(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5473603号
(P5473603)
(45)発行日　平成26年4月16日(2014.4.16)　(24)登録日　平成26年2月14日(2014.2.14)

(51)Int.Cl.		F I		
G06F 19/22	(2011.01)	G06F	19/22	
G01N 33/68	(2006.01)	G01N	33/68	ZNA
C40B 20/00	(2006.01)	C40B	20/00	
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	

請求項の数 67　(全 45 頁)

(21)出願番号　特願2009-531542 (P2009-531542)
(86)(22)出願日　平成19年9月28日 (2007.9.28)
(65)公表番号　特表2010-506303 (P2010-506303A)
(43)公表日　平成22年2月25日 (2010.2.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/079849
(87)国際公開番号　WO2008/042754
(87)国際公開日　平成20年4月10日 (2008.4.10)
審査請求日　平成22年9月28日 (2010.9.28)
(31)優先権主張番号　60/849,035
(32)優先日　平成18年10月2日 (2006.10.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　508339161
シー　レーン　バイオテクノロジーズ，エルエルシー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２７，　アサートン，　セルビー　レーン　３５６
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多様な合成ペプチドおよびポリペプチドライブラリーの設計および構築

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

少なくとも１つの共通配列モチーフを特徴とする関連するアミノ酸配列を含むデータベースの多様性解析のためのコンピュータ支援方法であって、

（ａ）前記関連するアミノ酸配列をアラインメントする手順と、

（ｂ）前記アミノ酸配列に、前記アミノ酸配列のパラメータに基づく２つ以上のフィルタの既定の組み合わせを適用することによって、前記関連するアミノ酸配列のサブセットを示す第１データセットを作成する手順と、

（ｃ）前記第１データセットを前記共通配列モチーフ内での位置によるアミノ酸使用頻度について解析する手順と、

（ｄ）前記共通配列モチーフ内の１つ以上のアミノ酸位置における手順（ｃ）で得られた位置アミノ酸利用頻度に対して最小閾値アミノ酸使用頻度を適用することによって、前記パラメータの既定の組み合わせを特徴とするアミノ酸配列のための前記共通配列モチーフ内の位置アミノ酸多様性をモデルとする第２データセットを作成する手順と、

（ｅ）前記第２データセットの支援の下で設計された関連するアミノ酸配列の物理的ライブラリーを合成する手順と、

を含み、

前記物理的ライブラリーの合成は、前記第２データセットのコンビナトリアルな位置のアミノ酸多様性を物理的に示す縮重オリゴヌクレオチド配列の集合を合成することと、適切なテンプレートに前記オリゴヌクレオチド配列をクローニングすることとを包含する、

方法。
【請求項２】
手順（ｄ）において、最小閾値アミノ酸使用頻度は、前記共通配列モチーフ内の大部分のアミノ酸位置に指定される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
手順（ｄ）において、最小閾値アミノ酸使用頻度は、前記共通配列モチーフ内の全アミノ酸位置に指定される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記アミノ酸位置に指定される全閾値アミノ酸使用頻度は同一である、請求項２または請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記アミノ酸位置に指定される全閾値アミノ酸使用頻度が同一であるとは限らない、請求項２または請求項３に記載の方法。
【請求項６】
前記最小閾値アミノ酸使用頻度は、前記共通配列モチーフ内の大部分のアミノ酸位置に最小合計アミノ酸使用を提供するように設定される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記最小閾値アミノ酸使用頻度は、前記共通配列モチーフ内の全アミノ酸位置に最小合計アミノ酸使用を提供するように設定される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約６０％である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約６５％である、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約７０％である、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約７５％である、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約８０％である、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約８５％である、請求項７に記載の方法。
【請求項１４】
前記最小合計アミノ酸使用は、少なくとも約９０％である、請求項７に記載の方法。
【請求項１５】
前記関連するアミノ酸配列は、抗体配列である、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記関連するアミノ酸配列は、抗体重鎖配列を含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記関連するアミノ酸配列は、抗体軽鎖配列を含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
前記共通配列モチーフは、ＣＤＲ配列である、請求項１６または請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記共通配列モチーフは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列からなる群より選択される、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
手順（ｂ）において、前記フィルタの既定の組み合わせは、（１）前記抗体重鎖または軽鎖のアイソタイプ、（２）前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列のうちの１つ以上の長さ、（３）前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列のうちの１つ以上の内の１つ以上の既定の位置における、１つ以上の既定のアミノ酸残基の存在、（４）フレー

ムワークのタイプ、（５）前記抗体が結合する抗原、（６）前記抗体の親和性、および（７）前記ＣＤＲ配列外の位置によるアミノ酸残基、からなる群より選択される、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

抗体重鎖および／または軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列のうちの少なくとも１つは、サイズが適合する、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

追加フィルタは、前記抗体重鎖および／または軽鎖配列のアイソタイプである、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、少なくとも約３％である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２４】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、少なくとも約５％である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２５】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、少なくとも約１０％である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２６】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、少なくとも約１５％である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２７】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、約３％ないし約１５％である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２８】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、約５％ないし約１０％である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２９】

同じ位置によるアミノ酸使用頻度が、前記ＣＤＲ配列内の各アミノ酸を特徴付ける、請求項１８に記載の方法。

【請求項３０】

前記位置によるアミノ酸使用頻度は、前記ＣＤＲ配列内の少なくとも２つのアミノ酸残基において異なる、請求項１８に記載の方法。

【請求項３１】

前記フィルタの既定の組み合わせは、フレームワークのタイプを含む、請求項２０に記載の方法。

【請求項３２】

抗体重鎖および軽鎖配列の双方が解析される、請求項１５に記載の方法。

【請求項３３】

前記抗体重鎖配列は、既定の抗体軽鎖の特徴と対にされる、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

前記抗体軽鎖配列は、既定の抗体重鎖の特徴と対にされる、請求項３２に記載の方法。

【請求項３５】

前記関連する抗体配列は、少なくとも１つの機能性抗体に由来する、請求項１５に記載の方法。

【請求項３６】

手順（ｂ）で適用される前記フィルタのうちの１つは、前記機能性抗体の重鎖および／または軽鎖フレームワーク配列に最も類似する生殖系列配列である、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記機能性抗体は、細胞表面および可溶性受容体、サイトカイン、成長因子、酵素、プロテアーゼ、およびホルモンからなる群より選択されるポリペプチドに結合する、請求項３５に記載の方法。

【請求項３８】

前記ポリペプチはサイトカインである、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】

前記サイトカインはインターロイキンである、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

前記インターロイキンは、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２３、およびそれらのそれぞれのファミリーメンバーからなる群より選択される、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】

前記サイトカインは、インターフェロン－α、－β、および－γ（ＩＦＮ－α、－β、および－γ）、腫瘍壊死因子－αおよび－β（ＴＮＦ－αおよび－β）、ＴＷＥＡＫ、ＴＡＮＫＬ、ＢＬｙｓ、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、ＳＤＦ－１、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭＣＳＦ）からなる群より選択される、請求項３８に記載の方法。

【請求項４２】

前記ポリペプチドは成長因子である、請求項３８に記載の方法。

【請求項４３】

前記成長因子は、神経成長因子（ＮＧＦ）、インスリン様成長因子１（ＩＧＦ－１）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、胎盤成長因子（ＰＬＧＦ）、組織成長因子－α（ＴＧＦ－α）、および組織成長因子－β（ＴＧＦ－β）からなる群より選択される、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

前記機能性抗体はハプテンに結合する、請求項３５に記載の方法。

【請求項４５】

前記ハプテンは、Ｄｉｇ、Ｂｉｏ、ＤＮＰ、およびＦＩＴＣからなる群より選択される、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

前記関連するアミノ酸配列は、分泌タンパク質または細胞外タンパク質のファミリーのメンバーに由来する、請求項１に記載の方法。

【請求項４７】

前記関連するアミノ酸配列は、サイトカインファミリーのメンバーに由来する、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

前記サイトカインはインターフェロン－αである、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

前記関連するアミノ酸配列は、ＩＦＮ－αサブタイプの配列である、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

前記ライブラリーは、定義されたアミノ酸のみが生成されるように、別個のいくつかの定義されたオリゴヌクレオチドまたは縮重オリゴヌクレオチドを生成することによって合成される、請求項１に記載の方法。

【請求項５１】

前記生成された物理的ライブラリーの多様性は、同定されたデータセットの物理的表現であるライブラリーの多様性を上回る、請求項１に記載の方法。

【請求項５２】

前記最小閾値アミノ酸使用頻度を満たさない少なくとも１つのアミノ酸も前記多様性を提供するために合成される、請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】

前記生成された物理的ライブラリーの多様性は、同定されたデータセットの物理的表現であるライブラリーの多様性を下回る、請求項１に記載の方法。

【請求項５４】

最小閾値アミノ酸使用頻度を満たす全アミノ酸が合成されるとは限らない、請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

前記データセットは、抗体重鎖および／または軽鎖配列を含む、請求項１、および５０ないし５４のうちのいずれか１項に記載の方法。

【請求項５６】

前記抗体重鎖および／または軽鎖配列は、１つ以上のＣＤＲを含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

前記ＣＤＲは、フレームワーク配列の骨格中にクローニングされる、請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

前記フレームワーク配列は、前記ＣＤＲを含むデータベース内で最も頻繁に使用されるフレームワーク配列である、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

前記物理的ライブラリーは、原核または真核発現系を用いて発現される、請求項１に記載の方法。

【請求項６０】

前記物理的ライブラリーは、ファージミドディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、微生物細胞ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、マイクロビーズディスプレイ技法、抗体アレイ、またはタンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイを用いて発現および表示される、請求項１に記載の方法。

【請求項６１】

前記ライブラリーは、そのメンバーの１つ以上の化学的および／または生物学的特性をスクリーニングされる、請求項１に記載の方法。

【請求項６２】

前記生物学的特性は、半減期、効力、有効性、結合親和性、および免疫原性からなる群より選択される、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

１つ以上のアミノ酸位置における、アミノ酸側鎖の多様性の導入を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項６４】

前記アミノ酸側鎖の多様性は、１つまたは複数の前記アミノ酸位置において、アミノ酸残基に少なくとも２つの異なる側鎖化学官能基を提供することによって導入される、請求項６３に記載の方法。

【請求項６５】

全アミノ酸の化学的性質の少なくとも３０％が各アミノ酸位置において表わされる、請求項６４に記載の方法。

【請求項６６】

全アミノ酸の化学的性質の少なくとも５０％が各アミノ酸位置において表わされる、請求項６４に記載の方法。

【請求項６７】

前記側鎖の多様性は、コンビナトリアル縮重オリゴヌクレオチド合成を用いて導入される、請求項６４に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、多様なペプチドおよびポリペプチドライブラリーの設計および構築に関する。具体的には、本発明は、複数の関連パラメータをフィルタとして用いてデータセットを作成するための解析データベースを設計する方法と、定方向マルチ合成体オリゴヌクレオチド合成によって配列多様性を生成する方法とに関する。本方法は、大きく複雑な注釈付きのデータベースを、個別に直接定義することができる関連性のある単一または複数のキーパラメータに基づいて、より単純な関連する配列のデータセットに縮小することを可能にする。本方法は、多様な配列の集合またはその部分を獲得するための別個および縮重オリゴヌクレオチドのマルチ合成集合を用いて、この手法に基づいて多様なライブラリーを作成することをさらに可能にする。
【背景技術】
【０００２】
ペプチドまたはポリペプチドベースの薬剤候補の開発は、しばしば関連するペプチドまたはポリペプチド配列のライブラリーのスクリーニングから始まる。したがって、治療用抗体候補選択の第１手順は、通常は、高度に多様な抗体配列のライブラリーの作成である。
【０００３】
多様な抗体ライブラリーの設計および構築のためのいくつかの方法は、当該技術分野で既知である。
【０００４】
繊維状ファージベースのコンビナトリアル抗体ライブラリーの多様性は、重鎖および軽鎖遺伝子をシャッフルすることによって（非特許文献１）、あるいは誤りがちのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によってライブラリーにランダム変異を導入することによって（非特許文献２）、増加させることができるということが記載されている。抗体ライブラリーを生成するための基礎として定義されたフレームワークを使用することは、非特許文献３；非特許文献４；および非特許文献５によって記載されている。そのほかに、ＣＤＲ－Ｈ３ライブラリーの単一V_L遺伝子との組み合わせ（非特許文献６）、V_L遺伝子の限られた組との組み合わせ（非特許文献７）、またはV_L遺伝子のランダム化されたレパートリーとの組み合わせ（非特許文献８）も報告されている。
【０００５】
また、普遍的またはランダム化免疫グロブリン軽鎖を用いて抗体ライブラリーを作成する方法を記載している特許文献１；特許文献２；特許文献３も参照。
【０００６】
非特許文献９は、ＨｕＣＡＬ（Ｈｕｍａｎ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ（ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー））と称されるヒト抗体ライブラリーの設計および構築への異なる概念を記載している。この手法は、免疫応答時に頻繁に使用されるヒトV_HおよびV_Lサブファミリーのそれぞれは、１つのコンセンサスフレームワークによって表され、これは７つの重鎖のＨｕＣＡＬコンセンサス遺伝子と７つの軽鎖のＨｕＣＡＬコンセンサス遺伝子とをもたらし、４９の可能な組み合わせを生じるという発見に基づく。全ての遺伝子は、コドン使用、タンパク質凝集を推進する好ましくない残基、ならびに全てのＣＤＲに隣接する固有および一般的な制限部位を考慮して、全合成によって作製される。この手法は、必要に応じて異なる抗体フォーマットに変換することができるＣＤＲを含有する、モジュラー抗体遺伝子の生成をもたらす。ＨｕＣＡＬ抗体ライブラリーの設計および合成は、特許文献４；特許文献５；特許文献６；および特許文献７に記載されている。
【先行技術文献】
【特許文献】

【０００７】
【特許文献１】米国特許第５，６６７，９８８号明細書
【特許文献２】米国特許第６，０９６，５５１号明細書
【特許文献３】米国特許第７，０６７，２８４号明細書
【特許文献４】米国特許第６，３００，０６４号明細書
【特許文献５】米国特許第６，６９６，２４８号明細書
【特許文献６】米国特許第６，７０６，４８４号明細書
【特許文献７】米国特許第６，８２８，４２２号明細書
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：１１１２０－１１１２３，（１９９１）
【非特許文献２】Ｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：３５７６－３５８０，（１９９２）
【非特許文献３】Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：４４５７－４４６１（１９９２）（ｒａｎｄｏｍｉｚｉｎｇ ＣＤ３－Ｈ３）
【非特許文献４】Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １３７：５７－６２（２００３）（ｅｘｔｅｎｄｉｎｇ ｒａｎｄｏｍｉｚａｔｉｏｎ ｔｏ Ｖκ ＣＤＲ３）
【非特許文献５】Ｈａｙａｎａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １７：３１０（１９９４）（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ＣＤＲ ｒｅｇｉｏｎｓ ｂｙ ｏｖｅｒｌａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ａｎｄ ＰＣＲ）
【非特許文献６】Ｎｉｓｓｉｍ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１３：６９２－６９８（１９９４）
【非特許文献７】Ｄｅ Ｋｒｕｉｆ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４８：９７－１０５（１９９５）
【非特許文献８】Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１３：３２４５－３２６０（１９９４）
【非特許文献９】Ｋｎａｐｐｉｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９６：５７－８６（２０００）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
これらおよびその他の前進にもかかわらず、高度に多様な（ポリ）ペプチド（例えば、抗体）ライブラリーの設計および構築のための新しい効率的な方法への必要性は大きい。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明は、多様なペプチドおよびポリペプチドライブラリーの設計および構築に関する
一態様において、本発明は、少なくとも１つの共通配列モチーフを特徴とする関連するアミノ酸配列を含むデータベースの多様性解析の方法であって、
（ａ）関連するアミノ酸配列をアラインメントする手順と、
（ｂ）共通配列モチーフを含む関連するアミノ酸配列に、２つ以上のフィルタの既定の組み合わせを適用することによって、第１データセットを作成する手順と、
（ｃ）第１データセットを共通配列モチーフ内での位置によるアミノ酸使用頻度について解析する手順と、
（ｄ）共通配列モチーフ内の１つ以上のアミノ酸位置における最小閾値アミノ酸使用頻度を特徴とする第２データセットを作成する手順と、
を含む方法に関する。

【００１１】
手順（ｄ）において、最小閾値アミノ酸使用頻度は、共通配列モチーフ内のあらゆるアミノ酸位置に対して指定することができる。
【００１２】
特定の一実施形態では、共通配列モチーフ内の大部分のアミノ酸位置に対して、最小閾値アミノ酸使用頻度を指定する。別の特定の実施形態では、共通配列モチーフ内の全アミノ酸位置に対して、最小閾値アミノ酸使用頻度を指定する。種々の実施形態において、共通配列モチーフ内の特定のアミノ酸位置に対して指定された最小閾値アミノ酸使用頻度は、同一であっても、あるいは異なってもよい。
【００１３】
さらなる実施形態では、共通配列モチーフ内の大部分のアミノ酸位置に最小合計アミノ酸使用を提供するように、最小閾値アミノ酸使用頻度を設定する。
【００１４】
またさらなる実施形態では、該共通配列モチーフ内の全アミノ酸位置に最小合計アミノ酸使用を提供するように、最小閾値アミノ酸使用頻度を設定する。
【００１５】
最小合計アミノ酸使用は、任意の所望のレベルに設定してもよく、特定の実施形態では、これは少なくとも約４０％、または少なくとも約４５％、または少なくとも約５０％、または少なくとも約５５％、または少なくとも約６０％、または少なくとも約６５％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約７５％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％である。
【００１６】
別の実施形態では、関連するアミノ酸配列は抗体配列である。
【００１７】
さらに別の実施形態では、関連するアミノ酸配列は、抗体重鎖配列を含む。
【００１８】
さらなる実施形態では、関連するアミノ酸配列は、抗体軽鎖配列を含む。
【００１９】
関連するアミノ酸配列が抗体配列である場合、共通配列モチーフは、例えば、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３配列などのＣＤＲ配列でよい。
【００２０】
本発明の方法の手順（ｂ）において使用できるフィルタの性質または数には制限はない。特定の実施形態において、抗体配列の場合、フィルタの既定の組み合わせは、（１）抗体重鎖または軽鎖のアイソタイプ、（２）ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列のうち１つ以上の長さ、（３）１つ以上のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列内の１つ以上の既定の位置における、１つ以上の既定のアミノ酸残基の存在、（４）フレームワークのタイプ、（５）抗体が結合する抗原、（６）抗体の親和性、および（７）ＣＤＲ配列外の位置によるアミノ酸残基、からなる群から選択できる。
【００２１】
さらなる実施形態では、抗体重鎖および／または軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列のうちの少なくとも１つは、サイズが適合する。このパラメータは、例えば、追加フィルタとして、抗体重鎖および／または軽鎖配列のアイソタイプと組み合わせることができる。
【００２２】
種々の実施形態において、位置によるアミノ酸使用頻度は、少なくとも約３％、または少なくとも約５％、または少なくとも約１０％、または少なくとも約１５％であるか、あるいは約３％～約１５％、または約５％～約１０％に設定する。
【００２３】
本発明の方法の別の実施形態では、同じ位置によるアミノ酸使用頻度が、該ＣＤＲ配列内の各アミノ酸を特徴付ける。代替実施形態では、位置によるアミノ酸使用頻度は、該Ｃ

ＤＲ配列内の少なくとも２つのアミノ酸残基において異なる。

【００２４】

別の実施形態では、フィルタの既定の組み合わせは、フレームワークのタイプを含む。

【００２５】

さらに別の実施形態では、抗体重鎖および軽鎖配列の双方が解析される。場合により、抗体重鎖配列は、既定の抗体軽鎖の特徴と対にされる、あるいは抗体軽鎖配列は、既定の抗体重鎖の特徴と対にされる。

【００２６】

さらなる実施形態では、関連する抗体配列は、少なくとも１つの機能性抗体に由来する。

【００２７】

またさらなる実施形態では、本発明の方法の手順（ｂ）で適用されるフィルタのうちの少なくとも１つは、機能性抗体の重鎖および／または軽鎖のフレームワーク配列に最も類似する生殖系列配列である。

【００２８】

限定はされないが、機能性抗体は、例えば、細胞表面および可溶性受容体、サイトカイン、成長因子、酵素、プロテアーゼ、およびホルモンからなる群から選択されるポリペプチドに結合する。したがって、抗体は、サイトカイン、例えばＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２３、およびそれらのそれぞれのファミリーメンバーなどのインターロイキンに結合してもよい。あるいは、サイトカインは、例えば、インターフェロン－α、－β、および－γ（ＩＦＮ－α、－β、および－γ）、腫瘍壊死因子－αおよび－β（ＴＮＦ－αおよび－β）、ＴＷＥＡＫ、ＲＡＮＫＬ、ＢＬｙｓ、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、ＳＤＦ－１、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭＣＳＦ）からなる群から選択されてもよい。

【００２９】

抗体が結合するポリペプチドは、成長因子であってもよく、これには神経成長因子（ＮＧＦ）、インスリン様成長因子１（ＩＧＦ－１）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、胎盤成長因子（ＰＬＧＦ）、組織成長因子－α（ＴＧＦ－α）、および組織成長因子－β（ＴＧＦ－β）が含まれるが、これらに限定されない。

【００３０】

別の実施形態では、機能性抗体は、例えばＤｉｇ、Ｂｉｏ、ＤＮＰ、またはＦＩＴＣなどのハプテンに結合する。

【００３１】

本明細書における方法のさらに別の実施形態では、関連するアミノ酸配列は、分泌タンパク質または細胞外タンパク質のファミリーメンバーに由来するが、これは例えばサイトカインでよい。

【００３２】

具体的な実施形態では、サイトカインはインターフェロン－αであり、関連するアミノ酸配列は、ＩＦＮ－αサブタイプの配列である。

【００３３】

特定の実施形態において、本発明は、同定されたデータセットを活用して設計された関連するアミノ酸配列の物理的ライブラリーを合成する手順をさらに含む。

【００３４】

本方法のある実施形態では、ライブラリーは、定義されたアミノ酸のみが生成されるように、別個のいくつかの定義されたオリゴヌクレオチドまたは縮重オリゴヌクレオチドを生成することによって合成される。

【００３５】

さらなる実施形態では、産生された物理的ライブラリーの多様性は、同定されたデータセットの物理的表現であるライブラリーの多様性を上回る。これは、例えば、最小閾値アミノ酸使用頻度を満たさない少なくとも１つのアミノ酸も該多様性を提供するために合成されることに起因しうる。

【００３６】

またさらなる実施形態では、作成された物理的ライブラリーの多様性は、同定されたデータセットの物理的表現であるライブラリーの多様性を下回る。これは、例えば、最小閾値アミノ酸使用頻度を満たす全アミノ酸が合成されるとは限らないことに起因しうる。

【００３７】

別の実施形態では、データセットは、抗体重鎖および／または軽鎖配列を含むが、これには１つ以上のＣＤＲを含んでよい。

【００３８】

さらに別の実施形態では、ＣＤＲは、フレームワーク配列の骨格中にクローニングされるが、これは場合により、該ＣＤＲを含むデータベース内で最も頻繁に使用されるフレームワーク配列であってもよい。

【００３９】

物理的ライブラリーは、全ての原核および真核発現系含む、任意の発現系を用いて発現することができる。

【００４０】

具体的な実施形態では、物理的ライブラリーは、ファージミドディスプレイ、ｍＲＮＡディスプレイ、微生物細胞ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、マイクロビーズディスプレイ技法、抗体アレイ、またはタンパク質－ＤＮＡ結合に基づくディスプレイを用いて発現およびディスプレイされる。

【００４１】

本発明の別の実施形態では、ライブラリーは、そのメンバーの１つ以上の化学的および／または生物学的特性をスクリーニングされる。かかる特性には、半減期、効力、有効性、結合親和性、および免疫原性が含まれるが、これらに限定されない。

【００４２】

さらに別の実施形態では、アミノ酸側鎖の多様性は、１つ以上のアミノ酸位置においてライブラリーのメンバーに導入される。

【００４３】

特定の実施形態では、アミノ酸側鎖の多様性は、１つ以上の該アミノ酸位置において、アミノ酸残基に少なくとも２つの異なる側鎖化学官能基を提供することによって導入される。

【００４４】

別の実施形態では、全アミノ酸の化学的性質の少なくとも３０％、または少なくとも５０％、または少なくとも５５％、または少なくとも６０％が、各アミノ酸位置において表わされる。

【００４５】

好ましくは、アミノ酸の該側鎖多様性は、コンビナトリアル縮重オリゴヌクレオチド合成を用いて導入される。

【００４６】

別の態様では、本発明は、ペプチドまたはポリペプチド配列のコンビナトリアルライブラリーを産生する方法であって、コンビナトリアルオリゴヌクレオチド合成を用いて、ペプチドまたはポリペプチド配列の２つ以上のアミノ酸位置に、アミノ酸側鎖の化学的多様性を導入する手順を含む方法に関する。

【００４７】

一実施形態において、アミノ酸側鎖の化学的多様性は、該ペプチドまたはポリペプチド配列の天然の多様性を模倣するように設計される。

【００４８】

ライブラリーは、抗体ライブラリーを含むがこれに限定されない、任意のタイプのライブラリーであってもよい。

【００４９】

具体的な実施形態では、抗体ライブラリーは、抗体の重鎖可変ドメイン配列を含む。

【００５０】

別の実施形態では、ライブラリーは、抗体の軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【００５１】

さらに別の実施形態では、ライブラリーは、コンビナトリアル一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）ライブラリーである。

【００５２】

さらなる実施形態では、抗体ライブラリーは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントのライブラリーである。

【図面の簡単な説明】

【００５３】

【図１】多様なヒト抗体ライブラリーの設計および構築の代表的な手順の要約を示す。

【図２－１】Ｖ$_\kappa$のＣＤＲ１、２、および３の頻度解析；位置による絶対使用の決定を示す。

【図２－２】Ｖ$_\kappa$のＣＤＲ１、２、および３の頻度解析；位置による絶対使用の決定を示す。

【図３－１】Ｖ$_\kappa$１軽鎖の閾値解析である。使用１０％を下回る個々のアミノ酸は報告されない。

【図３－２】Ｖ$_\kappa$１軽鎖の閾値解析である。使用１０％を下回る個々のアミノ酸は報告されない。

【図４－１】Ｖ$_\kappa$１軽鎖の閾値解析である。使用５％を下回る個々のアミノ酸は報告されない。

【図４－２】Ｖ$_\kappa$１軽鎖の閾値解析である。使用５％を下回る個々のアミノ酸は報告されない。

【図５】軽鎖ＣＤＲ１の多様性の合成を示す。図５は、それぞれ、出現する順番で、配列番号４および５～２０を開示する。

【図６】Ｖ$_H$３重鎖合成ライブラリーの閾値解析（長さ１０残基）である。閾値使用率は、各アミノ酸位置に対して個別に設定されており、これは３％～１０％である。

【図７－１】図６に示されるように設計されたライブラリーを合成するために使用されるオリゴヌクレオチド（ぞれぞれ、出現する順番で、配列番号２１～４８）を示す。

【図７－２】図６に示されるように設計されたライブラリーを合成するために使用されるオリゴヌクレオチド（ぞれぞれ、出現する順番で、配列番号４９～７８）を示す。

【図７－３】図６に示されるように設計されたライブラリーを合成するために使用されるオリゴヌクレオチド（ぞれぞれ、出現する順番で、配列番号７９～１０８）を示す。

【図７－４】図６に示されるように設計されたライブラリーを合成するために使用されるオリゴヌクレオチド（ぞれぞれ、出現する順番で、配列番号１０９～１１６）を示す。

【図８－１】生産的抗ＴＮＦ－α抗体重鎖（それぞれ、出現する順番で、配列番号１１７～１３９）の生殖系列起源の決定を示す。

【図８－２】生産的抗ＴＮＦ－α抗体重鎖（それぞれ、出現する順番で、配列番号１１７～１３９）の生殖系列起源の決定を示す。

【図９】生産的抗ＴＮＦ－α抗体重鎖の生殖系列起源を図示するデンドログラムアラインメントを示す。

【図１０－１】生産的抗ＴＮＦ－α抗体軽鎖（それぞれ、出現する順番で、配列番号１４０～１５９）の生殖系列起源の決定を示す。

【図１０－２】生産的抗ＴＮＦ－α抗体軽鎖（それぞれ、出現する順番で、配列番号１４０～１５９）の生殖系列起源の決定を示す。

【図１１】生産的抗ＴＮＦ－α抗体軽鎖の生殖系列起源を図示するデンドログラムアライ

ンメントを示す。
【図１２－１】V_{κ}１軽鎖合成ライブラリーの多様性を示す。図１２は、配列番号１６０を開示する。
【図１２－２】V_{κ}１軽鎖合成ライブラリーの多様性を示す。
【図１３－１】V_{H}３のＣＤＲ１およびＣＤＲ２の頻度解析を示す。
【図１３－２】V_{H}３のＣＤＲ１およびＣＤＲ２の頻度解析を示す。
【図１４－１】ＣＤＲ１およびＣＤＲ２の閾値解析パート１を示す。
【図１４－２】ＣＤＲ１およびＣＤＲ２の閾値解析パート１を示す。
【図１５－１】ＣＤＲ１およびＣＤＲ２の閾値解析パート２を示す。
【図１５－２】ＣＤＲ１およびＣＤＲ２の閾値解析パート２を示す。
【図１６－１】V_{H}３重鎖合成ライブラリーの多様性を示す。図１６は、配列番号１６１を開示する。
【図１６－２】V_{H}３重鎖合成ライブラリーの多様性を示す。図１６は、配列番号１６１を開示する。
【図１７－１】抗ジゴキシゲニン抗体Ｄ２Ｅ７に基づく、V_{H}３重鎖合成ライブラリー多様性の設計を示す。図１７－１は、配列番号１６２を開示する。
【図１７－２】抗ジゴキシゲニン抗体Ｄ２Ｅ７に基づく、V_{H}３重鎖合成ライブラリー多様性の設計を示す。
【図１８】抗ジゴキシゲニン抗体Ｉｇλの軽鎖可変領域（配列番号１）および重鎖可変領域（配列番号２）の配列を示す。
【図１９】抗ジゴキシゲニン抗体重鎖および軽鎖（それぞれ、出現する順番で、配列番号２、１２５、１および１６３）の生殖系列起源の決定を示す。
【図２０】λの長さが適合するC_{L}１フレームワークのハプテン解析を示す。
【図２１】Ｈ３（長さ８アミノ酸）へのハプテン解析を示す。
【図２２】ＩＦＮ－αサブタイプのアミノ酸残基３２～３８のアラインメント（それぞれ、出現する順番で、配列番号１６４～１６８、１６７、１６７、１６９、１６７、１７０、１６７および１７１）を示す。
【図２３】所望のＩＦＮ－α多様性をコードするためのオリゴヌクレオチド設計（それぞれ、出現する順番で、配列番号１７２、１７２および１７３～１７４）を示す。
【図２４】側鎖の化学的性質によって分類したアミノ酸を示す。
【図２５】化学的に探索された多様性位置のコーディングを示す。
【図２６】化学的に探索された多様性を含有するＣＤＲ３を示す。
【図２７】化学プローブの組を用いたＣＤＲ３重鎖多様性のコーディング（それぞれ、出現する順番で、配列番号１７５および１７６）を示す。
【発明を実施するための形態】
【００５４】
Ａ．定義
特に定めのない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者が通常理解するのと同じ意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９４）は、当業者に、本出願において使用される用語の多くの概括的指針を与える。
【００５５】
当業者は、本発明を実施する際に使用しうる、本明細書において記載されるものと同様または同等の多くの方法および材料に気付くであろう。実際に、本発明は、記載される方法および材料に決して限定されない。本発明の目的上、以下の用語を下記に定義する。
【００５６】
「共通配列モチーフ」という表現は、本明細書において最も広い意味で用いられ、２つ以上のペプチドまたはポリペプチド配列の間で共通するアミノ酸残基のパターンを指して

用いられる。配列モチーフは、本発明の詳細な説明に記載されるものなどの様々なパターン発見アルゴリズムによって、容易に同定することができる。

【００５７】

本発明の文脈において、「抗体」（Ａｂ）という用語は、最も広い意味で用いられ、特定の抗原に対して結合特異性を示す免疫グロブリン、ならびに抗原特異性を欠く免疫グロブリンおよびその他の抗体様分子を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系により低レベルで生成され、骨髄腫により増加したレベルで生成される。本出願において、「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および抗体フラグメントを具体的に対象とするが、これらに限定されない。

【００５８】

「天然抗体」は、通常は、２つの同一の軽（Ｌ）鎖と２つの同一の重（Ｈ）鎖とから構成される、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されるが、ジスルフィド連鎖の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。また、各重鎖および軽鎖は、規則的な間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン（V_H）を有し、それにいくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（V_L）を、その他端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第１定常ドメインと並び、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８６：６５１（１９８５）；Ｎｏｖｏｔｎｙ ａｎｄ Ｈａｂｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８２：４５９２（１９８５））。

【００５９】

抗体鎖に関する「可変」という用語は、抗体間で配列が大きく異なり、各特定の抗体のその特定の抗原への結合および特異性に関与する、抗体鎖の部分を指して用いられる。かかる可変性は、軽鎖および重鎖の可変ドメインの双方における超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存される部分は、フレームワーク（ＦＲ）と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ４つのＦＲ（それぞれＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４）を含み、主としてβ－シート配置をとり、β－シート構造を接続するかあるいは場合によりその一部を構成するループを形成する３つの超可変領域によって接続される。各鎖における超可変領域は、ＦＲによって近接して一緒に保持され、他方の鎖の超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に貢献する（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１），６４７～６６９ページを参照）。定常ドメインは、抗体を抗原に結合することに直接関与していないが、抗体依存細胞毒性への抗体の関与などの種々のエフェクター機能を示す。

【００６０】

「超可変領域」という用語は、本明細書において用いられる場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」からのアミノ酸残基を含む（すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基３０～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、および８６～９６（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメイン中の３０～３５（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、および９３～１０１（Ｈ３）；ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６）。

【００６１】

「フレームワーク領域」という用語は、より相違するＣＤＲ領域の間に存在する、当該技術分野で認められる抗体可変領域の部分を指す。かかるフレームワーク領域は、典型的には、フレームワーク１～４（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４）と称され、三次元空間において、重鎖または軽鎖抗体可変領域に見られる３つのＣＤＲを保持するための

骨格を提供し、それによってＣＤＲは抗原結合表面を形成することができる。

【００６２】

抗体は、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに指定することができる。抗体には、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭの５つの主要なクラスがあり、それらのうちのいくつかは、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、およびＩｇＡ２などのサブクラス（アイソタイプ）にさらに分類できる。

【００６３】

免疫グロブリンのこれらの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。

【００６４】

任意の脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる明確に区別できる２つの型のうちの１つに指定することができる。

【００６５】

「抗体フラグメント」は、全長抗体の一部、一般的にはその抗原結合または可変ドメインを含む。抗体フラグメントの例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント、線状抗体、一本鎖抗体分子、二重特異性抗体、および抗体フラグメントから形成された多特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【００６６】

「モノクローナル抗体」という用語は、Ｂ細胞の単一クローンによって合成された抗体分子を指して用いられる。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体の特徴を示し、特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるものではない。したがって、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎによって最初に記載されたハイブリドーマ法（Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５（１９７５）；Ｅｕｒ． Ｊ． Ｉｍｍｕｎｏｌ． ６：５１１ （１９７６））により、組換えＤＮＡ技法によって作製することができ、あるいはファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【００６７】

「ポリクローナル抗体」という用語は、Ｂ細胞の集団によって合成された抗体分子の集団を指して用いられる。

【００６８】

「一本鎖Ｆｖ」または「ｓＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のＶ$_H$およびＶ$_L$ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Ｆｖポリペプチドは、Ｖ$_H$とＶ$_L$ドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それによりｓＦｖは、抗原結合に望ましい構造を形成することができる。ｓＦｖの概説については、Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ， ｖｏｌ． １１３， Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ． Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ， Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ， （１９９４）の２６９～３１５ページ、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎを参照。一本鎖抗体は、例えば、ＷＯ ８８／０６６３０号およびＷＯ ９２／０１０４７号に開示されている。

【００６９】

本明細書において用いられる「抗体結合領域」という用語は、１つ以上の抗原を結合することができる、免疫グロブリンまたは抗体可変領域の１つ以上の部分を指す。典型的には、抗体結合領域は、例えば、抗体軽鎖（ＶＬ）（またはその可変領域）、抗体重鎖（ＶＨ）（またはその可変領域）、重鎖Ｆｄ領域、組み合わされた抗体軽鎖および重鎖（またはその可変領域）であるＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、単一ドメイン、または一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）など、あるいは全長抗体、例えばＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブタイプ）、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、またはＩｇＭ抗体などである。

【００７０】

「閾値出現頻度」という用語は、本明細書におけるライブラリーで用いるために選択される配列が、発現に有利な配列であると決定された配列に由来することを要求する、本発明の基準を指す。要求される多様性の程度、ライブラリーの所望のサイズなどの最終的な目標に応じて、「閾値出現頻度」を異なるレベルに設定することができる。

【００７１】

「アミノ酸」または「アミノ酸残基」という用語は、典型的には、当該技術分野で認められる定義を有するアミノ酸を指し、例えば、アラニン（Ａｌａ）、アルギニン（Ａｒｇ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）、システイン（Ｃｙｓ）、グルタミン（Ｇｌｎ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、グリシン（Ｇｌｙ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、リジン（Ｌｙｓ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）、プロリン（Ｐｒｏ）、セリン（Ｓｅｒ）、トレオニン（Ｔｈｒ）、トリプトファン（Ｔｒｐ）、チロシン（Ｔｙｒ）、およびバリン（Ｖａｌ）からなる群から選択されるアミノ酸などであるが、所望の場合、修飾、合成、または希少アミノ酸も使用してよい。したがって、３７　ＣＦＲ　１．８２２（ｂ）（４）に記載される修飾および異常アミノ酸は、具体的に本定義に含まれ、参考として本明細書で特に援用される。アミノ酸は、種々のサブグループにさらに分類することができる。したがって、アミノ酸は、非極性側鎖（例えば、Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｖａｌ）；負荷電側鎖（例えば、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）；正荷電側鎖（例えば、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ）；または非荷電極性側鎖（例えば、Ａｓｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、およびＴｙｒ）を有するとしてグループ化することができる。アミノ酸は、小型のアミノ酸（Ｇｌｙ、Ａｌａ）、求核性アミノ酸（Ｓｅｒ、Ｈｉｓ、Ｔｈｒ、Ｃｙｓ）、疎水性アミノ酸（Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｍｅｔ、Ｐｒｏ）、芳香族アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、アミド（Ａｓｐ、Ｇｌｕ）、および塩基性アミノ酸（Ｌｙｓ、Ａｒｇ）としてもグループ化することができる（図２５を参照）。

【００７２】

「保存アミノ酸残基」という用語は、比較される２つ以上のアミノ酸配列における所定の残基位置に対して、典型的には少なくとも５０％以上（例えば、約６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上）の高い頻度で出現することが決定されたアミノ酸残基を指す。

【００７３】

「半保存アミノ酸残基」という用語は、所定の残基位置が比較される２つ以上のアミノ酸配列の間で、高い頻度で出現すると決定されたアミノ酸残基（複数）を指す。２～３個の残基、好ましくは２個の残基が合わせて約４０％以上（例えば、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、またはそれ以上）の頻度で示される場合、それらの残基は、半保存であると決定される。

【００７４】

「可変アミノ酸残基」という用語は、所定の残基位置が比較される２つ以上の配列の間で、可変頻度で生じると決定されたアミノ酸残基を指す。多数の残基が所定の位置に現すれる場合、その残基位置は、可変であると決定される。

【００７５】

「可変性プロファイル」という用語は、抗体のＣＤＲ内など、ポリペプチド配列内の特定のアミノ酸位置に存在する、アミノ酸およびその個別の出現頻度の列挙を指す。

【００７６】

「ポリヌクレオチド」という用語は、ＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子などの核酸、ならびにそれらの類似体（例えば、ヌクレオチド類似体を用いて、あるいは核酸化学を用いて生成したＤＮＡまたはＲＮＡ）を指す。必要に応じて、ポリヌクレオチドは、例えば、当該技術分野において認められる核酸化学を用いて合成的に作製しても、あるいは例えばポリメラーゼを用いて酵素的に作製してもよく、また所望であれば修飾してもよい。典型的な修飾には、メチル化、ビオチン化、および当該技術分野において既知のその他の修飾が含

まれる。さらに、核酸分子は、一本鎖または二本鎖でよく、所望の場合は、検出可能部分に連結していてもよい。

【００７７】

「突然変異誘発」という用語は、特別の定めのない限り、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を変更するための当該技術分野において認められる任意の技法を指す。好ましい種類の突然変異誘発には、誤りがちなＰＣＲ突然変異誘発、飽和突然変異誘発、またはその他の部位特異的突然変異誘発が含まれる。

【００７８】

「ベクター」という用語は、細胞内で自己複製ができ、また例えば遺伝子またはポリヌクレオチドなどのＤＮＡセグメントを効果的に連結させて、付着したセグメントの複製をもたらすことができるｒＤＮＡ分子を指して用いられる。１つ以上のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を指示することができるベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と称する。

【００７９】

本明細書において用いられる「プライマー」という用語は、核酸の制限消化反応物から精製されたものか、あるいは合成的に産生されたものかに関わらず、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下に置かれたとき、核酸合成の開始点としての機能を果たすことができるポリヌクレオチドを指す。かかる条件には、好適な温度およびｐＨでの、ヌクレオチドおよびＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素などの存在を含んでもよい。プライマーは、好ましくは一本鎖であるが、二本鎖型であってもよい。プライマーは、重合剤の存在下で伸長産物の合成を刺激するために十分長くなくてはならない。プライマーの正確な長さは、標的配列の複雑さ、温度、およびプライマー源を含む多くの要因に依存するであろう。プライマーは、典型的には、約１５～約２５ヌクレオチドを含有するが、より短いプライマーおよびより長いプライマーも使用できる。短いプライマーは、一般に、テンプレートと安定複合体を形成するのにより低い温度を必要とする。

【００８０】

「ファージディスプレイライブラリー」は、ファージコートタンパク質との融合体としてクローン化タンパク質配列の集合を発現するタンパク質発現ライブラリーである。したがって、「ファージディスプレイライブラリー」という表現は、本明細書において、ファージが外部（典型的には異種）タンパク質を発現する、ファージ（例えば、繊維状ファージ）の集合を指す。外部タンパク質は、ファージが接触する他の部分と自由に相互作用（結合）することができる。外部タンパク質をディスプレイする各ファージは、ファージディスプレイライブラリーの「メンバー」である。

【００８１】

「抗体ファージディスプレイライブラリー」は、抗体または抗体フラグメントをディスプレイするファージディスプレイライブラリーを指す。抗体ライブラリーには、ファージの集団、またはかかるファージの集団をコードするベクターの集合、あるいはかかるファージもしくはベクターの集合を有する１つ以上の細胞が含まれる。このライブラリーは、ファージ粒子１個当たり平均１つの一本鎖抗体または抗体フラグメントをディスプレイする一価であっても、あるいはウイルス粒子１個当たり平均２つ以上の抗体または抗体フラグメントをディスプレイする多価であってもよい。「抗体フラグメント」という用語は、一本鎖Ｆｖ（ｓｃｆｖ）フラグメントおよびＦａｂフラグメントを含むが、これらに限定されない。好ましい抗体ライブラリーは、平均10^{6}を超える、または10^{7}を超える、または10^{8}を超える、または10^{9}を超える異なるメンバーを含む。

【００８２】

「繊維状ファージ」という用語は、その表面に異種ポリペプチドをディスプレイできるウイルス粒子を指し、これにはｆ１、ｆｄ、Ｐｆ１、およびＭ１３が含まれるが、これらに限定されない。繊維状ファージは、テトラサイクリン（例えば、「ｆｄ－ｔｅｔ」）などの選択可能なマーカーを含んでもよい。種々の繊維状ファージディスプレイ系が当業者に周知である（例えば、Ｚａｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ． Ｇｅｎｅ ９： １２７－１４０

（１９８０），Smith et al. Science 228：１３１５－１３１７（１９８５），ならびにParmley and Smith Gene 73：３０５－３１８（１９８８）を参照）。

【００８３】

「パニング」という用語は、標的への高い親和性および特異性を有する抗体などの化合物を担持するファージの同定および単離の際の、複数ラウンドのスクリーニングプロセスを指して用いられる。

【００８４】

Ｂ．詳細な説明

本発明の方法を実施するための技法は、当該技術分野において周知であり、標準的な実験用教本に記載されている。これには、例えば、Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons（１９９７）；Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, J. Sambrook and D. W. Russell, eds., Cold Spring Harbor, New. York., USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ２００１；O'Brian et al., Antibody Phage Display, Methods and Protocols, Humana Press, ２００１；Phage Display: A Laboratory Manual, C. F. Barbas III et al. eds., Cold Spring Harbor, New. York., USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ２００１；およびAntibodies, G. Subramanian, eds., Kluwer Academic, ２００４などがある。突然変異誘発は、例えば、部位特異的突然変異誘発（Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82：４８８－４９２（１９８５））を用いて実施することができる。ＰＣＲ増幅法は、米国特許第４，６８３，１９２号、第４，６８３，２０２号、第４，８００，１５９号、および第４，９６５，１８８号、ならびに「PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification」（H. Erlich, ed., Stockton Press, New York（１９８９））；および「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」（Innis et al., eds., Academic Press, San Diego, Calif.（１９９０））を含むいくつかの教本に記載されている。

【００８５】

Ｋａｂａｔデータベースおよび Ｋａｂａｔの慣例を用いた抗体配列解析に関する情報は、例えば、Johnson et al., The Kabat database and a bioinformatics example, Methods Mol. Biol. ２００４；２４８：１１－２５；およびJohnson et al., Preferred CDRH3 lengths for antibodies with defined specificities, Int Immunol. １９９８, Dec；１０（１２）：１８０１－５などで見出されるであろう。

【００８６】

Ｃｈｏｔｈｉａの慣例を用いた抗体配列解析に関する情報は、例えば、Chothia et al., Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain, J Mol. Biol. １９９８ May １；２７８（２）：４５７

－79；Morea et al., Antibody structure, prediction and redesign, Biophys Chem. 1997; 68（1－3）：9－16；Morea et al., Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins; J Mol. Biol. 1998, 275（2）：269－94；Al－Lazikani et al., Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins, J Mol. Biol. 1997, 273（4）：927－48；Barre et al., Structural conservation of hypervariable regions in immunoglobulins evolution, Nat Struct Biol. 1994, 1（12）：915－20；Chothia et al., Structural repertoire of the human VH segments, J Mol. Biol. 1992, 227（3）：799－817；Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, Nature. 1989, 342（6252）：877－83；およびChothia et al., Review Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, J Mol. Biol. 1987, 196（4）：901－17などで見出されるであろう。

【0087】

１．多様な（ポリ）ペプチドライブラリーのｉｎ ｓｉｌｉｃｏ設計

本発明によると、多様な（ポリ）ペプチドライブラリーの設計は、対象とされる関連する（ポリ）ペプチド配列のデータベースの使用と、典型的には、ライブラリーの個々のメンバーが共有する配列モチーフの同定とから始まる。ポリペプチド中の配列モチーフを同定するための様々なコンピュータプログラムは、当該技術分野において周知であり、オンラインで利用できる。したがって、例えば、配列モチーフは、ＥＬＰＨ（一組のＤＮＡまたはタンパク質配列においてモチーフを発見するための汎用Ｇｉｂｂｓサンプラー）、ＭＥＭＥ（関連するＤＮＡまたはタンパク質配列のグループ内で高度に保存された領域のモチーフを発見することを可能にするＭｕｌｔｉｐｌｅ ＥＭ ｆｏｒ Ｍｏｔｉｆ Ｅｌｉｃｉｔａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ（モチーフ導出のためのマルチプルＥＭシステム））；ＰＰＳＥＡＲＣＨ（ＰＲＯＳＩＴＥデータベース内で配列をモチーフまたは機能性パターンについて検索できるようにする（ＥＢＩ））；ｅｍｏｔｉｆ（アラインメントされた配列のサブセットへのモチーフを形成し、発見するモチーフをその特異性と包含する供給される配列の数との双方によって、ランク付けするリサーチシステム（Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｇｒｏｕｐ））などを用いて同定することができる。

【0088】

次の手順では、同定された１つ以上の配列モチーフを互いにアラインメントし、各データセットがアラインメントされた配列モチーフのうちの１つ以上に特有の既定のパラメータの組み合わせを共有することを特徴とする、別々のデータセットにさらに分割する。かかるパラメータは、例えば、長さ、特定の配列モチーフが属するサブファミリー、配列が由来する種、生物学的機能などである。次に、２つ以上のパラメータの所定の組み合わせを特徴とするデータセットをアミノ酸使用頻度について位置によって解析して、データセット内の個々の一続きのアミノ酸における主要なアミノ酸使用を同定する。

【0089】

配列モチーフのアラインメントは、当該技術分野内にある種々の方法で達成できるが、これには例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェアである、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなど

の使用が挙げられる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含み、アラインメントを測定するための適当なパラメータを決定することができる。

【００９０】

アミノ酸使用頻度の決定は、高度（典型的には少なくとも５０％）の出現、および好ましくは完全な、所定の位置（保存アミノ酸残基）のデータセットの全メンバーにおける同一性、または所定の残基位置へのデータセットの２つ以上のメンバー（好ましくは大部分）におけるアミノ酸残基の出現に基づいてよい。次に、１つ以上の追加パラメータを特徴とする追加データセットを作成することができるが、これらは必ずしも配列が関連していなくてもよい。

【００９１】

例えば、目標が多様な抗体ライブラリーの設計である場合、非冗長再構成抗体配列を含有する電子データベースであるＫａｂａｔデータベースに存在する抗体重鎖および軽鎖のＣＤＲ配列は、既定のパラメータの固有の組み合わせ（フィルタ）を用いて、位置による頻度について解析することができる。Ｋａｂａｔデータベースは、抗体タンパク質配列を含有し、これらは提出時に注釈が付けられる。Ｋａｂａｔデータベースからの情報は、他の環境、例えばＭｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ａｃｃｅｓｓデータベースなどにインポートすることができるが、それによりフィルタを簡便に適用することができ、また、結果を例えばＥｘｃｅｌを含む別の任意のソフトウェアを用いて表にし、さらに解析することができる。

【００９２】

本発明の手法は、多様なパラメータ（フィルタ）およびパラメータ（フィルタ）の組み合わせを用いて、抗体重鎖および軽鎖配列の双方を同時にフィルタ処理することを可能にする。したがって、個々の重鎖についての多様性データセットの生成を軽鎖の選定制限に関連付けることができる。例えば、抗体の重鎖ＣＤＲ配列を解析するためのフィルタは、（１）ある軽鎖タイプ（例えばカッパ（κ）またはラムダ（λ））との対合；（２）ＣＤＲサイズ（例えば、ＣＤＲ１＝６残基；ＣＤＲ２＝１３残基）；および（３）ＣＤＲ３サブファミリー（例えば、V_H１対V_H３）のうちの１つ以上を含んでもよい。軽鎖では、全てのＣＤＲはサイズが適合してもよい。例えば、ＣＤＲ１＝７、ＣＤＲ２＝１０、およびＣＤＲ３＝８アミノ酸残基であることを既定することができる。追加として、あるいは代替として、軽鎖は、軽鎖サブファミリーのタイプ（例えば、κ１またはκ３サブファミリー）に基づいてフィルタ処理（さらに分割）してもよい。

【００９３】

したがって、例えば、重鎖の多様性解析はκ軽鎖との対合に基づいて実施できるが、解析は、V_κ３サブファミリーの軽鎖と対合する重鎖配列に、または８アミノ酸の長さを含有するＣＤＲ３を有するκ軽鎖に、あるいは両者の組み合わせにさらに制限することもできる。

【００９４】

抗体重鎖および／または軽鎖の共変解析のための追加フィルタには、アイソタイプ、抗原タイプ、親和性、および／またはＣＤＲと関連のない位置による残基、あるいは抗体鎖のタイプもしくはサブタイプを含んでよいが、これらに限定されない。

【００９５】

さらに、本発明は、「生産的」な重鎖および軽鎖の対合に基づいた、テーマに沿ったライブラリーの設計を可能にする。したがって、市販の抗体を含む、同じ抗原への種々の抗体に多様性解析を行なって、ヒトの治療において成功する可能性が最も高い抗体を同定することができる。

【００９６】

目標が、生産的な重鎖および軽鎖の対合に基づく、テーマに沿った抗体ライブラリーの設計である場合、選択された抗原に対して、１つ以上の生産的な（例えば、市販の）抗体を選択する。次に、重鎖および軽鎖の生殖系列の起源を決定し、同じタイプの重鎖および軽鎖のＣＤＲ配列（例えば、V_H３、V_κ１）に上述のタイプの多変量解析を行なって、

多様性データセットを作成する。好ましくは、解析は、サイズが適合するＣＤＲのみに基づくべきである。

【００９７】

本発明の方法では、アラインメントおよびフィルタの適用後、位置による解析を行なって、前もって作成されたデータセット内の個々のアミノ酸またはアミノ酸のグループの位置による頻度を決定し、ＣＤＲ多様性データセットなどの多様性データセットを生成する。対象とされる各アミノ酸位置への絶対的な位置によるアミノ酸使用を決定したあと、アミノ酸の使用率および合計使用への閾値を下げて、より広い適用範囲の多様性に対応することができる。したがって、例えば、必要な総適用範囲は８０％を超え、個々のアミノ酸が１０％未満とならないように設定することができる。

【００９８】

ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏモデリングは、関連性のある任意の情報源、例えば、遺伝子およびタンパク質配列、および三次元データベース、および／または抗体など、以前に試験したポリペプチドからの結果などの追加モデリング情報を用いて、継続的に更新することができ、それによりｉｎ　ｓｉｌｉｃｏデータベースは、その予測能力がより正確になる。

【００９９】

さらに、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏサブセットは、結合親和性／結合活性の結果などの生物検定の結果、以前に試験した抗体の生物活性で補完することができる。このようにして、構造的特色を、目的の用途に期待される能力とより密接に相関させることが可能である。

【０１００】

ＣＤＲ多様性データセットの設計に続き、要求される多様性を提供するコンビナトリアル（縮重）オリゴヌクレオチド配列の集合を合成し、好適なテンプレートを背景に、その集合をクローニングする。

【０１０１】

２．多様な（ポリ）ペプチドライブラリの構築

上述のようにコンビナトリアルな位置による多様性のデータセットを作成したあと、マルチ合成体オリゴヌクレオチド合成によって物理的なコンビナトリアル多様性の組を生成することができる。本発明によると、突然変異誘発コードまたは混合コドン三量体を使用する代わりに、別個の縮重オリゴヌクレオチドの集合を生成させるが、これを定量的に制限または緩和して、前述の解析および設計によって作成されたコンビナトリアル多様性の組を物理的に表わすことができる。基準を緩和することにより、より少ないオリゴヌクレオチドプローブの合成によって所望の多様性を獲得することができ、あるいは集合をクローニングする能力が多様性解析によって生成された予測集団を上回る場合には、多様性の組を合理的に拡大することができる。さらに、物理的なコンビナトリアル多様性の組は、追加規定を伴ってあるいは伴わずに、仮想の多様性の組には認められない副産物を含みうる。この手法は、コンビナトリアル抗体ライブラリー生成の分野で最も役立つが、例えば種々のポリペプチドクラスのライブラリー（例えば、成長因子ライブラリー）などの生成など、他の適当な応用例にも合理的に拡大しうる。物理的ライブラリーは、上述のように閾値使用率を設定することによって同定された任意の所定の位置にも、全アミノ酸を含むメンバーを必ずしも含有する必要がないことに留意することは重要である。様々な理由から、例えば、必要とされるオリゴヌクレオチドの数を減らすために、所定の位置におけるあるアミノ酸を省くことは有利となりうる。代替的あるいは追加的に、あらかじめ設定した閾値使用頻度に満たなかった、所定の位置にアミノ酸残基を有するメンバーを合成することによって、ライブラリーの適用範囲および多様性を増加させることができる。この２つの手法は組み合わせることができる、すなわちｉｎ　ｓｉｌｉｃｏでの多様性データセットに存在するあるアミノ酸残基を省くと同時に、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏでの多様性データセットで所定の位置に示されなかった他の残基を追加することができる。

【０１０２】

本明細書においてペプチドまたはポリペプチドライブラリーを作成する際の第１手順は

、位置による集合全体を含有するように多重合成するためのアミノ酸の集合の逆翻訳である。逆翻訳ツールは、当該技術分野で周知であり、市販されている。例えば、Ｅｎｔｅｌｅｃｈｏｎ（ドイツ）のＪａｖａ（登録商標）ベースの逆翻訳ツールは、タンパク質を適合されたコドン使用を有するヌクレオチド配列に翻訳し、特定の生物における発現に配列を最適化させる。好ましい実施形態では、本発明の方法は、別個および縮重オリゴヌクレオチドの組を合成できる自動逆翻訳アルゴリズムを使用して、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ解析によって作成された多様性表を表現する。このアルゴリズムは、特定のコドンを含んでも、あるいは含まなくてもよく、また非等モルの縮重を組み込んで、データセットの多様性だけでなく、相対分布もより正確に実現することができる。

【０１０３】

必要とされるオリゴヌクレオチドの数は、縮重塩基を選択して、頻繁に使用されるアミノ酸のうちの１つを超えるものを一度で同時にコードすることによって制限することができる。さらに、かかる縮重塩基を制限して、対象とされる種の希少コドンを避けることができる。例えば、集合を大腸菌の中で合成する場合、希少アルギニンコドン使用を大腸菌に用いることは、逆翻訳において制限される。さらに、全アミノ酸が同じ頻度で使用されるとは限らないことは知られている。したがって、非等モルの混合物を使用して、仮想（ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ）多様性表のプロファイルをより正確に反映することができる。

【０１０４】

位置による多様性が所望するよりも多くのオリゴヌクレオチドの合成を要求する場合、多様性を化学プローブ集合を用いて任意に定義することができる。したがって、アミノ酸側鎖の化学的性質をアミノ酸のサブセット内で獲得してもよく、小型、疎水性、芳香族、塩基性、酸性、アミド、求核性などのアミノ酸が、かかるサブセットを構成できる。実施例が説明するように、かかる化学的に探索された多様性の位置は、別の状況では要求されるよりもはるかに少ない数のオリゴヌクレオチドを用いて合成することができる。化学的に探索された多様性は、天然の多様性の大半を包含し、広範な相互作用的な化学的性質を提供する。

【０１０５】

本発明の多様な抗体ライブラリーを構築するとき、修飾アミノ酸残基、例えば、ほとんどのポリペプチドに用いられる従来の２０種のアミノ酸以外の残基で、例えばホモシステインなどを、所望であれば、ＣＤＲなどの抗体配列に組み込むことができる。これは当該技術分野において認められる技法を用いて実行できるが、典型的には、修飾アミノ酸残基が望まれるポリヌクレオチドに終止コドンを導入する。この技法は、次に、ポリペプチドに組み込まれる修飾アミノ酸に連結された修飾ｔＲＮＡ（例えばアンバー、オパール、またはオーカー終止コドンのいわゆるサプレッサーｔＲＮＡ）を提供する（例えば、Ｋｏｈｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　ＰＮＡＳ，　９８，　１４３１０－１４３１５　（２００１）を参照）。

【０１０６】

好ましい実施形態では、上記の手順のうちの１つ以上は、コンピュータを利用する。特定の実施形態では、コンピュータを利用した手順は、例えば、Ｋａｂａｔデータベースのマイニング、および場合により、Ｖｂａｓｅ配列ディレクトリの結果（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，Ｉ Ｍ．ｅｔ ａｌ．，．VBASE Sequence Directory. Cambridge, U.K.: MRC Centre for Protein Engineering; １９９５）との相互参照を含む。本発明の方法は、様々な手順を実行するためのソフトウェア（例えば、コンピュータ可読命令）およびハードウェア（例えば、コンピュータ、ロボット、およびチップ）を含むハイスループット手法に修正可能である。

【０１０７】

本明細書においてライブラリーを生成するためのオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ合成の既知の方法によって合成できる。既知の合成方法には、ホスホラミダイト化学（Ｂｅａｕｃａｇｅ　ａｎｄ　Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ，　Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｓ．，

２２（２０）：１８５９　１８６２　（１９８１））が含まれるが、これは、例えばＮｅｅｄｈａｍ－ＶａｎＤｅｖａｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，　１２：６１５９　６１６８　（１９８４））に記載されるように、自動合成機を用いて、特に最も一般的な４０～８０ｂｐのサイズ範囲で、効果的なオリゴ調製を可能にする。さらに、オリゴヌクレオチドは、トリエステル法、ホスファイト法、およびＨ－ホスホネート法などによって合成できるが、これらは全て当該技術分野で周知である。オリゴヌクレオチド合成方法の概説は、例えば、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：　Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ」，　ｅｄ．　Ｍ．　Ｊ．　Ｇａｉｔ，　ＪＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，　Ｎ．Ｙ．　（１９９０）を参照されたい。オリゴヌクレオチドは、様々な市販用供給元に特注もできるが、これには例えば、Ｔｈｅ　Ｍｉｄｌａｎｄ　Ｃｅｒｔｉｆｉｅｄ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ（米国テキサス州ミッドランド）、Ｔｈｅ　Ｇｒｅａｔ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｃｏｍｐａｎｙ（米国ユタ州ソルトレイクシティ）、ＥｘｐｒｅｓｓＧｅｎ　Ｉｎｃ．（米国イリノイ州シカゴ）、Ｏｐｅｒｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．（米国カリフォルニア州アラメダ）などがある。

【０１０８】

ライブラリーが抗体ライブラリーである場合、次の手順において、多様性をフレームワーク中にクローニングして、多様な抗体ライブラリーを作成する。

【０１０９】

フレームワーク骨格は、当該技術分野で周知の方法によって選択することができる。したがって、データベース内で最も頻繁に使用されるフレームワークを骨格として使用するために選定し、多様性を生殖系列フレームワーク中にクローニングする。フレームワーク配列を選択するために、特定の抗原に反応して発現されたことを決定された全ての使用可能なフレームワーク骨格のサブセットを配列する。所定の抗原クラスに反応して本来最も頻繁に発現されるフレームワークを決定することによって、適当なフレームワークアクセプターを選択する。例えば、タンパク質ベースの抗原に反応して発現される好ましいアクセプターフレームワークを決定するために、Ｋａｂａｔデータベースで「タンパク質を標的とする」フレームワーク検索する。異なる抗原クラスに対するＣＤＲを提示するために好ましいアクセプター配列が必要な場合、および／または、特定の種のアクセプター配列が必要な場合、それに応じてＫａｂａｔタンパク質配列フィルタを設定する。したがって、タンパク質ベースの標的に対するヒト治療法として使用する配列を決定するために、タンパク質／ペプチド抗原を認識するヒト抗体配列のみに焦点を合わせるようにフィルタを設定する。これは、結果を偏らせるデータセットおよび配列情報の冗長性を大きく減少させる。かかる解析は、V_H、V_κ、および／またはV_λ遺伝子にも同様に実施できる。

【０１１０】

多様な集合を標的特異的アクセプター上に組み込んで、抗体エンジニアリングのための変異体集合を生成することができる。

【０１１１】

生成されたＣＤＲの多様性は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの当該技術分野で既知の方法によって、フレームワーク領域に組み込むことができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、伸長用プライマーとして使用できる。この手法では、ＣＤＲなどの定義された領域（またはその部分）に対応する突然変異誘発性カセットをコードするオリゴヌクレオチドは、少なくとも部分的に互いに相補的であり、例えばＴａｑポリメラーゼなどのポリメラーゼを用いて、伸長させて大きい遺伝子カセット（例えば、ｓｃＦｖ）を形成することができる。

【０１１２】

別の手法では、部分的に重複するオリゴヌクレオチドを設計する。内部オリゴヌクレオチドをそれらの相補鎖にアニーリングして、さらなるアニーリングに有用な一本鎖伸長部を有する二本鎖ＤＮＡ分子を生じる。次に、ＰＣＲを用いて、アニーリングされた対を混合し、伸長させて、ライゲートし、全長二本鎖分子を形成することができる。好適なベク

ター中にクローニングするために、合成遺伝子の端部付近に便利な制限部位を設計してもよい。この手法では、縮重ヌクレオチドをオリゴヌクレオチドのうちの１つの代わりに直接組み込むこともできる。相補鎖は、プライマー伸長反応において、ポリメラーゼを活用した酵素伸長によって、他方の鎖の部分的に相補的なオリゴヌクレオチドから合成される。合成段階での縮重ポリヌクレオチドの取り込みは、例えば、遺伝子の１つを超えるドメインまたは定義された領域に突然変異を起こさせて、あるいはそれを改変して多様性を持たせる場合に、クローニングを簡単にする。

【０１１３】

用いる方法に関わらず、二本鎖形態に変換したあと、標準的技法によって、オリゴヌクレオチドを好適な発現ベクター中にライゲートすることができる。好適なプラスミドなどの適当なベクターを用いて、遺伝子を無細胞抽出液、あるいは抗体の発現に適した原核細胞もしくは真核細胞に導入することができる。

【０１１４】

異なる手法では、ファージベクター、またはヘルパーファージを用いて、一本鎖分子の増殖を可能にする繊維状ファージの複製起点を有するベクター中に、所望のコード配列をクローニングすることができる。一本鎖テンプレートを、所望の突然変異を示す１組の縮重オリゴヌクレオチドを用いてアニーリングし、伸長およびライゲートして、それによって各類似体鎖を適当な宿主に導入できる分子の集団に組み込む（例えば、Ｓａｙｅｒｓ，Ｊ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：７９１－８０２（１９８８）を参照）。

【０１１５】

本明細書において、合成ヒト抗体ライブラリーなどのライブラリーを作成するのに適した様々なファージミドクローニングシステムは、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８８：４３６３ ４３６６（１９９１）；Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：７９７８ ７９８２（１９９１）；Ｚｅｂｅｄｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８９：３１７５ ３１７９（１９９２）；Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８８：１１１２０ １１１２３（１９９１）；Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８９：４４５７ ４４６１（１９９２）；およびＧｒａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８９：３５７６ ３５８０（１９９２）に記載されている。

【０１１６】

ライブラリーのサイズは、ＣＤＲの長さ、および表示が必要なＣＤＲ多様性の量によって異なるであろう。好ましくは、ライブラリは、10^{15}、10^{14}、10^{13}、10^{12}、10^{11}、10^{10}、10^{9}、10^{8}または10^{7}未満、またより好ましくは10^{6}以下の抗体または抗体フラグメントを含有するように設計されるであろう。

【０１１７】

本発明に従って構築されたライブラリーは、当該技術分野において認められる技法を用いて、好ましくは配列された、マイクロチップなどの固体支持体に付着してもよい。

【０１１８】

本発明に従って構築されたライブラリーは、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて発現させることができ、これには細菌発現系、哺乳動物発現系、およびｉｎ ｖｉｔｒｏリボソームディスプレイ系が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１９】

好ましい実施形態では、本発明は、本明細書における多様なライブラリーを発現させるためのファージベクターの使用を包含する。この方法は、一般的に、クローニングおよび発現のための繊維状ファージ（ファージミド）表面発現ベクター系の使用を伴う。例えば、Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳ

A, 88：4363−4366 (1991)；Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88：7978−7982 (1991)；Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89：3175−3179 (1992)；Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88：11120−11123 (1991)；Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89：4457−4461 (1992)；Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89：3576−3580 (1992)；Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182：41−50 (1995)；Ames et al., J. Immunol. Methods 184：177−186 (1995)；Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24：952−958 (1994)；Persic et al., Gene 187 9−18 (1997)；Burton et al., Advances in Immunology 57：191−280 (1994)；ならびに米国特許第5，698，426号；第5，233，409号；第5，580，717号；第5，427，908号；第5，750，753号；第5，821，047号；第5，403，484号；第5，571，698号；第5，516，637号；第5，780，225号；第5，658，727号；第5，733，743号；第5，837，500号；第5，969，108号；第6，326，155号；第5，885，793号；第6，521，404号；第6，492，160号；第6，492，123号；第6，489，123号；第6，342，588号；第6，291，650号；第6，225，447号；第6，180，336号；第6，172，197号；第6，140，471号；第5，994，519号；第6，969，108号；第5，871，907号；および第5，858，657号を参照。

【0120】

ベクターは、導入されたファージ遺伝子とディスプレイタンパク質遺伝子を発現させるために培養される組換え宿主細胞を形質転換し、またファージ粒子を集めて宿主細胞から脱落させるために使用される。次に、脱落したファージ粒子を宿主細胞培養培地から回収（収集）し、所望の抗体結合特性についてスクリーニングする。典型的には、回収した粒子をあらかじめ選択した抗原と結合させるために「パニング」する。強く結合している粒子を収集し、粒子の個々の種をクローニングによって単離して、抗原への結合についてさらにスクリーニングする。所望の抗原結合特異性を有する結合部位を産生するファージを選択する。

【0121】

本発明の方法は、抗体ライブラリーの発現およびディスプレイに用いられる任意の特定の技術にも制限されないことは重要である。また、他のディスプレイ技法、例えば、リボソームまたはmRNAディスプレイ（Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91：9022−9026 (1994)；Hanes and Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94：4937−4942 (1997)）、細菌ディスプレイ（Georgiou et al., Nature Biotech. 15：29−34 (1997)）または酵母細胞ディスプレイ（Kieke et al., Protein Eng. 10：1303−1310 (1997)）などの微生物細胞ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、胞子ディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ（Urban et al., Nucleic Acids Res. 33：e35 (2005)）などのウイルスディスプレイ、タンパク質−DNA結合に基づくディスプレイ（Odegrip et al., Proc. Acad. Natl. Sci. USA 101：2806−2810 (2004)；Reiersen et al., Nucleic Acids Res. 33：e10 (2005)）、

およびマイクロビーズディスプレイ（Ｓｅｐｐ ｅｔ ａｌ．， ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５３２：４５５－４５８ （２００２））も適している。

【０１２２】

リボソームディスプレイでは、抗体およびコードするｍＲＮＡはリボソームによって連結されるが、これはｍＲＮＡの翻訳終結時に、ポリペプチドを解放せずに停止させられる。選択は、全体としての三元複合体に基づく。

【０１２３】

ｍＲＮＡディスプレイライブラリーにおいて、抗体とコードするｍＲＮＡとの共有結合は、アダプター分子として用いられるピューロマイシンを介して確立される（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．， Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９８：３７５０－３７５５ （２００１））。抗体をディスプレイするためのこの技法の使用については、例えば、ＬｉｐｏｖｓｅｋおよびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ， Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．２９０：５１－６７ （２００４）を参照されたい。

【０１２４】

微生物細胞ディスプレイ法には、サッカロマイセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母表面ディスプレイが含まれる（ＢｏｄｅｒおよびＷｉｔｔｒｕｐ， Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：５５３－５５７ （１９９７））。したがって、例えば、抗体を、酵母細胞壁に位置するα凝集素酵母接着受容体への融合によって、サッカロマイセス・セレヴィシエの表面上にディスプレイすることができる。この方法は、フローサイトメトリーによってレパートリーを選択する可能性を提供する。蛍光標識抗原および抗エピトープタグ試薬で細胞を染色することによって、細胞表面上の抗原結合および抗体発現のレベルに従って、酵母細胞を分類することができる。酵母ディスプレイの基盤は、ファージと組み合わせることもできる（例えば、Ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｕｃｋｅｎ ｅｔ ａｌ．， ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５４６：２８８－２９４ （２００３）を参照）

抗体ライブラリーの選択およびスクリーニングのための技法の概要は、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ， Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３（９）：１１０５－１１１６ （２００５）を参照されたい。

【０１２５】

以下の非限定的実施例によって、本発明を説明する。

【実施例】

【０１２６】

本発明の方法を実施するための技法は、当該技術分野において周知であり、標準的な実験用教本に記載されている。これには、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．， Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ， Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ （１９９７）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ， Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ， Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｄ．Ｗ．Ｒｕｓｓｅｌｌ， ｅｄｓ．， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ， Ｎｅｗ．Ｙｏｒｋ．， ＵＳＡ， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ， ２００１；Ｏ’Ｂｒｉａｎ ｅｔ ａｌ．， Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ， Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ， Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ， ２００１； Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ， Ｃ．Ｆ．Ｂａｒｂａｓ ＩＩＩ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ， Ｎｅｗ．Ｙｏｒｋ．， ＵＳＡ， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ， ２００１；およびＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ， Ｇ．Ｓｕｂｒａｍａｎｉａｎ， ｅｄ．， Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ， ２００４などがある。突然変異誘発は、例えば、部位特異的突然変異誘発（Ｋｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．， Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：４８８－４９２ （１９８５））；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ，１巻および２巻（Ｄ．Ｎ．Ｇｌｏｖ

er, Ed. 1985)；Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait, Ed. 1984)；PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999)(編者)；Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure, Neidle, Ed., Oxford Univ Press (1999)；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Academic Press (1990)；PCR Essential Techniques: Essential Techniques, Burke, Ed., John Wiley & Son Ltd (1996)；The PCR Technique: RT−PCR, Siebert, Ed., Eaton Pub. Co. (1998)；Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996)；Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996)；Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C. S. H. L. Press, Pub. (1999)；Large−Scale Mammalian Cell Culture Technology, Lubiniecki, A., Ed., Marcel Dekker, Pub., (1990)；Border et al., Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nature Biotechnology, 15(6)：553−7 (1997)；Border et al., Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol., 328：430−44 (2000)；Pluckthun等により米国特許第6，348，315号に記載される、リボソームディスプレイ；Szostak等により米国特許第6，258，558号、第6，261，804号、および第6，214，553号に記載されるProfusion（登録商標）；ならびに米国特許出願公開第20040058403(A1)号に記載される細菌ペリプラスム発現を用いて実施することができる。

【0127】

Kabatの慣例を用いた抗体配列解析に関するさらなる詳細は、例えば、Johnson et al., The Kabat database and a bioinformatics example, Methods Mol. Biol. 2004; 248: 11−25；Johnson et al., Preferred CDRH3 lengths for antibodies with defined specificities, Int Immunol. 1998, Dec; 10(12)：1801−5；Johnson et al., SEQHUNT. A program to screen aligned nucleotide and amino acid sequences, Methods Mol. Biol. 1995; 51：1−15；ならびにWu et al., Length distribution of CDRH3 in antibodies；およびJohnson et al., Proteins. 1993 May; 16(1)：1−7. Reviewなどに見られるであろう。

【0128】

Chothiaの慣例を用いた抗体配列解析に関するさらなる詳細は、例えば、Chothia et al., Structural determinants in

the sequences of immunoglobulin variable domain, J Mol. Biol. 1998 May 1; 278(2):457−79;Morea et al., Antibody structure, prediction and redesign, Biophys Chem. 1997 Oct; 68(1−3):9−16;Morea et al., Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins, J Mol. Biol. 1998 Jan 16, 275(2):269−94;Al−Lazikani et al., Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins, J Mol. Biol. 1997 Nov 7, 273(4):927−48;Barre et al., Structural conservation of hypervariable regions in immunoglobulins evolution, Nat Struct Biol. 1994 Dec 1(12):915−20;Chothia et al., Structural repertoire of the human VH segments, J Mol. Biol. 1992 Oct 5, 227(3):799−817;Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, Nature. 1989 Dec 21−28, 342(6252):877−83;およびChothia et al., Review Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, J Mol. Biol. 1987 Aug 20, 196(4):901−17などに見られるであろう。

【0129】

Chothia解析に関するさらなる詳細は、例えば、Morea V, Tramontano A, Rustici M, Chothia C, Lesk A M. Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. J Mol Biol. 1998 Jan 16; 275(2):269−94;Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. Structural repertoire of the human VH segments. J Mol Biol. 1992 Oct 5; 227(3):799−817;Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith−Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989 Dec 21−28; 342(6252):877−83;Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. 1987 Aug 20; 196(4):901−17;およびChothia C, Lesk AM. The evolution of protein structures. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1987; 52:399−405に記載されている。

【0130】

CDR接触考察に関するさらなる詳細は、例えば、MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody−antigen i

ｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ： ｃｏｎｔａｃｔ ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｉｔｅ Ｔｏｐｏｇｒａｐｈｙ． Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ． １９９６ Ｏｃｔ １１； ２６２（５）：７３２－４５に記載されている。

【０１３１】

本明細書において参照される抗体配列およびデータベースに関するさらなる詳細は、例えば、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ＩＭ， Ｗａｌｔｅｒ Ｇ， Ｍａｒｋｓ ＪＤ， Ｌｌｅｗｅｌｙｎ ＭＢ， Ｗｉｎｔｅｒ Ｇ． Ｔｈｅ ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｇｅｒｍｌｉｎｅ ＶＨ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｒｅｖｅａｌｓ ａｂｏｕｔ ｆｉｆｔｙ ｇｒｏｕｐｓ ｏｆ ＶＨ ｓｅｇｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｌｏｏｐｓ． Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ． １９９２ Ｏｃｔ ５； ２２７（３）：７７６－９８；Ｌｉ Ｗ， Ｊａｒｏｓｚｅｗｓｋｉ Ｌ， Ｇｏｄｚｉｋ Ａ． Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ ｏｆ ｈｉｇｈｌｙ ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｔｏ ｒｅｄｕｃｅ ｔｈｅ ｓｉｚｅ ｏｆ ｌａｒｇｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅｓ． Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ． ２００１ Ｍａｒ； １７（３）：２８２－３；［ＶＢＤＢ］ｗｗｗ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｖｂａｓｅ－ｏｋ．ｐｈｐ？ｍｅｎｕ＝９０１；［ＫＢＴＤＢ］ｄａｔａｂａｓｅ．ｃｏｍ；［ＢＬＳＴ］ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／［ＣＤＨＩＴ］ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．ｌｊｃｒｆ．ｅｄｕ／ｃｄ－ｈｉ／；［ＥＭＢＯＳＳ］ｗｗｗ．ｈｇｍｐ．ｍｒｃ．ａｃ．ｕｋ／Ｓｏｆｔｗａｒｅ／ＥＭＢＯＳＳ／；［ＰＨＹＬＩＰ］ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ．ｇｅｎｅｔｉｃｓ．ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ．ｅｄｕ／ｐｈｙｌｉｐ．ｈｔｍｌ；および［ＦＡＳＴＡ］ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕなどに見られるであろう。

【０１３２】

（実施例１）

抗体軽鎖Ｖ$_{\kappa}$１のＣＤＲ１、２、および３配列の頻度解析

第１手順において、ヒト抗体Ｖ$_{\kappa}$１軽鎖可変ドメイン配列２３７４個をＫａｂａｔデータベースのＳｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔから収集した。各配列に対し、遺伝子配列を対応するアミノ酸配列に翻訳し、Ｋａｂａｔの番号付けシステムに従って、そのアミノ酸配列を位置によってアラインメントした。

【０１３３】

次に、得られたＶ$_{\kappa}$１軽鎖配列の集合は、位置１８～１９にアミノ酸「ＲＶ」を有する配列を選択し、また以下の長さ制限を適用することによってフィルタ処理した：ＣＤＲ１＝７アミノ酸、ＣＤＲ２＝１０アミノ酸、およびＣＤＲ３＝８アミノ酸。これらのフィルタを適用することによって、本来２３７４メンバーであった集合は、７７１メンバーに減少した。

【０１３４】

ＣＤＲ１に先行する「ＲＶ」モチーフから完全なＣＤＲ３配列までの完全な明確な配列を含有する登録のみを使用することによって、Ｖ$_{\kappa}$１軽鎖可変ドメイン配列の数をさらに３８３にまで減少させた。

【０１３５】

続いて、配列をアラインメントし、各位置の出現アミノ酸を表にし、各位置の２０種の天然アミノ酸の分布を計算して、位置によるアミノ酸の絶対使用に基づき、位置による頻度に基づくＣＤＲドメイン多様性のデータベースを生成した。この作表の結果は、図２に示す。

【０１３６】

図２に記載するデータセットは、任意の所定の位置について１０％を上回ったアミノ酸使用のみを報告することよって、さらにフィルタ処理した。結果は図３に記載する。多様性への指定される使用率の影響を評価するために、５％を上回ったアミノ酸使用のみを含

めて、別のデータセットを作成した。結果は図４に示す。図３と図４のデータセットとの比較から、より低いアミノ酸使用率を要求することによって、より広い適用範囲の多様性を実現できることが明らかである。

【０１３７】

図５に示すように、図４に記載される軽鎖ＣＤＲ１の多様性をコードするためには、コンビナトリアルオリゴヌクレオチド１２８個または縮重コンビナトリアルオリゴヌクレオチド１６個を合成する必要がある。塩基は、等モルである必要はなく、アミノ酸使用を偏らせるように調節して、本解析で認められた頻度を反映させることができ、さらに頻度表に含まれない残基を含んでもよい。代替的にまたは追加的に、頻度表に含まれる残基を省いて、例えば、合成に必要なオリゴヌクレオチドの数をさらに減らしてもよい。

【０１３８】

（実施例２）

V_H３重鎖合成ライブラリーの多様性の設計

基本的に実施例１に記載されるように抗体配列のＫａｂａｔデータベースから得られた、長さ１０アミノ酸のV_H３重鎖ポリペプチド配列を解析して、図６に示されるデータを生成した。図６に示されるように、残基９７を除く全ての位置に対する少なくとも７５％の位置による適用範囲を示す、３．３×１０^{5}のＣＤＲ３の多様性は、様々なアミノ酸位置に対して異なる閾値使用パーセントを設定して、わずか９６個の縮重オリゴヌクレオチドを用いて提供することができる。したがって、閾値使用率は、位置９３、９４、１００、および１０１では１０％；位置９５、９６、９８、および９９では５％；位置９７では４％；および位置１００Ａでは３％とした。この多様性を合成するのに必要とされるオリゴヌクレオチド配列は、図７に示す。

【０１３９】

（実施例３）

半合成抗体ライブラリーの作成

前述のように、V_HのＣＤＲ多様性の解析と生成を調節して、κまたはλ軽鎖との生産的かつ特異的な対合（すなわち、標的抗原に特異的に結合する抗体をもたらす対合）のための組成物を前後関係上反映することができる。これらの合成V_Hのレパートリーは、合成軽鎖のレパートリーと独占的に対合する必要はないが、リンパ球由来の軽鎖の集合を用いてコンビナトリアル的にクローニングすることができる。実際には、κおよびλ軽鎖の集合をファージディスプレイベクター中に別々にクローニングしたあと、続いて多様性を導入する個々の重鎖可変領域フレームワークのクローニング、あるいはあらかじめ多様化させた可変領域フレームワークの集合のクローニングを行なう。いずれの場合にも、軽鎖と互換するように対合された重鎖の可変領域は、対応する軽鎖とより生産的に対合すると期待される。

【０１４０】

（実施例４）

基本クローンに対する変異体のライブラリーを作成することによる改善された抗体の改変

新規免疫グロブリンレパートリーを作製するために生殖系列のアクセプターフレームワーク上に生産的多様性を導入するのに類似した状況で、特定の抗体または定義された抗体の集合への、標的特異的突然変異誘発ライブラリーを作成する。かかるライブラリーは、抗体エンジニアリングの作業において、特に親和性成熟の分野で有用である。まず対象とされるモノクローナル抗体から、定義する特徴を決定し、これをすでに定義した本発明の多様性に影響を与える要素である、生殖系列フレームワークの起源、軽鎖タイプ、ならびに軽鎖および重鎖ＣＤＲの長さなどに取り込む。これらまたは類似の特徴を決定したあと、次の手順は、これらのパラメータに対応するデータベース配列を参照することである。

対応する配列の組を同定したあと、上記に記載のものと類似の解析を行ってサブセットレパートリーの多様性を検討し、次に、所望の多様性をコードするのに必要な、対応するマルチ縮重オリゴヌクレオチドを生成する。次に、これらのマルチ縮重オリゴヌクレオチドを単一またはコンビナトリアルＣＤＲ集合としてクローニングする。マルチＣＤＲ突然変異誘発により相乗的な改善が認められる可能性がより高いため、コンビナトリアルＣＤＲ突然変異誘発ライブラリーを作成することが好ましい。上述の解析によるマルチ縮重オリゴヌクレオチドを使用して、ヒト偏向および優先に対する位置による多様性に従って、抗体を合理的に作成し、再多様化する。任意の軽鎖ＣＤＲ配列、あるいは重鎖ＣＤＲ１またはＣＤＲ２配列が、生殖系列配列から逸脱する場合、対応する生殖系列をコードするオリゴヌクレオチドもコンビナトリアルＣＤＲライブラリーに含むことに留意することは重要である。このように生殖系列をコードするオリゴヌクレオチドを含むことによって、生殖系列配列の戻し交配が可能となり、より生産的なＣＤＲの組み合わせが作成される。

【０１４１】

この「多様性再取り込みスキーム」は、既存の合成抗体のクローンから、再多様化された抗体の組を改変する際にも有用である。本発明に従って作成した合成ライブラリーの潜在的多様性は、全てのメンバーをディスプレイおよび選択するために現在利用できる技法の限界を上回るため、発見された標的特異的クローンが、典型的にスクリーニングされたライブラリーの任意のＤＮＡレベルに存在し、アクセスできる、可能性のある解決策のうちのごく一部のみを示す可能性が非常に高い。したがって、本発明のライブラリーにおいて、４ラウンドのパニング後に、抗ＥＧＦ抗体を同定したあと、本来設計された多様性をクローンにコンビナトリアル的に再導入して、新しい変異体の組を作成した。次に、これらの新しい変異体の組をＥＧＦへのパニングによって再びスクリーニングし、連続する各ラウンドにおいて、結合および洗浄のストリンジェンシーを高めた。最終結果は、最初のパニングで見られたよりも高い、バックグラウンドを上回るレベルに濃縮されたＥＧＦ結合ファージのプールを作成した。

【０１４２】

（実施例５）

サイトカインをテーマとするライブラリーの設計

新しい抗サイトカイン抗体である生産的抗ＴＮＦ－α抗体の発見のための生産的ライブラリーを作成するために、基本テーマとしてＨＵＭＩＲＡ（登録商標）（アダリムマブ）を選択した。ＨＵＭＩＲＡ（登録商標）（アダリムマブ）は、ファージディスプレイ技術を用いて作成された組換えヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体であり、ヒト由来の重鎖および軽鎖可変領域およびヒトＩｇＧ１：κ定常領域を備える抗体が得られる。

【０１４３】

親抗体Ｄ２Ｅ７の重鎖の生殖系列起源を決定するために、フレームワーク領域を解析した。これは、Ｄ２Ｅ７とヒト生殖系列ＶＨ遺伝子とのＣＤＲをマスキングして達成した。次に、ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって、Ｄ２Ｅ７のＦＲ１とＦＲ３との間の残りの配列を全てのヒト生殖系列ＶＨ遺伝子に対してアラインメントした。図８に示すように、Ｄ２Ｈ７のV_H領域は、V_H３＿３－０９と最大の類似性を示した。図９に示すデンドログラムアラインメントは、同様の結果を示した。同様に、親抗体Ｄ２Ｅ７の軽鎖は、V_κ１Ａ２０と最も類似していることがわかった（図１０および１１）。

【０１４４】

実施例１に記載される抗体軽鎖V_κ１のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列の頻度解析は、閾値使用パーセントのフィルタを６％に設定することによって修正した。図１２に示すように、このフィルタでは、位置９１を除く全アミノ酸位置についての合計使用は８０％を上回り、これはライブラリー多様性9×10^6に対応し、この多様性は、３０個の縮重オリゴヌクレオチドで生成できる。

【０１４５】

次に、ＫａｂａｔデータベースのＳｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ

Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔから、ヒト抗体の重鎖可変ドメイン配列５９７１個を収集した。各配列に対し、遺伝子配列を対応するアミノ酸配列に翻訳し、そのアミノ酸配列をＫａｂａｔの番号付けシステムに従って位置によってアラインメントした。

【０１４６】

次に、重鎖可変ドメイン集合を以下のフィルタで処理した：

１．アミノ酸位置２２～２５に「ＣＡＡＳ」（配列番号３）を含有するV_H３配列（５９７１メンバー中１５３０メンバー）；

２．κ軽鎖、ＣＤＲ１＝６アミノ酸およびＣＤＲ２＝１３アミノ酸と組み合わされた配列（１５３０メンバー中２２６メンバー）；

３．ＣＤＲ１に先行する「ＣＡＡＳ」（配列番号３）から完全なＣＤＲ２配列までの完全な配列を含有するメンバーのみを含む（２２６メンバー中１８０メンバー）。

【０１４７】

続いて、配列をアラインメントし、各位置の出現アミノ酸を表にし、各位置の２０種の天然アミノ酸の分布を計算して、位置によるアミノ酸の絶対使用に基づき、位置による頻度に基づくＣＤＲドメイン多様性のデータベースを生成した。この作表の結果は、図１３に示す。

【０１４８】

図１３に記載するデータセットは、任意の所定の位置について少なくとも１０％であったアミノ酸使用のみを報告することよって、さらにフィルタ処理した。図１４に示すように、このフィルタを用いると、ＣＤＲ２では、位置５２、５２Ａ、５５、および５８における合計アミノ酸適用範囲が７５％を下回る。より広い適用範囲に対応するために、要求される使用パーセントを１０％から５％に下げた。図１５に示すように、この変更によって、全ての位置の合計アミノ酸使用が７５％を上回るまで増加した。

【０１４９】

ＣＤＲ１およびＣＤＲ２の双方に５％使用フィルタを適用すると、ＣＤＲ１領域の合成に４個の縮重オリゴヌクレオチドが必要となり、ＣＤＲ２の多様性は、２８個の縮重オリゴヌクレオチドでコードできる（図１６参照）。したがって、合計２８個の縮重オリゴヌクレオチドを使用して、総多様性1.5×10^{8}を実現することができ、８０％を上回る位置による適用範囲を提供する。

【０１５０】

次の手順では、上述のヒト抗体の重鎖可変ドメイン配列５９７１個から、アイソタイプであるかに関わらず、長さ１３アミノ酸のV_H３配列を集めた。要求される各位置のアミノ酸使用パーセントを、閾値を４％使用に設定したアミノ酸位置９３、９４、および１０１を除いて、４％に設定した。結果は図１７に示す。これらの閾値を設定することにより、総多様性7.5×10^{9}を有する合成V_H３重鎖の合成ライブラリーを、３８４個の縮重オリゴヌクレオチドを用いて調製することができる。示されるように、ＣＤＲ３領域の残基は、親抗体Ｄ２Ｅ７の対応する残基と良好な一致を示す。

【０１５１】

（実施例６）

ハプテンをテーマとする抗体ライブラリーの設計

本方法の目的は、新しい抗ハプテン抗体同定のための生産的ライブラリーを設計することである。

【０１５２】

設計は、抗ジゴキシゲニン（抗ＤＩＧ）抗体から始めた（Ｄｏｒｓａｍ，　Ｈ．　ｅｔ　ａｌ．，　ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．　４１４：７－１３　（１９９７））。この抗体のＩｇλ軽鎖可変領域配列（配列番号１）および重鎖可変領域配列（配列番号２）は、図１８に示す。

【０１５３】

この重鎖および軽鎖の生殖系列起源を決定するために、親抗体を解析した。図１９に示すように、V_L－Ｉｇは軽鎖に最も類似し、V_H３－２３は重鎖に最も類似しているため、ＣＤＲをこの環境に置いて、抗ハプテン抗体の同定のための生産的ライブラリーを作成した。

【０１５４】

次に、λの長さが適合するV_Lフレームワーク残基について、軽鎖ＣＤＲ１およびＣＤＲ２配列を上記の実施例に記載されるように解析した。各位置について要求されるアミノ酸使用パーセントを６％に設定することによって、６％を下回る個々の配列が報告されないようにした。図２０に示すように、このフィルタは、各アミノ酸位置について優れた適用範囲を提供する。Ｈ３の長さが適合する（８アミノ酸）重鎖について類似の解析を行なうが、６．２５％のフィルタを適用し、全ての位置を含む合計アミノ酸適用範囲は７５％であった（図２１）。

【０１５５】

（実施例７）

サイトカイン（ＩＦＮ－α）の解析およびライブラリー作成

ＩＦＮは、抗ウイルス活性を有するサイトカインの総称であり、このうちウイルスまたは二本鎖核酸による刺激によって白血球またはリンパ芽球細胞から産生されたものは、ＩＦＮ－αと称される。ＩＦＮ－αは、抗ウイルス活性および細胞増殖抑制活性を含む様々な活性を有するが、これらの活性は、Ｂ型およびＣ型肝炎感染症、ならびに癌などの様々な疾患の処置に有用であることがわかっている。様々なＤＮＡライブラリーからクローニングされたＩＦＮ－α遺伝子の配列の解析は、ＩＦＮ－αがいくつかのサブタイプとして存在することを明らかにしている。例えば、ＩＦＮ－α２遺伝子では、さらに３つのタイプ（α２ａ、α２ｂ、およびα２ｃ）が同定されている。合計すると、２０を超えるＩＦＮ－αサブタイプが現在知られている。さらなる既知のサブタイプには、例えば、ＩＦＮ－α１ａ、ＩＦＮ－α１ｂ、ＩＦＮ－α４ａ、ＩＦＮ－α４ｂ、ＩＦＮ－α５、ＩＦＮ－α６などがある。ＩＦＮ－αサブタイプの多くが、その生物学的活性およびその他の生物学的特性において異なることが明らかにされている。したがって、ＩＦＮ－αファミリーのメンバー間の既存の天然の多様性に基づいて作成されたライブラリーは、新しい、改善された特性、例えば向上した効力、低下した免疫原性、増加した半減期、改善されたタンパク質分解安定性などを有するＩＦＮ－αポリペプチドの生成において、有用性を見いだしている。

【０１５６】

多様なＩＦＮ－αライブラリーを作成するための第１手順として、１１個の１８９アミノ酸長の遺伝子産物を同定した。図２２に示すように、これらのＩＦＮ－αポリペプチドのアミノ酸残基３２～３８を互いにアラインメントして、残基使用頻度を決定した。閾値アミノ酸使用パーセントを９％に設定した場合、２個の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、１００％の適用範囲を達成することができる（図２２および２３参照）。図２３に示すように、非縮重設計を用いると、要求される適用範囲を提供するために、４０個のオリゴヌクレオチドが必要である。

【０１５７】

ライブラリーを調製したあと、当該技術分野で既知の方法によって、所望の新規の特性についてのスクリーニングを実施することができる。したがって、効力の向上は、ファージディスプレイＩＦＮ－αライブラリーのバイオパニングによってなど、標準的な生物検定で試験することができる。半減期が増加したメンバーは、例えば、ＩＦＮ－α受容体に対してファージディスプレイライブラリーをバイオパニングすることによって、あるいはライブラリーのメンバーを１つ以上の血清プロテアーゼに曝露させることによって同定することができる。免疫原性の低下は、例えば、最も低いＭＨＣ分子との結合性を示す、ライブラリー中に存在するペプチドまたはポリペプチドを同定することによって、あるいは直接全タンパク質のＴ細胞エピトープ提示を試験することによって、試験することができ

る。
【０１５８】
これらおよび多数のさらなる試験は当業者に周知である。
【０１５９】

（実施例８）
化学的に探索された抗体集合
本実施例は、化学原理に基づいて設計されたプローブの組を用いた、ＣＤＲ３重鎖の多様性の作成を示す。
【０１６０】
アミノ酸は、それぞれ小型、求核性、疎水性、芳香族、酸性、アミド、および塩基性の側鎖化学官能基を特徴とする７つのグループに分けることができる（図２４）。図２５の左上の図は、７つのグループのそれぞれに属するアミノ酸の１文字記号を示している。異なる側鎖の化学的性質を代表する９種のアミノ酸（Ａ、Ｓ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｙ、Ｄ、Ｑ、Ｒ）を選択した。図２５の他の部分に示すように、９個のコドンまたは２個の縮重コドンによって、ハイライトした９種のアミノをコードすることができ、またそれにより側鎖の化学的性質の多様性を獲得することができる。（Ｂ＝Ｃ、Ｇ、またはＴ；Ｍ＝ＡまたはＣ；Ｙ＝ＣまたはＴ；Ｄ＝Ａ、Ｇ、またはＴ）
天然の重鎖ＣＤＲ３配列は、高度の化学的多様性（およそ６０％以上）を含有する。類似の化学的多様性は、１２８個の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、コンビナトリアル縮重オリゴヌクレオチド合成によって生成できると決定されている。対応する縮重オリゴヌクレオチドの設計は、図２７に示す。図２６に示すように、この手法は、天然の多様性の大部分を包含し、広範な相互作用的な化学的性質を提供する。
【０１６１】
この化学的に探索された多様性の手法は、単独で、あるいは本発明のその他の任意の方法との組み合わせで用いて、所望の特性を備えるコンビナトリアルライブラリーを作成することができる。
【０１６２】

本発明は、上記の記載においてある実施形態を参照して説明されているが、そのように限定はされない。実際には、当業者には、本明細書において示され記載されているものに加え、本発明の種々の変形形態が前述の説明から明らかとなり、またこれらは添付の特許請求の範囲の適用範囲に含まれる。したがって、本発明は、抗体ライブラリーに関して説明されるが、一般的に全てのペプチドおよびポリペプチドのライブラリーに及ぶ。
【０１６３】
本明細書を通して引用される全ての参考文献は、参考として本明細書で明示的に援用される。

【図１】

概括的ヒト抗体ライブラリー手順

以下の固有のフィルタを用いて、KabatのCDRの位置による頻度を解析する

- 重鎖
  - 軽鎖が対合。例：カッパまたはラムダ
  - CDRサイズが適合。例：CDR1＝6またはCDR2＝13
  - CDR3サブファミリーフィルタ処理。例：VH1対VH3
- 軽鎖
  - 全CDRサイズが適合。例：CDR1＝7、CDR2＝10、CDR3＝8のアミノ酸を含有する配列登録のみを選択
  - サブファミリーフィルタ処理。例：K1またはK3
- 位置による解析 – CDR多様性の組を生成するための位置による頻度を決定
  - 個々のアミノ酸の使用%の下界を設定
  - 最も一般的に使用されるアミノ酸の合計使用%の下界を設定
  - 下界は、単一または複数のCDRによって、あるいは個々の位置によっても定義できる

- 多様性の組の生成
  - 個別に合成したオリゴを用いて、コンビナトリアルな位置による多様性の組全体を獲得
  - 縮重合成が使用できる
  - 追加規定を伴ってまたは伴わずに、多様性の組に認められない副産物を含むことができる。
- データベース内で最も頻繁に使用されるフレームワークを骨格に選択
  - $V_H1\ V_H3$
  - $V_K1\ V_K3$
  - $V_\lambda1\ V_\lambda2\ V_\lambda3$
- 生殖系列フレームワーク上に多様性をクローニング
- 含むことが可能な追加フィルター
  - 分泌タンパク質、病原体標的、ハプテン、自己免疫源などの抗原のタイプ
- IgG、IgMなどの重鎖アイソタイプ

FIG. 1

【図２－１】

VK1のCDR1、2、および3の頻度解析

- 位置による絶対使用

		30	31	32	33	34	35	36	46	47	48
配列の数		383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
閾値使用パーセント	0								N		L
A		3%	1%	2%	0%	43%	0%	0%	0%	0%	0%
C		0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D		4%	2%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
E		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
F		0%	0%	8%	0%	0%	0%	7%	1%	2%	0%
G		8%	2%	0%	0%	7%	0%	0%	0%	0%	0%
H		0%	2%	1%	0%	2%	0%	1%	0%	0%	0%
I		2%	3%	0%	2%	0%	0%	0%	1%	0%	95%
K		2%	3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
L		1%	0%	0%	95%	0%	0%	1%	82%	97%	2%
M		0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	2%
N		8%	34%	4%	0%	42%	0%	0%	0%	0%	0%
P		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%
Q		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
R		12%	5%	2%	0%	0%	0%	0%	6%	0%	0%
S		54%	39%	6%	0%	2%	0%	0%	4%	0%	0%
T		3%	6%	0%	0%	2%	0%	0%	1%	0%	0%
V		1%	0%	0%	2%	2%	0%	0%	4%	0%	1%
W		0%	0%	17%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%
Y		2%	1%	52%	0%	0%	0%	92%	0%	0%	0%
表示%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
合計パーセント閾値	80	CDR1									

FIG. 2 （パート１）

【図２－２】

49	50	51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95	96
383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
							Q	G						
0%	55%	90%	1%	0%	0%	5%	0%	0%	5%	1%	2%	5%	1%	0%
0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%
0%	13%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	2%	11%	4%	1%	0%	1%
0%	1%	0%	0%	0%	0%	22%	0%	1%	0%	1%	1%	0%	0%	0%
4%	1%	0%	1%	0%	1%	0%	0%	0%	2%	2%	0%	9%	0%	7%
0%	9%	1%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	1%	1%	2%	1%	0%	1%
1%	0%	0%	0%	1%	0%	6%	2%	2%	7%	7%	3%	1%	0%	2%
0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	2%	2%	0%	5%
0%	10%	0%	0%	4%	0%	1%	0%	4%	0%	2%	0%	0%	0%	2%
0%	0%	0%	0%	1%	93%	1%	10%	0%	4%	1%	0%	10%	5%	26%
0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0%	1%	0%	1%	16%	0%	0%	0%	0%	2%	28%	16%	2%	0%	0%
0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	84%	4%
0%	0%	0%	0%	0%	0%	61%	86%	92%	0%	1%	0%	0%	2%	3%
0%	1%	0%	0%	2%	3%	1%	0%	1%	1%	0%	1%	1%	1%	14%
7%	3%	1%	94%	48%	1%	0%	0%	0%	26%	6%	61%	3%	7%	1%
0%	3%	5%	2%	27%	2%	0%	0%	0%	5%	1%	7%	23%	0%	0%
0%	1%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	1%	0%	4%	0%	3%
0%	1%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	1%	1%	0%	1%	0%	13%
88%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	36%	0%	33%	0%	18%
100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CDR2							CDR3							

FIG. 2 （パート２）

【図３－１】

V_L カッパ1閾値解析；パート1

- 使用10%を下回る個々のアミノ酸は報告されない
- 各CDRの少なくとも1つの位置で合計使用が75%を下回ることに注意
  - より広い適応範囲に対応するために、閾値使用パーセントを下げることができる

		30	31	32	33	34	35	36	46	47	48	49	50
配列の数		383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
閾値使用パーセント	10								N		L		
A						43%							55%
C													
D													13%
E													
F													
G													
H													
I											95%		
K													10%
L					95%				82%	97%			
M													
N			34%			42%							
P													
Q													
R		12%											
S		54%	39%										
T													
V													
W				17%			100%						
Y				52%				92%				88%	
表示%		66%	73%	69%	95%	85%	100%	92%	82%	97%	95%	88%	78%
許容可否		否	否	否									否
合計パーセント閾値	80	CDR1						CDR2					

FIG. 3 （パート１）

【図３－２】

51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95	96
383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
					Q	G						
90%				5%			5%					
								11%				
				22%								
										9%		7%
				6%			7%	7%				
			93%		10%					10%		26%
		16%						28%	16%			
				61%	86%	92%						
	94%	48%					26%	6%	61%		7%	14%
		7%							7%	23%		
							40%	36%		33%		13% 18%
90%	94%	91%	93%	95%	97%	92%	79%	88%	84%	75%	91%	78%
CDR2					CDR3							

FIG. 3 （パート２）

【図４－２】

51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95	96
383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
					Q	G						
90%				5%			5%					
								11%				
				22%								
										9%		7%
				6%			7%	7%				
			93%		10%					10%		26%
		16%						28%	16%			
				61%	86%	92%						
	94%	48%					26%	6%	61%		7%	14%
		7%							7%	23%		
							40%	36%		33%		13% 18%
90%	94%	91%	93%	95%	97%	92%	79%	88%	84%	75%	91%	78%
CDR2					CDR3							

FIG. 4 （パート２）

【図４－１】

V_L カッパ1閾値解析：パート2

- ここでは使用5%を下回る個々のアミノ酸は報告されない
- 結果として、全ての位置の合計使用は少なくとも75%
  ーより広い適用範囲の多様性に対応

		30	31	32	33	34	35	36	46	47	48	49	50
配列の数		383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
閾値使用パーセント	5								N		L		
A						43%							55%
C													
D				8%									13%
E													
F				8%				7%					
G		8%				7%							9%
H													
I											95%		
K													10%
L					95%				82%	97%			
M													
N		8%	34%			42%							
P													
Q													
R		12%	5%						6%				
S		54%	39%	6%								7%	
T			6%										
V													
W				17%			100%						
Y				52%				92%				88%	
表示%		83%	85%	90%	95%	92%	100%	99%	88%	97%	95%	95%	88%
許容可否													
合計パーセント閾値	75	CDR1							CDR2				

FIG. 4 （パート１）

【図５】

軽鎖CDR1の多様性の合成

- 多様性を包含するには、目的の多様性をコードするための128個のコンビナトリアルオリゴヌクレオチドを作製しなければならない
- または、16個の縮重コンビナトリアルオリゴヌクレオチド

注：塩基は、等モルである必要はなく、アミノ酸使用を偏らせるように調節して、本解析 で認められた頻度を反映させることができ、さらに 頻度表に含まれない残基を含んでもよい。

縮重設計

S	G	T	A	M	T	T	G	K	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T	オリゴ数
A	R	T	M	G	T	T	W	T				A	T	C							
2			2			2			1			2			1			1			16

K1_01	S	G	T	A	M	T	T	G	K	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_02	A	R	T	A	M	T	T	G	K	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_03	S	G	T	M	G	T	T	G	K	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_04	A	R	T	M	G	T	T	G	K	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_05	S	G	T	A	M	T	T	W	T	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_06	A	R	T	A	M	T	T	W	T	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_07	S	G	T	M	G	T	T	W	T	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_08	A	R	T	M	G	T	T	W	T	C	T	C	G	C	A	T	G	G	T	C	T
K1_09	S	G	T	A	M	T	T	G	K	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_10	A	R	T	A	M	T	T	G	K	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_11	S	G	T	M	G	T	T	G	K	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_12	A	R	T	M	G	T	T	G	K	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_13	S	G	T	A	M	T	T	W	T	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_14	A	R	T	A	M	T	T	W	T	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_15	S	G	T	M	G	T	T	W	T	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T
K1_16	A	R	T	M	G	T	T	W	T	C	T	C	A	T	C	T	G	G	T	C	T

FIG. 5

【図６】

V_H３重鎖合成ライブラリー多様性（長さ10）

- CDR3は、総多様性 $3.3x10^5$ を含有する。
- わずか96個の縮重オリゴヌクレオチドが必要
- 位置97のSWY（各4%）を省いた
- 位置100AのG（6%）を省いた

VH3 長さ 10	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	101
配列の数	68	68	68	68	68	68	67	68	68	68
閾値使用パーセント	10	10	5	5	4	5	5	10	3	5
A	91%			6%		9%		32%		
C										
D			25%	7%	6%	7%	9%			85%
E			12%							
F									32%	
G			10%	13%	13%	31%	19%	22%		
H							9%			
I									3%	
K		22%	6%		21%					
L				6%	6%				7%	
M			21%						38%	
N										
P					6%					
Q					4%					
R		63%		31%	4%	6%	6%			
S						12%		16%		
T										
V			6%	12%	9%					
W										
Y						12%	36%	12%		
適用範囲%	91%	85%	79%	75%	69%	76%	79%	82%	81%	85%
	CDR3									
縮重コドンの数	1	2	2	2	3	2	1	2	1	1
	96 オリゴ									
多様性	1	2	6	6	8	6	6	4	4	1
	3.3E+05 総 CDR3 多様性									

FIG. 6

【図７－１】

V_H３重鎖CDR3（長さ10）多様性の合成

名称	配列
H3 3 10 001a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 002a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 003a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 004a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 005a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 006a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 007a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 008a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTAAGKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 009a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 010a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 011a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 012a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 013a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 014a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 015a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 016a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTGDTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 017a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 018a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 019a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 020a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 021a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 022a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 023a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 024a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTCNTKMTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 025a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 026a	ACCGCAGTTTACTAGTGCGCAAAGVTGSKTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 027a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 028a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC

FIG. 7（パート１）

【図７－２】

H3 3 10 029a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 030a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 031a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 032a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTAAGSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 033a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 034a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTGSTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 035a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 036a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 037a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 038a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 039a	ACCGCAGTTTACTATTGCTCACGTGRWGMTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 040a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTGDTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 041a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 042a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTCNTSGRBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 043a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 044a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 045a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 046a	ACCGCGTTTACTATTGCGCAAAGCTGGGMTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 047a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 048a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTCNTSGTBRTGSTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 049a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 050a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 051a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 052a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 053a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 054a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 055a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 056a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTAAGKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 057a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 058a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC

FIG. 7（パート２）

【図７－３】

H3 3 10 059a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 060a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 061a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 062a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 063a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 064a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTGDTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 065a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 066a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 067a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 068a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 069a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 070a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 071a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 072a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTCNTKMTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 073a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 074a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 075a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 076a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 077a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 078a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 079a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 080a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTAAGSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 081a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 082a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 083a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 084a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 085a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 086a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 087a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 088a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTGDTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC

FIG. 7（パート３）

【図７－４】

H3 3 10 089a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGSKTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 090a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGSKTCNTSGRBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 091a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWSKTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 092a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWSKTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 093a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTVTGGMTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 094a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGVTGGMTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 095a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCACGTGRWGMTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC
H3 3 10 096a	ACCGCAGTTTACTATTGCGCAAAGGRWGMTCNTSGTBRTTMTWTKGATTACTGGGGTCAGGGCAC

FIG. 7 （パート４）

【図８－２】

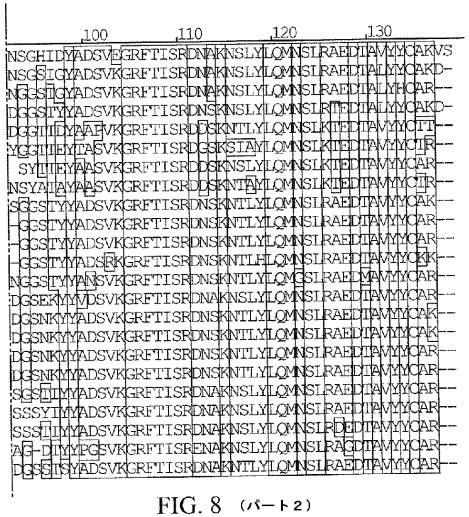

FIG. 8 （パート２）

【図８－１】

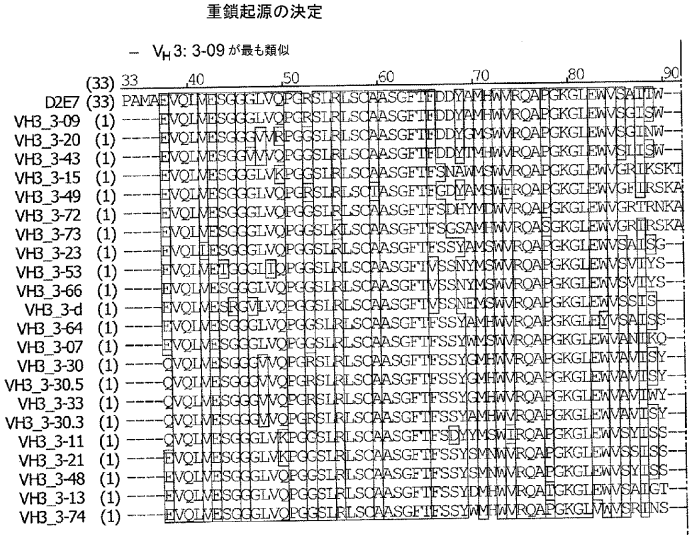

FIG. 8 （パート１）

【図９】

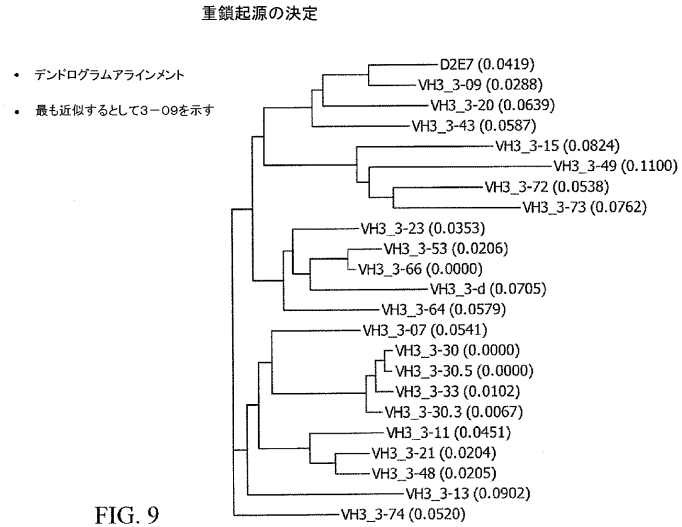

FIG. 9

【図１０－１】

軽鎖起源の決定

– A20 が最も類似

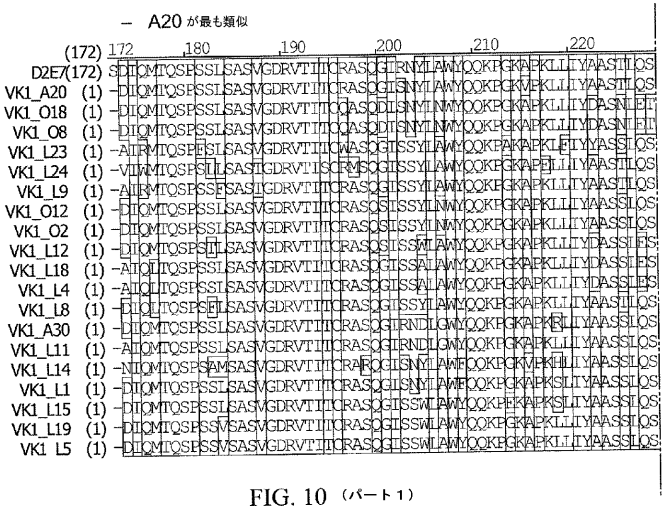

FIG. 10 （パート１）

【図１０－２】

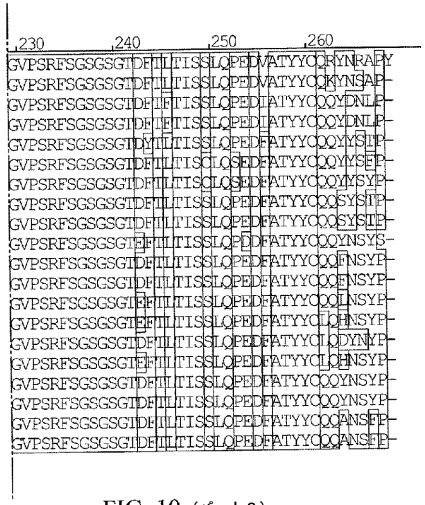

FIG. 10 （パート２）

【図１１】

軽鎖起源の決定

- デンドログラムアラインメント
- 最も近似するとしてA20を示す

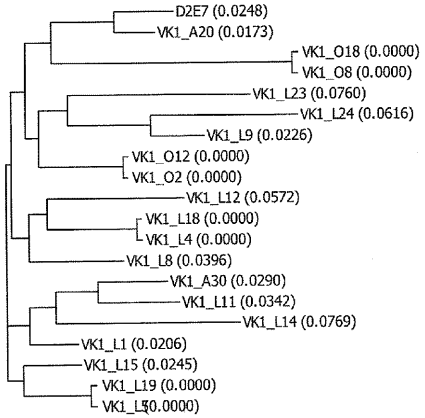

FIG. 11

【図１２－１】

Vカッパ１軽鎖合成ライブラリーの多様性

- ８０%より大きい位置 適用範囲%を示す総多様性９×１０^{6}を含有する
- ３０の縮重オリゴヌクレオチドが必要とされる

Vカッパ１分析		30	31	32	33	34	35	36	46	47	48	49	50	51	52	53
配列の数		383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	383
閾値使用パーセント	6								N		L					
A						43%							55%	90%		
C																
D				8%									13%			
E																
F				8%				7%								
G		8%				7%							9%			
H																
I											95%					
K													10%			
L					95%				82%	97%						
M																
N		8%	34%			42%										16%
P																
Q																
R		12%	5%						6%							
S		54%	39%	6%								7%			94%	48%
T			6%													27%
V				0%												
W				17%			100%									
Y				52%				92%				88%				
適用範囲%		83 %	84%	90%	95%	92%	100%	99%	88%	97%	95%	95%	88%	90%	94%	91%
	80	CDR1							CDR2							
縮重コドンの数		2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
		16 オリゴ											2 オリゴ			
位置の多様性		4	4	6	1	2	1	1	1	1	1	1	4	1	1	3
		192 CDR 1 の多様性							24 CDR 2 の多様性							
D2E7 マッチ		R	N	Y	L	A	W	Y	L	L	I	Y	A	A	S	T

青でハイライトした残基は、D2E7と合成レパートリーの双方で認められる

FIG. 12 （パート１）

【図１２－２】

54	55	89	90	91	92	93	94	95	96	
383	383	383	383	383	383	383	383	383	383	
		Q	G							
				5%			5%			
					11%					
	22%									
							9%		7%	
	6%			7%	7%					
93%		10%					10%		26%	
					28%	16%				
								84%		
	61%	86%	92%							
									14%	
				26%	6%	61%		7%		
						7%	23%			
									13%	
				40%	36%		33%		18%	
93%	90%	97%	92%	78%	88%	84%	80%	91%	78%	
CDR2		CDR3								
1	1	1	1	1	2	1	3	1	2	総オリゴ
12 オリゴ										30
1	2	1	1	4	4	3	6	1	7	組合せの多様性
2016 CDR 多様性										9.29E+06
L	Q	Q	R	Y	N	R	A	P	Y	

FIG. 12 （パート２）

【図１３－１】

V_H3のCDR1およびCDR2の頻度解析

• 位置による絶対使用

		30	31	32	33	34	35	47	48	49	50
配列の数		181	181	181	181	181	181	181	181	181	181
閾値使用パーセント	0										
A		0%	1%	0%	44%	0%	0%	0%	1%	40%	12%
C		0%	1%	2%	1%	0%	0%	5%	0%	0%	0%
D		4%	11%	1%	3%	0%	3%	0%	0%	0%	1%
E		1%	0%	0%	11%	0%	0%	0%	0%	1%	0%
F		0%	1%	12%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	4%
G		1%	2%	0%	18%	0%	1%	0%	0%	1%	13%
H		0%	0%	4%	0%	0%	34%	0%	0%	0%	2%
I		1%	0%	0%	0%	6%	0%	0%	1%	0%	2%
K		4%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
L		0%	0%	1%	1%	2%	0%	0%	1%	0%	11%
M		0%	0%	0%	0%	89%	0%	0%	0%	0%	1%
N		2%	24%	1%	0%	0%	23%	0%	0%	0%	3%
P		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Q		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
R		10%	2%	0%	0%	1%	0%	1%	0%	0%	1%
S		76%	40%	3%	11%	1%	34%	0%	0%	58%	16%
T		1%	17%	2%	1%	0%	3%	0%	0%	0%	1%
V		0%	1%	1%	2%	3%	0%	0%	98%	0%	18%
W		0%	0%	0%	4%	0%	0%	94%	0%	0%	2%
Y		0%	0%	76%	4%	0%	2%	0%	0%	0%	14%
表示%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
合計パーセント閾値		CDR1									

FIG. 13 （パート１）

【図１３－２】

51	52	52A	53	54	55	56	57	58
181	180	181	180	181	180	180	180	181
0%	0%	4%	1%	1%	5%	2%	0%	0%
0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0%	0%	6%	32%	0%	9%	1%	0%	1%
0%	0%	2%	0%	1%	3%	2%	3%	1%
2%	0%	2%	0%	0%	0%	2%	0%	4%
0%	6%	19%	11%	78%	31%	0%	0%	4%
0%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	4%
88%	0%	1%	0%	0%	1%	4%	23%	0%
1%	7%	2%	0%	0%	0%	2%	28%	1%
3%	1%	0%	1%	0%	0%	2%	4%	0%
2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0%	7%	6%	14%	1%	3%	28%	0%	5%
0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0%	0%	4%	0%	0%	0%	1%	1%	0%
2%	5%	4%	3%	0%	7%	3%	2%	2%
1%	61%	20%	36%	20%	34%	22%	1%	9%
2%	3%	2%	2%	0%	5%	22%	37%	1%
1%	1%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	0%
0%	7%	6%	0%	0%	0%	0%	0%	2%
0%	3%	23%	0%	0%	1%	10%	0%	66%
100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CDR2								

FIG. 13 （パート２）

【図１４－１】

CDR1およびCDR2の閾値解析パート1

• １０%より低い使用率の報告された個々のアミノ酸はない
• CDR2では、位置52、52A、55、および58の合計アミノ酸使用は75%を下回る
　ーより大きい適用範囲に適応するため閾値使用パーセントを減少させることが可能である

		30	31	32	33	34	35	47	48	49	50
配列の数		181	181	181	181	181	181	181	181	181	181
閾値使用パーセント	10										
A					44%					40%	12%
C											
D			11%								
E					11%						
F				12%							
G					18%						13%
H							34%				
I											
K											
L											11%
M						89%					
N			24%				23%				
P											
Q											
R		10%									
S		76%	40%		11%		34%			58%	16%
T			17%								
V									98%		18%
W								94%			
Y				76%							14%
表示%		86%	93%	88%	85%	89%	91%	94%	98%	98%	85%
許容可否											
合計パーセント閾値	75	CDR1									

FIG. 14 （パート１）

【図１４－２】

51	52	52A	53	54	55	56	57	58
181	**180**	**181**	**180**	**181**	**180**	**180**	**180**	**181**
			32%					
		19%	11%	78%	31%			
88%							23%	
								28%
			14%			28%		
	61%	20%	36%	20%	34%	22%		
						22%	37%	
		29%				10%		66%
88%	61%	62%	93%	98%	65%	81%	88%	66%
	否	否			否			否
		CDR2						

FIG. 14 （パート２）

【図１５－１】

CDR1およびCDR2の閾値解析：パート2

- 閾値%を５%に変えると、使用率が５%より低いことが報告される個々はなくなる。
- この時、全ての位置の総アミノ酸使用率が７５%を越える。

		30	31	32	33	34	35	47	48	49	50	51
配列の数		**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**
閾値使用パーセント	**5**											
A					44%					40%	12%	
C												
D			11%									
E					11%							
F				12%								
G					18%						13%	
H							34%					
I						6%						88%
K												
L												
M						89%						
N			24%				23%					
P												
Q												
R		10%										
S		76%	40%		11%		34%			58%	16%	
T			17%									
V									98%		18%	
W								94%				
Y				76%							14%	
表示%		86%	93%	88%	85%	94%	91%	99%	98%	98%	85%	88%
許容可否												
合計パーセント閾値	**75**	**CDR1**										

閾値の減少は適用範囲を改善する

FIG. 15 （パート１）

【図１５－２】

52	52A	53	54	55	56	57	58
180	**181**	**180**	**181**	**180**	**180**	**180**	**181**
				5%			
	6%	32%		9%			
6%	19%	11%	78%	31%			
						23%	
7%						28%	
7%	6%	14%			28%		5%
5%				7%			
61%	20%	36%	20%	34%	22%		9%
				5%	22%	37%	
7%	6%						
	29%				10%		66%
93%	79%	93%	98%	91%	81%	88%	80%
	CDR2						

FIG. 15 （パート２）

【図１６－１】

V_H3 重鎖合成ライブラリー多様性

- ＣＤＲ１とＣＤＲ２の組み合わせは、８０%より大きい位置適用範囲を示す１×１０^{8}総多様性を含有する。
- ２８の縮重オリゴヌクレオチドが必要とされる。

VH3カッパ対	30	31	32	33	34	35	47	48	49	50	51	52
配列の数	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**181**	**180**
A				44%					40%	12%		
C												
D												
E				11%								
F			12%									
G				18%						13%		
H						34%						
I											88%	
K												7%
L										11%		
M					89%							
N		24%				23%						7%
P												
Q												
R	10%											5%
S	76%	40%		11%		34%			58%	16%		61%
T		17%										
V												
W							94%					7%
Y			76%							14%		
適用範囲%	86%	82%	88%	85%	89%	91%	94%	98%	98%	85%	88%	87%
	CDR1											**CDR2**
縮重コドンの数	1	1	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2
	4 オリゴ											**24オリゴ**
多様性	2	3	2	4	1	3	1	1	2	6	1	4
	144 CDR1 多様性											**1.03E+06**
D2E7 マッチ	D	D	Y	A	M	H	W	V	S	A	I	T

青でハイライトした残基は、D2E7と合成パートナーの双方で認められる

FIG. 16 （パート１）

【図１６－２】

52A	53	54	55	56	57	58
181	**180**	**181**	**180**	**180**	**180**	**181**
4%			5%			
0%						
6%	32%		9%			
19%	11%	78%	31%			
					23%	
					28%	
6%	14%		3%	28%		5%
			7%			
20%	36%	20%	34%	22%		9%
			5%	22%	37%	0%
6%						
23%				10%		66%
83%	93%	98%	94%	81%	88%	80%
2	**1**	**1**	**2**	**1**	**1**	**1**
8	**4**	**2**	**7**	**4**	**3**	**4**
CDR2 多様性						
W	N	S	G	H	I	D

総オリゴ	**28**
総多様性	**1.49E+08**

FIG. 16（パート２）

【図１７－１】

V_H３重鎖合成ライブラリー多様性

- ＣＤＲ３は、８０％より大きい位置適用範囲を示す７．５×１０^9 総多様性を含有する。
- ３８４の縮重オリゴヌクレオチドが必要とされる。

VH3　長さ　13	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101
配列の数	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**	**114**
A	95%		14%		18%	5%	2%		9%	6%	17%		
C													
D			23%		11%	11%				5%			79%
E					2%								
F					1%		5%	4%		4%		43%	
G			23%	14%	12%	14%	14%	25%	7%	13%	7%		9%
H				3%							3%		
I				4%		4%	7%					1%	
K		56%			5%	12%							
L				17%			4%	4%	11%			24%	
M												8%	
N			8%	5%			4%		1%		2%		
P				9%				5%	8%	6%	13%		
Q													
R		26%		11%	5%			16%	6%	13%			
S			7%	11%	9%	10%	18%	11%	14%	15%	20%		
T			4%	0%		12%	9%		8%	6%	4%		
V				8%	6%	6%	4%	5%	2%	4%			
W							7%	7%	15%		4%		
Y					12%	6%	12%	4%	10%	13%	19%		
適用範囲％	95%	82%	79%	82%	83%	82%	87%	80%	90%	85%	90%	76%	88%
	CDR3												
縮重コドンの数	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**3**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**1**	**1**
	384 オリゴ												
多様性	**1**	**2**	**6**	**10**	**10**	**9**	**11**	**8**	**11**	**10**	**9**	**4**	**2**
	7.5E+09 総 CDR3 多様性												
D2E7 マッチ	A	K	V	S	Y	L	S	T	A	S	S	L	D

青でハイライトした残基は、D2E7と合成レパートリーの双方で認められる

FIG. 17（パート１）

【図１７－２】

位置の省略

- 残基　95 E (6%　普及率)
- 残基　98 P (5%　普及率)
- 残基　99 E (6%　普及率)
- 残基　100D G (11% 普及率)

位置の追加

- 囲みと太字で示す

FIG. 17（パート２）

【図１８】

抗ハプテンをテーマとする解析

IGラムダ軽鎖可変領域

SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNYVYWYQHLPGTAPKLLIFRNSQRPS
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG

重鎖可変領域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
GSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDKGSGWYWGQGT
LVTVSS

FIG. 18

【図19】

重鎖および軽鎖起源の決定

- VL-1g が、最も類似した軽鎖
- VH 3-23 が、最も類似した重鎖

```
抗ジゴキシゲニン重鎖  (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST
VH3_3-23              (1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST

                          YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDKGSGWYWGQGTLVTVSS
                          YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------

anti dig LC   (1) SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNYVYWYQHLPGTAPKLLIFRNS
VL1_1g        (1) QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNN

                  QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG
                  QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG----------
```

FIG. 19

【図20】

ラムダの長さが適合するVL1フレームワークのハプテン解析

ハプテン解析		27C	29	30	31	32	33	34	35	36	46	47	48	49	50	51
配列の数		166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166
閾値使用パーセント	6															
A																
C																
D															24%	13%
E															12%	
F																
G			92%												7%	
H																
I		95%											96%			
K																
L											94%	95%				
M																
N				36%	87%			40%							11%	82%
P																
Q																
R															13%	
S				39%		7%		39%							18%	
T						29%										
V							95%									
W									100%							
Y						45%		13%		96%				87%		
表示%		95%	92%	75%	87%	81%	95%	92%	100%	96%	94%	95%	96%	87%	85%	95%
許容可否																
合計パーセント閾値	75	CDR1									CDR2					
		1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	3	1
						4	オリゴ								3	オリゴ
			1	2	1	2		2	1	1	1	1	1	1	5	2
						8	多様性								40	多様性

FIG. 20

【図21】

H3(長さ8)のハプテン解析

非対 VH3 解析		93	94	95	96	97	98	99	101
配列の数		32	32	32	32	32	32	32	32
閾値使用パーセント	6.25								
A		91%		6%	6%	9%			9%
C									
D				47%				6%	56%
E					16%				
F				6%			6%	22%	
G				22%	6%	28%	16%		9%
H					9%				
I									
K			31%						6%
L		6%			6%	6%	9%	9%	
M								16%	9%
N						16%			
P								6%	
Q					13%		6%		
R			44%		19%				
S			9%				9%		
T							19%		
V					13%			13%	
W				6%			6%		
Y						22%	13%	6%	
表示%		97%	84%	88%	88%	81%	84%	78%	91%
許容可否									
合計パーセント閾値	75	CDR3							

FIG. 21

【図22】

インターフェロンのアミノ酸番号32～38

1. 11個のIFN－α配列のアミノ酸番号32～38をアラインメント
2. 残基使用頻度を決定

```
                (30) 30        43
P01563(30)           HSLGSRRTLMLLAQ
P05013(30)           HSLGLRRTLMLLAQ
P01569(30)           HSLSNRRTLMLMAQ
P32881(30)           HSLGNRRALILLAQ
P01570(30)           HSLNNRRTLMLMAQ
P05015(30)           HSLGNRRALILLAQ
P01568(30)           HSLGNRRALILLAQ
P01566(30)           HSLGNRRALILLGQ
P01571(30)           HSLGNRRALILLAQ
P01567(30)           HSLRNRRALILLAQ
P05014(30)           HSLGNRRALILLAQ
コンセンサス(30)     HSLGNRRALILLAQ
```

インターフェロンアルファ例		32	33	34	35	36	37	38
配列の数		11	11	11	11	11	11	11
閾値使用パーセント	9							
A							64%	
C								
D			9%					
E								
F								
G			64%					
H				9%				
I								
K								
L		100%						91%
M								9%
N			9%	91%				
P								
Q								
R			9%		100%	100%		
S			9%					
T							36%	
V								
W								
Y								
適用範囲%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
箱重合成数		1	2	1	1	1	1	1
2								
多様性		1	5	2	1	1	2	2
40								

FIG. 22

【図２３】

IFN多様性をコードディング

	32	33	34	35	36	37	38	
	L	G	H	R	R	A	L	
		R	N			T	M	
		S						
		D						
		N						
	C T T	G G T	C A T	C G T	C G T	G C T	C T G	
		C G T	A A T			A C T	A T G	
		A G T						
		G A T						
		A A T						オリゴの数
	1	5	2	1	1	2	2	40
	縮重設計							
	C T T	V G T / R A T	M A T	C G T	C G T	R C T	M T G	オリゴの数
	1	2	1	1	1	1	1	2
ifn_01	C T T	R A T	M A T	C G T	C G T	R C T	M T G	
ifn_02	C T T	V G T	M A T	C G T	C G T	R C T	M T G	

FIG. 23

【図２４】

側鎖の化学的性質によって分類したアミノ酸

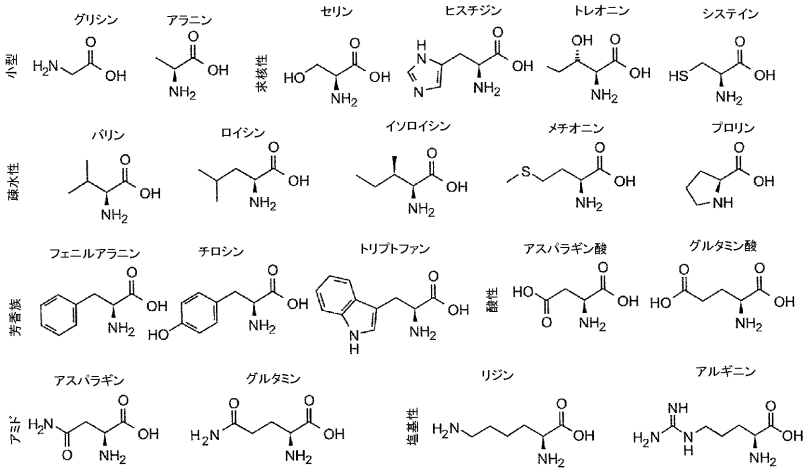

FIG. 24

【図２５】

化学的に探索された多様性位置のコーディング

小型	A	G		
求核性	S	T	C	H
疎水性	L	P	V	I
芳香族	Y	F	W	
酸性	D	E		
アミド	Q	N		
塩基性	K	R		

A	A	T	B M Y
C	A	T	
T	A	T	
A	C	T	
C	C	T	
T	C	T	
C	A	G	C D G
C	G	G	
C	T	G	
9個のコドン			2個の縮重コドン

	第2位置	T				C				A				G			
	第3位置	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
第1位置	T	F	F	L	L	S	S	S	S	Y	Y	*	*	C	C	*	W
	C	L	L	L	L	P	P	P	P	H	H	Q	Q	R	R	R	R
	A	I	I	I	M	T	T	T	T	N	N	K	K	S	S	R	R
	G	V	V	V	V	A	A	A	A	D	D	E	E	G	G	G	G

FIG. 25

【図２６】

化学的に探索された多様性を含有するCDR3

VH3(長さ11)化学プローブ	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	101		
A	93%		8%	4%	16%	9%	8%	8%	10%				
C													
D			26%	4%	1%	3%	6%	0%	3%		86%		
E													
F										48%			
G													
H			3%	1%	0%	0%	0%	11%	0%				
I										1%			
K													
L			4%	6%	3%	5%	5%	1%	1%	15%			
M										18%			
N													
P			0%	6%	13%	0%	4%	3%	8%				
Q			0%	1%	1%	3%	1%	1%	0%				
R		59%	14%	16%	11%	13%	8%	5%	5%				
S			1%	16%	10%	11%	20%	10%	10%				
T													
V													
W													
Y			1%	5%	8%	16%	9%	19%	24%				
表示%	93%	59%	56%	60%	63%	59%	60%	58%	60%	81%	86%		
	CDR3												
縮重オリゴ	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	128	オリゴ
位置による多様性	1	1	9	9	9	9	9	9	9	4	1	2E+07	多様性
			化学的に探索された位置										

化学的に探索された多様性
- 相互作用的化学的性質を提供
- 大部分の天然の多様性を包含

FIG. 26

【図２７】

化学プローブの組を用いたCDR3重鎖の多様性のコーディング

93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	101
A	R	A	A	A	A	A	A	A	F	D
		P	P	P	P	P	P	P	L	
		S	S	S	S	S	S	S	I	
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	M	
		H	H	H	H	H	H	H		
		D	D	D	D	D	D	D		
		L	L	L	L	L	L	L		
		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
		R	R	R	R	R	R	R		
G		G	G	G	G	G	G	G	A	G
C		C	C	C	C	C	C	C	T	A
T		T	T	T	T	T	T	T	A	T
G		G	G	G	G	G	G	G	T	G
C		C	C	C	C	C	C	C	A	T
T		T	T	T	T	T	T	T	T	T
G		G	G	G	G	G	G	G	T	G
C		C	C	C	C	C	C	C	T	A
T		T	T	T	T	T	T	T	T	T
C		C	C	C	C	C	C	C	T	C
T		T	T	T	T	T	T	T	T	T
G		G	G	G	G	G	G	G	T	G
C		C	C	C	C	C	C	C	T	A

フロントページの続き

(72)発明者　ホロウィッツ，　ローレンス
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２７，　アサートン，　セルビー　レーン　３６２
(72)発明者　バート，　ラメッシュ　アール.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２２，　ベルモント，　ウォルサム　クロス　２７２９
(72)発明者　カーツマン，　アロン　エル.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０７０，　サン　カルロス，　ルピン　ウェイ　１０７１

審査官　岡北　有平

(56)参考文献　国際公開第２００６／０１４４９８（WO，Ａ２）
国際公開第２００５／０９８０３９（WO，Ａ２）
特表２００５－５２６５１８（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５２２１０３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００６／０８４０５０（WO，Ａ２）
特表２００４－５０７４６７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
ＩＰＣ
Ｇ０６Ｆ　１９／１０　－　１９／２８
Ｃ４０Ｂ　２０／００
Ｇ０１Ｎ　３３／６８
Ｃ０７Ｋ　１６／００

ＤＢ名
ＰｕｂＭｅｄ