(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6974909号
(P6974909)
(45)発行日　令和3年12月1日(2021.12.1)　(24)登録日　令和3年11月9日(2021.11.9)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N 15/63	(2006.01)		C12N	15/63	ZNAZ
C40B 40/02	(2006.01)		C40B	40/02	
C12N 15/13	(2006.01)		C12N	15/13	
C40B 40/08	(2006.01)		C40B	40/08	
C40B 40/10	(2006.01)		C40B	40/10	

請求項の数 12　(全 51 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-513413(P2019-513413)
(86)(22)出願日　平成29年9月6日(2017.9.6)
(65)公表番号　特表2019-528712(P2019-528712A)
(43)公表日　令和1年10月17日(2019.10.17)
(86)国際出願番号　PCT/EP2017/072315
(87)国際公開番号　WO2018/046525
(87)国際公開日　平成30年3月15日(2018.3.15)
審査請求日　令和2年4月10日(2020.4.10)
(31)優先権主張番号　16187884.8
(32)優先日　平成28年9月8日(2016.9.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　591279294
イタルファルマコ　ソシエタ　ペル　アチオニ
ＩＴＡＬＦＡＲＭＡＣＯ　ＳＯＣＩＥＴＡ　ＰＥＲ　ＡＺＩＯＮＩ
イタリア共和国、２０１２６　ミラノ、ビアレ　フルビオ　テスチ　３３０
(74)代理人　110001243
特許業務法人　谷・阿部特許事務所
(72)発明者　アルミン　ラーム
イタリア　アイ－００１５３　ローマ　ピアッツァ　サンタ　マリア　リベラトリチェ　１８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】減少したコンビナトリアル冗長性及び最適化ループ長分布を有するＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の多様性ファミリーのメンバーを発現し、抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の前記ファミリーの多様性の少なくとも一部を発現する、全体の複雑さＣ＝１．３×１０^{10}のベクターのライブラリーであって、前記ベクターがＨＣ－ＣＤＲ３領域の前の位置９４及びＨＣ-ＣＤＲ３領域をコード化する多様なＤＮＡ配列を含み、

- 長さＬ＝７のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１０１及び１０２で、表３Ａに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ａは、長さＬ＝７を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ａ：

【表３Ａ】

92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(79.6%)	G(30.0%)	G(16.6%)	G(22.9%)	G(19.4%)	F(27.6%)	D(100.0%)	Y(68.0%)	W(100.0%)
		S(11.2%)	D(18.3%)	R(11.5%)	S(12.2%)	S(14.1%)	L(15.4%)		V(12.6%)	
		T(9.2%)	E(8.3%)	D(11.2%)	D(10.1%)	A(12.0%)	G(8.5%)		P(12.0%)	
			W(8.2%)	S(10.9%)	Y(7.7%)	Y(11.8%)	S(7.8%)		I(7.4%)	
			R(7.2%)	L(7.2%)	R(7.2%)	W(5.4%)	V(6.1%)			
			V(7.1%)	A(6.3%)	A(6.4%)	T(5.1%)	Y(6.0%)			
			A(6.5%)	V(5.6%)	T(5.5%)	V(4.9%)	I(5.0%)			
			L(6.0%)	P(5.3%)	V(5.2%)	R(4.5%)	P(4.5%)			
			S(5.2%)	T(4.5%)	N(4.0%)	P(4.5%)	A(4.2%)			
			Y(3.2%)	Y(4.4%)	P(4.0%)	L(4.0%)	D(3.1%)			
				N(3.5%)	L(3.9%)	D(3.8%)	T(2.8%)			
				E(3.3%)	E(3.5%)	N(3.0%)	N(2.5%)			
				W(3.0%)	W(3.4%)	E(2.8%)	R(2.1%)			
				K(2.6%)	I(1.7%)	F(1.9%)	W(1.8%)			
				F(2.2%)	F(1.6%)	I(1.7%)	E(1.8%)			
				I(1.9%)	K(0.7%)	K(1.1%)	K(0.7%)			

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝７を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が０．１％であり、

- 長さ８のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１及び１０２で、表３Ｂに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｂは、長さＬ＝８を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｂ：

【表３Ｂ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(84.1%)	G(25.5%)	G(15.3%)	G(21.7%)	G(26.8%)	G(17.5%)	F(36.1%)	D(100.0%)	Y(71.5%)	W(100.0%)
		T(8.2%)	D(24.1%)	S(11.9%)	S(15.3%)	S(12.7%)	A(14.3%)	L(11.0%)		P(10.6%)	
		S(7.8%)	E(10.5%)	R(11.6%)	A(7.8%)	Y(10.3%)	Y(13.2%)	G(7.4%)		I(9.3%)	
			V(9.3%)	L(9.0%)	R(7.4%)	D(7.5%)	S(10.5%)	Y(6.9%)		V(8.6%)	
			A(7.4%)	V(6.5%)	Y(6.7%)	A(6.9%)	W(6.9%)	S(5.6%)			
			S(6.9%)	A(6.3%)	D(6.6%)	R(6.1%)	L(5.6%)	I(5.6%)			
			R(6.8%)	D(6.2%)	V(5.6%)	T(5.4%)	T(5.5%)	V(5.5%)			
			L(6.0%)	P(6.0%)	T(5.4%)	W(4.5%)	V(4.5%)	P(4.6%)			
			T(3.5%)	Y(5.6%)	L(4.6%)	N(4.3%)	D(4.5%)	A(4.1%)			
				T(5.5%)	E(3.8%)	L(3.7%)	R(4.0%)	T(3.6%)			
				E(3.5%)	N(3.5%)	V(3.7%)	P(3.3%)	D(2.2%)			
				I(3.4%)	P(3.2%)	E(2.7%)	N(2.6%)	N(2.2%)			
				W(2.5%)	W(2.9%)	P(1.7%)	E(2.4%)	W(2.0%)			
				N(2.4%)	I(2.6%)	F(1.5%)	F(2.1%)	E(1.8%)			
				F(2.2%)	F(1.6%)	I(1.4%)	I(2.0%)	R(0.8%)			
				K(2.2%)	K(1.5%)	K(0.6%)	K(1.1%)	K(0.5%)			

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝８を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が１．０％であり、

- 長さＬ＝９のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１０１及び１０２で、表３Ｃに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｃは、長さＬ＝９を有するＨＣ-ＣＤＲ３に対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｃ：

【表３Ｃ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(85.7%)	G(26.3%)	G(19.8%)	G(19.9%)	G(18.6%)	G(21.6%)	G(17.4%)	F(65.4%)	D(100.0%)	Y(70.1%)	W(100.0%)
		S(7.5%)	D(21.5%)	R(11.1%)	S(13.8%)	S(15.5%)	Y(12.5%)	A(13.7%)	L(16.9%)		P(11.6%)	
		K(6.8%)	E(10.5%)	S(10.9%)	A(8.0%)	A(9.4%)	S(11.5%)	Y(12.8%)	Y(9.0%)		I(9.4%)	
			V(9.6%)	P(7.3%)	R(7.8%)	Y(8.8%)	A(8.4%)	S(9.9%)	I(8.8%)		V(8.8%)	
			A(9.3%)	L(7.0%)	Y(7.4%)	L(6.8%)	D(8.2%)	W(8.3%)				
			R(8.8%)	D(6.7%)	V(7.0%)	V(5.9%)	T(5.8%)	P(7.0%)				
			S(7.6%)	V(6.2%)	T(6.5%)	D(5.8%)	R(5.6%)	T(5.0%)				
			L(6.6%)	A(5.9%)	P(5.5%)	R(5.7%)	W(5.3%)	L(4.9%)				
				Y(5.7%)	D(5.4%)	T(5.3%)	N(5.1%)	D(4.6%)				
				T(4.8%)	L(4.4%)	W(4.1%)	L(4.9%)	V(4.3%)				
				I(3.7%)	I(3.3%)	P(3.7%)	V(3.5%)	R(3.2%)				
				E(3.6%)	E(3.2%)	E(3.3%)	E(2.5%)	E(2.8%)				
				K(2.6%)	W(3.0%)	N(2.6%)	P(2.2%)	N(2.4%)				
				N(2.5%)	F(2.5%)	F(2.3%)	F(1.7%)	F(1.9%)				
				W(2.2%)	N(2.3%)	I(2.3%)	K(1.3%)	I(1.7%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝９を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が２．５％であり、

- 長さＬ＝１０のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１００Ｂ、１０１及び１０２で、表３Ｄに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｄは、長さＬ＝１０を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｄ：

【表３Ｄ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(90.7%)	G(25.6%)	G(17.3%)	G(19.1%)	G(19.1%)	G(18.5%)	G(17.8%)	Y(17.7%)	F(76.2%)	D(100.0%)	Y(77.3%)	W(100.0%)
		K(9.3%)	D(23.7%)	R(12.8%)	S(13.7%)	S(15.5%)	S(13.6%)	Y(14.9%)	G(15.3%)	L(15.9%)		I(11.4%)	
			E(12.1%)	S(11.5%)	Y(8.7%)	A(9.8%)	Y(10.1%)	S(12.1%)	A(14.3%)	I(7.9%)		P(11.3%)	
			R(10.0%)	P(8.1%)	A(8.2%)	Y(9.2%)	A(9.9%)	D(9.4%)	W(7.9%)				
			V(9.9%)	L(7.9%)	R(7.8%)	V(7.6%)	T(7.4%)	A(7.5%)	P(7.7%)				
			A(9.5%)	V(6.4%)	V(6.9%)	D(5.7%)	L(6.1%)	T(5.7%)	S(7.5%)				
			S(9.2%)	D(5.8%)	D(6.5%)	T(5.5%)	V(5.9%)	N(5.5%)	L(5.0%)				
				A(5.8%)	T(6.3%)	R(5.5%)	D(5.8%)	W(5.3%)	T(4.6%)				
				Y(5.4%)	P(4.9%)	L(4.3%)	W(4.9%)	R(5.0%)	V(4.3%)				
				T(4.5%)	L(4.8%)	W(3.7%)	R(4.5%)	L(4.6%)	D(3.5%)				
				E(3.9%)	I(3.4%)	P(3.6%)	P(3.7%)	V(4.0%)	R(3.3%)				
				I(3.9%)	E(3.1%)	E(3.3%)	E(2.9%)	P(2.9%)	N(2.7%)				
				N(2.3%)	W(2.8%)	I(3.1%)	N(2.7%)	E(2.1%)	E(2.6%)				
				F(2.3%)	F(2.1%)	N(2.2%)	I(2.1%)	F(1.7%)	F(2.0%)				
				W(2.2%)	K(1.8%)	F(1.8%)	F(1.9%)	K(1.4%)	I(1.8%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝１０を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が１１．５％であり、

- 長さＬ＝１１のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１００Ｂ、１００Ｃ、１０１及び１０２で、表３Ｅに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｅは、長さＬ＝１１を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｅ：

【表３Ｅ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(87.7%)	G(28.8%)	G(19.1%)	G(18.9%)	G(19.4%)	G(20.8%)	G(16.5%)	Y(18.6%)	Y(18.8%)	F(77.3%)	D(100.0%)	Y(85.1%)	W(100.0%)
		K(12.3%)	D(27.3%)	R(12.5%)	S(14.1%)	S(16.6%)	S(16.4%)	S(14.5%)	G(17.0%)	G(16.8%)	L(15.2%)		P(14.9%)	
			E(11.5%)	S(10.9%)	Y(9.6%)	Y(12.1%)	A(10.6%)	Y(12.8%)	S(10.8%)	A(12.9%)	I(7.5%)			
			V(11.1%)	P(8.3%)	R(8.3%)	A(10.1%)	Y(10.5%)	A(9.0%)	D(8.0%)	W(9.7%)				
			A(11.0%)	L(8.0%)	A(7.4%)	V(7.0%)	V(7.0%)	T(7.1%)	N(6.4%)	P(8.1%)				
			R(10.4%)	Y(6.4%)	V(7.4%)	D(6.1%)	T(6.0%)	L(5.9%)	R(6.0%)	S(6.3%)				
				D(5.9%)	D(6.3%)	T(5.5%)	D(5.8%)	D(5.8%)	A(6.0%)	L(5.1%)				
				A(5.7%)	T(5.5%)	R(4.5%)	L(4.7%)	W(5.5%)	T(5.4%)	T(4.7%)				
				V(5.6%)	P(4.9%)	L(4.4%)	R(4.4%)	R(5.3%)	W(5.2%)	V(3.7%)				
				T(4.5%)	L(4.6%)	W(3.5%)	W(4.0%)	V(5.1%)	L(4.8%)	R(3.1%)				
				I(4.1%)	I(4.3%)	I(3.5%)	P(3.2%)	P(3.9%)	V(3.8%)	D(3.0%)				
				E(3.6%)	E(3.4%)	P(2.6%)	I(2.4%)	E(3.1%)	P(3.2%)	N(3.0%)				
				F(2.8%)	W(3.2%)	E(2.3%)	E(2.3%)	N(3.0%)	E(2.7%)	F(2.7%)				
				N(2.5%)	N(2.2%)	F(2.3%)	N(2.0%)	F(2.4%)	F(2.2%)	E(2.3%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝１１を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が２８．３％であり、

- 長さＬ＝１２のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１００Ｂ、１００Ｃ、１００Ｄ、１０１及び１０２で、表３Ｆに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｆは、長さＬ＝１２を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｆ：

【表３Ｆ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(33.2%)	G(18.5%)	G(19.7%)	G(18.1%)	G(19.2%)	G(19.9%)	G(15.2%)	Y(20.2%)	Y(22.6%)	F(86.5%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(28.8%)	R(14.4%)	S(12.6%)	S(17.5%)	S(18.8%)	S(16.6%)	S(14.8%)	G(17.9%)	G(17.0%)	L(13.5%)			
			E(13.4%)	P(9.9%)	Y(12.2%)	Y(12.1%)	Y(11.8%)	Y(12.4%)	Y(14.4%)	S(10.1%)	A(14.3%)				
			A(12.3%)	S(9.7%)	R(8.6%)	V(8.6%)	A(11.5%)	A(9.6%)	A(7.6%)	D(9.7%)	W(12.1%)				
			V(12.2%)	L(9.3%)	A(7.7%)	A(8.3%)	V(6.6%)	T(6.9%)	T(7.4%)	N(8.3%)	P(7.5%)				
				V(6.4%)	V(7.4%)	D(6.6%)	D(6.6%)	V(6.5%)	L(7.0%)	W(5.5%)	S(5.3%)				
				Y(5.8%)	D(6.3%)	T(5.8%)	T(5.8%)	D(5.3%)	W(5.8%)	R(5.3%)	L(4.1%)				
				A(5.5%)	T(5.4%)	R(5.2%)	L(4.5%)	W(5.1%)	R(5.6%)	T(5.3%)	T(4.0%)				
				D(5.4%)	L(5.2%)	L(4.6%)	R(4.2%)	L(4.9%)	P(5.4%)	A(4.8%)	V(3.1%)				
				T(4.6%)	I(4.5%)	I(3.9%)	W(3.7%)	R(4.2%)	V(5.4%)	P(3.8%)	D(2.8%)				
				E(4.0%)	P(4.4%)	W(3.3%)	I(2.7%)	P(3.7%)	D(5.1%)	L(3.5%)	R(2.5%)				
				I(3.9%)	E(3.4%)	P(3.2%)	N(2.3%)	I(2.4%)	N(3.4%)	V(3.1%)	F(2.3%)				
				K(2.8%)	W(2.7%)	E(2.6%)	P(2.1%)	E(2.4%)	E(3.1%)	E(2.5%)	N(2.2%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝１２を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が１９．８％であり、

- 長さＬ＝１３のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１００Ｂ、１００Ｃ、１００Ｄ、１００Ｅ、１０１及び１０２で、表３Ｇに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｇは、長さＬ＝１３を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｇ：

【表３Ｇ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(40.5%)	G(17.6%)	G(20.8%)	G(17.1%)	G(20.0%)	G(19.4%)	G(19.5%)	Y(18.9%)	Y(24.9%)	Y(22.8%)	F(100.0%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(32.2%)	R(16.0%)	S(12.2%)	S(16.0%)	S(18.5%)	S(17.6%)	S(15.8%)	G(16.5%)	G(18.2%)	G(20.3%)				
			V(13.9%)	P(12.1%)	R(11.4%)	Y(14.5%)	Y(13.4%)	Y(13.9%)	Y(15.2%)	S(14.1%)	D(10.6%)	A(15.4%)				
			A(13.4%)	S(10.9%)	Y(10.7%)	V(9.0%)	A(9.8%)	A(9.9%)	A(8.4%)	L(7.5%)	N(9.4%)	W(14.5%)				
				L(10.4%)	A(7.9%)	A(8.3%)	V(7.8%)	V(7.2%)	V(7.2%)	T(7.3%)	S(9.2%)	P(6.8%)				
				A(7.1%)	V(7.8%)	D(7.7%)	D(6.4%)	D(7.2%)	T(7.1%)	P(6.6%)	W(6.0%)	S(5.2%)				
				V(6.2%)	D(6.9%)	R(7.1%)	T(5.6%)	T(6.7%)	R(6.1%)	A(6.5%)	R(5.0%)	L(4.1%)				
				Y(5.8%)	L(6.4%)	T(5.8%)	L(5.2%)	L(6.0%)	L(5.7%)	R(6.5%)	T(4.7%)	V(3.2%)				
				D(4.8%)	P(5.6%)	I(5.2%)	R(5.1%)	W(4.8%)	W(5.6%)	V(5.7%)	A(4.2%)	T(3.0%)				
				T(4.7%)	T(5.5%)	L(4.8%)	W(4.3%)	R(4.2%)	D(5.6%)	D(5.2%)	P(3.9%)	R(2.7%)				
				I(4.3%)	I(4.8%)	P(4.5%)	I(3.8%)	P(3.2%)	P(3.9%)	W(5.2%)	L(3.8%)	D(2.2%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝１３を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が１７．７％であり、

- 長さＬ＝１４のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１００Ｂ、１００Ｃ、１００Ｄ、１００Ｅ、１００Ｆ、１０１及び１０２で、表３Ｈに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｈは、長さＬ＝１４を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｈ：

【表３Ｈ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(45.4%)	G(21.9%)	G(20.5%)	G(20.0%)	G(20.5%)	G(21.6%)	G(20.3%)	Y(21.3%)	Y(26.0%)	Y(30.1%)	Y(25.1%)	F(100.0%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(38.2%)	R(16.4%)	S(13.4%)	Y(15.7%)	S(19.8%)	S(20.1%)	S(18.5%)	G(20.1%)	G(16.3%)	G(18.3%)	G(23.0%)				
			E(16.4%)	P(12.4%)	Y(12.9%)	S(15.7%)	Y(15.7%)	Y(13.7%)	Y(17.1%)	S(16.2%)	S(14.2%)	D(12.2%)	A(16.4%)				
				L(11.6%)	R(12.6%)	D(9.9%)	A(9.5%)	A(10.4%)	A(9.3%)	T(7.8%)	P(9.0%)	N(9.9%)	W(14.7%)				
				S(10.7%)	V(9.1%)	V(9.3%)	V(8.9%)	V(8.7%)	T(8.3%)	A(7.8%)	L(8.2%)	S(9.2%)	P(6.7%)				
				A(7.6%)	L(8.5%)	R(8.4%)	D(7.0%)	D(7.7%)	V(8.1%)	V(7.3%)	R(7.3%)	W(6.0%)	S(4.4%)				
				Y(7.4%)	A(8.2%)	A(8.3%)	T(6.9%)	L(6.3%)	D(6.6%)	P(6.7%)	T(7.1%)	R(5.5%)	L(4.2%)				
				V(6.6%)	P(7.8%)	T(6.5%)	R(6.3%)	T(6.3%)	L(5.9%)	L(6.5%)	A(6.6%)	P(4.6%)	V(2.9%)				
				T(5.4%)	D(7.1%)	L(6.2%)	L(5.4%)	W(5.3%)	W(5.9%)	R(6.3%)	V(5.5%)	A(4.2%)	T(2.6%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝１４を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が１３．１％であり、

- 長さＬ＝１５のＨＣ-ＣＤＲ３ループの場合、前記配列がカバト位置の９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１００Ａ、１００Ｂ、１００Ｃ、１００Ｄ、１００Ｅ、１００Ｆ、１００Ｇ、１０１及び１０２で、表３Ｉに定義されるアミノ酸組成と各アミノ酸の相対頻度を含み、ここで、表３Ｉは、長さＬ＝１５を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成であり、各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されており、

表３Ｉ：

【表３Ｉ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(54.1%)	G(20.8%)	G(23.7%)	Y(19.4%)	G(21.0%)	G(22.2%)	S(23.4%)	G(23.5%)	Y(28.4%)	Y(34.3%)	Y(35.1%)	G(27.3%)	F(100.0%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(45.9%)	R(19.6%)	Y(17.2%)	G(17.9%)	S(19.9%)	S(21.4%)	G(21.6%)	Y(21.3%)	G(19.3%)	G(15.5%)	G(16.9%)	Y(23.5%)				
				P(14.2%)	R(13.7%)	S(17.2%)	Y(17.7%)	Y(15.1%)	Y(14.9%)	S(19.2%)	S(15.7%)	S(14.0%)	D(11.9%)	W(16.5%)				
				L(12.1%)	S(12.6%)	D(10.6%)	V(9.6%)	V(10.0%)	V(8.8%)	T(7.7%)	R(8.0%)	L(8.4%)	N(11.9%)	A(16.4%)				
				S(10.9%)	V(9.0%)	V(9.9%)	A(9.5%)	A(9.2%)	T(8.6%)	A(7.7%)	A(7.5%)	P(8.3%)	S(8.3%)	P(6.4%)				
				V(7.6%)	L(8.1%)	R(9.0%)	D(8.5%)	D(8.3%)	A(8.4%)	V(7.2%)	P(7.3%)	T(6.8%)	W(6.0%)	S(4.0%)				
				Y(7.5%)	P(7.9%)	A(8.5%)	R(7.0%)	T(6.9%)	D(7.6%)	D(6.9%)	T(6.9%)	R(6.7%)	R(5.2%)	L(3.5%)				
				A(7.3%)	D(7.8%)	T(7.5%)	L(6.8%)	L(6.8%)	L(6.7%)	L(6.5%)	L(6.8%)	A(6.0%)	P(4.6%)	T(2.4%)				

ベクターのライブラリーにおける長さＬ＝１５を有するＨＣ-ＣＤＲ３ループの分率ｐ（Ｌ）が６．０％である、ベクターのライブラリー。

【請求項２】

前記抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、１以上の定常領域を含む抗体、一本鎖抗体、ＦＡＢ断片、重鎖のみの抗体又は可変重鎖のみのドメインから選択される抗体又はその断片である、請求項１に記載のベクターのライブラリー。

【請求項３】

前記抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、ヒト抗体生殖細胞系列の可変セグメントを含む、請求項１又は２に記載のベクターのライブラリー。

【請求項４】

前記抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、ヒト生殖細胞系列の配列を含有するヒト抗体ＶＫ１軽鎖可変領域及びヒト生殖細胞系列の配列を含有するヒト抗体ＶＨ３重鎖可変領域を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のベクターのライブラリー。

【請求項５】

ＶＫ１κ軽鎖可変領域が配列番号３及び配列番号４のヒト生殖細胞系列の配列を含有し、軽鎖ＣＤＲ３領域が配列番号５の配列を含有し、ＶＨ３重鎖可変領域が配列番号１及び配列番号２のヒト生殖細胞系列の配列を含有する、請求項４に記載のベクターのライブラリー。

【請求項６】

ヒト生殖細胞系列の配列を含むＶＨ３重鎖可変領域が、配列番号６のリンカーと共に、ヒト生殖細胞系列の配列を含むヒト抗体ＶＫ１κ軽鎖可変領域に連結されることを特徴とする、請求項４に記載のベクターのライブラリー。

【請求項７】

前記ライブラリーを産生するのに使用されるベースベクターが配列番号８を有することを特徴とする、請求項１～６のいずれか一項に記載のベクターのライブラリー。

【請求項８】

標的抗原に対する選択のための請求項１～７のいずれか一項に記載のベクターのライブラリー。

【請求項９】

前記ライブラリーが標的抗原に対する選択のためのファージ上にディスプレイされることを特徴とする、請求項８に記載のベクターのライブラリー。

【請求項１０】

前記ライブラリーがＨＣ－ＣＤＲ３領域及びＨＣ－ＣＤＲ３の前の位置に限定された多様性を有することを特徴とする、請求項１～９のいずれか一項に記載のベクターのライブラリー。

【請求項１１】

ＨＣ-ＣＤＲ３ループの長さが９～１１であることを特徴とする、請求項１に記載のベ

クターのライブラリー。

【請求項１２】

ＨＣ-ＣＤＲ３ループの長さが１１であることを特徴とする、請求項１に記載のベクターのライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、長さを変化したヒトＨＣ－ＣＤＲ３領域を含むベクターのライブラリーを提供し、このライブラリーでは、前記ライブラリーの多様性がＨＣ－ＣＤＲ３領域のみにフォーカスされており、多様性は、冗長性（redundancy）が短いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対して減少され、より長いループ長に対するＨＣ－ＣＤＲ３領域の変異の対象範囲が増加するように最適化されている。本発明のライブラリーは、標的抗原に対する選択用のファージ上でディスプレイされる。

【背景技術】

【０００２】

全ヒト抗体（Green, 2014（非特許文献１））を提供するｉｎ　ｖｉｖｏでのディスカバリープラットホームの最近の進展にもかかわらず、組換え抗体ライブラリーは、特に、ｉｎ　ｖｉｖｏでの試みが失敗に終わるか、又は抗体の性質に起因して実施するのが不可能である困難な標的に対して、重要な相補的アプローチの代表であり続けている。組み換え抗体ライブラリーは、多くのレイアウト及びフォーマットで記述されている（Mondon et al., 2008）（非特許文献２）。ライブラリーは、６ループ領域、即ち相補性決定領域（ＣＤＲｓ）までの範囲内で連続的により複雑な変化を組み合わせて、通常コンビナトリアル形式で無作為に構築される。最も大きな変化は、一般に、天然の抗体に存在する最も可変で重要なＣＤＲセグメントである、重鎖（ＨＣ）可変領域のＣＤＲ３領域（ＨＣ－ＣＤＲ３）に誘導される（Togegawa, 1983（非特許文献３）；Chothia et al,. 1989（非特許文献４））。

【０００３】

ＨＣ－ＣＤＲ領域について、組み換え抗体ライブラリーに移植されたループ長分布（ライブラリーに存在する各ループ長のパーセンテージ）は、通常、天然の抗体で観測されるもの、即ち、１２の長さのＨＣ－ＣＤＲループの周りに最大値を有する、ほぼベル型の分布を示す分布を反映する（Zemlin et al., 2003（非特許文献５））。いくつかの例外はあるが（例えば、Fellouse et al., 2007（非特許文献６）；Mahon et al., 2013（非特許文献７））、組み換え抗体ライブラリーは、このベル型分布に（ほぼ）従って設計されてきた。これは、複雑さの高いライブラリー（10^{9}～10^{10}以上の全複雑さ）がコンビナトリアル形式で生成される場合に、重要な意義を有する。より短いＨＣ－ＣＤＲ３ループからの変異は、長いＨＣ－ＣＤＲ３ループからの変異よりも多く表れる（実際には、全ての変異が存在するか、数回存在しさえする）。これは、後者について、すべての可能な変異がほんのわずかしか存在しないからである。ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して一定の長さ分布（全てのＨＣ－ＣＤＲ３長がライブラリーで等しい割合で存在する）を使用すると、より短いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対して冗長性がさらに増加し（これらの分率（percent fraction）は天然抗体に対して観測されるベル型分布に比較して高い。）、長いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する可能な変異の全対象範囲がわずかに増加し、中間の長さのＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する対象範囲が減少する。

【０００４】

治療剤として既に承認されているか又は臨床開発中の抗体の全数は、着実に増加している。ＣｈＥＭＢＬデータベース（https://www.ebi.ac.uk/chembl/（非特許文献８））の調査は、天然のヒト抗体で観測された滑らかなベル型の長さ分布と異なるが、マウス抗体のそれとも異なるＨＣ－ＣＤＲ３長１０で明確な最大値を有する。従って、長さ１０のＨＣ－ＣＤＲ３ループは、治療抗体の候補を単離しようと意図されたライブラリー内で特によく表れる。より短いＨＣ－ＣＤＲ３ループを有する抗体は、よく発現し、製品の開発を

成功させるのに重要な特性である低い凝集の傾向を示すようである。

【０００５】

ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーが種々の状況で生成される（Barbas et al., 1992（非特許文献９）；Braunagel et al., 1997（非特許文献１０）；Pini et al., 1998（非特許文献１１）；Hoet et al., 2005（非特許文献１２）；Silacci et al., 2005（非特許文献１３）；Mahon et al., 2013（非特許文献７）；ＵＳ２００６／０２５７９３７Ａ１（特許文献１））が、多くの組み換え抗体ライブラリーは、ＨＣ－ＣＤＲ３領域だけでなく、５つの他のＣＤＲ領域の１つ以上にも多様性を導入する（例えば、Knappik et al., 2000（非特許文献１４）；Prassler et al., 2013（非特許文献１５））。種々のＣＤＲ領域に存在する多様性は、次に、全体の多様性が最も低いＣＤＲ領域で通常開始されるライブラリーのクローニングの間に、完全に無作為な形式で組み合わされる。いくらかの冗長性と重複（duplicates）が存在しうる短いＨＣ－ＣＤＲ３ループを除いて、各ＨＣ－ＣＤＲ３領域の変異は、ライブラリーで１度だけ存在する特有のものと考える必要がある。結果として、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループの変異は、適合性についての任意の構造的又は機能的選択をされることなく、他のＣＤＲ領域からの完全に無作為な変異の組み合わせと「対応付けられる」ことになる。他のＣＤＲ領域が生殖細胞系列の配列によって、又は単一のコンセンサス配列（例えば軽鎖ＣＤＲ３領域に対して）によって表れる状況と比較して、他（５種類のうちの１つ）のＣＤＲ領域からの変異の無作為な選択と組み合わされた特定のＨＣ－ＣＤＲ３の変異を有することには利点がない。従って、ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーは、追加の多様性を持ったライブラリーと比較して、良いか又はよりよく機能すべきである。唯一の例外は、短いＨＣ－ＣＤＲ３ループであり、この場合、冗長性（ライブラリーに１コピーを超えて変異が存在する）ために、非常に制限された数の、他のＣＤＲｓにおける変化の組み合わせが探索される。即ち、同じＨＣ－ＣＤＲ３の変異が複数回存在し、それぞれが、他のＣＤＲ領域において異なる変異の組み合わせを有するものが探索される。しかし、ＨＣ－ＣＤＲ３の変異がこれらの組み合わせの１０のみと組み合わされるためには、ＨＣ－ＣＤＲ３領域の重複（duplication）レベルも１０あたりでなければならない。短いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対してさえ、これは、ほとんどのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して非実用的である１０の因子によって、ライブラリー内のそのループ長の割合を増加することを意味する。ライブラリー、例えばＬＣ－ＣＤＲ３に存在する追加の多様性を効果的に探索するためには、例えば、数パーセントの全ライブラリーを表す特定の長さを有するＨＣ－ＣＤＲ３ループが、かなり高い２桁の分率（percent fraction）で存在する必要がある。これは、単一のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して達成することがすでに困難であることに加え、全てのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長からの変異が他のＣＤＲ領域中の制限された数の変異をも効果的に兼ね備えたライブラリーを生成することは不可能である。１つのケース（Mahon et al., 2013（非特許文献７））では、ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーの性能が、対応するＨＣ－ＣＤＲ３ライブラリー及びＬＣ－ＣＤＲ３ライブラリーと比較された。ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーは優れた特性を示したが、著者らは、ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーに都合のよい「コンビナトリアル効果（combinatorial effect）」を完全に認めておらず、ＨＣ－ＣＤＲ３ライブラリーのよりよい性能を、ＬＣ－ＣＤＲ３及びＨＣ－ＣＤＲ３ライブラリーにおけるＬＣ－ＣＤＲ３とＨＣ－ＣＤＲ３の多様性の間の可能な構造的不親和性にあるとした。

【０００６】

ＨＣ－ＣＤＲ３の多様性の設計が天然の抗体で観測される位置ごとのアミノ酸頻度に基づく組み換え抗体ライブラリーは、所望のアミノ酸分布の適切な表現のみを可能にし、望まないＣｙｓ及びストップコドンを生じる、標準の変性オリゴヌクレオチドを用いるか（例えば、Philibert et al., 2007（非特許文献１６）、或いは、多様性がトリマーブロック（三量体ブロック（trimer block））をコード化するアミノ酸の混合物を通して導入されているオリゴヌクレオチドによって、生成されている（Braunagel et al., 1997（非特許文献１０）；Knappik et al., 2000（非特許文献１４）；Prassler et al, 2013（非特許文献１５）；Mahon et al, 2013（非特許文献７）；ＵＳ２００６／０２５７９３７Ａ

１（特許文献１）、ＥＰ１９７９３７８Ｂ１（特許文献２））。

【０００７】

しかし、これらの例の何れも、特定のＨＣ－ＣＤＲ３長に対するライブラリー内に実際に存在する異なる変異の数に関連し、ライブラリーの設計によって定義される理論的に可能な数の変異に比較された全ライブラリーの一定の割合（フラクション（fraction））を表すコンビナトリアル効果を正しく認識していない。ベル型をした「天然様」ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布の存在下で、コンビナトリアル効果は、短いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する変異の過剰表現と、長いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する非常に小さい対象範囲を導く。ＵＳ２００６／０２５７９３７Ａ１（特許文献１）は、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長（８、１０、１３、１４、１５、１７、１８、１９）の制限された範囲をカバーするライブラリーの設計、並びに、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ位置でのアミノ酸組成が、１９種の異なるアミノ酸の固定した当モル混合物に対応するか、或いは特定の位置に対して、即ち全てのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して無差別に、いくつかのアミノ酸の固定した混合物に制限されることのみを記載している。ＥＰ１９７９３７８Ｂ１（特許文献２）は、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長が３つの変化した長さ範囲に分割され、各々の範囲が、定義されたアミノ酸組成（多様性因子と呼ばれる）を有するものであるライブラリーの設計を記載している。種々のＨＣ－ＣＤＲ３ループ位置に対する一定の長さ範囲内で全てのＨＣ－ＣＤＲ３ループのアミノ酸組成を表す多様性因子は、Ｋａｂａｔ位置９５～１０２を含む。ＨＣ－ＣＤＲ３内の各位置又は位置の範囲に対して、多様性因子はアミノ酸のサブセットに特定の頻度で割り当てられるが、残りのアミノ酸は全て（Ｃｙｓを除く）、アミノ酸のサブセットのみが存在する位置１０１及び１０２の他は、固定した頻度で含まれる。従って、全てのアミノ酸（Ｃｙｓを除く）が、ほぼ全てのＨＣ－ＣＤＲ３ループ位置で、及び全てのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して種々の頻度で存在するので、この設計は、莫大な数の理論的に可能な変異を生じる。中間の長さのＨＣ－ＣＤＲ３ループ（例えば、長さ９、１０、１１）に対してさえ、１０^{10}の全複雑さのライブラリーに存在する変異の実際の数は、設計に従ったすべての可能な変異のほんのわずかである。

【０００８】

約１０^{12}の全体にわたる総複雑さまで、合成ＣＤＲ３の多様性を取り込んだ組み換えヒト抗体ライブラリーが生成されており（Knappik et al., 2000（非特許文献１４）、Prassler et al., 2011（非特許文献１７））、実際の応用において成果（特定の標的に対する抗体の選択）が立証されており、これは、とてつもない大きさのためであるかもしれない。しかし、このようなサイズのライブラリーの生成は、かなりの努力を必要とし、経済的コストも高くなる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】米国特許出願公開第２００６／０２５７９３７Ａ１号明細書

【特許文献２】欧州特許第１９７９３７８Ｂ１号明細書

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Green, 2014

【非特許文献２】Mondon et al., 2008

【非特許文献３】Togegawa, 1983

【非特許文献４】Chothia et al,. 1989

【非特許文献５】Zemlin et al,. 2003

【非特許文献６】Fellouse et al., 2007

【非特許文献７】Mahon et al., 2013

【非特許文献８】https://www.ebi.ac.uk/chembl/

【非特許文献９】Barbas et al., 1992

【非特許文献１０】Braunagel et al., 1997

【非特許文献１１】Pini et al., 1998
【非特許文献１２】Hoet et al., 2005
【非特許文献１３】Silacci et al., 2005
【非特許文献１４】Knappik et al., 2000
【非特許文献１５】Prassler et al., 2013
【非特許文献１６】Philibert et al., 2007
【非特許文献１７】Prassler et al., 2011
【非特許文献１８】Kabat, 1983
【非特許文献１９】Chothia & Lesk, 1987
【非特許文献２０】Lppolito et al., 2012
【非特許文献２１】Huang et al. 1996
【非特許文献２２】de Waldt et al., 1999
【非特許文献２３】DeKosky et al.,2013
【非特許文献２４】Glanville et al., 2010
【非特許文献２５】Ewert et al., JMB 2003
【非特許文献２６】McCafferty et al., 1994

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

従って、最適化された特性、即ち治療抗体への更なる発展に向けた良好な候補クローンを選択するための高い可能性を有し、受け入れ可能な実験的な努力と受け入れ可能な経済的コストをもたらすヒト抗体ライブラリーを設計することの必要性が存在する。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】ループ長５～２０に対する重鎖ＣＤＲ３領域のカバト（Kabat）番号付けの図である。ＨＣ－ＣＤＲ３領域が示されており、ＨＣ－ＣＤＲ３領域の部分である残基に灰色の影をつけている。ＨＣ－ＣＤＲ３領域の前及び後の、カバト位置９２、９３、９４、及び、１０３、１０４で、それぞれ、最も頻繁に観測されるアミノ酸（ＣＡＲ及びＷＧ）が報告される。

【図２】天然抗体で観測されるＨＣ－ＣＤＲ３ループ長の分布である。

【図３】ＨＣ－ＣＤＲ３領域を置き換えるスタッファー要素を含む一本鎖骨格（scaffold）の配列である。Ｐｓｔｌ／Ｓｔｙｌでの消化によりスタッファーを除去し、ＨＣ－ＣＤＲ３多様性を含有するオリゴヌクレオチドの挿入を可能にする。特有の制限酵素認識部位（restriction site）は配列中にアンダーラインで示した。可変軽鎖のＣＤＲ１及びＣＤＲ３領域の位置も示さている。

【図４】ＨＣ－ＣＤＲ３多様性を含有するオリゴヌクレオチドの挿入後の一本鎖骨格の重鎖を示す概略図である。

【図５】ＨＣ－ＣＤＲ３多様性を含有するオリゴヌクレオチド内の１を超えるアミノ酸を有する位置で多様性を生じるのに使用される、コドンをコード化するトリマーブロックの表である。

【図６】ファージミドベクターである、ベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿Ｖ２２の概略図である。

【図７】ファージミドベクターである、ベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿Ｖ２２であって、特有の制限酵素認識部位を有するものを示す概略図である。

【図８－１】承認された又は臨床用に開発された治療抗体のＨＣ－ＣＤＲ３配列及びＨＣ－ＣＤＲ３ループ長である。

【図８－２】承認された又は臨床用に開発された治療抗体のＨＣ－ＣＤＲ３配列及びＨＣ－ＣＤＲ３ループ長である。

【図８－３】承認された又は臨床用に開発された治療抗体のＨＣ－ＣＤＲ３配列及びＨＣ－ＣＤＲ３ループ長である。

【図８－４】承認された又は臨床用に開発された治療抗体のＨＣ－ＣＤＲ３配列及びＨＣ－ＣＤＲ３ループ長である。
【図８－５】承認された又は臨床用に開発された治療抗体のＨＣ－ＣＤＲ３配列及びＨＣ－ＣＤＲ３ループ長である。
【図９】承認された又は臨床用に開発された治療抗体及び天然抗体におけるＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布の比較である。天然抗体に対するパーセント値は４～１９の長さで再正規化（トータルで１００％まで）されている。
【図１０】承認された又は臨床用に開発された治療抗体のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長、天然抗体、及び最適化されたライブラリー設計におけるループ長分布の比較である。天然抗体に対するパーセント値は５～１９の長さで再正規化（トータルで１００％まで）されている。
【図１１－１】ループ長１５に対するＨＣ－ＣＤＲ３多様性をコード化するオリゴヌクレオチドである。１を超えるアミノ酸が存在する位置では、個々のトリマーブロックの相対頻度を含むトリマーブロックの混合物が示される。Ｐｓｔｌ又はＳｔｙｌ制限酵素認識部位を含有するオリゴヌクレオチドの部分は灰色で示されている。
【図１１－２】ループ長１５に対するＨＣ－ＣＤＲ３多様性をコード化するオリゴヌクレオチドである。１を超えるアミノ酸が存在する位置では、個々のトリマーブロックの相対頻度を含むトリマーブロックの混合物が示される。Ｐｓｔｌ又はＳｔｙｌ制限酵素認識部位を含有するオリゴヌクレオチドの部分は灰色で示されている。
【図１２Ａ】ライブラリーからのＢＳＡ特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×10^5）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＢＳＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３３）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１２の陽性クローンの特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。
【図１２Ｂ】ライブラリーからのＢＳＡ特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×10^5）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＢＳＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３３）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１２の陽性クローンの特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。
【図１２Ｃ】ライブラリーからのＢＳＡ特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×10^5）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＢＳＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３３）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１２の陽性クローンの特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。
【図１２Ｄ】ライブラリーからのＢＳＡ特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×10^5）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＢＳＡ

及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＢＳＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３３）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１２の陽性クローンの特異性を、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１３Ａ】ライブラリーからのオバルブミン（ＯＶＡ）特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な冨化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＯＶＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１６６）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１３Ｂ】ライブラリーからのオバルブミン（ＯＶＡ）特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な冨化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＯＶＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１６６）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１３Ｃ】ライブラリーからのオバルブミン（ＯＶＡ）特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な冨化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＯＶＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１６６）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１３Ｄ】ライブラリーからのオバルブミン（ＯＶＡ）特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な冨化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＯＶＡについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１６６）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１４Ａ】ライブラリーからのＤｓｇ１特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な冨化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、商業的に利用可能なＤｓｇ１を予めコーティングしたウェル及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＤｓｇ１を予めコーティングしたウェルについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１０２）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、Ｄｓｇ１及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳ

Ａによって試験した。

【図１４Ｂ】ライブラリーからのＤｓｇ１特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、商業的に利用可能なＤｓｇ１を予めコーティングしたウェル及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＤｓｇ１を予めコーティングしたウェルについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１０２）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、Ｄｓｇ１及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１４Ｃ】ライブラリーからのＤｓｇ１特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、商業的に利用可能なＤｓｇ１を予めコーティングしたウェル及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＤｓｇ１を予めコーティングしたウェルについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１０２）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、Ｄｓｇ１及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１４Ｄ】ライブラリーからのＤｓｇ１特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、商業的に利用可能なＤｓｇ１を予めコーティングしたウェル及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＤｓｇ１を予めコーティングしたウェルについてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１０２）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）１０の陽性クローンの特異性を、Ｄｓｇ１及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１５Ａ】ライブラリーからのＦＧＦＲ４特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＦＧＦＲ－４についてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３４）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）２０の陽性クローンの特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１５Ｂ】ライブラリーからのＦＧＦＲ４特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＦＧＦＲ－４についてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３４）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）２０の陽性クローンの特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１５Ｃ】ライブラリーからのＦＧＦＲ４特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ

）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＦＧＦＲ－４についてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３４）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）２０の陽性クローンの特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【図１５Ｄ】ライブラリーからのＦＧＦＲ４特異的Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンの単離。Ａ）３ラウンドのパニングを実施し、相対的な富化を入力／出力（ＩＮＰＵＴ／ＯＵＴＰＵＴ）比(全ｔ．ｕ．×１０^{5}）として表した。Ｂ）ポリクローナルファージ混合物（Ｉ～ＩＩＩラウンドの選択から溶離されたファージからなるサブライブラリー）の特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。Ｃ）ＩＩＩラウンドから単離された単クローンのＦＧＦＲ－４についてのＥＬＩＳＡアッセイ。破線は、特異性（ＯＤ＝０．１３４）を決定するために使用される計算したカットオフを示す。Ｄ）２０の陽性クローンの特異性を、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

定義

特に定義しない限り、本明細書で使用される、全ての技術用語、表記及び科学用語は、本開示が関連する当業者によって一般に理解される意味を有すると解釈される。いくつかの場合、一般的に解釈される意味を有する用語は、明確性のために、及び／又は、素早く参照するために本明細書で定義される。従って、本明細書にこのような定義を含めることが当分野で一般に理解されている事項を越えた実質的な違いを表す、と理解されるべきではない。

【００１４】

本明細書において、用語「ライブラリーの複雑さ」は、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長から独立して、ライブラリーに存在する変異の総数をいう。

【００１５】

本明細書において、用語「多様性」は、１つ以上の位置での１を超えるアミノ酸の存在をいう。

【００１６】

本明細書において、用語「冗長性（redundancy）」は、定義された長さを有するＨＣ－ＣＤＲ３ループについて変異がライブラリー内に表れる平均回数をいう。

【００１７】

用語「ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリー」について、発明者らは、ＨＣ－ＣＤＲ３領域内及びＨＣ－ＣＤＲ３領域の前のカバト位置９４のみの変異を有するライブラリー、並びに、他の５つのＣＤＲ領域、即ちＨＣ－ＣＤＲ１、ＨＣ－ＣＤＲ２、ＬＣ－ＣＤＲ１、ＬＣ－ＣＤＲ２及びＬＣ－ＣＤＲ３の変異を全く有しないライブラリーを意図する。

【００１８】

本明細書で使用される用語「抗体断片」又は「機能性断片」は、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ‘）２、Ｆａｂ’、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆｃ部分を含む一本鎖、ナノボディ、及び可変フレームワーク領域以外の骨格（scaffold）を有する他の抗体様構造などの、任意の抗体結合性断片を含む。用語「機能性断片」は、抗体の任意の部分であって、目的の抗原に結合する能力を保持しているものを含むが、これに限定されない。

【００１９】

本明細書において、用語「生殖細胞系列」は。親から子へ受け継がれる抗体又はその機能性断片をコード化する核酸配列をいう。

【００２０】

本明細書において「可変重鎖及び可変軽鎖の組み合わせ」又は「ＶＨ／ＶＬの組み合わせ」は、１つの可変重鎖及び１つの可変軽鎖の組み合わせをいう。抗体又は機能性抗体断片は、可変軽鎖に結合した少なくとも１つの可変重鎖であって、抗原結合領域を形成するものを含む。

【００２１】

本明細書において、用語「可変領域（variable domain）」、軽鎖可変領域（ＶＬ）又は重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗原と接触し、「相補性決定領域」又は「ＣＤＲｓ」といわれる３つの超可変領域を含有する免疫グロブリンの領域をいう（Kabat, 1983（非特許文献１８）; Chothia & Lesk, 1987（非特許文献１９）。

【００２２】

本明細書において、ＨＣ－ＣＤＲ３及びＬＣ－ＣＤＲ３は、それぞれ、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の第三の相補性決定領域をいう。

【００２３】

本明細書において、用語「カバト命名法」は、カバトによって１９８３年に定義されたＶＬ又はＶＨ領域の残基の番号付けの体系をいい、図１のＶＨ領域のＣＤＲ３領域について系統的に示されている。ＶＨ領域及びＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する残基の番号付けは、本開示の全体を通して、カバト命名法という。

【００２４】

本明細書において、用語「変異体（variant）」は、ライブラリー内のすべての他の抗体又は抗体断片のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する抗体又は抗体断片をいう。

【００２５】

本明細書において，用語「最適化されたコドン」又は「コドンの最適化」は、コード化されたアミノ酸配列が同じまま残されるように変化されるが、個々のアミノ酸をコード化するコドンが特定の宿主、例えば細菌細胞中でコード化されたタンパク質の発現を最適化するように変化されている核酸配列をいう。

【００２６】

本明細書で使用される用語「ライブラリー」は、ファージディスプレイ、リボソームティスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ及び哺乳動物ディスプレイのライブラリーを含むが，これらに限定されない。本発明の好ましい実施形態では、ファージディスプレイライブラリーを使用する。

【００２７】

使用される用語「ディスプレイベクター（display vector）」は、組み換えＤＮＡで形質転換された、細菌性宿主細胞などの宿主細胞内で、染色体外で（extra chromosomally）、組み換えＤＮＡ分子の複製及び維持を指令する能力を有するＤＮＡ配列を含む。このようなＤＮＡ配列は当分野で周知である。

【００２８】

本発明によれば、ディスプレイベクターは、例えば、ｆｄ、Ｍ１３、又はｆ１糸状バクテリオファージの組から生じるファージベクター又はファージミドベクターでありうる。このようなベクターは、糸状バクテリオファージの表面でのタンパク質のディスプレイを促進することができる。

【００２９】

本明細書において、用語「抗体関連ペプチド」は、抗体に由来する構造ドメインを含有し、共有結合できるか、ジスルフィド結合できるか又は複合体として会合できる１以上の抗体ドメインを含むことができるペプチドをいう。

【００３０】

本明細書で使用される、用語「遺伝子パッケージ（genetic package）」は、複製可能な遺伝子ディスプレイパッケージであって、粒子がその表面でポリペプチドをディスプレイするものをいう。このパッケージは、バクテリオファージであって、その表面で抗原結合ドメインをディスプレイするものである。抗原結合ドメインが抗体関連ペプチドに対応

する場合、このタイプのパッケージはファージ抗体と称される。

【００３１】

本発明の説明

本発明は、最適化された特性を有する異なるヒト抗体ＨＣ－ＣＤＲ３領域の収集物であって、多様性が、所望のライブラリーの複雑さの全体において、ライブラリー内のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布の変化、及び、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループの各位置でのアミノ酸の多様性の変化を可能にする方法を通して設計されるものを提供する。

【００３２】

特に、本発明は、受け入れ可能な実験的努力及び低費用で得られる、最適化された特性、即ち、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布の最適化による低下したコンビナトリアル冗長性（重複変異の存在）を有するヒト抗体ライブラリーを生じる。

【００３３】

上記の利点は、驚くべきことに、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ及びＨＣ－ＣＤＲ３領域の前の位置にのみ多様性を限定することによって得られ、これによって、冗長性が全てのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長について受け入れ可能なレベル（２未満）に減少し、９～１１のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長についての変異がライブラリー中で特によく表れるようになる。

【００３４】

本発明のライブラリーは、従って、承認された治療抗体又は臨床開発中の抗体でしばしば観測されるＨＣ－ＣＤＲ３ループ長を特によく表すという利点を有する。

【００３５】

実施例４に開示されるライブラリーの設計の最適化の方法を適用することで、冗長性（重複変異の存在）の所望の閾値を、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して調節することができる。

【００３６】

同時に、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長の対象範囲（ライブラリー中に実際に存在する特定のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対するすべての可能な変異の割合）は、ライブラリー全体にわたる複雑さによって決定される制限の範囲内で、特に注目される１以上のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長について最適化されうる。

【００３７】

従って、複雑さＣ全体にわたるベクター又は遺伝子パッケージのライブラリーであって、抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の多様性ファミリーのメンバーをディスプレイ及び発現するか、又はこれを含むもの、及び、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部をディスプレイ及び発現するか、又はこれを含むものを生じることが、本発明の目的である。ここで、当該ベクター又は遺伝子パッケージは、ＨＣ－ＣＤＲ３領域及びＨＣ－ＣＤＲ３領域の前の位置をコード化するＤＮＡ配列であって、以下の配列を含む。

$ZX_1Y_nX_3X_4X_5$

（式中、

$C = 1.3 \times 10^{10}$

Ｚはカバト位置９４に対応し、

X_1はカバト位置９５に対応し、

ｎは３～１１の整数であり、

Ｙは、ＨＣカバト位置の９６～９８（ｎ＝３）、又はＨＣカバト位置の９６～９９（ｎ＝４）、又はＨＣカバト位置の９６～１００（ｎ＝５）、又はＨＣカバト位置の９６～１００ａ（ｎ＝６）、又はＨＣカバト位置の９６～１００ｂ（ｎ＝７）、又はＨＣカバト位置の９６～１００ｃ（ｎ＝８）、又はＨＣカバト位置の９６～１００ｄ（ｎ＝９）、又はＨＣカバト位置の９６～１００ｅ（ｎ＝１０）、又はＨＣカバト位置の９６～１００ｆ（ｎ＝１１）に対応し、

X_3は、ＨＣカバト位置の９９（ｎ＝３）、又はＨＣカバト位置の１００（ｎ＝４）、又はＨＣカバト位置の１００ａ（ｎ＝５）、又はＨＣカバト位置の１００ｂ（ｎ＝６）、又はＨＣカバト位置の１００ｃ（ｎ＝７）、又はＨＣカバト位置の１００ｄ（ｎ＝８）

、又はＨＣカバト位置の１００ｅ（ｎ＝９）、又はＨＣカバト位置の１００ｆ（ｎ＝１０）、又はＨＣカバト位置の１００ｇ（ｎ＝１１）に対応し、

X_4はＨＣカバト位置１０１に対応し、

X_5はＨＣカバト位置１０２に対応し、

各$ZX_1Y_nX_3X_4X_5$領域の分率（percentage fraction）ｐ（Ｌ）（Ｌ＝ｎ＋４）が表２Ｃに与えられる値に従って、ライブラリーに存在することで特徴づけられ、

長さＬ＝ｎ＋４の各ＨＣ－ＣＤＲ３領域に対する位置Ｚ、X_1、X_2、X_3、X_4、X_5及びY_n（ｎ＝３～１１）が、表３Ａ～３Ｉに開示された相対頻度に従って定義されるアミノ酸によって占められることを特徴とする。）

【００３８】

好ましい実施形態では、前記抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、ヒト由来である。

【００３９】

さらなる実施形態では、前記抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は猫又は犬由来である。

【００４０】

本発明のベクター又は遺伝子パッケージのライブラリーの更に好ましい実施形態では、ＨＣ－ＣＤＲ３ループの長さは９～１１の範囲である。本発明の実施形態では、抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、抗体又はその断片であり、１以上の定常領域を含む抗体、一本鎖抗体、ＦＡＢ断片、重鎖のみの抗体又は可変重鎖のみのドメインから選択される。

【００４１】

好ましくは、前記抗体又はその断片は、一本鎖抗体である。

【００４２】

更なる実施形態では、本発明に従った抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、ヒト抗体の生殖細胞系列可変セグメントを含む。

【００４３】

本発明の更なる実施形態では、前記ＨＣ－ＣＤＲ３のみの領域は、ヒト重鎖及び軽鎖の生殖細胞系列可変領域によって特徴づけられる定常一本鎖骨格に導入され、軽鎖ＣＤＲ領域は長さ９である。

【００４４】

前記配列は、天然のヒト抗体中の軽鎖ＣＤＲ３の９個の位置の各々で最も頻繁に観測されるそれらのアミノ酸を表す。

【００４５】

一本鎖骨格内の生殖細胞系列の可変領域の配列を使用することは、これらの配列が体細胞突然変異を含有せず、従って、免疫原性を小さくしてヒト対象での臨床試験中に、引き続いて起こるヒトの抗ヒト抗体応答を観測する可能性を減少することが期待される。

【００４６】

本発明の好ましい実施形態では、抗体関連ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質は、ヒト生殖細胞系列の配列を含有するヒト抗体ＶＫ１軽鎖可変領域、及びヒト生殖細胞系列の配列を含有するヒト抗体ＶＨ３重鎖可変領域を含む。

【００４７】

好ましくは、前記ＶＫ１κ軽鎖可変領域は配列番号３及び配列番号４のヒト生殖細胞系列の配列を含有し、軽鎖ＣＤＲ３領域は配列番号５の配列を含有し、ＶＨ３重鎖可変領域は配列番号１及び配列番号２のヒト生殖細胞系列の配列を含有する。

【００４８】

本発明に従ったベクター又は遺伝子パッケージのライブラリーの更に好ましい実施形態では、ヒト生殖細胞系列の配列を含むＶＨ３重鎖可変領域は、配列番号６のリンカーを有するヒト生殖細胞系列の配列を含むヒトＶＫ１κ軽鎖可変領域に連結される。

【００４９】

更なる実施形態によれば、本発明のライブラリーを産生するために使用されるベースベクターは、配列番号８を有する。

【００５０】

更なる実施形態では、本発明に従ったベクター又は遺伝子パッケージのライブラリーは、標的抗原に対する抗体の選択に使用される。

【００５１】

好ましくは、前記ライブラリーは、標的抗原に対する選択のためのファージ上にディスプレイされる。

【００５２】

本発明によれば、ベクター又は遺伝子パッケージのライブラリーは、ＨＣ－ＣＤＲ３領域に、及びＨＣ－ＣＤＲ３の前の位置に限定された多様性を有する。

【００５３】

ＨＣ－ＣＤＲ３の多様性を導入したライブラリー及び本発明の方法は、以下の実施例によってより完全に説明される。しかし、このような実施例は例示のために与えれ、制限のために与えられるものでないことに注意すべきである。

【実施例】

【００５４】

実施例１　天然抗体由来の可変領域の配列及び長さの変化の分析

ＨＣ－ＣＤＲ３ループ領域に対するハイ－スループット次世代配列決定データをＮＣＢＩ　ＳＲＡアーカイブＳＲＲ４００１５８（Lppolito et al., 2012（非特許文献２０））からダウンロードし、カバト命名法（図１）に従ってコード化されたＨＣ－ＣＤＲ３ループの長さ及びアミノ酸組成（図２）について試験した。ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布はループ長１２で最大値を有する（図２）。天然抗体由来の７～１５のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対する各ループ位置におけるアミノ酸組成は表１ａ～１ｉに示されている。

【００５５】

表１ａ．　天然抗体の長さ７のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００５６】

【表１ａ】

92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103
C(100.0%)	A(84.5%)	R(63.4%)	G(25.4%)	G(15.7%)	G(22.1%)	G(18.7%)	F(25.6%)	D(56.5%)	Y(47.3%)	W(100.0%)
	T(5.2%)	S(8.9%)	D(15.5%)	R(10.8%)	S(11.8%)	S(13.7%)	L(14.3%)	S(8.0%)	V(8.8%)	
	V(3.3%)	T(7.3%)	E(7.0%)	D(10.5%)	D(9.7%)	A(11.6%)	G(7.9%)	G(6.5%)	P(8.3%)	
	S(2.8%)	K(5.8%)	W(7.0%)	S(10.2%)	Y(7.4%)	Y(11.4%)	S(7.3%)	T(3.5%)	I(5.2%)	
	G(2.2%)	A(4.6%)	R(6.1%)	L(6.8%)	R(6.9%)	W(5.2%)	V(5.6%)	N(3.4%)	G(4.8%)	
	N(0.6%)	G(2.4%)	V(6.0%)	A(6.0%)	A(6.2%)	T(4.9%)	Y(5.6%)	Y(3.0%)	S(4.2%)	
	I(0.4%)	V(1.3%)	A(5.5%)	V(5.3%)	T(5.3%)	V(4.7%)	M(5.2%)	A(2.7%)	L(3.8%)	
	E(0.3%)	H(1.1%)	L(5.1%)	P(5.0%)	V(5.0%)	R(4.4%)	I(4.7%)	V(2.5%)	A(3.1%)	
	K(0.3%)	L(1.0%)	S(4.4%)	T(4.2%)	N(3.9%)	P(4.3%)	P(4.2%)	E(2.5%)	N(2.6%)	
	R(0.2%)	I(0.8%)	Y(2.7%)	Y(4.1%)	P(3.8%)	L(3.8%)	A(3.9%)	L(1.8%)	D(2.5%)	
	M(0.1%)	E(0.7%)	Q(2.6%)	N(3.3%)	L(3.7%)	D(3.7%)	D(2.9%)	P(1.7%)	H(2.1%)	
	D(0.1%)	N(0.7%)	T(2.4%)	E(3.1%)	E(3.4%)	N(2.9%)	T(2.6%)	R(1.5%)	F(1.9%)	
		P(0.5%)	H(2.3%)	W(2.8%)	W(3.3%)	E(2.7%)	N(2.4%)	W(1.3%)	T(1.7%)	
		W(0.3%)	I(2.0%)	K(2.4%)	I(1.6%)	F(1.8%)	R(1.9%)	H(1.1%)	R(1.5%)	
		M(0.3%)	P(1.6%)	H(2.4%)	F(1.5%)	I(1.7%)	E(1.7%)	I(1.1%)	C(0.7%)	
		C(0.3%)	N(1.3%)	Q(2.2%)	Q(1.5%)	Q(1.5%)	W(1.7%)	F(1.0%)	K(0.5%)	
		D(0.2%)	F(1.1%)	F(2.1%)	H(1.1%)	H(1.1%)	H(0.9%)	Q(0.8%)	E(0.3%)	
		Q(0.2%)	K(1.1%)	I(1.8%)	M(0.8%)	K(1.1%)	Q(0.7%)	K(0.3%)	Q(0.3%)	
		Y(0.1%)	M(0.8%)	M(1.2%)	K(0.7%)	M(0.7%)	K(0.7%)	M(0.3%)	W(0.3%)	
		F(0.1%)	C(0.2%)	C(0.1%)	C(0.2%)	C(0.1%)	C(0.5%)	C(0.1%)	M(0.1%)	

【００５７】

表１ｂ．　天然抗体の長さ８のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００５８】

【表１ｂ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
C(100.0%)	A(88.0%)	R(70.0%)	G(21.0%)	G(14.3%)	G(20.6%)	G(25.8%)	G(16.6%)	F(33.4%)	D(66.1%)	Y(54.8%)	W(100.0%)
	T(5.3%)	T(6.8%)	D(19.8%)	S(11.1%)	S(14.6%)	S(12.3%)	A(13.6%)	L(10.2%)	G(6.6%)	P(8.2%)	
	V(4.0%)	S(6.5%)	E(8.6%)	R(10.8%)	A(7.4%)	Y(9.9%)	Y(12.5%)	G(6.8%)	S(3.4%)	I(7.1%)	
	G(1.1%)	K(5.7%)	V(7.7%)	L(8.4%)	R(7.0%)	D(7.2%)	S(10.0%)	Y(6.4%)	Y(2.9%)	V(6.6%)	
	S(0.8%)	G(2.5%)	A(6.1%)	V(6.0%)	Y(6.3%)	A(6.6%)	W(6.5%)	S(5.2%)	L(2.2%)	S(3.6%)	
	N(0.2%)	A(2.2%)	S(5.7%)	A(5.8%)	D(6.2%)	R(5.9%)	L(5.3%)	I(5.2%)	N(2.2%)	D(3.1%)	
	I(0.2%)	H(1.2%)	R(5.5%)	D(5.8%)	V(5.3%)	T(5.2%)	T(5.2%)	V(5.1%)	T(2.0%)	L(3.0%)	
	E(0.2%)	I(1.1%)	L(4.9%)	P(5.6%)	T(5.2%)	W(4.3%)	V(4.3%)	M(4.9%)	V(1.9%)	H(2.6%)	
	M(0.1%)	V(1.1%)	H(3.2%)	Y(5.3%)	L(4.4%)	N(4.2%)	D(4.2%)	P(4.3%)	A(1.8%)	N(2.0%)	
	R(0.1%)	L(0.6%)	T(2.9%)	T(5.1%)	E(3.6%)	L(3.6%)	R(3.8%)	A(3.8%)	R(1.8%)	F(1.9%)	
	K(0.1%)	Y(0.4%)	Q(2.8%)	E(3.3%)	N(3.3%)	V(3.5%)	P(3.1%)	T(3.3%)	P(1.5%)	G(1.7%)	
		P(0.3%)	W(2.5%)	I(3.1%)	P(3.0%)	E(2.6%)	N(2.5%)	D(2.0%)	E(1.5%)	T(1.2%)	
		Q(0.3%)	Y(2.2%)	Q(2.9%)	W(2.8%)	P(1.6%)	E(2.3%)	N(2.0%)	F(1.4%)	A(1.1%)	
		M(0.3%)	I(1.8%)	W(2.3%)	I(2.5%)	H(1.5%)	F(2.0%)	W(1.9%)	I(1.1%)	R(1.0%)	
		C(0.2%)	N(1.4%)	H(2.3%)	Q(2.1%)	F(1.5%)	I(1.9%)	E(1.7%)	H(1.0%)	E(0.6%)	
		N(0.2%)	P(1.3%)	N(2.2%)	H(1.7%)	I(1.4%)	H(1.7%)	H(1.2%)	Q(0.8%)	C(0.6%)	
		W(0.2%)	F(1.1%)	F(2.1%)	F(1.5%)	Q(1.4%)	Q(1.5%)	C(0.8%)	W(0.7%)	W(0.4%)	
		E(0.2%)	K(0.6%)	K(2.0%)	K(1.4%)	M(0.9%)	K(1.1%)	R(0.8%)	K(0.5%)	Q(0.3%)	
		F(0.1%)	M(0.5%)	M(1.0%)	M(0.9%)	K(0.5%)	M(1.0%)	Q(0.6%)	M(0.2%)	M(0.2%)	
			C(0.4%)	C(0.3%)	C(0.1%)	C(0.1%)	C(0.8%)	K(0.4%)	C(0.1%)	K(0.1%)	

【００５９】

表１ｃ．　天然抗体の長さ９のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰s色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００６０】

【表１ｃ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	101	102	103
C(100.0%)	A(90.9%)	R(72.7%)	G(20.6%)	G(18.3%)	G(18.5%)	G(17.5%)	G(20.4%)	G(16.5%)	F(41.2%)	D(74.0%)	Y(57.3%)	W(100.0%)
	T(4.2%)	S(6.4%)	D(16.9%)	R(10.3%)	S(12.9%)	S(14.6%)	Y(11.8%)	A(12.9%)	L(10.6%)	G(5.8%)	P(9.5%)	
	V(2.7%)	K(5.7%)	E(8.2%)	S(10.1%)	A(7.5%)	A(8.8%)	S(10.9%)	Y(12.1%)	M(5.8%)	S(2.4%)	I(7.7%)	
	G(1.0%)	T(5.1%)	V(7.5%)	P(6.7%)	R(7.3%)	Y(8.2%)	A(7.9%)	S(9.4%)	Y(5.7%)	V(2.1%)	V(7.2%)	
	S(0.6%)	G(2.1%)	A(7.3%)	L(6.5%)	Y(6.9%)	L(6.4%)	D(7.7%)	W(7.8%)	I(5.6%)	Y(1.9%)	L(3.2%)	
	D(0.2%)	A(1.4%)	R(6.9%)	D(6.2%)	V(6.5%)	V(5.6%)	T(5.5%)	P(6.6%)	V(4.9%)	L(1.7%)	S(2.5%)	
	E(0.1%)	H(1.4%)	S(6.0%)	V(5.8%)	T(6.1%)	D(5.5%)	R(5.3%)	T(4.7%)	G(4.3%)	N(1.6%)	H(2.5%)	
	I(0.1%)	L(0.9%)	L(5.2%)	A(5.4%)	P(5.1%)	R(5.3%)	W(5.0%)	L(4.7%)	P(3.9%)	A(1.5%)	D(2.3%)	
	N(0.1%)	V(0.8%)	H(4.2%)	Y(5.3%)	D(5.0%)	T(5.0%)	N(4.8%)	D(4.3%)	S(3.6%)	T(1.4%)	N(1.8%)	
	M(0.1%)	I(0.8%)	Q(3.2%)	T(4.5%)	L(4.1%)	W(3.9%)	L(4.7%)	V(4.0%)	A(2.9%)	E(1.4%)	F(1.5%)	
		N(0.7%)	T(2.9%)	I(3.4%)	I(3.1%)	P(3.5%)	V(3.3%)	R(3.0%)	T(2.6%)	R(1.0%)	G(1.1%)	
		E(0.3%)	Y(2.2%)	E(3.3%)	E(3.0%)	E(3.1%)	E(2.3%)	E(2.6%)	N(1.5%)	P(0.9%)	T(1.1%)	
		Q(0.3%)	I(1.9%)	Q(2.6%)	Q(2.8%)	N(2.4%)	P(2.1%)	N(2.3%)	W(1.4%)	I(0.9%)	A(0.6%)	
		Y(0.3%)	P(1.7%)	K(2.5%)	W(2.8%)	F(2.2%)	F(1.6%)	H(2.0%)	D(1.3%)	Q(0.9%)	R(0.6%)	
		C(0.3%)	W(1.7%)	N(2.3%)	F(2.4%)	I(2.1%)	H(1.5%)	F(1.8%)	R(1.2%)	H(0.7%)	C(0.4%)	
		M(0.2%)	F(1.4%)	W(2.0%)	N(2.2%)	Q(1.9%)	Q(1.3%)	I(1.6%)	H(1.0%)	F(0.6%)	Q(0.3%)	
		P(0.2%)	N(0.8%)	F(2.0%)	K(1.5%)	H(1.5%)	K(1.2%)	Q(1.0%)	E(1.0%)	W(0.4%)	E(0.2%)	
		W(0.2%)	K(0.7%)	H(1.8%)	H(1.3%)	M(1.4%)	M(1.2%)	K(0.8%)	C(0.6%)	K(0.3%)	W(0.1%)	
		D(0.1%)	M(0.5%)	M(0.9%)	M(0.9%)	K(0.9%)	I(1.2%)	C(0.8%)	Q(0.5%)	M(0.2%)	K(0.1%)	
		F(0.1%)	C(0.3%)	C(0.2%)	C(0.1%)	C(0.2%)	C(0.3%)	M(0.7%)	K(0.5%)	C(0.2%)		

【００６１】

表１ｄ．　天然抗体の長さ１０のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００６２】

【表１ｄ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103
C(100.0%)	A(92.0%)	R(72.3%)	G(18.4%)	G(15.8%)	G(17.8%)	G(18.1%)	G(17.5%)	G(16.8%)	Y(16.5%)	F(48.4%)	D(79.0%)	Y(59.4%)	W(100.0%)
	T(4.2%)	K(7.4%)	D(17.0%)	R(11.7%)	S(12.8%)	S(14.7%)	S(12.9%)	Y(14.0%)	G(14.3%)	L(10.1%)	G(5.1%)	I(8.8%)	
	V(2.2%)	S(6.6%)	E(8.7%)	S(10.5%)	Y(8.1%)	A(9.2%)	Y(9.6%)	S(11.4%)	A(13.3%)	M(5.8%)	S(1.6%)	P(8.7%)	
	G(0.6%)	T(4.8%)	R(7.2%)	P(7.4%)	A(7.6%)	Y(8.7%)	A(9.4%)	D(8.8%)	W(7.4%)	I(5.0%)	A(1.4%)	V(6.8%)	
	S(0.4%)	G(2.1%)	V(7.1%)	L(7.2%)	R(7.3%)	V(7.2%)	T(7.0%)	A(7.1%)	P(7.2%)	Y(4.5%)	V(1.4%)	L(3.2%)	
	I(0.3%)	H(1.7%)	A(6.9%)	V(5.9%)	V(6.5%)	D(5.4%)	L(5.8%)	T(5.4%)	S(7.0%)	V(4.4%)	L(1.3%)	S(2.6%)	
	D(0.1%)	A(1.3%)	S(6.6%)	D(5.3%)	D(6.0%)	T(5.2%)	V(5.6%)	N(5.2%)	L(4.6%)	G(3.8%)	Y(1.3%)	H(2.3%)	
	R(0.1%)	I(0.8%)	L(5.5%)	A(5.3%)	T(5.9%)	R(5.2%)	D(5.5%)	W(4.9%)	T(4.3%)	P(3.5%)	T(1.2%)	D(1.6%)	
	E(0.1%)	L(0.5%)	H(5.2%)	Y(4.9%)	P(4.6%)	L(4.1%)	W(4.6%)	R(4.7%)	V(4.0%)	S(3.2%)	E(1.2%)	F(1.4%)	
		N(0.5%)	Q(2.9%)	T(4.2%)	L(4.5%)	W(3.5%)	R(4.3%)	L(4.3%)	D(3.3%)	A(1.9%)	N(1.1%)	N(1.4%)	
		V(0.4%)	T(2.6%)	E(3.5%)	I(3.2%)	P(3.4%)	P(3.5%)	V(3.7%)	R(3.1%)	T(1.7%)	Q(1.0%)	T(0.8%)	
		P(0.3%)	Y(2.3%)	I(3.5%)	E(2.9%)	E(3.1%)	E(2.7%)	P(2.7%)	N(2.5%)	W(1.2%)	P(0.8%)	G(0.7%)	
		Y(0.2%)	P(2.2%)	Q(3.1%)	W(2.6%)	I(2.9%)	N(2.6%)	E(2.0%)	H(2.5%)	E(1.1%)	R(0.8%)	R(0.7%)	
		M(0.2%)	I(1.8%)	H(2.2%)	Q(2.4%)	N(2.1%)	I(2.0%)	H(1.8%)	E(2.4%)	R(1.0%)	I(0.6%)	A(0.5%)	
		C(0.2%)	F(1.5%)	N(2.1%)	F(2.0%)	Q(2.1%)	F(1.8%)	F(1.6%)	F(1.8%)	D(1.0%)	F(0.6%)	C(0.4%)	
		Q(0.1%)	W(1.1%)	F(2.1%)	K(1.7%)	F(1.7%)	Q(1.5%)	K(1.3%)	I(1.7%)	N(1.0%)	H(0.5%)	Q(0.2%)	
		E(0.1%)	K(1.0%)	W(2.0%)	N(1.6%)	M(1.2%)	H(1.5%)	Q(1.3%)	Q(1.3%)	H(0.8%)	W(0.4%)	E(0.2%)	
		F(0.1%)	N(0.9%)	K(1.8%)	M(1.4%)	H(1.0%)	K(1.0%)	M(1.1%)	C(1.0%)	C(0.8%)	C(0.2%)	M(0.1%)	
		W(0.1%)	M(0.6%)	M(1.1%)	H(1.1%)	K(0.8%)	M(1.0%)	I(1.1%)	K(0.9%)	Q(0.5%)	M(0.2%)	K(0.1%)	
		D(0.1%)	C(0.5%)	C(0.3%)	C(0.2%)	C(0.1%)	C(0.2%)	C(0.5%)	M(0.7%)	K(0.2%)	K(0.1%)	W(0.1%)	

【００６３】

表１ｅ．　天然抗体の長さ１１のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００６４】

【表１ｅ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	103
C(100.0%)	A(91.9%)	R(71.5%)	G(19.4%)	G(17.0%)	G(17.2%)	G(18.1%)	G(19.4%)	G(15.3%)	Y(17.3%)	Y(17.3%)	F(50.6%)	D(81.3%)	Y(58.4%)	W(100.0%)
	T(4.5%)	K(10.0%)	D(18.4%)	R(11.1%)	S(12.8%)	S(15.4%)	S(15.4%)	S(13.4%)	G(15.8%)	G(15.6%)	L(9.9%)	G(4.4%)	P(10.2%)	
	V(2.4%)	S(6.2%)	E(7.7%)	S(9.7%)	Y(8.7%)	Y(11.3%)	A(9.9%)	Y(11.8%)	S(10.1%)	A(11.9%)	M(7.1%)	E(1.5%)	I(8.2%)	
	G(0.5%)	T(4.9%)	V(7.5%)	P(7.4%)	R(7.6%)	A(9.4%)	Y(9.8%)	A(8.3%)	D(7.4%)	W(9.0%)	I(4.9%)	Y(1.3%)	V(7.9%)	
	I(0.2%)	G(1.9%)	A(7.4%)	L(7.2%)	A(6.8%)	V(6.5%)	V(6.5%)	T(6.6%)	N(5.9%)	P(7.5%)	Y(4.6%)	S(1.3%)	L(2.8%)	
	S(0.2%)	H(1.3%)	R(7.0%)	Y(5.7%)	V(6.7%)	D(5.7%)	T(5.6%)	L(5.4%)	R(5.6%)	S(5.8%)	V(4.1%)	N(1.2%)	H(2.5%)	
	D(0.1%)	A(1.1%)	S(5.9%)	D(5.3%)	D(5.7%)	T(5.1%)	D(5.5%)	D(5.4%)	A(5.5%)	L(4.7%)	P(3.3%)	Q(1.2%)	S(2.4%)	
	R(0.1%)	I(0.9%)	L(5.5%)	A(5.1%)	T(5.0%)	R(4.2%)	L(4.4%)	W(5.1%)	T(5.1%)	T(4.3%)	G(3.1%)	V(1.1%)	F(1.5%)	
	E(0.1%)	V(0.4%)	H(4.2%)	V(5.0%)	P(4.5%)	L(4.1%)	R(4.1%)	R(4.9%)	W(4.9%)	V(3.4%)	S(2.7%)	T(1.1%)	D(1.3%)	
		N(0.4%)	T(3.3%)	T(4.0%)	L(4.2%)	W(3.3%)	W(3.8%)	V(4.7%)	L(4.5%)	R(2.9%)	T(1.5%)	A(1.0%)	N(1.1%)	
		L(0.3%)	P(3.0%)	I(3.6%)	I(3.9%)	I(3.3%)	P(3.0%)	P(3.6%)	V(3.5%)	D(2.8%)	A(1.5%)	L(0.9%)	T(1.0%)	
		E(0.2%)	Q(2.8%)	E(3.2%)	E(3.1%)	P(2.5%)	I(2.2%)	E(2.9%)	P(3.0%)	N(2.7%)	W(1.3%)	H(0.7%)	C(0.8%)	
		P(0.2%)	Y(1.6%)	Q(2.8%)	W(2.9%)	E(2.2%)	E(2.1%)	N(2.7%)	E(2.5%)	F(2.5%)	N(0.9%)	P(0.6%)	G(0.5%)	
		C(0.2%)	I(1.5%)	H(2.6%)	N(2.0%)	F(2.1%)	N(1.9%)	F(2.2%)	F(2.0%)	H(2.3%)	R(0.9%)	R(0.6%)	A(0.4%)	
		M(0.1%)	F(1.2%)	F(2.5%)	H(1.8%)	N(1.8%)	Q(1.7%)	I(1.8%)	H(1.7%)	E(2.1%)	E(0.8%)	F(0.5%)	R(0.3%)	
		Y(0.1%)	N(1.1%)	N(2.2%)	Q(1.7%)	Q(1.7%)	F(1.7%)	Q(1.7%)	I(1.5%)	I(1.5%)	C(0.8%)	I(0.4%)	W(0.2%)	
		Q(0.1%)	W(0.8%)	K(2.1%)	M(1.7%)	M(1.5%)	M(1.1%)	K(1.4%)	K(1.1%)	C(1.4%)	D(0.8%)	W(0.3%)	K(0.2%)	
		W(0.1%)	K(0.7%)	W(1.6%)	F(1.5%)	H(0.8%)	H(0.9%)	H(1.4%)	Q(1.1%)	Q(1.1%)	H(0.7%)	M(0.2%)	E(0.1%)	
		F(0.1%)	M(0.7%)	M(1.2%)	K(1.3%)	K(0.8%)	K(0.8%)	M(1.1%)	C(0.7%)	K(0.8%)	Q(0.4%)	K(0.2%)	Q(0.1%)	
			C(0.5%)	C(0.5%)	C(0.6%)	C(0.1%)	C(0.3%)	C(0.3%)	M(0.7%)	M(0.5%)	K(0.2%)	C(0.1%)	M(0.1%)	

【００６５】

表１ｆ．　天然抗体の長さ１２のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００６６】

【表１ｆ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102	103
C(100.0%)	A(92.7%)	R(72.2%)	D(20.7%)	G(16.2%)	G(17.4%)	G(16.3%)	G(17.6%)	G(18.3%)	G(13.6%)	Y(18.1%)	Y(20.7%)	F(57.6%)	D(83.9%)	Y(53.9%)	W(100.0%)
	T(3.7%)	K(11.8%)	G(17.9%)	R(12.6%)	S(11.2%)	S(15.8%)	S(17.2%)	S(15.2%)	S(13.3%)	G(16.1%)	G(15.6%)	L(9.0%)	G(3.6%)	P(12.7%)	
	V(2.3%)	S(5.1%)	E(8.4%)	P(8.6%)	Y(10.8%)	Y(10.9%)	Y(10.8%)	Y(11.4%)	Y(12.9%)	S(9.1%)	A(13.1%)	M(7.7%)	Q(1.7%)	I(9.9%)	
	G(0.6%)	T(4.3%)	A(7.7%)	S(8.4%)	R(7.6%)	V(7.8%)	A(10.5%)	A(8.9%)	A(6.8%)	D(8.7%)	W(11.1%)	Y(3.9%)	N(1.1%)	V(9.1%)	
	S(0.3%)	G(1.4%)	V(7.6%)	L(8.1%)	A(6.8%)	A(7.5%)	V(6.0%)	T(6.3%)	T(6.6%)	N(7.5%)	P(6.8%)	I(3.7%)	E(1.0%)	L(3.6%)	
	I(0.1%)	H(1.1%)	R(6.3%)	V(5.5%)	V(6.5%)	D(6.0%)	D(6.0%)	V(6.0%)	L(6.2%)	W(4.9%)	S(4.9%)	V(3.0%)	A(1.0%)	H(3.1%)	
	D(0.1%)	A(1.0%)	S(5.4%)	Y(5.1%)	D(5.6%)	T(5.3%)	T(5.3%)	D(4.9%)	W(5.2%)	R(4.8%)	L(3.8%)	P(2.8%)	V(1.0%)	S(2.3%)	
	E(0.1%)	I(0.7%)	L(5.0%)	A(4.8%)	T(4.8%)	R(4.7%)	L(4.1%)	W(4.7%)	R(5.0%)	T(4.8%)	T(3.7%)	S(2.5%)	S(1.0%)	F(1.4%)	
		N(0.4%)	H(4.8%)	D(4.7%)	L(4.6%)	L(4.2%)	R(3.9%)	L(4.5%)	P(4.8%)	A(4.3%)	V(2.9%)	G(2.5%)	Y(0.9%)	D(0.8%)	
		L(0.3%)	T(3.0%)	T(4.0%)	I(4.0%)	I(3.5%)	W(3.4%)	R(3.9%)	V(4.8%)	P(3.4%)	D(2.6%)	A(1.2%)	T(0.8%)	N(0.7%)	
		V(0.3%)	Q(2.8%)	E(3.5%)	P(3.9%)	W(3.0%)	I(2.5%)	P(3.4%)	D(4.5%)	L(3.1%)	R(2.3%)	T(1.1%)	L(0.7%)	T(0.6%)	
		E(0.3%)	P(2.7%)	I(3.4%)	E(3.0%)	P(2.9%)	N(2.1%)	I(2.2%)	N(3.0%)	V(2.8%)	F(2.1%)	N(0.9%)	H(0.7%)	G(0.4%)	
		M(0.2%)	I(1.7%)	Q(2.7%)	W(2.4%)	E(2.4%)	P(2.0%)	E(2.2%)	E(2.8%)	E(2.3%)	H(2.1%)	W(0.9%)	R(0.6%)	A(0.3%)	
		C(0.2%)	Y(1.3%)	K(2.4%)	Q(2.4%)	Q(2.1%)	F(1.9%)	N(1.9%)	F(2.3%)	H(2.1%)	N(2.0%)	R(0.7%)	P(0.5%)	C(0.3%)	
		Q(0.2%)	F(1.1%)	H(2.1%)	N(2.0%)	N(2.0%)	Q(1.9%)	F(1.6%)	H(2.0%)	F(2.0%)	E(1.7%)	E(0.6%)	F(0.5%)	R(0.3%)	
		P(0.1%)	N(1.0%)	N(1.9%)	F(1.6%)	F(1.8%)	E(1.8%)	Q(1.4%)	I(1.8%)	C(1.6%)	C(1.4%)	D(0.5%)	W(0.3%)	Q(0.2%)	
		Y(0.1%)	K(0.8%)	W(1.9%)	H(1.6%)	M(1.4%)	M(1.2%)	M(1.2%)	K(1.4%)	I(1.3%)	I(1.3%)	C(0.5%)	I(0.3%)	E(0.1%)	
			W(0.8%)	F(1.8%)	K(1.4%)	H(1.1%)	H(0.7%)	H(0.9%)	Q(1.4%)	Q(1.1%)	Q(1.1%)	H(0.5%)	K(0.1%)	W(0.1%)	
			M(0.6%)	M(1.5%)	C(1.2%)	K(0.8%)	K(0.6%)	K(0.7%)	M(1.0%)	K(1.0%)	K(0.7%)	Q(0.4%)	M(0.1%)	M(0.1%)	
			C(0.4%)	C(0.7%)	M(1.2%)	C(0.4%)	C(0.4%)	C(0.3%)	C(0.5%)	M(0.6%)	M(0.3%)	K(0.1%)	C(0.1%)	K(0.1%)	

【００６７】

表１ｇ．　天然抗体の長さ１３のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００６８】

【表１ｇ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	101	102	103
C(100.0%)	A(93.2%)	R(74.2%)	D(23.7%)	G(14.2%)	G(17.0%)	G(14.3%)	G(17.4%)	G(16.8%)	G(16.7%)	Y(15.4%)	Y(21.4%)	Y(20.4%)	F(59.3%)	D(86.4%)	Y(47.4%)	W(100.0%)
	T(3.6%)	K(12.3%)	G(18.9%)	R(12.9%)	S(10.0%)	S(13.4%)	S(16.1%)	S(15.2%)	S(13.5%)	G(13.4%)	G(15.7%)	G(18.1%)	M(11.4%)	G(3.5%)	P(15.3%)	
	V(2.3%)	S(4.5%)	V(8.1%)	P(9.8%)	R(9.3%)	Y(12.1%)	Y(11.6%)	Y(12.0%)	Y(13.0%)	S(11.4%)	D(9.1%)	A(13.7%)	L(8.0%)	Q(1.4%)	V(12.9%)	
	S(0.3%)	T(3.5%)	A(7.8%)	S(8.8%)	Y(8.7%)	V(7.6%)	A(8.5%)	A(8.5%)	A(7.2%)	L(6.1%)	N(8.1%)	W(12.9%)	Y(3.2%)	T(1.0%)	I(11.1%)	
	G(0.3%)	H(1.1%)	E(7.3%)	L(8.4%)	A(6.4%)	A(7.0%)	V(6.8%)	V(6.2%)	V(6.1%)	T(5.9%)	S(7.9%)	P(6.0%)	V(3.0%)	E(0.8%)	L(3.9%)	
	D(0.1%)	G(1.1%)	R(5.2%)	A(5.7%)	V(6.3%)	D(6.5%)	D(5.5%)	D(6.2%)	T(6.1%)	P(5.4%)	W(5.2%)	S(4.6%)	I(3.0%)	N(0.8%)	H(2.4%)	
	I(0.1%)	A(0.7%)	S(5.0%)	V(5.0%)	D(5.6%)	R(5.9%)	T(4.9%)	T(5.8%)	R(5.2%)	R(5.2%)	R(4.3%)	L(3.6%)	P(2.3%)	Y(0.8%)	S(1.9%)	
		I(0.5%)	H(5.0%)	Y(4.7%)	L(5.2%)	T(4.9%)	L(4.5%)	L(5.2%)	L(4.8%)	A(5.2%)	T(4.1%)	V(2.8%)	G(2.0%)	V(0.8%)	F(1.2%)	
		L(0.5%)	L(4.1%)	D(3.8%)	P(4.6%)	I(4.4%)	R(4.5%)	W(4.1%)	W(4.8%)	V(4.7%)	A(3.6%)	T(2.6%)	S(1.9%)	A(0.7%)	T(0.9%)	
		V(0.3%)	T(2.6%)	T(3.8%)	T(4.5%)	L(4.0%)	W(3.8%)	R(3.6%)	D(4.8%)	D(4.2%)	P(3.3%)	R(2.4%)	A(0.9%)	S(0.7%)	N(0.8%)	
		N(0.3%)	P(2.6%)	I(3.5%)	I(3.9%)	P(3.7%)	I(3.3%)	P(2.8%)	P(3.3%)	W(4.2%)	L(3.2%)	D(1.9%)	W(0.7%)	L(0.7%)	D(0.7%)	
		P(0.3%)	Q(2.4%)	E(3.3%)	E(3.4%)	W(3.0%)	F(2.3%)	I(2.5%)	I(2.5%)	N(3.3%)	V(2.6%)	F(1.9%)	T(0.7%)	P(0.6%)	C(0.4%)	
		E(0.3%)	I(1.5%)	Q(3.1%)	W(2.3%)	E(2.5%)	P(2.1%)	E(2.2%)	N(2.4%)	E(3.0%)	E(2.1%)	E(1.7%)	R(0.6%)	R(0.5%)	A(0.3%)	
		Q(0.1%)	Y(1.3%)	K(2.5%)	Q(2.2%)	F(2.3%)	Q(2.0%)	N(2.0%)	E(2.2%)	I(2.6%)	H(2.1%)	H(1.6%)	E(0.6%)	H(0.4%)	R(0.3%)	
		C(0.1%)	N(1.1%)	H(2.3%)	N(2.1%)	Q(2.0%)	N(1.8%)	F(1.9%)	F(2.0%)	F(2.6%)	F(2.0%)	N(1.5%)	N(0.5%)	I(0.4%)	G(0.2%)	
		F(0.1%)	F(0.9%)	F(2.2%)	F(2.1%)	N(1.9%)	E(1.7%)	Q(1.5%)	Q(1.4%)	H(1.9%)	I(1.4%)	I(1.2%)	D(0.5%)	F(0.2%)	Q(0.1%)	
		Y(0.1%)	W(0.7%)	N(2.1%)	K(1.9%)	M(1.5%)	M(1.4%)	M(1.4%)	K(1.2%)	K(1.7%)	C(1.2%)	C(1.1%)	H(0.5%)	K(0.1%)	E(0.1%)	
		M(0.1%)	K(0.7%)	M(1.8%)	M(1.7%)	K(1.1%)	H(0.8%)	H(0.9%)	H(1.1%)	Q(1.4%)	K(1.0%)	Q(0.9%)	C(0.4%)	W(0.1%)	M(0.1%)	
			M(0.7%)	W(1.5%)	H(1.7%)	H(1.1%)	K(0.5%)	K(0.7%)	M(1.0%)	C(1.2%)	Q(0.9%)	K(0.6%)	Q(0.3%)	C(0.1%)	W(0.1%)	
			C(0.4%)	C(0.7%)	C(1.1%)	C(0.8%)	C(0.5%)	C(0.3%)	C(0.6%)	M(0.9%)	M(0.7%)	M(0.3%)	K(0.1%)		K(0.1%)	

【００６９】

表１ｈ．　天然抗体の長さ１４のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００７０】

【表１ｈ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102	103
C(100.0%)	A(94.0%)	R(74.6%)	D(22.4%)	G(16.3%)	G(15.3%)	G(14.8%)	G(15.9%)	G(17.2%)	G(16.0%)	Y(16.6%)	Y(19.4%)	Y(24.1%)	Y(21.5%)	F(60.0%)	D(88.5%)	Y(45.1%)	W(100.0%)
	T(3.1%)	K(11.2%)	G(18.8%)	R(12.2%)	S(9.9%)	Y(11.7%)	S(15.4%)	S(16.0%)	S(14.6%)	G(15.6%)	G(12.2%)	G(14.6%)	G(19.7%)	M(14.5%)	G(2.6%)	V(15.7%)	
	V(2.2%)	S(4.6%)	E(8.1%)	P(9.2%)	Y(9.6%)	S(11.6%)	Y(12.2%)	Y(10.9%)	Y(13.5%)	S(12.6%)	S(10.6%)	D(9.7%)	A(14.0%)	L(7.8%)	Q(1.4%)	P(14.9%)	
	G(0.3%)	T(4.2%)	V(7.9%)	L(8.6%)	R(9.4%)	D(7.3%)	A(7.4%)	A(8.3%)	A(7.4%)	T(6.0%)	P(6.7%)	N(7.9%)	W(12.6%)	I(2.7%)	E(1.1%)	I(11.4%)	
	S(0.3%)	H(1.3%)	A(7.2%)	S(8.0%)	V(6.7%)	V(6.9%)	V(6.9%)	V(7.0%)	T(6.6%)	A(6.0%)	L(6.1%)	S(7.3%)	P(5.7%)	V(2.6%)	T(0.9%)	L(4.3%)	
	D(0.1%)	G(1.2%)	R(6.0%)	A(5.6%)	L(6.3%)	R(6.2%)	D(5.5%)	D(6.1%)	V(6.4%)	V(5.7%)	R(5.4%)	W(4.8%)	S(3.8%)	Y(2.2%)	A(0.8%)	H(2.4%)	
	I(0.1%)	A(0.7%)	H(5.0%)	Y(5.5%)	A(6.1%)	A(6.2%)	T(5.4%)	L(5.0%)	D(5.2%)	P(5.2%)	T(5.3%)	R(4.4%)	L(3.6%)	P(2.1%)	H(0.7%)	S(2.0%)	
		I(0.5%)	S(5.0%)	V(4.9%)	P(5.8%)	T(4.8%)	R(4.9%)	T(5.0%)	L(4.7%)	L(5.1%)	A(5.0%)	P(3.6%)	V(2.5%)	S(1.8%)	N(0.7%)	F(1.3%)	
		N(0.4%)	L(4.4%)	T(4.0%)	D(5.3%)	L(4.6%)	L(4.2%)	W(4.2%)	W(4.7%)	R(4.9%)	V(4.1%)	A(3.3%)	T(2.3%)	G(1.5%)	R(0.6%)	T(0.6%)	
		L(0.3%)	T(3.0%)	D(3.7%)	T(4.4%)	P(4.5%)	I(4.0%)	R(3.7%)	R(4.0%)	D(4.0%)	D(3.9%)	T(3.0%)	R(2.1%)	A(0.8%)	Y(0.5%)	N(0.6%)	
		E(0.2%)	Q(2.7%)	I(3.0%)	I(4.3%)	I(3.9%)	W(3.8%)	I(2.9%)	P(2.9%)	W(3.5%)	W(2.9%)	L(2.9%)	H(1.9%)	T(0.7%)	V(0.4%)	D(0.5%)	
		V(0.2%)	P(2.3%)	E(3.0%)	E(2.9%)	W(3.0%)	F(2.5%)	F(2.3%)	N(2.4%)	I(2.4%)	N(2.9%)	V(2.4%)	D(1.9%)	N(0.7%)	S(0.4%)	C(0.3%)	
		M(0.2%)	I(1.4%)	Q(2.9%)	Q(2.5%)	E(2.4%)	P(2.2%)	P(2.2%)	I(2.2%)	E(2.4%)	E(2.7%)	H(2.2%)	F(1.9%)	W(0.6%)	L(0.3%)	A(0.2%)	
		Y(0.1%)	N(1.2%)	F(2.5%)	F(2.1%)	Q(2.4%)	E(2.0%)	N(2.2%)	E(2.0%)	N(2.2%)	F(2.5%)	E(2.0%)	E(1.6%)	D(0.5%)	I(0.3%)	G(0.2%)	
		P(0.1%)	Y(1.0%)	K(2.3%)	W(2.1%)	N(2.1%)	Q(1.9%)	E(2.0%)	F(1.9%)	F(1.9%)	I(2.4%)	F(1.8%)	N(1.5%)	R(0.4%)	P(0.3%)	R(0.2%)	
		Q(0.1%)	F(1.0%)	H(2.3%)	H(1.6%)	F(2.0%)	M(1.5%)	M(1.6%)	M(1.3%)	Q(1.4%)	H(2.3%)	C(1.8%)	I(1.2%)	H(0.4%)	F(0.2%)	M(0.1%)	
		C(0.1%)	K(0.7%)	N(2.2%)	N(1.6%)	M(1.5%)	N(1.4%)	Q(1.4%)	H(1.3%)	C(1.4%)	K(1.6%)	I(1.3%)	C(0.8%)	C(0.3%)	K(0.1%)	Q(0.1%)	
		W(0.1%)	W(0.7%)	W(1.7%)	K(1.5%)	H(1.5%)	H(1.1%)	H(0.8%)	Q(1.2%)	K(1.2%)	C(1.5%)	Q(1.1%)	Q(0.7%)	E(0.3%)	W(0.1%)	W(0.1%)	
			M(0.6%)	M(1.3%)	C(1.4%)	C(1.3%)	C(1.1%)	C(0.6%)	K(0.9%)	H(1.1%)	Q(1.3%)	K(1.0%)	K(0.6%)	Q(0.2%)		E(0.1%)	
			C(0.6%)	C(0.8%)	M(1.2%)	K(1.2%)	K(0.6%)	K(0.5%)	C(0.7%)	M(0.7%)	M(0.9%)	M(0.6%)	M(0.2%)	K(0.1%)			

【００７１】

表１ｉ．　天然抗体の長さ１５のＨＣ－ＣＤＲ３ループについてのアミノ酸組成。各ループ位置（最上列のカバト命名法のＨＣ－ＣＤＲ３位置を灰色で示した）の下に、その位置で各アミノ酸に対して観測される頻度の率が示されている。観測された頻度が０．０５％未満のアミノ酸は示されていない。

【００７２】

【表１ｉ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103
C(100.0%)	A(94.3%)	R(76.0%)	D(23.1%)	G(14.4%)	G(16.3%)	Y(13.4%)	G(15.1%)	G(16.6%)	S(17.6%)	G(17.2%)	Y(20.6%)	Y(24.1%)	Y(27.8%)	G(23.4%)	F(59.8%)	D(89.9%)	Y(39.8%)	W(100.0%)
	T(3.6%)	K(10.2%)	G(19.6%)	R(13.6%)	Y(11.8%)	G(12.4%)	S(14.3%)	S(16.0%)	G(16.2%)	Y(15.6%)	G(14.0%)	G(10.9%)	G(13.4%)	Y(20.2%)	M(18.3%)	G(2.3%)	V(19.9%)	
	V(1.6%)	S(4.1%)	V(7.8%)	P(9.8%)	R(9.4%)	S(11.9%)	Y(12.7%)	Y(11.3%)	Y(11.2%)	S(14.0%)	S(11.4%)	S(9.8%)	D(9.4%)	W(14.1%)	L(6.4%)	Q(1.5%)	P(16.2%)	
	S(0.2%)	T(4.0%)	E(7.8%)	L(8.4%)	S(8.6%)	D(7.3%)	V(6.9%)	V(7.5%)	V(6.6%)	T(5.6%)	R(5.8%)	L(5.9%)	N(9.4%)	A(14.1%)	V(2.1%)	E(0.8%)	I(11.9%)	
	G(0.1%)	H(1.6%)	A(7.2%)	S(7.5%)	V(6.2%)	V(6.9%)	A(6.8%)	A(6.9%)	T(6.4%)	A(5.6%)	A(5.5%)	P(5.9%)	S(6.6%)	P(5.5%)	I(2.0%)	T(0.8%)	L(4.3%)	
	E(0.1%)	G(1.3%)	R(5.6%)	V(5.3%)	L(5.5%)	R(6.2%)	D(6.1%)	D(6.2%)	A(6.3%)	V(5.2%)	P(5.3%)	T(4.8%)	W(4.7%)	S(3.4%)	P(1.9%)	N(0.6%)	H(2.1%)	
	D(0.1%)	A(1.0%)	H(5.0%)	Y(5.2%)	P(5.4%)	A(5.9%)	R(5.0%)	T(5.2%)	D(5.7%)	D(5.0%)	T(5.0%)	R(4.7%)	R(4.1%)	L(3.0%)	Y(1.9%)	A(0.6%)	S(1.9%)	
	I(0.0%)	N(0.5%)	S(5.0%)	A(5.1%)	D(5.3%)	T(5.2%)	L(4.8%)	L(5.1%)	L(5.1%)	L(4.7%)	L(4.9%)	A(4.2%)	P(3.7%)	T(2.1%)	G(1.6%)	H(0.6%)	F(0.9%)	
	M(0.0%)	I(0.3%)	L(4.7%)	T(3.9%)	A(5.1%)	L(5.0%)	T(4.8%)	W(4.4%)	R(4.0%)	R(4.4%)	V(4.5%)	V(4.0%)	A(2.8%)	V(2.0%)	S(1.6%)	S(0.4%)	T(0.6%)	
	R(0.0%)	V(0.2%)	T(2.9%)	D(3.8%)	T(4.7%)	P(5.0%)	I(4.6%)	R(4.4%)	W(4.0%)	W(3.9%)	D(3.8%)	D(3.8%)	L(2.7%)	H(1.9%)	T(0.6%)	Y(0.4%)	D(0.5%)	
		L(0.2%)	P(2.4%)	E(3.4%)	I(4.1%)	I(4.6%)	W(3.3%)	I(3.0%)	P(3.2%)	P(3.6%)	W(2.9%)	N(3.3%)	T(2.6%)	R(1.9%)	A(0.6%)	R(0.4%)	N(0.4%)	
		Y(0.1%)	Q(2.4%)	Q(3.0%)	E(2.9%)	E(2.8%)	P(2.5%)	F(2.5%)	F(2.4%)	I(2.6%)	I(2.3%)	E(2.9%)	H(2.3%)	F(1.8%)	W(0.5%)	V(0.4%)	C(0.3%)	
		C(0.1%)	I(1.4%)	I(2.9%)	F(2.2%)	W(2.2%)	F(2.5%)	P(2.3%)	I(2.2%)	E(2.5%)	E(2.2%)	W(2.7%)	V(2.0%)	D(1.4%)	N(0.5%)	F(0.3%)	R(0.3%)	
		F(0.1%)	Y(1.1%)	H(2.6%)	W(1.9%)	F(2.1%)	M(2.0%)	N(1.7%)	N(2.1%)	N(2.3%)	C(2.1%)	H(2.3%)	E(1.9%)	N(1.3%)	H(0.5%)	P(0.3%)	A(0.2%)	
		M(0.1%)	N(0.9%)	F(2.4%)	N(1.9%)	Q(2.0%)	E(1.8%)	E(1.6%)	E(2.0%)	F(1.8%)	N(2.0%)	I(2.2%)	F(1.6%)	E(1.2%)	C(0.4%)	L(0.2%)	M(0.2%)	
		P(0.1%)	F(0.8%)	K(2.4%)	Q(1.8%)	C(2.0%)	N(1.7%)	Q(1.5%)	M(1.2%)	C(1.8%)	F(1.9%)	F(2.1%)	C(1.3%)	I(1.0%)	D(0.4%)	I(0.2%)	G(0.1%)	
		E(0.1%)	W(0.7%)	N(2.3%)	H(1.8%)	N(1.5%)	C(1.6%)	M(1.2%)	Q(1.2%)	H(1.1%)	H(1.7%)	K(1.9%)	K(1.0%)	C(0.6%)	R(0.4%)	K(0.1%)	Q(0.1%)	
		W(0.0%)	K(0.6%)	W(1.9%)	K(1.6%)	M(1.4%)	Q(1.6%)	C(1.1%)	C(0.8%)	Q(1.1%)	K(1.6%)	C(1.8%)	Q(0.9%)	Q(0.5%)	E(0.3%)	W(0.1%)	W(0.1%)	
		Q(0.0%)	M(0.6%)	M(1.4%)	M(1.6%)	H(1.1%)	H(1.1%)	H(0.7%)	H(0.8%)	K(0.9%)	Q(1.6%)	Q(1.6%)	I(0.9%)	K(0.4%)	Q(0.2%)	M(0.1%)	K(0.1%)	
			C(0.4%)	C(0.9%)	C(1.6%)	K(1.1%)	K(0.6%)	K(0.6%)	K(0.7%)	M(0.9%)	M(0.7%)	M(1.0%)	M(0.7%)	M(0.1%)	K(0.1%)	C(0.0%)	E(0.0%)	

【００７３】

実施例２．　生殖細胞系列のＶＨ－リンカー－ＶＨ一本鎖骨格の設計

一本鎖抗体に基づくファージ－ディスプレイ抗体ライブラリーを、広範なスペクトルのライブラリーレイアウトに対してうまく生成しており（Mondon et al., 2008（非特許文献２））、従って、このフォーマットをＨＣ－ＣＤＲ３多様性を導入する抗体フォーマットとして選択した。ＶＨ３／ＶＫ１可変領域のペアリングは、天然抗体で観測されるＶＨ／ＶＫの組み合わせの最も一般的なものの１つである（Huang et al. 1996（非特許文献２１）、de Waldt et al., 1999（非特許文献２２）、DeKosky et al.,2013（非特許文献２３））。これはまた、天然の可変領域の組み換え一本鎖抗体ライブラリーにおいて高頻度で観測され（Glanville et al., 2010（非特許文献２４））、良好な熱安定性を有し、効率よく発現もされる（Ewert et al., JMB 2003（非特許文献２５））。生殖細胞系列の配列は、治療抗体に存在する場合に免疫原性を引き起こしうる体細胞突然変異の不存在、及び、多様なＨＣ－ＣＤＲ３領域の存在に対する固有の寛容性などの有利な特性有するので、ＶＨ３／ＶＫ１一本鎖骨格の組み立てに対して、ヒト生殖細胞系列抗体の配列を選択した。重鎖可変領域骨格のアミノ酸配列は、翻訳されたＧｅｎｂａｎｋ生殖細胞系列の配列Ｍ９９６６０（配列番号１）、及び翻訳されたＧｅｎｂａｎｋ生殖細胞系列の配列Ｊ００２５６（Ｊ４断片）（配列番号２）から組み立てた。この骨格において、わずかなフランキングアミノ酸しか含まないＨＣ－ＣＤＲ３は、ライブラリーのクローニングの間に非開裂ベクターの除去を可能にする特有のＥｃｏＲＶ部位を含有するスタッファー断片によって表される（図３）。スタッファー断片は、その５’末端にＰｓｔｌ部位を、その３’末端にＳｔｙｌ部位を含有し、ライブラリーの生成の間の断片の除去、及びＨＣ－ＣＤＲ３の多様性をコード化するオリゴヌクレオチドのクローニングを可能にする、（図４）。Ｐｓｔｌ（ＣＴＧＣＡＧ）及びＳｔｙｌ（ＣＣＷＷＧＧ）が、コドンをコード化するトリマーブロックの組み合わせがほんのわずかである（図５）ので選択され、ＨＣ－ＣＤＲ３

多様性コード化オリゴヌクレオチドを合成するのに使用され、Ｐｓｔｌ及びＳｔｙｌ認識部位を生成する。従って、Ｈｉｓ及びＧｌｎトリマーブロック（ＣＡＴ及びＣＡＧ）が、続いて、ＨＣ－ＣＤＲ３の多様性をコード化するオリゴヌクレオチドの設計から排除された。軽鎖可変領域のアミノ酸骨格配列を、翻訳されたＧｅｎｂａｎｋ生殖細胞系列の配列Ｘ９３６２７（配列番号３）及びＧｅｎｂａｎｋ生殖細胞系列の配列の配列Ｊ００２４２（ＶＫ－１　Ｊ１断片）（配列番号４）から組み立てた。ＬＣ－ＣＤＲ３ループの長さは、天然抗体におけるＶＨ３／ＶＫ１重鎖／軽鎖の組み合わせで最も頻繁に観測される長さである（DeKosky et al., 2013（非特許文献２３））９アミノ酸となるように選択した。ＬＣ－ＣＤＲ３ループのアミノ酸配列は、ＶＨ３／ＶＫ１の組み合わせにおいて長さ９のＬＣ－ＣＤＲ３ループで最も頻繁に観測されるアミノ酸によって表される（図５）。ＬＣ－ＣＤＲ３ループのアミノ酸配列において、Ｔｒｐをコード化するＶＫ－１　Ｊ１断片（ＴＧＧ）由来の開始コドン（initial codon）をＣＴＧ（Ｌｅｕ）によって置換した。ここで、ＣＧＴ（Ｌｅｕ）は、ＶＨ３／ＶＫ１の組み合わせを有する長さ９の天然抗体のＬＣ－ＣＤＲ３ループにおいてこの位置で最も頻繁に観測されるアミノ酸である（DeKosky et al., 2013（非特許文献２３））。追加の特有の制限部位を、軽鎖ＬＣ－ＣＤＲ１領域及びＬＣ－ＣＤＲ３領域の上流及び下流に導入した（図３）。次に、一本鎖骨格が、結合性ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳリンカー（配列番号６）によってＶＨ／ＶＬ一本鎖トポロジーに組み立てられ（図３）、望まない制限部位が代替コドンを選択することによって除去され、得られた核酸配列は、Ｅ．ｃｏｌｉ（配列番号７）での発現のためにコドンを最適化された。

【００７４】

実施例３．　一本鎖ＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーを生成できるディスプレイベクターであるベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿ｖ２２（BaseVector_VH3_VK1_v22）の設計及び生成

ライブラリー構築のためのファージディスプレイベクターは、ｐＣＡＮＴＡＢ５ベクター（McCafferty et al., 1994（非特許文献２６））の誘導体である、ｐＣＡＮＴＡＢ６ベクターに基づく。ｐＣＡＮＴＡＢ６の配列は、McCafferty et al., 1994（非特許文献２６）に略述されている修飾を導入したＧｅｎｂａｎｋ登録Ｕ１４３２１から開始して再構築された。ｐＣＡＮＴＡＢ６のｓｃＦｖクローニング部位を、スタッファーセグメントを含むＶＨ３－リンカー－ＶＫ１一本鎖骨格によって置き換えた（図６）。望まない制限部位を除去するためのいくつかの一塩基置換の導入と、以下に列記した複製起源の配列の回復により、ベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿ｖ２２（配列番号８）の配列を得た。

【００７５】

ディスプレイベクターであるベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿ｖ２２の組成：

位置１～２３３４：以下の修飾を有するＵ１４３２１由来

　３２０　Ｃ－＞Ｔ　Ｘｈｏｌ部位を除去する

　６１７　Ｇ－＞Ｃ　Ｐｖｕｌ部位を除去する

　１３７９　Ｔ－＞Ｃ　他のファージミドベクターと同一の複製起源の配列を作成する

　２３２８　Ｃ－＞Ｇ　Ｓｔｙｌ部位を除去する

【００７６】

位置２３３５～３３６６：ＶＨ３－リンカー－ＶＫ１一本鎖骨格（配列番号７）

【００７７】

位置３３６７～３４４７：McCafferty et al., 1994（非特許文献２６）に示される、軽鎖可変領域のＣ－末端をｐＩＩＩタンパク質と連結するセグメント

【００７８】

位置３４４８～５５４０：以下の修飾を含むＵ１４３２１由来：

　４０２９　Ｇ－＞Ａ　ＢａｍＨＩ部位を除去する

　４７８８　Ａ－＞Ｃ　Ｐｖｕｌ部位を除去する

【００７９】

一本鎖骨格が挿入されたベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿ｖ２２の概略配置図を図６

に示す。Ｐｓｔｌ及びＳｔｙｌを含むスタッファー領域の除去は、ＨＣ－ＣＤＲ３多様性をコード化するオリゴヌクレオチドのクローニングを可能にする。追加の特有の制限部位は、完全な一本鎖抗体、個々の可変軽鎖又は重鎖の除去、又は可変軽鎖領域内の追加の多様性の導入を可能にする（図７）。次に、ベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿ｖ２２を合成し、標準的な方法（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）によって組み立てた。

【００８０】

実施例４．　ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布の最適化、及び各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ内の位置ごとのアミノ酸多様性の最適化

Ｈｉｓ及びＧｌｎを、Ｈｉｓ及びＧｌｎトリマーブロックによってＨＣ－ＣＤＲ３ループ内のＰｓｔｌ及びＳｔｙｌ部位の生成を排除するためにＨＣ－ＣＤＲ３多様性の設計から除外した。この除外は、天然抗体のＨＣ－ＣＤＲ３配列の組成が、Ｈｉｓ及びＧｌｎが一般に非常にわずかな頻度で観測される（表１ａ～１ｉ）ことを示しているので、受け入れ可能である。対形成していないＣｙｓ残基を通した分子間ジスルフィド架橋の形成を防止するために、ＣｙｓをＨＣ－ＣＤＲ３ループのどの位置においても除外した。酸化の傾向のあるＭｅｔもいずれの位置においても排除した。位置１０１の前の位置を除いて、Ｍｅｔは一般に、天然のＨＣ－ＣＤＲ３配列には非常に低い頻度で存在する（表１ａ～１ｉ）。位置１０１はＡｓｐとして、常に固定されたままである。

【００８１】

ループ長７～１５（ループ長分布及び位置ごとのアミノ酸の可変性)に対するＨＣ－ＣＤＲ３ループの多様性の設計は、スプレッドシートアプリケーションを使用して最適化される。このアプリケーションにおいて、ライブラリー内の各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長についての分率（percent fraction）、及び、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長についてのＨＣ－ＣＤＲ３位置（ＨＣ－ＣＤＲ３ループの前のＰｏｓ９４も含む）の各々における可変性（異なるアミノ酸の数）を調節することができる。次に、アプリケーションは、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長、理論的に可能な変異の数、実際に存在するクローンの数（＝ライブラリーの全複雑さ×特定のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長の分率（percent fraction））、実際に存在する理論的に可能な全ての変異の割合についてのポアソン（Poisson）評価、ポアソン評価に従って存在する異なる変異の実際の数、及び冗長性（各変異が平均して存在する回数）につて計算する。

【００８２】

ポアソン評価：$1-e^{(-1*N/M)}$

式中、

Ｎ＝複雑さＣのライブラリーにおいて、長さＬのＨＣ－ＣＤＲ３ループを有するクローンの数

Ｍ＝各ループ位置でアミノ酸の特定の組成を有する長さＬのＨＣ－ＣＤＲ３ループについての、理論的に可能な変異の数

【００８３】

最初に、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ一での異なるアミノ酸の数を、位置１０１及び１０２（それぞれ、５及び８個の異なるアミノ酸）を除いて、１６（Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ及びＭｅｔを除く全てのアミノ酸）までに設定し、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対する初期分率（percent fraction）を７～１５までのループ長に対して天然の抗体で観測されるＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布にした。即ち１００％に再正規化した。この構成では、より短いＨＣ－ＣＤＲ３ループが過剰に表れ、１０～１５のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対しては、理論的に可能な変異の１％未満がライブラリー内に存在する（表２Ａ）。治療抗体又は臨床開発の抗体で富化される(図８～９）長さ１０のＨＣ－ＣＤＲ３ループに対しては、全ての可能な変異の極一部がライブラリー内に実際に存在する。

【００８４】

表２Ａ．　超可変位置で１６個の異なるアミノ酸を、位置１０１で５個の異なるアミノ酸を、そして位置１０２で８個の異なるアミノ酸を有する天然アミノ酸と同様のＨＣ－Ｃ

ＤＲ３ループ長分布を持つ、全複雑さ１．３×１０^{10}のＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーのための設計スキーム。位置を考慮した超可変領域は、アンダーラインを付した異なるアミノ酸の数を有する。カバト位置９４は変化しない。

【００８５】

【表２Ａ】

表 2A

CDR3H 長さ L	分率 (percent fraction) p(L)	超可変位置での異なるアミノ酸の数	Pos 93	Pos 94	Pos 95	Pos 96	Pos 97	Pos 98	Pos 99	Pos 100	Pos 100a	Pos 100b	Pos 100c	Pos 100d	Pos 100e	Pos 100f	Pos 100g	Pos 101	Pos 102	理論的に可能な変異の数	存在するクローンの実際の数	実際に存在する理論的に可能な変異の割合(fraction)（ポアソン評価）	実際に存在する理論的に可能な変異の数（ポアソン評価）	冗長性（各変異が存在する回数）
7	3.3	16	1	1	16	16	16	16	16									5	8	4.19E+07	4.32E+08	100.0%	4.19E+07	10.3
8	5.1	16	1	1	16	16	16	16	16	16								5	8	6.71E+08	6.60E+08	62.6%	4.20E+08	1.6
9	8.6	15	1	1	16	16	16	16	16	16	16							5	8	1.07E+10	1.12E+09	9.9%	1.06E+09	1.1
10	11.2	15	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16						5	8	1.72E+11	1.45E+09	0.8%	1.45E+09	1.0
11	13.6	14	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16					5	8	2.75E+12	1.76E+09	0.1%	1.76E+09	1.0
12	15.8	13	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16				5	8	4.40E+13	2.06E+09	0.005%	2.06E+09	1.0
13	15.6	11	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16			5	8	7.04E+14	2.03E+09	0.00029%	2.03E+09	1.0
14	14.0	9	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16		5	8	1.13E+16	1.82E+09	0.00002%	1.82E+09	1.0
15	12.8	8	1	1	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	5	8	1.80E+17	1.67E+09	0.000001%	1.67E+09	1.0

【００８６】

超可変領域で１６から８個に異なるアミノ酸の数を減少すると、１１までのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長をよく表すライブラリーが生成されるが、同時に、冗長性（変異が存在する

回数の平均）はかなり増強される（表２Ｂ）。

【００８７】

表２Ｂ．　超可変位置で８個の異なるアミノ酸を、位置１０１で一定のアミノ酸を、そして位置１０２で８個の異なるアミノ酸を有する天然アミノ酸と同様のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布を持つ、全複雑さ１．３×１０^{10}のＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーのための設計スキーム。位置を考慮した超可変領域は、アンダーラインを付した異なるアミノ酸の数を有する。カバト位置９４は変化しない。

【００８８】

【表２Ｂ】

表 2B

CDR3H 長さ L	分率 (percent fraction) p(L)	超可変位置での異なるアミノ酸の数	Pos 93	Pos 94	Pos 95	Pos 96	Pos 97	Pos 98	Pos 99	Pos 100	Pos 100a	Pos 100b	Pos 100c	Pos 100d	Pos 100e	Pos 100f	Pos 100g	Pos 101	Pos 102	理論的に可能な変異の数	存在するクローンの実際の数	実際に存在する理論的に可能な変異の割合(fraction)(ポアソン評価)	実際に存在する理論的に可能な変異の数(ポアソン評価)	冗長性(各変異が存在する回数)
7	3.3	16	1	1	8	8	8	8	8									1	8	2.62E+05	4.32E+08	100.0%	2.62E+05	1648.1
8	5.1	16	1	1	8	8	8	8	8	8								1	8	2.10E+06	6.60E+08	100.0%	2.10E+06	314.8
9	8.6	15	1	1	8	8	8	8	8	8	8							1	8	1.68E+07	1.12E+09	100.0%	1.68E+07	66.5
10	11.2	15	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8						1	8	1.34E+08	1.45E+09	100.0%	1.34E+08	10.8
11	13.6	14	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8					1	8	1.07E+09	1.76E+09	80.7%	8.66E+08	2.0
12	15.8	13	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8				1	8	8.59E+09	2.06E+09	21.30%	1.83E+09	1.1
13	15.6	11	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8			1	8	6.87E+10	2.03E+09	2.91250%	2.00E+09	1.0
14	14.0	9	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		1	8	5.50E+11	1.82E+09	0.33006%	1.81E+09	1.0
15	12.8	8	1	1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8	4.40E+12	1.67E+09	0.037941%	1.67E+09	1.0

【００８９】
ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布に対するパーセントの値を調節し、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長７～１１に対して位置９４で追加の可変性を導入し、より大きなＨＣ－ＣＤＲ３ループに対して超可変位置に存在する異なるアミノ酸の数を徐々に減少し、位置１０２及び位置１０１の前の位置での異なるアミノ酸の数を減少すると、有利な特性を有するライブラリーの設計が得られる（表２Ｃ）。冗長性は、短いＨＣ－ＣＤＲ３ループに対してかなり減少され、９～１１の長さのループに対する変異の対象範囲は高く、より大きなＨＣ－ＣＤＲ３ループもかなりよく表れる（表２Ｃ）。最適化されたＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布は、天然抗体で観測されるＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布及び既に承認された治療抗体又は臨床開発中の治療抗体に対するものと共に、図１０に示されている。

【００９０】
表２Ｃ．　最適化されたＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布を有し、及びカバト位置９４及び各ＨＣ－ＣＤＲ３ループの各位置で最適化された可変性を有する、全複雑さ１．３×10^{10}のＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーに対する設計スキーム。位置を考慮した超可変領域は、アンダーラインを付した異なるアミノ酸の数を有する。

【００９１】

【表２Ｃ】

表 2C

CDRH3長さ L	分率 (percent fraction) p(L)	超可変位置での異なるアミノ酸の数	Pos 93	Pos 94	Pos 95	Pos 96	Pos 97	Pos 98	Pos 99	Pos 100	Pos 100a	Pos 100b	Pos 100c	Pos 100d	Pos 100e	Pos 100f	Pos 100g	Pos 101	Pos 102	理論的に可能な変異の数	存在するクローンの実際の数	実際に存在する理論的に可能な変異の割合 (fraction) (ポアソン評価)	実際に存在する理論的に可能な変異の数 (ポアソン評価)	冗長性 (各変異が存在する回数)
7	0.1	16	1	3	10	16	16	16	16									1	4	7.86E+06	1.30E+07	80.9%	6.36E+06	2.0
8	1.0	16	1	3	9	16	16	16	16	16								1	4	1.13E+08	1.30E+08	68.3%	7.73E+07	1.7
9	2.5	15	1	3	8	15	15	15	15	15	4							1	4	2.92E+08	3.25E+08	67.2%	1.96E+08	1.7
10	11.5	15	1	2	7	15	15	15	15	15	15	3						1	3	1.44E+09	1.50E+09	64.8%	9.31E+08	1.6
11	28.3	14	1	2	6	14	14	14	14	14	14	14	3					1	2	7.59E+09	3.68E+09	38.4%	2.92E+09	1.3
12	19.8	13	1	1	5	13	13	13	13	13	13	13	13	2				1	1	8.16E+09	2.57E+09	27.1%	2.21E+09	1.2
13	17.7	11	1	1	4	11	11	11	11	11	11	11	11	11	1			1	1	9.43E+09	2.30E+09	21.6%	2.04E+09	1.1
14	13.1	9	1	1	3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	1		1	1	1.05E+10	1.70E+09	15.0%	1.57E+09	1.1
15	6.0	8	1	1	2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	1	1.72E+10	7.80E+08	4.4%	7.63E+08	1.0

【００９２】

実施例５．　最適化されたライブラリーの設計に従ったオリゴヌクレオチドの設計

各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対するアミノ酸組成を、表２Ｃに示される最適化されたライブラリーの設計に基づいて集めた。各位置で、及び各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して、表２Ｃに示されたアミノ酸の数は、表１ａ～１ｉに従ったそのＨＣ－ＣＤＲ３ループ長及び位置に対する天然抗体で最も頻繁に観測されるアミノ酸から選択され、パーセントの値は１００に再正規化された。最適化されたライブラリーの設計に従ってＨＣ－ＣＤＲ３長７～１５に対するアミノ酸組成と頻度のパーセントを表３Ａ～３Ｉに示す。例えば、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長７に対しては、表２Ｃは、３つの異なるアミノ酸が位置９４に存在する必要があることを示す。長さ７の天然のＨＣ－ＣＤＲ３ループで最も頻繁に観測される３つのアミノ酸は、Ａｒｇ６３．４％、Ｓｅｒ８．９％、及びＴｈｒ７．３％（表１ａ）である。これらのアミノ酸についてパーセントの値を１００％に再正規化すると、Ａｒｇ７９．６％、Ｓｅｒ１１．２％、及びＴｈｒ９．２％となる。

【００９３】

-表３Ａ．　長さＬ＝７を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。全体の可変性を増加するために、ＨＣ－ＣＤＲ３ループの前の位置９４もＨＣ－ＣＤＲ３ループ長７に対して変化されている。

【００９４】

【表３Ａ】

92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(79.6%)	G(30.0%)	G(16.6%)	G(22.9%)	G(19.4%)	F(27.6%)	D(100.0%)	Y(68.0%)	W(100.0%)
		S(11.2%)	D(18.3%)	R(11.5%)	S(12.2%)	S(14.1%)	L(15.4%)		V(12.6%)	
		T(9.2%)	E(8.3%)	D(11.2%)	D(10.1%)	A(12.0%)	G(8.5%)		P(12.0%)	
			W(8.2%)	S(10.9%)	Y(7.7%)	Y(11.8%)	S(7.8%)		I(7.4%)	
			R(7.2%)	L(7.2%)	R(7.2%)	W(5.4%)	V(6.1%)			
			V(7.1%)	A(6.3%)	A(6.4%)	T(5.1%)	Y(6.0%)			
			A(6.5%)	V(5.6%)	T(5.5%)	V(4.9%)	I(5.0%)			
			L(6.0%)	P(5.3%)	V(5.2%)	R(4.5%)	P(4.5%)			
			S(5.2%)	T(4.5%)	N(4.0%)	P(4.5%)	A(4.2%)			
			Y(3.2%)	Y(4.4%)	P(4.0%)	L(4.0%)	D(3.1%)			
				N(3.5%)	L(3.9%)	D(3.8%)	T(2.8%)			
				E(3.3%)	E(3.5%)	N(3.0%)	N(2.5%)			
				W(3.0%)	W(3.4%)	E(2.8%)	R(2.1%)			
				K(2.6%)	I(1.7%)	F(1.9%)	W(1.8%)			
				F(2.2%)	F(1.6%)	I(1.7%)	E(1.8%)			
				I(1.9%)	K(0.7%)	K(1.1%)	K(0.7%)			

【００９５】

表３Ｂ．　長さＬ＝８を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。全体の可変性を増加するために、ＨＣ－ＣＤＲ３ループの前の位置９４もＨＣ－ＣＤＲ３ループ長８に対して変化されている。

【００９６】

【表３Ｂ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(84.1%)	G(25.5%)	G(15.3%)	G(21.7%)	G(26.8%)	G(17.5%)	F(36.1%)	D(100.0%)	Y(71.5%)	W(100.0%)
		T(8.2%)	D(24.1%)	S(11.9%)	S(15.3%)	S(12.7%)	A(14.3%)	L(11.0%)		P(10.6%)	
		S(7.8%)	E(10.5%)	R(11.6%)	A(7.8%)	Y(10.3%)	Y(13.2%)	G(7.4%)		I(9.3%)	
			V(9.3%)	L(9.0%)	R(7.4%)	D(7.5%)	S(10.5%)	Y(6.9%)		V(8.6%)	
			A(7.4%)	V(6.5%)	Y(6.7%)	A(6.9%)	W(6.9%)	S(5.6%)			
			S(6.9%)	A(6.3%)	D(6.6%)	R(6.1%)	L(5.6%)	I(5.6%)			
			R(6.8%)	D(6.2%)	V(5.6%)	T(5.4%)	T(5.5%)	V(5.5%)			
			L(6.0%)	P(6.0%)	T(5.4%)	W(4.5%)	V(4.5%)	P(4.6%)			
			T(3.5%)	Y(5.6%)	L(4.6%)	N(4.3%)	D(4.5%)	A(4.1%)			
				T(5.5%)	E(3.8%)	L(3.7%)	R(4.0%)	T(3.6%)			
				E(3.5%)	N(3.5%)	V(3.7%)	P(3.3%)	D(2.2%)			
				I(3.4%)	P(3.2%)	E(2.7%)	N(2.6%)	N(2.2%)			
				W(2.5%)	W(2.9%)	P(1.7%)	E(2.4%)	W(2.0%)			
				N(2.4%)	I(2.6%)	F(1.5%)	F(2.1%)	E(1.8%)			
				F(2.2%)	F(1.6%)	I(1.4%)	I(2.0%)	R(0.8%)			
				K(2.2%)	K(1.5%)	K(0.6%)	K(1.1%)	K(0.5%)			

【００９７】

表３Ｃ．　長さＬ＝９を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。全体の可変性を増加するために、ＨＣ－ＣＤＲ３ループの前の位置９４もＨＣ－ＣＤＲ３ループ長９に対して変化されている。

【００９８】

【表３Ｃ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(85.7%)	G(26.3%)	G(19.8%)	G(19.9%)	G(18.6%)	G(21.6%)	G(17.4%)	F(65.4%)	D(100.0%)	Y(70.1%)	W(100.0%)
		S(7.5%)	D(21.5%)	R(11.1%)	S(13.8%)	S(15.5%)	Y(12.5%)	A(13.7%)	L(16.9%)		P(11.6%)	
		K(6.8%)	E(10.5%)	S(10.9%)	A(8.0%)	A(9.4%)	S(11.5%)	Y(12.8%)	Y(9.0%)		I(9.4%)	
			V(9.6%)	P(7.3%)	R(7.8%)	Y(8.8%)	A(8.4%)	S(9.9%)	I(8.8%)		V(8.8%)	
			A(9.3%)	L(7.0%)	Y(7.4%)	L(6.8%)	D(8.2%)	W(8.3%)				
			R(8.8%)	D(6.7%)	V(7.0%)	V(5.9%)	T(5.8%)	P(7.0%)				
			S(7.6%)	V(6.2%)	T(6.5%)	D(5.8%)	R(5.6%)	T(5.0%)				
			L(6.6%)	A(5.9%)	P(5.5%)	R(5.7%)	W(5.3%)	L(4.9%)				
				Y(5.7%)	D(5.4%)	T(5.3%)	N(5.1%)	D(4.6%)				
				T(4.8%)	L(4.4%)	W(4.1%)	L(4.9%)	V(4.3%)				
				I(3.7%)	I(3.3%)	P(3.7%)	V(3.5%)	R(3.2%)				
				E(3.6%)	E(3.2%)	E(3.3%)	E(2.5%)	E(2.8%)				
				K(2.6%)	W(3.0%)	N(2.6%)	P(2.2%)	N(2.4%)				
				N(2.5%)	F(2.5%)	F(2.3%)	F(1.7%)	F(1.9%)				
				W(2.2%)	N(2.3%)	I(2.3%)	K(1.3%)	I(1.7%)				

【００９９】

表３Ｄ．　長さＬ＝１０を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。全体の可変性を増加するために、ＨＣ－ＣＤＲ３ループの前の位置９４もＨＣ－ＣＤＲ３ループ長１０に対して変化されている。

【０１００】

【表３Ｄ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(90.7%)	G(25.6%)	G(17.3%)	G(19.1%)	G(19.1%)	G(18.5%)	G(17.8%)	Y(17.7%)	F(76.2%)	D(100.0%)	Y(77.3%)	W(100.0%)
		K(9.3%)	D(23.7%)	R(12.8%)	S(13.7%)	S(15.5%)	S(13.6%)	Y(14.9%)	G(15.3%)	L(15.9%)		I(11.4%)	
			E(12.1%)	S(11.5%)	Y(8.7%)	A(9.8%)	Y(10.1%)	S(12.1%)	A(14.3%)	I(7.9%)		P(11.3%)	
			R(10.0%)	P(8.1%)	A(8.2%)	Y(9.2%)	A(9.9%)	D(9.4%)	W(7.9%)				
			V(9.9%)	L(7.9%)	R(7.8%)	V(7.6%)	T(7.4%)	A(7.5%)	P(7.7%)				
			A(9.5%)	V(6.4%)	V(6.9%)	D(5.7%)	L(6.1%)	T(5.7%)	S(7.5%)				
			S(9.2%)	D(5.8%)	D(6.5%)	T(5.5%)	V(5.9%)	N(5.5%)	L(5.0%)				
				A(5.8%)	T(6.3%)	R(5.5%)	D(5.8%)	W(5.3%)	T(4.6%)				
				Y(5.4%)	P(4.9%)	L(4.3%)	W(4.9%)	R(5.0%)	V(4.3%)				
				T(4.5%)	L(4.8%)	W(3.7%)	R(4.5%)	L(4.6%)	D(3.5%)				
				E(3.9%)	I(3.4%)	P(3.6%)	P(3.7%)	V(4.0%)	R(3.3%)				
				I(3.9%)	E(3.1%)	E(3.3%)	E(2.9%)	P(2.9%)	N(2.7%)				
				N(2.3%)	W(2.8%)	I(3.1%)	N(2.7%)	E(2.1%)	E(2.6%)				
				F(2.3%)	F(2.1%)	N(2.2%)	I(2.1%)	F(1.7%)	F(2.0%)				
				W(2.2%)	K(1.8%)	F(1.8%)	F(1.9%)	K(1.4%)	I(1.8%)				

【０１０１】

表３Ｅ．　長さＬ＝１１を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。全体の可変性を増加するために、ＨＣ－ＣＤＲ３ループの前の位置９４もＨＣ－ＣＤＲ３ループ長１１に対して変化されている。

【０１０２】

【表３Ｅ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(87.7%)	G(28.8%)	G(19.1%)	G(18.9%)	G(19.4%)	G(20.8%)	G(16.5%)	Y(18.6%)	Y(18.8%)	F(77.3%)	D(100.0%)	Y(85.1%)	W(100.0%)
		K(12.3%)	D(27.3%)	R(12.5%)	S(14.1%)	S(16.6%)	S(16.4%)	S(14.5%)	G(17.0%)	G(16.8%)	L(15.2%)		P(14.9%)	
			E(11.5%)	S(10.9%)	Y(9.6%)	Y(12.1%)	A(10.6%)	Y(12.8%)	S(10.8%)	A(12.9%)	I(7.5%)			
			V(11.1%)	P(8.3%)	R(8.3%)	A(10.1%)	Y(10.5%)	A(9.0%)	D(8.0%)	W(9.7%)				
			A(11.0%)	L(8.0%)	A(7.4%)	V(7.0%)	V(7.0%)	T(7.1%)	N(6.4%)	P(8.1%)				
			R(10.4%)	Y(6.4%)	V(7.4%)	D(6.1%)	T(6.0%)	L(5.9%)	R(6.0%)	S(6.3%)				
				D(5.9%)	D(6.3%)	T(5.5%)	D(5.8%)	D(5.8%)	A(6.0%)	L(5.1%)				
				A(5.7%)	T(5.5%)	R(4.5%)	L(4.7%)	W(5.5%)	T(5.4%)	T(4.7%)				
				V(5.6%)	P(4.9%)	L(4.4%)	R(4.4%)	R(5.3%)	W(5.2%)	V(3.7%)				
				T(4.5%)	L(4.6%)	W(3.5%)	W(4.0%)	V(5.1%)	L(4.8%)	R(3.1%)				
				I(4.1%)	I(4.3%)	I(3.5%)	P(3.2%)	P(3.9%)	V(3.8%)	D(3.0%)				
				E(3.6%)	E(3.4%)	P(2.6%)	I(2.4%)	E(3.1%)	P(3.2%)	N(3.0%)				
				F(2.8%)	W(3.2%)	E(2.3%)	E(2.3%)	N(3.0%)	E(2.7%)	F(2.7%)				
				N(2.5%)	N(2.2%)	F(2.3%)	N(2.0%)	F(2.4%)	F(2.2%)	E(2.3%)				

【０１０３】

表３Ｆ．　長さＬ＝１２を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。

【０１０４】

【表３Ｆ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(33.2%)	G(18.5%)	G(19.7%)	G(18.1%)	G(19.2%)	G(19.9%)	G(15.2%)	Y(20.2%)	Y(22.6%)	F(86.5%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(28.8%)	R(14.4%)	S(12.6%)	S(17.5%)	S(18.8%)	S(16.6%)	S(14.8%)	G(17.9%)	G(17.0%)	L(13.5%)			
			E(13.4%)	P(9.9%)	Y(12.2%)	Y(12.1%)	Y(11.8%)	Y(12.4%)	Y(14.4%)	S(10.1%)	A(14.3%)				
			A(12.3%)	S(9.7%)	R(8.6%)	V(8.6%)	A(11.5%)	A(9.6%)	A(7.6%)	D(9.7%)	W(12.1%)				
			V(12.2%)	L(9.3%)	A(7.7%)	A(8.3%)	V(6.6%)	T(6.9%)	T(7.4%)	N(8.3%)	P(7.5%)				
				V(6.4%)	V(7.4%)	D(6.6%)	D(6.6%)	V(6.5%)	L(7.0%)	W(5.5%)	S(5.3%)				
				Y(5.8%)	D(6.3%)	T(5.8%)	T(5.8%)	D(5.3%)	W(5.8%)	R(5.3%)	L(4.1%)				
				A(5.5%)	T(5.4%)	R(5.2%)	L(4.5%)	W(5.1%)	R(5.6%)	T(5.3%)	T(4.0%)				
				D(5.4%)	L(5.2%)	L(4.6%)	R(4.2%)	L(4.9%)	P(5.4%)	A(4.8%)	V(3.1%)				
				T(4.6%)	I(4.5%)	I(3.9%)	W(3.7%)	R(4.2%)	V(5.4%)	P(3.8%)	D(2.8%)				
				E(4.0%)	P(4.4%)	W(3.3%)	I(2.7%)	P(3.7%)	D(5.1%)	L(3.5%)	R(2.5%)				
				I(3.9%)	E(3.4%)	P(3.2%)	N(2.3%)	I(2.4%)	N(3.4%)	V(3.1%)	F(2.3%)				
				K(2.8%)	W(2.7%)	E(2.6%)	P(2.1%)	E(2.4%)	E(3.1%)	E(2.5%)	N(2.2%)				

【０１０５】

表３Ｇ．　長さＬ＝１３を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。

【０１０６】

【表３Ｇ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(40.5%)	G(17.6%)	G(20.8%)	G(17.1%)	G(20.0%)	G(19.4%)	G(19.5%)	Y(18.9%)	Y(24.9%)	Y(22.8%)	F(100.0%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(32.2%)	R(16.0%)	S(12.2%)	S(16.0%)	S(18.5%)	S(17.6%)	S(15.8%)	G(16.5%)	G(18.2%)	G(20.3%)				
			V(13.9%)	P(12.1%)	R(11.4%)	Y(14.5%)	Y(13.4%)	Y(13.9%)	Y(15.2%)	S(14.1%)	D(10.6%)	A(15.4%)				
			A(13.4%)	S(10.9%)	Y(10.7%)	V(9.0%)	A(9.8%)	A(9.9%)	A(8.4%)	L(7.5%)	N(9.4%)	W(14.5%)				
				L(10.4%)	A(7.9%)	A(8.3%)	V(7.8%)	V(7.2%)	V(7.2%)	T(7.3%)	S(9.2%)	P(6.8%)				
				A(7.1%)	V(7.8%)	D(7.7%)	D(6.4%)	D(7.2%)	T(7.1%)	P(6.6%)	W(6.0%)	S(5.2%)				
				V(6.2%)	D(6.9%)	R(7.1%)	T(5.6%)	T(6.7%)	R(6.1%)	A(6.5%)	R(5.0%)	L(4.1%)				
				Y(5.8%)	L(6.4%)	T(5.8%)	L(5.2%)	L(6.0%)	L(5.7%)	R(6.5%)	T(4.7%)	V(3.2%)				
				D(4.8%)	P(5.6%)	I(5.2%)	R(5.1%)	W(4.8%)	W(5.6%)	V(5.7%)	A(4.2%)	T(3.0%)				
				T(4.7%)	T(5.5%)	L(4.8%)	W(4.3%)	R(4.2%)	D(5.6%)	D(5.2%)	P(3.9%)	R(2.7%)				
				I(4.3%)	I(4.8%)	P(4.5%)	I(3.8%)	P(3.2%)	P(3.9%)	W(5.2%)	L(3.8%)	D(2.2%)				

【０１０７】

表３Ｈ．　長さＬ＝１４を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。

【０１０８】

【表３Ｈ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(45.4%)	G(21.9%)	G(20.5%)	G(20.0%)	G(20.5%)	G(21.6%)	G(20.3%)	Y(21.3%)	Y(26.0%)	Y(30.1%)	Y(25.1%)	F(100.0%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(38.2%)	R(16.4%)	S(13.4%)	Y(15.7%)	S(19.8%)	S(20.1%)	S(18.5%)	G(20.1%)	G(16.3%)	G(18.3%)	G(23.0%)				
			E(16.4%)	P(12.4%)	Y(12.9%)	S(15.7%)	Y(15.7%)	Y(13.7%)	Y(17.1%)	S(16.2%)	S(14.2%)	D(12.2%)	A(16.4%)				
				L(11.6%)	R(12.6%)	D(9.9%)	A(9.5%)	A(10.4%)	A(9.3%)	T(7.8%)	P(9.0%)	N(9.9%)	W(14.7%)				
				S(10.7%)	V(9.1%)	V(9.3%)	V(8.9%)	V(8.7%)	T(8.3%)	A(7.8%)	L(8.2%)	S(9.2%)	P(6.7%)				
				A(7.6%)	L(8.5%)	R(8.4%)	D(7.0%)	D(7.7%)	V(8.1%)	V(7.3%)	R(7.3%)	W(6.0%)	S(4.4%)				
				Y(7.4%)	A(8.2%)	A(8.3%)	T(6.9%)	L(6.3%)	D(6.6%)	P(6.7%)	T(7.1%)	R(5.5%)	L(4.2%)				
				V(6.6%)	P(7.8%)	T(6.5%)	R(6.3%)	T(6.3%)	L(5.9%)	L(6.5%)	A(6.6%)	P(4.6%)	V(2.9%)				
				T(5.4%)	D(7.1%)	L(6.2%)	L(5.4%)	W(5.3%)	W(5.9%)	R(6.3%)	V(5.5%)	A(4.2%)	T(2.6%)				

【０１０９】

表３Ｉ．　長さＬ＝１５を有するＨＣ－ＣＤＲ３ループに対する最適化されたライブラリーのアミノ酸組成。各位置に対して、存在する異なるアミノ酸がそれらの相対頻度と共に示されている。

【０１１０】

【表３Ｉ】

92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	101	102	103
C(100.0%)	A(100.0%)	R(100.0%)	D(54.1%)	G(20.8%)	G(23.7%)	Y(19.4%)	G(21.0%)	G(22.2%)	S(23.4%)	G(23.5%)	Y(28.4%)	Y(34.3%)	Y(35.1%)	G(27.3%)	F(100.0%)	D(100.0%)	Y(100.0%)	W(100.0%)
			G(45.9%)	R(19.6%)	Y(17.2%)	G(17.9%)	S(19.9%)	S(21.4%)	G(21.6%)	Y(21.3%)	G(19.3%)	G(15.5%)	G(16.9%)	Y(23.5%)				
				P(14.2%)	R(13.7%)	S(17.2%)	Y(17.7%)	Y(15.1%)	Y(14.9%)	S(19.2%)	S(15.7%)	S(14.0%)	D(11.9%)	W(16.5%)				
				L(12.1%)	S(12.6%)	D(10.6%)	V(9.6%)	V(10.0%)	V(8.8%)	T(7.7%)	R(8.0%)	L(8.4%)	N(11.9%)	A(16.4%)				
				S(10.9%)	V(9.0%)	V(9.9%)	A(9.5%)	A(9.2%)	T(8.6%)	A(7.7%)	A(7.5%)	P(8.3%)	S(8.3%)	P(6.4%)				
				V(7.6%)	L(8.1%)	R(9.0%)	D(8.5%)	D(8.3%)	A(8.4%)	V(7.2%)	P(7.3%)	T(6.8%)	W(6.0%)	S(4.0%)				
				Y(7.5%)	P(7.9%)	A(8.5%)	R(7.0%)	T(6.9%)	D(7.6%)	D(6.9%)	T(6.9%)	R(6.7%)	R(5.2%)	L(3.5%)				
				A(7.3%)	D(7.8%)	T(7.5%)	L(6.8%)	L(6.8%)	L(6.7%)	L(6.5%)	L(6.8%)	A(6.0%)	P(4.6%)	T(2.4%)				

【０１１１】

次に、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対するオリゴヌクレオチドを、表３Ａ～Ｉの値に基づいて設計した。１を超えるアミノ酸を有する位置で、図５から対応するトリマーブロックが選択され、混合物として所望の分率（percent fraction）で、設計に含まれる。完全なコドンをコード化するトリマーブロックを使用することは有利である。これは、それらが、オリゴヌクレオチドを変性する標準的な場合である望まない停止コドンの生成又は望まないアミノ酸の取り込みを起こさずに、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループの各々の位置で表３Ａ～Ｉに示されるアミノ酸組成及び頻度を生じることができるからである。オリゴヌクレオチドの定常部分（１つのみのアミノ酸が存在する位置、又はクローニングに必要な部分）が、代わりに設計され、標準のオリゴヌクレオチド合成によって合成される。１５のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対するオリゴヌクレオチドの設計が図１１に示されている。他のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対するオリゴヌクレオチドを、表３Ａ～Ｉに与えられた値を用いて等価な方法で設計した。オリゴヌクレオチドは、これらのトリマーブロック技術を用いてＥｌｌａＢｉｏｔｅｃｈによって合成された。

【０１１２】

実施例６．　ベースベクター＿ＶＨ３＿ＶＫ１＿ｖ２２に、ＨＣ－ＣＤＲ３多様性を含有するオリゴヌクレオチドを挿入することによるライブラリーの多様性の生成

第１ステップでは、ＨＣ－ＣＤＲ３ループ多様性をコード化する一本鎖オリゴヌクレオチドを、プライマーＳｔｙ＿ｒｅｖ＿１（配列番号９）及びＨｅｒｃｕｌａｓｅＩＩ－ＦｕｓｉｏｎＤＮＡポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　ｃａｔ＃６００６７９）と、以下の条件：９８℃で３５秒間の変性、４７℃で１５秒間のアニーリング、ループ長７～１１及び１２～１５をコード化するオリゴヌクレオチドに対して、それぞれ４７℃及び６５℃で１５秒間の伸長を用いて、プライマー伸長（二本鎖オリゴヌクレオチドの生成）にかけた。得られた二本鎖オリゴヌクレオチドを、次に、プライマーＰｓｔｌ＿ｆｏｒ＿１（配列番号１０）、及びＳｔｙ＿ｒｅｖ＿２（配列番号１１）を用い、ＨｅｒｃｕｌａｓｅＩＩ－ＦｕｓｉｏｎＤＮＡポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　ｃａｔ＃６００６７９）を用い、以下の条件：９５℃で１５秒間の変性、５２℃で１５秒間のアニーリング、７２℃で１５秒間の伸長を１６サイクル繰り返すことによって増幅した。

【０１１３】

増幅後、オリゴヌクレオチドをＱｉａｑｕｉｃｋヌクレオチドリムーバルキット（nucleotide Removal Kit）（Ｑｉａｇｅｎ　Ｃａｔ＃２８３０４）により精製し、Ｐｓｔｌ／Ｓｔｙｌ制限酵素での消化にかけ、各ＨＣ－ＣＤＲ３ループ長に対して，別々に、挿入物：ベクター比１：６（５×１０^{7}／１０^{8}クローン／μｇの範囲の形質転換効率）でＰｓｔｌ／Ｓｔｙｌ消化したファージミドベクターに結紮した。得られた結紮物を、次に、ＸＬ１ブルー－ＭＲＦ’エレクトロコンピテントセル（５０μｌ細胞中５０ｎｇベクター）に移入し、２３×２３ｃｍの２ＸＴＹアガーバイオアッセイプレート上にプレート化し、３７℃で一夜（ｏ／ｎ）成長させた。次の日の細胞を２ＸＴＹＡＧ／グリセロール１７％中

でプレートから採取し、－８０℃で保存した。所望のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布及び１．３×１０^{10}の全体にわたるライブラリーの複雑さを実現するため、形質転換の効率を、所望のＨＣ－ＣＤＲ３ループ長分布及び複雑さに到達するまで、クローンの採取サイクルを定期的に繰り返してチェックした。次に、全ての個々の採取サイクルからクローンを一緒にプールして最終ライブラリーを生成した。

【０１１４】

ファージフォーマットでライブラリーを調製するために、６ｍｌのプールした細菌を４Ｌの２ＸＴＹ／アンピシリン／２％グルコース中でインキュベートした。ここで、８．４×１０^{10}の細菌の全体に対して、開始のＯＤ６００＝０．１は約６．５倍のライブラリーの複雑さを示す。ＯＤ６００＝０．５が達成されたら、細胞をＭＯＩ＝１０でＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージにより重複感染させ、媒体を２ＸＴＹ／アンピシリン／カナマイシンに変更し、細胞を３０℃で一夜振盪しながらインキュベートした。得られた細胞培養物を遠心分離し、ファージライブラリを含有する上清を、２回のＰＥＧ沈澱ステップ（３／１０の容積について２０％ＰＥＧ８０００／ＮａＣｌ２．５Ｍを添加）にかけ、次いで、ＣｓＣｌ勾配での更なる精製ステップのために１ＸＴＥ中でファージを再懸濁した。次に、ファージ個体群を勾配から集め、２Ｌの１ＸＴＥに対して一夜透析してＣｓＣｌを除去し、個体群のファージ濃度をＴＵ、ｐｆｕ、及びＰＰ／ｍｌによって決定し、ＴＢＥ１Ｘ、グリセロール１５％、$NaN_3$０．０２％中に保存した。

【０１１５】

実施例７．　ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）への選択的結合の同定

選択の幾つかのステップにおいて、標準のブロッキングバッファーを２％ミルクで作成し、従ってこれは多量のウシアルブミンを含有するので、本発明者らは、この可溶性ＢＳＡが、選択のためのプラスチック上にコーティングされた標的組み換えＢＳＡタンパク質と競合できると判断した。結論として、この標的に関するファージの選択に対して、１％カゼイン（ロッシュ（Roche））を含むブロッキングバッファー試薬を、標準のブロッキングバッファーに代えて使用した。加えて、コーティングに使用されたＢＳＡ溶液中に存在するNaN_3に対する特異的なファージの選択を防止するために、０．０２％NaN_3を含有するブロッキングバッファー試薬を使用し、これによって、NaN_3に潜在的に特異的なファージを溶液内に残し、洗浄除去した。

【０１１６】

この標的に対して、ライブラリーからの２．１×１０^{12}ＴＵ（ファージ）を、３ｍｌの最終体積で、５０μｇ／ｍｌ（第１ラウンド）の濃度で、イムノチューブ上にコーティングされ、それぞれ、３０μｇ／ｍｌ及び１５μｇ／ｍｌにスケールダウンされた精製されたＢＳＡと共に、以下の２種類の選択のラウンドでインキュベートした。

【０１１７】

入力／出力比は、特異的クローンの富化の尺度を表し、実際に、これは選択の第１ラウンドでは通常非常に高く、前のラウンドから溶出されたファージの個体群が特定のファーに対して段階的に富化される場合、引き続きのラウンドで急速に低下する。この標的に対して、入力／出力比は、パニングの第１ラウンドから第３ラウンドまでの特定のクローンの可能な富化を示唆した（図１２Ａ）。ポリクローナルファージを、ＢＳＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。抗－ＢＳＡＭ１３－ｓｃＦｖクローンが、選択の第２及び第３ラウンドで存在した（図１２Ｂ）。ウェルにコーティングされた市販品として製造された抗原（ＢＰ１８０及びコラーゲンＶＩＩ）への非特異的結合は、おそらく、製造者（ＭＢＬ）によって使用されたＢＳＡを含有するブロッキング試薬による（図１２Ｂ）。選択の第３ラウンドにおける抗－ＢＳＡクローンのパーセンテージは、８９のうち５０（５６％）であった（図１２Ｃ）。分析された１２の陽性クローンはすべて、ＢＳＡに特異的であった（図１２Ｄ）。

【０１１８】

実施例８．　オバルブミン（ＯＶＡ）への選択的結合の同定

この標的に対して、総クローンとして９．３×１０^{12}ＴＵからの陽性ファージの選択を

、５０μｇ／ｍｌの濃度のＯＶＡであって、選択の以下の２種類のラウンドにおいて、それぞれ３０μｇ／ｍｌ及び１０μｇ／ｍｌにスケールダウンされたものでイムノチューブをコーティングすることにより実施した。入力／出力比は、パニングの第１ラウンドから第２及び第３ラウンドまでの特定のクローンの可能な富化を示唆した（図１３Ａ）。ポリクローナルファージを、ＯＶＡ及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。抗－ＯＶＡＭ１３－ｓｃＦｖクローンが、他の抗原へのいずれの非特異的結合もなく、選択のＩＩ及びＩＩＩラウンドで存在した（図１３Ｂ）。選択の第３ラウンドにおける抗－ＯＶＡクローンのパーセンテージは、９４のうち８１（８６％）であった（図１３Ｃ）。１０の陽性クローンの分析は、それらの全てがＯＶＡに特異的であることを示した（図１３Ｄ）。

【０１１９】

実施例９．　デスモグレイン１（Ｄｓｇ１）への選択的結合の同定

ライブラリーの選択を、１０のＤａｇ１をプレコーティングしたウェル（ＭＢＬ　ＥＬＩＳＡ）及びライブラリーを含有するバッファーの１６００μｌ中９．３×１０^{12}ＴＵ（１６０μｌ／ウェル）を用いて実施した。コーティングした抗原の濃度は未知である。入力／出力比は、パニングの第１ラウンドから第３ラウンドまでの特定のクローンの可能な富化を示唆した（図１４Ａ）。ポリクローナルファージを、Ｄｓｇ１をプレコーティングしたウェル及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。抗－Ｄｓｇ１Ｍ１３－ｓｃＦｖが、Ｄｅｓ３及びＤｅｓ３由来の構造物（ＥＣ－１２）以外の他の抗原へのいずれの非特異的結合なく、選択の第２及び第３ラウンドで存在した（図１４Ｂ）。検出された交差反応性は、Ｄｓｇ１及び３の間の高い配列相同性によると思われる。選択の第３ラウンドにおける抗－Ｄｓｇ１クローンのパーセンテージは、９４のうち８６（９１％）であった（図１４Ｃ）。８つの陽性クローンの分析は、それらの全てがＤｓｇ１に特異的であることを示した（図１４Ｄ）。

【０１２０】

実施例１０．　線維芽細胞成長因子受容体４（ＦＧＦＲ４）への選択的結合の同定

ライブラリーの選択を、１０μｇ／ｍｌの濃度でＦＧＦＲ－４をコーティングした１０のマイクロプレートウェル中、１６００μｌのライブラリー（１６０μｌ／ウェル）を用いて実施した。選択の３つのラウンドはすべて、同じ濃度のＦＧＦＲ－４をコーティングしたウェルで実施した。ＦＧＦＲ－４組み換えタンパク質は、ヒトＩｇＧ１ＦＣに融合されたキメラタンパク質であるので、選択される抗－ＦＣファージの量を減少させるために、第１ラウンドはＦＣに融合された異なる組み換えタンパク質（８μｇ／ｍｌのＤｓｇ３－ＦＣ）を用いて実施した。入力／出力比は、パニングの第１ラウンドから第３ラウンドまでの特定のクローンの可能な富化を示唆した（図１５Ａ）。ポリクローナルファージを、ＦＧＦＲ－４及び幾つかの非関連抗原についてファージＥＬＩＳＡによって試験した。抗－ＦＧＦＲ－４Ｍ１３－ｓｃＦｖクローンが、他の抗原へのいずれの非特異的結合なく、選択の第２及び第３ラウンドで存在した（図１５Ｂ）。注目すべきことに、Ｄｓｇ３－ＦＣとの競合的選択は全ての抗－ＦＣファージを除去しなかった。実際に、ポリクローナル混合物は、ＦＧＦＲ－４及びＤｓｇ３－ＦＣの両方と反応した（図１５Ｂ）。選択の第３ラウンドの抗－ＦＧＦＲ－４－ＦＣクローンのパーセンテージは、７７のうち７２（９４％）であった（図１５Ｃ）。分析された２０の陽性クローンはＦＧＦＲ－４に結合し、４つがＤｓｇ３－ＦＣにも弱く反応した（図１５Ｄ）。従って、Ｄｓｇ３－ＦＣとの競合的バイオパニングは抗－ＦＣクローンの量を減少することに成功した。

【０１２１】

４つの標的についての選択の結果を表４にまとめた。

【０１２２】

表４－　４つの異なる確認標的についてのライブラリースクリーニングの結果のまとめ。Ａ）各標的に対して陽性として選択されたファージの数とパーセンテージ、Ｂ）結合性対特異的標的又は他の非関連組み換えタンパク質に関する特異性、及び、各標的に対して見出された異なる配列の数（以下参照）

【０１２３】
【表４Ａ】
Ａ

抗原	ラウンド数	分析したクローンの数	陽性クローンの数	抗ー標的陽性クローン％	標的に対する特異性
ＢＳＡ	３	８９	５０	５６％	１０／１２
ＯＶＡ	３	９４	８１	８６％	１０／１０
ＤＳＧ１	３	９４	８６	９１％	８／８
ＦＧＦＲ４	３	７７	７２	９４％	１７／２０

【０１２４】
【表４Ｂ】
Ｂ

抗原	陽性クローンの数	配列クローン	異なる配列の数	配列のグループの数
ＢＳＡ	５０	５	１	１
ＯＶＡ	８１	１０	１０	４
ＤＳＧ１	８６	８	５	３
ＦＧＦＲ４	７２	１０	３	３

【０１２５】
４つの標的抗原の全てについて、選択が成功し、大量のクローンを生じ、そして重要なこととして、高い特異性で標的抗原を認識するクローンを生じた。
【０１２６】
実施例１１．　選択されたファージのＨＣ－ＣＤＲ３ＤＮＡ配列の同定
表４のパネルＢに報告されているように、多くのクローンが各標的に対して配列決定され、その配列は分析されて、表５に示されているように配列されている（以下を参照）。
【０１２７】
ＢＳＡの場合、５つのクローンが配列決定され、それらの全てが同じＨＣ－ＣＤＲ３配列を示した。その代わりに、配列決定された１０のＯＶＡ陽性クローンは全て、特有のクローンであり、少なくとも４つの異なるクローンのファミリーに対応した。また、Ｄｓｇ１の場合には、８つの陽性クローンが配列決定され、これらの全てが特異的であり、８つのうちの５つが特有であり、３つの異なるクローンのファミリーであった。
【０１２８】
最後に、１０のＦＧＦＲ－４特異的クローンが配列決定され、７つが同一の配列を有することが示された。３つの異なるクローンのファミリーが同定された。
【０１２９】
Ｍ１３－ｓｃＦｖクローン（ｃｌ．３３）の、その標的ＦＧＦＲ－４に対する親和性を、ファージＥＬＩＳＡによって決定し、ナノモル範囲（８，７×１０$^{-8}$Ｍ）であることが見いだされた。この値は、これらのＨＣ－ＣＤＲ３のみのライブラリーで選択されたファージに対する１０５～４７５ｎＭの親和性を見出したＰｆｉｚｅｒ（Mahon et al. J.Mol:Biol. 405, 1712, 2013（非特許文献７））によって報告された値と互角である。
【０１３０】
表５　選択を通して単離されたクローンのサブセットの配列分析。各標的に対して、５～１０のクローンが配列決定された。
【０１３１】

【表５】

抗原	クローン		位置94	H-CDR3	位置103	CDR3
BSA	40,46,56,58,82	CA	R	DPLDIYSWGYFDY	W	13
OVA	2	CA	V	VTGVLWGFDY	W	10
OVA	11	CA	K	DYASGYGYFDY	W	11
OVA	58	CA	K	DYASGWGYFDY	W	11
OVA	15	CA	K	DFGRGYGYFDY	W	11
OVA	65	CA	K	DFRSGYGYFDY	W	11
OVA	40	CA	Q	DVRRGCGYFDY	W	11
OVA	53	CA	K	DVARGYGYFDY	W	11
OVA	95	CA	K	DVWRGYGYFDY	W	11
OVA	88	CA	K	DVGRGVGYFDY	W	11
OVA	87	CA	K	VVGGVLYAFDY	W	11
DSG1	24,32,37,47	CA	R	GAGYYGLPVYAFDY	W	14
DSG1	73	CA	R	GAGYSGLPVYAFDY	W	14
DSG1	80	CA	R	GAGYLGYPVYAFDY	W	14
DSG1	91	CA	R	ANWASSYEFDY	W	11
DSG1	1	CA	R	VGRYGYYDAAFDY	W	13
FGFR4	2,10,27,28,33,70,73	CA	R	EGDPDLYFFDY	W	11
FGFR4	18,25	CA	R	GYAWPSWFDY	W	10
FGFR4	30	CA	R	EWWDYLYLDY	W	10

【０１３２】

結論

得られた結果から、ライブラリーの設計は、４つの試験した標的抗原の全てに対して成功した。高い標的親和性が得られた（表４）ことに加えて、ライブラリーはまた、各標的に対して種々の異なるクローン配列のファミリーを提供する。重要なこととして、得られた結果が、１１のＨＣ－ＣＤＲ３長を有するほとんどの配列を持つライブラリーの基本的設計原理をよく反映している。加えて、少数の（大抵１つのみ）の異なるアミノ酸のみを有する多くの選択されたクローンの存在により、設計で履行されたように９～１１の、最も重要なＨＣ－ＣＤＲ３長に対するすべてのＨＣ－ＣＤＲ３ループの変異について大きな対象範囲を提供することが確認される。

【０１３３】

参考文献

－ Barbas CF 3rd, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 May 15;89(10):4457-61.

【０１３４】

－ Braunagel M, Little M. Construction of a semisynthetic antibody library using trinucleotide oligos. Nucleic Acids Res. 1997 Nov 15;25(22):4690-1.

【０１３５】

－ Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. 1987 Aug 20;196(4):901-17.

【０１３６】

— DeKosky BJ, Ippolito GC, Deschner RP, Lavinder JJ, Wine Y, Rawlings BM, Varadarajan N, Giesecke C, Dörner T, Andrews SF, Wilson PC, Hunicke-Smith SP, Willson CG, Ellington AD, Georgiou G.: High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. Nat Biotechnol. 2013 Feb;31(2):166-9.

【0137】

— de Wildt RM1, Hoet RM, van Venrooij WJ, Tomlinson IM, Winter G. Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. J Mol Biol. 1999 Jan 22;285(3):895-901.

【0138】

— Ewert S1, Huber T, Honegger A, Plückthun A. Biophysical properties of human antibody variable domains. Mol Biol. 2003 Jan 17;325(3):531-53.

【0139】

— Fellouse FA, Esaki K, Birtalan S, Raptis D, Cancasci VJ, Koide A, Jhurani P, Vasser M, Wiesmann C, Kossiakoff AA, Koide S, Sidhu SS. High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. J Mol Biol. 2007 Nov 2;373(4):924-40.

【0140】

— Glanville J1, Zhai W, Berka J, Telman D, Huerta G, Mehta GR, Ni I, Mei L, Sundar PD, Day GM, Cox D, Rajpal A, Pons J. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20216-21.

【0141】

— Green LL. Transgenic mouse strains as platforms for the successful discovery and development of human therapeutic monoclonal antibodies. Curr Drug Discov Technol. 2014 Mar;11(1):74-84.

【0142】

— Hoet RM, Cohen EH, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, Rem L, Frans N, Daukandt M, Pieters H, van Hegelsom R, Neer NC, Nastri HG, Rondon IJ, Leeds JA, Hufton SE, Huang L, Kashin I, Devlin M, Kuang G, Steukers M, Viswanathan M, Nixon AE, Sexton DJ, Hoogenboom HR, Ladner RC. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. Nat Biotechnol. 2005 Mar;23(3):344-8.

【0143】

— Huang, S. C., Jiang, R., Glas, A. M. & Milner, E. C. Non-stochastic utilization of Ig V region genes in unselected human peripheral B cells. Mol. Immunol. 1996 33, 553-560.

【0144】

— Ippolito GC1, Hoi KH, Reddy ST, Carroll SM, Ge X, Rogosch T, Zemlin M, Shultz LD, Ellington AD, Vandenberg CL, Georgiou G. Antibody repertoires in humanized NOD-scid-IL2Rγ(null) mice and human B cells reveals human-like diversification and tolerance checkpoints in the mouse. PLoS One. 2012;7(4):e35497.

【0145】

— Kabat EA. Sequence of proteins of immunological interest. Bethesda: National Institute of Health; 1991, Vol.1.Fifth Ed.

【0146】

— Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoes s A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B. Fully synthetic human combinato rial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J Mol Biol. 2000 Feb 11;296(1):57-86.

【0147】
— Mahon CM, Lambert MA, Glanville J, Wade JM, Fennell BJ, Krebs MR, Armellino D, Yang S, Liu X, O'Sullivan CM, Autin B, Oficjalska K, Bloom L, Paulsen J, Gill D, Damelin M, Cunningham O, Finlay WJ.: Comprehensive interrogation of a minima list synthetic CDR-H3 library and its ability to generate antibodies with therap eutic potential. J Mol Biol. 2013 May 27;425(10):1712-30.

【0148】
— McCafferty J1, Fitzgerald KJ, Earnshaw J, Chiswell DJ, Link J, Smith R, Kent en J. Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. Appl Biochem Biotechnol. 1994 May-Jun; 47(2-3):157-71

【0149】
— Mondon P, Dubreuil O, Bouayadi K, Kharrat H. Human antibody libraries: a rac e to engineer and explore a larger diversity. Front Biosci. 2008 Jan 1;13:1117-29.

【0150】
— Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D. Design an d use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity ag ainst a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. J Biol Chem. 1 998 Aug 21;273(34):21769-76.

【0151】
— Philibert P, Stoessel A, Wang W, Sibler AP, Bec N, Larroque C, Sav en JG, Courtête J, Weiss E, Martineau P.: A focused antibody library f or selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. BMC Biot echnol. 2007 Nov 22;7:81.

【0152】
— Prassler J, Thiel S, Pracht C, Polzer A, Peters S, Bauer M, Nörenb erg S, Stark Y, Kölln J, Popp A, Urlinger S, Enzelberger M. HuCAL PLAT INUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and sup erior performance in mammalian expression systems. J Mol Biol. 2011 Oc t 14;413(1):261-78.

【0153】
— Silacci, M., Brack, S., Schirru, G., Marlind, J., Ettorre, A., Merlo, A., Vi ti, F., Neri, D.: Design, construction, and characterization of a large syntheti c human antibody phage display library. Proteomics. 2005 Jun;5(9):2340-50.

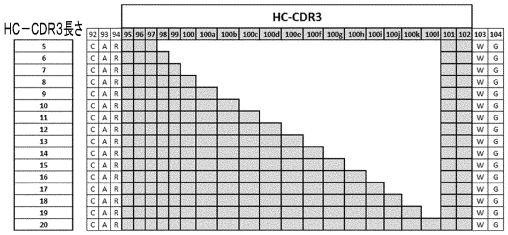
【0154】
— Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 1983 Apr 14;30 2(5909):575-81.

【0155】
— Zemlin M, Klinger M, Link J, Zemlin C, Bauer K, Engler JA, Schroeder HW Jr, Kirkham PM.: 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. J Mol Biol. 2003 Dec 5;334(4):733-49.

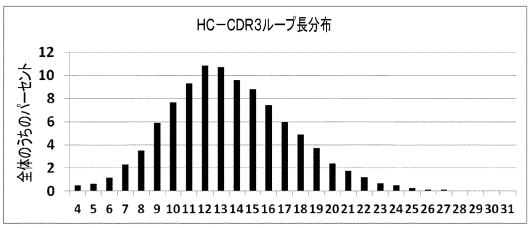
【図１】

Figure 1



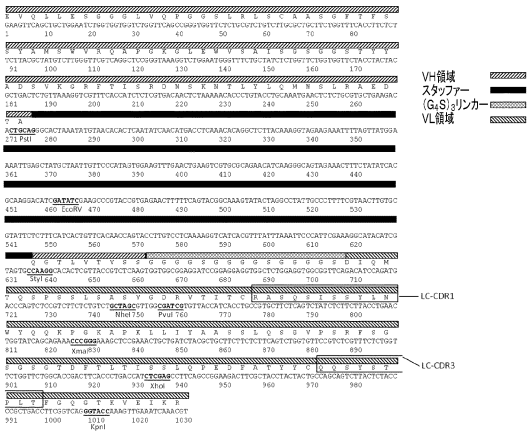
【図２】

Figure 2



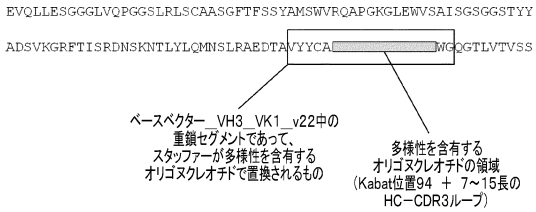
【図３】

Figure 3



【図４】

Figure 4



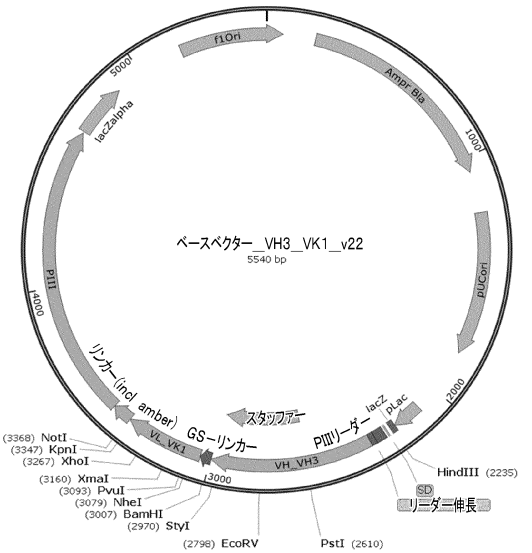
【図５】

Figure 5

トリマーブロック	アミノ酸	
GCT	Ala	A
GAC	Asp	D
GAA	Glu	E
TTC	Phe	F
GGT	Gly	G
CAT	His	H
ATA	Ile	I
AAA	Lys	K
CTG	Leu	L
ATG	Met	M
AAC	Asn	N
CCG	Pro	P
CAG	Gln	Q
CGT	Arg	R
TCT	Ser	S
ACT	Thr	T
GTT	Val	V
TGG	Trp	W
TAC	Tyr	Y

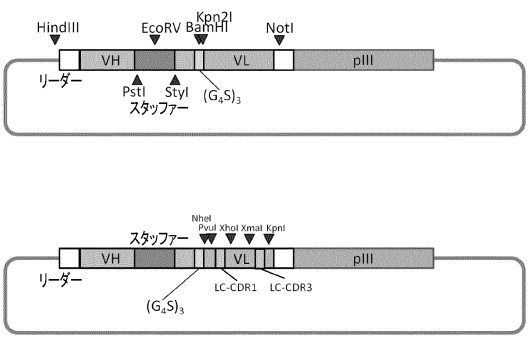
【図６】

Figure 6



【図７】

Figure 7



【図８－１】

抗体		CDR3H		CDR3H長さ
クレネズマブ(Crenezumab) MABT-5102A CHEMBL1743004	CAS	G.....DY	WGQG	3
ニボルマブ(Nivolumab) BMS-936558 CHEMBL2108738	CAR	ND.....DY	WGQG	4
アチヌマブ(Atinumab) CHEMBL1742987	CAT	EL.....FDL	WGQG	5
ダセツズマブ(Dacetuzumab) CHEMBL1743005	CAR	EG.....IYW	WGRG	5
エンシンキニマブ(Ensituximab) CHEMBL1743013	CVK	PG.....GDY	WGQG	5
サツモマブペンテチド(Satumomab pendetide) CHEMBL1743091	CER	SY.....YGH	WGHG	5
ブリアキヌマブ(Briakinumab) CHEMBL1742995	CKT	HGS.....HDN	RGQG	6
ランパリズマブ抗因子－D(Lampalizumab Anti-Factor-D) CHEMBL2109408	CER	EGG.....VNN	WGQG	6
オゾラリズマブ(Ozoralizumab) CHEMBL1743054	CAR	SPS.....GFN	WGQG	6
プロダルマブ(Prodalumab) CHEMBL1742996	CAR	RQL.....YFDY	WGQG	7
シタンズマブボガトックス(Citatuzumab bogatox) CHEMBL1743000	CAQ	NLE.....IPRT	FGQG	7
ダクリズマブ(Daclizumab) Ro-247375 CHEMBL1201605	CAR	GGG.....VFDY	WGQG	7
オポルツズマブモナトックス(Oportuzumab monatox) CHEMBL1743052	CAQ	NLE.....IPRT	FGQG	7
ポネズマブ(Ponezumab) PF-04360365 CHEMBL1743058	CAS	LYS.....LPVY	WGQG	7
ラドレツマブ(Radretumab) CHEMBL1743060	CAK	PFP.....YFDY	WGQG	7
ラムシルマブ(Ramucirumab) CHEMBL1743062	CAR	VTD.....AFDI	WGQG	7
サリルマブ(Sarilumab) SAR-153191 CHEMBL2108730	CAR	GRD.....SFDI	WGQG	7
シファリムマブ(Sifalimumab) CHEMBL1743069	CAR	DPI.....AAGY	WGQG	7
シムツズマブ(Simtuzumab) CHEMBL2109667	CAR	NWM.....NFDY	WGQG	7
アラシズマブペゴール(Alacizumab Pegol) CHEMBL1742983	CYR	IGED.....ALDY	WGQG	8
バシリキシマブシムレクト(Basiliximab Simulect) CHEMBL1201439	CSR	DYGY.....YFDF	WGQG	8
ブレンツキシマブベドチン(Brentuximab Vedotin) CHEMBL1742994	CAN	YGNY.....WFAY	WGQG	8
ダロツズマブ(Dalotuzumab) CHEMBL1743006	CAR	WGRV.....FFDW	WGQG	8
エナバシズマブ(Enavatuzumab) CHEMBL1743011	CTG	YYAD.....AMDY	WGQG	8
エタラシズマブエタラツズマブ(Etaracizumab Etaratuzumab) CHEMBL1743014	CAR	HLHG.....SFAS	WGQG	8
パノバクマブ(Panobacumab) CHEMBL1743055	CAR	DRYY.....GPEM	WGQG	8
キリスマブ抗－M1プライム(Quilizumab Anti-M1 Prime) CHEMBL2109456	CAR	DNWD.....AMDY	WGQG	8
ロンタリズマブ(Rontalizumab) RhuMAb IFNα CHEMBL1743066	CAS	WISD.....FFDY	WGQG	8
サマリズマブ(Samalizumab) CHEMBL1743067	CGR	SKRD.....YFDY	WGQG	8

【図８－２】

抗体		CDR3H		CDR3H 長さ
アリロクマブ(Alirocumab) CHEMBL2109540	CAK	DSNW.....GNFDL	WGRG	9
ブロゾズマブ(Blosozumab) LY-2541546 CHEMBL1742993	CAT	GDTT.....YKFDF	WGQG	9
カナキヌマブ(Canakinumab) ACZ-885 L04AC08 CHEMBL1201834	CAR	DLRT.....GPFDY	WGQG	9
エトロリズマブ(Etrolizumab) rhuMAb β7 抗－β7 Pro145223 CHEMBL1743015	CAR	TGSS.....GYFDF	WGQG	9
フィクラツズマブ(Ficlatuzumab) CHEMBL1743018	CAR	NYVG.....SIFDY	WGQG	9
フォラルマブ(Foralumab) CHEMBL1743020	CAR	QMGY.....WHFDL	WGRG	9
グレンバツムマブベドチン(Glembatumumab vedotin) CHEMBL1743028	CAR	GYNW.....NYFDY	WGQG	9
ロルボツズマブメルタンシン(Lorvotuzumab Mertansine) CHEMBL1743037	CAR	MRKG.....YAMDY	WGQG	9
オロキズマブ(Olokizumab) CHEMBL1743050	CAR	ESYY.....GFTSY	WGQG	9
パテクリズマブ(Pateclizumab) CHEMBL1743056	CSR	PTML.....PWFAY	WGQG	9
パトリツマブ(Patritumab) CHEMBL2109406	CAR	DKWT.....WYFDL	WGRG	9
スビズマブ(Suvizumab) CHEMBL1743074	CSR	GIPG.....YAMDY	WGQG	9
テプロツムマブ(Teprotumumab) Ro-4858696-000 CHEMBL1743079	CAR	ELGR.....RYFDL	WGRG	9
ウブリツキスマブ(Ublituxumab) CHEMBL1743084	CAR	YDYN.....YAMDY	WGQG	9
ボルセツズマブマフォドチン(Vorsetuzumab Mafodotin) CHEMBL2108672	CAR	DYGD.....YGMDY	WGQG	9
ムロモナブ－Cd3(Muromonab-Cd3) L04AA02 CHEMBL1201608	CAR	YYDD.....HYCLDY	WGQG	10
アバゴボマブ(Abagovomab) CHEMBL1742981	CAR	GEGN.....YAWFAY	WGQG	10
アブシキマブ(Abciximab) B01AC13 ReoPro CHEMBL1201584	CVR	PLYD.....YYAMDY	WGQG	10
アフツズマブ(Afutuzumab) Ro-5072759 HUMAB CHEMBL1743048	CAR	NVFD.....GYWLVY	WGQG	10
アレムツズマブキャンパス－1H(Alemtuzumab Campath-1H) L01XC04 CHEMBL1201587	CAR	EGHT.....AAPFDY	WGQG	10
アマツキシマブ(Amatuximab) CHEMBL1742984	CAR	GGYD.....GRGFDY	WGSG	10
アンルキンズマブ(Anrukinzumab) CHEMBL1742985	CAR	LDGY.....YFGFAY	WGQG	10
アルシツモマブ(Arcitumomab) CHEMBL1743090	CTR	DRGL.....RFYFDY	WGQG	10
ベズロトキズマブ(Bezlotoxumab) CHEMBL2108670	CAR	RRNW.....GNAFDI	WGQG	10
ガンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine) CHEMBL1742997	CAR	RGPY.....NWYFDV	WGQG	10
カルルマブ(Carlumab) CHEMBL1742999	CAR	YDGI.....YGELDF	WGQG	10
クリバツズマブテトラキセタン(Clivatuzumab tetraxetan) CHEMBL1743002	CAR	GFGG.....SYGFAY	WGQG	10
デムシズマブ(Demcizumab) CHEMBL2109384	CAR	DYDY.....DVGMDY	WGQG	10
エロツズマブ(Elotuzumab) CHEMBL1743010	CAR	PDGN.....YWYFDV	WGQG	10
ファルレツズマブ(Farletuzumab) CHEMBL1743016	CAR	HGDD.....PAWFAY	WGQG	10

【図８－３】

抗体		CDR3H		CDR3H 長さ
ファシヌマブ(Fasinumab) SAR-164877 CHEMBL2109528	CST	IFGV.....VTNFDN	WGQG	10
フランボツマブ(Flanvotumab) CHEMBL2108734	CAP	RYSS.....SWYLDY	WGQG	10
フォラビルマブ(Foravirumab) CHEMBL1743021	CAK	VAVA.....GTHFDY	WGQG	10
ゲボキズマブ(Gevokizumab) CHEMBL1743026	CAR	NRYD.....PPWFVD	WGQG	10
ギレンツキシマブ(Girentuximab) CA9-SCAN CG250 CHEMBL1743027	CAR	HRSG.....YFSMDY	WGQG	10
インテツムマブ(Intetumumab) CHEMBL1743032	CAR	EARG.....SYAFDI	WGQG	10
イトリズマブ(Itolizumab) CHEMBL1743033	CAR	RDYD.....LDYFDS	WGQG	10
イキセキズマブ(Ixekizumab) LY-2439821 CHEMBL1743034	CAR	YDYF.....TGTGVY	WGQG	10
レブリキズマブ(Lebrikizumab) PRO-301444 RG-3637 CHEMBL1743035	CAG	DGYY.....PYAMDN	WGQG	10
モガムリズマブ(Mogamulizumab) CHEMBL1743041	CGR	HSDG.....NFAFGY	WGQG	10
モタビズマブ(Motavizumab) CHEMBL1743042	CAR	DMIF.....NFYFDV	WGQG	10
ナミルマブ(Namilumab) CHEMBL1743044	CTR	TTLI.....SVYFDY	WGQG	10
オナルツズマブ(Onartuzumab) CHEMBL1743051	CAT	YRSY.....VTPLDY	WGQG	10
オテリキシズマブ(Otelixizumab) CHEMBL1743053	CAK	FRQY.....SGGFDY	WGQG	10
ロバツムマブ(Robatumumab) CHEMBL1743064	CAR	LGNF.....YYGMDV	WGQG	10
シルツキシマブ(Siltuximab) CHEMBL1743070	CAR	GLWG.....YYALDY	WGQG	10
シルクマブ(Sirukumab) CHEMBL1743071	CAR	QLWG.....YYALDI	WGQG	10
ソリトマブ(Solitomab) CHEMBL2109264	CAR	LRNW.....DEPMDY	WGQG	10
タドシズマブ(Tadocizumab) CHEMBL1743076	CAR	RDGN.....YGWFAY	WGQG	10
チガツズマブ(Tigatuzumab) CHEMBL1743080	CAR	RGDS.....MITTDY	WGQG	10
ザッキシマブ(Zatuximab) HC Zatuximab CHEMBL2109395	CVR	YYGY.....DEAMDY	WGQG	10
バビツキシマブ(Bavituximab) CHEMBL1742989	CVK	GGYYG.....HWYFDV	WGAG	11
セツキシマブ(Cetuximab) IMC-C225 L01XC06 CHEMBL1201577	CAR	ALTYY.....DYEFAY	WGQG	11
エフングマブ(Efungumab) MYC-123A MYC-123B MYC-124 HSP90MAB CHEMBL1743009	CAR	GGRDF.....GDSFDY	WGQG	11
フレソリムマブ(Fresolimumab) CHEMBL1743022	CAS	TLGLV.....LDAMDY	WGQG	11
イムガツズマブ(IMGATUZUMAB) HC GA201 RG-7160 Ro-5083945 HuMAB CHEMBL2109389	CAR	LSPGG.....YYVMDA	WGQG	11
ルカツムマブ(Lucatumumab) CHEMBL1743038	CAR	DGGIA.....APGPDY	WGQG	11
マブリリムマブ(Mavrilimumab) CHEMBL1743039	CAI	VGSFS.....PLTLGL	WGQG	11
ミラツズマブ(Milatuzumab) CHEMBL1743040	CSR	SRGKN.....EAWFAY	WGQG	11
ナプツモマブエスタフェナトクス(Naptumomab Estafenatox) CHEMBL1743045	CAR	STMIT.....NYVMDY	WGQG	11
ネシツムマブ(Necitumumab) CHEMBL1743047	CAR	VSIFG.....VGTFDY	WGQG	11
テナツモマブ(Tenatumomab) CHEMBL1743077	CAR	GGGSI.....YYAMDY	WGQG	11
トラスツズマブ(Trastuzumab) L01XC03 CHEMBL1201585;	CSR	WGGDG.....FYAMDY	WGQG	11
バテリズマブ(Vatelizumab) CHEMBL1743086	CAR	ANDGV.....YYAMDY	WGQG	11

【図８－４】

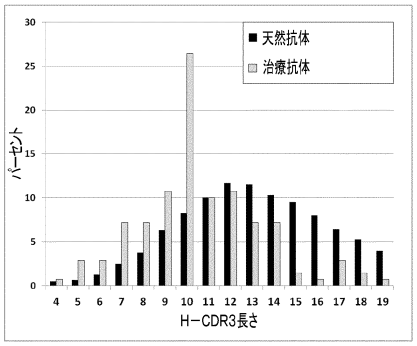
抗体		CDR3H		CDR3H 長さ
ベンラリズマブ(Benralizumab) CHEMBL1742991	CGR	EGIRY.....YGLLGDY	WGQG	12
クラザキズマブ(Clazakizumab) CHEMBL2108589	CAR	DDSSD.....WDAKFNL	WGQG	12
コナツムマブ(Conatumumab) CHEMBL1743003	CAR	DRGGD.....YYYGMDV	WGQG	12
ドロジシマブ 抗－Dr5(Drozitumab Anti-Dr5) Rhumab-Dr5 CHEMBL1743008	CAK	ILGAG.....RGWYFDL	WGKG	12
ドゥリゴツマブ(Duligotumab) CHEMBL2109405	CAR	ESRVS.....FEAAMDY	WGQG	12
フェザキヌマブ(Fezakinumab) CHEMBL1743017	CAR	EPEKF.....DSDDSDV	WGRG	12
ベルツズマブ(Veltuzumab) CHEMBL1743088	CAR	STYVG.....GDWQFDV	WGKG	12
オマリズマブ(Omalizumab) RG-3648 CHEMBL1201589	CAR	GSHYF.....GHWHFAV	WGQG	12
オルチクマブ(Orticumab) CHEMBL2109533	CAR	IRVGP.....SGGAFDY	WGQG	12
ラコツモマブ(Racotumomab) CHEMBL1743059	CAR	EDYYD.....NSYYFDY	WGQG	12
リロツムマブ(Rilotumumab) CHEMBL1743063	CAR	GGYDF.....WSGYFDY	WGQG	12
リツキシマブ(Rituximab) リツキサン(Rituxan) RG-105 L01XC02 R-105 IDEC-102 CHEMBL1201	CAR	STYYG.....GDWYFNV	WGAG	12
ベドリズマブ(Vedolizumab) CHEMBL1743087	CAR	GGYDG.....WDYAIDY	WGQG	12
ベルツズマブ(Veltuzumab) CHEMBL1743088	CAR	STYYG.....GDWYFDV	WGQG	12
ダラツムマブ(Daratumumab) CHEMBL1743007	CAK	DKILW.....FGEPVFDY	WGQG	13
エノキズマブ(Enokizumab) CHEMBL1743012	CAR	ADYYG.....SDYVKFDY	WGQG	13
イバリズマブ(Ibalizumab) CHEMBL1743029	CAR	EKDNY.....ATGAWFAY	WGQG	13
インダツキシマブ(Indatuximab) Ravtansine CHEMBL1743031	CAR	RDYYG.....NFYYAMDY	WGQG	13
ナルナツマブ(Narnatumab) RON8 CHEMBL1743046	CTR	DGYSS.....GRHYGMDV	WGQG	13
ペラキズマブ(Perakizumab) CHEMBL2109470	CAR	DGDYG.....SSYGAMDY	WGQG	13
イブリツモマブチウキセタン(Ibritumomab tiuxetan) CHEMBL1201606	CAR	VVYYS.....NSYWYFDV	WGTG	13
トラロキヌマブ(Tralokinumab) CHEMBL1743081	CAR	DSSSS.....WARWFFDL	WGRG	13
トレガリズマブ(Tregalizumab) CHEMBL1743083	CSA	SYYRY.....DVGAWFAY	WGQG	13
ウレルマブ(Urelumab) BMS-663513 CHEMBL1743085	CAR	DYGPG.....NYDWYFDL	WGRG	13
ベバシズマブ(Bevacizumab) L01XC07 Rhumab-12-IGG1 CHEMBL1201583	CAK	YPHYYG.....SSHWYFDV	WGQG	14
エノチクマブ(Enoticumab) CHEMBL2109385	CAR	DHDFRS.....GYEGWFDP	WGQG	14
フルラヌマブ(Fulranumab) JNJ-42160443 CHEMBL1743023	CAR	VYSSGW.....HVSDYFDY	WGQG	14
フツキシマブ(Futuximab) CHEMBL2109388	CTR	NGDYYV.....SSGDAMDY	WGQG	14
リゲリズマブ(Ligelizumab) CHEMBL2109457	CAR	FSHFSG.....SNYDYFDY	WGQG	14
リリルマブ(Lirilumab) BMS-986015 BMS-986015-01 抗-KIR抗体 CHEMBL2109500	CAR	IPSGSY.....YYDYDMDV	WGQG	14
モキセツモマブパスドトクス(Moxetumomab Pasudotox) CHEMBL1743043	CAR	HSGYGT.....HWGVLFAY	WGQG	14
パルサツズマブ(Parsatuzumab) CHEMBL2109387	CAR	EGVYHD.....YDDYAMDY	WGQG	14
ロモソズマブ(Romosozumab) CHEMBL2107874	CAR	LGYDDI.....YDDWYFDV	WGQG	14
ベセンクマブ(Vesencumab) CHEMBL1743089	CAR	GELPYY.....RMSKVMDV	WGQG	14

【図８－５】

抗体		CDR3H		CDR3H 長さ
ブリナツモマブ(Blinatumomab) CHEMBL1742992	CAR	RETTTV....GRYYYAMDY	WGQG	15
タバルマブ(Tabalumab) LY-2127399 CHEMBL1743075	CAR	GYYDIL....TGYYYYFDY	WGQG	15
フィギツムマブ(Figitumumab) CHEMBL1743019	CAK	DLGWSDS...YYYYYGMDV	WGQG	16
インクラクマブ(Inclacumab) LC1004-002 Ro-4905417 CHEMBL2109468	CAR	GRYSGSG...SYYNDWFDP	WGQG	16
ガンテネルマブ(Gantenerumab) CHEMBL1743025	CAR	GKGNTHK.P.YGYVRYFDV	WGQG	17
イクルクマブ(Icrucumab) CHEMBL1743030	CAR	DHYGSGV.HHYFYYGLDV	WGQG	17
オララツマブ(Olaratumab) CHEMBL1743049	CAR	QSTYYYG.S.GNYYGWFDR	WDQG	17
ロレデュマブ(Roledumab) CHEMBL1743065	CAR	PVRSRWL.Q.LGLEDAFHI	WGQG	17
ラフィビルマブ(Rafivirumab) CR-57 CHEMBL1743061	CAR	ENLDNSG.YTYYFSGWFDP	WGQG	18
セクキヌマブ(Secukinumab) AIN457 AIN-457 L04AC10 CHEMBL1743068	CVR	DYYDILT.YDYIHYWYFDL	WGRG	18
カプラシズマブ(Caplacizumab) CHEMBL2109624	CAA	AGVRAEDGVRRTLPSEYTF	WGQG	19

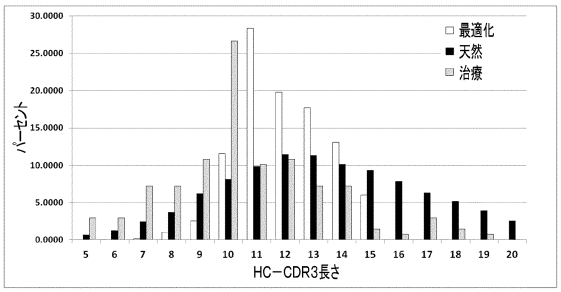
【図９】

Figure 9

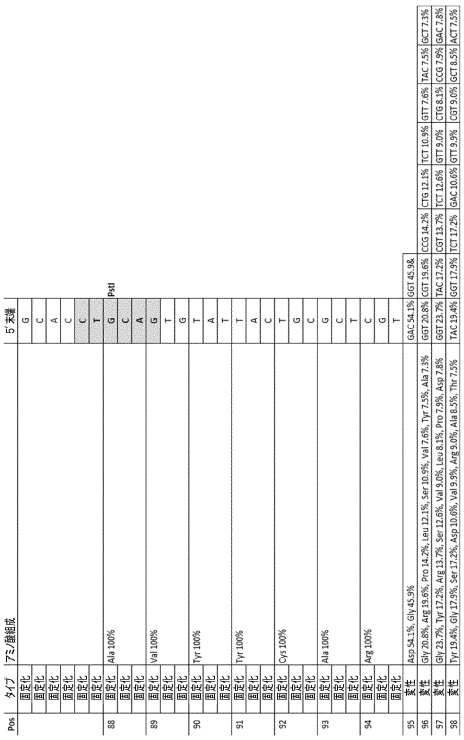


【図１０】

Figure 10



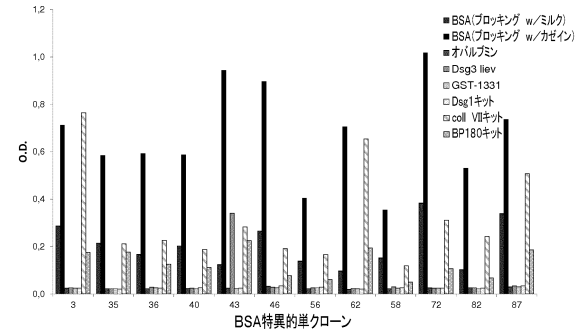
【図１１－１】



| Pos | タイプ | アミノ酸組成 | 5'未満 | | |

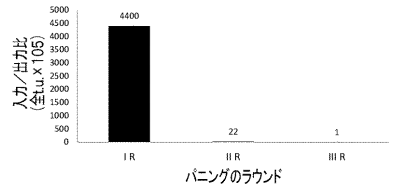
【図１２Ｄ】

Fig.12D



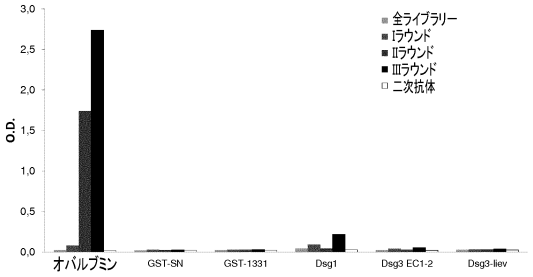
【図１３Ａ】

Fig. 13A



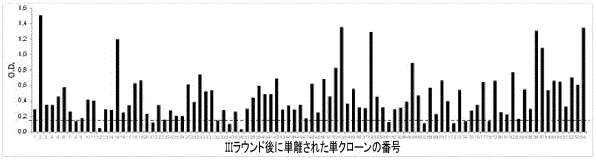
【図１３Ｂ】

Fig. 13B



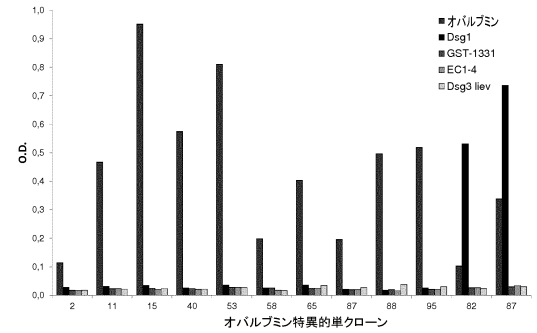
【図１３Ｃ】

Fig. 13C



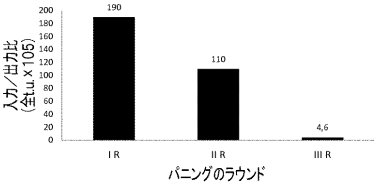
【図１３Ｄ】

Fig. 13D



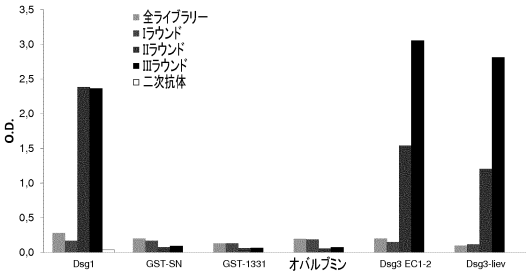
【図１４Ａ】

Fig. 14A



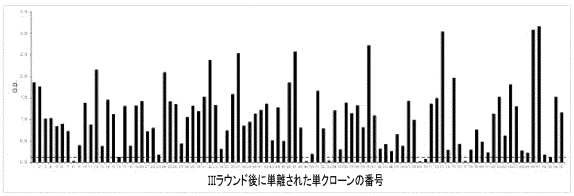
【図１４Ｂ】

Fig. 14B



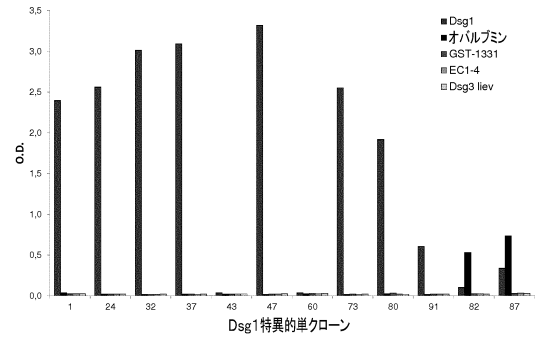
【図１４Ｃ】

Fig. 14C



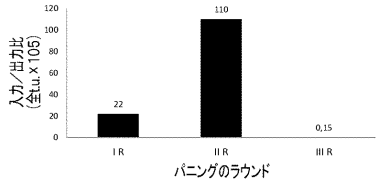
【図１４Ｄ】

Fig. 14D



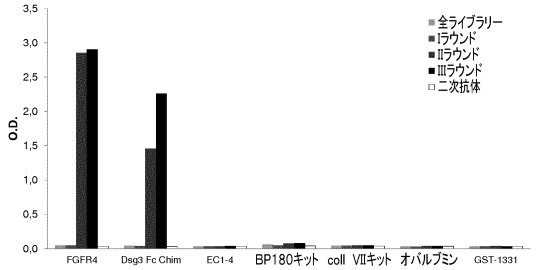
【図１５Ａ】

Fig. 15A



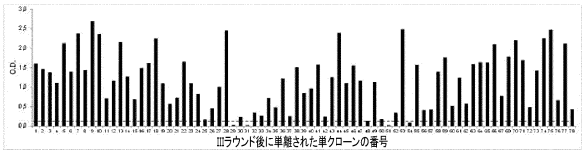
【図１５Ｂ】

Fig. 15B



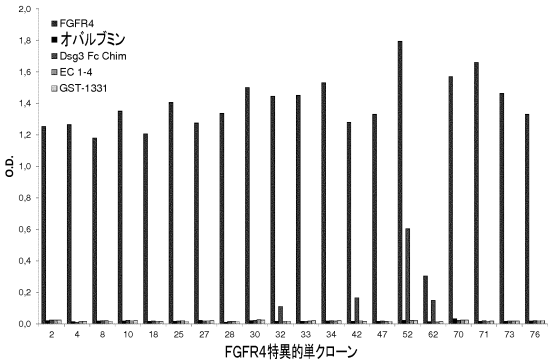
【図１５Ｃ】

Fig. 15C



【図１５Ｄ】

Fig. 15D



【配列表】
0006974909000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ｃ０７Ｋ 16/00 (2006.01) Ｃ０７Ｋ 16/00

(72)発明者 クリスティアン ステインクーラー
イタリア アイ－００１２８ ローマ ヴィア エルネスト バジーレ １１
(72)発明者 ジェシカ フィローカモ
イタリア アイ－００１５２ ローマ ヴィア オッターヴィオ ガスパッリ ３２

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第２０１１／０３２１８１（WO, Ａ２）
国際公開第２００９／１３２２８７（WO, Ａ２）
特表２０１０－５３８６５６（ＪＰ, Ａ）
特表２００８－５３６４７３（ＪＰ, Ａ）
特表２００７－５０１０１１（ＪＰ, Ａ）
国際公開第２０１０／００３１０８（WO, Ａ２）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ４０Ｂ １０／００－９９／００
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ