

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5780951号
(P5780951)

(45) 発行日 平成27年9月16日(2015.9.16)

(24) 登録日 平成27年7月24日(2015.7.24)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 40 B	40/08	(2006.01)	C 40 B	40/08	
C 40 B	40/10	(2006.01)	C 40 B	40/10	
C 07 K	16/00	(2006.01)	C 07 K	16/00	

請求項の数 27 (全 137 頁)

(21) 出願番号	特願2011-506483 (P2011-506483)
(86) (22) 出願日	平成21年4月24日 (2009.4.24)
(65) 公表番号	特表2011-518565 (P2011-518565A)
(43) 公表日	平成23年6月30日 (2011.6.30)
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/041688
(87) 国際公開番号	W02009/132287
(87) 国際公開日	平成21年10月29日 (2009.10.29)
審査請求日	平成24年3月14日 (2012.3.14)
(31) 優先権主張番号	61/047,529
(32) 優先日	平成20年4月24日 (2008.4.24)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506065987 ダイアックス コーポレーション アメリカ合衆国、O 1803-2756 マサチューセッツ州、バーリントン、55 ネットワーク ドライブ
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	ラドナー, ロバート シー. アメリカ合衆国 メリーランド 2175 4, イジャムスビル, グリーン バレ ー ロード 3827

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライプラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、

(i) アミノ酸配列 X₃₁ Y X₃₃ M X₃₅ を有する重鎖 (H C) C D R 1 であって、X₃₁、X₃₃ および X₃₅ は、C y s または M e t 以外の任意のアミノ酸である、H C C D R 1 ;

(i i) アミノ酸配列 X₅₀ I X₅₂ X₅₂_a S G G X₅₆ T X₅₈ Y A D S V K G を有する重鎖 (H C) C D R 2 であって、X₅₀、X₅₂、X₅₆ および X₅₈ は、C y s または M e t 以外の任意のアミノ酸であり、X₅₂_a は、G l y 、S e r 、P r o または T y r からなる群より選択される、H C C D R 2 ;

(i i i) 重鎖 (H C) C D R 3 であって、該ファミリーの該 H C C D R 3 において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 または 35 の位置が、T y r 、G l y 、A s p 、S e r および A r g 残基の間で変化する、H C C D R 3 ; および

(i v) 軽鎖 (L C)

をコードする多彩化された D N A 配列を含む、ライプラリ。

10

20

【請求項 2】

前記 H C C D R 3 の全位置の 50% が T y r、G l y、A s p、S e r または A r g である、請求項 1 に記載のライプラリ。

【請求項 3】

A r g 残基が、V と Dとの間、D と Jとの間、または V と Jとの間のフィラー領域に存在する、請求項 1 に記載のライプラリ。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のライプラリであって、前記 H C C D R 3 は、個々の残基が独立して T y r、A s n、A s p、S e r および A r g 残基の間で変化する、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 または 35 の残基を含み、フレームワーク領域 (F R) 3 が該 C D R 3 のアミノ末端に位置し、J H 領域の F R 4 部分が該 C D R 3 のカルボキシ末端に位置するライプラリ。
10

【請求項 5】

前記 F R 3 が 3 - 2 3 V H F R 3 である、請求項 4 に記載のライプラリ。

【請求項 6】

前記 H C C D R 3 配列の 20% 超が T y r 残基を含む、請求項 1 に記載のライプラリ。

【請求項 7】

前記 H C C D R 3 の D 領域および J s t u m p が、20% 超の T y r 残基を含む、請求項 6 に記載のライプラリ。
20

【請求項 8】

前記 H C C D R 3 配列の 20% 未満が T y r 残基を含む、請求項 1 に記載のライプラリ。

【請求項 9】

前記 H C C D R 3 のリードインまたは D J フィラー位置が、20% 未満の T y r 残基を含む、請求項 8 に記載のライプラリ。

【請求項 10】

前記 H C C D R 3 が 3 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、F、S、Y、D および R の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、
30

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

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、H、D、R、S、Y および L の間で 3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化する、請求項 1 に記載のライプラリ。

【請求項 11】

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

【請求項 12】

前記 H C C D R 3 が 3 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、5 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、
40

該 H C C D R 3 の第 2 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、5 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が、G、S、Y、R、D および L の間で 5 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化する、請求項 1 に記載のライプラリ。

【請求項 13】

前記 H C C D R 3 が 4 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、Y、S、D、R および L の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、
50

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

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

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

【請求項 14】

前記 H C C D R 3 が 4 アミノ酸長であり、

該 H C C D R 3 の第 1 の残基が、L、S、Y、D および R の間で、4 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、10

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

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

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

【請求項 15】

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

【請求項 16】20

前記 H C C D R 3 が 16 アミノ酸長であり、

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

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

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

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

該 H C C D R 3 の第 5 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、30

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

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

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

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

該 H C C D R 3 の第 10 の残基が、Y、S、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、40

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

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

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

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

該 H C C D R 3 の第 15 の残基が、Q、E、R、S および Y の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、50

: 1 の比率で変化し、

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

【請求項 1 7】

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、3 : 1 の比率で変化する、請求項 1 6 に記載のライブラリ。

【請求項 1 8】

前記 H C C D R 3 が 1 6 アミノ酸長であり、

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

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

該 H C C D R 3 の第 3 の残基が C であり、

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

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

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

該 H C C D R 3 の第 7 の残基が、S、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、20

該 H C C D R 3 の第 8 の残基が、C であり、

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

該 H C C D R 3 の第 1 0 の残基が、T、Y、R、D および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

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

該 H C C D R 3 の第 1 2 の残基が、E、R、S、Y および L の間で、3 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、30

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

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

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

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

【請求項 1 9】

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、3 : 1 の比率で変化する、請求項 1 8 に記載のライブラリ。40

【請求項 2 0】

前記 L C が、A 2 7 軽鎖 (L C) であり、該 L C の C D R 1 が多様化され、

2 7 位は、5 5 % が Q、それぞれ 9 % が E、R、Y、S および L であり、

2 8 位は、4 6 % が S、それぞれ 9 % が N、T、Y、E、R、および L であり、

3 0 位は、5 5 % が S、それぞれ 9 % が D、N、R、T、および Y であり、

3 0 a 位は、4 6 % が S、それぞれ 9 % が G、N、R、T、Y、および D であり、8 % はアミノ酸を含まず、50

3 1 位は、4 4 % が S、それぞれ 8 % が D、F、G、N、R、T、および Y であり、

3 2 位は、4 4 % が Y、それぞれ 7 % が F、D、L、N、Q、R、S、および Y であり50

34位は、70%がA、それぞれ15%がSおよびYである、請求項1に記載のライプラリ。

【請求項21】

前記LCが、A27軽鎖(LC)であり、該LCのCDR2が多様化され、
50位は、55%がG、それぞれ9%がD、R、S、YおよびLであり、
53位は、52%がS、それぞれ8%がN、T、S、Y、EおよびRであり、
56位は、64%がT、それぞれ9%がE、R、SおよびYである、請求項1に記載のライプラリ。

【請求項22】

前記LCが、A27軽鎖(LC)であり、該LCのCDR3が多様化され、
91位は、64%がY、それぞれ9%がF、E、RおよびSであり、
92位は、52%がG、それぞれ8%がA、D、R、S、TおよびYであり、
93位は、52%がS、それぞれ8%がD、F、N、R、TおよびYであり、
94位は、55%がS、それぞれ9%がW、E、R、YおよびSであり、
95位は、64%がP、それぞれ9%がE、R、YおよびSであり、8%はアミノ酸を含まず、

96位は、55%がL、それぞれ9%がE、R、P、YおよびSである、請求項1に記載のライプラリ。

【請求項23】

請求項21に記載のLC CDR2の多様性をさらに含む、請求項20に記載のライプラリ。

【請求項24】

請求項22に記載のLC CDR3の多様性をさらに含む、請求項20に記載のライプラリ。

【請求項25】

請求項22に記載のLC CDR3の多様性をさらに含む、請求項21に記載のライプラリ。

【請求項26】

前記軽鎖(LC)は、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つまたは複数において多様性を有する、請求項1～19のいずれかに記載のライプラリ。

【請求項27】

前記軽鎖(LC)は、請求項20、21または22に記載のLC CDR1、LC CDR2またはLC CDR3をそれぞれ、またはそれらの組合せを含む、請求項26に記載のライプラリ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

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

【背景技術】

【0002】

(背景)

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の多様なファミリーのメンバーを個別に提示し、提示および発現し、または含み、ファミリーのアミノ酸の多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含む遺伝子パッケージのライプラリの調製は、現在当分野において一般的に行われている。多くの一般的なライプラリにおいて、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、抗体(例えば、一本鎖Fv(scfv)、Fv

10

20

30

40

50

、F_ab、全抗体またはミニボディ（すなわち、V_Lに連結したV_Hからなる二量体）)に関連する。多くの場合、それらはヒト抗体の重鎖および軽鎖の、1種または複数種のCDRおよびフレームワーク領域を含む。

【0003】

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

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

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

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(要旨)

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

30

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

40

(項目1)

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

50

(項目2)

前記H C C D R 3の全位置の約50%がT y r、G l y、A s p、S e rまたはA r gである、項目1に記載のライプラリ。

(項目3)

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

(項目4)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライプラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35の残基からなる重鎖(H C)C D R 3をコードする多彩化されたDNA配列を含み、個々の残基は独立してT y r、A s n、A s p、S e rおよびA r g残基の間で変化し、フレームワーク領域(F R)3が該C D R 3のアミノ末端に位置し、J H領域のF R 4部分が該C D R 3のカルボキシ末端に位置するライプラリ。

(項目5)

前記F R 3が3-23V H F R 3である、項目4に記載のライプラリ。

(項目6)

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

(項目7)

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

(項目8)

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

(項目9)

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

(項目10)

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

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

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

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

10

20

30

40

50

: 1 : 1 の比率で変化するライブラリ。

(項目 1 1)

F R 3 が前記 C D R 3 のアミノ末端に位置し、該 F R 3 の最後の残基が、K および R の間で、3 : 1 の比率で変化する、項目 1 0 に記載のライブラリ。

(項目 1 2)

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

10

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

該 H C C D R 3 の第2の残基が、T、Y、R、D および L の間で、5 : 1 : 1 : 1 : 1 の比率で変化し、

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

(項目 1 3)

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

20

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

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

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

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

30

(項目 1 4)

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

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

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

40

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

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

(項目 1 5)

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

(項目 1 6)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を

50

集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライ

プラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖（H C）C D R 3をコード

する多彩化されたD N A配列を含み、該H C C D R 3が16アミノ酸長であり、

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

1の比率で変化し、

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

1の比率で変化し、

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

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第4の残基が、D、Y、S、RおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、10

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

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第6の残基が、S、Y、R、DおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第7の残基が、G、A、S、Y、R、DおよびLの間で、3：1：

1：1：1：1：1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第8の残基が、Y、S、R、DおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第9の残基が、Y、S、R、DおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、20

該H C C D R 3の第10の残基が、Y、S、R、DおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、

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

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第12の残基が、E、R、S、YおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第13の残基が、Y、S、R、DおよびLの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第14の残基が、F、Y、S、RおよびDの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、30

該H C C D R 3の第15の残基が、Q、E、R、SおよびYの間で、3：1：1：1：

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第16の残基が、H、E、R、S、YおよびLの間で、3：1：1：

1：1：1の比率で変化するライプラリ。

（項目17）

F R 3が前記C D R 3のアミノ末端に位置し、該F R 3の最後の残基が、KおよびRの

間で、3：1の比率で変化する、項目16に記載のライプラリ。

（項目18）

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバー

を提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を

集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライ

プラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、重鎖（H C）C D R 3をコード

する多彩化されたD N A配列を含み、該H C C D R 3が16アミノ酸長であり、

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

1：1：1の比率で変化し、

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

1の比率で変化し、

該H C C D R 3の第3の残基がCであり、

該H C C D R 3の第4の残基が、S、Y、R、DおよびLの間で、3：1：1：1：

40

50

1の比率で変化し、

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

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

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

該 H C C D R 3 の第 8 の残基が、 C であり、

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

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

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

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

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

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

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

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

(項目 19)

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

(項目 20)

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

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

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

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

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

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

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

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

(項目 21)

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

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

10

20

30

40

50

5 3 位は、約 5 2 % が S、それぞれ約 8 % が N、T、S、Y、E および R であり、
5 6 位は、約 6 4 % が T、それぞれ約 9 % が E、R、S および Y であるライプラリ。

(項目 2 2)

ヒト抗体関連ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質の多様なファミリーのメンバーを提示し、提示および発現し、または含み、抗体ファミリーの多様性の少なくとも一部を集合的に提示し、提示および発現し、または含むベクターまたは遺伝子パッケージのライプラリであって、該ベクターまたは遺伝子パッケージが、A 2 7 軽鎖 (LC) をコードする多彩化された DNA 配列を含み、該 LC の CDR 3 が多様化され、

9 1 位は、約 6 4 % が Y、それぞれ約 9 % が F、E、R および S であり、

9 2 位は、約 5 2 % が G、それぞれ約 8 % が A、D、R、S、T および Y であり、

10

9 3 位は、約 5 2 % が S、それぞれ約 8 % が D、F、N、R、T および Y であり、

9 4 位は、約 5 5 % が S、それぞれ約 9 % が W、E、R、Y および S であり、

9 5 位は、約 6 4 % が P、それぞれ約 9 % が E、R、Y および S であり、約 8 % はアミノ酸を含まず、

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

(項目 2 3)

項目 2 1 に記載の LC CDR 2 の多様性をさらに含む、項目 2 0 に記載のライプラリ。

(項目 2 4)

20

項目 2 2 に記載の LC CDR 3 の多様性をさらに含む、項目 2 0 に記載のライプラリ。

(項目 2 5)

項目 2 2 に記載の LC CDR 3 の多様性をさらに含む、項目 2 1 に記載のライプラリ。

(項目 2 6)

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

(項目 2 7)

項目 2 0、2 1 または 2 2 に記載の LC CDR 1、LC CDR 2 または LC CD R 3 をそれぞれ、またはそれらの組合せを含む、項目 2 6 に記載のライプラリ。

30

(項目 2 8)

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

【0 0 0 6】

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

40

【0 0 0 7】

ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を提示する、提示および発現するまたは含む遺伝子パッケージのこのようなライプラリのさらなる不利な点は、天然発生の多様性に基づくこれらのメンバー、したがって、機能的である可能性が最も高く、免疫原性である可能性が最も低いメンバーに集中していないことである。どちらかと言えば、通常ライプラリは個々の CDR 位置に可能な限りすべての多様性または多彩性を含むように試みる。このことは、ライプラリ構築の時間を消費し、効率を必要より下げる。完全な多様性を獲得

50

しようとする試みにより作製された多数のメンバーもまた、スクリーニングを必要以上に手間のかかるものにする。このことは、ライプラリの多くのメンバーが機能的でなくなり、または非特異的に付着性になる場合に特にあてはまる。

【0008】

さらに、合成ライプラリの構築の苦労は免疫原性の問題である。例えば、すべての C D R 残基が T y r (Y) または S e r (S) のどちらかであるライプラリがある。これらのライプラリから選択された抗体 (A b) は、高い親和性および特異性を示すが、それらの非常にまれな組成はそれらを免疫原性にすることができる。本発明は、ヒト免疫系に十分由来することができ、したがって免疫原性である可能性の低い A b の作製を対象とする。本発明のライプラリは、 V - D - J または V - J の融合に由来する残基を可能な限り多く保有する。免疫原性の危険性を減少するために、フレームワークおよび C D R の双方の中の個々の非生殖系列アミノ酸の変化を、生殖系列アミノ酸に戻し、結合親和性を保有するために生殖系列からの変化が必要かどうかを決定することが賢明であり得る。したがって、生殖系列に対する個々の変異位置にバイアスのかかったライプラリは、必要のない非生殖系列アミノ酸を有する A b の単離の可能性を減少させる。10

【0009】

A b は高分子タンパク質であり、さまざまな分解形態に供される。分解の一形態は、 A s n および G l n 残基（特に A s n - G l y または G l n - G l y ）の脱アミドおよび A s p 残基の異性化である。分解の別の形態は、メチオニン、トリプトファンおよびシステインの酸化である。分解の別の形態は、 A s p - P r o ジペプチドの切断である。分解の別の形態は、 N 末端の G l u または G l n からのピログルタミン酸の形成である。問題のある配列の発生を最小にしたライプラリを提供することが有利である。20

【0010】

約 3 アミノ酸長から約 3 5 アミノ酸長の間の重鎖 (H C) C D R 3 を含むヒト抗体の多様なファミリーのメンバーをコードするベクターまたはパッケージのライプラリを提供する。特定の実施形態において、 H C C D R 3 もまた、 T y r (Y) と S e r (S) とに富み、かつ / または多様化された D 領域を含み、かつ / または伸長された J H 領域を含むことができる。例えば、 H C C D R 3 は、例えば本明細書中の実施例において提供するように、約 4 0 % を超える（例えば、約 4 3 % および約 8 0 % の間；例えば、約 4 0 % を超えるが約 1 0 0 % 未満） Y および / または S 残基を含有することができる。さらに、このような H C C D R 3 を含む集中的なライプラリも提供する。さらに、 H C C D R 1 、 H C C D R 2 の設計および C D R に多様性のある V K I I I A 2 7 のライプラリも提供する。本明細書に記載の H C C D R 3 を含むヒト抗体の多様なファミリーのメンバーをコードするベクターまたはパッケージのライプラリは、さらに H C C D R 1 、 H C C D R 2 、 L C C D R 1 、 L C C D R 2 および L C C D R 3 の 1 つまたは複数（例えば、 1 つ、 2 つまたは 3 つにおいて）に多様性を有することができる。例えば、ライプラリは、本明細書に記載のように、 H C C D R 1 、 H C C D R 2 、 L C C D R 1 、 L C C D R 2 および L C C D R 3 の 1 つまたは複数（例えば、 1 つ、 2 つまたは 3 つにおいて）に多様性を有することができる。30

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

さらに、上記のライプラリを作製し、スクリーニングする方法およびこのようなスクリ40

50

ーニングにおいて得られた H C C D R 3 および抗体を提供する。これらの方針を実践する組成物およびキットもまた、本明細書に記載する。

【 0 0 1 4 】

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

- (a) 約 3 または約 4 または約 5 アミノ酸長である H C C D R 3 ；
- (b) 約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 、約 3 0 、約 3 1 、
約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 または約 3 5 アミノ酸長の H C C D R 3 （例えば、約 2 3 から
約 3 5 アミノ酸長）；および
- c) 約 6 から約 2 0 アミノ酸長である H C C D R 3 （例えば、約 6 、約 7 、約 8 、約
9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1
9 または約 2 0 アミノ酸長）

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

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態において、 H C C D R 3 は、 T y r (Y) および S e r (S) に富んでいる（例えば、 H C C D R 3 の残基の 4 0 % 超が Y および / または S である）。

【 0 0 1 6 】

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

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態において、ライプラリは、 J H 領域、例えば伸長された J H 領域を含む。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態において、 H C C D R 3 は、 D 領域または D 領域の断片（例えば、 J H 領域に隣接する D 領域）由来のアミノ酸を含む。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態において、 D 領域は、 D 2 - 2 (R F 2) 、 D 2 - 8 (R F 2) 、 D 2 - 1 5 (R F 2) 、 D 2 - 2 1 (R F 2) 、 D 3 - 1 6 (R F 2) 、 D 3 - 2 2 (R F 2) 、 D 3 - 3 (R F - 2) 、 D 3 - 9 (R F 2) 、 D 3 - 1 0 (R F 2) 、 D 1 - 2 6 (R F 3) 、 D 4 - 1 1 (R F 2) 、 D 4 - 4 (R F 2) 、 D 5 - 5 (R F 3) 、 D 5 - 1 2 (R F 3) 、 D 5 - 1 8 (R F 3) 、 D 6 - 6 (R F 1) 、 D 6 - 1 3 (R F 1) および D 6 - 1 9 (R F 1) からなる群から選択される。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態において、 H C C D R 3 は、 J H 領域由来のアミノ酸を含む。 J H 領域は、伸長された J H 領域であってよい。一部の実施形態において、伸長された J H 領域は、 J H 1 、 J H 2 、 J H 3 、 J H 4 、 J H 5 および J H 6 からなる群から選択される。一部の実施形態において、 J H 領域は、 Y および / または S 残基に富んでいてよく、例えば、約 4 0 % を超える（例えば、約 4 3 % および約 8 0 % の間；例えば、約 4 0 % を超えるが約 1 0 0 % 未満） Y および / または S 残基を含有することができる。

【 0 0 2 1 】

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

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、H C C D R 3（例えば、H C C D R 3をコードするD N A）は、F R 3とD領域との間の、1つまたは複数のフィラー（f i l l e r）コドンを含み、個々のフィラーコドンは、個別にN N K、T M Y、T M TまたはT M C（T M Y、T M TまたはT M CはSまたはYをコードする）である。

【0023】

一部の実施形態において、H C C D R 3（例えば、H C C D R 3をコードするD N A）は、D領域とJ Hとの間の、1つまたは複数のフィラーコドンを含み、個々のフィラーコドンは、個別にN N K、T M Y、T M TまたはT M Cである。

【0024】

一部の実施形態において、ライプラリ（例えば、ライプラリのベクターまたは遺伝子パッケージ）は、H C C D R 1、H C C D R 2、および／または軽鎖をさらに含み、H C C D R 1、H C C D R 2に多様性もまた含み、あるいは軽鎖はH C C D R 1および／またはH C C D R 2および／または軽鎖（例えば、または軽鎖）において多様性（それぞれ）を含む。例えば、H C C D R 3の多様性は、H C C D R 1、H C C D R 2および／または軽鎖中の多様性のバックグラウンドに構築できる。例えば、軽鎖の多様性は、H Cの多様性と同じD N A分子中にコードでき、あるいはL CおよびH Cの多様性は、別々のD N A分子中にコードできる。

【0025】

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

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

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

10

20

30

40

50

【0032】

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

【0033】

一部の実施形態において、突然変異化はエラープローン P C R を含む。

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

「w o b b l i n g」は、元の配列が好ましいように、多彩化された D N A を作製する方法である。例えば元の配列が、G C T によりコードされ得る A l a を有する場合、混合物（0.7 G、0.1 A、0.1 T、0.1 C）を 1 番目の位置に、（0.7 C、0.1 A、0.1 T、0.1 G）を 2 番目の位置に、（0.7 T、0.1 A、0.1 G、0.1 C）を 3 番目の位置に使用できる。「d o p i n g」の他の比率も使用できる。このことは、A l a を約 50 % の確率で出現させることができ、一方 V、D、G、T、P および S 20 は約 7 % の確率で生じる。他の A A 型はさらに低い頻度で生じる。

【0038】

一部の態様において、本開示は、例えば、（精製された）H C C D R 1 ~ 2 のレバートリーを維持し、合成 H C C D R 3 および L C の多様性を構築するために描かれる。

【0039】

一部の実施形態において、本開示は、w o b b l i n g された重鎖（H C ）C D R 3 を提示するためのカセットを提供し、例えばこのカセットは、表 400 に示すカセットを含む。

【0040】

一部の態様において、本開示は、H C C D R 3 において T y r のレベルが調節されたライプラリを特徴とする。一部の実施形態において、H C C D R 3 領域は、約 15 % またはそれを超える（例えば、約 16 %、約 18 %、約 20 % またはそれを超える）T y r 残基を含有する。一部の実施形態において、高レベル（例えば、約 20 % より多い）の T y r が、例えば、T y r を含有する D 領域および J s t u m p （またはそれらに相当する合成配列）において、ライプラリメンバーの H C C D R 3 に挿入される。一部の実施形態において、リードイン位置または D J フィラー位置（またはそれらに相当する合成配列）において、T y r が許容されるが、20 % 以下である。一部の実施形態において、H C C D R 3 領域は、約 15 % 未満（例えば、約 14 %、約 12 %、約 10 %、約 8 %、約 6 % またはそれより少ない）の T y r 残基を含有する。一部の実施形態において、H C リードイン位置または D J フィラー位置（またはそれらに相当する合成配列）は、約 15 % 未満（例えば、約 14 %、約 12 %、約 10 %、約 8 %、約 6 % またはそれより少ない）の T y r 残基を含有する。 30 40

【0041】

一部の態様において、本開示は、ヒト抗体重鎖をコードする遺伝子パッケージのライプラリを特徴とし、このライプラリにおいて、親アミノ酸配列は、V H 配列、続いて（Y、S、D、L、R）からなる群から選択される 0 から 10 個のアミノ酸、続いてヒト D 領域または D 領域の断片、続いて（Y、S、R、D、L）からなる群から選択される 0 から 10 個のアミノ酸、続いて少なくとも W 103 を前方に含む J H セグメントを含み、この配列をコードする可変 D N A が、親アミノ酸配列が最も可能性の高い配列となるように（例えば w o b b l i n g により）合成される。 50

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

一部の態様において、本開示は、本明細書に開示されるようなHCCDR3領域をコードする多様なメンバーのライブラリを特徴とする。一部の実施形態において、このライブラリは表1097のライブラリである。

【0045】

一部の態様において、本開示は多様なメンバーのライブラリを特徴とし、個々のメンバーはHCCDR3をコードし、

HCCR3中の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、または8位は、ライブラリにおいて、それぞれG、S、R、D、L、およびYによって、[1.0G、.57S、.46R、.42D、.36L、.35Y]の割合で占められ、場合によって、

HCCDR3の最後の4位は以下のように示される：

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

【0046】

一部の態様において、本開示は多様なメンバーのライブラリを特徴とし、個々のメンバーはHCCDR3をコードし、

HCCDR3の最初の1、2、3、4、5、6、7または8位の少なくとも1つ、好ましくはすべてが、ライブラリにおいて、[1.0G、.57S、.46R、.42D、.36L、.35Y]の割合でG、S、R、D、LおよびYに占められ、場合によって

HCCDR3の最後の4位は、以下のように示される：

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

【0047】

一部の態様において、本開示は多様なメンバーのライブラリを特徴とし、個々のメンバーはHCCDR3をコードし、

HCCDR3の長さは10、11または12位であり、

HCCDR3の最初の6、7または8位はそれぞれ、ライブラリにおいて、[1.0G、.57S、.46R、.42D、.36L、.35Y]の割合で、G、S、R、D、LおよびYで占められ、

HCCDR3の最後の4位は以下のように示される：

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

【0048】

一部の実施形態において、HCCDR3の最後の4位は個々に、ライブラリにおいて、7/12が親、ならびにY、S、D、RおよびGが個々に1/12で示される。

【0049】

一部の実施形態において、HCCDR3の最後の4位は個々に、ライブラリにおいて、A6=7/12AならびにY、S、D、RおよびGが個々に1/12；F7=7/12FならびにY、S、D、RおよびGが個々に1/12；D8=7/11DならびにY、S、RおよびGが個々に1/11；I9=7/12IならびにY、S、R、DおよびGが個々に1/12で示される。

10

20

30

40

50

【0050】

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

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

一部の実施形態において、メンバーは、3 - 2 3 の H C フレームワークを含む。

10

【0054】

一部の実施形態において、ライプラリは、L C 可変領域をさらに含む。

【0055】

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

【0056】

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

【0057】

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

20

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

30

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

【発明を実施するための形態】**【0061】****(詳細な説明)**

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

40

【0062】

本発明によれば、また以下でさらに十分に説明するように、約 3 から約 3 5 の間のアミノ酸長である重鎖 (H C) C D R 3 を含むヒト抗体の多様なファミリーのメンバーをコードする、ベクターおよび遺伝子パッケージのライプラリを調製し使用できる。特定の実施形態において、H C C D R 3 はさらに、Y と S とに富んでいてよく、かつ / または多様化された D 領域を含んでよい。このような H C C D R 3 を含む集中的ライプラリをさらに提供する。

【0063】

免疫細胞が抗体重鎖を構築する場合、免疫細胞は、V セグメントを D セグメントに接続

50

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

【0064】

定義

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

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

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

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

において、(N) は結合部位の数 / 標的分子である。

【0068】

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

10

20

30

40

50

の推定値を得ることができる。

【0069】

「抗体」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を指す。例えば、抗体は、重(H)鎖可変領域(本明細書においてVHと略記する)および軽(L)鎖可変領域(本明細書においてVLと略記する)を含むことができる。別の実施例において、抗体は、2つの重(H)鎖可変領域および2つの軽(L)鎖可変領域を含む。重鎖および軽鎖は、それぞれさらにHCおよびLCと略記してもよい。「抗体」という用語は、抗体の抗原結合断片(例えば、一本鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、scFvおよびドメイン抗体(dAb)断片(de Wildtら、Eur J Immunol. 1996年; 26巻(3号): 629~39頁))および完全抗体を包含する。抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(およびそれらのサブタイプ)の構造的特徴を有することができる。抗体は任意の供給源由来でよいが、靈長類(ヒトおよび非ヒト靈長類)および靈長類化されたものが好ましい。10

【0070】

VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」('FR')と呼ばれる、より保存された領域に散在する、「相補性決定領域」('CDR')と呼ばれる超可変性の領域にさらに細かく分けることができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、厳密に定義されている(Kabat, E.A., ら、(1991年) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication 91巻3242頁およびChothia, C. ら、(1987年) J. Mol. Biol. 196巻: 901~917頁を、さらに www.hgmp.mrc.ac.uk を参照されたい)。Kabatの定義を本明細書において使用する。VHおよびVLは個々に、3つのCDRおよび4つのFRにより通常構成され、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端に配置されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。20

【0071】

抗体のVHまたはVL鎖は、重鎖または軽鎖の定常領域のすべてまたは一部をさらに含むことができ、その結果免疫グロブリンの重鎖または軽鎖をそれぞれ形成する。一実施形態において、抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖の四量体であり、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖は、例えばジスルフィド結合により相互接続している。IgGにおいて、重鎖定常領域は3つの免疫グロブリンドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む。軽鎖定常領域は、CLドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、通常抗体と、宿主組織または免疫系のさまざまな細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1成分(C1q)を含む因子との結合を媒介する。免疫グロブリンの軽鎖は、または型であり得る。一実施形態において、抗体はグリコシリ化される。抗体は、抗体依存性細胞障害作用および/または補体媒介性細胞障害作用に対して機能性であり得る。30

【0072】

抗体の1つまたは複数の領域は、ヒトまたは有効にヒトであり得る。例えば、可変領域の1つまたは複数は、ヒトまたは有効にヒトであり得る。例えば、CDR、例えばHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1つまたは複数は、ヒトであり得る。個々の軽鎖CDRは、ヒトであり得る。HC CDR3はヒトであり得る。フレームワーク領域、例えばHCまたはLCのFR1、FR2、FR3およびFR4の1つまたは複数は、ヒトであり得る。例えば、Fc領域はヒトであり得る。一実施形態において、すべてのフレームワーク領域は、ヒト、例えばヒト細胞、例えば、免疫グロブリンを産生する造血細胞または非造血細胞に由来する。一実施形態において、ヒト配列は、例えば生殖系列核酸によりコードされる生殖系列配列である。一実施形態において、選択されたFabのフレームワーク(FR)残基は、4050

最も類似した靈長類生殖系列遺伝子、特にヒト生殖系列遺伝子中の対応する残基のアミノ酸型に変換され得る。定常領域の1つまたは複数は、ヒトまたは有効にヒトであり得る。例えば、免疫グロブリン可変ドメイン、定常領域、定常ドメイン（C H 1、C H 2、C H 3、C L）あるいは完全抗体の少なくとも70、75、80、85、90、92、95、98または100%、は、ヒトまたは有効にヒトであり得る。

【0073】

抗体のすべてまたは一部は、免疫グロブリン遺伝子またはそれらのセグメントによりコードされ得る。例示的なヒト免疫グロブリン遺伝子は、 α 、 γ および μ （Ig A 1およびIg A 2）、 δ （Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4）、 ϵ および μ の定常領域遺伝子ならびに多くの免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。完全長免疫グロブリンの「軽鎖」（約25 KDaまたは約214アミノ酸）は、NH₂末端において可変領域遺伝子（約110アミノ酸）により、COOH末端においてまたは定常領域遺伝子によりコードされる。完全長免疫グロブリンの「重鎖」（約50 KDaまたは約446アミノ酸）は、可変領域遺伝子（約116アミノ酸）および他の前述の定常領域遺伝子の1つ、例えば（約330アミノ酸をコードする）により、同様にコードされる。ヒトHCの長さは、HC CDR 3が約3アミノ酸残基から35アミノ酸残基超にわたって変化するので、大幅に変化する。10

【0074】

本明細書において、「Dセグメント」とおよび「D領域」という用語は、交換可能に用いられ、同一である。これらの要素は、DNAおよびアミノ酸の双方の表現を有し、その意味するところは文脈から明らかであることは理解されるべきである。20

【0075】

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

【0076】

本明細書において使用する「パッケージ」という用語は、粒子がその表面にポリペプチドを提示している、複製可能な遺伝子ディスプレイパッケージを指す。このパッケージは、その表面に抗原結合ドメインを提示するバクテリオファージであってよい。この型のパッケージは、ファージ抗体（pAb）と呼ばれている。30

【0077】

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

【0078】

本明細書において使用する「複製可能なディスプレイパッケージ」という用語は、複製能力を有する粒子を提供する遺伝子情報を有する生物学的粒子を指す。この粒子はその表面にポリペプチドの少なくとも一部を提示できる。このポリペプチドは、この粒子にネイティブな遺伝子情報および/または粒子内に人工的に配置された遺伝子情報あるいはその原型によりコードされ得る。提示されたポリペプチドは、特異的結合対、例えば、免疫グロブリン分子、酵素または受容体などに基づく重鎖または軽鎖ドメインの任意のメンバーであってよい。この粒子は、例えば、ウィルス、例えば、fdまたはM13などのバクテリオファージであってよい。40

【0079】

「ベクター」という用語は、遺伝子が挿入され、組み換えDNA分子を構築する、宿主生命体中で複製可能なDNA分子を指す。「ファージベクター」は、バクテリオファージに関する複製起点を含有するが、プラスミドに関する複製起点を含有しない、ファージゲノムの改変に由来するベクターである。「ファージミドベクター」は、バクテリオファージに関する複製起点およびプラスミドの複製起点を含有する、プラスミドゲノムの改変に由来するベクターである。50

【0080】

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

【0081】

ヒト抗体重鎖CDR3

重鎖（「HC」）生殖系列遺伝子（GLG）3-23（VP-47としても公知）は、全ヒトAbの約12%を占め、本発明の好ましい実施形態においてフレームワークとして好ましい。しかし、他の周知のフレームワーク、例えば4-34、3-30、3-30.3および4-30.1も、本発明の集中的多様性の原理から逸脱することなく使用できることを理解するべきである。

10

【0082】

加えて、

【0083】

【化1】

JH4 (YFDYW₁₀₃GQGTLVTVSS (配列番号1))

は、ネイティブ抗体中のJH3より頻繁に現れる。したがって、JH4は本発明の集中的ライブラリにとって好ましい。しかし、

【0084】

【化2】

20

JH3 (AFDIW₁₀₃GQQTMVTVSS (配列番号2)), JH6

(YYYYYGMDVW₁₀₃GQGTTTVSS (配列番号3)),

、JH1、JH2またはJH5も同様に使用できる。JH2は、すべての他のヒトJHにおいてQGの代わりに105-106にRGを有する有利性を有する。JH3は、M₁₀₈の不利を有する。少なくとも1つの標的に対してELISA陽性であった1419のAbのコレクションにおいて、本発明者らは、17のJH1、31のJH2、452のJH3、636のJH4、32のJH5および251のJH6を見出した。存在するのであれば、JHの二重下線部分は、CDR3の一部であると考えられる。表3において、JHのFR4部分は、下線を引いてある。

30

【0085】

これらの1419のAbのHC CDR3に出現する個々のアミノ酸の頻度を、表75に一覧にし、記録した。最も一般的なアミノ酸は、順番に Tyr と Gly 、 Asp 、 Ser および Arg であったことに留意されたい。 Rel . Up は、最もまれな Cys と比較した個々の型の相対存在量である。 Rel . Down は、最も一般的な Tyr と比較した個々の型の存在量である。したがって、HC CDR3内に置換する好ましいアミノ酸型は、Y、G、D、SおよびRである。

【0086】

必然的に、HC CDR3は長さが変わる。ヒトHCの約半分は、成分：V : : n z : D : : n y : : JHnからなり、VはV遺伝子であり、n zは、本質的にランダムな一連の塩基であり、Dは、多くの場合双方の末端で大量の編集があるDセグメントであり、nyは、本質的にランダムな一連の塩基であり、JHnは、多くの場合、5'末端で大量の編集がある6つのJHセグメントの1つである。Dセグメントは、IgGを折り畳ませるスペーサーセグメントを提供するために出現する。最も大きい多様性は、VとDおよびDとJHのジャンクションにおいてある。

40

【0087】

Corbettら、(Corbett SJ、Tomlinson IM、Sonnenhammer EL、Buck D、Winter G. J Mol Biol. 1997年V270巻: 587~97頁)は、ヒト免疫系は、複数のDセグメントおよび組み換えられたDセグメントを挿入しないことを示した。それにもかかわらず、Dセグメン

50

トは、H C C D R 3 の優れた成分として選択されており、本発明は、複数のDセグメントを含有するH C C D R 3 を含む。

【0088】

ヒトDセグメントは、いくつかの非常に強いバイアスを有する。ヒトDセグメントにおける522のアミノ酸の集計は、Yが70(13.4%)、Lが63(12.1%)、Vが52(10%)、Gが49(9.4%)、Iが41(7.9%)、Tが40(7.7%)、Sが33(6.3%)、Wが27(5.2%)、Dが21(4%)、Aが19(3.6%)、Rが16(3.1%)、TAGが15(2.9%)、Nが14(2.7%)、Qが11(2.1%)、Cが9(1.7%)、Eが9(1.7%)、Fが8(1.5%)、Mが8(1.5%)、TGAが8(1.5%)、TAAが7(1.3%)、Pが1(0.2%)、Hが1(0.2%)、およびKが0(0%)である。不対のCysを有し、さらにTGA終止コドンを有する、1つのD(2-8 RF1)があり、あまり使用されない。したがって、Dセグメントは、主に疎水性である。ヒトH C C D R 3 におけるアミノ酸の頻度を、表75に示す。頻度には、類似点および相違点の双方がある。H C C D R 3 全体において、Tyrは最も一般的であり、Glyだけがそれに近い(Tyrの96%一般的)。Asp(Tyrの75%一般的)、Ser(Tyrの53%一般的)、Leu、ValおよびIleは、すべてのDセグメントが等しいとして数えた場合、Dセグメントにおいて比較的一般的である。免疫系は、Dセグメントと同じ頻度で使用しない。表77は、Dセグメントの利用頻度を示す。しばしば使用されるDセグメントは、Tyr、Gly、SerおよびAspに非常に富んでいる。Argは、最も多く使用されるDセグメントには見出されず、Argは、JHセグメントの任意のCDR部分にもコードされない。Argは、V、DおよびJの突然変異により、またはVおよびD、DおよびJまたはVおよびJの間のフィラー領域においてのどちらかで優勢になる。このサンプルにおいて、全アミノ酸の50%は、Tyr、Gly、Asp、SerまたはArgである。本発明の一実施形態において、「親」H C C D R 3 配列の置換は、Tyr、Gly、Ser、AspおよびArgからなるアミノ酸のセットに限定される。本発明の一実施形態において、Argは、VおよびDの間、DおよびJの間またはVおよびJの間のフィラー領域において一般的である。10

【0089】

本発明の好ましいライブラリにおいて、両方の型のH C C D R 3 を使用する。特定可能なDセグメントを有さないH C C D R 3 において、構造は、V : : n z : : J H n (n = 1, 6)であり、JHは5'末端において通常編集されている。特定可能なDセグメントを有するH C C D R 3 において、構造はV : : n z : : D : : n y : : J H n である。30

【0090】

本明細書において、約3から約35アミノ酸長の間のH C C D R 3 を提供する。特定の実施形態において、H C C D R 3 は、YとSとに富んでいる、および/またはD領域が存在する場合、多様化されたD領域を含むことができる。例えば、H C C D R 3 は約43%および約80%間の、例えば、約43%、約48%、約69%、約63%、約71%、約62%、約58%、約68%、約80%、約77%のYおよび/またはS残基を含むことができ、あるいは残基の約40%より多く、または約40%から約100%未満はYおよび/またはSである。例えば、CDR3中のすべての残基がYおよび/またはSではない。特定の実施形態において、H C C D R 3 は、伸長されたJH領域を含むことができる。本発明の好ましいライブラリの例示的なH C C D R 3 成分設計を、実施例1、2および3に示し、説明する。40

【0091】

一部の実施形態において、(例えばCDR例えばH C C D R 3 またはフレームワーク領域(例えばCDR、例えばCDR3、例えばH C C D R 3 に近いまたは隣接するフレームワーク領域)における)多様性は、平均して約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、または約1から約10の突然変異(例えば塩基の変化)/例50

えば C D R (例えば H C C D R 3) またはフレームワーク領域 (C D R 、 例えば C D R 3 、 例えば H C C D R 3 に近いまたは隣接するフレームワーク領域) を創製するために生成される。いくつかの実践形態において、突然変異誘発は、公知の領域または結合界面において可能性の高い領域を標的にする。さらに、突然変異誘発は、 C D R に近いまたは隣接するフレームワーク領域を対象とできる。抗体の場合、突然変異誘発は、 例えば、精密な段階的な改善を起こすために C D R の 1 つまたはいくつかにも限定され得る。同様に、特定されたリガンドが酵素である場合、突然変異誘発は、活性部位および周辺に結合できる抗体を提供できる。特定の実施形態において、 C D R またはフレームワーク領域 (例えば、本明細書に記載の H C C D R 3) を、エラープローン P C R に供し、多様性を生成することができる。この手法は、「スロッピー (s l o p p y) 」型の P C R を使用し、 「スロッピー (s l o p p y) 」型の P C R において、ポリメラーゼは非常に高いエラー率 (最大 2 %) を有し、野生型配列を増幅し、 P r i t c h a r d ら、 (2 0 0 5 年) J . Theor . Biol . 2 3 4 巻 : 4 9 7 ~ 5 0 9 頁および L e u n g ら、 (1 9 8 9 年) T e c h n i q u e 1 巻 : 1 1 ~ 1 5 頁に一般的に記載されている。他の例示的な突然変異誘発技術は、ランダムな切断を使用する D N A シャッフリング (S t e m m e r (1 9 9 4 年) N a t u r e 3 8 9 ~ 3 9 1 頁 ; 「核酸シャッフリング」と呼ばれる) 、 R A C H I T T (商標) (C o c o ら、 (2 0 0 1 年) N a t u r e B i o t e c h . 1 9 巻 : 3 5 4 頁) 、部位特異性突然変異誘発 (Z o l l e r ら、 (1 9 8 7 年) N u c l A c i d s R e s 1 0 巻 : 6 4 8 7 ~ 6 5 0 4 頁) 、カセット突然変異誘発 (R e i d h a a r - O l s o n (1 9 9 1 年) M e t h o d s E n z y m o l . 2 0 8 巻 : 5 6 4 ~ 5 8 6 頁) および縮重オリゴヌクレオチドの組み込み (G r i f f i t h s ら、 (1 9 9 4 年) E M B O J . 1 3 巻 : 3 2 4 5 頁) を含む。
10

【 0 0 9 2 】

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

【 0 0 9 3 】

一部の実施形態において、本明細書に記載の H C C D R 3 配列を、対象となる H C C D R 3 をインフレームでコードする配列と、抗生物質耐性遺伝子、 例えば K a n ^R 遺伝子とを融合するステップおよびカナマイシン耐性に関して選択するステップにより、オープンリーディングフレームに関する選択に供することができる。 C D R 3 が終止コドンまたはフレームシフトを有する可能性のある細胞は、抗生物質耐性を有さず、その配列は除去される。
30

【 0 0 9 4 】

ヒト抗体重鎖 C D R 3 を含むライプラリの構築方法およびヒト抗体重鎖 C D R 3 を含むライプラリ。

【 0 0 9 5 】

抗体ライプラリは、少なくとも 1 つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を有するタンパク質を含む、タンパク質のコレクションである。 例えば、ラクダ化 (c a m e l i z e d) 可変ドメイン (例えば、 V H ドメイン) は、唯一の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質のライプラリのための足場として使用できる。別の実施例において、タンパク質は、対になり得る 2 つの可変ドメイン配列、 例えば V H および V L ドメインを含む。抗体ライプラリは、抗体コーディング配列を含む、 例えば、本明細書において提供される H C C D R 3 をコードする配列を含む核酸ライプラリから調製できる (抗体コーディングライプラリ) 。
40

【 0 0 9 6 】

ディスプレイライプラリを使用する場合、抗体コーディングライプラリの個々のメンバーは、コードする抗体を伴うことができる。ファージディスプレイの場合、抗体タンパク質は、ファージでコートされたタンパク質を (直接的または間接的に) 物理的に伴う。代
50

表的な抗体ディスプレイライブラリのメンバーは、V H ドメインおよびV L ドメインを含むポリペプチドを提示する。ディスプレイライブラリのメンバーは、F a b 断片（例えば、2つのポリペプチド鎖を使用する）または一本鎖F v（例えば、一本鎖ポリペプチドを使用する）として抗体を提示できる。他のフォーマットもまた使用できる。

【0097】

F a b および他のフォーマットの場合のように、提示された抗体は、1つまたは複数の定常領域を、軽鎖および／または重鎖の一部として含むことができる。一実施形態において、個々の鎖は、例えばF a b の場合のように1つの定常領域を含む。他の実施形態において、さらなる定常領域が含まれる。有用な抗原結合部位を有すると特定された後で、1つまたは複数の定常領域を分子に加えることもまた可能である。例えば米国特許出願第2003-0224408号を参照されたい。10

【0098】

抗体ライブラリは多くの方法により構築できる（例えば、de Haardら、（1999年）J. Biol. Chem 274巻：18218～30頁；Hoogenboomら、（1998年）Immunotechnology 4巻：1～20頁、Hoogenboomら、（2000年）Immunol Today 21巻：371～8頁およびHoetら、（2005年）Nat Biotechnol. 23巻（3号）：344～8頁を参照されたい。

【0099】

ライブラリの構築のための特定の実施形態において、本明細書に記載のCDR3を含む重鎖ならびに および 軽鎖が、個別のベクターにおいて最も良く構築される。第1に、合成遺伝子を設計し、個々の合成可変ドメインを統合する。軽鎖は、ApaLI（シグナル配列の最末端に位置する）およびAscI（終止コドンの後ろに位置する）のための制限部位に結合できる。重鎖は、SfiI（Pebシグナル配列内に位置する）およびNotI（CH1およびアンカータンパク質の間のリンカーに位置する）に結合できる。Peb以外のシグナル配列、例えばM13pIIシグナル配列もまた使用できる。20

【0100】

最初の遺伝子は、所望のCDRの代わりに「スタッファー」配列を用いて作製できる。「スタッファー」は切り取られ、多様なDNAに置き換えられるが、機能性の抗体遺伝子を発現できない配列である。例えば、スタッファーは、いくつかの終止コドンおよび正確な完成ライブラリベクターには発生しないであろう制限部位を含有し得る。スタッファーは、高度に示されたCDR配列の任意の1つを有することを避けるために使用される。30

【0101】

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

【0102】

最も好ましくは、提示は、M13ファージの誘導体の表面上である。最も好ましいベクターは、M13の全遺伝子、抗生物質耐性遺伝子およびディスプレイカセットを含有する。カセットとして、遺伝子の多様なファミリーのメンバーの導入および除去を可能にする制限部位を有する好ましいベクターが提供される。好ましいベクターは、ファージの増幅に使用される成長条件下で、再構成に対して安定である。40

【0103】

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

10

20

30

40

50

の提示および／または発現のために多様性を保存することもできる。

【0104】

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

【0105】

別の態様において、2008年2月13日出願のU.S.S.N 61/028, 265、2008年4月10日出願のU.S.S.N. 61/043, 938および2009年2月13日出願のU.S.S.N. 12/371, 000にさらに記載の、重鎖の経済的選択または「ESCH」と呼ばれる方法において、LCの小型の集団が、それらの分泌を起こすべくター中に配置され得る。CDR3を含む本明細書において提供されるHCのライブラリのような、HCの新しいライブラリがファージ中に構築される。次いでLCおよびHCは、感染のさらにもっと有効な方法により組み合わせることができる。有効なHCの小型のセットが選択されたら、これらを使用して、ROLICに供し、最適なHC/LCの対合を得る、または古典的選択のためのLCのFabライブラリにクローン化されるように使用できる。
20

【0106】

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

【0107】

タンパク質ディスプレイの他の型は、細胞ベースの提示（例えばWO 03/029, 456を参照されたい）；リボソームディスプレイ（例えば、Mattheakisら、（1994年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：9022頁およびHanesら、（2000年）Nat Biotechnol. 18巻：1287～92頁を参照されたい）；タンパク質-核酸融合（例えば、米国特許第6,207,446号を参照されたい）；および非生物学的タグの固定（米国特許第5,874,214号を参照されたい）を含む。
30

【0108】

本開示のライブラリから単離された抗体を分析し、LCの型および最も近い生殖系列遺伝子を決定できる。好ましい実施形態において、非生殖系列フレームワーク残基は、結合親和性および特異性が許容不可能な程度に悪影響を与えない限り、生殖系列アミノ酸に戻される。置換は、群として、または1つずつ実施され得る。ヒト生殖系列配列は、Tomlinson, I.A.ら、1992年、J. Mol. Biol. 227巻：776～798頁；Cook, G.P.ら、1995年、Immunol. Today 16巻（5号）：237～242頁；Chothia, D.ら、1992年、J. Mol. Biol. 227巻：799～817頁に開示されている。V BASEの要覧は、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的な総覧を提供する（Tomlinson, I.A.らにより編纂、MRC Centre for Protein Engineering、Cambridge、UK）。抗体は、結合特性が実質的に保有される限り、フレームワーク領域中の1つまたは複数の非生殖系列アミノ酸を抗体の対応する生殖系列アミノ酸に戻すことによって「生殖系列化」される。類似の方法は、定常領域、例えば免疫グロブリン定常ドメインにおいてもまた使用できる。
40

【0109】

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

10

【0110】

一実施形態において、突然変異誘発を使用し、1つまたは複数の生殖系列残基を、フレームワークおよび/または定常領域に置換または挿入する。例えば、生殖系列のフレームワークおよび/または定常領域残基は、改変された非可変領域と類似（例えば、最も類似）の生殖系列配列に由来することができる。突然変異誘発後、生殖系列残基または残基が許容される（すなわち、活性を無効にしない）場合、抗体の活性（例えば、結合活性または他の機能活性）を評価し、決定できる。類似の突然変異誘発は、フレームワーク領域において実施できる。

【0111】

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

20

【0112】

CDR1、CDR2および軽鎖多様性

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

30

【0113】

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

40

50

様性にクローン化される。

【0114】

一実施形態において、HCの多様性は、軽鎖の多様性を含有するベクター(ファージまたはファージミド)にクローン化される。この多様性は、少なくとも25、50、100、500、1.E3、1.E4、1.E5、1.E6、または1.E7である。HC C D R 3の多様性は、少なくとも221、272、500、1000、1.E4、1.E5、1.E6、1.E7、1.E8または1.E9である。

【0115】

一実施形態において、HCの多様性は、ファージタンパク質、例えばI I I、V I I I、V I I、V IもしくはIXまたは提示を起こすために十分なこれらの1つの断片上にHCを提示するファージベクターにクローン化され、軽鎖は、個々の細胞が軽鎖を分泌する細胞コレクションに感染することによってHCに組み込まれる。細胞中の軽鎖の多様性は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、50、75または100である。HC C D R 3の多様性は、少なくとも221、272、500、1000、1.E4、1.E5、1.E6、1.E7、1.E8または1.E9である。

【0116】

表30は、P_{1a c}プロモーターの調節下で重鎖に関するディスプレイカセットである、b1a遺伝子を担持するファージベクターDY3FHC87(配列番号:894)の配列を示す。DY3FHC87は、同様にM13の全遺伝子を含有する。ベクター、例えばpLCSK23(表40の配列)(配列番号:896)における軽鎖の多様性を持つF+E.coli細胞を感染させる。ベクターpLCSK23はKan^R遺伝子を担持する。P1a cプロモーターの調節下で、シグナル配列を有する、塩基2215で始まる遺伝子(塩基2215~2277)、VL(この配列において、VLは塩基2278から塩基2598の(配列番号:897)に示される配列をコードする)、塩基2599から2922のC、2923から2931のNotI部位を許容するリンカーおよびV5タグ(塩基2932~2973)がある。2259~2271にSfiI部位および2602~2605にKpnI部位があり、Vの置き換えを容易にさせる。(配列番号:897)は、分泌されるタンパク質の例である。CおよびV5タグは一定であることを理解すべきである。表19に示されるすべてのタンパク質(VK1O2g1-JK3、VK1O2var1、VK1O2var2、VK1O2var3、VK1O2var4、VK1O2var5、VK3L6g1-JK4、VK3L6var1、VK3L6var2、VK3L6var3、VK3L6var4、VK3L6var5、VK3L6var6、VK3L6var7、VK3L6var8、VK3A27g1-JK3、VK3A27var1、VK3A27var2、VK3A27var3、VK3A27var4、VK3A27var5、VK3A27var6、VK3A27var7、VK3L2g1-JK3、およびVK1g1L8-JK5)は、カルボキシ末端に結合したこれらの配列を有するであろう。

【0117】

軽鎖の多様性

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

【0118】

ヒトLCにおいて、CDR3は最も重要であり、CDR1が次に重要である。CDR2は、ほとんどAgと接触しない。多様性を、表900および表1000(CDR1)、表1100および表1200(CDR2)、表1300、1400および1500(CDR

10

20

30

40

50

3)に示すようにCDRに導入する。重鎖の経済的選択(ESH C)のために、少数の、例えば表1200のようにCDR3に多様性を有する50のLCを、ペリプラズムへの分泌のためにpLCSK24における発現に関する選別した。個々の細胞系が、例えば50またはそれより少ないLCを含有するように、いくつかの細胞系を維持する場合、より多くのLCを使用できる。

【0119】

表900は、LC CDR1に関する多様性を示す。このライブラリは、「許容」として示されるAA型の追加の多様性を有する、O12残基を含有することができ、表900、1000、1100、1200、1300、1400において、「許容」は「さらなる許容型」と解釈する。O12は、R₂₄ASQSISSYLN₃₄(配列番号935)を10有する。他のVK1遺伝子座は、24にQを有する。他の遺伝子座は、25にMを有する。S₂₆およびQ₂₇は、VKIにおいて不变である。他のVKI遺伝子座は、28にDまたはGを有する。I₂₉およびL₃₃は、VKIにおいて不变であり、側基は内側を向いている。他のVKI遺伝子座は、30、31、32、および34において、表900に示す多様性を許容する。表900において、11の位置のうち7つだけが変化し、総多様性は576である。

【0120】

表1000は、LC CDR1に関する高レベルの多様性を示す。ここでは11の位置のうち8位が変化している。一定であるものは組み込み部位から離れているか、または埋もれた側基を有する。20

【0121】

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

【0122】

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

【0123】

ROLICのために、表900、1100および1300に示した多様性を有する、約3×10⁷のLCを作製した。30

【0124】

重鎖の多様性

A b HC(重鎖)は、CDR1、CDR2およびCDR3において多様性を有する。配列および長さ双方の多様性があるので、CDR3における多様性は特に複雑である。配列多様性はランダムではない。Ab遺伝子を作る細胞は、VセグメントとDセグメントとJHセグメントを接合する。Dセグメントは任意選択であり、認識可能なDを有する、天然のヒトAbの約半分である。0から多数の塩基が付加または除去される、V-D、D-JまたはV-Jの境界において広範囲に編集され得る。生殖系列V::D::JHを有するAbは、生殖系列Abと見なすことができる。40

【0125】

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

【0126】

一態様において、本発明は、3-23(または別のVH、例えば4-34)と、a)(

50

S、Y、D、R、N)を含むセットから選別された多数のアミノ酸、b) D領域、c) J H領域およびd) J H領域のF R 4部分、の1つとの融合による、A b H C遺伝子の構成に関する。これらの融合は、G L 3 - 2 3あるいはC D R 1および/またはC D R 2に合成多様性を有する3 - 2 3であってよい。H C C D R 3の長さは約3から約2 4までの任意の数であってよい。好ましくは、ライプラリは、6、8、10、12、14、16、18および2 0の長さのH C C D R 3を有するメンバーを含有するであろう。あるいは、長さは5、8、11、14、17および2 0または任意の他の組合せであってよい。

【0127】

表2 1は、長さ6から2 0の適切なC D R 3の設計の多くの例を示す。2列に大文字で明記したコドンは、w o b b l i n gを用いて合成される。3列は、d o p i n gのレベルを示す。表1 0 0は、さまざまな長さのH C C D R 3を組み合わせ、ほぼすべてのタンパク質的と結合するA bを含有することが期待されるライプラリの形成が可能である比率を示す。

【0128】

【表1】

表100							
長さ	6	8	10	12	14	16	20
多様性	1. x 10 ⁵	2. x 10 ⁵	4. x 10 ⁵	8. x 10 ⁵	8. x 10 ⁵	8. x 10 ⁵	4. x 10 ⁵

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

【0129】

長さ8に関して、表2 1は3つの例を示す。8 aはJ H 1のすべてに融合されたY Yを有し、一方、8 bは、J H 1のF R領域に融合されたD 6 - 1 3 (1)に融合された1つのYを有する。長さ10、12、14、16および2 0もまた、表2 1に示す。H C C D R 3の多様性は、生殖系列3 - 2 3または合成多様性を含有する3 - 2 3において構築できる。あるいは、異なるV H、例えば4 - 3 4を使用できる。

【0130】

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

10

20

30

40

50

【0131】

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

【0132】

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

【0133】

E S H C を使用することによって、合成 H C C D R 3 の多様性の新規な設計をサンプリングすることができる。所与の実施例において、例えば 50 L C のプールを使用する。 5 × 10⁸ の H C のライプラリは、 2.5 × 10¹⁰ の旧式のライプラリと同様に機能し、必要な労力は非常に少ないはずである。

【0134】

配列を w o b b l i n g する場合、最初のコドンの選別は、ライプラリ中に見られる A A の実際の混合物に影響を与える。表 300 は、アミノ酸置換が、個々の開始親コドンから 1 、 2 または 3 つの塩基変化を要求することを示す。例えば、本発明者らが、 A l a のために g c t または g c c で開始した場合、 3 種すべての終止コドンは 3 つの塩基変化を要求し、それはまれである。 76 : 8 : 8 : 8 混合物を使用する場合、 A l a は、事例の 57 % (0.76 × 0.76) で出現するであろう。 V 、 G 、 T 、 P 、 S は、個々に約 6 % で出現し、 D は約 3 % で出現する。 E 、 I 、 L 、 F 、 Y 、 H 、 N 、 C および R は、約 10 倍下がるであろう。 M 、 W 、 Q 、 K 、 A m 、 O c および O p は、さらによりまれである。本発明者らが g c a で開始した場合、その後一塩基変化だけを必要として E は D に置き換えられるが、オパールおよびオーカーの終止は二塩基変化だけを要求し、このことは望ましくない。好ましいコドンに、星印 (*) で印をつけてある。セリンの選択は、高い頻度で Y を S に置換するという本発明者らの要望を困難にする。このことは、たった 2 つの塩基が親と異なる群に O p および O c をもたらす。この問題は、 H C C D R 3 レパートリーを、抗生物質耐性遺伝子、例えば K a n R または A m p R の前にクローン化し、耐性を選択すること、したがって終止コドンを含有するメンバーを除去することによって克服することができる。さらに、このライプラリは、終止の代わりに Q を挿入する s u p E E . c o l i において作製できる。

【0135】

10

20

30

40

【表2】

表300

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

10

20

30

【0136】

【表3】

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

【0137】

10

20

30

40

【表4】

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

AmはTAG終止であり、OpはTGAであり、OcはTAAである。

ライプラリの使用方法

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

【0138】

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

【0139】

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

【0140】

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

【0141】

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

10

20

30

40

50

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

【0142】

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

10

【0143】

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

【0144】

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

20

【0145】

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

【0146】

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

30

【0147】

他の細胞型は、当分野において公知の方法によりFACS用に調製できる。

【0148】

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

40

50

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

【0149】

均一アッセイの別の例は、アルファスクリーン (Alpha Screen) (Packard Bioscience, Meriden Conn.) である。¹⁰ アルファスクリーンは、2種の標識されたビーズを使用する。一方のビーズは、レーザーで励起された場合、一重項酸素を発生する。他方のビーズは、第1のビーズから一重項酸素が拡散された場合、光のシグナルを発生し、一重項酸素と衝突する。シグナルは、2種のビーズが近接する場合にだけ発生する。一方のビーズは、ディスプレイライブラリのメンバーに結合させることができ、他方のビーズを標的に結合させることができる。シグナルを測定し、結合の程度を決定する。

【0150】

均一アッセイは、候補ポリペプチドを、ディスプレイライブラリのヒヒクル、例えばパケテリオファージに結合させたまま実施できる。²⁰

【0151】

表面プラズモン共鳴 (SPR)。ディスプレイライブラリから単離された分子と標的との結合相互作用は、SPRを使用して分析できる。SPRまたは生体分子相互作用分析 (Biomolecular Interaction Analysis) (BIA) は、反応体のいずれも標識せずに、生体特異性相互作用をリアルタイムで検出する。BIAチップの結合表面の質量の変化（結合事象の表示）は、表面近くの光の屈折率の変更（表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学現象）をもたらす。屈折度の変化は検出可能なシグナルを発生し、これを生体分子間のリアルタイム反応の指標として測定する。SPRを使用するための方法は、例えば、米国特許第5,641,640号；Raether (1988年) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjölander および Urbaniczky (1991年) Anal. Chem. 63巻: 2338~2345頁; Szabóら、(1995年) Curr. Opin. Struct. Biol. 5巻: 699~705頁ならびにBIAcore International AB (Uppsala, Sweden) により提供されるオンライン供給源に記載されている。³⁰

【0152】

SPRからの情報を使用し、生体分子と標的との結合に関する平衡解離定数 (K_D) ならびに k_{on} および k_{off} を含む力学的パラメーターの正確かつ定量的測定を提供できる。このようなデータを使用し、さまざまな生体分子を比較できる。例えば、多様性ストランドのライブラリから選択された核酸によりコードされるタンパク質を比較し、標的に関する高い親和性を有する、または遅い k_{off} を有する個体を特定できる。さらに、この情報を使用し、構造活性相關 (SAR) を明らかにすることも可能である。例えば、親タンパク質の成熟型の力学的パラメーターおよび平衡結合パラメーターを、親タンパク質のパラメーターと比較することもできる。所与の位置の変異体アミノ酸が、特定の結合パラメーター、例えば、高親和性および遅い k_{off} と相関することを特定できる。この情報は、（例えば、ホモロジーモデリング、エネルギー最小化または結晶学もしくはNMRによる構造決定を使用する）構造モデリングと組み合わせることができる。結果として、タンパク質とその標的との物理的相互作用の理解を系統立てて説明でき、他の設計方法を導くために使用できる。⁴⁰

【0153】

50

50

50

50

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

【0154】

キット

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

【0155】

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

【0156】

このキットは、遊離の形態のコードされたポリペプチドの発現のために、HC CDR3の挿入用部位を有するファージベクター(例えば、DY3F87HC)を含むことができる。このキットは、可溶性軽鎖、例えばpLCSK23の発現用プラスミドベクターもまた含むことができる。このキットは、適切な細胞系(例えばTG1)もまた含むことができる。pLCSK23によりコードされる軽鎖の多様性は、10、15、20、25、30または50であってよい。多様性においてLCは、フレームワーク領域中の生殖系列であること、およびCDR3および/またはCDR1に多様性を有することなど特定の望ましい特性を有するように構築または選別され得る。生殖系列は、高度に利用される生殖系列、例えば、にはVK1_2-O2、VK3_I-A27、VK3_5-L6、VK3_3-L2およびにはVL2_2a2、VL1_1c、VL1_1g、VL3_3rであってよい。

【0157】

例えば、生殖系列は、

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

10

20

30

40

50

【0158】

【表5】

表19:pLCSK23に使用される26種のVL

VK1O2g1-JK3	(配列番号 4)				
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ	SYSTPFTFGP GTKVDIK	107			
VK1O2var1	(配列番号 5) S28D				
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ	SYSTPFTFGP GTKVDIK	107			
VK1O2var2	(配列番号 6) S91R				10
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ	RYSTPFTFGP GTKVDIK	107			
VK1O2var3	(配列番号 7) S91E				
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS	SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ	EYSTPFTFGP GTKVDIK	107			
VK1O2var4	(配列番号 8) S31R				
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS	RYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ	SYSTPFTFGP GTKVDIK	107			
VK1O2var5	(配列番号 9) S31E, S93R				
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS	EYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ	SYRTPFTFGP GTKVDIK	107			20
VK3L6g1-JK4	(配列番号 10)				
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGG GTKVEIK	107			
VK3L6var1	(配列番号 11) S31R				
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS	RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA	60			
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGG GTKVEIK	107			
VK3L6var2	(配列番号 12) S92R				

【0159】

【表6】

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RRNWPLTFGG GTKVEIK	60 107	
VK3L6var3 (配列番号 13) S92G EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RGNWPLTFGG GTKVEIK	60 107	
VK3L6var4 (配列番号 14) S92Y EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RYNWPLTFGG GTKVEIK	60 107	
VK3L6var5 (配列番号 15) S92E EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RENWPLTFGG GTKVEIK	60 107	10
VK3L6var6 (配列番号 16) Y32F EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SFLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGG GTKVEIK	60 107	
VK3L6var7 (配列番号 17) Y32D EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SDLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGG GTKVEIK	60 107	
VK3L6var8 (配列番号 18) N93G EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSGWPLTFGG GTKVEIK	60 107	20
VK3A27gl-JK3 (配列番号 19) EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	
VK3A27var1 (配列番号 20) S31R EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RSYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	
VK3A27var2 (配列番号 21) S32R EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SRYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	
VK3A27var3 (配列番号 22) S32D EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SDYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	30
VK3A27var4 (配列番号 23) G93E EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYESSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	
VK3A27var5 (配列番号 24) G93R EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYRSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	
VK3A27var6 (配列番号 25) S30D, G93E EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWSQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYESSSPFTFG PGTKVDIK	60 108	40

【0160】

【表7】

VK3A27var7	(配列番号 26) S94R	
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP	60
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ	QYGRSPFTFG PGTKVDIK	108
VK3L2g1-JK3	(配列番号 27)	
EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSVS	SNLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPA	60
RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ	YNNWPFTFGP GTKVDIK	107
VK1gL1L8-JK5	(配列番号 28)	
D1QLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS	60	
RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPITFGQ GTRLEIK	107	
VK1GLC12-JK3	(配列番号 897)	10
D1QMTQSPSS LSASVGDRV TITCRASQSI SSYLNWYQQK PGKAPKLLIY AASSLQSGVP	60	
SRFSGSGSGT DFTLTSSL QPEDFATYYC QQSYSTPFTF GPGTKVDIKR GTVAAPS VFI	120	
FPPSDEQLKS GTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS	180	
STLTL SKADY EKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGECA AAGKPIP NPL LG LD ST	236	

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

【0161】

多様性を導入する方法

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

【0162】

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

10

20

30

40

50

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

【 0 1 6 3 】

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

【 0 1 6 4 】

【表 8】

10

表5:混合ヌクレオチドの標準的コード

N	はA、C、G、Tが等モルである	
B	はC、G、Tが等モルである (Aは等モルではない)	
D	はA、G、Tが等モルである (Cは等モルではない)	
H	はA、C、Tが等モルである (Gは等モルではない)	
V	はA、C、Gが等モルである (Tは等モルではない)	
K	はG、Tが等モルである (ケト)	
M	はA、Cが等モルである (アミノ)	
R	はA、Gが等モルである (プリン)	
S	はC、Gが等モルである (強い)	20
W	はA、Tが等モルである (弱い)	
Y	はC、Tが等モルである (ピリミジン)	

表6:wobblingのための混合ヌクレオチドの例

$$\begin{aligned} e &= 0.82 \text{ A} + 0.06 \text{ C} + 0.06 \text{ G} + 0.06 \text{ T} \\ q &= 0.06 \text{ A} + 0.82 \text{ C} + 0.06 \text{ G} + 0.06 \text{ T} \\ j &= 0.06 \text{ A} + 0.06 \text{ C} + 0.82 \text{ G} + 0.06 \text{ T} \\ z &= 0.06 \text{ A} + 0.06 \text{ C} + 0.06 \text{ G} + 0.82 \text{ T} \end{aligned}$$

【 実施例 】

30

【 0 1 6 5 】

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

【 0 1 6 6 】

(机上の実施例 1)

非常に短い H C C D R 3 を有するライブラリ

非常に短い H C C D R 3 が当分野において記載されている。Kadi r v e l r a j ら、(2006年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103巻 : 8149 ~ 54 頁は S t r e p t o c o c c u s B I I I 型 Ag (G B S - A g) に結合するが、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e の夾膜 Ag には結合しない抗体中の 4 個のアミノ酸の H C C D R 3 配列を記載している。G B S - A g は、定期的にシアル化される。S . p n e u m o n i a e の夾膜 Ag (S P C - A g) は非常に似ているが、シアル酸基を欠いている。このような短い H C C D R 3 は、その中に炭水化物が結合できる広い溝を創製し、このような A b は、既存の抗体ライブラリにおいて、非常にとてもまれである。したがって、現行ライブラリは、炭水化物に対する多種多様な潜在的バインダーをもたらさない。

【 0 1 6 7 】

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

40

50

D R 3 を有する、公知の 3 D 構造の抗体である。3 - 2 3 H C 構造の検査により、R₉ - R₄ (F R 3 の終了) の C から W₁₀ - R₄ (F R 4 の開始) の C までの、約 10 の距離が得られた。1 B 1 (N W D Y (配列番号：29)) の C D R 3 は、A A は、小型の側基だけを有する必要はなく、またはグリシンの大部分である必要もないことを示す。3 個のアミノ酸 (A A) は、P P P は機能しないが 10 を架橋できる。実際に、本発明者らは、3 個の A A と同じくらい短い C D R 3 を有するいくつかの F a b を得ているが、非常にまれである。

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

表 11 の三量体、表 12 の四量体、表 13 の五量体を使用して構築される短いライブライアリは、実質的多様性をそれぞれ 266、266 および 215 有する。このことを、これらの長さをペプチドの数と比較すると、それぞれ 8000、16000 および 32000 である。

10

20

30

40

50

【0172】

V - 3 D 1 - 1 . 1 . 1 - J H 1 は、 F R 3 の最終部分、続く D 1 - 1 (R F 1) からの 3 個のアミノ酸、すなわち G T T (配列番号 : 257) を含有する。 V - 3 D 1 - 1 . 2 - J H 1 は、 D 1 - 1 (R F 1) のアミノ酸 2 ~ 4 個を親 C D R 3 として使用する。 V - 3 D 3 - 3 . 3 . 3 - J H 2 は、 F R 3 の末端、続く D 3 - 3 (R F 3) のアミノ酸 3 ~ 5 個を示す。本発明は、 F R 3 : : (ヒト D セグメントの 3 、 4 、 5 個の終止を含まない A A) : : ヒト J H 由来の F R 4 を含む、任意のアミノ酸配列を含む。不対 C y s 残基を含有する D 領域の断片は、不対 C y s 残基を含まない D 領域の断片ほど好ましくない。 V - 5 J H 3 において、 J H 3 は、 F R 4 の開始を規定する T r p - G l y に対するコドンの前に 4 個だけコドンを有するため、「 y 」で示される T y r が存在する。 V - 5 J H 4 は、同じ理由で「 s 」で示される S e r を有する。 w o b b l i n g を使用する場合、純度の好ましいレベルは、 0 . 75 と 0 . 90 との間である。本発明は、配列 V - 3 J H 1 から V - 3 J H 6 、 V - 4 J H 1 から V - 4 J H 6 および V - 5 J H 1 から V - 5 J H 6 およびそれらを含有するライプラリを含む。本発明は、 C D R 領域がヒト D 領域由来の 3 、 4 または 5 個のアミノ酸セグメントにより置き換えられた配列およびそれらを含有するライプラリもまた含む。本発明は、親配列が C D R 3 領域において突然変異を起こしている D N A およびそれらを含有するライプラリを、さらに含む。好ましい実施形態は、 C D R 3 当たり塩基変化の平均数が 1 , 2 または 3 である実施形態である。突然変異誘発の方法は、エラープローン P C R 、 w o b b l i n g および d o b b l i n g である。

【0173】

【表 9 】

表7-長さ3、4、5の親CDR3のアミノ酸配列

長さ3

...FR3----- CDR3- FR4-----

V-3JH1	TAVYYCAK	FQH WGQGTLVTVSS	(配列番号 31)
V-3JH2	TAVYYCAK	FDL WGRGTLVTVSS	(配列番号 32)
V-3JH3	TAVYYCAK	FDI WGQGTMVTVSS	(配列番号 33)
V-3JH4	TAVYYCAK	FDY WGQGTLVTVSS	(配列番号 34)
V-3JH5	TAVYYCAK	FDP WGQGTLVTVSS	(配列番号 35)
V-3JH6	TAVYYCAK	MDV WGQGTTVTVSS	(配列番号 36)
V-3D1-1.1.1-JH1	TAVYYCAK	GTT WGQGTLVTVSS	(配列番号 37)
V-3D1-1.1.2-JH1	TAVYYCAK	TTG WGQGTLVTVSS	(配列番号 38)
V-3D3-3.3.3-JH2	TAVYYCAK	IFG WGRGTLVTVSS	(配列番号 39)

長さ4

V-4JH1	TAVYYCAK	YFQH WGQGTLVTVSS	(配列番号 40)
V-4JH2	TAVYYCAK	YFDL WGRGTLVTVSS	(配列番号 41)
V-4JH3	TAVYYCAK	AFDI WGQGTMVTVSS	(配列番号 42)
V-4JH4	TAVYYCAK	YFDY WGQGTLVTVSS	(配列番号 43)
V-4JH5	TAVYYCAK	WFDP WGQGTLVTVSS	(配列番号 44)

【0174】

【表10】

V-4JH6	TAVYYCAK	GMDV	WGQGTTTVSS	(配列番号45)
V-4D3-10.1a-JH2	TAVYYCAK	LLWF	WGRGTLVTVSS	(配列番号46)

長さ5

V-5JH1	TAVYYCAK	EYFQH	WGQGTLVTVSS	(配列番号47)
V-5JH2	TAVYYCAK	WYFDL	WGRGTLVTVSS	(配列番号48)
V-5JH3	TAVYYCAK	yAFDI	WGQGTMVTVSS	(配列番号49)
V-5JH4	TAVYYCAK	SYFDY	WGQGTLVTVSS	(配列番号50)
V-5JH5	TAVYYCAK	NWFDP	WGQGTLVTVSS	(配列番号51)
V-5JH6	TAVYYCAK	YGMDV	WGQGTTTVSS	(配列番号52)
V-5D2-8.2a-JH2	TAVYYCAK	DIVLM	WGRGTLVTVSS	(配列番号53)

10

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

!	CDR3.....															
!	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	I	V	L	M
!	tgct	tgat	tgta	tgta	tgca	tgta	tgta	tgta	tgct	aag	jez	ezq	jzz	qzz	ezj	
!	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S					(配列番号54)
!	tgg	ggc	cag	ggt	act	acG	GTC	ACC	gtc	tcc	agt-3'					(配列番号55)
!	BstEII...															

20

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

30

【0175】

本発明者らの現行の ライブライリから、例えば、 a) フレームワーク領域中の生殖系列、 b) C D R において適切な多様性を示す、および c) 十分作製され、 3 - 23 と良く対合する型である、 25 の 軽鎖のコレクションを選択できる。これらの L C は、 K a n R を担持するベクターおよびファージをパッケージングしないシグナルから、 E . c o l i 内に作製される。次いで、 L C を有さないファージベクター中に本発明者らの H C ライブライリを構築した。 H C および L C は、 L C 作製細胞を H C ファージに感染させることにより交雑される。選択された H C ファージは、 E L I S A + ファージを作製する細胞の L C を組み合わせることができ、または H C は、全 L C の多様性を有する p M I D 21 内にクローニングできる。あるいは、選択された H C は p H C S K 85 に移動でき、 R O L I C に使用して本発明者らのコレクションの全 L C と組み合わせることができる。 L C もまた使用できた。したがって、ファージ中の 1×10^9 H C のライブライリは、 1.2×10^1 $^1 (1. \times 10^9 \times 117)$ の F a b ライブライリに拡大できる。 1×10^7 の C D R 1 ~

40

50

2と10⁶のH C C D R 3とを組み合わせた場合、個々のC D R 3が50のC D R 1～2と結びついた、5×10⁷のライブラリを作ることができる。ファージ中の5×10⁷のH Cのライブラリは、6×10⁹の旧式のライブラリと同様の結果ともたらすことができた。

【0176】

【表11】

表1:非常に短い例示的なHC CDR3の設計

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

10

【0177】

【表12】

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

30

aRgはKまたはRをコードする

または、現行のH Cの多様性を、D Y 3 F 8 7 H C内にクローニングでき、上記のC D R 3の多様性を、X b a I - B s t E I I断片としてその多様性内にクローニングする。例えば、25のL Cのライブラリをp L C S K 2 3内にクローニングし、T G 1 E . c o l i中に細胞系を創製するために使用する。これらの細胞を、新規なH C C D R 3（およびC D R 1～2）の多様性を持つD Y 3 F 8 7 H Cファージに感染させる。この感染から得

られたファージを、所望の標的に対する結合に関して選択する。2から4ラウンドの選択の後で、選択されたH Cをp H C S K 2 2に移し、R O L I Cに使用して、選択されたH CとR O L I C LCライブラリ中の全LCと組み合わせることができる細胞系を創造する。この方法において、1.E 9のライブラリは、通常なら1.E 16の(1.E 7のLCの多様性を推測する)ライブラリの構築が必要と思われるA bを得ることができる。

【0178】

(机上の実施例2)：非常に長いH C C D R 3を有するライブラリ

S i d h u ら、(J Mol Biol. 2004年338巻:299~310頁および米国特許出願第20050119455A1号)は、長さが20アミノ酸までに制限されたC D Rにおいて、YおよびSだけが許容されるライブラリから選択される、高親和性A bを報告している。a) YまたはSを許容されるいくつかの(しかしすべてではない)部位、b) 4~6のNNKコドンを含む、c)(Dにおいて多様化を有するまたは有さない)Dセグメントを導入する、および/またはd)エラープローンP C Rを使用する、のうち1つまたは複数の多様性の形態を有するH C C D R 3を有するライブラリから、高親和性A bを作製することができる。本発明者らは、H C C D R 3が約8から約22の範囲で、長さの中央値が13であるA bの空間を既にサンプリングしている。したがって、H C C D R 3が約23AAまたは約35AAのどちらかであるライブラリが可能であり、標的の特定の型に対して有利性を有することができる。例えば、G P C Rは、多重状態を有すると思われる細胞の脂質二分子層を横断する、7つのらせん形セグメントを有する内在性膜タンパク質である。非常に長いH C C D R 3を有する抗体は、7つのストランドにより形成されるチャネルに適合する隆起を形成できる。G P C Rに結合するA bを見つけることは困難であり、すべてのメンバーが非常に長いH C C D R 3を有するライブラリを意図的に構築することにより、この問題は改善され得る。長さは、いくらか可変にでき、1つのライブラリにおいて、約23、24、または25、第2のライブラリにおいて33、34または35である。

【0179】

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

【0180】

個々のライブラリは、少なくとも4つの方法で構築できる：1)特定のアミノ酸配列をコードするD N Aをまず合成し、エラープローンP C Rに供する、2)ライブラリは、w o b b l i n gによって、またはヌクレオチドの混合物を用いて合成され得る、3)ライブラリは、d o b b l i n gを使用して構築され得る、4)(2)または(3)の手段に続いてエラープローンP C Rを行うことができる。(1)の手段の例として、設計12において、配列番号908をコードする、配列番号：911に示すようなD N Aが合成できる。このD N Aを、配列番号：909および配列番号：910に示すプライマーを使用して、エラープローンP C Rに供することができる。これらのプライマーは、フレームワーク領域を含むので、エラーはC D R 3だけで発生する。

【0181】

例えば 2×10^9 のメンバーの、長さ23のC D R 3を有するH Cのライブラリおよび同様に 2×10^9 のメンバーの、長さ約35のH C C D R 3を有する第2のライブラリが構築できる。あるいはD N Aを混合し、 4×10^9 の1つのライブラリを構築できる。

【0182】

【表13】

表4:ヒトJHアミノ酸配列

	H3		
	-----	CDR3	
	100	110	
JH1	---AEYFQHWGQGTLVTVSS	(配列番号66)
JH2	---YWYFDL WGRGTLVTVSS	(配列番号67)
JH3	-----AFD IWGQGTMVTVSS	(配列番号2)
JH4	-----YFDY WGQGTLVTVSS	(配列番号1)
JH5	---NWFD PWGQGTLVTVSS	(配列番号68)
JH6	YYYYYYGMDV WGQGTTVTVSS	(配列番号3)

10

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

【0183】

設計1

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

20

【0184】

【表14】

XX::D2-2.2::XX:::JH1	1	1	2	2
FR3 1 5 0 5 0 3FR4				
YYCAK DYGYCSSTSCYTYGYSYAEYFQHWGQGTLVTVSS	(配列番号898)
YYCAK XXGYCSXXSCYTXXYSYAEYFQHWGQGTLVTVSS	(配列番号69)
R GYCSSTSCYT AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1)				
(配列番号70) (配列番号66)				
1 1 1 1				
9 9 0 0 0 1				
4 5 0 2abcdefghijklmnp3 0				

30

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

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

まで、およびWGQG(配列番号939)から

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

40

【0185】

【表15】

```

C23D222JH1
! scab DNA      S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!          XbaI...

!   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   KIR
!TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg -
!          -

CDR3-----
! X   X   D2-2 RF2..... X   X   JH1..
! any any G   Y   C   S   any any S   C   Y   T   any any Y   S   Y   A
! nnk nnk ggt tat tgt tcc nnk nnk tct tgc tat act nnk nnk tat tcc tac gct-
!          -

CDR3-----
! E   Y   F   Q   H
! gaa tat ttc cag cac-
!          -

! W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   (      配列番号 71)
! tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' (      配列番号 72)
!          BstEII...

```

【0186】

【表16】

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

10

設計2

1	1	2	2
1	5	0	5
YYCAK GSYYYGSYSYNNVDSYYAEYFQHWGQGTLVTVSS	(配列番号 899)		
YYCAK XXXYYGXGSXYNXXSYAEEYFQHWGQGTLVTVSS	(配列番号 80)		
R YYYGSGSYNN AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1)			
(配列番号 81) (配列番号 66)			

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

20

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

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

30

【0187】

40

【表17】

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

設計3

	1	1	2	2		
1	5	0	5	0	3	
YYCAK	YYYYGSGSYNNSDSYSA	EYFQH	WGQGT	LTV	VSS	(配列番号 900)
YYCAK	XZYZZGZGZX	YZAXZFQ	HWGQGT	LTV	VSS	(配列番号 940)
R	YYGSGSYN	A	EYFQH	WGQGT	LTV	VSS (JH1)
(配列番号 81)	(配列番号 66)					10
アミノ酸多様性	= 1.64 E 8					
DNA多様性	= 1.07 E 9					
終止なし	= 88%					
無償性Cysなし	= 88%					
終止およびCysなし	= 77%					

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

A V Y Y C A RIK any Y|S Y Y|S Y|S G Y|S G
 (C23D310b) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|act aRg nnk tmc tac tmc tmt ggt tmc ggc-
 Y|S any Y N Y|S any Y|S Y Y|S A any Y|S F Q H W G Q
 tmt nnk tac aat tmt nnk tmc tat tmc gct nnk tmc ttt caa cat tgg ggc cag-
 G T L (配列番号 85)
gt act ct-3' (配列番号 86)

ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4は上記の通り。

設計4

	1	1	2	2	2	3	3	
1	5	0	5	0	3	5	0	5
YYCAK	YYSF	YYDSSGGYYY	SDSSG	YYGYY	YSSY	YSSYAEYFQH	WGQGT	LTV
YYCAK	YYSX	SYY	ZYDSZ	GYZ	YXYS	ZYZ	ZAZZ	ZAZZ
R	YYDSSGGYYY	A	EYFQH	WGQGT	LTV	VSS (JH1)	(配列番号 901)	(配列番号 87)
(配列番号 88)	(配列番号 66)							30
1 1		1	1					
9 9	0 0		0	1				
4 5	0 2abcde	fghijklmno	pqrstuvwxyz	ab3		0		
アミノ酸多様性	= 1.64 E 8							
DNA多様性	= 1.07 E 9							
終止なし	= 88%							
無償性Cysなし	= 88%							
終止およびCysなし	= 77%							

【0188】

【表18】

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

```
C35D322JH1
! scab DNA      S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|tac|ttg|cag|atg|aac|agC-
!           XbaI...
!
!   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   K|R
! ITTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgc|gtc aRg -
!
! CDR3-----
!
!   Y   Y   S   any   S   Y   Y   any   Y   Y|S   Y   D   S   Y|S   G   Y   Y|S   Y
tac tat tcc nnk tct tac tat nnk tat tmt tac gat agt tmt ggt tac tmc tat
!
any   Y   Y   S   any   Y   Y|S   Y   Y|S   Y|S   Y|S   A   Y|S   Y|S   F   Q   H
nnk tac tat agc nnk tat tmc tac tmc tmt tmc gct tmt tmc ttc caa cac
!
!   W   G   Q   G   T   L   V   T   v   S   S   ( 配列番号 89)
tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' ( 配列番号 90)
!           BscEII...
!
(c35d322B) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gtc aRg tac tat tcc nnk tct tac tat nnk-
tat tmt tac gat agt tmt ggt tac tmc tat nnk tac tat agc nnk tat tmc tac-
tmc tmt tmc gct tmt tmc ttc caa cac tgg ggc cag ggt act ct-3' ( 配列番号 91)
ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4 は上記の通り。 20
```

10

20

設計5

1 1 2 2	
1 5 0 5 0 3	
YYCAK SSGYCSSTSCYTGVYYYAEYFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 902)	
YYCAK ZZGZCZZXZCZTXXYZZYXZYFOHWGQGTLVTVSS (配列番号 92)	
R GYCSSTSCYT AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1)	
(配列番号 70) (配列番号 66)	
アミノ酸多様性	= 1.64 E 8
DNA多様性	= 1.07 E 9
終止なし	= 88%
無償性Cysなし	= 88%
終止およびCysなし	= 77% 30

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

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

【0189】

【表19】

```

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

```

10

設計6

```

1 5 1 2 2 2 3 3
YYCAK SYDYGGCSSTSCTYYSYVSYSSYYAEXFQHWGQGTTLVTVSS ( 配列番号903)
YYCAK ZYXZYGCZXXSCZTYZSXZYSZYAEZFOHWGQGTTLVTVSS ( 配列番号96)
R GYCSSTSCYT D2-2.2 AEYFQHWGQGTTLVTVSS (JH1)
( 配列番号70) ( 配列番号66)

```

20

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

C35D222JH1

```

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

```

30

【0190】

40

【表20】

設計7

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

YYCAK YYSYGYCSSTSCTYSSSVSYYSSYYAEYFQHVGQGTILTVSS (配列番号 904)
 YYCAK ZYZZYGZCZZXZCZTYZSZXZYSZYSA~~Z~~^ψZQBWGQGTILTVSS (配列番号 100)
 R GYCSTSCYT D2-2.2 AEYFQHWGQGTILTVSS (JH1)
 (配列番号 70) (配列番号 66)
 (J=FSY, B=YHND, ψ=EKQ)

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

10

C35D222JH1B

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

20

設計8

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

YYCAK SRSYYVWGSYRYTSSYSSYSSYAEYFQHVGQGTILTVSS (配列番号 905)
 YYCAK ZXZYBZVWGZZRZTZSZXZYZZZYSA~~Z~~^ψZQHWGQGTILTVSS (配列番号 103)
 R YYDYVWGSYRYT D3-16.2 AEYFQHWGQGTILTVSS (JH1)
 (配列番号 104) (配列番号 66)
 (J=FSY, B=YHND, ψ=EKQ)

30

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

【0191】

【表21】

C34D316JH1A

```

! scab DNA      S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
5'-ttc|act|atc|TCT|AGA|gac|aac|tct|aag|aat|act|ctc|taclttg|cag|atg|aac|agC-
!           XbaI...
!
!       L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   K|R
!       |TTA|AGg|gct|gag|gaT|aCT|GCA|GtT|taT|taC|tgclgct aRg -
!
! CDR3-----
!       N|D
! Y|S any Y|S Y Y|S Y|H Y|S V   W   G   Y|S Y|S R   Y|S T   Y|S
! tmt nnk tmc tac tmt Nat tmt gtt tgg ggt tmt tmc cgt tmt act tmt
!       10
! S   Y|S any Y|S Y Y|S Y|S Y|S Y   Y|S S   Y|S
! agt tmc nnk tmt tac tmc tmt tmc tat tmc agt tmt
!
!       Q
! A, EIK Y|S F   Q   H
! GCT vag tmc ttc cag cat
!
! W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   (    配列番号105)
! tgg ggc cag ggt act ctG GTC ACC gtc tcc agt-3' (    配列番号106)
!       BstEII...
!
```

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

設計9

20

設計9は、Dセグメントが右に移動することを除き設計8と同様である。

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

YYCAK YYGSYSDSYSSYYDYVWGSYRYTYSSYYAEYFQHWGQGTLLTVSS (配列番号 906)
 YYCAK ZXZZZXZYZZYZBZVWGZTZYSZYAψZEQHWGQGTLLTVSS (配列番号 108)
 R D3-16.2 YYDYVWGSYRYT AEYFQHWGQGTLLTVSS (JH1)
 (配列番号 104) (配列番号 66)
(J=FSY, B=YHND, ψ=EKQ)

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

30

【0192】

【表22】

C34D316JH1B

```

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

```

(C35D316JH1B)

5'-GCA|Gt|T|ta|T|ta|C|tg|c|gct aRg tmt nnk tmc tmt tmc nnk tmt tac tmc tmt tmc
 tac tmt Nat tmt gtt tgg ggt tmt tmc cgt tmt act tat tmc agt tmt tac GCT vag
 tmc ttc cag cat tgg ggc cag ggt act ct-3' (配列番号111)

20

設計10

1 5	1 1	2 2
	0 5	0 4

YYCAK GSSYYYGSGSYYNSDYYSAYFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 907)
 YYCAK XZZYZZGZGZXYNZXZYAZZFRQHWGQGTLVTVSS (配列番号 112)
 R YYYGSGSYYN AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1)
 (配列番号 81) (配列番号 66)

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

30

(C24D310b) 5'-GCA|Gt|T|ta|T|ta|C|tg|c|gct aRg nnk tmc tmc tac tmc tmt ggt tmc-
ggc tmt nnk tac aat tmt nnk tmc tat tmc gct nnk tmc tt caa cat tgg ggc-
cag ggt act ct-3' (配列番号 113)
 ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4 は上記の通り。

設計11

1 5	1 1	2 2
	0 5	0 5

40

【0193】

【表 2 3】

YYCAR SSRSGYCTNGVCYRSGSYWYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 991)
 YYCAR ZZXZGZC32GVCZ3ZXZ24Z12LWGRGTLVTVSS (配列番号 114)
 K GYCTNGVCYT YWYFDLWGRGTLVTVSS D2-8.2 JH2
 (配列番号 115) (配列番号 67)
 (1=FYS(THT), 2=YHND(NAT), 3=ITKR(ANA), 4=LSW(TBG))

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

(C24D282.1) 5'-GCAGtT|taT|taC|tgc aRg tmc tmt nnk tmc ggt tmc tgc ana-
nat ggc gtc tgc tmt ana tmc nnk tmt tmt tbg tmt tht nat ctg tgg ggc-
caq got act ct-3' (配列番号117)

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

設計 12

1	1	2	2	3	3		
1	5	0	5	0	5	0	5
YYCAR	SSYYSSGYC	TNGVC	TYSYSYSSYSY	SYWYFDL	WGRGTLVTVSS	(配列番号 908)	
YYCAR	ZZZZZZGZC	32GVC	Z3ZZZZYZZY	ZY2Z4Z12L	WGRGTLVTVSS	(配列番号 121)	
K	GYCTNGVCY			Y	WYFDL	WGRGTLVTVSS	D2-8.2 JH2
(配列番号 115)				(配列番号 67)			
(1=FYS, 2=YHND, 3=ITKR, 4=LSW, 2=YS)							

(C33D282TP) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct-3' (配列番号 909)
(C33D282BP) 5'-ag agt acc ctg gcc cca-3' (配列番号 910)
(C33D282) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmc tmc tmt tmc ggt-
tmt tgt ana nat ggc gtg tgc tmt ana tmc tmc tmc tat tmt tmc tat tmt-
tat tmc tbg tmc tht nat ctg tgg ggc cag ggt act ct-3' (配列番号 122)
(C33D282F) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct agg tct tcc tac tat tcc tac ggt-
tat tgt aca aat ggc gtg tgc tat aca tac tcc tac tat tct tat tcc tat tct-
tac tct tac tgg tac ttt cat ctg too ggc cag ggt act ct-3' (配列番号 911)

設計 13

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

YYCAR SSSYYSSYSSGYCTNGVCYTYSSYYSSYYWYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 912)
 YYCAR ZZZZZZZZZZGYZCTNGVCYTZZZZZZZZWZF2LWGRGTLVTVSS (配列番号 123)
 K GYCTNGVCYT YWYFDLWGRGTLVTVSS D2-8.2 JH2
 (配列番号 115) (配列番号 67)

【 0 1 9 4 】

【表24】

(2=YHND)

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

設計14

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

10

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

YYCAK YYYSGSYYYSDYVWGSYRYTSYDSYYYAEYFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 913)
YYCAK ZZZZZZZZZZZDYYVWGSYRZTZQQQQQQAEZFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 127)
R D3-16.2 YYDYVWGSYRYT AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1)
(配列番号 104) (配列番号 66)

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

20

設計15

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

30

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

YYCAK SYDYSSSYYYYDYYVWGSYRYTSYSGDSYYYAEYFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 914)
YYCAK ZZZZZZZZZZZDZYVWGSYRZTZQQQQQQAEZFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 131)
YYDYVWGSYRYT AEYFQHWGQGTLVTVSS
(配列番号 104) (配列番号 66)

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

【0195】

【表25】

設計16

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

1 5 0 5 0 3 5 0 5	1 1 2 2 2 3 3	
		YYCAK SSSYYSSYSSGYCSCGGSCYSSYYSSYSAEYFQGWGQGTLVTVSS (配列番号 915)
		YYCAK ZZZZZZZZZZGZCZGGZCZSZZZZZZZZAEZFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 135)
		R GYCSGGSCYS 2-25.2 AEYFQHWGQGTLVTVSS JH1 (配列番号 136) (配列番号 66)

10

(C35D225.2A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmt tmt-
tmc tmc ggc tmc tgt tmc ggt ggc tmc tgc tmc tcc t-3' (配列番号 137)
(C35D225.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cca ATg TTg gAA AKA TTc Agc gKA gKA-
gKA gKA gKA gKA gKA ggA gca gKA gcc Acc gKA AcA gKA gcc gKA g-3'
(配列番号 138)! 96塩基

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

(C34D225.2A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmt-
tmc tmc ggc tmc tgt tmc ggt ggc tmc tgc tmc tcc t-3' (配列番号 139)
(C34D225.2B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc cca ATg TTg gAA AKA TTc Agc gKA gKA-
gKA gKA gKA gKA gKA ggA gca gKA gcc Acc gKA AcA gKA gcc gKA g-3'
(配列番号 140)! 93塩基

20

設計17

1 5 0 5 0 3 5 0 5	1 1 2 2 2 3 3	
		YYCAK YSSYSSYYDYVWGSYRYTSSSSYSSYYSSYYAEYFQGWGQGTLVTVSS (配列番号 916)
		YYCAK ZZZZZZZDZVWGZZRZTZBBBBBBBBBBZAEZFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 141)
		R YYDYVWGSYRYT D3-16.2 AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1) (配列番号 104) (配列番号 66)

(C35D3162A) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmc gac-
tmc gtc tgg ggt tmt tmc cgt tmt acc t-3' (配列番号 142)
(C35D3162B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc ccA gTg cTg gAA gKA cTc Agc gKA gKA-
gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA gKA g-3' (配列番号 143)

30

設計18

1 5 0 5 0 3 5 0 5	1 1 2 2 2 3 3	
		YYCAK SSYYSSYYDYVWGSYRYTSSYYSSYSSYAEYFQGWGQGTLVTVSS (配列番号 917)
		YYCAK ZZZZZZZZZDZVWGZZRZTZBBBBBBBBBBZAEZFQHWGQGTLVTVSS (配列番号 144)
		R YYDYVWGSYRYT D3-16.2 AEYFQHWGQGTLVTVSS (JH1) (配列番号 104) (配列番号 66)

(C35D3162C) 5'-GCA|GtT|taT|taC|tgc|gct aRg tmt tmt tmt tmt tmt tmc-
tmc tmc gac tmc gtc tgg ggt tmc tmc cgt tmc acc t-3' (配列番号 145)
82塩基
(C35D3162B) 5'-Ag AgT Acc cTg gcc ccA gTg cTg gAA gKA cTc Agc gKA gKA-

40

【0196】

【表26】

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

設計19

1 5 1 1 2 2 2 3 3									
YYCAK YSGDSYSYYYYDSSGGYYYYSSSSYYSSYYAEYFQGWGOGTLVTVSS	(配列番号918)								
YYCAK ZZZZZZZZZZZDSSGZZZZZZZZZZZZAEZFQHWGQGTIVTVSS	(配列番号147)								
R YYYDSSGGYYY	AEYFQHWGQGTIVTVSS (JH1)								
	(配列番号88)	(配列番号66)							
1 1 1 1									
9 9 0 0 0 0 0 0 0									
4 5 2 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y a b 3									

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

設計19は、長さ35のCDR3を有する。残基94は、KまたはR、ZZZZZZZZZ::D3-22(Zとして6つのYを有する第2のRF)::ZZZZZZZZZ::JH1(1つのZを有する)であってよい。エラープローンPCRは、より多くの多様性を加えるために使用できる。

10

20

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

30

【0197】

【表 27】

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

ON_1, ON_2, ON_3, および ON_4 は上記の通り。

設計20

1	5	1	1	2	2	2	3	3
		0	5	0	3	5	0	5
YYCAK	YSSYSS	YYYYDSSGGYYYYSSYS	YYYYAEYFQGKGQGTILTVSS	(配列番号 919)				
YYCAK	Z Z Z Z Z Z (Z) Z Z Z D S S G Z Z Z Z Z Z Z Z (Z) Z Z Z A E Z F Q H W G Q G T L V T V S S	(Z) Z Z Z Z Z Z (Z) Z Z Z A E Z F Q H W G Q G T L V T V S S	(JH1)	(配列番号 152)				
R		YYYDSSGYYY	AEYFQHWGQGTLVTVSS	(JH1)				
		(配列番号 88)	(配列番号 66)					
9	9	1	1	1	1	1	1	1
4	5	0	0	0	0	0	0	0
		3abcdefghijklmnop q rstuvwxyz a4						

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

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

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

終止コドンに対する選択：

これらのライプラリのいくつかはN N K コドンを有するので、それらはいくつかのT A G 終止コドンを有するであろう。b l a 遺伝子に対するシグナル配列と、実際の b l a タンパク質との間のX b a I - B s t E I I 部位内に増幅されたD N A をクローニングし、S u p⁰ 細胞において発現させることによって、T A G を有するクローニングを取り除くことができる。B l a^R のコロニーはT A G 終止を含有しない。あるいは、カナマイシン耐性遺伝子の前方のX b a I - B s t E I I 断片をクローニングし、K a n^R に関して選択することができる。次いで、X b a I - B s t E I I カセットをファージライプラリに移動する。

【 0 1 9 8 】

さらに、w o b b l i n g は、いくつかの終止コドンを許容するので、b l a 遺伝子に対するシグナル配列と、実際の b l a タンパク質との間のX b a I - B s t E I I 部位内に増幅されたD N A をクローニングし、S u p⁰ 細胞において発現させることによって、終止を有するクローニングを取り除くことにより、ライプラリを改善することができる。B l a^R コロニーは終止を含有しない。あるいは、カナマイシン耐性遺伝子の前方のX b a I -

10

20

30

40

50

BstEII断片をクローン化し、Kan^Rに関して選択することができる。次いでXbaI-BstEIIカセットをファージライブリに移動することができる。

【0199】

【表28】

表20:ヒトD領域

! TAGに対しては*、TAAに対しては@、TGAに対しては\$

Dアミノ酸配列アライメント(RF:リーディングフレーム)

D	行番号	RF 1			RF 2			RF 3			設計に使用した	10
		(配列番号156)	GTTGT	(配列番号157)	VQLER	(配列番号158)	YNWND					
D1	1-1											
	1-7	(配列番号159)	GITGT	(配列番号160)	V*LEL	(配列番号161)	YNWNY					
	1-20	(配列番号159)	GITGT	(配列番号162)	V*LER	(配列番号163)	YNWND					
	1-26	(配列番号164)	GIVGAT	(配列番号165)	V*WELL	(配列番号166)	YSGSY					
D2	2-2	(配列番号171および167)	RIL**YQLLY	(配列番号70)	GYCSSTSCYT	(配列番号168)	DIVVVPAAI	1, 5, 6, 7,				
	2-8	(配列番号189および392)	RILY@WCMLY	(配列番号115)	GYCTNGVCYT	(配列番号170)	DIVLMVYAI	20, 21, 22,				20
	2-15	(配列番号171)	RIL*WW*LLL	(配列番号136)	GYCSGGSCYS	(配列番号172)	DIVVVVAAT	25,				
	2-21	(配列番号173)	SILWWS\$LLF	(配列番号174)	AYCGGDCYS	(配列番号175)	HIVVVTAI					
D3	3-3	(配列番号176)	VLRFLEWLLY	(配列番号177)	YYDFWSGYYT	(配列番号178)	ITIFGVVII					
	3-9	(配列番号179)	VLRYFDWLL@	(配列番号180)	YYDILTGYYN	(配列番号181および579)	ITIF*LVII					
	3-10	(配列番号182)	VLLWFGEELL@	(配列番号81)	YYYGSGSYYN	(配列番号183)	ITMVRGVII					30
	3-16	(配列番号184)	VL\$LRLGELSLY	(配列番号104)	YYDYVWGSYRT	(配列番号185)	IMITFGVIVI	8, 9, 14, 15, 17, 18				
	3-22	(配列番号186)	VLL***WLLL	(配列番号187)	YYYDSSSGYYY	(配列番号188)	ITMIVVVIT	4, 19, 20				
D4	4-4	(配列番号189)	\$LQ@L	(配列番号192)	DYSNY	(配列番号190)	TTVT					
	4-11	(配列番号191)	\$LQ@L	(配列番号192)	DYSNY	(配列番号193)	TTVT					
	4-17	(配列番号194)	\$LR@L	(配列番号195)	DYGDY	(配列番号196)	TTVT					40
	4-23	(配列番号197)	\$LRW@L	(配列番号198)	DYGGNS	(配列番号199)	TTVVT					

【0200】

【表29】

D5	5-5	(配列番号 200) (VDTAMV	(配列番号 201) (WIQLWL	(配列番号 202) GYSYGY	
	5-12	(配列番号 203) (VDIVATI	(配列番号 204) (WI*WLRL	(配列番号 205) GYSGYDY	
	5-18	(配列番号 206) (VDTAMV	(配列番号 207) (WIQLWL	(配列番号 208) GYSYGY	
	5-24	(配列番号 209) (VEMATTI	(配列番号 210) (*RWLQL	(配列番号 211) RDGYN	
D6	6-6	(配列番号 212) (EYSSSS	(配列番号 213) (SIAAR	(配列番号 214) V*QLV	10
	6-13	(配列番号 215) (GYSSSWY	(配列番号 216) (GIAAAG	(配列番号 217) V*QQLV	
	6-19	(配列番号 218) (GYSSGKY	(配列番号 219) (GIAVAG	(配列番号 220) V*QWLV	
D7	7-27	(配列番号 221) LTG	(配列番号 222) @LG	(配列番号 223) NWG	

表3:ヒトJHセグメント

JH - アミノ酸配列アライメント

H3

----- CDR3 -----		
	100	110
	FR4	-----
JH1	---AEYFOHWGQGTLVTVSS	1-8, (配列番号 66)
JH2	---YWYFDLWGRTGLVTVSS	(配列番号 67)
JH3	---AFDIWGQGTMVTVSS	(配列番号 2)
JH4	---YFDYWQGQGTLVTVSS	(配列番号 1)
JH5	---NWFDPWQGQGTLVTVSS	(配列番号 68)
JH6	YYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	(配列番号 3)
	123456789	

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

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

【0201】

【表30】

表11:ヒトDセグメントから抽出可能な三量体

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

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

【表 3 1】

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

10

20

30

40

【0203】

【表 3 2】

RFL D3-3.1.3	107	
DFW D3-3.2.3	108	
IFG D3-3.3.3	109	
FLE D3-3.1.4	110	
FWS D3-3.2.4	111	
FGV D3-3.3.4	112	
LEW D3-3.1.5	113	
WSG D3-3.2.5	114	
GVV D3-3.3.5	115	
EWL D3-3.1.6	116	
SGY D3-3.2.6	117	10
VVI D3-3.3.6	118	
WLL D3-3.1.7	119	
GYY D3-3.2.7	120	
VII D3-3.3.7	121	
YYT D3-3.2.8	122	
LRY D3-9.1.2	123	
YDI D3-9.2.2	124	
RYF D3-9.1.3	125	
DIL D3-9.2.3	126	
IFy D3-9.3.3	127 *	
YFD D3-9.1.4	128	
ILT D3-9.2.4	129	
FyL D3-9.3.4	130 *	
FDW D3-9.1.5	131	
LTG D3-9.2.5	132 (配列番号221)	
yLV D3-9.3.5	133 *	20
DWL D3-9.1.6	134	
TGY D3-9.2.6	135	
LVI D3-9.3.6	136	
LLy D3-9.1.8	137 *	
YN Y D3-9.2.8	138	
VLL D3-10.1.1	139	
YYY D3-10.2.1	140	
ITM D3-10.3.1	141	
LLW D3-10.1.2	142	
YYG D3-10.2.2	143	
TMV D3-10.3.2	144	
LWF D3-10.1.3	145	
YGS D3-10.2.3	146	
MVR D3-10.3.3	147	
WFG D3-10.1.4	148	
GSG D3-10.2.4	149	30
VRG D3-10.3.4	150	
FGE D3-10.1.5	151	
RGV D3-10.3.5	152	
GEL D3-10.1.6	153	
GVI D3-10.3.6	154	
VLW D3-16.1.1	155 *	
IMI D3-16.3.1	156	
LWL D3-16.1.2	157 *	
YDY D3-16.2.2	158	
MIT D3-16.3.2	159	
WLR D3-16.1.3	160 *	
DYV D3-16.2.3	161	
ITF D3-16.3.3	162	
RLR D3-16.1.4	163	

40

【 0 2 0 4 】

【表33】

YVW D3-16.2.4	164	
TFG D3-16.3.4	165	
RLG D3-16.1.5	166	
VWG D3-16.2.5	167	
FGG D3-16.3.5	168	
LGE D3-16.1.6	169	
WGS D3-16.2.6	170	
GGV D3-16.3.6	171	
ELS D3-16.1.8	172	
SYR D3-16.2.8	173	
VIV D3-16.3.8	174	
LSL D3-16.1.9	175	
YRY D3-16.2.9	176	10
IVI D3-16.3.9	177	
SLY D3-16.1.10	178	
RYT D3-16.2.10	179	
LLW D3-22.1.2	180	*
TMI D3-22.3.2	181	
Lwy D3-22.1.3	182	*
YDS D3-22.2.3	183	
MIV D3-22.3.3	184	
wyy D3-22.1.4	185	*
DSS D3-22.2.4	186	
yyW D3-22.1.5	187	*
SSG D3-22.2.5	188	
yWL D3-22.1.6	189	*
VIT D3-22.3.7	190	
wLQ D4-4.1.1	191	*
DYS D4-4.2.1	192	
TTV D4-4.3.1	193	
LQy D4-4.1.2	194	*
YSN D4-4.2.2	195	
TVT D4-4.3.2	196	
QyL D4-4.1.3	197	*
SNY D4-4.2.3	198	
DYG D4-17.2.1	199	
LRw D4-17.1.2	200	* (配列番号197)
YGD D4-17.2.2	201	
RwL D4-17.1.3	202	*
GDY D4-17.2.3	203	
LRW D4-23.1.2	204	(配列番号197)
YGG D4-23.2.2	205	
TVV D4-23.3.2	206	
RWy D4-23.1.3	207	*
GGN D4-23.2.3	208	
GNS D4-23.2.4	209	
VDT D5-5.1.1	210	
WIQ D5-5.2.1	211	
GYS D5-5.3.1	212	
DTA D5-5.1.2	213	
IQL D5-5.2.2	214	
YSY D5-5.3.2	215	
TAM D5-5.1.3	216	
QLW D5-5.2.3	217	
SYG D5-5.3.3	218	
AMV D5-5.1.4	219	
LWL D5-5.2.4	220	

40

【0205】

【表34】

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

10

20

30

表12ヒトDセグメントから抽出可能な、異なる四量体

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

40

【0206】

【表 3 5】

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

10

20

30

40

【0207】

【表 3 6】

VVVV D2-15.3.3	(配列番号 411)	66	
yWWy D2-15.1.4	(配列番号 418)	67	
SGGS D2-15.2.4	(配列番号 419)	68	
VVVA D2-15.3.4	(配列番号 420)	69	
WWyL D2-15.1.5	(配列番号 427)	70	
GGSC D2-15.2.5	(配列番号 428)	71	
VVAA D2-15.3.5	(配列番号 429)	72	
WyLL D2-15.1.6	(配列番号 435)	73	
GSCY D2-15.2.6	(配列番号 436)	74	
VAAT D2-15.3.6	(配列番号 437)	75	
YLLL D2-15.1.7	(配列番号 440)	76	
SCYS D2-15.2.7	(配列番号 441)	77	
SILW D2-21.1.1	(配列番号 442)	78	10
AYCG D2-21.2.1	(配列番号 443)	79	
HIVV D2-21.3.1	(配列番号 444)	80	
ILWW D2-21.1.2	(配列番号 451)	81	
YCGG D2-21.2.2	(配列番号 452)	82	
LWWw D2-21.1.3	(配列番号 459)	83	
CGGD D2-21.2.3	(配列番号 460)	84	
VVVT D2-21.3.3	(配列番号 461)	85	
WWWL D2-21.1.4	(配列番号 468)	86	
GGDC D2-21.2.4	(配列番号 469)	87	
VVTA D2-21.3.4	(配列番号 470)	88	
WwLL D2-21.1.5	(配列番号 476)	89	
GDCY D2-21.2.5	(配列番号 477)	90	
VTAI D2-21.3.5	(配列番号 478)	91	
WLLF D2-21.1.6	(配列番号 481)	92	
DCYS D2-21.2.6	(配列番号 482)	93	20
VLRF D3-3.1.1	(配列番号 483)	94	
YYDF D3-3.2.1	(配列番号 484)	95	
ITIF D3-3.3.1	(配列番号 485)	96	
LRFL D3-3.1.2	(配列番号 492)	97	
YDFW D3-3.2.2	(配列番号 493)	98	
TIFG D3-3.3.2	(配列番号 494)	99	
RFLE D3-3.1.3	(配列番号 501)	100	
DFWS D3-3.2.3	(配列番号 502)	101	
IFGV D3-3.3.3	(配列番号 503)	102	
FLEW D3-3.1.4	(配列番号 510)	103	
FWSG D3-3.2.4	(配列番号 511)	104	
FGVV D3-3.3.4	(配列番号 512)	105	
LEWL D3-3.1.5	(配列番号 519)	106	
WSGY D3-3.2.5	(配列番号 520)	107	
GVVI D3-3.3.5	(配列番号 521)	108	30
EWLL D3-3.1.6	(配列番号 527)	109	
SGYY D3-3.2.6	(配列番号 528)	110	
VVII D3-3.3.6	(配列番号 529)	111	
WLLY D3-3.1.7	(配列番号 532)	112	
GYYT D3-3.2.7	(配列番号 533)	113	
VLRY D3-9.1.1	(配列番号 534)	114	
YYDI D3-9.2.1	(配列番号 535)	115	
LRYF D3-9.1.2	(配列番号 542)	116	
YDIL D3-9.2.2	(配列番号 543)	117	
TIFY D3-9.3.2	(配列番号 544)	118	
RYFD D3-9.1.3	(配列番号 551)	119	
DILT D3-9.2.3	(配列番号 552)	120	
IFyL D3-9.3.3	(配列番号 553)	121	
YFDW D3-9.1.4	(配列番号 560)	122	

【表 3 7】

ILTG D3-9.2.4	(配列番号 561)	123	
FyLV D3-9.3.4	(配列番号 562)	124	
FDWL D3-9.1.5	(配列番号 569)	125	
LTGY D3-9.2.5	(配列番号 570)	126	
YLVI D3-9.3.5	(配列番号 571)	127	
DWLL D3-9.1.6	(配列番号 577)	128	
TGYY D3-9.2.6	(配列番号 578)	129	
LVII D3-9.3.6	(配列番号 579)	130	
WLLy D3-9.1.7	(配列番号 582)	131	
GYYN D3-9.2.7	(配列番号 583)	132	
VLLW D3-10.1.1	(配列番号 584)	133	
YYYG D3-10.2.1	(配列番号 585)	134	10
ITMV D3-10.3.1	(配列番号 586)	135	
LLWF D3-10.1.2	(配列番号 593)	136	
YYGS D3-10.2.2	(配列番号 594)	137	
TMVR D3-10.3.2	(配列番号 595)	138	
LWFG D3-10.1.3	(配列番号 602)	139	
YGSG D3-10.2.3	(配列番号 603)	140	
MVRG D3-10.3.3	(配列番号 604)	141	
WFGE D3-10.1.4	(配列番号 611)	142	
GSGS D3-10.2.4	(配列番号 612)	143	
VRGV D3-10.3.4	(配列番号 613)	144	
FGEL D3-10.1.5	(配列番号 620)	145	
RGVI D3-10.3.5	(配列番号 621)	146	
GELL D3-10.1.6	(配列番号 626)	147	
GVII D3-10.3.6	(配列番号 627)	148	
ELLY D3-10.1.7	(配列番号 630)	149	
SYYN D3-10.2.7	(配列番号 631)	150	
VLWL D3-16.1.1	(配列番号 632)	151	
YYDY D3-16.2.1	(配列番号 633)	152	
IMIT D3-16.3.1	(配列番号 634)	153	
LwLR D3-16.1.2	(配列番号 641)	154	
YDYV D3-16.2.2	(配列番号 642)	155	
MITF D3-16.3.2	(配列番号 643)	156	
WLRL D3-16.1.3	(配列番号 650)	157	
DYVW D3-16.2.3	(配列番号 651)	158	
ITFG D3-16.3.3	(配列番号 652)	159	
LRLG D3-16.1.4	(配列番号 659)	160	
YVWG D3-16.2.4	(配列番号 660)	161	
TFGG D3-16.3.4	(配列番号 661)	162	
RLGE D3-16.1.5	(配列番号 668)	163	
VWGS D3-16.2.5	(配列番号 669)	164	
FGGV D3-16.3.5	(配列番号 670)	165	30
LGEL D3-16.1.6	(配列番号 677)	166	
WGSY D3-16.2.6	(配列番号 678)	167	
GGVI D3-16.3.6	(配列番号 679)	168	
GELS D3-16.1.7	(配列番号 686)	169	
GSYR D3-16.2.7	(配列番号 687)	170	
GVIV D3-16.3.7	(配列番号 688)	171	
ELSL D3-16.1.8	(配列番号 694)	172	
SYRY D3-16.2.8	(配列番号 695)	173	
VIVI D3-16.3.8	(配列番号 696)	174	
LSLY D3-16.1.9	(配列番号 699)	175	
YRYT D3-16.2.9	(配列番号 700)	176	
VLLw D3-22.1.1	(配列番号 701)	177	
YYD D3-22.2.1	(配列番号 702)	178	
ITMI D3-22.3.1	(配列番号 703)	179	

【0209】

【表 3 8】

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

【0 2 1 0】

40

10

20

30

【表39】

RWLQ D5-24.2.2	(配列番号 833)	237	
DGYN D5-24.3.2	(配列番号 834)	238	
MATI D5-24.1.3	(配列番号 838)	239	
WLQL D5-24.2.3	(配列番号 839)	240	
GYNY D5-24.3.3	(配列番号 840)	241	
EYSS D6-6.1.1	(配列番号 841)	242	
SIAA D6-6.2.1	(配列番号 842)	243	
VyQL D6-6.3.1	(配列番号 843)	244	
YSSS D6-6.1.2	(配列番号 848)	245	
IAAR D6-6.2.2	(配列番号 849)	246	
yQLV D6-6.3.2	(配列番号 850)	247	
SSSS D6-6.1.3	(配列番号 852)	248	
GYSS D6-13.1.1	(配列番号 853)	249	10
GIAA D6-13.2.1	(配列番号 854)	250	
VyQQ D6-13.3.1	(配列番号 855)	251	
IAAA D6-13.2.2	(配列番号 862)	252	
yQQL D6-13.3.2	(配列番号 863)	253	
SSSW D6-13.1.3	(配列番号 868)	254	
AAAG D6-13.2.3	(配列番号 869)	255	
QQLV D6-13.3.3	(配列番号 870)	256	
SSWY D6-13.1.4	(配列番号 872)	257	
GIAV D6-19.2.1	(配列番号 873)	258	
VyQW D6-19.3.1	(配列番号 874)	259	
YSSG D6-19.1.2	(配列番号 881)	260	
IAVA D6-19.2.2	(配列番号 882)	261	
yQWL D6-19.3.2	(配列番号 883)	262	
SSGW D6-19.1.3	(配列番号 888)	263	
AVAG D6-19.2.3	(配列番号 889)	264	20
QWLV D6-19.3.3	(配列番号 890)	265	
SGWY D6-19.1.4	(配列番号 941)	266	

表13ヒトDセグメントから抽出可能な五量体

GTTGT D1-1.1.1	(配列番号 260)	1	
VQLER D1-1.2.1	(配列番号 261)	2	
YNWND D1-1.3.1	(配列番号 262)	3	
GITGT D1-7.1.1	(配列番号 268)	4	
VyLEL D1-7.2.1	(配列番号 269)	5	
YNWNY D1-7.3.1	(配列番号 270)	6	
VyLER D1-20.2.1	(配列番号 274)	7	
GIVGA D1-26.1.1	(配列番号 279)	8	
VyWEL D1-26.2.1	(配列番号 280)	9	
YSGSY D1-26.3.1	(配列番号 281)	10	30
IVGAT D1-26.1.2	(配列番号 288)	11	
yWELL D1-26.2.2	(配列番号 289)	12	
SGSYY D1-26.3.2	(配列番号 290)	13	
RILyy D2-2.1.1	(配列番号 297)	14	
GYCSS D2-2.2.1	(配列番号 298)	15	
DIVVV D2-2.3.1	(配列番号 299)	16	
ILyyY D2-2.1.2	(配列番号 306)	17	
YCSST D2-2.2.2	(配列番号 307)	18	
IVVVP D2-2.3.2	(配列番号 308)	19	
LyyYQ D2-2.1.3	(配列番号 315)	20	
CSSTS D2-2.2.3	(配列番号 316)	21	
VVVPA D2-2.3.3	(配列番号 317)	22	
yyYQL D2-2.1.4	(配列番号 324)	23	
SSTSC D2-2.2.4	(配列番号 325)	24	

【0211】

40

【表 4 0】

VVPAA D2-2.3.4	(配列番号 326)	25	
yYQLL D2-2.1.5	(配列番号 333)	26	
STSCY D2-2.2.5	(配列番号 334)	27	
VPAAI D2-2.3.5	(配列番号 335)	28	
YQLLY D2-2.1.6	(配列番号 341)	29	
TSCYT D2-2.2.6	(配列番号 342)	30	
RILYy D2-8.1.1	(配列番号 348)	31	
GYCTN D2-8.2.1	(配列番号 349)	32	
DIVLM D2-8.3.1	(配列番号 350)	33	
ILYyw D2-8.1.2	(配列番号 357)	34	
YCTNC D2-8.2.2	(配列番号 358)	35	
IVLMV D2-8.3.2	(配列番号 359)	36	
LYywC D2-8.1.3	(配列番号 366)	37	10
CTNGV D2-8.2.3	(配列番号 367)	38	
VLMVY D2-8.3.3	(配列番号 368)	39	
YywCm D2-8.1.4	(配列番号 375)	40	
TNGVC D2-8.2.4	(配列番号 376)	41	
LMVYA D2-8.3.4	(配列番号 377)	42	
yWCML D2-8.1.5	(配列番号 384)	43	
NGVCY D2-8.2.5	(配列番号 385)	44	
MVYAI D2-8.3.5	(配列番号 386)	45	
WCMLY D2-8.1.6	(配列番号 392)	46	
GVCYT D2-8.2.6	(配列番号 393)	47	
RILyW D2-15.1.1	(配列番号 396)	48	
GYCSG D2-15.2.1	(配列番号 397)	49	
ILyWW D2-15.1.2	(配列番号 403)	50	
YCSGG D2-15.2.2	(配列番号 404)	51	
IVVVV D2-15.3.2	(配列番号 405)	52	20
LyWWy D2-15.1.3	(配列番号 412)	53	
CSGGS D2-15.2.3	(配列番号 413)	54	
VVVVA D2-15.3.3	(配列番号 414)	55	
yWWyL D2-15.1.4	(配列番号 421)	56	
SGGSC D2-15.2.4	(配列番号 422)	57	
VVVAA D2-15.3.4	(配列番号 423)	58	
WyLL D2-15.1.5	(配列番号 430)	59	
GGSCY D2-15.2.5	(配列番号 431)	60	
VVAAT D2-15.3.5	(配列番号 432)	61	
WyLLL D2-15.1.6	(配列番号 438)	62	
GSCYS D2-15.2.6	(配列番号 439)	63	
SILWW D2-21.1.1	(配列番号 445)	64	
AYCGG D2-21.2.1	(配列番号 446)	65	
HIVVV D2-21.3.1	(配列番号 447)	66	
ILWWw D2-21.1.2	(配列番号 453)	67	30
YCGGD D2-21.2.2	(配列番号 454)	68	
IVVVVT D2-21.3.2	(配列番号 455)	69	
LWWwl D2-21.1.3	(配列番号 462)	70	
CGGDC D2-21.2.3	(配列番号 463)	71	
VVVTA D2-21.3.3	(配列番号 464)	72	
WWwLL D2-21.1.4	(配列番号 471)	73	
GGDCY D2-21.2.4	(配列番号 472)	74	
VVTAI D2-21.3.4	(配列番号 473)	75	
WwLLF D2-21.1.5	(配列番号 479)	76	
GDCYS D2-21.2.5	(配列番号 480)	77	
VLRFL D3-3.1.1	(配列番号 486)	78	
YYDFW D3-3.2.1	(配列番号 487)	79	
ITIFG D3-3.3.1	(配列番号 488)	80	
LRFLE D3-3.1.2	(配列番号 495)	81	

40

【0 2 1 2】

【表 4 1】

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

10

20

30

40

【0 2 1 3】

【表 4 2】

TFGGV D3-16.3.4	(配列番号 664)	139	
RLGEL D3-16.1.5	(配列番号 671)	140	
VWGSY D3-16.2.5	(配列番号 672)	141	
FGGVI D3-16.3.5	(配列番号 673)	142	
LGELS D3-16.1.6	(配列番号 680)	143	
WGSYR D3-16.2.6	(配列番号 681)	144	
GGVIV D3-16.3.6	(配列番号 682)	145	
GELSL D3-16.1.7	(配列番号 689)	146	
GSYRY D3-16.2.7	(配列番号 690)	147	
GVIVI D3-16.3.7	(配列番号 691)	148	
ELSLY D3-16.1.8	(配列番号 697)	149	
SYRYT D3-16.2.8	(配列番号 698)	150	
VLLwy D3-22.1.1	(配列番号 704)	151	10
YYDSD D3-22.2.1	(配列番号 705)	152	
ITMIV D3-22.3.1	(配列番号 706)	153	
LLwyy D3-22.1.2	(配列番号 713)	154	
YYDSS D3-22.2.2	(配列番号 714)	155	
TMIVV D3-22.3.2	(配列番号 715)	156	
LwyyW D3-22.1.3	(配列番号 722)	157	
YDSSG D3-22.2.3	(配列番号 723)	158	
MIVVV D3-22.3.3	(配列番号 724)	159	
wyyWL D3-22.1.4	(配列番号 730)	160	
DSSGY D3-22.2.4	(配列番号 731)	161	
IVVVI D3-22.3.4	(配列番号 732)	162	
yyWLL D3-22.1.5	(配列番号 739)	163	
SSGYY D3-22.2.5	(配列番号 740)	164	
VVVIT D3-22.3.5	(配列番号 741)	165	
YWLLL D3-22.1.6	(配列番号 746)	166	20
SGYYY D3-22.2.6	(配列番号 747)	167	
WLQyL D4-4.1.1	(配列番号 753)	168	
DYSNY D4-4.2.1	(配列番号 754)	169	
wLRWL D4-17.1.1	(配列番号 759)	170	
DYGDY D4-17.2.1	(配列番号 760)	171	
wLRWy D4-23.1.1	(配列番号 766)	172	
DYGGN D4-23.2.1	(配列番号 767)	173	
TTVVT D4-23.3.1	(配列番号 768)	174	
LRWyL D4-23.1.2	(配列番号 774)	175	
YGGNS D4-23.2.2	(配列番号 775)	176	
VDTAM D5-5.1.1	(配列番号 781)	177	
WIQLW D5-5.2.1	(配列番号 782)	178	
GYSYG D5-5.3.1	(配列番号 783)	179	
DTAMV D5-5.1.2	(配列番号 790)	180	
IQLWL D5-5.2.2	(配列番号 791)	181	30
YSYGY D5-5.3.2	(配列番号 792)	182	
VDIVA D5-12.1.1	(配列番号 799)	183	
WIyWL D5-12.2.1	(配列番号 800)	184	
GYSGY D5-12.3.1	(配列番号 801)	185	
DIVAT D5-12.1.2	(配列番号 808)	186	
IyWLR D5-12.2.2	(配列番号 809)	187	
YSGYD D5-12.3.2	(配列番号 810)	188	
IVATI D5-12.1.3	(配列番号 817)	189	
yWLRL D5-12.2.3	(配列番号 818)	190	
SGYDY D5-12.3.3	(配列番号 819)	191	
VEMAT D5-24.1.1	(配列番号 826)	192	
YRWLQ D5-24.2.1	(配列番号 827)	193	
RDGYN D5-24.3.1	(配列番号 828)	194	
EMATI D5-24.1.2	(配列番号 835)	195	

【0 2 1 4】

【表43】

RWLQL D5-24.2.2	(配列番号 836)	196	
DGYNY D5-24.3.2	(配列番号 837)	197	
EYSSS D6-6.1.1	(配列番号 844)	198	
SIAAR D6-6.2.1	(配列番号 845)	199	
VyQLV D6-6.3.1	(配列番号 846)	200	
YSSSS D6-6.1.2	(配列番号 851)	201	
GYSSS D6-13.1.1	(配列番号 856)	202	
GIAAA D6-13.2.1	(配列番号 857)	203	
VyQQL D6-13.3.1	(配列番号 858)	204	
YSSSW D6-13.1.2	(配列番号 864)	205	
IAAAG D6-13.2.2	(配列番号 865)	206	
yQQLV D6-13.3.2	(配列番号 866)	207	
SSSWY D6-13.1.3	(配列番号 871)	208	10
GYSSG D6-19.1.1	(配列番号 875)	209	
GIAVA D6-19.2.1	(配列番号 876)	210	
VyQWL D6-19.3.1	(配列番号 877)	211	
YSSGW D6-19.1.2	(配列番号 884)	212	
IAVAG D6-19.2.2	(配列番号 885)	213	
yQWLV D6-19.3.2	(配列番号 886)	214	
SSGKY D6-19.1.3	(配列番号 891)	215	

表14:ヒトDセグメントから抽出可能な全六量体

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

【0215】

【表44】

ILyWWy D2-15.1.2	(配列番号 406)	35	
YCSGGS D2-15.2.2	(配列番号 407)	36	
IVVVVA D2-15.3.2	(配列番号 408)	37	
LyWWyL D2-15.1.3	(配列番号 415)	38	
CSGGSC D2-15.2.3	(配列番号 416)	39	
VVVVAA D2-15.3.3	(配列番号 417)	40	
yWWyLL D2-15.1.4	(配列番号 424)	41	
SGGSCY D2-15.2.4	(配列番号 425)	42	
VVVVAT D2-15.3.4	(配列番号 426)	43	
WWyLLL D2-15.1.5	(配列番号 433)	44	
GGSCYS D2-15.2.5	(配列番号 434)	45	
SILWWw D2-21.1.1	(配列番号 448)	46	
AYCGGD D2-21.2.1	(配列番号 449)	47	10
HIVVVT D2-21.3.1	(配列番号 450)	48	
ILWWwL D2-21.1.2	(配列番号 456)	49	
YCGGDC D2-21.2.2	(配列番号 457)	50	
IVVVTA D2-21.3.2	(配列番号 458)	51	
LWWwLL D2-21.1.3	(配列番号 465)	52	
CGGDCY D2-21.2.3	(配列番号 466)	53	
VVVVTAI D2-21.3.3	(配列番号 467)	54	
WWwLLF D2-21.1.4	(配列番号 474)	55	
GGDCYS D2-21.2.4	(配列番号 475)	56	
VLRFLE D3-3.1.1	(配列番号 489)	57	
YYDFWS D3-3.2.1	(配列番号 490)	58	
ITIFGV D3-3.3.1	(配列番号 491)	59	
LRFLEW D3-3.1.2	(配列番号 498)	60	
YDFWSG D3-3.2.2	(配列番号 499)	61	
TIFGVV D3-3.3.2	(配列番号 500)	62	20
RFLEWL D3-3.1.3	(配列番号 507)	63	
DFWSGY D3-3.2.3	(配列番号 508)	64	
IFGVVI D3-3.3.3	(配列番号 509)	65	
FLEWLL D3-3.1.4	(配列番号 516)	66	
FWSGYY D3-3.2.4	(配列番号 517)	67	
FGVVII D3-3.3.4	(配列番号 518)	68	
LEWLLY D3-3.1.5	(配列番号 525)	69	
WSGYYT D3-3.2.5	(配列番号 526)	70	
VLRYFD D3-9.1.1	(配列番号 539)	71	
YYDILT D3-9.2.1	(配列番号 540)	72	
ITIFyL D3-9.3.1	(配列番号 541)	73	
LRYFDW D3-9.1.2	(配列番号 548)	74	
YDILTG D3-9.2.2	(配列番号 549)	75	
TIFyLV D3-9.3.2	(配列番号 550)	76	
RYFDWL D3-9.1.3	(配列番号 557)	77	30
DILTGY D3-9.2.3	(配列番号 558)	78	
IFyLVI D3-9.3.3	(配列番号 559)	79	
YFDWL D3-9.1.4	(配列番号 566)	80	
ILTGYY D3-9.2.4	(配列番号 567)	81	
FyLVII D3-9.3.4	(配列番号 568)	82	
FDWLly D3-9.1.5	(配列番号 575)	83	
LTGYYN D3-9.2.5	(配列番号 576)	84	
VLLWFG D3-10.1.1	(配列番号 590)	85	
YYYGSG D3-10.2.1	(配列番号 591)	86	
ITMVRG D3-10.3.1	(配列番号 592)	87	
LWFGGE D3-10.1.2	(配列番号 599)	88	
YYGSGS D3-10.2.2	(配列番号 600)	89	
TMVRGV D3-10.3.2	(配列番号 601)	90	
LWFGEL D3-10.1.3	(配列番号 608)	91	

【0216】

40

【表45】

YGSGSY D3-10.2.3	(配列番号 609)	92	
MVRGVI D3-10.3.3	(配列番号 610)	93	
WFGEELL D3-10.1.4	(配列番号 617)	94	
GSGSYY D3-10.2.4	(配列番号 618)	95	
VRGVII D3-10.3.4	(配列番号 619)	96	
FGELLY D3-10.1.5	(配列番号 624)	97	
SGSYYN D3-10.2.5	(配列番号 625)	98	
VlwLRL D3-16.1.1	(配列番号 638)	99	
YYDYVW D3-16.2.1	(配列番号 639)	100	
IMITFG D3-16.3.1	(配列番号 640)	101	
LwLRLG D3-16.1.2	(配列番号 647)	102	
YDYVWG D3-16.2.2	(配列番号 648)	103	
MITFGG D3-16.3.2	(配列番号 649)	104	10
WLRLGE D3-16.1.3	(配列番号 656)	105	
DYVWGS D3-16.2.3	(配列番号 657)	106	
ITFGGV D3-16.3.3	(配列番号 658)	107	
LRLGEL D3-16.1.4	(配列番号 665)	108	
YVWGSY D3-16.2.4	(配列番号 666)	109	
TFGGVI D3-16.3.4	(配列番号 667)	110	
RLGELS D3-16.1.5	(配列番号 674)	111	
VWGSYR D3-16.2.5	(配列番号 675)	112	
FGGVIV D3-16.3.5	(配列番号 676)	113	
LGELESL D3-16.1.6	(配列番号 683)	114	
WGSYRY D3-16.2.6	(配列番号 684)	115	
GGVIVI D3-16.3.6	(配列番号 685)	116	
GELSLY D3-16.1.7	(配列番号 692)	117	
GSYRYT D3-16.2.7	(配列番号 693)	118	
VLLwy D3-22.1.1	(配列番号 707)	119	
YYDSS D3-22.2.1	(配列番号 708)	120	
ITMIVV D3-22.3.1	(配列番号 709)	121	
LLwyW D3-22.1.2	(配列番号 716)	122	
YYDSSG D3-22.2.2	(配列番号 717)	123	20
TMIVVV D3-22.3.2	(配列番号 718)	124	
LwyWL D3-22.1.3	(配列番号 725)	125	
YDSSGY D3-22.2.3	(配列番号 726)	126	
MIVVVI D3-22.3.3	(配列番号 727)	127	
wyyWLL D3-22.1.4	(配列番号 733)	128	
DSSGYY D3-22.2.4	(配列番号 734)	129	
IVVVIT D3-22.3.4	(配列番号 735)	130	
yyWLLL D3-22.1.5	(配列番号 742)	131	
SSGYYY D3-22.2.5	(配列番号 743)	132	
wLRWyl D4-23.1.1	(配列番号 769)	133	
DYGGNS D4-23.2.1	(配列番号 770)	134	30
VDTAMV D5-5.1.1	(配列番号 784)	135	
WIQLWL D5-5.2.1	(配列番号 785)	136	
GYSYGY D5-5.3.1	(配列番号 786)	137	
VDIVAT D5-12.1.1	(配列番号 802)	138	
WIyWLR D5-12.2.1	(配列番号 803)	139	
GYSGYD D5-12.3.1	(配列番号 804)	140	
DIVATI D5-12.1.2	(配列番号 811)	141	
IyWLRL D5-12.2.2	(配列番号 812)	142	
YSGYDY D5-12.3.2	(配列番号 813)	143	
VEMATI D5-24.1.1	(配列番号 829)	144	
yRWLQL D5-24.2.1	(配列番号 830)	145	
RDGYNY D5-24.3.1	(配列番号 831)	146	
EYSSSS D6-6.1.1	(配列番号 847)	147	
GYSSSW D6-13.1.1	(配列番号 859)	148	40

【0217】

【表46】

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

(実施例3)

長さ 6 ~ 20 の CDR3

Dセグメントの合成 H C C D R 3への挿入は、より高い安定性およびより低い免疫原性をもたらし得る。ライプラリは、V Hを、Dセグメントに接合された、ある長さの任意選択のフィラー、任意選択の第2のフィラーおよびJ Hに接合することによって、アミノ酸レベルで設計される。長さ6または8のライプラリのために、完全長J Hが、V Hおよび短いフィラーに続いてもよい。表77は、F A B - 3 1 0またはF A B - 4 1 0から、1つの標的または別の標的への結合に関して選択された、1419のA bのサンプリングにおけるDセグメントの頻度を示す。サンプルにおいて、1099のA bは、検出可能なDセグメントを有さなかった（すなわち、70%未満の一一致）。Dセグメントを使用する場合、DセグメントのD 1 - 1 . 3、D 1 - 2 6 . 3、D 2 - 2 . 2、D 2 - 8 . 2、D 2 - 1 5 . 2、D 2 - 2 1 . 2、D 3 - 1 6 . 2、D 3 - 2 2 . 2、D 3 - 3 . 2、D 3 - 9 . 1、D 3 - 9 . 2、D 3 - 1 0 . 2、D 3 - 1 6 . 2、D 4 - 4 . 2、D 4 - 4 . 3、D 4 - 1 1 . 2、D 4 - 4 . 2、D 4 - 1 7 . 2、D 4 - 2 3 . 2、D 5 - 5 . 3、D 5 - 1 2 . 3、D 5 - 1 8 . 3、D 6 - 6 . 1、D 6 - 6 . 2、D 6 - 1 3 . 1、D 6 - 1 3 . 2、D 6 - 1 9 . 1、D 6 - 1 9 . 2およびD 7 - 2 7 . 1が好ましい。
10

【0218】

親アミノ酸配列が設計されたら、それを、いくつかの方法：エラープローンP C R、w o b b l i n gおよびd o b b l i n gで多様化できる。表14は、ヒトD領域に由来できる多数の六量体を示す。一実施形態において、システイン残基を含有する六量体は除外する。一実施形態において、終止を含有するD領域の断片は除外する。一実施形態において、D領域に見出される任意のT A Gコドンを、T C G、T T G、T G G、C A G、A A G、T A TおよびG A Gを含むセットから選別されたコドンで置き換える。一実施形態において、D領域に見出される任意のT A Aコドンを、T C A、T T A、C A A、A A A、T A TおよびG A Aを含むセットから選別されたコドンで置き換える。一実施形態において、D領域の任意のT G Aを、T G G、T C A、T T A、A G AおよびG G Aを含むセットから選別されたコドンで置き換える。
20

【0219】

表21は、6から20アミノ酸のC D R 3に対する、例示的な親アミノ酸配列を示す。これらの親配列は、H C C D R 1およびC D R 2における多様性と組み合わせ、ライプラリを形成することができる。C D R 3領域が、例えば、C D R 3のw o b b l i n g、d o b b l i n gまたはエラープローンP C Rにより多様化された場合、有用性が改善される可能性が高い。表21において、配列6aは、全J H 1と接合する3 - 2 3由來のV H末端を含む。配列6bは、3 - 2 3の末端と接合し、Yと接合し、D 4 - 1 7 (R F 2)と接合するJ H 1のF R 4領域を含有する。配列6cは、3 - 2 3の末端、続いてD 5 - 5 (R F 3)、続いてJ H 1のF R 4部分を含有する。配列6dは、3 - 2 3の末端と接合し、S Yと接合する全J H 4を含有する。表21は、C D R 3のw o b b l i n gに適切と思われるd o p i n gのレベルを示し、他のレベルも同様に許容される。他のD領域またはD領域の断片も許容される。他のJ H配列も許容される。
30

【0220】

【表 4 7】

表21: 6~20AAのHC CDR3に対する親アミノ酸配列

長さ	親配列	doping のレベル	解説	配列番号
6a	yycakAEYFQHwgqgtlvtvss	70:10:10:10	JH1(全体)	226
6b	yycakAYGDDYwgqgtlvtvss	70:10:10:10	JH1 の Y:D4-17(2)::Fr4	227
6c	yycakGYSYGYwgqgtlvtvss	70:10:10:10	JH1 の D5-5:(3)::Fr4	228
6d	yycakSYYFDYwgqgtlvtvss	70:10:10:10	SY::JH4(全体)	229
8a	yycakYYAEYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	YY::JH1(全体)	230
8b	yycakGYSSSWYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の Y:D6-13(1)::Fr4	231
8c	yycakGYYYFDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	D4-17(2)[2-5]:JH4(全体)	232
10a	yycakYYYDSSGGYYYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D3-22(2)::Fr4	233
10b	yycakGYcSSTSScYTwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D2-2(2)::Fr4	234
10c	yycakYYSSAEEYFQHwgqgtlvtvss	73:9:9:9	YYSS::JH1(全体) (配列番号 942)	235
10d	yycakGYSYGYFDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	D5-5:(3)::JH4(全体)	236
12a	yycakYYDSGSYYYYQHWwgqgtlvtvss	85:5:5:5	JH1 の D3-22(2)::QH::Fr4	237
12b	yycakGYcSSTSScYTQHWwgqgtlvtvss	85:5:5:5	JH1 の D2-2(2)::QH::Fr4	238
12c	yycakYDGSYSAEYFQHwgqgtlvtvss	85:5:5:5	YDGSYS::JH1(全体) (配列番号 943)	239
12d	yycakYYDYwGGSYRYTwwgqgtlvtvss	85:5:5:5	JH1 の D3-16(2)::Fr	240
12e	yycakGYSYGYWWYFDLwgqgtlvtvss	85:5:5:5	D5-5:(3)::JH2(全体)	241
14a	yycakYYDSGSYYYYFQHWwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D3-22(2)::YFQH::Fr (配列番号 944)	242
14b	yycakGYcSSTSScYTQHWwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の D2-2(2)::YFQH::Fr (配列番号 944)	243
14c	yycakSYGYcSSTSScYTQHWwgqgtlvtvss	73:9:9:9	JH1 の SY::D2-2(2)::QH::Fr	244
14d	yycakSYRSGYSAEYFQHWwgqgtlvtvss	73:9:9:9	SYRSGYS::JH1(全体) (配列番号 945)	245
14e	yycakAYcGGDGcYSNWFPwgqgtlvtvss	73:9:9:9	D2-2(2)::JH5(全体)	246
15a	yycakSDGYYYDSGGYYYDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	SD::D3-22(2)::JH4(10ff)	930
15b	yycakGSGYCSCGSCYSFDYwgqgtlvtvss	73:9:9:9	GS::D2-15(2)::JH4(10ff)	931
15c	yycakGGRGYSSGWYRAFDIwgqgtmvtvss	73:9:9:9	GGR::D6-19(1)::R::JH3(all)	932

【 0 2 2 1 】

【表 4 8】

16a	yycaKYDSSGGYYYYAEYFQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	D3-22(2)::JH1(全体)	247
16b	yycaKGYcSSTSceYTAEYFQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	D2-2(2)::JH1(全体)	248
16c	yycaKSYDSYRSYGSYSAEYFQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	SYDSYRSYGS::JH1(全体) (配列番号 946)	249
16d	yycaKSYSGYcSSTSceYTQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	SYSY::D2-2(2)::QH::Fr JH1 (配列番号 947)	250
17a	yycaKSRPGYSSSWYYYYGMDVwgqgttvtss	73:9:9:9	SRP::6-13::JH6(-1Y)	933
18a	yycaKGCGSGSCSYYYYYGMDVwgqgttvtss	73:9:9:9	2-15.2::JH6(-1Y)	221
18b	yycaKGCGSGSCSYYYYYGMDVwgqgttvtss	73:9:9:9	D::2-15.2::JH6(-2Ys)	222
19a	yycaKDGYYYDSSGGYYYYRGYYYFDYwgqgtlvtss	73:9:9:9	D::D3-22.2:RGY::JH4(all)	223
20a	yycaKSYSSYYYDSSGGYYYYAEYFQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	YSSY::D3-22(2)::JH1(全体) (配列番号 948)	251
20b	yycaKSYSGYcSSTSceYTAEYFQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	SYYS::D2-2(2)::JH1(全体) (配列番号 949)	252
20c	yycaKGYcSSTSceYTYSSAEYFQHwgqgtlvtss	73:9:9:9	S::D2-2(2)::YYSS::JH1(全体)	253
20d	yycaKYYDDYWGSYRTTSNWFDPwgqgtlvtss	73:9:9:9	Y::D3-16(2)::S::JH5(全体)	254
20e	yycaKYYDDYWGSYRTSSYFDYwgqgtlvtss	73:9:9:9	Y::D3-16(2)::SS::JH4(全体)	255

【 0 2 2 2 】

【表49】

表22:HCディスプレイカセット

表22に示すアミノ酸配列は配列番号892である。
表22に示すDNA配列は配列番号893である。

```

! VH-CH1-IIIスタンプに対するシグナル
!   1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
!   M K Y L L P T A A A G L L L L
946 atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc

!   16 17 18 19 20 21 22
!   A A Q P A M A
991 gCG GCC cag ccG GCC atg gcc
!   SfiI.....
!   NgoMI...(1/2)
!   NcoI.....
! VH

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

```

【表 5 0】

```

!      N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   K
1261  |aac|agC|TTA|AGg|gct|gag|gac|aCT|GCA|Gtc|tac|tat|tgC|gct|aaa|
!      |AfIII |                                | PstI |(2/2)

! .....CDR3.....|----FR4-----+
! 95  96  97  98  98a 98b 98c 99  100 101 102 103 104 105 106
!  D   Y   E   G   T   G   Y   A   F   D   I   W   G   Q   G
1306  |gac|tat|gaa|ggT|act|ggT|tat|gct|ttc|gaC|ATA|TGg|ggT|caa|ggT|
!                                | NdeI |

! -----FR4----->|
! 107 108 109 110 111 112 113
!  T   M   V   T   V   S   S
1351  |act|atG|GTC|ACC|gtc|tct|agt
!                                | BstEII |  c tcg ag = XhoI.

! CH1

!      A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P   S   S
1372  gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccG CTA GCa ccc tcc tcc
!                                NheI.....
!
! 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165
!  K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C   L   V   K
1417  aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag
!
! 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
!  D   Y   F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S   G   A
1462  gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc gcc
!
! 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195
!  L   T   S   G   V   H   T   F   P   A   V   L   Q   S   S
1507  ctg acc agc ggc gtc cac acc ttc ccG gct gtc cta cag tcc tca
!
! 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
!  G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P   S   S   S
1552  gga ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc gtg ccc tCC Agc agc
!                                BstXI.....
!
! 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
!  L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H   K   P   S
1597  tTG Ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc
!                                BstXI.....
!
! 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238
!  N   T   K   V   D   K   K   V   E   P   K   S   C
1642  aac acc aag gtg gac aaG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT
!
! 139 140 141 His tag..... cMyc tag.....
!  A   A   A   H   H   H   H   H   H   G   A   A   E   Q   K   L   I
1681  GCG GCC GCa cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca gaa caa aaa ctc atc
! NotI.....
! EagI.....
!
! .....S   E   E   D   L   N   G   A   A   E   A   S   S   A   S   N   A   S
1732  tca gaa gag gat ctg aat ggg GCC gca gaG GCt agt tct gct agt aAC GCG Tct
!
```

【0224】

【表51】

BgI I.....(3/4) MluI....

```

! ドメイン3(IIIスタンプ)
-----  

! S G D F D Y E K M A N A N K G A  

1786 tcc ggt gat ttt gat tat gaa aag atg gca aac gct aat aag ggg gct  

! M T E N A D E N A L Q S D A K G  

1834 atg acc gaa aat gcc gat gaa aac gcg cta cag tct gac gct aaa ggc  

! K L D S V A T D Y G A A I D G F  

1882 aaa ctt gat tct gtc gct act gat tac ggt gct gct atc gat ggt ttc  

! I G D V S G L A N G N G A T G D  

1930 att ggt gac gtt tcc ggc ctt gct aat ggt aat ggt gct act ggt gat  

! F A G S N S Q M A Q V G D G D N  

1978 ttt gct ggc tct aat tcc caa atg gct caa gtc ggt gac ggt gat aat  

! S P L M N N F R Q Y L P S L P Q  

2026 tca cct tta atg aat aat ttc cgt caa tat tta cct tcc ctc cct caa  

! S V E C R P F V F G A G K P Y E  

2074 tcg gtt gaa tgt cgc cct ttt gtc ttt ggc gct ggt aaa cca tat gaa  

! F S I D C D K I N L F R  

2122 ttt tct att gat tgt gac aaa ata aac tta ttc cgt  

! ドメイン3末端  

! G V F A F L L Y V A T F M Y V F140  

2158 ggt gtc ttt gcg ttt ctt tta tat gtt gct acc ttt atg tat gta ttt  

! 膜貫通セグメント開始  

! S T F A N I L  

2206 tct acg ttt gct aac ata ctg  

! R N K E S ( 配列番号 892 )  

2227 cgt aat aag gag tct TAA tga aAC GCG Tga tga GAATTG ( 配列番号 893 )  

! 細胞内アンカー。 MluI.... EcoRI.  


```

表25:サンプル生殖細胞系列のO12 κ軽鎖を含有するDY3F85LCのDNA配列。

示した抗体配列は、実際の抗体の形態の配列であるが、特定の抗原に結合するものとして特定されてはいない。

それぞれの系において、エクスクラメーションマーク(!)の後ろは、すべて注釈である。

DY3F85LCのDNAは配列番号 950である。

```

-----  

1 AATGCTACTA CTATTAGTAG AATTGATGCC ACCTTTTCAG CTCGGCCCCC AAATGAAAAT  

61 ATAGCTAAC AGGTTATTGA CCATTGCGA AATGTATCTA ATGGTCAAAC TAAATCTACT  

121 CGTTCCAGA ATTGGGATC AACTGTTATA TGGAATGAAA CTTCAGACA CCGTACTTTA  

181 GTTGATATT TAAAACATGT TGAGCTACAG CATTATATTG AGCAATTAAAG CTCTAAGCCA  

241 TCCGCAAAAA TGACCTCTTA TCAAAAGGAG CAATTAAGG TACTCTCTAA TCCTGACCTG  

301 TTGGAGTTG CTTCCGGTCT GGTCGCTT GAAGCTCGAA TAAAAACGCG ATATTIGAAG  

361 TCTTTCGGGC TTCCCTCTAA TCTTTTGAT GCAATCCGCT TTGCTTCTGA CTATAATAGT  

421 CAGGGTAAAG ACCTGATTT TGATTTATGG TCATTCCTCGT TTTCTGAAC GTTTAAAGCA

```

【0225】

10

20

30

40

【表52】

481	TTTGAGGGGG ATTCAATGAA TATTATGAC GATTCCGCAG TATTGGACGC TATCCAGTCT	
541	AAACATTTA CTATTACCCC CTCTGGCAAA ACTTCTTTG CAAAAGCCTC TCGCTATTT	
601	GGTTTTTATC GTCGCTGGT AAACGAGGGT TATGATACTG TTGCTCTTAC TATGCCCTCGT	
661	AATTCTTTT GGC GTT ATGT ATCTGCATTA GTTGAATGT GTATTCTAA ATCTCAACTG	
721	ATGAATCTT CTACCTGTAA TAATGTTGTT CGGTAGTTC GTTTTATTAA CGTAGATTT	
781	TCTTCCCAAC GTCTGACTG GTATAATGAG CCAGTTCTTA AAATCGATA ACGTAATTCA	
841	CAATGATTA AGTTGAAATT AAACCATCTC AAGCCCAATT TACTACTCGT TCTGGTGT	
901	CTCGTCAGGG CAAGCCTAT TCACTGAATG AGCAGCTTG TTACGTTGAT TTGGGTAATG	
961	AATATCCGGT TCTTGTCAAG ATTACTCTTGT ATGAAGGTCA GCCAGCCTAT GCGCCTGGTC	
1021	TGTACACCGT TCATCTGTCC TCTTCAAAG TTGGTCAGTT CGGTTCCCTT ATGATTGACC	10
1081	GTCTGCGCT CGTTCGGCT AAGTAACATG GAGCAGGTG CGGATTCGA CACAATTAT	
1141	CAGGCGATGA TACAAATCTC CGTTGTACTT TGTTTCGCG TTGGTATAAT CCCTGGGGT	
1201	CAAAGATGAG .TGTTTAGTG TATCTTTTG CCTCTTCTCG TTAGGTTGG TGCCTTCGTA	
1261	GTGGCATTAC GTATTITACC CGTTAAATGG AAACCTCCAT ATGAAAAAGT CTTAGTCCCT	
1321	CAAAGCCTCT GTAGCCGTTG CTACCCCTCGT TCCGATGCTG TCTTCGCTG CTGAGGGTGA	
1381	CGATCCCGCA AAAGCGGCCT TTAACCTCCCT GCAAGCCTCA GCGACCGAAT ATATCGGTTA	
1441	TGCGTGGGGCG ATGGTTGTTG TCATTGTCGG CGCAACTATC GGATCAAGC TGTAAAGAA	
1501	ATTCACCTCG AAAGCAAGCT GATAAACCGA TACAATTAAA GGCTCCTTT GGAGCCTTT	
1561	TTTGGAGAT TTCAACGTG AAAAATTAT TATTCGCAAT TCCTTTAGTT GTCTTCTTCT	
1621	ATTCTCACTC CGCTGAAACT GTGAAAGTT GTTAGCAAA ATCCCATACA GAAAATTCA	
1681	TTACTAACGT CTGGAAAGAC GACAAAATT TAGATCGTA CGCTAACTAT GAGGGCTGTC	
1741	TGTGGAATGC TACAGCGTGT GTAGTTGTA CTGGTACGA AACTCAGTGT TAAGGTACAT	
1801	GGGTTCTAT TGGGCTTGCT ATCCCTGAAA ATGAGGGTGG TGGCTCTGAG GGTCGGCGTT	
1861	CTGAGGGTGG CGGTTCTGAG GGTGGCGGT ACAAACCTCC TGAGTACGGT GATACACCTA	
1921	TTCCGGGCTA TACTTATATC AACCCCTCTCG ACGGCACTTA TCCGCTGGT ACTGAGCAA	
1981	ACCCCGCTAA TCCTAATCTC TCTCTTGGAG AGTCTCAGCC TCTTAATACT TTATGTTTC	
2041	AGAATAATAG GTTCCGAAAT AGGCAGGGGG CATTAACTGT TTATAACGGGC ACTGTTACTC	20
2101	AAGGCACTGA CCCCGTTAAA ACTTATTACCG AGTACACTCC TGATCATCA AAAGCCATGT	
2161	ATGACGCTTA CTGGAACGGT AAATTCAAGAG ACTGCGCTTT CCATTCTGGC TTTAATGAGG	
2221	ATTATTTGT TTGTGAATAT CAAGGCCAAT CGTCTGACCT GCCTCAACCT CCTGTCATG	
2281	CTGGCGGCGG CTCTGGTGG GGTCTGGTGC GCGGCTCTGA GGGTGGTGGC TCTGAGGGTG	
2341	GCGGTTCTGA GGGTGGCGGC TCTGAGGGAG GCGGTTCCGG TGGTGGCTCT GGTCGGGTG	
2401	ATTITGATTA TGAAAAGATG GCAAACGCTA ATAAGGGGGC TATGACCGAA AATGCCGATG	
2461	AAAACCGCCT ACAGTCTGAC GCTAAAGGC AACTTGATTC TGTCCCTACT GATTACGGTG	
2521	CTGCTATCGA TGGTTCTATT GTGACGTTT CGGGCTCTGC TAATGGTAAT GTGCTACTG	
2581	GTGATTTGC TGGCTCTAAAT TCCCAAATGG CTCAAGTCGG TGACGGTGTAAATCACCTT	
2641	TAATGATAA TTTCCGCTAA TATTTACCTT CCCTCCCTCA ATCGGGTGAAT TGTGCCCTT	
2701	TTGTCTTGG CGCTGGTAAA CCATATGAAT TTTCTATTGA TTGTGACAAA ATAAACCTAT	
2761	TCCGTGGTGT CTTTGCCTT CTTTATAATG TTGCCACCTT TAATGATGTA TTTCTACGT	
2821	TTGCTAACAT ACTCGTAAT AAGGAGCTT AATCATGCCA GTTCTTTGG GTATTCCGTT	
2881	ATTATTCGCT TTCCCGGTT TCCTCTGGT AACTTTGTC GGCTATCTGC TTACTTTCT	
2941	AAAAAGGGC TTGGTAAGA TAGCTATTGC TATTTCTATTG TTTCTGCTC TTATTATTGG	
3001	GCTTAACCTCA ATTCTGTGG GTTATCTCTC TGATATTAGC GCTCAATTAC CCTCTGACTT	30
3061	TGTCAGGGT GTTCAGTTAA TTCTCCCGTC TAATGCGCTT CCCTGTTTT ATGTTATTCT	
3121	CTCTGTAAGAAG GCTGCTATT TCATTTTGAG CGTTAAACAA AAAATCGTTT CTATTGGAA	
3181	TTGGGATAAA TAATATGGCT GTTATTTTG TAATGGCCTA ATTAGGCTCT GGAAAGACGC	
3241	TCGTTAGCGT TGGTAAGATT CAGGATAAAA TTGTAGCTGG GTGCAAATA GCAACTAATC	
3301	TTGATTTAAG GCTTCAAAAC CTCCCGCAAG TCGGGAGGT CGCTAAACG CCTCGCGGTIC	
3361	TTAGAATACC GGATAAGCCT TCTATATCTG ATTTGCTTGC TATTGGCGC GGTAAATGATT	
3421	CCTACGATGA AAATAAAAAC GGCTTGCTTG TTCTCGATGA GTGCGGACT TCGTTTAATA	
3481	CCCGTTCTG GAATGATAAG GAAAGACAGC CGATTATTGA TTGGTTCTA CATGCTCGTA	
3541	AATTAGGATG GGATATTATT TTCTCTGTC AGGACTTATC TATTGTTGAT AACACAGGCC	
3601	GTTCTGCATT AGCTGAACAT GTTGTGTTATT GTCTCGTCT GGACAGAATT ACTTTACCTT	
3661	TTGTCGGTAC TTTATATTCT CTTATTACTG GCTCGAAAT GCCTCTGCC AAATTACATG	
3721	TTGGCGTTGT TAAATATGGC GATTCTCAAT TAAGCCCTAC TGTTGAGCGT TGGCTTATA	
3781	CTGGTAAGAA TTTGTATAAC GCATATGATA CTAAACAGGC TTTTCTAGT AATTATGATT	
3841	CCGGTGTGTTA TTCTTATTAA ACGCCCTATT TATCACACGG TCGGTATTTC AAACCAATTAA	

【0226】

【表 5 3】

3901 ATTTAGGTCA GAAGATGAAA TTAACAAAAA TATATGGAA AAAGTTTCT CGCGTTCTT
 3961 GTCTTCGAT TGGATTGCA TCAGCATTA CATATAGTTA TATAACCAA CCTAAGCCGG
 4021 AGGTTAAAAA CGTAGTCTCT CAGACCTATG ATTTGATAA ATTCACTATT GACTCTCTC
 4081 ACCGTCTAA TCTAACGCTAT CGCTATGTT TCAAGGATTC TAAGGGAAA TTAATTATA
 4141 GCGACGATT ACAGAAGCAA GGTTATTCAC TCACATATA TGATTTATGT ACTGTTCCA
 4201 TTAAAAAAGG TAATTCAAAT GAAATTGTTA AATGTAATTA ATTTGTTT CTTGATGTTT
 4261 GTTTCATCAT CTTCTTGC TCAGGTAATT GAAATGAATA ATTCCGCTCT GCGCGATTT
 4321 GTAACCTGGT ATTCAAAGCA ATCAGGCAGA TCCGTTATTG TTTCTCCGA TGAAAAGGT
 4381 ACTGTTACTG TATATTCATC TGACGTTAAA CCTGAAAATC TAGCAATT TTTTATTCT
 4441 GTTTTACGTG CAAATAATT TGATATGGT GGTCTAACCT CTCACATAAT TCAGAACTAT
 4501 AATCCAAACA ATCAGGATA TATTGATGAA TTGCCATCAT CTGATAATCA GGAATATGAT
 4561 GATAATTCCG CTCCCTCTGG TGTTTCTT GTTCCGCAA ATGATAATGT TACTCAAAC
 4621 TTAAAAAATT ATAACGTTG GCGAAGGGAT TTAATACGAG TTGTCGAATT GTTGTAAAG
 4681 TCTAATACCT CAAATCCTC AAATGTATTA TCTATTGAC GCTCTAATCT ATTAGTGT
 4741 ACTGCTCTA AAGATATTCTT AGATAACCTT CCTCAATTCC TTTCAACTGT TGATTTGCCA
 4801 ACTGACCAGA TATTGATTGA GGGTTTGATA TTTGAGGTTG AGCAAGGTGA TGCTTTAGAT
 4861 TTTTCATTIG CTGCTGGCTC TCAGCGTGGC ACTGTTGCAG GCGGTTAA TACTGACCGC
 4921 CTCACCTCTG TTTTATCTTC TGCTGGTGGT TCGTCGTA TTTTAATGG CGATGTTTA
 4981 GGGCTATCAG TCGCGCATT AAAGACTAAT AGCCATTCAA AAATATTGTC TGTGCCACGT
 5041 ATTCTTACGC TTTCAGGTCA GAAGGGTTCT ATCTCTGTTG GCCAGAATGT CCCTTTATT
 5101 ACTGGTCGTG TGACTGGTGA ATCTGCCAAT GTAAATAATC CATTTCAGAC GATTGAGCGT
 5161 CAAAATGAG GTATTCCAT GAGCGTTTT CCTGTTGCAA TGGCTGGCG TAATATTGTT
 5221 CTGGATATA CCAGCAAGGC CGATAGTTTG ACTTCTCTA CTCAGGCAAG TGATGTTATT
 5281 ACTAATCAA GAAGTATTGC TACAACGGTT AATTGCGTG ATGGACAGAC TCTTTTACTC
 5341 GGTGGCCTCA CTGATTATAA AAACACTTCT CAGGATTCTG GCGTACCGTT CCTGTCTAAA
 5401 ATCCCTTAA TCGGCTCTC GTTCTAGCTCC CGCTCTGATT CTAACGAGGA AAGCACGTTA
 5461 TACGTGCTCG TCAAAGCAAC CATAGTACGC GCCCCTGTAAG GGCGCATTAA GCGCGGCGGG
 5521 TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC CCGCTCTT
 5581 CGCTTCTTC CTTCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTT CCCCGTCAAG CTCTAAATCG
 5641 GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGAC CTCGACCCCC AAAAACTTGA
 5701 TTTGGGTGAT GTTACCGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GCCCTTGAC
 5761 GTTGGAGTCC ACGTTCTTA ATAGTGGACT CTIGTICCAA ACTGGAACAA CACTCAACCC
 5821 TATCTCGGGC TATTCTTTG ATTATTAAGG GATTTGGCG ATTTCGGAAC CACCATCAA
 5881 CAGGATTTC GCCTGCTGGG GCAAACCGAGC GTGGACCGCT TGCTCAACT CTCTCAGGGC
 5941 CAGGCGGTGA AGGGCAATCA GCTGTTGCC GTCTCACTGG TGAAAAGAAA AACCAACCTG
 6001 GATCCAAGCT TGCAGGTGGC ACTTTTGGGG GAAATGTGG CGGAACCCCT ATTGTTTAT
 6061 TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCG TCATGAGACA ATAACCCCTGA TAAATGCTTC
 6121 AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATT CCCTGTCGCC CTTATTCCCT
 6181 TTTTGCAGG ATTTGCTT CCTGTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGT AAAGTAAAAG
 6241 ATGCTGAAGA TCAGTGGGC GCACTAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA
 6301 AGATCCTTGA GAGTTTGC CCGAAGAAC GTTTTCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTIC
 6361 TGCTATGIGG CGCGGTATT TCCCGTATTG ACGCCGGCA AGAGCAACTC GGTGCCCGCA
 6421 TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG
 6481 ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCG
 6541 CCAACTTACT TCTGACAAACG ATCCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGTTT TTGCAACACA
 6601 TGGGGATCA TGTAACTCGC CTGATCGTT GGGAAACCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA
 6661 ACGACGAGCG TGACACCAAG ATGCCCTGTAG CAATGGCAAC AACGGTGC GAAACTATTAA
 6721 CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAAATTAA AGACTGGAG GAGGCGGATA
 6781 AAGTTGCAGG ACCACTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG CTGGTTATT GCTGATAAAAT
 6841 CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGT A CATTGCAAGC ACTGGGGCCA GATGGTAAGC
 6901 CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT GAACGAAATA
 6961 GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAACGTCA GACCAAGTTT
 7021 ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAAC TTCATTTTA ATTAAAAGG ATCTAGGTGA
 7081 AGATCCTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTCG TTCCACTGIA
 7141 CGTAAGACCC CCAAGCTTGT CGACTGAATG GCGAATGGCG CTTTGCCTGG TTTCCGGCAC
 7201 CAGAAGCGGT GCGGAAAGC TGCGTGGAGT GCGATCTTCC TGACGCTCGA GCGAACGCA

XhoI...

【表54】

7261 ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTAT GCTTCCGGCT
 7321 CGTATGTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCACA CAGGAAACAG CTATGACCAT
 7381 GATTACGCCA AGCTTGGAG CCTTTTTT GGAGATTT AAC

表30:DY3FHC87のDNA配列(配列番号894)

1 aatgctacta ctattagtag aattgatgcc acctttcag ctcgcgcccc aatgaaaat 61 atagctaaac aggttattga ccatttgcga aatgtatcta atggtaaac taaatctact 121 cggtcgacaa attggaaatc aactgttata tggaaatgaaa cttccagaca ccgtacttta 181 gttgcattatt taaaacatgt tgagctacag cattatata agcaattaag ctctaaagcc 241 tccgcaaaaaa tgacccttta taaaaggag caattaaagg tactcttaa tcctgacctg 301 ttggagtttg ctteccgtt ggttcgcgtt gaagctcgaa taaaacgcg atatttgaag 361 tcttcgggc ttccctttaa tcttttttat gcaatccgtt ttgcctctga ctataatagt 421 cagggtaaag acctgatccc tgatttatgg tcattctcg tttctgaact gttaaagca 481 tttgaggggg attcaatgaa tatttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagct 541 aaacattttta ctattacccc ctctggcaaa acttcttttgc caaaagcctc tcgctatccc 601 ggtttttatac gtcgtctggt aaacgagggt tatgataatg ttgccttac tatgcctcg 661 aattccctttt ggcgttatgt atctgcattt gttgaatgt gtattccctaa atctcaactg 721 atgaatctt ctacctgtta taatgttggg ccgttagttc gttttattaa cgtagattt 781 tcttcccaac gtcctgactg gtataatgag ccagttctta aatcgata aggttaattca 841 caatgattaa agttgaaattt aaaccatctc aagcccaatt tactactgt tctgggttt 901 ctgcgtcaggg caagccttatactgatggt aycgacttgc ttacgttgc ttgggtaaatg 961 aatatccggg tcttgcattt atactcttgc atgaaggta gcccgcctat ggcgcctgg 1021 tgcgtacccgt tcattctgtcc tctttcaatgg ttggcgttgc ttgcctccctt atgattgacc 1081 gtcgtcgccct cgttccggcgtt aagtaacatgg gaggcgttgc cggatttcg cacaatttt 1141 caggcgatga tacaatctc ctgttgcattt tggtcgcc ttgggtataat cgctgggg 1201 caaagatgag tggggatgtt tatttttttgc ccttttcgtt ttttaggttgg tgccttcgt 1261 gtcgtcgccctt gtttttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaatgtt cttagtgc 1321 caaaggccctt gtagccgttgc ctaccctcg tccgtcg tctttcgctg ctgagggt 1381 cgatcccgca aaagccggcctt taaactccct gcaaggctca ggcgcctat atatcggt 1441 tgcgtggggcg atgggtgttgc tattgtcg gcaactatc ggtatcaagc tggtaagaa 1501 attcacccgtt aaagcaagctt gataaaccgg tacaatttttgc ggcctttt ggagcc 1561 tttttggaga ttttcaacgtt gaaaaatttttgc ttattcgaa ttccctttagt tgggt 1621 tattctcaactt ccgttgcggat ttt 1681 ttttactaaatc tctggaaatggt cggccatctttagatcgatcgtt acgctacta tgagg 1741 ctgtggaaatg ctacaggcgat ttt 1801 tgggttccta ttgggttgc tatt 1861 tctgagggttgc ggggttgc ggggttgc ggggttgc ggggttgc ggggttgc ggggttgc 1921 attccgggctt atacttatat caaccctctc gacggactt atccgcctgg tactgag 1981 aaccccgctt atccctaatcc ttcttgcgtt gaggctcgc ctcttataac tttcatgtt 2041 cagaataataa ggttccggaaa taggcagggg gcatatcttgc ttttacccggg cactgttact 2101 caaggccactt acccccgatcc ttttacccggg gcatatcttgc ttttacccggg cactgttact 2161 tatgacgtt actggaaatgg taaattcaga gactgcgtt tccattctgg ctgtatcatc 2221 gatttttttgc ttttgcataa tcaaggccaa ttttgcgtt tccattctgg ctgtatcatc 2281 gctggccggcg gctctgggttgc ttttgcgtt ggcggctctg aggggttgg ctctgagg 2341 ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg 2401 gatttttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg 2461 gaaaacgcgc tacgttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt 2521 gctgtatcg atgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt 2581 ggtgatttttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg 2641 ttaatgatataa ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg 2701 ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg 2761 ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg 2821 ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg 2881 ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg 2941 ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg ggcgggttgc ttttgcgtt ggggttgg ctctgagg	10
	20
	30

【表 5 5】

3001 ggcttaactc aattcttggg ggttatctct ctgatattag cgctcaatta ccctctgact
 3061 ttgttcaggg tggtcagttt attctccgt ctaatgcgt tcctgttt tatgttattc
 3121 tctctgtaaa ggctgttattt tcattttt acgttaaaca aaaaatcggtt tcttatttgg
 3181 attgggataa ataatatggc tggttatttt gtaactggca aatttaggctc tggaaagacg
 3241 ctcgttagcg tggtaagat tcaggataaa attgttagctg ggtgaaaaat agcaactaat
 3301 ctgtttaaa gcgttcaaaa cctccgcaa gtcgggggt tcgttcaaaaac gcctcgcggt
 3361 cttagaatac cggataagcc ttctatct gatttgctt ctattggcg cggtaatgt
 3421 tcctacgatg aaaataaaaaa cggcttgcgtt gttctcgatg agtgcgttac ttggttat
 3481 acccggttctt ggaatgataa ggaaagacag ccgattattt attgggttctt acatgcgt
 3541 aaattaggat gggatattat ttttcttgcgtt caggacttat ctattgttga taaacaggcg
 3601 cggttgcgtt tagctgaaca tggttattt tgctgtcggtt tggacagaat tactttac
 3661 tttgtcggtt ctttatattt tcttattact ggctcgaaaaa tgcctctgccc taaattac
 3721 gttgcgttgcgtt taaatatgg cgattctcaa ttaagcccta ctgttgcgtt ttggttat
 3781 actgttaaga atttgtataa cgcataatgtt actaaacagg ctttttcttag taattatgt
 3841 tccgtgtttt attcttattt aacgccttattt ttatcacacg gtccgttattt caaaccatta
 3901 aatttaggtc aagagatgaa attaataaaa atatatttgcgtt aaaaagggtttt tcgcgttctt
 3961 tgcgttgcgtt tggttatttgcgtt atcagcattt acatatagt atataacccca acctaagccg
 4021 gaggttaaaa aggttagtctc tcagacccat gatttgataaatttactat tgactttctt
 4081 cagcgtctta atctaagctt tcgttatgtt ttcaaggattt ctaaggggaaa attaattat
 4141 agcgtacgtt tacagaagca aggttatttca ctcacatata ttgattttatg tactgttcc
 4201 attaaaaaaag gtaattcaaa tgaaatttttgcgtt aaatgttattt aattttgtt tcttgcgtt
 4261 tgcgttgcgtt ttttttttttgcgtt atcagcattt tgaaatgtt aatttcgcctt tgcgttgcgtt
 4321 tgtaacttgg tattcaaaaggcgtt aatcaggcgaa atccgttattt gtttctcccg atgtttttt
 4381 tactgttact gtatattcat tcgttgcgtt acctgaaaat ctacgcattt tcttttttgcgtt
 4441 tgcgttgcgtt gcaaaataattt tgatattttgcgtt aggttcttac ctttccatata ttccgttgcgtt
 4501 taatccaaac aatcaggattt atattgttgcgtt atttgcgtt aatccgcctt tgcgttgcgtt
 4561 tgataatttcc gtccttgcgtt tggttgcgtt ttttccgttgcgtt aatgttgcgtt ttacttcaaac
 4621 ttttttttttgcgttgcgtt ttttccgttgcgtt aatgttgcgtt ttacttcaaac
 4681 gtcttaatctt tctaaatcc taaatgttattt atcttgcgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4741 tagtgcgttgcgtt aatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4801 aactgaccatg atattgttgcgtt aggttgcgtt atttgcgttgcgtt ctttccgttgcgtt
 4861 tttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4921 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4981 agggtatca gtttccgttgcgtt taaagactaa tagccattca aaaaatatttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5041 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5101 tactgggtcggtt gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5161 tcaaaatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5221 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5281 tactaatcaa aagatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5341 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5401 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5461 atacgtgtc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5521 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5581 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5641 gggggctccc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5701 atttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5761 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5821 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5881 acaggtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5941 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6001 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6061 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6121 caataatattt gaaaaggaa ggttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6181 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6241 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6301 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6361 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt

10

4681 gtcttaatctt tctaaatcc taaatgttattt atcttgcgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4741 tagtgcgttgcgtt aatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4801 aactgaccatg atattgttgcgtt aggttgcgtt atttgcgttgcgtt ctttccgttgcgtt
 4861 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4921 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4981 agggtatca gtttccgttgcgtt taaagactaa tagccattca aaaaatatttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5041 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5101 tactgggtcggtt gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5161 tcaaaatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5221 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5281 tactaatcaa aagatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5341 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5401 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5461 atacgtgtc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5521 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5581 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5641 gggggctccc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5701 atttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5761 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5821 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5881 acaggtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5941 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6001 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6061 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6121 caataatattt gaaaaggaa ggttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6181 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6241 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6301 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6361 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt

20

4681 gtcttaatctt tctaaatcc taaatgttattt atcttgcgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4741 tagtgcgttgcgtt aatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4801 aactgaccatg atattgttgcgtt aggttgcgtt atttgcgttgcgtt ctttccgttgcgtt
 4861 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4921 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4981 agggtatca gtttccgttgcgtt taaagactaa tagccattca aaaaatatttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5041 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5101 tactgggtcggtt gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5161 tcaaaatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5221 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5281 tactaatcaa aagatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5341 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5401 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5461 atacgtgtc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5521 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5581 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5641 gggggctccc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5701 atttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5761 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5821 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5881 acaggtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5941 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6001 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6061 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6121 caataatattt gaaaaggaa ggttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6181 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6241 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6301 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6361 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt

30

4681 gtcttaatctt tctaaatcc taaatgttattt atcttgcgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4741 tagtgcgttgcgtt aatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4801 aactgaccatg atattgttgcgtt aggttgcgtt atttgcgttgcgtt ctttccgttgcgtt
 4861 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4921 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 4981 agggtatca gtttccgttgcgtt taaagactaa tagccattca aaaaatatttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5041 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5101 tactgggtcggtt gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5161 tcaaaatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5221 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5281 tactaatcaa aagatgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5341 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5401 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5461 atacgtgtc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5521 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5581 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5641 gggggctccc ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5701 atttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5761 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5821 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5881 acaggtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 5941 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6001 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6061 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6121 caataatattt gaaaaggaa ggttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6181 ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6241 gtttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6301 aatcccttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt
 6361 ctttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt ttttccgttgcgtt

40

【表 5 6】

表35:pMID21のDNA配列:5957bp(配列番号895)

1 gacgaaaggc cctcggtata cgccattttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt

(0 2 3 0)

【表57】

61 ctttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatttt
 121 tcttaataaca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcatt
 181 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctt attcccttt
 241 ttgcggcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaagatg
 301 ctqaagatca gttgggtqcc cgagtgggtt acatcgact ggatctcaac agcggtaaga
 361 tccttgagag tttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgt gaggacttt aaagttctgc
 421 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac
 481 actattctca gaatgacttg gttgagact caccagtac agaaaaagcat cttacggatg
 541 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtc ccataaccat gagtgataac actgcggcca
 601 acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttt cacaacatgg
 661 gggatcatgt aactcgctt gatcggtgg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg
 721 acgagcgtga caccacatg cctgtacaa tggcaacaac gttgcgc当地 ctattaactg
 781 gcgaactact tacttaget tccggcaac aattaataga tggatggag gcggtaaag
 841 ttgcaggacc acttctgcgc tcggccctt cggctggctg gtttattgt gataaaatctg
 901 gagccgtga gcgtgggtct cgcgttatca ttgcagcact gggggccagat ggttaagccct
 961 cccgtatcgt agttatctac acgacgggg atcggcaac tatggatgaa cggaaatagac
 1021 agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agcattgtt actgtcagac caagttact
 1081 catatataact ttagattgtt taaaacttc attttttaatt taaaaggatc taggtgaaga
 1141 tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttAACGTGA gttttcggtt cactgagcgt
 1201 cagaccccgta agaaaagatc aaaggatctt ttgcagatcc ttttttctg cgcgtatct
 1261 gctgcttgca aaaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgttgc当地 gatcaagagc
 1321 taccaactct tttccgaaag gtaactggct tcaagcagac gcaagatcca aataactgttc
 1381 ttcttagtgc gcccgttagt gcccaccact tcaagaactc tgcacccg cctacatacc
 1441 tcgcgtctgt aatctgttta ccagtgtcgt ctgcgttgg cgtataatgc tgcgttaccg
 1501 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt
 1561 cgtgcataca gcccagctt gagcgaacga cttacaccga actgagatac ctacagcgt
 1621 agctatgaga aagcgc当地 cttccggaaag ggagaaaggc ggacaggatc cggtaagcg
 1681 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgagg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt
 1741 atagtcctgt cgggttgc当地 cacctctgac ttgcgtcg atttttgtg tgcgtc当地
 1801 gggggccggag cctatggaaa aacgc当地 caccgc当地 tttacgggtt cttggcc
 1861 gctggccctt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgt gataaccgt
 1921 ttacccgc当地 tgagtgc当地 gataccgtc gccc当地 cggcc当地 aacgaccgag cgc当地
 1981 cagtgc当地 ggaagcggaa gagc当地 caccgc当地 tacgc当地 aacc
 2041 cgatccatc atgc当地 cggc当地 cgc当地 cggc当地 gaaagcggc当地 agtgc当地
 2101 acgc当地 attaa tgc当地 gatggctt ctc当地 ctttgc当地 agc当地
 2161 cggctcgtat gttgtgtggaa attgtgagcg gataacaatt tcaacacaggaa aacagctatg
 2221 accatgatta cggccaaatgtt tggagcctt ttttggaga ttttcaacgt gaaaaaaat
 2281 ttattcgaa ttcccttagt ttgc当地 ttttgc当地 tattctcaca gtgc当地 ccaactgc当地
 2341 gagctcgaga tcaaaatgtt aactgtggct gc当地 ctttcatctt cccgc当地
 2401 gatgagc当地 tgaatgtt aactgc当地 ttgtgtgc当地 tgctgaaataa ctctatccc
 2461 agagaggc当地 aagtacagtg gaagggtggat aacgc当地 aatcggtt当地 ctccaggag
 2521 agtgc当地 cacagc当地 agcaggacagc caaggacagc acctacagcc tc当地 cctgc当地
 2581 agc当地 aacgc当地 actacaggac当地 acacaactc tacgc当地 cggcc当地
 2641 agttcaccgg tgacaaaaggg cttcaacagg ggagactgtt aataaggc当地 gctaaccat
 2701 ctattcaag gaacagctt aatggaaaatg ct当地 ttttgc当地 tgatccc当地 agtgc当地
 2761 ttgc当地 gggccctc tgctgaaatgtt caattttgtt agtgc当地 cggc当地
 2821 cagctgggtg gttctttagt tcttcttgc gctgcttccg gagcttccgat tctgttgc当地
 2881 ttttgc当地 gttggc当地 tc当地 gcttccg gagatgc当地 gactgc当地 gcaaaaggca
 2941 cgtttaactg ctgatcaggc atggatgtt attcgccaaa ccaggctc当地 ggatctt
 3001 ctgaggctt ttttacctac tctgcaagca gcaactctg gtttgc当地 gagc当地
 3061 cgtc当地 ctgtc当地 agtgc当地 gggatggca tcaatgttgc当地 taatgtatgt
 3121 ggtaaaacctt ggc当地 gagc当地 aggtctgatc atcctgatc gttggctgac cagtagtgc当地
 3181 aagcttaccg tagtggctgc cgtaccatgtt ccatttgc当地 agtggatcag cggccact
 3241 tacgaaacaa cccaggacgg cccaaacttggt tc当地 gtaata taatgttgg agcaaaaatt
 3301 ttgtatgagg cggc当地 gagc当地 acaatccac ccaatccac aggccgttgc当地 tctgttgc当地
 3361 gggaaaccac agcaggatg ttttgc当地 gcaatggaaat gactcttcc
 3421 aaacgtatg gcaataatgtt gatgttggctt gaaacaccgg caatggccctt aacgttccgg

【0231】

10

20

30

40

【表 5 8】

表36:IIIss:A27::C κを含有するpM21J

塩基数 5225 (配列番号 921)

GACGAAAGGG	CCTCGTATA	CCCTATTT	TATAGTTAA	TGTCTATGATA	ATAATGGTT	60
CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	TTTCGGGGAA	ATGTGCCCG	AACCCCTATT	TGTTTATTTT	120
TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCGCTCA	TGAGACAATA	ACCCGTATAA	ATGCCTAACAT	180
AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	ATGAGTATTTC	AACATTCCG	TGTGCCCTT	ATCCCCTTTT	240
TTGCGGCACTT	TTGCTTCCT	TTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	GCTGGTGAAA	GTAAAAAGATG	300
CTGAAGATCA	GTGCGGTGCC	CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	AGCGGTAAGA	360
TCCTTGAGGAC	TTTCGCCCC	GAAGAACGTT	TTCCAATGAT	GAGCACTT	AAAGTCTGC	420
TATGTGGCGC	GGTATTATCC	CGTATTGACG	CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC	480
ACTATTCTCA	GAATGACTTG	GTGAGTACT	CACCAGTCAC	AGAAAAGCAT	CTTACGGATG	540
GCAATGACAGT	AAGAGAATT	TGCAGTGCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA	600

【 0 2 3 2 】

【表 5 9】

ACTTACTCTCT GACAACGATC GGAGGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG	660
GGGATCATGT AACTCGCCTI GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG	720
ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAAC GTGCGCAAA CTATTAACGT	780
GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCCGCAAC ATTAAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG	840
TTGCAGGACC ACTTCTCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTATTGCT GATAAAATCTG	900
GAGCCGGTGA CGCTGGGTCT CGCGGTATCA TTGAGCAGCT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT	960
CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC	1020
AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAAGAC CAAGTTACT	1080
CATATATACAT TTAGATTGAT TAAAAACTTC ATTTTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA	1140
TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTCGTTTC CACTGAGCGT	1200
CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT	1260
GCTGCTTGC AACAACAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCTG GATCAAGAGC	1320
TACCAACTCT TTTTCCGAG GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTTC	1380
TTCTAGTGTG CGCGTAGTTA GGCCACCATC TCAAGAACCT TGTAGGCACCG CCTACATACC	1440
TCGCTCTGCT AATCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG	1500
GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT	1560
CGTGCATACA GCCCCAGCTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGT	1620
AGCTATGAGA AAGGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG	1680
GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTT	1740
ATAGTCTGTG CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTGC ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG	1800
GGGGGCGGAG CCTATGGAA AACGCCAGCA ACGCCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTT	1860
GCTGGCCTT TGCTCACATG TTCTTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA	1920
TTACCGCCTT TGACTGACCT GATACCGCTC GCGCAGCGC AACGACCGAG CGCAGCGAGT	1980
CACTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCAA TAGCCAAACG GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC	2040
CGATTCTTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCAGCTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA	2100
ACGCAATTAA TGAGATTAG CTCACCTATT AGGCACCCCCA GGCTTACAC TTTATGCTTC	2160
CGGCTCGTAT GTTGTGTTGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG	2220
ACCATGATTA CGCCAAGCTT TGGAGCCTT TTTTGAGA TTTTCAACAT GAAGAAACTG	2280
CTGCTCTGTA TCCCACACTG TGTCCCTTTC TATTCTCATA GTGAAATCGT TCTGACCCAG	2340
TCCCCGGGGA CCCTGTCCT GTCTCCGGGT GAACGTGCTA CGCTGAGCTG TCCTGCTTCT	2400
CAATCCGTTA GCTCCTCTTA TTTAGCTTG TATCAGCAA AGCCGGTCA AGCTCCGCG	2460
CTGTTGATCT ATGGTGCCTC TAGTCGTGCT ACTGGCATCC CTGATCGTT CTCTGGCTCT	2520
GGCTCCGGAA CCGATTTCAC TCTGACCAATT TCTCGTCTCG AGCCGGAAGA TTTCGCTGTC	2580
TACTATTGTC AACAGTATGG TTCTAGTCCG CTGACTTTCG GTGGCGGTAC CAAAGTCGAA	2640
ATCAAGCGTGA AACTGTGGC TGCAACATCT GTCTTCATCT TCCCGCCATC TGATGAGCAG	2700
TTGAAATCTG GAACTGCTC TTGTTGTGC CTGCTGAATA ACTTCTATCC CAGAGAGGCC	2760
AAAGTACAGT GGAAGGTGGA TAACGCCCTC CAATCGGTA ACTCCCAGGA GAGTGTACA	2820
GAGCAGGACA GCAAGGACAG CACCTACAGC CTCAGCAGCA CCCTGACTCT GTCCAAAGCA	2880
CACTACGAGA AACACAAAGT CTACGCCCTGC GAAGTCACCC ATCAGGGCCT GAGTTCACCG	2940
GTGACAAAAGA GCTTCAACAG GGGAGAGTGT TAATAAGGC CGCCAATTAA ACCATCTATT	3000
TCAAGGAACA GTCTTAATGA AGAAGCTCCT CTTGCTATC CCGCTCGTCG TTCTTTTGT	3060
GGCCCGAGCCG GCCATGGCCG AAGTCAATT TTAGAGTCT GGTGGCGGTCT TTGTTCAGCC	3120
TGGTGGTTCT TTACGTCTT CTTGGCCTGC TTCCGGATTIC ACTTTCTCTC GTTACAAGAT	3180
GAAGTGGGTT CGCCAAGCTC CTGGTAAAGG TTGGAGTGG GTTCTGTGTTA TCTATCCTTC	3240
TGGTGGCGGT ACTGGTTATG CTGACTCCGT TAAAGGTGCG TTCACTATCT CTAGAGACAA	3300
CTCTAAAGAAT ACTCTCTACT TGCAGATGAA CAGCTTAAGG GCTGAGGACG CTGCACTCTA	3360
CTATTGTCG AGAGTCATT ACTATGATAG TAGTGGTTAC GGTGGCTATAG CTCTGGACT	3420
TGACTACTGG GGCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCAAGC GCCTCCACCA AGGGTCCGTC	3480
GGTCTTCCCC CTAGCACCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGCTG	3540
CCTGGTCAG GACTACTCC CGAACCGGT GACGGTGTG TGGAACCTAG GCGCCCTGAC	3600
CAGCGCGCTC CACACCTTC CGGCTGTCT ACAGTCTAG GGAACCTACT CCCTCAGCAG	3660
CGTAGTGACC GTGCCCTCTT CTAGCTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA	3720
CAAGCCCAAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTGTG CGGGCGCACA	3780
TCATCATCAC CATCACGGGG CGCGAGAAC AAAACTCATC TCAGAAGAGG ATCTGAATGG	3840
GGCGCGAGAG GCTAGTTCTG CTAGAACGC GTCTTCCGGT GATTTGATT ATGAAAAGAT	3900
GGCAAACGCT AATAAGGGGG CTATGACCGA AAATGCCGAT GAAAACGCCG TACAGTCTGA	3960
CGCTAAAGGC AAACTTGATT CTGTCGCTAC TGATTACGGT GCTGCTATCG ATGGTTICAT	4020

40

【0233】

【表60】

TGGTGACGT	TCCGGCCTTG	CTAATGGTAA	TGGTGCCTACT	GGTGATTTG	CTGGCTCTAA	4080
TTCCTCAAATG	GCTCAAGTCG	GTGACGGTGA	TAATTACACCT	TTAACATA	ATTCCCGTCA	4140
ATATTTACCT	TCCCCTCCCTC	AATCGGTTGA	ATGTCGCCCT	TTTGTCTTG	GCGCTGGTAA	4200
ACCATATGAA	TTTCTATG	ATTGTGACAA	AATAAACTTA	TTCCGTTG	TCTTGCCTT	4260
TCTTTTATAT	GTTGCCACCT	TTATGTATGT	ATTTTCTAGC	TTTGTCTAAC	TACTGCGTAA	4320
TAAGGAGTCT	TAATGAAACG	CGTGATGAGA	ATTCACTGGC	CGTGTGTTA	CAACGTCGTG	4380
ACTGGGAAAA	CCCTGGCGTT	ACCCAACCTTA	ATCGCCTGTC	AGCACATCCC	CCTTTCGCCA	4440
GCTGGCGTAA	TAGCGAAGAG	GCCCCCACCG	ATCGCCCTTC	CCAACAGTTG	CGCAGCCTGA	4500
ATGGCGAATG	GCGCCTGATG	CGGTATTTTC	TCCTTACGCA	TCTGTGCGGT	ATTTCACACC	4560
GCATACGTCA	AAGCAACCAT	AGTACGCGCC	CTGTAGCGGC	GCATTAAGCG	CGGGGGGTGT	4620
GGTGGTTACG	CGCAGCGTGA	CCGCTACACT	TGCCAGCGC	TTAGCGCCCG	CTCCTTCGC	4680
TTTCTTCCCT	TCCTTCTCG	CCACGTTGC	CGGCTTCCC	CGTCAAGCTC	AAATCGGGG	4740
GCTCCCTTA	GGGTTCCGAT	TTAGTGCCTT	ACGGCACCTC	GACCCCAAAA	AACTTGATTT	4800
GGGTGATGGT	TCACGTAGTG	GGCCATCGCC	CTGATAGACG	TTTTTTCGCC	CTTGACGTT	4860
GGAGTCCACG	TTCTTAAATA	GTGACTCTT	GTTCCAAACT	GGAACAAACAC	TCAACTCTAT	4920
CTCGGGCTAT	TCTTTGATT	TATAAGGGAT	TTTGCGATT	TCGGTCTATT	GGTAAAAAAA	4980
TGAGCTGATT	TAACAAAAAT	TTAACCGAA	TTTAAACAAA	ATATTAAACGT	TTACAATTIT	5040
ATGGTGCACT	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	TGCGCATAG	TTAACGCCAG	CCCGACACCC	5100
GCCAACACCC	GCTGACCGCG	CCTGACGGGC	TTGTCGCTC	CCGGCATCCG	CTTACAGACA	5160
AGCTGTGACC	GTCTCCGGGA	GCTGCATGTG	TCAGAGGTTT	TCACCGTCAT	CACCGAAACG	5220
CGCGA						5225

表40:pLCSK23(配列番号896)

1	GACGAAAGGG	CCTGCTCTGC	CAAGTGTACA	ACCAATTAAAC	CAATTCTGAT	TAGAAAAACT
61	CATCGAGCAT	CAAATGAAAC	TGCAATTAT	TCATATCAGG	ATTATCAATA	CCATATTTT
121	AAAAAAAGCCG	TTTCTGTAAT	GAAGGAGAAA	ACTCACCGAG	GCAGTTCAT	AGGATGGCAA
181	GATCCTGGTA	TCGGTCTCGC	ATTCCGACTC	GTCCAAACATC	AATAACACCT	ATTAATTCC
241	CCTCGTCAAA	AATAAGGTTA	TCAAGTGAGA	AATCACCATG	AGTGACGACT	GAATCCGGTG
301	AGAATGGCAA	AAGCTTATGC	ATTCTTTC	AGACTTGTTC	AACAGGCCAG	CCATTACGCT
361	CGTCATCAAA	ATCACTCGCA	TCAACCAAAAC	CGTTATTCAT	TCGTGATTGC	GCCTGAGCGA
421	GACGAAACAT	GCGATCGCTG	TTAAAAGGAC	AATTACAAAC	AGGAATTGAA	TGCAACCGGC
481	GCAGGAAACAC	TGCCAGCGCA	TCAACAAAT	TTTCACCTGA	ATCAGGATAT	TCTTCTAATA
541	CCTGGATATGC	TGTTTCCCG	GGGATCGCAG	TGGTGAGTAA	CCATGCATCA	TCAGGAGTAC
601	GGATAAAATG	CTTGATGGTC	GGAAAGGCCA	TAAATTCCGT	CAGCAGTTT	AGTCTGACCA
661	TCTCATCTGT	AAACATATTG	GCAACGCTAC	TTTGCCATG	TTTCAGAAAC	AACTCTGGCG
721	CATCGGGCTT	CCCATACAAAT	CGATAGATTG	TCGCACCTGA	ITGCCCGACA	TTATCGCGAG
781	CCCATTATA	CCCATATAAA	TCAGCATCCA	TGTTGAAATT	TAATCGCGC	CTCGAGCAAG
841	ACGTTTCCCG	TTGAATATGG	CTCATAACAC	CCCTTGATT	ACTGTTTATG	TAAGCAGACA
901	GTTTATTGAT	TCATGATGAT	ATATTTTAT	CTTGTGCAAT	TTAACATCAG	AGATTTTGGAG
961	ACACAAACGTG	GCTTCCCCCCC	CCCCCCCCCTG	CAGGTCTCGG	GCTATTCCTG	TCAGACCAAG
1021	TTTACTCTATA	TATACCTTAG	ATTGATTTAA	AACTTCATTI	TTAATTAAA	AGGATCTAGG
1081	TGAAGATCTT	TTTGATAAT	CTCATGACCA	AAATCCCTTA	ACGTGAGTTT	TCGTTCCACT
1141	GAGCGTCAGA	CCCCGTAGAA	AAGATCAAAAG	GATCTTCTTG	AGATCTTTT	TTTCTGCCG
1201	TAATCTGCTG	CTTGCACAAAC	AAAAAAACAC	CGCTACCGAG	GGTGGTTTGT	TTGCCGGATC
1261	AAGAGCTACC	AACTCTTTT	CCGAAGGTA	TCGGCTTCAG	CAGAGCGCAG	ATACCAAATA
1321	CTGTTCTCT	AGTGAGCG	TAGTTAGGCC	ACCACTCAA	GAACCTGTGA	GCACCGCTA
1381	CATACCTCGC	TCTGCTAAC	CTGTTACCA	TGGCTGCTGC	CAGTGGCGAT	AAGTCGTGTC
1441	TTACCGGGTT	GGACTCAAGA	CGATAGTTAC	CGGATAAGGC	GCAGCGGTG	GGCTGAACGG
1501	GGGGTTCGTG	CATACAGCCC	AGCTTGGAGC	GAACGACCTA	CACCGAAC	AGATACCTAC
1561	AGCGTGAGCT	ATGAGAAACG	GCCACGCTTC	CCGAAGGGAG	AAAGGCAG	AGGTATCCGG
1621	TAAGCGGCAG	GGTCGGAACA	GGAGAGGCCA	CGAGGGAGCT	TCCAGGGGGA	AACGCCGTG
1681	ATCTTATAG	TCTGTGCGG	TTTCCACACC	TCTGACTTGA	GCGTCGATTT	TTGTGATGCT
1741	CGTCAGGGGG	GGCGAGCCCA	TGGAAAAACG	CCAGCAACGC	GGCCTTTTA	CGGTTCCTGG
1801	CCTTTGCTG	GCCTTTGCT	CACATGTTCT	TTCTGCGTT	ATCCCCTGAT	TCTGTGGATA
1861	ACCGTATTAC	CGCCTTGAG	TGAGCTGATA	CCGCTGCCG	CAGCGAACG	ACCGAGCGCA

40

【0234】

【表 6 1】

1921 GCGAGTCAGT GAGCGAGGA CGCGAAGAGC GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGC
 1981 GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCACG ACAGGTTCC CGACTGGAAA GCAGGGCAGTG
 2041 AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTAGCTCA CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTT
 2101 TGCTTCCGGC TCGTAITGTG TGIGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTTCAC ACAGGAAACA
 2161 GCTATGACCA TGATTACGCC AAGCTTGGC GCCTTTTTT TGGAGATTT CAACATGAAG
 2221 AAGCTCCTCT TTGCTATCCC GCTCGTCGTT CCTTTTGTGG CCCAGCCGGC CATGGCCGAC
 2281 ATCCAGATGA CCCAGTCTCC ATCCTCCCTG TCTGCATCTG TAGGAGACAG AGTCACCATC
 2341 ACTTGCCGGG CAAGTCAGAG CATTAGCAGC TATTAAATT GGTATCAGCA GAAACCAGGG
 2401 AAAGCCCCA AGCTCCGTAT CTATGCTGCA TCCAGTTGC AAAGTGGGGT CCCATCAAGG
 2461 TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTC ACTCTCACCA TCAGCAGTCT GCAACCTGAA
 2521 GATTTGCAA CTTACTACTG TCAACAGAGT TACAGTACCC CTTTCACITI CGGCCCTGGG
 2581 ACCAACAGTGG ATATCAAAACG TGGTACCGTG GCTGCACCAT CTGTCCTCAT CTTCCCGCCA
 2641 TCTGATGAGC ACTTGAATAC TGGAACTGCC TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACCTCTAT
 2701 CCCAGAGAGG CCAAAGTACA GTGGAAGGTG GATAACGCC TCCAATCGGG TAACTCCAG
 2761 GAGAGIGTCA CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCCTGACG
 2821 CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCGT GCGAAGTCAC CCATCAGGGC
 2881 CTGAGTTCAC CGGTGACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT GTGCGGCCGC TGGTAAGCCT
 2941 ATCCCTAACCT CTCTCCCTCG TCTCGATCT ACCTGATAAC TTCACCGGT AACCGGTGAT
 3001 GAGAATTCAC TGGCCGTCGT TTTACACGT CGTGACTGGG AAAACCCCTGG CGTTACCCAA
 3061 CTTAAICGCC TTGCAAGCACA TCCCCCTTC GCCAGCTGGC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC
 3121 ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCAGCAGC CTGAATGGCG AATGGCGCT GATGCGGTAT
 3181 TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTCA CACCGCATAAC GTCAAAGCAA CCATAGTCTC
 3241 AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT
 3301 GACCGGCCCT GACAGGCTTG TCTGCTCCCG GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC
 3361 TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTCAC CCGTCATCAC CGAAACCGC GA

10

(実施例 4)

20

CDR の D o b b l i n g

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

(実施例 4 . 1)

H C C D R 1

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

30

【 0 2 3 5 】

40

【表 6 2】

表50-3-23におけるCDR1に関する多様性

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

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

50

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

【0236】

(実施例 4.2)

H C C D R 2

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

【0237】

【表 63】

表51:HC CDR2:多様性 = 419,904

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

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

(実施例 4.3)

H C C D R 3、長さ3、4、5

非常に短いC D R 3は、d o b b l i n gにより作製できる。表 7は、長さ3のC D R 3に対するいくつかの親配列を示す。94位において、多くのV H 3はA r gを有し、本発明者らはこの変化を許容したが、L y sは3倍可能性がある。95位において、FはJ H 1中のこの位置において見出される。本発明者らはS e r、T y r、A s pおよびA r gもまた許容して、小型、大型、正の電荷および負の電荷を許容する。96位において、J H 1はQを有する。QはG l uに非常に似ているので、本発明者らは、A r g、S e r、T y r、およびL e uに加えて、G l uを酸性代替物として許容する。97位において、H i sはJ H 1に由来する生殖系列A Aである。本発明者らは、負の電荷(D)、正の電荷(R)、低極性(S)、高疎水性(Y)および脂肪族化合物(L)を許容する。親配列は、ライブラリの最大4.5%をなすが、これは、C D R 1およびC D R 2における大きい多様性を組み合わせている。d o b b l i n gは、全部で360の配列を許容する。最も可能性の低い配列は、1792分の1で生じる。最も可能性の高い(親)配列は、約22分の1で生じる。
20

【0238】

10

20

30

40

40

【表64】

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

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

10

表61は、d o b b l i n gされた長さ3のHC CDR3を示す。ここで、K 94はW 103のように固定されている。本発明者らは、「親」Dセグメントアミノ酸を、他の許容されたAA型より5倍の可能性で作製した。

【0239】

【表65】

表61:D断片由来の長さ3のdoobblingされたHC CDR3(表7のV-3D1-1.1.2-JH1)。

(配列番号952として開示された'KTTG')

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

20

この実施例において(表62、表8のV-4JH2を使用する)、94はLysとして固定されている。95位において、JH2はTyrを有し、本発明者らは、許容されるSer、Asp、ArgおよびLeuを有し、その結果、抗原に適合するためにサイズ、電荷および疎水性を変更できる。JH2は96位にPheを有し、本発明者らは、Ser、Tyr、Asp、Arg、およびLeuを許容した。97位において、JH2はAspを有し、本発明者らは、Arg、Ser、Tyr、およびLeuを許容した。98位において、JH2はLeuを有し、本発明者らは、Ser、Tyr、AspおよびArgを許容した。このパターンは、750の異なる配列を許容し、親が最も可能性(1/18)が高い。最も可能性が低い配列は、4608分の1で生じ、または最も可能性が高い配列より可能性が256倍低い。

30

【0240】

【表66】

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

40

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

表63において、表8のV-4D3-10.1a-JH2のdoobblingがあった

50

。94位において、本発明者らは L y s および A r g を許容し、L y s (親) は A r g の4倍の可能性があった。95位において、D 3 - 1 0 . 1 a (すなわち、第1のリーディングフレーム中のD 3 - 1 0 であり、A A 1 から出発する) は L e u を有し、本発明者らは、同様に S Y D R を許容した。L e u は他のA A型個々の4倍の可能性である。96位において、D 3 - 1 0 . 1 a は同様に L e u を有し、本発明者らは、同じメニューを許容した。97位において、D 3 - 1 0 . 1 a は T r p を有し、本発明者らは、S e r 、T y r 、A s p および A r g を許容する。T r p は4倍の可能性である。98位において、D 3 - 1 0 . 1 a は P h e を有し、本発明者らは、同様に S e r 、T y r 、A s p および A r g を許容とする。

【0241】

10

【表67】

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

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

20

(実施例4.4)

長さ10から20のH C C D R 3

H C C D R 3

2つのサプライブドリ、双方とも長さ16のC D R 3を有する。

【0242】

【表 6 8】

表52:ライブラリ1:多様性=5E11、「親」配列は1/1.5E6で生じる。

(配列番号955として開示された 'KYYYDSSGYYYAEYFQHW')

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

表53:ライブラリ2:長さ16のCDR3;多様性は、3.0E10であり、親配列は

1/3.7E5で生じる。 (配列番号956として開示された 'KGYCSSTSCYTAEYFQHW')

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

【 0 2 4 3 】

10

20

30

【表 6 9】

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

表 6 5 は、配列番号：898 の d o b b l i n g による多彩化を示す。許容されたすべての多様性は 2 . 1 E 1 3 である。1 . E 8 、 3 . E 8 、 5 . E 8 、 1 . E 9 または 5 . E 9 を作製する合成は、多様性を適切にサンプリングするであろう。配列番号：898 の設計は上で述べた。配列番号：898 の d o b b l i n g において、 d o b b l i n g は、大部分の位置で他の A A 型を 3 倍上回る親 A A 型を許容することである。親が T y r である位置で、その場合、本発明者らは、 T y r および S e r を等量で使用し、 L e u はその頻度の 1 / 2 で使用する。C y s 残基は固定されている。個々の親 A A 型は許容され、 A r g 、 A s p 、 S e r 、 T y r または L e u (親が疎水性、例えば P h e である場合、 L e u は除かれることがある) の 1 つに進む。親配列は、 1 / 1 . E 8 のメンバーで生じる。最も可能性が低い配列は、 1 / 9 . 5 E 1 6 で生じる。ライブラリが実際に親配列を含有することは重要ではなく、親に似た配列を多数含有することだけが重要である。したがって、 H C C D R 1 、 H C C D R 2 、 L C C D R 1 、 L C C D R 2 および L C C D R 3 の多様性を組み合わせる場合、 1 . E 7 、 5 . E 7 、 1 . E 8 、 3 . E 8 、 1 . E 9 または 5 . E 9 を含有するライブラリは、多くの可変 A b を含有するライブラリを提供する。

【 0 2 4 4 】

10

20

30

【表70】

表65:配列番号898を親として有する設計1のdoubling
 (配列番号957として開示された 'KDYGYSSTSCYTYGYSYAEYFQHW')

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

(実施例4.5)

y y c a k G S G Y C S G G S C Y S F D Y w g q g t l v t v s s (配列番号: 93
 1) の d o b b l i n g

表80は、長さ15のH C C D R 3の例である、配列番号: 931のd o b b l i n gを示す。94位はF R 3の一部であり、一定に保たれる。95位および96位は高度に使用される(Y G D R S)のセットから選別される「親」アミノ酸型を有し、G 95およびS 96である。次の10の位置は、D 2 - 15 . 2 (ジスルフィド閉ループを含有する、中程度に良く使用されるDセグメント)から選別される。最後の3つの位置は、表3に示すように、J H 4の100位、101位および102位に由来する。個々の位置において、本発明者らは、親アミノ酸型を他の許容される型より3倍多く作製する。C y s 残基は固定されている。102eにおいて、P h eはY G S R Dより3倍可能性が高い(すなわち、P h eは、アミノ酸Y、G、S、RまたはDのいずれより3倍可能性が高い)。許容される多様性は、1 . 4 6 E 9である。親配列は、1 / 6 . 9 E 4で期待される。個々の1つずつ置換された配列はおそらく約1 / 3であり、二重に置換された配列は、おそらく1 / 9でありそのように続く。完全に他のA A型で構成された配列は、わずか1 / 1 . 1 E 1 1で発生する。

【0245】

表21の個々の他の配列は、同じ方法でd o b b l i n gできる。

【0246】

10

20

30

40

【表71】

表80: yyckakGSGYCSGGSCYSFDYwgqgtlvtvss (配列番号931)のdubbling
(配列番号958として開示された 'KGSGYCSGGSCYSFDYW')

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

(実施例5)

10

合成軽鎖の多様性

全抗体を作るために、重鎖のライプラリと軽鎖(LC)のライプラリとを組み合わせる必要がある。天然Abにおいて、HCが結合の大部分を行っており、多くのライプラリはLCにほとんど注目していない、またはLCの多様性をヒトドナーから得ていることは、しばしば観察されることである。十分な多様性を有し、ほとんどすべての標的に対する優れたバインダーを得るために、本発明者らは、ヒト免疫系が通常に提供する多様化プログラムを超える多様化プログラムを設計した。にもかかわらず、このプログラムは、天然Abに見られるのと同様の変化を有する、完全に機能性のLCを若干多く得るために設計された。V I I I A 2 7を、LCとして選別した。

【0247】

20

提供されたおよびLCを含むライプラリから、1266のAbのコレクションを打ち込んだ。VKIIIの中で、A 2 7は最も多くみられ(表66)、HC 3-23と良く対応する。

【0248】

30

A 2 7のCDRは12、7、および9個のアミノ酸を含有する。これらの位置すべてに多様性を加えることは、うまく機能しない恐れがあり、: a)多くの不安定または非機能性のメンバーが存在する恐れがある、およびb)いくつかの位置において、多様性が結合を改善する助けにならない恐れがある。本発明者らは、可変位置の数を28から16に減らした。

【0249】

40

本発明者らは、A 2 7 LCを有する1QLRの3D構造を研究した。1QLRの構造は、RCDBタンパク質データベースにおいて公的に利用可能である。このことから、表68に示された残基は、変化させるのに有効と思われる。T 5 6は、HC CDR3においてHisから約10である。5 6での変化は有用であり得る。G 2 4は、HC CDR3において原子からわずか約7である。生殖系列はR 2 4であり、したがって2 4での変化は有用であり得る。

【0250】

表69は、本発明者らがpMID21において使用するために設計したディスプレイカセットを示す。したがって、選別された制限酵素はpMID21に他の部位を有さない。SpeIはiiiシグナル配列中にあり、全LCの挿入および除去を可能にする。Xma

50

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

【0251】

本発明者らは155のA27配列を収集し、CDRにおいて起こっていることを分析した。表70は分析結果を示す。表70において、本発明者らのライブラリ由来のAb中に発見されたもの、および本発明者らが個々の位置に置いたと思われるものを示す。

【0252】

【表72】

10

! 表68: A27の変異場所

	22	3	3	5	5	89	.	9
	45	0a	4	0	5	90		5
! IQLR	GASQSVS_NYLA	DASSRAT	QQYGSSPLT					
! A27	RASQSVSSSYLA	GASSRAT	QQYGSSPLT					

GASQSVSは、(配列番号922) NYLA(配列番号959)である

DASSRATは、(配列番号923)である

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

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

表68は、A27のCDRが多様化される場所を示す。

20

【0253】

【表 7-3】

表67:VKIII AA配列の比較

VK3 [は(配列番号927)]である
A27 [は(配列番号960)]である
A11 [は(配列番号961)]である
L2 [は(配列番号962)]である
L16 [は(配列番号962)]である
L6 [は(配列番号963)]である
L20 [は(配列番号964)]である
L25 [は(配列番号965)]である

C D R 1

R 2 4、A 2 5 および S 2 6 は結合部位から遠すぎて役に立たず、一定に保たれた。V 2 9 の側基は埋もれており、この位置は V a 1 として一定に保たれていた。他の位置において、Y または S および 帯電したフリップフロップ (R E または R D、問題の位置においてサンプルがより多くの E または D を有する場所に依存する) ならびに頻繁に見られた他の型を許容した。Excel のスプレッドシートを使用して、多彩化のこのパターンは、「他の」AA が 5 % 置換された場合、親配列は 0 . 8 %、「他の」AA が 6 . 5 % 置換された場合、親配列は 0 . 1 %、「他の」AA が 9 % 置換された場合、親配列は 0 . 0 2 % 得られることを決定した。155 のサンプルのうち、17 が、欠失された AA (1QLR を含む) を 1 つ有し、したがって、メンバーの約 8 % において S30a が欠失されるよう

VK3は、A27とE1D、G9A、I58V、D60A、R77Sが異なる。

A27とL6とは、G9a(FR1)、Δ31a(CDR1中)、G50D(CDR2)、S53N(CDR2)、G92S(CDR3)、S93N(CDR3)、S94W(CDR3)が異なる。

10

20

30

40

50

に構成できる。

【0254】

C D R 2

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

10

【0255】

C D R 3

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

20

【0256】

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

【0257】

他の生殖系列はサンプル中に存在しなかった。

【0258】

【表74】

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

10

20

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

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

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

30

【0259】

【表75】

FR1----- CDR1-----
 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
 L13 S P G E R A T L S C23 R24 A S Q
 91 |ctg|tct|ccg|ggt|gaa|cgt|gct|acG|CTg|AGC|tgt|cgt|gct|tct|caa|
 BlpI....

CDR1----- FR2-----
 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 S28 V S S S30a Y L A34 W Y Q Q K P G
 136 |tcc|gtt|agC|TCC|TCt|tat|tta|gct|tgg|tat|cag|caa|aag|ccg|ggt|
 BseRI...

FR2----- CDR2-----
 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 Q A P R45 L L I Y G50 A S S R A T56
 181 |caa|gct|CCG|CGG|ctg|ttg|atc|tat|gg|gc|tct|agt|cgt|gct|act|
 SacII..

FR3-----
 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
 G I P D60 R F S G S65 G S G T D F
 226 |ggc|atc|cct|gat|cgt|ttc|tct|ggc|tct|ggc|TCC|GGA|acc|gat|ttc|
 BspEI..

FR3-----
 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105
 T L T I S R L E P E D F A V Y
 271 |act|ctg|acc|att|tct|CGT|CTC|GAG|ccg|gaa|gat|ttc|gct|gtc|tac|
 BsmBI..
 XhoI...

FR3---- CDR3----- FR4-----
 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
 Y C Q89 Q Y G S S P95 L T F G G G
 316 |tat|tgt|caa|cag|tat|gg|tct|agt|ccg|ctg|act|ttc|gg|GGT|
 KpnI...

FR4-----
 121 122 123 124 125 126
 T K V E I K
 361 |ACC|aaa|gtc|gaa|atc|aag
 KpnI.

Oκ -----
 R G T V A A P S V F I F P P S
 379 cgt gga act gtg gCT GCA Cca tct GTC TTC atc ttc ccg cca tct
 BsgI.... BbsI...

D E Q L K S G T A S V V C L L
 424 gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg
 .

N N F Y P R E A K V Q W K V D
 469 aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat
 .

N A L Q S G N S Q E S V T E Q
 514 aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag
 .

【表76】

```

!
!      D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T   L   T   L
559    gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg act ctg

!
!
!      S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E   V
604    tcc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa GTC TAC gcc tgc gaa gtc

!
!
!      T   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R
649    acc cat cAG GGC CTg agt tCA CCG GTG aca aag agc ttc aac agg
          AlwNI..... SgrAI.....
          EcoO109I.(2/2) AgeI.....
!
!
!      G   E   C   .   .
694    gga gag tgt taa taa

!
!
709           GG CGCGCCaatt
!
!
          AscI.....
          BssHII.

```

10

表70:A27 AbのCDR1における突然変異の集計

CDR1 (配列番号925として開示された'RASQSVSSSYLA')		
R24 1, 3G, 1T, 151-,	固定	
A25 2, 3T, 152-,	固定	
S26 3, 1R, 154-,	固定	20
Q27 4, 3E, 1H, 1L, 1P, 4R, 145-,	9% ERYSL	
S28 5, 1A, 2F, 2G, 1I, 2L, 5N, 1P, 1R, 10T, 1V, 1Y, 128-,	9% NTYERL	
V29 6, 1F, 19I, 6L, 129-,	固定	
S30 7, 2A, 2D, 8G, 2H, 1I, 11N, 9R, 6T, 4V, 2Y, 108-,	9% DNRTY	
S30a 8, 1A, 2F, 6G, 1H, 6N, 1P, 10R, 6T, 3Y, 119-, (8%は30aを欠失)	9% GNRTYD	
S31 9, 1A, 5D, 3F, 4G, 1H, 2I, 4K, 1L, 31N, 19R, 7T, 7Y, 70-,	9% DFGNRTY	
Y32 10, 5F, 1K, 14L, 4N, 4Q, 2R, 8S, 3V, 1W, 113-,	9% FDLNQRSY	
L33 11, 16A, 1F, 4I, 1N, 1S, 8V, 1Y, 123-,	固定	
A34 12, 2G, 2L, 1N, 1S, 4V, 128-,	9% SY	
- 13, 2A, 1G,		
- 14, 1S,		
- 15, 1S,		
- 16, 1Y,		
- 17, 1L,		
- 18, 1A,		30

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

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

【0261】

【表77】

T56 7, 10A¹, 1G, 1H, 2P, 4S, 137-, 9% ERSY
 - 8, 1A, 6T,

注:AAが1個挿入された抗体は7つである。

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

(配列番号966として開示された'QQYGSSPLT')

Q89	1, 5H, 1L, 2M, 147-,	固定	
Q90	2, 1E, 1F, 13H, 2K, 2L, 4R, 1S, 1Y, 130-,	固定	
Y91	3, 2A, 8F, 2G, 2H, 1L, 1P, 13R, 4S, 122-,	9% FERS	
G92	4, 10A, 3D, 2H, 1I, 1L, 2N, 6R, 12S, 2V, 3Y, 108-, 5-,	9% ADRSTY	
S93	5, 1A, 2D, 2F, 6G, 2H, 3I, 2K, 2M, 14N, 1P, 8R, 17T, 2Y, 86-, 6-, (8%は93を欠失)	9% DFNRTY	
S94	6, 3A, 6F, 1I, 3L, 3P, 2R, 2T, 11W, 117-, 7-,	9% WERYS	10
P95	7, 2A, 1E, 1G, 1K, 3L, 1M, 7R, 3S, 3T, 1V, 108-, 24-,	9% ERYS	
L96	8, 2A, 2E, 3F, 3G, 1H, 1I, 3K, 7L, 2M, 24P ² , 6Q, 28R, 3S, 3T, 7V, 2Y, 58-,	9% ERPYS	
T97	9, 2A, 1F, 2G, 3I, 1K, 2L, 3M, 1N, 1R, 6S, 3V, 2Y, 128-, - 10, 1A, 1S, 34-, - 11, 1S, 7-, - 12, 1A,	固定	

3個のAAが挿入されたAbは1つである。

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

表71:A27:JK4のCDR1、2および3の許容される多様性。

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

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

¹これらのうち7つは挿入によってもたらされる

²これらのうちいくつかは、挿入により出現する。

【0262】

【表78】

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

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

【0263】

20

30

40

50

单一置換の配列は、1 . 1 E - 5 から 7 . 5 E - 6 の確率である。

【0264】

親 A A を 1 つも有さない配列は、1 / 6 . 7 E 1 6 で起こる。

【0265】

許容される多様性は、約 2 . 3 5 E 1 2 である。

【0266】

【表79】

表75:HC CDR3におけるアミノ酸の頻度

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

10

20

【0267】

30

【表 8 0】

表76:HC CDR3の長さの分布

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

10

20

30

表77:Dセグメントの利用(カットオフは0.70の一一致)

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

【 0 2 6 8 】

40

【表 8 1】

5-5.3	18	GYSYGY	786	
6-13.1	18	GYSSSWY	215	
5-12.3	13	GYSGYDY	205	
6-13.2	10	GIAAG	216	
1-26.3	9	YSGSYY	284	
2-15.2	9	<u>GYCSGGSCYS</u>	136	
4-4.3	9	TTVT	190	
3-10.2	8	YYYGSGSYNN	81	
1-1.3	7	YNWND	262	10
4-4.2	7	DYSNY	754	
2-2.2	6	GYCSSTSCYT	70	
3-16.2	6	YYDYVWGSYRYT	104	
6-6.1	6	EYSSSS	212	
6-19.2	6	GIAVAG	219	
3-9.1	5	VLRYFDWLL@	179	
4-23.2	5	DYGGNS	198	
6-6.2	5	SIAAR	213	
1-7.3	4	YNWNY	270	
2-2.3	4	DIVVVPAAI	168	
4-23.3	4	TTVVT	199	20
1-7.1	3	GITGT	268	
1-26.1	3	GIVGAT	282	
7-27.3	3	NWG	223	
3-10.1	2	VLLWFGELL@	182	
3-10.2	2	ITMVRGVII	183	
5-5.1	2	VDTAMV	200	
5-5.2	2	WIQLWL	201	
5-12.1	2	VDIVATI	203	
5-24.3	2	RDGYNY	211	
1-1.1	1	GTTGT	260	
2-21.3	1	HIVVVTAI	175	30
3-3.3	1	ITIFGVVII	178	
5-24.2	1	*RWLQL	210	
6-6.3	1	V*QLV	214	
6-19.3	1	V*QWLV	220	

表 78: D セグメントの利用 (カットオフは 0.667 の一致)

名前	番号	配列	配列番号	%
なし	935			0.517

【 0 2 6 9 】

【表 8-2-1】

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

10

20

30

【表 8 2 - 2】

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

10

表 78: JH セグメントの利用

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

(実施例 6)

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

20

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

30

【 0 2 7 0 】

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

40

【 0 2 7 1 】

【表 8 3】

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

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

10

【0 2 7 2】

【表 8 4】

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

20

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

".." = TGAまたはTAA; "b" = TAG

30

配列番号970として開示されたアミノ酸

配列番号969として開示されたDNA配列

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

名目塩基純度 = 0.7300 他 = 0.0900

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

50

【0 2 7 3】

【表 8 5】

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

最も可能性の高い配列の有する頻度 = 4.8E-05

終止コドンを含まない分画 = 5.5E-01

(TAAおよびTGA)を含まない分画 = 7.4E-01

10

【0 2 7 4】

20

【表 8 6】

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

分画%の総計 21.65 49.34 29.01

!表800: LC K1(O12)::JK1

!配列番号972として開示されたアミノ酸

配列番号971として開示されたDNA配列

```
! ..リーダー配列. ->|----- FR1 ----->
!                               1  2   3   4   5   6   7   8   9   10  11
!      G   V   H   S   A   Q   D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L
1     |ggT|GTA|CAC|aGT|GCT|Cag|gat|att|cag|atg|act|caa|tct|ccC|TCG|AGt|ctg|
      BsrGI... ApALI...                                         XhoI....
```

30

```
! ----- FR1 ----->|--- CDR1 -->
!      12  13  14  15  16  17  18  19  20  21  22  23  24  25  26
!      S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S
46    |tct|gct|tct|gtc|gGC|GAT|CGC|gtt|act|att|act|tgt|cgt|gct|tcc|
      SgfI.....
```

30

```
! ----- CDR1 ----->|--- FR2 ----->
!      27  28  29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39  40  41
!      Q   S   I   S   S   Y   L   N   W   Y   Q   Q   K   P   G
91    |cag|tcc|att|tct|agc|tat|ctg|aat|tGG|TAC|Cag|caa|aag|ccg|ggt|
      KpnI....
```

40

```
! ----- FR2 ----->|--- CDR2 ----->|
!      42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54  55  56
```

【表 8 7】

10

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

表900:CDR1の多様性 (配列番号973)

20

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

表1000:大型のCDR1の多様性

30

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

【 0 2 7 6 】

【表 8 8】

表1100:CDR2の多様性								
位置	50	51	52	53	54	55	56	多様性
O12	A	A	S	S	L	Q	S	.
多様性	2	1	1	3	1	2	2	24
許容	D		N		E	T		
			T					

10

表1200:大型のCDR2の多様性								
位置	50	51	52	53	54	55	56	多様性
O12	A	A	S	S	L	Q	S	.
多様性	4	1	4	6	1	4	5	1920
許容	D		E	N		E	T	
	R		R	T		R	Y	
	Y		Y	E		Y	R	
				R			E	
				Y				

20

表1300:CDR3の多様性										
位置	93	94	95	96	97	98	99	100	101	div. tot.
O12	Q	Q	S	Y	S	S	P	W	T	.
多様性	2	2	6	3	3	5	2	1	1	2160
許容	L	K	Y	D	N	T	S			
			H	N	Y	L				
			F			Y				
			A			F				
			D							

30

表1400:大型のCDR3の多様性										
位置	93	94	95	96	97	98	99	100	101	div. tot.
O12	Q	Q	S	Y	S	S	P	W	T	.
多様性	6	1	7	7	6	5	2	6	1	105840
許容	L		Y	D	N	T	S	F		
	E		H	N	Y	L		Y		
	R		F	R	D	Y		H		
	Y		A	A	R	F		L		
	A		D	L	A	E		I		
			R	S		R				

40

(実施例 7)

合成 H C C D R 3 のさらなる例

F A B - 3 1 0 または F A B - 4 1 0 のライプラリから選択された異なる C D R 3 を有し、少なくとも 1 種の抗原に対して E L I S A であった、2 2 , 0 6 3 の F a b のコレクションを検査した。 J H 鎖の利用を、表 1 0 0 1 に示す；個々の J H の F R 4 部分を太字で示す。表 1 0 1 0 は、H C C D R 3 におけるアミノ酸の利用を示す。表 1 0 2 0 は、C D R 3 の長さの分布を示す。長さの中央値は 1 1 . 5 である。

【 0 2 7 7 】

50

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

【0278】

10

VまたはV：：DがJに接合される場合、VまたはV：：Dの3'末端およびJの5'末端が多くの場合編集されている。多数のCDR3-FR4配列の調査により、多くの場合、CDR3の一部を構成するJHの一部が存在することが示される。多くの場合、JH残基1~9に対応するCDR3残基において、突然変異が存在する。本明細書において、JHに由来すると思われるCDR3の一部は、「Jstump」と呼ばれる。重鎖に使用されるJHは、6から20位の6つのJH鎖の個々の残基と、CDR3の最後の4個のアミノ酸とFR4との融合を比較することによって決定される。不一致が最も少ないJHを選択する。CDR3配列を、Jstumpに関して、9位からCDR3と比較した選択されたJHの第1の位置へ、検索が、a) JHの末端、b) CDR3の末端またはc) 2つの連続する不一致により終了するまで、選択されたJHにおいて逆に働くことによって検査した。鎖の末端の1つと、最後の比較位置が一致する場合、その場合Jstumpに含まれる。一致しない場合は、Jstumpに含まれない。表1070は、いくつかの例を示す。CDRは上に記載し、JHは下であり、Jstumpは下線を引いてある。1070Aにおいて、本発明者らは、9位から始め、VはVに一致し、本発明者らは、一致する6位へと続けた。検索は、二重の不一致のため、4位で停止する。GMDV(配列番号974)はJstumpの蓄積内となり、GLは「リードイン」の蓄積内となる。1070Bにおいて、検索はJH6の末端で停止する。下線の残基は、Jstumpの蓄積内となり、EPIWG(配列番号975)はリードインの蓄積内となる。1070Eにおいて、検索はJH4の末端のため終了するが、被験最終残基(CDR中のD対JH4中のY)は不一致であり、それ故、JstumpはFDSであり、DSGVVAAAD(配列番号976)はリードインの蓄積内となる。

20

【0279】

30

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

40

【0280】

【表 8 9】

表1070:Jスタンプの割当ての例

A)			
6	GLGMDV	(配列番号977)	
JH6	YYYYYGM D VWQGQGTTTVSS	(配列番号3)	
	123456789		
B)			
13	EPIWG Y YYGM D V	(配列番号978)	
JH6	YYYYYGM D VWQGQGTTTVSS	(配列番号3)	
C)			
9	DFFTSYFD Y	(配列番号979)	10
JH4	-----YFD Y WGQGTLVTVSS	(配列番号1)	
D)			
12	DRGVSLLGAFDI	(配列番号980)	
JH3	-----AFDIWGQGTMVTVSS	(配列番号2)	
E)			
12	DSGVVAAAD FDS	(配列番号981)	
JH4	-----YFD Y WGQGTLVTVSS	(配列番号1)	
	6789		

表1082は、個々のJ HのJ s t u m pにおけるアミノ酸の使用分布を示す。最も一般的なJ HはJ H 3、J H 4およびJ H 6であるので、これらはライプラリ構築にとって好ましいJ Hである。表1082は、C D R 3においてテトラペプチド配列A F D I (配列番号986)を保有するJ H 3の例が最も多いことを示す。J H 4では、多数がD Yを保有し、大型の分画がC D R 3において配列F D Yを保有する。J H 6では、大多数が配列D Vを保有し、多数が配列M D Vを保有し、かなりの分画が配列G M D V (配列番号974)を保有する。配列Y G M D V (配列番号982)、Y Y G M D V (配列番号983)またはY Y Y G M D V (配列番号984)を保有する分画も少なくない。

【0281】

5.001(表1097)などのライプラリが、本発明のライプラリに含まれる。ライプラリ5.001は、本出願の他所に記載のように、L CおよびH C C D R 1~2を含有する。このライプラリは、H C V H (例えば、3-23)、続いて表1097に示される割合で[G S R D L Y]を許容する6、7または8個のアミノ酸を含有する。J s t u m pにおいて、親アミノ酸は、「他の」アミノ酸型の3、4、5、6、7、8、10倍で存在する。「他の」アミノ酸型は、Y、S、D、R、Gを含む。したがって、A 6において、本発明者らは、7/12のAならびに個々に1/12のY、S、D、R、およびGを許容する。F 7において、本発明者らは、7/12のFならびに個々に1/12のY、S、D、RおよびGを許容する。D 8において、本発明者らは、7/11のDならびに1/11のY、S、R、およびGを許容する。I 9において、本発明者らは、7/12のIならびに1/12のY、S、R、D、Gを許容する。親アミノ酸は、他のアミノ酸型より5、6、7、8、10倍可能性が高い。

【0282】

表1097のライプラリ5.002が、本発明のライプラリに含まれる。このライプラリは、長さ13、14および15のC D R 3を含み、Dセグメントは含まない。G、S、R、D、L、またはYを1:0.57:0.46:0.42:0.36:0.35の比率で、またはそれらに対して合理的な近似で許容する6、7、8個のリードイン残基が存在する。C D R 3は、J H 6の一部分：Y Y Y G M D V (配列番号984)で完了する。親配列Y Y Y G M D V (配列番号984)をコードするD N Aは、親アミノ酸を用いて他より5、6、7、8または10倍高い可能性で合成される。

【0283】

表1097のライプラリ5.003は、本発明のライプラリに含まれる。F R 3の後に、G、S、R、D、L、Yを1.0:0.57:0.46:0.42:0.36:0.35の比率で許容する4、5、または6個のリードイン残基が続く。次に来るのは、Dセグ

20

30

40

50

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

【 0 2 8 4 】

表 1097 のライブラリ 5 . 0 0 4 は本発明の一部である。示した比率で G S R D L Y を許容する 2、3 または 4 個のリードイン残基が存在する。配列 G Y S S G W Y (配列番号 218) をコードする DNA は、親アミノ酸が他より 6 倍であるように合成され、2 つの DJ - フィラー残基は、1 . 0 : 0 . 5 7 : 0 . 4 6 : 0 . 4 2 : 0 . 3 6 : 0 . 3 5 の比率で許容される G S R D L Y により許容される。AFDI (配列番号 986) をコードする DNA は、他より 6 倍の親アミノ酸を用いて合成される。

10

【 0 2 8 5 】

ライブラリ 5 . 0 0 5 は本発明の一部である。ライブラリ 5 . 0 0 5 は、長さ 11 ~ 14 の CDR3 を有するメンバーを含む。FR3 の後に、示した比率で G S R D L Y を許容する 0、1、または 2 個のリードイン残基が存在し、親アミノ酸が、他の許容された型より 6 倍であるように Y G S R D を許容する変動性のある親配列 G Y S S G W Y (配列番号 218) をコードする DNA が後に続く。D 領域の後に、G S R D L Y を示した比率で許容する 0 または 1 個の DJ フィラー残基がある。最後に、他の許容された型より 6 倍可能性が高い親アミノ酸により Y G S R D を許容する、Jstump (配列 : YFDY (配列番号 985)) に変動性を有する JH3 がある。

20

【 0 2 8 6 】

表 1097 のライブラリ 5 . 0 0 6 は、本発明の一部である。CDR3 は長さ 19 ~ 25 であってよい。示した比率で G S R D L Y を許容する 0 から 3 個のリードイン残基がある。リードインの後に D 領域 2 - 2 . 2 がある。2 - 2 . 2 をコードする DNA は、2 つの CyS 残基が固定されていることを除いて、親アミノ酸が、他 (つまり Y G S R D) より 6 倍可能性が高いように合成される。2 - 2 . 2 の後に、G S R D L Y を示した比率で許容する 0 から 3 個の DJ フィラー残基がある。JH6 の最初の 9 個の残基をコードする DNA は、親アミノ酸ならびに YSGDR を許容し、親の型は他より 6 倍可能性が高い。

【 0 2 8 7 】

【 表 9 0 】

30

表1001:JHの利用

JH	数	%	11111111112 12345678901234567890	配列番号
JH1	1356	6.15	---AEYFQHWGQGTLTVSS	66
JH2	1720	7.80	---YWYFDLWGRGTLTVSS	67
JH3	5601	25.39	-----AFDIWGQGTMVTVSS	2
JH4	7658	34.71	-----YFDYWGQGTLTVSS	1
JH5	1062	4.81	----NWFDPWGQGTLTVSS	68
JH6	4666	21.15	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	3
総計	22063			

【 0 2 8 8 】

40

【表 9 1】

表1010:HC CDR3におけるアミノ酸の利用

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

10

20

【 0 2 8 9 】

【表 9 2】

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

10

20

30

40

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

【0 2 9 0】

【表 9 3】

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

10

20

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

30

40

【0 2 9 1】

【表 9 4】

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

10

20

30

40

【0 2 9 2】

【表 9 5】

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

10

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

20

30

40

【0 2 9 3】

【表 9 6】

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

10

表 1050: Dセグメントを含まないリードインにおけるアミノ酸の利用

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

20

30

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

40

【0 2 9 4】

【表 9 7】

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

【0 2 9 5】

【表 9 8】

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

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

【0 2 9 6】

10

20

30

40

【表 9 9】

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

10

【0 2 9 7】

【表 100】

名前	配列	配列番号	長さ
1-1.1	GTTGT	156	3
1-1.2	VQLER	157	4
1-1.3	YNWNND	158	5
1-7.1	GITGT	159	6
1-7.3	YNWNWY	161	7
1-26.1	GIVGAT	164	8
1-26.2	V*WELL	165	9
1-26.3	YSGSYY	166	10
2-2.2	GYCSSTS ^Y CYT	70	11
2-2.3	DIVVVPAAI	168	12
2-8.2	GYCTNGV ^Y CYT	115	13
2-8.3	DIVLMVYAI	170	14
2-15.2	GYCGGGSCYS	136	15
2-15.3	DIVVVVAAT	172	16
2-21.2	AYCGGGDCYS	174	17
2-21.3	HIVVVTAI	175	18
3-3.1	VLRFLEWL ^Y Y	176	19
3-3.2	YYDFWSGYYT	177	20
3-3.3	ITIFGVVII	178	21
3-9.1	VLRYFDWLL@	179	22
3-9.2	YYDILTGYYN	180	23
3-10.1	VLLWFGE ^L LL@	182	24
3-10.2	YYYGSGSY ^N	81	25
3-10.2	ITMVRGVII	183	26
3-16.2	YYDYVWG ^S YRYT	104	27
3-16.2	IMITFGGVVI	185	28
3-22.2	YYDSSGYYY	187	29
3-22.3	ITMIVVIT	188	30

【0298】

【表 101】

名前	配列	配列番号	長さ														
			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
4-4.2	DYSNY	192	0	0	0	0	0	3	3	4	6	14	4	7	4	10	6
4-4.3	TTVVT	190	0	0	0	0	2	4	11	19	23	19	25	19	10	11	9
4-17.2	DYGDY	195	0	0	2	6	12	8	38	40	48	47	50	40	29	21	10
4-23.2	DYGGNS	198	0	0	0	0	0	0	2	7	4	5	17	4	8	5	1
4-23.3	TTVVT	199	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	2	1	2	0
5-5.1	VDTAMV	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	8	1	3	2	0
5-5.2	WQQLWL	201	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	3	1	4	3	3
5-5.3	GYSYGY	202	0	0	0	0	1	6	9	20	43	29	27	22	32	26	27
5-12.1	VDIVATTI	203	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	4	0	2	1
5-12.3	GYSGYDY	205	0	0	0	0	4	10	13	15	19	15	22	27	16	15	9
5-24.1	VEMATI	209	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	6	0	0	0	0
5-24.2	*RWLQL	210	0	0	0	0	1	0	3	1	3	2	2	1	2	2	2
5-24.3	RDGYNY	211	0	0	0	0	0	0	0	1	8	12	6	7	3	2	1
6-6.1	EYSSSS	212	0	0	0	0	0	0	9	7	16	19	13	2	4	2	
6-6.2	SIAAR	213	0	0	1	1	0	17	8	7	13	17	6	16	16	7	
6-6.3	V*QLV	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
6-13.1	GYSSSWY	215	0	0	0	0	1	6	11	35	40	56	44	50	42	35	
6-13.2	GIAAAG	216	0	0	0	0	1	2	18	14	15	20	20	15	16	14	11
6-19.1	GYSSGWWY	218	0	0	0	0	1	1	4	27	57	58	48	52	45	35	30
6-19.2	GIAVAG	219	0	0	0	0	1	1	0	7	8	20	8	13	16	8	10
6-19.3	V*QWLV	220	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
7-27.1	LTG	221	0	0	1	0	2	8	12	7	14	11	17	17	24	24	31
7-27.3	NWG	223	0	0	1	2	11	6	5	10	6	7	5	7	1	0	
なし			36	153	118	660	726	1007	2063	2463	1851	1596	1502	1075	874	681	609

表 1060b Hc CDR3 の長さ 対 長さ18～32に關してどの(もししあれば)Dセグメントが発生するか

名前	配列	配列番号	長さ														
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1-1.1	GTTGT	156	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-1.2	VQLER	157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【0299】

【表 102】

名前	配列	配列番号	長さ													
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1-1.3	YNWNND	158	6	5	3	4	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1-7.1	GITGT	159	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1-7.3	YNWNWY	161	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1-26.1	GIVGAT	164	0	0	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1-26.2	V*WELL	165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-26.3	YSGSYY	166	14	11	9	8	6	3	3	0	3	1	0	0	0	0
2-22	GYCSSTSCTY	70	11	7	2	10	11	4	2	0	0	0	1	0	0	0
2-2.3	DIVVVPAAI	168	2	6	3	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
2-8.2	GYCCTNGVCYT	115	3	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2-8.3	DIVLMVYAI	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15.2	GYCGGGSCYS	136	20	10	7	4	8	9	3	0	0	0	0	0	0	0
2-15.3	DIVVVVAAT	172	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2-21.2	AYCGGGDCYS	174	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-21.3	HIVVVTAL	175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-3.1	VLRFLEWLLY	176	6	2	4	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3-3.2	YYDFWSGYYT	177	82	97	104	67	61	32	23	7	3	4	0	0	2	1
3-3.3	ITIFGVVII	178	3	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-9.1	VLRYFDWLL@	179	7	2	2	6	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
3-9.2	YYDILTGYYN	180	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-10.1	VLLWFGEI@	182	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-10.2	YYYGSGSYNN	81	15	10	8	7	6	3	2	1	1	0	0	0	0	0
3-10.2	ITMVRGVII	183	3	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-16.2	YYDYVWGSYRYT	104	11	11	14	10	18	13	5	2	2	0	0	1	0	0
3-16.2	IMITFGGGVM	185	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-22.2	YYDSSGGYY	187	77	54	28	22	18	8	1	2	1	1	0	0	0	0
3-22.3	ITMIVVVIIT	188	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-4.2	DYSNY	192	7	2	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4-4.3	TTVT	190	4	2	2	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4-17.2	DYGDY	195	17	7	8	3	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0
4-23.2	DYGGNS	198	3	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【0300】

10

20

30

40

【表 103】

名前	配列	配列番号	長さ													
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
4-23.3	TTVVT	199	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-5.1	VDTAMV	200	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-5.2	WQLWL	201	3	3	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
5-5.3	GYSYGY	202	13	18	7	2	2	6	0	0	2	0	0	0	0	0
5-12.1	VDIVATI	203	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-12.3	GYSGYDY	205	11	10	6	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5-24.1	VEMATI	209	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-24.2	*RWLQL	210	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-24.3	RDGYNV	211	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-6.1	EYSSSS	212	9	3	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6-6.2	SIAAR	213	2	3	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-6.3	V*QLV	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-13.1	GYSSSWY	215	24	22	17	4	5	1	3	2	0	0	1	0	0	0
6-13.2	GIAAAG	216	10	4	2	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6-19.1	GYSSGWY	218	23	25	13	7	7	3	0	2	1	0	1	0	0	0
6-19.2	GIAVAG	219	6	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
6-19.3	V*QWLVL	220	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7-27.1	LTG	221	29	23	12	9	7	4	3	1	0	1	0	0	0	0
7-27.3	NWG	223	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
なし		339	217	198	85	60	36	27	13	9	2	1	0	0	1	0

【0301】

【表 104】

JH1 ---AEYFQIHWGQQGTLVTVSS 6.15%											
(配列番号 66)											
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N
4	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	1	64	0	6	0	1	0	0	0
6	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	2
7	1	0	1	0	363	3	1	0	0	0	1
8	8	0	59	23	4	17	11	3	5	19	0
9	2	1	13	2	13	3	447	19	2	6	3
JH2 ---YWYFDLWGRGTLVTVSS 7.80%											
(配列番号 67)											
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	2	0	2	11	0	0	1	0	0
6	3	2	9	0	40	5	7	4	1	9	0
7	1	6	1	0	1209	2	6	23	0	89	30
8	31	2	1241	90	4	38	30	3	1	0	1
9	3	1	9	3	34	2	26	17	5	1064	36
JH3 ---AFDIWGQQGTMVTVSS 25.4%											
(配列番号 2)											
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N
6	4374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	4	0	1	4612	2	0	8	0	56	3
8	23	0	4765	51	0	28	14	0	3	0	15
9	7	5	5	0	73	2	1	4439	4	64	43

【0302】

【表 1 0 5】

JH4 ---YFDYWGQQGTLVTVSS 34.7%																						
	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	—	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1975	5683	
7	9	1	10	7	3950	31	6	26	0	109	4	5	24	4	5	35	7	28	16	59	3322	
8	26	0	5991	32	5	91	19	2	1	6	1	21	7	0	8	13	3	6	2	14	1410	
9	5	18	17	0	119	2	0	0	14	0	2	64	15	16	10	216	11	3	6	6317	823	
JH5 ---NWFDPWGQQGTLVTVSS 4.8%																						
	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	—	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	764	
6	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	644	0	390
7	1	1	0	0	768	2	1	1	0	13	0	0	0	0	1	0	0	2	0	4	244	
8	2	0	810	3	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	218	
9	3	0	3	0	3	0	3	0	0	4	0	4	814	1	0	14	2	0	0	0	187	
JH6 YYYYGGMDWGGTTTVSS 21.1%																						
	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	—	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	690	3967	
2	4	0	15	0	16	31	12	2	1	4	0	8	7	4	14	18	7	4	1	1694	2815	
3	3	0	19	3	14	23	16	1	5	9	0	16	9	5	12	20	4	1	4	2440	2053	
4	4	0	14	2	31	16	25	3	2	10	0	13	6	5	15	35	5	5	4	2815	1647	
5	2	1	9	1	23	19	21	1	1	3	1	15	3	1	7	26	3	0	1	3350	1169	
6	69	5	14	1	4	3057	8	1	0	0	0	8	7	5	4	15	3	7	0	657	792	
7	3	0	1	0	4	5	0	18	2	108	3866	0	2	2	3	1	7	18	3	1	613	
8	7	0	4064	5	1	17	4	1	0	2	0	11	2	0	0	3	2	3	2	6	527	
9	9	0	1	0	6	1	1	19	0	7	2	1	1	0	1	4	0	4092	0	1	511	

【0 3 0 3】

【表 106】

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

参照文献

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

【0304】

【数1】

U.S. Published Application 2005-0119455A1

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

同等物

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

【配列表】

0005780951000001.app

10

20

30

40

フロントページの続き

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第2006/084050 (WO, A1)

SIDHU, S.S. et al., "Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 2004年 4月23日, Vol.338, No.2, P.299-310

LEE, C.V. et al., "High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold.", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 2004年 7月23日, Vol.340, No.4, P.1073-1093

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

P u b M e d