよい。標的は、検出を容易にするために標識されていてよく、例えば、標的は、蛍光標識を有するか、またはビオチン化されていてよい。結合体が、標識された分子を捕捉するものである場合、直接的または間接的に標識された標的分子を使用して、標的に特異的な結合体を発現する細胞を単離してよい。例えば、結合体：標的の相互作用を介して、蛍光標識された標的に結合する細胞を検出し、フローサイトメトリーまたはＦＡＣＳによって選別して、所望の細胞を単離することができる。サイトメトリーを伴う選択には、標的分子が、直接的に蛍光標識されているか、または二次試薬で検出することができる分子で標識されている必要があり、例えば、ビオチン化標的を細胞に添加して、細胞表面に対する結合をストレプトアビジン－フィコエリトリンなどの蛍光標識されたストレプトアビジンで検出することができる。さらなる可能性は、標的分子を固定化するか、または磁気ビーズもしくはアガロースビーズなどの個体表面で標的に結合する二次試薬を固定化し、標的に結合する細胞の濃縮を可能にすることである。例えば、結合体：標的の相互作用を介して、ビオチン化標的に結合する細胞は、ストレプトアビジン被覆ビーズなどの、ストレプトアビジンで被覆された基質で単離することができる。

【０１３９】

ライブラリーの選別では、ライブラリーの効果的な提示を確実なものとするために、過剰な試料採取、すなわち、ライブラリー内に存在する独立クローンの数を超えるクローンを選別することが好ましい。流動選別によって、本発明が提供する非常に大きなライブラリーに由来する結合体を同定することができるが、これは、数日を要するであろうし、ライブラリーから過剰な試料採取を行うのであれば、特にそうである。代替として、回収可能な抗原の使用に基づいて、最初の選択を実施することができ、当該回収可能な抗原は、例えば、ストレプトアビジンで被覆された磁気ビーズで回収されるビオチン化抗原である。したがって、ストレプトアビジンで被覆された磁気ビーズを使用して、ビオチン化抗原に結合した細胞を捕捉することができる。磁気ビーズでの選択は、選択のみを実施する方法として使用するか、またはフローサイトメトリーと併用して実施することができ、この場合、より良い分離を達成することができ、例えば、発現レベルが上昇しているクローンの識別、及び親和性が上昇しているクローンの識別である［５６、５７］。

【０１４０】

ディスプレイ技術を使用した手法の試験管内での性質は、免疫化では不可能な方法での選択制御を可能にするものであり、例えば、標的の特定の立体構造状態での選択が可能である［９０、９１］。化学的修飾（フルオレセイン、ビオチン）を介するか、あるいは遺伝子融合（例えば、ＦＬＡＧタグなどのエピトープタグ、または別のタンパク質ドメイン

もしくは全タンパク質に融合したタンパク質）によって、標的にタグを付加することが可能である。タグは、核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、または非生物学的な核酸）であり得、この場合、タグは、標的核酸分子の一部として融合されるか、またはタンパク質などの別の型の分子に化学的に付加することができる。これは、化学的結合または酵素的な付加を介するものであり得る［９２］。リボソームディスプレイなどの翻訳プロセスを介して、核酸を標的に融合させることもできる。「タグ（ｔａｇ）」は、細胞内で生じる別の修飾（例えば、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、アルキル化、ＰＡＳ化、ＳＵＭＯ化、及びｈｔｔｐ：／／ｄｂｐｔｍ．ｍｂｃ．ｎｃｔｕ．ｅｄｕ．ｔｗ／ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ．ｐｈｐの翻訳後修飾データベース（Ｐｏｓｔ－ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｄａｔａｂａｓｅ）（ｄｂ－ＰＴＭ）において説明されている他のもの）であってよく、当該修飾は、二次試薬を介して検出することができる。これによって、特定の修飾に基づいて、未知の標的タンパク質に結合する結合体が得られるであろう。

【０１４１】

例えば、標的に対して特異的な抗体といった、その標的分子に結合する現存の結合体を使用して、標的分子を検出することができる。検出に現存の結合体を使用することで、検出に使用する結合体とは異なるエピトープを認識する結合体のライブラリー内の結合体の同定がさらに有利なものとなるであろう。この方法では、サンドイッチＥＬＩＳＡなどの用途における使用に向けて、結合体のペアを同定することができる。可能な場合、精製された標的分子が好ましいであろう。あるいは、標的は、標的細胞集団の表面にディスプレイされてよく、結合体は、ライブラリー細胞の表面にディスプレイされ、この方法は、ライブラリー細胞を標的細胞へと接触させることによって、標的に対して結合体を曝露することを含むものである。標的を発現する細胞を回収（例えば、標的を発現するビオチン化細胞を使用して）することによって、標的を発現する細胞に対する結合体を発現する細胞の濃縮が可能となる。この手法であれば、強い結合力効果が発生する可能性があるため、低親和性相互作用が関与している場合に有効であろう。

【０１４２】

（上記のような）細胞結合を同定するために、検出分子が利用可能なことが条件であるが、標的分子は、未精製組換え体または未精製天然標的でもあり得る。さらに、結合体を発現する細胞に対する標的分子の結合は、検出される別の分子に標的分子が結合することを介して、間接的に検出することができ、例えば、タグを有する分子を含む細胞可溶化液を、結合体ライブラリーと共にインキュベートして、タグを有する分子に対する結合体だけでなく、タグを有する分子の結合パートナータンパク質に対する結合体も同定することができる。これによって、パートナーの検出または同定（例えば、質量分析を使用して）に使用することができる、こうしたパートナーに対する抗体のパネルがもたらされるであろう。細胞分画を使用することで、特定の細胞内位置に由来する標的を濃縮することができる。あるいは、真核生物ディスプレイに向けて、ストレプトアビジン検出試薬と併せて、表面画分または細胞質画分の分画ビオチン化を使用することができる［９３、９４］。界面活性剤で可溶化した標的調製物を使用することは、変性させなければ調製することが困難であるＧＰＣＲ及びイオンチャネルなどの未変性膜タンパク質に向けては、特に有用な手法である。界面活性剤が存在すると、結合体をディスプレイする真核細胞に対して有害な効果を有し得、このため、選択した細胞をさらに増殖させることなく、結合体の遺伝子を回収する必要がある。

【０１４３】

同種結合体による標的認識の検出後に、同種結合体をコードするＤＮＡを含むクローンの細胞を回収してよい。その後、回収したクローンから、結合体をコードするＤＮＡを単離（例えば、同定または増幅）し、それによって、標的を認識する結合体をコードするＤＮＡを得てよい。

【０１４４】

例示の結合体及び標的は、本明細書の他の箇所に詳細に記載されている。古典的な例は、抗体分子のライブラリーであり、関心標的抗原に対する結合を選別し得るものである。

他の例には、標的ＭＨＣ：ペプチド複合体に対するＴＣＲのライブラリーの選別、または標的ＴＣＲに対するＭＨＣ：ペプチド複合体のライブラリーの選別が含まれる。

【０１４５】

ＴＣＲ：ＭＨＣ相互作用及び他の受容体の相互作用

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、Ｔ細胞上に発現し、抗原提示細胞上にＭＨＣ分子との複合体において提示されるペプチドを認識するために進化してきたものである。ＴＣＲは、ヘテロ２量体であり、９５％の場合が、アルファ及びベータのヘテロ２量体からなり、５％の場合が、ガンマ及びデルタのヘテロ２量体からなる。両方の単量体ユニットが、Ｎ末端免疫グロブリンドメインを有し、当該ドメインは、標的との相互作用の推進に関与する３つの可変相補性決定領域（ＣＤＲ）を有している。機能性ＴＣＲは、他のサブユニットの複合体内に存在し、シグナル伝達は、ＣＤ４分子及びＣＤ８分子（それぞれクラスＩ及びクラスＩＩのＭＨＣ分子に特異的）での同時刺激によって増進される。抗原提示細胞でタンパク質が処理され、それ自体が多量体タンパク質複合体の一部であるＭＨＣ分子との複合体において細胞表面に提示される。「自己（ｓｅｌｆ）」が起源であるペプチドを認識するＴＣＲは、発生段階で除去されると共に、抗原提示細胞上に提示される外来ペプチドの認識に向けてシステムが準備されて、免疫応答を引き起こす。ペプチド：ＭＨＣ複合体の認識による結果は、Ｔ細胞の独自性及びその相互作用の親和性に依存するものである。

【０１４６】

例えば、自己免疫疾患において生じるような病理学的な状態に関与する相互作用を推進するＴＣＲまたはＭＨＣ：ペプチド複合体をコードする遺伝子を同定することは、有用であろう。自己免疫疾患の場合は、例えば、病理学的な状態を推進するＴＣＲといった相互作用パートナーを同定すれば、そのような相互作用の特異的な遮断、または害を与える細胞障害性の細胞の除去、のいずれかへの道を築くことができる。例えば、癌におけるＴ細胞の再標的化または現存Ｔ細胞の作用増進［９５］における、例えば、関心標的に対する親和性の強化といった、結合性の変更に向けて、ＴＣＲを操作することが望ましいであろう。あるいは、例えば、特異的ＴＣＲの、Ｔ細胞への導入によるか、または発現ＴＣＲタンパク質の、治療実体としての使用による、癌の免疫治療の指示もしくは増進に向けて、治療様式として制御性Ｔ細胞または抑制性Ｔ細胞の挙動を変えてよい［９６］。

【０１４７】

酵母細胞の表面及び哺乳類細胞の表面での、ＴＣＲライブラリーのディスプレイは、これまでに示されてきた。酵母細胞の場合は、ＴＣＲを操作し、単鎖形式でＴＣＲを提示することが必要であった。ＴＣＲと、ペプチド：ＭＨＣ複合体との相互作用の親和性は低いため、可溶性成分（例えば、この場合は、ペプチド：ＭＨＣ）は、通常、多量体形式において提示される。ＴＣＲ特異性は、ＭＨＣクラスＩ［９７］及びＭＨＣクラスＩＩ［９８］との複合体におけるペプチドに向けて操作された。ＴＣＲは、変異体マウスＴ細胞（ＴＣＲのアルファ鎖及びベータ鎖を欠いている）の表面にも発現され、結合特性が改善した変異体ＴＣＲが単離された［９９］。例えば、Ｃｈｅｒｖｉｎらは、レトロウイルス感染によって、ＴＣＲを導入し、有効なライブラリーサイズが、10^4個のクローンであるライブラリーを生成させた［１００］。本明細書で提唱するような、ヌクレアーゼ指向型の結合体の組込みを使用することで、類似の手法をＴ細胞の操作に適用することができる。認識特性が変化したＴＣＲの選択に加えて、ディスプレイライブラリーを使用して、ＴＣＲによる認識に向けて、ペプチドライブラリーまたはＭＨＣ変異体ライブラリーを選別することができる。例えば、ペプチド：ＭＨＣ複合体は、昆虫細胞上にディスプレイされ、多量体形式において提示されたＴＣＲのエピトープマッピングに使用された［１０１］。

【０１４８】

記載のように、選別方法は、細胞表面での結合体レパートリーのディスプレイと、多量体標的であり得る、可溶性分子として提示される標的での探索と、を含んでよい。結合体及び標的が、異なる細胞表面に提示される場合、細胞：細胞の相互作用を直接的に選別することが代替手法であり、これは、標的が多量体である場合に特に有用であり得る。例えば、関心ＴＣＲの活性化が、レポーター遺伝子の発現を引き起こすのであれば、ペプチド

：ＭＨＣライブラリー内に提示される活性化ペプチドまたは活性化ＭＨＣ分子の同定に使用することができる。この特定の実施例では、レポーター細胞は、ライブラリーのメンバーをコードはしないが、それを確実にコードする細胞の同定に使用することができる。当該手法は、「ライブラリー対ライブラリー」の手法にまで拡張できる可能性がある。例えば、上記の実施例を拡張することで、ペプチド：ＭＨＣライブラリーに対してＴＣＲライブラリーを選別することができる。より広くは、１つの細胞表面に提示される結合体のライブラリーを選別する実施例を、別の細胞上の結合パートナーを使用することで、他の型の細胞：細胞相互作用にまで拡張することができ、これは、例えば、Ｎｏｔｃｈ経路またはＷｎｔ経路内のシグナル伝達を阻害または活性化する結合体の同定である。したがって、細胞：細胞相互作用に基づく認識システムを含む、代替の細胞に基づく選別システムにおいて、本発明を使用することができる。

【０１４９】

例として、キメラ抗原受容体（「ＣＡＲＳ」）は、抗体結合ドメイン（通常、ｓｃＦｖとして編成される）と、シグナル伝達ドメインと、の融合体に相当するものである。こうしたものは、生体内においてＴ細胞に再指示することで、抗体認識を介して腫瘍細胞を攻撃させると共に、腫瘍特異的抗原に対して結合させる目的で、Ｔ細胞へと導入されてきた。数多くの異なる因子が、この方針の成功に影響を与えることができ、当該因子には、抗体特異性の組み合わせ、形式、抗体親和性、リンカーの長さ、融合されるシグナル伝達モジュール、Ｔ細胞における発現レベル、Ｔ細胞サブタイプ、及びＣＡＲと、他のシグナル伝達分子との相互作用が含まれる［１０２、１０３］。初代Ｔ細胞において、上記変数の個々または組み合わせを組込んで、ＣＡＲの大きなライブラリーを創出できる能力があれば、有効かつ最適なＣＡＲ構築物の機能探索が可能となるであろう。この機能「探索（ｓｅａｒｃｈ）」は、試験管内または生体内で実施することができる。例えば、Ａｌｏｎｓｏ－Ｃａｍｉｎｏ（２００９）は、ＴＣＲ：ＣＤ３複合体のζ鎖に対して、ＣＥＡを認識するｓｃＦｖを融合し、この遺伝子構築物をヒトＪｕｒｋａｔ細胞株へと導入した［１０４］。ＨｅＬａ細胞上または腫瘍細胞上のいずれかに存在するＣＥＡとの相互作用に際して、初期Ｔ細胞活性化マーカーであるＣＤ６９の発現上昇が示された。この手法を使用することで、培養細胞または初代細胞を使用して、適切な活性化特性または阻害特性を有するＣＡＲ融合構築物を同定することができる。

【０１５０】

さらにもう一段階進んだ、ＣＡＲ構築物の機能性を生体内で評価することができる。例えば、初代マウスＴ細胞において構築されたＣＡＲのライブラリーを担腫瘍マウスへと導入し、腫瘍との遭遇を介して増殖刺激されたＴ細胞クローンを同定することができる。必要であれば、上記の方法を使用することで、抗原結合特異性に基づいて、このＴ細胞ライブラリーを事前に選択することができる。いずれに場合においても、新規結合体ライブラリーを使用して、現存する結合体分子（例えば、ＭＨＣまたはＴＣＲまたは抗体可変ドメイン）を置き換えることができる。

【０１５１】

表現型の選別

細胞のシグナル伝達及び細胞の挙動を修飾する結合体の様々な選択方法が、本明細書に記載されている。

【０１５２】

結合体の、標的に対する結合体の作用の結果として変化した細胞表現型に向けて、ライブラリーが選別されてよい。

【０１５３】

リガンドまたは受容体に結合することによって細胞のシグナル伝達を修飾する抗体は、薬物開発において、実績が証明されており、そのような治療抗体に対する需要は増すばかりである。そのような抗体及び他のクラスの機能性結合体は、生体内及び試験管内での細胞の挙動制御における可能性も有する。しかしながら、細胞の挙動を制御及び指示する能力は、特定のシグナル伝達経路を制御する天然リガンドの利用可能性に依存するものであ

る。残念なことに、幹細胞の分化を制御するもの（例えば、ＦＧＦ、ＴＧＦベータ、Ｗｎｔ、及びＮｏｔｃｈのスーパーファミリーのメンバー）などの天然リガンドの多くが、雑多な相互作用を示し、その不十分な発現／安定性特性に起因して利用可能性が限定されることが多い。抗体は、それが精巧な特異性を有していることから、細胞の挙動制御において大きな可能性を有している。

【０１５４】

細胞のシグナル伝達を修飾する機能性抗体の同定は、クローン選定、抗体発現、配列及び結合特性による特徴づけ、哺乳類発現システムへの変換、ならびに細胞に基づく機能アッセイに供すことを伴い、歴史的にみて、相対的に多くの時間と労力を要するものであった。本明細書に記載の真核生物ディスプレイ手法であれば、この労力を減らすことになるが、抗体を産生させ、別々のレポーター細胞培養物に添加することが依然として必要である。したがって、産生細胞自体をレポーター細胞として使用することによって、細胞のシグナル伝達または細胞の挙動に対する結合作用に向けて、真核細胞において発現される結合体のライブラリーを直接的に選別することが好ましい代替手法であり得る。抗体遺伝子の導入後に、得られる細胞集団内で、レポーター遺伝子の発現変化または表現型の変化を示すクローンを同定することができる。

【０１５５】

最近の論文の多くが、レポーター細胞へと抗体遺伝子のレパートリーをクローン化することによって、抗体ライブラリーを構築することについて説明している［４７、１０５、１０６］。こうしたシステムは、１つの細胞内で、発現と、レポーティングとを組み合わせており、典型的には、（例えば、ファージディスプレイを使用して）前定義標的に対して選択された抗体集団を導入するものである。

【０１５６】

抗体遺伝子集団は、レポーター細胞へと導入し、本明細書に記載の方法によって、ライブラリーを産生させてよく、表現型（例えば、遺伝子発現変化または生存変化）において抗体指向型の変化を有する集団内のクローンを同定することができる。この表現型指向型の選択が、そこで機能するには、発現細胞（遺伝子型）内に存在する抗体遺伝子と、抗体発現の結果（表現型）と、のつながりが保持されることが必要要件である。これは、抗体ディスプレイに向けて説明されるような、細胞表面への抗体の繋留［４７］、または産生細胞の近傍において分泌抗体を保定するための半固体媒体の使用［１０５］、のいずれかを介して以前に達成されている。あるいは、抗体及び他の結合体は、細胞内に保定することができる［１０７］。細胞表面または媒体周囲において保定された結合体は、内在性または外来性の受容体と、細胞表面で相互作用することができ、これによって、受容体の活性化を引き起こす。これは、次に、レポーター遺伝子の発現変化または細胞表現型の変化を引き起こすことができる。代替として、抗体は、受容体またはリガンドを遮断して、受容体の活性化を低減することができる。その後、細胞の挙動の修飾を引き起こす結合体をコードする遺伝子を、産生またはさらなる操作に向けて回収することができる。

【０１５７】

この「標的指向型（ｔａｒｇｅｔ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ）」手法に対する代替として、特定標的に対して事前選択されていない「ナイーブ」抗体集団を導入することが可能である［１０８］。細胞のレポーティングシステムは、挙動が変化した集団のメンバーを同定するために使用される。標的の先行知見が存在しないため、この非標的手法では、大きな抗体レパートリーが特に必要となり、これは、標的に対して抗体集団を事前に濃縮することが不可能なためである。この手法は、本発明において記載されるようなヌクレアーゼ指向型の、導入遺伝子の組込みを使用することで、有利なものとなるであろう。

【０１５８】

「機能選択（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ）」手法は、真核細胞、具体的には、哺乳類細胞などの高等真核生物におけるライブラリーが関与する他の用途で使用することができる。標的に対する結合が、受容体の活性化を引き起こすように、抗体をシグナル伝達ドメインに融合することができる。Ｋａｗａｈａｒａらは、キメラ受容体を構

築しており、ここで、フルオレセインを標的とする細胞外ｓｃＦｖは、スペーサードメイン（Ｅｐｏ受容体のＤ２ドメイン）と、様々な細胞内サイトカイン受容体ドメインと、に融合したものであり、当該細胞内サイトカイン受容体ドメインには、トロンボポエチン（Ｔｐｏ）受容体、エリスロポエチン（Ｅｐｏ）受容体、ｇｐ１３０、ＩＬ－２受容体、及びＥＧＦ受容体が含まれる［１０９、１１０、１１１］。こうしたものは、ＩＬ３依存性プロＢ細胞株（ＢａＦ３）へと導入され［２７］、ここで、キメラ受容体は、抗原依存性である、キメラ受容体の活性化を示し、これによって、ＩＬ－３非依存性の増殖を引き起こすことが示された。これと同一の手法が、モデル実験において使用され、ＢａＦ３細胞の化学誘引を抗原が媒介することが示された［１１０］。当該手法は、安定培養細胞を超えて、Ｔｐｏ応答性造血幹細胞の生存及び増殖［１１２］によって例示される初代細胞、またはＩＬ２依存性初代Ｔ細胞にまで拡張され、ここで、Ｔｐｏ及びＩＬ－２による通常刺激は、ｓｃＦｖキメラ受容体のフルオロセイン指向型刺激によってそれぞれ置き換えられた。したがって、キメラ抗体－受容体キメラに基づくシステムを使用して、初代レポーター細胞または安定レポーター細胞における、標的依存性である遺伝子発現変化または表現型変化を推進することができる。この能力を使用して、シグナル伝達応答を推進する融合した結合体、または当該応答を阻害する結合体を同定することができる。

【０１５９】

上記手法を改変したものでは、抗リゾチーム抗体に由来する別々のＶＨドメイン及びＶＬドメインが、Ｅｐｏの細胞内ドメインに融合された［１１３］。細胞は、リゾチームの添加に応答して増殖し、これは、抗体が、別々であるＶＨ融合パートナー及びＶＬ融合パートナーの２量体形成または安定化を誘導したことを示している。したがって、このシステムにおける最適応答に向けて、３つの相互作用成分が一緒になったものである。

【０１６０】

ここでは、抗体分子を参照して記載したが、上記方法は、他の結合体ライブラリーにも適応し得ると共に、それを使用して実施してよい。

【０１６１】

タンパク質断片の相補性は、哺乳類細胞におけるタンパク質：タンパク質相互作用の研究及び選択に向けた代替システムに相当するものである［１１４、１１５］。これには、タンパク質：タンパク質相互作用を介して、開裂したレポータータンパク質を修復する機能が関与している。使用されたレポータータンパク質には、ユビキチン、ＤＮＡＥインテイン、ベーターガラクトシダーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素、ＧＦＰ、ホタルルシフェラーゼ、ベーターラクタマーゼ、ＴＥＶプロテアーゼが含まれる。例えば、この手法の最近の例は、哺乳類膜ツーハイブリッド（ＭａＭＴＨ）手法であり、ベイトタンパク質：開裂ユビキチン：転写因子の融合体と、パートナータンパク質：開裂ユビキチン：と、が会合することで、ユビキチン認識が修復され、転写因子が遊離して、レポーター遺伝子の発現を引き起こすものである［１１６］。さらに、シグナル伝達の攪乱を介して、この相互作用を妨害または増進する結合体を同定することができる。

【０１６２】

結合体及びコードＤＮＡの回収及び再編成

ライブラリーから関心結合体または関心クローンを選択した後の、一般的な次の段階は、結合体をコードするＤＮＡの単離（例えば、同定または増幅）であろう。任意選択で、例えば、結合体を再構築し、及び／または異なるベクターへとコード配列を挿入するために、結合体をコードする核酸を修飾することが望ましくあり得る。

【０１６３】

結合体が、抗体分子である場合は、方法は、クローン細胞からの、抗体分子をコードするＤＮＡの単離と、少なくとも１つの抗体可変領域、好ましくはＶＨドメイン及びＶＬドメインの両方をコードするＤＮＡの増幅と、抗体分子をコードするベクターを提供するための、ベクターへのＤＮＡの挿入と、を含んでよい。可溶性分泌形態での発現に向けて、定常ドメインを有する多量体抗体分子を単鎖抗体分子に変換してよい。

【０１６４】

抗体は、異なる形式で提示されてよいが、選択される抗体形式がどのようなものであれ、抗体遺伝子が一旦単離されると、数多くの異なる形式に再形成することが可能である。ＶＨドメインまたはＶＬドメインが、一旦単離されると、それらは、必要なパートナードメインを包含する発現ベクターへと再クローン化することができる（二重プロモーターＩｇＧ発現カセットが示されている実施例１を参照のこと）。

【０１６５】

再編成段階は、サブユニットのペアからなる結合体（例えば、ｓｃＦｖ分子）の、異なる分子結合体形式（例えば、ＩｇまたはＦａｂ）への再編成を含んでよく、当該段階において、サブユニットの元のペアは維持される。そのような方法は、本明細書の他の箇所に、より詳細に記載されており、モノクローナルクローンの再編成、オリゴクローナルクローンの再編成、またはポリクローナルクローンの再編成に使用することができる。方法を使用することで、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはリボソームディスプレイを含む、一般に使用されるディスプレイ技術のいずれかに由来する全アウトプット集団を「一斉（ｅｎ　ｍａｓｓｅ）」変換することができる。

【０１６６】

Ｆｃドメインに融合した哺乳類細胞の表面でのｓｃＦｖのディスプレイ

抗体ファージディスプレイライブラリーの多くが、ｓｃＦｖをディスプレイするために編成されるが、真核生物ディスプレイシステムであれば、Ｆａｂ形式またはＩｇＧ形式での提示が可能となるであろう。ＩｇＧ／Ｆａｂ発現に向けた可能性を完全に利用するために、細菌発現システム内で連結されたＶＨドメイン及びＶＬドメインを選択取得し、適切な定常ドメインと融合した真核生物システム内でそれらを発現することが必要であろうし、他のディスプレイシステムに由来するｓｃＦｖを使用するときは、特にこのことが必要であろう。本明細書には、ｓｃＦｖ集団の免疫グロブリン（Ｉｇ）形式または断片形式、抗原結合（Ｆａｂ）形式への変換方法であって、その結果、ＶＨ鎖及びＶＬ鎖の元のペアが維持される変換方法が記載されている。本発明では、ｓｃＦｖとして編成された個々のクローン、オリゴクローナル混合物、または全体集団を使用して、ＶＨ鎖及びＶＬ鎖の元のペアを保持しながら変換することが可能である。方法は、新しい「スタッファー（ｓｔｕｆｆｅｒ）」ＤＮＡ断片をもたらす、中間の非複製「小環（ｍｉｎｉ－ｃｉｒｃｌｅ）」ＤＮＡの生成を介して進行するものである。環状ＤＮＡは、直鎖化し（例えば、制限消化またはＰＣＲによって）、これによって、元のＶＨ断片及びＶＬ断片の相対的位置が変化し、それらの間に、「スタッファー」ＤＮＡが設置される。直鎖化の後、産物は、例えば、哺乳類発現ベクターといった選択ベクターへとクローン化することができる。このように、ＶＨ及びＶＬ以外のすべての要素を置き換えることができる。哺乳類発現及び代替パートナーへの融合に向けた要素で、細菌発現に向けた要素を置き換えることができる。完全な変換プロセスに必要となるのは、Ｅｃｏｌｉ細菌の単回の形質転換段階のみであり、これによって、細菌コロニーの集団が生成し、それぞれの細菌コロニーが、特有のＩｇ編成またはＦａｂ編成された組換え抗体をコードするプラスミドを保有する。ｓｃＦｖからＩｇＧ／Ｆａｂへの変換を超えて拡張することで、方法を用いて、任意の２つの結合したＤＮＡ要素を再編成して、ベクターへとクローン化することができ、その結果、元のペアを維持しながら、異なるＤＮＡ制御特徴が、それぞれの再編成ＤＮＡ要素を囲む。これまでに説明された方法は、２つの連続的なクローン化段階を使用して［１１７］、こうした要素を置き換えるものであり、中間の非複製環状中間体を介して進行する本発明の方法とは対照的なものである。

【０１６７】

結合体、または結合体集団の再構築方法は、ｓｃＦｖの、Ｉｇまたは例えば、ＦａｂといったＩｇの断片への変換を含んでよい。方法は、ｓｃＦｖをコードする核酸の、免疫グロブリン（Ｉｇ）またはＦａｂ形式などの免疫グロブリンの断片をコードするＤＮＡへの変換を含んでよく、その結果、可変ＶＨ鎖及び可変ＶＬ鎖の元のペアは維持される。好ましくは、変換は、非複製「小環」ＤＮＡであり得る環状ＤＮＡ中間体を介して進行する。方法は、ＩｇまたはＦａｂのＤＮＡをコードするプラスミドを保有する細菌形質転換体の

直接的な生成に向けた、Ｅ．ｃｏｌｉの単回の形質転換を必要とする。
【０１６８】
方法は、モノクローナルクローンの再編成、オリゴクローナルクローンの再編成、またはポリクローナルクローンの再編成に使用してよい。方法を使用して、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはリボソームディスプレイを含む、一般に使用されるディスプレイ技術のいずれかに由来する全アウトプット集団を「一斉」変換することができる。
【０１６９】
より一般的には、本発明のこの態様は、任意の２つの結合したＤＮＡ要素の、ベクターへの再編成を可能にし、ここで、ＤＮＡ要素は、別々のプロモーターの制御下にクローン化されるか、または代替の制御要素によって分離されるが、元のＤＮＡペアは維持される。
【０１７０】
実施例７及び実施例１４では、そのような方法についてさらに詳細に記載されている。
【０１７１】
結合体をコードするＤＮＡの単離、及び任意選択でその再構築の後に、本明細書の他の箇所に記載されるような派生ライブラリーを創出するさらなる細胞に、そのＤＮＡを導入してよく、または１つもしくは複数の特定関心結合体をコードするＤＮＡを発現用の宿主細胞へと導入してもよい。宿主細胞は、それが得られたライブラリーの細胞と比較して、異なる型のものであってよい。一般に、ＤＮＡは、ベクターにおいて提供されることになる。宿主細胞へと導入されるＤＮＡは、宿主細胞の細胞ＤＮＡへと組込まれてよい。その後、分泌可溶性抗体分子を発現する宿主細胞を選択することができる。
【０１７２】
１つまたは複数の結合体をコードする宿主細胞が、培養培地において提供され、１つまたは複数の結合体を発現するために培養してよい。
【０１７３】
派生ライブラリー
本発明の方法によってライブラリーを産生させた後に、１つまたは複数のライブラリークローンを選択し、使用して、さらなる第２世代のライブラリーを産生させてよい。本明細書に記載のような真核細胞へと、ＤＮＡを導入することによって、ライブラリーが産生したとき、ライブラリーを培養して結合体を発現させてよく、例えば、本明細書の他の箇所に記載されるような標的に対する結合体を選択することによって、関心結合体を発現する１つまたは複数のクローンを回収してよい。続いて、こうしたクローンを使用して、第２の結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む派生ライブラリーを生成させてよい。
【０１７４】
派生ライブラリーを生成させるために、１つまたは複数の回収クローンのドナーＤＮＡを変異させることで、第２の結合体レパートリーが得られる。変異は、１つまたは複数の核酸の追加、置換、または欠失であってよい。結合体が、ポリペプチドである場合は、１つまたは複数のアミノ酸の追加、置換、または欠失によって変異させれば、コードされる結合体の配列が変化することになる。変異は、抗体分子の１つまたは複数のＣＤＲなどの、１つまたは複数の領域に焦点を合わせてよく、これによって、本明細書の他の箇所に記載されるように、１つまたは複数の多様性領域が異なる共通構造クラスの結合体レパートリーが得られる。
【０１７５】
派生ライブラリーの生成は、１つまたは複数の回収クローンに由来するドナーＤＮＡの単離と、第２の結合体レパートリーをコードするドナーＤＮＡ分子の派生集団を提供するための、ＤＮＡへの変異導入と、第２の結合体レパートリーをコードするＤＮＡを含む細胞の派生ライブラリーを創出するための、ドナーＤＮＡ分子の派生集団の、細胞への導入と、を含んでよい。
【０１７６】

ドナーＤＮＡの単離は、クローンからの、ＤＮＡの取得及び／または同定を含んでよい。そのような方法は、例えば、ＰＣＲによる、回収クローンに由来する結合体コードＤＮＡの増幅と、変異導入と、を含んでよい。ＤＮＡは、配列を決定し、変異ＤＮＡを合成してよい。

【０１７７】

あるいは、クローン内のＤＮＡに変異を導入することによって、１つまたは複数の回収クローンにおけるドナーＤＮＡに変異を導入してよい。したがって、派生ライブラリーは、例えば、トリＤＴ４０細胞における内在性変異を介して、ＤＮＡの単離を必要とせず、１つまたは複数のクローンから創出されてよい。

【０１７８】

抗体ディスプレイは、派生ライブラリーの創出に特に役立つ。抗体遺伝子が、一旦単離されると、多様な変異誘発手法（例えば、エラープローンＰＣＲ、オリゴヌクレオチド指向型変異誘発、鎖混合（ｃｈａｉｎ　ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ））を使用して、改善変異体を選択できる関連クローンのディスプレイライブラリーを創出することが可能である。例えば、鎖混合では、選択したＶＨクローンの集団、ＶＨオリゴクローナル混合体、またはＶＨ集団をコードするＤＮＡを、適した抗体形式と、適切に編成されたＶＬ鎖レパートリーと、をコードするベクターへとサブクローン化することができる［１１８］。あるいは、及びさらに、ＶＨの例を使用して、適切に編成された軽鎖パートナー（例えば、ＩｇＧ編成重鎖またはＦａｂ編成重鎖との会合向けのＶＬ－ＣＬ鎖）の集団をコード及び発現する真核細胞の集団へと、ＶＨクローン、ＶＨオリゴ混合体、またはＶＨ集団を導入することができる。免疫化動物のＢ細胞または選択ファージ集団に由来するｓｃＦｖ遺伝子を含む、上で考察した供給源のいずれかから、ＶＨ集団を生じさせることができる。後者の例において、軽鎖レパートリーへの選択ＶＨのクローン化では、１つの段階で、鎖混合と、再編成（例えば、ＩｇＧ形式へ）とを組み合わせることができる。

【０１７９】

真核細胞上でのディスプレイの特定の優位性は、選択／選別段階の厳密性を制御する能力にある。抗原濃度を低減することによって、集団内で、より低い親和性を有するクローンから、最も高い親和性を有する結合体を発現している細胞を区別することができる。ナイーブライブラリーにおいて陽性割合の指標が早期に得られると共に、選別の間に、選択クローンの親和性と、親集団の親和性との直接的な比較が可能となるため、フローサイトメトリーを使用した、親和性成熟プロセスの可視化及び定量化は、真核生物ディスプレイの主要な優位性である。選別後に、多様な抗原濃度で事前にインキュベートし、フローサイトメトリーもしくは均一時間分解蛍光（ｈｏｍｏｇｅｎｏｕｓ　Ｔｉｍｅ　Ｒｅｓｏｌｖｅｄ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ）（ＴＲＦ）アッセイでの分析、または表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）（Ｂｉａｃｏｒｅ）を使用することによって、個々のクローンの親和性を決定することができる。

【０１８０】

ライブラリーの特性及び形態

本発明によって、多くの有利な特性を有する真核細胞ライブラリーの構築が可能となる。本発明は、下記特徴のいずれか１つまたは複数を有するライブラリーを提供する。

【０１８１】

多様性。ライブラリーは、少なくとも１００、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、または10^9個の異なる結合体をコード及び／または発現し得る。

【０１８２】

均一な組込み。ライブラリーは、細胞ＤＮＡにおける１つの固定遺伝子座、または限定数の固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含むクローンからなり得る。したがって、ライブラリーにおけるそれぞれのクローンは、１つの固定遺伝子座または少なくとも１つの固定遺伝子座にドナーＤＮＡを含む。好ましくは、クローンは、細胞ＤＮＡにおける１つまたは２つの固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含む。本明細書の他の箇所に記載されるように、組込み部位は、部位特異的ヌクレアーゼの認識配列に位置する。組換え

ＤＮＡ産生のためのドナーＤＮＡの組込みは、本明細書の他の箇所に詳細に記載されており、組込み部位の数に応じて異なる結果を与え得る。細胞において、ライブラリー生成に使用する潜在的な組込み部位が１つ存在する場合、ライブラリーは、１つの固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含むクローンのライブラリーとなるであろう。したがって、ライブラリーのすべてのクローンが、細胞ＤＮＡにおいて、同一位置に結合体遺伝子を含む。あるいは、潜在的な組込み部位が、複数存在する場合は、ライブラリーは、複数及び／または異なる固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含むクローンのライブラリーであり得る。好ましくは、ライブラリーのそれぞれのクローンは、第１固定遺伝子座及び／または第２固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含む。例えば、ライブラリーは、ドナーＤＮＡが、第１固定遺伝子座に組込まれたクローンと、ドナーＤＮＡが、第２固定遺伝子座に組込まれたクローンと、ドナーＤＮＡが、第１固定遺伝子座及び第２固定遺伝子座の両方に組込まれたクローンと、を含み得る。特定用途に望ましいのであれば、複数遺伝子座にドナーＤＮＡを組込むことが可能であるが、好ましい実施形態では、ライブラリーのクローンにおいて存在する遺伝子座は、１つまたは２つのみである。したがって、ライブラリーによっては、それぞれのクローンは、例えば、３つ、４つ、５つ、または６つの遺伝子座といった数個の固定遺伝子座のいずれか１つまたは複数に組込まれたドナーＤＮＡを含み得る。

【０１８３】

別々の部位に組込まれた結合体サブユニットを含むライブラリーに向けては、ライブラリーのクローンは、第１固定遺伝子座に組込まれた第１結合体サブユニットをコードするＤＮＡと、第２固定遺伝子座に組込まれた第２結合体サブユニットをコードするＤＮＡと、を含んでよく、クローンは、第１サブユニット及び第２サブユニットを含む、多量体である結合体を発現する。

【０１８４】

均一な転写。ライブラリーの異なるクローン間の結合体の相対的な転写レベルは、制御限度内に維持されており、これは、ドナーＤＮＡが組込まれる遺伝子座の数が制御されていると共に、ドナーＤＮＡが、異なるクローンの同一遺伝子座（固定遺伝子座）に組込まれていることに起因する。結合体遺伝子の転写が相対的に均一であることによって、ライブラリーにおけるクローン上またはこれに由来する結合体の発現レベルは同等となる。ライブラリーの細胞表面にディスプレイされる結合体は、同一細胞上にディスプレイされる他の結合体と同一（当該他の結合体と同一のアミノ酸配列を有する）であってよい。ライブラリーは、それぞれが、結合体レパートリーの単一メンバーをディスプレイする細胞のクローンからなってよく、または細胞当たり、結合体レパートリーの複数メンバーをディスプレイするクローンからなってよい。あるいは、ライブラリーは、結合体レパートリーの単一メンバーをディスプレイするいくつかのクローンと、結合体レパートリーの複数（例えば２つ）メンバーをディスプレイするいくつかのクローンと、を含んでよい。好ましくは、ライブラリーのクローンは、結合体レパートリーの１つまたは２つのメンバーを発現する。

【０１８５】

例えば、本発明による真核細胞クローンのライブラリーは、少なくとも10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、または10^9個の異なる結合体のレパートリーを発現し得、当該結合体は、例えば、ＩｇＧ抗体断片、Ｆａｂ抗体断片、ｓｃＦｖ抗体断片、またはｓｃＦｖ－Ｆｃ抗体断片であり、それぞれの細胞が、細胞ＤＮＡにおける固定遺伝子座に組込まれたドナーＤＮＡを含む。ドナーＤＮＡは、結合体をコードし、固定遺伝子座にドナーＤＮＡが組込まれた細胞の選択に向けた遺伝子要素をさらに含んでよい。ライブラリーの細胞は、外来性の部位特異的ヌクレアーゼをコードするＤＮＡを含んでよい。

【０１８６】

本発明によるライブラリーのこうした特徴及び他の特徴は、本明細書の他の箇所にさらに記載されている。

【０１８７】

本発明は、他の真核細胞が存在しないライブラリークローンの集団としての純粋形態のライブラリー、または他の真核細胞と混ざったライブラリーのいずれかまで拡張されるものである。他の細胞は、同一型（例えば、同一細胞株）の真核細胞であってよく、または異なる細胞であってよい。選別の促進もしくは広幅化のいずれか、または本明細書に記載のような他の使用もしくは当業者であれば明らかであろう他の使用に向けて、本発明による２つ以上のライブラリーを組み合わせることによってか、または本発明によるライブラリーと、第２のライブラリーもしくは第２の細胞集団と、を組み合わせることによって、さらなる優位性を得てよい。

【０１８８】

本発明によるライブラリー、ライブラリーから得られる１つもしくは複数のクローン、またはライブラリーに由来する結合体をコードするＤＮＡが導入された宿主細胞は、細胞培養培地において提供されてよい。細胞は、輸送または貯蔵が簡便なように、培養した後に濃縮して細胞ペレットを形成させてよい。

【０１８９】

ライブラリーは、通常、試験管内で提供されることになる。ライブラリーは、細胞培地に懸濁されたライブラリーの細胞を含む細胞培養フラスコなどの容器、またはライブラリーを含む、真核細胞のペレットまたは濃縮懸濁液を含む容器、において存在してよい。ライブラリーは、容器における真核細胞の少なくとも７５％、８０％、８５％、または９０％を構成してよい。

【０１９０】

本発明の実施形態は、添付図面を参照しながら、より詳細に記載されることになり、添付図面は、下記のとおりである。

【図面の簡単な説明】

【０１９１】

【図１－１】ＩｇＧ編成抗体の発現用ベクターを示す。ａ．ｐＤＵＡＬ　Ｄ１．３であり、ＩｇＧ分泌用の二重プロモーター発現ベクターを示す（「ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ＥＲ」ベクター骨格中）。ｂ．ｐｌＮＴ３－Ｄ１．３であり、ＩｇＧ分泌用の二重プロモーター発現ベクターを示す（「ｐＳＦ－ＣＭＶ－ｆ１－Ｐａｃ１」ベクター骨格中）。

【図１－２】ＩｇＧ編成抗体の発現用ベクターを示す。ｃ．ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ＥＲベクター骨格を示す。ＥＣｏＲ１部位は、ＣＭＶプロモーターに先行している。ＢｓｔＢ１部位及びＢｓｔＺ１７１部位は、ＳＶ４０ポリＡ部位と隣接している。ｄ．ｐＳＦ－ＣＭＶ－ｆ１－Ｐａｃ１ベクター骨格（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ）を示す。ｅ．ＰＤＧＦＲ膜貫通領域（ＴＭ）をコードするエクソンと、分泌（ｓｅｃ）を引き起こすエクソンとを、を有する合成遺伝子を示す。実線矢印は、Ｒｏｘ組換え部位を示す。

【図２－１】ｐＤ１の配列（配列認識番号：１、２、３、４、及び５）であり、表面発現用の二重プロモーター抗体発現カセットを示す。特徴は下記のとおりである。ｐＥＦプロモーター　１３－１１８０ＢＭ４０リーダー　１１９３－１２４９ヒト化Ｄ１．３　ＶＬ　１２５０－１５７８ヒトＣカッパ　１５７７－１８９１ＢＧＨ　ポリＡ　１９１６－２１３０ＣＭＶプロモーター　２１４６－２７３４イントロンを有するマウスＶＨリーダー　３２８３２－３４１４ヒト化Ｄ１．３　ＶＨ　３４１９－３７６９最適化ヒトＩｇＧ２　ＣＨ１－ＣＨ３

【図２－２】ｐＤ１の配列（配列認識番号：１、２、３、４、及び５）であり、表面発現用の二重プロモーター抗体発現カセットを示す。特徴は下記のとおりである。ｐＥＦプロモーター　１３－１１８０ＢＭ４０リーダー　１１９３－１２４９ヒト化Ｄ１．３　ＶＬ　１２５０－１５７８ヒトＣカッパ　１５７７－１８９１ＢＧＨ　ポリＡ　１９１６－２１３０ＣＭＶプロモーター　２１４６－２７３４イントロンを有するマウスＶＨリーダー　３２８３２－３４１４ヒト化Ｄ１．３　ＶＨ　３４１９－３７６９最適化ヒトＩｇＧ２　ＣＨ１－ＣＨ３

【図２－３】ｐＤ１の配列（配列認識番号：１、２、３、４、及び５）であり、表面発現用の二重プロモーター抗体発現カセットを示す。特徴は下記のとおりである。ｐＥＦプロ

モーター　１３－１１８０ＢＭ４０リーダー　１１９３－１２４９ヒト化Ｄ１．３　ＶＬ　１２５０－１５７８ヒトＣカッパ　１５７７－１８９１ＢＧＨ　ポリＡ　１９１６－２１３０ＣＭＶプロモーター　２１４６－２７３４イントロンを有するマウスＶＨリーダー　３２８３２－３４１４ヒト化Ｄ１．３　ＶＨ　３４１９－３７６９最適化ヒトＩｇＧ２　ＣＨ１－ＣＨ３

【図２－４】ｐＤ１の配列（配列認識番号：１、２、３、４、及び５）であり、表面発現用の二重プロモーター抗体発現カセットを示す。特徴は下記のとおりである。ｐＥＦプロモーター　１３－１１８０ＢＭ４０リーダー　１１９３－１２４９ヒト化Ｄ１．３　ＶＬ　１２５０－１５７８ヒトＣカッパ　１５７７－１８９１ＢＧＨ　ポリＡ　１９１６－２１３０ＣＭＶプロモーター　２１４６－２７３４イントロンを有するマウスＶＨリーダー　３２８３２－３４１４ヒト化Ｄ１．３　ＶＨ　３４１９－３７６９最適化ヒトＩｇＧ２　ＣＨ１－ＣＨ３

【図２－５】ｐＤ１の配列（配列認識番号：１、２、３、４、及び５）であり、表面発現用の二重プロモーター抗体発現カセットを示す。特徴は下記のとおりである。ｐＥＦプロモーター　１３－１１８０ＢＭ４０リーダー　１１９３－１２４９ヒト化Ｄ１．３　ＶＬ　１２５０－１５７８ヒトＣカッパ　１５７７－１８９１ＢＧＨ　ポリＡ　１９１６－２１３０ＣＭＶプロモーター　２１４６－２７３４イントロンを有するマウスＶＨリーダー　３２８３２－３４１４ヒト化Ｄ１．３　ＶＨ　３４１９－３７６９最適化ヒトＩｇＧ２　ＣＨ１－ＣＨ３

【図３－１】ＡＡＶＳドナープラスミド（ｐＤ２）の構築を示す。ａ．ヒトＡＡＶＳ遺伝子座を示す。ＡＡＶＳ遺伝子座のエクソン１及びエクソン２（タンパク質ホスファターゼ１、調節サブユニット１２Ｃ、ＰＰＰ１Ｒ１２Ｃをコードする）は、４４２８ｂｐのイントロンによって分離されている。スプライシングは、フレーム「０」で生じる。すなわち、２つの未変化コドンの間で、それぞれのエクソンから生じる。ＴＡＬＥＮ構築物及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９構築物が、このイントロン内の切断に利用可能である。線の下の斜線区画は、この切断部位の左右への領域を示し、当該領域は、ベクター構築物内で使用されて、この遺伝子座への相同組換えを推進するものである（ＡＡＶＳホモロジーアーム左「左ＨＡ」及びＡＡＶＳホモロジーアーム右（「右ＨＡ」）。ｂ．抗体をコードするドナープラスミドｐＤ２を示す。左右のホモロジーアームが、構築物表記の両末端に示されている。スプライスアクセプターが、合成ブラストサイジン遺伝子に先行しており、当該スプライスアクセプターは、ＡＡＶＳエクソン１との「インフレーム」融合を創出するものである。Ｄ１．３軽鎖及びＤ１．３　ＩｇＧ２重鎖からなる抗体発現カセットも示されており、当該Ｄ１．３軽鎖及びＤ１．３　ＩｇＧ２重鎖は、ｐＥＦプロモーター及びＣＭＶプロモーターによって、それぞれ推進されるものである。

【図３－２】ＡＡＶＳドナープラスミド（ｐＤ２）の構築を示す。ｃ．ドナー構築物であるｐＤ１－ｈｕＤ１．３（配列識別番号：６、７、及び８）の配列を示す。ＡＡＶＳホモロジーアームには、下線が引かれ、太字で示されている。簡潔に示すために、抗体カセット（既に図２で示した）は詳細には示されていない。クローンにおいて使用される制限酵素部位は、太字で示されている。プラスミド骨格の配列は、アンピシリン耐性遺伝子までが示されている。

【図３－３】ＡＡＶＳドナープラスミド（ｐＤ２）の構築を示す。ｃ．ドナー構築物であるｐＤ１－ｈｕＤ１．３（配列識別番号：６、７、及び８）の配列を示す。ＡＡＶＳホモロジーアームには、下線が引かれ、太字で示されている。簡潔に示すために、抗体カセット（既に図２で示した）は詳細には示されていない。クローンにおいて使用される制限酵素部位は、太字で示されている。プラスミド骨格の配列は、アンピシリン耐性遺伝子までが示されている。

【図４】細胞表面でのＩｇＧの発現を示す。ａ、ｃ．分析は、前方散乱及びＦＬ３チャネルにおける染色を使用して、生存細胞に着目した（ａ、ｃ）。ＦＬ３チャネルにおける染色に陽性であった細胞（７－ＡＡＤを取り込んだ非生存細胞に相当する）は除外した。ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮ存在下（ａ，ｂ）、または非存在下（ｃ、ｄ）で、すべての細胞にｐ

Ｄ２－Ｄ１．３を遺伝子導入し、抗Ｆｃ抗体で染色した。
【図５】細胞表面での、抗原の抗体への結合を示す。前方散乱及び７ＡＡＤによる除外に基づき、生存細胞を選択した（ａ）。蛍光標識されたニワトリ卵白リゾチームと共に細胞をインキュベートした（ｂ）。
【図６】ブラストサイジン耐性遺伝子の組込みに対するＴＡＬＥＮ指向型ゲノム切断の効果を示す。図は、記載条件下でのコロニー数を示す。
【図７】ＡＡＶＳ遺伝子座へのｐＤ２－Ｄ１．３ドナープラスミドの組込みの分析を示す。遺伝子導入後に、ブラストサイジン中で細胞を選択し、ゲノムを調製した。試料１～９は、ＡＡＶＳ指向型ＴＡＬＥヌクレアーゼ添加による恩恵を受けたものであり、試料１０～１１は、ＴＡＬＥヌクレアーゼ非存在下で遺伝子導入された細胞から生じたクローンに由来するものである。ゲノムＤＮＡの分析は、本明細書中に記載したようにＰＣＲによって実施した。ａ．組込み部位の５’末端からの検証を示す。Ｂ．組込み部位の３’末端からの検証を示す。
【図８】ｓｃＦｖ－Ｆｃ発現ベクターであるｐＤ６の構築を示す。ａ．ｓｃＦｖとして編成された抗体が、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１部位へとクローン化され、ＩｇＧ２のヒトＦｃ領域との「インフレーム」融合が創出されていることを示す。ｂ．Ｎｃｏ１部位からＰｍｅ１部位までのｐＤ６配列を示す（配列識別番号：９、１０、及び１１）。
【図９－１】細胞表面ｓｃＦｖ－Ｆｃライブラリー（選択したファージ集団由来）に由来する結合体の選択を示す。下記の細胞のフローサイトメトリー分析が示されている。ａ～ｃ．ＣＤ２２９での２ラウンドのファージディスプレイによる選択に由来する、組込み抗ＣＤ２２９　ｓｃＦｖ－Ｆｃの集団を示す。ｄ．ｆ．β－ガラクトシダーゼ（β－ｇａｌＲ１細胞）での１ラウンドのファージディスプレイによる選択に由来する、組込み抗β－ガラクトシダーゼｓｃＦｖ－Ｆｃの集団を示す。ｅ．β－ガラクトシダーゼでの２ラウンドのファージディスプレイによる選択に由来する、組込み抗β－ガラクトシダーゼｓｃＦｖ－Ｆｃの集団を示す。試料（ａ）は、未染色細胞であり、残りは、ヒト抗Ｆｃ－フィコエリトリン（ＦＬ２において）及び１００ｎＭの適切なビオチン化抗原／ストレプトアビジンＦＩＴＣ（ＦＬ１において）で染色したものを示す。細胞は、１３日後に分析した（ａ、ｂ、ｄ、ｅ）。実施例ｃ及び実施例ｆは、２０日後に染色した細胞を示し、マークした領域は、フローサイトメトリーによって採取した細胞を示す。
【図９－２】細胞表面ｓｃＦｖ－Ｆｃライブラリー（選択したファージ集団由来）に由来する結合体の選択を示す。下記の細胞のフローサイトメトリー分析が示されている。ｈ．フローサイトメトリー（図６ｆ）によって選択したβ－ｇａｌＲ１細胞を２２日間増殖させ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ発現及び抗原結合性（１００ｎＭの抗原を使用）を再分析したものを示す。ｇ．未染色の相当物を示す。ｊ．遺伝子導入後に４２日間増殖した元の集団（ｄに示される）に由来する非選別β－ｇａｌＲ１細胞を示す（ｊ）。比較のために、それぞれの集団の未標識細胞が示されている（ｇ、ｉ）。
【図１０】哺乳類ディスプレイ及びＩｇＧ編成ライブラリーの選別を示す。抗体集団を、１ラウンドまたは２ラウンドのファージディスプレイを使用して、β－ガラクトシダーゼで選択し、ＩｇＧとして再編成して、ＨＥＫ２９３細胞のＡＡＶＳ遺伝子座への、ヌクレアーゼ指向型組込みを介して標的化したものである。パネルａ、パネルｂは、１ラウンド目のファージ集団から得られた細胞を示し、ａは、非選別細胞（３８日間増殖後）、ｂは、フローサイトメトリーによって選別し、１９日間増殖した細胞を示す。パネルｃ、パネルｄは、２ラウンド目のファージ集団から得られた細胞を示し、ｃは、非選別細胞（３８日間増殖後、ｄは、選別されて、１９日間増殖した細胞を示す。
【図１１】大きなナイーブｓｃＦｖ－Ｆｃライブラリーの構築及び結合体の選択を示す。前述同様に、５００ｎＭのビオチン化抗原、及びフィコエリトリン標識抗Ｆｃ抗体と共にストレプトアビジン－ＦＩＴＣを用いて、ナイーブｓｃＦｖ－Ｆｃライブライリーに由来する細胞を染色した。領域は、流動選別によって選択した細胞を示す。試料は、下記のビオチン化物によって標識した。　ａ．ＣＤ２８　ｂ．β－ガラクトシダーゼ　ｃ．サイログロブリン　ｄ．ＥｐｈＢ４

【図１２】組込み方法の比較向けた、「マルチプルランディング（ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｌａｎｄｉｎｇ）」部位を含むイントロンの導入のための標的化ベクターを示す。 ａ．中間ＧＦＰ発現プラスミド（ｐＤ３）を示す。 ｂ．ＡＡＶＳ１指向型標的化ベクター（ｐＤ４）を示す。「ランディング部位」には、組込み指示に向けた要素が組込まれており、当該要素は、ＦＲＴ、ｌｏｘ２２７２、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ、及びＧＦＰ ＴＡＬＥＮである。ＡＡＶＳ遺伝子座へのｐＤ４の組込み後は、複数の組換え部位またはヌクレアーゼ切断部位が、ゲノム内に存在する。新規ｐＤ５プラスミド（図１５）は、相同組換えによる抗体挿入を推進するために、左右のホモロジーアームを有しており、当該左右のホモロジーアームは、「ランディング部位」のいずれかの側に存在する配列に相当するものである。

【図１３－１】ｐＤ４の配列を示す（配列識別番号：１２、１３、１４、１５、１６、１７、及び１８）。配列特徴には、下記のものが含まれる。ＡＡＶＳ左ホモロジー １９－８２２ＦＲＴ部位 ８３２－８７９、Ｌｏｘ２２７２部位 ８８４－９１７、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位 ９３３－９５０ＧＦＰ左ＴＡＬＥＮ結合 ９５４－９６８、ＧＦＰ右ＴＡＬＥＮ結合 ９８４－９９７Ｔ２Ａ １０４１－１１０３ＧＦＰ １１０４－１９４９ＰＧＫプロモーター ２１７８－２６９１ピューロマイシンデルタチミジンキナーゼ ２７０６－４３０７ｌｏｘＰ ４６３４－４６６７ＡＡＶＳ右ホモロジー ４６９２－５５２８

【図１３－２】ｐＤ４の配列を示す（配列識別番号：１２、１３、１４、１５、１６、１７、及び１８）。配列特徴には、下記のものが含まれる。ＡＡＶＳ左ホモロジー １９－８２２ＦＲＴ部位 ８３２－８７９、Ｌｏｘ２２７２部位 ８８４－９１７、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位 ９３３－９５０ＧＦＰ左ＴＡＬＥＮ結合 ９５４－９６８、ＧＦＰ右ＴＡＬＥＮ結合 ９８４－９９７Ｔ２Ａ １０４１－１１０３ＧＦＰ １１０４－１９４９ＰＧＫプロモーター ２１７８－２６９１ピューロマイシンデルタチミジンキナーゼ ２７０６－４３０７ｌｏｘＰ ４６３４－４６６７ＡＡＶＳ右ホモロジー ４６９２－５５２８

【図１４】クローン６Ｆにおける「マルチプルランディング部位」イントロンの組込みの検証を示す。ピューロマイシン中で遺伝子導入細胞を選択した後、ゲノムＤＮＡを調製した。試料１は、選択集団全体を示す。試料２は、クローン６Ｆを示し、試料３は、ＴＡＬＥＮ非存在下で遺伝子導入されたクローンであり、そして試料４は、野生型ＨＥＫ２９３細胞である。本明細書に記載のプライマー及び条件を使用し、ゲノム挿入の５’末端及び３’末端に正しく組込みまれたかどうかをＰＣＲによって検証した。主要な（正しいサイズの）バンドが、選択クローン（６Ｆ）ならびに選択集団で見られる。

【図１５－１】Ｆｌｐ／ＧＦＰ ＴＡＬＥＮ部位（ｐＤ５）への組込みに向けたドナープラスミドの配列を示す（配列識別番号：１９、２０、または２１）。特徴には、下記のものが含まれる。ＡＡＶＳ ＨＡ １３－２３３ＦＲＴ部位 ２４３－２９０Ｌｏｘ２２７２ ２９５－３２８Ｉ－Ｓｃｅ１ ３４４－３６１ブラストサイジン耐性 ４１７－８１８ポリＡ ８３２－１０７０

【図１５－２】Ｆｌｐ／ＧＦＰ ＴＡＬＥＮ部位（ｐＤ５）への組込みに向けたドナープラスミドの配列を示す（配列識別番号：１９、２０、または２１）。特徴には、下記のものが含まれる。ＡＡＶＳ ＨＡ １３－２３３ＦＲＴ部位 ２４３－２９０Ｌｏｘ２２７２ ２９５－３２８Ｉ－Ｓｃｅ１ ３４４－３６１ブラストサイジン耐性 ４１７－８１８ポリＡ ８３２－１０７０

【図１６】Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ構築物の配列を示す（配列識別番号：２２及び２３）。

【図１７】リコンビナーゼと共にＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼを使用して、ヌクレアーゼ指向型組込みを比較したフローサイトメトリー分析を示す。ｐＤ５－Ｄ１．３及び記載のヌクレアーゼ／リコンビナーゼをコードするプラスミドをクローン６Ｆ細胞に同時導入した。ブラストサイジンで細胞を選択し、遺伝子導入の３日後に、ビオチン化抗ヒトＦｃ抗体及びストレプトアビジンフィコエリトリンを使用して分析した。陽性細胞の割合が示

されている（表５にもまとめられている）。ａ．遺伝子導入無し、ｂ．ドナーのみ、ｃ．Ｉ－Ｓｃｅ１、ｄ．ｅＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ、ｅ．Ｃｒｅ、ｆ．Ｆｌｐリコンビナーゼ（ｐＯＧ４４プラスミドによってコードされている）。

【図１８－１】ヌクレアーゼ指向型組込みが、相同組換え及び「非相同末端結合」（ＮＨＥＪ）を推進することを示す。ａ．「クローン６Ｆ細胞のイントロン内のマルチプル「ランディング部位」を標的にするために使用したプラスミドｐＤ５の構造を示し、プライマーＪ４８の位置が示されている。このプラスミドにおける「ランディング部位」には、ＦＲＴ部位、ｌｏｘ２２７２部位、及びＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位が組込まれている（しかし、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ部位は組込まれていない）。ｂ．クローン６Ｆ（ｐＤ４から得られた）内の組込み部位を示し、プライマーＪ４４の位置が示されている。「ランディング部位」には、組込み指示に向けた要素が組込まれており、当該要素は、ＦＲＴ、ｌｏｘ２２７２、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ、及びＧＦＰ　ＴＡＬＥＮである。

【図１８－２】ヌクレアーゼ指向型組込みが、相同組換え及び「非相同末端結合」（ＮＨＥＪ）を推進することを示す。ｃ．ｐＤ５の相同組換え後のクローン６Ｆの組込み部位を示し、プライマーＪ４４及びプライマーＪ４８の位置が示されている。ｄ．ｐＤ５のＮＨＥＪまたはＦｌｐ相同組換え後のクローン６Ｆの組込み部位を示し、プライマーＪ４４、プライマーＪ４６、及びリバースプライマーＪ４４の位置が示されている。両矢印は、ＮＨＥＪまたはＦｌｐ指向型組込みによって組込まれた「余分（ｅｘｔｒａ）」プラスミドに由来するＤＮＡを示す。この実施例では、新規プラスミドＤＮＡ（ｐＤ５）は、ホモロジーアーム（相同組換えを指示するが、ＮＨＥＪには必要でない）を有していることに留意されたい。こうした配列は、ＮＨＥＪによる組込み後に保持され、ホモロジーアーム内に示される配列の複製を引き起こし、当該ホモロジーアームは、一方のペアは、この場合はプラスミドに由来し、もう一方のペアは、内在性のゲノム配列に相当するものである。簡潔に示すために、プラスミドがコードするホモロジーアームは示されておらず、ゲノム内のその相当配列のみが示されている。

【図１８－３】ヌクレアーゼ指向型組込みが、相同組換え及び「非相同末端結合」（ＮＨＥＪ）を推進することを示す。ｅ．試料ｉ～ｉｖのＰＣＲプライマーとしてプライマー４４及びプライマー４８を使用し、ゲノムＤＮＡは、下記のヌクレアーゼ／インテグラーゼで遺伝子導入した細胞に由来するものを使用した。ｉ．Ｓｃｅ１、ｉｉ．ＴＡＬＥＮ（ＧＦＰ）、ｉｉｉ．Ｆｌｐ（ｐＯＧ４４）、ｉｖ．ドナーのみ。分子量マーカーは、「ＧｅｎｅＲｕｌｅｒ　１ｋｂラダー」（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用した。プライマーＪ４４及びプライマーＪ４８によって、ヌクレアーゼが切断した試料ｉ及び試料ｉｉにおいて、相同組換えが生じたことが示されており、１９２８ｂｐのバンド（矢印によって示されている）が産生している。試料ｖ～ｖｉｉｉには、プライマー４４及びプライマー４６を使用し、ゲノムＤＮＡは、下記の試料に由来するものを使用した。ｖ．Ｓｃｅ１、ｖｉ．ＴＡＬＥＮ（ＧＦＰ）、ｖｉｉ．Ｆｌｐ（ｐＯＧ４４）、ｖｉｉｉ．ドナーのみ。プライマーＪ４４及びプライマーＪ４６によって、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼによるドナーＤＮＡ及びゲノムＤＮＡの切断が、ＮＨＥＪ（試料ｖ．）をもたらしたことが示されており、１８００ｂｐのバンド（矢印によって示されている）が産生している。予想どおり、Ｆｌｐ媒介性組込みによって、類似サイズのバンドが生成した（ｖｉｉ）。当該新規プラスミドには、切断部位が存在しないため、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮでは、ＮＨＥＪは生じなかった。

【図１９】ＩｇＧ抗体の培養上清への分泌を示す。ａ．培養上清に由来するＩｇＧをプロテインＡで精製してから、電気泳動後にクーマシー染色したゲルを示す。ｉ．Ｄｒｅリコンビナーゼ遺伝子の遺伝子導入無しのｐＤ２－Ｄ１．３細胞の上清から精製したＩｇＧを示す。ｉｉ．Ｄｒｅリコンビナーゼ遺伝子を遺伝子導入したｐＤ２－Ｄ１．３細胞の上清から精製したＩｇＧを示す。分泌抗体のポリクローナルＥＬＩＳＡを示す。図９Ｈに示される実験から選別された細胞（１ラウンドのファージディスプレイによって選択した抗体集団細胞を起源とする）を、選別後に７日間増殖させ、培養上清を採取した。β－ガラクトシダーゼ（１０ｕｇ／ｍｌ）またはＢＳＡ（１０ｕｇ／ｍｌ）のいずれかで、ＥＬＩＳ

Ａプレートを一晩被覆した。混合後容積の３３％にあたる６％のＭａｒｖｅｌ－ＰＢＳで、培養上清を、混合後に６６％となるように希釈した（これは、「ニート（ｎｅａｔ）」試料として上に記載されている）。加えて、上清をＰＢＳで１／１０に希釈してから、６％のＭＰＢＳと同一様式で混合した。結合したｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体の検出は、抗ヒトＩｇＧ－Ｅｕ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　カタログ番号１２４４－３３０）を使用して実施した。

【図２０】選択したｓｃＦｖ集団の、ＩｇＧ形式への変換に向けたＤＮＡ断片の調製を示す。（ａ）ＣＬ－ｐＡ－ＣＭＶ－Ｓｉｇｐ　ＤＮＡ挿入断片（図２１ｂに示されている）の生成を示す。プライマー２５９５及びプライマー２５９７を使用して、プラスミドｐＤ２からＰＣＲで増幅し、ゲルで精製した。レーンｍは、Ｇｅｎｅｒｕｌｅｒ　１　ｋｂラダー（Ｔｈｅｒｍｏ、ＳＭ０３１Ｄ）であり、レーン１は、$Ｃ_{Ｌ}$－ｐＡ－ＣＭＶ－Ｓｉｇｐ　ＤＮＡ挿入断片である。（ｂ）ｓｃＦｖのＤＮＡ挿入断片の生成を示し、これは、実施例６に記載のとおり実施した。レーンｍは、Ｇｅｎｅｒｕｌｅｒ　１ｋｂラダー（Ｔｈｅｒｍｏ、ＳＭ０３１Ｄ）、レーン１は、ブランク、レーン２は、精製されたｓｃＦｖ、レーン３は、β－ガラクトシダーゼでの１ラウンド目のアウトプットｓｃＦｖ集団、レーン４は、β－ガラクトシダーゼでの２ラウンド目のアウトプットｓｃＦｖ集団、レーン５は、ＣＤ２２９での２ラウンド目のアウトプットｓｃＦｖ集団である。（ｃ）ＮｈｅＩ及びＸｈｏＩで消化した「小環」ＤＮＡの精製を示す。ｓｃＦｖをコードする、ＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化したＤＮＡ（図２１、挿入断片ａ）と、定常軽（$Ｃ_{Ｌ}$）鎖、ポリＡ（ｐＡ）、ＣＭＶプロモーター、及びシグナルペプチドをコードするＤＮＡ（図２１、挿入断片ｂ）と、のライゲーションによって、「小環」ＤＮＡ（図２１ｃ）を形成させ、スピンカラムで精製し、ＮｈｅＩ及びＸｈｏＩで消化してから、１％のアガロースゲルによって精製した。レーンｍは、Ｇｅｎｅｒｕｌｅｒ　１ｋｂラダー（Ｔｈｅｒｍｏ、ＳＭ０３１Ｄ）、レーン１は、β－ガラクトシダーゼでの１ラウンド目のアウトプット、レーン２は、β－ガラクトシダーゼでの２ラウンド目のアウトプット、レーン３は、ＣＤ２２９での２ラウンド目のアウトプットである。矢印が示す２．６ｋｂに位置する直鎖化産物を切り出して、精製した。

【図２１】ｓｃＦｖからＩｇＧ形式への変換プロセスを模式的に示したものである。抗体の$Ｖ_{Ｈ}$ドメイン及び$Ｖ_{Ｌ}$ドメインをコードするＤＮＡ挿入断片（ａ）と、定常軽（$Ｃ_{Ｌ}$）鎖、ポリアデニル化配列（ｐＡ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、及びシグナルペプチド（ＳｉｇＰ）をコードするＤＮＡ断片（ｂ）と、を連結する。非複製ＤＮＡ「小環」ｃを創出するための、ＤＮＡ分子ａ及びＤＮＡ分子ｂの結合は、「粘着末端」ライゲーションによって促進される。ライゲーション後に、「小環」ｃを、制限酵素であるＮｈｅＩ及びＸｈｏＩで直鎖化する。その後、直鎖化産物ｄを精製し、消化したベクターｅと連結する。ベクターｅは、ＮｈｅＩ部位の上流にｐＥＦプロモーター及びＳｉｇＰ配列を含み、ＸｈｏＩ部位の下流に、抗体定常重（ＣＨ）ドメイン１～３をコードする。挿入断片ｄと、ベクターｅとのライゲーション産物は、プラスミドｆをもたらすであろうし、プラスミドｆは、細菌の形質転換に使用することができ、適切な選択可能マーカーと共に増殖させれば、標準方法によるプラスミドＤＮＡの産生及び精製が可能になるであろう。精製されたプラスミドｆは、異種Ｉｇ抗体発現に向けて、哺乳類細胞へと導入することができる［１３４］。あるいは、ベクターｅにおいてＣＨ１～３をコードするＤＮＡは、Ｆａｂ発現に向けて、単一ＣＨ１ドメインをコードするＤＮＡと置き換えることができる。$Ｖ_{Ｈ}$及び$Ｖ_{Ｌ}$は、それぞれ抗体可変重鎖及び抗体可変軽鎖である。伸長因子プロモーター（ｐＥＦ）、抗体定常軽鎖（$Ｃ_{Ｌ}$）及び抗体定常重ドメイン１～３（ＣＨ１～３）、ポリアデニル化配列（ｐＡ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ならびにシグナルペプチド（ＳｉｇＰ）をコードするＤＮＡが示されている。

【図２２】ｓｃＦｖからＩｇＧへの変換に必要なＤＮＡ断片の調製の追加実施例を示す。（ａ）実施例１４に記載のように、ｓｃＦｖ挿入断片を生成させ、１％アガロースＴＢＥゲルで分離した。レーン１及びレーン１４は、５００ｂｐから始まる５００ｂｐＤＮＡラダーである。レーン２～１３は、ｓｃＦｖＰＣＲ産物である。（ｂ）直鎖化「小環」ｄ（

図２１）の精製を、１％アガロースＴＢＥゲルでの分離によって実施した。左～右に向かって、最初のレーンは、ＤＮＡラダー（１ｋｂラダー、Ｌｉｆｅｔｅｃｈ、１５６１５－０２４）であり、残りのレーンは、直鎖化「小環」ｄである。（ｃ）ＣＭＶプロモーターがＰ２Ａ配列によって置き換えられており、用いたＤＮＡラダーが、Ｇｅｎｅｒｕｌｅｒ　１ｋｂラダー（Ｔｈｅｒｍｏ、ＳＭ０３１Ｄ）であったことを除き、（ｂ）と同一である。

【図２３】流動電気穿孔（ｆｌｏｗ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ）システムを使用した、結合体遺伝子のヌクレアーゼ指向型組込みを示す。流動電気穿孔システムを使用して、抗ＦＧＦＲ１抗体または抗ＦＧＦＲ２抗体のいずれかをコードする５０：５０混合ｐＤ６プラスミドを電気穿孔した。１３日後に、Ｄｙｅｌｉｇｈｔ－６３３で標識されたＦＧＦＲ１－Ｆｃ（ＦＧＦＲ１－Ｄｙ６３３）またはＤｙｅｌｉｇｈｔ－４８８で標識されたＦＧＦＲ２－Ｆｃ（ＦＧＦＲ２－Ｄｙ４８８）で、ブラストサイジンで選択した細胞を標識した。ドットブロットは下記を示す。ａ．ＦＧＦＲ２－４８８での単一染色（表７の試料１ｂ）ｂ．ＦＧＦＲ１－６３３での単一染色（表７の試料１ｂ）ｃ．ＦＧＦＲ１－６３３／ＦＧＦＲ２－４８８での二重染色（表７の試料１ｂ）ｄ．ＦＧＦＲ１－６３３／ＦＧＦＲ２－４８８での二重染色（表７の試料３）

【図２４】流動選別後の抗体遺伝子の回収を示す。１ラウンドのファージディスプレイによって抗体集団を選択し、Ｍａｘｃｙｔｅシステムを使用して、流動電気穿孔によって哺乳類ディスプレイライブラリーを創出した。１ｎＭまたは１０ｎＭの抗原のいずれかを使用して、細胞を選別し、ｍＲＮＡを直接単離した。ＰＣＲによって抗体遺伝子を回収し、細菌発現ベクターへとクローン化してから、ＥＬＩＳＡでの陽性割合を決定した（「１ｎＭアウトプット」、「１０ｎＭアウトプット」）。これを、元の１ラウンド目のアウトプット（「Ｒ１ファージアウトプット」）と比較した。プロットは、それぞれの集団で得られたＥＬＩＳＡシグナルのプロファイルを示す。ＥＬＩＳＡシグナルはそれぞれに対してである

【図２５－１】Ｔ細胞受容体の発現に向けたｐｌＮＴ２０ベクターを示す。ａ．二重プロモータープラスミドｐｌＮＴ２０を示し、ＡＡＶＳホモロジーアーム、ピューロマイシンでの選択が可能な遺伝子（以下に示されるスプライスアクセプター部位周辺領域）が示されている。アルファ鎖（可変アルファ、マウスアルファ定常－ＣＤ３ζを包含する）は、Ｎｈｅ１、Ｎｏｔ１、及びＡｃｃ６５Ｉの制限酵素部位と隣接し、ｐＥＦプロモーターの制御下にある。ベータ鎖（可変ベータ、マウスベータ定常－ＣＤ３ζを包含する）は、Ｎｃｏ１部位、Ｘｈｏ１部位、及びｈｉｎｄ３部位と隣接し、ＣＭＶプロモーターの制御下にある。ｂ．スプライスアクセプターの配列及びピューロマイシン遺伝子の開始地点を示す（配列域別番号：２４及び２５）。

【図２５－２】Ｔ細胞受容体の発現に向けたｐｌＮＴ２０ベクターを示す。ｃ．Ｔ細胞受容体クローンｃ１２／ｃ２アルファ鎖構築物の配列を示し、Ｎｈｅ１、Ｎｏｔ１、及びＡｃｃ６５Ｉの制限酵素部位が示されている（配列識別番号：２６及び２７）。

【図２５－３】Ｔ細胞受容体の発現に向けたｐｌＮＴ２０ベクターを示す。ｄ．Ｔ細胞受容体クローンｃ１２／ｃ２ベータ鎖構築物の配列を示し、Ｎｃｏ１、Ｘｈｏ１、及びＨｉｎｄ３の制限酵素部位が示されている（配列識別番号：２８及び２９）。

【図２５－４】Ｔ細胞受容体の発現に向けたｐｌＮＴ２０ベクターを示す。ｅ．Ｔ細胞受容体クローン４ＪＦＨアルファ鎖構築物の配列を示し、Ｎｈｅ１／Ｎｏｔ１の制限酵素部位が示されている（配列識別番号：３０及び３１）。ｆ．Ｔ細胞受容体クローン４ＪＦＨベータ鎖構築物の配列を示し、Ｎｃｏ１／Ｘｈｏ１の制限酵素部位が示されている（配列識別番号：３２及び３３）。

【図２５－５】Ｔ細胞受容体の発現に向けたｐｌＮＴ２０ベクターを示す。ｇ．ｃ１２／ｃ２　ＴＣＲアルファ鎖のＣＤＲ３の変異に使用した方針及びプライマーを示す（配列識別番号：３４、３５、３６、及び３７）。ｈ．ｃ１２／ｃ２　ＴＣＲベータ鎖のＣＤＲ３の変異に使用した方針及びプライマーを示す（配列識別番号：３８、３９、４０、及び４１）。（Ｎ＝Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔ；Ｓ＝ＣまたはＧ；Ｗ＝ＡまたはＴ）

【図２６－１】ヌクレアーゼ指向型組込みによって哺乳類細胞へと導入されたＴ細胞受容体によるペプチド；ＭＨＣ複合体の認識を示す。ＴＣＲ１は、フィコエリトリンで標識されたＨＬＡ－Ａ２（ペプチド１）との複合体の形態において、ペプチド１（ＳＬＬＭＷＩＴＱＶ）を認識するＴＣＲ　ｃ１２／ｃ２である。ＴＣＲ２は、フィコエリトリンで標識されたＨＬＡ－Ａ２（ペプチド２）との複合体の形態において、ペプチド２（ＥＬＡＧＩＧＩＬＴＶ）を認識するＴＣＲ　４ＪＦＨである。試料ａ及び試料ｃは、ペプチド１（ａ）またはペプチド２（ｃ）に曝露されたＴＣＲ１発現細胞を示す。試料ｂ及び試料ｄは、ペプチド１（ａ）またはペプチド２（ｃ）に曝露されたＴＣＲ２発現細胞を示す。

【図２６－２】ヌクレアーゼ指向型組込みによって哺乳類細胞へと導入されたＴ細胞受容体によるペプチド；ＭＨＣ複合体の認識を示す。試料ｅ及び試料ｆは、ペプチド１（ｅ）またはペプチド２（ｆ）で標識された非遺伝子導入ＨＥＫ２９３細胞を示す。ｇ．ＴＣＲ１をコードするプラスミドと、１００倍過剰のＴＣＲ２プラスミドとを混合し、ヌクレアーゼ指向型組込みによって、ＨＥＫ細胞へと導入した。１．１５％の細胞がペプチド１で標識された。１．１５％の細胞が陽性であった。ｈ．ＴＣＲ２コードするプラスミドと、１００倍過剰のＴＣＲ１プラスミドとを混合し、ヌクレアーゼ指向型組込みによって導入し、ペプチド２で標識した。０．６２％の細胞が標識された。流動選別によって陽性細胞を採取し、特定ＴＣＲが濃縮されたかを分析するために、ｍＲＮＡを回収した。

【図２６－３】ヌクレアーゼ指向型組込みによって哺乳類細胞へと導入されたＴ細胞受容体によるペプチド；ＭＨＣ複合体の認識を示す。試料ｉ～ｌは、ＨＥＫ２９３細胞におけるＴ細胞ライブラリーの発現を示す。Ｍａｘｃｙｔｅ電気穿孔によってＴＣＲライブラリーを導入し、ピューロマイシン中で１１日間選択した。Ｉ．ＡＰＣで標識された抗ＴＣＲ抗体（ｙ軸）で標識された細胞を示す。ｊ．フィコエリトリンで標識されたペプチド１：ＭＨＣ（ｘ軸）で標識された細胞を示す。ｋ．抗ＴＣＲ抗体及びペプチド１：ＭＨＣの両方で標識された非遺伝子導入細胞を示す。ｌ．抗ＴＣＲ抗体及びペプチド１：ＭＨＣの両方で標識されたＴＣＲ１ライブラリー遺伝子導入細胞を示す。試料ｍ～ｎは、Ｊｕｒｋａｔ細胞におけるＴＣＲの発現を示す。Ａｍａｘａ電気穿孔によってＴＣＲ１を送達し、ピューロマイシン中で２５日間選択した。

【図２６－４】ヌクレアーゼ指向型組込みによって哺乳類細胞へと導入されたＴ細胞受容体によるペプチド；ＭＨＣ複合体の認識を示す。ＴＡＬＥヌクレアーゼの存在下（ｍ）または非存在下（ｎ）で、プラスミドを遺伝子導入し、ＡＰＣで標識された抗ＴＣＲβ鎖抗体と共にインキュベートした。試料ｏ～ｒは、同一のＴＣＲ１遺伝子導入Ｊｕｒｋａｔ細胞のＴ細胞受容体の活性化を示す。すべての細胞を抗ＣＤ６９抗体によって標識した（ｙ軸）。試料ｏは、刺激を与えずｐは、抗ＣＤ３抗体で２４時間刺激した。試料ｑ及び試料ｒは、それぞれ２ｕｌ及び６ｕｌの、ＰＥで標識されたＭＨＣ：ペプチド１と共に２４時間インキュベートした。すべての細胞をＣＤ２８抗体にも曝露した。

【図２７－１】ヒト細胞への、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）ライブラリーの導入に向けたｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ１ベクター及びｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ２ベクターを示す。単一プロモータープラスミドであるｐｌＮＴ２１を示し、ＡＡＶＳホモロジーアーム、ピューロマイシンでの選択が可能な遺伝子、ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインに対する結合体の融合を推進するＣＭＶプロモーターが示されている。Ｎｃｏ１部位及びＮｏｔ１部位は、結合体のクローン化に適したものである。　ａ．ｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ１は、ＣＤ３ζの膜近傍ドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインに対して、結合体を融合させることを示す。　ｂ．ｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ２は、ＣＤ８のヒンジドメイン及び膜貫通ドメイン、４－１ＢＢ活性化ドメイン及びＣＤ３ζ活性化ドメインに対して、結合体を融合させることを示す。

【図２７－２】ヒト細胞への、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）ライブラリーの導入に向けたｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ１ベクター及びｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ２ベクターを示す。　ｃ．ｐｌＮＴ２１＿ＣＡＲ１におけるＣＤ３ζの配列を示す（配列識別番号：４２、４３、及び４４）。

【図２７－３】ヒト細胞への、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）ライブラリーの導入に向けた

ｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ１ベクター及びｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ２ベクターを示す。　ｄ．ｐｌＮＴ２１＿ＣＡＲ２におけるＣＤ８、４－１ＢＢ、及びＣＤ３ζの配列を示す（配列識別番号：４５及び４６）。

【図２７－４】ヒト細胞への、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）ライブラリーの導入に向けたｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ１ベクター及びｐｌＮＴ２１　ＣＡＲ２ベクターを示す。　ｅ．ＦＭＣ６３　Ｈ－Ｌ（抗ＣＤ１９抗体）の配列を示す（配列識別番号：４７及び４８）。

【図２８－１】ヌクレーゼ媒介性組込みによって、ヒト細胞へと導入されたキメラ抗原受容体構築物内のｓｃＦｖ及び代替骨格の発現を示す。ＨＥＫ細胞に、抗ＦＧＦＲ１抗体（ｂ）またはｌｏｘ１　ａｄｈｉｒｏｎ（ｃ）を遺伝子導入し、標識ＦＧＦＲ１及び標識ｌｏｘ１でそれぞれ標識した。対照として、同一抗原を非遺伝子導入ＨＥＫ２９３細胞と共にインキュベートした（それぞれａ及びｃ）。

【図２８－２】ヌクレーゼ媒介性組込みによって、ヒト細胞へと導入されたキメラ抗原受容体構築物内のｓｃＦｖ及び代替骨格の発現を示す。メソセリン及びＣＤ２２９で選択したファージディスプレイに由来する集団をヌクレーゼ媒介性組込みによって、ＨＥＫ細胞へと導入し（それぞれｆ及びｈ）１１日間ピューロマイシン中で選択した。こうした細胞または非遺伝子導入ＨＥＫ２９３細胞を、標識メソセリン（ｅ，ｆ）または標識ＣＤ２２９（ｇ、ｈ）と共にインキュベートした。ｅ及びｈは、非遺伝子導入ＨＥＫ２９３細胞を示す。

【図２９－１】哺乳類ディスプレイに向けた代替の結合体骨格の配列を示す。本明細書に記載のベクターを使用して、ヌクレアーゼ指向型組込みによって、異なる結合体形式のライブラリーを容易に導入することができる。例として、ＣＡＲ構築物またはＦｃ融合構築物への導入に向けて、Ｎｃｏ１部位及びＮｏｔ１部位を隣接させて、Ａｄｈｉｒｏｎ構築物を調製した。　ａ．ｌｏｘ１結合Ａｄｈｉｒｏｎ＿ｌｏｘ１Ａの配列を示す（配列識別番号：４９及び５０）。　ｂ．ｌｏｘ１結合Ａｄｈｉｒｏｎ＿ｌｏｘ１Ｂの配列を示す（配列識別番号：５１及び５２）。（可変ループは、タンパク質配列中で太字かつ下線有りで示されている）

【図２９－２】哺乳類ディスプレイに向けた代替の結合体骨格の配列を示す。本明細書に記載のベクターを使用して、ヌクレアーゼ指向型組込みによって、異なる結合体形式のライブラリーを容易に導入することができる。例として、ＣＡＲ構築物またはＦｃ融合構築物への導入に向けて、Ｎｃｏ１部位及びＮｏｔ１部位を隣接させて、Ａｄｈｉｒｏｎ構築物を調製した。　ｃ．結合体ライブラリーの構築に向けた、ループ１（ａｄｈｉｒｏｎ　ｍｕｔ１）（配列識別番号：５３、５５、及び５６）内またはループ２（ａｄｈｉｒｏｎ　ｍｕｔ２）（配列識別番号：５４、５７、及び５８）内の潜在的変異誘発プライマーを示し、下に示されるものは、当該プライマーによってカバーされる領域であり、（下の鎖）は、タンパク質翻訳を示している。ｎは、異なるループの長さを生じさせるＮＮＳコドンの可変数を示す。

【図２９－３】哺乳類ディスプレイに向けた代替の結合体骨格の配列を示す。本明細書に記載のベクターを使用して、ヌクレアーゼ指向型組込みによって、異なる結合体形式のライブラリーを容易に導入することができる。例として、ＣＡＲ構築物またはＦｃ融合構築物への導入に向けて、Ｎｃｏ１部位及びＮｏｔ１部位を隣接させて、Ａｄｈｉｒｏｎ構築物を調製した。　ｄ．本明細書に記載のベクター内でのノッチン発現を可能にするＮｃｏ１部位及びＮｏｔ１部位が隣接した、トリプシン結合ノッチンＭＣｏＴＩ－ＩＩの配列を示す。第１ループの配列に下線が引かれている　配列識別番号：５９及び６０）。　ｅ．ノッチン変異体ライブラリーの創出に向けた方針を示す。この例では、ループ１は、１０個の無作為化アミノ酸によって置き換えられている。この例では、ＶＮＳコドンが導入され（Ｖ＝Ａ、Ｃ、またはＧ）、１７個アミノ酸をコードする２４個のコドンが提供されている。この配列は、標準方法を使用して、ＭＣｏＴＩ－ＩＩをコードするクローンへと導入することができる（配列識別番号：６１、６２、及び６３）。

【図３０】ライゲーションまたはマイクロホモロジー媒介性末端結合（ＭＭＥＪ）によるヌクレアーゼ媒介性の抗体遺伝子挿入に向けた配列例を示す。ａ．ｐＤ７－Ｓｃｅ１の配

列を示す（ヌクレオチド１～１２０）（配列識別番号：６４、６５）。当該配列は、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ認識（太字）によって、ＥｃｏＲ１及びＮｓｉ１の間のＡＡＶＳ左アームが置き換えられていることを除き、ｐＤ６（図３ｃ及び図８参照）と同一ある。さらに、プライマー２７２３及びプライマー２７３４によってコードされる挿入断片によって、Ａｓｃ１及びＭｌｕ１の間のＡＡＶＳ右アームが置き換えられている（示されていない）。ｂ．ｐＤ７－ＯｂＬｉＧａＲｅの配列を示す（ヌクレオチド１～１２０）（配列識別番号：６６、６７）。当該配列は、ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥの右アーム認識部位及び左アーム認識部位によって、ＥｃｏＲ１及びＮｓｉ１の間のＡＡＶＳ左アームが置き換えられていることを除き、ｐＤ６（図３ｃ及び図８参照）と同一ある。さらに、プライマー２７２３及びプライマー２７３４によってコードされる挿入断片によって、Ａｓｃ１及びＭｌｕ１の間のＡＡＶＳ右アームが置き換えられている（示されていない）。

【図３１】結合体の、ＲＯＳＡ２６遺伝子座へのヌクレアーゼ指向型組込みを示す。　ａ．ピューロマイシン遺伝子の開始地点までの、左ホモロジーアームの配列を示し、実施例２２において言及されているプライマー及び制限酵素部位が示されている（配列識別番号：６８）。　ｂ．ＲＯＳＡ２６遺伝子座へのヌクレアーゼ指向型組込みに向けた右ホモロジーアームの配列を示し、実施例２２において言及されているプライマー及び制限酵素部位が示されている（配列識別番号：６９）。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【０１９２】

実施例１．ＩｇＧ編成抗体の発現に向けたベクターの構築

結合体（例えば、抗体、タンパク質、またはペプチド）の遺伝子的な選択をもたらすために、その結合体をコードする遺伝子を導入し、外来性プロモーターからのその遺伝子発現を推進するか、または例えば、内在性プロモーターといった、細胞ＤＮＡに既に存在するプロモーターの下流への導入遺伝子の組込みを指示することによってその遺伝子発現を推進する必要がある。抗体は、最も一般に使用されるクラスの結合体に相当するものであり、異なる形態における発現に向けて編成することができる。下記の実施例では、我々は、ｓｃＦｖが、Ｆｃドメインに融合されている（ｓｃＦｖ－Ｆｃ）単一遺伝子形式の発現について説明している。我々は、ヒトＩｇＧ２分子として編成された抗体の発現についても例示している。高等真核生物などの産生細胞において、ＩｇＧ編成抗体またはＦＡｂ編成抗体を発現するためには、別々の重鎖及び軽鎖を発現することが必要である。これは、それぞれの鎖をコードする別々のプラスミドを導入するか、または単一プラスミドにそれらを導入することによって実施できる。単一プラスミド内の２つの鎖は、マルチシストロン性の単一ｍＲＮＡから発現させることができる。単一メッセージから異なるタンパク質を発現させるには、二次性の下流位置での翻訳開始を可能にする内部リボソーム進入（ＩＲＥ）配列などの要素が必要となる。あるいは、ウイルス２Ａ配列などの翻訳の停止／開始を促進する配列要素を使用することができる［１１９］。

【０１９３】

あるいは、複数のプロモーターを使用して、単一プラスミドから複数の異なるタンパク質を発現させることができる。図１ａ及び図１ｂは、異なるベクター骨格（ｐＤＵＡＬ及びｐｌＮＴ３）内の２つの類似発現カセットの構成を示し、当該発現カセットは、分泌ＩｇＧ編成抗体の発現に向けて開発したものである。こうした発現カセットは、プロモーター配列及びポリＡ配列などの標準要素の遺伝子合成及びポリメラーゼ連鎖反応での増幅の組み合わせを使用して創出した。抗体重鎖（ｐＢＩＯＣＡＭ１－ＮｅｗＮｏｔ）及び抗体軽鎖（ｐＢＩＯＣＡＭ２－ｐＥＦ）の発現に向けて、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ＥＲ（図１ｃ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）内で、第１の別々のプラスミドを創出した。ｐＢＩＯＣＡＭ２－ｐＥＦに由来する要素（ｐＥＦプロモーター、軽鎖遺伝子、ポリＡ部位を含む）をｐＢＩＯＣＡＭ１－ＮｅｗＮｏｔ）へとクローン化して、ｐＤＵＡＬを創出した。示されている例は、Ｄ１．３［１２０］と呼ばれるヒト化抗リゾチーム抗体に由来するＶＨドメイン及びＶＬドメインを含み、ｐＤＵＡＬ－Ｄ１．３及びｐｌＮＴ３－Ｄ１．３

と称す。図１ａに示されるｐＤＵＡＬ　Ｄ１．３の要素は、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ＥＲ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　カタログ番号Ｖ８２３２０　図１ｃ）に由来するプラスミド骨格のＥｃｏＲ１及びＢＧＨポリＡ部位の間に存在する。

【０１９４】

同様に、別々の軽鎖カセット及び重鎖カセットをｐＳＦ－ｐＥＦ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ＯＧ４３）及びｐＳＦ－ＣＭＶ－Ｆ１－Ｐａｃ１（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ＯＧ１１１）へとそれぞれ導入して、ｐｌＮＴ１及びｐｌＮＴ２を創出した。これらを、ｐｌＮＴ２のＣＭＶプロモーターの上流に位置する軽鎖カセット（ｐＥＦプロモーター、軽鎖遺伝子、及びポリＡ部位を含む）をクローン化することによって、組み合わせて、ｐｌＮＴ３を創出した。図１ｂにおいて示されるｐｌＮＴ３－Ｄ１．３の要素は、プラスミドｐＳＦ－ＣＭＶ－Ｆ１－Ｐａｃ１（図１ｄ、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ＯＧ１１１）内に示される第１のＢｇｌ２及びＳｂｆ１の間にクローン化されている。

【０１９５】

サイトメガロウイルスの最初期プロモーター（ＣＭＶプロモーター）は、強力なプロモーターであり、重鎖の発現を推進するために使用した。ｐＤＵＡＬ　Ｄ１．３にも、ＣＭＶプロモーターのすぐ下流に、アデノウイルス２の３分節系リーダー（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ　ｌｅａｄｅｒ）（ＴＰＬ）及び増進主要後期プロモーター（ｅｎｈａｎｃｅｄ　ｍａｊｏｒ　ｌａｔｅ　ｐｒｏｍｏｔｅｒ）（ｅｎｈ　ＭＬＰ）が組込まれている［１２１］。伸長因子１アルファタンパク質は、ほとんどの真核細胞において一様かつ豊富に発現しており、そのプロモーター（ｐＥＦプロモーター）は、導入遺伝子の発現推進に向けて、一般に使用される［１２２］。ｐＤＵＡＬ－Ｄ１．３及びｐｌＮＴ３－Ｄ１．３において、ｐＥＦプロモーターは、抗体軽鎖の発現推進に使用されている。ウシ成長ホルモン（ＢＧＨポリＡ）を起源とするポリアデニル化部位は、それぞれの発現カセットの末端に位置している。

【０１９６】

小胞体、（及び最終的には培養上清）における別々の重鎖及び軽鎖の分泌は、２つの異なるリーダー配列によって指示される。軽鎖の発現は、ＢＭ４０リーダー配列によって指示される［１２３］。この配列には、Ｎｈｅ１クローン化部位及びＮｏｔ１クローン化部位が続き、当該クローン化部位は、ＶＬ遺伝子のインフレームクローン化を可能にし、続いて当該ＶＬ遺伝子は、ヒトＣカッパ遺伝子に融合される。重鎖の分泌は、マウスＶＨ遺伝子を起源とするイントロンによって分断されたリーダーによって指示されている（ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ＥＲにおいてみられるように）。リーダーには、抗体ＶＨ遺伝子のインフレームクローン化を可能にするＮｃｏ１部位及びＸｈｏ１部位が続き、その後にコドン最適化ＩｇＧ２遺伝子が続いている。ヒト化Ｄ１．３抗体［１２０］のＶＬ遺伝子及びＶＨ遺伝子を、ｐＤＵＡＬ－Ｄ１．３内及びｐｌＮＴ３－Ｄ１．３内のＮｈｅ１／Ｎｏｔ１部位及びＮｃｏ１／Ｘｈｏ１部位にそれぞれクローン化した。

【０１９７】

哺乳類ディスプレイに向けて、こうしたプラスミドの膜繋留型を創出した。ｐＤＵＡＬ－Ｄ１．３を、Ｂｓｕ３６Ｉ（ＩｇＧ２の重鎖遺伝子のＣＨ３ドメインを切断する）及びＢｓｔＺ１７１で消化することによってプラスミドｐＤ１を創出した。当該ＢｓｔＺ１７１は、ＳＶ４０ポリＡ領域の後のネオマイシン耐性カセット骨格を切断するものである（図１ｃ）。したがって、これによって、ＣＨ３ドメイン及びネオマイシン発現カセット全体のほとんどが除去される。ＣＨ３ドメインは、互換性Ｂｓｕ３６Ｉ末端及びＢｓｔＺ１７１末端を有する合成挿入断片によって置き換えられている（図１ｅに示される）。合成挿入断片を設計し、抗体ＣＨ３ドメイン末端の終始コドンを、スプライスドナー及びイントロンで置き換えた。当該スプライスドナーは、エクソンまで生じる、ＣＨ３終端のスプライシングを引き起こすものであり、当該エクソンは、ヒトＰＤＧＦ受容体膜貫通ドメイン［８４］の最初の５個の細胞内残基、終始コドン、及び追加のスプライスドナーをコードするものである。これには、追加のイントロン及びスプライスアクセプターが続き、そ

の後に、単一アミノ酸向けのコドン、そして終始コドンが続く（図１ｅ）。膜貫通ドメインをコードするエクソンと隣接する２つの合成イントロンは、それらの内部にＲＯＸ認識部位が位置するように設計した。ＲＯＸ部位は、Ｄｒｅリコンビナーゼによって認識され、こうした部位を含むＤＮＡ間の組換えを引き起こす［８８］。膜貫通ドメインをコードするエクソンと隣接する２つのＲＯＸ部位を含めることで、Ｒｏｘリコンビナーゼをコードする遺伝子の遺伝子導入によってこのエクソンが除去される可能性が創出される。こうすることで、分泌抗体産物の創出が期待されるであろう。

【０１９８】

図２は、得られた二重プロモーター抗体発現プラスミドの配列を示し、当該発現プラスミド（これ以後、ｐＤ１－Ｄ１．３（配列識別番号：１と称す）は、ヒト化Ｄ１．３抗リゾチーム抗体を発現するものである。抗リゾチーム結合特異性は、Ｄ１．３［１２０］に由来するＶＨ配列及びＶＬ配列を、それぞれＮｃｏ／Ｘｈｏ１及びＮｈｅ１／Ｎｏｔ１の制限酵素部位の間に含めることによって組込んだ。配列は、ＥｃｏＲ１部位からＢｓｔＺ１７１までが示されている。ＥＣｏＲ１部位及びＢｓｔＺ１７１部位を超える、ベクター骨格由来の配列は、図１ｃに示されているとおりである。

【０１９９】

実施例２．抗体カセットのＡＡＶＳ遺伝子座に対する標的化に向けたベクター（ｐＤ２）の構築

部位特異的ヌクレアーゼを使用したゲノム内の切断は、相同組換えまたは非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を介した、異種性ＤＮＡの挿入を促進するものである。タンパク質ホスファターゼ１、調節サブユニット１２Ｃ（ＰＰＰ１Ｒ１２Ｃ）遺伝子の第１イントロンを標的とするヌクレアーゼで、ヒトＨＥＫ２９３細胞を切断した。この遺伝子座は、アデノ随伴ウイルスの共通組込み部位として同定され、ＡＡＶＳ部位と称される（図３ａ）。ＡＡＶＳ部位は、ヒト細胞における異種性遺伝子の挿入及び発現に向けた「セーフハーバー（ｓａｆｅ　ｈａｒｂｏｕｒ）」遺伝子座であると考えられている［１２４］。

【０２００】

ゲノム内の部位特異的切断に続いて、相同組換えを使用して、タンパク質発現カセットの組込みを促進することが可能である。これを実施するためには、ゲノム切断部位のいずれかの部位にみられる配列に相同である領域に、発現カセットを隣接させる必要がある。ＡＡＶＳ遺伝子座への組込みを指示するために、ＡＡＶＳ遺伝子座の５’から意図する切断部位までの８０４ｂｐの区間をＰＣＲで増幅し、５’末端及び３’末端にそれぞれＥｃｏＲ１部位及びＭｆｅ１部位を創出した。抗体カセットの標的化に向けた左ホモロジーアームに相当するこの増幅産物をｐＤ１のＥｃｏＲ１部位へとクローン化し、５’末端にＥｃｏＲ１部位を再構築した。右ホモロジーアームに向けて、切断部位の３’側にあたる、ＡＡＶＳ遺伝子座の８３６ｂｐの区間をＰＣＲで増幅し、Ｂｓｔｚ１７１部位を両終端に創出し、これをｐＤ１のＢｓｔｚ１７１へとクローン化した。構築物は、図３ｂに示されており、得られた構築物（ｐＤ２）の配列は、図３ｃに示されている。

【０２０１】

ＡＡＶＳ左ホモロジーアームのクローン化の間に、３’末端にＮｓｉ１及びＰａｃ１の制限酵素部位も挿入した。続いて、これらの部位を使用して、ポリＡ部位が付随するブラストサイジン遺伝子が続く合成イントロンをクローン化した。ブラストサイジン遺伝子は、プロモーターを欠いているものの、スプライスアクセプター部位が先行しており、当該スプライスアクセプター部位は、ＡＡＶＳ遺伝子座に由来する上流エクソンとのインフレーム融合を創出するものである（図３ａ及び図３ｂ）。ＡＡＶＳ遺伝子座への組込みが生じれば、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の発現を引き起こす。ｐＤ２と呼ばれるこの最終構築物の配列は、図３ｃに示されている。

【０２０２】

ｐＥＦプロモーター、Ｄ１．３軽鎖、ポリＡ領域、ＣＭＶプロモーター、Ｄ１．３重鎖、代替スプライス部位、及びポリＡ部位を包含する抗体カセットの配列が、図２に示されている。繰り返しを避けるために、この配列は、図３ｃでは、区間標識して「Ｄ１．３抗

体発現カセット」と示されている。
【０２０３】
実施例３．細胞表面での抗体発現及び抗体結合に向けた、ＩｇＧ構築物のＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮ指向型組込み
　Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ培地で増殖したＨＥＫ２９３Ｆ細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に、ＡＡＶＳ指向型ＴＡＬＥＮベクターペアの存在下または非存在下で、ｐＤ２－Ｄ１．３ＤＮＡを遺伝子導入した。ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮペア（「ＡＡＶＳ　オリジナル（ｏｒｉｇｉｎａｌ）」）は、以前に説明されており［１２５］、下記の配列を認識する。
左ＴＡＬＥＮ：５’（Ｔ）ＣＣＣＣＴＣＣＡＣＣＣＣＡＣＡＧＴ（配列識別番号：７０）
スペーサー５’ＧＧＧＧＣＣＡＣＴＡＧＧＧＡＣ（配列識別番号：７１）
右ＴＡＬＥＮ：５’ＡＧＧＡＴＴＧＧＴＧＡＣＡＧＡＡＡＡの相補鎖（配列識別番号：７２）（すなわち、５’ＴＴＴＴＣＴＧＴＣＡＣＣＡＡＴＣＣＴ（配列識別番号：７３）
【０２０４】
　代替として、より効率的なＡＡＶＳ標的化ＴＡＬＥＮペアが同定され、後の実験に使用した（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１　ＴＡＬＥ－Ｎ及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｒ１　ＴＡＬＥ、カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）。このペアは、同一部位を認識し（しかし、上に括弧付きで示される最初の「Ｔ」残基は認識しない）、「ＡＡＶＳ－ＳＢＩ」ＴＡＬＥＮペアと称される。
【０２０５】
　０．５ｘ１０^{6}個細胞／ｍｌで細胞を播種し、次の日に、１：２（ｗ／ｗ）の比で添加されたＤＮＡ：ポリエチレンイミン（ＰｏｌｙＰｌｕｓ）を使用して、１０^{6}個細胞／ｍｌで遺伝子導入した。０．６μｇ／ｍｌのｐＤ２を細胞に遺伝子導入し、対象としてｐｃＤＮＡ３．０（０．６μｇ／ｍｌ）または左右の「オリジナルＡＡＶＳ」ＴＡＬＥＮプラスミドの組み合わせ（それぞれ０．３μｇ／ｍｌ）のいずれかを同時導入した。実験における遺伝子導入対照として、ＣＭＶプロモーターからＥＧＦＰを発現するｐＤ３（以下参照）を含め、遺伝子導入効率は３５％であった。５μｇ／ｍｌのブラストサイジンを添加したＦｒｅｅｓｔｙｌｅ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用した懸濁培養において、細胞を選択した。
【０２０６】
　抗体発現が、細胞表面で起きたかを決定するために、下記のプロトコールに従って抗ヒトＦｃ抗体で細胞を染色した。
１．遺伝子導入の１６日後に、ブラストサイジンで選択した集団に由来する０．５～１ｘ１０^{6}個の細胞を４℃で２分間遠心（２００～３００ｘｇ）。
２．洗浄用緩衝液（ＰＢＳ中０．１％のＢＳＡ　Ｇｉｂｃｏ番号１００１０）１ｍｌで細胞を洗浄し、細胞を４℃で２分間遠心（２００～３００ｘｇ）。
３．染色緩衝液（ＰＢＳ中１％のＢＳＡ）１００μｌに細胞を再懸濁し、蛍光色素複合化抗体を５～１０ｕｌ添加。抗体は、フィコエリトリンで標識された抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（クローンＨＰ６０１７、カタログ番号４０９３０４、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）またはフィコエリトリンで標識されたマウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ対照（カタログ番号４００２１４、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）を使用。４℃で３０分を超える時間、暗所でインキュベート。
４．洗浄緩衝液１ｍｌで２回洗浄し、洗浄緩衝液５００ｕｌに再懸濁。
５．７－アミノ－アクチノマイシンＤ（７－ＡＡＤ）を５０ｕｇ／ｍｌで含む細胞生存率測定用染色溶液（番号００－６９９３－５０　ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を５ｕｌ添加して、死細胞を同定。
６．（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳ　ＩＩ）フローサイトメトリーで細胞を分析。
【０２０７】
　図４は、ＡＡＶＳ標的化ＴＡＬＥＮの存在下でｐＤ２－Ｄ１．３を遺伝子導入すると、

陽性率が８６％であり、陽性率が１．５％であったｐＤ２－Ｄ１．３単独と比較して、抗体を発現する細胞の集団が顕著に多く存在したことを示す。

【０２０８】

標識抗原に対する結合性を評価することによって、表面に発現した抗リゾチーム抗体の機能性を決定した。ニワトリ卵白リゾチーム（Ｓｉｇｍａ：Ｌ６８７６）は、Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ Ｒａｐｉｄ ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ（Ｄｙｌｉｇｈｔ ４８８、Ｉｎｎｏｖａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ：３２２－００１０）を使用して、下記のとおり標識した。

１．リゾチーム１００ｕｌ（ＰＢＳ１００ｕｌに２００ｕｇを溶解）にＬＬ－Ｒａｐｉｄ Ｍｏｄｉｆｉｅｒ試薬を１０ｕｌ添加し、穏やかに混合。

２．Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ（商標）Ｒａｐｉｄ混合液に、混合液を添加し、ピペッティングして穏やかに再懸濁。

３．室温で１５～３０分間暗所で混合液をインキュベート。

４．反応液にＬＬ－Ｒａｐｉｄ Ｑｕｅｎｃｈｅｒ試薬を１０ｕｌ添加し、穏やかに混合。

５．４℃で保存。リゾチーム－Ｄｙ４８８の最終濃度は、１．６μｇ／μｌである。

６．染色当たり、リゾチーム－Ｄｙ４８８を６μｌ（約１０ｕｇ）使用。

７．上記のとおり染色、洗浄、及びフローサイトメトリーを実施。

【０２０９】

分析によって、ｐＤ２－ｈｕＤ１．３を遺伝子導入した細胞の８６％が、標識ＨＥＬに結合した（Ｍ１ゲートによって判断）のに対し、遺伝子導入無しの細胞では、０．２９％であったことが示されている（図５）。

【０２１０】

実施例４．部位特異的ヌクレアーゼ（ＡＡＶＳ指向型ＴＡＬＥＮ）は、ドナーＤＮＡの組込みを増進する

遺伝子導入細胞もプレートに播種し、ブラストサイジンで選択して、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の発現が活性化した細胞の数を決定した。遺伝子導入の２４時間後に、０．２５ｘ１０^{6}個細胞／１０ｃｍペトリ皿（組織培養処理済）で細胞を播種し、１０％のウシ胎仔血清（１０２７０－１０^{6}、Ｇｉｂｃｏ）及び１％のＭｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｍｅｄｉｕｍ ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ（ＭＥＭ＿ＮＥＡＡ 番号１１１４０－０３５ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において増殖させた。２４時間後に５ｕｇ／ｍｌのブラストサイジンを添加し、２日おきに培地を交換した。９日後、ｐＤ２プラスミドを受け入れなかった細胞はすべて死滅した。１２時間後に、２％のメチレンブルー（５０％メタノール中）でプレートを染色した。正確に定量化するにはコロニー密度が高すぎたが、ＡＡＶＳ ＴＡＬＥＮの存在下では、ブラストサイジン耐性コロニーの数は増加しており、これは、ＡＡＶＳ遺伝子座への標的組込みが起きたことを示唆している。より正確な定量化に向けて、ＤＮＡ量を減らして導入した。

【０２１１】

１０^{6}個の細胞当たり、５０ｎｇ、２００ｎｇ、または４００ｎｇのいずれかの量のｐＤ２－Ｄ１．３を使用して、前述のとおり、ＡＡＶＳ ＴＡＬＥＮ（存在する場合は、ＴＡＬＥＮはそれぞれ０．３ｕｇ／ｍｌ、表１Ａ）の存在下または非存在下で、遺伝子導入を実施した。対照プラスミドであるｐｃＤＮＡ３．０で総ＤＮＡインプットを調整して、１０^{6}個の細胞当たり１．２ｕｇのＤＮＡとした。遺伝子導入の２４時間後、１０ｃｍのディッシュに０．２５ｘ１０^{6}個の細胞を播種し、播種の２４時間後に、７．５ｕｇ／ｍｌのブラストサイジンを添加した。ブラストサイジンでの選択の１０日後に、２％のメチレンブルー（５０％メタノール中）でコロニーを染色した。結果は、図６に示され、表１Ａにまとめられている。これによって、ＡＡＶＳ指向型ＴＡＬＥＮをコードするＤＮＡを同時導入すると、ブラストサイジン耐性コロニーの数が約１０倍に増加することが示された。

【０２１２】
ＡＡＶＳ遺伝子座を標的とする「ＡＡＶＳ　オリジナル」ＴＡＬＥＮペアと、「ＡＡＶＳ　ＳＢＩ」ＴＡＬＥＮペアとの比較を実施した。表１Ｂは、「ＡＡＶＳ　ＳＢＩ」ＴＡＬＥＮペアを使用することで、ブラストサイジン耐性コロニーの数が増加することを示す。

【表１】
表1．ｐＤ２－Ｄ１．３の遺伝子導入に由来するブラストサイジン耐性コロニーの定量化

A.

酵素 プラスミド	pD2-D1.3 ドナー (ng/10^6個細胞)	AAVS TALEN 有り	AAVS TALEN 無し
AAVS オリジナル	50	319	32
AAVS オリジナル	200	526	41
AAVS オリジナル	400	686	75

B.

酵素 プラスミド	pD2-D1.3 ドナー (ng/10^6個細胞)	AAVS TALEN 有り	AAVS TALEN 無し（対照 pcDNA3.0）
AAVS オリジナル	300	1420	111
AAVS オリジナル	1000	1080	127
AAVS オリジナル	3000	560	70
AAVS-SBI	300	2800	111
AAVS-SBI	1000	1630	127
AAVS-SBI	3000	870	70

【０２１３】
本明細書で、我々は、細胞表面での抗体発現（実施例３）またはプロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の活性化（実施例４）のいずれかを使用して、ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ添加の効果を比較した。ヌクレアーゼ指向型組込みの利点は、ブラストサイジン耐性コロニーに対する効果と比較して、抗体発現を測定すると、より明らかである。可能性のある１つの説明は、ブラストサイジン存在下における生存をもたらすために必要な発現レベルは、表面上でのＩｇＧ２発現を検出するために必要な発現レベルと比較して、顕著に低くあり得るというものである。したがって、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の誤った組込み／スプライシングが生じると、ブラストサイジン抵抗遺伝子の低レベル発現をもたらし得、これによって、顕著な抗体発現を伴わず、ブラストサイジン耐性を有するコロニーの数が増加した基礎環境が作りだされている。

【０２１４】
実施例５．ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮを使用した組込みの正確性の決定
組込みの正確性を調べるために、実施例４／表１Ａの実験からコロニーを選定し（二連かつ非染色のプレート由来）、増殖させ、こうした細胞に由来するゲノムＤＮＡをＰＣＲの鋳型として使用した。ゲノムＤＮＡの調製に向けて、細胞を回収し、溶解緩衝液（１０ｍＭのトリスＣｌ、ｐＨ＝８．０、５０ｍＭのＥＤＴＡ、２００ｍＭのＮａＣｌ、０．５％のＳＤＳ、０．５ｍｇ／ｍＬでプロテイナーゼＫ添加（溶解直前に添加）７００μＬに再懸濁した。その後、溶解緩衝液に再懸濁した細胞を微量遠心管に移し、６０℃で約１８時間保った。翌日、ゲノムＤＮＡを沈殿させるために、可溶化液にイソプロパノールを７００μＬ添加した。１３，０００ｒｐｍで微量遠心管を２０分間遠心した。その後、ゲノ

ムＤＮＡのペレットを７０％のエタノールで洗浄し、１３，０００ｒｐｍでさらに１０分間遠心した。遠心後、ゲノムＤＮＡのペレットに触れないようにしながら、上清を注意深く分離した。その後、１０ｍＭのトリス（ｐＨ８．０）及び１ｍＭのＥＤＴＡを含む緩衝液１００μＬにゲノムＤＮＡのペレットを再懸濁してから、微量のエタノールを除去するために、蓋を開けたままにして６０℃で３０分間保った。この溶液１００μＬに、ＲＮＡｓｅＡを添加し（最終濃度２０μｇ／ｍＬ）、６０℃で約１時間インキュベートした。ｎａｎｏｄｒｏｐ分光光度計（Ｎａｎｏｄｒｏｐ）を使用して、ゲノムＤＮＡの濃度を測定した。

【０２１５】

正しい組込みを同定するために、左右のホモロジーアームの域を超えて、ＡＡＶＳゲノム遺伝子座にハイブリッド形成するＰＣＲプライマーを設計した。これらのプライマーは、挿入断片特異的プライマーとペアにした。５’末端側のプライマーは下記のとおりである。

ＡＡＶＳ－左－アーム－接合部－ＰＣＲ－フォワード（９６２５）　５’ＣＣＧＧＡＡＣＴＣＴＧＣＣＣＴＣＴＡＡＣ（配列識別番号：７４）

ＢＳＤ＿接合部　ＰＣＲ－リバース（９６２６）：５’ＴＡＧＣＣＡＣＡＧＡＡＴＡＧＴＣＴＴＣＧＧＡＧ（配列識別番号：７５）

【０２１６】

正しい組込みが起きた場合、これらのプライマーによって、１．１ｋｂの増幅産物が得られる。ＡＡＶＳ指向型組込みから生じたクローンの８／９から、正しいサイズのバンドが得られた（図７ａ、図７ｂ）。ＴＡＬＥＮ無しで得られた２つのブラストサイジン耐性コロニーからは、増幅産物は得られず（図１１ａ）、これは、組込みが無作為であることを意味している。３’末端側のプライマーは下記のとおりである。

ドナー＿プラスミド＿配列＿ＰＤＧＦＲＴＭ－２　フォワード　５’ＡＣＡＣＧＣＡＧＧＡＧＧＣＣＡＴＣＧＴＧＧ（配列識別番号：７６）

ＡＡＶＳ１＿右アーム＿接合部＿ＰＣＲ＿リバース　５’ＴＣＣＴＧＧＧＡＴＡＣＣＣＣＧＡＡＧＡＧ（配列識別番号：７７）

【０２１７】

これらのプライマーによって、組込みが正しければ、１．５ｋｂの増幅産物が得られる。ＡＡＶＳ指向型組込みから生じたクローンの７／９から、正しいサイズのバンドが得られた。ＴＡＬＥＮ無しで得られた２つのブラストサイジン耐性コロニーからは、増幅産物は得られなかった（図１１ｂ）。したがって、ブラストサイジン耐性細胞の大部分が、ＡＡＶＳ遺伝子座への正しい組込みから生じている一方で、ＴＡＬＥＮ非存在下で生じたブラストサイジン耐性コロニーは、正しく組込まれていないものである。

【０２１８】

実施例６．ファージディスプレイ及び哺乳類ディスプレイを介した選択からの選択集団に由来するｓｃＦｖディスプレイライブラリーの構築

ｓｃＦｖ編成可溶性抗体は、これまでに、ベクターｐＢＩＯＣＡＭ５－３Ｆから発現されており、この場合、ＣＭＶプロモーターが発現を推進し、ベクターによって、抗体遺伝子に対するＣ末端融合パートナーが与えられ、当該Ｃ末端融合パートナーは、ヒトＦｃ、Ｈｉｓ６、及び３ｘＦＬＡＧからなるものである［１０５、１２６］。これを改変し、ベクターｐＢＩＯＣＡＭ５ｎｅｗＮｏｔを創出し、抗体のＦｃ領域内にＮｏｔ１部位を埋め込んだ（図８に示されるとおり）。これを開始点として使用し、細胞表面に繋留されたｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体の発現に向けて、ベクターｐＤ６（図８）を創出した。プライマー（２５９８及び２６１９）を設計し、ｐＢＩＯＣＡＭ５ｎｅｗＮｏｔからのＣＭＶプロモーター－ｓｃＦｖ－Ｆｃ発現カセットの増幅を可能にした。プライマー２５９８は、ＣＭＶプロモーターの上流でハイブリッド形成すると共に、末端にＰａｃ１部位（下線が引かれている）が配置されている。

２５９８：ＴＴＴＴＴＴ［ＴＴＡＡＴＴＡＡ］ＧＡＴＴＡＴＴＧＡＣＴＡＧＴＴＡＴＴＡＡＴＡＧＴＡＡＴＣＡＡＴＴＡＣＧＧＧＧＴＣ（配列識別番号：７８）

【０２１９】
プライマー２６１９は、Ｆｃドメインの末端近くでハイブリッド形成し、イントロンの開始部位に、スプライスドナー部位及びＰｍｅ１部位（下線が引かれている）を導入する。
２６１９：ＴＴＴＴＴＴＧ［ＴＴＴＡＡＡ］ＣＴＴＡＣＣＴＴＧＧＡＴＣＣＣＴＴＧＣＣＧＧＧＧＣＴＣＡＧＧＣＴＣＡＧＧＧＡＣ（配列識別番号：７９）
【０２２０】
得られたＰＣＲ産物は、ｐＤ２（図３）のＰａｃ１部位及びＰｍｅ１部位と互換性である。
ｐＤ２をＰａｃ１及びＰｍｅ１で消化することによって、ｐＥＦプロモーター－リーダー－－左鎖－ＣＭＶプロモーター－リーダー－重鎖が除去される。
Ｐａｃ１／Ｐｍｅ１で切断したＰＣＲ産物のクローン化によって、ＣＭＶプロモーター－リーダー－Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１部位－ヒトＦｃが差し込まれる。
【０２２１】
この様式でのクローン化は、下流の膜貫通ドメインまでのスプライシングに向けて、適切にｓｃＦｖ－Ｆｃカセットを配置するものであり、当該膜貫通ドメインは、ｐＤ２において、細胞表面でのＩｇＧ提示に向けて既に説明したとおりである。最終的なベクターであるｐＤ６は、図８に示され、Ｎｃｏ１部位からＰｍｅ１部位までのＤ６の配列が示されている。
【０２２２】
ベーターガラクトシダーゼ（Ｒｏｃｋｌａｎｄ、カタログ番号Ｂ０００－１７）及びＣＤ２２９（Ｒ ａｎｄ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号８９８－ＣＤ－０５０）を抗原として使用して、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙファージディスプレイライブラリー［７］を使用したファージディスプレイでの選択を実施した。以前に説明したように、使用した選択及びサブクローン化の方法は、基本的なものである［６、７、１１８、１２７］。ベーターガラクトシダーゼでの１回または２回のラウンドの選択、及びＣＤ２２９での２回のラウンドの選択から生じた集団に由来するｓｃＦｖ遺伝子をＰＣＲによって回収した。プライマーＭ１３Ｌｅａｄｓｅｑは、ｓｃＦｖ遺伝子に先行する細菌リーダー配列内でハイブリッド形成し、Ｎｏｔｍｙｃｓｅｑは、ファージディスプレイベクターにおいてｓｃＦｖ遺伝子に続くｍｙｃタグでハイブリッド形成するものである［１２７］。
Ｍ１３Ｌｅａｄｓｅｑ（配列識別番号：８０）
ＡＡＡ ＴＴＡ ＴＴＡ ＴＴＣ ＧＣＡ ＡＴＴ ＣＣＴ ＴＴＧ ＧＴＴ ＧＴＴ ＣＣＴ
Ｎｏｔｍｙｃｓｅｑ（配列識別番号：８１）
ＧＧＣ ＣＣＣ ＡＴＴ ＣＡＧ ＡＴＣ ＣＴＣ ＴＴＣ ＴＧＡ ＧＡＴ ＧＡＧ
【０２２３】
Ｎｃｏ１及びＮｏｔ１でＰＣＲ産物を消化し、消化挿入断片をゲルで精製した。細菌発現プラスミドであるｐＳＡＮＧ１０－３ＦのＮｏｃｏ１部位及びＮｏｔ１部位へと消化産物を連結し、説明したとおりに、抗体を発現させ、選別した［１２７］。ベーターガラクトシダーゼ及びＣＤ２２９での２ラウンドの選択後に、ＥＬＩＳＡによって、４０／１９０（２１％）及び３５／１９０（１８％）のクローンが陽性であることが明らかとなった。
【０２２４】
Ｎｃｏ／Ｎｏｔで切断した挿入断片５５０ｎｇについてもｐＤ６（２．４μｇ）のＮｃｏ１及びＮｏｔ１部位へと連結し、ｓｃＦｖと、ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域との融合体を発現する構築物を創出した。エレクトロコンピテントなＮＥＢ５ａｌｐｈａ細胞（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｃ２９８９）へと連結ＤＮＡを形質転換し、それぞれの集団で、サイズが２～３ｘ10^7個クローンであるライブラリーを生成させた。ＤＮＡを調製し、10^6個の細胞当たりドナーＤＮＡ（ｐＤ６ライブラリー）を０．３μｇ使用して、上記のように、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ培地において増殖した１００ｍｌ

のＨＥＫ２９３細胞へと同時導入した。「ＡＡＶＳ－ＳＢＩ」ＴＡＬＥＮ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１　ＴＡＬＥ－Ｎ及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｒ１　ＴＡＬＥ、カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）をそれぞれ０．５μｇ使用して、細胞に同時導入した。

【０２２５】

遺伝子導入の２４時間後に、バルク培養容積を２倍にし、２４時間後に、ブラストサイジン（１０μ／ｍｌ）を添加した。３～４日ごとに培地を新しくし、６日後にブラストサイジン濃度を２０μｇ／ｍｌまで増加させた。

【０２２６】

ライブラリーサイズを決定するために、遺伝子導入の２４時間後に、１０ｃｍのペトリ皿（組織培養処理済）に２０，０００個の細胞を播種し、１０％のウシ胎仔血清（１０２７０－１０６、Ｇｉｂｃｏ）及び１％のＭｉｎｉｍａｌ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｍｅｄｉｕｍ　ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ（ＭＥＭ＿ＮＥＡＡ　番号１１１４０－０３５　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において増殖させた。さらに２４時間後に、１０μｇ／ｍｌのブラストサイジンを添加し、培地を２日おきに交換した。８日後に、２％のメチレンブルー（５０％のメタノール中）でプレートを染色した。表２に結果を示す。これは、３つ集団で、約３ｘ１０^{6}個のクローン（遺伝子導入細胞の３％に相当する）のライブラリーが得られたことを示すものである。

【表２】

表2．ｓｃＦｖ－Ｆｃライブラリーサイズの決定

試料	コロニー数/20,000個細胞	コロニー数/10^{6}個細胞	ライブラリーサイズ
β－ガラクトシダーゼ Rd1	546	27,300	2.7 x 10^{6}
β－ガラクトシダーゼ Rd2	654	32,700	3.2 x 10^{6}
CD229 Rd2	556	27,800	2.8 x 10^{6}

【０２２７】

１０～２０ｘ１０^{6}個の細胞の標識及び流動選別のプロトコールを以下に示す。遺伝子導入後の１３日目に、インキュベーション容積を減らし（示されているものの１／１０の試薬容積）、試料当たり１０^{6}個の細胞のみを使用して、最初の分析を実施した。

【０２２８】

図９は、遺伝子導入後１３日目に、少なくとも４３～４６％の細胞が、細胞表面にｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体を発現しており、これは、ＦＩＴＣまたはフィコエリトリンのいずれかで標識された抗Ｆｃ抗体を使用して検出できることを示している。ＦＩＴＣまたはフィコエリトリンのいずれかで標識されたストレプトアビジンを使用して、ビオチン化ベータガラクトシダーゼの結合もこの集団内で検出される。１ラウンドまたは２ラウンドのファージディスプレイよる選択から生じたアウトプット集団から得られたライブラリーを使用し、ストレプトアビジン－ＦＩＴＣを使用したところ、それぞれ１１．８％及び３９％の細胞が、抗体発現及び抗原結合の両方で陽性であった。２ラウンドのファージディスプレイから得られたＣＤ２２９に向けたものでは、６６％の細胞が、ｓｃＦｖ－Ｆｃに陽性であり、こうした細胞の２４％が、ＣＤ２２９結合に対して陽性であった（総集団の１５％）。

【０２２９】

遺伝子導入後２０日目に、下記のプロトコールに従って（ビオチン化抗原／フィコエリトリンで標識されたストレプトアビジン及びＦＩＴＣで標識された抗ヒトＦｃを使用して

）、細胞を標識した。
１．細胞を回収、洗浄し、試料当たり１５～２０ｘ１０^{6}個に調整。室温、２５０ｇで４分間細胞を遠心沈降し、１ｍｌのＰＢＳ＋０．１％のＢＳＡ（４℃）で細胞を洗浄し、室温、２５０ｇで４分間細胞を遠心沈降してから、１ｍｌのＰＢＳ＋０．１％ＢＳＡに再懸濁。
２．ビオチン化抗原を添加し、最終濃度を１００ｎＭとして、４℃で３０分間インキュベート。
３．５分間、１５００ｒｐｍの遠心によって、１ｍｌの０．１％のＢＳＡで細胞を２回洗浄。
４．以下のいずれかを添加し、暗所で１５分間保持。
１０μｌのＦＩＴＣ標識ストレプトアビジン（１μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ　カタログ番号Ｓ３７６２）及び２０μｌのフィコエリトリン標識抗ヒトＦｃ（２００μｇ／ｍｌ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　カタログ番号４０９３０４）、
または
２０μｌのフィコエリトリン標識ストレプトアビジン（２００μｇ／ｍｌ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　カタログ番号４０５２０３）及び２０μｌのＦＩＴＣ標識抗ヒトＦｃ（２００μｇ／ｍｌ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　カタログ番号４０９３１０）ＰＢＳ＋１％のＢＳＡ
５．５分間、１５００ｒｐｍの遠心によって、１ｍｌの０．１％のＢＳＡで細胞を２回洗浄。
６．５００μｌの氷冷したＰＢＳ＋１％ＢＳＡに再懸濁。
７．生存率測定用染色に向けて、バイアル当たり２０μｌの７ＡＡＤを添加。
【０２３０】
選別に向けて、細胞サイズ、粒度、パルス幅及び生存率（７－ＡＡＤ染色による、前方散乱ならびに側方散乱に基づき、細胞をゲートした。結果を図９ｃ及び図９ｆに示す。２ラウンドのＣＤ２２９（ＣＤ２２９　Ｒ２）での選択、及び１ラウンドのβ－ガラクトシダーゼでの選択（β－ｇａｌＲ１）から生じたアウトプット集団から得られたライブラリーで、合計１千万個の細胞を選別し、それぞれ３．１％及び７％の二重陽性である細胞を回収した。
【０２３１】
β－ｇａｌＲ１から得られた細胞から選択した細胞をさらに２０日間増殖させ、再度分析した（図９ｈ）。これは、今や大部分の細胞が、ｓｃＦｖ－Ｆｃを発現し、β－ガラクトシダーゼに結合することを示すものである。この図は、遺伝子導入の４２日後に、非選択集団内の二重陽性である細胞の割合が減少していないことも示す（図９ｋ）。
【０２３２】
１５０，０００～１０^{6}個の選別された細胞からゲノムＤＮＡを調製した。ゲノムＤＮＡは、前述の方法またはＧｅｎＥｌｕｔｅ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ｋｉｔ（Ｓｉｇｍａ　Ｇ１Ｎ１０）を使用して調製した。
ｓｃＦｖ遺伝子は、下記のプライマーを使用して、ゲノムＤＮＡからＰＣＲで増幅した。
２６２３（配列識別番号：８２）
ＴＡＡＡＧＴＡＧＧＣＧＧＴＣＴＴＧＡＧＡＣＧ
２６２４（配列識別番号：８３）
ＧＡＡＧＧＴＧＣＴＧＴＴＧＡＡＣＴＧＴＴＣＣ
【０２３３】
０．３ｕＭのそれぞれのプライマー及び３％のＤＭＳＯを含む製造者の緩衝液中で、Ｐｈｕｓｉｏｎポリメラーゼ（ＮＥＢ　カタログ番号Ｍ０５３２Ｓ）を使用して、ＰＣＲ反応を実施した。５０ｕｌの反応において、１００～１０００ｎｇのゲノムＤＮＡを鋳型として使用した。９８℃で１０秒、５５℃で２５秒、７２℃で４５秒のサイクルを３０回実施した。これによって、１．４ｋＢの増幅産物が得られ、これをＮｃｏ１及びＮｏｔ１で消化した。約７５０～８００ｂｐのバンドが生成し、これをゲルで精製してからｐＳＡＮＧ１０へとクローン化した。連結したＤＮＡをＢＬ２１細胞（Ｅｄｇｅ　Ｂｉｏ　Ｕｌｔ

ｒａ　ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテント細胞、カタログ番号４５３６３）へと形質転換した。このようにして、選別した集団から得られたｓｃＦｖ断片を細菌において発現させることができ、以前に説明したとおりである［７、１２７］。

【０２３４】

抗体遺伝子を単離して、代替のベクター／宿主の組み合わせにおいて発現するというものの代わりとして、単一細胞クローン化後の選択細胞、またはポリクローナル抗体混合物を生成させるための選別集団を使用して選択した細胞のいずれかから直接的に分泌抗体を得ることが可能である。これを例示するために、培養７日後に、選別細胞（βｇａｌＲ１細胞由来）から培養上清を取得した。これは、βガラクトシダーゼで被覆したプレートを使用したＥＬＩＳＡにおいて陽性であることが示された（実施例１３及び図１９ｂ参照のこと）。

【０２３５】

実施例７．ファージディスプレイから選択した集団に由来するＩｇＧディスプレイライブラリーからの構築及び選択

実施例６に記載したように、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡ断片を生成させた。当該ＤＮＡ断片は、β－ガラクトシダーゼ及びＣＤ２２９に対する、抗体ファージディスプレイでの選択の１ラウンド目及び２ラウンド目のアウトプットに相当するものである。ｓｃＦｖ集団は、実施例１４及び下記に詳細に示される方法に従って、ＩｇＧ形式へと変換した。

【０２３６】

ヒトカッパ軽鎖定常ドメイン（C_L）、ポリアデニル化配列（ｐＡ）、ＣＭＶプロモーター、及びマウスV_H鎖に由来するシグナルペプチドをコードするＤＮＡ挿入断片（図２１ｂにおいて示されるｐＤ２のＮｏｔ１部位と、Ｎｃｏ１部位との間に相当する）を、プライマー２５９５（ＧＡＧＧＧＣＴＣＴＧＧＣＡＧＣＴＡＧＣ）（配列識別番号：８４）及びプライマー２５９７（ＴＣＧＡＧＡＣＴＧＴＧＡＣＧＡＧＧＣＴＧ）（配列識別番号：８５）を使用して、プラスミドｐＤ２からＰＣＲで増幅した。ＰＣＲ反応は、それぞれのプライマーを０．２５μＭで含む製造者の緩衝液中で、ＫＯＤホットスタートポリメラーゼ（Ｎｏｖａｇｅｎ　カタログ番号７１０８６－４）を使用して実施した。５０ｕｌの反応において、１０ｎｇのｐＤ２プラスミドＤＮＡを鋳型として使用した。９８℃で１０秒、５５℃で２５秒、７２℃で４０秒のサイクルを２５回実施した。これによって、１．８ｋＢの増幅産物が得られ、これをＮｃｏ１及びＮｏｔ１で消化し、ゲルで精製した（図２０ａ、図２１ｂではC_L－ｐＡ－ＣＭＶ－ＳｉｇＰ挿入断片として示される）。

【０２３７】

実施例６に記載したように、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡ断片を生成させた。当該ＤＮＡ断片は、β－ガラクトシダーゼ及びＣＤ２２９に対する、抗体ファージディスプレイでの選択の１ラウンド目及び２ラウンド目のアウトプットに相当するものである。図２０ｂは、β－ガラクトシダーゼ及びＣＤ２２９に対して選択したｓｃＦｖ集団を１％のアガロースゲルでの電気泳動によって分離したものを示す。

【０２３８】

ＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化したｓｃＦｖ挿入断片（１μｇ）と、ＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化したC_L－ｐＡ－ＣＭＶ－ＳｉｇＰ挿入断片（１μｇ）と、を総容積が４０μｌの製造者の緩衝液中で、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ（１．５μｌ、Ｒｏｃｈｅ、１０－４８１－２２０－００１）と共にインキュベートすることによって、ｓｃＦｖ挿入断片と、C_L－ｐＡ－ＣＭＶ－ＳｉｇＰ挿入断片とのライゲーションを実施し、図２１ｃに示される「小環」を形成させた。１６℃で１６時間、ライゲーション物をインキュベートし、スピンカラムによって精製してから、ＮｈｅＩ及びＸｈｏＩで消化して得られた２．６ｋｂの産物（図２１ｄに示される）を、１％のアガロースゲルでの電気泳動によって分離精製した（図２０ｃ）。

【０２３９】

V_L－C_L－ｐＡ－ＣＭＶ－ＳｉｇＰ－V_H（０．５μｇ）をコードする、図２１ｄに示されるＤＮＡ挿入断片と、ＮｈｅＩ／ＸｈｏＩで消化し、ゲルで精製したベクターｐＤ

２（０．７μｇ）（図２１ｅ）と、を総容積が４０μｌである製造者の緩衝液中で、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ（１．５μｌ、Ｒｏｃｈｅ、１０－４８１－２２０－００１）を使用して連結し、図２１ｆに示される標的化ベクターを生成させた。これは、ＩｇＧとして編成された抗体集団をコードしており、β－ガラクトシダーゼまたはＣＤ２２９に対する抗体ファージディスプレイでの選択の１ラウンド目または２ラウンド目を起源とするものである。１６℃で１６時間、ライゲーション物をインキュベートし、スピンカラムで精製してからＨＰＬＣグレードの水で溶出した。

【０２４０】

エレクトロコンピテントなＮＥＢ５ａｌｐｈａ細胞（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｃ２９８９）へと連結ＤＮＡを形質転換し、それぞれの集団で、サイズが１～４ｘ１０^{5}個クローンであるライブラリーを生成させた。ＤＮＡを調製し、１０^{6}個の細胞当たりドナーＤＮＡ（ｐＤ６ライブラリー）を０．３μｇ使用して、上記のようにＦｒｅｅｓｔｙｌｅ培地において増殖した１００ｍｌのＨＥＫ２９３細胞へと同時導入した。それぞれ０．５μｇの「ＡＡＶＳ－ＳＢＩ」ＴＡＬＥＮ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１ Ｌ１ ＴＡＬＥ－Ｎ及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ１ Ｒ１ ＴＡＬＥ、カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１ Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を細胞に同時導入した。

【０２４１】

遺伝子導入の２４時間後に、バルク培養容積を２倍にし、２４時間後に、ブラストサイジン（１０μ／ｍｌ）を添加した。３～４日ごとに培地を新しくし、６日後にブラストサイジン濃度を２０μｇ／ｍｌまで増加させた。

【０２４２】

ライブラリーサイズを決定するために、遺伝子導入の２４時間後に、１０ｃｍのペトリ皿（組織培養処理済）に２５０，０００個の細胞を播種し、１０％のウシ胎仔血清（１０２７０－１０６、Ｇｉｂｃｏ）及び１％のＭｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｍｅｄｉｕｍ ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ（ＭＥＭ＿ＮＥＡＡ 番号１１１４０－０３５ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において増殖させた。さらに２４時間後に、１０μｇ／ｍｌのブラストサイジンを添加し、培地を２日おきに交換した。８日後に、２％のメチレンブルー（５０％のメタノール中）でプレートを染色した。表３に結果を示す。これは、３つ集団で、５ｘ１０^{5}～９ｘ１０^{5}個のクローン（遺伝子導入細胞の０．５％～０．９％に相当する）のライブラリーが得られたことを示すものである。

【表３】

表3．ＩｇＧとして編成された哺乳類ディスプレイライブラリーのサイズの決定

試料	コロニー数/0.25 x 10^{6}個細胞	コロニー数/10^{6} 個細胞	ライブラリーサイズ(x10^{5})
β－ガラクトシダーゼ Rd1	1337	5348	5.3
β－ガラクトシダーゼ Rd2	1972	7888	7.9
CD229 Rd2	2175	8700	8.7

【０２４３】

β－ガラクトシダーゼでの１ラウンドまたは２ラウンドの選択に由来するアウトプットを遺伝子導入した細胞のバルク集団を、前述のように、ブラストサイジン含有培地中で選択した。１９日後に、実施例６に記載されるように、１０～２０ｘ１０^{6}個の細胞を標識し、流動選別を実施した。選別細胞を１７日間増殖させ、フローサイトメトリーで再分析した（図１０）。これによって、今や大部分の細胞が、ＩｇＧ発現及びβ－ガラクトシダ

ーゼに対する結合に対して、二重陽性であることを示された。

【０２４４】

選別細胞からゲノムＤＮＡを調製し、ＰＣＲによって、ＩｇＧ挿入断片をコードするＤＮＡを単離した。ＫＯＤポリメラーゼ（Ｍｅｒｃｋ、カタログ番号７１０８６－３）を使用して、アニーリング温度を６０℃にし、３０サイクル実施して、ＩｇＧをコードする挿入断片を増幅した。５％のＤＭＳＯを含む、製造者提供の緩衝液を、０．３μＭのプライマー２５９７（配列識別番号：５４）及びプライマー２５９８（配列識別番号：４７）と共に使用した。所望のサイズの増幅産物をゲルで精製した。その後、ネステッドＰＣＲに、ゲルで精製した増幅産物を使用した。当該ネステッドＰＣＲは、ＫＯＤポリメラーゼ（Ｍｅｒｃｋ、カタログ番号７１０８６－３）を使用し、５％のＤＭＳＯを含む、製造者の緩衝液中で、０．３μＭのプライマー２６２５（配列識別番号：５５）と、プライマー１９９９（配列識別番号：５６）（Ｒ１試料向け）またはプライマー２５９５（配列識別番号：５３）（４Ｒ１及び５Ｒ１向け）のいずれかと、を組み合わせて使用し、アニーリング温度を６０℃、サイクル数を３０として実施した。こうしたネステッドＰＣＲによる増幅産物をゲルで精製し、ＮｈｅＩ－ＨＦ（ＮＥＢ、カタログ番号Ｒ３１３１Ｓ）及びＸｈｏＩ（ＮＥＢ、カタログ番号Ｒ０１４６Ｓ）での二重消化に供した。この処理は、可溶性ＩｇＧとして編成された結合体の発現に向けて、当該増幅産物と、同様に二重消化されたｐｌＮＴ３（図１）と、を連結するためのものである。プライマー配列は下記のとおりである。

２５９７：ＡＧＧＧＧＴＴＴＡＴＧＣＧＡＴＧＧＡＧＴＴ（配列識別番号：８５）

２５９８：ＧＴＴＡＣＡＧＧＴＧＴＡＧＧＴＣＴＧＧＧＴＧ（配列識別番号：７８）

２６２５：ＣＣＴＴＧＧＴＧＣＴＧＧＣＡＣＴＣＧＡ（配列識別番号：８６）

１９９９：ＡＡＡＡＡＧＣＡＧＧＣＴＡＣＣＡＴＧＡＧＧＧＣＣＴＧＧＡＴＣＴＴＣＴＴＴＣＴＣＣ（配列識別番号：８７）

２５９５：ＧＡＧＧＧＣＴＣＴＧＧＣＡＧＣＴＡＧＣ（配列識別番号：８４）

【０２４５】

実施例８．ナイーブｓｃＦｖライブラリーからの構築及び選択

Ｓｃｈｏｆｉｅｌｄら［７］は、ファージディスプレイライブラリー（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙライブラリー」）の構築について説明しており、その中で、数多くのヒトドナーのＢリンパ球由来の抗体遺伝子を「中間ライブラリー（ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａｔｅ ｌｉｂｒａｒｙ）」へと最初にクローン化してから、最終的な機能性ファージディスプレイライブラリーへと再クローン化した。これと同一の中間ライブラリー及び同一の方法論を使用して、４ｘ１０^{10}個のクローンの新しいライブラリー（ＩＯＮＴＡＳライブラリー）を生成された。細菌播種内ライブラリーを確実に十分再現するように注意しながら、このライブラリーからプラスミドＤＮＡを調製した。総量が２ｕｇのＤＮＡ鋳型を使用し、数多くのＰＣＲ反応を組成した。Ｎｃｏ１及びＮｏｔ１で、ＰＣＲ産物を消化し、ゲルで精製してから実施例６に記載されているように連結した。９．３ｕｇのｐＤ６及び０．９３ｕｇのＰＣＲ挿入断片を一晩連結させ、フェノールクロロホルム抽出を使用してライゲーション反応液を精製し、以前に説明したようにＤＨ５アルファ細胞へとＤＮＡを電気穿孔で導入した［７］。結果的に、ｓｃＦｖ－Ｆｃディスプレイベクター内における、２．４ｘ１０^{8}個のクローンのライブラリーが創出された。この「ナイーブライブラリー」からＤＮＡを調製し、ｐＤ６へとクローン化してから、（上記のとおり）Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ培地において増殖した１リットルのＨＥＫ２９３Ｆ細胞（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）へと遺伝子導入した。０．３ｕｇのｐＤ６ライブラリーＤＮＡ、それぞれ０．５ｕｇの「ＡＡＶＳ－ＳＢＩ」ＴＡＬＥＮペアを使用した。遺伝子導入の２４時間後に、培養容積を２倍にし、遺伝子導入の４８時間後に、上記のようにブラストサイジンでの選択を開始した。形質転換から２４時間後の培養液を一定分量播種し、上記のようにブラストサイジンで選択することによって、ライブラリーサイズを決定した。０．９ｘ１０^{7}個のクローンのライブラリーが創出された。

【０２４６】

製造者の説明書に従って、ＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－ＬＣ－Ｂｉｏｔｉｎキット（Ｐｉｅｒｃｅ　カタログ番号２１３２７）を使用し、数多くの抗原をビオチン化した。使用した抗原は、ウシサイログロブリン（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ　カタログ番号６０９３１０）、ヒトＣＤ２８－Ｆｃキメラ（Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号３４２－ＣＤ－２００）、及びマウスＥｐｈＢ４－Ｆｃキメラ（Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号４４６－Ｂ４－２００）。ビオチン化β－ガラクトシダーゼ（Ｒｏｃｋｌａｎｄ　カタログ番号Ｂ０００－１７）も使用した。

【０２４７】

液体培養において、１７時間、上記のとおりブラストサイジン中で遺伝子導入細胞を選択した。細胞を回収、洗浄してから、試料当たりの細胞が１５～２０ｘ１０^{6}個となるように調整した。記載のように細胞を調製し、濃度が５００ｎＭとなるようにビオチン化抗原を添加した。標識化及び流動選別は、上記のとおり実施した。フィコエリトリンで標識された抗Ｆｃ抗体のみとインキュベートした対照細胞を使用して、「ゲート（ｇａｔｅ）」を創出したところ、こうした細胞の０．０５％が含まれた。標識細胞に同一ゲートを使用したところ、０．２８～０．５１％の細胞が含まれた（図１１）。こうした細胞を回収し、増殖させることで、ナイーブライブラリーに由来するｓｃＦｖ遺伝子の選別及び増幅のラウンドをさらに実施することが可能となった。

【０２４８】

実施例９．ゲノム組込みのための、ヌクレアーゼ指向型手法と、リコンビナーゼ指向型手法と、を比較するための、マルチプル「ランディング部位」を有する細胞株の創出

ゲノム切断またはリコンビナーゼ媒介性組込みのいずれかに基づく組込み方法の比較を可能にするために、マルチプル「ランディング部位」（実施例３）を有するイントロン導入するＡＡＶＳ指向型標的化ベクター（ｐＤ４）を構築した。こうした部位は、Ｆｌｐリコンビナーゼによって認識されるＦＲＴ部位と、Ｃｒｅリコンビナーゼによって認識されるｌｏｘ２２７２／ｌｏｘＰ部位のペアと、を含む。さらに、標的切断を可能にするために、ｐＤ４は、ＴＡＬＥＮペアが設計された、ＧＦＰに由来する配列［１２８］と、エンドヌクレアーゼ指向型組込みを可能にするＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位と、を含んでいる。ヌクレアーゼ指向型組込みまたはリコンビナーゼ指向型組込みが、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の活性化と、抗体発現カセットの組込みと、を引き起こすように、適切な認識部位を有する互換性の新規ドナープラスミドを構築した（ｐＤ５）。

【０２４９】

ｐＤ４のプラスミド構成及び配列構成を図１２ｂに示す。中間体プラスミドｐＤ３を最初に創出し、当該プラスミドは、ＣＭＶプロモーター制御下のＧＦＰ遺伝子と、これに続くＰＧＫプロモーター制御下のピューロマイシン／チミジンキナーゼ遺伝子融合体と、を包含するものである（図１２ａ）。これは、Ｓａｃ１（ＣＭＶプロモーターの末端が対象）と、ＢｓｔＢ１（Ｎｅｏ遺伝子とポリＡ部位との間が対象、図１ａ）と、でｐＢＩＯＣＡＭ１－ｎｅｗＮｏｔを消化することによって創出した。これによって、ネオマイシン発現カセットを除去して、ＣＭＶプロモーターの制御下に増進緑色蛍光タンパク質（ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｇｒｅｅｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＥＧＦＰ）遺伝子を包含する合成挿入断片で置き換えることが可能となる。変異したマウスオルニチン脱炭酸酵素ＰＥＳＴ配列の残基４２２～４６１へと、このＧＦＰ構築物をＣ末端で融合させた。このＰＥＳＴ配列は、プラスミドｐＺｓＧｒｅｅｎ１－ＤＲ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に組込まれ、融合ＧＦＰの半減期を１時間にまで減少させることが示されている。ＰＧＫプロモーター、ピューロマイシン／チミジンキナーゼ遺伝子融合体（Ｐｕｒｏ　ｄｅｌｔａ　ＴＫ）、及びポリＡカセットをコードするカセットを、Ｘｍｎ１及びＦｓｅ１を使用して、プラスミドｐＦＬＥＸＩＢＬＥ［１２９］から切り出し、元の合成挿入断片に存在するＳｍａ１部位及びＦｓｅ１部位へとクローン化した。得られたプラスミド（ｐＤ３と呼ばれる）は、ＣＭＶが推進するＧＦＰ遺伝子と、ＰＧＫプロモーターが推進するピューロマイシン耐性遺伝子と、をコードする。

【０２５０】
最終的な標的化ベクターｐＤ４を創出するために、ＣＭＶプロモーターを除去し、ＡＡＶＳホモロジーアームを挿入した。ＡＡＶＳ遺伝子座の８５０ｂｐの区間をＰＣＲで増幅し、５’末端にＥｃｏＲ１と、３’末端にＭｒｅ１と、が隣接するＡＡＶＳ左ホモロジーアームを創出した。これをｐＤ３のＥｃｏＲ１／Ｍｒｅ１部位へとクローン化し、それによってＣＭＶプロモーターを除去した。このＡＡＶＳ左ホモロジーアームの３’末端に、Ｎｓｉ１部位も組込んだ。隣接するＭｒｅ１部位及びＮｓｉ１部位を使用して、合成断片を導入して、図１３に示すように、イントロンをＥＧＦＰ遺伝子に融合させた。ＥＧＦＰ遺伝子に先行する合成イントロンには下記が組込まれている。
Ｆｌｐリコンビナーゼに向けたＦＲＴ認識部位
ｌｏｘ２２７２組換え部位
Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位
ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ認識部位
Ｔ２Ａリボソーム停止（ｓｔａｌｌｉｎｇ）配列［１３０］
【０２５１】
ＰＣＲによって、ＡＡＶＳ左ホモロジーアームを生成させ、５’末端及び３’末端にＨｐａ１部位及びＢｓｔＺ１７１部位を創出した。ｐＤ３のＨｐａ１部位及びＢｓｔＺ１７１部位へと、この断片をクローン化した。得られたプラスミドｐＤ４は、ピューロマイシン耐性カセット（「Ｐｕｒｏ　ｄｅｌｔａＴＫ」）をコードしていると共に、ＡＡＶＳ遺伝子座への、「ランディング部位」の導入に使用することができ、これによって、比較に向けて、様々なヌクレーゼ部位及びリコンビナーゼ部位が組込まれる。ｐＤ４の配列を図１３に示す（配列識別番号：５、配列識別番号：６、及び配列識別番号：７）。ＡＡＶＳの左及び右を標的とするアームは、図３に詳細に示されており、したがって、図１３では、省略されている。
【０２５２】
ｐＤ４へと導入されたイントロンは、ＧＦＰを起源とするＴＡＬＥＮ認識部位を含むものである［１２８］。ｅＧＦＰ指向型ＴＡＬＥＮペア（ｅＧＦＰ－ＴＡＬＥＮ－１８－左、及びｅＧＦＰ－ＴＡＬＥＮ－１８－右）は、下記の配列（配列及びプライマーはすべて、５’から３’の方向で示されている）を認識し、ここで、大文字は、ＴＡＬＥＮによる左右の認識部位を示し、小文字は、スペーサー配列を示す。右側ＴＡＬＥＮは、示される配列の相補鎖を認識する。ＧＦＰの開始ＡＴＧ配列（スペーサー中に下線で示されている）に対して、最初の塩基対は、マイナス１６の配列位置に相当する。
ＴＣＣＡＣＣＧＧＴＣＧＣＣＡｃｃ［ａｔｇ］ｇｔｇａｇｃａａｇｇｇＣＧＡＧＧＡＧＣＴＧＴＴＣＡ（配列識別番号：８８）
【０２５３】
プラスミドｐＤ４には、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位及びＦｌｐリコンビナーゼによって認識されるＦＲＴ部位も組込まれている。最終的に、ｐＤ４には、ＧＦＰ及びピューロマイシンの発現カセットと隣接するｌｏｘ２２７２及びｌｏｘＰ（これらは相互に互換性）が組込まれている。これら２つの同一ｌｏｘＰ部位を隣接させて組込むことで、ドナープラスミド（下記のｐＤ５）の組込みカセット（ＰＧＫ　ピューロマイシンデルタＴＫカセットを含む）を置き換える機会が得られ、これによって、当該カセットが、リコンビナーゼ媒介性のカセット交換を介して、ブラストサイジン及び抗体の発現を推進する新規のカセットに交換される。
【０２５４】
ｐＤ４の遺伝子導入による細胞株の創出
10^6個細胞／ｍｌでＨＥＫ２９３Ｆ細胞を再懸濁し、ＤＮＡ：ポリエチレンイミン（ＰｏｌｙＰｌｕｓ）を１：２（ｗ／ｗ）の比率で添加した。０．６μｇ／ｍｌのｐＤ４を細胞に遺伝子導入し、「オリジナルＡＡＶＳ」ＴＡＬＥＮペアまたは対照としてのｐｃＤＮＡ３．０（０．６μｇ／ｍｌ）のいずれかを同時導入した。ＣＭＶプロモーターからＥＧＦＰを発現するｐＤ３を、遺伝子導入対照として実験に含め、遺伝子導入効率は、３５

％であった。２４時間に、０．５ｘ１０^{6}個細胞／１０ｃｍペトリ皿（組織培養処理済）で、遺伝子導入細胞を播種し、１０％のウシ胎仔血清（１０２７０－１０６、Ｇｉｂｃｏ）及び１％のＭｉｎｉｍａｌ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｍｅｄｉｕｍ　ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ（ＭＥＭ＿ＮＥＡＡ　番号１１１４０－０３５　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において増殖させた。さらに２４時間後に、５μｇ／ｍｌのピューロマイシンを添加し、培地を２日おきに交換した。非遺伝子導入細胞またはｐＤ３のみが遺伝子導入した細胞は、５日後に死滅した。１２日後に、ｐＤ４のみを遺伝子導入した細胞で形成されたコロニー数は、約２００であり、ｐＤ４及びＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮペアを遺伝子導入した細胞は形成されたコロニー数は、約４００であった。

【０２５５】

ｐＤ４及びＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮペアの遺伝子導入から生じたピューロマイシン耐性集団に正しい組込みが起きたかを分析した。さらに、この集団（クローン６Ｆ）から単一コロニーを選定し、ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮペアの非存在下で実施したｐＤ４の遺伝子導入から生じたピューロマイシン耐性集団に由来するコロニーと比較した。正しい組込みを同定するために、左右のホモロジーアームを超えてＡＡＶＳゲノム遺伝子座においてハイブリッド形成するＰＣＲプライマーを設計した。こうしたプライマーは、挿入断片に特異的なプライマーとペアにした。プライマーは、５’末端表記で、下記のとおりである。

ＡＡＶＳ１＿ＨＡ－Ｌ＿Ｎｅｓｔｅｄ＿Ｆｏｒｗ１　ＧＴＧＣＣＣＴＴＧＣＴＧＴＧＣＣＧＣＣＧＧＡＡＣＴＣＴＧＣＣＣＴＣ（配列識別番号：８９）

ＥＧＦＰ＿Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ＿ｇｅｎｅ＿Ｒｅｖ＿Ａｓｓｅｍｂｌｙ　ＴＴＣＡＣＧＴＣＧＣＣＧＴＣＣＡＧＣＴＣＧＡＣ（配列識別番号：９０）

Ｐｕｒｏｔｋ＿ｓｅｑ＿ｆｏｗ２　ＴＣＣＡＴＡＣＣＧＡＣＧＡＴＣＴＧＣＧＡＣ（配列識別番号：９１）

ＡＡＶＳ１＿Ｒｉｇｈｔ＿ａｒｍ＿Ｊｕｎｃｔｉｏｎ＿ＰＣＲ＿Ｒｅｖ　ＴＣＣＴＧＧＧＡＴＡＣＣＣＣＧＡＡＧＡＧ（配列識別番号：７７）

【０２５６】

図１４は、クローン６Ｆ及び当該集団は、左右の末端の両方で正しいが、非ＡＡＶＳ指向型の集団から選定したクローンでは、正しくないことを示している。したがって、ＰＣＲ分析は、ゲノムＤＮＡの切断が、ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮによって指示されると、ドナーカセット組込みの正確性が向上することを示している。

【０２５７】

ｐＤ４は、プロモーター無しのインフレームＧＦＰ遺伝子を導入するものであり、当該インフレームＧＦＰ遺伝子は、ＡＡＶＳプロモーターに由来して推進される。ピューロマイシン耐性集団のフローサイトメトリーによって、ＧＦＰの発現が存在しないことが示された。半減期の短さ（マウスのオルニチン脱炭酸酵素ＰＥＳＴ配列要素由来）と、Ｔ２Ａプロモーターを使用することで生じた発現の減少と、が組み合わされたことに起因して、この発現欠如が起きた可能性がある。実際、プロモーターが存在しないブラストサイジン要素（ｐＤ２向けに記載したとおり）の前にＴ２Ａ要素を追加することで、ブラストサイジン耐性コロニーの数は４倍減少することが明らかとなった。ＧＦＰ発現は存在しないものの、マルチプルランディング部位の組込みは、リコンビナーゼ指向型のゲノム組込みと、ＤＮＡ切断指向型のゲノム組込みと、の比較に向けた機会を依然として与えるものである。

【０２５８】

実施例１０．「マルチプルランディング」部位への抗体カセットの挿入に向けたベクター（ｐＤ５）の構築

ＡＡＶＳ遺伝子座への「マルチプルランディング部位」イントロンの導入に続いて、ヌクレアーゼ指向型の手段またはリコンビナーゼ指向型の手段を介した、抗体カセットの導入が可能である。これを実施するために、ドナープラスミドｐＤ５を創出し、ここで、発現カセットは、左右のホモロジーアームと隣接しており、当該左右のホモロジーアームは、ｐＤ４へと導入されたＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ切断部位と隣接する配列と等しいものである

。ｐＤ５自体には、無処理のＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ認識部位は組込まれておらず、組込みは、相同組換えによって推進される。ドナープラスミドの相同性指向型組込みは、ブラストサイジン遺伝子の導入を引き起こすことになり、当該ブラストサイジン遺伝子は、プロモーターを欠いているが、前述にように、ＡＡＶＳ遺伝子座に由来する上流エクソンとのインフレーム融合を創出するスプライスアクセプター部位が先行するものである。ＡＡＶＳ遺伝子座への組込みが生じれば、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の発現を引き起こすことになる。挿入カセットは、上記のように、ｐＥＦプロモーター及びＣＭＶプロモーターの制御下に、それぞれＩｇＧ編成抗体重鎖及びＩｇＧ編成抗体軽鎖もコードするものである。ｐＤ５には、新規ドナーの切断を引き起こすことができるＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位が組込まれており、これによって、ＮＨＥＪ向けの機会を提供するものである（実施例１２参照）。ドナープラスミドｐＤ５には、ＦＲＴ部位も組込まれており、これによって、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子と、抗体発現カセットと、の同一遺伝子座でのリコンビナーゼ指向型組込みが可能である。上で考察したように、Ｃｒｅリコンビナーゼが、ドナー及びゲノムＤＮＡにおけるｌｏｘＰ部位に作用し、リコンビナーゼ媒介性のカセット交換を指示することになる。

【０２５９】

ｐＤ５の配列を図１５に示す。ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ部位の５’末端の配列は、ＡＡＶＳ遺伝子座に由来するものである。ＴＡＬＥＮ切断部位の上流にある、ＡＡＶＳ遺伝子座の２６７ｂｐの区間は、ＰＣＲによって生成した。プライマーを使用して、ＥｃｏＲ１部位及びＭｆｅ１部位を５’末端及び３’末端に創出し、増幅産物をｐＤ１－Ｄ１．３のＥＣｏＲ１部位へとクローン化した。ＥｃｏＲ１部位は、５’末端に再創出されている。左ホモロジーアームのクローン化の間に、Ｎｓｉ１及びＰａｃ１も３’末端に挿入した。右ホモロジーアームには、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮの３’側配列と等しい約７００ｂｐが組込まれており、当該右ホモロジーアームは、ＰＣＲ構築によって創出した。ＰＣＲプライマーによって、構築断片の５’末端及び３’末端にＢｓｔＺ１７１部位を導入し、これをｐＤ１－Ｄ１．３のＢｓｔＺ１７１部位へとクローン化した。ＰＣＲプライマーによって、５’末端にＨｐａ１部位も導入した。

【０２６０】

イントロン（ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ、Ｉ－Ｓｃｅ１エンドヌクレアーゼ、Ｆｌｐリコンビナーゼ、及びＣｒｅリコンビナーゼに向けた認識部位が組込まれている）、スプライスアクセプター領域、ブラストサイジン遺伝子、ならびにポリＡ部位（上記のとおり）を包含するＰＣＲ断片を、５’末端にＮｓｉ１部位、及び３’末端にＰａｃ１部位を有する形で創出した。これを、上記のプラスミドのＮｓｉ１部位及びＰａｃ１部位へとクローン化し、ｐＤ５－Ｄ１．３を創出した（図１５に示される配列及び図１８ａに示されるプラスミド構造）。

【０２６１】

実施例１１　抗体発現カセットの、ヌクレアーゼ指向型組込みと、Ｆｌｐ指向型組込みとの比較

抗体発現カセットのリコンビナーゼ媒介性組込みに向けて、これまで使用されてきたＦｌｐ－Ｉｎシステム［１８］は、天然Ｆｌｐリコンビナーゼの３７℃での活性の僅か１０％しか有さない変異体Ｆｌｐリコンビナーゼ（プラスミドｐＯＧ４４中）を使用するものである［１９］。野生型と比較して、熱安定性及び３７℃での活性が上昇したＦｌｐリコンビナーゼの変異体（Ｆｌｐｅ）が同定された［１９、２０］。これは、コドン最適化によってさらに改善され、プラスミドｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ（Ｇｅｎｅｂｒｉｄｇｅｓカタログ番号Ａ２０３）内コードされたＦｌｐｏ［１３１］が創出された。Ｆｌｐリコンビナーゼ（ｐＯＧ４４及びｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ内にコードされる）の両変異体の作用が比較された。Ｃｒｅリコンビナーゼによって指示される組換えについても、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードするプラスミド（ｐＣＡＧＧＳ－Ｃｒｅ、Ｇｅｎｅｂｒｉｄｇｅｓカタログ番号Ａ２０４）を細胞に同時導入することによって調べられた［１３２］。それぞれのベクターにおいて、リコンビナーゼは、ニワトリ－β－アクチンプロモーター及び

ＣＭＶ最初期エンハンサーの制御下で発現される。ＳＶ４０ラージＴ核局在配列（Ｌａｒｇｅ Ｔ ｎｕｃｌｅａｒ ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ）が、核の局在に向けて使用されている［２０］。元のベクター（ｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ及びｐＣＡＧＧＳ－Ｃｒｅ）においては、リコンビナーゼの発現は、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）によって、ピューロマイシン耐性遺伝子に結び付けられているが、当該耐性遺伝子は、標準的な分子生物学的手法を使用して除去した。

【０２６２】

抗体カセットの、ゲノム切断指向型組込みと、リコンビナーゼ指向型組込みと、の効率を比較するために実験を実施した。結果は、下記の２つの方法で評価した。

１．プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の組込みから生じたブラストサイジン耐性コロニー数の測定。

２．異なる手法によって達成される抗体発現の程度の評価。

【０２６３】

実施例９に記載したように、Ｃｒｅリコンビナーゼの認識部位（ｌｏｘ２２７２及びｌｏｘＰ）及びＦｌｐリコンビナーゼの認識部位（ＦＲＴ）をクローン６Ｆ内のＡＡＶＳ遺伝子座へと予め組込んだ。さらに、ＧＦＰ ＴＡＬＥＮペアの認識部位及びメガヌクレアーゼ Ｉ－Ｓｃｅ１の認識部位も同一イントロン内に存在する。ドナープラスミドｐＤ５－Ｄ１．３は、プロモーターが存在しないブラストサイジン遺伝子の上流に存在するイントロン内に同一認識部位（ＧＦＰ ＴＡＬＥＮ以外）を保有する。正しい組込みが生じれば、ブラストサイジン遺伝子の活性化を引き起こすことになる。ｐＤ５－Ｄ１．３は、ＩｇＧ編成されたＤ１．３抗体遺伝子もコードしており、当該遺伝子は、細胞表面に発現することになるものである。

【０２６４】

ｐＤ５－Ｄ１．３と、ｐＯＧ４４またはｐＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ（Ｆｌｐリコンビナーゼの２つの変異体をコードする）と、を同時導入すれば、ｐＤ５プラスミド全体が、クローン６ＦのＦＲＴ部位へと組込まれるはずである。さらに、ドナープラスミドｐＤ５－Ｄ１．３は、ブラストサイジン遺伝子の上流に位置する合成イントロン内のｌｏｘ２２７２部位と、抗体発現カセットの末端のｌｏｘＰ部位と、を有する。ｐＣＡＧＧＳ－Ｃｒｅから発現されるＣｒｅリコンビナーゼの作用下では、リコンビナーゼ媒介性カセット交換は、クローン６Ｆ内のｌｏｘ２７２２部位及びｌｏｘＰ部位への、ブラストサイジン及び抗体発現カセットの組込みをもたらすはずである。

【０２６５】

リコンビナーゼ指向型の手法と、ゲノム切断指向型の手法と、を使用したベクター組込みの効率を、ＧＦＰに由来する配列（Ｒｅｙｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１２）を対象としたＴＡＬＥＮペア（ｅＧＦＰ－ＴＡＬＥＮ－１８－左、及びｅＧＦＰ－ＴＡＬＥＮ－１８－右）を使用して比較した。ＧＦＰ ＴＡＬＥＮの場合は、ＴＡＬＥＮによるゲノム切断に続いて、左右のホモロジーアームの間に存在する要素が組込まれることになる。

【０２６６】

Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼとの比較を可能にするために、Ｉ－Ｓｃｅ１をコードするコドン最適化遺伝子を構築した（図１６）。この遺伝子は、Ｎ末端に、Ｎ末端ＨＡエピトープタグ／ＳＶ核局在シグナル（ＮＬＳ）を有しており、５’末端及び３’末端でＮｃｏ１部位及びＸｂａ１部位と隣接している。ベクターｐＳＦ－ＣＭＶ－Ｆ１－Ｐａｃ１（Ｏｘｆｏｒｄ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ＯＧ１１１）に当該遺伝子をクローン化し、ここでは、ＣＭＶプロモーターが発現を推進する。

【０２６７】

「マルチプルランディング部位」が正しく組込まれたクローン６Ｆを使用して遺伝子導入を実施した。細胞を10^6個／ｍｌで懸濁してから、酵素をコードするプラスミドと併せて、10^6個の細胞当たり５０ｎｇのｐＤ５－Ｄ１．３ドナープラスミドを遺伝子導入した（表４Ａ）。

【０２６８】

２４時間後に、遺伝子導入細胞を０．５ｘ１０^{6}個細胞／１０ｃｍペトリ皿（組織培養処理済）で播種し、１０％のウシ胎仔血清（１０２７０－１０６、Ｇｉｂｃｏ）及び１％のＭｉｎｉｍａｌ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｍｅｄｉｕｍ　ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ（ＭＥＭ＿ＮＥＡＡ　番号１１１４０－０３５　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）において増殖させた。さらに２４時間後に、5ug／ｍｌのブラストサイジンを添加し、培地を２日おきに交換した。１２日後に、２％のメチレンブルー（５０％メタノール中）でプレートを染色し、コロニー数を数えた（表２）。Ｆｌｐリコンビナーゼ、Ｃｒｅリコンビナーゼ、及びＴＡＬＥＮの直接比較において、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮを使用することで最も多くの数のコロニーが得られ、「ドナーのみ」と比較して９倍上昇した（表４Ａ）。最適化されたＦｌｐｏ遺伝子を使用すると、「ドナーのみ」の対照と比較して、ブラストサイジン耐性コロニーの数がかえって減少するという結果であったことも明らかとなり、これは、おそらくＦｌｐリコンビナーゼの活性が増進したことからくる毒性によるものであると想定される。ｐＣＡＧＧＳ－Ｃｒｅを使用しても、ドナーのみの対照と比較してコロニー数は増加した。

【０２６９】

第２の実験を実施することで、増進Ｆｌｐ（ｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ由来）、ならびにＦｌｐ－Ｉｎシステム（Ｚｈｏｕらによって使用されたもの［１７、１８、ＵＳ７，８８４，０５４］に由来するｐＯＧ４４内にコードされる低活性Ｆｌｐ酵素、の両方と、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮを比較した。これらをＧＰＦ　ＴＡＬＥＮ及びＣｒｅリコンビナーゼと比較した（表４Ｂ）。細胞百万個当たりで示されるＤＮＡ量で、細胞に遺伝子導入した。０．２５ｘ１０^{6}個の細胞をプレートに播種し、上記のように、ブラストサイジン耐性コロニーの数を決定した。細胞は、液体培養においてもブラストサイジン耐性で３０日間選択してから、（上記のように）表面ＩｇＧを発現する細胞の割合を決定した。表４Ｂは、耐性コロニーの数に関して、ＴＡＬＥＮが他の手法に対して優位であったことを示す。ｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ内の最適化Ｆｌｐを使用することで、「ドナーのみ」の対照と比較して、ブラストサイジン耐性コロニーの数がかえって減少するということが再び引き起こされた。Ｃｒｅリコンビナーゼは、対照と比較して、ブラストサイジンコロニー数の増加を再度もたらした一方で、ｐＯＧ４４内のＦｌｐ遺伝子は、対照と比較して僅かな増加を示しただけであった。

【表４】

表4．ＴＡＬＥヌクレアーゼ指向型組込みの手法と、リコンビナーゼ指向型組込みの手法との比較

A.

酵素プラスミド	量	pD5-D1.3 ドナー (ng/10^6個細胞)	ブラストサイジン耐性コロニー数 (コロニー数/10^6個細胞)
GFP TALEN ペア	各 0.575(μg)	50	152(304)
pCAGGS-Flp。	1.15μg	50	1(2)
pCAGGS-Cre	1.15μg	50	57(114)
対照(pCDNA3.0)	1.15μg	50	17(34)

B.

試料 10^6個の細胞当たり各 2μg	pD5-D1.3 ドナーμg/10^6個細胞	ブラストサイジンコロニー数	10^6個の細胞当たりのブラストサイジンコロニー数(ブラストサイジン耐性割合)	ir フロー(flow)陽性割合
GFP TALEN ペア	0.6	270	1080 (1.1%)	95.6
cCAGGS-Flp。	0.6	35	140 (0.14%	細胞数過少
pOG44	0.6	96	384 (0.38%)	6.4
pCAGGS-Cre	0.6	180	720 (0.72%)	4
対照 (PCDNA3.0)	0.6	81	324 (0.32%)	37.3

C.

試料 10^6 個の細胞当たり各 2μg	pD5-D1.3 ドナーμg/10^6個細胞	ブラストサイジンコロニー数	ir フロー(ir flow)陽性割合
GFP TALEN	2	210	95.3
GFP TALEN	6	120	73.6
cCAGGS-Flp。	2	62	細胞数過少
cCAGGS-Flp。	6	41	細胞数過少
pOG44	2	178	35.6
pOG44	6	63	58.7
pCAGGS-Cre	2	84	40.9
pCAGGS-Cre	6	52	細胞数過少
対照(PCDNA3.0)	2	340	65.6
対照(PCDNA3.0)	6	82	55.5

【０２７０】

ドナーＤＮＡをさらに追加することで（表４Ｃ）、中間レベル（２μｇ／百万個細胞）では、コロニー数が増加し、高レベル（６μｇ／百万個細胞）では、全体的に減少した。ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ指向型組込みで見られた抗体ディスプレイのレベルを達成したものは、他の試料には無かった。

【０２７１】

細胞は、液体培養においてもブラストサイジンで選択して、上記のように、抗体発現で細胞を染色した。ＴＡＬＥＮ指向型組込みでは、他の手法と比較して、抗体陽性の割合が顕著に上昇した。ｃＣＡＧＧＳ－Ｆｌｐｏ及び高濃度のｐＣＡＧＧＳ－Ｃｒｅを遺伝子導入した細胞は、健全ではなく、フローサイトメトリーを実施するには、数が不十分であった。

【０２７２】

Ｉ－Ｓｃｅエンドヌクレアーゼを含めて、比較を広げた。Ｉ－Ｓｃｅ１をコードする合成遺伝子を合成し（図１６）、ｐＳＦ－ＣＭＶ－ｆ１－Ｐａｃ１（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ）のＮｃｏ１／Ｘｂａ１部位へとクローン化した。10^6個／ｍｌで細胞を懸濁し、酵素をコードするプラスミド（１μｇ／10^6個細胞）と併せて、３００ｎｇのｐＤ５－Ｄ１．３ドナープラスミドを細胞各ｍｌ（10^6個細胞／ｍｌ）に遺伝子導入した。翌日、０．０５ｍｌの細胞を播種し、ブラストサイジン中で選択して、記載したように、１４日後に染色した。表５は、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレーゼから、最大数のブラストサイジン耐性コロニーが得られ、その次にｅＧＦＰ　ＴＡＬＥＮペアであったことを示す。Ｃｒｅリコンビナーゼ及びＦｌｐリコンビナーゼ（ｐＯＧ４４内にコードされる）の両方で、「ドナーのみ」の対照と比較して、僅かに高い数が得られた。前述同様に、Ｆｌｐｅをコードするプラスミドの遺伝子導入は、「ドナーのみ」と比較して、かえってコロニー数が減少した。

【表５】
表5．メガヌクレーゼ指向型組込みの手法と、リコンビナーゼ指向型組込みの手法との比較

試料 10^6個の細胞当たり各2μg	pD5-D1.3ドナーμg/10^6個細胞	ブラストサイジンコロニー	10^6個の細胞当たりのブラストサイジンコロニー数(ブラストサイジン耐性割合)	フローd7における陽性割合	フローd13における陽性割合
GFP TALENペア	0.6	90	1800	27.6	55%
I-Sce1 メガヌクレアーゼ		150	3000	29.9	47%
pOG44	0.6	60	1200	2.79	6.5%
pCAGGS-Cre	0.6	56	1120	2.95	6.6%
cCAGGS-Flp。	0.6	4	80	5.9（細胞数低）	細胞数過少
対照(PCDNA3.0)		40	800	3.3	4.9%
(WT HEK へSBI AAVS		251(x2)	10040(1%)	ND	ND

【０２７３】
遺伝子導入後、液体培養においてブラストサイジン耐性で細胞の大部分を選択し、７日後及び１３日後に、上記のように、抗Ｆｃフィコエリトリン標識抗体で染色した。図１７（表５にまとめられている）は、「ドナーのみ」（４．９％）と比較して、Ｉ－Ｓｃｅ１エンドヌクレアーゼ及びｅＧＦＰ　ＴＡＬＥＮを遺伝子導入した細胞で、抗体発現の顕著な上昇（それぞれ４７％及び５５％）が達成されたことを示す。対照的に、Ｆｌｐリコンビナーゼ（ｐＯＧ４４）またはＣｒｅリコンビナーゼをコードするプラスミドを細胞に同時導入すると、抗体陽性細胞の割合は、それぞれ６．６％及び６．５％であった。抗体陽性細胞の割合は、ブラストサイジン中での選択継続に伴って増加し続け、Ｉ－Ｓｃｅ１及びＥＧＦＰ　ＴＡＬＥＮを遺伝子導入した試料を１９日目にアッセイした場合、８５～９０％の割合で抗体陽性が達成される。したがって、メガヌクレアーゼは、抗体をコードする導入遺伝子のヌクレアーゼ指向型組込みを引き起こすための代替手法を提供するものである。

【０２７４】
実施例１２．相同組換え及びＮＨＥＪの両方によって、抗体カセットのヌクレアーゼ指向型組込みを生じさせることができる

細胞ＤＮＡへの導入遺伝子の組込み効率は、二本鎖切断（ＤＳＢ）の導入によって増進することができる。真核細胞における内在性のＤＮＡ修復機構には、相同組換え、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）、及びこうしたものの変種が含まれる。すべてが、ライブラリー内

で結合体をコードする遺伝子を導入する手段を提供するものである。相同組換えは、相同領域と、挿入される導入遺伝子との正確な結合を提供するが、ドナープラスミドにおいて相同領域を用意する必要がある。相同組換えに向けたＤＮＡは、直鎖状または環状のＤＮＡとして提供することができる。ＮＨＥＪでは、ＤＮＡの末端が、相同性の鋳型を必要とせずに直接的に再連結される。ＤＮＡ修復に対するこの手法は、正確性が低く、挿入または欠失を引き起こし得る。それにもかかわらず、ＮＨＥＪは、インフレームエクソンをイントロンへと組込むための簡便な手段を提供し、プロモーター：遺伝子カセットをゲノムへと組込むことを可能にするものである。非相同性の方法を使用することで、ホモロジーアームを欠いたドナーベクターを使用することが可能になり、それによって、ドナーＤＮＡの構築が単純化される。

【０２７５】

クローン６Ｆは、ゲノムに組込まれたＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ認識部位及びＩ－Ｓｃｅ１ヌクレーゼ認識部位を有しており、こうしたヌクレアーゼが提供されると、こうした部位が、切断されることになる。ドナーベクターｐＤ５は、ＧＦＰ　ＴＡＬＥヌクレアーゼ認識部位を有さないが、切断部位と隣接するホモロジーアームは有しているため、相同組換えのみによる組込みが予想される。隣接するＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼでのゲノムＤＮＡの切断もｐＤ５要素の相同組換えによる組込みを引き起こすことになる。しかしながら、ｐＤ５は、Ｉ－Ｓｃｅ１が提供されると、試験管内で切断され得るＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼ部位も有している。これによって、ＮＨＥＪによって組込まれる可能性のある直鎖状ＤＮＡ産物が創出されることになる。前述のとおり、ＮＨＥＪを使用するドナーＤＮＡの生体内での切断を使用することで、効率優位性さえ存在し得る。

【０２７６】

図１８ａは、新規ｐＤ５－Ｄ１．３ドナーＤＮＡを示し、図１８ｂは、「マルチプルランディング」部位が組込まれたクローン６Ｆ細胞のゲノム遺伝子座を示す。図１８ｃは、ｐＤ５－Ｄ１．３（図１８ａ）と、クローン６Ｆのマルチプルランディング部位（図１８ｂ）と、の相同組換えの結果を示す。対照的に、図１８ｄは、ＮＨＥＪの結果を示す。この場合、新規プラスミドの骨格に由来する余分なＤＮＡが組込まれている（両矢印で示される）。「マルチプルランディング」部位でのＦｌｐ媒介性組換えは、類似産物をもたらすことになる。実施例１１に記載の試料（図１７に示される）で使用されている経路がどちらであるかを決定するために、前述のように、ブラストサイジンで選択した集団からゲノムＤＮＡを調製した。組込みＰＧＫプロモーターとハイブリッド形成するリバースＰＣＲプライマー（Ｊ４４）を設計した。このプライマーを、ＩｇＧタンパク質の末端でハイブリッド形成する、もう一方のＪ４８と併せて使用した。プライマーＪ４４及びプライマーＪ４８は、Ｉ－Ｓｃｅ１が組込みを担っていると、１９２８ｂｐのバンドを与えることで、相同組換えが生じたことが明らかになるように設計した（図１８ｅに矢印で示される）。（ＮＨＥＪが生じると、このプライマーペアは、５１３１ｂｐのバンドを与える可能性があるが、この実験のゲノムＰＣＲにおいて、この長鎖増幅産物を目視することは不可能である。）

【０２７７】

プライマーＪ４６は、ベクター骨格内のβ－ラクタマーゼ遺伝子内でハイブリッド形成するように設計した。プライマーＪ４４及びプライマーＪ４６は、ＮＨＥＪが生じると、１８００ｂｐのバンドを与えると見込まれる。ＦｌＰリコンビナーゼが、相同組換え媒介性の組込みを引き起こした場合、類似サイズのバンドが見込まれる。

Ｊ４４：ＡＡＡＡＧＣＧＣＣＴＣＣＣＣＴＡＣＣＣＧＧＴＡＧＡＡＴ（配列識別番号：９２）

Ｊ４６：ＧＧＣＧＡＣＡＣＧＧＡＡＡＴＧＴＴＧＡＡＴＡＣＴＣＡＴ（配列識別番号：９３）

Ｊ４８：ＣＡＣＴＡＣＡＣＣＣＡＧＡＡＧＴＣＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧ（配列識別番号：９４）

【０２７８】

図１８ｅは、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮ及びＩ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼで処理した試料のみで相同組換えが生じていることを明確に明らかにするものである（（ｉ及びｉｉをｉｉｉ及びｉｖと比較して）。対照的に、Ｉ－Ｓｃｅ１メガヌクレアーゼが切断を引き起こしたときのみ、ＮＨＥＪが生じる（図１８ｅのｖ．）が、ＧＦＰ　ＴＡＬＥＮでは生じない（図１８ｅのｖｉ）。予想どおり、類似サイズのバンドが、Ｆｌｐリコンビナーゼで処理した試料において見られる（１８ｅのｖｉｉ）。したがって、この実験は、抗体カセットのヌクレアーゼ指向型組込みが、相同組換え及びＮＨＥＪの両方によって生じ得ることを明らかにするものである。

【０２７９】

実施例１３．同一細胞に由来する分泌抗体断片及び膜結合抗体断片の生成

上記のとおり、哺乳類ディスプレイベクターであるｐＤ２及びｐＤ５は、Ｄｒｅリコンビナーゼ［８８］によって認識される２つのＲＯＸ認識部位が隣接する膜貫通ドメインをコードするエクソンと共に構築した。膜結合形態から分泌形態への変換が可能であるかを決定するために、ｐＤ２－Ｄ１．３／ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮペアの遺伝子導入から生じたブラストサイジン耐性集団に、Ｄｒｅリコンビナーゼ（ｐＣＡＧＧｓ－Ｄｒｅ）をコードするプラスミドを再導入した。これは、ＣＡＧＧｓプロモーター（ＧｅｎｅＢｒｉｄｇｅｓ　Ａ２０５）に由来してＤｒｅリコンビナーゼ遺伝子を推進するプラスミドｐＣＡＧＧｓ－Ｄｒｅ－ＩＲＥＳ　ｐｕｒｏ［８８］に基づくものである。標準的な分子生物学的手法を使用してピューロマイシン耐性遺伝子を除去した。ブラストサイジンでの選択の２２日後に、細胞を０．５ｘ１０^{6}個細胞／ｍｌに調整し、１０^{6}個の細胞当たり０．５μｇのｐＣＡＧＧｓ－Ｄｒｅを前述のように遺伝子導入した。６日後に、上清を回収し、プロテインＡを使用して抗体を精製してから、試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで電気泳動し、クマシーブルーで染色した。図１９ａは、Ｄｒｅリコンビナーゼ遺伝子の遺伝子導入を実施しなかった場合でさえ上清中に分泌抗体が見られることを示している。これは、膜貫通ドメインをコードするエクソンをスキップする代替のスプライシングから生じ得たものである。あるいは、培養上清中の抗体は、膜結合抗体が切断されたことに由来して生じた可能性がある。Ｄｒｅリコンビナーゼを遺伝子導入することで、分泌抗体のレベルが増加した（図１９ａ）。

【０２８０】

分泌ｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体の産生は、実施例７に記載の実験においても示された（図９ｈ）。１ラウンドのファージディスプレイによって、β－ガラクトシダーゼでの選択を実施した抗体ｓｃＦｖ集団をｐＤ６ベクターへと導入し、ＡＡＶＳ　ＴＡＬＥＮを使用して、ＨＥＫ２９３細胞のＡＡＶＳ遺伝子座へと組込んだ。流動選別によって抗原結合細胞を選別し、抗体の蓄積を可能にするために、選別後７日間培地を交換せずに、選択細胞を増殖させた。ＥＬＩＳＡプレートをβ－ガラクトシダーゼ（１０ｕｇ／ｍｌ）またはＢＳＡ（１０ｕｇ／ｍｌ）のいずれかで一晩被覆した。７日間培養して得た培養上清を５０％容積の６％のＭａｒｖｅｌ－ＰＢＳと混合し、試料を三連で試験した。１／１０希釈も同様に試験した。結合したｓｃＦｖ－Ｆｃ融合体の検出は、抗ヒトＩｇＧ－Ｅｕ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　カタログ番号１２４４－３３０）を使用して実施した。図１９ｂは、ニートまたは１／１０希釈のいずれにおいて、培養上清から抗体結合を直接的に検出できることを示している。これは、表面ディスプレイ及び抗体分泌の両方が、追加の段階無しに同一細胞内で達成できることを示している。単一細胞のクローン化に続いて、選択細胞から分泌抗体を直接的に得るか、またはここで示されるように選別集団を使用して、ポリクローナル抗体混合物を生成させることが可能となるであろう。

【０２８１】

実施例１４．ｓｃＦｖからの、ＩｇＧ形式またはＦａｂ形式への変換に向けた簡便な方法

実施例７に記載したように、ｓｃＦｖとして編成された抗体の、ＩｇＧ形式への変換をもたらすための新規の方法を発明した。この変換は、ＩｇＧ編成抗体またはＦａｂ編成抗体が最終形式として必要である、ｓｃＦｖ抗体のファージディスプレイライブラリーを用いた抗体創薬プロジェクトの間に必須となるプロセスである。現在の方法は、面倒である

と共に、可変重（V_H）鎖及び可変軽（V_L）鎖の、適切な発現ベクターへの個々のクローン化を伴うものである。さらに、ｓｃＦｖ集団を「一斉」変換することは不可能であり、これは、V_H鎖と、V_L鎖との間の結び付きが失われるためである。V_H鎖及びV_L鎖は、両方が抗原結合特異性に寄与するため、このことは問題である。ｓｃＦｖの集団を、Ｉｇ形式またはＦａｂ形式へと容易に変換できないという現状によって、外来診療所で使用されることになる最終形式において、数多く抗体を選別するという能力が制限されている。標的結合、細胞レポーター選別、ならびに凝集状態を含めた、生物物理学的な特性及び機能に向けて、Ｉｇ形式またはＦａｂ形式の組換え抗体を選別する能力は、臨床的な候補としての候補抗体薬物を選択するための必須段階である。この段階で、ＩｇＧ形式またはＦａｂ形式において試験される抗体の数が増えれば増えるほど、最良の抗体薬物候補を選択する確率が増加する。本明細書には、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）集団の、免疫グロブリン（Ｉｇ）形式またはＦａｂ形式への変換方法であって、その結果、可変重（V_H）鎖及び可変軽（V_L）鎖の元のペアが維持される変換方法が記載されている。方法は、モノクローナルｓｃＦｖ、オリゴクローナルｓｃＦｖ、またはポリクローナルｓｃＦｖを、Ｉｇ形式またはＦａｂ形式へと同時に変換するものである。好ましくは、方法は、非複製「小環」ＤＮＡの生成を介して進行するものである。好ましくは、完全変換プロセスは、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌の単回の形質転換を伴うことで、細菌コロニーの集団が生成され、当該細菌コロニーは、それぞれが、特有のＩｇ編成組換え抗体またはＦａｂ編成組換え抗体をコードするプラスミドを保有する。これは、２つの別々であるクローン化段階及び形質転換段階を必要とする代替方法［１１７］とは異なるものである。

【０２８２】

より広くは、本発明のこの態様は、３つの連結された遺伝子要素であるＡ、Ｂ、及びＣ（ｓｃＦｖの場合は、それぞれがV_H、リンカー、及びV_Lに相当する）を有する遺伝子構築物を、隣接要素（Ａ及びＣ）の順序が逆転した形式へと、単一のクローン化段階で変換する方法に関する。中間要素が、保持される可能性はあるが、非常に有用なことに、方法によって、新しい要素であるＤによる、この中間要素の置き換えが可能となり、（Ｃ－Ｄ－Ａが得られる）。ｓｃＦｖからＩｇＧまたはＦａｂへの変換の実施例なら、Ｃは、抗体V_Lドメインであり、Ａは、V_Hドメインである。この実施例では、要素Ｄは、ＶＨ（要素Ａ）に融合した軽鎖定常ドメイン、ポリＡ部位、プロモーター、及びリーダー配列を包含する。プロセスにおいて、産物（Ｃ－Ｄ－Ａ）は、再クローン化され、これによって、隣接配列を変えることも可能になる。ｓｃＦｖからＩｇＧへの変換の実施例では、プロモーター及びリーダー配列が、V_L要素に先行し、V_Hの後には、ＩｇＧ編成抗体の場合はC_{H1}－C_{H2}－C_{H3}ドメインが続き、Ｆａｂ編成抗体の場合はC_{H1}ドメインが続く。要素Ａ及び要素Ｃ（上記の命名法を使用）が、他の遺伝子要素に相当し得る場合、方法は、より広く適用することができ、例えば、元のＮ末端及びＣ末端が融合して、新規の内部終端が操作形成された環状順列を有するタンパク質の構築における遺伝子要素である。

【０２８３】

図２１は、ｓｃＦｖからＩｇＧへの変換を例として使用して、変換プロセスを模式的に示したものである。抗体のＶＨドメイン及びＶＬドメインをコードするＤＮＡ挿入断片（ａ）と、定常軽（ＣＬ）鎖、ポリアデニル化配列（ｐＡ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、及びシグナルペプチド（ＳｉｇＰ）をコードするＤＮＡ断片（ｂ）と、が連結されている。ＤＮＡ断片（ｂ）は、ＣＭＶプロモーターの代わりに任意のプロモーターをコードすることもできる。同様に、ｐＡ－ＣＭＶカセットを、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）［１１９］または２Ａ型「自己切断（ｓｅｌｆ－ｃｌｅａｖｉｎｇ）」小ペプチド［１３０、１３３］によって置き換えることができる。非複製ＤＮＡ「小環」（ｃ）を創出するためのＤＮＡ分子（ａ）と、ＤＮＡ分子（ｂ）との結合は、「粘着末端」ライゲーションによって促進される。図２１では、ＮｃｏＩ部位及びＮｏｔＩ部位を用いており、これは、こうした部位を、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙファージディスプレイライブラリー［７］の創出に使用したためであるが、任意の適した制限酵素部位を使用して、

非複製「小環」ｃを創出することができる。ライゲーションの後、「小環」ｃは、その認識部位がV_Hドメインと、V_Lドメインとの間のリンカーと隣接している、制限酵素であるＮｈｅＩ及びＸｈｏＩで直鎖化される。本発明を示すためにＮｈｅＩ及びＸｈｏＩを選択しており、これは、これらの制限酵素を、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙファージディスプレイライブラリー［７］の創出に使用したためであるが、任意の適した制限酵素部位を使用することができる。

【０２８４】

その後、直鎖化産物ｄを精製し、消化したベクター（ｅ）と連結する。ベクター（ｅ）は、ＮｈｅＩ部位の上流にＣＭＶプロモーターまたはｐＥＦプロモーター及びシグナル配列を含み、ＸｈｏＩ部位の下流に抗体定常重（C_H）ドメイン１～３をコードする。得られるプラスミドＤＮＡの細菌における選択及び複製を可能にするために、ベクターは、細菌複製起点または細菌複製及び抗生物質耐性マーカー（示されていない）もコードすることになるであろう。挿入断片（ｄ）と、ベクター（ｅ）とのライゲーションによる産物は、プラスミドｆをもたらすことになり、当該プラスミドｆを使用して細菌を形質転換し、適した選択可能マーカーで増殖させれば、標準方法によるプラスミドＤＮＡの産生及び精製が可能となるであろう。精製したプラスミドｆは、異種性Ｉｇ抗体発現に向けて哺乳類細胞へと導入することができる［１３４］。あるいは、ベクター（ｅ）においてCH$_{1-3}$をコードするＤＮＡと、単一C_{H1}ドメインをコードするＤＮＡと、をＦａｂ発現に向けて置き換えることができる。

【０２８５】

本発明を示すために使用する、以下の詳細な方法説明では、挿入断片ｂは、ＣＭＶプロモーターまたはＰ２Ａペプチドのいずれかを含み、Ｐ２Ａペプチドは、単一メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）から別々の抗体軽鎖及び抗体重鎖を発現することを可能にするものである。方法は、自明なものではなく、数度の実験試行の末に洗練されたものである。例えば、初期には、ＰＣＲによるＤＮＡ「小環」（ｃ）の直鎖化を試みた。しかしながら、この試行は、ホモ２量体である副産物の増幅に終わり、もたらされた所望の増幅産物（ｄ）の収率は低いものであった。対照的に、ＤＮＡ「小環」（ｃ）を直接消化することで、十分な材料（ｄ）が得られたことにより、方法を実行可能なものとすることに成功した。第２に、不必要なホモ２量体産物を防ごうと試みた際に、初期には挿入断片（ａ）が脱リン酸化した。しかしながら、これには、「末端（ｅｎｄ）」消化を防ぐための慎重な制御が必要であった。当該「末端（ｅｎｄ）」消化は、ライゲーションに向けた所望の「粘着末端」を欠いた産物をもたらすものである。最適化された方法では、脱リン酸化が生じないことで、ライゲーションに適格である産物の割合が最大化されている。最後に、ＤＮＡ「小環」（ｃ）の収率を最大化するためには、ＤＮＡ挿入断片である（ａ）及び（ｂ）のライゲーションにおいて使用する比率を慎重に制御する必要があった。

１．ＰＣＲによるｓｃＦｖ挿入断片の調製

ｓｃＦｖをコードするプラスミドＤＮＡを保有する細菌グリセロールストックを、５０ｕｌの水へと削り入れた。これを１０倍希釈した。ここから５μを使用し、フォワードプライマーｐＳＡＮＧ１０ｐｅｌＢ（ＣＧＣＴＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＡＴＧＧ　配列識別番号９５）（２．５μｌ、５μＭ）、リバースプライマー２０９７（ＧＡＴＧＧＴＧＡＴＧＡＴＧＡＴＧＴＧＣＧＧＡＴＧＣＧ　配列識別番号：９６）、（２．５μｌ、５μＭ）、１０ｘＫＯＤ緩衝液（Ｍｅｒｃｋから入手したＫＯＤホットスタートキット、７１０８６－４）、ｄＮＴＰ（５μｌ、２ｍＭ）、ＭｇＳＯ４（２μｌ、２５ｍＭ）、ＫＯＤホットスタートポリメラーゼ（２．５ユニット）を含めて総容積を５０μｌとしてＰＣＲ反応を実施した。サイクル条件は、９４℃を２分保った後、９４℃で３０秒、５４℃で３０秒、次いで７２℃で１分のサイクルを２５回実施する条件を使用した。スピンカラム（ＱｉａｇｅｎまたはＦｅｒｍｅｎｔａｓ）によってＰＣＲ反応物の精製を実施し、９０μｌのＰＣＲ反応物溶出液を調製した。図２２ａは、１μｌのＰＣＲ反応物を負荷した１％のアガロースＴＢＥゲルを示す。精製したｓｃＦｖのＤＮＡ（８０μｌ、８μｇ）に、緩衝液４（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）、ＢＳＡ（０．１ｍｇ／ｍｌ）、ならび

に４０ユニットのＮｃｏＩ－ＨＦ及びＮｏｔＩ－ＨＦを含む総容積１００μｌの溶液を添加することによって消化し、３７℃で２時間インキュベートした。挿入断片をＱｉａｇｅｎＰＣＲ精製キットで精製し、３０μｌの溶出液を調製して、ｎａｎｏｄｒｏｐ分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ）を使用して２６０ｎＭの吸光度を測定することによって、ＤＮＡ濃度を測定した。

２．ＤＮＡ挿入断片のライゲーション（図２１ａ及び図２１ｂ）

ライゲーション反応は、ＤＮＡ「小環」を産生するために実施する（図２１ｃ）。ライゲーション反応液は、挿入断片ｂ（１２５ｎｇ）、ｓｃＦｖ挿入断片ａ（図２１）（１２５ｎｇ）、１０ｘライゲーション緩衝液（Ｒｏｃｈｅ　Ｔ４　ＤＮＡリガーゼキット、１．５ｕｌ）、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ（１ユニット）を含み、総容積が１５μｌである。２１℃で１～２時間インキュベートした。ライゲーション混合物に水（３５μｌ）を添加し、Ｑｉａｇｅｎ　ＰＣＲ精製キットで精製し、３０μｌの溶出液を調製した。

３．Ｘｈｏ１／Ｎｈｅ１でのＤＮＡ「小環」（図２１ｃ）の消化

精製したライゲーション反応液（２８μｌ）は、緩衝液４（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、３．５μｌ）、ＢＳＡ（０．１ｍｇ／ｍｌ）、ならびに１０ユニットのＮｃｏＩ－ＨＦ及びＮｏｔＩ－ＨＦを含む総容積３５μｌの溶液を添加することによって消化し、３７℃で２時間インキュベートする。その後、これを１％のアガロースＴＢＥで分離することによって精製する（図２２ｂ）。代替方法として、図２２ｃは、ＣＭＶプロモーターの代わりにＰ２Ａ配列を含む直鎖化「小環」を示すものである。２．６ｋｂに位置するＤＮＡバンド（図２２ｂ）を切り出し、Ｑｉａｇｅｎゲル抽出キットで精製し、３０μｌの溶出液を調製する。

４．直鎖化ＤＮＡ「小環」ｄと、ｐｌＮＴ３（ＸｈｏＩ／ＮｈｅＩ切断）ベクターと、のライゲーション、及びＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５αの形質転換

標準ライゲーションは、ｐｌＮＴ３切断ベクター（５０ｎｇ）、直鎖化「小環」ｄ（２０ｎｇ）、１０ｘリガーゼ緩衝液（Ｒｏｃｈｅ、１．５μｌ）、及び１ユニットのＴ４　ＤＮＡリガーゼ（ＮＥＢ）を使用し、最終容積を１５μｌとして実施した。２１℃で２時間インキュベートした。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５アルファ化学的コンピテント細胞（ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　ｃｅｌｌ）、ｓｕｂｃｌｏｎｉｎｇ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１８２６５０１７）の形質転換は、製造者の説明書に従って実施した。６μｌのライゲーション混合液に、化学的にコンピテントなＤＨ５ａ細胞を８０μｌ添加し、氷上静置１時間、４２℃の熱ショック１分、氷上静置２分の後に、９００μｌのＳＯＣ培地を含む１４ｍｌのポリプロピレンチューブに移し、３７℃で１時間インキュベートしてからＬＢアンピシリンプレートに播種した。

【０２８６】

実施例１５：流動電気穿孔を使用した、ヌクレアーゼ指向型組込みによる、哺乳類細胞における大きなディスプレイライブラリーの構築

電気穿孔は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及びタンパク質を細胞へと導入する効率的な方法であり、電気穿孔流動システムによって、数多くの哺乳類細胞へと効率的にＤＮＡを導入することが可能になる。例えば、「ＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸ　Ｓｃａｌａｂｌｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ」（Ｍａｘｃｙｔｅ）によって、３０分以内に10^{10}個の細胞の電気穿孔が可能であり、１日に最大で10^{11}個の細胞に遺伝子導入を実施する可能性を創出するものである。細胞及びＤＮＡは、混合され、リザーバーから電気穿孔チャンバーへと通って電気穿孔され、ポンプで押し出される。このプロセスは、新たな一定分量の細胞及びＤＮＡで繰り返し実施される。培養細胞（例えば、ヒト２９３細胞もしくはＪｕｒｋａｔ細胞）または例えば、ヒトリンパ球［１３５］といった初代細胞への、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、またはその混合物の導入に向けて、同一の方法を適用することができる。流動電気穿孔は、数多くの初代細胞及び培養細胞への、ＤＮＲ、ＲＮＡ、及びタンパク質の、効率的な導入に使用されてきた。

【０２８７】

本明細書で、我々は、そのようなシステムを使用することで、ヒトＨＥＫ２９３細胞及

びＪｕｒｋａｔ細胞のヒトＡＡＶＳ遺伝子座を標的としたＴＡＬＥヌクレアーゼのペアをコードするＤＮＡの同時導入による、抗体遺伝子をコードするドナーＤＮＡの導入を例示する。

【０２８８】

蛍光標識された抗原を使用して、フローサイトメトリーによって２つの異なる抗体の特異性の分布を決定した。ＥＧＦ受容体であるＥＧＦＲ１またはＥＧＦＲ２を認識する抗体の生成は以前に説明した［１０５］。クローンα－ＥＧＦＲ１＿Ａ及びクローンα－ＥＧＦＲ２＿Ａ（そこに記載されている）を、実施例６に記載したようにｐＤ６へとクローン化した。さらに、β－ガラクトシダーゼ（β－ｇａｌ）での１ラウンドのファージディスプレイを使用して「ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ」ファージディスプレイライブラリー［７］から選択したｓｃＦｖ抗体集団もこのベクターへとクローン化した（実施例６に記載のとおり）。

【０２８９】

ＨＥＫ２９３細胞を遠心し、製造者の電気穿孔緩衝液（Ｍａｘｃｙｔｅ　Ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ緩衝液、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　カタログ番号ＮＣ０８５６４２８））に再懸濁し、最終容積を10^8個細胞／ｍｌとした。一定分量の$4x10^7$個細胞（０．４ｍｌ）を、１００μｇのＤＮＡ（すなわち、２．５μｇ／10^6個細胞）と共に電気穿孔キュベットに添加した。使用した種々の成分量を以下に示す。抗体α－ＦＧＦＲ１＿Ａ及び抗体α－ＦＧＦＲ２＿Ａをコードするドナー ＤＮＡは、等モル混合物として使用し、以下の表６に10^6個の細胞当たりの総量で示されている。ＡＡＶＳ－ＳＢＩ　ＴＡＬＥＮ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１）をコードするＤＮＡは、等モル混合物として使用し、以下の表６に10^6個の細胞当たりの総量で示されている。ＴＡＬＥＮ添加無しの試料では、対照プラスミドｐｃＤＮＡ３．０を使用して、インプットＤＮＡを２．５μｇ／10^6個細胞とした。

【０２９０】

遺伝子導入効率の割合は、総細胞の所与のインプットで達成されたブラストサイジンコロニーの数を数えることによって計算した。負対照（すなわち、ＴＡＬＥＮ　ＤＮＡの添加無し）と比較した倍数差異が括弧内に示されている。最終的に、Ｍａｘｃｙｔｅシステムの全サイクルを実行することによって達成可能な形質転換コロニーの数を計算し、最終列に示している。Ｍａｘｃｙｔｅシステムの全サイクルの実行は、10^{10}個の細胞の電気穿孔を実施するものである。これは、約３０分の単一サイクルに相当し、１日に複数サイクルを実行する可能性を与えるものである。したがって、毎日のアウトプットは、５～１０倍大きい可能性がある。Ｗａｖｅｂａｇシステム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）またはＣｅｌｌｔａｉｎｅｒシステム（Ｃｅｌｌｔａｉｎｅｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）などの大スケールの発酵及び培養システムを使用することで、遺伝子導入に向けた細胞を生成させることができると共に、得られるライブラリーの培養に使用することができる。

【表６】
表6．HEK２９３細胞の電気穿孔

試料	αFGFR1_A/αFGFR2_A ドナー DNA/10^6個細胞	ng TALEN DNA/10^6個細胞	遺伝子導入%	10^{10}個の細胞当たりのクローン数
1	580	1920	5.1（51x）	5.1 x 10^8
1b	580	640	3.3（33x）	3.3 x 10^8
2	580	-	0.1 -	0.1 x 10^8
3	194	1920	2.7（89x）	2.7 x 10^8
4	194	-	0.03	0.03 x 10^8
5	1185	1315	5.8（25x）	5.8 x 10^8
6	1185	-	0.23	0.23 x 10^8
7	1825	675	6.1（11x）	6.1 x 10^8
8	1825	-	0.57	0.57 x 10^8
9	580（FGFR1 単独）	1920	5.3	5.3 x 10^8
10	580（FGFR2 単独）	1920	5.3	5.3 x 10^8

試料	β-ガラクトシダーゼドナー DNA/10^6個細胞	ng TALEN DNA/10^6個細胞	遺伝子導入%	10^{10}個の細胞当たりのクローン数
11	580	1920	4.5	4.5 x 10^8
12	580	-	0.21	0.21 x 10^8
13	1185	1315	5.5	5.5 x 10^8
14	1185	-	0.21	0.21 x 10^8

【０２９１】
この実施例は、抗体カセットが組込まれた細胞の非常に大きなライブラリーを作成することが可能であることを示すものである。遺伝子導入効率の範囲は、２．７～６．１％であった。β－ガラクトシダーゼで選択した集団（試料１３）の場合は、単一の流動電気穿孔セッションで、５．５ｘ１０^{8}個クローンのライブラリーを創出することができる。１日に２回以上のセッションで、２～５ｘ１０^{9}個のクローンのライブラリーを生成させることができる。
【０２９２】
ブラストサイジンでの選択（１０μｇ／ｍｌ）の１３日後に、前述のように、細胞をフィコエリトリンで標識された抗Ｆｃ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号４０９３０４）で標識した。β－ガラクトシダーゼで選択した抗体集団の３４～３６％の細胞が、Ｆｃ発現に陽性であり、１１～１３％が１０ｎＭ濃度のＤｙｅｌｉｇｈｔ－６３３－標識抗原の結合に陽性であった。
【０２９３】
ＦＧＦＲ結合クローンを使用した場合、９８～９９％の細胞がＦｃ発現に陽性であった。α－ＦＧＦＲ１＿Ａ抗体及びα－ＦＧＦＲ２＿Ａ抗体の混合物は、複数の組込み事象を有する細胞の集団を調べるための機会を与えるものである。正しく組込まれたカセット（例えば、α－ＦＧＦＲ１＿Ａ）を有する個々の細胞では、第２の組込みが、別の特異性（

すなわち、α－ＦＧＦＲ２＿Ａ）をもたらすことになる確率はおよそ五分五分である。複数組込みの頻度が高いのであれば、二重陽性クローンの割合は高いことになろうが、二重陽性クローンの割合は高くないことが明らかとなり、これは、細胞当たり１つの抗体遺伝子を生成することにおける、ヌクレアーゼ指向型ライブラリー組込みシステムの忠実性を示すものである。表面ディスプレイされた抗ＦＧＦＲ抗体が、その適切な抗原に特異的に結合する能力を確認した。抗原の発現は、マウスＦｇｆｒ１外部ドメイン（ＥＮＳＭＵＳＰ００００００６３８０８）をコードするプラスミドｐＴＴ３ＤｅｓｔｒＣＤ４（ｄ３＋４）－Ｈｉｓ１０［１３４］に由来するものである。これをＨＥＫ２９３懸濁細胞への遺伝子導入に使用し、以前に説明したように［１３４］、固定化金属親和性クロマトグラフィーによって、分泌Ｆｇｆｒ１－ｒＣｄ４－Ｈｉｓ１０を精製した。マウスＦｇｆｒ２外部ドメインは、

プライマー２４２３（ＴＴＴＴＴＴＣＣＡＴＧＧＧＣＣＧＧＣＣＣＴＣＣＴＴＣＡＧＴＴＡＧＴＴＧＡＧ）（配列識別番号：９７）及び

プライマー２４３７（ＴＴＴＴＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＧＡＡＧＣＣＧＴＧＡＴＣＴＣＣＴＴＣＴＣＴＣＴＣ）（配列識別番号：９８）

を使用して、ＩＭＡＧＥクローン９０８８０８９からＰＣＲで増幅し、ＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化し、発現プラスミドｐＢＩＯＣＡＭ５［１２６］にクローン化した。Ｆｇｆｒ２－Ｆｃは、以前に説明したように［１３４］、ＨＥＫ２９３細胞の一過性遺伝子導入によって発現させ、親和性クロマトグラフィーによって精製した。

【０２９４】

両方の標識抗原を使用して、二重の結合性で遺伝子導入集団を探索したところ、二重陽性の割合は低かった。この実験では、10^6個の細胞当たり１９７ｎｇのドナーＤＮＡを使用して、二重陽性割合が低い（３．５％）最適バランスのライブラリーサイズ（Ｍａｘｃｙｔｅセッション当たり２．７ｘ10^8個のクローン）を明らかにした（図２３）。

【０２９５】

この二重陽性割合は、第２抗体カセットが誤って組込まれていることを示している可能性があるが、ライブラリーのヌクレアーゼ指向型組込み効率を考慮すると、細胞の一部において、両対立遺伝子（この実施例ではＡＡＶＳ遺伝子座）が、新規結合体の標的となった可能性もあり得る。１つの細胞内に２つの異なる抗体遺伝子が存在すること自体は、結合体またはそれをコードする遺伝子の単離を妨げるものではないが、標的細胞の単一遺伝子座を最初に修飾し、単一のヌクレアーゼ標的部位を導入することによって、これを回避することができ、当該単一のヌクレアーゼ標的部位は、例えば、実施例９で示した事前組込みのＳｃｅ１メガヌクレアーゼ部位である。

【０２９６】

実施例１６．選別ライブラリー集団からの結合体コード遺伝子の回収

ファージディスプレイでの選択をβ－ガラクトシダーゼ（実施例６に記載のように）で実施し、１～２ラウンドの選択に由来する抗体集団をベクターｐＤ６へとクローン化し、実施例６に記載のように、ＨＥＫ２９３細胞のＡＡＶＳ遺伝子座へと導入した。β－ガラクトシダーゼは、製造者の説明書に従って、Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ Ｌｉｎｋ Ｄｙｅｌｉｇｈｔ－６３３（Ｉｎｎｏｖａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ カタログ番号３２５－００１０）を使用して標識した。ブラストサイジン（１０μｇ／ｍｌ）中で遺伝子導入細胞集団を２５日間選択し、１０ｎＭのＤｙｅｌｉｇｈｔ－６３３標識β－ガラクトシダーゼ及びフィコエリトリン標識抗Ｆｃ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ カタログ番号４０９３０４）で標識した。細胞を抗体と共に４℃で３０分間インキュベートし、ＰＢＳ／０．１％ＢＳＡで２回洗浄し、ＰＢＳ／０．１％ＢＳＡに再懸濁してから、流動選別機を使用して二重陽性細胞を選別した。

【０２９７】

選別細胞を増殖させ、１０ｎＭの抗原を使用して、第２ラウンドの選別を実施した。細胞を増殖させ、選別した選択集団からゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡのいずれかを単離した。

【０２９８】
異なる鎖（例えば、ＩｇＧ編成抗体）を包含する結合体が、（例えば、同一プラスミド上への導入によって）同一ゲノム配列上に存在するが、異なるｍＲＮＡへと転写される場合、多量体である結合体をコードする別々の遺伝子を、ゲノムＤＮＡからの増幅によって回収することが最適であり得る。代替として、「内部リボソーム進入配列」（ＩＲＥＳ）要素、または翻訳停止／タンパク質切断を促進するウイルスのＰ２Ａ配列もしくはＴ２Ａ配列などの配列の使用を介して、複数タンパク質鎖を包含する結合体を同一ｍＲＮＡ上にコードさせることができる［１３３、１３６］。この場合、及び単一のタンパク質鎖としてコードされる結合体の場合、コード遺伝子をｍＲＮＡから単離することも可能であろう。

【０２９９】
ゲノムＤＮＡは、「ＤＮｅａｓｙ ｂｌｏｏｄ ａｎｄ ｔｉｓｓｕｅ ｋｉｔ」（ＱＩＡＧＥＮ カタログ番号６９５０４）を使用して調製した。ｍＲＮＡは、「Ｉｓｏｌａｔｅ ＩＩ ＲＮＡ ｍｉｎｉ ｋｉｔ」（Ｂｉｏｌｉｎｅ Ｂｉｏ－５２０７２）を使用して調製した。ゲノムＤＮＡからの増幅では、製造者の説明書に従って「２ｘＰｈｕｓｉｏｎ ＧＣ」混合液と共にＰｈｕｓｉｏｎポリメラーゼを使用して、ＰＣＲ反応を実施した。Ｎｃｏ１及びＮｏｔ１のクローン化部位と隣接するプライマーを使用して、抗体カセットを増幅した（９８℃で１０秒、５８℃で２０秒、７２℃で９０秒を３５サイクル。当該プライマーは、例えば、プライマー２６２２（ＧＡＡＣＡＧＧＡＡＣＡＣＧＧＡＡＧＧＴＣ）（配列識別番号：９９）及びプライマー２６２３（ＴＡＡＡＧＴＡＧＧＣＧＧＴＣＴＴＧＡＧＡＣＧ）（配列識別番号：８２）である。

【０３００】
選択ｓｃＦｖ遺伝子をコードする遺伝子は、ｍＲＮＡから増幅した。全ＲＮＡは、「Ｉｓｏｌａｔｅ ＩＩ ＲＮＡ ｍｉｎｉ ｋｉｔ」（Ｂｉｏｌｉｎｅ カタログ番号Ｂｉｏ－５２０７２）を使用して、選別細胞から単離した。ｃＤＮＡは、ＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔＩＩ逆転写酵素（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１８００６４－０２２）を使用して、２μｇのＲＮＡから合成した。その後、選択ｓｃＦｖ遺伝子を、ＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ カタログ番号７１０８６－３）と、Ｎｃｏ１及びＮｏｔ１のクローン化部位と隣接するプライマーと、を使用したＰＣＲによって、ｃＤＮＡから増幅した。この場合、プライマー４１６７９ ＡＴＧＡＧＴＴＧＧＡＧＣＴＧＴＡＴＣＡＴＣＣ（配列識別番号：１００）及び
プライマー２６２１ ＧＣＡＴＴＣＣＡＣＧＧＣＧＧＣＣＧＣ（配列識別番号：１０１）
を使用して、抗体カセットを増幅した（９５℃で２０秒、６０℃で１０秒、７０℃で１５秒を２５サイクル）。ＰＣＲ増幅産物は、Ｎｃｏ１及びＮｏｔ１で消化してから、細菌抗体発現ベクターｐＳＡＮＧ１０のＮｃｏ／Ｎｏｔ１部位へとクローン化した。ｐＳＡＮＧ１０の構築、細菌発現の方法、及びＥＬＩＳＡによる選別は、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ ２００６［１２７］において説明されている。

【０３０１】
ファージディスプレイによる１ラウンドの選択に由来する集団のＥＬＩＳＡ選別によって、０／９０個のクローンが陽性であることが明らかとなった。対照的に、この同一集団をさらに哺乳類ディスプレイに供してから、ｓｃＦｖ遺伝子集団を回収して選別したところ、ＥＬＩＳＡにおいて、２７／９０個のクローン（３０％）が陽性であった。これは、ライブラリーで哺乳類ディスプレイを実施して、結合体が濃縮された集団を回収することが可能であることを示している。

【０３０２】
実施例１５は、β－ガラクトシダーゼでの１ラウンドのファージディスプレイによって選択した集団の、流動電気穿孔を使用した、ＨＥＫ細胞への導入について説明するものである。前述のように、ブラストサイジン中で哺乳類ディスプレイ細胞集団を選択し、１０

ｎＭの標識β－ガラクトシダーゼを使用した流動選別に供した。増殖９日後に、１０ｎＭのβ－ガラクトシダーゼを使用して、フローサイトメトリーによって、７５％の細胞が、β－ガラクトシダーゼへの結合に陽性であることが明らかとなった。こうした細胞を選別し、さらに増殖させた。厳密性を推進する能力を示すために、１ｎＭまたは１０ｎＭのいずれかの抗体濃度を使用して、標識化を実施した。それぞれの集団から、それぞれ２０．３％及び５５．９％の細胞を選別した。選別の後、追加の細胞培養はせずに、選別集団から迅速にｍＲＮＡを調製した。クローン化、細菌における発現、及びＥＬＩＳＡ選別（前述同様）に続いて、流動選別時の厳密性が増加するにしたがって、ＥＬＩＳＡでの成功率が増加することが明らかとなった。この群から得られたクローン
は、最高シグナルレベルを示し、陽性クローン数も同様に改善した（図２４）。これは、ディスプレイ集団内の選別の厳密性を推進する能力が、得られる抗体の性能良化に反映されることを示している。

【０３０３】

実施例１７．ヌクレアーゼ指向型組込みによる哺乳類ライブラリー産生に向けたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子の組込み

本明細書に記載の方法は、抗体ディスプレイを超える用途を有する。ヌクレアーゼ指向型組込みを使用した、Ｔ細胞受容体ライブラリーの選別に向けた可能性を示すために、Ｔ細胞受容体の発現を可能にするベクター構築物（ｐｌＮＴ２０）を構築した。

【０３０４】

ｐｌＮＴ２０（図２５ａ）は、ヒトＡＡＶＳ遺伝子座を標的とするための二重プロモーターベクターである。当該ベクターは、図３に示すように左右のホモロジーアームを有する。左ＡＡＶＳホモロジーアームは、特有なＡｓｉＳＩ部位及びＮｓｉ１部位と隣接しており、その後にスプライスアクセプター及びピューロマイシン遺伝子が続いている。左ホモロジーアームの末端と、スプライスアクセプターとの間の配列は、既に説明したものと同一であり、ピューロマイシン遺伝子は、上流エクソンを含むフレーム内でＡＴＧから始まる（図２５Ｂ及び同様に図３でブラストサイジン遺伝子向けに示される）。ヌクレアーゼ指向型組込みが正しければ、内在性の上流エクソンまでスプライシングされるピューロマイシン遺伝子のインフレームスプライシングを引き起こすことになり、当該上流エクソンは、それ自体が内在性ＡＡＶＳプロモーターによって推進されるものであり、これによって、正しい組込みが生じたクローンを選択することが可能になる。ピューロマイシン耐性遺伝子の後には、ＳＶ４０ポリアデニル化部位が続く。右ＡＡＶＳホモロジーアームは、特有なＢｓｔＺ１７１部位及びＳｂｆ１部位と隣接している。

【０３０５】

ｐｌＮＴ２０は、ｐＥＦプロモーター（ｐＳＦ－ｐＥＦ由来、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　カタログ番号ＯＧ４３）で構成されており、関心遺伝子の、Ｎｈｅ１／Ｋｐｎ１部位へのクローン化を可能にするものである。分泌リーダー配列が、Ｎｈｅ１部位に先行しており、Ｋｐｎ１部位の後に、図２に既に示したウシ成長ホルモン（ｂＧＨポリＡ）のポリアデニル化シグナルが続く。下流は、ＣＭＶプロモーター（ｐＳＦ－ＣＭＶ－ｆ１－Ｐａｃ１由来、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　カタログ番号ＯＧ１１１）であり、Ｎｃｏ及びＮｏｔ（図２に示されるとおり）またはＨｉｎｄ３を介したクローン化が可能である。分泌リーダー配列が、Ｎｃｏ１部位に先行しており、カセットの後にｂＧＨポリＡ部位が続く。

【０３０６】

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）のディスプレイ及び濃縮を例示するために、Ｌｉら（２００５）によって説明され、後にＺｈａｏら（２００７）［１３７、１３８］によって説明された、癌マーカーを認識するＴＣＲを使用した。ｃ１２ｃ２と呼ばれるこのＴＣＲは、ＨＬＡ－Ａ２上に提示されるペプチドＳＬＬＭＷＩＴＱＶ（配列識別番号：１０２）を４５０ｎＭの親和性をもって認識する。このペプチドは、ＮＹ－ＥＳＯ－１に由来する残基１５７－１６５（ＮＹ－ＥＳＯ－１　１５７－１６５）に相当する。これは、３２μＭの親和性を有する１Ｇ４と呼ばれる親抗体の親和性が成熟した変異体である。

【０３０７】
別の癌マーカーを認識する第２のＴＣＲを使用した。親であるＭＥＬ５　ＴＣＲは、ＨＬＡ－Ａ２上に提示されるペプチドＭＡＲＴ－１　２６－３５（「Ｔ細胞－１によって認識されるメラノーマ抗原」）を認識し、ＭＡＲＴ－１　２６－３５は、ペプチド配列ＥＬＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列識別番号：１０３）を有する。このＴＣＲは、ファージディスプレイによって親和性が成熟し、クローンα２４／β１７が得られ、Ｍｕｄｕｒａ　ｅｔａｌ（２０１３）［１３９］において、親和性は、０．５ｎＭであったと説明された。ＴＣＲと、ＭＨＣ：ペプチド複合体との複合体の構造は解析されており（ｐｄｂコード４ＪＦＨ）、これ以後、本明細書では、当該クローンを「４ＪＦＨ」と呼ぶ。同一の親ＴＣＲについても、Ｐｉｅｒｃｅら（２０１４）［１４０］による設計に基づいて操作されており、複合体の構造が解析された。

【０３０８】
Ｄｅｂｅｔｓらによれば、示されたＣＤ３ζドメインを結合すると、天然のヒトＴＣＲが存在するときでさえ、異種性遺伝子の会合を引き起こす傾向がある［１４１、１４２］。使用されたＣＤ３ζ要素は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び完全な細胞質ドメインからなるものである。さらに、異種性遺伝子において、ヒト定常ドメインをマウス定常ドメインによって置換しても、内在性のヒト定常ドメインとの会合を上回ってその会合が推進される傾向がある［１４３］。最終的に、マウス定常ドメインの使用は、ヒトＴＣＲの骨格に対して異種性であるＴＣＲ鎖を検出する選択肢を与えるものである。こうした要素をＴＣＲ発現カセットの設計に組込んだ。

【０３０９】
２つ合成遺伝子を設計、合成し、下記の構造を有する遺伝子構築物を生じさせた。
ヒトＴＣＲ　Ｖα－マウスα定常－ヒトＣＤ３ζ
ヒトＴＣＲ　Ｖβ－マウスβ定常－ヒトＣＤ３ζ

【０３１０】
ｃ１２／ｃ２の可変ドメインが組込まれたα鎖構築物及びβ鎖構築物を含む合成遺伝子配列を図２５ｃ及び図２５ｄに示す。これらの構築物は、ｐｌＮＴ２０のＮｈｅ１／Ｋｐｎ１部位及びＮｃｏ１／Ｈｉｎｄ３部位にそれぞれクローン化されている。ＴＣＲをコードする構築物をｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２と呼ぶ。最初の実例では、合成遺伝子は、ＶαＣαドメイン（Ｎｈｅ１部位及びＮｏｔ１部位と隣接）ならびにＶβドメイン（ＴＣＲｃ１２／ｃ２をコードするＮｃｏ１／Ｘｈｏ１部位と隣接）が組込まれるように設計した。こうした要素は、こうした制限酵素部位を使用して、代替のＴＣＲによって置き換えることができる。

【０３１１】
４ＪＦＨ［１３９］のＶαドメイン及びＶβドメインをコードする２つの追加合成遺伝子を作成した（図２５ｅ及び図２５ｆ）。このＴＣＲをコードする構築物をｐｌＮＴ２０－４ＪＦＨと呼ぶ。

【０３１２】
ドナーＤＮＡ（10^6個の細胞当たり３００ｎｇのドナーＤＮＡ）として、表７に示す比で、３μｇのｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２及びｐｌＮＴ２０－４ＪＨＦを使用して、10^7個のＨＥＫ２９３細胞に遺伝子導入した。ｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２は、ＴＣＲ１と称し、ｐｌＮＴ２０－４ＪＨＦは、ＴＣＲ２と称す。それぞれ５μｇのｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ　Ｒ１　ＴＡＬＥＮを10^7個の細胞（10^6個の細胞当たりそれぞれ５００ｎｇ）に添加したが、例外として、試料６の場合は、これを１０μｇの対照ＤＮＡ（ｐｃＤＮＡ３．０）で置き換えた。ＤＮＡは、上記のように、ポリエチレンイミンでの遺伝子導入によって導入した。

【表７】

表7

試料	TCR1/TCR2比
1	1：100
2	100：1
3	50：50
4	100% TCR1
5	100% TCR2
6	50：50（TALEヌクレアーゼ無し）

【０３１３】

１２日間の選択（０．２５μｇ／ｍｌのピューロマイシン）の後、細胞を標的抗原で標識した。上記のＴＣＲによって認識されるペプチド：ＭＨＣ複合体は、フィコエリトリンで標識された５量体（ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ）として提示される。ｃ１２／ｃ２は、ＨＬＡ－Ａ２上に提示されるペプチドＳＬＬＭＷＩＴＱＶを認識し、ペプチドＳＬＬＭＷＩＴＱＶは、ＮＹ－ＥＳＯ－１　１５７－１６５（Ｐｒｏｉｍｍｕｎｅ　製品コード３９０）に相当するものである。４ＪＨＦ（α２４／β１７としても知られる）は、ＨＬＡ－Ａ２上に提示されるペプチドＥＬＡＧＩＧＩＬＴＶを認識し、ペプチドＥＬＡＧＩＧＩＬＴＶは、ＭｅｌａｎＡ／ＭＡＲＴ２６－３５（Ｐｒｏｉｍｍｕｎｅ　製品コード０８２）に相当するものである。それぞれの場合において、ＭＨＣ：ペプチド複合体をフィコエリトリンで標識し、製造者の説明書に従って使用した。図２６（ａ～ｄ）は、それぞれのＴＣＲが、予想されるＭＨＣ：ペプチド複合体（ａ，ｄ）に特異的であり、複合体中の非同種ペプチドには結合しない（図２６ｂ、図２６ｃ）ことを示す。それぞれのＴＣＲをコードするＤＮＡに、もう一方をコードする遺伝子を１００倍過剰で混合した（試料１～２、表７）。ＨＥＫ２９３細胞に遺伝子導入し、ピューロマイシン中で選択した。ピューロマイシンでの選択の１４日後に、抗体陽性細胞の選別を実施した（図２６ｇ、図２６ｈ）。

【０３１４】

流動選別したアウトプット集団内の濃縮レベルを定量化するために、ＰＣＲ増幅によってＴＣＲ遺伝子を回収し、クローン化後に、それぞれのＴＣＲ種の相対的な量を決定した。選別集団から総ＲＮＡを単離した。ｃＤＮＡ合成は、実施例１６に記載したように実施した。ＴＣＲアルファ鎖及びＴＣＲベータ鎖を増幅するためのプライマーは、それぞれ１９９９／２７８２及び４１６７９／２７８９を使用した（表８）。ＰＣＲ増幅は、製造者の推奨プロトコール（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７１０８６、ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して、ＫＯＤホットスタートポリメラーゼを用いて実施した。ＰＣＲ反応条件は、９５℃（２分）、次いで９５℃（２０秒）、６０℃（１０秒）、７０℃（１５秒）を２５サイクル、その後に７０℃（５分）の条件を使用した。増幅したＴＣＲアルファ鎖及びＴＣＲベータ鎖をＮｈｅＩ／ＮｏｔＩまたはＮｃｏＩ／ＸｈｏＩで消化し、互換性部位を用いてベクターへとサブクローン化した（この場合、それぞれｐＢＩＯＣＡＭ１－Ｔｒ－Ｎ　ＮｈｅＩ／ＮｏｔＩ切断ベクターまたはｐＢＩＯＣＡＭ２－Ｔｒ－Ｎ（ＮｃｏＩ／ＸｈｏＩ）切断ベクターを使用した）。個々のクローンのＰＣＲ増幅は、ｃ２ｃ１２（ＴＣＲ１）特異的ＴＣＲアルファプライマー（２７８１）または４ＪＦＨ（ＴＣＲ２）特異的ＴＣＲアルファプライマー（４ＪＦＨ－Ｖα－Ｆ）、及びＴＣＲクローンの独自性をアッセイするためのベクター特異的プライマーを用いて実施した。１：１００のＴＣＲ１／ＴＣＲ２ドナープラスミド比（表７）を用いた試料１（表７）のＴＣＲ１特異的クローンを、ＨＬＡ－Ａ２上に提示されたペプチドＳＬＬＭＷＩＴＱＶ（Ｐｒｏｉｍｍｕｎｅ、製品コード３９０）を使用して選別濃縮した後に、コロニーＰＣＲによってＴＣＲ１クローンの割合を決定したところ、１１／１５（７３％）まで増加した。ＨＬＡ－Ａ２上に

提示されたペプチドＥＬＡＧＩＧＩＬＴＶ（Ｐｒｏｉｍｍｕｎｅ　製品コード０８２）を使用して、１００：１のＴＣＲ１／ＴＣＲ２ドナープラスミド比を用いた試料２（表７）を選別によって濃縮し、コロニーＰＣＲによってＴＣＲ２クローンの割合を決定したところ、４／１５（２７％）まで増加した。

【０３１５】

ヌクレアーゼ指向型組込みを使用したライブラリーの選択を示すために、変異体ＴＣＲベータ鎖をコードする遺伝子レパートリーと共に、変異体ＴＣＲアルファ鎖をコードする遺伝子レパートリーをクローン化することによって、ｃ１２／ｃ２に基づく変異体ライブラリーを創出した。そのようなライブラリーは、オリゴヌクレオチド指向型の変異誘発手法を使用して創出することができ、例えば、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発法［１４４］に基づく方法である。代替として、及び例として、ＰＣＲ構築手法を使用して、変異体ＴＣＲアルファ鎖（Ｎｈｅ１／Ｋｐｎ１断片として）及び変異体ＴＣＲベータ鎖（ＣＭＶプロモーターを含むＫｐｎ／Ｈｉｎｄ３断片として）を創出し、ｐｌＮＴ２０のＮｈｅ１／Ｈｉｎｄ３部位へとクローン化した。これは、表８に示すプライマーを使用して実施した。

【表８】

表８．ライブラリーの構築及びクローンの回収に使用したプライマー

4JFH-Va-F （配列識別番号：104）	ACACACGCTAGCCAGAAAGAGGTGGAACAG
1999 （配列識別番号：87）	AAAAAGCAGGCTACCATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCC
2770 （配列識別番号：105）	CAAAGAACAGCTCGCCGGTSNNCCCGASSNNGGAGCTGGCGCAAAAGTAC
2771 （配列識別番号：106）	CTCGCCCGAAGGTGGGAATGTANGWTCCSNNSNNAAGTGGGCGCACGGCG CAC
2780 （配列識別番号：107）	CTGGCAGCTAGCAAGCAGGAAG
2781 （配列識別番号：108）	TACATTCCCACCTTCGGGCGAG
2782 （配列識別番号：109）	TTTTTTGCGGCCGCGGACAGGTTCTG
2783 （配列識別番号：110）	CGTAAGCTGGTACCTTATTATCTAGGG
2785 （配列識別番号：111）	CCCTAGATAATAAGGTACCAGCTTACG
2787 （配列識別番号：112）	ACCGGCGAGCTGTTCTTTG
2788 （配列識別番号：113）	AGTGACAAGCTTTTATTATCTGGGTG
2789 （配列識別番号：114）	CAGGTCCTCGAGCACTGTC
41679 （配列識別番号：100）	ATGAGTTGGAGCTGTATCATCC

（N＝A、C、G、T。S＝CまたはG、W＝AまたはT）

【０３１６】

変異体オリゴヌクレオチドを設計した（プライマー２７７１）。当該変異体オリゴヌクレオチドは、ｃ１２／ｃ２アルファ鎖のＣＤＲ３内の２つのアミノ酸位置が無作為化されており、別の位置でセリンまたはスレオニンのいずれかの選択肢を与えるものである（プライマー２７７１は、図２５ｇの下側の鎖としても示されている）。プライマー２７７１をプライマー２７８０と併せて使用して、末端に不変配列を有するＣＤＲ３変異誘発領域が組込まれた、Ｎｈｅ１クローン化部位から始まる変異体ＴＣＲアルファのレパートリーを創出した。プライマー２７８１は、プライマー２７７１の不変５’末端に対して相補性である。プライマー２７８１及びプライマー２７８３でのＰＣＲによって、Ｋｐｎ１部位

までであるＴＣＲアルファ－ＣＤ３ゼータカセットの残りが得られた。２つのＰＣＲ断片のＰＣＲ構築を使用して、ＴＣＲアルファ－ＣＤゼータ断片を創出した。当該断片は、Ｎｈｅ１及びＫｐｎ１での消化後に、ｐｌＮＴ２０へとクローン化することができる。

【０３１７】

第２の変異体オリゴヌクレオチド（プライマー２７７０）を設計した。当該変異体オリゴヌクレオチドは、ｃ１２／ｃ２ベータ鎖のＣＤＲ３内の２つのアミノ酸位置が無作為化されており、別の位置でバリンまたはロイシンのいずれかの選択肢を与えるものである（プライマー２７７０は、図２５ｈの下側の鎖としても示されている）。プライマー２７７０をプライマー２７８５と併せて使用し、末端に不変配列を有するＣＤＲ３変異誘発領域が組込まれた、Ｋｐｎ１クローン化部位から始まる変異体ＴＣＲベータのレパートリーを創出した。プライマー２７８７は、プライマー２７００の不変５’末端に相補性である。プライマー２７８７及びプライマー２７８８でのＰＣＲによって、Ｈｉｎｄ３部位までであるＴＣＲベーター－ＣＤ３ゼータカセットの残りが得られた。これら２つのＰＣＲ断片のＰＣＲ構築を使用して、ＴＣＲベーター－ＣＤ３ゼータ断片を創出した。当該断片は、ｐｌＮＴ２０へとクローン化することができる。Ｎｈｅ１／Ｋｐｎ断片、及びＫｐｎ１／Ｈｉｎｄ３断片を、Ｎｈｅ１／Ｈｉｎｄ３で消化したｐｌＮＴ２０へとクローン化することによって、アルファ鎖のＣＤＲ３及びベータ鎖のＣＤＲ３の両方に変異が組込まれた完全なレパートリーを創出した。ライゲーションの後に、ライブラリーをエレクトロコンピテントなＤＨ１０Ｂ細胞へとクローン化した。プラスミドＤＮＡを調製し、前述のように、ＴＡＬＥヌクレアーゼ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ　Ｒ１の等モル混合物　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１）をコードするベクターと併せて、当該ＤＮＡをＨＥＫ２９３細胞へと遺伝子導入した。

【０３１８】

ｃ１２／ｃ２変異体ライブラリーの変異体アルファ鎖及び変異体ベータ鎖をｐｌＮＴ２０へとライゲーションとした後、ＤＮＡをＤＨ１０Ｂ細胞へと電気穿孔した。プラスミドＤＮＡを調製して、ライブラリーをＡＡＶＳ遺伝子座を標的とするＴＡＬＥヌクレアーと共に同時導入した。遺伝子導入は、Ｍａｘｃｙｔｅ電気穿孔を使用して実施した。増殖及び選択は、上記の通り実施した。遺伝子導入細胞の滴定及びプレートに基づくピューロマイシン中での選択によって、ライブラリーサイズを定量化し、これにより、サイズが$5x10^5$であるライブラリーが創出されたことが示された。１１日間のピューロマイシンでの選択の後、マウスＴＣＲのβ鎖に対して特異的なＡＰＣ標識抗体（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　カタログ番号Ｈ５７－９５７）を使用して細胞を標識した。図２６ｉ～ｊは、集団におけるクローンの３８％が、Ｔ細胞受容体を発現していることを示す。このＴＣＲ陽性集団の１３％が、ペプチド１にも結合した（総集団の５％）。この手法によって、発現またはペプチド：ＭＨＣ結合活性が改善したクローンを単離することができる。

【０３１９】

図２６から、それぞれのＴ細胞受容体が、その同種抗原のみを認識したことが見て取れる。さらに、２つの異なる特異性を混合して使用すると、標識抗原を介して、それらのそれぞれを区別することが可能である。この手法によって、親クローンと比較して、標識度合が上昇したライブラリーのサブセットを同定することによって、変異体ＴＣＲライブラリー内で、親和性（または発現）が改善したＴＣＲクローンを区別することも可能になる。

【０３２０】

電気穿孔によって、Ｔ細胞受容体遺伝子をＪｕｒｋａｔ細胞にも導入した。Ｊｕｒｋａｔ細胞を遠心し、製造者の電気穿孔緩衝液（Ｍａｘｃｙｔｅ電気穿孔緩衝液、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　カタログ番号ＮＣ０８５６４２８））に再懸濁し、最終容積を10^8個細胞／ｍｌとした。ＯＣ４００電気穿孔キュベットに、一定分量の$4x10^7$個細胞（０．４ｍｌ）を、４０μｇのＤＮＡ（すなわち、１μｇ／10^6個細胞）と共に添加した。ＤＮＡは、ドナープラスミドＤＮＡ（ｐｌＮＴ２０－ｃ１２／

ｃ２またはｐｌＮＴ２０－４ＪＨＦまたはｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２のＴＣＲライブラリー、９．２μｇ）と、ＡＡＶＳ－ＳＢＩ　ＴＡＬＥＮをコードするＤＮＡ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ　Ｒ１　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１）の等モルＤＮＡ混合物（全部で３０．８μｇ）と、の混合物からなるものを使用した。ＴＡＬＥＮ添加無しの試料では、対照プラスミドｐｃＤＮＡ３．０を使用して、インプットＤＮＡを１μｇ／10^6個細胞とした。代替として、４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ）を使用して、Ｊｕｒｋａｔ細胞へとＴ細胞受容体遺伝子を導入する方法を用いた。当該方法では、ＳＥ細胞株キット（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号ＰＢＣ１－０２２５０）による製造者の説明書に従って、遺伝子導入プロトコールを実施した。簡潔に記載すると、ドナープラスミドＤＮＡ（ｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２またはｐｌＮＴ２０－４ＪＨＦまたはｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２のＴＣＲライブラリー、０．４６μｇ）と、ＡＡＶＳ－ＳＢＩ　ＴＡＬＥＮをコードするＤＮＡ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ　Ｒ１　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１）の等モルＤＮＡ混合物（全部で１．５４μｇ）と、の混合物からなる２μｇのＤＮＡを、10^6個のＪｕｒｋａｔ細胞当たりとなるように遺伝子導入した。パルスコード設定は、ＣＬ１２０とし、細胞型プログラムは、Ｊｕｒｋａｔ　Ｅ６．１（ＡＴＣＣ）細胞に特有なものを使用した。

【０３２１】

図２６は、ＴＣＲ発現が達成されたと共に、適切なペプチド：ＭＨＣ分子の認識が達成されたことを示す。これは、ＴＡＬＥヌクレアーゼの使用に依存するものであった（図２６ｍと図２６ｎとの比較）。関連ペプチド：ＭＨＣ分子を使用して、導入ＴＣＲを介したシグナル伝達も達成された。

【０３２２】

ｐｌＮＴ２０－ｃ１２／ｃ２を遺伝子導入したＪｕｒｋａｔ細胞または非遺伝子導入Ｊｕｒｋａｔ細胞を、９６ウェルプレートに、１ｘ10^6／ｍｌの密度で、ウェル当たり２００μｌ播種した。２μｇ／ｍｌの抗ヒトＣＤ２８（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　カタログ番号５５５７２５）の存在下または非存在下で、ウェル当たり２μｌもしくは６μｌのいずれか量のＰＥ標識ペプチド１－ＭＨＣ５量体（ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ）、または２μｇ／ｍｌの抗ヒトＣＤ３（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　カタログ番号５５５３２９）を使用して、細胞を刺激した。３７℃、５％のCO_2雰囲気下で、２４時間インキュベートした後、ＣＤ６９の発現を調べることによって、Ｊｕｒｋａｔ細胞の活性化を検出した。細胞は、４℃で４５分間、ウェル当たり５０μｌのＰＢＳ＋１％のＢＳＡ＋０．５μｌの抗ヒトＣＤ６９－ＡＰＣ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号ＭＨＣＤ６９０５）で染色した。

【０３２３】

図２６（試料ｏ及び試料ｐ）は、ＣＤ３での刺激に際したＣＤ６９の発現上昇を示す。図は、２μｌ（ｑ）または６μｌ（ｒ）のペプチド１：ＭＨＣの添加効果も示す。ペプチド：ＭＨＣに結合し、ＣＤ６９を発現している二重陽性細胞の集団が明らかに見て取れる。この実施例は、ＣＤ２８の存在下でインキュベートされた細胞を示すものであるが、ＣＤ２８の非存在下でも同一の効果が観測された（未掲載）。

【０３２４】

この実施例は、代替型の結合体、すなわち、Ｔ細胞受容体のライブラリーのヌクレアーゼ指向型組込みの可能性を示すものである。我々は、ＴＣＲを発現させ、特異的抗体を使用して、細胞表面のＴＣＲ発現を検出することが可能であることを示している。我々は、こうしたＴ細胞受容体が、そのそれぞれの標的を特異的に認識することも示している。我々は、変異体ライブラリーも構築し、これによって、改善結合体の選択を可能にした。最終的に、我々は、Ｔ細胞におけるＴＣＲシグナル伝達の活性化に基づく、ライブラリーの選別が可能であることを示した。本明細書で、我々は、培養したヒトＴ細胞株を使用した。Ｍａｘｃｙｔｅ電気穿孔によって、初代Ｔ細胞へＤＮＡを導入することも可能である。初代Ｔリンパ球の単離方法及び調製方法は、当業者に知られている（例えば、Ｃｒｉｂｂ

ｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３、Ｏｅｌｋｅ　ｅｔ　ａｌ．２００３）［１４５、１４６］。ＴＣＲが遺伝子導入されたリンパ球を、多量体であるペプチド：ＭＨＣに対して曝露することで、ペプチド：ＭＨＣ多量体に対する曝露［１４６］または適切なペプチドが負荷された抗原提示細胞に対する曝露［１４６、１４７］のいずれかを介した活性化を達成することができる。活性化は、レポーター遺伝子の発現、またはＣＤ６９などの内在性遺伝子の発現上昇、のいずれかを介して検出することができる［１０４、１４８］。

【０３２５】

実施例１８．哺乳類細胞上でのキメラ抗原受容体ライブラリーのディスプレイ

Ｔ細胞の活性化は、通常、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）と、特異的なペプチド：ＭＨＣ複合体と、の相互作用を介して生じる。次いで、これは、ＣＤ３及び他のＴ細胞シグナル伝達分子を介して指示されるシグナル伝達を引き起こす。ＴＣＲが指示する標的認識の代替として、ｓｃＦｖ（または代替の結合体）が認識する分子に対するＴ細胞活性化を再指示する様式において、単鎖Ｆｖなどの代替結合性分子を、下流シグナル伝達分子との融合体として、Ｔ細胞上に提示することができることが示された。このように、Ｔ細胞活性化は、もはや、ペプチド：ＭＨＣ複合体を対象としたＴＣＲによる分子認識に限定されるものではなく、他の細胞表面分子を対象にすることができる。非ＴＣＲ結合実体が、シグナル伝達成分に融合しているこの代替形式は、「キメラ抗原受容体（ｃｈｉｍｅｒｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ）」（ＣＡＲ）と称される。Ｔ細胞の場合は、これは、Ｔ細胞活性化を再指示する、重要かつ有用な手段であることが示されてきた。

【０３２６】

ＣＡＲへと取り込まれるためには、任意の所与の標的にどのような最適エピトープまたは親和性特徴が備わっているべきであるかは未だ明らかではない［１０３］。リンカーの長さなどのＣＡＲ設計の特徴、または膜貫通ドメインの選択は、最適エピトープを構成するものに影響を与え得るものである。標的細胞上及び非標的細胞上の抗原密度と、シグナルドメインの選択と、を組み合わせることで、最適親和性の必要事項に影響を与えることができる。Ｔ細胞上にキメラ抗原受容体のライブラリーを提示する能力は、最適な結合特異性、結合形式、リンカーの長さ／配列、シグナル伝達分子と融合した変異体等の１つまたは複数を同定する機会を与えるものである。本明細書で、我々は、哺乳類細胞におけるキメラ抗原受容体ライブラリーの構築に向けた、ヌクレアーゼ指向型組込みの有用性を示している。ベクターｐｌＮＴ２１（図２７ａ）は、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１制限酵素部位と隣接するｓｃＦｖなどの結合体の簡便な発現及び分泌に向けた、単一のＣＭＶプロモーターを有するベクターであり、上流のリーダー配列及び下流の融合パートナーのインフレーム発現を可能にするものである（先に図８に示したとおり）。ｐｌＮＴ２１におけるＣＡＲ発現カセットは、先に図３に記載したようにＡＡＶＳホモロジーアームと隣接している。

【０３２７】

ベクターｐｌＮＴ２１－ＣＡＲ１（図２７ａ及び図２７ｃ）は、単鎖Ｆｖなどの結合体を、ＣＤ３ζの膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインに融合させるものである（図２７ｃ及び図２５でＴＣＲ発現に向けて記載したとおり）。この形式は、「第１世代」のキメラ抗原受容体と称されることが多い。他の同時刺激分子に由来するシグナル伝達ドメインも追加シグナルを与えるために使用されており、こうしたものは、シグナル伝達を改善することが示された。こうしたものは、第２世代及び第３世代のキメラ抗原受容体と称される。例えば、ｐｌＮＴ２１－ＣＡＲ２（図２７ｂ、図２７ｄ）は、結合体（この場合、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１断片として簡便にクローン化される）を、以前に説明した第２世代のドメイン（ＷＯ２０１２／０７９０００Ａ１）に融合するものであり、当該ドメインは、

ＣＤ８に由来するヒンジドメイン及び膜貫通ドメインと、

４－１ＢＢシグナル伝達ドメインと、

ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインと、

からなる。

【０３２８】

例として、数多くの異なる結合体群をｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ１及びｐｌＮＴ２０－ＣＡ

Ｒ２のＮｃｏ／Ｎｏｔ１部位にクローン化した。ＣＤ１９は、これまでに、Ｂ細胞悪性腫瘍を標的とする数多くの異なる研究に使用されており、Ｓａｄｅｌａｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）［１０３］においてそうした研究が引用されている。以前に説明した抗ＣＤ１９抗体（ＷＯ２０１２／０７９０００Ａ１）（ＦＭＣ６３と呼ばれる）は、ＶＨ－リンカー－ＶＬの配置またはＶＬ－リンカー－ＶＨの配置のいずれかにおいて、合成ｓｃＦｖ遺伝子として調製し（それぞれＦＭＣ６３　Ｈ－ＬまたはＦＭＣ　Ｌ－Ｈ）、図２７Ｅは、ＦＭＣ６３　Ｈ－Ｌの配列を示す。ＦＭＣ６３　Ｌ－Ｈは、５’末端及び３’末端で、それぞれＮｃｏ１及びＮｏｔ１と隣接する、ＶＬ－リンカー－ＶＨの配置の可変ドメインで形成した。

【０３２９】

対象として、代替の結合特異性を有するｓｃＦｖもｐｌＮＴ２０へとクローン化した。こうしたものには、抗－ＦＧＦＲ１＿Ａ［１０５］及び抗デスミン対照抗体［７］が含まれる。さらに、ＣＡＲ融合体として形成された代替結合体形式の例として、ｌｏｘ１を認識するＡｄｈｉｒｏｎ［１５２］（図２９ａ及び２９ｂ）を導入した（説明は実施例１９を参照のこと）。

【０３３０】

ＣＡＲ形式で提示される結合体ライブラリーの創出を示すために、メソセリン及びＣＤ２２９で選択されたｓｃＦｖ編成抗体の集団をクローン化した。メソセリンは、中皮腫を含む数多くの癌において高度に発現する細胞表面糖タンパク質である。メソセリンを対象とするＣＡＲを含む、抗体に基づく形式の多くが開発中、及び臨床試験中である［１４９］。ＣＤ２２９は、別の潜在的な腫瘍関連抗原に相当するものであり、これは、慢性リンパ性白血病及び多発性骨髄腫などの癌における免疫療法によって標的とされる可能性があるものである［１５０、１５１］。

【０３３１】

実施例６及び参考文献７において説明されるように、「ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ」ファージディスプレイライブラリーを使用した選択によって、メソセリンまたはＣＤ２２９のいずれかを認識する抗体集団を創出した。２ラウンドの選択を実施し、プライマーＭ１３ｌｅａｄｓｅｑ及びプライマーＮｏｔｍｙｃｓｅｑ（実施例６）を使用して、ｓｃＦｖをコードする遺伝子を回収した。増幅産物は、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１で切断してからゲルで精製し、ｐｌＮＴ２１－ＣＡＲ２へとクローン化した。ＴＡＬＥヌクレアーゼ切断によって、こうしたものをＨＥＫ２９３細胞のＡＡＶＳ遺伝子座に向けて導入し、ＣＤ２２９向けには、４．８ｘ１０^{5}のライブラリー、メソセリン向けには、６．４ｘ１０^{5}のライブラリーを生成させた（これは、ＴＡＬＥヌクレアーゼの非存在下で遺伝子導入した試料と比較して、ライブラリーサイズが３０倍及び５３倍に増加したことを示すものである）。

【０３３２】

ＰＥＩでの遺伝子導入によって、ｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ１及びｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ２をＨＥＫ２９３細胞に導入した。ここでは、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ２９３培地（Ｌｉｆｅｔｅｃｈ、カタログ番号１２３３８－０２６）中のドナープラスミドＤＮＡ（６μｌのｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ１またはｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ２と、ＡＡＶＳ－ＳＢＩ　ＴＡＬＥＮ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ　Ｒ１　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１）をコードするＤＮＡの等モルＤＮＡ混合物（全体で２０μｇ）と、の混合物）に、直鎖状ＰＥＩ（５２μｌ、１ｍｇ／ｍｌ、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．）を添加し、室温で１０分間インキュベートした。その後、当該混合物を、２０ｍｌのＨＥＫ２９３懸濁細胞（１ｘ１０^{6}個細胞／ｍｌ）を含む１２５ｍｌの通気（ｖｅｎｔｅｄ）三角フラスコに添加した。ｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ１及びｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ１は、電気穿孔によってＪｕｒｋａｔ細胞にも導入した。Ｊｕｒｋａｔ細胞を遠心し、製造者の電気穿孔緩衝液（Ｍａｘｃｙｔｅ電気穿孔緩衝液、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　カタログ番号　ＮＣ０８５６４２８））に再懸濁し、最終濃度を１０^{8}個細胞／ｍｌとした。一定分量の４ｘ１０^{7}個の細胞（０．４ｍｌ）を４０μｇのＤＮＡ（すなわち、１μｇ／１０^{6}個細胞）と共にＯＣ４００電気穿

孔キュベットに添加した。ＤＮＡは、ドナープラスミドＤＮＡ（ｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ１及びｐｌＮＴ２０－ＣＡＲ２、９．２μｇ）と、ＡＡＶＳ－ＳＢＩ　ＴＡＬＥＮ（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳ　Ｒ１　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　カタログ番号ＧＥ６０１Ａ－１）をコードするＤＮＡの等モルＤＮＡ混合物（全部で３０．８μｇ）と、の混合物からなるものを使用した。ＴＡＬＥＮ添加無しの試料では、対照プラスミドｐｃＤＮＡ３．０を使用して、インプットＤＮＡを１μｇ／10^6個細胞とした。

【０３３３】

Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ　Ｒａｐｉｄ　Ｄｙｅ－Ｌｉｇｈｔ　６３３結合キット（Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号３２５－００１０）を使用して、様々な抗原の蛍光標識を実施した。ＦＧＦＲ１及びＦＧＦＲ２の調製は、実施例１５で説明されている。Ｌｏｘ１及びＣＤ２２９は、Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（それぞれ、カタログ番号１７９８－ＬＸ－０５０、及びカタログ番号８９８－ＣＤ０５０）から入手し、ＣＤ１９－Ｆｃ及びメソセリンは、（それぞれ、ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　カタログ番号ＣＤ９－Ｈ５２５９、及びカタログ番号ＭＳＮ－Ｈ５２６ｘ）から入手した。

【０３３４】

図２８ｂは、第２世代のＣＡＲ構築物（ｐｌＮＴ２１－ＣＡＲ２－ＦＧＦＲ１＿Ａ）内のヌクレアーゼ指向型抗ＦＧＦＲ１抗体［１０５］のディスプレイを示す。図２８ｄでは、第２世代のキメラ抗原受容体（ｐｌＮＴ２１－ＣＡＲ２－ｌｏｘ１）との融合体としての、代替骨格分子（Ａｄｈｉｒｏｎ、参考文献［１５２］）のディスプレイについても示している。図２８ｆ及び図２８ｇでは、メソセリンまたはＣＤ２２９で選択されたｓｃＦｖライブラリー内の陽性クローンについても示している。

【０３３５】

この実施例では、ＨＥＫ細胞及びＪｕｒｋａｔ細胞へとＣＡＲを導入したが、これは、例えば、電気穿孔を使用して［１３５］、（例えば、Ｓａｄｅｌａｉｎｅら（２０１３）［１０３］によって説明されるように）ヒトＴリンパ球などの初代細胞へ構築物を導入することによって、同様に実施することができる。リンパ球におけるＣＡＲ発現に向けた発現構築物は、以前に説明されたように、例えば、５’側及び３’側の非翻訳領域、ポリＡの長さ等の多様性を介して、ｍＲＮＡの安定性及び翻訳を最適化することによって最適化され得る［１３５］。初代Ｔリンパ球またはＴリンパ球細胞株へと導入されたＴＣＡＲ構築物のシグナル伝達は、標的抗原を発現する細胞への曝露によって誘導するか、または例えば、表面に固定化された抗原もしくはビーズ上に提示された抗原といった多量体抗原を使用して誘導することができる［１０４、１４８］。

【０３３６】

実施例１９．ヌクレアーゼ指向型組込みを介して哺乳類細胞で構築された代替骨格ライブラリーのディスプレイ

結合体ライブラリーの構築に向けて説明される方法は、抗体及びＴ細胞受容体のディスプレイにとどまることなく、それを超えて用いることができる。数多くの代替骨格について説明されたことで、変異体ライブラリーの構築が可能になり、そこから新規の結合特異性が単離された。これは、例えば、Ｔｉｅｄｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）［１５２］及び当該文献中の参考文献において説明されている。Ｔｉｅｄｅら（２０１４）によって説明された例では、植物から得られたフィトシスタチン（ｐｈｙｔｏｃｙｓｔａｔｉｎ）に由来するコンセンサス配列に基づく安定な多用途骨格が使用された。この骨格は、Ａｄｈｉｒｏｎと称され、図２９ａは、ｌｏｘ１に結合するように選択されたＡｄｈｉｒｏｎをコードする合成遺伝子を示す（ＷＯ２０１４１２５２９０Ａ１）。図２９Ｂは、代替のｌｏｘ１結合体（ｌｏｘ１Ｂ）を示す。両方を合成し、ｐｌＮＴ２０＿ＣＡＲ２のＮｃｏ１／Ｎｏｔ１部位へとクローン化し、下流に存在するパートナーとの融合体を創出した。

【０３３７】

ライブラリーは、（例えば、Ｋｕｎｋｅｌ変異誘発法または実施例１７において上に記

載したＰＣＲ構築によって）ループ残基を無作為化することによって構築することができる。例として、図２９ｃは、実施例１７において記載したものと同一手法を実施した後のライブラリー構築に有用でである変異体オリゴヌクレオチドの設計を示す。この場合、無作為化は、可変数のＮＮＳ残基を導入することによって達成されるが、当業者に知られる代替方法を使用することができる。

【０３３８】

別の実施例として、図２９ｄ及び２９ｅは、ヌクレアーゼ指向型組込みによって、ノッチン骨格［１５６］に基づく結合体のライブラリーを創出する手段を示す。ノッチンは、約３０個のアミノ酸のペプチドであり、当該ペプチドは３つのジスルフィド結合によって安定化されており、１つが残りの２つを通り抜けて「結び目（ｋｎｏｔｔｅｄ）」構造を創出しているものである。図２９ｄは、トリプシン結合ノッチンＭＣｏＴＩ－ＩＩを示し、５’末端にＮｃｏ１部位、及び３’末端にＮｏｔ部位を有することで、本明細書に記載のベクターでのインフレーム発現を可能にするものである。ライブラリー構築に向けた実施例として、第１ループ（図２９ｄの下線部）の６個のアミノ酸を変異させ、可変数のアミノ酸を有する形とすることができる。図２９ｅは、コドンＶＮＳ（Ｖ＝Ａ、ＣまたはＧ、Ｓ＝ＣまたはＧ）を使用して、ループ１の６個のアミノ酸を１０個の無作為化アミノ酸で置き換える変異誘発方針を示す。ＶＮＳコドンは、システインを除く１７個のアミノ酸をコードする２４個のコドンを包含するものである。この方針は、例示目的のみのものであり、当業者であれば、代替の変異誘発方針を知っているであろう。

【０３３９】

実施例２０．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用した抗体ライブラリーのヌクレアーゼ指向型導入

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を介したヌクレアーゼ指向型組込みは、「Ｇｅｎｅａｒｔ ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼベクターキット」（Ｌｉｆｅｔｅｃｈ Ａ２１１７５）を使用して実施した。このシステムでは、Ｕ６ ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターが、標的に対して相補性であるＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の発現を推進し、当該相補性ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に連結される。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、同一「ＧｅｎｅＡｒｔ ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼベクター」（製造者の説明書を参照のこと）上にコードされるＣａｓタンパク質の切断特異性を指示するガイドＲＮＡを共に作り出すものである。ベクターは、適切な３’突出部を有する短い二本鎖オリゴヌクレオチドがクローン化された直鎖化プラスミドとして提供される。切断特異性は、クローン化された区間の配列によって決定される。上記のヒトＡＡＶＳ遺伝子座の切断を指示するために、２つの異なる標的化配列を設計した。

当該配列は、下記のとおりである。

ＣＲＩＳＰＲ１二本鎖ＤＮＡ挿入断片

５’ ＧＧＧＧＣＣＡＣＴＡＧＧＧＡＣＡＧＧＡＴＧＴＴＴＴ（配列識別番号：１１５）

３’ ＧＴＧＧＣＣＣＣＣＧＧＴＧＡＴＣＣＣＴＧＴＣＣＴＡＣ（配列識別番号：１１６）

ＣＲＩＳＰＲ２二本鎖ＤＮＡ挿入断片

５’ ＧＴＣＡＣＣＡＡＴＣＣＴＧＴＣＣＣＴＡＧＧＴＴＴＴ（配列識別番号：１１７）

３’ ＧＴＧＧＣＣＡＧＴＧＧＴＴＡＧＧＡＣＡＧＧＧＡＴＣ（配列識別番号：１１８）

【０３４０】

得られたガイドＲＮＡは、上記のＴＡＬＥヌクレアーゼと同一のＡＡＶＳ領域内での切断を標的とするものである（ＣＲＩＳＰＲ２は、ＣＲＩＳＰＲ１とは逆配向である）。したがって、発現カセットの組込みを指示するために、先に使用したＡＡＶＳホモロジーアームを、こうしたＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡが指示する組込みに使用することができる。直鎖化ベクター及び二本鎖オリゴヌクレオチドを連結し、エレクトロコンピテントなＤＨ

１０Ｂ細胞へと形質転換した。挿入断片が正しくクローン化されたかを配列決定によって確認し、プラスミドＤＮＡを調製した。Ｃａｓ９／ＣＲＩＳＰＲ２構築物（ＣＲＩＳＰＲ２オリゴヌクレオチドを包含する）をドナーＤＮＡと共に遺伝子導入した。当該ドナーＤＮＡは、１段階のファージディスプレイでの選択によって選択したβ－ガラクトシダーゼライブラリー（実施例１５）をコードするものである。こうしたものを、ＯＣ－４００組立品（ａｓｓｅｍｂｌｙ）と共にＭａｘｃｙｔｅ電気穿孔システムを使用して、ＨＥＫ２９３細胞へと遺伝子導入した。４ｘ１０^{7}個の細胞に、２３．２μｇのドナーＤＮＡを遺伝子導入した。当該ドナーＤＮＡは、β－ガラクトシダーゼでの１ラウンドのファージディスプレイによって選択され、ｐＤ６にクローン化されたｓｃＦｖ遺伝子の集団に相当するものである。細胞に、７７μｇのＣａｓ９－ＣＲＩＳＰＲ２プラスミド、または７７μｇのＴＡＬＥＮプラスミド（ｐＺＴ－ＡＡＶＳ１　Ｌ１及びｐＺＴ－ＡＡＶＳをそれぞれ３８．５μｇ）または７７μｇの対照プラスミドのいずれかを同時導入した。

【表９】

表9

試料番号	使用ヌクレアーゼ	遺伝子導入効率%	10^{10}個の細胞当たりのクローン数
1	Cas9/CRISPR 2	10.53 (29x)	10 x 10^{8}
2	AAVS TALEN	51 (14x)	5.1 x 10^{8}
3	無し(pCDNA3.0)	0.36	0.36 x 10^{8}

【０３４１】

Ｃａｓ９／ＣＲＩＳＰＲ２の遺伝子導入によって形成された形質転換体数の滴定（ブラストサイジン耐性コロニーの測定による）によって、播種した１０，０００個の細胞から１０５３個のブラストサイジン耐性コロニーが生成したことが明らかとなり、これは、１０．５％の遺伝子導入効率に相当するものであった（表９）。ＴＡＬＥヌクレアーゼ指向型遺伝子導入の場合では、５．１％の遺伝子導入効率を達成した。対照的に、Ｃａｓ９／ＣＲＩＳＰＲ２構築物が存在しない場合、達成遺伝子導入効率は、僅か０．３６％であった。

【０３４２】

Ｃａｓ９タンパク質及びガイドＲＮＡを細胞へと導入するための、プラスミドＤＮＡを使用した遺伝子導入に代わるものとして、Ｃａｓ９タンパク質（Ｔｏｏｌｇｅｎ，Ｉｎｃ．）及びガイドＲＮＡからなる核タンパク質複合体を直接的に導入することも可能である。ガイドＲＮＡは、単一転写物として、Ｔ７プロモーターに由来する試験管内転写を使用して、Ｔｏｏｌｇｅｎ，Ｉｎｃ．によって調製された。当該単一転写物には、以下に示すとおり、標的ＤＮＡ（太字）に対する相補性配列が先行する形で、ＴＲＡＣＲ配列（下線有り）が導入されている［訳者注：四角で囲まれている下記配列箇所は、ＰＣＴ／ＧＢ２０１５／０５１２８７では太字である］。

ＣＲＩＳＰＲ１　ＲＮＡ（配列識別番号：１１９：

５’

ＧＧＧＧＧＧＣＣＡＣＵＡＧＧＧＡＣＡＧＧＡＵ［ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ］

ＣＲＩＳＰＲ２　ＲＮＡ（配列識別番号：１２０）

５’ＧＧＧＵＣＡＣＣＡＡＵＣＣＵＧＵＣＣＣＵＡＧ［ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ］

上記のように、Ｍａｘｃｙｔｅ電気穿孔によって、６．６μｇのＣｓ９タンパク質、４．６μｇのＲＮＡ、及び１０μｇのドナーＤＮＡ（ｐＤ６中で抗ＦＧＦＲ１＿Ａ抗体をコ

ードする）を10^7個のＨＥＫ２９３細胞へと導入した。ＣＲＩＳＰＲ１　ＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ２　ＲＮＡで達成した遺伝子導入効率は、それぞれ２．２％及び２．９％であり、Ｃａｓ９：ＲＮＡタンパク質複合体を添加しなかった場合では、それぞれ０．７％及び０．８％であった。

【０３４３】

こうしたガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ１及びＣＲＩＳＰＲ２によってコードされるものと同一の配列を標的とする。代替として、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを化学合成によって作成することができる（例えば、ＧＥ　Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）。

【０３４４】

実施例２１：ライゲーションまたはマイクロホモロジー媒介性末端結合（ＭＭＥＪ）によるヌクレアーゼ媒介性の抗体遺伝子挿入

相同組換え（ＨＲ）は、大きなＤＮＡ断片の正確な挿入に有用であるが、これには、長いホモロジーアームが組込まれた大きな標的化ベクターの構築が必要である。このことは、大きなライブラリーの構築を難化し得るものであり、これは、ＤＮＡ構築物が大きくなると形質転換効率が減少するためである。あるいは、ヌクレアーゼ認識配列が、標的化ベクターへと組込まれているのであれば、染色体ＤＮＡと、標的化ベクターとの間で単純なライゲーション反応を生じさせることができる。ライゲーション反応は、例えば、５’突出部を残す二本鎖切断（ＤＳＢ）を作ることができるジンクフィンガーヌクレアーゼ（Ｏｒｌａｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）［４５］もしくはＴＡＬＥＮ（Ｃｒｉｓｔｅａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）［２２］を用いた「粘着末端」、またはＣＲＩＳＰ／Ｃａｓ９リボ核タンパク質を用いた「平滑末端」のいずれかで生じ得る。ベクターｐＤ７－Ｓｃｅ１の構築によって、Ｉ－ＳｃｅＩメガヌクレアーゼを使用したライゲーションによる、ヌクレアーゼでの遺伝子組込みの実施例を示した。ｐＤ７は、ｐＤ６（図８）から得られたものであるが、左右のＡＡＶＳホモロジーアームを短い二本鎖オリゴヌクレオチドによって置き換えたものである。ｐＤベクターシリーズの左ＡＡＶＳホモロジーアームは、ＥｃｏＲＩ及びＮｓｉＩの制限酵素と隣接している（図３参照）。ｐＤ６からｐＤ７－Ｓｃｅ１へと変換するために、プライマー２７７８及びプライマー２７７９によって形成した二本鎖オリゴヌクレオチドの挿入断片によって、左ＡＡＶＳホモロジーアームを置き換えた。当該挿入断片は、ＥｃｏＲＩ／ＮｓｉＩによって形成される「粘着末端」と互換性である「粘着末端」を有するＩ－ＳｃｅＩメガヌクレアーゼ認識配列をコードするものである。右側ＡＡＶＳホモロジーアームは、Ａｓｃ１及びＭｌｕ１の制限酵素部位と隣接している（図３）。右ホモロジーアームは、ＡｓｃＩ／ＭｌｕＩ消化によって形成される「粘着末端」と互換性である「粘着末端」を有する二本鎖オリゴヌクレオチドの挿入断片によって置き換えた。当該挿入断片は、プライマー２７２３及びプライマー２７２４によって形成したものである。

【表１０】
表１０．ｐＤ７及びｐｌＮＴ１９の構築用プライマー

2723 (配列識別番号121)	CGCGCCAGAAGTCTCACCAAGCCCA
2724 (配列識別番号122)	CGCGTGGGCTTGGTGAGACTTCTGG
2768 (配列識別番号123)	AATTCTCCCCTCCACCCCACAGT［AGGGACAGTGGGGCC］AGGATTGGTGACAGAAAATGCA
2769 (配列識別番号124)	TTTTCTGTCACCAATCCTGGCCCCACTGTCCCTACTGTGGGGTGGAGGGGAG
2778 (配列識別番号125)	AATTCTAGGGATAACAGGGTAATATGCA
2779 (配列識別番号126)	TATTACCCTGTTATCCCTAG
2808 (配列識別番号127)	AATTCTTTTCTGTCACCAATCCTGGGGCCACTAGGGACACTGTGGGGTGGAGGGGATGCA
2809 (配列識別番号128)	TCCCCTCCACCCCACAGTGTCCCTAGTGGCCCCAGGATTGGTGACAGAAAAGAATTG

【０３４５】
Ｆｇｆｒ１及びＦｇｆｒ２を認識する抗体（実施例１５）をｐＤ７へとクローン化し、ｐＤ７－ＳｃｅＩ抗Ｆｇｆｒ１及びｐＤ７－ＳｃｅＩ抗Ｆｇｆｒ２をそれぞれ創出した。これらを、Ｉ－Ｓｃｅ１発現プラスミド（実施例１１、図１６）と共に、組込みＩ－Ｓｃｅ１認識部位を含むＨＥＫ２９３クローン６Ｆ細胞株（実施例１１参照）へと同時導入した。

【０３４６】
染色体及び標的化ベクターにおいて、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはＴＡＬＥヌクレアーゼによって生成したＤＳＢのライゲーションも達成することができる。標的化ベクター上のジンクフィンガーヌクレアーゼ認識部位またはＴＡＬＥＮ認識部位を反転させることによって、「偏性ライゲーションでゲートされた相同組換え（Ｏｂｌｉｇａｔｅ ｌｉｇａｔｉｏｎ－ｇａｔｅｄ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ）」またはＯｂＬｉＧａＲｅ（Ｍａｒｅｓｃａ ｅｔ ａｌ．，２０１３）［１５３］と命名された方法において、挿入による産物がもはや切断の標的とならないことを確実にすることができる。ｐＤ７－ＯｂＬｉＧａＲｅベクターは、ｐＤ７－Ｓｃｅ１の創出に向けて上で記載したものと同一の方法で生成させることができる。この場合、左側ホモロジーアームは、反転したＴＡＬＥＮ認識部位（太字で示される）及びスペーサー領域をコードする、プライマー２８０８及びプライマー２８０９からなるオリゴヌクレオチドによって置き換える。［訳者注：四角で囲まれている配列箇所は、ＰＣＴ／ＧＢ２０１５／０５１２８７では太字である］。右側ホモロジーアームは、プライマー２７２３及びプライマー２８０９によって、上記のように置き換える。

【０３４７】
染色体のＤＳＢと、標的化ベクターのＤＳＢとの間の単純なライゲーション反応は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって媒介されるものがあるが、これに代わるものとしては

、相同媒介性末端結合（ＭＭＥＪ）がある。ＭＭＥＪは、エラープローン末端結合に向けて、５～２５ｂｐのマイクロホモロジー配列を使用するＤＳＢの修復機構である（ＭｃＶｅｙ　ａｎｄ　Ｌｅｅ，２００８）［１５４］。正確な遺伝子組込みに向けた方針が考案され、これは、ゲノム配列及び標的化ベクターは同一のＴＡＬＥヌクレアーゼペア認識配列を含むが、前方半分と、後方半分とが交換された異なるベクタースペーサー配列を含むというものである。ゲノム配列及びベクターは、同一のＴＡＬＥＮペアで切断することができ、マイクロホモロジーを有するＤＮＡ末端を介してＭＭＥＪが起こる。得られる組込み標的化ベクターは、もはやＴＡＬＥヌクレアーゼの標的とはならず、これは、短化したスペーサー領域は、ＴＡＬＥヌクレアーゼによる切断に最適ではないためである（Ｎａｋａｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）［１５５］。

【０３４８】

ＭＭＥＪ　ＡＡＶＳ標的化ベクターであるｐＤ７－ＭＭＥＪは、ｐＤ７－Ｓｃｅ１の創出に向けて上で説明したものと同一の方法で創出することができる。この場合、左側ホモロジーアームを、ＴＡＬＥＮ認識部位（太字で示される）及び交換したスペーサー領域（下線で示される）をコードする、プライマー２７６８及びプライマー２７６９からなるオリゴヌクレオチドによって置き換える[訳者注：四角で囲まれている配列箇所は、ＰＣＴ／ＧＢ２０１５／０５１２８７では太字である］。右側ホモロジーアームは、プライマー２７２３及びプライマー２８０９を使用して、上記のように置き換える。

【０３４９】

実施例２２：ＲＯＳＡ２６アームと隣接する単一（ＣＭＶ）プロモーターカセットの創出に向けたプライマーの設計（ｐｌＮＴ１９－ＲＯＳＡ）

この実施例は、ヌクレアーゼ指向型の方法によって、哺乳類細胞のゲノムへと抗体または代替結合性分子の遺伝子を組み込むことができ、レポーターまたは表現型のいずれかによる選別によって、所望の機能で選別されたクローンが得られることを示すことを意図する。この実施例は、以前に示されており、これは、抗体遺伝子がマウス胚性幹（ＥＳ）細胞の染色体へと組込まれており、個々のＥＳコロニーを異なる条件に供した際の多能性を維持する能力で選別するというものであった［１０５］。多能性の表現型を維持したＥＳコロニーから回収された抗体遺伝子は、ＦＧＦＲ１／ＦＧＦ４シグナル伝達経路を遮断することが示された。以前に報告されたこの方法に関する問題は、相同組換えによってもたらされるライブラリーのサイズが小さくあり得るということであり、したがって、大きな結合性分子ライブラリーに存在する稀なクローンを直接的に選別するというその能力を限定するものである。抗体及び結合性分子の遺伝子組込みに向けた、ヌクレアーゼ媒介性の遺伝子組込み方法は、より効率的であることで、生成するライブラリーサイズが大きくなり、それによって、表現型またはレポーター細胞での選別による機能性抗体の同定が可能である哺乳類細胞ライブラリーを生成する可能性が上昇する。

【０３５０】

ドナー標的化ベクターであるｐｌＮＴ１９は、直接的な機能選別に向けて、ヌクレアーゼ指向型の方法によって、抗体遺伝子をマウスＲＯＳＡ２６遺伝子座へと導入するために設計されている。ｐｌＮＴ１９は、ｓｃＦｖ－Ｆｖ融合体の発現に向けた単一ＣＭＶプロモーターのベクターである。発現カセットは、マウスＲＯＳＡ２６アームと隣接している。上流エクソンが翻訳されないため、スプライスアクセプターがピューロマイシン遺伝子に先行しており、さらに下流に、ピューロマイシン遺伝子へと繋がるコザック（ＫＯＺＡＫ）配列を有する。

【０３５１】

ｐｌＮＴ１８のＡＡＶＳ左ホモロジーアーム及びピューロマイシン耐性遺伝子を、ＲＯＳＡ２６左ホモロジー、スプライスアクセプター、最適化されたコザックコンセンサス配列、及びピューロマイシン耐性遺伝子をコードするカセットによって置き換えた。ＲＯＳＡ２６左ホモロジーアームは、内部のＮｏｔＩ部位をノックアウトした２つの断片として、ｐＧＡＴＯＲ（Ｍｅｌｉｄｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３（１０５））から最初に増幅した。２つの断片は、プライマーＪ６０／２７１６及びプライマー２７１５／２７０６

によって生成させたものであり、プライマーＪ６０及びプライマー２７０６を使用した構築ＰＣＲで結合させ、ＡｓｉＳＩ及びＮｓｉＩで消化した。スプライスアクセプターは、プライマー２７０９及びプライマー２７１０を使用してｐＧＡＴＯＲから増幅し、ピューロマイシン耐性カセットは、プライマー２７４５（スプライスアクセプター及び最適化コザックコンセンサスに対して相同性である領域を含む）ならびにプライマーＪ５９を使用して増幅した。スプライスアクセプター領域及びピューロマイシン耐性カセットは、プライマー２７０９及びプライマーＪ５９を使用した構築ＰＣＲで結合し、Ｎｓｉ１及びＢｇｌ２で消化した。ＲＯＳＡ２６左アームホモロジー及びスプライスアクセプター－ピューロマイシンカセットは、ｐｌＮＴ１８（ＡｓｉＳ１／Ｂｇｌ２）ベクターと連結した。

【０３５２】

ＲＯＳＡ標的化ベクターを完成させるため、ＣＭＶ－ｓｃＦｖ－Ｆｃカセットの下流に、導入し、ｐｌＮＴ１８　ＡＡＶＳ右ホモロジーアームと置き換えた。これは、プライマーＪ６１及びプライマーＪ６２を使用した、ｐＧＡＴＯＲ（Ｍｅｌｉｄｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）に存在するＲＯＳＡ右ホモロジーアームのＰＣＲによって実施し、一方にＢｓｔＺ１７１及びもう一方にＳｂｆ１を有する断片を増幅した。プライマー６１は、ＲＯＳＡ　ＺＦＮ切断部位から上流６５ｂｐに位置する内在性Ｓｂｆ１部位を除外するように位置させた。図３１は、ＲＯＳＡ２６左ホモロジーアーム及びＲＯＳＡ２６右ホモロジーアームの配列を示す。

【表１１】

表１１．マウスＲＯＳＡ２６遺伝子座のヌクレアーゼ指向型の標的化に向けたプライマー

J60 (配列識別番号:129)	ACACACGGTACCGCGATCGCGCTGATTGGCTTCTTTTCCTC	AsiSI-rosa26-L-F
2706 (配列識別番号:130)	TTTTTTATGCATTCTAGAAAGACTGGAGTTGCAGA	NsiI-rosa26-L-R
2715 (配列識別番号:131)	GAGCGTCCGCCCACCCTC	ROSA-Left-NotI_knockout_F
2716 (配列識別番号:132)	GAGGGTGGGCGGACGCTC	ROSA-Left-NotI_knockout_R
2709 (配列識別番号:133)	TTTTTTATGCATTAAGGGATCTGTAGGGCGCAG	Splice_acceptor-F-NsiI
2710 (配列識別番号:134)	GTGAATTCCTAGAGCGGCCTC	Splice_acceptor-R
2745 (配列識別番号:135)	GAGGCCGCTCTAGGAATTCACGCCGCCACCATGACCGAGTACAAGCCCAC	Overlap-Puro-F+kozak
J59 (配列識別番号:136)	AAAAAAAGATCTGTGTGTTTCGAATCAGGCACCGGGCTTGCGGGTCAT	Bgl2-Puro-R
J61 (配列識別番号:137)	tttttttGTATACGGGAATTGAACAGGTGTAAAATTG	ROSA-Right_F-BstZ171
J62 (配列識別番号:138)	TTTTTTCCTGCAGGAGGTTGGATTCTCAATACATCTATTGTTG	ROSA-Right_R-SbfI
2701 (配列識別番号:139)	GCCGACGTCTCGTCGCTGATGTTTT	
2702 (配列識別番号:140)	ATCAGCGACGAGACGTCGGCCGGTG	
2703 (配列識別番号:141)	CGCCCATCTTCTAGAAAGACGTTTT	
2704 (配列識別番号:142)	GTCTTTCTAGAAGATGGGCGCGGTG	

【０３５３】

抗体または代替結合性分子をコードするｐｌＮＴ１９の、マウスＲＯＳＡ２６遺伝子座への組込みは、実施例２０に記載したように、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用した、抗体ライブラリーのヌクレアーゼ指向型導入によって達成することができる。本明細書では、「Ｇｅｎｅａｒｔ　ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼベクターキット」（Ｌｉｆｅｔｅｃｈ　Ａ２１１７５）を使用して、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を介したヌクレアーゼ指向型組込みを示すことができる。このシステムでは、Ｕ６　ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターが

、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に連結された標的相補性ＣＲＩＰＳＲＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の発現を推進する。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡが共にガイドＲＮＡを作り出し、当該ガイドＲＮＡは、同一の「ＧｅｎＡｒｔ　ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼベクター」（製造者の説明書を参照のこと）上にコードされるＣａｓ９タンパク質の特異的切断を指示する。ベクターは、適切な３’末端部を有する短い二本鎖オリゴヌクレオチドがクローン化された直鎖化プラスミドとして提供される。そして、切断特異性は、クローン化された区間の配列によって決定される。プライマー２７０１／２７０２及びプライマー２７０３／２７０４（表１０参照）によってコードされる２つの異なる標的化配列を設計し、マウスＲＯＳＡ２６の切断を指示した。

【０３５４】

代替として、ＲＯＳＡ２６遺伝子座内を切断するジンクフィンガーヌクレアーゼについて説明されている［３４］。こうしたものは、Ｓｃｅ－Ｉメガヌクレアーゼ向けに記載したように（図１６、実施例１１）、適切な発現ベクターにおいて構築することができる。

【０３５５】

ドナープラスミドｐｌＮＴ１９のヌクレアーゼ媒介性組込みは、内在性の受容体またはリガンドに結合することができる分泌抗体を発現するクローンを生じさせることになり、受容体シグナル伝達経路のアンタゴニズム［１０５、１０７］またはアゴニズム［４７、１０６、１０８］のいずれかをもたらす。細胞表現型と、分泌抗体の機能活性とのつながりを可能にするために、細胞を半固体培地に低密度で播種することができ、その結果、個々のクローンが増殖し、誘導可能なプロモーターを介して抗体発現を開始することができる［１０５］。あるいは、恒常的なプロモーターを抗体遺伝子の発現に用いることができる。半固形培地であれば、内在的に発現した抗体の局所的な濃度上昇を維持することになり、その結果、個々の細胞から生じるコロニーに対して特異的な任意の表現型変化が、その特定クローンから発現した特有の抗体によって引き起こされることになる。レポーター遺伝子に融合したＲｅｘプロモーターまたはＮａｎｏｇプロモーターなどの迅速に応答するレポーターを用いるのであれば、半固体培地において低密度で細胞を播種し、回収した後、フローサイトメトリーで選別することが可能であろう。あるいは、ｐｌＮＴ１９における抗体遺伝子の下流に存在する終始コドンを、細胞表面に抗体を繋留することが可能な膜貫通ドメインによって置き換えることができる。ｐｌＮＴ１９において抗体遺伝子の下流に存在する終始コドンは、小胞体（ＥＲ）保留シグナル配列によっても置き換えることができ、当該小胞体（ＥＲ）保留シグナル配列は、抗体をＥＲ内に留めて、内因性に発現する標的受容体または任意の分泌タンパク質もしくは分泌ペプチドを潜在的に減少させることが可能なものである。ｐｌＮＴ１９は、マウスＲＯＳＡ２６遺伝子座を標的とするために、特別に設計されており、マウスＥＳ細胞における、抗体または代替結合性分子の表現型の選別に用いることができる。しかしながら、ヌクレアーゼ指向型である抗体遺伝子組込み方法または結合体分子遺伝子組込み方法は、レンチウイルスの手法を使用して説明されたものなど［４７、１０６、１０７、１０８］の他の機能選別に対しても適用することができる。

【０３５６】

参考文献

以下に記載の参考文献及び本開示における任意の箇所で引用した他の参考文献はすべて、参照によって、それらの全体が本明細書に組込まれる。

１　Ｒｕｓｓｅｌｌ，Ｓ．Ｊ．，Ｈａｗｋｉｎｓ，Ｒ．Ｅ．，＆　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｇ．（１９９３）．Ｒｅｔｒｏｖｉｒａｌ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ｄｉｓｐｌａｙｉｎｇ　ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｆｒａｇｍｅｎｔｓ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ，２１（５），１０８１－１０８５．

２　Ｂｏｕｂｌｉｋ，Ｙ．，Ｄｉ　Ｂｏｎｉｔｏ，Ｐ．，＆　Ｊｏｎｅｓ，Ｉ．Ｍ．（１９９５）．Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ　ｖｉｒｕｓ　ｄｉｓｐｌａｙ：Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｔｈｅ　ｍａｊｏｒ　ｓｕｒｆａｃｅ　ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ　ｎｕｃｌｅａｒ　ｐｏｌｙｈｅｄｒｏ

sis virus(AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. Nature Biotechnology, 13(10), 1079-1084.
3 Mottershead, D. G., Alfthan, K., Ojala, K., Takkinen, K., & Oker-Blom, C. (2000). Baculoviral display of functional scFv and synthetic IgG-binding domains. Biochemical and Biophysical Research Communications, 275(1), 84-90.
4 Oker-Blom, C., Airenne, K. J., & Grabherr, R. (2003). Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2(3), 244-253.
5 Edwards, B. M., Barash, S. C, Main, S. H., Choi, G. H., Minter, R., Ullrich, S., et al. (2003). The Remarkable Flexibility of the Human Antibody Repertoire; Isolation of Over One Thousand Different Antibodies to a Single Protein, BLyS. Journal of Molecular Biology, 334(1), 103-118. doi:10.1016/j.jmb.2003.09.054
6 Pershad, K., Pavlovic, J. D., Graslund, S., Nilsson, P., Colwill, K., Karatt-Vellatt, A., et al. (2010). Generating a panel of highly specific antibodies to 20 human SH2 domains by phage display. Protein Engineering, Design and Selection, 23(4), 279-288. doi:10.1093/protein/gzq003
7 Schofield, D. J., Pope, A. R., Clementel, V., Buckell, J., Chappie, S., Clarke, K. F., et al. (2007). Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. Genome Biol, 8(11), R254.
8 Salema, V., Marin, E., Martinez-Arteaga, R., Ruano-Gallego, D., Fraile, S., Margolles, Y., et al. (2013). Selection of Single Domain Antibodies from Immune Libraries Displayed on the Surface of E.coli Cells with Two β-Domains of Opposite Topologies. PLoS ONE, 8(9), e75126. doi:10.1371/journal.pone.0075126.s007
9 Chao, G., Lau, W. L, Hackel, B. J., Sazinsky, S. L, Lippow, S. M., & Wittrup, K. D. (2006). Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc, 1(2), 755-768.
10 Higuchi, K., Araki, T., Matsuzaki, O., Sato, A., Kanno, K., Kitaguchi, N., & Ito, H. (1997). Cell display library for gene cloning o

f variable regions of human antibodies to hepatitis B surface antigen. J Immunol Methods, 202(2), 193-204.
11 Ho, M., Nagata, S., & Pastan, I. (2006). Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(25), 9637-9642. doi:10.1073/pnas.0603653103
12 Ho, M., & Pastan, I. (2009). Display and selection of scFv antibodies on HEK-293T cells. Methods Mol Biol, 562, 99-113. doi:10.1007/978-1-60327-302-2_8
13 Akamatsu, Y., Pakabunto, K., Xu, Z., Zhang, Y., & Tsurushita, N. (2007). Whole IgG surface display on mammalian cells:Application to isolation of neutralizing chicken monoclonal anti-IL-12 antibodies. Journal of Immunological Methods, 327(1-2), 40-52. doi:10.1016/j.jim.2007.07.007
14 Beerli, R. R., Bauer, M., Buser, R. B., Gwerder, M., Muntwiler, S., Maurer, P., et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 23;105(38):14336-41. doi:10.1073/pnas.0805942105
15 Breous-Nystrom, E., Schultze, K., Meier, M., Flueck, L, Holzer, C, Boll, M., et al. (2013). Retrocyte DisplayA(登録商標) technology:Generation and screening of a high diversity cellular antibody library. Methods, 1-11. doi:10.1016/j.ymeth.2013.09.003
16 Grindley, Whiteson & Rice. Mechanisms of Site-Specific Recombination. Annu Rev Biochem 2006 75:567-605
17 Zhou, C., Jacobsen, F. W., Cai, L, Chen, Q., & Shen, W. D. (2010). Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform. mAbs, 2(5), 508-518
18 Li, C. Z., Liang, Z. K., Chen, Z. R., Lou, H. B., Zhou, Y., Zhang, Z. H., et al. (2012). Identification of HBsAg-specific antibodies from a mammalian cell displayed full-length human antibody library of healthy immunized donor. Cellular and Molecular Immunology, 9(2), 184-190.
19 Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F., & Stewart, A. F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases:Implications for applied site-specific recombination. Nucleic Acids Res, 24(

21), 4256-4262.
20 Schaft, J., Ashery-Padan, R., Van Hoeven, F. D., Gruss, P., & Francis Stewart, A. (2001). Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. Genesis, 31(1), 6-10.
21 Moehle, E. A., Moehle, E. A., Rock, J. M., Rock, J. M., Lee, Y.-L., Lee, Y. L., et al. (2007). Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(9), 3055-3060. doi:10.1073/pnas.0611478104
22 Cristea, S., Freyvert, Y., Santiago, Y., Holmes, M. C., Urnov, F. D., Gregory, P. D., & Cost, G. J. (2013). In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration. Biotechnology and Bioengineering, 110(3), 871-880. doi:10.1002/bit.24733
23 Letourneur, F., & Malissen, B. (1989). Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin. European Journal of Immunology, 19(12), 2269-2274.
doi:10.1002/eji.1830191214
24 Kanayama, N., Todo, K., Reth, M., & Ohmori, H. (2005). Reversible switching of immunoglobulin hypermutation machinery in a chicken B cell line. Biochem Biophys Res Commun, 327(1), 70-75. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.143
25 Lin, W., Kurosawa, K., Murayama, A., Kagaya, E., & Ohta, K. (2011). B-cell display-based one-step method to generate chimeric human IgG monoclonal antibodies. Nucleic Acids Research, 39(3), e14-e14. doi:10.1093/nar/gkq1122
26 Adachi, N., So, S., Iiizumi, S., Nomura, Y., Murai, K., Yamakawa, C., et al. (2006). The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. DNA and Cell Biology, 25(1), 19-24. doi:10.1089/dna.2006.25.19
27 Palacios, R., & Steinmetz, M. (1985). IL3-Dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. Cell, 41(3), 727-734

28 Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. Nature, 483(7391), 603-607. doi:10.1038/nature11003
29 Forbes, S. A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D., et al. (2011). COSMIC:mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Nucleic Acids Research, 39(Database issue), D945-50. doi:10.1093/nar/gkq929
30 Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P., & Paques, F. (2011). Meganucleases and other tools for targeted genome engineering:Perspectives and challenges for gene therapy. Current Gene Therapy, 11(1), 11-27
31 Epinat, J. C., Silva, G. H., Paques, F., Smith, J., & Duchateau, P. (2013). Engineered meganucleases for genome engineering purposes. Topics in Current Genetics(Vol. 23, pp. 147-185).
32 Szczepek, M., Brondani, V., Buchel, J., Serrano, L., Segal, D. J., & Cathomen, T. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. Nature Biotechnology, 25(7), 786-793. doi:10.1038/nbt1317
33 Doyon, Y., Vo, T. D., Mendel, M. C, Greenberg, S. G., Wang, J., Xia, D. F., et al. (2011). Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. Nat Methods, 8(1), 74-79. doi:10.1038/nmeth.1539
34 Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G., Brown, M. T., & Gersbach, C. A. (2012). Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. Nucleic Acids Research, 40(8), 3741-3752. doi:10.1093/nar/gkr1214
35 Urnov, F. D., Miller, J. C, Lee, Y. -L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., et al. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature, 435(7042), 646-651. doi:10.1038/nature03556
36 Maresca, M., Lin, V. G., Guo, N., & Yang, Y. (2013). Obligate ligation-gated recombination (ObLiGaRe):custom-designed nuclease-m

ediated targeted integration through non homologous end joining. Genome Research, 23(3), 539-546. doi:10.1101/gr.145441.112
37 Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. Science, 333(6051), 1843-1846. doi:10.1126/science.1204094
38 Reyon, D., Tsai, S. Q., Khgayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nature Biotechnology, 30(5), 460-465. doi:10.1038/nbt.2170
39 Boissel, S., Jarjour, J., Astrakhan, A., Adey, A., Gouble, A., Duchateau, P., et al. (2013). megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. Nucleic Acids Research. doi:10.1093/nar/gkt1224
40 Beurdeley, M., Bietz, F., Li, J., Thomas, S., Stoddard, T., Juillerat, A., et al. (2013). Compact designer TALENs for efficient genome engineering. Nature Communications, 4, 1762. doi:10.1038/ncomms2782
41 Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2014). Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 36(1), 34-38. doi:10.1002/bies.201300135
42 Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science, 343(6166), 84-87. doi:10.1126/science.1247005
43 Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., & Lander, E. S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science, 343(6166), 80-84. doi:10.1126/science.1246981
44 Beard, C., Hochedlinger, K., Plath, K., Wutz, A., & Jaenisch, R. (2006). Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. Genesis, 44(1), 23-28.
45 Orlando, S. J., Santiago, Y., DeKelver, R. C., Freyvert, Y., Boydston, E. A., Moehle, E. A., et al. (2010). Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. Nucleic Acids Research, 38(15), e152. doi:10.1093/nar/gkq512

46 Cadinanos 2007
47 Zhang, H., Yea, K., Xie, J., Ruiz, D., Wilson, I. A., & Lerner, R. A. (2013). Selecting agonists from single cells infected with combinatorial antibody libraries. Chemistry & Biology, 20(5), 734-741. doi:10.1016/j.chembiol.2013.04.012
48 Porteus, M. H., & Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science, 300(5620), 763. doi:10.1126/science.1078395
49 Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. Molecular and Cellular Biology, 14(12), 8096-8106.
50 Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. Trends in Genetics, 12(6), 224-228
51 Davis, L., & Maizels, N. (2011). DNA nicks promote efficient and safe targeted gene correction. PLoS ONE, 6(9), e23981. doi:10.1371/journal.pone.0023981
52 Fujioka, K., Aratani, Y., Kusano, K., & Koyama, H. (1993). Targeted recombination with single-stranded DNA vectors in mammalian cells. Nucleic Acids Res, 21(3), 407-412
53 Khan, I. F., Hirata, R. K., & Russell, D. W. (2011). AAV-mediated gene targeting methods for human cells. Nat Protoc, 6(4), 482-501. doi:10.1038/nprot.2011.301
54 Deyle, D. R., & Russell, D. W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 11(4), 442-447
55 Benatuil, L., Perez, J. M., Belk, J., & Hsieh, C. M. (2010). An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. Protein Engineering, Design and Selection, 23(4), 155-159.
56 Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M., Yeung, Y. A., et al. (2003). Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune Saccharomyces cerevisiae surface display library. Nat Biotechnol.
57 Zhao, A., Nunez-Cruz, S., Li, C., Coukos, G., Siegel, D. L, & Scholler, N. (2011). Rapid isolation of high-affinity human antibodie

s against the tumor vascular marker Endosialin/TEM1, using a paired yeast-display/secretory scFv library platform. Journal of Immunological Methods, 363(2), 221-232. doi:10.1016/j.jim.2010.09.001
58 Skerra, A. (2007). Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. Curr Opin Biotechnol, 18(4), 295-304. doi:10.1016/j.copbio.2007.04.010
59 Gebauer, M., & Skerra, A. (2009). Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Current Opinion in Chemical Biology, 13(3), 245-255. doi:10.1016/j.cbpa.2009.04.627
60 Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5):A1-A6
61 Koide et al. (1998) Journal of Molecular Biology, 284:1141-1151.
62 Nygren et al. (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7:463-469
63 Wess, L. In:BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004
64 Chang, H.-J., Hsu, H.-J., Chang, C.-F., Peng, H.-P., Sun, Y.-K., Yu, H.-M., et al. (2009). Molecular Evolution of Cystine-Stabilized Miniproteins as Stable Proteinaceous Binders. Structure, 17(4), 620-631. doi:10.1016/j.str.2009.01.011
65 Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)
66 McCafferty et al Nature, 348, 552-554 (1990)
67 Holt et al Trends in Biotechnology 21, 484-490 (2003)
68 Bird et al, Science, 242, 423-426, (1988)
69 Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, (1988)
70 Holliger, P. et al, PNAS USA 90 6444-6448, (1993)
71 Reiter, Y. et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, (1996)
72 Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005)
73 Knappik et al. J. Mol. Biol. 296, 57-86 (2000)
74 Krebs et al. Journal of Immunological Methods 254, 67-84 (2001)
75 Holliger and Bohlen Cancer and metastasis rev. 18:411-419 (1999)
76 Holliger, P. and Winter G. Current Opini

on Biotechnol 4, 446-449 (1993)
77 Glennie M J et al., J. Immunol. 139, 2367-2375 (1987)
78 Repp R. et al., J. Hemat. 377-382 (1995)
79 Staerz U. D. and Bevan M. J. PNAS 83 (1986)
80 Suresh M. R. et al., Method Enzymol. 121: 210-228 (1986)
81 Merchand et al., Nature Biotech. 16:677-681 (1998)
82 Ridgeway, J. B. B. et al, Protein Eng., 9, 616-621, (1996)
83 Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol, 222 (3), 581-597.
84 Gronwald, R. G. K., Grant, F. J., Haldeman, B. A., Hart, C. E., O'Hara, P. J., Hagen, F. S., et al. (1988). Cloning and expression of a cDNA coding for the human platelet-derived growth factor receptor: Evidence for more than one receptor class (Vol. 85, pp. 3435-3439). Presented at the Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
85 Kumar, N., & Borth, N. (2012). Flow-cytometry and cell sorting: an efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories. Methods, 56 (3), 366-374. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.03.004
86 Brezinsky, S. C. G., Chiang, G. G., Szilvasi, A., Mohan, S., Shapiro, R. I., MacLean, A., et al. (2003). A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. J Immunol Methods, 277 (1-2), 141-155.
87 Pichler, J., Hesse, F., Wieser, M., Kunert, R., Galosy, S. S., Mott, J. E., & Borth, N. (2009). A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay. Journal of Biotechnology, 141 (1-2), 80-83. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.03.001
88 Anastassiadis, K., Fu, J., Patsch, C., Hu, S., Weidlich, S., Duerschke, K., et al. (2009). Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in E. coli, mammalian cells and mice. Disease Mode

ls & Mechanisms, 2(9-10), 508-515. doi:10.1242/dmm.003087
89 Horlick, R. A., Macomber, J. L, Bowers, P. M., Neben, T. Y., Tomlinson, G. L., Krapf, I. P., et al. (2013). Simultaneous surface display and secretion of proteins from mammalian cells facilitate efficient in vitro selection and maturation of antibodies. J Biol Chem, 288(27), 19861-19869. doi:10.1074/jbc.M113.452482
90 Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., & Balasubramanian, S. (2013). Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. Nature Chemistry, 5(3), 182-186. doi:10.1038/nchem.1548
91 Gao, J., Sidhu, S. S., & Wells, J. A. (2009). Two-state selection of conformation-specific antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(9), 3071-3076. doi:10.1073/pnas.0812952106
92 Gu, G. J., Friedman, M., Jost, C., Johnsson, K., Kamali-Moghaddam, M., Pluckthun, A., et al. (2013). Protein tag-mediated conjugation of oligonucleotides to recombinant affinity binders for proximity ligation. N Biotechnol, 30(2), 144-152. doi:10.1016/j.nbt.2012.05.005
93 Cho, Y. K., & Shusta, E. V. (2010). Antibody library screens using detergent-solubilized mammalian cell lysates as antigen sources. Protein Eng Des Sel, 23(7), 567-577. doi:10.1093/protein/gzq029
94 Tillotson, B. J., Cho, Y. K., & Shusta, E. V. (2013). Cells and cell lysates:a direct approach for engineering antibodies against membrane proteins using yeast surface display. Methods, 60(1), 27-37. doi:10.1016/j.ymeth.2012.03.010
95 Kunert, A., Straetemans, T., Govers, C., Lamers, C., Mathijssen, R., Sleijfer, S., & Debets, R. (2013). TCR-Engineered T Cells Meet New Challenges to Treat Solid Tumors:Choice of Antigen, T Cell Fitness, and Sensitization of Tumor Milieu. Frontiers in Immunology, 4, 363. doi:10.3389/fimmu.2013.00363
96 Liddy, N., Bossi, G., Adams, K. J., Lissina, A., Mahon, T. M., Hassan, N. J., et al. (2012). Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. Nature Medicine, 18(6), 980-987. doi:10

.1038/nm.2764
97 Holler, P.D., Holman, P.O., Shusta, E.V., O'Herrin, S., Wittrup, K.D., & Kranz, D.M. (2000). In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(10), 5387-5392. doi:10.1073/pnas.080078297
98 Weber, K.S., Donermeyer, D.L., Allen, P.M., & Kranz, D.M. (2005). Class ll-restricted T cell receptor engineered in vitro for higher affinity retains peptide specificity and function. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(52), 19033-19038. doi:10.1073/pnas.0507554102
99 Kessels, H.W., van Den Boom, M.D., Spits, H., Hooijberg, E., & Schumacher, T.N. (2000). Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(26), 14578-14583. doi:10.1073/pnas.97.26.14578
100 Chervin, A.S., Aggen, D.H., Raseman, J.M., & Kranz, D.M. (2008). Engineering higher affinity T cell receptors using a T cell display system. Journal of Immunological Methods, 339(2), 175-184.
101 Crawford, F., Jordan, K.R., Stadinski, B., Wang, Y., Huseby, E., Marrack, P., et al. (2006). Use of baculovirus MHC/peptide display libraries to characterize T-cell receptor ligands. Immunological Reviews, 210, 156-170. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00365.x
102 Hinrichs, C.S., & Restifo, N.P. (2013). Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. Nat Biotechnol, 31(11), 999-1008. doi:10.1038/nbt.2725
103 Sadelain, M., Brentjens, R., & Riviere, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. Cancer Discovery, 3(4), 388-398. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0548
104 Alonso-Camino, V., Sanchez-Martin, D., Compte, M., Sanz, L., & Alvarez-Vallina, L. (2009). Lymphocyte display:a novel antibody selection platform based on T cell activation. PLoS ONE, 4(9), e7174. doi:10.1371/journal.pone.0007174
105 Melidoni, A.N., Dyson, M.R., Wormald, S., & McCafferty, J. (2013). Selecting antagonistic antibodies that control differentia

tion through inducible expression in embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(44), 17802-17807. doi:10.1073/pnas.1312062110
106 Zhang, H., Wilson, I. A., & Lerner, R. A. (2012). Selection of antibodies that regulate phenotype from intracellular combinatorial antibody libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(39), 15728-15733. doi:10.1073/pnas.1214275109
107 Xie, J., Yea, K., Zhang, H., Moldt, B., He, L., Zhu, J., & Lerner, R. A. (2014). Prevention of cell death by antibodies selected from intracellular combinatorial libraries. Chemistry & Biology, 21(2), 274-283.
108 Yea, K., Zhang, H., Xie, J., Jones, T. M., Yang, G., Song, B. D., & Lerner, R. A. (2013). Converting stem cells to dendritic cells by agonist antibodies from unbiased morphogenic selections (Vol. 110, pp. 14966-14971). Presented at the Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. doi:10.1073/pnas.1313671110
109 Kawahara, M., Kimura, H., Ueda, H., & Nagamune, T. (2004). Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera. Biochem Biophys Res Commun, 315(1), 132-138. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.030
110 Kawahara, M., Shimo, Y., Sogo, T., Hitomi, A., Ueda, H., & Nagamune, T. (2008). Antigen-mediated migration of murine pro-B Ba/F3 cells via an antibody/receptor chimera. Journal of Biotechnology, 133(1), 154-161. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.09.009
111 Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., & Nagamune, T. (2009). T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. Cytokine, 46(1), 127-136. doi:10.1016/j.cyto.2008.12.020
112 Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., Teng, J., Otsu, M., Onodera, M., et al. (2011). Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. Cytokine, 55(3), 402-408. doi:10.1016/j.cyto.2011.05.024
113 Ueda, H., Kawahara, M., Aburatani, T., Tsumoto, K., Todokoro, K., Suzuki, E., et al. (200

0). Cell-growth control by monomeric antigen: the cell surface expression of lysozyme-specific Ig V-domains fused to truncated Epo receptor. J Immunol Methods, 241(1-2), 159-170.
114 Kerppola, T. K. (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: Characteristics of protein fragment complementation. Chemical Society Reviews, 38(10), 2876-2886.
115 Michnick, S. W., Ear, P. H., Manderson, E. N., Remy, I., & Stefan, E. (2007). Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. Nature Reviews Drug Discovery, 6(7), 569-582. doi:10.1038/nrd231
116 Petschnigg, J., Groisman, B., Kotlyar, M., Taipale, M., Zheng, Y., Kurat, C. F., et al. (2014). The mammalian-membrane two-hybrid assay (MaMTH) for probing membrane-protein interactions in human cells. Nat Methods. doi:10.1038/nmeth.2895
117 Renaut, L, Monnet, C., Dubreuil, O., Zaki, O., Crozet, F., Bouayadi, K., et al. (2012). Affinity maturation of antibodies: Optimized methods to generate high-quality scfv libraries and isolate igg candidates by high-throughput screening. Methods in Molecular Biology (Vol. 907, pp. 451-461)
118 Dyson, M. R., Zheng, Y., Zhang, C., Colwill, K., Pershad, K., Kay, B. K., et al. (2011). Mapping protein interactions by combining antibody affinity maturation and mass spectrometry. Anal Biochem, 417(1), 25-35. doi:10.1016/j.ab.2011.05.005
119 de Felipe P (2002) Polycistronic viral vectors. Curr Gene Ther 2:355-378. doi:10.2174/1566523023347742.
120 Foote, J., & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol, 224(2), 487-499.
121 Massie, B., Dionne, J., Lamarche, N., Fleurent, J., & Langelier, Y. (1995). Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. Nature Biotechnology, 13(6), 602-608.
122 Kim, D. W., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamagu

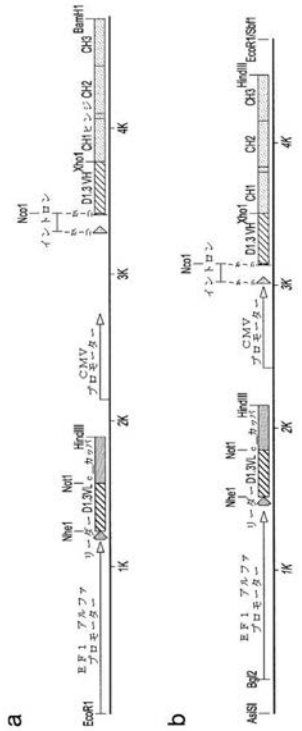
chi, N., & Sugano, S. (1990). Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene, 91(2), 217-223.
123 Holden, P., Keene, D. R., Lunstrum, G. P., Bachinger, H. P., & Horton, W. A. (2005). Secretion of cartilage oligomeric matrix protein is affected by the signal peptide. J Biol Chem, 280(17), 17172-17179.
124 Sadelain, M., Papapetrou, E. P., & Bushman, F. D. (2012). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. Nature Reviews Cancer, 12(1), 51-58.
125 Sanjana, N. E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., & Zhang, F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. Nat Protoc, 7(1), 171-192. doi:10.1038/nprot.2011.431
126 Falk, R., Falk, A., Dyson, M. R., Melidoni, A. N., Parthiban, K., Young, J. L., et al. (2012). Generation of anti-Notch antibodies and their application in blocking Notch signalling in neural stem cells. Methods, 58(1), 69-78. doi:10.1016/j.ymeth.2012.07.008
127 Martin, C. D., Rojas, G., Mitchell, J. N., Vincent, K. J., Wu, J., McCafferty, J., & Schofield, D. J. (2006). A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. BMC Biotechnology, 6, 46.
128 Reyon, D., Tsai, S. Q., Khgayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nature Biotechnology, 30(5), 460-465. doi:10.1038/nbt.2170
129 Van Der Weyden, L., Adams, D. J., Harris, L. W., Tannahill, D., Arends, M. J., & Bradley, A. (2005). Null and conditional Semaphorin 3B alleles using a flexible puroΔtk Lox P/FRT vector. Genesis, 41(4), 171-178
130 de Felipe, P., & Ryan, M. D. (2004). Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. Traffic, 5(8), 616-626.
131 Raymond, C. S., & Soriano, P. (2007). High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. PLoS ONE, 2(1), e162. doi:10.1371/journal.pone.0000162

132 Kranz, A., Fu, J., Duerschke, K., Weidlich, S., Naumann, R., Stewart, A. F., & Anastassiadis, K. (2010). An improved Flp deleter mouse in C57BI/6 based on Flpo recombinase. Genesis, 48(8), 512-520. doi:10.1002/dvg.20641
133 Szymczak AL, Vignali DA (2005) Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. Expert Opin Biol Ther 5:627-638. doi:10.1517/14712598.5.5.627
134 Chappie, S. D., Crofts, A. M., Shadbolt, S. P., McCafferty, J., and Dyson, M. R. (2006). Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. BMC biotechnology 6, 49.
135. Zhao, Y. et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. Cancer Research 70, 9053-9061 (2010).
136 Szymczak, A. L. et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. Nature biotechnology 22, 589-594 (2004).
137. Li, Y. et al. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. Nat. Biotechnol. 23, 349-354 (2005).
138. Zhao, Y. et al. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4+ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines. J. Immunol. 179, 5845-5854 (2007).
139. Madura, F. et al. T-cell receptor specificity maintained by altered thermodynamics. The Journal of biological chemistry 288, 18766-18775 (2013).
140. Pierce, B. G. et al. Computational design of the affinity and specificity of a therapeutic T cell receptor. PLoS Comput Biol 10, e1003478 (2014).
141. Sebestyen, Z. ef al. Human TCR that incorporate CD3zeta induce highly preferred pairing between TCRalpha and beta chains following gene transfer. J. Immunol. 180, 7736-7746 (2008).
142. Roszik, J. et al. T-cell synapse formation depends on antigen recognition but n

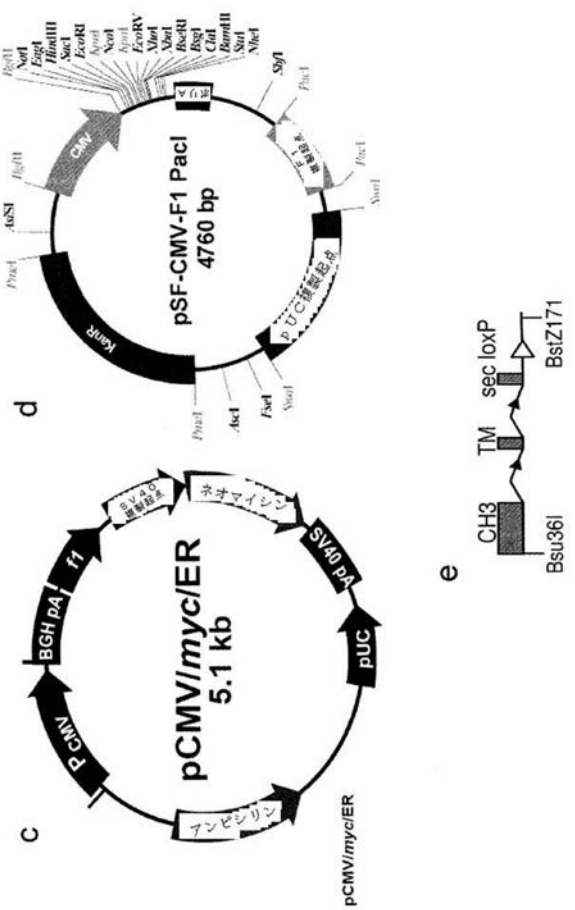
ot CD3 interaction:studies with TCR:ζ, a candidate transgene for TCR gene therapy. Eur. J. Immunol. 41, 1288-1297(2011).
143. Cohen, C. J., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor(TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. Cancer Research 66, 8878-8886(2006).
144. Huovinen, T. et al. Primer extension mutagenesis powered by selective rolling circle amplification. PLoS ONE 7, e31817(2012).
145. Cribbs, A. P., Kennedy, A., Gregory, B. & Brennan, F. M. Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. BMC biotechnology 13, 98(2013).
146. Oelke, M. et al. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. Nat Med 9, 619-624(2003).
147. Wolfl, M. & Greenberg, P. D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. Nature Protocols 9, 950-966(2014).
148. Lipowska-Bhalla, G., Gilham, D. E., Hawkins, R. E. & Rothwell, D. G. Isolation of tumor antigen-specific single-chain variable fragments using a chimeric antigen receptor bicistronic retroviral vector in a Mammalian screening protocol. Hum Gene Ther Methods 24, 381-391(2013).
149. Kelly, R. J., Sharon, E., Pastan, I. & Hassan, R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. Mol. Cancer Ther. 11, 517-525(2012).
150. Atanackovic, D. et al. Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. Haematologica 96, 1512-1520(2011).
151. Bund, D., Mayr, C., Kofler, D. M., Hallek, M. & Wendtner, C.-M. Human Ly9(CD229) as novel tumor-associated antigen(TAA) in chronic lymphocytic leukemia(B-CLL) recognized by autologous CD8+ T cells. Exp. Hematol. 34, 860-869(2006).
152. Tiede, C. et al. Adhiron:a stable and v

ersatile peptide display scaffold for molecular recognition applications. Protein Eng. Des. Sel. 27, 145－155（2014）.
153. Maresca, M., Lin, V. G., Guo, N. & Yang, Y. Obligate ligation－gated recombination（ObLiGaRe）：custom－designed nuclease－mediated targeted integration through nonhomologous end joining. Genome Res. 23, 539－546（2013）.
154. McVey, M. & Lee, S. E. MMEJ repair of double－strand breaks（director's cut）：deleted sequences and alternative endings. Trends Genet. 24, 529－538（2008）.
155. Nakade, S. et al. Microhomology－mediated end－joining－dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR／Cas9. Nat Commun 5, 5560（2014）.
156. Chiche, L. et al. Squash inhibitors：From structural motifs to macrocyclic knottins. Current Protein & Peptide Science 5, 341－349.

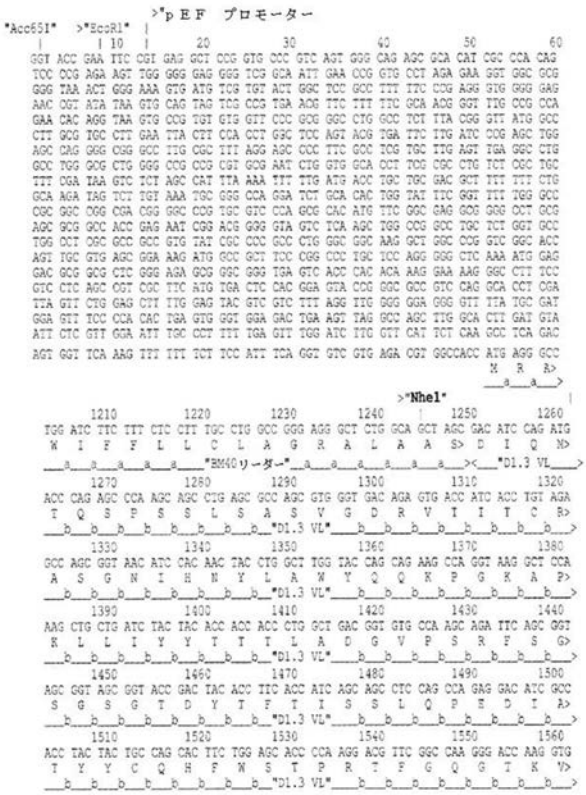
【図１－１】



【図１－２】



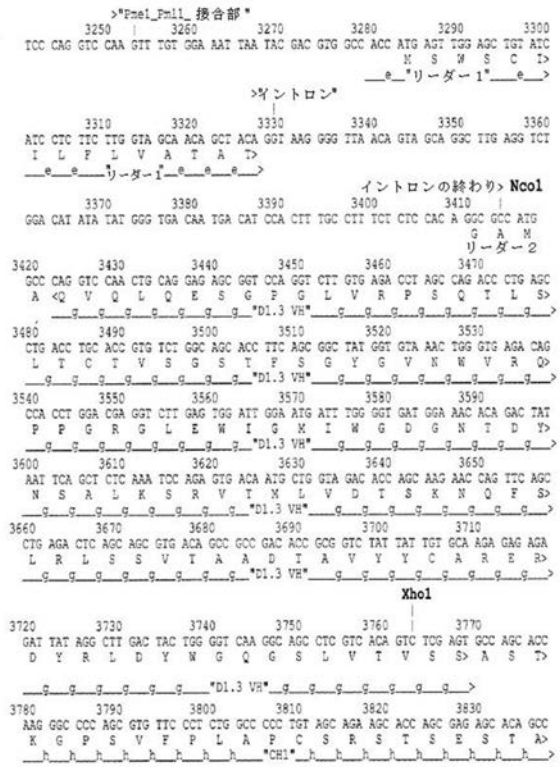
【図２－１】



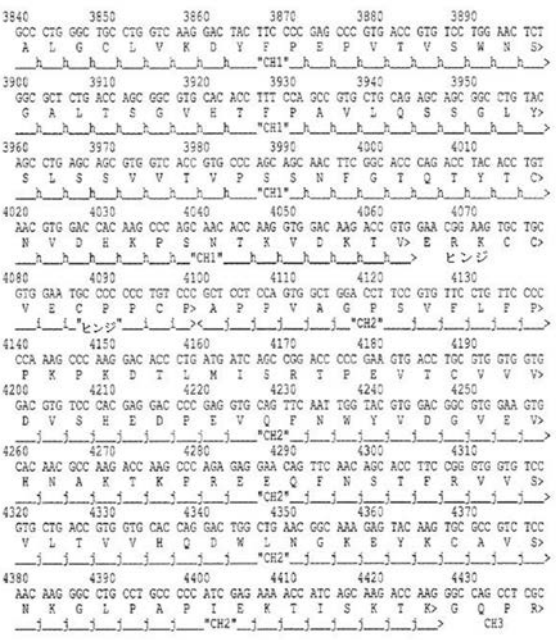
【図２－２】



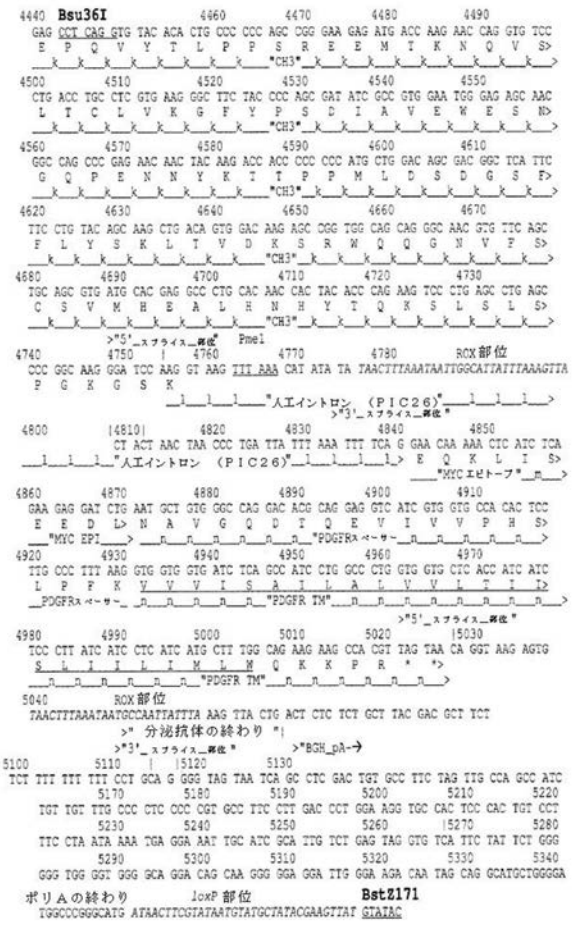
【図２－３】



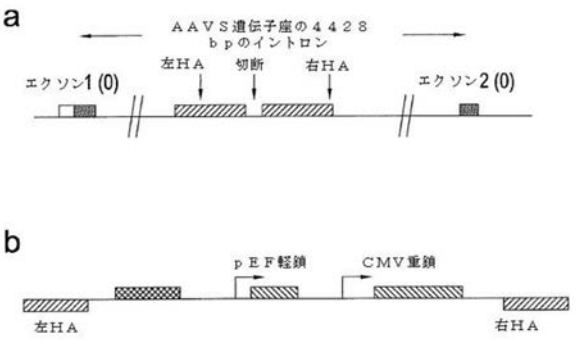
【図２－４】



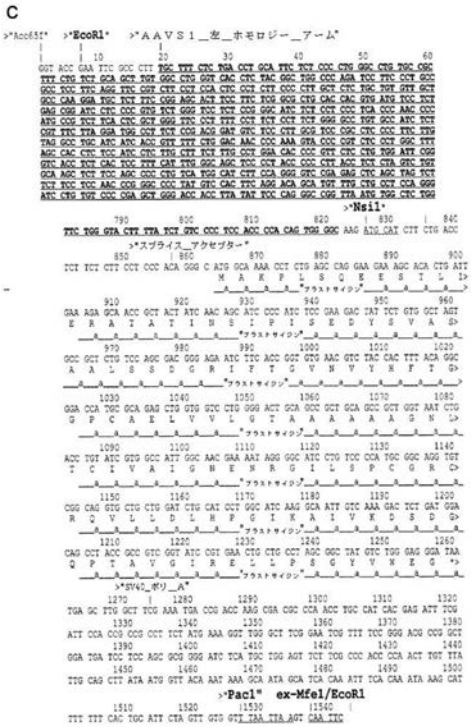
【図２－５】



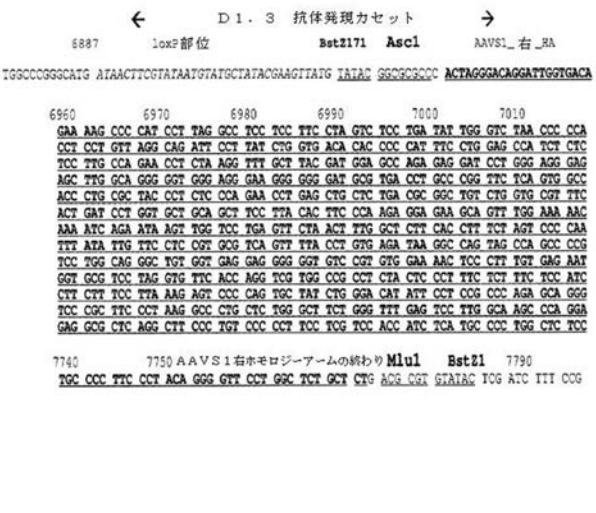
【図３－１】



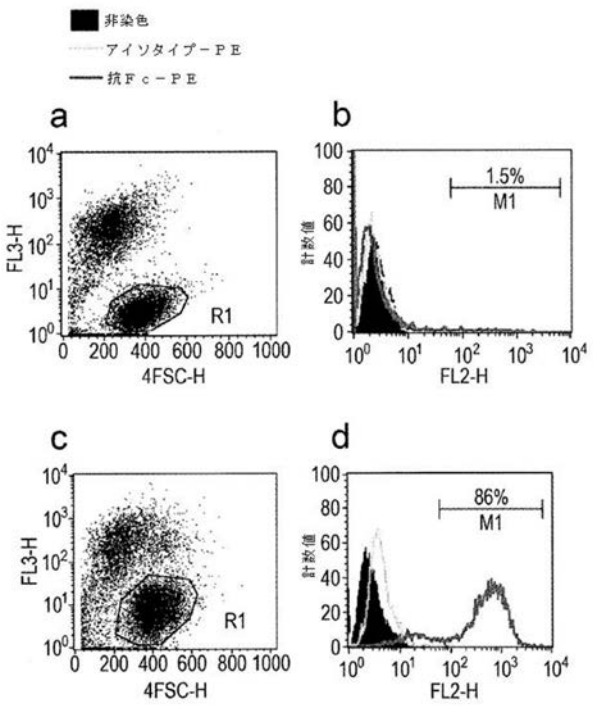
【図３－２】



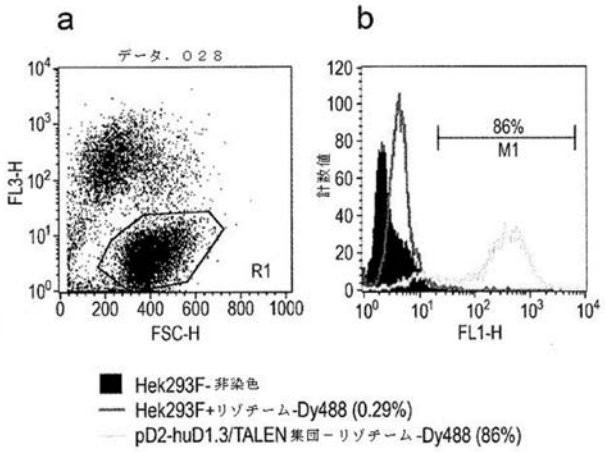
【図３－３】



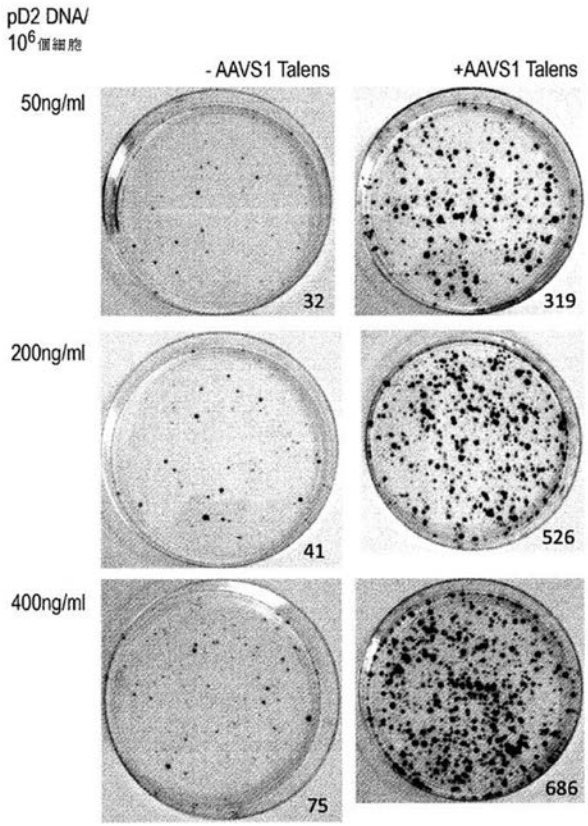
【図４】


非染色
アイソタイプ－ＰＥ
抗Ｆｃ－ＰＥ
a
b
c
d
FL3-H
4FSC-H
FL2-H
計数値
R1
1.5%
M1
86%
M1

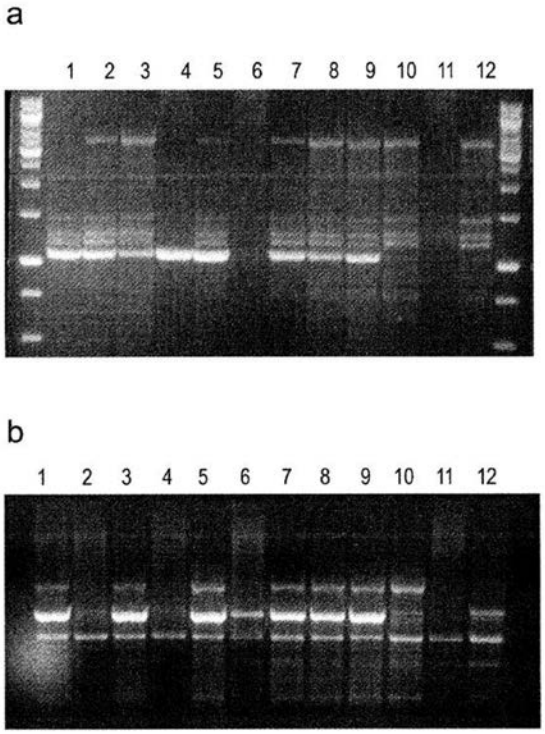
【図５】


a
b
データ．０２８
FL3-H
FSC-H
FL1-H
計数値
R1
86%
M1
Hek293F-非染色
Hek293F+リゾチーム-Dy488 (0.29%)
pD2-huD1.3/TALEN集団－リゾチーム-Dy488 (86%)

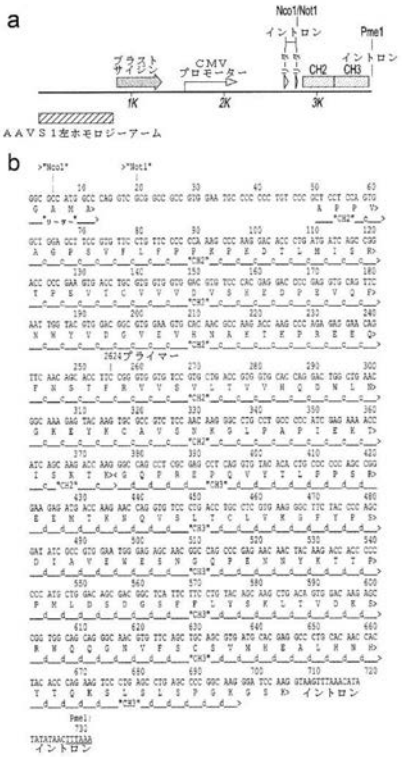
【図６】


pD2 DNA/
10⁶個細胞
- AAVS1 Talens
+AAVS1 Talens
50ng/ml
200ng/ml
400ng/ml
32
319
41
526
75
686

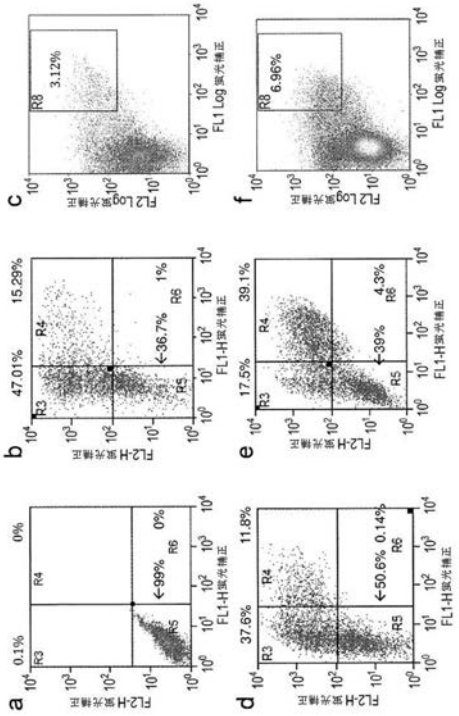
【図７】


a
b
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

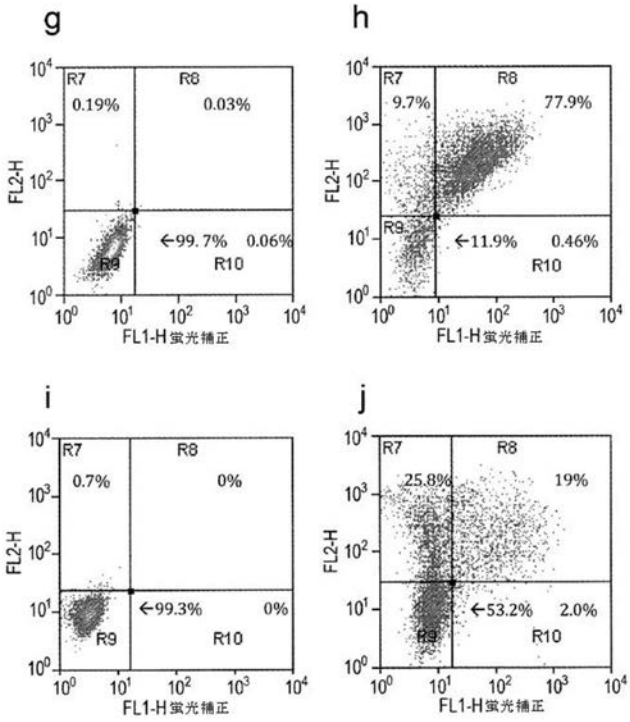
【図８】



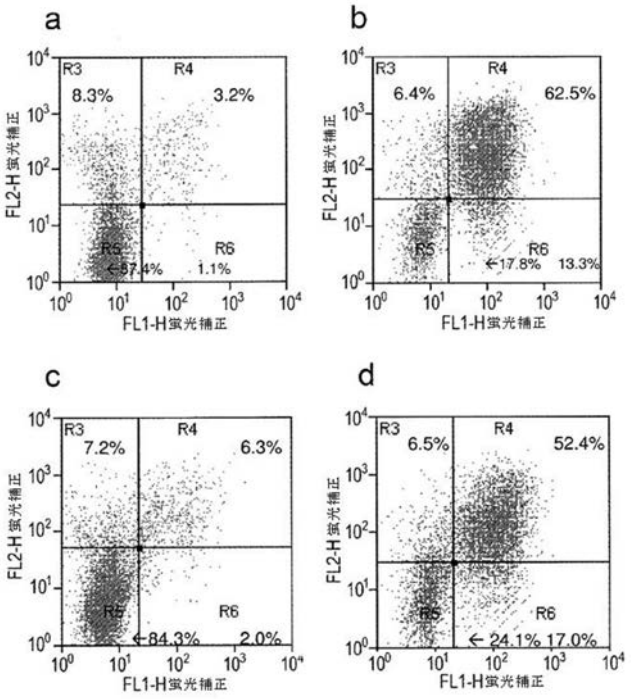
【図９－１】



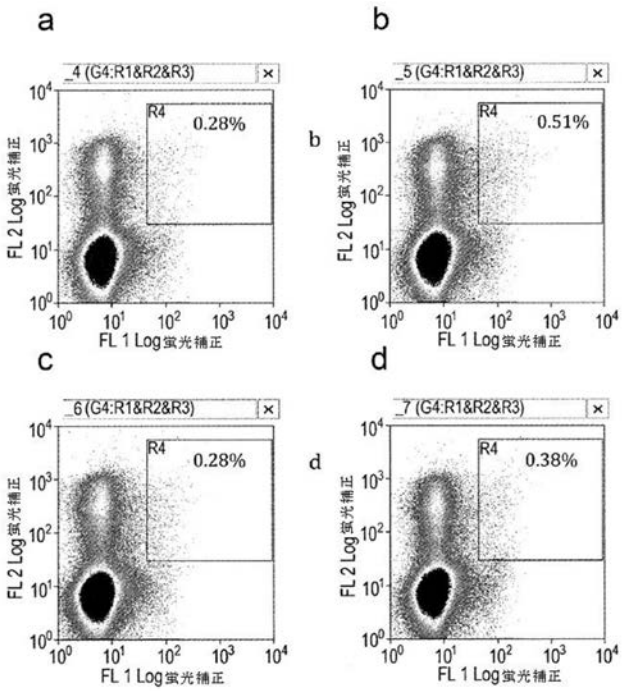
【図９－２】



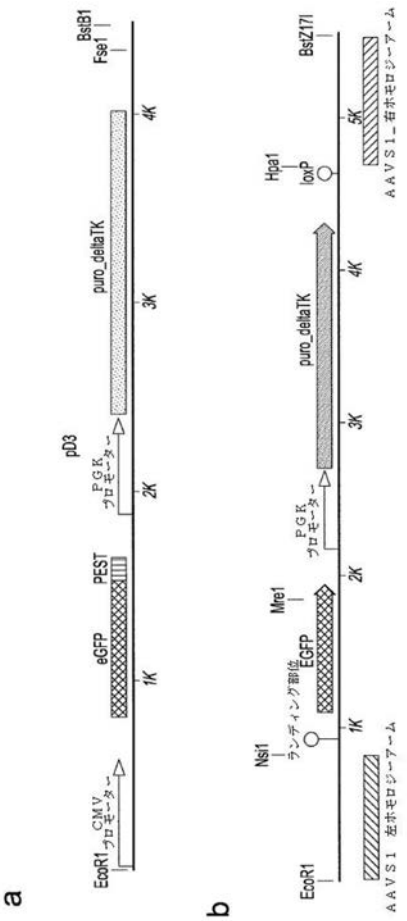
【図１０】



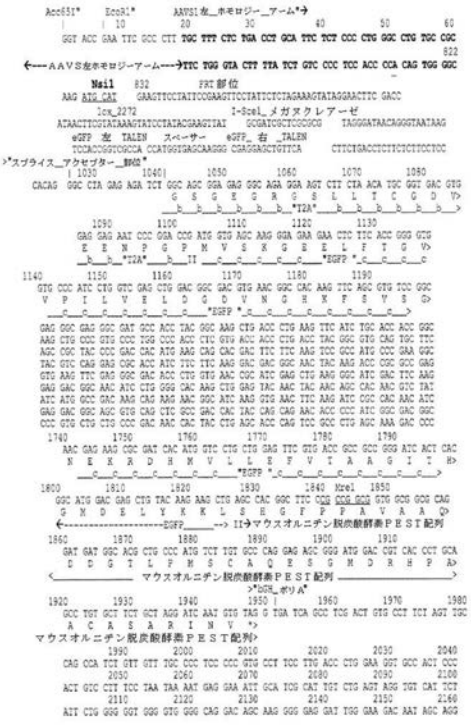
【図１１】



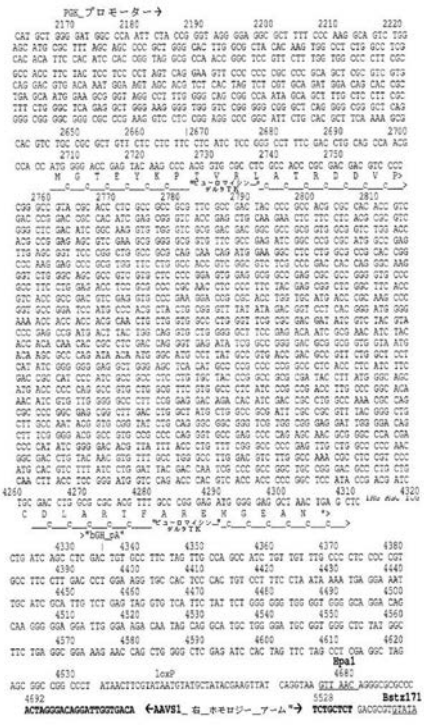
【図１２】



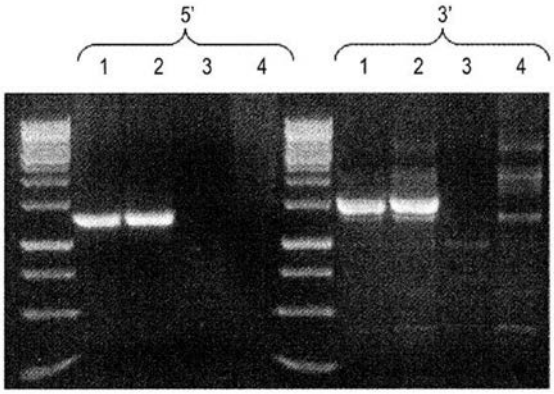
【図１３－１】



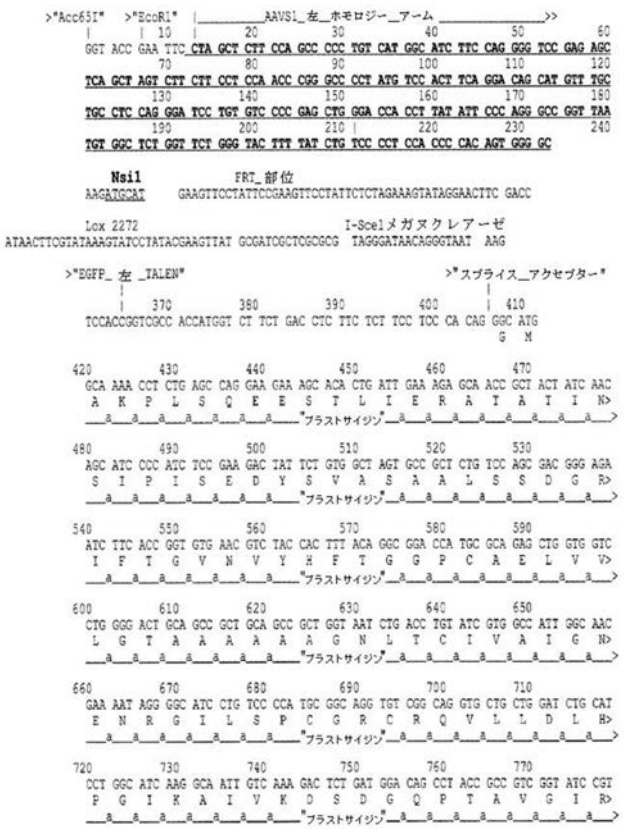
【図１３－２】



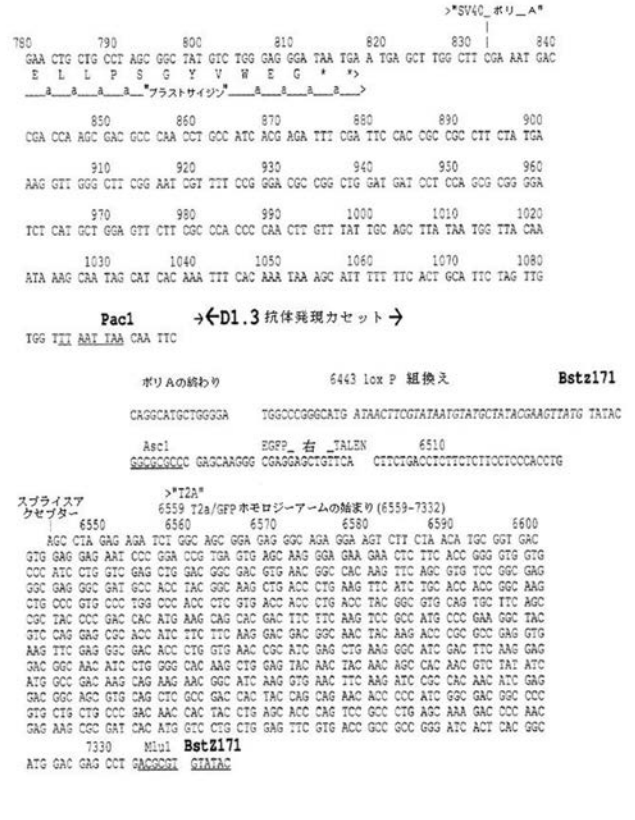
【図１４】



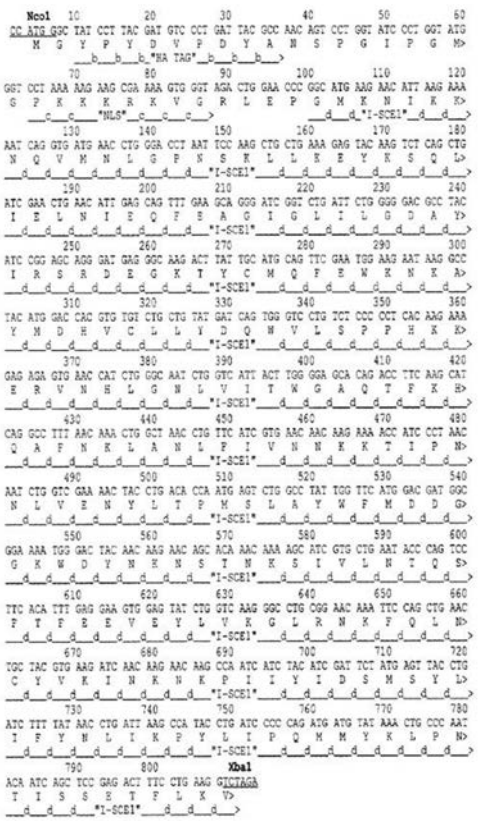
【図１５－１】



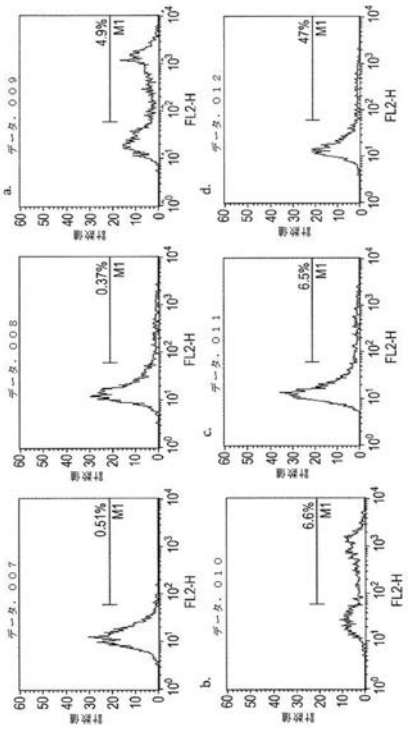
【図１５－２】



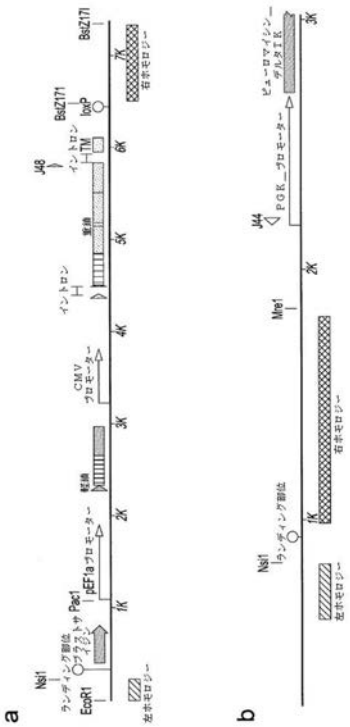
【図１６】



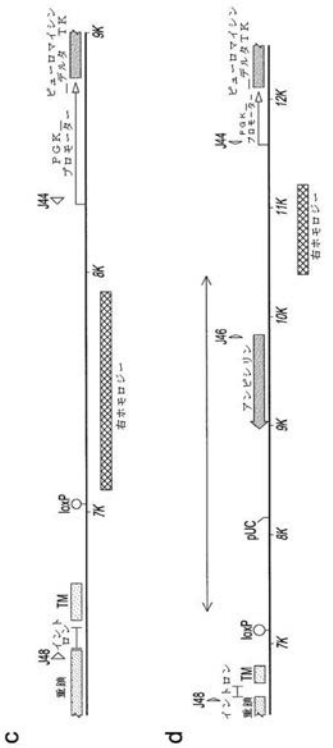
【図１７】



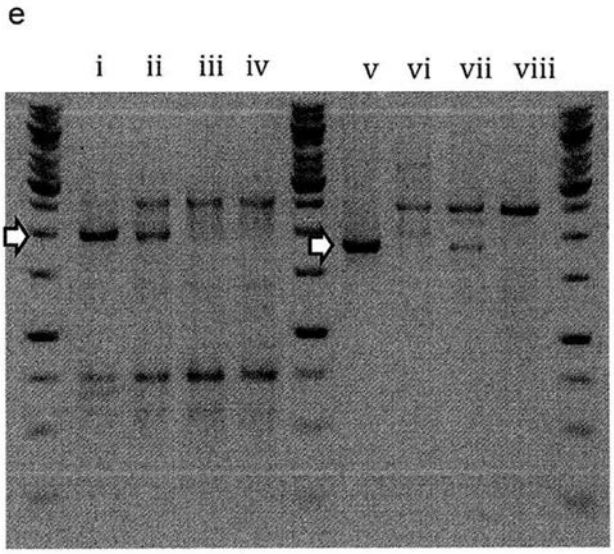
【図１８－１】



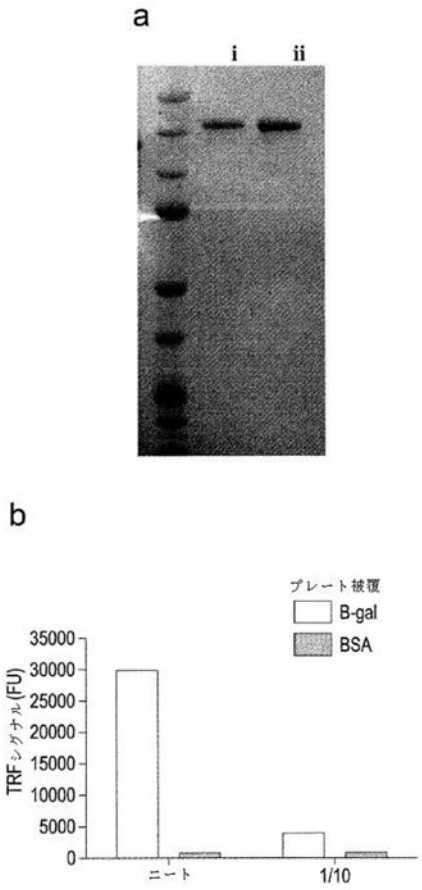
【図１８－２】



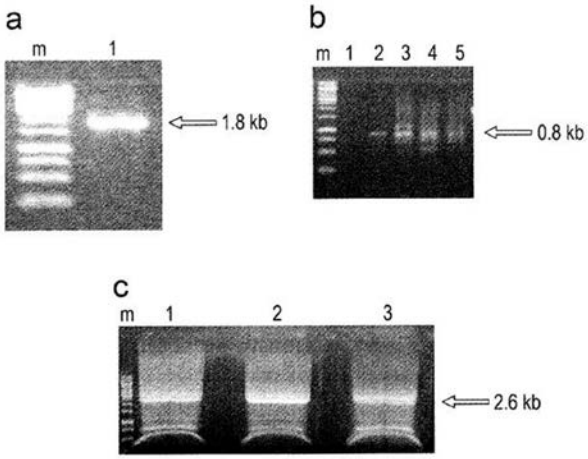
【図１８－３】



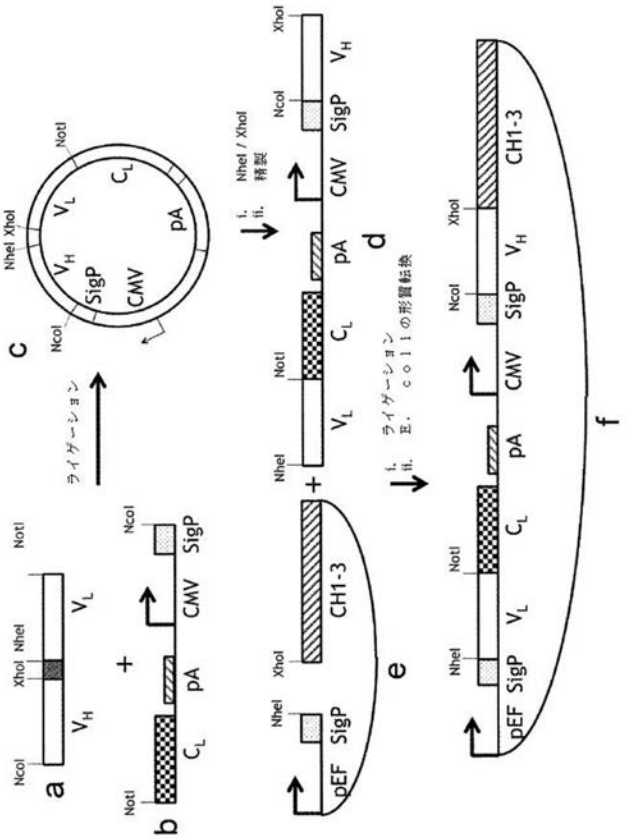
【図１９】



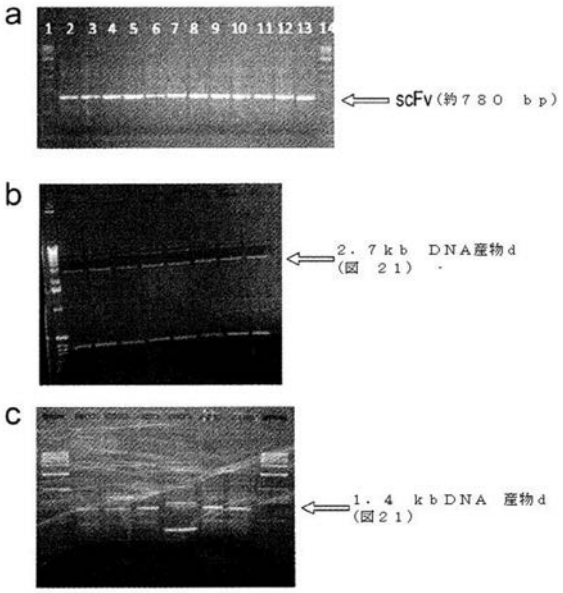
【図２０】



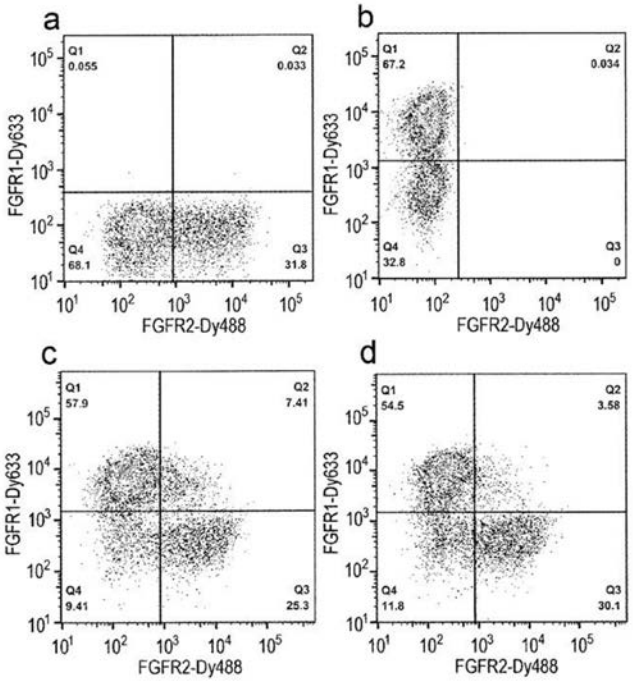
【図２１】



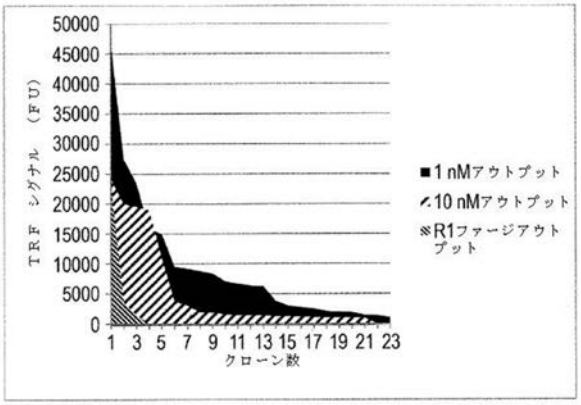
【図２２】



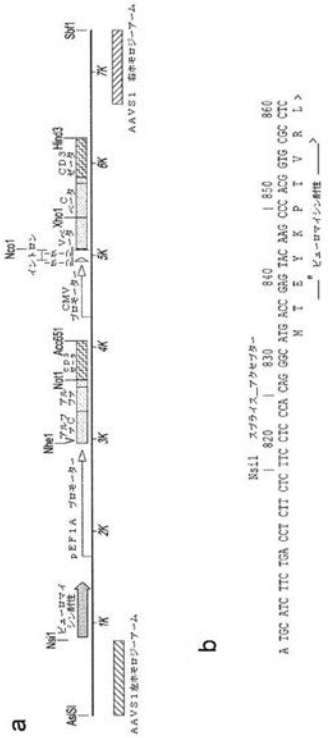
【図２３】



【図２４】



【図２５－１】

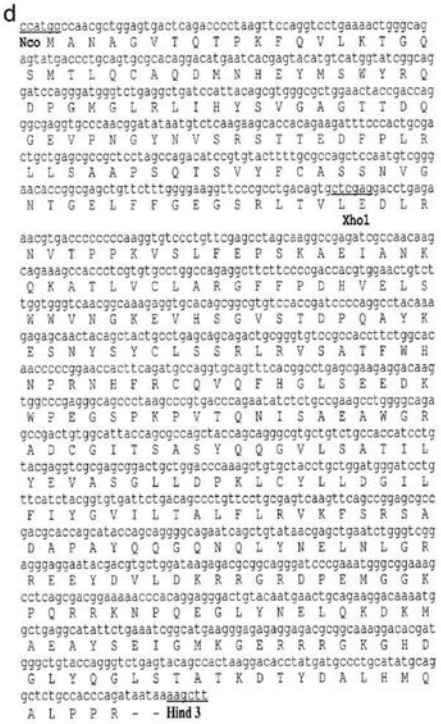


【図２５－２】

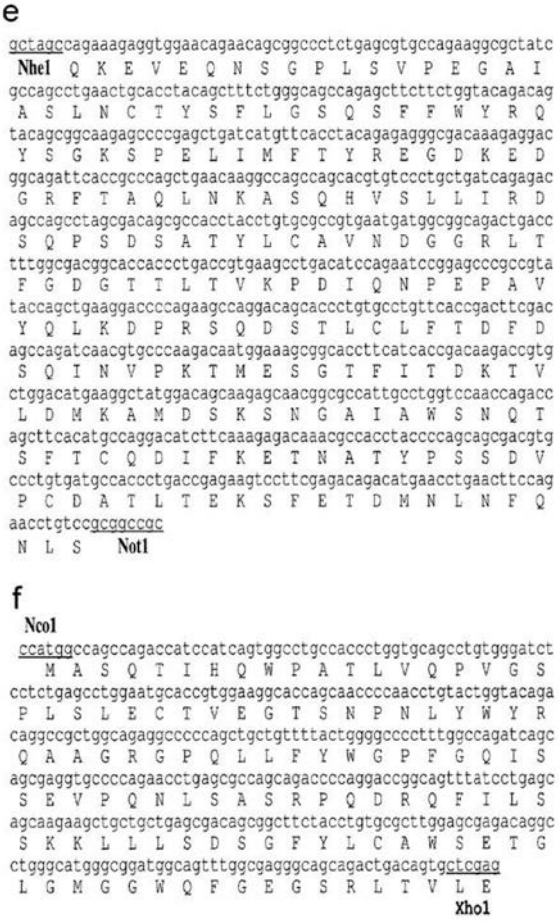
c

```
gctagcaagcaggaagtgactcagatcccagccgctctgagcgtgcctgagggagaaaac
 NheI  K  Q  E  V  T  Q  I  P  A  A  L  S  V  P  E  G  E  N
ctggtcctgaattgcagtttcaccgactcagccatctataacctgcagtggtttcgccag
 L  V  L  N  C  S  F  T  D  S  A  I  Y  N  L  Q  W  F  R  Q
gatccaggcaagggactgacctccctgctgctgattcagagctcccagagggaacagaca
 D  P  G  K  G  L  T  S  L  L  L  I  Q  S  S  Q  R  E  Q  T
tctggcagactgaatgctagtctggacaaatctagtggacggtctaccctgtacatcgca
 S  G  R  L  N  A  S  L  D  K  S  S  G  R  S  T  L  Y  I  A
gccagccagcctggagattccgcaacatatctgtgcgccgtgcgcccacttacaggcgga
 A  S  Q  P  G  D  S  A  T  Y  L  C  A  V  R  P  L  T  G  G
agctacattcccaccttcgggcgaggtacaagcctgatcgtgcacccagacatccagaat
 S  Y  I  P  T  F  G  R  G  T  S  L  I  V  H  P  D  I  Q  N
ccggagcccgccgtataccagctgaaggaccccagaagccaggacagcaccctgtgcctg
 P  E  P  A  V  Y  Q  L  K  D  P  R  S  Q  D  S  T  L  C  L
ttcaccgacttcgacagccagatcaacgtgcccaagacaatggaaagcggcaccttcatc
 F  T  D  F  D  S  Q  I  N  V  P  K  T  M  E  S  G  T  F  I
accgacaagaccgtgctggacatgaaggctatggacagcaagagcaacggcgccattgcc
 T  D  K  T  V  L  D  M  K  A  M  D  S  K  S  N  G  A  I  A
tggtccaaccagaccagcttcacatgccaggacatcttcaaagagacaaacgccacctac
 W  S  N  Q  T  S  F  T  C  Q  D  I  F  K  E  T  N  A  T  Y
cccagcagcgacgtgccctgtgatgccaccctgaccgagaagtccttcgagacagacatg
 P  S  S  D  V  P  C  D  A  T  L  T  E  K  S  F  E  T  D  M
Aacctgaacttccagaacctgtccgcggccgcaggcctgctggatcccaagctgtgctac
                        NotI
 N  L  N  F  Q  N  L  S  A  A  A  G  L  L  D  P  K  L  C  Y
ctgctggacgggatcctgttcatctacggtgtgatcctgactgccctgttcctgcgagtc
 L  L  D  G  I  L  F  I  Y  G  V  I  L  T  A  L  F  L  R  V
aaattttctcggagtgccgacgctcctgcataccagcaggggcagaaccagctgtataac
 K  F  S  R  S  A  D  A  P  A  Y  Q  Q  G  Q  N  Q  L  Y  N
gagctgaatctgggtcggagggaggaatatgacgtgctggataagagacgcggcagggat
 E  L  N  L  G  R  R  E  E  Y  D  V  L  D  K  R  R  G  R  D
ccagaaatgggggcaagccccagcgacggaaaaaccctcaggagggactgtataatgaa
 P  E  M  G  G  K  P  Q  R  R  K  N  P  Q  E  G  L  Y  N  E
ctgcagaaggacaaaatggccgaggcttactctgaaattgggatgaagggcgagaggaga
 L  Q  K  D  K  M  A  E  A  Y  S  E  I  G  M  K  G  E  R  R
cgcggcaaaggacacgatggcctgtaccagggactgagcactgctaccaaggacacatat
 R  G  K  G  H  D  G  L  Y  Q  G  L  S  T  A  T  K  D  T  Y
gatgctctgcatatgcaggcactgccccctagataataaggtacc
 D  A  L  H  M  Q  A  L  P  P  R  -  -  Acc65I
```

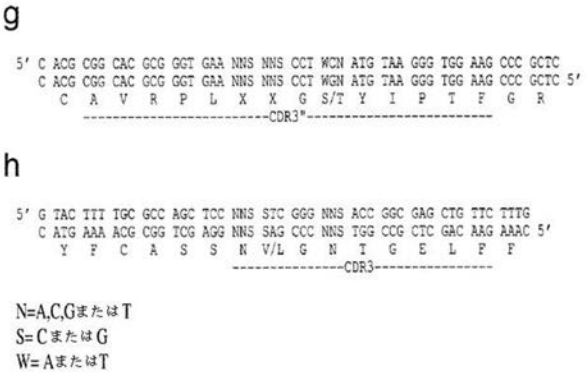
【図２５－３】



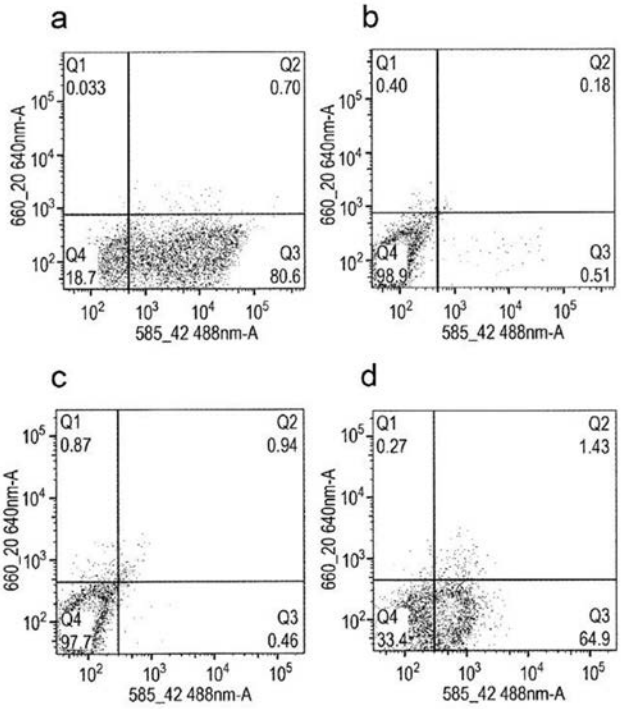
【図２５－４】



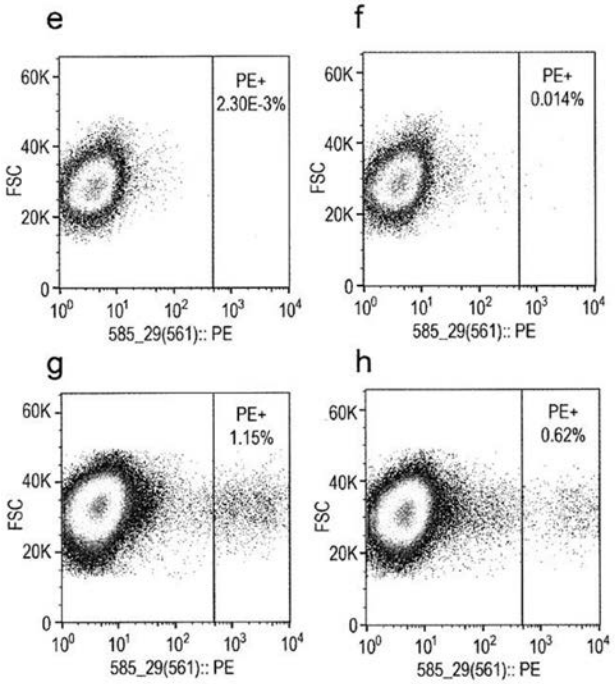
【図２５－５】



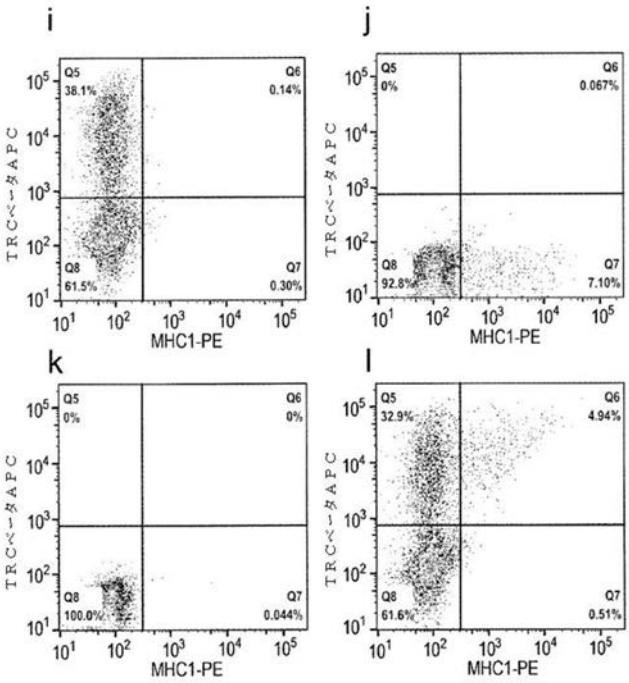
【図２６－１】



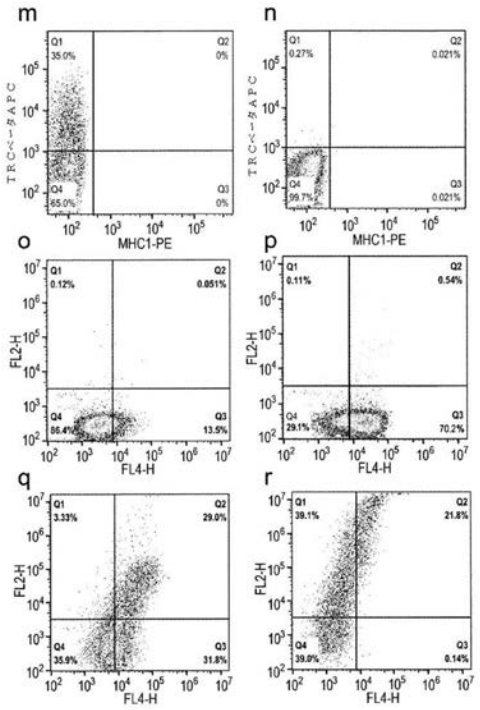
【図２６－２】



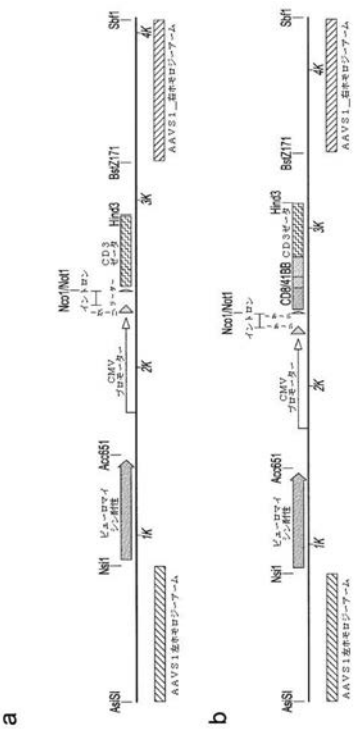
【図２６－３】



【図２６－４】



【図２７－１】



【図２７－２】

c

リーダー **Nco1** **Not1**

ggcgccatggcccaggtcgcggccgcaagcggactgctggacccaaagctgtgctacctg
G A M A S G L L D P K L C Y L
ctggatgggatcctgttcatctacggtgtgattctgacagccctgttcctgcgagtcaag
L D G I L F I Y G V I L T A L F L R V K
ttcagccggagcgccgacgcaccagcataccagcaggggcagaatcagctgtataacgag
F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E
ctgaatctgggtcggagggaggaatacgacgtgctggataagagacgcggcagggatccc
L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P
gaaatgggcggaaagcctcagcgacggaaaaacccacaggagggactgtacaatgaactg
E M G G K P Q R R K N P Q E G L Y N E L
cagaaggacaaaatggctgaggcatattctgaaatcggcatgaagggagagaggagacgc
Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R
ggcaaaggacacgatgggctgtaccagggtctgagtacagccactaaggacacctatgat
G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D

Hind3

gccctgcatatgcaggctctgccacccagataataaaagctt
A L H M Q A L P P R - -

【図２７－３】

d

リーダー **Nco1** **Not1** I--- CD 8 ヒンジ／膜貫通 →

gccatggcc caggtcgcggccgca acaacaaccccagcccccagacctcctacccct
A M A T T T P A P R P P T P
gcccctacaattgccagccagcctctgagcctgaggcccgaggcttgtagaccagctgct
A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A
ggcggagccgtgcacaccagaggactggatttcgcctgcgacatctacatctgggccccct
G G A V H T R G L D F A C D I Y I W A P

←--- CD 8 ヒンジ 膜貫通 ---II 4-1BB→

ctggccggcacatgtggcgtgctgctgctgagcctcgtgatcaccctgtactgc aagcgg
L A G T C G V L L L S L V I T L Y C K R
ggcagaaagaaactgctgtacatctttaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacc
G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T

←-- 4-1BB--I

caggaagaggacggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggc ggctgcgagctg
Q E E D G C S C R F P E E E E E G G C E L

I---CD3ζ→

agagtgaagttcagcagatccgccgacgcccctgcctacaagcagggccagaaccagctg
R V K F S R S A D A P A Y K Q G Q N Q L
tacaacgagctgaacctgggcagacgggaagagtacgacgtgctggacaagcggagaggc
Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G
cgggacccagagatgggcggaaagcccagaagaaagaacccccaggaaggcctgtataac
R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N
gaactgcagaaagacaaaatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgg
E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R
agaagaggcaaggggcacgatggcctgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggacacc
R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T
tatgacgccctgcacatgcaggccctgccccctagataataaaagctt
Y D A L H M Q A L P P R - - **Hind 3**

【図２７－４】

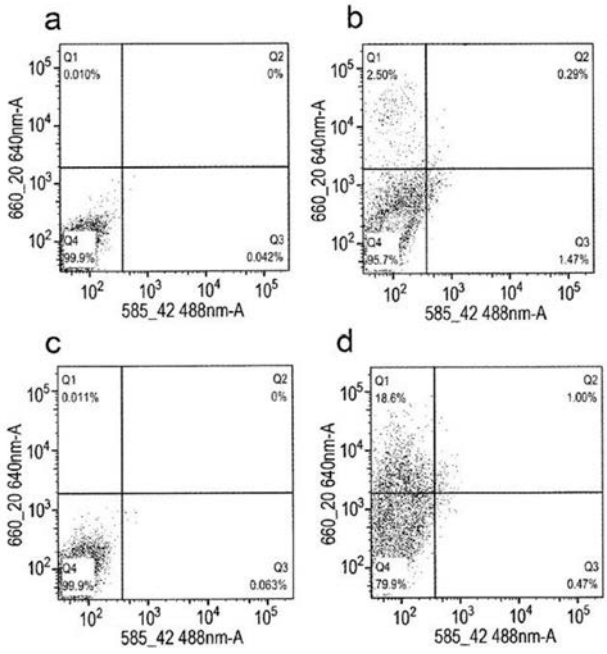
e

Nco1

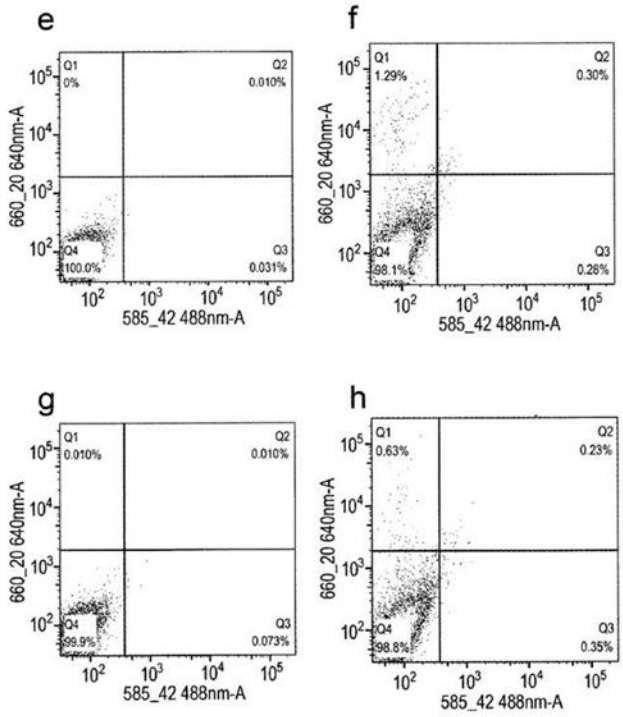
g**ccatgg**ccgaagtgaaactgcaggagtctggacccggcctggtggccccatctcagtct
A M A E V K L Q E S G P G L V A P S Q S
ctgagcgtgacctgtaccgtgtccggcgtgtccctgcctgactatggcgtgtcctggatc
L S V T C T V S G V S L P D Y G V S W I
agacagccccccagaaagggcctggaatggctgggagtgatctggggcagcgaaaccacc
R Q P P R K G L E W L G V I W G S E T T
tactacaacagcgccctgaagtcccggctgaccatcatcaaggacaactccaagagccag
Y Y N S A L K S R L T I I K D N S K S Q
gtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaag
V F L K M N S L Q T D D T A I Y Y C A K
cactactactacggcggcagctacgctatggactactggggccagggcacctcggtcacc
H Y Y Y G G S Y A M D Y W G Q G T S V T
gtctcgagtggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtggcgctagcgacatc
V S S G G G G S G G G G S G G G A S D I
cagatgacccagaccaccagcagcctgagcgccagcctgggcgatagagtgaccatcagc
Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S
tgcagagccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaaacccgacggc
C R A S Q D I S K Y L N W Y Q Q K P D G
accgtgaagctgctgatctaccacaccagcagactgcacagcggcgtgcccagcagattt
T V K L L I Y H T S R L H S G V P S R F
tccggctctggcagcggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagat
S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D
atcgctacctacttctgtcagcaaggcaacaccctgccctacaccttcggcggagggacc
I A T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G G T
aagctggagatcaaacgtaccgcggccgca
K L E I K R T A A A

Not1

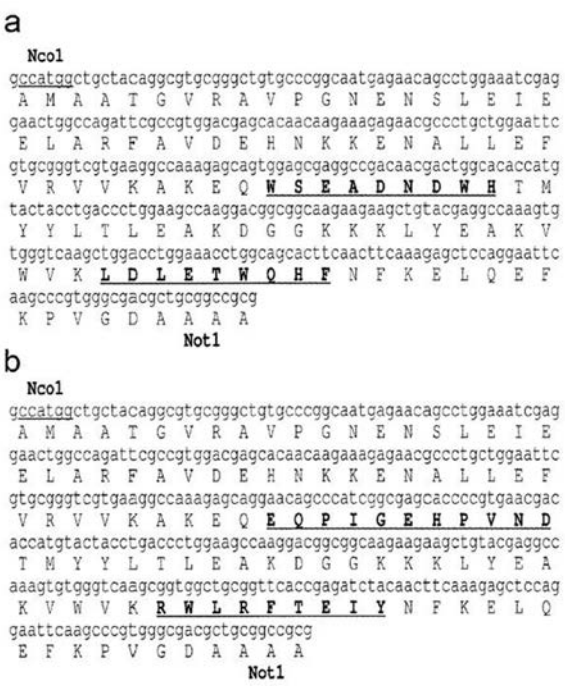
【図２８－１】



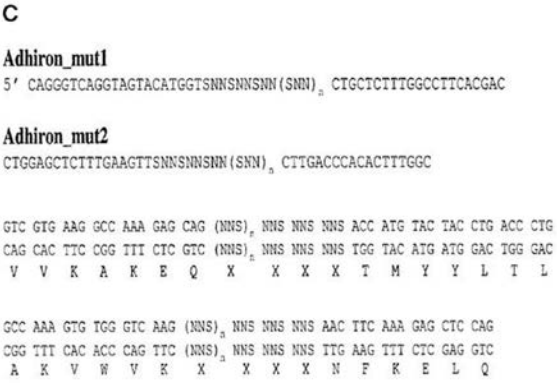
【図２８－２】



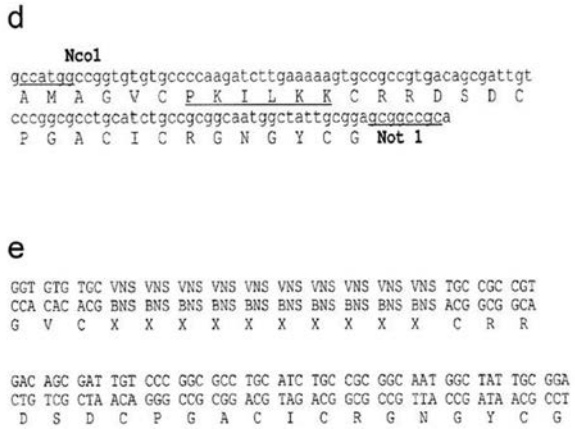
【図２９－１】



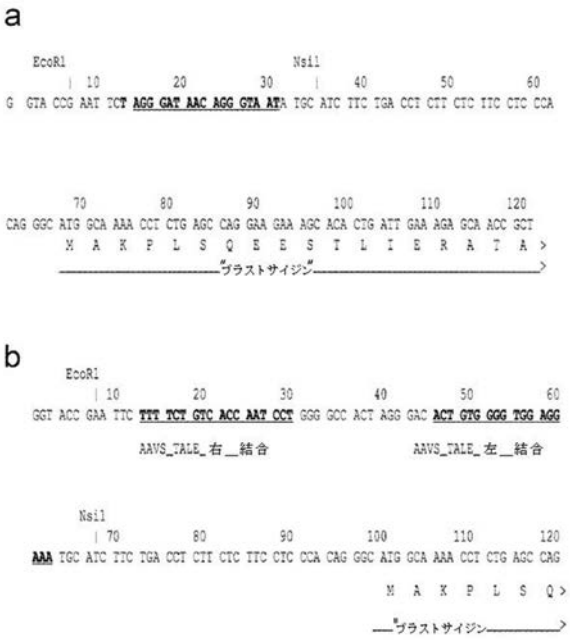
【図２９－２】



【図２９－３】



【図３０】



【図３１】



【配列表】

2017518362000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/051287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C12N15/90 C12N9/22
ADD.

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)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CAB Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI CHANG-ZHENG ET AL: "Identification of HBsAg-specific antibodies from a mammalian cell displayed full-length human antibody library of healthy immunized donor.", CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY MAR 2012, vol. 9, no. 2, March 2012 (2012-03), pages 184-190, XP002743051, ISSN: 2042-0226 cited in the application	66-74
Y	the whole document	1-65, 75-77

X	WO 2013/092720 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HUELSMANN PETER MICHAEL [DE]; KNOETGEN HENDRIK) 27 June 2013 (2013-06-27)	66-74
Y	the whole document	1-65, 75-77

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 November 2015	18/11/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hornig, Horst

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

International application No.
PCT/GB2015/051287

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-77

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/051287

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU CHEN ET AL: "Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 2, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 508-518, XP009162612, ISSN: 1942-0870	66-74
Y	the whole document	1-65, 75-77

X	RAN TAUBE ET AL: "Lentivirus Display: Stable Expression of Human Antibodies on the Surface of Human Cells and Virus Particles", PLOS ONE, vol. 3, no. 9, 11 September 2008 (2008-09-11), page e3181, XP055027886, DOI: 10.1371/journal.pone.0003181	66-74
Y	the whole document	1-65, 75-77

X	BEERLI R R ET AL: "Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 105, no. 38, 23 September 2008 (2008-09-23), pages 14336-14341, XP002518752, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0805942105	66-74
Y	the whole document	1-65, 75-77

X	LEE H W ET AL: "Construction and characterization of a pseudo-immune human antibody library using yeast surface display", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 346, no. 3, 4 August 2006 (2006-08-04), pages 896-903, XP024925400, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.05.202 [retrieved on 2006-08-04] cited in the application	66-74
Y	the whole document	1-65, 75-77

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/051287

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOEHLE E A ET AL: "Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 104, no. 9, 1 February 2007 (2007-02-01), pages 3055-3060, XP002518477, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0611478104 cited in the application the whole document -----	1-65, 75-77
Y	SANDRA CRISTEA ET AL: "In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 110, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01) , pages 871-880, XP055076901, DOI: 10.1002/bit.24733/abstract) the whole document -----	1-65, 75-77
A	S. J. ORLANDO ET AL: "Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 38, no. 15, 8 June 2010 (2010-06-08), pages e152-e152, XP055076783, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq512 cited in the application the whole document -----	1-77
A	WO 2014/033644 A2 (NOVARTIS AG [CH]; YANG YI [US]; MARESCA MARCELLO [US]) 6 March 2014 (2014-03-06) the whole document -----	1-77
A	M. MARESCA ET AL: "Obligate Ligation-Gated Recombination (ObLiGaRe): Custom-designed nuclease-mediated targeted integration through nonhomologous end joining", GENOME RESEARCH, vol. 23, no. 3, 14 November 2012 (2012-11-14), pages 539-546, XP055077484, ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/gr.145441.112 cited in the application the whole document -----	1-77

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/051287

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALLEN C ET AL: "Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining", MOLECULAR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 1, no. 12, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 913-920, XP002616893, ISSN: 1541-7786 the whole document	1-77
A	MELANIE MEYER ET AL: "Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 107, no. 34, 24 August 2010 (2010-08-24), pages 15022-15026, XP009143027, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1009424107 cited in the application the whole document	1-77
A	XIAOXIA CUI ET AL: "Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 29, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 64-67, XP055065200, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1731 the whole document	1-77

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2015/051287

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013092720 A1	27-06-2013	CA 2854246 A1	27-06-2013
		CN 104011080 A	27-08-2014
		EP 2794662 A1	29-10-2014
		HK 1200849 A1	14-08-2015
		JP 2015503907 A	05-02-2015
		KR 20140107295 A	04-09-2014
		SG 11201403445Y A	30-07-2014
		US 2015038354 A1	05-02-2015
		WO 2013092720 A1	27-06-2013
WO 2014033644 A2	06-03-2014	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/GB2015/051287

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-77

A method of producing a library of eukaryotic cell clones containing DNA encoding a diverse repertoire of binders, comprising providing donor DNA molecules encoding the binders, and eukaryotic cells, introducing the donor DNA into the cells and providing a site-specific nuclease within the cells, wherein the nuclease cleaves a recognition sequence in cellular DNA to create an integration site at which the donor DNA becomes integrated into the cellular DNA, integration occurring through DNA repair mechanisms endogenous to the cells, thereby creating recombinant cells containing donor DNA integrated in the cellular DNA, and culturing the recombinant cells to produce clones, thereby providing a library of eukaryotic cell clones containing donor DNA encoding the repertoire of binders; A method of producing a library of eukaryotic cell clones containing DNA encoding a diverse repertoire of multimeric binders, each binder comprising a first and a second subunit; a method of producing a library of eukaryotic cell clones containing DNA encoding a diverse repertoire of multimeric binders, each binder comprising at least a first and a second subunit; a library produced by a method according to any of said methods; a container containing eukaryotic cells comprising said library; use of a site-specific nuclease for targeted cleavage of cellular DNA in the construction of a library of eukaryotic cells containing DNA encoding a repertoire of binders, wherein nuclease-mediated DNA cleavage enhances site-specific integration of binder genes through endogenous cellular DNA repair mechanisms;

---

2. claims: 78-87

A method to convert single chain antibody (scFv) populations to immunoglobulin (Ig) or fragment, antigen binding (Fab) format in such a way that original variable heavy (VH) and variable light (VL) chain pairings are maintained; said method which proceeds via a non-replicative "mini-circle" DNA; A method that allows the reformatting of any two joined DNA elements into a vector where the DNA elements are cloned under the control of separate promoters, or separated by alternative control elements, but maintaining the original DNA pairing;

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	***16/46***	***(2006.01)***	C07K	16/46		
C40B	***30/04***	***(2006.01)***	C40B	30/04		
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*9/16*	*(2006.01)*	C12N	9/16	A	

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

(72)発明者 マッカファティ，ジョン
イギリス国，ケンブリッジシャー州 シービー２２ ３エーピー，バブラハム，サウストン ロード，チャーチ ファーム コテージ
(72)発明者 ダイソン，マイケル
イギリス国，ケンブリッジシャー州 シービー２２ ５イージェー，ケンブリッジ，グレート シェルフォード，ベリステッド ロード ４８
(72)発明者 パールティバン，コタイ
イギリス国，ケンブリッジシャー州 シービー５ ８エイチエー，ケンブリッジ，ニューマーケット ロード １２３

Ｆターム(参考) 4B029 AA23 BB06 BB07 BB11 BB12 FA03 FA04 GA01 GA03
4B050 CC07 LL03 LL10
4B063 QA20 QQ07 QQ08 QQ09 QQ34 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QS33 QS34 QX02
4B065 AA57X AA88X AA90X AC20 BA01 BA21 CA44 CA46
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA22 EA50 EA60 FA74