(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-538656
(P2010-538656A)
(43)公表日　平成22年12月16日(2010.12.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		4H045
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 215 頁）

(21)出願番号　特願2010-525049 (P2010-525049)
(86)(22)出願日　平成20年9月12日 (2008.9.12)
(85)翻訳文提出日　平成22年4月7日 (2010.4.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/076300
(87)国際公開番号　WO2009/036379
(87)国際公開日　平成21年3月19日 (2009.3.19)
(31)優先権主張番号　60/993,785
(32)優先日　平成19年9月14日 (2007.9.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

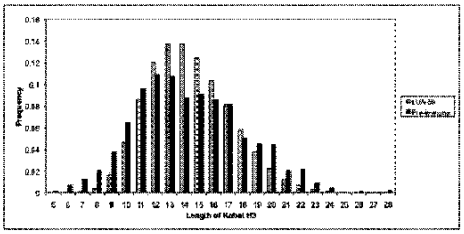
(71)出願人　510066628
アディマブ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニュー　ハンプシャー　０３７６６，　レバノン，　カベンディッシュ　コート　１６
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　バスケス，　マキシミリアーノ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０３，　パロ　アルト，　ルイス　ロード　３８１３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】合理的に設計された、合成抗体ライブラリおよびその使用

(57)【要約】
定方向の配列および長さの多様性を有するライブラリーを具体的に設計することによって、抗体をコードするポリヌクレオチドのライブラリーを作製する既知の方法に固有の欠点を克服する手順。ライブラリーは、ヒト免疫系によって天然に生成される免疫前のレパートリーを反映するように設計され、ヒト抗体配列の公的に利用可能なデータベースを調べることによって情報を得る合理的な設計に基づく。特定の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列と、（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列などを含む少なくとも10^6種の独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードするライブラリーを含む。

Figure 23



【特許請求の範囲】
【請求項１】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、
（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ１アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ１アミノ酸配列と、
（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、
（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ２アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ２アミノ酸配列と、
（ｉｖ）ヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と
を含む少なくとも10^6種の独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする、ライブラリー。
【請求項２】
請求項１に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。
【請求項３】
１つまたは複数のＣＤＲＨ３アミノ酸配列が、Ｎ末端の尾部残基をさらに含む、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項４】
前記Ｎ末端の尾部残基が、Ｇ、Ｄ、およびＥからなる群より選択される、請求項３に記載のライブラリー。
【請求項５】
前記Ｎ１アミノ酸配列が、
【化６２】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP, AP, SP, LP,
TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG, GVG, PGG, RGG, AGG,
SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR, GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F,
H, I, K, M, Q, W, Y, AR, AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS,
KV, LD, LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH, RL, RR,
RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST, SV, TA, TR, TS, TT,
TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL, EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA,
PTQ, REL, RPL, SAA, SAL, SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択される、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項６】
前記Ｎ２アミノ酸配列が、

【化６３】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP, AP, SP, LP,
TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG, GVG, PGG, RGG, AGG,
SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR, GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F,
H, I, K, M, Q, W, Y, AR, AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS,
KV, LD, LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH, RL, RR,
RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST, SV, TA, TR, TS, TT,
TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL, EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA,
PTQ, REL, RPL, SAA, SAL, SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択される、請求項１に記載のライブラリー。

【請求項７】

前記Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列が、

【化６４】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, H, YWYFDL,
WYFDL, YFDL, FDL, DL, L, AFDV, FDV, DV, V, YFDY, FDY, DY, Y,
NWFDS, WFDS, FDS, DS, S, YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV,
YYGMDV, YGMDV, GMDV, および MDV.

からなる群より選択される、請求項１に記載のライブラリー。

【請求項８】

前記ポリヌクレオチドが、相同組換えを促進する５’ポリヌクレオチド配列および３’ポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１に記載のライブラリー。

【請求項９】

前記ポリヌクレオチドが、前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列に対してＮ末端にある１つまたは複数の重鎖シャーシアミノ酸配列をさらにコードし、前記１つまたは複数の重鎖シャーシアミノ酸配列が、

【化６５】

IGHV1-2, IGHV1-3, IGHV1-8, IGHV1-
18, IGHV1-24, IGHV1-45, IGHV1-46, IGHV1-58, IGHV1-69, IGHV2-5,
IGHV2-26, IGHV2-70, IGHV3-7, IGHV3-9, IGHV3-11, IGHV3-13, IGHV3-15,
IGHV3-20, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-33, IGHV3-43, IGHV3-
48, IGHV3-49, IGHV3-53, IGHV3-64, IGHV3-66, IGHV3-72, IGHV3-73,
IGHV3-74, IGHV4-4, IGHV4-28, IGHV4-31, IGHV4-34, IGHV4-39, IGHV4-
59, IGHV4-61, IGHV4-B, IGHV5-51, IGHV6-1, および IGHV7-4-1,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸９４、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択される、請求項１に記載のライブラリー。

【請求項１０】

前記ポリヌクレオチドが、前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列に対してＣ末端にある１つまたは複数のＦＲＭ４アミノ酸配列をさらにコードし、前記１つまたは複数のＦＲＭ４アミノ酸配列が、ＩＧＨＪ１、ＩＧＨＪ２、ＩＧＨＪ３、ＩＧＨＪ４、ＩＧＨＪ５、およびＩＧＨＪ６によってコードされるＦＲＭ４アミノ酸配列、またはそれらのいずれかと少なくと

も約８０％の同一性のある配列からなる群より選択される、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項１１】
前記ポリヌクレオチドが、前記ＦＲＭ４アミノ酸配列に対してＣ末端にある１つまたは複数のイムノグロブリン重鎖定常領域アミノ酸配列をさらにコードする、請求項１０に記載のライブラリー。
【請求項１２】
前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列が、完全長重鎖の一部として発現される、請求項１１に記載のライブラリー。
【請求項１３】
前記完全長重鎖が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４、またはその組合せからなる群より選択される、請求項１２に記載のライブラリー。
【請求項１４】
前記ポリヌクレオチドが、代替足場をさらにコードする、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項１５】
前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の長さが、約２～約３０、約８～約１９、または約１０～約１８アミノ酸残基である、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項１６】
前記ライブラリーの合成ポリヌクレオチドが、約10^{6}～約10^{14}、約10^{7}～約10^{13}、約10^{8}～約10^{12}、約10^{9}～約10^{12}、または約10^{10}～約10^{12}種の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項１７】
請求項１に記載の合成ポリヌクレオチドライブラリーによってコードされるポリペプチドのライブラリー。
【請求項１８】
請求項１に記載のポリヌクレオチドライブラリーを含むベクターのライブラリー。
【請求項１９】
請求項１８に記載のベクターを含む細胞の集団。
【請求項２０】
前記細胞の集団の倍加時間が、約１～約３時間、約３～約８時間、約８～約１６時間、約１６～約２０時間、または約２０～３０時間である、請求項１９に記載の細胞の集団。
【請求項２１】
前記細胞が酵母細胞である、請求項１９に記載の細胞の集団。
【請求項２２】
Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅである、請求項２１に記載の酵母細胞。
【請求項２３】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ライブラリーは、Ｎ種の独特のＣＤＲＨ３配列の理論的全多様性を有し、Ｎが約10^{6}～約10^{15}であり、理論的全ＣＤＲＨ３多様性の物理的実現物が少なくとも約３Ｎのサイズを有し、それによって前記ライブラリーの理論的全多様性内に含まれる任意の個々のＣＤＲＨ３配列が現実のライブラリー中に存在する確率が少なくとも約９５％となる、ライブラリー。
【請求項２４】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、
（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、
（ａ）最もＮ末端にあるＮ１アミノ酸が、存在する場合には、Ｒ、Ｇ、Ｐ、Ｌ、Ｓ、Ａ、Ｖ、Ｋ、Ｉ、Ｑ、ＴおよびＤからなる群より選択され、
（ｂ）最もＮ末端から２番目のＮ１アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｌ、Ｖ、Ｅ、Ａ、Ｄ、Ｉ、ＴおよびＫからなる群より選択され、

（ｃ）最もＮ末端から３番目のＮ１アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｒ、Ｐ、Ｓ、Ｌ、Ａ、Ｖ、Ｔ、Ｅ、Ｄ、ＫおよびＦからなる群より選択される、Ｎ１アミノ酸配列と、
（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、
（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、
（ａ）最もＮ末端にあるＮ２アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｒ、Ｌ、Ｓ、Ａ、Ｔ、Ｖ、Ｅ、Ｄ、ＦおよびＨからなる群より選択され、
（ｂ）最もＮ末端から２番目のＮ２アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｌ、Ａ、Ｖ、Ｅ、Ｙ、ＤおよびＫからなる群より選択され、
（ｃ）最もＮ末端から３番目のＮ２アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｓ、Ｒ、Ｌ、Ａ、Ｔ、Ｖ、Ｄ、Ｅ、ＷおよびＱからなる群より選択されるＮ２アミノ酸配列と、
（ｉｖ）ヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と
を含む少なくとも約10^6種の独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする、ライブラリー。

【請求項２５】
請求項２４に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。

【請求項２６】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、下記の式：
［Ｘ］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％同一である少なくとも約10^6種の独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードし、式中、
（ｉ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、またはアミノ酸残基を有さず、
（ｉｉ）Ｎ１は、
【化６６】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｉｉ）ＤＨは、
【化６７】

IGHD1-1, IGHD1-20, IGHD1-26, IGHD1-7, IGHD2-
15, IGHD2-2, IGHD2-21, IGHD2-8, IGHD3-10, IGHD3-16,
IGHD3-22, IGHD3-3, IGHD3-9, IGHD4-17, IGHD4-23, IGHD4-
4, IGHD-4-11, IGHD5-12, IGHD5-24, IGHD5-5, IGHD-5-18,
IGHD6-13, IGHD6-19, IGHD6-25, IGHD6-6, および IGHD7-27,

によってコードされる、終止コドンを含まないすべての考えられる読み枠、ならびにそのＮおよびＣ末端切断物からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｖ）Ｎ２は、
【化６８】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｖ）Ｈ３－ＪＨは、
【化６９】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, H,
YWYFDL, WYFDL, YFDL, FDL, DL, L, AFDV, FDV, DV, V,
YFDY, FDY, DY, Y, NWFDS, WFDS, FDS, DS, S,
YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV, YYGMDV,
YGMDV, GMDV,およびMDV,

またはそれらのいずれかと少なくとも８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列である、
ライブラリー。
【請求項２７】
請求項２６に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。
【請求項２８】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、下記の式：
［Ｘ］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％同一であるＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする複数のポリヌクレオチドから本質的になり、式中、
（ｉ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、またはアミノ酸残基を有さず、
（ｉｉ）Ｎ１は、

【化７０】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｉｉ）ＤＨは、
【化７１】

IGHD1-1, IGHD1-20, IGHD1-26, IGHD1-7, IGHD2-15, IGHD2-2, IGHD2-21, IGHD2-8, IGHD3-10, IGHD3-16, IGHD3-22, IGHD3-3, IGHD3-9, IGHD4-17, IGHD4-23, IGHD4-4, IGHD-4-11, IGHD5-12, IGHD5-24, IGHD5-5, IGHD-5-18, IGHD6-13, IGHD6-19, IGHD6-25, IGHD6-6, および IGHD7-27,

によってコードされる、終止コドンを含まないすべての考えられる読み枠、ならびにそのＮおよびＣ末端切断物からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｖ）Ｎ２は、
【化７２】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｖ）Ｈ３－ＪＨは、

【化７３】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, H,

YWYFDL, WYFDL, YFDL, FDL, DL, L, AFDV, FDV, DV, V,

YFDY, FDY, DY, Y, NWFDS, WFDS, FDS, DS, S,

YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV, YYGMDV,

YGMDV, GMDV, およびMDV,

またはそれらのいずれかと少なくとも８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列である、
ライブラリー。

【請求項２９】

請求項２８に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。

【請求項３０】

合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが１つまたは複数の抗体重鎖アミノ酸配列をコードし、前記重鎖の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列が、
（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ１アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ１アミノ酸配列と、
（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、
（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ２アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ２アミノ酸配列と、
（ｉｖ）ヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と
を含むライブラリー。

【請求項３１】

請求項３０に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。

【請求項３２】

合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、特定のＩＧＫＶまたはＩＧＫＪ生殖系列配列に由来する選択されたＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列中のｋａｂａｔ８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９５Ａ、９６、および９７位で認められるアミノ酸を約１～約１０個含む複数の抗体ＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列をコードする、ライブラリー。

【請求項３３】

前記合成ポリヌクレオチドが、表３３に挙げたアミノ酸配列、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％同一である配列の１つまたは複数をコードする、請求項３２に記載のライブラリー。

【請求項３４】

請求項３２に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。

【請求項３５】

合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、下記の式：
［ＶＫ＿シャーシ］－［Ｌ３－ＶＫ］－［Ｘ］－［ＪＫ＊］
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性がある複数の独特の抗体ＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列をコードし、式中、
（ｉ）ＶＫ＿シャーシは、

【化７４】

IGKV1-05, IGKV1-06, IGKV1-08, IGKV1-09,
IGKV1-12, IGKV1-13, IGKV1-16, IGKV1-17, IGKV1-27,
IGKV1-33, IGKV1-37, IGKV1-39, IGKV1D-16, IGKV1D-17,
IGKV1D-43, IGKV1D-8, IGKV2-24, IGKV2-28, IGKV2-29,
IGKV2-30, IGKV2-40, IGKV2D-26, IGKV2D-29, IGKV2D-30,
IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV3D-07, IGKV3D-11,
IGKV3D-20, IGKV4-1, IGKV5-2, IGKV6-21, およびIGKV6D-41,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｉ）Ｌ３－ＶＫは、ＩＧＫＶ遺伝子セグメントによってコードされるＶＫＣＤＲ３の部分であり、
（ｉｉｉ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、
（ｉｖ）ＪＫ＊は、ＩＧＪＫ１、ＩＧＪＫ２、ＩＧＪＫ３、ＩＧＪＫ４、およびＩＧＪＫ５によってコードされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各アミノ酸配列の最初のアミノ酸残基が存在しない、
ライブラリー。

【請求項３６】
請求項３５に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。

【請求項３７】
Ｘが、Ｆ、Ｌ、Ｉ、Ｒ、Ｗ、Ｙ、およびＰからなる群より選択される、請求項３５に記載のライブラリー。

【請求項３８】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、下記の式：
［Ｖλ＿シャーシ］－［Ｌ３－Ｖλ］－［Ｊλ］
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性がある複数のＶλＣＤＲ３アミノ酸配列をコードし、式中、
（ｉ）Ｖλ＿シャーシは、

【化７５】

IGλV1-36, IGλV1-40, IGλV1-44, IGλV1-47,
IGλV1-51, IGλV10-54, IGλV2-11, IGλV2-14, IGλV2-18,
IGλV2-23, IGλV2-8, IGλV3-1, IGλV3-10, IGλV3-12, IGλV3-16, IGλV3-19, IGλV3-21, IGλV3-25, IGλV3-27, IGλV3-9,
IGλV4-3, IGλV4-60, IGλV4-69, IGλV5-39, IGλV5-45, IGλV6-57, IGλV7-43, IGλV7-46, IGλV8-61, IGλV9-49,およびIGλV10-54,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｉ）Ｌ３－Ｖλは、ＩＧλＶセグメントによってコードされるＶλＣＤＲ３の部分であり、
（ｉｉｉ）Ｊλは、ＩＧλＪ１－０１、ＩＧλＪ２－０１、ＩＧλＪ３－０１、ＩＧλＪ３－０２、ＩＧλＪ６－０１、ＩＧλＪ７－０１、およびＩＧλＪ７－０２によってコー

ドされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各配列の最初のアミノ酸残基が欠失していてもよく、または欠失していなくてもよい、
ライブラリー。
【請求項３９】
請求項３８に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。
【請求項４０】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、
（ｉ）請求項１に記載のＣＤＲＨ３アミノ酸配列と、
（ｉｉ）特定のＩＧＫＶまたはＩＧＫＪ生殖系列配列に由来する選択されたＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列中のＫａｂａｔ８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９５Ａ、９６、および９７位で認められるアミノ酸を約１～約１０個含むＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列とを含む複数の抗体タンパク質をコードする、ライブラリー。
【請求項４１】
前記ＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列が、表３３に挙げたアミノ酸配列、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％同一である配列の１つまたは複数を含む、請求項４０に記載のライブラリー。
【請求項４２】
請求項４０に記載のライブラリーから単離される抗体。
【請求項４３】
前記抗体タンパク質が、ヘテロ二量体の形態で発現される、請求項４０に記載のライブラリー。
【請求項４４】
前記抗体タンパク質が、抗体断片として発現される、請求項４０に記載のライブラリー。
【請求項４５】
前記抗体断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ断片、ダイアボディ、直鎖抗体、および単鎖抗体からなる群より選択される、請求項４４に記載のライブラリー。
【請求項４６】
合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、
（ｉ）請求項１に記載のＣＤＲＨ３アミノ酸配列と、
（ｉｉ）下記の式：
［ＶＫ＿シャーシ］－［Ｌ３－ＶＫ］－［Ｘ］－［ＪＫ＊］
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性のあるＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列であって、式中、
（ａ）ＶＫ＿シャーシは、
【化７６】

IGKV1-05, IGKV1-06,
IGKV1-08, IGKV1-09, IGKV1-12, IGKV1-13, IGKV1-16, IGKV1-17, IGKV1-27, IGKV1-33, IGKV1-37,
IGKV1-39, IGKV1D-16, IGKV1D-17, IGKV1D-43,
IGKV1D-8, IGKV2-24, IGKV2-28, IGKV2-29, IGKV2-30, IGKV2-40, IGKV2D-26, IGKV2D-29, IGKV2D-30,
IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV3D-07,
IGKV3D-11, IGKV3D-20, IGKV4-1, IGKV5-2, IGKV6-21, およびIGKV6D-41,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ

酸配列であり、
（ｂ）Ｌ３－ＶＫは、ＩＧＫＶ遺伝子セグメントによってコードされるＶＫＣＤＲ３の部分であり、
（ｃ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、
（ｄ）ＪＫ＊は、ＩＧＪＫ１、ＩＧＪＫ２、ＩＧＪＫ３、ＩＧＪＫ４、およびＩＧＪＫ５によってコードされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各ＩＧＪＫアミノ酸配列の最初の残基が存在しないＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列と
を含む複数の抗体タンパク質をコードする、ライブラリー。
【請求項４７】
請求項４６に記載のライブラリーから単離される抗体。
【請求項４８】
複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ライブラリー中の下記のｉ－ｉ＋１の対の少なくとも１つの、前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の中心ループ内でのパーセント出現率が、
約２．５％～約６．５％の量のＴｙｒ－Ｔｙｒ、
約２．５％～約４．５％の量のＳｅｒ－Ｇｌｙ、
約２％～約４％の量のＳｅｒ－Ｓｅｒ、
約１．５％～約４％の量のＧｌｙ－Ｓｅｒ、
約０．７５％～約２％の量のＴｙｒ－Ｓｅｒ、
約０．７５％～約２％の量のＴｙｒ－Ｇｌｙ、および
約０．７５％～約２％の量のＳｅｒ－Ｔｙｒ
の特定の範囲内にある、ライブラリー。
【請求項４９】
前記ライブラリー中の特定のｉ－ｉ＋１の対の少なくとも２、３、４、５、６、または７つが、前記特定の範囲内にある、請求項４８に記載のライブラリー。
【請求項５０】
請求項４８に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。
【請求項５１】
前記ポリヌクレオチドが、少なくとも約10^6種の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする、請求項４８に記載のライブラリー。
【請求項５２】
複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ライブラリー中の下記のｉ－ｉ＋２の対の少なくとも１つの、前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の中心ループ内でのパーセント出現率が、
約２．５％～約４．５％の量のＴｙｒ－Ｔｙｒ、
約２．５％～約５．５％の量のＧｌｙ－Ｔｙｒ、
約２％～約４％の量のＳｅｒ－Ｔｙｒ、
約１．７５％～約３．７５％の量のＴｙｒ－Ｓｅｒ、
約２％～約３．５％の量のＳｅｒ－Ｇｌｙ
約１．５％～約３％の量のＳｅｒ－Ｓｅｒ、
約１．５％～約３％の量のＧｌｙ－Ｓｅｒ、および
約１％～約２％の量のＴｙｒ－Ｇｌｙ
の特定の範囲内にある、ライブラリー。
【請求項５３】
前記ライブラリー中の特定のｉ－ｉ＋２の対の少なくとも２、３、４、５、６、７、または８つが、前記特定の範囲内にある、請求項５２に記載のライブラリー。
【請求項５４】
請求項５２に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。
【請求項５５】
前記ポリヌクレオチドが、少なくとも約10^6種の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコ

ードする、請求項５２に記載のライブラリー。
【請求項５６】
複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ライブラリー中の下記のｉ－ｉ＋３の対の少なくとも１つの、前記ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の中心ループ内でのパーセント出現率が、
約２．５％～約６．５％の量のＧｌｙ－Ｔｙｒ、
約１％～約５％の量のＳｅｒ－Ｔｙｒ、
約２％～約４％の量のＴｙｒ－Ｓｅｒ、
約１％～約３％の量のＳｅｒ－Ｓｅｒ、
約２％～約５％の量のＧｌｙ－Ｓｅｒ、および
約０．７５％～約２％の量のＴｙｒ－Ｔｙｒ
の特定の範囲内にあるライブラリー。
【請求項５７】
前記ライブラリー中の特定のｉ－ｉ＋３の対の少なくとも２、３、４、５、または６つが、前記特定の範囲内にある、請求項５６に記載のライブラリー。
【請求項５８】
請求項５６に記載のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体。
【請求項５９】
前記ポリヌクレオチドが、少なくとも約10^6種の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする、請求項５６に記載のライブラリー。
【請求項６０】
合成ポリヌクレオチドライブラリーを調製する方法であって、請求項１、２４、２６、２８、３０、３２、３５、３８、４０、４６、４８、５２、および５６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド配列を提供し集めるステップを含む方法。
【請求項６１】
複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを調製する方法であって、
（ｉ）（ａ）１つまたは複数の、０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ１アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ１アミノ酸配列、
（ｂ）１つまたは複数のヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列、
（ｃ）１つまたは複数の、０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ２アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ２アミノ酸配列、ならびに
（ｄ）１つまたは複数のヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列
をコードするポリヌクレオチド配列を提供するステップと、
（ｉｉ）前記ポリヌクレオチド配列を集めて、下記の式：
［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］
によって表される複数のヒト抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを作製するステップと
を含む方法。
【請求項６２】
前記ポリヌクレオチド配列の１つまたは複数がスプリットプール合成を介して合成される、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
相同組換えを促進する５’ポリヌクレオチド配列および３’ポリヌクレオチド配列を提

供するステップをさらに含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６４】
前記集めた合成ポリヌクレオチドを、重鎖シャーシおよび重鎖定常領域を含むベクターで組み換えて、完全長重鎖を形成するステップをさらに含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６５】
前記組み換えるステップが酵母中で行われる、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記酵母がＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅである、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
１つまたは複数の抗体を発現する１つまたは複数の宿主細胞を単離する方法であって、
（ｉ）１つまたは複数の宿主細胞中で請求項４０および４６のいずれか一項に記載の抗体を発現させるステップと、
（ｉｉ）前記宿主細胞を１つまたは複数の抗原と接触させるステップと、
（ｉｉｉ）前記１つまたは複数の抗原と結合する抗体を有する１つまたは複数の宿主細胞を単離するステップと
を含む方法。
【請求項６８】
前記１つまたは複数の宿主細胞から１つまたは複数の抗体を単離するステップをさらに含む、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記１つまたは複数の宿主細胞から、１つまたは複数の抗体をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチド配列を単離するステップをさらに含む、請求項６７に記載の方法。
【請求項７０】
請求項１に記載の合成ポリヌクレオチドのライブラリーを含むキット。
【請求項７１】
コンピュータで読み取り可能な形態での、請求項１、２４、２６、２８、３０、３２、３５、３８、４０、４６、４８、５２、および５６のいずれか一項に記載の合成ポリヌクレオチドのライブラリーによってコードされるＣＤＲＨ３アミノ酸配列。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
この出願は、２００７年９月１４日に出願された米国仮出願第６０／９９３，７８５号（これは、この参照によって、その全体が本明細書に援用される）への優先権を主張する。
【背景技術】
【０００２】
抗体は、研究ツールとして、また診断および治療的用途において、大きな適合性を有している。しかしながら、有用な抗体の同定は困難であり、同定後、抗体は治療的用途に適する前に大幅な再設計または「ヒト化」を必要とすることが多い。
【０００３】
所望の抗体を同定するための以前の方法は、典型的には、代表的な抗体、例えば、Ｂ細胞もしくは組織の核酸増幅によって得られるヒトライブラリー、または代替として、合成ライブラリーのファージディスプレイを含んでいた。しかしながら、こうしたアプローチには制限がある。例えば、当技術分野において知られているヒトライブラリーの大半は、供給源（例えば、Ｂ細胞）から実験的に捕捉またはクローニングすることができる抗体配列多様性のみを含有する。したがって、ヒトライブラリーは特定の有用な抗体配列を完全に欠くか、または過少提示する可能性がある。当技術分野において知られている合成またはコンセンサスライブラリーには、免疫原性となる可能性のある非天然由来（例えば、非ヒト）配列をコードする可能性などの他の制限がある。さらに、当技術分野の特定の合成

ライブラリーは、（１）ライブラリーが理論的に含有することができるメンバー数（すなわち、理論的多様性）が、実際に合成可能なメンバー数よりも多い可能性があり、（２）実際に合成されるメンバー数が多過ぎて、ライブラリーの物理的実現物における各メンバーのスクリーニングを排除し、それにより特定の性質を有するライブラリーメンバーが単離される可能性を減少させる可能性がある、という２つの制限のうち少なくとも１つの欠点を持つ。

【０００４】

例えば、10^{12}個のライブラリーメンバーをスクリーニングすることができるライブラリーの物理的実現物（例えば、酵母ディスプレイ、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイなど）は、10^{13}個のメンバーを有するライブラリー中に含有される配列の約１０％をサンプリングするのみであるはずである。ＣＤＲＨ３長の中央値を約１２．７アミノ酸と仮定すると（非特許文献１）、ＣＤＲＨ３単独における理論的配列変異体の数は、約$20^{12.7}$個、または約3.3×10^{16}個の変異体である。この数は、ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２重鎖フレームワーク領域、ならびにそれぞれのＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、およびＣＤＲＬ３においてもそれぞれが変異を示す異なる軽鎖との対形成において出現する既知の変異の説明にはならない。最終的に、これらのライブラリーから単離された抗体は、候補分子の結合を改良するための合理的な親和性成熟技術に適さないことが多い。

【０００５】

したがって、体系的に非免疫原性の（すなわち、さらにはヒト）候補抗体を提示し、所望の性質（例えば、広範な種々の抗原を認識する能力）を有する、定方向の多様性を有するより小さい（すなわち、合成することができ、物理的実現可能な）抗体ライブラリーが必要である。しかしながら、このようなライブラリーの取得は、広範な種々の抗原を認識するために十分な多様性レベルを維持しながら、（潜在的には非ヒト配列の導入を制限しながらオーバーサンプリングによって、合成および物理的実現を可能にするために）ライブラリーにおいて提示される配列多様性を制限するという相反する目的を両立させることを必要とする。本発明より前に、「重鎖ＣＤＲ３の長さの多様性を含むライブラリーが報告されたが、天然重鎖ＣＤＲ３レパートリーに認められる配列および長さの多様性の両方をコードするＤＮＡを合成することは不可能である」ことが当技術分野において知られていた（その全体が参照により組み込まれる、非特許文献２）。

【０００６】

したがって、（ａ）容易に合成することができる、（ｂ）物理的実現が可能であり、特定の場合にはオーバーサンプリング可能である、（ｃ）免疫前ヒトレパートリー（すなわち、負の選択前）によって認識されるすべての抗原を認識するのに十分な多様性を含む、（ｄ）ヒトにおいて非免疫原性である（すなわち、ヒト起源の配列を含む）、および（ｅ）天然に存在するヒト抗体を表す、ＣＤＲの長さおよび配列の多様性、ならびにフレームワーク多様性を含む、抗体ライブラリーを有することが望ましいはずである。本発明の実施形態は、初めて、これらの望ましい特徴を有する抗体ライブラリーを少なくとも提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｒｏｃｋら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１９９４年、１７９巻：３２３～３２８頁

【非特許文献２】Ｈｏｅｔら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、２００５年、２３巻：３４４頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明は、少なくとも、合成ポリヌクレオチドライブラリー、本発明のライブラリーを

作製および使用する方法、本発明のライブラリーを含むキットおよびコンピュータで読み取り可能な形態に関する。いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーは、ヒト免疫系によって天然に生成される免疫前のレパートリーを反映するように設計され、ヒト抗体配列の公的に利用可能なデータベースを調べることによって情報を得る合理的な設計に基づく。本発明の特定の非限定的な実施形態が以下に説明されることが理解されるであろう。明細書全体にわたって記述されるように、本発明は多くの他の実施形態もまた包含する。

【０００９】

特定の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、

（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ１アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ１アミノ酸配列と、

（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、

（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ２アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ２アミノ酸配列と、

（ｉｖ）ヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と

を含む少なくとも10^6種の独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードするライブラリーを含む。

【００１０】

他の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、

（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、

（ａ）最もＮ末端にあるＮ１アミノ酸が、存在する場合には、Ｒ、Ｇ、Ｐ、Ｌ、Ｓ、Ａ、Ｖ、Ｋ、Ｉ、Ｑ、ＴおよびＤからなる群より選択され、

（ｂ）最もＮ末端から２番目のＮ１アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｌ、Ｖ、Ｅ、Ａ、Ｄ、Ｉ、ＴおよびＫからなる群より選択され、

（ｃ）最もＮ末端から３番目のＮ１アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｒ、Ｐ、Ｓ、Ｌ、Ａ、Ｖ、Ｔ、Ｅ、Ｄ、ＫおよびＦからなる群より選択されるＮ１アミノ酸配列と、

（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、

（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、

（ａ）最もＮ末端にあるＮ２アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｒ、Ｌ、Ｓ、Ａ、Ｔ、Ｖ、Ｅ、Ｄ、ＦおよびＨからなる群より選択され、

（ｂ）最もＮ末端から２番目のＮ２アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｌ、Ａ、Ｖ、Ｅ、Ｙ、ＤおよびＫからなる群より選択され、

（ｃ）最もＮ末端から３番目のＮ２アミノ酸が、存在する場合には、Ｇ、Ｐ、Ｓ、Ｒ、Ｌ、Ａ、Ｔ、Ｖ、Ｄ、Ｅ、ＷおよびＱからなる群より選択されるＮ２アミノ酸配列と、

（ｉｖ）ヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と

を含む少なくとも約10^6種の独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードするライブラリーを含む。

【００１１】

さらに他の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、下記の式：

［Ｘ］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％同一である少なくとも約10^6種の

独特の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードし、式中、
（ｉ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、またはアミノ酸残基を有さず、
（ｉｉ）Ｎ１は、
【００１２】
【化１】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｉｉ）ＤＨは、
【００１３】
【化２】

IGHD1-1, IGHD1-20, IGHD1-26, IGHD1-7, IGHD2-
15, IGHD2-2, IGHD2-21, IGHD2-8, IGHD3-10, IGHD3-16,
IGHD3-22, IGHD3-3, IGHD3-9, IGHD4-17, IGHD4-23, IGHD4-
4, IGHD-4-11, IGHD5-12, IGHD5-24, IGHD5-5, IGHD-5-18,
IGHD6-13, IGHD6-19, IGHD6-25, IGHD6-6,およびIGHD7-27,

によってコードされる、終止コドンを含まないすべての考えられる読み枠、ならびにその
ＮおよびＣ末端切断物からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｖ）Ｎ２は、
【００１４】

【化３】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｖ）Ｈ３－ＪＨは、
【００１５】
【化４】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, H,
YWYFDL, WYFDL, YFDL, FDL, DL, L, AFDV, FDV, DV, V,
YFDY, FDY, DY, Y, NWFDS, WFDS, FDS, DS, S,
YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV, YYGMDV,
YGMDV, GMDV,および MDV,

またはそれらのいずれかと少なくとも８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であるライブラリーを含む。
【００１６】
さらに別の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、下記の式：
［Ｘ］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％同一であるＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする複数のポリヌクレオチドから本質的になり、式中、
（ｉ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、またはアミノ酸残基を有さず、
（ｉｉ）Ｎ１は、
【００１７】

【化５】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｉｉ）ＤＨは、
【００１８】
【化６】

IGHD1-1, IGHD1-20, IGHD1-26, IGHD1-7, IGHD2-
15, IGHD2-2, IGHD2-21, IGHD2-8, IGHD3-10, IGHD3-16,
IGHD3-22, IGHD3-3, IGHD3-9, IGHD4-17, IGHD4-23, IGHD4-
4, IGHD-4-11, IGHD5-12, IGHD5-24, IGHD5-5, IGHD-5-18,
IGHD6-13, IGHD6-19, IGHD6-25, IGHD6-6,およびIGHD7-27,

によってコードされる、終止コドンを含まないすべての考えられる読み枠、ならびにその
ＮおよびＣ末端切断物からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｉｖ）Ｎ２は、
【００１９】
【化７】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV,
PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP,
AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG,
GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR,
GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR,
AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD,
LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH,
RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST,
SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL,
EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL,
SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択されるアミノ酸配列であり、
（ｖ）Ｈ３－ＪＨは、
【００２０】

【化８】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, H,
YWYFDL, WYFDL, YFDL, FDL, DL, L, AFDV, FDV, DV, V,
YFDY, FDY, DY, Y, NWFDS, WFDS, FDS, DS, S,
YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV, YYGMDV,
YGMDV, GMDV, およびMDV,

またはそれらのいずれかと少なくとも８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であるライブラリーを含む。

【００２１】

別の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが１つまたは複数の完全長抗体重鎖配列をコードし、重鎖のＣＤＲＨ３アミノ酸配列が、

（ｉ）０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ１アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ１アミノ酸配列と、

（ｉｉ）ヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と、

（ｉｉｉ）０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ２アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ２アミノ酸配列と、

（ｉｖ）ヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列と

を含むライブラリーを含む。

【００２２】

以下の実施形態は、本発明の実施形態全体にわたって適用することができる。一態様では、１つまたは複数のＣＤＲＨ３アミノ酸配列は、Ｎ末端尾部残基をさらに含む。さらに別の態様では、Ｎ末端尾部残基は、Ｇ、Ｄ、およびＥからなる群より選択される。

【００２３】

さらに別の態様では、Ｎ１アミノ酸配列は、

【００２４】

【化９】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV, PG, RG, AG,
SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP, AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG,
GRG, GAG, GSG, GLG, GTG, GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG,
GGP, GGR, GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR, AS, AT,
AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD, LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE,
QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH, RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR,
SS, ST, SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL, EKR, ISR,
NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL, SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択される。特定の別の態様では、Ｎ１アミノ酸配列は、約０～約５アミノ酸のものであってもよい。

【００２５】

さらに別の態様では、Ｎ２アミノ酸配列は、

【００２６】

【化１０】

G, P, R, A, S, L, T, V, GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV, PG, RG, AG,
SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP, AP, SP, LP, TP, VP, GGG, GPG,
GRG, GAG, GSG, GLG, GTG, GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG,
GGP, GGR, GGA, GGS, GGL, GGT, GGV, D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y, AR, AS, AT,
AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD, LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE,
QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH, RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR,
SS, ST, SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS, AAE, AYH, DTL, EKR, ISR,
NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL, SGL, SSE, TGL, WGT,

およびその組合せからなる群より選択される。特定の他の態様では、Ｎ２配列は、約０～約５アミノ酸のものであってもよい。

【００２７】

さらに別の態様では、Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列は、

【００２８】

【化１１】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, H, YWYFDL, WYFDL, YFDL,
FDL, DL, L, AFDV, FDV, DV, V, YFDY, FDY, DY, Y, NWFDS, WFDS, FDS, DS, S,
YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV, YYGMDV, YGMDV, GMDV, および
MDV.

からなる群より選択される。

【００２９】

他の実施形態では、本発明は、複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、ライブラリー中の下記のｉ－ｉ＋１の対の少なくとも１つの、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の中心ループ内でのパーセント出現率が、
約２．５％～約６．５％の量のＴｙｒ－Ｔｙｒ、
約２．５％～約４．５％の量のＳｅｒ－Ｇｌｙ、
約２％～約４％の量のＳｅｒ－Ｓｅｒ、
約１．５％～約４％の量のＧｌｙ－Ｓｅｒ、
約０．７５％～約２％の量のＴｙｒ－Ｓｅｒ、
約０．７５％～約２％の量のＴｙｒ－Ｇｌｙ、および
約０．７５％～約２％の量のＳｅｒ－Ｔｙｒ
の特定の範囲内にあるライブラリーを含む。

【００３０】

さらに他の実施形態では、本発明は、複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、ライブラリー中の下記のｉ－ｉ＋２の対の少なくとも１つの、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の中心ループ内でのパーセント出現率が、
約２．５％～約４．５％の量のＴｙｒ－Ｔｙｒ、
約２．５％～約５．５％の量のＧｌｙ－Ｔｙｒ、
約２％～約４％の量のＳｅｒ－Ｔｙｒ、
約１．７５％～約３．７５％の量のＴｙｒ－Ｓｅｒ、
約２％～約３．５％の量のＳｅｒ－Ｇｌｙ
約１．５％～約３％の量のＳｅｒ－Ｓｅｒ、
約１．５％～約３％の量のＧｌｙ－Ｓｅｒ、および
約１％～約２％の量のＴｙｒ－Ｇｌｙ
の特定の範囲内にあるライブラリーを含む。

【００３１】
別の実施形態では、本発明は、複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、ライブラリー中の下記のｉ－ｉ＋３の対の少なくとも１つの、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の中心ループ内でのパーセント出現率が、
約２．５％～約６．５％の量のＧｌｙ－Ｔｙｒ、
約１％～約５％の量のＳｅｒ－Ｔｙｒ、
約２％～約４％の量のＴｙｒ－Ｓｅｒ、
約１％～約３％の量のＳｅｒ－Ｓｅｒ、
約２％～約５％の量のＧｌｙ－Ｓｅｒ、および
約０．７５％～約２％の量のＴｙｒ－Ｔｙｒ
の特定の範囲内にあるライブラリーを含む。
【００３２】
本発明の一態様では、ライブラリー中の少なくとも２、３、４、５、６、または７個の特定のｉ－ｉ＋１対は特定の範囲内にある。別の態様では、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列はヒトである。さらに別の態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも約10^6個の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする。
【００３３】
本発明の他の態様では、ポリヌクレオチドは、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列に対してＮ末端にある１つまたは複数の重鎖シャーシ（Ｃｈａｓｓｉｓ）アミノ酸配列をさらにコードし、１つまたは複数の重鎖シャーシ配列は、
【００３４】
【化１２】
IGHV1-2, IGHV1-3, IGHV1-8, IGHV1-18, IGHV1-24, IGHV1-45, IGHV1-46,
IGHV1-58, IGHV1-69, IGHV2-5, IGHV2-26, IGHV2-70, IGHV3-7, IGHV3-9,
IGHV3-11, IGHV3-13, IGHV3-15, IGHV3-20, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30,
IGHV3-33, IGHV3-43, IGHV3-48, IGHV3-49, IGHV3-53, IGHV3-64, IGHV3-66,
IGHV3-72, IGHV3-73, IGHV3-74, IGHV4-4, IGHV4-28, IGHV4-31, IGHV4-34,
IGHV4-39, IGHV4-59, IGHV4-61, IGHV4-B, IGHV5-51, IGHV6-1, およびIGHV7-4-1,
によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸９４、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択される。
【００３５】
別の態様では、ポリヌクレオチドは、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列に対してＣ末端にある１つまたは複数のＦＲＭ４アミノ酸配列をさらにコードし、１つまたは複数のＦＲＭ４アミノ酸配列は、ＩＧＨＪ１、ＩＧＨＪ２、ＩＧＨＪ３、ＩＧＨＪ４、ＩＧＨＪ５、およびＩＧＨＪ６によってコードされるＦＲＭ４アミノ酸配列、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択される。さらに別の態様では、ポリヌクレオチドは、ＦＲＭ４配列に対してＣ末端にある１つまたは複数のイムノグロブリン重鎖定常領域アミノ酸配列をさらにコードする。
【００３６】
さらに別の態様では、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列は、完全長重鎖の一部として発現される。他の態様では、完全長重鎖は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４、またはその組合せからなる群より選択される。他の実施形態では、ＣＤＲＨ３アミノ酸配列の長さは、約２～約３０、約８～約１９、または約１０～約１８アミノ酸残基である。他の態様では、ライブラリーの合成ポリヌクレオチドは、約10^6～約10^{14}、約10^7～約10^{13}、約10^8～約10^{12}、約10^9～約10^{12}、または約10^{10}～約10^{12}種の独特のＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする。
【００３７】
特定の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記

ポリヌクレオチドが、特定のＩＧＫＶまたはＩＧＫＪ生殖系列配列に由来する選択されたＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列中のｋａｂａｔ８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９５Ａ、９６、および９７位で認められるアミノ酸を約１～約１０個含む複数の抗体ＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列をコードするライブラリーを含む。

【００３８】

一態様では、合成ポリヌクレオチドは、表３３に挙げたアミノ酸配列、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％同一である配列の１つまたは複数をコードする。

【００３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、下記の式：

［ＶＫ＿シャーシ］－［Ｌ３－ＶＫ］－［Ｘ］－［ＪＫ＊］

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性がある複数の独特の抗体ＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列をコードし、式中、

（ｉ）ＶＫ＿シャーシは、

【００４０】

【化１３】

IGKV1-05, IGKV1-06, IGKV1-08, IGKV1-09,
IGKV1-12, IGKV1-13, IGKV1-16, IGKV1-17, IGKV1-27,
IGKV1-33, IGKV1-37, IGKV1-39, IGKV1D-16, IGKV1D-17,
IGKV1D-43, IGKV1D-8, IGKV2-24, IGKV2-28, IGKV2-29,
IGKV2-30, IGKV2-40, IGKV2D-26, IGKV2D-29, IGKV2D-30,
IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV3D-07, IGKV3D-11,
IGKV3D-20, IGKV4-1, IGKV5-2, IGKV6-21, および IGKV6D-41,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

（ｉｉ）Ｌ３－ＶＫは、ＩＧＫＶ遺伝子セグメントによってコードされるＶＫＣＤＲ３の部分であり、

（ｉｉｉ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、

（ｉｖ）ＪＫ＊は、ＩＧＪＫ１、ＩＧＪＫ２、ＩＧＪＫ３、ＩＧＪＫ４、およびＩＧＪＫ５によってコードされる配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各ＩＧＪＫ配列の最初の残基が存在しないライブラリーを含む。

【００４１】

さらに他の態様では、Ｘは、Ｆ、Ｌ、Ｉ、Ｒ、Ｗ、Ｙ、およびＰからなる群より選択することができる。

【００４２】

特定の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、下記の式：

［Ｖλ＿シャーシ］－［Ｌ３－Ｖλ］－［Ｊλ］

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性がある複数のＶλＣＤＲ３アミノ酸配列をコードし、式中、

（ｉ）Ｖλ＿シャーシは、

【００４３】

【化１４】

IGλV1-36, IGλV1-40, IGλV1-44, IGλV1-47, IGλV1-51, IGλV10-54, IGλV2-11, IGλV2-14, IGλV2-18, IGλV2-23, IGλV2-8, IGλV3-1, IGλV3-10, IGλV3-12, IGλV3-16, IGλV3-19, IGλV3-21, IGλV3-25, IGλV3-27, IGλV3-9, IGλV4-3, IGλV4-60, IGλV4-69, IGλV5-39, IGλV5-45, IGλV6-57, IGλV7-43, IGλV7-46, IGλV8-61, IGλV9-49, および IGλV10-54,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

（ｉｉ）Ｌ３－Ｖλは、ＩＧλＶセグメントによってコードされるＶλＣＤＲ３の部分であり、

（ｉｉｉ）Ｊλは、ＩＧλＪ１－０１、ＩＧλＪ２－０１、ＩＧλＪ３－０１、ＩＧλＪ３－０２、ＩＧλＪ６－０１、ＩＧλＪ７－０１、およびＩＧλＪ７－０２によってコードされる配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各ＩＧＪλ配列の最初の残基が欠失していてもよく、または欠失していなくてもよいライブラリーを含む。

【００４４】

さらなる他の態様では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、

（ｉ）請求項１に記載のＣＤＲＨ３アミノ酸配列と、

（ｉｉ）特定のＩＧＫＶまたはＩＧＫＪ生殖系列配列に由来する選択されたＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列中のＫａｂａｔ８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９５Ａ、９６、および９７位で認められるアミノ酸を約１～約１０個含むＶＫＣＤＲ３配列と

を含む複数の抗体タンパク質をコードするライブラリーを含む。

【００４５】

さらなる態様では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、

（ｉ）請求項１に記載のＣＤＲＨ３アミノ酸配列と、

（ｉｉ）下記の式：

［ＶＫ＿シャーシ］－［Ｌ３－ＶＫ］－［Ｘ］－［ＪＫ＊］

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性のあるＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列であって、式中、

（ａ）ＶＫ＿シャーシは、

【００４６】

【化１５】

IGKV1-05, IGKV1-06,
IGKV1-08, IGKV1-09, IGKV1-12, IGKV1-13, IGKV1-16, IGKV1-17, IGKV1-27, IGKV1-33, IGKV1-37, IGKV1-39, IGKV1D-16, IGKV1D-17, IGKV1D-43, IGKV1D-8, IGKV2-24, IGKV2-28, IGKV2-29, IGKV2-30, IGKV2-40, IGKV2D-26, IGKV2D-29, IGKV2D-30, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV3D-07, IGKV3D-11, IGKV3D-20, IGKV4-1, IGKV5-2, IGKV6-21,およびIGKV6D-41,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、

（ｂ）Ｌ３－ＶＫは、ＩＧＫＶ遺伝子セグメントによってコードされるＶＫＣＤＲ３の部分であり、

（ｃ）Ｘは任意のアミノ酸残基であり、

（ｄ）ＪＫ＊は、ＩＧＪＫ１、ＩＧＪＫ２、ＩＧＪＫ３、ＩＧＪＫ４、およびＩＧＪＫ５によってコードされる配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各ＩＧＪＫ配列の最初の残基が存在しないＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列と

を含む複数の抗体タンパク質をコードするライブラリーを含む。

【００４７】

いくつかの態様では、ＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列は、表３３に記載されている１つまたは複数の配列、またはそれらのうちのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列を含む。他の態様では、抗体タンパク質はヘテロ二量体の形態で発現される。さらに他の態様では、ヒト抗体タンパク質は抗体断片として発現される。さらに別の本発明の態様では、抗体断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ断片、ダイアボディ、直鎖抗体、および単鎖抗体からなる群より選択される。

【００４８】

特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の任意のライブラリーのポリペプチド発現産物から単離される抗体を含む。

【００４９】

さらに他の態様では、ポリヌクレオチドは、相同組換えを促進する５’ポリヌクレオチド配列および３’ポリヌクレオチド配列をさらに含む。

【００５０】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、代替足場をさらにコードする。

【００５１】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の合成ポリヌクレオチドライブラリーのいずれかによってコードされるポリペプチドのライブラリーを含む。

【００５２】

さらに別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチドライブラリーのいずれかを含むベクターのライブラリーを含む。ある他の態様では、本発明は、本発明のベクターを含む細胞の集団を含む。

【００５３】

一態様では、倍加時間は、約１～約３時間、約３～約８時間、約８～約１６時間、約１６～約２０時間、または約２０～３０時間である。さらに別の態様では、細胞は酵母細胞である。さらに別の態様では、酵母はＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａ

ｅである。
【００５４】
他の実施形態では、本発明は、Ｎ種の独特のＣＤＲＨ３配列の理論的全多様性を有し、Ｎが約10^6～約10^{15}であり、理論的全ＣＤＲＨ３多様性の物理的実現物が少なくとも約３Ｎのサイズを有し、それによって前記ライブラリーの理論的全多様性内に含まれる任意の個々のＣＤＲＨ３配列が現実のライブラリー中に存在する確率が少なくとも約９５％となるライブラリーを含む。
【００５５】
特定の実施形態では、本発明は、合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドが、単一の生殖系列配列によりコードされる選択されたＶλＣＤＲ３配列においてＫａｂａｔ８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９５Ａ、９５Ｂ、９５Ｃ、９６、および９７位で認められる約１～約１０個のアミノ酸を含む複数の抗体ＶλＣＤＲ３アミノ酸配列をコードするライブラリーを含む。
【００５６】
いくつかの実施形態では、本発明は、複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーであって、約10^6～約10^{15}個の独特のＣＤＲＨ３配列の理論的全多様性を有するライブラリーに関する。
【００５７】
さらに他の実施形態では、本発明は、複数の抗体ＶＫアミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを調製する方法であって、
（ｉ）（ａ）
【００５８】
【化１６】

IGKV1-05, IGKV1-06, IGKV1-08, IGKV1-09, IGKV1-12, IGKV1-13, IGKV1-16, IGKV1-17, IGKV1-27, IGKV1-33, IGKV1-37, IGKV1-39, IGKV1D-16, IGKV1D-17, IGKV1D-43, IGKV1D-8, IGKV2-24, IGKV2-28, IGKV2-29, IGKV2-30, IGKV2-40, IGKV2D-26, IGKV2D-29, IGKV2D-30, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV3D-07, IGKV3D-11, IGKV3D-20, IGKV4-1, IGKV5-2, IGKV6-21, および IGKV6D-41,

によってコードされる約Ｋａｂａｔアミノ酸１～約Ｋａｂａｔアミノ酸８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択される、１つまたは複数のＶＫ＿シャーシアミノ酸配列、
（ｂ）Ｌ３－ＶＫがＩＧＫＶ遺伝子セグメントによってコードされるＶＫＣＤＲ３アミノ酸配列の部分である、１つまたは複数のＬ３－ＶＫアミノ酸配列、
（ｃ）Ｘが任意のアミノ酸残基である、１つまたは複数のＸ残基、および
（ｄ）ＪＫ＊が、ＩＧＫＪ１、ＩＧＫＪ２、ＩＧＫＪ３、ＩＧＫＪ４、およびＩＧＫＪ５によってコードされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各配列の最初のアミノ酸残基が存在しない、１つまたは複数のＪＫ＊アミノ酸配列
をコードするポリヌクレオチド配列を提供するステップと、
（ｉｉ）前記ポリヌクレオチド配列を集めて、下記の式：
［ＶＫ＿シャーシ］－［Ｌ３－ＶＫ］－［Ｘ］－［ＪＫ＊］
によって表される複数のヒトＶＫ配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを作製するステップと
を含む方法に関する。
【００５９】
いくつかの実施形態では、本発明は、複数の抗体軽鎖ＣＤＲ３配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを調製する方法であって、
（ｉ）単一の生殖系列ポリヌクレオチド配列に由来する選択された軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列中の各位置での各アミノ酸残基のパーセント出現率を決定するステップと、

（ｉｉ）複数のヒト抗体軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドを設計するステップであって、設計される軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列内の任意の位置の任意のアミノ酸のパーセント出現率が、（ｉ）において決定される場合、単一の生殖系列ポリヌクレオチド配列に由来する選択された軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列中で少なくとも約３０％のパーセント出現率の範囲内であるステップと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）において設計された１つまたは複数のポリヌクレオチドを合成するステップと
を含む方法に関する。
【００６０】
別の実施形態では、本発明は、複数の抗体Ｖλアミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを調製する方法であって、
（ｉ）（ａ）
【００６１】
【化１７】

IGλV1-36, IGλV1-40, IGλV1-44, IGλV1-47, IGλV1-51, IGλV10-54, IGλV2-11,
IGλV2-14, IGλV2-18, IGλV2-23, IGλV2-8, IGλV3-1, IGλV3-10, IGλV3-12, IGλV3-16,
IGλV3-19, IGλV3-21, IGλV3-25, IGλV3-27, IGλV3-9, IGλV4-3, IGλV4-60, IGλV4-69,
IGλV5-39, IGλV5-45, IGλV6-57, IGλV7-43, IGλV7-46, IGλV8-61, IGλV9-49, および
IGλV10-54,

によってコードされる約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基８８、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列からなる群より選択される、１つまたは複数のＶλ＿シャーシアミノ酸配列、
（ｂ）Ｌ３－ＶλがＩＧλＶ遺伝子セグメントによってコードされるＶλＣＤＲ３アミノ酸配列の部分である、１つまたは複数のＬ３－Ｖλ配列、
（ｃ）Ｊλが、ＩＧλＪ１－０１、ＩＧλＪ２－０１、ＩＧλＪ３－０１、ＩＧλＪ３－０２、ＩＧλＪ６－０１、ＩＧλＪ７－０１、およびＩＧλＪ７－０２によってコードされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であり、各配列の最初のアミノ酸残基が存在していてもよく、または存在していなくてもよい、１つまたは複数のＪλ配列
をコードするポリヌクレオチド配列を提供するステップと、
（ｉｉ）前記ポリヌクレオチド配列を集めて、下記の式：
［Ｖλ＿シャーシ］－［Ｌ３－Ｖλ］－［Ｘ］－［Ｊλ］
によって表される複数のヒトＶλアミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを作製するステップと
を含む方法に関する。
【００６２】
特定の実施形態では、本発明のライブラリーのポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列はヒトである。
【００６３】
本発明はまた、合成ポリヌクレオチドライブラリーを調製する方法であって、本発明のポリヌクレオチド配列を提供し集めるステップを含む方法も対象とする。
【００６４】
別の態様では、本発明は、複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを調製する方法であって、
（ｉ）（ａ）１つまたは複数の、約０～約３アミノ酸のＮ１アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ１配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ１アミノ酸配列、

（ｂ）１つまたは複数のヒトＣＤＲＨ３　ＤＨアミノ酸配列、そのＮおよびＣ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列、
（ｃ）１つまたは複数の、約０～約３アミノ酸のＮ２アミノ酸配列であって、その各アミノ酸が、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３アミノ酸配列のＮ２アミノ酸配列中の対応する位置で最も頻繁に出現する１２種のアミノ酸の１つであるＮ２アミノ酸配列、ならびに
（ｄ）１つまたは複数のヒトＣＤＲＨ３　Ｈ３－ＪＨアミノ酸配列、そのＮ末端切断物、またはそれらのいずれかと少なくとも約８０％の同一性のある配列
をコードするポリヌクレオチド配列を提供するステップと、
（ｉｉ）前記ポリヌクレオチド配列を集めて、下記の式：
［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］
によって表される複数のヒト抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列をコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを作製するステップと
を含む方法を含む。

【００６５】
一態様では、ポリヌクレオチド配列の１つまたは複数はスプリットプール合成を介して合成される。

【００６６】
別の態様では、本発明の方法は、集めた合成ポリヌクレオチドを、重鎖シャーシおよび重鎖定常領域を含むベクターで組み換えて、完全長重鎖を形成するステップをさらに含む。

【００６７】
別の態様では、本発明の方法は、相同組換えを促進する５’ポリヌクレオチド配列および３’ポリヌクレオチド配列を提供するステップをさらに含む。さらに別の態様では、本発明の方法は、前記集めた合成ポリヌクレオチドを、重鎖シャーシおよび重鎖定常領域を含むベクターで組み換えて、完全長重鎖を形成するステップをさらに含む。

【００６８】
いくつかの実施形態では、組み換えるステップは酵母中で行われる。特定の実施形態では、酵母はＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅである。

【００６９】
ある他の実施形態では、本発明は、１つまたは複数の抗体を発現する１つまたは複数の宿主細胞を単離する方法であって、
（ｉ）１つまたは複数の宿主細胞中で請求項４０および４６のいずれか一項に記載のヒト抗体を発現させるステップと、
（ｉｉ）前記宿主細胞を１つまたは複数の抗原と接触させるステップと、
（ｉｉｉ）前記１つまたは複数の抗原と結合する抗体を有する１つまたは複数の宿主細胞を単離するステップと
を含む方法を含む。

【００７０】
別の態様では、本発明の方法は、１つまたは複数の抗原を認識する抗体を提示する１つまたは複数の宿主細胞から１つまたは複数の抗体を単離するステップをさらに含む。さらに別の態様では、本発明の方法は、１つまたは複数の抗原を認識する抗体を提示する１つまたは複数の宿主細胞から１つまたは複数の抗体をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチド配列を単離するステップをさらに含む。

【００７１】
特定の他の実施形態では、本発明は、複数の抗体ＣＤＲＨ３アミノ酸配列、または本明細書に開示されている他の配列のいずれかをコードする合成ポリヌクレオチドのライブラリーを含むキットを含む。

【００７２】
さらに他の態様では、本明細書に記載の合成ポリヌクレオチドのライブラリーによって

コードされるＣＤＲＨ３アミノ酸配列、または本明細書に開示されている他の配列のいずれかは、コンピュータで読み取り可能な形態である。

【図面の簡単な説明】

【００７３】

【図１】ライブラリーの構築のための、断片（例えば、ＣＤＲ３）およびベクター（例えばシャーシおよび定常領域を含む）間の組換えの概略図である。

【図２】Ｊａｃｋｓｏｎら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁、参照によりその全体を組み込む）により集積された、再構成されたヒト抗体配列のＮ１およびＮ２領域の長さの分布を表す図である。

【図３】ＮＣＢＩデータベース（付録Ａ）から集積された、再構成されたヒトκ軽鎖配列のＣＤＲＬ３領域の長さの分布を表す図である。

【図４】ＮＣＢＩデータベース（付録Ｂ）から集積された、再構成されたヒトλ軽鎖配列のＣＤＲＬ３領域の長さの分布を表す図である。

【図５】［ＤＨ］－［Ｎ２］－［ＪＨ］セグメントの連結前後でＣＤＲＨ３領域の合成に使用する４２４のクローニングベクターの略図である。

【図６】ＣＤＲＨ３を用いた組換えの前の、重鎖ベクターの構造略図である。

【図７】重鎖ベクターに組み込まれたＣＤＲＨ３ならびにＣＤＲＨ３のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の略図である。

【図８】ＣＤＲＬ３を用いた組換えの前の、κ軽鎖ベクターの構造略図である。

【図９－１】軽鎖ベクターに組み込まれたＣＤＲＬ３ならびにＣＤＲＬ３のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の略図である。

【図９－２】軽鎖ベクターに組み込まれたＣＤＲＬ３ならびにＣＤＲＬ３のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の略図である。

【図１０】実施例１０に記載のように合成された４２４個のベクターの１０個を用いた形質転換により得られた９６個のコロニー由来のＣＤＲＨ３ドメイン（Ｋａｂａｔの位置９５～１０２）の（観察された）長さの分布を、期待された（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１１】実施例１０に記載のように合成された４２４個のベクターの１０個を用いた形質転換により得られた９６個のコロニー由来のＤＨセグメントの（観察された）長さの分布を、期待された（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１２】実施例１０に記載のように合成された４２４個のベクターの１０個を用いた形質転換により得られた９６個のコロニー由来のＮ２セグメントの（観察された）長さの分布を、期待された（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１３】実施例１０に記載のように合成された４２４個のベクターの１０個を用いた形質転換により得られた９６個のコロニー由来のＨ３－ＪＨセグメントの（観察された）長さの分布を、期待された（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１４】実施例１０．４に要約した方法、つまり重鎖シャーシおよび定常領域を含むベクターおよびＣＤＲＨ３挿入物の同時形質転換に従って形質転換された酵母細胞から調製された、２９１の配列に由来するＣＤＲＨ３ドメインの（観察された）長さの分布を、期待された（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１５】実施例１０．４に要約したプロトコルに従って形質転換された酵母細胞から調製された、２９１の配列に由来する［尾部］－［Ｎ１］領域の（観察された）長さの分布を、期待された（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１６】実施例１０．４に要約したプロトコルに従って形質転換された酵母細胞から調製された、２９１の配列に由来するＤＨ領域の（観察された）長さの分布を、理論的（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１７】実施例１０．４に要約したプロトコルに従って形質転換された酵母細胞から調製された、２９１の配列に由来するＮ２領域の（観察された）長さの分布を、理論的（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。

【図１８】実施例１０．４に要約したプロトコルに従って形質転換された酵母細胞から調

製された、２９１の配列に由来するＨ３－ＪＨ領域の（観察された）長さの分布を、理論的（すなわち設計された）分布と比較して表す図である。
【図１９】２９１の配列において同定されたＪＨセグメントの（観察された）ファミリー起源を、理論的（すなわち設計された）ファミリー起源と比較して表す図である。
【図２０】理論的（すなわち設計された）シャーシの表現と比較した、（観察された）ライブラリーの１６のシャーシの各提示を表す図である。ＶＨ３－２３は２回提示され、１回はＣＡＲで終了し、１回はＣＡＫで終了している。これらの提示を組合せ、１０のＶＨ３－３３の変異体および１つのＶＨ３－３０の変異体もまた組み合わせた。
【図２１】実施例６．２のＶＫＣＤＲ３ライブラリーより選択された８６の配列に由来するＣＤＲＬ３の（観察された）長さを、ヒト配列（ヒト）および設計された配列（設計）と比較して表す図である。
【図２２】ライブラリーより選択された８６の配列の中の軽鎖シャーシの（観察された）提示を、理論的（すなわち設計された）シャーシの提示と比較して表す図である。
【図２３】本発明の例示的ライブラリーにおけるさまざまなＣＤＲＨ３の長さの出現頻度対Ｌｅｅら、（Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁、参照によりその全体を組み込む）の免疫前のレパートリーを表す図である。
【図２４】本発明のライブラリーより選択された６種の抗体に関する結合曲線を表す図である。
【図２５】本発明のライブラリーより選択された、鶏の卵白のリゾチームに結合する１０種の抗体に関する結合曲線を表す図である。
【発明を実施するための形態】
【００７４】
本発明は、少なくとも、合成ポリヌクレオチドライブラリー、本発明のライブラリーを作製および使用する方法、本発明のライブラリーを含むキットおよびコンピュータで読み取り可能な形態を対象とする。本出願において教示されるライブラリーは、少なくとも一部は、集められる構成要素に関して記述される。
【００７５】
特定の実施形態では、本発明は、天然に存在するヒト抗体レパートリーにおける組成およびＣＤＲ長分布に基づいて特に設計された抗体ライブラリーを提供する。抗原刺激が存在しない場合であっても、ヒトは少なくとも約10^7個の異なる抗体分子を生成することが推定される。多くの抗体の抗原結合部位は、さまざまな関連するが異なるエピトープと交差反応することができる。加えて、ヒト抗体レパートリーは、低い親和性ではあるがほとんどすべての潜在的エピトープに適合する抗原結合部位が確実に存在するほど十分に大きい。
【００７６】
哺乳動物免疫系は、染色体上の離れた遺伝子セグメントを転写前に組み合わせて連結することによって、非常に経済的な方法でほとんど無限の数の異なる軽鎖および重鎖を作製することを可能にする独特の遺伝機構を進化させてきた。各種のイムノグロブリン（Ｉｇ）鎖（すなわち、κ軽鎖、λ軽鎖、および重鎖）は、単一のポリペプチド鎖を作製するための、遺伝子セグメントの２つ以上のファミリーより選択されるＤＮＡ配列の組合せ集合によって合成される。特に、重鎖および軽鎖はそれぞれ、可変および定常（Ｃ）領域からなる。重鎖の可変領域は、遺伝子セグメントの３つのファミリー：可変（ＩＧＨＶ）、連結（ＩＧＨＪ）および多様性（ＩＧＨＤ）から集められたＤＮＡ配列によりコードされる。軽鎖の可変領域は、κおよびλ軽鎖のそれぞれにつき遺伝子セグメントの２つのファミリー：可変（ＩＧＬＶ）および連結（ＩＧＬＪ）から集められたＤＮＡ配列によりコードされる。各可変領域（重鎖および軽鎖）はまた、完全長イムノグロブリン鎖を作製するために定常領域とも再結合する。
【００７７】
Ｖ、ＤおよびＪ遺伝子セグメントの組合せ集合は、抗体可変領域多様性に大きく貢献する一方、前Ｂ細胞段階で、これらの遺伝子セグメントの不正確な連結および遺伝子セグメ

ント間の連結部での非鋳型ヌクレオチド導入を介して、さらなる多様性がインビボで導入される。

【００７８】

Ｂ細胞は抗原を認識した後、誘導されて増殖する。増殖の間、Ｂ細胞受容体遺伝子座は、通常の遺伝子突然変異率よりもはるかに大きい、極めて高い率の体細胞突然変異を受ける。出現する突然変異は、Ｉｇ可変領域に主に限局され、置換、挿入および欠失を含む。この体細胞超突然変異は、抗原に対する増強された親和性を有する抗体を発現するＢ細胞の産生を可能にする。このような抗原誘発性体細胞超突然変異は、所与の抗原に対する抗体反応を微調整する。

【００７９】

広範囲な多様性を有する抗体ライブラリーを作製するため、およびさまざまな抗原、特に、自己免疫疾患、癌、および感染症などの疾患に関連する抗原に対する抗体の親和性成熟の自然過程を模倣するために、著しい努力がなされてきた。標的に対して容易にスクリーニングすることができる候補結合分子を含む抗体ライブラリーが望ましい。しかしながら、免疫前ヒト抗体レパートリーを表す抗体ライブラリーの完全な有望性は、依然として把握し難いままである。上記でおよび出願全体にわたって列挙されている欠点に加えて、当技術分野において知られている合成ライブラリーはノイズ（すなわち、非常に大きなライブラリーは、うまく発現しない、および／またはミスフォールドする多くの配列の存在を増加させる）を受けることが多く、一方、当技術分野において知られている完全ヒトライブラリーは、特定の抗原クラス（例えば、自己抗原）に対して偏る可能性がある。さらに、合成および物理的実現技術の限界は、当技術分野の抗体ライブラリーの機能的多様性を制限する。本発明は、ヒト免疫前抗体レパートリー（例えば、組成および長さにおいて）を表す、および、例えば、新しい治療法および／または診断法を得るために、例えば、ハイスループット法を使用して容易にスクリーニングすることができる（すなわち、物理的実現可能であり、場合によってはオーバーサンプリングすることができる）、完全合成抗体ライブラリーを初めて提供する。

【００８０】

特に、本発明の合成抗体ライブラリーは、ヒト起源の自己抗原を含む任意の抗原を認識する潜在能力を有する。自己抗原を認識する能力は通常、自己反応性抗体がドナーの免疫系によって負の選択を介して除去されるため、発現されたヒトライブラリーにおいて失われる。本発明の別の特徴は、例えば、ＦＡＣＳ（蛍光活性化細胞選別装置）による陽性クローン選択を使用して抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより、ハイブリドーマライブラリーの作製および上清のスクリーニングという標準の冗長な方法を回避することである。さらに、ライブラリー、またはそのサブライブラリーは、他の望ましい標的に対するさらなる抗体を発見するために複数回スクリーニングすることができる。

【００８１】

本発明のさらなる説明の前に、特定の用語を定義する。

【００８２】

１．定義

別途定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明に関連する分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の定義は当業者を補助し、本出願において説明される実施形態を対象とする。

【００８３】

用語「抗体」は、最も広い意味で本明細書において使用され、特に、少なくともモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および抗体断片を包含する。抗体は、イムノグロブリン遺伝子またはイムノグロブリン遺伝子断片によって実質的にまたは部分的にコードされる、１つまたは複数のポリペプチドを含むタンパク質である。認識されるイムノグロブリン遺伝子は、κ、λ、α、γ、δ、εおよびμ定常領域遺伝子のほかに、無数のイムノグロブリン可変領域遺伝子もまた含む。

【００８４】
「抗体断片」は、インタクトな抗体の部分、例えば、その抗原結合領域の１つまたは複数の部分を含む。抗体断片の例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦｖ断片、ダイアボディ、直鎖抗体、単鎖抗体、ならびにインタクトな抗体および抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。
【００８５】
「インタクトな抗体」は、完全長重鎖および軽鎖ならびにＦｃ領域を含む抗体である。インタクトな抗体は、「完全長、ヘテロ二量体」抗体またはイムノグロブリンとも称される。
【００８６】
用語「可変」とは、その配列において可変性を示し、特定の抗体の特異性および結合親和性の決定にかかわるイムノグロブリンドメインの部分（すなわち、「可変ドメイン（複数可）」）のことをいう。可変性は、抗体の可変ドメインの全体にわたって均等に分布しているわけではなく、重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれのサブドメイン中に集中している。こうしたサブドメインは、「超可変」領域または「相補性決定領域」（ＣＤＲ）と呼ばれる。可変ドメインのより保存されている（すなわち、非超可変）部分は、「フレームワーク」領域（ＦＲＭ）と呼ばれる。天然に存在する重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、大部分がβ－シート構造をとる４つのＦＲＭ領域を含み、これらはβ－シート構造を連結する、および場合によってはその一部を形成するループを形成する３つの超可変領域によって連結される。各鎖における超可変領域は、別の鎖の超可変領域と一緒にＦＲＭによってごく近接してまとめられ、抗原結合部位の形成に寄与する（その全体が参照により組み込まれる、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．、１９９１年を参照）。定常ドメインは抗原結合に直接関与しないが、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害および補体活性化などのさまざまなエフェクター機能を示す。
【００８７】
本発明の「シャーシ」は、それぞれＣＤＲＨ３またはＣＤＲＬ３の一部ではない抗体重鎖可変（ＩＧＨＶ）または軽鎖可変（ＩＧＬＶ）ドメインの部分を表す。本発明のシャーシは、最初のアミノ酸ＦＲＭ１で始まり最後のアミノ酸ＦＲＭ３で終わる抗体の可変領域の部分と定義される。重鎖の場合、シャーシは、約Ｋａｂａｔ１位から約Ｋａｂａｔ９４位までを含むアミノ酸を含む。軽鎖（κおよびλ）の場合、シャーシは、約Ｋａｂａｔ１位から約Ｋａｂａｔ８８位までを含むと定義される。本発明のシャーシは、本明細書において提示される、または公共データベースにおいて利用可能な、対応する生殖系列可変ドメイン配列と比較して若干の変更を含むことができる。こうした変更は、人工的（例えば、Ｎ結合グリコシル化部位を除去する）であっても、または天然に存在（例えば、対立遺伝子変異に相当する）していてもよい。例えば、イムノグロブリン遺伝子レパートリーが多型である（それぞれその全体が参照により組み込まれる、Ｗａｎｇら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、２００８年、８６巻：１１１頁；Ｃｏｌｌｉｎｓら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００８年、ＤＯＩ １０．１００７／ｓ００２５１－００８－０３２５－ｚ、オンライン版）ことが当技術分野において知られており、これらの対立遺伝子変異体を表すシャーシ、ＣＤＲ（例えば、ＣＤＲＨ３）および定常領域もまた、本発明に包含される。いくつかの実施形態では、本発明の特定の実施形態では使用される対立遺伝子変異体（複数可）は、例えば、異なる患者集団において非免疫原性である抗体を同定するために、これらの患者集団において存在する対立遺伝子変異に基づいて選択することができる。特定の実施形態では、本発明の抗体の免疫原性は、患者集団の主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）遺伝子における対立遺伝子変異に依存していてもよい。このような対立遺伝子変異はまた、本発明のライブラリーの設計において考慮されてもよい。本発明の特定の実施形態では、シャーシおよび定常領域がベクター上に含まれ、ＣＤＲ３領域はそ

れらの間に相同組み換えによって導入される。

【００８８】

いくつかの実施形態では、１つ、２つまたは３つのヌクレオチドが重鎖シャーシの後に続いて、部分的（１つまたは２つの場合）または完全な（３つの場合）コドンのいずれかを形成することができる。完全なコドンが存在する場合、これらのヌクレオチドは、「尾部」と称されるアミノ酸残基をコードし、９５位を占める。

【００８９】

本明細書において使用される場合、「ＣＤＲＨ３番号付けシステム」は、ＣＤＲＨ３の最初のアミノ酸をＫａｂａｔ９５位（存在する場合、「尾部」）およびＣＤＲＨ３の最後のアミノ酸を１０２位と定義する。「尾部」の後に続くアミノ酸は、「Ｎ１」と呼ばれ、存在する場合、９６、９６Ａ、９６Ｂなどの番号を割り当てられる。Ｎ１セグメントの後には「ＤＨ」セグメントが続き、９７、９７Ａ、９７Ｂ、９７Ｃなどの番号を割り当てられる。ＤＨセグメントの後には「Ｎ２」セグメントが続き、存在する場合、９８、９８Ａ、９８Ｂなどの番号を割り当てられる。最終的に、「Ｈ３～ＪＨ」セグメントの組の最もＣ末端のアミノ酸残基は番号１０２と称される。その直前（Ｎ末端側）の残基は、存在する場合、１０１であり、前の残基（存在する場合）は１００である。便宜のため、および他の部分で明らかになるはずであるが、Ｈ３～ＪＨアミノ酸の残りの部分は、１００のちょうどＮ末端側のアミノ酸の９９で始まり、９９のＮ末端側の残基を９９Ａ、および９９Ｂ、９９Ｃなどについて以下同様に、逆の順序で番号付けされる。したがって、特定のＣＤＲＨ３配列残基番号の例は、以下を含み得る：

【００９０】

【化１８】

N1およびN2を有する13アミノ酸CDR-H3

```
(95)(96)(96A)(97)(97A)(97B)(97C)(97D)  (98)  (99)(100)(101)(102)
|---|--------|-----------------------|----|------------------|
 尾部    N1                DH              N2         H3-JH
```

N1およびN2を有さない10アミノ酸CDR-H3

```
(97)(97A)(97B)(97C)(97D)(97E)(97F)(97G)(101)(102)
|--------------------------------------|---------|
                        DH                   H3-JH
```

本明細書において使用される場合、用語「多様性」は、多様さまたは顕著な不均一性のことをいう。用語「配列多様性」は、例えば、天然ヒト抗体において認められる配列などの配列のいくつかの可能性を集合的に表すさまざまな配列のことをいう。例えば、重鎖ＣＤＲ３（ＣＤＲＨ３）配列多様性は、既知のヒトＤＨならびにＮ１およびＮ２領域を含むＨ３－ＪＨセグメントを組み合わせて重鎖ＣＤＲ３配列を形成するさまざまな可能性のことを指し得る。軽鎖ＣＤＲ３（ＣＤＲＬ３）配列多様性は、ＣＤＲＬ３に寄与している天然に存在する軽鎖可変領域（すなわち、Ｌ３－ＶＬ）および連結（すなわち、Ｌ３－ＪＬ）セグメントを組み合わせて軽鎖ＣＤＲ３配列を形成するさまざまな可能性のことを指し得る。本明細書において使用される場合、Ｈ３－ＪＨは、ＣＤＲＨ３に寄与しているＩＧＨＪ遺伝子の部分のことをいう。本明細書において使用される場合、Ｌ３－ＶＬおよびＬ３－ＪＬは、それぞれＣＤＲＬ３に寄与しているＩＧＬＶおよびＩＧＬＪ遺伝子（κまたはλ）の部分のことをいう。

【００９１】

本明細書において使用される場合、用語「発現」は、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾および分泌を含むがこれらに限定されない、ポリペプチド産生に関与する任意の段階を含む。

【００９２】
本明細書において使用される場合、用語「宿主細胞」は、本発明のポリヌクレオチドが導入される細胞のことを指すことを意図する。このような用語は特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫または潜在的子孫も指すことが理解されるべきである。突然変異または環境の影響により後世において若干の変更が起こる可能性があるため、このような子孫は実際には親細胞と同一ではないことがあるが、本明細書において使用される用語の範囲内にやはり含まれる。
【００９３】
用語「長さの多様性」は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の長さの多様さのことをいう。例えば、天然に存在するヒト抗体において、重鎖ＣＤＲ３配列は長さが、例えば、約３アミノ酸から約３５アミノ酸超まで異なり、軽鎖ＣＤＲ３配列は長さが、例えば、約５から約１６アミノ酸まで異なる。本発明より前に、配列多様性または長さの多様性を含む抗体ライブラリーを設計することが可能である（例えば、それぞれその全体が参照により組み込まれる、Ｈｏｅｔら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、２００５年、２３巻：３４４頁；Ｋｒｅｔｚｓｃｈｍａｒおよびｖｏｎ　Ｒｕｄｅｎ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、２００２年、１３巻：５９８頁；およびＲａｕｃｈｅｎｂｅｒｇｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２００３年、２７８巻：３８１９４頁を参照）ことが当技術分野において知られていたが、本発明は、少なくとも、天然に存在するヒト抗体の配列多様性および長さの多様性を含む合成抗体ライブラリーの設計を対象とする。いくつかの事例において、配列および長さの多様性を含む合成ライブラリーが合成されているが、これらのライブラリーは、設計されたレパートリー全体を合成するには大き過ぎる理論的多様性、および／またはライブラリー全体を物理的に実現またはオーバーサンプリングするには多過ぎる理論的メンバーを含む。
【００９４】
本明細書において使用される場合、「定方向の多様性」を考慮して設計される配列は、配列多様性および長さの多様性の両方を含むように特に設計されている。定方向の多様性は確率論的ではない。
【００９５】
本明細書において使用される場合、「確率論的」は、確率分布の１つの要素のサンプルとみなされる、無作為に決定されるアミノ酸配列を作製するプロセスを表す。
【００９６】
用語「ポリヌクレオチドのライブラリー」は、本明細書に記載の多様性を有する、特に、本発明の方法に従って設計される、２つ以上のポリヌクレオチドのことを指す。用語「ポリペプチドのライブラリー」は、本明細書に記載の多様性を有する、特に、本発明の方法に従って設計される、２つ以上のポリペプチドのことを指す。用語「合成ポリヌクレオチドのライブラリー」は、合成ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリーのことを指す。用語「ベクターのライブラリー」は本明細書において、少なくとも２つの異なるベクターのライブラリーのことを指す。本明細書において使用される場合、用語「ヒト抗体ライブラリー」は、天然に存在するヒト抗体の配列多様性および長さの多様性を示すように設計された、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドライブラリーを少なくとも含む。
【００９７】
明細書全体にわたって記載されるように、用語「ライブラリー」は本明細書において、その最も広い意味で使用され、また、本発明のライブラリーを作製するために組み合わせてもよく、または組み合わせなくてもよいサブライブラリーも含み得る。
【００９８】
本明細書において使用される場合、用語「合成ポリヌクレオチド」は、天然起源の分子とは対照的に化学プロセスによって形成される分子、または天然起源の分子の鋳型に基づく増幅を介して得られる分子のことを指す（例えば、ＰＣＲ増幅を介してＢ細胞集団からクローニングされたイムノグロブリン鎖は、本明細書において使用される「合成」ではな

い）。場合によっては、例えば、複数の構成要素（例えば、Ｎ１、ＤＨ、Ｎ２、および／またはＨ３－ＪＨ）を含む本発明のライブラリーについて言及する場合、本発明は、前述の構成要素の少なくとも１つが合成であるライブラリーを包含する。例示のために、特定の構成要素が合成であるが、別の構成要素が天然起源である、または天然起源の分子の鋳型に基づく増幅を介して得られるライブラリーは、本発明に包含されることになる。

【００９９】

用語「スプリットプール合成」は、複数の第１反応の産物が混合（プール）され、次いで複数の第２反応に加わる前に分離（分割）される手順のことを指す。実施例９は、それぞれ別個の反応における２７８個のＤＨセグメント（産物）の合成を記述する。合成後、これらの２７８個のセグメントは混合（プール）され、次いでＮ２セグメント合成のために１４１個のカラムに分配（分割）される。これにより、２７８個のＤＨセグメントのそれぞれを１４１個のＮ２セグメントのそれぞれと対にすることができる。本明細書の他の部分に記載の通り、これらの数は限定するものではない。

【０１００】

「免疫前」抗体ライブラリーは、天然に存在するヒト抗体配列が負の選択または体細胞超突然変異を受ける前の、これらの配列に類似した配列多様性および長さの多様性を有する。例えば、Ｌｅｅら（その全体が参照により組み込まれる、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁）において記述されている配列の組は、免疫前のレパートリーの配列を表すと考えられている。本発明の特定の実施形態では、本発明の配列は、これらの配列と類似している（例えば、組成および長さに関して）はずである。本発明の特定の実施形態では、このような抗体ライブラリーは、化学合成および物理的実現を行うために十分小さいが、任意の抗原を認識する潜在能力を有する抗体をコードするために十分な大きさであるように設計される。本発明の一実施形態では、抗体ライブラリーは、約10^7～約10^{20}個の異なる抗体および／またはライブラリーの抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーは、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}、10^{19}、または10^{20}個の異なる抗体および／または抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含むように設計される。特定の実施形態では、本発明のライブラリーは、約10^3～約10^5、約10^5～約10^7、約10^7～約10^9、約10^9～約10^{11}、約10^{11}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{15}、約10^{15}～約10^{17}、または約10^{17}～約10^{20}個の異なる抗体を含む、またはコードすることができる。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーの多様性は、上記で列挙された多様性の１つまたは複数より大きいまたは未満、例えば、約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}、10^{19}、または10^{20}個より大きい、または約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}、10^{19}、または10^{20}個未満であると特徴付けることができる。本発明の別の特定の実施形態では、上記で列挙された大きさを有するライブラリーの物理的実現物において存在している対象の抗体の確率は、少なくとも約０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．５％、または９９．９％である（ライブラリーの物理的実現物において存在している特定の配列の確率に関するさらなる情報については、発明を実施するための形態の中のライブラリーサンプリングを参照）。本発明の抗体ライブラリーはまた、例えば、自己（すなわち、ヒト）抗原を対象とする抗体も含むことができる。本発明の抗体は、自己反応性抗体がドナーの免疫系によって負の選択を介して除去されるという理由を含む理由により、発現されたヒトライブラリーにおいて存在しない可能性がある。しかしながら、新規な重鎖／軽鎖対形成は、場合によって自己反応性抗体特異性を生じることがある（その全体が参照により組み込まれる、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓらの米国特許第５，８８５，７９３号参照）

。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーにおける独特の重鎖の数は、約１０、５０、10^2、１５０、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}、10^{19}、10^{20}個以上であってもよい。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーにおける独特の軽鎖の数は、約５、１０、２５、５０、10^2、１５０、５００、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}、10^{19}、10^{20}個以上であってもよい。

【０１０１】

本明細書において使用される場合、用語「ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリー」は、天然に存在するヒト抗体の配列多様性および長さの多様性を示すように設計される、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドライブラリーを少なくとも含む。「免疫前」ＣＤＲＨ３ライブラリーは、天然に存在するヒト抗体ＣＤＲＨ３配列が負の選択および体細胞超突然変異を受ける前の、これらの配列と類似した配列多様性および長さの多様性を有する。既知のヒトＣＤＲＨ３配列は、それぞれその全体が参照により組み込まれる、Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁；Ｍａｒｔｉｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、１９９６年、２５巻：１３０頁；およびＬｅｅら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁を含むさまざまなデータセットにおいて提示されている。本発明の特定の実施形態では、このようなＣＤＲＨ３ライブラリーは、化学合成および物理的実現を行うために十分小さいが、任意の抗原を認識する潜在能力を有するＣＤＲＨ３をコードするために十分な大きさであるように設計される。本発明の一実施形態では、抗体ライブラリーは、約10^6～約10^{15}個の異なるＣＤＲＨ３配列および／または前記ＣＤＲＨ３配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーは、約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、または10^{16}個の、異なるＣＤＲＨ３配列および／または前記ＣＤＲＨ３配列をコードするポリヌクレオチド配列を含むように設計される。いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーは、約10^3～約10^6、約10^6～約10^8、約10^8～約10^{10}、約10^{10}～約10^{12}、約10^{12}～約10^{14}、または約10^{14}～約10^{16}個の異なるＣＤＲＨ３配列を含む、またはコードすることができる。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーの多様性は、上記で列挙された多様性の１つまたは複数より大きいまたは未満、例えば、約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、または10^{16}個より大きい、または約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、または10^{16}個未満であると特徴付けることができる。本発明の特定の実施形態では、上記で列挙された大きさを有するライブラリーの物理的実現物において存在している対象のＣＤＲＨ３の確率は、少なくとも約０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．５％、または９９．９％である（ライブラリーの物理的実現物において存在している特定の配列の確率に関するさらなる情報については、発明を実施するための形態におけるライブラリーサンプリングを参照）。本発明の免疫前ＣＤＲＨ３ライブラリーはまた、例えば、自己（すなわち、ヒト）抗原を対象とするＣＤＲＨ３も含むことができる。このようなＣＤＲＨ３は、自己反応性ＣＤＲＨ３がドナーの免疫系によって負の選択を介して除去されるため、発現されたヒトライブラリーにおいて存在しない可能性がある。

【０１０２】

「ＶＫＣＤＲ３」配列および「ＶλＣＤＲ３」配列を含む本発明のライブラリーは、ＣＤＲＬ３配列のκおよびλサブセットのことをそれぞれ指す。これらのライブラリーは、ヒト抗体ＣＤＲＬ３レパートリーの長さおよび配列の多様性を集合的に表すように、定方

向の多様性を考慮して設計することができる。これらのライブラリーの「免疫前」バージョンは、天然に存在するヒト抗体ＣＤＲＬ３配列が負の選択を受ける前の、これらの配列と類似した配列多様性および長さの多様性を有する。既知のヒトＣＤＲＬ３配列は、ＮＣＢＩデータベース（軽鎖配列データセットに関しては付録Ａおよび付録Ｂを参照）およびその全体が参照により組み込まれる、Ｍａｒｔｉｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、１９９６年、２５巻：１３０頁を含むさまざまなデータセットにおいて提示されている。本発明の特定の実施形態では、このようなＣＤＲＬ３ライブラリーは、化学合成および物理的実現を行うために十分小さいが、任意の抗原を認識する潜在能力を有するＣＤＲＬ３をコードするために十分な大きさであるように設計される。

【０１０３】

本発明の一実施形態では、抗体ライブラリーは、約10^5個の異なるＣＤＲＬ３配列および／または前記ＣＤＲＬ３配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーは、約10^1、10^2、10^3、10^4、10^6、10^7、または10^8個の異なるＣＤＲＬ３配列および／または前記ＣＤＲＬ３配列をコードするポリヌクレオチド配列を含むように設計される。いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーは、約10^1～約10^3、約10^3～約10^5、または約10^5～約10^8個の異なるＣＤＲＬ３配列を含む、またはコードすることができる。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーの多様性は、上記で列挙された多様性の１つまたは複数より大きいまたは未満、例えば、約10^1、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、または10^8個より大きい、または約10^1、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、または10^8個未満であると特徴付けることができる。本発明の特定の実施形態では、上記で列挙された大きさを有するライブラリーの物理的実現物において存在している対象のＣＤＲＬ３の確率は、少なくとも０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．５％、または９９．９％である（ライブラリーの物理的実現物において存在している特定の配列の確率に関するさらなる情報については、発明を実施するための形態におけるライブラリーサンプリングを参照）。本発明の免疫前ＣＤＲＬ３ライブラリーはまた、例えば、自己（すなわち、ヒト）抗原を対象とするＣＤＲＬ３も含むことができる。このようなＣＤＲＬ３は、自己反応性ＣＤＲＬ３がドナーの免疫系によって負の選択を介して除去されるため、発現されたヒトライブラリーにおいて存在しない可能性がある。

【０１０４】

本明細書において使用される場合、用語「既知の重鎖ＣＤＲ３配列」は、ヒトＢ細胞集団からクローニングされたパブリックドメインにある重鎖ＣＤＲ３配列のことを指す。このような配列の例は、例えば、それぞれその全体が参照により組み込まれる、Ｚｅｍｌｉｎら、ＪＭＢ、２００３年、３３４巻：７３３頁；Ｌｅｅら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁；およびＪａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁を含む公開データセットから公開されている、または得られるものである。

【０１０５】

本明細書において使用される場合、用語「既知の軽鎖ＣＤＲ３配列」は、ヒトＢ細胞集団からクローニングされたパブリックドメインにある軽鎖ＣＤＲ３配列（例えば、κまたはλ）のことを指す。このような配列の例は、例えば、ＮＣＢＩデータベース（本明細書に添付して提出された付録ＡおよびＢを参照）を含む公開データセットから公開されている、または得られるものである。

【０１０６】

本明細書において使用される場合、用語「抗体結合領域」は、抗原（複数可）に結合することができるイムノグロブリンまたは抗体可変領域の１つまたは複数の部分のことをいう。典型的には、抗体結合領域は、例えば、抗体軽鎖（または可変領域またはその１つもしくは複数のＣＤＲ）、抗体重鎖（または可変領域またはその１つもしくは複数のＣＤＲ

）、重鎖Ｆｄ領域、結合した抗体軽鎖および重鎖（またはその可変領域）、例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、単一ドメイン、もしくは単鎖抗体（ｓｃＦｖ）など、または抗原を認識する完全長抗体、例えば、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブタイプ）、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ、もしくはＩｇＭ抗体の任意の領域である。

【０１０７】

用語「フレームワーク領域」は、より異なる（すなわち、超可変）ＣＤＲの間に存在する、当技術分野において認識されている抗体可変領域の部分のことを指す。このようなフレームワーク領域は、典型的にはフレームワーク１から４（ＦＲＭ１、ＦＲＭ２、ＦＲＭ３、およびＦＲＭ４）と称され、３次元空間において６個（３個は重鎖および３個は軽鎖）のＣＤＲを提示するための足場を提供し、抗原結合表面を形成する。

【０１０８】

用語「基準構造」は、抗原結合（ＣＤＲ）ループがとっている主鎖の高次構造のことを指す。比較構造研究から、６個のうち５個の抗原結合ループが、利用可能な高次構造の限られたレパートリーしか有さないことが明らかになった。各基準構造は、ポリペプチド骨格のねじれ角によって特徴付けることができる。したがって、ループの大部分における高度なアミノ酸配列可変性にもかかわらず、抗体間の対応するループは非常に類似した３次元構造を有する可能性がある（それぞれその全体が参照により組み込まれる、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９８７年、１９６巻：９０１頁；Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｎａｔｕｒｅ、１９８９年、３４２巻：８７７頁；ＭａｒｔｉｎおよびＴｈｏｒｎｔｏｎ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９６年、２６３巻：８００頁）。さらに、採用されているループ構造とその周囲のアミノ酸配列の間には関係がある。特定の基準クラスの高次構造は、ループの長さおよびループ内だけでなく保存されているフレームワーク（すなわち、ループの外）の重要な位置に存在しているアミノ酸残基によって決定される。したがって、特定の基準クラスへの割り当ては、これらの重要なアミノ酸残基の存在に基づいて行うことができる。用語「基準構造」はまた、例えば、Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、１９９２年）によって列記されているように、抗体の直鎖状配列に関する考察も含むことができる。Ｋａｂａｔ番号付けスキームは、矛盾のないように抗体可変ドメインのアミノ酸残基を番号付けするための、広く採用されている基準である。さらなる構造的考察もまた、抗体の基準構造を決定するために使用することができる。例えば、Ｋａｂａｔ番号付けによって完全に反映されない差異は、Ｃｈｏｔｈｉａらの番号付けシステムによって記述する、および／または別の技術、例えば、結晶学および２または３次元コンピュータモデリングによって明らかにすることができる。したがって、所与の抗体配列は、とりわけ、適切なシャーシ配列を同定することを可能にする基準クラスに入れることができる（例えば、ライブラリー中にさまざまな基準構造を含みたいという要望に基づいて）。Ｃｈｏｔｈｉａらにより記述されている抗体アミノ酸配列のＫａｂａｔ番号付けおよび構造的考察、ならびに抗体構造の基準態様の解釈に関する示唆は、文献中に記述されている。

【０１０９】

用語「ＣＤＲ」、およびその複数形「複数のＣＤＲ（ＣＤＲｓ）」は、そのうちの３つ（ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２およびＣＤＲＬ３）が軽鎖可変領域の結合特性を決定し、３つ（ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２およびＣＤＲＨ３）が重鎖可変領域の結合特性を決定する、相補性決定領域（ＣＤＲ）のことを指す。ＣＤＲは抗体分子の機能活性に寄与し、足場またはフレームワーク領域を含むアミノ酸配列によって分離されている。正確な定義のＣＤＲ境界および長さは、異なる分類および番号付けシステムによって変わる。したがってＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａによって接触面、または本明細書に記載の番号付けシステムを含む任意の別の境界の定義のことを指すことがある。境界が異なるにもかかわらず、これらのシステムはそれぞれ、可変領域内のいわゆる「超可変領域」を構成している

ものの中にある程度のオーバーラップを有する。したがって、これらのシステムによるＣＤＲの定義は、隣接するフレームワーク領域に対して長さおよび境界部分が異なっている可能性がある。例えば、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、および／またはＭａｃＣａｌｌｕｍら（それぞれその全体が参照により組み込まれる、Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、１９９２年；Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９８７年、１９６巻：９０１頁；およびＭａｃＣａｌｌｕｍら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９６年、２６２巻：７３２頁）を参照されたい。

【０１１０】

用語「アミノ酸」または「アミノ酸残基」は、必要に応じて修飾、合成、または希少アミノ酸が使用されることもあるが、典型的には、アラニン（ＡｌａまたはＡ）；アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）；アスパラギン（ＡｓｎまたはＮ）；アスパラギン酸（ＡｓｐまたはＤ）；システイン（ＣｙｓまたはＣ）；グルタミン（ＧｌｎまたはＱ）；グルタミン酸（ＧｌｕまたはＥ）；グリシン（ＧｌｙまたはＧ）；ヒスチジン（ＨｉｓまたはＨ）；イソロイシン（ＩｌｅまたはＩ）；ロイシン（ＬｅｕまたはＬ）；リシン（ＬｙｓまたはＫ）；メチオニン（ＭｅｔまたはＭ）；フェニルアラニン（ＰｈｅまたはＦ）；プロリン（ＰｒｏまたはＰ）；セリン（ＳｅｒまたはＳ）；トレオニン（ＴｈｒまたはＴ）；トリプトファン（ＴｒｐまたはＷ）；チロシン（ＴｙｒまたはＹ）；およびバリン（ＶａｌまたはＶ）からなる群より選択されるアミノ酸など、当技術分野において認識されている定義を有するアミノ酸のことをいう。一般に、アミノ酸は、非極性側鎖（例えば、Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｖａｌ）；負に荷電している側鎖（例えば、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）；正に荷電している側鎖（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）を有するものにグループ分けすることができる。

【０１１１】

用語「ポリヌクレオチド（複数可）」は、ＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子およびそれらの類似体（例えば、ヌクレオチド類似体を使用して、または核酸化学を使用して作製されたＤＮＡまたはＲＮＡ）などの核酸のことをいう。必要に応じて、ポリヌクレオチドは合成によって、例えば、当技術分野において認識されている核酸化学を使用して、または酵素的に、例えば、ポリメラーゼを使用して、作製されてもよく、所望の場合は修飾されてもよい。典型的な修飾は、メチル化、ビオチン化、および他の当技術分野で既知の修飾を含む。加えて、核酸分子は一本鎖または二本鎖とすることができ、所望の場合は検出可能な部分に連結することができる。

【０１１２】

用語「理論的多様性」、「理論的全多様性」、または「理論的レパートリー」は、ライブラリー設計における変異体の最大数のことをいう。例えば、３残基のアミノ酸配列を仮定すると、残基１および３はそれぞれ５アミノ酸タイプのうちの任意の１つであってもよく、残基２は２０アミノ酸タイプのうちの任意の１つであってもよく、理論的多様性は５×２０×５＝５００個の考えられる配列となる。同様に、配列Ｘが４個のアミノ酸セグメントの組合せによって構築される場合、セグメント１は１００個の考えられる配列を有し、セグメント２は７５個の考えられる配列を有し、セグメント３は２５０個の考えられる配列を有し、およびセグメント４は３０個の考えられる配列を有し、断片Ｘの理論的全多様性は１００×７５×２００×３０、または５．６×10^5個の考えられる配列となるはずである。

【０１１３】

用語「物理的実現」は、例えば、任意のディスプレイ方法によって、実際に物理的にサンプリングすることができる理論的多様性の部分のことをいう。例示的なディスプレイ方法は、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、および酵母ディスプレイを含む

。合成配列について、ライブラリーの物理的実現物の大きさは（１）実際に合成することができる理論的多様性の割合、および（２）特定のスクリーニング方法の制限、に依存する。例示的なスクリーニング方法の制限は、特定のアッセイ（例えば、リボソームディスプレイ、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ）においてスクリーニング可能な変異体の数およびスクリーニングアッセイにおいて使用される宿主細胞（例えば、酵母、哺乳動物細胞、細菌）の形質転換効率を含む。例示を目的として、10^{12}個のメンバーの理論的多様性を有するライブラリーを仮定すると、最大で10^{11}個のメンバーを含むことができるライブラリー（例えば、酵母、細菌細胞、リボソームディスプレイにおいて；詳細は以下に記載）の例示的な物理的実現物は、したがって、ライブラリーの理論的多様性の約１０％をサンプリングすることになる。しかしながら、10^{12}個の理論的多様性を有するライブラリーの10^{11}個未満のメンバーが合成され、ライブラリーの物理的実現物が最大で10^{11}個のメンバーを含むことができる場合、ライブラリーの理論的多様性の約１０％未満がライブラリーの物理的実現物においてサンプリングされる。同様に、最大で10^{12}個を超えるメンバーを含むことができるライブラリーの物理的実現物は、理論的多様性を「オーバーサンプリングする」ことになり、（10^{12}個の理論的多様性全体が合成されるとすれば）それぞれのメンバーが１回より多く存在する可能性があることを意味する。

【０１１４】

用語「すべての考えられる読み枠」は、少なくとも３つの順方向読み枠および、いくつかの実施形態では、３つの逆方向読み枠を包含する。

【０１１５】

用語「対象とする抗体」は、本発明のライブラリーから単離される、対象とする性質を有する任意の抗体のことを指す。対象とする性質は、これらに限定されるものではないが、特定の抗原またはエピトープに結合すること、２つの分子間の結合相互作用を妨害すること、または特定の生物学的作用を誘発することを含んでもよい。

【０１１６】

用語「機能的に発現される」は、ヒトＢ細胞によって発現され、未成熟終止コドンを含まないイムノグロブリン遺伝子のことをいう。

【０１１７】

用語「完全長重鎖」は、４つのフレームワーク領域、３つのＣＤＲ、および定常領域を含む、イムノグロブリン重鎖のそれぞれの基準構造ドメインを含むイムノグロブリン重鎖のことを指す。用語「完全長軽鎖」は、４つのフレームワーク領域、３つのＣＤＲ、および定常領域を含む、イムノグロブリン軽鎖のそれぞれの基準構造ドメインを含むイムノグロブリン軽鎖のことを指す。

【０１１８】

本明細書において使用される場合、用語「独特の」は、設計される理論的多様性の中ですべての他の配列と異なる（例えば、異なる化学構造を有する）配列のことを指す。特定の物理的実現物において、理論的多様性の多くの独特の配列の複数のコピーが存在する可能性があることが理解されるべきである。例えば、３個の独特の配列を含むライブラリーは、各配列がライブラリーにおいて３回出現する場合には計９個のメンバーを含む可能性がある。しかしながら、特定の実施形態では、それぞれの独特の配列は１回のみ出現することがある。

【０１１９】

用語「異種部分」は本明細書において、通常は抗体の一部ではない組成物の抗体への付加を示すために使用される。例示的な異種部分は、薬剤、毒素、造影剤、および抗体自体には本来備わっていない活性をもたらす可能性のある任意の他の組成物を含む。

【０１２０】

本明細書において使用される場合、用語「各位置での各アミノ酸残基のパーセント出現率」は、サンプルにおいて特定の配列内の規定の位置にアミノ酸が認められる事例のパーセンテージのことを指す。例えば、以下の３つの配列を仮定すると：

ＫＶＲ
ＫＹＰ
ＫＲＰ、
Ｋは事例の１００％において１位に出現し、Ｐは事例の約６７％において３位に出現する。本発明の特定の実施形態では、比較のために選択された配列はヒトイムノグロブリン配列である。

【０１２１】

本明細書において使用される場合、ポリペプチド集団における配列の特定の位置で「最も頻繁に出現するアミノ酸」という用語は、示されたポリペプチド集団中の示された位置で最も高いパーセント出現率を有するアミノ酸残基のことを指す。例えば、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３配列のＮ１配列中の最もＮ末端側の３つの各位置において、最も頻繁に出現するアミノ酸を表２１に列挙し、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるＣＤＲＨ３配列のＮ２配列中の最もＮ末端側の３つの各位置において、最も頻繁に出現するアミノ酸を表２２に列挙する。

【０１２２】

本発明のライブラリーおよび別のライブラリーの、特定のデュプレットの出現（実施例１３）および情報量（実施例１４）を解析するという目的で、ＣＤＲＨ３の「中心ループ」を定義する。Ｋａｂａｔ　ＣＤＲＨ３（９５～１０２）からＣ末端の５アミノ酸が除去されると、残りの配列が「中心ループ」と呼ばれる。したがって、実施例１３のデュプレット出現予測を考慮すると、６個以下の大きさのＣＤＲＨ３を使用することはデュプレットの出現の解析に寄与しないであろう。７個の大きさのＣＤＲＨ３は、ｉ－ｉ＋１データセットにのみ寄与するはずであり、８個の大きさのＣＤＲＨ３はまた、ｉ－ｉ＋２データセットに寄与するはずであり、および９個以上の大きさのＣＤＲＨ３はまた、ｉ－ｉ＋３データセットに寄与するはずである。例えば、９個の大きさのＣＤＲＨ３は、９５－９６－９７－９８－９９－１００－１００Ａ－１０１－１０２位にアミノ酸を有してもよいが、最初の４残基（太字）のみが中心ループの一部となり、ペアワイズの出現（デュプレット）統計データに寄与するはずである。さらなる例として、１４個の大きさのＣＤＲＨ３は配列：９５－９６－９７－９８－９９－１００－１００Ａ－１００Ｂ－１００Ｃ－１００Ｄ－１００Ｅ－１００Ｆ－１０１－１０２を有することができる。ここでは、最初の９残基（太字）のみが中心ループに寄与する。

【０１２３】

ライブラリースクリーニングは、遺伝子型－表現型連鎖を必要とする。用語「遺伝子型－表現型連関」は、当技術分野において認識されている意味と一致する形で使用され、特定の表現型（例えば、抗原への結合）を有するタンパク質をコードする核酸（遺伝子型）がライブラリーから単離可能であるということを指す。例示のために、ファージの表面上で発現される抗体断片は、抗原に対する結合に基づいて単離することができる（例えば、Ｌａｄｎｅｒら）。抗原に対する抗体の結合は同時に、抗体断片をコードする核酸を含むファージの単離を可能にする。したがって、表現型（抗体断片の抗原結合特性）は、遺伝子型（抗体断片をコードする核酸）に「連関」している。遺伝子型－表現型連関を維持する別の方法は、Ｗｉｔｔｒｕｐら（それぞれその全体が参照により組み込まれる、米国特許第６，３００，０６５号、同第６，３３１，３９１号、同第６，４２３，５３８号、同第６，６９６，２５１号、同第６，６９９，６５８号、および米国特許出願公開番号２００４０１４６９７６）、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ（その全体が参照により組み込まれる、米国特許第７，１６６，４２３号）、Ｆａｎｄｌ（それぞれその全体が参照により組み込まれる、米国特許第６，９１９，１８３号、米国特許出願公開番号２００６０２３４３１１）、Ｃｌａｕｓｅｌｌ－Ｔｏｒｍｏｓら（その全体が参照により組み込まれる、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．、２００８年、１５巻：４２７頁）、Ｌｏｖｅら（その全体が参照により組み込まれる、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、２００６年、２４巻：７０３頁）、およびＫｅｌｌｙら（その全体が参照により組み込まれる、Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．、２００７年、１４巻：１７７３頁）の方法を含む。両者の間の連関を保持しながら両者をともに回

収することができるように、抗体をコードする遺伝子を有する抗体タンパク質を限局させる任意の方法が適している。

【０１２４】

２．ライブラリーの設計

本発明の抗体ライブラリーは、ヒト免疫系によって天然に生成される免疫前のレパートリーの特定の態様を反映するように設計される。本発明の特定のライブラリーは、ヒトＶ、ＤおよびＪ遺伝子のコレクション、ならびにヒト重鎖および軽鎖配列の他の大きなデータベースから知られる、合理的な設計に基づいている（例えば、公知の生殖系列配列；参照によりその全体が組み込まれるＪａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁からの配列；参照によりその全体が組み込まれるＬｅｅら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁からの配列；および、再構成されたＶＫおよびＶλのために編集された配列－本明細書とともに出願した付録ＡおよびＢを参照）。追加の情報が、例えば、それぞれ参照によりその全体が組み込まれる、Ｓｃａｖｉｎｅｒら、Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．、１９９９年、１６巻：２３４頁；Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９２年、２２７巻：７９９頁；およびＭａｔｓｕｄａら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１９９８年、１８８巻：２１５１頁で見られる。本発明の特定の実施形態では、ヒトレパートリーで見られる可能なＶ、ＤおよびＪ多様性、ならびに接合部多様性（すなわち、Ｎ１およびＮ２）を表すカセットが、一本鎖または二本鎖のＤＮＡオリゴヌクレオチドとして新規に合成される。本発明の特定の実施形態では、ＣＤＲ配列をコードするオリゴヌクレオチドカセットが、重鎖または軽鎖シャーシ配列を含む１つまたは複数の受容体ベクターとともに、酵母に導入される。哺乳動物のｃＤＮＡまたはｍＲＮＡからのプライマーベースのＰＣＲ増幅および鋳型指定クローニング段階は、使用されない。標準の相同組換えを通して、レシピエント酵母はカセット（例えば、ＣＤＲ３）をシャーシ配列（複数可）および定常部を含む受容体ベクター（複数可）で組み換えて、遺伝的に増殖させ、発現させ、提示しスクリーニングすることができる、正しい順序で合成された、完全長ヒト重鎖および／または軽鎖イムノグロブリンライブラリーを生成する。当業者は、受容体ベクターに含まれるシャーシを、完全長ヒト重鎖および／または軽鎖以外の構築物を生成するように設計することができることを容易に認識するであろう。例えば、本発明の特定の実施形態では、抗体断片またはそのサブユニットをコードする配列が、ＣＤＲを含むオリゴヌクレオチドカセットが受容体ベクターで組み換えられるときに生成されるように、抗体断片または抗体断片のサブユニットをコードするポリペプチドの部分をコードするように、シャーシを設計することができる。

【０１２５】

特定の実施形態では、本発明は約10^7～約10^{20}個の抗体メンバーを含む、合成された免疫前ヒト抗体レパートリーを提供し、このレパートリーは、

（ａ）選択されるヒト抗体重鎖シャーシ（すなわち、Ｋａｂａｔの定義を用いて重鎖可変領域のアミノ酸１～９４）；

（ｂ）ヒトＩＧＨＤおよびＩＧＨＪ生殖系列配列に基づいて設計されるＣＤＲＨ３レパートリーであって、以下のもの、すなわち、

（ｉ）任意選択で、１つまたは複数の尾部領域、

（ｉｉ）ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）の作用で優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるアミノ酸型のうちの２０個未満からなる群より選択される、約０～約１０個のアミノ酸を含む１つまたは複数のＮ１領域、

（ｉｉｉ）１つまたは複数の選択されるＩＧＨＤセグメント、および１つまたは複数のそのＮ末端またはＣ末端の切断物に基づく、１つまたは複数のＤＨセグメント、

（ｉｖ）ＴｄＴの作用で優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるアミノ酸のうちの２０個未満からなる群より選択される、約０～約１０個のアミノ酸を含む１つまたは複数のＮ２領域、

（ｖ）１つまたは複数のＩＧＨＪセグメント、および１つまたは複数のそのＮ末端切断物（例えば、ＸＸＷＧまで）に基づく、１つまたは複数のＨ３－ＪＨセグメント
を含むＣＤＲＨ３レパートリー、
（ｃ）１つまたは複数の選択されるヒト抗体κおよび／またはλ軽鎖シャーシ；ならびに
（ｄ）ヒトＩＧＬＶおよびＩＧＬＪ生殖系列配列に基づいて設計されるＣＤＲＬ３レパートリーであって、「Ｌ」はκもしくはλ軽鎖であることができるＣＤＲＬ３レパートリー
を含む。

【０１２６】

重鎖シャーシは、イムノグロブリン重鎖可変ドメインのＫａｂａｔ残基１～９４に相同性を有する、任意の配列であってよい。重鎖シャーシのそれには限定されない例が実施例に含まれ、当業者は、その中で、および明細書全体で提示される原理を、追加の重鎖シャーシを誘導するために用いることができることを容易に認識するであろう。

【０１２７】

上に述べたように、重鎖シャーシ領域には、任意選択で、「尾部」領域が続く。尾部領域は、天然の重鎖配列との比較に基づいて選択しても選択しなくてもよい、０、１つまたは複数のアミノ酸を含む。例えば、本発明の特定の実施形態では、当技術分野で利用可能な重鎖配列を比較し、天然配列の尾部位置で最も頻繁に出現する残基をライブラリーに含めることができる（例えば、ヒト配列に最も似ている配列を生成するために）。他の実施形態では、使用頻度のより低いアミノ酸を用いることができる。さらに他の実施形態では、アミノ酸の任意の群より選択されるアミノ酸を用いることができる。本発明の特定の実施形態では、尾部の長さは、０個（残基なし）または１個（例えば、Ｇ／Ｄ／Ｅ）のアミノ酸である。明快さのために、また理論によって束縛されることなく、天然のヒトレパートリーでは、尾部残基をコードするコドンの最初の２／３は、ＶＨ遺伝子のＦＲＭ３領域によって提供される。したがって、天然の重鎖配列のこの位置のアミノ酸は、ＩＧＨＶ遺伝子によって部分的に（２／３）コードされ、ＣＤＲＨ３によって部分的に（１／３）コードされると考えることができる。しかし、本発明の特定の態様を明らかに例示するために、尾部残基をコードするコドン全体（および、したがって、それに由来するアミノ酸）は、ＣＤＲＨ３配列の一部であると、本明細書で記載される。

【０１２８】

上に述べたように、天然のヒト抗体レパートリーにおいてＴｄＴによって加えられるヌクレオチド由来の２つのペプチドセグメントが存在する。これらのセグメントは、Ｎ１およびＮ２と命名されている（本明細書では、Ｎ１およびＮ２セグメント、ドメイン、領域もしくは配列と称する）。本発明の特定の実施形態では、Ｎ１およびＮ２は、長さが約０、１、２または３個のアミノ酸である。理論によって束縛されることなく、これらの長さは、ヒトレパートリーで見出されるＮ１およびＮ２長に最も近いと思われる（図２を参照）。本発明の他の実施形態では、Ｎ１およびＮ２は、長さが約４、５、６、７、８、９または１０個のアミノ酸であってよい。同様に、Ｎ１およびＮ２セグメントを生成するために利用されるアミノ酸残基の組成も、異なることができる。本発明の特定の実施形態では、Ｎ１およびＮ２セグメントを生成するために用いられるアミノ酸は、ヒトレパートリーのＮ１およびＮ２ドメインで最も頻繁に出現する８個のアミノ酸（例えば、Ｇ、Ｒ、Ｓ、Ｐ、Ｌ、Ａ、ＶおよびＴ）より選択することができる。本発明の他の実施形態では、Ｎ１およびＮ２セグメントを生成するために用いられるアミノ酸は、ＴｄＴの活性によって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって機能的に発現されるアミノ酸の、約２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４または３個未満からなる群より選択することができる。代わりに、Ｎ１およびＮ２は、アミノ酸の任意の群より選択されるアミノ酸を含むことができる。Ｎ１およびＮ２が類似した長さまたは組成である必要はなく、Ｎ１およびＮ２の長さおよび組成の独立した変動は、追加の多様性をライブラリーに導入することができる１つの方法である。

【０１２９】
ライブラリーのＤＨセグメントは、天然のＩＧＨＤ遺伝子レパートリーによってコードされるペプチドに基づき、ＮおよびＣ末端の残基の順次欠失を有する。ＩＧＨＤ遺伝子は、複数の読み枠で読むことができ、これらの読み枠を表すペプチド、ならびにそれらのＮ末端およびＣ末端欠失も、本発明のライブラリーに含まれる。本発明の特定の実施形態では、アミノ酸残基３個と同じくらい短いＤＨセグメントが、ライブラリーに含まれてもよい。本発明の他の実施形態では、約１、２、４、５、６、７または８個のアミノ酸と同じくらい短いＤＨセグメントが、ライブラリーに含まれてもよい。
【０１３０】
ライブラリーのＨ３－ＪＨセグメントは、天然のＩＧＨＪ遺伝子レパートリーによってコードされるペプチドに基づき、Ｎ末端の残基の順次欠失を有する。ＣＤＲＨ３の一部を構成するＩＧＨＪセグメントのＮ末端部分は、本明細書ではＨ３－ＪＨと称する。本発明の特定の実施形態では、Ｈ３－ＪＨセグメントは、１つまたは複数のＨ３－ＪＨ残基の、２つのＨ３－ＪＨ残基までの順次Ｎ末端欠失によって表すことができる。本発明の他の実施形態では、ライブラリーのＨ３－ＪＨセグメントは、約６、５、４、３、２、１または０個のＨ３－ＪＨ残基までの、Ｎ末端欠失を含むことができる（または無欠失）。
【０１３１】
ライブラリーの軽鎖シャーシは、天然の軽鎖（κまたはλ）配列のＫａｂａｔ残基１～８８に相同性を有する任意の配列であることができる。本発明の特定の実施形態では、ＶＬおよびＪＬセグメントを利用して、本発明の軽鎖シャーシを組合せの方法で合成し、シャーシおよびＣＤＲ３配列の多様性を有する軽鎖配列の１つまたは複数のライブラリーを作製する。本発明の他の実施形態では、縮重オリゴヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを用いて、軽鎖ＣＤＲ３配列を合成し、軽鎖シャーシおよび軽鎖定常領域で組み換えて、完全長軽鎖を形成する。
【０１３２】
本発明は、そのようなライブラリー、ならびに１つまたは複数のイムノグロブリンドメインまたは抗体断片を含むライブラリーを作製、使用する方法も提供する。特許請求される抗体ライブラリーの各構成要素の設計および合成は、下でさらに詳細に提供される。
【０１３３】
２．１．抗体ライブラリーシャーシ配列の設計
本発明の特定のライブラリーの構築の１段階は、天然の可変ドメイン配列（例えば、ＩＧＨＶおよびＩＧＬＶ）に基づくシャーシ配列の選択である。この選択は、任意に、または、特定の基準を満たすシャーシの選択によってなすことができる。例えば、最も頻繁に提示される重鎖および軽鎖の生殖系列配列について、非冗長再構成抗体配列を含む電子データベースである、Ｋａｂａｔデータベースに照会することができる。ＢＬＡＳＴ検索アルゴリズム、またはＳｏＤＡ（参照によりその全体が組み込まれる、Ｖｏｌｐｅら、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００６年、２２巻：４３８～４４頁）などのより特化されたツールを、再構成された抗体配列を、Ｖ　ＢＡＳＥ２データベース（Ｒｅｔｔｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２００５年、３３巻：Ｄ６７１～Ｄ６７４頁）を用いて生殖系列配列と、またはヒトＶ、ＤおよびＪ遺伝子の類似したコレクションと比較するために用いて、機能的抗体を生成するために最も頻繁に使われる生殖系列ファミリーを特定することができる。
【０１３４】
本発明のライブラリーに組み入れるためのシャーシの選択のために、いくつかの基準を利用することができる。例えば、酵母または本発明で用いられる他の生物（例えば、細菌、哺乳動物細胞、真菌類または植物）での発現が劣ることが知られている（または判断されている）配列を、ライブラリーから除外してもよい。シャーシは、ヒトの末梢血でのそれらの提示に基づいて選択することもできる。本発明の特定の実施形態では、ヒトの末梢血で高度に提示される生殖系列配列に対応するシャーシを選ぶことが望ましいであろう。他の実施形態では、ライブラリーの基準の多様性を増加させるために、例えば、提示頻度

のより低い生殖系列配列に対応するシャーシを選択することが望ましいであろう。したがって、機能的ヒト抗体で最も大きくて最も構造的に多様な群を提示するライブラリーを生成するように、シャーシを選択することができる。本発明の他の実施形態では、より小さなシャーシ変動性およびより大きなＣＤＲ変動性を有する、より小さくより集中したライブラリーを生成することが望ましい場合、例えば、より低い多様性のシャーシを利用することができる。本発明のいくつかの実施形態では、本発明の細胞（例えば、酵母細胞）でのそれらの発現、および選択される配列によって提示される基準構造の多様性の双方に基づいて、シャーシを選択することができる。したがって、本発明の細胞で十分に発現する基準構造の多様性を有するライブラリーを生成することができる。

【０１３５】

２．１．１．重鎖シャーシ配列の設計

本発明の特定の実施形態では、抗体ライブラリーは、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン、またはそれらの部分を含む。これらのドメインの各々は、本明細書で提供される実施例でより完全に記載される特定の構成要素から構築される。特定の実施形態では、本明細書で記載されるライブラリーは、診断法および／または治療法として用いることができる、完全ヒト抗体を単離するために用いることができる。理論に束縛されないが、末梢血（例えば、ヒトの）で最も頻繁に見出されるものに最も類似するか同一の配列を有する抗体は、治療剤として投与される場合、免疫原性である可能性がより低いであろう。

【０１３６】

理論によって束縛されないが、また、本発明の特定の実施形態を例示するために、ライブラリーのＶＨドメインは、以下の３つの主要構成要素を含むと考えることができよう：（１）アミノ酸１～９４（Ｋａｂａｔの番号付けを用いる）を含むＶＨ「シャーシ」、（２）本明細書で適切なＫａｂａｔ　ＣＤＲＨ３（位置９５～１０２）を含むと定義されるＣＤＲＨ３、および（３）アミノ酸１０３～１１３（Ｋａｂａｔ番号付け）を含むＦＲＭ４領域。したがって、全体的ＶＨ構造は、以下のように図式的に示すことができる（比例していない）：

【０１３７】

【化１９】

(1) … (94)　(95) … (102)　(103) … (113)

|----------|----------|----------|

VH シャーシ　CDRH3　FRM4

ヒトＩＧＨＶ生殖系列レパートリーに基づくＶＨシャーシ配列の選択および設計は、本明細書で提供される実施例の検討により、より明らかになる。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーで使用するために選択されるＶＨシャーシ配列は、すべての機能的に発現されるヒトＩＧＨＶ生殖系列配列に対応することができる。あるいは、１つまたは複数の基準によって、ＩＧＨＶ生殖系列配列を、ライブラリー中での提示について選択することができる。例えば、本発明の特定の実施形態では、選択されるＩＧＨＶ生殖系列配列は、健康な成体、小児または胎児の末梢血から単離される抗体分子の間で最も高度に提示されるものであってよい。

【０１３８】

特定の実施形態では、ＶＨシャーシの設計が、疾患、例えば自己免疫疾患を有する成体、小児または胎児のＩＧＨＶ生殖系列配列の利用に基づくことが望ましいであろう。理論によって束縛されることなく、自己免疫疾患の個体の末梢血から単離される抗体分子での生殖系列配列の使用頻度の分析が、ヒト抗原を認識する抗体の設計のために有用な情報を提供することができる可能性がある。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、本発明のライブラリーでの提示のためのＩＧＨＶ生殖系列配列の選択は、末梢血におけるそれらの出現頻度に基づくことができる。例示のために、４

つのＩＧＨＶ１生殖系列配列（ＩＧＨＶ１－２、ＩＧＨＶ１－１８、ＩＧＨＶ１－４６およびＩＧＨＶ１－６９）は、末梢血でＩＧＨＶ１ファミリーレパートリーの約８０％を含む。したがって、ライブラリーでの提示のために選択される特定のＩＧＨＶ１生殖系列配列には、最も頻繁に出現するもの、および、末梢血で見出されるＩＧＨＶ１ファミリーレパートリーの少なくとも約８０％を累積的に含むものを含めることができる。他の任意のＩＧＨＶファミリー（すなわち、ＩＧＨＶ１、ＩＧＨＶ２、ＩＧＨＶ３、ＩＧＨＶ４、ＩＧＨＶ５、ＩＧＨＶ６およびＩＧＨＶ７）から特定のＩＧＨＶ生殖系列配列を選択するために、類似した手法を用いることができる。したがって、本発明のライブラリーでの特定のＩＧＨＶファミリーの提示のために選択される特定の生殖系列配列は、末梢血で見出される特定のＩＧＨＶファミリーメンバーレパートリーの少なくとも約１００％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％または０％を含むことができる。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、選択されるＩＧＨＶ生殖系列配列は、ＶＨシャーシライブラリーの構造的多様性を最大にするように選択することができる。構造的多様性は、例えば、ＩＧＨＶ生殖系列配列で、ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２の長さ、組成および基準構造を比較することによって評価することができる。ヒトＩＧＨＶ配列では、ＣＤＲＨ１（Ｋａｂａｔ定義）はアミノ酸５、６または７個の長さを有することができるが、ＣＤＲＨ２（Ｋａｂａｔ定義）はアミノ酸１６、１７、１８または１９個の長さを有することができる。ＩＧＨＶ生殖系列配列および、特にＣＤＲドメインのアミノ酸組成は、実施例で提供されるように、配列のアラインメントによって評価することができる。基準構造は、例えば、参照によりその全体が組み込まれるＣｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９２年、２２７巻：７９９頁によって記載される方法によって割り当てることができる。

【０１４１】

本発明の特定の実施形態では、特定の特性を有する抗体を単離する可能性を最大にすることができるＩＧＨＶ生殖系列配列に基づいて、ＶＨシャーシを設計することが有利であろう。例えば、理論によって束縛されることなく、いくつかの実施形態では、臨床開発中の抗体、または治療剤として承認された抗体で利用される生殖系列配列だけを含むように、ＩＧＨＶ生殖系列配列を限定することが有利であろう。他方、いくつかの実施形態では、臨床的に利用される抗体の間では提示されないＶＨシャーシを含むライブラリーを生成することが有利であろう。そのようなライブラリーは、「定型的」ＩＧＨＶ生殖系列配列を使って得られるものよりも有利である新規特性を有する抗体を産することができるか、または、「非定型的」ＩＧＨＶ生殖系列配列の構造および特性または基準構造の研究を可能にすることができるであろう。

【０１４２】

当業者は、本発明のライブラリーでの提示のためにＩＧＨＶ生殖系列配列を選択するために、他のさまざまな基準を用いることができることを容易に認識するであろう。本明細書で記載される基準のいずれかを、他の任意の基準と組み合わせることもできる。さらなる例示的な基準には、特定の細胞培養系で十分なレベルで発現される能力、特定の抗体フォーマット（例えば、完全体イムノグロブリンおよび抗体断片）での溶解性、ならびに個々のドメイン、完全体イムノグロブリンまたは抗体断片の熱力学安定性が含まれる。本発明の方法は、本発明の抗体ライブラリーで有用性を有する、任意のＩＧＨＶ生殖系列配列を選択するために適用することができる。

【０１４３】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーのＶＨシャーシは、以下のＩＧＨＶ生殖系列配列の１つまたは複数の約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基９４を含むことができる：

【０１４４】

【化２０】

IGHV1-2, IGHV1-3, IGHV1-8, IGHV1-18,
IGHV1-24, IGHV1-45, IGHV1-46, IGHV1-58, IGHV1-69, IGHV2-5, IGHV2-26,
IGHV2-70, IGHV3-7, IGHV3-9, IGHV3-11, IGHV3-13, IGHV3-15, IGHV3-20,
IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-33, IGHV3-43, IGHV3-48, IGHV3-49,
IGHV3-53, IGHV3-64, IGHV3-66, IGHV3-72, IGHV3-73, IGHV3-74, IGHV4-4,
IGHV4-28, IGHV4-31, IGHV4-34, IGHV4-39, IGHV4-59, IGHV4-61, IGHV4-B,
IGHV5-51, IGHV6-1, および IGHV7-4-1.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、これらの配列の１つまたは複数の対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１４５】

他の実施形態では、ライブラリーのＶＨシャーシは、以下のＩＧＨＶ生殖系列配列の約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基９４を含むことができる：

【０１４６】

【化２１】

IGHV1-2, IGHV1-18, IGHV1-46, IGHV1-69, IGHV3-7, IGHV3-15, IGHV3-23,
IGHV3-30, IGHV3-33, IGHV3-48, IGHV4-31, IGHV4-34, IGHV4-39, IGHV4-59,
IGHV4-61, IGHV4-B, および IGHV5-51.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、これらの配列の１つまたは複数の対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。これらのシャーシのアミノ酸配列を、表５に示す。

【０１４７】

２．１．１．１．重鎖シャーシ変異体

ＩＧＨＶ生殖系列配列に基づく配列を有するＶＨシャーシの選択は、ＣＤＲＨ３配列の大きな多様性を支えることが予想されるが、ライブラリーへの組み入れのために選択される各シャーシのＣＤＲＨ１および／またはＣＤＲＨ２領域を含むアミノ酸残基を変更することによって、ＶＨシャーシのさらなる多様性を生成することができる（実施例２を参照）。

【０１４８】

本発明の特定の実施形態では、ＩＧＨＶ生殖系列配列のＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２領域、または他の領域を含むアミノ酸残基の変化または突然変異は、再構成された配列が由来する元のＩＧＨＶ生殖系列配列の同一性によって分類されている、再構成されたヒト重鎖配列のデータセット内で配列同一性を分析した後に加えられる。例えば、再構成された

抗体配列のセットから、各抗体のＩＧＨＶ生殖系列配列が決定され、再構成された配列は、ＩＧＨＶ生殖系列配列に従って分類される。この決定は、配列同一性に基づいてなされる。

【０１４９】

次に、これらの配列の各位置での２０個のアミノ酸残基のいずれかの出現を判定する。本発明の特定の実施形態では、例えば、ＶＨシャーシの抗原結合性部分の多様性を増加させることが所望である場合は、ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２の中の位置の異なるアミノ酸残基の出現に特に興味を有するであろう。本発明の他の実施形態では、フレームワーク領域での異なるアミノ酸残基の出現を評価することが、望ましいであろう。理論によって束縛されることなく、フレームワーク領域の変化は、ＣＤＲの空間配向性を変化させることによって、抗原結合に影響するであろう。

【０１５０】

対象とする各位置のアミノ酸の出現が特定された後、特定の基準に従って、ＶＨシャーシ配列に変更を加えることができる。いくつかの実施形態では、その目的は、再構成されたヒト抗体配列（それぞれのＩＧＨＶ生殖系列配列に由来する）の重鎖ドメインで観察される変動性を最も模倣する配列変動性を有する追加のＶＨシャーシを生成し、それによって、性質が最もヒト的である配列（すなわち、ヒト配列の組成および長さを最も模倣する配列）を場合によっては得ることであろう。この場合、特定の位置で天然に見出される突然変異を含む追加のＶＨシャーシ配列を合成して、これらのＶＨシャーシ配列の１つまたは複数を、例えば天然で見出される頻度を模倣する頻度で、本発明のライブラリーに含めることができる。本発明の別の実施形態では、再構成されたヒト抗体配列の所与の位置で最も頻繁に出現する突然変異だけを提示するＶＨシャーシを含めることを、望むことができる。例えば、正確に、上に述べたように、ヒトの変動性を模倣するのではなく、および、例示的な表６および７に関して、各位置で最も頻繁に出現する、上位１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個のアミノ酸残基だけを含むように選択することができる。例示のため、および表６に関して、ＶＨ１－６９配列の位置３１で最も頻繁に出現する上位４個のアミノ酸残基を含めることを望むならば、ＶＨ１－６９配列の位置３１は、Ｓ、Ｎ、ＴおよびＲを含むように変更されるであろう。理論によって束縛されることなく、再構成された重鎖配列の天然の組成を模倣することによる多様性の導入は、組成が最もヒト的である抗体を生成するであろうと思われる。しかし、本発明のライブラリーは、この方法によって多様化される重鎖配列に限定されず、多様性を重鎖シャーシに導入するために、任意の基準を用いることができ、これにはランダムまたは合理的な突然変異誘発が含まれる。例えば、本発明の特定の実施形態では、中性および／またはより小さなアミノ酸残基を、ＩＧＨＶ生殖系列配列で出現する残基の代わりに置換することが好ましいであろう。理論によって束縛されることなく、中性および／またはより小さなアミノ酸残基は、ＣＤＲ配列の多様性の提示のために、より柔軟で、立体障害のより少ない場所を提供することができる。

【０１５１】

実施例２は、特定のＩＧＨＶ生殖系列に由来する重鎖への、この方法の適用を例示する。当業者は、この方法を任意の生殖系列配列に適用することができること、および、各重鎖シャーシの少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０００、10^4、10^5、10^6個、またはそれ以上の変異体を生成するためにそれを用いることができることを、容易に認識するであろう。

【０１５２】

２．１．２．軽鎖シャーシ配列の設計

本発明の軽鎖シャーシは、κおよび／またはλ軽鎖配列に基づくことができる。ライブラリーでの提示のための軽鎖可変（ＩＧＬＶ）生殖系列配列の選択の基礎をなす原理は、重鎖配列の選択のために使用されるもの（上で、および実施例１および２に記載される）

に類似している。同様に、選択される重鎖シャーシに変動性を導入するために用いる方法を、軽鎖シャーシに変動性を導入するために用いることもできる。

【０１５３】

理論によって束縛されないが、また、本発明の特定の実施形態を例示するために、ライブラリーのＶＬドメインは、以下の３つの主要構成要素を含むと考えることができよう：（１）アミノ酸１～８８（Ｋａｂａｔの番号付けを用いる）を含むＶＬ「シャーシ」、（２）本明細書で適切なＫａｂａｔ　ＣＤＲＬ３（位置８９～９７）を含むと定義されるＶＬＣＤＲ３、および（３）アミノ酸９８～１０７（Ｋａｂａｔ番号付け）を含むＦＲＭ４領域。したがって、全体的ＶＬ構造は、以下のように図式的に示すことができる（比例していない）：

【０１５４】

【化２２】

(1) … (88) (89) … (97) (98) … (107)

|----------|----------|----------|

VLシャーシ CDRL3 FRM4

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーのＶＬシャーシは、ＩＧＫＶ生殖系列配列に基づく１つまたは複数のシャーシを含む。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーのＶＬシャーシは、以下のＩＧＫＶ生殖系列配列の１つまたは複数の約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基８８を含むことができる：

【０１５５】

【化２３】

IGKV1-05, IGKV1-06, IGKV1-08, IGKV1-09, IGKV1-12, IGKV1-13, IGKV1-16, IGKV1-17, IGKV1-27, IGKV1-33, IGKV1-37, IGKV1-39, IGKV1D-16, IGKV1D-17, IGKV1D-43, IGKV1D-8, IGKV2-24, IGKV2-28, IGKV2-29, IGKV2-30, IGKV2-40, IGKV2D-26, IGKV2D-29, IGKV2D-30, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV3D-07, IGKV3D-11, IGKV3D-20, IGKV4-1, IGKV5-2, IGKV6-21, および IGKV6D-41

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、これらの配列の１つまたは複数の対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１５６】

他の実施形態では、ライブラリーのＶＬシャーシは、以下のＩＧＫＶ生殖系列配列の約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基８８を含むことができる：

【０１５７】

【化２４】

IGKV1-05, IGKV1-12, IGKV1-27, IGKV1-33, IGKV1-39, IGKV2-28, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, およびIGKV4-1.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、これらの配列の１つまたは複数の対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、

９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。これらのシャーシのアミノ酸配列を、表１１に示す。

【０１５８】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーのＶＬシャーシは、ＩＧλＶ生殖系列配列に基づく１つまたは複数のシャーシを含む。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーのＶＬシャーシは、以下のＩＧλＶ生殖系列配列の１つまたは複数の約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基８８を含むことができる：

【０１５９】

【化２５】

IGλV3-1, IGλV3-21, IGλV2-14, IGλV1-40, IGλV3-19, IGλV1-51, IGλV1-44, IGλV6-57, IGλV2-8, IGλV3-25, IGλV2-23, IGλV3-10, IGλV4-69, IGλV1-47, IGλV2-11, IGλV7-43, IGλV7-46, IGλV5-45, IGλV4-60, IGλV10-54, IGλV8-61, IGλV3-9, IGλV1-36, IGλV2-18, IGλV3-16, IGλV3-27, IGλV4-3, IGλV5-39, IGλV9-49, および IGλV3-12.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、これらの配列の１つまたは複数の対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１６０】

他の実施形態では、ライブラリーのＶＬシャーシは、以下のＩＧλＶ生殖系列配列の約Ｋａｂａｔ残基１～約Ｋａｂａｔ残基８８を含むことができる：

【０１６１】

【化２６】

IGλV3-1, IGλV3-21, IGλV2-14, IGλV1-40, IGλV3-19, IGλV1-51, IGλV1-44, IGλV6-57, IGλV4-69, IGλV7-43, およびIGλV5-45.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、これらの配列の１つまたは複数の対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。これらのシャーシのアミノ酸配列を、表１４に示す。

【０１６２】

２．２．抗体ライブラリーＣＤＲＨ３構成要素の設計

重鎖のＣＤＲ３領域の多様性がほとんどの抗体特異性に十分であること（参照によりその全体が組み込まれる、ＸｕおよびＤａｖｉｓ、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、２０００年、１３巻：２７～４５頁）、および、既存の好結果のライブラリーが、多様化の主要な供給源としてＣＤＲＨ３を用いて作製されたこと（その各々は参照によりその全体が組み込まれる、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９２年、２２７巻：３８１頁；Ｌｅｅら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２００４年、３４０巻：１０７３頁）は、当技術分野で既知である。ＤＨ領域およびＮ１／Ｎ２領域の両方が、ＣＤＲＨ３の機能的多様性に寄与することも知られている（その各々は参照によりその全体が組み込まれる、Ｓｃｈｒ

ｏｅｄｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２００５年、１７４巻：７７７３頁およびＭａｔｈｉｓら、Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９５年、２５巻：３１１５頁）。本発明の目的で、天然に存在するヒト抗体のＣＤＨＲ３領域は、以下の５つのセグメントに分割することができる：（１）尾部セグメント、（２）Ｎ１セグメント、（３）ＤＨセグメント、（４）Ｎ２セグメント、および（５）ＪＨセグメント。下で例示するように、尾部、Ｎ１およびＮ２セグメントは存在してもよく、または存在しなくともよい。

【０１６３】

本発明の特定の実施形態では、合成ＣＤＲＨ３ライブラリーのためのアミノ酸配列を選択する方法には、頻度分析および既存の再構成された抗体配列の対応する変動性プロフィールの生成が含まれる。実施例のセクションでさらに詳細に記載されるこの工程では、再構成されたＣＤＲＨ３（または他の任意の重鎖または軽鎖領域）の中の特定の位置での特定のアミノ酸残基の出現頻度が、判定される。次に、本発明のライブラリーへの組み入れのために、天然でより頻繁に用いられるアミノ酸を選択することができる。

【０１６４】

２．２．１．ＤＨセグメントレパートリーの設計および選択

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、ＩＧＨＤ遺伝子生殖系列レパートリーに基づいて設計される１つまたは複数のセグメントを含む、ＣＤＲＨ３領域を含む。本発明のいくつかの実施形態では、ＩＧＨＤ遺伝子セグメントのインビボプロセシングを模倣するために、ライブラリーへの組み入れのために選択されるＤＨセグメントが、ヒトＩＧＨＤ遺伝子の最も頻繁な使用、ならびにその順次Ｎ末端およびＣ末端欠失に基づいて選択、設計される。本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーのＤＨセグメントは、長さが約３～約１０個のアミノ酸である。本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーのＤＨセグメントは、長さが約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個のアミノ酸、またはそれらの組合せである。特定の実施形態では、本発明のライブラリーは、長さの広い分布（例えば、約０～約１０個のアミノ酸）を有するＤＨセグメントを含むことができる。他の実施形態では、ＤＨの長さの分布が制限されてもよい（例えば、約１～約５個のアミノ酸、約３個のアミノ酸、約３個および約５個のアミノ酸、その他）。ライブラリーの特定の実施形態では、最も短いＤＨセグメントは、約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個のアミノ酸であってよい。

【０１６５】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、任意のＩＧＨＤ生殖系列配列の任意の読み枠を代表するＤＨセグメントを含むことができる。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーへの組み入れのために選択されるＤＨセグメントには、以下のＩＧＨＤ配列の１つまたは複数、またはそれらの誘導体（すなわち、任意の読み枠、ならびに任意の程度のＮ末端およびＣ末端の切断部分）が含まれる：

【０１６６】

【化２７】

IGHD3-10,

IGHD3-22, IGHD6-19, IGHD6-13, IGHD3-3, IGHD2-2, IGHD4-17, IGHD1-26,

IGHD5-5 / 5-18, IGHD2-15, IGHD6-6, IGHD3-9, IGHD5-12, IGHD5-24, IGHD2-21,

IGHD3-16, IGHD4-23, IGHD1-1, IGHD1-7, IGHD4-4/4-11, IGHD1-20, IGHD7-27,

IGHD2-8, および IGHD6-25.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、それらの対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７

５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１６７】

例示のために、ＩＧＨＤ３－１０、読み枠１の順次Ｎ末端およびＣ末端欠失を、表１に挙げる。他のＩＧＨＤ配列および読み枠のＮ末端およびＣ末端欠失も、本発明によって包含され、当業者は、例えば、表１６で提供する非限定的例示的データ、および／または上で概説した方法を用いて、これらの配列を容易に判定することができる。表１８（実施例５）は、本発明の特定の実施形態で用いられる特定のＤＨセグメントを挙げている。

【０１６８】

【表１】

表1：DHセグメントを与える、遺伝子IGHD3－10の読み枠1の順次N末端およびC末端欠失の例

DH	配列番号	DH	配列番号
VLLWFGELL		LWFGEL	
VLLWFGEL		LWFGE	
VLLWFGE		LWFG	
VLLLWFG		LWF	
VLLWF		WFGELL	
VLLW		WFGEL	
VLL		WFGE	
LLWFGELL		WFG	
LLWFGEL		FGELL	
LLWFGE		FGEL	
LLWFG		FGE	
LLWF		GELL	
LLW		GEL	
LWFGELL		ELL	

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーへの組み入れのために選択されるＤＨセグメントには、以下のＩＧＨＤ配列の１つまたは複数、またはそれらの誘導体（すなわち、任意の読み枠、ならびに任意の程度のＮ末端およびＣ末端の切断部分）が含まれる：ＩＧＨＤ３－１０、ＩＧＨＤ３－２２、ＩＧＨＤ６－１９、ＩＧＨＤ６－１３、ＩＧＨＤ３－０３、ＩＧＨＤ２－０２、ＩＧＨＤ４－１７、ＩＧＨＤ１－２６、ＩＧＨＤ５－５／５－１８およびＩＧＨＤ２－１５。本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、それらの対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１６９】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーへの組み入れのために選択されるＤＨセグメントには、以下のＩＧＨＤ配列であって、記号「＿ｘ」は遺伝子の読み枠を表す配列の１つまたは複数、またはそれらの誘導体（すなわち、任意の程度のＮ末端またはＣ末端の切断部分）が含まれる：

【０１７０】

【化２８】

IGHD1-26_1, IGHD1-26_3, IGHD2-2_2, IGHD2-2_3, IGHD2-15_2, IGHD3-3_3, IGHD3-10_1, IGHD3-10_2, IGHD3-10_3, IGHD3-22_2, IGHD4-17_2, IGHD5-5_3, IGHD6-13_1, IGHD6-13_2, IGHD6-19_1, および IGHD6-19_2.

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、それらの対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１７１】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、Ｎ末端およびＣ末端が欠失しているＩＧＨＤセグメントの所定の長さの分布を反映するように設計される。例えば、ライブラリーの特定の実施形態では、ライブラリーのＤＨセグメントは、ヒトレパートリーで見出されるＤＨセグメントの天然の長さの分布を模倣するように設計することができる。例えば、Ｌｅｅら（参照によりその全体が組み込まれるＩｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁）からの再構成したヒト抗体重鎖ドメイン中での異なるＩＧＨＤセグメントの相対的出現。表２は、Ｌｅｅらからの上位６８％のＩＧＨＤセグメントの相対的出現を示す。

【０１７２】

【表２】

表2. Leeらからの上位68%のIGHD遺伝子使用の相対的出現

IGHD読み枠	配列(親)	配列番号	相対的出現
IGHD3-10_1	VLLWFGELL		4.3%
IGHD3-10_2	YYYGSGSYYN		8.4%
IGHD3-10_3	ITMVRGVII		4.0%
IGHD3-22_2	YYYDSSGYYY		15.6%
IGHD6-19_1	GYSSGWY		7.4%
IGHD6-19_2	GIAVAG		6.0%
IGHD6-13_1	GYSSSWY		8.4%
IGHD6-13_2	GIAAAG		5.3%
IGHD3-3_3	ITIFGVVII		7.4%
IGHD2-2_2	GYCSSTSCYT		5.2%
IGHD2-2_3	DIVVVPAAM		4.1%
IGHD4-17_2	DYGDY		6.8%
IGHD1-26_1	GIVGATT		2.9%
IGHD1-26_3	YSGSYY		4.3%
IGHD5-5_3	GYSYGY		4.3%
IGHD2-15_2	GYCSGGSCYS		5.6%

特定の実施形態では、これらの相対的出現は、末梢血で見出されるＩＧＨＤ使用に類似したＤＨ発生率を有するライブラリーを設計するために用いることができる。本発明の他の実施形態では、より長いかより短いＤＨセグメントに、または特定の組成のＤＨセグメントにライブラリーを偏らせることが好ましいであろう。他の実施形態では、ライブラリーのために選択されるすべてのＤＨセグメントを、同等の割合で用いることが望ましいであろう。

【０１７３】

本発明の特定の実施形態では、１０個の最も頻繁に出現するＩＧＨＤ配列で最も一般的に用いられる読み枠が利用され、これらの配列の順次Ｎ末端およびＣ末端欠失が形成され、このように、本発明のＣＤＲＨ３レパートリーを作製するために用いられる合計２７８個の非冗長ＤＨセグメントが提供される（表１８）。本発明のいくつかの実施形態では、上記の方法は、上位１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４または２５個の発現されるＩＧＨＤ配列、ならびにその順次Ｎ末端およびＣ末端欠失を含むライブラリーを生成するために適用することができる。ライブラリーの他のすべての構成要素と同様に、ＤＨセグメントは一般的に発現されるものの中より選択することができるが、それらがより低い頻度で発現されるという事実に基づいてこれらの遺伝子セグメントを選択することも、本発明の範囲内である。例えば、自己抗原に対する抗体を得ることにおいて、または、ライブラリーの多様性をさらに拡張することにおいて、このことは有利であろう。あるいは、実際のヒト重鎖配列でのそれらの出現と厳密に相対的である方法で組成多様性を加えるために、ＤＨセグメントを用いることができる。

【０１７４】

本発明の特定の実施形態では、ループを元通りに保ち、不対のシステイン残基の存在を回避するために、セグメントをコードするジスルフィドループを含むＩＧＨＤ遺伝子の順次欠失を限定することができる。本発明の他の実施形態では、ループの存在を無視することができ、ＩＧＨＤ遺伝子セグメントの順次欠失が、不対のシステイン残基の存在に関係なく、他の任意のセグメントに関して出現することができる。本発明のさらに他の実施形態では、システイン残基を他の任意のアミノ酸に突然変異させることができる。

【０１７５】

２．２．２．Ｈ３－ＪＨセグメントレパートリーの設計および選択

６個のＩＧＨＪ（連結）セグメント、ＩＧＨＪ１、ＩＧＨＪ２、ＩＧＨＪ３、ＩＧＨＪ４、ＩＧＨＪ５およびＩＧＨＪ６がある。親セグメントおよび順次Ｎ末端欠失のアミノ酸配列を、表２０（実施例５）に示す。ＩＧＨＤ遺伝子が経るＮ末端およびＣ末端欠失と同様に、エキソヌクレアーゼ活性による１つまたは複数のコドンのＮ末端「ニブリング」または順次欠失によって、天然の変化がＩＧＨＪ遺伝子に導入される。

【０１７６】

Ｈ３－ＪＨセグメントは、ＣＤＲＨ３の一部であるＩＧＨＪセグメントの部分を指す。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーのＨ３－ＪＨセグメントは、以下の配列の１つまたは複数を含む：

【０１７７】

【化２９】

AEYFQH(配列番号___), EYFQH(配列番号___), YFQH(配列番号___), FQH(配列番号___), QH(配列番号___), H(配列番号___), YWYFDL(配列番号___), WYFDL(配列番号___), YFDL(配列番号___), FDL(配列番号___), DL(配列番号___), L(配列番号___), AFDV(配列番号___), FDV(配列番号___), DV(配列番号___), V(配列番号___), YFDY(配列番号___), FDY(配列番号___), DY(配列番号___), Y(配列番号___), NWFDS(配列番号___), WFDS(配列番号___), FDS(配列番号___), DS(配列番号___), S(配列番号___), YYYYYGMDV(配列番号___), YYYYGMDV(配列番号___), YYYGMDV(配列番号___), YYGMDV(配列番号___), YGMDV(配列番号___), GMDV(配列番号___), MDV(配列番号___), およびDV(配列番号___).

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、これらの配列の１つまたは複数、それらの対立遺伝子変異体を含むことができるか、または、これらの配列の１つまたは複数と少なくとも約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、９７．５％、９７％、９６．５％、９６％、９５．５％、９５％、９４．５％、９４％、９３．５％、９３％、９２．５％、９２％、９１．５％、９１％、９０．５％、９０％、８９％、８８％、８７％、８６％、８５％、８４％、８３％、８２％、８１％、８０％、７７．５％、７５％、７３．５％、７０％、６５％、６０％、６０％、５５％または５０％同一であるアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１７８】

本発明の他の実施形態では、Ｈ３－ＪＨセグメントは、約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９個またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。例えば、ＪＨ１＿４のＨ３－ＪＨセグメント（表２０）は３残基の長さであるが、非欠失ＪＨ６は９残基のＨ３－ＪＨセグメント長である。ＩＧＨＪセグメントのＦＲＭ４－ＪＨ領域は、配列ＷＧ（Ｑ／Ｒ）Ｇ（配列番号＿）から始まり、フレームワーク４の一部を構成するＩＧＨＪセグメントの部分に対応する。本発明の特定の実施形態では、表２０で挙げるように、ライブラリーに含まれる２８個のＨ３－ＪＨセグメントがある。他の特定の実施形態では、上で、または表２０で挙げるＩＧＨＪセグメントのうちの約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０個を利用することによって、ライブラリーを生成することができる。

【０１７９】

２．２．３．Ｎ１およびＮ２セグメントレパートリーの設計および選択

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）は、一本鎖か二本鎖のＤＮＡの３’ヒドロキシル基への５’三リン酸の結合を触媒する、脊椎動物由来の高度に保存されている酵素である。したがって、その酵素は、鋳型非依存性ポリメラーゼとして作用する（各々参照によりその全体が組み込まれる、Ｋｏｉｗａｉら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９８６年、１４巻：５７７７頁；Ｂａｓｕら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．、１９８３年、１１１巻：１１０５頁）。インビボで、ＴｄＴは、抗体重鎖のＶ－ＤおよびＤ－Ｊ接合点へのヌクレオチドの付加の役割を担う（各々参照によりその全体が組み込まれる、ＡｌｔおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ、ＰＮＡＳ、１９８２年、７９巻：４１１８頁；Ｃｏｌｌｉｎｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２００４年、１７２巻：３４０頁）。具体的には、ＴｄＴは、Ｄ（多様性）領域に連なる

Ｎ１およびＮ２（非鋳型化）セグメントを生成する役割を担う。

【０１８０】

本発明の特定の実施形態では、Ｎ１およびＮ２セグメントの長さおよび組成は、ヒト抗体の天然に存在するＮ１およびＮ２セグメントで見られるアミノ酸使用頻度の統計的偏りに従って、合理的に設計される。この方法を通して生成されるライブラリーの一実施形態を、実施例５に記載する。ヒトデータベースから編集されるデータ（参照によりその全体が組み込まれる、Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁）によると、２個以下のヌクレオチドの挿入を考慮しない場合、Ｎ１については平均３．０２個のアミノ酸挿入、Ｎ２については２．４個のアミノ酸挿入がある（図２）。本発明の特定の実施形態では、Ｎ１およびＮ２セグメントは、０～３個のアミノ酸の長さに限定される。本発明の他の実施形態では、Ｎ１およびＮ２を、約４、５、６、７、８、９または１０個未満のアミノ酸の長さに限定してもよい。

【０１８１】

本発明のいくつかの実施形態では、これらの配列の組成を、天然のヒト抗体のＮ１およびＮ２配列での特定のアミノ酸の出現頻度に従って選択することができる（この分析の例については、実施例５の表２１～２３を参照）。本発明の特定の実施形態では、合成Ｎ１およびＮ２セグメントを設計するために、これらの領域で最も一般的に出現する８個のアミノ酸（すなわち、Ｇ、Ｒ、Ｓ、Ｐ、Ｌ、Ａ、ＴおよびＶ）を用いる。本発明の他の実施形態では、最大約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８または１９個の最も一般的に出現するアミノ酸を、合成Ｎ１およびＮ２セグメントの設計で用いることができる。さらに他の実施形態では、全２０個のアミノ酸をこれらのセグメントで用いることができる。最後に、本発明のＮ１およびＮ２セグメントの設計組成について、天然のＮ１およびＮ２セグメントの組成を基にすることが可能であるが、このことは要件でない。Ｎ１およびＮ２セグメントは、アミノ酸の任意の群より選択されるアミノ酸、または、本発明のライブラリーの設計のために考慮される他の基準に従って設計されるアミノ酸を含むことができる。当業者は、本発明のライブラリーの任意の部分の設計に用いられる基準は、特定のライブラリーの適用によって異なってもよいことを容易に認識するであろう。本発明の目的は、任意の群のアミノ酸より選択されるＮ１およびＮ２セグメントの使用により、Ｎ１またはＮ２セグメントを用いずに、あるいは、本明細書で記載されるもの以外の組成を有するＮ１およびＮ２セグメントの使用により、機能的ライブラリーを生成することが可能であろうことである。

【０１８２】

本発明のライブラリーと当技術分野で既知である他のライブラリーとの間の１つの重要な差は、ライブラリーの設計の間の、天然のデュプレットおよびトリプレットのアミノ酸配列の組成の考慮である。表２３は、Ｎ１およびＮ２領域での上位２５個の天然のデュプレットを示す。これらの多くは、一般式（Ｇ／Ｐ）（Ｇ／Ｒ／Ｓ／Ｐ／Ｌ／Ａ／Ｖ／Ｔ）（配列番号＿）または（Ｒ／Ｓ／Ｌ／Ａ／Ｖ／Ｔ）（Ｇ／Ｐ）（配列番号＿）によって表すことができる。本発明の特定の実施形態では、合成Ｎ１およびＮ２領域は、これらのデュプレットのすべてを含むことができる。他の実施形態では、ライブラリーは、上位２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４または２５個の最も一般的な天然のＮ１および／またはＮ２デュプレットを含むことができる。本発明の他の実施形態では、ライブラリーは、出現頻度のより低いデュプレット（すなわち、上位２５個以外のもの）を含むことができる。これらの追加のデュプレットまたはトリプレットの組成は、本明細書で教示される方法があれば容易に判定することができよう。

【０１８３】

最後に、天然のトリプレットＮ１およびＮ２領域からのデータは、天然のＮ１およびＮ２トリプレット配列を、式（Ｇ）（Ｇ）（Ｇ／Ｒ／Ｓ／Ｐ／Ｌ／Ａ／Ｖ／Ｔ）（配列番号＿）、（Ｇ）（Ｒ／Ｓ／Ｐ／Ｌ／Ａ／Ｖ／Ｔ）（Ｇ）（配列番号＿）、または（Ｒ／Ｓ／Ｐ／Ｌ／Ａ／Ｖ／Ｔ）（Ｇ）（Ｇ）（配列番号＿）によってしばしば表すことができるこ

とを証明する。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、上位２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４または２５個の最も一般的に出現するＮ１および／またはＮ２トリプレットを含むことができる。本発明の他の実施形態では、ライブラリーは、出現頻度のより低いトリプレット（すなわち、上位２５個以外のもの）を含むことができる。これらの追加のデュプレットまたはトリプレットの組成は、本明細書で教示される方法があれば容易に判定することができよう。

【０１８４】

本発明の特定の実施形態では、ＣＤＲＨ３のライブラリーを作製するために用いられる、約５９個の総Ｎ１セグメントおよび約５９個の総Ｎ２セグメントがある。本発明の他の実施形態では、Ｎ１セグメント、Ｎ２セグメントまたは両方の数は、約１４１個に増加される（例えば、実施例５を参照）。本発明の他の実施形態では、合計約０、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２８０、３００、３２０、３４０、３６０、３８０、４００、４２０、４４０、４６０、４８０、５００、１０００、10^4個またはそれ以上のＮ１および／またはＮ２セグメントを、本発明のライブラリーへの組み入れのために選択することができる。

【０１８５】

当業者は、本明細書の教示があれば、（例えば配列アラインメント、ＳｏＤＡアルゴリズム、およびヒト配列の任意のデータベースを用いて、例えば、本明細書で提供されるものを越えて拡張する天然のデュプレットおよびトリプレット（またはより高いオーダー）Ｎ領域の追加のランキングを生成するために、本明細書で詳述される分析を拡張することは、通常の実験の領域に十分含まれることを容易に認識する（参照によりその全体が組み込まれる、Ｖｏｌｐｅら、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００６年、２２巻：４３８～４４頁）。熟練技術者は、本明細書で教示される情報に基づいて、Ｎ１プールおよび／またはＮ２プールで用いられる異なるアミノ酸配列の数を変化させることによって、より多様であるか多様性のより低い（すなわち、より集中している）ライブラリーを生成することが今では可能であることも認識するであろう。

【０１８６】

上に述べたように、Ｎ１およびＮ２セグメントの組成および長さが本明細書の実施例で提供されるものと異なる、多くの代わりの実施形態が想定される。いくつかの実施形態では、Ｎ１およびＮ２セグメントの合成のために、トリヌクレオチドの亜化学量論的合成を用いることができる。トリヌクレオチドによる亜化学量論的合成は、Ｋｎａｐｐｉｋら（参照によりその全体が組み込まれる、米国特許第６，３００，０６４号）に記載される。亜化学量論的合成の使用は、Ｎ１およびＮ２配列の長さの変動を考慮する合成を可能にするであろう。

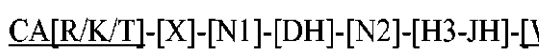
【０１８７】

本発明のライブラリーでのＮ１およびＮ２配列の組成を判定するために、上記の実施形態に加えて、ＴｄＴ活性のモデルを用いることもできる。例えば、ＴｄＴの活性によってポリヌクレオチドの上に特定のヌクレオチド塩基（Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔ）を組み込む可能性は、塩基の種類、および、加えられる塩基の直前の鎖の上に出現する塩基に依存することが提案されている。Ｊａｃｋｓｏｎら、（参照によりその全体が組み込まれる、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁）は、この工程を記載するマルコフモデルを構築した。本発明の特定の実施形態では、本発明のライブラリーで用いられるＮ１および／またはＮ２セグメントの組成を判定するために、このモデルを用いることができる。あるいは、ヒト配列をより厳密に模倣する配列を生成するために、Ｊａｃｋｓｏｎらで提供されるパラメータをさらに洗練することができよう。

【０１８８】

２．２．４．Ｎ１、ＤＨ、Ｎ２およびＨ３－ＪＨセグメントを用いるＣＤＲＨ３ライブ

ラリーの設計
本発明のＣＤＲＨ３ライブラリーは、最初のアミノ酸（特定の例示的な実施形態では、Ｇ、Ｄ、Ｅ）を含むかそれを含まず（本明細書で位置９５と命名される）、続いて、Ｎ１、ＤＨ、Ｎ２およびＨ３－ＪＨセグメントを含む。したがって、本発明の特定の実施形態では、ＣＤＲＨ３ライブラリーの全体的設計は、以下の式によって表すことができる：
［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］。
【０１８９】
本発明のライブラリーのＣＤＲＨ３の各部分の組成は、上でより完全に記載されるが、上で提供される尾部の組成（Ｇ／Ｄ／Ｅ／－）は非限定的であり、任意のアミノ酸をこの位置で用いること（またはどのアミノ酸も用いないこと）ができる。したがって、本発明の特定の実施形態を、以下の式によって表すことができ：
［Ｘ］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］、
上式で、［Ｘ］は、任意の、または無アミノ酸残基である。
【０１９０】
本発明の特定の実施形態では、相同組換えを通して、合成ＣＤＲＨ３レパートリーを、選択されるＶＨシャーシ配列および重鎖定常領域と組み合わせる。したがって、本発明の特定の実施形態では、合成ＣＤＲＨ３ライブラリーと、選択されるシャーシおよび定常領域を含むベクターとの間の相同組換えを促進するために、合成ＣＤＲＨ３ライブラリーの５’および３’末端に連なるＤＮＡ配列を含める必要があろう。特定の実施形態では、ベクターは、ＩＧＨＪ遺伝子の非ニブリング領域（すなわち、ＦＲＭ４－ＪＨ）の少なくとも一部をコードする配列も含む。したがって、Ｎ末端配列をコードするポリヌクレオチド（例えば、ＣＡ（Ｋ／Ｒ／Ｔ））を合成ＣＤＲＨ３配列に加えることができ、そこでは、Ｎ末端ポリヌクレオチドはシャーシのＦＲＭ３と相同的であり、一方、Ｃ末端配列をコードするポリヌクレオチド（例えば、ＷＧ（Ｑ／Ｒ）Ｇ）を合成ＣＤＲＨ３に加えることができ、そこでは、Ｃ末端ポリヌクレオチドはＦＲＭ４－ＪＨと相同的である。この例示的な実施形態で配列ＷＧ（Ｑ／Ｒ）Ｇが提供されているが、ＦＲＭ４－ＪＨでこの配列のＣ末端の追加のアミノ酸が、Ｃ末端配列をコードするポリヌクレオチドに含まれてもよい。この場合、Ｎ末端およびＣ末端の配列をコードするポリヌクレオチドの目的は、相同組換えを促進することであり、当業者は、これらの配列が下で表すよりも長いか短くともよいことを認識するであろう。したがって、本発明の特定の実施形態では、選択されるシャーシとの相同組換えを促進するために必要とされる配列を含むＣＤＲＨ３レパートリーの全体的設計は、以下の式（ベクターと相同的な領域を下線で示す）によって表すことができる：
【０１９１】
【化３０】



本発明の他の実施形態では、ＣＤＲＨ３レパートリーは、上の図式で提供されるＴ残基が除外されている、以下の式によって表すことができる：
【０１９２】
【化３１】



Ｖ、ＤおよびＪ遺伝子のコレクションを記載する参考文献には、それぞれ参照によりその全体が組み込まれる、Ｓｃａｖｉｎｅｒら、Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．、１９９９年、１６巻：２４３頁およびＲｕｉｚら、Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ、１９９９年、１６巻：１７３頁が含まれる。
【０１９３】
２．２．５．ＣＤＲＨ３長分布
本出願全体で記載されるように、天然のＣＤＲＨ３セグメントの組成の考慮に加えて、

本発明は、天然のＣＤＲＨ３セグメントの長さの分布も考慮する。Ｚｅｍｌｉｎら（参照によりその全体が組み込まれる、ＪＭＢ、２００３年、３３４巻：７３３頁）およびＬｅｅら（参照によりその全体が組み込まれる、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁）による調査は、天然のＣＤＲＨ３長の分析を提供する。これらのデータは、約９５％の天然のＣＤＲＨ３配列が、約７～約２３個のアミノ酸の長さであることを示す。特定の実施形態では、本発明は、天然のＣＤＲＨ３配列のサイズ分布を直接模倣するＣＤＲＨ３セグメントを有する、合理的に設計された抗体ライブラリーを提供する。本発明の特定の実施形態では、ＣＤＲＨ３の長さは、約２～約３０、約３～約３５、約７～約２３、約３～約２８、約５～約２８、約５～約２６、約５～約２４、約７～約２４、約７～約２２、約８～約１９、約９～約２２、約９～約２０、約１０～約１８、約１１～約２０、約１１～約１８、約１３～約１８、または約１３～約１６個の残基の長さであってよい。

【０１９４】

本発明の特定の実施形態では、本発明のＣＤＲＨ３ライブラリーの長さの分布は、特定の長さの範囲内の配列の割合に基づいて規定することができる。例えば、本発明の特定の実施形態では、約１０～約１８個のアミノ酸残基の長さを有するＣＤＲＨ３は、ライブラリーの配列の約８４％～約９４％を含む。いくつかの実施形態では、この長さの範囲内の配列は、ライブラリーの配列の約８９％を含む。

【０１９５】

本発明の他の実施形態では、約１１～約１７個のアミノ酸残基の長さを有するＣＤＲＨ３は、ライブラリーの配列の約７４％～約８４％を含む。いくつかの実施形態では、この長さの範囲内の配列は、ライブラリーの配列の約７９％を含む。

【０１９６】

本発明のさらに他の実施形態では、約１２～約１６個の残基の長さを有するＣＤＲＨ３は、ライブラリーの配列の約５７％～約６７％を含む。いくつかの実施形態では、この長さの範囲内の配列は、ライブラリーの配列の約６２％を含む。

【０１９７】

本発明の特定の実施形態では、約１３～約１５個の残基の長さを有するＣＤＲＨ３は、ライブラリーの配列の約３５％～約４５％を含む。いくつかの実施形態では、この長さの範囲内の配列は、ライブラリーの配列の約４０％を含む。

【０１９８】

２．３．抗体ライブラリーＣＤＲＬ３構成要素の設計

本発明のＣＤＲＬ３ライブラリーは、いくつかの手法のうちの１つによって生成することができる。本発明の特定の実施形態で作製され、用いられるＣＤＲＬ３ライブラリーの実際のバージョンは、ライブラリーの使用目的によって決まる。複数のＣＤＲＬ３ライブラリーを、特定の実施形態で用いることができ、その例には、ＣＤＲＨ３多様性を含み、κおよびλ軽鎖が本発明の適用範囲内であるライブラリーが含まれる。

【０１９９】

本発明の特定の実施形態では、ＣＤＲＬ３ライブラリーは、ＶＫＣＤＲ３（κ）ライブラリーおよび／またはＶλＣＤＲ３（ラムダ）ライブラリーである。本明細書で記載されるＣＤＲＬ３ライブラリーは、当技術分野のＣＤＲＬ３ライブラリーとかなり異なる。第１に、それらは、実際のヒト配列で観察されるものと一致する長さ変動を考慮する。第２に、それらは、ＣＤＲＬ３のかなりの部分がＩＧＬＶ遺伝子によってコードされるという事実を考慮する。第３に、ＩＧＬＶ遺伝子によってコードされるＣＤＲＬ３部分の中のアミノ酸変動パターンは、確率的ではなく、ＩＧＬＶ遺伝子の同一性に依存的に選択される。まとめると、第２および第３の相違は、ヒト配列の観察パターンを忠実に模倣するＣＤＲＬ３ライブラリーが、ＦＲＭ１～ＦＲＭ３のシャーシ配列とは無関係にある一般的な設計を用いることができないことを意味する。第４に、ＣＤＲＬ３へのＪＬの寄与も明示的に考慮され、関連する位置の各アミノ酸残基の算入は、ＪＬ遺伝子自体の組成および天然の変動に基づく。

【０２００】
上に示すように、および、出願全体を通して、本発明のライブラリーの設計の独特の態様は、生殖系列または「シャーシに基づく」態様であり、それは、実際のヒト配列の統合性および変動性をより多く保存するためのものである。これは、文献に記載されている、「フリーサイズ」（例えば、コンセンサス）ライブラリーを生成することを目的とする、他のコドンに基づく合成または縮重オリゴヌクレオチド合成手法と対照的である（例えば、各々参照によりその全体が組み込まれる、Ｋｎａｐｐｉｋら、Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ、２０００年、２９６巻：５７頁；Ａｋａｍａｔｓｕら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ、１９９３年、１５１巻：４６５１頁）。

【０２０１】
本発明の特定の実施形態では、ＶＬ配列中の規定位置での特定のアミノ酸の出現パターンは、公開のまたは他のデータベース、例えば、ＮＣＢＩデータベースで利用可能なデータを分析することによって判定される（例えば、本明細書とともに出願される付録ＡおよびＢのＧＩナンバーを参照）。本発明の特定の実施形態では、これらの配列は同一性に基づいて比較され、それらが由来する生殖系列遺伝子に基づいてファミリーに帰属される。次に、各生殖系列ファミリーにおける配列の各位置のアミノ酸組成を判定することができる。この工程は、本明細書で提供される実施例で例示する。

【０２０２】
２．３．１．必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリー
本発明の特定の実施形態では、軽鎖ＣＤＲ３ライブラリーは、ＶＫＣＤＲ３ライブラリーである。本発明の特定の実施形態は、最も一般的なＶＫＣＤＲ３長、９残基だけを用いることができる；この長さは、ヒトＶＫＣＤＲ３配列の優位な割合（約７０％を超える）で出現する。長さ９個のヒトＶＫＣＤＲ３配列では、位置８９～９５はＩＧＫＶ遺伝子によってコードされ、位置９６～９７はＩＧＫＪ遺伝子によってコードされる。ヒトκ軽鎖配列の分析は、ＩＧＫＪ遺伝子の使用において強い偏りが存在しないことを示す。したがって、本発明の特定の実施形態では、５個のＩＧＫＪ遺伝子のそれぞれを同等の割合で提示し、（Ｍ ＶＫシャーシ）×（５ＪＫ遺伝子）の組合せライブラリー、またはサイズＭ×５のライブラリーを作製することができる。しかし、本発明の他の実施形態では、例えばライブラリーのサイズを限定するか、または特定の特性を有することが既知であるＩＧＫＪ遺伝子の方へライブラリーに重み付けするために、ＩＧＫＪ遺伝子提示を偏らせることが望ましいであろう。

【０２０３】
実施例６．１に記載のように、ＩＧＫＪ遺伝子によってコードされる最初のアミノ酸（位置９６）の調査は、この位置で見られる最も一般的な７個の残基がＬ、Ｙ、Ｒ、Ｗ、Ｆ、ＰおよびＩであることを示した。これらの残基は、累積により、天然のκ軽鎖配列の位置９６で見られる残基の約８５％を占める。本発明の特定の実施形態では、位置９６のアミノ酸残基は、これらの７個の残基の１つであってよい。本発明の他の実施形態では、この位置のアミノ酸は、その他の１３個のアミノ酸残基のいずれかの中より選択することができる。本発明のさらに他の実施形態では、位置９６のアミノ酸残基は、位置９６に出現する上位１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０個のアミノ酸から、あるいは、位置９６には決して出現しない残基の中からでさえ選択することができる。同様に、位置９６を占めるのに選択されるアミノ酸の出現は、同等であっても、または重み付けされてもよい。本発明の特定の実施形態では、位置９６への組み入れのために選択されるアミノ酸の各々を、同等の量で含めるのが望ましいであろう。本発明の他の実施形態では、特定の残基を他よりも頻繁に、または低い頻度で含むように、位置９６の組成を偏らせることが望ましいであろう。例えば、実施例６．１で提供するように、ＩＧＫＪ１生殖系列配列を用いる場合に、アルギニンは位置９６に最も頻繁に出現する。したがって、本発明の特定の実施形態では、ライブラリーでの提示のために選択されるＩＧＫＪ生殖系列配列（複数可）および／またはＩＧＫＶ生殖系列配列（複数可）の起源に従って、位置９６のアミノ酸使用頻度を偏らせ

ることが望ましいであろう。

【０２０４】

したがって、本発明の特定の実施形態では、必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、以下のアミノ酸配列の１つまたは複数によって表すことができる：

【０２０５】

【化３２】

[VK_シャーシ]-[L3-VK]-[F/L/I/R/W/Y/P]-[JK*]

[VK_シャーシ]-[L3-VK]-[X]-[JK*]

これらの図式的な例示配列では、ＶＫ＿シャーシは、本発明のライブラリーへの組み入れのために選択される任意のＶＫシャーシを表す（例えば、表１１を参照）。具体的には、ＶＫ＿シャーシは、選択されるＩＧＫＶ配列の約Ｋａｂａｔ残基１～８８を含む。Ｌ３－ＶＫは、選択されるＩＧＫＶ遺伝子によってコードされるＶＫＣＤＲ３の部分（この実施形態では、Ｋａｂａｔ残基８９～９５）を表す。Ｆ、Ｌ、Ｉ、Ｒ、Ｗ、ＹおよびＰは、長さ９個のＶＫＣＤＲ３の位置９６における最も一般的に出現する７個のアミノ酸であり、Ｘは任意のアミノ酸であり、ＪＫ＊は、Ｎ末端残基のないＩＧＫＪアミノ酸配列（すなわち、Ｎ末端残基は、Ｆ、Ｌ、Ｉ、Ｒ、Ｗ、Ｙ、ＰまたはＸで置換される）である。したがって、必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーの１つの可能な実施形態では、各々がそれぞれのＬ３－ＶＫと対にされている１０個のＶＫシャーシ、位置９６（すなわち、Ｘ）の７個のアミノ酸、および１つのＪＫ＊配列を利用することによって、７０個のメンバーを生成することができた。ライブラリーの別の実施形態は、各々がそれぞれのＬ３－ＶＫと対にされている１０個のＶＫシャーシを、位置９６の７個のアミノ酸、および全５個のＪＫ＊遺伝子と組み合わせることによって生成される、３５０個のメンバーを有することができる。ライブラリーのさらに別の実施形態は、各々がそれぞれのＨ３－ＪＫと対にされている１５個のＶＫシャーシを、位置９６の１５個のアミノ酸、および全５個のＪＫ＊遺伝子と組み合わせることによって生成される、１，１２５個のメンバーを有することができる、などである。当業者は、他の多くの組合せが可能であることを容易に認識するであろう。さらに、ＶＫシャーシとＬ３－ＶＫとの間の対合を維持することが、組成がヒトκ軽鎖配列により類似しているライブラリーをもたらすと考えられているが、Ｌ３－ＶＫ領域を異なるＶＫシャーシ領域と組み合わせて変化させ、追加の多様性を生成することもできる。

【０２０６】

２．３．２．約10^5の複雑性のＶＫＣＤＲ３ライブラリー

ヒトでのＶＫＣＤＲ３配列の優位な長さは約９個のアミノ酸であるが、ＶＫＣＤＲ３配列のほぼ約３０％に累積的に近づく他の長さが測定可能な頻度で出現する。詳細には、長さ８個および１０個のＶＫＣＤＲ３は、代表的なサンプルでのＶＫＣＤＲ３長の、それぞれ約８．５％および約１６％を表す（実施例６．２；図３）。したがって、より複雑なＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、８、１０および１１個のアミノ酸のＣＤＲ長を含むことができる。そのようなライブラリーは、ヒトＶＫＣＤＲ３配列の集合で観察される長さの分布のより大きな割合を占めることができ、または、ヒトＶＫＣＤＲ３配列で頻繁に出現しないＶＫＣＤＲ３長（例えば、８個未満の残基または１１個を超える残基）を導入することもできる。

【０２０７】

本発明のライブラリーへのκ軽鎖長の変動多様性の組み入れは、ＶＫ－ＪＫ接合点（すなわち、位置９６、上記）のアミノ酸の外部に発生する配列変動性を含めることも可能にする。本発明の特定の実施形態では、ＶＫおよび／またはＪＫセグメントの中の配列変動パターンは、特定の生殖系列配列に由来する配列の集合を並べることによって判定することができる。本発明の特定の実施形態では、ＶＫＣＤＲ３の中のアミノ酸残基の出現頻度

は、配列のアラインメントによって判定することができる（例えば、実施例６．２および表３０を参照）。本発明のいくつかの実施形態では、この出現頻度は、ＶＫＣＤＲ３ライブラリーを合成するために用いられるＶＫ＿シャーシ、Ｌ３－ＶＫおよび／またはＪＫセグメントに変動性を導入するために用いることができる。本発明の特定の実施形態では、天然のレパートリーの任意の特定の位置で出現する、上位１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０個のアミノ酸を、本発明のＶＫＣＤＲ３ライブラリーのその位置に含めることができる。本発明の特定の実施形態では、ＶＫＣＤＲ３またはＶＫ軽鎖の中の任意の特定の位置の任意のアミノ酸の出現率は、約０％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または１００％であってよい。本発明の特定の実施形態では、本発明のＶＫＣＤＲ３またはκ軽鎖ライブラリーの中の任意の位置での任意のアミノ酸の出現率は、天然のＶＫＣＤＲ３またはκ軽鎖ドメインの中の任意の位置での任意のアミノ酸の出現率の、少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２０％、１４０％、１６０％、１８０％または２００％の範囲内であってよい。

【０２０８】

本発明のいくつかの実施形態では、ＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、縮重オリゴヌクレオチドを用いて合成することができる（ＩＵＰＡＣ塩基シンボル定義については表３１を参照）。本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド合成および遺伝子コードの限界は、ＶＫＣＤＲ３配列の特定の位置でのより多くの、もしくはより少ないアミノ酸の組み入れを必要とするであろう。この手法の例示的な実施形態は、実施例６．２で提供する。

【０２０９】

２．３．３．より複雑なＶＫＣＤＲ３ライブラリー

遺伝子コードおよび縮重オリゴヌクレオチド合成の使用に固有の限界は、場合によっては、天然のその位置で見られるそれらのアミノ酸と比較して、ＶＫＣＤＲ３の中の特定の位置で、より多くの、もしくはより少ないアミノ酸の組み入れを必要とするであろう（例えば、実施例６．２、表３２）。この限界は、特定のアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドの正確な合成、および任意の位置に組み込まれる任意の特定のアミノ酸の割合に対するより微細な制御を可能にする、コドンに基づく合成手法（参照によりその全体が組み込まれる、Ｖｉｒｎｅｋａｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９９４年、２２巻：５６００頁）を用いることにより克服することができる。実施例６．３は、この手法をより詳細に記載する。

【０２１０】

本発明のいくつかの実施形態では、コドンに基づく合成手法を、ＶＫＣＤＲ３またはκ軽鎖の中の任意の特定の位置での任意のアミノ酸の出現率を変えるために用いることができる。特定の実施形態では、ライブラリーのＶＫＣＤＲ３またはκ軽鎖配列の中の任意の位置での任意のアミノ酸の出現率は、約０％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または１００％であってよい。本発明のいくつかの実施形態では、任意の位置での任意のアミノ酸の出現率は、約１％、２％、３％または４％であってよい。本発明の特定の実施形態では、本発明のＶＫＣＤＲ３またはκ軽鎖ライブラリーの中の任意の位置での任意のアミノ酸の出現率は、天然のＶＫＣＤＲ３またはκ軽鎖ドメインの中の任意の位置での任意のアミノ酸の出現率の、少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２０％、１４０％、１６０％、１８０％または２００％の範囲内であってよい。

【０２１１】
本発明の特定の実施形態では、ＶＫＣＤＲ３（および、それがＶＫＣＤＲ３の一部であるかどうかに関係なく、ライブラリーで用いられる他の任意の配列）を変更して、望ましくないアミノ酸モチーフを除去することができる。例えば、ＸおよびＺはＰと異なる、パターンＮ－Ｘ－（ＳまたはＴ）－Ｚを有するペプチド配列は、酵母および哺乳動物の細胞を含むいくつかの発現系で、翻訳後修飾（Ｎ結合グリコシル化）を経る。本発明の特定の実施形態では、Ｎ結合グリコシル化部位の導入を回避するために、特定の位置でのＮ残基の導入を回避してもよい。本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーを発現するために用いる生物および培養条件次第では、これらの修飾は必要でない場合もある。しかし、潜在的Ｎ結合グリコシル化部位を有するライブラリーを発現するために用いる生物が、Ｎ結合グリコシル化ができない場合（例えば、細菌）でさえ、Ｎ－Ｘ－（Ｓ／Ｔ）配列を回避することが望ましいであろうが、その理由は、そのようなライブラリーから単離される抗体は、後に（例えば、臨床開発に向けて）異なる系（例えば、酵母、哺乳動物の細胞）で発現させることができ、可変ドメイン、特にＣＤＲでの炭水化物部分の存在は、活性の望ましくない修飾をもたらすことができるからである。

【０２１２】
本発明の特定の実施形態では、異なる長さ（例えば、長さ５、６、７、８、９、１０、１１個またはそれ以上の１つまたは複数）の個々のサブライブラリーを別々に作製し、次に、ヒト配列でのＶＫＣＤＲ３の長さの分布を反映する割合で、例えば、長さ８、９および１０の天然のＶＫＣＤＲ３配列で出現する１：９：２の分布に近い比で、サブライブラリーを混合することが好ましいであろう（図３を参照）。他の実施形態では、例えば、より集中したライブラリーまたは特定の特性を有するライブラリーを生成するために、天然のＶＫＣＤＲ３配列での長さの分布と異なる比でこれらのサブライブラリーを混合することが望ましいであろう。

【０２１３】
２．３．４．ＶλＣＤＲ３ライブラリー
本発明の必要最小限ＶλＣＤＲ３ライブラリーを設計するために用いる原理は、ＶＫＣＤＲ３ライブラリーのために上で挙げるものに類似し、それらは、実施例でさらに詳細に説明される。本発明のＶλＣＤＲ３ライブラリーと本発明のＶＫＣＤＲ３ライブラリーとの間の１つの差は、ＩＧＫＶ遺伝子と異なって、ＣＤＲＬ３（すなわち、Ｌ３－Ｖλ）へのＩＧＶλ遺伝子の寄与が、一定数のアミノ酸残基に限定されないことである。したがって、位置９６を含む、ＶＫ（Ｌ３－ＶＫを含む）およびＪＫセグメントの組合せは、長さが９個の残基だけのＣＤＲＬ３を与えるが、Ｖλ（Ｌ３－Ｖλを含む）およびＪλセグメントだけが考慮される場合でも、ＶλＣＤＲ３ライブラリーの中で長さの変動を得ることができる。

【０２１４】
ＶＫＣＤＲ３配列に関しては、上で概説するのと同じ方法によって、すなわち、ＶλＣＤＲ３配列の中で特定の残基の出現頻度を判定して、縮重オリゴヌクレオチド合成またはトリヌクレオチドに基づく合成を通して所望の組成をコードするオリゴヌクレオチドを合成することによって、追加の変動性をＶλＣＤＲ３配列に導入することができる。

【０２１５】
２．４．合成抗体ライブラリー
本発明の特定の実施形態では、重鎖および軽鎖シャーシ配列ならびに重鎖および軽鎖ＣＤＲ３配列は、合成されるものである。本発明のポリヌクレオチド配列は、さまざまな方法によって合成することができる。例えば、配列は、Ｆｅｌｄｈａｕｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２０００年、２８巻：５３４頁；Ｏｍｓｔｅｉｎら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ、１９７８年、１７巻：２３４１頁；およびＢｒｅｎｎｅｒおよびＬｅｒｎｅｒ、ＰＮＡＳ、１９９２年、８７巻：６３７８頁（それぞれは参照によりその全体が組み込まれる）に記載のスプリットプールＤＮＡ合成によって合成することができる。

【０２１６】
本発明のいくつかの実施形態では、ヒトレパートリーで見られる可能なＶ、ＤおよびＪ多様性、ならびに接合部多様性を表すカセットが、二本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド、コード鎖を表す一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド、または、非コード鎖を表す一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドとして、デノボで合成される。次に、これらの配列を、シャーシ配列および、ある場合にはＦＲＭ４の一部および定常領域を含む受容体ベクターとともに、宿主細胞に導入することができる。哺乳動物のｃＤＮＡまたはｍＲＮＡからのプライマーベースのＰＣＲ増幅、または哺乳動物のｃＤＮＡまたはｍＲＮＡからの鋳型指定クローニング段階を使用する必要はない。

【０２１７】
２．５．酵母相同組換えによるライブラリーの構築
特定の実施形態では、本発明は、高効率の相同組換えを促進する、酵母細胞の固有の能力を活用する。酵母における相同組換えの機構およびその応用を、下で簡単に説明する。

【０２１８】
例示的な実施形態として、相同組換えは、例えば、高効率で相同組換えを実行するように設計された遺伝的機構を有する、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅで実行することができる。例示的なＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株には、ＥＭ９３、ＣＥＮ．ＰＫ２、ＲＭ１１－１ａ、ＹＪＭ７８９およびＢＪ５４６５が含まれる。この機構は染色体修復の目的で発展したと考えられ、「ギャップ修復」または「ギャップ充填」とも呼ばれる。この機構を活用することによって、酵母ゲノムの特定の遺伝子座に突然変異を導入することができる。例えば、突然変異遺伝子を運ぶベクターは、遮断するか変異させようとする遺伝子の５’および３’オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）配列に相同的である、２つの配列セグメントを含むことができる。ベクターは、２つの相同ＤＮＡセグメントに連なる陽性の選択マーカー、例えば栄養酵素対立遺伝子（例えば、ＵＲＡ３）および／または抗生物質耐性マーカー（例えば、Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ／Ｇ４１８）をコードすることもできる。他の選択マーカーおよび抗生物質耐性マーカーは、当業者に知られている。本発明のいくつかの実施形態では、このベクター（例えば、プラスミド）は直鎖状にされ、酵母細胞内へ形質転換される。２つの相同組換え部位におけるプラスミドと酵母ゲノムとの間の相同組換えを通して、酵母ゲノムの野生型遺伝子と、２つの相同配列セグメントに連なる突然変異遺伝子（選択マーカー遺伝子（複数可）を含む）との間で、ＤＮＡ内容の相互交換が起こる。１つまたは複数の選択マーカーについて選択することによって、生存酵母細胞は、野生型遺伝子が突然変異遺伝子によって置換されている細胞である（参照によりその全体が組み込まれる、Ｐｅａｒｓｏｎら、Ｙｅａｓｔ、１９９８年、１４巻：３９１頁）。この機構は、機能的ゲノム解析研究のために、全６，０００個の酵母遺伝子またはオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）で、体系的突然変異を起こさせるために用いられている。交換は相互的であるので、プラスミドベクターに酵母ゲノムＤＮＡ断片をクローニングするためにも、類似した手法が首尾よく用いられている（参照によりその全体が組み込まれる、Ｉｗａｓａｋｉら、Ｇｅｎｅ、１９９１年、１０９巻：８１頁）。

【０２１９】
酵母に存在する内因性相同組換え機構を利用することによって、連結段階なしで、遺伝子断片または合成オリゴヌクレオチドを、プラスミドベクターにクローニングすることもできる。相同組換えの本出願では、標的遺伝子断片（すなわち、プラスミドベクターに挿入される断片、例えば、ＣＤＲ３）が得られる（例えば、別のベクターからのオリゴヌクレオチド合成、ＰＣＲ増幅、制限消化などによって）。プラスミドベクターの選択される領域に相同的であるＤＮＡ配列を、標的遺伝子断片の５’および３’末端に加える。これらの相同領域は完全に合成的であってよく、または、相同配列を組み込むプライマーによる、標的遺伝子断片のＰＣＲ増幅を通して加えることができる。プラスミドベクターは、陽性の選択マーカー、例えば栄養酵素対立遺伝子（例えば、ＵＲＡ３）、または抗生物質耐性マーカー（例えば、Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ／Ｇ４１８）を含むことができる。次に、標

的遺伝子断片と共有される配列相同性の領域の間に位置する特異な制限切断によってプラスミドベクターを直鎖状にし、それによって切断部位に人工ギャップを形成する。直鎖化プラスミドベクターおよびプラスミドベクターに相同的な配列に連なる標的遺伝子断片を、酵母宿主株に同時形質転換する。次に、酵母は、ベクターと標的遺伝子断片との間の配列相同性の２つの範囲を認識し、ギャップでの相同組換えを通してＤＮＡ内容の相互交換を促進することができる。結果として、標的遺伝子断片が、連結なしでベクターに挿入される。

【０２２０】

上記の方法は、標的遺伝子断片が一本鎖ＤＮＡの形である場合にも、例えば、環状Ｍ１３ファージ由来の形として、または一本鎖オリゴヌクレオチドとして有効であることが証明されている（各々参照によりその全体が組み込まれる、ＳｉｍｏｎおよびＭｏｏｒｅ、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、１９８７年、７巻：２３２９頁；Ｉｖａｎｏｖら、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１９９６年、１４２巻：６９３頁およびＤｅＭａｒｉｎｉら、２００１年、３０巻：５２０頁）。したがって、ギャップがあるベクターに組み換えることができる標的の形態は、二本鎖または一本鎖であってよく、化学合成、ＰＣＲ、制限消化、または他の方法に由来してもよい。

【０２２１】

いくつかの因子が、酵母での相同組換えの効率に影響することができる。例えば、ギャップ修復の効率は、直鎖化ベクターおよび標的遺伝子の両方に連なる相同配列の長さと相関している。特定の実施形態では、約２０個以上の塩基対を相同配列の長さのために用いることができ、約８０個の塩基対は、ほぼ最適な結果を与えることができる（各々参照によりその全体が組み込まれる、Ｈｕａら、Ｐｌａｓｍｉｄ、１９９７年、３８巻：９１頁；Ｒａｙｍｏｎｄら、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．、２００２年、１２巻：１９０頁）。本発明の特定の実施形態では、組換えを促進するために、少なくとも約５、１０、１５、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４　３５、３６、３７、３８、３９、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１８７、１９０または２００個の相同塩基対を用いることができる。他の実施形態では、約２０～約４０個の塩基対が利用される。さらに、ベクターと遺伝子断片との間の相互交換は厳密に配列依存性であり、すなわち、それはフレームシフトを引き起こさない。したがって、ギャップ修復クローニングは、高効率および高精度での遺伝子断片の挿入を保証する。高効率は、１回の形質転換の試みで、２、３個またはそれ以上の標的遺伝子断片を、同じベクターに同時にクローニングすることを可能にする（参照によりその全体が組み込まれる、Ｒａｙｍｏｎｄら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１９９９年、２６巻：１３４頁）。さらに、相同組換えを通しての正確な配列保存の性質は、直接の機能試験のために、選択される遺伝子または遺伝子断片を発現ベクターまたは融合ベクターにクローニングすることを可能にする（各々参照によりその全体が組み込まれる、Ｅｌ－Ｄｅｉｒｙら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１９９２年、１巻：４５４９頁；Ｉｓｈｉｏｋａら、ＰＮＡＳ、１９９７年、９４巻：２４４９頁）。

【０２２２】

遺伝子断片のライブラリーは、相同組換えを用いて酵母でも構築されている。例えば、ベクターｐＪＧ４－５で、ヒト脳ｃＤＮＡライブラリーが２ハイブリッド融合ライブラリーとして構築された（参照によりその全体が組み込まれる、ＧｕｉｄｏｔｔｉおよびＺｅｒｖｏｓ、Ｙｅａｓｔ、１９９９年、１５巻：７１５頁）。酵母ゲノムタンパク質相互作用の研究のために、６，０００個の既知の酵母ＯＲＦの増幅のために、合計６，０００対のＰＣＲプライマーが用いられたと報告されてもいる（参照によりその全体が組み込まれるＨｕｄｓｏｎら、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．、１９９７年、７巻：１１６９頁）。２０００年に、Ｕｅｔｚらは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅでタンパク質間相互作用の包括的な分析を行った（参照によりその全体が組み込まれる、Ｕｅｔｚら、Ｎａｔｕｒｅ、２０００年、４０３巻：６２３頁）。出芽酵母のタンパク質間相互作用

マップが、酵母タンパク質の間のすべての可能な組合せで２ハイブリッド相互作用を検討するための包括的な系を用いて研究され（参照によりその全体が組み込まれる、Ｉｔｏら、ＰＮＡＳ、２０００年、９７巻：１１４３頁）、ワクシニアウイルスのゲノムタンパク質連鎖地図がこの系を用いて研究された（参照によりその全体が組み込まれる、ＭｃＣｒａｉｔｈら、ＰＮＡＳ、２０００年、９７巻：４８７９頁）。

【０２２３】

本発明の特定の実施形態では、合成ＣＤＲ３（重鎖または軽鎖）を、重鎖または軽鎖シャーシ、ＦＲＭ４の一部および定常領域をコードするベクターと、相同組換えによって結合させて、完全長重鎖または軽鎖を形成することができる。本発明の特定の実施形態では、相同組換えは酵母細胞で直接に実行される。いくつかの実施形態では、この方法は、

（ａ）酵母細胞に、

（ｉ）重鎖もしくは軽鎖シャーシ、ＦＲＭ４の一部および定常領域をコードする直鎖化ベクターであって、直鎖化部位がシャーシのＦＲＭ３の末端と定常領域の開始部との間にあるベクター、および

（ｉｉ）線状二本鎖であるＣＤＲ３挿入ヌクレオチド配列のライブラリーであって、ＣＤＲ３挿入配列の各々が、ＣＤＲ３ならびに、相同組換えがベクターとＣＤＲ３挿入配列のライブラリーとの間で起こさせるために、直鎖化部位で（ｉ）のベクターの末端に十分に相同である５’および３’に連なる配列をコードするヌクレオチド配列を含むライブラリーを形質転換するステップと、

（ｂ）ＣＤＲ３挿入配列がベクターに組み込まれるように、形質転換された酵母細胞内でベクターとＣＤＲ３挿入配列との間で相同組換えを起こさせて、完全長重鎖または軽鎖をコードするベクターを生成するステップと

を含む。

【０２２４】

上記のように、ＣＤＲ３挿入物は、直鎖化ベクターの末端に相同的である、５’に連なる配列および３’に連なる配列を有することができる。ＣＤＲ３挿入物および直鎖化ベクターが宿主細胞、例えば酵母細胞に導入される場合、ベクターの直鎖化によって形成される「ギャップ」（直鎖化部位）は、これらの２つの直鎖二本鎖ＤＮＡ（すなわち、ベクターおよび挿入物）の５’および３’末端の相同配列の組換えを通して、ＣＤＲ３断片挿入物によって埋められる。この相同組換えの事象を通して、可変ＣＤＲ３挿入物を含む完全長重鎖または軽鎖をコードする環状ベクターのライブラリーが生成される。これらの方法の特定の例を、実施例で提供する。

【０２２５】

ベクターへのＣＤＲ３配列の正しい挿入をもたらす相同組換えの効率を判定するために、以降の分析を実行することができる。例えば、ＣＤＲ３挿入物の、選択される酵母クローンからの直接のＰＣＲ増幅は、どのくらい多くのクローンが組換え体であるかを明らかにすることができる。特定の実施形態では、最低約９０％の組換え体クローンのライブラリーが利用される。他の特定の実施形態では、最低約１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の組換え体クローンのライブラリーが利用される。選択されるクローンの同じＰＣＲ増幅は、挿入物サイズを明らかにすることもできる。

【０２２６】

選択されるクローンでの挿入物の配列多様性を検証するために、挿入物の正しいサイズを有するＰＣＲ増幅生成物を、増幅された領域の中で切断するか切断しないことが知られている制限酵素で、「フィンガープリント」することができる。ゲル電気泳動パターンから、分析するクローンが同じ素性であるか、または、異なるか多様化された素性であるかどうかを判定することができる。挿入物の素生およびクローニング方法の忠実度を明らかにし、クローンの独立性および多様性を証明するために、ＰＣＲ生成物を直接に配列決定

することもできる。図１は、ライブラリーの構築のための、断片（例えば、ＣＤＲ３）とベクター（例えば、シャーシ、ＦＲＭ４の一部および定常領域を含む）との間の組換えの図式図を表す。

【０２２７】

２．６．発現およびスクリーニング系

本明細書で記載される技術のいずれか、または他の適する技術によって生成されるポリヌクレオチドのライブラリーは、所望の構造および／または活性を有する抗体を特定するために、発現させることおよびスクリーニングすることができる。抗体の発現は、例えば、無細胞抽出物（および、例えば、リボソームディスプレイ）、ファージディスプレイ、原核細胞（例えば、細菌性ディスプレイ）または真核生物の細胞（例えば、酵母ディスプレイ）を用いて実行することができる。本発明の特定の実施形態では、抗体ライブラリーは、酵母で発現される。

【０２２８】

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、無細胞抽出物で発現させることができる鋳型の役目を果たすように工作される。例えば、米国特許第５，３２４，６３７号、第５，４９２，８１７号、第５，６６５，５６３号（各々参照によりその全体が組み込まれる）に記載のベクターおよび抽出物を用いることができ、多くは市販されている。ポリヌクレオチド（すなわち、遺伝子型）をポリペプチド（すなわち、表現型）に関連付けするためのリボソームディスプレイおよび他の無細胞技術、例えば、Ｐｒｏｆｕｓｉｏｎ（商標）を用いることができる（例えば、各々参照によりその全体が組み込まれる、米国特許第６，３４８，３１５号、第６，２６１，８０４号、第６，２５８，５５８号および第６，２１４，５５３号を参照）。

【０２２９】

あるいは、本発明のポリヌクレオチドは、Ｅ．ｃｏｌｉ発現系で、例えばＰｌｕｃｋｔｈｕｎおよびＳｋｅｒｒａ（各々参照によりその全体が組み込まれる、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１９８９年、１７８巻：４７６頁、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１９９１年、９巻：２７３頁）によって記載されるもので発現させることができる。参照によりその全体が組み込まれる、ＢｅｔｔｅｒおよびＨｏｒｗｉｔｚ、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１９８９年、１７８巻：４７６頁に記載のように、突然変異体タンパク質を、培地および／または細菌の細胞質での分泌のために発現させることができる。いくつかの実施形態では、ＶＨおよびＶＬをコードする単一のドメインは、シグナル配列、例えばｏｍｐＡ、ｐｈｏＡまたはｐｅｌＢシグナル配列をコードする配列の３’末端に、各々結合される（参照によりその全体が組み込まれる、Ｌｅｉら、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．、１９８７年、１６９巻：４３７９頁）。これらの遺伝子融合はジシストロン構築物に組み立てられ、その結果、それらを単一のベクターから発現させ、Ｅ．ｃｏｌｉのペリプラズム間隙に分泌させることができ、そこでは、それらが再び折りたたまれて、活性型で回収することができる。（参照によりその全体が組み込まれる、Ｓｋｅｒｒａら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１９９１年、９巻：２７３頁）。例えば、抗体または抗体断片を生成するために、抗体重鎖遺伝子を抗体軽鎖遺伝子と同時に発現させることができる。

【０２３０】

本発明の他の実施形態では、例えばＵＳ２００４００７２７４０、ＵＳ２００３０１００２３およびＵＳ２００３００３６０９２（各々参照によりその全体が組み込まれる）に記載の分泌シグナルおよび脂質化部分を用いて、抗体配列が原核生物、例えばＥ．ｃｏｌｉの膜表面に発現される。

【０２３１】

より高等な真核生物の細胞、例えば哺乳動物の細胞、例えば骨髄腫細胞（例えば、ＮＳ／０細胞）、ハイブリドーマ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）およびヒト胚性腎臓（ＨＥＫ）細胞を、本発明の抗体の発現のために用いることもできる。一般的に、哺乳動物の細胞で発現される抗体は、培地に分泌されるように、または細胞の表面で発現されるように設計される。抗体または抗体断片は、例えば、無傷の抗体分子、または個々

のＶＨおよびＶＬ断片、Ｆａｂ断片、単一のドメイン、または一本鎖（ｓｃＦｖ）として生成することができる（参照によりその全体が組み込まれるＨｕｓｔｏｎら、ＰＮＡＳ、１９８８年、８５巻：５８７９頁）。

【０２３２】

あるいは、例えば、Ｊｅｏｎｇら、ＰＮＡＳ、２００７年、１０４巻：８２４７頁（参照によりその全体が組み込まれる）に記載のアンカーペリプラズム発現（ＡＰＥｘ２ハイブリッド表面ディスプレイ）によって、または、例えば、Ｍａｚｏｒら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２００７年、２５巻：５６３頁（参照によりその全体が組み込まれる）に記載の他のアンカリング方法によって、抗体を発現させ、スクリーニングすることができる。

【０２３３】

本発明の他の実施形態では、哺乳動物の細胞ディスプレイを用いて抗体を選択することができる（参照によりその全体が組み込まれる、Ｈｏら、ＰＮＡＳ、２００６年、１０３巻：９６３７頁）。

【０２３４】

本発明のライブラリーに由来する抗体のスクリーニングは、任意の適当な手段によって実行することができる。例えば、結合活性は、標準のイムノアッセイおよび／またはアフィニティークロマトグラフィーによって評価することができる。触媒機能、例えばタンパク分解性機能についての本発明の抗体のスクリーニングは、標準アッセイ、例えば、米国特許第５，７９８，２０８号（参照によりその全体が組み込まれる）に記載のヘモグロビンプラークアッセイを用いて達成することができる。治療標的に結合する候補抗体の能力の判定は、例えば、表面プラズモン共鳴に基づいて所与の標的または抗原に対する抗体の結合速度を測定する、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）装置を用いてインビトロで試験することができる。インビボアッセイは、いくつかの動物モデルのいずれかを用いて実行することができ、その後、適宜、ヒトで試験することができる。細胞ベースのバイオアッセイも、企図される。

【０２３５】

本発明の一態様は、ライブラリーの抗体を発現させ、スクリーニングすることができる速度である。本発明の特定の実施形態では、抗体ライブラリーを酵母で発現させることができ、それは、約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３または２４時間未満の倍加時間を有する。いくつかの実施形態では、倍加時間は、約１～約３時間、約２～約４、約３～約８時間、約３～約２４、約５～約２４、約４～約６、約５～約２２、約６～約８、約７～約２２、約８～約１０時間、約７～約２０、約９～約２０、約９～約１８、約１１～約１８、約１１～約１６、約１３～約１６、約１６～約２０、または約２０～約３０時間である。本発明の特定の実施形態では、抗体ライブラリーは、約１６～約２０時間、約８～約１６時間または約４～約８時間の倍加時間の酵母で発現される。したがって、抗体ライブラリーを発現させ、スクリーニングするために数日を要する既知の技術と比較して、本発明の抗体ライブラリーは、数時間足らずで発現させ、スクリーニングすることができる。哺乳動物細胞でのそのようなスクリーニング工程のスループットにおける制限段階は、単に、単離細胞の集団を反復して再増殖させるのに要する時間であり、それは、場合によっては、本発明で用いられる酵母の倍加時間よりも長い倍加時間を有する。

【０２３６】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーの組成は、１つまたは複数の絞込み段階（例えば抗原結合または他の性能についてのスクリーニングによって）を経て、確定することができる。例えば、本発明の配列またはライブラリーの約ｘ％を含む組成を有するライブラリーは、１つまたは複数のスクリーニング段階の後、本発明の配列またはライブラリーの約２ｘ％、３ｘ％、４ｘ％、５ｘ％、６ｘ％、７ｘ％、８ｘ％、９ｘ％、１０ｘ％、２０ｘ％、２５ｘ％、４０ｘ％、５０ｘ％、６０ｘ％、７５ｘ％、８０ｘ％、９０ｘ％、９５ｘ％または９９ｘ％を含むように絞り込むことができる。本発明の他の実施形態では

、１つまたは複数の絞込み段階より前のそれらの出現と比較して、本発明の配列またはライブラリーを、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１００倍、１，０００倍またはそれ以上絞り込むことができる。本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは少なくともある数の特定の種類の配列（複数可）、例えば、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ３、重鎖、軽鎖または完全体抗体を含むことができる（例えば、少なくとも約10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}、10^{19}または10^{20}個）。特定の実施形態では、１つまたは複数の絞込み段階の間、これらの配列を絞り込んで、それぞれの配列（複数可）の少なくとも約10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{16}、10^{17}、10^{18}または10^{19}個を含むライブラリーを提供することができる。

【０２３７】

２．７．親和性成熟のための突然変異誘発手法

上に述べたように、１つまたは複数の抗原への結合について、または生物活性について、本発明のライブラリーの抗体をスクリーニングすることを含む選択工程を通して、抗体リード物質を特定することができる。これらの抗体リード物質のコード配列は、最初の抗体リード物質との関係で多様性が導入されている二次性ライブラリーを生成するために、インビトロまたはインビボで、さらに突然変異させることができる。次に、突然変異を起こさせた抗体リード物質は、最初のライブラリーからの最初の抗体リード物質の選択のために用いられる手順に類似した手順に従って、標的抗原との結合または生物活性についてインビトロまたはインビボでさらにスクリーニングすることができる。最初の抗体リード物質のそのような突然変異誘発および選択は、抗原に対する親和性の漸進的増加を有する抗体を生成する哺乳動物で天然に存在する親和性成熟過程を効果的に模倣する。本発明の一実施形態では、ＣＤＲＨ３領域だけが突然変異を起こす。本発明の別の実施形態では、可変領域全体が突然変異を起こす。本発明の他の実施形態では、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２およびＣＤＲＬ３の１つまたは複数に突然変異を起こさせることができる。本発明のいくつかの実施形態では、「軽鎖シャッフリング」を、親和性成熟プロトコルの一部として用いることができる。特定の実施形態では、これは、１つまたは複数の重鎖をいくつかの軽鎖と対合させて、抗体の親和性および／または生物活性を高める軽鎖を選択することを含むことができる。本発明の特定の実施形態では、１つまたは複数の重鎖と対にすることができる軽鎖の数は、少なくとも約２、５、１０、１００、１０００、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9または10^{10}個である。本発明の特定の実施形態では、これらの軽鎖は、プラスミドによってコードされる。本発明の他の実施形態では、軽鎖を宿主細胞のゲノムに組み込むことができる。

【０２３８】

抗体リード物質のコード配列は、多種多様な方法によって突然変異させることができる。突然変異誘発の方法の例には、それらに限定されないが、部位特異的突然変異誘発、変異性ＰＣＲ突然変異誘発、カセット式変異誘発およびランダムなＰＣＲ突然変異誘発が含まれる。あるいは、所望の突然変異を有する領域をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、例えば組換えまたは連結を通して、突然変異を起こさせる配列に導入することができる。

【０２３９】

部位特異的突然変異誘発または点突然変異誘発は、特定の領域でＣＤＲ配列を徐々に変化させるために用いることができる。これは、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発またはＰＣＲを用いて達成することができる。例えば、抗体リード物質の短い配列を、重鎖もしくは軽鎖領域、またはその両方の合成的に突然変異を起こさせたオリゴヌクレオチドで置換することができる。この方法は、多数のＣＤＲ配列に突然変異を起こさせるのに有効ではないかもしれないが、特定の標的タンパク質へのより高い親和性を達成するために、特定のリード物質の微細な調整のために用いることができる。

【０２４０】
カセット式変異誘発を、特定の領域でＣＤＲ配列を突然変異させるために用いることもできる。一般的なカセット式変異誘発では、単一の鋳型の配列ブロックまたは領域が、完全または部分的にランダム化された配列によって置換される。しかし、得られる最大情報量は、オリゴヌクレオチドのランダム配列の数によって、統計学的に制限されるであろう。点突然変異誘発と同様に、この方法は、特定の標的タンパク質へのより高い親和性を達成するために、特定のリード物質の微細な調整のために用いることもできる。
【０２４１】
変異性ＰＣＲまたは「毒」ＰＣＲは、以下の、ＣａｌｄｗｅｌｌおよびＪｏｙｃｅ、ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、１９９２年、２巻：２８頁；Ｌｅｕｎｇら、Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ、１９８９年、１巻：１１頁；Ｓｈａｆｉｋｈａｎｉら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１９９７年、２３巻：３０４頁およびＳｔｅｍｍｅｒら、ＰＮＡＳ、１９９４年、９１巻：１０７４７頁（それぞれは参照によりその全体が組み込まれる）に記載のプロトコルによってＣＤＲ配列を突然変異させるために、用いることができる。
【０２４２】
変異性ＰＣＲの条件は、（ａ）Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼの機能不全を効率的に誘導する高濃度のMn^{2+}（例えば、約０．４～約０．６ｍＭ）；および（ｂ）鋳型へのその高濃度の基質の誤った組込みを引き起こして突然変異を起こさせる、ＰＣＲ反応での１つのヌクレオチド基質（例えば、ｄＧＴＰ）の不釣合いに高い濃度を含むことができる。さらに、ＰＣＲサイクルの数、用いるＤＮＡポリメラーゼの種類および鋳型の長さなどの他の因子が、ＰＣＲ生成物への「間違った」ヌクレオチドの誤った組込みの率に影響を及ぼすことができる。選択される抗体ライブラリーの突然変異誘発のために、「多様性ＰＣＲランダム突然変異誘発キット」（ＣＬＯＮＴＥＣＨ（商標））などの、市販のキットを利用することができる。
【０２４３】
特定の実施形態では、ＰＣＲに基づく突然変異誘発で用いられるプライマー対は、発現ベクター中の相同組換え部位に一致させた領域を含むことができる。この設計は、突然変異誘発の後、相同組換えを通して、重鎖もしくは軽鎖シャーシベクターへのＰＣＲ生成物の容易な戻し再導入を可能にする。
【０２４４】
他のＰＣＲに基づく突然変異誘発方法は、単独で、または上記の変異性ＰＣＲと併用して用いることもできる。例えば、ＰＣＲ増幅ＣＤＲセグメントは、ＤＮアーゼで消化して、二本鎖ＤＮＡ中にニックを形成することができる。これらのニックは、Ｂａｌ３１などの他のエキソヌクレアーゼによってギャップに拡張することができる。次に、基準の基質ｄＧＴＰ、ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰおよびｄＣＴＰの低い濃度でＤＮＡクレノウポリメラーゼを用い、１つの基質（例えば、ｄＧＴＰ）を不相応に高い濃度で用いることにより、ギャップをランダム配列で埋めることができる。この穴埋め反応は、埋めたギャップ領域で高頻度の突然変異を起こさせるはずである。これらのＤＮアーゼ消化方法は、所望のＣＤＲセグメントで高頻度の突然変異を起こさせるために、変異性ＰＣＲと併用することができる。
【０２４５】
最初の抗体リード物質から増幅させたＣＤＲまたは抗体セグメントは、プレＢ細胞の生来の突然変異能力を活用することによって、インビボで突然変異を起こさせることもできる。プレＢ細胞中のＩｇ遺伝子は、高率の突然変異に特異的に感受性である。Ｉｇプロモーターおよびエンハンサーは、プレＢ細胞が増殖する間、プレＢ細胞環境でのそのような高率突然変異を促進する。したがって、ヒトＩｇエンハンサーおよびプロモーターを含む哺乳動物の発現ベクターに、ＣＤＲ遺伝子セグメントをクローニングすることができる。プレＢ細胞でのＶＨおよびＶＬ遺伝子セグメントの突然変異を当然可能にする、３８Ｂ９などのプレＢ細胞系に、この構築物を導入することができる（参照によりその全体が組み

込まれる、ＬｉｕおよびＶａｎ　Ｎｅｓｓ、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９９年、３６巻：４６１頁）。突然変異を起こさせたＣＤＲセグメントは、培養したプレＢ細胞系から増幅させ、例えば相同組換えを通して、シャーシを含有するベクター（複数可）に戻し再導入することができる。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、ライブラリーのスクリーニングから単離されるＣＤＲ「ヒット」は、縮重コドンまたはトリヌクレオチドを用いて再合成し、ギャップ修復を用いて重鎖もしくは軽鎖ベクターに再クローニングすることができる。

【０２４７】

３．ライブラリーサンプリング

本発明の特定の実施形態では、本発明のライブラリーは、設計された、非ランダムレパートリーを含み、そこでは、必ずしもすべての構成要素でなく、またはライブラリー全体ではなく、ライブラリーの特定の構成要素（例えば、ＣＤＲＨ３）の理論的多様性が、理論的ライブラリーの任意の所与のメンバーが、ライブラリー中に少なくとも特定の頻度（例えば、少なくとも１回、２回、３回、４回、５回またはそれ以上）でライブラリーの物理的実現で存在する、特定の程度の統計的信頼度（例えば、９５％）が存在するレベルで、ライブラリーの物理的実現においてオーバーサンプリングされる可能性がある。

【０２４８】

ライブラリーでは、所与のクローンの複製数は、ポアソン確率分布に従うと一般に仮定される（参照によりその全体が組み込まれる、Ｆｅｌｌｅｒ，　Ｗ．Ａｎ　Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｔｏ　Ｐｒｏｂａｂｉｌｉｔｙ　Ｔｈｅｏｒｙ　ａｎｄ　Ｉｔｓ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、１９６８年、Ｗｉｌｅｙ　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）。ライブラリーの例（下記参照）で所与の構成要素のメンバーが欠ける確率に対応する、ポアソン乱数がゼロである確率はe^{N}であって、Ｎは乱数の平均である。例えば、10^{6}個の可能なライブラリーの理論的メンバーが存在し、ライブラリーの物理的実現が10^{7}個のメンバーを有し、サンプリングされる理論的ライブラリーの各メンバーの確率が同等であるならば、各メンバーがライブラリーの物理的実現で出現する平均回数は$10^{7}／10^{6}＝10$であり、所与のメンバーの複製数がゼロである確率は、$e^{-N}＝e^{-10}＝0.000045$であり、または、10^{6}個の理論的メンバーのいずれかの少なくとも１つの複製がこの１０Ｘオーバーサンプリングライブラリーに存在するのは９９．９９５５％の確率である。２．３Ｘのオーバーサンプリングライブラリーの場合、所与の構成要素は９０％の信頼度で存在する。３Ｘのオーバーサンプリングライブラリーの場合、所与の構成要素は９５％の信頼度で存在する。４．６Ｘのオーバーサンプリングライブラリーの場合、所与のクローンは９９％の信頼度で存在する、などなどである。

【０２４９】

したがって、Ｍが、うまく物理的に実現することができる理論的ライブラリーメンバーの最大数であるならば、Ｍ／３は、理論的ライブラリーの任意の所与のメンバーがサンプリングされる９５％の信頼度である、最大の理論的レパートリーサイズである。所与のメンバーが提示される９５％の可能性と可能なあらゆるメンバーが提示される９５％の可能性との間に、差があることに注意されたい。特定の実施形態では、任意の所与のメンバーが９５％の可能性でライブラリーの物理的実現において提示されるように、本発明は、多様性を有する合理的に設計されたライブラリーを提供する。本発明の他の実施形態では、任意の所与のメンバーが、少なくとも約０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．５％または９９．９％の可能性でライブラリーの物理的実現において提示されるように、ライブラリーが設計される。概説については、例えば、各々参照によりその全体が組み込まれる、ＦｉｒｔｈおよびＰａｔｒｉｃｋ、Ｂｉｏｍｏｌ．Ｅｎｇ．、２００５年、２２巻：１０５頁およびＰａｔｒｉｃｋら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、２００３年、１６巻：４５１頁を参照。

【０２５０】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、Ｘ個の独特のメンバーの理論的総多様性有することができ、理論的総多様性の物理的実現は、少なくとも約１Ｘ、２Ｘ、３Ｘ、４Ｘ、５Ｘ、６Ｘ、７Ｘ、８Ｘ、９Ｘ、１０Ｘ個、またはそれ以上のメンバーを含むことができる。いくつかの実施形態では、理論的総多様性の物理的実現は、約１Ｘ～約２Ｘ、約２Ｘ～約３Ｘ、約３Ｘ～約４Ｘ、約４Ｘ～約５Ｘ、約５Ｘ～約６Ｘ個のメンバーを含むことができる。他の実施形態では、理論的総多様性の物理的実現は、約１Ｘ～約３Ｘまたは約３Ｘ～約５Ｘ個の総メンバーを含むことができる。

【０２５１】

すべての誘導発展実験の基礎をなす仮説は、理論的に可能な分子多様性の量が、それを合成し、それを物理的に実現し、それをスクリーニングする能力と比較して膨大であるということである。所与のライブラリーで改善された特性を有する変異体を見出す可能性は、そのライブラリーが最大限に多様な場合に最大になる。Ｐａｔｒｉｃｋらは、ランダムなオリゴヌクレオチド突然変異誘発、変異性ＰＣＲおよびインビトロ組換えによって構築されたライブラリーで、独特の配列の変異体の数を推定するための一連の方程式およびコンピュータアルゴリズムを導くために、単純な統計を用いた。彼らは、ＧＬＵＥ、ＧＬＵＥ－ＩＴ、ＰＥＤＥＬ、ＰＥＤＥＬ－ＡＡおよびＤＲＩＶｅＲなどの、ライブラリー統計を計算するためのプログラムのセットを書いた。これらのプログラムは、それらにアクセスする方法の説明書と一緒に、Ｐａｔｒｉｃｋら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、２００３年、１６巻：４５１頁およびＦｉｒｔｈら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２００８年、３６巻：Ｗ２８１頁（それぞれは参照によりその全体が組み込まれる）に記載されている。

【０２５２】

理論的多様性の一部の構成要素（ＣＤＲＨ３など）はオーバーサンプリングされるが、他の態様（ＶＨ／ＶＬ対合）はそうではないライブラリーの物理的実現を構築することが可能である。例えば、10^8個のＣＤＲＨ３セグメントが単一のＶＨシャーシに存在し、次に10^5個のＶＬ遺伝子と対を形成して、10^{13}個（＝10^8＊10^5）の可能な完全ヘテロダイマー抗体を生成するように設計されているライブラリーを考える。このライブラリーの物理的実現が、10^9個の形質転換体クローンの多様性で構築されるならば、ＣＤＲＨ３多様性は１０倍（＝10^9／10^8）オーバーサンプリングされるが、可能なＶＨ／ＶＬ対合は10^{-4}（＝10^9／10^{13}）倍アンダーサンプリングされる。この例では、平均すると、各ＣＤＲＨ３は、可能な10^5個のパートナーからのＶＬの１０サンプルだけと対を形成する。本発明の特定の実施形態では、好ましくオーバーサンプリングされるのは、ＣＤＲＨ３多様性である。

【０２５３】

３．１．本発明のポリヌクレオチド配列の他の変異体

特定の実施形態では、本発明は、本明細書で教示されるポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチド、または、本明細書で教示されるポリヌクレオチドの補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。例えば、ハイブリダイゼーションおよび、低い、中間のまたは高いストリンジェンシー条件下での洗浄の後に、本明細書で教示されるポリヌクレオチドまたは本明細書で教示されるポリヌクレオチドの補体とハイブリダイズしたままである、単離されたポリヌクレオチドが本発明に包含される。

【０２５４】

例示的な低いストリンジェンシー条件には、約３７℃の約３０％～約３５％ホルムアミド、約１ＭのＮａＣｌ、約１％のＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝溶液でのハイブリダイゼーション、および、約５０℃～約５５℃の約１×～約２×のＳＳＣ（２０×ＳＳＣ＝３．０Ｍ ＮａＣｌ／０．３Ｍクエン酸三ナトリウム）での洗浄が含まれる。

【０２５５】

例示的な中程度のストリンジェンシー条件には、約３７℃における約４０％～約４５％ホルムアミド、約１ＭのＮａＣｌ、約１％のＳＤＳでのハイブリダイゼーション、および、約５５℃～約６０℃における約０．５×～約１×のＳＳＣでの洗浄が含まれる。

【０２５６】
例示的な高いストリンジェンシー条件には、約３７℃における約５０％ホルムアミド、約１ＭのＮａＣｌ、約１％のＳＤＳでのハイブリダイゼーション、および、約６０℃～約６５℃における約０．１×のＳＳＣでの洗浄が含まれる。
【０２５７】
任意選択で、洗浄緩衝液は、約０．１％～約１％のＳＤＳを含むことができる。
【０２５８】
ハイブリダイゼーションの持続時間は、一般に約２４時間未満、通常約４～約１２時間である。
【０２５９】
３．２．サブライブラリーおよび本発明のライブラリーまたはサブライブラリーを含むより大きなライブラリー
本出願全体で記載されるように、本発明のライブラリーは、特定の実施形態では、それらのヒト様配列組成および長さによって、ならびに、ライブラリーの特定の構成要素のすべてのメンバー（または場合によっては、オーバーサンプルさえ）を含むライブラリーの物理的実現を生成する能力によって識別される。本明細書で記載されるライブラリーの組合せ（例えば、ＣＤＲＨ３およびＣＤＲＬ３ライブラリー）を含むライブラリーが、本発明に包含される。本明細書で記載されるライブラリーの部分を含むサブライブラリーも、本発明に包含される（例えば、特定の重鎖シャーシ中のＣＤＲＨ３ライブラリーまたはＣＤＲＨ３ライブラリーのサブセット）。当業者は、本明細書で記載されるライブラリーの各々がいくつかの構成要素（例えば、ＣＤＲＨ３、ＶＨ、ＣＤＲＬ３、ＶＬなど）を有すること、および、これらの構成要素の多様性を変化させて、本発明の範囲内のサブライブラリーを生成することができることを容易に認識する。
【０２６０】
さらに、本発明のライブラリーまたはサブライブラリーのうちの１つを含むライブラリーも、本発明の範囲内である。例えば、本発明の特定の実施形態では、本発明の１つまたは複数のライブラリーまたはサブライブラリーが、他の手段によって誘導される配列、例えば、確率的もしくは半確率的合成によって誘導されるヒト以外もしくはヒトの配列を含むことができる、より大きなライブラリーに含まれてもよい。本発明の特定の実施形態では、ポリヌクレオチドライブラリー中の配列の少なくとも約１％が、配列の他の９９％の組成に関係なく、本発明のもの（例えば、ＣＤＲＨ３配列、ＣＤＲＬ３配列、ＶＨ配列、ＶＬ配列）であってよい。本発明の他の実施形態では、任意のポリヌクレオチドライブラリー中の配列の、少なくとも約０．００１％、０．０１％、０．１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％が、他の配列の組成に関係なく、本発明のものであってよい。いくつかの実施形態では、本発明の配列は、他の配列の組成に関係なく、任意のポリヌクレオチドライブラリー中の配列の約０．００１％～約１％、約１％～約２％、約２％～約５％、約５％～約１０％、約１０％～約１５％、約１５％～約２０％、約２０％～約２５％、約２５％～約３０％、約３０％～約３５％、約３５％～約４０％、約４０％～約４５％、約４５％～約５０％、約５０％～約５５％、約５５％～約６０％、約６０％～約６５％、約６５％～約７０％、約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、または約９５％～約９９％を含むことができる。したがって、１つまたは複数の本発明のライブラリーまたはサブライブラリーよりも多様であるが、１つまたは複数の本発明のライブラリーまたはサブライブラリーを、１つまたは複数の本発明のライブラリーまたはサブライブラリーを効果的にスクリーニングすることができ、１つまたは複数の本発明のライブラリーまたはサブライブラリーによってコードされる配列をそこから単離することができる量でなお含むライブラリーも、本発明の範囲内である。
【０２６１】

３．３．代替足場（ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ　ｓｃａｆｆｏｌｄ）

本発明の特定の実施形態では、本発明のライブラリーのアミノ酸生成物（例えば、ＣＤＲＨ３またはＣＤＲＬ３）を、代替足場の上に提示してもよい。これらの足場のいくつかは、抗体のそれらに匹敵する特異性および親和性を有する分子を生成することがわかっている。例示的な代替足場には、フィブロネクチン（例えば、ＡｄＮｅｃｔｉｎ）、β－サンドイッチ（例えば、ｉＭａｂ）、リポカリン（例えば、Ａｎｔｉｃａｌｉｎ）、ＥＥＴＩ－ＩＩ／ＡＧＲＰ、ＢＰＴＩ／ＬＡＣＩ－Ｄ１／ＩＴＩ－Ｄ２（例えば、Ｋｕｎｉｔｚドメイン）、チオレドキシン（例えば、ペプチドアプタマー）、プロテインＡ（例えば、Ａｆｆｉｂｏｄｙ）、アンキリンリピート（例えば、ＤＡＲＰｉｎ）、γＢ－クリスタリン／ユビキチン（例えば、Ａｆｆｉｌｉｎ）、$CTLD_3$（例えば、Ｔｅｔｒａｎｅｃｔｉｎ）および$(LDLR-Aモジュール)_3$（例えば、Ａｖｉｍｅｒｓ）から誘導されるものが含まれる。代替足場に関する追加の情報は、各々参照によりその全体が組み込まれる、Ｂｉｎｚら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、２００５年、２３巻：１２５７頁およびＳｋｅｒｒａ、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎ．ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．、２００７年、１８巻：２９５～３０４頁で提供される。

【０２６２】

４．本発明の他の実施形態

特定の実施形態では、本発明は、既知の重鎖ＣＤＲ３配列で見出される配列多様性および長さ多様性を表す１０^{7}～１０^{8}個のポリヌクレオチド配列を含む、合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリーを含む。

【０２６３】

他の実施形態では、本発明は、以下の式、

［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］［Ｎ１］［ＤＨ］［Ｎ２］［Ｈ３－ＪＨ］

によって表されるＣＤＲＨ３をコードするポリヌクレオチド配列を含む合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリーを含み、上式で、［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］は長さが０～１個のアミノ酸、［Ｎ１］は０～３個のアミノ酸、［ＤＨ］は長さが３～１０個のアミノ酸、［Ｎ２］は長さが０～３個のアミノ酸、および［Ｈ３－ＪＨ］は長さが２～９個のアミノ酸である。

【０２６４】

本発明の特定の実施形態では、［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］は、Ｇ、Ｄ、Ｅおよび無からなる群より選択されるアミノ酸配列によって表される。

【０２６５】

本発明のいくつかの実施形態では、［Ｎ１］は、

【０２６６】

【化３３】

G, R, S, P, L, A, V, T,

(G/P)(G/R/S/P/L/A/V/T), (R/S/L/A/V/T)(G/P), GG(G/R/S/P/L/A/V/T),

G(R/S/P/L/A/V/T)G, (R/S/P/L/A/V/T)GG,

、および無からなる群より選択されるアミノ酸配列によって表される。

【０２６７】

本発明の特定の実施形態では、［Ｎ２］は、

【０２６８】

【化３４】

G, R, S, P, L, A, V, T,

(G/P)(G/R/S/P/L/A/V/T), (R/S/L/A/V/T)(G/P), GG(G/R/S/P/L/A/V/T),

G(R/S/P/L/A/V/T)G, (R/S/P/L/A/V/T)GG,

、および無からなる群より選択されるアミノ酸配列によって表される。

【０２６９】

本発明のいくつかの実施形態では、［ＤＨ］は、ＩＧＨＤ３－１０読み枠１、ＩＧＨＤ３－１０読み枠２、ＩＧＨＤ３－１０読み枠３、ＩＧＨＤ３－２２読み枠２、ＩＧＨＤ６－１９読み枠１、ＩＧＨＤ６－１９読み枠２、ＩＧＨＤ６－１３読み枠１、ＩＧＨＤ６－１３読み枠２、ＩＧＨＤ３－０３読み枠３、ＩＧＨＤ２－０２読み枠２、ＩＧＨＤ２－０２読み枠３、ＩＧＨＤ４－１７読み枠２、ＩＧＨＤ１－２６読み枠１、ＩＧＨＤ１－２６読み枠３、ＩＧＨＤ５－５／５－１８読み枠３、ＩＧＨＤ２－１５読み枠２、ならびに３個のアミノ酸までの上で特定されたＩＧＨＤのすべての可能なＮ末端およびＣ末端の切断物からなる群より選択される配列を含む。

【０２７０】

本発明の特定の実施形態では、［Ｈ３－ＪＨ］は、

【０２７１】

【化３５】

AEYFQH, EYFQH, YFQH, FQH, QH, YWYFDL,

WYFDL, YFDL, FDL, DL, AFDV, FDV, DV, YFDY, FDY, DY, NWFDS, WFDS,

FDS, DS, YYYYYGMDV, YYYYGMDV, YYYGMDV, YYGMDV, YGMDV,

GMDV, MDV, およびDV.

からなる群より選択される配列を含む。

【０２７２】

本発明のいくつかの実施形態では、［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］［Ｎ１］［ｅｘｔ－ＤＨ］［Ｎ２］［Ｈ３－ＪＨ］によって表される配列は、長さが約３～約２６個のアミノ酸の配列を含む。

【０２７３】

本発明の特定の実施形態では、［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］［Ｎ１］［ｅｘｔ－ＤＨ］［Ｎ２］［Ｈ３－ＪＨ］によって表される配列は、長さが約７～約２３個のアミノ酸の配列を含む。

【０２７４】

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーは、約10^7～約10^{10}個の配列を含む。

【０２７５】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、約10^7個の配列を含む。

【０２７６】

本発明のいくつかの実施形態では、ライブラリーのポリヌクレオチド配列は、ライブラリー配列の対応するＮ末端のフレームワーク３（ＦＲＭ３）領域をコードする５’ポリヌクレオチド配列をさらに含み、そこにおいて、ＦＲＭ３領域は、約１～約９個のアミノ酸残基の配列を含む。

【０２７７】

本発明の特定の実施形態では、ＦＲＭ３領域は、ＣＡＲ、ＣＡＫおよびＣＡＴからなる群より選択される配列を含む。

【０２７８】

本発明のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、ライブラリー配列の対応するＣ末端のフレームワーク４（ＦＲＭ４）領域をコードする３’ポリヌクレオチド配列をさらに含み、そこにおいて、ＦＲＭ４領域は、約１～約９個のアミノ酸残基の配列を含む。

【０２７９】

本発明の特定の実施形態では、ライブラリーは、ＷＧＲＧおよびＷＧＱＧより選択される配列を含むＦＲＭ４領域を含む。

【０２８０】
本発明のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、ＣＡＲ、ＣＡＫおよびＣＡＴからなる群より選択される配列を含む、対応するポリペプチド配列をコードするＦＲＭ３領域、ならびに、ＷＧＲＧおよびＷＧＱＧより選択される配列を含む、対応するポリペプチド配列をコードするＦＲＭ４領域をさらに含む。
【０２８１】
本発明の特定の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、重鎖シャーシとの相同組換えを促進する５’および３’配列をさらに含む。
【０２８２】
いくつかの実施形態では、本発明は、下記式によって表されるヒト抗体κ軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む、合成免疫前ヒト抗体軽鎖ライブラリーを含む：
［ＩＧＫＶ（１～９５）］［Ｆ／Ｌ／Ｉ／Ｒ／Ｗ／Ｙ］［ＪＫ］。
【０２８３】
本発明の特定の実施形態では、［ＩＧＫＶ（１～９５）］は、
【０２８４】
【化３６】

IGKV3-20 (1-95), IGKV1-39 (1-95), IGKV3-11 (1-95), IGKV3-15 (1-95), IGKV1-05 (1-95), IGKV4-01 (1-95), IGKV2-28 (1-95), IGKV 1-33 (1-95), IGKV1-09 (1-95), IGKV1-12 (1-95), IGKV2-30 (1-95), IGKV1-27 (1-95), IGKV1-16 (1-95),

からなる群、および、Ｋａｂａｔに従う、位置９５を含む位置９５までの前記群の切断物より選択される。
【０２８５】
本発明のいくつかの実施形態では、［Ｆ／Ｌ／Ｉ／Ｒ／Ｗ／Ｙ］は、Ｆ、Ｌ、Ｉ、Ｒ、ＷおよびＹからなる群より選択されるアミノ酸である。
【０２８６】
本発明の特定の実施形態では、［ＪＫ］は、ＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫおよびＴＦＧＧＧＴからなる群より選択される配列を含む。
【０２８７】
本発明のいくつかの実施形態では、軽鎖ライブラリーは、κ軽鎖ライブラリーを含む。
【０２８８】
本発明の特定の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、軽鎖シャーシとの相同組換えを促進する５’および３’配列をさらに含む。
【０２８９】
いくつかの実施形態では、本発明は、10^{7}～10^{8}個のポリヌクレオチド配列を含む合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリーを生成するための方法であって、
ａ）以下の通り、ＣＤＲＨ３配列によってコードされるＣＤＲＨ３ポリヌクレオチド配列を選択すること：
｛ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）によって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって優先的に機能的に発現されるアミノ酸のうち１０個未満からなる群より選択される０～５個のアミノ酸｝、続いて
｛ＩＧＨＤのすべての可能なＮ末端またはＣ末端の切断物単独、ならびに、Ｎ末端およびＣ末端の切断物のすべての可能な組合せ｝、続いて
｛ＴｄＴによって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって優先的に機能的に発現されるアミノ酸のうち１０個未満からなる群より選択される０～５個のアミノ酸｝、続いて
｛ＤＸＷＧまでのＩＧＨＪのすべての可能なＮ末端切断物であって、Ｘは、Ｓ、Ｖ、ＬまたはＹである｝、ならびに
ｂ）化学合成によってａ）に記載のＣＤＲＨ３ライブラリーを合成することであって、

合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリーが生成されること
を含む方法を含む。
【０２９０】
特定の実施形態では、本発明は、以下の式で表される、ＣＤＲＨ３をコードする既知のヒトＩＧＨＤおよびＩＧＨＪ生殖系列配列を表す10^7～10^{10}個のポリヌクレオチド配列を含む、合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリーを含む：すなわち、
｛ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）によって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって優先的に機能的に発現されるアミノ酸のうち１０個未満からなる群より選択される０～５個のアミノ酸｝、続いて
｛ＩＧＨＤのすべての可能なＮ末端またはＣ末端の切断物単独、ならびに、Ｎ末端およびＣ末端の切断物のすべての可能な組合せ｝、続いて
｛ＴｄＴによって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって優先的に機能的に発現されるアミノ酸のうち１０個未満からなる群より選択される０～５個のアミノ酸｝、続いて
｛ＤＸＷＧまでのＩＧＨＪのすべての可能なＮ末端切断物であって、Ｘは、Ｓ、Ｖ、ＬまたはＹである｝。
【０２９１】
特定の実施形態では、本発明は、ヒト抗体重鎖可変ドメインをコードする10^7～10^{10}個のポリヌクレオチド配列を含む合成免疫前ヒト抗体重鎖可変ドメインライブラリーであって、
ａ）抗体重鎖シャーシ、および
ｂ）以下の通り、ヒトＩＧＨＤおよびＩＧＨＪ生殖系列配列に基づいて設計されるＣＤＲＨ３レパートリー、
｛ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（ＴｄＴ）によって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって優先的に機能的に発現されるアミノ酸のうち１０個未満からなる群より選択される０～５個のアミノ酸｝、続いて
｛ＩＧＨＤのすべての可能なＮ末端またはＣ末端の切断物単独、ならびに、Ｎ末端およびＣ末端の切断物のすべての可能な組合せ｝、続いて
｛ＴｄＴによって優先的にコードされ、ヒトＢ細胞によって優先的に機能的に発現されるアミノ酸のうち１０個未満からなる群より選択される０～５個のアミノ酸｝、続いて
｛ＤＸＷＧまでのＩＧＨＪのすべての可能なＮ末端切断物であって、Ｘは、Ｓ、Ｖ、ＬまたはＹである｝
を含むライブラリーを含む。
【０２９２】
本発明のいくつかの実施形態では、合成免疫前ヒト抗体重鎖可変ドメインライブラリーは、ＩｇＧ１完全長鎖、ＩｇＧ２完全長鎖、ＩｇＧ３完全長鎖およびＩｇＧ４完全長鎖からなる群より選択される完全長鎖として発現される。
【０２９３】
本発明の特定の実施形態では、ヒト抗体重鎖シャーシは、
【０２９４】
【化３７－１】

IGHV4-34, IGHV3-23, IGHV5-51, IGHV1-69,
IGHV3-30, IGHV4-39, IGHV1-2, IGHV1-18, IGHV2-5, IGHV2-70, IGHV3-7,
IGHV6-1, IGHV1-46, IGHV3-33, IGHV4-31, IGHV4-4, IGHV4-61, および IGHV3-15.

からなる群より選択される。
【０２９５】
本発明のいくつかの実施形態では、合成免疫前ヒト抗体重鎖可変ドメインライブラリーは、ヒト抗体重鎖可変ドメインをコードする10^7～10^{10}個のポリヌクレオチド配列を含み、

ａ）抗体重鎖シャーシ、および
ｂ）合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリー
を含む。
【０２９６】
本発明のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、一本鎖のポリヌクレオチドコード配列である。
【０２９７】
本発明の特定の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、一本鎖のポリヌクレオチド非コード配列である。
【０２９８】
本発明のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、二本鎖のポリヌクレオチド配列である。
【０２９９】
特定の実施形態では、本発明は４時間以下の倍加時間を有する複製可能な細胞の集団を含み、そこにおいて、合成免疫前ヒト抗体レパートリーが発現される。
【０３００】
本発明のいくつかの実施形態では、複製可能な細胞の集団は、酵母細胞である。
【０３０１】
特定の実施形態では、本発明は、免疫前ヒト抗体重鎖可変ドメインライブラリーおよび合成免疫前ヒト抗体軽鎖ライブラリーで細胞を形質転換するステップを含む、完全長抗体ライブラリーを生成する方法を含む。
【０３０２】
いくつかの実施形態では、本発明は、免疫前ヒト抗体重鎖可変ドメインライブラリーおよび合成免疫前ヒト抗体軽鎖ライブラリーで細胞を形質転換するステップを含む、完全長抗体ライブラリーを生成する方法を含む。
【０３０３】
特定の実施形態では、本発明は、スプリットプールＤＮＡ合成によってポリヌクレオチド配列を合成するステップを含む、抗体ライブラリーを生成する方法を含む。
【０３０４】
本発明のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、一本鎖のポリヌクレオチドコード配列、一本鎖のポリヌクレオチド非コード配列および二本鎖のポリヌクレオチド配列からなる群より選択される。
【０３０５】
特定の実施形態では、本発明は、既知の重鎖ＣＤＲ３配列で見出される配列多様性および長さ多様性を表す約10^7～約10^{10}個のポリヌクレオチド配列を含む、合成完全長免疫前ヒト抗体ライブラリーを含む。
【０３０６】
特定の実施形態では、本発明は、ヒト抗体ライブラリーから対象とする抗体を選択する方法であって、既知の重鎖ＣＤＲ３配列で見出される配列多様性および長さ多様性を表す（Ｎ）ポリヌクレオチド配列の理論的多様性を含む、合成免疫前ヒト抗体ＣＤＲＨ３ライブラリーを提供するステップであって、その多様性の物理的実現が少なくとも３（Ｎ）のサイズの実際のライブラリーであり、それによって、対象とする単一の抗体がライブラリーに存在する９５％の確率を提供するステップと、対象とする抗体を選択するステップとを含む方法を含む。
【０３０７】
本発明のいくつかの実施形態では、理論的多様性は、約10^7～約10^8個のポリヌクレオチド配列である。
【実施例】
【０３０８】
本発明を下記の実施例によりさらに例示するが、これらの実施例は限定であると解釈さ

れるべきではない。本出願中に引用されるすべての参考文献、特許および特許出願公開公報の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３０９】

全般的に、本発明の実施は、特に表示しない限り、化学、分子生物学、組換えＤＮＡ技術、ＰＣＲ技術、免疫学（特に、例えば抗体技術）、発現系（例えば、酵母発現、無細胞発現、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイおよびＰＲＯＦＵＳＩＯＮ（商標））ならびに当分野の技術の範囲内であり、文献に説明されている任意の必須な細胞培養の既存の技術を用いる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ およびＭａｎｉａｔｉｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９年）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ、第１巻および第２巻、（Ｄ．Ｎ．Ｇｌｏｖｅｒ編、１９８５年）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編、１９８４年）；ＰＣＲ Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｂｅａｕｃａｇｅ編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（１９９９年）（編集者）；Ｏｘｆｏｒｄ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、Ｎｅｉｄｌｅ編、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖ Ｐｒｅｓｓ（１９９９年）；ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｉｎｎｉｓ ら、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９０年）；ＰＣＲ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ：Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ｂｕｒｋｅ編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎ Ｌｔｄ（１９９６年）；Ｔｈｅ ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ：ＲＴ－ＰＣＲ、Ｓｉｅｂｅｒｔ編、Ｅａｔｏｎ Ｐｕｂ．Ｃｏ．（１９９８年）；Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）、５１０巻、Ｐａｕｌ， Ｓ．、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒ （１９９６年）；Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ Ｓｅｒｉｅｓ、１６９巻）、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ編、Ｉｒｌ Ｐｒ（１９９６年）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｈａｒｌｏｗら、Ｃ．Ｓ．Ｈ．Ｌ．Ｐｒｅｓｓ， Ｐｕｂ．（１９９９年）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（１９９２年）；Ｌａｒｇｅ－Ｓｃａｌｅ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｌｕｂｉｎｉｅｃｋｉ， Ａ．編、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ， Ｐｕｂ．（１９９０年）；Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃ．Ｂａｒｂａｓ（編）、ＣＳＨＬ Ｐｒｅｓｓ、（２００１年）；Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ、Ｐ Ｏ’Ｂｒｉｅｎ（編）、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２００１年）；Ｂｏｒｄｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１９９７年、１５巻：５５３頁；Ｂｏｒｄｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．、２０００年、３２８巻：４３０頁；米国特許第６，３４８，３１５号においてＰｌｕｃｋｔｈｕｎらにより記載されたリボソームディスプレイならびに米国特許第６，２５８，５５８号；第６，２６１，８０４号；および第６，２１４，５５３号においてＳｚｏｓｔａｋらにより記載された Ｐｒｏｆｕｓｉｏｎ（商標）；ならびにＵＳ２００４００５８４０３Ａ１に記載された細菌のペリプラスム発現を参照されたい。この段落に引用された参考文献は、各々参照によりその全体が組み込まれる。

【０３１０】

アラインメントされたヌクレオチドおよびアミノ酸配列をスクリーニングするための、Ｋａｂａｔの慣習およびプログラムを使用する抗体配列分析に関するさらなる詳細は、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２００４年、２４８巻：１１頁；Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９８年、１０巻：１８０１頁；Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９５年、５１巻：１頁；Ｗｕら、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、１９９３年、１６巻：１頁；およびＭａｒｔｉｎ、Ｐ

ｒｏｔｅｉｎｓ、１９９６年、２５巻：１３０頁に認めることができる。この段落に引用された参考文献は、各々参照によりその全体が組み込まれる。

【０３１１】

Ｃｈｏｔｈｉａの慣習を使用する抗体配列分析に関するさらなる詳細は、例えば、Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９８年、２７８巻：４５７頁；Ｍｏｒｅａら、Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｃｈｅｍ．、１９９７年、６８巻：９頁；Ｍｏｒｅａ ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９８年、２７５巻：２６９頁；Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９７年、２７３巻：９２７頁；Ｂａｒｒｅ ら、Ｎａｔ， Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、１９９４年、１巻：９１５頁；Ｃｈｏｔｈｉａ ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９２年、２２７巻：７９９頁；Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｎａｔｕｒｅ、１９８９年、３４２巻：８７７頁；およびＣｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９８７年、１９６巻：９０１頁に認めることができる。ＣＤＲＨ３の高次構造のさらなる分析は、Ｓｈｉｒａｉら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．、１９９９年、４５５巻：１８８頁およびＳｈｉｒａｉら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．、１９９６年、３９９巻：１頁に認めることができる。Ｃｈｏｔｈｉａの分析に関するさらなる詳細は、例えば、Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ．Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ Ｂｉｏｌ．、１９８７年、５２巻：３９９頁に記載されている。この段落に引用された参考文献は、各々参照によりその全体が組み込まれる。

【０３１２】

ＣＤＲ接触の考慮に関するさらなる詳細は、例えば、参照によりその全体が組み込まれるＭａｃＣａｌｌｕｍら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９６年、２６２巻：７３２頁に記載されている。

【０３１３】

本明細書において意味す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 ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９２年、２２７巻：７７６頁、ＶＢＡＳＥ２（Ｒｅｔｔｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２００５年、３３巻：Ｄ６７１頁）；ＢＬＡＳＴ（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）に認められる。この段落に引用された参考文献は、各々参照によりその全体が組み込まれる。

【０３１４】

（実施例１）

例示的ＶＨシャーシライブラリーの設計

この実施例は、本発明の例示的な、限定されないＶＨシャーシ配列の選択および設計を実証する。ＶＨシャーシ配列を、ヒトＩＧＨＶ生殖系列配列（Ｓｃａｖｉｎｅｒ ら、Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．、１９９９年、１６巻：２３４頁； Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９２年、２２７巻：７９９頁； Ｍａｔｓｕｄａら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１９９８年、１８８巻：２１５１頁、各々参照によりその全体が組み込まれる）のコレクションを調べることによって選択した。詳細な説明および下記において述べたように、これらのデータ供給源または他の供給源から、ライブラリーに包括するために、さまざまな基準を使用してＶＨシャーシ配列を選択できる。

【０３１５】

表３（Ｓｃａｖｉｎｅｒら、Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．、１９９９年、１６巻：２３４頁；Ｍａｔｓｕｄａら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１９９８年、１８８巻：２１５１頁；およびＷａｎｇら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、２００８年、８６巻：１１１頁に提供された情報から適合し、各々参照によりその全体が組み込まれる）は、各ヒトＩＧＨＶ生殖系列配列によりコードされるタンパク質に関するＣＤＲＨ

１およびＣＤＲＨ２の長さ、基準構造および末梢血中の推定される相対的出現率を挙げている。

【０３１６】

【表３】

表3. 末梢血由来の抗体におけるIGHVの特性および出現率

生殖系列 IGHV	CDRH1 の長さ	CDRH2 の長さ	基準構造[1]	末梢血中の推定される 相対的出現率[2]
IGHV1-2	5	17	1-3	37
IGHV1-3	5	17	1-3	15
IGHV1-8	5	17	1-3	13
IGHV1-18	5	17	1-2	25
IGHV1-24	5	17	1-U	5
IGHV1-45	5	17	1-3	0
IGHV1-46	5	17	1-3	25
IGHV1-58	5	17	1-3	2
IGHV1-69	5	17	1-2	58
IGHV2-5	7	16	3-1	10
IGHV2-26	7	16	3-1	9
IGHV2-70	7	16	3-1	13
IGHV3-7	5	17	1-3	26
IGHV3-9	5	17	1-3	15
IGHV3-11	5	17	1-3	13
IGHV3-13	5	16	1-1	3
IGHV3-15	5	19	1-4	14
IGHV3-20	5	17	1-3	3
IGHV3-21	5	17	1-3	19
IGHV3-23	5	17	1-3	80
IGHV3-30	5	17	1-3	67
IGHV3-33	5	17	1-3	28
IGHV3-43	5	17	1-3	2
IGHV3-48	5	17	1-3	21
IGHV3-49	5	19	1-U	8
IGHV3-53	5	16	1-1	7
IGHV3-64	5	17	1-3	2
IGHV3-66	5	17	1-3	3
IGHV3-72	5	19	1-4	2
IGHV3-73	5	19	1-4	3
IGHV3-74	5	17	1-3	14
IGHV4-4	5	16	1-1	33
IGHV4-28	6	16	2-1	1
IGHV4-31	7	16	3-1	25
IGHV4-34	5	16	1-1	125
IGHV4-39	7	16	3-1	63
IGHV4-59	5	16	1-1	51
IGHV4-61	7	16	3-1	23
IGHV4-B	6	16	2-1	7
IGHV5-51	5	17	1-2	52
IGHV6-1	7	18	3-5	26
IGHV7-4-1	5	17	1-2	8

[1]Chothiaら、J. Mol. Biol.、1992年、227巻:799頁から適合

[2]Wangら、Immunol. Cell. Biol.、2008年、86巻:111頁の表S1から適合

現在例示されたライブラリーにおいて、１７の生殖系列配列を、ライブラリーのＶＨシャーシにおける提示に選択した（表４）。下記により詳細に記載したように、これらの配列は、シャーシの構造的多様性および診療所で使用される抗体中の特定の生殖系列配列の提示を考慮して、成人の末梢血における比較的高い提示に基づいて選択した。これらの

１７の配列は、表４の結果を導くために使用された重鎖配列の全サンプルの約７６％を占める。詳細な説明に要約したように、これらの基準は非限定的であり、当業者は、さまざまな他の基準もＶＨシャーシ配列の選択に使用でき、本発明が、表４に提示された１７のＶＨシャーシ遺伝子を含むライブラリーに限定されないことを容易に認識するであろう。

【０３１７】

【表４】

表4. 例示的ライブラリーにおける使用のために選択されたVHシャーシ

VH シャーシ	相対的出現率	CDRH1の長さ	CDRH2の長さ	注釈
VH1-2	37	5	17	VH1ファミリーに関して最も使用頻度が高いものの1つ
VH1-18	25	5	17	VH1ファミリーに関して最も使用頻度が高いものの1つ
VH1-46	25	5	17	VH1ファミリーに関して最も使用頻度が高いものの1つ
VH1-69	58	5	17	VH1ファミリーに関して最も使用頻度が高い。4つの選択されたVH1シャーシがVH1レパートリーの約80%を表す
VH3-7	26	5	17	VH3ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH3-15	14	5	19	使用頻度は最も高いものの1つではないが、独特の構造(長さ19のH2)を有する。このような構造を有するものの中では最も出現率が高い
VH3-23	80	5	17	VH3ファミリーの中で最も使用頻度が高い
VH3-30	67	5	17	VH3ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH3-33	28	5	17	VH3ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH3-48	21	5	17	VH3ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ。6つの選択されたVH3シャーシが、VH3レパートリーの約70%を占める。
VH4-31	25	7	16	VH4ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH4-34	125	5	16	VH4ファミリーの中で最も使用頻度が高い
VH4-39	63	7	16	VH4ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH4-59	51	5	16	VH4ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH4-61	23	7	16	VH4ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つ
VH4-B	7	6	16	VH4ファミリーの中で最も使用頻度が高いものの1つではないが、独特の構造(長さ6のH1)を有する。6つの選択されたVH4シャーシが、VH4ファミリーレパートリーの90%近くを占める。
VH5-51	52	5	17	使用頻度が高い

ライブラリーのこの特定の実施形態では、ＩＧＨＶ２、ＩＧＨＶ６およびＩＧＨＶ７生殖系列ファミリー中の配列に由来するＶＨシャーシは含まれなかった。詳細な説明において記載したように、この例示は、限定を意味するものではなく、いくつかの実施形態では、調査されていない可能性があるさらなる多様性を有するライブラリーを作製するため、

またはこれらのＩＧＨＶファミリーの特性および可能性をより詳細に研究するために、これらのファミリーの１つまたは複数を含むことが、類似配列を有する抗体についての臨床的情報が特に利用可能になり望ましい場合がある。本発明のライブラリーのモジュール設計は、これらおよび他のＶＨシャーシ配列の導入を容易に可能にする。ライブラリーのこの特定の実施形態に利用する、ＩＧＨＶ生殖系列配列に由来するＶＨシャーシのアミノ酸配列を、表５に提示する。誘導手順の詳細を下記に提示する。

【０３１８】

【表５－１】

表5. 例示的ライブラリーに包括するために選択されたVHシャーシに関するアミノ酸配列

シャーシ	配列番号	FRM1	CDRH1	FRM2	CDRH2	FRM3
VH1-2		QVQLVQSG AEVKKPGA	GYYMH	WVRQAPG QGLEWMG	WINPNSG GTNYAQK	RVTMTRDTSI STAYMELSRL

【０３１９】

【表５－２】

		SVKVSCKA SGYTFT			FQG	RSDDTAVYYC AR
VH1-18		QVQLVQSG AEVKKPGA SVKVSCKA SGYTFT	SYGIS	WVRQAPG QGLEWMG	WISAYNG NTNYAQK LQG	RVTMTTDTST STAYMELRSL RSDDTAVYYC AR
VH1-46		QVQLVQSG AEVKKPGA SVKVSCKA SGYTFT	SYYMH	WVRQAPG QGLEWMG	IINPSGG STSYAQK FQG	RVTMTRDTST STVYMELSSL RSEDTAVYYC AR
VH1-69		QVQLVQSG AEVKKPGS SVKVSCKA SGGTFS	SYAIS	WVRQAPG QGLEWMG	GIIPIFG TANYAQK FQG	RVTITADKST STAYMELSSL RSEDTAVYYC AR
VH3-7		EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA SGFTFS	SYWMS	WVRQAPG KGLEWVA	NIKQDGS EKYYVDS VKG	RFTISRDNAK NSLYLQMNSL RAEDTAVYYC AR
VH3-15[1]		EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAA SGFTFS	NAWMS	WVRQAPG KGLEWVG	RIKSKTD GGTTDYA APVKG	RFTISRDDSK NTLYLQMNSL **RA**EDTAVYYC **AR**
VH3-23		EVQLLESG GGLVQPGG SLRLSCAA SGFTFS	SYAMS	WVRQAPG KGLEWVS	AISGSGG STYYADS VKG	RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC AK
VH3-30		QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA SGFTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VISYDGS NKYYADS VKG	RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC AR
VH3-33		QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA SGFTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGS NKYYADS VKG	RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC AR
VH3-48		EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA SGFTFS	SYSMN	WVRQAPG KGLEWVS	YISSSSS TIYYADS VKG	RFTISRDNAK NSLYLQMNSL RAEDTAVYYC AR
VH4-31		QVQLQESG PGLVKPSQ TLSLTCTV SGGSIS	SGGYY WS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC AR

【０３２０】

【表５－３】

VH4-34[2]		QVQLQQWG AGLLKPSE TLSLTCAV YGGSFS	GYYWS	WIRQPPG KGLEWIG	EI**DHS**GS TNYNPSL KS	RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC AR
VH4-39		QLQLQESG PGLVKPSE TLSLTCTV SGGSIS	SSSYY WG	WIRQPPG KGLEWIG	SIYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC AR
VH4-59		QVQLQESG PGLVKPSE TLSLTCTV SGGSIS	SYYWS	WIRQPPG KGLEWIG	YIYYSGS TNYNPSL KS	RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC AR
VH4-61		QVQLQESG PGLVKPSE TLSLTCTV SGGSVS	SGSYY WS	WIRQPPG KGLEWIG	YIYYSGS TNYNPSL KS	RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC AR
VH4-B		QVQLQESG PGLVKPSE TLSLTCAV SGYSIS	SGYYW G	WIRQPPG KGLEWIG	SIYHSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC AR
VH5-51		EVQLVQSG AEVKKPGE SLKISCKG SGYSFT	SYWIG	WVRQMPG KGLEWMG	IIYPGDS DTRYSPS FQG	QVTISADKSI STAYLQWSSL KASDTAVYYC AR

[1] VH3-15中の元のKT配列をRA（太字/下線）に、およびTTをAR（太字/下線）に、ライブラリーに包括するために選択された他のVH3ファミリーメンバーと一致させるために突然変異させた。RAに対する修飾を、約20アミノ酸までの独特の配列伸長がないように実施した。理論に束縛されないが、この修飾が、VH3-15-由来シャーシ配列に新規なT細胞エピトープを導入する確率を減少させることが期待される。T細胞エピトープの回避は、本発明の特定のライブラリーの設計において考慮できるさらなる基準である。

[2] CDR-H2中の考えられるN結合型グリコシル化部位を除去するために、VH4-34中の元のNHSのモチーフをDHSに突然変異させた。本発明の特定の実施形態では、例えば、ライブラリーを酵母に形質転換する場合、このことにより、望ましくないN結合型グリコシル化を防ぐことができる。

表５は、１７のシャーシのアミノ酸配列を提供する。ヌクレオチドの欄において、対応する生殖系列ヌクレオチド配列の大部分は、２個の追加のヌクレオチド（すなわち、コドンの２／３）を３’末端に含む。ほとんどの場合、それらの２個のヌクレオチドはＧＡである。多くの場合ヌクレオチドは、ＩＧＨＤ遺伝子セグメントにより組み換える前にインビボでＩＧＨＶ由来遺伝子セグメントの３’末端に付加される。任意の追加のヌクレオチドから、下記の２種のアミノ酸：Ａｓｐ（コドンが

【０３２１】

【化３７－２】

GA**C** または GA**T**

の場合）またはＧｌｕ（コドンが

【０３２２】

【化３７－３】

GA**A** または GA**G**

の場合）の１つをコードするコドンが得られる。２個の３’末端ヌクレオチドの１つまたは双方は、最終的に再構成された重鎖配列において欠失されてもよい。Ａのみが欠失された場合、得られたアミノ酸は非常に高い頻度でＧである。双方のヌクレオチドが欠失され

た場合、この位置は「空」であるが、一般的なＶ－Ｄの付加またはＩＧＨＤ遺伝子によりコードされるアミノ酸が続く。さらなる詳細を実施例５に提示する。ＦＲＭ３（表５）のＣ末端のＣＡＲまたはＣＡＫモチーフの後のこの最初の位置を、「尾部」と呼ぶ。ライブラリーの現在例示された実施形態では、この残基はＧ、Ｄ、Ｅであってもよく、または何も存在しなくてもよい。したがって、上（表５）に列挙した任意のシャーシに尾部を付加することは、下記の４種の概略的配列のうちの１種を作製でき、ＶＨシャーシの後の残基が尾部である：

（１）　［ＶＨ＿シャーシ］－［Ｇ］
（２）　［ＶＨ＿シャーシ］－［Ｄ］
（３）　［ＶＨ＿シャーシ］－［Ｅ］
（４）　［ＶＨ＿シャーシ］

これらの構造はフォーマット：
［ＶＨ＿シャーシ］－［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］
で表すこともでき、ハイフン記号（－）は空またはゼロの位置を示す。

【０３２３】

定義の項で定義されたＣＤＲＨ３番号付けシステムを使用すると、上記の配列は、例えば、（１）、（２）および（３）はそれぞれ、アミノ酸９５にＧ、ＤまたはＥを有することを示すことができ、一方例４の配列は９５位を有さず、ＣＤＲＨ３の特有部は９６位または９７位から始まる。

【０３２４】

本発明のいくつかの実施形態では、基準構造１－１（ＣＤＲＨ１中に５個の残基およびＣＤＲＨ２に関して１６）を有するＶＨ３－６６をライブラリーに含むことができる。ＶＨ３－６６の包括は、ライブラリーから他のシャーシの除去に関して補正でき、他のシャーシはいくつかの条件下（例えば、ＶＨ４－３４およびＶＨ４－５９）で、酵母においてあまり発現できない。

【０３２５】

（実施例２）

ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２内に変異を有するＶＨシャーシ変異体の設計

この実施例は、実施例１に示した各シャーシへのＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２領域中に突然変異を起こすことによる、さらなる多様性のＶＨシャーシの導入を実証する。下記の研究方法を使用して、各シャーシに関するアミノ酸変異の位置および性質を選択した：まず、再構成されたヒト重鎖抗体配列間の配列同一性を分析し（Ｌｅｅら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁；Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁）、それらを、それらの個々のＩＧＨＶ生殖系列配列の起源により分類した。例示的な例として、データセット中の約２００の配列はＩＧＨＶ１－６９生殖系列に非常に高い同一性を示し、それらがＩＧＨＶ１－６９に由来したと思われることを示した。次に、実施例１において選択された各生殖系列ファミリー中の、ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２セグメント内の各位置におけるアミノ酸残基の出現率を確定した。ＶＨ１－６９に関して、これらの出現率を表６および表７に例示する。第２に、可能であれば、置き換えとして中性および／または小型のアミノ酸残基が好ましかった。理論に束縛されないが、これらのアミノ酸残基の選択の理論的根拠は、ＣＤＲ配列の多様性の表示に関してより柔軟であり、より立体的に遮蔽されていない状態を提供することが望ましい。

【０３２６】

【表６】

表6. IGHV1-69由来CDRH1配列内の各位置におけるアミノ酸残基の出現率

	31	32	33	34	35
	S	Y	A	I	S
A	1	0	**129**	0	0
C	0	1	0	0	2
D	0	5	1	0	0
E	0	0	0	0	0
F	0	9	1	8	0
G	0	0	**24**	0	3
H	2	11	0	0	4
I	2	0	0	**159**	1
K	3	0	0	0	0
L	0	**10**	2	5	0
M	1	0	0	0	0
N	**21**	2	2	0	**27**
P	0	0	1	0	0
Q	1	1	0	0	5
R	9	0	0	0	1
S	**133**	3	7	0	**129**
T	12	1	**10**	0	12
V	0	0	7	13	0
W	0	0	0	0	0
Y	0	**142**	1	0	1

【０３２７】

【表７】

表7. IGHV1-69由来CDRH2配列内の各位置におけるアミノ酸残基の出現率

	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G
A	0	0	7	0	2	0	4	3	132	0	0	178	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	1	0	0	0	0	0	11	0	1	21	0	0	0	2	0	0	12
E	2	0	0	0	0	0	4	0	0	2	0	1	1	4	0	2	0
F	0	1	0	1	7	119	0	0	0	0	0	0	0	0	180	0	0
G	135	0	1	0	0	0	155	0	3	1	0	0	0	0	0	0	173
H	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	4	0	3	0	0	4	0
I	0	166	159	0	132	2	0	34	0	2	1	0	0	0	0	0	0
K	1	0	0	0	0	0	0	4	1	5	0	0	2	156	0	3	0
L	0	1	2	0	16	37	0	1	0	0	0	0	0	0	3	2	0
M	0	6	2	0	9	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	1	0	2	0	5	0	0	132	1	0	0	8	0	0	0
P	0	2	0	181	1	3	0	0	15	0	0	3	6	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	173	2	0	164	0
R	44	0	0	0	0	0	1	4	0	3	0	0	0	13	0	9	0
S	1	0	1	1	2	6	3	5	8	7	0	2	0	0	1	0	0
T	1	1	7	2	2	1	0	127	15	8	3	1	0	0	0	0	0
V	0	8	5	0	11	4	0	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0
W	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0	11	1	0	0	0	176	0	0	0	1	1	0

元の生殖系列配列を、表の２番目の行、残基番号のすぐ下に太字フォントで載せている（Ｋａｂａｔ系）。表の項目は、所与のアミノ酸残基（第１列）が、表示のＣＤＲＨ１（表６）またはＣＤＲＨ２（表７）の位置において観察されている回数を示す。例えば、３３位においてアミノ酸型Ｇ（グリシン）は、検査した一連のＩＧＨＶ１－６９－に基づく配列中に２４回観察されている。したがって、上記の基準を用いて、変異体は３１位がＮ、３２位がＬ（いくつかの条件下でＨに変化し得る）、３３位がＧおよびＴ、３４位において変異体はなく、３５位がＮで構築されており、下記のＶＨ１－６９シャーシＣＤＲＨ

１－１アミノ酸変異体配列をもたらす：
【０３２８】
【化３８】

NYAIS (**配列番号** ___)
S**L**AIS (**配列番号** ___)
SY**G**IS (**配列番号** ___)
SY**T**IS (**配列番号** ___)
SYAI**N** (**配列番号** ___)

同様に、表７を作成した分析は、ＶＨ１－６９シャーシＣＤＲＨ２に関する下記の１アミノ酸変異体配列の選択のための根拠を提供した：
【０３２９】
【化３９】

SIIPIFGTANYAQKFQG (**配列番号** ___)
GI**A**PIFGTANYAQKFQG (**配列番号** ___)
GIIPI**L**GTANYAQKFQG (**配列番号** ___)
GIIPIFGTA**S**YAQKFQG (**配列番号** ___)

類似の研究方法を使用して、他の選択シャーシの変異体を設計および構築し、各例示的シャーシの個々に関して得られた、ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２の変異体を表８に載せる。当業者は、本明細書に記載の方法を用いて、他のＶＨシャーシおよびＶＬシャーシの変異体を作製できることを容易に認識するであろう。
【０３３０】

【表８－１】

表8. VHシャーシ変異体

シャーシ	CDRH1	配列番号	CDRH2	配列番号	シャーシ	CDRH1	配列番号	CDRH2	配列番号
1-18.0	SYGIS		WISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.0**	SYSMN		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.1	**N**YGIS		WISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.1**[1]	**N**YSMN		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.2	S**N**GIS		WISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.2**	**I**YSMN		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.3	SY**A**IS		WISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.3**	S**N**SMN		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.4	SYGI**T**		WISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.4**	SY**E**MN		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.5	SYGI**H**		WISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.5**	SY**N**MN		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.6	SYGIS		**S**ISAYNGNT NYAQKLQG		**3-48.6**	SYSM**T**		YISSSSTI YYADSVKG	
1-18.7	SYGIS		WIS**T**YNGNT NYAQKLQG		**3-48.7**	SYSMN		TISSSSTI YYADSVKG	
1-18.8	SYGIS		WIS**P**YNGNT NYAQKLQG		**3-48.8**	SYSMN		YISGSSTI YYADSVKG	
1-18.9	SYGIS		WIS**A**YNGNT YYAQKLQG		**3-48.9**	SYSMN		YISSSSTI **L**YADSVKG	

【０３３１】

【表８－２】

1-2.0	GYYMH		WINPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.0**	SYWMS		NIKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.1	**D**YYMH		WINPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.1**	**T**YWMS		NIKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.2	**R**YYMH		WINPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.2**	**N**YWMS		NIKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.3	G**S**YMH		WINPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.3**	S**S**WMS		NIKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.4	GY**S**MH		WINPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.4**	SY**G**MS		NIKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.5	GYYM**Q**		WINPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.5**	SYWM**T**		NIKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.6	GYYMH		**S**INPNSGGT NYAQKFQG		**3-7.6**	SYWMS		**S**IKQDGSEK YYVDSVKG
1-2.7	GYYMH		WINP**S**SGGT NYAQKFQG		**3-7.7**	SYWMS		NI**N**QDGSEK YYVDSVKG
1-2.8	GYYMH		WINPNSGGT **K**YAQKFQG		**3-7.8**	SYWMS		NIK**S**DGSEK YYVDSVKG
1-2.9	GYYMH		WINPNSGGT **S**YAQKFQG		**3-7.9**	SYWMS		NIKQDGSEK **Q**YVDSVKG
1-46.0	SYYMH		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.0**	SGGYYWS		YIYYSGSTY YNPSLKS

【０３３２】

【表８－３】

1-46.1	**N**YYMH		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.1**	SG**S**YYWS		YIYYSGSTY YNPSLKS	
1-46.2	S**S**YMH		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.2**	SG**T**YYWS		YIYYSGSTY YNPSLKS	
1-46.3	SY**S**MH		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.3**	SGG**T**YWS		YIYYSGSTY YNPSLKS	
1-46.4	SYY**I**H		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.4**	SGGY**S**WS		YIYYSGSTY YNPSLKS	
1-46.5	SYYM**V**		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.5**	SGGYYWS		**S**IYYSGSTY YNPSLKS	
1-46.6	SYYM**S**		IINPSGGST SYAQKFQG		**4-31.6**	SGGYYWS		**N**IYYSGSTY YNPSLKS	
1-46.7	SYYMH		**V**INPSGGST SYAQKFQG		**4-31.7**	SGGYYWS		YIYYSG**N**TY YNPSLKS	
1-46.8	SYYMH		IINP**G**GGST SYAQKFQG		**4-31.8**	SGGYYWS		YIYYSGST**S** YNPSLKS	
1-46.9	SYYMH		IINPSGGST **T**YAQKFQG		**4-31.9**	SGGYYWS		YIYYSGST**V** YNPSLKS	
1-69.0	SYAIS		GIIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.0**	GYYWS		EIDHSGSTN YNPSLKS	
1-69.1	**N**YAIS		GIIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.1**	**D**YYWS		EIDHSGSTN YNPSLKS	

【０３３３】

【表８－４】

1-69.2	S**L**AIS	GIIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.2**	GYYW**T**		EIDHSGSTN YNPSLKS
1-69.3	SY**G**IS	GIIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.3**	GYYWS		**D**IDHSGSTN YNPSLKS
1-69.4	SY**T**IS	GIIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.4**	GYYWS		EI**S**HSGSTN YNPSLKS
1-69.5	SYAI**N**	GIIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.5**	GYYWS		EID**Q**SGSTN YNPSLKS
1-69.6	SYAIS	**S**IIPIFGTA NYAQKFQG		**4-34.6**	GYYWS		EIDH**G**GSTN YNPSLKS
1-69.7	SYAIS	GI**A**PIFGTA NYAQKFQG		**4-34.7**	GYYWS		EIDHSG**N**TN YNPSLKS
1-69.8	SYAIS	GIIPI**L**GTA NYAQKFQG		**4-34.8**	GYYWS		EIDHSGST**S** YNPSLKS
1-69.9	SYAIS	GIIPIFGTA **S**YAQKFQG		**4-34.9**	GYYWS		EIDHSGST**D** YNPSLKS
3-15.0	NAWMS	RIKSKTDGG TTDYAAPVK G		**4-39.0**	SSSYYWG		SIYYSGSTY YNPSLKS
3-15.1	**K**AWMS	RIKSKTDGG TTDYAAPVK G		**4-39.1**	**T**SSYYWG		SIYYSGSTY YNPSLKS
3-15.2	**D**AWMS	RIKSKTDGG		**4-39.2**	S**N**SYYWG		SIYYSGSTY

【０３３４】

【表８－５】

			TTDYAAPVKG					YNPSLKS
3-15.3	NAL<u>M</u>S		RIKSKTDGGTTDYAAPVKG		**4-39.3**	SSD<u>Y</u>YWG		SIYYSGSTYYNPSLKS
3-15.4	NA<u>A</u>MS		RIKSKTDGGTTDYAAPVKG		**4-39.4**	SSN<u>Y</u>YWG		SIYYSGSTYYNPSLKS
3-15.5	NAWM<u>N</u>		RIKSKTDGGTTDYAAPVKG		**4-39.5**	SSR<u>Y</u>YWG		SIYYSGSTYYNPSLKS
3-15.6	NAWMS		**S**<u>I</u>KSKTDGGTTDYAAPVKG		**4-39.6**	SSSY<u>A</u>WG		SIYYSGSTYYNPSLKS
3-15.7	NAWMS		RIKS<u>T</u>TDGGTTDYAAPVKG		**4-39.7**	SSSYYWG		<u>N</u>IYYSGSTYYNPSLKS
3-15.8	NAWMS		RIKSK<u>A</u>DGGTTDYAAPVKG		**4-39.8**	SSSYYWG		SI<u>S</u>YSGSTYYNPSLKS
3-15.9	NAWMS		RIKSKTDGGTT<u>G</u>YAAPVKG		**4-39.9**	SSSYYWG		SIYYSGST<u>S</u>YNPSLKS
3-23.0	SYAMS		AISGSGGSTYYADSVKG		**4-59.0**	SYYWS		YIYYSGST<u>N</u>YNPSLKS

【０３３５】

【表８－６】

3-23.1	**N**YAMS	AISGSGGST YYADSVKG		**4-59.1**	**T**YYWS		YIYYSGSTN YNPSLKS				
3-23.2	**T**YAMS	AISGSGGST YYADSVKG		**4-59.2**	S**S**YWS		YIYYSGSTN YNPSLKS				
3-23.3	S**S**AMS	AISGSGGST YYADSVKG		**4-59.3**	SY**S**WS		YIYYSGSTN YNPSLKS				
3-23.4	SYAMS	**G**ISGSGGST YYADSVKG		**4-59.4**	SYYWS		**F**IYYSGSTN YNPSLKS				
3-23.5	SYAMS	**S**ISGSGGST YYADSVKG		**4-59.5**	SYYWS		**H**IYYSGSTN YNPSLKS				
3-23.6	SYAMS	**T**ISGSGGST YYADSVKG		**4-59.6**	SYYWS		**S**IYYSGSTN YNPSLKS				
3-23.7	SYAMS	**V**ISGSGGST YYADSVKG		**4-59.7**	SYYWS		YIY**S**SGSTN YNPSLKS				
3-23.8	SYAMS	AIS**A**SGGST YYADSVKG		**4-59.8**	SYYWS		YIYYSGST**D** YNPSLKS				
3-23.9	SYAMS	AISGSGGST **S**YADSVKG		**4-59.9**	SYYWS		YIYYSGS**T** YNPSLKS				
3-30.0	SYGMH	VISYDGSNK YYADSVKG		**4-61.0**	SGSYYWS		YIYYSGSTN YNPSLKS				
3-30.1	NYGMH	VISYDGSNK YYADSVKG		**4-61.1**	SG**G**YYWS		YIYYSGSTN YNPSLKS				

【０３３６】

【表８－７】

3-30.2	SY**A**MH		VISYDGSNK YYADSVKG		**4-61.2**	SG**N**YYWS		YIYYSGSTN YNPSLKS
3-30.3	SYG**F**H		VISYDGSNK YYADSVKG		**4-61.3**	SGS**S**YWS		YIYYSGSTN YNPSLKS
3-30.4	SYGMH		**F**ISYDGSNK YYADSVKG		**4-61.4**	SGSY**S**WS		YIYYSGSTN YNPSLKS
3-30.5	SYGMH		**L**ISYDGSNK YYADSVKG		**4-61.5**	SGSYYW**T**		YIYYSGSTN YNPSLKS
3-30.6	SYGMH		VIS**S**DGSNK YYADSVKG		**4-61.6**	SGSYYWS		**R**IYYSGSTN YNPSLKS
3-30.7	SYGMH		VISYDG**N**NK YYADSVKG		**4-61.7**	SGSYYWS		**S**IYYSGSTN YNPSLKS
3-30.8	SYGMH		VISYDGS**I**K YYADSVKG		**4-61.8**	SGSYYWS		YIY**T**SGSTN YNP**S**LKS
3-30.9	SYGMH		VISYDGSN**Q** YYADSVKG		**4-61.9**	SGSYYWS		YIYYSGST**S** YNPSLKS
3-33.0	SYGMH		VIWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.0**	SGYYWG		SIYHSGSTY YNPSLKS
3-33.1	**T**YGMH		VIWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.1**	S**A**YYWG		SIYHSGSTY YNPSLKS
3-33.2	**N**YGMH		VIWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.2**	SG**S**YWG		SIYHSGSTY YNPSLKS

【０３３７】

【表８－８】

3-33.3	S**S**GMH		VIWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.3**	SGY**N**WG		SIYHSGSTY YNPSLKS		
3-33.4	SY**A**MH		VIWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.4**	SGYYW**A**		SIYHSGSTY YNPSLKS		
3-33.5	SYGM**N**		VIWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.5**	SGYYWG		**T**IYHSGSTY YNPSLKS		
3-33.6	SYGMH		**L**IWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.6**	SGYYWG		S**S**YHSGSTY YNPSLKS		
3-33.7	SYGMH		**F**IWYDGSNK YYADSVKG		**4-B.7**	SGYYWG		SIYHSG**N**TY YNPSLKS		
3-33.8	SYGMH		VIWYDGSNK **S**YADSVKG		**4-B.8**	SGYYWG		SIYHSGST**N** YNPSLKS		
3-33.9	SYGMH		VIWYDGSNK **G**YADSVKG		**4-B.9**	SGYYWG		SIYHSGST**G** YNPSLKS		
					5-51.0	SYWIG		IIYPGDSDT RYSPSFQG		
					5-51.1	**T**YWIG		IIYPGDSDT RYSPSFQG		
					5-51.2	**N**YWIG		IIYPGDSDT RYSPSFQG		
					5-51.3	S**N**WIG		IIYPGDSDT RYSPSFQG		

【０３３８】

【表８－９】

	5-51.4	SY**Y**IG				IIYPGDSDT RYSPSFQG	
	5-51.5	SYWI**S**				IIYPGDSDT RYSPSFQG	
	5-51.6	SYWIG				**S**IYPGDSDT RYSPSFQG	
	5-51.7	SYWIG				IIYP**A**DSDT RYSPSFQG	
	5-51.8	SYWIG				IIYPGDS**S**T RYSPSFQG	
	5-51.9	SYWIG				IIYPGDSDT **T**YSPSFQG	

[1]**所望であれば、本明細書に記載のように除去できるN結合型グリコシル化部位を含む。**

詳細な説明において明記したように、他の基準を使用してどのアミノ酸が改変されるか、および得られた改変配列の同一性を選択できる。このことは、本発明の任意の重鎖シャ

ーシ配列または任意の他の配列に当てはまる。上に要約した研究方法は例示的目的を意味し、限定されない。

【０３３９】

（実施例３）

例示的ＶＫシャーシライブラリーの設計

この実施例は、例示的ＶＫシャーシライブラリーの設計について説明する。当業者は、類似の原理を使用して、Ｖλライブラリーまたは ＶＫおよびＶλシャーシの双方を含有するライブラリーを設計できることを認識するであろう。Ｖλシャーシライブラリーの設計を実施例４に提示する。

【０３４０】

実施例１において既に実証したように、ＩＧＨＶ生殖系列配列に関して、配列特性および末梢血由来の抗体におけるヒトＩＧＫＶ生殖系列配列の出現率を分析した。データを、表９に提示する。

【０３４１】

【表９】

表9. 末梢血由来の抗体におけるIGKV遺伝子の特性および出現率

IGKV遺伝子	代替名	CDRL1の長さ	CDRL2の長さ	基準構造[1]	末梢血における推定される相対的出現率[2]
IGKV1-05	L12	11	7	2-1-(U)	**69**
IGKV1-06	L11	11	7	2-1-(1)	14
IGKV1-08	L9	11	7	2-1-(1)	9
IGKV1-09	L8	11	7	2-1-(1)	**24**
IGKV1-12	L5, L19	11	7	2-1-(1)	**32**
IGKV1-13	L4, L18	11	7	2-1-(1)	13
IGKV1-16	L1	11	7	2-1-(1)	15
IGKV1-17	A30	11	7	2-1-(1)	**34**
IGKV1-27	A20	11	7	2-1-(1)	**27**
IGKV1-33	O8, O18	11	7	2-1-(1)	**43**
IGKV1-37	O14, O4	11	7	2-1-(1)	3
IGKV1-39	O2, O12	11	7	2-1-(1)	**147**
IGKV1D-16	L15	11	7	2-1-(1)	6
IGKV1D-17	L14	11	7	2-1-(1)	1
IGKV1D-43	L23	11	7	2-1-(1)	1
IGKV1D-8	L24	11	7	2-1-(1)	1
IGKV2-24	A23	16	7	4-1-(1)	8
IGKV2-28	A19, A3	16	7	4-1-(1)	**62**
IGKV2-29	A18	16	7	4-1-(1)	6
IGKV2-30	A17	16	7	4-1-(1)	**30**
IGKV2-40	O1, O11	17	7	3-1-(1)	3
IGKV2D-26	A8	16	7	4-1-(1)	0
IGKV2D-29	A2	16	7	4-1-(1)	**20**
IGKV2D-30	A1	16	7	4-1-(1)	4
IGKV3-11	L6	11	7	2-1-(1)	**87**
IGKV3-15	L2	11	7	2-1-(1)	**53**
IGKV3-20	A27	12	7	6-1-(1)	**195**
IGKV3D-07	L25	12	7	6-1-(1)	0
IGKV3D-11	L20	11	7	2-1-(U)	0
IGKV3D-20	A11	12	7	6-1-(1)	2
IGKV4-1	B3	17	7	3-1-(1)	**83**
IGKV5-2	B2	11	7	2-1-(1)	1
IGKV6-21	A10, A26	11	7	2-1-(1)	6
IGKV6D-41	A14	11	7	2-1-(1)	0

[1]参照によりその全体を組み込まれたTomlinsonら、EMBO J.、1995年、14巻：4628頁から適合した。括弧内の数字は、最も一般的な長さを仮定した場合のCDRL3中の基準構造を指す（CDRL3についてのさらなる詳細は実施例5を参照されたい）。

[2] NCBIデータベースから集積された一連のヒトVK配列により推定；GIの数の完全なセットは、付録Aに載せた。

１４の最も一般的に発生するＩＧＫＶ生殖系列遺伝子（表９の列６の太字）は、末梢血中の全レパートリーの使用頻度の９０％強を占める。表９の分析から、１０のＩＧＫＶ生殖系列遺伝子を現在例示されたライブラリー中のシャーシとしての提示のために選択した（表１０）。Ｖ１－１２およびＶ１－２７を除くすべてが、最も一般的に出現する上位１０の中にある。末梢血における出現率に関して１０番目であったＩＧＫＶ生殖系列遺伝子のＶＨ２－３０は、短鎖（すなわち、１１または１２残基長）ＣＤＲＬ１配列を含むシャーシの比率を、最終セットの１０のシャーシにおいて約８０％に維持するために、ライブラリーの現在例示された実施形態に含まなかった。Ｖ１－１２は、その場所に含まれた。Ｖ１－１７は、既に選択されたＶ１ファミリーの他のメンバーにより類似していた；した

がって、Ｖ１－２７が、Ｖ１－１７の代わりに含まれた。他の実施形態では、ライブラリーは、１２のシャーシ（例えば、表１０の１０種＋Ｖ１－１７およびＶ２－３０）あるいは出現率（表９）または任意の他の基準により厳密に選択された任意の「Ｎ個の」シャーシの異なるセットを含むことができた。１０種の選択されたＶＫシャーシは、全κ軽鎖のレパートリーの提示であると考えられるデータセット中の使用頻度の約８０％を占める。

【０３４２】

【表１０】

表10. 例示的ライブラリーにおける使用のために選択されたVKシャーシ

シャーシ	CDR-L1 の長さ	CDR-L2 の長さ	基準構造	末梢血における推定される 相対的出現率
VK1-5	11	7	2-1-(U)	69
VK1-12	11	7	2-1-(1)	32
VK1-27	11	7	2-1-(1)	27
VK1-33	11	7	2-1-(1)	43
VK1-39	11	7	2-1-(1)	147
VK2-28	16	7	4-1-(1)	62
VK3-11	11	7	2-1-(1)	87
VK3-15	11	7	2-1-(1)	53
VK3-20	12	7	6-1-(1)	195
VK4-1	17	7	3-1-(1)	83

表１０に列挙された選択されたＶＫシャーシのアミノ酸配列を、表１１に載せる。

【０３４３】

【表１１】

表11. 例示的ライブラリー中の包括のために選択されたVKシャーシに関するアミノ酸配列

シャーシ	FRM1	CDRL1	FRM2	CDRL2	FRM3	CDRL3[1]	配列番号
VK1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASQSISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	DASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	QYNSYS	
VK1-12	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QANSFP	
VK1-27	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISNYLA	WYQQKPGKVPKLLIY	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	KYNSAP	
VK1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	QYDNLP	
VK1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QSYSTP	
VK2-28	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	RSSQSLLHSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	QALQTP	
VK3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	QRSNWP	
VK3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	QYNNWP	
VK3-20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QYGSSP	
VK4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVLYSSNNKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRES	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QYYSTP	

[1] VKCDR3に貢献するIGKV遺伝子の部分は、本明細書中に記載のシャーシの一部とは考えられないことに留意されたい。VKシャーシは、IGKVによりコードされる配列のKabat残基の1から88またはFRM1の開始からFRM3の終わりまでとして定義されている。IGKV遺伝子によりもたらされるVKCDR3配列の部分は、本明細書においてL3-VK領域と称される。

（実施例４）

例示的Ｖλシャーシライブラリーの設計

この実施例は、例示的Ｖλシャーシライブラリーの設計について説明する。実施例１～３において既に実証されたように、ＶＨおよびＶＫのシャーシ配列に関して、末梢血中のヒトＩｇλＶ生殖系列由来配列の、配列の特徴および出現率を分析した。生殖系列ファミリーに対して本明細書において説明された他の配列の指定と同様に、生殖系列ファミリーに対するＶλ配列の指定を、ＳｏＤＡおよびＶＢＡＳＥ２を介して実施した（Ｖｏｌｐｅ およびＫｅｐｌｅｒ、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００６年、２２巻：４３８頁；Ｍｏｌｌｏｖａら、ＢＭＳ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｂｉｏｌｏｇｙ、２００７年、１Ｓ：３０頁、各々参照によりその全体が組み込まれる）。データを表１２に提示する。

【０３４４】

【表１２】

表12. 末梢血中のIGλV遺伝子の特徴および出現率

IGλV 遺伝子	代替名	基準構造[1]	IGVλ遺伝子のCDRL3に対する貢献	末梢血における推定される相対的出現率[2]
IGλV3-1	3R	11-7(*)	8	11.5
IGλV3-21	3H	11-7(*)	9	10.5
IGλV2-14	2A2	14-7(A)	9	10.1
IGλV1-40	1E	14-7(A)	9	7.7
IGλV3-19	3L	11-7(*)	9	7.6
IGλV1-51	1B	13-7(A)	9	7.4
IGλV1-44	1C	13-7(A)	9	7.0
IGλV6-57	6A	13-7(B)	7	6.1
IGλV2-8	2C	14-7(A)	9	4.7
IGλV3-25	3M	11-7(*)	9	4.6
IGλV2-23	2B2	14-7(A)	9	4.3
IGλV3-10	3P	11-7(*)	9	3.4
IGλV4-69	4B	12-11(*)	7	3.0
IGλV1-47	1G	13-7(A)	9	2.9
IGλV2-11	2E	14-7(A)	9	1.3
IGλV7-43	7A	14-7(B)	8	1.3
IGλV7-46	7B	14-7(B)	8	1.1
IGλV5-45	5C	14-11(*)	8	1.0
IGλV4-60	4A	12-11(*)	7	0.7
IGλV10-54	8A	14-7(B)	8	0.7
IGλV8-61	10A	13-7(C)	9	0.7
IGλV3-9	3J	11-7(*)	8	0.6
IGλV1-36	1A	13-7(A)	9	0.4
IGλV2-18	2D	14-7(A)	9	0.3
IGλV3-16	3A	11-7(*)	9	0.2
IGλV3-27		11-7(*)	7	0.2
IGλV4-3	5A	14-11(*)	8	0.2
IGλV5-39	4C	12-11(*)	12	0.2
IGλV9-49	9A	12-12(*)	12	0.2
IGλV3-12	3I	11-7(*)	9	0.1

[1] Williamsら、J. Mol. Biol.1996年：264巻、220～32頁から適合した。（＊）は、基準構造がCDRのL1およびL2の長さによって完全に画定されることを示す。同じL1およびL2の長さの組合せに関して異なる構造が可能な場合、所与の遺伝子に存在する構造はA、BまたはCとして説明される。

[2] NCBIデータベースから集積された一連のヒトＶλ配列から推定した；完全なセットのGIコードは付録Bに説明した。

シャーシとしての役割を果たす、表１２からの配列サブセットを選択するために、末梢血において１％未満で提示されるもの（付録Ｂに載せられたＧＩコードに対応する公開された配列の分析から推定）を、まず処分した。残りの１８の生殖系列配列から、独特の基準構造およびＣＤＲＬ３をもたらすこと、それぞれに関して出現率が上位の遺伝子ならびに５％を超えるレベルで提示される任意の生殖系列遺伝子を、例示的Ｖλシャーシを構築

するために選択した。１１のこのような配列のリストを下記の表１３に示す。これらの１１の配列は、検査したデータセット（付録Ｂ）中のレパートリーの約７３％を提示する。

【０３４５】

【表１３】

表13. 例示的ライブラリーにおける使用のために選択されたＶλシャーシ

シャーシ	CDRL1の長さ	CDRL2 の長さ	基準構造	相対的出現率
Vλ3-1	11	7	11-7(*)	11.5
Vλ3-21	11	7	11-7(*)	10.5
Vλ2-14	14	7	14-7(A)	10.1
Vλ1-40	14	7	14-7(A)	7.7
Vλ3-19	11	7	11-7(*)	7.6
Vλ1-51	13	7	13-7(A)	7.4
Vλ1-44	13	7	13-7(A)	7.0
Vλ6-57	13	7	13-7(B)	6.1
Vλ4-69	12	11	12-11(*)	3.0
Vλ7-43	14	7	14-7(B)	1.3
Vλ5-45	11	11	14-11(*)	1.0

表１３に列挙された、選択されたＶλシャーシのアミノ酸配列を、下記の表１４に載せる。

【０３４６】

【表１４】

表14. 例示的ライブラリー中の包括のために選択されたＶλシャーシに関するアミノ酸配列

シャーシ	FRM1	CDRL1	FRM2	CDRL2	FRM3	CDRL3[2]
Vλ1-40	QSVLTQP PSVSGAP GQRVTIS C	TGSSSN IGAGYD ---VH	WYQQLP GTAPKL LIY	GN---- SNRPS	GVPDRFSGSKSG-- TSASLAITGLQAEDE ADYYC	QSYDSS LSG
Vλ1-44	QSVLTQP PSASGTP GQRVTIS C	SGSSSN IGSNT- ---VN	WYQQLP GTAPKL LIY	SN---- NQRPS	GVPDRFSGSKSG-- TSASLAISGLQSEDE ADYYC	AAWDDS LNG
Vλ1-51	QSVLTQP PSVSAAP GQKVTIS C	SGSSSN IGNNY- ---VS	WYQQLP GTAPKL LIY	DN---- NKRPS	GIPDRFSGSKSG-- TSATLGITGLQTGDE ADYYC	GTWDSS LSA
Vλ2-14	QSALTQP ASVSGSP GQSITIS C	TGTSSD VGGYNY ---VS	WYQQHP GKAPKL MIY	EV---- SNRPS	GVSNRFSGSKSG-- NTASLTISGLQAEDE ADYYC	SSYTSS STL
Vλ3-1[1]	SYELTQP PSVSVSP GQTASIT C	SGDKLG DKY--- ---A**S**	WYQQKP GQSPVL VIY	QD---- SKRPS	GIPERFSGSNSG-- NTATLTISGTQAMDE ADYYC	QAWDSS TA-
Vλ3-19	SSELTQD PAVSVAL GQTVRIT C	QGDSLR SYY--- ---AS	WYQQKP GQAPVL VIY	GK---- NNRPS	GIPDRFSGSSSG-- NTASLTITGAQAEDE ADYYC	NSRDSS GNH
Vλ3-21	SYVLTQP PSVSVAP GKTARIT C	GGNNIG SKS--- ---VH	WYQQKP GQAPVL VIY	YD---- SDRPS	GIPERFSGSNSG-- NTATLTISRVEAGDE ADYYC	QVWDSS SDH
Vλ4-69	QLVLTQS PSASASL GASVKLT C	TLSSGH SSYA-- ---IA	WHQQQP EKGPRY LMK	LNSDGS HSKGD	GIPDRFSGSSSG-- AERYLTISSLQSEDE ADYYC	QTWGTG I--
Vλ6-57	NFMLTQP HSVSESP GKTVTIS C	TRSSGS IASNY- ---VQ	WYQQRP GSSPTT VIY	ED---- NQRPS	GVPDRFSGSIDSSSN SASLTISGLKTEDEA DYYC	QSYDSS N--
Vλ5-45	QAVLTQP ASLSASP GASASLT C	TLRSGI NVGTYR ---IY	WYQQKP GSPPQY LLR	YKSDSD KQQGS	GVPSRFSGSKDASAN AGILLISGLQSEDEA DYYC	MIWHSS AS-
Vλ7-43	QTVVTQE PSLTVSP GGTVTLT C	ASSTGA VTSGYY ---PN	WFQQKP GQAPRA LIY	ST---- SNKHS	WTPARFSGSLLG-- GKAALTLSGVQPEDE AEYYC	LLYYGG AQ-

[1] Ｖλ３-１シャーシのCDRL１中の最後のアミノ酸であるSは、IGλV3-1生殖系列遺伝子の対応する最後のアミノ酸であるCと異なる。このことは、得られた合成軽鎖において潜在的に不対のCYS（C）アミノ酸を有することを避けるために実施された。

[2] VKシャーシについて、ＶλCDR3をもたらすIGλV遺伝子の部分は、本明細書中に記載のシャーシの一部とは考えられないことに留意されたい。ＶλシャーシはIGλVによりコードされる配列のKabat残基の1から88またはFRM1の開始からFRM3の終わりまでとして定義されている。IGλV遺伝子によりもたらされるＶλCDR3配列の部分は、本明細書においてL3-Vλ領域と称される。

（実施例５）

ＣＤＲＨ３ライブラリーの設計

この実施例は、個々の構成要素からのＣＤＨＲ３ライブラリーの設計について説明する。実際は、ＣＤＲＨ３配列は、ＩＧＨＶ、ＩＧＨＤおよびＩＧＨＪと呼ばれる３種の異な

る遺伝子の組換えを含む複合過程から導かれる。組換えに加えて、これらの遺伝子は、ＩＧＨＶ遺伝子の３’末端からＩＧＨＤ遺伝子の末端および／またはＩＧＨＪ遺伝子の５’末端のいずれかへ順次ヌクレオチド欠失に供することもできる。非鋳型ヌクレオチドの付加は、Ｖ、ＤおよびＪの配列間のジャンクションにおいても起こり得る。Ｖ－Ｄジャンクションにおける非鋳型付加は、「Ｎ１」と称され、Ｄ－Ｊジャンクションにおける非鋳型付加は、「Ｎ２」と称される。Ｄ遺伝子セグメントは、３つの順方向読み枠、いくつかの場合において、３つの逆方向読み枠において読み取ることができる。

【０３４７】

本例示的ライブラリーの設計において、コドン（３つのヌクレオチド）または１つのアミノ酸を基本単位として設計し、所望の読み枠中の全配列を維持した。したがって、遺伝子セグメントの欠失または付加はすべて、アミノ酸またはコドンの付加または欠失を介して実施し、１個のヌクレオチドを介しては実施しなかった。本出願のＣＤＲＨ３番号付けシステムに従って、ＣＤＲＨ３はアミノ酸番号９５（存在する場合、実施例１を参照されたい）からアミノ酸１０２まで伸長する。

【０３４８】

（実施例５．１）

ＤＨセグメントの選択

本例示的実施例において、ライブラリーにおける使用のためのＤＨ遺伝子セグメントの選択は、シャーシ配列の選択のために使用した原理と同様の原理に従って実施した。まず、ＩＧＨＤ遺伝子の使用頻度の分析は、Ｌｅｅら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁；Ｃｏｒｂｅｔｔら、ＰＮＡＳ、１９８２年、７９巻：４１１８頁；およびＳｏｕｔｏ－Ｃａｒｎｅｉｒｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２００４年、１７２巻：６７９０頁（各々参照によりその全体が組み込まれる）からのデータを使用し、ヒト配列において最も高い頻度で観察されるそれらのＩＧＨＤ遺伝子に与えられるライブラリーの提示を優先して実施した。第２に、ＩＧＨＤ遺伝子セグメントのいずれかの末端における欠失の程度を、ＳｏＤＡアルゴリズム（Ｖｏｌｐｅ　ら、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００６年、２２巻：４３８頁、参照によりその全体が組み込まれる）および配列アラインメントを使用して、既知の重鎖配列と比較することによって評価した。現在例示されているライブラリーには、３個のアミノ酸と同程度に短い順次欠失されたＤＨセグメントを含んだ。詳細な説明に列挙されたように、本発明の他の実施形態は、さまざまな長さ、例えば、約１、２、４、５、６、７、８、９または１０個のアミノ酸に欠失されたＤＨセグメントを含む。表１５は、末梢血Ｂ細胞から主に単離されたヒト抗体重鎖配列におけるＩＧＨＤ遺伝子の使用頻度の相対的出現率を示す（Ｌｅｅら、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ、２００６年、５７巻：９１７頁から適合したリスト、参照によりその全体が組み込まれる）。

【０３４９】

【表１５】

表15. 末梢血における相対的出現率に基づくIGHD遺伝子の使用頻度*

IGHD遺伝子	末梢血における推定される相対的出現率[3]
IGHD3-10	117
IGHD3-22	111
IGHD6-19	95
IGHD6-13	93
IGHD3-3	82
IGHD2-2	63
IGHD4-17	61
IGHD1-26	51
IGHD5-5 / 5-18[1]	49
IGHD2-15	47
IGHD6-6	38
IGHD3-9	32
IGHD5-12	29
IGHD5-24	29
IGHD2-21	28
IGHD3-16	18
IGHD4-23	13
IGHD1-1	9
IGHD1-7	9
IGHD4-4/4-11[2]	7
IGHD1-20	6
IGHD7-27	6
IGHD2-8	4
IGHD6-25	3

[1] ゲノム中の遺伝子は異なるが、IGHD5-5およびIGHD5-18のヌクレオチド配列は、100%同一であり、したがって再構成されたVH配列において識別できない。

[2] IGHD4-4およびIGHD4-11もまた100%同一である

[3] 同じIGHD遺伝子の異なる対立遺伝子に関する情報を統合することによってLeeら、Immunogenetics、2006年、57巻:917頁から適合

* IGHD1-14もまた、本発明のライブラリーに含まれ得る。

天然に出現するヒト抗体に、３つの読み枠において見出される１０の最も一般的に発現されるＩＧＨＤ遺伝子配列の翻訳を表１６に示す。末梢血において最も一般的に出現するそれらの読み枠を、灰色に強調してある。表１５のように、ＩＧＨＤ配列の使用頻度に関するデータおよび読み枠の統計値は、Ｌｅｅら、２００６年から導き、ＩＧＨＤ配列の読み枠使用頻度に関するデータは、Ｃｏｒｂｅｔｔら、ＰＮＡＳ、１９８２年、７９巻：４１１８頁およびＳｏｕｔｏ－Ｃａｒｎｅｉｒｏ ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２００４年、１７２巻：６７９０頁から導かれるデータによってさらに補完し、これらは各々参照によりその全体が組み込まれる。

【０３５０】

【表１６】

表16. 3つの読み枠(RF)中の、10の最も一般的に天然に出現する IGHD配列の翻訳

IGHD	RF 1	配列番号	RF 2	配列番号	RF 3	配列番号
IGHD3-10	VLLWFGELL		YYYGSGSYYN		ITMVRGVII	
IGHD3-22	VLLL###WLLL		YYYDSSGYYY		ITMIVVVIT	
IGHD6-19	GYSSCWY		GIAVAG		V#QWLV	
IGHD6-13	GYSSSWY		GIAAAG		V#QQLV	
IGHD3-03	VLRFLEWLLY		YYDFWSGYYT		ITIFGVVII	
IGHD2-02	WIL##YQLLC		GYCSSTSCYT		DIVVVPAAM	
IGHD4-17	#LR#L		DYGDY		TTVT	
IGHD1-26	GIVGATT		V#WELL		YSGSYY	
IGHD5-5/5-18	VDTAMVT		WIQLWL		GYSYGY	
IGHD2-15	RIL#WW#LLL		GYCSGGSCYS		DIVVVVAAT	

#は終始コドンを表す。
灰色に強調した読み枠は、最も一般的に使用される読み枠に対応する。

現在例示されているライブラリーにおいて、末梢血中に出現する重鎖配列に最も頻繁に使用される上位１０種のＩＧＨＤ遺伝子を、ライブラリー中の提示のために選択した。ライブラリーの他の実施形態は、より多いまたはより少ないＤ遺伝子を容易に利用できる。最も一般的に使用される読み枠を含む選択されたＩＧＨＤ遺伝子のアミノ酸配列ならびに最小で３残基までＮ－およびＣ－末端が順次欠失された後の変異体総数を表１７に挙げる。表１７に表したように、特定のＩＧＨＤ遺伝子の最も一般的に出現する対立遺伝子のみを、例示的ライブラリーに含んだ。しかしこのことは必要ではなく、本発明の他の実施形態は、末梢血においてあまり頻繁に出現しないＩＧＨＤ読み枠も利用できる。

【０３５１】

【表１７】

表17. 例示的ライブラリーにおける使用のために選択されたD遺伝子

IGHD遺伝子[1]	アミノ酸配列	配列番号	変異体の総数[2]
IGHD1-26_1	GIVGATT		15
IGHD1-26_3	YSGSYY		10
IGHD2-2_2	GYCSSTSCYT		9[3]
IGHD2-2_3	DIVVVPAAM		28
IGHD2-15_2	GYCSGGSCYS		9
IGHD3-3_3	ITIFGVVII		28
IGHD3-10_1	VLLWFGELL		28
IGHD3-10_2	YYYGSGSYYN		36
IGHD3-10_3	ITMVRGVII		28
IGHD3-22_2	YYYDSSGYYY		36
IGHD4-17_2	DYGDY		6
IGHD5-5_3	GYSYGY		10
IGHD6-13_1	GYSSSWY		15
IGHD6-13_2	GIAAAG		10
IGHD6-19_1	GYSSGWY		15
IGHD6-19_2	GIAVAG		10

[1]読み枠(RF)は遺伝子の名前の後に__RFのように明記する

[2]多くの場合、変異体の総数は(N-1)×(N-2)÷2で表し、Nは無傷のDセグメントのアミノ酸の全長である。

[3]本明細書において詳述するように、推定のジスルフィド結合(2個のCまたはCys残基)を含むセグメントに関する変異体の数は、本例示的実施形態では限定される。

表１７の選択された個々の配列に関して、３個のアミノ酸が残るまでＮ末端および／またはＣ末端から系統的に欠失することによって、変異体を作製した。例えば、上記のＩＧＨＤ４－１７＿２に関して、完全配列ＤＹＧＤＹ（配列番号＿）を使用して順次欠失変異体：ＤＹＧＤ（配列番号＿）、ＹＧＤＹ（配列番号＿）、ＤＹＧ（配列番号＿）、ＧＤＹ（配列番号＿）およびＹＧＤ（配列番号＿）を作製できる。一般的に、サイズＮの任意の完全長配列に関して、元の完全配列を含めて計（Ｎ－１）＊（Ｎ－２）／２の総変異体が存在することになる。ＩＧＨＤ２－２およびＩＧＨＤ２－１５、（すなわち、ＩＧＨＤ２－２＿２およびＩＧＨ２－１５＿２）の双方の読み枠２により例示されるように、ジスルフィドーループーコードセグメントに関してループが無傷であるように順次欠失は制限され、すなわちＮ末端から最初のＣｙｓまで、またはＣ末端から第２のＣｙｓまでのアミノ酸だけが個々のＤＨセグメント変異体において欠失された。前述の戦略を使用して、ライブラリーの例示されたバージョンにおいて不対システイン残基の存在を避けた。しかし、詳細な説明において述べたように、ライブラリーの他の実施形態は、不対システイン残基またはこれらのシステイン残基と他のアミノ酸との置換を含んでもよい。ＩＧＨＤ遺伝子の切断物がＣｙｓ残基の存在により制限される場合、９種の変異体（元の完全配列を含む）のみを作製した、例えば、ＩＧＨＤ２－２＿２に関して、変異体は、：ＧＹＣＳＳＴＳＣＹＴ（配列番号＿）、ＧＹＣＳＳＴＳＣＹ（配列番号＿）、ＹＣＳＳＴＳＣＹＴ（配列番号＿）、ＣＳＳＴＳＣＹＴ（配列番号＿）、ＧＹＣＳＳＴＳＣ（配列番号＿）、ＹＣＳＳＴＳＣＹ（配列番号＿）、ＣＳＳＴＳＣＹ（配列番号＿）、ＹＣＳＳＴＳＣ（配列番号＿）およびＣＳＳＴＳＣ（配列番号＿）である。

【０３５２】

上に要約した基準に従って、２９３ＤＨ配列を、元のＩＧＨＤ遺伝子セグメントを含む選択されたＩＧＨＤ遺伝子セグメントから得た。特定の配列は重複する。例えば、ＹＹＹ変異体を、ＩＧＨＤ３－１０＿２

【０３５３】

【化４０】

(　完全配列 YYYGSGSYYN (　配列番号＿＿))

のいずれかから、またはＩＧＨＤ３－２２＿２（配列番号＿）

【０３５４】

【化４１】

(YYYDSSGYYY)

から２つの異なる方法で得ることが可能である。重複配列を除去した場合、ライブラリーの本例示的実施形態中の独特のＤＨセグメント配列の数は２７８である。これらの配列を表１８に列挙する。

【０３５５】

【表１８－１】

表18. 現在例示されたライブラリーに使用するDH遺伝子セグメント*

DHセグメント記号[1]	ペプチド	配列番号	DHセグメント記号	ペプチド	配列番号
IGHD1-26_1-1	ATT		IGHD3-10_2-20	YYGSG	
IGHD1-26_1-2	GAT		IGHD3-10_2-21	YYYGS	
IGHD1-26_1-3	GIV		IGHD3-10_2-22	GSGSYY	
IGHD1-26_1-4	IVG		IGHD3-10_2-23	SGSYYN	
IGHD1-26_1-5	VGA		IGHD3-10_2-24	YGSGSY	
IGHD1-26_1-6	GATT		IGHD3-10_2-25	YYGSGS	
IGHD1-26_1-7	GIVG		IGHD3-10_2-26	YYYGSG	
IGHD1-26_1-8	IVGA		IGHD3-10_2-27	GSGSYYN	
IGHD1-26_1-9	VGAT		IGHD3-10_2-28	YGSGSYY	
IGHD1-26_1-10	GIVGA		IGHD3-10_2-29	YYGSGSY	
IGHD1-26_1-11	IVGAT		IGHD3-10_2-30	YYYGSGS	
IGHD1-26_1-12	VGATT		IGHD3-10_2-31	YGSGSYYN	
IGHD1-26_1-13	GIVGAT		IGHD3-10_2-32	YYGSGSYY	
IGHD1-26_1-14	IVGATT		IGHD3-10_2-33	YYYGSGSY	
IGHD1-26_1-15	GIVGATT		IGHD3-10_2-34	YYGSGSYYN	
IGHD1-26_3-1	YSG		IGHD3-10_2-35	YYYGSGSYY	
IGHD1-26_3-2	YSGS		IGHD3-10_2-36	YYYGSGSYYN	

【０３５６】

【表１８－２】

IGHD1-26_3-3	YSGSY		IGHD3-10_3-1	GVI	
IGHD1-26_3-4	YSGSYY		IGHD3-10_3-2	ITM	
IGHD2-02_2-1	CSSTSC		IGHD3-10_3-3	MVR	
IGHD2-02_2-2	CSSTSCY		IGHD3-10_3-4	RGV	
IGHD2-02_2-3	YCSSTSC		IGHD3-10_3-5	TMV	
IGHD2-02_2-4	CSSTSCYT		IGHD3-10_3-6	VII	
IGHD2-02_2-5	GYCSSTSC		IGHD3-10_3-7	VRG	
IGHD2-02_2-6	YCSSTSCY		IGHD3-10_3-8	GVII	
IGHD2-02_2-7	GYCSSTSCY		IGHD3-10_3-9	ITMV	
IGHD2-02_2-8	YCSSTSCYT		IGHD3-10_3-10	MVRG	
IGHD2-02_2-9	GYCSSTSCYT		IGHD3-10_3-11	RGVI	
IGHD2-02_3-1	AAM		IGHD3-10_3-12	TMVR	
IGHD2-02_3-2	DIV		IGHD3-10_3-13	VRGV	
IGHD2-02_3-3	IVV		IGHD3-10_3-14	ITMVR	
IGHD2-02_3-4	PAA		IGHD3-10_3-15	MVRGV	
IGHD2-02_3-5	VPA		IGHD3-10_3-16	RGVII	
IGHD2-02_3-6	VVP		IGHD3-10_3-17	TMVRG	
IGHD2-02_3-7	VVV		IGHD3-10_3-18	VRGVI	
IGHD2-02_3-8	DIVV		IGHD3-10_3-19	ITMVRG	
IGHD2-02_3-9	IVVV		IGHD3-10_3-20	MVRGVI	
IGHD2-02_3-10	PAAM		IGHD3-10_3-21	TMVRGV	
IGHD2-02_3-11	VPAA		IGHD3-10_3-22	VRGVII	
IGHD2-02_3-12	VVPA		IGHD3-10_3-23	ITMVRGV	
IGHD2-02_3-13	VVVP		IGHD3-10_3-24	MVRGVII	
IGHD2-02_3-14	DIVVV		IGHD3-10_3-25	TMVRGVI	
IGHD2-02_3-15	IVVVP		IGHD3-10_3-26	ITMVRGVI	
IGHD2-02_3-16	VPAAM		IGHD3-10_3-27	TMVRGVII	
IGHD2-02_3-17	VVPAA		IGHD3-10_3-28	ITMVRGVII	
IGHD2-02_3-18	VVVPA		IGHD3-22_2-1	DSS	
IGHD2-02_3-19	DIVVVP		IGHD3-22_2-2	GYY	
IGHD2-02_3-20	IVVVPA		IGHD3-22_2-3	SGY	
IGHD2-02_3-21	VVPAAM		IGHD3-22_2-4	SSG	
IGHD2-02_3-22	VVVPAA		IGHD3-22_2-5	YDS	
IGHD2-02_3-23	DIVVVPA		IGHD3-22_2-6	YYD	
IGHD2-02_3-24	IVVVPAA		IGHD3-22_2-7	DSSG	
IGHD2-02_3-25	VVVPAAM		IGHD3-22_2-8	GYYY	
IGHD2-02_3-26	DIVVVPAA		IGHD3-22_2-9	SGYY	

【０３５７】

【表１８－３】

IGHD2-02_3-27	IVVVPAAM		IGHD3-22_2-10	SSGY	
IGHD2-02_3-28	DIVVVPAAM		IGHD3-22_2-11	YDSS	
IGHD2-15_2-1	CSGGSC		IGHD3-22_2-12	YYDS	
IGHD2-15_2-2	CSGGSCY		IGHD3-22_2-13	YYYD	
IGHD2-15_2-3	YCSGGSC		IGHD3-22_2-14	DSSGY	
IGHD2-15_2-4	CSGGSCYS		IGHD3-22_2-15	SGYYY	
IGHD2-15_2-5	GYCSGGSC		IGHD3-22_2-16	SSGYY	
IGHD2-15_2-6	YCSGGSCY		IGHD3-22_2-17	YDSSG	
IGHD2-15_2-7	GYCSGGSCY		IGHD3-22_2-18	YYDSS	
IGHD2-15_2-8	YCSGGSCYS		IGHD3-22_2-19	YYYDS	
IGHD2-15_2-9	GYCSGGSCYS		IGHD3-22_2-20	DSSGYY	
IGHD3-03_3-1	FGV		IGHD3-22_2-21	SSGYYY	
IGHD3-03_3-2	GVV		IGHD3-22_2-22	YDSSGY	
IGHD3-03_3-3	IFG		IGHD3-22_2-23	YYDSSG	
IGHD3-03_3-4	ITI		IGHD3-22_2-24	YYYDSS	
IGHD3-03_3-5	TIF		IGHD3-22_2-25	DSSGYYY	
IGHD3-03_3-6	VVI		IGHD3-22_2-26	YDSSGYY	
IGHD3-03_3-7	FGVV		IGHD3-22_2-27	YYDSSGY	
IGHD3-03_3-8	GVVI		IGHD3-22_2-28	YYYDSSG	
IGHD3-03_3-9	IFGV		IGHD3-22_2-29	YDSSGYYY	
IGHD3-03_3-10	ITIF		IGHD3-22_2-30	YYDSSGYY	
IGHD3-03_3-11	TIFG		IGHD3-22_2-31	YYYDSSGY	
IGHD3-03_3-12	VVII		IGHD3-22_2-32	YYDSSGYYY	
IGHD3-03_3-13	FGVVI		IGHD3-22_2-33	YYYDSSGYY	
IGHD3-03_3-14	GVVII		IGHD3-22_2-34	YYYDSSGYYY	
IGHD3-03_3-15	IFGVV		IGHD4-17_2-1	DYG	
IGHD3-03_3-16	ITIFG		IGHD4-17_2-2	GDY	
IGHD3-03_3-17	TIFGV		IGHD4-17_2-3	YGD	
IGHD3-03_3-18	FGVVII		IGHD4-17_2-4	DYGD	
IGHD3-03_3-19	IFGVVI		IGHD4-17_2-5	YGDY	
IGHD3-03_3-20	ITIFGV		IGHD4-17_2-6	DYGDY	
IGHD3-03_3-21	TIFGVV		IGHD5-5_3-1	SYG	
IGHD3-03_3-22	IFGVVII		IGHD5-5_3-2	YGY	

【０３５８】

【表１８－４】

IGHD3-03_3-23	ITIFGVV		IGHD5-5_3-3	YSY	
IGHD3-03_3-24	TIFGVVI		IGHD5-5_3-4	GYSY	
IGHD3-03_3-25	ITIFGVVI		IGHD5-5_3-5	SYGY	
IGHD3-03_3-26	TIFGVVII		IGHD5-5_3-6	YSYG	
IGHD3-03_3-27	ITIFGVVII		IGHD5-5_3-7	GYSYG	
IGHD3-10_1-1	ELL		IGHD5-5_3-8	YSYGY	
IGHD3-10_1-2	FGE		IGHD5-5_3-9	GYSYGY	
IGHD3-10_1-3	GEL		IGHD6-13_1-1	SSS	
IGHD3-10_1-4	LLW		IGHD6-13_1-2	SSW	
IGHD3-10_1-5	LWF		IGHD6-13_1-3	SWY	
IGHD3-10_1-6	VLL		IGHD6-13_1-4	SSSW	
IGHD3-10_1-7	WFG		IGHD6-13_1-5	SSWY	
IGHD3-10_1-8	FGEL		IGHD6-13_1-6	YSSS	
IGHD3-10_1-9	GELL		IGHD6-13_1-7	GYSSS	
IGHD3-10_1-10	LLWF		IGHD6-13_1-8	SSSWY	
IGHD3-10_1-11	LWFG		IGHD6-13_1-9	YSSSW	
IGHD3-10_1-12	VLLW		IGHD6-13_1-10	GYSSSW	
IGHD3-10_1-13	WFGE		IGHD6-13_1-11	YSSSWY	
IGHD3-10_1-14	FGELL		IGHD6-13_1-12	GYSSSWY	
IGHD3-10_1-15	LLWFG		IGHD6-19_1-1	GWY	
IGHD3-10_1-16	LWFGE		IGHD6-19_1-2	GYS	
IGHD3-10_1-17	VLLWF		IGHD6-19_1-3	SGW	
IGHD3-10_1-18	WFGEL		IGHD6-19_1-4	YSS	
IGHD3-10_1-19	LLWFGE		IGHD6-19_1-5	GYSS	
IGHD3-10_1-20	LWFGEL		IGHD6-19_1-6	SGWY	
IGHD3-10_1-21	VLLWFG		IGHD6-19_1-7	SSGW	
IGHD3-10_1-22	WFGELL		IGHD6-19_1-8	YSSG	
IGHD3-10_1-23	LLWFGEL		IGHD6-19_1-9	GYSSG	
IGHD3-10_1-24	LWFGELL		IGHD6-19_1-10	SSGWY	
IGHD3-10_1-25	VLLWFGE		IGHD6-19_1-11	YSSGW	
IGHD3-10_1-26	LLWFGELL		IGHD6-19_1-12	GYSSGW	
IGHD3-10_1-27	VLLWFGEL		IGHD6-19_1-13	YSSGWY	
IGHD3-10_1-28	VLLWFGELL		IGHD6-19_1-14	GYSSGWY	
IGHD3-10_2-1	GSG		IGHD6-19_2-1	AVA	
IGHD3-10_2-2	GSY		IGHD6-19_2-2	GIA	
IGHD3-10_2-3	SGS		IGHD6-19_2-3	IAV	
IGHD3-10_2-4	SYY		IGHD6-19_2-4	VAG	
IGHD3-10_2-5	YGS		IGHD6-19_2-5	AVAG	
IGHD3-10_2-6	YYG		IGHD6-19_2-6	GIAV	
IGHD3-10_2-7	YYN		IGHD6-19_2-7	IAVA	
IGHD3-10_2-8	YYY		IGHD6-19_2-8	GIAVA	
IGHD3-10_2-9	GSGS		IGHD6-19_2-9	IAVAG	
IGHD3-10_2-10	GSYY		IGHD6-19_2-10	GIAVAG	
IGHD3-10_2-11	SGSY		IGHD6-13_2-1	AAA	
IGHD3-10_2-12	SYYN		IGHD6-13_2-2	AAG	

【０３５９】

【表１８－５】

IGHD3-10_2-13	YGSG		IGHD6-13_2-3	IAA	
IGHD3-10_2-14	YYGS		IGHD6-13_2-4	AAAG	
IGHD3-10_2-15	YYYG		IGHD6-13_2-5	GIAA	
IGHD3-10_2-16	GSGSY		IGHD6-13_2-6	IAAA	
IGHD3-10_2-17	GSYYN		IGHD6-13_2-7	GIAAA	
IGHD3-10_2-18	SGSYY		IGHD6-13_2-8	IAAAG	
IGHD3-10_2-19	YGSGS		IGHD6-13_2-9	GIAAAG	

[1] 配列記号は下記のように形式を合わせる:
(IGHD遺伝子名)__(読み枠)-(変異体数)

* 重複するセグメントをライブラリーから削除した場合、特定の変異体の起源は幾分不定となる(すなわち、特定セグメントは、表に明記された親を含む複数の親をそれらの起源に有することができる)ことに留意されたい。

表１９は、上記の方法に従って選択された２７８のＤＨセグメントの長さの分布を示す。

【０３６０】

【表１９】

表19. 例示的ライブラリーに包括するために選択されたDHセグメントの長さの分布

DHサイズ	出現数
3	78
4	64
5	50
6	38
7	27
8	20
9	12
10	4

上に明記したように、本出願において定義されたＣＤＲＨ３番号付けシステムに基づき、ＩＧＨＤ由来アミノ酸（すなわち、ＤＨセグメント）は、９７位から始まり番号付けされ、９７Ａ位、９７Ｂ位などが続く。ライブラリーの現在例示されている実施形態では、最も短いＤＨセグメントは、３個のアミノ酸：９７、９７Ａおよび９７Ｂを有し、一方最も長いＤＨセグメントは１０個のアミノ酸：９７、９７Ａ、９７Ｂ、９７Ｃ、９７Ｄ、９７Ｅ、９７Ｆ、９７Ｇ、９７Ｈおよび９７Ｉを有する。

【０３６１】

（実施例５．２）

Ｈ３－ＪＨセグメントの選択

６種のヒト生殖系列のＩＧＨＪ遺伝子がある。抗体遺伝子のインビボ組み立ての間、これらのセグメントを、それらの５’末端から順に欠失する。ライブラリーのこの例示的実施形態では、１３アミノ酸程の長さのＪＨセグメントをもたらす、欠失のないまたは（アミノ酸レベルで）１、２、３、４、５、６、または７個が欠失したＩＧＨＪ遺伝子セグメントを含んだ（表２０）。ＩＧＨＪ遺伝子セグメントを順次欠失し、１５、１４、１２または１１アミノ酸をもたらす、（それらの５’／Ｎ末端において）本発明の他の実施形態もまた企図される。

【０３６２】

【表２０】

表20. 例示的ライブラリーにおける使用のために選択されたIGHJ遺伝子セグメント

IGHJ セグメント	[H3-JH]-[FRM4][1]	配列番号	H3-JH	配列番号
JH1の親または JH1_1	AEYFQHWGQGTLVTVSS		AEYFQH	
JH1_2	EYFQHWGQGTLVTVSS		EYFQH	
JH1_3	YFQHWGQGTLVTVSS		YFQH	
JH1_4	FQHWGQGTLVTVSS		FQH	
JH1_5	QHWGQGTLVTVSS		QH	
JH2の親または JH2_1	YWYFDLWGRGTLVTVSS		YWYFDL	
JH2_2	WYFDLWGRGTLVTVSS		WYFDL	
JH2_3	YFDLWGRGTLVTVSS		YFDL	
JH2_4	FDLWGRGTLVTVSS		FDL	
JH2_5	DLWGRGTLVTVSS		DL	
JH3の親または JH3_1	AFDVWGQGTMVTVSS		AFDV	
JH3_2	FDVWGQGTMVTVSS		FDV	
JH3_3	DVWGQGTMVTVSS		DV	
JH4の親または JH4_1	YFDYWGQGTLVTVSS		YFDY	
JH4_2	FDYWGQGTLVTVSS		FDY	
JH4_3	DYWGQGTLVTVSS		DY	
JH5の親または JH5_1	NWFDSWGQGTLVTVSS		NWFDS	
JH5_2	WFDSWGQGTLVTVSS		WFDS	
JH5_3	FDSWGQGTLVTVSS		FDS	
JH5_4	DSWGQGTLVTVSS		DS	
JH6の親または JH6_1	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS		YYYYYGMDV	
JH6_2	YYYYGMDVWGQGTTVTVSS		YYYYGMDV	
JH6_3	YYYGMDVWGQGTTVTVSS		YYYGMDV	
JH6_4	YYGMDVWGQGTTVTVSS		YYGMDV	
JH6_5	YGMDVWGQGTTVTVSS		YGMDV	
JH6_6	GMDVWGQGTTVTVSS		GMDV	
JH6_7	MDVWGQGTTVTVSS		MDV	
JH6_8	DVWGQGTTVTVSS		DV	

[1]H3-JHは、CDRH3のKabatの定義の範囲内に含まれるIGHJセグメントの一部として定義される；FRM4は、フレームワーク領域4をコードするIGHJセグメントの一部として定義される。

本出願のＣＤＲＨ３番号付けシステムに従って、例えば、ＪＨ６＿１がＣＤＲＨ３にもたらすものは、９９Ｆ、９９Ｅ、９９Ｄ、９９Ｃ、９９Ｂ、９９Ａ、１００、１０１および１０２位（それぞれＹ、Ｙ、Ｙ、Ｙ、Ｙ、Ｇ、Ｍ、ＤおよびＶ）により示されるであろう。同様に、ＪＨ４＿３配列は、ＣＤＲＨ３にアミノ酸位１０１および１０２（それぞれＤおよびＹ）をもたらす。しかし、例示されたライブラリーのすべての場合において、ＪＨセグメントは、抗体の可変領域のための標準的Ｋａｂａｔ番号付けシステム（Ｋａｂａｔ、前引用書、１９９１年）に一致して、アミノ酸１０３～１１３をＦＲＭ４領域にもたらす。このことは、ライブラリーの他の実施形態ではそうとは限らない。

【０３６３】

（実施例５．３）

Ｎ１およびＮ２セグメントの選択

（上に例示したような）順次欠失の天然に存在する過程の模倣により促進されたＶ－Ｄ－Ｊ組換えの考慮は非常に大きな多様性を生み出すことができるが、インビボＣＤＲＨ３

配列の多様性は、Ｖ－ＤジャンクションおよびＤ－Ｊジャンクションにおいてさまざまな数のヌクレオチドの非鋳型付加によりさらに増幅される。

【０３６４】

Ｖ－ＤおよびＤ－Ｊジャンクションにそれぞれ位置するＮ１およびＮ２セグメントを、約２，７００の抗体配列を含むサンプルにおいて同定し（Ｊａｃｋｓｏｎ ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁）、Ｖｏｌｐｅら、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００６年、２２巻：４３８～４４頁のＳｏＤＡ法によりさらに分析した；（Ｊａｃｋｓｏｎら、およびＶｏｌｐｅら、は双方とも参照によりその全体が組み込まれる）。これらの配列の検査により、Ｎ１およびＮ２の長さおよび組成のパターンが明らかになった。現在例示されたＣＤＲＨ３ライブラリーの構築のために、特定の短鎖アミノ酸配列を上記の分析から導き、本明細書に記載の合成スキームを使用してＣＤＲＨ３の設計に組み込まれた多くのＮ１およびＮ２セグメントの作製のために使用した。

【０３６５】

詳細な説明に記載したように、本発明の特定の実施形態は、ヒト抗体中に天然に存在するＮ１およびＮ２セグメントを比較することにより見出されるこれらのパラメーター中の統計的バイアスにより情報を得た、合理的に設計された長さおよび組成を有するＮ１およびＮ２セグメントを含む。ヒトデータベース（例えば、参照によりその全体を組み込む、Ｊａｃｋｓｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００７年、３２４巻：２６頁を参照されたい）から集積されたデータによれば、２個以下のヌクレオチドの挿入は考慮に入れずに、Ｎ１に関して平均約３．０２アミノ酸の挿入、およびＮ２に関して約２．４アミノ酸の挿入がある。図２は、ヒト抗体中のＮ１およびＮ２領域の長さの分布を示す。本発明のこの例示的実施形態では、Ｎ１およびＮ２を、０、１、２、または３アミノ酸長に固定した。ヒト抗体中のこれらの配列の天然に存在する組成を、さまざまなアミノ酸残基の包括のためのガイドとして使用した。

【０３６６】

１アミノ酸、２アミノ酸および３アミノ酸のＮ１付加の天然に存在する組成を、表２１に定義し、対応するＮ２付加の天然に存在する組成を表２２に定義する。Ｎ１およびＮ２のセットに最も頻繁に発生するデュプレットを、表２３に集める。

【０３６７】

【表２１】

表21．天然に存在する1、2および3アミノ酸のN1付加の組成*

位置1	出現数	位置2	出現数	位置3	出現数
R	251	G	97	G	101
G	249	P	67	R	66
P	173	R	67	P	47
L	130	S	42	S	47
S	117	L	39	L	38
A	84	V	33	A	33
V	62	E	24	V	28
K	61	A	21	T	27
I	55	D	18	E	24
Q	51	I	18	D	22
T	51	T	18	K	18
D	50	K	16	F	14
E	49	Y	16	I	13
F	3	H	13	W	13
H	32	F	12	N	10
N	30	Q	11	Y	10
W	28	N	5	H	8
Y	21	W	5	Q	5
M	16	C	4	C	3
C	3	M	4	M	3
	1546		530		530

＊C末端配列をVHの「CARX」または同等物と定義し、「X」が「尾部」（例えば、D、E、Gまたはアミノ酸残基なし）である。

【０３６８】

【表２２】

表22. 天然に存在する1、2および3アミノ酸のN2付加の組成*

位置1	出現数	位置2	出現数	位置3	出現数
G	242	G	244	G	156
P	219	P	138	P	79
R	180	R	86	S	54
L	132	S	85	R	51
S	123	T	77	L	49
A	97	L	74	A	41
T	78	A	69	T	31
V	75	V	46	V	29
E	57	E	41	D	23
D	56	Y	38	E	23
F	54	D	36	W	23
H	54	K	30	Q	19
Q	53	F	29	F	17
I	49	W	27	Y	17
N	45	H	24	H	16
Y	40	I	23	I	11
K	35	Q	23	K	11
W	29	N	21	N	8
M	20	M	8	C	6
C	6	C	5	M	6
	1644		1124		670

＊C末端配列をDセグメントに定義するが、IGHJ遺伝子によりコードされない。

【０３６９】

【表２３】

表23. 天然に存在するN1およびN2のデュプレットの上位25

配列	出現数	累積頻度	個別頻度
GG	17	0.037	0.037
PG	15	0.070	0.033
RG	15	0.103	0.033
PP	13	0.132	0.029
GP	12	0.158	0.026
GL	11	0.182	0.024
PT	10	0.204	0.022
TG	10	0.226	0.022
GV	9	0.246	0.020
RR	9	0.266	0.020
SG	8	0.284	0.018
RP	7	0.299	0.015
IG	6	0.312	0.013
GS	6	0.325	0.013
SR	6	0.338	0.013
PA	6	0.352	0.013
LP	6	0.365	0.013
VG	6	0.378	0.013
KG	6	0.389	0.011
GW	5	0.400	0.011
FP	5	0.411	0.011
LG	5	0.422	0.011
RS	5	0.433	0.011
TP	5	0.444	0.011
EG	5	0.455	0.011

（実施例５．３．１）

Ｎ１セグメントの選択

ＶおよびＤの間のジャンクションに位置する、同定されたＮ１セグメントの分析により、８種の最も頻繁に出現するアミノ酸残基がＧ、Ｒ、Ｓ、Ｐ、Ｌ、Ａ、ＴおよびＶであることが明らかになった（表２１）。Ｎ１セグメントにおけるアミノ酸の付加数は、高い頻度で０、１、２または３であった（図２）。４個以上のアミノ酸の付加は、比較的稀であった。したがって、ライブラリーの現在例示された実施形態では、Ｎ１セグメントは、０、１、２または３個のアミノ酸を含むように設計した。しかし、他の実施形態では、４、５またはそれ以上のアミノ酸のＮ１セグメントもまた利用できる。ＧおよびＰは、常にＮ１領域において最も一般的に出現するアミノ酸残基の１つであった。したがって、ライブラリーの本例示的実施形態では、ジペプチドであるＮ１セグメントは、ＧＸ、ＸＧ、ＰＸ、またはＸＰの形態であり、Ｘは、上に挙げた８種の最も一般的に発生するアミノ酸のいずれかである。Ｇ残基がＰ残基より頻繁に観察されたという事実により、例示的Ｎ１ライブラリーのトリペプチドメンバーは、ＧＸＧ、ＧＧＸまたはＸＧＧの形態を有し、再度Ｘは、上に挙げた８種の最も頻繁に発生するアミノ酸残基の１つである。ライブラリーの本例示的実施形態に使用する、「ゼロ」付加を含む得られたＮ１配列のセットは、表２４に挙げた５９の配列になる。

【０３７０】

【表２４】

表24. 例示的ライブラリーに包括するために選択されたN1配列

セグメント型	配列	数
「ゼロ」	(付加なし)Vセグメントは直接Dセグメントに連結する	1
単量体	G, P, R, A, S, L, T, V	8
二量体	GG, GP, GR, GA, GS, GL, GT, GV, PG, RG, AG, SG, LG, TG, VG, PP, PR, PA, PS, PL, PT, PV, RP, AP, SP, LP, TP, VP	28
三量体	GGG, GPG, GRG, GAG, GSG, GLG, GTG, GVG, PGG, RGG, AGG, SGG, LGG, TGG, VGG, GGP, GGR, GGA, GGS, GGL, GGT, GGV	22

本出願のＣＤＲＨ３番号付けシステムに従って、表２４に列挙された配列は、下記の位置をＣＤＲＨ３にもたらす：単量体は９６位、二量体は９６および９６Ａ、ならびに三量体は９６、９６Ａおよび９６Ｂをもたらす。代替の実施形態では、四量体およびそれより長いセグメントがＮ１配列に含まれ得る場合、対応する数は、９６Ｃなどを含むように続くであろう。

【０３７１】

（実施例５．３．２）

Ｎ２セグメントの選択

同様に、ＤおよびＪの間のジャンクションに位置する、同定されたＮ２セグメントの分析により、８種の最も頻繁に出現するアミノ酸残基がまた、Ｇ、Ｒ、Ｓ、Ｐ、Ｌ、Ａ、ＴおよびＶであることが明らかになった（表２２）。Ｎ２セグメントにおけるアミノ酸の付加数もまた、高い頻度で０、１、２または３であった（図２）。例示的ライブラリーにおけるＮ２セグメントの設計のために、拡大されたセットの配列を利用した。具体的には、Ｎ１に関する表２４に列挙された５９の配列に加えて、表２５の配列を使用した。

【０３７２】

【表２５】

表25. N2の付加における追加配列

セグメント型	配列	新規の数	総数
単量体	D, E, F, H, I, K, M, Q, W, Y	10	18
二量体	AR, AS, AT, AY, DL, DT, EA, EK, FH, FS, HL, HW, IS, KV, LD, LE, LR, LS, LT, NR, NT, QE, QL, QT, RA, RD, RE, RF, RH, RL, RR, RS, RV, SA, SD, SE, SF, SI, SK, SL, SQ, SR, SS, ST, SV, TA, TR, TS, TT, TW, VD, VS, WS, YS	54	82
三量体	AAE, AYH, DTL, EKR, ISR, NTP, PKS, PRP, PTA, PTQ, REL, RPL, SAA, SAL, SGL, SSE, TGL, WGT	18	40

したがって、ライブラリーの目下例示された実施形態は、「ゼロ」状態を含むＮ２配列を総数１４１含有する。当業者は、これらの１４１の配列がＮ１領域においても使用でき、このような実施形態は本発明の範囲内であることを容易に認識するであろう。さらに、Ｎ１およびＮ２配列の長さおよび組成の多様性は、天然に存在する抗体のＮ１およびＮ２領域に、Ｇ、Ｒ、Ｓ、Ｐ、Ｌ、Ａ、ＴおよびＶより出現の頻度が低いアミノ酸を利用すること、および４、５またはそれ以上のアミノ酸のＮ１およびＮ２セグメントをライブラリーに含むことによりさらに広がり得る。表２１から２３および図２は、天然の組成および長さを模倣するさらなるＮ１およびＮ２領域の設計に有用な天然に存在する抗体における

、Ｎ１およびＮ２配列の組成および長さについての情報を提供する。
【０３７３】
本出願のＣＤＲＨ３番号付けシステムに従って、Ｎ２配列は（存在する場合）９８位から始まり、９８Ａ（二量体）および９８Ｂ（三量体）に伸長するであろう。代替の実施形態は、９８Ｃ、９８Ｄ位などを占有することができる。
【０３７４】
（実施例５．４．）
ＣＤＲＨ３ライブラリー
「尾部」（すなわち、Ｇ／Ｄ／Ｅ／－）を考える場合、例示されたライブラリー中のＣＤＲＨ３は、一般式：
［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］
で表すことができる。
【０３７５】
ライブラリーの現在例示された、非限定的実施形態では、［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］は、４種の考えられる末端のアミノ酸「尾部」を個々に表し、Ｎ１は表２４の５９配列のいずれかであり得、ＤＨは表１８の２７８配列のいずれかであり得、Ｎ２は表２４および２５の１４１配列のいずれかであり得、ならびにＨ３－ＪＨは表２０の２８のＨ３－ＪＨ配列のいずれかであり得る。このＣＤＲＨ３ライブラリーのすべての理論的多様性またはレパートリーのサイズは、各構成要素の変異をかけることによって得られる、すなわち、４×５９×２７８×１４１×２８＝２．５９×10^{8}である。
【０３７６】
しかし、先の実施例において記載のように、重複がライブラリーから排除できる。目下例示された実施形態では、尾部およびＮ１セグメントを合わせ、ライブラリーから重複を排除した。例えば、ＶＨシャーシ、尾部およびＮ１領域を考慮すると、配列［ＶＨ＿シャーシ］－［Ｇ］は異なる２つの方法：［ＶＨ＿シャーシ］＋［Ｇ］＋［なし］または［ＶＨ＿シャーシ］＋［なし］＋［Ｇ］で得ることができる。重複配列の除去により、２３６の考えられる組合せの（すなわち、４種の尾部×５９のＮ１）中から総計２１２の独特の［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］－［Ｎ１］セグメントがもたらされた。したがって、目下例示されたＣＤＲＨ３ライブラリーの実際の多様性は、２１２×２７８×１４１×２８＝２．１１×10^{8}である。図２３は、本ライブラリー中のさまざまなＣＤＲＨ３の長さの出現頻度対Ｌｅｅらの免疫前のレパートリーを表す。
【０３７７】
表２６は、本出願のＣＤＲＨ３番号付けシステムを使用した、上記のＣＤＲＨ３ライブラリー由来の特定の例示的配列をさらに例示する。位置を使用しない場合、代わりに表にハイフン記号（－）を含む。
【０３７８】

【表２６】

表26. 実施例1～5に例示されたライブラリーに従ったCDRH3配列の設計例

	[尾部]	[N1]			[DH]										[N2]		[H3-JH]						CDRH3長さ
	95	96	96A	96B	97	97A	97B	97C	97D	97E	97F	97G	97H	97I	98	98A	98B	99E	99D	99C	99B	99A	99	100	101	102	
No. 1	G	-	-	-	Y	Y	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	V	6
No. 2	D	G	-	-	G	Y	C	S	G	G	S	C	Y	S	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	F	Q	H	16
No. 3	E	R	-	-	I	T	I	F	G	V	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	-	Y	F	D	Y	14
No. 4	-	P	P	-	V	L	L	W	F	G	E	L	L	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	L	14
No. 5	G	G	S	G	Y	Y	Y	G	S	G	S	Y	Y	N	P	-	-	-	-	-	A	E	Y	F	Q	H	21
No. 6	D	-	-	-	R	G	V	I	I	-	-	-	-	-	M	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V	16
No. 7	E	S	G	-	Y	Y	Y	D	S	S	G	Y	Y	Y	T	G	L	-	-	-	-	W	Y	F	D	L	21
No. 8	-	S	-	-	D	Y	G	D	Y	-	-	-	-	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-	F	D	I	11
No. 9	-	P	G	-	W	F	G	-	-	-	-	-	-	-	P	S	-	-	-	-	Y	Y	G	M	D	V	13
No. 10	-	-	-	-	C	S	G	G	S	C	-	-	-	-	A	Y	-	-	-	-	-	N	W	F	D	P	13

（実施例６）

ＶＫＣＤＲ３ライブラリーの設計

この実施例は、多くの例示的ＶＫＣＤＲ３ライブラリーの設計について説明する。詳細な説明の項に明記したように、本発明の特定の実施形態では作製されたまたは本発明の特定の実施形態に使用されたＶＫＣＤＲ３ライブラリーの実際のバージョン（複数可）は、ライブラリーの使用目的に依存するであろう。この実施例において、軽鎖可変領域に関するＫａｂａｔ番号付けシステムを使用した。

【０３７９】

出現パターンの検査を容易にするために、ヒトκ軽鎖配列を、公的に利用可能なＮＣＢＩデータベース（付録Ａ）から得た。重鎖配列（実施例２）に関しては、公的に利用可能なデータベースから得た個々の配列を、配列同一性に基づき、その最も近い生殖系列遺伝子に指定した。その後、各位置におけるアミノ酸組成を、各κ軽鎖のサブセット内で決定した。

【０３８０】

（実施例６．１）

必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリー

この実施例は、「必要最小限」ＶＫＣＤＲ３ライブラリーの設計について説明し、ＶＫＣＤＲ３のレパートリーは、９残基長に制限する。ヒト配列のＶＫＣＤＲ３の長さの検査により、ＣＤＲＬ３：８９から９７位のＫａｂａｔの定義内で９アミノ酸が優勢な比率（７０％を超える）であることが示される。したがって、現在例示された必要最小限の設計は、長さ９のＶＫＣＤＲ３のみであると考えられる。ヒトκ軽鎖配列の検査により、ＩＧＫＪ遺伝子の使用頻度に強いバイアスはなく、ヒトにおいてＩＫＪ遺伝子などの５つが存在することが示される。表２７は、３種のデータセット、つまりＪｕｕｌら（Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９７年、１０９巻：１９４頁、参照によりその全体が組み込まれる）、ＫｌｅｉｎおよびＺａｃｈａｕ（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９３年、２３巻：３２４８頁、参照によりその全体が組み込まれる）および付録Ａに提供されたκ軽鎖のデータセット（標識ＬＵＡ）の中のＩＧＫＪ遺伝子の使用頻度を表す。

【０３８１】

【表２７】

表27. さまざまなデータセット中のIGKJ遺伝子の使用頻度

遺伝子	Klein	Juul	LUA
IGKJ1	35.0%	29.0%	29.3%
IGKJ2	25.0%	23.0%	24.1%
IGKJ3	7.0%	8.0%	12.1%
IGKJ4	26.0%	24.0%	26.5%
IGKJ5	6.0%	18.0%	8.0%

したがって、「Ｍ」個のＶＫシャーシおよび５つのＩＧＫＪ遺伝子の単純な組合せによりサイズＭ×５個のライブラリーが作製されるであろう。９個の長さのＶＫＣＤＲ３に関するＫａｂａｔの番号付けシステムにおいて、アミノ酸番号９６は、ＩＧＫＪ遺伝子により最初にコードされる。ヒト配列においてこの位置を占めるアミノ酸の検査により、７種の最も一般的な残基がＬ、Ｙ、Ｒ、Ｗ、Ｆ、ＰおよびＩであり、９６位において見出される残基の約８５％を累積的に占めることが示された。残りの１３アミノ酸が他の１５％を占める。９６位における２０種のアミノ酸すべての出現を、表２８に提示する。

【０３８２】

【表２８】

表28. ヒトVKデータセット中の96位における20種のアミノ酸残基の出現

型	数	パーセント	累積値
L	333	22.3	22.3
Y	235	15.8	38.1
R	222	14.9	52.9
W	157	10.5	63.5
F	148	9.9	73.4
I	96	6.4	79.8
P	90	6.0	85.9
Q	53	3.6	89.4
N	39	2.6	92.0
H	31	2.1	94.1
V	21	1.4	95.5
G	20	1.3	96.8
C	14	0.9	97.8
K	7	0.5	98.3
S	6	0.4	98.7
A	5	0.3	99.0
D	5	0.3	99.3
E	5	0.3	99.7
T	5	0.3	100.0
M	0	0.0	100.0

９６位において最も一般的に見出される７種の残基の起源を確定するために、既知のヒトＩＧＫＪアミノ酸配列を検査した（表２９）。

【０３８３】

【表２９】

表29. 既知のヒトIGKJアミノ酸配列

遺伝子	配列
IGKJ1	WTFGQGTKVEIK
IGKJ2	YTFGQGTKLEIK
IGKJ3	FTFGPGTKVDIK
IGKJ4	LTFGGGTKVEIK
IGKJ5	ITFGQGTRLEIK

理論に束縛されないが、再構成されたヒト配列の９６位において見出される、最も一般的に出現する７種のアミノ酸の５種は、５種のヒトＩＧＫＪ遺伝子つまり、Ｗ、Ｙ、Ｆ、ＬおよびＩそれぞれによってコードされる最初のアミノ酸が起源であると思われる。

【０３８４】

ＰおよびＲ残基の起源は明白ではなかった。理論に束縛されないが、ヒトＩＧＫＶ遺伝子のヌクレオチド配列の大部分は配列ＣＣで終わり、これは（すなわち３’から）最後の（例えば、表１１に示すＣ末端残基をコードする）完全コドンの後に出現する。したがって、どのヌクレオチドがこの配列の後に配置されるかにかかわらず（すなわちＣＣＸ、Ｘは任意のヌクレオチドであってよい）、コドンはプロリン（Ｐ）残基をコードするであろう。したがって、ＩＧＫＪ遺伝子が順次欠失を受けた場合（ちょうど重鎖のＩＧＨＪのように；実施例５を参照されたい）、最初の完全アミノ酸を欠損し、ＩＧＫＶ遺伝子において欠失が全く起こらなかった場合、Ｐ残基が得られる。

【０３８５】

９６位においてアルギニン残基の起源を確定するために、９６位にＲを含む再構成されたκ軽鎖配列中のＩＧＫＪ遺伝子の起源を分析した。この分析により、ＩＧＫＪ遺伝子がＩＧＫＪ１である場合に、最も高い頻度で９６位にＲが出現することが示された。ＩＧＫＪ１に関する生殖系列Ｗ（位置１；表２９）は

【０３８６】

【化４２】
TGG

によりコードされる。理論に束縛されないが、１つのヌクレオチドが
【０３８７】
【化４３】
T

からＣ（ＣＧＧが得られる）またはＡ（ＡＧＧが得られる）に変化すると、Ａｒｇ（Ｒ）をコードするコドンがもたらされる。Ｇへの変化（ＧＧＧが得られる）はＧｌｙ（Ｇ）をコードするコドンをもたらす。ＲはＧの約１０倍の頻度でヒト配列の９６位に出現し（ＩＧＫＪ遺伝子がＩＧＫＪ１の場合）、ＲはＣＧＧによりコードされる頻度がＡＧＧより高い。したがって、理論に束縛されないが、ＣはＩＧＫＶ遺伝子の末端の、前述の２つのＣの１つを起源とする可能性がある。しかし、出現の機序（複数可）にかかわらず、ＶＫＣＤＲ３の長さが９である場合、ＲおよびＰは９６位において最も高い頻度で観察されるアミノ酸型の１つである。したがって、必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、下記のアミノ酸配列：
【０３８８】
【化４４】

[VK_シャーシ]-[L3-VK]-[F/L/I/R/W/Y/P]-[TFGGGTKVEIK]

により表すことができる。
【０３８９】
この配列において、ＶＫ＿シャーシは、任意の選択されたＶＫシャーシ（非限定例に関して、表１１を参照されたい）、具体的にはＩＧＫＶ遺伝子によりコードされるＫａｂａｔ残基の１から８８を表す。Ｌ３－ＶＫは、選択されたＩＧＫＶ遺伝子（この実施形態において残基８９～９５）によりコードされるＶＫＣＤＲ３の一部を表す。Ｆ／Ｌ／Ｉ／Ｒ／Ｗ／Ｙ／Ｐは、アミノ残基Ｆ、Ｌ、Ｉ、Ｒ、Ｗ、ＹまたはＰの任意の１つを表す。この例示的提示において、ＩＫＪ４（最初の残基を引く）を表した。理論に束縛されないが、ＩＧＫＪ４がヒトに最も一般的に使用されるＩＧＫＪ遺伝子の１つであることとは別に、ＧＧＧアミノ酸配列は、ＸがＧ以外のアミノ酸であるＧＸＧアミノ酸配列を含む任意の代替のＩＧＫＪ遺伝子より大きな高次構造の柔軟性をもたらすことが期待される。いくつかの実施形態では、高度の高次構造の柔軟性を有する必要最小限免疫前レパートリーを作製することは有利であり得る。表１１に表される１０のＶＫシャーシを考慮して、必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーの１つの実施態様は、１０のＶＫシャーシ×７のジャンクション（９６位）の組合せの選択肢から得られる７０のメンバーおよび１つのＩＧＫＪ－由来配列（例えばＩＧＫＪ４）を有するであろう。ライブラリーのこの実施形態はＩＧＫＪ４を使用して表されるが、他の４つのＩＧＫＪ配列の１つを使用する必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーを設計することが可能である。例えば、ライブラリーの別の実施形態は、３５０のメンバーを有することができる（１０のＶＫシャーシ×７のジャンクション×５のＩＧＫＪ遺伝子）。
【０３９０】
当業者は、１つまたは複数の必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーが、任意のＩＧＫＪ遺伝子を使用して構築できることを容易に認識するであろう。上記の注釈を使用して、これらの必要最小限ＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、例えば：
【０３９１】

【化４５】

JK1: **[VK_シャーシ]-[L3-VK]-[F/L/I/R/W/Y/P]-[TFGQGTKVEIK];**

JK2: **[VK_シャーシ]- [L3-VK]-[F/L/I/R/W/Y/P]-[TFGQGTKLEIK];**

JK3: **[VK_シャーシ]- [L3-VK]-[F/L/I/R/W/Y/P]-[TFGPGTKVDIK];および**

JK5: **[VK_シャーシ]- [L3-VK]-[F/L/I/R/W/Y/P]-[TFGQGTRLEIK].**

により表される配列を有することができる。

【０３９２】

（実施例６．２）

約10^5の複雑性のＶＫＣＤＲ３ライブラリー

この実施例において、実施例６．１に記載の９残基のＶＫＣＤＲ３レパートリーを、８および１０残基の長さのＶＫＣＤＲ３を含むように拡大する。さらに、先に列挙されたＶＫＣＤＲ３ライブラリーはＶＫシャーシおよびＶＫＣＤＲ３に貢献しないＩＧＫＪ遺伝子の一部を含んだが、目下例示されたバージョンはＶＫＣＤＲ３の一部を含む残基のみに焦点を合わせる。例えば、既にＶＫシャーシ配列および定常領域配列を含むベクターを用いた組み換えが望ましい場合、この実施形態は好ましいことがある。

【０３９３】

ヒトにおいて優勢なＶＫＣＤＲ３配列の長さは９アミノ酸であるが、他の長さも、累積的にκ軽鎖配列の約３０％に近づく測定可能な割合で現れる。特に、長さ８および１０のＶＫＣＤＲ３は、それぞれ代表的なサンプルにおいて配列の約８．５％および約１６％を表す（図３）。したがって、より複雑なＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、８から１０アミノ酸長のＣＤＲを含み、このライブラリーは、ヒトＶＫＣＤＲ３配列の通常のコレクションにおいて観察される長さの分布の９５％強を占める。このライブラリーはさらに、ＶＫおよびＪＫ遺伝子の間のジャンクションのほかに追加の変異の包括が可能である。本実施例は、このようなライブラリーについて説明する。このライブラリーは１０個のサブライブラリーを含み、個々に表１１に表された１０個の例示的ＶＫシャーシのおよそ１つを設計した。明らかに、本明細書において例示された研究方法は、Ｍ個の異なるシャーシを考慮して一般化でき、Ｍは１０より少ないかまたは１０より多い場合がある。

【０３９４】

Ｋａｂａｔの８９～９５位を占めるポリペプチドセグメント内の変動性を特徴づけるために、実施例３の１０個の生殖系列配列それぞれに由来するヒトκ軽鎖配列のコレクションをアラインメントし、個別（すなわち、生殖系列群内で）に比較した。この分析により、本発明者らは、生殖系列によって分類された、各κ軽鎖配列中のそれぞれ個々の位置における配列の変異のパターンを判別できた。下記の表は、ＩＧＫＶ１－３９由来の配列に関する結果を示す。

【０３９５】

【表３０】

表30. IGKV1-39-由来配列中のアミノ酸型のパーセント出現率

アミノ酸	P89	P90	P91	P92	P93	P94	P95
A	0	0	1	0	0	4	1
C	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	1	1	3	0	0
E	0	1	0	0	0	0	0
F	0	0	0	5	0	2	0
G	0	0	2	1	2	0	0
H	1	1	0	4	0	0	0
I	0	0	1	0	4	5	1
K	0	0	0	1	2	0	0
L	3	0	0	1	1	3	7
M	0	0	0	0	0	1	0
N	0	0	3	2	6	2	0
P	0	0	0	0	0	4	85
Q	96	97	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	5	0	2
S	0	0	80	4	65	6	3
T	0	0	9	0	10	65	1
V	0	0	0	0	0	1	1
W	0	0	0	0	0	0	0
Y	0	0	2	80	0	3	0

例えば、８９位において２種のアミノ酸、ＱおよびＬが、観察された変動性の約９９％を占め、したがって現在例示されたライブラリー（下記を参照されたい）において、８９位にはＱおよびＬのみが含まれた。当然のことながら、より大きなライブラリーにおいて、追加の、出現頻度がより低いアミノ酸型（例えばＨ）もまた含むことができる。

【０３９６】

同様に、９３位において、最も頻繁に出現するものの１つであるアミノ酸型Ｓ、Ｔ、Ｎ、ＲおよびＩによる、より多くの変異がある。したがって、より多様性の特定のライブラリーには明らかに他のアミノ酸が含まれ得るが、現在例示されたライブラリーは、これらの５種のアミノ酸を９３位に含むことを目的とした。しかし、このライブラリーは標準的な化学的ヌクレオチド合成を介して構築されたので、例示されたライブラリーの９３位において表される実際のアミノ酸セットがＳ、Ｔ、Ｎ、Ｒ、ＰおよびＨからなり、ＰおよびＨはＩに置き換わるように、ライブラリーは遺伝子コードの制限により縛られている（下記の表３２の例示的９残基のＶＫＣＤＲ３を参照されたい）。この制限は、下記の実施例６．３に記載のように、コドンに基づくオリゴヌクレオチド合成を使用することによって克服できる。同様の研究方法：位置あたりのアミノ酸型の出現の分析、最も高い頻度で出現するサブセットからの選択、その後の遺伝子コードによって指示される調整を、他の位置においておよび他の配列に関して続けた。

【０３９７】

上に示したように、ライブラリーは、標準的オリゴヌクレオチド合成装置および縮重オリゴヌクレオチドを使用して、実用的で容易な合成の研究方法を用いる。ライブラリーの説明を容易にするために、表３１に示した縮重ヌクレオチドに関するＩＵＰＡＣコードを使用する。

【０３９８】

【表３１】

表31. 縮重塩基記号の定義

IUPAC 記号	塩基対組成
A	A (100%)
C	C (100%)
G	G (100%)
T	T (100%)
R	A (50%) G (50%)
Y	C (50%) T (50%)
W	A (50%) T (50%)
S	C (50%) G (50%)
M	A (50%) C (50%)
K	G (50%) T (50%)
B	C (33%) G (33%) T (33%) (*)
D	A (33%) G (33%) T (33%)
H	A (33%) C (33%) T (33%)
V	A (33%) C (33%) G (33%)
N	A (25%) C (25%) G (25%) T (25%)

(*) この33%は、ここでは1/3を指す
（すなわち、33. 3333. . . %）

実施例のようにＶＫ１－３９シャーシおよび長さ９のＶＫＣＤＲ３を使用して、ＶＫＣＤＲ３ライブラリーを下記の４種のオリゴヌクレオチドにより表すことができ（表３２の左の列）、ＣＤＲＬ３（Ｋａｂａｔの番号付け）の各位置においてコードされる対応するアミノ酸を右の列に示す。

【０３９９】

【表３２】

表32. VK1-39CDR3ライブラリーをコードする例示的オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド配列	89	90	91	92	93	94	95	95A	96	97
CWGSAAWCATHCMVTABTCCTTWCACT	LQ	EQ	ST	FSY	HNPRST	IST	P	-	FY	T
CWGSAAWCATHCMVTABTCCTMTCACT	LQ	EQ	ST	FSY	HNPRST	IST	P	-	IL	T
CWGSAAWCATHCMVTABTCCTWGGACT	LQ	EQ	ST	FSY	HNPRST	IST	P	-	WR	T
CWGSAAWCATHCMVTABTCCTCBTACT	LQ	EQ	ST	FSY	HNPRST	IST	P	PLR	-	T

例えば、Ｋａｂａｔの８９位に対応する表３２の最初のヌクレオチドの最初のコドン（ＣＷＧ）は、５０％はＣＴＧおよび５０％はＣＡＧを表し、それぞれＬｅｕ（Ｌ）およびＧｌｎ（Ｑ）をコードする。したがって、発現ポリペプチドは、それぞれ約５０％の確率でＬおよびＱを有することが期待されるであろう。同様に、４番目のオリゴヌクレオチドのＫａｂａｔの９５Ａ位に関して、コドンＣＢＴはＣＣＴ、ＣＧＴおよびＣＴＴを１／３ずつ表し、翻訳において順にＰｒｏ（Ｐ）、Ｌｅｕ（Ｌ）およびＡｒｇ（Ｒ）が１／３ずつ対応する。ペプチド配列の各位置において利用可能な選択肢の数を掛けることによって、ペプチドの空間に各オリゴヌクレオチドによってもたらされる複雑性を得ることができる。上記のＶＫ１－３９の例に関して、数は最初の３種のオリゴヌクレオチドに関しては８６４、４番目のオリゴヌクレオチドに関しては１，２９６である。したがって、長さ９のＶＫ１－３９ＣＤＲ３をコードするオリゴヌクレオチドは、３，８８８のメンバーをライブラリーにもたらす。しかし、表３２に示すように、９５Ａ位にＬまたはＲを有する配列（９６位が空である場合）は、９６位にＬまたはＲを有する（および９５Ａが空の）配列と同一である。したがって、３，８８８という数はもたらされるＬＲを過大評価しており、独特のメンバーの実際の数はわずかに少なく、３，０２４である。表３３に表すように、１０のＶＫシャーシすべてに関するサイズ８、９および１０のＶＫＣＤＲ３を表すオリゴヌクレオチドの完全なリストのために、サイズ９のＶＫＣＤＲ３にもたらされたＬＲを過剰に数えたことを補正した後の、全体の複雑性は約１．３×１０^{5}または１．２×１０^{5}の独特の配列である。

【０４００】
【表３３－１】

表33. 例示的VKCDR3ライブラリーをコードする縮重オリゴヌクレオチド

シャーシ	CDR L3 長さ	ジャンクション型 (1)	縮重オリゴヌクレオチド	配列番号	89	90	91	92	93	94	95	95A	96	97
VK1-5	8	1	CASCASTMCVRTRSTT WCTWCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	-	-	FY	T
VK1-5	8	2	CASCASTMCVRTRSTT WCMTCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	-	-	IL	T
VK1-5	8	3	CASCASTMCVRTRSTT WCWGGACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	-	-	WR	T
VK1-5	8	4	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	-	-	T
VK1-5	9	1	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTTWCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	-	FY	T
VK1-5	9	2	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTMTCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	-	IL	T
VK1-5	9	3	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTWGGACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	-	WR	T
VK1-5	9	4	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTYCTACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	PS	-	T
VK1-5	10	1	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTCBTTWCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	PLR	FY	T
VK1-5	10	2	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTCBTMTCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	PLR	IL	T
VK1-5	10	3	CASCASTMCVRTRSTT WCYCTCBTWGGACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	AGST	FY	PS	PLR	WR	T

【０４０１】

【表３３－２】

VK1-12	8	1	CASCASDCTRVCARTT TSTWCACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	-	-	FY	T
VK1-12	8	2	CASCASDCTRVCARTT TSMTCACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	-	-	IL	T
VK1-12	8	3	CASCASDCTRVCARTT TSWGGACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	-	-	WR	T
VK1-12	8	4	CASCASDCTRVCARTT TSCCTACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	-	-	T
VK1-12	9	1	CASCASDCTRVCARTT TSCCTTWCACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	-	FY	T
VK1-12	9	2	CASCASDCTRVCARTT TSCCTMTCACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	-	IL	T
VK1-12	9	3	CASCASDCTRVCARTT TSCCTWGGACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	-	WR	T
VK1-12	9	4	CASCASDCTRVCARTT TSCCTCBTACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	PLR	-	T
VK1-12	10	1	CASCASDCTRVCARTT TSCCTCBTTWCACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	PLR	FY	T
VK1-12	10	2	CASCASDCTRVCARTT TSCCTCBTMTCACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	PLR	IL	T
VK1-12	10	3	CASCASDCTRVCARTT TSCCTCBTWGGACT		HQ	HQ	AST	ADGNST	NS	FL	P	PLR	WR	T
VK1-27	8	1	CASMAGTWCRRTASKG BATWCACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	-	-	FY	T
VK1-27	8	2	CASMAGTWCRRTASKG BAMTCACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	-	-	IL	T
VK1-27	8	3	CASMAGTWCRRTASKG BAWGGACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	-	-	WR	T
VK1-27	8	4	CASMAGTWCRRTASKG BACCTACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	-	-	T
VK1-27	9	1	CASMAGTWCRRTASKG BACCTTWCACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	-	FY	T
VK1-27	9	2	CASMAGTWCRRTASKG		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	-	IL	T

【０４０２】

【表３３－３】

			BACCTMTCACT												
VK1-27	9	3	CASMAGTWCRRTASKG BACCTWGGACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	-	WR		T
VK1-27	9	4	CASMAGTWCRRTASKG BACCTCBTACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	PLR	-		T
VK1-27	10	1	CASMAGTWCRRTASKG BACCTCBTTWCACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	PLR	FY		T
VK1-27	10	2	CASMAGTWCRRTASKG BACCTCBTMTCACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	PLR	IL		T
VK1-27	10	3	CASMAGTWCRRTASKG BACCTCBTWGGACT		HQ	KQ	FY	DGNS	RST	AGV	P	PLR	WR		T
VK1-33	8	1	CASCWTTMCRATRVCB WTTWCACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	-	-	FY		T
VK1-33	8	2	CASCWTTMCRATRVCB WTMTCACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	-	-	IL		T
VK1-33	8	3	CASCWTTMCRATRVCB WTWGGACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	-	-	WR		T
VK1-33	8	4	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	-		T
VK1-33	9	1	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTTWCACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	FY		T
VK1-33	9	2	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTMTCACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	IL		T
VK1-33	9	3	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTWGGACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	WR		T
VK1-33	9	4	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTCBTACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	-		T
VK1-33	10	1	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTCBTTWCACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	FY		T
VK1-33	10	2	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTCBTMTCACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	IL		T
VK1-33	10	3	CASCWTTMCRATRVCB WTCCTCBTWGGACT		HQ	HL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	WR		T

【０４０３】

【表３３－４】

VK1-39	8	1	CWGSAAWCATHCMVTA BTTWCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	-	-	FY	T
VK1-39	8	2	CWGSAAWCATHCMVTA BTMTCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	-	-	IL	T
VK1-39	8	3	CWGSAAWCATHCMVTA BTWGGACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	-	-	WR	T
VK1-39	8	4	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	-	-	T
VK1-39	9	1	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTTWCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	-	FY	T
VK1-39	9	2	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTMTCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	-	IL	T
VK1-39	9	3	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTWGGACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	-	WR	T
VK1-39	9	4	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTCBTACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	PLR	-	T
VK1-39	10	1	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTCBTTWCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	PLR	FY	T
VK1-39	10	2	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTCBTMTCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	PLR	IL	T
VK1-39	10	3	CWGSAAWCATHCMVTA BTCCTCBTWGGACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRS T	IST	P	PLR	WR	T
VK3-11	8	1	CASCASAGWRGKRVCT SGTWCACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	-	-	FY	T
VK3-11	8	2	CASCASAGWRGKRVCT SGMTCACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	-	-	IL	T
VK3-11	8	3	CASCASAGWRGKRVCT SGWGGACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	-	-	WR	T
VK3-11	8	4	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	-	-	T
VK3-11	9	1	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTTWCACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	-	FY	T
VK3-11	9	2	CASCASAGWRGKRVCT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS	SW	P	-	IL	T

【０４０４】

【表３３－５】

			SGCCTMTCACT						T					
VK3-11	9	3	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTWGGACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	- PLR	WR -	T T
VK3-11	9	4	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTCBTACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	PLR	-	T
VK3-11	10	1	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTCBTTWCACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	PLR	FY	T
VK3-11	10	2	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTCBTMTCACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	PLR	IL	T
VK3-11	10	3	CASCASAGWRGKRVCT SGCCTCBTWGGACT		HQ	HQ	RS	GRS	ADGNS T	SW	P	PLR	WR	T
VK3-15	8	1	CASCASTMCVRTRRKT GGTWCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	-	-	FY	T
VK3-15	8	2	CASCASTMCVRTRRKT GGMTCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	-	-	IL	T
VK3-15	8	3	CASCASTMCVRTRRKT GGWGGACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	-	-	WR	T
VK3-15	8	4	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	-	-	T
VK3-15	9	1	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTTWCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	-	FY	T
VK3-15	9	2	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTMTCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	-	IL	T
VK3-15	9	3	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTWGGACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	-	WR	T
VK3-15	9	4	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTCBTACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	PLR	-	T
VK3-15	10	1	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTCBTTWCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	PLR	FY	T
VK3-15	10	2	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTCBTMTCACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	PLR	IL	T
VK3-15	10	3	CASCASTMCVRTRRKT GGCCTCBTWGGACT		HQ	HQ	SY	DGHNRS	DEGKN RS	W	P	PLR	WR	T

【０４０５】

【表３３－６】

VK3-20	8	1	CASCASTWCGRTRVKK CATWCACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	-	-	FY	T
VK3-20	8	2	CASCASTWCGRTRVKK CAMTCACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	-	-	IL	T
VK3-20	8	3	CASCASTWCGRTRVKK CAWGGACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	-	-	WR	T
VK3-20	8	4	CASCASTWCGRTRVKK CACCTACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	-	-	T
VK3-20	9	1	CASCASTWCGRTRVKK CACCTTWCACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	-	FY	T
VK3-20	9	2	CASCASTWCGRTRVKK CACCTMTCACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	-	IL	T
VK3-20	9	3	CASCASTWCGRTRVKK CACCTWGACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	-	WR	T
VK3-20	9	4	CASCASTWCGRTRVKK CACCTCBTACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	PLR	-	T
VK3-20	10	1	CASCASTWCGRTRVKK CACCTCBTTWCACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	PLR	FY	T
VK3-20	10	2	CASCASTWCGRTRVKK CACCTCBTMTCACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	PLR	IL	T
VK3-20	10	3	CASCASTWCGRTRVKK CACCTCBTWGGACT		HQ	HQ	FY	DG	ADEGK NRST	AS	P	PLR	WR	T
VK2-28	8	1	ATGCASRBTCKTSASA BTTWCACT		M	HQ	AGI STV	LR	DEHQ	IST	-	-	FY	T
VK2-28	8	2	ATGCASRBTCKTSASA BTMTCACT		M	HQ	AGI STV	LR	DEHQ	IST	-	-	IL	T
VK2-28	8	3	ATGCASRBTCKTSASA BTWGGACT		M	HQ	AGI STV	LR	DEHQ	IST	-	-	WR	T
VK2-28	8	4	ATGCASRBTCKTSASA BTCCTACT		M	HQ	AGI STV	LR	DEHQ	IST	P	-	-	T
VK2-28	9	1	ATGCASRBTCKTSASA BTCCTTWCACT		M	HQ	AGI STV	LR	DEHQ	IST	P	-	FY	T
VK2-28	9	2	ATGCASRBTCKTSASA		M	HQ	AGI	LR	DEHQ	IST	P	-	IL	T

【０４０６】

【表３３－７】

			BTCCTMTCACT				STV							
			ATGCASRBTCKTSASA				AGI							
VK2-28	9	3	BTCCTWGGACT		M	HQ	STV	LR	DEHQ	IST	P	-	WR	T
			ATGCASRBTCKTSASA				AGI							
VK2-28	9	4	BTCCTCBTACT		M	HQ	STV	LR	DEHQ	IST	P	PLR	-	T
	1		ATGCASRBTCKTSASA				AGI							
VK2-28	0	1	BTCCTCBTTWCACT		M	HQ	STV	LR	DEHQ	IST	P	PLR	FY	T
	1		ATGCASRBTCKTSASA				AGI							
VK2-28	0	2	BTCCTCBTMTCACT		M	HQ	STV	LR	DEHQ	IST	P	PLR	IL	T
	1		ATGCASRBTCKTSASA				AGI							
VK2-28	0	3	BTCCTCBTWGGACT		M	HQ	STV	LR	DEHQ	IST	P	PLR	WR	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	8	1	BTTWCACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	-	-	FY	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	8	2	BTMTCACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	-	-	IL	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	8	3	BTWGGACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	-	-	WR	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	8	4	BTCCTACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	-	-	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	9	1	BTCCTTWCACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	-	FY	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	9	2	BTCCTMTCACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	-	IL	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	9	3	BTCCTWGGACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	-	WR	T
			CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	9	4	BTCCTCBTACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	PLR	-	T
	1		CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	0	1	BTCCTCBTTWCACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	PLR	FY	T
	1		CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	0	2	BTCCTCBTMTCACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	PLR	IL	T
	1		CASCASTWCTWCRVCA						ADGNS					
VK4-1	0	3	BTCCTCBTWGGACT		HQ	HQ	FY	FY	T	IST	P	PLR	WR	T

【０４０７】

【表３３－８】

[VK1-33の代替] (2)															
VK1-33	8	1	CASCWATMCRATRVCB WTTWCACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	-	-	FY	T
VK1-33	8	2	CASCWATMCRATRVCB WTMTCACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	-	-	IL	T
VK1-33	8	3	CASCWATMCRATRVCB WTWGGACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	-	-	WR	T
VK1-33	8	4	CASCWATMCRATRVCB WTCCTACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	-	T
VK1-33	9	1	CASCWATMCRATRVCB WTCCTTWCACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	FY	T
VK1-33	9	2	CASCWATMCRATRVCB WTCCTMTCACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	IL	T
VK1-33	9	3	CASCWATMCRATRVCB WTCCTWGGACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	-	WR	T
VK1-33	9	4	CASCWATMCRATRVCB WTCCTCBTACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	-	T
VK1-33	10	1	CASCWATMCRATRVCB WTCCTCBTTWCACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	FY	T
VK1-33	10	2	CASCWATMCRATRVCB WTCCTCBTMTCACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	IL	T
VK1-33	10	3	CASCWATMCRATRVCB WTCCTCBTWGGACT		HQ	QL	SY	DN	ADGNS T	DFH LVY	P	PLR	WR	T

(1) ジャンクション1型は、96位にFY、2型はIL、3型はRWを有し、4型は欠失している。

(2) VK1-33ライブラリーのための2つの実施形態を示す。一実施形態では、2番目のコドンはCWTであった。別の実施形態では、2番目のコドンはCWAまたはCWGであった。

（実施例６．３）

より複雑なＶＫＣＤＲ３ライブラリー

この実施例は、コドンに基づく合成の研究方法（Ｖｉｒｎｅｋａｓ ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９９４年、２２巻：５６００頁）により、どのようにして

各位置のアミノ酸変異のより信頼できる提示を得ることができるかを実証する。この合成スキームは、位置に含まれる特定のアミノ酸の割合のより細かい調整もまた可能にする。例えば、ＶＫ１－３９配列に関して上に記載したように、８９位は５０％のＱおよび５０％のＬとして設計されたが、表３０は、ＱがＬよりはるかに高い頻度で使用されることを示す。本実施例のより複雑なＶＫＣＤＲ３ライブラリーは、ＱおよびＬの異なる相対的出現率、例えば９０％のＱおよび１０％のＬを占める。このような調整は、コドンに基づく合成スキームの中で、特に複数のアミノ酸型が考えられる場合によく実行される。

【０４０８】

この実施例はまた、表１１に記載の１０のＶＫシャーシを使用するコドンに基づく合成スキームの実施態様についても説明する。当然のことながら、同様の研究方法の実施に用いるこのようなシャーシは、より多くてもまたはより少なくても可能である。詳細な説明に示したように、本ライブラリーの設計の独特の態様および前記実施例の態様は、生殖系列またはシャーシに基づく態様であり、これは実際のヒトκ軽鎖配列の完全性および変異を一層多く保存することを意味する。これは、文献に記載されており、「フリーサイズの」（例えば、コンセンサス）κ軽鎖ライブラリー（例えば、Ｋｎａｐｐｉｋら、Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ、２０００年、２９６巻：５７頁；Ａｋａｍａｔｓｕら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ、１９９３年、１５１巻：４６５１頁）を作製することを目的とする、他のコドンに基づく合成または縮重オリゴヌクレオチド合成の研究方法とは対照的である。

【０４０９】

ＶＫ１－３９に関して得られた表３０を参照し、表３４の長さ９のＶＫＣＤＲ３ライブラリーを設計することができる。そこで、実用的理由から、各位置における比率を５％の倍数単位で表示する。より優れた合成スキームが開発されると、より細かい解析、例えば１、２、３または４％の解析を得ることができる。

【０４１０】

【表３４】

表34. 9残基長のCDRを有するVK1-39ライブラリーに関する各VKCDR3の位置におけるアミノ酸組成（%）

アミノ酸	89	90	91	92	93	94	95	96 (*)	97 (*)
A						5			5
D				5	5				
E		5				5			
F				5				10	
G			5	5	5			5	
H	5	5		5		5			
I					5			5	
K					5				
L	10					5	10	20	
M									
N			**0**	**0**	5	**0**		5	
P						5	85	5	
Q	85	90						5	
R					5		5	10	
S			80	5	60	5			5
T			10		10	65			90
V								5	
W								15	
Y			5	75		5		15	
数の差	3	3	4	6	8	8	3	11	3

(*) 主にジャンクションおよびIGKJの多様性により画定された96および97位の組成は、全シャーシの長さ9のVKCDR3と同じであり得る。

表３４のライブラリーは、１．３７×１０^{6}の独特のポリペプチド配列を有し、計算は

表の最下行の数字を掛けることによって行った。
【０４１１】
特定の位置におけるＡｓｎ（Ｎ）に関する下線付きの
【０４１２】
【化４６】
0

の記入は、ＶＫＣＤＲ３中にＮ結合型グリコシル化部位を有する可能性が最小または排除された領域を表す。ＸおよびＺがＰではないＮ－Ｘ－（ＳまたはＴ）－Ｚのパターンのペプチド配列は、酵母および哺乳動物細胞を含む多くの発現系において翻訳後修飾を受けることができる。さらに、このような修飾の特性は特定の細胞型に依存し、所与の細胞型についても、培養条件に依存する。調整が困難であり得る因子により抗体の機能が影響され得るので、Ｎ結合型グリコシル化は、抗原結合に関与すると思われる抗体分子の領域（例えばＣＤＲ）において起こった場合不利であり得る。例えば、上記の９１位を考えると、９２位は決してＰではないことが観察できる。９４位は９５％の事例でＰではない。しかし、９３位は７５％（６５＋１０）の事例でＳまたはＴである。したがって、９１位がＮであるとすると、望ましくないモチーフのＮ－Ｘ－（Ｔ／Ｓ）－Ｚ（ＸおよびＺは双方ともＰとは異なる）が作製され、実際のヒト配列においていくらかの頻度でＮが観察されたとしても、したがって出現率０となる（表３０を参照されたい）。同様の議論が９２位および９４位のＮにも当てはまる。しかし、抗体ライブラリーが、細菌などのＮ結合型グリコシル化が不可能な系、またはＮ結合型グリコシル化が起こらない培養条件下において発現された場合、この考えを当てはめることはできないことを理解するべきである。しかし、潜在的なＮ結合型グリコシル化部位を有するライブラリーの発現に使用される生物が、Ｎ結合型グリコシル化不可能である場合でも（例えば、細菌）、このようなライブラリーから単離された抗体は、異なる系（例えば酵母、哺乳動物細胞）において後に（例えば臨床開発に向けて）発現でき、可変ドメイン、特にＣＤＲ中の炭水化物部分の存在が活性の望まない修正をもたらし得るので、Ｎ－Ｘ－（Ｓ／Ｔ）配列を避けることは依然として望ましい場合がある。これらの実施形態もまた、本発明の範囲内である。本発明者らの知るかぎりでは、当分野において既知のＶＫＣＤＲ３ライブラリーはこの効果を考慮せず、したがってそれらのメンバーの比率は上述の望ましくない性質を有し得る。
【０４１３】
本発明者らは、表３４に要約したライブラリーのための、長さ８および１０のＶＫＣＤＲ３に関する追加のサブライブラリーもまた設計した。これらの実施形態では、８９から９４および９７位における組成は依然として表３４に表した組成と同じである。９５および９５Ａ位に導入され、９５Ａについては長さ１０のＶＫＣＤＲ３のみに関して定義された追加の多様性を表３５に例示する。
【０４１４】

【表３５】

表35. 長さ8および10のVK1-39ライブラリーに関するアミノ酸組成(%)

アミノ酸	位置95－長さ8 (*)		位置95－長さ10 (**)	位置95A－長さ10
A				
D				
E				
F	5			
G				5
H				
I	10			5
K				
L	20		10	10
M				
N				
P	25		85	60
Q				
R	10		5	10
S	5			5
T				5
V	5			
W	10			
Y	10			
数の差	9		3	8

(*)サイズ8のVKCDR3において96位は欠失される。
(**)これは、サイズ9のVKCDR3と同じ組成である。

長さ８のＶＫ１－３９ライブラリー中の独特のメンバーの総数は、こうして前述のように得ることができ、３．７３×１０^{5}（すなわち、３×３×４×６×８×８×９×３）である。同様に、長さ１０のＶＫ１－３９ライブラリーの複雑性は１０．９×１０^{6}である（すなわち、挿入位置９５Ａにおける追加の８倍の変異があるので、サイズ９のライブラリーの複雑性の８倍である）。したがって、明記された長さそれぞれに関する独特のメンバーの数を足すことによって得られるように、総計１２．７×１０^{6}の独特のメンバーが全ＶＫ１－３９ライブラリー中に存在することになる。本発明の特定の実施形態では、長さ８、９および１０の個別のサブライブラリーを別々に作製し、その後ヒト配列中のＶＫＣＤＲ３の長さの分布を反映する比率で、例えば、天然のＶＫＣＤＲ３配列において起こる１：９：２の分布に近い比率でサブライブラリーを混合することが好ましい場合がある（図３を参照されたい）。本発明は、通常の技術を有する者に、他のＶＫシャーシに対応するＶＫＣＤＲ３ライブラリーを合成するための組成および方法を提供する。

【０４１５】

（実施例７）

必要最小限ＶλＣＤＲ３ライブラリー

この実施例は、必要最小限ＶλＣＤＲ３ライブラリーの設計について説明する。このライブラリー（またはより複雑なＶλライブラリー）の設計に使用する原理は、ＶＫＣＤＲ３ライブラリーの設計に使用した原理と同様である。しかし、ＶＫ遺伝子とは違って、ＩｇλＶセグメントをＣＤＲＬ３へもたらすことは、アミノ酸の固定数に制約されない。したがって、ＶλシャーシとＪλ配列との組合せを考えるだけのときでさえ、長さの変異を必要最小限ＶλＣＤＲ３ライブラリーにおいて得ることができる。

【０４１６】

ヒト配列のＶλＣＤＲ３の長さの検査は、９～１２の長さが配列の約９５％を占め、８～１２の長さが配列の約９７％を占めることを示す（図４）。表３６は、ＮＣＢＩデータ

ベースから集積された、再構成されたヒトλ軽鎖配列中の６種の既知のＩＧλＪ遺伝子使用頻度（パーセント出現率）を示し（付録Ｂを参照されたい）、表３７は遺伝子によりコードされた配列を示す。

【０４１７】

【表３６】

表36. NCBIデータベースから集積されたλ軽鎖配列における IGλJ遺伝子の使用頻度(付録Bを参照されたい)

遺伝子_対立遺伝子	LUA
Jλ1_01	20.2%
Jλ2_01	42.2%
Jλ3_02	36.2%
Jλ6_01	0.6%
Jλ7_01	0.9%

【０４１８】

【表３７】

表37. 観察されたヒトIGλJアミノ酸配列

遺伝子	配列
IGλJ1-01	**YVFGTGTKVTVL**
IGλJ2-01	**VVFGGGTKLTVL**
IGλJ 3-01	WVFGGGTKLTVL
IGλJ3-02	**VVFGGGTKLTVL**
IGλJ6-01	NVFGSGTKVTVL
IGλJ7-01	AVFGGGTQLTVL
IGλJ7-02	AVFGGGTQLTAL

ＩＧλＪ３－０１およびＩＧλＪ７－０２は、分析された配列中に表されない、したがって、それらは表３６に含まなかった。表３６に例示するように、ＩＧλＪ１－０１、ＩＧλＪ２－０１およびＩＧλＪ３－０２は、それらの使用頻度において過分に表され、したがって表３７において太字で示した。本発明のいくつかの実施形態では、例えば、これらの３種の過分表示の配列のみを利用できる。本発明の他の実施形態では、６種すべてのセグメント、６セグメントの任意の１、２、３、４または５種、あるいはそれらの任意の組合せを利用できる。

【０４１９】

表１４に示したように、ＩＧλＶ遺伝子セグメントによりもたらされたＣＤＲＬ３の一部は、７、８または９アミノ酸である。ＣＤＲＬ３およびＦＲＭ４の残りはＩＧλＪ配列に由来する（表３７）。ＩＧλＪ配列は、１個または２個いずれかのアミノ酸をＣＤＲＬ３にもたらす。２個のアミノ酸がＩＧλＪにもたらされた場合、ＩＧλＪセグメントのＮ末端の２個の残基：ＹＶ（ＩＧλＪ１－０１）、ＶＶ（ＩＧλＪ２－０１）、ＷＶ（ＩＧλＪ３－０１）、ＶＶ（ＩＧλＪ３－０２）またはＡＶ（ＩＧλＪ７－０１およびＩＧλＪ７－０２）からもたらされる。１個のアミノ酸がＩＧλＪからもたらされた場合、それはＶ残基であり、ＩＧλＪセグメントのＮ末端残基の欠失後に形成される。

【０４２０】

本発明のこの非限定の例示的実施形態では、ＩＧλＪ２－０１およびＩＧλＪ３－０２に対応する、ＦＲＭ４セグメントをＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬとして固定した。

【０４２１】

１１の選択されたシャーシの７つ（Ｖλ１－４０、Ｖλ３－１９、Ｖλ３－２１、Ｖλ

６－５７、Ｖλ１－４４、Ｖλ１－５１およびＶλ４－６９）は、最後の完全コドンの後に追加２個のヌクレオチドを有する。それらの７つの例の４つにおいて、付録Ｂに提供されたデータセットの分析により、１個のヌクレオチドの付加（すなわち、理論に制限されるものではないが、ＴｄＴの活性を介して）によりＣＤＲＬ３の長さがさらに延長されることが示された。この効果は、これらの４つのＩＧλＶ配列によりもたらされるＬ３－Ｖλ配列に関する変異体を導入することによると考えることができる（表３８）。

【０４２２】

【表３８】

表38. CDRL3に追加の残基を含む変異体

名称	遺伝子座	FRM1	CDR1	FRM2	CDR2	FRM3	CDR3 / L3-Vλ
1E+	IGVλ1-40+	QSVLTQPPSVSGAPG QRVTISC	TGSSSNIGAG YD---VH	WYQQLPGTAP KLLI	YGN---- SNRPS	GVPDRFSGSKSG-- TSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSL SG**S**
3L+	IGVλ3-19+	SSELTQDPAVSVALG QTVRITC	QGDSLRSYY- -----AS	WYQQKPGQAP VLVI	YGK---- NNRPS	GIPDRFSGSSSG-- NTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSG NH**H/Q**
3H+	IGVλ3-21+	SYVLTQPPSVSVAPG KTARITC	GGNNIGSKS- -----VH	WYQQKPGQAP VLVI	YYD---- SDRPS	GIPERFSGSNSG-- NTATLTISRVEAGDEADYYC	QVWDSSS DH**P**
6A+	IGVλ6-57+	NFMLTQPHSVSESPG KTVTISC	TRSSGSIASN Y----VQ	WYQQRPGSSP TTVI	YED---- NQRPS	GVPDRFSGSIDSSSNSASLT ISGLKTEDEADYYC	QSYDSSN **H/Q**--

(＋)配列は、それぞれのCDR3(太字、下線付き)の末端におけるアミノ酸の付加によって、それらの親から生じる。H/Qは、縮重コドンCAWまたは同等物の使用によって1つの配列に導入できる。

したがって、本発明の現在例示された実施形態におけるシャーシの最終セットは１５であり、１１は表１４のシャーシによりもたらされ、追加の４つは表３８のシャーシによりもたらされる。１５のシャーシの対応するＬ３－Ｖλドメインは、７～１０個のアミノ酸をＣＤＲＬ３にもたらす。ＩＧλＪ配列によりもたらされたアミノ酸を考慮に入れる場合

、ＣＤＲＬ３の長さの全変異は８～１２アミノ酸であり、図４の分布に近づく。したがって、本発明のこの例示的実施形態では、必要最小限Ｖλライブラリーは、下記：１５シャーシ×５のＩＧλＪ由来セグメント＝７５配列により表すことができる。ここで、１５のシャーシは、Ｖλ１－４０、Ｖλ１－４４、Ｖλ１－５１、Ｖλ２－１４、Ｖλ３－１＊、Ｖλ３－１９、Ｖλ３－２１、Ｖλ４－６９、Ｖλ６－５７、Ｖλ５－４５、Ｖλ７－４３、Ｖλ１－４０＋、Ｖλ３－１９＋、Ｖλ３－２１＋およびＶλ６－５７＋である。５ＩＧλＪ由来セグメントは、ＹＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬ（ＩＧλＪ１）、ＶＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬ（ＩＧλＪ２）、ＷＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬ（ＩＧλＪ３）、ＡＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬ（ＩＧλＪ）、および－ＶＦＧＧＧＴＫＬＴＶＬ（前記配列のいずれかから）である。

【０４２３】

（実施例８）

「参照」抗体とのマッチング

当分野で既知である、対象となるヒト抗体のＣＤＲＨ３配列（例えば、診療所で使用される抗体）は、本発明において設計されたライブラリー中に近い対応物を有する。臨床的に関連のある抗体に由来する、一連の１５のＣＤＲＨ３配列を表３９に提示する。

【０４２４】

【表３９】

表39. 参照抗体のCDRH3配列

抗体名	標的	起源	状況	CDHR3配列	配列番号
CAB1	TNF-α	ファージディスプレイ-ヒトライブラリー	FDA承認	AKVSYLSTASSLDY	
CAB2	EGFR	トランスジェニックマウス	FDA承認	VRDRVTGAFDI	
CAB3	IL-12/IL-23	ファージディスプレイ-ヒトライブラリー	フェーズIII	KTHGSHDN	
CAB4	インターロイキン-1-β	トランスジェニックマウス	フェーズIII	ARDLRTGPFDY	
CAB5	RANKL	トランスジェニックマウス	フェーズ III	AKDPGTTVIMSWFDP	
CAB6	IL-12/IL-23	トランスジェニックマウス	フェーズ III	ARRRPGQGYFDF	
CAB7	TNF-α	トランスジェニックマウス	フェーズ III	ARDRGASAGGNYYYYGMDV	
CAB8	CTLA4	トランスジェニックマウス	フェーズ III	ARDPRGATLYYYYYGMDV	
CAB9	CD20	トランスジェニックマウス	フェーズ III	AKDIQYGNYYYGMDV	
CAB10	CD4	トランスジェニックマウス	フェーズ III	ARVINWFDP	
CAB11	CTLA4	トランスジェニックマウス	フェーズIII	ARTGWLGPFDY	
CAB12	IGF1-R	トランスジェニックマウス	フェーズII	AKDLGWSDSYYYYYGMDV	
CAB13	EGFR	トランスジェニックマウス	フェーズII	ARDGITMVRGVMKDYFDY	
CAB14	EGFR	ファージディスプレイ-ヒトライブラリー	フェーズII	ARVSIFGVGTFDY	
CAB15	BLyS	ファージディスプレイ-ヒトライブラリー	フェーズII	ARSRDLLLFPHHALSP	

上記の個々の配列を、実施例５のライブラリーの個々のメンバーと比較し、同じ長さを有し、不一致のアミノ酸の数が最も少ないメンバーまたは複数のメンバーを記録した。結果を下記の表４０に要約する。大部分の事例において、８０％またはより高い同一性を有する一致するものを、例示されたＣＤＲＨ３ライブラリーに見出した。理論に束縛されないが、これらの抗体の個々の特異性および結合親和性が、それらのＣＤＲＨ３配列により影響される範囲まで、これらのライブラリーの１つまたは複数のメンバーは関連標的に対する測定可能な親和性を有することができる。

【０４２５】

【表４０】

表40. 参照抗体のCDRH3と設計ライブラリーとの一致

抗体名	不一致の数 (*)	長さ	最もよく一致した同一性%
CAB1	5	14	64%
CAB2	2	11	82%
CAB3	4	8	50%
CAB4	2	11	82%
CAB5	3	15	80%
CAB6	3	12	75%
CAB7	2	20	90%
CAB8	0	19	100%
CAB9	3	15	80%
CAB10	1	9	89%
CAB11	1	11	91%
CAB12	2	18	89%
CAB13	2	18	89%
CAB14	1	13	92%
CAB15	7	16	56%

(*) ライブラリー中の最も一致する配列（複数可）に関する

約10^8の異なるメンバーを有するライブラリーの物理的実現物が、実際に個々の１つのメンバーを含むことができるならば、対象となる抗体と同一性のパーセントが近い配列がライブラリーの物理的実現物に存在するであろう。この実施例はまた、当分野のライブラリーより優れた本発明のライブラリーの多くの違いの１つ、つまり本発明のライブラリーのメンバーは正確に列挙できることを強調する。対照的に、当分野において既知のＣＤＲＨ３ライブラリーは、本明細書に記載の方法で明白に列挙できない。例えば当分野において既知の多くのライブラリー（例えば、Ｈｏｅｔら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、２００５年、２３巻：３４４頁；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ら、ＥＭＢＯ Ｊ．、１９９４年、１３巻：３２４５頁；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．、１９９３年、１２巻：７２５頁；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９９１年、２２２巻：５８１頁、各々参照によりその全体を組み込む）は、天然のヒトＣＤＲＨ３配列のクローニングによって生じ、それらの正確な組成は特徴付けられておらず、一覧表は排除されている。

【０４２６】

他の（例えば、ランダムまたは半ランダム／バイアス）方法（Ｋｎａｐｐｉｋら、Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ、２０００年、２９６巻：５７頁、参照によりその全体を組み込む）により作製された合成ライブラリーは、非常に多くの独特のメンバーを有する傾向がある。したがって、所与のインプット配列との一致（例えば、８０％またはそれより高く）が、このようなライブラリーの理論的提示で存在できるが、合成およびその後のこのような配列を含む理論的ライブラリーの物理的実現物の作製およびその後のこのような一致に対応する抗体の選択の可能性は、実際には非常に小さいことがある。例えばＫｎａｐｐｉｋのライブラリー中の長さ１９のＣＤＲＨ３は、10^{19}を超える異なる配列を有することができる。このようなライブラリーの実際の実現において、１／１０程度の配列が長さ１９を有することができ、最も大きい全ライブラリーは10^{10}～10^{12}程度の形質転換体を有することができ、したがって所与のあらかじめ定義されたメンバーが存在する可能性は、実際は事実上ゼロである（１０００万中に１つ未満）。他のライブラリー（例えば、Ｅｎｚｅｌｂｅｒｇｅｒら、ＷＯ２００８０５３２７５およびＬａｄｎｅｒのＵＳ２００６０２５７９３７、各々参照によりその全体を組み込む）は、本出願を通して記載の制限の少なくとも１つを受けている。

【０４２７】

したがって、例えば、抗体ＣＡＢ１４について考えると、ＣＡＢ１４のＣＤＲＨ３の配列とアミノ酸の位置がわずか１つ異なる、実施例５の設計ライブラリーのメンバーが７つ

ある（表３９に示す）。このＣＤＲＨ３配列の全長は１３であるので、本発明のライブラリーのこれらの７つの配列個々に関して、同一アミノ酸のパーセントは１２／１３すなわち約９２％である。Ｋｎａｐｐｉｋらのライブラリーにおけるこのような一致（またはもっと高い）を得る可能性は、約1.4×10^{-9}であると予測でき、等しいアミノ酸比率（すなわち、完全にランダム）のライブラリーにおいても約5.5×10^{-10}でさらに低い。したがって、約１／１０が長さ１３を有し得る、約10^{10}の形質転換体を含むライブラリーの物理的実現物において、これらの最もよく一致する１つまたは２つの事例があり得る。しかし、ＣＡＢ１２のようなより長い配列を用いると、約８９％またはそれ以上に一致するメンバーをＫｎａｐｐｉｋ　ライブラリー中に有する可能性は約10^{-15}より低く、ライブラリーの物理的実現物中の例の期待される数は本質的にゼロである。対象となる配列が実際のヒトＣＤＲＨ３配列に似ているという点で、ヒト配列を模倣するように設計された実施例５のライブラリーと密接に一致する。したがって、当分野のライブラリーに対する本ライブラリーの多くの相対的有利性の１つが、ＣＤＲＨ３の長さが増加するにつれ、より明らかになる。

【０４２８】

（実施例９）

ＤＨ、Ｎ２およびＨ３－ＪＨセグメントをコードするオリゴヌクレオチドのスプリットプール合成

この実施例は、本発明の例示的ライブラリーを構築するために使用するオリゴヌクレオチドを合成するために使用する手順を要約する。Ｃｕｓｔｏｍ　Ｐｒｉｍｅｒ　Ｓｕｐｐｏｒｔ（商標）２００ｄＴ４０Ｓ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、約３９μｍｏｌ／ｇの樹脂の装填を使用してオリゴヌクレオチドを合成した。カラム（直径＝３０μｍ）およびフリットはＢｉｏｓｅａｒｃｈ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．から購入した。３０μＬのカラムベッド容量を合成に使用し、各カラムに１２０ｎｍｏｌの樹脂を装填した。ジクロロメタン（ＤＣＭ）およびメタノール（ＭｅＯＨ）の、比率４００／１２２（ｖ／ｖ）の混合物を使用し、樹脂を装填した。オリゴヌクレオチドを、Ｄｒ．Ｏｌｉｇｏ（登録商標）１９２オリゴヌクレオチド合成装置および標準的ホスホロチオエート化学を使用して合成した。

【０４２９】

［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］オリゴヌクレオチドの合成のためにスプリットプール手順を、下記のように実施した：まず、ランダムに選択された１０個のヌクレオチド配列（ＡＴＧＣＡＣＡＧＴＴ；配列番号＿）ＢｓｒＤＩ認識部位（ＧＣＡＡＴＧ）および２つの塩基「重複配列」（ＴＧ、ＡＣ、ＡＧ、ＣＴまたはＧＡ）を含むオリゴヌクレオチドのリーダー配列を合成した。これらのセグメントのそれぞれの目的を下記に説明する。この１８個のヌクレオチド配列の合成後、ＤＨセグメントを合成した；およそ１ｇの樹脂（１８個のヌクレオチドセグメントがまだ接合している）を、２０ｍＬのＤＣＭ／ＭｅＯＨに懸濁した。約６０μＬの得られたスラリー（１２０ｎｍｏｌ）を、個々の２７８のオリゴヌクレオチド合成カラム内に撒いた。これらの２７８のカラムを使用して、３’から上記の１８個のヌクレオチドセグメントに表１８の２７８のＤＨセグメントを合成した。合成後、２７８のＤＨセグメントを下記のようにプールした：樹脂およびフリットをカラムの外に押し出し、２０ｍＬの注射筒内（プランジャーなし）に回収した。各カラムをその後０．５ｍＬのＭｅＯＨで洗浄し、カラム壁に吸着した残留樹脂をすべて取り除いた。注射筒中の樹脂を、樹脂を保持するために多孔性の低いガラスフィルターを使用して、ＭｅＯＨを用いて３回洗浄した。その後樹脂を乾燥させ秤量した。

【０４３０】

続いて、２７８のＤＨセグメントを含む、プールした樹脂（約１．３６ｇ）を、約１７ｍＬのＤＣＭ／ＭｅＯＨに懸濁し、約６０μＬの得られたスラリーをそれぞれ２セットの１４１のカラム内に撒いた。次いで、表２４および２５に列挙された１４１のＮ２セグメントを、二重に合成し（総カラム２８２）、第１ステップにおいて３’から２７８のＤＨセグメントに、合成した。その後、２８２のカラムからの樹脂を、上記のようにプールし

、洗浄し、乾燥させた。

【０４３１】

Ｎ２合成から得られたプールした樹脂（約１．３５ｇ）を、約１７ｍＬのＤＣＭ／ＭｅＯＨに懸濁し、約６０μＬの得られたスラリーを、それぞれ１０回合成された２８のＨ３－ＪＨセグメントを表す２８０カラムの各々の内部に撒いた。表２０のＨ３－ＪＨを含む２８のＩＧＨＪセグメントの個々の部分（下記に、より完全に記載）を、その後１０のカラムにおいて３’からＮ２セグメントに合成した。最終オリゴヌクレオチドを切断し、気体アンモニアに曝露することによって脱保護した（８５℃、２時間、６０ｐｓｉ）。

【０４３２】

スプリットプール合成を使用し、例示的ＣＤＲＨ３ライブラリーを合成した。しかし、より長いオリゴヌクレオチドをより高い忠実性で合成できる、オリゴヌクレオチド合成における最近の進歩、およびスプリッティングを含み、プールを含まない合成手順によるライブラリーのオリゴヌクレオチドの作製を、本発明の代替の実施形態に使用できることは評価される。したがって、本明細書に記載のスプリットプール合成は、ライブラリーのオリゴヌクレオチドを得る考えられる手段の１つであるが、限定されない。本出願に記載のオリゴヌクレオチドを合成する他の考えられる手段の１つは、トリヌクレオチドの使用である。これは、フレームシフト突然変異体が減少または排除されるので、合成の忠実性の増加が期待できる。

【０４３３】

（実施例１０）

ＣＤＲＨ３および重鎖ライブラリーの構築

この実施例は、本発明の例示的ＣＤＲＨ３および重鎖ライブラリーを作製するために使用する手順を要約する。２ステップの方法を使用してＣＤＲＨ３ライブラリーを作製した。第１ステップは尾部およびＮ１セグメントをコードする一連のベクターの組み立てを含み、第２ステップはＤＨ、Ｎ２およびＨ３－ＪＨセグメントをコードするオリゴヌクレオチドを作製するための、実施例９に要約したスプリットプール核酸合成手順の利用を含んだ。その後、化学的に合成したオリゴヌクレオチドをベクターに連結し、本明細書に記載の番号付けシステムに基づき、ＣＤＲＨ３残基９５～１０２を得た。その次に、このＣＤＲＨ３ライブラリーをＰＣＲによって増幅し、実施例１および２に記載の重鎖シャーシ変異体を含む複数のベクターに組み換えた。ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２の変異体を、実施例１の１０の重鎖シャーシをコードするオリゴヌクレオチドを鋳型として使用して、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（商標））によって作製した。重鎖シャーシおよび定常領域を含むベクターを用いたＣＤＲＨ３の組換えで、完全長重鎖を形成できるように、重鎖シャーシに加えて、複数のベクターは、ＩｇＧ１由来の重鎖定常領域（すなわち、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３）を含んだ。この例示的実施形態では、完全長重鎖を作製するための組換え、および完全長重鎖の発現の双方をＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいて実施した。

【０４３４】

重鎖および軽鎖を含む完全長のヘテロ二量体ＩｇＧを作製するために、軽鎖タンパク質をさらに酵母細胞において発現させた。この実施形態に使用する軽鎖ライブラリーはκ軽鎖ライブラリーであり、ＶＫＣＤＲ３は縮重オリゴヌクレオチドを使用して合成した（実施例６．２を参照されたい）。（重鎖ライブラリーをコードするオリゴヌクレオチドと比較して）軽鎖ライブラリーをコードするより、短いオリゴヌクレオチドにより、（重鎖ＣＤＲ３合成のように）サブ要素からの組み立てを必要としない、オリゴヌクレオチド合成に関する標準的な手順を使用して、軽鎖ＣＤＲ３オリゴヌクレオチドを新たに合成できた。１つまたは複数の軽鎖は、本発明のライブラリーから特定の重鎖クローンを発現する個々の酵母細胞において発現させることができる。１つまたは複数の軽鎖は、エピソーム性（例えばプラスミド）ベクターおよび酵母のゲノムの組み込み部位の双方から発現させることに成功した。

【０４３５】

本発明のＣＤＲＨ３ライブラリーの合成のために、個々の要素の組み立て、およびその次の例示的ＣＤＲＨ３ライブラリーと、シャーシおよび定常領域を含むベクターとの連結についてのさらなる詳細を下記に提供する。本発明のこの特定の例示的実施形態では、この方法に関与するステップは、（ｉ）尾部およびＮ１領域をコードする４２４のベクターの合成；（ｉｉ）［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］セグメントをコードするオリゴヌクレオチドとこれらの４２４のベクターとの連結；（ｉｉｉ）これらの連結において作製されたベクター由来のＣＤＲＨ３配列のＰＣＲ増幅；ならびに（ｉｖ）ＰＣＲ増幅されたＣＤＲＨ３ドメインの、シャーシおよび常領域を含む酵母発現ベクターへの相同組換え、を全般に特徴とすることができる。

【０４３６】

（実施例１０．１）

尾部およびＮ１領域をコードするベクターの合成

この実施例は、ＣＤＲＨ３の尾部およびＮ１領域をコードする４２４のベクターの合成を実証する。本発明のこの例示的実施形態では、尾部はＧ、Ｄ、Ｅまたは何もないことに制限され、Ｎ１領域は表２４に示された５９の配列に制限された。本明細書を通して記載したように、多くの他の実施形態が可能である。

【０４３７】

この方法の第１ステップにおいて、１つの「基本ベクター」（ｐＪＭ２０４、ｐＵＣ由来クローニングベクター）を構築し、これは（ｉ）すべての２８のＩＧＨＪセグメント（ＳＳ）のＣ末端部分に共通である２つのアミノ酸をコードする核酸配列、および（ｉｉ）ＩｇＧ１由来のＣＨ１定常領域の一部をコードする核酸配列を含んだ。したがって、基本ベクターは、

【０４３８】

【化４７】

[SS]-[CH1~],

として表すことができる配列をコードする挿入物を含み、ＳＳは、２８のＩＧＨＪセグメントのＣ末端の共通部分であり、ＣＨ１～はＩｇＧ１由来のＣＨ１定常領域の一部、つまり：ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧ（配列番号＿）

である。

【０４３９】

次に、４２４のさまざまなオリゴヌクレオチドを、基本ベクターの［ＳＳ］－［ＣＨ１～］をコードする領域から上流（すなわち５’）にクローン化した。これらの４２４のオリゴヌクレオチドを、標準的方法によって合成し、個々に表５に列挙された１７の重鎖シャーシのＣ末端部分＋４種の例示的尾部セグメント（Ｇ／Ｄ／Ｅ／－）の１つおよび５９の例示的Ｎ１セグメント（表２４）の１つをコードした。したがって、これらの４２４オリゴヌクレオチドは、

【０４４０】

【化４８】

[~FRM3]-[G/D/E/-]-[N1],

で表すことができる複数の配列をコードし、～ＦＲＭ３は、表５の１７の重鎖シャーシの１つに由来するＦＲＭ３領域のＣ末端部分を表し、Ｇ／Ｄ／Ｅ／－はＧ、Ｄ、Ｅまたは何もないことを表し、Ｎ１は表２４に列挙された５９のＮ１配列の１つを表す。本明細書を通して記載したように、本発明は、表５に例示したシャーシ、それらのＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２変異体（表８）、この実施例に使用する４種の例示的尾部の選択肢または表２４に提示した５９のＮ１セグメントに限定されない。

【０４４１】

上記の配列により表されるオリゴヌクレオチド配列を、２種の群において合成した。１つの群は、表５に列挙された１７の重鎖シャーシの１６に対応する領域と同一な～ＦＲＭ３領域を含み、別の群は、ＶＨ３－１５の対応する領域と同一な～ＦＲＭ３領域を含む。前者の群において、ＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号＿）をコードするオリゴヌクレオチドを～ＦＲＭ３に関して使用した。その次のＰＣＲ増幅の間に、ＶＨ５－５１生殖系列配列に対応するようにＶＨ５－５１のＶ残基をＭに改変した。（ＶＨ３－１５と共通な配列を含む）後者の群において、
ＡＩＳＧＳＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫ（配列番号＿）
の配列をコードするより、大きなオリゴヌクレオチドを、～ＦＲＭ３に関して使用した。

【０４４２】

～ＦＲＭ３領域をコードする２つのオリゴヌクレオチドは、それぞれ４種の尾部領域（Ｇ／Ｄ／Ｅ／－）の１つおよび５９のＮ１セグメントの１つをコードするオリゴヌクレオチドと対になり、個々の～ＦＲＭ３（すなわち、１×４×５９）に関して計２３６の考えられる組合せまたは双方の～ＦＲＭ３配列が考えられる場合、総計４７２の考えられる組合せを得た。しかし、これらの組合せのみ合わせの４８は重複しており、これらの配列の１つの提示だけが現在例示されたＣＤＲＨ３ライブラリーに使用され、［～ＦＲＭ３］－［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］－［Ｎ１］の配列をコードする４２４の独特のオリゴヌクレオチドを得た。

【０４４３】

［～ＦＲＭ３］－［Ｇ／Ｄ／Ｅ／－］－［Ｎ１］および［ＳＳ］－［ＣＨ１－］セグメントをコードするオリゴヌクレオチドを、上記のようにベクターにクローン化した後で、追加の配列をベクターに付加し、その後のスプリットプール合成の間に合成された［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］断片をコードするオリゴヌクレオチドの挿入を促進した。これらの追加の配列は、選択可能なマーカータンパク質をコードするポリヌクレオチドを、ＩＩ型制限酵素に対する認識部位の両側に隣接して含む、例えば：

【０４４４】

【化４９】

[II型RS 1]-[選択可能なマーカータンパク質]-[II型RS 2]

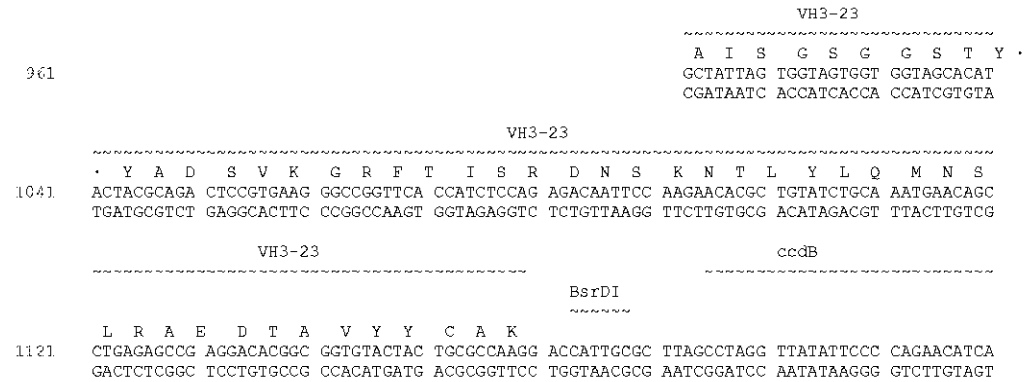
この例示的実施形態では、選択可能なマーカータンパク質はｃｃｄＢであり、ＩＩ型制限酵素認識部位は、ＢｓｒＤＩおよびＢｂｓＩに特異的である。Ｅ．ｃｏｌｉの特定菌株において、ｃｃｄＢタンパク質は毒性であり、その結果、遺伝子が存在する場合、これらの細菌の成長を防ぐ。

【０４４５】

ＶＨ３－２３シャーシに基づく～ＦＲＭ３領域、Ｄ尾部残基および長さゼロのＮ１セグメントを含む、２１２のベクターの１つの５’末端の例を下記に提示する：

【０４４６】

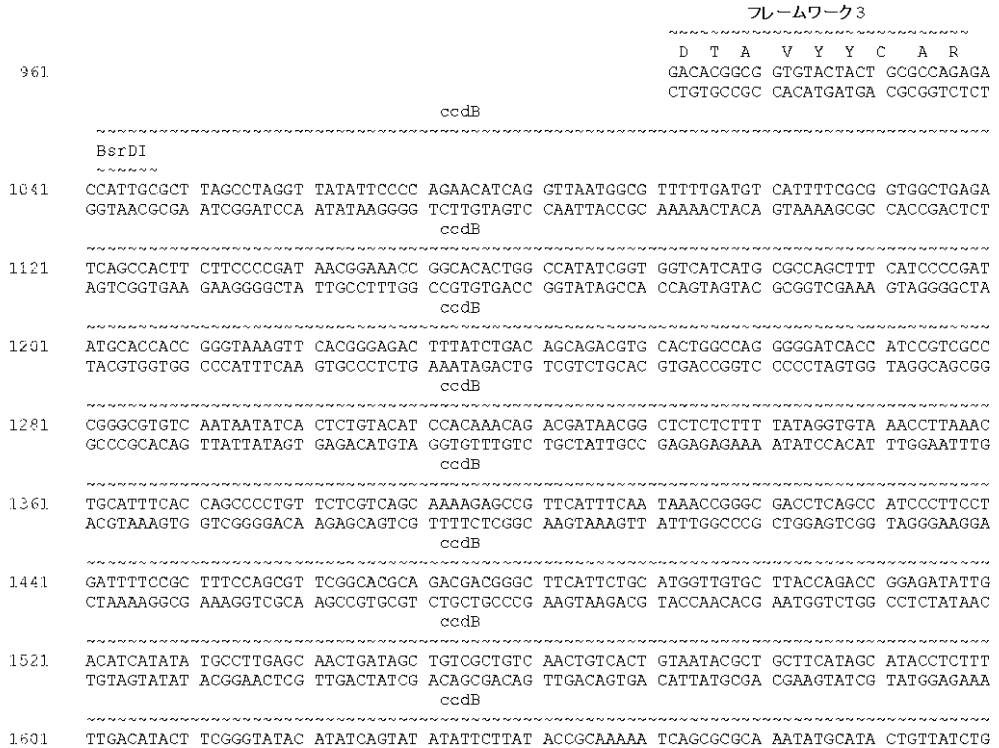
【化５０】



尾部としてのＤ残基および長さゼロのＮ１セグメントを含む、他の１６のシャーシの１つに基づく～ＦＲＭ３領域を含む、２１２のベクターの１つの例を下記に提示する。

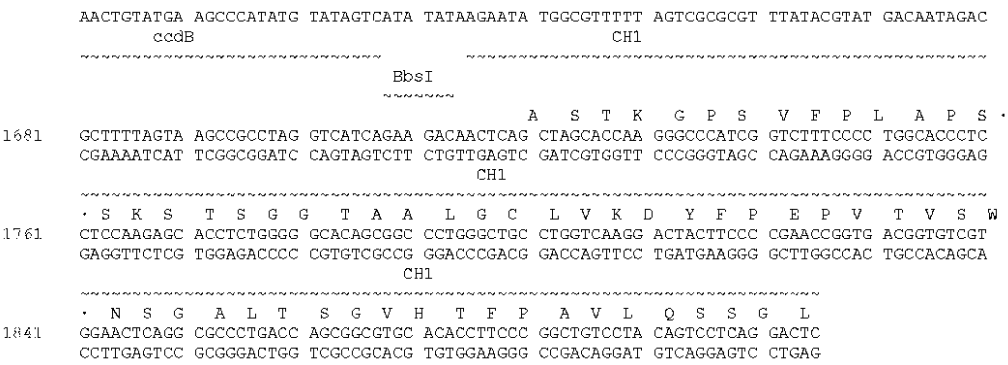
【０４４７】

【化５１】



【０４４８】

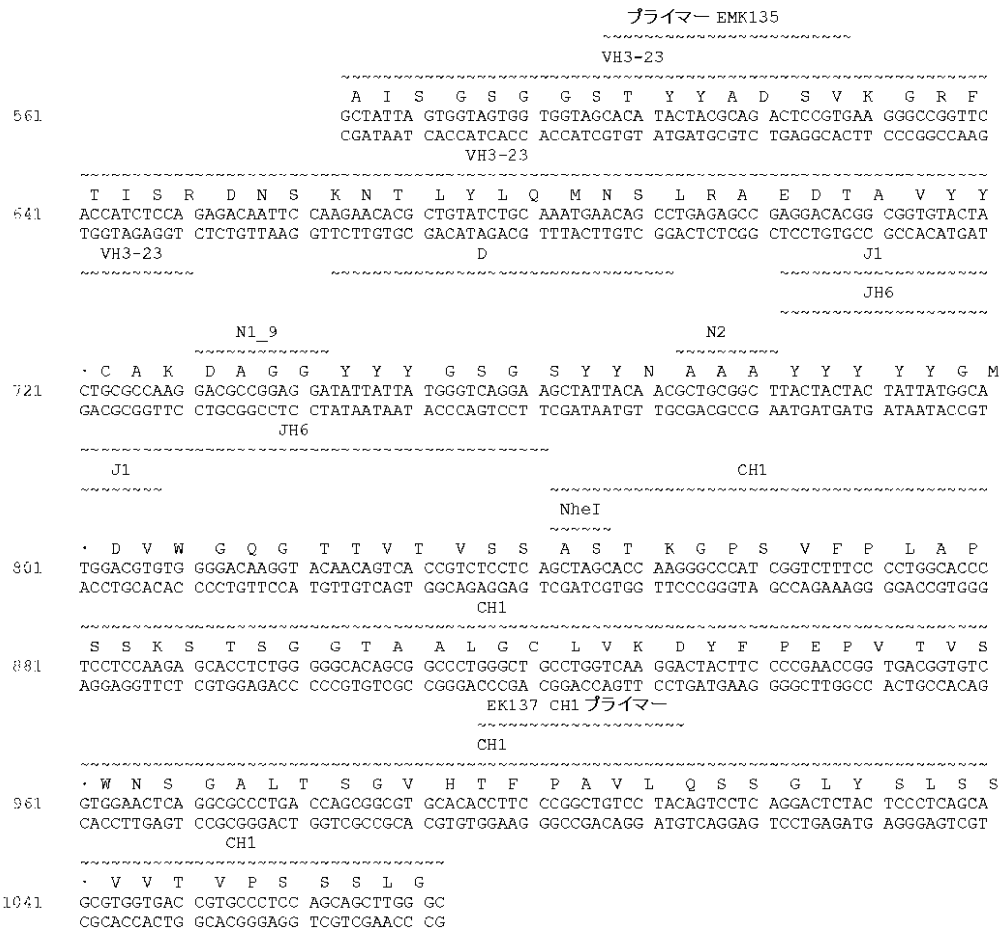
【化５２】



全４２４のベクターを配列検証した。［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］断片のクローニング前後の、４２４のベクターの内容の略図を、図５に提示した。下記はＶＨ３－２３由来のＦＲＭ３領域を含む、４２４のベクターの１つに由来する例示的配列である。

【０４４９】

【化５３】



（実施例１０．２）

ＤＨ、Ｎ２、Ｈ３－ＪＨセグメントをコードするオリゴヌクレオチドの、尾部およびＮ１セグメントを含むベクターへのクローニング

この実施例は、［Ｄ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］セグメント（スプリットプール合成を介して作製；実施例９）をコードするオリゴヌクレオチドの、実施例１０．１において作製された４２４のベクターへのクローニングを説明する。要約すると、スプリットプール合成を介して作製された［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］オリゴヌクレオチドをＰＣＲにより増幅し、二本鎖オリゴヌクレオチドを作製し、ベクター上の制限部位（すなわち、ＢｓｒＤＩおよびＢｂｓＩ）に相補的なオーバーハングを作製する制限部位を導入し、スプリットプール合成において合成されなかったＩＧＨＪセグメントの３’部分を完了させる。増幅されたオリゴヌクレオチドをその後、制限酵素ＢｓｒＤＩ（ＤＨセグメントの隣で切断する）およびＢｂｓＩ（ＪＨセグメントの終わり近くで切断する）を用いて消化した。切断されたオリゴヌクレオチドを、その後精製し、既にＢｓｒＤＩおよびＢｂｓＩにより消化されている４２４のベクターに連結した。連結後、反応物を精製し、エタノール沈殿させ、再可溶化させた。

【０４５０】

スプリットプール合成において合成された［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］オリゴヌクレオチドの１つのためのこの方法を、下記に例示する。下記のオリゴヌクレオチド（配列番号＿）は、スプリットプール合成の間に合成されたオリゴヌクレオチドの１つである：

【０４５１】

【化５４】

1 ATGCACAGTTGCAATGTGTATTACTATGGATCTGGTTCTTACTATAATGT 50
51 GGGCGGATATTATTACTACTATGGTATGGACGTATGGGGGCAAGGGACC 99

最初の１０個のヌクレオチド（ＡＴＧＣＡＣＡＧＴＴ；配列番号：＿）は、ＰＣＲ増幅ステップにおいて２０塩基対に増加されたランダムな配列の一部を表す、下記。配列のこの部分は、ＢｓｒＤＩ消化の効率を上昇させ、オリゴヌクレオチドの下流精製を促進する。

【０４５２】

ヌクレオチド１１～１６（下線）は、ＢｓｒＤＩ認識部位を表す。この部位の後に続く、２つの塩基重複配列（この実施例においてＴＧ；太字）を、ＢｓｒＤＩを含む４２４のベクター特定部（すなわち、特定のベクターの尾部／Ｎ１領域の組成次第で）を消化することによって作製された、２個の塩基のオーバーハングに相補的であるように合成した。他のオリゴヌクレオチドは、下記に記載のような、さまざまな２塩基のオーバーハングを含む。

【０４５３】

２塩基の重複の後に、ＤＨ遺伝子セグメント（ヌクレオチド１９～４８）が続く、この実施例においては、１０残基のＤＨセグメントＹＹＹＧＳＧＳＹＹＮ（すなわち、表１７のＩＧＨＤ３－１０＿２；配列番号：＿）をコードする３０ｂｐの配列（ＴＡＴＴＡＣＴＡＴＧＧＡＴＣＴＧＧＴＴＣＴＴＡＣＴＡＴＡＡＴ，配列番号：＿）が続く。

【０４５４】

ＤＨセグメントをコードするオリゴヌクレオチドの領域が続き、この実施例においては、Ｎ２セグメントを（この場合ＶＧＧ；表２４）コードする９塩基の領域（ＧＴＧＧＧＣＧＧＡ；太字；ヌクレオチド４９～５７）が続く。

【０４５５】

この例示的オリゴヌクレオチドの残りはスプリットプール合成の間に合成されたＪＨセグメントの一部、配列ＹＹＹＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴ（表２０；配列番号：＿）をコードする（ＴＡＴＴＡＴＴＡＣＴＡＣＴＡＴＧＧＴＡＴＧＧＡＣＧＴＡＴＧＧＧＧＧＣＡＡＧＧＧＡＣＣ；配列番号＿；ヌクレオチド５８～９９；下線）を表す。ＩＧＨＪセグメントのバランスを、その後の下記のＰＣＲ増幅の間に付加する。

【０４５６】

スプリットプール合成されたオリゴヌクレオチドを樹脂から切断し、脱保護した後で、それらは、ランダムに選択された追加の１０個のヌクレオチド（例えば、ＧＡＣＧＡＧＣＴＴＣ；配列番号＿）を５’末端に、ＩＧＨＪセグメントの残り＋ＢｂｓＩ制限部位を３’末端に付加する、ＰＤＲ反応の鋳型としての役目を果たした。これらの付加は、［ＤＨ］－［Ｎ２］－［ＪＨ］オリゴヌクレオチドの４２４のベクターへのクローニングを促進する。上記のように（実施例９）、スプリットプール合成の最後の回は、２８０のカラムを含む：２８のＨ３－ＪＨセグメントの１つをコードする個々のオリゴヌクレオチドのために１０個のカラム。これらの２８０のカラムから得られたオリゴヌクレオチド産物を、それらのＨ３－ＪＨセグメントの同一性に従って、計２８のプールをプールした。その後、これらの２８のプールをそれぞれ、個々に異なる２塩基の重複をコードする（前記ＤＨセグメント；上を参照されたい）５種の順方向プライマーを使用して５つの個別のＰＣＲ反応において増幅し、Ｈ３－ＪＨセグメントの家族性起源に対応する配列を有する１種の逆方向プライマーを使用して増幅する。これら１１のプライマーの配列を下記に載せる。

【０４５７】

【化５５】

順方向プライマー

AC GACGAGCTTCAATGCACAGTTGCAATGAC (配列番号___)
AG GACGAGCTTCAATGCACAGTTGCAATGAG (配列番号___)
CT GACGAGCTTCAATGCACAGTTGCAATGCT (配列番号___)
GA GACGAGCTTCAATGCACAGTTGCAATGGA (配列番号___)
TG GACGAGCTTCAATGCACAGTTGCAATGTG (配列番号___)

逆方向プライマー

JH1 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAGGAGACGGTGACCAAGGTGCCCTGGCCCCA
(配列番号___)
JH2 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAGGAGACAGTGACCAAGGTGCCACGGCCCCA
(配列番号___)
JH3 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCCCCA
(配列番号___)
JH4 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAGGAGACGGTGACCAAGGTTCCTTGGCCCCA

【０４５８】

【化５６】

(配列番号___)
JH5 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAGGAGACGGTGACCAAGGTTCCCTGGCCCCA
(配列番号___)
JH6 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCCCA
(配列番号___)

増幅は、Ｔａｑポリメラーゼを使用して標準条件下で実施した。オリゴヌクレオチドを、さまざまな長さの配列の提示を維持するように８周期増幅した。鎖の溶解は、９５℃において３０秒、アニーリングは５８℃において１５秒、伸長時間は７２℃において実施した。

【０４５９】

例として上に列挙された例示的スプリットプール由来のオリゴヌクレオチドを使用して、ＰＣＲ増幅を、ＴＧプライマーおよびＪＨ６プライマーを使用して実施し、プライマーのアニーリング部分に下線を引いた。

【０４６０】

【化５７】

TG GACGAGCTTCAATGCACAGTTGCAATGTG (配列番号___)

JH6 TGCATCAGTGCGACTAACGGAAGACTCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCCCA
(配列番号___)

５’からアニーリング部分までであるＴＧプライマーの部分は、上記のランダムな１０塩基対を含む。５’からアニーリング部分までであるＪＨ６プライマーの部分は、ＪＨ６セグメントのバランスおよびＢｂｓＩ制限部位を含む。下記のＰＣＲ産物（配列番号＿）は、この反応において形成される（付加配列に下線を引いた）：

【０４６１】

【化５８】

GACGAGCTTCATGCACAGTTGCAATGTGTATTACTATGGATCTGGTTCTTACTATAATGTGGGCGGATATTAT
TACTACTATGGTATGGACGTATGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGAGTCTTCCGTTAGTCGCA
CTGATGCAG

その後、各反応からのＰＣＲ産物を、反応に使用した順方向プライマーに基づき、５種のプールに組合せ、ＢｓｒＤＩ消化の後で、配列のセットを作製し、同じ２塩基のオーバーハングを得た。その後、ＰＣＲ産物の５種のプールを、ＢｓＲＤＩおよびＢｂｓｌ（１００μｇのＰＣＲ産物；１ｍＬの反応液量；２００ＵのＢｂｓｌ；１００ＵのＢｓｒＤｌ；２時間；３７℃；ＮＥＢバッファー２）を用いて消化した。消化されたオリゴヌクレオチドを、フェノール／クロロホルムで２回抽出し、エタノール沈殿させ、短時間風乾し、

３００μＬのＴＥバッファー中に４℃において一晩放置することによって再可溶化した。

【０４６２】

その後、前項に記載の４２４のベクターを個々にＢｓｒＤＩおよびＢｂｓＩを用いて消化し、各ベクターにより、ＰＣＲ産物の５種のプールの１つに含まれるオーバーハングの１つに相補的な２塩基のオーバーハングを得た。したがって、制限消化されたＰＣＲ産物の５種のプールの１つを、それらの適合末端に応じて、計４２４の連結に関して４２４のベクターそれぞれに連結する。

【０４６３】

（実施例１０．３）

４２４のベクター由来のＣＤＲＨ３のＰＣＲ増幅

この実施例は、上記の４２４のベクター由来のＣＤＲＨ３領域のＰＣＲ増幅について説明する。上に説明したように、４２４のベクターは、２個のセットを表し、１つはＣＡＫで終わるＦＲＭ３を含むＶＨ３－２３ファミリー（２１２ベクター）および１つはＣＡＲで終わるＦＲＭ３を含む他の１６のシャーシ（２１２ベクター）を表す。ＶＨ３－２３に基づくベクター中のＣＤＲＨ３を、プラスミドのＣＨ１領域の一部を認識する逆方向プライマー（ＥＫ１３７；表４１を参照されたい）およびＶＨ３－２３特異的プライマーのＥＫ１３５（表４１を参照されたい）を使用して増幅した。ＣＡＲで終わるＦＲＭ３を含む２１２のベクターに由来するＣＤＲＨ３の増幅を、同じ逆方向プライマー（ＥＫ１３７）および表４１に示すＦＲＭ３特異的プライマーのそれぞれ（ＥＫ１３９、ＥＫ１４０、ＥＫ１４１、ＥＫ１４３およびＥＫ１４４）を使用して実施した。したがって、２１２のＶＨ３－２３の増幅および２１２×５のＦＲＭ３のＰＣＲ反応、計１，２７２の反応を実施した。追加のＰＣＲ反応により、２１２のＶＨ３－２３に基づくベクター由来のＣＤＲＨ３を、ＥＫ１３３順方向プライマーを使用して増幅し、アンプリコンが他の５つのＶＨ３ファミリーメンバーのシャーシに、これらのシャーシの最後の３個のアミノ酸を、元のＣＡＲ（ＶＨ３－２３＊）の代わりにＣＡＫにして、クローンできるようした。各反応に使用したプライマーを、表４１に示す。

【０４６４】

【表４１】

表41. CDRH3配列の増幅に使用したプライマー

プライマー番号	対合シャーシ	プライマー配列	配列番号
EK135	VH3-23	CACATACTACGCAGACTCCGTG	
EK133	VH3-48; VH3-7; VH3-15; VH3-30; VH3-33; VH3-23*	CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTG	
EK139	VH4-B; VH4-31; VH4-34; VH4-39; VH4-59; VH4-61	AAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTG	
EK140	VH1-46; VH1-69	GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTG	
EK141	VH1-2	GAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTACTG	
EK143	VH5-51	CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACGGCGATGTACTACTG	
EK144	VH1-18	GAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTACTG	
EK137	CH1 逆方向プライマー	GTAGGACAGCCGGGAAGG	

（実施例１０．４）

ＰＣＲ増幅されたＣＤＲＨ３領域の重鎖シャーシへの相同組換え

増幅後、反応産物を、それらが最終的にクローン化されるであろう個々のＶＨシャーシに従ってプールした。表４２にこれらのプールを列挙し、最後の２列に各プール中のＣＤＲＨ３配列を得るために使用したＰＣＲプライマーを載せた。

【０４６５】

【表４２】

表42. 424のベクター由来のCDRH3領域を増幅するために使用したPCRプライマー

プール番号(任意の)	HC シャーシ標的	5'プライマー	3'プライマー
1	1-46	EK140	EK137
	1-69	EK140	EK137
2	1-2	EK141	EK137
3	1-18	EK144	EK137
4	4-B	EK139	EK137
	4-31	EK139	EK137
	4-34[2]	EK139	EK137
	4-39	EK139	EK137
	4-59	EK139	EK137
	4-61	EK139	EK137
5	5-51	EK143	EK137
6	3-15[1]	EK133	EK137
	3-7	EK133	EK137
	3-33	EK133	EK137
	3-33	EK133	EK137
	3-48	EK133	EK137
7	3-23	EMK135	EK137
8	3-23*	EK133	EK137

* アンプリコンが他の5つのVH3ファミリーメンバーのシャーシ(すなわち、VH3-23以外)に、これらのシャーシの最後の3個のアミノ酸を、元のCARの代わりにCAKにして、クローンできるようした。

[1] 表5に記載のように、VH3-15中の元のKT配列をRAに、および元のTTからARに突然変異させた。

[2] 表5に記載のように、潜在的N結合型グリコシル化部位を、このシャーシのCDRH2から除去した。

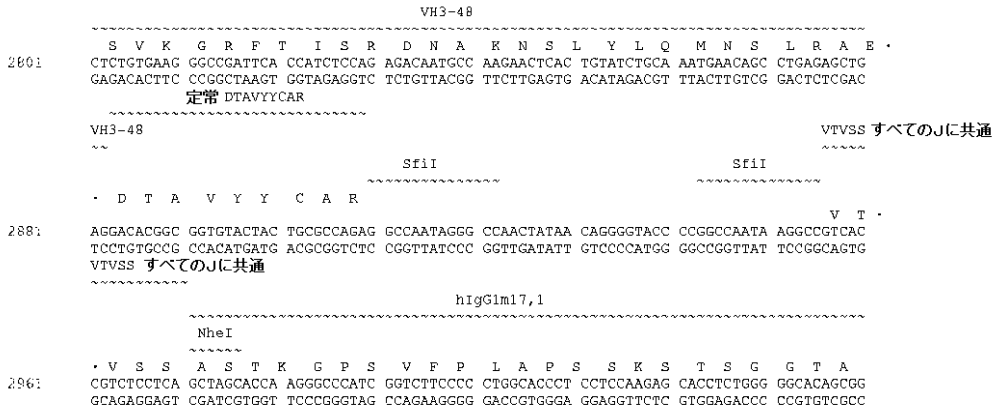
増幅されたＣＤＲＨ３領域を、上に要約した方法に従ってプールした後、重鎖シャーシ発現ベクターを、それらの起源および切断部に従ってプールし、増幅されたＣＤＲＨ３との相同組換えのための「ギャップ」を作製した。図６はＣＤＲＨ３との組換え前の重鎖ベクターの構造略図を示す。本発明のこの例示的実施形態では、重鎖シャーシおよびＩｇＧ１の定常領域をコードするがＣＤＲＨ３はコードしない、計１５２のベクターがあった。これらの１５２のベクターは、１７の個別の可変重鎖遺伝子ファミリー（表５；実施例１および２）を表す。ファミリーの１５は、表５に記載の重鎖シャーシ配列および表８に記載のＣＤＲＨ１／Ｈ２変異体（すなわち１５０のベクター）によって表された。ＶＨ３－３０は、ＶＨ３－３３とアミノ酸が１個違い、したがってＶＨ３－３０は、変異体のＶＨ３－３３のプールに含めた。４－３４ＶＨファミリーメンバーを、他のすべてと分け、この例示的実施形態では、その変異体は本ライブラリーに全く含めなかった。したがって、１７の重鎖シャーシを表す計１６のプールを、１５２のベクターから作製した。

【０４６６】

このベクターのプールを、可変ドメインのＦＲＭ３の末端と、ＣＨ１開始点の間に位置するベクターの２つの部位において切断する制限酵素ＳｆｉＩで消化した。

【０４６７】

【化５９】



その後、ギャップベクターのプールを、上記のように作製された適切な（すなわち対合）ＣＤＲＨ３アンプリコンのプールと、挿入物対ベクターの比が５０：１で混合した。その後、混合物を、既にプラスミドまたはＶＫ軽鎖ライブラリー（下記）を含む組み込み遺伝子を含むエレクトロコンピテント酵母（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）に形質転換した。ライブラリーの多様性の程度を、エレクトロポレートした細胞の希釈液を選択可能な寒天プレート上に播種することによって確定した。本発明のこの例示された実施形態では、寒天はトリプトファンを欠いており、酵母は内因的にトリプトファンを合成する能力を欠いていた。この欠損を、重鎖シャーシプラスミド上にＴＲＰマーカーを包括することによって、このプラスミドを受け取り、それをＣＤＲＨ３挿入物と組み換える任意の酵母が成長するように是正した。その後、エレクトロポレートされた細胞は、トリプトファンを欠いた液体培地中でおよそ１００倍増殖した。ライブラリーのアリコートを、５０％のグリセロール中で凍結し、－８０℃で保存した。このステージで得られた各形質転換体は、完全ＩｇＧ分子を発現できるクローンを表す。ＣＤＲＨ３を重鎖ベクターに組み込んだ略図、付随する配列を図５に示す。

【０４６８】

その後、表４３に表したように、重鎖ファミリーメンバーの適切な提示に基づいて、重鎖ライブラリーのプールを作製した。

【０４６９】

【表４３】

表43. ライブラリーの設計に使用したデータセット、期待される（設計された）ライブラリーおよび実際の（観察された）ライブラリーにおける重鎖シャーシの出現率

シャーシ	データセット中の相対出現率(1)	期待された(2)	観察された(3)
VH1-2	5.1	6.0	6.4
VH1-18	3.4	3.7	3.8
VH1-46	3.4	5.2	4.7
VH1-69	8.0	8.0	10.7
VH3-7	3.6	6.1	4.5
VH3-15	1.9	6.9	3.6
VH3-23	11.0	13.2	17.1
VH3-33/30	13.1	12.5	6.6
VH3-48	2.9	6.3	7.5
VH4-31	3.4	2.5	4.3
VH4-34	17.2	7.0	4.7
VH4-39	8.7	3.9	3.0
VH4-59	7.0	7.8	9.2
VH4-61	3.2	1.9	2.4
VH4-B	1.0	1.4	0.8
VH5-51	7.2	7.7	10.5

(1) 実施例1に詳述したように、これらの17の配列がヒトレパートリーを提示するために使用されたヒトVH配列の全サンプルの76%を占める。

(2) 各シャーシ型のサブライブラリーのプールに基づく。

(3) ライブラリーからの531の配列中の使用頻度、図20と比較されたい。

（実施例１０．５）：ＶＨ３－２３におけるＫ９４Ｒの突然変異およびＶＨ３－３３、ＶＨ３－３０、ＶＨ３－７およびＶＨ３－４８におけるＲ９４Ｋの突然変異

この実施例は、ＶＨ３－２３、ＶＨ３－３３、ＶＨ３－３０、ＶＨ３－７およびＶＨ３－４８における９４位の突然変異について説明する。ＶＨ３－２３において、この位置のアミノ酸をＫからＲに突然変異させた。ＶＨ３－３３、ＶＨ３－３０、ＶＨ３－７およびＶＨ３－４８において、このアミノ酸をＲからＫに突然変異させた。ＶＨ３－３２において、この位置をＫからＲに突然変異させた。これらの突然変異を引き起こす目的は、ライブラリーにおけるＣＤＲＨ３提示の多様性を促進することである。例えば、天然に存在するＶＨ３－２３配列において、約９０％が９４位にＫを有するが、一方約１０％はＲを有する。これらの変化を引き起こすことによって、ＣＤＲＨ３提示の多様性が増加し、ライブラリーの全多様性もまた増加する。

【０４７０】

増幅は、４２４のベクターを鋳型として使用して実施した。Ｋ９４Ｒの突然変異に関しては、配列ＤＴＡＶＹＹＣＡＫ（ＶＨ３－２３）を含むベクターを、ＫをＲに変えるＰＣＲプライマーを用いて増幅させ、ＶＨ３－４８、ＶＨ３－３３、ＶＨ－３０およびＶＨ３－７との相同組換えのために、５’尾部に付加した。３－４８中の「Ｔ」塩基は、コードされたアミノ酸を変化させず、したがってＴ：：Ｃが不一致な同じプライマーもまた、３－４８シャーシへの相同組換えが可能である。

【０４７１】

さらに、ＤＴＡＶＹＹＣＡＲ配列を含む４２４のベクターからの増幅産物（上記のように作製した）は、ＶＨ３－２３（ＣＡＲ）ベクターに相同組換えでき、このフレームワーク内でＲをＫに変化させ、したがってこのシャーシにおいてＣＤＲＨ３の提示の多様性をさらに増加させる。

【０４７２】

【化６０】

	240	294
VH3-48 (240)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGA	
VH3-33/30(240)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGA	
VH3-7 (240)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGA	
VH3-23 (240)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAAG	

（実施例１１）

ＶＫライブラリーの構築

この実施例は、本発明のＶＫライブラリーの構築について説明する。本明細書に記載の例示的ＶＫライブラリーは、実施例６．２に記載の約10^5の複雑性のＶＫＣＤＲ３ライブラリーに対応する。実施例６に記載のように、本出願を通して、他のＶＫライブラリーも本発明の範囲内であり、Ｖλライブラリーもまた同様である。

【０４７３】

重鎖ベクターのように、ＶＫＣＤＲ３を含まないが、代わりにＶＫＣＤＲ３の位置に２つのＳｆｉＩ制限部位を含む１０のＶＫシャーシを合成した（表１１）。κ定常領域が、ＳｆｉＩ制限部位の後に続いた。図８は、ＣＤＲＬ３の組換え前の軽鎖ベクターとの構造略図である。

【０４７４】

その後、実施例６．２に記載のように、縮重オリゴヌクレオチド（表３３）を使用して、１０のＶＫＣＤＲオリゴヌクレオチドライブラリーを合成した。その後、このオリゴヌクレオチドを個別のプールとしてＰＣＲ増幅し、それらを二本鎖にし、ＶＫシャーシおよび定常領域配列を含む（ＳｆｉＩによる）ギャップベクターとの効率的な相同組換えに必要な、追加のヌクレオチドを付加した。本発明の実施形態におけるＶＫＣＤＲ３のプールは、ＰＣＲ後に、１：８：１の比率で混合された、長さ８、９および１０のアミノ酸を提示した。その後プールを、上に説明したＣＤＲＨ３領域に関して記載のように、それぞれのＳｆｉＩギャップＶＫシャーシに相同組換えを介してクローン化した。軽鎖ベクターに組み込んだＣＤＲＬ３および付随する配列の略図を図９に載せた。

【０４７５】

その後、Ｂ細胞の循環プール中に見出されるＶＫファミリーメンバーの適切な提示に基づいて、κ軽鎖ライブラリーのプールを作製した。使用した１０のκ可変領域および最終ライブラリーのプールにおける相対頻度を表４４に示す。

【０４７６】

【表４４】

表44. ライブラリーに使用するデータセット、期待された（設計された）ライブラリーおよび実際の（観察された）ライブラリーにおけるVKシャーシの出現率

シャーシ	データセット中の相対出現率(1)	期待された(2)	観察された(3)
VK1-5	8.6	7.1	5.8
VK1-12	4.0	3.6	3.5
VK1-27	3.3	3.6	8.1
VK1-33	5.3	7.1	3.5
VK1-39	18.5	21.4	17.4
VK2-28	7.7	7.1	5.8
VK3-11	10.9	10.7	20.9
VK3-15	6.6	7.1	4.7
VK3-20	24.5	21.4	18.6
VK4-1	10.4	10.7	11.6

(1) 実施例3に示したようにこれらの10のシャーシは、検査したVK配列の全データセット中の出現率の約80%を占める。

(2) 2列目のデータからの概数比を、実際の実験設定に対して標準化した。相対的概数比は、VK1-39およびVK3-20が6、VK3-11およびVK4-1が3、VK-15、VK1-33、VK2-28およびVK3-15が2ならびにVK1-12およびVK1-27が1である。

(3) ライブラリーから得られた86の配列セットにおけるシャーシの使用頻度；図22もまた参照されたい。

（実施例１２）

例示的ライブラリーの特徴付け

この実施例は、本明細書に記載の方法に従って構築された、本発明の例示的ライブラリーの特徴を示す。

【０４７７】

（実施例１２．１）

重鎖の特徴付け

スプリットプール合成の産物を特徴付けするために、［尾部］－［Ｎ１］－［ＤＨ］－［Ｎ２］－［Ｈ３－ＪＨ］産物を含む４２４のベクターの１０をランダムに選択し、Ｅ．ｃｏｌｉに形質転換した。スプリットプール産物は、約１．１×１０^{6}（すなわち、２７８×１４１×２８）の理論的多様性を有した。９６のコロニーを形質転換より選択し、順方向および逆方向配列を、各クローンに関して作製した。９６の配列決定反応のうち、ＣＤＲＨ３領域が同定できる９０の配列を得、これらの配列の約７０％が、ライブラリーの設計配列に一致した。（設計に基づく）理論的分布と比較した、１０のベクターに由来する、配列決定されたＣＤＲＨ３セグメントの長さの分布を、図１０に載せた。１０のベクターから得られたＤＨ、Ｎ２およびＨ３－ＪＨセグメントの個別の長さの分布を、図１１～１３に示す。

【０４７８】

ベクターの一致する設計中に含まれたライブラリーのＣＤＲＨ３要素の長さの分布を検証したら、実施例１０．４に記載の方法に従って形質転換された酵母におけるＣＤＲＨ３ドメインおよび重鎖ファミリーの提示を、特徴付けした。５００を超えるシングルパス配列を得た。これらのうち、重鎖シャーシを同定するための５３１の十分な配列情報を得、ＣＤＲＨ３の特徴付けのための２９１の十分な配列情報を得た。これらのＣＤＲＨ３ドメインを、本明細書に記載の相同組換え方法に従って、重鎖シャーシおよび定常領域に組み込んだ。理論的な長さの分布と比較した、２９１の配列に由来するＣＤＲＨ３ドメインの長さの分布を図１４に示す。理論的長さの平均は、１４．４±４アミノ酸であり、一方、観察された長さの平均は１４．３±３アミノ酸であった。理論的な長さの分布と比較した

、ＣＤＲＨ３の各部分の観察された長さを、図１５～１８に提示する。図１９は、２９１の配列において同定されたＪＨセグメントの家族性起源をあらわし、図２０は、ライブラリーのシャーシの１６の提示を示す。ＶＨ３－１５シャーシは、これらの配列の中に提示されなかった。これを、後で、ＣＤＲＨ３の多様性があるＶＨ３－１５シャーシを含む酵母形質転換体を導入することによって、所望の組成のライブラリーに補正した。

【０４７９】

（実施例１２．２）

軽鎖の特徴付け

実施例１０．４に記載の方法を介した酵母の形質転換の後で、実施例６．２に記載のＶＫＣＤＲ３ライブラリー由来のＣＤＲＬ３要素の長さの分布を確定した。ライブラリーの８６の配列に由来するＣＤＲＬ３の長さと、ヒト配列および設計された配列との比較を、図２１に載せる。図２２は、ライブラリーより選択された８６の配列の中から、軽鎖シャーシの提示を示す。ＣＤＲＬ３配列の約９１％が設計と正確に一致し、約９％はアミノ酸が１個異なった。

【０４８０】

（実施例１３）

設計されたＣＤＲＨ３ライブラリーの組成の特徴付け

この実施例は、例示的ライブラリーのＣＤＲＨ３ドメインの組成についてのデータを提示し、当分野の他のライブラリーと比較する。より具体的には、この実施例は、ライブラリーのＣＤＲＨ３ドメインに出現する４００の考えられるアミノ酸対（２０アミノ酸×２０アミノ酸）の出現率の分析を提示する。ＣＤＲＨ３中のｉ残基の最も近い隣接アミノ酸対（ｉ－ｉ＋１；ＩＰ１と指定）、次に最も近い隣接アミノ酸対（ｉ－ｉ＋２；ＩＰ２と指定）および次の次に近い隣接アミノ酸対（ｉ－ｉ＋３；ＩＰ３と指定）を調べることによって、これらの対の保有を計算する。当分野で既知のライブラリー（例えば、Ｋｎａｐｐｉｋら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２０００年、２９６巻：５７頁；Ｓｉｄｈｕ ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２００４年、３３８巻：２９９頁；およびＬｅｅら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００４年、３４０巻：１０７３頁、個々をその全体を参照により組み込む）は、ＣＤＲＨ３の中心にわたる同じ組成を維持しながらＣＤＲＨ３内の個別の位置における２０アミノ酸の出現が考えられただけであり、対の出現は考えられていない。実際、Ｓｉｄｈｕら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２００４年、３３８巻：２９９頁、その全体を参照により組み込む）によれば、「ＣＤＲ－Ｈ３において、特定の残基型に対していくらかのバイアスがあるが、２０種すべての天然アミノ酸残基が有意な範囲で出現し、ループの中心位置内に位置特異的バイアスはほとんどなかった」。したがって、本発明は、驚いたことに、上に列挙したアミノ酸対の出現を考えた場合、位置特異的バイアスはＣＤＲＨ３ループの中心位置には存在しないという初めての認識を表す。この実施例は、本明細書に記載のライブラリーがヒト配列に認められるように、これらの対の出現を、当分野の他のライブラリーと比較してより忠実に再現することを示す。したがって、本明細書に記載のライブラリーの組成は、当分野の他のライブラリーより、より「ヒト」であると考えることができる。

【０４８１】

ＣＤＲＨ３ドメインの対の組成を調べるために、９５位から始まるＣＤＲＨ３の部分を選択した。ＫｎａｐｐｉｋらおよびＬｅｅらの提示したデータと比較する目的で、分析した各ＣＤＲＨ３の最後の５残基は無視した。したがって、この分析の目的のために、対のｉ－ｉ＋Ｘ（Ｘ＝１～３）の両方のメンバーは９５位から始まりＣＤＲＨ３のＣ末端から６番目の残基で終わる（６番目を含む）領域に収まらなくてはならない。分析した部分を、「中心ループ」と呼ぶ（定義を参照）。

【０４８２】

本発明の代表的ライブラリーにおける対の分布を評価するために、サンプリングの手法を使用した。ランダムに、４２４の尾部の１つ＋Ｎ１セグメント、２７８のＤＨセグメントの１つ、１４１のＮ２セグメントの１つおよび２８のＪＨセグメントの１つ（後者はＫ

ａｂａｔのＣＤＲＨ３の９５～１０２だけを含むように切断した）を選択することによって、多くの配列を作製した。この方法を、１０，０００配列のサンプルを作製するために１０，０００回繰り返した。乱数発生のために異なる種を選択することによって、別の１０，０００配列の独立したサンプルもまた作製し、対の分布の結果を観察しほぼ同じであった。本明細書に提示した計算のために、５０，０００配列の１／３またはそれ以上のサンプルを使用した。同様の研究方法を、代替のライブラリーの実施形態（Ｎ１－１４１）に使用し、そのために第１のセグメントを１０６８の尾部＋Ｎ１セグメント（２×４×１４１すなわち１１２８の考えられる組合せから重複する配列を除去した後に得られた）より選択した。

【０４８３】

Ｋｎａｐｐｉｋらの対の組成はＫｎａｐｐｉｋらの図７ａ（ｐ．７１）に提示したパーセント出現率に基づいて確定した。関連データを、下記の表４５に再現する。

【０４８４】

【表４５】

表45. KnappikらのCDRH3（Knappikらの図7aから）のCDRH3の95～100位（本発明のライブラリーの95～99Bに対応する）の組成

アミノ酸	計画された(%)	見出された(%)
A	4.1	3.0
C	1.0	1.0
D	4.1	4.2
E	4.1	2.3
F	4.1	4.9
G	15.0	10.8
H	4.1	4.6
I	4.1	4.5
K	4.1	2.9
L	4.1	6.6
M	4.1	3.3
N	4.1	4.5
P	4.1	4.8
Q	4.1	2.9
R	4.1	4.1
S	4.1	5.6
T	4.1	4.5
V	4.1	3.7
W	4.1	2.0
Y	15.0	19.8

Ｌｅｅらの対の組成を、Ｌｅｅらの表５に表されたライブラリーに基づいて確定し、本発明およびＫｎａｐｐｉｋらから分析されたそれらのＣＤＲＨ３領域に対応する位置は、Ｌｅｅらの「ＸＹＺ」コドンから構成される。ＬｅｅらのＸＹＺコドンは下記の組成を有する縮重コドンである。

位置１　（Ｘ）：Ａが１９％、Ｃが１７％、Ｇが３８％およびＴが２６％；
位置２　（Ｙ）：Ａが３４％、Ｃが１８％、Ｇが３１％およびＴが１７％；ならびに
位置３　（Ｚ）：Ｇが２４％およびＴが７６％。

【０４８５】

終始コドン（これらは機能的に発現されたヒトＣＤＲＨ３配列に出現しない）をコードするコドンのおよそ２％を排除し、パーセントを１００％に再標準化する場合、下記のアミノ酸提示が、ＬｅｅらのＸＹＺコドンの組成から推測できる（表４６）。

【０４８６】

【表４６】

表46. 縮重XYZコドンの組成に基づく、Leeらの CDRH3の組成

型	パーセント	型	パーセント
A	6.99%	M	0.79%
C	6.26%	N	5.02%
D	10.03%	P	3.13%
E	3.17%	Q	1.42%
F	3.43%	R	6.83%
G	12.04%	S	9.35%
H	4.49%	T	3.49%
I	2.51%	V	6.60%
K	1.58%	W	1.98%
L	4.04%	Y	6.86%

ＩＰ１、ＩＰ２およびＩＰ３の配置のそれぞれにおける４００のアミノ酸対の個々の出現率は、個別のアミノ酸組成を掛け合わせることによって、ＫｎａｐｐｉｋらおよびＬｅｅらに関して計算できる。例えば、Ｋｎａｐｐｉｋらに関しては、ライブラリー中のＹＳ対の出現率は、１５％×４．１％を計算して６．１％となり、ＳＹ対の出現率も同じであることに留意されたい。同様に、ＬｅｅらのＸＹＺコドンに基づくライブラリーに関して、ＹＳ対の出現率は、６．８６％（Ｙ）×９．３５％（Ｓ）で６．４％となり、これもまたＳＹと同じである。

【０４８７】

ヒトＣＤＲＨ３配列に関して、Ｋａｂａｔの定義における最後の５個のアミノ酸を無視して計算する。ヒトＣＤＲＨ３のＣ末端の５個のアミノ酸を無視することによって、これらの配列を、ＸＹＺコドンに基づくＬｅｅらの配列と比較できる。Ｌｅｅらはさらに、「ＮＮＫ」および「ＮＮＳ」のコドンを含むライブラリーを提示しているが、これらのライブラリーの対組成は、ヒトＣＤＲＨ３の対組成とさらに離れる。ＸＹＺコドンは、Ｌｅｅらによって設計され、ＣＤＲＨ３において観察された個々のアミノ酸型のバイアスを、ある程度再現していた。

【０４８８】

上記の方法を使用し、サンプルの配列を作製した後で、同じ方法を本発明のライブラリーに使用した。これらの計算をライブラリーのすべての配列に実施することが可能であるが、１０，０００～２０，０００のメンバーの独立したランダムなサンプルは識別不可能な結果となった。したがって、本明細書において報告された数は、５０，０００メンバーのサンプルから作製された。

【０４８９】

ＩＰ１、ＩＰ２およびＩＰ３に関して、個々に３つの表を作成した（表４７、４８および４９）。４００対のうちより選択して、最も頻繁に出現する２０を表に含む。約１，０００のヒト配列（Ｌｅｅら、２００６年）のサンプルを「免疫前」として表し、約２，５００配列（Ｊａｃｋｓｏｎら、２００７年）のサンプルを「Ｈｕｍａｂ」として表し、すべての免疫前セットを排除する、後者のより親和性の成熟したサブセットを「成熟」として表した。当分野の合成ライブラリーを、ＨｕＣＡＬ（Ｋｎａｐｐｉｋら、２０００年）およびＸＹＺ（Ｌｅｅら、２００４年）として表した。本発明の２つの代表的ライブラリーが含まれ、ＬＵＡ－５９は５９のＮ１セグメント、２７８のＤＨセグメント、１４１のＮ２セグメントおよび２８のＨ３－ＪＨセグメントを含む（上記の実施例を参照されたい）。ＬＵＡ－１４１は、１４１のＮ１セグメント、２７８のＤＨセグメント、１４１のＮ２セグメントおよび２８のＨ３－ＪＨセグメントを含む（上記の実施例を参照されたい）。Ｎ１および尾部配列の組合せによって作製された重複分をそれぞれのライブラリーのデ

ータセットから除去した。特定の実施形態では、本発明は、４００のアミノ酸対のいずれか、特に表４７～４９のアミノ酸対のパーセント出現率に基づいて定義することができる。特定の実施形態では、本発明は、これらの対の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれ以上に基づいて定義することができる。本発明の特定の実施形態では、アミノ酸の特定の対のパーセント出現率は、下記の表において、「ＬＵＡ－」（下限）および「ＬＵＡ＋」（上限）で示される範囲内に収めることができる。本発明のいくつかの実施形態では、任意のアミノ酸対のパーセント出現率の下限は、約０．１、０．２５、０．５、０．７５、１、１．２５、１．５、１．７５、２、２．２５、２．５、２．７５、３、３．２５、３．５、３．７５、４、４．２５、４．５、４．７５、および５であり得る。本発明のいくつかの実施形態では、任意のアミノ酸対のパーセント出現率の上限は、約０．１、０．２５、０．５、０．７５、１、１．２５、１．５、１．７５、２、２．２５、２．５、２．７５、３、３．２５、３．５、３．７５、４、４．２５、４．５、４．７５、５、５．２５、５．５、５．７５、６、６．２５、６．５、６．７５、７、７．２５、７．５、７．７５および８であり得る。本発明によれば、列挙された任意の下限は、列挙された任意の上限と合わせ、範囲を確立することができ、逆もまた同様である。

【０４９０】

【表４７】

表47．ヒト配列のi－i＋１(IP1)アミノ酸対、本発明の例示的ライブラリーならびにKnappikらおよびLeeらのライブラリーのパーセント出現率。

対	免疫前	Humabs	成熟	LUA-59	LUA-141	HuCAL	XYZ	LUA-	LUA+	範囲	HuCAL	XYZ
YY	**5.87**	**4.44**	**3.27**	**5.83**	**5.93**	**2.25**	**0.47**	**2.50**	**6.50**	**4.00**	**0**	**0**
SG	**3.54**	**3.41**	**3.26**	**3.90**	**3.72**	**0.61**	**1.13**	**2.50**	**4.50**	**2.00**	**0**	**0**
SS	**3.35**	**2.65**	**2.26**	**2.82**	**3.08**	**0.16**	**0.88**	**2.00**	**4.00**	**2.00**	**0**	**0**
GS	**2.59**	**2.37**	**2.20**	**3.82**	**3.52**	**0.61**	**1.13**	**1.50**	**4.00**	**2.50**	**0**	**0**
GY	**2.55**	**2.34**	**2.12**	**3.15**	**2.56**	**2.25**	**0.83**	**2.00**	**3.50**	**1.50**	**1**	**0**
GG	**2.19**	**2.28**	**2.41**	**6.78**	**3.51**	**2.25**	**1.45**	**2.00**	**7.00**	**5.00**	**1**	**0**
YS	**1.45**	**1.30**	**1.23**	**1.40**	**1.52**	**0.61**	**0.64**	**0.75**	**2.00**	**1.25**	**0**	**0**
YG	**1.35**	**1.21**	**1.10**	**1.64**	**1.69**	**2.25**	**0.83**	**0.75**	**2.00**	**1.25**	**0**	**1**
SY	**1.31**	**1.07**	**0.90**	**1.65**	**1.77**	**0.61**	**0.64**	**0.75**	**2.00**	**1.25**	**0**	**0**
YD	1.67	1.40	1.17	0.88	0.90	0.61	0.69	0.75	2.25	1.50	0	0
DS	1.53	1.31	1.16	1.20	1.46	0.16	0.94	0.75	2.00	1.25	0	1
DY	1.40	1.23	1.11	0.34	0.48	0.61	0.69	0.25	2.00	1.75	1	1
VV	1.37	0.94	0.64	2.30	2.30	0.16	0.44	0.50	2.50	2.00	0	0
GD	1.20	1.21	1.25	0.49	0.44	0.61	1.21	0.25	1.75	1.50	1	1
AA	1.16	0.93	0.75	1.27	1.46	0.16	0.49	0.60	1.50	0.90	0	0
RG	1.08	1.26	1.38	1.69	1.38	0.61	0.82	1.00	2.00	1.00	0	0
VA	0.91	0.66	0.46	0.36	0.35	0.16	0.46	0.25	1.00	0.75	0	1
GV	0.84	0.89	0.95	2.87	2.16	0.61	0.79	0.80	3.00	2.20	0	0
CS	0.82	0.55	0.38	0.79	0.80	0.04	0.59	0.50	1.00	0.50	0	1
GR	0.74	0.90	1.00	1.01	0.79	0.61	0.82	0.70	1.25	0.55	0	1

太字の対は、免疫前(Leeら、2006年)、Humab(Jacksonら、2007年)および成熟(Jackson-Lee)のセットに関して、(考えられる400対の中で)約19%～約24%の出現率を含む。それらはLUAライブラリーにおいて約27%～約31%の出現率のを占めるが、HuCALライブラリーにおいてはわずか約12%およびLUAライブラリーにはやはり存在し、他には存在しないという事実の反映である。最後の2つの列は、対応する対の組成が、LUA－およびLUA+の限界内に収まるかどうかを示す：範囲外なら0、範囲内なら1。

【０４９１】

表48. ヒト配列のi－i＋2（IP2）アミノ酸対、本発明の例示的ライブラリー
ならびにKnappikらおよびLeeらのライブラリーのパーセント出現率。

対	免疫前	Humabs	成熟	LUA-59	LUA-141	HuCAL	XYZ	LUA-	LUA+	範囲	HuCAL	XYZ
YY	**3.57**	**2.59**	**1.78**	**2.99**	**3.11**	**2.25**	**0.47**	**2.5**	**4.5**	**2**	**0**	**0**
GY	**3.34**	**2.91**	**2.56**	**4.96**	**3.78**	**2.25**	**0.83**	**2.5**	**5.5**	**3**	**0**	**0**
SY	**2.94**	**2.41**	**2.01**	**3.03**	**3.42**	**0.61**	**0.64**	**2**	**4**	**2**	**0**	**0**
YS	**2.88**	**2.34**	**1.95**	**3.24**	**3.32**	**0.61**	**0.64**	**1.75**	**3.75**	**2**	**0**	**0**
SG	**2.60**	**2.29**	**2.05**	**2.84**	**2.96**	**0.61**	**1.13**	**2**	**3.5**	**1.5**	**0**	**0**
SS	**2.27**	**2.01**	**1.84**	**2.30**	**2.50**	**0.16**	**0.88**	**1.5**	**3**	**1.5**	**0**	**0**
GS	**2.16**	**2.12**	**2.10**	**2.96**	**2.32**	**0.61**	**1.13**	**1.5**	**3**	**1.5**	**0**	**0**
GG	**1.92**	**2.25**	**2.44**	**6.23**	**3.68**	**2.25**	**1.45**	**1.5**	**7**	**5.5**	**1**	**0**
YG	**1.17**	**1.14**	**1.15**	**1.39**	**1.47**	**2.25**	**0.83**	**1**	**2**	**1**	**0**	**0**
DS	2.03	1.67	1.40	1.21	1.48	0.16	0.94	1	2.5	1.5	0	0
YD	1.71	1.39	1.11	0.89	0.92	0.61	0.69	0.75	1.75	1	0	0
VG	1.35	1.17	1.01	1.75	1.54	0.61	0.79	1	2	1	0	0
DY	1.06	1.02	0.99	0.23	0.40	0.61	0.69	0.2	1.2	1	1	1
WG	1.06	0.76	0.53	0.85	0.91	0.61	0.24	0.75	1.25	0.5	0	0
RY	0.98	1.00	0.96	0.70	0.91	0.61	0.47	0.6	1	0.4	1	0
GC	0.97	0.75	0.64	0.94	0.81	0.15	0.75	0.5	1	0.5	0	1
DG	0.95	1.05	1.08	1.78	1.05	0.61	1.21	0.75	2	1.25	0	1
GD	0.94	0.88	0.86	0.47	0.36	0.61	1.21	0.25	1	0.75	1	0
VV	0.94	0.59	0.35	0.95	0.90	0.16	0.44	0.5	1	0.5	0	0
AA	0.90	0.73	0.59	0.72	0.74	0.16	0.49	0.5	1	0.5	0	0

太字の対は、免疫前（Leeら、2006年）、Humab（Jacksonら、2007年）および成熟（Jackson-Lee）のセットに関して、（考えられる400対の中で）約18%～約23%の出現率を含む。それらはLUAライブラリーにおいて約27%～約30%の出現率を占めるが、HuCALライブラリーにおいてはわずか約12%および「XYZ」ライブラリーにおいては約8%を占める。HuCALおよびYZライブラリー中の中心ループの構築の性質のために、これらの数は、IP1、IP2およびIP3の対に関して同じである。最後の2つの列は、対応する対の組成が、LUA－およびLUA＋の限界内に収まるかどうかを示す：範囲外なら0、範囲内なら1。

10 20 30 40

【表４９】

表49. ヒト配列のi－i＋3(IP3)アミノ酸対、本発明の例示的ライブラリーならびにKnappikらおよびLeeらのライブラリーのパーセント出現率。

対	免疫前	Humabs	成熟	LUA-59	LUA-141	HuCAL	XYZ	LUA-	LUA+	範囲	HuCAL	XYZ
GY	**3.55**	**2.85**	**2.32**	**5.80**	**4.42**	**2.25**	**0.83**	**2.5**	**6.5**	**4**	**0**	**0**
SY	**3.38**	**3.01**	**2.67**	**3.78**	**4.21**	**0.61**	**0.64**	**1**	**5**	**4**	**0**	**0**
YS	**3.18**	**2.56**	**2.05**	**3.20**	**3.33**	**0.61**	**0.64**	**2**	**4**	**2**	**0**	**0**
SS	**2.26**	**1.74**	**1.37**	**1.81**	**2.18**	**0.16**	**0.88**	**1**	**3**	**2**	**0**	**0**
GS	**2.23**	**2.13**	**2.00**	**4.60**	**3.33**	**0.61**	**1.13**	**2**	**5**	**3**	**0**	**0**
YG	**2.14**	**1.65**	**1.35**	**2.69**	**2.79**	**2.25**	**0.83**	**1.5**	**3**	**1.5**	**1**	**0**
YY	**1.86**	**1.48**	**1.12**	**1.18**	**1.27**	**2.25**	**0.47**	**0.75**	**2**	**1.25**	**0**	**0**
GG	**1.60**	**1.87**	**2.11**	**4.73**	**2.84**	**2.25**	**1.45**	**1.5**	**5**	**3.5**	**1**	**0**
SG	**0.90**	**1.04**	**1.12**	**0.93**	**1.25**	**0.61**	**1.13**	**0.75**	**1.5**	**0.75**	**0**	**1**
DG	2.01	1.94	1.84	2.51	2.03	0.61	1.21	1.5	3	1.5	0	0
DS	1.48	1.31	1.22	0.41	0.55	0.16	0.94	0.25	1.5	1.25	0	1
VA	1.18	0.83	0.55	1.48	1.46	0.16	0.46	0.5	2	1.5	0	0
AG	1.13	1.09	1.03	0.97	1.04	0.61	0.84	0.9	2	1.1	0	0
TY	1.05	0.90	0.76	1.01	1.16	0.61	0.24	0.75	1.75	1	0	0
PY	1.02	0.88	0.79	1.23	0.86	0.61	0.21	0.75	1.75	1	0	0
RS	1.02	0.88	0.77	0.38	0.55	0.16	0.64	0.25	1.25	1	0	1
RY	1.02	1.12	1.14	0.68	0.88	0.61	0.47	0.65	1.25	0.6	0	0
LY	1.01	0.88	0.75	0.69	0.76	0.61	0.28	0.65	1.25	0.6	0	0
DY	0.93	0.84	0.77	0.72	0.95	0.61	0.69	0.7	1.3	0.6	0	0
GC	0.90	0.62	0.48	0.86	0.68	0.15	0.75	0.5	1	0.5	0	1

太字の対は、免疫前(Leeら、2006年)、Humab(Jacksonら、2007年)および成熟(Jackson-Lee)のセットに関して、(考えられる400対の中で)出現率の約16%～約21%を構成する。それらはLUAライブラリーにおいて約26%～約29%の出現率を占めるが、HuCALライブラリーにおいてはわずか約12%およびXYZライブラリーにおいては約8%を占める。HuCALおよびXYZライブラリー中の中心ループの構築の性質のために、これらの数は、IP1、IP2およびIP3の対に関して同じである。最後の2つの列は、対応する対の組成が、LUA－およびLUA＋の限界内に収まるかどうかを示す：範囲内なら0、範囲内なら1。

この実施例に提供された分析により、本発明のライブラリーの組成が、当分野において既知の他のライブラリーよりヒト配列の組成を密接に模倣していることが実証される。当分野の合成ライブラリーは、対のパーセントのレベルで、実際のヒトＣＤＲＨ３配列の「

中心ループ」部分の組成を本質的に再現しない。本発明のライブラリーは、実際のヒトＣＤＲＨ３配列において観察される、密接に再現されるより複雑な対組成を有する。実際のヒトＣＤＲＨ３配列の標的セットと対比したこの再現の正確度は、例えば、ＣＤＲＨ３ライブラリーの設計に使用するセグメントの組成を変更することによって最適化され得る。さらに、ヒト配列に認められる対の組成の保有を正確に模倣するライブラリーを、コンピュータ的に設計するこれらのメトリックの利用もまた可能である。

【０４９３】

（実施例１４）

例示的ライブラリーの情報内容

特定のライブラリーまたは配列コレクションが、他より本質的に複雑または「ランダムさが少ない」であろうという観察を定量化する１つの方法は、情報理論（Ｓｈａｎｎｏｎ、Ｂｅｌｌ　Ｓｙｓ．Ｔｅｃｈ．Ｊ．、１９８４年、２７巻：３７９頁；Ｍａｒｔｉｎら、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００５年、２１巻：４１１６頁；Ｗｅｉｓｓら、Ｊ．Ｔｈｅｏｒ．Ｂｉｏｌ．、２０００年、２０６巻：３７９頁、各々を参照によりその全体を組み込む）を用いることである。例えば、メトリックは、固定したアミノ酸を有する位置が、２０種すべてのアミノ酸が同じ確率で出現し得る位置より、ランダム差が少ないという事実の定量化を考案できる。中間状態は、順にこのようなメトリックの中間値をもたらすはずである。情報理論によれば、このメトリック　は、式：

【０４９４】

【化６１－１】

$$I = \sum_{i=1}^{N} f_i \log_2 f_i$$

で表すことができる。

【０４９５】

ここで、f_iはｉの出現率の標準化した頻度であり、ｉはアミノ酸型であってよい（この場合Ｎは２０に等しい）。すべてのf_iが１を除けば０である場合、Ｉの値はゼロである。任意の他の場合においてＩの値はより小さい、すなわち負であり、すべてのf_i値が同じでＮに等しい場合、最も小さい値となる。アミノ酸の場合Ｎは２０であり、得られたＩの値は－４．３２２であろう。Ｉは２を底とする対数により定義されているので、Ｉの単位はビット（ｂｉｔ）である。

【０４９６】

１つの位置レベルでＨｕＣＡＬおよびＸＹＺのライブラリーに関するＩ値は、それぞれ表４５および４６から導くことができ、－４．０８および－４．０６に等しい。本発明の限定されない例示的ライブラリー中の、対応する１個の残基の出現頻度および上に定義した「中心ループ」内に取り込まれた、既に導入された一連のヒト配列のセットを表５０に載せる。

【０４９７】

【表５０】

表50. 中心ループにおけるアミノ酸型の頻度

型	免疫前	Humabs	成熟	LUA-59	LUA-141
A	5.46	5.51	5.39	5.71	6.06
C	1.88	1.46	1.22	1.33	1.34
D	7.70	7.51	7.38	4.76	5.23
E	2.40	2.90	3.28	3.99	4.68
F	2.29	2.60	2.81	1.76	2.17
G	14.86	15.42	15.82	24.90	18.85
H	1.46	1.79	2.01	0.20	0.67
I	3.71	3.26	2.99	3.99	4.34
K	1.06	1.27	1.44	0.21	0.67
L	4.48	4.84	5.16	4.12	4.54
M	1.18	1.03	0.93	0.94	1.03
N	1.81	2.43	2.84	0.41	0.65
P	4.12	4.10	4.13	5.68	3.96
Q	1.60	1.77	1.95	0.21	0.68
R	5.05	5.90	6.41	3.35	4.11
S	12.61	11.83	11.37	11.18	12.77
T	4.59	5.11	5.47	4.36	4.95
V	6.21	5.55	5.12	8.13	7.67
W	2.79	2.91	3.07	1.57	1.98
Y	14.74	12.81	11.24	13.20	13.63

上記の式により計算された、これらのセットの情報内容は、免疫前、ヒト、成熟、ＬＵＡ－５９およびＬＵＡ－１４１のセットに関してそれぞれ－３．８８、－３．９３、－３．９６、－３．５６および－３．７５であった。頻度が完全な一様からより大きくそれているので（２０種それぞれに関して５％）、その結果、数はより大きいまたはより小さい負の値である傾向がある。

【０４９８】

同一の研究方法を使用して、対の組成または頻度を、それぞれの対に関する頻度の、上記の式の２０×２０すなわち４００にわたる値の和を計算することによって分析できる。２つのシングルトン頻度のセットの単純な産物で構成される任意の対の頻度は、個々のシングルトンＩの値の和に等しいことを示すことができる。２つのシングルトン頻度のセットが同じまたはほぼ同じである場合、これはＩ（独立した対）＝２×Ｉ（１個）を意味する。したがって、対の頻度それ自体の構造によって獲得した情報量を測定するために、対頻度の一般的なセットに関する相互情報量、ＭＩの特例を、ＭＩ（対）＝Ｉ（対）－２×Ｉ（１個）として定義できる（Ｍａｒｔｉｎら、２００５年の標準的定義と比較されたい、例えば、それらの表記においてＩ（Ｘ）＝－Ｈ（Ｘ）であることを考えた後で）。このような構造が全くない場合、ＭＩの値は単純にゼロである。

【０４９９】

上に述べた対の分布から計算したＭＩの値（４００の値の全セットにわたる）を表５１に示す。

【０５００】

【表５１】

表51. CDRH3の中心ループ内の相互情報量

ライブラリーまたはセット	i - i+1	i - i+2	i - i+3
免疫前	0.226	0.192	0.163
Humabs	0.153	0.128	0.111
成熟	0.124	0.107	0.100
LUA-59	0.422	0.327	0.278
LUA-141	0.376	0.305	0.277
HuCAL	0.000	0.000	0.000
XYZ	0.000	0.000	0.000

ヒト配列はさらなる体細胞変異を受けるので、ヒト配列のセット内でＭＩ値が減少し、多くの独立した配列にわたる方法は基本的にランダムであることは重要である。対はどんどん離れていくのでＭＩ値が減少することもまた注目に値し、これは、ヒト配列および本発明の例示的ライブラリーの両方のセットに関する事例である。双方の場合において、対の２個のアミノ酸はさらに離れていくので、それらが実際のセグメント（Ｖ、Ｄ、Ｊ＋Ｖ－ＤまたはＤ－Ｊ挿入物）をまたぐ確率は増加し、それらの対の頻度はシングルトン頻度の単純な産物に近づいている。

【０５０１】

表５２は、本出願に引用した特定のイムノグロブリン遺伝子セグメントの配列情報を含む。これらの配列は非限定的であり、対立遺伝子多型が存在し、本発明によって包含されることが認識される。したがって、本明細書に提示の方法を、これらの配列の突然変異体に利用できる。

【０５０２】

【表５２－１】

表52. 本明細書に引用された特定のイムノグロブリン遺伝子セグメントに関する情報

配列番号	配列	ペプチドまたはヌクレオチドの配列	所見
	IGHV1-3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQ APGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR	
	IGHV1-8_v1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQ ATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTR**NTS**IS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	NからDへの突然変異により、元の生殖系列配列（上記のv1）においてNTS潜在的グリコシル化部位を避ける。XがNでないXTSおよびZがSまたはTでないNTZもまた選択肢である。NPSは、N結合型グリコシル化されている可能性があまりないさらに別の選択肢である。
	IGHV1-8_v2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQ ATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTR**DTS**IS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	
	IGHV1-24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQ APGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDT AYMELSSLRSEDTAVYYCAT	
	IGHV1-45	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYRYLHWVRQ APGQALEWMGWITPFNGNTNYAQKFQDRVTITRDRSMST AYMELSSLRSEDTAMYYCAR	

【０５０３】

【表５２－２】

IGHV1-58	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTSSAVQWVRQ ARGQRLEWIGWIVVGSGNTNYAQKFQERVTITRDMSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAA			
IGHV2-5	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQ PPGKALEWLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTATYYCAHR			
IGHV2-26	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQ PPGKALEWLAHIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLT MTNMDPVDTATYYCARI			
IGHV2-70_v1	RVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMCVSWIRQ PPGKALEWLARIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTATYYCARI			
IGHV2-70_v2	RVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQ PPGKALEWLARIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTATYYCARI	CからGへの突然変異により、上記のv 1において不対Cysを避ける。Gは他の 生殖系列配列に対する類似性によって 選択されたが、限定されない例としての 他のアミノ酸型R、S、Tは可能である。		
IGHV3-9	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQ APGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTALYYCAKD			
IGHV3-11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAR			
IGHV3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQ ATGKGLEWVSAIGTAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKNSLYL QMNSLRAGDTAVYYCAR			
IGHV3-20	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVR QAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTALYHCAR			
IGHV3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAR			

【０５０４】

【表５２－３】

	IGHV3-43	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQ APGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNSL YLQMNSLRTEDTALYYCAKD	
	IGHV3-49	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWVRQ APGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSI AYLQMNSLKTEDTAVYYCTR	
	IGHV3-53	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQ APGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAR	
	IGHV3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMHWVRQ APGKGLEYVSAISSNGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMSSLRAEDTAVYYCVK	
	IGHV3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQ APGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAR	
	IGHV3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQ APGKGLEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR	
	IGHV3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQ ASGKGLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKN TAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR	
	IGHV3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVR QAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
	IGHV4-4v1	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGGSISSSNWWSWVR QPPGKGLEWIGEIYHSGSTNYNPSLKSRVTISVDKSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCAR	サイズ6(Kabatの定義)のCDRH1を含む;基準構造H1-2。IGHV4-4の対立遺伝子*02に対応する配列。
	IGHV4-4v2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP AGKGLEWIGRIYTSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCAR	サイズ5(Kabatの定義)のCDRH1を含む;基準構造H1-1。IGHV4-4の対立遺伝子*07に対応する配列。

【０５０５】

【表５２－４】

	IGHV4-28	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISSSNWWGWIR QPPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTMSVDTSKNQF SLKLSSVTAVDTAVYYCAR		
	IGHV6-1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR		
	IGHV7-4-1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQ APGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVST AYLQISSLKAEDTAVYYCAR		
	IGKV1-06	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCLQDYNYP		
	IGKV1-08_v1	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS**C**LQSE DFATYYCQQYYSYP		
	IGKV1-08_v2	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS**S**LQSE DFATYYCQQYYSYP	CからSへの突然変異により、上記のv1において不対Cysを避ける。Sは他の生殖系列配列に対する類似性によって選択されたが、限定されない例としてのアミノ酸型N、R、Sもまた可能である。	
	IGKV1-09	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPG KAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDF ATYYCQQLNSYP		
	IGKV1-13	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPG KAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQFNSYP		
	IGKV1-16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQKP GKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYNSYP		
	IGKV1-17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKP		

【０５０６】

【表５２－５】

	GKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DFATYYCLQHNSYP	
IGKV1-37_v1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYRQKPG KVPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYY**G**QRTYNAP	
IGKV1-37_v2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYRQKPG KVPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYY**C**QRTYNAP	上記のv1において欠損した保存されたCysを、CDRL3の直前に復活させる。
IGKV1D-16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKP EKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYNSYP	
IGKV1D-17	NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGISNYLAWFQQKP GKVPKHLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DFATYYCLQHNSYP	
IGKV1D-43	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKP AKAPKLFIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQYYSTP	
IGKV1D-8_v1	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWYQQKP GKAPELLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS**C**LQSE DFATYYCQQYYSFP	Cから**S**への突然変異により、上記のv1において不対Cysを避ける。Sは他の生殖系列配列に対する類似性によって選択されたが、限定されない例としてのアミノ酸型N、R、Sもまた可能である。
IGKV1D-8_v2	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWYQQKP GKAPELLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS**S**LQSE DFATYYCQQYYSFP	
IGKV2-24	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWL QQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQATQFP	
IGKV2-29	DIVMTQTFLSLSVTRQQPASISCKSSQSLLHSDGVTYLYWY LQRPQQSPQLLTYEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQGTHLP	
IGKV2-30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNW	

【０５０７】

【表５２－６】

		FQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGTHWP						
	IGKV2-40	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDW YLQKPGQSPQLLIYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQRIEFP						
	IGKV2D-26	EIVMTQTPLSLSITPGEQASMSCRSSQSLLHSDGYTYLYWF LQKARPVSTLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDFGVYYCMQDAQD						
	IGKV2D-29	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWY LQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQSIQLP						
	IGKV2D-30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNW FQQRPGQSPRRLIYKVSNWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGTHWP						
	IGKV3D-07	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLSWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFAVYYCQQDYNLP						
	IGKV3D-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRSNWH						
	IGKV3D-20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQK PGLAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSP						
	IGKV5-2_v1	ETTLTQSPAFMSATPGDKV**NIS**CKASQDIDDDMNWYQQKP GEAAIFIIQEATTLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDA AYYFCLQHDNFP						
	IGKV5-2_v2	ETTLTQSPAFMSATPGDKV**TIS**CKASQDIDDDMNWYQQKP GEAAIFIIQEATTLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDA AYYFCLQHDNFP						NからDへの突然変異により、上記のv1中のNIS潜在的グリコシル化部位を避ける。XがNでないXISおよびZがSまたはTでないNIZもまた選択肢である。NPSは、N結合型グリコシル化されている可能性があまりないさらに別の選択肢である。

【０５０８】

【表５２－７】

IGKV6-21	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPD QSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAED AATYYCHQSSSLP		
IGKV6D-21	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPD QSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAED AATYYCHQSSSLP		
IGKV7-3	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQ KPGQPPKLLIYQASNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVE ANDTANYYCLQSKNFP		
IGλV1-36	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQL PGKAPKLLIYYDDLLPSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQS EDEADYYCAAWDDSLNG		
IGλV1-47	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSG		
IGλV10-54	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQ HQGHPPKLLSYRNNNRPSGISERLSASRSGNTASLTITGLQ PEDEADYYCSAWDSSLSA		
IGλV2-11_v1	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC**C**SYAGSYTF		
IGλV2-11_v2	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC**S**SYAGSYTF	Cからｓへの突然変異により、上記のv1中の不対Cysを避ける。Sは他の生殖系列配列に対する類似性によって選択されたが、限定されない例としてのQ、G、A、Lのような他のアミノ酸型もまた可能である。	
IGλV2-18	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSYNRVSWYQ QPPGTAPKLMIYEVSNRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCSLYTSSSTF		
IGλV2-23_v1	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQ		

【０５０９】

【表５２－８】

	HPGKAPKLMIYEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC**C**SYAGSSTL		
IGλV2-23_v2	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQ HPGKAPKLMIYEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYC**S**SYAGSSTL	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSG LQAEDEADYYCSSYAGSNNF	CからSへの突然変異により、上記のv1中の不対Cysを避ける。Sは他の生殖系列配列に対する類似性によって選択されたが、限定されない例としてのQ、G、A、Lのような他のアミノ酸型もまた可能である。
IGλV2-8	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSG QAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVED EADYYCYSTDSSGNH		
IGλV3-10	SYELTQPHSVSVATAQMARITCGGNNIGSKAVHWYQQKP GQDPVLVIYSDSNRPSGIPERFSGSNPGNTTTLTISRIEAGD EADYYCQVWDSSSDH		
IGλV3-12	SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQQKPG QFPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDE ADYYCLSADSSGTY		
IGλV3-16	SYELMQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKP GQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAE DEADYYCQSADSSGTY		
IGλV3-25	SYELTQPSSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQQKPG QAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGAQVEDE ADYYCYSAADNN		
IGλV3-27	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGD EADYYCQVWDSSTA		
IGλV3-9	LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYTIEWYQQRPG RSPQYIMKVKSDGSHSKGDGIPDRFMGSSSGADRYLTFSN LQSDDEAEYHCGESHTIDGQVG		
IGλV4-3			

【０５１０】

【表５２－９】

IGλV4-60	QPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSSYIIAWHQQQP GKAPRYLMKLEGSGSYNKGSGVPDRFSGSSSGADRYLTIS NLQLEDEADYYCETWDSNT		
IGλV5-39	QPVLTQPTSLSASPGASARFTCTLRSGINVGTYRIYWYQQK PGSLPRYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASTNAGLL LISGLQSEDEADYYCAIWYSSTS		
IGλV7-46	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPYWFQ QKPGQAPRTLIYDTSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCLLSYSGAR		
IGλV8-61	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPSWYQ QTPGQAPRTLIYSTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGA QADDESDYYCVLYMGSGI		
IGλV9-49	QPVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRP GKGPRFVMRVGTGGIVGSKGDGIPDRFSVLGSGLNRYLTI KNIQEEDESDYHCGADHGSGSNFV		
IGHD1-1	GGTACAACTGGAACGAC	下記の(1)を参照されたい。	
IGHD1-14	GGTATAACCGGAACCAC		
IGHD1-20	GGTATAACTGGAACGAC		
IGHD1-7	GGTATAACTGGAACTAC		
IGHD2-21_v1	AGCATATTGTGGTGGTGA**T**TGCTATTCC		
IGHD2-21_v2	AGCATATTGTGGTGGTGA**C**TGCTATTCC	3つの順方向読み枠の2つにおいて、v1と比較して異なるアミノ酸配列をコードする、共通の対立遺伝子多型。	
IGHD2-8	AGGATATTGTACTAATGGTGTATGCTATACC		
IGHD3-16	GTATTATGATTACGTTTGGGGGAGTTATGCTTATACC		
IGHD3-9	GTATTACGATATTTTGACTGGTTATTATAAC		
IGHD4-23	TGACTACGGTGGTAACTCC		
IGHD4-4/4-11	TGACTACAGTAACTAC		
IGHD5-12	GTGGATATAGTGGCTACGATTAC		
IGHD5-24	GTAGAGATGGCTACAATTAC		

【０５１１】

【表５２－１０】

	IGHD6-25	GGGTATAGCAGCGGCTAC	
	IGHD6-6	GAGTATAGCAGCTCGTCC	
	IGHD7-27	CTAACTGGGGA	

(1) 各IGHDヌクレオチド配列は、三(3)つの順方向読み枠、場合により3つの逆方向読み枠において読み取ることができる。例えば、IGHD1-1のヌクレオチド配列は、どのように完全V-DJの再構成に挿入するかに依存して、完全ペプチド配列：順方向にGTTGT、VQLERおよびYNWNDおよび逆方向にVVPVV、SFQLYおよびRSSCTをコードできる。これらの配列はそれぞれ、順に、実施例において説明されたように順次欠失されたセグメントを作製でき、本発明のライブラリーのための適切な要素を作製できる。

（実施例１５）

ライブラリーから抗体の選択

この実施例において、本発明のライブラリー（実施例９～１１および他の実施例におい

ての説明）からの抗体の選択を実証する。これらの選択は、本発明のライブラリーが、抗原に結合できる抗体タンパク質をコードすることを実証する。１つの選択において、タンパク質抗原の「抗原Ｘ」、に特異的な抗体を、本明細書に記載の方法を使用してライブラリーから単離した。図２４は、抗原Ｘに特異的に結合する６種のクローンの結合曲線およびそれらのＫｄ値を示す。この選択を、プラスミドベクター上の重鎖を含む酵母および酵母のゲノムに組み込まれたκ軽鎖ライブラリーを使用して実施した。

【０５１２】

別の選択において、モデル抗原である鶏卵白のリゾチーム（ＨＥＬ）に特異的な抗体を単離した。図２５は、ＨＥＬに特異的に結合する１０種のクローンに関する結合曲線を示し、それぞれのＫｄは＞５００ｎＭであった。この選択を、プラスミドベクター上に重鎖を含む酵母およびプラスミドベクター上のκ軽鎖ライブラリーを使用して実施した。重鎖および軽鎖の配列をライブラリーから単離されたクローンに関して確定し、複数のクローンが存在することを実証した。４種のクローン由来のＦＲＭ３（下線付き）の一部および全ＣＤＲＨ３を下記（表５３および表５４、後者は本発明の番号付けシステムを使用）に示す。

【０５１３】

【表５３】

表53．4種のHELバインダー由来のCDRH3配列およびFRM3の一部の配列

配列名	配列番号	FRM3およびCDRH3	尾部	N1	DH	N2	H3-JH
CR080362		AKGPSVPAARAEYFQH	G	PS	VPA	AR	AEYFQH
CR080363		AREGGLGYYYREWYFDL	E	GGL	GYYY	RE	WYFDL
CR080372		AKPDYGAEYFQH	-	P	DYG	-	AEYFQH
EK080902		AKEIVVPSAEYFQH	E	-	IVV	PS	AEYFQH

【０５１４】

【表５４】

表54．本発明の番号付けシステムに従った、本発明の番号付けシステムにおける4種のHELバインダー由来のCDRH3配列

クローン	[尾部]	[N1]			[DH]				[N2]			[H3-JH]							CDRH3長さ
	95	96	96A	96B	97	97A	97B	97C	97D	98	98A	98B	99E	99D	99C	99B	99A	99	100	101	102	
CR080362	G	P	S	-	V	P	A	-	-	A	R	-	-	-	-	A	E	Y	F	Q	H	14
CR080363	E	G	G	L	G	Y	Y	Y	-	R	E	-	-	-	-	-	W	Y	F	D	L	15
CR080372	-	P	-	-	D	Y	G	-	-	-	-	-	-	-	-	A	E	Y	F	Q	H	10
EK080902	E	-	-	-	I	V	V	-	-	P	S	-	-	-	-	A	E	Y	F	Q	H	12

単離した重鎖シャーシは、ＶＨ３－２３．０（ＥＫ０８０９０２およびＣＲ０８０３６３）、ＶＨ３－２３．６（ＣＲ０８０３６２）およびＶＨ３－２３．４（ＣＲ０８０３７２）であった。これらの変異体は、実施例２の表８において定義される。４種の重鎖ＣＤ

ＲＨ３配列はそれぞれ、例示されたライブラリーから設計された配列に一致した。クローン（ＥＤ０８０９０２）の１つのＣＤＲＬ３配列をさらに確定し、下線を付けた周囲のＦＲＭ領域とともに下記に示す。

【０５１５】

【化６１－２】

CDRL3: YYCQESFHIPYTFGGG.

この場合において、ＣＤＲＬ３は、表３３の４９行の縮重ＶＫ１－３９オリゴヌクレオチド配列の設計と一致した。この表の関連部分を、単離されたＣＤＲＬ３の個々の位置を占めるアミノ酸を太字にして、下線を付けて下記に再現する。

【０５１６】

【表５５】

シャーシ	CDRの長さ	ジャンクション型	縮重オリゴヌクレオチド	配列番号	89	90	91	92	93	94	95	96	97
VK1-39	9	1	CWGSAAWCATH CMVTABTCCTT WCACT		LQ	EQ	ST	FSY	HNPRST	IST	P	FY	T

同等物

当業者は、本明細書に記載の特定の実施形態および方法に対する多くの同等物を、これ以上通常の実験をせずに認識するまたは解明できるであろう。このような同等物は、下記の特許請求の範囲の範囲によって包含されるよう意図されている。

【０５１７】

【数１】

付録A

VKライブラリーを得るために使用されたκ軽鎖のGI番号

23868	2385488	16923194	58222611	70798854	98956311
32779	2385490	16923202	58222613	70798856	98956323
32810	2385492	16923208	58222615	70798858	98956325
33059	2385494	17226623	58222617	70798860	98956327
33144	2385495	17226631	58222619	70798862	98956337
33156	2385497	17226635	58222621	70798866	98956341
33170	2597932	17226639	58222623	70798868	98956343
33173	2597935	17226643	58222625	70798872	98956349
33183	2597937	17226645	58222627	70798874	98956355
33185	2597943	17226655	58222629	70798878	98956357
33189	2597946	17381491	58222631	70798880	98956365
33191	2597948	17385013	58222633	70798882	98956375
33195	2597950	17385015	58222635	70798884	98956379
33200	2597952	17385017	58222637	70798886	98956381
33202	2599531	17385019	58222639	70798888	98956383
33221	2599533	17385021	58222641	70798890	98956400
33227	2599535	17483729	58222643	70798892	98956404
33230	2599545	18025561	58222645	70798894	98956406
33233	2625059	18025563	58222647	70798896	98956414
33237	2632152	18025573	58222649	70798898	98956418
33268	2654047	18025575	58222651	70798900	98956422
33288	2654051	18025577	58222653	70798902	98956426
33290	2654055	18025579	58222655	70798904	98956428
33294	2773084	18025581	58222657	70798906	98956430
33296	2920359	18025583	58222659	70798914	98956432
33298	2995674	18025585	58222661	70798916	98956436
33300	2995676	18025587	58222663	70798918	98956440
33302	2995678	18025589	58222665	70798920	99022977
33304	2995680	18025591	58222667	70798922	99022979
33324	2995682	18025593	58222669	70798926	99022981
33330	2995688	18025595	58222671	70798928	99022983
33415	2995690	18025597	58222673	70798930	99022985
33416	3023134	18025599	58222675	70798934	99022987
33417	3023136	18025603	58222677	70798936	99022989
33418	3023138	18025605	58222679	70798940	99022991
33421	3023140	18025607	58222681	70798942	99022993
33422	3023142	18025611	58222683	70798946	99022995
33423	3023144	18025613	58222685	70798948	99022997
33424	3023146	18025617	58222687	70798950	99022999
33426	3023148	18025621	58222689	70798952	99023002
33647	3251385	18025623	58222691	70798954	99023004
33649	3251387	18025627	58222693	70798956	99023006
33655	3251389	18025629	58222695	71058688	99023008
33657	3251391	18025635	58222697	71058704	99023010
33659	3251744	18025639	58222699	71058712	99023012
33665	3251749	18025641	58222701	71058717	99023474
33669	3251983	18025645	58222703	71058719	99023476
33679	3251985	18025651	58222705	71058721	99023478
33683	3288824	18025653	58222707	71058723	99023480
33685	3378165	18025655	58222709	71058725	99023482
33756	3378177	18025657	58222711	71058727	99023484

【０５１８】

【数２】

34022	3378183	18025659	58222713	71058729	99025082
36657	3451194	18025661	58222715	71058731	99025083
37860	3603382	18025665	58222717	71482591	99025084
37909	3603384	18025667	58222719	71482622	99025903
38361	3603386	18025669	58222721	71482624	99025916
38362	3603388	18025677	58222723	71482634	99026398
38363	3603390	18025679	58222725	71482636	99026399
38367	3603392	18025681	58222727	71482638	99026416
38436	3603394	18025683	58222729	71482640	99026418
38438	3603396	18025685	58222731	71482642	109240611
38439	3641303	18025687	58222733	71482644	109240615
38440	3641307	18025689	58222735	71482646	109240619
38441	3644015	18025693	58222737	71482648	109240627
38442	3644021	18025697	58222739	71482650	109240631
38448	3746530	18025701	58222741	71482652	109240635
38485	3747011	18025705	58222743	71482654	109240637
38487	3747015	18025709	58222745	71792302	109240641
38489	3821085	18025715	58222747	71792306	109240643
38491	3821088	18025717	58222749	71792308	109240647
38493	3901025	18025719	58222751	73532341	109240655
38495	3928173	18092607	58222753	75707120	109240657
38497	3928181	18092609	58222755	75707124	109240661
38499	3928185	18092611	58222757	75707126	109240665
38501	3928189	18092613	58222759	75707128	109240669
38503	3928210	18092615	58222761	75707130	109240671
38505	3928211	18092617	58222763	75707132	109240675
178678	3928212	18092619	58222765	75707134	109240679
182338	3928214	18092621	58222767	75707138	109240687
182340	3928215	18092623	58222769	75707140	109240691
182342	3928219	18307263	58222771	75707148	109240695
182344	3928220	18307265	58222773	75707154	109240701
182346	3928222	18307267	58222775	75707156	109240705
182348	3928223	18307269	58222777	75707158	109240709
183962	3928224	18307271	58222779	75707160	109240713
183968	3928225	18307273	58222781	75707162	109240717
183972	3928227	18307275	58222783	75707168	109240721
185375	3928231	18307277	58222785	75707170	109240723
185377	3928232	18307279	58222787	75707172	109240729
185379	3928233	18307281	58222789	75707174	109240733
185381	3928234	18307283	58222791	75707176	109240737
185383	3928235	18307285	58222793	75707180	109240741
185385	3928236	18307289	58222795	75707188	109240745
185387	3928237	18307291	58222797	75707194	109240760
185389	3928238	18307293	58222799	75707196	109240764
185391	3928239	18626727	58222801	75707198	109240766
185393	3928240	18626728	58222803	75707204	109240770
185395	3928243	18626729	58222805	75707206	109241210
185397	3928244	18626730	58222807	75707208	109241212
185399	3928245	18632678	58222809	75707210	109241214
185401	3928248	18698406	58222811	75707220	109241216
185403	3928250	19170347	58222813	75707222	109241218
185415	3928251	19701578	58222815	75707226	109241220
185417	3928252	19744467	58222817	75707228	109241450

【０５１９】

【数３】

185419	3928253	19744471	58222819	75707230	109241549
185423	3928254	19744475	58222821	75707232	109241551
185427	3928257	19744479	58222823	75707234	109242373
185811	3928258	19744487	58222825	75707236	109242377
185813	3928259	19744491	58222828	75707238	109242379
185815	3928260	19744495	58222830	75707240	109242381
185816	3928261	19744499	58222832	75707242	109242383
185827	3928263	19744503	58222834	75707244	109242385
185829	3928264	19744507	58222836	75707246	109242387
185831	3928265	19744511	58222838	75707248	109242389
185833	3928266	19744515	58222840	75707250	109242395
185835	3928267	19744519	58222843	75707262	109242399
185837	3928276	19744523	58222845	75707264	109242401
185839	3928277	19744527	58222847	75707268	109242403
185841	3928278	19744531	58222849	75707270	109242409
185845	3928279	19744535	58222851	75707272	109242411
185847	3928280	19744539	58222853	75707274	109242417
185849	3928283	19744543	58222855	75707276	109242419
185855	3928287	19744547	58222857	75707278	109242421
185859	3928288	19744551	58222859	75707282	109242423
185862	3928289	19744555	58222861	75707284	109242425
185866	3928290	19744559	58222863	75707292	109242427
185868	3928291	19744563	58222865	75707298	109245190
185870	3928293	19744567	58222867	75707300	109245192
185872	3928294	19744571	58222869	75707302	109245194
185874	3928295	19744575	58222871	75707304	109693080
185880	3928296	19744579	58222873	75707306	109693082
185882	3928297	19744583	58222875	75707316	109693084
185884	3928298	19744587	58222877	75707318	109693094
185886	3928299	20372497	58222879	75707322	109693096
185888	3928301	20372499	58222881	75707324	109693100
185890	3928302	20372501	58222883	75707334	109693102
185892	3928303	20372503	58222885	75707338	109693110
185894	3928304	20372505	58222887	75707340	109693112
185896	3928308	20372507	58222889	75707362	109693114
185898	3928309	20372509	58222891	75707368	109693116
185904	3928310	20372511	58222893	75707370	109693118
185906	3928312	20372513	58222895	75707372	109693120
185908	3928315	20372515	58222897	75707374	109693135
185910	3928316	20372517	58222899	75707378	109693137
185912	3928317	20372519	58222901	75707382	109693139
185920	3928318	20372521	58222903	75707384	109693144
185922	3928319	20372523	58222905	75707386	109693146
185928	3928320	20372525	58222907	75707398	109693148
185934	3928321	20372527	58222909	75707406	109693150
185950	3928323	20372529	58222911	75707408	109693152
185980	3928324	20387057	58222913	75707410	109693154
185984	3928325	20387059	58222915	75707412	109693157
185987	3928326	20387061	58222917	75707416	109693159
185988	3928327	21311286	58222919	75707418	109693165
186008	3928329	21311288	58222923	75707420	109693167
186015	3928330	21311294	58222925	75707422	109693169
186017	3928331	21311296	58222927	75707424	109693171

【０５２０】

【数４】

186019	3928332	21311318	58222929	75707426	109693177
186040	3928333	21311322	58222931	75707428	109693179
186041	3928334	21669062	58222933	75707430	109693181
186042	3928335	21669064	58222935	75707432	109693183
186047	3928336	21669066	58222937	75707434	109693187
186199	3928337	21669068	58222939	75707444	109693189
186266	3928338	21669070	58222941	75707446	109693201
254719	3928339	21669072	58222943	75707448	109693203
257550	3928340	21669074	58222945	75707454	109693206
261239	3928341	21669076	58222947	75707460	109693210
265236	3928342	21669078	58222949	75707462	109693216
265240	3928343	21669080	58222951	75707464	109693218
298552	3928344	21669082	58222953	75707472	109693220
298560	3928345	21669084	58222955	75707476	109693222
298827	3928346	21669086	58222957	75707500	109693228
298829	3928347	21669088	58222959	75707502	109693230
299955	3928348	21669090	58222961	75707504	109693232
306919	3928349	21669092	58222963	75707506	109693235
306957	3928350	21669094	58222965	75707508	109693237
306959	3928351	21669096	58222967	75707510	109693239
306961	3928352	21669098	58222969	75707514	109693241
306963	3928353	21669100	58222971	75707516	109693249
306965	3928354	21669102	58222973	75707518	109693253
306967	3928355	21669104	58222975	75707520	109693255
306971	3928356	21669106	58222977	75707522	109693261
306980	3928357	21669108	58222979	75707524	109693264
306982	3928358	21669110	58222981	75707526	109942421
306984	3928359	21669112	58222983	75707528	109942431
306986	3928360	21669114	58222985	75707530	110290934
306988	3928361	21669116	58222987	75707534	110610132
306990	3928362	21669118	58222989	75707536	110624509
306992	3928363	21669120	58222991	75707540	110657101
306994	3928364	21669122	58222993	75707542	110657103
306996	3928365	21669124	58222995	75707544	110657105
306998	3928366	21669126	58222997	75707546	110657107
307000	3928367	21669128	58222999	75707548	110657109
348203	3928368	21669130	58223001	75707550	110657111
348205	3928369	21669132	58223003	75707552	110657113
348207	3928370	21669134	58223005	75707586	110657115
348211	3928371	21669136	58223007	75707598	110657123
386052	3928372	21669138	58223009	75707600	110657124
396631	3928373	21669140	58223011	75707602	110657125
397787	3928374	21669142	58223013	75707604	110657158
397789	3928375	21669144	58223015	75707618	110657159
397791	3928376	21669146	58223017	76058957	110657160
397793	3928377	21669148	58223019	76252624	110657161
397795	3928378	21727250	58223021	76252626	110657162
398490	3928379	21998806	58223023	76252630	110657163
398491	3928380	21998808	58223025	76252632	110657164
398492	3928381	21998810	58223027	76252634	110657165
404110	3928382	21998812	58223029	76252636	110657166
404112	3928383	21998814	58223031	76252638	110657167
404114	3928384	21998816	58223033	76252640	110657168

【０５２１】

【数５】

408365	3928385	21998818	58223035	76252642	110657169
409042	3928386	21998820	58223037	76252644	110657170
414035	3928387	21998822	58223039	76252646	110657171
415651	3928388	21998824	58223041	76781673	110657172
415710	3928389	21998826	58223043	77378090	110657173
415955	3928390	21998830	58223045	77378092	110657174
415957	3928391	21998832	58223047	77378094	110657175
415959	3928392	22086572	58223049	77378096	110657176
415961	3928393	22086575	58223051	77378098	110657177
415963	3928394	22086581	58223053	77378100	110657178
415965	3928395	22086587	58223055	77378102	110657179
415967	3928396	22086593	58223057	77378105	110657180
415969	3928397	22091617	58223059	77378107	110657181
415971	3928398	22214019	58223061	77378109	110657182
416329	3928399	22214023	58223063	77378111	110657183
416331	3928400	22297542	58223065	77378135	110657184
416333	3928401	22556681	58223067	77378137	110657185
416335	3928402	22556683	58223069	77378139	110657186
416337	3928403	22556684	58223071	77378141	110657187
430845	3928404	22607990	58223073	77378143	110657188
431039	3928405	22620896	58223075	77378145	110657189
431040	3928406	22620899	58223077	77378147	110657230
431041	3928407	22640510	58223079	77378149	110657232
431042	3928408	22640512	58223081	77378151	110657234
431043	3928409	22640513	58223083	77378153	110657236
431044	3928410	22642789	58223085	77378155	110657238
431045	3928411	22642790	58223087	77378157	110657240
431046	3928412	22642791	58223089	77378159	110657242
431047	3928413	22642808	58223091	77378161	110657244
431048	3928414	22642809	58223093	77378163	110657246
431049	3928415	22642810	58223095	77378165	110657248
431051	3928416	22642811	58223097	77378167	110657250
431052	3928417	22643188	58223099	77378169	110657252
431053	3928418	22643190	58223101	77378172	110657254
431067	3928419	22643192	58223103	77378174	110657256
431069	3928420	22643196	58223105	77378176	110657258
431071	3928421	22647625	58223107	77378224	110657615
431073	3928422	22647633	58223109	77378225	110657617
431075	3928423	23194480	58223111	77378228	110657619
431077	3928424	23194500	58223113	77378230	110657621
431079	3928425	23225992	58223115	77378234	110657624
431081	3928426	23225994	58223117	77378236	110657676
431083	3928427	23225996	58223119	77378237	110657678
431085	3928428	23234613	58223121	77378239	110657728
431087	3928430	23320663	58223123	77378241	110657730
431089	3928431	23342423	58223125	77378245	110658341
433889	3928432	23343554	58223127	77378247	110660158
436562	3928433	24412754	58223129	77378249	110660166
440153	3928434	24412756	58223131	77378251	110660174
441312	3928435	24412758	58223133	77378253	112184495
441314	3928436	24474081	58223135	77378255	112184497
441316	3928437	24850297	58223137	77379405	112184499
441318	3928438	26985941	58223139	77379407	112184501

【０５２２】

【数６】

441320	3928439	27368974	58223141	77379409	112184503
441322	3928440	27368976	58223149	77379412	112184505
441324	3928441	27368978	58223151	77379414	112184507
441330	3928442	27368981	58223153	77379416	112184509
441332	3928443	27368983	58223155	77379418	112184511
441334	3928444	27368986	58223157	77379420	112184513
441336	4100379	27368991	58223159	77379422	112189154
441338	4100381	27368993	58223161	77379425	112191695
441342	4100383	27368997	58223163	77379427	112191699
441344	4103644	27368999	58223165	77379429	112703827
441346	4103662	27369001	58223167	77379431	112708249
441348	4103664	27369003	58223169	77379433	112708250
441350	4103666	27369007	58223171	77379435	112711584
441352	4103674	27369009	58223173	77379437	112712351
441354	4128063	27369011	58223175	77379439	112712352
441356	4139195	27818830	58223177	77379441	112712353
441358	4139197	27867541	58223179	77379443	112712354
441360	4139199	27873542	58223181	77379445	112712355
441364	4139201	27875080	58223183	77379447	112712356
441366	4323178	27875088	58223185	77379449	112712357
441368	4323182	27875191	58223187	77379457	112712358
441370	4323186	27875199	58223189	77379459	112712359
441372	4323194	28611056	58223191	77379461	112712360
441374	4323809	28848873	58223193	77379463	112712361
441376	4323811	28883544	58223195	77379477	112712362
441378	4323813	28883548	58223197	77379479	112712363
441380	4323821	28883550	58223199	77379481	112712364
441382	4323823	29650328	58223201	77379483	112712365
441384	4323825	29650334	58223203	77379485	112712366
441386	4323829	29650337	58223205	77379487	112712367
441388	4323831	29650339	58223207	77379489	112712368
441390	4323833	29725711	58223209	77379491	112712369
441392	4323839	29725713	58223211	77379493	112712370
441394	4323841	29725715	58223213	77379495	112712371
441396	4323845	29725717	58223215	77379497	112712372
441398	4323847	29725719	58223217	77379499	112712373
441400	4323849	29725721	58223219	77379501	112712374
441402	4323851	29725723	58223221	77379503	112712375
441408	4323853	29725725	58223223	77379505	112712376
441412	4323855	29725727	58223225	77379507	112712377
441414	4323857	29725729	58223227	77379509	112712378
441416	4323859	29725731	58223229	77379511	112712379
441418	4323861	29725733	58223231	77379513	112712380
441422	4323863	30026987	58223233	77379515	112712381
441424	4323865	30258344	58223235	77379517	112712382
441426	4323869	30258346	58223237	77379519	112712383
441428	4323871	30793253	58223239	77379521	112727205
441430	4323873	30793255	58223241	77379523	112727206
441432	4323875	30793257	58223243	77379525	112727207
441434	4323877	30793259	58223245	77379527	112727208
441436	4323881	30793261	58223247	77379529	112727209
441440	4323883	30793263	58223249	77379545	112727210
441444	4323885	30793265	58223251	77994607	112727211

【０５２３】

【数７】

441446	4323887	30793565	58223253	77994611	112727212
441448	4323889	30793567	58223255	77994615	112727213
452060	4323891	30793569	58223257	77994619	112727214
452061	4323893	30793571	58223259	78629976	112727215
452062	4323895	30793573	58223261	78629977	112727216
452063	4323897	30841928	58223263	78629978	112727217
459655	4323899	30841931	58223265	80750467	112727218
460858	4323901	30841933	58223267	80975580	114155738
472970	4323903	30841935	58223269	80975600	114155883
472971	4323905	30841939	58223271	80975604	114155884
472972	4323907	30841943	58223273	80975616	114156208
472973	4323909	30841945	58223275	80975618	114207907
472974	4323911	30841947	58223277	80975638	114385493
472975	4323913	31879463	58223279	80975642	114385505
472976	4323915	31879464	58223281	80975644	114385507
487826	4323923	31879467	58223283	81020146	114385509
487827	4323927	31879468	58223285	81020229	114385511
493148	4323929	31879471	58223287	81020258	114385513
493149	4323931	31879472	58223289	81239122	114385515
493150	4323933	33021483	58223291	81251581	114385517
496044	4323935	33044572	58223293	81251585	114385521
496046	4323937	33044573	58223295	82794837	114385537
496048	4323939	33044574	58223297	83410334	114385539
496050	4323941	33044582	58223299	83697271	114385541
496053	4323945	33044586	58223301	83959521	114385543
496055	4323947	33051527	58223303	83959523	114385545
496059	4323949	33051528	58223305	83959525	114385547
496061	4323951	33070272	58223307	83959937	114385549
496063	4323953	33070283	58223309	83959939	114385551
496065	4323955	33070284	58223311	83964685	114385553
496071	4323957	33083474	58223313	83964762	114385567
496073	4323959	33083476	58223315	83964764	114385569
506420	4323961	33083477	58223317	83964766	114385571
506424	4323963	33083478	58223319	83964768	114385573
510839	4323965	33083479	58223321	83966574	114385575
510841	4323983	33083480	58223323	83966576	114385579
510843	4323989	33083481	58223325	83966578	114385581
510845	4323993	33083482	58223327	83966655	114385583
514428	4323997	33083483	58760238	83966657	114385585
514429	4323999	33085842	59890568	83966659	114385587
514430	4324005	33235609	59890571	83966661	114385589
514431	4324007	33235611	59894819	83966663	114385591
514432	4324009	33235613	60392126	83966665	114385593
514433	4324011	33235615	60616327	83966667	114385595
514434	4324013	33235617	60616352	83970756	114385597
515780	4324019	33235619	60650119	83970763	114385599
516137	4378181	33235621	60650123	83970769	114385601
516187	4378183	33235623	60734312	83970772	114385603
516198	4378185	33235625	61697118	84659318	114385605
516213	4378187	33235627	61853816	84659320	114385607
516249	4378189	33235629	61970154	84660715	114385609
516265	4378191	33235631	61970158	84660717	114385611
516316	4378193	33235633	61970160	84660719	114385613

【０５２４】

【数８】

545722	4378195	33304656	61970164	84660720	114385615
557650	4378197	33304658	61970168	84660721	114385617
557651	4378199	33304661	61970172	84660722	114385619
560677	4378201	33304663	61970176	84660723	114385621
560678	4378203	33355480	61970180	84660725	114385623
560841	4378207	33868634	61970184	84797793	114385625
560843	4378209	33868636	61970192	84797795	114385627
575228	4378211	33868638	61970194	84797797	114385629
575236	4378213	33868640	61970198	84797799	114385631
575240	4378215	33868642	61970202	84797801	114385633
575257	4378217	33868644	61970206	84797803	114385635
575261	4378221	33868646	61970228	84797805	114385645
587143	4378223	37287525	62001845	84797807	114385647
587245	4378225	37605051	62120916	84797823	114385649
587323	4378227	37694620	62120917	84797825	114385651
587325	4378229	37694622	62120918	84797827	114385653
587327	4378233	37694624	62120919	84797857	114385655
587329	4378237	37694626	62120920	84797861	114385659
587331	4378239	37694628	62120921	84797883	114385661
587333	4378243	37694630	62120922	84797915	114385663
587335	4378245	37694632	62120923	84797929	114385665
587337	4378247	37694634	62120924	84797959	114385669
587341	4378249	37694636	62120925	84797961	114385671
587343	4378251	37694638	62120926	84797963	114385673
587345	4378253	37694640	62120927	84797979	114385675
587347	4378255	37694642	62120929	84797981	114385677
587349	4378259	37694644	62120931	84797985	114385679
587351	4378261	37694646	62120932	84798001	114385681
587353	4378265	37694648	62120933	84798003	114385683
598165	4378267	37694650	62120934	84798005	114385685
598167	4378269	37694654	62120935	84798007	114385687
598170	4378271	37694660	62120938	84798009	114385689
598172	4378273	37694662	62120939	84798011	114385691
601979	4378275	37694664	62120940	84798033	114385693
601982	4378279	37694666	62120941	84798035	114385699
601984	4378281	37694668	62120943	84798055	114385701
609002	4378283	37694670	62120944	84798057	114385703
609004	4378287	37694672	62120945	84798059	114385705
619259	4378291	37694674	62120946	84798061	114385707
623043	4378293	37694676	62120947	84798063	114385709
624874	4378295	37694678	62120948	84798103	114385711
632983	4378297	37694680	62120949	84798107	114385713
632985	4378299	37694682	62120950	84798115	114385715
632987	4378301	37694684	62120951	84798117	114385717
633227	4378303	37694686	62120952	84798147	114385719
642581	4378305	37694688	62120953	84798149	114385721
681896	4378307	37694690	62120954	84798167	114385723
681899	4378309	37694692	62120955	84798169	114385725
685029	4378313	37694694	62120956	84798171	114385727
693862	4378315	37694696	62120957	84798173	114385729
722413	4378317	37694698	62120958	84798175	114385731
722417	4378319	37694700	62120959	84798177	114385744
722419	4378323	37694702	62120960	84798179	114385746

【０５２５】

【数９】

722421	4378325	37694704	62120961	84798181	114385748
722423	4378327	37694706	62120962	84798183	114385750
722425	4378331	37694708	62199500	84798197	114385752
722427	4378333	37694710	62421462	84798199	114385756
722429	4378335	37702652	62421466	84798201	114385774
722431	4378337	37732215	62720427	84798203	114385776
722433	4378339	37780362	62720431	84798213	114385778
722435	4378341	39103877	62720436	84798215	114385780
722437	4378343	39103879	62720442	84798217	114385782
722439	4378345	39103881	62720444	84798219	114385804
722441	4378347	39103883	62720446	84798241	114385806
722443	4378349	39103885	62720452	84798249	114385808
722455	4378351	39103887	62720454	84798255	114385921
722461	4378353	40231616	62720473	84798257	115268711
722463	4378359	40288410	62720475	84798267	115268713
722465	4378361	40288412	62720477	84798269	115268880
722467	4378363	40288414	62720483	84798271	115268892
722469	4378365	40288416	62860940	84798273	115268894
722471	4378367	40288418	62860955	84798275	115268896
722473	4378369	40388582	62860957	84798277	115268898
722475	4378371	40388585	62860959	84798279	115268900
722477	4378373	40388592	62860961	84798295	115268902
722479	4378375	40388599	62860963	84798309	115268904
722483	4378377	40647131	62860965	84798321	115268906
722485	4378379	40784425	62860981	84798323	115270875
722487	4378383	40784429	62860983	84798325	115270877
722489	4378385	40795876	62860987	84798327	116543556
722493	4378387	42541061	62860989	84798343	116543560
722495	4378389	42541069	62860991	84798345	116543564
722497	4378391	42794782	62860994	84798347	116546686
722503	4378393	42794786	62860996	84798349	116546688
722505	4378395	44829186	62861000	84798351	116551153
722511	4378397	45111420	62861002	84798364	116551156
722513	4378399	45386482	62861004	84798366	116551162
722515	4378401	46016047	62861012	84798370	116551171
722521	4558868	46093898	62861015	84798372	116551175
722523	4680172	46093902	62861017	84798374	116551179
722525	4759539	46093906	62861019	84798377	116551183
722529	4759543	46093910	62861022	84798381	116551188
722531	4759547	46575858	62861024	84798383	116551192
722535	4759551	47078185	62861029	84798386	116551201
722537	4759555	47154907	62861031	84798388	116551207
722539	4759563	47154909	62861037	84798390	116551216
722541	4759567	47154911	62861041	84798397	116551226
722543	4759575	47154913	62861045	84798407	116551231
722545	4759579	47154915	62861054	85632219	116551235
722549	4759583	47154917	62868475	85642735	116551239
722553	4759587	47154919	62868477	85644222	116551244
722555	4759591	47154921	62868479	85644224	116551249
722557	4759595	47271269	62999493	85644226	116551258
722559	4759599	47271271	63102866	85644228	116551313
722561	4761194	47271273	63102872	85644230	116551317
722569	4761281	47271275	63102874	85644232	116551321

【０５２６】

【数１０】

722571	4761283	47271277	63102876	85644600	116551325
722573	4837686	47271279	63102880	85644602	116551329
722581	4837688	47271281	63102882	85644604	116551333
722585	4837690	47271283	63102888	85650161	116551337
722587	4837692	47271285	63102892	85650163	116551341
722591	4837694	47271287	63102898	85650165	116551347
722593	4837696	47271289	63102900	85650167	116551351
722599	4837698	47271291	63102902	85650169	116551369
722601	5006350	47271295	63102904	85650171	116551373
722603	5006354	47271297	63102906	85650173	116551377
722605	5006356	47271299	63102908	85650175	116551381
722607	5006358	47271307	63102910	85650177	116551404
722609	5006360	47271309	63102912	85650179	116551413
722615	5019510	47271311	63102916	85650276	116551418
732737	5019512	47271313	63102920	85650278	116551422
732739	5019514	47271315	63102922	85650280	116551427
732741	5019522	47271317	63102924	85657010	116551431
732743	5019524	49073024	63102928	85658337	116551436
732745	5019526	49073036	63102938	85658632	116551446
732747	5019538	50199324	63102940	85660488	116551452
758588	5081714	50199334	63102942	85660492	116551772
758598	5081716	50831237	63102954	85660494	116551776
758600	5081718	50844518	63102962	85660497	116551780
762823	5081720	50844522	63102964	85660498	116551785
773589	5081722	50844526	63102966	85660502	116551790
790442	5102680	50844536	63102968	86439043	116553242
790450	5419682	50844540	63102970	86439047	116555276
790794	5419684	50844548	63102972	86439051	116555819
790802	5419700	50844552	63102974	86439053	116555821
790810	5419702	50871685	63102976	86439057	116555823
791015	5419704	50871687	63102980	86439061	116559889
791019	5419706	50898144	63102986	86439063	116560960
791023	5419708	50898148	63102988	86439071	116634471
791027	5419710	50898150	63102992	86439075	116634475
791031	5419712	50898152	63102994	86439081	116795086
791035	5419731	50898154	63102996	86439147	117576090
809552	5419738	50898158	63102998	86439151	118143176
809553	5419740	50898160	63103012	86439153	118143178
809554	5524134	50898162	63103014	87298995	118147088
845515	5524140	50898164	63103030	87298999	118147090
845517	5524142	50898170	63103032	87299001	118147092
845519	5524144	51103388	63103034	87299003	118147094
845521	5524146	51103390	63103040	87299007	118147096
845523	5524148	51103392	63103044	87299009	118147098
845525	5524150	51103394	63103046	87299011	118147100
845527	5566507	51103396	63103048	87299015	118147102
845529	5578779	51103398	63103054	88496317	118147104
845531	5578781	51103400	63103056	88496922	118147106
845533	5578783	51103402	63103070	90092372	118147108
845535	5578785	51103404	63103072	90092373	118147110
854111	5578787	51103406	63103076	90092374	118147112
871275	5578789	51103408	63103078	90092387	118147114
871819	5578791	51103410	63103086	90092910	118147116

【０５２７】

【数１１】

871823	5578793	51103412	63103096	90092911	118147118
882261	5578795	51103414	63103098	90092912	118147120
882263	5578797	51103416	63103106	90092913	118147122
882265	5578799	51103418	63103108	90823178	118147125
882267	5578801	51103420	63103110	90823182	118147127
882269	5578803	51103422	63103112	90823186	118425771
882271	5578805	51103424	63103114	90823190	118425773
882273	5578807	51103522	63103116	90823196	118425775
882275	5578809	51103526	63103118	90823198	118490144
882277	5578811	51103528	63103120	90994745	118490148
882279	5578815	51103532	63103140	90994747	118490152
882281	5690395	51103534	63103142	90994751	118490156
882283	5690399	51103536	63103144	92115496	119359417
882285	5690403	51103538	63103146	92115497	119836694
882287	5709454	51103540	63103148	92130102	119836767
882289	5731228	51103542	63103150	92130103	119838997
882291	5731232	51103544	63103154	92131782	119839065
882293	5731236	51103546	63103156	92131783	119839355
882295	5731242	51103548	66096574	92131784	119839523
882297	5731252	51103550	66096603	92131785	119841342
882299	5921608	51103552	66096637	92133663	119841388
882301	5921610	51103554	66711101	92133665	119841425
882303	5921614	51103556	66711102	92137567	119841512
882305	5921618	51103558	66711103	92140334	121309186
882307	5921620	51103560	66711104	92140336	124042790
882309	5921622	51103562	66711105	92141530	124042792
882311	5921624	51103564	66711106	92155949	124042815
882313	5921626	51103566	66711107	92157443	126146964
882315	5921640	51103568	66711108	92157445	126146965
882317	6110569	51103570	66711109	92157453	126146966
882319	6179861	51851021	66711110	92157459	126147776
882321	6179863	51949938	66711111	92157461	126147812
882323	6179865	53988135	66711112	92158828	126147817
882325	6179867	53988137	66711114	92158980	126147952
882327	6179869	54034484	66711116	92161545	126147954
882329	6492198	54145422	66711117	92249233	126147956
882331	6492200	54145426	66711118	92298212	126152193
894090	6492202	54145440	66711119	92298539	126152196
904629	6492204	54781098	66711120	92315622	126633956
913352	6648587	54781100	66711123	92315624	126633957
929640	6649889	54781102	66711124	92315626	126633958
929642	6649895	54781104	66711125	92315628	134125852
944925	6708204	54781106	66711126	92332837	134125853
950049	7012704	54781108	66711128	92332841	134125854
973411	7012706	54781110	66711129	92348102	134128019
973415	7024356	54781112	66711130	92348670	134269772
999107	7160978	54781126	66711131	92349881	134273023
1020008	7673384	54781129	66711132	92360819	145850477
1020012	7673388	54781202	66711133	92370888	145850518
1020016	7673392	54781204	66711134	92381676	145850519
1070309	7745134	54781206	66711135	92496960	145850520
1070313	8250280	54781208	66711136	92520581	145850521
1070315	8777870	54781213	66711137	92520583	145850522

【０５２８】

【数１２】

1070317	8777874	54781216	66711138	92520584	145850523
1070321	8777878	54781218	66711139	92520586	145850524
1070325	8777880	54781220	66711140	92575636	145850525
1070327	8777884	54781223	66711141	92589636	145850526
1070347	8777888	54781225	66711142	92589637	145850527
1136554	8777890	54781227	66711143	92589638	145850528
1136556	8777892	54781229	66711144	92589639	145850529
1208913	9295278	54781231	66711145	92589640	145850530
1235764	9295280	55274149	66711146	92589641	145850531
1235766	9295282	55274153	66711147	92589642	145850532
1235768	9295284	55274159	67509857	92589643	145850533
1235770	9295286	55274163	67509861	92589644	145850534
1235772	9295290	55824376	68148126	92589645	145850535
1235774	9295292	56118076	68148140	92589646	145850536
1245380	9295296	56118080	68148142	92589647	145850537
1245382	9295298	56292538	68148144	92589648	145850558
1255605	9295300	56294837	68148150	92589649	145850561
1255607	9437312	56294841	68148152	92589650	145850563
1255608	9927567	56399565	68148154	92589651	145854440
1255609	9928208	56609227	68148158	92589652	145856824
1255612	9968441	56609228	68148160	92589653	145859735
1292860	9968443	56609229	68148164	92589656	148355517
1292862	9968486	56609230	68148166	92600475	148355518
1353813	9968488	56609232	68148174	92600479	148355519
1353815	9968490	56609235	70797818	92600487	148355520
1353817	9968492	56742105	70797820	92607622	148355521
1353819	9968494	56742106	70797822	92667306	148355522
1353821	9968496	58003567	70797824	92667307	148355523
1353825	9968498	58003568	70797826	92667308	148355524
1353827	9968500	58003569	70797828	92667309	148355525
1353831	9997457	58003570	70797830	92667310	148355526
1370131	10636524	58003571	70797832	92667329	148355527
1370135	11229436	58003572	70797834	92667331	148355528
1370137	11343336	58003573	70797836	92798195	148355529
1495627	11343337	58003587	70797838	92798196	148355530
1495628	11876718	58003588	70797842	92798197	148355531
1495629	11876734	58003589	70797844	92798198	148355532
1495630	11876735	58003608	70797846	92798199	148355533
1495631	11876736	58003609	70797850	92798218	148540957
1495632	11876737	58003610	70797852	92798220	148578450
1495633	11876738	58003611	70797854	92824835	148578452
1495634	11876739	58003612	70797856	92834676	148578454
1495635	11876740	58003613	70797858	92835832	148578455
1495637	11876741	58003614	70797860	92835834	148578456
1495638	11878173	58003615	70797866	92835836	148578457
1495639	11878175	58003616	70797870	92839400	148578458
1495640	11878177	58003618	70797872	92839402	148578460
1495641	11992075	58003619	70797874	92839403	149849068
1495642	11992193	58003620	70797876	92839404	149849080
1495643	12003249	58003622	70797878	92839405	149849084
1495644	12003251	58003623	70797884	92839406	149849088
1495645	12003253	58003624	70797886	92839407	150447881
1495646	12003255	58003625	70797888	92839408	150447883

【０５２９】

【数１３】

1495647	12003257	58003626	70797890	92839409	150447885
1495648	12655491	58003627	70797894	92845038	150447887
1495649	12655493	58003628	70797898	92845490	150450134
1495650	12655500	58003629	70798601	92845651	150450135
1495651	12655502	58003630	70798603	92855396	150450136
1495652	12655504	58003631	70798605	92855400	150450137
1532001	12655519	58003632	70798607	92855404	150450138
1532002	12655521	58003633	70798609	92855408	150450139
1532027	12655525	58003634	70798611	92855412	150450140
1552277	12655527	58003656	70798613	92855416	150450636
1552283	12655529	58003657	70798615	92855420	150453145
1552285	12655531	58003658	70798617	92855424	150453147
1552287	12655541	58003659	70798619	92855428	150453149
1552291	12655558	58003660	70798621	92855432	150453151
1552295	12655565	58003661	70798623	92855436	150453153
1552299	12655567	58032596	70798627	92855441	150453154
1552319	12655569	58032603	70798629	92855444	150453155
1561601	12655643	58032606	70798631	92856854	150453156
1561605	12655655	58194104	70798633	92856855	150453157
1561607	12655662	58194120	70798635	92856859	150453159
1561609	12655665	58194136	70798637	92857001	150453161
1561611	12655672	58202701	70798639	92857003	150453163
1572702	12655713	58202709	70798641	92857012	150453165
1572704	12655723	58202711	70798643	92857016	150453167
1572706	12655730	58202713	70798645	92857018	150453169
1572708	12655732	58202715	70798649	92858156	150453171
1572710	12655736	58202717	70798653	92861312	150453174
1657324	12655738	58202719	70798655	92861313	150453213
1657326	12655740	58202721	70798657	92861314	150453216
1657328	12655748	58202723	70798659	92862784	153590356
1673592	12655751	58202725	70798661	92875826	153590359
1673602	12710669	58202727	70798667	92878541	153590361
1710418	12710671	58202729	70798669	92878543	153590363
1770403	12734084	58202733	70798671	92878545	153590365
1770415	12734089	58202735	70798673	92903931	153590367
1773056	12750933	58202737	70798675	92905358	153590371
1778125	12836990	58222454	70798677	92905360	156149223
1785869	12957385	58222456	70798679	92905362	156149224
1785873	12957387	58222458	70798681	94034254	156149225
1785877	13170940	58222460	70798683	94034257	156229617
1800286	13170944	58222462	70798685	94034261	156557387
1813653	13170948	58222464	70798687	94034264	156557389
1813655	13171333	58222466	70798690	94034267	156557391
1813657	13171339	58222468	70798692	94034271	156557393
1834498	13171341	58222470	70798694	94034285	156557399
1834563	13171343	58222473	70798696	94034316	156557403
1834564	13447996	58222476	70798698	94034339	156557405
1835872	13448000	58222478	70798700	94034342	156557407
1835873	13448002	58222480	70798702	94034384	156557411
1839291	13448004	58222482	70798706	94034387	156562058
1864110	13448006	58222484	70798708	94034390	157087534
1864112	13448010	58222487	70798710	94034393	157896695
1864114	13448012	58222489	70798712	94035272	157896697

【０５３０】

【数１４】

1864116	13448016	58222491	70798716	94035284	157903220
1864118	13448018	58222493	70798718	94035289	158055245
1864136	13448022	58222497	70798720	94035298	158055254
1864138	13549147	58222499	70798722	94035300	158055268
1890131	13785652	58222501	70798724	94035312	158055282
1890133	13939245	58222503	70798732	94469910	158055285
1905798	13939277	58222505	70798734	94469912	158055288
1905937	13939331	58222507	70798736	94469914	158058441
1905941	13991697	58222509	70798738	94469922	158731523
1911732	14150696	58222511	70798742	94469924	158731524
1922370	14150698	58222513	70798744	94469926	158731525
1922438	14290262	58222515	70798750	95007504	158731526
1922466	14573212	58222517	70798752	95007510	158731527
1922501	14573214	58222519	70798758	95007512	158731528
1922528	14573216	58222521	70798760	95007514	158731529
1922535	14573218	58222523	70798764	95007516	158731530
1922602	14573220	58222525	70798766	95007518	158731531
1922618	14573222	58222527	70798768	95007520	158731532
1922645	14573226	58222529	70798770	95007522	158731533
1922679	14573254	58222531	70798772	95007524	158731534
1922796	14573256	58222533	70798774	95007526	158731536
1922805	14573258	58222535	70798776	95007528	158731538
1932772	14573260	58222537	70798778	95007530	158731539
1943727	14573262	58222539	70798780	95007532	158731540
2058533	14573264	58222541	70798782	95007534	158731541
2058535	14573266	58222543	70798784	95007536	158731542
2058678	14573268	58222545	70798786	95007538	158731545
2072271	14573270	58222547	70798788	95007540	158731546
2072273	14573272	58222549	70798792	95007542	158731547
2072279	14573274	58222551	70798794	95007544	158731548
2072981	14573276	58222553	70798796	95101759	158731550
2078359	14573278	58222556	70798798	95101761	158731551
2078371	14588864	58222558	70798800	95101767	158731552
2078373	14588866	58222560	70798802	95101769	158731553
2169989	14588868	58222562	70798804	95101777	158731554
2169990	14588870	58222564	70798806	98956195	158731555
2172285	14588872	58222566	70798808	98956209	158731556
2173403	14597098	58222568	70798810	98956219	158731557
2175768	14597112	58222570	70798812	98956223	158731558
2175852	14597124	58222572	70798814	98956232	158731559
2175867	14597127	58222575	70798816	98956244	158731560
2218123	14625743	58222577	70798818	98956249	158731561
2239113	14625918	58222579	70798820	98956255	158731562
2239115	14626493	58222581	70798824	98956261	158731563
2253439	14716957	58222583	70798826	98956263	158731564
2266632	14716961	58222585	70798828	98956271	158731565
2266634	14716969	58222587	70798830	98956277	158731566
2291087	14716971	58222589	70798832	98956279	158731567
2293965	14716973	58222591	70798834	98956281	158731568
2293967	15011457	58222593	70798836	98956285	158731569
2306827	15099974	58222595	70798838	98956289	158744132
2306829	15277619	58222597	70798840	98956291	158744140
2345025	15419020	58222599	70798842	98956293	158744148

【０５３１】

【数１５】

2345029	15859220	58222601	70798844	98956299	158744156
2345031	15986229	58222603	70798846	98956301	158744164
2345033	16508167	58222605	70798848	98956303	158746355
2385484	16554974	58222607	70798850	98956305	158746363
2385486	16923186	58222609	70798852	98956307	158746371

【０５３２】

【数１６】

付録B

Vλライブラリーを得るために使用したλ軽鎖のGI番号

31454	3142529	4566076	9968397	51103608	77379760
32808	3142531	4566078	9968401	51103612	77379824
32812	3142533	4566082	9968403	51103614	77379826
33335	3142535	4566084	9968405	51103616	77379828
33368	3142537	4566086	9968409	51490956	77379830
33383	3142539	4566088	9968411	54781261	77379832
33387	3142541	4566090	9968413	61815560	77379834
33412	3142543	4566092	9968415	62720404	77379836
33429	3142545	4566094	9968417	62720406	77379838
33431	3142547	4566096	9968419	62720408	77379840
33433	3142549	4566098	9968421	62720412	77379842
33703	3142553	4566101	9968423	62860947	77379846
33711	3142556	4566105	9968425	62860950	77379848
37918	3142558	4732059	9968427	62860967	77379850
37920	3142562	4761253	9968429	62860969	77379855
37922	3142564	4761255	9968433	62860971	77379857
37923	3142566	4761257	9968435	62860973	77379859
38359	3142569	4761259	9968437	62860975	77379861
38360	3142573	4761261	9968439	62860977	77379863
38364	3142577	4761263	10636511	62860979	77379865
38365	3142579	4761265	10636514	62860985	77379867
38366	3142581	4761267	10636518	62861006	77379869
38368	3142583	4761269	10636521	62861008	77379871
186078	3142585	4761271	10636527	62861010	77379875
186080	3142587	4761273	11992185	62861047	77379877
186082	3142589	4761277	11992187	62999489	77379879
186084	3142591	4761279	11992189	62999497	77379882
186086	3142593	4927957	11992191	62999501	77379884
186088	3142595	5019504	11992195	62999509	77379886
186090	3142597	5019506	11992197	70888031	77379888
186092	3142599	5019516	11992199	70888035	77379890
186094	3142601	5019518	11992201	70888037	77379894
186096	3142603	5019520	12666922	70888041	77379896
186097	3142612	5019528	12666924	70888043	77379900
186111	3142614	5019530	12666926	70888045	77379908
186162	3142616	5019532	12666928	70888047	77379910
186164	3142618	5019534	12666930	70888049	77379912
186168	3142620	5019536	12666932	70888051	77379916
186170	3142649	5174362	12666934	70888053	77379918
186172	3142651	5174364	12666936	70888055	80975584
186175	3142653	5174366	12666938	70888057	80975588
298556	3142656	5174378	12666940	70888059	80975598
405223	3142658	5524086	12666942	70888061	80975622
405227	3142660	5524106	12666944	70888063	80975628
409040	3142662	5524108	12666946	70888065	80975632
409041	3142668	5524118	12666948	70888067	80975636
409043	3142670	5524122	12666952	70888069	81020028
433485	3142672	5524132	12666954	70888071	81020064
434041	3142674	5578817	12666956	70888073	86438995
434045	3142676	5578819	12666958	70888075	86439001
439514	3142678	5578823	12666960	70888077	86439005

【０５３３】

【数１７】

439516	3142680	5578825	12666962	70888079	86439015
441251	3142684	5578827	12830380	70888081	86439017
460854	3153359	5578829	12830382	70888083	86439087
460856	3153361	5578831	12830384	70888085	86439089
460860	3153365	5578833	13276707	70888087	86439091
465157	3153366	5911837	13877276	70888089	86439093
465167	3153368	6492194	14279402	70888091	86439095
465171	3153374	6492196	14279404	70888093	86439097
465175	3153376	6492206	14279406	70888095	86439099
469249	3335577	6492208	17226627	70888097	86439101
483911	3335579	6492210	17226649	70888099	86439105
487824	3335585	6492212	18307305	70888103	86439127
487825	3335587	6643078	18307307	70888105	86439133
487828	3335591	6643082	18307309	70888109	86439137
493153	3388046	6643086	18307311	70888111	86439139
506426	3388048	6643088	18307313	70888113	86439141
506428	3388050	6643090	18307315	70888115	90994749
515765	3388054	6643098	18307317	70888117	95007506
532599	3388056	6643104	18307319	70888121	95007546
532600	3388058	6643106	18307321	70888123	95007548
532603	3388060	6643114	18307329	70888125	95007550
560845	3388062	6643118	21311290	70888127	95007552
575230	3388064	6643120	21311292	70888129	95007554
575238	3388066	6643124	21669150	70888133	95007556
575242	3388070	6643126	21669152	70888137	95007558
685021	3388072	6643128	21669154	70888139	95007560
773591	3388074	6643136	21669156	70888141	95007562
871362	3388080	6643138	21669158	70888143	95007564
987068	3747019	6643154	21669160	70888147	95007566
987076	3821077	6643156	21669162	70888149	95007570
998390	3821078	6643158	21669164	70888151	95007572
998394	3821079	6643162	21669166	70888155	95007576
1055278	3821080	6643168	21669172	70888157	95007578
1070329	3821081	6643170	21669174	70888159	109240683
1070341	3821082	6643172	21669176	70888161	109240697
1070349	3821083	6643176	21669178	70888163	109240743
1143195	3821084	6643178	21669180	70888165	109240749
1200068	3821086	6643180	21669182	70888167	109240754
1235776	3821087	6643182	21669184	70888169	109240756
1235778	3821089	6643184	21669186	70888171	109240758
1235780	3821090	6643186	21669188	70888173	116795127
1235782	3821091	6643188	21669190	70888179	116795192
1255606	3821092	6643192	21669192	70888181	146336934
1255610	3821093	6643196	21669194	70888183	156632919
1255611	3821094	6643198	21669196	70888185	156632943
1255613	3821095	6643200	21669198	70888187	156632945
1552313	3821096	6643202	21669200	70888193	156632975
1561599	3821097	6643204	21669204	70888195	156633095
1770407	4103646	6643210	21669206	70888197	156633103
1864134	4103648	6643214	21669210	70888199	156633141
1864140	4103650	6643218	21669212	70888201	156633153
1864142	4103652	6643220	21669214	70888204	156633155
1864144	4103654	6643224	21669218	70888206	156633159

【０５３４】

【数１８】

2078365	4103656	6643226	21669220	70888208	156633171
2654039	4103658	6643230	21669222	70888210	156633179
2654043	4103660	6643232	21669224	70888212	156633199
2865485	4103672	6643238	21669226	70888216	156633203
3023094	4324023	6643240	21669228	70888218	156633209
3023096	4324025	6643242	21669230	70888220	156633211
3023098	4324029	6643244	21669232	70888222	156633225
3023100	4324031	6643248	21669234	70888224	156633229
3023102	4324037	6643250	21669236	70888228	156633237
3023104	4324039	6643254	21669238	70888230	156633241
3023106	4324043	6643256	21669240	70888232	156633245
3023108	4324047	6643258	21669242	70888234	156633253
3023110	4324055	6643268	21669244	70888236	156633255
3023112	4324057	6643272	21669248	70888238	156633267
3023114	4324061	6643274	21669252	70888240	156633283
3023116	4324063	6643276	21669254	70888242	157093725
3023118	4324067	6643278	21669256	70888244	170684323
3023120	4324069	6643280	21669260	70888246	170684325
3023122	4324073	6643282	21669262	70888248	170684329
3023126	4324075	6643286	21669264	70888250	170684331
3023130	4324077	6643290	21669266	70888252	170684333
3023132	4324085	6643292	21669268	70888254	170684335
3091153	4324087	6643294	21669270	70888258	170684339
3091155	4324089	6643296	21669272	70888260	170684341
3091157	4324091	6643302	21669274	70888262	170684345
3091159	4324093	6643304	21669276	70888264	170684349
3091161	4324097	6643308	21669278	70888266	170684351
3091163	4324103	6643314	21669280	70888268	170684355
3091165	4324107	6643318	21669288	70888270	170684363
3091167	4324111	6643328	21998780	70888272	170684365
3091169	4324113	6643344	21998782	70888274	170684369
3091171	4324115	6643352	21998784	70888276	170684371
3091173	4324117	6643354	21998786	70888278	170684373
3091175	4324123	6643358	21998792	70888280	170684375
3091177	4324125	6643360	21998794	70888282	170684379
3091179	4324127	6643362	21998800	70888284	170684381
3091181	4324139	6643366	21998802	70888286	170684385
3091183	4324145	6643368	21998804	70888288	170684387
3091185	4324151	6643374	23194484	70888290	170684389
3091187	4324155	6643376	23194488	70888292	170684397
3091191	4324157	6643378	23194492	70888294	170684405
3091193	4324159	6643382	23194496	70888296	170684407
3091195	4324163	6643386	23343556	70888304	170684409
3091197	4324169	6643390	24474079	70888306	170684411
3091201	4324175	6643392	27369031	71482628	170684417
3091203	4324177	6643402	27369033	71482632	170684419
3091205	4324181	6643416	27369035	77378177	170684423
3091207	4324187	6643418	27369037	77378188	170684425
3091209	4324189	6643424	27369045	77378257	170684427
3091213	4324193	6643428	27369047	77378266	170684429
3093861	4324197	6643436	27369051	77378268	170684431
3093863	4324199	6643446	27369053	77378270	170684433
3093865	4324205	6643448	27369058	77378273	170684439

【０５３５】

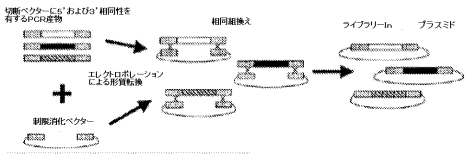
【数１９】

3093867	4324207	6643450	27369060	77378277	170684443
3093869	4324209	6643452	27369064	77378280	170684449
3093871	4324211	6643456	27369068	77378282	170684451
3093873	4324213	6643470	27369075	77378284	170684453
3093875	4324215	6643474	27369082	77378286	170684461
3093877	4324221	6643478	27369084	77378288	170684469
3093879	4324223	6643484	27369088	77378291	170684473
3093881	4324229	6643488	27818828	77378293	170684489
3093883	4324231	6643492	28394695	77378298	170684495
3093885	4324245	6643500	28394699	77378300	170684497
3093887	4324247	6643512	28394703	77378303	170684499
3093889	4324249	6643514	28394707	77378305	170684501
3093891	4324251	6643528	28394711	77378307	170684507
3093895	4324255	6643534	28394715	77378309	170684513
3093903	4324257	6643558	28848877	77378312	170684515
3142451	4324261	6643560	28848881	77378316	170684517
3142453	4324263	6643562	28848885	77378318	170684527
3142455	4324265	6643564	29342115	77378320	170684531
3142457	4324271	6643572	33304654	77378322	170684535
3142459	4324273	6643574	40647151	77378377	170684537
3142461	4324275	6643580	47271301	77378379	170684539
3142465	4324283	6643582	47271303	77378381	170684541
3142467	4324285	6643584	47271319	77378383	170684545
3142471	4468355	6643586	47271321	77378385	170684549
3142475	4468367	6643588	47271323	77378387	170684553
3142477	4468369	6643592	47271325	77378389	170684555
3142479	4468371	6643596	50199320	77378392	170684557
3142481	4565964	6643598	50199322	77378394	170684561
3142483	4565966	6643600	50199328	77378396	170684565
3142485	4565996	6643602	50199330	77378398	170684567
3142487	4566007	6643604	50199338	77378400	170684569
3142489	4566009	6643606	50199340	77378402	170684571
3142491	4566016	6643614	50871689	77379590	170684583
3142493	4566021	6643628	51103426	77379620	170684589
3142495	4566023	6643630	51103428	77379622	170684591
3142497	4566025	6649891	51103430	77379624	170684593
3142499	4566029	6649893	51103434	77379632	170684597
3142503	4566045	8920222	51103436	77379642	170684599
3142505	4566049	8920226	51103572	77379644	170684601
3142507	4566051	9864840	51103574	77379646	170684603
3142509	4566053	9968383	51103576	77379675	170684607
3142511	4566055	9968385	51103588	77379677	170684609
3142515	4566057	9968387	51103590	77379726	170684613
3142517	4566059	9968389	51103592	77379728	170684617
3142519	4566061	9968391	51103600	77379730	170684619
3142521	4566065	9968393	51103602	77379738	
3142527	4566074	9968395	51103606	77379740	

【図１】

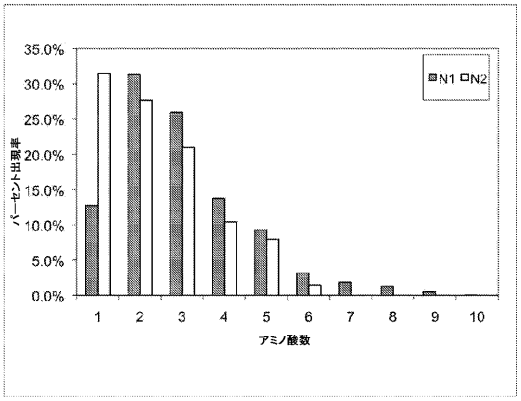
Figure 1

酵母の相同組換えによる構築



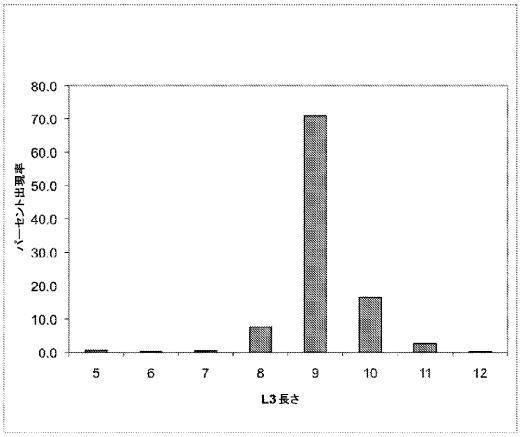
【図２】

Figure 2



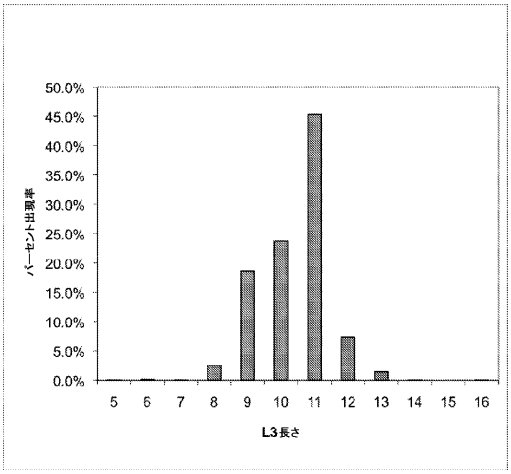
【図３】

Figure 3



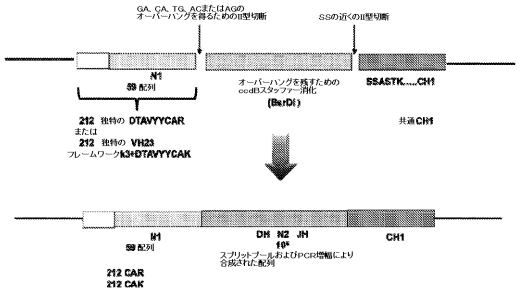
【図４】

Figure 4



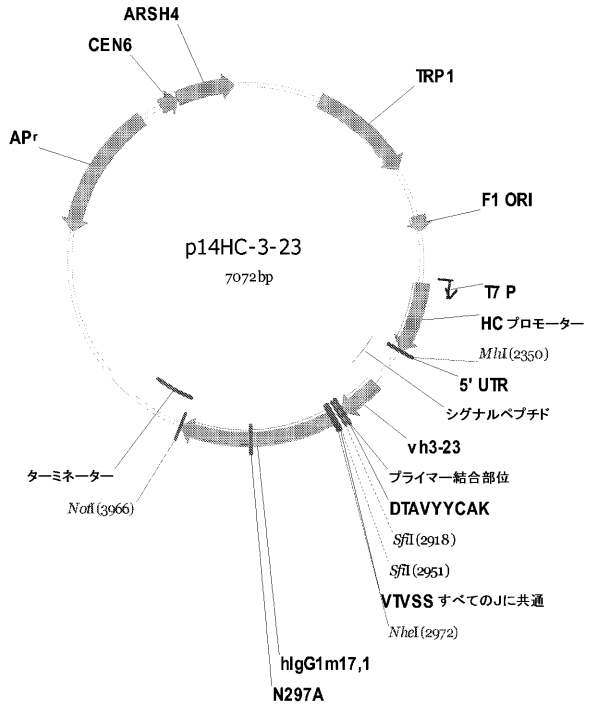
【図５】

Figure 5



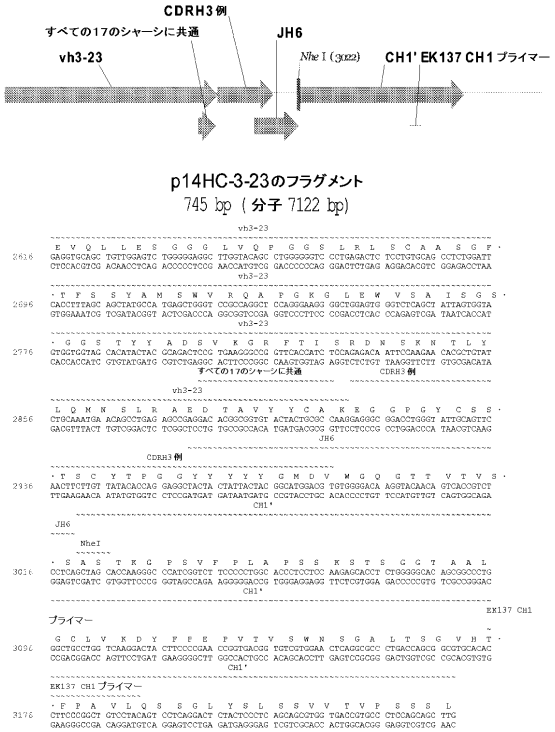
【図６】

Figure 6



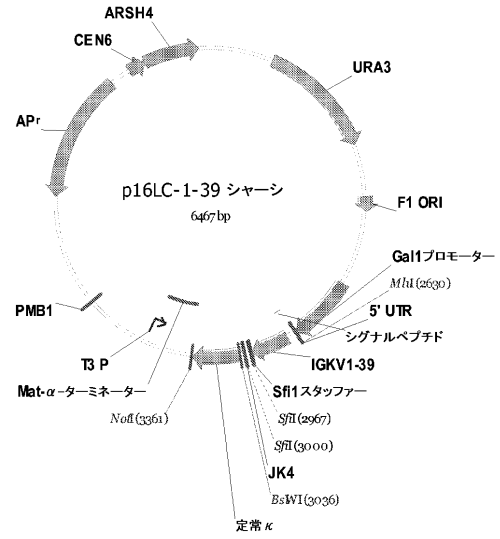
【図７】

Figure 7



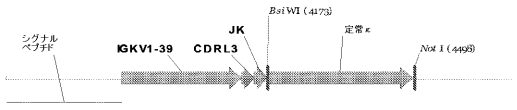
【図８】

Figure 8



【図９－１】

Figure 9

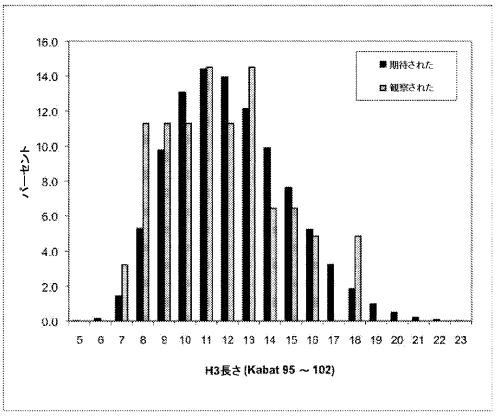


【図９－２】

```
                                定常κ
      ------------------------------------------------------------
      · K  A  D   Y  E  K   H  K  V  Y   A  C  E   V  T  H   Q  G  L  S   S  P  V   T  K  S
4395  CCAAGGCCGA CTACGAGAAG CATAAGGTGT ACCGCTGCGA GGTGACCCAC CAGGGCCTGT CCAGCCCTGT GACCAAGTCC
      GGTTCCGGCT GATGCTCTTC GTATTCCACA TGCGGACGCT CCACTGGGTG GTCCCGGACA GGTCGGGACA CTGGTTCAGG
      定常κ
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                  NotI
                                ~~~~~~~
       F  N  R  G   E  C  *
4475  TTCAACCGGG GCGAGTGCTA GGCGGGCGCA
      AAGTTGGCCC CGCTCACGAT CCGCCCGCGT
```

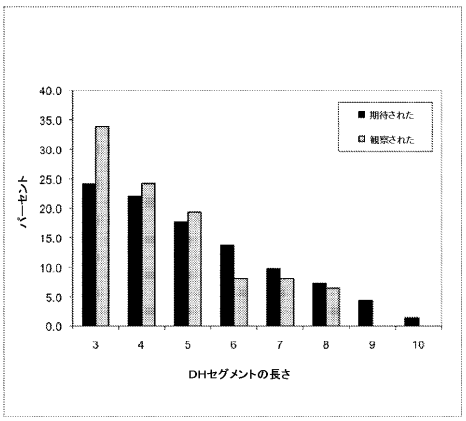
【図１０】

Figure 10



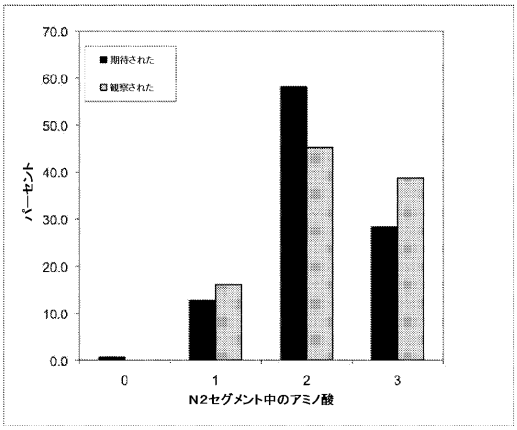
【図１１】

Figure 11



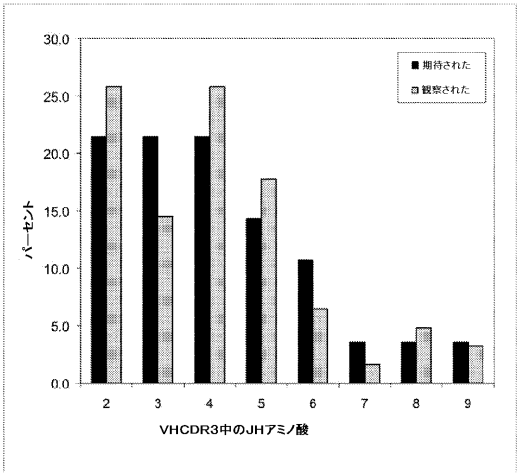
【図１２】

Figure 12



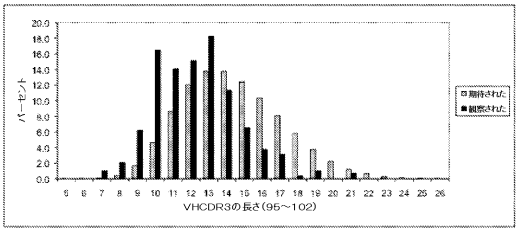
【図１３】

Figure 13



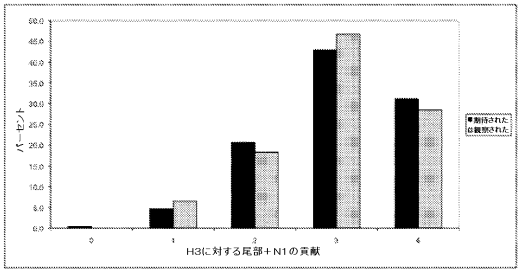
【図１４】

Figure 14



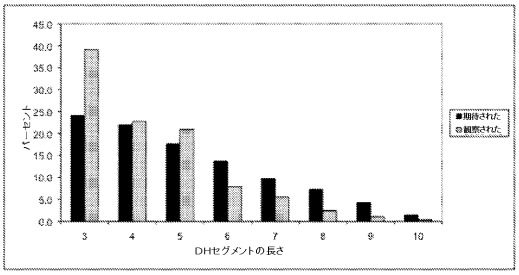
【図１５】

Figure 15



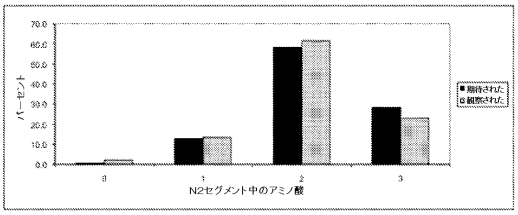
【図１６】

Figure 16



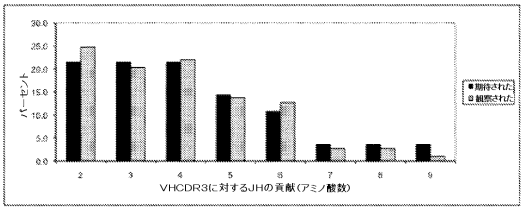
【図１７】

Figure 17



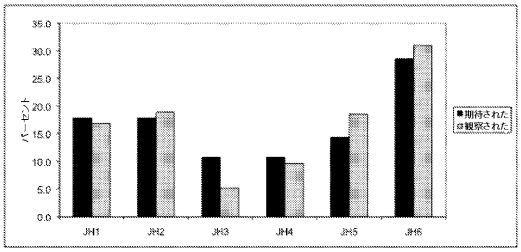
【図１８】

Figure 18



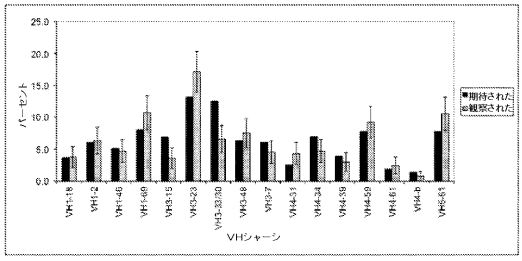
【図１９】

Figure 19



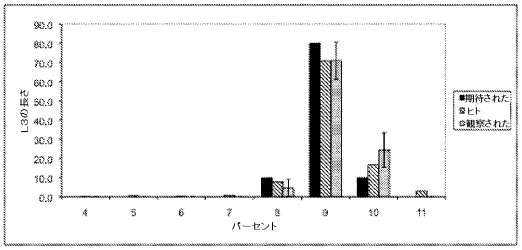
【図２０】

Figure 20



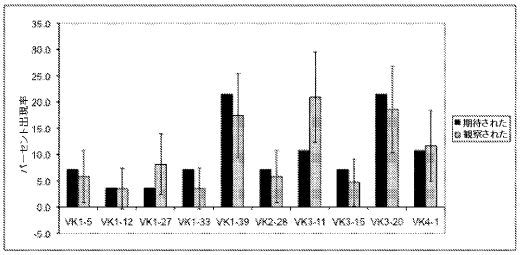
【図２１】

Figure 21



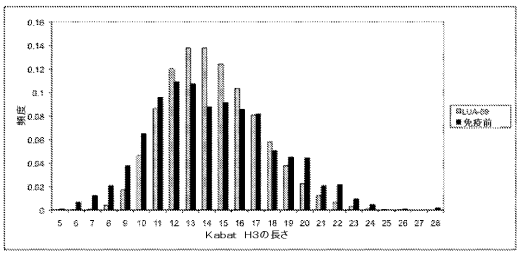
【図２２】

Figure 22



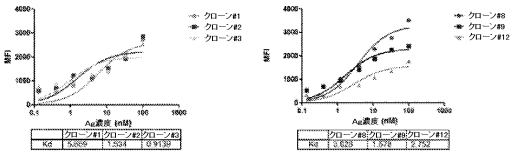
【図２３】

Figure 23



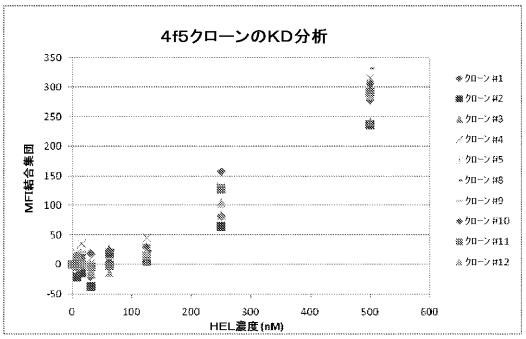
【図２４】

Figure 24



【図２５】

Figure 25



【手続補正書】
【提出日】平成22年6月15日(2010.6.15)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2010538656000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/076300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/00 C12N15/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUH GERMAINE: "Synthetic antibodies as therapeutics" EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, ASHLEY, LONDON, GB, vol. 7, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 73-87, XP009099132 ISSN: 1471-2598 pages 73-78 ----- -/--	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 April 2009	01/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Luyten, Kattie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/076300

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KNAPPIK A ET AL: "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 296, no. 1, 11 February 2000 (2000-02-11), pages 57-86, XP004461525 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
X	LEE C V ET AL: "High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 340, no. 5, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 1073-1093, XP004518119 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
X	FELLOUSE ET AL: "High-throughput Generation of Synthetic Antibodies from Highly Functional Minimalist Phage-displayed Libraries" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 373, no. 4, 19 August 2007 (2007-08-19), pages 924-940, XP022285568 ISSN: 0022-2836 the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
X	FELLOUSE FREDERIC A ET AL: "Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: A dominant role for tyrosine in antigen recognition" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US, vol. 101, no. 34, 24 August 2004 (2004-08-24), pages 12467-12472, XP002428966 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/076300

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FELLOUSE F A ET AL: "Molecular Recognition by a Binary Code" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 348, no. 5, 20 May 2005 (2005-05-20), pages 1153-1162, XP004870065 ISSN: 0022-2836 the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
X	SIDHU S S ET AL: "Phage-displayed Antibody Libraries of Synthetic Heavy Chain Complementarity Determining Regions" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 338, no. 2, 23 April 2004 (2004-04-23), pages 299-310, XP004500301 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
X	KRUIF DE J ET AL: "SELECTION AND APPLICATION OF HUMAN SINGLE CHAIN FV ANTIBODY FRAGMENTS FROM A SEMI-SYNTHETIC PHAGE ANTIBODY DISPLEY LIBRARY WITHDESIGNED CDR3 REGIONS" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 248, no. 1, 21 April 1995 (1995-04-21), pages 97-105, XP000646544 ISSN: 0022-2836 the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
X	WO 2007/056441 A (GENENTECH INC [US]; DENNIS MARK [US]; LIANG WEI-CHING [US]; WU YAN [US]) 18 May 2007 (2007-05-18) pages 98-105	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
P,X	WO 2008/053275 A (MORPHOSYS AG [DE]; ENZELBERGER MARKUS [DE]; THIEL STEFANIE [DE]) 8 May 2008 (2008-05-08) pages 26-50	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/076300

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JACKSON ET AL: "Identifying highly mutated IGHD genes in the junctions of rearranged human immunoglobulin heavy chain genes" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 324, no. 1-2, 2 July 2007 (2007-07-02), pages 26-37, XP022138110 ISSN: 0022-1759 cited in the application the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
A	LEE C E H ET AL: "Reconsidering the human immunoglobulin heavy-chain locus:; 1. An evaluation of the expressed human IGHD gene repertoire" IMMUNOGENETICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 57, no. 12, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 917-925, XP019331634 ISSN: 1432-1211 cited in the application the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71
A	ZEMLIN M ET AL: "Expressed Murine and Human CDR-H3 Intervals of Equal Length Exhibit Distinct Repertoires that Differ in their Amino Acid Composition and Predicted Range of Structures" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 334, no. 4, 5 December 2003 (2003-12-05), pages 733-749, XP004473368 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1,3-24, 26,28, 30,40, 41, 43-46, 48,49, 51-53, 55-57, 59-71

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/076300

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [ ] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. [X] Claims Nos.: 2, 25, 27, 29, 31, 42, 47, 50, 54 and 58
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 3-24, 26, 28, 30, 48-49, 51-53, 55-57, 59, 61-66, 70 (completely)
40-41, 43-46, 60, 67-69, 71 (partially)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008/076300

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2, 25, 27, 29, 31, 42, 47, 50, 54 and 58

Present claims 2, 25, 27, 29, 31, 42, 47, 50, 54 and 58 relate to an extremely large number of possible antibodies, well over a million. In order to complete a meaningfull search, the Examiner needs the sequences of all the possible CDRH3 sequences defined in said claims. Hence, a meaningfull search of said claims is not possible due to the absence of said sequences, nor practical due to the large number of putative sequences.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

International Application No. PCT/US2008/076300

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 3-24, 26, 28, 30, 48-49, 51-53, 55-57, 59, 61-66, 70 (all completely) and 40-41, 43-46, 60, 67-69, 71 (all partially)

a library of synthetic polynucleotides, wherein said polynucleotides encode antibody CDRH3 amino acid sequences, as defined in claim 1, and corresponding products and methods.

---

2. claims: 32-37 (all completely) and 40-41, 43-46, 60, 67-69, 71 (all partially)

a library of synthetic polynucleotides, wherein said polynucleotides encode antibody VKCDR3 amino acid sequences, as defined in claims 32 and 35, and corresponding products and methods.

---

3. claims: 38-39 (all completely) and 60, 71 (all partially)

a library of synthetic polynucleotides, wherein said polynucleotides encode antibody V CDR3 amino acid sequences, as defined in claim 38, and corresponding products and methods.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/076300

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007056441 A	18-05-2007	EP 1957531 A2	20-08-2008
WO 2008053275 A	08-05-2008	AU 2006350452 A1	08-05-2008
		CA 2634387 A1	08-05-2008
		CN 101389655 A	18-03-2009
		EP 1979378 A2	15-10-2008
		JP 2009519727 T	21-05-2009
		KR 20080080653 A	04-09-2008
		US 2009088346 A1	02-04-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フェルダウス, マイケル
アメリカ合衆国 ニュー ハンプシャー ０３７５３, グランサム, ノブ ヒル ４
(72)発明者 ゲルングロス, ティルマン ユー.
アメリカ合衆国 ニュー ハンプシャー ０３７５５, ハノーバー, パークウェイ ２
(72)発明者 ウィットラプ, ケー. デーン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４６７, チェストナット ヒル, ウッドローン ドライブ ４８

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 BA53 DA12 EA04 FA02 FA07 GA11 HA03
4B065 AA72X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44
4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 FA74