(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4386741号
(P4386741)
(45)発行日　平成21年12月16日(2009.12.16)　(24)登録日　平成21年10月9日(2009.10.9)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 ZNAA
C12P 21/08 (2006.01)　　C12P 21/08

請求項の数 2　(全 19 頁)

(21)出願番号　特願2003-584118(P2003-584118)
(86)(22)出願日　平成15年4月15日(2003.4.15)
(86)国際出願番号　PCT/JP2003/004773
(87)国際公開番号　WO2003/087163
(87)国際公開日　平成15年10月23日(2003.10.23)
審査請求日　平成18年4月12日(2006.4.12)
(31)優先権主張番号　特願2002-112369(P2002-112369)
(32)優先日　平成14年4月15日(2002.4.15)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000003311
中外製薬株式会社
東京都北区浮間５丁目５番１号
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(72)発明者　小嶋　哲郎
静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地　中外製薬株式会社内

審査官　冨永　みどり

(56)参考文献　国際公開第９９／０５７１５０（WO, A１）
NATURE BIOTECHNOLOGY, １９９６年, Vol.14,No.9, p.1149-1154

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｓｃＤｂライブラリーの作成方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程を含む抗体ライブラリーの作成方法。
(a)第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域をコードする塩基配列が、工程(d)においてライゲーションを行った際に、第一のリンカー及び第三のリンカーの長さが6bpから27bpとなる位置に少なくとも1つの制限酵素切断部位を含み、全長が30bpから150bpのリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
(b)第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域をコードする塩基配列が長さ30bpから150bpのリンカーで結ばれ、それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に、工程(d)においてライゲーションを行った際に、第一及び第三のリンカーの長さが6bpから27bpとなる位置に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、
(c)(a)及び(b)で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む塩基配列を制限酵素で処理する工程、及び
(d)上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域をコードする塩基配列と重鎖可変領域をコードする塩基配列の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域をコードする塩基配列と軽鎖可変領域をコードする塩基配列が挿入されたフラグメントを作成する工程。
【請求項２】
請求項１の工程(a)～(d)に記載の方法によって得られたライブラリーから選ばれる少なく

とも一つの単鎖ダイアボディをコードする塩基配列を宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養することを特徴とする単鎖ダイアボディの作成方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、単鎖ダイアボディ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　ｄｉａｂｏｄｙ；ｓｃＤｂ）ライブラリー及びその作成方法に関する。また、本発明は該単鎖ダイアボディライブラリーを構成する遺伝子、及び、該遺伝子を含む発現ベクター、並びに、それらの作成方法に関し、さらに、該遺伝子によりコードされるペプチドに関する。

背景技術

異なる抗原に結合することができる多特異性抗体（例えば、二特異性抗体（ＢｓＡｂ））は免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。多特異性抗体は、例えば、酵素免疫分析で用いられる酵素を固定化する際に利用することができる。即ち、多特異性抗体の一方の腕を酵素上の酵素反応を阻害しない部分のエピトープと結合するように、そしてもう一方の腕は固定化する担体上に対して結合するように設計し、担体上に酵素を抗体を介して結合する（例えば、Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１２８：１４６１－１４７３（１９６８））。また、多特異性抗体を癌等の様々な疾病の免疫診断において利用する方法も報告されている（Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５（１９９０））。癌の診断において使用される二特異性抗体は、例えば、抗体の一方の腕が腫瘍関連抗原を認識するように設計され、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計される（例えば、Ｌｅ　Ｄｏｕｓｓａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｕｐｐｌ．７：５８－６２（１９９２）；Ｌｅ　Ｄｏｕｓｓａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．３４：１６６２－１６７１（１９９３）；Ｓｔｉｃｋｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５１：６６５０－６６５５（１９９１））。

さらに、病原体または腫瘍細胞に対する患者の細胞性免疫応答の誘発において多特異性抗体を利用する方法も知られている（Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４７：１７９（１９８９）；Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｌｏｇｉｃ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ　２（４）Ｄｅ　Ｖｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．ｅｄｓ．，Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｏｍｃｏｔｔ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（１９９２）ｐ．１；Ｈｓｅｉｈ－Ｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５２：６８３２－６８３９（１９９２）；Ｗｅｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：９４－１００（１９９３））。また、多特異性抗体はＴ細胞の細胞を殺す作用を誘起するように設計することもできる（Ｓｈａｌａｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５（１）：２１７（１９９２）；ｄｅ　Ｌｉｊｉ　ｅｔ　ａｌ．”Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔａｒｇｅｔｅｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ”，Ｒｏｍｅｔ－Ｌｅｍｏｎｎｅ，Ｆａｎｇｅｒ　ａｎｄ　Ｓｅｇａｌ　Ｅｄｓ．，Ｌｉｅｎｈａｒｔ（１９９１）ｐ．２４９；Ｃｌａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．”Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔａｒｇｅｔｅｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ”，Ｒｏｍｅｔ－Ｌｅｍｏｎｎｅ，Ｆａｎｇｅｒ　ａｎｄ　Ｓｅｇａｌ　Ｅｄｓ．Ｌｉｅｎｈａｒｔ（１９９１）ｐ．２４３；Ｋｒｏｅｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｎｏｔｈｅｒ．３７：４００－４０７（１９９３）；Ｋｒｏｅｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　７０：６５２－６６１（１９９４）；Ｗｅｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：２３８５（１９９４））。その他、多特異性抗体は、繊維素溶解剤またはワクチンのアジュバントとしても利用し得るし、感染性の疾患（例えば、ＨＩＶ、インフルエンザ、原生虫等に感染した細胞を標的として）の治療用、腫瘍細胞へ抗毒素の運搬、及び、細胞表面受容体へ免疫複合体を作用させるためにも利用することができる（Ｆａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、上述）。

従来、多特異性抗体は、（１）異なる特異性を有する抗体の異種二機能性リンカーによる化学的カップリング（Ｐａｕｌｕｓ、Ｂｅｈｒｉｎｇ　Ｉｎｓｔ．Ｍｉｔｔ．，７８：１１８－１３２（１９８５））、（２）異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドー

マ細胞の融合（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ ３０５：５３７－５３９（１９８３））、及び（３）異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子（４種類の遺伝子）のマウス骨髄腫細胞または他の真核細胞発現系へのトランスフェクションとそれに続く二特異性の一価部分の単離（Ｚｉｍｍｅｒｅｍａｎｎ、Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１０５：１７６－２６０（１９８６）；Ｖａｎ Ｄｉｊｋ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ４３：９４４－９４９（１９８９））等の方法により製造されてきた。

ダイアボディ（Ｄｂ）は、遺伝子融合により構築された二価（ｂｉｖａｌｅｎｔ）の抗体断片である（Ｐ．Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８（１９９３）、ＥＰ４０４，０９７号、ＷＯ９３／１１１６１号等）。ダイアボディは、２本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域（ＶＬ）及び重鎖可変領域（ＶＨ）が、互いに結合できない位に短い、例えば、５残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるＶＬとＶＨとは、その間のリンカーが短いため単鎖Ｖ領域フラグメント（ｓｃＦｖ）を形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは２つの抗原結合部位を有することとなる。このとき２つの異なる抗原（ａ、ｂ）に対するＶＬとＶＨをＶＬａ－ＶＨｂとＶＬｂ－ＶＨａの組合わせで５残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二特異性Ｄｂとして分泌される。二特異性Ｄｂは多特異性抗体の一種である。

発明の開示

二特異性Ｄｂにおいては、２種類の鎖の汲み合わせは３通りあるため、得られる二特異性Ｄｂは全体の５０％に留まる。一方、ファージ抗体ライブラリーを用いて抗原との反応性により特定の遺伝子を選択するためには、抗原結合部位をｓｃＦｖとして提示させるためにＶＨとＶＬを１５残基程度のリンカーで結合して発現させる必要がある。このように抗原との結合性により選択されたファージ抗体ライブラリー由来のｓｃＦｖのＶＨとＶＬを二特異性ｓｃＤｂとして発現させるためには、リンカーの長さをｓｃＦｖの発現に必要とされる１５残基程度のものから、Ｄｂの発現を可能にする５残基程度の長さのリンカーに換えるためのＰＣＲアセンブル等の煩雑な操作が必要となり、一括処理することは困難であった。

本発明により、新規な二特異性ｓｃＤｂライブラリーの構築法が提供される。本発明においては、二特異性Ｄｂを確実に生産できるよう、２つの異なる抗原（ａ、ｂ）に対するＶＬとＶＨをＶＬａ－ＶＨｂ－ＶＬｂ－ＶＨａの順に、ＶＨとＶＬｂの間は１５残基以上のリンカーで結んだ単鎖として発現させる（但し、本発明はＶＬａ、ＶＨａ、ＶＬｂ、ＶＨｂ等の可変領域の順序で限定されるものではない）。本発明では、このようなポリペプチド鎖（ＶＬａ－ＶＨｂ－ＶＬｂ－ＶＨａ）を発現する二特異性ｓｃＤｂライブラリーをｓｃＦｖのファージライブラリーから一括処理により作成することができる。即ち、２つの抗体可変領域（ＶＬａとＶＨａ）をコードするヌクレオチドが制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれた遺伝子、及び、２つの抗体可変領域（ＶＬｂとＶＨｂ）をコードするヌクレオチドが長いリンカーにより結ばれ、可変領域をコードするヌクレオチドのリンカーと結合されていない側に制限酵素切断部位を有する遺伝子を用い、これらを制限酵素で処理した後、ＶＬａとＶＨａの間にＶＬｂ及びＶＨｂが挟まれるように結合させる。本発明は、このような二特異性ｓｃＤｂライブラリーの構築法に加え、該方法に用い得る遺伝子、該方法により得られる遺伝子、これらの遺伝子を含む発現ベクターまたは抗体ライブラリー、及び、該遺伝子によりコードされるペプチドを提供する。

また、本発明では、抗原との結合で選択されたｓｃＦｖのＶＨとＶＬを二特異性ｓｃＤｂとして一括処理で発現させる方法として、ファージ抗体ライブラリーからパンニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提案する。より詳細には、本発明は、

（１）２つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、

（２）リンカーに制限酵素切断部位が２つ以上存在することを特徴とする（１）記載の遺伝子、
（３）２つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である（１）または（２）記載の遺伝子、
（４）２つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする（１）～（３）いずれか記載の遺伝子、
（５）２つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子、
（６）２つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である（５）記載の遺伝子、
（７）２つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする（５）または（６）記載の遺伝子、
（８）４つの抗体可変領域をコードし、１番目の抗体可変領域と２番目の抗体可変領域の間、及び３番目の抗体可変領域と４番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在することを特徴とする遺伝子、
（９）１番目と２番目の抗体可変領域の間及び３番目と４番目の抗体可変領域の間が短いリンカーで結ばれ、２番目と３番目の抗体可変領域の間が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする（８）記載の遺伝子、
（１０）４つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である（８）または（９）記載の遺伝子、
（１１）第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる（１０）記載の遺伝子、
（１２）以下の工程を含む二特異性単鎖ダイアボディーをコードする遺伝子の作成方法
（ａ）（１）～（４）記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
（ｂ）（５）～（７）記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
（ｃ）（ｂ）の工程で作成した遺伝子を、（ａ）の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、
を含む方法、
（１３）（１）～（１１）いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド、
（１４）（１）～（１１）のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー、
（１５）以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、
（ａ）第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
（ｂ）第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、
（ｃ）（ａ）及び（ｂ）で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、
（ｄ）上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工程、
（１６）以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法
（ａ）（１）～（４）記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
（ｂ）（５）～（７）記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
（ｃ）（ｂ）の工程で作成した遺伝子を、（ａ）の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、
（１７）以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、
（ａ）抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が２つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

（ｂ）上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
（ｃ）上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程、並びに
（１８）（１）～（１１）いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクター
に関する。
本発明の方法は、二特異性ｓｃＤｂのみならず一特異性ｓｃＤｂ（例えば、同じエピトープを認識するが配列の異なる可変領域を有するｓｃＤｂなど）のスクリーニングにも応用できる。
本発明のｓｃＤｂライブラリーの作成方法においては、例えば、まず図１に示すように、抗原Ａを免疫した動物の脾臓等からＶＬ－ＶＨの順につないだ抗体ファージライブラリーを構築する。抗体ファージライブラリーは、公知の方法に従って構築することができる（例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５４（１９９０）；Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）；Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８２－５９７（１９９１）等参照）。
動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原（ハプテンを含む）が挙げられる。蛋白質、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質等からなる物質が抗原として挙げられ、本発明において、特に抗原を構成する物質の種類は限定されない。動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片（例えば、受容体の細胞外領域）を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然（腫瘍セルライン等）由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であり得る。
二特異性Ｄｂは、従来知られている二特異性抗体と同様に使用することができるものである。そこで癌の治療を目的として、例えば、一方の腕を腫瘍細胞抗原を認識するようにし、他方が細胞傷害性を誘起する分子を認識するように設計することができる。この場合、腫瘍細胞抗原としては例えばＣＤ１５、ｐ１８５^{ＨＥＲ２}、１Ｄ１０（悪性Ｂ細胞）、ｐ９７、腎細胞癌、ＯＶＣＡＲ－３、Ｌ－Ｄ１（大腸癌）、メラノサイト刺激ホルモンアナログ、ＥＧＦ受容体、ＣＡＭＡ１、ＭｏＶ１８、ＣＤ１９、神経細胞接着分子（ｎｅｕｒａｌ ｃｅｌｌ ａｄｈｅｓｉｏｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅ；ＮＣＡＭ）、葉酸結合蛋白質（ＦＢＰ）、ＡＭＯＣ－３１（ｐａｎ ｃａｒｃｉｎｏｍａ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ）、Ｉｄ－１、ＣＤ２２、ＣＤ７、ＣＤ３８、ＣＥＡを選択することができる。また、細胞傷害性を誘起する分子としては、ＦｃγＲＩ、ＣＤ１６、ＣＤ３等を挙げることができる。また、上述の細胞障害性を誘起する分子に代えて、例えば、サポニン、リシンのＡ鎖、ＩＦＮ－α、ビンカアルカロイド等の毒素と結合するようにＤｂを設計することもできる。このような二特異性Ｄｂは癌の治療において特に有用である。
又、二特異性Ｄｂはアゴニスト抗体としても有用である。例えば、多くのサイトカイン受容体ではホモ又はヘテロ二量体を形成しており、リガンドが結合することによって二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝えうるようになると考えられている。従って、このような二量体を形成する受容体に結合する二特異性Ｄｂは、リガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニストＤｂとなり得る。
その他の二特異性Ｄｂとしては、（１）ＣＤ３０及びアルカリホスファターゼに結合し、その結果、リン酸マイトマイシンをマイトマイシンアルコールに変換するＤｂ等、物質の変換を助ける酵素を伴うもの、（２）繊維素溶解剤として用い得る、フィブリン、ｔＰＡ、ｕＰＡ等に結合するＤｂ、（３）ＬＤＬ及びＦｃ受容体（ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩまたはＦｃγＲＩＩＩ）等に結合し免疫複合体を細胞表面受容体へ誘導するＤｂ、（４）ＣＤ３等のＴ細胞上の抗原と、ＨＣＶ、インフルエンザ、ＨＩＶ等の病原菌の抗原を認識する感染性の疾患に用い得るＤｂ、（５）腫瘍の検出に用い得る腫瘍抗原と、ＥＯＴＵＢＥ

、ＤＰＴＡ、ハプテン等の検出可能な物質に結合性を有するＤｂ、（６）ワクチンアジュバントとして用い得るＤｂ（Ｆａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：１０１－１２４（１９９２）参照）、並びに（７）診断において使用し得るウサギＩｇＧ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、ＦＩＴＣ、β－ガラクトシダーゼ等の検出可能な物質と、ホルモン、フェリチン、ソマトスタチン、サブスタンスＰ、ＣＥＡ等を抗原とするＤｂが挙げられる。しかしながら、本発明のＤｂはこれらに限定されるものではない。

次に抗原を用いて適当な哺乳動物を免疫する。例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等の動物を免疫化に使用することができる。また、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするＤＮＡを、慣用の方法（例えば、抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプローブ等を用いる方法）により単離する。

本発明における、Ｈ鎖及びＬ鎖可変領域とは、免疫グロブリンのＨ鎖及びＬ鎖のうち、Ｎ末端から通常約１１０残基のアミノ酸からなる部分を指す。免疫グロブリンは、異なるクラス（ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ）に分類され、さらにこれらは幾つかのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ－３、及びＩｇＧ－４、並びにＩｇＡ－１、及びＩｇＡ－２等）に分類されるが、本発明のＨ鎖及びＬ鎖可変領域は、これらいずれのクラス及びサブクラスに属するものであってもよく、特に限定されない。

さらに、本発明の抗体可変領域は所望の抗原との結合性を有している限り、より短いまたは改変された抗体断片であってもよい。「Ｆｖ」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位とを含むものである。この領域は１つのＨ鎖及びＬ鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。各可変領域中に存在する３つの相補性決定領域（超可変部；ＣＤＲ）が相互作用し、ダイマーの表面上に抗原結合部位を形成している。即ち、Ｈ鎖とＬ鎖をあわせて６つのＣＤＲが抗体の抗原結合部位として機能している。しかしながら、１つの可変領域であっても全結合部位を含む場合よりは低い親和性ではあるものの、抗原を認識し、結合する能力を有していることが知られている。従って、本発明におけるＤｂを構成する抗体可変領域は、Ｆｖ断片が特に好ましいが、これに限定されるものではなく、Ｈ鎖またはＬ鎖のＣＤＲが保存され抗原を認識し、結合する能力を有する領域であればよい。

また、遺伝子工学的に非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスター等）由来のモノクローナル抗体のＣＤＲ以外の部分をヒト免疫グロブリン由来の可変領域の枠組構造配列に置き換え「ヒト化抗体」とする技術が公知である（例えば、Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｅｉｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２９（１９８８）；Ｐｒｅｓｔａ　Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）参照）。ヒト化抗体は、レシピエント抗体に導入させたＣＤＲまたは枠組構造配列のどちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、抗体の抗原認識・結合能力をより正確に至適化するために行われる。本発明の可変領域はヒト化等の改変された可変領域も包含する。

その他の可変領域を、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変することもできる。このような改変は、部位特異的変異（Ｋｕｎｋｅｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：４８８（１９８５）参照）、ＰＣＲ変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上（例えば９５％以上）のアミノ酸配列相同性・類似性を元となった抗体Ｈ鎖またはＬ鎖の可変領域のアミノ酸配列と有する。本明細書において、配列の相同性・類似性は、配列相同性が最大の値を取るように必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となった抗体残基と相同（同じ残基）または類似（一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基づき同じグループに分類

されるアミノ酸残基）するアミノ酸残基の割合として定義される。
通常、天然のアミノ酸残基は（１）疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、（２）中性親水性：システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン及びグルタミン、（３）酸性：アスパラギン酸及びグルタミン酸、（４）塩基性：ヒスチジン、リシン及びアルギニン、（５）鎖の配向に影響する残基：グリシン及びプロリン、並びに（６）芳香族性：トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンのグループに各々のアミノ酸の側鎖の性質に基づき分類される。
続いて、単離した重鎖及び軽鎖のＤＮＡを間に２０残基程度の長さのリンカーを用い結合し、適当なファージベクターに組込み、ファージライブラリーを作成する。このとき、リンカーの中に、例えば制限酵素ＢａｍＨＩ、ＡｃｃＩＩＩ等の認識配列を配しておく。このようなリンカーとしては、例えば以下のような配列を有するものを例示することができる：

BamHI　　AccIII

GGTGGTGGT**GGATCC**GGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGC**TCCGGA**GGTGGTGGTTCT（配列番号：１）

CCACCACCA**CCTAGG**CCACCACCACCAAGACCGCCGCCGCCG**AGGCCT**CCACCACCAAGA

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer（配列番号：２）

その他、本発明において使用し得る制限酵素認識配列としては、例えばＢａｍＨＩ、ＡｃｃＩＩＩ、ＡｌｕＩ、ＥｃｏＲＩ、ＨｉｎｃＩＩ、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＨｉｎｆＩ、ＮｏｔＩ、ＳａｃＩ、ＳａｌＩ、Ｓａｕ３ＡＩ、ＳｍａＩ、ＴａｑＩ、ＸｂａＩ、ＡａｔＩ、ＢｃｌＩ、ＢｓｔＥＩＩ、ＥｈｅＩ、ＫｐｎＩ、ＮｈｅＩ、ＰｓｔＩ、ＰｖｕＩＩ、ＳｆｉＩ、ＢｇｌＩ、ＨａｅＩＩＩ、ＨｈａＩ、ＨｐａＩＩ、ＸｈｏＩ等が挙げられる。
また、ファージライブラリーを構成するファージとしては、Ｇ４ファージ、Ｍ１３ファージ、ｆｄファージ、ｆ１ファージ、λファージ、Ｔ４ファージ、Ｔ７ファージ、Ｐ１ファージ、ＭＳ２ファージ、ΦＫファージ、ΦＸ１７４ファージ、λｇＷＥＳ、λＢ、Ｃｈａｒｏｎ　４Ａ、Ｃｈａｒｏｎ３０等を例示することができる。
同様にして抗原Ａとは異なる抗原、または同じ抗原（例えば、エピトープが異なる場合など）により動物またはリンパ球を免疫化し、抗体の重鎖または軽鎖をコードするＤＮＡを単離し、２０残基程度の長さのリンカーを用いＶＨ－ＶＬの順につないだ抗体ファージライブラリーを構築する。このとき、抗原Ａに結合するＶＬａとＶＨａとをコードする遺伝子の間に、抗原Ｂに結合するＶＨｂ及びＶＬｂをコードする遺伝子を挿入することができるようにＶＨｂの５’末端、及びＶＬｂの３’末端に制限酵素により認識される配列を設ける。即ち、抗原Ａについてのライブラリーを制限酵素ＢａｍＨＩ、ＡｃｃＩＩＩ等の認識配列を配して作成した場合には、ＶＨの５’末端にはＢａｍＨＩを、ＶＬの３’末端にはＡｃｃＩＩＩを配しておく。
次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子（例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリーのファージミド（例えば、Ｖａｕｇｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：３０９－３１４（１９９６）参照）あるいは上記ファージライブラリーからＰＣＲを用いて増幅した遺伝子など）を、リンカー並びにＶＬ及びＶＨをコードする遺伝子の末端に配置した制限酵素、例えば上記ＢａｍＨＩとＡｃｃＩＩＩの認識部位を含むリンカーを用いた場合には、ＢａｍＨＩとＡｃｃＩＩＩで処理する。得られた抗原Ｂに対する抗体のＶＨ－ＶＬ断片をコードする遺伝子を抗原Ａに対する抗体ファージミドのＢａｍＨＩとＡｃｃＩＩＩの間に挿入する。これによって抗Ａ抗体と抗Ｂ抗体の様々な組み合わせのｄｉｓｃＤｂのライブラリーが構築できる。
本発明において、「リンカー」は、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されず、制限酵素切断部位を有していても、有していなくてもよい。ここで、「長いリンカー」とは、抗体のＨ鎖可変領域とＬ鎖可変領域を該リンカーを結んでファージライブラリー上に発現させた場合に、ｓｃＦｖとして提示される長さのリンカーのことを意味する。その鎖長は特に制限されないが、好ましくは３０～１５０ｂｐ

の鎖長を有し、さらに好ましくは３６～９０ｂｐの鎖長を有し、特に好ましくは４５～６０ｂｐの鎖長を有する。また、「短いリンカー」とは、抗体のＨ鎖可変領域とＬ鎖可変領域を該リンカーで結んで発現させた場合に、二量体（ｄｉａｂｏｄｙ：Ｄｂ）を形成するリンカーのことを意味し、その鎖長は特に制限されないが、好ましくは６～２７ｂｐの鎖長を有し、さらに好ましくは９～２１ｂｐの鎖長を有し、特に好ましくは１２～１８ｂｐの鎖長を有する。

さらに、ＶＬａ及びＶＨａをコードする遺伝子のリンカーとは逆側の部分にも適当な制限酵素認識部位を設けておくことによりＶＬａ－ＶＨｂ－ＶＬｂ－ＶＨａをコードする断片を切出し、適当な発現ベクターへ挿入し、発現させ、その生物活性を指標に目的とするＤｂをコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。例えば、上述のように抗原Ａ及び抗原Ｂに対するファージ抗体ライブラリーにおいてＢａｍＨＩ及びＡｃｃＩＩＩを用いている場合には、図１において示すようにＳｆｉＩ等の別の制限酵素を用いて適当な発現ベクターに挿入することが出来る。指標とする生物活性としては、例えば、抗原と特異的に結合する活性が挙げられ、抗原の種類によっては阻害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性等も挙げられる。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築したｂｉｓｃＤｂライブラリーについては、レトロウイルスベクター等のベクターに挿入し、目的サイトカイン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニストｂｉＤｂを選択することができる。

本発明のＤｂを発現させるための発現系を構築するための手順および宿主に適合した組換えベクターの構築は遺伝子工学の分野において慣用の技術を用いて行うことができる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｌａｔｏｒｉｅｓ（１９８９）等参照）。宿主細胞としては、細菌等の原核生物、並びに、酵母、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞等の真核細胞等、本発明のＤｂを発現できる細胞であればいずれも用いることができる。特に、グリコシル化の点から考えると哺乳動物細胞が好ましい。

発現ベクターは、遺伝情報の転写及び翻訳を制御するプロモーター、ターミネーター等のユニットを含む必要がある。例えば、大腸菌等のエシェリシア属の微生物を宿主細胞とする場合、プラスミドベクターとしてｐＢＲ、ｐＵＣ系プラスミドを利用することができｌａｃ、ｔｒｐ、ｔａｃ、ｔｒｃ、λファージＰＬ、ＰＲ等に由来するプロモーターが利用可能である。また、ターミネーターとしてはｔｒｐＡ由来、ファージ由来、ｒｒｎＢリボソーマルＲＮＡ由来のものを用いることができる。枯草菌等のバチルス属の微生物を宿主とする場合については、ｐＵＢ１１０系、ｐＣ１９４系等のプラスミドが知られており、場合により遺伝子を染色体にインテグレートすることもできる。プロモーター・ターミネーターとしてａｐｒ、ｎｐｒ、ａｍｙ等由来のものが利用できる。その他、原核細胞としてはシュードモナス属（例えば、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ，Ｐ．ｃｅｐａｃｉａ等；ｐＫＴ２４０等のベクター）、ブレビバクテリウム属（例えば、Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌａｃｔｏｆｅｒｍｅｎｔｕｍ；ｐＡＪ４３等）、コリネバクテリウム属（例えば、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ等；ｐＣＳ１１、ｐＣＢ１０１等）、ストレプトコッカス属（ｐＨＶ１３０１、ｐＧＫ１等）、ラクトバチルス属（ｐＡＭβ１等）、ロドコッカス属（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ等より単離されたプラスミド（Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３８：１００３（１９９２））等）、ストレプトマイセス属（例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｌｉｖｉｄａｎｓ，Ｓ．ｖｉｒｇｉｎｉａｅ等；ｐＩＪ４８６、ｐＫＣ１０６４、ｐＵＷＬ－ＫＳ等）、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレビシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ等）、セラチア属（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ）、シゲレラ属に属する微生物が挙げられる。

真核微生物の発現系としては、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅを宿主とし、ＹＲｐ系、ＹＥｐ系、ＹＣｐ系、ＹＩｐ系のプラスミドを用いた系が知られている。また、ＡＤＨ、ＧＡＰＤＨ、ＰＨＯ、ＧＡＬ、ＰＧＫ、ＥＮＯ等のプロモーター・ターミネーターが利用可能である。その他、クライベロマイセス属（例えば、Ｋｌｕｙｖｅ

ｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ等；２μｍ系、ｐＫＤ１系、ｐＧＫＩ１系、ＫＡＲＳ系等のプラスミド）、シゾサッカロマイセス属（例えば、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ等；ｐＡＵＲ２２４等）、チゴサッカロマイセス属（例えば、Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｒｏｕｘｉｉ等；ｐＳＢ３、及び、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来ＰＨＯ５プロモーター等）、ハンゼヌラ属（例えば、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ　ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ等）、ピキア属（例えば、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ等）、カンディダ属（例えば、Ｃａｎｄｉｄａ　ｍａｌｔｏｓａ，Ｃａｎｄｉｄａ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ，Ｃａｎｄｉｄａ　ｕｔｉｌｉｓ，Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ等）、アスペルギルス属（例えば、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ，Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ等）、及びトリコデルマ属（例えば、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ等）等を本発明の発現ベクター系において用いることができる。

その他、植物細胞を宿主として用いることもできる。例えば、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト、ダイズ、ペチュニア、及びタバコ等由来の植物細胞を宿主とすることができる。特に良く知られた系としてＮｉｃｏｔｉｎａ　ｔａｂａｃｕｍ由来の細胞を用いたものが知られており、これをカルス培養すればよい。植物を形質転換する際には、例えば、ｐＭＯＮ５３０等の発現ベクターを用い、該ベクターをＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ等の細菌に導入する。この細菌をタバコ（例えば、Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｔａｂａｃｕｍ）に感染させると、所望のポリペプチドをタバコの葉等から得ることができる。

カイコ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ）、カ（Ａｅｄｅ　ａｅｇｙｐｔｉ，Ａｅｄｅｓ　ａｌｂｏｐｉｃｔｕｓ）、ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）等の昆虫細胞を宿主として用いることも可能である。例えば、カイコを用いる場合、ＤｂをコードするｄｓＤＮＡをバキュロウイルスベクター等に挿入し、該ウイルスをカイコに感染させることによりカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる（Ｎａｔｕｒｅ　３１５：５９２－５９４（１９８５））。

動物細胞を宿主として用いる場合には、例えば、ｐＭＥ１８Ｓ（Ｍｅｄ．ｉｍｍｕｎｏｌ．２０：２７－３２（１９９０））、ｐＥＦ－ＢＯＳ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：５３２２（１９９０））、ｐＣＤＭ８（Ｎａｔｕｒｅ　３２９：８４０－８４２（１９８７）、ｐＲＳＶｎｅｏ、ｐＳＶ２－ｎｅｏ、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐｃＤＮＡＩ、ｐＡＭｏＥＲＣ３Ｓｃ、ｐＣＤＭ８（Ｎａｔｕｒｅ　３２９：８４０（１９８７））、ｐＡＧＥ１０７（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３：１３３（１９９０））、ｐＲＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐＡＧＥ１０３（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０１：１３０７（１９８７））、ｐＡＭｏＡ、ｐＡＳ３－３、ｐＣＡＧＧＳ（Ｇｅｎｅ　１０８：１９３－２００（１９９１））、ｐＢＫ－ＣＭＶ、ｐｃＤＮＡ３．１（Ｉｎｖｉｒｔｏｇｅｎ）、ｐＺｅｏＳＶ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）等が発現ベクターとして挙げられる。プロモーターとしては、サイトメガロウイルスのＩＥ遺伝子のプロモーター及びエンハンサー、ＳＶ４０の初期プロモーター、ＲＳＶ、ＨＩＶ及びＭＭＬＶ等のレトロウイルスのＬＴＲ、メタロチオネインβ－アクチン、伸長因子１、ＨＳＰ等の動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等を挙げることができる。その他、上述のようにウイルスベクターを用いることもできる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、ＳＶ４０、ＨＩＶ等のＤＮＡ及びＲＮＡウイルスが挙げられる。

動物細胞宿主としては、マウス・ミエローマ細胞（例えば、ＳＰ２／０、ＮＳＯ等）、ラット・ミエローマ細胞（例えば、ＹＢ２／０等）、マウス・ハイブリドーマ細胞、Ｎｍａｌｗａ細胞（ＫＪＭ－１細胞等も含む）、ヒト胎児腎臓細胞（２９３細胞等）、ヒト白血病細胞（ＢＡＬＬ－１等）、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞（ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－７等）、ハムスター胎児腎臓細胞（ＢＨＫ等）、マウスセルトリ細胞（ＴＭ４等）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６等）、ＨＢＴ６３７細胞、ＨｅＬａ細胞、ウサギ腎臓細胞（ＭＤＣＫ等）、ヒト肝臓細胞（ＨｅｐＧ２等）、マウス乳癌細胞（ＭＭＴ０６０５６２

細胞）、ＴＲＩ細胞、ＭＲＣ細胞、ＦＳ３細胞等がある。
発現ベクターの導入方法としては、宿主及びベクターの種類に依存するが、細胞にＤｂをコードするＤＮＡを導入できる方法であれば、いずれも用いることができる。原核細胞へベクターを導入する方法としては、カルシウムイオンを用いる方法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ６９：２１１０（１９７２））、プロトプラスト法（特開昭６３－２４８２９号公報）、エレクトポーレーション法（Ｇｅｎｅ １７：１０７（１９８２）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ＆Ｇｅｎｅｒａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １６８：１１１（１９７９））等があり；酵母への導入方法としては、エレクトポレーション法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１９４：１８２（１９９０））、スフェロプラスト法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：４８８９（１９８４））、酢酸リチウム法（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５３：１６３（１９８３））等があり；植物細胞についてはＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ法（Ｇｅｎｅ ２３：３１５（１９８３）；ＷＯ８９／０５８５９等）や、超音波処理による方法（ＷＯ９１／００３５８）等が知られる；動物細胞へベクターを導入する方法としてはエレクトポレーション（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：１３３（１９９０））、リン酸カルシウム法（特開平２－２７０７５号公報）、リポフェクション法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：７４１３（１９８７）；Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２：４５６（１９７３））、リン酸－カルシウム共沈法、ＤＥＡＥ－デキストラン法、微小ガラス管を用いたＤＮＡの直接注入法等が挙げられる。
上述のようにして取得された形質転換体は、例えば、以下の方法で培養することができる。
形質転換体が原核生物や真核微生物である場合は、培地は該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等の生育に必要な物質を含有し、形質転換体の効率的な培養を可能にするものであれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は好気的条件、嫌気的条件のいずれで行ってもよく、生育温度、培地のｐＨ、生育時間等の条件は、用いる形質転換体の種類に応じ適宜当業者により決定され得るものである。また、誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターについては、必要に応じてインデューサーを培地に添加すればよい（例えば、ｌａｃプロモーターであればＩＰＴＧ、ｔｒｐプロモーターであればＩＡＡ等）。
昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、培地としてはＴＮＭ－ＦＨ培地（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、Ｓｆ－９００ ＩＩ ＳＦＭ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＥｘＣｅｌｌ４００及びＥｘＣｅｌｌ４０５（ＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、Ｇｒａｃｅ’ｓ Ｉｎｓｅｃｔ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｎａｔｕｒｅ １９５：７８８（１９６２））等を用いることができ、必要に応じゲンタマイシン等の抗生物質を添加してもよい。
形質転換体が動物細胞である場合には、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地（Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ １９９：５１９（１９６７））、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地（Ｓｃｉｅｎｃｅ １２２：５０１（１９５２））、ＤＭＥＭ培地（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ８：３９６（１９５９））、１９９培地（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ７３：１（１９５０））、または、これらの培地にＢＳＡ等を添加した培地を使用することができる。培養は通常の条件、例えば、ｐＨ６～８、３０～４０℃、５％CO_2存在下で行うことができる。この際、必要に応じカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。
このようにして得られた本発明のＤｂは、宿主細胞内、または、シグナル配列を用いて細胞外に分泌させた場合には培地等から単離し、実質的に純粋なポリペプチドとして精製することもできる。ポリペプチドの分離、精製は、一般的に使用される、クロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈澱、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、再結晶等の方法を適宜選択し、必要に応じて組合せることにより行うことができる。クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィ

ー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８８））。これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、本発明のＤｂは抗原に対して結合することから、抗原への結合性を利用して精製することも可能である。

さらに、本発明は上述のｓｃＤｂライブラリーの作成方法において用いることができる、（Ｉ）２つの抗体可変領域をコードし、一方の可変領域と他方の可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、及び（ＩＩ）２つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子に関する。これらの本発明のｓｃＤｂライブラリーの作成における材料となる遺伝子の可変領域は好ましくは、ｓｃＦｖとして発現されるように重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが長いリンカーで結合されているものである。このような遺伝子は、（Ｉ）または（ＩＩ）を含む発現ベクターをバクテリオファージコート蛋白質融合（Ｓｍｉｔｈ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１３１５（１９８５）；Ｓｃｏｔｔ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６（１９９０）；Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８：３０９（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４（１９９０）；Ｗｅｌｌｓ ａｎｄ Ｌｏｗｍａｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９７（１９９２）；米国特許第５，２２３，４０９号）等の方法によりファージ粒子表面上にディスプレイさせ、ディスプレイされたペプチドの表現型により選択することにより、それをコードする遺伝子も同時に得られるという点で有利である。

（Ｉ）及び（ＩＩ）の遺伝子、または、該遺伝子を含む抗体ライブラリーを制限酵素処理し、連結することで本発明の４つの抗体可変領域をコードし、１番目の抗体可変領域と２番目の抗体可変領域の間、及び３番目の抗体可変領域と４番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在する遺伝子を得ることができる。このような遺伝子において、１番目と２番目の抗体可変領域の間及び３番目と４番目の抗体可変領域の間を短いリンカーで、２番目と３番目の抗体可変領域の間を長いリンカーで結合し、且つ、１番目が第一の抗原に対する重鎖可変領域、２番目が第二の抗原に対する軽鎖可変領域、３番目が第二の抗原に対する重鎖可変領域、そして４番目が第一の抗原に対する軽鎖可変領域の順で並んでいると、これを発現させた場合に二特異性単鎖ダイアボディを得ることができる。

本発明は、このような遺伝子を含むベクター及びライブラリー、並びに、該遺伝子によりコードされるペプチドを含むものである。

本発明はまた、

（ａ）抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が２つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

（ｂ）上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

（ｃ）上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程

を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法を提供する。この方法により、本発明のｓｃＤｂライブラリーの作成方法を一特異性Ｄｂへ応用することができる。例えば、ファージライブラリー構築時にリンカー内に例えば、下記のようなＢａｍＨＩサイト（下線部）を二箇所設けておく。

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer（配列番号：３）

GGTGGTGGT**GGATCC**GGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGT**GGATCC**（配列番号：４）

次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子（例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリーのファージミドあるいは上記ファージライブラリーからＰＣＲを用いて増幅した遺伝子など）を、ＢａｍＨＩで処理し、自己閉環させることでリンカーの長さをｓｃＦｖ用の２０残基からダイアボディに最適の５残基

（“GGTGGTGGTGGATCC(配列番号：５)”

によりコードされる“ＧｌｙＧｌｙＧｌｙＧｌｙＳｅｒ（配列番号：６）”）にすることが出来る。こうして出来た受容体結合抗体を含むＶＬ－ＶＨ断片を適当な発現ベクターに挿入することによって生物活性を指標にＤｂをスクリーニングすることが出来る。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築したＤｂライブラリーをレトロウイルスベクターに挿入し、目的サイトカイン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニストＤｂを選択することができる。

本発明のｓｃＤｂは、従来知られている多特異性抗体と同様に、免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。例えば、腫瘍細胞を殺す等の細胞障害性を誘起するため、ワクチンアジュバントとして、血栓溶解剤等の薬剤を適切に生体内において標的に対して運搬するため、酵素により活性化されるプロドラッグを標的部位において確実に変換するため、感染性の疾患の治療用に、細胞表面受容体に対して免疫複合体を誘導するため、免疫毒素等を腫瘍細胞等の標的細胞に運搬するため等、様々な治療目的が考えられる。

このような治療目的で使用される本発明のＤｂを含む医薬組成物は、必要に応じ、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、防腐剤、界面活性剤（ＰＥＧ、Ｔｗｅｅｎ等）、キレート剤（ＥＤＴＡ等）、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ＰＥＧ等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０）等と併用してもよい。

また、必要に応じ本発明のＤｂをマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ［メチルメタクリル酸］等のマイクロカプセル）に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等）とすることもできる（”Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ １６^{ｔｈ} ｅｄｉｔｉｏｎ”, Ｏｓｌｏ Ｅｄ.（１９８０）等参照）。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明のＤｂに適用し得る（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｂｉｏｍｅｄ. Ｍａｔｅｒ. Ｒｅｓ. １５：１６７－２７７（１９８１）；Ｌａｎｇｅｒ, ｃｈｅｍ. Ｔｅｃｈ. １２：９８－１０５（１９８２）；米国特許第３，７７３，９１９号；欧州特許出願公開（ＥＰ）第５８，４８１号；Ｓｉｄｍａｎ ｅｔ ａｌ., Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２：５４７－５５６（１９８３）；ＥＰ第１３３，９８８号）。

患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮または経口等の経路により当業者に公知の方法により行い得る。投与量は、患者の体重、年齢、疾病の種類、症状、投与方法等の種々の要因により変化するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することができる。

また、本発明のＤｂをコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を

行うことも考えられる。投与方法としては、ｎａｋｅｄプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、ＨＶＪベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか（Ａｄｏｌｐｈ『ウイルスゲノム法』，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｆｌｏｒｉｄ（１９９６）参照）、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆（ＷＯ９３／１７７０６等）して投与することができる。しかしながら、生体内においてＤｂが発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路（静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介する注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等）により十分な量が投与される。ｅｘ　ｖｉｖｏにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法（米国特許第４，９４５，０５０号）、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髄由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明のＤｂをコードする遺伝子を投与してもよい。

本発明のＤｂは酵素免疫分析に用いることもできる。このためには、Ｄｂの一方の抗体可変領域は酵素上の酵素活性を阻害しないエピトープを、そして他方は担体に結合するような担体を認識するように設計する。例えば、ＩｇＧ、フェリチン、ＨＲＰ及びホルモン等を認識するＤｂを挙げることができる。

また、本発明のＤｂはｉｎ　ｖｉｖｏ及びｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける種々の疾病の免疫診断に用いることも可能である。例えば、Ｄｂの一方の抗体可変領域を腫瘍細胞に特異的な抗原等を認識するようにし、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計することができる。検出可能なマーカーとしては放射性同位体（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ等）、蛍光色素（フルオレセイン、ルシフェリン等）、化学ルミネセンス化合物（イソチオシアネート、ローダミン等）、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、ＨＲＰ等の汎用の酵素等を挙げることができ、Ｄｂのこれらの物質との結合及び検出は公知の方法に従って行うことができる（Ｈｕｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　１４４：９４５（１９６２）；Ｄａｖｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１３：１０１４（１９７４）；Ｐａｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．４０：２１９（１９８１）；Ｎｙｇｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ　ａｎｄ　Ｃｙｔｏｃｈｅｍ　３０：４０７（１９８２）参照）。

このように検出可能な物質に対して反応性を有する本発明のＤｂは、拮抗的結合分析、直接的及び間接的なサンドイッチ免疫分析（ＥＬＩＳＡ等）、免疫沈降分析（Ｚｏｌａ，”Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ”，ｐｐ．１４７－１５８，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ．（１９８７））等を含む、種々の分析において用いることができる。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規な二特異性ｓｃＤｂライブラリーの構築法が提供される。本発明の方法により、二特異性ｓｃＤｂライブラリーをｓｃＦｖのファージライブラリーから煩雑な処理なしに一括処理により作成することができる。また、本発明は、ファージ抗体ライブラリーからパニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提供するものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> A method for scDb library construction

<130> C1-A0203P

<140>

<141>

<150> JP 2002-112369

<151> 2002-04-15

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 1

ggtggtggtg gatccggtgg tggtggttct ggcggcggcg gctccggagg tggtggttct 60

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 3

ggtggtggtg gatccggtgg tggtggttct ggcggcggcg gctccggagg tggtggatcc 60

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 5

ggtggtggtg gatcc 15

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

【図面の簡単な説明】

図１は、抗原Ａ、Ｂに対する二特異性ｓｃＤｂライブラリーの構築方法を概略的に示す図である。

図２は、ファージ抗体ライブラリーからのＤｂライブラリーの構築方法を概略的に示す図である。

【図１】

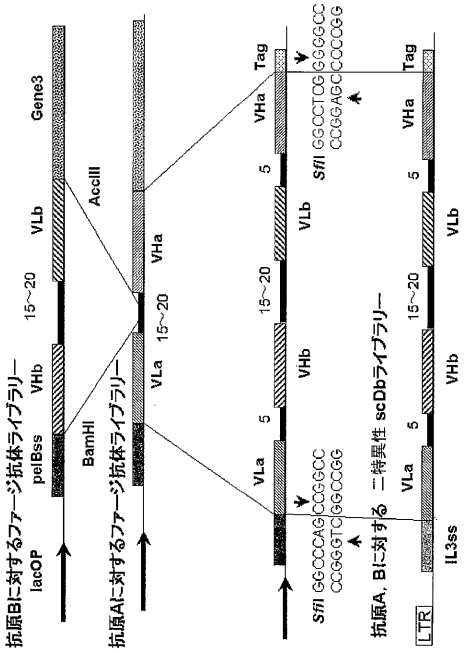

抗原Bに対するファージ抗体ライブラリー
lacOP
pelBss
VHb
15~20
VLb
Gene3
AccIII
BamHI
抗原Aに対するファージ抗体ライブラリー
VLa
15~20
VHa
VLa
5
VHb
15~20
VLb
5
VHa
Tag
SfiI GGCCCAG CCGGCC
CCGGGTC GGCCGG
SfiI GGCCTCG GGGGCC
CCGGAGC CCCCGG
抗原A, Bに対する 二特異性 scDbライブラリー
VLa
5
VHb
15~20
VLb
5
VHa
Tag
LTR
IL3ss

図１

【図２】

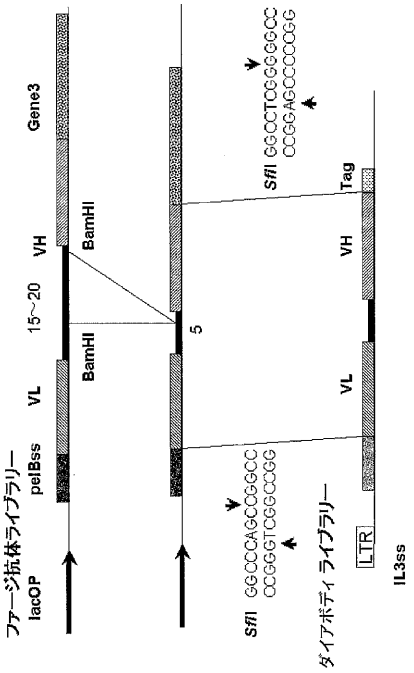

ファージ抗体ライブラリー
lacOP
pelBss
VL
15~20
VH
Gene3
BamHI
BamHI
5
SfiI GGCCTCG GGGGCC
CCGGAGC CCCCGG
SfiI GGCCCAG CCGGCC
CCGGGTC GGCCGG
ダイアボディ ライブラリー
VL
VH
Tag
LTR
IL3ss

図２

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed