

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5436736号  
(P5436736)

(45) 発行日 平成26年3月5日 (2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月20日 (2013.12.20)

|                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| (51) Int. Cl.           | F I             |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01)  | C 1 2 N 1/19    |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/02    |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/68 Z  |

請求項の数 15 (全 61 頁)

|               |                               |           |                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2000-540270 (P2000-540270)  | (73) 特許権者 | 595006898            |
| (86) (22) 出願日 | 平成11年1月20日 (1999.1.20)        |           | ザ、ボード、オブ、トラスティーズ、オブ  |
| (65) 公表番号     | 特表2002-508977 (P2002-508977A) |           | 、ザ、ユニバシティー、オブ、イリノイ   |
| (43) 公表日      | 平成14年3月26日 (2002.3.26)        |           | アメリカ合衆国イリノイ州 61801   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US1999/001188             |           | アーバナ サウス ライト ストリート   |
| (87) 国際公開番号   | W01999/036569                 |           | 506 ヘンリー アドミニストレーション |
| (87) 国際公開日    | 平成11年7月22日 (1999.7.22)        |           | ビルディング 352           |
| 審査請求日         | 平成18年1月19日 (2006.1.19)        | (74) 代理人  | 100078282            |
| 審査番号          | 不服2010-26602 (P2010-26602/J1) |           | 弁理士 山本 秀策            |
| 審査請求日         | 平成22年11月25日 (2010.11.25)      | (74) 代理人  | 100062409            |
| (31) 優先権主張番号  | 09/009,388                    |           | 弁理士 安村 高明            |
| (32) 優先日      | 平成10年1月20日 (1998.1.20)        | (74) 代理人  | 100113413            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 森下 夏樹            |
| (31) 優先権主張番号  | 09/140,084                    |           |                      |
| (32) 優先日      | 平成10年8月26日 (1998.8.26)        |           |                      |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           |                      |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の酵母細胞表面ディスプレイおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質の野生型の表現型特性と比較して、増強した表現型特性を有する、ディスプレイ可能なタンパク質を選択するための方法であって、以下：

酵母細胞壁タンパク質に融合された、試験されるタンパク質を発現するベクターを用いて酵母細胞を形質転換する工程であって、ここで変異誘発が、該試験されるタンパク質の変異体の変化に富む集団を生成するために使用される、工程；

該酵母細胞を第1の標識で標識する工程であって、ここで該第1の標識が、該試験されるタンパク質を発現する酵母とは結合し、そして該試験されるタンパク質を発現しない酵母と結合しない、工程；

該第1の標識が結合した該酵母細胞を単離する工程；

酵母により発現された該変異タンパク質の該表現型特性を分析し、そして該野生型タンパク質の表現型特性と比較する工程；ならびに

該野生型タンパク質を越える増強した表現型特性を有する変異タンパク質を提示する酵母細胞を選択する工程；

を含み、ここで、該増強した表現型特性が、表面発現レベル、安定性、分泌レベルおよび可溶性の1つ以上であり、該試験されるタンパク質がT細胞レセプターのリガンド結合ドメインである、方法。

【請求項2】

前記試験されるタンパク質が、そのN末端によって、前記酵母細胞壁タンパク質のC末端

に融合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酵母細胞壁タンパク質がアグルチニンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで前記酵母が *Saccharomyces*、*Pichia*、*Hansenula*、*Schizosaccharomyces*、*Kluyveromyces*、*Yarrowia*、および *Candida* からなる群から選択される属からのものである、方法。

【請求項 5】

前記試験されるタンパク質の前記変異体が、単一変異体および多重変異体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 6】

前記第 1 の標識が、前記試験されるタンパク質に対するリガンドに付着された磁性粒子および蛍光標識からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

増強した表現型特性を有する目的の変異したタンパク質の選択が、前記形質転換工程および標識する工程の反復サイクルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法であって、以下：

前記酵母細胞を第 2 の標識で標識する工程であって、ここで該酵母細胞を形質転換するために使用される前記ベクターが、該試験されるタンパク質に融合されたポリペプチド配列を発現して融合ポリペプチドを産生するための手段を含み、そして該第 2 の標識が、該融合ポリペプチドを発現する酵母細胞と結合し、そして該融合ポリペプチドを発現しない酵母細胞と結合しない、工程； 20

該第 2 の標識を定量することによって、形質転換された酵母集団を富化する工程であって、ここで該第 2 の標識の出現が、細胞表面上に発現される該融合ポリペプチドの量に正比例する、工程；ならびに

該第 2 の標識の該定量と前記第 1 の標識の前記定量とを比較して、前記試験されるタンパク質の表面発現レベルを決定する工程、  
をさらに含む、方法。 30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、ここで試験される野生型タンパク質の表面発現レベルと比較した前記試験される変異タンパク質の前記表面発現レベルにおける増加が、該変異タンパク質の所望の表現型特性について選択するために使用され得、ここで該所望の表現型特性が、細胞内発現レベル、安定性、分泌レベル、および可溶性の 1 つ以上を含む、方法。

【請求項 10】

前記第 2 の標識により認識される前記融合ポリペプチドの前記ポリペプチド部分がエピトープタグである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 の標識および前記第 2 の標識が蛍光標識である、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法であって、以下の工程：

真核生物細胞中での発現に適合したベクター中に前記選択された変異タンパク質をコードする遺伝子をクローニングする工程；および

該真核生物細胞中で該変異タンパク質を発現させる工程であって、ここで該変異タンパク質の前記増強した表現型特性が、該変異タンパク質の該増強した表現型特性の特性と前記野生型タンパク質の特性とを比較することによって確認される、工程、  
をさらに含む、方法。

【請求項 13】

50

前記真核生物細胞が、哺乳動物細胞、昆虫細胞および酵母細胞からなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

請求項1に記載の方法であって、以下：

原核生物中での発現に適合したベクター中に前記選択された変異タンパク質をコードする遺伝子をクローニングする工程；および

該原核生物において該変異タンパク質を発現させる工程であって、ここで該変異タンパク質の前記増強した表現型特性が、該変異タンパク質の該増強した表現型特性の特性と前記野生型タンパク質の特性とを比較することによって確認される、工程、  
をさらに含む、方法。

10

【請求項15】

前記単離する工程がフローサイトメトリーによって実施される、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

（発明の背景）

（発明の分野）

本発明は、一般に、免疫学およびタンパク質化学の分野に関する。より具体的には、本発明は、コンビナトリアルライブラリーからの所望の結合特性を有する配列の選択のための酵母細胞表面上のペプチドおよびタンパク質のディスプレイに関する。

【0002】

（関連する技術分野の記載）

抗体が結合する部位の構造は、ペプチド配列データから合理的な精度で推定され得るが、結合親和性および結合特異性における改良を合理的に操作する能力は、いくつかの成功にもかかわらずより理解しにくいことが証明されている（例えば、Robertsonら、87年；Rechmannら、92年）。結果として、ライブラリーの変異誘発およびスクリーニングは、現在のところ、抗体の指向性の親和性成熟への最も有益なアプローチを示す。コンビナトリアルライブラリースクリーニングおよび選択方法は、タンパク質の認識特性を変化させるための共通の道具となった（Ellmanら、1997、Phizicky & Fields、1995）。特に、インビトロでの抗体免疫レパートリーの構築およびスクリーニングは、抗体-抗原相互作用の強度および特異性に対して改良された制御を約束する。

20

30

【0003】

最も広範な技術は、ファージディスプレイであり、ここで目的のタンパク質は、バクテリオファージ被膜タンパク質へのポリペプチド融合体として発現され、そして固定化されたかまたは可溶性のビオチン化されたリガンドに結合することによって引き続きスクリーニングされる（例えば、Huseら、89年；Clacksonら、91年；Marksら、92年）。融合体は、最も一般的にはマイナーな被膜タンパク質（遺伝子IIIタンパク質（pIII）と呼ばれる）に対して作製され、このタンパク質は、ファージのチップで3～5コピー中に存在する。この方法で構築されるファージは、1つのパッケージ中で表現型（表示された抗体の結合活性）および遺伝子型（その抗体をコードする遺伝子）の両方を有する、コンパクトな遺伝子「単位」とみなされ得る。ファージディスプレイは、抗体、DNA結合タンパク質、プロテアーゼインヒビター、短いペプチド、および酵素に首尾よく適用されている。

40

【0004】

所望の結合特性を有する抗体は、「パンニング」と呼ばれるプロセスにおいて固定化された抗原に結合することによって選択される。ファージ保有非特異的抗体を、洗浄することによって取り除き、次いで、結合したファージを溶出し、そしてE. coliの感染により増幅する。このアプローチは、以下を含む多数の抗原に対する抗体を生成するために適用されている：B型肝炎表面抗原（Zebedeera、92年）；多糖類（Dengra、94年）、インスリン様増殖因子1（GarrardおよびHenner、93年）、

50

2-フェニルオキサゾール-5-オン (R i e c h m a n n および W e i l l、93年)、ならびに4-ヒドロキシ-5-ヨード-3-ニトロ-フェナセチル-(N I P)-カプロン酸 (H a w k i n s ら、92年)。

#### 【0005】

それにもかかわらず、ファージディスプレイは、いくつかの弱点を有する。抗体ファージディスプレイライブラリーのパンニングは、強力な技術であるが、それは、その広範な成功した適用を制限するいくつかの本質的な困難性を有する。例えば、いくつかの真核生物の分泌型タンパク質および細胞表面タンパク質は、細菌細胞中では利用不可能な、グリコシル化または大規模なジスルフィド異性化のような翻訳後修飾を必要とする。さらに、ファージディスプレイの性質は、リガンド結合パラメーターの定量的な識別および直接的な識別を不可能にする。例えば、非常に高度な親和性抗体 ( $K_D \leq 1 \text{ nM}$ ) は、パンニングにより単離することが困難である。なぜなら、この非常に強い抗体-抗原相互作用を破壊するために必要とされる溶出条件は、一般に、それを十分に非感染性にするためにファージ粒子を十分に変性させるのに十分に過酷である (例えば、低い pH、高い塩)。さらに、固体表面への抗原の物理的な固定化についての必要性は、多数の人工的な困難性を生じる。例えば、高い抗原表面密度は、真の親和性を隠すアビディティー効果を導入する。また、物理的なつなぎとめ (t e t h e r i n g) は、抗原の並進エントロピーおよび回転エントロピーを減少し、可溶性抗原についてのものと比較して、抗体結合に対してより小さい DS および結果として生じる結合親和性の過大評価を生じ、そして混合手順および洗浄手順の際の可変性からの大きな効果は、再現性の困難性を導く。さらに、1 ファージ粒子当たり 1 から数個の抗体のみの存在は、実質的に確率論的な変動を誘導し、そして類似の親和性の抗体の間での識別が不可能になる。例えば、6 倍以上の親和性の差異は、しばしば、効率的な識別のために必要とされる (R i e c h m a n n および W e i l l、93年)。最終的に、集団は、より急速に増殖する野生型ファージにより追い越され得る。特に、p I I I は、ファージの生活環に直接的に関与するので、いくつかの抗体または結合抗原の存在は、会合したファージの増殖を妨げるかまたは遅らせる。

#### 【0006】

いくつかの細菌細胞表面ディスプレイ方法が、開発されている。しかし、原核生物発現系の使用は、時折、予測し得ない発現の偏りを誘導し、そして細菌莢膜多糖層は、低分子リガンドに対してこのような系を制限する拡散障壁を提示する (R o b e r t s、1996)。E. c o l i は、高分子結合反応を立体的に妨害し得る、リボ多糖類層または莢膜を有する。実際、細菌莢膜の推定される生理学的機能は、免疫系から細胞を保護するために、細胞膜に対する高分子の拡散の制限である (D i R i e n z o ら、78年)。E. c o l i のペリプラズムは、抗体フラグメントの折り畳みおよびアセンブリのための区画として進化していないので、E. c o l i 中の抗体の発現は、代表的には、非常にクローン依存性である (いくつかのクローンは、よく発現し、そして他のクローンは、全く発現しない)。このような可変性は、E. c o l i の表面上に発現される抗体ライブラリーにおける全ての可能な配列の等価な提示に対する懸念を誘導する。

#### 【0007】

新規な治療剤の発見は、酵母選択系の開発により促進される。B細胞ディスプレイ抗体と酵母細胞ディスプレイ抗体との間の構造類似性は、糸状ファージで入手可能であるよりも、インビボでの親和性成熟に対してより近い類似性を提供する。さらに、酵母で利用可能な増殖培養の容易さおよび遺伝子操作のたやすさは、大きな集団を急速に変異誘発し、そしてスクリーニングさせることを可能にする。哺乳動物の身体における状態と対比させることにより、結合および選択の生理化学的条件を、pH、温度、およびイオン強度の広範な範囲内で酵母培養物について変化させ、抗体操作実験においてさらなる自由度を提供し得る。コンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング、および抗体-抗原の解離速度に基づくスクリーニングのための酵母表面ディスプレイ系の開発は、本明細書中に記載されている。

#### 【0008】

ヒト疾患の診断および処置のための、モノクローナル抗体を操作することの可能性のある適用は、遠い道のりである。特に、癌治療および腫瘍画像化に対する適用は、活動的に追求されている。グラム陰性敗血症についての抗体治療はなお、落胆させる予備的な結果にもかかわらず見込みを有している。免疫組織化学、免疫アッセイ、および免疫親和性クロマトグラフィーへのインビトロでの適用は、既によく開発されている。これらの適用の各々について、高親和性（すなわち、 $K_D \leq 10 \text{ nM}$ ）および高い特異性を有する抗体が望ましい。事例証拠は、ファージディスプレイ系および細菌ディスプレイ系が  $\text{nM}$  より小さい親和性の抗体を一貫して産生していないようであることを示唆する。現在までに、酵母ディスプレイは、このギャップを満たし、そしてこのようなものは、巨大な商業的な重要性および医学的な重要性の鍵となる技術であるはずである。

10

#### 【0009】

細胞媒介性免疫に対するT細胞レセプターの重要性は、1980年代から公知であったが、より高い親和性のT細胞レセプターを操作するための方法は、開発されていなかった。いくつかのグループが、単鎖T細胞レセプター構築物を産生したが、これらの発現系は、T細胞レセプター結合の生化学的分析を可能にしたが、指向性の様式でこれらの結合特性を変化させるためのライブラリー方法を可能にできなかった。このT細胞レセプターを、可溶性型で産生することは特に困難であった。その内因性型において、Tリンパ球の表面上のCD3複合体のサブユニットと非共有結合的に会合するのは、ヘテロ二量体（ $\alpha\beta$ ）膜タンパク質である。この細胞外 $\alpha$ および $\beta$ ドメインは、定常領域（ $C\alpha$ および $C\beta$ ）、ならびにペプチド/MHC抗原の結合の際に直接的に機能する可変領域（ $V\alpha$ および $V\beta$ ）の両方から構成される。産生のためのいくつかの困難な方法が開発されている：E. coliからの $V\alpha V\beta$ の分泌、免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖の定常領域に融合された $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ からなるミエローマ細胞中でのキメラ分子の産生、胸腺腫中での細胞表面脂質との融合からの切断による $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ の産生（Slanetzら、1991）、トロンピン消化での膜貫通領域の前のラット好塩基球形白血病細胞株産生 $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ -Z複合体の切断、ロイシンジッパー会合を有するまたは有さないバキュロウイルス感染昆虫細胞における $V\alpha C\alpha V\beta C\beta$ の産生、ならびにCOS細胞からの免疫グロブリンCH-gd TCRキメラの分泌（Eilatら、1992）。完全TCRの最小結合サブユニットを含む単鎖抗体フラグメントに類似する、より小さい単鎖TCRフラグメント（scTCR）は、E. coli中で構築され、そして産生されており、0.5~1.0 mg/Lのレベルで封入体から再び折り畳まれるかまたはペリプラズム中で折り畳まれる。

20

30

#### 【0010】

先行技術は、所望の結合特性を有する配列の選択のために細胞表面ペプチドおよびタンパク質を表示する効果的な手段を欠くという点で不十分である。先行技術はまた、改良された結合特性のためのT細胞レセプターを操作する効果的な手段を欠くという点で不十分である。より具体的には、細胞媒介性免疫の治療介入を生じるために可溶性T細胞レセプターを操作するための技術は、利用可能ではない。本発明は、当該分野における長年の必要性および願望を満たす。

#### 【0011】

40

（発明の要旨）

本発明の1つの実施態様において、タンパク質-タンパク質結合に接近可能な形態でポリペプチドを酵母細胞壁につなぐ（tethering）ための遺伝子方法が提供される。この方法を蛍光活性化セルソーティングと組み合わせることは、別の分子に対する増加または減少した親和性、変化した特異性、あるいは条件的な結合を有するタンパク質を選択する手段を提供する。

#### 【0012】

本発明の別の実施態様において、酵母Agap細胞壁タンパク質のC末端に目的のポリペプチドを遺伝的に融合する方法が提供される。接合の条件下で、各酵母細胞の外壁は、アグルチニンと呼ばれる約 $10^4$ タンパク質分子を含む。このアグルチニンは、接合中

50

に反対の接合型の酵母細胞の接着を媒介するために特定の接触として働く。実際には、酵母は、細胞壁成分からの立体障害なしにタンパク質-タンパク質結合のためのプラットフォームを進化した。アグルチニンに抗体を付着することによって、免疫系におけるB細胞による、抗体の細胞表面ディスプレイを効果的に模倣し得る。

**【0013】**

別の実施態様において、9残基エピトープ(HA)タグをAGA2タンパク質のC末端に融合する方法が提供される。この短いペプチドは、細胞の固定または消化なしに溶液中の抗体に対する細胞表面上での接近可能であり、そしてフローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡により検出され得る。従って、酵母は、ペプチドを表示するために使用され得る。

**【0014】**

さらに別の実施態様において、4-4-20モノクローナル抗体のscFvフラグメントをAGA2タンパク質のC末端に融合する方法が提供され、このフラグメントは、細胞表面上で接近可能であり、そして細胞の任意の固定または消化なしに蛍光抗原を結合し、そしてフローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡により検出され得る。従って、酵母を使用し、抗体フラグメントを表示し得る。

**【0015】**

本発明の1つの局面において、以下の工程を含む所望の結合特性を有するタンパク質を選択するための方法を提供する：酵母細胞壁結合タンパク質にN末端で融合された、試験されるタンパク質を発現するベクターを用いて酵母細胞を形質転換する工程；酵母細胞を第1の標識で標識する工程、ここで第1の標識が上記の試験されるタンパク質を発現する酵母と結合し、そして上記の試験されるタンパク質を発現しない酵母と結合しない、工程；この第1の標識と結合する酵母細胞について選択する工程；ならびに第1の標識を定量する工程、ここで第1の標識の高い出現は、試験されるタンパク質が所望の結合特性を有することを示し、ここで第1の標識の低い出現は、試験されるタンパク質が所望の結合特性を有さないことを示す、工程。

**【0016】**

本発明の好ましい実施態様はさらに、以下の工程を含む：酵母細胞を第2の標識で標識する工程、ここで第2の標識が、この試験されかつベクターによりコードされたタンパク質に融合されたエピトープタグを発現する酵母と結合し、そしてベクターによりコードされるエピトープタグを発現しない酵母と結合しない、工程；第2の標識を定量する工程、ここで上記第2の標識の出現は、酵母細胞表面上の試験されるエピトープタグ化タンパク質の発現コピー数を示す、工程、ならびに第2の標識の出現に対して基準化された第1の標識の出現を決定するために第2の標識の定量と第1の標識の定量を比較する工程、ここで第2の標識の出現と比較して高い第1の標識の出現は、試験されるタンパク質が所望の結合特性を有することを示す、工程。

**【0017】**

本発明の別の好ましい実施態様は、以下の工程を含む：試験されるタンパク質への結合について第1の標識と競合する第3の標識を用いて酵母細胞を標識する工程；第1の標識で酵母細胞を標識する工程；第1の標識を定量する工程；第2の標識で酵母細胞を標識する工程；第2の標識を定量する工程；ならびに第2の標識の出現に対して基準化された第1の標識の出現を決定するために、第2の標識の定量と第1の標識の定量を比較する工程、ここで第2の標識の出現と比較して低い第1の標識の出現は、試験されるタンパク質が所望の結合特性を有することを示す、工程。

**【0018】**

本発明の1つの実施態様において、第1の標識は、リガンドに付着された蛍光標識であり、そして第2の標識は、抗体に付着された蛍光標識である。この標識が蛍光である場合、この定量工程を、フローサイトメトリーまたは共焦点蛍光顕微鏡によって実行する。

**【0019】**

本発明の別の局面は、本発明の方法を実行するためのベクターを提供し、ベクターは、目的のタンパク質のN末端に融合された細胞壁結合タンパク質を含む。本発明のこの局面

10

20

30

40

50

の好ましい実施態様は、酵母細胞中で目的のタンパク質に融合されたポリペプチドエピトープタグを発現するための手段を含む。より好ましい実施態様は、この細胞壁結合タンパク質が酵母アグルチニンタンパク質の結合サブユニットであり、さらにより好ましくは、酵母アグルチニン結合サブユニットがA g a 2 pであることを提供する。

#### 【0020】

本発明の本局面の別の好ましい実施態様は、エピトープタグアミノ酸配列が、Y P Y D V P D Y A (H A) (配列番号1)、E Q K L I S E E D L (c - m y c) (配列番号2)、D T Y R Y I (配列番号3)、T D F Y L K (配列番号4)、E E E E Y M P M E (配列番号5)、K P P T P P P E P E T (配列番号6)、H H H H H H (配列番号7)、R Y I R S (配列番号8)、またはD Y K D D D D K (配列番号9)の群から選択されること、ならびに目的のタンパク質のN末端が、細胞壁結合タンパク質のC末端に融合されることを提供する。

10

#### 【0021】

本発明のなお別の好ましい実施態様において、野生型タンパク質の表現型特性と比較して増強した表現型特性を有するタンパク質を選択するための方法が提供され、この方法は、以下の工程を含む：酵母細胞壁タンパク質に融合された試験されるタンパク質を発現するベクターを用いて酵母細胞を形質転換する工程であって、ここで変異誘発を使用し、試験されるタンパク質の変異体の変化に富んだ集団を生成する、工程；第1の標識で酵母細胞を標識する工程であって、ここで第1の標識が、試験されるタンパク質を発現する酵母と結合し、そして試験されるタンパク質を発現しない酵母と結合しない、工程；第1の標識と結合する酵母細胞を単離する工程；ならびに野生型タンパク質の特性を有する酵母細胞により発現される変異タンパク質の特性を分析かつ比較する工程であって、ここで野生型タンパク質に対して増強した特性を有する変異タンパク質を提示する酵母細胞が選択される、工程。上記のように、第2および／または第3の標識を本実施態様に用い得、そして増強した表現型特性を有する目的の変異タンパク質の選択が、富化工程および標識する工程の反復サイクルを含み得る。

20

#### 【0022】

好ましい実施態様において、酵母細胞壁タンパク質がアグルチニンであり；試験されるタンパク質が結合サブユニットアグルチニンのC末端にそのN末端により融合され；酵母株が、S a c c h a r o m y c e s、P i c h i a、H a n s e n u l a、S c h i z o s a c c h a r o m y c e s、K l u y v e r o m y c e s、Y a r r o w i a、およびC a n d i d aからなる群から選択される属であり；試験されるタンパク質が、抗体、F a b、F v、またはs c F v抗体フラグメントであり、より好ましくは、試験されるタンパク質が細胞表面レセプターのリガンド結合ドメインであり、さらにより好ましくは、細胞表面レセプターは、T細胞レセプターである。

30

#### 【0023】

本発明の目的は、表面発現、安定性、結合定数、解離定数、分泌のレベル、および可溶性からなる群から選択される増強した表現型特性を示す変異タンパク質を選択するための方法を提供することであり、ここで試験されるタンパク質の変異体は、単一の変異または複数の変異を含み得る。

40

#### 【0024】

さらに別の実施態様において、第2の標識を使用し、細胞表面発現レベルを定量的に決定し得、これは、他の所望の表現型特性（例えば、細胞内発現、安定性、結合定数、解離定数、分泌のレベル、および可溶性）について選択するためのアッセイとして使用され得る。

#### 【0025】

別の実施態様において、本発明の方法により選択される変異体タンパク質は、この選択される変異体タンパク質をコードする遺伝子を真核生物における発現のために適合されたベクターにクローニングすることにより；およびその真核生物においてこの変異体タンパク質を発現することにより、さらに特徴付けられ得る。ここで、この変異体タンパク質の

50

増強された特性は、この変異体タンパク質の増強された特性の表現型特性を、野生型タンパク質の特性と比較することにより確認される。好ましくは、この真核生物は、哺乳動物、昆虫、または酵母からなる群から選択される。選択される変異体の表現型は、「新しい」（すなわち、変異型の）タンパク質の遺伝的特性であるので、このアプローチはまた、他の非真核生物発現系におけるこの変異体の発現に適用可能である。

#### 【0026】

酵母表面提示、およびフローサイトメトリーによる選別が、T細胞レセプターのVb8領域に特異的なscFv変異体を単離するために使用されてきた。選択は、2つの蛍光標識プローブ（可溶性Vb8ドメイン、およびscFvのカルボキシ末端に存在するc-mycエピトープタグに対する抗体）による平衡結合に基づいた。このスクリーニングで選択された変異体は、Vb8に関する3倍増加された親和性を有するscFv、および抗c-myc抗体により減少した親和性で結合されたscFvクローンを含んだ。後者の発見は、酵母提示系が、立体配置的なエピトープ（標準的ペプチドスクリーニングにより明らかにされ得ない）のマッピングに使用され得ることを示す。平衡抗原結合定数は、表面提示形式内で評価され得、このことにより、サブクローニングおよび可溶性発現を必要とすることなく、単離された変異体のスクリーニングが可能になる。ランダムに突然変異されたscFvを提示する酵母細胞の比較的小さいライブラリー（ $3 \times 10^5$ ）のみをスクリーニングして、これらの変異体を同定した。このことは、この系が、真核生物分泌タンパク質および細胞表面タンパク質の結合特性を操作するための強力な手段を提供することを示した。

#### 【0027】

本発明のこの局面の別の好ましい実施態様は、その通常の（「野生型」）配列として提示されないタンパク質を提示する方法を提供する。示される実施例において、抗原に対するT細胞レセプターは、その「野生型」配列として発現されなかった。しかし、ランダム突然変異、適切な立体配置特異的抗体を用いるフローサイトメトリーによる選択の後、この変異体レセプターを酵母細胞表面上に発現した。このストラテジーにより、新規なT細胞レセプターの発見が可能になり、そしてこのストラテジーは、事実上、任意のポリペプチドの提示のための方法を提供する。従って、本発明はまた、酵母細胞表面上での提示可能性についてタンパク質を選択するための方法を提供し、この方法は、以下の工程：酵母細胞を、試験されるタンパク質を酵母細胞壁タンパク質と融合して発現するベクターで形質転換する工程であって、試験されるタンパク質の変異体のまだらな集団を生成するために突然変異を使用する、工程；酵母細胞を第1の標識で標識する工程であって、第1の標識が、試験されるタンパク質を発現する酵母と結合し、かつ試験されるタンパク質を発現しない酵母と結合しない、工程；第1の標識が結合する酵母細胞を、第1の標識を定量することにより単離する工程であって、第1の標識の高い存在は、試験されるタンパク質が所望の提示特性を有することを示し、そしてここで、第1の標識の低い存在は、試験されるタンパク質が所望の提示特性を有さないことを示す、工程を包含する。好ましくは、試験されるタンパク質は、抗体、Fab抗体フラグメント、Fv抗体フラグメント、またはscFv抗体フラグメント、あるいは、細胞表面レセプターのリガンド結合ドメインである。細胞表面レセプターの代表的な例は、T細胞レセプターである。

#### 【0028】

本発明の他の、そしてさらなる局面、特徴、および利点は、以下の、開示の目的のために提供される本発明の現在の好ましい実施態様の記載から明らかである。

#### 【0029】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される場合、用語「アフィニティー成熟」とは、より高い親和性の抗体が選択される、連続する変異および選択のプロセスをいう。本明細書中で使用される場合、用語「アグルチニン」とは、接合の間に、2つの酵母細胞を一緒に結合する酵母表面接着タンパク質をいう。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、特定の分子に強固かつ特異的に結合する哺乳動物免疫系により産生されるタンパク質をいう。本明細書

中で使用される場合、用語「リガンド」とは、特定のタンパク質により特異的に結合される分子をいう。本明細書中で使用される場合、用語「抗原」とは、抗体により特異的に結合されるリガンドをいう。本明細書中で使用される場合、用語「相補性決定領域」または「CDR」とは、結合された抗原に直接接触する抗体の一部をいう。本明細書中で使用される場合、用語「蛍光活性化セルソーティング」または「フローサイトメトリー」とは、差示的な蛍光標識に基づいて細胞集団を選別する方法をいう。本明細書中で使用される場合、用語「ハプテン」とは、キャリアに結合化されることなく免疫応答を刺激し得ない小さい抗原をいう。本明細書中で使用される場合、用語「単鎖抗体」または「SCA」とは、単一の活性結合部位を保持する抗体の、重鎖と軽鎖の一部の融合物をいう。用語 s c F v は、互換可能に使用され単鎖抗体をいう。本明細書中で使用される場合、用語「エピトープタグ」とは、別のタンパク質に融合される場合に、抗体に特異的に結合されるアミノ酸の一連の配列をいう。本明細書中で使用される場合、用語「HA」とは、エピトープタグ配列 Y P Y D V P D Y A（配列番号 1）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「c-myc」とは、エピトープタグ配列 E Q K L I S E E D L（配列番号 2）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「s c F v 4-4-20」とは、フルオレセインおよび他の分子（例えば、ビオチンまたはデキストラン）に結合体化されたフルオレセインに特異的に結合する s c F v をいう。本明細書中で使用される場合、用語「AGA 2 p」とは、酵母 A G A 2 接合型の a アグルチニン遺伝子のタンパク質産物をいう。用語「表示可能性」とは、タンパク質が、誤って折り畳まれたタンパク質を保持し分解する分泌の「品質維持」装置から免れることを可能にする生物物理学的特徴の組合せを記載するために使用される（Hammond および Helenius、1995）。酵母細胞表面上で提示されるタンパク質は、最初に、この品質維持ステップを首尾良く通過しなければならない。タンパク質折り畳みの動態力学および熱力学的安定性はともに、品質維持装置から免れる効率を決定すると考えられる。

#### 【0030】

本発明に従って、従来の分子生物学、微生物学、および当業者の範囲内の組換え DNA 技術が使用され得る。このような技術は、文献中に完全に説明される。例えば、Maniatis、Fritsh および Sambrook、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual（1982）」；「DNA Cloning: A Practical Approach」、第 I 巻および第 II 巻（D. N. Glover 編、1985）；「Oligonucleotide Synthesis」（M. J. Gait 編、1984）；「Nucleic Acid Hybridization」（B. D. Hames および S. J. Higgins 編、（1985））；「Transcription and Translation」（B. D. Hames および S. J. Higgins 編、（1984））；「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney 編、（1986））；「Immobilized Cells And Enzymes」（IRL Press、（1986））；B. Perbal、「A Practical Guide To Molecular Cloning」（1984）を参照のこと。

#### 【0031】

「ベクター」とは、別の DNA セグメントが、付加されたセグメントの複製が起こるように付加され得るレプリコン（例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド）である。

#### 【0032】

DNA「コード配列」とは、適切な調節配列の制御下に配置される場合に、インビボでポリペプチドに転写および翻訳される二重鎖 DNA 配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび 3'（カルボキシル）末端の翻訳終止コドンにより決定される。コード配列は、原核生物配列、真核生物の mRNA 由来の cDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA 由来のゲノム DNA 配列、および合成 DNA 配列さえも含み得る。ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は、通常、コード配列の 3' 側に位

10

20

30

40

50

置する。

#### 【0033】

転写制御配列および翻訳調節配列は、宿主細胞においてコード配列の発現を提供するDNA調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなど）である。

#### 【0034】

「プロモーター配列」とは、細胞中でRNAポリメラーゼに結合し得、そして下流（3'方向）のコード配列の転写を開始し得るDNA調節領域である。本発明を規定する目的のために、プロモーター配列は、その3'末端に転写開始部位を結合され、そして上流（5'方向）を伸長して、上記の背景で検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小の数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列中に、転写開始部位（ヌクレアーゼSIを用いるマッピングにより都合良く規定された）、およびRNAポリメラーゼの結合の原因であるタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見出される。真核生物のプロモーターは、しばしば（但し、常にではない）、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。原核生物のプロモーターは、-10および-35コンセンサス配列に加えて、シャイン-ダルガーノ配列を含む。

10

#### 【0035】

「発現制御配列」とは、別のDNA配列の転写および翻訳を、制御および調節するDNA配列である。コード配列は、RNAポリメラーゼがこのコード配列をmRNA（次いで、このコード配列にコードされるタンパク質に翻訳される）に転写する場合には、細胞において、転写制御配列および翻訳制御配列の「制御下」である。

20

#### 【0036】

「選択遺伝子」とは、特定の条件の実行の際に、必要とされる表現型を提示する細胞の区別を可能にする遺伝子をいう。例えば、抗生物質耐性遺伝子を含む細菌細胞を選択するための抗生物質を含む培地における細菌の増殖。

#### 【0037】

用語「プライマー」とは、本明細書中で使用される場合、オリゴヌクレオチド（精製された制限消化などで天然に生じるか、または合成により生成されるか）をいい、このオリゴヌクレオチドは、プライマー伸長産物（これは核酸の鎖に相補的である）の合成が誘導される条件下に配置された場合（すなわち、ヌクレオチドおよび誘導物質（例えば、DNAポリメラーゼ）の存在下で、かつ適切な温度およびpHで、合成の開始点として作用し得る。プライマーは、一本鎖かまたは二本鎖のいずれかであり得、そして誘導物質の存在下で所望の伸長産物の合成をプライムするのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、多くの因子（温度、プライマーの供給源、および使用される方法を含む）に依存する。例えば、診断的適用のためには、標的配列の複雑性に依存し、そのオリゴヌクレオチドプライマーは、代表的には、15～25以上のヌクレオチドを含むが、それは、より少ないヌクレオチドを含み得る。

30

#### 【0038】

本明細書中のプライマーは、特定の標的DNA配列の別々の鎖に「実質的に」相補的であるように選択される。このことは、これらのプライマーが、その各自の鎖とハイブリダイズするように実質的に相補的でなければならないことを意味する。従って、このプライマー配列は、鋳型の正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントが、プライマーの5'末端に付加され得、残りのプライマー配列は、鎖に相補的であり得る。あるいは、プライマー配列が配列との十分な相補性を有するか、または標的配列とハイブリダイズし、それにより、伸長産物の合成のための鋳型を形成すると仮定すると、非相補的塩基またはより長い配列が、プライマー中に点在し得る。

40

#### 【0039】

細胞は、このようなDNAがその細胞内部に導入された場合、外因性DNAまたは異種DNAにより、「形質転換され」てきた。形質転換するDNAは、細胞のゲノムに、組み込まれて（共有結合されて）もよいし、組み込まれなくてもよい。例えば、原核生物細胞

50

、酵母細胞、および哺乳動物細胞において、形質転換するDNAは、エピソームエレメント（例えば、プラスミド）上に維持され得る。真核生物細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、形質転換DNAが染色体に組み込まれ、その結果、形質転換DNAが、染色体の複製を通じて娘細胞に遺伝される細胞である。この安定性は、形質転換DNAを含む娘細胞の集団からなる細胞株またはクローンを樹立する、真核生物細胞の能力により実証される。「クローン」は、有糸分裂により単一細胞または共通の祖先から誘導された細胞の集団である。「細胞株」は、インビトロで何世代でも安定に増殖し得る初代細胞のクローンはである。

#### 【0040】

DNA構築物の「異種」領域は、天然では、より大きい分子と関連して見出されない、より大きいDNA分子中の同定可能なDNAセグメントである。従って、異種領域が哺乳動物遺伝子をコードする場合、この遺伝子は、通常、供給源の生物のゲノムにおける哺乳動物ゲノムDNAに隣接しないDNAにより隣接される。別の例では、コード配列は、コード配列自体が天然には見出されない構築物である（例えば、ゲノムコード配列がイントロンを含有するcDNA、または天然遺伝子と異なるコドンを含む合成配列）。対立遺伝子改変体または天然に存在する変異事象は、本明細書において規定されるようなDNAの異種領域を生じない。

#### 【0041】

タンパク質に融合され得、そして抗体により特異的に結合され得る多数のポリペプチド配列は、公知であり、そしてエピトープタグとして利用され得る。これらとしては、例えば、HA（配列番号1）、c-myc（配列番号2）、DTYRYI（配列番号3）、TDFYLK（配列番号4）、EEEEYMPME（配列番号5）、KPPTPPPEPET（配列番号6）、HHHHHH（配列番号7）、RYIRS（配列番号8）およびDYKDDDDK（配列番号9）が挙げられる。

#### 【0042】

抗体は、ヒトの免疫系により産生されるタンパク質分子であり、外来物質の認識をし、外来物質へ結合し、そして身体からの外来物質の排除の媒介をする。高度に特異的な、癌の診断および治療のための抗体を利用するために技術が開発された。例えば、腫瘍細胞に結合する抗体に対して放射性同位体または毒素を係留することにより、周辺組織を比較的無傷のままにしながら、罹病組織に対して、そのような細胞傷害性薬剤の集中させた投薬を送達することは可能である。抗体はまた、生物学において重要なツールであり、そして分析目的のため（例えば、微量の物質および分離物を定量するため）、ならびに複合物から所望の生物学的産物を精製するために広範に用いられる。

#### 【0043】

これらの適用において、抗体のその標的との結合の強度（親和性）、および抗体がその特定の標的のみに結合する選択性（特異性）の両方が重大である。この理由のため、タンパク質技術者は、特定の抗体の結合特性の変化および改善を求める。抗体の構造的設計への合理的なアプローチは、限定的な成功しか満たさなかった。そしてランダムなスクリーニングのために利用可能な方法は、重大な限界を有する。

#### 【0044】

抗体親和性を微調整する問題に対する哺乳動物の免疫系のアプローチは、「親和性成熟」と呼ばれるプロセスによる。ここで、変異および進化的な選択のサイクルは、それらの標的にさらに強固に結合する抗体を産生する。本発明は、哺乳動物の免疫系のB細胞のレパートリーの微生物性のアナログを構築することにより、抗体親和性および抗体特異性を操作するための強力な新しいシステムを開示する。抗体は、細胞壁タンパク質との遺伝的融合により酵母細胞の表面に提示された。変異後、改変体は、蛍光的に標識された標的との結合特性の改善に基づいて選択された。

#### 【0045】

酵母の抗体の提示方法は、物理的特性および化学的特性がすでに十分特徴付けられているモデル抗体を研究することにより試験された。次いで、これらの方法は、実際の目的の

10

20

30

40

50

抗体にそのまま適用される。酵母の遺伝的順応、この微生物の増殖の容易さ、および試験管内の抗体結合条件を変更する能力は、組み合わせられて、抗体親和性および抗体特異性の操作に対する今までにない制御を生じる。

#### 【0046】

本発明のライブラリー方法の利点は、これが抗体のようなタンパク質に特に適していることである。最も広範に用いられる方法は、現在、バクテリオファージの表面上で提示される抗体の「パニング (panning)」からなる。酵母の提示は、ファージの提示を超えるいくつかの利点を有する。第1に、抗体-抗原結合は、密接に結合した改変体を回収するために壊される必要はない。先行技術の方法における、この結合を切断するために必要な過酷な条件は、ファージの感染性を低下させ得る。第2に、クローンの欠失の低下によるライブラリーの多様性の増加は、利点である。多くの抗体構造が、細菌の分泌装置によって、正確にプロセッシングされ得ないことは、周知である。酵母細胞は、真核生物であり、そして哺乳動物細胞と非常に類似の分泌経路を有する。第3に、本発明は、抗体-抗原親和性のより正確かつ緻密な決定を提供する。1細胞あたり  $10^4$  個の分子の存在は、1ファージあたりわずか数分子については生じる確率的な変動を排除する。最後に、フローサイトメトリーによる蛍光の定量は、ファージのパニングでの2つの結合/遊離二分法との比較によって、論理に基づいた親和性の知識がなくても、表面結合抗原の持続的な測定を提供する。また、細菌は、提示された分子に抗体またはタンパク質が接近することを妨げる高分子透過性障壁として作用するリボ多糖層を有する。

#### 【0047】

本発明は、酵母上でのペプチドおよびタンパク質ライブラリーのインビトロにおける発現および選択のための表面提示系を開示する。9残基のペプチドエピトープ (HA) は、酵母細胞壁タンパク質 (AGA2) の結合サブユニットに、次いで4-4-20抗フルオレセイン単鎖Fvに融合された。選択は、提示された融合物を有する細胞および有さない細胞の混合物についてフローサイトメトリーにより実行された。600倍の富化が、分別 (sort) の1回通過で達成された。本発明のこの系は、抗体のインビトロ親和性成熟のためのプロセスならびに他のタンパク質およびペプチドの方向付けられた進化のためのプロセスを例証し、これは、以下の利点を有する：(i) パニングより微細な親和性識別を可能にする2重標識フローサイトメトリー選択計画；(ii) 選択における確率的な変動を排除する、1細胞あたり  $10^4$  コピーもの多くの提示配列、および(iii) E. coli 中で発現されるライブラリーから欠失されたクローンを産生し得る発現の偏り (bias) を改変した、または潜在的に改善した酵母におけるライブラリー発現。

#### 【0048】

本発明の1つの目的は、親和性および特異性の改善のための抗体の操作である。この目的に向かって、抗体-ハプテン結合は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の外部細胞壁上で発現される抗体の変異誘発およびスクリーニングを介して研究された。実験的に容易な、そして遺伝的に柔軟な真核生物であるので、酵母は、抗体発現および操作のためのプラットフォームとして、線維状ファージ提示を超える有意な利点を示す。本質的に、哺乳動物の免疫系B細胞レパトリーの微生物性のアナログは、インビトロで構築され、変異誘発および選択の厳密に制御された条件下で実行されるべき抗体の親和性成熟を可能にした。結果として、親和性および特異性が有意に改善された抗体を達成できた。

#### 【0049】

本発明の1つの局面は、以下の工程を含む、所望の結合特性を有するタンパク質を選択するための方法を提供する：そのN末端で酵母細胞壁結合タンパク質と融合された試験されるべきタンパク質を発現するベクターで酵母細胞を形質転換する工程；第1標識で酵母細胞を標識する工程であって、ここでこの第1標識は、試験されるべきタンパク質を発現する酵母と会合し、そして試験されるべきタンパク質を発現しない酵母と会合しない、工程；第1標識が会合している酵母細胞を選択する工程；第1標識を定量する工程であって、ここで第1標識の高頻度の出現は、試験されるべきタンパク質が所望の結合特性を有す

ることを示し、そして第1標識の低度の出現は、試験されるべきタンパク質が所望の結合特性を有さないことを示す、工程。

#### 【0050】

本発明の好ましい実施態様は、さらに以下の工程を包含する：第2標識で酵母細胞を標識する工程であって、ここで第2標識は、試験されるべきであって、かつベクターによってコードされるタンパク質と融合されたエピトープタグを発現する酵母と会合し、そしてベクターによってコードされるエピトープタグを発現しない酵母と会合しない、工程；第2標識を定量する工程であって、第2標識の出現は、酵母細胞表面上の試験されるべきエピトープタグ化タンパク質の多数の発現コピーを示す、工程；ならびに第1標識の量を第2標識の量に対して比較して、第2標識の出現に対して正規化された第1標識の出現を決定する工程であって、ここで第2標識の出現に比較して高い第1標識の出現は、試験されるべきタンパク質が所望の結合特性を有することを示す、工程。

10

#### 【0051】

本発明の別の好ましい実施態様は、以下の工程を包含する：試験されるべきタンパク質に対する結合について第1標識と競合する第3標識で酵母細胞を標識する工程；第1標識で酵母細胞を標識する工程；第1標識を定量する工程；第2標識で酵母細胞を標識する工程；第2標識を定量する工程；および第1標識の量を第2標識の量に対して比較して、第2標識の出現に対して正規化された第1標識の出現を決定する工程であって、ここで第2標識の出現に比較して低い第1標識の出現は、試験されるべきタンパク質が所望の結合特性を有することを示す、工程。

20

#### 【0052】

本発明の別の局面は、本発明の方法を実施するためのベクターを提供し、これには目的のタンパク質のN末端に融合された細胞壁結合タンパク質を含む。本発明のこの局面の好ましい実施態様は、酵母細胞において、ポリペプチドエピトープタグを発現するための手段を含む。より好ましい実施態様は、細胞壁結合タンパク質が、酵母アグルチニンタンパク質結合サブユニットであり、なおより好ましくは、酵母アグルチニンタンパク質が、Agapであることを提供する。

#### 【0053】

本発明の別の局面は、野生型タンパク質の特性と比較して増強された表現型特性を有するタンパク質を選択する方法を提供し、この方法には以下の工程を包含する：酵母細胞壁タンパク質と融合した試験されるべきタンパク質を発現するベクターで酵母細胞を形質転換する工程であって、ここで変異誘発が試験されるべきタンパク質の改変体の種々の集団を作成するために用いられる、工程；第1標識で酵母細胞を標識する工程であって、ここで第1標識は、試験されるべきタンパク質を発現する酵母と会合し、そして試験されるべきタンパク質を発現しない酵母と会合しない、工程；第1標識が会合している酵母細胞を単離する工程；ならびに酵母によって発現される変異体タンパク質の特性を分析し、そして野生型タンパク質の特性と比較する工程であって、ここで野生型のタンパク質を超える増強された特性を有する変異体タンパク質を提示する酵母細胞が選択される、工程。上記のように、第2標識および／または第3標識がこの実施態様において用いられ得、そして増強された表現型特性を有する目的の変異タンパク質の選択は、濃縮工程および標識化工程の反復サイクルを包含し得る。

30

40

#### 【0054】

好ましい実施態様では、酵母細胞壁タンパク質は、アグルチニンである；試験されるべきタンパク質は、そのN末端によってアグルチニンの結合サブユニットのC末端に融合される；酵母株は、*Saccharomyces*、*Pichia*、*Hansenula*、*Schizosaccharomyces*、*Kluyveromyces*、*Yarrowia*および*Candida*からなる群から選択される属の酵母株である；この試験されるべきタンパク質は、抗体、Fab、Fv、またはscFv抗体フラグメントであり、より好ましくはこの試験されるべきタンパク質は、細胞表面レセプターのリガンド結合ドメインであり、なおより好ましくは、この細胞表面レセプターは、T細胞レセプターである。

50

## 【0055】

本発明の目的は、表面発現、安定性、結合定数、解離定数、分泌レベルおよび溶解度からなる群から選択される増強された表現型特性を示す変異体タンパク質を選択するための方法を提供することであり、ここで、試験されるべきタンパク質の変異体は、単一変異または多重変異を含み得る。

## 【0056】

本発明のさらに別の局面では、第2標識は、細胞表面の発現レベルを定量的に決定するために用いられ得る。これは、細胞内発現、安定性、結合定数、解離定数、分泌レベルおよび溶解度のような他の所望の表現型特性を選択するためのアッセイとして用いられ得る。

10

## 【0057】

本発明の方法により選択される変異体タンパク質は、真核生物における発現に適応したベクターに、選択された変異体タンパク質をコードする遺伝子をクローニングすること；および真核生物において変異体タンパク質を発現することによりさらに特徴付けられ得る。ここで変異体タンパク質の増強された特性は、変異体タンパク質の増強された特性の表現型の特性を野生型タンパク質の特性と比較することによって確認される。好ましくは、真核生物は、哺乳動物、昆虫、または酵母からなる群から選択される。選択される変異体の表現型は、「新しい」（すなわち、変異された）タンパク質の固有の特性であるので、このアプローチはまた、他の非真核生物発現系において変異体を発現するために適用可能である。

20

## 【0058】

本発明の別の好ましい局面は、それらの正常な（「野生型」）配列として提示されないタンパク質を提示するための方法を提供する。示した実施例において、抗原に対するT細胞レセプターは、その「野生型」配列のようには発現されなかった。しかし、ランダムな変異誘発、および適切な立体配置上特異的な抗体を用いたフローサイトメトリーによる選択の後、変異体レセプターは、酵母細胞表面上で発現された。この戦略は、新規のT細胞レセプターの発見を可能にし、そして実質的に任意のポリペプチドの提示の方法を提供する。従って、本発明はまた、以下の工程を含む、酵母細胞表面上での表示可能性についてタンパク質を選択するための方法を提供する：酵母細胞壁タンパク質と融合した試験されるべきタンパク質を発現するベクターで酵母細胞を形質転換する工程であって、ここで変異誘発が、試験されるべきタンパク質の変異体の種々の集団を生成するために用いられる、工程；第1標識で酵母細胞を標識する工程であって、ここでこの第1標識は、試験されるべきタンパク質を発現する酵母と会合し、そして試験されるべきタンパク質を発現しない酵母と会合しない、工程；第1標識が会合している酵母細胞を、第1標識を定量することによって単離する工程であって、ここで第1標識の高頻度の出現は、試験されるべきタンパク質が所望の提示特性を有することを示し、そして第1標識の低頻度の出現は、試験されるべきタンパク質が所望の提示特性を有さないことを示す、工程。好ましくは、試験されるタンパク質は、抗体、Fab、Fv、もしくはscFv抗体フラグメント、または細胞表面レセプターのリガンド結合ドメインである。細胞表面レセプターの代表的な例は、T細胞レセプターである。

30

40

## 【0059】

以下の実施例は、本発明の種々の実施態様を例証する目的のために与えられ、そして、いずれの様式でも本発明を限定する意味はない。

## 【0060】

（実施例1）

（培地／緩衝液）

本明細書において、以下の培地／緩衝液を用いた。

## 【0061】

（E. coli）

LB 培地（1×）：Bacto トリプトン（Difco, Detroit, MI）

50

: 10.0 g; Bacto 酵母抽出物 (Difco): 5.0 g; NaCl: 10.0 g。1 Lに作成し、オートクレーブする。プレートについては、15 g/Lの寒天を添加し、そしてオートクレーブする。

#### 【0062】

アンピシリンの貯蔵物: 水中のアンピシリンのナトリウム塩 25 mg/ml。濾過滅菌し、そして-20℃で4 mlのアリコートで保管する。作業時は [ ] = 35~50 mg/ml; 1 L中に4 mlのアリコート→100 mg/ml; 1 L中に2 mlのアリコート→50 mg/ml。オートクレーブしたLBが約55℃まで冷却した後にLBに添加する。

#### 【0063】

10

SOC培地 (100 mL): 2%のBacto トリプトン: 2.0 g; 0.5%の酵母抽出物 (Difco): 0.5 g; 10 mMのNaCl: 0.2 ml 5 M; 10 mMのMgCl<sub>2</sub>: 1.0 ml 1 M; 10 mMのMgSO<sub>4</sub>: 1.0 ml 1 M; 20 mMのブドウ糖: 0.36 g。オートクレーブするまたは濾過滅菌する。

#### 【0064】

(酵母)

(合成最小+カザミノ酸 (SD-CAA) 500 mL)

|                                                       |         |    |
|-------------------------------------------------------|---------|----|
| ブドウ糖 (グルコース)                                          | 10.00 g |    |
| アミノ酸非含有 酵素窒素塩基 (Difco)                                | 3.35 g  |    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 5.1 g   | 20 |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O   | 4.28 g  |    |
| カザミノ酸 (Trp-, Ura-) (Difco)                            | 2.5 g   |    |

蒸留水を加えて最終容量にする。濾過滅菌し、そして冷蔵する。プレートについては、リン酸ナトリウムおよびソルビトールを溶解して、400 mlの蒸留水中で最終濃度1 Mにする。7.5 gの寒天を添加し、そしてオートクレーブする。ブドウ糖、N<sub>2</sub>塩基およびアミノ酸を蒸留水100 mlに溶解し、そして濾過滅菌する。オートクレーブした塩が触れるのに十分なまで冷めた後、濾過した試薬を添加する。

#### 【0065】

(SG-CAA (誘導培地) 500 mL)

|                                                       |         |    |
|-------------------------------------------------------|---------|----|
| ガラクトース                                                | 10.00 g | 30 |
| アミノ酸非含有 酵母窒素塩基 (Difco)                                | 3.35 g  |    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 5.1 g   |    |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O   | 4.28 g  |    |
| カザミノ酸 (Trp-, Ura-) (Difco)                            | 2.5 g   |    |

蒸留水を添加し、最終容量にする。濾過滅菌し、そして冷蔵する。

#### 【0066】

(濃厚 (YPD) (1000 mL); 酵母抽出液: 10 g; ペプトン (Difco): 20 g; デキストロース: 20 g。蒸留水を添加し、1 Lにする。オートクレーブする。

#### 【0067】

(TAE (Tris-酢酸): 作業溶液: 0.04 MのTris-酢酸および0.001 MのEDTA

|                     |         |  |
|---------------------|---------|--|
| 保存溶液 (50×)          | 1 L中    |  |
| Tris 塩基             | 242 g   |  |
| 氷酢酸                 | 57.1 ml |  |
| 0.5 M EDTA (pH 8.0) | 100 ml  |  |

TBE (Tris-ホウ酸塩): 作業溶液: 0.09 MのTris-ホウ酸塩および0.001 MのEDTA

|           |        |    |
|-----------|--------|----|
| 保存溶液 (5×) | 1 L中   |    |
| Tris 塩基   | 54 g   |    |
| ホウ酸       | 27.5 g | 50 |

0.5 M EDTA (pH 8.0) 20.0 ml

停止緩衝液 10× (制限) : 50% v/v グリセロール ; 0.1 M の EDTA (pH 7.5) ; 1% w/v の SDS ; 0.1% w/v ブロモフェノールブルー。色素を除くすべての成分を組み合わせ、そして色素の添加前に pH を 7.5 にする。

#### 【0068】

染色-臭化エチジウム : 水中で 0.5 mg/ml ; 貯蔵溶液 : 10 mg/ml。貯蔵溶液の希釈 : TBE 中で 1/10。100 ml の緩衝液に 100 ml の希釈液を添加する。

#### 【0069】

TBS 作業溶液 : 10 mM の Tris-HCl、140 mM の NaCl および 5 mM の EDTA。濾過滅菌する。

10

#### 【0070】

(実施例 2)

(プロトコル : レプリカプレート法)

1. コロニーリフトのために適切な材料を選択する (その材料が洗浄、乾燥および滅菌されることを確認する)。
2. それぞれの新鮮なレプリカプレートの底を矢印でマークし、プレートを 1 列に並べる。また、出発プレートをマークする。
3. 出発プレートのフタを取り、プレートを裏返し、そしてコロニーリフト材料上のマークと底の矢印を 1 列に並べる。プレートを材料の表面に下ろし、そして穏やかにプレート全体に押し付ける。プレートが材料に接触した後、それがまわりに動いていないことを確認する。プレートを取り除き、そしてフタを再度置く。材料に転写されたコロニーの部分が見られ得る。
4. この手順を 1 枚の新鮮なレプリカプレートを用いて繰り返す。矢印がマークと 1 列に並び、また正確なレプリカを作成することを確認する。転写された小さいコロニーを見るため光にかかげる。
5. 作成されるべきそれぞれのレプリカプレートについて全手順を繰り返す。
6. 選択増殖のために適切な条件でレプリカプレートをインキュベートする。コロニーは、通常、1 日かそのぐらいで増殖する。

20

#### 【0071】

(実施例 3)

(プロトコル : 酵母の電氣的形質転換)

細胞の調製 :

1. 50 ml の YPD を OD が 0.1 になるように終夜培養物で接種する。
2. 激しく振盪しながら 30 °C で細胞を増殖させ、1.3 ~ 1.5 の OD<sub>600</sub> にする (約 6 時間)。
3. 4 °C で 5 分間、3500 rpm にて冷却したローターで回収する。上清を廃棄する。
4. 細胞を、50 ml の冷滅菌水に再懸濁することにより徹底的に洗浄する。上記のように遠心分離し、そして上清を廃棄する。
5. 25 ml の冷水を用いて 4 の工程を繰り返す。
6. 2 ml の氷冷滅菌 1 M ソルビトールに再懸濁する。上記のように遠心分離し、そして上清を廃棄する。
7. 50 ml の氷冷 1 M ソルビトールに再懸濁する。細胞の最終容量は、約 150 ml (3 回の形質転換に十分) である。

40

#### 【0072】

電氣的形質転換 :

1. 氷上に 0.2 cm のキュベットおよび白色スライドチャンバーを置く。
2. エッペンドルフチューブ中に、50 ml の酵母懸濁液を添加し、そして TE 中の < 5 ml (0.1 mg) のプラスミド DNA に穏やかに混合する。すでにエッペンドルフチューブ中の酵母に DNA を添加することを確認する。5 分間氷上に置く (この時間枠は、かなり重要である)。

50

3. GENE PULSERを1.5 kVおよび25 mFに設定する。パルスコントローラーを200 Wに設定する。このパルスについての時定数は、4.5～5.0 msecであるべきである。

4. 40 mlの細胞/DNA混合物を、事前冷却したエレクトロポレーションキュベットに移す。内容物を底まで取り、サンプルがキュベットの両方のアルミニウム側面と接触することを確認する。このキュベットを冷却された安全チャンバースライド内に置く。キュベットがチャンバーの基部にある電極と接触するまでチャンバー内にスライドを押し込む。

5. 上記の設定で1パルスを適用する。

6. キュベットとスライドを離し、そして直ちに、1 mlの冷たい1 Mのソルビトールをキュベットに添加する。混合し、そしてキュベットを氷に戻す。1 Mのソルビトールを含有する選択プレート上に200 mlを塗りひろげる。

10

#### 【0073】

(実施例4)

(プロトコル：E. coliの形質転換)

1. コンピテントサブクロニングが効率的なHB101 (−70℃保管)のアリコート氷上で融解し、すべての試薬を氷上に維持する。lacZ相補性についてはDH5α細胞を；非メチル化についてはDM-1を用いる。

2. それぞれのDNAサンプルのために1、pBR322 (陽性コントロール) (DH5αおよびDM-1についてはpUC19)のために1、DNAなし (陰性コントロール)のために1の、必要な数のエッペンドルフチューブに50 mlのHB101を分配する。

20

3. 未使用の細胞を50 mLの部分に等分し、そしてドライアイス/エタノール浴中で再凍結する；−70℃で貯蔵する。

#### 【0074】

4. 1 mlのDNA (1 mg)をエッペンドルフ (1 mlのpBR322もしくはpUC19)に加え、チューブを叩き混合する。次いで氷上で30分間インキュベートする。連結のために、1～2 mlの連結混合溶液 (ligation mixture)を使用する (過剰量は形質転換を困難にする)。

#### 【0075】

5. 37℃で20秒間、熱ショックを与える (DM-1細胞については42℃で45秒間)。

30

#### 【0076】

6. 氷上に2分間配置し、次いで0.95 mlの室温のSOC培地を加える。浴槽 (随意に振盪する) 中で、あるいは37℃の室温下で振盪機において、37℃で1時間インキュベートする。。

#### 【0077】

7. 100～200 mLの細胞をLB (100 mg/mLアンピシリン)に播種し、そして37℃で一晩インキュベートする。

#### 【0078】

(実施例5)

(プロトコル：GELase (商標登録) DNA精製)

Wizard (商標登録) PCR prep (Promega; Madison, WI)は、ゲルからのDNA精製のための代替のプロトコルである。Wizard (商標登録) prepの収量が低い場合、GELase (商標登録)が推奨される。所望のフラグメントが200 kb長未満もしくは5 kb長より長い場合、収量は低い。

#### 【0079】

1. 新鮮な1×TAE緩衝液中で、1%低融点アガロースゲルにてDNAフラグメントを分離する。

#### 【0080】

2. エチジウムブロマイドを含む水中で、このゲルを染色する。携帯型のUVランプを

50

使用して、新しい剃刀の刃で目的のフラグメントを切り出す。

【0081】

3. このゲル切片を、予め重量測定しておいたエッペンドルフチューブ中に配置する。ゲル切片の重量を決定するために、両方の重量を再度測定する。ゲル切片の重量が300 mgを超える場合、工程6の後に、サンプルを2つのチューブに分割する。

【0082】

4. ゲル切片100 mgあたり、2 mlの50×GELase（商標登録）緩衝液を加える。

【0083】

5. このゲル切片を含むチューブを、ゲルが完全に融解されるまで、70℃でインキュベートする。これには少なくとも20分を要する。望ましい技術としては、30分間保持し、ピペットで混合物を数回上げ下げし、次いでさらに10分間保持することである。ゲルが完全に融解するのを確認すること。

10

【0084】

6. 融解したゲルを、45℃で少なくとも30分間平衡化する。

【0085】

7. 融解したゲル150 mgあたり、1 UのGELase（商標登録）を加える。4時間インキュベートする。600 mgより多い場合は、2 UのGELase（商標登録）を加える。

【0086】

20

8. 1容積（1容積＝ゲル切片のmg）の5 M酢酸アンモニウムをこの溶液に加える。300 mgより重いゲルを使用する場合、エタノール沈殿のために、より大きなチューブを必要とする。

【0087】

9. 2容積（1容積＝ゲル切片＋酢酸アンモニウムのmg）に室温の100%エタノールを加え、そして数回反転する。

【0088】

10. 19 RALにて、室温下で少なくとも30分間遠心分離することによってDNAをペレット化する。DNA濃度が非常に低い場合、エタノールを加えてから30分間保持し、次いで30分間遠心する。

30

【0089】

11. ピペットで上清を除き、処分する。

【0090】

12. ペレットを、室温の70%アルコールで洗浄する。

【0091】

13. DNAを、水もしくはTEに溶解する。次いで、DNAを−20℃で保存し得る。

【0092】

（実施例6）

（プロトコル：連結）

40

材料：T4 DNAリガーゼおよび2×T4 DNAリガーゼ緩衝液

ホスファターゼ処理：仔ウシ腸ホスファターゼ（CIP）および緩衝液（必要である場合）。平滑末端化処理：dNTP混合物（0.5 mM）。E. coli DNAポリメラーゼIもしくはT4 DNAポリメラーゼのクレノウフラグメント。連結処理：オリゴヌクレオチドリンカー0.2 mM DTT。

【0093】

1. 20 mlの反応溶液中で、個々のDNA成分を適切な制限エンドヌクレアーゼで切断する。この反応が完了した後、65℃まで15分間加熱することによって酵素を不活性化する。さらなる酵素的な処置を必要としない場合、工程6へ進む。

【0094】

50

2. DNAのうち1つの5'リン酸が除去されるべき場合、2mlの10×CIP緩衝液および1UのCIPを加え、30～60分間、37℃でインキュベートする。この反応が完了した後、75℃まで15分間加熱することによってCIPを不活性化する。さらなる酵素的な処理を必要としない場合、工程6へ進む。

#### 【0095】

3. 平滑末端化処理のために、1mlの溶液（4つ全てのdNTP（各0.5mM）および適切な量のE. coli DNAポリメラーゼIもしくはT4 DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントを含む）を加え、充填反応もしくはトリミング反応を行う。完了した後、75℃まで15分間加熱することによって酵素を不活性化する。オリゴヌクレオチドリンカーを加えるべき場合、工程4へ進む。1つの平滑断端のみを含むDNAフラグメントを所望する場合、反応産物を適切な制限エンドヌクレアーゼで切断する。さらなる酵素的な処理を必要としない場合、工程6へ進む。

10

#### 【0096】

4. 0.1～1.0mgの適切なオリゴヌクレオチドリンカー、1mlの10mM ATP、1mlの0.2M DTT、および20～100付着末端単位のT4 DNAリガーゼを加え、15℃で一晩インキュベートする。75℃まで15分間加熱することによってリガーゼを不活性化する。

#### 【0097】

5. 工程4の産物を、オリゴヌクレオチドリンカーを認識する制限酵素で切断する（必要ならば、緩衝液条件を調整する）。2つの末端の1つのみがリンカーを含むべき場合、この産物をさらなる制限酵素で切断する。

20

#### 【0098】

6. 必要ならば、所望のDNAセグメントをゲル電気泳動によって単離する。次いで、精製する（GeneCleanII（商標登録）またはGELase（商標登録））。

#### 【0099】

7. 連結：20mlの水に対して、9mlのDNA成分（0.1～5mg）、4mlの5×リガーゼ緩衝液、1mL（付着末端）のT4 DNAリガーゼ（BRL：1単位＝300付着末端単位、20～500の付着末端単位が必要）。1～24時間、16℃でインキュベートする。

#### 【0100】

30

8. 1mlの連結された産物を形質転換受容性E. coli細胞へ導入し、そして形質変換体を選択する。次いで、ミニプレップおよび制限酵素マッピングを行い、所望の産物についてスクリーニングする。

#### 【0101】

（実施例7）

（クローニング：）

全ての形質転換体は、下記の製造者プロトコルに従い、E. coli株DH5α中に存在した。

#### 【0102】

PCR

40

・Ampliwax PCR-gem媒介性ホットスタートPCR（Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT）—シンウォールチューブのための製造者プロトコル

・GeneAmp PCR中心試薬（Perkin-Elmer-Cetus）・DNAサーマルサイクラー480（Perkin-Elmer-Cetus）AGA2  
PCRによってクローン化する。

・PCRのためのテンプレートは、CEN BANK S. cerevisiaeゲノムライブラリー（American Type Culture Collection, Rockville, MD）であった。

・プライマー：5'-ATTAGAATTCCCTACTTCATACATTTTCAA

50

－ 3' (配列番号 10)

および

5'－ATTACTCGAGCTATTACTGCAGagcgtagtctggaacgtcgtatgggtAAAAACATACTGTGTGTTTATGGG－3' (配列番号 11)。

・サーマルプロファイル：

変性 94℃で1分間

アニール化 41℃で2分間 (初めの5サイクル)、45℃で2分間 (さらなる25サイクル)

伸長 72℃で25秒間

最後のポリッシング工程 72℃10秒間

PCR産物を、pCR-Script SK (+) クローニングキット (Stratagene, La Jolla, CA) を使用して、製造者プロトコルに従い、プラスミド pCR-Script にクローン化した。342bp AGA2フラグメントをEcoRIおよびXhoIで切除し、1%アガロースゲル上で精製し (プロトコル6.1.7.2)、そしてKpnI/EcoRIフラグメントとしてCUP1プロモーターを含む、pCR-Script にサブクローン化した。

#### 【0103】

HAペプチド

HAペプチドを、カセット式変異誘発によって挿入した。Xa因子認識配列およびHAエピトープをコードする相補的なオリゴヌクレオチド鎖を、AGA2クローンの3' XhoI部位への連結を可能にする付着突出で合成する一方で、同時にこの部位を破壊した；pCR-Script内の下流のSacI部位をアニール化し、そしてpCR-Script内のCUP1-AGA2構築物に連結した。この挿入は、HA配列の3'末端で新規のXhoI部位を含む。CUP1-AGA2-HAを、KpnI/XhoIフラグメントとして切り出し、1%アガロースゲル上で精製し、そしてすでにα因子終結配列を含む酵母のシャトルベクターpRS314 (1) 内にサブクローンし、表面提示ベクターpCT101を形成した。オリゴ配列：

5'－TCGACGATTGAAGGTAGATACCCATACGACGTTCCAGACTACGCTCTGCAGTAATAGATTATCCTCGAGCT－3' (配列番号 12) および

5'－CGAGGATAATCTATTACTGCAGAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGTATCTACCTTCAATCG－3' (配列番号 13)。

#### 【0104】

GALプロモーターをベクターYCplac22-GALから切り出した。適切な付着突出を有する12bpのパリンドロームリンカーを、まずこのベクターにクローン化し、両方の末端で制限部位を変えた：EcoRI→KpnI (E/KLINK) およびBamHI→EcoRI (B/ELINK)。得られたKpnI/EcoRIフラグメントをpCT101にクローン化し、ベクターpCT201を形成した。オリゴヌクレオチド配列：E/LLINK 5'－AATTGGTACC－3' (配列番号 14)；B/ELINK 5'－GATCGAATTC－3' (配列番号 15)。

#### 【0105】

4-4-20scFvを、上記のようにPCRによって増幅した：

・テンプレート：GeneXベクター内の4-4-20 (D. Kranz (UIUC Dept. of Biochem.) から得た)

・プライマー：5'－ggtttgcccaagctagcGACGTCGTTATGACTCAA－3' (配列番号 16) および

5'－ggccggcccaactcgcagctattacaaagtctttcttcagaaataagcttttggttcTGAGGAGACGGTGACTGA－3' (配列番号 17)。

10

20

30

40

50

・サーマルプロファイル：

変性 94℃で1分間

アニール化 40℃で2分間（初めの5サイクル）、48℃で2分間（さらなる30サイクル）

伸張 72℃で50秒間

最後のポリッシュ工程 72℃で10分間。

#### 【0106】

PCR産物をpCR-Script内にクローン化し、上記の方法を使用して、Nhe I/Xho Iフラグメントとして、pCT201内にサブクローン化し、ベクターpCT202を作製した。ベクターpCT302を、(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>リンカーをコードする合成オリゴヌクレオチド(UIC Biotechnology Center)を挿入することによって、AGA2とpCT202の4-4-20オープンリーディングフレームとの間にフレーム内に作成した。

10

#### 【0107】

AGA1

上記のようにPCRで増幅した：

・テンプレート：CEN BANK

・プライマー：5'-ATTAGAA TTCAGCTAAAAAAACC AAAAAAT-3'（配列番号18）および

5'-ATTACTCGAGctaTTAACTGAAAAATTACATTGC-3'（配列番号19）

20

・サーマルプロファイル：

変性 94℃で1分間

アニール化 41℃で2分間（初めの5サイクル）、45℃で2分間（さらなる25サイクル）

伸張 72℃で2分20秒間

最後のポリッシュ工程 72℃で10分間

PCR産物を、GELase（商標登録）キットを使用してゲル精製した。pCT201のKpn I/Sst IフラグメントをベクターpRS316内にクローン化した。次いで、これをEcoRIおよびXho Iで消化し、切り出されたAGA2フラグメントを、残存するベクターフラグメントをゲル精製することによって除去し、そして精製したAGA1 PCR産物に連結し、EcoRIおよびXho Iで消化した。得られたクローンはpCT211であった。pCT211のKpn I/Sst Iフラグメントを、実質的に、ベクターYIplac211内でクローン化し、ベクターpIU211を形成した。

30

#### 【0108】

（実施例8）

（酵母における発現）

酵母株、S. cerevisiae BJ5465 (ura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4:HIS2 prb1D1.6R can1 GAL)。この株は、pep4およびprb1変異体であり、プロテアーゼを欠く変異体を作製する。3つの栄養マーカーを除去し、そしてプラスミド選択のために使用し得た：URA3、TRP1、およびLEU2。HIS3を除去したが、PEP4除去は、HISマーカーで補われる。

40

#### 【0109】

形質転換：

ベクターpIU211を、AGA1配列において独自に存在するBsiWIで切断した。約100ngのこの直鎖化されたベクターおよび200ngのpCT202を、エレクトロポレーション（プロトコル2.6.1）によって、酵母株BJ5465に同時に形質転換した。形質転換体をSD-CAAプレート上で選択した。

#### 【0110】

50

実験的な誘導条件：

p I U 2 1 1 および p C T 2 0 2 で形質転換された酵母の単一コロニーを、3 ml の S D - C A A に接種し、そして約 24 時間、30 °C で増殖させた。この時点では、細胞密度は、1 ml あたり約  $10^7 \sim 10^8$  細胞（すなわち、 $OD_{600}$  は約 1 ~ 3）であった。遠心分離によって十分な量の細胞を回収し、開始  $OD_{600}$  が ~ 0.5 になるように、3 ml の S G - C A A に接種した。この培養物を、約 20 時間、30 °C で増殖させた。

【0111】

（実施例 9）

（酵母細胞の蛍光標識化）

以下の方法を使用して、酵母細胞の蛍光標識化を行った：

10

1. S G - C A A 中で 20 時間培養した後、0.2  $OD_{600}$  (600 nm) の細胞を、約 10 ~ 30 秒間、14,000 g で遠心分離することによって回収する。

【0112】

2. 細胞ペレットを、T B S 中に再懸濁して、そして遠心沈殿することによって洗浄する。

【0113】

3. ペレットを、適切な容積の T B S 中に再懸濁して、インキュベーションのために最終容積を 100 ml にする。以下の量の標識化試薬を、適切な量として加える：1 ml の 25 mg/ml F I T C - デキストラン (MW 2,000,000) (S i g m a) ; 1 ml の 9 E 1 0 M a b 腹水 (B a b c o) または 100 mg/ml の 10 ml の 9 E 1 0 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) ; T B S 中で 10 mg/ml の 100 ml の 12 C A 5 M a b (B o e h r i n g e r - M a n n h e i m) 。ボルテックスまたは上下のピペティングによって混合する。

20

【0114】

4. 室温で 1 時間インキュベートし、チューブを指で軽くはじくか、ボルテックスするか、またはピペティングすることによって、約 20 分毎に細胞を混合する。

【0115】

5. この細胞を遠心沈殿し、そして適切な量の T B S 中に再懸濁し、最終容積を 100 ml にする。以下の量の第 2 の試薬を、適切な量として加える：4 ml のマウス - P E (S i g m a) ; 2 ml のマウス - F I T C (S i g m a) ; 1 ml の F I T C - デキストラン。

30

【0116】

6. 室温で 30 分間インキュベートする。

【0117】

7. 遠心沈殿し、そして工程 2 のように洗浄する。

【0118】

8. ペレットを、約 100 ml の 10 mM T r i s 塩基, pH 8.3 (F I T C で標識化した任意のものについて) または T B S (顕微鏡のため) に再懸濁する。フローサイトメトリーのために、500 ml の 10 mM T r i s に懸濁する (最終細胞密度約  $10^6$  /ml あるいはそれ以上)。サンプルは、フローサイトメトリーのために、0.5 ml 微量遠心チューブ中にある必要がある。ビオチン-フルオレセインを使用する実験のために、細胞を増殖し、誘導し、回収し、そして記載されるように、1 次標識として、F I T C - デキストランの代用として 10 mM のビオチン-フルオレセインで標識し、そして二次標識試薬として、3 mg のストレプトアビジン - P E および 1 mg の R E D 6 1 3 結合ヤギ抗マウス F (a b ' ) <sub>2</sub> (L i f e T e c h n o l o g i e s , G r a n d I s l a n d , N Y) の混合物で標識した。

40

【0119】

（実施例 10）

（共焦点蛍光顕微鏡）

H A ペプチド (p C T 2 0 1) もしくは s c F V 融合 (p C T 2 0 2) のプラスミド指

50

向表面発現を含む酵母を、唯一の炭素源として2%ガラクトースを含む培地中で20時間増殖させ、そして実質的に、mAb 9E10で標識し、次いで、記載されるように、二次抗マウスIgG-R-フィコエリトリン(PE)結合体およびFITC-デキストランによって標識した。標識された細胞を、抗退色試薬として1mg/mlのp-フェニレンジアミンを含む90%グリセロールマウント媒体中で、ポリリジン被覆スライド上にマウントし、そしてレーザー共焦点蛍光顕微鏡(UIC Beckman Institute Microscopy Suite)を用いて、63×の対物レンズの倍率で8秒間の速度で分析した。DIC、赤色PE蛍光、および緑色FITC蛍光からのイメージを収集した。

#### 【0120】

10

(実施例11)

(フローサイトメトリー分析および分類)

標識された酵母細胞懸濁液を、UIC Biotechnology Centerのフローサイトメトリーセンターで、Coulter Epics XLフローサイトメーターで分析した。事象速度を、ほぼ500細胞/秒で維持した。集団を光散乱によってゲートし、凝集細胞の検査を避け、そして100,000事象に関するデータを収集した。初期細胞分類実験については、pCT202ベクターを保有する酵母を、非形質転換の親株BJ5465と混合し、そしてFITCシグナルに基づいて、CICERO分類エレクトロニクスで改変されたCoulter 753細胞分類ベンチ(UICフローサイトメトリーセンター)にて分類した。分類前のサンプルおよび分類後のサンプルを非選択培地上に播種し、次いで、レプリカをpCT202ベクターに選択的な培地上に播種した。選択的なプレート上で生存可能な非選択的なコロニー画分として、純度を決定した。

20

#### 【0121】

(実施例12)

(表面抗体発現レベルの定量化)

ベクターpCT202を保有する細胞およびQuantum Simply細胞ビーズ(Sigma, St. Louis, MO)を、記載されるように、FITC結合mAb 12CA5(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)(TBS中に10g/ml)で標識し、そしてCoulter Epics XLフローサイトメーターにて分析した。酵母サンプルの、標準ビーズとの蛍光強度の比較は、Quantum Simply Cellular(Sigma)のQuickCalを使用する直線回帰によって、提示している酵母細胞の抗体結合能力の決定を可能にした。

30

#### 【0122】

(実施例13)

(scFvを提示する細胞からの抗原解離の動力学的分析)

プラスミドpCT202保有する酵母細胞を増殖し、そして記載されるように、抗c-myc mAb 9E10およびFITC-デキストランまたはビオチン-フルオレセインで標識した。標識された集団の画分をフローサイトメトリー分析し、蛍光の初期レベルを測定した。非蛍光競合剤(5-アミノフルオレセイン)を約10mM(約1000倍過剰)の最終濃度で加え、c-myc陽性細胞集団のFITCもしくはPE蛍光を、Coulter Epics XLにて室温(21-23℃)で、時間の関数として追跡した。データを、指数関数的な減衰として当てはめた。多価抗原が時間の関数として細胞に結合するという可能性は、 $P = 1 - (1 - e^{-kt})^N$ (Nは結合価であり、Kは解離に動力学的速度定数であり、そしてtは時間である)によって与えられる。長時間のtについては、これは、 $P = Ne^{-kt}$ まで減少する。従って、長時間のt~0時間のデータの推定は、 $P = N$ 、または $F_{ext} = NF_0$ の蛍光強度を産する。ここで $F_{ext}$ は、競合剤添加時で推定された蛍光であり、そして $F_0$ は実際の初期蛍光である。従って、表面提示scFv 4-4-20と多価のFITC-デキストランとの相互作用の結合価は、図11における曲線のy切片として決定した。

40

#### 【0123】

50

可溶性フルオレセイン (FDS) への結合を、scFvを提示する細胞全体の近傍の蛍光消光作用を観察することによってアッセイした。細胞を、23℃で温度自動調節された石英キュベットにおいて、TBS+0.1%BSAに $2 \times 10^7$ 細胞/mlで懸濁し、そして0~7.5nMの範囲にわたるFDSで滴定する。520nmでの蛍光を、488nmの励起波長を使用して、SLM Aminco SPF-500分光蛍光光度計で観察した。不適切なscFvを提示するコントロール細胞を滴定し、平衡結合型データモデルに対する2つのパラメータ適合について勾配を得、平衡定数および有効scFV濃度を得た。平衡滴定に続いて、5-アミノフルオレセインを1mMまで加え、そしてサンプルの蛍光の変化を、FDSに対する $k_{off}$ を決定するために経時的に追跡した。

#### 【0124】

(実施例14)

(scFv遺伝子の変異原性)

約100ngのpCT302を、製造者プロトコルに従い、2連でE. coli株XL-1Red (Stratagene, La Jolla, CA) に形質転換した。SOC培地中での1時間の誘導の後、2つの形質転換体群をプールし、そしてそのプールの1/2000を、100mg/mlのアンピシリンを含むLB培地上に播種し、形質転換効率を決定した。50mg/mlのアンピシリンおよび100mg/mlのカルベニシリンを含む5mlの液体LB培地 (LB-AMP50-CARB100) を、残余の形質転換体と共に接種し、そして一晩37℃で増殖させた ( $OD_{600}$  約1.0)。この培養物の十分な量を収集し、バッフル振盪フラスコ中で、この培養物を50mlのLB-AMP50-CARB100に $OD_{600}=0.01$ になるまで接種し、そして $OD_{600}$  約1.0~1.1まで37℃で増殖させた。細胞を遠心分離によって収集し、そして200mlのLB-AMP50-CARB100に $OD_{600}=0.001$ まで接種するために使用し、そしてこの培養物を、37℃で $OD_{600}$  約1.0まで増殖させた。プラスミドDNAを、QIAGEN (商標登録) Maxi prepキット (QIAGEN (商標登録), Santa Clarita, CA) によって単離した。回収したDNAをXL1-Redに再び形質転換し、そして成長周期を3回繰り返し、得られる最終産物を突然変異誘発遺伝子株における増殖の約90世代に供した。

#### 【0125】

(実施例15)

(ライブラリーの発現および動力学的スクリーニング)

50mgの突然変異を誘発されたpCT302 DNAを、10の分離した反応におけるGietzおよびSchiestlの方法により、酵母株EY100に形質転換した。その生成物をプールし、そして全体の1/2000を選択培地上にプレートして、形質転換体の総数を決定した。その残余物を50mlの選択グルコース培地中で接種し、30℃で一晩増殖し、 $OD_{600}=0.1$ まで継代し、そして10倍に拡大させた。選択ガラクトース培地 (5ml) を $OD_{600}=0.5$ に接種し、そして $OD_{600}=1.0-2.0$ まで30℃で一晩増殖させた。10<sup>7</sup>細胞のサンプル (1  $OD_{600}$  ml) を、記載されるようにFITC-デキストランで標識した。標識に続いて、細胞を、10mMの5-アミノフルオレセインおよび9E10mAb中に室温で20分間再懸濁し、同時にサンプルを氷冷緩衝液でリンスしてFITC-デキストランの競合的解離を停止し、そして記載されるように抗マウスPE二次抗体で標識した。サンプルを、図4に示されるような選別ウインドウと4000/秒の事象速度 (event rate) を有するクーラー (Coulter) 753ベンチ (bench) 上で選別した。選別第1回の間に $6 \times 10^7$ 細胞を試験し、そしてウインドウを、集団の0.2%を回収するようにセットした。回収された細胞をグルコース培地中で再増殖し、そして競合および選別の繰り返しの前に、記載されるようにガラクトースに切り替えた。合計4回の選別および増幅を実施した。4 $\times 10^7$ 細胞を第2回で試験し、そして2 $\times 10^7$ 細胞を、各第3回および第4回において試験した。第1および第2回を、全ての陽性クローンの高回収率を提供するために濃縮様式において実施し、そして第3および第4回は、同時に発生した陰性細胞を拒絶し、かつより多量

10

20

30

40

50

の濃縮要因を達成するために精製様式において実施した。第4回の生成物を、個々のコロニーを単離するためにプレートした。

#### 【0126】

(実施例16)

(融合ディスプレイ系の確立)

酵母細胞壁タンパク質を有するペプチドエピトープタグ融合物をコードする遺伝子を構築し、そしてそのエピトープの表面発現を改変した。この細胞壁タンパク質である $\alpha$ -アグルチニンは、酵母の接合の間の細胞と細胞の接着に関与する。従って対向する接合型の細胞上のアグルチニンに対するレセプターとして、外部細胞表面上に曝露される。試験的な混合および選別実験を実施して、フローサイトメトリーによる親和性スクリーニングについて、一回通過および二回通過の精製収量ならびに純度を決定した。

10

#### 【0127】

(実施例17)

(酵母接合のアグルチニン)

酵母の生活環において、一倍体細胞は、2つの可能な接合型( $a$ または $\alpha$ )のうちの1つとして生じる。 $a$ -一倍体細胞および $\alpha$ -一倍体細胞が物理的接触する場合、それらは、「アグルチニン」と呼ばれる細胞表面接着タンパク質の間の強力の特異的な相互作用を通して互いに接着する。いったんこの様式において結合すると、その細胞は融合して二倍体細胞を形成する。酵母細胞壁における抗体提示についてのプラットフォーム(platform)として、 $a$ -アグルチニンのサブユニットに対するポリペプチドの融合物を構築した。アグルチニンの生理学的役割は、他のタンパク質との特異的で高親和性の相互作用のために、細胞の外側にタンパク質結合部位を提示することであるので、酵母細胞壁成分からの人工的な立体障害を最小限であった。

20

#### 【0128】

真核生物として、酵母は、抗体分泌Bリンパ球の分泌装置と非常に相同性の高い分泌装置を保有する。結果として、人工的クローン依存性の非効率的な分泌は、この宿主によって最小化されるべきである。多数の研究は、特定分子がインビトロおよびインビボの両方において、機能の有意な損失を伴わずに変換され得るというように、酵母と哺乳動物の分泌経路の間に著しい相同性を明らかにした。マウスBiPの発現は、その発現が増殖に対して必須である酵母のBiPと機能的に置換される(Normington, 1989)。哺乳動物のPDIの発現は、別の必須な酵母のER管腔タンパク質である酵母のPDIと機能的に置換される(Guntherら, 1993)。酵母の分泌と哺乳動物の分泌との間に広範な類似性が与えられれば、誤った折りたたみに起因する抗体発現におけるクローンの変異性は、細菌性宿主と比較して、酵母において実質的に減じられるべきである。実際、酵母における活性な抗体の折りたたみ、アセンブリ、および分泌は、以前に実証されている(Woodら, '85; Horwitzら, '88)。

30

#### 【0129】

酵母の $a$ -アグルチニンを以下の2つのサブユニットとして合成する; Agal p (これは、細胞壁への固定のためにホスファチジルイノシトールグリカンテイルを保有する)および Aga2 p (これは、高親和性( $K_D$  1 nM)で $\alpha$ -アグルチニンに結合する)(LipkeおよびKurjan, 1992)。Agal pおよびAga2 pは、サブユニット間ジスルフィド結合によって連結され、そしてAga2 pは、DTTのような還元剤とのインキュベーションの後に、増殖培地に放出される。ホスファチジルイノシトールグリカンテイルは、一般的に膜に局在化されるが、Agal pは、グリコシル転移によって細胞壁中の線維状グルカンに連結されるという実質的な証拠が集積されている(de NobelおよびLipke, 1994)。

40

#### 【0130】

(実施例18)

(融合構築物)

酵母細胞表面上でポリペプチドを提示するためにアグルチニン融合を使用することの可

50

能性を確立するために、「エピトープタグ」ペプチドをA g a 2 pに最初に遺伝的に融合した。このアプローチを抗体の融合に拡張することは簡単である。酵母の分泌経路を通したs c F v分子の継代は、効率的である。なぜなら、活性化I g GおよびF a bの折りたたみ、アセンブリ、および分泌が酵母において実証されているからである（H o r w i t zら、1988；W o o dら、1985）。

#### 【0131】

A G A 2 遺伝子を酵母のゲノムライブラリーからP C Rによってクローン化し、そして発現レベルの25倍の改変を可能にする強力な銅誘導性C U P 1プロモーターを含む発現ベクター中にサブクローニングした。インフルエンザH Aエピトープタグについてのコード配列（T y r - P r o - T y r - A s p - V a l - P r o - A s p - T y r - A l a）  
（配列番号1）を、A G A 2オープンリーディングフレームの3'末端に融合し、その前にはX a因子の部位特異的プロテアーゼ切断部位（I l e - G l u - G l y - A r g '）  
（配列番号26）が存在する。この構築物のD N A配列を、図7において示す。利便性のよい制限部位を、単鎖抗体の遺伝子のインフレーム融合物に対して含んでいる。

#### 【0132】

A g a 2 p - H A 融合物は、単に、最終的なA g a 2 p - H A - 抗体融合物に対する構築物の中間体であるが、これは融合ペプチドが、この系において細胞表面上に固定され、そして接近可能であることを確認するための手段を提供する。融合による外部細胞壁へのH Aペプチドの固定化を、12 C A 5 m A b（B o e h r i n g e r M a n n h e i m、I n d i a n a p o l i s、I N）を用いる全ての固定されていない細胞の免疫蛍光染色によって確認し、フローサイトメトリーおよび蛍光鏡検によって検出した（図9）。全体の12 C A 5抗体分子は、いかなる破壊的な細胞壁の生化学的処理も伴わずにH Aエピトープに結合するので、A g a 2 pは、高分子認識のために、細胞外部に接近可能である。

#### 【0133】

前記したように、A g a 2 p結合サブユニットは、A g a 1 pへのジスルフィド結合を通して細胞壁に接着され、これは他の細胞壁成分と共有結合的に固定される。D T Tでの処理は12 C A 5での標識を無効にした。このことは、A g a 2 p - H A融合がジスルフィド結合によって細胞表面に付着されることを示す。A G A 1遺伝子を、P C Rによってクローン化し、そしてG A L 1プロモーターの下流にサブクローニングした。A G A 1の発現を、ガラクトース増殖培地に切り替えることによって誘導した。

#### 【0134】

H Aエピトープタグを、表面抗体レベルおよび蛍光的に標識された抗原結合の両方について二重蛍光標識することを可能にするように、抗体融合物中に含有する。このアプローチは、抗体発現レベルにおける細胞と細胞の変動を、抗原親和性の単一細胞の測定値から切り離す。例えば、a - H Aモノクローナル抗体に対するフィコエリトリン標識された二次I g Gでの間接的な免疫蛍光は、表面抗体数の測定を提供し、一方、抗体に結合するフルオレセイン標識された抗原は、結合親和性の測定を提供する。1細胞あたり約 $10^4$ コピーのa - アグルチニンが提示されるため、結合測定値における確率的影響は、最小限である。市販のフローサイトメーターは $10^3$ の発蛍光団分子の下で検出し得るので、シグナル対ノイズの比率は問題とならないはずである。緑色蛍光（フルオレセイン、すなわち、抗原結合）の赤色蛍光（フィコエリトリン、すなわち、抗体数）に対する比率は、抗原による抗体結合画分に比例する。

#### 【0135】

本方法によって可能な分離因子を試験するために、H Aエピトープタグを発現する細胞を、規定された比率で野生型の細胞と混合した。この細胞の混合物を、フルオレセイン標識されたa - H A I g Gで標識し、そして最も高い蛍光の亜集団をフローサイトメトリーによって選別した。選別した画分を再培養し、そしてA g a 2 p - H A融合を保有する細胞の画分を、発現ベクターに関連する遺伝的マーカーについてのレプリカ平板法によって決定した。この情報から、本方法によって可能な一回通過精製を推定した。

## 【0136】

(実施例19)

(α-アグルチニンに対する単鎖の抗フルオレセイン抗体の融合)

モノクローナル抗体4-4-20に基づく抗フルオレセイン単鎖抗体が構築され、そして特徴付けられている(Bird、'88; Davidら、1991)。この単鎖抗体は、安定的に折りたたまれ、そしてFabフラグメントに匹敵する親和性を保持することが公知である。モノクローナル抗体4-4-20についての遺伝子を、酵母細胞表面上での発現のために、現存のAGA2-HA融合遺伝子に融合した。

## 【0137】

フルオレセインに対するモノクローナル抗体は、抗体-ハプテンの相互作用についての物理化学的研究のために有用なモデル系である。抗体-抗原結合の動力学(Kranzら、1982)、錯体化の熱力学解析(Herronら、1986)、静電相互作用の役割(Omel'yanenkoら、1993)、および抗体結合部位の部位指定突然変異誘発(Denzinら、1993)は、この系を使用して研究されている。

## 【0138】

提示された4-4-20融合の機能性を、多様なフルオレセイン標識デキストラン(Sigma)に結合することによって決定した。抗体結合がフルオレセイン発光を消光するので、検出されたフルオレセインは、4-4-20結合フルオレセインを通して酵母に結合されるデキストランにつながれた部分を表す。

## 【0139】

(実施例20)

(提示骨格の発達)

酵母は、α-アグルチニンおよびα-アグルチニンとして公知の2つの関連した細胞表面レセプターを保有する。これら2つのアグルチニンは、二倍体を形成するための融合に先立つように、α-一倍体細胞とα-一倍体細胞との間の細胞-細胞接着を媒介するように機能する(Lu、1995)。α-アグルチニンは、C末端で細胞壁グルカンに共有結合的に連結されることが示されており(Lu、1995; Schreuder、1993)、そしてα-アグルチニンは類似の結合によって固定されると考えられる(Lu、1995)。α-アグルチニンのC末端部分への融合は、酵母表面上で酵素およびウイルス抗原を固定するために、以前に使用されている(Schreuder、1993)。

## 【0140】

酵母表面提示ライブラリスクリーニング方法の開発のためのモデル系として、本発明者らは、α-アグルチニン(これは、α-アグルチニンと異なり、2つのサブユニットの糖タンパク質である)への融合によって酵母の細胞壁上に機能的な抗フルオレセインscFvおよびc-mycエピトプタグを提示している(図2)。725残基のAga1pサブユニットは、β-グルカン共有結合を通して(Lu、1995)アセンブリを細胞壁に固定し(Roy、1991); 69のアミノ酸の結合サブユニットAga2pは、2つのジスルフィド結合によってAga1pに連結される(Cappel'laro、1994)。天然のα-アグルチニン結合活性はAga2pのc-末端に局在化され(Cappel'laro、1994); 従って、これは、細胞外高分子への接近性を有する分子ドメイン、および提示のためのつなぎのタンパク質について有用な部位を表す。Aga2pへのC-末端融合として、提示タンパク質についてのベクターを構築した(図3)。

## 【0141】

(実施例21)

(scFvの発現および表面局在化の確認)

Aga2p-scFv融合物の発現は、誘導性GAL1プロモーターによって指示される(Johnston、1984)。グルコース培地における酵母の増殖は、GAL1プロモーター由来の転写物の本質的に完全な抑制を可能にし、宿主増殖に負に影響する配列に対して対抗選択回避するための重要な考察を可能にする。ガラクトースを含む培地への細胞の切り替えは、分泌経路内で関連しそして細胞表面に曝露される、Aga1pおよび

A g a 2 p 融合遺伝子産物の生成を誘導する。A g a 2 p - s c F v 融合物の表面局在化を、共焦点の蛍光鏡検およびフローサイトメトリーによって確認している。抗 c - m y c m A b およびフルオレセイン結合デキストラン (F I T C - デキストラン) で同時に標識された細胞を、レーザー走査共焦点鏡検によって試験した (図 8)。関連のないペプチド (すなわち、血球凝集素 (H A) エピトープタグ単独) の提示に指向するベクターを保有するコントロール細胞は、c - m y c エピトープまたは F I T C - デキストランについて特異的な m A b によって標識されない (図 8 A)。

#### 【0142】

対照的に、A g a 2 p - s c F v - c - m y c 融合物を発現する表面提示ベクター p C T 2 0 2 を保有する細胞を、抗 c - m y c 抗体および F I T C - デキストランの両方で同時標識し (図 8 B)、抗原結合部位が非常に大きな高分子に接近可能であることを実証する。これらの菌株の両方を、H A エピトープタグに対して指向された m A b 1 2 C A 5 によって陽性に染色した。インタクトな I g G (1 5 0 k D a) および  $2 \times 10^6$  D a のデキストランポリマーの両方に対する結合についての融合の接近性は、細胞壁成分からの有意な立体障害が存在しないことを示し、このことは、E. c o l i 表面が、高分子拡散に対する障壁を形成するリボ多糖層内に埋め込まれたタンパク質を提示したことに関連して重要な利点である。

#### 【0143】

これらの酵母株の二色フローサイトメトリー分析は、同様に、細胞表面上に接近しやすく提示された s c F v を実証する。陰性コントロールおよび s c F v 提示菌株を、抗 c - m y c m A b 9 E 1 0 および F I T C - デキストランで同時に標識した。二変数ヒストグラムは、4 - 4 - 2 0 提示プラスミドを保有する細胞集団についてのフィコエリトリン蛍光 (m A b 9 E 1 0 結合のレベル) の強度と F I T C 蛍光 (抗原結合) の強度との間における直線的な関係を実証し、一方、コントロール集団はバックグラウンド蛍光を示す (図 9 A および B)。陽性画分内での蛍光強度の分布は、エピトープタグ標識によって決定されるように、提示された融合物の数における細胞と細胞の変動性について、抗原結合シグナルを補正することの重要性を例示する。

#### 【0144】

s c F v 提示細胞集団の公知の抗体結合能力の校正標準との比較による提示効率の定量化は、1 細胞あたり  $3 \times 10^4$  融合より大きな平均値を生じる。A g a 2 p - s c F v 融合を提示する細胞の、標識前のジチオトレイトールでの処理は、F I T C - デキストランおよび m A b 9 E 1 0 の両方による細胞表面の染色を排除し (図 9 C)、これは組換え A g a 2 p サブユニットと A g a 1 p との間の特異的ジスルフィド結合相互作用による、細胞表面への融合タンパク質の付着と一致する。この特徴は、酵母の提示系の別の重要な特徴、すなわち、タンパク質は、単純に、さらなる特徴付けのために還元によって細胞表面から放出され得ることを例示する。

#### 【0145】

4 - 4 - 2 0 / フルオレセイン相互作用の特異性をさらに試験するために、フルオレセインの非蛍光アナログ (5 - アミノフルオレセイン) を使用して、競合的解離アッセイを実施した。これらのデータの解析から、F I T C - デキストランについては  $21^\circ\text{C}$  で  $3.7 \times 10^{-3}$  / 秒の一価の解離速度定数 (d i s s o c i a t i o n r a t e c o n s t a n t) ( $k_{off}$ )、およびフルオレセイン-ビオチンについては  $3.9 \times 10^{-3}$  / 秒の一価の解離速度定数を得る。 $t = 0$  秒に対する指数適合の外挿は、F I T C - デキストラン分子の s c F v との相互作用の平均価が 1.5 より少ないことを示す。同様の結果は、競合物として、フルオレセイン化 (f l u o r e s c e i n a t e) されたインスリン、フルオレセイン結合ウシ血清アルブミン、およびフルオレセイン-ビオチンを使用して得られ、このことは F I T C - デキストランまたはフルオレセイン-ビオチンによる細胞の標識が、提示された融合とフルオレセイン部分との間の特異的な相互作用に起因することを示した。さらに、表面提示された 4 - 4 - 2 0 s c F v 由来のフルオレセイン二ナトリウム塩 (F D S) の解離動力学は、分光蛍光計によって観察されるように、酵母が産生

10

20

30

40

50

する可溶性 4-4-20 s c F v 由来の F D S の解離動力学と整合した。

【0146】

(実施例 22)

(フローサイトメトリーでの細胞選別による提示細胞の濃縮)

酵母表面提示を用いたフローサイトメトリー選別の有効性を試験するために、表面提示ベクターを保有する酵母と関連する選択マーカーを欠損した酵母の混合物を選別し、そして純度をレプリカ平板法によって独立して決定した。重要な濃縮因子 (600 倍まで) を得た (表 I)。従って、稀なクローンは、より小さな集団を提供するために、緩和されたストリンジェンシーかつ高収量で、最初に陽性細胞を濃縮することにより、酵母提示ライブラリーから選択され得、次いで、稀なクローンを単離するための数回通過のよりストリン

10

【0147】

【表 1】

表 I

4-4-20 提示細胞は、フローサイトメトリーにより選択的に濃縮され得る

| 初期画分     | レプリカ  | 選別された画分  | 濃縮度  |
|----------|-------|----------|------|
| w/pCT202 | コロニー  | w/pCT202 | 因子   |
| 14%      | 48/58 | 83%      | 6x   |
| 0.5%     | 87/92 | 95%      | 200x |
| !!-0.1%* | 34/58 | 59%      | 600x |

20

\* 初期画分は、フローサイトメトリーによって推定された。

(実施例 23)

30

(酵母提示の突然変異誘発ライブラリーからの、より低い  $k_{off}$  を有する s c F v 変異体の単離)

E. coli の「突然変異誘発遺伝子」株における増殖によって無作為に突然変異誘発された s c F v 遺伝子の選抜が、記載されている (Low, 1996)。そのような株中の酵母表面提示ベクターの増殖によって作製された、約  $5 \times 10^5$  の 4-4-20 s c F v 変異体のライブラリーを、酵母中で発現した。s c F v ライブラリーを提示する細胞のプールを、F I T C-デキストラン標識した細胞の 5-アミノフルオレセインとの競合による動力的選別に供した。P E フルオレセインに対して最も高い割合の F I T C を示す c-myc 陽性細胞を、フローサイトメトリー選別によって回収し (図 10A)、融合抑制条件下 (グルコース炭素供給源) での再増殖によって増幅し、表面融合提示について誘導し、そして再選別した。F I T C-デキストランによる標識の持続時間の実質的な増加を実証する細胞は、3 回の選別および増幅の後に劇的に濃縮された (図 10)。

40

【0148】

s c F v ライブラリーから選択された 2 つの個々のクローンについての F I T C-デキストラン解離動力学は、野生型 4-4-20 s c F v と比較して 2.9 倍異なった (図 11)。変異体の速度定数は、野生型の  $5.6 \times 10^{-3}$  / 秒と比較して、23°C で  $1.9 \times 10^{-3}$  / 秒 (変異体 4M1.1) および  $2.0 \times 10^{-3}$  / 秒 (4M1.2) であり; 類似の実験から、それぞれ、 $5.0 \times 10^{-3}$  / 秒、 $2.4 \times 10^{-3}$  / 秒、 $2.8 \times 10^{-3}$  / 秒のフルオレセイン-ビオチンについての  $k_{off}$  値を得た。さらに、分光蛍光計によって決定された可溶性フルオレセイン解離動力学は、野生型と比較して両方の変異体につい

50

て2.2倍の改善を示し、そして初期の平衡した蛍光消光実験は、結合反応の親和性定数において類似の改善を示唆する。わずか3倍減少したoff速度(off-rate)でのクローンの単離は、このスクリーニング方法の、正確な定量的識別を達成する能力を実証する。

#### 【0149】

個々に分析される選択された26のクローンのうち、2つは $k_{off}$ において等しく改善され(上記の4M1.1および4M1.2)；2つは、直線的発現レベル/活性関係をゆがめるc-myc標識における減少を伴う野生型 $k_{off}$ を実証し；1つは野生型 $k_{off}$ およびc-myc標識を実証し；そして21個は、野生型より約10倍低い明らかな $k_{off}$ で、一価のFITC-デキストランまたはフルオレセイン-ビオチンではなく、多価の $2 \times 10^6$  Da FITC-デキストランにのみ結合した。アビディティの増加を伴うクローンの濃縮は、多価抗原の使用により生じ(1デキストランあたり約90フルオレセイン)；アビディティ効果は、一価抗原結合を保証するスクリーニング条件の適切な設計によって、効率的に回避され得る。さらに、エピトープタグ変異体の選択は、連続した選別回においてc-mycおよびHAタグ標識による発現レベルを交互に検出することによって、またはscFv遺伝子に対してのみの変化を標的化する二者択一的な突然変異誘発ストラテジーによって排除され得る。

#### 【0150】

これらの結果は、scFvフラグメントが、高分子認識に対して接近可能な様式、および組み合わせのライブラリーの構築およびスクリーニングに受け入れられやすい様式で酵母の表面上に提示され得ることを示す。提示されたscFvは、抗原に特異的に結合する一酵母細胞表面上に提示された機能的抗体フラグメントの第1の証明。インビトロ抗体親和性成熟のためのライブラリー方法、および他の哺乳動物タンパク質の提示のためのライブラリー方法に対してのこの提示系の適用は、ファージディスプレイ、細菌性表面ディスプレイ、および酵母ツーハイブリッド方法のような現存の技術に対して重要な補完的代替法である。実際、最適化されていないスクリーニング条件下での比較的小さなライブラリーからの改善されたフルオレセイン結合scFv変異体の回収においての、酵母ディスプレイ系の全くの最初の試みの成功は、この技術の頑健性を明らかに実証する。表面につながれたscFvの実証された高度に定量的な動力学的解析および類似した結合特性を有するクローンの良好な識別は、タンパク質の組み合わせ最適化についての酵母ディスプレイの重要な潜在性をさらに証明する。

#### 【0151】

(実施例24)

(酵母提示系におけるT細胞レセプターへの抗体の提示)

本明細書において、T細胞レセプターのVb8領域について特異的なscFv(KL16)(Roehmら、1985)を、酵母提示系において発現した。このscFv-KJ16は、TCRリガンド(例えば、スーパー抗原ブドウ球菌エンテロトキシンB(Chorら、1995))の認識を競合的にブロックすることによって、T細胞の活性を阻害する。このscFvの親和性改変体は、増強したT細胞阻害を示し得るため、scFv-KJ16のより高い親和性形態を操作する際の、この酵母提示系の使用を試験した。

#### 【0152】

蛍光的に標識された抗原である、Vb8単鎖TCR(Schlueterら、1996)への細胞表面scFvの平衡結合に基づくスクリーニングを開発した。2チャンネルのフロー選別を使用し、選択はまた、scFvのカルボキシ末端にある10残基のc-mycタグへの蛍光的に標識された抗c-myc抗体の結合に基づいた。TCRに対してより高親和性を有するscFv改変体または抗c-myc抗体についてより低い親和性を有するscFv改変体を単離した。期待通り、前者はCDRにおける変異を有し( $V_L$  CDR1)、そして後者はc-mycエピトープにおいて変異を有した。従って、これらの発現は、酵母の提示アプローチが、より高い親和性のscFvを単離することか、または特定のMabによって認識される提示タンパク質のエピトープを同定することのいずれかのた

めに使用され得ることを実証する。

#### 【0153】

(プラスミドおよび菌株)

改変された205リンカー(Chora, 1995)によって結合されたscFv-KJ16<sub>V<sub>L</sub></sub>およびscFv-KJ16<sub>V<sub>H</sub></sub>遺伝子を、製造者のプロトコルに従って、ベクターpCR-Script(Stratagene, La Jolla, CA)中に、PCRによってサブクローニングした。c-mycエピト-タグを、scFvのカルボキシ末端に含ませた。scFvを含む約800bpのNheI/XhoIフラグメントを、pCR-Scriptから切り出し、そして9残基のエピト-タグ(HA)を含む酵母表面表示ベクターpCT202および誘導性GAL1プロモーターの下流のAGA2オーブンリーディングフレーム中に連結した。得られた構築物を、GAL1プロモーターによって制御された、染色体に組み込まれたAGA1を含む*S. cerevisiae*菌株BJ5465(*ura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4::HIS2 prbD1.6 can1 GAL; Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA*)中に、GietzおよびSchiestlの酢酸リチウム(LiAc)形質転換法(Gietzら, 1995)によって形質転換した(菌株EBY100)。

10

#### 【0154】

(実施例25)

(酵母表面上のscFv-KJ16の誘導および検出)

20

pCT202/scFv-KJ16で形質転換された酵母細胞を、3mlの選択的グルコース培地SD-CAA(グルコース 2wt%、Difco酵母窒素塩基 0.67wt%、カサミノ酸 0.5wt%)中で振盪しながら、30℃で一晩増殖させた。約18~20時間後、組換えAGA1+AGA2-scFv発現を、5mlの選択的ガラクトース培地(SG-CAA、ここで2%のガラクトースは、SD-CAA中のグルコースと置換する)中で振盪しながら、20℃で誘導した。培養物を、約20~24時間(1~2増増)後に、遠心分離によって収集し、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.05%アジドを含むPBS(10mM NaPO<sub>4</sub>、150mM NaCl、pH7.3)で洗浄し、そして25mlの10mg/ml抗-HA Mab 12CA5(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)、抗c-myc Mab 9E10(原腹水の1:100希釈; Berkeley Antibody Co., Richmond, CA)、またはE. coliで発現される封入体から調製されるビオチン化sc-TCR(Schodinnら, 1996)[約360nM]とともに、氷上で45分インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、そしてFITC標識化F(ab')<sub>2</sub>ヤギ抗マウスIgG(1:50; Kirkegaard and Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD)またはストレプトアビジン-フィコエリトリン(SA-PE)結合体(1:100; Pharmingen, San Diego, CA)のいずれかとともに、氷上で30分インキュベートした。標識化酵母細胞を、Flow Cytometry Center of the UIUC Biotechnology Centerにおいて、Coulter Epics XLフローサイトメーターで分析した。イベント速度は、約250細胞/秒であった。10,000イベントについてのデータを収集し、そしてこの集団を、光散乱(サイズ)に従って制御(gate)して、細胞塊の分析を阻止した。これらの条件をまた使用して、scTCRの種々の希釈液でscFv-KJ16酵母をインキュベーション後に、等温で結合する平衡な抗原を産生した。散乱分析を行い、ビオチン化scTCRの推定濃度およびフローデータから直接得られた平均蛍光単位を使用して、K<sub>D</sub>値を決定した。

30

40

#### 【0155】

(実施例26)

(scFv-KJ16ランダム変異ライブラリーの生成)

およそ50ngのpCT202/scFv-KJ16を、製造者のプロトコルに従って

50

、E. coli XL1-Red細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) 中に形質転換した。SOC培地中での1時間の誘導に続いて、この回収物を、2000 rpmで5分間遠心分離し、そして500mlの液体LB培地 (100mg/mlのアンピシリンおよび50ml/mlのカルベニシリンを含む) (LB-AMP100-CARB50) 中で再懸濁した。この再懸濁液を、50mlのErlenmeyerフラスコ中で、15mlのLB-AMP100-CARB50に添加し、そして振盪しながら37℃で増殖した。この培養物を、中間対数期 (mid-log phase) ( $OD_{600}$  約0.2~0.4) において、新鮮な15mlのLB-AMP100-CARB50を補充し、次いで、飽和まで増殖させた ( $OD_{600}$  約1.0~1.1; これを、変異の1「サイクル」または一回とみなした)。この培養物の小画分 (0.75ml) を、次のサイクル (15mlのLB-AMP100-CARB50) に添加した。6サイクルの増殖後、Wizard Miniprep (Promega, Madison, WI) DNAプラスミドの調製を、15mlの培養物で実施した。LiAc法 (Gietzら、1995) を使用して、6サイクル目からのおよそ4.5mlのpCT202/scFv-KJ16 DNAを、酵母株E BY100の3つの管の各々の中で形質転換した。この3つの反応物をプールし、そして1mlのddH<sub>2</sub>O中に再懸濁後、1/2000のプールを選択プレート上に置き、形質転換効率を決定した。50mlのSD-CAAに、この培養物の残留物を播種し、振盪させながら30℃で一晩増殖させ、 $OD_{600}=0.05$ まで継代し、そして $OD_{600}>1.0$ まで30℃で一晩増殖させた。次いで、5mlのSG-CAAを $OD_{600}$  約0.5に対して播種し、そして $OD_{600}=1.0\sim2.0$ まで振盪させながら30℃で一晩増殖させた。

#### 【0156】

(実施例27)

(FACSによるscFv-KJ16変異ライブラリーの選択)

細胞を、上記のように、抗c-myc Mabおよびビオチン化scTCR (約10nMの濃度で使用される) で二重標識した。この反応容量を調整し、表面のscFvに対して約10倍モル濃度過剰の抗原 (scTCR) を維持した。サンプルを、図3に示されるような分離窓 (sort window) を備えたCoulter 753ベンチ上で、そして4,000細胞/秒のイベント速度で分離した。総数 $8\times10^7$ 細胞を、収集された集団の0.1~0.4%を有する、最初の分離回の間に調べた。収集された細胞をSD-CAA中で30℃で再増殖させ、そして次の分離する回の前に、SG-CAAに切り替えた。4回の分離の総量を、最初の2回の分離を富化様式 (全てのポジティブクローンの高回収率) で行い、そして最後の2回の分離を精製様式 (同時発生的なネガティブ細胞の拒絶) で行った。最後の分離の直後に、収集された細胞を再分離し、そして選択プレート上に置いて、個々のクローンを単離した。

#### 【0157】

(実施例28)

(変異scFv-KJ16遺伝子のレスキューおよび配列決定)

scFv-KJ16酵母由来のプラスミド (野生型および2つの変異体) を、細胞をボルテックスの代わりに2分間ビーズビーター (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK) を用いて破壊したこと以外は、Ward (Ward, 1991) に記載されたプロトコルに従ってレスキューした。細胞を1分間遠心分離し、そして上相 (水相) を収集した。Wizard (登録商標) ミニプレップキット (Promega, Madison, WI) を使用してプラスミドDNAを調製し、そしてE. coli DH5 $\alpha$ コンピテント細胞 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) を、CaCl<sub>2</sub>法を使用して、1mlのDNA調製物で形質転換した。形質転換物を、LB-AMP50上にプレートした。野生型scFv-KJ16および2つの変異体 (mut4およびmut7) の配列決定を、表示ベクターのscFvに隣接するプライマーおよび蛍光自動化配列決定装置 (Genetic Engineering Facility of the UIUC Biotechnology Center) を

使用して行った。

#### 【0158】

(実施例29)

(酵母細胞表面 s c F v による T C R 結合)

モノクローナル抗 T C R 抗体 K J 1 6 は、T C R の V b 8 鎖上の立体構造的エピトープを認識する (B r o d n i c k i ら、1996)。K J 1 6 は、T 細胞の V b 8 集団を標的および欠失するための試みを含む、マウスにおける多くのインビボの研究に使用されてきた (B o r n ら、1987、M c D u f f i e ら、1986、R o e h m ら、1985)。これらの効果を媒介上で、抗体親和性を変化させる可能な効果を評価するために、T C R について増加する親和性を有する K J 1 6 改変体を同定するための酵母ディスプレイシステムの使用を試験した。この抗 T C R 抗体 K J 1 6 由来の s c F v 遺伝子は、以前にクローニングされ、そしてこの s c F v タンパク質は、K J 1 6 F a b フラグメントとほぼ同じ親和性 ( $K_D$  約 120 nM) を示した (C h o ら、1995)。

#### 【0159】

酵母細胞表面上で発現される A g a 2 p アグルチニンサブユニットを有する融合ポリペプチドとして発現されるために、s c F v - K J 1 6 コード配列をサブクローン化した。この融合ポリペプチドは、s c F v の N 末端に血球凝集素 (H A) エピトープタグを含み、そしてカルボキシ末端に c - m y c エピトープタグを含む。これらのエピトープの含有は、モノクローナル抗 H A (12 C A 5) 抗体および抗 c - m y c (9 E 1 0) 抗体を、抗原結合活性と無関係に、全長 s c F v の表面発現を定量するためにフローサイトメトリーでを使用することを可能にする。このような規格化は、融合ポリペプチドの表面レベルにおいて、細胞から細胞 (c e l l - t o - c e l l) の可変性の効果を明らかにすることを助ける。以下に議論されるように、2つの独立エピトープタグの有用性はまた、変異体に結合するリガンドについてスクリーニングすることを所望されなくてもよい、個々のエピトープ変異体の選択について制御し得る。細胞表面 s c F v の結合特性を評価するために、可溶性単鎖 V b 8 - V a 3 T C R (S c h o d i n ら、1996) をビオチン化し、そして結合されたリガンドを、フィコエリトリン-ストレプトアビジン結合体を用いて検出した。

#### 【0160】

図12は、s c F v - K J 1 6 / A g a 2 プラスミドで形質転換された酵母が、H A エピトープ (図12A) および c - m y c エピトープ (図12B) を発現したことを示す。A g a 2 p / H A 発現ベクターのみでトランスフェクトされたコントロール酵母は、抗 H A M a b についてポジティブであったが、抗 c - m y c 抗体についてはポジティブでなかった。非蛍光集団における細胞の画分は、プラスミドの安定性および培養増殖期に依存することが見出されたが、関係する生理学的なプロセスは未知である。それにも関わらず、20℃まで誘導温度が減少して、そして2つの培養物が倍増する時間未満まで誘導時間が減少して、s c F v - K J 1 6 を表示する細胞の75%より多くを有する集団を産生する。s c F v - 4 - 4 - 2 0 は、ほぼ同じポジティブ細胞の比率を有するこの系を用いて表示された。

#### 【0161】

細胞表面 s c F v に対するビオチン化 s c T C R の結合はまた、フローサイトメトリーによって検出された (図12C)。発現された活性 s c F v が抗 H A 抗体および c - m y c 抗体を用いて検出されるものと同様であった細胞の画分は、全長の発現、正しく折り畳まれた s c F v と一致した。さらに、2色のヒストグラムは、H A エピトープ表示および c - m y c エピトープ表示の両方と結合する s c T C R の強固な相関を実証した。ビオチン化 s c T C R 結合は、s c F v - K J 1 6 を表示する酵母に対して特異的であり、そして過剰な可溶性 K J 1 6 I g G によって完全に阻害された (図12D)。

#### 【0162】

表面に表示された s c F v - K J 1 6 のおよその親和性を、ビオチン化 s c T C R の変化した濃度を有する全細胞の滴定によって、細胞壁上でインサイチュにおいて決定した。

平衡結合を、フローサイトメトリーにより細胞に結合した s c T C R を分析することによって測定した。結合データのスキッチャード分析 (図 1 3) によって 5 0 0 n M の  $K_D$  を得、これは可溶性 s c F v - K J 1 6 について観察された  $K_D$  の 5 倍以内であった。 $K_D$  は、過大評価でありそうな、1 0 0 % の s c T C R が活性であったという仮定の下で計算されたので、このような一致は妥当である (すなわち、2 0 % のみが正確に折り畳まれた場合、表面 s c F v は約 1 0 0 n M の  $K_D$  を有する)。以前に、可溶性 E . c o l i 封入体から精製された s c T C R の実質的な画分は不正確に折り畳まれることが、見出された (S c h o d i n ら、1 9 9 6)。

#### 【0163】

(実施例 3 0)

(蛍光活性化細胞選別による、変異された s c F v - K J 1 6 / 酵母の選択)

E . c o l i 変異株を使用して、ファージディスプレイによる親和性成熟について s c F v を変異誘発した (L o w ら、1 9 9 6)。このアプローチは、酵母ディスプレイを使用するフルオレセインについての高い親和性を用いて、s c F v - 4 - 4 - 2 0 の変異体を同定することにおいて首尾良いものであった。この変異誘発アプローチの長所は、その単純性、すなわち、E . c o l i の形質転換および細胞増殖のみを必要とすることである。さらに、この E . c o l i 変異誘発遺伝子系統は、発現プラスミドを介して変異を導入し、そして従って、結合の特徴を決定するために重要であると考えられる、s c F v の一部に対して偏って変化しない。変異誘発遺伝子系統の変異誘発のこの局面が都合良いかどうかは、利用可能な構造情報に基づいて、抗原結合に影響を与え得る重要な残基を同定する能力に依存する。公表された親和性変異研究の試験は、このような残基の位置が (一般に非接触残基において)、まだ演繹的に予測可能でないことを示唆する (H a w k i n s ら、1 9 9 3、P a t t e n ら、1 9 9 6、S c h i e r ら、1 9 9 6、T h o m p s o n ら、1 9 9 6、Y a n g ら、1 9 9 5、Y e l t o n ら、1 9 9 5)。

#### 【0164】

s c F v - K J 1 6 に対するこのストラテジーを適用するために、s c F v - K J 1 6 / A g a 2 プラスミドを、6 サイクルの増殖について、E . c o l i 変異誘発遺伝子系統 X L 1 - R e d (S t r a t a g e n e) において増殖させた。この手順が、2 0 0 0 b p における 1 サイクルあたりの変異速度に基づいて、s c F v コード配列において平均 2 ~ 3 点の変異を導入することを予測した。得られたプラスミド調製物で、およそ  $3 \times 10^5$  の形質転換体のライブラリーサイズを産生する酵母を形質転換した。他の研究において、より大きなライブラリー ( $10^7$ ) は、さらなる形質転換手順の最適化によって、および独立した形質転換体をプールすることによって得られた。この数は、ライブラリー構築物についてサイズの上限を示すのではなく、さらなる最適化の試みとして、スケールアップが直接適用され得る。

#### 【0165】

変異誘発された酵母ライブラリーを、抗 c - m y c 抗体結合 (F I T C) およびビオチン化 s c T C R 結合 (P E) について 2 重染色を使用して、4 回の首尾良い分離のサイクルおよび増幅に供した。ビオチン化 T C R を、野生型 s c F v - K J 1 6 / 酵母による結合の検出可能なしきい値を少し下まわって産生される 1 : 5 0 0 0 希釈液 (約 1 0 n M) で使用した (図 1 3)。1 回の分離サイクル後 (図 1 4 A) および 4 回の分離サイクル後 (図 1 4 B) の変異された s c F v - K J 1 6 サンプルの 2 つのチャンネル蛍光プロフィールを示す。図 1 4 に示された対角窓上に蛍光を示す細胞を、再増殖のために収集した。この対角窓の原理は、任意の所定の回において、分離基準が表示されたポリペプチドの融合あたりの抗原結合に基づくことにあった。例えば、より高い P E 蛍光レベル (すなわち、s c T C R 結合) のみに基づく選択は、より高い親和性 s c F v を有するこれらの変異体のみならず、酵母細胞あたりの s c F v のより高い密度を表示する変異体を含んだ。後者の変異体は、原理的に、表面発現可変性について規格化するために 2 つのパラメーターの 1 つとして抗 c - m y c 抗体を誘導することによって除去される。最初の 2 つの分離回を、富化様式において実施し、最も高い蛍光を有する約 0 . 5 % の細胞集団を単離し、そし

10

20

30

40

50

て一致（同時に分離された液滴における2つの細胞）を避けるために分離ソフトウェアを設定しなかった。この最後の2回の分離回を、高い一致を避けるために、精製のために実施した。4サイクルの後、細胞を直ちに再分離し、そしてプレートした。10のコロニー（mut 1～10）を、さらなる分析のために選択した。

#### 【0166】

（実施例31）

（変異scFv-酵母の特徴付け）

10の選択された変異体の各々を、抗HA抗体、抗c-myc抗体、およびビオチン化TCRで標識し、そしてフローサイトメトリーによって分析した（図15）。予測され得るように、1つのクローン（mut 6）は、野生型scFv-KJ16/酵母に表現型的に類似して現れた。別のクローン（mut 7）を、より高いTCR結合レベルを示すために見出し、結果を、いくつかの独立した滴定によって確認した。最終的に、多くの変異体（mut 1～5、8、9）は、抗HA抗体またはビオチン化scTCRの結合と比較された抗c-myc抗体に対する減少された結合を一貫して示した。このクラスの変異体の存在は、図14に示されるように、対角線上の分離窓の詳細によって説明され得る。細胞は、定常c-myc（FITC）シグナルで結合するscTCR（PE）を増加させることによってか、または代わりに定常scTCR（PE）シグナルで結合するc-myc（FITC）を減少させることによってのいずれかによって分離窓に「移動」し得る。これらの変異体の選択は、融合物中のエピトープタグである、HAおよびc-mycの両方を使用することによって容易に回避され得る。従って、各回の分離におけるこれらの各々のエピトープタグの標識を代替することによって、エピトープタグの1つへの減少された結合は、この場合におけるように、連続した分離回において富化されない。

#### 【0167】

推定的なc-mycエピトープ変異体（mut 4）、scTCR結合変異体（mut 7）および別の変異体（mut 10）の蛍光のヒストグラムを、野生型scFvと比較した（図16）。mut 4（図16Aおよび16B）は、抗c-myc標識における減少を示し、mut 7は、scTCR結合の増強を示し（図16Cおよび16D）、そしてmut 10は、どちらにおいても変化を示さなかったが、ポジティブであった細胞の画分は、野生型scFvに対して、より高かった（図16Eおよび16F）。図16Eおよび16Fにおいて示されるように、ほぼ100%のmut 10細胞は、試験された各々の薬剤についてポジティブであった。これは、細胞表面scFvのレベルを減少させる、2つの別個の細胞集団を示す野生型scFv-KJ16酵母と似ている各々の他の変異体（例えば、mut 4およびmut 7を参照のこと）と対比する。mut 10の増強されたプラスミド安定性およびmut 10からE. coliへの発現プラスミドをレスキューするために繰り返される失敗は、染色体の組込みがこの変異体プラスミドで起こったことを示唆する。従って、mut 10の変化された表面発現の特徴付けは、発現プラスミドの組込みの結果であると思われる。

#### 【0168】

scTCRに対する結合親和性を、可溶性ビオチン化scTCRを用いる滴定によって、図16に示される変異体について評価した（図17）。このデータの非直線の曲線適合性は、mut 4およびmut 10について変化していない $K_D$ を示すが、mut 7については親和性が3倍増加することを示す。mut 10の平均蛍光における増大は、図16Eおよび16Fにおいて明らかなように、増大するscTCR結合よりむしろ、この分布における非蛍光端部の非存在のためである。

#### 【0169】

（実施例32）

（変異体scFvの配列決定）

酵母ディスプレイプラスミドにクローニングされたwt-scFv-KJ16ならびに酵母由来のプラスミドのレスキューに従うmut 4およびmut 7のヌクレオチド配列を、決定した（図18）。野生型scFv-KJ16は、当初公表されたscFv配列（C

h o ら、1995) から、2つのサイレント変化を含んだ。これらは、酵母ディスプレイプラスミドへの s c F v のクローニングの前に、PCRによって導入され得た。mut 4 配列は1つの変異を含み、そしてmut 7は2つの変異を含んだ。mut 4における唯一の変異は、上記のように抗c-myc抗体による結合の減少と一致する、c-myc エピトープに存在した (L y s から G l u)。mut 7は、V<sub>L</sub>領域のフレームワーク領域におけるA r g からL y s への変化およびV<sub>L</sub>鎖のCDR1におけるS e r からA r g への変化を含んだ。後者の変異は、mut 7について観察される、より高い結合親和性に一致した。

#### 【0170】

ファージディスプレイは、より高い抗原結合親和性を有するs c F v の選択ならびに未処置のライブラリー由来の新規なs c F v の単離のため使用された (H o o g e n b o o m、1997)。しかし、部分的には、毒性、コドンの偏り、または折り畳みの問題のために、E. c o l i におけるいくつかの哺乳動物タンパク質の発現において差異が存在した (例えば、K n a p p i k および P l u c k t h u m、1995、U l r i c h ら、1995、W a l k e r および G i l b e r t、1994)。酵母の発現は、タンパク質が真核生物の翻訳後修飾 (例えば、グリコシル化および効率的なジスルフィド異性化) を伴って発現され得ることの利点を提案することによって、潜在的に、いくつかのこれらの問題を未然に防ぎ得る。さらに、ファージディスプレイは、一般に、5倍未満で異なる結合親和性を有する変異体間を識別するための、定量的な精度を有さない (K r e t z s c h m a r ら、1995)。対照的に、蛍光標識および分離は、3倍のみ増大した親和性を有する4-4-20 s c F v クローンの単離を可能にした。抗原結合親和性の最大変化が、より小さな効果を各々有する点変異の指向された組合せによって生じる (H a w k i n s ら、1993、S c h i e r ら、1996、Y a n g ら、1995) ので、親和性におけるわずかな改良を同定するための能力は、有意な値であり得る。これらの利点を考慮して、抗T細胞レセプターs c F v の親和性の成熟についての酵母ディスプレイシステムの使用が、開発された。

#### 【0171】

マウスTCRのVb8領域に対して特異的であるs c F v を、インビボでT細胞標的特性を究極的に増強し得た抗TCR試薬を生成するために使用した (C h o ら、1997、C h o ら、1995)。活性なs c F v を、ネイティブs c F v に類似する親和性を有する、酵母の表面上のA g a 2 p 融合タンパク質として発現させた (s c F v についての120 nMと比較して、約500 nM)。より高い親和性s c F v を選択するために、E. c o l i のDNA修復欠乏性菌株を用いるランダム変異誘発は、6回の増殖サイクル後に、1000塩基対あたり約2~3の頻度で変異を生じた。蛍光性標識化s c TCRおよび抗c-myc抗体を用いるフローサイトメトリーを使用して、増大されたs c TCR親和性を有する細胞ディスプレイs c F v を分離した。抗c-myc抗体は、より高い親和性のためではなく、s c F v -c-myc融合物のより高い細胞表面発現のために増大されたTCR結合を有する変異体の制御する、選択のための第2の基準として含まれた。複数回の選択後、3つの変異表現型クラスを観察した：1) c-myc抗体に対する結合を減少したが、s c TCR結合は変化しない (mut 1~5、8、9)；2) c-myc標識を変化せずにs c TCRに対する結合を増強した (mut 7)；および3) 染色体ベクター組込みによる、より高効率の表面発現 (mut 10)。

#### 【0172】

mut 4およびmut 7によって示される変異体のクラスの単離は、図14に例示される選択基準から予測され得る。すなわち、s c TCR (P E) シグナルの増加またはc-myc (F I T C) シグナルの減少のいずれかが細胞を分離窓中に置くので、対角線上の分離窓の境界上で同定された任意の変異細胞は、mut 4およびmut 7について記載されたいずれかの特性によって説明され得る。このことは、2つの独立したエピトープタグの利用性のためであるが、しかし、このアプローチについて実質的な問題を示していない。変化する分離サイクルにおいてHAおよびc-mycタグを利用することによって、1

つのエピトープタグの減少された標識についての進行性の富化は、起こるべきではない。

#### 【0173】

エピトープタグ変異体の単離は、酵母表面ディスプレイについてさらなる適用を強調する：モノクローナル抗体によって認識されるエピトープのマッピング。ペプチドライブラリーを使用する代替的なストラテジーが、この点における直鎖状エピトープについて首尾良いが、本明細書に記載されるアプローチは、立体配座的なエピトープに対して伸長され得る。従って、正しく折り畳まれたタンパク質は、酵母細胞上に表示され得、そして本明細書で記載されるような直接のランダム変異誘発は、隣接していないポリペプチド配列からエピトープ残基を同定するために適用され得る。非折り畳みタンパク質が保持され、そして真核生物分泌特性制御装置によって分解され、そして種々の発現レベルがHA標識またはc-myc標識によって同定されるので、エピトープ残基の誤った同定は、この手順によって最小化されるべきである。この記載されたアプローチは、アラニンスキャン変異誘発よりも実質的に容易である。

10

#### 【0174】

c-myc標識あたりのmut10の平均単鎖T細胞レセプター標識が変化されなかったので、mut10がこのスクリーンにおいて富化された理由は、明らかでない。明確に標識化された細胞のより高い画分が、分離窓へのランダムな過剰のために、富化についてこのクローンを偏らせることは可能である。いかなる場合においても、scTCR標識またはc-myc標識のいずれもが、このクローンについて異なず、そしてこの発現プラスミドの構造的再配列は、この発現プラスミドが染色体への組込みを有することを示す。

20

#### 【0175】

mut7における唯一の独特なCDR変異の同定は、この変異体scFvがT細胞レセプターに対する結合を増強したという知見と一致する。T細胞レセプターに対する、より高い親和性を有するscFvのみ（そしてc-myc変異体ではない）を得るための将来の試みは、scFvの細胞表面レベルについて制御するために抗HA抗体および抗c-myc抗体を用いる、代替の選択を含む。このストラテジーは、選択された変異体間のDNAシャッフリング技術（Stemmer, 1994）と組合わせて、野生型scFv（ $K_D$  約120nM）よりも、著しく高い親和性を有するscFv-KJ16の単離を可能にすべきである。このような変異体KJ16のscFvを使用して、T細胞シグナル伝達の反応速度論的な現象ならびに二抗原特異的抗体を介するT細胞媒介性殺傷の標的化を試験し得る（Chora, 1997）。

30

#### 【0176】

本発明は、細胞表面ディスプレイを介してアフィニティー成熟させた抗体の意図的な単離を実証する。上記のように、オフ速度（off-rate）選択を用いて、解離速度が減少した変異体を同定し、それゆえ、scFv-KJ16の発現において、平衡化した抗原結合を用いた。これらの2つのアプローチは相補的であり、そして出発scFvのアフィニティーに依存する。1nMを超える $K_D$ については、反応速度の変動の有効な識別を可能にするには解離速度が迅速すぎるので、可溶性標識抗原を用いての平衡化のストラテジーを遂行することが合理的である。さらに、これらのより低いアフィニティーでは、大量の可溶性抗原は、もし、提示されたscFvが、約1~10nMの有効濃度で存在するならば、標識反応混合物から実質的に欠乏していない。対照的に、強く結合している抗体（例えば、4-4-20（ $K_D=0.4$ nM））は、不便な大きな標識容量を用いない限り、可溶性の標識抗原を $K_D$ 未満の濃度で欠乏する。しかし、このような強く結合している抗体についての解離反応速度は、手動での混合手順を介しての、クエンチング、選別、および分析を可能にするのに十分にゆっくりである。従って、ストラテジーを用い得、それによってscFvは、約1nMの $K_D$ になるまで、平衡化に基づくスクリーニングおよび変異誘発の繰り返しを介して、続いて、オフ速度スクリーニングおよび変異誘発の繰り返しにより、アフィニティー成熟させて、なおさらなる改良を入手し得る。

40

#### 【0177】

細胞表面ディスプレイおよびフローサイトメトリースクリーニングは、反応速度結合パ

50

ラメーター（例えば、 $K_D$ および解離速度定数（ $k_{diss}$ ））に基づくライブラリー由来のクローンの選択を可能にする。次いで、選択された変異体の結合パラメーターは、図17に示すように、サブクロニングまたは可溶性発現の必要性を伴わずに、ディスプレイ形式において、インサイチュで定量的に見積もられ得る。対照的に、ファージディスプレイされた抗体の選択は、しばしば、 $pH 2$ および $8 M \text{ GuHCl}$ という程度までですらある、漸増的なストリンジェントの洗浄条件および溶出条件を含む。このようなストリンジェンシー選択は、定量的な精度が乏しく、そして結合パラメーター（例えば、 $K_D$ または $k_{diss}$ ）と環境条件または生理学的条件下で常に直接的に関連するとは限らない。

#### 【0178】

細菌細胞表面ディスプレイ系は、抗体および他のタンパク質の操作について記載された（Gunneriussonら，1996）。これらの系は、本発明の酵母ディスプレイ系のいくつかの利点を保有するが、これらは、真核生物分泌経路の翻訳後プロセッシング能力を提供しない。細菌上にディスプレイしたタンパク質への巨大分子の接近はまた、リポ多糖層により提示される拡散障壁により制限され得る（Roberts，1996）。この理由のために、モノクローナル抗体で標識した可溶性タンパク質抗原またはエピトープタグに対する結合は可能ではない。培養した哺乳動物細胞における表面ディスプレイ系もまた利用可能であるが、これらの系についてのコンビナトリアルライブラリーの構築およびスクリーニングは、酵母についてのように迅速でないかまたは用途が広いわけではない。

#### 【0179】

かなり小さなライブラリー（ $3 \times 10^5$ ）をスクリーニングして、本明細書中に記載した変異体を単離した。これは、酵母のライブラリーサイズについての上限を表さない。 $10^7$ クローンを有する酵母ライブラリーが構築されており、そして必要な場合には、さらにライブラリーサイズにおける増加が達成できる。本発明は、酵母表面ディスプレイを用いて、増加したアフィニティを有する変異  $scFv$  を単離し得ること、および変化した  $mAb$  エピトープを有する変異体が所望により富化または排除され得ることを示す。さらに、 $K_D$ は、サブクロニングおよび可溶性発現を必要とすることなく、ディスプレイ形式においてインサイチュで見積もられ得る。スクリーニング条件の定量的最適化は、本方法におけるさらなる改良を可能にする。酵母表面ディスプレイの適用は、抗体アフィニティ成熟を超えて、反応速度および平衡結合パラメーターに直接基づく、 $cDNA$  発現ライブラリーからの結合ドメインの単離、または変異レセプターもしくはリガンドの単離にまで広がる。

#### 【0180】

（実施例33：酵母ディスプレイ系におけるT細胞レセプターのディスプレイ可能性および発現）

本発明はまた、例えば、ペプチド-MHC複合体またはスーパー抗原に対する改良された結合特性に関して、T細胞レセプターを操作するための新規なプロセスに関する。本発明は、酵母表面ディスプレイライブラリー形式においてT細胞レセプターを提示するための方法を確立する。この方法は、以下のために用いられ得る：1）一般に、表面または酵母において通常発現されないポリペプチドを発現するため、および2）より詳細には、選り抜きのリガンドについて、より高いアフィニティのT細胞レセプターを操作するため。

#### 【0181】

タンパク質操作は、増加したアフィニティ結合の合理的かつ指向的な操作を可能にする開発のレベルには到達していない。結果として、大きな変異集団から改良された変異体を同定するアプローチが開発された。最も広範に用いられるアプローチは、「ファージディスプレイ」であり、これは、抗体を、特に、連結した「単鎖」抗体の形態で操作するために使用されてきた。しかし、ファージディスプレイ方法論は、単鎖T細胞レセプター（ $s cTCRs$ ）を好首尾に提示できなかった。これは、単離された単鎖T細胞レセプターの折畳みが、 $CD3$ 複合体の他の成分および真核生物小胞体のタンパク質折畳み機構の非

存在下では、非常に非効率的であることによる可能性が最も高い；細菌のペリプラズムは、これらのフラグメントを効果的に折り畳むことができない。

#### 【0182】

酵母表面に提示されたT細胞レセプターの確立を、図19～21に図示する。重要な改良は、この系において提示され得る変異T細胞レセプターを単離するために行われた。野生型T細胞レセプターは、T細胞レセプターの天然のコンホメーションに特異的である抗体（1B2）による結合が存在しないことによって示されたように、機能的に提示されない（図19）。T細胞レセプターを変異させることおよび1B2結合についてライブラリーをスクリーニングすることにより、酵母において提示された変異単鎖T細胞レセプターが同定された。これは、改良された結合特性を有する変異単鎖T細胞レセプターを単離するために現在用いられ得る系を確立する。

10

#### 【0183】

本発明は、T細胞レセプターを発現するのに好首尾な酵母細胞－表面ディスプレイ系を提供する。第2に、全長T細胞レセプターの発現は、T細胞レセプター遺伝子をランダムに変異誘発し、次いで表面発現についてフローサイトメトリーによって選択した後にのみ達成され得る。この方法は、T細胞レセプター中の発現欠損を「訂正」する進化的アプローチを利用した。

#### 【0184】

この同じアプローチは、その野生型形態では効率的に提示されない任意のポリペプチドに適用され得る。「表示可能性」についての選択は、実施例33～37に記載されるように、T細胞レセプターについての実施を減少させた。一旦提示可能な変異バージョンのポリペプチドが得られたら、次いで、これらのバージョンは、実施例1～32に記載される改良された結合特性についてのスクリーニングプロセスに供され得る。

20

#### 【0185】

改良されたT細胞レセプター分子は、癌、敗血症、および自己免疫疾患（例えば、関節炎、糖尿病、または多発性硬化症）の治療において有用である。例えば、可溶性形態の高アフィニティーT細胞レセプターは、有害なT細胞媒介自己免疫疾患のアンタゴニストとして作用し、それにより、これらの疾患のための潜在的な処置を提供する。類似のストラテジーが、可溶性腫瘍壊死因子レセプター（TNF-R）について好首尾で用いられた。そしてこのレセプターの形態は、臨床試験においては、敗血症性ショックおよび慢性関節リウマチについてである（Moosmayerら、1995）。

30

#### 【0186】

本発明の方法では、酵母表面ディスプレイは、単鎖T細胞レセプターがMHCペプチド複合体またはスーパー抗原に対して高アフィニティーで結合するように操作されることを可能にする。このような分子は、種々の医学的用途を見出す。例としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：1）自己免疫疾患（例えば、関節炎、糖尿病、および多発性硬化症）における健常組織に対する不適切なT細胞攻撃を妨害すること；2）T細胞と相互作用して大量の炎症性反応を導く細菌性スーパー抗原に起因する敗血症性ショックを妨害すること；および3）高アフィニティーT細胞レセプターを抗CD3二重特異性薬剤とともに用いてT細胞を再度癌性細胞に攻撃させることによる、T細胞レセプターリガンド（例えば、特異的腫瘍ペプチド／MHC複合体）を保有する腫瘍細胞の破壊。

40

#### 【0187】

（プラスミドおよび株）

単鎖TCR遺伝子（修飾された205リンカーにより連結されたV（8.2－リンカー－V（3.1）遺伝子（Chora、1995））を、製造業者のプロトコルに従って、PCRによってベクターpCR-Script（Stratagene, La Jolla, CA）にサブクローニングした。6-Hisエピトープタグを、精製目的のためにscTCRのカルボキシ末端に含めた。scTCRを含有する約800-bpのNheI/XhoIフラグメントを、pCR-Scriptから切り出し、そして9残基のエピトープタグ（HA）および誘導性GAL1プロモーターの下流にAGA2オープンリーディング

50

フレームを含む酵母表面ディスプレイベクター pCT202 に連結した。得られた構築物を、Gietz および Schiestl (Gietz ら, 1995) の酢酸リチウム (LiAc) 形質転換方法により、GAL1 プロモーター (株 EBY100) により制御される、染色体に組み込まれた AGA1 を含有する *S. cerevisiae* BJ5465 株 (aura3-52 trp1 leu2D1 his3D200 pep4::HIS2 prbD1.6 can1 GAL; Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA) に形質転換した。

#### 【0188】

(実施例 34: scTCR ランダム変異体ライブラリーの生成)

約 50 ng の pCT202/scTCR を、*E. coli* XL1-Red 細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) 中に製造業者のプロトコルに従って形質転換した。SOC 培地における 1 時間の誘導後、回復物を、2000 rpm にて 5 分間遠心分離し、そして 100 mg/ml アンピシリンおよび 50 mg/ml カルベニシリンを含有する 500 ml の液体 LB 培地 (LB-AMP100-CARB50) に再懸濁した。再懸濁物を、50-ml の Erlenmeyer フラスコ中の 15-ml の LB-AMP100-CARB50 に添加し、そして 37 °C にて振盪しながら増殖させた。培養物に新鮮な 15-ml の LB-AMP100-CARB50 を、対数中期 ( $OD_{600}$  (0.2 ~ 0.4)) にて補充し、次いで飽和になるまで増殖させた ( $OD_{600}$  約 1.0 ~ 1.1; これは、1 「サイクル」または 1 回の変異とみなされた)。わずかな部分のこの培養物 (0.75 ml) を次のサイクルに添加した (15-ml LB-AMP100-CARB50)。6 サイクルの増殖後、Wizard (登録商標) ミニプレップ (Promega, Madison, WI) DNA プラスミド調製を、15-ml 培養物について行った。第 6 サイクルからの約 10 mg の pCT202/scTCR DNA を、10 チューブの酵母 EBY100 株の各々に LiAc 法を用いて形質転換した。1-ml ddH<sub>2</sub>O/チューブ中に再懸濁した後、10 反応物をプールし、1/10,000 のプールを選択プレート上にプレーティングして形質転換効率を決定した。ライブラリーサイズは約  $7 \times 10^6$  であった。50 ml 容量の SD-CAA (グルコース 2 wt %, Difco 酵母窒素ベース 0.67 wt %, カザミノ酸 0.5 wt %) に、残りの培養物を接種し、30 °C にて振盪しながら一晩培養し、 $OD_{600} = 0.05$  になるように継代し、そして 30 °C にて  $OD_{600} > 1.0$  になるように一晩増殖させた。次いで、5 ml の選択的ガラクトース培地 SG-CAA (ここで、2 % ガラクトースが SD-CAA 中のグルコースを置換する) を、 $OD_{600} = 0.05$  になるように接種し、そして 20 °C にて約 20 ~ 24 時間 (1 ~ 2 回の倍加) 振盪しながら一晩増殖させた。

#### 【0189】

(実施例 35: 蛍光活性化細胞選別による scTCR 変異体ライブラリーの選択)

細胞を、25 mL Mab 1B2 (抗 Vb8.2Va3.1; 腹水液から調製し、そしてビオチン結合体化した) を 20 mg/ml の濃度で用いて標識した。サンプルを、約 4,000 細胞/秒の事象速度 (event rate) で Coulter 753 ベンチ (Flow Cytometry Center, UIUC Biotechnology Center) で選別した。合計  $6 \times 10^7$  細胞を、最初の選別の回の間に調べ、この集団のうちの約 5 % を収集した。収集した細胞を、4 ml の選択的グルコース培地 SD-CAA 中で 30 °C にて選別の間に再度増殖させた。約 18 ~ 20 時間後、組換え AGA1+AGA2-scFv 発現を、5 ml SG-CAA 中で振盪しながら 20 °C にて誘導した。合計 3 回の選別を行い、最初の選別では、富化態様であり (高回収率の全てのポジティブクローン) そして最後の 2 回の選別では精製態様であった (同時ネガティブ細胞を拒否した)。最後の選別の直後に、収集した細胞を 2 つの別々の集団 (「高発現」および「低発現」) として再度選別、収集し、そして選択プレートにプレーティングして個々のクローンを単離した。20 個のクローンを、フローサイトメトリーによって調べた。

#### 【0190】

(実施例 36: 酵母表面上での変異 scTCR の誘導および検出)

pCT202/scTCRライブラリー選別由来の個々のクローンを、30℃にて振盪しながら3mlのSD-CAA中で一晩増殖させ、続いてSG-CAA中で上記の通りに誘導した。培養物を、20～24時間（1～2回の倍加）後に遠心分離によって収集し、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.05%アジドを含有するPBS（10mM NaPO<sub>4</sub>、150mM NaCl、pH7.3）を用いて洗浄し、そして氷上にて25Lの10mg/ml抗HA Mab 12CA5（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）、または腹水から調製したビオチン化1B2 Mab（20mg/ml）を用いて45分間インキュベートした。細胞を、PBSを用いて洗浄し、そしてFITC標識F(ab')<sub>2</sub>ヤギ抗マウスIgG（1:50; Kifkegaard and Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD）またはストレプトアビジン-フィコエリトリン（SA-PE）結合体（1:100; Pharmingen, San Diego, CA）のいずれかを用いて30分間、氷上にてインキュベートした。標識した酵母細胞を、Coulter Epics XLフローサイトメーターで分析した。事象速度は、約250細胞/秒であった。10,000事象についてのデータを収集し、そして集団を光散乱（サイズ）に従ってゲートに通して細胞凝集の分析を防止した。野生型（wt）TCRおよびいくつかの代表的なTCR変異体からの結果を図19に示す。いくつかのこれらの単離体由来の組み合わせられた変異を含む二重変異体をまた構築し、そしてこれらのフローサイトメトリーの結果を図20に示す。

#### 【0191】

（実施例37：変異scTCR遺伝子のレスキューおよび配列決定）

scTCR酵母（wtおよび20個の変異体）からのプラスミドを、細胞をボルテックスする代わりにビーズビーター（BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK）を2分間用いて破碎した以外は、Ward（Ward, 1991）により記載されるプロトコルに従ってレスキューした。細胞を1分間遠心分離し、そして上層（水層）を収集した。Wizard（登録商標）DNA Clean-Upキット（Promega, Madison, WI）を用いてプラスミドDNAを調製し、そしてE. coli DH5α ElectroMAX（登録商標）コンピテント細胞（GibcoBRL, Gaithersburg, MD）を1mlのDNA調製物を用いるエレクトロポレーションにより形質転換した。形質転換物を、LB-AMP50上にプレーティングした。wt scTCRおよび20個の変異体（mTCR1-mTCR20）の配列決定を、ディスプレイベクターのscTCRに隣接するプライマー、および蛍光自動化配列決定（Genetic Engineering Facility of the UIUC Biotechnology Center）を用いて行った。単一変異を、（図21）に示した単離物の各々についてのTCRにおいて見出した。

#### 【0192】

（実施例38：一重TCR変異体、二重TCR変異体、および三重TCR変異体の表面ディスプレイおよび可溶性発現）

単一部位変異体は、以下の残基を含んでいた：Val43P（mTCR7）、Val104P（mTCR16）、およびVbG17E（mTCR15）。二重変異体または三重変異体におけるこれらの変異の組合せは、さらに高いレベルでさえscTCRの表面ディスプレイを生じた。

#### 【0193】

酵母表面ディスプレイにより選択された変異scTCRをより詳細に調べるために、一重変異体（mTCR7、mTCR15、mTCR16）、二重変異体（mTCR7/15、mTCR7/16、mTCR15/16）、ならびに三重変異体（mTCR7/15/16）を、コンセンサスシグナル配列（Clementsら, 1991）に基づく合成プロレド領域とともに、誘導性GAL 1～10プロモーターの制御下で酵母分泌プラスミド中にクローニングした。構築物を、酵母において発現させ、そして得られた上清を、正しく折り畳まれたTCRタンパク質の尺度として定量的1B2結合アッセイにおいてモニタリングした。1B2活性scTCR変異体の発現レベルは、野生型scTCRについて

の検出できないレベルから、最大レベルを発現した三重変異体まで変化した（図22）。分泌レベルの順番は、以下の通りであった：三重変異体＞二重変異体＞一重変異体＞野生型。選択されたs c T C R二重変異体を、抗T C R抗体カラム（K J 1 6 - A f f i g e 1）を用いてアフィニティー精製し、そして低コピー発現系を用いる絶対分泌レベルは、約100mg/Lであることが見出された。

#### 【0194】

（実施例39：T C R分泌レベルと表面ディスプレイレベルとの比較）

この系におけるs c T C Rの分泌レベルを、表面ディスプレイ系において発現されたT C Rのレベルと直接比較するために、同じ変異体を、フローサイトメトリーを用いて酵母におけるA g a - 2融合体として調べた。酵母の表面上に提示されたs c T C Rを、抗H A抗体を用いて、続いてフルオレセイン標識二次抗体およびビオチン化1 B 2を用いて、続いてストレプトアビジン-フィコエリトリンを用いて標識した。酵母集団の得られた蛍光強度をフローサイトメトリーによりモニタリングし、そして平均蛍光単位として決定した（図23A）。蛍光のレベルは、一重変異体、二重変異体、および三重変異体の間で変動したが、相対レベルは、酵母分泌系と正確に同じであった（図23B）（すなわち、三重変異体＞二重変異体＞一重変異体＞野生型）。従って、この酵母ディスプレイ系は、酵母表面において、より高いレベルで発現されるものを単に選択することにより、分泌可能な発現系において高レベルで生成されるこれらのT C R変異体を同定し得た。

#### 【0195】

（実施例40：可溶性T C Rの温度安定性）

変異s c T C Rについて分泌（および提示）レベルを支配し得るタンパク質の特性を探索するために、変異s c T C Rの安定性を、熱変性を行うことにより調査した。酵母s c T C R上清を、種々の温度で1時間インキュベートし、そしてタンパク質活性を残存した1 B 2活性のパーセントとしてモニタリングした。野生型s c T C Rが酵母系においては発現されないので、E . c o l i封入体から再折畳みした野生型s c T C Rを比較のために使用した。このs c T C Rを、チオレドキシン融合タンパク質（T R X - T C R）として用いた。この融合タンパク質は、タンパク質の安定性および可溶性を増加させることが予測される。結果は、T R X - T C Rよりも一重変異体の方が高い熱変性温度を有することを示した（図24A）。さらに、二重変異体および三重変異体はさらに安定であり、野生型T C Rまたは一重変異体のいずれよりもさらに高い変性温度を有した（図24A）。

#### 【0196】

変異s c T C Rについての熱変性の反応速度を、各変異体についての変性速度を比較するために46℃にて決定した（図24B）。さらに、酵母s c T C R上清およびそれらの1 B 2結合活性を、種々の時間の間のインキュベーション後に残存したT C R活性についてモニタリングした。熱変性速度は、T R X - T C Rについて最も高く、そして三重変異体について最も低く、単一変異体および二重変異体は中間の範囲にあった（図24B）。アフィニティー精製したm T C R 1 5 / 1 6は、酵母培養上清において直接測定されたm T C R 1 5 / 1 6について決定された類似の熱変性反応速度を有した。このことは、上清中の内因性酵母タンパク質の存在が、測定された変性反応速度に影響を与えないことを示す。

#### 【0197】

48℃にて1時間の後に残存したネイティブなT C Rの量を、変異s c T C Rについての分泌レベルに対してプロットした場合に直接的な相関が、観察された（S h u s t aからの図4＝図25を必要とする）。従って、T C Rの場合、安定性の固有特性は、分泌効率の信頼性のある予測物であり、T C Rの酵母細胞表面レベルと直接相関した。この相関によって、増加した安定性を示す変異タンパク質を単離するためにより高い表面レベルのタンパク質について選択することにより、このディスプレイ系が用いられ得る。

#### 【0198】

（実施例41：翻訳後修飾および酵母ディスプレイ）

本発明の方法は、酵母において容易に発現され、そして有意に増強された熱安定性を提

10

20

30

40

50

示する 2 C s c T C R の改変体を同定した。事実、同定した単一部位変異体は、通常不安定である s c T C R を、共有結合的にジスルフィドで「安定化」されたかまたは化学的に架橋された単鎖抗体フラグメント ( s c F v ) と同等に安定であるようである s c T C R へと変換した。T C R についてはこれは特に重要であり、T C R は、自己免疫疾患の処置においてアンタゴニストとしての可能性を有する。異種発現された野生型 T C R は、以前は非常に不安定であり、生理学的温度での薬物動態が重要である。

#### 【0199】

グリコシル化が、タンパク質の増加した分泌および熱安定性をもたらすことが示された。例えば、グルコアミラーゼは、E. coli において生成された非グリコシル化形態では、酵母 S. cerevisiae において生成されたグリコシル化形態よりも安定性が低かった。それゆえ、V $\alpha$  領域中に 1 つの N 結合型グリコシル化部位を有する、酵母において生成される s c T C R s の安定性は、E. coli において生成される非グリコシル化 T R X - T C R の安定性よりも大きいことが可能であった。しかし、これは、二重変異体および三重変異体が、一重変異体を超える増加した安定性を有し、かつ両方の種がグリコシル化されるので、唯一の説明ではないようである。さらに、野生型 s c T C R はまたグリコシル化されることが期待されるとはいえ、酵母における野生型 s c T C R の発現は検出されなかった。

#### 【0200】

分泌系における種々の変異 s c T C R の発現レベルは、酵母ディスプレイ系における表面上での T C R のレベルと完全に相関した。この関係は、両方の系が同じ分泌装置を必要とするという事実から生じ得る。従って、タンパク質の折畳みおよび安定性に影響を与える変異は、外側（すなわち、細胞表面または分泌される）へのタンパク質輸送の同じ工程に影響を与え得る。これは、酵母において真核生物タンパク質を発現することの（バクテリオファージまたは細菌と比較して）明確な利点である。なぜなら、正しく折り畳まれたタンパク質のみをエキソサイトーシス経路全体を横断させることを確実にする質的な制御機構が存在するからである。

#### 【0201】

変異 s c T C R 発現レベルはまた、熱変性速度と相関した。この効果は、ウシ膵臓トリプシンインヒビターについて見られた効果と類似している。この効果においては、増加した安定性をもたらした変異がまた、酵母における分泌レベルの増加を導いた。この相関は、折り畳まれた形態における増加した安定性を有するタンパク質が、真核生物の質制御機構により保持および分解されるよりも、適切にパッケージングされ、そして細胞から輸送される可能性の方がより高いという理論を支持する。もちろん、多くの他の因子（例えば、正方向折畳み速度 (forward folding rate)、ジスルフィド結合形成、および小胞体タンパク質折畳み補助物との会合) はまた、重要な役割を果たす。しかし、本発明が実証するように、熱安定性は、以前に不安定でかつほとんど分泌されなかった分子（例えば、T C R）についての分泌能力の良好な尺度であるようである。

#### 【0202】

本明細書中に提示した知見に基づいて、ほとんど発現されないおよび／または不安定なタンパク質が、より高いレベルで、および／またはより安定な分子として発現されるために系統的に進化され得る方法論を想像し得る。このタンパク質をコードする遺伝子は、ランダムに変異され得、そしてこのライブラリーは、酵母の表面において発現され得る。一旦提示されると、この集団は、高い表面濃度（特異的プローブに起因する高い平均蛍光）を示すクローンについてスクリーニングされ得る。s c T C R について実証したように、表面発現が改善された改変体は、高いレベルで発現する、より安定な分子であるという可能性を有する。従って、酵母表面ディスプレイは、結晶化、工業的適用、および医学的適用のためにタンパク質の安定性を増加させるための強力な道具であり得る。

#### 【0203】

以下の参考文献は、本明細書中で引用された：

#### 【0204】

## 【表 2】

- Bassolino-Klimas, D., et al., Protein Science 1:1465-1476, 1992.
- Baumgartner, J-D, et al., Immunobiol. 187:464-477, 1993.
- Berek, C., et al., Immunol Rev. 96:23-41, 1987.
- Bird, R.E., et al., Science 242:423-426, 1988.
- Born, et al., (1987) J. Immunol. 138, 999.
- Brodnicki, et al., (1996) Mol. Immunol. 33, 253-263.
- Brummell, D.A., et al., Biochemis. 32:1180-1187, 1993.
- Cappellaro, C., et al., EMBO Journal 13:4737-4744, 1994.
- Chang et al., (1994) PNAS USA 91:11408-11412.
- Cho, et al., (1997) Bioconj. Chem. 8, 338-346.
- Cho, et al., (1995) J. Biol. Chem. 270, 25819-25826.
- Choo, Y., & Klug, A. (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6, 431-436.
- Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991.

(表2の続き)

- Clements, et al., (1991) *Gene* 106:267-271.
- Daniels, D. A., & Lane, D. P. (1996) *Methods* 9, 494-507.
- Davis, G.T., et al., *Biotechnology* 9:165-169, 1991.
- de Nobel, H., et al., *Trends in Cell Biol.* 4:42-45, 1994.
- Deng, S., et al., *J. Biol. Chem.* 269:9533-9538, 1994.
- Denzin, L.K., et al., *Mol. Immunol.* 30:1331-1345, 1993.
- DiRienzo, J.M., et al., *Ann. Rev. Biochem.* 47: 481-532, 1978.
- Droupadi, P.R., et al., *J. Mol. Recog.* 5:173-179, 1993.
- Eilat et al., (1992) *PNAS USA* 89:6871-6875.
- Ellman, et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2779-2782.
- Engel et al., (1992) *Science* 256:1318-1321.
- Fischman, A.J., et al., *J. Nucl. Med.* 34:2253-2263, 1993.
- Foot, J., et al., *Nature* 352: 530-532, 1991.
- Francisco, S.A., et al., *PNAS* 90:10444-10448, 1993.
- Garrard, L.J., et al., *Gene* 128: 103-109, 1993.
- Georgiou, et al., (1997) *Nat. Biotechnol.* 15, 29-34.
- Gilli, P., et al., *J. Phys. Chem.* 98:1515-1518, 1994.
- Gilson, M.K., et al., *Proteins:Struc., Func., Genet.* 3:32-52, 1988.
- Goldenberg, D.M. et al., *Am. J. Med.* 94:2973-12, 1993.
- Goldenberg, D.M., et al., *Int. J. Oncol.* 3:5-11, 1993.
- Greener, A., et al., *Strat. in Mol. Biol.* 7: 32-34, 1994.
- Guddat, L.W., et al., *J. Mol. Biol.* 236:247-274, 1994.
- Gunther, R., et al., *J. Biol. Chem.* 268: 7728-7732, 1993.
- Hammond, C., Helenius, A. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:523-529, 1995.
- Hand, P.H., et al., *Cancer* 73:1105-1113, 1994.
- Hawkins, R.E., et al., *J. Mol. Biol.* 234: 958-964, 1993.
- Hawkins, R.F., et al., *Mol. Biol.* 226: 889-896, 1992.
- Herron, J.N., et al., *Biochemistry* 25:4602-4609, 1986.
- Hibbits, K.A., et al., *Biochemistry* 33:3584-3590, 1994.
- Hilzemann, R. *TIPS* 9:408-411, 1988.
- Holland, J.I. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, MIT Press, Cambridge, 1992.

10

20

30

40

## (表2の続き)

- Holst, M., et al., *Proteins: Struct., Func., & Gen.* 18:231-245, 1994.
- Horwitz, A.H., et al., *PNAS* 85: 8678-8682, 1988.
- Huse, W.D., et al., *Science* 246: 1275-1291, 1989.
- Huston, J.S., et al., *PNAS* 85:5879, 1988.
- Ishikawa, E., et al., *J. Clin. Lab. Anal.* 7:376-393, 1993.
- Johnsson, N., et al., *Cell*, in press, 1994.
- Johnston, M., et al., *Mol. Cell Biol.* 4:1440-1448, 1984.
- Kang, A.S., et al., *PNAS* 88:11120-11123, 1991.
- Kappler et al., (1994) *PNAS USA* 91:8462-8466.
- Kelley, R.F., et al., *Biochemistry* 32:6828-6835, 1993.
- Kozack, R.E., et al., *Protein Sci.* 2:915-926, 1993.
- Kranz, D.M., et al., *J. Biol. Chem.* 257:6987-6995, 1982.
- Kricka, L.J. *J. Clin. Immunoassay* 16:267-271, 1993.
- Lipka, P.N., et al., *Microbiol. Rev.* 56:180-194, 1992.
- Low, N. M., et al., *J. Mol. Biol.* 260:359-368, 1996.
- Lu, C.-F., et al., *J. Cell Biol.* 128:333-340, 1995.
- Mallender, W.D., et al., *J. Biol. Chem.* 269: 199-206, 1994.
- Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M., Ward, A.C. *Nucl. Acids. Res.* 18:5319, 1991.
- Winter, G. "By-Passing Immunization: Building High Affinity Human Antibodies by Chain Shuffling." *Biotechnology* 10:779-783, 1992.
- Marks, J.D., et al., *J. Biol. Chem.* 267: 16007-16010, 1992.
- McKearn, T.J. *Cancer* 71:4302-4313, 1993,
- Miettinen, M. *Ann. Med.* 25:221-233, 1993.
- Moks, T., et al., *Biochemistry* 26:5239-5244, 1987.
- Mukkur, T.K.S. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16:133-167, 1984.
- Muller, G.W., et al., *J. Med. Chem.* 35:740-743, 1992.
- Near, R.L., et al., *Mol Immunol.* 30: 369-377, 1993.
- Necker et al., (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:3035-3040.
- Nell, L.J., et al., *Biopolymers* 32:11-21, 1992.
- Normington, K., et al., *Cell* 57:1223-1236, 1999.
- Novotny et al., (1991) *PNAS USA* 88:8646-8650.

10

20

30

40

(表2の系表)

- Omelyanenko, V.G., et al., *Biochemistry* 32:10423-10429, 1993.
- Riechmann, L., et al., *Biochemistry* 32:8848-8855, 1993,
- Riechmann, L., et al., *Mol. Biol.* 224:913-918, 1992.
- Roberets, S., et al., *Nature* 328:731-734, 1987.
- Roy, A., et al., *Mol. Cell. Biol.* 11:4196-4206, 1991.
- Rumbloy, C.A., et al., *J. Biol. Chem.* 268: 13667-13674, 1993.
- Schreuder, M. P., et al., *Yeast* 9:399-409, 1993.
- Schreuder, M. P., et al., *Trends Biotechnol.* 14:115-120, 1996.
- Searle, M.S., et al., *Anal. de Quimica* 89:17-26, 1993.
- Serafini, A.N. *J. Nucl. Med.* 34:533-536, 1993.
- Sigurskjold, B.W., et al., *Eur. J. Biochem.* 197:239-246, 1991.
- Slanetz et al., (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:179-183.
- Soo Hoo et al., (1992) *PNAS USA* 89:4759-4763.
- Stemmer, W.P.C. *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10747-10751, 1994 a.
- Stemmer, W.P.C. *Nature* 370:389-391, 1994 b.
- Stemmer, W.P.C. et al., *BioTechniques* 14:256-265, 1993.
- Ward, M., et al., *Biotechnology* 8:435-440, 1990.
- Ward et al. (1991) *Scand. J. Immunol.* 34:215-220.
- Williams, D.H., et al., *PNAS* 90:1172-1178, 1993.
- Wood, C.R., et al., *Nature* 314:446-449, 1985.
- Wulfing et al. (1994) *J. Mol. Biol.* 242:655-669.
- Yaimush, M., et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* 10:197-252, 1993.
- Yarmush, M.L., et al., *Biotech. Adv.* 10:413-446, 1992.
- Zaccolo, M., et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.* 23:192-198, 1993.
- Zebedee, S.L., et al., *PNAS* 89:3175-3179, 1992.
- Gietz, et al., (1995) *Yeast* 11, 355-360.
- Gunneriusson, et al., (1996) *J. Bacteriol.* 178, 1341-1346.
- Hoogenboom, H. R. (1997) *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.
- Knappik, A., & Pluckthun, A. (1995) *Prot. Eng.* 8, 81-89.
- Kretzschmar, et al., (1995) *Anal. Biochem.* 224, 413-419.
- Ladner, R. C. (1995) *Trends Biotechnol.* 13, 426-430.
- Lowman, et al., (1991) *Biochemistry* 30, 10832-10838.

10

20

30

40

(表2の続き)

- Markland, et al., (1996) *Methods Enzymol.* 267, 28-51.
- Matthews, D. J., & Wells, J. A. (1993) *Science* 260, 1113-1117.
- McDuffie, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8728.
- Patten, et al., (1996) *Science* 271, 1086-1091.
- Petsko, G. (1996) *Nature* 384 (Supplement), 7-9.
- Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995) *Microbiol. Rev.* 59, 94-123.
- Rabinowitz, et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1401-1405.
- Roberts, I. S. (1996) *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 285-315.
- Rode, et al., (1996) *Biotechniques* 21, 650.
- Roehm, et al., (1985) *J. Immunol.* 135, 2176.
- Schier, et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 263, 551-567.
- Schlueter, et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 256, 859-869.
- Schodin, et al., (1996) *Mol. Immunol.* 33, 819-829.
- Thompson, et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 256, 77-88.
- Ulrich, H. D., Patten, P. A., Yang, P. L., Romesberg, F. E., & Schultz, P. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11907-11911.
- Walker, K. W., & Gilbert, H. F. (1994) *J. Biol. Chem* 269, 28487-28493.
- Wang, C. I., Yang, Q., et al. (1996) *Methods Enzymol.* 267, 52-68.
- Yang, et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 392-403.
- Yelton, et al., (1995) *J. Immunol.* 155, 1994-2004.

10

20

本明細書中で言及される任意の特許または刊行物は、本発明が属する当業者のレベルを示す。これらの参考文献は、各々の個々の刊行物が、参考として具体的かつ個別に援用されるのと同じ程度に参考として援用される。

30

#### 【0205】

当業者は、本発明が、目的を実行し、そして言及した目的および利点、ならびにそれに固有の目的および利点を得るようによく適合されることを容易に理解する。本明細書中に記載される、方法、手順、分子、および特定の化合物を伴う本実施例は、現在のところ、好ましい実施態様の代表的なものであり、例示であり、そして本発明の範囲に対する限定ではない。特許請求の範囲により規定される本発明の精神内に含まれるその変更および他の使用を、当業者は、想起する。

#### 【0206】

本発明の上記に引用された特徴、利点および目的が達成される主題が、詳細に理解され得るように、添付の図面に図示されるその特定の実施態様を参照することにより、本発明のより特定の記載が理解され得る。これらの図面は、本明細書の一部を形成する。添付の図面は、本発明の好ましい実施態様を図示し、従って、それらの実施態様の範囲の制限を考慮されるべきではないことが、注意されるべきである。

40

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、模式図であり、酵母提示によるインビトロ親和性成熟を示す。

【図2】 図2は、酵母上での表面提示の模式図を示す。赤血球凝集素抗原 (HA) 由来の9アミノ酸ペプチドのエピトープが、a-アグルチニンのAg2pサブユニットのC末端、続いて、4-4-20抗フルオレセインscFv配列と融合された。さらなる10残基エピトープタグ (c-myc) が、scFvのC末端で融合され、これにより、HA

50

タグか c-myc タグのいずれかにより、抗原結合から独立している融合提示の定量が可能になった。HA タグまたは c-myc タグを使用して、二重標識フローサイトメトリーにおける提示された融合タンパク質の数の変動を正規化し得る。

【図 3】 図 3 は、酵母表面提示のためのベクターを示す。図 3 A は、ベクター p C T 2 0 2 の構造を示す。図 3 B は、特異的制限部位およびガラクトースによる転写調節、N 末端 HA タグおよび C 末端 c-myc エピトープタグ、ならびに F a c t o r X A プロテアーゼ切断部位を示す。

【図 4】 図 4 は、提示された融合物が、蛍光技術により検出され得ることを実証し、a-c-myc / a-mouse-PE で標識された酵母のフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。

10

【図 5】 図 5 は、4-4-20 s c F v による抗原結合が、蛍光により検出され得ることを示し、F I T C-デキストラン ( $2 \times 10^6$  Da) で標識された酵母のフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。

【図 6】 図 6 は、4-4-20 活性および c-myc が、同時に検出され得ることを示し、そして蛍光シグナルの 1:1 の相関を実証する；従って、強度シグナル 1 (F I T C) における変動は、シグナル 2 (P E) の強度により、目的のタンパク質の発現における細胞間の変動を正規化し得る。

【図 7】 図 7 は、A G A 2-HA-4-4-20-c-myc 遺伝子カセットの配列を示す。

【図 8】 図 8 は、s c F v を提示する酵母の共焦点顕微鏡画像を示す。HA ペプチド (図 8 A) または s c F v 融合物 (図 8 B) の表面発現を指向するプラスミドを含む酵母が、mAb 9 E 1 0、続いて 2 次抗マウス I g G-R-フィコエリトリン (P E) 結合体および F I T C-デキストランで標識された。D I C (上のパネル)、赤色 P E 蛍光 (中のパネル)、および緑色 F I T C 蛍光 (下のパネル) 画像を収集した。

20

【図 9 A】 図 9 は、s c F v を提示する酵母のフローサイトメトリー分析を示す。図 9 A は、無関係のペプチド (図 9 A) かまたは 4-4-20 s c F v (図 9 B) を提示する酵母株を、mAb 9 E 1 0 および F I T C-デキストランで標識した。また、s c F v を提示する細胞を、標識前に 5 mM D T T で処置した (図 9 C)。(i) 9 E 1 0 による標識化と結合した P E 蛍光の 1 変量ヒストグラム；(i i) F I T C 蛍光の 1 変量ヒストグラム；(i i i) P E と F I T C 蛍光との間の相関を示す 2 変量ヒストグラム。

30

【図 9 B】 図 9 は、s c F v を提示する酵母のフローサイトメトリー分析を示す。図 9 A は、無関係のペプチド (図 9 A) かまたは 4-4-20 s c F v (図 9 B) を提示する酵母株を、mAb 9 E 1 0 および F I T C-デキストランで標識した。また、s c F v を提示する細胞を、標識前に 5 mM D T T で処置した (図 9 C)。(i) 9 E 1 0 による標識化と結合した P E 蛍光の 1 変量ヒストグラム；(i i) F I T C 蛍光の 1 変量ヒストグラム；(i i i) P E と F I T C 蛍光との間の関連を示す 2 変量ヒストグラム。

【図 9 C】 図 9 は、s c F v を提示する酵母のフローサイトメトリー分析を示す。図 9 A は、無関係のペプチド (図 9 A) かまたは 4-4-20 s c F v (図 9 B) を提示する酵母株を、mAb 9 E 1 0 および F I T C-デキストランで標識した。また、s c F v を提示する細胞を、標識前に 5 mM D T T で処置した (図 9 C)。(i) 9 E 1 0 による標識化と結合した P E 蛍光の 1 変量ヒストグラム；(i i) F I T C 蛍光の 1 変量ヒストグラム；(i i i) P E と F I T C 蛍光との間の関連を示す 2 変量ヒストグラム。

40

【図 10】 図 10 は、動態力学的選択およびフローサイトメトリーセル選別による、改良された s c F v 改変体を提示する酵母の濃縮を実証する。突然変異された 4-4-20 s c F v を発現する酵母ライブラリー (図 10 A)、ならびに 3 回の動態力学的選択および増殖から生じる酵母のプール (図 10 B) が、5-アミノフルオレセインを有する蛍光抗原の競合解離に供され、F I T C 強度 / P E 強度の最も高い割合で、最も強固に結合する変異体を提示する細胞を残した。

【図 11】 図 11 は、フルオレセインと表面提示された s c F v との間の相互作用の解離動態力学を示す。4-4-20 s c F v を提示する酵母 (丸)、ライブラリーから単

50

離された変異体 4 M 1. 1 (四角)、および変異体 4 M 1. 2 (三角) は、m A b 9 E 1 0 および F I T C - デキストランで標識された。5 - アミノフルオレセインが、競合剤として添加された。細胞の 9 E 1 0 陽性集団の F I T C 蛍光の平均強度は、時間の関数に従った。この直線の傾きは、動態力学的解離速度に等しく、そして時間  $t = 0$  での外挿値は、相互作用の結合価に等しい。 $MFI_i$  = 時間  $t = i$  での酵母の相対的平均蛍光強度。

【図 1 2】 図 1 2 は、酵母表面に提示された s c F v - K J 1 6 (影をつけた) およびコントロール A g a 2 p / H A (影をつけていない) の、発現レベルおよび抗原結合特性を示す。酵母 E B Y 1 0 0 株は、酵母提示ベクター p C T 2 0 2 にクローン化された s c F v - K J 1 6 または p C T 2 0 2 ベクター単独で形質転換された。20 °C で一晩のガラクトース培地での誘導の後、細胞を蛍光抗体で染色し、そしてフローサイトメトリーで分析した。(図 1 2 A) マウス抗 H A M a b (1 2 C A 5) に続いて F I T C 標識ヤギ抗マウス I g G で染色された、s c F v - K J 1 6 / 酵母または A g a 2 p / H A / 酵母、(図 1 2 B) マウス抗 c - m y c M a b (9 E 1 0) に続いて F I T C 標識ヤギ抗マウス I g G で染色された、s c F v - K J 1 6 / 酵母または A g a 2 p / H A / 酵母、(図 1 2 C) 約 1 0 n M のビオチン化 s c T C R に続いてストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体で染色された、s c F v - K J 1 6 / 酵母または A g a 2 p / H A / 酵母、および(図 1 2 D) ビオチン化 s c T C R に続いて、1 0 0 m g / m l のインタクトな I g G K J 1 6 の存在下 (影をつけた) または非存在下 (影をつけていない) でストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体で染色された s c F v - K J 1 6 / 酵母。

【図 1 3】 図 1 3 は、フローサイトメトリーにより決定された、s c F v - K J 1 6 を提示した細胞壁の平衡抗原結合等温式を示す。表面 s c F v - K J 1 6 を提示する酵母 E B Y 1 0 0 株を、ビオチン化 s c T C R の濃度を変化させてインキュベートし、ストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体で標識し、そしてフローサイトメトリーにより検出した。データを、スキッチャード図として、または力価として (挿入図) プロットし、そして約 5 0 0 n M の有効  $K_D$  を決定した。M F U は、平均蛍光単位をいう。

【図 1 4 A】 図 1 4 は、二次元蛍光ヒストグラムおよび s c F v - K J 1 6 変異体を選択するために使用される選別ウィンドウを示す。提示ベクター p C T 2 0 2 にクローン化された s c F v - K J 1 6 は、E. c o l i 突然変異誘発遺伝子株 X L 1 - R e d (S t r a t a g e n e) に形質転換され、そして 6 晩の増殖周期の間増殖された。変異体ライブラリーのプラスミドは、精製され、そして E B Y 1 0 0 酵母の L i A c 形質転換 (G i e t z ら、1 9 9 5) に使用された。3 0 °C での導入後、酵母は、蛍光活性化セルソーターを使用して選別された。(図 1 4 A) 第 1 回のセル選別からの代表的ヒストグラム (選別ウィンドウが示される)、および (図 1 4 B) 第 4 (最終) 回の選別からの代表的ヒストグラム (選別ウィンドウに集団の濃縮を示す)。

【図 1 4 B】 図 1 4 は、二次元蛍光ヒストグラムおよび s c F v - K J 1 6 変異体を選択するために使用される選別ウィンドウを示す。提示ベクター p C T 2 0 2 にクローン化された s c F v - K J 1 6 は、E. c o l i 突然変異誘発遺伝子株 X L 1 - R e d (S t r a t a g e n e) に形質転換され、そして 6 晩の増殖周期の間増殖された。変異体ライブラリーのプラスミドは、精製され、そして E B Y 1 0 0 酵母の L i A c 形質転換 (G i e t z ら、1 9 9 5) に使用された。3 0 °C での導入後、酵母は、蛍光活性化セルソーターを使用して選別された。(図 1 4 A) 第 1 回のセル選別からの代表的ヒストグラム (選別ウィンドウが示される)、および (図 1 4 B) 第 4 (最終) 回の選別からの代表的ヒストグラム (選別ウィンドウに集団の濃縮を示す)。

【図 1 5】 図 1 5 は、図 1 4 B に示される最終選別由来の 1 0 個のランダムに選択されたクローンについて、抗 H A M a b、抗 c - m y c M a b、またはビオチン化 s c T C R に対する結合の平均レベルを示す。1 0 個の変異体および野生型 s c F v - K J 1 6 / 酵母は、ガラクトース培地中で 3 0 °C で一晩誘導された。細胞は、マウス抗 H A M a b に続く F I T C 標識ヤギ抗マウス I g G での染色後 (白色棒)、マウス抗 c - m y c に続く F I T C 標識ヤギ抗マウス I g G での染色後 (灰色棒)、またはビオチン化 s c T C R (約 4 0 n M) に続くストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体での染色後 (黒色

10

20

30

40

50

棒)、フローサイトメトリーにより分析された。

【図16】 図16は、図4に示される3つの選択された変異体の、抗c-myc結合またはscTCR結合に関する蛍光標識分布を示す。3つのクラスのscFv-KJ16/酵母変異体は、抗c-mycおよびビオチン化scTCRに続き、FITC標識ヤギ抗マウスIgGおよびストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体で二重染色され、次いで、図4に記載されるようにフローサイトメトリーにより分析された。各scFv-KJ16/酵母変異体(影をつけた)および野生型scFv-KJ16/酵母(影をつけない)についての蛍光分布が示される。図16Aおよび16B(mut4);図16Cおよび16D(mut7);図16Eおよび16F(mut10)。

【図17】 図17は、図16に示される3つの変異体についての平衡抗原結合等温式を示す。Agarose/HSA/酵母、野生型scFv-KJ16/酵母、および図16で特徴付けられる3つの変異体scFv-KJ16/酵母が、種々の希釈度のビオチン化scTCRに続きストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体で染色された。フローサイトメトリーによる分析の後、結合等温式が、MFUをscTCR希釈度の関数として、グラフ化された。

【図18】 図18は、野生型scFv-KJ16/酵母、mut4およびmut7の配列分析を示す。野生型scFv-KJ16および2つの変異体由来のプラスミド(mut4およびmut7)が、下記のように、プラスミドレスキューにより回収され、そして、配列決定のためのプラスミドを生成するために、E.coli DH5αコンピテント細胞に形質転換された。配列決定分析は、提示ベクターのscFvに隣接するプライマーを使用して実行された。変異が、太字で示される。

【図19】 図19は、T細胞レセプター単鎖(VαVβ)遺伝子を含むプラスミドで形質転換された酵母に結合する抗体のフローサイトメトリープロファイルを示す。通常の、すなわち野生型(wt)の配列が、scTCRプラスミドのランダム突然変異後に選択されたいくつかの変異体(mTCR7、mTCR15、mTCR16)と比較された。選択は、抗体1B2(T細胞レセプター上の高次構造エピトープを認識する)の結合に続き、数回の蛍光活性化セル選別を含んだ。第1のパネルにおいて、酵母細胞は、HAタグに対する抗体(12CA5)で染色された。第2のパネルにおいて、酵母細胞は、T細胞レセプターに対する抗体(1B2)で染色された。HAエピトープは、各々の場合、表面上に発現されるが、変異型プラスミドを発現する細胞のみが、ネイティブのT細胞レセプター(1B2ポジティブ)を発現し得る。

【図20】 図20は、図19に示される選択由来の二重変異体で形質転換された酵母に結合する抗体のフローサイトメトリープロファイルを示す。細胞は、図19に示されるように、フローサイトメトリーのために染色された。二重変異体は、T細胞レセプターのレベル(すなわち、1B2反応物質)において増加を示した。この結果は、単一の変異と組み合わせることにより、T細胞レセプターの細胞表面発現のレベルを増強することが可能であることを示す。

【図21】 図21は、細胞表面T細胞レセプターの増強された発現を導く変異の配列を示す。これらは、Vβの残基17、Vαの残基43、およびVαの残基104を含んだ。

【図22】 図22は、scTCRの相対的分泌レベルを示す。低コピー酵母発現系を使用して産生されたscTCRの可溶性発現レベル(自由裁量単位)。独立したクローン由来の3通りの培養物を、1B2 ELISA活性について分析した。

【図23A】 図23Aは、scTCRを提示する酵母のフローヒストグラムを示す。野生型、ならびに代表的単一変異体、二重変異体、および三重変異体についてのセル選別された集団を表す。平均蛍光単位(FITC蛍光:抗HSA、PE蛍光:1B2)が、各ヒストグラム上に示される。抗HSAは、表面融合物の数を示し、そして1B2は、適切に折り畳まれたscTCRを提示する細胞の数を示す。

【図23B】 図23Bは、表面発現と可溶性分泌との間の相関関係を示す。フローにより決定された1B2活性表面scTCRが、ELISAアッセイにより決定された可溶性分泌物質の1B2活性と比較される。最低限の、二連のフロー実験が行われ、特定のクロ

10

20

30

40

50

ーの平均蛍光単位が決定された。

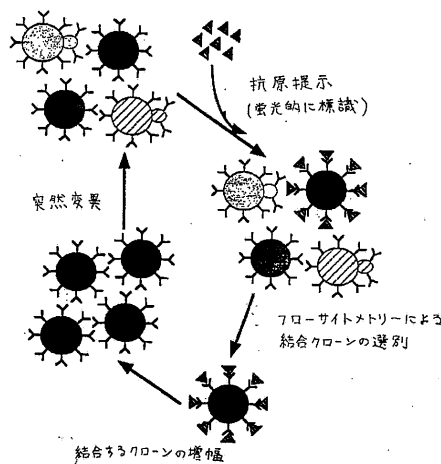
【図24A】 図24Aは、scTCRの温度安定性を示す。scTCRを含む酵母上清サンプルが、示される温度に1時間供された。3連のサンプルが、ELISAによる1B2活性画分について分析された。画分は、全く活性の損失を有さない最も高い強度のELISAシグナルにより、個々に正規化されて統一された。図24Aおよび図24Bの両方において、比較は、野生型scTCRよりもTRX-TCRに対してなされた。なぜなら、野生型scTCRは、酵母上清中で検出されなかったからである。

【図24B】 図24Bは、scTCRの温度変性の動態力学を示す。上清サンプルの1B2 ELISA活性が、各サンプルが46℃でインキュベートされた時間の関数としてモニターされた。46℃での観察された動態力学的熱変性速度( $k_{obs}$ )が示される。図24Aおよび図24Bの両方において、比較は、野生型scTCRよりもTRX-TCRに対してなされた。なぜなら、野生型scTCRは、酵母上清中で検出されなかったからである。

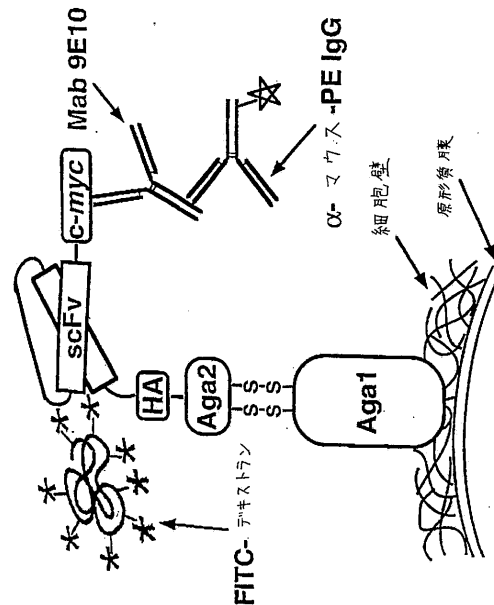
【図25】 図25は、熱安定性発現と可溶性発現との間の相関関係を示す。48℃で1時間のインキュベートの後に残存するscTCR 1B2 ELISA活性が、相対的分泌レベル(1B2 ELISA)と比較される。3連のサンプルが、分泌レベルおよび熱安定性分析について分析された。

10

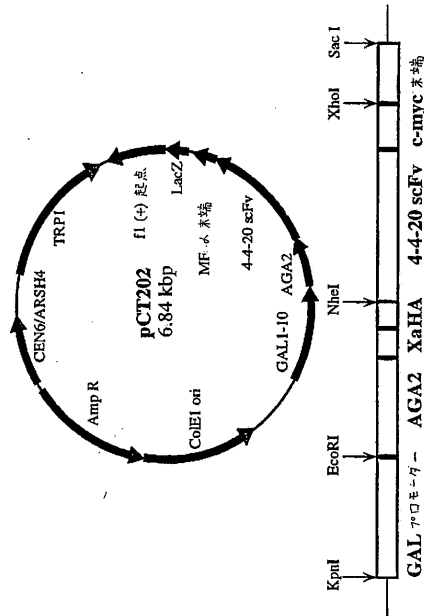
【図1】



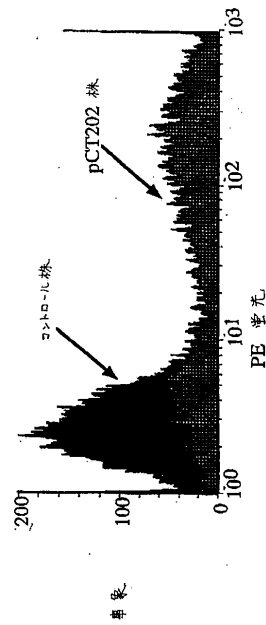
【図2】



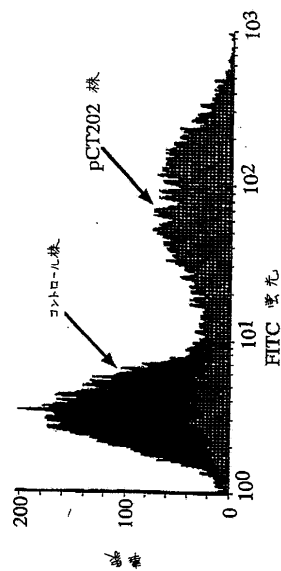
【図 3】



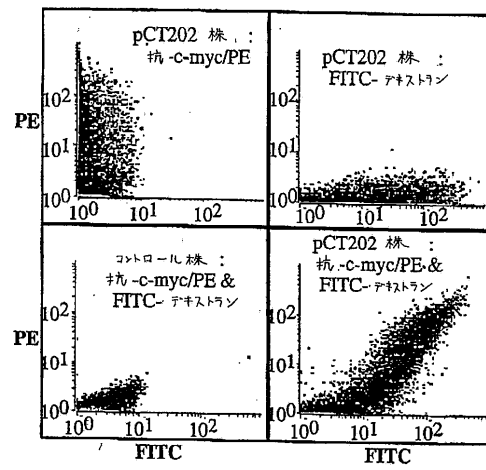
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

Sequence of AGA2-HA-4-4-20 gene cassette:

```

1  ATTAGATTC CCTACTTCAT ACATTTCAA TTAAGATGCA GTTACTTCG
5  TTTTTCAC TATTTTCGT TATTGCTCA GTTTAGCAC AGGACTGAG
101 AACATATGC GAGCAATCC CCTACCAAC TTTAGATCG AGGCTACTT
151 CTTTGTCAAC GACTACTATT TTGGCCAACG GGAAGGCAAT GCAGGAGTT
201 TTTGAATAT ACNAATCAGT AACGTTTGTG AGTAATTGGG GTTCTCACCC
251 CTCACAACT AGCAAGGCA GCGCCATAAA CACACAGTAT GTTTTAAAG
301 ACAATAGCTC GACGATTGAA GGTAGATACC CATACAGACT TCCGACTAC
351 GCTCTGACG CTAGCGACGT GGTATGACT CAACACACAC TATCACTCC
401 TGTTAGCTA GGAGTCAGC CCTCCTCTC TTGCAGACT AGTCAGGCC
451 TTGTACACAG TAATGGAAC ACCTATTAC GTTGTACTT GCAGAGCCA
501 GGCCAGTCTC CAAGGTCTCT GATCTACAAA GTTTCCAAAC GATTTTCTGG
551 GGTCCACAG AGGTTCACTG GCACTGATC AGGACAGAT TTCACACTCA
601 AGATCAGCAG ACTGGAGGCT GAGGATCTGG GAGTTTATT CTGCTCCTAA
651 AGTACACATG TTCCGTGGAC GTTCCGTGGA GCACCAAGC TTGAATATA
701 GTCTCTCTCT GATGATGCTA AGAAGGATGC TGCTAGAGG GATGATGCTA
751 AGAAAGATGA TGCTAGAAA GATGATGAG TCAAACTGGA TGAGACTGGA
801 GAGGCTCTGG TGCAACTGG GAGGCCATG AACTCTCTCT GTGTGCTCC
851 TGGAATCACT TTTAGTACT ACTGATGAA CTGGTCCGC CAGTCTCCAG
901 AGAAAGGACT GGATGGGTA GCACAAATTA GAAACAACC TTATATATAT
951 GAAACATATT ATTCAGATTG TGTAAGAGC AGATTACCA TGTCAAGAGA
1001 TGATTCCTAA AGTAGTCTCT ACTGCAAT GACACCTTA AGAGTTGAG
1051 ACATGGGTAT CTATTAATCT AGGGTCTCT ACTATGATAT GACTACTCG
1101 GGTCAAGGAA CTCAGTCAC CGTCTCTCTA GAACAAAAGC TTATTTCTGA
1151 AGAAGACTTG TAATAGCTCG AG

```

FIGURE 7

【図 8】

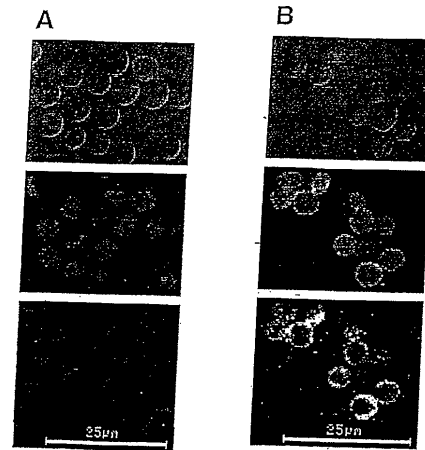
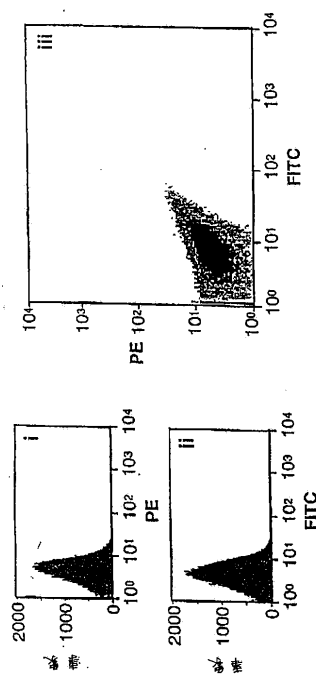
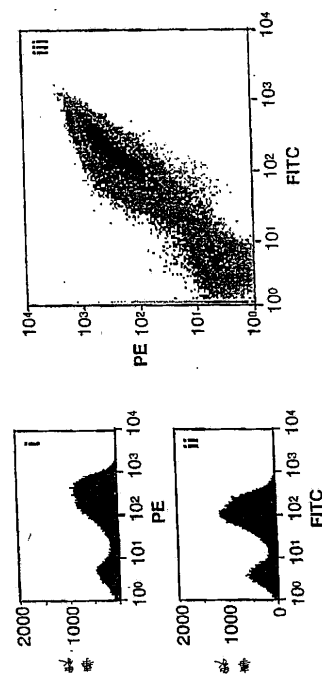


Figure 8

【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】



【図 10】

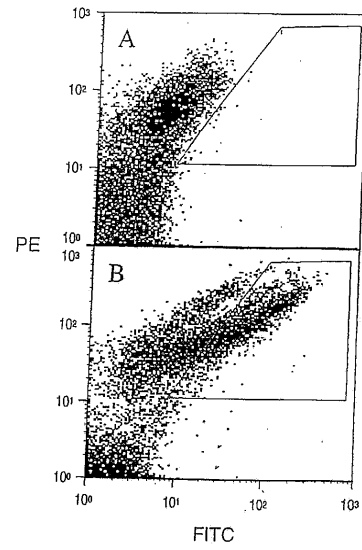
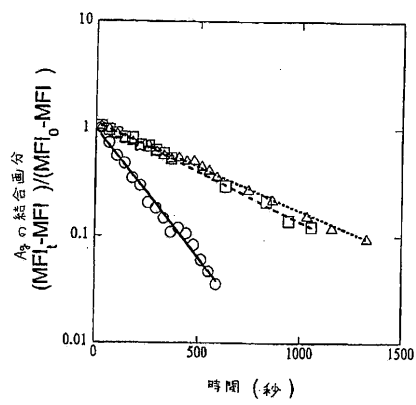
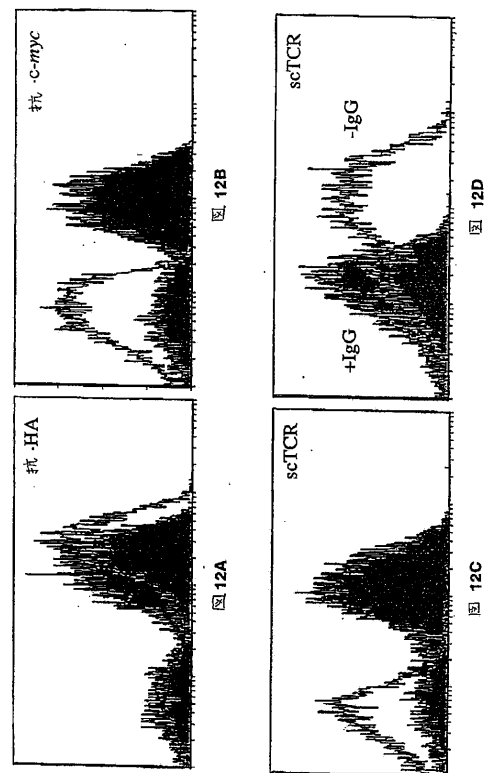


Figure 10

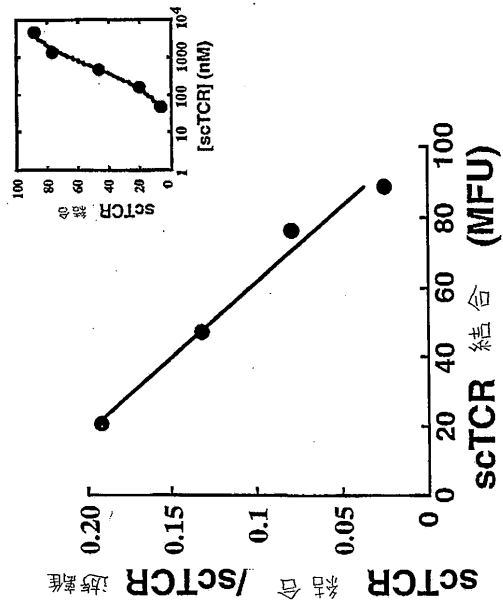
【図 11】



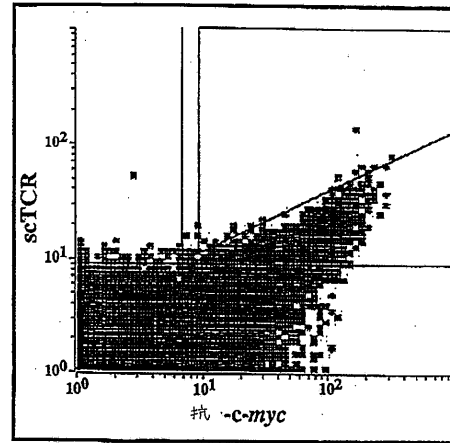
【図 12】



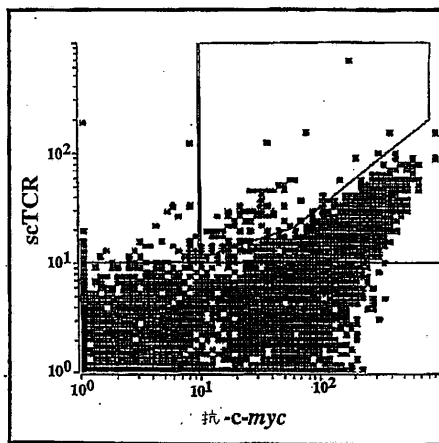
【図 1 3】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【図 1 5】

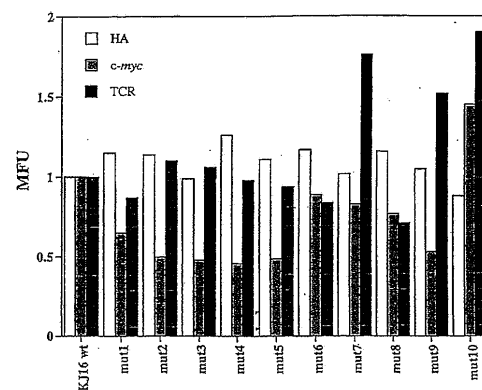
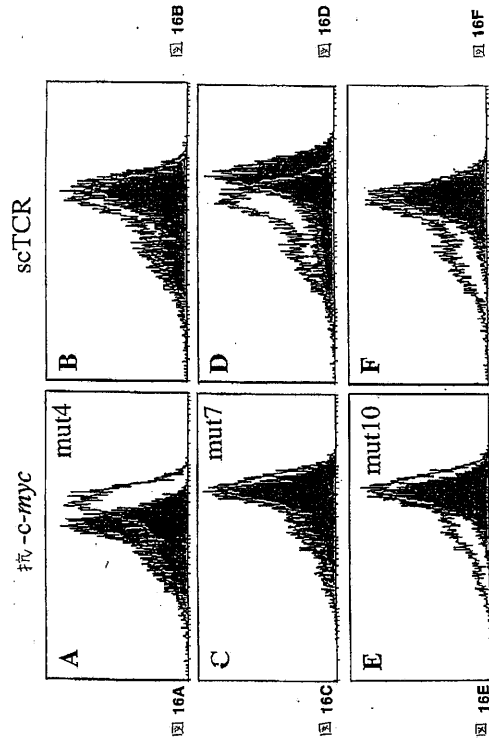
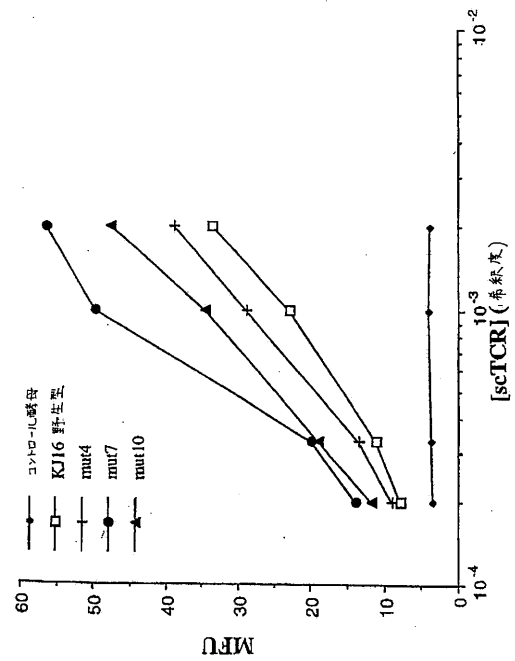


Figure 15

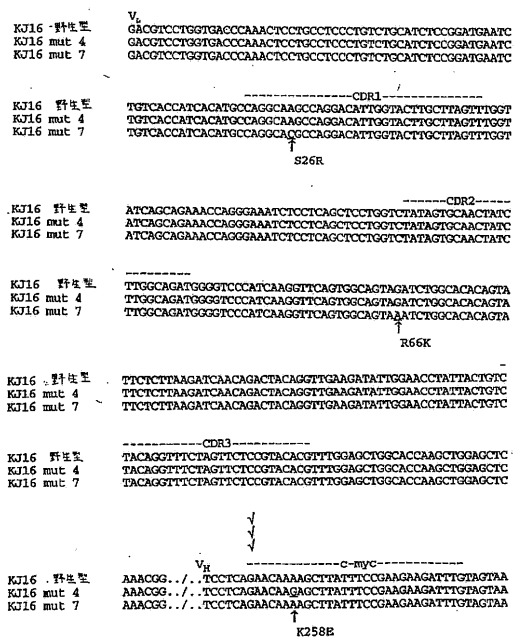
【図16】



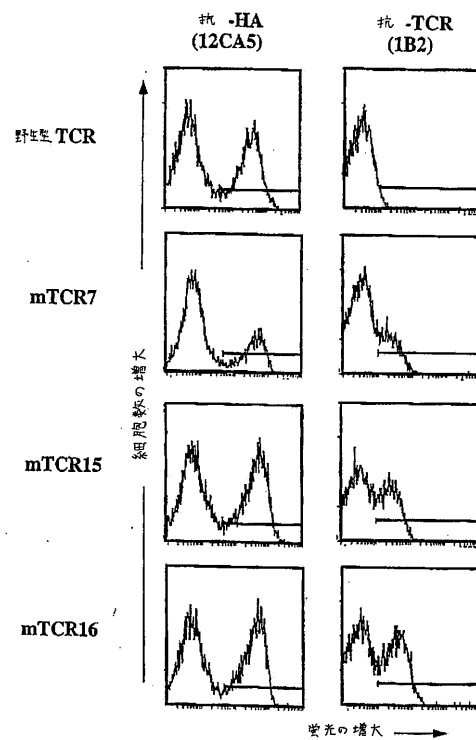
【図17】



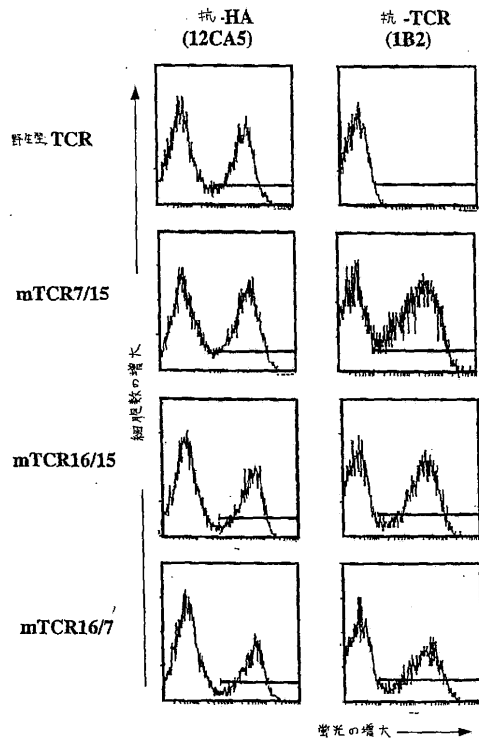
【図18】



【図19】



【図 20】



【図 21】

vβ8.2  
GACGTGGCAG TCACCCAAAG CCCAAGAAAC AAGGTGGCAG TAACAGGAGG AAAGGTGACA  
Gly17A<sub>Glu</sub>

-----cd1-----  
TTGAGCTGTA ATCAGACTAA TAACCACAC ACATGTACT GTATCGCA GGACCGGGG

-----cd2-----  
CATGGGCTGA GGCTGATCCA TTATTCATAT GTGCTGGCA GCCTGAGAA AGGAGATATC

-----hv4-----  
CCTGATGGAT ACAAGGCTC CAGACCAAGC CAGAGAACT TCTCCCTCAT TCTGGAGTGT

-----cd3-----  
GCTACCCCTC CTCAGACATC AGTGTACTTC TGTCCCGCG GTGGGGGGG CACCTGTGAC

リンカー  
TTTGGTGGG GCAACCGACT ATCGTGCTA TCTCCGGGG ATGATGCTAA GAAGGATGCT

Vα3.1  
GCTAAGAAG ATGATGCTAA GAAAGATGAT GCTAAGAAG ATGCACAGTC AGTGACACAG

-----cd1-----  
CCGATGCTC GCGTCACTGT CTCGAGGA GCTCTCTGC AGCTGAGATG CAAGTATTC

-----cd2-----  
TACTCTGGA CACCTTATCT GTTCTGGTAT GTCCAGTACC CCGCGCAGG GCTGACAGTC  
Leu43A<sub>Pro</sub>

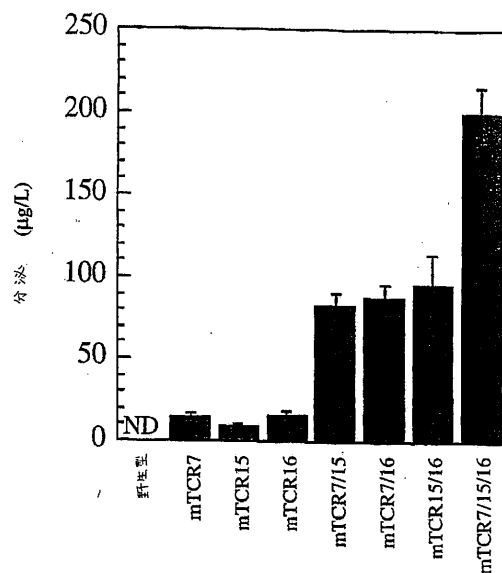
-----cd2-----  
CTCTCAAGT ACTATTCGG AGACCCAGTG GTTCAAGGAG TGAATGGCTT TGAGGCTGAG

-----hv4-----  
TTCAGCAGA GCAACTCTTC CTCCACCTG CGGAAAGCTC CCGTGCAGTC GAGGACTCG

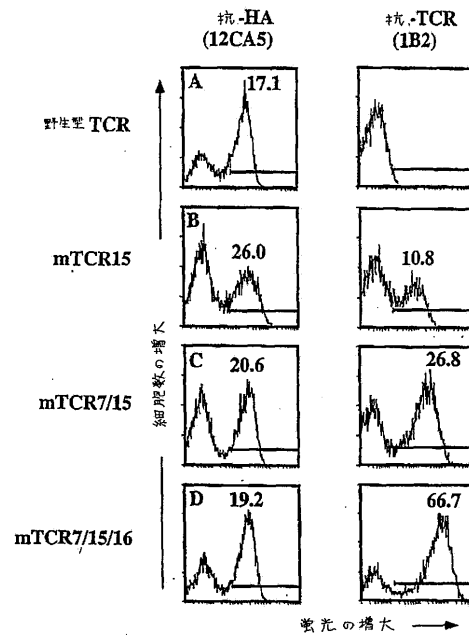
-----cd3-----  
GCTGIGTACT TCTGTGCTGT GAGCGGCTT GCAAGTGCGC TGACATTTGG ATCTGCACA  
Leu104A<sub>Pro</sub>

AAAGTCATTG TTCTACATA CATCTAG + 6-His

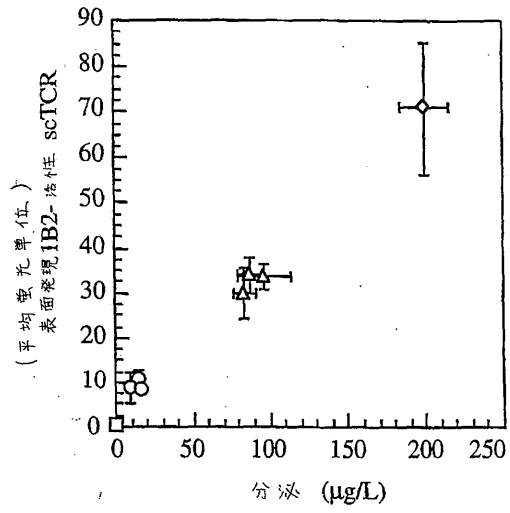
【図 22】



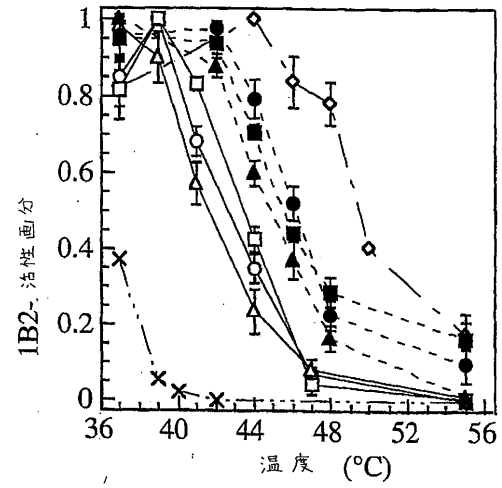
【図 23 A】



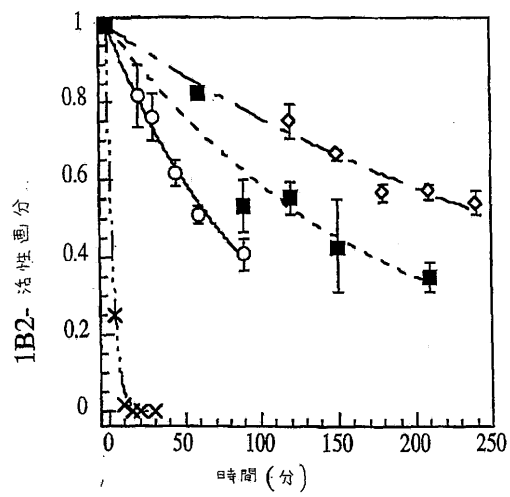
【図 2 3 B】



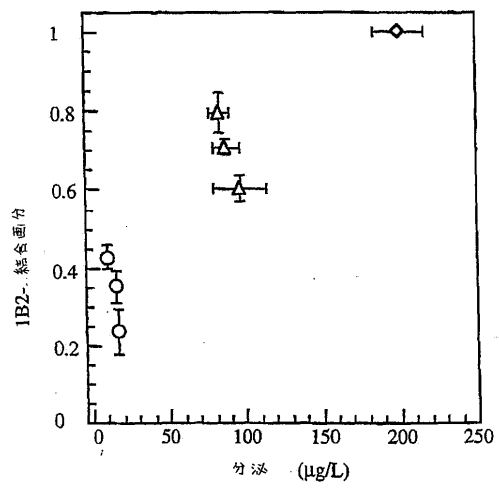
【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



【図 2 5】



【配列表】

0005436736000001.xml

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ウィットラップ, ケイ. ディーナ  
アメリカ合衆国 イリノイ 61801, アーバナ, ダブリュー. デラウェア 208
- (72)発明者 キーケ, ミシェル シー.  
アメリカ合衆国 イリノイ 61801, アーバナ, ダブリュー. メイン ナンバー230  
502
- (72)発明者 クランツ, デイビッド エム.  
アメリカ合衆国 イリノイ 61821, キャンペイン, オドネル ドライブ 2202
- (72)発明者 シュスタ, エリック  
アメリカ合衆国 イリノイ 61801, アーバナ, エス. バイン ストリート ナンバー  
3 908
- (72)発明者 ボダー, エリック ティー.  
アメリカ合衆国 イリノイ 61801, アーバナ, トレイルズ ドライブ 1612エイ

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 田中 晴絵

審判官 富永 みどり

- (56)参考文献 国際公開第97/8320 (WO, A1)  
Nature Biotechnology (1997) Vol. 15, No. 6, p. 553  
-557  
Protein Engineering (1997) Vol. 10, No. 11, p. 130  
3-1310

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

C12P21/00-08

C07K14/00-19/00

C12Q1/00-70

PUBMED

MEDLINE

BIOSIS

WPI