(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2010-522566
(P2010-522566A)
(43)公表日　平成22年7月8日(2010.7.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4H045
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 52 頁）

(21)出願番号　特願2010-501191 (P2010-501191)
(86)(22)出願日　平成20年3月26日 (2008.3.26)
(85)翻訳文提出日　平成21年10月23日 (2009.10.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/058283
(87)国際公開番号　WO2008/118970
(87)国際公開日　平成20年10月2日 (2008.10.2)
(31)優先権主張番号　60/920,568
(32)優先日　平成19年3月27日 (2007.3.27)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　508339161
シー　レーン　バイオテクノロジーズ，エルエルシー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２７，　アサートン，　セルビー　レーン　３５６
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体代替軽鎖配列を含む構築物およびライブラリー

(57)【要約】
Ｂ細胞の前駆体（プレＢ細胞）は、μ重鎖を産生するが、十分に発達した軽鎖の代わりにＶｐｒｅＢ（ｌ－３）およびλ５とそれぞれ呼ばれるＢ系統特異的遺伝子のセットを発現するリンパ球として骨髄中で特定されてきた。本発明は、抗体代替軽鎖配列を含む構築物およびライブラリーに関する。特に、本発明は、例えば、抗体重鎖可変ドメイン配列のような別のポリペプチドと任意にパートナーにされたＶｐｒｅＢ配列を含む構築物、およびそれを含有するライブラリーに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
異種アミノ酸配列にコンジュゲートされたＶｐｒｅＢ配列および／またはλ５配列を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、標的に結合することができる、ポリペプチド。
【請求項２】
ＶｐｒｅＢ配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
前記ＶｐｒｅＢ配列が、未変性ＶｐｒｅＢ１配列、未変性ＶｐｒｅＢ２配列、未変性ＶｐｒｅＢ３配列ならびにそれらの断片および変異体からなる群より選択される、請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
前記未変性ＶｐｒｅＢ配列が、配列番号１のヒトＶｐｒｅＢ１、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２、配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３、ならびにそれらの断片および変異体からなる群より選択される、請求項３に記載のポリペプチド。
【請求項５】
前記異種アミノ酸配列が、λ５配列を含む、請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記異種アミノ酸配列が、配列番号５のヒトλ５または配列番号６のヒトλ５様ポリペプチドの全部または一部を含む、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記λ５配列が、前記ＶｐｒｅＢ配列に融合される、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項８】
異種アミノ酸配列へのＶｐｒｅＢ配列の融合物を含む、請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項９】
前記異種アミノ酸配列が、λ５配列である、請求項８に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
前記ＶｐｒｅＢ配列が、配列番号１のヒトＶｐｒｅＢｌ、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２、および配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３、ならびにそれらの断片および変異体からなる群より選択される、請求項９に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
前記λ５配列が、配列番号５のヒトλ５の配列、配列番号６のヒトλ５様ポリペプチド、またはそれらの断片もしくは変異体である、請求項１０に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
前記融合が、それぞれ、前記ＶｐｒｅＢ配列およびλ５のＣＤＲ３類似領域においてまたはそのまわりで起きる、請求項９に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記異種アミノ酸配列が、抗体軽鎖可変領域配列を含む、請求項８に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
前記抗体軽鎖可変領域配列が、抗体軽鎖ＣＤＲ３領域に類似する部位において前記ＶｐｒｅＢ配列に融合される、請求項１３に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記抗体軽鎖可変領域配列の前記ＣＤＲ３領域が、前記ＣＤＲ３領域に類似する部位において前記ＶｐｒｅＢ配列に融合される、請求項１３に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
前記抗体軽鎖が、λ鎖である、請求項１５に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
前記抗体軽鎖が、κ鎖である、請求項１５に記載のポリペプチド。

【請求項１８】
前記異種アミノ酸配列が、抗体軽鎖定常領域配列をさらに含む、請求項１３に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
前記定常領域配列が、抗体軽鎖の定常領域全体である、請求項１８に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
λ５配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項２１】
前記λ５配列が、配列番号５のヒトλ５の配列、または配列番号６のヒトλ５様ポリペプチド、あるいはそれらの断片または変異体である、請求項２０に記載のポリペプチド。
【請求項２２】
前記異種アミノ酸配列が、前記λ５配列にコンジュゲートされたＶｐｒｅＢ配列である、請求項２１に記載のポリペプチド。
【請求項２３】
前記コンジュゲーションが、前記λ５およびＶｐｒｅＢ配列の融合である、請求項２２に記載のポリペプチド。
【請求項２４】
前記コンジュゲーションが、前記λ５とＶｐｒｅＢ配列との間の共有結合である、請求項２２に記載のポリペプチド。
【請求項２５】
前記共有結合が、接続ペプチドまたはポリペプチド配列により形成される、請求項２４に記載のポリペプチド。
【請求項２６】
ＶｐｒｅＢ配列およびλ５配列を含み、前記コンジュゲーションが、非共有結合性会合であり、前記ＶｐｒｅＢおよびλ５配列の少なくとも一方が、それぞれ、完全長未変性ＶｐｒｅＢおよびλ５配列以外である、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項２７】
前記ＶｐｒｅＢおよびλ５配列の少なくとも一方が、それぞれ、未変性ＶｐｒｅＢおよびλ５配列の断片または変異体である、請求項２６に記載のポリペプチド。
【請求項２８】
前記ポリペプチドが、第２の異種アミノ酸配列にさらにコンジュゲートされる、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項２９】
前記第２の異種アミノ酸配列と共有結合的に会合させられた、λ５配列へのＶｐｒｅＢ配列の融合物を含む、請求項２８に記載のポリペプチド。
【請求項３０】
前記第２の異種ポリペプチド配列が、可変領域を含む抗体重鎖配列である、請求項２９に記載のポリペプチド。
【請求項３１】
前記抗体重鎖配列が、前記ＶｐｒｅＢ配列と前記λ５配列との融合物にペプチドリンカーによってコンジュゲートされる、請求項３０に記載のポリペプチド。
【請求項３２】
前記抗体重鎖配列が、前記ＶｐｒｅＢ配列と前記λ５配列との融合物に非共有結合性の会合によってコンジュゲートされ、二量体複合体を形成する、請求項３０に記載のポリペプチド。
【請求項３３】
前記抗体重鎖可変領域配列が、前記ポリペプチドと同じ標的に結合する、請求項３２に記載のポリペプチド。
【請求項３４】

前記抗体重鎖可変領域配列が、前記ポリペプチドが結合する標的と異なる標的に結合する、請求項３２に記載のポリペプチド。
【請求項３５】
前記ポリペプチドが腫瘍抗原に結合し、前記抗体可変領域配列がエフェクター細胞に結合する、請求項３４に記載のポリペプチド。
【請求項３６】
非共有結合的に会合させられたＶｐｒｅＢ配列およびλ５配列と非共有結合的に会合させられて三量体複合体を形成する可変領域を含む抗体重鎖配列をさらに含む、請求項２６に記載のポリペプチド。
【請求項３７】
前記抗体重鎖が、前記ポリペプチドと同じ標的に結合する可変領域配列を含む、請求項３６に記載のポリペプチド。
【請求項３８】
前記抗体重鎖が、前記ポリペプチドが結合する標的と異なる標的に結合する可変領域配列を含む、請求項３６に記載のポリペプチド。
【請求項３９】
前記ポリペプチドが腫瘍抗原に結合し、前記可変領域配列がエフェクター細胞に結合する、請求項３８に記載のポリペプチド。
【請求項４０】
前記ＶｐｒｅＢ配列および／または前記λ５配列のＣＤＲ類似領域が、治療抗体由来の対応するＣＤＲ配列をグラフトすることにより設計される、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４１】
前記標的が、抗原である、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
前記標的が、ウイルス抗原である、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４３】
前記標的が、インフルエンザＡウイルスである、請求項４２に記載のポリペプチド。
【請求項４４】
前記ポリペプチドが、前記インフルエンザＡウイルスを無力化する、請求項４３に記載のポリペプチド。
【請求項４５】
請求項１～４４のいずれか１項に記載のポリペプチドを含むライブラリー。
【請求項４６】
抗体重鎖と会合させられたＶｐｒｅＢ配列とλ５配列とのコンジュゲートを含むライブラリー。
【請求項４７】
前記コンジュゲートが、前記ＶｐｒｅＢとλ５配列との融合物である、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項４８】
前記コンジュゲートが、前記ＶｐｒｅＢとλ５配列との非共有結合性会合である、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項４９】
前記コンジュゲートが、ペプチドリンカーを介した前記ＶｐｒｅＢとλ５配列との共有結合である、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項５０】
前記抗体重鎖可変領域配列が、前記コンジュゲートと非共有結合的に会合される、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項５１】
前記抗体重鎖可変領域配列が、前記コンジュゲートと共有結合的に会合させられる、請

求項４６に記載のライブラリー。
【請求項５２】
前記抗体重鎖が、前記コンジュゲートと同じ標的に結合する可変領域配列を含む、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項５３】
前記抗体重鎖が、前記コンジュゲートが結合する標的と異なる標的に結合する可変領域配列を含む、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項５４】
前記コンジュゲートが腫瘍抗原に結合し、前記可変領域配列がエフェクター細胞に結合する、請求項５３に記載のライブラリー。
【請求項５５】
ディスプレイの形態である、請求項４５に記載のライブラリー。
【請求項５６】
前記ディスプレイが、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、ＤＮＡディスプレイ、哺乳動物細胞上のディスプレイ、胞子ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ、およびミクロビーズディスプレイからなる群より選択される、請求項５５に記載のライブラリー。
【請求項５７】
ディスプレイの形態である、請求項４６に記載のライブラリー。
【請求項５８】
前記ディスプレイが、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、ＤＮＡディスプレイ、哺乳動物細胞上のディスプレイ、胞子ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ、およびミクロビーズディスプレイからなる群より選択される、請求項５７に記載のライブラリー。
【請求項５９】
代替軽鎖配列を含むライブラリー。
【請求項６０】
ディスプレイの形態である、請求項５９に記載のライブラリー。
【請求項６１】
前記ディスプレイが、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、ＤＮＡディスプレイ、哺乳動物細胞上のディスプレイ、胞子ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ、およびミクロビーズディスプレイからなる群より選択される、請求項５９に記載のライブラリー。
【請求項６２】
前記ライブラリーのメンバーに付加されたまたは埋め込まれた少なくとも１つの付加的な機能性をさらに含む、請求項４５、４６または５９に記載のライブラリー。
【請求項６３】
前記付加的な機能性が、抗体、ペプチド、またはポリペプチド配列により提供される、請求項６２に記載のライブラリー。
【請求項６４】
前記ポリペプチド配列が、受容体またはリガンド配列である、請求項６３に記載のライブラリー。
【請求項６５】
前記抗体、ペプチド、またはポリペプチド配列が、抗体、ペプチド、またはポリペプチドライブラリーのメンバーである、請求項６３に記載のライブラリー。
【請求項６６】
前記ペプチドライブラリーが、ランダムペプチド配列のライブラリーである、請求項６

５に記載のライブラリー。
【請求項６７】
前記ペプチド配列の少なくともいくつかが、標的抗原への結合特異性を有する、請求項６６に記載のライブラリー。
【請求項６８】
ディスプレイの形態である、請求項６２に記載のライブラリー。
【請求項６９】
前記ディスプレイが、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、ＤＮＡディスプレイ、哺乳動物細胞上のディスプレイ、胞子ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ、およびミクロビーズディスプレイからなる群より選択される、請求項６８に記載のライブラリー。
【請求項７０】
抗体重鎖可変領域配列と会合させられた代替軽鎖配列のコレクションを含む、ライブラリー。
【請求項７１】
前記代替軽鎖配列が、１つ以上の標的に対する結合特異性を有する、請求項７０に記載のライブラリー。
【請求項７２】
前記代替軽鎖配列が、同じ標的に対する結合特異性を有する、請求項７１に記載のライブラリー。
【請求項７３】
前記代替軽鎖配列が、少なくとも２つの異なる標的に対する結合特異性を有する、請求項７１に記載のライブラリー。
【請求項７４】
前記代替軽鎖配列が、複数の標的に対する結合特異性を有する、請求項７１に記載のライブラリー。
【請求項７５】
前記代替軽鎖配列が、ＶｐｒｅＢ配列および／またはλ５配列を含む、請求項７０に記載のライブラリー。
【請求項７６】
前記ＶｐｒｅＢ配列が、ヒトＶｐｒｅＢ１（配列番号１）、マウスＶｐｒｅＢ２（配列番号２および３）、およびヒトＶｐｒｅＢ３（配列番号４）配列、ならびにそれらの断片および変異体からなる群より選択される、請求項７５に記載のライブラリー。
【請求項７７】
前記λ５配列が、配列番号５のヒトλ５、配列番号６のヒトλ５様ポリペプチド、ならびにそれらの断片および変異体からなる群より選択される、請求項７５に記載のライブラリー。
【請求項７８】
前記ＶｐｒｅＢおよびλ５配列が、互いに非共有結合的に会合させられる、請求項７５に記載のライブラリー。
【請求項７９】
前記ＶｐｒｅＢおよびλ５配列が、互いに共有結合的に接続される、請求項７５に記載のライブラリー。
【請求項８０】
前記ＶｐｒｅＢおよびλ５配列が、互いに直接的に融合される、請求項７９に記載のライブラリー。
【請求項８１】
前記ライブラリーのメンバーに付加されたまたは埋め込まれた少なくとも１つの付加的な機能性をさらに含む、請求項７５に記載のライブラリー。

【請求項８２】
前記付加的な機能性が、抗体、ペプチド、またはポリペプチド配列により提供される、請求項８１に記載のライブラリー。
【請求項８３】
前記ポリペプチド配列が、受容体またはリガンド配列である、請求項８２に記載のライブラリー。
【請求項８４】
前記抗体、ペプチド、またはポリペプチド配列が、抗体、ペプチド、またはポリペプチドライブラリーのメンバーである、請求項８２に記載のライブラリー。
【請求項８５】
前記ペプチドライブラリーが、ランダムペプチド配列のライブラリーである、請求項８４に記載のライブラリー。
【請求項８６】
前記ペプチド配列の少なくともいくつかが、標的抗原への結合特異性を有する、請求項８５に記載のライブラリー。
【請求項８７】
ディスプレイの形態である、請求項７０に記載のライブラリー。
【請求項８８】
前記ディスプレイが、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、ＤＮＡディスプレイ、哺乳動物細胞上のディスプレイ、胞子ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ、およびミクロビーズディスプレイからなる群より選択される、請求項８７に記載のライブラリー。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗体代替軽鎖配列を含む構築物およびライブラリーに関する。特に、本発明は、例えば、抗体重鎖可変ドメイン配列のような別のポリペプチドと任意にパートナーにされたＶｐｒｅＢ配列を含む構築物、およびそれを含有するライブラリーに関する。
【背景技術】
【０００２】
Ｂリンパ球により産生された抗体（Ｉｇ）分子は、重（Ｈ）鎖および軽（Ｌ）鎖で作られている。Ｈ鎖およびＬ鎖のアミノ末端ドメインのアミノ酸配列は、特に抗原結合部位を形成する３つの超可変領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）において可変である（V_HおよびV_L）。Ｈ鎖およびＬ鎖の集合は、Ｌ鎖（C_L）の定常領域と重鎖（C_{H1}）の第１の定常領域との間のジスルフィド結合によって、およびV_HドメインとV_Lドメインとの間の非共有結合的相互作用によって安定化される。
【０００３】
ヒトおよびマウスのような多くの動物において、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖をコードする遺伝子は、Ｖ領域のいくつかの部分をコードする遺伝子断片の段階的体細胞再構成により組み立てられる。Ｂリンパ球発達の様々な段階は、Ｉｇ遺伝子座の再構成状態により特徴付けられる（例えば、非特許文献１を参照されたい）。
【０００４】
Ｂ細胞の前駆体（プレＢ細胞）は、μ重鎖を産生するが、十分に発達した軽鎖の代わりにＶｐｒｅＢ（ｌ－３）およびλ５とそれぞれ呼ばれるＢ系統特異的遺伝子のセットを発現するリンパ球として骨髄中で特定されてきた。
【０００５】
ヒトＶｐｒｅＢ１（ＣＡＧ３０４９５）の主要なアイソフォームは、１４５ａａ－長ポリペプチド（配列番号１）である。これは、ＩｇＶドメイン様構造を有しているが、典型的なＶドメインの最後のβ－ストランド（β７）を欠いており、他のどのようなタンパク

質とも配列相同性を全く示さないカルボキシル末端を有する。ＶｐｒｅＢ２は、１４２－アミノ酸マウスＶｐｒｅＢ２ポリペプチド（Ｐｌ３３７３；配列番号２）、およびマウスＶｐｒｅＢ２配列の１７１－アミノ酸長スプライス変異体（ＣＡＡ０１９６４１　配列番号３）を含むいくつかのアイソフォームを有する。ＶｐｒｅＢ１配列およびＶｐｒｅＢ２配列は、欧州特許第０２６９１２７号および米国特許第５，１８２，２０５号；非特許文献２；ならびに非特許文献３に開示にされている。ヒトＶｐｒｅＢ３（配列番号４）の主要なアイソフォームは、非特許文献２に開示されている１２３アミノ酸長タンパク質（ＣＡＧ３０４９６）である。

【０００６】

ＶｐｒｅＢ（１－３）は、別のタンパク質、λ５と、非共有結合的に会合している。ヒトλ５は、抗体軽鎖との強い相同性および、そのアミノ末端に向かって、一方がＶλドメインのβ７との強い相同性を示す２つの機能的に別個の領域を有するＩｇＣドメイン様構造を持つ２０９－アミノ酸ポリペプチド（ＣＡＡ０１９６２；配列番号５）である。ヒトλ５様タンパク質は、２１３のアミノ酸（ＮＰ＿０６４４５５；配列番号６）を有し、抗体λ軽鎖定常領域と約８４％の配列同一性を示す。

【０００７】

さらなる詳細については、以下の総説を参照されたい：非特許文献４；非特許文献５；および非特許文献６。

【０００８】

ＶｐｒｅＢおよびλ５ポリペプチドは共に、非共有結合的に会合されたＩｇ軽鎖様構造を形成し、これは、代替軽鎖または偽軽鎖と呼ばれる。初期のプレＢ細胞の表面において、代替軽鎖は、シグナルトランスデューサーＣＤ７９ａ／ＣＤ７９ｂヘテロ二量体と共同して膜結合Ｉｇμ重鎖にジスルフィド結合されており、Ｂ細胞様構造、いわゆるプレＢ細胞受容体（ｐｒｅＢＣＲ）を形成する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｍｅｌｃｈｅｒｓ，Ｆ．＆Ｒｏｌｉｎｋ，Ａ．，Ｂ－Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ａｎｄ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｐａｕｌ，Ｗ．Ｅ．，ｅｄ．，１９９９，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｐｈｉｌａｄｅｐｈｉａ

【非特許文献２】Ｃｏｌｌｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．５（１０）：Ｒ８４（２００４）

【非特許文献３】Ｈｏｌｌｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６（１４）：５５５２－５５５６（１９８９）

【非特許文献４】Ｋａｒａｓｕｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６３：１－４１（１９９６）

【非特許文献５】Ｍｅｌｃｈｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｔｏｄａｙ　１４：６０－６８（１９９３）

【非特許文献６】Ｍｅｌｃｈｅｒｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：２５７１－２５７３（１９９９）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

１つの態様において、本発明は、異種アミノ酸配列にコンジュゲートされたＶｐｒｅＢ配列またはλ５配列を含むポリペプチドに関し、このポリペプチドは、標的に結合することができる。

【００１１】

好ましい実施形態において、ポリペプチドはＶｐｒｅＢ配列を含み、ここで、ポリペプチドが標的に結合する能力を保持するのであれば、ＶｐｒｅＢは、ヒトＶｐｒｅＢ１（配列番号１）、マウスＶｐｒｅＢ２（配列番号２および３）およびヒトＶｐｒｅＢ３（配列

番号４）、あるいは別の哺乳動物種におけるそれらの相同体、またはそれらの断片もしくは変異体を含む任意の未変性ＶｐｒｅＢであり得る。

【００１２】

好ましい実施形態において、異種アミノ酸配列はλ５配列であり、これは、配列番号５の未変性ヒトλ５配列、配列番号６のヒトλ５様配列、ならびにそれらの断片および変異体を含む、任意の未変性λ５配列、またはそれらの任意の断片もしくは変異体であり得る。

【００１３】

ＶｐｒｅＢ配列および異種アミノ酸配列、例えばλ５配列は、互いに直接融合されてもよく、または非共有結合的に会合させられてもよい。前者の場合、融合は好ましくは、それぞれ、ＶｐｒｅＢおよびλ５のＣＤＲ３類似領域においてまたはそのまわりで起きる。

【００１４】

別の実施形態において、異種アミノ酸配列は、抗体軽鎖可変領域配列であるか、またはそれを含む。特定の実施形態において、抗体軽鎖可変領域配列は、抗体軽鎖ＣＤＲ３領域に類似する部位においてＶｐｒｅＢ配列に融合される。別の実施形態において、融合は、抗体軽鎖のＣＤＲ３領域とＶｐｒｅＢのＣＤＲ３類似領域との間である。すべての実施形態において、抗体軽鎖は、λ鎖またはκ鎖であり得る。

【００１５】

特定の実施形態において、ＶｐｒｅＢ－λ５コンジュゲート（融合、他の共有結合、および非共有結合性会合を含む）、およびＶｐｒｅＢ－抗体軽鎖コンジュゲートを制限なく含む本明細書におけるポリペプチドは、抗体重鎖可変領域のような抗体重鎖可変領域配列、または可変領域を含む完全な抗体重鎖を含む配列とさらに会合させられてもよい。

【００１６】

ポリペプチドがλ５配列を含む場合、ポリペプチドが標的に結合する能力を保持するのであれば、λ５は、配列番号５のヒトλ５および配列番号６のヒトλ５様タンパク質、あるいは別の哺乳動物種における相同体、またはそれらの任意の断片もしくは変異体を含む任意の未変性λ５であり得る。特定の実施形態において、λ５配列にコンジュゲートされた異種アミノ酸配列は、ＶｐｒｅＢ配列である。

【００１７】

本発明のポリペプチド構築物において、ＶｐｒｅＢおよびλ５配列は、もし両方とも存在すれば、直接融合、リンカー配列（例えば、ペプチドリンカー）による共有結合、および非共有結合性会合を含む任意の手段によるコンジュゲートであり得る。

【００１８】

特定の実施形態において、ＶｐｒｅＢ配列とλ５配列との融合物は、非共有結合性会合によって抗体重鎖配列にコンジュゲートされて、二量体複合体を形成する。

【００１９】

別の実施形態において、三量体複合体が、ＶｐｒｅＢ配列、λ５配列および抗体重鎖配列の非共有結合性会合によって形成される。ある一定の実施形態において、「ＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標）変異体」の変異体代替軽鎖構造とも呼ばれるこれらの構造において、ＶｐｒｅＢおよびλ５部分の一方または両方の特徴的な尾部（付属物）が、保持され得る（ただし、保持されなくてもよい）。付加的な機能性をそのような付属物に付けることが可能である。加えて、様々な実施形態において、有用な付属物融合が、ＰＫおよび／または効力のような構築物の様々な特性を向上させるために設計および作られ得る。

【００２０】

すべての実施形態において、可変領域配列を含む抗体重鎖が存在する場合、本発明のポリペプチドおよび抗体重鎖可変領域配列は、同じまたは異なる標的に結合してもよい。

【００２１】

別の態様において、本発明は、そのようなポリペプチドのライブラリーに関する。

【００２２】

さらに別の態様において、本発明は、可変領域配列を含む抗体重鎖またはその断片と会

合させられたそのようなポリペプチドのライブラリーに関する。
【００２３】
さらなる態様において、本発明は、抗体重鎖可変領域配列と任意に会合させられた代替軽鎖配列のコレクションを含むライブラリーに関する。
【００２４】
すべての態様において、ライブラリーは、例えば、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、ＤＮＡディスプレイ、哺乳動物細胞上のディスプレイ、胞子ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ、またはミクロビーズディスプレイのようなディスプレイの形態でもよい。
【００２５】
本発明はさらに、例えば、重要な治療的応用を有する所望の結合特性および／または結合親和性を有する抗体様分子を設計または選択するための、そのようなポリペプチドおよびそのようなポリペプチドを含むライブラリーの様々な使用に関する。
【図面の簡単な説明】
【００２６】
【図１】ヒトＶｐｒｅＢｌ（配列番号１）およびヒトλ５と、抗体λ鎖可変および定常領域との配列比較を示す。ＶｐｒｅＢｌが抗体λ鎖可変領域といくらかの配列類似性を共有する一方、λ５は、抗体λ鎖定常領域およびフレームワーク領域４といくらかの類似性を共有する。四角で囲んだ領域は、抗体λ鎖ＣＤＲｌ、ＣＤＲ２および各ＣＤＲ３領域とそれぞれ類似するＶｐｒｅＢ１およびλ５配列を特定する。
【図２】ＶｐｒｅＢおよびλ５配列により形成された代替軽鎖、代替軽鎖配列を含む例示的な融合ポリペプチド、およびＶ－Ｊ接合由来の抗体軽鎖構造の概略図である。
【図３】様々な代替軽鎖欠失および単鎖構築物の概略図である。
【図４】代替軽鎖構築物内への組み合せ機能多様性の組み込みを概略的に例示する。
【図５】様々な例示的な代替軽鎖構築物の遺伝子およびタンパク質構造を示す。
【図６】ＶｐｒｅＢｌ配列と抗体λ５軽鎖可変領域配列との配列比較である。最も高い配列類似度を有する領域が四角で囲んである。図に示されるように、ＶｐｒｅＢｌは、λ５軽鎖可変領域生殖系列に対し５６％～６２％（アミノ酸２～９７）配列同一性しか示さない。
【図７】ＶｐｒｅＢｌ配列と抗体λ５軽鎖定常領域配列との配列比較である。図に示されるように、整列されたＶｐｒｅＢｌ配列は、対応する抗体λ５軽鎖定常領域配列に対し６２％（アミノ酸９７～２０９）配列同一性しか示さない。
【図８】ＶｐｒｅＢｌ配列と抗体κ軽鎖定常領域配列との配列比較である。図に示されるように、整列されたＶｐｒｅＢｌ配列は、対応する抗体κ軽鎖定常領域配列に対し３５％（アミノ酸１０５～２０９）配列同一性しか示さない。
【図９】代替軽鎖（ＳＬＣ）コンポーネントに機能性を付加する様々な代表的方法を例示する。
【図１０－１】配列番号１のヒトＶｐｒｅＢｌ配列、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２配列；配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３配列、配列番号５のヒトλ５配列および配列番号６のヒトλ５様タンパク質配列、ならびに実施例において用いられた様々な構築物の配列を示す。
【図１０－２】配列番号１のヒトＶｐｒｅＢｌ配列、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２配列；配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３配列、配列番号５のヒトλ５配列および配列番号６のヒトλ５様タンパク質配列、ならびに実施例において用いられた様々な構築物の配列を示す。
【図１０－３】配列番号１のヒトＶｐｒｅＢｌ配列、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２配列；配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３配列、配列番号５のヒトλ５配列および配列番号６のヒトλ５様タンパク質配列、ならびに実施例において用いられた様々な構築物の配列を示す。

【図１０－４】配列番号１のヒトＶｐｒｅＢｌ配列、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２配列；配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３配列、配列番号５のヒトλ５配列および配列番号６のヒトλ５様タンパク質配列、ならびに実施例において用いられた様々な構築物の配列を示す。
【図１１】本発明の様々な三量体および二量体代替軽鎖構築物を例示する。
【図１２】代替軽鎖およびコンジュゲートされた重鎖の検出。レーン１：完全長、レーン２：λ５　ｄＴ、レーン３：ＶｐｒｅＢ　ｄｔ、レーン４：ショート、レーン５：ＳＣＬ融合１、レーン６：ＳＬＣ融合２、レーン７：抗体。
【図１３】ＳＬＣ融合タンパク質が、Ｅ．ｃｏｌｉのペリプラズム中で発現および十分に分泌し、ＩｇＭではなくＩｇＧｌ由来の重鎖ＣＨｌと最もうまくパートナーにされる。パネルＡ：Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＳＣＬ融合タンパク質発現。パネルＢ：ＩｇＧｌγ鎖は、ＩｇＭμ鎖よりもうまくＳＬＣ融合とパートナーになり精製する。
【図１４】抗ファージ検出を介したファージ代替軽鎖構築物捕獲ＥＬＩＳＡ。
【図１５】哺乳動物細胞中で発現された精製代替軽鎖構築物がウイルス標的と結合する。
【図１６】哺乳動物細胞中で発現された精製代替軽鎖構築物が、ウイルス抗原と結合する安定な複合体を含む。
【図１７】Ｅ．ｃｏｌｉペリプラズムライゼートと結合する抗原。
【図１８】無力化重鎖と対にされた代替軽鎖融合構築物ファージがＨ５　ＨＡ抗原と容易に結合する。
【図１９】無力化重鎖と対にされた代替軽鎖構築物ファージが抗原と結合する。
【図２０】ファージディスプレイ実験の結果の概要を示す表。
【図２１】代替軽鎖融合１および２のラウンド１のクローン分析の結果。
【図２２】代替軽鎖融合１および２のラウンド２のクローン分析の結果。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
Ａ．　定義
他に定義されなければ、本明細書中で用いられる技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２ｎｄ　ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＮＹ　１９９４）は、本出願中で用いられる用語の多くへの一般的指針を当業者に提供する。
【００２８】
当業者は、本明細書中に記載されるものと類似または同等な多くの方法および材料を認め、それらは、本発明の実施において使用することができるかもしれない。事実、本発明は、記載された方法および材料に全く限定されるものではない。本発明の目的のため、次の用語が以下定義される。
【００２９】
用語「代替軽鎖」は、本明細書中で用いられる場合、ＶｐｒｅＢおよびλ５タンパク質の非共有結合性会合により形成された二量体を意味する。
【００３０】
用語「ＶｐｒｅＢ」は、本明細書中では最も広い意味で用いられ、さらに、具体的には、配列番号１のヒトＶｐｒｅＢ１、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２、配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３、および、スプライス変異体および翻訳後修飾によって形成された変異体を含むアイソフォーム、それらの他の哺乳動物相同体を、制限なく含む任意の未変性配列ＶｐｒｅＢポリペプチド、ならびにそのような未変性配列ポリペプチドの変異体を意味する。
【００３１】
用語「λ５」は、本明細書中では最も広い意味で用いられ、さらに、具体的には、配列番号５のヒトλ５、配列番号６のヒトλ５様タンパク質、および、スプライス変異体およ

び翻訳後修飾によって形成された変異体を含むそれらのアイソフォーム、それらの他の哺乳動物相同体を、制限なく含む任意の未変性配列または変異体λ５ポリペプチド、ならびにそのような未変性配列ポリペプチドの変異体を意味する。

【００３２】

用語「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」および「ＶｐｒｅＢポリペプチドの変異体」は、区別なく用いられ、本明細書中では、アミノ酸修飾の結果として１つ以上のアミノ酸位置において未変性配列ＶｐｒｅＢポリペプチドと異なるポリペプチドとして定義される。本明細書中で定義されるような「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」は、未変性抗体λまたはκ軽鎖配列、あるいはそれらの断片と異なる。「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」は、好ましくは、未変性配列ＶｐｒｅＢポリペプチドと、少なくとも約６５％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約７５％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９８％配列同一性を保持する。別の好ましい実施形態において、「変異体ＶｐｒｅＢポリペプチド」は、そのアミノ酸配列において、未変性抗体λまたはκ軽鎖配列と、９５％未満、または９０％未満、または８５％未満、または８０％未満、または７５％未満、または７０％未満、または６５％未満、または６０％未満同一である。変異体ＶｐｒｅＢポリペプチドは、具体的には、ＶｐｒｅＢ配列のＣ末端における非Ｉｇ様ユニーク尾部が部分的にまたは完全に取り去られているＶｐｒｅＢポリペプチドを制限なく含む。

【００３３】

用語「変異体λ５ポリペプチド」および「λ５ポリペプチドの変異体」は、区別なく用いられ、本明細書中では、アミノ酸修飾の結果として１つ以上のアミノ酸位置において未変性λ５ポリペプチドと異なるポリペプチドとして定義される。本明細書中で定義されるような「変異体λ５ポリペプチド」は、未変性抗体λまたはκ軽鎖配列、あるいはそれらの断片と異なる。「変異体λ５ポリペプチド」は、好ましくは、未変性配列λ５ポリペプチドと、少なくとも約６５％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約７５％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９８％配列同一性を保持する。別の好ましい実施形態において、「変異体λ５ポリペプチド」は、そのアミノ酸配列において、未変性抗体λまたはκ軽鎖配列と、９５％未満、または９０％未満、または８５％未満、または８０％未満、または７５％未満、または７０％未満、または６５％未満、または６０％未満同一である。変異体λ５ポリペプチドは、具体的には、λ５配列のＮ末端におけるユニーク尾部が部分的にまたは完全に取り去られているλ５ポリペプチドを制限なく含む。

【００３４】

パーセントアミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７））を用いて決定され得る。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２配列比較プログラムは、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖからダウンロードされてもよく、またはＮａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤから別の方法で得られてもよい。ＮＣＢＩ－ＢＬＡＳＴ２は、いくつかの検索パラメータを含んでおり、それらの検索パラメータのすべては、例えば、アンマスク＝はい、ストランド＝全部、予想発生数＝１０、最小低複雑度長＝１５／５、マルチパスｅ－値＝０．０１、マルチパスのための定数＝２５、最終ギャップ付加配列比較のためのドロップオフ＝２５およびスコアリング行列＝ＢＬＯＳＵＭ６２を含む既定値に設定される。

【００３５】

用語「ＶｐｒｅＢ配列」は、本明細書中で、上記で定義されたような「ＶｐｒｅＢ」の配列、またはその断片を意味するために用いられる。

【００３６】

用語「λ５配列」は、本明細書中で、上記で定義されたような「λ５」の配列、またはその断片を意味するために用いられる。

【００３７】
本明細書中で定義されるような用語「代替軽鎖配列」は、上記で定義されたような「ＶｐｒｅＢ配列」および／または「λ５配列」を含む任意のポリペプチド配列を意味する。本明細書中で定義されるような「代替軽鎖配列」は、具体的には、配列番号１のヒトＶｐｒｅＢ１配列、配列番号２および３のマウスＶｐｒｅＢ２配列、配列番号４のヒトＶｐｒｅＢ３配列、および、スプライス変異体および翻訳後修飾によって形成された変異体を含むそれらの種々のアイソフォーム、他の哺乳動物種におけるそれらの相同体、ならびにそれらの断片および変異体を制限なく含む。用語「代替軽鎖配列」はさらに、配列番号５のヒトλ５配列、配列番号６のヒトλ５様配列、および、スプライス変異体および翻訳後修飾によって形成された変異体を含むそれらのアイソフォーム、他の哺乳動物種におけるそれらの相同体、ならびにそれらの断片および変異体を制限なく含む。用語「代替軽鎖配列」はさらに、上記で定義されたようなＶｐｒｅＢ配列およびλ５配列双方を含む配列を含む。

【００３８】
代替軽鎖（ＳＣＬ）およびそのコンポーネントの構造を含む、プレＢ細胞受容体（ｐｒｅ－ＢＣＲ）の三次元構造については、例えば、Ｌａｎｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４０（１７）：１２６３－７２（２００４）を参照されたい。

【００３９】
「代替軽鎖配列」は、異種アミノ酸配列、または何か他の異種コンポーネントに任意にコンジュゲートさせて、本明細書における「代替軽鎖構築物」を形成することができる。従って、用語「代替軽鎖構築物」は、最も広い意味で用いられ、異種アミノ酸配列、核酸、および代替軽鎖配列にコンジュゲートされた他の分子を含むすべての付加的な異種コンポーネントを含み、「コンジュゲーション」は、以下で定義される。「代替軽鎖構築物」はまた、本明細書中で、「ＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標）」とも呼ばれ、これら２つの用語は区別なく用いられる。

【００４０】
本発明のポリペプチドの脈絡の中で、用語「異種アミノ酸配列」は、第１のアミノ酸配列を基準として、第１のアミノ酸配列に自然に会合されておらず、少なくとも第１のアミノ酸配列が本明細書における代替軽鎖構築物中で存在する形態ではないアミノ酸配列を意味するために用いられる。従って、ＶｐｒｅＢに比べて「異種アミノ酸配列」は、その未変性環境において未変性ＶｐｒｅＢと会合されていない任意のアミノ酸配列であり、アミノ酸配列変異体、例えば、誘導体化されたおよび／またはトランケートされたλ５配列のような代替軽鎖を発生途上のＢ細胞上にＶｐｒｅＢと共に形成するλ５配列とは異なるλ５配列を制限なく含む。ＶｐｒｅＢに比べて「異種アミノ酸配列」はまた、未変性配列λ５を含む、ＶｐｒｅＢに共有結合的に会合された、例えば、融合されたλ５配列も含む。なぜならば、ＶｐｒｅＢおよびλ５配列は、それらの未変性環境において、互いに共有結合的に会合、例えば、融合されていないからである。異種アミノ酸配列はまた、例えば、抗体軽鎖および重鎖可変領域配列、ならびに抗体軽鎖および重鎖定常領域配列のような、抗体および重鎖配列ならびにそれらの断片を含む抗体配列を制限なく含む。

【００４１】
用語「コンジュゲート」、「コンジュゲートされた」および「コンジュゲーション」は、共有結合的または非共有結合的な結合のすべての形態を意味し、直接遺伝子または化学的融合、リンカーまたは架橋剤を介したカップリング、および、例えば、ファンデルワールス力を介した、またはロイシンジッパーを用いた非共有結合的会合を制限なく含む。

【００４２】
用語「融合」は、本明細書中で、１つのポリペプチド鎖中における異なる起源のアミノ酸配列のコード化ヌクレオチド配列のインフレーム組み合わせによるそれらのアミノ酸の組み合わせを意味するために用いられる。用語「融合」は、内部融合、すなわち、ポリペプチド鎖の末端の１つへの融合に加え、ポリペプチド鎖内への異なる起源の配列の挿入を明示的に包含する。

【００４３】
本明細書中で用いられるように、用語「標的」は、本明細書中におけるポリペプチドと相互作用する物質である。本明細書中で定義されるような標的は、具体的には、本発明のＶｐｒｅＢ－含有構築物が相互作用する抗原を含む。好ましくは、相互作用は、直接結合によって起こる。
【００４４】
本明細書中で用いられるように、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」はすべて、共有結合的な「ペプチド結合」によって結合されるアミノ酸の一次配列を意味する。一般に、ペプチドは、少数のアミノ酸、典型的には、約２～約５０のアミノ酸からなり、タンパク質よりも短い。本明細書中で定義されるような用語「ポリペプチド」は、ペプチドおよびタンパク質を包含する。
【００４５】
用語「アミノ酸」または「アミノ酸残基」は典型的には、アラニン（Ａｌａ）；アルギニン（Ａｒｇ）；アスパラギン（Ａｓｎ）；アスパラギン酸（Ａｓｐ）；システイン（Ｃｙｓ）；グルタミン（Ｇｌｎ）；グルタミン酸（Ｇｌｕ）；グリシン（Ｇｌｙ）；ヒスチジン（Ｈｉｓ）；イソロイシン（Ｉｌｅ）：ロイシン（Ｌｅｕ）；リシン（Ｌｙｓ）；メチオニン（Ｍｅｔ）；フェニルアラニン（Ｐｈｅ）；プロリン（Ｐｒｏ）；セリン（Ｓｅｒ）；トレオニン（Ｔｈｒ）；トリプトファン（Ｔｒｐ）；チロシン（Ｔｙｒ）；およびバリン（Ｖａｌ）からなる群より選択される技術的に認識される定義を有するアミノ酸を意味するが、変性アミノ酸、合成アミノ酸、またはまれなアミノ酸も要望どおりに用いられ得る。従って、３７　ＣＦＲ　１．８２２（ｂ）（４）に記載される変性アミノ酸およびまれなアミノ酸は、この定義に具体的に含まれ、参照により本明細書に明確に組み込まれる。アミノ酸は様々なサブグループに細分することができる。従って、アミノ酸は、非極性側鎖を有するもの（例えば、Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｖａｌ）、負電荷を帯びた側鎖を有するもの（例えば、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）；正電荷を帯びた側鎖を有するもの（例えば、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ）；または、電荷を帯びていない極性側鎖を有するもの（例えば、Ａｓｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒ）として分類することができる。アミノ酸はまた、小アミノ酸（Ｇｌｙ、Ａｌａ）、求核性アミノ酸（Ｓｅｒ、Ｈｉｓ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ）、疎水性アミノ酸（Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｍｅｔ、Ｐｒｏ）、芳香族アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、アミド（Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、および塩基性アミノ酸（Ｌｙｓ、Ａｒｇ）として分類することもできる。
【００４６】
用語「ポリヌクレオチド（単数または複数）」は、ＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子ならびにそれらの類似体（例えば、ヌクレオチド類似体を用いてまたは核酸化学を用いて生成されたＤＮＡまたはＲＮＡ）のような核酸を意味する。要望どおりに、ポリヌクレオチドは、合成的に、例えば、技術的に認識される核酸化学を用いてまたは、例えば、ポリメラーゼを酵素的に用いて作成することができ、あるいは、要望されれば、変性され得る。典型的な変性としては、メチル化、ビオチン化、および他の技術的に知られている変性が含まれる。加えて、核酸分子は、一本鎖または二本鎖とすることができ、要望されれば、検出可能部分に結合され得る。
【００４７】
基準ポリペプチドと比べて用語「変異体」は、未変性ポリペプチドと比較して少なくとも１つのアミノ酸変異または変性（すなわち、改変）を有するポリペプチドを意味する。「アミノ酸変性」により生成された変異体は、例えば、未変性アミノ酸配列中の少なくとも１つのアミノ酸を置換、欠失、挿入および／または化学的に変性することによって産生され得る。
【００４８】
「アミノ酸変性」は、予め決められたアミノ酸配列のアミノ酸配列における変化を意味する。代表的な変性としては、アミノ酸置換、挿入および／または欠失が含まれる。

【００４９】
指定された位置「におけるアミノ酸変性」は、指定された残基の置換または欠失、あるいは指定された残基に隣接する少なくとも１つのアミノ酸残基の挿入を意味する。指定された残基に「隣接する」挿入は、その１つないし２つの残基以内の挿入を意味する。挿入は、指定された残基へのＮ末端またはＣ末端であり得る。
【００５０】
「アミノ酸置換」は、別の異なる「交換」アミノ酸残基による、前もって決められたアミノ酸配列中の少なくとも１つの既存のアミノ酸残基の交換を意味する。１つまたは複数の交換残基は、「天然アミノ酸残基」（すなわち、遺伝コードによりコードされている）であてえもよく、アラニン（Ａｌａ）；アルギニン（Ａｒｇ）；アスパラギン（Ａｓｎ）；アスパラギン酸（Ａｓｐ）；システイン（Ｃｙｓ）；グルタミン（Ｇｌｎ）；グルタミン酸（Ｇｌｕ）；グリシン（Ｇｌｙ）；ヒスチジン（Ｈｉｓ）；イソロイシン（Ｉｌｅ）：ロイシン（Ｌｅｕ）；リシン（Ｌｙｓ）；メチオニン（Ｍｅｔ）；フェニルアラニン（Ｐｈｅ）；プロリン（Ｐｒｏ）；セリン（Ｓｅｒ）；トレオニン（Ｔｈｒ）；トリプトファン（Ｔｒｐ）；チロシン（Ｔｙｒ）；およびバリン（Ｖａｌ）からなる群より選択されてもよい。１つ以上の非天然アミノ酸残基による置換もまた、本明細書中におけるアミノ酸置換の定義により包含される。
【００５１】
「非天然アミノ酸残基」は、上記で列記された天然アミノ酸残基以外の残基であって、ポリペプチド鎖中の隣接アミノ酸残基（単数または複数）と共有結合できるものを意味する。非天然アミノ酸残基の例としては、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリンおよびＥｌｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．２０２：３０１　３３６（１９９１）に記載されるような他のアミノ酸残基類似体が含まれる。そのような非天然アミノ酸残基を生成するため、Ｎｏｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２４：１８２（１９８９）および上記のＥｌｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．の手技を用いることができる。簡潔に言えば、これらの手技は、非天然アミノ酸残基によりサプレッサーｔＲＮＡを化学的に活性化させ、続いてＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写および翻訳を行うことを含む。
【００５２】
「アミノ酸挿入」は、前もって決められたアミノ酸配列中への少なくとも１つのアミノ酸の組み込みを意味する。挿入が通常、１つないし２つのアミノ酸残基の挿入からなるのに対し、本出願は、より大きい「ペプチド挿入」、例えば、約３～約５さらには最大約１０のアミノ酸残基に挿入を企図する。挿入された残基（単数または複数）は、上記で開示されたように天然または非天然であり得る。
【００５３】
「アミノ酸欠失」は、前もって決められたアミノ酸配列からの少なくとも１つのアミノ酸残基の除去を意味する。
【００５４】
用語「突然変異誘発」は、特にことわらない限り、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を改変するための任意の技術的に認識された手法を意味する。突然変異誘発の好ましいタイプとしては、エラー頻発型ＰＣＲ突然変異誘発、飽和突然変異誘発、または他の部位特異的突然変異誘発が含まれる。
【００５５】
「部位特異的突然変異誘発」は、当該分野における技術的標準であり、所望の突然変異を表す、限定されたミスマッチを除いて変異を誘発させられる単鎖ファージＤＮＡに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて実施される。簡潔に言えば、合成のオリゴヌクレオチドは、単鎖ファージＤＮＡに相補的なストランドの合成を導くプライマーとして用いられ、結果として生じる二本鎖ＤＮＡは、ファージ支持宿主細菌に形質変換される。形質転換された細菌の培養物は、上層寒天に塗布され、ファージを収容する単細胞からのプラーク形成を可能にする。理論的には、新しいプラークの５０％が、単鎖として、突然変異形を有するファージを含有し、５０％が本来の配列を有する。目的とするプラー

クは、正確な一致のハイブリダイゼーションを可能にするが、本来のストランドとのミスマッチがハイブリダイゼーションを防止するのに十分である温度で、キナーゼ処理した合成プライマーとハイブリダイズすることによって選択される。プローブとハイブリダイズするプラークが次に選択され、配列決定および培養され、ＤＮＡが回復される。

【００５６】

本発明の脈絡において、用語「抗体」（Ａｂ）は、Ｖ（Ｄ）Ｊ遺伝子組み換えから誘導された古典的な方法で組み換えられた重鎖およびやはりＶＪ遺伝子組み換えから誘導された古典的な方法で組み換えられた軽鎖に由来する未変性抗体、またはその断片を指すために用いられる。

【００５７】

「未変性抗体」は、２つの同一の軽（Ｌ）鎖および２つの同一の重（Ｈ）鎖で構成された約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、共有結合ジスルフィド結合（単数または複数）によって重鎖に接続される一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンイソタイプの重鎖の間で変化する。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔をおいて配置された鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の末端において、いくつかの定常ドメインが続く可変ドメイン（V_H）を有する。各軽鎖は、その一方の末端において可変ドメイン（V_L）を、他方の末端において定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第１の定常ドメインと位置合わせされており、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと位置合わせされている。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間のインターフェースを形成すると考えられている、Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８６：６５１（１９８５）、Ｎｏｖｏｔｎｙ ａｎｄ Ｈａｂｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８２：４５９２（１９８５）。

【００５８】

用語「可変」は、抗体鎖に関連して、抗体間で配列が広範囲にわたって異なっており、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性に関係する抗体鎖の部分を指すために用いられる。そのような変動性は、軽鎖および重鎖可変ドメイン双方における超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる。未変性の重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、３つの超可変領域によって接続されたβ－シート立体配置を主としてとる４つのＦＲ（それぞれ、ＦＲｌ、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含み、３つの超可変領域は、β－シート構造を接続、場合によってはその一部をなす、ループを形成する。各鎖中の超可変領域は、ＦＲによって一緒に極めて接近して保持されており、他の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｎｅｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）６４７－６６９ページ参照）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を発揮する。

【００５９】

用語「超可変領域」は、本明細書中で用いられる場合、抗原結合をつかさどる抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「ＣＤＲ」由来のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基３０－３６（Ｌｌ）、４６－５５（Ｌ２）および８６－９６（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメイン中の３０－３５（Ｈｌ）、４７－５８（Ｈ２）および９３－１０１（Ｈ３）；ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ，．Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２６２（５）：７３２－４５（１９９６））を含む。

【００６０】

用語「フレームワーク領域」は、より分岐したＣＤＲ領域間に存在する抗体可変領域の技術的に認識される部分を意味する。そのようなフレームワーク領域は、フレームワーク

１～４（ＦＲｌ、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４）と一般に呼ばれ、ＣＤＲが抗原結合表面を形成できるように、重鎖または軽鎖抗体可変領域中に見出される３つのＣＤＲを三次元空間中に保持するための骨格を提供する。

【００６１】

抗体の重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体は、異なるクラスに割り当てることができる。抗体の５つの主要なクラスＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭがあり、これらのうちのいくつかが、サブクラス（イソタイプ）、例えば、ＩｇＧｌ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、およびＩｇＡ２にさらに分割され得る。

【００６２】

免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。

【００６３】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）、およびラムダ（λ）と呼ばれる２つの明確に異なるタイプの一方に割り当てることができる。本明細書中における抗体軽鎖へのどのような参照も、κ軽鎖およびλ軽鎖双方を含む。

【００６４】

「抗体断片」は、完全長抗体の一部、一般的には抗原結合またはその可変ドメインを含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、および（ｓｃＦｖ）$_2$断片が含まれるが、それらに限定されない。

【００６５】

本明細書中で用いられるように、用語「抗体結合領域」は、抗原（単数または複数）と結合することができる免疫グロブリンまたは抗体可変領域の１つ以上の部分を意味する。典型的には、抗体結合領域は、例えば、抗体軽鎖（ＶＬ）（またはその可変領域）、抗体重鎖（ＶＨ）（またはその可変領域）、重鎖Ｆｄ領域、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、単一ドメイン、または単鎖抗体（ｓｃＦｖ）のような組み合わされた抗体軽および重鎖（またはその可変領域）、あるいは完全長抗体、例えば、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧｌ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブタイプ）、ＩｇＡｌ、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、またはＩｇＭ抗体である。

【００６６】

本明細書中で用いられるような用語「エピトープ」は、少なくとも約３～５、好ましくは少なくとも約５～１０、または少なくとも約５～１５のアミノ酸、一般にはせいぜい約５００、または約１０００のアミノ酸の配列を意味し、これらのアミノ酸は、それ自体で、またはより大きい配列の一部として、そのような配列に応答して生成された抗体に結合する配列を定義する。エピトープは、それが誘導される親タンパク質の部分と同一の配列を有するポリペプチドに限定されない。実際に、ウイルスゲノムは、一定の変化の状態にあり、単離物間で比較的高い程度の変動性を示す。従って、用語「エピトープ」は、未変性配列と同一の配列、ならびに、未変性配列に対する欠失、置換および／または挿入のような変性も包含する。一般に、そのような変性は、本質的に保存的であるが、非保存的な変性もまた企図される。この用語は、具体的には「ミモトープ」、すなわち連続的な線状の未変性配列を識別せず、または必ずしも未変性タンパク質中で生じるわけではないが、未変性タンパク質上のエピトープを機能的に模倣する配列を含む。用語「エピトープ」は、具体的には、線状および立体配座的なエピトープを含む。

【００６７】

用語「ベクター」は、細胞中での自律的複製が可能であり、かつ付着させられたセグメントの複製を生じさせるようにＤＮＡセグメント、例えば、遺伝子またはポリヌクレオチドが操作的に結合させられ得るｒＤＮＡ分子を意味するために用いられる。１つ以上のポリペプチドについてコードする遺伝子の発現を導くことが可能なベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。用語「制御配列」は、特定の宿主生物における操作的に結合されたコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を意味する。原核生物に適する制御配列

は、例えば、プロモーター、任意にオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが知られている。

【００６８】

核酸は、それが別の核酸配列との機能的関係の中に置かれる場合に、「操作的に結合」される。例えば、プレ配列または分泌リーダーのためのＤＮＡは、もしそれが、ポリペプチドの分泌に関与する前タンパク質として発現されれば、ポリペプチドのためのＤＮＡに操作的に結合され、プロモーターまたはエンハンサーは、もしそれが配列の転写に影響すれば、コード配列に操作的に結合され、あるいは、リボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするように置かれていれば、コード配列に操作的に結合される。一般に、「操作的に結合された」は、結合されているＤＮＡ配列が、隣接しており、分泌リーダーの場合には、隣接しておりかつ読み取り段階にある。しかしながら、エンハンサーは、隣接している必要がない。結合は、手頃な制限部位でのライゲーションによって達成される。もしそのような部位が存在しなければ、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の手法に従って用いられる。

【００６９】

「ファージディスプレイライブラリー」は、クローン化されたタンパク質配列のコレクションをファージコートタンパク質との融合として発現させるタンパク質発現ライブラリーである。従って、「ファージディスプレイライブラリー」の語句は、本明細書中では、ファージ（例えば、繊維状ファージ）のコレクションを意味し、ファージは、外部（一般には異種）タンパク質を発現させる。外部タンパク質は、ファージと接触させられている他の部分と自由に相互作用する（結合する）。外部タンパク質をディスプレイしている各ファージは、ファージディスプレイライブラリーの「メンバー」である。

【００７０】

用語「繊維状ファージ」は、異種ポリペプチドをその表面にディスプレイすることができるウイルス粒子を意味し、ｆｌ、ｆｄ、Ｐｆ１、およびＭ１３を制限なく含む。繊維状ファージは、テトラサイクリン（例えば、「ｆｄ－ｔｅｔ」）のような選択可能なマーカーを含んでもよい。様々な繊維状ファージディスプレイシステムが当業者によく知られている（例えば、Ｚａｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ９：１２７－１４０（１９８０），Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１３１５－１３１７（１９８５）；およびＰａｒｍｌｅｙ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ Ｇｅｎｅ ７３：３０５－３１８（１９８８）を参照されたい）。

【００７１】

用語「パンニング」は、標的に対する高い親和性および特異性を有する抗体のような化合物を運ぶファージの同定および単離におけるスクリーニングプロセスの複数のラウンドを意味するために用いられる。

【００７２】

Ｂ．　詳細な説明

本発明の方法を実行するための手法は、当該技術分野においてよく知られており、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９９７）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｄ．Ｗ．Ｒｕｓｓｅｌｌ，ｅｄｓ．．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＵＳＡ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２００１；Ｏ’Ｂｒｉａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｂａｃｉｌｌｕｓ Ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ，Ｈｉｃｋｌｅ ａｎｄ Ｆｉｔｃｈ，ｅｄｓ．，Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ，１９９０；Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ：ｂｉｏｌｏｇｙ，ｅｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｓａｆｅｔｙ，Ｔ．Ｒ．Ｇｌａｒｅ ａｎｄ Ｍ．Ｏ’Ｃａｌｌａｇｈａｎ，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ，２０００；Ａ

ntibody Phage Display, Methods and Protocols, Humana Press, 2001；and Antibodies, G. Subramanian, ed., Kluwer Academic, 2004を含む標準実験室教科書に記載されている。突然変異誘発は、例えば、部位特異的変異誘発を用いて実行できる（Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82：488－492（1985））。PCR増幅方法は、米国特許第4，683，192号、同第4，683，202号、同第4，800，159号、および同第4，965，188号、ならびに“PCR Technology：Principles and Applications for DNA Amplification”, H. Erlich, ed., Stockton Press, New York（1989）；およびPCR Protocols：A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds.. Academic Press, San Diego, Calif.（1990）を含むいくつかの教科書に記載されている。

【００７３】

本発明は、抗体代替軽鎖配列を含む構築物およびライブラリーに関する。

【００７４】

代替軽鎖構築物

上記で論じられたように、プレＢ細胞は、μ重鎖を産生するが成熟した軽鎖の代わりに、それぞれＶｐｒｅＢ（１－３）およびλ５と呼ばれるＢ系統特定的遺伝子のセットを発現するリンパ球として骨髄中で同定されてきた。ＶｐｒｅＢおよびλ５ポリペプチドは一緒に、非共有結合的に会合したＩｇ軽鎖様構造を形成し、これは代替軽鎖と呼ばれる。代替軽鎖は、抗体鎖ではないものの、すべての抗体重鎖と自然に会合し、代替軽鎖－抗体重鎖複合体は、自己抗原と結合することが明らかにされている。

【００７５】

１つの態様において、本発明は、ＶｐｒｅＢおよび／またはλ５配列を含み、標的と結合する能力を有するポリペプチドを提供する。標的は、本発明のＶｐｒｅＢおよび／またはλ５配列含有ポリペプチドにとっての結合パートナーである任意のペプチドまたはポリペプチドであり得る。標的としては具体的に、抗体結合の文脈において「抗原」と一般に呼ばれるすべてのタイプの標的が含まれる。

【００７６】

従って、本発明のポリペプチドとしては、異種アミノ酸配列へのＶｐｒｅＢ配列のコンジュゲートが、もしそれらが所望の標的と結合する能力を保持するのであれば、制限なく含まれる。異種アミノ酸配列へのＶｐｒｅＢ配列の結合は、共有結合的か、または非共有結合的であり得、直接的または、ペプチドリンカーを含むリンカーを介して生じてもよい。

【００７７】

本明細書中におけるポリペプチド構築物の具体的な例としては、未変性配列の断片および変異体を含むＶｐｒｅＢ１、ＶｐｒｅＢ２、またはＶｐｒｅＢ３配列のようなＶｐｒｅＢ配列が、未変性配列の断片および変異体を含むλ５配列にコンジュゲートされるポリペプチドが含まれる。このタイプの代表的な融合は、図２および図１１に例示され、実施例において説明される。

【００７８】

直接融合において、典型的には、ＶｐｒｅＢ配列（例えば、ＶｐｒｅＢ１、ＶｐｒｅＢ２またはＶｐｒｅＢ３配列）のＣ末端がλ５配列のＮ末端に融合される。未変性ＶｐｒｅＢ配列の長さ全体を完全長λ５配列に融合させることが可能である一方（例えば、図３の第１図参照）、典型的には、融合は、２つのポリペプチドの各々におけるＣＤＲ３類似部位においてまたはそのまわりで起こる。ＶｐｒｅＢ１およびλ５のためのそのようなＣＤＲ３類似部位が図１に例示してあり、代表的な融合構築物が図２に例示してある。この実施形態において、融合は、ＣＤＲ３類似領域の中でまたはそのどちらか一方の側で約１０

アミノ酸残基以内の位置で起こり得る。好ましい実施形態において、融合は、未変性ＶｐｒｅＢ１配列（配列番号１）のアミノ酸残基１１６～１２６の間付近および未変性λ５配列（配列番号５）のアミノ酸残基８２と９３との間付近で起こる。

【００７９】

図２に示されるように、ＶｐｒｅＢ配列を、抗体λ軽鎖のＣＤＲ３領域に融合させることも可能である。ＶｐｒｅＢおよびλ５の一方のみがトランケートされるさらなる構築物が図３に示してある。同様な構築物は、抗体κ軽鎖配列を用いて調製することができる。

【００８０】

さらなる直接融合構造が図１１の右側に例示してある。「ＳＬＣ融合１」と呼ばれる構造は、２つの二量体で構成された四量体であり、これらの二量体において、トランケートされたＶ－ｐｒｅＢ１配列（未変性ＶｐｒｅＢｌのＣ末端における特徴的な「尾部」を欠いている）の、同様にトランケートされたλ５配列への融合は、抗体重鎖と非共有結合的に会合されている。「ＳＬＣ融合２」と呼ばれる構造は、２つの二量体で構成された四量体であり、これらの二量体において、トランケートされたＶｐｒｅＢ１配列（未変性ＶｐｒｅＢｌのＣ末端における特徴的な「尾部」を欠いている）の、抗体軽鎖定常領域への融合は、抗体重鎖と非共有結合的に会合されている。「ＳＬＣ融合３」と呼ばれる構造は、２つの二量体で構成された四量体であり、これらの二量体において、抗体軽鎖可変領域の、トランケートされたλ５配列（未変性λ５のＮ末端における特徴的な「尾部」を欠いている）への融合物は、抗体重鎖と非共有結合的に会合されている。

【００８１】

上記で指摘されたように、直接融合に加え、本発明のポリペプチド構築物としては、ＶｐｒｅＢ配列（未変性配列の断片および変異体を含む）の、λ５配列（未変性配列の断片および変異体を含む）のような異種配列、および／または抗体配列との非共有結合的会合が含まれる。従って、例えば、完全長ＶｐｒｅＢ配列は、トランケートされたλ５配列と非共有結合的に会合され得る。あるいは、トランケートされたＶｐｒｅＢ配列は、完全長λ５配列と非共有結合的に会合され得る。

【００８２】

抗体重鎖と非共有結合的に会合している、非共有結合的に会合させられたＶｐｒｅＢ１およびλ５配列を含む代替軽鎖構築物が、図１１の左側に示してある。種々の図解が示すように、構造としては、例えば、完全長ＶｐｒｅＢｌおよびλ５配列、トランケートされたλ５配列と会合させられた完全長ＶｐｒｅＢｌ配列１（「λ５ｄＴ」）、完全長λ５配列と会合させられたトランケートされたＶ－ｒｅＢｌ配列（ＶｐｒｅＢｄＴ）およびトランケートされたλ５配列と会合させられたトランケートされたＶｐｒｅＢ１配列（「短」）が含まれる。

【００８３】

図１１は一定の具体的な構築物を例示しているが、当業者は、様々な他の構築物が同様な方法で作成および使用され得ることを理解するであろう。例えば、構造は、図１１に例示される構造とは対照的に、非対称的であることができ、各アーム中に異なる代替軽鎖配列を含み、および／または三量体もしくは五量体構造を有する。本発明の代替軽鎖構築物の様々な部分に異なる機能性を含ませ、それによって多特異的および／または多価構築物を産生することが可能である。

【００８４】

もし要望されれば、本発明の構築物は、例えば、抗体のＣＤＲｌ、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３領域由来の既知の配列または配列モチーフを組み込みまたは追加し、既知の治療抗体を代替軽鎖配列のＣＤＲｌ、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３類似領域に含ませることにより設計され得る。これにより、抗体ではないが、既知の治療抗体の結合特性および親和性に非常に類似した結合特性および親和性を示す分子を作り出すことが可能になる。

【００８５】

本明細書中のすべての代替軽鎖構築物は、抗体配列と会合させられてもよい。例えば、

図５に示されるように、ＶｐｒｅＢ－λ５融合物は、ペプチドリンカーにより抗体重鎖可変領域配列に結合することができる。別の実施形態において、ＶｐｒｅＢ－λ５融合物は、抗体重鎖、または可変領域配列を含むその断片と非共有結合的に会合され、二量体複合体を形成する。さらに別の実施形態において、ＶｐｒｅＢおよびλ５配列は、互いにおよび抗体重鎖、または可変領域配列を含むその断片と非共有結合的に会合されており、それによって三量体複合体を形成する。抗体重鎖を含む代表的な構築物が図１１に例示してある。

【００８６】

本発明の構築物がある特定の実施形態に関連して例示されるのに対して、当業者は、代替軽鎖および抗体配列の様々な並べ換えにより得られる多くのさらなる実施形態が可能であり、本発明の範囲内にあることを理解するであろう。本発明は、代替軽鎖配列を含みかつ所望の標的に結合する能力を有するすべての構築物を含む。ある特定の実施形態において、構築物は、抗体重鎖可変領域配列と会合する能力も有する。

【００８７】

本発明の構築物は、代替軽鎖配列のライブラリーを構築するために用いてもよく、このライブラリーは、抗体ライブラリーと同様、所望の結合特性および親和性を有する構築物の選択を含む様々な目的のために使用することができる。

【００８８】

ＶｐｒｅＢおよびλ５代替軽鎖配列が互いに非共有結合的に会合させられている場合、一方または双方のコンポーネントの自由端（すなわち、ＶｐｒｅＢ配列のＣ－末端および／またはλ５配列のＮ－末端）は、付加的な多様性をそのような配列のライブラリーに組み入れるために利用可能である。例えば、ランダムペプチドライブラリーを、これらの自由端の１つに付加または置換し、特定の標的に対する特定の結合についてパンニングすることができる。所望の結合特異性を有することが確認されている代替軽鎖を、同じ標的に対する抗体由来の重鎖または重鎖断片と組み合わせることにより、２つの別個の場所で同族体に結合する能力を有する分子を作り出すことができる。このタンデム結合、または「キレーティング」効果は、二量体免疫グロブリンにおいて見られるアビディティー効果と同様、単一標的への結合を強力に増強させる。異なる標的に結合するコンポーネントを用いることも可能である。従って、例えば、所望の結合特異性を持つ代替軽鎖コンポーネントを、異なる標的に結合する抗体重鎖または重断片と組み合わせることができる。例えば、代替軽鎖コンポーネントが腫瘍抗原を結合してもよい一方で、抗体重鎖または重鎖断片は、エフェクター細胞に結合してもよい。このように、ターゲティングおよび抗腫瘍活性を持つ単一の実体を作り出すことができる。特定の実施形態において、ＶｐｒｅＢおよびλ５配列を接続する付属物またはポリペプチドは、ＦａｂまたはｓｃＦｖ断片のような、抗体または抗体断片であり得る。抗体配列の組み込みは、「キレーティング」効果をもたらすだけでなく、二重特異性抗体に見られるような第２の独立したアームを必要とせずに、単一分子の二重特異性も生成することができる。これら２つの特異性は、同じ標的の異なる部分に対するもの、異種の標的に対するもの、または標的抗体複合体に対するものであってもよい。同様に、多特異的な構築物を、ペプチド、タンパク質、酵素等を含む、抗体または抗体断片を除く、任意のタイプの分子で作ることができる。例えば、所望の特異性を持つ代替軽鎖コンポーネントは、任意の治療ペプチドまたはタンパク質と組み合わせることができる。

【００８９】

代替軽鎖構築物の調製

本発明の代替軽鎖構築物は、周知の組み換えＤＮＡ技術を含む当該技術分野において知られている方法により調製され得る。

【００９０】

代替軽鎖、例えば、ＶｐｒｅＢおよびλ５ポリペプチドをコードする核酸は、自然供給源、例えば発生途上のＢ細胞から単離および／または合成もしくは半合成的方法により得ることができる。ひとたびこのＤＮＡが同定および単離または別の方法で産生されると、

さらなるクローニングまたは発現のためにこのＤＮＡを複製可能なベクター中にライゲートすることができる。

【００９１】

本明細書においてポリペプチドのコード配列を発現するために使用され得るクローニングおよび発現ベクターは、当該技術分野においてよく知られており、商業的に利用可能である。ベクターコンポーネントとしては一般に、以下のもののうちの１つ以上が含まれるが、それらに限定されない：シグナル配列、複製起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。本明細書においてベクター中で代替軽鎖構築物をコードするＤＮＡをクローニングまたは発現させるための適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、またはより高等な真核生物（哺乳動物）細胞であり、哺乳動物細胞が好ましい。

【００９２】

適切な哺乳動物宿主細胞系統の例としては、ＳＶ４０により変換されたサル腎臓ＣＶ１系統（ＣＯＳ－７，ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；懸濁培養中での増殖のためにサブクローニングされたヒト胎児腎臓系統２９３（２９３細胞）、Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ，ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ，Ｕｒｌａｕｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：４２１６（１９８０））；マウスセルトーリ細胞（ＴＭ４，Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０））；サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６，ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ，ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ，ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ，ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８，ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）；ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２，ＨＢ　８０６５）；マウス乳癌（ＭＭＴ　０６０５６２，ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　５１）；ＴＲＩ細胞（Ｍａｔｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２））；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒトヘパトーマ系統（Ｈｅｐ　Ｇ２）が制限なく含まれる。

【００９３】

哺乳動物細胞における使用のため、発現ベクターに関する制御機能はしばしばウイルス性材料から提供される。従って、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイスル２、レトロウイルス、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）のゲノムから誘導することができる。β－アクチンプロモーターのような他のプロモーターは、異種供給源に由来する。適切なプロモーターの例としては、ＳＶ４０ウイルスの初期および後期プロモーター（Ｆｉｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２７３：１１３（１９７８））、ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーター（Ｇｒｅｅｎａｗａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１８：３５５－３６０（１９８２））、ならびに所望の遺伝子配列と普通に会合させられたプロモーターおよび／または制御配列が、もしそのような制御配列が宿主細胞系と共存できるのであれば、制限なく含まれる。

【００９４】

より高等な真核生物による所望の異種ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増大させられる。エンハンサーは、通常約１０～３００ｂｐの、ＤＮＡのシス作用因子であり、プロモーターに作用してその転写開始活性を増強させる。エンハンサーは、配向および位置に比較的依存しないが、好ましくは、発現ベクター中に存在するプロモーター配列の上流に位置する。エンハンサーは、例えば、真核細胞ウイルス、例えば、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー（ｂｐ１００－２７０）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサー由来のような、プロモーターと同じ供給源由来であるかもしれない。

【００９５】

哺乳動物宿主細胞において用いられる発現ベクターは、例えば、ＳＶ４０（初期および後期）またはＨＢＶのようなウイルスから誘導されたポリアデニル化部位のようなポリアデニル化部位も含む。

【００９６】

複製の起点は、ＳＶ４０または他のウイルス（例えば、ポリオーマ、アデノ、ＶＳＶ、ＢＰＶ）供給源から誘導されるような外因的起点を含むベクターの構築によって提供されるか、あるいは宿主細胞によって提供されてもよい。

【００９７】

発現ベクターは通常、ベクターによって形質転換された宿主細胞の生存または成長に必要なタンパク質をコードする選択可能なマーカーを含んでいる。哺乳動物細胞のための適切な選択可能なマーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）、チミジンキナーゼ（ＴＫ）、およびネオマイシンが含まれる。

【００９８】

適切な哺乳動物発現ベクターは、当該技術分野においてよく知られており、商業的に利用可能である。従って、例えば、本発明の代替軽鎖構築物は、ＤＮＡインサートの構成性発現を促進するためにヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）最初期エンハンサー／プロモーター領域を持つｐＣＩ発現ベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて哺乳動物宿主細胞において産生することができる。ベクターは、選択可能なマーカーとしてネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含み得る。

【００９９】

本発明の代替軽鎖構築物はまた、細菌宿主細胞において産生することもできる。細菌系において使用するための制御要素としては、オペレーター配列を任意に含むプロモーター、およびリボソーム結合部位が含まれる。適切なプロモーターとしては、ガラクトース（ｇａｌ）、ラクトース（ｌａｃ）、マルトース、トリプトファン（ｔｒｐ）、β－ラクタマーゼプロモーター、バクテリオファージλおよびＴ７プロモーターが、制限なく含まれる。加えて、ｔａｃプロモーターのような合成プロモーターを用いることができる。細菌系において使用するためのプロモーターは一般に、Ｆａｂ分子をコードするＤＮＡに操作的に結合されたシャイン－ダルガノ（ＳＤ）配列も含む。プラスミドｐＢＲ３２２からの複製の起点は、ほとんどのグラム陰性菌に適する。

【０１００】

抗体代替軽鎖配列を含む多鎖構築物内の個々の鎖のコード配列は、別個の調節配列の制御下で同じ発現ベクター中に、または真核および原核宿主を含む所望の宿主細胞に同時形質移入するために用いられる別個の発現ベクター中に存在し得る。従って、複数の遺伝子を、Ｎｏｖａｇｅｎから商業的に利用可能なＤｕｅｔ（商標）ベクターを用いて同時発現させることができる。

【０１０１】

形質転換された宿主細胞は、各種の培地中で培養されてもよい。哺乳動物宿主細胞を培養するための商業的に利用可能な培地としては、Ｈａｍ’ｓ Ｆ１０（Ｓｉｇｍａ）、Ｍｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭＩ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）、およびＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅｓ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）が含まれる。加えて、Ｈａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．５８：４４（１９７９）およびＢａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５（１９８０）に記載される培地のいずれかを、宿主細胞のための培地として用いてもよい。温度、ｐＨ等の培養条件は、発現のために選択された宿主細胞と共にこれまで用いられているものであり、製造業者の取扱説明に含まれているか、さもなければ当業者には明白であろう。

【０１０２】

哺乳動物、細菌（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）または他の宿主細胞を培養するためのさらなる適切な培地も、例えば、上記のＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．、または上記のＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．のような標準教科書に記載されている。

【０１０３】
精製は、当該技術分野において知られている方法により実行できる。好ましい実施形態において、代替抗体分子は、Ｎｉ－ＮＴＡ精製システム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて６ｘＨｉｓ－タグ付加形で精製される。
【０１０４】
ライブラリーは代替軽鎖配列を含む
本発明はさらに、代替軽鎖配列およびそのような配列を含む構築物の様々なライブラリーに関する。従って、そのようなライブラリーは、上記で具体的に説明され、図に例示されおよび／または実施例中で説明されるものを制限なく含む本発明のＶｐｒｅＢ－および／またはλ５－含有構築物のような代替軽鎖配列のディスプレイを含んでもよく、それらで本質的に構成されてもよく、またはそれらで構成されてもよい。
【０１０５】
本発明のライブラリーは、好ましくはディスプレイの形態である。抗体および他のポリペプチドを含む異種タンパク質をディスプレイするためのシステムは、当該技術分野においてよく知られている。抗体断片は、抗体遺伝子をコードする繊維状ファージの表面でディスプレイされてきた（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：３８１ ３８８（１９９２）；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４８（６３０１）：５５２ ５５４（１９９０）；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．ＥＭＢＯ Ｊ．，１３（１４）：３２４５－３２６０（１９９４））。抗体ライブラリーを選択およびスクリーニングするための技術の総説については、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（９）：１１０５－１１１６（２００５）を参照されたい。加えて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（Ａｇｔｅｒｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ８８：３７－４５（１９９０）；Ｃｈａｒｂｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ７０：１８１－１８９（１９８８）；Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：２７１３－２７１７（１９９２））、およびＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのような酵母（Ｂｏｄｅｒ ａｎｄ Ｗｉｔｔｒｕｐ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：５５３－５５７（１９９７）；Ｋｉｅｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１０：１３０３－１３１０（１９９７））の表面での異種タンパク質およびそれらの断片のディスプレイのためのシステムが当該技術分野において知られている。他の知られているディスプレイ技術としては、リボソームまたはｍＲＮＡディスプレイ（Ｍａｔｔｈｅａｋｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：９０２２－９０２６（１９９４）；Ｈａｎｅｓ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：４９３７－４９４２（１９９７））、ＤＮＡディスプレイ（Ｙｏｎｅｚａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．３１（１９）：ｅｌ １８（２００３））、細菌ディスプレイのような微生物細胞ディスプレイ（Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１５：２９－３４（１９９７））、哺乳動物細胞、胞子上でのディスプレイ（Ｉｓｔｉｃａｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８３：６２９４－６３０１ （２００１）；Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７１：３３３７－３３４１（２００５）および２００６年１１月１３日提出の同時係属仮出願番号第６０／８６５，５７４号）、レトロウイルスディスプレイのようなウイルスディスプレイ（Ｕｒｂａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３３：ｅ３５（２００５）、タンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイ（Ｏｄｅｇｒｉｐ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ａｃａｄ．Ｎａｔｌ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０１：２８０６－２８１０（２００４）；Ｒｅｉｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３３：ｅ１０（２００５））、ならびにマイクロビーズディスプレイ（Ｓｅｐｐ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５３２：４５５－４５８（２００２））が含まれる。
【０１０６】
本発明の目的のため、代替軽鎖含有ライブラリーは、ファージディスプレイおよび胞子

ディスプレイを含む任意のディスプレイ技術を用いて有利にディスプレイできる。

【０１０７】

ファージディスプレイにおいて、代替軽鎖ポリペプチドのような異種タンパク質は、ファージ粒子のコートタンパク質に結合される一方、それが発現されたＤＮＡ配列は、ファージコート内にパッケージされる。ファージディスプレイ方法の詳細は、例えば、免疫化されていないドナーからの免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーからのｉｎ ｖｉｔｒｏでのヒト抗体および抗体断片の産生を記載しているＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４８，５５２－５５３（１９９０））に見出すことができる。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子は、Ｍ１３またはｆｄのような、繊維状バクテリオファージのメジャーかマイナーコートタンパク質遺伝子のどちらかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上で機能性抗体断片としてディスプレイされる。繊維状粒子がファージゲノムの単鎖ＤＮＡコピーを含んでいるので、抗体の機能的特性に基づく選択も、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択にという結果になる。従って、ファージはＢ－細胞の特性のいくつかを模倣する。

【０１０８】

ファージディスプレイは、各種の型式で実行でき、それらの総説については、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｋｅｖｉｎ Ｓ．，ａｎｄ Ｃｈｉｓｗｅｌｌ，Ｄａｖｉｄ Ｊ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｓｔｒｕｃｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３，５６４－５７１（１９９３）を参照されたい。重鎖Ｖ－遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイを介して見出すことができる。Ｃｌａｒｋｓｏｎ ｅｔ ａ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２，６２４－６２８（１９９１）は、免疫化したマウスの脾臓由来のＶ遺伝子の小さいランダム組合せライブラリーからの抗オキサゾロン重鎖および軽鎖の様々なアレイを単離した。抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに特異的な、免疫化されていないヒトドナーからの重および軽鎖Ｖ遺伝子のレパートリーは、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２，５８１－５９７（１９９１）、またはＧｒｉｆｆｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１２，７２５－７３４（１９９３）により記載された技術に本質的に従って、構築および回復することができる。これら、および当該技術分野において知られている他の技術は、代替軽鎖配列を含むポリペプチドおよび他の構築物を含む任意のポリペプチドのディスプレイに適合させることができる。従って、例えば、代替軽鎖は、リンパ球のような天然の多様な供給源から、あるいは完全に分子生物学の技術により作り出された合成的に生成されたコレクションからのどちらか一方からの重鎖のコレクションで補うことができる。これらのコレクションは、当該技術分野において知られている方法により、クローニング、発現および選択され得る。選択された結果として生じるＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標）は、直接使用したり、多量体分子として発現させたり、あるいは、例えば、ランダムまたは非ランダム部位特異的または限局的変異誘発を用いて、重鎖最適化、または代替軽鎖最適化によりさらに最適化したりできる。

【０１０９】

胞子ディスプレイシステムは、ディスプレイされる配列を、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ胞子コートタンパク質のようなコートタンパク質に付加させていることに基づく。胞子原形質体（核）は、細胞壁、皮質、および胞子コートにより包囲されている。種によっては、エキソスポリウムも存在することがある。核壁は、栄養細胞壁と同じタイプのペプチドグリカンで構成されている。Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ胞子コート（ＣｏｒＢ）およびＢａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ（Ｂｔ）胞子ディスプレイのコンポーネントを用いた表面ディスプレイシステムを含む胞子ディスプレイは、Ｉｓｔｉｃａｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８３：６２９４－６３０１（２００１）；Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７１：３３３７－３３４１（２００５）に記載されており、その開示全体は、参照により本明細書中に明確に組み込まれる。様々な胞子ディスプレイ技術はまた、米国特許出願公開第２００２／０１５０５９４号、同２００３／０１６５５３８号、同２００４／０１８０３４８号、同２００４／０１７１０６５号、および同２００４／０２５４３６

４号において開示されており、開示全体は、参照により本明細書中に明確に組み込まれる。

【０１１０】

胞子ディスプレイシステムの利点は、理想的な非反応性のバックグラウンドを提供することが期待される非真核的性質の均質な粒子表面および粒径である。加えて、胞子の粒径は、相互作用に基づいて、選択可能なクローン単離を可能にするフローサイトメトリーによる選択を可能にするのに十分である。

【０１１１】

胞子の安定性に影響を与えることにより、様々な芽胞形成後の化学的、酵素的および／または環境的な処理および変性を実行することが可能である。従って、そのような構造がディスプレイされる場合、トリフルオロエタノール（ＴＦＥ）を用いる化学的処理により構造的螺旋構造を安化することが可能である。加えて、活性酸素種（例えば、過酸化物）または活性窒素種（例えば、亜硝酸）を用いた処理のような酸化ストレス処理が可能である。胞子ディスプレイされたポリペプチドの定義された粗製の個体群を、タンパク質分解暴露、他の酵素プロセス、リン酸化などの酵素処理に暴露することも可能である。他の考え得る処理としては、ペルオキシナイトライト処理によるニトロシル化、組み換え、精製、または血清プロテアーゼ処理によるタンパク質分解、照射、熱ショックタンパク質（細菌性および哺乳動物性双方）のような既知のシャペロンを用いたコインキュベーション、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、プロピルイソメラーゼ等の折りたたみタンパク質を用いた処理、凍結乾燥、およびチメロソルを用いた処理のような防腐剤様処理が、制限なく含まれる。これらの処理は、当該技術分野においてよく知られた方法により実行され得る。

【０１１２】

同様な技術は、例えば、以下に開示される胞子ディスプレイシステムを含む、付加が胞子コートタンパク質に対してであるディスプレイを含むすべての胞子ディスプレイシステムにおいて用いることができる。

【０１１３】

代替軽鎖配列、構築物およびそれらを含むライブラリーの使用

本発明のライブラリーは、所望の特性を有する代替軽鎖配列を含む融合物のような代替軽鎖配列および代替軽鎖構築物を識別するために用いることができる。例えば、本明細書中におけるライブラリーのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏスクリーニングは、高い結合特異性および親和性で所望の標的に結合する代替軽鎖配列を含むポリペプチドを産生できる。従って、本明細書中のライブラリーは、腫瘍マーカーまたは治療的介入の他の分子標的に結合する代替軽鎖配列を含むポリペプチドのような治療および診断目的のための分子を識別するために使用できる。加えて、上述の技術によって、同じ標的に結合するポリペプチドのコレクションを含むライブラリー、異なる標的に結合するポリペプチドのライブラリー、複数の特性を備えるポリペプチドのライブラリー等を含む、代替軽鎖の非常に多岐にわたるライブラリーを設計することができる。

【０１１４】

本発明の抗体代替軽鎖構築物は、任意の所望の標的に結合するそれらの能力の結果として、腫瘍抗原または病態もしくは状態に関連した任意のポリペプチドのような所望の標的分子の存在を検出するために、分析および診断アッセイにおいて用いることができる。加えて、本発明の代替軽鎖構築物は、例えば、癌治療において、癌の発生および／または広がりに関連することが突き止められている腫瘍抗原を標的とするために、治療薬剤として用いることができる。

【実施例】

【０１１５】

本発明のさらなる詳細が、以下の非限定的な実施例において提供される。

【０１１６】

（実施例１）

結合ドメインタンパク質としてのＶｐｒｅＢおよびそれを含む融合物

ＶｐｒｅＢ結合ドメインを作るため、図５に示される単一タンパク質を、組み換え的作成する。ＳＬＣ結合ドメインタンパク質構築物は、ＶｐｒｅＢ１からのアミノ酸２０～１２１およびλ５からのアミノ酸８７～１０５で構成される。もし所望されれば、新規かつ特定の結合能力を作り出すため、分子を、構造的または配列エビデンスに従って再設計される。付加的に、または代わりに、変異体のコレクションが、例えば、エラー頻発型ＰＣＲにより無作為に、あるいはアミノ酸のコレクションを用いた単一または多部位特定突然変異誘発により直接的に、のいずれかで作り出される。結果として生じるクローンまたはコレクションは次に、ファージまたはファージミドディスプレイで使用するためにｐＩＩＩを用いてインフレームでクローニングする。このファージミド構築物をＴＧｌ細胞に転換する。次に、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび２％グルコースを補ったルリアブロス（ＬＢ）中で、単一コロニーを、それがＯＤ６００～０．３に達するまで繁殖させ、３０分間、３７℃で振とうせずにＭＫ３０７ヘルパーファージで感染させる。次に細胞をペレットにし、次いで、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび７５μｇ／ｍｌカナマイシンを含有するＬＢ中に再懸濁させ、３０℃で、強くエアレーションして一晩成長させる。翌日、ファージミド発現ＳＬＣ－ＨＣ融合タンパク質を含有する上清をファージＥＬＩＳＡにおいて使用し、標的とした結合を決定する。簡潔に言えば、ＥＬｌＳＡは、ヒトＴＮＦ－αによるＥＬＩＳＡプレートの被覆および遮断を伴い、４℃で２時間のＳＬＣ－ＨＣファージのインキュベーション、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ－２０（０．０５％）を用いた洗浄および抗ｍ１３－ＨＲＰ抗体による直接検出が続く。あるいは、結合は、結合ファージを直接増幅または溶出し、ＸＬ－１Ｂｌｕｅ細胞を用いてファージ力価を決定することにより評価される。この実施例は、ＳＬＣ結合ドメイン融合を単一クローンとして記載しているが、このＳＬＣは、共通の標的を認識する他の異種配列と組み換え的に組み換え、ライブラリーとしてスクリーニングされ得る。さらに、このＳＬＣ結合タンパク質は、重鎖の前もって選ばれたコレクションと組み合わせ、目的とする同じ標的または目的とする第２の標的に関して直接スクリーニングされて二重特異性分子を作り出すことができる。あるいは、この強化された結合または二重特異性結合は、重鎖の選択されていないコレクションと共にスクリーニングすることによって見出すことができる。加えて、この実施例は抗体重鎖を指している一方で、完全な重鎖が要求されないことが理解されるべきである。重鎖可変領域配列を含む単鎖融合物は、重鎖定常領域、または完全な重鎖定常領域でない場合、類似したやり方で作ることができ、この実施例の範囲内である。

【０１１７】

（実施例２）

可変重鎖（ＶＨ）パートナーとしてのＶｐｒｅＢ融合物

図５の第２の図に示される機能性ＶｐｒｅＢ－λ５融合タンパク質（「ＶｐｒｅＢタンパク質融合物－二量体複合体」と呼ばれる）は、組み換え的に作り出される。ＶｐｒｅＢ－λ５融合タンパク質は、ｍ１３遺伝子ＩＩＩシグナル配列、ＶｐｒｅＢ１からのアミノ酸２０～１１５、およびλ５からのアミノ酸８３～２０９で構成される。この構築物は、ファージまたはファージミドディスプレイで使用するためにｐＩＩＩを用いて可変重鎖－ＣＨ１融合物と共にインフレームで同時発現させる。ＶＨコード配列として、抗－ＴＮＦ－α抗体、Ｄ２Ｅ７、のＶＨコード配列が用いられ、ＣＨ１は、ヒトＩｇＧｌのＣＨｌ領域である。このファージミド構築物を、ＴＧ１細胞に形質転換させる。次に、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび２％グルコースを補ったルリアブロス（ＬＢ）中で、単一コロニーを、それがＯＤ６００～０．３に達するまで繁殖させ、３０分間、３７℃で振とうせずにＭＫ３０７ヘルパーファージで感染させる。次に細胞をペレットにし、次いで、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび７５μｇ／ｍｌカナマイシンを含有するＬＢ中に再懸濁させ、３０度で、強くエアレーションして一晩成長させる。翌日、ファージミド発現ＳＬＣ－ＨＣ融合タンパク質を含有する上清をファージＥＬＩＳＡにおいて使用し、標的とした結合を決定する。簡潔に言えば、ＥＬｌＳＡは、ヒトＴＮＦ－αによるＥＬＩＳＡプレートの被覆および遮断を伴い、４度で２時間のＳＬＣ－ＨＣファージのインキュベーション、

ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ－２０（０．０５％）を用いた洗浄および抗ｍ１３－ＨＲＰ抗体による直接検出が続く。あるいは、結合は、結合ファージを直接増幅または溶出し、ＸＬ－１Ｂｌｕｅ細胞を用いてファージ力価を決定することにより評価される。この実施例は、重鎖可変－ＣＨ１融合物とパートナーにされたＳＬＣ融合物を単一クローンとして記載しているが、このＳＬＣは、共通の標的を認識する重鎖可変領域のフォーカスされたコレクションと組み合わせ、ライブラリーとしてスクリーニングすることもできる。さらに、このＳＬＣ融合物は、重鎖の選択されていないコレクションと組み合わせ、目的とする標的に関して直接スクリーニングすることができる。ＳＬＣ融合の妥当な代案として、ＶＨ会合を、λ５タンパク質断片の代わりに従来の抗体軽鎖からの定常ラムダ領域を融合させることにより強化することができる。

【０１１８】

（実施例３）

会合させられた可変重鎖（ＶＨ）パートナーとしてのＶｐｒｅＢおよびλ５

図５の第３の図に示されるＶｐｒｅＢ－λ５同時発現タンパク質は、（「ＶｐｒｅＢおよびλ５－三量体複合体」と呼ばれる）は、ｍ１３遺伝子ＩＩＩシグナル配列ならびに予測され成熟した処理されたＶｐｒｅＢｌ（アミノ酸２０～１４６）およびλ５（アミノ酸３１～２０９）の対応するアミノ酸で構成される。これらは、ファージまたはファージミドディスプレイにおいて使用するためにｐＩＩＩを用いて可変重鎖－ＣＨ１融合物と共にインフレームで同時発現させる。ＶＨコード配列として、抗－ＴＮＦ－α抗体、Ｄ２Ｅ７、のＶＨコード配列が用いられ、ＣＨ１は、ヒトＩｇＧｌのＣＨｌ領域である。このファージミド構築物を、ＴＧ１細胞に形質転換させる。次に、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび２％グルコースを補ったルリアブロス（ＬＢ）中で、単一コロニーを、それがＯＤ６００～０．３に達するまで繁殖させ、３０分間、３７℃で振とうせずにＭＫ３０７ヘルパーファージで感染させる。次に細胞をペレットにし、次いで、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび７５μｇ／ｍｌカナマイシンを含有するＬＢ中に再懸濁させ、３０度で、強くエアレーションして一晩成長させる。翌日、ファージミド発現ＳＬＣ－ＨＣ三量体タンパク質複合体を含有する上清をファージＥＬＩＳＡにおいて使用し、標的とした結合を決定する。簡潔に言えば、ＥＬｌＳＡは、ヒトＴＮＦ－αによるＥＬＩＳＡプレートの被覆および遮断を伴い、４度で２時間のＳＬＣ－ＨＣファージのインキュベーション、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ－２０（０．０５％）を用いた洗浄および抗ｍ１３－ＨＲＰ抗体による直接検出が続く。あるいは、結合は、結合ファージを直接増幅または溶出し、ＸＬ－１Ｂｌｕｅ細胞を用いてファージ力価を決定することにより評価される。この実施例は、重鎖可変－ＣＨ１融合物とパートナーにされたＳＬＣ融合物を単一クローンとして記載しているが、このＳＬＣは、共通の標的を認識する重鎖可変領域のフォーカスされたコレクションと組み合わせ、ライブラリーとしてスクリーニングすることができる。さらに、このＳＬＣ融合物は、重鎖の選択されていないコレクションと組み合わせ、目的とする標的に関して直接スクリーニングすることができる。

【０１１９】

（実施例４）

ＶｐｒｅＢｌ　ＣＤＲ３類似領域への多様性の設計

代替軽鎖（ＳＬＣ）のＣＤＲ類似領域は、抗体軽鎖のＣＤＲの機能と同様な機能を有するので、ＶｐｒｅＢとλ５との間の融合点を決定することが重要である。１つのアプローチによれば、特定の目的に最も適切な融合点は、すべてのＶｐｒｅＢアミノ酸を含有するＣＤＲ３類似部位から始め、アミノ酸位置を、クローニング可能なオリゴヌクレオチド中でコードされたλ５の位置により増分的に置換することにより決定される。この増分的置換は、ＣＤＲ類似部位が、λ５ソースの配列によって完全に構成されるまで続く。このプロセスの間のある時点で、相補的重鎖を付加し、その抗原結合および認識を可能／容易にすることが望ましいかもしれない。この相補性をさらに強化または可能にするため、一致ＣＤＲ長さ分析に基づく多様性だけでなく、ランダム多様性をＣＤＲ類似部位のうちのいずにおいても用いることができる。代わりに、またはそれに加えて、多様性を付加するた

めに抗体Ｖλ５配列を用いることができる。なぜならば、それらのＣＤＲ長さが、ＶｐｒｅＢ　ＣＤＲ類似部位長さと良好に一致するからである。

【０１２０】

（実施例５）

ＳＬＣコンポーネントへの機能性の付加

ＳＬＣは２つの独立なポリペプチドで構成されているので、これにより第２の機能性を付加または埋め込むための自然な機会が作り出される。本実施例では、第１の例において、ＶｐｒｅＢをλ５と結合する融合タンパク質を作り出すために、抗ＶＥＧＦｓｃＦｖが挿入される（図９Ａ）。この結果として生じる設計されたＳＬＣ－制約ｓｃＦｖは、抗ＴＮＦ－α抗体の重鎖と対にされる。結果として生じる構築物は、ファージまたはファージミドディスプレイで使用するためにｐＩＩＩを用いてインフレームクローニングされた重鎖と共に同時発現させる。このファージミド構築物を、ＴＧｌ細胞に形質転換し、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび２％グルコースを補ったルリアブロス（ＬＢ）中で、単一コロニーを、それがＯＤ６００～０．３に達するまで繁殖させ、３０分間、３７℃で振とうせずにＭＫ３０７ヘルパーファージで感染させる。次に細胞をペレットにし、次いで、５０μｇ／ｍｌアンピシリンおよび７５μｇ／ｍｌカナマイシンを含有するＬＢ中に再懸濁させ、３０度で、強くエアレーションして一晩成長させる。翌日、ファージミド発現ＳＬＣ－ＨＣ融合タンパク質を含有する上清をファージＥＬＩＳＡにおいて使用し、標的とした結合を決定する。簡潔に言えば、ＥＬｌＳＡは、ヒトＴＮＦ－αまたはヒトＶＥＧＦによるＥＬＩＳＡプレートの被覆および遮断を伴い、４℃で２時間のＳＬＣ－ＨＣファージのインキュベーション、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ－２０（０．０５％）を用いた洗浄および抗ｍ１３－ＨＲＰ抗体による直接検出が続く。

【０１２１】

次に、ＶｐｒｅＢのＣ末端への抗ＶＥＧＦｓｃＦｖの融合を作り出し、結果として生じる３つの部分からなるタンパク質複合体構築物を、上述のファージミドＥＬＩＳＡと同様に評価した。

【０１２２】

あるいは、抗オボアルブミンｓｃＦｖを、λ５のアミノ末端に融合し、３つの部分からなるタンパク質複合体を、ＴＮＦ－αおよびオボアルブミンの双方への結合について試験する。

【０１２３】

最後に、これらの２つの融合構築物（ＶｐｒｅＢ－抗ＶＥＧＦｓｃＦｖおよびλ５－抗オボアルブミン）を、抗ＴＮＦ－α抗体の重鎖と組み合わせて三重特異性分子を作り出し、次に上記のようにファージミドＥＬＩＳＡにおいて確認する。

【０１２４】

この説明において、異種標的に対するｓｃＦｖが組み込まれるが、機能性バインダーを同じ標的と組み合わせてタンデム「スーパーバインダー」を作り出すことができる。これらのタンデムバインダーは、強化された結合を提供するか、あるいは場合によっては架橋機能さえも提供できる。Ｆａｂ架橋は、すべての抗体が、望ましくなくかつ長期の架橋をもたらす場合には、有用であろう。例えば、インスリン代替物として作用するすべての免疫グロブリンインスリン受容体抗体が、血清クリアランスに３～４週間要することは望ましくないことがある。インシュリンは通常、数分間の半減期を有するので、Ｆａｂは、この半減期のスケールとより一致するであろうし、タンデム機能性はこの用途に適切に対処できるかも知れない。

【０１２５】

上記の記述は、２次機能性群としての抗体のみを説明しているが、関連するペプチド（例えば、エリスロポエチン（ＥＰＯ）ミメティック）、受容体（例えば、ＴＮＦ－ＲＩ）、結合タンパク質（例えば、ＩＬ－１ｒａ）、およびインターフェロンのような治療タンパク質を、付加および制約された構築物に同様に組み込み、同様な機能の分子を作り出すことができる。

【０１２６】
また、２次Ｆａｂ様分子を作り出すための重および軽鎖のように、ヘテロ二量体タンパク質を組み込むために２つの部位を利用できるかも知れない。
【０１２７】
最後に、本発明者らは、個別の例のみを説明してきたが、ＳＬＣ候補抗体を用いてそれらの指示されたおよび所望された標的に対してスクリーニングするために、組み合わせ的に多様なファージ抗体ライブラリーおよびペプチド多様性ライブラリーの組み込みも本明細書に含まれる。
【０１２８】
（実施例６）
哺乳動物細胞における代替軽鎖構築物（ＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標））の発現
図１１において「三量体」（「ＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標）変異体」とも呼ばれる）と呼ばれる構造物の代替軽鎖コンポーネントのコード配列を、完全長ＩｇＧｌ抗体重鎖を用いてＣＨＯ－Ｋｌ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）に同時形質移入し、生化学分析のための代替軽鎖構築物を一時的に産生した。具体的には、完全長ヒトＶｐｒｅＢｌおよびλ５を、哺乳動物発現ベクターｐＣＩ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ）中にクローニングした。これらの構築物は、それらの未変性の予測される分泌物シグナルを含んでいた。ＶｐｒｅＢ１の場合、予測されるシグナルペプチドは、配列番号１のアミノ酸１－２０であり、λ５については、予測されるシグナル配列は、配列番号５のアミノ酸１－３０である。これらのタンパク質の双方について、それらの予測される非構造的尾部の部分は欠失されていた。ＶｐｒｅＢｌについては、これは、配列番号１のＣ末端アミノ酸１２２－１４６を含んでおり、ラムダ５については、これは、配列番号５のＮ末端アミノ酸３０－８６を含んでいた。
【０１２９】
図１１において「ラムダ５　ｄＴ」と呼ばれる「三量体」中のトランケートされたλ５配列の配列が、配列番号７として示してある。図１１において「ＶｐｒｅＢ　ｄＴ」と呼ばれる「三量体」中のトランケートされたＶｐｒｅＢｌ配列の配列が、配列番号８として示してある。
【０１３０】
４つの組合せ代替軽鎖可能性の各々を、Ｃ末端ヘキサヒスチジン（Ｈｉｓ６）タグ（配列番号９）を含有する既知のヒト抗インフルエンザ重鎖で同時形質移入し、製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）の提案に従って低血清培地中で発現させた。３日後、上清を採集し、濾過し、ニッケルキレートクロマトグラフィー（Ｑｉａｇｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）により精製した。次に、精製タンパク質を、抗ペプチドウサギ血清（ＶｐｒｅＢおよびλ５）か、あるいは抗ヒスチジン抗体（Ｓｅｒｏｔｅｃ，Ｒａｌｅｉｇｈ　ＮＣ）のいずれかによるウェスタンブロット分析により試験し。タンパク質の検出は、抗ウサギＨＲＰ（ＶｐｒｅＢおよびλ５）または抗マウスＨＲＰ（重鎖）およびＴＭＢ基質による比色発色の後に視覚化した。（図１２、レーン１～４）
加えて、代替軽鎖融合物（図１１参照）を、ＶｐｒｅＢｌ遺伝子とλ５遺伝子か軽鎖定常ラムダドメインとで構成されたキメラタンパク質を設計することにより作り出した。具体的には、ＶｐｒｅＢ（配列番号１）からλ５タンパク質アミノ酸１２１－２０９（配列番号５）（配列番号１０）までのアミノ酸１－８７を含む組み換え的に融合されたタンパク質を産生した。加えて、ＶｐｒｅＢ（配列番号１）から抗体λ軽鎖定常（配列番号１１）のＣ末端１２１アミノ酸までのアミノ酸１－８７を含む第２の融合物を作成した。各代替軽鎖融合物を、基本的には上記で記載されたように、一時的に発現させ、収集し、精製し、ウェスタンブロット分析により試験した。特に、両方の融合物が、抗ＶｐｒｅＢ１抗ペプチド血清に対するエピトープを含んでいたので、これはウェスタンブロット分析に用いた。（図１２、レーン５－６）
（実施例７）
Ｅ．ｃｏｌｉにおける代替軽鎖構築物（ＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標））の発現

組み換えタンパク質は、細菌中でしばしば有用に発現させられるので、原核生物系において可溶性代替軽鎖構築物を産生する能力を試験した。これに対処するため、図１１において「二量体」と呼ばれる代替軽鎖融合を、Ｅ．ｃｏｌｉ発現／分泌系中でクローニングした。ｐｌａｃ抑制発現系が用いられ、成熟哺乳動物タンパク質、原核生物リーダー配列への組み換え融合によりペリプラズムに発現および分泌された。具体的には、代替軽鎖融合物は、ｍ１３　ｇＩＩＩリーダーコード配列（配列番号１２および１３）のＣ末端へ成熟タンパク質のコード配列を融合させることにより、ペリプラズムへ誘導した。重鎖は、ＩｇＧｌ重鎖可変領域および抗インフルエンザ抗体の重鎖定常領域ドメインを、ｐｅｌＢリーダー配列（配列番号１４）のＣ末端に融合させることにより発現させた。両方のタンパク質を発現させるプラスミドを、ＨＢ２１５１　Ｅ．ｃｏｌｉ細胞（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に形質変換し、１００ｍｃｇ／ｍｌアンピシリンおよび２００ミクロモルＩＰＴＧを含有するＬＢ培地中で、３０度で一晩発現させた。細胞を収集し、当該技術分野において知られている方法に従い、ペリプラズムライゼートを調製した。このペリプラズムライゼートを、ウェスタンブロット分析により直接試験、または上述のように精製した（図１３、パネルＡ）。

【０１３１】

代替軽鎖は従来、膜結合ｐｒｅＢ細胞受容体のコンポーネントなので、これは通常、ＩｇＭクラス重鎖と対になっているのが見出される。本発明者らの実用的な目的のため、本発明者らは、ＩｇＭ対ＩｇＧベースの定常重ドメイン１領域と代替軽鎖融合物とを対にする能力を比較したいと考えた。これを調べるため、本発明者らは、μ定常重ドメイン１（配列番号１５）を、上述の抗インフルエンザ抗体のガンマ定常ドメイン領域で置換した。本発明者らは、ペリプラズムライゼートのウェスタンブロット分析から、ＩｇＧ（γ）－ベースの定常重ドメインが、μ－ベースの定常重ドメインベースの系よりも、より良好に発現され、かつより高水準に精製されることを見出した（図１３、パネルＢ）。

【０１３２】

（実施例８）

代替軽鎖構築物（ＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標））ｍ１３ファージミドの発現

組み換えタンパク質は、細菌においてだけでなく、個別におよび細菌ウイルス粒子の表面上の多様なライブラリーコレクションにおいて有用に発現されるので、本発明者らは、ｍ１３ファージミドの表面上に可溶性代替軽鎖構築物を産生したいと考えた。これに対処するため、代替軽鎖融合物（図１１の「二量体」）を、Ｅ．ｃｏｌｉ発現／分泌系にクローニングした。すべての系について、上述のｐＬａｃ抑制発現系を用いた。しかしながら、この場合、本発明者らは、Ｅ－タグエピトープ（ＧＡＰＶＰＹＰＤＰＬＥＰＲ）（配列番号１６）を代替軽鎖融合物、ならびに軽鎖制御タンパク質にも付加した。遺伝子ＩＩＩ　ＶｐｒｅＢｌ－ラムダ５－Ｅ－タグ融合物（融合物１）および遺伝子ＩＩＩ　ＶｐｒｅＢｌ－ＣＩ－Ｅタグ融合物（融合物２）の配列が、それぞれ配列番号１２および１３として示してある。重鎖構築物をｍ１３ファージミドに固着するため、重鎖構築物を、可変重鎖およびガンマ定常重ドメイン１領域とインフレームでｍ１３遺伝子ＩＩＩ生成物により組み換え的にクローニングした。具体的には、組み換えタンパク質は、介在性のヘキサヒスチジンペプチド、抗ｃ－ｍｙｃ抗体（ＧＥＱＫＬＩＳＬＥＥＤＬ）（配列番号１７）のためのペプチドエピトープ、およびアンバー終止コドンを含んでいた。本発明者らは、抗ヒスチジンおよび抗Ｅ－捕獲ＥＬＩＳＡにより、タンパク質発現および複合体形成の忠実度をそれぞれ調べた。

【０１３３】

抗体およびｓｕｒｒｏｂｏｄｙのファージミド発現を、当該技術分野においてよく知られた標準的方法により達成した。本質的に、発現プラスミドで形質移入されたＴＧ－１細胞を、１００ｍｃｇ／ｍｌアンピシリンおよび２％ブドウ糖抑制を補った２－ＹＴ培地中で、ｍｉｄ　ｌｏｇ（ＯＤ６００～０．３）まで成長させ、次にｍ１３Ｋ０７ヘルパーファージで感染させ、次いで、１００ｍｃｇアンピシリン、７０ｍｃｇ／ｍｌカナマイシン、および２００ミクロモルＩＰＴＧを補った２－ＹＴ培地中で一晩成長させた。ファージ

含有上清または沈降させＰＢＳ再懸濁させたファージを、ファージ捕獲ＥＬＩＳＡ用に用いた。ファージ捕獲ＥＬＩＳＡは、マイクロタイタープレートに抗ヒスチジン（Ｓｅｒｏｔｅｃ）か抗Ｅ抗体（Ａｂｃａｍ）を塗布し、次に抗ｍ１３ペルオキシダーゼ抗体（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）との結合を検出し、続いてＴＭＢ基質で比色視覚化することにより達成した。これらの例において、本発明者らは、重鎖および安定な代替軽鎖会合によるファージへの高信頼度タンパク質発現融合をサポートする、両方の方法によるファージの特異的捕獲を見出した。結果は、図１４に示してある。

【０１３４】

（実施例９）

哺乳動物細胞中で発現された代替軽鎖構築物の抗原結合

代替軽鎖変異体が、ニッケルキレートクロマトグラフィーの後に容易に検出可能な複合体を形成すると思われたので、同族の重鎖パートナーの親抗原に結合するそれらの能力を試験した。一時的発現および精製は、上述の通り実行した。抗原結合を、ＥＬｌＳＡにより試験した。簡潔に言えば、マイクロタイターウェルを、不活性化したＨ５Ｎ１ベトナム１２－３／０４ウイルス製剤（ＵＳＦＤＡ－ＣＢＥＲ、抗原基準）で塗布し、ブロックし、次に、定量した連続希釈精製タンパク質でインキュベートした。洗浄後、複合体を、抗ヒトＦｃペルオキシダーゼコンジュゲート抗体で検出した。最後に、結合を、ＴＭＢ基質発色により、比色的に視覚化し、定量した（図１５参照）。

【０１３５】

加えて、一時的形質移入の上清を、抗原結合について未希釈で同様に試験し、図１６に示してある。洗浄後、代替軽鎖複合体を、抗－ＶｐｒｅＢｌ抗ペプチド血清および抗ウサギペルオキシダーゼコンジュゲート２次抗体か抗ヒトＦｃペルオキシダーゼコンジュゲート抗体を用いて検出し、次いでＴＭＢ基質発色により比色的に視覚化し、定量した。

【０１３６】

（実施例１０）

Ｅ．ｃｏｌｉにおいて発現された代替軽鎖構築物の抗原結合

代替軽鎖融合物が安定な複合体を形成すると思われたので、本発明者らは、抗インフルエンザ抗体からの重鎖と対にされたそのような融合物が抗体の同族ウイルスと結合するかどうかを確かめたいと考えた。結合について試験するため、ペリプラズムライゼートを、上述の通りに調製した。ライゼートを次に、本質的には上述の通りにＥＬＩＳＡ抗原結合に供したが、重鎖のＣ末端の付加されたヘキサヒスチジンエピトープか、あるいは代替軽鎖融合物のＣ末端の付加されたＥ－タグかのどちらか一方に対するモノクローナル抗体を用いてポリクローナル親和性精製抗体を介して結合を検出した点が異なる。エピトープ検出は、抗マウスペルオキシダーゼコンジュゲート抗体か抗ウサギペルオキシダーゼコンジュゲート抗体のどちらか一方により達成した。最後に、結合を、ＴＭＢ基質発色により比色的に視覚化し、定量した。結果は、図１７に示してある。

【０１３７】

（実施例１１）

ファージディスプレイされた代替軽鎖構築物の抗原結合

異種系中で代替軽鎖変異体を作成することが可能であり、ファージディスプレイされたコレクションが将来のタンパク質発見および設計に望ましいので、本発明者らは、代替軽鎖変異体および／または融合物が、ｍ１３ファージの表面で遺伝子ＩＩＩ－会合複合体として容易にディスプレイされるかどうかを決定したいと考えた。変異体（配列番号１８－２２）および前に記載された融合物（配列番号１２および１３）を、上述の通りに２つの抗インフルエンザ抗体重鎖（配列番号１９および１４）のどちらか一方と共に同時発現させ、結合は本質的に、同じく上述された条件に従った。簡潔に言えば、マイクロタイターウェルを、Ｈ５Ｎ１ベトナム１２０３／０４ウイルスで塗布し、ファージミドを結合させ、次に洗浄し、抗ｍ１３ペルオキシダーゼコンジュゲート抗体で直接検出した。結合は、ＴＭＢを用いて比色基質生成物形成に従って定量的に決定した。結果は、図１８および１９に示してある。

【０１３８】
（実施例１２）
ファージ代替軽鎖構築物ライブラリー構築、選択、およびクロナールＥＬｌＳＡ
抗原に結合した代替軽鎖構築物を発生および試験するため、組み合わせ抗体ライブラリーを用いた反復アプローチを使用した。簡潔に言えば、Ｈ５Ｎ１トリインフルエンザ生存者の骨髄から調製した組み合せ抗体ライブラリーを作成した。これらのライブラリーを、Ｈ５Ｎ１ウイルス血球凝集素タンパク質に対して２ラウンドの選択についてスクリーニングした。次に、ファージミドプラスミドを増幅および精製した。重鎖可変領域を制限消化によりこのプラスミド調製物から単離し、定常重ドメイン１と共にインフレームでクローニングして、ファージミドディスプレイのためのｍ１３遺伝子ＩＩＩコートタンパク質への組み換えの融合を形成した。重要なことに、本発明者らは、ＶｐｒｅＢｌおよびラムダ５（ＳＬＣ融合物１）（配列番号１０）か、ＶｐｒｅＢｌおよび古典的なラムダ軽鎖（ＳＬＣ融合物２）からの定常ラムダドメイン（配列番号１１）かで構成される代替軽鎖融合物を同時発現させる２つの受容体プラスミドを用いた。融合物１ライブラリーが３．８４×10^7の独立した形質転換体を産生したのに対し、融合物２ライブラリーは、７．８×10^7の形質転換体を産生した。両方のライブラリーを、２ラウンドを通して独立してスクリーニングし、両方ともバックグラウンド（融合物１＝５×、融合物２＝２０×）に対し有意な濃縮を示し、この濃縮は第２のパンニングラウンドにおいて増大した（融合物１＝９７×、融合物２＝４８×）。
【０１３９】
クロナール抗原結合についてＥＬＩＳＡにより試験するため、両方のラウンドおよび両方のライブラリーからのファージをＨＢ２１５１　Ｅ．ｃｏｌｉ株中に移行させて、可溶性ｓｕｒｒｏｂｏｄｙ融合タンパク質を産生した。簡潔に言えば、ＨＢ２１５１クローンを成長させ、可溶性ｓｕｒｒｏｂｏｄｉｅｓを産生するように誘導した。具体的には、コロニーを、１００ｍｃｇ／ｍｌアンピシリンおよび２００ミクロモルＩＰＴＧを補った２－ＹＴ培地中で、３０度で一晩培養し、上述のようにペリプラズムライゼートを得た。結果として生じるペリプラズムライゼートを、本質的に上記で略述されるように、ＥＬＩＳＡにより試験した。
【０１４０】
ラウンド１および２のパンニングにおける、２つの融合物についての形質転換体の数および陽性クローン百分率が図２０に示してあり、融合物１および融合物２ライブラリークローンのラウンド１および２についてのクローン分析データが図２１および２２に示してある。
【０１４１】
（実施例１３）
血清半減期を増大させる代替軽鎖融合物
ｉｎ　ｖｉｖｏの抗体断片の半減期は、その抗体断片が、すべての重鎖定常ドメインを含む元のままの完全な重鎖への融合の一部であって、安定な抗原結合断片を形成するのに必要なものではない場合に、大きく延長される。ＩｇＧの場合、このことは、ドメインＣＨｌ、ＣＨ２、およびＣＨ３の包含を意味する。特に、ＣＨ２およびＣＨ３がｉｎ　ｖｉｖｏでこの効果の大部分を付与することが十分に確認されている。実際、異種タンパク質へのこれらのＣＨ２およびＣＨ３ドメインの融合は一般に、親分子と比較してこれらのキメラ分子の効力およびＰＫ／ＰＤを改善するのに十分である。同様に、ＶｐｒｅＢおよびλ５の両方またはどちらか一方への機能的融合は、重鎖の定常ドメインとのこの会合により恩恵を受ける。
【０１４２】
ＩＩ型糖尿病の処置について、グルカゴン様ペプチド１（またはＧＬＰ－１）の投与は、膵臓でのグルコース依存性インスリン分泌を誘導し、それによって患者におけるグルコース糖管理を改善することにより、患者に利益をもたらす。しかしながら、長命ＧＬＰ－１ペプチドが望ましい目標である。代替軽鎖の尾部が特異でありかつアクセス可能なので

、活性ＧＬＰ－１部分を、ＶｐｒｅＢ１尾部のＣ末端（配列番号２３および２４）か、λ５のＮ末端尾部（配列番号２５および２６）かのどちらか一方に組み換え的に融合することによりこの目標を遂行できるかも知れない。λ５融合の場合、図１１に描かれるように、ＶｐｒｅＢｌの存在下でまたはそれ無しで、さらには可変重ドメインの存在下でまたはそれ無しで、これを発現させてもよい。ＶｐｒｅＢｌへの融合は同様に、λ５の存在下でまたはそれ無しで、そしておそらく重鎖のＣＨｌドメインの存在下でまたはそれ無しで行うことができる。同様に、他の有用な成長因子、サイトカイン、受容体、および酵素融合物を作り出すことができる。これらのケースのすべてにおいて、結合は、代替軽鎖、またはＳＵＲＲＯＢＯＤＹ（商標）コンポーネントの必要条件ではなく、むしろ、異種代替軽鎖融合された要素により、完全にまたは大部分が付与され得る。

【０１４３】

上記の説明において、本発明はある一定の実施形態に関連して例示されている、本発明はそのように限定されない。事実、本明細書中で示されかつ説明されるもの加えて本発明の様々な修正が上記の説明から当業者にとって明らかになり、特許請求の範囲に入るであろう。

【０１４４】

（実施例１４）

血球凝集素－結合代替軽鎖構築物の親和性決定

融合代替軽鎖構築物（ＳＵＲＲＯＢＯＤＩＥＳ（商標）、図１１参照）の親和性を決定するため、本発明者らは、Ｅ．ｃｏｌｉ中で様々なｓｕｒｒｏｂｏｄｙを過剰発現および精製し、それらを、重鎖が最初に同定された親Ｆａｂと比較した。親和性は、基本的に以下の通り、ＢｉｏＦｏｒｔｅ　Ｏｃｔｅｔ上でのＢｉｏ－Ｌａｙｅｒ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｍｅｔｒｙにより決定した。最初に、１００μｇの精製血球凝集素タンパク質を、製造業者の取扱説明に従いＰｉｅｒｃｅ　Ｎｏ－Ｗｅｉｇｈｔ　ＰＥＯ４ビオチン（ｃａｔ＃２１３２９）を用いて２０：１モル過剰でビオチニル化し、室温で１～３時間、間欠的に撹拌しつつインキュベートし、次に、４Ｃで一晩インキュベートした。過剰ビオチンは、サイズ排除スピンカラムによって除去し、ＰＢＳに交換した。次に、ＨＡ結合代替軽鎖構築物およびＦａｂを、Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィーを用いてＦＰＬＣにより精製し、脱塩して過剰なイミダゾールを除去し、濃縮し、製造業者の取扱説明に従って実行する定量的軽鎖ＥＬｌＳＡ（Ｂｅｔｈｅｌ　Ｌａｂｓ，ｃａｔ＃Ｅ８０－１１５－κ、およびＥ８０－１１６－λ）により定量した。最後に、親和性を、一般に連続２倍希釈して１５ｎＭ～５００ｎＭである試料濃度の範囲を分析することにより決定した。試料を、ＨＡタンパク質を塗布したバイオセンサーを用いて最高１５分間インキュベートし、次に試料希釈剤中で最高１時間インキュベートした。これらのステップのすべては、１５００　ＲＰＭでの試料プレート回転で行った。会合は、ＨＡ－塗布バイオセンサーによりＦａｂインキュベーションの間に測定し、解離は、結合の後に試料希釈剤インキュベーションにおいて測定する。親和性は、以下の表に示してある。

【０１４５】

【表１】

クローン	融合物1 VpreB1-ラムダ5	融合物1 VpreB1-定常ラムダ	Fab
F5	250-400 pM	150-270 pM	1 pM
B11	31-180 pM	決定されず	13 pM

本明細書全体を通して引用されたすべての参考文献、およびその中で引用された参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書により明確に組み込まれる。

Figure 3

代替軽鎖欠失および単鎖構築物

【図３】

個別にまたは重鎖のような別のタンパク質と共に用いることができる

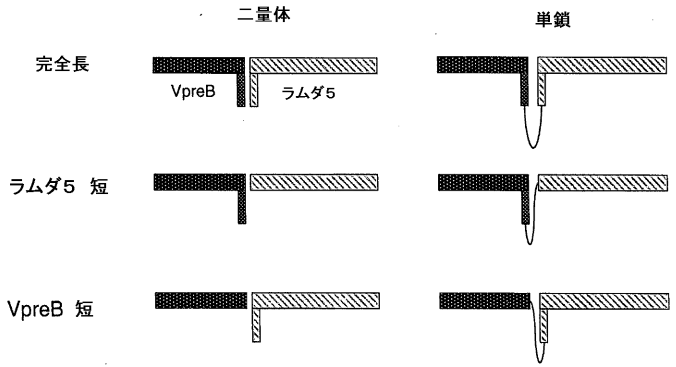


Figure 4

代替軽鎖構築物内への組み合わせ機能多様性の組み込み

【図４】

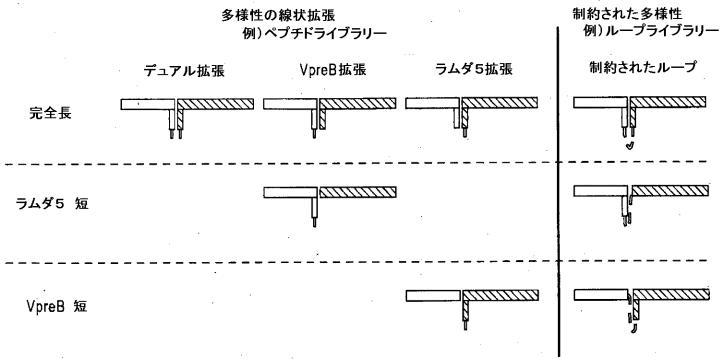


Figure 1

可変および定常ラムダ軽鎖との代替軽鎖配列比較

【図１】



- *VPREB1*は、従来のラムダ軽鎖可変領域といくらかの配列類似性を共有する
- ラムダ5は、Vラムダ定常領域およびフレームワーク領域4と類似性を共有する
- 代替軽鎖は、CDR領域と類似する領域を有する

Figure 2

代替軽鎖および融合構築物

【図２】

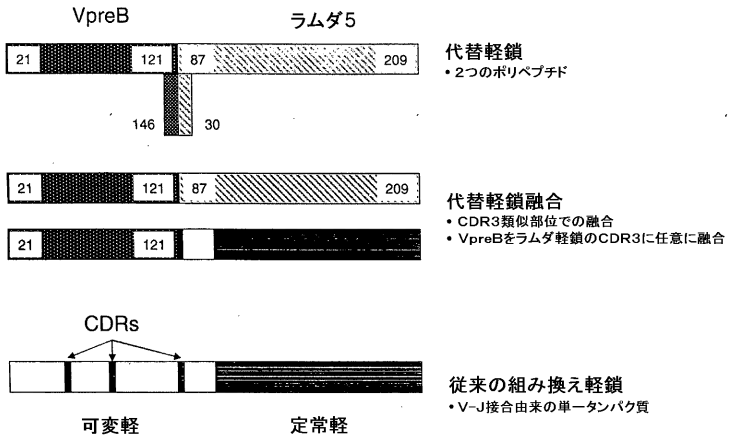
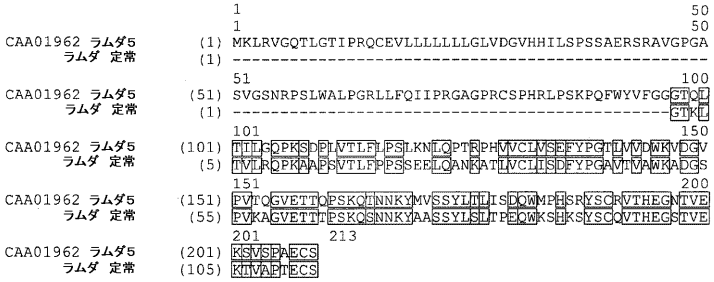


Figure 7

定常ラムダとのSLC配列比較

【図７】

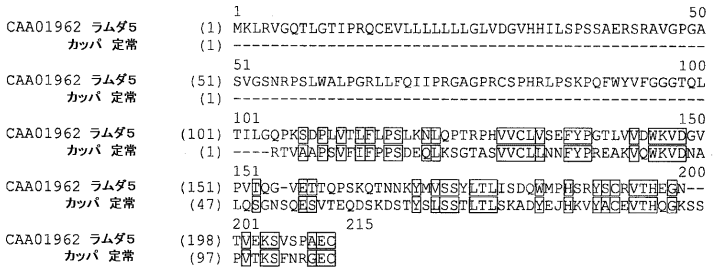


ラムダ5は、定常ラムダ領域に対し62%（アミノ酸97～209）しか共有しない

Figure 8

定常カッパとのSLC配列比較

【図８】



ラムダ5は、定常カッパ領域に対し35%（アミノ酸105～209）しか共有しない

Figure 5

代替軽鎖構築物のタイプ

【図５】

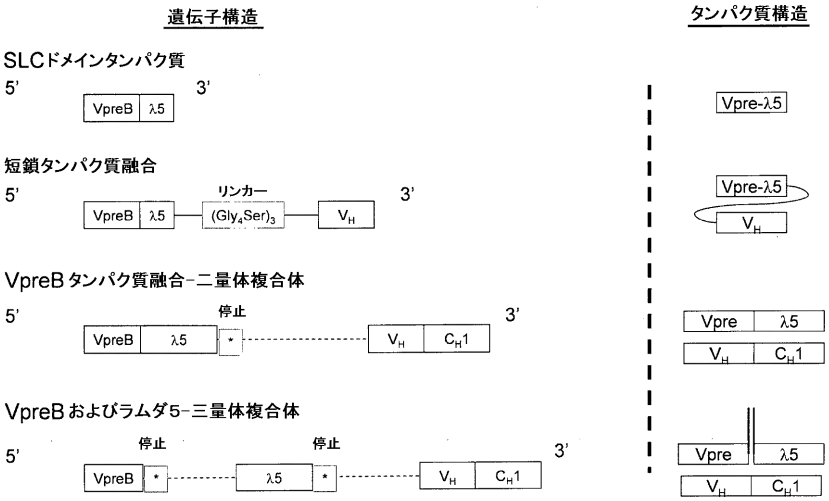
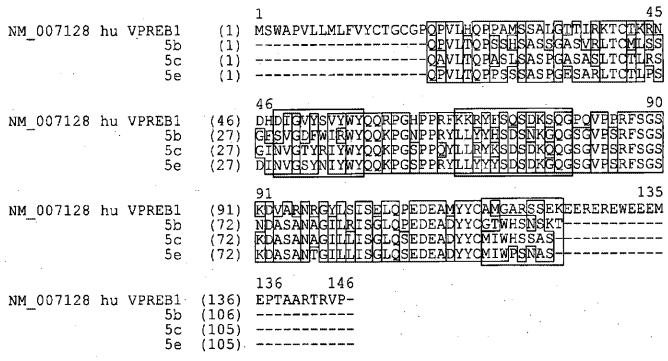


Figure 6

VL5遺伝子とのSLC配列比較

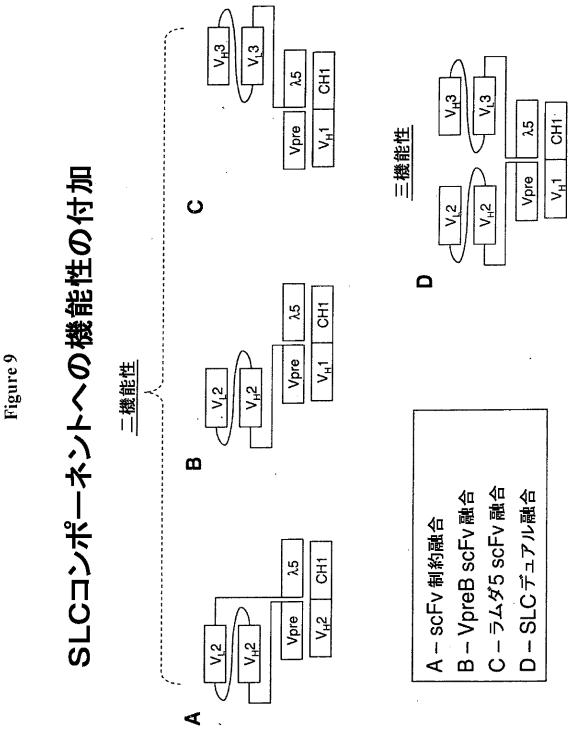
【図６】



VpreB1は、VLラムダ5生殖系列に対し56%～62%（アミノ酸2～97）しか共有しない

【図９】

Figure 9



【図１０－１】

FIGURE 10

MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIG
MSWAPVLLML FVYCTGCGPQ PVLHQPPAMS SALGTTIRLT CTLRNDHDIG
VYSVYWYQQR PGHPPRFLLR YFSQSDKSQG PQVPPRFSGS KDVARNRGYL
SISELQPEDE AMYYCAMGAR SSEKEERERE WEEEMEPTAA RTRVP (ヒトVpreB1; CAG30495; 145アミノ酸;配列番号1)

MAWTSVLLML LAHLTGCGPQ PMVHQPPSAS SSLGATIRLS CTLSNDHNIG
IYSIYWYQQR PGHPPRFLLR YFSHSDKHQG PDIPPRFSGS KDTARNLGYL
SISELQPEDE AVYYCAVGLR SHEKKRMERE WEGEKSYTDL GS (マウスVpreB2; P13373; 142アミノ酸;配列番号2)

MAWTSVLLML LAHLTGKGTL GVQGFLAPPV ALLCPSDGHA SIFSGCGPQP
MVHQPPSASS SLGATIRLSC TLSNDHNIGI YSIYWYQQRP GHPPRFLLRY
FSHSDKHQGP DIPPRFSGSK DTARNLGYLS ISELQPEDEA VYYCAVGLRS
HEKKRMEREW EGEKSYTDLG S (マウスVpreB2スプライス変異体; CAA01964; 171アミノ酸;配列番号3)

MACRCLSFLL MGTFLSVSQT VLAQLDALLV FPGQVAQLSC TLSPQHVTIR
DYGVSWYQQR AGSAPRYLLY YRSEEDHHRP ADIPDRFSAA KDEAHNACVL
TISPVQPEDD ADYYCSVGYG FSP (ヒトVpreB3; CAG30496; 123アミノ酸;配列番号4)

MKLRVGQTLGTIPRQCEVLLLLLLLGLVDGVHHILSPSSAERSRAVGPGASVGSNRPSL
WALPGRLLFQIIPRGAGPRCSPHRLPSKPQFWYVFGGGTQLTILGQPKSDPLVTLFLPSLK
NLQPTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGVPVTQGVETTQPSKQTNNKYMVSSYLTLI
SDQWMPHSRYSCRVTHEGNTVEKSVSPAECS (ヒト ラムダ5 ; CAA01962; 209アミノ酸;配列番号5)

MRPGTGQGGL EAPGEPGPNL RQRWPLLLLG LAVVTHGLLR PTAASQSRAL
GPGAPGGSSR SSLRSRWGRF LLQRGSWTGP RCWPRGFQSK HNSVTHVFGS
GTQLTVLSQP KATPSVTLFP PSSEELQANK ATLVCLMNDF YPGILTVTWK
ADGTPITQGV EMTTPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWRSRR SYSCQVMHEG
STVEKTVAPA ECS (ヒト ラムダ5様タンパク質; NP_064455; 213アミノ酸;配列番号6)

【図１０－２】

FIGURE 10(続き)

ラムダ5dT
MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLGLAVVTHGSVTHVFGSGTQLTVLSQPKAT
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNK
YAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKTVAPAECS (配列番号7)

VpreB1d
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GA (配列番号8)

B11 HC-His+(無力化抗インフルエンザ重鎖)
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAQMQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSFDSGYYWG
WLRQPPGKGLEWIGSIYHSRNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLQLSSVTAADTAVYY
CARGTWYSSNLRYWFDPWGKGTLVRVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGHHHHHH (配列番号9)

VpreB1-ラムダ5(融合物1)
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVT
WKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKT
VAPAECS (配列番号10)

VpreB1-CL (融合物2)
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSVTHVFGSGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSXELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA
WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPAECS (配列番号11)

遺伝子III VpreB1-ラムダ5-Eタグ融合(融合物1)
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILTVT
WKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVEKT
VAPAECSGAPVPYPDPLEPR (配列番号12)

遺伝子III VpreB1-C1-Eタグ融合(融合物2)
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM

【図１０－３】

FIGURE 10(続き)

GARSSVTHVFGSGTQLTVLRQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA
WKADGSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECSGAPVPYPDPLEPR (配列番号13)

pelB F5 HCガンマ-His+(非無力化抗インフルエンザ重鎖)
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYVMIW
VRQVPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVY
YCVLSPKSYYDNSGIYFDFWGKGTLVRVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCAAAHHHHHHGEQKLISEEDL (配列番号14)

pelB F5 HCミュー-His+(非無力化抗インフルエンザIgM重鎖)
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSYVMIW
VRQVPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVY
YCVLSPKSYYDNSGIYFDFWGKGTLVRVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLA
QDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCK
VQHPNGNKEKNVPLPVAAAHHHHHHGEQKLISEEDL (配列番号15)

GAPVPYPDPLEPR (配列番号16)

GEQKLISEEDL (配列番号17)

遺伝子IIIリーダーVpreB1-Eタグ完全長
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSEKEERERWEEEMEPTAARTRVPGAPVPYPDPLEPR (配列番号18)

遺伝子IIIリーダーVpreB1dT
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GA (配列番号19)

遺伝子IIIリーダーVpreB1dT-Eタグ
VKKLLLFAIPLVVPFYSHSAQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GAGAPVPYPDPLEPR (配列番号20)

OmpAリーダー-ラムダ5
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAALLRPTAASQSRALGPGAPGGSSRSSLRSRWGRFLLQR
GSWTGPRCWPRGFQSKHNSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATL
VCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSY
SCQVMHEGSTVEKTVAPAECS (配列番号21)

【図１０－４】

FIGURE 10(続き)

OmpAリーダー−ラムダ5dT
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQAN
KATLVCLMNDFYPGILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWR
SRRSYSCQVMHEGSTVEKTVAPAECS (配列番号22)

GLP-1 VpreB1 完全長
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GARSSEKEERERE WEEEMEPTAARTRVPHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
(配列番号23)

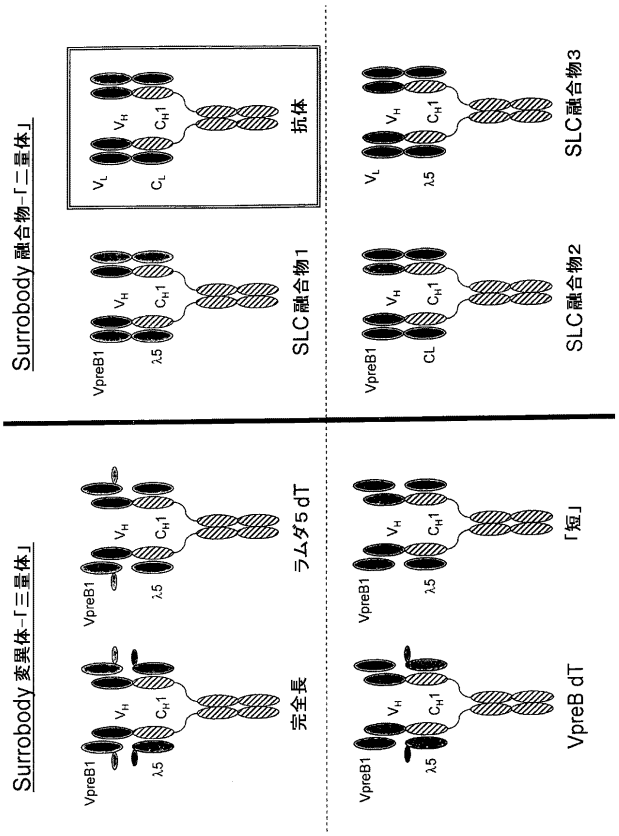
GLP-1 VpreB1dT
MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPVLHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIGVYSVYWYQ
QRPGHPPRFLLRYFSQSDKSQGPQVPPRFSGSKDVARNRGYLSISELQPEDEAMYYCAM
GAHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (配列番号24)

GLP-1ラムダ5完全長
MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKG
RGLAVVTHGLLRPTAASQSRALGPGAPGGSSRSSLRSRWGRFLLQRGSWTGPRCWPRG
FQSKHNSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYPGILT
VTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGSTVE
KTVAPAECS (配列番号25)

GLP-1ラムダ5dT
MRPGTGQGGLEAPGEPGPNLRQRWPLLLLGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK
GRLAVVTHGSVTHVFGSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLMNDFYP
GILTVTWKADGTPITQGVEMTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWRSRRSYSCQVMHEGS
TVEKTVAPAECS (配列番号26)

【図１１】

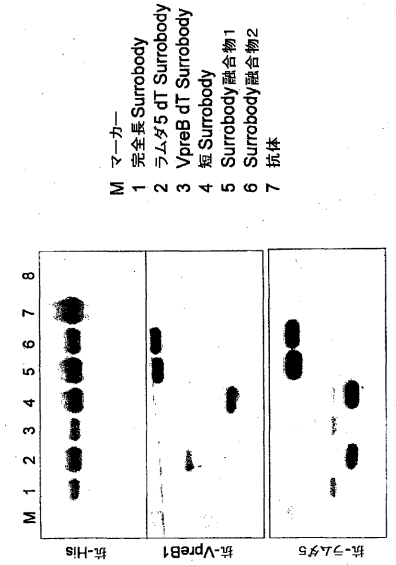
Figure 11



【図１２】

Figure 12

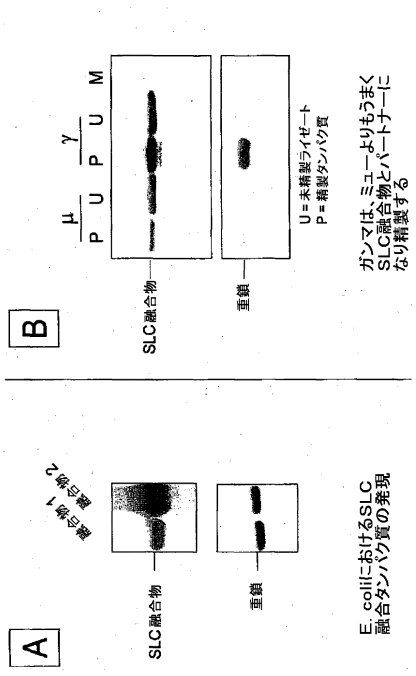
代替軽鎖および複合化重鎖の検出



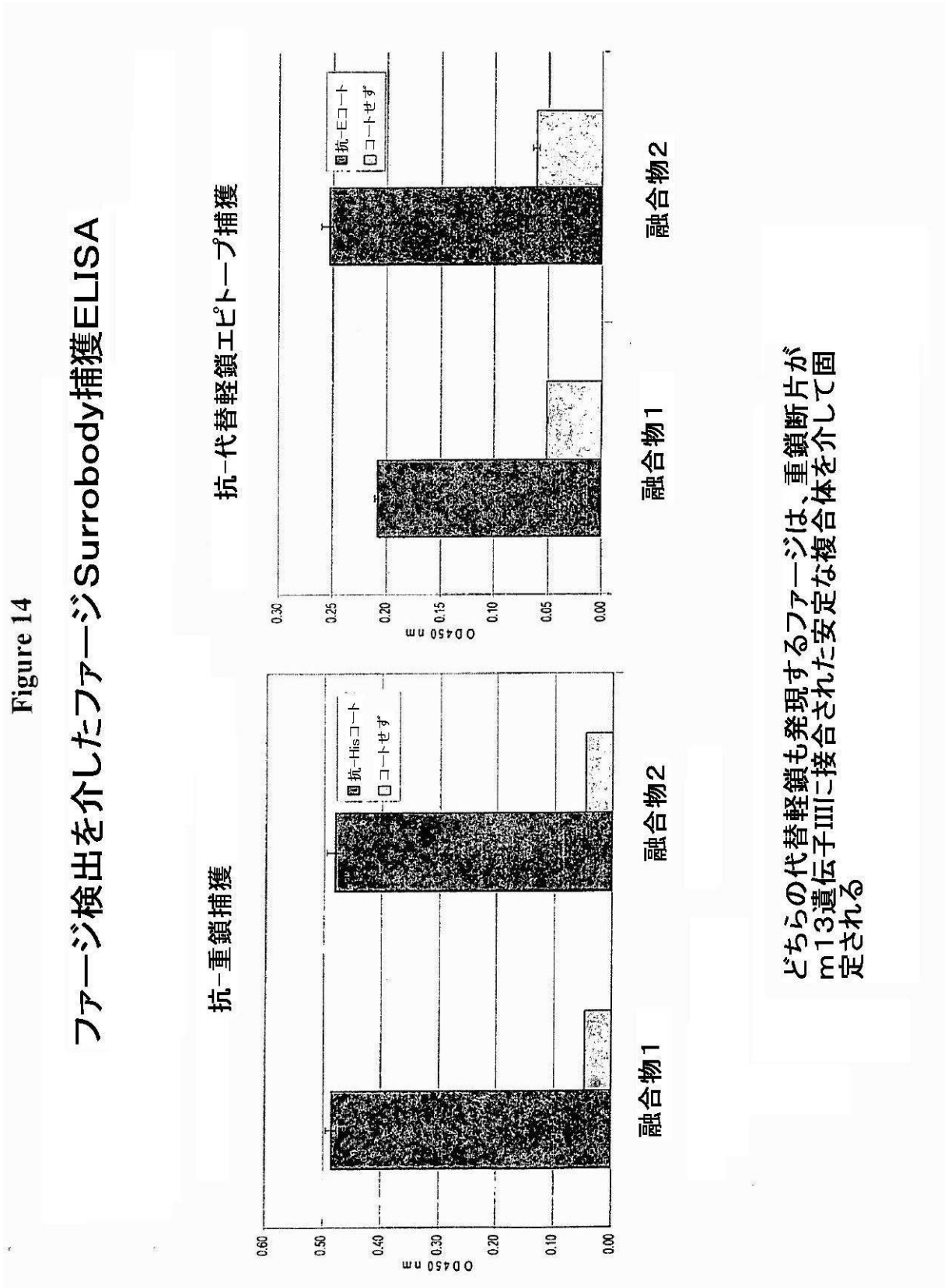
【図１３】

Figure 13

SLC融合タンパク質が、E. coliのペリプラズム中で発現および十分に分泌し、IgMではなくIgGi由来の重鎖CH1と最もうまくパートナーにされる



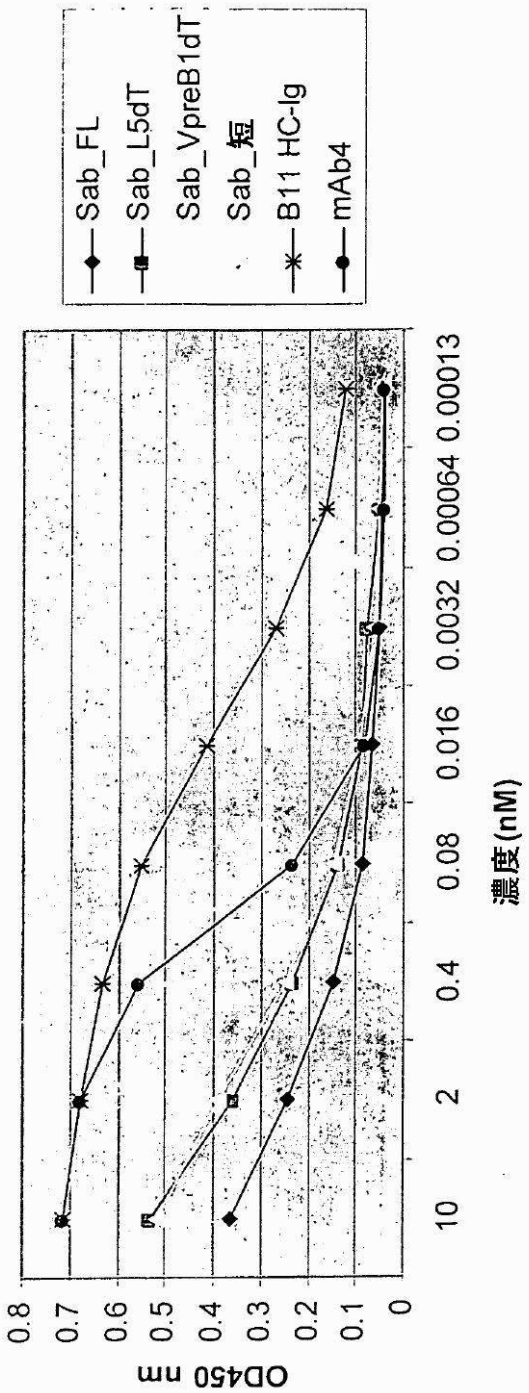
【図１４】


Figure 14
ファージ検出を介したファージSurrobody捕獲ELISA
抗−重鎖捕獲
抗−His コート
コートせず
OD450 nm
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
融合物1
融合物2
抗−代替軽鎖エピトープ捕獲
抗−E コート
コートせず
OD450 nm
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
融合物1
融合物2
どちらの代替軽鎖も発現するファージは、重鎖断片がm13遺伝子IIIに接合された安定な複合体を介して固定される

【図１５】

Figure 15

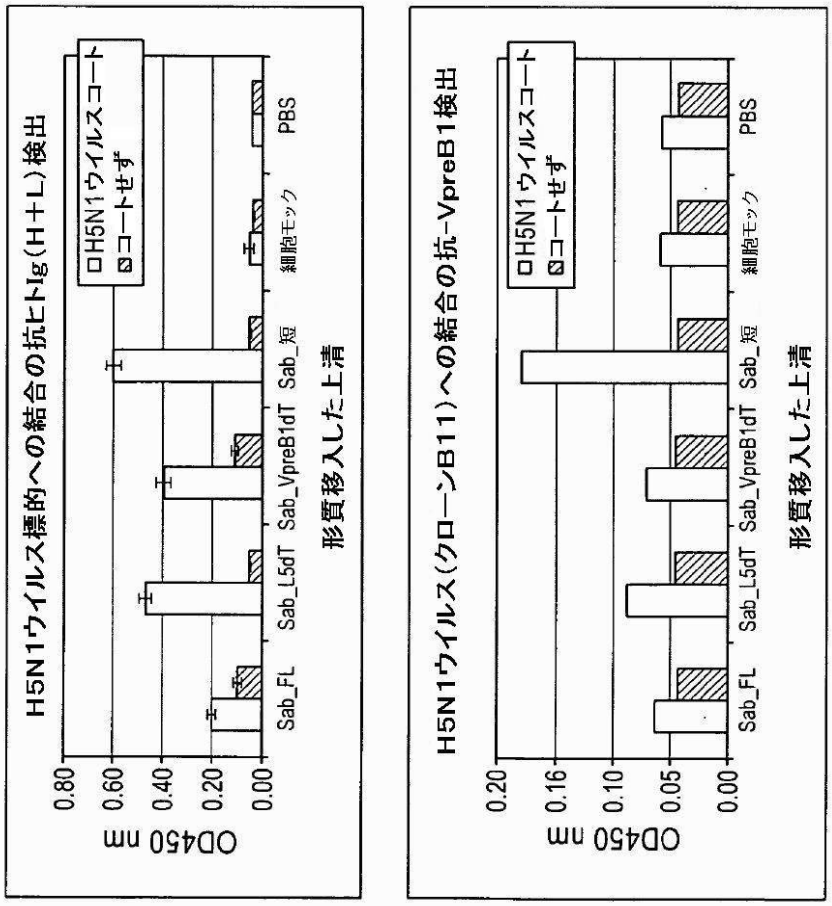
精製された哺乳動物発現surrobodySLC変異体がウイルス標的と結合する



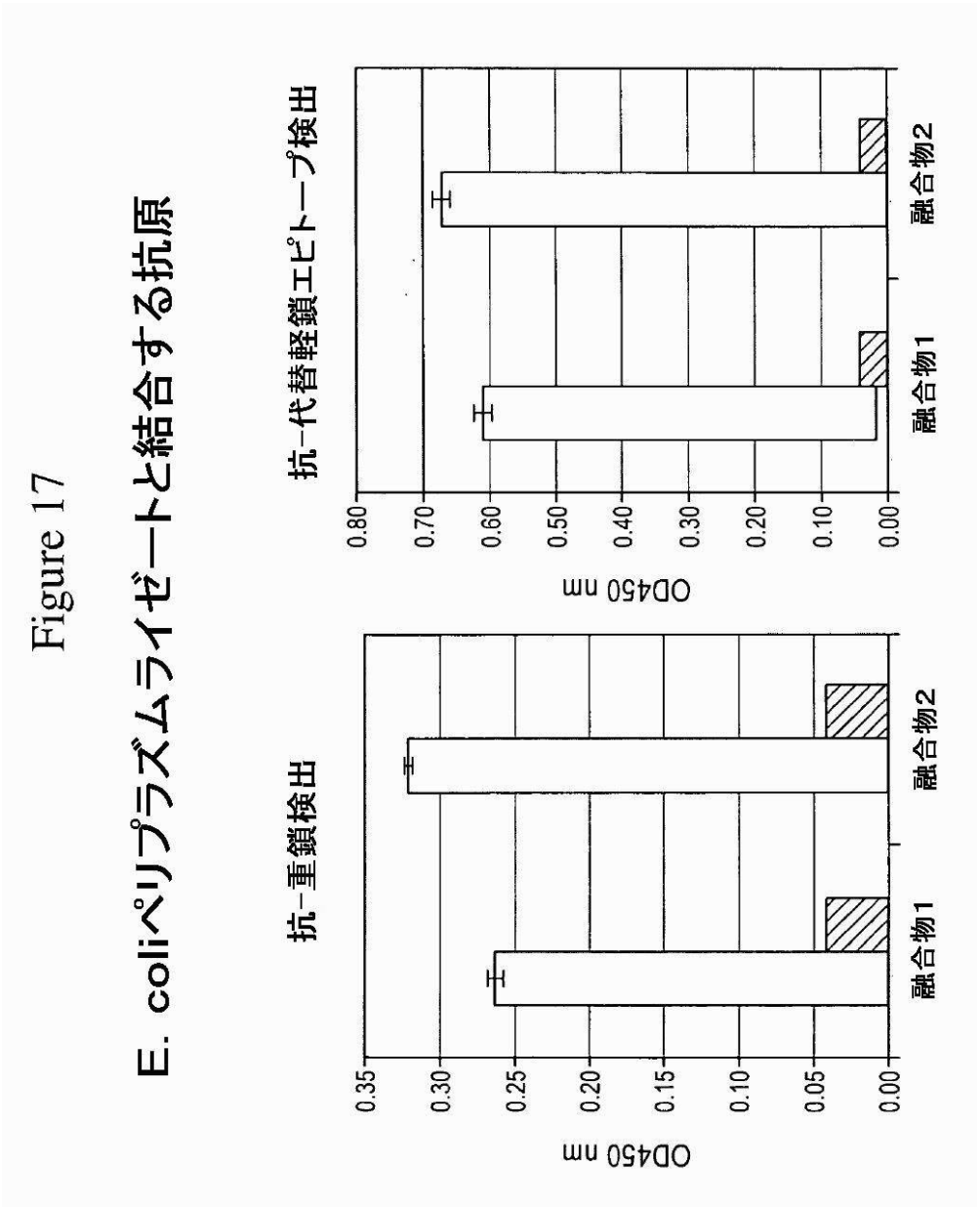
【図１６】

Figure 16

哺乳動物発現SurrobodySLC変異体の上清が、ウイルス標的に結合する安定な複合体を含有する



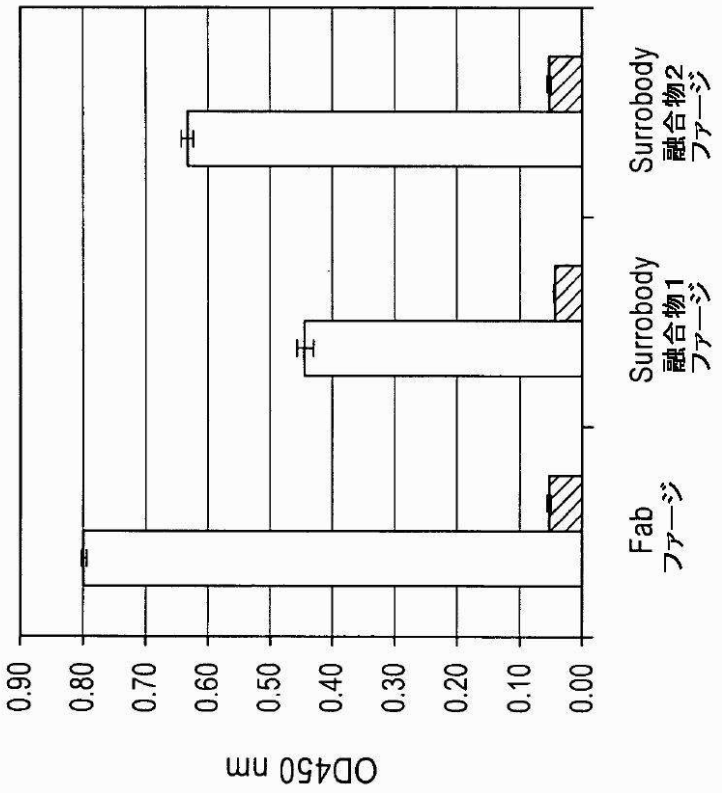
【図１７】


Figure 17
E. coliペリプラズムライゼートと結合する抗原
抗−重鎖検出
抗−代替軽鎖エピトープ検出
OD450 nm
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
融合物1
融合物2

【図１８】

Figure 18

無力化重鎖と対にされたSurrobodySLC融合ファージがH5 HA抗原と容易に結合する



【図１９】

Figure 19

無力化重鎖と対にされたSurrobody変異体ファージが抗原と結合する

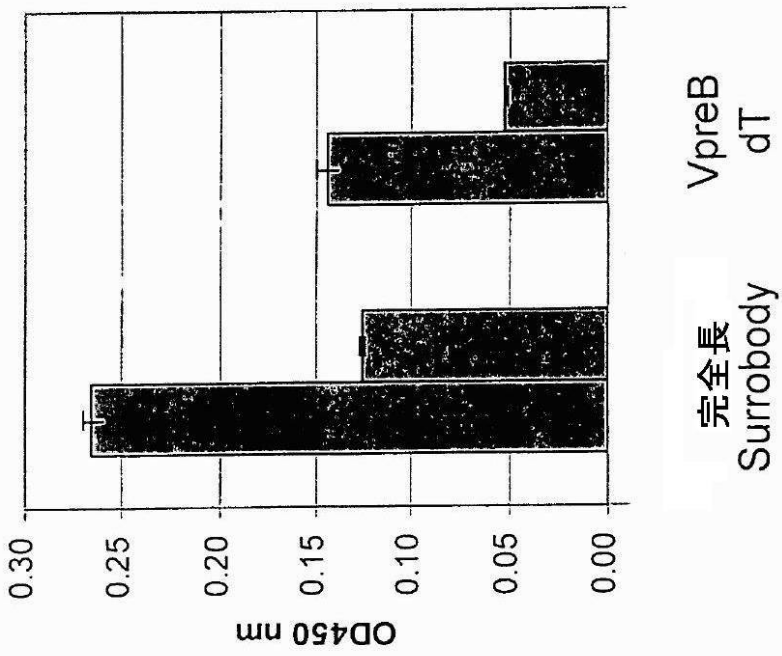
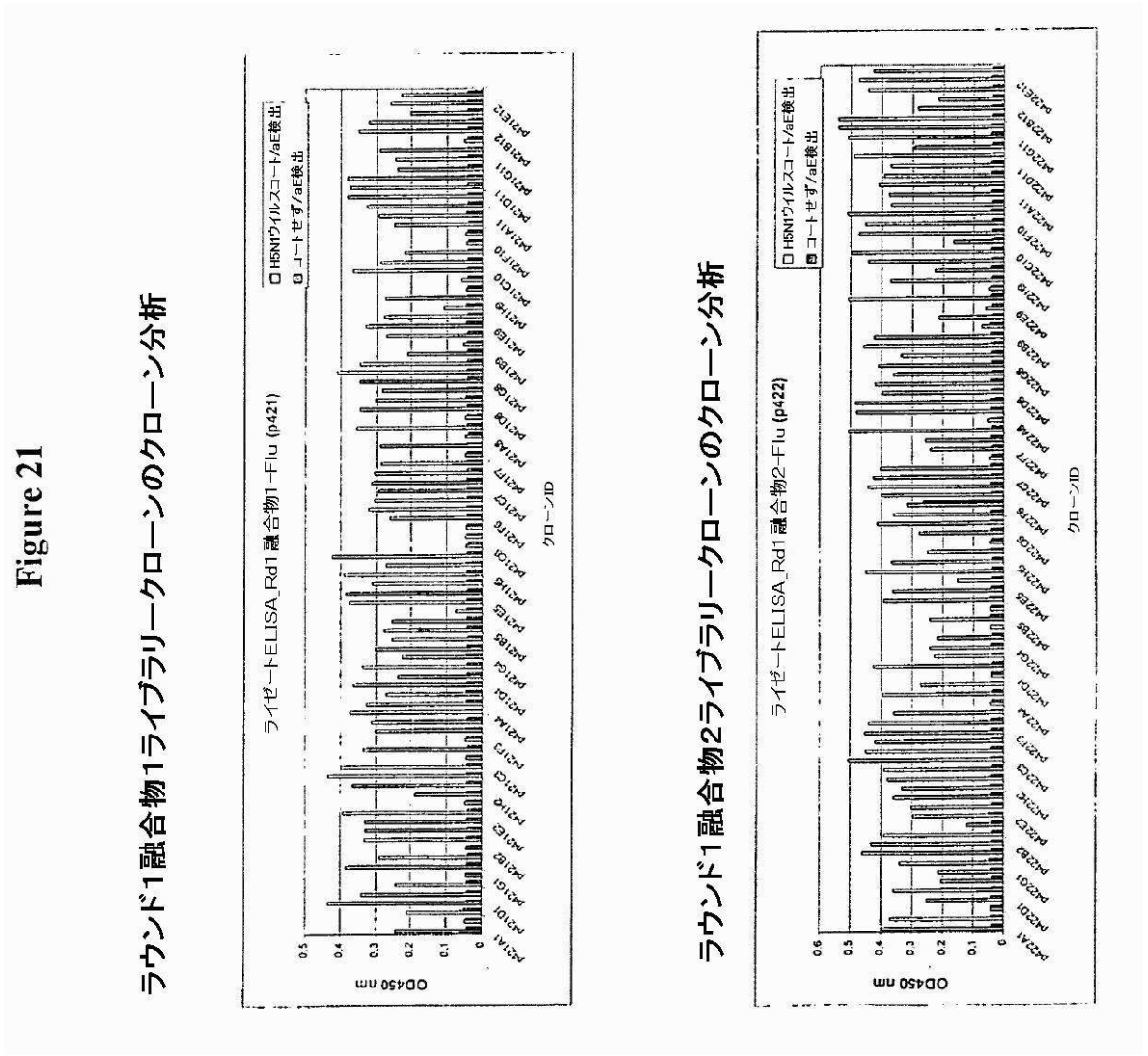


Figure 20

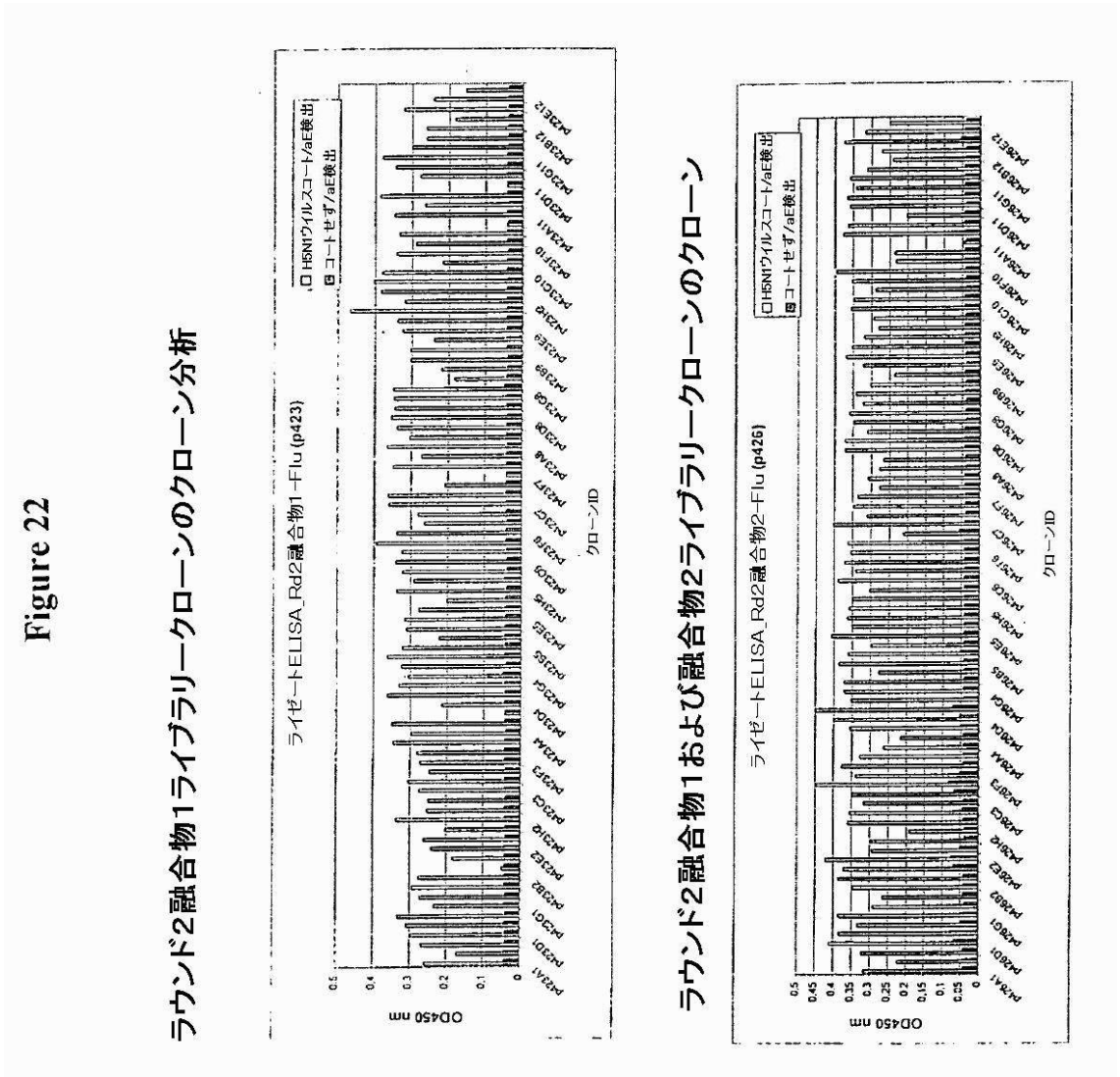
形質転換体の数	ライブラリー	パンニングのラウンド（倍濃縮）	陽性クローン百分率
3.84×10^7	融合物1−インフルエンザ	1 (5x)	79%
	融合物1−インフルエンザ	2 (97x)	95%
7.80×10^7	融合物2−インフルエンザ	1 (20x)	95%
	融合物2−インフルエンザ	2 (48x)	99%

【図２１】

Figure 21



【図２２】



【配列表】

2010522566000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/058283

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C07K16/28 G01N33/68 C12N15/62

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 C07K

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 269 127 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 1 June 1988 (1988-06-01) page 10, lines 11-14 page 22, line 49 - page 23, line 1; claims 1-25; figures 14,27 ----- -/--	1-6, 20-22,59

[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 document 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
21 October 2008	30/10/2008

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	Huber, Angelika

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/058283

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRABAYASHI Y ET AL: "Kinetic analysis of the interactions of recombinant human VpreB and Ig V domains." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 AUG 1995, vol. 155, no. 3, 1 August 1995 (1995-08-01), pages 1218-1228, XP002498061 ISSN: 0022-1767 page 1223, left-hand column - right-hand column, line 2; figure 1 Discussion page 1226 - page 1227	1-6,8, 20-22,28
X	LANIG HARALD ET AL: "Three-dimensional modeling of a pre-B-cell receptor." MOLECULAR IMMUNOLOGY MAR 2004, vol. 40, no. 17, March 2004 (2004-03), pages 1263-1272, XP002498062 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-6, 20-22,28
X	HAGIWARA S: "Transgenic expression of VpreB-3 under the control of the immunoglobulin heavy chain enhancer and SV40 promoter." THE KOBE JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES FEB 1996, vol. 42, no. 1, February 1996 (1996-02), pages 43-59, XP009106454 ISSN: 0023-2513 abstract	59
A	DATABASE UniProt [Online] 1 April 1990 (1990-04-01), "RecName: Full=Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1; AltName: Full=Immunoglobulin-related protein 14.1; AltName: Full=Immunoglobulin omega polypeptide; AltName: Full=Ig lambda-5; AltName: Full=CD179 antigen-like family member B; AltName: CD_antigen=CD179b; Flags: Precursor;" XP002498065 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P15814 Database accession no. P15814 the whole document	1,6,9, 11,20

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/058283

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	XU LI ET AL: "Combinatorial surrobody libraries." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 5 AUG 2008, vol. 105, no. 31, 5 August 2008 (2008-08-05), pages 10756-10761, XP002498064 ISSN: 1091-6490 the whole document	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/058283

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0269127 A	01-06-1988	DE 3789138 D1	31-03-1994
		DE 3789138 T2	26-05-1994

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

フロントページの続き

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

(72)発明者 バート, ラメシュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００２, ベルモント, ウォルサム クロス ２７２９
(72)発明者 ホロウィッツ, ローレンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０２７, アサートン, セルビー レーン ３６２
(72)発明者 スー, リー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９５０１４, クパティーノ, ベイウッド ドライブ １９８４４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 CA07 DA02 DA05 DA12 EA03 EA04
FA01 GA11 HA11
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 EA50 FA74