

【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28年11月17日 (2016.11.17)

【公表番号】特表2015-533089(P2015-533089A)

【公表日】平成27年11月19日 (2015.11.19)

【年通号数】公開・登録公報2015-072

【出願番号】特願2015-535788(P2015-535788)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 M 1/00 A

G 0 1 N 33/543 5 0 1 A

G 0 1 N 33/543 5 9 5

G 0 1 N 33/543 5 7 5

G 0 1 N 33/543 5 4 1 B

C 0 7 K 16/00

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月27日 (2016.9.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) V H および C H 1 領域を含む第 1 の重鎖ポリペプチド (H 1) と、

第 1 の V L および第 1 の C L 領域を含む第 1 の軽鎖ポリペプチド (L 1) と、

第 2 の V L および第 2 の C L 領域を含む第 2 の軽鎖ポリペプチド (L 2) と

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第 1 または第 2 の軽鎖ポリペプチドと対合した前記重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 競合アッセイデータを生成するために、前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第 1 の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチド (H 1 L 1) の量、および前記第 2 の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチド (H 1 L 2) の量を定量化するステップと

を含み、

前記第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第 1 または第 2 の軽鎖ポリペ

プチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

【請求項 2】

前記重鎖ポリペプチド、ならびに第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドが、約 0.25 : 1 : 1 の所定の比率で発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記重鎖ポリペプチド、ならびに第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドが、約 1 : 2 : 2 の所定の比率で発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記重鎖ポリペプチド、ならびに第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドが、約 1 : 3 : 3 の所定の比率で発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記同時発現が、宿主細胞内においてである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記同時発現が、インビトロ無細胞発現系においてである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

発現後に、発現したポリペプチドを発現培地から分離するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記発現したポリペプチドが、遠心分離によって分離される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記発現したポリペプチドが、精製カラムの使用によって分離される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

VH および CH1 領域を含む前記第 1 の重鎖ポリペプチドが、CH3 領域、または、CH2 領域および CH3 領域を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

一連の構築物が VH 領域および CH1 領域を含む第 2 の重鎖ポリペプチドを更に含み、前記第 2 の重鎖ポリペプチドは前記第 1 の重鎖ポリペプチドと異なる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記重鎖ポリペプチド、ならびに前記第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドのうちの 1 つを、少なくとも 1 つの宿主細胞内で、他の軽鎖ポリペプチドの不在下で発現させるステップと、

前記重鎖ポリペプチドおよび前記第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドの 1 つを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を単離するステップと、

前記重鎖対合ポリペプチド生成物の量を定量化するステップであって、前記量が、前記重鎖ポリペプチドの前記第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドの 1 つとの最大の検出可能な結合のための対照標準としての役割を果たす、ステップとを更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記重鎖ポリペプチドおよび所望の軽鎖ポリペプチドを含む生成物が、陽性対照標準を提供する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記重鎖ポリペプチドおよびあまり所望でない軽鎖ポリペプチドを含む生成物が、陰性対照標準を提供する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

全ての未結合のポリペプチドを、単離された構築物から除去するステップを更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも 1 つの軽鎖ポリペプチドが、検出可能な部分を含む、請求項 1 ~ 10 のい

れか一項に記載の方法。

【請求項 17】

検出可能な部分が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または、更なる検出可能な部分を含むタグである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドが、異なる検出可能な部分を含む異なるタグでそれぞれ標識されている、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

少なくとも 1 つの軽鎖ポリペプチドが、相互作用表面層を含む表面上に捕捉されかつ更に装置によって検出および定量化されることができる、タグを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記重鎖ポリペプチドが、タグで標識されている、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記重鎖ポリペプチドを標識している前記タグが、相互作用表面層を含む表面上に捕捉されかつ更に装置によって検出および定量化されることができる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドが、異なる検出可能な部分を含む異なるタグでそれぞれ標識されており、前記装置が、前記第 1 および第 2 の軽鎖ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つにおける前記検出可能な部分を検出および定量化することができる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記装置が、ハイスループットが可能である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

検出可能な部分が、ELISA、SPR、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別 (FACS)、DELFIA (登録商標)、蛍光偏光／異方性 (FP)、蛍光／フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET、TR-FRET、HTRF)、AlphaScreen (登録商標)、またはこれらの組み合わせにより検出される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 25】

前記検出可能な部分が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定により検出される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 26】

前記同時発現させるステップが、細菌細胞である宿主細胞内においてである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記同時発現させるステップが、酵母細胞である宿主細胞内においてである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記同時発現させるステップが、哺乳類細胞である宿主細胞内においてである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記哺乳類細胞が、COS、CHO、BHK、HEK-293、NS0、3T3 細胞、およびこれらの派生物のうちの少なくとも 1 つである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

少なくとも 1 つの前記重鎖および軽鎖ポリペプチドが、6×His、FLAG、HA、c-myc、s-FLAG、SBP、V5、および ABD から選択されるタグを含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

(c) が、重鎖対合ポリペプチド生成物を捕捉する表面上で検出される H 1、L 1 および L 2 間の対合を定量化することを含み、前記方法が、ELISA、SPR、二分子蛍光補完、蛍光活性化細胞選別 (FACS)、DELFA (登録商標)、蛍光偏光／異方性 (FP)、蛍光／フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET、TR-FRET、HTRF)、AlphaScreen (登録商標)、またはこれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記表面が、複合分子混合物、細胞上清、宿主細胞の細胞質、またはこれらの組み合わせである環境から重鎖対合ポリペプチド生成物を補足する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記競合アッセイデータが汎用コンピュータに送信され、前記データを出力することが、前記結果をデータ記憶媒体上に記憶することを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記競合アッセイデータを分析するステップを任意に含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記競合アッセイデータの分析に基づいて、対合された重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの L C C A ライブラリを構築するステップを更に含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

重鎖ポリペプチドとの対合についての軽鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) VL および CL 領域を含む第 1 の軽鎖ポリペプチド (L 1) と、

第 1 の VH および第 1 の CH 1 領域を含む第 1 の重鎖ポリペプチド (H 1) と、

第 2 の VH および第 2 の CH 1 領域を含む第 2 の重鎖ポリペプチド (H 2) と

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記軽鎖ポリペプチドおよび前記重鎖ポリペプチドが、前記軽鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第 1 または第 2 の重鎖ポリペプチドと対合した前記軽鎖ポリペプチドを含む軽鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 競合アッセイデータを生成するために、前記軽鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第 1 の重鎖ポリペプチドと対合した軽鎖ポリペプチド (L 1 H 1) の量、および前記第 2 の重鎖ポリペプチドと対合した軽鎖ポリペプチド (L 1 H 2) の量を定量化するステップと

を含み、

前記第 1 または第 2 の重鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記軽鎖ポリペプチドの、他方の重鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第 1 または第 2 の重鎖ポリペプチドとの対合についての前記軽鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

【請求項 3 7】

前記第 1 または前記第 2 の重鎖ポリペプチドが、F c 領域を更に含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

H 1 と対合する L 1 の相対対合傾向を、H 1 と対合する L 2 の相対対合傾向と比較して決定するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

H 1 L 2 種よりも高い H 1 L 1 種の相対量を生成する H 1 L 1 の対合を選択するステップを更に含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

以下の計算式に従って $H1L1$ および $H1L2$ の比率を比較するステップを含み、

$$R = \frac{[H1L1]}{[H1L2]}$$

$$S = \log \frac{[H1L1]}{[H1L2]}$$

$$P1 = 100 \cdot \frac{[H1L1]}{[H1L1] + [H1L2]}$$

$$P2 = 100 \cdot \frac{[H1L2]}{[H1L1] + [H1L2]}$$

式中、 R は、前記 $H1L1$ および $H1L2$ の量の比率であり、 S は R の対数であって、 $L1$ の $H1$ との対合と $L2$ の $H1$ との対合の間の自由エネルギー差に比例し、 $P1$ および $P2$ は、

$$S = \log \frac{P1}{P2}$$

であるような、それぞれ所望のおよび あまり所望ではない種 の百分率である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの選択的対合を可視化する方法であって、

1 つ以上の処理装置と、前記方法を実行するために前記 1 つ以上の処理装置によって実行される 1 つ以上のプログラムを記憶する記憶装置とを含む、コンピュータシステム上での、

(a) 複数の結合アッセイを含む競合アッセイデータを取得するステップであって、前記複数の結合アッセイのうちの各それぞれの結合アッセイが、溶液中で、複数の重鎖ポリペプチド構築物から選択される 1 つ以上の対応する重鎖ポリペプチドの第 1 の量を、複数の軽鎖ポリペプチド構築物から選択される 1 つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの第 2 の量に、溶液中の前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドまたは前記対応する 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドのいずれかを限定する条件下で、曝露することを含み、

前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが複数の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記対応する 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが単一軽鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが複数の重鎖ポリペプチド構築物からなる、ステップと、

(b) 複数の節点を含むグラフを構築するステップであって、

前記複数の節点が、節点の第 1 のサブセット、および節点の第 2 のサブセットを含み、

節点の前記第 1 のサブセットにおける各それぞれの節点が、第 1 の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの 1 つ以上の結合アッセイにおける 1 つ以上の対応する重鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第 2 のサブセットにおける各それぞれの節点が、第 2 の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの 1 つ以上の結合アッセイにおける 1 つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第 1 のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記重鎖ポリペプチドの全てを集合的に表し、

節点の前記第 2 のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記軽鎖ポリペプチドの全てを集合的に表す、ステップと、

(c) 前記グラフに、複数のエッジを設定するステップであって、

前記複数のエッジにおける各それぞれのエッジが、前記複数の結合アッセイにおける

対応する結合アッセイを表し、かつ前記対応する結合アッセイにおける前記 1 つ以上の重鎖ポリペプチドを表す節点の前記第 1 のサブセット中の第 1 の節点を、前記対応する結合アッセイにおける前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドを表す節点の前記第 2 のサブセット中の第 2 の節点と接続し、

前記複数のエッジにおける各エッジの第 1 の図示様式は、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが、前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの 1 つに対して選好を有するかどうかを示す、ステップとを含む、方法。

【請求項 4 2】

前記複数のエッジにおける各エッジの第 2 の図示様式が、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの 1 つに対して選好を有する量によって、決定される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 1 の図示様式が点線であり、前記第 2 の図示様式が線幅である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記複数のエッジにおける 1 つのエッジの前記線幅が、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの 1 つに対する選好を有する量によって、決定され、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの 1 つに対する選好を有する量が多ければ多いほど、前記エッジの前記線幅が大きくなる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記第 1 の図示形式が、第 1 の二次元閉形式の形状であり、前記第 2 の図示形式が、前記第 1 の二次元閉形式の形状以外の第 2 の二次元閉形式の形状である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記第 1 の図示形式が、第 1 の二次元幾何学的形状であり、前記第 2 の図示形式が、前記第 1 の二次元幾何学的形状以外の第 2 の二次元幾何学的形状である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記第 1 の二次元幾何学的形状または前記第 2 の二次元幾何学的形状が、 n が 3 以上の整数である n 角形、円、または楕円からなる群から選択される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが、V H 領域および C H 1 領域を含む単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが、第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物および第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物が、第 1 の V L 領域および第 1 の C L 領域からなり、前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物が、第 2 の V L 領域および第 2 の C L 領域を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記複数のエッジにおける各エッジの線幅 (W) が、前記対応する結合アッセイにおける前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物または前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対する選好を有する量によって、決定され、前記量が、下記式によって決定され、

$$W = \left| f\left(\frac{P1}{P2}\right) \right|$$

式中、

f は、線形または非線形関数であり、

P 1 は、(i) 前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量であり、

P 2 は、(i) 前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

f が対数関数である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第 1 の図示様式が実線であり、

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第 1 の図示様式が破線である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが、第 1 の V H および第 1 の C H 1 領域を含む第 1 の重鎖ポリペプチド構築物、ならびに第 2 の V H および第 2 の C H 1 領域を含む第 2 の重鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが、V L および C L 領域を含む軽鎖ポリペプチド構築物からなる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記複数のエッジにおける各エッジの線幅 (W) が、前記対応する結合アッセイにおける前記単一軽鎖ポリペプチド構築物が前記第 1 の重鎖ポリペプチド構築物または前記第 2 の重鎖ポリペプチド構築物に対する選好を有する量によって、決定され、前記量が、下記式によって決定され、

$$W = \left| f\left(\frac{P1}{P2}\right) \right|$$

式中、

f は、線形または非線形関数であり、

P 1 は、(i) 前記第 1 の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第 2 の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第 1 の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量であり、

P 2 は、(i) 前記第 1 の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第 2 の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第 2 の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

f が対数関数である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記単一軽鎖ポリペプチド構築物が前記第 1 の重鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合

する場合、前記第 1 の図示様式が実線であり、

前記単一軽鎖ポリペプチド構築物が前記第 2 の重鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第 1 の図示様式が破線である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが、V H 領域、C H 1 領域、C H 2 領域、および C H 3 領域を含む単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが、第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物および第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物が、第 1 の V L および第 1 の C L 領域を含み、前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物が、第 2 の V L および第 2 の C L 領域を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記複数の結合アッセイにおける各結合アッセイが、溶液中に、C H 2 領域および C H 3 領域からなる追加の分子実体を更に含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記複数のエッジにおける各エッジの線幅 (W) が、前記対応する結合アッセイにおける前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物または前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対する選好を有する量によって、決定され、前記量が、下記式によって決定され、

$$W = \left| f\left(\frac{P1}{P2}\right) \right|$$

式中、

f は、線形または非線形関数であり、

P 1 は、(i) 前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量であり、

P 2 は、(i) 前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との合計量によって正規化された、前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

f が対数関数である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第 1 の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第 1 の図示様式が実線であり、

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第 2 の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第 1 の図示様式が破線である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記複数の結合アッセイのうちの 1 つの結合アッセイにおける前記曝露することが、前記 1 つ以上の対応する重鎖ポリペプチドおよび前記 1 つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの同時発現によって実行される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記第 1 の図示様式が線色であり、前記第 2 の図示様式が線幅である、請求項 4 2 または 4 3 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記第 1 の図示様式が線色および点線の組み合わせであり、前記第 2 の図示様式が線幅である、請求項 4 2 または 4 3 に記載の方法。

【請求項 6 4】

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの選択的対合を可視化するためのシステムであって、

1つ以上の処理装置と、

前記1つ以上の処理装置によって実行される1つ以上のプログラムを記憶する記憶装置と

を含み、前記1つ以上のプログラムが、

(a) 複数の結合アッセイを含む競合アッセイデータを取得する命令であって、前記複数の結合アッセイのうちの各それぞれの結合アッセイが、溶液中で、複数の重鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドの第1の量を、複数の軽鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの第2の量に、溶液中の前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドまたは前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドのいずれかを限定する条件下で、曝露することを含み、

前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが複数の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが単一軽鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが複数の重鎖ポリペプチド構築物からなる、命令と、

(b) 複数の節点を含むグラフを構築する命令であって、

前記複数の節点が、節点の第1のサブセット、および節点の第2のサブセットを含み、

節点の前記第1のサブセットにおける各それぞれの節点が、第1の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第2のサブセットにおける各それぞれの節点が、第2の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第1のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記重鎖ポリペプチドの全てを集散的に表し、

節点の前記第2のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記軽鎖ポリペプチドの全てを集散的に表す、命令と、

(c) 前記グラフに、複数のエッジを設定する命令であって、

前記複数のエッジにおける各それぞれのエッジが、前記複数の結合アッセイにおける対応する結合アッセイを表し、かつ前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の重鎖ポリペプチドを表す節点の前記第1のサブセット中の第1の節点を、前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドを表す節点の前記第2のサブセット中の第2の節点と接続し、

前記複数のエッジにおける各エッジの第1の図示様式は、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが、前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対して選好を有するかどうかを示す、命令とを含む、システム。

【請求項 6 5】

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの選択的対合を可視化するためのコンピュータシステムによる実行のための1つ以上のコンピュータプログラムを記憶する、非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、前記1つ以上のコンピュータプログラムが、

(a) 複数の結合アッセイを含む競合アッセイデータを取得する命令であって、前記複数の結合アッセイのうちの各それぞれの結合アッセイが、溶液中で、複数の重鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドの第1の量を、複数の軽鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの第2の量に

、溶液中の前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドまたは前記対応する 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドのいずれかを限定する条件下で、曝露することを含み、

前記対応する 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが複数の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記対応する 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドが単一軽鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記 1 つ以上の重鎖ポリペプチドが複数の重鎖ポリペプチド構築物からなる、命令と、

(b) 複数の節点を含むグラフを構築する命令であって、

前記複数の節点が、節点の第 1 のサブセット、および節点の第 2 のサブセットを含み、

節点の前記第 1 のサブセットにおける各それぞれの節点が、第 1 の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの 1 つ以上の結合アッセイにおける 1 つ以上の対応する重鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第 2 のサブセットにおける各それぞれの節点が、第 2 の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの 1 つ以上の結合アッセイにおける 1 つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第 1 のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記重鎖ポリペプチドの全てを集合的に表し、

節点の前記第 2 のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記軽鎖ポリペプチドの全てを集合的に表す、命令と、

(c) 前記グラフに、複数のエッジを設定する命令であって、

前記複数のエッジにおける各それぞれのエッジが、前記複数の結合アッセイにおける対応する結合アッセイを表し、かつ前記対応する結合アッセイにおける前記 1 つ以上の重鎖ポリペプチドを表す節点の前記第 1 のサブセット中の第 1 の節点を、前記対応する結合アッセイにおける前記 1 つ以上の軽鎖ポリペプチドを表す節点の前記第 2 のサブセット中の第 2 の節点と接続し、

前記複数のエッジにおける各エッジの第 1 の図示様式は、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが、前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの 1 つに対して選好を有するかどうかを示す、命令と

を含む、コンピュータプログラム。

【請求項 66】

前記第 1 または第 2 の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性が、請求項 41～61 および 64～66 のいずれか一項に記載の方法によって可視化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 67】

一連の構築物が、CH2 領域および CH3 領域を含む第 2 の重鎖ポリペプチドを更に含み、前記第 2 の重鎖ポリペプチドは前記第 1 の重鎖ポリペプチドと異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 68】

前記第 1 の重鎖ポリペプチドの CH3 領域および前記第 2 の重鎖ポリペプチドの CH3 領域が、当該第 1 および第 2 の重鎖がヘテロ二量体化することを可能にするように少なくとも 1 つの改変を含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

(d) VH および CH1 領域を含む第 2 の重鎖ポリペプチド (H2) と、

第 1 の VL および第 1 の CL 領域を含む第 1 の軽鎖ポリペプチド (L1) と、

第 2 の VL および第 2 の CL 領域を含む第 2 の軽鎖ポリペプチド (L2) と

を含む、第 2 の一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記第 2 の重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記第 2 の重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記第 2 の一連の構築物を同時発現させるステップが第 2 の

一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(e) 前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと対合した第2の重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、第2の一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(f) 競合アッセイデータを生成するために、前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した第2の重鎖ポリペプチド(H2L1)の量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した第2の重鎖ポリペプチド(H2L2)の量を定量化するステップとを含む、

ステップ(c)および(f)より得られる競合アッセイデータが、L2の存在下においてL1と選択的に対合するH1ポリペプチドを示し、かつ、L1の存在下においてL2と選択的に対合するH2ポリペプチドを示す、請求項1に記載の方法。

【請求項70】

第1の重鎖ポリペプチドおよび第2の重鎖ポリペプチドの少なくとも1つが検出可能な標識を含む、請求項36記載の方法。

【請求項71】

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) VHおよびCH1領域を含む第1の重鎖ポリペプチド(H1)と、

VHおよびCH1領域を含む第2の重鎖ポリペプチド(H2)と、

第1のVLおよび第1のCL領域を含む第1の軽鎖ポリペプチド(L1)と、

第2のVLおよび第2のCL領域を含む第2の軽鎖ポリペプチド(L2)と

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと対合した前記重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 競合アッセイデータを生成するために、前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチド(H1L1)の量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチド(H1L2)の量を定量化するステップと

を含む、

前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチド(H1)の、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチド(H1)の選択性を示す、方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

発明の一態様において、以下のステップを含む、同時発現アッセイにおいて少なくとも1つの変更された重鎖が特定の変更された軽鎖に選択的に対合する能力を決定する方法が提供される：a. 少なくとも1つの変更された重鎖および2つの異なる変更された軽鎖を、細胞内で、変更された重鎖が限定的な対合反応体となるような比率で同時発現させるステップであって、同時発現したタンパク質が、細胞から分泌される、ステップと、b. 同時発現した分泌されたタンパク質を、細胞から任意で分離するステップと、c. 変更された重鎖に結合する軽鎖ポリペプチドを、残りの分泌されたタンパク質から分離して、単離された重鎖対合画分を生成するステップと、d. 単離された重鎖画分中の、各異なる変更

された軽鎖の量を検出するステップと、e. 単離された重鎖画分中の、各異なる変更された軽鎖の相対量を分析して、少なくとも1つの重鎖が、軽鎖のうちの1つと選択的に対合する能力を決定するステップ。

[本発明1001]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) V HおよびC H1領域を含む第1の重鎖ポリペプチドと、

第1のV Lおよび第1のC L領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第2のV Lおよび第2のC L領域を含む第2の軽鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと対合した前記重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量のステップと

を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1002]

前記重鎖ポリペプチド、ならびに第1および第2の軽鎖ポリペプチドが、約0.25:1:1の所定の比率で発現する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記重鎖ポリペプチド、ならびに第1および第2の軽鎖ポリペプチドが、約1:2:2の所定の比率で発現する、本発明1001の方法。

[本発明1004]

前記重鎖ポリペプチド、ならびに第1および第2の軽鎖ポリペプチドが、約1:3:3の所定の比率で発現する、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記同時発現が、宿主細胞内においてである、本発明1001~1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

前記同時発現が、インビトロ無細胞発現系においてである、本発明1001~1004のいずれかの方法。

[本発明1007]

発現後に、発現したポリペプチドを発現培地から分離するステップを更に含む、本発明1001~1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記ポリペプチドが、遠心分離によって分離される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記ポリペプチドが、精製カラムの使用によって分離される、本発明1007の方法。

[本発明1010]

V HおよびC H1領域を含む前記第1の重鎖ポリペプチドが、C H3領域を更に含む、本発明1001~1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

第2の重鎖ポリペプチドの同時発現を更に含む、本発明1001~1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

少なくとも1つの重鎖ポリペプチドが、C H2領域またはその断片を含む、本発明1010~

1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記重鎖ポリペプチド、ならびに前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドのうちの1つを、少なくとも1つの宿主細胞内で、他の軽鎖ポリペプチドの不在下で発現させるステップと、

前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を単離するステップと、

前記生成物の量を定量化するステップであって、前記量が、前記重鎖ポリペプチドの前記軽鎖ポリペプチドとの最大の検出可能な結合のための対照標準としての役割を果たす、ステップと

を更に含む、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記重鎖ポリペプチドおよび所望の軽鎖ポリペプチドを含む生成物が、陽性対照標準を提供する、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記重鎖ポリペプチドおよびあまり所望でない軽鎖ポリペプチドを含む生成物が、陰性対照標準を提供する、本発明1013の方法。

[本発明1016]

全ての未結合のポリペプチドを、単離された構築物から除去するステップを更に含む、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

少なくとも1つの軽鎖ポリペプチドが、検出可能な部分を含む、本発明1001～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

検出可能な部分が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または、更なる検出可能な部分を含むタグである、本発明1016の方法。

[本発明1019]

各軽鎖ポリペプチドが、異なる検出可能な部分を含む異なるタグで標識されている、本発明1018の方法。

[本発明1020]

少なくとも1つの軽鎖ポリペプチドが、相互作用表面層を含む表面上に捕捉されかつ更に装置によって検出および定量化されることができる、タグを含む、本発明1017～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

前記重鎖ポリペプチドが、タグで標識されている、本発明1001～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

前記重鎖ポリペプチドを標識している前記タグが、相互作用表面層を含む表面上に捕捉されかつ更に装置によって検出および定量化されることができる、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記装置が、前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドのうちの少なくとも1つにおける前記検出可能な部分を検出および定量化することができる、本発明1020および1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

前記装置が、ハイスループットが可能である、本発明1020、1022～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

検出可能な部分の前記検出が、ELISA、SPRチップ、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別（FACS）、DELTA（登録商標）、蛍光偏光／異方性（FP）、蛍光／フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET、TR-FRET、HTRF）、

AlphaScreen（登録商標）、またはこれらの組み合わせによる測定を含む、本発明1017～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

前記検出可能な部分の前記検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、本発明1017～1024のいずれかの方法。

[本発明1027]

競合する重鎖もしくは軽鎖ポリペプチド、またはそれらの組み合わせの存在下でのFab含有構築物の選択的形成を決定する方法であって、

VHおよびCH1領域を含む第1の重鎖ポリペプチド、ならびに

第1のVLおよび第1のCL領域を含む第1の軽鎖ポリペプチド、

1つ以上の他の重鎖ポリペプチド、軽鎖ポリペプチド、またはこれらの組み合わせを同時発現させるステップであって、前記第1の軽鎖ポリペプチドが、選択的に前記重鎖ポリペプチドと結合して、所望のFab構築物を形成する、ステップと、

前記第1の重鎖ポリペプチドまたは前記第1の軽鎖ポリペプチドを含む各Fab構築物を単離するステップと、

所望のFab構築物の量を、他のFab構築物と比較して検出するステップであって、前記所望のFab構築物のより多い量が、前記Fab構築物の形成のより高い選択性を示す、ステップとを含む、方法。

[本発明1028]

前記第1の重鎖ポリペプチド、および前記軽鎖ポリペプチドが、異なる検出可能な部分を含むタグで標識されている、本発明1027の方法。

[本発明1029]

合理的に設計されたFab構築物の、他の重鎖または軽鎖ポリペプチドの存在下で自己結合する能力を決定する方法であって、本発明1027～1028のいずれかの方法を含み、前記第1の重鎖ポリペプチドおよび前記第1の軽鎖ポリペプチドが結合して、前記設計されたFab構築物を形成する、方法。

[本発明1030]

前記同時発現が、細菌細胞である宿主細胞内においてである、本発明1001～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

前記同時発現が、酵母細胞である宿主細胞内においてである、本発明1001～1029のいずれかの方法。

[本発明1032]

前記同時発現が、哺乳類細胞である宿主細胞内においてである、本発明1001～1029のいずれかの方法。

[本発明1033]

前記哺乳類細胞が、COS、CHO、BHK、HEK-293、NSO、3T3細胞、およびこれらの派生物のうちの少なくとも1つである、本発明1032の方法。

[本発明1034]

6×His、FLAG、HA、c-myc、s-FLAG、SBP、V5、およびABDから選択される、前記重鎖および軽鎖ポリペプチドのうちの少なくとも1つのための少なくとも1つのタグを含む、本発明1001～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

二パラトープ抗体構築物を形成するためのFab構築物の選択における、本発明1001～1029のいずれかの方法の使用。

[本発明1036]

前記二パラトープ抗体構築物が、二重特異性抗体構築物である、本発明1030の使用。

[本発明1037]

前記二パラトープ抗体構築物が、同一の抗原上の2つの異なる部位を結合する、本発明1

030の使用。

[本発明1038]

(a) 第1の免疫グロブリン重鎖領域を含む第1の重鎖ポリペプチドと、
前記第1の重鎖ポリペプチドと結合して第1のF a b構築物を形成することができる、第1の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、
第2の免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第2の重鎖ポリペプチドと結合して第2のF a b構築物を形成することができる、第2の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第2の軽鎖ポリペプチドと
を同時発現させるステップであって、前記第1および第2の重鎖ポリペプチドが、前記重鎖ポリペプチドが互いと優先的にヘテロ二量体化するように、変異C H3領域を含む、ステップと、
(b) 前記第1の重鎖ポリペプチドおよびいずれか1つの前記軽鎖ポリペプチドを含んで形成されたF a b構築物の量を検出するステップと、
(c) 前記第2の重鎖ポリペプチド、第1の軽鎖ポリペプチド、および第2の軽鎖ポリペプチドを宿主細胞において発現させるステップと、
(d) 前記第2の重鎖ポリペプチドおよびいずれか1つの前記軽鎖ポリペプチドを含んで形成されたF a b構築物の量を検出するステップと
を含み、
他のF a b構築物と比較した、ステップ(b)における前記第1のF a b構築物のより多い量、およびステップ(d)における前記第2のF a b構築物のより多い量が、前記ポリペプチドが自己集合してヘテロ多量体抗体構築物を形成し得ることを示す、前記ヘテロ多量体抗体構築物を設計するための、本発明1001～1034のいずれかの方法。

[本発明1039]

ヘテロ多量体抗体を設計するための、ポリペプチドのハイスループットスクリーニング方法であって、
(a) 第1の免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第1の重鎖ポリペプチドと、
前記第1の重鎖ポリペプチドと結合して第1のF a b構築物を形成することができる、第1の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、
第2の免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第2の重鎖ポリペプチドであって、前記第1および第2の重鎖ポリペプチドは変異C H3可変領域を含むヘテロ多量体を形成することができる、第2の重鎖ポリペプチドと、
前記第2の重鎖ポリペプチドと結合して第2のF a b構築物を形成することができる、第2の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第2の軽鎖ポリペプチドと
を取得するステップと、
(b) 溶液中で、前記第1の重鎖ポリペプチドを、前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドと接触させるステップと、
(c) ステップ(b)の前記溶液中で、前記第1の重鎖ポリペプチドおよびいずれか1つの前記軽鎖ポリペプチドを含んで形成されたF a b構築物の量を検出するステップと、
(d) 別の溶液中で、前記第2の重鎖ポリペプチドを、前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドと接触させるステップと、
(e) ステップ(d)の前記溶液中で、前記第2の重鎖ポリペプチドおよびいずれか1つの前記軽鎖ポリペプチドを含んで形成されたF a b構築物の量を検出するステップと
を含み、
他のF a b構築物と比較した、ステップ(c)における前記第1のF a b構築物のより多い量、およびステップ(e)における前記第2のF a b構築物のより多い量が、前記ポリペプチドが自己集合してヘテロ多量体抗体構築物を形成し得ることを示す、方法。

[本発明1040]

各軽鎖ポリペプチドおよび各重鎖ポリペプチドが、異なる検出可能な部分を含む異なるタグで標識されている、本発明1038～1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

各重鎖タグが、相互作用表面層を含む装置によって捕捉されることができる、本発明1040の方法。

[本発明1042]

前記装置が、各軽鎖ポリペプチド上の前記タグを定量的に認識することができる、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記装置が、ハイスループットが可能である、本発明1041～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記検出可能な部分が、ELISA、SPRチップ、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別(FACS)、DELFA(登録商標)、蛍光偏光/異方性(FP)、蛍光/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET、TR-FRET、HTRF)、Alphascreen(登録商標)、またはこれらの組み合わせによる測定によって、定量化可能に検出される、本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記検出可能な部分が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光による測定によって、定量化可能に検出される、本発明1040の方法。

[本発明1046]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を決定するハイスループット法であって、

免疫グロブリン重鎖可変領域を含む重鎖ポリペプチドと、

第1の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第2の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む少なくとも1つの第2の軽鎖ポリペプチドとを取得するステップと、

溶液中で、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドを、前記重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように、所定の比率で接触させるステップと、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと対合した前記重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を単離するステップと、

前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量を定量化するステップとを含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1047]

重鎖ポリペプチドの軽鎖ポリペプチドとの選択的対合についてのハイスループットスクリーニングのシステムであって、

免疫グロブリン重鎖可変領域、および相互作用表面層を含む装置によって捕捉されることができるタグを含む、重鎖ポリペプチドと、

第1の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第2の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む少なくとも1つの第2の軽鎖ポリペプチドとを発現させるための、1つ以上の宿主細胞、またはインビトロ機構であって、

前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、重鎖の量が前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドの合計より多くなるように、所定の比率で発現し、前記第1および第2の軽鎖ポリペプチドが、検出可能な部分でタグ付けされる、宿主細胞、またはインビトロ機構と、

前記重鎖ポリペプチドを捕捉することができる相互作用表面層を含む検出装置であって、前記検出装置が各前記軽鎖ポリペプチド上の前記検出可能な部分を検出することが更に可能であり、

前記重鎖ポリペプチドおよび第1または第2の軽鎖ポリペプチドを含む構築物が、前記1つ以上の宿主細胞によって発現し、かつ前記検出装置と接触し、

前記検出装置が、前記重鎖ポリペプチドおよび第1の軽鎖ポリペプチドを含む第1の構築物の量と、前記重鎖ポリペプチドおよび第2の軽鎖ポリペプチドを含む第2の構築物の量とを、前記第2の構築物と比較してより多い前記第1の構築物の量が前記第2の軽鎖ポリペプチドと比較してより高い前記第1の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示すように検出するために有用である、検出装置とを含む、システム。

[本発明1048]

前記検出装置と接触させる前に、前記構築物を前記1つ以上の宿主細胞から単離するための機構を更に含む、本発明1047のシステム。

[本発明1049]

前記重鎖ポリペプチドならびに第1および第2の軽鎖ポリペプチドの前記所定の比率が、約0.25:1:1である、本発明1047~1048のいずれかのシステム。

[本発明1050]

前記重鎖ポリペプチドならびに第1および第2の軽鎖ポリペプチドの前記所定の比率が、約1:2:2である、本発明1047~1048のいずれかのシステム。

[本発明1051]

前記重鎖ポリペプチドならびに第1および第2の軽鎖ポリペプチドの前記所定の比率が、約1:3:3である、本発明1047~1048のいずれかのシステム。

[本発明1052]

本発明1047~1052のいずれかのシステム、および使用説明書を含む、重鎖ポリペプチドの軽鎖ポリペプチドとの選択的対合のハイスループットスクリーニングのためのキット。

[本発明1053]

試薬および緩衝剤を更に含む、本発明1052のキット。

[本発明1054]

前記重鎖および軽鎖ポリペプチドを精製するための機構を更に含む、本発明1052のキット。

[本発明1055]

(c)が、HC:LC1:LC2を捕捉する表面上で検出されるHC:LC1:LC2間の対合を定量化することを含み、前記方法が、ELISA、SPRチップ、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別(FACS)、DELTA(登録商標)、蛍光偏光/異方性(FP)、蛍光/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET、TR-FRET、HTRF)、AlphaScreen(登録商標)、またはこれらの組み合わせ、ならびに前記ユニットのうちの1つ以上と前記環境との間の相互作用について前記表面をスクリーニングすることを含む、本発明1001の方法。

[本発明1056]

前記対合が、検出可能な部分を定量化することによって検出される、本発明1055の方法。

[本発明1057]

前記検出可能な部分が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または更なる検出可能な部分を含むタグである、本発明1056の方法。

[本発明1058]

前記検出可能な部分の検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、本発明1056または1057の方法。

[本発明1059]

前記HC:LC1:LC2を含む環境が、複合分子混合物、細胞上清、宿主細胞の細胞質、またはこれらの組み合わせである、本発明1055の方法。

[本発明1060]

特定の軽鎖タグを有する抗体の質量が、単離された重鎖画分の量によって正規化される、本発明1001の方法。

[本発明1061]

等価質量比が対照抗体に対して評価される、本発明1060の方法。

[本発明1062]

2つの質量比の比率が、特定のタグを有する単離された抗体の百分率に等しい、本発明1061の方法。

[本発明1063]

前記方法によって取得されたデータが汎用コンピュータに送信され、前記データを出力することが、前記結果をデータ記憶媒体上に記憶することを含む、本発明1055～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

H C - L C 結果を分析するステップを任意に含む、本発明1063の方法。

[本発明1065]

対合された重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの L C C A ライブラリを構築するステップを更に含む、本発明1064の方法。

[本発明1066]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) V L および C L 領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第1の V H および第1の C H 1 領域を含む第1の重鎖ポリペプチドと、

第2の V H および第2の C H 1 領域を含む第2の重鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記軽鎖ポリペプチドおよび前記重鎖ポリペプチドが、前記軽鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第1または第2の重鎖ポリペプチドと対合した前記軽鎖ポリペプチドを含む軽鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 前記軽鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の重鎖ポリペプチドと対合した軽鎖ポリペプチドの量、および前記第2の重鎖ポリペプチドと対合した軽鎖ポリペプチドの量のステップと

を含み、

前記第1または第2の重鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記軽鎖ポリペプチドの、他方の重鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の重鎖ポリペプチドとの対合についての前記軽鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1067]

前記第1または前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域を更に含む、本発明1001の方法。

[本発明1068]

前記第1および前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域を更に含む、本発明1001の方法。

[本発明1069]

前記第1または前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c および領域および F v 領域を含む、本発明1001の方法。

[本発明1070]

前記第1および前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域および F v 領域を含む、本発明1001の方法。

[本発明1071]

前記第1または前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域を更に含む、本発明1066の方法。

[本発明1072]

前記第1および前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域を更に含む、本発明1066の方法。

[本発明1073]

前記第1または前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域およびF v 領域を含む、本発明1066の方法。

[本発明1074]

前記第1および前記第2の重鎖ポリペプチドが、F c 領域およびF v 領域を含む、本発明1066の方法。

[本発明1075]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

- (a) V H、C H1、C H2、およびC H3領域を含む第1の重鎖ポリペプチドと、
第1のV Lおよび第1のC L領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、
第2のV Lおよび第2のC L領域を含む第2の軽鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと対合した前記重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量のステップと
を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1076]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

- (a) V H、C H1、C H2、およびC H3領域を含む完全長の重鎖ポリペプチドと、
C H2領域およびC H3領域を含む重鎖ポリペプチドと、
第1のV Lおよび第1のC L領域を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、
第2のV Lおよび第2のC L領域を含む第2の軽鎖ポリペプチドと

を含む一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記完全長の重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドを有する、C H2領域およびC H3領域を含む前記重鎖ポリペプチドと対合した前記完全長の重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c) 前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量を決定するステップと
を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1077]

Hと対合するL1の相対対合傾向を、Hと対合するL2の相対対合傾向と比較して決定するステップを含む、本発明1001の方法。

[本発明1078]

H L 2種よりも高いH L 1種の相対量を生成する対合したポリペプチドを選択するステップを更に含む、本発明1077の方法。

[本発明1079]

以下の計算式に従って比率を比較するステップを含み、

$$R = \frac{[HL1]}{[HL2]}$$

$$S = \log \frac{[HL1]}{[HL2]}$$

$$P1 = 100 \cdot \frac{[HL1]}{[HL1] + [HL2]}$$

$$P2 = 100 \cdot \frac{[HL2]}{[HL1] + [HL2]}$$

式中、Rは、前記2つのF a b種の量の比率であり、SはRの対数であって、L 1のHとの対合とL 2のHとの対合の間の自由エネルギー差に比例し、P1およびP2は、

$$S = \log \frac{P1}{P2}$$

であるような、それぞれ所望のおよび不所望の種の百分率である、本発明1078の方法。

[本発明1080]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) V H領域、C H 1領域、および第1の検出可能な標識（タグ）を含む重鎖ポリペプチドと、

第1のV L、第1のC L領域、および第2の検出可能な標識を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第2のV L、第2のC L領域、および第3の検出可能な標識を含む第2の軽鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記完全長の重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと共に前記重鎖ポリペプチドを含む重鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から、前記重鎖ポリペプチド上の前記第1の検出可能な標識を使用して単離するステップと、

(c) 前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量を決定するステップと

を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1081]

前記第1の検出可能な標識が、6×H i sタグである、本発明1080の方法。

[本発明1082]

前記第2の検出可能な標識が、前記第3の検出可能な標識とは異なる、本発明1080の方法。

[本発明1083]

(c)の決定するステップが、E L I S A、S P R、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別（F A C S）、D E L F I A（登録商標）、蛍光偏光／異方性（F P）、蛍

光／フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET、TR-FRET、HTRF）、Alphahaseen（登録商標）、またはこれらの組み合わせを含む、本発明1080の方法。

[本発明1084]

前記検出可能な標識が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または更なる検出可能な部分を含むタグである、本発明1080の方法。

[本発明1085]

前記検出可能な標識の検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、本発明1084の方法。

[本発明1086]

重鎖ポリペプチドとの対合についての軽鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

（a）V L領域およびC L領域を含む軽鎖ポリペプチドと、

第1のV H、第1のC H1領域、および少なくとも1つの検出可能な標識を含む第1の重鎖ポリペプチドと、

第2のV H、第2のC H1領域、および少なくとも1つの検出可能な標識を含む第2の重鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記軽鎖ポリペプチドおよび前記重鎖ポリペプチドが、前記軽鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

（b）前記第1または第2の重鎖ポリペプチドと共に前記軽鎖ポリペプチドを含む軽鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

（c）前記軽鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の重鎖ポリペプチドと対合した軽鎖ポリペプチドの量、および前記第2の重鎖ポリペプチドと対合した軽鎖ポリペプチドの量を決定するステップと

を含み、

前記第1または第2の重鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記軽鎖ポリペプチドの、他方の重鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の重鎖ポリペプチドとの対合についての前記軽鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1087]

（c）の決定するステップが、ELISA、SPR、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別（FACS）、DELTA（登録商標）、蛍光偏光／異方性（FP）、蛍光／フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET、TR-FRET、HTRF）、Alphahaseen（登録商標）、またはこれらの組み合わせを含む、本発明1086の方法。

[本発明1088]

前記第1の重鎖ポリペプチドが、2つの標識で標識されている、本発明1086の方法。

[本発明1089]

前記第1の重鎖ポリペプチドが、6×Hisタグおよび第2の標識で標識されている、本発明1086の方法。

[本発明1090]

前記第2の重鎖ポリペプチドが、2つの標識で標識されている、本発明1086の方法。

[本発明1091]

前記第2の重鎖ポリペプチドが、6×Hisタグおよび第2の標識で標識されている、本発明1086の方法。

[本発明1092]

前記検出可能な標識が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または更なる検出可能な部分を含むタグである、本発明1086の方法。

[本発明1093]

前記検出可能な標識の検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、本発明1092の方法。

[本発明1094]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) V H、C H1、C H2、およびC H3領域を含む完全長の重鎖ポリペプチドと、
C H2領域およびC H3領域を含む重鎖ポリペプチドと、

第1のV L、第1のC L領域、および第1の検出可能な標識を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第2のV L、第2のC L領域、および第2の検出可能な標識を含む第2の軽鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記完全長の重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 重鎖対合ポリペプチド生成物を抗F c抗体で単離するステップと、

(c) 前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量を決定するステップと

を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1095]

(c) の決定するステップが、E L I S A、S P R、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活性化細胞選別 (F A C S)、D E L F I A (登録商標)、蛍光偏光／異方性 (F P)、蛍光／フェルスター共鳴エネルギー移動 (F R E T、T R - F R E T、H T R F)、A l p h a S c r e e n (登録商標)、またはこれらの組み合わせを含む、本発明1094の方法。

[本発明1096]

前記第1の検出可能な標識が、前記第2の検出可能な標識とは異なる、本発明1094の方法。

[本発明1097]

前記検出可能な標識が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または更なる検出可能な部分を含むタグである、本発明1094の方法。

[本発明1098]

前記検出可能な標識の検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、本発明1097の方法。

[本発明1099]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスループット法であって、

(a) V H、C H1、C H2、およびC H3領域を含む完全長の重鎖ポリペプチドと、
第1のV L、第1のC L領域、および第1の検出可能な標識を含む第1の軽鎖ポリペプチドと、

第2のV L、第2のC L領域、および第2の検出可能な標識を含む第2の軽鎖ポリペプチドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドおよび前記軽鎖ポリペプチドが、前記完全長の重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもたらす、ステップと、

(b) 重鎖対合ポリペプチド生成物を抗F c抗体で単離するステップと、

(c) 前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペプチドの量を決定するステップと

チドの量を決定するステップと
を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの
、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチ
ドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1100]

(c)の決定するステップが、ELISA、SPR、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活
性化細胞選別(FACS)、DELFIA(登録商標)、蛍光偏光/異方性(FP)、蛍
光/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET、TR-FRET、HTRF)、Alp
haScreen(登録商標)、またはこれらの組み合わせを含む、本発明1099の方法。

[本発明1101]

前記第1の検出可能な標識が、前記第2の検出可能な標識とは異なる、本発明1099の方法
。

[本発明1102]

前記検出可能な標識が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または更なる検出可
能な部分を含むタグである、本発明1099の方法。

[本発明1103]

前記検出可能な標識の検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、
本発明1102の方法。

[本発明1104]

軽鎖ポリペプチドとの対合についての重鎖ポリペプチドの選択性を定量化するハイスル
ープット法であって、

(a) VH領域、CH1領域、および検出可能な標識を含む第1の重鎖ポリペプチドと、
VH領域、CH1領域、および検出可能な標識を含む第2の重鎖ポリペプチドと、
第1のVL、第1のCL領域、および検出可能な標識を含む第1の軽鎖ポリペプチ
ドと、
第2のVL、第2のCL領域、および検出可能な標識を含む第2の軽鎖ポリペプチ
ドと

を含む、一連の構築物を同時発現させるステップであって、前記重鎖ポリペプチドお
よび前記軽鎖ポリペプチドが、前記重鎖ポリペプチドの総量が限定的であるように発現し
、かつ、前記一連の構築物を同時発現させるステップが一連のポリペプチド生成物をもた
らす、ステップと、

(b)前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドと対合した前記重鎖ポリペプチドを含む重
鎖対合ポリペプチド生成物を、前記一連のポリペプチド生成物から単離するステップと、

(c)前記重鎖対合ポリペプチド生成物において、前記第1の軽鎖ポリペプチドと対合
した重鎖ポリペプチドの量、および前記第2の軽鎖ポリペプチドと対合した重鎖ポリペ
チドの量を決定するステップと
を含み、

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドのうちの一方と対合した前記重鎖ポリペプチドの
、他方の軽鎖ポリペプチドと比較してより多い量が、前記第1または第2の軽鎖ポリペプチ
ドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性を示す、方法。

[本発明1105]

前記検出可能な標識のうちのそれぞれが固有である、本発明1104の方法。

[本発明1106]

(c)の決定するステップが、ELISA、SPR、二分子蛍光補完読み取り、蛍光活
性化細胞選別(FACS)、DELFIA(登録商標)、蛍光偏光/異方性(FP)、蛍
光/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET、TR-FRET、HTRF)、Alp
haScreen(登録商標)、またはこれらの組み合わせを含む、本発明1104の方法。

[本発明1107]

前記検出可能な標識が、タンパク質結合部位、リガンド結合部位、または更なる検出可

能な部分を含むタグである、本発明1104の方法。

[本発明1108]

前記検出可能な標識の検出が、蛍光、消光、放射活性、または化学発光の測定を含む、本発明1107の方法。

[本発明1109]

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの選択的対合を可視化する方法であって、
1つ以上の処理装置と、前記方法を実行するために前記1つ以上の処理装置によって実行される1つ以上のプログラムを記憶する記憶装置とを含む、コンピュータシステム上での、

(a) 複数の結合アッセイを含む競合アッセイデータを取得するステップであって、前記複数の結合アッセイのうちの各それぞれの結合アッセイが、溶液中で、複数の重鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドの第1の量を、複数の軽鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの第2の量に、溶液中の前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドまたは前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドのいずれかを限定する条件下で、曝露することを含み、

前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが複数の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが単一軽鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが複数の重鎖ポリペプチド構築物からなる、ステップと、

(b) 複数の節点を含むグラフを構築するステップであって、

前記複数の節点が、節点の第1のサブセット、および節点の第2のサブセットを含み、

節点の前記第1のサブセットにおける各それぞれの節点が、第1の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第2のサブセットにおける各それぞれの節点が、第2の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第1のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記重鎖ポリペプチドの全てを集合的に表し、

節点の前記第2のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記軽鎖ポリペプチドの全てを集合的に表す、ステップと、

(c) 前記グラフに、複数のエッジを設定するステップであって、

前記複数のエッジにおける各それぞれのエッジが、前記複数の結合アッセイにおける対応する結合アッセイを表し、かつ前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の重鎖ポリペプチドを表す節点の前記第1のサブセット中の第1の節点を、前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドを表す節点の前記第2のサブセット中の第2の節点と接続し、

前記複数のエッジにおける各エッジの第1の図示様式は、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが、前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対して選好を有するかどうかを示す、ステップと

を含む、方法。

[本発明1110]

前記複数のエッジにおける各エッジの第2の図示様式が、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対して選好を有する量によって、決定される、本発明1109の方法。

[本発明1111]

前記第1の図示様式が点線であり、前記第2の図示様式が線幅である、本発明1110の方法

[本発明1112]

前記複数のエッジにおける1つのエッジの前記線幅が、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対する選好を有する量によって、決定され、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対する選好を有する量が多ければ多いほど、前記エッジの前記線幅が大きくなる、本発明1111の方法。

[本発明1113]

前記第1の図示形式が、第1の二次元閉形式の形状であり、前記第2の図示形式が、前記第1の二次元閉形式の形状以外の第2の二次元閉形式の形状である、本発明1109の方法。

[本発明1114]

前記第1の図示形式が、第1の二次元地理的形状であり、前記第2の図示形式が、前記第1の二次元地理的形状以外の第2の二次元地理的形状である、本発明1109の方法。

[本発明1115]

前記第1の二次元地理的形状または前記第2の二次元地理的形状が、 n が3以上の整数である n 角形、円、または楕円からなる群から選択される、本発明1114の方法。

[本発明1116]

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが、V H領域およびC H1領域を含む単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが、第1の軽鎖ポリペプチド構築物および第2の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物が、第1のV L領域および第1のC L領域からなり、前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物が、第2のV L領域および第2のC L領域を含む、本発明1109の方法。

[本発明1117]

前記複数のエッジにおける各エッジの線幅(W)が、前記対応する結合アッセイにおける前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物または前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対する選好を有する量によって、決定され、前記量が、下記式によって決定され、

$$W = \left| f\left(\frac{P1}{P2}\right) \right|$$

式中、

f は、線形または非線形関数であり、

$P1$ は、(i) 前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量であり、

$P2$ は、(i) 前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(i i) 前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量である、本発明1116の方法。

[本発明1118]

f が対数関数である、本発明1117の方法。

[本発明1119]

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第1の図示様式が実線であり、

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第1の図示様式が破線である、本発明1117の方法。

[本発明1120]

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが、第1のVHおよび第1のCH1領域を含む第1の重鎖ポリペプチド構築物、ならびに第2のVHおよび第2のCH1領域を含む第2の重鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが、VLおよびCL領域を含む軽鎖ポリペプチド構築物からなる、本発明1109の方法。

[本発明1121]

前記複数のエッジにおける各エッジの線幅(W)が、前記対応する結合アッセイにおける前記単一軽鎖ポリペプチド構築物が前記第1の重鎖ポリペプチド構築物または前記第2の重鎖ポリペプチド構築物に対する選好を有する量によって、決定され、前記量が、下記式によって決定され、

$$W = \left| f\left(\frac{P1}{P2}\right) \right|$$

式中、

fは、線形または非線形関数であり、

P1は、(i) 前記第1の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量と、(ii) 前記第2の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第1の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量であり、

P2は、(i) 前記第1の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量と、(ii) 前記第2の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第2の重鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一軽鎖ポリペプチド構築物の量である、本発明1120の方法。

[本発明1122]

fが対数関数である、本発明1121の方法。

[本発明1123]

前記単一軽鎖ポリペプチド構築物が前記第1の重鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第1の図示様式が実線であり、

前記単一軽鎖ポリペプチド構築物が前記第2の重鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第1の図示様式が破線である、本発明1121の方法。

[本発明1124]

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが、VH領域、CH1領域、CH2領域、およびCH3領域を含む単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記複数の結合アッセイのうちの各結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが、第1の軽鎖ポリペプチド構築物および第2の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物が、第1のVLおよび第1のCL領域を含み、前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物が、第2のVLおよび第2のCL領域を含む、本発明1109の方法。

[本発明1125]

前記複数の結合アッセイにおける各結合アッセイが、溶液中に、CH2領域およびCH3領域からなる追加の分子実体を更に含む、本発明1124の方法。

[本発明1126]

前記複数のエッジにおける各エッジの線幅(W)が、前記対応する結合アッセイにおける前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物または前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対する選好を有する量によって、決定され、前記量が、下記式によって決定され、

$$W = \left| f\left(\frac{P1}{P2}\right) \right|$$

式中、

fは、線形または非線形関数であり、

P1は、(i) 前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(ii) 前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との組み合わせによって正規化された、前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量であり、

P2は、(i) 前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量と、(ii) 前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量との合計量によって正規化された、前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に対合した前記単一重鎖ポリペプチド構築物の量である、本発明1124の方法。

[本発明1127]

f が対数関数である、本発明1126の方法。

[本発明1128]

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第1の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第1の図示様式が実線であり、

前記単一重鎖ポリペプチド構築物が前記第2の軽鎖ポリペプチド構築物に優先的に結合する場合、前記第1の図示様式が破線である、本発明1124の方法。

[本発明1129]

前記複数の結合アッセイのうちの1つの結合アッセイにおける前記曝露することが、前記1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドおよび前記1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの同時発現によって実行される、本発明1109の方法。

[本発明1130]

前記第1の図示様式が線色であり、前記第2の図示様式が線幅である、本発明1110または1111の方法。

[本発明1131]

前記第1の図示様式が線色および点線の組み合わせであり、前記第2の図示様式が線幅である、本発明1110または1111の方法。

[本発明1132]

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの選択的対合を可視化するためのシステムであって、

1つ以上の処理装置と、

前記1つ以上の処理装置によって実行される1つ以上のプログラムを記憶する記憶装置と

を含み、前記1つ以上のプログラムが、

(a) 複数の結合アッセイを含む競合アッセイデータを取得する命令であって、前記複数の結合アッセイのうちの各それぞれの結合アッセイが、溶液中で、複数の重鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドの第1の量を、複数の軽鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの第2の量に、溶液中の前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドまたは前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドのいずれかを限定する条件下で、曝露することを含み、

前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが複数の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが単一軽鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが複数の重鎖ポリペプチド構築物からなる、命令と、

(b) 複数の節点を含むグラフを構築する命令であって、

前記複数の節点が、節点の第1のサブセット、および節点の第2のサブセットを含み、

節点の前記第1のサブセットにおける各それぞれの節点が、第1の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第2のサブセットにおける各それぞれの節点が、第2の図示形式で表示され

、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第1のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記重鎖ポリペプチドの全てを集合的に表し、

節点の前記第2のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記軽鎖ポリペプチドの全てを集合的に表す、命令と、

(c) 前記グラフに、複数のエッジを設定する命令であって、

前記複数のエッジにおける各それぞれのエッジが、前記複数の結合アッセイにおける対応する結合アッセイを表し、かつ前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の重鎖ポリペプチドを表す節点の前記第1のサブセット中の第1の節点を、前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドを表す節点の前記第2のサブセット中の第2の節点と接続し、

前記複数のエッジにおける各エッジの第1の図示様式は、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが、前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対して選好を有するかどうかを示す、命令を含む、システム。

[本発明1133]

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの選択的対合を可視化するためのコンピュータシステムによる実行のための1つ以上のコンピュータプログラムを記憶する、非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、前記1つ以上のコンピュータプログラムが、

(a) 複数の結合アッセイを含む競合アッセイデータを取得する命令であって、前記複数の結合アッセイのうちの各それぞれの結合アッセイが、溶液中で、複数の重鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドの第1の量を、複数の軽鎖ポリペプチド構築物から選択される1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドの第2の量に、溶液中の前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドまたは前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドのいずれかを限定する条件下で、曝露することを含み、

前記対応する1つ以上の重鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが単一重鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが複数の軽鎖ポリペプチド構築物からなり、

前記対応する1つ以上の軽鎖ポリペプチドが限定的である場合、前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドが単一軽鎖ポリペプチド構築物からなり、かつ前記1つ以上の重鎖ポリペプチドが複数の重鎖ポリペプチド構築物からなる、命令と、

(b) 複数の節点を含むグラフを構築する命令であって、

前記複数の節点が、節点の第1のサブセット、および節点の第2のサブセットを含み、

節点の前記第1のサブセットにおける各それぞれの節点が、第1の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する重鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第2のサブセットにおける各それぞれの節点が、第2の図示形式で表示され、前記複数の結合アッセイのうちの1つ以上の結合アッセイにおける1つ以上の対応する軽鎖ポリペプチドを一意的に表し、

節点の前記第1のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記重鎖ポリペプチドの全てを集合的に表し、

節点の前記第2のサブセットが、前記複数の結合アッセイにおいて使用された前記軽鎖ポリペプチドの全てを集合的に表す、命令と、

(c) 前記グラフに、複数のエッジを設定する命令であって、

前記複数のエッジにおける各それぞれのエッジが、前記複数の結合アッセイにおける対応する結合アッセイを表し、かつ前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の重鎖ポリペプチドを表す節点の前記第1のサブセット中の第1の節点を、前記対応する結合アッセイにおける前記1つ以上の軽鎖ポリペプチドを表す節点の前記第2のサブセット中の第2の節点と接続し、

前記複数のエッジにおける各エッジの第1の図示様式は、前記対応する結合アッセイにおける前記限定的ポリペプチドが、前記対応する結合アッセイにおける前記非限定的ポリペプチドのうちの1つに対して選好を有するかどうかを示す、命令とを含む、コンピュータプログラム。

[本発明1134]

前記第1または第2の軽鎖ポリペプチドとの対合についての前記重鎖ポリペプチドの選択性が、本発明1109～1133のいずれかの方法によって可視化される、本発明1001の方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0194

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0194】

いくつかの実施形態において、第1の図示形式は、第1の二次元閉形式の形状であり、第2の図示形式は、第1の二次元閉形式の形状以外の第2の二次元閉形式の形状である。いくつかの実施形態において、第1の図示形式は、第1の二次元幾何学的形状であり、第2の図示形式は、第1の二次元幾何学的形状以外の第2の二次元幾何学的形状である。例えば、いくつかの実施形態において、第1の二次元幾何学的形状または第2の二次元幾何学的形状は、 n が3以上の整数である n 角形、円、または楕円からなる群から選択される。