

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4439262号
(P4439262)

(45) 発行日 平成22年3月24日(2010.3.24)

(24) 登録日 平成22年1月15日(2010.1.15)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A

請求項の数 8 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2003-529974 (P2003-529974)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月19日 (2002.9.19)
 (65) 公表番号 特表2005-503802 (P2005-503802A)
 (43) 公表日 平成17年2月10日 (2005.2.10)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/029889
 (87) 國際公開番号 WO2003/025202
 (87) 國際公開日 平成15年3月27日 (2003.3.27)
 審査請求日 平成17年9月16日 (2005.9.16)
 (31) 優先権主張番号 60/323,455
 (32) 優先日 平成13年9月19日 (2001.9.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503102674
 アレクシオン ファーマシューティカルズ
 , インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 コネチカット 0641
 0, チェシア, ノッター ドライブ
 352
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】操作されたテンプレートおよび単一プライマー増幅におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸を増幅する方法であって、以下：

a) プライマーをテンプレートにアニーリングする工程であって、該プライマーは、該テンプレートにアニールする第1部分、および該テンプレートにアニールしない所定の配列の第2部分を有する、工程；

b) 該プライマーの第1部分が該テンプレートにアニールする位置と該テンプレートの末端との間の該テンプレートの部分に相補的なポリヌクレオチドを合成する工程であって、該ポリヌクレオチドは第1末端および第2末端を有し、該第1末端は該プライマーを組み込んでいる、工程；

c) 該テンプレートから、工程(b)において合成されたポリヌクレオチドを分離する工程；

d) 工程(b)において合成された該ポリヌクレオチドの第2末端に、入れ子式オリゴヌクレオチドをアニーリングする工程であって、該入れ子式オリゴヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドの第2末端にアニールする第1部分、および該プライマーの第2部分と同一な所定の配列を有する第2部分を有し、該入れ子式オリゴヌクレオチドはその3'末端で伸長されない、工程；

e) 工程(b)において合成された該ポリヌクレオチドを伸長させ、該所定の配列に相補的な該ポリヌクレオチドの末端部分を提供する工程；ならびに

f) 該所定の配列を有する単一プライマーを用いて、該伸長されたポリヌクレオチドを

増幅させる工程、
を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記入れ子式オリゴヌクレオチドをアニーリングする工程が、異なる配列を有する入れ子式オリゴヌクレオチドのコレクションを提供する工程、および工程 (b) において合成された前記ポリヌクレオチドと、該入れ子式オリゴヌクレオチドのコレクションとを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 3】

前記テンプレートが、前記プライマーにアニーリングする前に消化される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

工程 (b) において合成された前記ポリヌクレオチドが、前記入れ子式オリゴヌクレオチドにアニーリングされる前に消化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記入れ子式オリゴヌクレオチドの 3' 末端が、工程 (b) において合成された前記ポリヌクレオチドにハイブリダイズしない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記入れ子式オリゴヌクレオチドの 3' 末端が、該 3' 末端の伸長を防ぐ改変された塩基を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

核酸を増幅する方法であって、以下：

a) プライマーを、制限エンドヌクレアーゼで消化されたテンプレートにアニーリングする工程であって、該プライマーは、該テンプレートにアニールする第 1 部分、および該テンプレートにアニールしない所定の配列の第 2 部分を有する、工程；

b) 該プライマーの第 1 部分が該テンプレートにアニールする位置と該テンプレートの末端との間の該テンプレートの部分に相補的なポリヌクレオチドを合成する工程であって、該ポリヌクレオチドは第 1 末端および第 2 末端を有し、該第 1 末端は該プライマーを組み込んでいる、工程；

c) 該テンプレートから、工程 (b) において合成されたポリヌクレオチドを分離する工程；

20

d) 工程 (b) において合成された該ポリヌクレオチドの第 2 末端に、入れ子式オリゴヌクレオチドをアニーリングする工程であって、該入れ子式オリゴヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドの第 2 末端にアニールする第 1 部分、および該プライマーの第 2 部分と同一な所定の配列を有する第 2 部分を有する、工程；

e) 工程 (b) において合成された該ポリヌクレオチドを伸長させ、該所定の配列に相補的な該ポリヌクレオチドの末端部分を提供する工程；ならびに

f) 該所定の配列を有する単一プライマーを用いて、該伸長されたポリヌクレオチドを増幅させる工程、
を包含する、方法。

【請求項 8】

核酸を増幅する方法であって、以下：

a) プライマーをテンプレートにアニーリングする工程であって、該プライマーは、該テンプレートにアニールする第 1 部分、および該テンプレートにアニールしない所定の配列の第 2 部分を有する、工程；

b) 該プライマーの第 1 部分が該テンプレートにアニールする位置と該テンプレートの末端との間の該テンプレートの部分に相補的なポリヌクレオチドを合成する工程であって、該ポリヌクレオチドは第 1 末端および第 2 末端を有し、該第 1 末端は該プライマーを組み込んでいる、工程；

c) 工程 (b) において合成されたポリヌクレオチドを制限エンドヌクレアーゼで消化する工程；

40

50

d) 該テンプレートから、工程 (b) において合成されたポリヌクレオチドを分離する工程；

e) 工程 (b) において合成された該ポリヌクレオチドの第 2 末端に、入れ子式オリゴヌクレオチドをアニーリングする工程であって、該入れ子式オリゴヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドの第 2 末端にアニールする第 1 部分、および該プライマーの第 2 部分と同一な所定の配列を有する第 2 部分を有する、工程；

f) 工程 (b) において合成された該ポリヌクレオチドを伸長させ、該所定の配列に相補的な該ポリヌクレオチドの末端部分を提供する工程；ならびに

g) 該所定の配列を有する単一プライマーを用いて、該伸長されたポリヌクレオチドを增幅させる工程、

を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、米国仮出願第 60/323,455 号 (2001 年 9 月 19 日出願) に対して優先権を主張する。

【0002】

(技術分野)

本開示は、標的核酸配列の増幅に有用な操作されたテンプレートに関する。より詳細には、その反対の末端に相補配列を含むように操作されたテンプレートが、入れ子式 (nested) オリゴヌクレオチド伸長反応 (NOER) により提供される。この操作されたテンプレートは、単一プライマー増幅 (SPA) により操作されたテンプレート内で標的核酸を増幅することを可能にする。特に有用な実施形態において、この操作されたテンプレート由来の標的配列は、発現ビヒクルにクローン化されて、例えば、抗体ライブラリーのような、ポリペプチドまたはタンパク質のライブラリーを提供する。

【背景技術】

【0003】

(関連技術の背景)

核酸増幅および増幅産物の検出の方法は、核酸配列の検出、同定、定量および配列解析において補助する。核酸増幅は、関連遺伝子由来の (例えば、抗体) ライブラリーの構築における重要な工程である。これらのライブラリーは、特定の所望の活性を有する抗体についてスクリーニングされ得る。核酸分析は、病原体の検出および同定、規定された表現型を生じる遺伝子変更の検出、遺伝的疾患または疾患に対する感受性の診断、疾患の発症における遺伝子発現および規定された刺激に応じた遺伝子発現の評価、ならびに種々のゲノムプロジェクトのために重要である。核酸増幅方法の他の適用としては、希少な細胞の検出、病原体の検出、および悪性疾患における変更された遺伝子発現の検出などが挙げられる。核酸増幅はまた、定性的分析 (例えば、規定された核酸配列の存在の検出) および規定された遺伝子配列の定量 (例えば、病原性配列の量の評価、ならびに遺伝子の増殖または欠失の決定、および正常細胞型から悪性細胞型への細胞の形質転換などにおいて有用) のために有用である。核酸配列における配列変更の検出は、遺伝子分析に関連する場合、変異体遺伝子型の検出、薬物耐性をもたらす変異の検出、薬理ゲノム学 (pharmacogenomics) などのために重要である。

【0004】

核酸増幅の多くのバリエーションが存在する (例えば、指數関数的増幅、関連 (linker) 線形増幅、ライゲーションベースの増幅、および転写ベースの増幅)。指數関数的核酸増幅方法の一例は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) であり、これは、多数の刊行物に開示されている。例えば、Mullisら Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273 (1986); Mullis K. E P 201, 184; Mullisら 米国特許第 4,582,788 号; Erl 50

inchら EP50, 424, EP84, 796, EP258, 017, EP237, 362; および Saiki R. ら米国特許第4, 683, 194号を参照のこと。実際、このポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、最も一般的に使用される標的增幅方法である。PCRは、変性、2つの異なるオリゴヌクレオチドプライマーの、標的鎖のそれぞれ反対の鎖へのハイブリダイゼーションおよびヌクレオチドポリメラーゼによるプライマー伸長の複数のサイクルに基づいて、標的配列の複数の二本鎖コピーを产生する。

【0005】

単一プライマーを使用する增幅方法もまた、開示されている。例えば、米国特許第5, 508, 178号；同第5, 595, 891号；同第5, 683, 879号；同第5, 130, 238号；および同第5, 679, 512号を参照のこと。プライマーは、米国特許第5, 744, 308号に開示されるように、DNA / RNAキメラプライマーであり得る。

【0006】

いくつかの增幅方法は、テンプレート切換え（switching）オリゴヌクレオチド（TSO）およびブロックオリゴヌクレオチドを使用する。例えば、キメラDNAプライマーが利用されるテンプレート切換え増幅は、米国特許第5, 679, 512号；同第5, 962, 272号；同第6, 251, 639号に開示され、そして Pate1 ら Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 2969-2974 (1996) により開示される。

【0007】

しかし、以前に記載された標的增幅方法は、いくつかの欠点を有する。例えば、転写ベースの增幅方法（例えば、核酸配列ベースの増幅（NASBA）および転写媒介増幅（TMA））は、ポリメラーゼプロモーター配列の、プライマーによる増幅産物への組込み（非特異的増幅を生じる傾向のあるプロセス）の必要性により制限される。現行の増幅方法の欠点の別の例は、異なる温度で最適な結合を有し得る2つの結合事象の要件、および天然に存在する配列を含むプライマーの使用である。この要因の組合せは、ミスプライミングおよび結果としての標的配列以外の配列の増幅の増加した可能性を生じる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、これらの欠点を克服する改善された核酸増幅方法の必要性が存在する。本明細書中に提供される本発明は、この必要性を満たし、そしてさらなる利益を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

（要旨）

核酸の新規な増幅方法がここで開示されており、この方法は、以下の工程：a) プライマーをテンプレート核酸配列にアニーリングする工程であって、このプライマーは、このテンプレートにアニーリングする第1の部分および所定の配列の第2の部分を有する、工程；b) ポリヌクレオチドを合成する工程であって、このポリヌクレオチドは、このプライマーの第1の部分がテンプレートにアニーリングする位置と、テンプレートの末端（このポリヌクレオチドは、第1末端および第2末端を有する）との間のテンプレートの部分にアニーリングしつつ相補的であり、ここでこの第1末端がプライマーを組み込む、工程；c) 工程（b）において合成されたポリヌクレオチドを、テンプレートから分離する工程；d) 入れ子式オリゴヌクレオチドを、工程（b）で合成されたポリヌクレオチドの第2末端にアニーリングする工程であって、この入れ子式オリゴヌクレオチドは、このポリヌクレオチドの第2末端にアニーリングする第1の部分およびプライマーの第2部分と同じ所定の配列を有する第2部分を有する、工程；e) 工程（b）で合成されたポリヌクレオチドを伸長して、所定の配列に相補的であるその末端部分を提供する工程；ならびにf) 所定の配列を有する単一のプライマーを使用して伸長されたポリヌクレオチドを増幅する工程、を包含する。

10

20

30

40

50

【0010】

代替の実施形態において、この方法は、以下の工程：プライマーおよび境界オリゴヌクレオチドを、テンプレート核酸配列にアニーリングする工程であって、このプライマーは、このテンプレートにアニーリングする第1部分および所定の配列の第2部分を有する、工程；b) ポリヌクレオチドを合成する工程であって、このポリヌクレオチドは、このプライマーの第1部分がテンプレートにアニーリングする位置と、境界オリゴヌクレオチドがアニーリングするテンプレートの部分との間のテンプレートの部分に対してアニーリングしあつ相補的であり、このポリヌクレオチドが、第1末端および第2末端を有し、ここでこの第1末端が、プライマーを組み込む、工程；c) 工程(b)で合成されたポリヌクレオチドを、テンプレートから分離する工程；d) 入れ子式オリゴヌクレオチドを、工程(b)で合成されたポリヌクレオチドの第2末端へアニーリングする工程であって、この入れ子式オリゴヌクレオチドは、このポリヌクレオチドの第2末端へアニーリングする第1部分およびプライマーの第2部分と同じ所定の配列を有する第2部分を有する、工程；e) 工程(b)で合成されたポリヌクレオチドを伸長して、所定の配列に対して相補的であるその終結部分を提供する工程；ならびにf) 所定の配列を有する単一のプライマーを使用してこの伸長されたポリヌクレオチドを増幅する工程、を包含する。

10

【0011】

その第1末端において所定の配列を有しそしてその他方の末端において所定の配列に相補的な配列を有する操作された核酸鎖自体が、本開示の新規な局面であることもまた企図される。

20

【0012】

別の局面において、本開示は、核酸鎖を増幅する新規な方法を提供し、この方法は、その第1末端に所定の配列を有し、そしてその他方の末端に所定の配列に相補的な配列を有する操作された核酸鎖を提供する工程；ならびにポリメラーゼおよびヌクレオチドの存在下においてヌクレオチドの重合に適切な条件下で、この操作された核酸鎖を、所定の配列を有するプライマーと接触させる工程を包含する。

【0013】

本明細書中に記載される増幅プロセスおよび操作されたテンプレートを使用して、適切な発現ベクターに連結され得る増幅産物を調製し得る。次いで、このベクターを使用して、標的配列によりコードされるポリペプチドまたはタンパク質を產生するための標準的な方法を使用して適切な宿主生物を形質転換し得る。特に有用な実施形態において、本明細書中に記載される技術は、関連した配列のファミリーを増幅して、複雑なライブラリー（例えば、抗体ライブラリー）を構築するために使用される。

30

【0014】

（好みしい実施形態の詳細な説明）

本開示は、標的核酸配列を増幅させる方法を提供する。特に有用な実施形態において、標的核酸配列は、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子である。本開示はまた、増幅産物が、適切な発現系においてクローニングされ得、そして発現され得る方法を記載する。特に有用な実施形態において、本明細書中に記載される技術は、関連するファミリーの配列を増幅させ、複雑なライブラリー（例えば、抗体ライブラリー）を構築するために使用される。

40

【0015】

標的核酸配列は、単一プライマーのみを含むプロセスによって指數関数的に増幅される。単一プライマー（すなわち、各々異なる配列を有する順方向プライマーおよび逆方向プライマーの両方を必要としない）を使用する能力は、増幅されるべき標的配列を含む核酸の鎖を操作することによって達成される。操作された核酸の鎖（本明細書中で時々、「操作されたテンプレート」といわれる）は、2つのテンプレートから調製される；つまり、1) 増幅されるべき配列を含む天然の核酸または合成の核酸（例えば、DNAまたはcDNA）である開始物質および2) 入れ子式オリゴヌクレオチド。開始物質は、元のテンプレートと考えられ得る。入れ子式オリゴヌクレオチドは、操作された核酸の鎖の生成の間

50

、元のテンプレートのヌクレオチド配列を伸長するテンプレートとして使用される。操作される核酸の鎖は、一連の操作によって元のテンプレートから作製され、その反対の末端に相補的配列を生じる。この配列は、単一プライマーのみを使用して増幅を可能にするこれらの相補的配列である。

【0016】

精製形態または非精製形態の任意の核酸は、本明細書中で記載されるプロセスのための開始物質として使用され得、但し、この開始物質は、増幅されるべき標的核酸配列を含むかまたは含むと疑われる。従って、このプロセスで使用される開始物質は、例えば、DNAまたはRNA（メッセンジャーRNAを含む）であり得、このDNAまたはRNAは、一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。さらに、各々の一本鎖を含むDNA-RNAハイブリッドが、使用され得る。これらの核酸の任意の混合物をまた使用しても、または同じプライマーもしくは異なるプライマーを使用して本明細書中の前記増幅反応から生成された核酸を使用してもよい。増幅されるべき標的核酸配列は、より大きな分子の小部分であっても、別個の分子として最初に存在していてもよい。開始核酸は、1つを超える所望の核酸配列を含み得、これらは、同じであっても異なっていてもよい。従って、本プロセスは、巨大量の1つの標的核酸配列を產生するためだけでなく、同じ核酸分子または異なる核酸分子上に位置する1つを越える異なる標的核酸配列を同時に増幅するためにも有用であり得る。

【0017】

核酸は、以下の任意の供給源（例えば、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー、プラスミド、クローン化されたDNAまたはRNA）から得られても、任意の供給源（細菌、酵母、ウイルス、およびより高等な生物（例えば、植物または動物）を含む）由來の天然のDNAまたはRNAから得られてもよい。核酸は、天然に存在しても、全体または一部のいずれかが合成であってもよい。本発明で使用される核酸を得る技術および生成する技術は、当業者に周知である。核酸が、二本鎖を含む場合、核酸の鎖を元のテンプレートとして使用し得る前に、別々の工程かまたはプライマー伸長産物の合成と同時にかのいずれかで、分離することが必要である。さらに、開始物質が第1鎖DNAである場合、第2鎖DNAは、有利には、当業者の視野内のプロセスによって生成され得、操作されたテンプレートが生成される元のテンプレートとして使用される。

【0018】

第1鎖cDNAは、本方法に関して、特に有用な元のテンプレートである。DNAテンプレートを生成するために適切な方法は、公知であり、当業者に容易に選択される。好ましい実施形態において、第1鎖cDNAは、逆転写酵素が、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーおよび4つのデオキシヌクレオシド三リン酸（dATP、dGTP、dCTP、およびTTP）の存在下で、任意のRNA開始物質に対して相補的なDNAの合成を触媒する反応において、合成される。反応は、mRNAの3'末端に対するオリゴデオキシヌクレオチドプライマーのアニーリングによって開始され、伸長する鎖の3'末端に、mRNAヌクレオチド配列との塩基対形成関係によって決定されるように適切なデオキシヌクレオチドの段階的な付加が続く。当業者が認識するように、サンプル中の全てのmRNAは、オリゴdTの、mRNAのポリA尾部へのアニーリングによって第1鎖cDNAを生成するために使用され得る。

【0019】

一旦、オリジナルのテンプレートが得られると、プライマー20および境界オリゴヌクレオチド30が、オリジナルテンプレート10にアニールされる（図1を参照のこと）。プライマーの3'末端で始まり、境界オリゴヌクレオチドの5'末端あたりまでの元のテンプレートの部分に相補的な核酸の鎖が、重合される。

【0020】

元のテンプレートにアニールされるプライマー20は、好ましくは、元のテンプレートにアニールしない、所定の配列の第1部分22および元のテンプレートにアニールする第2部分25を含み、そして必要に応じて、第1の部分と第2の部分との間に制限部位23

10

20

30

40

50

を含む。プライマーは、増幅されるべき標的配列 1 2 に隣接する元のテンプレートにアニールする。プライマーが、増幅されるべき標的配列の上流の元のテンプレートにアニールし得るか、またはプライマーが、図 1 に示されるように増幅されるべき標的配列 1 2 の開始と重なり得ることが企図される。プライマーの非アニーリング部分 2 2 の所定の配列は、元のテンプレートにおいてネイティブではなく、そして増幅プロセスの間使用される单一プライマーが、下記に詳述されるようにハイブリダイズし得る配列を提供するように選択される。必要に応じて、所定の配列は、操作されたテンプレートの一部を、本明細書中以下に、より完全に記載されるような発現ベクターへの挿入に有用な制限部位を含み得る。

【 0 0 2 1 】

元のテンプレートにアニールされる境界オリゴヌクレオチド 3 0 は、核酸の重合を終結させる。核酸重合を終結させ得る任意のオリゴヌクレオチドは、境界オリゴヌクレオチド 3 0 として使用され得る。好ましい実施形態において、境界オリゴヌクレオチドは、第 1 の部分 3 5 および第 2 の部分 3 2 を含み、この第 1 の部分は、元のテンプレート 1 0 にアニールし、そしてこの第 2 の部分は、伸長反応を受けにくい。境界オリゴが、伸長のための部位として作用することを妨げるための技術は、当業者の視野内である。例として、境界オリゴ 3 0 の部分 3 2 は、それが図 1 に示されるような元のテンプレート 1 0 にアニールしないように設計され得る。このような実施形態において、境界オリゴヌクレオチド 3 0 は、重合をさらに阻止するが、核酸合成のためのプライマーとして働くかない。なぜなら、その 3' 末端は、元のテンプレート 1 0 とハイブリダイズしないからである。あるいは、境界オリゴ 3 0 の 3' 末端は、ロックされた (locked) 核酸を含み、同じ効果を達成するように設計され得る。ロックされた核酸は、例えば、W099/14226 に開示され、この内容は、参考として本明細書中に援用される。当業者は、境界オリゴの 3' 末端の伸長が生じないことを保証する他の方法を構想する。

【 0 0 2 2 】

本明細書中に記載のプライマーおよびオリゴヌクレオチドを、当該分野で周知の確立されたオリゴヌクレオチド合成方法を使用して合成し得る。オリゴヌクレオチド（本発明のプライマーを含む）としては、天然モノマーまたは改変モノマーの直鎖オリゴマーあるいは連結物（linkage）（例えば、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドなど）が挙げられ、これらは、ワトソン - クリック塩基対形成のような通常パターンのモノマー - モノマー相互作用によって、標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し得る。通常、モノマーは、ホスホジエステル結合またはそれらのアナログによって連結され、数個のモノマー単位（例えば、3 ~ 4 ）～数十のモノマー単位のサイズの範囲に亘るオリゴヌクレオチドを形成する。プライマーは、代表的には、一本鎖であるが、二本鎖であってもよい。プライマーは、代表的には、デオキシリボ核酸であるが、当該分野で公知の広範な種々の合成プライマーおよび天然に存在するプライマーが、本開示の方法に有用であり得る。プライマーは、テンプレートに相補的であり、そのテンプレートにハイブリダイズして、合成を開始するための部位としての機能を果たすように設計されるが、テンプレートの正確な配列を反映する必要はない。このような場合、テンプレートに対するプライマーの特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリングエンサーに依存する。プライマーを、例えば、色素生成性部分、放射活性部分、または蛍光部分で標識し得、そして検出可能部分として使用し得る。

【 0 0 2 3 】

核酸の重合を、当業者に公知の方法を使用して達成し得る。重合を、一般的に、テンプレートの指示に従って遊離ヌクレオチドを順次付加する DNA ポリメラーゼを使用して酵素的に達成する。いくつかの異なる DNA ポリメラーゼが、本発明のプロセスにおける使用に適切である。特定の実施形態において、選択基準としては、エキソヌクレアーゼ活性の欠損または強力なエキソヌクレアーゼを保持しない DNA ポリメラーゼが挙げられる。本発明のプロセスにおける使用のための低いエキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼを、天然供給源から単離し得るか、または組換え DNA 技術を介して作製し得る

10

20

30

40

50

。使用し得るポリメラーゼの例示的な例としては、T 7 Sequenase v. 2.0、エキソヌクレアーゼ活性を欠損する、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、Taqポリメラーゼのクレノウフラグメント、exo. - Pfu DNAポリメラーゼ、Vent. (exo. -) DNAポリメラーゼおよびDeep Vent. (exo. -) DNAポリメラーゼであるが、これらに限定されない。

【0024】

特に有用な実施形態では、境界オリゴヌクレオチドの使用を、消化により出発材料の不要部分を除去することによって回避する。この実施形態(図2Aにで概略的に示す)では、制限オリゴヌクレオチド70を、前もって選択された位置で出発材料100にアニーリングする。この制限オリゴヌクレオチドは、制限部位72を含む、出発材料における二本鎖部分を提供する。適切な制限部位としては、Xho I、Spe I、Nhe I、 Hind III、Nco I、Xma I、Bgl II、Bst IおよびPvu Iが挙げられるが、これらに限定されない。適切な制限酵素への曝露により、この出発材料を消化し、それにより、増幅されるべき所望の標的配列12(またはその部分)を維持しつつ、不要な配列を除去するように短くし、最初のテンプレート110として使用する。一旦、最初のテンプレート110を得ると、前記実施形態と関連して上記に記載されるように、標的配列12と隣接するかまたは重複する最初のテンプレート110(図2Bを参照のこと)に、プライマー20をアニーリングする。プライマー20の3'末端と最初のテンプレート110の5'末端との間の最初のテンプレートの一部に相補的な核酸40の1つの鎖を重合する。当業者が理解するように、この実施形態(最初のテンプレートを作製するために制限オリゴヌクレオチドが使用される)では、境界オリゴヌクレオチドを使用する必要性はない。なぜなら、短縮された最初のテンプレート110の5'末端までプライマー伸長を進行させ得るからである。

【0025】

一旦、重合が完了すると(すなわち、伸長中の鎖40が、境界オリゴヌクレオチド30または短縮された最初のテンプレート110の5'末端に達すると)、新たに合成したこの相補鎖を、任意の適切な変性方法(物理的手段、化学的手段または酵素的手段が挙げられる)によって最初のテンプレートから分離する。鎖の分離をまた、ヘリカーゼまたは酵素RecA(これは、ヘリカーゼ活性を有し、そしてリボATPの存在下でDNAを変性することが知られている)として公知の酵素の分類からの酵素によって引き起こし得る。ヘリカーゼを用いて核酸の鎖を分離するために適切な反応条件は、Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 第XLII卷「DNA: Replication and Recombination」(New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978), B. Kuhnら、「DNA Helicases」、63-67頁によって記載され、そしてRecAを使用するための技術は、C. Radding, Ann. Rev. Genetics, 16: 405-37 (1982)において概説される。

【0026】

従って、新たに合成した相補鎖は、プライマー20によって提供される配列(例えば、所定の配列22、任意の制限部位23およびプライマーのアニーリング部分25)ならびにプライマー20が最初のテンプレート10にアニーリングされた位置と、境界オリゴヌクレオチド30がアニーリングされるかまたは短縮された最初のテンプレートの5'末端がアニーリングされるかのいずれかの最初のテンプレート10の部分との間の最初のテンプレート10の部分に相補的である新たに合成した部分45を含む。図4を参照のこと。

【0027】

必要に応じて、最初のテンプレートおよびプライマーを使用する、複数回の重合(好ましくは、15~25回)を実施して、引き続く工程で使用するための複数コピーの新たに合成した相補鎖を作製する。このプロセスにおけるこの時点にて(増幅工程の前に、完全な操作されたテンプレートが作成されるまで待たずに)、複数コピーの新たに合成した相補鎖を作製することは、標的配列の正確なコピーの最終的に作製される操作されたテンプ

10

20

30

40

50

レート中への組み込みを確実にすることに役立つ。最初のテンプレートに基づく複数ラウンドの重合は、ライブラリーの全メンバーのよりよい提示が達成されることのより高い可能性を提供し、それ故、単回の重合と比較してより高い多様性を提供すると考えられる。

【0028】

代替の実施形態において、上記のようなプライマー20を、最初のテンプレート10にアニーリングし、そして複数回の重合化を実施することによって、ロックオリゴヌクレオチドが存在しなくとも、最初のテンプレートの一部を除去する工程がなくても、新たに合成した鎖を作製し得る。この実施形態（図3において概略的に示す）では、全長の最初のテンプレートに沿ってプライマーを伸長して、全長の新たに合成した鎖140を提供する。次に、制限オリゴヌクレオチド170を、全長の新たに合成した鎖にハイブリダイズさせる。この制限オリゴヌクレオチドは、制限部位を含む新たに合成した鎖の二本鎖部分を提供する。適切な制限部位としては、*Xho* I、*Spe* I、*Nhe* I、*Hind* III、*Nco* I、*Xma* I、*Bgl* II、*Bst* I、*Pvu* I、*Xcm* I、*Bsa*J I、*Hpa* I、*Apal* I、*Sac* I、*Dra* IIIおよび*Sma* Iが挙げられるが、これらに限定されない。適切な制限酵素への曝露により、新たに合成した鎖を消化し、それにより短くする。次いで、下記により詳細に記載するように、入れ子式オリゴヌクレオチド50を、短縮した新たに合成した鎖142にハイブリダイズして、操作したテンプレートの調製を完了する。

【0029】

操作したテンプレートを調製する際の次の工程は、例えば、図4に示すように、入れ子式オリゴヌクレオチド50を、新たに合成した相補鎖の3'末端にアニーリングさせる工程を包含する。図4に示すように、入れ子式オリゴヌクレオチド50は、操作したテンプレートを完了するために必要なさらなる重合のためのテンプレートを提供する。入れ子式オリゴヌクレオチド50は、新たに合成した相補鎖にハイブリダイズせず、そして/または改変された塩基を含む部分52を含み、それによって、入れ子式オリゴヌクレオチドがプライマーとして働くことを防ぐ。入れ子式オリゴヌクレオチド50はまた、新たに合成した相補鎖の3'末端にハイブリダイズする部分55を含む。部分55は、新たに合成した部分45と境界を共にし得る（coterminalous）か、または図4に示すように、新たに合成した部分45を越えて伸長し得る。入れ子式オリゴヌクレオチド50はまた、必要に応じて、制限部位を規定する部分56を含み得る。入れ子式オリゴヌクレオチド50の最後の部分58は、プライマー20の部分22と同じ所定の配列を含む。部分55が、新たに合成した相補鎖の最初の3'末端を越えて伸長する位置から、入れ子式オリゴヌクレオチドは、さらなる重合のためのテンプレートとして機能して、操作したテンプレートを形成する。入れ子式オリゴが標的配列の一部を含み得る（標的配列の一部が、最初のテンプレートを形成する工程において短縮された場合）か、または例えば、抗体の1つ以上のCDRまたはフレームワーク領域または定常領域のようなポリペプチドまたはタンパク質（もしくはその部分）をコードする遺伝子を含み得ることが理解されるべきである。異なる配列を有する入れ子式オリゴヌクレオチドの収集物を使用して、それにより多様な生成物のライブラリーを結果として得る種々のテンプレートを提供し得る。従って、重合は、図4に示すように、入れ子式オリゴヌクレオチドに相補的であるさらなる核酸60を付加することによって、新たに合成した相補鎖を伸長する。重合を達成するための技術は、当業者の範囲内である。前述のように、適切なポリメラーゼ（エキソヌクレアーゼ活性を欠く酵素）は、特定の実施形態において好ましくあり得る。

【0030】

一旦、ポリマー化（重合）が完結すると、操作されたテンプレート120は、例えば、熱変性のような当業者に周知の技術によって、入れ子式オリゴヌクレオチド50から分離される。この得られた操作されたテンプレート120は、オリジナルプライマー20に由来する部分、このオリジナルテンプレートに相補的な部分45、およびこの入れ子式オリゴヌクレオチドの部分に相補的な部分65を含む（図5を参照のこと）。顕著なことに、操作されたテンプレート120の3'末端は、プライマー20の部分22の予め決定され

10

20

30

40

50

た配列に相補的な配列を含む部分 6 8 を含む。これは、当業者に公知の技術を使用して、プライマー部分 2 2 の予め決定された配列と同一の配列を有する単一のプライマーを使用して操作したテンプレート 1 2 0 の中に含まれた所望の配列の増幅を可能にした。単一のプライマー増幅の間に、エンドヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼの存在が好適であるが、これは、このような酵素が「校正（ブルーフリーディング）」機能を提供しそしてエキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼと比較して相対的に高いプロセッセビティー（processivity）が有することが知られているためである。

【 0 0 3 1 】

図 6 は、新規に合成される c D N A テンプレートの単一プライマー増幅に関連する工程を図示する。このプライマーが反応混合物中に存在する場合に、このプライマーは、そのテンプレートに隣接する配列に相補的な 3' 末端配列にハイブリダイズし、そして、そのテンプレートを増幅させる。プライマーが存在しない場合に、5' 末端の予め決定された配列とこの予め決定された配列との間の内部自己アニーリングが存在すると考えられている。好ましい実施形態において、この予め決定された配列およびその相補的な予め決定された配列は、その単一プライマー増幅反応の間のミスプライマーリング（miss-priming）を避けるために高温でアニーリングを行うように設計され得る。

10

【 0 0 3 2 】

増幅が実施された後に、この生成物は、当業者に公知の技術のうちの任意のものを使用して検出され得る。核酸を検出するために使用される方法の例としては、これらに限定されるわけではないが、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション分析、制限エンドヌクレアーゼ切断分析、一本鎖コンフォメーション多型（SSCP）分析、ゲル電気泳動、エチジウムプロマイド染色、蛍光共鳴エネルギー移動、ヘアピン F R E T アッセイ、および T a q M a n アッセイが挙げられる。

20

【 0 0 3 3 】

一旦、この操作された核酸が、所望する回数で増幅されると、制限部位 2 3 および 6 6 または任意の内部制限部位は、その鎖を消化してその結果としてその標的核酸配列が適切な発現ベクターに連結され得るために使用され得る。次いで、このベクターは、この標的配列によってコードされるポリペプチドまたはタンパク質を産生するための標準的な方法を使用して、適切な宿主生物を形質転換するために使用され得る。

【 0 0 3 4 】

30

特に有用な実施形態において、本明細書中で記載される方法は、抗体の c D N A を使用して、抗体または例えは可変領域（軽鎖または重鎖のいずれか）のようなその抗体の部分をコードする標的配列を増幅するために使用される。この様式で、抗体のライブラリーは増幅され、そしてスクリーニングされ得る。従って、例えは、抗体 m R N A を用いて開始される場合に、第 1 鎖の c D N A が、産生されそして消化されて、オリジナルテンプレートを提供し得る。プライマーは、選択された相補性決定領域（CDR）に対して上流でアニーリングして、その結果、その新規に合成された核酸鎖が C D R を含むように設計され得る。例として、その標的配列が重鎖 C D R 3 である場合に、そのプライマーは、その重鎖フレームワーク 1 (F R 1) 領域にアニーリングするように設計され得る。当業者は、本開示に基づいて、他の上流部位にアニーリングするかまたはその抗体 c D N A 内の他の選択された標的を再生するための適切なプライマーを設計する方法を容易に想到する。

40

【 0 0 3 5 】

以下の実施例は、非限定的に、本発明を例示するために提供される：

【 実施例 】

【 0 0 3 6 】

（実施例 1 ）

（ I g M 重鎖可変領域遺伝子のレパートリーの増幅）

（第 1 鎖 c D N A の合成および変更）

ヒト末梢血リンパ球（ P B L ） m R N A を使用するが、本質的にはそのキット指示書に従って、 S u p e r S c r i p t F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S

50

ystem for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies)を使用して、オリゴdTプライマーとともに従来型の第1鎖cDNAを生成した。第1鎖cDNA生成物を、QIAGENスピンカラム(PCR Purification Kit)で浄化した。制限エンドヌクレアーゼEcoRIによって消化され得る二本鎖DNA領域を生成するために、制限オリゴオリゴヌクレオチドを、その第1鎖cDNAに添加した。制限オリゴヌクレオチド(CMEncoRI)の配列は、5' T C C T G T G A G A A T T C C C C G T C G 3' (配列番号(Seq. ID No.) 1) であった。この反応を、第1鎖cDNAおよび0.1 μMオリゴヌクレオチドとともに開始した。このサンプルを、95 で2分間加熱して、次いで、2分間、64 で保持し、特異的なアニーリングが生じることを可能にした。適量の、10 × 制限緩衝液H((Roche Diagnostics)を、このサンプルに添加して、そして、37 までさらに冷却した。制限エンドヌクレアーゼEcoRI(New England Biolabs)を添加して、そして、30分間、37 でインキュベートした。制限酵素を、20分間、65 で熱インキュベートして、次いで、このサンプルを4 まで冷却した。
10

【0037】

(第二鎖線形増幅および入れ子式オリゴ伸長)

EcoRIで消化された第一鎖cDNAを、プライマー「TMX24VH3a」(最終0.4 μM)、dNTP、AmpliTaq酵素およびその10 × 反応緩衝液(Applied Biosystems)とともに、第二鎖cDNA反応における最初のテンプレートとして使用した。このプライマーを、所定のTMX24配列、XhoI制限部位、およびヒト抗体重鎖遺伝子のフレームワーク1領域において第一鎖cDNAにアニーリングする領域、を含むように設計した。この「TMX24VH3a」の配列は、5' G T G C T G G C C G T T G G A A G A G G A G T G C T C G A G G A R G T G C A G C T G G T G G A G 3' (配列番号2) であった(ここで、Rは、塩基Aおよび塩基Gの等モル混合物を表わす)。このサンプルを、95 にて1分間熱変性させ、次いで95 にて5秒間、56 にて10秒間、および68 にて1分間というサイクルを20サイクル行った。これにより、第二鎖cDNAの線形増幅が可能になる。次いで、「TMX24CM0」と呼ばれる入れ子式オリゴを、氷上で、0.08 μMの最終濃度になるまで加えた。この「TMX24CM0」の配列は、5' G T G C T G G C C G T T G G A A G A G G A G T G A C T A G T A A T T C T C A C A G G A G A C G A G G G G G A 3' (配列番号3) であった(この配列は、引き続くクローニング工程において使用されるSpeI制限エンドヌクレアーゼ部位を含む)。この入れ子式オリゴの3'末端は、逆連結(3' - 5'ではなく、3' - 3')アデノシンの取り込みによる伸長を防止するように設計される。この第二鎖cDNAを、94 にて5秒間熱変性させることによって、入れ子式オリゴをさらに伸長させ、次いでアニーリングおよび伸長のために、68 にて10秒間および95 にて5秒間、続いて68 にて30秒間および4 というサイクルを4サイクル行った。次いで、得られた第二鎖cDNAまたは作製したテンプレートを、QIAGENスピンカラム(PCR Purification Kit)を使用して洗浄した。この工程は、オリゴヌクレオチドを取り除き、そして下流プロトコルのための単純な緩衝液交換を可能にする。
20
30
40

【0038】

(単一プライマー増幅(SPA))

操作されたテンプレートを、Advantage 2ポリメラーゼミックス(Clontech)およびその10 × 反応緩衝液、dNTPs、および単一プライマー(TMX24)(このプライマーは、5' G T G C T G G C C G T T G G A A G A G G A G T G 3' (配列番号4)の配列を有する)を使用して、増幅した。このサンプルを、95 にて1分間熱変性させ、次いで95 にて5秒間および68 にて1分間というサイクルを35サイクル行った。この後、さらに68 にて3分間行って、4 で維持し
50

た。

【0039】

(クローニングおよび配列決定)

約450bpの増幅産物をゲル精製し、次いで、*Xho* I および *Sph* I によって消化し、そして *pBlueScript KS+(Stratagene)* にクローニングした。個々のクローンを選択し、そしてそれらのDNA配列を決定した。分析した16個の全てのクローンは、*IGM*重鎖であり、これらの各々が、可変の長さを有する異なるCDR3配列を有し、それによって、抗体鎖の多種多様な集団がこの方法によって増幅されることが示された(表1を参照のこと)。

【0040】

【表1】

10

表1

	FR3	HCDR3	FR4
クローン1(配列番号5)	YYCAR	EGSSSGAFDI	WGQ
クローン2(配列番号6)	YYCAR	AAFYCSGGSCYFDYYYYGMDV	WGQ
クローン3(配列番号7)	YYCAK	DIGGLGVLFNDY	WGQ
クローン5(配列番号8)	YYCAK	GVLAIRICDY	WGQ
クローン6(配列番号9)	YYCAR	DPGVYDYVWGSYRYPPDAFDI	WGQ
クローン7(配列番号10)	YYCAR	GMIVGATSYPDY	WGQ
クローン8(配列番号11)	YYCLL	GYCSSTSCPDAFDI	WGQ
クローン9(配列番号12)	YYCVI	GGAVFSGGSYRQQIDY	WGQ
クローン10(配列番号13)	YYCTR	DRGGSYTSHLGAFDI	WGQ
クローン11(配列番号14)	YYCAK	DNDLGGDYYYYGMDV	WGQ
クローン12(配列番号15)	YYCAR	DRRFPTDLFDI	WGQ
クローン13(配列番号16)	YYCAR	EDGYNNSGWSYNWFDP	WGQ
クローン14(配列番号17)	YYCAK	DCVSGSYHYFDY	WGQ
クローン16(配列番号18)	YYCAK	DSYCSGGSCYYYYGVDV	WGQ
クローン17(配列番号19)	YYCAR	EVVPAAIIDYYYYGMDV	WGQ
クローン18(配列番号20)	YYCAK	DLGIAVVVPAH	WGQ

20

30

。

【0041】

(実施例2)

VH産物をベクターにクローニングして、それによってネイティブ *IGM* CH1 定常領域が再構築され得るように、CH1中の *EcoR* I 以外の部位を、第一鎖cDNAエンドヌクレアーゼ消化のために利用した。当業者が理解するように、*Taq* ポリメラーゼをこのプロトコルのために使用する場合、末端Aが、多数の新たな合成DNA鎖に加えられる。多様性を最大にするために、その末端Aの存在を、入れ子式オリゴヌクレオチドの設計において考慮した。しかし、過剰なAの存在は、*EcoR* I 認識部位の欠損を生じさせる。*IGM* 定常領域の分析により、この方法のために潜在的に使用され得る他のネイティブな制限部位(例えば、*Dra* III)が明らかとなった。CH1ドメインにおいて *Dra* IIIのネイティブ制限部位を使用した結果は、その上流の *EcoR* I 部位が未改变のままであり、その重鎖レパートリーをクローニングするためにこの部位を使用することができるということである。この重鎖のインサートは、*Xho* I および *EcoR* I によって、適切なベクター(これは、*EcoR* I から CH2ドメインまでにわたって残っている *IGM* CH1ドメインを有する)にクローニングされる。

40

【0042】

(第一鎖cDNAの合成および改変)

ヒト末梢血リンパ球(PBL) mRNAを使用して、オリゴdTプライマーを用いて伝

50

統的な第一鎖 cDNA を作製した。基本的にはキットの説明書に従って、RT - PCR 用の Super Script First - Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies) を使用して、これを行った。制限オリゴヌクレオチドをこの第一鎖 cDNA に加えて、制限エンドヌクレアーゼ Dra III によって消化され得る二本鎖 DNA 領域を生成した。この制限オリゴヌクレオチド (CMDra III) の配列は、5' GAC GAA CAC GTG GTG TGC AAA G 3' (配列番号 21) であった。反応を、第一鎖 cDNA および 1 μM オリゴヌクレオチドを用いて開始した。このサンプルを、95 まで 2 分間加熱し、次いで 64 にて 2 分間維持することで、特定のアニーリングが生じるのを可能にした。適切な量の 10 × 制限緩衝液 H (Roche Diagnostics) をこのサンプルに加え、37 までさらに冷却した。制限エンドヌクレアーゼ Dra III (New England Biolabs) を加え、そして 37 にて 30 分間インキュベートした。この制限酵素を、65 にて 20 分間熱不活化させ、次いでこのサンプルを 4 まで冷却した。

【0043】

(第 2 鎖の線形増幅および入れ子式オリゴ伸長)

DraIII で消化した第 1 鎖 cDNA を、プライマー「TMX24VH1a」(終濃度 0.4 μM)、dNTP、AmpliTaq 酵素およびその 10 × 反応緩衝液 (Applied Biosystems) と一緒に用いて、第 2 鎖 cDNA 反応における元のテンプレートとして使用した。このプライマーを、所定の TMX24 配列、XhoI 制限部位、およびヒト抗体重鎖遺伝子のフレームワーク 1 領域中で、第 1 鎖 cDNA にアニーリングする領域を含むように設計した。「TMX24VH1a」の配列は、5' GTGCT GGCGTTGGAAAGAGGAGTGCCTCGAGCAGGTTKCAAGCTGGTG CAG 3' (配列番号 22) であり、ここで、K は、G および T の塩基の等モル濃度混合物を表す。このサンプルを、94 で 1 分間、熱変性させ、次いで 94 で 5 秒間、56 で 10 秒間、および 68 で 2 分間のサイクルを 20 回繰り返した。このことは、第 2 鎖 cDNA の線形増幅を可能にした。「TMX24CMnpt」と名付けられた入れ子式オリゴを、終濃度 0.2 μM まで氷上で添加した。図 7 に示される様に、「TMX24CMnpt」の配列 (配列番号 23) は、オリゴヌクレオチドの伸長を妨げるように設計された、改変された構造を有する 3 つの 3' 末端ヌクレオチドを含む。具体的には、この入れ子式オリゴは、ホスホロチオエートおよび 2' OMe を有する、3 つの末端改変ヌクレオチドを有し、この 2' OMe は、伸長を妨げ、そしてエキソヌクレアーゼ活性およびエンドヌクレアーゼ活性に対して保護するように設計される。このオリゴの 3' 末端ヌクレオチドは、非ハイブリダイズ性である (c の代わりに g)。第 2 鎖 cDNA をさらに、94 で 1 分間の熱変性、68 で 2 分間のアニーリングおよび伸長、その後 4 にすることによって、入れ子式オリゴから伸長した。次いで、得られた第 2 鎖 cDNA または操作されたテンプレートを、QIAGEN 遠心カラム (PCR Purification Kit) を用いて浄化した。この工程は、オリゴヌクレオチドを除去し、そして下流のプロトコルのために、簡単な緩衝液交換を可能にする。この手順を、VH プライマーパネル (プライマーリスト参照) の停止 (rest) まで反復および伸長して、免疫グロブリン生成物のライブラリーを調製した。これら生成物を適切なベクターにクローニングし得る。

【0044】

(VH フレームワーク 1 特異的プライマー:)

【0045】

【化1】

プライマー-TMX24VH1a (配列番号 25)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTKCAGCTGGTGCAG

プライマー-TMX24VH1b (配列番号 26)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCCAGCTTGTGCAG

プライマー-TMX24VH1c (配列番号 27)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGSAGGTCCAGCTGGTACAG

プライマー-TMX24VH1d (配列番号 28)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCARATGCAGCTGGTGCAG

10

プライマー-TMX24VH2a (配列番号 29)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGATCACCTTGAAGGAG

プライマー-TMX24VH2b (配列番号 30)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACACCTTGARGGAG

プライマー-TMX24VH3a (配列番号 31)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGGAG

プライマー-TMX24VH3b (配列番号 32)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTGGTGGAG

20

プライマー-TMX24VH3c (配列番号 33)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGGAGGTGCAGCTGTTGGAG

プライマー-TMX24VH4a (配列番号 34)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGSTGCAGCTGCAGGAG

プライマー-TMX24VH4b (配列番号 35)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTACAGCAG

プライマー-TMX24VH5a (配列番号 36)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGCAG

プライマー-TMX24VH6a (配列番号 37)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACAGCTGCAGCAG

30

プライマー-TMX24VH7a (配列番号 38)

GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTSCAGCTGGTGCAG

上記の配列において、RはAおよびGの等量の混合であり、KはGおよびTの等量の混合であり、そしてSはCおよびGの等量の混合である。

【0046】

(单一プライマー増幅 (S P A))

操作されたテンプレートを、A d v a n t a g e 2 ポリメラーゼミックス (C l o n e t e c h) およびその10×反応緩衝液、d N T P および単独プライマー (T M X 2 4) (これは、配列5' G T G C T G G C C G T T G G A A G A G G A G T G C T C G A G G A G G T G C A G C A G C A G) (配列番号4) を有する) を使用して増幅した。これらのサンプルを、95°で1分間、熱変性させ、次いで95°で5秒間、および68°で1分間のサイクルを30回繰り返した。この後に、68°でさらに3分、そして4°で保持した。

40

【0047】

(クローニングおよび配列決定)

約450bpの増幅産物をゲル精製し、そしてX h o I およびE c o R I によって消化した。これらのインサートを、ネイティブE c o R I 部位からC H 2 ドメインまで(またはその一部を含む)のI g M C H 1 ドメインの残存部分、および増幅されたフラグメントをクローニングするための適合性の制限部位を含む、任意の適切な発現ベクターにクローニングする。

【0048】

50

(実施例3)

(B型肝炎ポジティブなドナーのmRNA由来の、ファージミドディスプレイライブリーアの構築)

(IgG重鎖および 軽鎖のための第1鎖cDNA合成および改変)

B型肝炎ワクチン接種されたドナー由来のヒト末梢血リンパ球(PBL)mRNAを使用して、オリゴdTプライマーを用いて伝統的な第1鎖cDNAを調製した。このことは、本質的にキットの指示書に従って、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES)を使用して行った。IgGに対する制限オリゴヌクレオチド「CGApal I」、または 軽鎖のための「CKSac I」を、2本鎖DNA領域を生成するために、第1鎖cDNAに添加した。この2本鎖DNA領域を、IgGについては制限エンドヌクレアーゼApal Iによって、または 軽鎖については制限エンドヌクレアーゼSac Iによって消化し得る。「CGApal I」配列は、5'CCA GCG GCG TGC ACA CCT TCC3' (配列番号39)である。「CKSac I」配列は、5'AGG GCC TGA GCT CGC CCC G T C3' (配列番号40)である。この反応を、第1鎖cDNA、1μMのオリゴヌクレオチドおよび適切な量の10×制限緩衝液A(Roche Diagnostics)に設定した。これらのサンプルを、95°で2分間加熱し、次いで64°で2分間保持して、特異的なアニーリングを生じさせ、そして37°に冷ました。制限エンドヌクレアーゼApal IまたはSac I(New England Biolabs)を添加し、そして37°で30分間インキュベートした。制限酵素を、Sac Iについては65°で20分間、加熱不活性化し、次いでサンプルを4°に冷却した。

【0049】

各々の制限エンドヌクレアーゼによる第1鎖cDNAの消化は、当業者に公知の技術を使用するPCR増幅によって確認した。これらの産物は、抗体遺伝子のクローニングには使用しなかった。消化した第1鎖cDNAのポジティブな増幅は、IgGについては5'VBVH1aおよび3'CG0の内部コントロールプライマーを使用する反応において、そして については5'VBVK1aおよび3'CK0の内部コントロールプライマーを使用する反応において、観察された。プライマー5'VBVH1a/3'CG0またはプライマー5'VBVK1a/3'CK0を用いた良好な増幅、およびプライマー5'VBVH1a/3'CG1Zまたはプライマー5'VBVK1a/3'CK1dx2を用いた最小限の増幅は、各々の制限エンドヌクレアーゼを用いた第1鎖cDNAテンプレートの首尾の良い消化を示す。確認PCRのために使用したプライマーの配列は、以下であった:
:

【0050】

【化2】

VBVH1a: 5' GAG

CCG CAC GAG CCC CTC GAG CAG GTK CAG CTG GTG CAG 3' (配列番号 41),

CG0: 5' GRG CGC CTG AGT TCC ACG ACA CCG 3' (配列番号 42), VBVK1a: 5'

GAC GCG CAC AAC ACG GAG CTC RAC ATC CAG ATG ACC CAG 3' (配列番号 43),

CK0: 5' GTG ACT TCG CAG GCG TAG ACT T 3' (配列番号 44), CG1z: 5'GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG 3' (配列番号 45), CK1dx2: 5'

AGA CAG TGA GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC

TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G 3' (配列番号 46).

(軽鎖第2鎖の線形増幅および入れ子式オリゴ伸長)

S a c I で消化した第1鎖 c D N A を、元のテンプレートとして使用して、フレームワーク1特異的プライマー (終濃度 0.4 μM) 、d N T P 、A m p l i T a q 酵素およびその 10 × 反応緩衝液 (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用する、複数の第2鎖 c D N A 反応を設定した。これらのプライマーを、鎖について所定の T M X 2 4 配列 5' G A C G A C C G G C T A C C A A G A G G A G T G 3' (配列番号 47) 、X b a I 制限部位、およびヒト抗体 軽鎖遺伝子のフレームワーク1領域中で、第1鎖 c D N A にアニーリングする領域を含むように設計した。これらのアニーリング配列を、V B a s e データベースプライマー (w w w . m r c - c p e . c a m . a c . u k / i m t - d o c / p u b l i c / I N T R O . h t m l) から誘導し、これらの配列は、ヒト抗体の公知の配列に基づいて設計され、そして 軽鎖遺伝子の全体のヒト抗体レパートリーをカバーすることが報告されている。

【0051】

(軽鎖フレームワーク1特異的プライマー :)

【0052】

10

20

30

【化3】

TMX24V_k1a (配列番号 48) Xba I
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGARACATCCAGATGACCCAG

TMX24V_k1b (配列番号 49)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGMCATCCAGTTGACCCAG

TMX24V_k1c (配列番号 50)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGCCATCCRGATGACCCAG

TMX24V_k1d (配列番号 51)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGTCATCTGGATGACCCAG

10

TMX24V_k2a (配列番号 52)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATATTGTGATGACCCAG

TMX24V_k2b (配列番号 53)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATRTTGATGACTCAG

TMX24V_k3a (配列番号 54)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGTTGACRCAG

20

TMX24V_k3b (配列番号 55)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATAGTGTGACGCAG

TMX24V_k3c (配列番号 56)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTAATGACACAG

TMX24V_k4a (配列番号 57)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATCGTGATGACCCAG

TMX24V_k5a (Seq. ID No. 58)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAACGACACTCACCGAG

30

TMX24V_k6a (Seq. ID No. 59)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGCTGACTCAG

TMX24V_k6b (Seq. ID No. 60)
 GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATGTTGATGACACAG

上記の配列において、RはAおよびGの等量混合物であり、MはAおよびCの等量混合物であり、YはCおよびTの等量混合物であり、WはAおよびTの等量混合物であり、そしてSはCおよびGの等量混合物である。

40

【0053】

これらのサンプルを、94で1分間、熱変性させ、次いで94で5秒間、56で10秒間、および68で2分間のサイクルを20回繰り返した。このことは、第2鎖cDNAの線形増幅を可能にした。鎖に対する「TMX24CKnpt」と名付けられた入れ子式オリゴを、終濃度0.2μMまで氷上で添加した。「TMX24CKnpt」は、所定の配列TMX24Kを含み、そしてこの配列は、5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGCTGACTCAGは、所定の配列TMX24Kを含み、そしてこの配列は、5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAATTGTGCTGACTCAGTGA TGG GTG ACT TCG CT3' (配列番号61)であった。第2鎖cDNAをさらに、94で1分間の熱変性、68で2分間のアニーリングおよび伸長

50

、その後4 にすることによって、入れ子式オリゴから伸長した。得られた第2鎖cDNA（操作されたテンプレート）を、QIAGEN遠心カラム（PCR Purification Kit）を用いて浄化した。この工程は、遊離オリゴヌクレオチドを除去し、そして下流のプロトコルのために、簡単な緩衝液交換を可能にする。

【0054】

（軽鎖單一プライマーの増幅（SPA））

操作されたテンプレートを、Advantage 2ポリメラーゼミックス（Clonetech）およびその10×反応緩衝液、dNTP、および鎖に対するプライマー「TMX24K」を使用して増幅した。「TMX24K」の配列は、5' G A C G A C C G G C T A C C A A G A G G A G T G 3'（配列番号62）である。これらのサンプルを、95 で1分間、熱変性させ、次いで95 で5秒間、および68 で1分間のサイクルを、30回繰り返した。これは、68 でさらに3分間、そして4 で保持した。

【0055】

（軽鎖のクローニング）

鎖増幅産物をゲル精製し、次いでXbaIおよびSacIにより消化した。これらのインサートを、軽鎖定常領域の残存部分含む、適切な発現ベクターにクローニングした。このライゲーション産物を、E.coliにエレクトロポレーションによって導入し、そして37 で一晩培養した。翌朝、DNAマキシプレップ（maxi prep）（QIAGEN）を実施して、軽鎖ライブリーDNAを回収した。次いで、この軽鎖ライブリーDNAを、次いで、XhoI/AgeIによって重鎖Fdフラグメント中にクローニングする工程において使用して、ライブリー構築物を完成した。

【0056】

（重鎖第2鎖直線増幅および入れ子式オリゴ伸長）

Apal I消化した第1鎖cDNAを、元のテンプレートとして使用して、フレームワーク1特異的プライマー（最終0.4 μM）、dNTP、AmpliTaq 酵素および10×反応混合物（Applied Biosystems）を使用する、複数の第2鎖cDNA反応を構築した。これらのプライマーを、所定のTMX24配列、XhoI制限部位、およびヒト抗体重鎖遺伝子のフレームワーク1領域において第1鎖cDNAにアニーリングされる領域を含むように設計した。これらのアニーリング配列を、ヒト抗体の既知の配列に基づいて設計されたVBaseデータベースプライマーから誘導した。これらは、重鎖遺伝子のヒト抗体レパートリー全体をカバーすることが報告される。

【0057】

重鎖特異的フレームワーク1特異的プライマー：

【0058】

【化4】

TMX24VH1a（配列番号 63）

GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCAGCTGGTGCAG

TMX24VH1b（配列番号 64）

GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTCAGCTGTGCAG

【0059】

【化 5】

TMX24VH1c (配列番号 65)
GTGCTGCCGTTGGAAGAGGAGTGTCTCGAGSAGGTCCAGCTGGTACAG

TMX24VH1d (配列番号 66)
 GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGTCTGAGCARATGCAGCTGGTGCAG
 TMX24VH2a (配列番号 67)
 GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGTCTGAGCAGATCACCTTGAAGGAG

TMX24VH2b (配列番号 68)
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGGAGTGCTCGAGCAGGTCACCTTGARGGGAG

TMX24VH3a (配列番号 69)
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGARGTGCAGCTGGTGGAG

TMX24VH3b (配列番号 70)
GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTGGTGGAG

TMX24VH3C (配列番号 71)
GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGGAGGTGCAGCTGTTGGAG

TMX24VH4a (配列番号 72)
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGGAGTGCTCGAGCAGSTGCAGCTGCAGGAG

TMX24VH4b (配列番号 73)
GTGCTGGCCGTTGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTGCAGCTACAGGAG

TMX24VH5a (配列番号 74)
GTGGCTGGCCGTTGGAAAGAGGGAGTGTCTGAGGARGTGCAGCTGGTGCAG

TMX24VH6a (配列番号 75)
GTGCTGGCCGTTGGAAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTACAGCTGCAGCAG

TMX24VH7a (配列番号 76)
GTGCTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGCAGGTSCAGCTGGTGAA

上記の配列において、Rは、AおよびGの等量の混合であり、Kは、GおよびTの等量の混合であり、そしてSは、CおよびGの等量の混合である。

[0 0 6 0]

これらのサンプルを、94℃で1分間熱変性させ、次いで、(94℃で5秒間、56℃で10秒間および68℃で2分間)×20回のサイクルにかけた。これにより、第2鎖cDNAの直線増幅が可能であった。「T M X 2 4 C G n p t」と称される入れ子式オリゴヌクレオチド(配列5' GTG CTG GCC GTT GGA AGA GGA GTG TGT TTG CAC GCC GCT GGT CAG RGC GCC TGA GTT G 3'(配列番号77))を、氷上で、0.2 μMの最終濃度まで添加した。1g M入れ子式オリゴについて図1で示されるように、3つの3'末端ヌクレオチドを、オリゴの伸長を防止するように改変した。第2鎖cDNAを、94℃で1分間の熱変性、アニーリングおよび68℃で2分間の伸長によって、入れ子式オリゴからさらに伸長させ、その後4℃にした。得られた第2鎖cDNA(操作されたテンプレート)を、次いで、QIAGENスピンカラム(PCR Purification Kit)を使用して清浄化した。この工程により、遊離のオリゴヌクレオチドを除去し、そして下流のプロトコルのための単なる緩衝液交換が可能となった。

〔 0 0 6 1 〕

(単一プライマー增幅 (S P A))

操作したテンプレートを、*Ad vant age 2* ポリメラーゼミックス (Clontech) およびその 10 × 反応緩衝液、dNTP およびプライマー「TMX24」を使用して増幅した。これらのサンプルを、95 °C で 1 分間熱変性させ、次いで、(95 °C で 5 秒間および 68 °C で 1 分間) × 30 回のサイクルにかけた。次に、さらに 3 分間 68 °C に

し、そして4で維持した。

【0062】

(重鎖のクローニングおよびライプラリーの生成)

増幅産物をプールし、次いでゲル精製した。DNAをQIAquick PCR精製キット(QIAGEN)を用いて回収した。このDNAを、続いてXhoI制限酵素およびAgeI制限酵素で消化し、次いでゲル精製した。AgeI部位は、Apal I部位の上流のIgG定常領域のCH1中に天然に存在する。DNAを、QIAquick Gel抽出キット(QIAGEN)を用いて回収した。

【0063】

軽鎖ライプラリーDNAを、XhoIおよびAgeIで連続的に消化し、次いでゲル精製した。この軽鎖ライプラリーDNAを、重鎖フラグメントと連結した。連結したDNAを、反応緩衝液を除去し、そしてDNAを濃縮するために、スピンカラム(PCR purification Kit、QIAGEN)上に配置した。最終的な形質転換を、エレクトロコンピテントXL-1 Blue細胞(Stratagene)で行った。

【0064】

(HBs Ag上でのライプラリーのパニングおよびスクリーニング)

このライプラリーを、実質的に、Barbas III, CF, Burton, DR, Scott, JK, and Silverman, GJ (2001) Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されるように、固定化HBs Ag上で4回にわたってパニングした。第2回、第3回および第4回のパニング由来の個々のクローンを、HBs Ag上でELISAによってスクリーニングした。

【0065】

(軽鎖についての第1鎖cDNA合成および改変)

B型肝炎ワクチン接種したドナー由来のヒトPBL mRNAを使用して、オリゴdTプライマーを用いて従来の第1鎖cDNAを生成した。これを、キットの指示書に従って、SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES)を使用して行った。制限オリゴヌクレオチド「CLSmal」を、制限エンドヌクレアーゼSmalによって消化され得る二本鎖DNA領域を作成するために、第1鎖cDNAに添加した。「CLSmal」配列は、5' GAC TTC TAC CCC GGA GCY GTG 3' (配列番号78)であり、ここで、Yは、CおよびTの混合である。この反応を、第1鎖cDNA、1μMオリゴヌクレオチド、および適切な量の10×制限緩衝液A(Roche Diagnostics)を用いて構成した。このサンプルを、95まで2分間加熱し、次いで64で2分間維持して、特異的アニーリングを生じさせ、そして37まで冷却した。制限エンドヌクレアーゼSmal (New England Biolabs)を添加し、そして37で30分間インキュベートした。制限酵素を、65で加熱不活化し、次いでサンプルを4まで冷却した。

【0066】

制限エンドヌクレアーゼによる第1鎖cDNAの消化を、当業者に公知の技術を使用するPCR増幅によって確認した。これらの産物は、抗体遺伝子のクローニングに使用しなかった。5' VBV1aおよび3' CL0内部コントロールプライマーを使用して、消化した第1鎖cDNAの陽性の増幅が、反応物中で観察された。

【0067】

プライマー-5' VBV1a / 3' CL0を用いた良好な増幅、およびプライマー-5' VBV1a / 3' CL2d x 2を用いた最小の増幅は、Smalによる第1鎖cDNAテンプレートの首尾よい消化を示した。PCRをチェックするためのプライマーの配列は、5' GAC GCG CAC AAC ACG GAG CTC CA G TCT GTG CTG ACT CAG 3' (配列番号79))、CL0 (5

10

20

30

30

40

50

' C C T C A G A G G A G G G Y G G G A A C A G 3 ' (配列番号 80))
および C L 2 d x 2 (5 ' A G A C A G T G A C G C C G T C T A G A A
T T A T G A A C A T T C T G T A G G 3 ' (配列番号 81)) であった。

【0068】

(軽鎖第2鎖直線増幅および入れ子式オリゴ伸長)

Sma I 消化した第1鎖 cDNA を、元のテンプレートとして使用して、フレームワーク1特異的プライマー (最終 0.4 μM) 、 dNTP 、 AmpliTaq 酵素およびその 10 × 反応緩衝液 (Applied Biosystems) を用いる、複数の第2鎖 cDNA 反応を構築した。これらのプライマーは、所定の TMX24L 配列、 XbaI 部位およびヒト抗体 軽鎖遺伝子のフレームワーク領域において第1鎖 cDNA にアニールする領域を含むように設計する。これらのアニーリング配列を、ヒト抗体の既知の配列に基づいて設計され、そして 軽鎖遺伝子の全ヒト抗体レパートリーをカバーすることが報告される、 VBase データベースプライマー (www.mrc-cpe.cam.ac.uk / imt-doc / public / INTRO.html) から誘導する。 軽鎖フレームワーク1特異的プライマーは、実施例4において使用したものである。

【0069】

これらのサンプルを、 94 で 1 分間熱変性させ、次いで、 (94 で 5 秒間、 56 で 10 秒間、および 68 で 2 分間) × 20 回のサイクルにかけた。このことにより、第2鎖 cDNA の直線増幅が可能となった。実施例4に示されるような、「 TMX24CL np t 」と称される入れ子式オリゴヌクレオチドを、 0.2 μM の最終濃度にまで、氷上で添加した。 IgM 入れ子式オリゴヌクレオチド「 TMX24CMnp t 」について図7に示されるように、「 TMX24CLnp t 」の 3' 末端ヌクレオチドを、オリゴ伸長を防止するために改変する。第2鎖 cDNA を、 94 で 1 分間の熱変性、アニーリングおよび 68 で 2 分間の伸長によって、入れ子式オリゴヌクレオチドからさらに伸長させ、その後 4 にした。得られた第2鎖 cDNA (操作されたテンプレート) を、 PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して清浄化した。この工程により、遊離のオリゴヌクレオチドを除去し、そして下流のプロトコルのための、単なる緩衝液の交換が可能となった。

【0070】

(軽鎖単一プライマー増幅 (SPA))

操作されたテンプレートを、 Advantage 2 ポリメラーゼミックス (Clontech) およびその 10 × 反応緩衝液、 dNTP およびプライマー「 TMX24L 」を使用して増幅した。 TMX24L の所定の配列は、 5 ' G A C G A C C G G C T A C C A A G A G G A C A G 3 ' (配列番号 82) である。これらのサンプルを、 95 で 1 分間熱変性させ、次いで、 (95 で 5 秒間および 68 で 1 分間) × 30 回のサイクルにかけた。その後さらに 3 分間 68 にし、そして 4 で維持した。

【0071】

(軽鎖クローニング)

軽鎖増幅産物を、 PCR purification kit (QIAGEN) によって清浄化し、そして XbaI および ScaI で消化した。挿入物を、ゲル抽出キット (QIAGEN) を使用してゲル精製し、そして 軽鎖定常領域の残りの部分を含む適切なベクター中にクローニングした。連結産物を、エレクトロポレーションによって E. coli に導入し、そして 37 で一晩増殖させた。次の朝、 DNA maxi prep (QIAGEN) を実施して、 軽鎖ライブラリー DNA を回収した。

【0072】

(重鎖クローニングおよび IgG ライブラリーの生成)

上記で調製した 軽鎖ライブラリー DNA を、以前に記載されたように IgG ライブラリーについてもまた調製された重鎖 Fd フラグメントの挿入のために、 XhoI および AgeI によって連続的に消化した。次いで、連結産物を、エレクトロポレーションによって E. coli に導入し、そして 37 で一晩増殖させた。次の朝、 DNA maxi

10

20

30

40

50

prep (QIAGEN) を実施して、完全 IgG ライブラリー-DNAを回収した。

【0073】

(HBsAg 上でのライブラリーのパニングおよびスクリーニング)

パニングおよびスクリーニングを、IgG ライブラリーについて以前に記載されたように実施した。

【0074】

(単離されたFabのDNA配列決定分析および特徴づけ)

ELISAスクリーニングにより、HBsAgに対する特異的結合および非特異的タンパク質(オボアルブミン)に対する最少の結合を示すクローンを、DNA配列決定によって分析した。図8a~eを参照のこと。HBsAgに対する合計38個の別個のIgG Fab(25個の重鎖および37個の軽鎖)および17個の別個のIgG Fab(13個の重鎖および16個の軽鎖)を、B型肝炎ワクチン接種したドナー由来のPBL mRNAから作成されたライブラリーから単離した。

10

【0075】

(実施例4)

(ヒトPBL mRNAからのファージディスプレイライブラリーの構築)

(軽鎖についての第1鎖cDNA合成および改変)

ドナー由来のヒトPBL mRNAを、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies)を実質的にキットの指示書に従って使用して、オリゴdTプライマーを用いて、従来の第1鎖cDNAを生成した。軽鎖および

20

軽鎖を、別々に構成する。制限オリゴヌクレオチド「CKSac I」または「CLSma I」を、軽鎖については制限エンドヌクレアーゼSac Iによって、または軽鎖については制限エンドヌクレアーゼSma Iによって消化され得る二本鎖DNA領域を生成するために、第1鎖cDNAに添加する。複数の定常領域(C1、C2、C3およびC6)が存在するので、このSma I部位が、全ての機能的定常ドメイン(C1、C2、C3およびC6)間で保存されていることに留意することが重要である。「CKSac I」配列は、5'AGG GCC TGA GCT CGC CCG TC 3'(配列番号179)であり、「CLSma I」配列は5'GAC TTC TAC CCC G GGA GCY GTG 3'(配列番号180)であり、ここで、Yは、CおよびTの混合である。この反応を、第1鎖cDNAおよび1μMのオリゴヌクレオチドを用いて構成する。このサンプルを、95℃で2分間加熱し、次いで2分間64℃に維持して、特異的なアニーリングを生じさせる。適切な量の10×制限緩衝液A(Roche Diagnostics)をサンプルに添加し、そしてさらに37℃まで冷却する。制限エンドヌクレアーゼSac IまたはSma I(New England Biolabs)を添加し、そして37℃で30分間インキュベートする。この制限酵素を65℃で20分間加熱インキュベートし、次いでサンプルを4℃まで冷却する。

30

【0076】

(軽鎖第2鎖直線増幅および入れ子式オリゴ伸長)

Sac I消化した第1鎖cDNAまたはSma I消化した第1鎖cDNAを元のテンプレートとして使用して、フレームワーク1特異的プライマー(最終0.4μM)、dNTP、AmpliTaq酵素およびその10×反応緩衝液(Applied Biosystems)を用いる、複数の第2鎖cDNA反応を構築する。プライマーを、TMX24K配列(について)またはTMX24L配列(について)、Xba I制限部位、およびヒト抗体 軽鎖遺伝子またはヒト抗体 軽鎖遺伝子のフレームワーク1領域において第1鎖cDNAにアニーリングする領域を含むように設計する。これらのアニーリング配列を、ヒト抗体の既知の配列に基づいて設計され、そして軽鎖遺伝子の全ヒト抗体レパートリーをカバーすることが報告されている、VBaseデータベースプライマー(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.htm)から誘導する。軽鎖フレームワーク1特異的プライマーは、実施例3にお

40

50

いて使用したものである。増幅において使用するためのプライマーの、以下の表を参照のこと。

【0077】

軽鎖フレームワーク1特異的プライマー：

【0078】

【化6】

TMX24VL1a (配列番号 181)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGTGCTGACTCAG

TMX24VL1b (配列番号 182)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGTGTYTGACGCAG

10

TMX24VL1C (配列番号 183)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGTGCGTGACGCAG

TMX24VL2 (配列番号 184)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGTCTGCCCTGACTCAG

TMX24VL3a (配列番号 185)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCCTATGWGCTGACTCAG

TMX24VL3b (配列番号 186)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCCTATGAGCTGACACAG

20

TMX24VL3c (配列番号 187)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCTTCTGAGCTGACTCAG

TMX24VL3d (配列番号 188)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGATCCTATGAGCTGATGCAG

TMX24VL4 (配列番号 189)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGCYTGTGCTGACTCAA

TMX24VL5 (配列番号 190)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGSCTGTGCTGACTCAG

TMX24VL6 (配列番号 191)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGAAATTATGCTGACTCAG

30

TMX24VL7 (配列番号 192)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGRCTGTGGTGACTCAG

TMX24VL8 (配列番号 193)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGACTGTGGTGACCCAG

TMX24VL4/9 (配列番号 194)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACWGCTGTGCTGACTCAG

【0079】

【化7】

40

TMX24VL10 (配列番号 195)

GACGACCGGCTACCAAGAGGACAGTCTAGACAGGCAGGGCTGACTCAG

上記の配列において、Rは、AおよびGの等量混合であり、Mは、AおよびCの等量混合であり、Yは、CおよびTの等量混合であり、Wは、AおよびTの等量混合であり、そしてSは、CおよびGの等量混合である。

【0080】

これらのサンプルを、94で1分間熱変性し、次いで(94で5秒間、56で10秒間および68で2分間)×20回のサイクルにかける。これにより、第2鎖cDNAの直線増幅が可能となった。鎖について「TMX24CKnpt」または鎖について

50

て「TMX24CLnpt」と称される入れ子式オリゴヌクレオチドを、氷上で、0.2 μ Mの最終濃度まで添加する。入れ子式オリゴヌクレオチド配列は、以下である：「TMX24CKnpt」(5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG CTC GAG CTC AGG CCC TGA TGG GTG ACT TCG CT 3') (配列番号196) および「TMX24CLnpt」(5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG AAG AGC TCC TGG GTA GAA GTC ACT KAT SAG RCA CAG 3') (配列番号197)。1gM入れ子式オリゴについて図7で示されるように、3つの3'末端ヌクレオチドを、オリゴ伸長を防止するために改変する。第2鎖cDNAは、94で1分間の熱変性、アニーリングおよび68で2分間の伸長によって、入れ子式オリゴからさらに伸長され、その後4にされる。得られた第2鎖cDNA (操作されたテンプレート)を、QUIAGENスピンカラム (PCR Purification Kit) を使用して清浄化する。この工程は、遊離のオリゴヌクレオチドを除去し、そして下流のプロトコルのための単純な緩衝液交換を可能にする。

【0081】

(軽鎖単一プライマー増幅 (SPA))

操作されたテンプレートを、Advantage 2 ポリメラーゼミックス (Clontech) およびその10×反応緩衝液、dNTP、ならびに鎖についてプライマー「TMX24K」または鎖について「TMX24L」を使用して増幅する。「TMX24K」の配列は、5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA GTG 3' (配列番号198) であり、そして「TMX24L」の配列は、5' GAC GAC CGG CTA CCA AGA GGA CAG 3' (配列番号199) である。サンプルを、95で1分間熱変性させ、次いで(95で5秒間および68で1分間) × 30回のサイクルにかける。その後、さらに3分間68にし、そして4で維持する。

【0082】

(軽鎖クローニング)

および増幅産物を、PCR精製キット (QUIAGEN) を使用して清浄化し、そして別々にゲル精製した。これらの産物を、XbaIおよびSacIで消化する。挿入物を、それぞれの軽鎖定常領域の残りの部分を含む適切なベクター中にクローニングする。連結産物を、エレクトロポレーションによってE.coli中に導入し、そして37で一晩増殖させる。次の朝、DNA maxiprepを実施して、軽鎖ライブラリーDNAを回収する。軽鎖ライブラリーDNA prepを、XhoI/EcoRIによる重鎖Fdフラグメントの挿入についてのクローニングベクターとして使用して、ライブラリーの構築を完了する。

【0083】

(重鎖についての第1鎖cDNAの合成および改変)

ドナー由来のヒトPBL mRNAを使用して、オリゴdTプライマーを用いて従来の第1鎖cDNAを生成する。これを、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies)を実質的にこれらの指示書に従って使用して行う。制限オリゴヌクレオチドCMDra IIIを、制限エンドヌクレアーゼDraI IIによって消化され得る二本鎖DNA領域を生成するために、第1鎖cDNAに添加する。この反応を、第1鎖cDNAおよび1 μ Mのオリゴヌクレオチドを用いて構成する。このサンプルを、95で2分間加熱し、次いで64で2分間維持して、特異的アニーリングを生じさせる。適切な量の10×制限緩衝液H (Roche Diagnostics)をこのサンプルに添加し、そして37までさらに冷却する。制限エンドヌクレアーゼDra III (New England Biolabs)を添加し、そして37で30分間インキュベートし、その後4で冷却する。

【0084】

10

20

30

40

50

D r a I I I による第 1 鎌 c D N A の消化を、 P C R 増幅によって確認する。増幅産物は、抗体フラグメントをクローニングするためには使用しない。消化された第 1 鎌 c D N A の陽性の増幅が、 5 ' V B V H 1 a および 3 ' C M 0 内部コントロールプライマーを、 2 つの異なる緩衝液条件下で使用して、この反応において観察される。プライマー 5 ' V B V H 1 a / 3 ' C M 0 を用いる良好な増幅およびプライマー 5 ' V B V H 1 a / 3 ' C M 1 を用いる最少の増幅は、第 1 鎌 c D N A テンプレートの首尾よい D r a I I I 消化を示す。

【 0 0 8 5 】

(重鎖第 2 鎌の直線増幅および入れ子式オリゴ伸長)

D r a I I I 消化した第 1 鎌 c D N A を元のテンプレートとして用い、フレームワーク 1 特異的プライマー (最終 0 . 4 μ M) 、 d N T P 、 A m p l i T a q 酵素およびその 10 \times 反応緩衝液 (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いた複数の第 2 鎌 c D N A 反応を構築する。これらのプライマーは、 T M X 2 4 配列、 1 つの X h o I 制限部位、およびヒト抗体重鎖遺伝子のフレームワーク 1 領域中の第 1 鎌 c D N A にアニーリングする領域を含むように設計される。これらのアニーリング配列は、ヒト抗体の既知の配列に基づいて設計され、そして上で実施例 3 に記載したように、重鎖遺伝子のヒト抗体レパートリー全体を網羅すると報告されている V B a s e データベースプライマー由来である。用いた重鎖フレームワーク 1 特異的プライマーは、実施例 3 に列挙したプライマーである。

【 0 0 8 6 】

サンプルを 9 4 で 1 分間加熱変性させ、次いで (9 4 で 5 秒間、 5 6 で 10 秒間、および 6 8 で 2 分間) \times 2 0 のサイクルにかけた。これにより、第 2 鎌 c D N A を直線増幅が可能であった。「 T M X 2 4 C M n p t 」 (実施例 3 で使用したように) と称される入れ子式オリゴヌクレオチドを氷上で添加し、 0 . 2 μ M の最終濃度にまでする。その第 2 鎌 c D N A を、 9 4 で 1 分間加熱変性させ、 6 8 で 2 分間アニーリングおよび伸長させ、入れ子式オリゴからさらに伸長させ、次いで 4 にする。次いで、生じた第 2 鎌 c D N A (操作したテンプレート) を、 Q I A G E N スピンカラム (P C R P u r i f i c a t i o n K i t) を用いて清浄化する。この工程は、遊離オリゴヌクレオチドを除去し、以降のプロトコルでの簡単な緩衝液の交換を可能にする。

【 0 0 8 7 】

(重鎖単一プライマー増幅 (S P A))

操作したテンプレートを、 A d v a n t a g e 2 p o l y m e r a s e m i x (C l o n t e c h) およびその 10 \times 反応緩衝液、 d N T P 、およびプライマー「 T M X 2 4 」を用いて増幅させる。このサンプルを、 9 5 で 1 分間熱変成させ、次いで (9 5 で 5 秒間、および 6 8 で 1 分間) \times 3 0 のサイクルにかけた。これに引き続き、 6 8 でさらに 3 分間置き、 4 にて維持する。

【 0 0 8 8 】

(重鎖クローニングおよびライプラリー作製)

約 5 0 0 b p の増幅産物を、ゲル精製し、次いで X h o I および E c o R I により消化する。この挿入物は、適切なベクターにクローニングされ、 I g M C H 1 ドメインの残りの部分を包含する。 F a b ライプラリーを含む連結産物を、エレクトロポレーションにより、 E . c o l i に導入する。

【 0 0 8 9 】

バクテリオファージの表面上の F a b ライプラリーを作製するために、抑制株細胞 (例えば、 X L 1 B L U E (S t r a t a g e n e)) が用いられる。エレクトロポレーション後、細胞を 3 7 で 1 時間振盪し、次いでカルベニシリンを 2 0 μ g / m l まで添加する。 3 7 で 1 時間の振盪後、カルベニシリンを 5 0 μ g / m l まで増加し、 3 7 でさらに 1 時間振盪する。次いで、この V C S - M 1 3 ヘルパーファージ (S t r a t a g e n e) を添加し、ファージミド粒子の產生に必要な全ての成分を提供し、培養物の容量を、 1 0 0 m l (S B 培地) まで増加させる。 3 7 にて 1 時間後、カナマイシンを 7 0 μ 50

g / mlまで添加し、ヘルパーファージDNAを含むバクテリアを選択する。この培養物を、37℃で一晩振盪する。その間に、細菌は、その表面上にFabが展示される新しいファージミド粒子を産生する。翌朝、ファージミド粒子を、細菌細胞をスピナウトし、次いで、4%PEG 8000および0.5M NaCl(氷上にて30分間)を有する上清からファージミド粒子を沈殿させることにより単離し得る。遠心分離(14,300×g)で、ファージペレットを沈殿させる。このペレットを、PBS/1%BSA中に再懸濁し得る。この調製物を濾過し、細菌の細片を除去し得る。得られたライブラリーを、4℃で保存する。

【0090】

(実施例5)

10

(IgEまたは組換えIgE Fc CH2~4で免疫したマウスのmRNA由来のファージミド表示ライブラリーの構築)

(IgG重鎖および軽鎖についての第1鎖cDNA合成および変更)

ヒトIgEまたは組換えヒトIgEで免疫したマウス由来のマウス脾臓mRNAを用い、オリゴdTプライマーを有する従来の第1鎖cDNAを生成した。これは、Super Script First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies)を、実質的に製造業者の指示に従って用いてなされた。制限オリゴヌクレオチド(IgG1に対して'mCG1Xcm I'、IgG2aに対して'mCG2aBsaJ I'、または軽鎖に対して'mCKHpa I')を、IgG1に対する制限エンドヌクレアーゼXcm I、IgG2aに対する制限エンドヌクレアーゼBsaJ I、または軽鎖に対する制限エンドヌクレアーゼHpa Iによって消化され得る2本鎖DNA領域を生成するために、第1鎖cDNAに添加した。「mCG1Xcm I」配列は、5'CTAACCTCCATGGTGACCCCTGGGATG3'(配列番号200)である。「mCG2aBsaJ I」配列は、5'CAACTGGCTCCCTCGGTGACTCTAG3'(配列番号201)である。「mCKHpa I」配列は、5'CAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG3'(配列番号202)である。第1鎖cDNAオリゴヌクレオチド(1μM)、および適切な量の10×NEB緩衝液(New England Biolab)または10×制限緩衝液A(Roche Diagnostics)を用いて、反応を構成した。このサンプルを95℃で2分間加熱し、次いで64℃で2分間維持して特異的アニーリングを生じさせ、そしてXcm IおよびHpa Iに対して37℃まで冷却し、BsaJ Iに対して60℃まで冷却した。この制限エンドヌクレアーゼXcm I、BsaJ I、またはHpa I(New England Biolabs)を添加し、各々、37℃で30分間、60℃で30分間、および37℃で10分間、インキュベートした。これらの制限酵素を、Xcm Iについては65℃で20分間、BsaJ Iについては80℃で20分間加熱して失活させ、次いでそのサンプルを、4℃まで冷却した。

【0091】

各制限エンドヌクレアーゼによる第1鎖cDNAの消化を、当業者に公知の技術を用いて、PCR增幅により確認した。これらの産物は、抗体遺伝子のクローニングに用いなかった。消化した第1鎖cDNAの正の增幅が、IgG1に対して5'TMX24mVHIBshortおよび3'mCG1内部制御プライマーを用いた反応、IgG2aに対して5'TMX24mVHIBshortおよび3'mCG2a内部制御プライマーを用いた反応、ならびにIgG1に対して5'TMX24mVKIVshortおよび3'mCK0内部制御プライマーを用いた反応において観察された。プライマー-5'TMX24mVHIBshort/3'mCG1またはプライマー-5'TMX24mVHIBshort/3'mCG2aまたは5'TMX24mVKIVshort/3'mCK0を用いた良好な增幅およびプライマー-5'TMX24mVHIBshort/3'mCG1Bまたはプライマー-5'TMX24mVHIBshort/3'mCG2aBまたは5'TMX24mVKIVshort/3'mCKBを用いた最小の增幅は、各制限エンドヌクレアーゼによる第1鎖cDNAテンプレートの消化の成功を示す。チェックPCRのため

30

40

50

に用いたプライマーの配列は、

T M X 2 4 m V H I I B s h o r t (配列番号 2 0 3)

5 ' G A C G T G G C C G T T G G A A G A G G A G T G C T C G A G G T C C A A C T
G C A G C A G Y C 3 '

m C G 1 (配列番号 2 0 4)

5 ' C A T G G A G T T A G T T G G G C A G C A G 3 '

m C G 1 B (配列番号 2 0 5)

5 ' C A A C G T T G C A G G T G A C G G T C T C 3 '

m C G 2 a (配列番号 2 0 6)

5 ' C G A G G A G C C A G T T G T A T C T C C A C 3 '

m C G 2 a B (配列番号 2 0 7)

5 ' C C A C A T T G C A G G T G A T G G A C T G 3 '

T M X 2 4 m V K I V s h o r t (配列番号 2 0 8)

5 ' G A C G A C C G G C T A C C A A G A G G A G T G T C T A G A G A A A W T G T
G C T C A C C C A G T C T C 3 '

m C K 0 (配列番号 2 0 9)

5 ' C T G C T C A C T G G A T G G T G G G A A G 3 '

m C K B (配列番号 2 1 0)

5 ' G A G T G G C C T C A C A G G T A T A G C T G 3 '

(軽鎖第2鎖の直線増幅および入れ子式オリゴ伸長)

H p a I 消化した第1鎖 c D N A を元のテンプレートとして用い、フレームワーク1特異的プライマー（最終 0 . 4 μ M ）、d N T P、A m p l i T a q 酵素およびその 1 0 \times 反応緩衝液 (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いた複数の第2鎖 c D N A 反応を構築した。これらのプライマーは、に対する T M X 2 4 m K 配列、および X b a I 制限部位、およびマウス抗体 軽鎖遺伝子のフレームワーク1領域中の第1鎖 c D N A にアニーリングする領域を含むように設計される。これらのアニーリング配列は、軽鎖遺伝子のマウス抗体レパートリー全体を網羅する K a b a t データベース由来である (h t t p : / / i m m u n o . b m e . n w u . e d u /) 、マウス抗体の既知の配列に基づいて設計された。

【 0 0 9 2 】

(D . フレームワーク1特異的プライマー)

【 0 0 9 3 】

10

20

30

【化8】

TMX24mVKI short (配列番号 211) Xba I
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTGATGWCACAGTCTC3'
TMX24mVKIIa short (配列番号 212)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATGTTGTGATGACCCARACTC3'
TMX24mVKIIb short (配列番号 213)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTGATGACKCAGGCTG3'
TMX24mVKIIId short (配列番号 214)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACAWTGTGCTGACCCARTCTC3'
TMX24mVKIV short (配列番号 215) 10
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTC3'
TMX24mVKVa short (配列番号 216)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATCCAGATGACMCAGTCTC3'
TMX24mVKVb short (配列番号 217)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGATATCCAGATGACACAGACTAC3'
TMX24mVKVc short (配列番号 218)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGAGACATTGTSATGACCCAGTC3'
TMX24mVKVI short (配列番号 219)
 5' GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCTAGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTC3'

ここで、RはAおよびGの等量の混合であり、MはAおよびCの等量の混合であり、KはGおよびTの等量の混合であり、WはAおよびTの等量の混合であり、SはCおよびGの等量の混合である。 20

【0094】

これらのサンプルを、94で1分間、熱変性させ、次いで(94で5秒間、56で10秒間、および68で2分間)×20回のサイクルにかけた。このことは、第2鎖cDNAの直線增幅を可能にした。鎖に対する、「TMX24mCKnoer」と名付けられた入れ子式オリゴを、最終濃度0.2μMまで氷上で添加した。「TM24CKnp」の配列は、

【0095】

【化9】

30

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTGTCCG
 GATGTTAACTGCTCACTGGATGGTGGAAAGATGG2'OMe[A(ps)U(ps)U(ps)]
 (プロピル)3' (配列番号 220)

であった。第2鎖cDNAをさらに、94での1分間の熱変性、68での2分間のアニーリングおよび伸長によって、入れ子式オリゴから伸長し、その後4にした。得られた第2鎖cDNA(操作されたテンプレート)を、QIAGEN遠心カラム(PCR Purification Kit)を用いて浄化した。この工程は、遊離オリゴヌクレオチドを除去し、そして下流のプロトコルのために、簡単な緩衝剤交換を可能にする。 40

【0096】

(軽鎖1本鎖プライマー増幅(SPA))

操作されたテンプレートを、Advantage 2ポリメラーゼミックス(Clonetech)およびその10×反応緩衝液、dNTPならびに鎖に対するプライマー「TMX24mK」を使用して増幅した。「TMX24mK」の配列は：

【0097】

【化10】

5'GACGACCGGCTACCAAGAGGAGTG3' (配列番号 221)

である。これらのサンプルを、95℃で1分間、熱変性させ、次いで(95℃で5秒間、および68℃で1分間)×25回のサイクルにかけた。これは、さらに68℃で3分間および4℃での保持を続けた。

【0098】

10

(軽鎖のクローニング)

増幅産物をゲル精製し、次いでXbaIおよびBspE Iにより消化した。このインサートを、鎖定常領域の残存部分を含む、適切な発現ベクターにクローニングした。このライゲーション産物を、E.coliにエレクトロポレーションによって導入し、そして37℃で一晩培養した。翌朝、DNAマキシプレップ(maxi prep)を実施して、軽鎖ライブライアリ-DNAを回収した。この軽鎖ライブライアリ-DNAを、XhoI/BlnIによって重鎖Fdフラグメント中にクローニングする、続く工程で使用して、以下の「重鎖のクローニング」に記載されるライブライアリの構築を完了した。

【0099】

20

(重鎖第2鎖の直線増幅および入れ子式オリゴの伸長)

XcmIおよびBsaJ Iで消化した第1鎖cDNAを使用して、フレームワーク1に特異的なプライマー(終濃度0.4μM)、dNTP、AmpliTaq酵素およびその10×反応緩衝液(Applied Biosystems)を使用する、複数の第2鎖cDNA反応を設定した。これらのプライマーを、TMAX24mH配列、XhoI制限部位およびマウス抗体重鎖遺伝子のフレームワーク1領域中に第1鎖cDNAにアニーリングする領域を含むように設計した。これらのアニーリング配列は、Kabatデータベース(<http://immuno.bme.nwu.edu/>)由来のマウス抗体の公知の配列に基づき設計して、重鎖遺伝子のマウス抗体レパートリー全体をカバーした。

【0100】

30

(重鎖フレームワーク1の特異的プライマー)

【0101】

【化11】

TMX24mVHIAshorter (配列番号 222) Xho I

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGCAGCTCAGSAGTC3'

TMX24mVHIBshorter (配列番号 223)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGCAGCTGAAGSAGTC3'

TMX24mVHIIAshorter (配列番号 224)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTYCAGCTGCARCARC3'

TMX24mVHIIIBshorter (配列番号 225)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCCAATGCAGCAGYC3'

10

TMX24mVHIIICshorter (配列番号 226)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTCAAGCTGCAGCAGTC3'

TMX24mVHIIIAshorter (配列番号 227)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGAAGCTGGTGGAGWC3'

TMX24mVHIIIBshorter (配列番号 228)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGAAGCTCTGGAGTC3'

20

TMX24mVHIIIDshorter (配列番号 229)

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTCGAGGTGMAGCTGGTGGAGTC3'

ここで、RはAおよびGの等量の混合であり、MはAおよびCの等量の混合であり、YはCおよびTの等量の混合であり、SはCおよびGの等量の混合である。

【0102】

これらのサンプルを、94で1分間、熱変性させ、次いで(94で5秒間、56で10秒間、および68で2分間)×20回のサイクルにかけた。このことは、第2鎖cDNAの直線増幅を可能にした。IgG1に対する「TMX24mCg1noer」、IgG2aに対する「TMX24mCg2anoer」と名付けられた入れ子式オリゴを、終濃度0.2μMまで氷上で添加した。「TMX24mCg1noer」の配列は、

30

【0103】

【化12】

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTAGGGTTACCATGGAGTTAGTTGG

GCAGCAGA2'OMe[U(ps)C(ps)A(ps)](プロピル)3' (配列番号230)

であり、そして「TMX24mCg2anoer」は、

【0104】

【化13】

40

5'GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTGCTAGGGTCATCGAGGAGCCAGTTGTA

TCTCCACA2'OMe[C(ps)A(ps)U(ps)](プロピル)3' (配列番号 231)

であった。

【0105】

第2鎖cDNAをさらに、94で1分間の熱変性、68で2分間のアニーリングおよび伸長することによって、入れ子式オリゴから伸長し、その後4にした。得られた第2鎖cDNA(操作されたテンプレート)を、QIAGEN遠心カラム(PCR Purification Kit)を用いて浄化した。この工程は、遊離オリゴヌクレオチド

50

を除去し、そして下流のプロトコルのために、簡単な緩衝液交換を可能にする。

【0106】

(重鎖1本鎖プライマーの増幅 (S P A))

操作されたテンプレートを、重鎖に対して、A d v a n t a g e 2 ポリメラーゼミックス (C l o n e t e c h) およびその 10 × 反応緩衝液、d N T P、およびプライマー「T M X 2 4 m H」を使用して増幅した。「T M X 2 4 m H」の配列は：

【0107】

【化14】

5' GACGTGGCCGTTGGAAGAGGAGTG 3' (配列番号 232)

10

である。これらのサンプルを、95 で 1 分間、熱変性させ、次いで (95 で 5 秒間、および 68 で 1 分間) を、I g G 1 については 28 回繰り返し、そして I g G 2 a については 30 回繰り返した。これに、さらに 68 で 3 分間、および 4 での保持を続けた。

【0108】

(重鎖のクローニング)

重鎖増幅産物をゲル精製し、次いで X h o I および B l n I により消化した。これらのインサートを、I g G 1 および I g G 2 a についての重鎖定常領域の残存部分を含む、鎖ライプラリー D N A にクローニングした。このライゲーションされた産物を、E . c o l i にエレクトロポレーションによって導入し、そして 37 で一晩培養した。翌朝、D N A マキシプレッピング (m a x i p r e p) を実施して、I g G 1 ライプラリー D N A または I g G 2 a ライプラリー D N A を回収した。

20

【0109】

(組換え I g E F c C H 2 ~ 4 に対するライプラリーのパニングおよびスクリーニング)

ライプラリーを、本質的に以下に記載されるように、組換え I g E F c C H 2 ~ 4 に対して 4 回パニングした：Barbas III、C F Burton、D R、Sco tt、J K、および Silverman、G J (2001) Phage Display : A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York。パニングの第二ラウンド、第三ラウンド、第四ラウンド由来の、個々のクローニングを、組換え I g E F c C H 2 ~ 4 について、E L I S A によってスクリーニングした。

30

【0110】

E L I S A によって、I g E F c C H 2 ~ 4 に特異的な結合、および非特異的タンパク質 (オブアルブミン) に対して最小限の結合を示したクローニングを、D N A 配列決定によって分析した。I g E F c C H 2 ~ 4 に対して、全部で 31 個の異なる F a b を、マウスライプラリーから単離した。図 9 a ~ d を参照のこと。

40

【0111】

種々の改変が、本明細書中に記載される実施形態に対してなされ得ることが理解される。従って、上記の説明は、限定としてではなく、単なる好ましい実施形態の例示としてみなされるべきである。当業者は、本開示の範囲および精神の中での、他の改変を想起するであろう。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図 1】図 1 は、テンプレートにアニールされたプライマーおよび境界オリゴの模式図である。

【図 2 A】図 2 A は、核酸鎖にアニールされた限定オリゴの模式図である。

50

【図2B】図2Bは、短くされた5'末端を有するテンプレートにアニールされたプライマーの模式図である。

【図3】図3は、代替的実施形態の模式図であり、ここで、複数回の重合が、実施され、限定オリゴヌクレオチドは、元のテンプレートではなく新たに合成された鎖にアニールされる。

【図4】図4は、新たに合成された核酸鎖にアニールされた入れ子式オリゴの模式図である。

【図5】図5は、この開示に従って操作されたテンプレートの模式図である。

【図6】図6は、操作されたテンプレートの單一プライマー増幅の模式図である。

【図7】図7は、TMX24CMnptと命名された入れ子式オリゴの配列を示す。 10

【図8a】図8aは、実施例3で產生された単離F a bの配列を示す。

【図8b】図8bは、実施例3で產生された単離F a bの配列を示す。

【図8c】図8cは、実施例3で產生された単離F a bの配列を示す。

【図8d】図8dは、実施例3で產生された単離F a bの配列を示す。

【図8e】図8eは、実施例3で產生された単離F a bの配列を示す。

【図9a】図9aは、実施例5で產生された単離F a bの配列を示す。

【図9b】図9bは、実施例5で產生された単離F a bの配列を示す。

【図9c】図9cは、実施例5で產生された単離F a bの配列を示す。

【図9d】図9dは、実施例5で產生された単離F a bの配列を示す。

【図1】

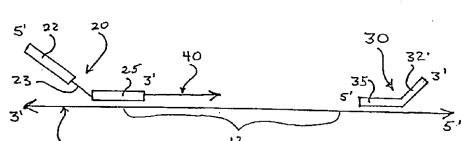


Fig. 1

【図2A】

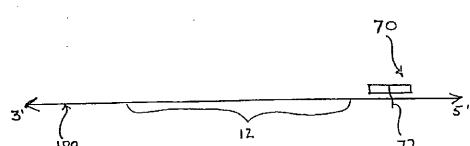


Fig. 2A

【図2B】

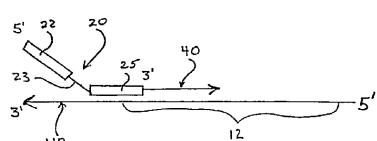
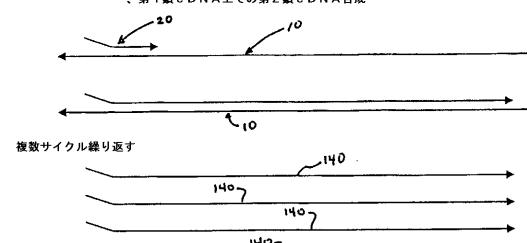


Fig. 2B

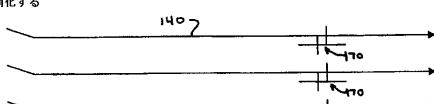
【図3】

Fig. 3

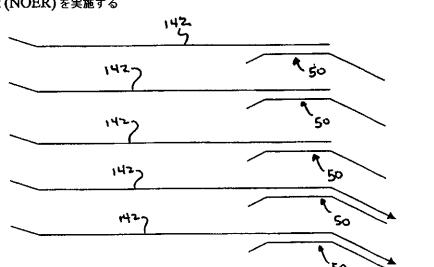
抗体連鎖子の可変領域にハイブリダイズする第1の部分および固定の配列を有する第2の部分を有するプライマーによる、第1鎖cDNA上での第2鎖cDNA合成



抗体の定常領域中の所望の位置で制限オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、適切な制限酵素 (RED) で消化する



熱変性し、入れ子式オリゴヌクレオチドを添加し、入れ子式オリゴヌクレオチドの伸長反応 (NOER) を実施する



〔 四 4 〕

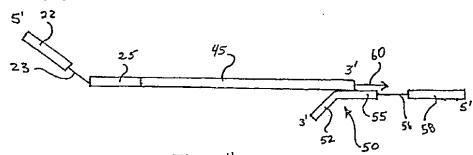


Fig. 4

〔 四 5 〕

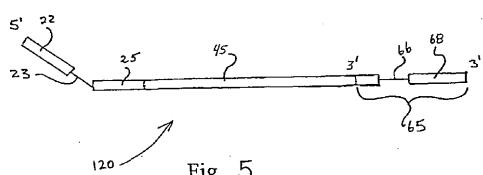
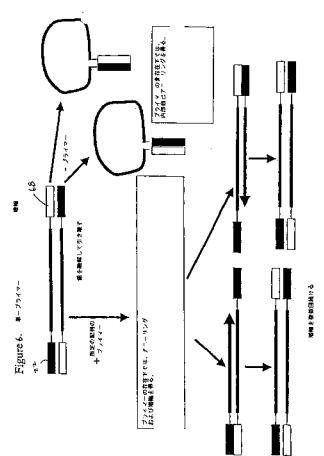


Fig. 5

【圖 6】



【図 8 a】

【図7】

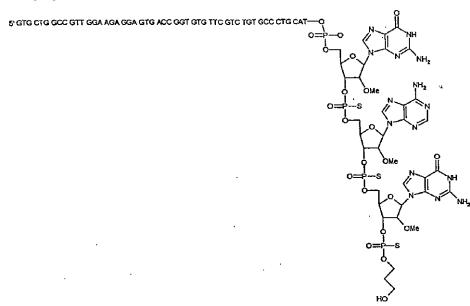


Fig. 7

【図 8 b】

Fig 8a

Fig 8b

【図 9 b】

IgE Fcヘリテイグス IgG クローン

Fab	CDR1		CDR2		CDR3	CDR4	
	ループ	アミノ酸	ループ	アミノ酸		ループ	アミノ酸
ループ							
m3G1R3B10	SRQVLTQSPAMASAGKVTMC	SASSSEVNH	WYQKSSPSPLKTY	DTSKLAS			
m3G1R3H9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3D12	SRQVLTQSPAMASAGKVTMC	SASSSEVNH	WYQKSSPSPLKTY	DTSKLAS			
m3G1R3E9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3B15	SRQVLTQSPAMASAGKVTMC	SASSSEVNH	WYQKSSPSPLKTY	DTSKLAS			
m3G1R3B13	*****	*****	*****	*****			
アミノ酸							
m3G1R3B10	SRQVLTQSPAMASAGKVTMC	SASSSEVNH	WYQKSSPSPLKTY	DTSKLAS			
m3G1R3H9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3D12	SRQVLTQSPAMASAGKVTMC	SASSSEVNH	WYQKSSPSPLKTY	DTSKLAS			
m3G1R3E9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3B15	SRQVLTQSPAMASAGKVTMC	SASSSEVNH	WYQKSSPSPLKTY	DTSKLAS			
m3G1R3B13	*****	*****	*****	*****			

Fig. 9b

【図 9 c】

Fab	CDR1		CDR2		CDR3	CDR4	
	ループ	アミノ酸	ループ	アミノ酸		ループ	アミノ酸
ループ							
m3G1R3A11	GAELMKPQKAVSKRQATVPPF	TWIE	WYQKSPHLEING	ELICCDTNNYNEKFG			
m3G1R3A12	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3D12	GAELMKPQKAVSKRQATVPPF	TWIE	WYQKSPHLEING	ELICCDTNNYNEKFG			
m3G1R3E9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3B10	GAELMKPQKAVSKRQATVPPF	TWIE	WYQKSPHLEING	ELICCDTNNYNEKFG			
m3G1R3F8	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3G9	*****	*****	*****	*****			
アミノ酸							
m3G1R3A11	GAELMKPQKAVSKRQATVPPF	TWIE	WYQKSPHLEING	ELICCDTNNYNEKFG			
m3G1R3A12	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3D12	GAELMKPQKAVSKRQATVPPF	TWIE	WYQKSPHLEING	ELICCDTNNYNEKFG			
m3G1R3E9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3B10	GAELMKPQKAVSKRQATVPPF	TWIE	WYQKSPHLEING	ELICCDTNNYNEKFG			
m3G1R3F8	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3G9	*****	*****	*****	*****			

Fig. 9c

【図 9 d】

Fab	CDR1		CDR2		CDR3	CDR4	
	ループ	アミノ酸	ループ	アミノ酸		ループ	アミノ酸
ループ							
m3G1R3B10	GVPORRSGNSITSLVNTSHEDVATYC	FQSYEPP	LT	PGAGTLLKGR			
m3G1R3H9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3D12	GVPORRSGNSITSLVNTSHEDVATYC	FQSYEPP	LT	PGAGTLLKGR			
m3G1R3E9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3B15	GVPORRSGNSITSLVNTSHEDVATYC	FQSYEPP	LT	PGAGTLLKGR			
m3G1R3B13	*****	*****	*****	*****			
アミノ酸							
m3G1R3B10	GVPORRSGNSITSLVNTSHEDVATYC	FQSYEPP	LT	PGAGTLLKGR			
m3G1R3H9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3D12	GVPORRSGNSITSLVNTSHEDVATYC	FQSYEPP	LT	PGAGTLLKGR			
m3G1R3E9	*****	*****	*****	*****			
m3G1R3B15	GVPORRSGNSITSLVNTSHEDVATYC	FQSYEPP	LT	PGAGTLLKGR			
m3G1R3B13	*****	*****	*****	*****			

Fig. 9d

【配列表】

0004439262000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ボウディッシュ, キャサリン エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014, デル マーク, ボキータ ドライブ 137
54

(72)発明者 フレデリックソン, シャナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92075, ソラナ ビーチ, サンタ カーネリア 70
5

(72)発明者 マルヤマ, トシアキ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラホヤ, カメニト イーストプラフ 325
3 ナンバー 28

(72)発明者 リン イン-チー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122, サン デイエゴ, ロビンズ ストリート 4
259

(72)発明者 レンシャウ, マーク
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129, サン デイエゴ, モラン ウェイ 1272
5

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 Nucleic Acids Res., (1992), 20, [11], p.2900

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed