

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501379

(P2004-501379A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z 2GO45
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	4B024
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A 4B063
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	GO 1 N 33/15	Z
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 76 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-504682 (P2002-504682)	(71) 出願人	502197046 ドマンティス リミテッド
(86) (22) 出願日	平成13年6月22日 (2001.6.22)		イギリス国 シービー1 6 ジーエス ケ ンブリッジ, アビントン, グランタ パー ク (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月20日 (2002.12.20)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002831	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02001/098534	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 国際公開日	平成13年12月27日 (2001.12.27)	(72) 発明者	ホルト, ルーシー, ジェシカ イギリス国 シービー2 2 ジェイイー ケンブリッジ, トランピントン, アンステ イー ウェイ 9 ビー
(31) 優先権主張番号	0015443.5		最終頁に続く
(32) 優先日	平成12年6月23日 (2000.6.23)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	0026099.2		
(32) 優先日	平成12年10月25日 (2000.10.25)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	60/246, 851		
(32) 優先日	平成12年11月8日 (2000.11.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 マトリクススクリーニング方法

## (57) 【要約】

本発明は、2以上の分子レパートリーを互いに対してスクリーニングしたり、かつ/または2以上のレパートリーを組み合わせることで組み合わせレパートリーを形成したりするのに用いることができる方法に関する。詳細には本発明は、2種類の分子レパートリーを、第1のレパートリーの実質的に全ての構成員を、機能的相互作用について第2のレパートリーの実質的に全ての構成員に対して調べるようスクリーニングすることができる方法に関する。さらに本発明は、重鎖および軽鎖の実質的に全ての組み合わせによって形成される抗体を1以上の標的リガンドに対してスクリーニングすることができるように重鎖レパートリーと軽鎖レパートリーとを組み合わせることによる、抗体レパートリーの形成およびスクリーニングに関するものである。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

第 1 の分子レポーターを第 2 の分子レポーターに対してスクリーニングして、前記第 2 のレポーターの構成員と相互作用する前記第 1 のレポーターの構成員を確認する方法において、

( a ) 前記第 1 のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるように、少なくとも一つのアレイを形成するよう、前記第 1 および第 2 のレポーターを配置する段階 ; ならびに

( b ) 前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターの構成員間での相互作用を検出する段階

を有することを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの両方の構成員を、それぞれが前記第 1 または前記第 2 のレポーターの構成員を含む一連の線、チャンネルまたは管に配置して、前記第 1 のレポーターに相当する線、チャンネルまたは管と前記第 2 のレポーターに相当するものが互いに並置されて、前記第 1 のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるようにする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

各線、チャンネルまたは管がそれぞれ、前記第 1 および前記第 2 のレポーターの異なる構成員の群を含む請求項 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

前記第 1 および第 2 のレポーターの構成員が、固体材料に切り込みまたはエッチング形成されたチャンネルに沿って配置されて、前記第 1 のレポーターの構成員を含む実質的に全てのチャンネルが前記第 2 のレポーターの構成員を含む実質的に全てのチャンネルと交差するようになっている請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5】**

前記第 1 および第 2 のレポーターの構成員が単一の支持体に付与されている請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

( a ) 第 1 および第 2 の支持体上に前記第 1 および第 2 のレポーターを配置する段階 ;  
( b ) 前記第 1 のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるように、前記第 1 の支持体と前記第 2 の支持体を並置させる段階 ; ならびに

( c ) 前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターの構成員間の相互作用を検出する段階

を有する請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の方法。

30

**【請求項 7】**

前記第 1 および第 2 のレポーターが、ペプチド ; ポリペプチド ; 核酸分子 ; 精製タンパク質 ; 組換えタンパク質 ; アミノ酸 ; c D N A ; 発現 c D N A ; オリゴヌクレオチド ; ヌクレオチド ; ヌクレオチド類縁体 ; 関係する遺伝子のファミリーまたはそれらに相当するタンパク質 ; 酵素 ; D N A 結合タンパク質 ; 免疫グロブリンファミリー構成員 ; 抗体 ; T 細胞受容体 ; ハプテン ; 小有機分子 ; 非有機化合物 ; 金属イオン ; および炭水化物のレポーターからなる群から選択される請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の方法。

40

**【請求項 8】**

前記第 1 および第 2 レポーターの構成員間の前記相互作用が、結合相互作用 ; D N A メチル化 ; 核酸分解 ; 核酸開裂 ( 1 本鎖または 2 本鎖 ) ; 信号伝達事象 ; 触媒反応 ; リン酸化事象 ; グリコシル化事象 ; タンパク質分解開裂 ; 化学反応 ; および細胞感染からなる群から選択される請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 9】**

50

第 1、第 2 および第 3 の分子レポトリを互いに対してスクリーニングして、相互作用する前記第 1、第 2 および第 3 のレポトリの構成員を確認する方法において、

( a ) 前記第 1、第 2 および第 3 のレポトリを少なくとも一つのアレイを形成するように配置して、前記第 1、第 2 および第 3 のレポトリの実質的に全ての構成員が並置されるようにする段階；ならびに

( b ) 前記第 1、第 2 および第 3 レポトリの構成員間の相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 10】

それぞれが第 1 のレポトリの 1 構成員および第 2 のレポトリの 1 構成員を有する二本鎖ポリペプチドのコンビナトリアルライブラリーを形成およびスクリーニングする方法において、

( a ) 前記第 1 のレポトリの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレポトリの実質的に全ての構成員と交差するように前記第 1 および第 2 のレポトリを配置することで、交差部で機能的二本鎖ポリペプチドの実質的に全ての組み合わせを得る段階；ならびに場合によって

( b ) 前記二本鎖ポリペプチドと標的分子との間の相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 11】

そうして得られた前記コンビナトリアルライブラリーを、複数の標的分子との相互作用についてスクリーニングする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

3 本鎖 ( t h r e e - c h a i n ) ポリペプチドライブラリーを、第 1、第 2 および第 3 の分子レポトリを 3 次元で使用して形成する ( そして場合によりスクリーニングする ) 請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 1、第 2 ( および場合により第 3 ) のレポトリ間の相互作用のパターンを用いて、陽性相互作用、陰性相互作用、特異的相互作用または交差反応相互作用を確認し、あるいは前記第 1 のレポトリ ( 前記第 2 および / または場合により第 3 のレポトリとの相互作用パターンを用いて )、前記第 2 のレポトリ ( 前記第 1 および / または場合により第 3 のレポトリとの相互作用パターンを用いて ) および / または前記第 3 のレポトリ ( 前記第 1 および / または第 2 のレポトリの構成員との相互作用パターンを用いて ) の構成員間の類似性を推定する系統樹を構築する請求項 1 ないし 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1、第 2 および場合により第 3 のレポトリの 1 以上が、アレイにおいてその相当するポリペプチドを *i n s i t u* で産生するために発現される複数の核酸分子を有する請求項 1 ないし 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸分子が、その転写を方向付けるのに十分な制御配列に機能し得る形で連結されたポリペプチドのレポトリの構成員をコードする発現ベクターの形である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記発現ベクターがバクテリオファージである請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記発現ベクターがプラスミドである請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記発現ベクターが直鎖核酸分子である請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記核酸が細胞内に含まれ、発現される請求項 14 ないし 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記細胞が、細菌細胞、下等真核細胞および高等真核細胞からなる群から選択される請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記核酸分子が、裸または複合体形成した核酸の形で固定化されている請求項 14 ないし 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

前記レポーター構成員をロボット手段を用いて配列する請求項 1 ないし 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

第 2 の分子レポーターに対して第 1 の分子レポーターをスクリーニングして、前記第 2 のレポーターの構成員と相互作用しない前記第 1 のレポーターの構成員を確認する方法において、

(a) 前記第 1 のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるように前記第 1 および第 2 のレポーターを配置する段階；および

(b) 互いに相互作用しない前記第 1 および第 2 のレポーターの構成員を確認する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 24】

第 2 の分子レポーターに対して第 1 の分子レポーターをスクリーニングして、互いの相互作用が第 3 の分子または分子群の有無によって決まる前記第 1 および第 2 のレポーターの構成員を確認する方法において、

(a) 前記第 1 のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるように前記第 1 および第 2 のレポーターを配置する段階；および

(b) 各種濃度の前記第 3 の分子または分子群の存在下に前記第 1 および第 2 のレポーターの構成員間の相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 25】

前記第 3 の分子または分子群が前記第 1 のレポーターのある種の構成員と相互作用することで、前記第 1 のレポーターの該構成員を前記第 2 のレポーターのある種の構成員と相互作用させることができる請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記第 1 および第 2 のレポーターの構成員が、それらの構成員の前記第 3 の分子または分子群への同時結合を必要とする請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 および第 2 レポーターの構成員間の前記相互作用が、第 3 の分子または分子群の存在によって促進される請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 1 および第 2 レポーターの構成員間の前記相互作用が、第 3 の分子または分子群の存在によって妨害される請求項 24 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1、第 2 および場合により第 3 の分子レポーターを含む高密度の線を描出する装置。

【請求項 30】

前記第 1、第 2 および場合により第 3 の分子レポーターが進むことができる交差したチャンネルまたは管を有する装置。

【請求項 31】

調べる相互作用の数より必要な分配作業の方が少ない請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

少なくとも一つであるが全てではないレポーターの構成員が、それぞれがそのレポーター

10

20

30

40

50

リーの1構成員を含む一連の線、チャンネルまたは管で配置されて、そのレパートリーに相当する前記線、チャンネルまたは管が、どのような配置であるかは問わず、他のレパートリーの実質的に全ての構成員と交差する請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記第1のレパートリーおよび前記第2のレパートリーの両方の構成員が、それぞれが前記第1または第2のレパートリーの1構成員を含む一連の線、チャンネルまたは管で配置されて、前記第1のレパートリーに相当する線、チャンネルまたは管および前記第2のレパートリーに相当するものが互いに接触することで、分配作業より多くの相互作用について試験が行われる請求項32に記載の方法。

【請求項34】

生物学的相互作用に最も好ましい条件を確認する方法において、可変パラメータの2以上の異なる集合の実質的に全ての組み合わせが関与して、各パラメータ集合が交差する線、チャンネルもしくは管によって形成されるアッセイを有することを特徴とする方法。

10

【請求項35】

前記変動させるパラメータが、緩衝液組成、基質濃度、pH、温度、変性剤および還元剤（これらに限定されるものではない）からなる群から取られる請求項34に記載の方法。

【請求項36】

2段階以上の酵素反応を含む酵素の2以上のレパートリーをスクリーニングして、所定の基質からの所定の産物を共同で形成する第1のレパートリーの構成員および第2のレパートリーの構成員を確認する方法において、

20

(a) 前記第1のレパートリーの実質的に全ての構成員が前記第2のレパートリーの実質的に全ての構成員に対して並置されるよう、前記第1および第2のレパートリーを配置して少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

(b) 前記第1および第2レパートリーの前記構成員の交差部での生成物形成を検出する段階  
を有することを特徴とする方法。

【請求項37】

各種細胞群を各種ウイルス群に対してスクリーニングして、前記細胞群に感染するウイルス群を確認する方法において、

(a) 実質的に全ての前記各種細胞画分が実質的に全てのウイルス群と並置されるよう、前記細胞群および前記ウイルス群を配置して少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

30

(b) 前記細胞群に感染するウイルス群を検出する段階  
を有することを特徴とする方法。

【請求項38】

各種細胞画分を互いに対してスクリーニングして、他の細胞画分中の成分と相互作用する成分を含む細胞画分を確認する方法において、

(a) 全ての前記各種細胞画分が互いに並置されるよう、前記細胞画分を配置して少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

(b) 前記各種細胞画分の交差部での相互作用を検出する段階  
を有することを特徴とする方法。

40

【請求項39】

各種細胞群を互いに対してスクリーニングして、他の細胞群と相互作用する細胞群を確認する方法において、

(a) 実質的に全ての前記各種細胞画分が互いに対して並置されるように、前記細胞群を配置して少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

(b) 前記各種細胞群の交差部での相互作用を検出する段階  
を有することを特徴とする方法。

【請求項40】

ペプチドレパートリーを同じペプチドレパートリーに対してスクリーニングして、前記ペ

50

プチドレパートリーの他の構成員と相互作用するペプチドレパートリーの構成員を確認する方法において、

(a) 前記ペプチドレパートリーの実質的に全ての構成員が互いに対して並置されるように、前記ペプチドレパートリーの前記構成員を配置して少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

(b) 前記ペプチドレパートリーの前記各種構成員の交差部での相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 1】

ポリペプチドレパートリーを同じポリペプチドレパートリーに対してスクリーニングして、前記ポリペプチドレパートリーの他の構成員と相互作用するポリペプチドレパートリーの構成員を確認する方法において、

(a) 前記ポリペプチドレパートリーの実質的に全ての構成員が互いに対して並置されるように、前記ポリペプチドレパートリーの前記構成員を配置して少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

(b) 前記ポリペプチドレパートリーの前記各種構成員の交差部での相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 2】

酵母 2 - ハイブリッド系を用いて、互いに相互作用する分子レパートリーの構成員を確認する請求項 1、40 または 41 に記載の方法。

【請求項 4 3】

一連の交差する線、チャンネルまたは管を用いて前記アレイを形成する請求項 36 ないし 42 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

ポリペプチドの第 2 レパートリーの実質的に全ての構成員とペアとなったポリペプチドの第 1 レパートリーの実質的に全ての構成員からなるコンビナトリアルライブラリーの形成（および場合によりスクリーニング）方法において、

(a) 前記第 1 のレパートリーの実質的に全ての構成員を含む細胞が、前記第 2 のレパートリーの実質的に全ての構成員に相当するヌクレオチド配列と交差するように、複数のヌクレオチド配列（それぞれが前記第 1 のレパートリーの異なるポリペプチド構成員をコードすることができる）および複数のヌクレオチド配列（それぞれが前記第 2 のレパートリーの異なるポリペプチド構成員をコードすることができる）を配置してアレイを形成する段階；および

(b) 前記 2 種類のレパートリーが交差する場所で、前記第 1 のレパートリーの前記ヌクレオチド構成員を含む細胞を、前記第 2 のレパートリーの構成員をコードするヌクレオチド配列でトランスフォームする段階；および場合によって

(c) 前記ヌクレオチド配列を発現させて、前記第 1 および第 2 のレパートリーの相当するポリペプチドを産生させる段階；および場合によって、

(d) 前記第 1 および第 2 レパートリーのポリペプチド構成員間の相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 5】

ポリペプチドの第 2 レパートリー的全構成員とペアとなった、ポリペプチドの第 1 レパートリー的全構成員からなるコンビナトリアルライブラリーの形成（および場合によりスクリーニング）方法において、

(a) 複数のヌクレオチド配列からなる第 1 のレパートリー（各配列が前記第 1 のレパートリーの異なるポリペプチド構成員をコードすることができる）および複数のヌクレオチド配列からなる第 2 のレパートリー（各配列が前記第 2 のレパートリーの異なるポリペプチド構成員をコードすることができる）を、前記第 1 のレパートリーの実質的に全ての構成員が前記第 2 のレパートリーの実質的に全ての構成員と交差するように配置してアレイ

10

20

30

40

50

を形成する段階；および

(b) 前記第 1 および第 2 レポートリー-の両方の構成員でトランスフォーム可能な宿主細胞と、(a) で形成されたアレイとを接触させる段階；および場合によって

(c) 前記ヌクレオチド配列を発現させて、前記宿主内部に前記第 1 および第 2 のレポートリー-の相当するポリペプチドを産生させる段階；および場合によって、

(d) 前記によって形成されたアレイを用いて、前記第 1 および第 2 レポートリー-の構成員の存在を必要とする機能的アッセイを行う段階

を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

ポリペプチドの第 2 レポートリー-の実質的に全ての構成員とペアとなったポリペプチドの第 1 レポートリー-の実質的に全ての構成員からなるコンビナトリアルライブラリー-の形成 (および場合によりスクリーニング) 方法において、 10

(a) 前記第 1 のレポートリー-の実質的に全てのヌクレオチド構成員を含む細胞が、前記第 2 のレポートリー-の実質的に全てのヌクレオチド構成員を含むウィルスと交差するように、複数のヌクレオチド配列 (それぞれが前記第 1 のレポートリー-の異なるポリペプチド構成員をコードすることができる) を含む宿主細胞のレポートリー-および複数のヌクレオチド配列 (それぞれが前記第 2 のレポートリー-の異なるポリペプチド構成員をコードすることができる) を含む複数のウィルスを配置してアレイを形成する段階；および

(b) 前記 2 種類のレポートリー-が交差する場所で、前記第 1 のレポートリー-の前記ヌクレオチド構成員を含む細胞を、前記第 2 のレポートリー-のヌクレオチド構成員を含むウィルスに感染させる段階；および場合によって 20

(c) 前記ヌクレオチド配列を発現させて、前記第 1 および第 2 のレポートリー-の相当するポリペプチドを産生させる段階；および場合によって、

(d) 前記第 1 および第 2 レポートリー-のポリペプチド構成員間の相互作用を検出する段階

を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 7】

ポリペプチドの第 2 レポートリー-の、実質的に全ての構成員とペアとなった、ポリペプチドの第 1 レポートリー-の、実質的に全ての構成員からなる酵母 2 ハイブリッドライブラリー-の形成 (および場合によりスクリーニング) 方法において、 30

(a) 前記第 1 のレポートリー-の実質的に全てのヌクレオチド構成員を含む酵母細胞が、前記第 2 のレポートリー-の実質的に全てのヌクレオチド構成員を含む酵母細胞と交差するように、複数のヌクレオチド配列 (それぞれが前記第 1 のレポートリー-の異なるポリペプチド構成員をコードすることができる) を含む酵母細胞および複数のヌクレオチド配列 (それぞれが前記第 2 のレポートリー-の異なるポリペプチド構成員をコードすることができる) を含む酵母細胞を配置してアレイを形成する段階；および

(b) 前記 2 種類のレポートリー-が交差する場所で、前記第 1 のレポートリー-の構成員を含む酵母細胞を、前記第 2 のレポートリー-の構成員を含む酵母細胞と交配させる段階；および場合によって

(c) 前記ヌクレオチド配列を発現させて、前記第 1 および第 2 のレポートリー-の相当するポリペプチドを産生させる段階；および場合によって、 40

(d) 前記第 1 および第 2 のレポートリー-のポリペプチド構成員間の相互作用を検出する段階

を有することを特徴とする方法。

【請求項 4 8】

前駆体の 2 種類 (またはそれ以上) のレポートリー-からなるコンビナトリアルケミカルライブラリー-を形成 (および場合によりスクリーニング) することで、第 1 の化学前駆体レポートリー-の実質的に全ての構成員を第 2 の化学前駆体レポートリー-の実質的に全ての構成員とともに組み立てる方法において、

(a) 前記第 1 の化学前駆体レポートリー-の実質的に全ての構成員が第 2 の化学前駆体レ 50

パーティリーの実質的に全ての構成員と並置されるように、前記第1および第2の化学前駆体レパートリーを配置してアレイを形成する段階；および

(b) 前記第1の化学前駆体レパートリーの構成員と前記第2の化学前駆体レパートリーの構成員とを組み立てて、新規化合物の組み合わせアレイを形成する段階；および場合によって

(c) 何らかの生物学的相互作用について前記新規化合物アレイをスクリーニングする段階

を有することを特徴とする方法。

【請求項49】

一連の交差する線、チャンネルまたは管を用いて前記アレイを形成する請求項44ないし47のいずれかに記載の方法。 10

【請求項50】

各線、チャンネルまたは管が前記レパートリーの特定の構成員に結合しやすくなるように、タグ付けシステムによってアレイ中での前記レパートリーの構成員の位置が方向付けされる請求項1ないし49のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、2以上の分子レパートリーを互いに対してスクリーニングしたり、かつ/または2以上のレパートリーを組み合わせることで組み合わせレパートリーを形成およびスクリーニングしたりするのに用いることができる方法に関する。詳細には本発明は、2種類の分子レパートリーをスクリーニングするのに、第1のレパートリーの実質的に全ての構成員(m e m b e r)を、機能的相互作用に関して第2のレパートリーの実質的に全ての構成員に対して調べることができる方法に関する。さらに本発明は、重鎖のレパートリーを軽鎖のレパートリーと組み合わせることで、重鎖と軽鎖の実質的に全ての組み合わせによって形成される抗体を1以上の標的リガンドに対してスクリーニングすることができるようにする抗体レパートリーの形成およびスクリーニングに関する。 20

【0002】

発明の背景

各種ゲノムのマッピングおよび配列決定によって、最終的にこれらの生物が発現する全てのタンパク質のクローニングが行われる。これらのタンパク質の相互作用マップを作成するためには、2次元スクリーニングを行って、全てのタンパク質の、全ての他のタンパク質に対する結合を調べることができるようにする必要がある。 30

【0003】

2次元スクリーニングは、他の多くの利用分野でも必要とされる。例えば、モノクローナル抗体の産生と組み合わせたマウス免疫感作などの方法ならびにファージディスプレイなどの*i n v i t r o*選択方法を用いて、同時に多くの異なる標的に対して多くの異なる抗体が作製されている。どの抗体がどの標的に結合するかを確認するためには、これらの集合についてデコンボリューション(*d e c o n v o l u t i o n*)を行う必要があり、それには複雑なスクリーニング法が必要とされる。 40

【0004】

さらに、治療用に低分子の薬物をヒト標的に対し得ようとする場合、あるヒトタンパク質が推定候補薬剤に結合する度合だけでなく、その候補薬剤の他のヒトタンパク質との交差反応(それがあつた場合)の度合、または他の関連薬剤がより良好な結合剤であるか、および/または相対的に交差反応性が低いか否かも確認することは有用であると考えられる。

【0005】

上記の例はいずれも、分子の第1の集合(またはレパートリー)の構成員間の相互作用を、分子の第2の集合(またはレパートリー)の全ての構成員に対して迅速に調べることができる方法を必要とする。現在のところそのようなスクリーニングは一般に、試薬の組み合わせを区画されたウェルに分配するか、あるいは膜上のスポットの形で互いの上に分配 50

して、試験対象の全ての試薬組み合わせが別個のウェル/スポットに存在するようにすることで行われる。従って、100種類の分子のレポーターを、やはり100種類の分子からなる異なるレポーターに対して試験するとした場合、それら2種類のレポーターの構成員の全ての組み合わせを完全に網羅するためには、10000個のウェル/スポットが必要となると考えられる。そのような不連続に配置された組み合わせを形成するには、2成分相互作用の場合、相互作用を誘発または検出するのに必要と考えられる分配作業以外に、存在するウェルまたはスポットの2倍の分配「作業」、この場合には20000回の作業が必要になると考えられる。各レポーター中の構成員数が直線的に増えるに連れて、組み合わせの数とそれに伴って分配作業数は指数関数的に増える。実際に、例えば100種類のみ抗体重鎖のレポーター、100種類のみ抗体軽鎖のレポーター、および100種類のみ抗原候補物のレポーターが関与する3成分相互作用の場合、100万回もの「分配」作業が必要になると考えられる。

10

#### 【0006】

##### 発明の概要

本発明者らは、2種類の分子レポーター中の全構成員間での、全ての可能な相互作用を調べるのに用いることができる、本発明者らがマトリクススクリーニングと称している方法であって、これらのレポーターの構成員個々の組み合わせを区画化する必要性をなくす方法を開発した。

#### 【0007】

本発明の第1の態様によれば、第1の分子レポーターを第2の分子レポーターに対してスクリーニングして、前記第2のレポーターの構成員と相互作用する前記第1のレポーターの構成員を確認する方法において、

20

(a) 前記第1のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第2のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるように、少なくとも一つのアレイを形成するよう、前記第1および第2のレポーターを配置する段階；ならびに

(b) 前記第1のレポーターと前記第2のレポーターの構成員間での相互作用を検出する段階

を有することを特徴とする方法が提供される。

#### 【0008】

最も広い形態において本発明は、2種類の分子レポーターを互いに対してスクリーニングする方法を提供する。その2種類のレポーターの個々の構成員は、両方のレポーターの構成員の実質的に全ての組み合わせの並置が可能となるように空間配置する。本明細書で「実質的に全ての組み合わせ」（または「実質的に全ての構成員」）に言及する場合にはそれは、ある種の並置が偶然や設計によって起こり得ないことを排除しないものであることは明らかである。しかしながら本発明は、2種類の分子レポーターを互いに対して同時にスクリーニングすることを必要とし、単一のレポーターを第2のレポーターの個々の構成員でスクリーニングすることを除外するものである。好ましくは「実質的に全ての」とは、レポーター構成員の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を指す。

30

40

#### 【0009】

本発明によれば並置は、例えば、2つのレポーターのそれぞれについて互いに交わる一連の線を形成することで達成できる。それらの線は、直線、実質的に平行な線または曲線、あるいはそれらの組み合わせであることができる。唯一の制限は、第1のレポーターの実質的に全ての構成員が第2のレポーターの実質的に全ての構成員と交差できるようにしなければならないという点である。相補的構成の例としては、平行直線に対してある角度で配置された平行直線；星型の放射状線とともに使用される同心円または多角形などがある。当業者であれば、本発明に従って、レポーター構成員を同様に空間配置させるためのその他多くのシステムを想起するであろうが、それらはいずれも、何らかの形の第1のレポーターの各構成員に相当する連続線、流線、チャンネルまたは流れであって、

50

そのうちの実質的に全てが第2のレパートリーの実質的に全ての構成員に相当する実質的に全ての線、流線、チャンネルまたは流れと交差することができるような配分により特徴づけられたものである。それには、第2のレパートリーの管と交差する、第1のレパートリーの各構成員に対する管、あるいは個々のレパートリー構成員が流れることができる固体材料に切り込まれたチャンネルなどがある。

**【0010】**

従って本発明の第2の態様によれば、前記第1レパートリーおよび前記第2レパートリーの両方の構成員を、それぞれが前記第1または前記第2のレパートリーの構成員を含む一連の線、チャンネルまたは管に配置して、前記第1のレパートリーに相当する線、チャンネルまたは管と前記第2のレパートリーに相当するものが互いに接触して、前記第1のレパートリーの実質的に全ての構成員が前記第2のレパートリーの実質的に全ての構成員と並置されるようにする方法が提供される。

10

**【0011】**

本発明の文脈において「一つの」構成員は、ただ一つの構成員または少なくとも一つの構成員を意味することができる。有利にはそれは、ただ一つの構成員を指す。しかしながら別の態様では本発明はさらに、各線、チャンネルまたは管における、レパートリーの複数構成員からなる群の使用をも提供するものである。好ましくはそのような群は、10以下の構成員、有利には5以下の構成員からなるものであるが、少なくとも2個の構成員を有する。

**【0012】**

先行技術における区画されたコンビナトリアルスクリーニングと比較した本発明による交差する線、チャンネル、流線または流れの使用の利点は、個々のレパートリーのサイズが直線的に大きくなるにつれ、レパートリー構成員の全ての組み合わせをスクリーニングするのに必要とされる分配段階の数も直線的に増えるという点である。例えば、ウェルを用いるスクリーニング法では100×100のレパートリーをスクリーニングするのに10000回の分配段階が必要になると考えられるが、本発明によるスクリーニングでは、わずか200回の分配段階が必要だけである。さらに、1回の分配作業を行うことで各レパートリーの各構成員を空間的に配置することから、第1のレパートリーの個々の構成員と並置された第2のレパートリーの構成員との間の相互作用の比較がより正確になる。さらに、本発明はスポットではなく交差線を使用したり、あるいはウェルではなく交差チャンネルを使用することから、可能な相互作用の実質的に全ての組み合わせについて試験を行うのに、さほど高い位置的な正確性は要求されない。すなわち、2次元スクリーニングを行う場合であって、第1のレパートリーの1構成員に相当する1本の線が例えば1mmだけずれている場合、その線は第2のレパートリーからの実質的に全ての線に対してある角度を形成して配置されていることから、その線はなおも実質的に全ての線と交差しており、従って相互作用の実質的に全ての組み合わせについて試験が良好に行われる。他方、第1のレパートリーの1構成員に相当するスポットが例えば1mmだけずれている場合、それらは第2のレパートリーの構成員に相当するスポットから完全にはずれる可能性があることから、多くの組み合わせの相互作用の試験が行われなくなる。従って本発明は、自動スクリーニング方法だけでなく、位置的正確さが保証できず、分配作業の数を制限しなければならぬ手動法にも好適である。

20

30

40

**【0013】**

以上説明したように、線、チャンネルまたは管は多様な形式で配置することができ、単一の支持体上または複数の支持体上に配置することができる。最も簡単な構成では、分子を単一の支持体上、例えばニトロセルロース膜上に線の形態で手動により引くことができる。それらの線は、ロボット技術を用いて好適な支持体に施すこともでき、それによってアレイの正確さおよび密度を本発明で非常に有利な程度に高めることができる。本発明の有利な態様では、複数支持システムを用いることができ、その場合には、線のアレイを別個の支持体上に設け、次にそれらの支持体を並置することで、レパートリーの構成員間における相互作用を評価することができる。

50

## 【0014】

従って本発明の第3の態様では、第1の分子レポーターを第2の分子レポーターに対してスクリーニングして、第2レポーターの1以上の構成員と相互作用する、第1レポーターの1以上の構成員を確認する方法において、

- (a) 第1および第2の支持体上に第1および第2のレポーターを配置する段階；
- (b) 前記第1のレポーターの実質的に全ての構成員が前記第2のレポーターの実質的に全ての構成員と並置されるように、前記第1の支持体と前記第2の支持体を並置させる段階；ならびに
- (c) 前記第1のレポーターと前記第2のレポーターの構成員間の相互作用を検出する段階

10

を有することを特徴とする方法が提供される。

## 【0015】

本発明はまた、より高次のアレイ、例えば3次元アレイにも適用可能である。そこで、酵素、基質および補因子などの3成分相互作用を、3次的に配置された線、チャンネルまたは管を用いてスクリーニングすることができる。別の形態では、3成分は抗体重鎖、抗体軽鎖および抗原であることができると考えられ、それらのレポーターを3次元でスクリーニングすることができる。本発明による2次元、3次元またはそれより高い次元でのレポーターのスクリーニングは、包括的なコンビナトリアルスクリーニングを行うことが必要と考えられる分配（またはピペット注入）作業の数が減ることから非常に有利である。すなわち、先行技術における従来の方法を用いる、例えば300種類の構成員からなる2種類のレポーターの互いに対するスクリーニングでは、少なくとも90000回の個別の分配作業が必要になると考えられ、例えば300種類の構成員からなる3種類のレポーターの互いに対するスクリーニングでは、少なくとも270万回の分配作業が必要になると考えられる。それに対して本発明では、同じレポーターを包括的にスクリーニングするための分配作業数がそれぞれ600回または900回まで減らせ、時間および労力の大幅な削減となる。

20

## 【0016】

従って本発明の第4の態様によれば、第1、第2および第3の分子レポーターを互いに対してスクリーニングして、相互作用する前記第1、第2および第3のレポーターの構成員を確認する方法において、

30

- (a) 前記第1、第2および第3のレポーターを少なくとも一つのアレイを形成するように配置して、前記第1、第2および第3のレポーターの実質的に全ての構成員が並置されるようにする段階；ならびに
  - (b) 前記第1、第2および第2のレポーターの構成員間の相互作用を検出する段階
- を有することを特徴とする方法が提供される。

## 【0017】

多次元アレイは、多くの方法で作製することができる。有利には、第3の次元は、フィルターやその他のそのような膜を積み重ねて分子を移動させる毛細管作用を利用することで、あるいは、電気泳動もしくは浸透などの手段によって積層物に強制的に分子を通すことで、あるいは積層物を貫通させることで、あるいは積層物を形成する浸透性フィルターを用いることにより形成される。

40

## 【0018】

さらに第3の次元は、チャンネルの交差部に（第1および第2のレポーターの場合）、孔を有してその孔が（ひとたび膜を積層すると）第3のレポーターの構成員が通過できる第3次元の付加的なチャンネル集合を形成するような非透過性層を積層することにより形成することができる。

## 【0019】

さらに別の実施形態では、前記第3の次元は、ゲルまたは類似のそのような物質のブロックを用いて形成することができ、それはx面、y面およびz面に沿ってそれぞれ第1、第2および第3のレポーターの構成員を注入することが可能で、そのようにして3次元空

50

間にアレイを形成するチャンネルを形成することができる。

【0020】

さらに、第1、第2（そして場合により第3）の分子レパートリーの構成員間の相互作用マトリクスを、互いに隣接して配置された交差管または半透過管のネットワークを用いて形成することができる。

【0021】

第1、第2（および場合によって第3）の分子レパートリーの構成員は、同じレパートリーからの異なる構成員と置き換えて、相互作用の新たな組み合わせや集合をスクリーニングすることができる。

【0022】

本発明を用いて多成分および多鎖の相互作用を迅速にスクリーニングすることができることから、それを、例えば、抗体もしくはT細胞受容体ライブラリーなどの分子のコンビナトリアルライブラリーの同時形成およびスクリーニングに適用することもできる。すなわち、重鎖および軽鎖の遺伝子を組み合わせることで抗体の広範なコンビナトリアルライブラリーを形成し、得られる対合を別個にスクリーニングする代わりに、対合自体を本発明に従って形成し、場合によって1以上の標的抗原に対してスクリーニングすることができる。そこで例えば、1000種類の重鎖を1次元で線として引くことができると考えられ、1000種類の軽鎖を別の次元で線として引いて、実質的に全ての重鎖線が実質的に全ての軽鎖線と交差して、その交差部において完全に機能を有し折り畳まれた抗体分子を形成することができ、それを次に並置させた抗原、例えばその交差する重鎖線および軽鎖線と接触するようになるさらに別の支持体上にコーティングされたものでスクリーニングすることができる。この実施形態によれば、1000種類の重鎖および1000種類の軽鎖の実質的に全ての組み合わせ、すなわち計100万種類の異なる抗体は、先行技術のスクリーニング法に従えば使用しなければならないと考えられる100万回ではなく、わずか2000回の分配作業を用いてスクリーニングされる。これによって、特異的相互作用についての「単純な」スクリーニングを行う迅速な方法が提供される。そこで例えば、構成員（またはいずれかの関連する構成員）がある標的抗原（またはそれらの関連する標的抗原）と接触したことがないかそれに対して選択されたことがない重鎖のレパートリーおよび軽鎖のレパートリーを、標的抗原に対してスクリーニングして、特異的結合性重鎖および軽鎖の対合を確認することができる。

10

20

30

【0023】

そこで本発明の第5の態様では、それぞれが第1のレパートリーの1構成員および第2のレパートリーの1構成員を有する二本鎖ポリペプチドのコンビナトリアルライブラリーを形成およびスクリーニングする方法において、

(a) 第1および第2のレパートリーを配置して、前記第1のレパートリーの実質的に全ての構成員が前記第2のレパートリーの構成員に対して並置されるように少なくとも一つのアレイを形成することで、機能的な二本鎖ポリペプチドの実質的に全ての組み合わせを設ける段階；ならびに場合により

(b) 前記二本鎖ポリペプチドと標的分子との間の相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法が提供される。

40

【0024】

好ましくは、前記コンビナトリアルライブラリーは、抗体もしくはT細胞受容体ライブラリーであり、前記2種類のレパートリーは重鎖および軽鎖（抗体ライブラリーの場合）または鎖および鎖（T細胞受容体ライブラリーの場合）からなる。

【0025】

そのようにして得られるコンビナトリアルライブラリーについて、好ましくは複数の標的分子との相互作用のスクリーニングを行う。そうして、標的分子を標的分子の群またはそのレパートリーの形で提供し、本明細書に記載の3次元アレイにおいてスクリーニングすることができる。

【0026】

50

好ましくは、本発明による方法を用い、3次元で第1、第2および第3の分子レポーターを用いて3本鎖ポリペプチドライブラリーを形成する（そして場合によりスクリーニングする）ようにすることができる。

【0027】

第1、第2（および場合によって第3）のレポーター間の相互作用のパターンを用いて、陽性相互作用、陰性相互作用、特異的相互作用または交差反応相互作用を確認したり、あるいは第1のレポーター（第2および/または場合により第3のレポーターとの相互作用パターンを用いて）、第2のレポーター（第1および/または場合により第3のレポーターとの相互作用パターンを用いて）および/または第3のレポーター（構成員第1および/または第2のレポーターの構成員との相互作用パターンを用いて）の構成員間の類似性を推定する系統樹を構築することができる。

10

【0028】

本発明に従ってスクリーニングされる相互作用の多くに、核酸配列の発現によって直接または間接的に誘導されたポリペプチドが含まれることから、その核酸自体を本発明による線、チャンネルまたは管に配置し、発現させて、それらに相当するポリペプチドを産生させることが非常に有利である。そのようにして、前記2種類のレポーターのそれぞれからの交差するポリペプチドと一緒に発現される。特に、例えば抗体の場合のように、2種類のレポーター構成員の会合が協同的折り畳みに依存している場合に、このことはそれらの会合に役立ち得る。さらに、レポーター構成員の相互作用に関する情報が、それらをコードする遺伝子情報と空間的に連結される。その遺伝子情報は、相互作用の座標を計算し、その線、チャンネルまたは管上のいずれかの点からの相当するヌクレオチド配列データを取り出すか、あるいは交差部自体からのヌクレオチド配列データを取り出すことで確認することができる。

20

【0029】

従って本発明の第6の態様では、第1、第2および場合によって第3のレポーターの1以上が、アレイにおいて、相当するポリペプチドを *in situ* で産生するために発現される複数の核酸分子を有するようにする方法が提供される。

【0030】

本発明は2以上のレポーターの互いに対する迅速かつ効率の良いスクリーニングに関するものであることから、現在使用されている分子相互作用を促進または妨害する方法を本発明とともに用いることができる。そこで、一方のレポーターは遊離ハプテンの変種からなることができ、他方のレポーターは選択抗ハプテン抗体からなることができる。両方のレポーターを固定化型の標的ハプテン分子の近位に配置することで、スクリーニングを行って、ある種の遊離ハプテン変種に結合することで固定化標的ハプテンへの結合に対し競合する抗体を確認することができる。この場合、結合がないことが陽性の結果と見なされるものと考えられる。そのような実験に対するコントロールには、その遊離ハプテンと平行な水の線および抗ハプテン抗体と平行な非ハプテン結合抗体の線などがあり得る。別の形態として、一つの遊離ハプテンを用いて、抗ハプテン抗体のレポーター構成員の、異なる固定化ハプテン変種のレポーターの構成員への結合を妨害することができると考えられる。他の第3の分子には、レポーター構成員の相互の結合を促進し、それ自体を本発明によるレポーターの形で用いることができる物質などがあると考えられる。そのようにして、標的分子を固体支持体に固定化することができると考えられ、結合剤および結合剤促進剤の交差するレポーターを標的分子と接触させるようにすることができると考えられる。当業者には、そのような分子およびレポーター構成員の多くの異なる組み合わせが想到されよう。

30

40

【0031】

従って本発明の第7の態様では、第1の分子レポーターを第2の分子レポーターに対してスクリーニングして、互いとの相互作用が第3の分子または分子集合の有無によって決まる第1および第2のレポーターの構成員を確認する方法において、

(a) 第1および第2のレポーターを配置して、前記第1のレポーターの実質的に全

50

ての構成員が前記第2のレパートリーの実質的に全ての構成員と並置されるように少なくとも一つのアレイを形成する段階；ならびに

(b) 各種濃度の前記第3の分子または分子集合の存在下に、前記第1のレパートリーの構成員と前記第2のレパートリーの構成員との間の相互作用を検出する段階を有することを特徴とする方法が提供される。

#### 【0032】

本発明の方法は、非常に大きいレパートリーからの主要な標的および分子の最初の確認と治療介入用の標的または薬剤の最終的な確認との間のギャップに橋渡しをするものである。この問題は先行技術では、可能な陽性相互作用物のELISAスクリーニングを用いることで対処される。しかしながらELISAのプロトコールは、自動化して高スループットとするのは容易ではない。本発明による方法の非常に高い平行性は、各レパートリーの構成員についての包括的な相互作用プロファイルを明らかにするものである。それによって例えば、あるタンパク質ファミリー全体と相互作用するリガンドを、そのファミリーの部分集合のみと反応するものと識別することができ、交差反応薬剤を開発プログラムから除外することができ、抗体の真の特異性および交差反応性を確認することができる。抗体交差反応性、従ってその特異性の確認は、免疫感作マウスから、あるいは例えばファージディスプレイによって行われる*in vitro*選択から派生した異なる抗体群がある場合に極めて重要である。マトリクススクリーニングは、それによって非常に広範囲の抗原を群内の各抗体に対して調べ、下流側の研究を妨害する未知で望ましくない交差反応の機会を低減することができることから、その文脈において特に強力である。

#### 【0033】

別の形態として、本発明を用いて大きい包括的なコンビナトリアルライブラリーを形成およびスクリーニングすることで、わずか2000回の分配作業を用いて、100万のクローン抗体ライブラリーを形成およびスクリーニングすることができると考えられる。さらに、豊富な相互作用ペア情報源から、あるいは可能性としては、本発明による非常に高密度のマトリクスとともに全プロテオームを用いることで、複雑なタンパク質-タンパク質相互作用マップを形成することができる。

#### 【0034】

本発明はさらに、ファージディスプレイおよび他の発現-表示法の重要な利点を有するものであり、すなわち、ポリペプチドレパートリーの構成員をコードする核酸をその相当するポリペプチドと空間的に会合させることができ、従って個々のポリペプチドの機能特性に基づいて選択することができる。しかしながら、表面にポリペプチドを示す細菌細胞を用いて核酸およびポリペプチドを区画することでその会合を達成するファージディスプレイとは異なり、本発明は、新規なアレイ形成戦略を利用して、その会合を提供するという長所を有する。核酸およびポリペプチドを細菌細胞内またはその表面に保持する必要性を排除することで本発明は、酵素活性、立体配置または他の検出可能な特性など、ポリペプチドの機能特性に基づいてポリペプチドレパートリーを選択するための結合活性の選択を超えて展開することができる。

#### 【0035】

上記のスクリーニングを行う上での試薬または手段に関連して、各種の装置を提供することができる。

#### 【0036】

#### 定義

本発明に従って使用される「レパートリー」という用語は、例えばアミノ酸配列が異なる多様なポリペプチド変種の群、ヌクレオチド組成および/または配列が異なるDNA変種の群、あるいは多くの異なる形態で存在し得る他の種類の分子の群を指す。一般にはレパートリーには、10を超える異なる変種が含まれる。大きいレパートリーは、選択に供される非常に多くの数の可能な変種を含み、 $10^{13}$ の大きさになる場合がある。比較的小さいレパートリーは、特にそれが予め選択されて、特に有用な小群（例えば、細胞表面マーカーに結合する抗体、ある種の反応群を触媒する酵素、他のタンパク質に結合するタン

10

20

30

40

50

パク質など)を富化している場合、あるいは望ましくない構成員(停止コドンをもつもの、正しい折り畳みを行うことができないもの、あるいは他の形で不活性なものなど)を除去している場合に特に有用である。そのような比較的小さいレパートリーは、 $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ またはそれ以上のポリペプチドを有することができる。有利には、比較的小さいレパートリーは、 $10 \sim 10^4$ のポリペプチドを有する。

#### 【0037】

本発明では、ポリペプチドの2以上のレパートリーを互いに対してスクリーニングする。有利には、構成員または各レパートリーの少なくとも50%を各スクリーニングで互いに対してスクリーニングする。好ましくは、各レパートリーの構成員の60%、70%、80%、90%、95%または100%をそのようにスクリーニングする。

10

#### 【0038】

本発明の文脈において「相互作用する」とは、各種レパートリーを構成する分子(および適宜、スクリーンを構成する別の分子)間の検出可能な相互作用を指す。例えば抗体-抗原相互作用の場合、一方のレパートリーは多様な抗体群を含み、他方は多様な抗原群を含み、その相互作用は結合相互作用であるものと考えられる。別の形態として相互作用は、一方のレパートリーが酵素からなり、他方のレパートリーがそれらの基質からなる酵素触媒反応であることができる。本発明を用いて、結合相互作用、DNAメチル化、核酸分解、核酸開裂(1本鎖または2本鎖)、シグナル伝達事象、触媒反応、リン酸化事象、グリコシル化事象、タンパク質分解開裂、化学反応、細胞感染およびそれらの組み合わせなどの相互作用についてアッセイを行うことができる。そのような相互作用の検出は、当業界

20

#### 【0039】

本発明の文脈において「分子」とは、スクリーニングに使用することができる物質を指す。そのような分子には、ペプチド、ポリペプチド、核酸分子、精製タンパク質、組換えタンパク質、アミノ酸、cDNA、発現cDNA、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁物、関連する遺伝子のファミリーまたはその相当するタンパク質、酵素、DNA結合タンパク質、免疫グロブリンファミリーの構成員、抗体、T細胞受容体、ハプテン、小有機分子、非有機化合物、金属イオン、炭水化物およびこれらの組み合わせなどがあり得る。そのような分子のレパートリー形成は当業界では公知である。「ポリペプチド」とは、発現cDNA、免疫グロブリンスーパーファミリーの構成員、抗体ポリペプチドまたはT細胞受容体ポリペプチドなどのポリペプチドを意味することができる。有利には抗体レパートリーは、予め組み立てられまたは組み立てられ、本発明に従ってスクリーニングされる重鎖( $V_H$ )および軽鎖( $V_L$ )の両方のポリペプチドを含むレパートリーを含むことができる。本明細書で使用される抗体ポリペプチドとは、修飾または未修飾の抗体または抗体の一部であるポリペプチドである。従って、抗体ポリペプチドという用語には、重鎖、軽鎖、重鎖-軽鎖二量体、Fab断片、 $F(ab)_2$ 断片、Dab断片、軽鎖もしくは重鎖単ドメインおよび1本鎖Fv( $scFv$ )もしくはジスルフィド結合Fv( $dsFv$ )などのFv断片などが含まれる。そのような抗体分子およびそれをコードする核酸の構築方法は、当業界では公知である。しかしながら「ポリペプチド」は、酵素、抗原、薬物、受容体分子などの細胞シグナル伝達に関与する分子あるいは標的分子と相互作用することができる比較的大きいポリペプチドの1以上の個々のドメインなどの他のポリペプチドを指すことができる。本発明による分子は、上記のような分子を産生する細胞の形での細胞形で、あるいは細胞内に含まれない非細胞形で提供することができる。細胞は例えば、細菌細胞、下等真核細胞(例:酵母)または高等真核細胞(例:昆虫細胞、両生類細胞、鳥類細胞または哺乳類細胞)であることができる。酵母細胞の使用も想到される。

30

40

#### 【0040】

本発明の文脈において、「細胞群」という用語は、細胞の集合を指す。細胞群を含む細胞は、全て同一の生物種および細胞種であることができるか、あるいは混合群であることができる。細胞群の1実施形態は、例えば所定の遺伝子コード配列の変種をコードするライ

50

ブラリーでトランスフォームされた哺乳動物線維芽細胞などの実質的に均一な細胞群を含む。

【0041】

本発明の文脈において、「ウィルス群」という用語は、ウィルス粒子の集合を指す。ウィルス群を含む粒子は、全てが同一の生物種および株のものであることができるか、あるいは混合群であることができる。ウィルス群の1実施形態は、例えばレトロウィルス粒子などの組換えまたはランダム突然変異粒子の群を含む。ウィルス群は、1以上の遺伝子コード配列の変種を有する複数の個体を含むことができる。

【0042】

本発明の文脈における「並置」には物理的接触が含まれるが、それに限定されるものではない。本発明による2以上のレパートリーを、レパートリーの構成員間の相互作用部位をその位置に関連付けることができるような形で、分子が互いに相互作用することができるよう並置することができる。別の形態として、レパートリーをお互いに、および標的分子と並置して、レパートリーの構成員が互いに相互作用し、その後一体となって標的分子と相互作用するようにすることができる。

【0043】

本明細書で言及される「アレイ」とは、レパートリー構成員の所定の空間配置である。アレイはいかなる物理的形態を取ることにもできる。アレイは、手動または自動化された手段によって作製することができ、好ましいアレイ作製法についてはさらに後述する。

【0044】

「分配作業」は、ある物質をある個別の場所から第2の個別の場所に移動させる単一作業である。個別の場所は、ウェル、管、チャンネル、スポット、線、矩形、球形、立方体などの形態であることができる。単一分配作業の例には、

(i) ある管もしくはウェルから第2の管もしくはウェルへの液体のピペット注入(この場合、同一液体の少量サンプルの、複数の管またはウェルへのピペット注入は、2以上の異なる液を同一の管またはウェルに分配する場合のように、複数の分配作業と見なされるものと考えられる);あるいは、

(ii) ピン移動によって原液ウェルから膜に液体を移動させて、その液のスポットを形成すること(この場合、同一原液ウェルからの、膜上の異なる接種位置への第2の少量サンプルのスポット形成は、別個の分配作業と見なされると考えられる);あるいは

(iii) 単一の原液ウェルから液体を移動させて、膜上に1本の連続線を形成すること(この場合、同じ液体のものであっても第2の別の線を形成することは、別個の分配作業と見なされるものと考えられる);あるいは

(iv) 管またはチャンネルへの溶液の滴下分配(この場合、同一の管もしくはチャンネルへの異なる液の滴下分配、または異なる管もしくはチャンネルへの同一液の滴下分配は、別個の分配作業と見なされると考えられる)などがある。

【0045】

本発明の文脈における「マトリクス」とは、2以上の分子レパートリーにおける実質的に全ての構成員間の実質的に全ての可能な相互作用を調べるのに用いることができる、特定の種類のアレイである。そのようなマトリクスは、それぞれがレパートリーの1以上の構成員を有する一連の交差する線、チャンネルまたは管を有することができる。一つのマトリクスは、多くの個々の線、チャンネルまたは管ならびにさらに多くの交差部または交点を有する。

【0046】

本明細書で使用される「促進」という用語は、所定の分子または複数の分子の存在下で、その分子または複数分子が存在しない場合の相互作用と比較して、検出される相互作用が少なくとも10%増加することを意味する。

【0047】

本明細書で使用される「妨害」という用語は、所定の分子または複数の分子の存在下で、その分子または複数分子が存在しない場合の相互作用と比較して、検出される相互作用が

少なくとも10%低減することを意味する。

【0048】

本明細書で使用される「細胞画分」という用語は、細胞分画工程から得られる細胞溶解物の一部を意味する。細胞分画法の非限定的な例としては、界面活性剤抽出、塩抽出、酸沈殿、脂溶性成分の抽出、膜単離、水溶性成分または水系成分の抽出、核/細胞質分画および遠心力による分離（例：S-100画分）などがある。細胞分画法と見なされる他の分離には、核酸単離、細胞溶解物もしくは分画細胞溶解物の成分のクロマトグラフィー分離、分取電気泳動分画、イオン交換およびアフィニティ分離（例：免疫沈殿または免疫アフィニティクロマトグラフィー、His/Ni<sup>++</sup>相互作用、GST/グルタチオン相互作用など）などがある。

10

【0049】

図面の簡単な説明

図1：数百の異なる抗体を数百の異なる抗原に対して同時にスクリーニングして相互作用するペアを確認できると考えられる方法を示す、本発明による抗体レパートリーを抗原レパートリーに対してスクリーニングする1方法の概略。特異的相互作用を図示してある。

【0050】

図2：手動で作成したマトリクスを用いるs c F v類の分析。この図では、21種類の抗原（横方向）を16種類のs c F v（縦方向）に対してスクリーニングする。4種類のs c F vが、ファージ選択によりユビキチンに対して選択されている（U b 1 b 1、U b 1 a 1、R 13およびR 14）。2種類の抗原クローン（QおよびT）がユビキチンであることが知られており、5種類の他のクローン（A、P、R、SおよびU）がおそらく抗ユビキチンs c F vと結合することが一次スクリーニングで確認されている。この4種類の抗ユビキチンs c F vのそれぞれが、2種類の既知ユビキチンクローンおよび前記5種類の潜在的なユビキチンクローンの各々と結合する。しかしながら、s c F v U b 1 b 1およびs c F v R 14の交差反応性が非常に高いことがわかる。

20

【0051】

図3：x、yおよびz次元での動きを可能とするロボットプラットフォームに搭載されるよう設計された本発明によるロボット線引き用ヘッド。1列の万年筆ペン先が懸濁液中のレパートリー構成員を毛細管現象によって好適な固体支持体上に送達する。ペン先は、固体支持体に対して至適な角度で液体を送達するように取り付けられており、次いで96ウェルマイクロタイタープレートからの液体吸い上げを停止することにより垂直に保持される。

30

【0052】

図4：ロボットによって作成されたマトリクスを用いるs c F vの分析。12種類の抗原の二重線（横方向）を、192種類のs c F v（縦方向）に対してスクリーニングする。特異的ペア形成の起こる交差部で特異的相互作用を認めることができる。さらに、ニトロセルロースと交差反応するs c F vが、実質的に全ての抗原と交差反応するs c F vと同様に、連続した横線として認められる（横方向のスポット形成）。

【0053】

図5：2本鎖抗体レパートリーの作成およびスクリーニングの例。（a）先行技術によるスポットアレイ。1．ウシ血清アルブミン（BSA）結合性重鎖、2．BSA結合性軽鎖、3．非結合性重鎖および軽鎖、あるいは4．BSA結合性重鎖および軽鎖を分泌する細菌を混合し、次いで固定化BSAの近傍で培養し誘導した。1および2は結合抗体を得るために混合する必要があることが示唆されている（対照である4で認められるように）。このスクリーニングを行うには32種類の別個の分配作業が必要であった。（b）本発明によるマトリクススクリーニングによって、わずか8回の分配作業を用いて同じスクリーニングを行うことができる（2との交差の下、1に対するシグナル（a signal for 1 down with 2 across）がないのはおそらく、誘発時にフィルター間に存在する気泡によるものである）。

40

【0054】

50

図 6 : 重鎖の線および軽鎖の線の密度を高くすることで、より密度の高い抗体アレイの作成およびスクリーニングが可能となる。そこで、24種類の抗BSA重鎖および48種類の抗BSA軽鎖をx軸およびy軸に垂直に描いて、BSAに対してスクリーニングされる1152通りのペア形成を行った。

【0055】

図 7 : 384種類の任意抽出した重鎖および384種類の任意抽出した軽鎖をx軸およびy軸に対して垂直に描き、ニトロセルロースフィルター上にコーティングされたBSAに対してスクリーニングした(147, 456通りの組み合わせ)。1組の特異的重鎖および軽鎖のペアを単離したが、それは後にニトロセルロースに対して結合性であることが確認された。

【0056】

図 8 : 本発明による3次元スクリーニングの模式図。この図では、レポトリの構成員はx軸、y軸およびz軸の平面に配置され、相互作用は交差面の各種頂点において生じる。

【0057】

図 9 : 3次元スクリーニングの概念を証明する図。抗BSA重鎖をある平面に設け、抗BSA軽鎖を第2の平面上に設け、BSAを第3の平面において設ける。それらの頂点での相互作用は、3成分全てが存在する場合にのみ検出される。

【0058】

#### 発明の詳細な説明

本発明によるマトリクスは多くの異なる方法で形成して、多くの異なる分子が関与する多くの異なる相互作用のスクリーニングを行うことができる。本発明は、2以上のレポトリの構成員の実質的に全ての組み合わせをスクリーニングする能力を特徴とする。本発明者らは、一連の交差線を用いてそれを行うことができることを明らかにしたが、最小数の分配作業を用いて2以上のレポトリのコンビナトリアルスクリーニングを行うことを可能とする他の手法も想到され、それには例えば交差するチャンネルまたは管の使用などがある。本発明者らの方法は、分子の連続群を並置して2次元または3次元の網目構造を形成することで、異なるレポトリの構成員が互いに一つとなり、相互作用する可能性があるという手法に基づくものである。これは、不連続のスポットまたは区画されたウェルを用いて分子の個々の組み合わせを分離する先行技術におけるスクリーニングプロトコールとは対照的である。本発明においては、連続的な線、チャンネルまたは管が互いに交差して、分子の個々の組み合わせがその交差箇所または交点に存在するようになっている。全体として見ると、それによって形成される分子「ウェブ」または「網目構造」を用いて、特定の相互作用するペアを確認できるだけでなく、2つのレポトリ間の相互作用の全体的パターンを確認することができる。そうして得られる情報を用いて、両方のレポトリの構成員の性能を互いに比較することができ、詳細にはその情報を用いて、マトリクス内の個々のレポトリ構成員の交差反応性を迅速に確認することができる。

【0059】

#### スクリーニングを行うためのレポトリ

構築について当業者には公知である多くの異なるレポトリを本発明とともに用いることができる。小有機分子のレポトリは、コンビナトリアルケミストリーの手法によって構築することができる。ペプチドのレポトリは、WO84/03564に記載のようなピンまたはロッド群の上で合成することができる。各ビーズが個々のレポトリ構成員であるペプチドレポトリを形成するビーズ表面でのペプチド合成が関与する類似の方法が、米国特許第4631211号に記載されており、関連する方法がWO92/00091に記載されている。ビーズに基づく方法の大幅な改善には、各ライブラリー構成員のアミノ酸配列の確認を容易にするための、オリゴヌクレオチドなど固有の識別タグによる各ビーズのタグ付けが含まれる。これらの改良されたビーズに基づく方法はWO93/06121に記載されている。

【0060】

10

20

30

40

50

これらのレパートリーはアレイ形成を行ってマトリクスを形成する前に構築することができると考えられるが、上記のいずれの技術も、本発明によるマトリクス自体において、直接のレパートリー構成員の *in situ* 合成（すなわち、レパートリー構築とレパートリースクリーニングの連携）に適用可能であることが想到される。実際、別の化学合成方法には、アレイにおける別個の所定位置に各個別のライブラリー構成員（例：固有ペプチド配列）を配置するような形での、表層でのペプチド（またはペプチド様物質）のアレイ合成が含まれる。従って、各ライブラリー構成員が何であるかは、アレイ中の空間位置によって決定される。所定の分子（例：受容体）と反応性ライブラリー構成員との結合相互作用が起こるアレイ中の位置を決定し、それによって空間位置に基づいて反応性ライブラリー構成員の配列を確認する。これらの方法については、米国特許第 5 1 4 3 8 5 4 号 ; WO 9 0 / 1 5 0 7 0 および WO 9 2 / 1 0 0 9 2 ; フォードらの報告 (Fodor et al. (1991) Science, 251: 767; ドワーらの報告 (Dower and Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem., 26: 271) に記載されており、本発明によるマトリクスの形成に容易に適合させることができるものと考えられる。

#### 【0061】

本発明は、タンパク質 - タンパク質相互作用、特に抗体 - 抗原相互作用のスクリーニングに特に有用である。本発明で有用な適切な抗体レパートリーの調製については、WO 9 9 / 2 0 7 4 9（この開示内容は参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されている。WO 9 9 / 2 0 7 4 9 には、免疫グロブリンのライブラリーを作成し、遺伝子リガンドを前選択できる方法および / またはそれを一つの主鎖配座を用いて作製する方法について記載されている。WO 9 9 / 2 0 7 4 9 に記載のライブラリーを、その明細書に記載の方法に従って、あるいは当業界で公知の方法によって宿主生物で発現させて、本発明でのアレイ形成および使用に好適なポリペプチドのレパートリーを得ることができる。別法ではポリペプチドを、本発明で用いるために *in situ* で合成する、あるいは *in vitro* の転写 / 翻訳を用いて発現させることができる。

#### 【0062】

##### レパートリー構成員のアレイ形成によるマトリクススクリーンの形成

本発明によれば、分子がそれ自体アレイ形成されるか、宿主細胞に存在してもしなくても良いアレイ形成されたヌクレオチド前駆物によって発現されるか否かに応じて、手動または自動の多様な方法のいずれかによって分子のアレイ形成を行って、マトリクスを形成することができる。アレイは有利にはロボット技術によって形成する。ロボット技術は正確かつ高密度のマトリクスを形成することが可能であり、容易に複製でき、例えば本発明に従って形成されるコンビナトリアル抗体レパートリーを多くの異なる標的リガンドに対してスクリーニングすることができるためである。ロボットプラットフォームは当業界では公知であり、機械は、小さな表面または広い表面に非常に正確に高速でアレイ形成することができるものが各社から入手可能である (Genetix、Genetic Micro Systems および BioRobotics 社製など)。そのような機械は、精製タンパク質、上清もしくは細胞を、多孔質表層または非多孔質表層上にスポット形成して、それを後に必要に応じ固定化して安定なアレイを得るようにすることができる。ロボット操作は高密度アレイを形成する上で好ましい方法であるが、分子もしくは細胞を支持体上の所定の位置に配置する上で好適な手動法を含むいかなる方法も用いることができる。アレイ形成は規則的な、線が隣りの線から所定の距離に「描出される」ようなものであってもよく、不規則なものや、ランダムなものであってもよい。

#### 【0063】

分子レパートリーは、相互作用について溶液中でスクリーニングすることができるか、あるいは 1 以上のレパートリーを固体支持体に固定化することができる。従って、2 種類の溶液を 2 チャンネルに流して、それらの交差箇所、例えば比色反応、蛍光反応または発光反応によって検出可能な相互作用を生じさせるようにすることができる。別法として、レパートリーの一つを、例えば架橋によってニトロセルロース膜上に固定化することが

きると考えられ、第2のレポトリに相当する溶液を、第1のレポトリの固定化構成員を固定した支持体上に「引く」ことができると考えられる。そのような固定化は、直接的または間接的であることができる。例えば、間接固定化には、遺伝子リガンドでコーティングした固体支持体上へのポリペプチドレポトリのアレイ形成が含まれる。

【0064】

1態様ではレポトリの構成員を、タグ付けシステムによってそれらの位置に指向させることで、各線、チャンネルまたは管がレポトリの特定の構成員と結合するか、結合するような状況を作らせる。例えばレポトリの1構成員における各ポリペプチドが、既知抗体のエピトープまたは、アフィニティペア（例：アビジン/ビオチンなど）の構成員などのタグを有することができる。線、チャンネルまたは管を、タグに結合する相当する分子（例：エピトープタグに特異的な抗体もしくは結合ペアの相当する構成員）でコーティングする。コーティングされた線、チャンネルまたは管とレポトリのタグ付けされた構成員を含む溶液との接触によって、アレイ上でのその構成員の配置が行われる。

10

【0065】

別法として、両方のレポトリを別個の固体支持体上に固定化し、次に並置して相互作用するペアを確認することができると考えられる。本発明の好ましい態様では、ポリペプチドのマトリクスを、最初に宿主細胞中のそれら核酸前駆体のアレイ形成を行い、次にヌクレオチド配列を発現させて相当するポリペプチドを得ることで形成することができる。

【0066】

1態様では、酵母細胞を用いて、本発明による方法で有用な分子の1以上のレポトリを発現させることができる。酵母に外因性核酸を導入および発現する方法は当業界で公知である。酵母を用いるある好ましい手法は、酵母2-ハイブリッド法を利用するものである。この手法では、ある酵母群を、2-ハイブリッドペアの一方の構成員との融合のレポトリをコードするライブラリーでトランスフォームし、別の群を2-ハイブリッドペアの相当する第2の構成員との融合のレポトリをコードするライブラリーでトランスフォームする。その2種類の酵母細胞群は、異なる交配型のものである。この2群を配置してアレイを形成することで、第1のレポトリの全ての構成員を含む酵母細胞が第2のレポトリの全ての構成員を含む酵母細胞と交差するようにし、細胞が交配できるようにする。第1のレポトリと第2のレポトリの構成員間相互作用によって、2-ハイブリッド受容体構築物からの信号が発生する。

20

30

【0067】

別の態様では、昆虫、両生類、鳥類、ほ乳類その他の高等真核細胞を用いることができる。限定的ではない例を挙げると、分子（小有機分子、ペプチド、ポリペプチドなど）のレポトリについて、分子レポトリの各構成員が受容体のレポトリの各構成員と交差するアレイを形成することで修飾組換え細胞表面受容体（例：リガンド結合もしくは活性化において有用な領域に挿入された可変カセットを有する受容体）のレポトリと相互作用する分子のスクリーニングを行うことができる。その後の細胞における受容体の活性化または阻害の検出により、どの分子がどの修飾受容体の活性に影響したかを示す。この方法によって、受容体その他のタンパク質の新たな調節剤の確認と構造/機能相関の迅速な確認の両方が可能となる。この方法はまた、相互作用について分析される両方のレポトリの発現について高等真核細胞を用いるように調整することもできる。それは例えば、両方のレポトリを細胞表面分子として発現させることで、あるいは例えば一方のレポトリを分泌タンパク質として発現させ、他方を細胞表面タンパク質として発現させることで行うことができると考えられる。個々のレポトリを発現する細胞と接触するかそれに近接並置されると、各レポトリの構成員と他方の構成員との生産的相互作用を検出することができる。当業者であれば、所定のポリペプチドレポトリを発現する高等真核細胞を容易に形成することができる。

40

【0068】

相互作用の検出方法は、形成されるアレイの詳細な性質に応じて変わる。例えば方法は、アレイが細胞を用いるか否かに応じて変わる。検出方法の例としては、蛍光共鳴エネルギー

50

ー移動 ( F R E T ) ; 蛍光消光 ; レポーター発現 ( 例 : ルシフェラーゼ、G S T、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、抗生物質耐性 ) ; 栄養素要求性からの救済 ; 2次メッセンジャーレベルにおける変化、G D P - G T P 交換、キナーゼ活性化もしくはリン酸化、ホスファターゼ活性化もしくは脱リン酸化、タンパク質分解もしくはイオン透過性変化などの信号伝達事象 ; 酵素反応 ; メチル化 ; 核酸開裂 ; グリコシル化 ; タンパク質分解 ; および感染 ( 例 : ウィルスまたはファージによる感染 ) などがあるが、これらに限定されるものではない。相互作用検出のためのこれらの手法または読み出しはそれぞれ当業界では公知であることから、当業者であれば、不必要な実験を行う必要なく、本発明の方法でそれを用いることができる。

【 0 0 6 9 】

本発明により選択される分子の使用

本発明の方法によって選択される分子は、実質的にあらゆる工程において用いることができる。その分子がポリペプチドである場合、*in vivo*での治療および予防の用途、*in vitro*および*in vivo*での診断用途、*in vitro*でのアッセイおよび試薬用途などの結合、または触媒作用が関与するプロセスで使用することができる。例えば抗体分子は、当業者には公知の方法に従って、E L I S A 法、ウェスタンブロッティング、免疫組織化学法、アフィニティークロマトグラフィーなどの、抗体に基づくアッセイ法で用いることができる。

【 0 0 7 0 】

上記で示唆したように、本発明によって選択される分子は、診断法、予防法および治療法において有用である。例えばこれらの方法によって形成および選択される酵素変種について、それを基質分子候補物質とともにインキュベートし、基質の生成物への変換を分析する当業界で公知の方法を*in vitro*または*in vivo*で用いて、活性のアッセイを行うことができる。選択される細胞表面受容体または接着分子を培養細胞で発現させ、次にそれについて、生化学的刺激に対して応答する能力または未変換の接着分子が結合すると予想される細胞表面分子を発現する他の細胞種との親和性を、それぞれ調べることができると考えられる。

【 0 0 7 1 】

本発明によって製造されるタンパク質の治療用途および予防用途には、ヒトなど、投与を受ける哺乳動物への、本発明により選択されるポリペプチドの投与が含まれる。その点に関して特に有用なものは、抗体、他の受容体 ( T 細胞受容体などがあるが、それに限定されるものではない ) またはそれらの結合タンパク質である。

【 0 0 7 2 】

哺乳動物への投与には、少なくとも 9 0 ~ 9 5 % の均質性を有する実質的に純粋な分子が好ましく、特にその哺乳動物がヒトである場合の医薬用途には、9 8 ~ 9 9 % またはそれ以上の均質性が最も好ましい。ひとたびある程度精製したら、あるいは所望の均質性まで精製したら、選択されたポリペプチドを診断または治療 ( 体外の場合を含む ) 用に、あるいはアッセイ法、免疫蛍光染色などの開発および実施において用いることができる ( L e f k o v i t e a n d P e r n i s , ( 1 9 7 9 a n d 1 9 8 1 ) I m m u n o l o g i c a l M e t h o d s , V o l u m e s I a n d I I , A c a d e m i c P r e s s , N Y ) 。

【 0 0 7 3 】

本発明の選択された抗体またはそれらの結合タンパク質は、典型的には、炎症状態、アレルギー性過敏症、癌、細菌もしくはウィルス感染および自己免疫障害 ( I 型糖尿病、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身紅斑性狼瘡、クローン病および重症筋無力症などがあるが、これらに限定されるものではない ) の予防、抑制または治療において有用であろう。

【 0 0 7 4 】

本願において「予防」という用語には、疾患が誘発される前の保護的組成物の投与が関与する。「抑制」とは、誘発事象の後であるが、疾患が臨床的に発症する前に前記組成物を

10

20

30

40

50

投与することを指す。「治療」には、疾患症状が認められるようになった後での保護組成物の投与が関与する。

【0075】

疾患に対する保護または疾患治療における抗体またはそれらの結合タンパク質の有効性をスクリーニングするために用いることができる動物モデル系が使用可能である。感受性マウスでの全身紅斑性狼瘡(SLE)の試験方法は当業界で公知である(Knight et al. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten et al. (1978) New Eng. J Med., 299: 515)。重症筋無力症(MG)は、他の動物種からの可溶性AchRタンパク質を用いてその疾患を誘発することで、SJL/J雌マウスで試験が行われる(Lindstrom et al. (1988) Adv. Immunol., 42: 233)。関節炎は、II型コラーゲンの注射によって、感受性系統のマウスで誘発される(Stuart et al. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233)。アジュバント関節炎を誘発する方法については、感受性ラットにおけるミコバクテリウム熱ショックタンパク質の注射による報告がある(Van Eden et al. (1988) Nature, 331: 171)。甲状腺炎は、記載の方法に従ってチログロブリンを投与することでマウスで誘発される(Maron et al. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115)。インシュリン依存型糖尿病(IDDM)は自然に生じるか、あるいはカナサワら(Kanasawa et al. (1984) Diabetologia, 27: 113)が記載のものなど、ある種の系統のマウスで誘発することができる。マウスおよびラットでのEAEは、ヒトにおけるMSのものであるとして役立つ。このモデルでは、ミエリン塩基性タンパク質の投与によって脱髄性疾患が誘発される(Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al. (1973) Science, 179: 478およびSato et al. (1987) J. Immunol., 138: 179参照)。

10

20

【0076】

本発明の選択された抗体、受容体(T細胞受容体などがあるが、それに限定されるものではない)またはそれらの結合タンパク質を、他の抗体、特に疾患に関与するヒト細胞上の他のマーカーと反応性のモノクローナル抗体(MAb)と組み合わせて使用することもできる。例えば好適なT細胞マーカーには、学会(the First International Leukocyte Differentiation Workshop; Bernhard et al. (1984) Leukocyte Typing, Springer Verlag, NY)によりいわゆる「分化クラスター」と称されているものに分類されたものなどがあり得る。

30

【0077】

通常、本発明の選択された抗体、受容体または結合タンパク質は、薬理的に適切な担体とともに純粋な形で利用されることになる。代表的にはその担体には、水系またはアルコール/水系の溶液、乳濁液または懸濁液などがあり、いずれも生理食塩水および/または緩衝媒体を含む。非経口媒体には、食塩水、リンゲルブドウ糖液、ブドウ糖および食塩ならびに乳酸加リンゲル液などがある。ポリペプチド複合体を懸濁状態に維持する上で必要であれば、好適な生理的に許容される補助剤を、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチンおよびアルギン酸類などの増粘剤から選択することができる。

40

【0078】

静脈内投与媒体には、リンゲルブドウ糖液をベースとする流体および栄養補給液ならびに電解質補給液などがある。抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤も存在させることができる(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

50

## 【0079】

本発明の選択されたポリペプチドは、別個に投与される組成物として用いることができるか、あるいは他の薬剤と共に用いることができる。それらには、シクロスポリン、メトトレキセート、アドリアマイシンまたはシスプラチナムならびにイムノトキシン類などの各種免疫治療薬などがあり得る。医薬組成物には、本発明の選択された抗体、受容体またはそれらの結合タンパク質と併用した各種細胞障害剤その他の薬剤の「カクテル」などが含まれ、あるいは投与前に蓄積されるか否かを問わず、異なる標的リガンドを用いて選択されるポリペプチドなどの、異なる特異性を有する本発明に従って選択されたポリペプチドの組み合わせもあり得る。

## 【0080】

本発明による医薬組成物の投与経路は、当業者には公知のいかなるものであっても良い。免疫療法（それに限定されない）などの療法の場合、本発明の選択された抗体、受容体またはそれらの結合タンパク質を、標準的な方法に従って患者に投与することができる。投与は、非経口投与、静脈内投与、筋内投与、腹腔内投与、経皮投与、肺経路を介した投与または適宜にカテーテルを用いる直接注入などの適切な形態によって行うことができる。投与の用量および回数は、患者の年齢、性別および状態、他薬剤の同時投与、禁忌ならびに臨床医が考慮すべき他のパラメータによって決まる。

## 【0081】

本発明の選択されたポリペプチドは、保存用に凍結乾燥し、使用前に好適な担体で再生させることができる。この方法は、従来の免疫グロブリンを用いる場合に有効であることが明らかになっており、当業界で公知の凍結乾燥および再生法を用いることができる。凍結乾燥および再生によって、多様な程度の抗体活性損失が生じ得ること（例えば、従来の免疫グロブリンを用いる場合、IgM抗体はIgG抗体より活性損失が大きい傾向がある）、ならびに相殺するために使用レベルを上方に調節する必要が生じる場合があることは当業者には明らかであろう。

## 【0082】

本発明の選択されたポリペプチドまたはそれらのカクテルを含む組成物を投与して、予防処置および/または治療処置を行うことができる。ある種の治療用途では、選択細胞群の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、殺滅または何らかの他の測定可能なパラメータを達成する上で十分な量を「治療上有効な用量」と定義する。その用量を達成する上で必要な量は、疾患の重度および患者自身の免疫系の全般的状態によって決まるが、通常は体重1kg当たりの選択された抗体、受容体（例：T細胞受容体）もしくはその結合タンパク質は0.005～5.0mgの範囲であり、0.05～2.0mg/kg/投与の用量がより一般的に用いられる。予防用途の場合、本発明の選択されたポリペプチドまたはそのカクテルを含む組成物も、同様またはそれより若干低い用量で投与することができる。

## 【0083】

本発明による選択されたポリペプチドを含む組成物を予防および治療の場面で利用して、哺乳動物における特定の標的細胞群の変化、失活、殺滅または除去に役立てることができる。さらに、本明細書に記載のポリペプチドの選択されたレパトリーを体外または*in vitro*で選択的に用いて、標的細胞群を殺滅、低減その他の形で、細胞の不均一集合から効果的に除去することができる。哺乳動物から取り出した血液を、選択された抗体、細胞表面受容体またはその結合タンパク質と体外で組み合わせることで、標準的な方法に従って哺乳動物に戻す血液から、望ましくない細胞を殺滅その他の形で除去することができる。

## 【0084】

説明のみを目的として、下記の実施例で本発明についてさらに説明する。

## 【0085】

実施例実施例 1

10

20

30

40

50

s c F v レパートリーのマトリクススクリーニング

本実施例の一部として使用した2フィルター捕捉システムは、発明の名称が「アレイスクリーニング方法」である本発明者らの同時係属中である英国特許出願（英国特許出願番号9928787.2）に記載のものに基づいたものである。細菌を一方のフィルター上の線で増殖させ、それによって産生されるs c F vを、第1のフィルター上のs c F vの線から90°の方向に向いたニトロセルロースに結合した抗原の線を有する第2のフィルターに捕捉する（図1参照）。s c F vが抗原と相互作用する交点では、抗原とs c F vが結合した場合にs c F vが捕捉される。本実施例では、結合したs c F vの検出は、HRPに結合した超抗原タンパク質Lを用いて行う。

【0086】

方法抗原ライブラリー

抗原は、オリゴ(dT)初回抗原刺激によって胎児脳ポリ(A)<sup>+</sup>RNAから得たヒト発現ライブラリー-hEX1から得る(Bussow et al 1998)。cDNAは、修飾pQE-30ベクター(Qiagen)において指向的にクローニングされる。

【0087】

抗原フィルター

抗原クローンを、37°の液体培地(100µg/mLのAmpおよび1%グルコースを含む2xTY)で終夜増殖させた。手動線描出の場合、ピペットに取り付けられていないp10フィルターチップ(Art)を用い、金属定規でフィルターに沿って線を引くことで、該液体培養物を予め湿らせておいたPVDFフィルター(エタノールに浸漬し、PBSで洗い、2xTYに浸したもの)に移した。そうしてチップの毛細管作用を利用して、該培養液を膜表面に移送した。各クローンはフィルター上で、前のものから6mm離れたところに線描された。自動線描出の場合、カイビーシステムズ(Kaybee Systems)のピッカー/グリッターシステムに取り付けられた図3に示すロボットヘッドを用いて、PVDFフィルターに液体培養物を移送した。各クローンはフィルター上に、25mm/秒の速度で、前のものから4.5mm離れたところに線描された。

【0088】

次に抗原フィルターを、100µg/mLのAmp、1%グルコースを含むTYE寒天平板上で30分にて終夜増殖させた。次に該フィルターを、100µg/mLのAmp、1mMのIPTGを含む別のTYE寒天平板に移し、37°で3時間経過させてクローンの誘発を行った。抗原フィルターを平板からはがし、0.5M NaOH、1.5M NaClを含む予め浸らせたプロットング紙上で10分間変性させ、1M TrisHCl(pH7.5)、1.5M NaCl中で5分間の中和を2回行い、次に2xSSC中で15分間インキュベートした。フィルターを乾燥させ、エタノールに短時間浸漬し、4% Marvel PBSでブロックし、PBSで洗い、2xTYに浸した。

【0089】

S c F v ライブラリー

s c F v類は、V<sub>H</sub>(V3-23/DP-47およびJ<sub>H</sub>4b)およびV<sub>K</sub>(O12/O2/DPK9およびJ<sub>K</sub>1)に関する単一のヒトフレームワークに基づくライブラリーから得たものであり、既知構造の抗原と接触し、成熟レパートリーにおいて非常に多様性に富んだ抗原結合部位において、側鎖の多様性(NNKまたはDVTコード)を有している。用いられる群(fold)はしばしば*in vivo*で発現され、s c F v類の捕捉または検出を促進するが抗原結合を妨害しない遺伝子リガンドタンパク質LおよびAに結合する。s c F vクローンは、タンパク質Aおよびタンパク質Lへの結合についてs c F v形式で予備スクリーニングして、それらが機能性であることを確認している。

【0090】

S c F v フィルター

抗体クローンを37°の液体培地(100µg/mLのアンピシリンおよび1%グルコースを含む2xTY)で終夜増殖させた。次に、液体培養物を予めブロッキング処理したニ

10

20

30

40

50

トロセルロースフィルター（４％スキムミルク粉末のPBS溶液中、室温（RT）で１時間経過させ、PBSで洗い、2×TYに浸したもの）に移した。抗原培地については手動およびロボットによる抗体のフィルターへの移動を行った。ロボット移動によって形成されるscFv類の線の密度については、1.125mmごとに1本とした。

【0091】

次にscFvフィルターを、100μg/mL Amp、1％グルコースを含むTYE寒天平板上で37にて増殖させた。終夜増殖させた後、抗原フィルターを100μg/mL Amp、1mM IPTGの入った新鮮なTYE寒天平板に載せて乾燥し、scFvフィルターをその上に置いた。次に、二枚のフィルターと共に平板培地を30で3時間インキュベートして、scFv類の誘発を行った。

10

【0092】

#### フィルターの精査

上側の（scFv）フィルターを廃棄し、2番目の（抗原）フィルターをPBS/0.05％Tween（PBST）で3回洗浄し、室温にて4％MPBSで30分間ブロッキングした。該フィルターをPBSTで3回洗浄し、次に4％MPBS中、室温で1時間にわたり、タンパク質LHRP結合体（Actigen、1/2000）とともにインキュベートした。フィルターをPBSTでさらに3回洗浄し、ECL試薬で現像した。インキュベーションはいずれも、緩く攪拌する振盪機にかけて、緩衝液50mL中にて行った。

【0093】

20

#### 結果

モデルシステムとして本発明者らは、16種類のscFvに対して21種類の抗原の手動マトリクススクリーニングを行い、わずか37回の分配作業を用いて336種類の相互作用を調べた。そのscFvレパートリーには、ファージ選択によってユビキチンに対して選択された4種類のscFvが含まれていた（Ub1b1、Ub1a1、R13およびR14）。抗原レパートリーには、ユビキチンであることが知られている2種類のクローン（QおよびT）ならびに一次スクリーニングで恐らく抗ユビキチンscFvに結合すると確認されている他の5種類のクローン（A、P、R、SおよびU）が含まれていた。図からわかるように（図2）、4種類の抗ユビキチンscFvのそれぞれが、2種類のユビキチンクローンならびに5種類の可能なユビキチンクローンのそれぞれに結合していた。しかしながら、scFv Ub1b1とscFv R14は交差反応性が非常に高いことがわかる。モデルアレイには、12種類のscFvクローンであるC2からH11に対して結合剤の可能性があるとして一次抗原アレイスクリーニングで確認された14種類の抗原クローンも含まれていた。マトリクスからわかる通り（図2）、抗原M（未知機能のタンパク質）は、scFv D12に特異的に結合する。抗原E（DNA結合タンパク質）も、scFv H11に特異的に結合する。これは、抗原アレイスクリーニングで最初に確認された相互作用を確認する上でのマトリクススクリーニングの有用性を示すものである。

30

【0094】

次に本発明者らは、ロボットヘッド（図3a - 設計；図3b - 写真）を用いて線描出を行うより高密度のマトリクススクリーンを扱った。このシステムでは、12種類の抗原の二重線（横方向）を192種類のscFv（縦方向）に対してスクリーニングするものである。そうして、2304種類の異なる可能な相互作用を、わずか216回の分配作業を用いて各2回試験した。やはり、特に3種類の抗原（そのうちの2種類は同じ）に対して、線の交点で多くの異なる相互作用が認められる。

40

【0095】

#### 実施例2

##### 本発明による二本鎖抗体レパートリーの作成およびスクリーニング

本実施例の一部として用いた2フィルター捕捉システムは、発明の名称が「アレイスクリーニング方法」である本発明者らの同時係属中である英国特許出願（英国特許出願番号9928787.2）に記載のものに基づいたものである。以前に、抗体重鎖および軽鎖が

50

溶液中で会合して、活性な抗原結合部位を有するFv断片を形成し得ることが明らかになっており、そのような技術は当業界において公知である。特定の重鎖および軽鎖の非共有結合的会合が、そのような会合がアレイ上で起こるだけの強さのものであるか否かを調べるため、本発明者らはファージ選択抗BSA-scFv(13cg2)の重鎖と軽鎖を分離した。重鎖と軽鎖の間の会合がどの程度強いものであるかは不明であったが、本発明者らは、13cg2の重鎖および軽鎖を別個に、重鎖または軽鎖のみ(単一領域); scFv(重鎖と軽鎖の間に15アミノ酸の連結部を有する)およびジアボディ(diabody)(重鎖と軽鎖の間にゼロアミノ酸連結部を有する)という3種類の組換え断片の形態にクローニングした。後者の2種類の形態は、軽鎖または重鎖13cg2の多様性を用いて構築し、各場合において未変化鎖がダミーの重鎖または軽鎖であった。(ダミー鎖は、単一であるが未知の抗原結合特異性を有する)。抗原としてBSAを用いたアレイ上の各種形態の試験は、ジアボディ形態がフィルター表面に最も安定な会合を与えることを示している。

10

#### 【0096】

いずれも上記のジアボディ形態でのウシ血清アルブミン(BSA)結合性重鎖(1)、BSA結合性軽鎖(2)、非結合性重鎖および軽鎖(3)またはBSA結合性重鎖および軽鎖(4)のいずれかを発現する細菌を混合し、スポットとして増殖させるか(図5a)、あるいは横線および縦線として描いてから増殖させた(図5b)。いずれの場合も、終夜増殖させた後、増殖細菌を含有するフィルターを、BSAでコーティングされた第2のフィルターの上に乗せ、タンパク質発現の誘発を行った。結合性重鎖が結合性軽鎖と共発現される場合にのみ、陽性シグナルが認められる(すなわち、1と2が一緒になった、もしくは4を含むいずれかの組み合わせ。2との交差の下、1に対するシグナルがないのはおそらく、誘発時にフィルター間に存在する気泡によるものである)。線を描くことで、分配作業の数が大幅に減る(この場合、32回から8回に)。

20

#### 【0097】

重鎖の線および軽鎖の線の密度を高くすることで、より高密度の抗体アレイを形成し、スクリーニングすることができる。そこで、24種類の抗BSA重鎖および48種類の抗BSA軽鎖をx軸およびy軸に対して垂直に描いて、BSAに対してスクリーニングされる1152種類のペアを形成した(図6)。さらに高密度の形態では、384種類の未選択重鎖および384種類の未選択軽鎖をx軸およびy軸に対して垂直に描き、ニトロセルロースフィルター上にコーティングされたBSAに対してスクリーニングした(147, 456通りの組み合わせ)。一組の特異的重鎖および軽鎖のペアを単離し、それを次にニトロセルロースに対して結合性であると確認した(図7)。スクリーンを増やして1000種類の重鎖対1000種類の軽鎖(100万種類の異なる抗体)を網羅しようとする場合、本発明による方法を用いることで、分配作業の数は200万回から2000回に低減するものと考えられる。

30

#### 【0098】

##### 実施例3

##### 3次元スクリーニング

本発明による3次元スクリーニングの模式図を示す(図8)。この図では、レポトリ構成員はx軸、y軸およびz軸における平面に配置され、相互作用は交差する面の各種頂点で起こる。その考え方を証明するものとして、抗BSA重鎖をある平面上に設け、抗BSA軽鎖を第2の平面上に設け、BSAを第3の平面上に設ける。頂点での相互作用は、3種類の成分全てが存在する場合にのみ検出される(図9)。

40

#### 【0099】

上記の明細書で言及した全ての刊行物ならびにその刊行物中で引用されている参考文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。本発明の前述した方法およびシステムについての各種の変更および別形態は、本発明の範囲および精神を逸脱しない限りにおいて、当業者には明らかであろう。上記においては具体的な好ましい実施形態と関連付けて本発明について記述したが、特許請求される本発明は、そのような具体的な実施形態に不当に限定

50

されるべきではないことが理解されるべきである。実際、分子生物学もしくは関連する分野における当業者には明らかな、本発明を実施する上での上記形態に対する各種の変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれるものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

数百の異なる抗体を数百の異なる抗原に対して同時にスクリーニングして相互作用するペアを確認できると考えられる方法を示す、本発明による抗体レパートリーを抗原レパートリーに対してスクリーニングする 1 方法の概略を示す図である。

【図 2】

手動で作成したマトリクスを用いた s c F v の分析を示す図である。

10

【図 3】

x、y および z 次元での動きを可能とするロボットプラットフォームに搭載されるよう設計された本発明によるロボット線引き用ヘッドを示す図である。

【図 4】

ロボットによって形成されたマトリクスを用いる s c F v の分析を示す図である。

【図 5】

2 本鎖抗体レパートリーの作成およびスクリーニングの例を示す図であり、( a ) は先行技術によるスポットアレイの図であり、( b ) 本発明によるマトリクススクリーニングによって、わずか 8 回の分配作業を用いて同じスクリーニングを行うことができることを示す図である。

20

【図 6】

重鎖線および軽鎖線の密度を高くすることで、より密度の高い抗体アレイの作成およびスクリーニングができることを示す図である。

【図 7】

3 8 4 種類の未選択重鎖および 3 8 4 種類の未選択軽鎖を x 軸および y 軸に対して垂直に描き、ニトロセルロース上にコーティングされた B S A に対してスクリーニングした ( 1 4 7 , 4 5 6 通りの組み合わせ ) 場合を示す図である。

【図 8】

本発明による 3 次元スクリーニングの模式図である。

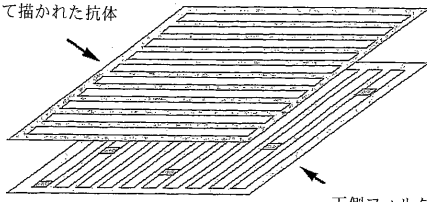
【図 9】

3 次元スクリーニングの考え方を証明する図である。

30

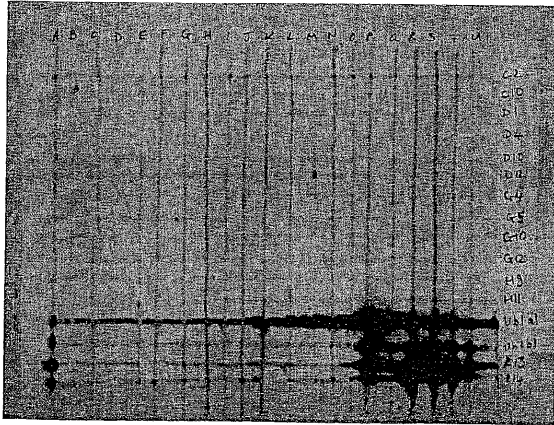
【 図 1 】

上側フィルターに  
線として描かれた抗体

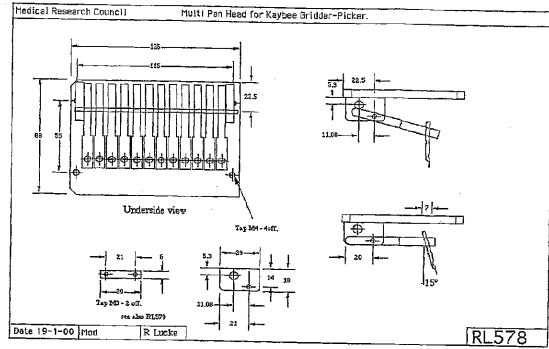


下側フィルターに  
線として描かれた抗原

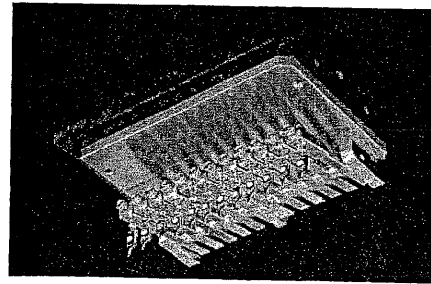
【 図 2 】



【 図 3 】

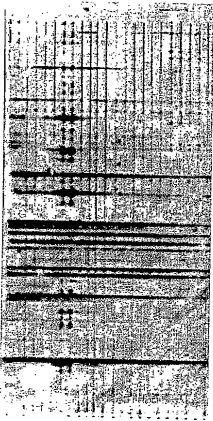


3a

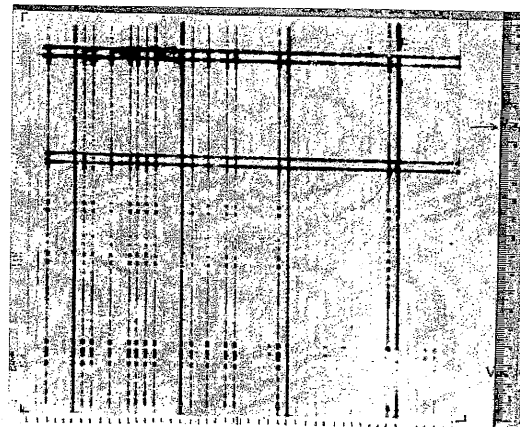


3b

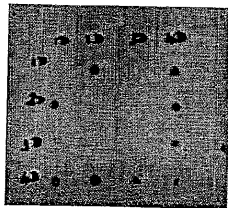
【 図 4 】



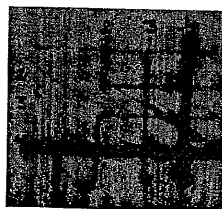
【 図 6 】



【 図 5 】

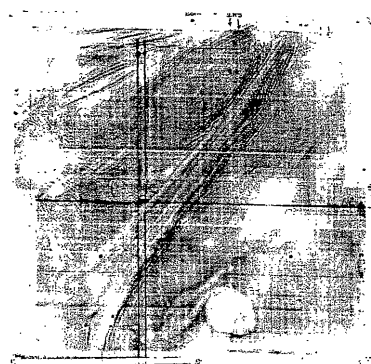


5a

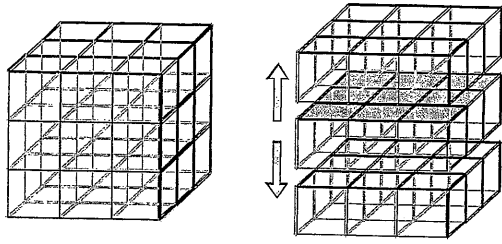


5b

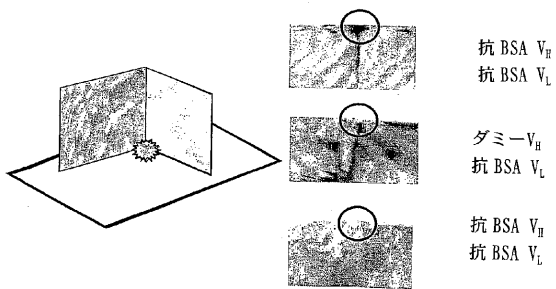
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/98534 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02831
- (22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
0015443.5 23 June 2000 (23.06.2000) GB  
0026099.2 25 October 2000 (25.10.2000) GB  
60/246,851 8 November 2000 (08.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): DIVERSYS LIMITED [GB/GB]; 20 Park Crescent, London W1N 4AL (GB).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOLT, Lucy, Jessica [GB/GB]; 96 Anstey Way, Trumpington, Cambridge CB2 2JE (GB). TOMLINSON, Ian [GB/GB]; 13 Tunwells Lane, Great Shelford, Cambridge CB2 5LJ (GB).
- (74) Agents: MASCHIO, Antonio et al.; D Young & Co., 21 New Fetter Lane, London EC4A 1AD (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/98534 A2

(54) Title: MATRIX SCREENING METHOD

(57) Abstract: The invention concerns a method which can be used to screen two or more repertoires of molecules against one another and/or to create combinatorial repertoires by combining two or more repertoires. In particular, the invention relates to a method whereby two repertoires of molecules can be screened such that substantially all members of the first repertoire are tested against substantially all members of the second repertoire for functional interactions. Furthermore, the invention relates to the creation and screening of antibody repertoires by combining a repertoire of heavy chains with a repertoire of light chains such that antibodies formed by the substantially all combinations of heavy and light chains can be screened against one or more target ligands.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

#### Matrix Screening Method

5 The present invention relates to a method which can be used to screen two or more  
repertoires of molecules against one another and/or to create and screen combinatorial  
repertoires by combining two or more repertoires. In particular, the invention relates to a  
method whereby two repertoires of molecules can be screened such that substantially all  
10 members of the first repertoire are tested against substantially all members of the second  
repertoire for functional interactions. Furthermore, the invention relates to the creation  
and screening of antibody repertoires by combining a repertoire of heavy chains with a  
repertoire of light chains such that antibodies formed by the substantially all combinations  
of heavy and light chains can be screened against one or more target ligands.

#### 15 Introduction

The mapping and sequencing of different genomes will eventually lead to the cloning of  
all the proteins expressed by these organisms. In order to create interaction maps of these  
proteins, two-dimensional screens need to be performed so that the binding of every  
protein to every other protein can be tested.

20

Two dimensional screens are also required for a number of other applications. For  
example, techniques such as mouse immunisation coupled with the production of  
*monoclonal antibodies* and *in vitro* selection methods such as phage display have been  
used to simultaneously generate many different antibodies against many different targets.

25 In order to determine which antibodies bind to which targets these pools need to be  
deconvoluted, which requires a complex screening procedure.

Furthermore, if small molecule drugs are to be generated against human targets for  
therapy it would be helpful to determine not only the extent of binding of a given human  
30 protein to a putative drug candidate but also the extent (if any) of cross-reaction of the  
same drug candidate with other human proteins or whether other related drugs are better  
binders and/or less cross-reactive.

All of these examples call for a technique whereby interactions between members of a  
35 first set (or repertoire) of molecules can be rapidly tested against all members of a second  
set (or repertoire) of molecules. To date, such screens are generally performed by  
dispensing combinations of reagents into compartmentalised wells or on top of one  
another in the form of spots on a membrane such that all combinations of reagents to be

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

2

tested are present in separate wells/spots. Therefore if a repertoire of 100 molecules were to be tested against a different repertoire also consisting of 100 molecules, 10,000 wells/spots would be required to exhaustively cover all combinations of members of the two repertoires. The creation of such discontinuously arranged combinations would require, for a two component interaction, twice as many dispensing 'events' as there are wells or spots, in this case 20,000, in addition to any dispensing events that might be required to facilitate or detect the interactions. As the number of members in each repertoire increases linearly, the number of combinations, and hence dispensing events, increases exponentially. Indeed for a three component interaction, involving, say, a repertoire of only 100 antibody heavy chains, a repertoire of only 100 antibody light chains and a repertoire of only 100 potential antigens, a million 'dispensing' events would be required.

#### Summary of the Invention

We have developed a methodology, which we have called Matrix Screening, which can be used to study all possible interactions between all the members in two repertoires of molecules which removes the need to compartmentalise individual combinations of members of these repertoires.

According to a first aspect of the present invention, there is provided a method for screening a first repertoire of molecules against a second repertoire of molecules to identify those members of the first repertoire which interact with members of the second repertoire, comprising:

- (a) arranging the first and second repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed to substantially all members of the second repertoire; and
- (b) detecting the interaction/s between the members of the first and second repertoires.

The invention, in its broadest form, provides a method for screening two repertoires of molecules against one another. Individual members of the two repertoires are spatially configured to enable the juxtaposition of substantially all combinations of members of both repertoires. It will be understood that reference herein to "substantially all combinations" (or "substantially all members") does not exclude that certain juxtapositions may not occur, either by chance or by design. However, the invention does require that two repertoires of molecules be screened against each other simultaneously, and excludes the screening of a single repertoire with individual member(s) of a second

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

3

repertoire. Preferably, "substantially all" refers to at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% of the members of a repertoire.

5 According to the invention, juxtaposition can be arrived at by, for example, creating a series of lines for each of the two repertoires, which intersect one another. The lines can be straight, substantially parallel lines, or curves, or combinations thereof; the only restriction is that substantially all members of the first repertoire should be able to interact substantially all members of the second repertoire. Examples of complementary  
10 configurations include straight parallel lines, disposed at an angle to straight parallel lines; concentric circles or polygons, used together with a star of radial lines. The skilled person will be able to imagine many other systems being used to achieve a similar spatial configuration of the repertoire members according to the invention, all being characterised by the dispensation of some form of continuous line, stream, channel or  
15 flow corresponding to each member of the first repertoire, substantially all of which has the ability to intersect substantially all lines, streams, channels or flows corresponding to substantially all members of the second repertoire. These include tubes for each member of the first repertoire which intersect tubes of the second repertoire, or channels cut in a solid material down which individual repertoire members can flow.

20 Therefore, according to a second aspect of the invention, there is provided a method wherein members of the both the first repertoire and the second repertoire are arranged in a series of lines, channels or tubes, each containing a member of the first or second repertoires such that the lines, channels or tubes corresponding to the first repertoire and  
25 those corresponding to the second repertoire are contacted with one another so that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire.

In the context of the present invention, "a" member can mean one single member or at  
30 least one member. Advantageously, it refers to one single member. However, in an alternative aspect the invention also provides the use of groups consisting of more than one member of the repertoire in each line, channel or tube. Preferably, such groups consist of 10 or fewer members, advantageously 5 or fewer, but at least 2.

35 The advantage of using intersecting lines, channels, streams or flows according to the present invention compared to compartmentalised combinatorial screening in the prior art is that as the size of the individual repertoires grow linearly, so does the number of dispensing steps required to screen all combinations of repertoire members. Thus,

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

4

whereas screening techniques using wells would require 10,000 dispensing steps to screen a 100 by 100 repertoire, screening according to the present invention requires only 200 dispensing steps. Furthermore, since a single dispensing event is used to spatially array each member of each repertoire, comparison of interactions between individual members of the first repertoire with the members of the second repertoire with which it is juxtaposed will be more accurate. In addition, since the present invention uses intersecting lines rather than spots or intersecting channels rather than wells, less positional accuracy is necessary to ensure that substantially all combinations of possible interactions are tested. Thus, if a two-dimensional screen is performed, and one line corresponding to a member of the first repertoire is offset by, for example, 1mm, since it is arranged at an angle to substantially all the lines from the second repertoire, it will still intersect substantially all of them and therefore substantially all combinations of interactions will still have been successfully tested. If, on the other hand, the spots corresponding to a member of the first repertoire are offset by, for example, 1mm, they may miss the spots corresponding to the members of the second repertoire altogether and therefore many combinations of interactions will not have been tested. Therefore, the present invention is not only well suited to automated methods of screening but also to manual methods, where positional accuracy cannot be guaranteed and the number of dispensing events must be limited.

As described above, the lines, channels or tubes can be arranged in a variety of formats and can be arranged on a single support, or a plurality of supports. In the simplest configuration, molecules can be manually drawn out in the form of lines on a single support, for example on a nitrocellulose membrane. These lines can also be applied to suitable supports using robotic techniques, which allow the accuracy and density of arrays to be increased to great advantage in the present invention. In an advantageous aspect of the invention, a multi-support system can be used, wherein arrays of lines are prepared on separate supports which are then juxtaposed in order to assess interaction between the members of the repertoires.

Accordingly, in a third aspect of the invention a method is provided for screening a first repertoire of molecules against a second repertoire of molecules to identify one or more members of the first repertoire which interact with one or more members of the second repertoire, comprising :

- (a) arranging the first and second repertoires on first and second supports;
  - (b) juxtaposing the first and second supports such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire;
- and

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

5

(c) detecting the interactions between the members of the first and second repertoires.

The present invention can also be applied to higher dimensional arrays, for example, those with 3 dimensions. Thus, three component interactions, such as enzyme, substrate  
5 and co-factor can be screened using lines, channels or tubes that are arranged in 3 dimensions. Alternatively, the three components could be antibody heavy chain, antibody light chain and antigen, and repertoires thereof can be screened in three dimensions. The screening of repertoires in 2, 3 or higher dimensions according to the present invention is highly advantageous as it reduces the number of dispensing (or pipetting) events that  
10 would be required to perform a comprehensive combinatorial screen. Thus, the screening of two repertoires, of, say, 300 members against one another using conventional techniques in the prior art would require at least 90,000 separate dispensing events and the screening of three repertoires, of, say, 300 members against one another would require  
15 at least 2.7 million dispensing events. By contrast, the present invention reduces the number of dispensing events to comprehensively screen the same repertoires to 600 or 900, respectively, a huge saving in terms of time and labour.

According to a fourth aspect of the present invention, therefore, there is provided a method for screening first, second and third repertoires of molecules against each other to  
20 identify those members of the first, second and third repertoires which interact, comprising:

- (a) arranging the first, second and third repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first, second and third repertoires are juxtaposed; and
- (b) detecting the interaction/s between the members of the first, second and second  
25 repertoires.

A multidimensional array can be created in a number of ways. Advantageously, a third dimension is created by stacking filters or other such membranes and relying on capillary  
30 action for transferring molecules, or by forcing molecules through the stack by a means such as electrophoresis or osmosis or by piercing the stack or by the use of permeable filters to create the stack.

Moreover, a third dimension can be created by stacking non-permeable layers which at the intersections of channels (for the first and second repertoires) have holes which (once  
35 the layers are stacked) form an additional set of channels in a third dimension along which members of a third repertoire can pass.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

6

In a further embodiment, the third dimension can be created using a block of gel or similar such substance, which can be injected with members of the first, second and third repertoires along the x, y and z faces, respectively, thus creating channels in a three-dimensional space which form the array.

5 Still further, the matrix of interactions between members of the first, second (and optionally third) repertoires of molecules can be created using a network of intersecting tubes or semi-permeable tubes laid adjacent to one another.

10 The members of the first, second (and optionally third) repertoires of molecules can be replaced over time with different members from the same repertoires so that a new combination or set of interactions can be screened.

15 Since the present invention can be used to rapidly screen multicomponent and multi-chain interactions, it can also be applied to the simultaneous creation and screening of combinatorial libraries of molecules, for example, antibody or T cell receptor libraries. Thus instead of generating a large combinatorial library of antibodies by combining the heavy and light chain genes and then separately screening the resulting pairings, the pairings themselves can be generated according to the invention and, optionally screened  
20 against one or more target antigens. Thus, say, 1000 heavy chains could be drawn as lines in one dimension, and a 1000 light chains can be drawn as lines in another, such that substantially all the heavy chain lines intersect substantially all the light chain lines, forming at their intersection fully functional and folded antibody molecules, which can then be screened with a juxtaposed antigen, for example coated on a further support  
25 which is brought into contact with the intersecting heavy and light chain lines. According to this embodiment, substantially all combinations of 1000 heavy chains and 1000 light chains will have been screened i.e. a total of 1 million different antibodies, using only 2000 dispensing events, rather than the 1 million that would have to be used according to screening techniques in the prior art. This provides a rapid way for 'naive' screening for  
30 specific interactions. Thus, for example, a repertoire of heavy chains and a repertoires of light chains, the members (or any related member) of which have never been in contact or selected against a given target antigen (or a related target antigen thereof) can be screened against the target antigen to identify a specific binding heavy and light chain pairing.

35 Thus, in a fifth aspect of the present invention a method is provided for creating and screening a combinatorial library of two-chain polypeptides, each of which comprises one member of a first repertoire and one member of a second repertoire, which method comprises:

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

7

- (a) arranging the first and second repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed to members of the second repertoire, thereby generating at their juxtapositions substantially all combinations of functional two-chain polypeptides; and optionally
- 5 (b) detecting the interaction between the two-chain polypeptides and a target molecule.

Preferably, the combinatorial library is an antibody or T cell receptor library and the two repertoires consist of heavy and light chains (in the case of an antibody library) or alpha and beta chains (in the case of a T cell receptor library).

10

The combinatorial library so produced is preferably screened for interactions with more than one target molecule. Thus, the target molecule can be provided in the form of a group of target molecules, or a repertoire thereof, and screened in a three-dimensional array as described herein.

15

Preferably, the method according to the invention can be used such that a three-chain polypeptide library is created (and optionally screened) using first, second and third repertoires of molecules in three dimensions.

20

The pattern of interactions between the first, second (and optionally third) repertoires can be used to identify positive interactions, negative interactions, specific interactions or cross-reactive interactions, or to construct a phylogenic tree inferring the similarity between members of the first repertoire (using the pattern of interactions with the second and/or, optionally third, repertoires), of the second repertoire (using the pattern of interactions with the first and/or, optionally third, repertoires) and/or of the third repertoire (using the pattern of interactions with members the first and/or second repertoires).

25

Since many of the interactions that will be screened according to the present invention involve polypeptides that have been derived, directly or indirectly, by expression of nucleic acid sequences, it is highly advantageous that the nucleic acids themselves are arranged in lines, channels or tubes according to the invention and expressed to produce their corresponding polypeptides. In this way, intersecting polypeptides from each of the two repertoires will be expressed together. This can assist their association, particularly when the association of the two repertoire members depends on co-operative folding, for example, as in the case of antibodies. In addition, information regarding the interactions of members of the repertoires will be spatially linked to the genetic information which

30

35

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

8

encodes them. This genetic information can be determined by calculating the co-ordinates of the interaction and isolating the corresponding nucleotide sequence data from any point on its line, channel or tube or by isolating the nucleotide sequence data from the intersection itself.

5

Accordingly, in a sixth aspect of the present invention, a method is provided whereby one or more of the first, second and, optionally, third repertoires comprise a plurality of nucleic acid molecules which are expressed to produce their corresponding polypeptides *in situ* in the array.

10

Since the present invention concerns the rapid and efficient screening of two or more repertoires against one another, any currently employed techniques for enhancing or disrupting molecular interactions can be used with the invention. Thus, one repertoire can consist of variants of a free hapten and the other repertoire can consist of selected anti-hapten antibodies. By arranging both repertoires in close proximity to an immobilised version of the target hapten molecule the screen can be used to identify those antibodies that are competed for binding to the immobilised target hapten by binding to certain free hapten variants. In this case, the lack of binding would be considered a positive result. Controls for such an experiment can include a line of water alongside the free haptens and a line of non-hapten binding antibodies alongside the anti-hapten antibodies. Alternatively, a single free hapten could be used to disrupt binding of members of a repertoire of anti-hapten antibodies to members of a repertoire of different immobilised hapten variants. Other third molecules might include substances that enhance binding of the repertoire members to one another, which can be used itself in the form of a repertoire

15

20

25

according to the invention. In this way, a target molecule could be immobilised on a solid support and intersecting repertoires of binders and binder enhancers could be brought into contact with the target molecule. Those skilled in the art will envisage many different combinations of such molecules and repertoire members.

30

Accordingly, in a seventh aspect of the present invention a method is provided for screening a first repertoire of molecules against a second repertoire of molecules to identify members of the first and second repertoires whose interactions with one another are dependant on the presence or absence of a third molecule or set of molecules, comprising:

35

(a) arranging the first and second repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire; and

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

9

(b) detecting the interactions between members of the first repertoire and the members of the second repertoire in the presence of different concentrations of the third molecule or set of molecules.

5 The method of the present invention bridges the gap between the initial identification of lead targets and molecules from very large repertoires and the final identification of targets or drugs for therapeutic intervention. This problem is addressed in the prior art by use of ELISA screening of possible positive interactants. However, protocols for ELISA are not easily automated for high throughput. The highly parallel nature of the method  
10 according to the present invention will reveal comprehensive interaction profiles for members of each repertoire. This will enable, for example, ligands that interact with an entire family of proteins to be distinguished from those which react with only a subset of that family, cross-reactive drugs to be eliminated from development programmes, and the true specificity and cross-reactivity of antibodies to be determined. The determination of  
15 an antibodies cross-reactivity and hence its specificity is of vital importance where there is a panel of different antibodies have been derived from an immunised mouse or from an *in vitro* selections performed, for example, by phage display. Matrix Screening is particularly powerful in this context as it enables a comprehensive range of antigens to be tested against each antibody in the panel, minimising the chance of unknown and  
20 unwanted cross reactivities disrupting downstream investigations.

Alternatively, by using the present invention to create and screen large comprehensively combinatorial libraries, one million clone antibody libraries could be created and screened using only 2,000 dispensing events. In addition, complex protein-protein interaction maps  
25 can be created from enriched sources of interacting pairs, or possibly using entire proteomes together with very high density matrices according to the invention.

The invention also incorporates the key advantages of phage display and other expression-display techniques, namely that the nucleic acids encoding the members of a  
30 polypeptide repertoire can be spatially associated with their corresponding polypeptides and can thus be selected on the basis of the functional characteristics of the individual polypeptide. Unlike phage display, however, in which this association is achieved by compartmentalising the nucleic acids and the polypeptides using bacterial cells which display the polypeptides on their surfaces, the subject invention advantageously exploits a  
35 novel arraying strategy to provide this association. By eliminating the requirement for the nucleic acids and the polypeptides to be retained in or on bacterial cells, the present invention can be extended beyond selection of binding activities to select any polypeptide

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

10

repertoire on the basis of any functional property of the polypeptides, including enzymatic activity, conformation or any other detectable characteristic.

5 Various apparatus can be supplied in association with reagents or tools for performing the screens described above.

#### Definitions

10 The term "repertoire" as used according to the present invention refers to a population of diverse variants, for example polypeptide variants which differ in amino acid sequence, DNA variants that differ in nucleotide composition and/or sequence or any other type of molecule which can exist in a number of different forms. Generally, a repertoire includes more than 10 different variants. Large repertoires comprise the highest number of possible variants for selection and can be up to  $10^{13}$  in size. Smaller repertoires are particularly useful, especially if they have been pre-selected to enrich for a particularly useful subset (for example, antibodies that bind cell surface markers, enzymes that catalyse a certain set of reactions, proteins that bind to other proteins etc) or to remove unwanted members (such as those including stop codons, incapable of correct folding or which are otherwise inactive). Such smaller repertoires can comprise  $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  or more polypeptides. Advantageously, smaller repertoires comprise between  $10$  and  $10^4$  polypeptides.

20 In the present invention, two or more repertoires of polypeptides are screened against each other. Advantageously, at least 50% of the members of each repertoire are screened against each other in each screen. Preferably, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% or even 100% of the members of each repertoire are so screened.

30 In the context of the present invention, "interact" refers to any detectable interaction between the molecules which comprise the various repertoires and, optionally, any additional molecules that comprise the screen. For example, in the case of antibody-antigen interactions one repertoire might comprise a diverse population of antibodies and the other a diverse population of antigens, the interaction being a binding interaction. Alternatively, the interaction can be an enzymatically-catalysed reaction, in which one repertoire is composed of enzymes and the other repertoire is composed of substrates therefor. Any interaction can be assayed using the present invention, including binding interactions, DNA methylation, nucleic acid degradation, nucleic acid cleavage (single or double stranded), signalling events, catalytic reactions, phosphorylation events,

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

11

glycosylation events, proteolytic cleavage, chemical reactions, cellular infection and combinations thereof. The detection of such interactions is well known in the art.

In the context of the present invention, "molecule" refers to any substance which can be applied to the screen. Such molecules can include peptides, polypeptides, nucleic acid molecules, purified proteins, recombinant proteins, amino acids, cDNAs, expressed cDNAs, oligonucleotides, nucleotides, nucleotide analogues, families of related genes or the corresponding proteins thereof, enzymes, DNA binding proteins, immunoglobulin family members, antibodies, T cell receptors, haptens, small organic molecules, non-organic compounds, metal ions, carbohydrates and combinations thereof. The creation of repertoires of such molecules is well known in the art. "Polypeptides" can refer to polypeptides such as expressed cDNAs, members of the immunoglobulin superfamily, such as antibody polypeptides or T-cell receptor polypeptides. Advantageously, antibody repertoires can comprise repertoires comprising both heavy chain ( $V_H$ ) and light chain ( $V_L$ ) polypeptides, which are either pre-assembled or assembled and screened according to the present invention. An antibody polypeptide, as used herein, is a polypeptide which either is an antibody or is a part of an antibody, modified or unmodified. Thus, the term antibody polypeptide includes a heavy chain, a light chain, a heavy chain-light chain dimer, a Fab fragment, a  $F(ab)_2$  fragment, a Dab fragment, a light or heavy chain single domain, and an Fv fragment, including a single chain Fv (scFv) or a di-sulphide bonded Fv (dsFv). Methods for the construction of such antibody molecules and nucleic acids encoding them are well known in the art. However, "polypeptides" can refer to other polypeptides, such as enzymes, antigens, drugs, molecules involved in cell signalling, such as receptor molecules, or one or more individual domains of larger polypeptides, which are capable of an interaction with a target molecule. Molecules according to the invention can be provided in cellular form, that is in the form of cells producing a molecule as described above, or in non-cellular form, that is not contained within cells. Cells can be, for example, bacterial cells, lower eukaryotic cells (e.g., yeasts), or higher eukaryotic cells (e.g., insect, amphibian, avian or mammalian cells). The use of yeast cells is also envisaged.

In the context of the present invention, the term "cellular population" refers to a collection of cells. The cells comprising a cellular population may all be of the same species and cell type, or they may be a mixed population. One embodiment of a cellular population comprises an essentially substantially uniform population of cells, for example mammalian fibroblasts, transformed with a library encoding variants of a given gene coding sequence.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

12

In the context of the present invention, the term "viral population" refers to a collection of virus particles. The particles comprising a viral population may all be of the same species and strain, or they may be a mixed population. One embodiment of a viral population comprises population of recombinant or randomly mutagenized particles, for example retroviral particles. A viral population can comprise multiple individuals carrying variations of one or more gene coding sequences.

"Juxtaposition", in the context of the present invention, includes but is not limited to physical contact. Two or more repertoires according to the invention can be juxtaposed such that the molecules are capable of interacting with one another in such a manner that the sites of interactions between the members of the repertoires can be correlated with their position. Alternatively, the repertoires can be juxtaposed with one another and with a target molecule such that the members of the repertoires interact with one another and then together interact with a target molecule.

An "array" as referred to herein, is a pre-determined spatial arrangement of the members of the repertoire. The array can take any physical form. The array can be created by manual or automated means and preferred arraying technologies are further described below.

A "dispensing event" is a single event whereby a substance is transferred from one discrete location to a second discrete location. A discrete location can be in the form of a well, a tube, a channel, a spot, a line, a rectangle, a sphere, a cube etc. Examples of single dispensing events include:

- (i) pipetting a liquid from one tube or well to a second tube or well. In this case pipetting aliquots of the same liquid into multiple tubes or wells would be considered to be multiple dispensing events, as would dispensing two or more different liquids into the same tube or well. or
- (ii) transferring liquid from a source well to a membrane by pin transfer to create a spot of that liquid. In this case spotting a second aliquot from the same source well onto a different destination location on the membrane would be considered a separate dispensing event. or
- (iii) transferring liquid from a single source well to create a single continuous line of liquid on a membrane. In this case creating a second separate line, even of the same liquid, would be considered a separate dispensing event. or

WO 01/98534

13

PCT/GB01/02831

(iv) dispensing a solution down a tube or channel. In this case, dispensing a different solution down the same tube or channel, or the same solution down a different tube or channel would be considered a separate dispensing event.

5 A "matrix" in the context of the present invention, is a particular kind of array which can be used to study substantially all possible interactions between substantially all the members in two or more repertoires of molecules. Such matrices can comprise a series of intersecting lines, channels or tubes, each containing one or more members of the repertoires. A single matrix will contain many individual lines, channels or tubes and  
10 many more intersections, or nodes.

The term "enhanced" as used herein means that a detected interaction is increased by at least 10% in the presence of a given molecule or molecules relative to the interaction in the absence of that molecule or molecules.

15

The term "blocked" as used herein means that a detected interaction is decreased by at least 10% in the presence of a given molecule or molecules relative to the interaction in the absence of that molecule or molecules.

20 The term "cellular fraction" as used herein means a portion of a cell lysate resulting from a cell fractionation process. Non-limiting examples of cell fractionation processes include, detergent extraction, salt extraction, acid precipitation, extraction of lipid soluble components, membrane isolation, extraction of water soluble or aqueous components, nucleic acid/cytoplasmic fractionation, and separations based on centrifugal forces (e.g., the S-  
25 100 fraction). Other separations considered to be cell fractionation processes include nucleic acid isolation, chromatographic separation of components of cell lysate or fractionated cell lysate, preparative electrophoretic fractionation, ion exchange and affinity separations (e.g., immunoprecipitation or immunoaffinity chromatography, His/Ni<sup>++</sup> interactions, GST/glutathione interactions, etc.).

30

#### Brief Description of the Drawings

35 **Figure 1:** Outline of one method for screening a repertoire of antibodies against a repertoire of antigens according to the present invention, demonstrating how hundreds of different antibodies could be screened simultaneously against hundreds of different antigens to identify interacting pairs. Specific interactions are indicated.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

14

**Figure 2:** Analysis of scFvs using a manually created matrix. Here, 21 antigens (horizontally) are screened against 16 scFvs (vertically). Four scFvs have been selected against ubiquitin by phage selection (Ub1b1, Ub1a1, R13 and R14). Two antigen clones are known to be ubiquitin (Q and T) and five other clones (A, P, R, S and U) have been identified in a primary screen as probably binding an anti-ubiquitin scFv. Each of the four anti ubiquitin scFvs binds the two known ubiquitin clones and each of the five potential ubiquitin clones. However, it can be seen that scFv Ub1b1 and scFv R14 are highly cross reactive.

**Figure 3:** A head for robotic line drawing according to the present invention designed for mounting on a robotic platform which allows movement in x, y and z dimensions. A row of fountain pen nibs delivers repertoire members in a liquid suspension, by capillary action to a suitable solid support. The nibs are mounted in such a way as to deliver liquid at an optimum angle to the solid support and then to be held vertical by a stop for loading with liquid from a 96 well microtitre plate.

**Figure 4:** Analysis of scFvs using a robotically created matrix. Double lines of 12 antigens (horizontally) are screened against 192 scFvs (vertically). Specific interactions can be observed at the intersections of specific pairings. In addition, scFvs that cross-react with the nitrocellulose can be seen as continuous horizontal lines as can scFvs that cross-react with substantially all antigens (horizontal spotting).

**Figure 5:** Example of creation and screening of a two-chain antibody repertoire. (a) A spotted array according to the prior art. Bacteria that secrete 1. Bovine Serum Albumin (BSA) binding heavy chains, 2. BSA binding light chains, 3. non binding heavy and light chains or 4. BSA binding heavy and light chains were mixed and then grown and induced in close proximity to immobilised BSA indicating that 1 and 2 need to be mixed to get a binding antibody (as seen in the control, 4). 32 separate dispensing events were required to produce this screen. (b) A matrix screen according to the present invention allows the same screen to be performed using only 8 dispensing events (the lack of a signal for 1 down with 2 across is probably due to a bubble being present between the filters during induction).

**Figure 6:** By increasing the density of the heavy and light chain lines higher density antibody arrays can be created and screened. Thus, 24 anti-BSA heavy chains and 48 anti-BSA light chains were drawn perpendicular to the x and y axes to create 1152 pairings screened against BSA.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

15

**Figure 7:** 384 unselected heavy chains and 384 unselected light chains were drawn perpendicular to the x and y axes and screened against BSA coated onto a nitrocellulose filter (147,456 combinations). A single specific heavy and light chain pairing was isolated which was subsequently confirmed as binding to nitrocellulose.

5

**Figure 8:** Schematic for three-dimensional screening according to the invention. Here, members of the repertoires are arranged in planes in the x, y and z axes and the interactions occur at the various vertices of the intersecting planes.

10

**Figure 9:** Proof of concept of a three-dimensional screen. The anti-BSA heavy chain is deposited on one plane, the anti-BSA light chain is deposited on a second plane, and BSA is deposited in the third plane. An interaction at their vertex is detected only when all three are present.

15

#### Detailed Description of the Invention

Matrices according to the present invention can be generated in many different ways to screen many different interactions involving many different molecules. The invention is characterised by the ability to screen substantially all combinations of members of two or more repertoires. We have shown that this can be performed using a series of intersecting lines, but other approaches which allow combinatorial screening of two or more repertoires using a minimum number of dispensing events are envisaged, such as the use of intersecting channels or tubes. Our method relies on the juxtaposition of continuous groupings of molecules to create a web in two or three dimensions whereby members of the different repertoires come together and potentially interact with one another. This contrasts with screening protocols in the prior art, whereby discontinuous spotting or compartmentalised wells are used to segregate individual combinations of molecules. In the present invention, continuous lines, channels or tubes intersect one another such that individual combinations of molecules exist at their points of intersection, or nodes. Taken as a whole, the molecular 'web' or 'network' thereby created can be used not only to identify specific interacting pairs, but also the overall pattern of interactions between two repertoires. The information so provided can be used to compare the performance of members of either of the repertoires with one another and in particular can be used to rapidly identify cross-reactivities of individual repertoire members within the matrix.

35

**Repertoires for screening**

Many different repertoires can be used with the present invention, the construction of which is well known by those skilled in the art. Repertoires of small organic molecules can be constructed by methods of combinatorial chemistry. Repertoires of peptides can be synthesised on a set of pins or rods, such as described in WO84/03564. A similar method involving peptide synthesis on beads, which forms a peptide repertoire in which each bead is an individual repertoire member, is described in U.S. Patent No. 4,631,211 and a related method is described in WO92/00091. A significant improvement of the bead-based methods involves tagging each bead with a unique identifier tag, such as an oligonucleotide, so as to facilitate identification of the amino acid sequence of each library member. These improved bead-based methods are described in WO93/06121. Although these repertoires could be constructed prior to arraying to produce the matrix, it is envisaged that all the techniques described above could be adapted for *in situ* synthesis of the repertoire members directly on the matrix itself - thus linking repertoire construction and repertoire screening according to the present invention. Indeed, another chemical synthesis method involves the synthesis of arrays of peptides (or peptidomimetics) on a surface in a manner that places each distinct library member (e.g., unique peptide sequence) at a discrete, predefined location in the array. The identity of each library member is therefore determined by its spatial location in the array. The locations in the array where binding interactions between a predetermined molecule (e.g., a receptor) and reactive library members occur is determined, thereby identifying the sequences of the reactive library members on the basis of spatial location. These methods are described in U.S. Patent No. 5,143,854; WO90/15070 and WO92/10092; Fodor *et al.* (1991) *Science*, **251**: 767; Dower and Fodor (1991) *Ann. Rep. Med. Chem.*, **26**: 271 and could be easily be adapted for creation of matrices according to the present invention.

The present invention is especially useful for the screening of protein-protein interactions, particularly antibody-antigen interactions. The preparation of appropriate antibody repertoires useful in the present invention is described in WO 99/20749, the disclosure of which is incorporated herein by reference. WO 99/20749 describes how a library of immunoglobulins can be prepared and preselected using a generic ligand, and/or prepared using a single main-chain conformation. Libraries as described in WO 99/20749 can be expressed in host organisms, as described therein or according to techniques well known in the art, to produce repertoires of polypeptides which are suitable for arraying and use in the present invention. Alternatively, polypeptides can be synthesised *in situ* for use in the present invention, or expressed using *in vitro* transcription/translation.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

17

**Arraying members of the repertoires to create the matrix screen**

According to the present invention, molecules can be arrayed by any one of a variety of methods, manual or automated, in order to create a matrix, depending upon whether the molecules are arrayed as such or expressed by arrayed nucleotide precursors, which may or may not be present in host cells. Arrays are advantageously created by robotic means, since robotic techniques allow the creation of precise and condensed matrices, which can be easily replicated so that, for example, a combinatorial antibody repertoire created according to the invention can be screened against many different target ligands. Robotic platforms are well-known in the art, and machines are available from companies such as Genetix, Genetic MicroSystems and BioRobotics which are capable of arraying at high speed with great accuracy over small or large surfaces. Such machines are capable of spotting purified protein, supernatant or cells onto porous or non-porous surfaces, such that they can subsequently be fixed thereto if necessary to produce stable arrays. Although robotic manipulation is the preferred method for creating high density arrays, any technique, including manual techniques, which is suitable for locating molecules or cells at pre-defined locations on a support, can be used. Arraying can be regular, such that lines are 'drawn' at a given distance from the next, irregular or random.

The repertoires of molecules can be screened in solution for interactions or one or more of the repertoires can be immobilised on a solid support. Thus, two solutions can flow down two channels such that at their point of intersection an interaction occurs which can be detected by, for example, a colorimetric, fluorescent, or luminescent reaction. Alternatively, one of the repertoires could be immobilised on a nitrocellulose membrane by, for example, cross-linking and then solutions corresponding to a second repertoire could be 'drawn' onto the support harbouring the immobilised members of the first repertoire. Such immobilisation can be direct or indirect. For example, indirect immobilisation can involve arraying a polypeptide repertoire onto a solid support coated with a generic ligand.

In one aspect, members of the repertoires are directed to their positions by means of a tagging system, such that each line, channel or tube binds or is predisposed to bind a particular member of the repertoire. For example, each polypeptide in one member of a repertoire can comprise a tag, such as an epitope for a known antibody, or a member of an affinity pair (e.g., avidin/biotin, etc.). The line, channel or tube is coated with a corresponding molecule that binds the tag (e.g., an antibody specific for the epitope tag, or the corresponding member of the binding pair). Contacting the coated line, channel or

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

18

tube with a solution comprising the tagged member of the repertoire will effect the arrangement of that member on the array.

5 Alternatively, both repertoires could be immobilised on a separate solid supports and then juxtaposed to identify interacting pairs. In a preferred aspect of the invention, matrices of polypeptides can be created by first arraying their nucleic acid precursors in host cells and then by expressing the nucleotide sequences to produce the corresponding polypeptides.

10 In one aspect, yeast cells can be used to express one or more repertoires of molecules useful in a method according to the invention. Methods of introducing and expressing exogenous nucleic acids in yeast are well known in the art. One preferred approach using yeast takes advantage of yeast two-hybrid techniques. In this approach, one population of yeast is transformed with a library encoding a repertoire of fusions with one member of a two-hybrid pair, and another population is transformed with a library encoding a repertoire of fusions with the corresponding second member of a two-hybrid pair. The two yeast cell populations are of different mating types. The two populations are arranged so as to create an array, such that yeast cells containing all members of the first repertoire intersect with yeast cells containing all members of the second repertoire, and the cells are allowed to mate. Interactions between members of the first repertoire and the second repertoire will generate a signal from an appropriate two-hybrid reporter construct.

15 In another aspect, insect, amphibian, avian, mammalian or other higher eukaryotic cells can be used. As a non-limiting example, a repertoire of molecules (small organic molecules, peptides, polypeptides, etc.) can be screened for those that interact with a repertoire of modified recombinant cell surface receptors (e.g., a receptor with a variable cassette inserted in a region instrumental in ligand binding or activation) by creating an array in which each member of the repertoire of molecules intersects with each member of the repertoire of receptors. Subsequent detection of receptor activation or inhibition in the cells indicates which of the molecules affected the activity of which modified receptor. The process permits both the identification of new modulators of the receptor or other protein, and the rapid identification of structure/function relationships. The method can also be adapted to use higher eukaryotic cells for the expression of both repertoires being analysed for interaction. This would be accomplished, for example, by expressing both repertoires as cell surface molecules, or for example, by expressing one repertoire as a secreted protein and the other as a cell surface protein. Upon contact or close juxtaposition of the cells expressing the respective repertoires, productive interaction of members of each repertoire with members of the other can be detected. One skilled in the

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

19

art can readily generate higher eukaryotic cells expressing a given repertoire of polypeptides.

Methods of detecting interactions will vary with the exact nature of the array generated. For example, methods will vary depending on whether the array uses cells or not. Non-limiting examples of detection methods include: fluorescence resonance energy transfer (FRET); fluorescence quenching; reporter expression (e.g., luciferase, GST, chloramphenicol acetyl transferase,  $\beta$ -galactosidase, antibiotic resistance); rescue from auxotrophy; signalling events, such as changes in second messenger levels, GDP for GTP exchange, kinase activation or phosphorylation, phosphatase activation or dephosphorylation, proteolysis or altered ion permeability; enzymatic reactions; methylation; nucleic acid cleavage; glycosylation; proteolysis; and infection (e.g., with a virus or phage). Each of these approaches or read-outs for the detection of interactions is known in the art such that one of ordinary skill can employ them in the methods of the invention without the need for undue experimentation.

15

#### Use of molecules selected according to the invention

Molecules selected according to the method of the present invention can be employed in substantially any process. Where the molecules are polypeptides, they can be used in any process which involve binding or catalysis, including *in vivo* therapeutic and prophylactic applications, *in vitro* and *in vivo* diagnostic applications, *in vitro* assay and reagent applications, and the like. For example, antibody molecules can be used in antibody based assay techniques, such as ELISA techniques, Western blotting, immunohistochemistry, affinity chromatography and the like, according to methods known to those skilled in the art.

20  
25

As alluded to above, the molecules selected according to the invention are of use in diagnostic, prophylactic and therapeutic procedures. For example, enzyme variants generated and selected by these methods can be assayed for activity, either *in vitro* or *in vivo* using techniques well known in the art, by which they are incubated with candidate substrate molecules and the conversion of substrate to product is analysed. Selected cell-surface receptors or adhesion molecules might be expressed in cultured cells which are then tested for their ability to respond to biochemical stimuli or for their affinity with other cell types that express cell-surface molecules to which the undiversified adhesion molecule would be expected to bind, respectively.

30  
35

Therapeutic and prophylactic uses of proteins prepared according to the invention involve the administration of polypeptides selected according to the invention to a recipient

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

20

mammal, such as a human. Of particular use in this regard are antibodies, other receptors (including, but not limited to T-cell receptors) or binding protein thereof.

5 Substantially pure molecules of at least 90 to 95% homogeneity are preferred for administration to a mammal, and 98 to 99% or more homogeneity is most preferred for pharmaceutical uses, especially when the mammal is a human. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the selected polypeptides can be used diagnostically or therapeutically (including extracorporeally) or in developing and performing assay procedures, immunofluorescent staining and the like (Lefkowitz and Pernis, (1979 and 10 1981) Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY).

The selected antibodies or binding proteins thereof of the present invention will typically find use in preventing, suppressing or treating inflammatory states, allergic hypersensitivity, cancer, bacterial or viral infection, and autoimmune disorders (which 15 include, but are not limited to, Type I diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease and myasthenia gravis).

In the instant application, the term "prevention" involves administration of the protective composition prior to the induction of the disease. "Suppression" refers to administration 20 of the composition after an inductive event, but prior to the clinical appearance of the disease. "Treatment" involves administration of the protective composition after disease symptoms become manifest.

Animal model systems which can be used to screen the effectiveness of the antibodies or 25 binding proteins thereof in protecting against or treating the disease are available. Methods for the testing of systemic lupus erythematosus (SLE) in susceptible mice are known in the art (Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.*, **147**: 1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, **299**: 515). Myasthenia Gravis (MG) is tested in SJL/J female mice by inducing the disease with soluble AchR protein from another species (Lindstrom *et al.* 30 (1988) *Adv. Immunol.*, **42**: 233). Arthritis is induced in a susceptible strain of mice by injection of Type II collagen (Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, **42**: 233). A model by which adjuvant arthritis is induced in susceptible rats by injection of mycobacterial heat shock protein has been described (Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, **331**: 171). Thyroiditis is induced in mice by administration of thyroglobulin as described (Maron *et al.* 35 (1980) *J. Exp. Med.*, **152**: 1115). Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) occurs naturally or can be induced in certain strains of mice such as those described by Kanasawa *et al.* (1984) *Diabetologia*, **27**: 113. EAE in mouse and rat serves as a model for MS in human. In this model, the demyelinating disease is induced by administration

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

21

of myelin basic protein (see Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer *et al.*, eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin *et al.* (1973) *Science*, 179: 478; and Satoh *et al.* (1987) *J. Immunol.*, 138: 179).

- 5 The selected antibodies, receptors (including, but not limited to T-cell receptors) or binding proteins thereof of the present invention can also be used in combination with other antibodies, particularly monoclonal antibodies (MAbs) reactive with other markers on human cells responsible for the diseases. For example, suitable T-cell markers can include those grouped into the so-called "Clusters of Differentiation," as named by the  
10 First International Leukocyte Differentiation Workshop (Bernhard *et al.* (1984) *Leukocyte Typing*, Springer Verlag, NY).

- Generally, the present selected antibodies, receptors or binding proteins will be utilised in purified form together with pharmacologically appropriate carriers. Typically, these  
15 carriers include aqueous or alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, any including saline and/or buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride and lactated Ringer's. Suitable physiologically-acceptable adjuvants, if necessary to keep a polypeptide complex in suspension, can be chosen from thickeners such as carboxymethylcellulose,  
20 polyvinylpyrrolidone, gelatin and alginates.

- Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers and electrolyte replenishers, such as those based on Ringer's dextrose. Preservatives and other additives, such as antimicrobials, antioxidants, chelating agents and inert gases, can also be present (Mack  
25 (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition).

- The selected polypeptides of the present invention can be used as separately administered compositions or in conjunction with other agents. These can include various  
30 immunotherapeutic drugs, such as cyclosporine, methotrexate, adriamycin or cisplatinum, and immunotoxins. Pharmaceutical compositions can include "cocktails" of various cytotoxic or other agents in conjunction with the selected antibodies, receptors or binding proteins thereof of the present invention, or even combinations of selected polypeptides according to the present invention having different specificities, such as polypeptides selected using different target ligands, whether or not they are pooled prior to  
35 administration.

The route of administration of pharmaceutical compositions according to the invention can be any of those commonly known to those of ordinary skill in the art. For therapy,

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

22

including without limitation immunotherapy, the selected antibodies, receptors or binding proteins thereof of the invention can be administered to any patient in accordance with standard techniques. The administration can be by any appropriate mode, including parenterally, intravenously, intramuscularly, intraperitoneally, transdermally, *via* the pulmonary route, or also, appropriately, by direct infusion with a catheter. The dosage and frequency of administration will depend on the age, sex and condition of the patient, concurrent administration of other drugs, counterindications and other parameters to be taken into account by the clinician.

10 The selected polypeptides of this invention can be lyophilised for storage and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional immunoglobulins and art-known lyophilisation and reconstitution techniques can be employed. It will be appreciated by those skilled in the art that lyophilisation and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss (e.g. with conventional immunoglobulins, IgM antibodies tend to have greater activity loss than IgG antibodies) and that use levels may have to be adjusted upward to compensate.

20 The compositions containing the present selected polypeptides or a cocktail thereof can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In certain therapeutic applications, an adequate amount to accomplish at least partial inhibition, suppression, modulation, killing, or some other measurable parameter, of a population of selected cells is defined as a "therapeutically-effective dose". Amounts needed to achieve this dosage will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's own immune system, but generally range from 0.005 to 5.0 mg of selected antibody, receptor (e.g. a T-cell receptor) or binding protein thereof *per* kilogram of body weight, with doses of 0.05 to 2.0 mg/kg/dose being more commonly used. For prophylactic applications, compositions containing the present selected polypeptides or cocktails thereof can also be administered in similar or slightly lower dosages.

30 A composition containing a selected polypeptide according to the present invention can be utilised in prophylactic and therapeutic settings to aid in the alteration, inactivation, killing or removal of a select target cell population in a mammal. In addition, the selected repertoires of polypeptides described herein can be used extracorporeally or *in vitro* selectively to kill, deplete or otherwise effectively remove a target cell population from a heterogeneous collection of cells. Blood from a mammal can be combined extracorporeally with the selected antibodies, cell-surface receptors or binding proteins

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

23

thereof whereby the undesired cells are killed or otherwise removed from the blood for return to the mammal in accordance with standard techniques.

The invention is further described, for the purpose of illustration only, in the following examples.

#### Example 1

##### Matrix Screening of a scFv Repertoire

10 The two filter capture system used as part of the present example is based upon that described in our co-pending UK patent application entitled "Array Screening Method", (UK Patent Application Number: 9928787.2). Bacteria are grown in lines on one filter and the scFvs thereby produced are captured on a second filter that has lines of antigen bound to the nitrocellulose, which are oriented at 90° from those lines of scFv on the first filter (see Fig 1). At intersections where scFv interacts with antigen, the scFv is captured if the antigen and scFv bind. In this example, detection of bound scFv is performed with superantigen Protein L conjugated to HRP.

#### Methods

20

##### *Antigen library*

The antigens are from human expression library hEX1, prepared from foetal brain poly(A)<sup>+</sup> RNA by oligo(dT)-priming (Büssow et al 1998). cDNAs are cloned directionally in a modified pQE-30 vector (Qiagen).

25

##### *Antigen filters*

Antigen clones were grown overnight in liquid culture (2xTY containing 100 µg/ml Amp, and 1 % glucose) at 37 °C. For manual line drawing, liquid cultures were transferred to a pre-wetted PVDF filter (soak in ethanol, rinse in PBS and dip in 2xTY) by drawing along the filter against a metal ruler with a p10 filter tip (Art) not mounted on a pipette. Thus, the capillary action of the tip was used for delivery of the liquid onto the surface of the membrane. Each clone was drawn onto the filter 6 mm from the previous one. For automated line drawing, liquid cultures were transferred to a PVDF filter using the robotic head depicted in Fig 3 attached to a Kaybee Systems picker/griddler system. Each clone was drawn onto the filter 4.5mm mm from the previous one at a speed of 25 mm/s.

The antigen filters were then grown overnight on TYE agar plates containing 100 µg/ml Amp, 1 % glucose at 30 °C. The filter was then transferred to another TYE agar plate

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

24

containing 100 µg/ml Amp, 1mM IPTG for 3h at 37 °C for induction of the clones. Antigen filters were removed from the plate and denatured on pre-soaked blotting paper containing 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl for 10 min, neutralised for 2 x 5 min in 1M Tris-HCl, pH7.5, 1.5M NaCl and incubated for 15 min in 2 x SSC. Filters were dried, soaked  
5 briefly in ethanol and then blocked in 4 % Marvel PBS, rinsed in PBS and dipped in 2xTY.

#### *ScFv library*

The scFvs are from a library based on a single human framework for V<sub>H</sub> (V3-23/DP-47 and J<sub>H</sub>4b) and V<sub>K</sub> (O12/O2/DPK9 and J<sub>K</sub>1), with side chain diversity (NNK or DVT encoded) incorporated at positions in the antigen binding site that make contacts to antigen in known structures and are highly diverse in the mature repertoire. The fold that is used is frequently expressed *in vivo*, and binds to the generic ligands Protein L and A, which facilitate capture or detection of the scFvs but do not interfere with antigen  
10 binding. The scFv clones have been pre-screened in scFv format for binding to Protein A and Protein L to ensure that they were functional.

#### *ScFv filter*

Antibody clones were grown overnight in liquid culture (2xTY containing 100 µg/ml ampicillin and 1% glucose) at 37°C. Liquid cultures were then transferred to a pre-blocked nitrocellulose filter (4% skimmed milk powder in PBS for 1 hour at room temperature (RT), rinse in PBS and dip in 2xTY). Manual and robotic transfer of antibodies to the filter was performed as for the antigen cultures, except that the density of scFvs lines created by robotic transfer was one every 1.125 mm.  
20

ScFv filters were then grown on TYE agar plates containing 100 µg/ml Amp, 1 % glucose at 37 °C. After overnight growth the antigen filter was placed onto a fresh TYE agar plate 100 µg/ml Amp, 1mM IPTG, dried, and then the scFv filter was placed on top of this. The plate with the two filters was then incubated for 3h at 30 °C for induction of the scFvs.  
25

*Probing of filters*  
The top (scFv) filter was discarded and the second (antigen) filter was washed 3 x with PBS/0.05% Tween (PBST) and blocked with 4% MPBS for 30 min at RT. The filters were washed 3x with PBST and then incubated with a Protein L HRP conjugate (Actigen, 1/2000) in 4% MPBS for 1 hr at RT. Filters were then washed a further three times with PBST and developed with ECL reagent. All incubations were performed in 50 ml of buffer on a gently agitating shaker.  
30

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

25

## Results

As a model system, we performed a manual matrix screen of 21 antigens against 16 scFvs, resulting in 336 interactions being tested using only 37 dispensing events. Included in the scFv repertoire were four scFvs that had been selected against ubiquitin by phage selection (Ub1b1, Ub1a1, R13 and R14). Included in the antigen repertoire were two clones known to be ubiquitin (Q and T) and five other clones (A, P, R, S and U) that had been identified in a primary screen as probably binding an anti ubiquitin scFv. As can be seen (Fig 2), each of the four anti ubiquitin scFvs bound the two known ubiquitin clones and each of the five potential ubiquitin clones. However, it can be seen that scFv Ub1b1 and scFv R14 are highly cross reactive. Also included in the model array were 14 antigen clones identified in a primary antigen array screen as possible binders to twelve scFv clones C2 to H11. As can be seen from the matrix (Fig 2), antigen M (a protein of unknown function) binds specifically to scFv D12. Also antigen E, (a DNA binding protein) binds specifically to scFv H11. This demonstrates the utility of the matrix screen in confirming interactions originally identified in an antigen array screen.

We then moved to a higher density matrix screen, using a robotic head (Fig 3a - design. Fig 3b - photograph) to draw the lines. In this system double lines of 12 antigens (horizontally) are screened against 192 scFvs (vertically). Thus, 2304 different potential interactions were tested each twice over using only 216 dispensing events. Again many different interactions are observed at the intersections of the lines, particularly against three antigens (two of which are the same).

## 25 Example 2

### Creation and screening of a two-chain antibody repertoire according to the present invention

The two filter capture system used as part of the present example is based upon that described in our co-pending UK patent application entitled "Array Screening Method", (UK Patent Application Number: 9928787.2). Previously, it has been shown that antibody heavy and light chains can associate in solution to form Fv fragments that have an active antigen-binding site and such techniques are well known in the art. In order to check whether the non-covalent association of the particular heavy and light chain was of sufficient strength for such association to occur on an array, we split the heavy and light chain of a phage selected anti-BSA scFv (13cg2). As we were unsure how strong the association between heavy and light chains would be, we cloned the 13cg2 heavy and light chains separately into three recombinant fragment formats; heavy or light chain

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

26

alone (single domains); scFv (with a 15 amino acid linker between heavy and light chain) and diabody (with a zero amino acid linker between heavy and light chain). The latter two formats were constructed with either light or heavy chain 13cg2 diversity, with the non-diversified chain in each case being a dummy heavy or light chain. (The dummy chain has a single but unknown antigen-binding specificity.) Testing of the various formats on the array, using BSA as the antigen, indicates that the diabody formats provide the most stable association on the filter surface.

Bacteria expressing either a Bovine Serum Albumin (BSA) binding heavy chain (1), a BSA binding light chain (2), non binding heavy and light chains (3) or BSA binding heavy and light chains (4), all in the diabody format described above, were either mixed and grown as spots (Figure 5a) or drawn as horizontal and vertical lines and then grown (Figure 5b). In both cases, after overnight growth the filters harbouring the grown bacteria were laid on top of a second filter coated with BSA and then induced for protein expression. Only in those cases where a binding heavy chain is co-expressed with a binding light chain is a positive signal observed (i.e. 1 and 2 together or any combination involving 4). The lack of a signal for 1 down with 2 across is probably due to a bubble being present between the filters during induction). The drawing of lines dramatically reduces the number of dispensing events (in this case from 32 to 8).

By increasing the density of the heavy and light chain lines higher density antibody arrays can be created and screened. Thus, 24 anti-BSA heavy chains and 48 anti-BSA light chains were drawn perpendicular to the x and y axes to create 1152 pairings screened against BSA (Figure 6). In an even higher density format 384 unselected heavy chains and 384 unselected light chains were drawn perpendicular to the x and y axes and screened against BSA coated onto a nitrocellulose filter (147,456 combinations). A single specific heavy and light chain pairing was isolated which was subsequently confirmed as binding to nitrocellulose (Figure 7). If the screen were to be increased to cover 1000 heavy chains versus 1000 light chains (1 million different antibodies) the number of dispensing events would be reduced from 2 million to 2 thousand by using the method according to the present invention.

### Example 3

#### Three-dimensional screening

A schematic for three-dimensional screening according to the invention is shown (Figure 8). Here, members of the repertoires are arranged in planes in the x, y and z axes and the interactions occur at the various vertices of the intersecting planes. As a proof of concept,

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

27

an anti-BSA heavy chain is deposited on one plane, an anti-BSA light chain is deposited on a second plane, and BSA is deposited in the third plane. An interaction at their vertex is detected only when all three are present (Figure 9).

- 5 All publications mentioned in the above specification, and references cited in said publications, are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it
- 10 should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

28

**Claims**

1. A method for screening a first repertoire of molecules against a second repertoire of molecules to identify those members of the first repertoire which interact with members of the second repertoire, comprising :
- 5 (b) arranging the first and second repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed to substantially all members of the second repertoire; and
- (b) detecting an interaction between the members of the first and second repertoires.
- 10
2. A method according to claim 1, wherein members of both the first repertoire and the second repertoire are arranged in a series of lines, channels or tubes, each containing a member of the first or second repertoires such that the lines, channels or tubes corresponding to the first repertoire and those corresponding to the second repertoire are
- 15 juxtaposed to one another so that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire.
3. A method according to claim 2, wherein each line, channel or tube comprises a group of different members of the first and second repertoires, respectively.
- 20
4. A method according to any preceding claim, wherein members of the first and second repertoires are run along channels cut or etched into a solid material such that substantially all the channels containing members of the first repertoire intersect substantially all the channels containing members of the second repertoire.
- 25
5. A method according to any one of claims 1 to 3, wherein members of the first and second repertoires are applied to a single support.
6. A method according to any one of claims 1 to 3, comprising the steps of:
- 30 (a) arranging the first and second repertoires on first and second supports;
- (b) juxtaposing the first and second supports such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire; and
- (c) detecting the interactions between the members of the first and second repertoires.
- 35
7. A method according to any preceding claim, wherein the first and second repertoires are selected from the group consisting of repertoires of: peptides; polypeptides; nucleic acid molecules; purified proteins; recombinant proteins; amino

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

29

acids; cDNAs; expressed cDNAs; oligonucleotides; nucleotides; nucleotide analogues; families of related genes or the corresponding proteins thereof; enzymes; DNA binding proteins; immunoglobulin family members; antibodies; T cell receptors; haptens; small organic molecules; non-organic compounds; metal ions; and carbohydrates.

5

8. A method according to any preceding claim, wherein the interaction between the members of the first and second repertoires is selected from the group consisting of: a binding interaction; DNA methylation; nucleic acid degradation; nucleic acid cleavage (single or double stranded); a signalling event; a catalytic reaction; a phosphorylation event; a glycosylation event; proteolytic cleavage; a chemical reaction; and cellular infection.

10

9. A method for screening first, second and third repertoires of molecules against each other to identify those members of the first, second and third repertoires which interact, comprising:

15

(a) arranging the first, second and third repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first, second and third repertoires are juxtaposed; and  
(b) detecting the interaction/s between the members of the first, second and third repertoires.

20

10. A method for creating and screening a combinatorial library of two-chain polypeptides, each of which comprises one member of a first repertoire and one member of a second repertoire, which method comprises:

25

(a) arranging the first and second repertoires, such that substantially all members of the first repertoire intersect substantially all members of the second repertoire, thereby generating at their intersections substantially all combinations of functional two-chain polypeptides; and optionally

(b) detecting the interaction between the two-chain polypeptides and a target molecule.

30

11. A method according to claim 10, wherein the combinatorial library so produced is screened for interactions with more than one target molecule.

35

12. A method according to claim 10 or claim 11, wherein a three-chain polypeptide library is created (and optionally screened) using first, second and third repertoires of molecules in three dimensions.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

30

13. A method according to any preceding claim, whereby the pattern of interactions between the first, second (and optionally third) repertoires is used to identify positive interactions, negative interactions, specific interactions or cross-reactive interactions, or is used to construct a phylogenic tree inferring the similarity between members of the first repertoire (using the pattern of interactions with the second and/or, optionally third, repertoires), of the second repertoire (using the pattern of interactions with the first and/or, optionally third, repertoires) and/or of the third repertoire (using the pattern of interactions with members the first and/or second repertoires).
- 10 14. A method according to any preceding claim, whereby one or more of the first, second and, optionally, third repertoires comprise a plurality of nucleic acid molecules which are expressed to produce their corresponding polypeptides *in situ* in the array.
- 15 15. A method according to claim 14, wherein the nucleic acid molecules are in the form of expression vectors which encode the members of the repertoire of polypeptides operatively linked to control sequences sufficient to direct their transcription.
16. A method according to claim 15, wherein the expression vector is a bacteriophage.
- 20 17. A method according to claim 16, wherein the expression vector is a plasmid.
18. A method according to claim 16, wherein the expression vector is a linear nucleic acid molecule.
- 25 19. A method according to any one of claims 14 to 18, wherein the nucleic acids are contained and expressed within cells.
20. A method according to claim 19, wherein the cells are selected from the group consisting of bacterial cells, lower eukaryotic cells and higher eukaryotic cells.
- 30 21. A method according to any one of claims 14 to 18, wherein the nucleic acid molecules are immobilised in the form of naked or complexed nucleic acid.
22. A method according to any previous claim, wherein the repertoire members are arrayed using robotic means.
- 35

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

31

23. A method for screening a first repertoire of molecules against a second repertoire of molecules to identify those members of the first repertoire which do not interact with those members of the second repertoire, comprising :
- 5 (a) arranging the first and second repertoires, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire; and
- (b) identifying those members of the first and second repertoires that do not interact with one another.
- 10 24. A method for screening a first repertoire of molecules against a second repertoire of molecules to identify members of the first and second repertoires whose interactions with one another are dependant on the presence or absence of a third molecule or set of molecules, comprising:
- 15 (a) arranging the first and second repertoires, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed with substantially all members of the second repertoire; and
- (b) detecting the interactions between members of the first repertoire and the members of the second repertoire in the presence of different concentrations of the third molecule or set of molecules.
- 20 25. A method according to claim 24, wherein the third molecule or set of molecules interacts with certain members of the first repertoire, thereby enabling those members of the first repertoire to interact with certain members of the second repertoire.
- 25 26. A method according to claim 24, wherein the interactions between the members of the first and second repertoire require the simultaneous binding of these members to the third molecule or set of molecules.
27. A method according to claim 24, wherein the interactions between the members of 30 the first and second repertoire are enhanced by the presence of a third molecule or set of molecules.
28. A method according to claim 24, wherein the interactions between the members of 35 the first and second repertoire are blocked by the presence of a third molecule or set of molecules.
29. An apparatus for drawing high density lines comprising members of the first, second and, optionally third repertoire of molecules.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

32

30. An apparatus which comprises intersecting channels or tubes along which members of the first, second and, optionally third repertoire of molecules can pass.
- 5
31. A method according to claim 1, wherein fewer dispensing events are required than the number of interactions to be tested.
- 10
32. A method according to claim 31, wherein members of at least one but not all repertoires are arranged in a series of lines, channels or tubes, each containing a member of that repertoire such that the lines, channels or tubes corresponding to that repertoire intersect with substantially all members of the other repertoires, howsoever arranged.
- 15
33. A method according to claim 32 wherein members of the both the first repertoire and the second repertoire are arranged in a series of lines, channels or tubes, each containing a member of the first or second repertoires such that the lines, channels or tubes corresponding to the first repertoire and those corresponding to the second repertoire are contacted with one another so that more interactions are tested than there were dispensing events.
- 20
34. A method for identifying the most favourable conditions for any biological interaction which method comprises an assay involving substantially all combinations of two or more different sets of variable parameters, such that each set of parameters is created by way of intersecting lines, channels or tubes.
- 25
35. A method according to claim 34, wherein the parameters to be varied are taken from the group consisting of, but not limited to, the following: any buffer composition, a substrate concentration, pH, temperature, denaturants and renaturants.
- 30
36. A method for screening two or more repertoires of enzymes which comprise a two or more step enzymatic reaction to identify those members of the first repertoire and those members of the second repertoire which together create a given product from a given substrate, which method comprises:
- 35
- (a) arranging the first and second repertoires to form at least one array, such that substantially all members of the first repertoire are juxtaposed to substantially all members of the second repertoire; and
  - (b) detecting the formation of product at the intersections of the members of the first and second repertoires.

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

33

37. A method for screening different cellular populations against different viral populations to identify those viral populations that infect those cellular populations, which method comprises:
- 5
- (a) arranging the cellular populations and the viral populations to form at least one array, such that substantially all the different cellular fractions are juxtaposed with substantially all the viral populations; and
  - (b) detecting those viral populations that infect those cellular populations.
- 10
38. A method for screening different cellular fractions against one another to identify those cellular fractions that contain components which interact with components in other cellular fractions, which method comprises:
- (a) arranging the cellular fractions to form at least one array, such that all the different cellular fractions are juxtaposed to one another; and
  - (b) detecting the interaction/s at the intersections of the different cellular fractions.
- 15
39. A method for screening different cellular populations against one another to identify those cellular populations interact with other cellular populations, which method comprises:
- 20
- (a) arranging the cellular populations to form at least one array, such that substantially all the different cellular fractions are juxtaposed to one another; and
  - (b) detecting the interaction/s at the intersections of the different cellular populations.
- 25
40. A method for screening a peptide repertoire against the same peptide repertoire to identify those members of the peptide repertoire that interact with other members of the peptide repertoire, which method comprises:
- (a) arranging the members of the peptide repertoire to form at least one array, such that substantially all the members of the peptide repertoire are juxtaposed to one another; and
  - (b) detecting the interaction/s at the intersections of the different members of the peptide repertoire.
- 30
41. A method for screening a polypeptide repertoire against the same polypeptide repertoire, in order to identify those members of the polypeptide repertoire that interact with other members of the polypeptide repertoire, which method comprises:
- 35

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

34

- (a) arranging the members of the polypeptide repertoire to form at least one array, such that substantially all the members of the polypeptide repertoire are juxtaposed to one another; and
- (b) detecting the interaction/s at the intersections of the different members of the polypeptide repertoire.
42. A method according to claims 1, 40 or 41, which method use the yeast two-hybrid system to identify those members of the repertoires of molecules that interact with one another.
43. A method according to claims 36 to 42, which method uses a series of intersecting lines, channels or tubes to create the array.
44. A method for creating (and optionally screening) a combinatorial library consisting of substantially all members of a first repertoire of polypeptides paired with substantially all members of a second repertoire of polypeptides, which method comprises:
- (a) arranging a repertoire of host cells containing a plurality of nucleotide sequences (each able to encode a different polypeptide member of the first repertoire) and a plurality of nucleotide sequences (each able to encode a different polypeptide member of the second repertoire) to create an array, such that cells containing substantially all members of the first repertoire intersect with nucleotide sequences corresponding to substantially all members of the second repertoire; and
- (b) transforming the cells containing the nucleotide members of the first repertoire with the nucleotide sequences that encode the members of the second repertoire where the two repertoires intersect; and optionally
- (c) expressing the nucleotide sequences to produce the corresponding polypeptides of the first and second repertoires; and optionally
- (d) detecting the interaction/s between the polypeptide members of the first and second repertoires.
45. A method for creating (and optionally screening) a combinatorial library consisting of all members of a first repertoire of polypeptides paired with all members of a second repertoire of polypeptides, which method comprises:
- (a) arranging a first repertoire consisting of a plurality of nucleotide sequences (each able to encode a different polypeptide member of the first repertoire) and a second repertoire consisting of a plurality of nucleotide sequences (each able to encode a different polypeptide member of the second repertoire) to create an array, such

WO 01/98534

35

PCT/GB01/02831

- that substantially all members of the first repertoire intersect with substantially all members of the second repertoire; and
- (b) contacting the array created in (a) with host cells that are able to be transformed with members of both the first and second repertoires; and optionally
- 5 (c) expressing the nucleotide sequences to produce the corresponding polypeptides of the first and second repertoires inside the host cells; and optionally
- (d) using the array thereby created to perform a functional assay that requires the presence of members of the first and second repertoire.
- 10 46 A method for creating (and optionally screening) a combinatorial library consisting of substantially all members of a first repertoire of polypeptides paired with substantially all members of a second repertoire of polypeptides, which method comprises:
- (a) arranging a repertoire of host cells containing a plurality of nucleotide sequences
- 15 (each able to encode a different polypeptide member of the first repertoire) and a plurality of viruses containing a plurality of nucleotide sequences (each able to encode a different polypeptide member of the second repertoire) to create an array, such that cells containing substantially all nucleotide members of the first repertoire intersect with the viruses containing substantially all nucleotide
- 20 members of the second repertoire; and
- (b) infecting the cells containing the nucleotide members of the first repertoire with the viruses that contain the nucleotide members of the second repertoire where the two repertoires intersect; and optionally
- (c) expressing the nucleotide sequences to produce the corresponding polypeptides of
- 25 the first and second repertoires; and optionally
- (d) detecting the interaction/s between the polypeptide members of the first and second repertoires.
- 47 A method for creating (and optionally screening) a yeast two hybrid library
- 30 consisting of substantially all members of a first repertoire of polypeptides paired with substantially all members of a second repertoire of polypeptides, which method comprises:
- (a) arranging yeast cells containing a plurality of nucleotide sequences (each able to
- 35 encode a different polypeptide member of the first repertoire) and yeast cells containing a plurality of nucleotide sequences (each able to encode a different polypeptide member of the second repertoire) to create an array, such that yeast cells containing substantially all nucleotide members of the first repertoire

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

36

intersect with yeast cells containing substantially all nucleotide members of the second repertoire; and

- 5 (b) allowing the yeast cells containing the members of the first repertoire to mate with the yeast cells containing the members of the second repertoire where the two repertoires intersect; and optionally
- (c) expressing the nucleotide sequences to produce the corresponding polypeptides of the first and second repertoires; and optionally
- (d) detecting the interaction/s between the polypeptide members of the first and second repertoires.

10

48 A method for creating (and optionally screening) a combinatorial chemical library consisting of two (or more) repertoires of precursors, whereby substantially all members of the first repertoire of chemical precursors are assembled with substantially all members of a second repertoire of chemical precursors, which method comprises:

- 15 (a) arranging the first and second repertoires of chemical precursors to create an array, such that substantially all members of the first repertoire of chemical precursors are juxtaposed with substantially all members of a second repertoire of chemical precursors; and
- (b) assembling the members of the first repertoire of chemical precursors with the members of the second repertoire of chemical precursors to create a combinatorial array of novel compounds; and optionally
- 20 (c) screening the array of novel compounds for some biological interaction.

49 A method according to claims 44 to 47, which method uses a series of intersecting lines, channels or tubes to create the array.

25

50 A method according to any preceding claim whereby the members of the repertoires are directed to their positions in the array by means of a tagging system, such that each line, channel or tube is predisposed to binding a particular member of the repertoires.

30

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

1/5

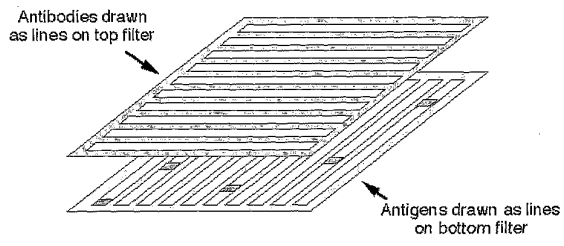


Figure 1

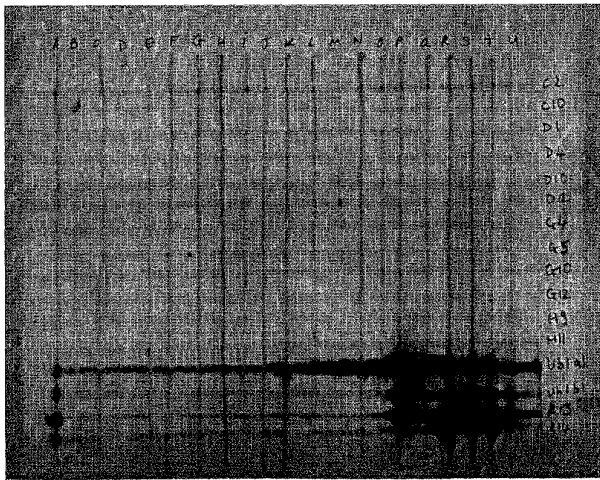


Figure 2

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

2/5

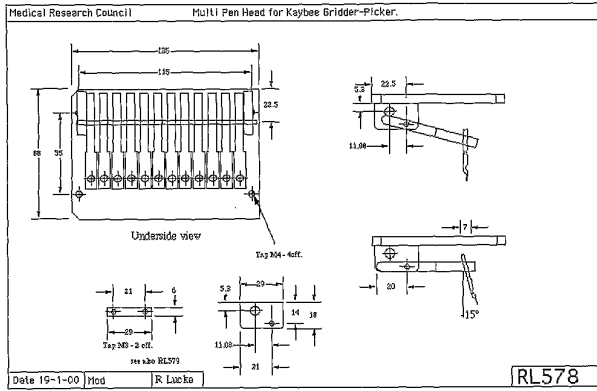


Figure 3a

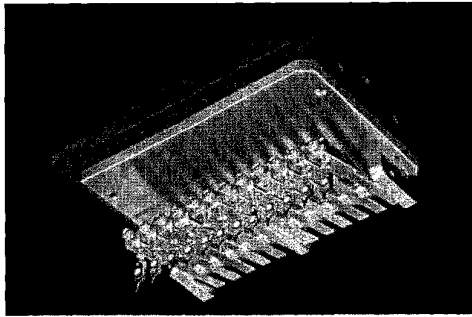


Figure 3b

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

3/5

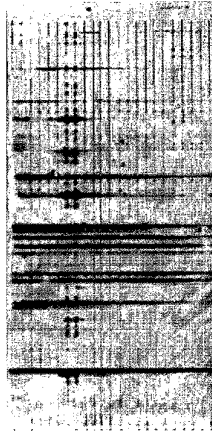


Figure 4

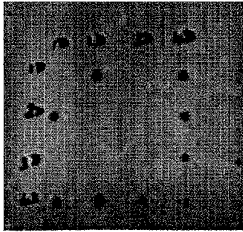


Figure 5a

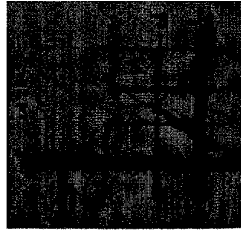


Figure 5b

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

4/5

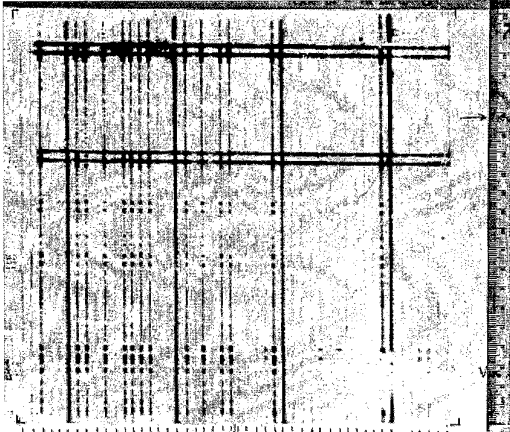


Figure 6

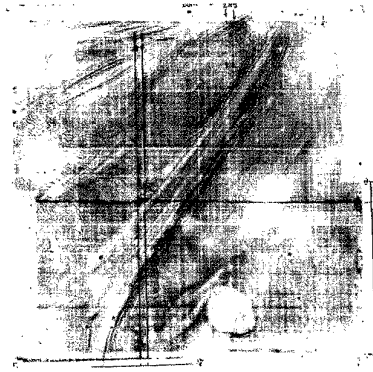


Figure 7

WO 01/98534

PCT/GB01/02831

5/5

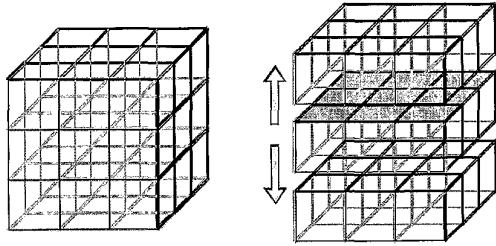


Figure 8

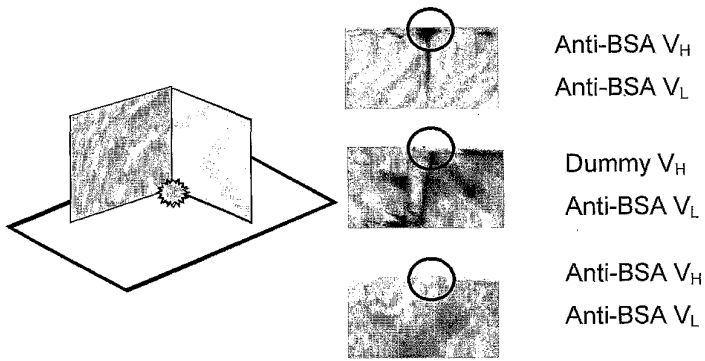


Figure 9

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

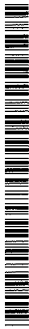
(10) International Publication Number  
WO 01/98534 A3(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C12Q 1/68, 1/70,  
G01N 33/68, C12N 15/10, B01L 3/00, B01J 19/00

(21) International Application Number: PCT/GB01/02831

(22) International Filing Date: 22 June 2001 (22.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
0015443.5 23 June 2000 (23.06.2000) GB  
0026099.2 25 October 2000 (25.10.2000) GB  
60/246,851 8 November 2000 (08.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): DIVER-  
SYS LIMITED [GB/GB]; 20 Park Crescent, London W1N  
4AL (GB).(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): HOLT, Lucy, Jes-  
sica [GB/GB]; 9b Anstey Way, Trumpington, Cambridge  
CB2 2JE (GB); TOMLINSON, Ian [GB/GB]; 13 Tunwells  
Lane, Great Shelford, Cambridge CB2 5LJ (GB).(74) Agents: MASCHIO, Antonio et al.; D Young & Co., 21  
New Fetter Lane, London EC4A 1AD (GB).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Declaration under Rule 4.17:  
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US onlyPublished:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments(88) Date of publication of the international search report:  
30 May 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/98534 A3

(54) Title: MATRIX SCREENING METHOD

(57) Abstract: The invention concerns a method which can be used to screen two or more repertoires of molecules against one another and/or to create combinatorial repertoires by combining two or more repertoires. In particular, the invention relates to a method whereby two repertoires of molecules can be screened such that substantially all members of the first repertoire are tested against substantially all members of the second repertoire for functional interactions. Furthermore, the invention relates to the creation and screening of antibody repertoires by combining a repertoire of heavy chains with a repertoire of light chains such that antibodies formed by the substantially all combinations of heavy and light chains can be screened against one or more target ligands.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/02831
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/68 C12N15/10 B01L3/00 B01J19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N B01L C12Q B01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 28744 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT -BANCROFT DAVID (DE); LEHRACH HANS (DE); W) 10 June 1999 (1999-06-10) page 3, paragraph 2 -page 6, paragraph 1 page 11, paragraph 2 -page 13, paragraph 5 page 34, paragraph 2 -page 36, paragraph 1; figure 7; example 9	1-50
X	MASKOS U ET AL: "A STUDY OF OLIGONUCLEOTIDE REASSOCIATION USING LARGE ARRAYS OF OLIGONUCLEOTIDES SYNTHESISED ON A GLASS SUPPORT" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, IRL PRESS LTD., OXFORD, GB, vol. 21, no. 20, 1993, pages 4663-4669, XP000999271 ISSN: 0305-1048 abstract; figures 1-3	1,5,7,8, 13,22, 23,31, 32,48-50
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 15 April 2002	Date of mailing of the international search report 23/04/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bradbrook, D	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 01/02831

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 09668 A (AFFYMAX TECH NV) 27 May 1993 (1993-05-27) page 14, line 13 -page 25, line 5; claims 1-17,35-47; figures 1-4 -----	4, 29, 30, 48-50
X	UETZ P ET AL: "A COMPREHENSIVE ANALYSIS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 403, 10 February 2000 (2000-02-10), pages 623-627, XP000938868 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-3, 6-8, 13-23, 34-47
X	EMILI A Q ET AL: "LARGE-SCALE FUNCTIONAL ANALYSIS USING PEPTIDE OR PROTEIN ARRAYS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUB. CO, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 393-397, XP000919070 ISSN: 1087-0156 the whole document -----	1, 5, 7, 8, 13-23
Y	-----	10-12, 24-28, 34-47
X	CHEUNG V G ET AL: "MAKING AND READING MICROARRAYS" NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 21, January 1999 (1999-01), pages 15-19, XP000961558 ISSN: 1061-4036 page 15, column 1, paragraph 2 -page 16, column 1, paragraph 2; figure 3 -----	1, 5, 7-9, 13, 29
X	PANDEY AKHILESH ET AL: "Proteomics to study genes and genomes" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 405, no. 6788, 15 June 2000 (2000-06-15), pages 837-846, XP002172041 ISSN: 0028-0836 page 841, column 1, paragraph 3 -page 845, column 1, paragraph 4; figures 4, 5, 7 -----	1, 5, 7, 8, 13-23
Y	-----	10-12, 24-28, 34-47
P, X	WO 01 00866 A (ODYSSEY PHARMACEUTICALS INC) 4 January 2001 (2001-01-04) page 6, line 20 -page 8, line 9; claims 1-17 -----	10-22, 44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/GB 01/02831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9928744	A	10-06-1999	AU 1757599 A	05-07-1999
			AU 2050499 A	16-06-1999
			AU 2050599 A	16-06-1999
			CA 2311705 A1	10-06-1999
			CA 2311896 A1	24-06-1999
			CA 2311927 A1	10-06-1999
			WO 9931509 A1	24-06-1999
			WO 9928744 A1	10-06-1999
			WO 9928745 A1	10-06-1999
			EP 1036329 A1	20-09-2000
			EP 1042670 A1	11-10-2000
			EP 1036324 A1	20-09-2000
			GB 2338711 A , B	29-12-1999
			JP 2001525186 T	11-12-2001
			WO 9309668	A
US 5412087 A	02-05-1995			
AU 675054 B2	23-01-1997			
AU 3148193 A	15-06-1993			
CA 2124087 A1	27-05-1993			
EP 1086742 A1	28-03-2001			
EP 0624059 A1	17-11-1994			
EP 0916396 A2	19-05-1999			
EP 0972564 A2	19-01-2000			
JP 7506561 T	20-07-1995			
WO 9309668 A1	27-05-1993			
US 6040193 A	21-03-2000			
US 6136269 A	24-10-2000			
US 5885837 A	23-03-1999			
US 5677195 A	14-10-1997			
AU 4110793 A	29-11-1993			
WO 9322680 A1	11-11-1993			
WO 0100866	A	04-01-2001	AU 6054900 A	31-01-2001
			WO 0100866 A1	04-01-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 トムリンソン, イアン

イギリス国 シービー 2 5 エルジェイ ケンブリッジ, グレート シェルフォード, タンウェルズ レーン 1 3

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02  
 FB03  
 4B024 AA11 CA04 CA09 DA02 DA05 EA03 EA04 GA11 HA14  
 4B063 QQ08 QQ42 QR32 QR60 QR77 QR80 QR82 QS34 QS39

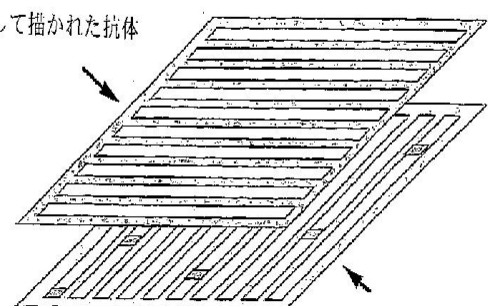
专利名称(译)	基质筛选方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004501379A</a>	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2002504682	申请日	2001-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	多曼提斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	德螳螂有限公司		
[标]发明人	ホルトルーシー、ジェシカ トムリンソン、イアン		
发明人	ホルト、ルーシー、ジェシカ トムリンソン、イアン		
IPC分类号	G01N33/50 B01J19/00 B01L3/02 C07K16/18 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/70 C40B30/04 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C40B30/04 B01J19/0046 B01J2219/00364 B01J2219/0038 B01J2219/00387 B01J2219/0052 B01J2219/00531 B01J2219/00533 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00626 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00641 B01J2219/00659 B01J2219/00668 B01J2219/00677 B01J2219/00691 B01J2219/0072 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01J2219/0074 B01L3/0244 B01L2400/0406 B82Y30/00 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/622 C12N15/1055 C12Q1/6837 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/54366 G01N33/6842 G01N33/6845		
FI分类号	G01N33/50.Z C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR60 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QS39		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	2000015443 2000-06-23 GB 2000026099 2000-10-25 GB 60/246851 2000-11-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及可用于通过组合两个或更多个库来筛选两个或更多个分子库彼此和/或形成组合库的方法。特别地，本发明检查了两种类型的分子库，基本上是第一组的所有成员，以及第二组的基本上所有成员用于功能相互作用。它涉及可以筛选的方法。此外，本发明通过将重链库与轻链库组合，使得可以针对一种或多种靶配体筛选由重链和轻链的基本上所有组合形成的抗体。 ，抗体谱库的形成和筛选。

【図1】

上側フィルターに  
線として描かれた抗体



下側フィルターに  
線として描かれた抗原