

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512181

(P2005-512181A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G06F 19/00	G06F 19/00 600	2G045
C12M 1/00	C12M 1/00 A	4B024
C12N 15/09	C12Q 1/68 Z	4B029
C12Q 1/68	GO1N 33/48 Z	4B063
GO1N 33/48	G06F 17/30 170F	5B075
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-550029 (P2003-550029)	(71) 出願人	502352519 ダイアックス、コープ DYAX CORP. アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、テクノロジー、スクエア、300
(86) (22) 出願日	平成14年12月3日 (2002.12.3)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月3日 (2004.6.3)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/038539	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02003/048902	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成15年6月12日 (2003.6.12)		
(31) 優先権主張番号	60/337,482		
(32) 優先日	平成13年12月3日 (2001.12.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/336,672		
(32) 優先日	平成13年12月5日 (2001.12.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ライブラリスクリーニング

(57) 【要約】

ライブラリ、特にディスプレイライブラリをスクリーニングするシステム、方法および装置を開示する。方法は、自動化することができ、または少なくとも部分的に機械化することができる。ディスプレイライブラリスクリーニングプロセスなどのライブラリスクリーニングプロセスのインターフェースとなるソフトウェアおよびデータベースも開示する。コンピュータシステムを使用して、様々な自動ステーションからのアッセイ結果および試料追跡を含む情報を保存し、管理し、作成することができる。このシステムは、プロジェクト管理、データ分析、および試料のタッキング (t a c k i n g) および監査のためのインターフェースを備えることができる。データベースは、ライブラリスクリーニング中に同定されるヒットを管理することができる。このデータベースは、プロジェクト、ライブラリ、スクリーンおよびヒットの表を含むリレーショナルデータベースとすることができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ライブラリ情報を管理する機械化された方法であって、

(a) 個々のライブラリメンバと (b) 複数の前記個々のライブラリメンバの各々についてのアッセイ情報との関連性を含む情報を保存するステップと；

該保存された情報を評価して前記個々のライブラリメンバのサブセットを同定するステップと；

を含む方法。

【請求項 2】

前記ライブラリメンバが、ディスプレイライブラリメンバを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記評価ステップが、前記保存された情報を選別して、関連するアッセイデータが判定基準を満たすディスプレイライブラリメンバのサブセットを同定するステップを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記選別ステップの前に、さらに、前記判定基準についての情報を含むクエリを受信するステップを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ディスプレイライブラリメンバが、第 1 の選択において前記ライブラリから抽出されるメンバと、第 2 の選択においてライブラリから抽出されるメンバとを含んでなる、請求項 2 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記ディスプレイライブラリメンバが、それぞれ個々のディスプレイライブラリメンバのクローンの物理的位置によって同定される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アッセイデータが、インビトロでの活性評価に関係する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記活性が結合活性である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ディスプレイライブラリメンバの各々が、1 つまたは複数の第 1 のアレイの一義的なアドレスに保存される、請求項 2 に記載の方法であって、 30

保存されたライブラリメンバの順序または総数が、前記第 1 のアレイに保存された総数の順序とは異なるように、前記サブセットの各メンバを 1 つまたは複数の第 2 のアレイの一義的なアドレスに移すよう試料取扱い装置に命令するステップを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

グラフィカルユーザインターフェースを含むディスプレイコンソールと；

実験装置と情報を送受信する通信インターフェースと；

方法を実行するように構成されたプロセッサと； 40

を備えるシステムであって、前記方法が、

ライブラリメンバアッセイデータを含む情報を前記通信インターフェースから受信するステップと；

(a) ライブラリメンバと (b) 前記ライブラリメンバアッセイデータとの関連性を含む情報を保存するステップと；

前記保存情報を評価してライブラリメンバのサブセットを同定するステップと；

前記ディスプレイコンソール上に前記評価の結果を表示するステップと；

を含んでなる、上記システム。

【請求項 11】

ライブラリメンバを選択する方法であって、 50

それぞれが多様なタンパク質成分をコードする核酸を含む複数のメンバを含むライブラリを用意するステップと；

前記ライブラリから 1 セットのメンバを選択するステップと；

前記 1 セットのメンバを評価して、前記セットのそれぞれ個々のメンバに対する機能パラメータを得るステップと；

前記セットのそれぞれ個々のメンバに対する前記機能パラメータについての情報を保存用コンピュータサーバに送信するステップと；

判定基準を満たす機能パラメータを特徴とする前記セットのサブセットを同定するために使用可能な機能判定基準を前記サーバに照会するステップと；

前記保存情報を選別して、関連する機能アッセイデータが前記判定基準を満たすライブラリメンバのサブセットを同定するステップと；
を含む、上記方法。 10

【請求項 1 2】

前記複数の各メンバが、さらに、前記それぞれのメンバの前記核酸によってコードされる前記多様なタンパク質成分を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ライブラリメンバの前記セットを選択するステップが、

前記ディスプレイライブラリメンバを標的と接触させるステップと；

前記標的に結合するメンバを前記標的に結合しない他のメンバから分離させるステップと；

を含む、請求項 1 2 に記載の方法。 20

【請求項 1 4】

ライブラリメンバの前記セットを選択するステップが、

(a) 前記ライブラリメンバを標的に接触させるステップと；

(b) 前記標的に結合するメンバを前記標的に結合しない他のメンバから分離させるステップと；

必要に応じて、(c) 前記標的に結合するメンバを増幅させるステップと；

の 4 サイクル未満を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記同定されたサブセットのメンバの前記多様なタンパク質成分に対応するタンパク質を産生するステップと； 30

前記タンパク質を医薬組成物として製剤するステップと；

をさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

(a) 所与の特性を有するポリペプチドを同定するためのスクリーンについての情報と、

(b) ポリペプチドをそれぞれコードするディスプレイライブラリメンバの識別子と、

(c) 前記ディスプレイライブラリメンバの少なくとも一部に対する機能アッセイの結果と、

(d) 前記ディスプレイライブラリメンバの少なくとも一部に対する生体高分子配列とを表すデータ；ならびに 40

(1) 前記スクリーン情報と前記ディスプレイライブラリメンバ識別子、および (2) ディスプレイライブラリメンバ識別子と機能アッセイ結果を関係付ける関連性；

を含む、機械的にアクセス可能な媒体。

【請求項 1 7】

スクリーンについての前記情報が、標的、スクリーニング条件、およびライブラリのうち 1 つ以上についての情報を含む、請求項 1 6 に記載の媒体。

【請求項 1 8】

前記データが、さらに、1 つまたは複数のスクリーンについての情報に関連する各プロジェクトについての情報を表す、請求項 1 6 に記載の媒体。 50

【請求項 19】

前記プロジェクトの少なくとも一部の各々についての前記情報が、さらに、クライアントについての情報に関連する、請求項 18 に記載の媒体。

【請求項 20】

クライアントおよび課金についての情報を表すデータをさらに含む、請求項 19 に記載の媒体。

【請求項 21】

ディスプレイライブラリスクリーンによって選択されたディスプレイライブラリメンバの核酸配列を決定するように構成された核酸配列決定装置と、

前記選択されたディスプレイライブラリメンバの機能特性を評価するように構成された 10
アクセシ装置と、

サーバと

を備えるシステムであって、前記サーバが、

前記選択されたディスプレイライブラリメンバの各々の前記決定された核酸配列についての情報を前記核酸配列装置から受信し、前記選択されたディスプレイライブラリメンバの各々の前記評価された機能特性についての情報を前記アクセシ装置から受信するコミュニケーションインターフェースと、

前記ディスプレイライブラリスクリーンについての情報に関連する前記受信情報を保存するメモリと、

前記受信情報を選別して前記選択されたディスプレイライブラリメンバのサブセットを 20
同定するプロセッサと

を備える、上記システム。

【請求項 22】

採取試料をマルチウェルプレートのウェル中に配置するように構成された試料採取装置をさらに備える、請求項 21 に記載のシステム。

【請求項 23】

前記試料採取装置が、前記マルチウェルプレート上のマルチウェルプレート識別子を検出する検出器を備え、さらに

前記試料採取装置が、サーバに接続されて、前記検出されたマルチウェルプレート識別子についての情報を前記サーバと通信する、請求項 21 に記載のシステム。 30

【請求項 24】

前記システムが自動警告を発する、請求項 21 に記載のシステム。

【請求項 25】

(i) 複数の選択されたディスプレイライブラリメンバの各々の前記決定された核酸配列についての、前記核酸配列装置からの情報と、前記ディスプレイライブラリメンバの各々の前記評価された機能特性についての、前記アクセシ装置からの情報、ならびに

(ii) クエリを受信し、前記保存情報を選別して前記選択されたディスプレイライブラリメンバのサブセットを同定し、前記選択されたディスプレイライブラリメンバの前記サブセットについての情報を配信するように構成されたソフトウェア 40
を保存するサーバ、を備えるシステム。

【請求項 26】

1 つまたは複数のライブラリスクリーンにおいて同定されたライブラリメンバの核酸配列についての情報を核酸配列決定装置から自動的に受信するステップと、

前記ライブラリメンバの機能についての情報をアクセシ装置から自動的に受信するステップと、

前記ライブラリメンバの識別子および前記ライブラリスクリーンの識別子に関連する前記受信情報を保存するステップと

を含む方法。

【請求項 27】

前記ライブラリメンバがディスプレイライブラリのメンバである請求項 26 に記載の方 50

法。

【請求項 28】

前記アッセイ装置が、前記ライブラリメンバの試料を含むマルチウェルプレート上の試料識別子を検出し、

前記アッセイ装置から受信した前記情報が前記試料識別子についての情報を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

ディスプレイライブラリメンバを評価する方法であって、

ディスプレイライブラリから選択されたディスプレイライブラリメンバに各々対応する複数の生物学的配列を表す情報を受信するステップと、

前記複数の各生物学的配列に対する前記情報を評価して、少なくとも複数の前記ディスプレイライブラリメンバに特徴的な配列がある場合にはその位置を決定するステップと、

前記特徴的配列が同定された各生物学的配列からの部分配列であって、前記特徴的配列の前記位置の関数として定義される前記部分配列に対する情報を保存または表示するステップと

を含む方法。

【請求項 30】

前記ディスプレイライブラリの各メンバが免疫グロブリン可変ドメインを含むタンパク質を表示し、

前記ディスプレイライブラリが、前記免疫グロブリン可変ドメインの少なくとも 10 個の異なる配列変異体を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

ディスプレイライブラリを評価する方法であって、

ディスプレイライブラリメンバをマルチウェルプレートの第 1 のセットに配置するステップであって、各ディスプレイライブラリメンバを前記第 1 のセットの前記マルチウェルプレートの 1 つの一義的なウェル中に採取するステップと、

各ディスプレイライブラリメンバを増幅するステップと、

各ディスプレイライブラリメンバの特性に関する評価を決定するステップと、

前記ディスプレイライブラリメンバの前記評価についての情報を保存するステップと、

前記情報を選別して前記ディスプレイライブラリメンバのサブセットを同定するステップと

を含む方法。

【請求項 32】

前記サブセットの各ディスプレイライブラリメンバをマルチウェルプレートの第 2 のセットに移すステップをさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記採取前に、磁性粒子処理装置を用いて標的に結合する前記ディスプレイライブラリメンバを選択するステップをさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

ライブラリのスクリーニングに関連するイベントを管理する方法であって、

少なくともその一部がライブラリの第 1 のスクリーニングに関連するイベント識別子を含む保存情報にアクセスするステップと、

ライブラリの第 2 のスクリーニングに係るイベントのイベント識別子に対する要求を受信するステップと、

前記保存情報中の前記イベント識別子中で一義的なイベント識別子を作製するステップと

を含み、前記第 1 および第 2 のスクリーニングがそれぞれ第 1 および第 2 の特性を有するタンパク質のライブラリスクリーンである、上記方法。

【請求項 35】

ライブラリスクリーニングのイベント情報を扱う方法であって、

10

20

30

40

50

ライブラリの第1のスクリーニングに関連する第1のイベントについての情報を第1のワークステーションから受信するステップと、

前記第1のスクリーニングに関連する第2のイベントについての情報を第2のワークステーションから受信するステップと、

前記第1のイベントについての前記情報と、前記第1のスクリーニングの指標または前記第1のスクリーニングに関連する他の情報に関連する前記第2のイベントについての前記情報とを保存するステップと

を含む、上記方法。

【請求項36】

マルチウェルプレートを実記一義的なイベント識別子で標識するステップをさらに含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記マルチウェルプレートを追跡するステップをさらに含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記一義的なイベント識別子が、光学的に検出可能なコードとして標識される、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

ディスプレイライブラリプロジェクトを管理する機械化された方法であって、プロジェクトのプロジェクト識別子を初期化するステップと、

ディスプレイライブラリメンバの第1のマルチウェル容器に対する前記プロジェクト識別子に関連する一義的な容器識別子を作成するステップと、

前記マルチウェル容器を実記一義的な容器識別子で標識するステップと、

個々のディスプレイライブラリメンバを実記マルチウェル容器のウェル中に自動的に配置するステップと

を含む、上記方法。

【請求項40】

複合核酸ライブラリのメンバを評価する方法であって、

少なくとも2つのライブラリの複合体から抽出されるライブラリメンバの核酸配列についての情報を受信するステップであって、前記複合体の各ライブラリが、少なくとも1つの位置における異なる限定されたコドンセットを用いて構築されるステップと、

前記核酸配列についての前記情報を解析してコドンにするステップと、

前記少なくとも1つの位置における前記核酸配列の前記コドンに基づいて、前記複合体の前記ライブラリから親ライブラリを同定するステップと

を含む、上記方法。

【請求項41】

複合核酸ライブラリを提供する方法であって、

核酸の第1のライブラリを構築するステップであって、前記第1のライブラリの各メンバが少なくとも1つの可変位置において限定されたコドンセットの1つを含むステップと

、核酸の第2のライブラリを構築するステップであって、前記第2のライブラリの各メンバが少なくとも1つの可変位置において限定されたコドンセットの1つを含むステップと

、

前記第1および第2のライブラリのメンバをプールし、それによって複合核酸ライブラリを提供するステップと

を含む、上記方法。

【請求項42】

前記第1のライブラリの核酸の前記限定されたコドンセットが、少なくとも1つの対応する可変位置において、前記第2のライブラリの核酸の前記限定されたコドンセットとは異なる、請求項41に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

少なくとも1つの対応する定常位置における前記コドンの使用が、前記第1のライブラリと前記第2のライブラリの核酸間で異なる、請求項41に記載の方法。

【請求項 4 4】

ユーザが請求項16に記載の媒体にアクセスし；ディスプレイライブラリメンバのサブセットを選択し、前記サブセットの各メンバについての情報を表示できるようにするユーザインターフェース。

【請求項 4 5】

前記ユーザが前記表示された情報を他のユーザに配信することをさらに可能にする、請求項44に記載のユーザインターフェース。

10

【請求項 4 6】

ディスプレイライブラリをスクリーニングする方法であって、
それぞれが多様なタンパク質成分および前記多様なタンパク質成分をコードする核酸を含む複数のメンバを含むディスプレイライブラリを用意するステップと、
標的への結合と分離の1つまたは複数のサイクルを用いて前記ディスプレイライブラリから1セットのメンバを選択するステップと、
前記選択されたセットのメンバを請求項21に記載のシステムを用いて処理するステップと
を含む、上記方法。

【請求項 4 7】

前記個々のディスプレイライブラリメンバが、異なる標的を用いたスクリーンにおいて同定される、請求項44に記載のユーザインターフェース。

20

【請求項 4 8】

ディスプレイライブラリスクリーン、および前記スクリーンにおいて同定されたディスプレイライブラリメンバについての情報を保存し、
前記ディスプレイライブラリスクリーンのサブセットに対する前記保存情報にアクセスする権限を遠隔ユーザに認証し、
判定基準を満たすディスプレイライブラリメンバについての情報に対する前記遠隔ユーザからのクエリを受信し、
前記保存情報を選別して、前記ディスプレイライブラリスクリーンの前記サブセット中で同定され、前記判定基準を満たす選択されたライブラリメンバを同定し、
前記選択されたライブラリメンバについての情報を前記遠隔ユーザに送信するように構成されたサーバ。

30

【請求項 4 9】

前記スクリーンの各々がクライアントに関連し、
前記遠隔ユーザが前記クライアントとして確認された場合、前記遠隔ユーザが認証される、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

請求項1に記載の方法をプロセッサに実行させる命令がコードされた機械可読媒体製品。

40

【請求項 5 1】

前記ライブラリメンバがディスプレイライブラリメンバを含む、請求項10に記載のシステム。

【請求項 5 2】

前記ライブラリがディスプレイライブラリである、請求項35に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記第1のスクリーニングに使用される前記ライブラリ、および前記第2のスクリーニングに使用される前記ライブラリがディスプレイライブラリである、請求項34に記載の方法。

【請求項 5 4】

50

前記第1および第2の特性が、それぞれ第1および第2の標的と相互作用する能力である、請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

[背景技術]

本発明は、ライブラリスクリーニングに関する。組換え技術によって、薬物療法、診断用薬（例えば、イメージングまたはバインディングアッセイ）、酵素およびアフィニティ分離用薬剤の開発に広く用途を有する合成ポリペプチドおよび天然ポリペプチドを発見することが可能になった。このような組換え技術のひとつは、多様な配列内容を含む核酸ライブラリの構築である。ライブラリは、他の活性の中でも、ハイブリダイゼーション、遺伝的相補性およびポリペプチド発現によってスクリーニングすることができる。発現ライブラリをスクリーニングする難題の1つは、多数の偽陽性を選別してスクリーニング基準を最も満たす真陽性を同定することである。

10

【0002】

発現ライブラリの1類型は、発現されたポリペプチドが、分析用にアクセス可能であり、発現されたポリペプチドが、それらをコードするそれぞれの核酸に結び付けられたディスプレイライブラリである。ディスプレイライブラリ形式の一例は、繊維状バクテリオファージを使用するものである。ポリペプチドは、ファージのタンパク質外被に融合し、ポリペプチドをコードする核酸は、外被に封入された核酸中にある。別のディスプレイ形式は細胞を使用するものである。ポリペプチドは、細胞表面で発現され、それらをコードする核酸は、細胞内にある。ディスプレイライブラリの応用例は、特定の結合活性を有するライブラリメンバの同定である。

20

[発明の概要]

本発明は、ライブラリ、特にディスプレイライブラリをスクリーニングするシステム、方法および装置を提供する。この方法の多くは自動化され、または少なくとも部分的に機械化されている。本発明は、ディスプレイライブラリスクリーニングプロセスのインターフェースとなるソフトウェアおよびデータベースも提供する。本発明の特徴を、発現ライブラリ、化学ライブラリなどの他のライブラリに使用できることは言うまでもない。

【0003】

ライブラリスクリーニングの情報管理

本発明は、様々な自動ステーションからのアッセイ結果および試料追跡を含めた情報を保存し、管理し、ある場合には作成するコンピュータシステムを提供する。このシステムは、プロジェクト管理、データ分析、ならびに試料追跡および監査用のインターフェースを備えることができる。

30

【0004】

ディスプレイライブラリのスクリーニング中に同定されるヒットを管理するデータベースも提供する。このデータベースは、プロジェクト、ライブラリ、スクリーンおよびヒットの表を含むリレーショナルデータベースとすることができる。例えば、ヒットの表は、ELISAアッセイ、ファージバインディングの結果、細胞密度、ポリペプチド配列、ヌクレオチド配列および親ライブラリ(originating library)のレコードを含むことができる。

40

【0005】

したがって、一態様において、本発明は、(a)個々のライブラリメンバと(b)複数の個々のライブラリメンバの各々についてのアッセイ情報との関連性(association)を始めとする情報を保存するステップ；および保存情報を評価して個々のライブラリメンバのサブセットを同定するステップ；とを含む方法(例えば、機械化された方法)を特徴とする。評価ステップは、保存情報を選別してライブラリメンバのサブセットを同定するステップを含むことができる。ライブラリメンバは、ディスプレイライブラリメンバまたは別のライブラリ(例えば、発現ライブラリまたは化学ライブラリ)のメンバと

50

することができる。個々のライブラリメンバは、異なるタイプのライブラリメンバを含むこともできる。

【0006】

アッセイ情報は、複数のライブラリメンバの各々に対する1つまたは複数の入力項目を含むことができる。この情報は、機能アッセイまたは構造アッセイのデータを含むことができる。情報は、例えば、ライブラリメンバに関連する特性の定性評価または定量評価の1つまたは複数の値を含むことができ、さらに、状態、例えば、「未評価」または「アッセイ失敗」までも含むことができる。一実施形態においては、アッセイ情報は、複数のアッセイの情報を含む。

【0007】

この方法は、さらに、機能の判定基準を含むクエリ（例えば、ユーザ）を受信するステップを含むこともできる。評価ステップは、保存情報を選別して、関連するアッセイ情報（例えば、機能アッセイデータを含む情報）が判定基準を満たしているライブラリメンバを同定するステップを含むことができる。

10

【0008】

別の例では、評価ステップは、アッセイデータが統計的に定義されたセットに準拠するライブラリメンバを同定するステップを含むことができる。統計的に定義されたセットは、平均、中央値、最頻数、標準偏差、最大または最小の関数とすることができる（例えば、ベストテンライブラリメンバの選択など）。

【0009】

この方法は、さらに、(a) 個々のライブラリメンバと生物学的配列情報の関連性を保存するステップを含むこともできる。評価ステップは、生物学的配列情報が基準配列または他のライブラリメンバの配列と所定の関係を示すサブセットを同定するステップを含むことができる。

20

【0010】

一実施形態においては、ライブラリメンバは、合成の多様性、例えば、天然の多様性、合成の多様性、またはそれらの両方を含むライブラリから選択される。少なくとも一部のライブラリメンバを第1のライブラリから選択し、少なくとも一部の他のライブラリメンバを第2のライブラリから選択することができる。別の実施形態においては、少なくとも一部のライブラリメンバを複合ライブラリから選択する。

30

【0011】

一実施形態においては、情報によって参照されるライブラリメンバは、それぞれのライブラリメンバのクローンの物理的位置によって、かつ/または生物学的配列情報によって同定される。

【0012】

別の場合には、ディスプレイライブラリメンバは、第1の特性に対してライブラリから抽出されるメンバ、および第2の特性に対してライブラリから抽出されるメンバを含む。例えば、第1の選択は、第1の特性に対するものであり、第2の選択は、第1の特性とは異なる第2の特性に対するものである。別の例においては、選択は、同じ特性に対するものである。さらに別の例においては、第1の特性は第1の標的に対する結合性であり、第2の特性は第2の標的に対する結合性である。

40

【0013】

アッセイ情報は、機能アッセイデータを含むことができる。機能アッセイデータは、バインディングアッセイのデータを含むことができ、機能の判定基準を、活性、例えば、結合活性または触媒活性とすることができる。例えば、判定基準は、最小活性レベル、または最大活性レベルなどのあらかじめ選択された値である。別の例においては、判定基準は、活性レベルの範囲である。一実施形態においては、判定基準は、親和性または特異性の関数である。

【0014】

一実施形態においては、活性は結合活性である。結合活性は、親和性に比例する値とし

50

て表される。別の実施形態においては、結合活性は、解離速度に比例する値として表される。結合活性は、標的への結合でも非標的への結合でもよい。活性の他の例としては、細胞アッセイにおける活性、酵素活性/触媒活性、および生物におけるインビボ活性がある。

【0015】

アッセイ情報は、構造アッセイ情報、例えば、生物物理学的アッセイまたは構造アッセイについての情報（例えば、タンパク質の安定性または折り畳み）を含むこともできる。

機能アッセイデータは、1セットのライブラリメンバの各々に対して、第1の化合物に対する結合活性および第2の化合物に対する結合活性を含むことができる。例えば、第1の化合物は標的化合物であり、第2の化合物は非標的化合物である。

10

【0016】

クエリは、クライアントシステムからサーバで受信することができる。同定されたライブラリメンバについての情報は、サーバからクライアントシステムに送られる。クエリは、ネットワークを介してクライアントシステムからサーバで受信することができる。保存情報の少なくとも一部は、装置、例えば、配列決定装置またはアッセイ装置から電子形式で受信することができる。情報は、ネットワーク（例えば、イントラネットまたはインターネット）経由で受信することができる。

【0017】

この方法は、例えば、デジタル形式（例えば、電子、磁気または光学形式）で、装置から情報を受信するステップを含むことができる。情報は、保存前に受信することができる。例示的な装置としては、核酸配列決定装置、プレートスキャナ、液体取扱い装置などがある。

20

【0018】

この方法は、さらに、同定されたディスプレイライブラリメンバについての情報を、例えば、テキスト、グラフ、ハイパーテキスト、またはそれらの組合せとしてユーザに表示するステップを含むこともできる。

【0019】

この方法は、さらに、同定されたディスプレイライブラリメンバについての情報をクライアントシステムに送信するステップを含むこともできる。送信された情報は、例えば、カラー情報またはグラフィカル情報を含むように、例えば、書式設定される。書式設定は、ユーザ設定または選択によって決定することができる。

30

【0020】

一実施形態においては、保存情報は、同じ標的への結合に対して抽出される少なくとも 10^2 、 10^4 または 10^7 のライブラリメンバ（例えば、ディスプレイライブラリメンバ）の情報を含むことができる。

【0021】

選別を利用して、ライブラリメンバのサブセット、例えば、関連する機能アッセイデータが判定基準を満たすメンバを同定することができる。

この方法は、サブセットのメンバの各々に対応するクローンを操作するよう試料取扱い装置に命令を送るステップを含むことができる。例えば、クローンは、別個の格納域、または1つもしくは複数の共通の格納域に分配される。

40

【0022】

この方法は、ヒットピッキングを含むこともできる。例えば、ディスプレイライブラリメンバの各々が、1つまたは複数の第1のレイの一義的なアドレスで保存され、この方法は、さらに、保存されたライブラリメンバの順序または全アドレス数が、第1のレイの順序または全アドレス数と異なるように、各サブセットのメンバ（または、サブセットの少なくとも一部もしくはすべてのメンバ）を1つまたは複数の第2のレイのあらかじめ選択されたアドレスに移すように試料取扱い装置に命令を送るステップも含む。あらかじめ選択されたアドレスは、各移動されたメンバの一義的なアドレスとすることができる。レイは、複数の試料担体、例えば、マルチウェルプレート、マイクロ流体チャネルを

50

備える装置、または連続アレイとすることができる。命令を送るステップは、例えば、自動にすることができ、ユーザが開始することができ、またはユーザ選択によって起動させることができる。この方法は、サブセットの各ライブラリメンバを評価するよう装置に命令を送るステップを含むことができる。この方法は、さらに、サブセットの各ライブラリメンバの核酸の配列を決定する核酸配列装置に命令を送るステップを含むこともできる。この方法は、各サブセットのメンバに対する生物学的配列情報を用いて第2のライブラリを設計するステップを含むことができる。

【0023】

この方法は、さらに、サブセットのメンバに対応するタンパク質を産生するステップを含むこともできる。この方法は、さらに、医薬組成物としてタンパク質を製剤するステップ、および必要に応じて、その医薬組成物を対象に投与するステップを含むこともできる。

10

【0024】

この方法は、本明細書に記載する他の特徴を含むことができる。本発明は、この方法の1つまたは複数の機械化された態様を実施することができるシステム、およびプロセッサにこの方法を実施させる命令がその上にコードされた1つの機械可読媒体製品も特徴とする。

【0025】

別の態様においては、本発明は、各メンバが多様なタンパク質成分および多様なタンパク質成分をコードする核酸を含む複数のメンバを含むライブラリを提供するステップと；ライブラリから1セットのメンバを選択するステップと；その1セットのメンバを評価してそのセットのそれぞれのメンバに対する機能パラメータを得るステップと；そのセットのそれぞれのメンバに対する機能パラメータについての情報を保存用コンピュータサーバに送信するステップと；判定基準を満たす機能パラメータによって特徴付けられるセットのサブセットを同定するために使用可能な機能判定基準によってサーバに照会するステップと；保存情報を選別して、関連する機能アッセイデータがその判定基準を満たすライブラリメンバのサブセットを同定するステップ；とを含む方法を特徴とする。サブセットは、単一のメンバまたは複数のメンバを含むことができる。ライブラリは、複数のメンバの一員ではないメンバを含むことができる。例えば、ライブラリは、例えば、アセンブリの欠陥のために多様なタンパク質成分を含まないいくつかのメンバを含むことができる。

20

30

【0026】

1セットのディスプレイライブラリメンバを選択するステップは、ディスプレイライブラリメンバを標的に接触させるステップと；標的に結合しない他のメンバから標的に結合するメンバを分離させるステップとを含むことができる。一実施形態においては、標的は、分離ステップ中に固定される。

【0027】

この方法は、さらに、同定されたサブセットのメンバの多様なタンパク質成分に対応するタンパク質を産生するステップを含むこともできる。この方法は、さらに、そのタンパク質を医薬組成物として製剤するステップ、および必要に応じて、その医薬組成物を対象に投与するステップを含むこともできる。

40

【0028】

この方法は、さらに、同定されたサブセットのメンバの多様なタンパク質成分に対応するタンパク質の変異体をコードする核酸を産生するステップを含むこともできる。

別の態様においては、本発明は、(a) 所与の特性を有するポリペプチドを同定する選択についての情報、(b) 各々がポリペプチドをコードする各ライブラリメンバの識別子、(c) ライブラリメンバの少なくとも一部に対するアッセイ結果、および必要に応じて、(d) ディスプレイライブラリメンバの少なくとも一部に対する生体高分子配列を表すデータ；ならびに(1) スクリーン情報とライブラリメンバ識別子、(2) ライブラリメンバ識別子と機能アッセイ結果(例えば、バインディングアッセイ結果、触媒アッセイ(catalytic assay)結果または生物学的アッセイ結果)、および(3) ラ

50

イブラリメンバ識別子と生体高分子配列の1つまたは複数に関係する関連性：を含む機械接続可能な媒体を特徴とする。このコードデータおよび関連性によって、例えば、アッセイ情報としきい値または生体高分子配列クエリに類似した配列とを比較して判定基準を満たすディスプレイライブラリメンバを同定することが可能になる。アッセイ情報は、機能アッセイについての情報、例えば、結合活性、細胞アッセイにおける活性、酵素/触媒活性、生物のインビボでの活性についての情報とすることができる。アッセイ情報は、生物物理学的アッセイまたは構造アッセイにおける活性についての情報（例えば、タンパク質の安定性または折り畳み）とすることができる。

【0029】

選択についての情報は、標的、選択条件およびライブラリの1つまたは複数についての情報を含むことができる。 10

データは、さらに、1つまたは複数の選択についての情報に各々が関連する各プロジェクトについての情報を表すことができる。少なくとも一部のプロジェクトの各々についての情報のインスタンスを、さらに、クライアントについての情報のインスタンスと関連付けることができる。

【0030】

生体高分子配列を表すデータは、核酸配列および/またはポリペプチド配列を表すデータを含むことができる。一実施形態においては、（例えば、少なくとも一部のベクターおよび/または不変配列の）生体高分子配列を表すデータが解析、例えば、トリミングされる。データは、変化した生体高分子配列を表すデータを用いて位置を示す情報を含むことができる。例えば、サブフィールドを使用して変化した位置についての情報を示すことができる。相互作用領域に対応する配列は、インデックスを付けることができ、または示すことができる。免疫グロブリン配列の場合、例えば、CDRもしくはCDRコード領域、またはFRもしくはFRコード領域に対応する各配列を示すことができる。媒体は、さらに、生体高分子配列を表すデータについての質情報を含むこともできる。 20

【0031】

媒体は、選択情報をスクリーンと関係付ける選択および関連性についての情報を表すデータを含むことができる。

媒体は、さらに、クライアントおよび課金についての情報を表すデータ、プロジェクトを表すデータのインスタンスと関連する情報のインスタンスを含むこともできる。 30

【0032】

自動ワークフロー用システム

本発明は、様々な自動化ワークステーションと接続されたサーバも提供する。このサーバは、各ワークステーションから情報を受信することができる。情報は、試料追跡および実験データを含むことができる。いくつかの実施形態においては、サーバは、ワークステーションに命令を送信することができる。ワークステーションは、ヒットのマスタープレート、配列決定装置、ELISA装置などを操作するために使用されるロボット装置を備えることができる。システムは、試薬の使用をモニタすることもできる。

【0033】

したがって、一態様においては、本発明は、（1）ライブラリスクリーン（例えば、ディスプレイライブラリまたは発現ライブラリ）によって選択されるライブラリメンバの核酸配列を決定するように構成された核酸配列決定装置、（2）選択されたライブラリメンバの機能特性を評価するように構成されたアッセイ装置、および（3）（a）選択されたライブラリメンバの各々の決定された核酸配列についての核酸配列装置からの情報、および選択されたライブラリメンバの各々に対して評価した機能特性についてのアッセイ装置からの情報を受信するコミュニケーションインターフェースと、（b）ライブラリスクリーンについての情報と関連する受信情報を記憶するメモリと、（c）受信した情報を選別して、選択ライブラリメンバのサブセットを同定するプロセッサとを備えるサーバを含むシステムを提供する。コミュニケーションインターフェースは、選択されたライブラリメンバの各々に対する別個の配列の読みについての情報を受信することができ、プロセッサ 40 50

は、1つの読みについての情報を別の読みについての情報と比較することができる。

【0034】

システムは、さらに、(4)複数の試料担体、例えば、マイクロタイタープレートなどの複数のチャンバを有する容器を保存するようになされた保存装置を備えることもできる。システムは、試料採取装置、例えば、採取された試料を複数の試料担体のアドレス上に配置するように構成された装置を備えることもできる。試料採取装置は、複数の試料担体上の識別子を検出する検出器を備えることができる。試料採取装置は、サーバに接続されて、検出された識別子についての情報をサーバに通信することができる。

【0035】

システムは、さらに、複数の試料担体を、例えば、試料採取装置から保存装置に、かつ / または試料採取装置からアッセイ装置に移動させるように構成された搬送装置を備えることもできる。

【0036】

システムは、さらに、複数の試料担体を再配列させる試料取扱い装置を備えることもできる。プロセッサは、試料取扱い装置に命令を送るよう構成することができる。

サーバプロセッサは、例えば自動的にまたはトリガーにตอบสนองしてレポートを作成するようにすることができる。レポートは、アッセイ装置または核酸配列決定装置によって扱われるイベントについての情報を含むことができる。例えば、レポートは、決定された核酸配列の少なくとも1つを含む生体高分子配列のデータベースを検索した結果を含むことができる。また、レポートは、ユーザ定義形式で書式設定することができる。

【0037】

サーバメモリは、複数のスクリーンによって選択されたディスプレイライブラリメンバに対する核酸配列情報を、各々のスクリーンについての情報と関連させて保存することができる。複数のスクリーンは、異なる標的化合物への結合に対するスクリーンを含むことができる。

【0038】

一実施形態においては、システムは、例えば、ディスプレイライブラリスクリーンに対して予想される進行と実際の進行との偏差、複数のスクリーンからのディスプレイライブラリメンバに対する配列中の配列またはモチーフの過剰表現 (overrepresentation)、または予想される試薬不足の1つまたは複数によって引き起こされる自動警告を発する。

【0039】

関係する実施形態においては、システムは、合成化合物ライブラリスクリーンについての情報を保存し、特定の化合物に対するブロック合成または合成経路を示す情報を含む。

別の態様においては、本発明は、(i)複数の選択されたライブラリメンバ(例えば、ディスプレイライブラリメンバ)の各々の決定された核酸配列についての核酸配列装置からの情報、および選択されたライブラリメンバの各々の評価された機能特性についてのアッセイ装置からの情報、ならびに(ii)保存情報からの情報をクライアントシステムに配信するように構成されたソフトウェアを保存するサーバを含むシステムを特徴とする。一実施形態においては、ソフトウェアは、クエリを受信し、保存情報を選別して選択されたライブラリメンバのサブセットを同定し、選択されたライブラリメンバのサブセットについての情報を配信するようにも構成される。一実施形態においては、ソフトウェアは、実験装置からの情報を受信するようにも構成される。

【0040】

別の態様においては、本発明は、1つまたは複数のライブラリスクリーンにおいて同定されたライブラリメンバの核酸配列についての情報を核酸配列決定装置から(例えば、自動的に)受信するステップと、ライブラリメンバの機能についての情報をアッセイ装置から(例えば、自動的に)受信するステップと、受信した情報をライブラリメンバの識別子およびライブラリスクリーンの識別子と関連させて保存するステップとを含む方法の特徴とする。ライブラリメンバは、ディスプレイライブラリのメンバとすることができる。

10

20

30

40

50

【0041】

アッセイ装置は、ライブラリメンバの試料を含む複数の試料担体（例えば、マルチウェルプレート）上の試料識別子を検出することができ、アッセイ装置から受信された情報は、試料識別子についての情報を含む。試料識別子は、ライブラリメンバが抽出されるライブラリ選択または選択キャンペーンを示すことができる。

【0042】

一実施形態においては、保存情報は、さらに、プロジェクト識別子と関連し、プロジェクト識別子は少なくとも別のライブラリスクリーンと関連する。この方法は、保存情報を選別して、判定基準を満たすライブラリメンバを同定するステップを含むことができる。

【0043】

別の実施形態においては、この方法は、同定されたライブラリメンバについての情報を表す図形表示を作成するステップを含むことができる。

さらに別の実施形態においては、この方法は、同定されたライブラリメンバの少なくとも1つによってコードされるポリペプチド（またはペプチド）を医薬組成物として製剤するステップと、その医薬組成物を対象に投与するステップと、同定されたライブラリメンバの少なくとも1つによってコードされるポリペプチド（またはペプチド）を標識と結合させるステップと、標識ポリペプチドを対象に投与するステップと、同定されたライブラリメンバの少なくとも1つによってコードされるポリペプチド（またはペプチド）を固体支持体に結合させるステップの1つまたは複数を含むことができる。

【0044】

別の態様においては、本発明は、核酸ライブラリ（例えば、ディスプレイライブラリなどの発現ライブラリ）から選択される核酸ライブラリメンバに対応する複数の生物学的配列を表す情報を受信するステップと、その複数の生物学的配列の各配列に対する情報を評価して特徴的配列（sequence feature）がある場合にはその場所を決定するステップであって、特徴的配列が核酸ライブラリメンバの少なくとも5、10、20、40、60、80または90%に特有であるステップと、特徴的配列が同定される各生物学的配列から、特徴的配列の位置の関数として定義される部分配列に対する情報を保存し、抽出し、または表示するステップとを含む方法を特徴とする。

【0045】

一例においては、ライブラリの各メンバは、免疫グロブリン可変ドメインを含むタンパク質をコードし、ライブラリは、免疫グロブリン可変ドメインの少なくとも10個の異なる配列変異体を含む。例えば、複数の特徴的配列は、以下の領域、すなわちシグナル配列、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4または定常ドメインの1つまたは複数に位置する特徴的配列を含むことができる。別の例においては、ライブラリの各メンバは、クニツドメイン（Kunitz domain）を含むタンパク質をコードし、ディスプレイライブラリは、クニツドメインの少なくとも10個の異なる配列変異体を含む。さらに別の例においては、各ライブラリメンバは、50、40、30または20アミノ酸未満の変化領域を含むアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。変化領域は、少なくとも4、8、12または18の変化位置を含む。

【0046】

一実施形態においては、この方法は、さらに、部分配列にはない配列をトリミングするステップ、または部分配列を抽出するステップを含むこともできる。

別の態様においては、本発明は、ライブラリメンバ（核酸ライブラリ、例えば、発現ライブラリメンバ、例えば、ディスプレイライブラリメンバ）を第1のセットの複数の試料担体に配置し、各ライブラリメンバが第1のセットの複数の試料担体の1つの一義的なアドレスで配置されるステップと、各ライブラリメンバを増幅させるステップと、特性（例えば、結合特性などの機能特性、またはライブラリメンバ核酸成分配列、ポリペプチド配列などの配列特性）に関して各ライブラリメンバの評価を決定するステップと、ライブラリメンバの評価についての情報を保存するステップと、その情報を選別して、ライブラリメンバのサブセットを同定するステップを含む方法を特徴とする。この方法は、さらに、

10

20

30

40

50

サブセットの各ライブラリメンバ核酸成分の配列を決定するステップ、サブセットの各ライブラリメンバを第2のセットの複数の試料担体中に移すステップ、および/または配置ステップの前に、標的に結合するライブラリメンバを選択するステップを含むこともできる。磁性粒子処理装置を選択ステップに使用することができる。

【0047】

さらに別の態様においては、本発明は、少なくともその一部がライブラリ（例えば、ディスプレイライブラリ、他の発現ライブラリなどの核酸ライブラリ）の第1のスクリーニングに関連するイベント識別子を含む保存情報にアクセスするステップと、ライブラリの第2のスクリーンに關係するイベントに対するイベント識別子への要求を受信するステップと、保存情報内のイベント識別子中で一義的であるイベント識別子を作成するステップとを含む方法の特徴とする。この方法は、さらに、作成されたイベント識別子、例えば、光学的に走査可能な識別子で複数の試料担体を標識するステップを含むこともできる。一例においては、第1および第2のスクリーニングは、異なるライブラリ、例えば、異なる標的に対するバインダを同定する異なるディスプレイライブラリのスクリーニングである。別の例においては、それらは同じライブラリ、例えば、異なる標的に対するバインダを同定する、例えば、同じディスプレイライブラリのスクリーンである。

10

【0048】

別の態様においては、本発明は、ディスプレイライブラリの第1のスクリーニングに付随する第1のイベントについての情報を第1のワークステーションから受信するステップと、第1のスクリーニングに付随する第2のイベントについての情報を第2のワークステーションから受信するステップと、第1のイベントについての情報および第2のイベントについての情報を、第1のスクリーニングの指標または第1のスクリーニングに関連する別の情報に関連させて保存するステップとを含む。この方法は、さらに、複数の試料担体を一義的なイベント識別子で標識するステップを含むこともできる。一義的なイベント識別子は、例えば、プロジェクト識別子またはスクリーニング識別子の関数である。

20

【0049】

標識された複数の試料担体は、例えば、バーコード、ドットコードなどのハイコントラスト画像標識によって光学的に同定可能である。

この方法は、さらに、複数の試料担体を追跡するステップを含むこともできる。例えば、ディスプレイライブラリの第2のスクリーニングに関連する第3のイベントについての情報を第1のワークステーションから受信することができる。第1および第2のスクリーニングは、無關係な標的に対するスクリーンとすることができる。

30

【0050】

さらに別の態様においては、本発明は、プロジェクトに対するプロジェクト識別子を初期化するステップと、ライブラリメンバ（例えば、発現ライブラリメンバ、例えば、ディスプレイライブラリメンバ）の第1のマルチウェル容器に対するプロジェクト識別子に関連する一義的な容器識別子を作成するステップと、マルチウェル容器を一義的な容器識別子で標識するステップと、個々のライブラリメンバをマルチウェル容器のウェル中に（例えば、自動的に）配置するステップとを含む方法（例えば、機械化された方法、または部分的に機械化された方法）を特徴とする。この方法は、マルチウェル容器中の各ライブラリメンバを増幅させるステップ、または各ライブラリメンバの機能特性（例えば、結合特性または触媒特性）を評価するステップを含むことができる。

40

【0051】

別の態様においては、本発明は、少なくとも1つの位置において異なる限定されたコドンセットを用いて構築される少なくとも2つのライブラリの複合体から抽出されるライブラリメンバの核酸配列についての情報を受信するステップと、核酸配列についての情報をコドンに分解するステップと、少なくとも1つの位置において核酸配列のコドンに基づいて複合体のライブラリから親ライブラリを同定するステップとを含む方法の特徴とする。

【0052】

さらに別の態様においては、本発明は、少なくとも1つの可変位置において第1の限定

50

されたコドンセットの1つを各メンバが含む第1の核酸ライブラリを構築するステップと、少なくとも1つの可変位置において第2の限定されたコドンセットの1つを各メンバが含む第2の核酸ライブラリを構築するステップと、第1および第2のライブラリのメンバをプールして複合ライブラリを形成させるステップとを含む方法の特徴とする。第1の限定セットは、少なくとも1つの対応する可変位置において第2の限定セットと異なり得る。例えば、第1の限定されたコドンセットは、所与の各アミノ酸に対して2つ未満のコドンを含むことができる。いくつかの実施形態においては、第1の限定されたコドンセットは、コドン表の一象限 (quadrant) ではない1セットのコドンからなる。

【0053】

構築ステップは、少なくとも部分的に無作為化された領域を含むオリゴヌクレオチドを合成するステップを含むことができる。この領域のヌクレオチドは、トリヌクレオチド混合物、例えば、限定されたトリヌクレオチドセットからトリヌクレオチドを添加することによって合成される。少なくとも1つの対応する定常位置におけるコドンの使用は、第1と第2のライブラリの核酸間で異なり得る。

10

【0054】

この方法は、さらに、所与の機能特性を有するポリペプチドをコードするプールのメンバを同定するステップ、所与の機能特性を有するポリペプチドの配列を決定するステップ、またはその決定された配列から、ポリペプチドが第1もしくは第2のライブラリ(または、別のライブラリ、例えば、第3のライブラリ)に由来するかどうかを決定するステップを含むことができる。決定された配列は、核酸配列であってもよい。

20

【0055】

実時間情報の送達

本発明は、ライブラリスクリーニング、例えば、契約ライブラリスクリーニングサービスのヒットおよびプロジェクト完了をモニタするために使用される情報管理システムも提供する。クライアントは、システムに接続し、ライブラリスクリーニングプロジェクトについての最新報告または特定の情報を受信する。情報送達システムは、上述したデータベースに接続することができる。例えば、本発明は、プロジェクト情報をクライアントにネットワークを介して送達する方法の特徴とする。この方法は、クライアントの接続要求を認証するステップと、多様なライブラリメンバに対する確認データを含む保存情報またはその選択された部分にアクセスするステップと、保存情報の評価を含む情報をネットワーク経由で送信するステップとを含むことができる。

30

【0056】

本発明は、ライブラリメンバのサブセットをユーザが選択するのを可能にし、各サブセットのメンバについての情報を表示するユーザインターフェースも特徴とする。例えば、このインターフェースは、ライブラリメンバのサブセットの選択を決定するパラメータをユーザから受信する。インターフェースは、パラメータ、例えば、生体高分子配列属性もしくは生体高分子配列、または機能の判定基準をユーザに照会することができる。ライブラリメンバの選択されたサブセットは、生体高分子配列に対する配列類似性を有することができる、または生体高分子配列属性を有することができる。

【0057】

インターフェースによって、(a)ライブラリスクリーニングについての情報、(b)ライブラリメンバの識別子、(c)ライブラリメンバの少なくとも一部に対する機能アッセイの結果、(d)ライブラリメンバの少なくとも一部の生体高分子配列、ならびに(1)スクリーニング情報とライブラリメンバ識別子および(2)ライブラリメンバ識別子と機能アッセイ結果に関する関連性を表す保存データを含むデータベースにユーザが接続することが可能になる。ライブラリメンバは、例えば、ディスプレイライブラリメンバまたは発現ライブラリメンバとすることができる。ライブラリメンバは、異なる選択によって同定することができる。インターフェースによって、ユーザは、表示情報を他のユーザに配信することが可能になる。

40

【0058】

50

別の態様においては、本発明は、プロセッサおよびメモリを備えるサーバを特徴とする。このプロセッサは、ディスプレイライブラリ選択キャンペーンおよびキャンペーンにおいて同定されたディスプレイライブラリメンバについての情報を保存し、その保存情報を選別して、ディスプレイライブラリ選択キャンペーンのサブセットにおいて同定され、かつ判定基準を満たす選択ライブラリメンバを同定し、遠隔ユーザに選択ライブラリメンバについての情報を送信するように構成されている。プロセッサは、判定基準を満たすディスプレイライブラリメンバについての情報に対する遠隔ユーザからのクエリを受信し、ディスプレイライブラリスクリーニングのサブセットの保存情報への接続許可に対して遠隔ユーザに認証を与えることもできる。スクリーニングの各々をクライアントと関連付けることができ、遠隔ユーザは、クライアントであると確認された場合、認証を受けることができる。

10

【0059】

本明細書で使用する「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、区別なく使用される。両方の用語は、短鎖ペプチド、例えば、3～25アミノ酸のペプチドを包含することができると同時に、より長鎖のペプチドおよび多連鎖ポリペプチドも包含できることは言うまでもない。

【0060】

本明細書に記載する新機軸の多数の態様が、一般に、ライブラリスクリーニング、例えば、ディスプレイライブラリ以外のライブラリのスクリーニング、例えば、発現ライブラリのスクリーニング、例えば、活性または細胞表現型に対するcDNA発現ライブラリ、触媒核酸(catalytic nucleic acid)に対する核アプタマー(nucleic aptamer)ライブラリ、コンビナトリアルライブラリまたは薬物化合物ライブラリなどの化学ライブラリに適用可能である。

20

【0061】

出版物、特許、および特許出願の引用を含めてすべての引用を、参照によりその全体を本明細書に援用する。本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細を、添付の図面および以下の記述において説明する。本発明の他の特徴、目的、および利点は、記述、図面および特許請求の範囲から明らかになるはずである。

[詳細な説明]

ディスプレイライブラリは、機械化された情報管理を含むプロセスを用いてスクリーニングされる。このプロセスの少なくとも一部の態様は自動化されている。本明細書に記載するプロセスおよび他のプロセスの技術的効果は、スクリーニングライブラリの処理量が増加し、ライブラリスクリーニングについての情報の迅速な接続および分析が可能になることである。例えば、このシステムは、異なる判定基準を有する複数のプロジェクトでスクリーニングされる1つまたは複数のディスプレイライブラリからのポリペプチドの同定を管理する。

30

【0062】

図1および図2を参照すると、例示的なプロセス10を使用して、ディスプレイライブラリがスクリーニングされる。プロセスからの情報は、リレーショナルデータベース60のプロセス全体にわたって収集される。この情報は、いつでもアクセスし、または解析することができる。

40

【0063】

プロセス10は、例えば、ライブラリから検索される所望のポリペプチドを示す、いわゆる「プロジェクト」を初期化するステップ20を含む。この情報は、プロジェクトの表100に保存することができる。同様に、ライブラリについての情報を別の表140に保存する。次に、ディスプレイライブラリをスクリーニング30して、そのような所望のポリペプチドの候補を同定する。候補についての機能情報110を与える高処理アッセイ40を用いて、候補を個々に分析する。候補または候補のサブセットの配列を決定する50。配列情報120は、候補の各々に対するレコードと関連付けられて保存される。

【0064】

50

また、プロセス10に付随するイベントを追跡し、監査して、やはりデータベース60に保存されるイベント情報130が作成される。

図3を参照すると、プロセス10は、例示的なシステム200によって実行される。システム200は、サーバ205、アッセイ装置210、試料取扱い装置220、および配列決定装置230を備える。サーバ205は、データベース60の情報を保存する。サーバ205は、ディスプレイライブラリメンバの機能を示すデータを作成し、それをサーバ205に送信するアッセイ装置210に接続されている。サーバ205は、核酸配列装置230とも通信状態にある。装置230は、個々のライブラリメンバの配列データをサーバ205に送信する。また、サーバ205は、試料取扱い装置220とも通信状態にある。試料取扱い装置220およびアッセイ装置210は、試料取扱いに付随するイベントについて10の情報をサーバ205に送信する。システム200が追加の装置を備えることができることは言うまでもない。

10

【0065】

命令は、装置210、220、230のいずれにもサーバ205から送信することができる。このような命令によって、装置は、特定の候補に対して特定の方法を実行することができる。

【0066】

また、装置210、220、230を、システム内で物理的に接続することもできる。例えば、試料取扱い装置220は、アッセイ用のマルチウェルプレート20を準備することができる。96または384ウェルマイクロタイタープレートなどのマルチウェルプレートは、本明細書で例として示すが、他の複数試料の担体(キャリア)をアッセイに使用することができる。複数の試料担体の別の例としては、複数のチャンバを有する担体、(試料が異なるアドレスで配置される)平面アレイ、「The Living Chip」(Biotrove, Inc., Cambridge MA)、およびマイクロ流体チャネルを備える装置がある。アッセイが実施されると、マルチウェルプレートは、アッセイ装置210に自動的に移送されて読み取られる(下記「ロボット(Robotics)」参照)。

20

【0067】

図4を参照すると、サーバ205を、ネットワーク、例えば、サーバ205をユーザシステム240および装置210、220、230と連結するイーサネット(登録商標)245に接続することができる。このネットワーク235によって、サーバ205は、装置と効率的に情報を交換することができ、ユーザは、ユーザシステム240のインターフェースを用いて情報にアクセスすることができる。サーバ205は、データベース情報60を重複して保存するように構成されたハードディスクセットなどのデータ記憶装置206に接続することができる。

30

【0068】

プロジェクト定義

データベース60は、各プロジェクトについての情報を保存する。各プロジェクトは、例えば、ポリペプチド(例えば、意図した用途を満足させるポリペプチド)を同定する1つまたは複数のスクリーンである。したがって、複数のプロジェクトを同時に実行し管理することができる。以前のプロジェクト情報は、現在および将来のプロジェクトに情報を与えることができる。プロジェクトのデータベース表は、以下の項目を含むことができる。

40

【0069】

(プロジェクト名) プロジェクトは、オペレータによる参照に好都合な、レポート、試料などを標識する名前を有することができる。

(標的) 標的は、ディスプレイライブラリメンバを抽出するもとなる化合物である。意図した用途が結合を含む場合、所望のライブラリメンバは標的に結合する。標的を、結合以外の機能活性、または結合に加えて作用する活性に関する標的とすることができることは言うまでもない。

【0070】

(意図した用途) 意図した用途の選択肢としては、治療、診断、酵素、または精製な

50

どがある。この項目は、あらかじめ定義されたリストを含むことができ、または、自由記載（例えば、可変長の自由記載）とすることができる。意図した用途についての以下の考察を参照されたい。

【0071】

（所望の結合条件） 所望の結合条件は、意図した用途に基づく。例えば、治療用途の場合、所望の結合条件を、生理学的強度のバッファとすることができる。精製用途の場合、所望の結合条件を、前の精製ステップにおいて使用したバッファ条件とすることができる。

【0072】

（所望の放出条件） 所望の放出条件も意図した用途に基づく。治療の場合、所望のポリペプチドが、生理学的条件下で有意な程度に分解しないように、放出条件を極めて厳格にすることができる。このような放出条件は、低pHでも、高pHでも、またはカオトロピックでもよい。精製用途の場合、所望の放出条件は、標的化合物によって限定されることがある。例えば、標的化合物は、変性されないか、精製中に所望のポリペプチドからの溶出によって攪乱される。

10

【0073】

（特異性要求） この項目は、候補ポリペプチドの所望の特異性を示すことができる。いくつかのプロジェクトでは、所望のポリペプチドは標的化合物に結合するが、密接に関係する化合物、非標的化合物には結合しない。標的化合物がポリペプチドである場合、関係する非標的化合物は、標的のアミノ酸配列ホモログ、標的の配座変異体（*conformational variant*）、タンパク質分解変異体またはグリコシル化変異体とすることができる。配座変異体の例は、プリオンタンパク質である。同様に、この項目は、触媒特異性（例えば、ある反応物を触媒するが、関係する非標的反応物を触媒しないという能力）を示すことができる。

20

【0074】

（他の諸要件） この項目は、候補ポリペプチドが満たさなければならない他の要件を示すテキストまたはパラメータを含むことができる。例えば、治療用途に関して、こうした要件は、抗原性、クリアランス速度、循環サイクルの半減期などである。酵素用途の場合、こうした要件は、 k_{cat} / K_m などの動力学パラメータとすることができる。

【0075】

（クライアント） クライアントは、パーティの名前、例えば、オペレータにプロジェクトの実行を要求する会社または個人の名前とすることができる。この項目は、リレーショナルデータベース内のクライアント表中のクライアントレコードのポイントを含むこともできる。

30

【0076】

（ユーザ） この項目は、プロジェクトに関連する特定の個人に対して使用することができる。これらは、プロジェクトを行うパーティで技術的役割および/または管理上の役割を担う個人、および外部のクライアントの位置にある類似の個人を含むことができる。

【0077】

（認証） この項目は、プロジェクトに許可を与えるために使用することができる。例えば、許可は、情報にアクセスし、情報を入力（またはアップロード）し、かつ/またはプロジェクトに関連するイベントを実行することができるオペレータを制限するために使用することができる。例えば、クライアント個人は、所与のクライアントによって要求される特定のプロジェクトについての情報にアクセスする許可を得ることができるが、別のクライアントに関連する別のプロジェクト、または同じクライアントに関連する別のプロジェクトでさえも許可を得ることができない。

40

【0078】

（優先度） この項目は、他の保留中のプロジェクトに相対して優先度を割り当てるために使用することができる。優先度項目を変える権限は、特定の責任者に制限することができる。優先度項目を使用して、装置時間、計算時間（例えば、CPU時間）および人的

50

時間を割り当てることができる。

【0079】

(マイルストーン) プロジェクトレコードは、プロジェクトのマイルストーンについての情報を含むことができる。これらのマイルストーンは、既定の進行が予測される将来の日付、または既定の進行が得られた過去の日付とすることができる。適切であれば、マイルストーン項目は、別のデータベース表中のマイルストーンイベント専用情報へのポインタを含むことができる。

【0080】

他の追加項目を多数含めることができる。

選択

図5を参照すると、ディスプレイライブラリメンバを抽出する方法は、ディスプレイライブラリ300を提供するステップ(例えば、調製するステップ)を含む。ディスプレイライブラリを作成する例示的な方法を以下(「ディスプレイライブラリ」)に示す。メンバは、例えば、ライブラリを標的リガンドに接触させ、標的リガンドに結合するメンバを同定することによってライブラリから選択304される。標的リガンドは、固体支持体上に固定することができ、または後で捕捉可能な溶液状態にすることができる。未結合または弱く結合したライブラリメンバは、支持体から洗い流される。次いで、結合したライブラリメンバが支持体から溶出する。他の方法も選択に使用できることは言うまでもない。例えば、Kolonin等(2001) *Current Opinion in Chemical Biology* 5:308~313; PasqualiniおよびRuoslahti(1996) *Nature* 380:364~366; およびPaqualini等(2000)「*In vivo Selection of Phage-Display Libraries*」*In Phage Display: A Laboratory Manual* Ed. Barbas等 Cold Spring Harbor Press 22.1~22.24に記載されたように、例えば、選択をインビボで実施して、標的組織または器官に結合するライブラリメンバを同定することができる。例えば、Widersten等(2000) *Methods Enzymol* 328:389~404(遷移状態アナログに結合することによって); Forrer等(1999) *Current Opin. Struct. Biol* 9:514~520; Gao等(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11777; およびBaca等(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10063に記載されたように、選択を使用して、酵素に対して選択を行うことができる。

【0081】

いくつかの場合においては、非特異的結合および他の非理想的な諸特性は、1サイクルを超える選択を必要とする。追加の選択サイクルによって、候補ライブラリメンバの濃縮が進む。選択ステップ314を繰り返す必要がある場合、溶出したライブラリメンバを増幅306させ、次いで、標的リガンドに再度適用する。インプリメンテーションに応じて、異なるサイクル数の選択が、極めて多様なライブラリから候補ライブラリメンバのプールを同定するのに十分であり得る。例えば、1ラウンドまたは2ラウンドの選択が十分なこともある。1セットの選択サイクルを、選択キャンペーンと称する。

【0082】

追加の選択ラウンドは、選択されたライブラリメンバのバイアスを増加させ、候補としての適合性とは無関係な理由のために他のメンバよりも希少なまたは損なわれたメンバを減少させる結果になり得る。例えば、いくつかのライブラリメンバが、宿主細胞中の複製に対して損なわれ得る。

【0083】

図6を参照すると、選択の各々に対するパラメータが、データベース中の選択363の表に記録される。選択は、選択キャンペーン362の表中のエントリによって、特定の選択キャンペーンに関連付けられる。上述したように、選択キャンペーンは、プロジェクト361の表中の特定のプロジェクトに関連付けられる。

10

20

30

40

50

【0084】

(選択) 選択のレコードは、以下の項目を含むことができる：

(選択キャンペーン) この項目は、選択が実施された選択キャンペーンを示す。

(ライブラリソース) この項目は、ディスプレイライブラリメンバのソースを示す。このソースは、選択キャンペーンの第1の選択の場合のようにライブラリ試料、または選択キャンペーンの後続の選択の場合のように以前の選択の出力とすることができる。

【0085】

(選択ラウンド) この項目は、選択キャンペーン内の選択の位置を示す整数値である。例えば、「1」は、選択が第1の選択であることを示し、以下同様である。

(入力サイズ) このパラメータは、標的に接触しているディスプレイライブラリメンバの数を示す。 10

【0086】

(出力サイズ) このパラメータは、標的から溶出するディスプレイライブラリメンバ数を示す。

(FOI) これは、選択キャンペーンによって回収される入力ディスプレイライブラリメンバのフラクションである。

【0087】

(標的試料) これは、標的試料の表に対する参照を含むことができる。例えば、標的化合物を、例えば、異なる日に、かつ/または異なるプロセスを用いて、複数のバッチで調製することができる。このような情報を追跡し、それを用いて、同定されたりガンド 20

【0088】

(選択キャンペーン) 選択キャンペーンのレコードは、以下の項目を含むことができる。

(プロジェクト) これは、選択キャンペーンが開始されたプロジェクトへのポインタである。

【0089】

(ライブラリ) これは、使用されたディスプレイライブラリを記載するライブラリレコードへのポインタである。

選択キャンペーンに関連するすべての選択を確認するために、選択の表は、選択キャンペーンを指すすべてのエントリに対して照会される。各選択エントリは、選択キャンペーンプロセスにおけるその相対的な位置を示す指標(選択ランク)を含む。 30

【0090】

プロジェクトを、1つを超える選択キャンペーンと関連付けることができる。

選択後、同定されたプールのメンバが個々に抽出される。ここで図5および図7を参照すると、ファージディスプレイライブラリの場合、例えば、プールを細菌細胞に感染させることができ、次いでそれを個々のコロニーまたはプラークが各感染イベントから形成されるような密度で平板培養316する。自動コロニー採取装置を用いて、個々のコロニーをマルチウェルプレート(例えば、94または364ウェルプレート)のウェル中に採取320する。一般に、コロニーは、例えば同じ2つのプレートの対応するウェルに2回採取される。これらのプレートのうち1つが保管される。もう1つのプレートは、後続の分析のソースとして使用することができる。 40

【0091】

自動採取によって、少なくとも 10^0 、 10^3 、 10^4 、 10^5 (またはそれ以上)の選択ライブラリメンバを採取することが可能になる。次いで、これらのライブラリメンバの各々を、以下に示すように個々に分析することができる。

【0092】

再度図6を参照すると、採取についての情報は、例えば、プレート366、各ウェル365および各ディスプレイライブラリメンバ364のそれぞれの相互参照レコードを用いてデータベース60に保存される。

【0093】

(マルチウェルプレート) マルチウェルプレートのレコードは、以下を含むことができる。

(プレートID) この項目は、自動的に作成されプレート上に標識される一義的なプレート識別子を記録する。下記「バーコード方式&イベント監査」参照。

【0094】

(プレートタイプ) この項目は、プレートタイプ、例えば、カタログ番号および製造者を示す。

(プレートサイズ) この項目は、プレート上のウェル数を示す。例えば、96または364である。

【0095】

(保存場所) この項目は、プレートが物理的に保存される場所を示す。これは、冷凍機またはプレートホテル内の場所とすることができる。

(プロジェクト) この項目は、プレートが作成されるプロジェクトを示す。

【0096】

(日付) この項目は、プレートがシステムに入れられた日付を示す。一般に、これは、ディスプレイライブラリメンバがプレートのウェル中に置かれた日付である。

(オペレータ) この項目は、プレートをシステムに入れることを指示または指導した人を示す。

【0097】

(ウェル) ウェルのレコードは以下を含むことができる。

(プレートID) この項目は、マルチウェルプレートのウェルに対するレコードへのポインタである。

【0098】

(ウェルX座標) この項目は、プレート上のウェルのx座標を示す。

(ウェルY座標) この項目は、プレート上のウェルのy座標を示す。

(内容) この項目は、プレート中に配置された試料を示す。これは、ディスプレイライブラリメンバのレコードへのポインタとすることができる。

【0099】

(ライブラリメンバ) ディスプレイライブラリメンバのレコードは以下を含むことができる。

(ファージID) この項目は、データベース60中のライブラリメンバを特定する一義的な識別子を含むことができる。

【0100】

(選択キャンペーン) この項目は、ライブラリメンバが抽出されるディスプレイライブラリ選択キャンペーンのエントリを参照するポインタを含む。

(プレートID) この項目は、ライブラリメンバが保存されるマルチウェルプレートのエントリを参照するポインタを含む。

【0101】

(ウェルID) この項目は、ライブラリメンバが保存されるウェルのエントリを参照するポインタを含む。

(抽出日) この項目は、ライブラリメンバが抽出された日付を示す。

【0102】

(オペレータ) この項目は、ライブラリメンバの抽出を監視するオペレータを示す。

(AA配列ID) これは、ディスプレイライブラリメンバによってコードされるアミノ酸配列を示す文字列を含むレコードへのポインタである。

【0103】

(DNA配列ID) これは、ディスプレイライブラリメンバによってコードされる核酸配列を示す文字列を含むレコードへのポインタである。関係するレコードは、例

10

20

30

40

50

えば、抗体のCDRまたはフレームワークのフィンガープリントを提供することができる。

【0104】

(サブライブラリID) 複合ライブラリがスクリーニングされるインプリメンテーションにおいて、これは、ディスプレイライブラリメンバのソースであることが決定されたサブライブラリを記録するレコードへのポインタである。サブライブラリは、複合ライブラリの構成集団の1つである。

【0105】

(親ライブラリ) これは、ライブラリメンバを同定するためにスクリーニングされたライブラリを記録するレコードへのポインタである。

(アッセイ結果) この項目は、ディスプレイライブラリメンバに対する機能情報110の表中のアッセイ結果のレコードが利用可能であるかどうかを示すブール演算子を含むことができる。別のインプリメンテーションにおいては、この項目は、1つまたは複数のこのようなレコードへのポインタを含むことができ、または機能情報自体を含むことができる。

【0106】

ディスプレイライブラリメンバのレコードは、初期化することができ、項目のいくつかに対する情報が利用可能になる前に使用することができる。例えば、核酸およびアミノ酸配列情報は、ライブラリメンバが分析され配列決定が認められた後でのみレコードと関連付けることができる。

【0107】

アッセイ

図5および図7を参照すると、個々のライブラリメンバは、アッセイ324、一般にハイスループットアッセイを用いて分析される。アッセイによって、各ライブラリメンバに対して表示されるポリペプチド成分の機能情報110が決定される。ポリペプチド成分に対する機能情報は、ポリペプチド成分がライブラリビヒクル(例えば、バクテリオファージ)に付着するかそこから除去されるときに得ることができる。機能情報110は、データベース60のアッセイ結果の表に記録される。表中の各エントリは、分析されるディスプレイライブラリメンバを指す項目、ならびにアッセイ結果、およびバックグラウンドレベルなどの他の関連する情報、および対照の結果を保存する別の項目を含む。

【0108】

機能情報110は、(例えば、特異性、動力学パラメータ、平衡パラメータ、結合力、親和性などに関係する情報を含めた)結合活性、触媒活性、構造特性または生化学特性(例えば、熱安定性、オリゴマー形成状態、溶解性など)、生理学的特性(例えば、腎クリアランス、毒性、標的組織特異性など)などの1つまたは複数に関係し得る。いくつかの実施形態においては、機能情報表の各レコード内の項目は、分析特性を示す。他の実施形態においては、機能情報は、例えば、異なる特性またはアッセイに対する複数の表を含む。

【0109】

ホモジナスアッセイ(homogenous assay)を含めて様々な可能なアッセイを以下に記述する。例えば、ELISAを、結合についての機能情報を特定するアッセイとして使用することができる。ELISAアッセイのデータベースレコードは、以下の情報を含むことができる。すなわち、標的試料(標的試料のレコードへのポインタ)、マルチウェルプレートタイプ、標的量(例えば、ng/ウェル)、遮断薬、遮断薬濃度、インキュベーション時間、インキュベーション温度、インキュベーション緩衝液組成、インキュベーションpH、インキュベーション体積、洗浄緩衝液、洗浄回数、洗浄体積、洗浄時間、認識分子(「RM」、例えば、ディスプレイライブラリメンバの定常領域に対する抗体などの酵素結合プローブ)、RM/ウェル量、RM結合時間、RM結合温度、RM用洗浄緩衝液、RM洗浄体積、洗浄回数、現像液、現像液量、現像時間、および予想信号範囲である。

10

20

30

40

50

【0110】

機能情報アッセイも以下で考察する（例えば、「後処理」参照）

ヒットピッキング

いわゆる「ヒットピッキング」プロセス330は、所与の判定基準を満たす個々のライブラリメンバを同定する機能情報の分析を含む。例えば、機能情報は、各ライブラリメンバによってコードされるポリペプチドの標的結合能力に関係し得る。この場合、分析の判定基準を最小結合活性とすることができる。機能情報のデータベースは、選別されて判定基準を満たす個々のライブラリメンバが同定される。

【0111】

サーバは、ヒットピッキング用インターフェースを備えることができる。サーバは、判定基準タイプ、例えば、特定のアッセイまたは他の要求（例えば、特定の配列またはライブラリメンバ）をユーザに照会する。サーバは、機能情報データベースを選別して、スクリーン（またはプロジェクト）の判定基準を満たすライブラリメンバを同定する。（例えば、同定されたライブラリメンバの数、平均スコアまたは中間スコアを示す）各同定されたライブラリメンバの情報を表示することができ、またはその結果の要約を表示することができる。個々のライブラリメンバに対する結果の表示例を図8に示す。

10

【0112】

オペレータ/ユーザは、結果を承認することができ、あるいはより多くのメンバまたはより少ないメンバを選択するために判定基準を変えることができる。また、同定されたヒット数を、プール検索用語を用いて（例えば、OR検索を用いて）増加させ、または（例えば、ANDを用いて）減少させることができる。これは、1つを超える機能アッセイを実施する場合には、特に有用になり得る。例えば、これは、（例えば、AND NOTを用いて）標的に結合するが非標的には結合しないものを同定することができる。

20

【0113】

次いで、この情報が、最初に第2のセットのマルチウェルプレートに配列された325個の個々のクローンをマルチウェルプレートから移動させる試料取扱い装置に通信される（いわゆる「再配列」プロセス325）。第2のセットには選択されたライブラリメンバのみが含まれるので、第2のセットは、マルチウェルプレートの最初のセットよりもサイズが小さい。この小さいフットプリントによって、後の操作が都合よく容易なものになる。

30

【0114】

データベース60への例示的なヒットピッキングインターフェース380を図8に示す。このインターフェースによって、ユーザは、タイトルバー386中のインターフェース上に示すことができる所与のプロジェクトに対するディスプレイライブラリメンバを手動で、または自動的に選択することができるようになる。インターフェースは、各ライブラリメンバの識別子（「抽出物」と標識されたカラムを参照）、その対応するアッセイ数値（「アッセイ値」と標識されたカラムを参照）およびグラフ書式設定396を表示する。利用可能であれば、各ライブラリメンバの配列またはその一部を示すことができる。アッセイの対照もグラフ化することができる。

40

【0115】

一態様では、ユーザは、判定基準を用いてライブラリメンバを選別することを選択する。この態様は、「判定基準を設定する」ボタン381を起動させ、判定基準を設定すべき特性を要求するクエリに応答することによって作動させることができる。一般に、この特性は、機能アッセイ結果の1つである。次に、グラフ表示396上でいわゆる「カットオフ」線394によって示すことができるしきい値がユーザに照会される。いくつかのインプリメンテーションにおいては、カットオフ線394自体は、ユーザがカーソル392を用いてしきい値を示すことによって位置決めすることができる。

【0116】

サーバ205は、ディスプレイライブラリメンバから判定基準を満たすメンバを選別する。チェックボックス390は、図8の例に示すように、アッセイ値が少なくとも0.2

50

5である判定基準を満たすメンバに対して自動的に選択されるようにすることができる。本明細書では示さない別の例においては、インターフェースは、判定基準を満たすライブラリメンバのみを表示する。

【0117】

別の態様においては、ユーザは、例えば、マウスによって制御されるカーソル292を用いて、1つまたは複数のライブラリメンバを手動で選択することができる。選択は、チェックボックス390の1つを「チェックする」ことによって起動させることができる。ユーザは、判定基準または検索表現（例えば、ブール検索表現）に対して照会すべき選択肢を選択することもできる。

【0118】

さらに別の態様においては、ユーザは、チェックボックス382を選択することによってブール検索を用いてライブラリメンバを照会するように選定することができる。ユーザは、複数の検索語を入力して、ライブラリメンバ情報を選別する。次いで、インターフェースは、検索語に合致するライブラリメンバを列挙し、または示す。

【0119】

インターフェース380は、選択されたライブラリメンバのリストを満たす383、または取り除く384ための選択可能なボックスも含む。例えば、インターフェースは、整数のマルチウェルプレートを作成するために追加または除去しなければならない選択ライブラリメンバの数の指標を表示することができる。この機能によって、ユーザは、マルチウェルプレート上の利用可能なすべてのウェルを積極的に再配列に使用することができる。ユーザは、選択を完了すると、「ヒットを再配列させる」ボタン386を選択する。これによって、再配列命令を試料取扱い装置に自動的に送ることができる。

【0120】

インターフェースは、例えばヒストグラムの棒を使用して、ライブラリメンバをグループとして表示して、分析した候補間の機能分布を示すこともできる。この例では、ユーザは、例えばカットオフ線を移動させてヒストグラムを切り詰めることによって、特定の棒、または一連の棒を選択してさらに分析することができる。

【0121】

いくつかのインプリメンテーションにおいては、ヒットピッキングが必要でないことは言うまでもない。メンバが初期に採取された容器から、選択されたライブラリメンバを「必要に応じて」回収することができる。さらに別のインプリメンテーションにおいては、再配列は、各選択されたライブラリメンバを処理するステップを含む。例えば、各選択されたライブラリメンバの関連する挿入断片をサブクロニングし、または異なる核酸ベクターに挿入することができる。

【0122】

配列決定

図5および図7を参照すると、第2のセットの各ライブラリメンバの核酸配列が決定される340。例えば、ライブラリの不変領域にアニールされるプライマーを用いて各メンバをPCR増幅させることができる。配列決定された領域がライブラリメンバ間で変動する領域に対応するように、プライマーを配置する。これらの試料を増幅させ、PCR配列決定反応によってその配列を決定する。

【0123】

これらの反応は、Applied Biosystems ABI3700などのキャピラリー配列決定装置230で分析される。ABI3700は、ディスプレイライブラリメンバと各読みを関連付ける情報および配列決定反応に関する情報（例えば、使用プライマー）とともに、配列決定結果を、自動的にサーバ205に送信するようにプログラムすることができる。このような情報を、サーバ205に手動でアップロードし、またはディスクまたは他の関係する記憶媒体を用いて転送できることは言うまでもない。他の配列決定方法、例えば、「ハイブリダイゼーションによる配列決定法」（例えば、米国特許第5,202,231号、同5,695,940号、および同6,007,987号参照）およ

10

20

30

40

50

び他の核酸アレイに基づく配列決定法も使用することができる。

【0124】

品質管理のために、配列の各領域を2回以上読み取ることができる。例えば、相補鎖にアニールされるプライマーを使用して、所与のセグメントの順方向と逆方向の読みを得ることができる。複数の読みを、PHREDおよびPHRAP（例えば、EwingおよびGreen（1998）Genome Research 8：175～185；EwingおよびGreen（1998）Genome Research 8：186～194；およびGordon等（1998）Genome Research 8：195～202参照）などのベースコーリングソフトウェアを用いて解析して、配列決定された各ヌクレオチドに対する確信値（certainty value）を得ることができる。

10

【0125】

サーバ205は、確信値を使用して核酸配列を検証する。確信値がプリセットしきい値外の場合、配列決定装置230に問題のディスプレイライブラリメンバを再配列させるように自動的に指示するステップ；例えば電子メールまたは警告メッセージボックスでオペレータに通知するステップ；および/またはさらに検証が必要な核酸配列レコードに印を付けるステップの1つまたは複数を実施する警告が起動される。

【0126】

特に確かめられた配列の場合、サーバ205は、関連する読み枠中の核酸を自動的に翻訳することができる。関連する読み枠は、ディスプレイライブラリ設計または推測によって示すことができる。データベース60は、核酸配列の翻訳に使用されるいくつかの静的テーブルを含むことができる。これらのテーブルとしては以下のものなどがある。

20

【0127】

（アミノ酸リスト）：この表は、20種類のアミノ酸名のカラムとそのコード識別子のカラムを有する。必要に応じて、この表は、3文字標準名称（例えば、「Ala」）、および単一文字標準名称（例えば、「A」）の追加カラムを含むことができる。

【0128】

（コドン表）：この表は、64個の全トリヌクレオチドをそれらがコードするアミノ酸または終止コドンと関連付ける。

サーバ205は、核酸配列をコドンに分解し、コードされるアミノ酸をコドン表で検索する。例えばアミノ酸表によって提供されるアミノ酸コードは、アミノ酸配列表中のアミノ酸配列レコードのストリングに追加される。当該ライブラリで適切であれば、サーバ205は、アミノ酸配列がライブラリ設計と一致することも検証する。例えば、アミノ酸は、定常領域（例えば、抗体ライブラリのフレームワーク領域およびシステインループライブラリのシステイン）中のテンプレートと合致する必要がある、可変領域中で許容される1セットのアミノ酸にも合致しなければならない。この検証は、例えば下記複合ライブラリで考察するように、核酸配列レベルでも実施できることは言うまでもない。

30

【0129】

いくつかのディスプレイライブラリは、多連鎖配列、例えば、2つのポリペプチド鎖を含むタンパク質を表示する。例えば、抗体Fab断片は、重鎖および軽鎖ポリペプチドを含む。両方の鎖の変異領域（variant region）の配列を決定することができ、または、いくつかのインプリメンテーションにおいては、ちょうど1本の鎖の配列を決定するだけで十分な場合もある。例えば、1本の鎖のみが変異領域を含む場合がある。

40

【0130】

ライブラリメンバの完全な変異領域配列を決定可能な一別法として、ライブラリメンバは、1つまたは複数の制限酵素で分解してフィンガープリントを取り、または単一のジデオキシヌクレオチドを用いて配列を決定してトラクト（tract）、例えば、T-トラクトを生成することができる。いくつかのライブラリ、例えば、非翻訳核酸タグ配列を含むライブラリの場合、完全な変異領域ではなくタグなどの小領域の配列を決定するだけで十分な場合がある。ディスプレイライブラリメンバ候補をさらに精査した後、部分的に配列決定した、またはフィンガープリントを取ったライブラリメンバの配列を決定して、完

50

全な変異領域、例えば、CDRなどの変化したドメイン全体またはセグメントの配列を決定することができる。

【0131】

ロボット工学

様々なロボット装置が自動化プロセスに使用される。これらは、マルチウェルプレート搬送システム、磁気ビーズ粒子処理装置、液体取扱い装置、コロニー採取装置などである。

【0132】

これらの装置は、注文仕様で製作することができ、またはAutogen (Framingham MA)、Beckman Coulter (USA)、Biorobotics (Woburn MA)、Genetix (New Milton, Hampshire UK)、Hamilton (Reno NV)、Hudson (Springfield NJ)、Lab systems (Helsinki, Finland)、Perkin Elmer Lifesciences (Wellseley MA)、Packard Bioscience (Meriden CT)、Tecan (Mannedorf, Switzerland)などの商用ソースから購入することができる。

10

【0133】

これらの装置の各々は、それら自体の特殊なデータフォーマットを有していてもよく、標準形式のデータ（例えば、タブ区切りテキストなど）をエクスポートすることもできる。サーバ205は、これらのデータ書式設定を、処理可能かつデータベース中に保存可能な情報に分解するスクリプトまたは他のソフトウェアを含むことができる。サーバ205は、装置が判断可能なコマンドおよび他の信号を用いて各装置と通信するように構成することもできる。これらの特別設計のインターフェースを、常法に従って、装置製造者が提供する仕様から構築することができる。

20

【0134】

図9に、プロセス10および図3に図式化したシステム200のインプリメンテーション用の例示的な自動システム400を示す。システム400は、ステーション420、430、440間でマルチウェルプレートを送送する搬送装置405を備える。

【0135】

例えば、このシステムは、コロニー採取用のマルチウェルプレートを用意する液体取扱いステーション420を備えることができる。この準備システムでは、プレートウェルに無菌培地を充填する。次いで、プレートがロボットによってプレート採取装置410中に配置される。1回、2回（または3回以上）採取した後、1対のプレートを自動的にインキュベータ424に移送して増殖させる。その後、1対のうちの1つを保存装置、例えば、4、-20 または -80 の保存装置420に移す。もう一方をバインディング（結合）アクセステーション440に移す。

30

【0136】

ELISAアッセイの例では、アクセステーション440は、ELISAプレートを用意する自動液体取扱い装置442、ELISAプレートを洗浄する洗浄装置444、および結合を定量する検出器446を備える。

40

【0137】

アッセイ結果を解析し、ヒットを採取した後、保存されたプレートを用いて、採取したヒットを第2のマルチウェルプレート対に再配列させることができる。再配列は、自動液体取扱いステーション420に配置された再配列ロボット422によって実施することができる。再配列後、1対のプレートをインキュベータ424に移送して増殖させる。1対のうちの1つを保存装置426に自動的に移し、もう一方を搬送装置405によって配列決定セットアップステーション430に移す。

【0138】

配列決定セットアップステーション430は、例えばマルチウェルプレートを受けるように構成されたサーマルサイクラー434中で、PCR配列決定反応用のマルチウェルプ

50

プレートを用意する。プレートの各ウェルに、ディスプレイライブラリメンバを含む細胞試料（例えば、ディスプレイライブラリの場合のファージ感染細胞）を蒔く。PCR増幅またはDNA調製および配列決定の後、試料をABI 3700などの配列決定装置436に手動または自動で装填する。

【0139】

自動選択

再度図1を参照すると、スクリーニングプロセス30は、手動で、または自動化された方法で実施することができる。自動選択の一例は磁性粒子を使用するものである。

【0140】

この場合、標的は、磁性粒子上（例えば下記の磁性粒子上）に固定される。Thermo Lab Systems (Helsinki, Finland)の磁性粒子処理装置であるKing Fisher (商標)システムを使用して、標的に対してディスプレイライブラリメンバを選択することができる。ディスプレイライブラリを、管中の磁性粒子に接触させる。ビーズとライブラリを混合させる。次いで、使い捨ての外筒で覆われた磁気ピンが、磁性粒子を回収し、洗浄溶液を含む別の管にそれらを送る。粒子を溶液と混合させる。このように、磁性粒子処理装置を使用して、磁性粒子を複数の管に連続移送して、非特異的にまたは弱く結合しているライブラリメンバを粒子から洗浄することができる。洗浄後、粒子を溶出緩衝液を含む管に移送して、特異的かつ/または強く結合しているライブラリメンバを粒子から取り除く。次いで、これらの溶出したライブラリメンバを個々に抽出して上述したように分析し、または追加の選択ラウンド用にプールする。

10

20

【0141】

選択を実施するために自動化を利用することによって、選択プロセスの再現性ならびに処理量が増す。

例示的な磁気応答粒子は、DynaL Biotech (Oslo, Norway)から入手可能なDynabead (登録商標)である。Dynabeads (登録商標)は、均一サイズ（例えば、 $2\ \mu\text{m}$ 、 $4.5\ \mu\text{m}$ および $5.0\ \mu\text{m}$ 直径）の球状表面を有する。ビーズは、磁気材料としてガンマ Fe_2O_3 および Fe_3O_4 を含む。粒子は、超常磁性であり、磁場中で磁気特性を有するが磁場の外では残留磁気がない。様々な表面（例えば、カルボキシル化表面を有する親水性表面、およびトシル基によって活性化された疎水性表面）の粒子が利用可能である。粒子をBSA、またはカゼインなどの遮断薬でブロックして、標的以外の化合物が粒子に非特異的に結合およびカップリングするのを抑えることもできる。

30

【0142】

標的は、常磁性粒子に直接または間接的に付着する。常磁性粒子に連結された形の様々な標的分子を購入することができる。一例においては、標的は、反応性基（例えば、架橋剤（例えば、N-ヒドロキシ-スクシンイミジルエステル）またはチオール）を含む粒子に化学的に結合する。

【0143】

別の例においては、標的を、特異的結合対のメンバを用いて粒子と連結させる。例えば、標的にビオチンを結合させることができる。次いで、その標的を、ストレプトアビジンで被覆された常磁性粒子に結合させる（例えば、DynaL Biotech, Oslo, Norwayから入手可能なM-270およびM-280ストレプトアビジンDyna particles (登録商標)）。一実施形態においては、標的に試料を接触させた後に、標的を常磁性粒子に付着させる。

40

【0144】

特異的結合対の別のクラスは、ペプチドエピトープおよびそれに特異的なモノクローナル抗体である（エピトープタグを用意する一般的な方法については、例えば、KolodziejおよびYoung (1991) Methods Enz. 194: 508-519を参照されたい）。例示的なエピトープタグとしては、HA（インフルエンザ血球凝集；Wilson等 (1984) Cell 37: 767）、myc（例えば、Myc1-

50

9 E 1 0、E v a n 等 (1 9 8 5) M o l . C e l l . B i o l . 5 : 3 6 1 0 ~ 3 6 1 6)、V S V - G、F L A G、および 6 - ヒスチジン (例 えば、ドイ ツ 特 許 第 1 9 5 0 7 1 6 6 号 参 照) が あ る。

【 0 1 4 5 】

他 の 例 示 的 な 特 異 的 結 合 対 と し て は、細 胞 表 面 タ ン パ ク 質 と そ れ に 結 合 す る リ ガ ン ド (例 えば、抗 体 な ど の ペ プ チ ド ま た は ポ リ ペ プ チ ド) が あ る。細 胞 表 面 タ ン パ ク 質 は、特 定 の 細 胞 タ イ プ、ま た は 特 定 の 特 性、挙 動 も し く は 障 害 を 有 す る 細 胞 に 特 異 的 で あ り 得 る。例 えば、細 胞 は 癌 細 胞 と す る こ と が で き、抗 体 は、低 グ リ コ シ ル 化 (h y p o g l y c o s y l a t e d) M U C 1、メ ラ ノ マ 分 化 抗 原 g p 1 0 0 ま た は C E A 1 に 特 異 的 に 結 合 す る こ と が で き る。

10

【 0 1 4 6 】

イ ン タ ー フ ェ ー ス

デ ー タ ベ ー ス 6 0 に 保 存 さ れ た 情 報 は、多 く の 方 法 で ア ク セ ス す る こ と が で き る。再 度 図 4 を 参 照 す る と、デ ー タ ベ ー ス 6 0 は、ネ ッ ト ワ ー ク 2 4 5 経 由 で 通 信 状 態 に あ る ユ ー ザ シ ス テ ム 2 4 0 の イ ン タ ー フ ェ ー ス に 接 続 す る こ と が で き る。例 えば、ユ ー ザ シ ス テ ム 2 4 0 は、サ ー バ 2 0 5 と X M L ま た は H T M L で 通 信 す る ウ ェ ブ ブラウザを用いて、デ ー タ ベ ー ス 6 0 に 照 会 す る こ と が で き る。一 例 に お い て は、イ ン タ ー フ ェ ー ス は、ユ ー ザ に い く つ か の 利 用 可 能 な 選 択 肢 を 決 定 さ せ る 最 上 位 メ ニ ュ ー を 含 む。ユ ー ザ は、デ ィ ス プ レ イ ラ イ ブ ラ リ メ ン バ を 照 会 し、レ ポ ー ト を 個 別 に 設 定 し、シ ス テ ム 2 0 0 ま た は プ ロ ジ ェ ク ト を 監 査 し、配 列 分 析 ま た は 他 の バ イ オ イ ン フ ォ マ テ ィ ク ス ツ ー ル を 実 行 す る な ど の 選 択 を す る こ と が で き る。ユ ー ザ 選 択 に よ っ て、イ ン タ ー フ ェ ー ス は 各 特 定 の 選 択 専 用 の 子 メ ニ ュ ー を 表 示 す る。

20

【 0 1 4 7 】

1 つ の 子 メ ニ ュ ー に よ っ て、ユ ー ザ は、可 能 な ク エ リ を 選 択 す る こ と が で き る。1 つ の タ イ プ の ク エ リ に よ っ て、上 述 し た 図 8 の ヒ ッ ト ピ ッ キ ン グ イ ン タ ー フ ェ ー ス が 作 動 す る。別 の タ イ プ の ク エ リ に よ っ て、ユ ー ザ は デ ー タ ベ ー ス 6 0 の 任 意 の 項 目 を 用 い て 検 索 す る こ と が で き る。例 えば、特 定 の プ ロ ジ ェ ク ト (例 えば、特 定 の 日 付 前 に 開 始 さ れ た プ ロ ジ ェ ク ト)、特 定 の ク ラ イ ア ン ト、特 定 の 選 択 条 件 (例 えば、特 定 の 製 造 者 か ら の 磁 性 粒 子 を 使 用 し た 選 択) な ど を 確 認 す る た め に 検 索 す る こ と が で き る。

【 0 1 4 8 】

別 の 子 メ ニ ュ ー に よ っ て、ユ ー ザ は、電 子 レ ポ ー ト の 様 式 を 個 別 に 設 定 す る こ と が で き る。こ の 書 式 を、特 定 の ク ラ イ ア ン ト、オ ペ レ ー タ ま た は プ ロ ジ ェ ク ト と 関 連 付 け る こ と が で き る。こ の 様 式 に よ っ て、レ ポ ー ト 書 式 設 定 パ ラ メ ー タ (例 えば、1 ペ ー ジ 当 た り の ヒ ッ ト 数、色 の 使 用、グ ラ フ の 使 用 な ど) が 決 定 さ れ る。様 式 は、レ ポ ー ト の ファ イ ル 形 式 (例 えば、マ イ ク ロ ソ フ ト (登 録 商 標) エ ク セ ル、ワ ー ド ま た は パ ワ ー ポ イ ン ト な ど の マ イ ク ロ ソ フ ト (登 録 商 標) オ フ ィ ス ア プ リ ケ ー シ ョ ン、ポ ス ト ス ク リ プ ト、ア ド ビ (登 録 商 標) ポ ー タ ブ ル ド キ ュ メ ン ト フ ォ ー マ ッ ト (P D F)、H T M L、X M L、メ タ タ グ 付 き テ キ ス ト、テ キ ス ト、タ ブ 区 切 り テ キ ス ト、ビ ジ ュ ア ル ベ ー シ ッ ク 互 換 な ど) も 指 定 す る こ と が で き る。フ ェ イ ル は、暗 号 化 す る こ と も プ ロ テ ク ト (例 えば、独 立 に、読 出 し 禁 止 ま た は 書 込 み 禁 止) を か け る こ と も で き る。サ ー バ 2 0 5 は、自 動 レ ポ ー ト の 書 式 を 設 定 す る た め に こ の 様 式 仕 様 に ア ク セ ス す る こ と が で き る (下 記 参 照)。こ の 様 式 メ ニ ュ ー は、検 索 後 に、検 索 結 果 レ ポ ー ト を 個 別 に 設 定 す る た め に 検 索 メ ニ ュ ー か ら ア ク セ ス す る こ と も で き る。

30

40

【 0 1 4 9 】

こ の 様 式 メ ニ ュ ー を 使 用 し て、核 酸 配 列 お よ び / ま た は ア ミ ノ 酸 配 列 の 表 示 を 個 別 に 設 定 す る こ と も で き る。配 列 の 様 式 仕 様 を、特 定 の ラ イ ブ ラ リ と 関 連 付 け る こ と も で き る。個 別 の パ ラ メ ー タ は、あ る 種 の 色 に よ る 特 定 位 置 の 着 色、ま た は あ る 種 の 色 に よ る 特 定 残 基 タ イ プ の 着 色 を 含 む こ と が で き る。ア ミ ノ 酸 配 列 の 場 合、例 えば、疎 水 性 残 基 を 赤 色 で、親 水 性 残 基 を 青 色 で 示 す こ と が で き る。抗 体 配 列 表 示 の 一 例 に お い て は、フ レ ー ム ワ ー ク に 対 応 す る 位 置 を 青 色、相 補 性 決 定 領 域 (C D R) に 対 応 す る 位 置 を 赤 色 と す る こ と が

50

できる。さらに別の例においては、この様式によって、特定の位置、例えば、可変位置のみまたはCDR位置のみの表示が指定される。

【0150】

さらに別の子メニューによって、ユーザは、システムまたはプロジェクトを監査することができる。この選択肢が起動されると、サーバ205は、必要な監査のタイプおよび程度に関してユーザに照会する。例えば、システムの監査は、作動中の装置および作動中のプロジェクトを簡潔に列挙するテキスト表示またはレポートを含むことができる。他の詳細なレベルが利用可能なことは言うまでもない。別の例においては、システム監査は、グラフ表示され、装置がアイコン表示され、操作上の処理量に応じて色付けされる。

【0151】

プロジェクト監査は、現在の日付、将来の目標日付、および過去のマイルストーンに関する時間線上に位置するアイコンを含むグラフとしても提供される。同じ監査を、テキストとして表形式で提示することもできる。

【0152】

さらに別の子メニューによって、ユーザは、下記に示すものなどのバイオインフォーマティクスツールに接続することができる。

インターフェースの1タイプは、例えば、1つもしくは複数のプロジェクト、または1つもしくは複数のヒットリストから選択された一部またはすべてのディスプレイライブラリのリストを示す。インターフェースは、本明細書に記載する1つまたは複数の項目を任意の様式（例えば、ユーザ指定の様式）で示すことができる。例えば、インターフェースは、識別子、選択位置のアミノ酸およびアッセイ情報（例えば、バインディングアッセイ、酵素アッセイなどの機能アッセイ情報）を示すことができる。選択された特徴的配列は、例えば、下記入力配列情報を解析することによって確認することができる。

【0153】

インターフェースは、各表示されたライブラリメンバの配列分析、例えば、基準配列に対する類似性（例えば、同一性パーセントまたはスコア）、コンセンサス配列に対する類似性、疎水性（例えば、全体の疎水性または選択部位の疎水性）、親水性、pI、電荷、分子量、予想されるストークス半径、薬らしさ（*drugability*）などに関連するパラメータを示すこともできる。このようなパラメータおよびスコアは、例えば、式、例えば、実験式、任意の式または理論式によって決定することができる。

【0154】

インターフェース上に示された別のパラメータは、2つ以上の項目の関数とすることができる。例えば、パラメータの1つを特異性比（例えば、非標的（例えば、標的分子と相同であるが同一ではない分子）に対する結合活性で割った標的結合活性）とすることができる。

【0155】

バイオインフォーマティクスおよび配列分析

様々なバイオインフォーマティクスツールを手動または自動で使用して、ディスプレイライブラリスクリーニングプロセス10によって同定された配列を解析することができる。このようなツールの例は、配列解析、配列検索、複数の配列アラインメント、および構造モデリングである。

【0156】

（配列解析）核酸配列決定装置によって決定された核酸配列データを解析することができる。解析は、いつでもあらゆるプロセッサ、例えば、配列装置に付属するプロセッサ、ネットワークコンピュータシステムなどによって実行することができる。一実施形態においては、解析は、配列生データの品質スコアを評価するステップ、ヌクレオチド（例えば、ディスプレイベクターまたは表示されたタンパク質中の不変位置にあるヌクレオチド）のパターンを同定するステップとを含む。いくつかの例においては、ヌクレオチドパターンは、特定のポリペプチドモチーフをコードするコドンのセットである。

【0157】

10

20

30

40

50

一実施形態においては、解析ルールは、天然の多様性（例えば、天然の免疫グロブリン可変ドメイン多様性）のプールを含むライブラリにおいて関連する特徴的配列を同定するように設計される。このようなルールは、タンパク質ファミリー中の既知のメンバを比較し、ライブラリ構築考慮事項、例えば、特定の変性プライマーまたは不変プライマーなどの使用を含めることによって確認することができる。天然の多様性を検索するルールは、一般に広く、特定の保存アミノ酸または特定のセットのアミノ酸をコードするすべてのコドンが関連する位置で同定される。

【0158】

別の実施形態においては、解析ルールは、合成ライブラリにおいて関連する特徴的配列を同定するように設計される。合成ライブラリは、（例えば、本明細書に記載するように）特定のヌクレオチド位置において程度の制御された変異を含むことができる。解析ルールは、ライブラリ設計に一致する特徴を同定するように「狭く」定義することができる。天然と合成の両方の多様性を含むいくつかのライブラリは、各関連する位置に対する両方のタイプのルールを含むことができる。

【0159】

核酸配列における特定の特徴を同定することによって、変動する領域または物理的相互作用に關与すると予想される領域（例えば、CDR位置）を、自動的に探し出し、ユーザに強調表示することが可能になる。また、不変領域をコードする核酸配列をデータから削除することができる。例えば、コード領域上流のベクター配列は廃棄される。

【0160】

1つのインプリメンテーションにおいては、削除された核酸配列が互いに比較され、複製を迅速に同定することができる。ライブラリメンバは、それらの配列同一性に基づいて各グループに分別することができる。例えば、特定の軽鎖配列を有する（例えば、免疫グロブリンライブラリからの）すべてのライブラリメンバを含むことができる第1のグループは、1つのグループを成す。グループメンバのすべてを同定することができ、または重鎖配列の変動を含むことができる。インターフェースは、グループ数および各グループのメンバ数を示すことができる。例えば配列同一性以外の他の判定基準を使用することができ、例えば、相同性、疎水性などに基づいてグループを形成することができる。ユーザは、スクリーニング結果をグループとして見ることができ、グループの個々のメンバを可視化するためにグループを選択することができる。

【0161】

一例においては、免疫グロブリン可変ドメインをコードするディスプレイライブラリメンバの核酸配列データを解析して、シグナル配列、FR1、FR2、FR3、FR4および定常領域を配置する配列特徴を同定する。CDRは長さが様々であり得るので、多くの場合、これらの特徴の位置は重要である。天然の多様な免疫グロブリン可変ドメインにおいて同定することができる特徴の一例は、表3および4に示す特徴である。

【0162】

【表1】

表3：免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの解析

ルール	特徴名
FYSH[S R].	シグナル
QDI[Q V].{19}.	FR1_1
QS.{19}.	FR1_2
W.{1,2}Q.{9,10}I.	FR2
G[V M I].{27,29}Y[Y H F]C	FR3
FG.G[T A].{5}	FR4
[G S R]QP.{3,4}P R.{4,5}P	末端

【0163】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 4：免疫グロブリン重鎖可変ドメインの解析

ルール	特徴名
.{3}QPA[M S]A	リーダー配列
EVQ.+LRLSCAASGFTF[S Y]	FR1
.Y.M.	CDR1
WVRQAPGKGLEWVS	FR2
.I.{2}SGG.T.YADSVKG	CDR2
R.{22}EDTA	FR3
.[Y C]YCA[R K S]	FR3
.[+WG[R K Q]G[T A]	CDR3 & FR4
.VTVS.	FR4
ASTKGPSVFP	末端

10

【0164】

これらの特徴を同定する表 3 および 4 におけるルールは、ストリング比較用の P E R L 規則を用いて書かれている。記号 = . (ドット) 意味 = スペース以外の任意の文字 (任意のアミノ酸を示すために使用される、または (. , q , s , *) によって表される終止コドンの一種。記号 = + 意味 = 併用されたときの任意の長さ (例えば、. + は、列中のスペース以外の文字の無限長を意味する)。記号 = [x | y] 意味 = アミノ酸パターンにおけるこの特定の位置は、x または y であり得る。[x u | y u] のように併用して使用することができ、x u または y u と称する相互の後の 2 つの a a を意味する。[] の記号間のあらゆるものは、連続した複数のアミノ酸に一致する場合でも、P E R L においては単一のエンティティと見なされる。例：[x u | y u] { 4 } は、「x u y u x u y u」またはいくつかの他の組合せのように 4 回連続して現れるパターン x u または y u を意味する。記号 = { x } 意味 = 先行するパターンが正確に x 回 (x は整数である) に一致する。例：x { 5 } は、パターンに一致する連続 5 回の x である。記号 = { x , y } 意味 = どんなパターンが前に来ようと、x の最小および y の最大 (x および y は整数である) に一致する。例：x { 1 , 2 } は、パターンに一致する少なくとも 1 つの x および最高 2 つの連続した x を意味する。x { 1 , } および x { , 4 } などの組合せは、それぞれ少なくとも 1

20

30

【0165】

いくつかの実施形態においては、解析に失敗した配列は標識されて、手動で再検討されるか、自動で再配列決定 (r e s e q u e n c i n g) される。例えば、下記「自動情報管理」を参照されたい。

【0166】

(配列検索) インターフェースメニューは、配列決定されたライブラリメンバ候補の 1 つまたは複数を用いて核酸またはアミノ酸配列検索を実行する選択肢を提供することができる。B L A S T (A l t s c h u l 等 (1 9 9 0) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 ~ 1 0) 、 F A S T A (P e a r s o n (1 9 9 0) M e t h o d s E n z y m o l 1 8 3 : 6 3 ~ 9 8) 、 C L U S T A L W (T h o m p s o n 等 (1 9 9 4) N u c l A c i d s R e s 2 2 : 4 6 7 3 ~ 4 6 8 0) などの標準配列比較ルーチンを使用して比較することができる。例えば、比較は、G C G (登録商標) W I S C O N S I N P A C K A G E (商標) プログラム (A c c e l r y s , S a n D i e g o C A) によって提供されるモジュールを用いて実行することができる。インターフェースを用いてモジュールを実行することができ、配列を単に選択することによって分析を実行することができる。配列検索ルーチンは、以下のデータベースの 1 つまたは複数を検索することができる。

40

【0167】

非冗長核酸配列 (例えば、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h

50

nology Information, National Institutes of Health, Bethesda MDから利用可能なGenBank提供)

- 非冗長ポリペプチド配列 (例えば、GenBankから)

- 特許配列

- 他の配列決定されたディスプレイライブラリメンバ (例えば、情報がすべての利用可能なプロジェクト、所与のプロジェクト、または1セットのプロジェクト用のサーバに保存された任意のディスプレイライブラリメンバ)のコレクションなど所有権のある配列。

【0168】

天然および他の利用可能な配列を検索することによって、活性に対して生物学的に関連のある共通の特徴を同定することができる。所有権のある配列を検索することによって、偽陽性を確認することが可能である。例えば、配列は、無関係な標的に対する選択キャンペーンにおいて同定される傾向にある。

10

【0169】

(複数の配列アラインメント)検索を使用して、ヒット(例えば、所与のプロジェクトに対するヒット)のコレクション内のモチーフを同定することもできる。所与の選択キャンペーンまたは所与のプロジェクトから抽出されるすべてのヒットの対ごとのアラインメントを再帰的に実行して、1つまたは複数の配列アラインメントを作成することができる。例えば、GCG(登録商標)「パイルアップ」モジュールを使用して、このような配列すべての整列を試みることができる。

【0170】

PHYLI Pの系統学的ブートストラッピング技術などの系統学的技術を用いて、このようなアラインメントの強制を試みることにも可能である(例えば、Felsenstein(1989)Cladistics 5:164~166およびUniversity of Washington, Seattle WAによって提供されるオンラインリソースを参照されたい)。

20

【0171】

この分析によって、リガンド間(特に少なくともしきい値の活性を有するリガンド間)で共通のモチーフを同定することができる。このようなモチーフの同定を使用して、モチーフの周囲の配列空間を高濃度にサンプリングするのに専用のより小さなディスプレイライブラリを設計することができる(下記参照)。

30

【0172】

外部および内部配列データベースの検索も、例えば、下記自動チェックのように自動化することができる。

(構造モデリング)このツールを使用して、ディスプレイライブラリメンバの3次元座標を設計することができる。このツールは、まず、多数の可能なモデリング技術の1つを用いてモデルを構築する。次いで、このツールによって、モデルがインターフェース上の2次元または3次元イメージにされ、ユーザに見えるようにする。

【0173】

モデリング技術は、相同モデリング、エネルギー極小化などの標準戦略に依拠することができる。コンピュータ支援の相同性に基づく構造予測方法は、周知であり、自動化でき、デスクトップPCを用いて局所的に、または、例えば、アプリケーションを走らせているサーバに接続することによって遠隔的に実行することができる。1つの例示的な相同モデリングスイートは、SWISS-MODEL構造予測プラットフォームである(例えば、Guex等(1999)TiBS 24:364~367、およびSwiss Institute of Bioinformatics, Geneva, SwitzerlandのEXPASYから利用可能なオンラインリソースを参照されたい)。さほど自動化されていない他のより高度なアルゴリズムを使用することもできる。Ludi(Biosym Technologies Inc., San Diego, CA)およびAladdin(Daylight Chemical Information Systems, Irvine CA)などのいくつかの予測プラットフォームが市販されている

40

50

。

【0174】

モデルは、標的リガンドまたは基質と合体させることもできる。例えば、Ewing および Kuntz (1997) J Comput. Chem. 18: 1175 ~ 1189 を参照されたい。

【0175】

自動情報管理

サーバ205は、システム200によって扱われる多数のプロジェクトおよび装置をモニタする自動チェックを、例えば、定期的に（例えば、毎晩、毎週など）実行することもできる。

10

【0176】

1セットの自動チェックによって、所与の間隔で装置使用効率が決定される。例えば、サーバは、各装置が最適に実行されているかどうかをイベントログから決定することができる。動作不能時間が増加すると、当該装置のオペレータまたはサービス技術者に、例えば電子メールで、自動警告を発することができる。

【0177】

別のセットの自動チェックによって、各ライブラリの性能が決定される。この分析は、複合ライブラリ、サブライブラリ、および個々のライブラリのレベルで実施することができる。このシステムは、ライブラリの各々から同定された候補数を決定することができる。これらの候補の成功率についての統計データを収集することができる。他の同様に設計されたライブラリよりも性能の劣るライブラリは注意を受ける。当該ライブラリのオペレータは、性能が最適以下である可能性を示す自動警告を受信することができる。

20

【0178】

同様に、サーバ205は、様々なプロジェクトに対して同じライブラリから得られる候補配列を比較することができる。無関係な標的化合物に対して抽出された候補において過度に見られる配列またはモチーフをサーバが同定した場合、これらの配列に、それらが出現するすべてのプロジェクトにおいて標識を付けることができる。この標識は、配列が偽陽性の恐れがあり、無関係な標的化合物に対する活性を点検すべきであることをオペレータに警告する。

【0179】

複合ライブラリの場合、サーバは、各サブライブラリが予想通りの性能を発揮しているかどうかを決定することができる。例えば、各サブライブラリから得られる候補数についての統計データがアップデートされ、設計パラメータと比較される。ライブラリ設計者は、統計データを点検し、新しい複合ライブラリ試料におけるサブライブラリの割合を変更し、新しいライブラリ構築物の品質を制御することができる。

30

【0180】

第3のセットの自動チェックは、プロジェクトの進行をモニタすることができる。サーバ205は、それまでの進行を初期に入力した予測マイルストーンと比較することができる。サーバ205は、オペレータおよび責任者に遅延を自動的に警告する。サーバ205は、これまでの進行および装置効率についての情報に基づいて予測を修正することもできる。例えば、必要な保全または試薬不足のために、例えば、動作不能時間が検出された場合、予測が変更され、オペレータおよび責任者に通知される。

40

【0181】

第4のセットの自動チェックは、例えば、プロジェクト内、スクリーン内、またはデータベース全体における、配列決定されたディスプレイライブラリメンバの配列比較および/または複数の配列アラインメントを開始することができる。サーバ205は、これらのタスクを実行ことができ、結果レポートをオペレータに自動的に送ることができる。これに加えて、またはこれとは別に、サーバ205は、結果を解析することができ、傾向および予想からの偏差を記録することができる。例えば、配列決定されたライブラリメンバすべての配列を、単一の複数の配列アラインメントに適合させることができる場合、こ

50

れは、スクリーニングプロセスにバイアスが導入されたこと、または共通の分子インターフェースが作動していることをユーザに示している可能性がある。

【0182】

第5のセットの自動チェックは、サーバ205によって受信されたデータの品質を検証することができる。例えば、受信された各配列の読みを、品質パラメータ、例えば、PHREDのパラメータによって検証することができる。別の例においては、アッセイプレートからスキャンされたデータを評価する。例えば、バックグラウンドおよび対照試料の値を、許容範囲と比較することができる。

【0183】

検査ルーチンが、標準以下のデータまたはいくつかの判定基準を満たすデータを同定するとき、システムは、試料取扱い装置にさらにデータを取得するように自動的に命令することができる。例えば、配列の品質が劣る場合、システムは、再配列決定の要求または命令を出すことができる。さらに、検査ルーチンは、例えば、品質が特定の領域において劣化する場合、配列決定反応用のプライマーおよびストランドを示すことができる。同様に、システムは、アッセイを再度実施する要求または命令を出すことができる。

【0184】

データ品質に偏向がある場合、システムは、装置またはユーザに接続して、実験室条件および試薬の不具合を改善することもできる。収集された情報を、データ品質と実験条件についての情報を関連させるデータベースに保存することができる。次いで、品質の劣るデータを受信したときに、問題を特定または示唆するように、システムを（例えば、ニューラルネット、ファジイ論理、または統計上の相関関係を用いて）トレーニングすることができる。例えば、特定の配列の読解が低活性DNA配列決定酵素（すなわち、ポリメラーゼ）と相関する場合、システムは、ユーザまたは装置に、点検または新しい酵素のバッチを用意することを警告することができる。したがって、試薬、装置、試料および環境条件を、システムによって自動的にモニタすることができる。

【0185】

バーコード方式&イベント監査

図10を参照すると、各マルチウェルプレートは、一般に、最初に用意されたときに、一義的なプレート識別子が割り当てられる。この割り当てとしては、サーバ205に一義的な識別子を要求するステップ450が含まれる。サーバ205は、割り当てられたプレート識別子の表を検索し452、例えば、識別子の最高値を増すステップ454によって、例えば、次に割り当てるべき識別子を決定する。プロジェクト名またはプロジェクト番号を識別子の左側に連結させて参照を容易にすることができる。サーバは、割り当てられたプレート識別子の表中に要求に関連する情報を保存456し、一義的な識別子をプレート採取装置に返信458する。次いで、識別子は、マルチウェルプレート上にバーコードを用いて貼られることができる460。マルチウェルプレートは、対象とする各イベントに対して追跡462される。追跡は、各イベントの前後にバーコード標識を走査するステップを含むことができる。イベントのインスタンスがサーバに通信され、ログに記録464される。

【0186】

ログは、イベント表とすることができる。各イベントは、イベントを追跡したプレート識別子と、イベント性質の表示（例えば、「ステーション1で用意」「ステーション2で接種」など）と、イベントの時間および位置についての情報との関連性を含む。記述的情報を、例えば、イベントコード表中で識別されたコードを用いてコード化することができる。

【0187】

プロセス全体440によって、マルチウェルプレートを容易かつ正確に標識することが可能になる。また、スクリーニングプロセス10に関連するイベントはすべて追跡されるので、プロジェクトまたはシステム200全体の状態を決定することが可能である。また、マルチウェルプレートがシステム200内にある場合、その内容および履歴についての

10

20

30

40

50

情報は、サーバ205を照会することによって容易に検索することができる。

【0188】

他のタイプのオブジェクト識別子を、例えば、バーコードの代わりに使用することができる。例えば、各プレートは、高周波(RF)タグ、ホログラムまたは電子チップなどあらゆるタイプの光学、磁気、電子、化学または物理的識別子を含むことができる。

【0189】

外部クライアント

図11を参照すると、外部クライアント262は、ライブラリスクリーニングサービスプロバイダー242にプロジェクトを依頼する。データベース60は、外部クライアント262に関連する個人が情報にアクセスできるように構成されている。アクセスは、1) 外部クライアントにおいて認証された個人、2) 依頼されたプロジェクト、ただし他人によって依頼されたプロジェクトではないプロジェクトに関連する情報、3) 例えば検証および品質管理に対して、内部ユーザによって公開された情報に制限することができる。

10

【0190】

例えば、外部クライアント262のクライアントユーザシステム265にいる個人は、ファイアウォール261によってインターネット250に接続されたイントラネット260に接続することができる。インターネット250を使用して、スクリーニングサービスプロバイダー242の内部イーサネット(登録商標)245に接続されたサーバ205との通信がルーティングされる。イーサネット(登録商標)245は、同様に、ファイアウォール241によって保護されている。

20

【0191】

クライアントユーザシステム265は、標準ハイパーテキスト転送プロトコルを使用して、このネットワークを介してサーバ205と機密を保持しつつ通信することができる。個人を認証するために電子証明書とパスワードが交換される。認証された個人は、ウェブブラウザでメニューを見ることができる。このメニューによって、例えば、個人が、プロジェクト概要を見たり、イベント、スクリーニングヒットおよびアッセイ結果のレポートを要求および/または閲覧することが可能になり、スクリーニングサービスプロバイダー242内でユーザシステム240においてコンタクト(contact)して通信することができる。レポートなどのいくつかの情報は、電子メールで、またはウェブブラウザに直接送ることができる。レポートは、マイクロソフト(登録商標)エクセル、ワードもしくはパワーポイントなどのマイクロソフト(登録商標)オフィスアプリケーション、またはポストスクリプト、またはアドビ(登録商標)ポータブルドキュメントフォーマット(PDF)用に書式設定することができる。

30

【0192】

プロジェクト概要は、プロジェクトに関連するマイルストンの目標日付を表示する図示時間線、および実際の進行の指標を含むことができる。例えば、時間線は、「スクリーニングライブラリ」、「アッセイ10,000ヒット」、「配列決定ベスト2,000」、「スクリーニングライブラリラウンド2」、「組換え産物」、「産物検証」、「送達」などのマイルストーンを含むことができる。

【0193】

1つのインプリメンテーションにおいては、インターフェースによって、クライアントユーザシステム265のユーザが、スクリーニングサービスプロバイダー242、例えば、スクリーニングサービスプロバイダー242の責任者または管理者と通信することも可能になる。例えば、インターフェースは、テキストコメントまたは要求のエントリ領域を含むことができる。別のインターフェースによって、図示またはテキストによる顧客満足指標を選択することが可能になり、またはクライアントユーザシステムからデータ、必須パラメータまたはアッセイ条件を入力することさえ可能になる。この情報の一部または全部を、例えば、ユーザ入力パラメータに従ってディスプレイライブラリメンバヒットのアッセイを構成するように自動的に処理することができる。

40

【0194】

50

いくつかのインプリメンテーションにおいては、サーバ205は、課金および他の会計情報を管理するように構成されたソフトウェアを含むことができる。例えば、クライアント表中の外部クライアント262用データベースレコードは、課金コード、請求料率および請求計画、ならびに会計担当者取引の各項目を含むことができる。プロジェクトが開始されると、課金予定がクライアントエントリに入力される。プロジェクト中、ソフトウェアは、指定のマイルストーンに達する時間を自動的に検出し、外部クライアント262に課金請求書を発行することができる。また、サーバ205を、企業間取引引き(business-to-business exchange)と接続することもできる。企業間取引引きは、例えば、SAP AG(Walldorf, Germany)から市販されている。

10

【0195】

ソフトウェアは、各プロジェクトに対する消耗品、装置時間およびオペレータ時間も追跡することができる。この情報を、外部クライアント262に請求書を送るために、または原価管理および費用効果管理に使用することができる。

【0196】

サーバは、システム操作に関係した配信およびオーダを追跡することもできる。特に主要な候補が同定されたときに、これらをクーリエによって外部クライアント262に送ることができる。送達の追跡情報は、サーバによってオンラインで、例えば、クーリエオペレータによって作成される。ライブラリスクリーニングパーティ242によって作成される、例えば、酵素、マルチウェルプレート、および他の消耗品に対するさらなるオーダを、サーバ205で追跡して各プロジェクトに必要な材料を時間通りに確実に送達させることができる。

20

【0197】

ソフトウェアおよびデータベースのインプリメンテーション

システム200のコンピュータを使用した態様は、デジタル電子回路、またはコンピュータハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、またはそれらの組合せにおいて実施することができる。本発明の装置、例えば、サーバ205は、機械読取り可能な記憶装置で明白に具体化されるコンピュータプログラム製品において実行することができ、プログラム可能なプロセッサによって実行される。方法アクション(method action)はプログラム可能なプロセッサによって実行され、命令プログラムを実行して入力データを処理し、出力することによって本発明の機能を実施することができる。本発明は、データ記憶システム、少なくとも1つの入力装置、ならびに少なくとも1つの出力装置からデータおよび命令を受信し、それらにデータおよび命令を送信するように接続された少なくとも1つのプログラム可能なプロセッサを含むプログラム可能なシステム上で実行される1つまたは複数のコンピュータプログラムで有利に実行することができる。各コンピュータプログラムは、高度手順(high-level procedural)またはオブジェクト指向プログラミング言語、または所望であればアセンブリもしくは機械語で実施可能である。いずれの場合にも、言語はコンパイルされた言語またはインタープリタ型言語とすることができる。適切なプロセッサとしては、例として示すと、汎用マイクロプロセッサ、専用マイクロプロセッサなどがある。一般に、プロセッサは、読み出し専用メモリおよび/またはランダムアクセスメモリから命令およびデータを受信する。一般に、コンピュータは、データファイルを保存する1つまたは複数の大容量記憶装置を備える。このような装置には、内部ハードディスク、リムーバブルディスクなどの磁気ディスク、光磁気ディスク、光ディスクなどがある。コンピュータプログラム命令およびデータを明白に具体化するのに適切な記憶装置としては、例としてEPROM、EEPROM、フラッシュメモリ素子などの半導体メモリ素子を含めた不揮発性メモリ、内部ハードディスク、リムーバブルディスクなどの磁気ディスク、光磁気ディスク、CD-ROMディスクなどのあらゆる形式がある。

30

40

【0198】

例えば、サーバ205を、複数のコンピュータ間に分散させることもできることは言う

50

までもない。

このようなタイプのコンピュータの一例を図12に示す。この図は、本発明の装置または方法を実行または実施するのに適切なプログラム可能なプロセッシングシステム510のブロック図である。システム510は、プロセッサ(CPU)バス525によって接続されたプロセッサ520、ランダムアクセスメモリ(RAM)521、プログラムメモリ522(例えば、フラッシュROMなどの書込み可能な読み出し専用メモリ(ROM))、ハードドライブ制御装置523および入力/出力(I/O)制御装置524を備える。システム510は、例えばROMに、あらかじめプログラムすることができ、または別のソース(例えば、フロッピー(登録商標)ディスク、CD-ROMまたは別のコンピュータ)からプログラムを書き込むことによってプログラムする(およびプログラムを書き変える)ことができる。

【0199】

ハードドライブ制御装置523は、本発明を具体化するプログラムを含めた実行可能なコンピュータプログラム、および記憶を含めたデータを保存するのに適切なハードディスク530に接続されている。I/O制御装置524は、I/Oバス526によってI/Oインターフェース527に接続されている。I/Oインターフェース527は、シリアルリンク、ローカルエリアネットワーク、ワイアレスリンク、パラレルリンクなどの通信リンクを介して、アナログ形式またはデジタル形式のデータを送受信する。

【0200】

非限定的な実行環境の一例は、ウィンドウズ(登録商標)NT4.0以上(マイクロソフト)またはソラリス2.6以上(Sun Microsystems)のオペレーティングシステムを作動させているコンピュータである。ブラウザは、マイクロソフトインターネットエクスプローラバージョン4.0以上、またはネットスケープナビゲータもしくはコミュニケータバージョン4.0以上とすることができる。データベース用コンピュータおよび管理サーバは、256MBメモリを用いた400MHzペンティアム(登録商標)II(インテル)プロセッサまたは同等品を有するウィンドウズ(登録商標)NT4.0、および9GB SCSIドライブを備えることができる。あるいは、256MBメモリを備えたソラリス2:6ウルトラ10(400MHz)および9GB SCSIドライブとすることができる。

【0201】

後処理

再度図5を参照すると、プロセス300は、様々ないわゆる「後処理」方法を含むことができる。例えば、第1の機能アッセイ324の後に、この方法は、追加のアッセイを含むことができる。これらの追加アッセイは、初期のセットのアッセイと異なってもよく、またはそれらを繰り返してもよい。それらは、ヒットピッキング330前またはヒットピッキング後および/または配列決定340後に実施することができる。追加アッセイを用いて、以下の情報を得ることができる。

【0202】

- 特異性、例えば、非標的分子に対する結合または非標的分子に対する触媒活性
- 親和性：見掛けK_d、または触媒の動力学パラメータ
- 結合部位または「エピトープ」(例えば、1つまたは数個のエピトープが標的化合物とは異なる競合化合物を使用して、ディスプレイライブラリメンバが結合するエピトープを同定することができる)
- 安定性(例えば、ディスプレイライブラリメンバは、ポリペプチドの安定性を精査する様々な条件下で前処理またはアッセイすることができる。このような処理としては、例えば、カオトロープ、極度のpHおよび熱への暴露がある。

【0203】

- 生物活性(例えば、増殖、分化、アポトーシス、細胞遊走、細胞接着などの細胞プロセスの調整能力)。
- 生理学的な諸性質(例えば、腎クリアランス、毒性、標的組織特異性など)

高処理機能アッセイのいくつかの例としては、ELISA、ホモジナスアッセイ、およびタンパク質アレイへの結合がある。

【0204】

(ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)) 標的に対するライブラリメンバの結合相互作用は、ELISAアッセイによって分析することができる。例えば、ライブラリメンバを、その底面が標的、例えば、限定量の標的で被覆されたマイクロタイプレートに接触させる。プレートを緩衝液で洗浄して、標的およびプレートに非特異的に結合している物質を除去する。次いで、ライブラリメンバを認識する抗体を用いてプレートを精査して、プレートに結合しているライブラリメンバの量を決定する。例えば、ディスプレイライブラリメンバの場合、抗体は、例えば、ファージディスプレイライブラリメンバ、主要ファージコートタンパク質に対して、すべてのディスプレイライブラリメンバ間で一定である領域を認識することができる。抗体は、適切な基質が提供されると比色産物 (colorimetric product) を産生するアルカリホスファターゼなどの酵素に結合する。いくつかの場合においては、産生される比色産物の量は、比色産物の吸収波長における光学濃度を測定する光学式読取り装置を用いて決定することができる。

10

【0205】

いくつかの後処理分析は、上で列挙した追加情報 (例えば、特異性など) を収集するELISA法の変法を含むことができる。これらの分析では、ELISAは、入力ディスプレイライブラリメンバ量、標的化合物量、競合化合物量、pH、イオン強度、温度、還元剤の有無、またはプロテアーゼの有無を変えるステップを含むことができる。

20

【0206】

ELISAは、「動力学モード」でも実施することができる。このモードでは、セットアップ後すぐに、ELISA分析物は、未結合ディスプレイライブラリメンバを設定時間で溶液から除去する液体取扱いステーションに移送される。別のインプリメンテーションでは、競合量の標的化合物が設定時間添加される。競合標的化合物は、アッセイプレートへの結合が阻止され、飽和量で存在するので、解離したディスプレイライブラリメンバは、プレートに結合している標的化合物に再結合しない。このバインディングアッセイの結果、結合の解離速度 (off rate) についての情報が提供される。

【0207】

(ホモジナスアッセイ) 標的との結合相互作用は、ホモジナスアッセイによっても分析することができる、すなわち、すべてのアッセイ成分が添加された後、追加の流体操作が不要である。一般に、ディスプレイライブラリメンバは、アッセイに必要な1つの標識を含むように改変され、標的化合物はもう一方の標識を含むように改変される。標識は、共有結合しても、非共有結合してもよい。例えば、標識を含む抗体を使用して、標識をファージディスプレイライブラリメンバに結合させることができる。

30

【0208】

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) をホモジナスアッセイとして使用することができる (例えば、Lakowicz他、米国特許第5,631,169号; Stavrianosopoulos他、米国特許第4,868,103号参照)。第1の分子 (例えば、画分中で同定された分子) 上のフルオロフォア標識は、第2の分子が第1の分子に近接して存在する場合、その放射する蛍光エネルギーが第2の分子 (例えば、標的) 上の蛍光標識によって吸収されるように選択される。第2の分子上の蛍光標識は、転移エネルギー (transferred energy) を吸収すると蛍光を発する。標識間のエネルギー移動効率は、分子間距離に関係するので、分子間の空間的關係を評価することができる。分子間に結合が存在する状況においては、アッセイにおける「受容体」分子標識の蛍光発光は、最大になるはずである。FRET結合イベントは、当分野で周知の標準的な蛍光定量検出手段 (例えば、蛍光光度計) によって都合良く測定することができる。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、結合曲線を作成して平衡結合定数を推定することができる。別のホモジナスアッセイは、Biosignal Packard (Montreal, Quebec) から入手可能なAlphaScreen (商標) 技術を使

40

50

用する。レーザによって励起されると一重項酸素を生成するドナービーズを、バインディングアッセイの1メンバ、例えば、ディスプレイライブラリメンバに結合させる。ドナービーズから拡散する一重項酸素に接触すると発光する受容体ビーズが、バインディングアッセイのもう一方のメンバ、例えば、標的化合物に結合する。このシステムおよびFRETは、近接アッセイの例である。

【0209】

(タンパク質アレイ)抽出された各ディスプレイライブラリメンバからのタンパク質を、固体支持体、例えば、ビーズまたはアレイ上に固定することができる。タンパク質アレイの場合、ポリペプチドの各々は、支持体上の一義的なアドレスに固定される。一般に、アドレスは2次元アドレスである。

10

【0210】

いくつかのインプリメンテーションにおいては、ディスプレイライブラリメンバ自体が増幅され、アレイ上に配置される。例えば、細胞またはファージを、アレイとして使用するフィルター上で直接増殖させることができる。他のインプリメンテーションにおいては、組換えタンパク質産生を使用して、少なくとも部分的に精製されたタンパク質試料が産生される。部分的に精製された(または純粋な)試料がアレイ上に配置される。

【0211】

タンパク質アレイを産生する方法は、例えば、De Wildt等(2000)Nat. Biotechnol. 18:989~994; Lueking等(1999)Anal. Biochem. 270:103~111; Ge(2000)Nucleic Acids Res. 28, e3, I~VII; MacBeathおよびSchreiber(2000)Science 289:1760~1763; 国際公開第01/40803号および同99/51773号A1に記載されている。アレイ用ポリペプチドは、例えば、市販の、例えば、Genetic Micro SystemsまたはBioroboticsからのロボット装置を用いて高速にスポットtingすることができる。アレイ基質は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面改質ガラスとすることができる。例えば、アレイは、例えば、上記De Wildtに記載されたように抗体のアレイとすることができる。

20

【0212】

タンパク質アレイを、標識標的に接触させ、多様性ストランドライブラリ(diversity strand library)からの各固定化タンパク質に対する標的の結合度を決定することができる。アレイの各アドレスにおける結合度についての情報は、プロフィールとして、例えば、コンピュータデータベースに保存することができる。タンパク質アレイは、繰り返し産生することができる。例えば標的および非標的の結合プロフィールを比較するために使用することができる。したがって、タンパク質アレイを使用して、1つまたは複数の分子に関して所望の結合特性を有する多様性ストランドライブラリの個々のメンバを同定することができる。

30

【0213】

(組換え産生)上述したように、いくつかの後処理分析には、表示されたポリペプチドの部分的に精製された試料、または精製された試料が必要である。これらの分析では、組換えポリペプチド産生技術を使用して試料を調製することができる。

40

【0214】

例えば、サーバ205は、組換え産生用のディスプレイライブラリメンバ候補をオペレータが選択することができるインターフェースを備えることができる。上述したように、インターフェースは、ディスプレイライブラリメンバ候補を選択するために使用することができるチェックボックス、プルダウンメニューまたは検索クエリを含むことができる。ユーザ選択に基づいて、サーバ205は、試料取扱い装置に指示して、組換えポリペプチド産生用に選択されたディスプレイライブラリメンバを調製することができる。

【0215】

試料取扱い装置は、自動クローニングプロセスにおいて、選択されたライブラリメンバ

50

を処理することができる。例えば、この装置は、様々な操作（例えば、PCR、他の増幅、プラスミド、または一本鎖核酸調製）を実行して各ライブラリメンバの関連表示ポリペプチドをコードする核酸を得て、その核酸を新しいベクターに挿入し、または組換え産生などの下流処理の新しい状況に置くことができる。自動クローニングを使用して、他の目的、例えば、配列決定、アーカイビング、トランスジェニック動物産生、遺伝子除去などのために、ライブラリメンバを再設定できることは言うまでもない。

【0216】

表示ポリペプチドが、ファージメンバコートタンパク質またはその断片に融合体として表示され、融合体をコードする核酸中に抑圧可能な終止コドンが含まれる場合、試料取扱い装置は、表示ポリペプチドをコードする核酸を非抑圧細菌菌株（non-suppressing bacterial strain）に移すことができる。これを実施するには、ライブラリ核酸のリクローニングまたは他の再設定は不要である。

10

【0217】

別の例においては、試料取扱い装置は、各選択されたディスプレイポリペプチドの変異領域をコードする核酸の増幅反応を構築することができる。これらの反応は、増幅条件、例えば、サーマルサイクラー中に移すことができる。次いで、増幅断片を単離し、発現ベクター、例えば、真核生物発現ベクター（例えば、哺乳動物、植物または真菌）または原核生物発現ベクターにクローン化することができる。

【0218】

さらに別の例においては、変異領域（または表示ポリペプチド全体）をコードする核酸を、末端組換え部位を含むプライマーを用いて増幅させる。このような部位は、増幅が不要であるディスプレイベクターにおいて設計することもできる。核酸は、組換え、例えば、インビボでの組換えまたはインビトロでの組換え（例えば、組換えクローニング）を用いて、発現ベクター中に挿入される。

20

【0219】

組換えクローニング方法は、例えば、米国特許第5,888,732号；Walhout等（2000）*Science* 287:116；およびLiu等（1998）*Curr. Biol.* 8（24）:1300～9に記載されている。組換えクローニングは、特異的配列でDNAを切断し、次いでその両末端を単一の協奏反応中に他の適合する配列と再結合させるある種の酵素の活性を利用する。組換え反応は、インビトロで起こすことができる。その後、反応混合物を、適切な細菌宿主菌株中に形質転換する。標的ベクターは、組換え部位間に位置し細菌に対して毒性のある遺伝子を、組換え中にその毒性遺伝子の切除が必要になるように含むことができる。したがって、適切な選択下にある細菌中に生存可能であるクローニング産物は、ほとんど所望の構築体だけである。実際には、所望の産物のクローニング効率は、95～100%に迫る。この高い効率によって、自動的に、例えばロボットで、ほとんど監視することなくプロセスを実施することが可能になる。

30

【0220】

自動クローニング（例えば、サブクローニング）の後、クローニングされた選択ライブラリメンバを、高処理形式で検証することができ、または例えば検証なしでスクリーニングすることができる。

40

【0221】

いくつかのタイプの細胞は、選択されたライブラリメンバによってコードされるタンパク質の発現に適切な宿主細胞として働くことができる。Scopes（1994）*Protein Purification: Principles and Practice*, New York: Springer-Verlagは、組換え（および非組換え）タンパク質を精製するいくつかの一般的な方法を提供している。この方法には、例えば、イオン交換クロマトグラフィ、サイズ-サイズ排除クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、選択的沈殿、透析および疎水性相互作用クロマトグラフィがある。これらの方法は、例えば並行して選択されたライブラリメンバのタンパク質に対する精製戦略を考案するように適合させることができる。特に、ヘキサ-ヒスチジンタグおよびエピト

50

ーブタグなどの精製ハンドル (purification handle) を使用することができる。抗体および抗体断片の場合、タンパク質 A、L または G などの抗体結合タンパク質を使用することができる。

【0222】

合成産生。70 アミノ酸未満、より典型的には30 アミノ酸未満のポリペプチドの場合、ディスプレイライブラリスクリーンによって同定されたポリペプチドは、例えば、t-BOC/FMOC を用いた合成によって合成することができる。サーバ205は、オペレータがペプチド合成用のディスプレイライブラリメンバを選択可能にするインターフェースを含むことができる。次いで、各選択されたメンバのアミノ酸配列を表すストリングは、自動ペプチド合成装置に(局所的にまたは遠隔で)送信される。次いで、合成装置は、ペプチドを産生し、バーコードで標識された容器、例えば、マルチウェルプレートのウェルまたは独立型容器にそれを配置する。これらの容器を、システムが追跡することもできる。必要に応じて、合成後、手動または自動の命令によってペプチドのHPLC精製および質量分析検証が行われる。

10

【0223】

(表面プラズモン共鳴(SPR))表示されたポリペプチドは、SPRによって標的への結合をアッセイすることができる。SPRまたは実時間生体分子相互作用分析(BIA)は、相互作用物質のいずれも標識することなく、生体特異的相互作用を実時間で検出する(例えば、BIAcore)。BIAチップの結合表面における(結合イベントを示す)質量変化は、表面近くの光屈折率変化(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学的現象)をもたらす。屈折率の変化によって検出可能な信号が発生し、生物学的分子間の実時間反応の指標として測定される。SPRの使用方法は、例えば、米国特許第5,641,640号; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander, S. および Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63: 2338~2345; Szabo等(1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699~705、およびBIAcore International AB (Uppsala, Sweden) から利用可能なオンラインリソースに記載されている。

20

【0224】

SPRからの情報を使用して、標的への生体分子の結合に対する平衡解離定数(K_d)、および K_{on} および K_{off} を含めた動力学パラメータを正確かつ定量的に測定することができる。このようなデータを使用して、様々な生体分子を比較することができる。例えば、ディスプレイライブラリから選択されたタンパク質を比較して、標的に対する親和性の高い個体、または K_{off} の遅い個体を同定することができる。生体分子が関係する場合、この情報を使用して、構造活性相関(SAR)を解明することもできる。例えば、タンパク質がすべて単一の親抗体または1セットの既知の親抗体の突然変異体である場合、所与の位置において、特定の結合パラメータ、例えば、高い親和性および遅い K_{off} と関連する変異アミノ酸を同定することができる。

30

【0225】

結合親和性を測定する別の方法としては、蛍光偏光(FP)(例えば、米国特許第5,800,989号参照)、核磁気共鳴(NMR)および結合滴定(例えば、蛍光エネルギー移動)などがある。

40

【0226】

(バイオアッセイ) 組換え産生された表示ポリペプチドの生物活性を分析することができる。一例においては、ポリペプチドは、免疫グロブリンのFcエフェクタードメインに融合される。表示ポリペプチドは、それ自体免疫グロブリンの断片、例えば、単鎖免疫グロブリンまたはFab断片であってもよい。ただし、表示ポリペプチドは、免疫グロブリンの断片でなくてもよい。

【0227】

Fcエフェクタードメインに融合したディスプレイライブラリメンバは、抗体依存性細

50

胞傷害 (ADCC) または補体依存性細胞性細胞傷害 (CDC) の2つのモードで細胞毒性を分析することができる。これらのアッセイは、当分野では日常的なものである。

【0228】

分化および増殖に対する多数の細胞培養アッセイが当分野で知られている。いくつかの例は以下のとおりである。

胚性幹細胞分化の (なかでも胚分化血球新生に影響を及ぼすタンパク質を同定する) アッセイとしては、例えば、Johansson等 (1995) *Cellular Biology* 15:141~151; Keller等 (1993) *Molecular and Cellular Biology* 13:473~486; McClanahan等 (1993) *Blood* 81:2903~2915に記載のものがある。

10

【0229】

リンパ球生存/アポトーシスの (なかでもスーパー抗原誘導後のアポトーシスを阻止するタンパク質、およびリンパ球ホメオスタシスを調節するタンパク質を同定する) アッセイとしては、例えば、Darzynkiewicz等、*Cytometry* 13:795~808、1992; Gorczyca等、*Leukemia* 7:659~670、1993; Gorczyca等、*Cancer Research* 53:1945~1951、1993; Itoh等、*Cell* 66:233~243、1991; Zacharchuk、*Journal of Immunology* 145:4037~4045、1990; Zamai等、*Cytometry* 14:891~897、1993; Gorczyca等、*International Journal of Oncology* 1:639~648、1992に記載のものがある。

20

【0230】

T細胞拘束 (commitment) および成長の初期ステップに影響を及ぼすタンパク質のアッセイとしては、Antica等、*Blood* 84:111~117、1994; Fine等、*Cellular Immunology* 155:111~122、1994; Galy等、*Blood* 85:2770~2778、1995; Toki等、*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:7548~7551、1991に記載のものなどがあるが、これらだけに限定されない。

【0231】

(なかでもナイーブT細胞を活性化させる樹状細胞によって発現されるタンパク質を同定する) 樹状細胞依存アッセイとしては、Guery等、*J. Immunol.* 134:536~544、1995; Inaba等、*Journal of Experimental Medicine* 173:549~559、1991; Macatonia、*Journal of Immunology* 154:5071~5079、1995; Porgador等、*Journal of Experimental Medicine* 182:255~260、1995; Nair等、*Journal of Virology* 67:4062~4069、1993; Huang等、*Science* 264:961~965、1994; Macatonia等、*Journal of Experimental Medicine* 169:1255~1264、1989; Bhardwaj等、*Journal of Clinical Investigation* 94:797~807、1994; および Inaba等、*Journal of Experimental Medicine* 172:631~640、1990に記載のものなどがあるが、これらだけに限定されない。

30

40

【0232】

T細胞または胸腺細胞増殖のアッセイとしては、*Current Protocols in Immunology*、J. E. Coligan、A. M. Kruisbeek、D. H. Margulies、E. M. Shevach、W. Strober編、Pub. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience (第3章、- Tn vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; 第7章、Im

50

munologic studies in Humans); Takai等、J. Immunol. 137:3494-3500、1986; Bertagnolli等、J. Immunol. 145:1706-1712、1990; Bertagnolli等、Cellular Immunology 133:327~341、1991; Bertagnolli, 等、I. Immunol. 149:3778~3783、1992; Bowman等、I. Immunol. 152:1756~1761、1994に記載のものなどがあるが、これらだけに限定されない。

【0233】

ひ臓細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖のアッセイとしては、Polyclonal T cell stimulation、Kruisbeek, A. M. および Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology. Coligan 編 Vol 1 pp. 3.12.1~3.12.14、John Wiley and Sons、Toronto. 1994; および Measurement of mouse and human interleukin gamma.、Schreiber, R. D. In Current Protocols in Immunology.、Coligan 編 Vol 1 pp. 6.8.1~6.8.8、John Wiley and Sons、Toronto. 1994に記載のものなどがあるが、これらだけに限定されない。

【0234】

造血およびリンパ球産生細胞の増殖および分化のアッセイとしては、Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4、Bottomly, K.、Davis, L. S. および Lipsky, P. E. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan 編 Vol 1 pp. 6.3.1~6.3.12、John Wiley and Sons、Toronto. 1991; deVries 等、J. Exp. Med. 173:1205-1211、1991; Moreau 等、Nature 336:690~692、1988; Greenberger 等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:2931~2938、1983; Measurement of mouse and human interleukin-6、Nordan, R. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan 編 Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5、John Wiley and Sons、Toronto. 1991; Smith 等、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83:1857~1861、1986; Measurement of human Interleukin-11、Bennett, F.、Giannotti, J.、Clark, S. C. および Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. Coligan 編 Vol 1 pp. 6.15.1-6.15.2、John Wiley and Sons、Toronto. 1991に記載のものなどがあるが、これらだけに限定されない。

【0235】

抗原に対するT細胞クローン反応の(なかでもAPC-T細胞相互作用ならびにT細胞効果に直接的な影響を及ぼすタンパク質を、増殖およびサイトカイン産生を測定することによって同定する)アッセイとしては、Current Protocols in Immunology、J. E. Coligan、A. M. Kruisbeek、D. H. Margulies、E. M. Shevach、W. Strober 編、Puh. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章、In vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; 第6章、Cytokines and their cellular receptors; 第7章、Immunologic studies in Humans); Weinberger 等、Proc. Natl. A

cad. Sci. USA 77:6091~6095、1980; Weinberger 等、Eur. J. Immunol. 11:405~411、1981; Takai 等、J. Immunol. 137:3494~3500、1986; Takai 等、J. Immunol. 140:508~512、1988に記載のものなどがあるが、これらだけに限定されない。

【0236】

例えば、他のアッセイによって、内皮細胞挙動、神経細胞成長、神経細胞遊走、精子形成、卵形成、アポトーシス、内分泌信号、グルコース代謝、アミノ酸代謝、コレステロール代謝、赤血球生成、血小板生成などに関する生物活性を決定することができる。

【0237】

(インビボでのアッセイ) ディスプレイライブラリによって同定されたタンパク質は、インビボでのアッセイにおいて、例えば、タンパク質を発現するファージディスプレイメンバ、または(例えば、ファージから単離された)タンパク質自体を、生物、例えば、無脊椎動物(例えば、線虫、ショウジョウバエ)または脊椎動物(例えば、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ヤギ、霊長類、ヒトなどの哺乳動物)に投与することによって評価することもできる。生物は、特定の疾患モデル、例えば、ヒト腫瘍を異種移植したヌードマウスとすることもできる。生物の1つまたは複数のパラメータをモニタすることができる。パラメータについての情報は、データベースに入力することができる。例示的なパラメータとしては、生命徴候、疾患に対する抵抗力、ストレスに対する抵抗力、活性、導入されたタンパク質の腎クリアランス、導入タンパク質の循環レベル、導入タンパク質の局在化などがある。

10

20

【0238】

関係する実施形態においては、タンパク質は、生物において異種核酸を用いて発現される。例えば、異種核酸をコードする核酸を、導入遺伝子またはDNAワクチンとして導入することができる。

【0239】

これらの方法を使用して、ライブラリから選択された1つまたは複数のタンパク質の毒性、効力および特異性についてのデータを収集することができる。これらのデータは、選択されたライブラリメンバについての他の情報に関連する(例えば、参照される)レコードに保存することができる。これらのデータを使用してタンパク質の構造活性相関を導き出すことができる。

30

【0240】

ディスプレイライブラリ

ディスプレイライブラリは、エンティティのコレクションである。各エンティティは、入手可能な多様なポリペプチド成分、およびポリペプチド成分をコードするまたは同定する回収可能な成分を含む。ポリペプチド成分は任意の鎖長とすることができ、例えば、3アミノ酸から300アミノ酸を超える鎖長とすることができ、表示には様々な形式を使用することができる。

【0241】

(ファージディスプレイ) 1つの形式では、ウイルス、特にバクテリオファージが使用される。この形式は、「ファージディスプレイ」と称する。変更が加えられたポリペプチド成分が、一般に、バクテリオファージコートタンパク質またはそのドメインに共有結合する。結合は、核酸によってコードされた翻訳融合(translational fusion)によって生成され、変更が加えられたポリペプチドと不変バクテリオファージコートタンパク質またはそのドメインが結合する。結合は、可とう性のペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、または終止コドンが抑圧された結果組み込まれたアミノ酸を含むこともできる。ファージディスプレイは、例えば、Ladner 他、米国特許第5,223,409号; Smith (1985) Science 228:1315~1317; 国際公開第92/18619号; 国際公開第91/17271号; 国際公開第92/20791号; 国際公開第92/15679号; 国際公開第93/01288号; 国際公開第9

40

50

2 / 0 1 0 4 7 号 ; 国際公開第 9 2 / 0 9 6 9 0 号 ; 国際公開第 9 0 / 0 2 8 0 9 号 ; 国際公開第 9 4 / 0 5 7 8 1 号 ; 国際公開第 0 0 / 7 0 0 2 3 号 ; F u c h s 等 (1 9 9 1) B i o / T e c h n o l o g y 9 : 1 3 7 0 ~ 1 3 7 2 ; H a y 等 (1 9 9 2) H u m A n t i b o d H y b r i d o m a s 3 : 8 1 ~ 8 5 ; H u s e 等 (1 9 8 9) S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 ~ 1 2 8 1 ; G r i f f i t h s 等 (1 9 9 3) E M B O J 1 2 : 7 2 5 ~ 7 3 4 ; H a w k i n s 等 (1 9 9 2) J M o l B i o l 2 2 6 : 8 8 9 ~ 8 9 6 ; C l a c k s o n 等 (1 9 9 1) N a t u r e 3 5 2 : 6 2 4 ~ 6 2 8 ; G r a m 等 (1 9 9 2) P N A S 8 9 : 3 5 7 6 ~ 3 5 8 0 ; G a r r a r d 等 (1 9 9 1) B i o / T e c h n o l o g y 9 : 1 3 7 3 ~ 1 3 7 7 ; R e b a r 等 (1 9 9 6) M e t h o d s E n z y m o l . 2 6 7 : 1 2 9 ~ 4 9 ; H o o g e n b o o m 等 (1 9 9 1) N u c A c i d R e s 1 9 : 4 1 3 3 ~ 4 1 3 7 ; および B a r b a s 等 (1 9 9 1) P N A S 8 8 : 7 9 7 8 ~ 7 9 8 2 に記載されている。多連鎖タンパク質、例えば、F a b s を表示することも可能である (下記参照) 。また、変更が加えられたポリペプチド成分は、非共有相互作用 (例えば、f o s - j u n 二量体化) または非ペプチド共有結合 (例えば、ジスルフィド結合) によって付着させることができる。

【 0 2 4 2 】

ファージディスプレイシステムは、繊維状ファージ (ファージ f l 、 f d 、 および M 1 3) ならびに他のバクテリオファージ (例えば、T7バクテリオファージおよびラムダファージ ; 例えば、S a n t i n i (1 9 9 8) J . M o l . B i o l . 2 8 2 : 1 2 5 ~ 1 3 5 ; R o s e n b e r g 等 (1 9 9 6) I n n o v a t i o n s 6 : 1 ~ 6 ; H o u s h m a n d 等 (1 9 9 9) A n a l B i o c h e m 2 6 8 : 3 6 3 ~ 3 7 0 参照) 用を開発された。繊維状ファージディスプレイシステムは、一般に、遺伝子 I I I タンパク質、遺伝子 V I I I タンパク質などの少数のコートタンパク質、主要なコートタンパク質への融合を使用するが、遺伝子 V I タンパク質、遺伝子 V I I タンパク質、遺伝子 I X タンパク質、またはそれらのドメインなどの他のコートタンパク質への融合も使用することができる (例えば、国際公開第 0 0 / 7 1 6 9 4 号参照) 。好ましい実施形態においては、融合は、遺伝子 I I I タンパク質のドメイン、例えば、アンカードメインまたは「スタンプ」に対するものである (遺伝子 I I I タンパク質アンカードメインの記述については、例えば、米国特許第 5 , 6 5 8 , 7 2 7 号を参照されたい) 。

【 0 2 4 3 】

ペプチド成分の結合価を制御することもできる。完全なファージゲノムへのペプチド成分をコードする配列のクローニングは、遺伝子 I I I タンパク質のすべての複製 (r e p l i c a t e) がペプチド成分に融合するので、複数の変異体表示をもたらす。結合価を減少させるために、ファージミド系を利用することができる。この系においては、遺伝子 I I I に融合したペプチド成分をコードする核酸は、一般に 7 0 0 ヌクレオチド未満の長さのプラスミド上で提供される。このプラスミドは、ファージ複製開始点を含み、プラスミドを含む細菌細胞がヘルパーファージ、例えば、M 1 3 K 0 1 に感染すると、バクテリオファージ粒子中に組み込まれる。ヘルパーファージは、ファージ複製および構築に必要な遺伝子 I I I および他のファージ遺伝子の完全なコピーを提供する。ヘルパーファージは、欠陥のある開始点を有するので、ヘルパーファージゲノムは野生型開始点のプラスミドほど効率良くファージ粒子中に組み込まれない。

【 0 2 4 4 】

ペプチド成分を表示するバクテリオファージは、標準ファージ準備方法、例えば増殖培地からの P E G 沈殿を用いて増殖させ収集することができる。

個々のディスプレイファージを選択した後、選択されたファージを用いて細胞を感染させることによって、選択されたペプチド成分をコードする核酸。個々のコロニーまたはプラークを採取し、核酸を単離し、配列を決定することができる。

【 0 2 4 5 】

(細胞ベースの表示) さらに別の形式においては、ライブラリは細胞ディスプレイラ 50

イブラリである。タンパク質は、細胞、例えば、真核生物細胞または原核生物細胞の表面に表示される。例示的な原核細胞としては、大腸菌細胞、枯草菌細胞、孢子などがある（例えば、Lu等（1995）*Biotechnology* 13:366参照）。例示的な真核細胞としては、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Hansenula*または*Pichia pastoris*）がある。酵母表面ディスプレイは、例えば、BoderおよびWitttrup（1997）*Nat. Biotechnol.* 15:553~557に記載されている。

【0246】

一実施形態においては、変更が加えられた核酸配列がベクターにクローン化されて酵母表示される。クローニングによって、変更が加えられた配列と、ドメイン（または完全）酵母細胞表面タンパク質、例えば、Flc1、 α -凝集素、 β -凝集素、またはそれらから誘導される断片、例えば、Agap、Agapとが結合する。これらのタンパク質ドメインは、多様な核酸配列によってコードされるポリペプチドを、GPI-アンカー（例えば α -凝集素、 β -凝集素またはそれらから誘導される断片、例えば、Agap、Agap）、膜貫通ドメイン（例えば、Flc1）によって固定することができる。ベクターは、細胞表面で2つのポリペプチド鎖を発現するように構成することができ、その鎖の1本は酵母細胞表面タンパク質に連結されている。例えば、2つの鎖を免疫グロブリン鎖とすることができる。

10

【0247】

（ペプチド-核酸融合）別の形式は、ペプチド-核酸融合を利用する。ポリペプチド-核酸融合は、例えば、RobertsおよびSzostak（1997）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297~12302、および米国特許第6,207,446号に記載されているように、共有結合したピューロマイシン基を含むmRNAのインビトロでの翻訳によって生成させることができる。次いで、このmRNAをDNAに逆転写し、ポリペプチドに架橋させることができる。

20

【0248】

（リボソームディスプレイ）RNAおよびそのRNAによってコードされるポリペプチドは、RNAを翻訳中であり、まだ付着している発生のポリペプチドを有するリボソームを安定化させることによって物理的に結合させることができる。一般に、高濃度の二価の Mg^{2+} と低温が使用される。例えば、Mattheakis等（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022; Hanes等（2000）*Nat. Biotechnol.* 18:1287~92; Hanes等（2000）*Methods Enzymol.* 328:404~30、およびSchaffitzel等（1999）*J. Immunol. Methods.* 231(1~2):119~35を参照されたい。

30

【0249】

（他のディスプレイ形式）さらに別のディスプレイ形式は、ポリペプチド成分が、ポリペプチドを識別する非核酸タグに付着している非生物学的なディスプレイである。例えば、タグは、ポリペプチドを表示するビーズに付着した化学タグ、または高周波タグとすることができる（例えば、米国特許第5,874,214号参照）。

40

【0250】

ディスプレイ技術を用いて、標的の特異的リガンド、例えば、抗体リガンド、特定のエピトープを得ることができる。これは、例えば、特定のエピトープを欠く、またはエピトープ内で、例えば、アラニンが突然変異した競合非標的分子を用いて実施することができる。このような非標的分子は、下記ネガティブセレクション操作において、ディスプレイライブラリを標的に結合させるときの競合分子として、または例えば、標的に特異的でない解離ディスプレイライブラリメンバを洗浄溶液中で捕捉するプレ溶出剤（pre-elution agent）として使用することができる。

【0251】

50

抗体

一実施形態においては、ディスプレイライブラリがスクリーニングされて免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片が同定される。「免疫グロブリンドメイン」とは、免疫グロブリン分子の可変または定常ドメインに由来するドメインを意味する。「免疫グロブリンスーパーファミリドメイン」とは、免疫グロブリンドメインに関係する3次元構造を有するが、非免疫グロブリン分子に由来するドメインを意味する。免疫グロブリンドメインおよび免疫グロブリンスーパーファミリドメインは、一般に、約7個のβ-ストランドで形成される2つのβ-シートと保存ジスルフィド結合 (conserved disulfide bond) を含む (例えば、A. F. Williams および A. N. Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6: 381~405 参照) 10。Igスーパーファミリドメインのドメインを含むタンパク質としては、T細胞受容体、CD4、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR)、細胞間接着分子 (ICAM) などがある。

【0252】

免疫グロブリン足場 (scaffold) の一実施形態は、抗体、特に抗体の抗原結合性フラグメントである。本明細書で使用する「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子またはその抗原結合部分を意味する。典型的な抗体は、2つの重 (H) 鎖可変領域 (本明細書ではVHと略記する)、および2つの軽 (L) 鎖可変領域 (本明細書ではVLと略記する) を含む。VHおよびVL領域は、より保存的な「フレームワーク領域」 (FR) と称する領域とともに散在する「相補性決定領域」 (「CDR」) と称する超可変領域にさらに細分することができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、正確に定義されている (Kabata, E. A. 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C. 等 (1987) J. Mol. Biol. 196: 901~917 参照)。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で整列した3つのCDRと4つのFRで構成される。 20

【0253】

免疫グロブリンドメインのディスプレイライブラリにおいては、これらの領域の各々は、例えば、合成または天然の多様性とともに変わり得る。変異は、免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3およびFR4の1つまたは複数の領域に導入することができ、このような重鎖および軽鎖のどちらかまたは両方の領域を可変ドメインと称する。一実施形態においては、変異は、所与の可変ドメインの3つのCDRすべてに導入される。別の好ましい実施形態においては、変異は、例えば、重鎖可変ドメインのCDR1およびCDR2に導入される。あらゆる組合せが可能である。 30

【0254】

抗体は、軽鎖または重鎖の一部として定常領域を含むこともできる。軽鎖は、COOH末端のカッパまたはラムダ定常領域遺伝子を含むことができる。重鎖は、例えば、ガンマ定常領域 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4; 約330アミノ酸をコードする) を含むことができる。 40

【0255】

本明細書で使用する抗体の「抗原結合性フラグメント」 (または単に「抗体部分」または「断片」) という用語は、標的に特異的に結合する能力を保持する完全長抗体の1つまたは複数の断片を意味する。抗原結合性フラグメントの例は、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片であるFab断片、(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdA 50

b断片 (Ward等、(1989) Nature 341:544~546)、および (v i) 単離された相補性決定領域 (CDR) であるが、これらだけに限定されない。また、Fv断片の2つのドメインVLおよびVHは、別々の遺伝子によってコードされているが、組換え方法を用いて、合成リンカーによって連結することができる。合成リンカーによって、VLとVHを、VL領域とVH領域が対になって一価の分子を形成する単一タンパク質鎖 (単鎖Fv (scFv) として知られる; 例えば、Bird等(1988) Science 242:423~426; およびHouston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883参照) として調製することが可能になる。このような単鎖抗体も、抗体の「抗原結合性フラグメント」という用語に包含される。

10

【0256】

必要であれば、本明細書に記載するディスプレイライブラリスクリーニング方法は、1つの形式から他の形式 (例えば、FabからIg、またはscFvからFabなど) への抗原結合ドメインの (例えば、ロボット駆動の核酸操作によって) 自動的な移動を含むことができる。

【0257】

ペプチドおよび足場ドメイン変異

一実施形態においては、本明細書に記載する核酸変異方法を使用して、ペプチド、例えば、標的に特異的に結合するペプチドリガンドをコードする核酸を変異させ、または、一般に、任意のタンパク質様ドメイン、例えば、標的に結合するドメイン、または標的への結合に関与するドメインをコードする核酸を変異させる。ペプチドリガンドまたは他の標的結合リガンドは、例えば下記のディスプレイライブラリを用いて同定される。

20

【0258】

(合成ペプチド) 結合リガンドは、独立に標的分子に結合する32アミノ酸以下の合成ペプチドを含むことができる。いくつかの合成ペプチドは、1つまたは複数のジスルフィド結合を含むことができる。他の合成ペプチド、いわゆる「リニアペプチド」には、システインがない。合成ペプチドは、溶液状態でほとんどまたはまったく構造を持たなくても (例えば、非構造 (unstructured)、不均一構造でも (例えば、選択的配座 (alternative conformation) または「ゆるく構造化された」)、あるいは (例えば、協同的に折り畳まれた) 単一の未変性構造であってもよい。いくつかの合成ペプチドは、標的分子に結合すると特定の構造をとる。いくつかの例示的な合成ペプチドは、少なくともジスルフィド結合と、例えば、約4~12非システイン残基のループとを有するいわゆる「環式ペプチド」である。多くの例示的なペプチドは、28、24、20または18アミノ酸より短い。

30

【0259】

分子標的に独立に結合するペプチド配列を、ディスプレイライブラリまたはペプチドのアレイから選択することができる。同定後、このようなペプチドを合成または組換え手段によって産生させることができる。これらの配列は、より長鎖の配列に組み込む (例えば、挿入、追加または付加) ことができる。

【0260】

例示的なファージディスプレイは、M13ファージ表面に短く多様な外因性ペプチドを表示する。ペプチドディスプレイライブラリは、システイン残基 (またはその補体) のコドンが隣接する4~30個の変更が加えられたコドン位置、例えば、4、5、6、7、8、10、11または12個の変更が加えられたコドンのセグメントを有するように設計された合成オリゴヌクレオチドから合成することができる。システイン対は、安定なジスルフィド結合を形成し、環式ディスプレイペプチドを生成すると考えられる。オリゴヌクレオチドは、表示に適切な形式にクローン化することができ、例えば、変更が加えられたペプチドは、ファージ表面のタンパク質IIIのアミノ末端に表示される。例えば、12アミノ酸長配列において4アミノ酸のループを作製するために、ライブラリは、変更が加えられた3つのコドン位置、システインをコードするコドン、変更が加えられた4つのコド

40

50

ン位置、システインをコードするコドン、および変更が加えられた3つのコドン位置を含むテンプレート配列を用いて構築される。変更が加えられたコドン位置は、システイン以外の任意のアミノ酸をコードするコドンを含むことができる。このような変異は、核酸合成用トリヌクレオチドサブユニットを用いて生じさせることができる。パターン形成および変異の程度を正確に制御して、例えば、他のサイズおよび組成のループを生成させることもできる。システインをすべて取り除き、リニアペプチドを調製することができる。例えば、Lin20ライブラリは、単一のリニアペプチドを20アミノ酸テンプレートで表示するように構築された。テンプレート中の各位置におけるアミノ酸は、システイン(Cys)以外の任意のアミノ酸が許容されるように変更された。

【0261】

Kay等、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996)および米国特許第5,223,409号で考察された技術は、選択された親テンプレートに対応するバインダ候補のライブラリを調製するのに有用である。上述したライブラリは、このような技術に従って調製され、例えば、上述したように、特定の分子標的に結合するペプチドをスクリーニングすることができる。

【0262】

1つまたは複数のペプチドが選択された後、1つまたは複数のペプチド(またはその補体)をコードするテンプレート核酸を調製することができる。これらのペプチドは、オリゴヌクレオチドのサブセットのみが結合する条件下で、多様なセットのオリゴヌクレオチド、例えば、最初のライブラリを構築するために使用されるオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって、制御された方法で変更を加えることができる。これらのハイブリダイゼーション条件は、テンプレート核酸に対していくつかの類似性を有する配列をコードするアニーリングオリゴヌクレオチドに有利であり、その結果、最初に選択されたペプチドから少なくとも一部のコドンが保持される。アニールされたオリゴヌクレオチドを組み込む多様な核酸が、ペプチドの第2のディスプレイライブラリを調製するために合成される。いくつかのインプリメンテーションにおいては(例えば、12アミノ酸未満のペプチドの場合)、これらのオリゴヌクレオチドを伸長させる必要は必ずしもなく、単にそれらを不変配列(例えば、アンカータンパク質)をコードする核酸に連結するだけでよい。すなわち、これらのインプリメンテーションにおいては、テンプレートストランドを複製する必要はない。例えば、オリゴヌクレオチド混合物は、オリゴヌクレオチドテンプレートハイブリッドを変性し、多様性の区域に接する相補領域を基にして直接クローン化することによって回収され、または保持されたオリゴヌクレオチドのPCR後に回収される。あるいは、突然変異体ストランドは、先に記述されたクンケルの突然変異誘発手順によって回収される。

【0263】

このような突然変異誘発手順の利点は、個々のクローンの特徴的配列を明らかにする必要がなく、選択された集団の遺伝的な複雑さを理解することさえなしに、選択された集団のコレクション全体の突然変異を起こすことができる点にある。したがって、1つの用途においては、コンセンサス配列をあらかじめ同定する必要はない。この手法によって、第1のラウンドの選択/スクリーニング/分析後に定義される特定のコンセンサスに従わず、初期に選択された集団においては稀なクローンの親和性選択が可能になり、頻度およびコンセンサスを頻繁に考慮し、このようなクローンを除去してさらに分析または成熟させることができる。このハイブリダイゼーションによる突然変異誘発戦略を複数のラウンドに適用し、ストリンジェンシーを増加させながら実行すると(例えば、それによって導入される突然変異の数を徐々に減少させる高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、および、例えば、抗原に対する結合を選択するとき洗淨のストリンジェンシーを徐々に増加させる高ストリンジェンシー選択の1つまたは複数)、初期のペプチドまたはタンパク質配列が繰り返し成熟することが予想される。配列空間を集中して利用することが

10

20

30

40

50

特に有用であり得る。

【0264】

(他の例示的な足場) 血清アルブミンおよび特定の標的に結合するタンパク質を産生するように変化させることができる他の例示的な足場としては、細胞外ドメイン(例えば、フィブロネクチンタイプIIIリピート、EGFリピート、T細胞受容体、MHCタンパク質);プロテアーゼ阻害剤(例えば、クニツドメイン、エコチン(ecotin)、BPTIなど);TPRリピート;トリフォイル(trifoil)構造;ジンクフィンガードメイン;DNA結合タンパク質;特に単量体DNA結合タンパク質;RNA結合タンパク質;酵素、例えば、(不活化プロテアーゼを含めた)プロテアーゼ、RNAアーゼ;シャペロン、例えば、チオレドキシン、および熱ショックタンパク質;ならびに細胞内シグナル伝達ドメイン(SH2およびSH3ドメインなど)および抗体(例えば、Fab断片、単鎖Fv分子(scFv)、単一のドメイン抗体、ラクダ抗体、およびラクダ化(camelized)抗体);T細胞受容体およびMHCタンパク質などがある。

10

【0265】

多くの実施形態においては、足場は、50アミノ酸長未満である。小さな足場ドメインの例は、クニツドメイン(約58アミノ酸、3個のジスルフィド結合)、Cucurbitidamaximatリブシン阻害ドメイン(約31アミノ酸、3個のジスルフィド結合)、グアニリンに關係するドメイン(約14アミノ酸、2個のジスルフィド結合)、グラム陰性菌由来の耐熱性エンテロトキシンIAに關係するドメイン(約18アミノ酸、3個のジスルフィド結合)、EGFドメイン(約50アミノ酸、3個のジスルフィド結合)、クリングルドメイン(約60アミノ酸、3個のジスルフィド結合)、真菌の炭水化物結合ドメイン(約35アミノ酸、2個のジスルフィド結合)、エンドセリンドメイン(約18アミノ酸、2個のジスルフィド結合)、ジンクフィンガードメイン(ジスルフィド結合なし、キレート亜鉛原子)、および連鎖球菌GlgG結合ドメイン(約35アミノ酸、ジスルフィド結合なし)である。

20

【0266】

米国5,223,409は、いくつかのいわゆる「ミニタンパク質」、例えば、(変異体GI、GIIおよびMIを含めた) -コノトキシン、ミュー-(GIIIA、GIIIB、GIIIC)またはオメガ-(GVIA、GVIB、GVIC、GVIIA、GVIIIB、MVIIA、MVIIBなど)コノトキシンをモデルにしたミニタンパク質も記載している。米国6,423,498は、変更が加えられたクニツドメインの例示的なライブラリ、およびこのようなライブラリを構築する方法を記載している。

30

【0267】

上述したように、ペプチドおよび免疫グロブリンドメインの場合、特定の性質に対するドメインを選択した後に、それ(および必要に応じて他のそのようなドメイン)をコードするテンプレート核酸を調製し、次いで、多様なオリゴヌクレオチド、例えば、合成オリゴヌクレオチドまたは天然源由来のオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって変更を加えることができる。ハイブリダイゼーション条件は、テンプレート核酸に対していくつかの類似性を有する配列をコードするアニーリングオリゴヌクレオチドに有利なように制御され、その結果、最初に選択されたペプチドから少なくとも一部のコドンが保持される。次いで、第2のディスプレイライブラリを調製し、スクリーニングすることができる。

40

【0268】

足場ドメインを評価する適切な判定基準としては、(1)アミノ酸配列、(2)いくつかの相同ドメイン配列、(3)3次元構造、および/または(4)一連のpH、温度、塩分、有機溶媒、酸化剤濃度にわたる安定性データなどがある。一実施形態においては、足場ドメインは、小さく安定なタンパク質ドメイン、例えば、100、70、50、40または30アミノ酸未満のタンパク質である。このドメインは、1つまたは複数のジスルフィド結合を含むことができ、または金属(例えば、亜鉛)をキレート化することができる。

50

【0269】

多様性

ディスプレイライブラリは、表示されたポリペプチド中の1つまたは複数の位置における変異を含む。所与の位置における変異は、合成されたものでも天然のものでもよい。いくつかのライブラリの場合、合成と天然の多様性が含まれる。

【0270】

(合成の多様性) ライブラリは、人工的に合成された配列から生じる多様な核酸配列の領域を含むことができる。一般に、これらは、各所与の位置のヌクレオチド分布を含む縮重オリゴヌクレオチド集団から形成される。所与の配列は、分布に関して無作為に含まれる。合成多様性の縮重源の一例は、NNNを含むオリゴヌクレオチドである。ここで、Nは、同じ比率の任意の4つのヌクレオチドである。

10

【0271】

合成の多様性は、さらに制限することもでき、例えば、所与のトリヌクレオチドにおける核酸配列中のコドン数をNNNよりも小さな分布に限定することができる。例えば、このような分布は、4つ未満のヌクレオチドを用いて、コドンのいくつかの位置において構築することができる。また、トリヌクレオチド付加技術を使用して、その分布をさらに制限することができる。

【0272】

いわゆる「トリヌクレオチド付加技術」は、例えば、Virnekas等(1994) *Nucl Acids Res* 22:5600~7に記載されている。オリゴヌクレオチドは、固相支持体上で、1回に1つのコドン(すなわち、トリヌクレオチド)が合成される。支持体は、多数のオリゴヌクレオチドが並行して合成されるような多数の合成官能基を含む。支持体は、まず、第1の位置に対するコドンセットの混合物を含有する溶液に曝される。このユニットは保護されており、さらなるユニットは添加されない。第1の混合物を含有する溶液が洗い流され、固体支持体が脱保護される。したがって、第2の位置に対する1セットのコドンを含む第2の混合物を添加して第1のユニットに付着させることができる。このプロセスは繰り返されて順次複数のコドンが構築される。トリヌクレオチド付加技術によって、所与の位置においていくつかのアミノ酸をコードできる核酸を合成することが可能になる。これらのアミノ酸の出現率は、混合物中のコドンの割合によって調節することができる。また、所与の位置におけるアミノ酸の選択は、単一ヌクレオチドの混合物が合成中に添加される場合のように、コドン表の象現に制限されない。

20

30

【0273】

(天然の多様性) ライブラリは、異なる天然配列から生じる(または、それに基づいて合成される)多様な核酸配列の領域を含むことができる。

ディスプレイライブラリ中に含めることができる天然の多様性の一例は、免疫細胞中に存在する配列多様性である。この多様性には、抗体、MHC複合体およびT細胞受容体の変異が含まれる。免疫細胞のいくつかの例は、B細胞およびT細胞である。免疫細胞は、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ウサギ、ラクダまたはげっ歯類から得ることができる。一例においては、細胞は、特定の性質に対して選択される。例えば、T細胞のCD4⁺およびCD8⁻を選択することができる。様々な成熟段階にあるB細胞を選択することができる。別の例においては、B細胞は未処理である。

40

【0274】

一実施形態においては、蛍光活性化細胞選別を使用して、表面結合IgM、IgDまたはIgG分子を発現するB細胞が選別される。また、異なるアイソタイプのIgGを発現するB細胞を単離することができる。別の好ましい実施形態においては、BまたはT細胞がインビトロで培養される。細胞は、例えば、支持細胞とともに培養することによって、あるいはCD40、CD40リガンドまたはCD20に対する抗体、酢酸ミリスチン酸ホルボール、細菌リポ多糖、コンカナバリンA、植物性赤血球凝集素、またはポークウィード分裂促進因子などの分裂促進因子もしくは他の調節試薬を添加することによって、インビトロで刺激することができる。

50

【0275】

さらに別の実施形態においては、細胞は、免疫障害、例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、リウマチ様関節炎、血管炎、シェーグレン症候群、全身性硬化症、または抗リン脂質症候群に罹った対象から単離される。対象は、ヒトまたは動物、例えば、ヒト疾患動物モデル、または類似の障害を有する動物とすることができる。さらに別の実施形態においては、細胞は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック非ヒト動物から単離される。

【0276】

好ましい一実施形態においては、細胞は、体細胞超変異のプログラムを起動させる。細胞は、例えば、抗免疫グロブリン、抗CD40および抗CD38抗体を用いて処理することによって、免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異を誘発するように刺激することができる（例えば、Bergthorsdottir等（2001）J Immunol. 166:2228参照）。別の実施形態においては、細胞は未処理である。

【0277】

核酸は、これらの免疫細胞から調製され、タンパク質表示形式に処理される。

別のタイプの天然多様性は、異なる生物種間の配列の多様性である。例えば、多様な核酸配列を、土壌などの環境試料から増幅させることができる。

【0278】

複合ライブラリ

複合ディスプレイライブラリは、本明細書では「成分ライブラリ」または「サブライブラリ」と称する別々に構築されたディスプレイライブラリをプールすることによって構築される。成分ライブラリは、天然または合成多様性を含むことができる。複合ライブラリから抽出されるメンバは、成分ライブラリの1つから生じるものとして識別することができる。この識別は、2つの方法のうち1つまたは両方において、ライブラリメンバの核酸配列中にコードすることができる。

【0279】

第1の方法の場合、成分ライブラリについての情報は、成分ライブラリメンバ間の定常領域中にコードされる。他の成分ライブラリ中の対応する位置は、異なるように設計される。定常領域は、定常なアミノ酸のコードンとすることができる。定常アミノ酸をコードする核酸位置においては、各成分ライブラリに対して単一のコードンが使用される。任意の成分ライブラリ中の定常位置におけるコードン使用の組合せは、成分ライブラリを他の成分ライブラリから区別するように設計される。成分ライブラリを識別するために定常領域のみが使用されるインプリメンテーションにおいては、使用されるコードンの組合せによって、成分ライブラリが一義的に識別されるべきである。

【0280】

表1に、システインであるように制約されている2つの定常位置における核酸配列を示す。システインは、2つのコードンTGTまたはTGCのうち1つによってコードすることができる。これら2つのシステイン位置は、4つの成分ライブラリを区別するのに十分である。

【0281】

【表3】

表1

成分ライブラリ	Cys1をコードする配列	Cys2をコードする配列
#1	TGT	TGT
#2	TGT	TGC
#3	TGC	TGT
#4	TGC	TGC

【0282】

第2の方法においては、成分ライブラリ内で変わる位置は、元になる成分ライブラリを示す情報を与えるように設計される。各位置が変動する場合、特定のアミノ酸に対するサブドンセットのみが許容される。

【0283】

その位置に出現し得るあらゆるアミノ酸に対して1つのコドンのみが許容されることが理想的である。上述したトリヌクレオチド付加技術を使用して、所与の位置においてコードされるアミノ酸間の変動を依然として許容しつつ、その位置において利用可能なコドンを制限することができる。

【0284】

表2に、ライブラリ中で変動する位置においてコドンがどのように制約されるかの例を示す。第1の位置においては、コードされるアミノ酸配列は、(AATまたはAACによってコードされる)Asnと(CAAまたはCAGによってコードされる)Glnの間で変わることができる。第2の位置においては、コードされるアミノ酸配列は、(AGA、AGG、CGTによってコードされ、他の3つのコドンは本明細書では使用されない)Argと(AAAまたはAAGによってコードされる)Lysの間で変わることができる。

【0285】

【表4】

表2

成分ライブラリ	AsnまたはGlnを コードする配列	ArgまたはLysを コードする配列
#1	AATまたはCAA	AGAまたはAAA
#2	AATまたはCAA	AGGまたはAAG
#3	AACまたはCAG	AGAまたはAAA
#4	AACまたはCAG	AGGまたはAAG
#5	AATまたはCAA	AGAまたはAAA
#6	AATまたはCAA	AGGまたはAAG
#7	AATまたはCAA	CGTまたはAAA
#8	AACまたはCAG	AGAまたはAAA
#9	AACまたはCAG	AGGまたはAAG
#10	AACまたはCAG	CGTまたはAAA

【0286】

表2に示すように、ライブラリメンバは、ライブラリ#1、2、3および4を含む複合ライブラリから選択される。第1の位置にAACを含み、第2の位置にAGAを含むこの複合ライブラリからのライブラリメンバは、必ずライブラリ#3から生じる。

【0287】

別の例においては、割り当ては不明瞭であるが、それでも、もとになり得る成分ライブラリの数は減少する。このような割り当ては、依然として有用である。この例においては、複合ライブラリは、成分ライブラリ#5、6、7、8、9および10から構築される。第1および第2の位置にAACおよびAGAを有するこの複合ライブラリからのライブラリメンバは、必ずライブラリ#8から生じる。しかし、第1および第2の位置にAACおよびAAAを有するライブラリメンバは、ライブラリ#8または#10のどちらからでも生じることができる。

【0288】

複合ライブラリの成分ライブラリを識別する一目的は品質管理である。複合ライブラリからのディスプレイライブラリメンバを解析し、配列を決定した後、各ライブラリメンバが由来する成分ライブラリが決定される。次いで、同定された有用なディスプレイライブラリメンバの数を、各成分ライブラリに対して数えることができる。また、挿入および欠失の頻度を各成分ライブラリに対して推定することができる。これらの統計を使用して、

最適以下の成分ライブラリを同定することができる。このようなライブラリは、その後の複合ライブラリのプーリングからは除外することができる。

【0289】

成熟ライブラリ

一実施形態においては、ディスプレイライブラリ技術は、反復モードで使用される。第1のディスプレイライブラリを使用して、標的に対する1つまたは複数のリガンドを同定することができる。次いで、これらの同定されたリガンドを突然変異させて、第2のディスプレイライブラリを形成させる。次いで、より親和性の高いリガンドを、例えば、より高いストリンジェンシー、またはより競合的な結合および洗浄条件を用いることによって、第2のライブラリから選択する。

10

【0290】

多数の技術を使用して、同定されたリガンドを突然変異させることができる。これらの技術には、エラープローンPCR (error-prone PCR) (Leung等(1989) *Technique* 1:11~15)、組換え、無作為切断を使用したDNAシャッフリング (Stemmer(1994) *Nature* 389~391; 「核酸シャッフリング」と称する)、RACHITT (商標) (Coco等(2001) *Nature Biotech.* 19:354)、部位特異的突然変異誘発 (Zooler等(1987) *Nucl Acids Res* 10:6487~6504)、カセット突然変異誘発 (Reidhaar-Olson(1991) *Methods Enzymol.* 208:564~586)、縮重オリゴヌクレオチドの組み込み (Griffiths等(1994) *EMBO J* 13:3245) などがある。

20

【0291】

例えば、同定されたリガンドが抗体である場合、突然変異誘発は、重鎖または軽鎖のCDR領域を対象にすることができる。また、突然変異誘発は、CDRに近いまたは隣接するフレームワーク領域を対象にすることができる。同様に、同定されたリガンドが酵素である場合、突然変異誘発は、活性部位の近傍を対象にすることができる。

【0292】

ネガティブセレクション

本明細書に記載するディスプレイライブラリスクリーニング方法は、非標的分子に結合するディスプレイライブラリメンバを除去する選択ステップを含むこともできる。このいわゆる「ネガティブセレクション」を使用して、標的分子と、関係するが異なる非標的分子とを識別するディスプレイライブラリメンバを同定することができる。ポリペプチド標的および核酸標的の場合、非標的分子と標的分子は、互いに少なくとも30%、50%、75%、80%、90%、95%、98%または99%同一であり得る。これらは、認識のためのエピトープである小領域のみが異なり得る。非標的分子と標的分子は同一であり得るが、異なるコンホメーション、オリゴマー形成状態または修飾(例えば、ポリペプチドの翻訳後修飾; 核酸のメチル化または塩基付加)を有し得る。一実施形態においては、標的は少なくとも2つのポリペプチドの複合体であり、非標的は非複合状態の成分ポリペプチドである。説明のための一例では、標的がフィブリンであり、非標的はフィブリノゲンである。フィブリンは、フィブリノゲンの処理された形態であり、フィブリノゲンにはないエピトープを含むメッシュ構造を形成するが、フィブリンのアミノ酸はすべてフィブリノゲン配列中に存在する。さらに別の実施形態においては、非標的は、標的分子の選択中に存在する定常領域、例えば、ペプチドタグ、精製ハンドル、または付着成分である。

30

40

【0293】

別の例においては、非標的分子と標的分子は、少なくとも30%、50%、60%、70%または80%互いに異なる。

ディスプレイライブラリまたはそのプールを、まず、非標的分子に接触させる。非標的に結合しない試料のメンバを収集し、その後の標的分子への結合の選択に使用することができる。またはその後のネガティブセレクションにさえ使用することができる。この手順によって、標的に結合するが、非標的には結合しないディスプレイライブラリメンバの識別

50

が促進される。

【0294】

解離速度選択

遅い解離速度は、高い親和性、特にポリペプチドとそれらの標的の相互作用に関する高い親和性を予測するものである。固定標的との結合相互作用に対して選択された動力学的解離速度によって生体分子を単離する方法を使用することができる。解離速度選択は、ディスプレイライブラリのメンバを標的に結合させるステップと、非特異的に結合したメンバおよび弱く結合したメンバの標的を洗浄するステップとを含む。次いで、固定標的を飽和量の遊離標的、すなわち、固定されていない標的の複製を含む溶出溶液と接触させる。遊離標的は、固定標的分子から解離するディスプレイライブラリメンバに結合する。再結合は、遊離標的の飽和量よりも粒子に付着した標的の濃度を極めて低濃度にするることによって効果的に防止される。

10

【0295】

溶出溶液は規則的な間隔で収集される。より遅く溶出するディスプレイライブラリメンバは、初期に溶出するメンバよりも解離速度が遅い可能性が高い。また、標的から溶出しないディスプレイライブラリメンバを回収することも可能である。例えば、標的が支持体に結合している場合、標的自体を支持体から分離させることができる。別の例においては、ディスプレイライブラリメンバまたはその核酸成分は、支持体から直接回収される。

【0296】

本明細書に記載する自動選択装置、例えば、磁性粒子処理装置を、解離速度選択用にプログラムすることができる。例えば、標的を磁性粒子上に固定し、溶出溶液を含む管に、早期に解離するライブラリメンバを遅く解離するメンバから分離させる間隔で移動させる。

20

【0297】

標的

一般に、任意の分子種を標的として使用することができる。標的は、小分子（例えば、有機小分子または無機小分子）、ポリペプチド、核酸、細胞などとすることができる。例として、標的のいくつかの例および構成を示す。以下に列挙するもの以外の標的、または以下に列挙するもの以外の諸特性を有する標的も使用できることは言うまでもない。

【0298】

標的の一つの分類としてポリペプチドが挙げられる。このような標的の例は、小ペプチド（例えば、約3～30アミノ酸長）、単一ポリペプチド鎖、多量体ポリペプチド（例えば、タンパク質複合体）などである。

30

【0299】

ポリペプチド標的は、例えば、グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、メチル化、切断、ジスルフィド結合などの修飾をすることができる。好ましくは、ポリペプチドは、特異的コンホメーション、例えば、未変性状態または変性状態をとる。一実施形態においては、ポリペプチドは、1つを超える特異的コンホメーションを有する。例えば、プリオンは、1つを超えるコンホメーションをとることができる。未変性コンホメーションと病的コンホメーションのどちらも望ましい標的となり得る。例えば、未変性コンホメーションを安定化させる試薬、あるいは病的コンホメーションを同定し、または標的にする試薬を単離することができる。

40

【0300】

しかし、いくつかの例においては、ポリペプチドは特定の構造をとらず、例えば、ランダムコイルコンホメーションをとり、または単一の安定なコンホメーションを欠いている。非構造ポリペプチドに結合する試薬を使用して、ポリペプチドを、例えば、変性SDS-PAGEゲル中で変性されるときに同定することができ、または、例えば予備精製プロセスにおいて、ポリペプチドの非構造アイソフォームを分離させて正確に折り畳まれたアイソフォームを得ることができる。

【0301】

50

いくつかの例示的なポリペプチド標的としては、細胞表面タンパク質（例えば、グリコシル化表面タンパク質または低グリコシル化変異体）、癌関連タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、ペプチドホルモン、神経伝達物質、細胞表面受容体（例えば、細胞表面受容体キナーゼ、7回膜貫通型受容体、ウイルス受容体および補助受容体、細胞外マトリックス結合タンパク質、または（例えば、哺乳動物の癌細胞または病原体の）細胞表面タンパク質などがある。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドは、疾患、例えば、癌と関連する。

【0302】

より具体的な例としては、インテグリン、カドヘリン、セレクション、N-CAM、E-CAM、U-CAM、I-CAMなどの細胞接着分子または「CAM」；プロテアーゼ、例えば、サブチリシン、トリプシン、キモトリプシン；ウロキナーゼ、またはヒト組織プラスミノゲンアクチベータ（t-PA）などのプラスミノゲンアクチベータ；ボンベシン；第IX因子、トロンピン；CD-4；CD-19；CD20；血小板由来成長因子；インシュリン様成長因子-Iおよび-II；神経成長因子；繊維芽細胞成長因子（例えば、aFGFおよびbFGF）；上皮成長因子（EGF）；形質転換成長因子（TGF、例えば、TGF- α およびTGF- β ）；インシュリン様成長因子結合タンパク質；エリスロポイエチン；トロンボポイエチン；ムチン；ヒト血清アルブミン；成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモン）；プロインシュリン、インシュリンA鎖インシュリンB鎖；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；チロキシン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；心房性ナトリウムペプチドA、BまたはC；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第VII因子；造血成長因子；腫瘍壊死因子（例えば、TNF- α およびTNF- β ）；エンケファリナーゼ；ミューラー管抑制物質；性腺刺激ホルモン関連ペプチド；組織因子タンパク質；インヒピン；アクチビン；血管内皮増殖因子；ホルモン受容体または成長因子受容体；タンパク質AまたはD；リウマチ因子；骨誘導因子；インターフェロン、例えば、インターフェロン- α 、 β 、 γ ；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、M-CSF、GM-CSFおよびG-CSF；インターロイキン（IL）、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4など；崩壊促進因子；免疫グロブリン（定常または可変ドメイン）；および上記ポリペプチドのいずれかの断片がある。いくつかの実施形態においては、標的は、疾患、例えば、癌と関連する。

【0303】

標的ポリペプチドは、好ましくは可溶性である。例えば、可溶性ドメインまたはタンパク質断片を使用することができる。この選択肢は、特に、細胞表面受容体、レトロウイルス表面タンパク質などの膜貫通タンパク質に結合する分子を同定するのに有用である。

【0304】

別のクラスの標的としては、細胞、例えば、固定細胞または生細胞が含まれる。細胞は、常磁性粒子に共有結合した抗体、または（例えば、別の抗体によって）間接的に結合した抗体に結合することができる。例えば、ビオチン化ウサギ抗マウスIg抗体は、ストレプトアビジン常磁性ビーズに結合し、当該細胞表面タンパク質に特異的なマウス抗体はウサギ抗体に結合する。

【0305】

一実施形態においては、細胞は、組換え細胞、例えば、異種遺伝子を発現する異種核酸、あるいは内因性遺伝子の発現を妨害または変える異種核酸を形質転換した細胞である。この異種核酸は、誘導性または構成性プロモーターの制御下に置くことができる。好ましい実施形態においては、異種核酸は、細胞表面タンパク質（例えば、当該細胞表面タンパク質）をコードする。プラスミドは、例えば、形質転換細胞を磁気応答粒子に結合させるのに使用されるマーカータンパク質を発現することもできる。

【0306】

別の実施形態においては、細胞は、対象（例えば、患者、例えば、癌患者）から単離される初代培養細胞である。さらに別の実施形態においては、細胞は、形質転換細胞、例えば、細胞増殖障害、例えば、新生物障害の哺乳動物細胞である。さらに別の実施形態にお

10

20

30

40

50

いては、細胞は、病原細胞、例えば、病原細菌、病原真菌、または病原原生生物（例えば、変形体細胞）などの微生物、または多細胞の病原体に由来する細胞である。標的は、細胞、例えば、癌細胞、造血細胞などとすることもできる。

【0307】

さらに別の実施形態においては、細胞は、（例えば、薬物または遺伝子改変を用いて）処理されている。例えば、この処理によって、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、エキソサイトーシスおよび/または細胞分泌の速度を変えることができる。この処理は、異種プロモーター-対象遺伝子構築体の薬物または誘導物質とすることもできる。この処理は、細胞挙動、形態などに変化をもたらす得る。処理によって細胞から解離する分子、または処理したときに細胞に付随する分子を収集し分析する。

10

【0308】

別の実施形態においては、標的は、組織または器官である。ディスプレイライブラリは、（例えば、Koltonin等（2001）Current Opinion in Chemical Biology 5:308~313に記載されているように）この組織または器官にインビトロまたはインビボで結合するメンバをスクリーニングすることができる。

【0309】

追加の例示的な標的には、核酸（例えば、調節領域中の部位、コード領域中の部位などの二本鎖、一本鎖、および部分二本鎖DNA、三次構造、例えば、G-カルテットまたはテロメア）；RNA（例えば、二本鎖RNA、一本鎖RNA、例えば、RNAi、リボザイム）；またはそれらの組合せなどがある。例えば、ある部位を含む二本鎖核酸を使用して、その部位に結合するDNA結合ドメインを同定することができる。そのDNA結合ドメインを細胞中で使用して、その部位に作動可能に結合した遺伝子を調節することができる。例えば、本明細書に記載する方法を使用して、標的核酸への結合についてジンクフィンガーポリペプチドのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Rebar等（1996）Methods Enzymol. 267:129~49を参照されたい。ジンクフィンガーポリペプチドのファージディスプレイライブラリの記載に関して入手可能な抄録はない。

20

【0310】

さらに例示的な標的としては、有機分子が含まれる。一実施形態においては、有機分子は遷移状態アナログであり、それを使用してそのアナログの構造に類似した遷移状態構造を安定化させる触媒を選択することができる。別の実施形態においては、有機分子は、触媒反応の結果として触媒に共有結合する自殺基質である。

30

【0311】

標的は、薬物（例えば、化学反応、バイオリアクター、培地、乳または細胞抽出物からの薬物の精製を改善するためにリガンドが必要とする薬物）とすることができる。薬物は、ペプチド、例えば、ポリペプチドまたは非ペプチド機能を含むことができる。

【0312】

他の標的は、生物工学的用途に関連し、例えば、研究室で有用な分子を生成させることに関連し得る。例えば、ストレプトアビジン、緑色蛍光タンパク質または核酸ポリメラーゼを標的とすることができる。

40

【0313】

いくつかの実施形態においては、1つを超える種を標的として使用する。例えば、試料は複数の標的に曝される。

治療用途

本明細書に記載するスクリーニング方法を使用して、治療上の諸特性を有するタンパク質を同定することができる。このタンパク質は、例えば、症状に関する治療、予防、一般的な改善に使用することができる。薬剤として許容される担体とともにこのタンパク質を製剤して医薬組成物を提供することができる。

【0314】

50

別の態様においては、本発明は、本明細書に記載する方法を用いて標的分子に結合することが確認された標的特異的リガンド、例えば、抗体分子、他のポリペプチドまたはペプチドを含み、薬剤として許容される担体とともに製剤された組成物を提供する。医薬組成物は、インビボでの画像化用標識リガンドならびに治療用組成物を包含する。

【0315】

本明細書で使用する「薬剤として許容される担体」としては、生理学的に適合する任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤などがある。担体は、（例えば、注射または注入による）静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与に適切であることが好ましい。投与経路によって、活性化化合物、すなわち、タンパク質リガンドは、酸および化合物を不活化する恐れがある他の天然条件の作用から同化合物を保護する材料で被覆することができる。

10

【0316】

「薬剤として許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、望ましくない毒性効果を何らもたらさない塩を意味する（例えば、Berge, S. M. 等 (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1~19 参照）。このような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩がある。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの無毒無機酸から誘導されるもの、ならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸、芳香族スルホン酸などの無毒有機酸から誘導されるものなどがある。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属から誘導されるもの、ならびにN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒有機アミンから誘導されるものなどがある。

20

【0317】

本発明の組成物は様々な形態をとることができる。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射溶液および注入溶液）、分散液または懸濁液、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム、坐剤などの液体、半固体、固体剤形などがある。好ましい形態は、意図する投与形式および治療用途による。典型的な好ましい組成物は、ヒトに抗体を投与するのに使用されるものと類似の組成物などの注射溶液または注入溶液の形態をしている。好ましい投与形式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい実施形態においては、標的特異的リガンドは、静脈内注入または注射によって投与される。例えば、治療用途の場合、標的特異的リガンドは、静脈内注入によって30、20、10、5または1 mg/min未満の速度で約1~100 mg/m²または7~25 mg/m²の用量になるまで投与することができる。投与の経路および/または形式は、所望の結果に応じて変わる。ある実施形態においては、活性化化合物は、移植錠、マイクロカプセル送達システムを含めた制御放出製剤などの、迅速放出に対して化合物を保護する担体とともに調製することができる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤を調製する多数の方法が特許化され、または一般に知られている。例えば、Sustained and Controlled-Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

30

40

【0318】

ある実施形態においては、リガンドを、例えば、不活性の希釈剤または同化可食担体とともに経口投与することができる。医薬組成物は、当分野で既知の医療器具を用いて投与することができる。

【0319】

診断用途

本明細書に記載するスクリーニング方法によって同定されたタンパク質を使用して、それらが結合する標的化合物を検出ことができ、例えば、インビトロ（例えば、組織、

50

生検、例えば、癌組織などの生物学的試料)またはインビボ(例えば、対象におけるインビボでの画像化)での標的の存在を検出することができる。以下は、標的特異的リガンドの単なる例示的使用である。これらには、ELISAアッセイ、FACS分析および選別、光学顕微鏡法、タンパク質アレイ、インビボでの画像化などがある。こういった用途は、1つの標的特異的リガンドについて行うことができ、また、多数のリガンドについて高処理モードで行うことができる。

【0320】

標的特異的リガンドは、例えば、蛍光団および発色団標識タンパク質リガンドを用いて標識することができる。抗体および他のタンパク質は、最高約310nmの波長の光を吸収するので、蛍光性成分は、310nmを超える、好ましくは400nmを超える波長を 10
実質的に吸収するように選択すべきである。様々な適切な蛍光剤および発色団が、Strayer(1968)Science、162:526およびBrand, L.等(1972)Annual Review of Biochemistry、41:843~868に記載されている。タンパク質リガンドは、米国特許第3,940,475号、同4,289,747号、および同4,376,110号に記載されているものなどの従来手順によって、蛍光性発色団基を用いて標識することができる。上述したいくつかの所望の諸特性を有する蛍光剤の1グループはキサントレン色素であり、フルオレセインおよびローダミンが含まれる。別のグループの蛍光性化合物は、ナフチルアミンである。蛍光団または発色団で標識された後、タンパク質リガンドを使用して、試料中の標的分子の存在または 20
局在を、例えば、蛍光顕微鏡法(共焦点またはデコンボリューション顕微鏡法など)を用いて検出することができる。

【0321】

(組織学的分析) 免疫組織化学を、本明細書に記載する方法によって同定された標的特異的リガンドを使用して実施することができる。このリガンドは標識されており、組織学的試料、例えば、顕微鏡スライド上の固定された組織切片に接触させられる。インキュベーションして結合させた後、試料を洗浄して未結合抗体を除去する。次いで試料を、例えば、顕微鏡法によって分析して、リガンドが試料に結合したかどうかを確認する。

【0322】

(タンパク質アレイ) 本明細書に記載する方法によって同定された標的特異的リガンドをタンパク質アレイ上に固定することができる。タンパク質アレイを、診断ツールとして 30
使用して、例えば、医学試料(単離細胞、血液、血清、生検など)をスクリーニングすることができる。ポリペプチドアレイを産生する方法は、例えば、De Wildt等(2000)Nat. Biotechnol. 18:989~994; Lueking等(1999)Anal. Biochem. 270:103~111; Ge(2000)Nucleic Acids Res. 28, e3, I~VII; MacBeathおよびSchreiber(2000)Science 289:1760~1763; 国際公開第01/40803および国際公開第99/51773号A1に記載されている。例えば、Genetic MicrosystemsまたはBioRoboticsから市販されている例えばロボット装置を使用して、アレイ用ポリペプチドを高速でスポットティング 40
することができる。アレイ基質は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面改質ガラスとすることができる。アレイは、多孔質マトリックス、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。

【0323】

(インビボでの画像化) さらに別の実施形態においては、本明細書の方法によって同定された標的特異的リガンドを、検出可能マーカーに結合させ、対象に投与し、標的の発現組織または細胞に結合した検出可能マーカーを検出することによって画像化する。例えば、対象を、例えば、NMRまたは他の断層撮影手段によって画像化する。

【0324】

本発明による画像診断に有用な標識の例は、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C および ^{188}Rh などの放射能標識、フルオレセイン、ローダミンなどの 50

蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子放射断層撮影(「PET」)スキャナによって検出可能な陽電子放射同位体、ルシフェリンなどの化学発光体、およびパーオキシダーゼ、ホスファターゼなどの酵素マーカーである。短距離検出プローブによって検出可能な同位体などの短距離放射線放出体を使用することもできる。タンパク質リガンドを、既知の技術を使用してこのような試薬で標識することができる。例えば、抗体の放射能標識に係する技術に対してはWenselおよびMearns(1983)Radioimmunology and Radioimmunotherapy、Elsevier、New York、およびD.Colcher等(1986)Meth.Enzymol.121:802~816を参照されたい。NMR信号は、造影剤によって増強させることができる。このような造影剤の例は、(主にT1を変える)いくつかの磁性剤常磁性剤、および(主にT2応答を変える)強磁性または超常磁性剤である。標的特異的リガンドは、NMR活性¹⁹F原子を含む表示基(indicating group)で標識することもできる。標的結合の許容時間後、全身MRIをPykett(1982)Scientific American、246:78~88に記載されたものの1つなどの装置を用いて実施して、癌組織の位置を特定し画像化する。

【0325】

精製用途

本明細書に記載するスクリーニング方法によって同定されたタンパク質を使用して、標的化合物を精製することができる。一実施形態においては、精製は、例えば、タンパク質医薬品または他の医薬品を精製する製造スケールである。本明細書の方法によって同定された標的特異的リガンドを支持体に結合させ、アフィニティークロマトグラフィにおける親和性試薬として使用することができる。Scopes(1994)Protein Purification: Principles and Practice、New York: Springer-Verlagは、組換えおよび非組換えタンパク質をアフィニティークロマトグラフィによって精製するいくつかの方法を提供している。カスタマイズした標的特異的リガンドを使用することによって、親和性タグの必要がなくなり、かつ/または密接に関係したアイソフォームを極めて特異的に分離することが可能になる。例えば、米国6,326,155参照。

【0326】

追加の例示的なライブラリ

この開示の態様を実行することができる他のタイプのライブラリとしては、タンパク質発現ライブラリ(例えば、細胞表現型、細胞内発現に対する例えばcDNAライブラリ)、二重ハイブリッドライブラリ、タンパク質アレイ、核アプタマー、コンビナトリアルライブラリまたは薬物化合物ライブラリなどの化学ライブラリなどがある。

【0327】

(一般の核酸ライブラリ) 本明細書に記載するライブラリ構築方法は、分子生物学、生化学、古典的遺伝学、および組換え遺伝学の分野における通常の技術の使用を含むことができる。本発明における一般的な使用方法を開示する基本的なテキストとしては、Sambrook等、Molecular Cloning、A Laboratory Manual(第2版、1989);Kriegler、Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual(1990);およびCurrent Protocols in Molecular Biology(Ausubel等編、1994)などがある。

【0328】

cDNAライブラリを作製するために、好適なRNAが豊富なソースを選択することができる。次いで、逆転写酵素を用いてmRNAからcDNAを作製し、組換えベクターに連結させ、組換え宿主に貫通させて(transfix)増殖させ、スクリーニングし、クローニングする。cDNAライブラリを作製しスクリーニングする方法は周知である(例えば、Gubler&Hoffman、Gene 25:263~269(1983);Sambrook等、同上;Ausubel等、同上参照)。cDNAライブラリをス

クリーニングする例示的な方法としては、米国 5,866,098 および同 5,654,150 がある。

【0329】

ゲノムライブラリーの場合、組織から DNA を抽出し、機械的せん断または酵素による消化のいずれかによって約 12 ~ 20 kb 断片を得る。次いで、それらの断片を勾配遠心分離によって不要なサイズのものから分離させ、真核生物プラスミドベクター、酵母人工染色体、P1 またはバクテリオファージラムダベクター中で構築する。ファージベクターをインビトロでパッケージにする。

【0330】

(二重ハイブリッド) 二重ハイブリッドアッセイまたは三重ハイブリッドアッセイを使用して、タンパク質ライブラリーをスクリーニングし、相互作用タンパク質(または RNA タンパク質相互作用)を同定することができる。例えば、米国特許第 5,283,317 号; Zervos 等(1993) Cell 72:223~232; Madura 等(1993) J. Biol. Chem. 268:12046~12054; Bartel 等(1993) Biotechniques 14:920~924; Iwabuchi 等(1993) Oncogene 8:1693~1696; および Brent 国際公開第 94/10300 号を参照されたい。二重ハイブリッドシステムは、分離可能な DNA 結合と活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュラー特性(modular nature)に基づいている。手短に述べると、このアッセイは、2つの異なる DNA 構築体を利用する。1つの構築体においては、目的タンパク質をコードする遺伝子を、既知の転写因子(例えば、GAL-4)の DNA 結合ドメインをコードする遺伝子に融合させる。もう一方の構築体においては、同定されていないタンパク質(「獲物(prey)」または「試料」)をコードする DNA 配列ライブラリーからの DNA 配列を、既知の転写因子の活性ドメインをコードする遺伝子に融合させる。「餌」と「獲物」タンパク質がインビボで相互作用して複合体を形成し得る場合、DNA 結合ドメインと転写因子活性ドメインが近接する。この近接によって、転写因子に反応する転写調節部位に作動可能に結合されたレポーター遺伝子(例えば、lacZ)の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は検出することができ、機能転写因子を含む細胞コロニーを単離し、使用して、目的タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得ることができる。

【0331】

(核酸アプタマー) 核酸アプタマーライブラリーは、多様な核酸配列のプールであり、そこから、核酸分子自体によって付与される結合特性または触媒特性に対して核酸が選択される。核酸配列の DNA および RNA の無作為なプールを、人工リガンドおよび触媒の豊富なソースとして使用することができる(例えば、Ellington および Szostak(1990) Nature 346:818; および(1992) Nature 355:850; ならびに Tuerk および Gold((1990) Science 249:505 および(1991) J. Mol. Biol. 222:739; 米国特許第 5,910,408 号参照)。このような人工核酸を、アプタマーと称する。一般に、合成オリゴヌクレオチドを使用して、無作為な核酸配列のプールが構築される。これらの配列は、プライマー結合部位として役立つ定常領域またはタグを含むことができる。プールは、意図するリガンドまたは遷移状態アナログであり得る標的に曝される。標的に結合するプール中の核酸が選択され、次いで、核酸増幅後にプールされてその後選択されるか、ベクター中にクローン化される。ベクター中にクローン化される核酸アプタマーは、宿主細胞に形質転換され、平板培養される。次いで、個々のクローンを、上述した方法を用いて処理することができる。個々の各クローン中の核酸の複製を、適切なプライマーを用いてクローン核酸を増幅させることによって回収することができ、必要であれば、それを一本鎖にすることができる。

【0332】

(他の化学ライブラリー) コンビナトリアル化学ライブラリーの例は、ペプチドライブラリー(例えば、米国特許第 5,010,175 号、Furka、Int. J. Pept. P

rot. Res. 37: 487~493 (1991) および Houghton 等、Nature 354: 84~88 (1991) 参照); ペプチド (例えば、国際公開第 91/19735); ベンゾジアゼピン (例えば、米国特許第 5,288,514 号); ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、ジペプチドなどのダイバースマー (diversomer) (Hobbs 等、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909~6913 (1993)); オリゴカーバメイト (Cho 等、Science 261: 1303 (1993)); 炭水化物ライブラリ (例えば、Liang 等、Science、274: 1520~1522 (1996) および米国特許第 5,593,853 号参照); および他の有機小分子ライブラリ (例えば、ベンゾジアゼピン、Baum C & EN、Jan 18、33 頁 (1993)); イソプレノイド、米国特許第 5,569,588 号; 10
チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第 5,549,974 号; ピロリジン、米国特許第 5,525,735 号および第 5,519,134 号; モルフォリノ化合物、米国特許第 5,506,337 号; ベンゾジアゼピン、5,288,514 など参照) であるが、これらだけに限定されない。

【0333】

本発明をその詳細な説明とともに記述してきたが、先の記述は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は、添付した特許請求の範囲によって定義されることを理解されたい。例えば、本発明の態様を、核酸発現ライブラリ (例えば、cDNA 発現ライブラリ)、核酸アプタマーライブラリ、コンビナトリアル化学ライブラリ、および合成ペプチドライブラリを用いたインプリメンテーションに適用する 20
ことができる。他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0334】

【図1】ディスプレイライブラリをスクリーニングする例示的なプロセスのフローチャートである。

【図2】ディスプレイライブラリスクリーンについての情報を保存する例示的なデータベースの概略図である。

【図3】ディスプレイライブラリをスクリーニングする例示的なシステムの概略図である。

【図4】ディスプレイライブラリをスクリーニングする例示的なネットワークの概略図である。 30

【図5】ディスプレイライブラリをスクリーニングする例示的なプロセスのフローチャートである。

【図6】ディスプレイライブラリスクリーンについての情報を保存する例示的なデータベースの概略図である。

【図7】ディスプレイライブラリをスクリーニングする例示的なプロセスの概略図である。

【図8】ヒットピッキングの例示的なインターフェースを示す図である。

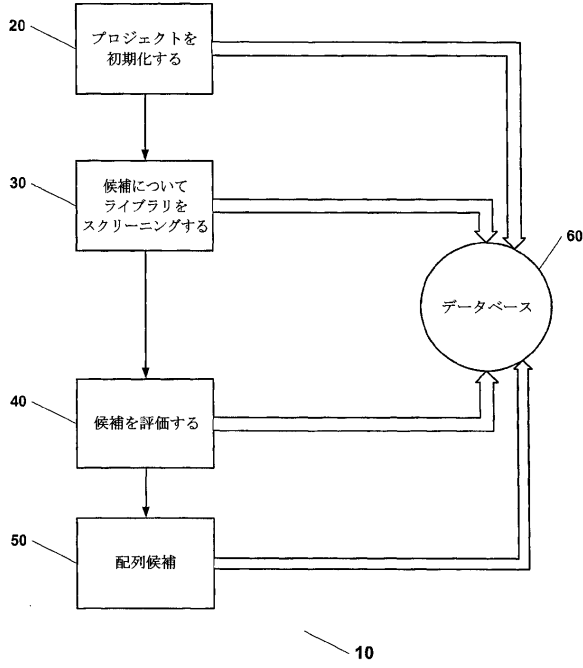
【図9】ディスプレイライブラリのスクリーニングをする例示的な自動システムの概略図である。 40

【図10】マルチウェルプレートおよび関連するイベントを追跡する例示的なプロセスのフローチャートである。

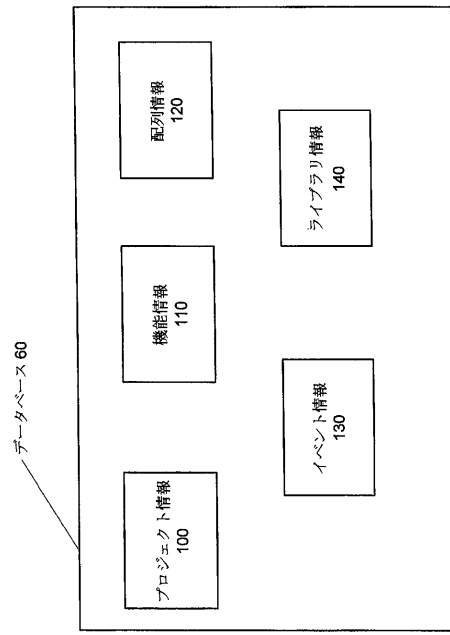
【図11】ディスプレイライブラリをスクリーニングする例示的な外部クライアント用ネットワークの概略図である。

【図12】例示的なサーバシステムの概略図である。

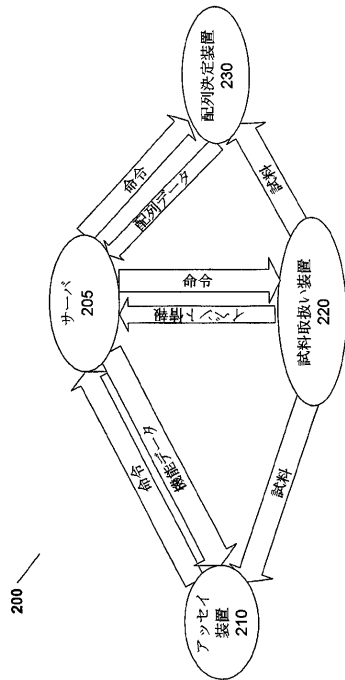
【 図 1 】



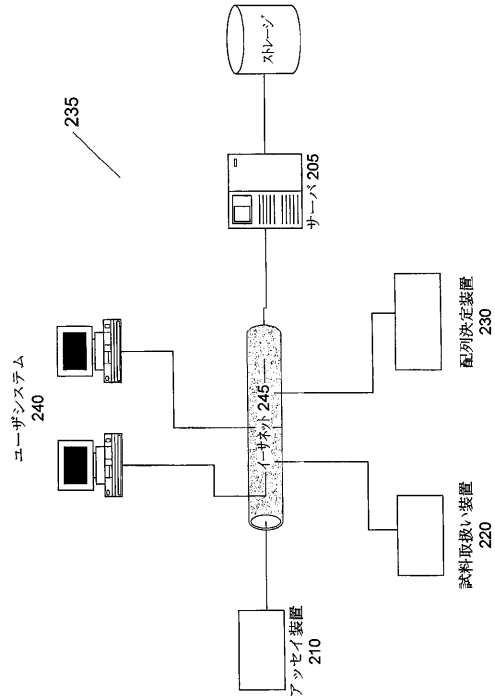
【 図 2 】



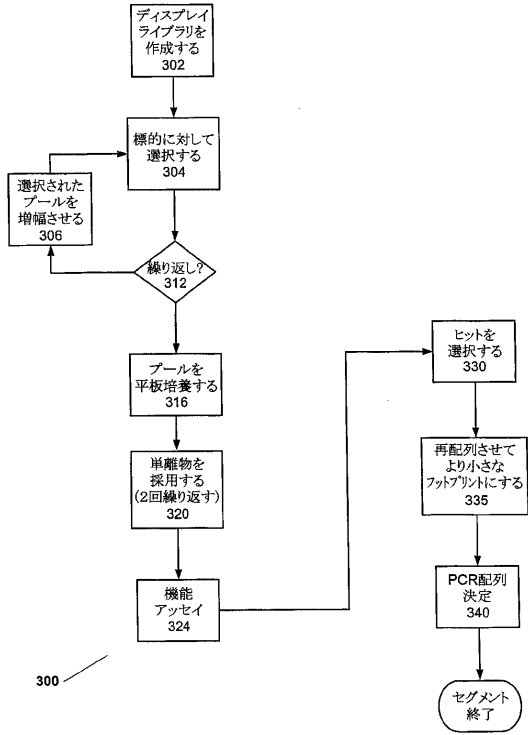
【 図 3 】



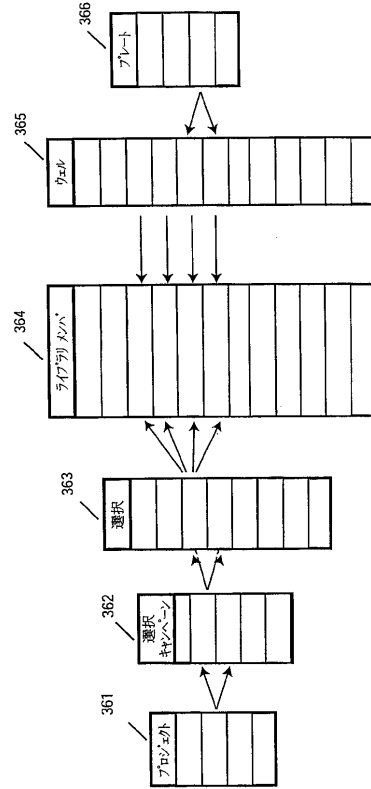
【 図 4 】



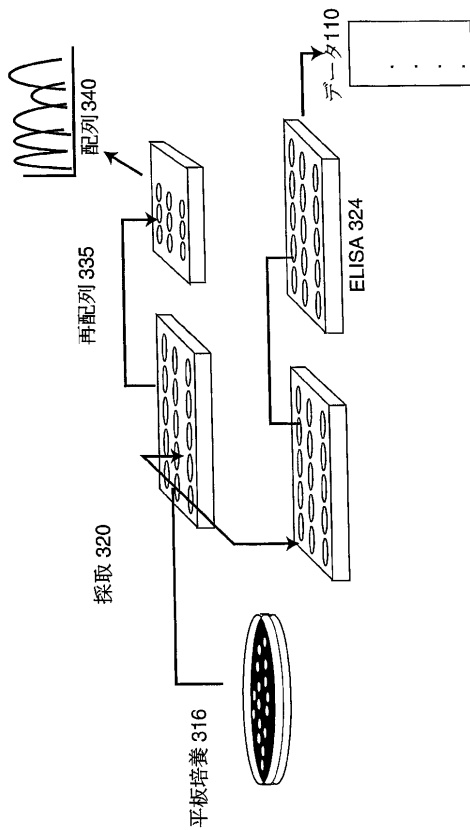
【 図 5 】



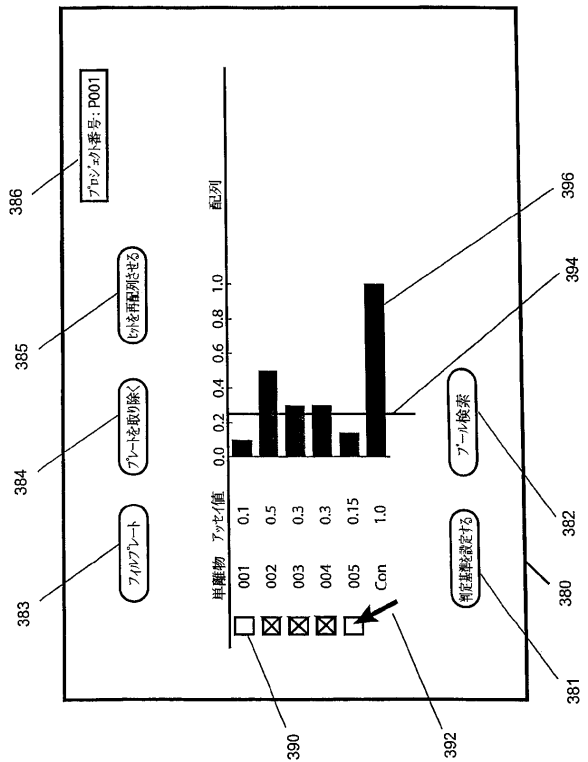
【 図 6 】



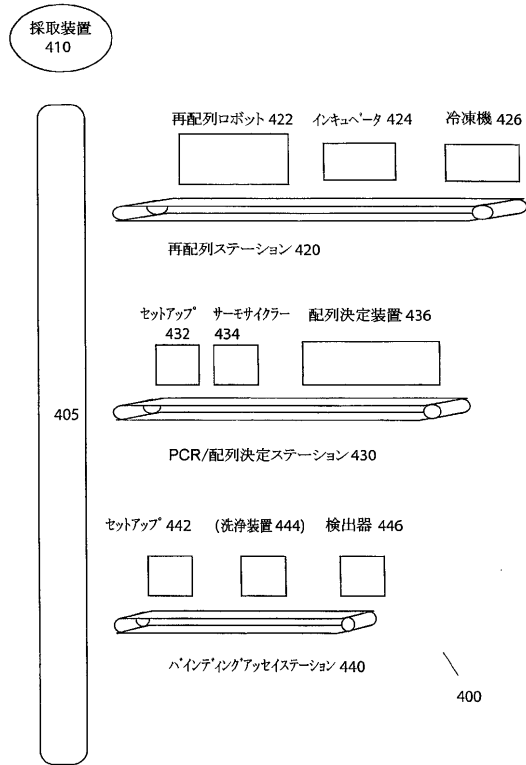
【 図 7 】



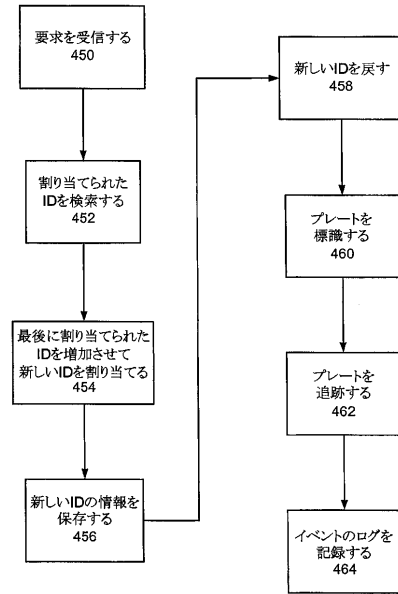
【 図 8 】



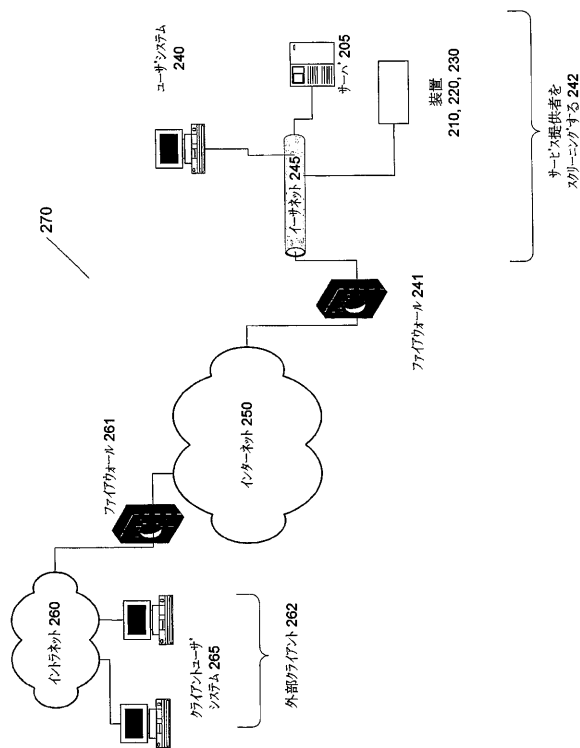
【図9】



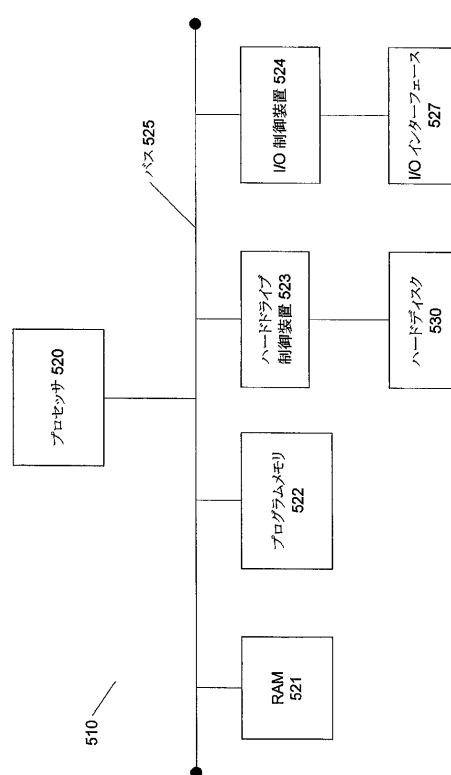
【図10】



【図11】



【図12】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/38539
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/48, 31/00 US CL : 702/19, 22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 702/19, 22		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, KEGG Website		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OGATA et al. KEGG; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acid Research. 1999, Volume 27, Number 1, Pages 29-34, especially page 29, column 2, lines 1-32; page 30, column 1, lines 8-10; page 32, column 2, lines 14-15; page 33, column 1, lines 4-5; page 33, column 2, lines 14-16; page 34, column 2, lines 8-25; and	1-8, 10, 50, and 51
Y	LENNON et al. The IMAGE Consortium: An Integrated Molecular Analysis of Genomes and Their Expression. Genomics. 1996, Volume 33, Pages 151-152, especially page 151, column 2, lines 11-20.	9
Y		9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 03 April 2003 (03.04.2003)		Date of mailing of the international search report 25 JUN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Arthur Lawrence Tor</i> Telephone No. 703 308-1234

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/38539

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claim Nos. :
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos. :
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. : 1-10, 50, and 51
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/38539

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-10, 50 and 51, drawn to a machine-based method for managing library information.

Group II, claim(s) 11-15, drawn to a method of selecting a library member.

Group III, claim(s) 16-20, 44, 45, and 47, drawn to a machine-accessible medium.

Group IV, claim(s) 21-25, 48 and 49, drawn to a system comprising a nucleic acid sequencing instrument, an assay apparatus and thereof.

Group V, claim(s) 26-28, drawn to a method comprising of automatically receiving and storing nucleic acid information from a sequencing instrument.

Group VI, claim(s) 29-30, drawn to a method of evaluating display library members.

Group VII, claim(s) 31-33, drawn to a method of evaluating a display library.

Group VIII, claim(s) 34, 53 and 54, drawn to a method of managing events associated with screening a library.

Group IX, claim(s) 35-38 and 52, drawn to a method of handling event information for library screening.

Group X, claim(s) 39, drawn to a machine-based method of managing a display project.

Group XI, claim(s) 40, drawn to a method of evaluating a member of a composite nucleic acid library.

Group XII, claim(s) 41-43, drawn to a method of providing a composite nucleic acid library.

Group XIII, claim(s) 46, drawn to a method of screening a display library.

The inventions listed as Groups I-XIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I is directed toward a machine-based method for managing library information.

Group II is directed toward a method of selecting a library member.

Group III is directed toward a machine-accessible medium.

Group IV is directed toward a system comprising a nucleic acid sequencing instrument, an assay apparatus and thereof.

Group V is directed toward a method comprising of automatically receiving and storing nucleic acid information from a sequencing instrument.

Group VI is directed toward a method of evaluating display library members.

Group VII is directed toward a method of evaluating a display library.

Group VIII is directed toward a method of managing events associated with screening a library.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/38539

Group IX is directed toward a method of handling event information for library screening.

Group X is directed toward a machine-based method of managing a display project.

Group XI is directed toward a method of evaluating a member of a composite nucleic acid library.

Group XII is directed toward a method of providing a composite nucleic acid library.

Group XIII is directed toward a method of screening a display library.

Clearly, these thirteen groups with their respective technical features are distinct from each other. Thus, Groups I-XIII are directed to different special technical features and thus support this lack of unity.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 G 0 6 F 17/30 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ, GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE, ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107696
 弁理士 西山 文俊

(72)発明者 ウェリハン, ファーイエル・イー
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02127, サウス・ボストン, オー・ストリート 110,
 ユニット・ナンバー1

(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州21754, イジャムビル, グリーン・バレー・ロード 382
 7

Fターム(参考) 2G045 DA13 JA01
 4B024 AA11 AA20 CA01 CA04 CA11 HA19
 4B029 AA23 BB20 CC03
 4B063 QA08 QA11 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR55 QR62 QR82 QS25
 QS34 QS39 QX10
 5B075 ND02 QT06 UU18

专利名称(译)	图书馆筛选		
公开(公告)号	JP2005512181A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003550029	申请日	2002-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧, 合作社		
[标]发明人	ウェリハンファーイエルイー ラドナーロバートシー		
发明人	ウェリハン, ファーイエルイー ラドナー, ロバートシー		
IPC分类号	G01N33/48 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N31/00 G01N33/50 G01N33/53 G06F G06F1/00 G06F17/30 G06F19/28 G06Q50/22 G06F19/00		
CPC分类号	G06Q50/22 G16B50/00 Y02A90/22		
FI分类号	G06F19/00.600 C12M1/00.A C12Q1/68.Z G01N33/48.Z G06F17/30.170.F C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/DA13 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024 /HA19 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B063/QA08 4B063/QA11 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063 /QS39 4B063/QX10 5B075/ND02 5B075/QT06 5B075/UU18		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/337482 2001-12-03 US 60/336672 2001-12-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于筛选文库，特别是展示文库的系统，方法和设备。该方法可以是自动的或至少部分地机械化的。还公开了连接库筛选过程的软件和数据库，例如显示库筛选过程。计算机系统可用于存储，管理和创建信息，包括来自各种自动化站的化验结果和样本跟踪。系统可以提供用于项目管理，数据分析以及样品定位和审核的接口。数据库可以管理库筛选期间识别的命中。该数据库可以是包含项目，库，屏幕和命中表的关数据库。

		***** (P2005-512181A (4) 公表日 平成17年4月28日 (2005. 4. 28
1) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参考)
G06F 19/00	G06F 19/00 600	2G045
C12M 1/00	C12M 1/00 A	4B024
C12N 15/09	C12Q 1/68 Z	4B029
C12Q 1/68	G01N 33/48 Z	4B063
G01N 33/48	G06F 17/30 170F	5B075
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁) 最終頁に続	
1) 出願番号	特願2003-550029 (P2003-550029)	(71) 出願人
6) (22) 出願日	平成14年12月3日 (2002. 12. 3)	ダイアックス、コープ
5) 前記文提出日	平成16年6月3日 (2004. 6. 3)	DYAX CORP.
6) 国際出願番号	PCT/US2002/038539	アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケン
7) 国際公開番号	W02003/048902	ブリッジ、テクノロジー、スクエア、30
7) 国際公開日	平成15年6月12日 (2003. 6. 12)	O
1) 優先権主張番号	60/337, 482	(74) 代理人
2) 優先日	平成13年12月3日 (2001. 12. 3)	100089705
3) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 社本 一夫
1) 優先権主張番号	60/336, 672	(74) 代理人
2) 優先日	平成13年12月5日 (2001. 12. 5)	100076691
3) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人
		100075270
		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人
		100080137
		弁理士 千原 昭男
		最終頁に続く