

明 細 書

発明の名称：

ランダム領域搭載用フレームワーク配列を有するペプチド及びそのペプチドで構成されるペプチドライブラリ

技術分野

[0001] 本発明は、ランダム領域搭載用フレームワーク配列を有するペプチド及びそのペプチドで構成されるペプチドライブラリに関する。

背景技術

[0002] 従来、生体には、自己と非自己とを認識する生体防御機構があること、そして、この生体防御機構には、細胞性免疫と液性免疫とが関わっていることが知られている。上記のうち、液性免疫では、B細胞が産生する抗体が、体内に侵入してきた異物を認識し、その異物上の表面に存在する抗原（標的）に特異的に結合する。そして、その異物を生体内から除去する。

[0003] 上記抗体は、「免疫グロブリン」（以下、「Ig」ということがある。）と呼ばれるタンパク質であり、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMに分けられている。これらのうち、IgGは産生量の多さから一般的な抗体と言われ、多くの哺乳類では重鎖と軽鎖とから構成されている。しかい、ラクダ、アルパカその他のラクダ科の動物又はサメその他の軟骨魚では重鎖のみで構成されている。こうした重鎖のみの単ドメインで構成される抗体は重鎖抗体と呼ばれ、可変領域のみで抗原と結合できることから、シングルドメイン抗体、ナノボディ（登録商標）、またはVHHとも呼ばれている。

[0004] 上記VHHは、それぞれのアミノ酸配列が厳密に定義されており、IgG等の従来型の抗体と同様に、免疫沈降法などの生化学的解析用ツールとして、または免疫組織化学で使用するツールとして利用することができる。

[0005] 上記VHHは上記の従来型の抗体とは抗原との結合部位が異なることが知られている。具体的には、従来型の抗体は抗原の凸部のエピトープに結合するが、上記VHHは抗原の隙間又は割れ目等を形成しているエピトープに結合するこ

とが知られている（先行技術文献1～3参照。）。

このため、従来型の抗体では開発が困難な治療薬を開発する上では、上記ラクダ科動物から得られるVHHの結合特性を有する候補タンパク質の探索が必要である。

[0006] 上記のような探索は、ペプチドライブラリを、ファージディスプレイ法等のディスプレイ法等を用いてスクリーニングすることが一般的である（先行技術文献1参照）。ここで、ペプチドライブラリとは、「アミノ酸の系統的な組み合わせを有するペプチドの大きなコレクション」と定義することができる。上記ペプチドは、種々の動物等から得られたナীবペプチド、それかを改変した半合成ペプチド、及び化学合成によって得られた合成ペプチドを含む。

[0007] そして、上記合成ペプチドライブラリをスクリーニングすることによって、エピトープペプチドマッピング、ワクチン開発用のペプチドライブラリの作製などをおこなうことができることが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2003/025020号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Marc Lauwereys, et al., EMBO J 17, (13): 3512, 1998

非特許文献2：M. Arbabi Ghahroudi, et al., FEBS Letters 414(1997): 521-526

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 探索によって多様な候補ペプチドを得るためには、ダイバーシティの大きなペプチドライブラリが必要である。そして、従来技術1（mRNAディスプレイ法）は、ライブラリサイズという点では優れた技術である。しかし、mRNAディスプレイ法では、mRNAは水溶液中ではRNase分解されやすいため、目的の

ペプチドが安定して得られないという問題があった。

- [0011] 従来技術 2（ファージディスプレイ法）は、ディスプレイの安定性という点では優れた技術である。しかし、ファージにディスプレイさせたペプチドを大量に取得するためには、上記ディスプレイされたペプチドをコードする DNA を発現するコンストラクトを作製し、これを最終的には大腸菌その他の菌に導入して発現させる必要があり、細胞を用いた翻訳システムを必要とする。

このため、扱うことができるライブラリサイズが小さく、また、そのペプチドの発現が、宿主にとって有害又は致死である場合には、ディスプレイ出来ないという問題点があった。

- [0012] また、タンパク質又はペプチドの三次構造は、二次構造からある程度の予測はできるものの、標的ペプチドとの結合様式を予測し、そうした構造が結合部位となるように設計をし、その通りに発現させることができないという問題点があった。

- [0013] このため、所望の長さの CDR を搭載することができる配列を有するフレームワークに対する強い社会的要請があった。特に、ラクダ科動物から得られた VHH 等のシングルドメイン抗体の効率の良いスクリーニングに供することができ、このスクリーニングで設計通りの構造的特性を有するペプチドを得ることができるようなフレームワーク配列に対する強い社会的要請があった。

さらに、上記のようなフレームワークを有するペプチドで構成されるペプチドライブラリについての強い社会的要請があった。

課題を解決するための手段

- [0014] こうした状況の下で、本発明の発明者らは、鋭意研究を重ねて本願発明を完成したものである。

すなわち、本発明の第 1 の態様は、3 つの相補性決定領域と 4 つのフレームワーク領域（以下、「FR」と略することがある。）とで構成され、配列番号 1 で表される配列をフレームワーク 1（以下、「FR1」という。）として含むペプチドである。

[0015] [配列番号 1] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

[0016] 前記FRは、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列をフレームワーク 2（以下、「FR2」という。）として含むことが好ましい。ここで、配列番号 2 中のXは任意のアミノ酸を表し、チロシン、バリン、フェニルアラニン、ロイシン、アルギニン、グリシン及びトリプトファンからなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸であることが三次構造の安定性の点から好ましい。

[配列番号 2] WXRQAPGKGXEXVA

[0017] また、前記FR2は、配列番号 3～6 で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるいずれかの配列であることが三次構造の安定性の点からより好ましい。

[0018] [配列番号 3] WYRQAPGKGLEWVA

[配列番号 4] WVRQAPGKGLEWVA

[配列番号 5] WFRQAPGKGREFVA

[配列番号 6] WFRQAPGKGREGVA

[0019] 前記FRは、配列番号 7 で表されるアミノ酸配列をフレームワーク 3（以下、「FR3」という。）として含むことが好ましい。ここで、配列番号 7 中のXは任意のアミノ酸を表し、ロイシン、バリン、アラニン（A）、アルギニン（R）、及びリジン（K）からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸であることが好ましい。

[0020] [配列番号 7] RFTISRDN SKNTXYLQMNSLRAEDTAVYYCX

[0021] 前記フレームワーク配列 3（以下、「FR3」という。）は、下記の配列番号 8～31 で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるいずれかの配列であることが好ましい。

[0022] [配列番号 8] RFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA

[配列番号 9] RFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNV

[配列番号 10] RFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNR

[配列番号 11] RFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNL

[配列番号 12] RFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNA

[配列番号 1 3]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCNV
[配列番号 1 4]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCNR
[配列番号 1 5]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCNL
[配列番号 1 6]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAV
[配列番号 1 7]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAR
[配列番号 1 8]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAL
[配列番号 1 9]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAV
[配列番号 2 0]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR
[配列番号 2 1]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAL
[配列番号 2 2]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCKA
[配列番号 2 3]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCKV
[配列番号 2 4]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCKR
[配列番号 2 5]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCKL
[配列番号 2 6]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCKA
[配列番号 2 7]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCKV
[配列番号 2 8]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCKR
[配列番号 2 9]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCKL
[配列番号 3 0]	RFTISRDNAKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAA
[配列番号 3 1]	RFTISRDNAKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAA

[0023] 前記FRは、下記の配列表の配列番号 3 2 で表されるアミノ酸配列をフレームワーク 4（以下、「FR4」という。）として含むことが好ましい。

[0024] [配列番号 3 2] WGQGTLVTVSS

[0025] 上記FR 1～4 は、それぞれ22～26アミノ酸、12～16アミノ酸、29～33アミノ酸、及び9～13アミノ酸で構成されていることが好ましい。また、上記FR 1～4 は、それぞれ、25アミノ酸、14アミノ酸、32アミノ酸、及び11アミノ酸で構成されていることがさらに好ましい。

[0026] 前記ペプチドは、8～12アミノ酸で構成される相補性決定領域 1（以下、「CDR1」という。）と、14～18アミノ酸で構成される相補性決定領域 2（以

下、「CDR2」という。)と、6、12及び15アミノ酸からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸配列で構成される相補性決定領域3 (CDR3)とを含むことが好ましい。前記ペプチドは、10アミノ酸で構成されるCDR1と、16又は17アミノ酸で構成されるCDR2と、6、12又は15アミノ酸で構成されるCDR3とを含むものであることがさらに好ましい。

[0027] 本発明の第2の態様は、上記のペプチドで構成されるペプチドライブラリである。好ましいペプチドライブラリは、ペプチドライブラリを構成するペプチドが、3つの相補性決定領域と4つのフレームワーク領域とで構成され、

フレームワーク1が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク2が、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク3が、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク4が、配列番号32で示されるアミノ酸配列を含み、
相補性決定領域1が、10アミノ酸で構成されるアミノ酸配列であり、
相補性決定領域2が、16又は17アミノ酸で構成されるアミノ酸配列であり、

相補性決定領域3が、6、12、又は15アミノ酸で構成されるアミノ酸配列である、
ペプチドライブラリである。

[0028] 特に好ましいペプチドライブラリは、
ペプチドライブラリを構成するペプチドが、3つの相補性決定領域と4つのフレームワーク領域とで構成され、

フレームワーク1が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク2が、配列番号3～6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク3が、配列番号8～31のいずれかに示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク4が、配列番号32に示されるアミノ酸配列を含み、

相補性決定領域 1 が、10 アミノ酸で構成されるアミノ酸配列であり、
相補性決定領域 2 が、16 又は 17 アミノ酸で構成されるアミノ酸配列であり、

相補性決定領域 3 が、6、12、又は 15 アミノ酸で構成されるアミノ酸配列である、

ペプチドライブラリである。

また、上記ペプチドライブラリのライブラリサイズは、約 10^{12} ～約 10^{14} であることが好ましい。上記ライブラリは、上述した重鎖抗体に由来するシングルドメイン抗体、またはそれらが相互に結合された多価体であることが好ましい。

[0029] また、前記多価体は、リンカーを介して相互に結合された 2 量体～5 量体からなる群から選ばれるいずれかのものであることが好ましい。

発明の効果

[0030] 本発明によれば、所望の長さの CDR を搭載することができる配列を有するフレームワーク配列、及びこれを含むペプチドを得ることができる。さらに、シングルドメイン抗体の効率の良いスクリーニングに供することができるとともに、設計通りの構造的特性を有するペプチドを得ることができるようなフレームワーク配列を得ることができる。さらに、上記のようなペプチドで構成されるペプチドライブラリを構築することができる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1] 図 1 は、ペプチドの CDR3 領域の構造に基づいて、これらを 3 つのグループに分類したことを示す模式図である。図 1(A) はアップライト型、同(B) はハーフロール型、同(C) はロール型をそれぞれ示す。図中、L1～L3 は、各分子中における CDR3 領域を示す。

[図2] 図 2 は、図 1 のグループ分けの基準とした、上記ペプチドの C α 原子間の距離（以下、「C α 距離」ということがある。）及び C α 原子間の疑似的二面角度（以下、「二面角」ということがある。）を示す模式図である。

[図3] 図 3 は、VHH の C α 距離と二面角とをプロットした図である。図 3(A) は、

VHHをUpright型、Half-roll型、Roll型に分類してC α 距離及び二面角の分布を示した図である。図3(B)は、VHHとヒトVHとのC α 距離及び二面角を上記と同様に示した図である。

[図4]図4は、上記図1に示したアップライト型とロール型とのアミノ酸配列を比較した図である。

[図5]図5は、VHHとヒトVHのCDR3の長さの分布を、上述したVHHの型別に示したグラフである。

[図6]図6は、VHHサブライブラリー（アップライト型又はロール型）のフレームワーク領域のデザインを示す図である。各アミノ酸配列の下段に示されているアルファベットは、変異したアミノ酸とその位置とを示す。

[図7]図7は、全長VHHのDNA配列作成手順を示した図である。

[図8]図8は、「The Month」プラットフォームを使用した際のスクリーニングの流れを模式的に示した図である。

[図9]図9は、スクリーニングで得られた抗GPC3-VHHの特性を示す図である。

[図10]図10は、スクリーニングで得られたVHHの特性を示す図である。図10(A)は、得られたVHHの熱安定性と解離定数との関係をプロットしたグラフである。図10(C)は、実際に解離定数を計測した際の結果を示す。図10(B)は、変性中点温度(T_m値)と凝集開始温度(T_{agg}値)との関係を示したグラフである。

[図11]図11は、細胞表面に発現した標的タンパク質へのVHHの結合能を評価した、フローサイトメトリーの解析結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0032] 以下に本発明を、必要に応じて、添付の図面を参照して説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書では、単数形の表現は、特に言及しない限り、複数の場

合をも含み得る。

[0033] 本発明で用いられる配列は、下記表 1 に示すとおりである。

本発明は上述した通り、(a) 3つのCDRと4つのFRとで構成され、(b) 下記に説明する特定の配列をFR1、FR2、FR3及びFR4として含むペプチドである。

[0034] (1) 上記FR1～FR4を構成するペプチド

上記FR1～FR4を構成するペプチドは、以下のようにして設計し、作成することができる。まず、ヒトフレームワーク配列IGHV3-23*01 DP-47のアミノ酸配列 (FR1～4を、配列番号34～37として表1に示す。) を、抗原性とVHHとの相同性の理由から、本発明のフレームワーク配列の設計に使用する基本的な配列として選択する。そして、最終的に形成されるペプチドの形状を勘案しつつ、設計を変更するFRを決定する。

[0035] ここで、上記FR1～4は、それぞれ22～26アミノ酸、12～16アミノ酸、29～33アミノ酸、及び9～13アミノ酸で構成されていることが、三次構造の安定性の点から好ましい。また、上記FR1～4は、それぞれ、24アミノ酸、14アミノ酸、32アミノ酸、及び11アミノ酸で構成されていることが、三次構造の安定性の理由からさらに好ましい。

[0036] 例えば、ペプチドの立体構造の安定性を維持する上で、そのN末端領域の配列及びC末端領域の配列を固定しておいた方が良いと考えられる場合には、FR1及びFR4の配列は変更しないこととし、FR2及びFR3の配列に変更を加えるようにしてもよい。その場合、CDR3の立体構造の観点から、上述したように、FR2及びFR3の所望の部位のアミノ酸を別のアミノ酸に置換することができる。

[0037] ここで、FR2の配列については、CDR2の三次元構造の安定性の点から、ヒトフレームワーク配列IGHV3-23*01 DP-47のFR2のC末端のアミノ酸をセリン (S) からアラニン (A) に変更することができる。また、他の位置にあるアミノ酸を別のアミノ酸に置換することもできる。例えば、N末端から2番目、10番目又は12番目のアミノ酸を、チロシン (Y)、バリン (V)、フェニルアラニン (F)、ロイシン (L)、アルギニン (R)、グリシン (G) 及びトリプト

ファン（W）からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸に置換してもよい。

[0038] この場合、上記の部位に置換されるアミノ酸を含むFR2は、下記配列番号2で表されるアミノ酸配列として示することができる。

[配列番号2] WXRQAPGKGXEXVA

ここで、N末端から2番目のX（以下、「X2」のように表す。）はチロシン、バリン（V）及びフェニルアラニン（F）、同10番目のX（X10）はアルギニン（R）又はロイシン（L）、N末端から12番目のX（X12）は、トリプトファン（W）、フェニルアラニン（F）及びグリシン（G）からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸としてもよい。

例えば、上記FR2は、配列番号3～6からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸配列で表される配列を有するものであることが好ましい。このような置換を行うことにより、ペプチドの立体構造をある程度制御することができるからである。

[0039]

[表1]

配列	配列番号	領域
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	1	FR1
WXRQAPGKGXEXVA	2	FR2
WYRQAPGKGLEWVA	3	FR2 (Upright型)
WVRQAPGKGLEWVA	4	FR2 (Upright型)
WFRQAPGKGREFVA	5	FR2 (Roll型)
WFRQAPGKGREGVA	6	FR2 (Roll型)
RFTISRDNAKNTXYLQMNSLRAEDTAVYYCXX	7	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA	8	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNV	9	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNR	1 0	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNL	1 1	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNA	1 2	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNV	1 3	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNR	1 4	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNL	1 5	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAV	1 6	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	1 7	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAL	1 8	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAV	1 9	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	2 0	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAL	2 1	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKA	2 2	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKV	2 3	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKR	2 4	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKL	2 5	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCKA	2 6	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCKV	2 7	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCKR	2 8	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCKL	2 9	FR3 (Upright型)
RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA	3 0	FR3(Roll/Upright型)
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA	3 1	FR3(Roll/Upright型)
WGQGTLVTVSS	3 2	FR4
XXXXXXXXXX	—	CDR1
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	—	CDR2 (Upright型)
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	—	CDR2 (Roll型)
XXXXXX	—	CDR3 (Upright型)
XXXXXXXXXXXXXX	—	CDR3 (Roll/Upright型)
XXXXXXXXXXXXXXXXXX	—	CDR3 (Roll型)
AANAATTTCCANGCCGCCCGG	3 3	cnvK rCリンカーの主鎖
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	3 4	DP-47のFR1
WVRQAPGKGLEWVS	3 5	DP-47のFR2
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	3 6	DP-47のFR3
WGQGTLVTVSS	3 7	DP-47のFR4

[0040] ここで、FR3の配列については、VHHのCDR3領域の構造の決定に関与し、また抗原との結合にも関与しうる領域でもあるという理由から、ヒトフレームワーク配列IGHV3-23*01 DP-47のFR3のC末端のアミノ酸を、アラニン（A）、バリン（V）、アルギニン（R）及びロイシン（L）に変更することができる。また、他の位置にあるアミノ酸を別のアミノ酸に置換することもできる。例えば、N末端から13番目、31番目または32番目のアミノ酸を、ロイシン（L）、バリン（V）、アラニン（A）、アスパラギン（N）、リシン（K）、及びアルギニン（R）からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸に置換してもよい。

[0041] この場合、上記の部位に置換されるアミノ酸を含むFR3は、配列番号7で表されるアミノ酸配列として示すことができる。ここで、X13はバリン（V）及びロイシン（L）、X31はアラニン（A）、アスパラギン（N）又はリシン（K）、X32はアラニン（A）、バリン（V）、アルギニン（R）及びロイシン（L）からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸としてもよい。

例えば、上記FR3は、配列番号8～31からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸配列で表される配列を有するものであることが好ましい。このような置換を行うことにより、ペプチドの立体構造をある程度制御することができるからである。

[0042] FR1～FR4は、固相合成法その他の常法に従って化学合成してもよく、企業に合成を委託してもよい。

[0043] （2）相補性決定領域1～相補性決定領域3（CDR1～CDR3）を構成するペプチド

（2-1）CDR1～3の長さ

上述したように、前記ペプチドは3つの相補性決定領域（以下、「CDR」と略す。）を有するが、相補性決定領域1（以下、「CDR1」という。）が8～12アミノ酸で構成され、相補性決定領域2（以下、「CDR2」という。）が14～18アミノ酸で構成され、相補性決定領域3（CDR3）が6、12及び15アミノ酸で構成されるようにしてもよい。CDR1が10アミノ酸で構成され、CDR2が16ア

ミノ酸及び17アミノ酸で構成され、CDR3が6、12又は15アミノ酸で構成されることが、後述する特性を有するペプチドを得られることから好ましい。

[0044] VHHは軽鎖を持たないため、FR2が抗原結合部位の形成に大きく関与する。CDR3は、特徴的なループ構造L1～L3によって3種類に大別される（図1(A)～(C)）。このループ構造L1～L3は、CDR3に含まれるアミノ酸の数に依存して変化し、CDR2のアミノ酸残基数にも影響を与える。軽鎖及び重鎖で構成される従来の抗体の場合、FR2は軽鎖と接するが、VHHではその部位が露出している。前述した通り、VHHは軽鎖のみで構成されているからである。

[0045] (2-2) CDR1～3の構造と分類

CDR3の3種類の構造は、FR2中に含まれる特定の位置にあるアミノ酸残基とCDR3中に含まれる特定の位置にあるアミノ酸残基のC α 原子同士の距離と、CDR3の末端の位置にあるアミノ酸残基のC α 原子から構成される疑似的な二平面がなす角度と、ループ自体の構造という3つの要素によって、以下のように分類される（図1(A)～(B)及び図2(A)～(B)）。以下にこの分類の基準を説明する。

第1に、C α は官能基と隣接した1番目の炭素をいう。そして、本明細書中では、2つの α 炭素同士の距離をC α 距離という。例えば、上記ペプチドに含まれるCDR3のC末端にあるアミノ酸を「n」としたときに、n-5番目の位置にあるアミノ酸残基のC α (n-5)とこのペプチドのN末端から46番目に位置するアミノ酸残基中のC α (46)との距離がC α 距離となる。

[0046] 第2に、疑似的な二平面の角度（以下、「二面角」という。）は以下のように定義される（図2(B)）。図1(E)は、上記ペプチドをX-Y平面から見たときの図である。ここで、第1の平面は、例えば、このペプチドのN末端から102番目のアミノ酸残基をnとしたときに（H102(n)）、H102(n)に含まれるペプチド結合と、その下流側に隣接するアミノ酸残基（H103(n+1)）に含まれるペプチド結合とが含まれる平面をいう。また、第2の平面は、同様に、H101の含まれるアミノ酸残基（H101(n-1)）に含まれるペプチド結合とその下流側に隣接するアミノ酸残基（H100(n-2)）に含まれるペプチド結合とを含

む平面をいう。上記第1の平面と第2の平面とがなす角を「二面角」という。

[0047] 第3に、CDR3自体の形状は、例えば、図1(A)のL1のように、Y方向に伸びた状態にあるもの、同図1(C)のL3ように丸まった状態にあるもの、同図1(B)のL2のようにその中間の状態にあるものというように、3つに分けることができる。なお、CDR3の長さが6アミノ酸未満のものは上記基準での分類が困難である、その構造の見掛けから、便宜的にアップライトに分類してもよい。

[0048] (2-3) CDR1~3の構造分類に基づくペプチドの分類

図1(A)に示すアップライトは、上記C α 距離が15Åより長く、上記二面角が140度より大きく、CDR3の構造が伸びた状態にあるものと定義される。次に、図1(C)に示すロールは、C α 距離が10Åより短く、上記二面角が140度より小さく、CDR3の構造が丸まった状態のものと定義される。次いで、図1(B)に示すハーフロールは、上記アップライトと上記ロールとの中間の構造のものと定義される。

表1に示すアップライト型又はロール型のFR2、FR3、CDR2及びCDR3を組み合わせることによって、アップライト型、ロール型又はハーフロール型のうち所望の構造を有するVHHを作成することが可能である。

なお、VHHと同様な方法で、ヒトVHについても構造を分類することができる。

[0049] 述した抗原結合部位、アミノ酸残基数及びCDR3の構造の解析に基づいて、上記のペプチドのサブライブラリを構築することができる。ここで、サブライブラリとは、元となるDNAライブラリから、研究等の目的に応じて、特定の条件の下でクローンを選別して作成したライブラリをいう。

[0050] (2-4) CDR1~3を構成するペプチドの作製方法

(2-4-1) ソース

CDR1~3を構成するペプチドは、標的ペプチドを選択することにより作製することができる。例えば、VHH及びヒトVHの構造データをタンパク質データベース(PDB)のSAbDabデータベース(<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps>)

/newsabdab/sabdab/) 等から、VHHの情報を入手することができる。入手した種々のVHHの情報から、幾つかの選定基準を定めて、それらの基準に従ってVH Hを選択することができる。VHH及びヒトVHの選択基準としては、例えば、下記表2に示すものを挙げることができる。

[0051] [表2]

No.	VHHの選択基準	ヒトVHの選択基準
1	重鎖のChain IDを有し、軽鎖のChain IDを有しないこと	重鎖及び軽鎖双方のChain IDを持つこと
2	2.8Åより高解像度のX線結晶解析で決定された3次構造であること	同左
3	—	重鎖及び軽鎖がホモサピエンスのものであること
4	ハプテン抗原との複合体ではないこと	同左

[0052] 以上の基準で選択したVHHのCDRを、例えば、Kabat法その他の従来法で決定する。こうした決定は市販のツールを用いて自動的に行うこともでき、こうしたツールとしては、ANARCIツール (<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab/sabpred/anarci/>) 等を挙げるすることができる。

[0053] 得られたアミノ酸残基の情報は、可変領域及びCDRを定義するために使用することができる。可変領域（ドメイン）データ間の類似度にもとづいて、データをグループ分けするクラスタリングを行う。こうしたクラスタリングは、CD-HIT (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/>) その他のクラスタリングを行うプログラムを用いて行うことができる。クラスタリング中に、完全一致を表す類似度（%id）が100%となるCDRを除去すると、得られたクラスターから冗長性を排除することができる。本明細書においては、以上のような冗長性を排除する操作を「キュレーション」という。

[0054] 以上のようなキュレーションの結果得られたVHH及びヒトVHの中から、抗原結合部位として十分な長さのアミノ酸配列を含むものを選択することができる。Kabat法で決定された領域、例えば、CDR1よりも上記の結果得られた配列の長さが長い場合には、Chothia法で調製された所望の領域、例えば、CDR1の配列と組み合わせたものを、例えば、CDR1として使用しても良い。

[0055] (2-4-2) CDR1及びCDR2のデザイン

CDR1及びCDR2は、アミノ酸部位特異的なランダム化ではなく、それぞれ重複しない配列セットを合成して混合する手法を用いた。自然界の抗体配列のgermlineの進化に沿ったものとするためである。

[0056] 以下の手順でCDR1及びCDR2のアミノ酸配列をデザインすることができる。

まず、ラクダ科動物、例えば、アルパカのナイーブ・シャッフリング・ライブラリの次世代シーケンサーで得られたデータ（以下、「NGS data」と略すところがある。）、一定以上に濃縮した配列を使用することが好ましい。濃縮比率は特に限定されないが、例えば、約0.001%以上とすることが、データの信頼性の理由から好ましい。

次いで、上記NGS dataを濃縮して得られた配列（以下、「濃縮配列」という。）からCDR1とCDR2のアミノ酸配列候補を選択する指標としては、それらのBM位置のアミノ酸配列を使用する。構造安定が高いアルパカVHHのCDR1とCDR2とを抽出するためである。

[0057] 引き続き、BM位置のアミノ酸配列が一致するアミノ酸配列を、例えば、PDBデータのVHH配列から選択し、CDR1及びCDR2のアミノ酸配列候補とすることが、三次構造安定性の理由から好ましい。

上記のようにして選択したCDR1及びCDR2のアミノ酸配列の候補と、アルパカのgermlineのアミノ酸配列と比較し、例えば、CDR1の配列についてはミスマッチを2つまで、CDR2の配列についてはミスマッチを3つまで許容する、というように基準を定めて、配列候補を絞り込むことができる。これらを用いて、CDR1及びCDR2のセットを準備することができる。

[0058] (2-4-3) CDR3の配列のデザイン

CDR3の配列は、例えば、CDR3ループ長の分布、CDR3長と構造分類との相関等に基づいて、所望の長さのライブラリをデザインすることができる。CDR3長は、アップライトとロールとで変更してもよく、標的ペプチドに合しするものと適宜選択すればよい。例えば、アップライトとして、CDR3長が6アミノ酸、12アミノ酸、のようにしてもよく、ロールではCDR3長が12アミノ酸、15アミノ酸のようにしてもよい。また、必要に応じて、Cys, Met, Pro等のアミ

ノ酸を排除した17種類のアミノ酸が等比率になるように設定することができる。これらのアミノ酸は、バイオ医薬品の製剤化の過程で不均一性を生じさせる可能性があるからである。

[0059] (3) フレームワークのデザイン

本発明のペプチドは、ヒト化されたラクダ科動物その他由来の重鎖抗体であるため、フレームワーク部分をヒト化することが必要である。

このため、まず、上記のようなデータベースから入手可能な構造情報に基づいて、ペプチドの復帰突然変異 (BM) 位置を決定する。そして、フレームワーク領域のヒト化を行うに当たって、基本とする配列を選択する。こうした配列としては、ヒトフレームワーク配列IGHV3-23*01のDP-47、DP-51、DP-29等を挙げることができる。また、こうしたフレームワーク配列の改変の検討に当たっては、上市又は臨床試験に使用されている、Caplacizumab、Ozorali z mab、Vobaraliz mabその他のVHH等のアミノ酸配列を参考にすることができる。

[0060] ここで、ヒト化フレームワーク配列を設計するための手法として、例えば、以下のような手法を挙げることができる。ソースの異なる複数のペプチドをそれらのアミノ酸配列を比較するために準備する。そして、これらのアミノ酸配列を比較し、同一のアミノ酸が同一の位置に割り当てられている場合には、それらをそのまま本発明のフレームワーク配列においても割り当てることが、抗原性を上昇させないという理由から好ましい。

例えば、上記4つのVHHアミノ酸配列を比較のために選択した場合、同じ位置に同一のアミノ酸が割り当てられているならば、それらはそのまま本発明のペプチドにおいても同じ位置に割り当てて、この作業を繰り返して、割り当てべきアミノ酸を決定することが、ヒト化フレームワークの設計上好ましい。

[0061] 最終的に、割り当てべきアミノ酸を決定することができない場合には、上述したCDR3ループの構造分類と配列プロファイルとの相関性、構造学的な知見、ヒトフレームワーク配列の知見等を組み合わせて決定することが好ま

しい。また、このヒト化フレームワークの作製過程において、いくつかのアミノ酸を置換し、例えば、システイン、プロリン等の出現頻度を低下させることが、医薬品として使用する上では好ましい。

[0062] (4) ライブラリの構築

以上のようにして設計したCDR1～3それぞれを含むDNAフラグメントをoverlap extension PCRにより合成し、制限酵素とリガーゼとを用いて目的とする全長ペプチドを含むライブラリを構築することができる。ここで使用する制限酵素としては、例えば、HphI、FokI、BsmBI、BtgZIその他のType IIS制限酵素（認識とヌクレアーゼのドメインが分離しており、非対称な塩基配列を認識して、片側の少し離れた部位を切断する制限酵素）を、また、リガーゼとしてはT4 DNAリガーゼ等を挙げることができる。

[0063] FR1～4の増幅用プライマー（以下、「FR3プライマー」のようにいう。）は、所望の配列を含むように設計することができ、FR4プライマーがcDNA displayでのリンカーハイブリダイゼーション配列を含むように設計することが、cDNAディスプレイ法を使用する上で好ましい。所望の配列としては、例えば、Hisタグ領域、3' UTR、T7プロモーター、SD配列、5' UTR等を挙げることができる。

[0064] 各配列に対するプライマーは、常法に従って合成してもよく、企業に合成を委託してもよい。こうした会社としては、例えば、ユーロフィンジェノミクス株式会社、Sigma Aldrich等を挙げることができる。CDR1領域の配列が異なるCDR1プライマー、CDR2領域の配列が異なるCDR2プライマーをそれぞれ多数合成し、混合して使用することがライブラリの多様性の理由から好ましい。CDR3プライマーには、トリマーオリゴヌクレオチドを用いて設計することが好ましい。アミノ酸の出現頻度の制御が可能となるからである。

[0065] まず、所望の条件の下で、overlap extension PCRを行い、各CDRを含むDNAフラグメントを合成する。overlap extension PCR用反応液としては、下記表3に示す組成の溶液を使用することができ、合成した各DNAフラグメントは、例えば、AMPureXP (Beckman)等を用いて精製することができる。

[0066] 次にCDR1フラグメントとCDR2フラグメントとを上記制限酵素で処理し、精製後、上記リガーゼを用いて相互に連結し、ライゲーション産物（CDR1-2フラグメント）を得る。このライゲーション産物を、例えば、ゲル電気泳動によって精製し、アウトプライマーを用いて増幅させる。増幅されたCDR1-2フラグメントを精製後、再び制限酵素処理を行う。

[0067] CDR3は、上記と同様に制限酵素処理し、精製後に、上記CDR1-2フラグメントとリガーゼで連結する。得られたライゲーション産物（CDR1-2-3フラグメント）を上記と同様に精製し、ライブラリとする。以上のようにして得られたCDR1-2-3フラグメントの配列を、例えば、次世代シーケンサー等を用いて確認する。

[0068] 以上のようにして、ペプチドライブラリを得ることができる。得られたペプチドライブラリを、下記のリンカーを用いたcDNAディスプレイ法でセクションを行うことによって、目的ペプチドを得ることができる。

[0069] (5) cnvK Linkerの調製

主鎖となるビオチンフラグメントの配列は配列番号33に記載された配列を有するようにすることが、反応効率の点から好ましい。ここで、上記主鎖の5'末端にはBioTEGが結合しており、また、塩基配列中の3位のNはグアノシンを表す。この配列には、Amino C6-dTを介してさらにCCTが結合されている。12位のNは3-シアノビニルカルバゾールをそれぞれ表す。

[0070] 5' AANAATTTCCANGCCGCCCCCG 3' (配列番号33)

[0071] また、側鎖となるピューロマイシンセグメントは、5' (5S)TcTcFCZZCCの配列を有するようにすることができる。上記側鎖配列中の遊離末端となるPは、タンパク質結合部位としてのピューロマイシンを表す。また、(5S)は5' Thiol C6を、cはシチジンを、FはFITC-dTを、そしてZは Spacer 18をそれぞれ表す。上記の主鎖及び側鎖の化学合成は、ユーフォフィンゲノミクス、つくばオリゴサービス（株）等に委託しても良い。

[0072] まず、0.1~0.3Mのリン酸ナトリウム(pH 7.2)に、10~20 nmolのビオチンフラグメント(終濃度100~200 μ M)及びEMCS（（株）同仁化学研究所製、終濃

度13~19 mM)を加え、36~38℃で15~45分間インキュベートする。その後、エタノールを加えて、得られた産物を沈殿させる。この反応には、適当な市販のキット、例えば、Quick-Precip Plus Solution (Edge BioSystems社製)を用いてもよい。

[0073] 次に、35~40 nmol分のピューロマイシン-セグメントを、終濃度400~435 μ Mとなるように、25~75 mMのDTTを含む0.5~1.5Mのリン酸水素二ナトリウム水溶液に溶解し、シェーカーを用いて室温で0.5~1.5時間攪拌する。次いで、0.02~0.04 MのNaClを含む0.01~0.03 Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8~7.2)にバッファー交換を行う。この操作には、NAP5カラム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)等を使用することができる。

[0074] 上記バッファー交換済みの還元ピューロマイシンセグメント溶液を、上記のEMCS修飾済みビオチンフラグメントのエタノール沈殿産物と混合し、2~6℃にて一晩放置する。引き続き、DTTを終濃度25~74 mMとなるように上記反応液に投入し、室温で15~45分間攪拌し、上記と同様にエタノール沈殿を行う。得られたエタノール沈殿産物を、50~150 μ LのNuclease-free water (ナカライテスク (株) 製)に溶解し、溶解産物とする。

[0075] 上記の溶解産物を、例えば、10~15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、cnvK rG Linker各分を切り出す。バイオマッシャーII セット (ニッピ)等を用いて切り出したゲルを砕き、400~600 μ LのNuclease-free waterを加え、2~6℃にて一晩攪拌し、cnvK rG Linkerを抽出するようにしてもよい。この攪拌溶液を、適当な遠心チューブフィルター、例えば、Costar (登録商標) Spin-X (登録商標) 遠心チューブフィルター (0.22 μ m セルロースアセテート (corning))等に移した後、10,000~20,000xgで10~20分遠心し、ゲルと抽出液とを分離する。その後、再度、上記と同様にエタノール沈殿を行ない、目的のcnvK Linkerを得ることができる。

[0076] mRNA/cDNA-リンカー-タンパク質連結体の生成に際しては、まず、上述したmRNA/cDNA-タンパク質連結体作製用リンカーと、前記リンカーの主鎖と相補的な配列を有するmRNAをmRNA連結部位でT4 RNAリガーゼによって連結して

、mRNA-リンカー連結体を生成させる。ついで、前記mRNAからタンパク質を無細胞翻訳系で合成し、前記合成されたタンパク質が、前記mRNA-リンカー連結体中の前記タンパク質連結部位に連結して、mRNA-リンカー-タンパク質連結体生成させる。

[0077] 引き続き、前記mRNA-リンカー-タンパク質連結体を、前記固相結合部位を介して固相に結合させ、前記mRNA-リンカー-タンパク質連結体の結合した固相を第1の緩衝液にて洗浄する。その後、前記主鎖の3'末端を反応開始点とし、前記mRNAを鋳型として、逆転写反応を行ってcDNA鎖を合成し、mRNA/cDNA-リンカー-タンパク質連結体を得る。次いで、前記mRNA/cDNA-リンカー-タンパク質連結体の結合した固相を第2の緩衝液で洗浄し、前記主鎖の切断部位を前記所定のエンドリボヌクレアーゼで切断する。

[0078] ライゲーション反応は、反応効率の点から20 μ L~40 μ Lで行い、RNA：リンカーを、モル比で3：1~1：6の範囲で行う。反応効率を上げ、残余を最小化するためには、1：（1~2）（10pmolのmRNAに対し、10 pmol~20pmolのリンカー）とするとよい。

[0079] 次に、ヒートブロック、アルミブロック、ウォーターバスその他の加温器具を用いて、約60℃~100℃にて約2分~約60分間、試料溶液を温めた後、室温で約2分~約60分間放置し、液温を穏やかに低下させる。その後、さらに、約-5℃~約10℃まで冷却する。具体的には、例えば、90℃で5分間アルミブロック上にて試料溶液を温め、次に、70℃のアルミブロック上に移して5分間置き、その後上記mRNAと上記リンカーとの光架橋反応を行なう。例えば、100mM~300mMのNaClを含む10mM~250mMのTris-塩酸緩衝液（pH 7.0~8.0）中で、365nmのUVを1~5分間照射することにより光架橋反応を行う。

[0080] 前期無細胞翻訳系として大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系を利用することが好ましく、さらに大腸菌の再構成型無細胞タンパク質合成系を利用することがより好ましい。

[0081] 例えば、大腸菌の再構成型無細胞タンパク質合成系と上記連結体とを加えて、翻訳反応を行うことができる。

反応効率の点から、大腸菌の再構成型無細胞タンパク質合成系の量を約8.5 μL ～約17 μL 、上記連結体の量を約2.4 μmol ～約4 μmol とし、反応系のサイズを約12.5 μL ～約50 μL として、約20℃～約40℃で約10分～約30分間行う。約37℃で約30分間翻訳を行うと、生成効率と作業効率が高い。

[0082] 翻訳反応後、翻訳産物であるタンパク質とmRNAーリンカー連結体とを、例えば、約0.3M～約1.6Mの塩化カリウム及び約40mM～約170mMの塩化マグネシウムの存在下（濃度はいずれも終濃度）、約27℃～約47℃で、約30分～約1.5時間反応させると、タンパク質を上記連結体と効率よく結合させることができる。

[0083] mRNAーリンカータンパク質連結体が固定される固相としては、例えば、スチレンビーズ、ガラスビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、磁性体ビーズ等のビーズ；ガラス基板、シリコン（石英）基板、プラスチック基板、金属基板（例えば、金箔基板）等の基板；ガラス容器、プラスチック容器等の容器；ニトロセルロース、ポリビニリデンフロリド（PVDF）等の材料からなるメンブレンなどが挙げられる。固相がスチレンビーズ、スチレン基板などのプラスチック材料で構成されている場合には、必要に応じて、公知の手法を用いてリンカーの一部を直接それらの固相に共有結合させてもよい（Qiagen社製、LiquiChip Applications Handbook等参照）。連結体にビオチン又はその類縁体が結合されている場合には、固相にアビジンを結合させておけば、上記連結体を容易に固相に結合させることができる。

[0084] 固相に結合しなかった連結体は、約0.1M～約10Mの塩化ナトリウム、約0.1mM～約10mMのEDTA、約0.01%～約1%の界面活性剤を含む1mM～100mMのTris-塩酸緩衝液（pH 7.0～9.0）もしくはリン酸緩衝液（pH 7.0～9.0）等を用いて、洗浄して除去する。2Mの塩化ナトリウム、2mMのEDTA、0.1%のTriton X-100を含む20mMのTris-塩酸緩衝液（pH 8.0）を使用すると、洗浄効率がよい。

[0085] 前記主鎖の3'末端を反応開始点とし、前記mRNAを鋳型として、所定の条件の下で、逆転写反応を行ってcDNA鎖を合成する。その結果、mRNA／cDNAーリンカータンパク質連結体を得られる。逆転写反応系は任意に選択できる。

が、上記mRNAーリンカータンパク質連結体と、dNTP Mixと、DTTと、逆転写酵素と、標準溶液と、RNaseを除去した水（以下、「RNaseフリー水」という。）とを加えて反応系を調製し、この系中、5分～20分間、30℃～50℃の条件で逆転写を行わせることが好ましい。

[0086] ついで、上記と同じ緩衝液で洗浄し、遊離の前記mRNA／cDNAーリンカータンパク質連結体を除去する。その後、前記主鎖の切断部位を、上述したエンドヌクレアーゼで切断する。以上のようにして、本発明のリンカーを用いて、種々のタンパク質を得るとともに、そのタンパク質に対応するcDNAをも得ることができる。

[0087] 以上の方法では、得られたmRNAとピューロマイシンを有するリンカーDNAとをアビジンービオチン結合を用いて、ストレプトアビジンで修飾された磁性体ビーズ上に固定し、無細胞翻訳系を用いて、mRNAよりタンパクを合成し、逆転写反応を用いてmRNAよりcDNAを合成している。このため、表現型であるタンパク質と遺伝型であるDNA配列情報とが、磁気ビーズ上で安定に1対1に対応付けられている。

[0088] 前記切断分離工程に引き続いて、得られたタンパク質のアフィニティー等を利用して、mRNA/cDNAーリンカータンパク質連結体を選別することができる。その後、選別された前記連結体中の塩基配列に、PCR法等を用いて変異を導入して増幅反応を行う。増幅産物を所望のプロモーター配列を有する二本鎖DNAと所定の方法で連結し、第1世代の変異型mRNA（以下、「mRNA G1」と略す。）を得る。次いで、mRNA G1を用いて、上述したcDNAディスプレイ法の各工程を繰り返すことによって、mRNA G2、mRNA G3等を得ることができ、以上の反応を繰り返しつつ、所望の突然変異等を導入することによって、種々の配列を有するペプチドアダプターを得ることができる。

実施例

[0089] （実施例1）VHH CDR3の構造解析

まず初めに、VHH及びヒトVHの構造データをタンパク質データバンク（PDB）のSA bDabデータベース（<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdab>

/sabdb/) から入手した。ここで入手したVHHは、CDRの構造が5 アミノ酸未満の短いものを除き、上記表2に示す基準で選択した。

[0090] データベースから得たVHHのCDR情報を、従来法であるKabat法で決定した。本実施例では、ANARCIツール (<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsabdb/sabpred/anarci/>) を用いて、自動的にKabat法によるCDR決定を行い、ナンバリングされたアミノ酸配列の情報を得た。得られた情報を、可変領域及びCDRを定義するために使用した。

上記情報に含まれるアミノ酸配列をもとに、CD-HIT (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/>) を用いて可変ドメイン領域のクラスタリングを行い、%idが100%の完全一致な部分を削除することで冗長性を排除するキュレーションを行った。

上記キュレーションの結果、得られたVHHは330種類、ヒトVHは926種類であった。

[0091] 上記の解析を行った結果、CDR2(H50-H65)及びCDR3(H95-H102)に十分な抗原結合部位が含まれていることが明らかになった。しかし、実際のCDR1抗原結合部位は、Kabat法で決定された領域 (H31-H35) よりも広がったため、Chothia法で調製されたCDR1(H26-H32)と組み合わせ、CDR1(H26-H35)とした。

[0092] 上述したように、CDR3をその特徴的なループ構造に基づいて、大きく3種類に分類した結果 (図1(A))、上記ループ構造はCDR3に含まれるアミノ酸の数に依存すること、及びCDR2のアミノ酸残基数にも影響を与えることが明らかになった。

従来の軽鎖及び重鎖で構成される抗体では、FR2は軽鎖と接しているが、VHHではFR2が軽鎖と接触する部位が露出していること、及びそれによってFR2が抗原結合部位の形成に大きく寄与することが明らかになった。図1(A)は抗原に近接するアミノ酸残基を黒色で示している。

[0093] CDR3の3種類のループ構造は、以下のように定義した。上記C α 距離が15Å以上かつ上記二面角が140度以上のものはアップライト型、上記C α 距離が10Å以上かつ上記二面角が140度以下のものはロール型、上記C α 距離が15Å以

上かつ上記二面角が140度より小さいか、もしくは上記C α 距離が10Åより大きくかつ上記二面角が140度より小さいものはハーフロール型とした。図4に、CDR3の長さとその分類型との関係を示す。これによると、CDR3長が12アミノ酸より短い場合には上記アップライト型に分類される傾向が、また、12アミノ酸以上と長い場合には上記ロール型に分類される傾向が見られた。上記ハーフロール型は、CDR3長とは無関係であることもわかった。

[0094] 上記アップライト型となるCDR3は、抗原結合部位にフレームワーク領域を含む傾向があることが分かった。一方で、CDR3に含まれるアミノ酸数が14以上になると、ロール型が増えること、及びフレームワーク領域が抗原結合部位に含まれることが減少することも示された。さらに、ロール構造は、フレームワーク領域とCDR3領域とがお互いに近づくことで安定化されることが明らかになった。さらに、16以上のアミノ酸がCDR3に含まれる場合、システインを含むCDR3の割合が増加し、そのシステインがCDR2のシステインとの間でジスルフィド結合を形成することにより、さらに安定したCDR3が形成されるようになることがわかった。

[0095] VHHと同様な方法で、ヒトVHについても構造の分類を行った。上記C α 距離と上記二面角との二次元プロットを図3(B)に示す。ヒトVHのほとんどがハーフロール型であり、上記ロール型は全くなく、また、上記アップライト型もほとんど存在していなかった。このことから、ヒト抗体では、軽鎖の存在が立体的な障害となり、CDR3が上記ロール型のような構造にフォールディングすることを防いでいると考えられた。

[0096] (実施例2) 人工VHHライブラリの構築

(2-1) 解析データに基づくライブラリデザイン

上述した抗原結合部位、アミノ酸残基数、及びCDR3の構造の解析結果に基づいて、Upright6、Upright12、Roll12、そしてRoll15という4つのサブライブラリを含む、合理的な人工VHHライブラリをデザインした。アップライト型のサブライブラリのCDR2を16アミノ酸残基から構成し、ロール型のサブライブラリのCDR2を17アミノ酸残基から構成した。これは、CDR2を構成するアミ

ノ酸残基の数（16アミノ酸残基又は17アミノ酸残基）とアップライト型又はロール型の形成に強い相関が確認されているためである。

CDRのアミノ酸配列は、CDR1は150種類の配列セットから構成され、CDR2は69又は71種類の配列セットから構成され、CDR3はメチオニン、プロリン及びシステインの3種類を除いた17種類のアミノ酸からランダムに構成されるように設計した。16アミノ酸長以上のCDR3は設計しなかった。ジスルフィド結合の形成が製薬の観点から望ましいものではないからである。最後に、以上のよう

にデザインした上記CDR1～3を1セットとして、ヒト化したFRに組み込んだ。

[0097] 以上の解析結果から、本ライブラリに含まれるVHHのフレームワーク領域及びCDRは以下のように定義された。FR1(H1-H25)、CDR1(H26-H35)、FR2(H36-H49)、CDR2(H50-H65)、FR3(H66-H94)、CDR3(H95-H102)、FR4(H103-H113)。以上の定義を踏まえて、次にフレームワークをデザインした。

[0098] (2-2) フレームワークのデザイン

まず、構造情報に基づいて、VHHの復帰突然変異(BM)位置を決定した。そして、フレームワーク領域のヒト化を、ヒトフレームワーク配列IGHV3-23*01のDP-47を基本とし、上市又は臨床試験されている3つのVHH (Caplacizumab、Ozoralizumab、Vobaralizumab) のアミノ酸配列を参考にして行った。

[0099] ここで、上記4つのVHHアミノ酸配列が同じアミノ酸を指定している場合はそのアミノ酸に決定した。未確定のアミノ酸配列は、CDR3ループの構造分類と配列プロファイルとの相関性、構造学的な知見、ヒトフレームワーク配列の知見などを組み合わせて決定した(図6)。また、このヒト化過程でいくつかのアミノ酸をさらに編集することで、製薬において好ましくないアミノ酸の出現頻度を低下させた。

[0100] (2-3) CDR1及びCDR2のデザイン

CDR1及びCDR2は、自然界において抗体配列のgermlineから大きく逸脱することは考えにくいことから、アミノ酸部位特異的なランダム化ではなく、重複のないCDR配列をそれぞれ合成し混合する手法を用いた。実際には、以下の

手順でCDR1及びCDR2のアミノ酸配列をデザインした。

(p1) アルパカ由来のNaive shuffling LibraryのNGSデータから、一定以上濃縮した配列(ratio=0.001%以上、以下、「濃縮配列」という。)を、データとして活用した。

(p2) 上記BM位置のアミノ酸配列が、上記(2-2)でデザインしたFR配列のBM位置のアミノ酸配列と一致するものを上記濃縮配列から選定し、CDR1及びCDR2のアミノ酸配列候補として列挙した。

(p3) BM位置のアミノ酸配列が、上記FR配列のBM位置のアミノ酸配列と一致するVHH配列をProtein data bank (PDB)に登録されているデータ(以下、「PDBデータ」ということがある。)の中から選定し、CDR1及びCDR2のアミノ酸配列候補として列挙した。

(p4) 上記(p2)及び(p3)で列挙したCDR1及びCDR2配列をアルパカのgermline配列と比較し、CDR1の場合にはミスマッチを2つまで、CDR2の場合はミスマッチを3つまで許容するように配列候補を絞り込み、上記(p2)の配列セットに追加した。

[0101] (2-4) CDR3のデザイン

CDR3ループ長の分布、CDR3長及びCDR3の構造分類の相関から、今回は、アップライト型ではCDR3長が6アミノ酸又は12アミノ酸、ロール型ではCDR3長が12アミノ酸又は15アミノ酸の計4種類のサブライブラリをデザインした。製剤化の過程で不均一性を生じさせる可能性のある3つのアミノ酸(Cys, Met, Pro)を排除した17種類のアミノ酸が等比率になるように設計した。

[0102] (2-5) DNA assemblyによるライブラリの構築

CDR1～CDR3のそれぞれを1つずつ含むDNAフラグメントをoverlap extension PCRにより合成し、Type IIS制限酵素とT4 DNA Ligaseとを用いて各フラグメントをライゲーションさせ、目的の全長VHH配列を含むライブラリを構築した(図6)。

[0103] FR3、4に対応するprimerはEurofins Genomics社に合成を依頼した。FR4 primerはHisタグ領域と3' UTR(cDNA displayでのリンカーハイブリダイゼーシ

ョン配列を含む)を含むものを設計した。FR1とCDR1、CDR2に対応するprimerはSigma Aldrich社に合成を依頼した。FR1 primerは5' UTR(T7プロモーター、SD配列を含む)を含むものを設計した。CDR1 primerはCDR1 領域の配列が異なる150種類をそれぞれ合成し、CDR2 primerはCDR2領域の配列が異なる140種類(Upright型:71種類、Roll型:69種類)をそれぞれ合成し、これらのプライマーを混合して使用した。各ライブラリのCDR3に対応するprimerはトリマーオリゴヌクレオチドを用いてアミノ酸出現頻度をコントロールするように設計しElla Biotech社に合成を依頼した。

[0104] まず、各CDRを含むDNAフラグメントを合成するために、overlap extension PCRによりFR1 primerとCDR1 primerを用いてCDR1 fragmentを、FR2 primerとCDR2 primerを用いてCDR2 fragmentを、CDR3 primerとFR4 primerを用いてCDR3 fragmentを合成した。反応組成はPrimeSTAR MAX PreMIX (2×) (タカラバイオ (株)) 125 μ L、10 μ M forward/reverse primer 5 μ Lずつ、超純水 115 μ Lであった。ただし、CDR3 fragmentの合成では全て倍量とした。反応条件は表3に示した。合成した各DNA fragmentはAMPureXP (Beckman社製)を用いて精製を行った(取扱説明書のプロトコルに従った。以下、単に「精製」と言った場合はこの方法で行う。))。

[0105] [表3]

項目	初期変性	変性	アニーリング	伸長	最終伸長	クーリング
温度(°C)	98	98	65	72	7	16
時間(秒)	60	10	5	10	60	∞
サイクル数	1	5			1	1

[0106] 次にCDR1フラグメントとCDR2フラグメントとをBsmB I(NEB)を用いて55°Cにて15分間制限酵素処理した。制限酵素処理されたこれらのDNAフラグメントを常法に従って精製し、T4 DNAリガーゼ(タカラバイオ (株))を用いて16°Cにて16時間でライゲーションし、これらの連結体であるCDR1-CDR2フラグメントをライゲーション産物として合成した。このライゲーション産物を8 M尿素PAGE-gelを用いて200 Vにて40分間泳動し目的産物領域を精製した後、アウタープライマーを用いてアニーリング温度62°Cにて10サイクルPCR増幅を行った

。増幅されたCDR1-2フラグメントを精製し、その後、BtgZ I(NEB)を用いて60℃にて15分間制限酵素処理した。

[0107] CDR3フラグメントを、BsmBIを用いて55℃にて15分間制限酵素処理し、AMPure XPを用いて精製を行い、精製CDR3フラグメントを得た。次に、上記精製CDR1-2フラグメント及び上記精製CDR3フラグメントをT4 DNAリガーゼを用いて、16℃にて16時間ライゲーションし、全長VHH配列を得た。ライゲーション産物は上記8 M尿素変性PAGE-gel精製により回収し、ライブラリを構築した。

[0108] (2-5) 作製したライブラリのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の確認
上記(2-4)で構築したライブラリが設計通りのヌクレオチド配列及びアミノ酸の出現頻度になっているのか確認するために、次世代シーケンサー(NGS)を用いてライブラリ中のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を解析した。

[0109] まず、上記の各ライブラリに対してPCR増幅を行った。反応溶液(合計25 μ L)の組成は、12.5 μ LのPrimeSTAR MAX PreMIX(2 $\times$)、1 μ Lのライブラリサンプル、それぞれ0.5 μ Lの20 μ M forward/reverse primer (PL_prRd-N4_NL_FW、PL_prRd-N4_NL_RV)、及び10.5 μ Lの超純水とした。反応条件は、アニーリング温度を62℃に、伸長時間を5秒に、及び変性等のサイクル数を8回にした以外は上記表3と同じとした。

[0110] 得られたPCR産物をAMPureXPを用いて精製し、精製産物を鋳型としてIndex PCR(反応条件は、アニーリング温度を52℃に変更した以外は上記PCRの条件と同じ。)を行った。反応溶液(合計25 μ L)の組成は、12.5 μ LのPrimeSTAR MAX PreMIX (2 $\times$)、1 μ LのPCR産物、それぞれ2 μ Lの5 μ M forward/reverse primer (Nextera XT Index 1 Primers (N7XX)、Nextera XT Index 1 Primers (S5XX))、7.5 μ Lの超純水とした。Index PCR産物を、上記と同様にAMPureを用いて精製し、DNA濃度をNanoPad DS-11を用いて測定した。その後、Index PCR精製産物を濃度が10 nMになるように希釈した後、各産物を5 μ Lずつ1つのチューブにまとめるように回収し混合した。

[0111] 今回のNGSでは、MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (illumina社)を用い

て解析を行った。試薬カートリッジを脱イオン水で溶解した。10 nMのNGSサンプルライブラリをResuspension bufferで4 nM ライブラリに希釈した。5 μ Lの4 nM ライブラリに5 μ Lの0.2 M NaOHを加え、ボルテックスして5分間室温で反応させ、その後、氷冷HT1を990 μ L加えて20 pMライブラリを調製した。この20 pMライブラリ450 μ Lに対して、氷冷HT1を150 μ L加えて15 pM サンプルライブラリを調製した。コントロールDNAライブラリであるPhiXライブラリも同様の方法で調製し、15 pMライブラリとした。最後に、15 pMサンプルライブラリ570 μ Lと15 pM PhiXライブラリ30 μ Lとを混合し、上記試薬カートリッジに最終NGSサンプルライブラリをローディングして、Miseqに試薬カートリッジをセットし、解析を行った。そして、得られたデータを解析し、各ライブラリが設計通りの塩基配列になっていることを確認した。

- [0112] (実施例3) PharmaLogical Libraryからの抗原結合性VHHクローンの取得
(3-1) In vitroセクション用リンカーの調製

セクション用のcnvKリンカーは以下のように調製した。

(1) cnvK rC Linkerの調製

主鎖となるビオチンフラグメントの配列は下記配列番号33に記載された配列とした。ここで、上記ビオチンフラグメント(主鎖)の5'末端にはBioTEGが結合しており、また、上記ヌクレオチド配列中の3位のNはグアノシンを、また、12位のNは3-シアノビニルカルバゾールをそれぞれ表す。下記の配列番号33の3'末端には、Amino C6-dTを介してCCTを結合させた。

- [0113] 5' AANAATTTCCANGCCGCCCCCG 3' (配列番号33)

- [0114] また、側鎖となるピューロマイシンセグメントは、5' (5S)TcTCFCZZCCPの配列を有する。上記側鎖配列中の遊離末端となるPは、タンパク質結合部位としてのピューロマイシンを表す。また、(5S)は5' Thiol C6を、cはシチジンを、FはFITC-dTを、そしてZは Spacer 18をそれぞれ表す。上記の主鎖及び側鎖の化学合成は、つくばオリゴサービス(株)に委託した。

- [0115] まず、0.2Mのリン酸ナトリウム(pH 7.2)に、15 nmolのビオチンフラグメント(終濃度150 μ M)及びEMCS ((株) 同仁化学研究所製、終濃度16.7 mM)を加

え、37℃で30分インキュベートした。その後、Quick-Precip Plus Solution (Edge BioSystems社製)を用いてエタノール沈殿させた。

次に37.5 nmol分のピューロマイシン-セグメントを終濃度417 μMとなるように、50 mMのDTTを含む1 Mのリン酸水素二ナトリウム水溶液に溶解し、シェーカーを用いて室温で1時間攪拌した。次いで、NAP5カラム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて、0.03 MのNaClを含む0.02 Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)にバッファーを交換した。

[0116] 上記バッファー交換済みの還元ピューロマイシンセグメント溶液を、上記のEMCS修飾済みビオチンフラグメントのエタノール沈殿産物と混合し、4℃で一晩放置した。続いて、DTTを終濃度50 mMとなるように上記反応液に投入し、室温で30分間攪拌した。その後、Quick-Precip Plus Solution (Edge Biosystems社製)を用いて、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿産物を、100 μLのNuclease-free water (ナカライテスク (株) 製)に溶解した。

[0117] 溶解産物を12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、cnvK rC L linker各分を切り出した。バイオマッシャーII セット (ニッピ)を用いて切り出したゲルを砕き、500 μLのNuclease-free waterを加え、4℃で一晩攪拌しcnvK rC Linkerを抽出した。攪拌した溶液をCostar (登録商標) Spin-X (登録商標) 遠心チューブフィルター、0.22 μm セルロースアセテート (corning)に移した後、16,000xgで15分遠心し、ゲルと抽出した液を分離した。その後、Quick-Precip Plus Solutionを用いてエタノール沈殿を行ない、目的のcnvK rC Linkerを得た。得られたcnvK rC LinkerはNuclease-free waterに溶解して-20℃で保存した。

[0118] (3-2) In vitroセレクション

構築したPharmaLogical Libraryから様々な抗原に結合するVHHの取得ができるのか否かについて、In vitroセレクションを行って検証した。

今回標的として使用した抗原は、HSA (Human Serum Albumin)、HER2 (Human Epidermal growth factor receptor 2)、GPC3 (Glypican 3)、GPC1 (Glypican 1)の4種類である。また、セレクション用ライブラリは、上述した4種類

のサブライブラリを混合したものを使用した。mRNA-リンカー連結体の合成、cDNA display分子の合成、In vitroセレクション、PCR増幅という一連の操作を1ラウンドとし、3ラウンド(GPC1は4ラウンド)のセレクションを行った(図7)。

[0119] (3-2) mRNA-リンカー連結体の合成

最初のラウンドでは各サブライブラリのDNA library 10 pmolを鋳型として、T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega社製)を用いて37℃、30分間転写反応を行った。転写反応後、RQ1 RNase-free DNase (Promega社製)を加えて37℃、15分間反応させることでDNAを分解し、RNAClean XP (Beckman社製)を用いてRNAの精製を行った(取扱説明書のプロトコルに従った)。その後、RNA濃度をNanoPad DS-11を用いて測定し、終濃度が200 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 μM mRNA、1 μM cnvK linkerになるように試薬を混合し、(s1) 90℃、1分、(s2) 70℃、1分、(s3) 4℃のプログラムで熱処理をすることでmRNAに対してcDNA display合成用リンカーをハイブリダイゼーションした。次に、mRNAとリンカーとのハイブリダイゼーション産物に、UVP closslinker cl-3000を用いて総エネルギー量が406 mJ/cm²となるように365 nmのUVを照射することで、mRNAとリンカーを光架橋し、mRNA-リンカー連結体を作成した。

[0120] (3-3) cDNA display分子の合成

各サブライブラリのmRNA-リンカー連結体を混合して混合物とし、この混合物を鋳型として、再構成系無細胞翻訳溶液Purefrex1.0 (Gene Frontier (株))とSS結合補助因子であるDsbC set (Gene Frontier(株))とを用いて37℃、30分間無細胞翻訳反応し(以下「IVV」ということがある。)を行った。反応液の組成は、1,600 μLのSolution I、それぞれ160 μLのSolution II及びSolution III、800 μLの1 pmol/μL Ligation産物、4倍希釈した160 μLのDsbC set、160 μLの20 mM GSSG、160 μLの80 mM GSHとした。翻訳後、1,920 μLのIVV formation Bufferを加え、その後、37℃にて30分反応させて翻訳産物をピューロマイシンを介してリンカーに共有結合させた。引き続き、1

, 280 μL の0.5 M EDTAを加え、4°Cにて10分間反応させ、リボソームを核酸から遊離させた。

[0121] 以上の操作によって、6,400 μL のIVV産物 (mRNA-リンカー-VHH結合体) を取得した。得られたIVV産物は、3,840 μL のDynabeads Streptavidin MyOne C1 (Thermo Scientific社製)を用いて、添付のプロトコルに従って精製した。IVV産物が結合したbeadsに対して、1,280 μL の5×RT Buffer、256 μL の25 mM dNTPs、128 μL のReverse Transcriptase、及び4736 μL の超純水から成る逆転写反応溶液を加え、42°Cにて1時間反応させてcDNA display産物 (cDNA-mRNA-リンカー-ペプチド結合体) を合成した。

[0122] 上記のようにして得られたcDNA display産物を、RNaseT1 (Thermo Scientific社製)を含む640 μL の溶出バッファーでビーズから溶出させ、その後、200 μL のHis-Magセファロース (Cytiva社製)を用いてcDNA display産物をHisタグ精製し、200 μL のcDNA display分子 (cDNA-リンカー-ペプチド連結体) を得た。

[0123] (3-4) 試験管内淘汰セレクション

cDNA display分子とビオチン化標的タンパク (HSA、HER2、GPC3、GPC1)とを、下記表4に示す量で混合し、4°Cにて30分間インキュベーションさせた。その後、この反応液を、洗浄済の120 μL のDynabeads Streptavidin MyOne C1と混合し、4°Cにて30分間インキュベーションして、ビオチン化標的タンパクを介して、結合性cDNA display分子をこのビーズに固相化した。

[0124] 上記固相化ビーズ (cDNAディスプレイ-ビオチン化標的タンパクストレプトアビジン-ビーズ)を200 μL のPBS-Tで3回洗浄した (3回目の洗浄はチューブを交換した)。その後、100 μL の溶出バッファーで2回溶出し、上記標的タンパクに結合能を示すcDNA display分子の核酸領域のみを回収した。得られた溶出サンプルはAMPure XPを用いて精製した。

[0125] 本実施例では、In vitroセレクションを3又は4ラウンド行った。2ラウンド目と3ラウンド目とは、各標的タンパク濃度が100 nMになるように、20 μL のcDNAディスプレイ溶液、10 μL の1 mMビオチン化標的タンパク、2.5 μL の2

00 mg/mLヘパリン溶液、0.5 μ Lの10% Tween、67 μ Lの1xPBSの組成で混合した。また、HSA以外の上記標的タンパクを使用した場合には、非特異的結合分子を排除するために、BSA（富士フィルム和光純薬（株））を終濃度0.5%となるように添加した。HASを使用した場合には、BSAを添加せずにセレクションを進めた。2ラウンド目ではMyOne T1に、3ラウンド目ではMyOne C1にそれぞれ固相化した。以上のように各ラウンドで使用するビーズの表面特性を変更したのは、ビーズに非特異的に結合するcDNAディスプレイ分子の排除を狙ったものである（下記表4 参照）。

[0126] [表4]

ラウンド	mRNA/リンカー連結産物 (Ligation ; pmol)	標的タンパク 濃度(nM)	使用したビーズ及び 量(μ L)
1 st	400	500	MyOne C1 : 120
2 nd	12.5	100	MyOne T1 : 24
3 rd	12.5	100	MyOne C1 : 24

[0127] (3-4) セレクションしたサンプルのPCR増幅

セレクションで溶出させたDNAについて、PrimeSTAR MAX（タカラバイオ（株））を用いてPCR増幅を行った。1st Roundでは定量PCRは実施せず、溶出サンプル全量を鋳型としてPCRを行った。反応溶液の組成（合計250 μ L）は、12.5 μ LのPrimeSTAR MAX PreMIX (2 $\times$)、100 μ Lの溶出したDNAサンプル、それぞれ5 μ Lの20 μ M forward/reverse primer (PL_T7pro、NewYtag_cnvk-linker)、15 μ Lの超純水とした。PCRプログラムはアニーリング温度を60 $^{\circ}$ C、伸長時間を5秒、変性等のサイクル数を15回にした以外は表3と同じとした。PCR産物はAMPure XPを用いて精製を行った。

[0128] 2nd ラウンド、3rd ラウンドでは、溶出サンプルの一部を定量PCRに使用し、残りをPCR増幅用の鋳型として用いた。定量PCRに使用した溶液（合計25 μ L）の組成は、12.5 μ LのTHUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡（株））、それぞれ0.5 μ Lの20 μ M forward/reverse primer (PL_T7pro、NewYtag_cnvk-linker)、1 μ Lの溶出したサンプルDNA、及び10.5 μ Lの超純水とした。PCRプログラムは、初期変性を98 $^{\circ}$ Cで30秒、（変性を98 $^{\circ}$ Cで5秒、アニーリングを60 $^{\circ}$ Cで10

秒、伸長を72℃で35秒)のサイクルを35回とした。

[0129] 引き続き、得られたデータであるCt値を参考としてPCR増幅を行った。反応溶液(合計100 μ L)の組成は、50 μ LのPrimeSTAR MAX PreMIX (2 $\times$)、25 μ Lの溶出したDNAサンプル、それぞれ2 μ Lの20 μ M forward/reverse primer (PL_T7pro、NewYtag_cnvk-linker)、21 μ Lの超純水とした。プログラムはアニーリング温度が65℃、伸長時間が5秒、変性等のサイクル数が15サイクルである以外は表3に記載のプログラムと同じとした。

[0130] (実施例4) NGSによるセレクション産物の解析

(4-1) シークエンスサンプルの調製

まず、セレクションで得られた各標的分子の濃縮ライブラリを用いて、以下の条件でPCR増幅を行った。反応液(合計25 μ L)の組成は、12.5 μ LのPrimeSTAR MAX PreMIX (2 $\times$)、1 μ Lのセレクション産物、それぞれ0.5 μ Lの20 μ M forward/reverse primer (PL_prRd-N4_NL_FW、PL_prRd-N4_Ytag_RV)、10.5 μ Lの超純水とした。PCRプログラムは、アニーリング温度を62℃、伸長時間を5秒、変性等のサイクル数を8回にした以外は表3と同じとした。

[0131] 得られたPCR産物をAMPure XPを用いて精製し、精製産物を鋳型としてIndex PCRを行った。反応液(合計25 μ L)の組成は、12.5 μ LのPrimeSTAR MAX PreMIX (2 $\times$)、1 μ Lのセレクション産物、それぞれ0.5 μ Lの5 μ M forward/reverse primer (Nextera XT Index 1 Primers (N7XX)、Nextera XT Index 2 Primers (S5XX))、10.5 μ Lの超純水とした。PCRプログラムはアニーリング温度を52℃、伸長時間を5秒、変性等のサイクル数を8回にした以外は表3と同じである。Index PCR産物を同様にAMPure XPを用いて精製し、DNA濃度をNanoPad DS-11を用いて測定した。そして、Index PCR精製産物を10 nMになるように希釈した後、各産物を5 μ Lずつ1つのチューブにまとめるように回収し混合した。

[0132] (4-2) NGSの実施

今回のNGSではMiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (illumina社)を用いて解析を行った。試薬カートリッジを脱イオン水で溶解した。10 nM NGSサンプル

ルライブラリをResuspension bufferで4 nM ライブラリに希釈した。5 μ Lの4 nMライブラリに5 μ Lの0.2 M NaOHを加えてボルテックスし、室温にて5分反応させた後、990 μ Lの氷冷HT1を加えて20 pMライブラリを調製した。450 μ Lの20 pMライブラリに対して氷冷HT1を150 μ L加え、15 pM サンプルライブラリを調製した。コントロールDNAライブラリであるPhiXライブラリも同様の方法で15 pMライブラリを調製した。最後に、570 μ Lの15 pMサンプルライブラリと30 μ Lの15 pM PhiXライブラリとを混合して最終NGSサンプルライブラリとした。試薬カートリッジに上記最終NGSサンプルライブラリをローディングし、Miseqに試薬カートリッジをセットして、解析を行った。得られたNGS解析データの処理を行い、各標的分子に対して結合配列の特定を行った。

[0133] (実施例5) VHHの一次結合評価

(5-1) VHH発現プラスミドライブラリの作成

上記のIn vitroセクションによって選抜したVHHをコードするDNAライブラリを、VHH発現用のプラスミドベクターにクローニングした。まず、In vitro セクションによって取得したDNAライブラリに対して、制限酵素処理するための配列をPCRにより付加し、PCR産物を得た。このPCR産物と*C. glutamicum*発現プラスミドベクターとを、制限酵素BamHIを用いて、37℃にて1時間処理し、その後、制限酵素SfiIを用いて、50℃にて1時間処理した。InsertとなるVHH DNA産物をAMPure XPで精製し、得られたVector DNA産物を100 Vにて30分間アガロースゲル電気泳動に供して切り出し精製を行った。

[0134] 以上のように精製したVector DNAを脱リン酸化酵素であるFastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific社製)を用いて、37℃にて1時間脱リン酸化反応させた。その後、Insert DNAとVector DNAとのモル比が1:10になるように混合し、Ligation high (東洋紡(株))を用いて、16℃にて終夜ライゲーション反応を行い、選抜VHHライブラリが導入されたプラスミドライブラリを取得した。

[0135] (5-2) VHH (培養上清) の産生

電気穿孔法により各プラスミドライブラリを*C. glutamicum*へ導入し、形質

転換体とした。得られた形質転換体をCM2G培地に植菌し、30℃にて終夜培養を行った。その後、前記培養液をVHH発現用培地PM1S培地に継代し、25℃にて72時間培養を行って、培養上清中にVHH（単量体）の分泌発現を行った。培養上清の回収は3000xgで遠心操作し、さらに0.22 μm のフィルター処理により上清から菌体を除去した。

[0136] (5-3) Octetによるsingle point binding assay

Octet RED384 (Fortebio社製)を用いて、上記産生したVHH クローンをHis1Kセンサーチップに固相化して各ターゲット分子に対する結合活性を測定した。リガンドとして各標的分子の濃度を400 nMに調製し、70 μL の測定液を384ウェルプレートに添加して各標的分子の結合を測定した。測定前にDip and Read (商標) His1K Biosensors (Fortebio社製)の先端を200 μL のPBS-T(0.05% Tween20, pH7.4)に10分間浸漬させて、センサーチップを水和させた。ラン測定毎の測定順の条件は以下の通りとした。

[0137] 1) Baseline step : PBS-T中で30秒間の測定。

2) Loading step : PBS-Tで50倍希釈したVHHで100秒間の測定。

3) Baseline step : PBS-T中で30秒間の測定。

4) Association step : PBS-Tで希釈し調製した各ターゲット分子で100秒間の測定。

[0138] 5) Dissociation step : PBS-T中で100秒間の測定。

6) Regeneration step : Glycine-HCl (pH2.2)中で5秒間測定、PBS-T中で30秒間の測定。

この工程を3回繰り返す。得られたデータはOctetソフトウェアバージョン(1.2.1.5) (Molecular Devices)を用いて処理し、Binding Responseが0.1以上の値を示したクローンについてHit cloneとした。

[0139] (5-3) Hit cloneの配列解析

Hit cloneについて各VHH遺伝子を配列解析により特定した。Hit cloneである形質転換体を37℃にて一晩培養を行い、この培養液についてコロニーPCRを行った。得られたPCR産物をAMPure XPを用いてDNA精製し、その後、各DNAの

解析をEurofins genomicsにいらした。取得したHit cloneの中で配列が重複するものを除き、残ったクローンをUnique cloneとした。

[0140] (実施例6) VHHクローンのin vitroにおける特性解析

(6-1) 精製VHHの取得

上記の配列解析によって特定したUniqueクローンについて、30℃にて一晩前培養を行った。その後、この前培養液をVHH発現用培地PM1S培地に継代し、25℃にて72時間培養を行って、培養上清中にVHH(単量体)の分泌発現を行った。培養上清の回収は遠心操作によって行い、上清からの菌体の除去を行った。

[0141] 取得した培養上清より、His MultiTrap HP (Cytiva社製)を用いて当該製品説明書に従って上記サンプルを精製した。100 μ Lの溶出バッファー(300 mM NaCl、500 mMイミダゾール含有50 mM Tris-HCl (pH7.5))を添加し、4℃にて2分間、500xgで遠心した。溶出液を回収し、この溶出液を精製VHHクローンサンプルとした。

[0142] (6-2) Octetによるmultipoint Binding assay

Octet RED384を用いて、上記サンプル中の精製したVHH クローンをHis1Kセンサーチップに固相化し、各標的分子に対する結合活性を測定した。各ターゲット分子の濃度は200 nMから2倍希釈系列で7点(200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM, 3.125 nM)と、ターゲット分子なしとの条件とし、70 μ Lの各測定液を384ウェルプレートに添加して測定した。測定前にDip and Read (商標) His1K Biosensorsの先端を200 μ LのPBS-T(0.05% Tween20, pH7.4)に10分間浸漬させ、センサーチップを水和させた。ラン測定毎の測定順の条件は以下の通りである。

- [0143] 1) Baseline step: PBS-T中で30秒間の測定。
2) Loading step: PBS-Tで50倍希釈したVHHで120秒間の測定。
3) Baseline step: PBS-T中で30秒間の測定。
4) Association step: PBS-Tで希釈し調製した各ターゲット分子で120秒間の測定。

[0144] 5) Dissociation step : PBS-T中で300秒間の測定。

6) Regeneration step : Glycine-HCl (pH2.2)中で5秒間測定、PBS-T中で30秒間の測定。

この工程を3回繰り返す。得られた解析データはOctetソフトウェアバージョン(1.2.1.5)を用いて、ターゲット濃度が0 nMの測定をReferenceに取り、3.15- 200 nM条件の測定結果に対してGlobal Fittingを行い、結合活性および解離速度を算出した(図9、10(A))。

[0145] (6-3) UNcleによる熱安定性測定

タンパク質物性評価装置UNcleを用いて、上記精製したVHHクローンについて変性中点温度(T_m値)と凝集開始温度(Tag_g値)とを導出した。

まず、精製VHHクローンを、16ウェル- 9 μ L quartz cuvettesにアプライし、UNcleにキュベットをセットした後、測定を行った。測定条件は機器に初期設定されているテンプレート通り、開始温度25°C、終点温度95°Cとし、1分間に0.3°Cずつ昇温させて、タンパク質溶液の蛍光及び散乱光の変化を測定した。変性中点温度(T_m値)は、約330 nmから350 nmの蛍光強度の減少(タンパク質の熱変性による)及び蛍光スペクトルの変化を基に算出した。凝集開始温度(Tag_g値)は熱による溶質の平均分子量の上昇(凝集)を266 nmの散乱光の強度の変化により測定し、算出した(図9、10(B))。

[0146] (実施例6) フローサイトメトリーによるVHHの結合能評価

上記実施例5にてin vitroでのVHH特性解析を行った。しかし、in vitroでの結合能が必ずしもin vivoでの結合能につながっているとは限らない。そこで、VHHの結合能をより正しく評価するために、細胞に発現した標的タンパク質(GPC3、HER2)に対するVHHの結合能を、フローセルサイトメトリー(FCM)にて検証した。

[0147] この実験では、GPC3を発現する細胞として肝細胞癌であるhepG2、HER2を発現する細胞として乳癌細胞であるSK-BR-3を選択した。これらの細胞を80%コンフルになるまで培養(37°C、5% CO₂インキュベータ中、遮光下)し、5mM EDTAを含むPBSで回収した。回収した細胞サンプルを1 % BSA/PBSで洗浄し

、1% BSA/PBSで100倍希釈したVHH溶液を加えて4℃にて1時間インキュベーションした。1% BSA/PBS で3回洗浄した後に、1,000倍希釈したAlexaFluor 488結合の抗Hisタグ抗体（Medical & Biological Laboratory社製）を加えて4℃にて1時間インキュベーションした。1% BSA/PBSで洗浄した後に、1% BSA/PBSで再懸濁し、FCM 解析（SH800、ソニー（株））を行った。

[0148] FCM解析の結果を図11に示す。どのVHHもネガティブコントロール（NC）より、左側にシフト、つまり標的タンパク質を発現した細胞に特異的に結合していることが示された。

以上より、本発明のフレームワークを有するDNAライブラリは、in vitro及びin vivoのいずれにおいても結合活性を示すことが確認された。

産業上の利用可能性

[0149] 本願発明は、創薬分野において有用である。

配列表フリーテキスト

[0150] 配列番号1：FR1のアミノ酸配列を示す。

配列番号2：FR2のアミノ酸配列を示す。

配列番号3：FR2（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号4：FR2（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号5：FR2（Roll型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号6：FR2（Roll型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号7：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号8：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号9：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号10：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号11：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号12：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号13：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号14：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

配列番号15：FR3（Upright型）のアミノ酸配列を示す。

- 配列番号 16 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 17 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 18 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 19 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 20 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 21 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 22 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 23 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 24 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 25 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 26 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 27 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 28 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 29 : FR3 (Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 30 : FR3(Roll/Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 31 : FR3(Roll/Upright型) のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 32 : FR4のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 33 : cnvK rCリンカーの主鎖のヌクレオチド配列を示す
- 配列番号 34 : DP-47のFR1のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 35 : DP-47のFR2のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 36 : DP-47のFR3のアミノ酸配列を示す。
- 配列番号 37 : DP-47のFR4のアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 3つの相補性決定領域と4つのフレームワーク領域とで構成され、配列番号1で表されるアミノ酸配列をフレームワーク1として含むペプチド。
- [請求項2] 前記フレームワーク領域は、配列番号2で表されるアミノ酸配列をフレームワーク2として含む、請求項1に記載のペプチド。
- [請求項3] 前記フレームワーク2は、配列番号3～6で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるいずれかの配列である、請求項2に記載のペプチド。
- [請求項4] 前記フレームワーク領域は、配列番号7で表されるアミノ酸配列をフレームワーク3として含む、請求項1に記載のペプチド。
- [請求項5] 前記フレームワーク3は、配列番号8～31で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるいずれかの配列である、請求項4に記載のペプチド。
- [請求項6] 前記フレームワーク領域は、配列番号32で表されるアミノ酸配列をフレームワーク4として含む、請求項1に記載のペプチド。
- [請求項7] 前記ペプチドは、10アミノ酸で構成される相補性決定領域1と、16又は17アミノ酸で構成される相補性決定領域2と、6、12又は15アミノ酸のいずれかのアミノ酸で構成される相補性決定領域3とを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のペプチド。
- [請求項8] 請求項7に記載のペプチドで構成されるペプチドライブラリ。
- [請求項9] ペプチドライブラリであって、前記ペプチドライブラリを構成するペプチドは、3つの相補性決定領域と4つのフレームワーク領域とで構成され、
フレームワーク1が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク2が、配列番号3～6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含み、
フレームワーク3が、配列番号8～31のいずれかに示されるアミ

ノ酸配列を含み、

フレームワーク 4 が、配列番号 3 2 に示されるアミノ酸配列を含み

、

相補性決定領域 1 が、10 アミノ酸で構成されるアミノ酸配列であり、

相補性決定領域 2 が、16 又は 17 アミノ酸で構成されるアミノ酸配列であり、

相補性決定領域 3 が、6、12、又は 15 アミノ酸で構成されるアミノ酸配列である、

ペプチドライブラリ。

[請求項10]

前記ペプチドは、重鎖抗体に由来するシングルドメイン抗体であることを特徴とする請求項 7 に記載のペプチド。