明　細　書

発明の名称 ：

モノクローナル抗体の酵母による製造方法およびスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、モノクローナル抗体の酵母による製造方法およびスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体は、重鎖（Ｈ鎖）と軽鎖（Ｌ鎖）とからなる１５０ｋＤａの大きなタンパク質分子である。これまで、抗体は、例えば脊椎動物個体に抗原を投与して、時間をかけて作製されてきた。抗体の抗原決定部位は、ゲノム上に多様な部位の遺伝子としてコードされており、外部からの多様な異物の侵入に対抗してその多様性を組み合わせ、いわゆるポリクローナル抗体タンパク質分子を作り出している。さらに、特異性を向上させたモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）とのハイブリドーマ細胞（融合細胞）を試験管内で調製し、培養することによって製造されている。

[0003] このように、ポリクローナル抗体については脊椎動物への投与、そしてモノクローナル抗体については試験管内での細胞培養によって製造されてきた。しかし、重鎖（Ｈ鎖）と軽鎖（Ｌ鎖）とからなるフルボディの抗体は大きなタンパク質分子であるため、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれの製造方法とも、費用および時間のかかる方法であった。

[0004] 他方、抗体の製造には、動物体内または培養細胞によって生産された抗体をスクリーニングするために、ディスプレイ技術（例えば、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイ）が用いられてきた。ディスプレイ技術では、抗体が細胞やファージの表層に固定化される。このように固定化された抗体は、構造の安定性が高まることが知られている。そのため、スクリーニングで取得された抗体を、実際の利用状況である遊離型抗体として用いる場合、構造の安定性が失われて使用できないことがある。また、１つの担体（例

えば、ファージまたは酵母細胞）に対して複数の抗体が提示されるため、近接阻害効果が生じ、低い結合能力しか持たない抗体が得られることがある。

[0005] 抗体医薬品として、モノクローナル抗体が注目されている。モノクローナル抗体は、単一の抗原に対して結合し、特異性が高いため、癌細胞、自己免疫疾患、感染症等への応用が期待されている。例えば、モノクローナル抗体は標的となる抗原に特異的に結合し、その抗原を含む細胞（例えば、癌細胞、感染因子が感染した細胞）を免疫機構によって攻撃し、破壊することができる。したがって、より簡便にモノクローナル抗体を製造する方法が求められている。さらに、標的の抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体をより容易に同定する方法もまた求められている。

[0006] 非特許文献１および２には、抗体を固定化せずに結合能力を調べる方法として、NestLinkという一度に数千のライブラリメンバーを特徴付けることができる結合物質の選択および同定方法を開発したことが記載されている。このNestLinkは、遺伝子でコードされたペプチドバーコード「フライコード」に基づくものであり、このフライコードを、質量分析の検出力を高めかつ配列解析の際のユニークな識別子として機能するように設計したことが記載されている。

[0007] しかし、結合能力を有する抗体の同定をより容易とするには、質量分析によるペプチドの検出に関して、感度および特異性を高めた識別バイアスの少ない方法がなお求められる。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Egloff P.ら、bioRxiv：287813（2018年12月21日）

非特許文献2：Egloff P.ら、NATURE METHOD VOL 16 MAY 2019 421-428

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、より迅速かつ効率的に、モノクローナル抗体を製造する方法を

提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、モノクローナル抗体を製造する方法を提供し、この方法は、

分泌シグナルをコードする遺伝子、ナノボディをコードする遺伝子およびペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片または該ＤＮＡ断片を含むベクターを、酵母の細胞に導入する工程、および

該細胞で発現されかつ該細胞の外に分泌された、該ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを回収する工程

を含む。

[0011] １つの実施形態では、上記酵母は、サッカロマイセス属、ピチア属、シゾサッカロマイセス属、ジゴサッカロマイセス属、カンジダ属、トルロプシス属、ヤロウイア属またはハンセヌラ属に属する酵母である。

[0012] １つの実施形態では、上記分泌シグナルは、α因子分泌シグナル、グルコアミラーゼ分泌シグナルまたはＰＨＯ１分泌シグナルである。

[0013] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、ＡＯＸ１プロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＦＬＤ１プロモーター、ＰＥＸ８プロモーターまたはＹＰＴ１プロモーターであるプロモーターをさらに含む。

[0014] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、カルモジュリンプロテイン（ＣＢＰ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓｔｒｅｐ ＩＩタグ、ＧＳＴタグ、Ｍｙｃタグ、マルトース結合プロテイン（ＭＢＰ）タグからなる群から選択される少なくとも１つのタグをコードする遺伝子をさらに含む。

[0015] １つの実施形態では、上記ペプチドバーコードは、６～１６個のアミノ酸からなるアミノ酸配列により表され、かつ該アミノ酸が独立してＡ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、ＶおよびＷからなる群から選択される。

[0016] １つの実施形態では、上記製造方法は、上記回収されたポリペプチドを抗原と合わせ、該抗原と特異的に結合するナノボディを含むポリペプチドを取得する工程、

該取得されたポリペプチドから前記ペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する工程、および

該同定されたペプチドバーコードをコードする核酸の塩基配列に基づいて、該同定されたペプチドバーコードが切り出されたポリペプチドに含まれていたナノボディを同定する工程

をさらに含む。

[0017] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、特異的プロテアーゼにより切断される部位をさらに含む。

[0018] １つの実施形態では、上記ペプチドバーコードを同定する工程は、高速液体クロマトグラフ（ＬＣ）に接続したタンデム質量分析計（ＭＳ／ＭＳ）を用いたピークの検出により行われる。

[0019] １つの実施形態では、上記高速液体クロマトグラフは、モノリスロング型カラムを備える。

[0020] １つの実施形態では、上記製造方法は、上記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程をさらに含む。

[0021] １つの実施形態では、上記酵母の細胞に導入する工程において、少なくとも２個の前記ＤＮＡ断片またはベクターが用いられ、各ＤＮＡ断片中のペプチドバーコードをコードする遺伝子が、それぞれ異なるアミノ酸配列で表されるペプチドバーコードをコードする。

[0022] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、２個以上のペプチドバーコードをコードする遺伝子を含み、該２個以上のペプチドバーコードの間に切断部位が配置されている。

[0023] 本発明はさらに、モノクローナル抗体を酵母で製造するためのベクターを提供し、このベクターは、分泌シグナルをコードする遺伝子、ナノボディをコードする遺伝子およびペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片を含有し、かつ該酵母の細胞に導入されて該ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを該酵母の細胞の外に分泌させるように発現させる。

[0024] １つの実施形態では、上記分泌シグナルは、α因子分泌シグナル、グルコアミラーゼ分泌シグナルまたはＰＨＯ１分泌シグナルである。

[0025] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、ＡＯＸ１プロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＦＬＤ１プロモーター、ＰＥＸ８プロモーターまたはＹＰＴ１プロモーターであるプロモーターをさらに含む。

[0026] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、カルモジュリンプロテイン（ＣＢＰ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐＩＩタグ、ＧＳＴタグ、Ｍｙｃタグ、マルトース結合プロテイン（ＭＢＰ）タグからなる群から選択される少なくとも１つのタグをコードする遺伝子をさらに含む。

[0027] １つの実施形態では、上記ペプチドバーコードは、６～１６個のアミノ酸からなるアミノ酸配列により表され、かつ該アミノ酸が独立してＡ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、ＶおよびWからなる群から選択される。

[0028] １つの実施形態では、上記ＤＮＡ断片は、特異的プロテアーゼにより切断される部位をさらに含む。

[0029] 本発明はさらに、モノクローナル抗体をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、

（ｉ）遺伝子ライブラリから抗体ライブラリを発現する工程であって、

該遺伝子ライブラリが少なくとも２個の遺伝子メンバーを含み、各遺伝子メンバーが、ナノボディをコードする遺伝子および少なくとも１つのペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片を含み、

該遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーの該ＤＮＡ断片が、該抗体ライブラリの各抗体メンバーのポリペプチドをコードし、

該抗体ライブラリの各抗体メンバーの該ポリペプチドが、ナノボディおよび少なくとも１個のペプチドバーコードを含み、該ナノボディおよび該少なくとも１個のペプチドバーコードが、該遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーに含まれるＤＮＡ断片によりコードされ、

該抗体メンバーの各ペプチドバーコードが、それぞれ異なるアミノ酸配

列で表される、

工程；

（ii）該抗体ライブラリを抗原と合わせ、該抗体ライブラリから、該抗原に結合したナノボディを含む該抗体ライブラリの抗体メンバーを選択する工程；

（iii）選択した該抗体ライブラリの抗体メンバーに含まれるペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する工程；および

（iv）該同定されたペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列を該遺伝子ライブラリの塩基配列に基づいて決定し、該同定されたペプチドバーコードが切り出された抗体メンバーのナノボディを同定する工程

を含み、

該発現工程は、上記ベクターを酵母の細胞に導入することにより行われる。

[0030] １つの実施形態では、上記スクリーニング方法は、上記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程をさらに含む。

発明の効果

[0031] 本発明によれば、任意の抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体を迅速に取得することができる。また、本発明では遊離型抗体を用いて結合能力を測定するため、実際の利用状況に応じた抗体の結合能力に基づいて、抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を取得することができる。

図面の簡単な説明

[0032] [図1]本発明における酵母による分泌発現で製造したペプチドバーコード付加ナノボディの抗原－抗体相互作用に基づく結合の解析の一例を示す模式図である。

[図2]実施例１において設計した４種のナノボディを示す模式図である。

[図3]ピチア・パストリス形質転換体から生産された抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧおよび抗ＧＦＰ－Ｆ

ＬＡＧ－バーコード２のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる結果を示す電気泳動写真である。

[図4]ピチア・パストリス形質転換体から生産された抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧおよび抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２の生産量を示すグラフである。

[図5]ペプチドバーコードを付加したナノボディを用いたＣＤ４の免疫蛍光染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図6]ペプチドバーコードの質量分析を用いてナノボディの結合能力を定量するためのスキームを示す模式図である。

[図7]バーコード１（Ａ）およびバーコード２（Ｂ）について種々の量のＬＣ－ＭＳ／ＭＳの分析結果を示すグラフである。

[図8]２５０ｆｍｏｌの抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１および２５０ｆｍｏｌの抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２からそれぞれ切り出されたペプチドバーコードをＬＣ－ＭＳ／ＭＳで定量した結果を示すグラフである。

[図9]５００μＬのナノボディ混合物（０．１μＭ　抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１および０．１μＭ　抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２を含む）をＣＤ４固定磁気ビーズを用いた一斉結合アッセイに供した後、ビーズから切り出されたペプチドバーコードをＬＣ－ＭＳ／ＭＳで定量した結果を示すグラフである。

[図10]ＬＣ－ＭＳ／ＭＳにおいて１００μｍ内径および７５μｍ内径のそれぞれのモノリスカラムを用いた場合のピークキャパシティを示すグラフである。

[図11]ＬＣ－ＭＳ／ＭＳにおいて５００ｍｍ長および１０００ｍｍ長のそれぞれのモノリスカラムを用いた場合のピークキャパシティを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0033] （定義）

本明細書中の用語は、本質的には、生物学および免疫学で通常用いる用語

において用いるが、以下の用語について説明する。

[0034] 用語「核酸」は、任意の長さのヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれかまたはその類似体の重合体形態を指す。この用語は、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡおよびそれらの修飾された形態を包含する。核酸は、線形である場合も、環状である場合もある。用語「遺伝子」は、その塩基配列によってコードされる遺伝情報を含む核酸の領域をいう。遺伝子は、「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」をコードし、その配列情報に基づき「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」を発現し得る。

[0035] 用語「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、アミノ酸の重合体形態を指す。「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、例えば、核酸によりコードされるアミノ酸を構成分子として含み、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸もまた構成分子として含んでもよい。本明細書において、「ポリペプチド」または「タンパク質」は互換的に用いられる。

[0036] 本明細書中で用語「抗体」は、生物学および免疫学において通常用いられる意味において用い、「免疫グロブリン」とも呼ばれるポリペプチドまたはタンパク質である。抗体は、フルボディでは、２個の重鎖（Ｈ鎖）と２個の軽鎖（Ｌ鎖）とからなり、鎖間はジスルフィド結合で結合されている。本明細書中で「抗体」とは、抗原に対する特異的結合を保持する任意のアイソタイプの抗体または抗体の断片を含み、例えば、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆｄ、V_HH（「ナノボディ」）、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体ならびに抗体の抗原結合部分および非抗体タンパク質を含む融合タンパク質も含まれる。抗体は、例えば、放射性同位元素、検出可能な生成物を生成する酵素、蛍光タンパク質、ペプチドバーコードなどを用いて検出可能に標識できる。

[0037] 「ナノボディ」とは、シングルドメイン抗体とも呼ばれ、単一のモノマー可変抗体ドメインからなり、軽鎖および従来のＦａｂ領域の重鎖のＣＨドメ

インを欠く、一種の抗体フラグメントである。ナノボディは、その分子量は１２～１５ｋＤａであり、通常のフルボディ抗体の分子量１５０ｋＤａと比べて約１０分の１である。ナノボディは、このように低分子であるにもかかわらず、フルボディの抗体と同様の特性を有する。例えば、ラクダ科動物が有する単一ドメイン抗体の可変領域であるV_HHドメインからなる抗体が挙げられる。ナノボディは、通常、約１２０アミノ酸残基のポリペプチドである。ナノボディは、基本的には、典型的な免疫グロブリンの可変領域の配列の構成と類似しており、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４という４個のフレームワーク領域を挟んで超可変領域である相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる３個のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が見られる。

[0038] 「遺伝子ライブラリ」とは、少なくとも２個の遺伝子を含む集団であり、集団を構成する各々の遺伝子を「遺伝子メンバー」ともいう。本発明においては、遺伝子ライブラリの集団において、遺伝子メンバーの遺伝子は各々、別個のベクター（例えばプラスミド）に組み込まれてそれぞれが独立して存在し得る。さらにこれらの遺伝子またはベクターの各々が個々の宿主細胞（例えば、酵母）に導入されて別々に存在するものであってもよい。「抗体ライブラリ」とは、少なくとも２個の抗体を含む集団であり、集団を構成する各々の抗体を「抗体メンバー」ともいう。本発明においては、抗体ライブラリの各抗体メンバーは、遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーの宿主細胞における発現によって得られる。抗体ライブラリの集団において、各抗体メンバーは、例えば、遺伝子ライブラリの遺伝子メンバーからの発現に用いた宿主細胞培養の上清中に遊離型抗体としてそれぞれ存在し得る。

[0039] 用語「塩基配列」とは、遺伝子における連続したヌクレオチド塩基の並びの順序であり、遺伝情報を担う。用語「アミノ酸配列」とは、ペプチドまたはタンパク質における連続したアミノ酸の並びの順序である。

[0040] ペプチドまたはタンパク質を「コードする」遺伝子は、例えば、当該遺伝子が、例えば適当な調節または制御エレメントの制御下に置かれた場合に転写され（ＤＮＡの場合）、ペプチドまたはタンパク質に翻訳される（ｍＲＮ

Ａの場合）。

[0041] 「ペプチドバーコード」は、ペプチドバーコードが融合された分子（例えば抗体）を同定する、かつ／または１種もしくは複数の異なる分子から区別することができる配列を有するペプチドをいう。ペプチドバーコードは、当該ペプチドバーコードが融合された抗体の抗原への結合に影響を及ぼさないように抗体に融合されており、かつそのような影響を及ぼさない大きさでありかつアミノ酸配列を有することが好ましい。本明細書において、ペプチド（例えば、ペプチドバーコード）が分子（例えば、抗体またはタグ）と「融合する」とは、当該ペプチドのＣ末端またはＮ末端に当該分子が連結されてより大きな分子を形成することをいうが、当該ペプチドと当該分子との間に、別の分子または領域（例えば切断部位）が配置されていてもよく、かつ／または１または複数個（例えば、２～１０数個）のアミノ酸が存在していてもよい。「ペプチドバーコード」は遺伝子によりコードされており、コードする遺伝子の塩基配列は、遺伝子バーコードとして機能し得る。

[0042] 本明細書において、「特異的結合」は、結合のパートナー同士（例えば、抗原と抗体）は互いに結合するが、所与の条件（例えば、生理学的条件）下でその環境（例えば、生体サンプル、組織）中に存在し得る他の分子とは十分または実質的に結合しないような、結合パートナー間の相互作用に基づく結合をいう。

[0043] （１．モノクローナル抗体の製造方法）

本発明は、モノクローナル抗体の製造方法を提供する。この製造方法は、分泌シグナルをコードする遺伝子、ナノボディをコードする遺伝子およびペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片または該ＤＮＡ断片を含むベクターを、酵母の細胞に導入する工程（工程（Ａ））；および該細胞で発現されかつ該細胞の外に分泌された、該ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを回収する工程（工程（Ｂ））を含む。

[0044] （１－１．工程（Ａ）：酵母による分泌発現）

本発明では、酵母による分泌発現によってモノクローナル抗体を製造する

。酵母は、エンドトキシンを含まず、発現により得られる抗体の精製プロセスを簡便にすることができる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス属（Saccharomyces）、ピチア属（Pichia）、シゾサッカロマイセス属（Schizosaccharomyces）、ジゴサッカロマイセス属（Zygosaccharomyces）、カンジダ属（Candida）、トルロプシス属（Torulopsis）、ヤロウイア属（Yarrowia）またはハンセヌラ属（Hansenula）に属する酵母が挙げられる。例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、シゾサッカロマイセス・ポムベ（Schizosaccharomyces pombe）、ピチア・パストリス（Pichia pastoris）などが挙げられる。ピチア・パストリス（Pichia pastoris）が好ましい。

[0045] 分泌シグナルは、モノクローナル抗体を発現する宿主酵母が、当該モノクローナル酵母を細胞外に分泌させることができる限り、いかなる分泌シグナルも用いることができる。酵母による分泌発現が効率的である点で、例えば、α因子分泌シグナル（例えば、サッカロマイセス・セレビシエ由来のα因子プレプロ配列）、グルコアミラーゼ分泌シグナル（例えば、リゾプス・オリゼ（Rhizopus oryzae）由来のグルコアミラーゼの分泌シグナル）またはＰＨＯ１分泌シグナル（例えば、ピチア・パストリス由来のフォスファターゼ（ＰＨＯ１）の分泌シグナル）である。

[0046] 本発明では、モノクローナル抗体は、ナノボディをコードする遺伝子を発現させることによって製造され得る。ナノボディは、抗体重鎖の単一の可変ドメイン（VHH）からなり、この可変ドメインが単一種の抗原と結合することができる。ナノボディをコードする遺伝子は、既知の塩基配列および未知の塩基配列のいずれであってもよい。ナノボディは、キメラとしたものを用いてもよい。

[0047] 塩基配列情報が既知である場合、当該配列情報に基づいて設計したプライマー対を用いた、入手可能なゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡなどをテンプレートとするＰＣＲによって、ナノボディをコードする遺伝子を取得することができる。その塩基配列を有するＤＮＡを化学合成して人工遺伝子を作出してもよ

い。ナノボディをコードする遺伝子は、例えば、ラクダ科動物を含む脊椎動物の胸腺、骨髄、末梢血等の白血球から抽出したＤＮＡから可変領域をＰＣＲなどにより増幅させることによって得ることもできる。

[0048] ナノボディをコードする遺伝子は、例えば、ＮＮＫコドンによる網羅的変異法によって種々の変異を導入してもよく、エラープローンＰＣＲを併用することもできる。これらの方法によると、動物個体を用いることなく多様な抗体をコードする遺伝子を設計し得る。

[0049] 上記ＤＮＡ断片は、プロモーターをさらに含むことができる。分泌シグナルの上流にプロモーターが配置され得る。酵母において遺伝子発現を導くことができる任意のプロモーターを用いることができる。上記ＤＮＡ断片は、プロモーターをさらに含むことができる。プロモーターは、誘導性プロモーターおよび構成的発現プロモーターのいずれでもよい。誘導性プロモーターとしては、ＡＯＸ１プロモーター（アルコールオキシダーゼ（ＡＯＸ）をコードする遺伝子のプロモーター）、ＦＬＤ１プロモーター（ホルムアルデヒド脱水素酵素（ＦＬＤ）をコードする遺伝子のプロモーター）およびＰＥＸ８プロモーター（ペルオキシン（ＰＥＸ）の１つをコードする遺伝子のプロモーター）が挙げられ、そして構成的発現プロモーターとしては、例えば、ＧＡＰプロモーター（グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のプロモーター）およびＹＰＴ１プロモーターが挙げられる（これらのプロモーターはいずれもピチア・パストリス由来であり得る）。酵母がピチア・パストリスの場合、メタノール誘導性プロモーター（例えば、ＡＯＸ１プロモーター、ＦＬＤ１プロモーターおよびＰＥＸ８プロモーター（上記））を用いることができ、構成的発現プロモーターでもよい。メタノール誘導性プロモーターは、メタノール資化性酵母で好ましく用いられる。

[0050] 上記ＤＮＡ断片は、タンパク質タグをコードする遺伝子をさらに含んでもよい。タンパク質タグとしては、例えば、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、ＣＢＰ（カルモジュリンプロテイン）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓｔｒｅｐ ＩＩタ

グ、ＧＳＴタグ、Ｍｙｃタグおよびｍｂｐ（マルトース結合プロテイン）タグ、ならびにそれらの組合せが挙げられる。このようなタグの付加により、酵母の細胞外に分泌されるモノクローナル抗体の回収および精製をより容易にすることができ、さらに、より高精度のペプチドバーコードの質量分析（ＭＳ）が可能となる。

[0051] ペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列は、以下に記載するペプチドバーコードのアミノ酸配列に基づいて作成され得る。ペプチドバーコードのアミノ酸配列は、例えば、５～３０個、好ましくは、６～２０個、より好ましくは、６～１６個、なお好ましくは、６個、７個、８個、９個または１０個のアミノ酸からなる。ペプチドバーコードのアミノ酸配列がこのような長さの範囲内であることにより、イオン化効率が高くなり、質量分析によってより良好に検出および定量することができ、当該ペプチドバーコードの同定が容易となる。また、上記の長さの範囲内であれば、設計したペプチドバーコードのイオン化効率が高いことをあらかじめ検証することができ、質量分析（ＭＳ）による同定にバイアスが生じにくい。そのため、候補となるすべてのナノボディの結合能を漏れなく測定することができる。例えば、６個、７個、８個、９個または１０個のアミノ酸からなるペプチドバーコードは、質量分析による高い検出感度に加え、かつバーコードが付加しているナノボディの抗原への結合能を実質的に低下させることなく、しかも多様なバーコードを作成することができ、あるいは、このようなペプチドバーコードは、ナノボディの結合能および質量分析の検出感度に実質的に影響を与えることなく、ペプチドバーコードにタンパク質タグをさらに付加することもできる。

[0052] １つの実施形態では、ペプチドバーコードを構成するアミノ酸は、独立して、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、グリシン（Ｇ）、リジン（Ｋ）、ロイシン（Ｌ）、プロリン（Ｐ）、アルギニン（Ｒ）、バリン（Ｖ）およびトリプトファン（Ｗ）からなる群から選択される。これらのアミノ酸は、イオン化効率に関してイオン抑制のないアミノ酸である。例えば、リジ

ン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）などのアミノ基を有する残基は正に帯電しやすく、それらはイオン化効率を高める。グリシン（Ｇ）およびプロリン（Ｐ）残基もまた、イオン化効率を高める。他方で、ヒスチジン（Ｈ）はイオン化効率を低下させ、システイン（Ｃ）およびメチオニン（Ｍ）は酸化されやすく、アスパラギン（Ｎ）、セリン（Ｓ）、およびトレオニン（Ｔ）は糖鎖付加され得るため、これらのアミノ酸は、ペプチドバーコードを構成するアミノ酸から除かれ得る。さらに、液体クロマトグラフ（ＬＣ）による溶出時間（リテンションタイム）を適度に分散させるために、疎水性のアミノ酸も含められる。１つの実施形態では、ペプチドバーコードは、Ａ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、ＶおよびＷをランダムに配置したものが用いられる。このような種類のアミノ酸でペプチドバーコードを構成することにより、上記のアミノ酸個数（特に６個、７個、８個、９個または１０個のアミノ酸）にて、イオン化効率の高いペプチドバーコードを作製することができる。このため、質量分析（ＭＳ）による同定にバイアスが生じにくく、候補となるすべてのナノボディの結合能を漏れなく測定することができる。また、ペプチドバーコードの同定に用いられる質量分析（ＭＳ）の事前の液体クロマトグラフ（ＬＣ）による分離のリテンションタイムを適度に分散させて質量分析による検出の特異度を向上させることもできる、多様なバーコードを作成することができる。

[0053] 例えば、上記の種類のアミノ酸によって６個のアミノ酸からなるペプチドバーコードを作製する場合、9^6＝５３１４４１種類のユニークバーコードを設計することができる。

[0054] ＤＮＡ断片は、切断部位をコードする遺伝子を含むことができ、切断部位は、酵素または化学的手段で分解可能な部位である。以下に説明するようにペプチドバーコードの切り出しをより容易にするために、切断部位は、好ましくは、切断特異性を有するプロテアーゼによって切断が可能な部位である。切断特異性を有するプロテアーゼ（本明細書中で「特異的プロテアーゼ」ともいう）が認識するアミノ酸配列を有することが好ましい。特異的プロテ

アーゼとして、例えば、エンテロキナーゼが挙げられるがこれに限定されない。例えば、特異的プロテアーゼがエンテロキナーゼである場合、アミノ酸配列ＤＤＤＤＫ（４個のアスパラギン酸－リジン）のリジンの後ろで（すなわち、上記５アミノ酸のペプチドに対してＣ末端側を）切断する。

[0055] 遺伝子の塩基配列は、宿主に応じて最適化したコドンを採用し得る。

[0056] ＤＮＡ断片は、ターミネーターをさらに含み得る。ターミネーターは、酵母において機能する限り任意のターミネーターを用いることができる。一例として、ＡＯＸ１ターミネーターが挙げられる。

[0057] 各種構成要素（すなわち、各種遺伝子、プロモーターおよびターミネーター）を含むＤＮＡの合成および結合は、当業者が通常用い得る技術で行われ得る。例えば、分泌シグナルペプチドをコードする遺伝子とナノボディをコードする遺伝子との結合は、部位特異的突然変異法を用いて行うことができる。この方法を用いることにより、より正確な分泌シグナルペプチドの切断およびナノボディの発現が可能である。

[0058] 上記のように構築されたＤＮＡ断片を酵母細胞に導入する。ＤＮＡ断片は、ベクターに組み込まれて導入されてもよい。ＤＮＡ断片の上記構成要素、例えば、プロモーターおよびターミネーター、ならびに／または分泌シグナルをコードする遺伝子は、市販の酵母発現用ベクターに予め備えられているものを用いてもよい。「導入」とは、ＤＮＡ断片中の遺伝子を細胞の中に導入するだけでなく、発現させることも意味する。このような導入の方法としては、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクション、コトランスフェクション、エレクトロポレーションなどの方法がある。酵母細胞への導入の場合、具体的には、例えば、酢酸リチウムを用いる方法、プロトプラスト法などがある。ＤＮＡ断片の導入は、宿主の遺伝子に挿入して、または宿主の遺伝子と相同組換えを起こして染色体に取り込まれてもよい。導入のために市販のキットもまた用いることができ、宿主細胞が酵母である場合には、例えば、Frozen EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research社製）が用いられる。

[0059]（１－２．工程（Ｂ）：分泌発現されたポリペプチドの回収）

上記の導入によって、該ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドが酵母の細胞で発現され、そして該細胞の外に分泌される。例えば、メタノール資化性であるピチア・パストリスを宿主細胞として用いる場合、例えばメタノール誘導性プロモーター（例えば、ＡＯＸ１プロモーター）の下流に、分泌シグナルペプチド（例えば、α因子分泌シグナルペプチド）とペプチドバーコードを付加したナノボディとの融合タンパク質をコードする遺伝子を配置したＤＮＡ断片を含むプラスミドベクターを設計する。このようなプラスミドベクターを宿主細胞に導入して融合タンパク質を発現させると、分泌過程でα因子分泌シグナルが切断され、最終的には、ペプチドバーコードを付加したナノボディが培地上清に分泌される。培養上清の回収により、ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを回収することができる。発現された抗体を得るために細胞を破砕する必要なく、ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを回収することができる。当該ポリペプチド（ペプチドバーコードを付加したモノクローナル抗体）を必要に応じて培養上清から精製してもよい。

[0060] 本発明の製造方法は、以下の工程をさらに含むことができる：回収されたポリペプチドを抗原と合わせ、該抗原と特異的に結合するナノボディを含むポリペプチドを取得する工程（工程（Ｃ））；該取得されたポリペプチドから前記ペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する工程（工程（Ｄ））；および該同定されたペプチドバーコードをコードする核酸の塩基配列に基づいて、該同定されたペプチドバーコードが切り出されたポリペプチドに含まれていたナノボディを同定する工程（工程（Ｅ））。

[0061]（１－３．工程（Ｃ）：抗体－抗原相互作用に基づく結合）

目的の抗原と特異的に結合するモノクローナル抗体をより確実に得るために、工程（Ｂ）で回収されたポリペプチドを当該抗原と合わせ、その抗原と特異的に結合するナノボディを含むポリペプチドを取得してもよい（工程（

Ｃ））。上記工程（Ｂ）によって例えば培地上清を回収すると、ペプチドバーコードを付加したナノボディがこの培地上清に含まれているので、培地上清をそのまま、抗原への結合能を調べる結合アッセイに用いることができる。発現された抗体を得るために細胞を破砕する必要なく、抗体の結合能力について培地上清をそのまま測定に用いることができ、プレ精製が必要なく迅速かつ低コストで抗原への結合能力の測定が可能である。

[0062] 抗原は、免疫反応で抗体を作製できるものであればよく、特に限定されないが、例えばタンパク質、ペプチド、多糖類、脂質、低分子化合物など、生体から採取された細胞などが挙げられ、好ましくは、タンパク質である。

[0063] 抗原は、担体に固定され得る。そのような担体として、磁気ビーズ（例えば、ＮＨＳ活性化磁気ビーズ（Thermo Scientific社製））を用いることができる）。例えば、抗原を表層提示する細胞（例えば酵母）を用いることもできる。また、セルソーター（ＦＣＳ）の利用も可能である。このような抗原－抗体間の結合のための結合アッセイの方法および条件は、当業者が通常用いる方法によって行うことができる。例えば、抗原を固定した磁気ビーズを用いる場合、抗原と抗体との結合反応を行った後に適当な溶剤でこのビーズを洗浄することにより、抗原に結合していない抗体を含むポリペプチドを洗い流し、ビーズ上で抗原に結合している抗体を含むポリペプチドを残すことができる。

[0064] 抗原への結合能力を調べるために、例えば、表面プラズモン共鳴に基づくアッセイもまた用いることができる。このようなアッセイは、例えば、Biacore T-200（GE Healthcare社製）を用いた速度論パラメータの測定によって行うことができる。

[0065]（１－４．工程（Ｄ）：ペプチドバーコードの同定）

抗原への結合が確認された抗体を同定および／または取得するために、工程（Ｃ）においてナノボディが抗原に結合したポリペプチドからペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定することができる（工程（Ｄ））。

[0066] ナノボディが抗原に結合したポリペプチドから、該ポリペプチドにナノボディと共に含まれるペプチドバーコードを切り出す。このようなペプチドバーコードの切り出しは、例えば、切断部位を認識する酵素を添加して、ポリペプチドの切断部位で切断することによって行われる。好ましくは、特異的プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ）が用いられる。これにより、抗原に結合した抗体が残り、ペプチドバーコードが切り離される。この切り離されたペプチドバーコードを回収し得る。

[0067] 次いで、切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する。例えば、質量分析で検出されたピークに基づいて決定された分子量と、ペプチドバーコードの構成（アミノ酸配列）によって推定される分子量とを対比して、ペプチドバーコードを同定することができる。

[0068] このような質量分析のために、例えば、高速液体クロマトグラフ（ＬＣ）に接続した質量分析計（ＭＳ）またはタンデム質量分析計（ＭＳ／ＭＳ）を用いることができる（すなわち、ＬＣ－ＭＳ法またはＬＣ－ＭＳ／ＭＳ法）。検出の特異度が上がる点で、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ法が好ましい。タンデム質量分析計としては、トリプル四重極型質量分析計（例えば、ＬＣＭＳ－８０６０：株式会社島津製作所製）が、感度が高く、特異的でありかつ定量的である点で好ましい。ＭＳ／ＭＳの測定法としては、好ましくは、選択反応モニタリング（ＳＲＭ：特定のｍ／ｚの前駆イオンを解離させて生じる特定のｍ／ｚのプロダクトイオンを検出する方法）が用いられる。

[0069] 液体クロマトグラフ（ＬＣ）のカラムとして、例えば、モノリスカラム、好ましくは、ロング型モノリスカラムが用いられる。モノリスカラムは、２種類の大きさの細孔（メソ孔・マクロ孔）を有した棒形状（ロッド）の液体クロマトグラフィー用一体型カラムであり、分離剤としてモノリスシリカゲルが用いられる。ロング型とは、カラムの長さが、例えば、１００ｍｍ～１００００ｍｍであるモノリスカラムをいう。モノリスカラムの内径は、例えば、１μｍ～２００μｍであり、好ましくは、３０μｍ～７５μｍである。ロング型であること、さらに好ましくは上記のような範囲内の内径であるこ

とにより、カラムの分離能力が高くなり、ペプチドバーコードの検出をより効率的に行うことができ同定が容易となる。またロング型モノリスカラムを用いることにより、ＳＲＭによってペプチドの絶対定量を行うこともできる。

[0070]（１－５．工程（Ｅ）：モノクローナル抗体の同定）

上記のように同定されたペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、該同定されたペプチドバーコードを含むポリペプチドに含まれる抗体を同定することができる（工程（Ｅ））。

[0071] 質量分析によりペプチドバーコードが同定されると、そのペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列から、そのペプチドバーコードを付加したナノボディを推定し得る。そのように推定したナノボディの塩基配列情報を取得し、ナノボディを同定することができる。例えば、ナノボディをコードする遺伝子として未知の塩基配列を用いた場合では、ナノボディをコードする遺伝子の塩基配列取得のために、上記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程を本発明の製造方法にさらに含めてもよい。このような塩基配列の決定には、当業者が通常用いる方法を用いることができる。

[0072] このようにして、目的の抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を同定することができる。

[0073] さらに、同定されたモノクローナル抗体をコードする遺伝子の発現により当該抗体を取得することもできる。例えば、同定された抗体をコードする核酸の塩基配列情報からプライマー対を設計し、これを用いるＰＣＲによって抗体をコードする核酸を取得する。このような核酸を用いて上記のように発現ベクターを構築し、この発現ベクターを宿主細胞に導入し、発現された抗体を取得することができる。このようなモノクローナル抗体の発現のために、好ましくは、上述したような酵母による分泌発現が用いられる。

[0074] 本発明の製造方法においては、２個以上のＤＮＡ断片を用いることもできる。この場合、上記酵母の細胞に導入する工程（工程（Ａ））において、少なくとも２つの前記ＤＮＡ断片またはベクターが用いられ、各ＤＮＡ断片中

のペプチドバーコードをコードする遺伝子は、それぞれ異なるアミノ酸配列で表されるペプチドバーコードをコードする。２個以上のＤＮＡ断片を用いる場合は、各ＤＮＡ断片中のペプチドバーコードのアミノ酸配列を異なるものとすることにより、工程（Ｄ）の質量分析によって検出されるペプチドバーコードを識別することができる。少なくとも２つのＤＮＡ断片またはベクターは、対応する数の別々の酵母細胞に導入され得る。複数のＤＮＡ断片またはベクターが１つの酵母細胞に導入されてもよい。少なくとも２つのＤＮＡ断片またはベクターは、少なくとも２個以上であればよいが、例えば、２～10^8個、好ましくは10^2～10^7個、または10^3～10^6個である。

[0075] また、１つのＤＮＡ断片が、２個以上のペプチドバーコードをコードする遺伝子を含んでいてもよい。この場合、１つのＤＮＡ断片によってコードされるナノボディに対し、該２個以上のペプチドバーコードがタンデムに配置され得る。その２つ以上のペプチドバーコードの間に切断部位が配置され得る。例えば、２個以上のペプチドバーコードをタンデムに並べ、それぞれの間に特異的プロテアーゼ切断配列を配置することで、ペプチドバーコードの多様性を増加させることができる。例えば、NH_2－［ナノボディ］－切断部位－［ペプチドバーコードＡ］－切断部位－［ペプチドバーコードＢ］－ＣＯＯＨというポリペプチドの配列でライブラリを構築するとした場合、ＣＯＯＨ末端に近いものをペプチドバーコードＢ、NH_2末端に近いものをペプチドバーコードＡと名付けるとき、ペプチドバーコードの位置を識別できるように、ペプチドバーコードの末端（Ｃ末端またはＮ末端のいずれであってもよい）に識別子となるアミノ酸を各ペプチドバーコードで異なるように１つ追加する。識別子のアミノ酸として、Ａ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、ＶおよびＷのいずれも用いることができる。例えば、ペプチドバーコードＡのＣ末端にＫ（リジン）、ペプチドバーコードＢのＣ末端にＲ（アルギニン）を付加するようにすれば、それぞれのペプチドバーコードがペプチドバーコードＡ由来かペプチドバーコードＢ由来かを質量分析で区別できるようになる。この場合、２種類のペプチドバーコードをタンデムに並べると、$(9^6)^2$＝

５３１４４１^{2}種類の多様性を評価できるようになる。３種類のペプチドバーコードをタンデムに並べれば、（９^{6}）^{3}＝５３１４４１^{3}種類の多様性を評価可能である。４種類以上のペプチドバーコードのタンデム化も可能であるため、定量可能なナノボディライブラリのサイズは高くなる。１つのＤＮＡ断片が含むペプチドバーコード数は、例えば、２～５個である。

[0076]（２．モノクローナル抗体を酵母で製造するためのベクター）

本発明は、モノクローナル抗体を酵母で製造するためのベクターをさらに提供する。本発明のベクターは、上記ＤＮＡ断片を含む。ＤＮＡ断片の構成要素（上述したような、分泌シグナルをコードする遺伝子、ナノボディをコードする遺伝子およびペプチドバーコードをコードする遺伝子、ならびにプロモーター、タンパク質タグをコードする遺伝子、切断部位をコードする遺伝子、およびターミネーター）は、上述したとおりである。

[0077] ベクターは、選択マーカー、複製起点、エンハンサー等の因子を適宜含み得る。ベクターは、例えば、プラスミドの形態である。例えば、酵母のＣｏｌＥ１の複製起点を有するプラスミドが好適に用いられる。プラスミドは、プラスミドの調製および形質転換体の検出を容易にする点で、選択マーカーを有することが好ましい。選択マーカーとしては、例えば、薬剤耐性遺伝子および栄養要求性遺伝子が挙げられる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（Ａｍｐｒ）、およびカナマイシン耐性遺伝子（Ｋａｎｒ）が挙げられるが、特に限定されない。栄養要求性遺伝子としては、例えば、Ｎ－（５’－ホスホリボシル）アントラニル酸イソメラーゼ（ＴＲＰ１）遺伝子、トリプトファンシンターゼ（ＴＲＰ５）遺伝子、リンゴ酸β－イソプロピル脱水素酵素（ＬＥＵ２）遺伝子、イミダゾールグリセロールリン酸脱水素酵素（ＨＩＳ３）遺伝子、ヒスチジノール脱水素酵素（ＨＩＳ４）遺伝子、ジヒドロオロト酸脱水素酵素（ＵＲＡ１）遺伝子、およびオロチジン－５－リン酸デカルボキシラーゼ（ＵＲＡ３）遺伝子が挙げられるが、特に限定されない。酵母用の複製遺伝子は必要に応じて選択され得る。

[0078]（３．モノクローナル抗体をスクリーニングする方法）

本発明は、モノクローナル抗体をスクリーニングする方法もまた提供する。この方法は、（ｉ）遺伝子ライブラリから抗体ライブラリを発現する工程であって、

該遺伝子ライブラリが少なくとも２つの遺伝子メンバーを含み、各遺伝子メンバーが、ナノボディをコードする遺伝子および少なくとも１つのペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片を含み、

該遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーの該ＤＮＡ断片が、該抗体ライブラリの各抗体メンバーのポリペプチドをコードし、

該抗体ライブラリの各抗体メンバーの該ポリペプチドが、ナノボディおよび少なくとも１つのペプチドバーコードを含み、該ナノボディおよび該少なくとも１つのペプチドバーコードが、該遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーに含まれるＤＮＡ断片によりコードされ、

該抗体メンバーの各ペプチドバーコードが、それぞれ異なるアミノ酸配列で表される、

工程；

（ii）該抗体ライブラリを抗原と合わせ、該抗体ライブラリから、該抗原に結合したナノボディを含む該抗体ライブラリの抗体メンバーを選択する工程；

（iii）選択した該抗体ライブラリの抗体メンバーに含まれるペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する工程；および

（iv）該同定されたペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列を該遺伝子ライブラリの塩基配列に基づいて決定し、該同定されたペプチドバーコードが切り出された抗体メンバーのナノボディを同定する工程

を含む。上記発現工程（工程（ｉ））は、上記「２．モノクローナル抗体を酵母で製造するためのベクター」に説明したようなベクターを、酵母の細胞に導入することにより行われる。

[0079] （３－１．工程（ｉ）：遺伝子ライブラリの発現）

本発明によれば、複数種のナノボディを一度に発現させることにより、目的の抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を選択して、同定することもできる。このために、遺伝子ライブラリを作成し得る。遺伝子ライブラリは少なくとも２つの遺伝子メンバーを含み、各遺伝子メンバーが、ナノボディをコードする遺伝子および少なくとも１個のペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片を含む。このＤＮＡ断片は上述したように構築し、必要に応じてベクターに組み込み得る。

[0080] 上記遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーのＤＮＡ断片は、抗体ライブラリの各抗体メンバーのポリペプチドをコードする。したがって、抗体ライブラリの各抗体メンバーのポリペプチドは、ナノボディおよび少なくとも１つのペプチドバーコードを含む。各抗体メンバーのナノボディおよび少なくとも１個のペプチドバーコードは、遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーに含まれるＤＮＡ断片によりコードされる。

[0081] 抗体ライブラリの各抗体メンバーのペプチドバーコードは、それぞれ異なるアミノ酸配列により表される。抗体ライブラリの抗体メンバーは、ランダム化された抗体にユニークな（唯一の）ペプチドバーコードが付加しており、遺伝子ライブラリの遺伝子メンバーは、ランダム化された抗体の遺伝子（抗体をコードする核酸）に対し、ユニークなペプチドバーコードをコードする遺伝子（核酸（例えばＤＮＡ））（よって、ユニークなＤＮＡバーコードとなる）が付加されている。これにより、遺伝子ライブラリ中のランダム化された抗体の遺伝子とＤＮＡバーコード、ならびにランダム化された抗体とペプチドバーコードとが１：１の対応関係にある。抗体ライブラリの各抗体メンバーのペプチドバーコードは、質量分析によって効率的に検出することができる。抗体メンバー毎にペプチドバーコードのアミノ酸配列が異なることにより、ペプチドバーコードをコードする核酸（ＤＮＡバーコード）の塩基配列が異なる。各抗体メンバーのペプチドバーコードのアミノ酸配列は、質量分析による同定で用いられ得る液体クロマトグラフ（ＬＣ）－タンデム質量分析（ＭＳ／ＭＳ）において、ＬＣによる分離で異なるリテンションタ

イムを得ることができるように設計され得、さらにその設計されたアミノ酸配列をコードするように遺伝子の塩基配列が設計され得る。

[0082] よって、ＤＮＡバーコードの塩基配列情報を得ることができると、当該ＤＮＡバーコードが付加された抗体遺伝子（抗体をコードする核酸）の塩基配列を決定することができる。核酸ライブラリにおいては、各核酸メンバーのペプチドバーコードをコードする核酸はいずれも異なるが、抗体については重複していてもよい（言い換えれば、１種の抗体に対し、１種または複数種類（例えば、２～１０種類）のペプチドバーコードが付加されてもよい）。これにより、ある核酸メンバーの発現がうまくいかない場合や、ペプチドバーコードが付加された抗体が何らかの原因で質量分析前に喪失されてしまう場合に備えることができる。

[0083] １つの実施形態では、抗体ライブラリの抗体メンバーは、２個以上のペプチドバーコードを含み、かつ２個以上のペプチドバーコードの間に切断部位が配置されている。ペプチドバーコードおよび切断部位は、上述したとおりである。２個以上のペプチドバーコードをタンデムに並べることにより、バーコードの組合せをより増大することができ、例えば、哺乳動物に見られる程度の多様性またはより多くの多様性を現出することができる。

[0084] 遺伝子ライブラリに含まれる遺伝子メンバーの数としては、少なくとも２個以上であればよいが、例えば、２～10^8個、好ましくは10^2～10^7個、または10^3～10^6個である。このような範囲内の遺伝子メンバー数であれば、遺伝子ライブラリの塩基配列の取得および／または抗原特異的結合に基づく一斉結合アッセイの実施をより効率的に行うことができる。

[0085] 遺伝子ライブラリは、抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体のスクリーニングに際し、新たに配列を設計して構築してもよく、あるいは既存の配列情報を利用して予め調製したものを用いてもよい。

[0086] 遺伝子ライブラリからの抗体ライブラリの発現は、上記のモノクローナル抗体の製造方法およびベクターに関して説明したとおりである。すなわち、遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーのＤＮＡ断片を酵母の細胞に導入し、

ナノボディおよびペプチドバーコードを酵母から分泌発現させる。この酵母による分泌発現のために、上述したベクターが用いられる。

[0087]（３－２．工程（ii）：抗原結合抗体メンバーの選択）

本発明のスクリーニング方法においては、抗体ライブラリを抗原と合わせ、該抗体ライブラリから、該抗原に結合した抗体を含む該抗体ライブラリの抗体メンバーを選択する（工程（ii））。この工程では、目的の抗原への結合に関して、抗体ライブラリをスクリーニングに供する。上記工程（ｉ）の酵母細胞への導入後、酵母による分泌発現のため培地上清に抗体ライブラリの各抗体メンバー（ペプチドバーコードを付加したナノボディ）が含まれている。よって、抗体ライブラリを抗原と合わせるために、培地上清をそのまま当該抗原に対して添加してもよい。必要に応じて、培地上清からポリペプチドを精製した後、抗原に対して添加してもよい。この工程（ii）は、基本的に、上記の「工程（Ｃ）：抗体－抗原相互作用に基づく結合」（工程（Ｃ））と同様にして行うことができる。好ましくは、抗原に対して、抗体ライブラリの抗体メンバーを一斉に添加する一斉結合アッセイが用いられる。

[0088]（３－３．工程（iii）：ペプチドバーコードの同定）

本発明のスクリーニング方法においては、選択した該抗体ライブラリの抗体メンバーに含まれるペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する（工程（iii））。この工程（iii）は、基本的に、上記の「工程（Ｄ）：ペプチドバーコードの同定」と同様にして行うことができる。

[0089]（３－４．工程（iv）：モノクローナル抗体の同定）

本発明のスクリーニング方法においては、該同定されたペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列を該遺伝子ライブラリの塩基配列に基づいて決定し、該同定されたペプチドバーコードが切り出された抗体メンバーのナノボディを同定する（工程（iv））。この工程（iv）は、基本的に、上記の「工程（Ｅ）：モノクローナル抗体の同定」と同様にして行うことができる。

[0090] 遺伝子ライブラリが、塩基配列が未知の核酸を含む場合やペプチドバーコードと抗体との組合せが不明の場合、当該遺伝子ライブラリの塩基配列を取得する工程をさらに含み得る。

[0091] 遺伝子ライブラリの塩基配列の取得は、遺伝子ライブラリを大規模配列解析によって行うことができる。大規模配列解析は、当業者が通常用いる方法に従ってすることができ、例えば、大量の塩基配列情報を処理できるＤＮＡシーケンサーを用いて行うことができる。大規模配列解析のために、例えば、例えば、ＭｉＳｅｑ（illumina社製）のような次世代シーケンサー（ＮＧＳ）を用いることができる。

[0092] 塩基配列の情報を用いてデータベースを作成してもよい。このようなデータベースは、質量分析によるペプチドバーコードの同定後に、同定されたペプチドバーコードを含む抗体ライブラリのメンバーをコードする核酸の塩基配列情報（ペプチドバーコードをコードする遺伝子および抗体をコードする遺伝子を含む）、必要に応じて当該塩基配列情報から推定されるアミノ酸配列（ペプチドバーコードおよび抗体を含む）の配列情報から抗体を同定するために用いることができる。

[0093] さらに、本発明について、図１を用いて説明する。

[0094] 図１は、本発明における酵母による分泌発現で製造したペプチドバーコード付加ナノボディの抗原－抗体相互作用に基づく結合の解析の一例を示す模式図である。図１に関して、（ａ）ランダム化されたナノボディ遺伝子（ナノボディをコードする遺伝子）のそれぞれに対してユニークなＤＮＡバーコード（ペプチドバーコードをコードする遺伝子）が付加された、少なくとも２個の遺伝子メンバーを含む遺伝子ライブラリを提供し、この各遺伝子メンバーを酵母細胞に導入する；（ｂ）酵母細胞での発現によりそれぞれのペプチドバーコードが付加された抗体（ナノボディ）を含む抗体メンバーが生成され、抗体ライブラリを構成し、この抗体ライブラリの各抗体メンバーは酵母細胞から培地上清に分泌される；（ｃ）この抗体ライブラリの各抗体メンバーを一斉に抗原と合わせて、抗原に対して結合させる；（ｄ）洗浄し、非

結合抗体を含む抗体メンバーを除去し、抗原に結合した抗体を含む抗体メンバーを残し、選択する；（ｅ）エンテロキナーゼによって、選択された抗体メンバーからペプチドバーコードを切り出す；そして（ｆ）切り出されたペプチドバーコードを質量分析で同定する。

[0095] 図１（ａ）の遺伝子ライブラリからの配列情報に基づき、ランダム化された抗体遺伝子の塩基配列と、ＤＮＡバーコード（ペプチドバーコードをコードする遺伝子）の塩基配列の１：１の対応関係を決定することができ、ランダム化された抗体のアミノ酸配列（当該抗体遺伝子の塩基配列によりコードされる）と、ペプチドバーコードのアミノ酸配列の対応関係を演繹的に調べることができる。上記（ｂ）～（ｆ）によって、抗体ライブラリから抗原に対して結合した抗体を含む抗体メンバーを選択し、選択した抗体メンバーからペプチドバーコードを切り出し、切り出したペプチドバーコードが質量分析で同定されると、核酸ライブラリの既知の配列情報または配列解析で得られた配列情報と併せて、この同定したペプチドバーコードを含む抗体メンバーをコードする遺伝子の塩基配列を求め、どの抗体が抗原に特異的に結合したかを決定することができ、よって抗原に対してモノクローナルなナノボディを得ることができる。さらに、このようにして同定された抗体を、核酸ライブラリの配列情報に基づいて当該抗体をコードする遺伝子を取得し、当該遺伝子から抗体を発現させて製造することもできる。

[0096] 以上のように、本発明によれば、モノクローナル抗体を、動物を用いずに試験管内で作製することができ、遊離型抗体に付加されたユニークなペプチドバーコードの質量分析を通じてその遊離型抗体の結合能力を同定することができる。また、本発明によれば、脊椎動物や培養細胞を使った費用と時間のかかる抗体生産に代わり、試験管内、実験室内で多様な性質の抗体を作り出すことができる。さらに、本発明によれば、モノクローナル抗体の候補となる多数のナノボディを用いる場合、各候補ナノボディに付加されたユニークなペプチドバーコードの質量分析での定量を通じて、目的の抗原に対するこれらのナノボディの結合能力を一回の実験で網羅的に同定することができ

る。したがって、より安価で迅速に、かつ効率的に目的の抗原に特異的に結合するモノクローナルなナノボディを製造することができる。本発明は、基礎的なイメージング研究やセンシング研究のための実験用試薬、分子標的抗体を用いた診断薬および医薬品の製造に有用である。

実施例

[0097] （実施例１：ペプチドバーコードと融合したナノボディの作製）

抗ＣＤ４ナノボディ（米国特許出願公開２０１１／０３１８３４７）および抗ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）ナノボディ（Mol. Cell. Proteomics. 2008：7：282-289）に基づいて、４つのナノボディを設計した。図２は、本実施例で設計した４種のナノボディの模式図である。ナノボディのうち、２つは、６個のアミノ酸残基からなるユニークなペプチドバーコードを付加し、残りの２つはペプチドバーコードなしとした。抗ＣＤ４ナノボディにペプチドバーコードとしてバーコード１を付加し、および抗ＧＦＰナノボディにペプチドバーコードとしてバーコード２を付加した（図２）。

[0098] ペプチドバーコードを以下のように設計した。ペプチドのイオン化効率は、ペプチドの長さや構成アミノ酸残基によって大きく異なる。６～１６残基を有するペプチドは高いイオン化効率を示す。イオン化効率はまた、ペプチドを構成するアミノ酸残基の種類に左右される。例えば、リジン（Ｋ）やアルギニン（Ｒ）などのアミノ基を有する残基は正に帯電しやすいので、それらはイオン化効率を上げる。グリシン（Ｇ）およびプロリン（Ｐ）残基はイオン化効率を高め、ヒスチジン（Ｈ）はイオン化効率を減らす。システイン（Ｃ）およびメチオニン（Ｍ）は酸化されやすく、アスパラギン（Ｎ）、セリン（Ｓ）、およびトレオニン（Ｔ）は糖鎖付加され得るため、これらの残基は所定のターゲットを分析するＳＲＭ分析に適していない。また、液体クロマトグラフの溶出時間（リテンションタイム）を適度に分散させるために疎水性のアミノ酸を含めた。

[0099] これらの要因を考慮して、９つのアミノ酸（Ａ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、Ｖ、およびW）を構成アミノ酸残基として選択し、それぞれ分子量が異な

る２つのペプチドバーコードを設計した：

バーコード１：ＷＬＦＰＶＧ（配列番号１）

バーコード２：ＦＶＧＡＲＬ（配列番号２）

[0100] バーコード１および２ともに、そのＮ末端にＦＬＡＧタグペプチド（ＤＹＫＤＤＤＤＫ：配列番号３）を融合させた。また、バーコード１および２ともに、そのＣ末端にもＦＬＡＧタグペプチドを融合させた（図２）。

[0101] 「ＦＬＡＧタグペプチド－バーコード１－ＦＬＡＧタグペプチド」（アミノ酸配列を配列番号４に示す）を抗ＣＤ４ナノボディのＣ末端に融合させ、そして「ＦＬＡＧタグペプチド－バーコード２－ＦＬＡＧタグペプチド」（アミノ酸配列を配列番号５に示す）を抗ＧＦＰナノボディのＣ末端に融合させた（これらを「抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１」および「抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２」と称した：図２）。

[0102] また、バーコードなしの抗ＣＤ４ナノボディおよび抗ＧＦＰナノボディの場合は、これらのナノボディのＣ末端にＦＬＡＧタグペプチド（ＤＹＫＤＤＤＤＫ：配列番号３）を融合させた（これらを「抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ」および「抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ」と称した：図２）。

[0103] これらのナノボディをコードするプラスミドを構築した。プラスミドは、ＡＯＸ１プロモーターの下流に、α因子分泌シグナルおよびナノボディをそれぞれコードする遺伝子を配置するように設計した。本実施例で設計したナノボディ（抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧまたは抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２）をコードする遺伝子を合成してＤＮＡ断片を得、このＤＮＡ断片を、EcoRIおよびNotI（いずれも東洋紡株式会社製）で予め切断したｐＰＩＣ９Ｋベクター（Invitrogrn製：このベクターは、ＡＯＸ１プロモーターおよびα因子分泌シグナルを含有する）に、In Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて組み込んだ。

[0104] 各プラスミドの全配列を配列番号６～１７に示す（抗ＣＤ４－ＦＬＡＧプラスミド：全配列（配列番号６）および発現ペプチド配列（配列番号７～８

）；抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１プラスミド：全配列（配列番号９）および発現ペプチド配列（配列番号１０～１１）；抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧプラスミド：全配列（配列番号１２）および発現ペプチド配列（配列番号１３～１４）；ならびに抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２プラスミド：全配列（配列番号１５）および発現ペプチド配列（配列番号１６～１７））。

[0105] 構築したプラスミドをSacI（東洋紡株式会社製）で消化し、MinElute PCR精製キット（QIAGEN社製）により精製した。このプラスミドをFrozen EZ Yeast Transformation II Kit（Zymo Research社製）を用いて、ピチア・パストリスＧＳ１１５株に形質転換した。形質転換した細胞をＭＤ固形培地（１．３４％ｗ／ｖ酵母窒素ベース（アミノ酸なし）、２％ｗ／ｖのＤ－グルコース、および２％ｗ／ｖの寒天）に播き、コロニーを得た。得られたコロニー（形質転換体）を２０ｍＬのＢＭＧＹ培地（１％ｗ／ｖ酵母エキス、２％ｗ／ｖペプトン、１％ｗ／ｖグリセロール、０．１Ｍリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、２．６８％ｗ／ｖ酵母窒素ベース（アミノ酸なし）、４００μｇ／ｍＬビオチン）に植菌し、３０℃にて２５０ｒｐｍ、４８時間培養した。生育させた菌を遠心で回収し、１０ｍＬのＢＭＭＹ培地（１％ｗ／ｖ酵母エキス、２％ｗ／ｖペプトン、０．１Ｍリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．０）、２．６８％ｗ／ｖ酵母窒素ベース（アミノ酸なし）４００μｇ／ｍＬビオチン、および０．５％ｖ／ｖメタノール）に懸濁し、３０℃、２５０ｒｐｍで２４時間培養した。培養後、ＢＭＭＹ培地を遠心分離し、上清を０．２２μｍフィルターで濾過した。この濾過上清をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析してナノボディの産生を確認した。

[0106] １０ｍＬの濾過上清をAmicon Ultra-15 Centrifugal Filters Ultracel-3K（Merck Millipore、Burlington、MA、USA）に８０００ｇ、６０分間遠心分離し、そして１０ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）をAmicon Ultra-３kユニットに添加し、６０分間８０００ｇで遠心分離した。この緩衝液交換手順を２回繰り返した。このようにバッファー置換を行いつつ濃縮し、この濃縮溶液をモノクローナル抗体溶液として用いた。

[0107] 図３は、ピチア・パストリス形質転換体から生産された抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧおよび抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる結果を示す電気泳動写真である。図３において、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧおよび抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２のいずれも対応する分子量の位置にバンドが観察された。図３の結果から分かるように、形質転換体をメタノール含有培地で培養した結果、設計したすべてのナノボディの生産が成功したことを確認した。図４は、ピチア・パストリス形質転換体から生産された抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧおよび抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２の生産量を示すグラフである（各値は、少なくとも５つの試料からの平均±標準偏差を表す。ｔ検定による統計学的解析を行った。星印は、有意差あり（ｐ＜０．０５）を表す）。抗ＣＤ４－ＦＬＡＧと抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１との間で生産性にわずかな違いがあったが（図４）、これは、ピチア・パストリス形質転換体のコピー数変動に由来したと考えられる。

[0108] （実施例２：バーコード付加ナノボディの結合特性の評価）

ペプチドバーコードの付加がナノボディの特性に影響を及ぼすかどうかを調べた。

[0109] まず、ＣＤ４またはＧＦＰを固定したセンサーチップを用いて、以下の手順にて表面プラズモン共鳴を行い、ナノボディの速度論パラメータを測定した。

[0110] 速度論パラメータは、Biacore T-200（GE Healthcare社製）を用いて測定した。組換えヒトｓＣＤ４　ＣＦ（Ｒ＆Ｄ Systems社製）および組換えＧＦＰ（ProSpec、Rehovot、イスラエル）をSeries S Sensor Chip M5（GE Healthcare社製）に固定化したところ、それぞれ２４８６．９ＲＵおよび１１８９．８ＲＵであった。抗ＣＤ４ナノボディ（抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１）をＨＢＳ－ＥＰ緩衝液（０．０１Ｍ　ＨＥＰＥ（ｐＨ７．４）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、および０．００

５％ｖ／ｖ界面活性剤）で希釈し、０．２、０．４、０．６、０．８、および１．０μＭとし、抗ＧＦＰナノボディ（抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２）を０．５、１、５、１０、および５０ｎＭとした。流速、接触時間、および解離時間は、それぞれ３０μＬ／分、１２０秒、および１２０秒であった。ＣＤ４固定チップを１０ｍＭ　ＮａＯＨ（流速３０μＬ／分および接触時間３０秒）により再生し、そしてＧＦＰ固定チップを５０ｍＭ　ＮａＯＨ（流速３０μＬ／分および接触時間３０秒）により再生した。

[0111] この結果を以下の表１に示す。

[0112] [表1]

ナノボディ	抗原	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	K_D(nM)
抗CD4－FLAG	CD4	$(6.8\pm2.3)\times10^{4}$	$(5.4\pm1.5)\times10^{-3}$	42±17
抗CD4－FLAG－バーコード1	CD4	$(7.7\pm0.6)\times10^{4}$	$(4.0\pm0.1)\times10^{-3}$	52±3
抗GFP－FLAG	GFP	$(1.1\pm0.3)\times10^{6}$	$(4.8\pm0.2)\times10^{-4}$	0.44±0.01
抗GFP－FLAG－バーコード2	GFP	$(1.4\pm0.6)\times10^{6}$	$(1.6\pm1.8)\times10^{-4}$	0.40±0.12

[0113] 全てのナノボディが各抗原に対して特異的結合を示し、ペプチドバーコードの有無によって速度論パラメータに有意差はみられなかった（表１）。

[0114] 次に、ナノボディを用いたＣＤ４の免疫蛍光染色を行った。ｐＣＡＧＧＳ－ＣＤ４－ｍｙｃはJacob Yountから贈与された（Addgeneプラスミド＃58537；http://n2t.net/addgene：５８５３７；ＲＲＩＤ：Addgene_58537）。ＨＥＫ２９３細胞を、Xfect Transfection Reagent（タカラバイオ株式会社製）を用いることによりｐＣＡＧＧＳ－ＣＤ４－ｍｙｃプラスミドでトランスフェクトし、そしてＤＭＥＭ低グルコース培地（ナカライテスク株式会社製）で１日間培養した。トランスフェクトした細胞を、ポリ－Ｌ－リジン臭化水素酸塩（Sigma-Aldrich社製）でコーティングしたカバーガラス上に移し、ＤＭＥＭ低グルコース培地で１～２時間培養した。培地を除去した後、細胞を４％パラホルムアルデヒドで室温にて３０分間固定した。固定した細胞をＰ

ＢＳで３回すすぎ、そして室温で３０分間、１０％ＦＢＳ（GE Healthcare社製）を含有するＰＢＳでブロックした。抗ＣＤ４ナノボディ（抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１）（２．７μｇ／ｍｌ）または抗ＧＦＰナノボディ（抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２）（３．３μｇ／ｍｌ）を、固定した細胞と共に９０分間インキュベートした後、細胞をＰＢＳで３回すすぎ、そしてＰＢＳで５分間３回洗浄した。二次抗体として抗ＤＤＤＤＫタグmAb Alexa Fluor 488（抗ＦＬＡＧ－ＡＦ４８８：蛍光顕微鏡下で緑色を示す）（株式会社医学生物学研究所製）を、１０％ＦＢＳを含むＰＢＳで１μｇ／ｍＬになるように希釈し、そして室温にて１時間、細胞と共にインキュベートした後、細胞をＰＢＳで３回すすぎ、５分間ＰＢＳで３回洗浄した。核を１μｇ／ｍＬの４’，６’-ジアミジノ－２－フェニルインドールジヒドロクロライド（ＤＡＰＩ：ナカライテスク株式会社製）で１分間染色した（青色に染色される）。染色した細胞を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡ＬＳＭ７００（Carl Zeiss社製）を用いて可視化した。なお、コントロールとして、野生型ＨＥＫ２９３細胞を用いた。

[0115] 図５は、ペプチドバーコードを付加したナノボディを用いたＣＤ４の免疫蛍光染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。ｐＣＡＧＧＳ－ＣＤ４－ｍｙｃでトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞（ＣＤ４表面発現細胞）およびコントロールの野生型ＨＥＫ２９３細胞において、抗ＣＤ４ナノボディ（抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１）、抗ＧＦＰナノボディ（抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２）およびナノボディ処理なしのいずれでも核の染色が観察されたのに対し、二次抗体の緑色は、抗ＣＤ４ナノボディ（抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１）をＣＤ４表面発現細胞とインキュベートした場合にのみ観察された。したがって、図５に示す結果は、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１がＨＥＫ２９３細胞の表面上のＣＤ４を認識したが、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２は認識しなかったことを示した。このような結果は、ペプチドバーコードの付加がナノボディの特性に影響しなかったことを示している。

[0116] （実施例３：質量分析によるナノボディの結合能力の特徴付け）

ペプチドバーコード付加技術が、一回の実験で複数の結合物質の結合能力を測定するのに有用な技術となり得ることを示すための原理証明実験を設計した（図６）。図６は、ＬＣ－ＭＳによるナノボディの結合能力を定量するためのスキームを示す模式図である。設計した実験は、まず、等モルに調製した抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１と抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコードとの混合物をＣＤ４固定磁気ビーズと反応させ（一斉結合アッセイ）、この反応で結合しなかった抗体を洗い流し、次いでエンテロキナーゼを添加してビーズからペプチドバーコードを切り出し、切り出されたペプチドバーコードをＬＣ－ＭＳまたはＬＣ－ＭＳ／ＭＳの選択反応モニタリング（ＳＲＭ）法で定量するというものである。具体的には、以下のように行った。

[0117] （一斉結合アッセイ：抗原－抗体相互作用によるＣＤ４ナノボディの濃縮）

組換えＣＤ４（０．１ｍｇ／ｍＬ）を、１ｍＭ氷冷ＨＣｌで予備洗浄した３０μＬのＮＨＳ活性化磁気ビーズ（Thermo Scientific社製）と混合した。反応後、ビーズを０．１Ｍグリシン－ＨＣｌ（ｐＨ２．０）で２回、そして蒸留水で１回洗浄し、３Ｍエタノールアミン（ｐＨ９．０）で室温にて２時間ブロックした。ブロッキングの後、磁気ビーズを、０．０５％アジ化ナトリウムを含有する３０μＬの５０ｍＭホウ酸緩衝液で懸濁し、ＣＤ４固定磁気ビーズを得た。

[0118] ＣＤ４固定磁気ビーズを５００μＬのナノボディ混合物（０．１μＭ 抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１および０．１μＭ 抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２を含む）と混合し、そして室温にて２時間インキュベートした。上清を除去した後、１ｍＬの０．０５％Ｔｗｅｅｎ ２０含有ＴＢＳで２回、そして１ｍＬの蒸留水で１回ビーズを洗浄した。

[0119] ペプチドバーコードの切断のため、ビーズを２０μＬの５０ｎｇ／ｍＬエンテロキナーゼ（New England Bio-Labs社製）と共に２５℃にて１６時間インキュベートした。上清をMonoSpin Ｃ１８（ジーエルサイエンス株式会社製

）を用いて脱塩し、そして凍結乾燥した。乾燥したペレットを２０μＬの５０ｍＭ　ＴＥＡＢを用いて溶解し、Ultrafree-MC-HV Centrifugal Filters Durapore PVDF　０．４５μｍ（Merck Millipore社製）により濾過し、そしてＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析に供するまで－２０℃で保存した。

[0120]　（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるペプチドバーコードの定量）

エンテロキナーゼにより切り出されたペプチドバーコードを、高速液体クロマトグラフィー（ＬＣ）（Nexera UHPLC/HPLCシステム：株式会社島津製作所製）－トリプル四重極質量分析（ＭＳ／ＭＳ）（ＬＣＭＳ－８０６０：株式会社島津製作所製）により分析した。

[0121]　ペプチドバーコードを含有する５μＬの溶液を、５０ｍｍのInert Sustain Swift™　Ｃ１８カラム（Ｐ．Ｎ．５０２０～８８２２８、内径２．１ｍｍ、粒径１．９μｍ；ジーエルサイエンス株式会社製）に注入してバーコードを分離する。カラムは４０℃に保たれており、そしてこの溶液は引き続き６口の注入／切替弁（Valco Instruments社製）を通してＭＳに注入される。ペプチドバーコードの分析を、６００μＬ／分の流速で３．５分間行った。２つの溶離液の混合比を変えることによってグラジエントを生成した：Ａ、０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸およびＢ、アセトニトリル含有０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸。グラジエントは、５％Ｂ０．５分保持から開始し、次にこれを２分間で５０％Ｂに上げ、次に０．５分間保持し９５％Ｂに上げて、最後にＢ濃度を直ちに５％に調整し、０．５分間保持してカラムを再平衡化した。オートサンプラーを４℃に保ち、黒のドアを装備させた。インターフェース温度、ヒートブロック温度および脱溶媒部（ＤＬ）温度をそれぞれ３００℃、４００℃および２５０℃に設定した。液滴を作製するためのネブライザーガス（N_2）、乾燥用ガス（N_2）、および加熱用ガス（乾燥空気）の流速をそれぞれ２Ｌ／分、１０Ｌ／分および１０Ｌ／分に設定した。

[0122]　ＳＲＭ法の最適化のために、Skylineソフトウェア（Proteomics 2012：12：1134-1141）で作製した各合成ペプチド（バーコード１のＣ末端にＦＬＡＧタグペプチドを融合したペプチドと、バーコード２のＣ末端にＦＬＡＧタグ

ペプチドを融合したペプチド）の全ての遷移を分析した。ペプチド毎に２つの感度の高い遷移を選択し、最も高いピーク強度を持つ衝突エネルギーを採用した（表２）。

[0123] [表2]

バーコード名	ペプチド配列	前駆イオンm/z	前駆イオン電荷	CE	プロダクトイオンm/z	プロダクト電荷	フラグメントイオン
バーコード1	WLFPVGDYKDDDDK（配列番号18）	571.60	3	20.3	300.17	1	b 2
					633.78	2	y 11
バーコード2	FVGARLDYKDDDDK（配列番号19）	552.93	3	19.6	759.41	1	b 7
					705.83	2	y 12

[0124] さらに、これらの遷移について、得られた保持時間に基づいて時間を決定した。イオン化ペプチドバーコードをこの方法によって５分の滞留時間で分析した。

[0125] （結果）

ＳＲＭの感度および定量性を検証するために、合成ペプチド（バーコード１のＣ末端にＦＬＡＧタグペプチドを融合したペプチド（配列番号１８）と、バーコード２のＣ末端にＦＬＡＧタグペプチドを融合したペプチド（配列番号１９））をそれぞれ連続希釈して定量した。

[0126] 図７は、バーコード１（Ａ）およびバーコード２（Ｂ）について種々の量のＬＣ－ＭＳ／ＭＳの分析結果を示すグラフである。図７の各値は、３つの試料の平均±標準偏差を表す。図７ＡおよびＢの結果から、バーコード１およびバーコード２ともに、本実施例で使用したＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析で高感度に検出され、かつ定量されることが分かった。

[0127] ポジティブコントロール実験として、２５０ｆｍｏｌの抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１または２５０ｆｍｏｌの抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２からそれぞれペプチドバーコード（すなわち、バーコード１－ＦＬＡＧ（配列番号１８）およびバーコード２－ＦＬＡＧ（配列番号１９））を切り出し、それらをＬＣ－ＭＳ／ＭＳで定量した。

[0128] 図８は、２５０ｆｍｏｌの抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１および２５０ｆｍｏｌの抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２からそれぞれ切り出されたペプチドバーコードをＬＣ－ＭＳ／ＭＳで定量した結果を示すグラフである。図８の各値は、３つの試料の平均±標準偏差を表す。図８の結果から、バーコード１およびバーコード２ともに、本実施例で使用したＬＣ－ＭＳ／ＭＳで高感度に検出され、かつサンプル調製手順中の損失を最小限に抑えて首尾よく定量されることがわかった。

[0129] 次に、５００μＬのナノボディ混合物（０．１μＭ 抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１および０．１μＭ 抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２を含む）をＣＤ４固定磁気ビーズに加えて一斉結合アッセイを行った後、ビーズ

から切り出されたペプチドバーコードを定量した。

[0130] 図９は、一斉結合アッセイ後、ビーズから切り出されたペプチドバーコードをＬＣ－ＭＳ／ＭＳで定量した結果を示すグラフである。図９の各値は、３つの試料の平均±標準偏差を表す。図９に見られるように、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１に由来するバーコード１のペプチドが検出されたが、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード２に由来するバーコード２のペプチドは検出されなかった。したがって、一斉結合アッセイに供した後にビーズ上に担持されたＣＤ４抗原に結合した抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１由来のペプチドバーコードが、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって特異的に検出されることを見出した。

[0131] （実施例４：種々のペプチドバーコードの結合アッセイに対する影響の検討）

以下の８つのペプチドバーコードを設計した。これらのペプチドバーコードは、疎水性の程度がばらつくように設計した。これにより、液体クロマトグラフの溶出時間を適度にずらすことができる：

バーコード４－１：ＤＩＶＶＬＧＶＥＫ（配列番号２０）

バーコード４－２：ＬＩＨＶＬＤＡＧＲ（配列番号２１）

バーコード４－３：ＬＨＡＩＬＦＧＬＰＲ（配列番号２２）

バーコード４－４：ＬＥＤＬＬＬＤＲ（配列番号２３）

バーコード４－５：ＬＡＥＩＨＧＶＰＲ（配列番号２４）

バーコード４－６：ＦＱＦＬＷＧＰＲ（配列番号２５）

バーコード４－７：ＶＥＬＱＱＥＶＥＫ（配列番号２６）

バーコード４－８：ＮＩＦＥＱＬＨＲ（配列番号２７）

[0132] 上記の各種ペプチドバーコードを付与した抗ＣＤ４ナノボディまたは抗ＧＦＰナノボディを酵母で分泌発現するためのプラスミドを構築した。プラスミドの構築は、抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ－バーコード１、抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ－バーコード１のバーコード部分を上記の各種ペプチドバーコードを発現する遺伝子に変更した以外は、実施例１のプラスミドの構築と同様に行った。本

実施例では、ペプチドバーコードはそのＮ末端にＦＬＡＧタグペプチド（ＤＹＫＤＤＤＤＫ：配列番号３）を融合させたが、Ｃ末端には融合させていない。各バーコード付きナノボディの融合タンパク質をコードするＤＮＡ断片の塩基配列および発現ペプチド配列を配列番号２８～７５に示す：バーコード４－１付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号２８）および発現ペプチド配列（配列番号２８～３０）；バーコード４－２付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号３１）および発現ペプチド配列（配列番号３１～３３）；バーコード４－３付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号３４）および発現ペプチド配列（配列番号３４～３６）；バーコード４－４付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号３７）および発現ペプチド配列（配列番号３７～３９）；バーコード４－５付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号４０）および発現ペプチド配列（配列番号４０～４２）；バーコード４－６付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号４３）および発現ペプチド配列（配列番号４３～４５）；バーコード４－７付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号４６）および発現ペプチド配列（配列番号４６～４８）；バーコード４－８付加抗ＣＤ４：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号４９）および発現ペプチド配列（配列番号４９～５１）；バーコード４－１付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号５２）および発現ペプチド配列（配列番号５２～５４）；バーコード４－２付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号５５）および発現ペプチド配列（配列番号５５～５７）；バーコード４－３付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号５８）および発現ペプチド配列（配列番号５８～６０）；バーコード４－４付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号６１）および発現ペプチド配列（配列番号６１～６３）；バーコード４－５付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号６４）および発現ペプチド配列（配列番号６４～６６）；バーコード４－６付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号６７）および発現ペプチド配列（配列番号６７～６９）；バーコード４－７付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号７０）および

発現ペプチド配列（配列番号７０～７２）；ならびにバーコード４－８付加抗ＧＦＰ：ＤＮＡ断片の塩基配列（配列番号７３）および発現ペプチド配列（配列番号７３～７５）。

[0133] 実施例１と同様にして、各種プラスミドから、ペプチドバーコードが付与されたモノクローナル抗体を得た。得られたモノクローナル抗体を、実施例２と同様にして速度論パラメータにて各抗原に対する結合能を調べた。なお対照として、ペプチドバーコードを付与していないナノボディ（実施例１の「抗ＣＤ４－ＦＬＡＧ」および「抗ＧＦＰ－ＦＬＡＧ」）を用いた。結果を以下の表３（ＣＤ４）および表４（ＧＦＰ）に示す。いずれの場合も、ペプチドバーコードの付与は、ナノボディの抗原に対する結合能に影響しないことがわかった。

[0134] [表3]

バーコード	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
バーコード4－1	1.4×10^{5}	3.0×10^{-3}	2.1×10^{-8}
バーコード4－2	1.0×10^{5}	2.8×10^{-3}	2.8×10^{-8}
バーコード4－3	1.4×10^{5}	3.6×10^{-3}	2.6×10^{-8}
バーコード4－4	1.2×10^{5}	2.9×10^{-3}	2.5×10^{-8}
バーコード4－5	1.8×10^{5}	2.8×10^{-3}	2.4×10^{-8}
バーコード4－6	1.2×10^{5}	3.3×10^{-3}	2.8×10^{-8}
バーコード4－7	1.1×10^{5}	2.8×10^{-3}	2.4×10^{-8}
バーコード4－8	1.6×10^{5}	2.9×10^{-3}	1.9×10^{-8}
なし	1.4×10^{4}	3.7×10^{-3}	2.6×10^{-8}

[0135]

[表4]

バーコード	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
バーコード4－1	6.6×10^{5}	3.0×10^{-4}	4.5×10^{-10}
バーコード4－2	5.6×10^{5}	3.0×10^{-4}	5.3×10^{-10}
バーコード4－3	7.1×10^{5}	2.1×10^{-4}	4.3×10^{-10}
バーコード4－4	6.4×10^{5}	3.0×10^{-4}	4.7×10^{-10}
バーコード4－5	5.8×10^{5}	3.0×10^{-4}	5.1×10^{-10}
バーコード4－6	データ示さず		
バーコード4－7	データ示さず		
バーコード4－8	6.0×10^{5}	3.0×10^{-4}	5.0×10^{-10}
なし	5.5×10^{5}	2.6×10^{-4}	4.6×10^{-10}

[0136] （実施例５：ロングモノリスカラムを用いた質量分析器検出力の向上）

ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるペプチドの検出力の向上のため、ロングモノリスカラムをさらに改良した。検出力の評価のため、実施例３と同様のＬＣ－ＭＳ／ＭＳ装置を用いて、そのピークキャパシティ（peak capacity）を測定した。ピークキャパシティが高くなるほど分離性能が高いことを示す。

[0137] 例えば、図１０は、ペプチドバーコード１（配列番号１８）のＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定において１００μｍ内径および７５μｍ内径のそれぞれのモノリスカラムを用いた場合のピークキャパシティを示すグラフである（いずれも５００ｍｍ長）。内径を１００μｍ内径から７５μｍ内径へと変化させることにより、ピークキャパシティが高くなった（図１０）。

[0138] さらに、カラムを長くすることでも、ピークキャパシティが高くなった。例えば、図１１は、ペプチドバーコード１（配列番号１８）のＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定において５００ｍｍ長および１０００ｍｍ長のそれぞれのモノリスカラムを用いた場合のピークキャパシティを示すグラフである（いずれも内径７５μｍ）。５００ｍｍの長さのカラムを１０００ｍｍに長くすることで、ピークキャパシティの向上が確認された（図１１）。モノリスカラムをさらに長くすることで、さらなる性能の向上が見込まれる。

[0139] ７５μｍ内径の１０００ｍｍモノリスカラムを使うことで、液体クロマトグラフィーによるペプチドの分離性能が高くなり、質量分析によるペプチド

の検出感度を大きく向上させることができた。

[0140] ７５μｍ内径の１０００ｍｍモノリスカラムを用いて、例えば、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）のトリプシン消化物をＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定で分析したところ、２倍以上の感度向上を確認した。

[0141] [表5]

ペプチド配列	100 μmと比較したピーク面積の比率	
	100 μm	75 μm
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK（配列番号７６）	1 ± 0.22	5.35 ± 0.18**
LVNELTEFAK（配列番号７７）	1 ± 0.02	1.59 ± 0.16**
SLHTLFGDELCK（配列番号７８）	1 ± 0.05	2.01 ± 0.13**
LKPDPNTLCDEFK（配列番号７９）	1 ± 0.04	2.49 ± 0.06**
ECCHGDLLECADDR（配列番号８０）	1 ± 0.11	2.12 ± 0.38*
DAFLGSFLYEYSR（配列番号８１）	1 ± 0.07	1.86 ± 0.09**
DDPHACYSTVFDK（配列番号８２）	1 ± 0.11	1.47 ± 0.10*
LGEYGFQNALIVR（配列番号８３）	1 ± 0.07	2.74 ± 0.65*
RPCFSALTPDETYVPK（配列番号８４）	1 ± 0.05	2.70 ± 0.07**
LFTFHADICTLPDTEK（配列番号８５）	1 ± 0.05	2.12 ± 0.61
Geometric mean	1	2.28

（数値は、平均値とその標準偏差を示す。下線のCは、カルバミドメチル化されたシステインを示す。）

産業上の利用可能性

[0142] 本発明は、例えば、実験用試薬、診断薬、および医薬品の製造に有用である。

請求の範囲

[請求項1] モノクローナル抗体を製造する方法であって、

分泌シグナルをコードする遺伝子、ナノボディをコードする遺伝子およびペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片または該ＤＮＡ断片を含むベクターを、酵母の細胞に導入する工程、および

該細胞で発現されかつ該細胞の外に分泌された、該ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを回収する工程

を含む、製造方法。

[請求項2] 前記酵母が、サッカロマイセス属、ピチア属、シゾサッカロマイセス属、ジゴサッカロマイセス属、カンジダ属、トルロプシス属、ヤロウイア属またはハンセヌラ属に属する酵母である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] 前記分泌シグナルが、α因子分泌シグナル、グルコアミラーゼ分泌シグナルまたはＰＨＯ１分泌シグナルである、請求項１または２に記載の製造方法。

[請求項4] 前記ＤＮＡ断片が、ＡＯＸ１プロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＦＬＤ１プロモーター、ＰＥＸ８プロモーターまたはＹＰＴ１プロモーターであるプロモーターをさらに含む、請求項１から３のいずれかに記載の製造方法。

[請求項5] 前記ＤＮＡ断片が、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、カルモジュリンプロテイン（ＣＢＰ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓｔｒｅｐ ＩＩタグ、ＧＳＴタグ、Ｍｙｃタグ、マルトース結合プロテイン（ＭＢＰ）タグからなる群から選択される少なくとも１つのタグをコードする遺伝子をさらに含む、請求項１から４のいずれかに記載の製造方法。

[請求項6] 前記ペプチドバーコードが、６～１６個のアミノ酸からなるアミノ酸配列により表され、かつ該アミノ酸が独立してＡ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、ＶおよびＷからなる群から選択される、請求項１から５の

いずれかに記載の製造方法。

[請求項7] 前記回収されたポリペプチドを抗原と合わせ、該抗原と特異的に結合するナノボディを含むポリペプチドを取得する工程、

該取得されたポリペプチドから前記ペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する工程、および

該同定されたペプチドバーコードをコードする核酸の塩基配列に基づいて、該同定されたペプチドバーコードが切り出されたポリペプチドに含まれていたナノボディを同定する工程

をさらに含む、請求項１から６のいずれかに記載の製造方法。

[請求項8] 前記ＤＮＡ断片が、特異的プロテアーゼにより切断される部位をさらに含む、請求項１から７のいずれかに記載の製造方法。

[請求項9] 前記ペプチドバーコードを同定する工程が、高速液体クロマトグラフ（ＬＣ）に接続したタンデム質量分析計（ＭＳ／ＭＳ）を用いたピークの検出により行われる、請求項７または８に記載の製造方法。

[請求項10] 前記高速液体クロマトグラフがモノリスロング型カラムを備える、請求項９に記載の製造方法。

[請求項11] 前記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程をさらに含む、請求項１から１０のいずれかに記載の製造方法。

[請求項12] 前記酵母の細胞に導入する工程において、少なくとも２個の前記ＤＮＡ断片またはベクターが用いられ、各ＤＮＡ断片中のペプチドバーコードをコードする遺伝子が、それぞれ異なるアミノ酸配列で表されるペプチドバーコードをコードする、請求項１から１１のいずれかに記載の製造方法。

[請求項13] 前記ＤＮＡ断片が、２個以上のペプチドバーコードをコードする遺伝子を含み、該２個以上のペプチドバーコードの間に切断部位が配置されている、請求項１から１２のいずれかに記載の製造方法。

[請求項14] モノクローナル抗体を酵母で製造するためのベクターであって、該

ベクターが、分泌シグナルをコードする遺伝子、ナノボディをコードする遺伝子およびペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片を含有し、かつ該酵母の細胞に導入されて該ナノボディおよび該ペプチドバーコードを含むポリペプチドを該酵母の細胞の外に分泌させるように発現させる、ベクター。

[請求項15] 前記分泌シグナルが、α因子分泌シグナル、グルコアミラーゼ分泌シグナルまたはＰＨＯ１分泌シグナルである、請求項１４に記載のベクター。

[請求項16] 前記ＤＮＡ断片が、ＡＯＸ１プロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＦＬＤ１プロモーター、ＰＥＸ８プロモーターまたはＹＰＴ１プロモーターであるプロモーターをさらに含む、請求項１４または１５に記載のベクター。

[請求項17] 前記ＤＮＡ断片が、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓタグ、カルモジュリンプロテイン（ＣＢＰ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓｔｒｅｐ ＩＩタグ、ＧＳＴタグ、Ｍｙｃタグ、マルトース結合プロテイン（ＭＢＰ）タグからなる群から選択される少なくとも１つのタグをコードする遺伝子をさらに含有する、請求項１４から１６のいずれかに記載のベクター。

[請求項18] 前記ペプチドバーコードが、６～１６個のアミノ酸からなるアミノ酸配列により表されかつ該アミノ酸が独立してＡ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｌ、Ｐ、Ｒ、ＶおよびＷからなる群から選択される、請求項１４から１７のいずれかに記載のベクター。

[請求項19] 前記ＤＮＡ断片が、特異的プロテアーゼにより切断される部位をさらに含む、請求項１４から１８のいずれかに記載のベクター。

[請求項20] モノクローナル抗体をスクリーニングする方法であって、

（ｉ）遺伝子ライブラリから抗体ライブラリを発現する工程であって、

該遺伝子ライブラリが少なくとも２個の遺伝子メンバーを含み、各遺伝子メンバーが、ナノボディをコードする遺伝子および少なくと

も１個のペプチドバーコードをコードする遺伝子を含むＤＮＡ断片を含み、

該遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーの該ＤＮＡ断片が、該抗体ライブラリの各抗体メンバーのポリペプチドをコードし、

該抗体ライブラリの各抗体メンバーの該ポリペプチドが、ナノボディおよび少なくとも１個のペプチドバーコードを含み、該ナノボディおよび該少なくとも１個のペプチドバーコードが、該遺伝子ライブラリの各遺伝子メンバーに含まれるＤＮＡ断片によりコードされ、

該抗体メンバーの各ペプチドバーコードが、それぞれ異なるアミノ酸配列で表される、

工程；

（ii）該抗体ライブラリを抗原と合わせ、該抗体ライブラリから、該抗原に結合したナノボディを含む該抗体ライブラリの抗体メンバーを選択する工程；

（iii）選択した該抗体ライブラリの抗体メンバーに含まれるペプチドバーコードを切り出し、該切り出されたペプチドバーコードを質量分析にて同定する工程；および

（iv）該同定されたペプチドバーコードをコードする遺伝子の塩基配列を該遺伝子ライブラリの塩基配列に基づいて決定し、該同定されたペプチドバーコードが切り出された抗体メンバーのナノボディを同定する工程

を含み、

該発現工程が、請求項１４から１９のいずれかに記載のベクターを酵母の細胞に導入することにより行われる、

方法。

[請求項21] 前記ＤＮＡ断片の塩基配列を決定する工程をさらに含む、請求項２０に記載の方法。