

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 25 年 4 月 11 日 (2013.4.11)

【公表番号】特表 2011-518565 (P2011-518565A)

【公表日】平成 23 年 6 月 30 日 (2011.6.30)

【年通号数】公開・登録公報 2011-026

【出願番号】特願 2011-506483 (P2011-506483)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成 24 年 3 月 14 日 (2012.3.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】新規の H C C D R 1、C D R 2、および C D R 3 設計、ならびに新規の L C C D R 1、C D R 2、および C D R 3 設計を含む、遺伝子パッケージのライブラリ

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本願は、2008 年 4 月 24 日に提出された米国仮特許出願第 61/047,529 号の優先権を主張する。この米国仮特許出願の開示は、本願の開示の一部と考えられる(かつ、本願の開示に参考として援用される)。

【背景技術】

【0002】

(背景)

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多様なファミリーのメンバーを個別に提示し、提示および発現し、または含み、ファミリーのアミノ酸の多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含む遺伝子パッケージのライブラリの調製は、現在当分野において一般的に行われている。多くの一般的なライブラリにおいて、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、抗体(例えば、一本鎖 F_v(sc F_v)、F_v、Fab、全抗体またはミニボディ(すなわち、V_Lに連結した V_H からなる二量体))に関連する。多くの場合、それらはヒト抗体の重鎖および軽鎖の、1 種または複数種の C D R およびフレームワーク領域を含む。

【0003】

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のライブラリは、いくつかの方法で作製されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる非特許文献 1 を参照されたい。一方の方法は、ナイーブなまたは免疫化されたかどちらかの、ネイティブなドナーの多様性を獲得することである。別の方法は、合成多様性を有するライブラリを生成することである。第 3 の方法は、最初の 2 つの方法の組合せである。通常、これらの方法により作製された多様性は、配列多様性に限定される、すなわち、ライブラリの個々のメンバーは同じ長さを有するが、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質鎖の所与の位置に異なるアミノ酸または多彩性を有することがファミリーの他のメンバーとは異なる。しかし、天然に多様なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、それらのアミノ酸配列だけに多様性が限定

されるわけではない。例えば、ヒト抗体は、それらのアミノ酸の配列多様性は限定されず、ヒト抗体は、それらのアミノ酸鎖の長さにおいてもまた多様である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Knappik ら、J. Mol. Biol.、296巻、57～86頁（2000年）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

（要旨）

抗体では、例えば、可変領域の再構成の間に重鎖の長さの多様性が発生する。例えば、Corbettら、J. Mol. Biol.、270巻、587～97頁（1997年）を参照されたい。V遺伝子とJ遺伝子との接合は、例えば重鎖抗体配列の約半分のCDR3中の認識可能なDセグメントの包含をもたらし、したがって、さまざまな長さのアミノ酸をコードする領域を創製する。Dセグメントは、長いHC CDR3を有する抗体においてより一般的である。以下もまた、抗体の遺伝子セグメントの接合の間に発生し得る：（i）V遺伝子の末端が、欠失または変化した0から数個の塩基を有し得る；（ii）Dセグメントの末端が、除去されたまたは変化した0から多くの塩基を有し得る；（iii）多数のほぼランダムな塩基が、VおよびDの間またはDおよびJの間に挿入され得る；ならびに（iv）Jの5'末端が、いくつかの塩基を除去または変化するよう編集され得る。これらの再構成は、アミノ酸配列および長さの双方において多様な抗体をもたらす。異なる長さのHC CDR3は、異なる形状に折り畳まれ、抗原と結合する新規な形状を抗体にもたすことができる。立体配座は、CDR3の長さおよび配列の双方に依存する。例えば長さ8で任意の配列のHC CDR3は、例えば長さ22のCDR3の挙動を、適切に模倣できないことを記憶に留めるべきである。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖（HC）CDR3をコードする多彩化されたDNA配列を含み、該ファミリーの該HC CDR3において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35の位置が、Tyr、Gly、Asp、SerおよびArg残基の間で変化するライブラリ。

（項目2）

前記HC CDR3の全位置の約50%がTyr、Gly、Asp、SerまたはArgである、項目1に記載のライブラリ。

（項目3）

Arg残基が、VおよびDの間、DおよびJの間またはVおよびJの間のフィラー領域に存在する、項目1に記載のライブラリ。

（項目4）

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35の

残基からなる重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、個々の残基は独立して T y r、A s n、A s p、S e r および A r g 残基の間で変化し、フレームワーク領域 (F R) 3 が該 C D R 3 のアミノ末端に位置し、J H 領域の F R 4 部分が該 C D R 3 のカルボキシ末端に位置するライブラリ。

(項目 5)

前記 F R 3 が 3 - 2 3 V H F R 3 である、項目 4 に記載のライブラリ。

(項目 6)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 配列の約 20% 超が T y r 残基からなるライブラリ。

(項目 7)

前記 H C C D R 3 の D 領域および J s t u m p が、約 20% 超の T y r 残基からなる、項目 6 に記載のライブラリ。

(項目 8)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 配列の約 20% 未満が T y r 残基からなるライブラリ。

(項目 9)

前記 H C C D R 3 のリードインまたは D J フィラー位置が、約 20% 未満の T y r 残基からなる、項目 8 に記載のライブラリ。

(項目 10)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 が 3 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、F、S、Y、D および R の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、Q、E、R、S、Y および L の間で 3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、H、D、R、S、Y および L の間で 3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 11)

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、3 : 1 の比率で変化する、項目 10 に記載のライブラリ。

(項目 12)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 が 3 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、5 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、5 : 1 : 1 : 1 : 1 :

1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、G、S、Y、R、D および L の間で 5 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 1 3)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 が 4 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、Y、S、D、R および L の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、F、S、Y、D、R および L の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、D、R、S、Y および L の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 4 の残基が、L、S、Y、D および R の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 1 4)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 が 4 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、L、S、Y、D および R の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、L、S、Y、D および R の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、W、S、Y、D および R の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 4 の残基が、F、S、Y、D および R の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 1 5)

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、4 : 1 の比率で変化する、項目 1 4 に記載のライブラリ。

(項目 1 6)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 H C C D R 3 が 1 6 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 4 の残基が、D、Y、S、R および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 5 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 6 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 7 の残基が、G、A、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 8 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 9 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 10 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 11 の残基が、A、S、Y、R および D の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 12 の残基が、E、R、S、Y および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 13 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 14 の残基が、F、Y、S、R および D の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 15 の残基が、Q、E、R、S および Y の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 16 の残基が、H、E、R、S、Y および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 17)

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、3 : 1 の比率で変化する、項目 16 に記載のライブラリ。

(項目 18)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖 (H C) C D R 3 をコードする多彩化された DNA 配列を含み、該 H C C D R 3 が 16 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、G、S、Y、D、R および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、Y、S、D、R、および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が C であり、

該 H C C D R 3 の第 4 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 5 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 6 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 7 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 8 の残基が、C であり、

該 H C C D R 3 の第 9 の残基が、Y、S、D、R および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 10 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 11 の残基が、A、S、Y、D、R、および L の間で、3 : 1 :

1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 1 2 の残基が、E、R、S、Y および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 1 3 の残基が、Y、S、D、R および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 1 4 の残基が、F、Y、S、R、D、および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 1 5 の残基が、Q、E、R、S、Y、および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 1 6 の残基が、H、D、R、S、Y および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 19)

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、3 : 1 の比率で変化する、項目 19 に記載のライブラリ。

(項目 20)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、A 27 軽鎖 (L C) をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 L C の C D R 1 が多様化され、

27 位は、約 55 % が Q、それぞれ約 9 % が E、R、Y、S および L であり、

28 位は、約 46 % が S、それぞれ約 9 % が N、T、Y、E、R、および L であり、

30 位は、約 55 % が S、それぞれ約 9 % が D、N、R、T、および Y であり、

30 a 位は、約 46 % が S、それぞれ約 9 % が G、N、R、T、Y、および D であり、約 8 % はアミノ酸を含まず、

31 位は、約 44 % が S、それぞれ約 8 % が D、F、G、N、R、T、および Y であり、

32 位は、約 44 % が Y、それぞれ約 7 % が F、D、L、N、Q、R、S、および Y であり、

34 位は、約 70 % が A、それぞれ約 15 % が S および Y であるライブラリ。

(項目 21)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、A 27 軽鎖 (L C) をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 L C の C D R 2 が多様化され、

50 位は、約 55 % が G、それぞれ約 9 % が D、R、S、Y および L であり、

53 位は、約 52 % が S、それぞれ約 8 % が N、T、S、Y、E および R であり、

56 位は、約 64 % が T、それぞれ約 9 % が E、R、S および Y であるライブラリ。

(項目 22)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集散的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライブラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、A 27 軽鎖 (L C) をコードする多彩化された D N A 配列を含み、該 L C の C D R 3 が多様化され、

91 位は、約 64 % が Y、それぞれ約 9 % が F、E、R および S であり、

92 位は、約 52 % が G、それぞれ約 8 % が A、D、R、S、T および Y であり、

93 位は、約 52 % が S、それぞれ約 8 % が D、F、N、R、T および Y であり、

94 位は、約 55 % が S、それぞれ約 9 % が W、E、R、Y および S であり、

95 位は、約 64 % が P、それぞれ約 9 % が E、R、Y および S であり、約 8 % はアミ

ノ酸を含まず、

9 6 位は、約 5 5 % が L、それぞれ約 9 % が E、R、P、Y および S であるライブラリ

。

(項目 2 3)

項目 2 1 に記載の L C C D R 2 の多様性をさらに含む、項目 2 0 に記載のライブラリ

。

(項目 2 4)

項目 2 2 に記載の L C C D R 3 の多様性をさらに含む、項目 2 0 に記載のライブラリ

。

(項目 2 5)

項目 2 2 に記載の L C C D R 3 の多様性をさらに含む、項目 2 1 に記載のライブラリ

。

(項目 2 6)

L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 の 1 つまたは複数において多様性を有する軽鎖をさらに含む、項目 1 ~ 1 9 のいずれかに記載のライブラリ。

(項目 2 7)

項目 2 0、2 1 または 2 2 に記載の L C C D R 1、L C C D R 2 または L C C D R 3 をそれぞれ、またはそれらの組合せを含む、項目 2 6 に記載のライブラリ。

(項目 2 8)

d o b b l i n g を含む、項目 1 から 2 7 のいずれか一項に記載のライブラリを調製する方法。

【 0 0 0 6 】

したがって、アミノ酸の配列多様性のみを含有するライブラリは、それらが、ライブラリが模倣しようとするペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の天然の多様性を反映しないという点で不利である。さらに、長さの多様性は、タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドの最終的な機能性にとって重要であり得る。例えば、抗体領域を含むライブラリに関して、ライブラリの遺伝子パッケージにより提示される、提示および発現される、または含まれるペプチド、ポリペプチド、タンパク質の多くは、配列および長さ双方における多様性がライブラリに示されない場合、適切に折り畳むことができない、または抗原とのそれらの結合が不利であり得る。

【 0 0 0 7 】

ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を提示する、提示および発現するまたは含む遺伝子パッケージのこのようなライブラリのさらなる不利な点は、天然発生の多様性に基づくそれらのメンバー、したがって、機能的である可能性が最も高く、免疫原性である可能性が最も低いメンバーに集中していないことである。どちらかと言えば、通常ライブラリは個々の C D R 位置に可能な限りすべての多様性または多彩性を含むように試みる。このことは、ライブラリ構築の時間を消費し、効率を必要より下げる。完全な多様性を獲得しようとする試みにより作製された多数のメンバーもまた、スクリーニングを必要以上に手間のかかるものにする。このことは、ライブラリの多くのメンバーが機能的でなくなり、または非特異的に付着性になる場合に特にあてはまる。

【 0 0 0 8 】

さらに、合成ライブラリの構築の苦労は免疫原性の問題である。例えば、すべての C D R 残基が T y r (Y) または S e r (S) のどちらかであるライブラリがある。これらのライブラリから選択された抗体 (A b) は、高い親和性および特異性を示すが、それらの非常にまれな組成はそれらを免疫原性にすることができる。本発明は、ヒト免疫系に十分由来することができ、したがって免疫原性である可能性の低い A b の作製を対象とする。本発明のライブラリは、V - D - J または V - J の融合に由来する残基を可能な限り多く保有する。免疫原性の危険性を減少するために、フレームワークおよび C D R の双方の中の個々の非生殖系列アミノ酸の変化を、生殖系列アミノ酸に戻し、結合親和性を保有するために生殖系列からの変化が必要かどうかを決定することが賢明であり得る。したがって

、生殖系列に対する個々の変異位置にバイアスのかかったライブラリは、必要のない非生殖系列アミノ酸を有するA bの単離の可能性を減少させる。

【0009】

A bは高分子タンパク質であり、さまざまな分解形態に供される。分解の一形態は、A s nおよびG l n残基（特にA s n - G l yまたはG l n - G l y）の脱アミドおよびA s p残基の異性化である。分解の別の形態は、メチオニン、トリプトファンおよびシステインの酸化である。分解の別の形態は、A s p - P r oジペプチドの切断である。分解の別の形態は、N末端のG l uまたはG l nからのピログルタミン酸の形成である。問題のある配列の発生を最小にしたライブラリを提供することが有利である。

【0010】

約3アミノ酸長から約35アミノ酸長の間の重鎖（H C）C D R 3を含むヒト抗体の多様なファミリーのメンバーをコードするベクターまたはパッケージのライブラリを提供する。特定の実施形態において、H C C D R 3もまた、T y r（Y）とS e r（S）とに富み、かつ/または多様化されたD領域を含み、かつ/または伸長されたJ H領域を含むことができる。例えば、H C C D R 3は、例えば本明細書中の実施例において提供するように、約40%を超える（例えば、約43%および約80%の間；例えば、約40%を超えるが約100%未満）Yおよび/またはS残基を含有することができる。さらに、このようなH C C D R 3を含む集中的なライブラリも提供する。さらに、H C C D R 1、H C C D R 2の設計およびC D Rに多様性のあるV K I I I A 27のライブラリも提供する。本明細書に記載のH C C D R 3を含むヒト抗体の多様なファミリーのメンバーをコードするベクターまたはパッケージのライブラリは、さらにH C C D R 1、H C C D R 2、L C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3の1つまたは複数（例えば、1つ、2つまたは3つにおいて）に多様性を有することができる。例えば、ライブラリは、本明細書に記載のように、H C C D R 1、H C C D R 2、L C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3の1つまたは複数（例えば、1つ、2つまたは3つにおいて）に多様性を有することができる。

【0011】

多様化されたD領域は、1つまたは複数のアミノ酸の変化が導入されているD領域である（例えば、天然発生のD領域の配列と比較して、例えば、終止コドンにT y r残基に変化できる）。

【0012】

伸長されたJ H領域は、J H領域のフレームワーク配列のアミノ末端に存在する、1つまたは複数のアミノ酸残基を有するJ H領域である（例えば、F R 4配列のアミノ末端、例えば、W G Qで始まる）。例えば、J H 1は伸長されたJ H領域である。他の例としては、J H 2、J H 3、J H 4、J H 5、およびJ H 6が伸長されたJ H領域である。

【0013】

さらに、上記のライブラリを作製し、スクリーニングする方法およびこのようなスクリーニングにおいて得られたH C C D R 3および抗体を提供する。これらの方法を実践する組成物およびキットもまた、本明細書に記載する。

【0014】

一部の態様において、本開示は、ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリー（例えば、抗体の多様なファミリー）のメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、ファミリーの多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージの集中的ライブラリを特徴とし、ベクターまたは遺伝子パッケージは、

（a）約3または約4または約5アミノ酸長であるH C C D R 3；

（b）約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34または約35アミノ酸長のH C C D R 3（例えば、約23から約35アミノ酸長）；および

c）約6から約20アミノ酸長であるH C C D R 3（例えば、約6、約7、約8、約

9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20アミノ酸長)

からなる群から選択される重鎖(HC)CDR3をコードする多彩化されたDNA配列を含み、HC CDR3は、D領域(例えば、多様化されたD領域)(またはそれらの断片(例えば、3アミノ酸以上のD領域、例えば多様化されたD領域))あるいはJH領域(例えば、伸長されたJH領域)由来のアミノ酸を含む。

【0015】

一部の実施形態において、HC CDR3は、Tyr(Y)およびSer(S)に富んでいる(例えば、HC CDR3の残基の40%超がYおよび/またはSである)。

【0016】

一部の実施形態において、ライブラリ(例えば、それらのベクターまたは遺伝子パッケージ)は、D領域またはD領域の断片(例えば、JH領域に隣接するD領域)を含む。

【0017】

一部の実施形態において、ライブラリは、JH領域、例えば伸長されたJH領域を含む。

【0018】

一部の実施形態において、HC CDR3は、D領域またはD領域の断片(例えば、JH領域に隣接するD領域)由来のアミノ酸を含む。

【0019】

一部の実施形態において、D領域は、D2-2(RF2)、D2-8(RF2)、D2-15(RF2)、D2-21(RF2)、D3-16(RF2)、D3-22(RF2)、D3-3(RF-2)、D3-9(RF2)、D3-10(RF2)、D1-26(RF3)、D4-11(RF2)、D4-4(RF2)、D5-5(RF3)、D5-12(RF3)、D5-18(RF3)、D6-6(RF1)、D6-13(RF1)およびD6-19(RF1)からなる群から選択される。

【0020】

一部の実施形態において、HC CDR3は、JH領域由来のアミノ酸を含む。JH領域は、伸長されたJH領域であってよい。一部の実施形態において、伸長されたJH領域は、JH1、JH2、JH3、JH4、JH5およびJH6からなる群から選択される。一部の実施形態において、JH領域は、Yおよび/またはS残基に富んでいてよく、例えば、約40%を超える(例えば、約43%および約80%の間;例えば、約40%を超えるが約100%未満)Yおよび/またはS残基を含有することができる。

【0021】

一部の実施形態において、D領域は1つまたは複数のシステイン(Cys)残基を含み、一部の実施形態において、1つまたは複数のCys残基は一定に保たれている(例えば変化しない)。

【0022】

一部の実施形態において、HC CDR3(例えば、HC CDR3をコードするDNA)は、FR3とD領域との間の、1つまたは複数のフィラー(filler)コドンを含み、個々のフィラーコドンは、個別にNNK、TMY、TMTまたはTMC(TMY、TMTまたはTMCはSまたはYをコードする)である。

【0023】

一部の実施形態において、HC CDR3(例えば、HC CDR3をコードするDNA)は、D領域とJHとの間の、1つまたは複数のフィラーコドンを含み、個々のフィラーコドンは、個別にNNK、TMY、TMTまたはTMCである。

【0024】

一部の実施形態において、ライブラリ(例えば、ライブラリのベクターまたは遺伝子パッケージ)は、HC CDR1、HC CDR2、および/または軽鎖をさらに含み、HC CDR1、HC CDR2に多様性もまた含み、あるいは軽鎖はHC CDR1および/またはHC CDR2および/または軽鎖(例えば、または軽鎖)において多様

性（それぞれ）を含む。例えば、H C C D R 3 の多様性は、H C C D R 1、H C C D R 2 および / または軽鎖中の多様性のバックグラウンドに構築できる。例えば、軽鎖の多様性は、H C の多様性と同じ D N A 分子中にコードでき、あるいは L C および H C の多様性は、別々の D N A 分子中にコードできる。

【 0 0 2 5 】

一部の態様において、本開示は、3、4 または 5 アミノ酸長である H C C D R 3 を含むライブラリを特徴とし、C D R 3 は、J H 領域（例えば、伸長された J H 領域）由来、または J H 領域の F R 4 部分に接合した D 領域（例えば、多様化された D 領域）（またはそれらの断片（例えば 3 アミノ酸以上の D 領域、例えば多様化された D 領域））由来のアミノ酸を含む。

【 0 0 2 6 】

一部の実施形態において、H C C D R 3 は、J H 領域の F R 4 部分に接合した D 領域に由来し、三量体、四量体または五量体を含み、この三量体、四量体または五量体はシステイン残基を含まない。

【 0 0 2 7 】

一部の実施形態において、H C C D R 3 は、J H 領域の F R 4 部分に接合した D 領域に由来し、三量体、四量体または五量体を含み、この三量体、四量体または五量体は終止コドンを含まない。

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態において、D 領域（例えば、D 領域をコードする D N A）は、T A G コドンを含み、T A G コドンは T C G、T T G、T G G、C A G、A A G、T A T および G A G からなる群から選択されるコドンによって置き換えられる。

【 0 0 2 9 】

一部の実施形態において、D 領域（例えば、D 領域をコードする D N A）は、T A A コドンを含み、T A A コドンは T C A、T T A、C A A、A A A、T A T および G A A からなる群から選択されるコドンによって置き換えられる。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態において、D 領域（例えば、D 領域をコードする D N A）は、T G A コドンを含み、T G A コドンは T G G、T C A、T T A、A G A、および G G A からなる群から選択されるコドンによって置き換えられる。

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態において、ライブラリは、H C C D R 1 および / または H C C D R 2 および / または軽鎖（例えば、または軽鎖）において多様性をさらに含む。例えば、H C C D R 3 の多様性は、H C C D R 1、H C C D R 2 および / または軽鎖中の多様性のバックグラウンドに構築できる。例えば、軽鎖の多様性は、H C の多様性と同じ D N A 分子中にコードでき、あるいは L C および H C の多様性は、別々の D N A 分子中にコードできる。

【 0 0 3 2 】

一部の態様において、本開示は、ライブラリを多様化する方法を提供し、この方法は本明細書に記載のライブラリを突然変異化するステップを含む。

【 0 0 3 3 】

一部の実施形態において、突然変異化はエラープローン P C R を含む。

【 0 0 3 4 】

一部の実施形態において、突然変異化は w o b b l i n g を含む。

【 0 0 3 5 】

一部の実施形態において、突然変異化は d o b b l i n g を含む。

【 0 0 3 6 】

一部の実施形態において、突然変異化は、平均約 1 から約 10 の突然変異（例えば、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10 の突然変異、例えば塩基変化）/ H C C D R 3 を導入する。

【0037】

「wobbling」は、元の配列が好ましいように、多彩化されたDNAを作製する方法である。例えば元の配列が、GCTによりコードされ得るAlaを有する場合、混合物（0.7G、0.1A、0.1T、0.1C）を1番目の位置に、（0.7C、0.1A、0.1T、0.1G）を2番目の位置に、（0.7T、0.1A、0.1G、0.1C）を3番目の位置に使用できる。「doping」の他の比率も使用できる。このことは、Alaを約50%の確率で出現させることができ、一方V、D、G、T、PおよびSは約7%の確率で生じる。他のAA型はさらに低い頻度で生じる。

【0038】

一部の態様において、本開示は、例えば、（精製された）HC CDR1～2のレパートリーを維持し、合成HC CDR3およびLCの多様性を構築するために描かれる。

【0039】

一部の実施形態において、本開示は、wobblingされた重鎖（HC）CDR3を提示するためのカセットを提供し、例えばこのカセットは、表400に示すカセットを含む。

【0040】

一部の態様において、本開示は、HC CDR3においてTyrのレベルが調節されたライブラリを特徴とする。一部の実施形態において、HC CDR3領域は、約15%またはそれを超える（例えば、約16%、約18%、約20%またはそれを超える）Tyr残基を含有する。一部の実施形態において、高レベル（例えば、約20%より多い）のTyrが、例えば、Tyrを含有するD領域およびJ stump（またはそれらに相当する合成配列）において、ライブラリメンバーのHC CDR3に挿入される。一部の実施形態において、リードイン位置またはDJフィラー位置（またはそれらに相当する合成配列）において、Tyrが許容されるが、20%以下である。一部の実施形態において、HC CDR3領域は、約15%未満（例えば、約14%、約12%、約10%、約8%、約6%またはそれより少ない）のTyr残基を含有する。一部の実施形態において、HC リードイン位置またはDJフィラー位置（またはそれらに相当する合成配列）は、約15%未満（例えば、約14%、約12%、約10%、約8%、約6%またはそれより少ない）のTyr残基を含有する。

【0041】

一部の態様において、本開示は、ヒト抗体重鎖をコードする遺伝子パッケージのライブラリを特徴とし、このライブラリにおいて、親アミノ酸配列は、VH配列、続いて（Y、S、D、L、R）からなる群から選択される0から10個のアミノ酸、続いてヒトD領域またはD領域の断片、続いて（Y、S、R、D、L）からなる群から選択される0から10個のアミノ酸、続いて少なくともW103を前方に含むJHセグメントを含み、この配列をコードする可変DNAが、親アミノ酸配列が最も可能性の高い配列となるように（例えばwobblingにより）合成される。

【0042】

一部の態様において、本開示は、生殖系列フレームワーク領域を有する軽鎖のライブラリを特徴とし、CDRは、残基が結合部位から離れるように、または一定に保たれる埋もれた側基を有するように変化する。一部の実施形態において、可変DNA合成の方法は、生殖系列配列が最も可能性のある配列となるように（例えばwobblingにより）使用される。

【0043】

一部の態様において、本開示は、本明細書に開示されるような抗原結合可変領域をコードする多様なメンバーのライブラリを特徴とする。

【0044】

一部の態様において、本開示は、本明細書に開示されるようなHC CDR3領域をコードする多様なメンバーのライブラリを特徴とする。一部の実施形態において、このライブラリは表1097のライブラリである。

【 0 0 4 5 】

一部の態様において、本開示は多様なメンバーのライブラリを特徴とし、個々のメンバーは H C C D R 3 をコードし、

H D C R 3 中の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、または 8 位は、ライブラリにおいて、それぞれ G、S、R、D、L、および Y によって、[1 . 0 G、. 5 7 S、. 4 6 R、. 4 2 D、. 3 6 L、. 3 5 Y] の割合で占められ、場合によって、

H C C D R 3 の最後の 4 位は以下のように示される：

親アミノ酸は、他のアミノ酸型より 3、4、5、6、7、8、10 倍の確率で存在し、他のアミノ酸型は Y、S、D、R、G を含む。

【 0 0 4 6 】

一部の態様において、本開示は多様なメンバーのライブラリを特徴とし、個々のメンバーは H C C D R 3 をコードし、

H C C D R 3 の最初の 1、2、3、4、5、6、7 または 8 位の少なくとも 1 つ、好ましくはすべてが、ライブラリにおいて、[1 . 0 G、. 5 7 S、. 4 6 R、. 4 2 D、. 3 6 L、. 3 5 Y] の割合で G、S、R、D、L および Y に占められ、場合によって

H C D R 3 の最後の 4 位は、以下のように示される：

親アミノ酸は、他のアミノ酸型より 3、4、5、6、7、8、10 倍の確率で存在し、他のアミノ酸型は Y、S、D、R、G を含む。

【 0 0 4 7 】

一部の態様において、本開示は多様なメンバーのライブラリを特徴とし、個々のメンバーは H C C D R 3 をコードし、

H C C D R 3 の長さは 10、11 または 12 位であり、

H C C D R 3 の最初の 6、7 または 8 位はそれぞれ、ライブラリにおいて、[1 . 0 G、. 5 7 S、. 4 6 R、. 4 2 D、. 3 6 L、. 3 5 Y] の割合で、G、S、R、D、L および Y で占められ、

H C D R 3 の最後の 4 位は以下のように示される：

親アミノ酸は、他のアミノ酸型より 3、4、5、6、7、8、10 倍の確率で存在し、他のアミノ酸型は Y、S、D、R、G を含む。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態において、H C C D R 3 の最後の 4 位は個々に、ライブラリにおいて、7 / 12 が親、ならびに Y、S、D、R および G が個々に 1 / 12 で示される。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態において、H C C D R 3 の最後の 4 位は個々に、ライブラリにおいて、A 6 = 7 / 12 A ならびに Y、S、D、R および G が個々に 1 / 12；F 7 = 7 / 12 F ならびに Y、S、D、R および G が個々に 1 / 12；D 8 = 7 / 11 D ならびに Y、S、R および G が個々に 1 / 11；I 9 = 7 / 12 I ならびに Y、S、R、D および G が個々に 1 / 12 で示される。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態において、メンバーは H C C D R 1、H C C D R 2 をさらにコードする。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、メンバーは、F フレームワーク (F R) 領域 1 ~ 4 をさらにコードする。

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態において、メンバーは、H C C D R 1、H C C D R 2 および F R 領域 1 ~ 4 をコードする。

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態において、メンバーは、3 - 23 の H C フレームワークを含む。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、ライブラリは、L C 可変領域をさらに含む。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、ライブラリは、多様な LC 可変領域をコードするメンバーを含む。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、LC 可変領域を含むメンバーは、A 2 7 LC フレームワークを含む。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、ライブラリは、ディスプレイライブラリ、例えば、ファージディスプレイライブラリである。

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態において、ライブラリは、少なくとも 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} の多様なメンバーを有する。

【 0 0 5 9 】

一部の態様において、本開示は、本明細書に記載のライブラリと標的を接触させるステップ、メンバーと前記標的とを結合させるステップ、および標的を結合したメンバーを回収するステップを含む、ライブラリメンバーを選択する方法を特徴とする。

【 0 0 6 0 】

本発明のこれらの実施形態、他の実施形態およびそれらの特徴および特性は、以下の説明、図面および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 6 1 】

(詳細な説明)

抗体 (「 A b 」) は、それらの多様性を、特定の標的に対する A b の親和性および特異性の決定に関与する領域に集中する。これらの領域は、配列および長さにおいて多様であってよい。一般的に、それらは双方の点において多様である。しかし、ヒト抗体のファミリーにおいて、配列および長さ双方における多様性は、真にランダムではない。むしろ、一部のアミノ酸残基は、CDR の特定の位置において好ましく、一部の CDR の長さが好ましい。これらの好ましい多様性は、抗体ファミリーの天然の多様性に相当する。

【 0 0 6 2 】

本発明によれば、また以下でさらに十分に説明するように、約 3 から約 35 の間のアミノ酸長である重鎖 (H C) C D R 3 を含むヒト抗体の多様なファミリーのメンバーをコードする、ベクターおよび遺伝子パッケージのライブラリを調製し使用できる。特定の実施形態において、H C C D R 3 はさらに、Y と S とに富んでいてよく、かつ / または多様化された D 領域を含んでよい。このような H C C D R 3 を含む集中的ライブラリをさらに提供する。

【 0 0 6 3 】

免疫細胞が抗体重鎖を構築する場合、免疫細胞は、V セグメントを D セグメントに接続し、それを J セグメントに接続する。D セグメントは任意選択であり、ヒト A b の約 50 % は認識可能な D を有する。この細胞は、ジャンクション部位 (V と D 、 D と J または V と J) において、塩基の除去および付加双方の多数の編集を実施できるが、必ずしもランダムではない。最初に再構成された抗体は、細胞の表面に提示され、抗原 (A g) と結合する場合、細胞は刺激され、親和性を改善するために体細胞突然変異を実施する。免疫グロブリン生殖系列遺伝子中にコードされるホットスポットがあり、その結果 A b 遺伝子の特定の場所が、持続性 A g に対する優れたバインダーを探し求めて特定のセットの突然変異を起こす可能性が非常に高い。実際には、突然変異の一部はフレームワーク位置にあるが、大部分は相補性決定領域 (C D R) にある。高度な配列多様性を占めすだけでなく、長さの多様性も示すので、重鎖 (H C) の C D R 3 が特に興味がある。C D R がランダムな D N A で置き換えられた抗体 (A b) ライブラリが構築されており、有用な A b が得られている。しかし、一部の治療用 A b は有意な程度の抗原性を示す。ヒト生殖系列に近い A b が低抗原性であり得る。

【 0 0 6 4 】

定義

便宜上、本発明のさらなる説明の前に、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲に用いた特定の用語をここで定義する。

【 0 0 6 5 】

単数形の「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかにそうでないと指示しない限り、複数に対する言及を含む。

【 0 0 6 6 】

「親和性」または「結合親和性」という用語は、見かけ上の結合定数すなわち K_a を指す。 K_a は、解離定数 (K_d) の逆数である。結合タンパク質は、例えば、特定の標的分子に対して、少なくとも 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} および 10^{11} M^{-1} の結合親和性を有することができる。第2の標的と比較して第1の標的に対する結合タンパク質の結合親和性がより高いことは、第2の標的への結合に関する K_A (または数値 K_D) より第1の標的への結合に関する K_A (または数値 K_D がより小さい) がより高いことにより示すことができる。このような場合、結合タンパク質は、第2の標的 (例えば、第2の立体配座中の同じタンパク質またはそれらの模倣体あるいは第2のタンパク質) と比較して、第1の標的 (例えば、第1の立体配座のタンパク質またはそれらの模倣体) に関して特異性を有する。結合親和性の差 (例えば、特異性または他の比較に関して) は、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000 または 10^5 倍であり得る。

【 0 0 6 7 】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲルろ過、ELISA、表面プラズモン共鳴または分光法 (例えば、蛍光測定を使用して) を含むさまざまな方法により決定できる。結合親和性を評価するための例示的な条件は、TRIS緩液 (50 mMのTRIS、150 mMのNaCl、5 mMのCaCl₂、pH 7.5) 中である。これらの技術は、結合タンパク質 (または標的) の濃度の関数として、結合しているタンパク質および遊離の結合タンパク質の濃度を測定するために使用できる。結合された結合タンパク質 ([Bound]) の濃度は、遊離の結合タンパク質 ([Free]) の濃度および標的上の結合タンパク質の結合部位の濃度に関連し、以下の方程式:

$$[\text{Bound}] = N \cdot [\text{Free}] / ((1/K_A) + [\text{Free}])$$

において、(N) は結合部位の数 / 標的分子である。

【 0 0 6 8 】

必ずしも K_A を正確に決定する必要はないが、これは、時として、ELISAまたはFACS分析などの方法を使用して決定される、親和性の定量的測定値を得ることで十分であるからであり、その測定値は K_A に比例し、したがって比較、例えば、より高い親和性が例えば2倍高いかどうかの決定に使用して、例えば、機能アッセイ、例えばインビトロまたはインビボアッセイにおける活性により、親和性の定性的測定値を得、または親和性の推定値を得ることができる。

【 0 0 6 9 】

「抗体」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を指す。例えば、抗体は、重(H)鎖可変領域 (本明細書においてVHと略記する) および軽(L)鎖可変領域 (本明細書においてVLと略記する) を含むことができる。別の実施例において、抗体は、2つの重(H)鎖可変領域および2つの軽(L)鎖可変領域を含む。重鎖および軽鎖は、それぞれさらにHCおよびLCと略記してもよい。「抗体」という用語は、抗体の抗原結合断片 (例えば、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、scFvおよびドメイン抗体(dAb)断片 (de Wildtら、Eur J Immunol、1996年; 26巻(3号): 629~39頁)) および完全抗体を包含する。抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM (およびそれらのサブタイプ) の構造的特徴を有することができる。抗体は任意の供給源由来でよいが、霊長類 (ヒトおよび非ヒト

霊長類)および霊長類化されたものが好ましい。

【0070】

VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」(「FR」)と呼ばれる、より保存された領域に散在する、「相補性決定領域」(「CDR」)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細かく分けることができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、厳密に定義されている(Kabat, E. A., ら、(1991年) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication 91巻3242頁およびChothia, C. ら、(1987年) J. Mol. Biol. 196巻: 901~917頁を、さらに www.hgmp.mrc.ac.ukを参照されたい)。Kabatの定義を本明細書において使用する。VHおよびVLは個々に、3つのCDRおよび4つのFRにより通常構成され、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端に配置されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0071】

抗体のVHまたはVL鎖は、重鎖または軽鎖の定常領域のすべてまたは一部をさらに含むことができ、その結果免疫グロブリンの重鎖または軽鎖をそれぞれ形成する。一実施形態において、抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖の四量体であり、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖は、例えばジスルフィド結合により相互接続している。IgGにおいて、重鎖定常領域は3つの免疫グロブリンドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む。軽鎖定常領域は、CLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、通常抗体と、宿主組織または免疫系のさまざまな細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体の第1成分(C1q)を含む因子との結合を媒介する。免疫グロブリンの軽鎖は、または型であり得る。一実施形態において、抗体はグリコシル化される。抗体は、抗体依存性細胞障害作用および/または補体媒介性細胞障害作用に対して機能性であり得る。

【0072】

抗体の1つまたは複数の領域は、ヒトまたは有効にヒトであり得る。例えば、可変領域の1つまたは複数のヒトまたは有効にヒトであり得る。例えば、CDR、例えばHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つまたは複数のヒトであり得る。個々の軽鎖CDRは、ヒトであり得る。HC CDR3はヒトであり得る。フレームワーク領域、例えばHCまたはLCのFR1、FR2、FR3およびFR4の1つまたは複数のヒトであり得る。例えば、Fc領域はヒトであり得る。一実施形態において、すべてのフレームワーク領域は、ヒト、例えばヒト体細胞、例えば、免疫グロブリンを産生する造血細胞または非造血細胞に由来する。一実施形態において、ヒト配列は、例えば生殖系列核酸によりコードされる生殖系列配列である。一実施形態において、選択されたFabのフレームワーク(FR)残基は、最も類似した霊長類生殖系列遺伝子、特にヒト生殖系列遺伝子中の対応する残基のアミノ酸型に変換され得る。定常領域の1つまたは複数のヒトまたは有効にヒトであり得る。例えば、免疫グロブリン可変ドメイン、定常領域、定常ドメイン(CH1、CH2、CH3、CL)あるいは完全抗体の少なくとも70、75、80、85、90、92、95、98または100%は、ヒトまたは有効にヒトであり得る。

【0073】

抗体のすべてまたは一部は、免疫グロブリン遺伝子またはそれらのセグメントによりコードされ得る。例示的なヒト免疫グロブリン遺伝子は、および(IgA1およびIgA2)、(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、およびμの定常領域遺伝子ならびに多くの免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。完全長免疫グロブリンの「軽鎖」(約25KDaまたは約214アミノ酸)は、NH2末端において可変領域遺伝子(約110アミノ酸)により、COOH末端においてまたは定常領域遺伝子によりコードされる。完全長免疫グロブリンの「重鎖」(約50KDaまたは約446アミノ酸

）は、可変領域遺伝子（約 116 アミノ酸）および他の前述の定常領域遺伝子の 1 つ、例えば（約 330 アミノ酸をコードする）により、同様にコードされる。ヒト H C の長さは、H C C D R 3 が約 3 アミノ酸残基から 35 アミノ酸残基超にわたって変化するので、大幅に変化する。

【0074】

本明細書において、「D セグメント」および「D 領域」という用語は、交換可能に用いられ、同一である。これらの要素は、DNA およびアミノ酸の双方の表現を有し、その意味するところは文脈から明らかであることは理解されるべきである。

【0075】

「ライブラリ」または「ディスプレイライブラリ」は、ヌクレオチド、例えば DNA、クローン内の配列のコレクション、または個別のポリペプチドまたはポリペプチドの混合集団を提供するために選択またはスクリーニングできる、複製可能なディスプレイパッケージに提示されたポリペプチドの遺伝子的に多様なコレクションを指す。

【0076】

本明細書において使用する「パッケージ」という用語は、粒子がその表面にポリペプチドを提示している、複製可能な遺伝子ディスプレイパッケージを指す。このパッケージは、その表面に抗原結合ドメインを提示するバクテリオファージであってよい。この型のパッケージは、ファージ抗体（pAb）と呼ばれている。

【0077】

「所定の標的」は、任意の開示された方法において、その使用に先だって同一性が既に公知である標的分子を指す。

【0078】

本明細書において使用する「複製可能なディスプレイパッケージ」という用語は、複製能力を有する粒子を提供する遺伝子情報を有する生物学的粒子を指す。この粒子はその表面にポリペプチドの少なくとも一部を提示できる。このポリペプチドは、この粒子にネイティブな遺伝子情報および/または粒子内に人工的に配置された遺伝子情報あるいはその原型によりコードされ得る。提示されたポリペプチドは、特異的結合対、例えば、免疫グロブリン分子、酵素または受容体などに基づく重鎖または軽鎖ドメインの任意のメンバーであってよい。この粒子は、例えば、ウィルス、例えば、fd または M13 などのバクテリオファージであってよい。

【0079】

「ベクター」という用語は、遺伝子が挿入され、組み換え DNA 分子を構築する、宿主生命体中で複製可能な DNA 分子を指す。「ファージベクター」は、バクテリオファージに関する複製起点を含有するが、プラスミドに関する複製起点を含有しない、ファージゲノムの改変に由来するベクターである。「ファージミドベクター」は、バクテリオファージに関する複製起点およびプラスミドの複製起点を含有する、プラスミドゲノムの改変に由来するベクターである。

【0080】

オリゴヌクレオチドの議論において、「[RC]」の表記は、示したオリゴヌクレオチドの逆相補体が、使用したオリゴヌクレオチドであることを示す。

【0081】

ヒト抗体重鎖 C D R 3

重鎖（「H C」）生殖系列遺伝子（G L G）3 - 23（V P - 47としても公知）は、全ヒト A b の約 12 % を占め、本発明の好ましい実施形態においてフレームワークとして好ましい。しかし、他の周知のフレームワーク、例えば 4 - 34、3 - 30、3 - 30、3 および 4 - 30、1 も、本発明の集中的多様性の原理から逸脱することなく使用できることを理解するべきである。

【0082】

加えて、

【0083】

【化 1】

JH4 (YFDYW₁₀₃GQGT^LTVTVSS (配列番号1))

は、ネイティブ抗体中の J H 3 より頻繁に現れる。したがって、J H 4 は本発明の集中的ライブラリにとって好ましい。しかし、

【0084】

【化 2】

JH3 (AFDW₁₀₃GQGT^MTVTVSS (配列番号2)), JH6(YYYYYGMDYW₁₀₃GQGT^TTVTVSS (配列番号3)),

、J H 1、J H 2 または J H 5 も同様に使用できる。J H 2 は、すべての他のヒト J H において Q G の代わりに 1 0 5 - 1 0 6 に R G を有する有利性を有する。J H 3 は、M₁₀の不利を有する。少なくとも 1 つの標的に対して E L I S A 陽性であった 1 4 1 9 の A b のコレクションにおいて、本発明者らは、1 7 の J H 1、3 1 の J H 2、4 5 2 の J H 3、6 3 6 の J H 4、3 2 の J H 5 および 2 5 1 の J H 6 を見出した。存在するのであれば、J H の二重下線部分は、C D R 3 の一部であると考えられる。表 3 において、J H の F R 4 部分は、下線を引いてある。

【0085】

これらの 1 4 1 9 の A b の H C C D R 3 に出現する個々のアミノ酸の頻度を、表 7 5 に一覧にし、記録した。最も一般的なアミノ酸は、順番に T y r と G l y、A s p、S e r および A r g であったことに留意されたい。R e l . U p は、最もまれな C y s と比較した個々の型の相対存在量である。R e l . D o w n は、最も一般的な T y r と比較した個々の型の存在量である。したがって、H C C D R 3 内に置換する好ましいアミノ酸型は、Y、G、D、S および R である。

【0086】

必然的に、H C C D R 3 は長さが変わる。ヒト H C の約半分は、成分：V : : n z : : D : : n y : : J H n からなり、V は V 遺伝子であり、n z は、本質的にランダムな一連の塩基であり、D は、多くの場合双方の末端で大量の編集がある D セグメントであり、n y は、本質的にランダムな一連の塩基であり、J H n は、多くの場合、5' 末端で大量の編集がある 6 つの J H セグメントの 1 つである。D セグメントは、I g G を折り畳ませるスパーサーセグメントを提供するために出現する。最も大きい多様性は、V と D および D と J H のジャンクションにおいてある。

【0087】

C o r b e t t ら、(C o r b e t t S J、T o m l i n s o n I M、S o n n h a m m e r E L、B u c k D、W i n t e r G. J M o l B i o l. 1 9 9 7 年 V 2 7 0 巻：5 8 7 ~ 9 7 頁) は、ヒト免疫系は、複数の D セグメントおよび組み換えられた D セグメントを挿入しないことを示した。それにもかかわらず、D セグメントは、H C C D R 3 の優れた成分として選択されており、本発明は、複数の D セグメントを含有する H C C D R 3 を含む。

【0088】

ヒト D セグメントは、いくつかの非常に強いバイアスを有する。ヒト D セグメントにおける 5 2 2 のアミノ酸の集計は、Y が 7 0 (1 3 . 4 %)、L が 6 3 (1 2 . 1 %)、V が 5 2 (1 0 %)、G が 4 9 (9 . 4 %)、I が 4 1 (7 . 9 %)、T が 4 0 (7 . 7 %)、S が 3 3 (6 . 3 %)、W が 2 7 (5 . 2 %)、D が 2 1 (4 %)、A が 1 9 (3 . 6 %)、R が 1 6 (3 . 1 %)、T A G が 1 5 (2 . 9 %)、N が 1 4 (2 . 7 %)、Q が 1 1 (2 . 1 %)、C が 9 (1 . 7 %)、E が 9 (1 . 7 %)、F が 8 (1 . 5 %)、M が 8 (1 . 5 %)、T G A が 8 (1 . 5 %)、T A A が 7 (1 . 3 %)、P が 1 (0 . 2 %)、H が 1 (0 . 2 %)、および K が 0 (0 %) である。不對の C y s を有し、さらに T G A 終止コドンを含む、1 つの D (2 - 8 R F 1) があり、あまり使用されない。したがって、D セグメントは、主に疎水性である。ヒト H C C D R 3 におけるアミノ

酸の頻度を、表 75 に示す。頻度には、類似点および相違点の双方がある。H C C D R 3 全体において、T y r は最も一般的であり、G l y だけがそれに近い (T y r の 96 % 一般的)。A s p (T y r の 75 % 一般的)、S e r (T y r の 53 % 一般的)、L e u、V a l および I l e は、すべての D セグメントが等しいとして数えた場合、D セグメントにおいて比較的一般的である。免疫系は、D セグメントを同じ頻度で使用しない。表 77 は、D セグメントの利用頻度を示す。しばしば使用される D セグメントは、T y r、G l y、S e r および A s p に非常に富んでいる。A r g は、最も多く使用される D セグメントには見出されず、A r g は、J H セグメントの任意の C D R 部分にもコードされない。A r g は、V、D および J の突然変異により、または V および D、D および J または V および J の間のフィラー領域においてのどちらかで優勢になる。このサンプルにおいて、全アミノ酸の 50 % は、T y r、G l y、A s p、S e r または A r g である。本発明の一実施形態において、「親」H C C D R 3 配列の置換は、T y r、G l y、S e r、A s p および A r g からなるアミノ酸のセットに限定される。本発明の一実施形態において、A r g は、V および D の間、D および J の間または V および J の間のフィラー領域において一般的である。

【0089】

本発明の好ましいライブラリにおいて、両方の型の H C C D R 3 を使用する。特定可能な D セグメントを有さない H C C D R 3 において、構造は、V : : n z : : J H n (n = 1, 6) であり、J H は 5' 末端において通常編集されている。特定可能な D セグメントを有する H C C D R 3 において、構造は V : : n z : : D : : n y : : J H n である。

【0090】

本明細書において、約 3 から約 35 アミノ酸長の間の H C C D R 3 を提供する。特定の実施形態において、H C C D R 3 は、Y と S とに富んでいる、および / または D 領域が存在する場合、多様化された D 領域を含むことができる。例えば、H C C D R 3 は約 43 % および約 80 % 間の、例えば、約 43 %、約 48 %、約 69 %、約 63 %、約 71 %、約 62 %、約 58 %、約 68 %、約 80 %、約 77 % の Y および / または S 残基を含むことができ、あるいは残基の約 40 % より多く、または約 40 % から約 100 % 未満は Y および / または S である。例えば、C D R 3 中のすべての残基が Y および / または S ではない。特定の実施形態において、H C C D R 3 は、伸長された J H 領域を含むことができる。本発明の好ましいライブラリの例示的な H C C D R 3 成分設計を、実施例 1、2 および 3 に示し、説明する。

【0091】

一部の実施形態において、(例えば C D R 例えは H C C D R 3 またはフレームワーク領域 (例えは C D R、例えは C D R 3、例えは H C C D R 3 に近いまたは隣接するフレームワーク領域) における) 多様性は、平均して約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、または約 1 から約 10 の突然変異 (例えば塩基の変化) / 例えは C D R (例えは H C C D R 3) またはフレームワーク領域 (C D R、例えは C D R 3、例えは H C C D R 3 に近いまたは隣接するフレームワーク領域) を創製するために生成される。いくつかの実践形態において、突然変異誘発は、公知の領域または結合界面において可能性の高い領域を標的にする。さらに、突然変異誘発は、C D R に近いまたは隣接するフレームワーク領域を対象とできる。抗体の場合、突然変異誘発は、例えば、精密な段階的な改善を起こすために C D R の 1 つまたはいくつかにも限定され得る。同様に、特定されたりガンドが酵素である場合、突然変異誘発は、活性部位および周辺に結合できる抗体を提供できる。特定の実施形態において、C D R またはフレームワーク領域 (例えは、本明細書に記載の H C C D R 3) を、エラープローン P C R に供し、多様性を生成することができる。この手法は、「スロッピー (sloppy)」型の P C R を使用し、「スロッピー (sloppy)」型の P C R において、ポリメラーゼは非常に高いエラー率 (最大 2 %) を有し、野生型配列を増幅し、P r i t c h a r d ら、(2005 年) J. Theor. Biol. 234 巻: 497 ~ 509 頁および L e u n g ら、

(1989年) *Technique* 1巻: 11~15頁に一般的に記載されている。他の例示的な突然変異誘発技術は、ランダムな切断を使用するDNAシャッフリング (Stemmer (1994年) *Nature* 389~391頁; 「核酸シャッフリング」と呼ばれる)、RACHITT (商標) (Cocoら、(2001年) *Nature Biotech.* 19巻: 354頁)、部位特異性突然変異誘発 (Zollerら、(1987年) *Nucleic Acids Res.* 10巻: 6487~6504頁)、カセット突然変異誘発 (Reidhaar-Olson (1991年) *Methods Enzymol.* 208巻: 564~586頁) および縮重オリゴヌクレオチドの組み込み (Griffithsら、(1994年) *EMBO J.* 13巻: 3245頁) を含む。

【0092】

本発明の一部の実施形態において、残基の大部分がSerまたはTyrのどちらかであるDセグメントを選択する。一部の実施形態において、D領域をコードするDNAを合成する場合、個々のSerまたはTyr残基は、コードされたアミノ酸がSerまたはTyrのどちらかであるように、TMT、TMCまたはTMYにより、コードされる。

【0093】

一部の実施形態において、本明細書に記載のHC CDR3配列を、対象となるHC CDR3をインフレームでコードする配列と、抗生物質耐性遺伝子、例えばKan^R遺伝子とを融合するステップおよびカナマイシン耐性に関して選択するステップにより、オープンリーディングフレームに関する選択に供することができる。CDR3が終止コドンまたはフレームシフトを有する可能性のある細胞は、抗生物質耐性を有さず、その配列は除去される。

【0094】

ヒト抗体重鎖CDR3を含むライブラリの構築方法およびヒト抗体重鎖CDR3を含むライブラリ。

【0095】

抗体ライブラリは、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を有するタンパク質を含む、タンパク質のコレクションである。例えば、ラクダ化 (camelized) 可変ドメイン (例えば、VHドメイン) は、唯一の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質のライブラリのための足場として使用できる。別の実施例において、タンパク質は、対になり得る2つの可変ドメイン配列、例えばVHおよびVLドメインを含む。抗体ライブラリは、抗体コーディング配列を含む、例えば、本明細書において提供されるHC CDR3をコードする配列を含む核酸ライブラリから調製できる (抗体コーディングライブラリ)。

【0096】

ディスプレイライブラリを使用する場合、抗体コーディングライブラリの個々のメンバーは、コードする抗体を伴うことができる。ファージディスプレイの場合、抗体タンパク質は、ファージでコートされたタンパク質を (直接的または間接的に) 物理的に伴う。代表的な抗体ディスプレイライブラリのメンバーは、VHドメインおよびVLドメインを含むポリペプチドを提示する。ディスプレイライブラリのメンバーは、Fab断片 (例えば、2つのポリペプチド鎖を使用する) または一本鎖Fv (例えば、一本鎖ポリペプチドを使用する) として抗体を提示できる。他のフォーマットもまた使用できる。

【0097】

Fabおよび他のフォーマットの場合のように、提示された抗体は、1つまたは複数の定常領域を、軽鎖および/または重鎖の一部として含むことができる。一実施形態において、個々の鎖は、例えばFabの場合のように1つの定常領域を含む。他の実施形態において、さらなる定常領域が含まれる。有用な抗原結合部位を有すると特定された後で、1つまたは複数の定常領域を分子に加えることもまた可能である。例えば米国特許出願第2003-0224408号を参照されたい。

【0098】

抗体ライブラリは多くの方法により構築できる (例えば、de Haardら、(19

99年) J. Biol. Chem 274 巻: 18218~30頁; Hoogenboom ら、(1998年) Immunotechnology 4 巻: 1~20頁、Hoogenboom ら、(2000年) Immunol Today 21 巻: 371~8頁および Hoet ら、(2005年) Nat Biotechnol. 23 巻(3号): 344~8頁を参照されたい。

【0099】

ライブラリの構築のための特定の実施形態において、本明細書に記載の CDR3 を含む重鎖ならびに および 軽鎖が、個別のベクターにおいて最も良く構築される。第1に、合成遺伝子を設計し、個々の合成可変ドメインを統合する。軽鎖は、ApalI (シグナル配列の最末端に位置する) および AscI (終止コドンの後ろに位置する) のための制限部位に結合できる。重鎖は、SfiI (Pe1Bシグナル配列内に位置する) および NotI (CH1 およびアンカータンパク質の間のリンカーに位置する) に結合できる。Pe1B 以外のシグナル配列、例えば M13 pIII シグナル配列もまた使用できる。

【0100】

最初の遺伝子は、所望の CDR の代わりに「スタッパー」配列を用いて作製できる。「スタッパー」は切り取られ、多様な DNA に置き換えられるが、機能性の抗体遺伝子を発現できない配列である。例えば、スタッパーは、いくつかの終止コドンおよび正確な完成ライブラリベクターには発生しないであろう制限部位を含有し得る。スタッパーは、高度に示された CDR 配列の任意の1つを有することを避けるために使用される。

【0101】

本発明の別の実施形態において、重鎖および または 軽鎖は、これらの鎖のクローニングを可能にする適切な制限部位を有する、(例えば、提示する、または提示および発現するための) 単一のベクターまたは遺伝子パッケージにおいて構築される。このようなベクターを構築するための方法は周知であり、当分野において広く使用される。好ましくは、重鎖および 軽鎖ライブラリならびに重鎖および 軽鎖ライブラリは別々に調製されるであろう。

【0102】

最も好ましくは、提示は、M13ファージの誘導体の表面上である。最も好ましいベクターは、M13の全遺伝子、抗生物質耐性遺伝子およびディスプレイカセットを含有する。カセットとして、遺伝子の多様なファミリーのメンバーの導入および除去を可能にする制限部位を有する好ましいベクターが提供される。好ましいベクターは、ファージの増幅に使用される成長条件下で、再構成に対して安定である。

【0103】

本発明の別の実施形態において、本発明の方法により獲得された多様性は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を提示および / または発現するファージミドベクター (例えば、pMID21 (表35に示したDNA配列)) において提示および / または発現され得る。このようなベクターを使用し、他のベクターまたはファージを使用する、その後の提示および / または発現のために多様性を保存することもできる。

【0104】

さらに他の実施形態において、2008年2月13日出願の U.S.S.N 61/028,265、2008年4月10日出願の U.S.S.N. 61/043,938 および 2009年2月13日出願の U.S.S.N. 12/371,000 に記載の、軽鎖の高速最適化または「ROLIC」と呼ばれる方法では、LCの大型の集団が、それらをファージ上に提示するファージベクター中に配置される。HCの小型の集団 (例えば、3、10または25) は、HC、例えば本明細書に記載の CDR3 を有する HC がペリプラズム中に分泌されるように、E.coli 中にクローン化される。次いで、E.coli を、LCの大型の集団をコードするファージベクターに感染させ、ファージ上に HC/LC タンパク質の対合を作製する。ファージ粒子は、LC 遺伝子のみを担持する。

【0105】

別の態様において、2008年2月13日出願の U.S.S.N 61/028,265

、2008年4月10日出願のU.S.S.N. 61/043,938および2009年2月13日出願のU.S.S.N. 12/371,000にさらに記載の、重鎖の経済的選択または「ESCH」と呼ばれる方法において、LCの小型の集団が、それらの分泌を起こすベクター中に配置され得る。CDR3を含む本明細書において提供されるHCのライブラリのような、HCの新しいライブラリがファージ中に構築される。次いでLCおよびHCは、感染のさらにもっと有効な方法により組み合わせることができる。有効なHCの小型のセットが選択されたら、これらを使用して、ROLICに供し、最適なHC/LCの対合を得る、または古典的選択のためのLCのFabライブラリにクローン化されるように使用できる。

【0106】

本発明の別の実施形態において、本発明の方法により獲得される多様性は、真核細胞、例えば酵母ベクターにおける発現、例えば酵母細胞における発現に適したベクターを使用して提示および/または発現され得る。

【0107】

タンパク質ディスプレイの他の型は、細胞ベースの提示（例えばWO03/029,456を参照されたい）；リボソームディスプレイ（例えば、Mattheakisら、（1994年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：9022頁およびHanesら、（2000年）Nat Biotechnol. 18巻：1287～92頁を参照されたい）；タンパク質-核酸融合（例えば、米国特許第6,207,446号を参照されたい）；および非生物学的タグの固定（米国特許第5,874,214号を参照されたい）を含む。

【0108】

本開示のライブラリから単離された抗体を分析し、LCの型および最も近い生殖系列遺伝子を決定できる。好ましい実施形態において、非生殖系列フレームワーク残基は、結合親和性および特異性が許容不可能な程度に悪影響を与えない限り、生殖系列アミノ酸に戻される。置換は、群として、または1つずつ実施され得る。ヒト生殖系列配列は、Tomlinson, I.A.ら、1992年、J. Mol. Biol. 227巻：776～798頁；Cook, G. P.ら、1995年、Immunol. Today 16巻（5号）：237～242頁；Chothia, D. ら、1992年、J. Mol. Bio. 227巻：799～817頁に開示されている。VBASEの要覧は、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的な総覧を提供する（Tomlinson, I.A. らにより編纂、MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK）。抗体は、結合特性が実質的に保有される限り、フレームワーク領域中の1つまたは複数の非生殖系列アミノ酸を抗体の対応する生殖系列アミノ酸に戻すことによって「生殖系列化」される。類似の方法は、定常領域、例えば免疫グロブリン定常ドメインにおいてもまた使用できる。

【0109】

例えば、抗体は、例えばフレームワーク、CDRまたは定常領域において、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、より参照生殖系列配列に近づくことができる。1つの例示的な生殖系列化の方法は、単離抗体の配列に類似する（例えば、特定のデータベースにおいて最も類似の）、1つまたは複数の生殖系列配列を特定するステップを含む。次いで、（アミノ酸レベルにおいて）突然変異を、増加的に、または他の突然変異と組み合わせて、単離抗体中に作製する。例えば、一部またはすべての生殖系列の突然変異候補をコードする配列を含む核酸ライブラリを作製する。次いで、突然変異を起こした抗体を評価し、例えば、単離抗体に対して1つまたは複数のさらなる生殖系列残基を有し、未だ有用である（例えば、機能活性を有する）抗体を特定する。一実施形態において、可能な限り多くの生殖系列残基を単離抗体に導入する。

【0110】

一実施形態において、突然変異誘発を使用し、1つまたは複数の生殖系列残基を、フレームワークおよび/または定常領域に置換または挿入する。例えば、生殖系列のフレーム

ワークおよび／または定常領域残基は、改変された非可変領域と類似（例えば、最も類似）の生殖系列配列に由来することができる。突然変異誘発後、生殖系列残基または残基が許容される（すなわち、活性を無効にしない）場合、抗体の活性（例えば、結合活性または他の機能活性）を評価し、決定できる。類似の突然変異誘発は、フレームワーク領域において実施できる。

【0111】

生殖系列配列の選択は、さまざまな方法で実施できる。例えば、選択性または類似性に関する所定の基準、例えば、少なくとも特定のパーセントの同一性、例えば、少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または99.5%の同一性を満たす場合、生殖系列配列は選択され得る。この選択は、少なくとも2、3、5または10種の生殖系列配列を使用して実施できる。CDR1およびCDR2の場合、類似の生殖系列配列の特定は、1つのこのような配列の選択を含むことができる。CDR3の場合、類似の生殖系列配列の特定は、1つのこのような配列の選択を含むことができるが、アミノ末端部分およびカルボキシ末端部分に別々に寄与する2つの生殖系列配列の使用を含んでもよい。他の実践形態において、1つを超えるまたは2つの生殖系列配列を使用し、例えば、コンセンサス配列を形成する。

【0112】

CDR1、CDR2および軽鎖多様性

HC CDR3のライブラリは、HC CDR1、HC CDR2および軽鎖における多様性のバックグラウンドに構築されると理解するべきである。軽鎖の多様性は、HCの多様性として同じDNA分子中にコードされ得、またはLCおよびHCの多様性は、別々のDNA分子にコードされ得る。表22において、シグナル配列の融合は、：：VH：：CH1：：His6：：Myc：：IIIs tumpである（His6は、配列番号934として開示される）。CDR1は残基31～35を含み、残基31、33および35に多様性がある。一実施形態において、残基31、33および35は、システインを除く任意のアミノ酸型であってよい。CDR2は、残基50から65を含む。50、52、52a、56および58の位置に多様性がある。一実施形態において、残基50および52は、Ser、Gly、Val、Trp、Arg、Tyrの任意の型であってよく、残基52aはProまたはSerであってよく、残基56および58は、Cysを除く任意のアミノ酸型であってよい。HC CDR3の多様性は、少なくとも1.E4、1.E5、1.E6、1.E7、5.E7または1.E8であるHC CDR1および2の多様性にクローン化される。

【0113】

一実施形態において、残基31、33、35、50、52、56および58は、CysまたはMetを除く任意のアミノ酸型であってよく、残基52aは、Gly、Ser、ProまたはTyrであってよい。HC CDR3の多様性は、少なくとも1.E4、1.E5、1.E6、1.E7、5.E7または1.E8であるHC CDR1および2の多様性にクローン化される。

【0114】

一実施形態において、HCの多様性は、軽鎖の多様性を含有するベクター（ファージまたはファージミド）にクローン化される。この多様性は、少なくとも25、50、100、500、1.E3、1.E4、1.E5、1.E6、または1.E7である。HC CDR3の多様性は、少なくとも221、272、500、1000、1.E4、1.E5、1.E6、1.E7、1.E8または1.E9である。

【0115】

一実施形態において、HCの多様性は、ファージタンパク質、例えばIII、VII、VII、VII、VIIもしくはIXまたは提示を起こすために十分なこれらの1つの断片上にHCを提示するファージベクターにクローン化され、軽鎖は、個々の細胞が軽鎖を分泌する細胞コレクションに感染することによってHCに組み込まれる。細胞中の軽鎖の多様性は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75または100

である。HC CDR3の多様性は、少なくとも221、272、500、1000、1.E4、1.E5、1.E6、1.E7、1.E8または1.E9である。

【0116】

表30は、P_{lac}プロモーターの調節下で重鎖に関するディスプレイカセットである、b_{la}遺伝子を担持するファージベクターDY3FHC87（配列番号：894）の配列を示す。DY3FHC87は、同様にM13の全遺伝子を含む。ベクター、例えばpLCSK23（表40の配列）（配列番号：896）における軽鎖の多様性を持つF+E.coli細胞を感染させる。ベクターpLCSK23はKan^R遺伝子を担持する。P_{lac}プロモーターの調節下で、シグナル配列を有する、塩基2215で始まる遺伝子（塩基2215～2277）、VL（この配列において、VLは塩基2278から塩基2598の（配列番号：897）に示される配列をコードする）、塩基2599から2922のC、2923から2931のNotI部位を許容するリンカーおよびV5タグ（塩基2932～2973）がある。2259～2271にSfiI部位および2602～2605にKpnI部位があり、Vの置き換えを容易にさせる。（配列番号：897）は、分泌されるタンパク質の例である。CおよびV5タグは一定であることを理解すべきである。表19に示されるすべてのタンパク質（VK102gl-JK3、VK102var1、VK102var2、VK102var3、VK102var4、VK102var5、VK3L6gl-JK4、VK3L6var1、VK3L6var2、VK3L6var3、VK3L6var4、VK3L6var5、VK3L6var6、VK3L6var7、VK3L6var8、VK3A27gl-JK3、VK3A27var1、VK3A27var2、VK3A27var3、VK3A27var4、VK3A27var5、VK3A27var6、VK3A27var7、VK3L2gl-JK3、およびVK1glL8-JK5）は、カルボキシ末端に結合したこれらの配列を有するであろう。

【0117】

軽鎖の多様性

表800は、3-23と十分に対合することが公知であり、5つのCDRの突然変異を有し、3-23に基づく1つのHCを有するLC（軽鎖）を示し、LC K1（O12）：JK1は、タンパク質標的に対して高親和性のAbを作製する。O12は、頻繁に使用されるVKIである。個々のCDRを変化した集団と置き換えることができるように、この遺伝子は、シグナル配列の（ApaLI）、FR1（XhoI、SgfI）、FR2（KpnI）、FR3（XbaI）およびFr4：C（BsiWI）において、有用で、異なる制限部位を有するように設計されている。

【0118】

ヒトLCにおいて、CDR3は最も重要であり、CDR1が次に重要である。CDR2は、ほとんどAgと接触しない。多様性を、表900および表1000（CDR1）、表1100および表1200（CDR2）、表1300、1400および1500（CDR3）に示すようにCDRに導入する。重鎖の経済的選択（ESH C）のために、少数の、例えば表1200のようにCDR3に多様性を有する50のLCを、ペリプラズムへの分泌のためにpLCSK24における発現に関して選別した。個々の細胞系が、例えば50またはそれより少ないLCを含むように、いくつかの細胞系を維持する場合、より多くのLCを使用できる。

【0119】

表900は、LC CDR1に関する多様性を示す。このライブラリは、「許容」として示されるAA型の追加の多様性を有する、O12残基を含むことができ、表900、1000、1100、1200、1300、1400において、「許容」は「さらなる許容型」と解釈する。O12は、R₂₄ASQSIS_{SYLN}₃₄（配列番号935）を有する。他のVK1遺伝子座は、24にQを有する。他の遺伝子座は、25にMを有する。S₂₆およびQ₂₇は、VKIにおいて不変である。他のVKI遺伝子座は、28にDまたはGを有する。I₂₉およびL₃₃は、VKIにおいて不変であり、側基は内側を向

いている。他の V K I 遺伝子座は、30、31、32、および34において、表900に示す多様性を許容する。表900において、11の位置のうち7つだけが変化し、総多様性は576である。

【0120】

表1000は、LC CDR1に関する高レベルの多様性を示す。ここでは11の位置のうち8位が変化している。一定であるものは組み込み部位から離れているか、または埋もれた側基を有する。

【0121】

表1100は、CDR2に関する低レベルの多彩性を示す。CDR2は、抗原結合部位から離れており、ここでは多様性はあまり有用ではないと思われる。実際に、GLの多様性は非常に限定される。表1100は、GLの多様性を含む。表1200は、高レベルの多様性を含有し、1920の配列を許容する。

【0122】

表1300は、LC CDR3に関する低レベルの多様性、2160の配列を示す。表1400は、105,840配列を許容する高レベルを示す。

【0123】

ROLICのために、表900、1100および1300に示した多様性を有する、約 3×10^7 のLCを作製した。

【0124】

重鎖の多様性

Ab HC (重鎖) は、CDR1、CDR2およびCDR3において多様性を有する。配列および長さ双方の多様性があるので、CDR3における多様性は特に複雑である。配列多様性はランダムではない。Ab遺伝子を作る細胞は、VセグメントとDセグメントとJHセグメントを接合する。Dセグメントは任意選択であり、認識可能なDを有する、天然のヒトAbの約半分である。0から多数の塩基が付加または除去される、V-D、D-JまたはV-Jの境界において広範囲に編集され得る。生殖系列V::D::JHを有するAbは、生殖系列Abと見なすことができる。

【0125】

ヒトDセグメントを、表21に示す。個々の生殖系列(GL)Dセグメントは、3つのフォワードリーディングフレームのいずれかにおいて、Ab遺伝子中に出現する。いくつかのリーディングフレームにおいて、いくつかのDセグメントは終止コドンにコードする。これらのDセグメントは、改変された終止コドンほとんど生じない。表600は、個々のDセグメントの頻度を、観察された全Dセグメントのパーセントとして示す。Dセグメントを含有する、本明細書の例の大部分は、非常に一般的なD(観察された全Dセグメントの2%より大きい)を使用する。

【0126】

一態様において、本発明は、3-23(または別のVH、例えば4-34)と、a)(S、Y、D、R、N)を含むセットから選別された多数のアミノ酸、b)D領域、c)JH領域およびd)JH領域のFR4部分、の1つとの融合による、AbHC遺伝子の構成に関する。これらの融合は、GL3-23あるいはCDR1および/またはCDR2に合成多様性を有する3-23であってよい。HC CDR3の長さは約3から約24までの任意の数であってよい。好ましくは、ライブラリは、6、8、10、12、14、16、18および20の長さのHC CDR3を有するメンバーを含有するであろう。あるいは、長さは5、8、11、14、17および20または任意の他の組合せであってよい。

【0127】

表21は、長さ6から20の適切なCDR3の設計の多くの例を示す。2列に大文字で明記したコドンは、wobblingを用いて合成される。3列は、dopingのレベルを示す。表100は、さまざまな長さのHC CDR3を組み合わせ、ほぼすべてのタンパク質標的と結合するAbを含有することが期待されるライブラリの形成が可能である比率を示す。

【 0 1 2 8 】

【 表 1 】

表100							
長さ	6	8	10	12	14	16	20
多様性	$1. \times 10^5$	$2. \times 10^5$	$4. \times 10^5$	$8. \times 10^5$	$8. \times 10^5$	$8. \times 10^5$	$4. \times 10^5$

長さ6に関して、表21は4つの例を示す。例えば、6aは、w o b b l i n gされた最初の6つのA Aを有するJ H 1と直接接合されたV H (3 - 2 3)を有し、6bは、J H 1のF R 4 A Aと接合された、第2のリーディングフレーム中のD 4 - 1 7と接合されたT y rを有し、および6cは、J H 1のF R 残基に接合されたD 5 - 5 (3)を有する。これらは異なる種類の多様性をもたらすので、すべてを含むことが好ましいが、これらの1つだけを含むライブラリも有用なA bをもたらすはずである。

【 0 1 2 9 】

長さ8に関して、表21は3つの例を示す。8aはJ H 1のすべてに融合されたY Yを有し、一方、8bは、J H 1のF R領域に融合されたD 6 - 1 3 (1)に融合された1つのYを有する。長さ10、12、14、16および20もまた、表21に示す。H C C D R 3の多様性は、生殖系列3 - 2 3または合成多様性を含む3 - 2 3において構築できる。あるいは、異なるV H、例えば4 - 3 4を使用できる。

【 0 1 3 0 】

R O L I Cは、H Cの小型の集団が、F ⁺ E . c o l iにおいて可溶性タンパク質として発現される方法である。この集団を、L C : : I I I s t u m pの融合を担持するファージに感染させる。作製されたファージは、それらを作製する細胞のペリプラズムに由来するH Cを得る。これらのファージは固定された標的に結合でき、バインダーは、非バインダーから分離される。回収されたファージが増殖した場合、ファージはL CおよびH Cの間の関連性を継続するためにもたらされるので回収されたファージは同じ型の細胞を探すはずであり、したがって集団のサイズは重要である。したがって、個々の細胞系におけるH Cの数は小さいことが望ましい。したがって、個々の細胞系において、最大10、20、30、または40の異なるH Cを有する、多数の細胞系を維持することが望ましいと思われる。したがって、1、2、4、6、8、10、24、48または96の細胞系を有することができ、同じ数の平行したファージの産生、選択および増幅を実施する。1または2ラウンド後、E L I S Aアッセイにより、標的に結合したファージの産生に関してコロニーを試験する。個々のE L I S A ⁺コロニーは、有用なL Cおよび有用なH Cを含むが、それらはD N Aの同じ破片ではない。にもかかわらず、本発明者らは、個々のL Cおよび個々のH Cの始まりおよび末端を知っており、したがって、コロニーにP C Rを使用し、ディスプレイファージもしくはファージミドまたはF a b産生プラスミドに送り込むことができるF a bディスプレイまたはF a b分泌カセットを作製できる。

【 0 1 3 1 】

H Cの効率的選択 (E S H C) において、R O L I CにおけるL CおよびH Cの役割を逆転させ、それらがF ⁺ E . c o l iのペリプラズム中に可溶性タンパク質として作製されるように、プラスミド中にL Cを有する。L C遺伝子を全く有さないファージベクターにおいてH Cの多様性を作製する。L C作製F ⁺ E . c o l iを、H C担持ファージに感染させる。H C遺伝子ならびにH CおよびL Cタンパク質の双方を担持するファージを得る。これらのファージを標的への結合のために選択する。多くのA bにおいて、L Cは許容状態であり、結合親和性に対してあまり寄与していない。最も優れたL Cの選別は、親和性を非常に増加できるが、L Cの非常に限定されたレパートリーを有するF a bの選択が通常可能である。したがって、L C作製F ⁺ E . c o l i中のフレームワーク領域にL C、好ましい生殖系列の小さいセットを配置する。例えば、L C細胞系に25のL Cが存在する場合、作製する必要のある形質転換細胞の数を25倍減少させる。

【 0 1 3 2 】

記載したライブラリは、さまざまな長さの H C C D R 3 を有する。適切な折り畳みを指示するために、H C C D R 3 は、J H セグメントの大部分、すべて、もしくはフレームワーク部分と接合される D セグメントを有するか、または有さない。この配列は、w o b b l i n g した D N A 合成を使用して多様化される。このことは、任意の位置の任意のアミノ酸型を理論上許容するが、実践において、実際の配列は、親配列および遺伝子コード表において近い A A 型に対して強くバイアスがかかっている。

【 0 1 3 3 】

E S H C を使用することによって、合成 H C C D R 3 の多様性の新規な設計をサンプリングすることができる。所与の実施例において、例えば 5 0 L C のプールを使用する。 5×10^8 の H C のライブラリは、 2.5×10^{10} の旧式のライブラリと同様に機能し、必要な労力は非常に少ないはずである。

【 0 1 3 4 】

配列を w o b b l i n g する場合、最初のコドンの選別は、ライブラリ中に見られる A A の実際の混合物に影響を与える。表 3 0 0 は、アミノ酸置換が、個々の開始親コドンから 1、2 または 3 つの塩基変化を要求することを示す。例えば、本発明者らが、A l a のために g c t または g c c で開始した場合、3 種すべての終止コドンは 3 つの塩基変化を要求し、それはまれである。7 6 : 8 : 8 : 8 混合物を使用する場合、A l a は、事例の 5 7 % (0.76×0.76) で出現するであろう。V、G、T、P、S は、個々に約 6 % で出現し、D は約 3 % で出現する。E、I、L、F、Y、H、N、C および R は、約 1 0 倍下がるであろう。M、W、Q、K、A m、O c および O p は、さらによりまれであろう。本発明者らが g c a で開始した場合、その後一塩基変化だけを必要として E は D に置き換えられるが、オパールおよびオーカーの終止は二塩基変化だけを要求し、このことは望ましくない。好ましいコドンに、星印 (*) で印をつけてある。セリンの選択は、高い頻度で Y を S に置換するという本発明者らの要望を困難にする。このことは、たった 2 つの塩基が親と異なる群に O p および O c をもたらす。この問題は、H C C D R 3 レポートリーを、抗生物質耐性遺伝子、例えば K a n R または A m p R の前にクローン化し、耐性を選択すること、したがって終止コドンを含むメンバーを除去することによって克服することができる。さらに、このライブラリは、終止の代わりに Q を挿入する s u p E

E . c o l i において作製できる。

【 0 1 3 5 】

【表 2】

表300

アミノ酸	親コドン	1塩基変化	2塩基変化	3塩基変化
A *	gct, gcc	V, D, G, T, P, S	E, I, L, F, Y, H, N, C, R	M, W, Q, K, Am, Oc, Op
A	gca	V, E, G, T, P, S	D, I, L, Oc, Q, K, Op, R	M, W, H, N, C, Am, F, Y
A	gcg	V, E, G, T, P, S	D, M, L, Am, Q, K, R, W	I, F, Y, Oc, Op, H, N, C
C	tgt, tgc	Y, S, F, W, Op, R, G	L, H, N, D, P, T, A, V, I	Am, Oc, Q, K, E, M
D	gat, gac	E, G, A, V, N, H, Y	F, S, C, L, P, Q, K, R, Oc, Am, I, T	M, W, Op
E	gaa	D, G, A, V, K, Q, Oc	Am, L, I, S, P, T, R, Op, Y, H, N	M, F, C, W
E *	gag	D, G, A, V, K, Q, Am	M, L, S, P, T, Y, H, N, Oc, R, W	F, C, I, Op
F	ttt, ttc	L, I, V, S, Y, C	M, Am, Op, Oc, W, P, T, A, H, N, D, R, G	Q, K, E
G *	ggt, ggc	D, A, V, S, R, C	E, W, F, L, I, T, P, Y, H, N	Am, Oc, Op, M, Q, K
G	gga	E, A, V, R, Oc	D, W, L, I, S, P, T, Op, Q, K	Am, Oc, M, F, Y, H, N
G	ggg	E, A, V, R, W	D, Oc, L, M, S, P, T, Am, Op, Q, K	Oc, I, F, Y, H, N
H	cat, cac	Q, Y, N, D, L, P, R	F, S, C, I, T, V, A, D, G, Am, Oc	Op, W, M, E
I *	att, atc	M, L, F, V, T, N, S	Y, C, P, H, R, A, D, G	Am, Op, Oc, W, Q, K, E
I	ata	M, L, V, T, K, R	Op, Oc, S, P, Q, A, E, G, F, N	Am, C, D, H, W, Y
K	aaa	N, Q, Oc, E, P, I, R	H, Y, D, M, L, V, S, T, A, Am, Op, G	C, F, W
K *	aag	N, Q, Am, E, P, M, R	H, Y, D, I, L, V, S, T, A, Oc, G, W	C, F, Op

【 0 1 3 6 】

【表 3】

アミノ酸	親コドン	1塩基変化	2塩基変化	3塩基変化
L	tta	F, S, Oc , Op , I, V	Y, C, W, M, P, T, A, Q, K, E, R, G, Am	D, H, N
L	ttg	F, S, Am , W, M, V	Y, C, Oc , Op , P, T, A, Q, K, E, R, G, I	D, H, N
L *	ctt, ctc	F, I, V, P, H, R	M, S, Y, C, T, N, A, D, G	Am , Oc , Op , W, E, K, Q
L	cta	I, V, P, Q, R	F, M, S, Oc , Op , T, K, A, E, G, H	Am , W, D, N, C, Y
L	ctg	M, V, P, Q, R	F, I, S, Am , T, K, A, E, G, H, W	Oc , Op , D, N, C, Y
M	atg	L, V, T, K, R, I	F, N, S, P, A, Am , Q, E, W, G	Oc , Op , Y, C, H, D
N	aat, aac	K, Y, H, D, I, T, S	F, C, L, P, R, V, A, G, M, Q, E, Am , Oc	Op , W
P *	cct, ccc	S, T, A, L, H, R	F, Y, C, I, N, V, D, G, Q	Am , Oc , Op , W, M, E, K
P	cca	S, T, A, L, Q, R	Oc , Op , I, K, V, E, G, H	Am , W, M, D, N, C, F, Y
P	ccg	S, T, A, L, Q, R	Am , M, K, V, E, G, H	C, D, F, I, N, W, Y, Oc , Op
Q	caa	Oc , K, E, R, P, L, H	Y, Am , N, D, S, T, A, I, V, G, Op	F, C, W, M
Q *	cag	H, Am , K, E, R, P, L	N, D, Y, M, T, V, A, G, W, Oc , S	C, F, Op , I
R *	cgt, cgc	C, S, G, H, P, L	Op , W, Q, F, Y, I, T, N, V, A, D	Am , Oc , M, E, K
R	cga	G, Op , Q, P, L	Oc , S, C, W, H, I, V, T, A, E, K	Am , M, C, D, N, F, Y
R	cgg	G, W, Q, P, L	Am , Op , S, M, V, T, A, K, E, H, C	F, Y, I, Oc , D, N
R	aga	G, Op , S, K, T, I	C, W, N, M, L, V, P, A, Oc , Q, E	F, Y, H, D, Am
R	agg	G, W, S, K, T, M	C, Op , Am , L, I, V, A, Q, P, E, N	F, Y, H, D, Oc
S *	tct, tcc	F, Y, C, P, T, A	L, Oc , Op , Am , W, I, V, N, D, R, G, H	E, K, M, Q
S	tca	L, Oc , Op , P, T, A	F, Y, C, W, Q, R, I, K, V, E, G, Am	M, W, D, N, H
S	tcg	L, Am , W, P, T, A	F, Y, C, Op , Oc , Q, R, M, K, V, E, G	I, D, N, H
S	agt, agc	C, R, G, N, T, I	F, Y, L, P, H, V, A, D, K, W, Op	Am , Oc , M, E, Q
T *	act, acc	S, P, A, I, N	F, Y, C, L, H, R, M, K, V, D, G	Am , Oc , Op , W, E, Q

【 0 1 3 7 】

【表 4】

アミノ酸	親コドン	1塩基変化	2塩基変化	3塩基変化
T	aca	S, P, A, I, K, R	L, Oc, Op, Q, M, E, G, V, N	F, Y, C, Am, W, D, H
T	acg	S, P, A, M, K, R	I, N, L, Am, W, Q, V, E, G	C, F, Y, Oc, Op, D, H
V *	ggt, gtc	F, L, I, A, D, G	S, P, T, Y, H, N, E, C, R, M	Am, Oc, Op, W, Q, K
V	gta	L, I, A, E, G	F, M, D, S, P, T, Oc, Op, Q, R, K	Am, W, C, Y, H, N
V	gtg	L, M, A, E, G	F, I, D, S, P, T, Am, Q, R, K, W	Oc, Op, C, Y, H, N
W	tgg	C, R, G, Am, S, L, Op	P, Q, F, M, T, K, V, A, E, Oc, Y	D, N, H, I
Y	tat, tac	C, S, F, N, H, D, Oc, Am	L, W, Q, K, E, P, I, T, V, A, G, Op, R	M

Am はTAG終止であり、Op はTGAであり、Oc はTAAである。

ライブラリの使用方法

オフレート選択 (Off - Rate Selection)。解離速度が遅いことは、特にポリペプチドとそれらの標的との間の相互作用に対して高親和性の予測であり得るので、本明細書に記載の方法は、標的に対する結合相互作用に関する、所望の (すなわち低下した) 動力学的解離速度を有するリガンドの単離に使用できる。

【0138】

ディスプレイライブラリ由来の、ゆっくり解離する抗体を選択するために、ライブラリを、固定された標的に接触させる。固定された標的を、次いで非特異的に結合された抗体または弱く結合された抗体を取り除く第1の溶液を用いて洗浄する。次いで、結合された抗体を、飽和量の遊離の標的を含む第2の溶液を用いて溶出する、すなわち、粒子に結合していない標的の再現。遊離の標的は、標的から解離する抗体に結合する。溶出された抗体の再結合は、かなり低い濃度の固定された標的に対して、飽和量の遊離の標的により有効に阻止される。

【0139】

第2の溶液は、実質的に生理学的な溶液条件、またはストリンジェントである溶液条件 (例えば、低pH、高pHまたは高塩濃度) を有することができる。通常、第2の溶液の溶液条件は、第1の溶液条件と同一である。第2の溶液の分画を時間的順序で収集し、早期から後期の分画に識別する。後期分画は、早期分画中の生体分子より、遅い速度で標的から解離する抗体を含む。さらに、延長してインキュベートした後もまだ標的に結合されたままの抗体を回収することも可能である。これらは、カオトロピック条件を使用して解離する、または標的に結合したまま増幅することのどちらかが可能である。例えば、標的に結合したファージを、細菌細胞に接触させることができる。

【0140】

特異性に関する選択またはスクリーニング。本明細書に記載のディスプレイライブラリのスクリーニング方法は、非標的分子に結合する抗体を廃棄する、選択またはスクリーニング方法を含むことができる。非標的分子の例は、例えば、標的分子と構造的に異なる炭水化物分子、例えば、標的分子と異なる生物学的特性を有する炭水化物分子を含む。硫酸化炭水化物の場合は、非標的は、硫酸塩を有さない、または異なる位置に硫酸塩を有する同じ炭水化物であり得る。リン酸化ペプチドの場合は、非標的は、リン酸塩を有さない同じペプチド、または異なるリン酸化ペプチドであり得る。

【0141】

一実践形態において、所謂「陰性選択」ステップを使用し、標的と、関連する非標的分子および関連するが異なる非標的分子とを区別する。ディスプレイライブラリまたはそれらのプールを、非標的分子に接触させる。非標的分子に結合しないメンバーを収集し、続く、標的分子に対する結合に関する選択または続く陰性選択にも使用する。陰性選択ステ

ップは、標的分子に結合するライブラリメンバーを選択する前または後であってよい。

【0142】

別の実践形態において、スクリーニングステップを使用する。ディスプレイライブラリメンバーを標的分子に対する結合に関して単離した後で、個々の単離ライブラリメンバーを、非標的分子（例えば、上記の非標的）に結合するその能力に関して試験する。例えば、ハイスループットELISAスクリーニングを使用してこのデータを得ることができる。ELISAスクリーニングを使用して、標的に対する個々のライブラリメンバーの結合に関する定量的データを得ることもできる。非標的および標的の結合データを（例えば、コンピュータおよびソフトウェアを使用して）比較し、標的に特異的に結合するライブラリメンバーを特定する。

【0143】

特定の実施形態において、本発明のCDR3を含む抗体は、炭水化物に結合できる。炭水化物の結合に関して抗体を評価する方法は、ELISA、免疫組織化学、免疫プロットイングおよび蛍光活性化細胞分類を含む。これらの方法を使用して、閾値を超える、例えば、100 nM、50 nM、10 nM、5 nM、1 nM、500 pM、100 pMおよび10 pMを超える K_D を有する抗体を特定できる。

【0144】

ELISA。ディスプレイライブラリによりコードされるタンパク質は、ELISAアッセイを使用して結合特性に関してスクリーニングすることもできる。例えば、個々のタンパク質を、底表面を標的、例えば限定量の標的でコーティングしてあるマイクロタイタープレートに接触させる。プレートを緩衝液で洗浄し、非特異的に結合されたポリペプチドを取り除く。次いで、プレートに結合されたタンパク質の量を、プレートをポリペプチド、例えば、ポリペプチドのタグまたは一定部分を認識できる抗体を用いてプローブすることによって決定する。抗体を酵素、例えばアルカリフォスファターゼに連結すると、適切な基質が提供された場合、熱量が発生する。タンパク質は、細胞から精製でき、または例えば繊維状バクテリオファージコートとの融合として、ディスプレイライブラリのフォーマットにおいて分析できる。あるいは、標的分子、例えば炭水化物部分を含有する標的を発現する細胞（生細胞または固定細胞）を、マイクロタイタープレートに播種し、ディスプレイライブラリに存在する、またはディスプレイライブラリからの選択により得られるペプチド/抗体の親和性を試験するために使用できる。

【0145】

ELISAアッセイの別の型において、多様性ストランドライブラリの個々のポリペプチドを使用して、マイクロタイタープレートの異なるウェルをコートできる。その後、一定の標的分子を使用してELISAを進行し、個々のウェルを照会する。

【0146】

細胞結合アッセイ。抗体を、1つまたは複数の細胞型、例えば造血細胞と相互作用するそれらの能力に関して評価することができる。蛍光活性化細胞分類（FACS）は、タンパク質と細胞との相互作用を試験するための、例示的な方法の1つである。抗体を、細胞に結合する前または後に、蛍光色素分子を用いて直接または間接的に標識し、その後細胞を、FACS分類装置において数える。

【0147】

他の細胞型は、当分野において公知の方法によりFACS用に調製できる。

【0148】

均一結合アッセイ。候補ポリペプチドと標的との結合相互作用を、均一アッセイを使用して分析できる、すなわち、例えばアッセイの全成分を加えた後に追加の液体操作を必要としない。例えば蛍光共鳴エネルギー転位（FRET）を、均一アッセイとして使用できる（例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号；Stavrianopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照されたい）。第1の分子の蛍光色素分子標識（例えば、分画中の特定された分子）は、第2の分子が第1の分子に近接している場合、その放出蛍光エネルギーが第2の分子（例えば標的）上の蛍光標識によ

り吸収され得るように選択される。第2の分子上の蛍光標識は、それが転移エネルギーを吸収する場合、蛍光を発する。標識間のエネルギー転位の効率は、分子を分離する距離に関係するので、分子間の空間的關係が評価され得る。分子間において結合が起こる状況において、アッセイにおいて「受容体」分子の標識の蛍光発光は、最大であるはずである。FRETによるモニター用に構成される結合事象は、当分野において周知の標準的蛍光検出手段（例えば、蛍光光度計を使用して）を介して簡便に測定できる。第1または第2の結合分子の量を滴定することによって、結合曲線を作製し、平衡結合定数を推定することができる。

【0149】

均一アッセイの別の例は、アルファスクリーン（Alpha Screen）（Packard Bioscience, Meriden Conn.）である。アルファスクリーンは、2種の標識されたビーズを使用する。一方のビーズは、レーザーで励起された場合、一重項酸素を発生する。他方のビーズは、第1のビーズから一重項酸素が拡散された場合、光のシグナルを発生し、一重項酸素と衝突する。シグナルは、2種のビーズが近接する場合にだけ発生する。一方のビーズは、ディスプレイライブラリのメンバーに結合させることができ、他方のビーズを標的に結合させることができる。シグナルを測定し、結合の程度を決定する。

【0150】

均一アッセイは、候補ポリペプチドを、ディスプレイライブラリのビヒクル、例えばバクテリオファージに結合させたまま実施できる。

【0151】

表面プラズモン共鳴（SPR）。ディスプレイライブラリから単離された分子と標的との結合相互作用は、SPRを使用して分析できる。SPRまたは生体分子相互作用分析（Biomolecular Interaction Analysis）（BIA）は、反応体のいずれも標識せずに、生体特異性相互作用をリアルタイムで検出する。BIAチップの結合表面の質量の変化（結合事象の表示）は、表面近くの光の屈折率の変更（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学現象）をもたらす。屈折度の変化は検出可能なシグナルを発生し、これを生体分子間のリアルタイム反応の指標として測定する。SPRを使用するための方法は、例えば、米国特許第5,641,640号；Raether（1988年）Surface Plasmons Springer Verlag；Sjolander および Urbaniczky（1991年）Anal. Chem. 63巻：2338～2345頁；Szaboら、（1995年）Curr. Opin. Struct. Biol. 5巻：699～705頁ならびにBIACore International AB（Uppsala, Sweden）により提供されるオンライン供給源に記載されている。

【0152】

SPRからの情報を使用し、生体分子と標的との結合に関する平衡解離定数（ K_D ）ならびに k_{on} および k_{off} を含む動力的パラメーターの正確かつ定量的測定を提供できる。このようなデータを使用し、さまざまな生体分子を比較できる。例えば、多様性ストランドのライブラリから選択された核酸によりコードされるタンパク質を比較し、標的に関する高い親和性を有する、または遅い k_{off} を有する個体を特定できる。さらに、この情報を使用し、構造活性相関（SAR）を明らかにすることも可能である。例えば、親タンパク質の成熟型の動力的パラメーターおよび平衡結合パラメーターを、親タンパク質のパラメーターと比較することもできる。所与の位置の変異体アミノ酸が、特定の結合パラメーター、例えば、高親和性および遅い k_{off} と相関することを特定できる。この情報は、（例えば、ホモロジーモデリング、エネルギー最小化または結晶学もしくはNMRによる構造決定を使用する）構造モデリングと組み合わせることができる。結果として、タンパク質とその標的との物理的相互作用の理解を系統立てて説明でき、他の設計方法を導くために使用できる。

【0153】

タンパク質アレイ。ディスプレイライブラリから特定されたタンパク質は、固体支持体、例えば、ビーズまたはアレイに固定できる。タンパク質アレイでは、個々のポリペプチドを、支持体の唯一のアドレスに固定する。通常、アドレスは、2次元のアドレスである。ポリペプチドアレイを作製する方法は、例えば、De Wildtら、(2000年) Nat. Biotechnol. 18巻: 989~994頁; Luekingら、(1999年) Anal. Biochem. 270巻: 103~111頁; Ge (2000年) Nucleic Acids Res. 28巻、e3、I~VII; Mac Beath および Schreiber (2000年) Science 289巻: 1760~1763頁; WO01/40803ならびにWO99/51773A1に記載されている。アレイのためのポリペプチドは、例えば、Genetic Micro Systems または BioRobotics による市販のロボット装置を使用して高速でスポットできる。アレイの基板は、例えばニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば表面改質ガラスであってよい。アレイは、多孔質のマトリックス、例えばアクリルアミド、アガロースまたは別のポリマーを含むこともできる。

【0154】

キット

本発明の任意の態様に従った方法の実践に使用するキットをさらに提供する。このキットは、必要なベクターを含むことができる。このようなベクターの1つは、通常一本鎖バクテリオファージの複製起点を有し、sbpメンバーの核酸を含有するか、またはファージカプシドタンパク質の成熟コード配列5'末端領域に、その挿入のための制限部位を有するかのどちらかであり、カプシドタンパク質外来性ポリペプチドと細胞膜周辺腔との融合を対象とする、前記部位の上流の分泌リーダーコード配列を有する。

【0155】

上記のHC CDR3をコードするパッケージならびに上記の方法のいずれかの使用により得ることができる、HC CDR3およびそれらの断片および誘導体を含むポリペプチドを、さらに提供する。この誘導体は、別の分子、例えば酵素またはFc尾部に融合したポリペプチドを含んでいてもよい。

【0156】

このキットは、遊離の形態のコードされたポリペプチドの発現のために、HC CDR3の挿入用部位を有するファージベクター(例えば、DY3F87HC)を含むことができる。このキットは、可溶性軽鎖、例えばpLCSK23の発現用プラスミドベクターもまた含むことができる。このキットは、適切な細胞系(例えばTG1)もまた含むことができる。pLCSK23によりコードされる軽鎖の多様性は、10、15、20、25、30または50であってよい。多様性においてLCは、フレームワーク領域中の生殖系列であること、およびCDR3および/またはCDR1に多様性を有することなど特定の望ましい特性を有するように構築または選別され得る。生殖系列は、高度に利用される生殖系列、例えば、 μ にはVK1__2-O2、VK3__I-A27、VK3__5-L6、VK3__3-L2および δ にはVL2__2a2、VL1__1c、VL1__1g、VL3__3rであってよい。

【0157】

例えば、生殖系列は、

VK1O2g1-JK3、VK1O2var1、VK1O2var2、VK1O2var3、VK1O2var4、VK1O2var5、VK3L6g1-JK4、VK3L6var1、VK3L6var2、VK3L6var3、VK3L6var4、VK3L6var5、VK3L6var6、VK3L6var7、VK3L6var8、VK3A27g1-JK3、VK3A27var1、VK3A27var2、VK3A27var3、VK3A27var4、VK3A27var5、VK3A27var6、VK3A27var7、VK3L2g1-JK3、VK1g1L8-JK5およびVK1GLO12-JK3(表19に示すアミノ酸配列)に関する遺伝子をpLCSK23にクローン化できる。

【 0 1 5 8 】

【 表 5 】

表19:pLGSK23に使用される26種のVL

VK102gl-JK3	(配列番号 4)	
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSIG	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQQ	SYSTPFTFGP GTKVDIK 107
VK102var1	(配列番号 5) S28D	
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDIS	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQQ	SYSTPFTFGP GTKVDIK 107
VK102var2	(配列番号 6) S91R	
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSIG	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQQ	RYSTPFTFGP GTKVDIK 107
VK102var3	(配列番号 7) S91E	
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSIG	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQQ	EYSTPFTFGP GTKVDIK 107
VK102var4	(配列番号 8) S31R	
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSIG	RYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQQ	SYSTPFTFGP GTKVDIK 107
VK102var5	(配列番号 9) S31E, S93R	
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSIG	EYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQQ	SYRTPFTFGP GTKVDIK 107
VK3L6gl-JK4	(配列番号 10)	
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLEP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGG GTKVEIK 107
VK3L6var1	(配列番号 11) S31R	
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60
RFSGSGSGTD	FTLTISLEP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGG GTKVEIK 107
VK3L6var2	(配列番号 12) S92R	

【 0 1 5 9 】

【表 6】

EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RRNWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3L6var3 (配列番号13) S92G						
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RGNWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3L6var4 (配列番号14) S92Y						
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RYNWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3L6var5 (配列番号15) S92E						
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RENWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3L6var6 (配列番号16) Y32F						
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SFLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RSNWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3L6var7 (配列番号17) Y32D						
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SDLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RSNWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3L6var8 (配列番号18) N93G						
EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	60
RFSGSGSGTD	FTLTSSLEP	EDFAVYYCQ	RSNWPLTFGG	GTKVEIK		107
VK3A27gl-JK3 (配列番号19)						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPFTFG	PGTKVDIK		108
VK3A27var1 (配列番号20) S31R						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	RSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPFTFG	PGTKVDIK		108
VK3A27var2 (配列番号21) S32R						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SRYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPFTFG	PGTKVDIK		108
VK3A27var3 (配列番号22) S32D						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SDYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPFTFG	PGTKVDIK		108
VK3A27var4 (配列番号23) G93E						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYESSPFTFG	PGTKVDIK		108
VK3A27var5 (配列番号24) G93R						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYRSSPFTFG	PGTKVDIK		108
VK3A27var6 (配列番号25) S30D, G93E						
EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYESSPFTFG	PGTKVDIK		108

【 0 1 6 0 】

【表 7】

VK3A27var7 (配列番号 26) S94R
 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP 60
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGRSPFTFG PGTKVDIK 108

VK3L2g1-JK3 (配列番号 27)
 EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSVS SNLAWYQQK GPQAPRLLIY ASTRATGIPA 60
 RFSGSGSGTE FTLTISSLQ EDFAVYYCQ YNNWPFTFGP GTKVDIK 107

VK1g1L8-JK5 (配列番号 28)
 DIQLTQSPSF LSASVGDRTV ITCRASQGIS SYLAWYQQK GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS 60
 RFSGSGSGTE FTLTISSLQ EDFAVYYCQ LNSYPITFGQ GTRLEIK 107

VK1GLO12-JK3 (配列番号 897)
 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV TITCRASQSI SSYLNWYQQK PGKAPKLLIY AASSLQSGVP 60
 SRFSGSGSGT DFTLTISL QPEDFATYYC QSYSTPFTF GPGTKVDIKR GTVAAPSVFI 120
 FPPSDEQLKS GTASVCLL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL 180
 STLTLKADY EKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGCA AAGKPIPNPL LGLDST 236

このキットは、本方法の実施に必要な補助成分を含むことができ、このような成分の特質は、当然ながら用いる具体的な方法に依存する。有用な補助成分は、ヘルパーファージ、PCRプライマー、緩衝液および/またはさまざまな種類の酵素を含むことができる。緩衝液および酵素は、本明細書に記載の戦略に従った、再構成された、または再構成されない免疫グロブリン遺伝子に由来する、Fv、scFvまたはFab断片をコードするヌクレオチド配列の調製を可能にするために、通常使用される。

【0161】

多様性を導入する方法

可変であるDNAを作製する多くの方法がある。1つの方法は、混合ヌクレオチド合成(MNS)の使用である。MNSの1つの型は、表5に示すようなヌクレオチドの等モル混合物を使用する。例えば、NNKコドンの使用により、20種すべてのアミノ酸および1種のTAG終止コドンをもたらされる。分布は、3(R/S/L):2(A/G/V/T/P):1(C/D/E/F/H/I/K/M/N/Q/W/Y)(例えば、Arg、SerおよびLeu各々3など)である。本明細書において「wobbling」と呼ばれる代替方法は混合ヌクレオチドを使用するが、等モル量ではない。例えば、親コドンがTTC(Pheをコードする)であった場合、本発明者らは、Tの場所に(0.082 T、0.06 C、0.06 Aおよび0.06 G)の混合物およびCの場所に(0.082 C、0.06 T、0.06 Aおよび0.06 G)の混合物を使用することができた。これにより、59%の確率でTTCまたはTTT(Pheをコードする)、13%のLeu、約5%のS/V/I/C/Yおよびさらに低い頻度で他のアミノ酸型がもたらされるであろう。

【0162】

Van den Brulleら、(Biotechniques 45巻:340~3頁(2008年))は、II型制限酵素を使用して、所謂「splinker」に固定されているヘアピンオリゴヌクレオチド(PHON)からトリヌクレオチドに変換する、可変DNAの合成方法を記載している。さらに、欧州特許EP第1181395号、EP第1411122号、EP第1314783号および欧州特許出願EP第01127864.5号、EP第04001462.3号、EP第08006472.8号を参照されたい。固定されたPHONおよびsplinkerの混合物を使用することによって、所望のアミノ酸型が設計者の決定した比率を許容するライブラリを構築できる。したがって、1つのアミノ酸型が例えば82%の確率で存在し、18の他のアミノ酸型(Cysを除く、すべての非親アミノ酸型)は、それぞれ2%で存在することを対象とできる。本明細書において、本発明者らは、このような合成を「dobbling」(digital wobbling)と称することにする。一部の態様において、dobblingがwobblingより好ましいが、部分的には、遺伝子コード表の構造はwobblingを起こし、大部分が保存的置換を起こすので、wobblingは、有用な実施形態を提供する。dobblingは、望まれないアミノ酸型を排除する可能性を提供する。CDRにお

いて、不對システインは、治療用として承認された A b においてさえ公知であるが、一部の実施形態では、それらを避けようとする。一部の実施形態において、ジスルフィドに近いループは重要な構造要素であり、不對システインは望ましくないため、システインの対を含有する D 領域を多様化する場合、システインは変化させられない。

【 0 1 6 3 】

加えて、親アミノ酸配列をコードする D N A 分子を合成でき、フレームワーク領域において突然変異を避けるように、フレームワーク領域を含むプライマーを使用して、D N A をエラープローン P C R に供することができる。

【 0 1 6 4 】

【 表 8 】

表5:混合ヌクレオチドの標準的コード

NはA、C、G、Tが等モルである	
BはC、G、Tが等モルである	(Aは等モルではない)
DはA、G、Tが等モルである	(Cは等モルではない)
HはA、C、Tが等モルである	(Gは等モルではない)
VはA、C、Gが等モルである	(Tは等モルではない)
KはG、Tが等モルである	(ケト)
MはA、Cが等モルである	(アミノ)
RはA、Gが等モルである	(プリン)
SはC、Gが等モルである	(強い)
WはA、Tが等モルである	(弱い)
YはC、Tが等モルである	(ピリミジン)

表6:wobblingのための混合ヌクレオチドの例

$$e = 0.82 \text{ A} + 0.06 \text{ C} + 0.06 \text{ G} + 0.06 \text{ T}$$

$$q = 0.06 \text{ A} + 0.82 \text{ C} + 0.06 \text{ G} + 0.06 \text{ T}$$

$$j = 0.06 \text{ A} + 0.06 \text{ C} + 0.82 \text{ G} + 0.06 \text{ T}$$

$$z = 0.06 \text{ A} + 0.06 \text{ C} + 0.06 \text{ G} + 0.82 \text{ T}$$

【 実施例 】

【 0 1 6 5 】

本発明を、以下の実施例によりさらに例示するが、以下の実施例は決して限定として解釈されるべきではない。本出願を通して引用されたすべての参考文献、係属中の特許出願および公開された特許の内容は、参照により明確に本明細書に組み込まれる。

【 0 1 6 6 】

(机上の実施例 1)

非常に短い H C C D R 3 を有するライブラリ

非常に短い H C C D R 3 が当分野において記載されている。K a d i r v e l r a j ら、(2 0 0 6 年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 0 3 巻 : 8 1 4 9 ~ 5 4 頁は S t r e p t o c o c c u s B I I I 型 A g (G B S - A g) に結合するが、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e の夾膜 A g には結合しない抗体中の 4 個のアミノ酸の H C C D R 3 配列を記載している。G B S - A g は、定期的にシアル化される。S . p n e u m o n i a e の夾膜 A g (S P C - A g) は非常に似ているが、シアル酸基を欠いている。このような短い H C C D R 3 は、その中に炭水化物が結合できる広い溝を創製し、このような A b は、既存の抗体ライブラリにおいて、非常にとてもまれである。したがって、現行ライブラリは、炭水化物に対する多種多様な潜在的バインダーをもたらさない。

【 0 1 6 7 】

A b 1 B 1 は、G B S - A g に結合するネズミ m A b である ; A b 1 Q F U は、公知の 3 D 構造および最も近い配列を有する m A b である ; 1 N S N は、長さ 4 の H C C

D R 3 を有する、公知の 3 D 構造の抗体である。3 - 2 3 H C 構造の検査により、R₉₄ (F R 3 の終了) の C から W₁₀₄ (F R 4 の開始) の C までの、約 10 の距離が得られた。1 B 1 (N W D Y (配列番号: 29)) の C D R 3 は、A A は、小型の側基だけを有する必要はなく、またはグリシンの大部分である必要もないことを示す。3 個のアミノ酸 (A A) は、P P P は機能しないが 10 を架橋できる。実際に、本発明者らは、3 個の A A と同じくらい短い C D R 3 を有するいくつかの F a b を得ているが、非常にまれである。

【0168】

短いおよび非常に短い H C C D R 3 が記載されているが、短い H C C D R 3 (例えば、3 から 5 個のアミノ酸の H C C D R 3) を有する、多くの (例えば、メンバーの約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90% または約 95% を超える) メンバーを有する A b ライブラリの作製を提案した人はいない。有効なライブラリを構築するための 1 つの手法は、V - J または V - D - J のカップリングから生じ得るアミノ酸配列を最初に設計することである。長さ 3、4 または 5 の C D R 3 のために、本発明者らは、表 7 に示すアミノ酸配列から出発する。例えば、配列 V - 3 J H 1 は、3 - 2 3 の F R 3 (T A V Y Y C A K (配列番号: 30)) の C 末端、続く N 末端から、F R 4 を開始する T r p - G l y のアミノ酸 3 個前までを切り取った J H 1 を示す。V - 3 J H 2 は、F R 3 の末端、続く切り取られた J H 2 を示す。V - 3 J H 6 の後ろの配列は、F R 4 を、ヒト D セグメントから採取した三量体、続くヒト J H セグメントの F R 4 領域に接合することによって構築される。3 D 3 - 3 . 3 . 2 は、セグメント D 3 - 3 由来の三量体、第 2 のアミノ酸から出発する第 3 のリーディングフレームである。5 D 5 - 1 2 . 2 . 3 は、アミノ酸 3 から出発するリーディングフレーム 2 中の D 5 - 1 2 由来の五量体である。生殖系列 D セグメントのいくつかは終止コドンを含み、終止コドンが編集され離れる場合、それにもかかわらず終止コドンは天然抗体中に出現する。ここで本発明者らは T A A および T A G コドンの T y r (Y) への変化の可能性が最も高く、T G A 終止は T r p (W) に突然変異する可能性が最も高いと仮定する。表 20 は、ヒト D セグメントのアミノ酸配列を示し、終止コドンの型は、T A G に関しては *、T A A に関しては @、T G A に関しては \$ の使用により示される。表 11 にあるのは、ヒト D セグメントから構築できる 266 の異なる三量体である。T A A および T A G 終止は、「y」(すなわち小文字) として示された T y r に変化している。これらは、単一の塩基変化により、さらに S e r、C y s、P h e、G l n、L y s、または G l u に変化し得る。T A G は、単一の塩基変化により、T r p ならびに T y r、G l n、L y s、G l u、S e r および L e u に変化し得る。表 12 は、ヒト D セグメントを切り取ることによって得ることができる、266 の異なる四量体である。表 13 は、ヒト D セグメントを切り取ることから得ることができる、215 の異なる五量体を示す。表 14 は、ヒト D セグメントを切り取るにより得ることができる、155 の異なる六量体を示す。構築されるライブラリは、H C C D R 1 および H C C D R 2 に実質的な多様性を有する。H C C D R 3 の配列多様性は、短いが許容できる配列を有することほど重要ではない可能性がある。J H セグメントまたは D セグメントの断片 (例えば、3 個またはそれ以上のアミノ酸) の多様性は、ヒト免疫系により構築でき、免疫原性である可能性が低い配列を提供する。

【0169】

一実施形態において、C y s を含有する三量体、四量体および五量体は除外する。

【0170】

一実施形態において、C y s を含有する、または終止を含有する D 断片に由来する三量体、四量体および五量体は除外する。

【0171】

表 11 の三量体、表 12 の四量体、表 13 の五量体を使用して構築される短いライブラリは、実質的な多様性をそれぞれ 266、266 および 215 有する。このことを、これらの長さをペプチドの数と比較すると、それぞれ 8000、160000 および 3200000 である。

【 0 1 7 2 】

V - 3 D 1 - 1 . 1 . 1 - J H 1 は、F R 3 の最終部分、続く D 1 - 1 (R F 1) からの 3 個のアミノ酸、すなわち G T T (配列番号 : 2 5 7) を含有する。V - 3 D 1 - 1 . 2 - J H 1 は、D 1 - 1 (R F 1) のアミノ酸 2 ~ 4 個を親 C D R 3 として使用する。V - 3 D 3 - 3 . 3 . 3 - J H 2 は、F R 3 の末端、続く D 3 - 3 (R F 3) のアミノ酸 3 ~ 5 個を示す。本発明は、F R 3 : : (ヒト D セグメントの 3、4、5 個の終止を含まない A A) : : ヒト J H 由来の F R 4 を含む、任意のアミノ酸配列を含む。不対 C y s 残基を含有する D 領域の断片は、不対 C y s 残基を含まない D 領域の断片ほど好ましくない。V - 5 J H 3 において、J H 3 は、F R 4 の開始を規定する T r p - G l y に対するコドンの前に 4 個だけコドンをもつため、「 y 」で示される T y r が存在する。V - 5 J H 4 は、同じ理由で「 s 」で示される S e r を有する。w o b b l i n g を使用する場合、純度の好ましいレベルは、0 . 7 5 と 0 . 9 0 との間である。本発明は、配列 V - 3 J H 1 から V - 3 J H 6、V - 4 J H 1 から V - 4 J H 6 および V - 5 J H 1 から V - 5 J H 6 およびそれらを含むライブラリを含む。本発明は、C D R 領域がヒト D 領域由来の 3、4 または 5 個のアミノ酸セグメントにより置き換えられた配列およびそれらを含むライブラリもまた含む。本発明は、親配列が C D R 3 領域において突然変異を起こしている D N A およびそれらを含むライブラリを、さらに含む。好ましい実施形態は、C D R 3 当たり塩基変化の平均数が 1、2 または 3 である実施形態である。突然変異誘発の方法は、エラープロードン P C R、w o b b l i n g および d o b b l i n g である。

【 0 1 7 3 】

【 表 9 】

表7:長さ3、4、5の親CDR3のアミノ酸配列

長さ3

	...FR3-----	CDR3-	FR4-----	
V-3JH1	TAVYYCAK	FQH	WGQGT L VT V SS	(配列番号 31)
V-3JH2	TAVYYCAK	FDL	WGRG T LVT V SS	(配列番号 32)
V-3JH3	TAVYYCAK	FDI	WGQGT M VT V SS	(配列番号 33)
V-3JH4	TAVYYCAK	FDY	WGQGT L VT V SS	(配列番号 34)
V-3JH5	TAVYYCAK	FDP	WGQGT L VT V SS	(配列番号 35)
V-3JH6	TAVYYCAK	MDV	WGQGT T VT V SS	(配列番号 36)
V-3D1-1.1.1-JH1	TAVYYCAK	GTT	WGQGT L VT V SS	(配列番号 37)
V-3D1-1.1.2-JH1	TAVYYCAK	TTG	WGQGT L VT V SS	(配列番号 38)
V-3D3-3.3.3-JH2	TAVYYCAK	IFG	WGRG T LVT V SS	(配列番号 39)

長さ4

V-4JH1	TAVYYCAK	YFQH	WGQGT L VT V SS	(配列番号 40)
V-4JH2	TAVYYCAK	YFDL	WGRG T LVT V SS	(配列番号 41)
V-4JH3	TAVYYCAK	AFDI	WGQGT M VT V SS	(配列番号 42)
V-4JH4	TAVYYCAK	YFDY	WGQGT L VT V SS	(配列番号 43)
V-4JH5	TAVYYCAK	WFDP	WGQGT L VT V SS	(配列番号 44)

【 0 1 7 4 】

【表 10】

V-4JH6	TAVYYCAK	GMDV	WGQGT TV TVSS	(配列番号 45)
V-4D3-10.1a-JH2	TAVYYCAK	LLWF	WGRGTL TV TVSS	(配列番号 46)
長さ5				
V-5JH1	TAVYYCAK	EYFQH	WGQGT LV TVSS	(配列番号 47)
V-5JH2	TAVYYCAK	WYFDL	WGRGTL TV TVSS	(配列番号 48)
V-5JH3	TAVYYCAK	yAFDI	WGQGT MT TVSS	(配列番号 49)
V-5JH4	TAVYYCAK	sYFDY	WGQGT LV TVSS	(配列番号 50)
V-5JH5	TAVYYCAK	NWFDP	WGQGT LV TVSS	(配列番号 51)
V-5JH6	TAVYYCAK	YGMDV	WGQGT TV TVSS	(配列番号 52)
V-5D2-8.2a-JH2	TAVYYCAK	DIVLM	WGRGTL TV TVSS	(配列番号 53)

表8:wobblingのためのV-5D2-8.2a-JH2をコードするDNA

```

!                                     CDR3.....
!   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   K   D   I   V   L   M
!   |gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aag jez ezq jzz qzz ezj
!
!   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S   ( 配列番号 54)
!   tgg ggc cag ggt act acG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 55)
!
!   BstEII...

```

あるいは、領域 X b a I から B s t E I I までに対応し、K または R である残基 9 4、続いて 3、4 または 5 つの N N K コドン、続いて F R 4 の W G . . . を有する DNA の 3 つの断片を合成できる。許容される変形は、 $20^3 + 20^4 + 20^5 = 3,368,000$ である。増幅後、これらの DNA 分子を（より短い配列が、相対的にオーバーサンプリングされるように）1 : 10 : 100 の比率で混合し、H C C D R 1 / 2 の多様性を有するライブラリをコードするファージミド内にクローン化する。 1×10^9 のライブラリは、有意な多様性をもたらし、小型から中程度の突出を有する標的に結合する抗体の単離を可能にするであろう。例えば、さまざまな炭水化物、さほど秩序だっていないタンパク質のループ（例えば、G P C R）は、非常に短い H C C D R 3 を有することにより創造される抗体中の溝から利益を得ることができる。ライブラリもまた構築できる。A A 配列の比率は 1 : 20 : 400 であり、この比率は、より短い配列をより高密度にサンプリングするためには重要である可能性がある。A b 中に大きくて広い溝を得ることは、厳密に 1 つの 3 A A C D R 3 を要求するが、4 A A C D R 3 ではおそらくもう少し自由な余地があり、5 A A では、さらにもっと自由な余地がある。この実施例において、前方の W G モチーフから F R 4 の J H 6 型を使用する。

【0175】

本発明者らの現行のライブラリから、例えば、a) フレームワーク領域中の生殖系列、b) C D R において適切な多様性を示す、および c) 十分作製され、3 - 23 と良く対合する型である、25 の軽鎖のコレクションを選択できる。これらの L C は、K a n^R を担持するベクターおよびファージをパッケージしないシグナルから、E . c o l i 内に作製される。次いで、L C を有さないファージベクター中に本発明者らの H C ライブラリを構築した。H C および L C は、L C 作製細胞を H C ファージに感染させることにより交雑される。選択された H C ファージは、E L I S A⁺ ファージを作製する細胞の L C を組み合わせることができ、または H C は、全 L C の多様性を有する p M I D 2 1 内にクローン化できる。あるいは、選択された H C は p H C S K 8 5 に移動でき、R O L I C に使用して本発明者らのコレクションの全 L C と組み合わせることができる。L C もまた使用できた。したがって、ファージ中の 1×10^9 H C のライブラリは、 1.2×10^{11} ($1. \times 10^9 \times 117$) の F a b ライブラリに拡大できる。 1×10^7 の C D R 1 ~

2と10⁶のHC CDR3とを組み合わせた場合、個々のCDR3が50のCDR1～2と結びついた、5×10⁷のライブラリを作ることができる。ファージ中の5×10⁷のHCのライブラリは、6×10⁹の旧式のライブラリと同様の結果ともたすことができた。

【0176】

【表11】

表1:非常に短い例示的なHC CDR3の設計

```
C3XXX
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
!              CDR3.....
! L R A E D T A V Y Y C A K|R any any any W G
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk nnk tgg ggc-
!
! Q G T T V T V S S ( 配列番号 56)
cag ggt act acG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 57)
!              BstEII...
!
(C3XXX)5'-T|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk nnk tgg ggc cag ggt act ac-3'
( 配列番号 58)
(ON_5) 5'-AcTggAgAcggTgAccgTAGTAcccTggcccccA-3' ! 33塩基 ( 配列番号 256)
(ON_5は、5'-tgg ggc cag ggt act acG GTC ACC gtc tcc agt-3'( 配列番号 59)
の逆相補体である)
! 以下に示すON-1およびON-3を使用
! -----
!
```

【0177】

【表12】

```
C3X4
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
!              CDR3.....
! L R A E D T A V Y Y C A K|R any any any any W
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk nnk nnk tgg-
!
! G Q G T T V T V S S ( 配列番号 60)
ggc cag ggt act acG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 61)
!              BstEII...
!
(C3X4)5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk nnk nnk tgg-
ggc cag ggt act ac-3' ( 配列番号 62)
! ON-1、ON-3およびON-5を使用
! -----
!
C3X5
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
!              CDR3.....
! L R A E D T A V Y Y C A K|R any any any any any
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk nnk nnk nnk-
!
! W G Q G T T V T V S S ( 配列番号 63)
tgg ggc cag ggt act acG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 64)
!              BstEII...
(C3X5)5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk nnk nnk nnk tgg-
ggc cag ggt act ac-3' ( 配列番号 65)
! -----
!
```

aRgはKまたはRをコードする

または、現行のHCの多様性を、DY3F87HC内にクローン化でき、上記のCDR3の多様性を、XbaI-BstEII断片としてその多様性内にクローン化する。例えば、25のLCのライブラリをpLCSK23内にクローン化し、TG1 E.coli中に細胞系を創製するために使用する。これらの細胞を、新規なHC CDR3（およびCDR1～2）の多様性を持つDY3F87HCファージに感染させる。この感染から得

られたファージを、所望の標的に対する結合に関して選択する。2 から 4 ラウンドの選択の後で、選択された H C を p H C S K 2 2 に移し、R O L I C に使用して、選択された H C と R O L I C L C ライブラリ中の全 L C と組み合わせることができる細胞系を創造する。この方法において、1 . E 9 のライブラリは、通常なら 1 . E 1 6 の (1 . E 7 の L C の多様性を推測する) ライブラリの構築が必要と思われる A b を得ることができる。

【 0 1 7 8 】

(机上の実施例 2) : 非常に長い H C C D R 3 を有するライブラリ

S i d h u ら、(J M o l B i o l . 2 0 0 4 年 3 3 8 巻 : 2 9 9 ~ 3 1 0 頁および米国特許出願第 2 0 0 5 0 1 1 9 4 5 5 A 1 号) は、長さが 2 0 アミノ酸までに制限された C D R において、Y および S だけが許容されるライブラリから選択される、高親和性 A b を報告している。a) Y または S を許容されるいくつかの (しかしすべてではない) 部位、b) 4 ~ 6 の N N K コドンを含む、c) (D において多様化を有するまたは有さない) D セグメントを導入する、および / または d) エラープローン P C R を使用する、のうち 1 つまたは複数の多様性の形態を有する H C C D R 3 を有するライブラリから、高親和性 A b を作製することができる。本発明者らは、H C C D R 3 が約 8 から約 2 2 の範囲で、長さの中央値が 1 3 である A b の空間を既にサンプリングしている。したがって、H C C D R 3 が約 2 3 A A または約 3 5 A A のどちらかであるライブラリが可能であり、標的の特定の型に対して有利性を有することができる。例えば、G P C R は、多重状態を有すると思われる細胞の脂質二分子層を横断する、7 つのらせん形セグメントを有する内在性膜タンパク質である。非常に長い H C C D R 3 を有する抗体は、7 つのストランドにより形成されるチャネルに適合する隆起を形成できる。G P C R に結合する A b をを見つけることは困難であり、すべてのメンバーが非常に長い H C C D R 3 を有するライブラリを意図的に構築することにより、この問題は改善され得る。長さは、いくらか可変にでき、1 つのライブラリにおいて、約 2 3 、2 4 , または 2 5 、第 2 のライブラリにおいて 3 3 、3 4 または 3 5 である。

【 0 1 7 9 】

下記は、多くの代表的な設計である。C D R 3 は分解され、さまざまな部分が、X の値に依存して異なる関係を有するようにされた多様性を作製した。完全長 J H 1 を使用して、いくつかの設計において、多様性は、J H 1 の C D R 3 における多様性を許容した。他の J H も使用できる。設計において、D セグメントは、Y に富むか、または S に富んだジスルフィドループを有するかのどちらかである。ヒト D セグメントのアミノ酸配列を表 3 に示す。D 領域が S もしくは Y のどちらかを有する、または他の組合せが許容される場所は、特に変化している。表 4 は、ヒト J 領域のアミノ酸配列を示す。

【 0 1 8 0 】

個々のライブラリは、少なくとも 4 つの方法で構築できる : 1) 特定のアミノ酸配列をコードする D N A をまず合成し、エラープローン P C R に供する、2) ライブラリは、w o b b l i n g によって、またはヌクレオチドの混合物を用いて合成され得る、3) ライブラリは、d o b b l i n g を使用して構築され得る、4) (2) または (3) の手段に続いてエラープローン P C R を行うことができる。(1) の手段の例として、設計 1 2 において、配列番号 9 0 8 をコードする、配列番号 : 9 1 1 に示すような D N A が合成できる。この D N A を、配列番号 : 9 0 9 および配列番号 : 9 1 0 に示すプライマーを使用して、エラープローン P C R に供することができる。これらのプライマーは、フレームワーク領域を含むので、エラーは C D R 3 だけで発生する。

【 0 1 8 1 】

例えば 2×10^9 のメンバーの、長さ 2 3 の C D R 3 を有する H C のライブラリおよび同様に 2×10^9 のメンバーの、長さ約 3 5 の H C C D R 3 を有する第 2 のライブラリが構築できる。あるいは D N A を混合し、 4×10^9 の 1 つのライブラリを構築できる。

【 0 1 8 2 】

【表 1 3】

表4:ヒトJHアミノ酸配列

	H3	
	CDR3	
	100	110
JH1	---AEYFQHWGQGT ¹⁰⁰ LVTVSS	(配列番号66)
JH2	---YWYFDLWGRGT ¹¹⁰ LVTVSS	(配列番号67)
JH3	-----AFDIWGGTMTVTVSS	(配列番号2)
JH4	-----YFDYWGGT ¹⁰⁰ LVTVSS	(配列番号1)
JH5	-----NWFDPWGGT ¹⁰⁰ LVTVSS	(配列番号68)
JH6	YYYYYGMDVWGGT ¹⁰⁰ TVTVSS	(配列番号3)

以下の個々の設計において、アミノ酸配列はFR3の末端であるYYCA(K/R)(配列番号936)で始まる。FR4はWGで出発し、太字で示してある。

【0183】

設計 1

配列番号：898は、FR3の末端と、それに接合された、免疫系がVとDとの間に位置するフィラー配列に頻繁に見出される型の2つの残基(DY)を含む。D2-2.2はジスルフィドループを有し、SerおよびTyr残基に富んでいるので、後にはD2-2.2が続くことが好ましい。この後に、TyrおよびSer残基に富んだYGYSY(配列番号937)が続き、その後に完全長JH1が続く。

【0184】

【表 1 4】

XX::D2-2.2::XX::JH1	
FR3 1 5 0 5 0 3FR4	1 1 2 2
YYCAK DYGYCSSTSCYTYGYSYAEYFQHWGQGT ¹⁰⁰ LVTVSS	(配列番号898)
YYCAK XXGYCSXXSCYTX YSYAEYFQHWGQGT ¹⁰⁰ LVTVSS	(配列番号69)
R GYCSSTSCYT AEYFQHWGQGT ¹⁰⁰ LVTVSS (JH1)	
(配列番号70)	(配列番号66)
1 1 1 1	
9 9 0 0 0 1	
4 5 0 2abcdefghijklmnp3	0

アミノ酸多様性	= 1.28 E 8
DNA多様性	= 2.15 E 9
終止なし	= 83%
無償性Cysなし	= 83%
終止およびCysなし	= 68%

設計1(C23D222)は、RまたはKである94、その後2X、ループ中に2つのXを有する第2のリーディングフレーム中にD2-2、続いて2つのXおよびJH1を有する。D2-2の第2のリーディングフレームは、2つの場所で多様性を導入されている、ジスルフィドに近いループを有する。このCDR3は23の長さである。... YYCA(配列番号938)まで、およびWGQG(配列番号939)... から

のDNAを含むプライマーを使用して、XbaIおよびBstEIIの外側に増幅する前に、κLCおよびHC CDR1/2のライブラリ内にクローン化するためにCDR3に対してエラーブローンPCRを実施できる。したがって、固定として示されるAAはいくらかの変化が可能であろう。PCRオーバーラップ領域の一部であるAAは、最終的な非エラーブローンPCRにより強化されるであろう。エラーブローンPCRは、設計の必要な部分ではない。

【0185】

【表 1 5】

C23D222JH1
 ! scab DNA S R D N S K N T L Y L Q M N S
 5'-ttc|act|atc|**TCT|AGA**|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
 ! XbaI...
 ! L R A E D T A V Y Y C A KIR
 ! |TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct **aRg** -
 ! CDR3-----
 ! X X D2-2 RF2..... X X JH1..
 ! **any any** G Y C S **any any** S C Y T **any any** Y S Y A
 ! **nnk nnk** ggt tat tgt tcc **nnk nnk** tct tgc tat act **nnk nnk** tat tcc tac gct-
 ! CDR3-----
 ! E Y F Q H
 ! gaa tat ttc cag cac-
 ! W G Q G T L V T V S S (配列番号 71)
 ! tgg ggc cag ggt act ctG **GTC ACC** gtc tcc agt-3' (配列番号 72)
 ! BstEII...

【 0 1 8 6 】

【表 16】

(ON_C23D222) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk nnk ggt tat tgt tcc nnk-
nnk tct tgc tat act nnk nnk tat tcc tac gct gaa tat ttc cag cac-
tgg ggc cag ggt act ct-3' ! 107 塩基 (配列番号 73)
(ON_1) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct-3' (配列番号 74)
(ON_2) 5'-AgAgTAcccTggccccAgAcgTccATAccgTAATAgT-3' ! 37 塩基 (配列番号 75)
(ON_2 は、5'-ac tat tac ggt atg gac gtc tgg ggc cag ggt act ct-3'
(配列番号 76) の逆相補体である)
(ON_3) 5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|
aac|agC|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct-3' (配列
番号 77)
(ON_4) 5'-AcTggAgAcggTgAccAgATAcccTggccccA-3' ! 33 塩基 (配列番号 78)
(5'-tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' [RC] (配列番号 79))

設計2

	1	1	2	2
1	5	0	5	0

YYCAK GSYYYGSGSYYNVDSYYAEYFQHWGQGLVTVSS (配列番号 899)
YYCAK XXYYYGXGSXYNXXSYAEYFQHWGQGLVTVSS (配列番号 80)
R YYYGSGSYYN AEYFQHWGQGLVTVSS (JH1)
(配列番号 81) (配列番号 66)

アミノ酸多様性 = 1.28 E 8
DNA多様性 = 2.15 E 9
終止なし = 83%
無償性Cysなし = 83%
終止およびCysなし = 68%

設計2(C23D310)は、RまたはKとしての94、2つのX、5番目および8番目の残基がXに変化したD3-10(RF2)、2つのX、SYYおよびJH1を有する。CDR3は23AA長であり、エラーブローンPCRの使用によりさらに多様化され得る。

C23D310JH1
! scab DNA S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
! XbaI...
!
! L R A E D T A V Y Y C A K|R
! TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!
! CDR3-----
!
! any any Y Y Y G any G S any Y N any any S Y Y
! nnk nnk tac tac tat ggt nnk ggc tct nnk tac aat nnk nnk tct tat tac
!
! A E Y F Q H
! gct gag tac ttt caa cat
!
! JH1.....
! W G Q G T L V T V S S (配列番号 82)
! tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' (配列番号 83)
! BstEII...

【0187】

【表 17】

(C23D310) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg nnk nnk tac tac tat ggt nnk ggc-
tct nnk tac aat nnk nnk tct tat tac gct gag tac ttt caa cat tgg ggc cag-
ggt act ct-3' (配列番号 84)
ON_1, ON_2, ON_3,および ON_4は上記の通り。

設計3

	1	5	0	5	0	3	
YYCAK	D	Y	Y	Y	G	S	Y
YYCAK	X	Z	Y	Z	G	Z	X
R	Y	Y	Y	G	S	S	Y

(配列番号 81) (配列番号 66) (JH1)

アミノ酸多様性 = 1.64 E 8
DNA多様性 = 1.07 E 9
終止なし = 88%
無償性Cysなし = 88%
終止およびCysなし = 77%

設計3(C23D310B)は、RまたはKとしての94、XZ、2番目、3番目、5番目および7番目がZ(Y | S)に、8番目の残基がXに変化したD3-10(RF2)、ZXZYおよび(EがXに変化した)JH1を有する。ZはYまたはSのどちらかである。CDR3は23AA長であり、エラープローンPCRの使用によりさらに多様化され得る。

(C23D310b) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg nnk tmc tac tmc tmt ggt tmc ggc-
YIS any Y N YIS any YIS Y YIS A any YIS F Q H W G Q
tmt nnk tac aat tmt nnk tmc tat tmc gct nnk tmc ttt caa cat tgg ggc cag-
G T L (配列番号 85)
ggt act ct-3' (配列番号 86)

ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4は上記の通り。

設計4

	1	5	0	5	0	3	5	0	5
YYCAK	Y	Y	S	F	S	Y	P	Y	Y
YYCAK	Y	Y	S	X	S	Y	X	Z	Y
R	Y	Y	D	S	S	G	Y	Y	Y

(配列番号 88) (配列番号 66) (JH1)

9	9	0	0	1	1
4	5	0	2	0	0

2abcdefghijklmnopqrstuvwxyab3 0

アミノ酸多様性 = 1.64 E 8
DNA多様性 = 1.07 E 9
終止なし = 88%
無償性Cysなし = 88%
終止およびCysなし = 77%

【 0 1 8 8 】

【表 18】

設計4は、長さ35のCDR3を有する。残基94はKまたはRであってよく、その後は YYS:
:X::SYY::X::D3-22(Xとして1つのSおよび3つのZを有する2番目のRF)::X::YY
S::X::YZZZ::JH1(2つのZを有する)であってよい。エラーブローンPCRは、より多くの
の多様性を加えるために使用できる。

```
C35D322JH1
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
!   L R A E D T A V Y Y C A KIR
!   |TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!
!   CDR3-----
!
!   Y Y S any S Y Y any Y Y|S Y D S Y|S G Y Y|S Y
!   tac tat tcc nnk tct tac tat nnk tat tmt tac gat agt tmt ggt tac tmc tat
!
!   any Y Y S any Y Y|S Y Y|S Y|S A Y|S Y|S F Q H
!   nnk tac tat agc nnk tat tmc tac tmt tmt tmc gct tmt tmc ttc caa cac
!
!   W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 89)
!   tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 90)
!   BstEII...
!
!(c35d322B) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tac tat tcc nnk tct tac tat nnk-
!   tat tmt tac gat agt tmt ggt tac tmc tat nnk tac tat agc nnk tat tmc tac-
!   tmc tmt tmc gct tmt tmc ttc caa cac tgg ggc cag ggt act ct-3' ( 配列番号 91)
ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4 は上記の通り。
```

設計5

```

      1      1      2      2
      1      5      0      5      0      3
YYCAK SSGYCSSTSCYTGvYyyAEYFQHWGQGLVTVSS ( 配列番号 902)
YYCAK ZZGZCZZXZCZIXXZYXZYFQHWGQGLVTVSS ( 配列番号 92)
      R   GYCSSTSCYT   AEYFQHWGQGLVTVSS (JH1)
      ( 配列番号 70)   ( 配列番号 66)
アミノ酸多様性          = 1.64 E 8
DNA多様性                = 1.07 E 9
終止なし                = 88%
無償性Cysなし           = 88%
終止およびCysなし       = 77%
```

設計5(C23D222b)は、設計1と同様であるが、多くのZ(YまたはS)の可変コドンを使用する。このCDR3は23長である。

```
C23D222JH1b
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
```

【0189】

【表 19】

```

!
!   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   KIR
!   |TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgC|gct aRg -
!
!   CDR3-----
!   Y|S Y|S G Y|S C Y|S Y|S any Y|S C Y|S T any any Y Y|S Y any
!   tmc tmt ggt tmt tgc tmc tmt nnk tmt tgt tmc acc nnk nnk tat tmt tac nnk
!
!   Y|S Y F Q H
!   tmt tat ttc cag cac
!
!   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   ( 配列番号93)
!   tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号94)
!
!   BstEII...
!
! (C23D222JH1b) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgC|gct aRg tmc tmt ggt tmt tgc tmc tmt-
! nnk tmt tgt tmc acc nnk nnk tat tmt tac nnk tmt tat ttc cag cac tgg ggc-
! cag ggt act ct-3' ( 配列番号95)

```

設計6

```

      1       1       2 2 2       3       3
      1 5       0 5       0 3 5       0 5
YYCAK SYDYYGYCSSTSCYTYYSYVSYSYSSYYAEYFQHWGQGLTVTVSS ( 配列番号903)
YYCAK ZYXZYGCZZXSCZTYZSZXZYSZYZSZYAEZFQHWGQGLTVTVSS ( 配列番号96)
      R      GYCSSTSCYT D2-2.2      AEYFQHWGQGLTVTVSS (JH1)
              ( 配列番号70)          ( 配列番号66)

```

アミノ酸多様性 = 2.00 E 8
 DNA多様性 = 5.37 E 8
 終止なし = 91%
 無償性Cysなし = 91%
 終止およびCysなし = 83%

C35D222JH1

```

!
!   scab DNA      S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
!   5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!   XbaI...
!
!   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   KIR
!   |TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgC|gct aRg -
!
!   CDR3-----
!   Y|S Y any Y|S Y G Y|S C Y|S Y|S any S C Y|S T Y Y|S S
!   tmt tac nnk tmc tac ggc tMt tgc tmt tmc nnk tCt tgt tmc acc tat tmt tcc
!
!   Y|S any Y|S Y S any Y Y|S S Y|S Y A E Y F Q H
!   tmt nnk tmc tat tct nnk tac tmc agt tmt tat gct gag tat ttc cag cac
!
!   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   ( 配列番号97)
!   tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号98)
!
!   BstEII...
!
! (C35D222JH1)5'-GCA|GtT|taT|taC|tgC|gct aRg tmt tac nnk tmc tac ggc tat- tgc tmt tmc
! nnk tmt tgt tmc acc tat tmt tcc tmt nnk tmc tat tct nnk tac-
! tmc agt tmt tat gct gag tat ttc cag cac tgg ggc cag ggt act ct-3' ( 配列番号99)

```

【0190】

【表 2 0】

設計7

```

      1   1   2   2   3   3
      1   5   0   5   0   3   5   0   5
YYCAK YYSYYGYCSSTSCYTYSSSVSYSSSYAEYFQHWGQGTTLVTVSS ( 配列番号 904)
YYCAK ZYZYGZCZZXZCZTYZSZXZYSZYSAZJQBWGQGTTLVTVSS ( 配列番号 100)
      R      GYCSSTSCYT D2-2.2      AEYFQHWGQGTTLVTVSS (JH1)
              ( 配列番号 70)          ( 配列番号 66)
(J=FSY, B=YHND, ψ=EKQ)

```

```

アミノ酸多様性      = 9.44 E 8
DNA多様性          = 2.42 E 9
終止なし           = 93%
無償性Cysなし      = 93%
終止およびCysなし  = 88%

```

C35D222JH1B

```

!
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
! L R A E D T A V Y Y C A K|R
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!
! CDR3-----
! Y|S Y Y|S Y|S Y G Y|S C Y|S Y|S any Y|S C Y|S T Y Y|S S
! tmt tac tmc tmc tac ggc tmt tgc tmt tmc nnk tmt tgt tmc acc tat tmt tcc
!
! Y|S any Y|S Y S Y|S Y Y|S S Y|S Y A E|K Y|S F|S Q H|Y
! tmt nnk tmc tat tct tmt tac tmc agt tmt tat gct Vag tmt tHc cag Nac
!
! W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 101)
! tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 102)
! BstEII...

```

設計8

```

      1   1   2   2   3   3
      1   5   0   5   0   3   5   0   5
YYCAK SRSYYDYVWGSYRYTSSSYSSSYSSSYAEYFQHWGQGTTLVTVSS ( 配列番号 905)
YYCAK ZXZYZBZVWGZZRZTZSZXZYZZZYSZSAZJQBWGQGTTLVTVSS ( 配列番号 103)
      R      YYDYVWGSYRYT D3-16.2      AEYFQHWGQGTTLVTVSS (JH1)
              ( 配列番号 104)          ( 配列番号 66)
(J=FSY, B=YHND, ψ=EKQ)

```

```

アミノ酸多様性      = 9.44 E 8
DNA多様性          = 1.61 E 9
終止なし           = 93%
無償性Cysなし      = 93%
終止およびCysなし  = 88%

```

【 0 1 9 1】

【表 2 1】

C34D316JH1A

```

!
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!               XbaI...
!
! L R A E D T A V Y Y C A K|R
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!
! CDR3-----
!               N|D
! Y|S any Y|S Y Y|S Y|H Y|S V W G Y|S Y|S R Y|S T Y|S
! tmt nnk tmc tac tmt Nat tmt gtt tgg ggt tmt tmc cgt tmt act tmt
!
! S Y|S any Y|S Y Y|S Y|S Y|S Y Y|S S Y|S
! agt tmc nnk tmt tac tmc tmt tmc tat tmc agt tmt
!
! Q
! A, E|K Y|S F Q H
! GCT vag tmc ttc cag cat
!
! W G Q G T L V T V S S ( 配列番号105)
! tgg ggc cag ggt act ctG ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号106)
!               BstEII...

(C34D316JH1A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt nnk tmc tac tmt Nat tmt-
gtt tgg ggt tmt tmc cgt tmt act tmt agt tmc nnk tmt tac tmc tmt tmc tat-
tmc agt tmt GCT vag tmc ttc cag cat tgg ggc cag ggt act ct -3' ( 配列番号107)

```

設計9

設計9は、Dセグメントが右に移動することを除き設計8と同様である。

```

      1      1      2 2 2      3      3
      1 5      0 5      0 3 5      0 5
YYCAK YGYSSDSYSSYYDYVWGSYRYTYSSYYAEYFQHGWGQGLVTVSS ( 配列番号906)
YYCAK, ZXZZXZYZZZYZBZVWVGZZRZTYZSZYAψZFQHWGQGLVTVSS ( 配列番号108)
      R D3-16.2 YYDYVWGSYRYT AEYFQHGWGQGLVTVSS (JH1)
              ( 配列番号104) ( 配列番号66)
(J=FSY, B=YHND, ψ=EKQ)

```

アミノ酸多様性 = 1.31 E 8
 DNA多様性 = 5.37 E 8
 終止なし = 91%
 無償性Cysなし = 91%
 終止およびCysなし = 83%

【 0 1 9 2 】

【表 2 2】

C34D316JH1B

```

!
! scab DNA      S R D N S K N T L Y L Q M N S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!              XbaI...
!
! L R A E D T A V Y Y C A K|R
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!
! CDR3-----
! Y|S any Y|S Y|S Y|S any Y|S Y Y|S Y|S Y|S
! tmt nnk tmc tmt tmc nnk tmt tac tmc tmt tmc
!
! N|D
! Y Y|S Y|H Y|S V W G Y|S Y|S R Y|S T
! tac tmt Nat tmt gtt tgg ggt tmt tmc cgt tmt act
!
! Y Y|S S Y|S Y
! tat tmc agt tmt tac
!
! Q
! A E|K Y|S F Q H
! GCT vag tmc ttc cag cat
!
! W G Q G T L V T V S S ( 配列番号109)
! tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号110)
!              BstEII...

```

(C35D316JH1B)

```

5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt nnk tmc tmt tmc nnk tmt tac tmc tmt tmc
tac tmt Nat tmt gtt tgg ggt tmt tmc cgt tmt act tat tmc agt tmt tac GCT vag
tmc ttc cag cat tgg ggc cag ggt act ct-3' ( 配列番号111)

```

設計10

```

      1      1      2      2
1      5      0      5      0      4
YYCAK GSSYYGSGSYNSDYSAEYFQHWGQGLVTVSS ( 配列番号 907)
YYCAK XZZYZZGZGXYNZXZYZAXZFQHWGQGLVTVSS ( 配列番号 112)
      R      YYYGSGSYN      AEYFQHWGQGLVTVSS (JH1)
      ( 配列番号 81)      ( 配列番号 66)

```

設計10(C24D310B)は設計3と同様であるが、CDR3は長さが24である。設計10は、RまたはKとしての94、XZZ、2番目、3番目、5番目および7番目がZ(Y|S)に、8番目の残基がXに変化したD3-10(RF2)、ZXZYZおよび(EがXに変化した)JH1を有する。ZはYまたはSのどちらかである。CDR3は24AA長であり、エラーブローンPCRの使用によりさらに多様化され得る。

```

(C24D310b) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg nnk tmc tmc tac tmc tmt ggt tmc-
ggc tmt nnk tac aat tmt nnk tmc tat tmc gct nnk tmc ttt caa cat tgg ggc-
cag ggt act ct-3' ( 配列番号 113)

```

ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4 は上記の通り。

設計11

```

      1      1      2      2
1      5      0      5      0      5

```

【 0 1 9 3 】

【表 2 3】

YYCAR SSRSGYCTNGVCYRSGSYWYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 991)
 YYCAR ZZXXZGZC32GVCZ3ZXZZ4Z12LWGRGTLTVSS (配列番号 114)
 K GYCTNGVCYT YWYFDLWGRGTLTVSS D2-8.2 JH2
 (配列番号 115) (配列番号 67)
 (1=FYS(THT), 2=YHND(NAT), 3=ITKR(ANA), 4=LSW(TBG))

(C24D282) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmc tmt nnk tmt ggt tmc tgt ana-
 nat ggt gtc tgc tmt ana tmc nnk tmt tmt tbg tmt tht nat ctg tgg ggc-
 cag ggt act ct-3' (配列番号 116)

(C24D282.1) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmc tmt nnk tmc ggt tmc tgc ana-
 nat ggc gtc tgc tmt ana tmc nnk tmt tmt tbg tmt tht nat ctg tgg ggc-
 cag ggt act ct-3' (配列番号 117)

(C24D282.1) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmc tmt nnk tmc ggt tmc tgc ana-
 nat ggc gtc tgc t-3' (配列番号 118) (R, M, N, Kが必要)
 (C24D282.2) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cCA cAg ATN ADA AKA cVA AKA MNN gKA TNT AKA gCA
 gAc gcc ATN TNT gCA gKA Acc g-3' (配列番号 119) ! 75塩基
 (5'-c ggt tmc tgc ana-
 nat ggc gtc tgc tmt ana tmc nnk tmt tmt tbg tmt tht nat ctg tgg ggc-
 cag ggt act ct-3' [RC] (配列番号 120) (N, M, K, B, Hが必要)

設計12

		1	1	2	2	3	3
1	5	0	5	0	5	0	5

YYCAR SSYYSSYGYCTNGVCYTYSYSSYSSYSSYWYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 908)
 YYCAR ZZZZZZGZC32GVCZ3ZZZZZZZYZZ4Z12LWGRGTLTVSS (配列番号 121)
 K GYCTNGVCYT YWYFDLWGRGTLTVSS D2-8.2 JH2
 (配列番号 115) (配列番号 67)
 (1=FYS, 2=YHND, 3=ITKR, 4=LSW, 2=YS)

(C33D282TP) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT-3' (配列番号 909)
 (C33D282BP) 5'-ag agt acc ctg gcc cca-3' (配列番号 910)
 (C33D282) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmt tmc tmc tmt tmc tmc ggt-
 tmt tgt ana nat ggc gtc tgc tmt ana tmc tmc tmc tmt tat tmt tmc tat tmt-
 tac tmt tmc tbg tmc tht nat ctg tgg ggc cag ggt act ct-3' (配列番号 122)
 (C33D282F) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT agg tct tcc tac tat tcc tac ggt-
 tat tgt aca aat ggc gtc tgc tat aca tac tcc tac tct tat tat tcc tat tct-
 tac tct tac tgg tac ttt gat ctg tgg ggc cag ggt act ct-3' (配列番号 911)

設計13

設計13は、定常領域を通してオーバーラップしているDNAの2つの小片を作製できるように、多数のZの中央に生殖系列Dセグメントを配置している。HC CD R3は34長であり、多様性は $2^{23} \sim 8 \times 10^6$ である。

		1	1	2	2	3	3
1	5	0	5	0	5	0	5

YYCAR SSSYYSSYSSYGYCTNGVCYTYSYSSYSSYSSYWYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 912)
 YYCAR ZZZZZZZZZZGVCYTZZZZZZZZZZWZF2LWGRGTLTVSS (配列番号 123)
 K GYCTNGVCYT YWYFDLWGRGTLTVSS D2-8.2 JH2
 (配列番号 115) (配列番号 67)

【 0 1 9 4 】

【表 2 4】

(2=YHND)

(C34D282.2A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmc tmc tmt tmt tmc tmc tmt-
tmc tmc ggt tat tgt act aac ggc gtt tgc tat act-3' (配列番号124)
(C34D282.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc ccA cAg gTN gAA AKA ccA AKA AKA gKA-
gKA gKA gKA AKA AKA AgT ATA gCA AAc gcc gTT AgT AcA ATA-3' (配列番号125)! 86
塩基
(5'- tat tgc act aac ggc gtt tgc tat act tmt tmt tmc tmc tmc tmc-
tmt tmt tmt tgg tmt ttc Nac ctg tgg ggc cag ggt act ct-3' (配列
番号126) [RC])

設計14

設計14は、Dセグメントが大部分生殖系列であることを除いて、9と同様である。

		1	1	2	2	2	3	3
1	5	0	5	0	3	5	0	5

YYCAK YSYYSYSGSYSDYVWGSYRYTSYDSYAAEYFQHWGQGLVTVSS (配列番号 913)
YYCAK ZZZZZZZZZZZDYVWGSYRZTZZZZZZZAEZFQHWGQGLVTVSS (配列番号 127)
R D3-16.2 YYDYVWGSYRYT AEYFQHWGQGLVTVSS (JH1)
(配列番号 104) (配列番号 66)

(C34D316.2A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmc tmc tmt tmt tmc tmc tmt-
tmc tmc tmc gat tat gtc tgg ggt act tat cgt-3' (配列
番号128)
(C34D316.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc ccA ATg cTg gAA AKA cTc Agc gKA gKA gKA-
gKA gKA gKA gKA AKA AgT gKA Acg ATA AgT Acc ccA gAc ATA ATc-3' (配列
番号129)! 86塩基
(5'-gat tat gtc tgg ggt act tat cgt tmc act tmt tmc tmc tmc tmc-
tmc tmc gct gag tmt ttc cag cat tgg ggc cag ggt act ct-3'
(配列番号130) [RC])

設計15

設計15は、オーバーラップにおいていくらかの多様性、5つの双方向フリップフロップが許容される。わずかに32のオーバーラップ配列があり、一致しなくても、それらは許容される多様性を変化させはしないであろう。

		1	1	2	2	2	3	3
1	5	0	5	0	3	5	0	5

YYCAK SYDYSSSYSDYVWGSYRYTSYSGDSYAAEYFQHWGQGLVTVSS (配列番号 914)
YYCAK ZZZZZZZZZZZDZVWGSYRZTZZZZZZZAEZFQHWGQGLVTVSS (配列番号 131)
YYDYVWGSYRYT AEYFQHWGQGLVTVSS
(配列番号 104) (配列番号 66)

(C35D316.2A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmc tmc tmt tmt tmc tmc tmt-
tmc tmc tmc gac tmt gtc tgg ggt tmc tmc cgt tmc acc t-3' (配列番号
132)
(C35D316.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc ccA ATg cTg gAA AKA cTc Agc gKA gKA-
gKA gKA gKA gKA gKA AKA gGT gKA Acg gKA gKA Acc ccA gAc AKA gTc gKA g-3'
(配列番号 133)
(5'-c tmc gac tmt gtc tgg ggt tmc tmc cgt tmc acc tmt tmc tmc-
tmc tmc tmc tmc tmc gct gag tmt ttc cag cat tgg ggc cag ggt act ct-3' (配列
番号134) [RC])

【0 1 9 5】

【表 2 5】

設計16

設計16は、35のCDR3を提供する。オーバーラップにおいて4つの双方向フリップフロップ、したがって16配列が存在する。

```

      1      1      2 2 2      3      3
      1      5      0      5      0 3 5      0      5
YYCAK SSSYYSSYSYSGYCSGGSCYSSYYSSYYSAEYFQGWGQGLTVTVSS ( 配列番号 915)
YYCAK ZZZZZZZZZGZCZGGZCZSSZZZZZZZZAEZFQHWGQGLTVTVSS ( 配列番号 135)
      R      GYCSGGSCYS 2-25.2 AEYFQHWGQGLTVTVSSJH1
              ( 配列番号 136) ( 配列番号 66)

(C35D225.2A) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmt tmt-
              tmc tmc ggc tmc tgt tmc ggt ggc tmc tgc tmc tcc t-3' ( 配列番号 137)
(C35D225.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cCA ATg TTg gAA AKA TTc Agc gKA gKA-
              gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA gGA gCA gKA gcc Acc gKA AcA gKA gcc gKA g-3'
              ( 配列番号 138)! 96塩基

```

C34D225.2AおよびC34D225.2Bを混合物に加えた場合、33、34、および35の長さのCDR3を得る。

```

(C34D225.2A) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmt tmt-
              tmc tmc ggc tmc tgt tmc ggt ggc tmc tgc tmc tcc t-3' ( 配列番号 139)
(C34D225.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cCA ATg TTg gAA AKA TTc Agc gKA gKA-
              gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA gGA gCA gKA gcc Acc gKA AcA gKA gcc gKA g-3'
              ( 配列番号 140)! 93塩基

```

設計17

```

      1      1      2 2 2      3      3
      1      5      0      5      0 3 5      0      5
YYCAK YSSYSYYDYVWGSYRYTSSSYSSYSYAEYFQGWGQGLTVTVSS ( 配列番号 916)
YYCAK ZZZZZZZZDZVWGGZZRZTZSSZZZZZZZZAEZFQHWGQGLTVTVSS ( 配列番号 141)
      R      YYDYVWGSYRYT D3-16.2 AEYFQHWGQGLTVTVSS (JH1)
              ( 配列番号 104) ( 配列番号 66)

(C35D3162A) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmt tmt-
              tmc tmc ggc tmc tgt tmc ggt ggc tmc tgc tmc tcc t-3' ( 配列番号 142)
(C35D3162B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cCA gTg cTg gAA gKA cTc Agc gKA gKA gKA-
              gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA gGA gCA gKA gcc Acc gKA AcA gKA gcc gKA g-3'
              ( 配列番号 143)

```

設計18

```

      1      1      2 2 2      3      3
      1      5      0      5      0 3 5      0      5
YYCAK SSSYYSSSYDYVWGSYRYTSSSYSSYSYAEYFQGWGQGLTVTVSS ( 配列番号 917)
YYCAK ZZZZZZZZZZDZVWGGZZRZTZSSZZZZZZZZAEZFQHWGQGLTVTVSS ( 配列番号 144)
      R      YYDYVWGSYRYT D3-16.2AEYFQHWGQGLTVTVSS (JH1)
              ( 配列番号 104) ( 配列番号 66)

(C35D3162C) 5'-GCAIGtTItaTItaCItgcIgcT aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmt tmt-
              tmc tmc tmc gac tmc gtc tgg ggt tmc tmc cgt tmc acc t-3' ( 配列番号 145)
82塩基
(C35D3162B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cCA gTg cTg gAA gKA cTc Agc gKA gKA-

```

【0 1 9 6】

gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA ggT gKA Acg gKA gKA Acc ccA gAc gKA-
gTc g-3' (配列番号 146)

		1	1	2	2	2	3	3																							
	1	5	0	5	0	3	5	0	5																						
YYCAK	YSGDSYSYYYYDSSGYYYSSSYSSSYAAEYFQGWGGTLVTVSS	(配列番号 918)																						
YYCAK	<u>ZZZZZZZZZZDSSGZZZZZZZZZZZAEZFQHGGGTGLTVTSS</u>	(配列番号 147)																						
R	YYDDSSGYYY						AEYFQHGGGTGLTVTSS	(JH1)																							
	(配列番号 66)																						
	1	1					1	1																							
9	9	0	0				0	1																							
4	5	0	2	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	p	q	r	s	t	u	v	w	x	y	a	b	3	0

アミノ酸多様性	= 6.7 E 7
DNA多様性	= 6.7 E 7
終止なし	= 100
無償性Cysなし	= 100
終止およびCysなし	= 100%

```

C35D322AJH1
! scab DNA      S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agc-
!              XbaI...
!
!   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   KIR
|TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!
! CDR3-----
!
! YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS D   S   S   G   YIS YIS YIS
tmc tmt tmc tmc tmt tmc tmt tmc tmc tmc tmc tmc gac agc tcc ggc tmc tmc tmt
!
! YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS YIS A   E   YIS F   Q   H
tmc tmt tmc tmc tmt tmc tmt tmc tmc tmc tmc gct gaa tmc ttc caa cac
!
!   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   (   配列番号 148)
tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' (   配列番号 149)
!
! BstEII...

```

【 0 1 9 7 】

【表 27】

(C35D322AJH1_T) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmc tmt tmc tmc tmt-
 tmc tmt tmc tmc tmc tmc gac agc tcc ggc tmc tmc t-3' (配列番号150)
 (C35D322AJH1_B) 5'-cAg AgT Acc cTg gcc ccA gTg TTg gAA gKA TTc Agc gKA-
 gKA gKA gKA AKA gKA AKA gKA gKA AKA gKA AKA gKA gKA gcc gga gct gTc-
 gKA gKA g-3' (配列番号151)

ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4 は上記の通り。

設計20

		1	1	2	2	2	3	3	
1	5	0	5	0	3	5	0	5	
YYCAK	YSSYS	YYYDSSGYYYSSYS	YYYAEYFQGWGQGLTVSS	(配列番号 919)
YYCAK	ZZZZZZ (Z)	ZZZZDSSGZZZZZZZZ (Z)	ZZZAEZFQHWGQGLTVSS	(配列番号 152)
R		YYYDSSGYYY	AEYFQHWGQGLTVSS	(JH1)					
		(配列番号 88)	(配列番号 66)						
	1	1	1	1					
9 9	0	0	0	0					
4 5	0	3	abc	defghijklmnop	q	rstuv	wxya	4	0

アミノ酸多様性 = 6.7 E 7
 DNA多様性 = 6.7 E 7
 終止なし = 100
 無償性Cysなし = 100
 終止およびCysなし = 100%

設計20は長さ33、34または35のCDR3を有する。残基94は、KまたはR、ZZZZZZ (Z)ZZ::D3-22(Zとして6つのYを有する第2のRF)::ZZZZZZ(Z)ZZZ::JH1(1つのZを有する)であってよい。(C35D322AJH1_T)、(C34D322AJH1_T)、(C35D322AJH1_B)および(C34D322AJH1_B)を組み合わせるPCRは、長さおよび配列の多様性が許容される。

(C35D322AJH1_T) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmc tmt tmc tmc-
 tmt tmc tmt tmc tmc tmc gac agc tcc ggc tmc tmc t-3' (配列番号153)
 (C34D322AJH1_T) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmc tmc tmc tmt-
 tmc tmt tmc tmc tmc tmc gac agc tcc ggc tmc tmc t-3' (配列番号154)
 (C35D322AJH1_B) 5'-cAg AgT Acc cTg gcc ccA gTg TTg gAA gKA TTc Agc gKA-
 gKA gKA gKA AKA gKA AKA gKA gKA AKA gKA AKA gKA gKA gcc gga gct gTc-
 gKA gKA g-3' (配列番号 920)
 (C34D322AJH1_B) 5'-cAg AgT Acc cTg gcc ccA gTg TTg gAA gKA TTc Agc gKA-
 gKA gKA gKA AKA gKA AKA gKA gKA AKA gKA gKA gcc gga gct gTc-
 gKA gKA g-3' (配列番号155)

終止コドンに対する選択：

これらのライブラリのいくつかはNNKコドンに有するので、それらはいくつかのTAG終止コドンに有するであろう。bla遺伝子に対するシグナル配列と、実際のblaタンパク質との間のXbaI-BstEII部位内に増幅されたDNAをクローン化し、Sup⁰細胞において発現させることによって、TAGを有するクローンを取り除くことができる。Bla^RのコロニーはTAG終止を含有しない。あるいは、カナマイシン耐性遺伝子の前方のXbaI-BstEII断片をクローン化し、Kan^Rに関して選択することができる。次いで、XbaI-BstEIIカセットをファージライブラリに移動する。

。

【0198】

さらに、wobblingは、いくつかの終止コドンに許容するので、bla遺伝子に対するシグナル配列と、実際のblaタンパク質との間のXbaI-BstEII部位内に増幅されたDNAをクローン化し、Sup⁰細胞において発現させることによって、終止を有するクローンを取り除くことにより、ライブラリを改善することができる。Bla^Rコロニーは終止を含有しない。あるいは、カナマイシン耐性遺伝子の前方のXbaI-

B s t E I I 断片をクローン化し、K a n^R に関して選択することができる。次いで X b a I - B s t E I I カセットをファージライブラリに移動することができる。

【 0 1 9 9 】

【 表 2 8 】

表20:ヒトD領域

! TAGに対しては*, TAAに対しては@, TGAに対しては\$

Dアミノ酸配列アライメント(RF:リーディングフレーム)

		RF 1 (配列番号 156) (RF 2 (配列番号 157) (RF 3 (配列番号 158)	設計に使用した
D1	1-1	GTTGT	VQLER	YNWND	
		(配列番号 159) ((配列番号 160) ((配列番号 161)	
	1-7	GITGT	V*LEL	YNWNY	
		(配列番号 159) ((配列番号 162) ((配列番号 163)	
	1-20	GITGT	V*LER	YNWND	
		(配列番号 164) ((配列番号 165) ((配列番号 166)	
	1-26	GIVGAT	V*WELL	YSGSY	
D2	2-2	(配列番号 171および167) ((配列番号 70) ((配列番号 168)	
		RIL**YQLLY	GYCSSTSCYT	DIVVVPAAI	1, 5, 6, 7,
		(配列番号 169および392) ((配列番号 115) ((配列番号 170)	
	2-8	RILY@WCMLY	GYCTNGVCYT	DIVLMVYAI	20, 21, 22,
		(配列番号 171) ((配列番号 136) ((配列番号 172)	
	2-15	RIL*WW*LLL	GYCSGGSCYS	DIVVVVAAT	25,
		(配列番号 173) ((配列番号 174) ((配列番号 175)	
	2-21	SILWWSLLF	AYCGGDCYS	HIVVVTAI	
D3	3-3	(配列番号 176) ((配列番号 177) ((配列番号 178)	
		VLRFLWLLY	YYDFWSGYT	ITIFGVVII	
		(配列番号 179) ((配列番号 180) ((配列番号 181および579)	
	3-9	VLRYFDWLL@	YYDILTGYN	ITIF*LVII	
		(配列番号 182) ((配列番号 81) ((配列番号 183)	
	3-10	VLLWFGELL@	YYGSGSYN	ITMVRGVII	
		(配列番号 184) ((配列番号 104) ((配列番号 185)	
	3-16	VL\$LRRLGELSLY	YYDYVWGSYRYT	IMITFGGVIVI	8, 9, 14, 15, 17, 18
		(配列番号 186) ((配列番号 187) ((配列番号 188)	
	3-22	VLL**WLLL	YYDSSGYYY	ITMIVVVIT	4, 19, 20
D4	4-4	(配列番号 189) ((配列番号 192) ((配列番号 190)	
		\$LQ@L	DYSNY	TTVT	
		(配列番号 191) ((配列番号 192) ((配列番号 193)	
	4-11	\$LQ@L	DYSNY	TTVT	
		(配列番号 194) ((配列番号 195) ((配列番号 196)	
	4-17	\$LR@L	DYGDY	TTVT	
		(配列番号 197) ((配列番号 198) ((配列番号 199)	
	4-23	\$LRW@L	DYGGNS	TTVVT	

【 0 2 0 0 】

【表 2 9】

D5	5-5	(配列番号 200) (VDTAMV	(配列番号 201) (WIQLWL	(配列番号 202) (GYSYGY
	5-12	(配列番号 203) (VDIVATI	(配列番号 204) (WI*WLRL	(配列番号 205) (GYSGYDY
	5-18	(配列番号 206) (VDTAMV	(配列番号 207) (WIQLWL	(配列番号 208) (GYSYGY
	5-24	(配列番号 209) (VEMATI	(配列番号 210) (*RWLQL	(配列番号 211) (RDGYNY
D6	6-6	(配列番号 212) (EYSSSS	(配列番号 213) (SIAAR	(配列番号 214) (V*QLV
	6-13	(配列番号 215) (GYSSSWY	(配列番号 216) (GIAAAG	(配列番号 217) (V*QQLV
	6-19	(配列番号 218) (GYSSGWY	(配列番号 219) (GIAVAG	(配列番号 220) (V*QWL
D7	7-27	(配列番号 221) (LTG	(配列番号 222) (@LG	(配列番号 223) (NWG

表3:ヒトJHセグメント

JH - アミノ酸配列アライメント

	H3		

	CDR3		

	100	110	
		FR4-----	設計に使用した
JH1	---AEYFOHWGQGT LVTVSS	1-8,	(配列番号 66)
JH2	---YWF DLWGRGTLTVTVSS		(配列番号 67)
JH3	---AF DLWGQGTMTVTVSS		(配列番号 2)
JH4	---YF DYWGQGTLVTVSS		(配列番号 1)
JH5	---NW FDPWGQGTLVTVSS		(配列番号 68)
JH6	Y YYYGMDVWGQGTTVTVSS		(配列番号 3)
	123456789		

表10:wobblingのためのV-5D2-8.2a-JH2をコードするDNA

```

!                                     CDR3.....
!  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  D  I  V  L  M
! |gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aag jez ezq jzz qzz ezj
!
!  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S  ( 配列番号 224)
!  tgg ggc cag ggt act acG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 225)
!                                     BstEII...

```

【 0 2 0 1 】

【表 3 0】

表11:ヒトDセグメントから抽出可能な三量体

表11～14において、アミノ酸配列における小文字の使用は、終止コドンが小文字で記載された残基に変化されたことを示す。例えば、アミノ酸配列「yLE」では、Tyr残基が終止コドンの場所に導入された。

GTT D1-1.1.1	1
VQL D1-1.2.1	2
YNW D1-1.3.1	3
TTG D1-1.1.2	4
QLE D1-1.2.2	5
NWN D1-1.3.2	6
TGT D1-1.1.3	7
LER D1-1.2.3	8 (配列番号162)
WND D1-1.3.3	9
GIT D1-7.1.1	10
VyL D1-7.2.1	11 *
ITG D1-7.1.2	12
yLE D1-7.2.2	13 *
LEL D1-7.2.3	14 (配列番号160)
WNY D1-7.3.3	15
GIV D1-26.1.1	16
VyW D1-26.2.1	17 *
YSG D1-26.3.1	18
IVG D1-26.1.2	19
yWE D1-26.2.2	20 *
SGS D1-26.3.2	21
VGA D1-26.1.3	22
WEL D1-26.2.3	23
GSY D1-26.3.3	24
GAT D1-26.1.4	25
ELL D1-26.2.4	26
SY Y D1-26.3.4	27
RIL D2-2.1.1	28 (配列番号171)
GYC D2-2.2.1	29 #
DIV D2-2.3.1	30
ILy D2-2.1.2	31 *
YCS D2-2.2.2	32 #
IVV D2-2.3.2	33
Lyy D2-2.1.3	34 *
CSS D2-2.2.3	35 #
VVV D2-2.3.3	36
yyY D2-2.1.4	37 *
SST D2-2.2.4	38
VVP D2-2.3.4	39
yYQ D2-2.1.5	40 *
STS D2-2.2.5	41
VPA D2-2.3.5	42
YQL D2-2.1.6	43
TSC D2-2.2.6	44 #
PAA D2-2.3.6	45
QLL D2-2.1.7	46
SCY D2-2.2.7	47 #
AAI D2-2.3.7	48
LLY D2-2.1.8	49

【 0 2 0 2 】

【表 3 1】

CYT D2-2.2.8	50	#
ILY D2-8.1.2	51	
YCT D2-8.2.2	52	#
IVL D2-8.3.2	53	
LYy D2-8.1.3	54	*
CTN D2-8.2.3	55	#
VLM D2-8.3.3	56	
YyW D2-8.1.4	57	*
TNG D2-8.2.4	58	
LMV D2-8.3.4	59	
yWC D2-8.1.5	60	*#
NGV D2-8.2.5	61	
MVY D2-8.3.5	62	
WCM D2-8.1.6	63	#
GVC D2-8.2.6	64	#
VYA D2-8.3.6	65	
CML D2-8.1.7	66	#
VCY D2-8.2.7	67	#
YAI D2-8.3.7	68	
MLY D2-8.1.8	69	
LyW D2-15.1.3	70	*
CSG D2-15.2.3	71	#
yWW D2-15.1.4	72	*
SGG D2-15.2.4	73	
WWy D2-15.1.5	74	*
GGs D2-15.2.5	75	
VVA D2-15.3.5	76	
Wyl D2-15.1.6	77	*
GSC D2-15.2.6	78	#
VAA D2-15.3.6	79	
yLL D2-15.1.7	80	*
AAT D2-15.3.7	81	
LLL D2-15.1.8	82	
CYS D2-15.2.8	83	#
SIL D2-21.1.1	84	
AYC D2-21.2.1	85	#
HIV D2-21.3.1	86	
ILW D2-21.1.2	87	
YCG D2-21.2.2	88	#
LWW D2-21.1.3	89	
CGG D2-21.2.3	90	#
WWw D2-21.1.4	91	*
GGD D2-21.2.4	92	
VVT D2-21.3.4	93	
WwL D2-21.1.5	94	*
GDC D2-21.2.5	95	#
VTa D2-21.3.5	96	
wLL D2-21.1.6	97	*
DCY D2-21.2.6	98	#
TAI D2-21.3.6	99	
LLF D2-21.1.7	100	
VLR D3-3.1.1	101	
YYD D3-3.2.1	102	
ITI D3-3.3.1	103	
LRF D3-3.1.2	104	
YDF D3-3.2.2	105	
TIF D3-3.3.2	106	

【 0 2 0 3 】

【表 3 2】

RFL D3-3.1.3	107
DFW D3-3.2.3	108
IFG D3-3.3.3	109
FLE D3-3.1.4	110
FWS D3-3.2.4	111
FGV D3-3.3.4	112
LEW D3-3.1.5	113
WSG D3-3.2.5	114
GVV D3-3.3.5	115
EWL D3-3.1.6	116
SGY D3-3.2.6	117
VVI D3-3.3.6	118
WLL D3-3.1.7	119
GYV D3-3.2.7	120
VII D3-3.3.7	121
YYT D3-3.2.8	122
LRY D3-9.1.2	123
YDI D3-9.2.2	124
RYF D3-9.1.3	125
DIL D3-9.2.3	126
IFy D3-9.3.3	127 *
YFD D3-9.1.4	128
ILT D3-9.2.4	129
FyL D3-9.3.4	130 *
FDW D3-9.1.5	131
LTG D3-9.2.5	132 (配列番号221)
yLV D3-9.3.5	133 *
DWL D3-9.1.6	134
TGY D3-9.2.6	135
LVI D3-9.3.6	136
LLy D3-9.1.8	137 *
YYN D3-9.2.8	138
VLL D3-10.1.1	139
YYY D3-10.2.1	140
ITM D3-10.3.1	141
LLW D3-10.1.2	142
YYG D3-10.2.2	143
TMV D3-10.3.2	144
LWF D3-10.1.3	145
YGS D3-10.2.3	146
MVR D3-10.3.3	147
WFG D3-10.1.4	148
GSG D3-10.2.4	149
VRG D3-10.3.4	150
FGE D3-10.1.5	151
RGV D3-10.3.5	152
GEL D3-10.1.6	153
GVI D3-10.3.6	154
VLw D3-16.1.1	155 *
IMI D3-16.3.1	156
LwL D3-16.1.2	157 *
YDY D3-16.2.2	158
MIT D3-16.3.2	159
wLR D3-16.1.3	160 *
DYV D3-16.2.3	161
ITF D3-16.3.3	162
LRL D3-16.1.4	163

【 0 2 0 4 】

【表 3 3】

YVW D3-16.2.4	164
TFG D3-16.3.4	165
RLG D3-16.1.5	166
VWG D3-16.2.5	167 *
FGG D3-16.3.5	168
LGE D3-16.1.6	169
WGS D3-16.2.6	170
GGV D3-16.3.6	171
ELS D3-16.1.8	172
SYR D3-16.2.8	173
VIV D3-16.3.8	174
LSL D3-16.1.9	175
YRY D3-16.2.9	176
IVI D3-16.3.9	177
SLY D3-16.1.10	178
RYT D3-16.2.10	179
LLw D3-22.1.2	180 *
TMI D3-22.3.2	181
Lwy D3-22.1.3	182 *
YDS D3-22.2.3	183
MIV D3-22.3.3	184
wyy D3-22.1.4	185 *
DSS D3-22.2.4	186
yyW D3-22.1.5	187 *
SSG D3-22.2.5	188
yWL D3-22.1.6	189 *
VIT D3-22.3.7	190
wLQ D4-4.1.1	191 *
DYS D4-4.2.1	192
TTV D4-4.3.1	193
LQy D4-4.1.2	194 *
YSN D4-4.2.2	195
TVT D4-4.3.2	196
QyL D4-4.1.3	197 *
SNY D4-4.2.3	198
DYG D4-17.2.1	199
LRw D4-17.1.2	200 * (配列番号197)
YGD D4-17.2.2	201
RwL D4-17.1.3	202 *
GDY D4-17.2.3	203
LRW D4-23.1.2	204 (配列番号197)
YGG D4-23.2.2	205
TVV D4-23.3.2	206
RWy D4-23.1.3	207 *
GGN D4-23.2.3	208
GNS D4-23.2.4	209
VDT D5-5.1.1	210
WIQ D5-5.2.1	211
GYS D5-5.3.1	212
DTA D5-5.1.2	213
IQL D5-5.2.2	214
YSY D5-5.3.2	215
TAM D5-5.1.3	216
QLW D5-5.2.3	217
SYG D5-5.3.3	218
AMV D5-5.1.4	219
LWL D5-5.2.4	220

【 0 2 0 5 】

【表 3 4】

YGY D5-5.3.4	221	
VDI D5-12.1.1	222	
WIY D5-12.2.1	223	*
IYW D5-12.2.2	224	*
IYA D5-12.1.3	225	
VAT D5-12.1.4	226	
WLR D5-12.2.4	227	
GYD D5-12.3.4	228	
ATI D5-12.1.5	229	
VEM D5-24.1.1	230	
YRW D5-24.2.1	231	*
RDG D5-24.3.1	232	
EMA D5-24.1.2	233	
RWL D5-24.2.2	234	
DGY D5-24.3.2	235	
MAT D5-24.1.3	236	
WLQ D5-24.2.3	237	
GYN D5-24.3.3	238	
LQL D5-24.2.4	239	
YNY D5-24.3.4	240	
EYS D6-6.1.1	241	
SIA D6-6.2.1	242	
VyQ D6-6.3.1	243	*
YSS D6-6.1.2	244	
IAA D6-6.2.2	245	
yQL D6-6.3.2	246	*
SSS D6-6.1.3	247	
AAR D6-6.2.3	248	
QLV D6-6.3.3	249	(配列番号214)
GIA D6-13.2.1	250	
yQQ D6-13.3.2	251	*
AAA D6-13.2.3	252	
QQL D6-13.3.3	253	
SSW D6-13.1.4	254	
AAG D6-13.2.4	255	
SWY D6-13.1.5	256	
IAY D6-19.2.2	257	
yQW D6-19.3.2	258	*
AVA D6-19.2.3	259	
QWL D6-19.3.3	260	
SGW D6-19.1.4	261	
VAG D6-19.2.4	262	
WLV D6-19.3.4	263	
GWY D6-19.1.5	264	
yLG D7-27.2.1	265	*
NWG D7-27.3.1	266	(配列番号223)

表12:ヒトDセグメントから抽出可能な、異なる四量体

GTGT D1-1.1.1	(配列番号 257)	1
VQLE D1-1.2.1	(配列番号 258)	2
YNWN D1-1.3.1	(配列番号 259)	3
TTGT D1-1.1.2	(配列番号 263)	4
QLER D1-1.2.2	(配列番号 264)	5
NWND D1-1.3.2	(配列番号 265)	6
GITG D1-7.1.1	(配列番号 266)	7
VyLE D1-7.2.1	(配列番号 267)	8

【 0 2 0 6 】

【表 3 5】

ITGT D1-7.1.2	(配列番号 271)	9
yLEL D1-7.2.2	(配列番号 272)	10
NWNY D1-7.3.2	(配列番号 273)	11
yLER D1-20.2.2	(配列番号 275)	12
GIVG D1-26.1.1	(配列番号 276)	13
VyWE D1-26.2.1	(配列番号 277)	14
YSGS D1-26.3.1	(配列番号 278)	15
IVGA D1-26.1.2	(配列番号 285)	16
yWEL D1-26.2.2	(配列番号 286)	17
SGSY D1-26.3.2	(配列番号 287)	18
VGAT D1-26.1.3	(配列番号 291)	19
WELL D1-26.2.3	(配列番号 292)	20
GSYY D1-26.3.3	(配列番号 293)	21
RILy D2-2.1.1	(配列番号 294)	22
GYCS D2-2.2.1	(配列番号 295)	23
DIVV D2-2.3.1	(配列番号 296)	24
ILyy D2-2.1.2	(配列番号 303)	25
YCSS D2-2.2.2	(配列番号 304)	26
IVVV D2-2.3.2	(配列番号 305)	27
LyyY D2-2.1.3	(配列番号 312)	28
CSST D2-2.2.3	(配列番号 313)	29
VVVP D2-2.3.3	(配列番号 314)	30
yyYQ D2-2.1.4	(配列番号 321)	31
SSTS D2-2.2.4	(配列番号 322)	32
VVPA D2-2.3.4	(配列番号 323)	33
yYQL D2-2.1.5	(配列番号 330)	34
STSC D2-2.2.5	(配列番号 331)	35
VPAA D2-2.3.5	(配列番号 332)	36
YQLL D2-2.1.6	(配列番号 338)	37
TSCY D2-2.2.6	(配列番号 339)	38
PAAI D2-2.3.6	(配列番号 340)	39
QLLY D2-2.1.7	(配列番号 343)	40
SCYT D2-2.2.7	(配列番号 344)	41
RILY D2-8.1.1	(配列番号 345)	42
GYCT D2-8.2.1	(配列番号 346)	43
DIVL D2-8.3.1	(配列番号 347)	44
ILYy D2-8.1.2	(配列番号 354)	45
YCTN D2-8.2.2	(配列番号 355)	46
IVLM D2-8.3.2	(配列番号 356)	47
LYyW D2-8.1.3	(配列番号 363)	48
CTNG D2-8.2.3	(配列番号 364)	49
VLNV D2-8.3.3	(配列番号 365)	50
YyWC D2-8.1.4	(配列番号 372)	51
TNGV D2-8.2.4	(配列番号 373)	52
LMVY D2-8.3.4	(配列番号 374)	53
yWCM D2-8.1.5	(配列番号 381)	54
NGVC D2-8.2.5	(配列番号 382)	55
MVYA D2-8.3.5	(配列番号 383)	56
WCML D2-8.1.6	(配列番号 389)	57
GVCY D2-8.2.6	(配列番号 390)	58
VYAI D2-8.3.6	(配列番号 391)	59
CMLY D2-8.1.7	(配列番号 394)	60
VCYT D2-8.2.7	(配列番号 395)	61
ILyW D2-15.1.2	(配列番号 401)	62
YCSG D2-15.2.2	(配列番号 402)	63
LyWW D2-15.1.3	(配列番号 409)	64
CSGG D2-15.2.3	(配列番号 410)	65

【 0 2 0 7 】

【表 3 6】

VVVV	D2-15.3.3	(配列番号 411)	66
yWwY	D2-15.1.4	(配列番号 418)	67
SGGS	D2-15.2.4	(配列番号 419)	68
VVVA	D2-15.3.4	(配列番号 420)	69
WwYl	D2-15.1.5	(配列番号 427)	70
GGSC	D2-15.2.5	(配列番号 428)	71
VVAA	D2-15.3.5	(配列番号 429)	72
Wyll	D2-15.1.6	(配列番号 435)	73
GSCY	D2-15.2.6	(配列番号 436)	74
VAAT	D2-15.3.6	(配列番号 437)	75
yLLL	D2-15.1.7	(配列番号 440)	76
SCYS	D2-15.2.7	(配列番号 441)	77
SILW	D2-21.1.1	(配列番号 442)	78
AYCG	D2-21.2.1	(配列番号 443)	79
HIVV	D2-21.3.1	(配列番号 444)	80
ILWW	D2-21.1.2	(配列番号 451)	81
YCGG	D2-21.2.2	(配列番号 452)	82
LWWw	D2-21.1.3	(配列番号 459)	83
CGGD	D2-21.2.3	(配列番号 460)	84
VVVT	D2-21.3.3	(配列番号 461)	85
WWwL	D2-21.1.4	(配列番号 468)	86
GGDC	D2-21.2.4	(配列番号 469)	87
VVTA	D2-21.3.4	(配列番号 470)	88
WwLL	D2-21.1.5	(配列番号 476)	89
GDCY	D2-21.2.5	(配列番号 477)	90
VTAl	D2-21.3.5	(配列番号 478)	91
wLLF	D2-21.1.6	(配列番号 481)	92
DCYS	D2-21.2.6	(配列番号 482)	93
VLRf	D3-3.1.1	(配列番号 483)	94
YYDF	D3-3.2.1	(配列番号 484)	95
ITIF	D3-3.3.1	(配列番号 485)	96
LRfL	D3-3.1.2	(配列番号 492)	97
YDFW	D3-3.2.2	(配列番号 493)	98
TIFG	D3-3.3.2	(配列番号 494)	99
RfLE	D3-3.1.3	(配列番号 501)	100
DFWS	D3-3.2.3	(配列番号 502)	101
IFGV	D3-3.3.3	(配列番号 503)	102
FLEW	D3-3.1.4	(配列番号 510)	103
FWSG	D3-3.2.4	(配列番号 511)	104
FGVv	D3-3.3.4	(配列番号 512)	105
LEWL	D3-3.1.5	(配列番号 519)	106
WSGY	D3-3.2.5	(配列番号 520)	107
GVVI	D3-3.3.5	(配列番号 521)	108
EWLL	D3-3.1.6	(配列番号 527)	109
SGYY	D3-3.2.6	(配列番号 528)	110
VVII	D3-3.3.6	(配列番号 529)	111
WLLY	D3-3.1.7	(配列番号 532)	112
GYyT	D3-3.2.7	(配列番号 533)	113
VLRy	D3-9.1.1	(配列番号 534)	114
YYDI	D3-9.2.1	(配列番号 535)	115
LRyF	D3-9.1.2	(配列番号 542)	116
YDIL	D3-9.2.2	(配列番号 543)	117
TIFy	D3-9.3.2	(配列番号 544)	118
RYFD	D3-9.1.3	(配列番号 551)	119
DILT	D3-9.2.3	(配列番号 552)	120
IFyL	D3-9.3.3	(配列番号 553)	121
YFDW	D3-9.1.4	(配列番号 560)	122

【 0 2 0 8 】

【表 3 7】

ILTG D3-9.2.4	(配列番号 561)	123
FyLV D3-9.3.4	(配列番号 562)	124
FDWL D3-9.1.5	(配列番号 569)	125
LTGY D3-9.2.5	(配列番号 570)	126
yLVI D3-9.3.5	(配列番号 571)	127
DWLL D3-9.1.6	(配列番号 577)	128
TGY Y D3-9.2.6	(配列番号 578)	129
LVII D3-9.3.6	(配列番号 579)	130
WLLy D3-9.1.7	(配列番号 582)	131
GYYN D3-9.2.7	(配列番号 583)	132
VLLW D3-10.1.1	(配列番号 584)	133
YYYG D3-10.2.1	(配列番号 585)	134
ITMV D3-10.3.1	(配列番号 586)	135
LLWF D3-10.1.2	(配列番号 593)	136
YYGS D3-10.2.2	(配列番号 594)	137
TMVR D3-10.3.2	(配列番号 595)	138
LWFG D3-10.1.3	(配列番号 602)	139
YGSG D3-10.2.3	(配列番号 603)	140
MVRG D3-10.3.3	(配列番号 604)	141
WFGD D3-10.1.4	(配列番号 611)	142
GSGS D3-10.2.4	(配列番号 612)	143
VRGV D3-10.3.4	(配列番号 613)	144
FGEL D3-10.1.5	(配列番号 620)	145
RGVI D3-10.3.5	(配列番号 621)	146
GELL D3-10.1.6	(配列番号 626)	147
GVII D3-10.3.6	(配列番号 627)	148
ELLy D3-10.1.7	(配列番号 630)	149
SYYN D3-10.2.7	(配列番号 631)	150
VLwL D3-16.1.1	(配列番号 632)	151
YYDY D3-16.2.1	(配列番号 633)	152
IMIT D3-16.3.1	(配列番号 634)	153
LwLR D3-16.1.2	(配列番号 641)	154
YDYV D3-16.2.2	(配列番号 642)	155
MITF D3-16.3.2	(配列番号 643)	156
wLRL D3-16.1.3	(配列番号 650)	157
DYVW D3-16.2.3	(配列番号 651)	158
ITFG D3-16.3.3	(配列番号 652)	159
LRLG D3-16.1.4	(配列番号 659)	160
YVWG D3-16.2.4	(配列番号 660)	161
TFGG D3-16.3.4	(配列番号 661)	162
RLGE D3-16.1.5	(配列番号 668)	163
VWGS D3-16.2.5	(配列番号 669)	164
FGGV D3-16.3.5	(配列番号 670)	165
LGEL D3-16.1.6	(配列番号 677)	166
WGSY D3-16.2.6	(配列番号 678)	167
GGVI D3-16.3.6	(配列番号 679)	168
GELS D3-16.1.7	(配列番号 686)	169
GSYR D3-16.2.7	(配列番号 687)	170
GVIV D3-16.3.7	(配列番号 688)	171
ELSL D3-16.1.8	(配列番号 694)	172
SYRY D3-16.2.8	(配列番号 695)	173
VIVI D3-16.3.8	(配列番号 696)	174
LSLY D3-16.1.9	(配列番号 699)	175
YRYT D3-16.2.9	(配列番号 700)	176
VLLw D3-22.1.1	(配列番号 701)	177
YY YD D3-22.2.1	(配列番号 702)	178
ITMI D3-22.3.1	(配列番号 703)	179

【 0 2 0 9 】

【表 3 8】

LLwy	D3-22.1.2	(配列番号 710)	180
YYDS	D3-22.2.2	(配列番号 711)	181
TMIV	D3-22.3.2	(配列番号 712)	182
Lwyy	D3-22.1.3	(配列番号 719)	183
YDSS	D3-22.2.3	(配列番号 720)	184
MIVV	D3-22.3.3	(配列番号 721)	185
wyyW	D3-22.1.4	(配列番号 728)	186
DSSG	D3-22.2.4	(配列番号 729)	187
yyWL	D3-22.1.5	(配列番号 736)	188
SSGY	D3-22.2.5	(配列番号 737)	189
VVVI	D3-22.3.5	(配列番号 738)	190
yWLL	D3-22.1.6	(配列番号 744)	191
VVIT	D3-22.3.6	(配列番号 745)	192
WLLL	D3-22.1.7	(配列番号 748)	193
GYYY	D3-22.2.7	(配列番号 749)	194
wLQy	D4-4.1.1	(配列番号 750)	195
DYSN	D4-4.2.1	(配列番号 751)	196
TTVT	D4-4.3.1	(配列番号 752)	197
LQyL	D4-4.1.2	(配列番号 755)	198
YSNY	D4-4.2.2	(配列番号 756)	199
wLRw	D4-17.1.1	(配列番号 757)	200
DYGD	D4-17.2.1	(配列番号 758)	201
LRwL	D4-17.1.2	(配列番号 761)	202
YGDY	D4-17.2.2	(配列番号 762)	203
wLRW	D4-23.1.1	(配列番号 763)	204
DYGG	D4-23.2.1	(配列番号 764)	205
TTVV	D4-23.3.1	(配列番号 765)	206
LRWy	D4-23.1.2	(配列番号 771)	207
YGGN	D4-23.2.2	(配列番号 772)	208
TVVT	D4-23.3.2	(配列番号 773)	209
RWyL	D4-23.1.3	(配列番号 776)	210
GGNS	D4-23.2.3	(配列番号 777)	211
VDTA	D5-5.1.1	(配列番号 778)	212
WIQL	D5-5.2.1	(配列番号 779)	213
GYSY	D5-5.3.1	(配列番号 780)	214
DTAM	D5-5.1.2	(配列番号 787)	215
IQLW	D5-5.2.2	(配列番号 788)	216
YSYG	D5-5.3.2	(配列番号 789)	217
TAMV	D5-5.1.3	(配列番号 793)	218
QLWL	D5-5.2.3	(配列番号 794)	219
SYGY	D5-5.3.3	(配列番号 795)	220
VDIV	D5-12.1.1	(配列番号 796)	221
WIyW	D5-12.2.1	(配列番号 797)	222
GYSG	D5-12.3.1	(配列番号 798)	223
DIVA	D5-12.1.2	(配列番号 805)	224
IyWL	D5-12.2.2	(配列番号 806)	225
YSGY	D5-12.3.2	(配列番号 807)	226
IVAT	D5-12.1.3	(配列番号 814)	227
yWLR	D5-12.2.3	(配列番号 815)	228
SGYD	D5-12.3.3	(配列番号 816)	229
VATI	D5-12.1.4	(配列番号 820)	230
WLRL	D5-12.2.4	(配列番号 821)	231
GYDY	D5-12.3.4	(配列番号 822)	232
HEMA	D5-24.1.1	(配列番号 823)	233
yRWL	D5-24.2.1	(配列番号 824)	234
RDGY	D5-24.3.1	(配列番号 825)	235
EMAT	D5-24.1.2	(配列番号 832)	236

【 0 2 1 0 】

【表 3 9】

RWLQ	D5-24.2.2	(配列番号 833)	237
DGYN	D5-24.3.2	(配列番号 834)	238
MATI	D5-24.1.3	(配列番号 838)	239
WLQL	D5-24.2.3	(配列番号 839)	240
GYNY	D5-24.3.3	(配列番号 840)	241
EYSS	D6-6.1.1	(配列番号 841)	242
SIAA	D6-6.2.1	(配列番号 842)	243
VyQL	D6-6.3.1	(配列番号 843)	244
YSSS	D6-6.1.2	(配列番号 848)	245
IAAR	D6-6.2.2	(配列番号 849)	246
yQLV	D6-6.3.2	(配列番号 850)	247
SSSS	D6-6.1.3	(配列番号 852)	248
GYSS	D6-13.1.1	(配列番号 853)	249
GIAA	D6-13.2.1	(配列番号 854)	250
VyQQ	D6-13.3.1	(配列番号 855)	251
IAAA	D6-13.2.2	(配列番号 862)	252
yQQL	D6-13.3.2	(配列番号 863)	253
SSSW	D6-13.1.3	(配列番号 868)	254
AAAG	D6-13.2.3	(配列番号 869)	255
QQLV	D6-13.3.3	(配列番号 870)	256
SSWY	D6-13.1.4	(配列番号 872)	257
GIAY	D6-19.2.1	(配列番号 873)	258
VyQW	D6-19.3.1	(配列番号 874)	259
YSSG	D6-19.1.2	(配列番号 881)	260
IAVA	D6-19.2.2	(配列番号 882)	261
yQWL	D6-19.3.2	(配列番号 883)	262
SSGW	D6-19.1.3	(配列番号 888)	263
AVAG	D6-19.2.3	(配列番号 889)	264
QWLW	D6-19.3.3	(配列番号 890)	265
SGWY	D6-19.1.4	(配列番号 941)	266

表13:ヒトDセグメントから抽出可能な五量体

GTTGT	D1-1.1.1	(配列番号 260)	1
VQLER	D1-1.2.1	(配列番号 261)	2
YNWND	D1-1.3.1	(配列番号 262)	3
GITGT	D1-7.1.1	(配列番号 268)	4
VyLEL	D1-7.2.1	(配列番号 269)	5
YNWNY	D1-7.3.1	(配列番号 270)	6
VyLER	D1-20.2.1	(配列番号 274)	7
GIVGA	D1-26.1.1	(配列番号 279)	8
VyWEL	D1-26.2.1	(配列番号 280)	9
YSGSY	D1-26.3.1	(配列番号 281)	10
IVGAT	D1-26.1.2	(配列番号 288)	11
yWELL	D1-26.2.2	(配列番号 289)	12
SGSYY	D1-26.3.2	(配列番号 290)	13
RILyy	D2-2.1.1	(配列番号 297)	14
GYCSS	D2-2.2.1	(配列番号 298)	15
DIVVV	D2-2.3.1	(配列番号 299)	16
ILyyY	D2-2.1.2	(配列番号 306)	17
YCSST	D2-2.2.2	(配列番号 307)	18
IVVVP	D2-2.3.2	(配列番号 308)	19
LyyYQ	D2-2.1.3	(配列番号 315)	20
CSSTS	D2-2.2.3	(配列番号 316)	21
VVVP	D2-2.3.3	(配列番号 317)	22
yyYQL	D2-2.1.4	(配列番号 324)	23
SSTSC	D2-2.2.4	(配列番号 325)	24

【 0 2 1 1 】

【表 4 0】

VVPAA	D2-2.3.4	(配列番号 326)	25
yYQLL	D2-2.1.5	(配列番号 333)	26
STSCY	D2-2.2.5	(配列番号 334)	27
VPAAI	D2-2.3.5	(配列番号 335)	28
YQLLY	D2-2.1.6	(配列番号 341)	29
TSCYT	D2-2.2.6	(配列番号 342)	30
RILYy	D2-8.1.1	(配列番号 348)	31
GYCTN	D2-8.2.1	(配列番号 349)	32
DIVLM	D2-8.3.1	(配列番号 350)	33
ILYyW	D2-8.1.2	(配列番号 357)	34
YCTNG	D2-8.2.2	(配列番号 358)	35
IVLMV	D2-8.3.2	(配列番号 359)	36
LYyWC	D2-8.1.3	(配列番号 366)	37
CTNGV	D2-8.2.3	(配列番号 367)	38
VLMVY	D2-8.3.3	(配列番号 368)	39
YyWCM	D2-8.1.4	(配列番号 375)	40
TNGVC	D2-8.2.4	(配列番号 376)	41
LMVYA	D2-8.3.4	(配列番号 377)	42
yWCML	D2-8.1.5	(配列番号 384)	43
NGVCY	D2-8.2.5	(配列番号 385)	44
MVYAI	D2-8.3.5	(配列番号 386)	45
WCMLY	D2-8.1.6	(配列番号 392)	46
GVCYT	D2-8.2.6	(配列番号 393)	47
RILyW	D2-15.1.1	(配列番号 396)	48
GYCSG	D2-15.2.1	(配列番号 397)	49
ILyWW	D2-15.1.2	(配列番号 403)	50
YCSGG	D2-15.2.2	(配列番号 404)	51
IVVVV	D2-15.3.2	(配列番号 405)	52
LyWWy	D2-15.1.3	(配列番号 412)	53
CSGGS	D2-15.2.3	(配列番号 413)	54
VVVVA	D2-15.3.3	(配列番号 414)	55
yWWyL	D2-15.1.4	(配列番号 421)	56
SGGSC	D2-15.2.4	(配列番号 422)	57
VVVAA	D2-15.3.4	(配列番号 423)	58
WWyLL	D2-15.1.5	(配列番号 430)	59
GGSCY	D2-15.2.5	(配列番号 431)	60
VVAAT	D2-15.3.5	(配列番号 432)	61
WyLLL	D2-15.1.6	(配列番号 438)	62
GSCYS	D2-15.2.6	(配列番号 439)	63
SILWW	D2-21.1.1	(配列番号 445)	64
AYCGG	D2-21.2.1	(配列番号 446)	65
HIVVV	D2-21.3.1	(配列番号 447)	66
ILWWw	D2-21.1.2	(配列番号 453)	67
YCGGD	D2-21.2.2	(配列番号 454)	68
IVVVT	D2-21.3.2	(配列番号 455)	69
LWWwL	D2-21.1.3	(配列番号 462)	70
CGGDC	D2-21.2.3	(配列番号 463)	71
VVVTA	D2-21.3.3	(配列番号 464)	72
WWwLL	D2-21.1.4	(配列番号 471)	73
GGDCY	D2-21.2.4	(配列番号 472)	74
VVTAI	D2-21.3.4	(配列番号 473)	75
WwLLF	D2-21.1.5	(配列番号 479)	76
GDCYS	D2-21.2.5	(配列番号 480)	77
VLRFL	D3-3.1.1	(配列番号 486)	78
YYDFW	D3-3.2.1	(配列番号 487)	79
ITIFG	D3-3.3.1	(配列番号 488)	80
LRFLE	D3-3.1.2	(配列番号 495)	81

【 0 2 1 2 】

【表 4 1】

YDFWS D3-3.2.2	(配列番号 496)	82
TIFGV D3-3.3.2	(配列番号 497)	83
RFLW D3-3.1.3	(配列番号 504)	84
DFWSG D3-3.2.3	(配列番号 505)	85
IFGVV D3-3.3.3	(配列番号 506)	86
FLEWL D3-3.1.4	(配列番号 513)	87
FWSGY D3-3.2.4	(配列番号 514)	88
FGVVI D3-3.3.4	(配列番号 515)	89
LEWLL D3-3.1.5	(配列番号 522)	90
WSGY Y D3-3.2.5	(配列番号 523)	91
GVVII D3-3.3.5	(配列番号 524)	92
EWLLY D3-3.1.6	(配列番号 530)	93
SGYYT D3-3.2.6	(配列番号 531)	94
VLRyf D3-9.1.1	(配列番号 536)	95
YYDIL D3-9.2.1	(配列番号 537)	96
ITIFy D3-9.3.1	(配列番号 538)	97
LRYFD D3-9.1.2	(配列番号 545)	98
YDILT D3-9.2.2	(配列番号 546)	99
TIFyL D3-9.3.2	(配列番号 547)	100
RYFDW D3-9.1.3	(配列番号 554)	101
DILTg D3-9.2.3	(配列番号 555)	102
IFyLV D3-9.3.3	(配列番号 556)	103
YFDWL D3-9.1.4	(配列番号 563)	104
ILTGy D3-9.2.4	(配列番号 564)	105
FyLVI D3-9.3.4	(配列番号 565)	106
FDWLL D3-9.1.5	(配列番号 572)	107
LTGYY D3-9.2.5	(配列番号 573)	108
yLVII D3-9.3.5	(配列番号 574)	109
DWLLy D3-9.1.6	(配列番号 580)	110
TGYYN D3-9.2.6	(配列番号 581)	111
VLLWF D3-10.1.1	(配列番号 587)	112
YYVGS D3-10.2.1	(配列番号 588)	113
ITMVR D3-10.3.1	(配列番号 589)	114
LLWFG D3-10.1.2	(配列番号 596)	115
YYGSG D3-10.2.2	(配列番号 597)	116
TMVRG D3-10.3.2	(配列番号 598)	117
LWGE D3-10.1.3	(配列番号 605)	118
YGS GS D3-10.2.3	(配列番号 606)	119
MVRGV D3-10.3.3	(配列番号 607)	120
WFGE L D3-10.1.4	(配列番号 614)	121
GSGSY D3-10.2.4	(配列番号 615)	122
VRGVI D3-10.3.4	(配列番号 616)	123
FGELL D3-10.1.5	(配列番号 622)	124
RGVII D3-10.3.5	(配列番号 623)	125
GELLy D3-10.1.6	(配列番号 628)	126
GSYYN D3-10.2.6	(配列番号 629)	127
VLwLR D3-16.1.1	(配列番号 635)	128
YYDYV D3-16.2.1	(配列番号 636)	129
IMITF D3-16.3.1	(配列番号 637)	130
LwLRL D3-16.1.2	(配列番号 644)	131
YDYVW D3-16.2.2	(配列番号 645)	132
MITFG D3-16.3.2	(配列番号 646)	133
wLRLG D3-16.1.3	(配列番号 653)	134
DYVWG D3-16.2.3	(配列番号 654)	135
ITFGG D3-16.3.3	(配列番号 655)	136
LRLGE D3-16.1.4	(配列番号 662)	137
YVWGS D3-16.2.4	(配列番号 663)	138

【 0 2 1 3 】

【表 4 2】

TFGGV D3-16.3.4	(配列番号 664)	139
RLGEL D3-16.1.5	(配列番号 671)	140
VWGSY D3-16.2.5	(配列番号 672)	141
FGGVI D3-16.3.5	(配列番号 673)	142
LGELS D3-16.1.6	(配列番号 680)	143
WGSYR D3-16.2.6	(配列番号 681)	144
GGVIV D3-16.3.6	(配列番号 682)	145
GELSL D3-16.1.7	(配列番号 689)	146
GSYRY D3-16.2.7	(配列番号 690)	147
GVIVI D3-16.3.7	(配列番号 691)	148
ELSLY D3-16.1.8	(配列番号 697)	149
SYRYT D3-16.2.8	(配列番号 698)	150
VLLWy D3-22.1.1	(配列番号 704)	151
YYYDS D3-22.2.1	(配列番号 705)	152
ITMIV D3-22.3.1	(配列番号 706)	153
LLWyy D3-22.1.2	(配列番号 713)	154
YDSS D3-22.2.2	(配列番号 714)	155
TMIVV D3-22.3.2	(配列番号 715)	156
LwywW D3-22.1.3	(配列番号 722)	157
YDSSG D3-22.2.3	(配列番号 723)	158
MIVVV D3-22.3.3	(配列番号 724)	159
wyyWL D3-22.1.4	(配列番号 730)	160
DSSGY D3-22.2.4	(配列番号 731)	161
IVVVI D3-22.3.4	(配列番号 732)	162
yyWLL D3-22.1.5	(配列番号 739)	163
SSGY Y D3-22.2.5	(配列番号 740)	164
VVVIT D3-22.3.5	(配列番号 741)	165
yWLLL D3-22.1.6	(配列番号 746)	166
SGYYY D3-22.2.6	(配列番号 747)	167
wLQyL D4-4.1.1	(配列番号 753)	168
DYSNY D4-4.2.1	(配列番号 754)	169
wLRwL D4-17.1.1	(配列番号 759)	170
DYGDY D4-17.2.1	(配列番号 760)	171
wLRWy D4-23.1.1	(配列番号 766)	172
DYGGN D4-23.2.1	(配列番号 767)	173
TTVVT D4-23.3.1	(配列番号 768)	174
LRWyL D4-23.1.2	(配列番号 774)	175
YGGNS D4-23.2.2	(配列番号 775)	176
VDIAM D5-5.1.1	(配列番号 781)	177
WQLW D5-5.2.1	(配列番号 782)	178
GYSYG D5-5.3.1	(配列番号 783)	179
DTAMV D5-5.1.2	(配列番号 790)	180
IQLWL D5-5.2.2	(配列番号 791)	181
YSYGY D5-5.3.2	(配列番号 792)	182
VDIVA D5-12.1.1	(配列番号 799)	183
WIyWL D5-12.2.1	(配列番号 800)	184
GYSYG D5-12.3.1	(配列番号 801)	185
DIVAT D5-12.1.2	(配列番号 808)	186
IyWLR D5-12.2.2	(配列番号 809)	187
YSGYD D5-12.3.2	(配列番号 810)	188
IVATI D5-12.1.3	(配列番号 817)	189
yWLRL D5-12.2.3	(配列番号 818)	190
SGYDY D5-12.3.3	(配列番号 819)	191
VEMAT D5-24.1.1	(配列番号 826)	192
yRWLQ D5-24.2.1	(配列番号 827)	193
RDGYN D5-24.3.1	(配列番号 828)	194
EMATI D5-24.1.2	(配列番号 835)	195

【 0 2 1 4 】

【表 4 3】

RWLQL D5-24.2.2	(配列番号 836)	196
DGYNY D5-24.3.2	(配列番号 837)	197
EYSSS D6-6.1.1	(配列番号 844)	198
SIAAR D6-6.2.1	(配列番号 845)	199
VyQLV D6-6.3.1	(配列番号 846)	200
YSSSS D6-6.1.2	(配列番号 851)	201
GYSSS D6-13.1.1	(配列番号 856)	202
GIAAA D6-13.2.1	(配列番号 857)	203
VyQQL D6-13.3.1	(配列番号 858)	204
YSSSW D6-13.1.2	(配列番号 864)	205
IAAAG D6-13.2.2	(配列番号 865)	206
yQQLV D6-13.3.2	(配列番号 866)	207
SSSWY D6-13.1.3	(配列番号 871)	208
GYSSG D6-19.1.1	(配列番号 875)	209
GIAVA D6-19.2.1	(配列番号 876)	210
VyQWL D6-19.3.1	(配列番号 877)	211
YSSGW D6-19.1.2	(配列番号 884)	212
IAVAG D6-19.2.2	(配列番号 885)	213
yQWL V D6-19.3.2	(配列番号 886)	214
SSGWY D6-19.1.3	(配列番号 891)	215

表14:ヒトDセグメントから抽出可能な全六量体

GIVGAT D1-26.1.1	(配列番号 282)	1
VyWELL D1-26.2.1	(配列番号 283)	2
YSGSYY D1-26.3.1	(配列番号 284)	3
RILyyY D2-2.1.1	(配列番号 300)	4
GYCSST D2-2.2.1	(配列番号 301)	5
DIVVVP D2-2.3.1	(配列番号 302)	6
ILyyYQ D2-2.1.2	(配列番号 309)	7
YCSSTS D2-2.2.2	(配列番号 310)	8
IVVPPA D2-2.3.2	(配列番号 311)	9
LyyyQL D2-2.1.3	(配列番号 318)	10
CSSTSC D2-2.2.3	(配列番号 319)	11
VVVPAA D2-2.3.3	(配列番号 320)	12
yyYQLL D2-2.1.4	(配列番号 327)	13
SSTSCY D2-2.2.4	(配列番号 328)	14
VVPAAI D2-2.3.4	(配列番号 329)	15
yYQLLY D2-2.1.5	(配列番号 336)	16
STSCYT D2-2.2.5	(配列番号 337)	17
RILYyW D2-8.1.1	(配列番号 351)	18
GYCTNG D2-8.2.1	(配列番号 352)	19
DIVLMV D2-8.3.1	(配列番号 353)	20
ILYyWC D2-8.1.2	(配列番号 360)	21
YCTNGV D2-8.2.2	(配列番号 361)	22
IVLMVY D2-8.3.2	(配列番号 362)	23
LYyWCM D2-8.1.3	(配列番号 369)	24
CTNGVC D2-8.2.3	(配列番号 370)	25
VLMVYA D2-8.3.3	(配列番号 371)	26
YyWCML D2-8.1.4	(配列番号 378)	27
TNGVCY D2-8.2.4	(配列番号 379)	28
LMVYAI D2-8.3.4	(配列番号 380)	29
yWCMLY D2-8.1.5	(配列番号 387)	30
NGVCYT D2-8.2.5	(配列番号 388)	31
RILyWW D2-15.1.1	(配列番号 398)	32
GYCSGG D2-15.2.1	(配列番号 399)	33
DIVVVV D2-15.3.1	(配列番号 400)	34

【 0 2 1 5 】

【表 4 4】

ILyWWy	D2-15.1.2	(配列番号 406)	35
YCSGGS	D2-15.2.2	(配列番号 407)	36
IVVVVA	D2-15.3.2	(配列番号 408)	37
LyWWyL	D2-15.1.3	(配列番号 415)	38
CSGGSC	D2-15.2.3	(配列番号 416)	39
VVVVAA	D2-15.3.3	(配列番号 417)	40
yWWyLL	D2-15.1.4	(配列番号 424)	41
SGGSCY	D2-15.2.4	(配列番号 425)	42
VVVAAT	D2-15.3.4	(配列番号 426)	43
WWyLLL	D2-15.1.5	(配列番号 433)	44
GGSCYS	D2-15.2.5	(配列番号 434)	45
SILWWw	D2-21.1.1	(配列番号 448)	46
AYCGGD	D2-21.2.1	(配列番号 449)	47
HIVVVT	D2-21.3.1	(配列番号 450)	48
ILWWwL	D2-21.1.2	(配列番号 456)	49
YCGGDC	D2-21.2.2	(配列番号 457)	50
IVVVTA	D2-21.3.2	(配列番号 458)	51
LWWwLL	D2-21.1.3	(配列番号 465)	52
CGGDCY	D2-21.2.3	(配列番号 466)	53
VVVTAI	D2-21.3.3	(配列番号 467)	54
WWwLLF	D2-21.1.4	(配列番号 474)	55
GGDCYS	D2-21.2.4	(配列番号 475)	56
VLRFLF	D3-3.1.1	(配列番号 489)	57
YYDFWS	D3-3.2.1	(配列番号 490)	58
ITIFGV	D3-3.3.1	(配列番号 491)	59
LRFLEW	D3-3.1.2	(配列番号 498)	60
YDFWSG	D3-3.2.2	(配列番号 499)	61
TIFGVV	D3-3.3.2	(配列番号 500)	62
RFLEWL	D3-3.1.3	(配列番号 507)	63
DFWSGY	D3-3.2.3	(配列番号 508)	64
IFGVVI	D3-3.3.3	(配列番号 509)	65
FLEWLL	D3-3.1.4	(配列番号 516)	66
FWSGYY	D3-3.2.4	(配列番号 517)	67
FGVVII	D3-3.3.4	(配列番号 518)	68
LEWLLY	D3-3.1.5	(配列番号 525)	69
WSGYT	D3-3.2.5	(配列番号 526)	70
VLRyFD	D3-9.1.1	(配列番号 539)	71
YYDILT	D3-9.2.1	(配列番号 540)	72
ITIFyL	D3-9.3.1	(配列番号 541)	73
LRYFDW	D3-9.1.2	(配列番号 548)	74
YDILTG	D3-9.2.2	(配列番号 549)	75
TIFyLV	D3-9.3.2	(配列番号 550)	76
RYFDWL	D3-9.1.3	(配列番号 557)	77
DILTGy	D3-9.2.3	(配列番号 558)	78
IFyLVI	D3-9.3.3	(配列番号 559)	79
YFDWLL	D3-9.1.4	(配列番号 566)	80
ILTGYY	D3-9.2.4	(配列番号 567)	81
FyLVII	D3-9.3.4	(配列番号 568)	82
FDWLLy	D3-9.1.5	(配列番号 575)	83
LTGYYN	D3-9.2.5	(配列番号 576)	84
VLLWFG	D3-10.1.1	(配列番号 590)	85
YYYGSG	D3-10.2.1	(配列番号 591)	86
ITMVRG	D3-10.3.1	(配列番号 592)	87
LLWFGE	D3-10.1.2	(配列番号 599)	88
YYGSGS	D3-10.2.2	(配列番号 600)	89
TMVRGV	D3-10.3.2	(配列番号 601)	90
LWFGEL	D3-10.1.3	(配列番号 608)	91

【 0 2 1 6 】

【表 4 5】

YGSYSY	D3-10.2.3	(配列番号 609)	92
MVRGVI	D3-10.3.3	(配列番号 610)	93
WFGELL	D3-10.1.4	(配列番号 617)	94
GSGSYI	D3-10.2.4	(配列番号 618)	95
VRGVII	D3-10.3.4	(配列番号 619)	96
FGELLY	D3-10.1.5	(配列番号 624)	97
SGSYYN	D3-10.2.5	(配列番号 625)	98
VLWLRL	D3-16.1.1	(配列番号 638)	99
YYDYVW	D3-16.2.1	(配列番号 639)	100
IMITFG	D3-16.3.1	(配列番号 640)	101
LWLRLG	D3-16.1.2	(配列番号 647)	102
YDYVWG	D3-16.2.2	(配列番号 648)	103
MITFGG	D3-16.3.2	(配列番号 649)	104
wLRLGE	D3-16.1.3	(配列番号 656)	105
DYVWGS	D3-16.2.3	(配列番号 657)	106
ITFGGV	D3-16.3.3	(配列番号 658)	107
LRLGEL	D3-16.1.4	(配列番号 665)	108
YVWGSY	D3-16.2.4	(配列番号 666)	109
TFGGVI	D3-16.3.4	(配列番号 667)	110
RLGELS	D3-16.1.5	(配列番号 674)	111
VWGSYR	D3-16.2.5	(配列番号 675)	112
FGGVIV	D3-16.3.5	(配列番号 676)	113
LGELSL	D3-16.1.6	(配列番号 683)	114
WGSYRY	D3-16.2.6	(配列番号 684)	115
GGVIVI	D3-16.3.6	(配列番号 685)	116
GELSLY	D3-16.1.7	(配列番号 692)	117
GSYRYT	D3-16.2.7	(配列番号 693)	118
VLLWyy	D3-22.1.1	(配列番号 707)	119
YYDSS	D3-22.2.1	(配列番号 708)	120
ITMIVV	D3-22.3.1	(配列番号 709)	121
LLWyyW	D3-22.1.2	(配列番号 716)	122
YDSSG	D3-22.2.2	(配列番号 717)	123
TMIVVV	D3-22.3.2	(配列番号 718)	124
LWyyWL	D3-22.1.3	(配列番号 725)	125
YDSSGY	D3-22.2.3	(配列番号 726)	126
MIVVVI	D3-22.3.3	(配列番号 727)	127
wyyWLL	D3-22.1.4	(配列番号 733)	128
DSSGYI	D3-22.2.4	(配列番号 734)	129
IVVVIT	D3-22.3.4	(配列番号 735)	130
yyWLLL	D3-22.1.5	(配列番号 742)	131
SSGYIY	D3-22.2.5	(配列番号 743)	132
wLRWYL	D4-23.1.1	(配列番号 769)	133
DYGGNS	D4-23.2.1	(配列番号 770)	134
VDTAMV	D5-5.1.1	(配列番号 784)	135
WIQLWL	D5-5.2.1	(配列番号 785)	136
GYSYGY	D5-5.3.1	(配列番号 786)	137
VDIVAT	D5-12.1.1	(配列番号 802)	138
WIyWLR	D5-12.2.1	(配列番号 803)	139
GYSYGD	D5-12.3.1	(配列番号 804)	140
DIVATI	D5-12.1.2	(配列番号 811)	141
IyWLRL	D5-12.2.2	(配列番号 812)	142
YSGYDY	D5-12.3.2	(配列番号 813)	143
VEMATI	D5-24.1.1	(配列番号 829)	144
yRWLQL	D5-24.2.1	(配列番号 830)	145
RDGYNY	D5-24.3.1	(配列番号 831)	146
EYSSSS	D6-6.1.1	(配列番号 847)	147
GYSSSW	D6-13.1.1	(配列番号 859)	148

【 0 2 1 7 】

【表 4 6】

GIAAAG	D6-13.2.1	(配列番号 860)	149
VyQQLV	D6-13.3.1	(配列番号 861)	150
YSSSWY	D6-13.1.2	(配列番号 867)	151
GYSSGW	D6-19.1.1	(配列番号 878)	152
GIAVAG	D6-19.2.1	(配列番号 879)	153
VyQWLv	D6-19.3.1	(配列番号 880)	154
YSSGWY	D6-19.1.2	(配列番号 887)	155

(実施例 3)

長さ 6 ~ 20 の C D R 3

Dセグメントの合成HC CDR3への挿入は、より高い安定性およびより低い免疫原性をもたらす。ライブラリは、VHを、Dセグメントに接合された、ある長さの任意選択のフィラー、任意選択の第2のフィラーおよびJHに接合することによって、アミノ酸レベルで設計される。長さ6または8のライブラリのために、完全長JHが、VHおよび短いフィラーに続いてよい。表77は、FAB-310またはFAB-410から、1つの標的または別の標的への結合に関して選択された、1419のAbのサンプリングにおけるDセグメントの頻度を示す。サンプルにおいて、1099のAbは、検出可能なDセグメントを有さなかった（すなわち、70%未満の一致）。Dセグメントを使用する場合、DセグメントのD1-1.3、D1-26.3、D2-2.2、D2-8.2、D2-15.2、D2-21.2、D3-16.2、D3-22.2、D3-3.2、D3-9.1、D3-9.2、D3-10.2、D3-16.2、D4-4.2、D4-4.3、D4-11.2、D4-4.2、D4-17.2、D4-23.2、D5-5.3、D5-12.3、D5-18.3、D6-6.1、D6-6.2、D6-13.1、D6-13.2、D6-19.1、D6-19.2およびD7-27.1が好ましい。

【0218】

親アミノ酸配列が設計されたら、それを、いくつかの方法：エラープローンPCR、wobblingおよびdobblingで多様化できる。表14は、ヒトD領域に由来できる多数の六量体を示す。一実施形態において、システイン残基を含有する六量体は除外する。一実施形態において、終止を含有するD領域の断片は除外する。一実施形態において、D領域に見出される任意のTAGコドンを、TCG、TTG、TGG、CAG、AAG、TATおよびGAGを含むセットから選別されたコドンで置き換える。一実施形態において、D領域に見出される任意のTAAコドンを、TCA、TTA、CAA、AAA、TATおよびGAAを含むセットから選別されたコドンで置き換える。一実施形態において、D領域の任意のTGAを、TGG、TCA、TTA、AGAおよびGGAを含むセットから選別されたコドンで置き換える。

【0219】

表21は、6から20アミノ酸のCDR3に対する、例示的な親アミノ酸配列を示す。これらの親配列は、HC CDR1およびCDR2における多様性と組み合わせ、ライブラリを形成することができる。CDR3領域が、例えば、CDR3のwobbling、dobblingまたはエラープローンPCRにより多様化された場合、有用性が改善される可能性が高い。表21において、配列6aは、全JH1と接合する3-23由来のVH末端を含む。配列6bは、3-23の末端と接合し、Yと接合し、D4-17(RF2)と接合するJH1のFR4領域を含有する。配列6cは、3-23の末端、続いてD5-5(RF3)、続いてJH1のFR4部分を含有する。配列6dは、3-23の末端と接合し、SYと接合する全JH4を含有する。表21は、CDR3のwobblingに適切と思われるdopingのレベルを示し、他のレベルも同様に許容される。他のD領域またはD領域の断片も許容される。他のJH配列も許容される。

【0220】

【表 4 7】

表21: 6~20AAのHC CDR3に対する親アミノ酸配列

長さ	親配列	doping のレベル	解説	配列番号
6a	yycaAEYFQHwgqgtlvtvss	70:10:10:10	JH1(全体)	226
6b	yycaKYDYGDYwgqgtlvtvss	70:10:10:10	JH1 の Y:D4-17(2)::FR4	227
6c	yycaKGSYGYwgqgtlvtvss	70:10:10:10	JH1 の D5-5(3)::FR4	228
6d	yycaKSYFDYwgqgtlvtvss	70:10:10:10	SY::JH4(全体)	229
8a	yycaKYAEYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	YY::JH1(全体)	230
8b	yycaKGYSSSWYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の Y:D6-13(1)::FR4	231
8c	yycaKYGDYFDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	D4-17(2)[2-5]::JH4(全体)	232
10a	yycaKYDSSGYGYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D3-22(2)::Fr4	233
10b	yycaKGYcSSTScYTwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D2-2(2)::Fr4	234
10c	yycaKYSSAEYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	YYSS::JH1(全体) (配列番号 942)	235
10d	yycaKGSYGYFDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	D5-5(3)::JH4(全体)	236
12a	yycaKYDSSGYGYQHwgqgtlvtvss	85:5:5:5	JH1 の D3-22(2)::QH::Fr4	237
12b	yycaKGYcSSTScYTQHwgqgtlvtvss	85:5:5:5	JH1 の D2-2(2)::QH::Fr4	238
12c	yycaKYDGSYSAEYFQHwgqgtlvtvss	85:5:5:5	YDGSYS::JH1(全体) (配列番号 943)	239
12d	yycaKYDYVWGSYRYTWgqgtlvtvss	85:5:5:5	JH1 の D3-16(2)::Fr	240
12e	yycaKGSYGYWYFDLwgrgtlvtvss	85:5:5:5	D5-5(3)::JH2(全体)	241
14a	yycaKYDSSGYGYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D3-22(2)::YFQH::Fr (配列番号 944)	242
14b	yycaKGYcSSTScYTYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D2-2(2)::YFQH::Fr (配列番号 944)	243
14c	yycaKSYGYcSSTScYTQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の SY::D2-2(2)::QH::Fr	244
14d	yycaKSYRYSGYSAEYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	SYRYSYGS::JH1(全体) (配列番号 945)	245
14e	yycaKAYcGGDcYSNWFDPWgqgtlvtvss	73:9:9:9	D2-21(2)::JH5(全体)	246
15a	yycaKSDGYDYDSSGYDYWgqgtlvtvss	73:9:9:9	SD:D3-22.2::JH4(101ff)	930
15b	yycaKGSYCGSGGSCYSFDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	GS:D2-15.2::JH4(100ff)	931
15c	yycaKGGRGYSYSGWYRAFDlwgggtmvtvss	73:9:9:9	GGR::D6-19.1::R::JH3(all)	932

【 0 2 2 1 】

【表 4 8】

16a	yycakYYDSSGYYAEYFQHwgqgtltvss	73:9:9:9	D3-22(2)::JH1(全体)	247
16b	yycakGYcSSTScYTAeyFQHwgqgtltvss	73:9:9:9	D2-2(2)::JH1(全体)	248
16c	yycakSYDSYRSYGSAeyFQHwgqgtltvss	73:9:9:9	SYDSYRSYGS::JH1(全体) (配列番号 946)	249
16d	yycakSYSYGYcSSTScYTQ Hwgqgtltvss	73:9:9:9	SYSY::D2-2(2)::QH::Fr JH1 (配列番号 947)	250
17a	yycakSRPGYSSSWYYYGMDVwgqgtltvss	73:9:9:9	SRP::6-13.1::JH6(-1Y)	933
18a	yycakGYCSGGSCYSYYYGMDVwgqgtltvss	73:9:9:9	2-15.2::JH6(-1Y)	221
18b	yycakDGYCSGGSCYSYYYGMDVwgqgtltvss	73:9:9:9	D::2-15.2::JH6(-2Ys)	222
19a	yycakDGYDYDSSGYYRGYYFDYwgqgtltvss	73:9:9:9	D::D3-22.2::RGY::JH4(all)	223
20a	yycakYSSYYYDSSGYYAEYFQHwgqgtltvss	73:9:9:9	YSSY::D3-22(2)::JH1(全体) (配列番号 948)	251
20b	yycakSYYSYGycSSTScYTAeyFQHwgqgtltvss	73:9:9:9	SYYS::D2-2(2)::JH1(全体) (配列番号 949)	252
20c	yycakSGYcSSTScYTYSAeyFQHwgqgtltvss	73:9:9:9	S::D2-2(2)::YYS::JH1(全体)	253
20d	yycakYYYYDYVWGSYRYTSNWFDPwgqgtltvss	73:9:9:9	Y::D3-16(2)::S::JH5(全体)	254
20e	yycakYYYYDYVWGSYRYTSSYFDYwgqgtltvss	73:9:9:9	Y::D3-16(2)::SS::JH4(全体)	255

【 0 2 2 2 2 】

【表 4 9】

表22:HCディスプレイカセット

表22に示すアミノ酸配列は配列番号892である。

表22に示すDNA配列は配列番号893である。

```

!           VH-CH1-IIIスタンプに対するシグナル
!           1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15
!           M   K   Y   L   L   P   T   A   A   A   G   L   L   L   L
! 946      atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc
!
!           16  17  18  19  20  21  22
!           A   A   Q   P   A   M   A
! 991      gcG GCC cag ccG GCC atg gcc
!           SfiI.....
!                   NgoMI... (1/2)
!                   NcoI....
!
! VH
!
!                               FR1 (DP47/V3-23) -----
!                               1   2   3   4   5   6   7   8
!                               E   V   Q   L   L   E   S   G
! 1012     gaa|ggt|CAA|TTG|tta|gag|tct|ggt|
!                               | MfeI |
!
! -----FR1-----
!           9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23
!           G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L   S   C   A
! 1036     |ggc|ggt|ctt|ggt|cag|cct|ggt|ggt|tct|tta|cgt|ctt|tct|tgc|gct|
!
! -----FR1----->|...CDR1.....|---FR2-----
!           24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38
!           A   S   G   F   T   F   S   S   Y   A   M   S   W   V   R
! 1081     |gct|TCC|GGA|ttc|act|ttc|tct|tCG|TAC|Gct|atg|tct|tgg|gtt|cgC|
!           | BspEI |                   | BsiWI |                   |BstXI.
!
! -----FR2----->|...CDR2.....
!           39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  52a
!           Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   A   I   S   G
! 1126     |CAa|gct|ccT|GGt|aaa|ggt|ttg|gag|tgg|gtt|tct|gct|atc|tct|ggt|
!           ...BstXI |
!
! .....CDR2.....|---FR3---
!           53  54  55  56  57  58  59  60  61  62  63  64  65  66  67
!           S   G   G   S   T   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
! 1171     |tct|ggt|ggc|agt|act|tac|tat|gct|gac|tcc|ggt|aaa|ggt|cgc|ttc|
!
! -----FR3-----
!           68  69  70  71  72  73  74  75  76  77  78  79  80  81  82
!           T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M
! 1216     |act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|
!           | XbaI |
!
! -----FR3----->|
!           82a 82b 82c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94

```

【 0 2 2 3】

【表 5 0】

```

!       N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   K
1261 |aac|agC|TTA|AGg|gct|gag|gac|aCT|GCA|Gtc|tac|tat|tgc|gct|aaa|
!       |AflIII|           |PstI|(2/2)
!
!       .....CDR3.....|----FR4-----
!       95 96 97 98 98a 98b 98c 99 100 101 102 103 104 105 106
!       D   Y   E   G   T   G   Y   A   F   D   I   W   G   Q   G
1306 |gac|tat|gaa|ggt|act|ggt|tat|gct|ttc|gaC|ATA|TGg|ggt|caa|ggt|
!       |NdeI|
!
!       -----FR4----->|
!       107 108 109 110 111 112 113
!       T   M   V   T   V   S   S
1351 |act|atG|GTC|ACC|gtc|tct|agt
!       |BstEII| c tcg ag = XhoI.
!
! CH1
!
!       A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P   S   S
1372 |gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccG CTA GCa ccc tcc tcc
!       |NheI....
!
!       151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
!       K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C   L   V   K
1417 |aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag
!
!       166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
!       D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S   G   A
1462 |gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc
!
!       181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
!       L   T   S   G   V   H   T   F   P   A   V   L   Q   S   S
1507 |ctg acc agc ggc gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca
!
!       196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
!       G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P   S   S   S
1552 |gga ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc gtg ccc tCC Agc agc
!       |BstXI.....
!
!       211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
!       L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H   K   P   S
1597 |tTG Ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc
!       |BstXI.....
!
!       226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238
!       N   T   K   V   D   K   K   V   E   P   K   S   C
1642 |aac acc aag gtg gac aaG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT
!
!       139 140 141 His tag..... cMyc tag.....
!       A   A   A   H   H   H   H   H   H   G   A   A   E   Q   K   L   I
1681 |GCG GCC GCa cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca gaa caa aaa ctc atc
!       |NotI.....
!       |EagI....
!
!       .....
!       S   E   E   D   L   N   G   A   A   E   A   S   S   A   S   N   A   S
1732 |tca gaa gag gat ctg aat ggg GCC gca gaG GCt agt tct gct agt aAC GCG Tct

```

【 0 2 2 4】

```

!                               BglI.....(3/4)                               MluI....
!
! ドメイン3 (IIIスタンプ)
! -----
!       S   G   D   F   D   Y   E   K   M   A   N   A   N   K   G   A
! 1786 tcc ggt gat ttt gat tat gaa aag atg gca aac gct aat aag ggg gct
!
!       M   T   E   N   A   D   E   N   A   L   Q   S   D   A   K   G
! 1834 atg acc gaa aat gcc gat gaa aac gcg cta cag tct gac gct aaa ggc
!
!       K   L   D   S   V   A   T   D   Y   G   A   A   I   D   G   F
! 1882 aaa ctt gat tct gtc gct act gat tac ggt gct gct atc gat ggt ttc
!
!       I   G   D   V   S   G   L   A   N   G   N   G   A   T   G   D
! 1930 att ggt gac gtt tcc ggc ctt gct aat ggt aat ggt gct act ggt gat
!
!       F   A   G   S   N   S   Q   M   A   Q   V   G   D   G   D   N
! 1978 ttt gct ggc tct aat tcc caa atg gct caa gtc ggt gac ggt gat aat
!
!       S   P   L   M   N   N   F   R   Q   Y   L   P   S   L   P   Q
! 2026 tca cct tta atg aat aat ttc cgt caa tat tta cct tcc ctc cct caa
!
!       S   V   E   C   R   P   F   V   F   G   A   G   K   P   Y   E
! 2074 tcg gtt gaa tgt cgc cct ttt gtc ttt ggc gct ggt aaa cca tat gaa
!
!       F   S   I   D   C   D   K   I   N   L   F   R
! 2122 ttt tct att gat tgt gac aaa ata aac tta ttc cgt
!                                     ドメイン3末端
!
!       G   V   F   A   F   L   L   Y   V   A   T   F   M   Y   V   F140
! 2158 ggt gtc ttt gcg ttt ctt tta tat gtt gcc acc ttt atg tat gta ttt
! 膜貫通セグメント開始
!
!       S   T   F   A   N   I   L
! 2206 tct acg ttt gct aac ata ctg
!
!       R   N   K   E   S   (   配列番号 892)
! 2227 cgt aat aag gag tct TAA   tga aAC GCG Tga tga GAATTC (   配列番号 893)
! 細胞内アンカー.                               MluI....                               EcoRI.

```

DY3F85LCのDNAは配列番号 950である。

【 0 2 2 5 】

【表 5 2】

481	TTTGAGGGGG	ATTCAATGAA	TATTTATGAC	GATTCCGCAG	TATTGGACGC	TATCCAGTCT
541	AAACATTTTA	CTATTACCCC	CTCTGGCAAA	ACTTCTTTTG	CAAAAGCCTC	TCGCTATTTT
601	GGTTTTTTATC	GTCGCTGGT	AAACGAGGGT	TATGATAGTG	TTGCTCTTAC	TATGCCCTCGT
661	AATTCCTTTT	GGCGTTATGT	ATCTGCATTA	GTTGAATGTG	GTATTCCTAA	ATCTCAACTG
721	ATGAATCTTT	CTACCTGTAA	TAATGTTGTT	CCGTTAGTTC	GTTTTATTAA	CGTAGATTTT
781	TCTTCCCAAC	GTCCTGACTG	GTATAATGAG	CCAGTTCTTA	AAATCGCATA	AGGTAATTCA
841	CAATGATTAA	AGTTGAAATT	AAACCATCTC	AAGCCCAATT	TACTACTCGT	TCTGGTGTTC
901	CTCGTCAGGG	CAAGCCTTAT	TCACTGAATG	AGCAGCTTTG	TTACGTTGAT	TTGGGTAATG
961	AATATCCGGT	TCTTGTCAGG	ATTACTCTTG	ATGAAGGTCA	GCCAGCCTAT	GCGCCTGGTC
1021	TGTACACCGT	TCATCTGTCC	TCTTTCAAAG	TTGGTCAGTT	CGGTTCCCTT	ATGATTGACC
1081	GTCTGCGCCT	CGTTCCGGCT	AAGTAACATG	GAGCAGGTG	CGGATTTCTG	CACAATTTAT
1141	CAGGCGATGA	TACAAATCTC	CGTTGTACTT	TGTTTCGCGC	TTGGTATAAT	CGCTGGGGGT
1201	CAAAGATGAG	TGTTTTAGTG	TATTCCTTTG	CCTCTTTCGT	TTTAGGTTGG	TGCCTTCGTA
1261	GTGGCATTAC	GTATTTTACC	CGTTTAAATG	AAACTTCCTC	ATGAAAAAGT	CTTTAGTCTT
1321	CAAAGCCTCT	GTAGCCGTTG	CTACCCTCGT	TCCGATGCTG	TCTTCGCTG	CTGAGGGTGA
1381	CGATCCCGCA	AAAGCGGCCT	TTAACTCCCT	GCAAGCCTCA	GCGACCGAAT	ATATCGGTTA
1441	TGCGTGGGCG	ATGGTTGTTG	TCATTGTCCG	CGCAACTATC	GGTATCAAGC	TGTTTAAAGAA
1501	ATTACCTCG	AAAGCAAGCT	GATAAACCGA	TACAATTAAA	GGCTCCTTTT	GGAGCCTTTT
1561	TTTTGGAGAT	TTTCAACGTG	AAAAAATTAT	TATTCGCAAT	TCCTTTAGTT	GTTCTTTTCT
1621	ATTCTCACCTC	CGCTGAAACT	GTTGAAAGTT	GTTTAGCAAA	ATCCCATACA	GAAAAATCAT
1681	TTACTAACGT	CTGGAAGAC	GACAAAACCT	TAGATCGTTA	CGCTAACTAT	GAGGGCTGTC
1741	TGTGGAATGC	TACAGGCGTT	GTAGTTTGTA	CTGGTGACGA	AACTCAGTGT	TACGGTACAT
1801	GGGTTCCCTAT	TGGGCTTGCT	ATCCCTGAAA	ATGAGGGTGG	TGGCTCTGAG	GGTGGCGGTT
1861	CTGAGGGTGG	CGGTTCTGAG	GGTGGCGGTA	CTAAACCTCC	TGAGTACGGT	GATACACCTA
1921	TTCCGGGGCTA	TACTTATATC	AACCCTCTCG	ACGGCACTTA	TCCGCTGGT	ACTGAGCAAA
1981	ACCCCGCTAA	TCCTAATCCT	TCTCTTGAGG	AGTCTCAGCC	TCTTAATACT	TTCATGTTTC
2041	AGAATAATAG	GTTCCGAAAT	AGGCAGGGGG	CATTAACGTG	TTATACGGGC	ACTGTTACTC
2101	AAGGCACTGA	CCCCGTAAAA	ACTTATTACC	AGTACACTCC	TGTATCATCA	AAAGCCTAGT
2161	ATGACGCTTA	CTGGAACGGT	AAATTCAGAG	ACTGCGCTTT	CCATTCTGGC	TTTAATGAGG
2221	ATTTATTTGT	TTGTGAATAT	CAAGGCCAAT	CGTCTGACCT	GCCTCAACCT	CCTGTCAATG
2281	CTGGCGGCGG	CTCTGGTGGT	GGTCTGTTG	GCGGCTCTGA	GGGTGGTGGC	TCTGAGGGTG
2341	GCGGTTCTGA	GGGTGGCGGC	TCTGAGGGAG	GCGGTTCCGG	TGGTGGCTCT	GGTTCGGGTG
2401	ATTTTGATTA	TGAAAAGATG	GCAAAACGCTA	ATAAGGGGGC	TATGACCGAA	AATGCCGATG
2461	AAAACGCGCT	ACAGTCTGAC	GCTAAAGGCA	AACTTGATTG	TGTCGCTACT	GATTACGGTG
2521	CTGCTATCGA	TGGTTTCATT	GGTGACGTTT	CCGGCCTTGC	TAATGGTAAT	GGTGCTACTG
2581	GTGATTTTGC	TGGCTCTAAT	TCCCAAATGG	CTCAAGTCGG	TGACGGTGAT	AATTACCTT
2641	TAATGAATAA	TTTCCGTCAA	TATTTACCTT	CCCTCCCTCA	ATCGGTTGAA	TGTCGCCCTT
2701	TTGTCTTTGG	CGCTGGTAAA	CCATATGAAT	TTTCTATTGA	TTGTGACAAA	ATAAACTTAT
2761	TCCGTGGTGT	CTTTGCGTTT	CTTTTATATG	TTGCCACCTT	TATGTATGTA	TTTTCTACGT
2821	TTGCTAACAT	ACTGCGTAAT	AAGGAGTCTT	AATCATGCCA	GTCTTTTGG	GTATTCGGTT
2881	ATTATTGCGT	TTCTCGGTT	TCCTTCTGGT	AACTTTGTTC	GGCTATCTGC	TTACTTTTCT
2941	TAAAAAGGGC	TTCGGTAAGA	TAGCTATTGC	TATTTTCATTG	TTTCTTGCTC	TTATTATTGG
3001	GCTTAACTCA	ATTCTTGTGG	GTTATCTCTC	TGATATTAGC	GCTCAATTAC	CCTCTGACTT
3061	TGTTTCAGGGT	GTTTCAGTTAA	TTCTCCCGTC	TAATGCGCTT	CCCTGTTTTT	ATGTTATTCT
3121	CTCTGTAAAG	GCTGCTATTT	TCATTTTTTGA	CGTTAAACAA	AAAATCGTTT	CTTATTTGGA
3181	TTGGGATAAA	TAATATGGCT	GTTTATTTTG	TAAGTGGCAA	ATTAGGCTCT	GGAAAGACGC
3241	TCGTTAGCGT	TGGTAAGATT	CAGGATAAAA	TTGTAGCTGG	GTGCAAAATA	GCAACTAATC
3301	TTGATTTAAG	GCTTCAAAAC	CTCCCGCAAG	TCGGGAGGTT	CGCTAAAACG	CCTCGCGTTC
3361	TTAGAATACC	GGATAAGCCT	TCTATATCTG	ATTTGCTTGC	TATTGGGCGC	GGTAATGATT
3421	CCTACGATGA	AAATAAAAAAC	GGCTTGCTTG	TTCTCGATGA	GTGCGGTACT	TGGTTTAATA
3481	CCCGTTCTTG	GAATGATAAG	GAAAGACAGC	CGATTATTGA	TTGGTTTCTA	CATGCTCGTA
3541	AATTAGGATG	GGATATTATT	TTTCTTGTTT	AGGACTTATC	TATTGTTGAT	AAACAGGCGC
3601	GTTCTGCATT	AGCTGAACAT	GTTGTTTATT	GTCGTCGTCT	GGACAGAATT	ACTTTACCTT
3661	TTGTCGGTAC	TTTATATTCT	CTTATTACTG	GCTCGAAAAT	GCCTCTGCCT	AAATTACATG
3721	TTGGCGTTGT	TAAATATGGC	GATTCTCAAT	TAAGCCCTAC	TGTTGAGCGT	TGGCTTTATA
3781	CTGGTAAGAA	TTTGTATAAC	GCATATGATA	CTAAACAGGC	TTTTTCTAGT	AATTATGATT
3841	CCGGIGTTTA	TTCTTATTTA	ACGCCTTATT	TATCACACGG	TCGGTATTTT	AAACCATTAA

【 0 2 2 6 】

【表 5 3】

3901	ATTTAGGTCA	GAAGATGAAA	TTAACTAAAA	TATATTTGAA	AAAGTTTTCT	CGCGTTCTTT
3961	GTCTTGCGAT	TGGATTTGCA	TCAGCATTTA	CATATAGTTA	TATAACCCAA	CCTAAGCCGG
4021	AGGTTAAAAA	GGTAGTCTCT	CAGACCTATG	ATTTTGATAA	ATTCACTATT	GACTCTTCTC
4081	AGCGTCTTAA	TCTAAGCTAT	CGCTATGTTT	TCAAGGATTC	TAAGGGAAAA	TTAATTAATA
4141	GCGACGATTT	ACAGAAGCAA	GGTTATTTCAC	TCACATATAT	TGATTTATGT	ACTGTTTCCA
4201	TTAAAAAAGG	TAATTCAAAT	GAAATTGTTA	AATGTAAATTA	ATTTTGTTTT	CTTGATGTTT
4261	GTTTCATCAT	CTTCTTTTGC	TCAGGTAATT	GAAATGAATA	ATTGCGCTCT	GCGCGATTTT
4321	GTAACCTGGT	ATTCAAAGCA	ATCAGGCGAA	TCCGTTATTG	TTTCTCCCGA	TGTAAAAGGT
4381	ACTGTTACTG	TATATTCATC	TGACGTTAAA	CCTGAAAAATC	TACGCAATTT	CTTTATTTCT
4441	GTTTTACGTG	CAAATAATTT	TGATATGGTA	GGTTCTAACC	CTTCCATAAT	TCAGAAGTAT
4501	AATCCAAACA	ATCAGGATTA	TATTGATGAA	TGCCATCAT	CTGATAATCA	GGAATATGAT
4561	GATAATTCCG	CTCCTTCTGG	TGGTTTCTTT	GTTCCGCAAA	ATGATAATGT	TACTCAAAC
4621	TTTAAAATTA	ATAACGTTTC	GGCAAAGGAT	TTAATACGAG	TTGTGCAATT	GTTTGTAAG
4681	TCTAATACTT	CTAAATCCTC	AAATGTATTA	TCTATTGACG	GCTCTAATCT	ATTAGTTGTT
4741	AGTGCTCCTA	AAGATATTTT	AGATAACCTT	CCTCAATTCC	TTTCAACTGT	TGATTTGCCA
4801	ACTGACCAGA	TATTGATTGA	GGGTTTGATA	TTTGAGGTTT	AGCAAGGTGA	TGCTTTAGAT
4861	TTTTCATTTG	CTGCTGGCTC	TCACGCTGGC	ACTGTTGCAG	GCGGTGTTAA	TACTGACCGC
4921	CTCACCTCTG	TTTTATCTTC	TGCTGGTGGT	TCGTTCCGTA	TTTTTAATGG	CGATGTTTTA
4981	GGGCTATCAG	TTGCGCATT	AAAGACTAAT	AGCCATTCAA	AAATATTGTC	TGTGCCACGT
5041	ATTCTTACGC	TTTCAGGTCA	GAAGGGTTCT	ATCTCTGTTG	GCCAGAATGT	CCCTTTTATT
5101	ACTGGTCGTG	TGACTGGTGA	ATCTGCCAAT	GTAATAATC	CATTTCAGAC	GATTGACCGT
5161	CAAAATGTAG	GTATTTCCAT	GAGCGTTTTT	CCTGTTGCAA	TGGCTGGCGG	TAATATTGTT
5221	CTGGATATTA	CCAGCAAGGC	CGATAGTTTG	AGTTCCTCTA	CTCAGGCAAG	TGATGTTATT
5281	ACTAATCAAA	GAAGTATTGC	TACAACGGTT	AATTTGCGTG	ATGGACAGAC	TCTTTTACTC
5341	GGTGGCCTCA	CTGATTATAA	AAACACTTCT	CAGGATTCTG	GCGTACCGTT	CCTGTCTAAA
5401	ATCCCTTTAA	TCGGCCTCCT	GTTTAGCTCC	CGCTCTGATT	CTAACGAGGA	AAGCACGTTA
5461	TACGTGCTCG	TCAAAGCAAC	CATAGTACGC	GCCCTGTAGC	GGCGCATTAA	GCGCGGCGGG
5521	TGTGGTGGTT	ACGCGCAGCG	TGACCCTAC	ACTTGCCAGC	GCCCTAGCGC	CCGCTCCTTT
5581	CGCTTTCTTC	CCTTCCTTTC	TCGCCACGTT	CGCCGGCTTT	CCCGTCAAG	CTCTAAATCG
5641	GGGGCTCCCT	TTAGGGTTCC	GATTTAGTGC	TTTACGGCAC	CTCGACCCCA	AAAACTTGA
5701	TTTGGGTGAT	GGTTCACGTA	GTGGGCCATC	GCCCTGATAG	ACGGTTTTTC	GCCCTTTGAC
5761	GTTGGAGTCC	ACGTTCTTTA	ATAGTGGACT	CTTGTTCCAA	ACTGGAACAA	CACTCAACCC
5821	TATCTCGGGC	TATTCTTTTG	ATTTATAAGG	GATTTTGCCG	ATTTGGAAC	CACCATCAAA
5881	CAGGATTTTC	GCCTGCTGGG	GCAAACCAGC	GTGGACCCTG	TGCTGCAACT	CTCTCAGGGC
5941	CAGGCGGTGA	AGGGCAATCA	GCTGTGCCCC	GTCTCACTGG	TGAAAAGAAA	AACCACCTGT
6001	GATCCCAAGT	TGCAGGTGGC	ACTTTTCGGG	GAAATGTGCG	CGGAACCCCT	ATTTGTTTAT
6061	TTTTCTAAAT	ACATTCAAAT	ATGTATCCGC	TCATGAGACA	ATAACCCTGA	TAAATGCTTC
6121	AATAATATTG	AAAAAGGAAG	AGTATGAGTA	TTCAACATTT	CCGTGTCGCC	CTTATTCCCT
6181	TTTTTGCGGC	ATTTTGCCCT	CCTGTTTTTG	CTCACCCAGA	AACGCTGGTG	AAAGTAAAAG
6241	ATGCTGAAGA	TCAGTTGGGC	GCACTAGTGG	GTTACATCGA	ACTGGATCTC	AACAGCGGTA
6301	AGATCCTTGA	GAGTTTTTCG	CCCGAAGAAC	GTTTTCCAAT	GATGAGCACT	TTTAAAGTTC
6361	TGCTATGTGG	CGCGGTATTA	TCCCGTATTG	ACGCCGGGCA	AGAGCAACTC	GGTCGCCGCA
6421	TACACTATTC	TCAGAAATGAC	TTGGTTGAGT	ACTCACCACT	CACAGAAAAG	CATCTTACGG
6481	ATGGCATGAC	AGTAAGAGAA	TTATGCAGTG	CTGCCATAAC	CATGAGTGAT	AACACTGCGG
6541	CCAACTTACT	TCTGACAACG	ATCGGAGGAC	CGAAGGAGCT	AACCGCTTTT	TTGCACAACA
6601	TGGGGGATCA	TGTAACCTCG	CTTGATCGTT	GGGAACCGGA	GCTGAATGAA	GCCATACCAA
6661	ACGACGAGCG	TGACACCACG	ATGCCTGTAG	CAATGGCAAC	AACGTTGCGC	AAACTATTAA
6721	CTGGCGAACT	ACTTACTCTA	GCTTCCCAGC	AACAATTAAT	AGACTGGATG	GAGGCGGATA
6781	AAGTTGCAGG	ACCACTTCTG	CGCTCGGCCC	TTCCGGCTGG	CTGGTTTATT	GCTGATAAAT
6841	CTGGAGCCGG	TGAGCGTGGG	TCTCGCGGTA	TCATTGCAGC	ACTGGGGCCA	GATGGTAAGC
6901	CCTCCCGTAT	CGTAGTTATC	TACACGACGG	GGAGTCAGGC	AACTATGGAT	GAACGAAATA
6961	GACAGATCGC	TGAGATAGGT	GCCTCACTGA	TTAAGCATTG	GTAAGTGTCA	GACCAAGTTT
7021	ACTCATATAT	ACTTTAGATT	GATTTAAATC	TTTATTTTAA	ATTTAAAGG	ATCTAGGTGA
7081	AGATCCCTTT	TGATAATCTG	ATGACCAAAA	TCCCTTAACG	TGAGTTTTCG	TTCCACTGTA
7141	CGTAAGACCC	CCAAGCTTGT	CGACTGAATG	GCGAATGGCG	CTTGCCCTGG	TTCCCGGCAC
7201	CAGAAGCGGT	GCCGGAAGC	TGGCTGGAGT	GCGATCTTCC	TGACGCTCGA	GCGCAACGCA

XhoI...

【 0 2 2 7 】

【表 5 4】

```

7261 ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT
7321 CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCACA CAGGAAACAG CTATGACCAT
7381 GATTACGCCA AGCTTTGGAG CCTTTTTTTC GGAGATTTC AAC

```

表30:DY3FHC87のDNA配列(配列番号894)

```

1 aatgctacta ctattagtag aattgatgcc accttttcag ctgcgcgcc aaatgaaaat
61 atagctaadc aggttattga ccatttgcca aatgtatcta atggtcacac taaatctact
121 cgttcgcaga attgggaatc aactgttata tggaatgaaa ctccagaca ccgtacttta
181 gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag cattatatc agcaattaag ctctaagcca
241 tccgcacaaa tgacctctta tcaaaaggag caattaaaag tactctctaa tccgtacctg
301 ttggagtttg ctccgggtct ggttcgcttt gaagctcgaa ttaaaacgag atatttgaag
361 tcttcggggc ttctctctaa tctttttgat gcaatccgct ttgctctcga ctataatagt
421 cagggtaaag acctgatttt tgatttatgg tcatctcgt tttctgaact gtttaaagca
481 tttagggggg attcaatgaa ttttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagctc
541 aaacatttta ctattacccc ctctggcaca acttcttttg caaaagcctc tcgctatttt
601 ggtttttatc gtcgtctggt aaacgagggt tatgatagt ttgctcttac tatgcctcgt
661 aattcctttt ggcgttatgt atctgcatta gttgaatgtg gtattcctaa atctcaactg
721 atgaatcttt ctacctgtaa taatgttgtt ccgttagttc gttttattaa cgtagatttt
781 tcttcccaac gtctcgactg gtataatgag ccagttctta aaatcgata aggtaatcca
841 caatgattaa agttgaaatt aaaccatctc aagcccaatt tactactcgt tctgggtttt
901 ctgctcaggg caagccttat tcaatgaatg agcagctttg ttacgttgat ttgggtaatg
961 aatattccgt tcttgtcaag attactcttg atgaaggtca gccagcctat gcgcctggtc
1021 tgtacaccgt tcatctgtcc tctttcaag ttggtcagtt cggttccctt atgattgacc
1081 gtctgcgcct cgttccggtc aagtaacatg gagcaggtcg cggatttcga cacaatttat
1141 caggcgatga tacaatctc cgttgactt tgtttcgcgc ttggtataat cgtcgggggt
1201 caaagatgag tgttttagtg tttcttttg cctctttcgt tttaggttg tgcttcgta
1261 gtggcattac gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtctc
1321 caaagcctct gtagccgttg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgtg ctgaggggtg
1381 cgattcccgca aaagcggtc ttaactccct gcaagcctca gcgacgaat atactcggtt
1441 tgcgtgggag atggttgttg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa
1501 attcacctcg aaagcaagct gataaaccca tacaattaaa ggctcctttt ggagcctttt
1561 tttttggaga ttttcaacgt gaaaaaatta ttattcgcaa tctcttagt tgttcctttc
1621 tattctcact ccgctgaaac tgttgaaagt tgtttagcaa aatcccatac agaaaattca
1681 tttactaacg tctgaaaaga cgacaaaact ttagatcgtt acgctaacta tgagggctgt
1741 ctgtggaatg ctacaggcgt tgtagtttgt actggtgacg aaactcagtg ttacggtaca
1801 tgggttccta ttgggtctgc tatccctgaa aatgaggttg gtggtctga ggggtggcgt
1861 tctgaggggt gcggttctga ggggtggcgt actaaacctc ctgagtacgg tgatacacct
1921 attccgggct atacttatat caacctctc gacggcactt atccgcctgg tactgagcaa
1981 aaccccgcta atoctaatcc ttctcttgag gagtctcagc ctcttaatac tttcatgttt
2041 cagaataata ggttccgaaa taggcagggt gcattaaactg tttatacggg cactgttact
2101 caaggcactg accccgttaa aacttattac cagtacactc ctgtatcatc aaaagccatg
2161 tatgacgctt actggaacgg taaattcaga gactgcgctt tccattctgg ctttaatgag
2221 gatttatttg tttgtgaata tcaaggccaa tcgtctgacc tgcccaacc tctgtcaat
2281 gctggcggtg gctctggttg tggttctggt ggcggtctg aggtggttg ctctgaggtg
2341 ggcggttctg aggttggtcg ctctgaggtg ggcggttccg gtggtggtc tgggtccggt
2401 gattttgatt atgaaaagat ggcaaacgct aat'aaggggg ctatgaccga aaatgccgat
2461 gaaaacgcgc tacagtctga cgtaaaggc aaacttgatt ctgtcgctac tgattacggt
2521 gctgctatcg atggtttcat tggtagcgtt tccggccttg ctaatggtaa tgggtctact
2581 ggtgattttg ctggctctaa ttcccaaatg gctcaagtcg gtgacggtga taattcacct
2641 ttaatgaata atttccgtca atatttacct tccctccctc aatcggttga atgtcgccct
2701 tttgtctttg gcgctggtaa accatatgaa ttttctattg attgtgacaa aataaactta
2761 ttccgtggtg tctttgcgtt tcttttatat gttgccacct ttatgtatgt attttctacg
2821 tttgtcaaca tactgcgtta taaggagctc taatcatgcc agttcttttg ggtattccgt
2881 tattattgct tttcctcggt ttctctctg taactttgtt cggctatctg cttacttttc
2941 ttaaaaaggg cttcggttaag atagctattg ctatttcatt gtttcttgct cttattattg

```

【 0 2 2 8 】

【表 5 5】

3001	ggcttaactc	aattcttctg	ggttatctct	ctgatattag	cgctcaatta	ccctctgact
3061	ttgttcaggg	tggttcagtta	attctcccgt	ctaattgcgt	tccctgtttt	tatgttattc
3121	tctctgtaaa	ggctgctatt	ttcatTTTTg	acgtttaaaca	aaaaatcggt	tcttattttg
3181	attgggataa	ataatatggc	tgtttatttt	gtaactggca	aattaggctc	tggaaagacg
3241	ctcgttagcg	ttggtaagat	tcaggataaa	attgtagctg	ggtgcaaaat	agcaactaat
3301	cttgatttaa	ggcttcaaaa	cctcccgcaa	gtcgggaggt	tcgctaaaaac	gcctcgcgtt
3361	cttagaatac	cggataagcc	ttctatatct	gatttgcttg	ctattggggcg	cggtaatgat
3421	tcttacgcat	aaaataaaaa	cggcttgctt	gttctcgtatg	agtgcgggtac	ttggtttaat
3481	acccgttctt	ggaatgataa	ggaaagacag	cggattattg	attggtttct	acatgctcgt
3541	aaattaggat	gggatattat	ttttcttgtt	caggacttat	ctattgttga	taaacaggcg
3601	cgttctgcat	tagctgaaca	tggtgtttat	tgctcgtcgtc	tggacagaat	tactttacct
3661	tttgctcggt	ctttatatct	tcttattact	ggctcgaaaa	tgctctcgcc	taaattacat
3721	gttggcggtt	ttaaataatg	cgattctcaa	ttaagcccta	ctgttgagcg	ttggctttat
3781	actggtaaga	atTTgtataa	cgcataatgat	actaaacagg	cttttcttag	taattatgat
3841	tccggtgttt	attcttattt	aacgccttat	ttatcacacg	gtcgggtattt	caaaccatta
3901	aatttaggtc	agaagatgaa	attaactaaa	atatatttga	aaaagttttc	tcgctgtctt
3961	tgtcttgcca	ttggatttgc	atcagcattt	acatatagtt	atataaccca	acctaagccg
4021	gaggttaaaa	aggtagtctc	tcagacctat	gattttgata	aattcactat	tgactcttct
4081	cagcgtctta	atctaagcta	tcgctatggt	ttcaaggatt	ctaagggaaa	attaattaat
4141	agcgacgatt	tacagaagca	aggttattca	ctcacatata	ttgatttatg	tactgtttcc
4201	attaaaaaag	gtaattcaaa	tgaaattggt	aaatgtaatt	aattttgttt	tcttgatggt
4261	tgtttcatca	tcttcttttg	ctcaggtaat	tgaaatgaat	aattcgcctc	tgcgcgattt
4321	tgtactttgg	tattcaagc	aatcaggcga	atcgttatt	gtttctcccg	atgtaaaagg
4381	tactgttact	gtatatctat	ctgacgttaa	acctgaaaat	ctacgcaatt	tctttatttc
4441	tgttttacgt	gcaaataatt	ttgatatggt	aggttctaac	ccttccataa	ttcagaagta
4501	taatccaaac	aatcaggatt	atattgatga	attgccatca	tctgataatc	aggaatatga
4561	tgataattcc	gctccttctg	gtggtttctt	tgttccgcaa	aatgataatg	ttactcaaac
4621	ttttaaaatt	aataacgttc	gggcaaagga	tttaatacga	gttgctgaat	tgtttgtaaa
4681	gtctaatact	tctaaatcct	caaatgtatt	atctattgac	ggctctaata	tattagttgt
4741	tagtgctcct	aaagatattt	tagataacct	tcctcaattc	ctttcaactg	ttgatttgcc
4801	aactgaccag	atattgattg	agggtttgat	atttgagggt	cagcaagggt	atgctttaga
4861	tttttcattt	gctgctggct	ctcagcgtgg	cactgttgca	ggcgggtgta	atactgaccg
4921	cctcaacctc	gttttatctt	ctgctgggtg	ttcgttcggt	atttttaatg	gcgatgtttt
4981	agggttatca	gttcgcgcat	taaaagactaa	tagccattca	aaaatattgt	ctgtgccacg
5041	tattcttacg	ctttcaggtc	agaagggttc	tatctctggt	ggccagaatg	tcccttttat
5101	tactgggtcg	gtgactggtg	aatctgccaa	tgtaaaataat	ccatttcaga	cgattgagcg
5161	tcaaaatgta	ggtagttcca	tgagcgtttt	tctgttgca	atggctggcg	gtaatatgtt
5221	tctggatatt	accagcaagg	ccgatagttt	gagttcttct	actcaggcaa	gtgatgttat
5281	tactaatcaa	agaagtattg	ctacaacggt	taatttgctg	gatggacaga	ctcttttact
5341	cgggtggcctc	actgattata	aaaacacttc	tcaggattct	ggcgtaccgt	tcctgtctaa
5401	aatcccttta	atcggcctcc	tgtttagctc	ccgctctgat	tctaacgagg	aaagcacgtt
5461	atacgtgctc	gtcaaagcaa	ccatagtagc	cgccctgtag	cggcgcatca	agcgcggcgg
5521	gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccttagcg	cccgtcctt
5581	tcgctttctt	cccttctctt	ctcgccacgt	tcgcgggctt	tcccgtcaa	gctctaaatc
5641	gggggtctcc	tttaggggtt	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg
5701	atttgggtga	tggttcacgt	agtgggcat	cgccctgata	gacggttttt	cgcccttgga
5761	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	tcttggtcca	aactggaaca	acactcaacc
5821	ctatctcggg	ctattctttt	gatttataag	ggattttgcc	gatttcggaa	ccaccatcaa
5881	acaggatttt	cgcctgctgg	ggcaaaccag	cgtggaccgc	ttgctgcaac	tctctcaggg
5941	ccaggcggtg	aagggaatc	agctgttgcc	cgtctcactg	gtgaaaagaa	aaaccacctt
6001	ggatccaagc	ttgcagggtg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta
6061	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt
6121	caataaatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc
6181	ttttttgctg	cattttgcct	tctgtttttt	gctcaccag	aaacgctggt	gaaagtaaaa
6241	gatgctgaag	atcagttggg	cgcactagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcggt
6301	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaaagtt
6361	ctgctatgtg	gcgcggat	atcccgat	gacgcgggc	aagagcaact	cggctcgcgc

【 0 2 2 9 】

【表 5 6】

```

6421 atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg
6481 gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg
6541 gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac
6601 atgggggagc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca
6661 aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta
6721 actggcggaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat
6781 aaagtgtgag gaccacttct gcgctcgccc cttccggctg gctggtttat tgcgtataaa
6841 tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc agatggtaag
6901 cctcccgtga tcgtagtatt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat
6961 agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt
7021 tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaaag gatctaggtg
7081 aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactgt
7141 acgtaagacc cccaagcttg tcgactgaat ggcaatggc gctttgcctg gtttccggca
7201 ccagaagcgg tgcgggaaag ctggtgggag tgcgatcttc ctgacgctcg agcgcaacgc
7261 aattaatgtg agttagctca ctcataggc accccaggct ttacacttta tgcctccggc
7321 tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca
7381 tgattacgcc aagctttgga gccttttttt tggagatttt caacatgaaa tacctattgc
7441 ctacggcagc cgctggattg ttattactcg cGGCCcagcc GGCCatggcc gaagttcaat
7501 tgttagagtc tgggtggcgg cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt tcttgcgctg
7561 cttccggatt cactttctct tcgtacgcta tgccttgggt tcgccaagct cctggtaaaag
7621 gtttggagtg ggtttctgct atctctggtt ctggtggcag tacttactat gctgactccg
7681 ttaaaggctc gttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac ttgcagatga
7741 acagcttaag ggctgaggac actgcagctc actattgcgc taaagcctat cgtccttctt
7801 atcatgacat atgggggtcaa ggtactatgg tcaccgtctc tagtgctctc accaagggcc
7861 catcgggtctt cccgctagca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg
7921 gctgctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggg tgcgtggaac tcaggcgccc
7981 tgaccagcgg cgtccacacc ttccggctg tctacagtc ctgaggactc tactcctca
8041 gcagcgtagt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc tgcaacgtga
8101 atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaactc tgtgcggccg
8161 cacatcatca tcaccatcac ggggcgcgag aacaaaaact catctcagaa gaggatctga
8221 atggggccgc agaggctagc tctgctagtg gcgacttcga ctacgagaaa atggctaatg
8281 ccaacaaaag cgccatgact gagaacgtg acgagaatgc tttgcaaagc gatgccaaag
8341 gtaagttaga cagcgtcgcg accgactatg gcgccgccat cgacggcttt atcggcgatg
8401 tcagtggttt ggccaacggc aacggagcca cgggagactt cgcaggttcg aattctcaga
8461 tggcccaggt tggagatggg gacaacagtc cgcttatgaa caactttaa cagtacctc
8521 cgtctcttcc gcagagtgtc gagtgcgctc cattcgtttt cggtgccggc aagccttacg
8581 agttcagcat cgactgcgat aagatcaatc ttttccggc cgttttcgct ttcttgctat
8641 acgtcgctac tttcatgtac gttttcagca ctttcgccaa tattttacgc aacaaagaaa
8701 gctagtgtac tcctaggaag cccgccta at gagcgggctt ttttttctg gtatgcatcc
8761 tgaggccgat actgtcgtcg tcccctcaaa ctggcagatg cagcgttacg atgcgccatc
8821 ctacaccaac gtgacctatc ccattacggg caatccgccg tttgttccca cggagaatcc
8881 gacgggttgt tactcgctca cattaatgt tgatgaaagc tggctacagg aaggccagac
8941 gcgaattatt tttgatggcg ttctatttgg ttaaaaaatg agctgattta aaaaaaattt
9001 aatgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttaaa tatttgctta tacaattctc
9061 ctgtttttgg ggcttttctg attatcaacc ggggtacata tgattgacat gctagtttta
9121 cgattaccgt tcctcgatct tcttgtttgc tccagactct caggcaatga cctgatagcc
9181 tttgtagatc tctcaaaaat agctaccctc tccggcatta atttatcagc tagaacggtt
9241 gaatatcata ttgatgggtga tttgactgtc tccggccttt ctacccttt tgaatcttta
9301 cctacacatt actcaggcat tgcatttaaa atatatgagg gttctaaaaa tttttatcct
9361 tgcgttgaaa taaaggcttc tcccgcacaa gtattacagg gtcataatgt ttttggtaca
9421 accgatttag ctttatgctc tgaggcttta ttgcttaatt ttgctaattc tttgccttgc
9481 ctgtatgatt tattggatgt t

```

表35:pMID21のDNA配列:5957bp(配列番号895)

```

1 gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgcctatgata ataattggtt

```

【 0 2 3 0 】

【表 5 7】

61	cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	tgtttatttt
121	tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat
181	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgctgcctct	attccctttt
241	ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg
301	ctgaagatca	gttgggtgcc	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga
361	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctc
421	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcgg	cgccgcatac
481	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg
541	gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtcg	ccataaccat	gagtataaac	actgcggcca
601	acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg
661	gggatcatgt	aactcgccct	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacc
721	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg
781	gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaaag
841	ttgcaggacc	acttctgcgc	tccgcccctc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg
901	gagccgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggttaagccct
961	cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac
1021	agatcgctga	gatagggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcacag	caagtttact
1081	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga
1141	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt
1201	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	cgcgtaatct
1261	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc
1321	taccaactct	ttttccgaag	gttaactggc	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgttc
1381	ttctagtgtg	gcccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc
1441	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgctttaccg
1501	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt
1561	cgtgcataca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg
1621	agctatgaga	aagcggccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacagggtat	ccggttaagcg
1681	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt
1741	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	tgctcgtcag
1801	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacgggtc	ctggcctttt
1861	gctggccttt	tgttcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgtg
1921	ttaccgcctt	tgaagttagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcaggt
1981	cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc
2041	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaactg	gaaagcgggc	agttagcgcga
2101	acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc
2161	cggctcgtat	gtgtgtgga	attgtgagcg	gataaacaatt	tcacacagga	aacagctatg
2221	accatgatta	cgcgaagctt	tggagccttt	tttttggaga	ttttcaacgt	gaaaaaatta
2281	ttattcgcaa	ttcctttagt	tgcttctttc	tattctcaca	gtgcacaggt	ccaactgcag
2341	gagctcgaga	tcaaacgtgg	aactgtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct
2401	gatgagcagt	tgaatcttgg	aactgcctct	gttgtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc
2461	agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgcccctcc	aatcgggtaa	ctcccaggag
2521	agtgctcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg
2581	agcaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg
2641	agttcacccg	tgacaaagag	cttcaacagg	ggagagtggt	aataaggcgc	gcctaaccat
2701	ctatttcaag	gaacagtcct	aatgaaaaag	cttttattca	tgatcccgtt	agttgtaccg
2761	ttcgtggccc	agccggcctc	tgctgaagtt	caattgttag	agtctgggtg	cggctctgtt
2821	cagcctgggtg	gttcttttacg	tctttcttgc	gctgcttccg	gagcttcaga	tctgtttgcc
2881	tttttgtggg	gtggtgcaga	tcgcgttacg	gagatcgacc	gactgcttga	gcaaaagcca
2941	cgtttaactg	ctgatcaggc	atgggatgtt	attcgccaaa	ccagtcgtca	ggatcttaac
3001	ctgaggcctt	ttttacctac	tctgcaagca	gcgacatctg	gtttgacaca	gagcgatccg
3061	cgtcgtcagt	tggtagaaac	attaacacgt	tgggatggca	tcaatttgct	taatgatgat
3121	ggtaaaaacct	ggcagcagcc	aggctctgcc	atcctgaacg	tttggctgac	cagtatgttg
3181	aagcgtaccg	tagtggctgc	cgtacctatg	ccatttgata	agtggtacag	cggcagtggc
3241	tacgaacaa	cccaggacgg	cccaactggt	tcgctgaata	taagtgttgc	agcaaaaatt
3301	ttgtatgag	cgggtgcagg	agacaaatca	ccaatccac	aggcgggtga	tctgtttgct
3361	gggaaaccac	agcaggaggt	tgtgttggct	gcgctggaag	atacctggga	gactctttcc
3421	aaacgctatg	gcaataatgt	gagtaactgg	aaaacaccgg	caatggcctt	aacgttccgg

【 0 2 3 1 】

【表 5 8】

```

3481 gcaataaatt tctttggtgt accgcaggcc gcagcgggaag aaacgcgtca tcaggcggag
3541 tatcaaaacc gtggaacaga aaacgatatg attgttttct caccaacgac aagcgatcgt
3601 cctgtgcttg cctgggatgt ggtcgacccc ggtagagatg ggtttattgc tcccgatgga
3661 acagttgata agcactatga agatcagctg aaaatgtacg aaaattttgg ccgtaagtcg
3721 ctctgggttaa cgaagcagga tgtggaggcg cataaggagt tctagagaca actctaagaa
3781 tactctctac ttgcagatga acagcttaag tctgagcatt cgggtccggc aacattctcc
3841 aaactgacca gacgacacaa acggcttacg ctaaatcccg cgcattggat ggtaaaagag
3901 tggcgtcttt gctggcctgg actcatcaga tgaaggccaa aaattggcag gagtggacac
3961 agcaggcagc gaaacaagca ctgacocatca actggtacta tgctgatgta aacggcaata
4021 ttggttatgt tcatactggt gcttatccag atcgtcaatc aggcctatgat ccgcgattac
4081 ccgttccctgg tacgggaaaa tgggactgga aagggtatt gccttttgaa atgaacccta
4141 aggtgtataa ccccagcag ctagccatat tctctcggtc accgtctcaa gcgcctccac
4201 caagggccca tcgggtcttc cgctagcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc
4261 ggccctgggc tgccctggtca aggactactt ccccgaaacg gtgacgggtg cgtggaactc
4321 aggcgccttg accagcggcg tccacacctt cccggtctgc ctacagtcta gcggaactta
4381 ctccctcagc agcgtagtga ccgtgccttc ttctagcttg ggcaccaga cctacatctg
4441 caacgtgaat cacaagcca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttagc ccaaactctg
4501 tgcggccgca catcatcatc accatcacgg ggccgcagaa caaaaactca tctcagaaga
4561 ggatctgaat ggggcccag aggctagttc tgctagttaac gcgtcttcg gtgattttga
4621 ttatgaaaag atggcaaacg ctaataaggg ggctatgacc gaaaatgccg atgaaaacgc
4681 gctacagtcg gacgctaaag gcaaacctga ttctgtcgct actgattacg gtgctgctat
4741 cgtatggtttc attggtgacg ttccggcct tgctaattggt aatggtgcta ctgggtgattt
4801 tgctggctct aattcccaa tggtcaagt cggtagcggg gataattcac cttaaatgaa
4861 taatttccgt caatatttac ctccctccc tcaatcgggt gaatgtcgcc cttttgcctt
4921 tggcgtggtt aaaccatatg aattttctat tgattgtgac aaaataaact tattccgtgg
4981 tgtctttgcg ttcttttat atgttgcac cttaattgat gtattttcta cgtttgctaa
5041 catactgctg aataaggagt cttaatgaaa cgcgtgatga gaattcactg gccgtcgttt
5101 tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttaccaact taatcgctt gcagcacatc
5161 cccttttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcgcgcac cgatcgccct tcccaacagt
5221 tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgccgta tgcggtattt tctccttacg catctgtgcg
5281 gtatttcaca ccgcatacgt caaagcaacc atagtacgag ccctgtagcg gcgcattaa
5341 cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccttagcgcc
5401 cgctcctttc gctttcttcc ctctcttct cgcacagctt gccggtttc ccgctcaagc
5461 tctaaatcgg gggctccctt tagggttcg atttagtct ttacggcacc tcgaccccaa
5521 aaaacttgat ttgggtgatg gttcacgtag tgggcatcg ccctgataga cgttttttcg
5581 ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggaact ttgttccaaa ctggaacaa
5641 actcaactct atctcgggct attcttttga ttataaggg attttgccga tttcggctta
5701 ttggttaaaa aatgagctga ttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac
5761 gtttacaatt ttatggtgca gtctcagtag aatctgctct gatgccgat agttaagcca
5821 gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc
5881 cgcttacaga caagctgtga ccgtctccg gagctgcatg tgtagaggt tttcacgctc
5941 atcaccgaaa cgcgcga

```

表36:IIIss:A27::Cκを含有するpM21J

塩基数 5225 (配列番号 921)

```

GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT 60
CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTATTATTT 120
TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT 180
AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT 240
TTGCGGCATT TTGCCCTTCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG 300
CTGAAGATCA GTTGGGTGCC CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA 360
TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC 420
TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC 480
ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAAGTAC CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG 540
GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA 600

```

【 0 2 3 2 】

【表 5 9】

ACTTACTTCT	GACAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	CACAACATGG	660
GGGATCATGT	AACTCGCCTT	GATCGTIGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG	720
ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA	CTATTAACGT	780
GCGAACTACT	TACTCTAGCT	TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG	840
TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG	900
GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT	960
CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTGAGGCAAC	TATGGATGAA	CGAAATAGAC	1020
AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCACTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT	1080
CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACTTC	ATTTTAAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA	1140
TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTTCGTC	CACTGAGCGT	1200
CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT	1260
GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC	1320
TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAACCTGGT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTTC	1380
TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC	1440
TCGCTCTGCT	AATCCTGTGA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGCTTACCG	1500
GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTGCGGCTGA	ACGGGGGGTT	1560
CGTGCATACA	GCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACCCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	1620
AGCTATGAGA	AACGCGCCAG	CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG	1680
GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT	1740
ATAGTCTGTG	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTTGTGA	TGCTCGTCAG	1800
GGGGGCGGAG	CCTATGGAAG	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	1860
GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCTCT	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA	1920
TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT	1980
CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	2040
CGATTTCATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA	2100
ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC	2160
CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG	2220
ACCATGATTA	CGCCAAGCTT	TGGAGCCTTT	TTTTTGGAGA	TTTTCAACAT	GAAGAAACTG	2280
CTGCTCTGCTA	TCCCACTAGT	TGTCCCTTTC	TATTCTCATA	GTGAAATCGT	TCTGACCCAG	2340
TCCCCGCGGA	CCCTGTCTCT	GTCTCCGGGT	GAACGTGCTA	CGCTGAGCTG	TCGTGCTTCT	2400
CAATCCGTTA	GCTCCTCTTA	TTTAGCTTGG	TATCAGCAAA	AGCCGGGTCA	AGCTCCGCGG	2460
CTGTTGATCT	ATGGTGCCCT	TAGTCGTGCT	ACTGGCATCC	CTGATCGTTT	CTCTGGCTCT	2520
GGCTCCGGAA	CCGATTTTAC	TCTGACCATT	TCTCGTCTCG	AGCCGGAAGA	TTTCGCTGTC	2580
TACTATTGTC	AACAGTATGG	TTCTAGTCCG	CTGACTTTCG	GTGGCGGTAC	CAAAGTCGAA	2640
ATCAAGCGTG	GAACTGTGGC	TGCACCATCT	GTCTTCATCT	TCCCGCCATC	TGATGAGCAG	2700
TTGAAATCTG	GAACTGCCTC	TGTTGTGTGC	CTGCTGAATA	ACTTCTATCC	CAGAGAGGCC	2760
AAAGTACAGT	GGAAGGTGGA	TAACGCCCTC	CAATCGGGTA	ACTCCAGGA	GAGTGTACAA	2820
GAGCAGGACA	GCAAGGACAG	CACCTACAGC	CTCAGCAGCA	CCCTGACTCT	GTCCAAAGCA	2880
GACTACGAGA	AACACAAAGT	CTACGCCTGC	GAAGTCACCC	ATCAGGGCCT	GAGTTCACCG	2940
GTGACAAAGA	GCTTCAACAG	GGGAGAGTGT	TAATAAGGCG	CGCCAATTTA	ACCATCTATT	3000
TCAAGGAACA	GTCTTAATGA	AGAAGCTCCT	CTTTGCTATC	CCGCTCGTCG	TTCTTTTGTG	3060
GGCCCAGCCG	GCCATGGCCG	AAGTTCAATT	GTTAGAGTCT	GGTGGCGGTC	TTGTTACAGC	3120
TGGTGGTTCT	TTACGTCTTT	CTTGCGCTGC	TTCCGGATTG	ACTTTCTCTC	GTTACAAGAT	3180
GAAGTGGGTT	CGCCAAGCTC	CTGGTAAAGG	TTTGGAGTGG	GTTTCTGTGA	TCTATCCTTC	3240
TGGTGGCGGT	ACTGGTTATG	CTGACTCCGT	TAAAGGTCGC	TTCATATCT	CTAGAGACAA	3300
CTCTAAGAAT	ACTCTCTACT	TGCAGATGAA	CAGCTTAAGG	GCTGAGGACA	CTGCAGTCTA	3360
CTATTTGTGCG	AGAGTCAATT	ACTATGATAG	TAGTGGTTAC	GGTCCTATAG	CTCCTGGACT	3420
TGACTACTGG	GGCCAGGGAA	CCCTGGTCAC	CGTCTCAAGC	GCCTCCACCA	AGGGTCCGTC	3480
GGTCTTCCCG	CTAGCACCTT	CCTCCAAGAG	CACCTCTGGG	GGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	3540
CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTGTCT	TGGAACCTAG	GCGCCCTGAC	3600
CAGCGGGCTG	CACACCTTCC	CGGCTGTCTT	ACAGTCTAGC	GGACTCTACT	CCCTCAGCAG	3660
CGTAGTGACC	GTGCCCTCTT	CTAGCTTGGG	CACCCAGACC	TACATCTGCA	ACGTGAATCA	3720
CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	AGTTGAGCCC	AAATCTTGTG	CGGCCGCACA	3780
TCATCATCAC	CATCAGGGG	CCGCAGAACA	AAAACCTATC	TCAGAAGAGG	ATCTGAATGG	3840
GGCCGCAGAG	GCTAGTTCTG	CTAGTAACGC	GTCTTCCGGT	GATTTTGATT	ATGAAAAGAT	3900
GGCAAACGCT	AATAAGGGGG	CTATGACCGA	AAATGCCGAT	GAAAACGCGC	TACAGTCTGA	3960
CGCTAAAGGC	AAACTTGATT	CTGTCGCTAC	TGATTACGGT	GCTGCTATCG	ATGGTTTCAT	4020

【 0 2 3 3 】

【表 6 0】

TGGTGACGTT	TCCGGCCTTG	CTAATGGTAA	TGGTGCTACT	GGTGATTTTG	CTGGCTCTAA	4080
TTCCCAAATG	GCTCAAGTCG	GTGACGGTGA	TAATTCACCT	TTAATGAATA	ATTTCCGTCA	4140
ATATTTACCT	TCCCTCCCTC	AATCGGTTGA	ATGTCGCCCT	TTTGTCTTTG	GCGCTGGTAA	4200
ACCATATGAA	TTTTCTATTG	ATTGTGACAA	AATAAACTTA	TTCCGTGGTG	TCTTTGCGTT	4260
TCTTTTATAT	GTTGCCACCT	TTATGTATGT	ATTTTCTACG	TTTGCTAACA	TACTGCGTAA	4320
TAAGGAGTCT	TAATGAAACG	CGTGATGAGA	ATTCACATGGC	CGTCGTTTTA	CAACGTCGTG	4380
ACTGGGAAAA	CCCTGGCGTT	ACCCAACTTA	ATCGCCTTGC	AGCACATCCC	CCTTTGCGCA	4440
GCTGGCGTAA	TAGCGAAGAG	GCCGCGACCG	ATCGCCCTTC	CCAACAGTTG	CGCAGCCTGA	4500
ATGGCGAATG	GCGCCTGATG	CGGTATTTTC	TCCTTACGCA	TCTGTGCGGT	ATTTACACAC	4560
GCATACGTCA	AAGCAACCAT	AGTACGCGCC	CTGTAGCGGC	GCATTAAGCG	CGGCGGGTGT	4620
GGTGGTTACG	CGCAGCGTGA	CCGCTACACT	TGCCAGCGCC	TTAGCGCCCG	CTCCTTTCGC	4680
TTTCTTCCCT	TCCTTTCTCG	CCACGTTCCG	CGGCTTTCCC	CGTCAAGCTC	TAAATCGGGG	4740
GCTCCCTTTA	GGGTTCGGAT	TTAGTGCTTT	ACGGCACCTC	GACCCCAAAA	AACTTGATTT	4800
GGGTGATGGT	TCACGTAGTG	GGCCATCGCC	CTGATAGACG	GTTTTTCGCC	CCTTGACGTT	4860
GGAGTCCACG	TTCTTTAATA	GTGACTCTTT	GTTCCAAACT	GGAACAACAC	TCAACTCTAT	4920
CTCGGGCTAT	TCTTTTGATT	TATAAGGGAT	TTTGCCGATT	TCGGTCTATT	GGTTAAAAAA	4980
TGAGCTGATT	TAACAAAAAT	TTAACGCGAA	TTTTAACAAA	ATATTAACGT	TTACAATTTT	5040
ATGGTGCACT	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	TGCCGCATAG	TTAAGCCAGC	CCCGACACCC	5100
GCCAACACCC	GCTGACGCGC	CCTGACGGGC	TTGTCTGCTC	CCGGCATCCG	CTTACAGACA	5160
AGCTGTGACC	GTCTCCGGGA	GCTGCATGTG	TCAGAGGTTT	TCACCGTCAT	CACCGAAACG	5220
CGCGA						5225

表40:pLCSK23(配列番号896)

1	GACGAAAGGG	CCTGCTCTGC	CAGTGTTACA	ACCAATTAAC	CAATTCTGAT	TAGAAAAACT
61	CATCGAGCAT	CAAATGAAAC	TGCAATTTAT	TCATATCAGG	ATTATCAATA	CCATATTTTT
121	GAAAAAGCCG	TTTCTGTAAT	GAAGGAGAAA	ACTCACCGAG	GCAGTTCCAT	AGGATGGCAA
181	GATCCTGGTA	TCGGTCTGCG	ATTCCGACTC	GTCCAACATC	AATACAACCT	ATTAATTTCC
241	CCTCGTCAAA	AATAAGGTTA	TCAAGTGAGA	AATCACCATG	AGTGACGACT	GAATCCGGTG
301	AGAATGGCAA	AAGCTTATGC	ATTTCTTTCC	AGACTTGTTT	AACAGGCCAG	CCATTACGCT
361	CGTCATCAAA	ATCACTCGCA	TCAACCAAAAC	CGTTATTTCAT	TCGTGATTGC	GCCGTGAGCGA
421	GACGAAATAC	GCGATCGCTG	TTAAAAGGAC	AATTACAAAC	AGGAATTGAA	TGCAACCGGC
481	GCAGGAACAC	TGCCAGCGCA	TCAACAATAT	TTTCACCTGA	ATCAGGATAT	TCTTCTAATA
541	CCTGGAATGC	TGTTTTCCCG	GGGATCGCAG	TGGTGAGTAA	CCATGCATCA	TCAGGAGTAC
601	GGATAAAATG	CTTGATGGTC	GGAAGAGGCA	TAAATTCCTG	CAGCCAGTTT	AGTCTGACCA
661	TCTCATCTGT	AACATCATTG	GCAACGCTAC	CTTTGCCATG	TTTCAGAAAC	AACCTGCGCG
721	CATCGGGCTT	CCCATAACAAT	CGATAGATTG	TCGCACCTGA	TTGCCCGACA	TTATCGCGAG
781	CCCATTTATA	CCCATAATAA	TCAGCATCCA	TGTTGGAATT	TAATCGCGGC	CTCGAGCAAG
841	ACGTTTCCCG	TTGAATATGG	CTCATAACAC	CCCTTGTATT	ACTGTTTATG	TAAGCAGACA
901	GTTTTATTGT	TCATGATGAT	ATATTTTTAT	CTTGTCGAAT	GTAACATCAG	AGATTTTGAG
961	ACACAACGTG	GCTTTCCCCC	CCCCCCCCTG	CAGGTCTCGG	GCTATTCCCTG	TCAGACCAAG
1021	TTTACTCATA	TATACTTTAG	ATTGATTTAA	AACTTCATTT	TTAATTTAAA	AGGATCTAGG
1081	TGAAGATCCT	TTTTGATAAT	CTCATGACCA	AAATCCCTTA	ACGTGAGTTT	TCGTTCCACT
1141	GAGCGTCAGA	CCCCGTAGAA	AAGATCAAAG	GATCTTCTTG	AGATCCTTTT	TTTCTGCGCG
1201	TAATCTGCTG	CTTGCAAACA	AAAAAACAC	CGCTACCAGC	GGTGGTTTGT	TTGCCGGATC
1261	AAGAGCTACC	AACTCTTTTT	CCGAAGGTAA	CTGGCTTCAG	CAGAGCGCAG	ATACCAAATA
1321	CTGTTCTTCT	AGTGTAGCCG	TAGTTAGGCC	ACCACTTCAA	GAACCTCTGA	GCACCGCCTA
1381	CATACCTCGC	TCTGCTAATC	CTGTTACCAG	TGGCTGCTGC	CAGTGGCGAT	AAGTCGTGTC
1441	TTACCGGGTT	GGACTCAAGA	CGATAGTTAC	CGGATAAGGC	GCAGCGGTGC	GGCTGAACGG
1501	GGGGTTCGTG	CATACAGCCC	AGCTTGGAGC	GAACGACCTA	CACCGAACTG	AGATACCTAC
1561	AGCGTGAGCT	ATGAGAAAGC	GCCACGCTTC	CCGAAGGGAG	AAAGGCGGAC	AGGTATCCGG
1621	TAAGCGGCAG	GGTCGGAACA	GGAGAGCGCA	CGAGGGAGCT	TCCAGGGGGA	AACGCCTGGT
1681	ATCTTTATAG	TCTGTGCGGG	TTTCGCCACC	TCTGACTTGA	GCGTCGATTT	TTGTGATGCT
1741	CGTCAGGGGG	GCGGAGCCTA	TGGA AAAACG	CCAGCAACGC	GGCCTTTTTA	CGGTTCTTGG
1801	CCTTTTGTCT	GCCTTTTGCT	CACATGTTCT	TTCTTGCGTT	ATCCCTTGAT	TCTGTGGATA
1861	ACCGTATTAC	CGCCTTTGAG	TGAGCTGATA	CCGCTCGCCG	CAGCGGAACG	ACCGAGCGCA

【表 6 1】

```

1921 GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGCGC
1981 GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCAGC ACAGGTTTCC CGACTGGAAA GCGGGCAGTG
2041 AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA
2101 TGCTTCCGGC TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA
2161 GCTATGACCA TGATTACGCC AAGCTTTGGA GCCTTTTTTT TGGAGATTTT CAACATGAAG
2221 AAGCTCCTCT TTGCTATCCC GCTCGTCGTT CCTTTTGTGG CCCAGCCGGC CATGGCCGAC
2281 ATCCAGATGA CCCAGTCTCC ATCCTCCCCTG TCTGCATCTG TAGGAGACAG AGTCACCATC
2341 ACTTGCCGGG CAAGTCAGAG CATTAGCAGC TATTTAAATT GGTATCAGCA GAAACCAGGG
2401 AAAGCCCCTA AGCTCCTGAT CTATGCTGCA TCCAGTTTGC AAAGTGGGGT CCCATCAAGG
2461 TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTC ACTCTACCA TCAGCAGTCT GCAACCTGAA
2521 GATTTTGCAA CTTACTACTG TCAACAGAGT TACAGTACCC CTTTCACITT CGGCCCTGGG
2581 ACCAAAGTGG ATATCAAACG TGGTACcGTG GCTGCACCAT CTGICTTCAT CTTCCCGCCA
2641 TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAAGTGGC TCTGTGTGTG GCCTGCTGAA TAACTTCTAT
2701 CCCAGAGAGG CCAAAGTACA GTGGAAGGTG GATAACGCCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG
2761 GAGAGTGTCA CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCTGACG
2821 CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC CCATCAGGGC
2881 CTGAGTTTAC CGGTGACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT GTGCGGCCGC TGGTAAGCCT
2941 ATCCCTAACC CTCTCCTCGG TCTCGATTCT ACGTGATAAC TTCACCGGTC AACCGTGAT
3001 GAGAATTCAC TGGCCGTCGT TTTACAACGT CGTGACTGGG AAAACCCTGG CGTTACCCAA
3061 CTTAATCGCC TTGCAGCACA TCCCCCTTTC GCCAGCTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC
3121 ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCGCAGC CTGAATGGCG AATGGCGCCT GATGCGGTAT
3181 TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTC AACCGCATAC GTCAAAGCAA CCATAGTCTC
3241 AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT
3301 GACGCGCCCT GACAGGCTTG TCTGCTCCCG GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC
3361 TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GA

```

(実施例 4)

C D R の D o b b l i n g

以下の実施例は、合成ライブラリの構築における d o b b l i n g の使用を例示する。親 3 - 2 3 重鎖 (H C) は、C D R 1、2 および 3 において多様化される。この多様性は、合成的に多様化された A 2 7 軽鎖 (L C) と組み合わせられる。この多様性は下記の通りである：

(実施例 4 . 1)

H C C D R 1

以下の d o b b l i n g の多様性は、5 , 8 3 2 の変異体を許容する。表 5 0 を参照されたい。3 1 位において、S e r は生殖系列 (G L) アミノ酸型である。したがって、本発明者らは、他の型より 3 倍可能性が高い S e r を作製した。1 8 の型が許容されるので、S e r は、1 5 % の確率で使用可能となり、他は 5 % で使用可能であろう。したがって、3 1 位において A A 型の選択がない場合、S e r を有する A b を単離する確率がより高い。同様に、3 3 位において G L A A 型は A 1 a であり、本発明者らは、他のすべて (5 %) より 3 倍可能性が高い A 1 a (1 5 %) を作製した。3 5 位において、S e r は G L A A 型であり、本発明者らは、それを他の 3 倍可能性が高く作製した。3 つすべての位置において、本発明者らは C y s および M e t を除外した。本発明者らは、無償性ジスルフィドまたは A b の溶解度および反応性に悪影響を与え得る、露出された不對システインを望まないのので、C y s を除外する。露出されたメチオニンの側基は、結合特性および保存期間を変更し得る酸化に供されるので、M e t を除外する。他の A A 型より 2、3、4、5、6、8 または 1 0 倍可能性が高い生殖系列アミノ酸型を作製できる。

【 0 2 3 5 】

【表 6 2】

表50:3-23におけるCDRIに関する多様性

位置	親AA	許容
31	S (他のよりも可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY
33	A (可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY
35	S (可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY

この開示を通して、示された「許容される」アミノ酸は、所与の位置で利用できるアミ

ノ酸である。例えば、表 50 において、31 位において、許容されるアミノ酸「A D E F G H K L N P Q R S T V W Y」を示す。このことは、アミノ酸 A、D、E、F、G、H、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W および Y のすべてが、31 位において許容されることを示している。

【0236】

(実施例 4.2)

H C C D R 2

C D R 2 において、本発明者らは、50、52、52a、56 および 58 位において多様性を許容する。50、52、56、および 58 位において、本発明者らは C y s および M e t を除くすべてのアミノ酸型を許容し、本発明者らは G L A A 型を 3 倍高い可能性で作製する。本発明者らは、G L A A 型を、他の A A 型より 2、3、4、5、6、8 または 10 倍高い可能性で作製できる。

【0237】

【表 63】

表51:HC CDR2:多様性 = 419,904

位置	親AA	許容
50	A (可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY
52	S (可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY
52a	G (可能性は3倍高い)	GPSY
56	S (可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY
58	Y (可能性は3倍高い)	ADEFGHKLNPQRSTVWY

組み合わせた C D R 1 および C D R 2 の多様性 = 2 . 4 5 E 9

(実施例 4.3)

H C C D R 3、長さ 3、4、5

非常に短い C D R 3 は、d o b b l i n g により作製できる。表 7 は、長さ 3 の C D R 3 に対するいくつかの親配列を示す。94 位において、多くの V H 3 は A r g を有し、本発明者らはこの変化を許容したが、L y s は 3 倍可能性がある。95 位において、F は J H 1 中のこの位置において見出される。本発明者らは S e r、T y r、A s p および A r g もまた許容して、小型、大型、正の電荷および負の電荷を許容する。96 位において、J H 1 は Q を有する。Q は G l u に非常に似ているので、本発明者らは、A r g、S e r、T y r、および L e u に加えて、G l u を酸性代替物として許容する。97 位において、H i s は J H 1 に由来する生殖系列 A A である。本発明者らは、負の電荷 (D)、正の電荷 (R)、低極性 (S)、高疎水性 (Y) および脂肪族化合物 (L) を許容する。親配列は、ライブラリの最大 4.5 % をなすが、これは、C D R 1 および C D R 2 における大きい多様性を組み合わせている。d o b b l i n g は、全部で 360 の配列を許容する。最も可能性の低い配列は、1792 分の 1 で生じる。最も可能性の高い (親) 配列は、約 22 分の 1 で生じる。

【0238】

【表 6 4】

表60:dobblingされた長さ3のHC CDR3(表7のV-3JH1) (配列番号951として開示された'KFQH')

位置	親アミノ酸(供給源)	許容
94	K (VH 3-23)	KR (3:1)
95	F (JH1)	FSYDR (3:1:1:1:1)
96	Q (JH1)	QERSYL (3:1:1:1:1:1)
97	H (JH1)	HDRSYL (3:1:1:1:1:1)
103	W (JH1)	W

表 6 1 は、 d o b b l i n g された長さ 3 の H C C D R 3 を示す。ここで、 K 9 4 は W 1 0 3 のように固定されている。本発明者らは、「親」Dセグメントアミノ酸を、他の許容された A A 型より 5 倍の可能性で作製した。

【 0 2 3 9】

【表 6 5】

表61:D断片由来の長さ3のdobblingされたHC CDR3(表7のV-3D1-1.1.2-JH1)。(配列番号952として開示された'KTTG')

位置	親	許容
94	K (V 3-23)	K
95	T (D1-1.1.2)	TYRDL (5:1:1:1:1)
96	T (D1-1.1.2)	TYRDL (5:1:1:1:1)
97	G (D1-1.1.2)	GSYRDL (5:1:1:1:1:1)
103	W (JH1)	W

この実施例において(表 6 2、表 8 の V - 4 J H 2 を使用する)、9 4 は L y s として固定されている。9 5 位において、J H 2 は T y r を有し、本発明者らは、許容される S e r、A s p、A r g および L e u を有し、その結果、抗原に適合するためにサイズ、電荷および疎水性を変更できる。J H 2 は 9 6 位に P h e を有し、本発明者らは、S e r、T y r、A s p、A r g、および L e u を許容した。9 7 位において、J H 2 は A s p を有し、本発明者らは、A r g、S e r、T y r、および L e u を許容した。9 8 位において、J H 2 は L e u を有し、本発明者らは、S e r、T y r、A s p および A r g を許容した。このパターンは、7 5 0 の異なる配列を許容し、親が最も可能性 (1 / 1 8) が高い。最も可能性が低い配列は、4 6 0 8 分の 1 で生じ、または最も可能性が高い配列より可能性が 2 5 6 倍低い。

【 0 2 4 0】

【表 6 6】

表62:JH2由来の長さ4のHC CDR3(表7のV-4JH2) (配列番号953として開示された'KYFDL')

位置	親AA(供給源)	許容
94	K (VH 3-23)	K
95	Y (JH2)	YSDRL (4:1:1:1:1)
96	F (JH2)	FSYDRL (4:1:1:1:1:1)
97	D (JH2)	DRSYL (4:1:1:1:1)
98	L (JH2)	LSYDR (4:1:1:1:1)
103	W (JH2)	W

表 6 3 において、表 8 の V - 4 D 3 - 1 0 . 1 a - J H 2 の d o b b l i n g があつた

。94位において、本発明者らはLysおよびArgを許容し、Lys(親)はArgの4倍の可能性があった。95位において、D3-10.1a(すなわち、第1のリーディングフレーム中のD3-10であり、AA1から出発する)はLeuを有し、本発明者らは、同様にSYDRを許容した。Leuは他のAA型個々の4倍の可能性である。96位において、D3-10.1aは同様にLeuを有し、本発明者らは、同じメニューを許容した。97位において、D3-10.1aはTrpを有し、本発明者らは、Ser、Tyr、AspおよびArgを許容する。Trpは4倍の可能性である。98位において、D3-10.1aはPheを有し、本発明者らは、同様にSer、Tyr、AspおよびArgを許容とする。

【0241】

【表67】

表63:表8のV-4D3-10.1aに由来する長さ4のHC CDR3 (配列番号954として開示された'KLLWF')

位置	親AA(供給源)	許容
94	K (VH 3-23)	KR (4:1)
95	L (D3-10.1a)	LSYDR (4:1:1:1:1)
96	L (D3-10.1a)	LSYDR (4:1:1:1:1)
97	W (D3-10.1a)	WSYDR (4:1:1:1:1)
98	F (D3-10.1a)	FSYDR (4:1:1:1:1)
103	W	W

(実施例4.4)

長さ10から20のHC CDR3

HC CDR3

2つのサブライブラリ、双方とも長さ16のCDR3を有する。

【0242】

【表 6 8】

表52:ライブラリ1:多様性=5E11、「親」配列は1/1.5E6で生じる。
(配列番号955として開示された 'KYYDSSGYAAEYFQHW')

位置	「親」AA(供給源)	許容
94	K(可能性は3倍高い)(3-23)	KR (3:1)
95	Y(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	YSRDL (3:1:1:1:1)
96	Y(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	YSRDL (3:1:1:1:1)
97	Y(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	YSRDL (3:1:1:1:1)
98	D(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	DYSRL (3:1:1:1:1)
99	S(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	SYRDL (3:1:1:1:1)
100	S(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	SYRDL (3:1:1:1:1)
101	G(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	GASYRDL (3:1:1:1:1:1)
102	Y(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	YSRDL (3:1:1:1:1)
102a	Y(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	YSRDL (3:1:1:1:1)
102b	Y(可能性は3倍高い)(D2-21(2))	YSRDL (3:1:1:1:1)
102c	A(可能性は3倍高い)(JH1)	ASYRD (3:1:1:1:1)
102d	E(可能性は3倍高い)(JH1)	ERSYL (3:1:1:1:1)
102e	Y(可能性は3倍高い)(JH1)	YSRDL (3:1:1:1:1)
102f	F(可能性は3倍高い)(JH1)	FYSRD (3:1:1:1:1)
102g	Q(可能性は3倍高い)(JH1)	QERSY (3:1:1:1:1)
102h	H(可能性は3倍高い)(JH1)	HERSYL (3:1:1:1:1:1)
103	W(JH1、固定)	W

表53:ライブラリ2:長さ16のCDR3;多様性は、3.0E10であり、親配列は
1/3.7E5で生じる。(配列番号956として開示された 'KGYCSSTSCYTAEYFQHW')

位置	「親」AA(供給源)	許容
94	K(可能性は3倍高い)(3-23)	KR (3:1)
95	G(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	GSYDRL (3:1:1:1:1:1)
96	Y(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	YSDRL (3:1:1:1:1)
97	C(固定)(D2-2(2))	C

【 0 2 4 3 】

【表 6 9】

98	S(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	SYRDL (3:1:1:1:1)
99	S(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	SYRDL (3:1:1:1:1)
100	T(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	TYRDL (3:1:1:1:1)
101	S(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	SYRDL (3:1:1:1:1)
102	C(固定)(D2-2(2))	C
102a	Y(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	YSDRL (3:1:1:1:1)
102b	T(可能性は3倍高い)(D2-2(2))	TYRDL (3:1:1:1:1)
102c	A(可能性は3倍高い)(JH1)	ASYDRL (3:1:1:1:1:1)
102d	E(可能性は3倍高い)(JH1)	ERSYL (3:1:1:1:1:1)
102e	Y(可能性は3倍高い)(JH1)	YSDRL (3:1:1:1:1:1)
102f	F(可能性は3倍高い)(JH1)	FYSRDL (3:1:1:1:1:1)
102g	Q(可能性は3倍高い)(JH1)	QERSYL (3:1:1:1:1:1)
102h	H(可能性は3倍高い)(JH1)	HDRSYL (3:1:1:1:1:1)
103	W(JH1))	W

表 6 5 は、配列番号：8 9 8 の d o b b l i n g による多彩化を示す。許容されたすべての多様性は 2 . 1 E 1 3 である。1 . E 8、3 . E 8、5 . E 8、1 . E 9 または 5 . E 9 を作製する合成は、多様性を適切にサンプリングするであろう。配列番号：8 9 8 の設計は上で述べた。配列番号：8 9 8 の d o b b l i n g において、d o b b l i n g は、大部分の位置で他の A A 型を 3 倍上回る親 A A 型を許容することである。親が T y r である位置で、その場合、本発明者らは、T y r および S e r を等量で使用し、L e u はその頻度の 1 / 2 で使用する。C y s 残基は固定されている。個々の親 A A 型は許容され、A r g、A s p、S e r、T y r または L e u (親が疎水性、例えば P h e である場合、L e u は除かれることがある) の 1 つに進む。親配列は、1 / 1 . E 8 のメンバーで生じる。最も可能性が低い配列は、1 / 9 . 5 E 1 6 で生じる。ライブラリが実際に親配列を含有することは重要ではなく、親に似た配列を多数含有することだけが重要である。したがって、H C C D R 1、H C C D R 2、L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 の多様性を組み合わせる場合、1 . E 7、5 . E 7、1 . E 8、3 . E 8、1 . E 9 または 5 . E 9 を含有するライブラリは、多くの可変 A b を含有するライブラリを提供する。

【0 2 4 4】

【表 7 0】

表65:配列番号898を親として有する設計1のdobbling

(配列番号957として開示された 'KDYGYCSSTSCYTYGYSYAEYFQHW')

位置	親(供給源)	許容
94	K (VH 3-23)	K
95	D (供給源なし)	DSYL (3:1:1:1)
96	Y (供給源なし)	YSL (2:2:1)
97	G (D2-2.2)	GSYDRL (3:1:1:1:1)
98	Y (D2-2.2)	YSL (2:2:1)
99	C (D2-2.2)	C
100	S (D2-2.2)	SYDRL (3:1:1:1:1)
101	S (D2-2.2)	SYDRL (3:1:1:1:1)
102	T (D2-2.2)	TYDRL (3:1:1:1:1)
102a	S (D2-2.2)	SYDRL (3:1:1:1:1)
102b	C (D2-2.2)	C
102c	Y (D2-2.2)	YSL (2:2:1)
102d	T (D2-2.2)	TYDRL (3:1:1:1:1)
102e	Y (供給源なし)	YDSL (3:1:1:1)
102f	G (供給源なし)	GSYRD (3:1:1:1:1)
102g	Y (供給源なし)	YSL (2:2:1)
102h	S (供給源なし)	SYDRL (3:1:1:1)
102i	Y (供給源なし)	YSL (2:2:1)
102j	A (JH1)	ASYDR (3:1:1:1:1)
102k	E (JH1)	ERSYL (3:1:1:1:1)
102l	Y (JH1)	YSL (2:2:1)
102m	F (JH1)	FSYDR (3:1:1:1:1)
102n	Q (JH1)	QYSYDRL (3:1:1:1:1:1)
102p	H (JH1)	HSYDRL (3:1:1:1:1:1)
103	W (JH1, FR4)	W

(実施例 4 . 5)

y y c a k G S G Y C S G G S C Y S F D Y w g q g t l v t v s s (配列番号 : 9 3 1) の d o b b l i n g

表 8 0 は、長さ 1 5 の H C C D R 3 の例である、配列番号 : 9 3 1 の d o b b l i n g を示す。9 4 位は F R 3 の一部であり、一定に保たれる。9 5 位および 9 6 位は高度に使用される (Y G D R S) のセットから選別される「親」アミノ酸型を有し、G 9 5 および S 9 6 である。次の 1 0 の位置は、D 2 - 1 5 . 2 (ジスルフィド閉ループを含有する、中程度に良く使用される D セグメント) から選別される。最後の 3 つの位置は、表 3 に示すように、J H 4 の 1 0 0 位、1 0 1 位および 1 0 2 位に由来する。個々の位置において、本発明者らは、親アミノ酸型を他の許容される型より 3 倍多く作製する。C y s 残基は固定されている。1 0 2 e において、P h e は Y G S R D より 3 倍可能性が高い (すなわち、P h e は、アミノ酸 Y、G、S、R または D のいずれより 3 倍可能性が高い)。許容される多様性は、1 . 4 6 E 9 である。親配列は、1 / 6 . 9 E 4 で期待される。個々の 1 つずつ置換された配列はおそらく約 1 / 3 であり、二重に置換された配列は、おそらく 1 / 9 でありそのように続く。完全に他の A A 型で構成された配列は、わずか 1 / 1 . 1 E 1 1 で発生する。

【 0 2 4 5 】

表 2 1 の個々の他の配列は、同じ方法で d o b b l i n g できる。

【 0 2 4 6 】

【表 7 1】

表80: yycakGSGYCSGGSCYSFDYwgqgtlvtvss (配列番号931)のdobbling
(配列番号958として開示された 'KSGYCSGGSCYSFDYW')

位置	親(供給源)	許容
94	K (VH 3-23)	K
95	G (供給源なし)	GYSRD (3:1:1:1:1)
96	S (供給源なし)	SGYRD (3:1:1:1:1)
97	G (D2-15.2)	GYSRD (3:1:1:1:1)
98	Y (D2-15.2)	YGSRD (3:1:1:1:1)
99	C (D2-15.2)	C
100	S (D2-15.2)	SGYRD (3:1:1:1:1)
101	G (D2-15.2)	GYSRD (3:1:1:1:1)
102	G (D2-15.2)	GYSRD (3:1:1:1:1)
102a	S (D2-15.2)	SGYRD (3:1:1:1:1)
102b	C (D2-15.2)	C
102c	Y (D2-15.2)	YGSRD (3:1:1:1:1)
102d	S (D2-15.2)	SGYRD (3:1:1:1:1)
102e	F (JH4)	FYGSRD (3:1:1:1:1:1)
102f	D (JH4)	DGSRY (3:1:1:1:1)
102g	Y (JH4)	YGSRD (3:1:1:1:1)
103	W (JH4, FR4)	W

(実施例 5)

合成軽鎖の多様性

全抗体を作るために、重鎖のライブラリと軽鎖 (LC) のライブラリとを組み合わせる必要がある。天然 Ab において、HC が結合の大部分を行っており、多くのライブラリは LC にほとんど注目していない、または LC の多様性をヒトドナーから得ていることは、しばしば観察されることである。十分な多様性を有し、ほとんどすべての標的に対する優れたバインダーを得るために、本発明者らは、ヒト免疫系が通常に提供する多様化プログラムを超える多様化プログラムを設計した。にもかかわらず、このプログラムは、天然 Ab に見られるのと同様の变化を有する、完全に機能性の LC を若干多く得るためだけに設計された。V I I I A 27 を、LC として選別した。

【0247】

提供された および LC を含むライブラリから、1266 の Ab のコレクションを打ち込んだ。V K I I I の中で、A 27 は最も多くみられ (表 66)、HC 3-23 と良く対合する。

【0248】

A 27 の CDR は 12、7、および 9 個のアミノ酸を含有する。これらの位置すべてに多様性を加えることは、うまく機能しない恐れがあり、: a) 多くの不安定または非機能性のメンバーが存在する恐れがある、および b) いくつかの位置において、多様性が結合を改善する助けにならない恐れがある。本発明者らは、可変位置の数を 28 から 16 に減らした。

【0249】

本発明者らは、A 27 LC を有する 1QLR の 3D 構造を研究した。1GLR の構造は、RCDB タンパク質データベースにおいて公的に利用可能である。このことから、表 68 に示された残基は、変化させるのに有効と思われる。T 56 は、HC CDR 3 において His から約 10 である。56 での変化は有用であり得る。G 24 は、HC CDR 3 において原子からわずかに約 7 である。生殖系列は R 24 であり、したがって 24 での変化は有用であり得る。

【0250】

表 69 は、本発明者らが pMID 21 において使用するために設計したディスプレイカセットを示す。したがって、選別された制限酵素は pMID 21 に他の部位を有さない。Spe I は i i i シグナル配列中にあり、全 LC の挿入および除去を可能にする。Xma

I、P p u M I、E c o O 1 0 9 IおよびB l p Iは、C D R 1の前方にある。S a c I IはF R 2中にあり、C D R 1とC D R 2とを隔てている。あるいは、A v r I I I部位は同じ位置に挿入可能である。B s p E IおよびX h o I部位はF R 3中にあり、K p n I部位はF R 4中にある。

【 0 2 5 1 】

本発明者らは1 5 5のA 2 7配列を収集し、C D Rにおいて起こっていることを分析した。表7 0は分析結果を示す。表7 0において、本発明者らのライブラリ由来のA b中に発見されたもの、および本発明者らが個々の位置に置いたと思われるものを示す。

【 0 2 5 2 】

【 表 7 2 】

！ 表68: A27の変異場所

```

!
!           22      3      3      5      5      89      9
!           45      0a     4      0      5      90      5
!1QLR       GASQSVS_NYLA  DASSRAT  QQYGSSPLT
!A27        RASQSVSSSYLA  GASSRAT  QQYGSSPLT
!           **  * * * * *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

GASQSVSは、(配列番号922) NYLA(配列番号959)である

DASSRATは、(配列番号923)である

QQYGSSPLYは、(配列番号924) QQYGSSPLT(配列番号966)である

RASQSVSSSYLAは、(配列番号925)である GASSRATは、(配列番号926)である

表68は、A27のCDRが多彩化される場所を示す。

【 0 2 5 3 】

表67:VKIII AA配列の比較

VK3 は (配列番号927)である
 A27 は (配列番号960)である
 A11 は (配列番号961)である
 L2 は (配列番号962)である
 L16 は (配列番号962)である
 L6 は (配列番号963)である
 20 は (配列番号964)である
 25 は (配列番号965)である

[illegible]

VK3は、A27とE1D、G9A、I58V、D60A、R77Sが異なる。

A27とL6とは、G9A(FR1)、 $\Delta 31_a$ (CDR1中)、G50D(CDR2)、S53N(CDR2)、G92S(CDR3)、S93N(CDR3)、S94W(CDR3)が異なる。

WK3はUS7,264,963に由来

C D R 1

R 2 4、A 2 5 および S 2 6 は結合部位から遠すぎて役に立たず、一定に保たれた。V 2 9 の側基は埋もれており、この位置は V a l として一定に保たれていた。他の位置において、Y または S および帯電したフリップフロップ (R E または R D、問題の位置においてサンプルがより多くの E または D を有する場所に依存する) ならびに頻繁に見られた他の型を許容した。E x c e l のスプレッドシートを使用して、多彩化のこのパターンは、「他の」A A が 5 % 置換された場合、親配列は 0 . 8 %、「他の」A A が 6 . 5 % 置換された場合、親配列は 0 . 1 %、「他の」A A が 9 % 置換された場合、親配列は 0 . 0 2 % 得られることを決定した。1 5 5 のサンプルのうち、1 7 が、欠失された A A (1 Q L R を含む) を 1 つ有し、したがって、メンバーの約 8 % において S 3 0 a が欠失されるよう

に構成できる。

【0254】

C D R 2

1 Q L R の調査により、C D R 2 が結合部位から若干離れていることが分かった。それでも、このC D R 中の残基を一定に保つという提案がなされてきた。3 D 構造の研究により、G 5 0、S 5 3 および T 5 6 における多彩化が有用であり得ることが示唆される。S 5 3 は、1 5 5 のサンプルの中で最も可変であるが、このことは、これらの変化が有用であることの証明にはならない、1 Q L R において、G 5 0 は R 5 0 に突然変異している。T 5 6 のこの側基は、H C C D R 3 の方を向いており、H C C D R 3 中の原子から約 1 1 である。

【0255】

C D R 3

Q 8 9 および Q 9 0 は埋もれており、それらの性質はあまり変化せず、これらの残基は変化しない。Y 9 1 は、H C C D R 3 に対して包まれており、この場所の変化は結合部位を変更することになり、実際結合部位は変更される。G 9 2 において、 = - 8 0 および = - 1 5 であり、それ故 G 1 y 以外への配置が実行可能であり、4 7 / 1 5 5 例で自然に起こる。S 9 3 は非常に頻繁に変化し、欠失する。S 9 4 は高度に露出されており、高度に変化する。P 9 5 は露出されており、変化する。L 9 6 は、H C C D R 3 に対して包まれており、この場所の変化は結合部位に影響を与えることになり、実際に影響が起こる。T 9 7 は埋もれており、一定に保たれておりアミノ酸は変化しない。

【0256】

親配列は、0 . 0 0 0 2 4 6 または 1 / 4 . 0 6 E 3 で出現する。許容される多様性は、約 2 . 1 E 1 2 である。2 つに関しては 8 % が欠失しており、メンバーの 8 4 . 6 % が完全長であり、7 . 4 % が短い C D R 1 および完全長 C D R 3 を有し、7 . 4 % が完全長 C D R 1 および短い C D R 3 を有し、0 . 6 % が双方を欠失しているであろう。

【0257】

他の生殖系列はサンプル中に存在しなかった。

【0258】

【表 7 4】

表66:1266の選択されたLGにおけるVLの分布。							
κ				λ			
O12	VKI	313		1a	VL1	9	
O18	VKI	1		1e	VL1	7	
A20	VKI	26		1c	VL1	55	
A30	VKI	26		1g	VL1	46	
L14	VKI	2		1b	VL1	1	118
L1	VKI	5		2c	VL2	18	
L15	VKI	1		2e	VL2	23	
L5	VKI	83		2a2	VL2	79	
L8	VKI	10		2d	VL2	1	121
L12	VKI	77	544	3r	VL3	56	
O11	VKII	4		3j	VL3	4	
A17	VKII	17		3l	VL3	31	
A19	VKII	31	52	3h	VL3	22	113
A27	VKIII	155		4a	VL4	1	1
L2	VKIII	31		5c	VL5	1	1
L6	VKIII	88		6a	VL6	8	8
L25	VKIII	16	290	10a	VL10	6	6
B3	VKIV	12	12	λ の数			368
λ の数			898	サンプル中のAbの総数			1266

表69:pM21JのA27に関するディスプレイ遺伝子
IIIシグナル::A27::G κ

表69のアミノ酸配列は(配列番号928)である。
表69のDNA配列は(配列番号929)である。

```

!               シグナル配列 -----
!               1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15
!               M   K   K   L   L   S   A   I   P   L   V   V   P   F   Y
!               1   |atg|aaG|aaA|ctg|ctg|tct|gct|atc|ccA|CTA|GTt|gtc|cct|ttc|tat|
!                               SpeI....
!
!               シグナル-----FR1-----
!               16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30
!               S   H   S   E1  I   V3  L   T5  Q   S7  P   G9  T   L   S12
!               46  |tct|cat|agt|gaa|atc|gtt|ctg|acc|cag|tcC|CCG|GGG|aCC|Ctg|tct|
!                               XmaI....
!                               PpuMI....
!                               EcoO109I. (1/2)
!

```

【 0 2 5 9 】

【表 7 5】

	FR1-----															CDR1-----																																															
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45																																																
	L13	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C23	R24	A	S	Q																																																
91	ctg tct ccg ggt gaa cgt gct acG CTg AGC tgt cgt gct tct caa																																																														
	BspI.....																																																														
CDR1-----															FR2-----																																																
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60																																																
	S28	V	S	S	S30a	Y	L	A34	W	Y	Q	Q	K	P	G																																																
136	tcc ggt agC TCC Tct tat tta gct tgg tat cag caa aag ccg ggt																																																														
	BseRI...																																																														
FR2-----															CDR2-----																																																
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75																																																
	Q	A	P	R45	L	L	I	Y	G50	A	S	S	R	A	T56																																																
181	caa gct CCG CGG ctg ttg atc tat ggt gcc tct agt cgt gct act																																																														
	SacII..																																																														
FR3-----																																																															
	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90																																																
	G	I	P	D60	R	F	S	G	S65	G	S	G	T	D	F																																																
226	ggc atc cct gat cgt ttc tct ggc tct ggc TCC GGA acc gat ttc																																																														
	BspEI..																																																														
FR3-----																																																															
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105																																																
	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y																																																
271	act ctg acc att tct CGT CTC GAG ccg gaa gat ttc gct gtc tac																																																														
	BsmBI..																																																														
	XhoI...																																																														
FR3-----															FR4-----																																																
	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120																																																
	Y	C	Q89	Q	Y	G	S	S	P95	L	T	F	G	G	G																																																
316	tat tgt caa cag tat ggt tct agt ccg ctg act ttc ggt ggc GGT																																																														
	KpnI...																																																														
FR4-----																																																															
	121	122	123	124	125	126																																																									
	T	K	V	E	I	K																																																									
361	ACC aaa gtc gaa atc aag																																																														
	KpnI.																																																														
OK -----																																																															
	R	G	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S																																																
379	cgt	gga	act	gtg	gCT	GCA	Cca	tct	GTC	TTC	atc	ttc	ccg	cca	tct																																																
	BsgI....																																																														
	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L																																																
424	gat	gag	cag	ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	ggt	gtg	tgc	ctg	ctg																																																
	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D																																																
469	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat																																																
	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q																																																
514	aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggt	aac	tcc	cag	gaq	agt	gtc	aca	gag	cag																																																

【 0 2 6 0 】

【表 7 6】

```

!      D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T   L   T   L
559    gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg act ctg
!
!
!      S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E   V
604    tcc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa GTC TAC gcc tgc gaa gtc
!
!
!      T   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R
649    acc cat cAG GGC CTg agt tCA CCG GTG aca aag agc ttc aac agg
!      AlwNI..... SgrAI.....
!      EcoOI09I.(2/2) AgeI....
!
!      G   E   C   .   .
694    gga gag tgt taa taa
!
!      709                                GG CGCGCCaatt
!                                AscI.....
!                                BssHII.
!

```

表70:A27 AbのCDR1における突然変異の集計

CDR1 (配列番号925として開示された'RASQSVSSSYLA')	
R24 1, 3G, 1T, 151-,	固定
A25 2, 3T, 152-,	固定
S26 3, 1R, 154-,	固定
Q27 4, 3E, 1H, 1L, 1P, 4R, 145-,	9% ERYSL
S28 5, 1A, 2F, 2G, 1I, 2L, 5N, 1P, 1R, 10T, 1V, 1Y, 128-,	9% NTYERL
V29 6, 1F, 19I, 6L, 129-,	固定
S30 7, 2A, 2D, 8G, 2H, 1I, 11N, 9R, 6T, 4V, 2Y, 108-,	9% DNRTY
S30a 8, 1A, 2F, 6G, 1H, 6N, 1P, 10R, 6T, 3Y, 119-,	9% GNRTYD
(8%(130aを欠失)	
S31 9, 1A, 5D, 3F, 4G, 1H, 2I, 4K, 1L, 31N, 19R, 7T, 7Y, 70-,	9% DFGNRTY
Y32 10, 5F, 1K, 14L, 4N, 4Q, 2R, 8S, 3V, 1W, 113-,	9% FDLNQRSY
L33 11, 16A, 1F, 4I, 1N, 1S, 8V, 1Y, 123-,	固定
A34 12, 2G, 2L, 1N, 1S, 4V, 128-,	9% SY
- 13, 2A, 1G,	
- 14, 1S,	
- 15, 1S,	
- 16, 1Y,	
- 17, 1L,	
- 18, 1A,	

注:CDR1に6個のAAが挿入された抗体は1つであった!他の2つのAbは挿入が1つであった。
17のAbは、CDR1において1個のAAが欠失した。

CDR2 (配列番号926として開示された'GASSRAT')	
G50 1, 10A, 11D, 1H, 2R, 2S, 1V, 7Y, 121-,	9% DRSYL
A51 2, 7G, 2I, 6S, 7T, 2V, 131-,	固定
S52 3, 6A, 3F, 1G, 1T, 144-,	固定
S53 4, 1A, 1G, 1H, 5I, 2K, 16N, 7R, 16T, 106-,	9% NTSYER
R54 5, 1A, 1I, 1N, 1S, 3T, 1Y, 147-,	固定
A55 6, 2P, 7R, 4S, 2V, 140-,	固定

【 0 2 6 1】

【表 7 7】

T56 7, 10A¹, 1G, 1H, 2P, 4S, 137-,
 8, 1A, 6T,

9% ERSY

注:AAが1個挿入された抗体は7つである。

CDR3 (「_」の表現は、AbがCDR3において欠失を有することを意味する。)

(配列番号966として開示された'QQYGSSPLT')

Q89 1, 5H, 1L, 2M, 147-,

固定

Q90 2, 1E, 1F, 13H, 2K, 2L, 4R, 1S, 1Y, 130-,

固定

Y91 3, 2A, 8F, 2G, 2H, 1L, 1P, 13R, 4S, 122-,

9% FERS

G92 4, 10A, 3D, 2H, 1I, 1L, 2N, 6R, 12S, 2V, 3Y, 108-, 5_,

9% ADRSTY

S93 5, 1A, 2D, 2F, 6G, 2H, 3I, 2K, 2M, 14N, 1P, 1Q, 8R, 17T, 2Y, 86-, 6_,

9% DFNRTY

(8%は93を欠失)

S94 6, 3A, 6F, 1I, 3L, 3P, 2R, 2T, 11W, 117-, 7_,

9% WERYS

P95 7, 2A, 1E, 1G, 1K, 3L, 1M, 7R, 3S, 3T, 1V, 108-, 24_,

9% ERYs

L96 8, 2A, 2E, 3F, 3G, 1H, 1I, 3K, 7L, 2M, 24P², 6Q, 28R, 3S, 3T, 7V, 2Y, 58-,

9% ERPYS

T97 9, 2A, 1F, 2G, 3I, 1K, 2L, 3M, 1N, 1R, 6S, 3V, 2Y, 128-,

固定

10, 1A, 1S, 34-,

11, 1S, 7-,

12, 1A,

3個のAAが挿入されたAbは1つである。

5つは4個のAAが欠失しており、1つは3個のAAが欠失しており、1つは2個のAAが欠失しており、17は1個のAAが欠失している。

表71:A27::JK4のCDR1、2および3の許容される多様性。

(配列番号925として開示された'RASQSVSSSYLA'; 配列番号926として開示された'GASSRAT'; 配列番号966として開示された'QQYGSSPLT')

位置	親	許容	
CDR1			
42(24)	R	固定	
43(25)	A	固定	
44(26)	S	固定	
45(27)	Q	ERYSL	55%Q 9% 他の型
46(28)	S	NTYERL	46%S 9% 他の型
47(29)	V	固定	
48(30)	S	DNRTY	55%S 9% 他の型
49(30a)	S	GNRTYD	46%S 9% 他の型
8%は30aを欠失			
50(31)	S	DFGNRTY	44%S 8% 他の型
51(32)	Y	FDLNQRSY	44%Y 7% 他の型
52(33)	L	固定	
53(34)	A	SY	70%A 15% 他の型
CDR2			
69(50)	G	DRSYL	55%G 9% 他の型
70(51)	A	固定	
71(52)	S	固定	
72(53)	S	NTSYER	52%S 8% 他の型
73(54)	R	固定	
74(55)	A	固定	
75(56)	T	ERSY	64%T 9% 他の型
CDR3			
108(89)	Q	固定	
109(90)	Q	固定	
110(91)	Y	FERS	64%Y 9% 他の型
111(92)	G	ADRSTY	52%G 8% 他の型

¹これらのうち7つは挿入によってもたらされる

²これらのうちいくつかは、挿入により出現する。

【0 2 6 2】

【表 7 8】

112(93)	S	DFNRTY	52%S 8% 他の型
113(94)	S	WERYS	55%S 9% 他の型
114(95)	P	ERYS	64%P 9% 他の型
8%はP95を欠失			
115(96)	L	ERPYS	55%L 9% 他の型
116(97)	T	固定	

親配列は、5 . 3 2 E - 5 または 1 / 1 . 8 8 E 4 で出現する。

【0 2 6 3】

単一置換の配列は、 1.1×10^{-5} から 7.5×10^{-6} の確率である。

【 0 2 6 4 】

親 A A を 1 つも有さない配列は、 $1 / 6.7 \times 10^6$ で起こる。

【 0 2 6 5 】

許容される多様性は、約 2.35×10^2 である。

【 0 2 6 6 】

【 表 7 9 】

表75:HC CDR3におけるアミノ酸の頻度

AA	数	%	Rel up	Rel down
Y	3428	15.64	50.41	1.00
G	3244	14.80	47.71	0.95
D	2622	11.96	38.56	0.76
S	1777	8.11	26.13	0.52
R	1337	6.10	19.66	0.39
F	1328	6.06	19.53	0.39
A	1213	5.53	17.84	0.35
V	1141	5.20	16.78	0.33
L	816	3.72	12.00	0.24
I	745	3.40	10.96	0.22
P	726	3.31	10.68	0.21
T	586	2.67	8.62	0.17
W	566	2.58	8.32	0.17
M	560	2.55	8.24	0.16
N	462	2.11	6.79	0.13
E	363	1.66	5.34	0.11
K	355	1.62	5.22	0.10
H	327	1.49	4.81	0.10
Q	259	1.18	3.81	0.08
C	68	0.31	1.00	0.02
総数	21923			

【 0 2 6 7 】

【表 8 0】

表76:HC CDR3の長さの分布

長さ	抗体数	合計	中央値
1	0		
2	0		
3	2	2	
4	21	23	
5	16	39	
6	100	139	
7	36	175	
8	78	253	
9	155	408	
10	153	561	
11	134	695	11.12
12	123	818	
13	133	951	
14	92	1043	
15	87	1130	
16	71	1201	
17	59	1260	
18	41	1301	
19	40	1341	
20	22	1363	
21	21	1384	
22	15	1399	
23	7	1406	
24	7	1413	
25	1	1414	
26	1	1415	
27	3	1418	
28	0	1418	
29	0	1418	
30	1	1419	
	1419	709.5	

表77:Dセグメントの利用(カットオフは0.70の一致)

3-22.2	38	YYDSSGYYY	配列番号 88
4-17.2	27	DYGDY	195
3-3.2	25	YYDFWSGYYT	177
6-19.1	25	GYSSGWY	218
7-27.1	19	LTG	221

【 0 2 6 8 】

【表 8 1】

5-5.3	18	GYSYGY	786
6-13.1	18	GYSSSWY	215
5-12.3	13	GYSGYDY	205
6-13.2	10	GIAAAG	216
1-26.3	9	YSGSY	284
2-15.2	9	GYCSGGSCYS	136
4-4.3	9	TTVT	190
3-10.2	8	YYYGSGSYN	81
1-1.3	7	YNWND	262
4-4.2	7	DYSNY	754
2-2.2	6	GYCSSTSCYT	70
3-16.2	6	YYDYVWGSYRYT	104
6-6.1	6	EYSSSS	212
6-19.2	6	GIAVAG	219
3-9.1	5	VLRYFDWLL@	179
4-23.2	5	DYGGNS	198
6-6.2	5	SIAAR	213
1-7.3	4	YNWNY	270
2-2.3	4	DIVVPAI	168
4-23.3	4	TTVVT	199
1-7.1	3	GITGT	268
1-26.1	3	GIVGAT	282
7-27.3	3	NWG	223
3-10.1	2	VLLWFGELL@	182
3-10.2	2	ITMVRGVII	183
5-5.1	2	VDTAMV	200
5-5.2	2	WIQLWL	201
5-12.1	2	VDIVATI	203
5-24.3	2	RDGYNY	211
1-1.1	1	GTTGT	260
2-21.3	1	HIVVVTAI	175
3-3.3	1	ITIFGVVII	178
5-24.2	1	*RWLQL	210
6-6.3	1	V*QLV	214
6-19.3	1	V*QWLV	220

表 78: D セグメントの利用 (カットオフは 0.667 の一致)

名前	番号	配列	配列番号	%
なし	935			0.517

【 0 2 6 9 】

【表 8 2 - 1】

7-27.1	158	LTG	221	0.087
7-27.3	98	NWG	223	0.054
5-5.3	72	GYSYGY	786	0.040
1-26.3	67	YSGSY	166	0.037
3-22.2	46	YYYDSSGYYY	187	0.025
4-17.2	38	DYGDY	195	0.021
3-3.2	37	YYDFWSGYT	177	0.020
7-27.2	37	@LG	222	0.020
6-19.1	33	GYSSGWY	218	0.018
6-13.2	31	GIAAAG	860	0.017
6-13.1	22	GYSSSWY	215	0.012
6-6.1	18	EYSSSS	847	0.010
6-19.2	18	GIAVAG	879	0.010
4-23.2	17	DYGGNS	198	0.009
5-12.3	17	GYSGYDY	205	0.009
5-24.3	14	RDGYNY	211	0.008
2-15.2	13	GYCSGGSCYS	136	0.007
1-26.1	11	GIVGAT	164	0.006
4-4.3	11	TTVT	190	0.006
1-1.3	9	YNWND	262	0.005
2-2.2	9	GYCSSTSCYT	70	0.005
3-16.2	9	YYDYVWGSYRYT	104	0.005
2-2.3	8	DIVVPAAI	168	0.004
3-10.2	8	YYYGSGSYYN	81	0.004
4-4.2	8	DYSNY	192	0.004
1-7.3	7	YNWNY	270	0.004
3-3.3	6	ITIFGVVII	178	0.003
6-6.2	6	SIAAR	213	0.003
3-9.1	5	VLRYFDWLL@	179	0.003
3-10.2	5	ITMVRGVII	183	0.003
6-19.3	5	V*QWLV	220	0.003
1-7.1	4	GITGT	268	0.002
4-23.3	4	TTVVT	768	0.002
1-1.1	3	GTTGT	156	0.002
5-5.1	3	VDTAMV	200	0.002
5-24.2	3	*RWLQL	210	0.002
3-10.1	2	VLLWFGELL@	182	0.001
5-5.2	2	WIQLWL	201	0.001
5-12.1	2	VDIVATI	203	0.001

【表 8 2 - 2】

1-26.2	1	V*WELL	165	0.001
2-21.2	1	AYCGGDCYS	174	0.001
2-21.3	1	HIVVVTAI	175	0.001
3-3.1	1	VLRFLWLLY	176	0.001
3-16.2	1	IMITFGGVIVI	185	0.001
6-6.3	1	V*QLV	214	0.001
6-13.3	1	V*QQLV	217	0.001

表 78: JH セグメントの利用

JH1	17
JH2	31
JH3	452
JH4	636
JH5	32
JH6	251

(実施例 6)

H C C D R 3 1 6 d のための W o b b l i n g された D N A

表 4 0 0 は、F R 3 中の X b a I 部位から F R 4 中の B s t E I I 部位までの D N A のセグメントを示す。H C C D R 3 は、S Y S Y : : D 2 - 2 (2) : : Q H (配列番号 9 4 7 として開示された ' S Y S Y ')、続いて J H 1 の F R 4 領域からなる。Q H は、J H 1 の生殖系列において見出される。V - D - J 接合において、免疫細胞は V、D および J の末端を頻繁に編集する。したがって、構成は、実際の免疫グロブリン遺伝子の構成および成熟において非常に可能性が高いものに対応する。w o b b l i n g による合成により、本発明者らは、3 - 2 3 と、D 領域またはほとんど編集されていない J H 1 との接合、続くいくつかの突然変異に由来するものに似ている、遺伝子の大きなコレクションを得る。ライブラリ 1 6 d において、推定上ジスルフィドを形成する 2 つのシステインが存在し、これらは w o b b l i n g されない。

【0 2 7 0】

表 5 0 0 は、1 6 d ライブラリにおける、個々の位置でのアミノ酸型の期待分布を示す。w o b b l i n g の d o p i n g は 7 3 : 9 : 9 : 9 に設定された。最も可能性のある配列は表 2 1 に示す配列であり、頻度が 4.8×10^{-5} で存在するはずである。5 5 % の配列だけが終止を含まず、7 4 % がオーカーまたはオペルを含まない。ライブラリが s u p E 細胞において発現する場合、これは重要な数である。終止コドンを含む配列を取り除くことは、本明細書の他の場所で述べたように、価値のあることである。S で始まるそれらの位置が、5 4 % の確率で S を、5.4 % の確率で Y を有すると予測され、一方、Y で始まるものは、4 4 % の確率で Y を、7.2 % の確率で S を有することが見て取れる。個々の位置において、1 % を超えて出現する 7 ~ 9 の A A 型が存在する。1 4 の多彩化された位置が存在する。最も有効であると思われる配列は、約 $8^{14} = 4.3 \times 10^5$ の数をサンプリングした。

【0 2 7 1】

【表 8 3】

表400:wobblingされたHC CDR3 16dのディスプレイのためのカセット

```

! -----FR3-----
!      68  69  70  71  72  73  74  75  76  77  78  79  80  81  82
!      T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M
! 1216 |act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|
!      | XbaI |
!
! -----FR3----->|
!      82a 82b 82c 83  84  85  86  87  88  89  90  91  92  93  94
!      N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   K
! 1261 |aac|agc|TTA|AGg|gct|gag|gac|act|gca|gtc|tac|tat|tgc|gct|aaa|
!      |AflII |
!
!

```

【 0 2 7 2 】

【表 8 4】

```

! e = 0.73 A + 0.09 C + 0.09 G + 0.09 T
! q = 0.09 A + 0.73 C + 0.09 G + 0.09 T
! j = 0.09 A + 0.09 C + 0.73 G + 0.09 T
! z = 0.09 A + 0.09 C + 0.09 G + 0.73 T
! 0.73+3×0.09=1.0のように、0.73および0.09の値が選別される。
! 他の比率も使用できる。
!
!      102 102 102 102 102 102 102 102
!      95  96  97  98  99  100 101 102 a  b  c  d  e  f  g  h
!      S   Y   S   Y   G   Y   c   S   S   T   S   c   Y   T   Q   H
!      zqz zez zqz zez jjz zez TGT zqz zqz eqz zqz TGT zez eqz qej qez
!
! -----FR4----->|
!      103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
!      W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   (配列番号968)
!      |TGg|ggg|caa|ggg|act|ttG|GTC|ACC|gtc|tct|agt (配列番号967)
!      | BstEII |
!
!

```

表500:wobblingされたHC CDR3 16dにおけるAA型の期待分布

"." = TGA または TAA; "b" = TAG

配列番号970として開示されたアミノ酸

配列番号969として開示されたDNA配列

```

S   Y   S   Y   G   Y   c   S   S   T   S   c   Y   T   Q   H
zqz zez zqz zez jjz zez tgt zqz zqz eqz zqz tgt zez eqz qej qez

```

名目塩基純度 = 0.7300 他 = 0.0900

s(zqz)	y(zez)	s(zqz)	y(zez)	g(jjz)	y(zez)	C(TGT)	s(zqz)	s(zqz)	t(eqz)
1 s 5.4-01	y 4.4-01	s 5.4-01	y 4.4-01	g 5.3-01	y 4.4-01	c 1.000	s 5.4-01	s 5.4-01	t 5.3-01
2 p 6.6-02	s 7.2-02	p 6.6-02	s 7.2-02	r 7.8-02	s 7.2-02		p 6.6-02	p 6.6-02	s 1.2-01
3 a 6.6-02	f 5.4-02	a 6.6-02	f 5.4-02	a 6.6-02	f 5.4-02		a 6.6-02	a 6.6-02	a 6.6-02
4 t 6.6-02	h 5.4-02	t 6.6-02	h 5.4-02	v 6.6-02	h 5.4-02		t 6.6-02	t 6.6-02	p 6.6-02
5 f 5.4-02	n 5.4-02	f 5.4-02	n 5.4-02	s 6.2-02	n 5.4-02		f 5.4-02	f 5.4-02	i 6.0-02
6 c 5.4-02	c 5.4-02	c 5.4-02	c 5.4-02	c 5.4-02	c 5.4-02		c 5.4-02	c 5.4-02	n 5.4-02
7 y 5.4-02	d 5.4-02	y 5.4-02	d 5.4-02	d 5.4-02	d 5.4-02		y 5.4-02	y 5.4-02	r 2.0-02
8 l 2.0-02	. 5.4-02	l 2.0-02	. 5.4-02	e 1.2-02	. 5.4-02		l 2.0-02	l 2.0-02	k 1.2-02
9 . 1.2-02	b 4.8-02	. 1.2-02	b 4.8-02	l 9.6-03	b 4.8-02		. 1.2-02	. 1.2-02	l 9.6-03
10 r 9.6-03	l 2.0-02	r 9.6-03	l 2.0-02	t 8.1-03	l 2.0-02		r 9.6-03	r 9.6-03	g 8.1-03
11 g 8.1-03	k 1.2-02	g 8.1-03	k 1.2-02	p 8.1-03	k 1.2-02		g 8.1-03	g 8.1-03	v 8.1-03
12 v 8.1-03	q 1.2-02	v 8.1-03	q 1.2-02	i 7.4-03	q 1.2-02		v 8.1-03	v 8.1-03	f 6.6-03
13 i 7.4-03	e 1.2-02	i 7.4-03	e 1.2-02	. 6.6-03	e 1.2-02		i 7.4-03	i 7.4-03	c 6.6-03
14 h 6.6-03	r 9.6-03	h 6.6-03	r 9.6-03	f 6.6-03	r 9.6-03		h 6.6-03	h 6.6-03	h 6.6-03
15 n 6.6-03	t 8.1-03	n 6.6-03	t 8.1-03	h 6.6-03	t 8.1-03		n 6.6-03	n 6.6-03	d 6.6-03
16 d 6.6-03	v 8.1-03	d 6.6-03	v 8.1-03	y 6.6-03	v 8.1-03		d 6.6-03	d 6.6-03	y 6.6-03
17 w 5.9-03	a 8.1-03	w 5.9-03	a 8.1-03	n 6.6-03	a 8.1-03		w 5.9-03	w 5.9-03	m 5.9-03
18 b 5.9-03	g 8.1-03	b 5.9-03	g 8.1-03	w 5.9-03	g 8.1-03		b 5.9-03	b 5.9-03	q 1.5-03
19 q 1.5-03	p 8.1-03	q 1.5-03	p 8.1-03	q 1.5-03	p 8.1-03		q 1.5-03	q 1.5-03	e 1.5-03
20 k 1.5-03	i 7.4-03	k 1.5-03	i 7.4-03	k 1.5-03	i 7.4-03		k 1.5-03	k 1.5-03	. 1.5-03
21 e 1.5-03	w 5.9-03	e 1.5-03	w 5.9-03	m 7.3-04	w 5.9-03		e 1.5-03	e 1.5-03	w 7.3-04
22 m 7.3-04	m 7.3-04	m 7.3-04	m 7.3-04	b 7.3-04	m 7.3-04		m 7.3-04	m 7.3-04	b 7.3-04

【 0 2 7 3 】

【 表 8 5 】

s(zqz)	C(TGT)	y(zez)	t(eqz)	q(qej)	h(qez)
1 s 5.4-01	c 1.000	y 4.4-01	t 5.3-01	q 4.4-01	h 4.4-01
2 p 6.6-02		s 7.2-02	s 1.2-01	h 9.6-02	q 9.6-02
3 a 6.6-02		f 5.4-02	a 6.6-02	l 7.2-02	l 6.7-02
4 t 6.6-02		h 5.4-02	p 6.6-02	r 7.2-02	r 6.7-02
5 f 5.4-02		n 5.4-02	i 6.0-02	p 6.6-02	p 6.6-02
6 c 5.4-02		c 5.4-02	n 5.4-02	e 5.4-02	n 5.4-02
7 y 5.4-02		d 5.4-02	r 2.0-02	k 5.4-02	d 5.4-02
8 l 2.0-02		. 5.4-02	k 1.2-02	b 4.8-02	y 5.4-02
9 . 1.2-02		b 4.8-02	l 9.6-03	d 1.2-02	s 1.5-02
10 r 9.6-03		l 2.0-02	g 8.1-03	y 1.2-02	k 1.2-02
11 g 8.1-03		k 1.2-02	v 8.1-03	n 1.2-02	e 1.2-02
12 v 8.1-03		q 1.2-02	f 6.6-03	s 9.6-03	g 8.1-03
13 i 7.4-03		e 1.2-02	c 6.6-03	t 8.1-03	t 8.1-03
14 h 6.6-03		r 9.6-03	h 6.6-03	v 8.1-03	v 8.1-03
15 n 6.6-03		t 8.1-03	d 6.6-03	a 8.1-03	a 8.1-03
16 d 6.6-03		v 8.1-03	y 6.6-03	g 8.1-03	i 7.4-03
17 w 5.9-03		a 8.1-03	m 5.9-03	. 6.6-03	. 6.6-03
18 b 5.9-03		g 8.1-03	q 1.5-03	w 5.9-03	c 6.6-03
19 q 1.5-03		p 8.1-03	e 1.5-03	m 5.9-03	f 6.6-03
20 k 1.5-03		i 7.4-03	. 1.5-03	i 2.2-03	b 5.9-03
21 e 1.5-03		w 5.9-03	w 7.3-04	f 1.5-03	w 7.3-04
22 m 7.3-04		m 7.3-04	b 7.3-04	c 1.5-03	m 7.3-04

最も可能性の高い配列の有する頻度 = 4.8E-05

終止コドンを含まない分画 = 5.5E-01

(TAAおよびTGA)を含まない分画 = 7.4E-01

【 0 2 7 4 】

【表 8 6】

		F%	F%	F%
D1	1-1	0.42	0.14	2.90
	1-7	0.42	0.28	1.24
	1-20	0.00	0.00	0.00
	1-26	0.00	0.97	1.80
D2	2-2	0.55	4.30	1.21
	2-8	0.00	0.67	0.41
	2-15	0.28	4.03	0.94
	2-21	0.00	2.22	0.94
D3	3-3	0.94	4.44	3.70
	3-9	0.67	1.82	0.00
	3-10	0.67	5.78	1.55
	3-16	1.08	2.49	0.67
	3-22	0.14	7.87	0.81
D4	4-4	0.28	0.69	0.28
	4-11	0.00	0.00	0.00
	4-17	0.00	4.03	2.76
	4-23	0.14	1.41	0.54
D5	5-5	1.34	0.40	4.30
	5-12	1.08	0.00	1.95
	5-18	0.00	0.00	0.00
	5-24	0.67	1.55	1.82
D6	6-6	1.21	1.55	0.13
	6-13	4.84	2.62	0.27
	6-19	6.66	1.95	0.54
D7	7-27	0.27	0.13	0.27

分画%の総計 21.65 49.34 29.01

!表800: LC K1(O12)::JK1

!配列番号972として開示されたアミノ酸

配列番号971として開示されたDNA配列

```

!
! ..リーダー配列.  ->|----- FR1 ----->
!
!      G   V   H   S   A   Q      1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11
!      |ggT|GTA|CAC|aGT|GCT|Cag|gat|att|cag|atg|act|caa|tct|ccC|TCG|AGt|ctg|
!      BsrGI...   ApaLI...                               XhoI....
!
! ----- FR1 ----->|--- CDR1 --->
!      12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26
!      S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S
!      |tct|gct|tct|gtc|gGC|GAT|CGC|ggt|act|att|act|tgt|cgt|gct|tcc|
!      SgfI.....
!
! ----- CDR1 ----->|----- FR2 ----->
!      27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41
!      Q   S   I   S   S   Y   L   N   W   Y   Q   Q   K   P   G
!      |cag|tcc|att|tct|agc|tat|ctg|aat|tGG|TAC|Cag|caa|aag|ccg|ggg|
!      KpnI....
!
! ----- FR2 ----->|--- CDR2 --->|
!      42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56

```

【 0 2 7 5 】

【表 8 7】

```

!      K  A  P  K  L  L  I  Y  A  A  S  S  L  Q  S
136   |aag|gct|ccg|aaa|ctg|tta|atc|tat|gcc|gct|tct|agt|ctg|cag|tct|
!
!      ----- FR3 ----->
!      57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71
!      G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F
181   |ggg|gtt|ccg|TCT|AGA|ttc|tct|ggc|tct|ggg|tct|ggg|act|gat|ttt|
!      XbaI...
!
!      ----- FR3 ----->
!      72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
!      T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y
226   |act|ctg|act|att|tcc|tct|ctg|caa|ccg|gag|gac|ttt|gct|acc|tat|
!
!      - FR3->|---- CDR3 ----->|---- FR4 ----->
!      87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101
!      Y  C  Q  Q  S  Y  S  T  P  W  T  F  G  Q  G
271   |tac|tgc|caa|cag|tct|tat|agt|act|ccg|tgg|act|ttc|ggg|caa|ggc|
!
!      ----- FR4 ----->|---- CK ----->
!      102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116
!      T  K  V  E  I  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F
316   |act|aaa|gtt|gag|att|aag|CGT|ACG|gtg|gct|gct|ccg|tct|gtc|ttc|
!      BsiWI..

```

表900:CDR1の多様性 (配列番号973)

												多様性
位置	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
O12	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	
多様性	2	2	1	1	3	1	2	2	4	1	3	576
許容	Q	M			D		R	N	D		A	
					G				W		G	
									A			

表1000:大型のCDR1の多様性

												多様性
位置	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
O12	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N	
多様性	3	2	4	1	5	1	4	5	5	1	6	72000
許容	Q	M	E		D		R	N	D		A	
	E		R		G		E	E	W		G	
			Y		R		Y	R	A		D	
					Y			Y	R		R	
											Y	

【 0 2 7 6 】

【表 8 8】

表1100:GDR2の多様性								
位置	50	51	52	53	54	55	56	多様性
O12	A	A	S	S	L	Q	S	
多様性	2	1	1	3	1	2	2	24
許容	D			N		E	T	
				T				

表1200:大型のGDR2の多様性								
位置	50	51	52	53	54	55	56	多様性
O12	A	A	S	S	L	Q	S	
多様性	4	1	4	6	1	4	5	1920
許容	D		E	N		E	T	
	R		R	T		R	Y	
	Y		Y	E		Y	R	
				R			E	
				Y				

表1300:GDR3の多様性											
位置	93	94	95	96	97	98	99	100	101	div.	tot.
O12	Q	Q	S	Y	S	S	P	W	T		
多様性	2	2	6	3	3	5	2	1	1	2160	
許容	L	K	Y	D	N	T	S				
			H	N	Y	L					
			F			Y					
			A			F					
			D								

表1400:大型のGDR3の多様性											
位置	93	94	95	96	97	98	99	100	101	div.	tot.
O12	Q	Q	S	Y	S	S	P	W	T		
多様性	6	1	7	7	6	5	2	6	1	105840	
許容	L		Y	D	N	T	S	F			
	E		H	N	Y	L		Y			
	R		F	R	D	Y		H			
	Y		A	A	R	F		L			
	A		D	L	A	E		I			
			R	S		R					

(実施例7)

合成HC CDR3のさらなる例

FAB-310またはFAB-410のライブラリから選択された異なるCDR3を有し、少なくとも1種の抗原に対してELISAであった、22,063のFabのコレクションを検査した。JH鎖の利用を、表1001に示す；個々のJHのFR4部分を太字で示す。表1010は、HC CDR3におけるアミノ酸の利用を示す。表1020は、CDR3の長さの分布を示す。長さの中央値は11.5である。

【0277】

表 1030 は、CDR3 における D セグメントの利用を示す。特定された D セグメントは、一致したアミノ酸の 70% であった。； 5, 654 例 (25.6%) が存在した。最も使用された D は、3-3.2 (743、配列：YYDFWSGY YT (配列番号 177))、3-22.2 (617、配列：YY YDSSGY Y (配列番号 88))、6-19.1 (441、配列：GYSSGWY (配列番号 218))、6-13.1 (399、配列：GYSSSWY (配列番号 215)) および 4-17.2 (392、配列：DYG DY (配列番号 760)) であった。対合した Cys 残基を含有する D のうち、2-15.2 (配列：GYCSGGSCYS (配列番号 136)) が最も使用された；コレクションの 0.6% である 139 の例が存在した。

【0278】

V または V : : D が J に接合される場合、V または V : : D の 3' 末端および J の 5' 末端が多くの場合編集されている。多数の CDR3 - FR4 配列の調査により、多くの場合、CDR3 の一部を構成する JH の一部が存在することが示される。多くの場合、JH 残基 1~9 に対応する CDR3 残基において、突然変異が存在する。本明細書において、JH に由来すると思われる CDR3 の一部は、「Jstump」と呼ばれる。重鎖に使用される JH は、6 から 20 位の 6 つの JH 鎖の個々の残基と、CDR3 の最後の 4 個のアミノ酸と FR4 との融合を比較することによって決定される。不一致が最も少ない JH を選択する。CDR3 配列を、Jstump に関して、9 位から CDR3 と比較した選択された JH の第 1 の位置へ、検索が、a) JH の末端、b) CDR3 の末端または c) 2 つの連続する不一致により終了するまで、選択された JH において逆に働くことによって検査した。鎖の末端の 1 つと、最後の比較位置が一致する場合、その場合 Jstump に含まれる。一致しない場合は、Jstump に含まれない。表 1070 は、いくつかの例を示す。CDR は上に記載し、JH は下であり、Jstump は下線を引いてある。1070A において、本発明者らは、9 位から始め、V は V に一致し、本発明者らは、一致する 6 位へと続けた。検索は、二重の不一致のため、4 位で停止する。GMDV (配列番号 974) は Jstump の蓄積内となり、GL は「リードイン」の蓄積内となる。1070B において、検索は JH 6 の末端で停止する。下線の残基は、Jstump の蓄積内となり、EPIWG (配列番号 975) はリードインの蓄積内となる。1070E において、検索は JH 4 の末端のため終了するが、被験最終残基 (CDR 中の D 対 JH 4 中の Y) は不一致であり、それ故、Jstump は FDS であり、DSGVVAAAD (配列番号 976) はリードインの蓄積内となる。

【0279】

表 1015 は、Jstump を取り除いてある D セグメントを有さない CDR3 のアミノ酸分布を示す。Tyr の頻度は、全 CDR3 がコンパイルされた場合よりさらに低いことに留意されたい。このことは、D セグメントおよび Jstump の組み込みを介して、Tyr が CDR3 に大量に入ってくることを示す。これらの Tyr はランダムには挿入されないが、哺乳類の進化を通して選択されてきた配列において生じる。高レベル (20% を超える) の Tyr が、D および Tyr を含有する Jstump の組み込みを介してライブラリに挿入されるはずであることが、本発明の特徴である。リードイン位置または DJ フィラー位置において、Tyr は許容されるが、20% 以下である。

【0280】

【表 8 9】

表1070:Jスタンプの割当ての例

A)			
6	GLGMDV	(配列番号977)	
JH6	YYYYYGMDVWGQGTITVTVSS	(配列番号3)	
	123456789		
B)			
13	EPIWGYYYYGMDV	(配列番号978)	
JH6	YYYYYGMDVWGQGTITVTVSS	(配列番号3)	
C)			
9	DFFTSYFDY	(配列番号979)	
JH4	-----YFDYWGQGTILVTVSS	(配列番号1)	
D)			
12	DRGVSLLGAFDI	(配列番号980)	
JH3	-----AFDIWGQGTIMVTVSS	(配列番号2)	
E)			
12	DSGVVAAADFDS	(配列番号981)	
JH4	-----YFDYWGQGTILVTVSS	(配列番号1)	
	6789		

表 1 0 8 2 は、個々の J H の J s t u m p におけるアミノ酸の使用分布を示す。最も一般的な J H は J H 3、J H 4 および J H 6 であるので、これらはライブラリ構築にとって好ましい J H である。表 1 0 8 2 は、C D R 3 においてテトラペプチド配列 A F D I (配列番号 9 8 6) を保有する J H 3 の例が最も多いことを示す。J H 4 では、多数が D Y を保有し、大型の分画が C D R 3 において配列 F D Y を保有する。J H 6 では、大多数が配列 D V を保有し、多数が配列 M D V を保有し、かなりの分画が配列 G M D V (配列番号 9 7 4) を保有する。配列 Y G M D V (配列番号 9 8 2)、Y Y G M D V (配列番号 9 8 3) または Y Y Y G M D V (配列番号 9 8 4) を保有する分画も少なくない。

【0 2 8 1】

5 . 0 0 1 (表 1 0 9 7) などのライブラリが、本発明のライブラリに含まれる。ライブラリ 5 . 0 0 1 は、本出願の他所に記載のように、L C および H C C D R 1 ~ 2 を含有する。このライブラリは、H C V H (例えば、3 - 2 3)、続いて表 1 0 9 7 に示される割合で [G S R D L Y] を許容する 6、7 または 8 個のアミノ酸を含有する。J s t u m p において、親アミノ酸は、「他の」アミノ酸型の 3、4、5、6、7、8、1 0 倍で存在する。「他の」アミノ酸型は、Y、S、D、R、G を含む。したがって、A 6 において、本発明者らは、7 / 1 2 の A ならびに個々に 1 / 1 2 の Y、S、D、R、および G を許容する。F 7 において、本発明者らは、7 / 1 2 の F ならびに個々に 1 / 1 2 の Y、S、D、R および G を許容する。D 8 において、本発明者らは、7 / 1 1 の D ならびに 1 / 1 1 の Y、S、R、および G を許容する。I 9 において、本発明者らは、7 / 1 2 の I ならびに 1 / 1 2 の Y、S、R、D、G を許容する。親アミノ酸は、他のアミノ酸型より 5、6、7、8、1 0 倍可能性が高い。

【0 2 8 2】

表 1 0 9 7 のライブラリ 5 . 0 0 2 が、本発明のライブラリに含まれる。このライブラリは、長さ 1 3、1 4 および 1 5 の C D R 3 を含み、D セグメントは含まない。G、S、R、D、L、または Y を 1 : 0 . 5 7 : 0 . 4 6 : 0 . 4 2 : 0 . 3 6 : 0 . 3 5 の比率で、またはそれらに対して合理的な近似で許容する 6、7、8 個のリードイン残基が存在する。C D R 3 は、J H 6 の一部分: Y Y Y G M D V (配列番号 9 8 4) で完了する。親配列 Y Y Y G M D V (配列番号 9 8 4) をコードする D N A は、親アミノ酸を用いて他より 5、6、7、8 または 1 0 倍高い可能性で合成される。

【0 2 8 3】

表 1 0 9 7 のライブラリ 5 . 0 0 3 は、本発明のライブラリに含まれる。F R 3 の後に、G、S、R、D、L、Y を 1 . 0 : 0 . 5 7 : 0 . 4 6 : 0 . 4 2 : 0 . 3 6 : 0 . 3 5 の比率で許容する 4、5、または 6 個のリードイン残基が続く。次に来るのは、D セグ

メント 3 - 3 . 2 ; 親アミノ酸を 5 倍好み、他のアミノ酸として Y、G、D、R、S を許容するこの領域をコードする DNA である。DJ フィラーは存在せず、最終の 4 個のアミノ酸は、JH3 の J s t u m p に由来する。J s t u m p をコードする DNA は、他より可能性が 5 倍高い親アミノ酸：Y S G R D を用いて合成される。

【 0 2 8 4 】

表 1 0 9 7 のライブラリ 5 . 0 0 4 は本発明の一部である。示した比率で G S R D L Y を許容する 2、3 または 4 個のリードイン残基が存在する。配列 G Y S S G W Y (配列番号 2 1 8) をコードする DNA は、親アミノ酸が他より 6 倍であるように合成され、2 つの DJ - フィラー残基は、1 . 0 : 0 . 5 7 : 0 . 4 6 : 0 . 4 2 : 0 . 3 6 : 0 . 3 5 の比率で許容される G S R D L Y により許容される。A F D I (配列番号 9 8 6) をコードする DNA は、他より 6 倍の親アミノ酸を用いて合成される。

【 0 2 8 5 】

ライブラリ 5 . 0 0 5 は本発明の一部である。ライブラリ 5 . 0 0 5 は、長さ 1 1 ~ 1 4 の C D R 3 を有するメンバーを含む。FR 3 の後に、示した比率で G S R D L Y を許容する 0、1、または 2 個のリードイン残基が存在し、親アミノ酸が、他の許容された型より 6 倍であるように Y G S R D を許容する変動性のある親配列 G Y S S G W Y (配列番号 2 1 8) をコードする DNA が後に続く。D 領域の後に、G S R D L Y を示した比率で許容する 0 または 1 個の DJ フィラー残基がある。最後に、他の許容された型より 6 倍可能性が高い親アミノ酸により Y G S R D を許容する、J s t u m p (配列 : Y F D Y (配列番号 9 8 5)) に変動性を有する JH3 がある。

【 0 2 8 6 】

表 1 0 9 7 のライブラリ 5 . 0 0 6 は、本発明の一部である。C D R 3 は長さ 1 9 ~ 2 5 であってよい。示した比率で G S R D L Y を許容する 0 から 3 個のリードイン残基がある。リードインの後に D 領域 2 - 2 . 2 がある。2 - 2 . 2 をコードする DNA は、2 つの C y s 残基が固定されていることを除いて、親アミノ酸が、他 (つまり Y G S R D) より 6 倍可能性が高いように合成される。2 - 2 . 2 の後に、G S R D L Y を示した比率で許容する 0 から 3 個の DJ フィラー残基がある。JH6 の最初の 9 個の残基をコードする DNA は、親アミノ酸ならびに Y S G D R を許容し、親の型は他より 6 倍可能性が高い。

【 0 2 8 7 】

【表 9 0】

表 1001: JH の利用

JH	数	%	1111111112 12345678901234567890	配列番号
JH1	1356	6.15	---AEYFQHWGQGTTLTVSS	66
JH2	1720	7.80	---YWYFDLWGRGTLTVSS	67
JH3	5601	25.39	-----AFDIWGQGTMTVTVSS	2
JH4	7658	34.71	-----YFDYWGQGTTLTVSS	1
JH5	1062	4.81	----NWFDPWGQGTTLTVSS	68
JH6	4666	21.15	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	3
総計	22063			

【 0 2 8 8 】

【表 9 1】

表1010:HC CDR3におけるアミノ酸の利用

AA	数	%	Rel up	Rel dwn
Y	42863	15.47	35.87	1.00
G	37512	13.54	31.39	0.88
D	34051	12.29	28.49	0.79
S	23068	8.33	19.30	0.54
F	17813	6.43	14.91	0.42
A	15150	5.47	12.68	0.35
R	14090	5.09	11.79	0.33
V	13834	4.99	11.58	0.32
L	12351	4.46	10.34	0.29
I	10014	3.61	8.38	0.23
P	9514	3.43	7.96	0.22
W	9340	3.37	7.82	0.22
T	7544	2.72	6.31	0.18
M	6093	2.20	5.10	0.14
E	6042	2.18	5.06	0.14
N	5901	2.13	4.94	0.14
H	4403	1.59	3.68	0.10
K	3147	1.14	2.63	0.07
Q	3097	1.12	2.59	0.07
C	1195	0.43	1.00	0.03
	277022			

【 0 2 8 9 】

【表 9 2】

表 1015: D領域を欠いた CDR3 のリードインにおけるアミノ酸の頻度				
AA	数	パーセント	rel up	rel dn
G	23134	18.24	46.45	1.000
S	13555	10.69	27.22	0.586
R	10562	8.33	21.21	0.457
D	9704	7.65	19.49	0.419
L	8255	6.51	16.58	0.357
Y	8099	6.39	16.26	0.350
A	7188	5.67	14.43	0.311
V	6599	5.20	13.25	0.285
P	5768	4.55	11.58	0.249
W	4804	3.79	9.65	0.208
T	4769	3.76	9.58	0.206
E	4497	3.55	9.03	0.194
N	3733	2.94	7.50	0.161
F	3616	2.85	7.26	0.156
I	3464	2.73	6.96	0.150
H	2787	2.20	5.60	0.120
K	2460	1.94	4.94	0.106
Q	2124	1.67	4.27	0.092
M	1225	0.97	2.46	0.053
C	498	0.39	1.00	0.022
	126841			

表 1020: HC CDR3 の長さ		
長さ	数	%
1	0	0.00
2	6	0.03
3	36	0.16
4	153	0.69
5	121	0.55
6	669	3.03
7	756	3.43
8	1066	4.83
9	2227	10.09
10	2701	12.24
11	2240	10.15
12	2071	9.39
13	2006	9.09
14	1594	7.22
15	1396	6.33
16	1254	5.68

【 0 2 9 0 】

【表 9 3】

表 1020: HC CDR3 の長さ		
長さ	数	D_0
17	1102	4.99
18	783	3.55
19	588	2.67
20	474	2.15
21	285	1.29
22	237	1.07
23	133	0.60
24	81	0.37
25	32	0.15
26	25	0.11
27	11	0.05
28	6	0.03
29	2	0.01
30	3	0.01
31	2	0.01
32	1	0.00
33	1	0.00
34	0	0.00
35	0	0.00
36	1	0.00
	22063	

表 1030: D セグメントの利用			配列番号
Id	数	配列	
1-1.1	29	GTTGT	156
1-1.2	6	VQLER	157
1-1.3	151	YNWND	158
1-7.1	34	GITGT	159
1-7.2	0	V*LEL	160
1-7.3	65	YNWNY	161
1-20.1	0	GITGT	268
1-20.2	0	V*LER	162
1-20.3	0	YNWND	163
1-26.1	48	GIVGAT	164
1-26.2	3	V*WELL	165
1-26.3	220	YSGSYY	166
2-2.1	0	RIL**YQLLY	177 & 167
2-2.2	102	GYCSSTSCYT	70
2-2.3	37	DIVVVPAAI	168
2-8.1	0	RILY@WCMLY	169 & 392
2-8.2	23	GYCTNGVCYT	115
2-8.3	1	DIVLMVYAI	170
2-15.1	0	RIL*WW*LLL	171
2-15.2	139	GYCSGGSCYS	136

【 0 2 9 1 】

【表 9 4】

表 1030: D セグメントの利用			配列番号
Id	数	配列	
2-15.3	12	DIVVVVAAT	172
2-21.1	0	SILWW\$LLF	173
2-21.2	24	AYCGGDCYS	174
2-21.3	6	HIVVVTAI	175
3-3.1	28	VLRFLWLLY	176
3-3.2	743	YYDFWSGYYT	177
3-3.3	15	ITIFGVVII	178
3-9.1	41	VLRYFDWLL@	179
3-9.2	8	YYDILTGYYN	180
3-9.3	0	ITIF*LVII	181 & 579
3-10.1	26	VLLWFGELL@	182
3-10.2	136	YYYGSGSYYN	81
3-10.2	32	ITMVRGVII	183
3-16.1	0	VL\$LRLGELSLY	184
3-16.2	109	YYDYVWGSYRYT	104
3-16.2	8	IMITFGGVIVI	185
3-22.1	0	VLL***WLLL	186
3-22.2	617	YYDSSGYYY	187
3-22.3	2	ITMIVVVIT	188
4-4.1	0	\$LQ@L	189
4-4.2	75	DYSNY	192
4-4.3	165	TTVT	190
4-11.1	0	\$LQ@L	191
4-11.2	0	DYSNY	192
4-11.3	0	TTVT	193
4-17.1	0	\$LR@L	194
4-17.2	392	DYGDY	195
4-17.3	0	TTVT	196
4-23.1	0	\$LRW@L	197
4-23.2	60	DYGGNS	198
4-23.3	16	TTVVT	199
5-5.1	25	VDTAMV	200
5-5.2	29	WIQLWL	201
5-5.3	292	GYSYGY	202
5-12.1	13	VDIVATI	203
5-12.2	0	WI*WLRL	204
5-12.3	200	GYSGYDY	205
5-18.1	0	VDTAMV	206
5-18.2	0	WIQLWL	207
5-18.3	0	GYSYGY	208
5-24.1	9	VEMATI	209
5-24.2	21	*RWLQL	210
5-24.3	44	RDGYNY	211
6-6.1	87	EYSSSS	212

【 0 2 9 2 】

【表 9 5】

表 1030: D セグメントの利用			配列番号
Id	数	配列	
6-6.2	122	SIAAR	213
6-6.3	1	V*QLV	214
6-13.1	399	GYSSSWY	215
6-13.2	170	GIAAAG	216
6-13.3	0	V*QQLV	217
6-19.1	441	GYSSGWY	218
6-19.2	104	GIAVAG	219
6-19.3	3	V*QWLV	220
7-27.1	257	LTG	221
7-27.2	0	@LG	222
7-27.3	64	NWG	223
なし	16409		

表 1040: JH 対 長さ						
長さ	JH1	JH2	JH3	JH4	JH5	JH6
1	0	0	0	0	0	0
2	1	4	0	1	0	0
3	20	2	3	9	0	2
4	75	3	10	45	8	12
5	47	6	10	38	8	12
6	273	14	43	280	26	33
7	88	27	194	337	30	80
8	134	43	243	503	41	102
9	121	70	855	886	61	234
10	116	693	623	979	68	222
11	105	81	675	1003	84	292
12	107	84	552	905	121	302
13	87	274	538	672	113	322
14	48	81	480	532	105	348
15	50	83	372	421	80	390
16	28	54	316	322	87	447
17	27	49	239	334	69	384
18	11	64	174	140	49	345
19	8	28	104	99	41	308
20	4	23	59	56	20	312
21	0	13	40	30	24	178
22	3	14	31	30	13	146
23	1	3	22	12	7	88
24	0	5	9	12	4	51
25	1	0	1	3	1	26
26	0	0	5	5	0	15
27	0	1	2	1	1	6
28	1	0	0	2	0	3
29	0	0	0	0	0	2

【表 9 6】

表 1040: JH 対 長さ						
長さ	JH1	JH2	JH3	JH4	JH5	JH6
30	0	0	0	0	0	3
31	0	0	1	0	0	1
32	0	1	0	0	0	0
33	0	0	0	1	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	1	0

表 1050: Dセグメントを含まないリードインにおけるアミノ酸の利用

AA	番号	%	Rel up	Rel dn
G	23134	18.24	46.45	1.00
S	13555	10.69	27.22	0.59
R	10562	8.33	21.21	0.46
D	9704	7.65	19.49	0.42
L	8255	6.51	16.58	0.36
Y	8099	6.39	16.26	0.35
A	7188	5.67	14.43	0.31
V	6599	5.20	13.25	0.29
P	5768	4.55	11.58	0.25
W	4804	3.79	9.65	0.21
T	4769	3.76	9.58	0.21
E	4497	3.55	9.03	0.19
N	3733	2.94	7.50	0.16
F	3616	2.85	7.26	0.16
I	3464	2.73	6.96	0.15
H	2787	2.20	5.60	0.12
K	2460	1.94	4.94	0.11
Q	2124	1.67	4.27	0.09
M	1225	0.97	2.46	0.05
C	498	0.39	1.00	0.02
	126841			

表 1080: HC CDR3 におけるジペプチド, パート 1							
YY	13565	FG	1073	PL	591	TV	397
FD	11637	RS	1072	TT	589	TP	390
DY	8337	SW	1014	ID	588	NA	389
SG	5979	DW	1003	DD	583	NS	388
GY	5805	LR	990	AS	570	ER	387
YG	5461	DG	989	KG	566	HG	386
DI	5448	PG	976	VD	556	VW	381
AF	4975	LL	974	VP	551	QL	378

【 0 2 9 4 】

【表 9 7】

DV	4968	AY	962	LT	540	RI	374
GG	4575	DR	923	LF	539	WN	365
SS	4491	VR	882	VL	539	YT	365
MD	4436	YM	877	FY	534	CS	360
GS	4047	AR	872	PD	533	DH	359
GM	3501	VV	869	RV	531	EA	359
YF	3438	YR	865	RF	525	WD	353
YD	3430	VA	857	AL	521	ES	350
RG	3118	RA	844	PS	510	FR	349
SY	2770	SP	820	EY	508	YC	343
GA	2611	GN	812	LW	508	PT	337
YS	2576	HY	809	PA	505	TL	326
DA	2285	SD	805	LP	500	KR	325
DS	2087	GI	804	VS	497	VF	324
WY	2079	NW	785	IR	493	MG	314
GD	2017	LS	760	YV	493	PN	313
GR	1985	LY	757	VY	478	RE	312
GL	1800	TY	749	IG	476	IV	311
DL	1777	PR	742	VT	475	KS	310
DF	1763	GE	737	TR	472	SC	310
GW	1725	SA	736	DN	471	FL	309
WS	1675	SF	728	SI	469	FF	306
AA	1671	PF	725	AD	462	CY	303
LD	1651	ND	693	LA	459	SH	302
EG	1610	ST	684	PP	451	LK	300
AG	1606	GH	683	RT	451	IT	298
RY	1558	YP	676	DT	448	LE	298
DP	1547	WL	675	RW	447	FS	296
GV	1500	SN	667	GQ	446	ED	294
RR	1498	TS	652	QG	446	RK	294
LG	1387	RD	648	TD	446	HF	292
GF	1386	YA	648	TA	437	VI	290
VG	1366	SL	644	TF	426	RH	287
GP	1339	RP	643	GK	422	MV	285
WF	1282	YL	638	YW	421	KY	284
FW	1277	IA	634	HD	420	AI	282
NY	1271	RL	627	IL	417	HS	281
PY	1209	EL	622	LV	406	YH	281
GT	1194	YN	607	IS	402	LN	278
WG	1177	AV	605	NG	398	PV	276
SR	1162	AP	600	RN	398	QY	276

【 0 2 9 5 】

【表 9 8】

TG	1142	AT	592	SV	397	WA	271
----	------	----	-----	----	-----	----	-----

表 1080: HC CDR3 におけるジペプチド・パート 2							
QH	267	KD	176	II	102	NQ	53
FQ	264	SK	176	HI	101	CF	51
LI	257	YK	176	KP	101	MP	50
EV	255	EF	174	MY	100	CP	49
AM	253	FN	174	RM	99	RC	47
DQ	250	HN	171	AQ	98	HE	46
HR	250	FH	165	EQ	96	VC	46
PH	248	YQ	165	QT	96	QI	45
AN	242	KN	164	LM	95	MN	44
WR	242	MA	163	HV	94	MF	43
NF	240	NN	160	IK	93	HQ	41
PI	239	KA	159	PM	93	CD	38
TN	239	SQ	157	QN	93	CL	38
TI	238	PE	156	CG	91	NC	38
PW	229	WV	154	QF	91	HM	37
IP	228	EI	153	FI	90	FM	36
QR	227	TH	153	HW	90	ME	36
EW	225	FV	152	WH	90	MK	35
YI	221	AK	151	QV	89	QM	35
FE	220	TK	151	WI	89	NM	34
IY	220	WT	151	KH	88	KM	32
EP	219	PK	150	MI	88	TC	31
NR	217	KK	148	MS	87	CR	29
DM	214	IW	145	TQ	86	CV	25
FA	212	VH	145	NV	85	HC	25
AE	210	VE	141	EM	84	WM	25
IF	210	EE	138	HK	84	AC	24
QW	208	DE	136	IN	83	FC	24
YE	208	KL	136	NH	82	CA	23
FP	201	PQ	136	NI	82	CH	21
TM	201	QP	135	HT	81	CN	21
WE	201	SM	134	WK	79	MW	21
WP	201	QD	133	KF	77	PC	19
AH	199	QS	131	VM	73	LC	17
NP	198	VQ	130	MT	71	IC	16
VN	198	QQ	129	IH	69	MM	16
HA	196	WW	129	EH	68	MH	15
LH	196	NT	128	IE	67	WC	15

【 0 2 9 6 】

【表 9 9】

表 1080: HC CDR3 におけるジペプチド, パート 2							
AW	193	DC	118	QK	65	EC	12
HP	192	KT	118	WQ	65	CK	10
HL	191	QA	118	GC	64	CW	10
RQ	191	NK	113	KE	61	MQ	10
TW	186	KW	112	KI	61	CI	9
EN	185	EK	109	CT	58	CC	8
LQ	182	FT	108	FK	58	CM	8
SE	180	KV	108	IM	57	CQ	6
VK	180	MR	105	KQ	57	QC	6
ET	178	TE	104	ML	55	CE	5
DK	177	HH	103	QE	55	KC	5
NL	177	IQ	103	NE	53	MC	3

【 0 2 9 7 】

【表 1 0 0】

表 1060a HC CDR3 の長さ 対 長さ3～17に関してどの(もしあれば)Dセグメントが発生するか																			
名前	配列	配列番号	長さ																
			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1-1.1	GTTGT	156	0	0	0	0	0	0	2	2	3	6	2	3	3	4	0		
1-1.2	VQLER	157	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	1		
1-1.3	YNWND	158	0	0	0	0	0	2	6	14	16	19	16	14	17	16	9		
1-1.7.1	GITGT	159	0	0	0	0	0	0	0	1	2	7	6	4	4	0	4		
1-1.7.3	YNWNY	161	0	0	0	0	1	0	2	5	7	8	8	6	5	9	4		
1-26.1	GIVGAT	164	0	0	0	1	0	0	2	4	10	4	6	9	3	2	2		
1-26.2	V*WELL	165	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1		
1-26.3	YSGSY	166	0	0	0	0	1	0	2	10	14	24	24	27	21	26	13		
2-2.2	GYCSSTSCYT	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	9	15	15	11		
2-2.3	DIVVPAAI	168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	5	5		
2-8.2	GYCTNGVCYT	115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	4	3	4		
2-8.3	DIVLMVYAI	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
2-15.2	GYCSGGSCYS	136	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	5	12	10	25	22		
2-15.3	DIVVVAAT	172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	1		
2-21.2	AYCGDCYS	174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	5	2	5		
2-21.3	HIVVTAI	175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	0	1		
3-3.1	VLFLEWLLY	176	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3		
3-3.2	YYDFWSGYT	177	0	0	0	0	0	0	0	1	5	8	22	38	44	72	69		
3-3.3	ITIFGVII	178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	5		
3-9.1	VLRYFDWLL@	179	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	5	5	5		
3-9.2	YYDILTGYN	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1		
3-10.1	VLLWFGELL@	182	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	4	2	3	5		
3-10.2	YYYGSGSYN	81	0	0	0	0	0	0	0	2	4	7	10	13	15	18	14		
3-10.2	ITMVRGVII	183	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	7	5	2		
3-16.2	YYDVWWSYRYT	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	7	7		
3-16.2	IMITFGGVVI	185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2		
3-22.2	YYDSSGYYY	187	0	0	0	0	0	0	0	0	6	30	45	56	59	108	101		
3-22.3	ITMIVVVIIT	188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

【 0 2 9 8 】

【表 1 0 1】

表 1060a HC CDR3 の長さ 対 長さ3～17に関してどの(もしあれば)Dセグメントが発生するか																			
名前	配列	配列番号	長さ																
			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
4-42	DYSNY	192	0	0	0	0	0	3	3	4	6	14	4	7	4	10	6		
4-43	TTVT	190	0	0	0	0	2	4	11	19	23	19	25	19	10	11	9		
4-17.2	DYGDY	195	0	0	2	6	12	8	38	40	48	47	50	40	29	21	10		
4-23.2	DYGGNS	198	0	0	0	0	0	2	7	4	5	17	4	8	5	1	1		
4-23.3	TTVVT	199	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	2	1	2	0	0		
5-5.1	VDTAMV	200	0	0	0	0	0	0	0	1	4	8	1	3	2	0	1		
5-5.2	WQLWL	201	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	3	1	4	3	3		
5-5.3	GSYGY	202	0	0	0	0	1	6	9	20	43	29	27	22	32	26	27		
5-12.1	VDIVATI	203	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	4	0	2	1		
5-12.3	GYSGDY	205	0	0	0	0	4	10	13	15	19	15	22	27	16	15	9		
5-24.1	VEMATI	209	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	6	0	0	0	0		
5-24.2	*RWLQL	210	0	0	0	0	1	0	3	1	3	2	2	1	2	2	2		
5-24.3	RDGYNV	211	0	0	0	0	0	0	0	1	8	12	6	7	3	2	1		
6-6.1	EYSSSS	212	0	0	0	0	0	0	0	9	7	16	19	13	2	4	2		
6-6.2	SIAAR	213	0	0	0	1	1	0	17	8	7	13	17	6	16	16	7		
6-6.3	V*QLV	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
6-13.1	GYSSSWY	215	0	0	0	0	0	1	6	11	35	40	56	44	50	42	35		
6-13.2	GIAAAG	216	0	0	0	0	1	2	18	14	15	20	20	15	16	14	11		
6-19.1	GYSSGWY	218	0	0	0	0	1	1	4	27	57	58	48	52	45	35	30		
6-19.2	GIAVAG	219	0	0	0	0	1	1	0	7	8	20	8	13	16	8	10		
6-19.3	V*QWLV	220	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
7-27.1	LTG	221	0	0	1	0	2	8	12	7	14	11	17	17	24	24	31		
7-27.3	NWG	223	0	0	0	1	2	11	6	5	10	6	7	5	7	1	0		
なし			36	153	118	660	726	1007	2063	2463	1851	1596	1502	1075	874	681	609		

表 1060b HC CDR3 の長さ 対 長さ18～32に関してどの(もしあれば)Dセグメントが発生するか																			
名前	配列	配列番号	長さ																
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
1-1.1	GTTGT	156	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
1-1.2	VQLER	157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

【表 1 0 2】

名前	配列	配列番号	長さ														
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1-1.3	YNWND	158	6	5	3	4	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1-7.1	GITGT	159	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1-7.3	YNWNY	161	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1-26.1	GIVGAT	164	0	0	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1-26.2	V*WELL	165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-26.3	YSGSY	166	14	11	9	8	6	3	3	0	3	1	0	0	0	0	0
2-2.2	GYCSSTSCYT	70	11	7	2	10	11	4	2	0	0	0	1	0	0	0	0
2-2.3	DIVVPAAI	168	2	6	3	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2-8.2	GYCTNGVCYT	115	3	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-8.3	DIVLMVYAI	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15.2	GYCSGGSCYS	136	20	10	7	4	8	9	3	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15.3	DIVVVAAT	172	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2-21.2	AYCGGDCYS	174	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-21.3	HIVVVTAI	175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-3.1	VLRFLWLLY	176	6	2	4	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3-3.2	YYDFWSGYT	177	82	97	104	67	61	32	23	7	3	4	0	0	2	1	0
3-3.3	ITIFGVVII	178	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-9.1	VLRFDWLL@	179	7	2	2	6	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3-9.2	YYDILTGYN	180	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-10.1	VLLWFGELL@	182	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-10.2	YYGSGSYN	81	15	10	8	7	6	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0
3-10.2	ITMVRGVII	183	3	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-16.2	YYDYVWGSYRYT	104	11	11	14	10	18	13	5	2	2	0	0	0	1	0	0
3-16.2	IMITFGGVIMI	185	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-22.2	YYDSSGYYY	187	77	54	28	22	18	8	1	2	1	1	0	0	0	0	0
3-22.3	ITMIVVIT	188	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4.2	DYSNY	192	7	2	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4.3	TTVT	190	4	2	2	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4-17.2	DYGDY	195	17	7	8	3	2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
4-23.2	DYGGNS	198	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【 0 3 0 0 】

【表 1 0 3】

表 1060b HC CDR3 の長さ対 長さ18～32に関してどの(もしあれば)Dセグメントが発生するか																																
名前	配列	配列番号	長さ																													
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32															
4-23.3	TTVVT	199	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
5-5.1	VDTAMV	200	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
5-5.2	WQLWL	201	3	3	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0															
5-5.3	GYSYGY	202	13	18	7	2	2	6	0	0	2	0	0	0	0	0	0															
5-12.1	VDIVATI	203	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
5-12.3	GYSGYDY	205	11	10	6	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
5-24.1	VEMATI	209	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
5-24.2	*RWLQL	210	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
5-24.3	RDGYNY	211	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
6-6.1	EYSSSS	212	9	3	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0															
6-6.2	SIAAR	213	2	3	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
6-6.3	V*QLV	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
6-13.1	GYSSSWY	215	24	22	17	4	5	1	3	2	0	0	1	0	0	0	0															
6-13.2	GIAAAG	216	10	4	2	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
6-19.1	GYSSGWY	218	23	25	13	7	7	3	0	2	1	0	1	0	0	0	0															
6-19.2	GIAVAG	219	6	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0															
6-19.3	V*QWL V	220	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
7-27.1	LTG	221	29	23	12	9	7	4	3	1	0	1	0	0	0	0	0															
7-27.3	NWG	223	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
なし			339	217	198	85	60	36	27	13	9	2	1	1	0	0	1															

【 0 3 0 1】

表 1082: J スタンプの集合

表 1082: J スタンプの集合																				
JH1	---AEYFQHWGGGLTVSS 6.15% (配列番号 66)																			
	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	
	4	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	1	0	1	64	0	6	0	1	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	
	6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	2	1	0	1	0	0	0	
	7	1	0	1	0	363	3	1	0	0	8	0	0	1	0	1	6	0	3	
	8	8	0	59	23	4	17	11	3	5	19	0	8	3	221	11	6	8	5	
	9	2	1	13	2	13	3	447	19	2	6	3	20	1	2	0	20	3	5	
	JH2	---YWFYDLWGRGLTVSS 7.80% (配列番号 67)																		
		A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W
4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5		0	0	2	0	2	11	0	0	1	0	1	0	0	7	1	1	1	929	
6		3	2	9	0	40	5	7	4	1	9	0	7	1	0	1	11	2	0	
7		1	6	1	0	1209	2	6	23	0	89	30	1	2	1	1	12	0	11	
8		31	2	1241	90	4	38	30	3	1	0	1	29	3	4	2	2	3	19	
9		3	1	9	3	34	2	26	17	5	1064	36	17	30	38	33	20	8	83	
JH3		-----AFDIWGGQIMTVSS 25.4% (配列番号 2)																		
		A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W
	6	4374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	1	4	0	1	4612	2	0	8	0	56	3	2	1	1	0	29	2	15	
	8	23	0	4765	51	0	28	14	0	3	0	0	15	2	1	1	2	2	6	
	9	7	5	5	0	73	2	1	4439	4	64	64	43	2	1	11	54	49	113	

【表 1 0 5】

表 1082: J スタンプの集合																			
JH4 -----YFDYWGGLTVSS 34.7% (配列番号 1)																			
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1975
7	9	1	10	7	3950	6	26	0	109	4	5	24	4	5	35	7	28	16	59
8	26	0	5991	32	5	91	19	2	6	1	21	7	0	8	13	3	6	2	14
9	5	18	17	0	119	2	0	0	0	2	64	15	16	10	216	11	3	6	6317
JH5 ----NWFDPWGGLTVSS 4.8% (配列番号 68)																			
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	274	0	0	0	0	0	0	0	764
6	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	644	0
7	1	1	0	0	768	2	1	1	13	0	0	0	0	0	1	0	2	0	4
8	2	0	810	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
9	3	0	3	0	3	0	3	0	4	0	4	814	1	0	14	2	0	0	187
JH6 YYYYYGMDVWGGLTVSS 21.1% (配列番号 3)																			
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	690
2	4	0	15	0	16	31	2	1	4	0	8	7	4	14	18	7	4	1	1694
3	3	0	19	3	14	23	1	5	9	0	16	9	5	12	20	4	1	4	2440
4	4	0	14	2	31	16	25	3	10	0	13	6	5	15	35	5	5	4	2815
5	2	1	9	1	23	19	21	1	3	1	15	3	1	7	26	3	0	1	3350
6	69	5	14	1	4	3057	8	1	0	0	8	7	5	4	15	3	7	0	657
7	3	0	1	0	4	5	0	18	2	3866	0	2	2	3	1	7	18	3	1
8	7	0	4064	5	1	17	4	1	0	2	11	2	0	0	3	2	3	2	6
9	9	0	1	0	6	1	1	19	0	7	2	1	0	1	4	0	4092	0	1

【 0 3 0 3 】

【表 106】

表1097:HC CDR3のライブラリ						
ライブラリ	CDR3 長さ	リードイン	D領域配列	DJフィラー 配列	Jスタンブ 配列	FR4 配列
5.001	10,11,12	6, 7,または8 X X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	なし	なし	AFDI (テキストに おける多様性)	WGQGTMTVTVSS (JH4)
5.002	13,14,15	6,7,8 X X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	なし	なし	YYYGMDV (テキストに おける多様性)	WGQGTTVTVSS (jh6)
5.003	18,19,20	4,5,6 X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	YYDFWSGYYT (3-3.2) (配列番号 177)	なし	YFDY	WGQGTTLVTVSS (JH3)
5.004	15,16,17	2,3,4 X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	GYSSGWY (6-19.1) (配列番号 218)	2X, X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	AFDI	WGQGTMTVTVSS (JH4)
5.005	11-14	0,1,2 X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	GYSSGWY (6-19.1) (配列番号218)	0,1 X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	YFDY	WGQGTTLVTVSS (JH3)
5.006	19-25	0,1,2,3 X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	GYCSGGSCYS (2-2.2) (Cys残基が一定) (配列番号 136)	0,1,2,3 X = (1.0G, .57S, .46R, .42D, .36L, .35Y)	YYYYYGMDV (親AAは他の8倍)	WGQGTTVTVSS (jh6)

参照文献

本出願を通して引用された、参考文献、発行された特許、公開または非公開の特許出願を含むすべての参考文献の内容ならびに以下に載せた参考文献は、参照によりその全体が明確に本明細書に組み込まれる。抵触の場合、本出願が、本明細書における任意の定義を含めて、支配するものとする。

【0304】

【数1】

U.S. Published Application 2005-0119455A1

Sidhu et al., *J Mol Biol.* 2004 **338**:299-310.

同等物

本発明の多数の実施形態を記載した。にもかかわらず、さまざまな変形が、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく可能であることは理解されるべきであろう。したがって、他の実施形態も、以下の特許請求の範囲内である。