

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] （参考）
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		39/39	4 B 0 2 4
39/39		48/00	4 B 0 6 3
48/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
審査請求 有 予備審査請求（全627数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000－597406(P2000－597406)	(71)出願人	ディベルサ コーポレーション アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 ,サンディエゴ,ディレクターズ プレイス 4955
(86)(22)出願日	平成12年2月4日(2000.2.4)	(72)発明者	ショート、ジェイ、エム . アメリカ合衆国 92024 カリフォルニア州 、エンシニタス、デラゲ ドライブ 320
(85)翻訳文提出日	平成12年10月4日(2000.10.4)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 （外1名）
(86)国際出願番号	PCT/US00/03086		
(87)国際公開番号	W000/046344		
(87)国際公開日	平成12年8月10日(2000.8.10)		
(31)優先権主張番号	09/246,178		
(32)優先日	平成11年2月4日(1999.2.4)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 遺伝的ワクチンおよび酵素の非確率論的生成

(57)【要約】

本発明は、定方向進化(Direct EvolutionTM)の非確率論的方法を使用することにより、新規のポリヌクレオチドおよびコードされたポリペプチドを取得する方法を提供する。これらの方法には、非確率論的ポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発(Gene Site Saturation MutagenesisTM)と非確率論的ポリヌクレオチド再集合(Gene ReassemblyTM)が含まれる。本発明の方法を用いると、遺伝的ワクチン、酵素、その他の所望の分子を望ましい性質の方向へと進化させることができる。例えば、遺伝的ワクチンとしての効力が増加しているワクチンベクターが得られる。本方法により得られたベクターは、例えば、抗原発現の増加、細胞への取込みの増加、細胞内安定性の増加、免疫反応を調節する能力などを示し得る。本発明は、最適化された物理的および／または生物学的性質をもつ新規酵素を取得する方法を提供する。さらに、本発明は、抗生物質、薬物療法およびトランスジェニック形質の分野でさまざまな新規の生物学的活性分子を取得する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫反応に最適化された調節効果を及ぼす、または免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする、免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することを含んでなり、

その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、

これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による突然変異の導入が含まれ、

さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれる、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項2】 免疫反応への最適化された調節効果が遺伝的ワクチンベクターにより生じる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 免疫反応に最適化された調節効果を及ぼす、または免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする、免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることにより、免疫反応に調節効果を及ぼすまたは免疫反応に調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする、最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定することを含んでなり、その際、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドまたは該非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力が増大していることを特徴とする上記方法。

【請求項4】 免疫反応への最適化された調節効果が遺伝的ワクチンベクターにより生じる、請求項3記載の方法。

【請求項5】 免疫反応に最適化された調節効果を及ぼす、または免疫反応

に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする、免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

a) 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製し、

b) 該ライブラリーをスクリーニングすることによって、遺伝的ワクチンベクターにより生起される免疫反応への調節効果を有する、または該調節効果を有するポリペプチドをコードする、最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定する、

ことを含んでなり、ここで、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドまたは該非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力が増大しており、

その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、

これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、

さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれる、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項6】 免疫反応への最適化された調節効果が遺伝的ワクチンベクターにより生じる、請求項5記載の方法。

【請求項7】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが遺伝的ワクチンベクターに組み込まれる、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドまたは該最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、遺伝的ワクチンベクターと共に投与される、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】 非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリー

が、遺伝子の再集合、オリゴヌクレオチドにより指令された飽和突然変異誘発、および任意の組合せ、順列、反復法からなる群より選択された方法により作製される、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】 免疫反応に調節効果を及ぼす、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが、

a) それぞれが免疫反応の調節に関与しているか、または関与している分子をコードしている、少なくとも2つの親鋳型ポリヌクレオチドを非確率論的に再集合させ、

ここで、第1および第2の親鋳型は、非確率論的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作るために、2個以上のヌクレオチドにおいて互いと相違しており、

b) 該ライブラリーをスクリーニングすることにより、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力が単独でまたはコード化分子を介して増大している少なくとも1つの最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドを同定する、

ことにより得られる、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】 前記方法がさらに、

c) 実施中の最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドを、第1および第2ポリヌクレオチドと同一であるかまたは異なる少なくとも1つの追加のポリヌクレオチドとの非確率論的再集合の更なるラウンドに付すことにより、組換えポリヌクレオチドの付加的実施ライブラリーを作り、

d) 該付加的実施ライブラリーをスクリーニングすることにより、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力が増大している少なくとも1つの追加の最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドを同定し、

e) 場合により、該ライブラリーをもたらした核酸の形態より免疫反応を調節する能力が増大している、望ましい追加の最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが得られるまで、必要に応じてステップc)およびd)を繰り返す、ことを含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが、免疫反応の調節に係わりのある細胞受容体と相互作用することができるポリペプチドをコードしており、該ポリペプチドが該受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】 細胞受容体がマクロファージのスカベンジャー受容体である、請求項12記載の方法。

【請求項14】 細胞受容体がサイトカイン受容体およびケモカイン受容体からなる群より選択される、請求項12記載の方法。

【請求項15】 ケモカイン受容体がCCR6である、請求項14記載の方法。

【請求項16】 前記ポリペプチドが該受容体の天然リガンドの活性を模倣しているが、該天然リガンドに対する免疫反応性を誘発しない、請求項12記載の方法。

【請求項17】 前記ライブラリーが、

i) コードされたポリペプチドが複製可能な遺伝的パッケージの表面に展示されたタンパク質との融合体として産生されるように、非確率論的に生成したポリヌクレオチドを発現させ、

ii) 該複製可能な遺伝的パッケージを、該受容体を展示する複数の細胞に接触させ、

iii) 該受容体により媒介される免疫反応の調節を示す細胞を同定する、ことによりスクリーニングされる、請求項12記載の方法。

【請求項18】 複製可能な遺伝的パッケージがバクテリオファージ、細胞、孢子およびウイルスからなる群より選択される、請求項17記載の方法。

【請求項19】 複製可能な遺伝的パッケージがM13バクテリオファージであり、前記タンパク質がgeneIIIまたはgeneVIIIによりコードされる、請求項18記載の方法。

【請求項20】 前記方法がさらに、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドを遺伝的ワクチンベクターに導入し、該ベクターを哺乳動物に投与することを含み、その際、該ペプチドまたはポリペプチドが発現されて、該受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する、請求項12記載の方法

。

【請求項21】 前記方法がさらに、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを産生させ、該ポリペプチドを遺伝的ワクチンベクターと共に哺乳動物に導入することを含む、請求項12記載の方法。

【請求項22】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが遺伝的ワクチンベクターの抗原をコードするヌクレオチド配列に挿入される、請求項12記載の方法。

【請求項23】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドがHBsAgポリペプチドのMループをコードするヌクレオチド配列に導入される、請求項22記載の方法。

【請求項24】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが非メチル化CpGに富むヌクレオチド配列からなる、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項25】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドがアレルギー反応を抑制するポリペプチドをコードする、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項26】 前記ポリペプチドがインターフェロナー、インターフェロナー、IL-10、IL-12、IL-4のアンタゴニスト、IL-5のアンタゴニスト、およびIL-13のアンタゴニストからなる群より選択される、請求項25記載の方法。

【請求項27】 最適化された組換えポリヌクレオチドがIL-10のアンタゴニストをコードする、請求項1記載の方法。

【請求項28】 IL-10のアンタゴニストが可溶性であるか、欠損IL-10受容体またはIL-20/MDA-7である、請求項27記載の方法。

【請求項29】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが補助的刺激物質をコードする、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項30】 補助的刺激物質がB7-1(CD80)またはB7-2(CD86)であり、スクリーニングステップが、CD28またはCTLA-4を介する活性が改変された変異体を選択することを含む、請求項29記載の方法。

【請求項31】 補助的刺激物質がCD1、CD40、CD154(CD40のリガンド)またはCD150(SLAM)である、請求項29記載の方法。

【請求項32】 補助的刺激物質がサイトカインである、請求項29記載の方法。

【請求項33】 サイトカインがIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、GM-CSF、G-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、IFN- β 、およびIL-20(MDA-7)からなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項34】 非確率論的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーが、サイトカインの受容体を含む細胞を活性化する非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるサイトカインの能力を試験することによってスクリーニングされる、請求項33記載の方法。

【請求項35】 前記細胞がサイトカインの受容体をコードする異種核酸を含む、請求項34記載の方法。

【請求項36】 サイトカインがインターロイキン-12であり、スクリーニングが、遺伝的ワクチンベクターを含む哺乳動物細胞を培地中で増殖させ、該培地との接触によりT細胞増殖またはT細胞分化が誘導されるか否かを検出することにより行われる、請求項33記載の方法。

【請求項37】 サイトカインがインターフェロン- γ であり、前記スクリーニングが

i) コードされたポリペプチドが複製可能な遺伝的パッケージの表面に展示されたタンパク質との融合体として産生されるように、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドを発現させ、

ii) 該複製可能な遺伝的パッケージを多数のB細胞に接触させ、

iii) B細胞の増殖を阻害することができるファージライブラリーのメンバーを同定する、

ことにより行われる、請求項33記載の方法。

【請求項38】 関心のある免疫反応がT細胞のT_H1細胞への分化であり、前記スクリーニングが、T細胞の集団を組換えポリヌクレオチドのライブラリー

のメンバーによりコードされるサイトカインに接触させ、IL-2およびインターフェロン- γ を産生するようにT細胞を誘導するサイトカインをコードするライブラリーのメンバーを同定することにより行われる、請求項33記載の方法。

【請求項39】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるサイトカインが、最適化されていないポリヌクレオチドによりコードされるサイトカインに比べて免疫原性の低下を示し、低下した免疫原性が、非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるサイトカインを哺乳動物に導入し、該サイトカインに対して免疫反応が誘導されるか否かを調べることにより検出される、請求項32記載の方法。

【請求項40】 補助的刺激物質がB7-1(CD80)またはB7-2(CD86)であり、前記細胞が免疫反応を共刺激する能力について試験される、請求項29記載の方法。

【請求項41】 最適化された組換えポリヌクレオチドがサイトカインアンタゴニストをコードする、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項42】 サイトカインアンタゴニストが可溶性のサイトカイン受容体および欠損シグナル配列をもつ膜貫通サイトカイン受容体からなる群より選択される、請求項41記載の方法。

【請求項43】 サイトカインアンタゴニストがIL-10RおよびIL-4Rからなる群より選択される、請求項41記載の方法。

【請求項44】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが主に T_H1 免疫反応を誘導することができるポリペプチドをコードする、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項45】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが主に T_H2 免疫反応を誘導することができるポリペプチドをコードする、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項46】 免疫反応への最適化された調節効果が免疫反応への望まれていない調節効果の低下であり、

その際、前記方法は、下記分子の宿主レシピエントから免疫反応を引き起こす能力が低下している分子を生成するために使用され、ここで該レシピエントはヒ

トまたは動物宿主であり、

それゆえに、前記方法は、該分子の少なくとも1の宿主レシピエントに対して抗原性が低下している分子を生成するために使用される、

請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項47】 免疫反応への最適化された調節効果が免疫反応への望ましい調節効果の増加であり、

その際、前記方法は、下記分子の宿主レシピエントから免疫反応を引き起こす能力が増加している分子を生成するために使用され、ここで該レシピエントはヒトまたは動物宿主であり、

それゆえに、前記方法は、該分子の少なくとも1の宿主レシピエントに対して抗原性が増加している分子を生成するために使用される、

請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項48】 免疫反応への最適化された調節効果が免疫反応への第1の望まれていない調節効果の低下と、免疫反応への第2の望ましい調節効果の増加の双方であり、

その際、前記方法は、下記分子の第1宿主レシピエントから第1免疫反応を引き起こす能力が低下しておりかつ下記分子の第2宿主レシピエントから第2免疫反応を引き起こす能力が増加している分子を生成するために使用され、

第1および第2の宿主レシピエントは同一でも異なってもよく、

第1および第2の宿主レシピエントの各々はヒトまたは動物宿主であり、

それゆえに、前記方法は、該分子の少なくとも1の宿主レシピエントに対して第1の低下した抗原性を有しかつ該分子の少なくとも1の宿主レシピエントに対して第2の低下した抗原性を有する分子を生成するために使用される、

請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項49】 免疫反応に対する第1および第2の調節効果が同一のマルチモジュールワクチンベクター上のそれぞれ第1および第2のモジュールのために導き出され、

ここで、モジュールは、次のモジュールまたはそのフラグメント誘導体もしくは類似体、すなわち、抗原コード配列、ポリアデニル化配列、補助的刺激分子を

コードする配列、誘導性のリプレッサーまたはトランスアクチベーターをコードする配列、真核生物の複製起点、原核生物の複製起点、原核生物のマーカーおよびエンハンサーをコードする配列、プロモーターおよびオペレーター、ならびにイントロンにより表される、
請求項48記載の方法。

【請求項50】 免疫反応に対する最適化された調節効果が免疫調節性(IM)ポリヌクレオチドまたはそれによりコードされるポリペプチドの安定性の向上を含み、

ここで、前記方法は、ex vivo安定性の向上（例えば、貯蔵の際の貯蔵期間の延長および／または貯蔵の容易性の向上および／または活性期間満了前の活性期限の延長）を有する分子を生成するために使用され、

さらに、前記方法は、宿主レシピエントに投与した際にin vivo安定性の向上（例えば、消化性の酸に対する耐性の増加および／または循環系中での安定性の増加および／または宿主レシピエントによる排除もしくは破壊の他のいずれかの方法に対する安定性の増加）を有する分子を生成するために使用される、
請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項51】 免疫調節性(IM)ポリヌクレオチドまたはそれによりコードされるポリペプチドが、ヒト宿主レシピエントの免疫反応に最適化された調節効果を及ぼし、

それゆえに、前記方法は、ヒトレシピエントのための最適化された遺伝的ワクチンを生成するために使用される、
請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項52】 免疫調節性(IM)ポリヌクレオチドまたはそれによりコードされるポリペプチドが、動物宿主レシピエントの免疫反応に最適化された調節効果を及ぼし、

それゆえに、前記方法は、動物レシピエント（例えば、ヒトに飼育されている動物、ヒトに飼育されていない動物、飼い馴らされている動物、および飼い馴らされていない動物）のための最適化された遺伝的ワクチンを生成するために使用される、

請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項53】 細胞による抗原の輸送または提示を向上させるアクセサリー分子をコードする最適化されたポリヌクレオチドを取得する方法であって、

a) 該アクセサリー分子の全部または一部をコードする親ポリヌクレオチドのセットを非確率論的定方向進化による最適化に付すことにより、非確率論的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作製し、

b) 該ライブラリーをスクリーニングすることにより、非確率論的再集合に付されていない鋳型ポリヌクレオチドによりコードされるアクセサリー分子と比べて、細胞表面上に抗原を輸送または提示する能力の向上または低下を細胞に賦与する組換え分子をコードする、最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定する、
ことを含んでなり、

それゆえに、前記方法は、ヒトレシピエントおよび／または動物レシピエント（例えば、ヒトに飼育されている動物、ヒトに飼育されていない動物、飼い馴らされている動物、および飼い馴らされていない動物）のための最適化された分子を生成するために使用され、

その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、

これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、

さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれる、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項54】 前記スクリーニングが、

i) 非確率論的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーを、抗原をコードする遺伝的ワクチンベクターに導入してベクターのライブラリーを作り、該ベクターのライブラリーを哺乳動物細胞に導入し、

ii) 該抗原に対して増大したまたは低下した免疫原性を示す哺乳動物細胞を同

定する、

ことを含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】 アクセサリー分子がプロテアソームまたはTAPポリペプチドからなる、請求項53記載の方法。

【請求項56】 アクセサリー分子が細胞傷害性T細胞を誘導する配列からなる、請求項53記載の方法。

【請求項57】 細胞傷害性T細胞を誘導する配列がB型肝炎表面抗原から得られる、請求項56記載の方法。

【請求項58】 アクセサリー分子が免疫原性アゴニスト配列からなる、請求項53記載の方法。

【請求項59】 組換え体発現宿主において最適化された発現を有する免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することを含んでなり、

その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、

これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、

さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれる、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項60】 組換え体発現宿主において最適化された発現を有する免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることにより、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドの発現と比較したとき、組換え体発現宿主において最適化された発現を有する、最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定する、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項61】 組換え体発現宿主において最適化された発現を有する免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

a) 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製し、

b) 非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることにより、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドの発現と比較したとき、組換え体発現宿主において最適化された発現を有する、最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定する、
ことを含んでなり、

その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、

これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、

さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれる、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項62】 組換え体発現宿主が原核生物である、請求項59～61のいずれか1項記載の方法。

【請求項63】 組換え体発現宿主が真核生物である、請求項59～61のいずれか1項記載の方法。

【請求項64】 組換え体発現宿主が植物である、請求項63記載の方法。

【請求項65】 組換え体発現宿主が単子葉植物である、請求項64記載の方法。

【請求項66】 組換え体発現宿主が双子葉植物である、請求項64記載の方法。

【請求項67】 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することが、親ポリヌクレオチドのセットを本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」に付すことを含む、請

請求項1～6、53または59～61のいずれか1項記載の方法。

【請求項68】 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することが、親ポリヌクレオチドのセットを本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」に付すことを含む、請求項1～6、53または59～61のいずれか1項記載の方法。

【請求項69】 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することが、親ポリヌクレオチドのセットを、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」と本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」の両方に付すことを含む、請求項1～6、53または59～61のいずれか1項記載の方法。

【請求項70】 二本鎖環状親ポリヌクレオチド分子を突然変異誘発に付すことにより子孫ポリヌクレオチドのセットを取得する方法であって、

a) 親ポリヌクレオチド分子に第1プライマーと第2プライマーをアニーリングし、

ここで、第1プライマーは親ポリヌクレオチド分子の第1アニールメント領域に相補的な第1プライマー配列を含み、

第2プライマーは親ポリヌクレオチド分子の第2アニールメント領域に相補的な第2プライマー配列を含み、

第1アニールメント領域と第2アニールメント領域はオーバーラップしておらず、そのためスタガーされており、

第1および第2のプライマーの少なくとも1つが親ポリヌクレオチド分子に対して非確率論的突然変異原性カセットを含み、

b) ポリメラーゼ触媒増幅反応によって、第1プライマーを含む第1子孫ポリヌクレオチド鎖と第2プライマーを含む第2子孫ポリヌクレオチド鎖を合成し、その際、第1子孫ポリヌクレオチド鎖と第2子孫ポリヌクレオチド鎖が、突然変異を起こした二本鎖環状ポリヌクレオチド産物を形成することができる、ことを特徴とする上記方法。

【請求項71】 二本鎖環状親ポリヌクレオチド分子を突然変異誘発に付すことにより子孫ポリヌクレオチドのセットを取得する方法であって、

a) 親ポリヌクレオチド分子に第1プライマーと第2プライマーをアニーリングし、

ここで、第1プライマーは親ポリヌクレオチド分子の第1アニールメント領域に相補的な第1プライマー配列を含み、

第2プライマーは親ポリヌクレオチド分子の第2アニールメント領域に相補的な第2プライマー配列を含み、

第1アニールメント領域と第2アニールメント領域はオーバーラップしておらず、そのためスタガーされており、

第1および第2のプライマーの少なくとも1つが親ポリヌクレオチド分子に対して非確率論的突然変異原性カセットを含み、

少なくとも1つの該プライマーに含まれる非確率論的突然変異原性カセットが縮重しているものであり、

b) ポリメラーゼ触媒増幅反応によって、第1プライマーを含む第1子孫ポリヌクレオチド鎖と第2プライマーを含む第2子孫ポリヌクレオチド鎖を合成し、ここで、第1子孫ポリヌクレオチド鎖と第2子孫ポリヌクレオチド鎖が、突然変異を起こした二本鎖環状ポリヌクレオチド産物を形成することができる、ことを含んでなり、

前記方法を使用することにより、縮重した子孫ポリヌクレオチドのセットを生成することができることを特徴とする上記方法。

【請求項72】 鋳型ポリペプチドから、非確率論的レンジの単一アミノ酸置換が各アミノ酸位置に呈示される子孫ポリペプチドのセットを取得する方法であって、

a) コドン含有鋳型ポリヌクレオチドを、突然変異を起こそうとする各コドンのための縮重オリゴヌクレオチドを用いてポリメラーゼ増幅反応に付して、子孫ポリヌクレオチドのセットを作り、ここで、縮重オリゴヌクレオチドのそれぞれは第1相同配列と縮重トリヌクレオチドカセットを含み、

b) 該子孫ポリヌクレオチドのセットをクローン増幅反応に付して、該子孫ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現させる、ことを含んでなり、

これにより、前記方法は、親ポリペプチド鋳型に沿った各アミノ酸部位に、予め決められた数の呈示されるべきアミノ酸（該アミノ酸部位のそれぞれに全部で20種もの多くのアミノ酸）をもたらす手段を提供する、ことを特徴とする上記方法。

【請求項73】 縮重オリゴヌクレオチドが第1相同配列と縮重トリヌクレオチドカセットと第2相同配列とを含む、請求項72記載の方法。

【請求項74】 縮重トリヌクレオチドカセットが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1モノヌクレオチドカセットを含み、
該縮重トリヌクレオチドカセットがさらに第2および第3モノヌクレオチドカセットを含み、それぞれが、

縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、

縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、
非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項72記載の方法。

【請求項75】 縮重トリヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、
からなる群より選択され、

これにより、前記方法は、特定されたトリヌクレオチドカセット配列の縮重が
20種全てのアミノ酸のコドンを含むので、親ポリペプチド鑄型に沿った各アミノ
酸部位に全部で20のアミノ酸変化を生じさせる方法を提供する、
請求項72記載の方法。

【請求項76】 縮重オリゴヌクレオチドが第1相同配列と複数のトリヌク
レオチドカセットを含み、

これにより、前記方法は、親ポリペプチド鑄型に対して複数の同時単一アミノ
酸変化を有する子孫ポリペプチドを生成させる手段を提供する、
請求項72記載の方法。

【請求項77】 縮重トリヌクレオチドカセットのそれぞれが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、

縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1モノヌクレオチドカセットを含み、
該縮重トリヌクレオチドカセットのそれぞれがさらに第2および第3モノヌクレオチドカセットを含み、それぞれが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、
非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項76記載の方法。

【請求項78】 縮重トリヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、

縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、
からなる群より選択され、

これにより、前記方法は、特定されたトリヌクレオチドカセット配列の縮重が20種全てのアミノ酸のコドンを含むので、親ポリペプチド鑄型に沿った各アミノ酸部位に全部で20のアミノ酸変化を生じさせる方法を提供する、
請求項76記載の方法。

【請求項79】 縮重オリゴヌクレオチドが第1相同配列と複数のトリヌクレオチドカセットと第2相同配列を含む、請求項72記載の方法。

【請求項80】 鑄型ポリペプチドから、非確率論レンジの単一アミノ酸置換が各アミノ酸位置に呈示される子孫ポリペプチドのセットを作り、該子孫分子のなかで望ましいアミノ酸置換またはその組合せを同定する方法であって、

a) コドン含有鑄型ポリヌクレオチドを、突然変異を起こそうとする各コドンのための縮重オリゴヌクレオチドカセットを用いてポリメラーゼ増幅反応に付して、子孫ポリヌクレオチドのセットを作り、ここで、縮重オリゴヌクレオチドのそれぞれは第1相同配列と縮重トリヌクレオチドカセットを含み、

b) 該子孫ポリヌクレオチドのセットをクローン増幅反応に付して、該子孫ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現させ、

c) 発現された子孫ポリペプチドをスクリーニングに付して、それらと親ポリペプチドとを、関心のある少なくとも1つの分子特性に関して比較する、
ことを含んでなり、

これにより、前記方法は、親ポリペプチド鑄型に沿った各アミノ酸部位に、予め決められた数の呈示されるべきアミノ酸（該アミノ酸部位のそれぞれに全部で20種もの多くのアミノ酸）をもたらす手段を提供し、

さらに、前記方法は、該子孫ポリペプチドのうち、その親ポリペプチドと比較して、少なくとも1つの分子特性に関して望ましい変化を呈示するものを同定す

る手段を提供する、
ことを特徴とする上記方法。

【請求項81】 縮重トリヌクレオチドカセットが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1ヌクレオチドを含み、
該縮重トリヌクレオチドカセットがさらに第2および第3モノヌクレオチドカ
セットを含み、それぞれが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、

非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項80記載の方法。

【請求項82】 縮重トリヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、
からなる群より選択され、

これにより、前記方法は、特定されたトリヌクレオチドカセット配列の縮重が
20種全てのアミノ酸のコドンを含むので、親ポリペプチド鑄型に沿った各アミノ
酸部位に全部で20のアミノ酸変化を生じさせる方法を提供する、
請求項80記載の方法。

【請求項83】 縮重オリゴヌクレオチドが第1相同配列と複数のトリヌク
レオチドカセットを含み、

これにより、前記方法は、親ポリペプチド鑄型に対して複数の同時単一アミノ
酸変化を有する子孫ポリペプチドを生成させる手段を提供する、
請求項80記載の方法。

【請求項84】 縮重トリヌクレオチドカセットのそれぞれが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、

縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1モノヌクレオチドカセットを含み、
該縮重トリヌクレオチドカセットのそれぞれがさらに第2および第3モノヌクレオチドカセットを含み、第2および第3モノヌクレオチドカセットのそれぞれが、

縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、
非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項83記載の方法。

【請求項85】 縮重トリヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、

縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、
からなる群より選択され、

これにより、前記方法は、特定されたトリヌクレオチドカセット配列の縮重が
20種全てのアミノ酸のコドンを含むので、親ポリペプチド鑄型に沿った各アミノ
酸部位に全部で20のアミノ酸変化を生じさせる方法を提供する、
請求項83記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****1. 概論****1.1. 発明の分野**

本発明は遺伝的ワクチンの分野に関する。特に、本発明は、特定のワクチン接種の目的のために最適化された成分を含有する多成分型遺伝的ワクチンを提供する。特定の態様において、本発明は、目的の特定の組織または細胞型への遺伝的ワクチンのターゲティングを容易にする物質を提供することによって遺伝的ワクチンの効率を改良する方法を提供する。

本発明はまた、遺伝的ワクチンによって誘導されるような免疫応答の調節の分野に関し、さらに広範囲の抗原に対する効果的な免疫応答を誘導し得る免疫原の開発方法の分野に関する。

従って、本発明はまた、新規のタンパク質とその断片、およびこれらのタンパク質をコードする核酸、ならびにこれらのタンパク質を製造し、診断、予防および治療用に使用する方法をも提供する。特定の実施形態において、本発明は、マラリアが寄生した赤血球由来の熱帯熱マラリア原虫赤血球膜タンパク質1（「PfEMP1」）遺伝子ファミリー由来のタンパク質およびその断片に関する。特に、これらのタンパク質は、同様に「PfEMP1」と呼ばれる、熱帯熱マラリア原虫が寄生した赤血球の赤血球膜タンパク質に由来する。本発明はまた、タンパク質および核酸がマラリア感染の病理に関連し、マラリア感染の予防のためのワクチンまたは他の予防的処置として、および／またはマラリアおよび関連疾患に罹患した患者の症状の診断および治療に使用され得る、これらのタンパク質をコードする核酸を提供する。

本発明はまた、タンパク質工学の分野に関する。特に、本発明は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製するための定方向進化法に関する。より詳細には、本発明は、突然変異誘発を使用して、それ自体が改良された生物学的分子であるか、および／または別の改良された生物学的分子の生成に寄与する、新規のポリペプチドをコードする新規のポリヌクレオチドを生成する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、非確率論的なポリヌクレオチドのキメラ化およ

び非確率論的な部位特異的点突然変異誘発の双方を実施する方法に関する。

従って、一態様において、本発明は、合成的かつ非確率論的な手段によってキメラポリヌクレオチドの子孫のセットを作製する方法であって、該子孫のポリヌクレオチドの設計が親ポリヌクレオチドのセットおよび／または親ポリヌクレオチドによって対応してコードされるポリペプチドの解析によって誘導される方法に関する。別の態様において、本発明は、消耗的、組織的、かつ非確率論的な手段を使用して部位特異的突然変異誘発を実施する方法に関する。

さらに本発明は、作製された子孫分子のセットから、末端選択と呼ばれるプロセス等によって、特に望ましいものから構成されるサブセットを選択する段階に関する。次いでこのサブセットはさらにスクリーニングすることができる。本発明はまた、ポリペプチドおよび／または有用な特性を有する別の発現される生物学的分子を産生するために、ポリヌクレオチドのセットをスクリーニングする段階に関する。

その製造が本発明によって開示される新規の生物学的分子としては、遺伝子、遺伝子経路、およびそれによって発現に影響を受けるあらゆる分子が含まれ、直接コードされるポリペプチドおよび／またはこうしたポリペプチドによって影響を受けるあらゆる分子も含まれる。上記新規生物学的分子としては、炭水化物、脂質、核酸、および／またはタンパク質成分を含むものが挙げられ、これらの特殊な例としては、抗生物質、抗体、酵素、ならびにステロイドおよび非ステロイドホルモンが挙げられるが、これらに制限されるものではない。

特定の非制限的態様において、本発明は、酵素、特に熱安定性酵素に関し、また定方向進化によるその生成に関する。より詳細には、本発明は、高温で安定であり、また、より低温では改善された活性を有する熱安定性酵素に関する。

【0002】

1.2. 背景

病原体があまり性状解析されていないか、または実験室の環境において単離もしくは培養することができない状況における防御免疫の提供

遺伝的免疫とは、防御的体液性および細胞性免疫を誘導する新規のメカニズムを意味する。遺伝的ワクチン接種のベクターは、一般にプロモーター／エンハン

サー配列、目的の遺伝子およびポリアデニル化／転写ターミネーター配列を含むDNAから構成される。筋肉内または皮内注射の後、目的の遺伝子が発現し、その後得られるタンパク質が免疫系の細胞によって認識される。遺伝的免疫によって、病原体があまり性状解析されていないか、実験室環境において単離もしくは培養することができない状況においても防御免疫を誘導する手段を提供できる。

遺伝的ワクチンベクターの効率のわずかな改良によって免疫応答のレベルが劇的に上昇し得る

遺伝的ワクチン接種の効率は、遺伝的ワクチンベクターの細胞内への非効率な取り込みによってしばしば制限される。一般に、注射部位にある筋肉または皮膚細胞の1%未満が目的の遺伝子を発現する。遺伝的ワクチンベクターの細胞内への侵入効率をわずかに改良することで、遺伝的ワクチン接種によって誘導される免疫応答のレベルが劇的に上昇し得る。ベクターは典型的には多くの障壁を通過しなければならず、そのためにこれまで発現されるDNAの割合は非常に少ないものであった。

免疫原性に対する種々の制限

免疫原性に対する制限としては、血液および組織中に存在するヌクレアーゼによるベクターの損失、細胞中へのDNAの不十分な侵入、細胞の核内へのDNAの不十分な侵入および他の区画へのDNAの嗜好性(preference)、核内におけるDNAの安定性の欠如（核内安定性を制限する因子は、他の細胞区画および細胞外区画に影響するものとは異なる可能性がある）、および、染色体中に組み込まれるベクターの場合には、組み込み効率および組み込み部位が挙げられる。さらに、遺伝的ワクチンの多くの応用のためには、該遺伝的ワクチンが特定の標的組織または細胞に侵入することが好ましい。

このように、目的とする特定の細胞および組織型をターゲットとすることができ、該標的細胞に侵入する能力が増した遺伝的ワクチンに対する需要がある。本発明はこれらの、また他の需要を満たすものである。

遺伝的ワクチンによって誘導される免疫応答のための経路

遺伝的ワクチンによる望ましいin vivo応答の誘導は、一般に複雑な配列における複数の細胞プロセスを必要とする。いくつかの潜在的経路が存在し、遺伝的

ワクチンはそれに沿って哺乳動物の免疫系にその効果を発揮し得る。一つの経路においては、遺伝的ワクチンベクターはワクチンを受ける組織における優勢な細胞型である細胞に侵入する（例えば筋肉または内皮細胞）。これらの細胞はベクターによってコードされる抗原を発現し、放出する。ワクチンベクターは遺伝子操作によって、生きたトランスフェクト細胞からインタクトなタンパク質として（すなわち分泌プロセスを介して）放出された抗原、またはこれらの細胞の表面上の膜結合形態に指令された抗原を有し得る。抗原はまた、これらの細胞が死んだ場合にはこうした細胞の細胞内コンパートメントから放出され得る。

ワクチンベクター由来の抗原のインターナリゼーションおよび組織内の優勢細胞型における抗原の発現はAPC内で終わり、次いでAPCは、抗原を内的にプロセスして、CD4+Tヘルパー細胞の活性化および強力な特異的免疫応答の発達における必須段階、MHC クラスIおよび／またはクラスIIをプライムする。

これらの状況のいずれかから誘導される細胞外抗原は、細胞表面への（IgMを介した、もしくは他の非免疫グロブリンレセプターを介した特異的な）結合およびそれに続く外膜のエンドサイトーシスによって、または抗原提示細胞（APC）が細胞外液およびその内容物をエンドサイトーシスコンパートメント中にインターナライズする液相微飲作用によってAPCと相互作用する。APCとの相互作用は細胞外環境における部分的タンパク分解的切断の前または後に生じ得る。いずれの場合にも、ワクチンベクターから誘導される抗原のインターナリゼーションおよび組織内の優勢細胞型における抗原発現はAPC内で終わる。次いでAPCは、抗原を内部でプロセスしてMHC クラスIおよび／またはクラスIIをプライムするが、これらはCD4+Tヘルパー細胞（ T_H1 および／または T_H2 ）の活性化および強力な特異的免疫応答の発達における必須の段階である。

遺伝的ワクチンプラスミドがAPCに侵入し、抗原が細胞質においてタンパク分解的に切断される。

並行した経路において、遺伝的ワクチンプラスミドがAPC（または組織において優勢な細胞型）に侵入し、さらに細胞外輸出を指令されるプラスミド発現由来の抗原の代わりに、抗原は細胞質内で（プロテアソーム依存的または非依存的プロセスにおいて）タンパク分解的に切断される。こうした細胞における細胞内プ

ロセシングは、TAP-1およびTAP-2タンパク質によって認識され粗面小胞体（RER）のルーメンに輸送されるペプチド内でプロテアソーム分解を介して行なわれることが多い。

ペプチド断片はRER複合体に輸送され、細胞表面上で発現する。適当なさらなるシグナルの存在下で機能的CTLまで分化し得る。

ペプチド断片は、MHCクラスIと共にRER複合体に輸送される。こうした抗原断片は次いでクラスIと関連して細胞表面上に発現する。次に特異的T細胞レセプターを保持するCD8⁺細胞障害性Tリンパ球（CTL）が複合体を認識し、適当なさらなるシグナルの存在下で、機能的CTLに分化し得る。

細胞質で生成したペプチドをエンドソームコンパートメントまで輸送する（trafficking）あまり性状解析されていない経路によって、遺伝的ワクチンベクターがCD4⁺T細胞刺激を導き得る。

さらに、一般的には優勢ではない、あまり性状解析されていない経路がAPC内に存在し、細胞質で生成したペプチドのエンドソームコンパートメントへの輸送に携わり、そこでペプチドはMHCクラスIIと複合体を形成し、それによって抗原ペプチドをCD4⁺T_H1およびT_H2細胞に提示するように働く。Bリンパ球による活性化、増殖、分化および免疫グロブリンイソ型のスイッチングにはCD4⁺T細胞の助けが必要であるため、MHCクラスII分子との関連における抗原提示は抗原特異的抗体の誘導には不可欠である。この経路のために、遺伝的ワクチンベクターは、上記の優勢なCD8⁺CTL活性化プロセスに加え、CD4⁺T細胞刺激を導き得る。しかしながら、MHCクラスII発現レベルが非常に低いかゼロである筋肉細胞においては、この代替経路はほとんど重要ではない。

この場合サイトカインはDNAの細胞との相互作用、または抗原に対する特異的細胞応答に本質的なプロセスからのみでなく、ワクチンプラスミドによって指令される合成を介しても誘導される。

遺伝的ワクチン接種はまた、DNAに結合するか、またはDNAを取り込む細胞からのサイトカインの放出を引き出し得る。いわゆるDNAの免疫刺激またはアジュバント特性は、DNAをインターナライズする細胞との相互作用から誘導される。サイトカインは、遺伝子転写の不存在下においてDNAに結合するか、および／また

はDNAをインターナライズする細胞から放出され得る。抗原のAPCとの相互作用およびそれに続く抗原提示および特異的認識も、これらの細胞および他の免疫細胞に対し陽性のフィードバック効果を有するサイトカインの放出を単独的に刺激する。これらの効果のうち第一のものは、 $CD4^+ T_H$ 細胞が $T_H 1$ または $T_H 2$ 表現型へ優先的に分化／増殖する方向性である。さらに、DNAワクチン接種の部位において放出されたサイトカインは、その放出のメカニズムに関わらず、他の免疫細胞の隣接局所領域、および排出（draining）リンパ節等のより離れた部位からのリクルートメントに寄与する。強力な免疫応答を引き出す上でのサイトカインの重要性を認識して、研究者の中には1種または複数種のサイトカインの遺伝子を免疫感作のための標的抗原と共にDNAワクチンプラスミド中に含めたものもいた。そうした場合、サイトカインは、DNAの細胞との相互作用に本質的に備わったプロセス、あるいは抗原に対する特異的細胞応答からだけでなく、ワクチンプラスミドによって指令された合成を介しても誘導される。

血流および別の部位から免疫感作部位へ、また免疫感作部位から他の部位への免疫細胞の移動

免疫細胞は離れた部位または血流から免疫感作部位までリクルートされる。次に特異的および非特異的免疫応答が大きく増幅される。MHC分子と複合体化した抗原断片を保持する、またはプラスミドの取り込みから抗原を発現さえする、APC等の免疫細胞はまた、免疫感作部位から他の部位（血液、従って全ての組織、リンパ節、脾臓）へ移動し、そこでさらなる免疫的リクルートメントならびに免疫応答の質的および量的発展が起こる。

現在の遺伝的ワクチンベクターは、望ましい抗原の発現のために、抗原の正確な細胞内運命や抗原発現の免疫学的結果を制御する設計エレメントが、あるとしてもわずかしかないうる単純な方法を使用している。

これらの経路は競合することが多いが、これまで利用可能であった遺伝的ワクチンは、それぞれの経路に影響を及ぼす成分全てを単一のポリヌクレオチド分子中に組み込んでいた。別々の細胞型が遺伝的ワクチンベクターに対する強力な免疫応答のために必要な複雑な相互作用に関わっているため、単一のベクター分子内に組み込まれた遺伝的ワクチンの投与から、互いに相容れない結果が生じ得る

。現在の遺伝的ワクチンベクターは、望ましい抗原の発現のために、抗原の正確な細胞内運命または抗原発現の免疫学的結果を制御する設計エレメントが、あるとしてもわずかしかない単純な方法を使用している。従って、遺伝的ワクチンはワクチン研究および開発のための見込みが大いにあることが示されているが、これらの技術には大幅な改善の必要性およびいくつかの重大な制限があることは明らかである。

既存の遺伝的ワクチンベクターはヒト組織に対して最適化されておらず、目的の抗原の発現が低く短期であり、特にin vivoにおける安定性、誘導能、または発現レベルが不十分であった。

適当な実験室モデルがないことが大きな理由で、既存の遺伝的ワクチンベクターの中でヒトの組織に最適化されたものはなかった。既存の遺伝的ワクチンベクターでは、典型的に目的とする抗原の発現が低くかつ短期間であり、大量のDNAであっても、必ずしも防御免疫応答を誘導するのに充分高い発現レベルには至らない。ベクターの細胞内への侵入および核内への転移のメカニズムはあまり明らかになっていないため、これらの鍵となる特性を改善しようとする試みは事実上なされていない。同様に、遺伝子の発現を含む、ベクター機能の維持を調節するメカニズムについてもほとんど知られていない。さらに、特定の配列がDNAの免疫刺激特性を変えることを示すデータが増大しているとはいえ、この情報を用いて改善された免疫調節特性を有するベクター骨格を作成する場合には、合理的な遺伝子操作を行なうのは非常に労力を要し、また時間のかかるアプローチである。

さらに、現在利用できる遺伝的ワクチンベクターでは、追加のワクチンを投与することなくブースター免疫を送達し得るワクチンに対する需要を満たすのに充分なin vivoにおける安定性、誘導性、または発現レベルが得られない。既存の遺伝的ワクチンでは、ブースター免疫は、典型的には一次注射から3-4週間後に必要である。

こうしたことから、改善された遺伝的ワクチンベクターと製剤、およびこうしたベクターの開発の方法に対する需要が存在する。本発明はこれらのおよびその他の需要を満たすものである。

病原体と宿主間の相互作用は、何百万年もの進化の結果であり、その間に哺乳動物の免疫系は病原体の侵入に対して反撃する複雑な手段を進化させてきた。しかしながら、細菌およびウイルスの病原体は、同時期にその毒性および宿主内の生存を高めるためにいくつかのメカニズムを獲得したため、現代の分子生物学および細胞生物学の技術力にも関わらず、ワクチン研究および開発に大きな課題を提供している。病原体抗原の進化と同様に、数種の癌抗原も、宿主の免疫系から逃れるためのメカニズムとして、自らの免疫原性をダウンレギュレートする手段をとってきているようである。

効率的なワクチン開発は、病原体が免疫防御を逃れる手段として進化の力によって一部生じてきた、異なる病原体株の抗原的不均一性によっても妨げられている。病原体はまた、宿主細胞における発現、プロセス、および／または輸送が困難な抗原を選択することによってその免疫原性を低下させ、それによって免疫応答を開始および調節する分子に対する免疫原ペプチドのアベイラビリティを低下させる。こうした問題に関連するメカニズムは複雑で、多変量的であり、ほとんど特徴付けられていない。従って、細菌およびウイルスの病原体に対する防御免疫応答を誘導し得るワクチンに対する需要が存在する。本発明はこれらのおよびその他の需要を満たすものである。

抗原のプロセッシングおよび提示は、遺伝的ワクチンで実施するか、より古典的な方法で実施するかに関わらず、ワクチン接種の有効性を決定する一つの因子に過ぎない。ワクチンの有効性決定に関わる他の分子としては、免疫系の細胞の成熟、活性化、増殖および分化を調節する小分子量タンパク質であるサイトカイン（インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、造血性（hematopoietic）成長因子、腫瘍壊死因子およびトランスフォーミング成長因子）が挙げられる。

サイトカインの特徴は、多面作用および重複性である。すなわち、一つのサイトカインが数種の機能を有することがしばしばあり、また特定の機能が2種以上のサイトカインによって仲介されることがしばしばある。さらに、いくつかのサイトカインは他のサイトカインと相加的または相乗的效果を有し、またいくつかのサイトカインはまたレセプター成分を共有する。

サイトカインのネットワークは複雑であるため、所定のサイトカインの生理的重要性に関する研究は困難であったが、サイトカイン遺伝子欠損マウスを用いた近年の研究によって、in vivoにおけるサイトカインの機能に対する理解は顕著に高まってきた。可溶性タンパク質に加え、いくつかの膜結合性の共刺激性分子が免疫応答の調節において基本的な役割を果たしている。これらの分子としてはCD40、CD40リガンド、CD27、CD80、CD86およびCD150 (SLAM) が挙げられ、これらは通常はリンパ系細胞上で、抗原認識を介した、または細胞-細胞相互作用を通じた活性化後に発現する。

免疫系の鍵となるレギュレーターであるTヘルパー (T_H) 細胞は多数の異なるサイトカインを産生することができ、そのサイトカイン合成パターンに基づいて、 T_H 細胞は2種のサブセットに分類される (PaulおよびSeder(1994) Cell 76:241-251)。 T_H1 細胞は高レベルのIL-2およびIFN-を産生し、IL-4、IL-5およびIL-13は全く、または最小限のレベルでしか産生しない。対照的に、 T_H2 細胞は高レベルのIL-4、IL-5およびIL-13を産生し、IL-2およびIFN-の産生は最小限であるか、または産生されない。 T_H1 細胞がマクロファージ、樹状細胞を活性化し、 $CD8^+$ 細胞障害性Tリンパ球およびNK細胞 (Id.) の細胞溶解活性を増大させるのに対し、 T_H2 細胞はB細胞に効率的な手助けを提供し、また、IgEイソ型のスイッチングおよびB細胞のIgE分泌細胞への分化を誘導する能力によって、アレルギー応答を仲介する (De VriesおよびPunnonen (1996), Cytokine regulation of humoral immunity: basic and clinical aspects., Eds . Snapper, C.M., John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK, p.195-215)。 T ヘルパー細胞の分化を調節する正確なメカニズムは十分には理解されていないが、サイトカインが主要な役割を果たしていると考えられる。IL-4が T_H2 分化を指令することが示された一方、IL-12は T_H1 細胞の発達を誘導する (PaulおよびSeder、上記)。さらに、CD80、CD86およびCD150等の膜結合共刺激性分子が $TH1$ および/または $TH2$ の発達を指令し得ること、および TH 細胞分化を調節する同じ分子が、B細胞のIg分泌プラズマ細胞への活性化、増殖および分化にも影響することが示唆されている (Cocksら, (1995) Nature 376:260-263; Lenschowら, (1996) Immunity 5:285-293; Punnonenら, (1993) Proc. Nat'l. Aca

d. Sci. USA 90:3730-3734; Punnonenら, (1997) J. Exp. Med. 185:993-1004)

。

ヒトおよびマウスの双方における研究から、Tヘルパー (T_H) 細胞のサイトカイン合成プロファイルが、いくつかのウイルス、細菌および寄生虫感染の結果を決定する上で重大な役割を果たしていることが示された。 $T_H 1$ 細胞の頻度が高いと一般に致死的な感染から保護されるのに対し、優性 $T_H 2$ 表現型ではしばしば伝染性の (disseminated) 慢性的感染が生じる。例えば、 $T_H 1$ 表現型はらいの類結核 (耐性) 形態で観察され、 $T_H 2$ 表現型はらい腫の、多種類のかん菌が存在する (感受性) 病変で観察される (Yamamuraら、(1991) Science 254:277-279)。同様に、後期段階のHIV患者は $T_H 2$ 様サイトカイン合成プロファイルを有し、 $T_H 1$ 表現型はAIDSから保護することが提示された (Maggiら、(1994) J. Exp. Med. 180:489-495)。さらに、髄膜炎菌性敗血症後の生存は、末梢白血球のTNF-およびIL-10産生能に基づいて遺伝的に決定される。IL-10産生が高い家族の個人では致死的な髄膜炎性疾患の危険性が高いのに対し、TNF-産生が高い家族のメンバーはその感染に打ち勝つ可能性が高いようである (Westendorpら、(1997) Lancet 349:170-173)。

サイトカイン処理は、 $T_H 1$ / $T_H 2$ 細胞分化およびマクロファージ活性化に劇的に影響し、それによって感染性疾患の結果に影響を及ぼすことができる。例えば、森林型熱帯リーシュマニアに感染したBALB/cマウスは一般に $T_H 2$ 表現型を有する散在性致死疾患を生じるが、抗IL-4mAbsまたはIL-12で処理した場合、マウスにおける $T_H 1$ 細胞の頻度が増し、病原体の侵襲を妨げることができる (Chatelainら、(1992) J. Immunol. 148:1182-1187)。同様に、IFN-は致死性の単純疱疹ウイルス (HSV) 感染からマウスを防御し、MCP-1は緑膿菌またはネズミチフス菌による致死感染を防ぐ。さらに、組み換えIL-2等のサイトカイン処理により、ヒトにおける一般的な種々の免疫不全において有益な効果が示された (Cunningham-Rundlesら、(1994) N. Engl. J. Med. 331:918-921)。

サイトカインおよび他の分子を投与して、特定の疾患の治療に最も適した方法で免疫応答をモジュレートすることにより、疾患の治療のための重要なツールが提供することができる。しかしながら、現在利用できる免疫調節剤による治療に

は、特異的な活性が不十分であること、投与される免疫調節剤に対する免疫応答の誘導、および他の潜在的な問題等のいくつかの欠点がある場合がある。従って、現在利用されているものと比較して改善された特性を示す免疫調節剤に対する需要が存在する。本発明はこのおおよそ他の需要を満たすものである。

マラリア原虫 *P. falciparum* に感染した赤血球は、環状期 (ring stage) から栄養型へと成熟するにつれて末梢循環から消失する (Bignami および Bastianelli、*Reforma Medica* (1889) 6:1334-1335)。壊死巣分離として知られるこの現象は、多様な器官における、寄生された赤血球 (「PE」) の微小血管内皮細胞への接着 (adherence) から生じる (Miller, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1969) 18:860-865)。壊死巣分離は、瘤の隆起の発現 (Leech ら、*J. Cell. Biol.* (1984) 98:1256-1264)、PfEMP1 と呼ばれる非常に大きな抗原的変異体表面タンパク質の発現 (Aley ら、*J. Exp. Med.* (1984) 160:1585-1590; Leech ら、*J. Exp. Med.* (1984) 159:1567-1575; Howard ら、*Molec. Biochem. Parasitol.* (1988) 27:207-223)、および内皮細胞への接着を仲介する新規レセプター特性の発現 (Miller, 上記; Udeinya ら、*Science* (1981) 213:555-557) に一時的に関係する。CD36、トロンボスポンディン (TSP) および ICAM-1 等の内皮細胞表面タンパク質は成熟 PE の主要宿主レセプターとして同定された。例えば、Barnwell ら、*J. Immunol.* (1985) 135:3494-3497; Roberts ら、*Nature* (1985) 318:64-66; および Berendt ら、*Nature* (1989) 341:57-59 を参照すること。

PE 壊死巣分離によって、*P. falciparum* 原虫に独特な利点が付与される (Howard および Gilladoga, *Blood* (1989) 74:2603-2618) が、また *P. falciparum* の急性病理にも直接寄与する (Miller ら、*Science* (1994) 264:1878-1883)。4 種のヒトのマラリアのうち、*P. falciparum* 感染のみが、重篤な薬剤耐性マラリアでの増加が見られる神経学的欠陥および大脳の病理と関連している (Howard および Gilladoga、上記)。

ヒト大脳マラリアの発生は、特定の寄生虫表現型 (Berendt ら、*Parasitol. Today* (1994) 10:412-414)、不適当な免疫応答、および大脳微小血管構造 (microvasculature) における内皮細胞表面タンパク質表現型 (Pasloske および Howard, *Ann. Rev. Med.* (1994) :283-295) を含む因子の組み合わせに起因するようで

あるが、大脳血管へのPEの接着およびそれに続く局所的微小血管閉塞が主要な要因である。例えば、Berendtら、上記；Patnaikら、Am. J. Trop. Med. Hyg. (1994) 51:642-647を参照すること。

P. falciparum PEがPfEMP1の変異型を発現する能力は、この寄生虫の特殊な毒性に寄与する。変異型寄生虫は、より初期の感染によって引き出される変異型特異的抗体から逃れることができる。*P. falciparum*変異型抗原は、個々の寄生虫株に感染したAotusサルで調製した抗血清を用いてin vitroで決定された(Howardら、Molec. Biochem. Parasitol. (1988) 27:207-223)。特定の寄生虫に対する抗体は、同じ株由来のPEを用いたPE凝集、間接免疫蛍光または免疫電子顕微鏡法によってのみ反応する(van Schravendijkら、Blood (1991) 78:226-236)。

種々の地理的地域におけるマラリア患者からのPEおよび同じ患者または異なる患者からの血清を用いた研究から、天然の単離体におけるPEは変異型表面抗原を発現しており、個々の患者は単離体特異的抗体の産生によって感染に応答していることが確認された(MarshおよびHoward, Science (1986) 231:150-153; Aguiarら、Am. J. Trop. Med. Hyg. (1992) 47:621-632; Iqbalら、Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1993) 87:583-588)。PE上における変異型抗原の発現は、*P. knowlesi* (BrownおよびBrown, Nature (1965) 208:1286-1288; Barnwellら、Infect. Immun. (1983) 40:985-994)、*P. chabaudi* (Gilksら、Parasite Immunol. (1990) 12:45-64; Brannanら、Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. (1994) 256:71-75)、*P. fragile* (Handunnettiら、J. Exp. Med. (1987) 165:1269-1283) および *P. vivax* (Mendisら、Am. J. Trop. Med. Hyg. (1988) 38:42-46) を含め、数種のサル、マウスおよびヒトのマラリア種でも報告された。サルの*P. knowlesi* (87:583-588)。PE上における変異型抗原の発現は、*P. knowlesi* (BrownおよびBrown、上記；Barnwellら、上記) または*P. falciparum* (Hommelら、J. Exp. Med. (1983) 157:1137-1148) およびマウスの*P. chabaudi* (Gilksら、上記) を使用した研究により、PE表面における抗原のバリエーションが、持続的または慢性の感染、および先に感染した動物で繰り返し血液感染を再確立する能力と関連することが確認された。クローン化した寄生虫を用いた研究により、抗原変異型が異常な頻度で生じ得ることが報告された。例えば*P. falciparum*で世代当たり2% (Robe

rtsら、Nature (1992) 357:689-692)、P.chabaudiで世代当たり1.6% (Brannanら、上記)である。

【0003】

PfEMP1は、非感染赤血球では見られず、また放射性標識アミノ酸の生合成的取り込みによっても標識される、 ^{125}I 標識されたPE上の多様なサイズのタンパク質 (200-350kD) として同定された (Leechら、J. Exp. Med. (1984) 159:1567-1575; Howardら、Molec. Biochem. Parasitol. (1988) 27:207-223)。PfEMP1はTritonX-100等の中性界面活性剤によってはPEから抽出されないが、SDSによって抽出され、赤血球の細胞骨格につながっていることが示唆される (Aleyら、J. Med. Exp. (1984) 160:1585-1590)。過剰量のTritonX-100を添加後、PfEMP1は適当な血清抗体と免疫反応する (Howardら、(1988)、上記)。インタクトなPEを穏やかな条件でトリプシン処理すると、細胞表面からPfEMP1が速やかに切断される (Leechら、J. Exp. Mod. (1984) 159:1567-1575)。PfEMP1は、同じ株に感染したAotusサルの血清由来の抗体によって、P.falciparumの特定の株から免疫沈降するが、異種の株に感染した動物由来の抗体によっては免疫沈降しないために、抗原として多様なエピトープを保持している。(Howardら、(1988)、上記)。脾臓を摘出したAotusサルに寄生虫を感染 (passage) させて誘導したKnobless PE (Aleyら、上記) は表面PfEMP1を発現せず、免疫した個体または感染したサル由来の血清と凝集反応を起こさない (Howardら、(1988)、上記; HowardおよびGilladoga, Blood (1989) 74:2603-2618)。一般に、間接免疫蛍光法および抗体介在型PE凝集によってPE表面と反応する血清は、いかなる特定株からの ^{125}I 標識PfEMP1をも免疫沈降させる唯一の血清である (Howardら、(1988), 上記; van Schravendijkら、Blood (1991) 78:226-236; Biggsら、J. Immunol. (1992) 149:2047-2054)。

寄生虫感染した赤血球の内皮細胞への接着は、CD36、トロンスポンディンおよび細胞内接着分子1 (ICAM-1) を主要な宿主細胞レセプターとして含む、複数のレセプター／カウンターレセプター相互作用によって仲介されている (HowardおよびGilladoga, Blood (1989) 74:2603-2618; PasloskeおよびHoward, Ann. Rev. Med. (1994) 45:283-295)。

血管細胞接着分子1 (VCAM-1) および内皮白血球接着分子1 (ELAM-1) も、*P. falciparum* PE (Ockenhouseら、J. Exp. Med. (1992) 176:1183-1189、およびHowardおよびPasloske、上記) のごく一部の接着を仲介し得るさらなる内皮細胞レセプターであると考えられてきた。PE表面上の接着レセプターはまだ完全には同定されておらず、AG332 (Udomsangpetchら、Nature (1989) 338:763-765)、修飾されたバンド3 (Crandallら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1993) 90:4703-4707)、セクエストリン (Sequesterin) (Ockenhouse, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1991) 88:3175-3179)、およびPfEMP1 (HowardおよびGilladoga、上記、ならびにPasloskeおよびHoward、上記) を含む数種の分子がその候補として提示されている。いくつかの間接的な証拠から、PfEMP1の発現と、PE表面上の新規の宿主タンパク質レセプター特性の獲得とが関連付けられた (HowardおよびGilladoga、上記; PasloskeおよびHoward、Ann. Rev. Med. (1994) 45:283-295)。PE接着は、成熟段階のPE表面上のPfEMP1の発現と関連している (Leechら、J. Exp. Med. (1984) 159:1567-1575)。in vitroで選択されたPEの接着表現型における変化は、通常PfEMP1の新規の形態の出現と関連している (Biggsら、J. Immunol. (1992) 149:2047-2054; Robertsら、Nature (1992) 357:689-692)。インタクトな成熟PEを穏やかな条件でトリプシン処理すると、PfEMP1の細胞外部分が切断され、同時にPE細胞接着が低減または消失する (Leechら、上記)。先に報告された細胞接着の抗体介在型妨害または逆転 (reversal) は株特異的であり、血清と反応して対応するPEを凝集させ、表面標識¹²⁵I-PfEMP1を免疫沈降させる能力と関連している (Howardら、Molec. Biochem. Parasitol. (1988) 27:207-224)。PfEMP1 (修飾されたバンド3) は非生理的条件下でCD36に結合することが示された (Crandallら、Exp. Parasitol. (1994) 78:203-209)。PfEMP1と相同であると考えられ、knobless PEからTX100で抽出されるセクエストリン (Sequesterin) は、固定化したCD36に結合することが示された (Ockenhouse, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1991) 88:3175-3179)。

マラリア抗原変異の複雑な性状および／またはメカニズム、およびその特定の毒性から、マラリア感染の治療、診断および予防において有用であり得る方法および組成物に対する需要が生じている。本発明はこれらのおよびその他の需要を

満たすものである。

【0004】

定方向進化における問題および考察の概要

望ましい特性の方へ生物学的分子を実験的に修飾する定方向進化と呼ばれるアプローチは、1またはそれ以上の親分子の鋳型を突然変異させ、子孫分子の中で望ましい分子を同定することによって達成することができる。定方向進化において現在利用できる技術としては、確率論的（すなわちランダム）突然変異誘発を行う方法および非確率論的（非ランダム）突然変異誘発を行う方法が挙げられる。しかしながら、双方の方法の重大な欠点を本明細書に開示する。

前置きとして、客観的な観点から考察すれば、全ての突然変異誘発は非確率論的であること、さらに、客観的な観点から考察すれば、宇宙全体が非確率論的なプロセスで進行していることは、哲学的にいくらか議論され得ることであることに注目すべきである。これが真実であるか否かは本発明の考察の範囲外である。従って、本明細書で使用する場合、用語「ランダム性」、「不確実性」、および「予測不可能性」は主観的な意味を有し、実験プロセスの設計者の知識、特に予測的知識が、そのプロセスが確率論的であるか非確率論的であるかの決定要因である。

例として、子孫分子の鋳型を突然変異（修飾または変化）させて、予め決定されていない突然変異を有する子孫分子のセットを得る状況によって、確率論的またはランダム突然変異誘発を例証する。従って、*in vitro*の確率論的突然変異誘発反応においては、例えばその産生が意図されたものである、特定の予め決められた生成物はない。むしろ達成された突然変異の正確な性状に関し、また産生される生成物に関して不確実性、すなわちランダム性が存在する。対照的に、子孫分子の鋳型を突然変異（修飾または変化）させて、1またはそれ以上の予め決められた突然変異を有するある子孫分子を得る状況によって、非確率論的または非ランダム突然変異誘発を例証する。ある程度の量のバックグラウンド生成物が分子のプロセシングが生じる多くの反応で実際に存在すること、およびこれらのバックグラウンド生成物の存在は、予め決められた生成物を有する突然変異誘発プロセスの非確率論的性状を減じるものでないことを認識する必要がある。

従って、本明細書中では、確率論的突然変異誘発は、誤りが発生しやすいPCRや確率論的シャフリング等のプロセスにおいて表されるのだが、こうしたプロセスでは達成される突然変異はランダムであるか、または予め決められていない。対照的に、本明細書中では、非確率論的突然変異誘発は、遺伝子の部位飽和突然変異誘発や合成的ライゲーション再アセンブリー等の本明細書に開示されるプロセスにおいて表されるのだが、こうしたプロセスでは目的の生成物の正確な化学構造が予め決められている。

簡潔に言うと、非確立論的である既存の突然変異誘発法は、1回の実施で1個から非常に少数の予め決められた突然変異を作製するために使用できるものであり、予め決められた分子構造を有する1個からわずか2-3個の子孫分子を1回の実施で産生する。さらに、これらの非確率論的方法の適用によって現在利用されている突然変異の型も限定されており、そのため子孫の突然変異分子の型も限定されている。

対照的に、本来確率論的である突然変異誘発の既存の方法は、ランダムな方法であり、かつ通常は多くの避けられない偶発的な望ましくないバックグラウンド生成物が伴うものであったが、1回の実施でかなり多数の突然変異を作製するために使用できるものであった。従って、こうした既存の確率論的方法では、1回の実施で多数の子孫分子が産生できるが、これらは未決定の分子構造を有するものである。こうした現在の確率論的方法の適用によって達成し得る突然変異の型も限定されており、子孫突然変異分子の型も限定されている。

以下のような非確率論的突然変異誘発法の開発に対する需要があることは即座に認識されることである。

- 1) 予め決められた分子構造を有する多数の子孫分子を作製するために使用でき、
- 2) より多くの突然変異の型を容易に作製するために使用でき、
- 3) 対応してより多様な子孫突然変異分子を産生でき、
- 4) 望ましくないバックグラウンド生成物の産生が減少し、
- 5) 全ての可能性を枯渇させるようなやり方で使用でき、そして
- 6) 合成的かつ非反復的な方法で子孫分子を産生できる方法。

本発明はこれらの需要を全て満たすものである。

定方向進化は自然進化を補足する：

自然進化は、定方向または実験的進化のための踏み台となっており、模倣される方法および突然変異誘発される分子鋳型の両方の母体として役立つ。自然進化は、その過程に関連した固有の制約（優先および／または許容される突然変異誘発方法の種類および速度におけるもの）を受けるにもかかわらず、何百万年もの間、多種多様な環境において進行してきたという利点を有すると理解されている。したがって、自然進化（自然界における分子突然変異誘発および選択）は、ある種の商業的用途において有用性を示している多数の生物学的化合物の生成をもたらしてきた。

しかしながら、満たされていない多数の商業的要求は、自然界で見出されうるいずれの進化圧および／または方向とも一致しないことが直ちに理解される。さらに、商業的に有用な突然変異が、そうでなければ自然界において分子レベルで優先される場合、自然進化が、しばしば、そのような突然変異の正の選択を凌ぐことは、よく認められることである（例えば、全体として生物に対する悪影響を伴う場合、例えば、有利な突然変異が、有害な突然変異を伴う場合）。また、自然進化は遅い場合が多く、多くのタイプの複製において忠実度を優先する。さらにまた、自然進化は、主として、連続した有益な突然変異によってできた経路を優先することが多いが、多数の連続した負の突然変異を避ける傾向があり、そのような負の突然変異が、組合された場合に有益となりうる場合、または迂回経路を通して有益な最終状態につながりうる場合であっても、そのような傾向が認められる。

さらに、自然進化は、それほど望ましくない段階を避けつつ、特定の段階（例えば、特異的突然変異誘発および選択過程）を経て進行する。例えば、多数の核酸は、機能的環境においては、キメラ化または取込みまたは1つの種から別の種へのその他のタイプの伝達を受けるほど互いに接近するには至らない。したがって、例えば、自然界において、2つの特定の種の間には性交が生じない場合には、これらの2つの種からの核酸のキメラ化も生じるとは考えられず、それらの2つの種に共通の寄生体が、DNAの分子間遭遇および交換のための非常に遅い経路の一

例として働く。もう1つの例としては、自己毒性または自己致死性または生殖不能性を引き起こす分子の生成が自然界においては避けられることが挙げられる。さらにもう1つの例としては、生物に対する特別の直接的利益を有さない分子の増殖が該生物の後代においては消滅する傾向があることが挙げられる。さらに、例えば、その内因性環境中でそれがさらされる条件以外の条件下の分子の性質の改善のための選択圧は存在しない。例えば、細胞質の分子が、細胞質内でそれに要求されるもの以外の機能的特徴を獲得するとは考えられない。さらに、生物学的分子の増殖は、その生態系に対する地球上の任意の悪影響（自然に生じるか否かにかかわらず）に感受性である。これらの及び他の特性は、自然界において増殖しうる突然変異のタイプを著しく制限する。

一方、定方向（または実験的）進化（特に、本発明で提供するもの）は、はるかに迅速に生じることが可能であり、自然では得られない及び／又は得られるとは考えられない商業的に望ましい予め決められた分子特性に進化するよう、より能率的に方向づけられうる。さらに、本発明で提供する定方向進化の発明は、突然変異誘発および選択方法において使用しうる工程のタイプにおける、より広範な可能性を与えうる。したがって、自然界から集めた鋳型を使用して、本発明の定方向進化は、自然そのものにおいて同一時間内でしばしば予想されるものより広範な、生成しうる子孫分子のタイプおよびそれらの生成速度における可能性を与える。

特定の実施形態において、本発明で開示する定方向進化法は、天然で増殖しそうにない（すなわち、生成したり、および／または選択されそうにない）が自然進化では得られない望ましい下流突然変異誘発産物の生成につながりうる子孫分子の系統（例えば、連続した子孫分子のセットを含むもの）を得るために、反復的に適用することができる。

従来の定方向進化法は次善的なものである：

これまでに多くの場合に突然変異誘発が試みられてきたが、それらで用いられた方法は本発明の目的には不適當である。例えば、従来記載されている非確率論的方法は、子孫分子の非常に小さなセット（専ら単独の子孫分子を含むことが多い）の生成に有用であるにすぎない。例えば、キメラ遺伝子は、制限酵素により

得られる適当な付着末端を用いて2つのポリヌクレオチド断片（各断片は別々の祖先（または親）分子に由来する）を結合することにより作製されている。もう1つの例としては、単一の部位突然変異誘発ポリヌクレオチドをコードする単一の子孫ポリヌクレオチドを得るための、親ポリヌクレオチド内での単一のコドン位置の突然変異誘発（すなわち、あるコドンの置換、付加または欠失を行なうためのもの）が挙げられるであろう。

従来の非確率論的アプローチは、方法の適用当たり僅か1個ないし数個の突然変異の生成に有用であるにすぎない。したがって、従来記載されているこれらの非確率論的方法は、本発明の主要目的の1つ（すなわち、核酸の網羅的および非確率論的なキメラ化）にも向けられていない。したがって、従来の非確率論的方法においては、非常に望ましい子孫分子の生成につながりうる可能な点突然変異、キメラ化およびそれらの組合せの大部分を利用しないままとなっている。

これに対して、多数の点突然変異および／またはキメラ化を達成するために、非確率論的方法ではなく確率論的方法が用いられている。このため、確率論的方法は、スクリーニングに付されうる子孫分子（望ましくは、そのなかから所望の分子種が見出されることとなる）のセットを生成させるための優れたアプローチを含むものとなっている。しかしながら、これらのアプローチの主な欠点は、それらの確率論的性質のため、生成する子孫分子の各セット内の厳密な成分に関して偶然性が存在することである。したがって、実験者には、典型的には、ある特定の反応容器内でどのような厳密な子孫分子種が表されるかが、それらが生成するまでほとんど又は全くわからない。したがって、確率論的方法を繰返した場合（例えば、所望の子孫分子の探索の継続において）、予め捨てられた望ましくない分子種の再生および再スクリーニングが、進行の労働集約的障害となり、そのため、循環とまではいかなくとも迂回した経路をとることになる。そのような非常に次善的な経路の欠点は、確率論的に生成する子孫分子のセットを手間のかかる方法（例えば、配列決定）に付してそれらの分子構造を同定することにより対処されうるが、これでさえ、不完全な解決策である。

さらに、現在の確率論的アプローチは、ある特定の突然変異群内の分子種のすべてを包括的または網羅的に生成させたり、機能が鋳型分子内の特定の構造群（

例えば、特定の単一のアミノ酸位置、または2以上のアミノ酸位置を含む配列)に起因すると判定したり、特定の突然変異群を分類し比較するには非常に不適当である。したがって、現在の確率論的アプローチは、望まない突然変異誘発結果の体系的な排除を本質的に可能にするものではない。要するに、該アプローチにおいては、定方向進化に最適となるには余りにも多くの本質的な欠点が障害となるのである。

本発明は、非限定的な態様において、親鋳型におけるすべての可能な点突然変異を包括的および網羅的に生成させるための非確率論的手段を提供することにより、これらの問題に対処する。本発明は更に、もう1つの非限定的な態様において、キメラ化群内のすべての可能なキメラ化を網羅的に生成させるための手段を提供する。このように、前記の課題は本発明により解決される。

本発明で検討する技術的背景における具体的な課題には、以下のものが含まれる：

1) 部位特異的突然変異誘発技術（例えば、雑な又は低い忠実度のPCR）は、ポリペプチド配列に添った各位置（部位）において、完全な（飽和した）範囲の可能な突然変異（すなわち、すべての可能なアミノ酸置換）を体系的に達成するには無効である。

2) ある分子配列および潜在的に莫大な数の子孫分子（1以上の分子鋳型の定方向進化により得られうると考えられるもの）内に含まれうる多量の情報を迅速に分析するための比較的容易な体系的手段は存在しない。

3) 分子位置に関する機能と構造とを関連づける包括的な実験的情報を得るための比較的容易な体系的手段は存在しない。

4) ある突然変異誘発（例えば、キメラ化）法における鍵工程で内部対照（例えば、陽性対照）を取込ませるための容易な体系的手段は存在しない。

5) 子孫分子（例えば、完全長キメラ）の特定の一群を、より小さな部分配列から選択するための容易な体系的手段は存在しない。

有用なハイブリッドタンパク質を得るためのタンパク質内のアミノ酸、およびこれらのハイブリッドタンパク質をコードするそれらに対応する生物学的分子（すなわち、DNA、RNA）の意図的および無作為な組合せには、非常に多数の可能性

が存在する。したがって、所望の用途のための多種多様なそのようなハイブリッドタンパク質（特に、多種多様なランダムタンパク質）を製造しスクリーニングする必要がある。

生物学的高分子（例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の両方を含む分子）の活性な配列の複雑性は、その情報量（「IC」）と称されており、これは、アミノ酸配列の変異に対する該活性タンパク質の抵抗性（同じ機能を有する関連配列のファミリーを表すのに要する不変アミノ酸の最小数（ビット）から計算される）として定義されている。ランダム突然変異誘発に、より感受性であるタンパク質は、高い情報量を有する。

分子ライブラリーなどの分子生物学における成果は、非常に多数の可変塩基の同定を可能にしており、ランダムライブラリーから機能的配列を選択するための方法さえも提供している。そのようなライブラリーにおいては、その場合に補償する変化に応じて、ほとんどの残基が変異しうる（尤も、典型的には、同時にすべてというわけではないが）。したがって、100アミノ酸のタンパク質は僅か2,000個の異なる突然変異を含有しうるにすぎないが、 20^{100} 個の配列の組合せが可能である。

情報密度は、配列の単位長さ当たりのICである。酵素の活性部位は高い情報密度を有する傾向にある。これに対して、酵素における情報の柔軟性リンカーは、低い情報密度を有する。

ライブラリー形態において代替タンパク質を作製するために広く用いられている現在の方法は、誤りがちなポリメラーゼ連鎖反応およびカセット突然変異誘発であり、この場合、最適化される特定の領域を、合成的に突然変異誘発されたオリゴヌクレオチドで置換する。どちらの場合も、相当数の突然変異部位が、元の配列内の或る部位の周囲に生じる。

誤りがちなPCRは、長い配列にわたり低レベルの点突然変異をランダムに導入するために低い忠実度の重合条件を用いる。未知配列の断片の混合物中で、誤りがちなPCRを用いて該混合物を突然変異誘発させることができる。公開されている誤りがちなPCRプロトコールは、ポリメラーゼのプロセシビティーの低さが欠

点となる。したがって、該プロトコールは、平均的なサイズの遺伝子のランダム突然変異誘発を行なうことができない。そのため、誤りがちなPCRの実際の適用は制限される。連続した劇的な配列進化に要する大規模なひとまとまりの変化が可能となるには、点突然変異誘発のみでは、しばしば余りにも漸進的すぎることも、いくつかのコンピューターシミュレーションから示唆されている。さらに、公開されている誤りがちなPCRプロトコールは、0.5~1.0kbを越えるDNA断片を増幅できないため、それらの実際の適用が制限される。また、誤りがちなPCRの反復サイクルは、望ましくない結果（例えば、タンパク質の結合親和性ではなく該タンパク質の免疫原性に対する影響）を有する中立突然変異の蓄積につながりうる。

オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発においては、短い配列を、合成的に突然変異誘発されたオリゴヌクレオチドで置換する。このアプローチは、隔たった突然変異の組合せを与えないため、複合的（combinatorial）ではない。非常に長い配列長の割にライブラリーサイズが限られていることは、タンパク質を最適化するのに多数のラウンドの選択が避けられないことを意味する。合成オリゴヌクレオチドでの突然変異誘発においては、各選択ラウンド後に個々のクローンを配列決定し、ついでそれらをファミリーに分類し、必要に応じて、単一のファミリーを選択し、それをコンセンサスモチーフに変換することが必要である。そのようなモチーフを再合成し、単一遺伝子内に再挿入し、ついで追加的な選択を行なう。この工程は統計的な障害となり、労働集約的であり、多ラウンドの突然変異誘発には実用的でない。

このように、誤りがちなPCRおよびオリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発は、単一サイクルの配列微調整には有用であるが、多サイクルに適用されると急に限定的なものとなる。

誤りがちなPCRのもう1つの制約は、ダウン突然変異（down-mutations）の速度が配列の情報量と共に増加することである。情報量、ライブラリーサイズおよび突然変異誘発速度が増加するにつれて、アップ突然変異（up-mutations）とダウン突然変異との平衡が、さらなる改善の選択を統計的に妨げるであろう（統計的な頭打ち）。

カセット突然変異誘発においては、単一の鋳型の配列のブロックを、典型的には、（部分的に）ランダム化された配列で置換する。したがって、得られうる最大の情報量は、ランダムな配列の数（すなわち、ライブラリーサイズ）により統計的に制限される。これは、現在では最良ではないが長期的にはより大きな潜在性を有する他の配列ファミリーを排除する。

また、合成オリゴヌクレオチドでの突然変異誘発は、各選択ラウンド後に個々のクローンの配列決定を要する。したがって、そのようなアプローチは面倒であり、多ラウンドの突然変異誘発には実用的でない。

したがって、比較的低い情報量の微調整領域には、誤りがちなPCRおよびカセット突然変異誘発が最も適しており、広く用いられている。1つの明らかな例外は、誤りがちなPCRおよび選択による多ラウンドの増幅を用いるランダムライブラリーからのRNAリガーゼリボザイムの選択である。

自然界においては、ほとんどの生物の進化は自然選択および有性生殖により生じる。有性生殖は、選択された個体の子孫における遺伝子の混合および組合せを保証するものである。減数分裂の間に、親由来の相同染色体が互いに整列し、それらの長さに沿った一部が交差し、それにより遺伝物質をランダムに交換する。DNAのそのような交換またはシャッフリングは、生物がより迅速に進化するのを可能にする。

組換えにおいては、挿入される配列は、相同な環境中で有用であると判明しているものであるため、該挿入配列は、それらが新たな配列内に挿入されたら、尚も相当な情報量を有すると考えられる。

理論的には、100アミノ酸のタンパク質には2,000個の異なる単一突然変異体が存在する。しかしながら、100アミノ酸のタンパク質は 20^{100} 個の可能な配列の組合せを有し、通常の方法で徹底的に検討するには、この数は余りに膨大である。これらの可能な組合せ突然変異のすべての生成およびスクリーニングを可能にする系を開発するのが好都合であろう。

当技術分野における幾人かの研究者は、ファージ系内での発現のための軽鎖抗体遺伝子と重鎖抗体遺伝子との組合せのハイブリッドを作製するために、*in vivo*部位特異的組換え系を利用している。しかしながら、それらの系は、特定の組

換え部位に基づくものであり、それに応じて限定されてしまう。重複伸長およびPCRによる一本鎖抗体（scFV）内の抗体CDR領域の同時突然変異誘発が報告されている。

他の研究者は、ランダムin vivo組換えを用いて多数のハイブリッドの大きな集団を作製する方法を記載している。この方法は、2つの異なるプラスミドライブラリー（各ライブラリーは異なる選択マーカーを有する）の組換えを要する。この方法は、存在する選択マーカーの数に等しい限られた数の組換えに限定されてしまい、選択された配列に結合したマーカー遺伝子の数の直線的増加を伴う。

プラスミド上の相同ではあるが末端切断型である2つの昆虫毒素遺伝子間のin vivo組換えが、ハイブリッド遺伝子の製造方法として報告されている。欠損したミスマッチ修復酵素を有する宿主細胞内での実質的にミスマッチしたDNA配列のin vivo組換えによるハイブリッド分子の形成が報告されている。

【0005】

1.3. 発明の概要

ワクチン接種に対して最適な応答を達成するような免疫反応の方向づけ

本発明は、ワクチン接種に対して最適な応答を達成するように免疫反応を方向づける能力をワクチンに賦与する、少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の遺伝的ワクチン成分を含む多成分遺伝的ワクチンを提供する。例えば、遺伝的ワクチンは、最適な抗原放出をもたらす成分、細胞傷害性Tリンパ球の最適な産生をもたらす成分、免疫調節物質の放出を指令する成分、ケモカインの放出を指令する成分、および／または目的の標的細胞型への結合または侵入を容易にする成分を含みうる。例えば、ある成分は抗原発現細胞や抗原提示細胞などの標的細胞への遺伝的ワクチンの結合および取込みを向上させることができる。

追加の成分としては、細胞への抗原の取込みから誘導された抗原ペプチドを、クラスIまたはクラスII分子による提示へと導くものが含まれる。例えば、抗原ペプチドをクラスI分子による提示へと導く成分（タパシン、TAP-1、TAP-2などのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む）が含まれ、かつ／または抗原ペプチドをクラスII分子による提示へと導く成分（エンドソームまたはリソソームプロテアーゼのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む）が

含まれる。

特に好ましい態様においては、本発明は、免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすか、免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法を提供し、前記方法は、親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することを含んでなり、その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による突然変異の導入が含まれ、さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれることを特徴とする。

別の特に好ましい態様において、本発明は、免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすか、免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法を提供し、前記方法は、非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることにより、免疫反応に調節効果を及ぼすまたは免疫反応に調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする、最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定することを含んでなり、その際、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドまたは該非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力が増大していることを特徴とする。

別の特に好ましい態様において、本発明は、免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすか、免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法を提供し、前記方法は、a)親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製し、b)該ライブラリーをスクリーニングすることによって、遺伝的ワクチンベクターにより生起される免疫反応への調節効果を有する、または該調節効果を有するポリペプチドをコードする、最適化された非確率論的に生成した

子孫ポリヌクレオチドを同定することを含んでなり、ここで、最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドまたは該非確率論的に生成したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力が増大しており、その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれることを特徴とする。

別の特に好ましい態様において、本発明は、組換え発現宿主内での最適化された発現を有する免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法を提供し、前記方法は、親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製することを含んでなり、その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれることを特徴とする。

別の特に好ましい態様において、本発明は、組換え発現宿主内での最適化された発現を有する免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法を提供し、前記方法は、非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることにより、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドの発現と比較して、組換え発現宿主において最適化された発現を有する最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定することを含んでなる。

別の特に好ましい態様において、本発明は、組換え発現宿主内での最適化された発現を有する免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法を提供し、前記方法

は、a)親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを作製し、b)非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることによって、該ライブラリーをもたらした親ポリヌクレオチドの発現と比較して、組換え発現宿主において最適化された発現を有する最適化された非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドを同定することを含んでなり、その際、最適化は、任意の組合せ、順列および反復法で本明細書に記載の1以上の定方向進化法を用いて達成することができ、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」によることを含めて、非確率論的方法による点突然変異の導入が含まれ、さらに、これらの定方向進化法には、本明細書に記載の「合成連結ポリヌクレオチド再集合」によることを含めて、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法による突然変異の導入が含まれることを特徴とする。

一態様において、本発明は、ワクチン（例えば、遺伝的ワクチン）またはワクチンの成分（例えば、遺伝的ワクチンの成分）の能力の、その免疫原性を最適化することによる増大を提供する。さらに、本発明は、下記の性質：

- ・ 1以上の触媒反応
- ・ 反応のタイプ
- ・ 1以上の天然基質
- ・ 基質スペクトル
- ・ 1以上のインヒビター
- ・ 1以上の補因子／補欠分子族
- ・ それに影響する1以上の金属化合物／塩
- ・ 代謝回転数
- ・ 比活性
- ・ K_m 値
- ・ 至適pH
- ・ pH範囲
- ・ 至適温度
- ・ 温度範囲

を含めて、他の性質を改変することを提供する。

また、免疫原性効果をもつ分子の実用性が更なる物理的性質（同様に本明細書中に記載の定方向進化によって改変され得る）により影響され得ること、例えば、それが、

- ・単離／精製
- ・精製
- ・復元条件（加熱と冷却、尿素、塩、界面活性剤、両極端のpH値にさらした際

の活性の可逆性または保持）

- ・結晶化
- ・pH
- ・温度
- ・酸化
- ・1以上の有機溶媒
- ・多様な保存条件

にさらされることによってどのように影響されるか、を直ちに理解できよう。

さらに、本発明は、分子の免疫原的特性の改変を提供し、かかる特性は、

- ・生物学的コンパートメント（胃酸、生体内分解）への暴露
- ・発現（例えば、転写および／または翻訳）レベル
- ・mRNAの安定性
- ・他の細胞または生化学的物質とのin vivo相互作用

などである。

【0006】

遺伝的成分の取得方法

幾つかの実施形態において、(1) 遺伝的ワクチンに所望の特性を賦与し得る核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1つ以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は互いに2個以上のヌクレオチドにおいて異なっている）；(2) 該ライブラリーをスクリーニングして、該遺伝的ワクチンに該所望の特性を賦与する能力が増大している、少なくとも1つの最適化さ

れた組換え成分を同定すること、を含む方法により、1つ以上の遺伝的ワクチン成分が得られる。該成分のさらなる最適化が望まれる場合には、以下の追加のステップを行い得る：(3) 少なくとも1つの最適化された組換え成分を、該第1および第2の形態と同一または異なる該核酸の別の形態と再集合させて（および／または本明細書に記載の1つ以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸の別のライブラリーを作製すること；(4) 該別のライブラリーをスクリーニングして、該遺伝的ワクチンに該所望の特性を賦与する能力が増大している、少なくとも1つの別の最適化された組換え成分を同定すること；そして(5) 必要に応じて、該別の最適化された組換え成分が該遺伝的ワクチンに該所望の特性を賦与する能力のさらなる増大を示すまで、(3)および(4)を繰り返すこと。

遺伝子ファミリーのメンバー

本発明の幾つかの実施形態においては、核酸の第1の形態は遺伝子ファミリーの第1のメンバーであり、核酸の第2の形態は該遺伝子ファミリーの第2のメンバーからなる。モジュール核酸のさらに別の形態もまた、該遺伝子ファミリーのメンバーであり得る。一例として、該遺伝子ファミリーの第1のメンバーは第1の種の生物から得ることができ、該遺伝子ファミリーの第2のメンバーは第2の種の生物から得ることができる。所望により、本発明の方法により得られる最適化された組換え遺伝的ワクチン成分は、例えば、該最適化された組換え遺伝的ワクチン成分を、モル過剰の基質核酸の第1および第2の形態の一方または両方と再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え遺伝的ワクチン成分の別のライブラリーを作製すること；さらに該別のライブラリーをスクリーニングして、その成分を含む遺伝的ワクチンベクターの免疫反応を調節する能力をさらに増大させるような少なくとも1つの最適化された組換え遺伝的ワクチン成分を同定することにより、バッククロスしてもよい。

【0007】

遺伝的ワクチンベクターに増大した宿主細胞内での複製能力を賦与する遺伝的ワクチン成分の取得方法

本発明のもう1つの実施形態は、遺伝的ワクチンベクターに増大した宿主細胞内での複製能力を賦与する遺伝的ワクチン成分を取得する方法を提供する。これ

らの方法は、ポリヌクレオチドを含むベクターにエピソーム複製をもたらし得る該ポリヌクレオチドの少なくとも2種の形態を再集合（および／または本明細書に記載の1以上の別の定方向進化法）に付すことにより、組換え核酸のライブラリーを作製すること；宿主細胞の集団に、それぞれが該組換え核酸のライブラリーのメンバーと細胞表面抗原をコードするポリヌクレオチドとを含むベクターのライブラリーを導入すること；該宿主細胞の集団を複数の世代にわたって増殖させ；そして、該細胞の表面に該細胞表面抗原を提示する細胞を同定すること（その際、該細胞表面抗原を提示する細胞は、ベクターのエピソーム複製する能力を増大させる組換えベクターモジュールを含むベクターを担持することが見込まれる）を含む。

ベクターに増大した宿主細胞内での複製能力を賦与する遺伝的ワクチン成分の取得

ベクターに増大した宿主細胞内での複製能力を賦与する遺伝的ワクチン成分はまた、ヒト・パピローマウイルス由来ポリヌクレオチドを含むベクターにエピソーム複製をもたらし得る該ポリヌクレオチドの少なくとも2種の形態を再集合（および／または本明細書に記載の1以上の別の定方向進化法）に付すことにより、組換え核酸のライブラリーを作製すること；宿主細胞の集団に、それぞれが該組換え核酸のライブラリーのメンバーを含むベクターのライブラリーを導入すること；該宿主細胞を複数の世代にわたって増殖させ；そして、該ベクターを含む細胞を同定すること、によっても得ることができる。

別の実施形態では、本発明は、ベクターに増大したヒト宿主細胞内での複製能力を賦与する遺伝的ワクチン成分を取得する方法であって、かつ、それを含むベクターにエピソーム複製をもたらし得るポリヌクレオチドの少なくとも2種の形態を再集合（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法）に付すことにより、組換え核酸のライブラリーを作製すること；ヒト免疫反応を模倣する試験系に、それぞれが該組換え核酸のライブラリーのメンバーを含む遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを導入すること；そして、該遺伝的ワクチンベクターが該試験系において複製するかまたは免疫反応を引き起こすかを判定すること、による上記方法を提供する。好適な試験系は、例えば、免疫無防備状態の非ヒ

ト宿主動物または機能的なヒト免疫反応系を含む非ヒト哺乳動物の皮膚上に異種移植体(xenotransplant)として存在するヒト皮膚細胞を含み得る。これらの系における複製は、その動物がその抗原に対して免疫反応を示すか否かを判定することにより検出できる。

本発明はまた、遺伝的ワクチンに増大した抗原提示細胞への侵入能力を賦与する遺伝的ワクチン成分を取得する方法を提供する。これらの方法は、それを含むベクターにエピソーム複製を賦与し得るポリヌクレオチドの少なくとも2種の形態を再集合（および／または本明細書に記載の1以上の別の定方向進化法）に付すこと；抗原提示細胞または抗原プロセッシング細胞の集団に、それぞれが組換え核酸のライブラリーのメンバーを含む遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを導入すること；そして、該集団中での該核酸ベクターを含む細胞の割合（％）を求めること、を含む。目的の抗原提示細胞または抗原プロセッシング細胞としては、例えば、B細胞、単球／マクロファージ、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、ケラチノサイト、および筋肉細胞が含まれる。

本発明は、遺伝的ワクチンにより誘導される免疫反応に、直接的に（すなわち、免疫調節性ポリヌクレオチドとして）または間接的に（すなわち、免疫調節性ポリペプチドを生成するための該ポリヌクレオチドの翻訳の際に）調節効果を及ぼすポリヌクレオチドを取得する方法を提供する。本発明のこの方法は、（in vitroおよび／またはin vivoで）実験的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作製すること；そして、該ライブラリーをスクリーニングすることにより、該ライブラリーを構成させた一形態の核酸よりも増大した免疫反応調節能力を、単独でもしくはそのコードされたポリペプチドを介して示す、少なくとも1つの最適化された実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドを同定すること、を含む。例としては、例えば、CpGに富むポリヌクレオチド配列、補助的刺激物質〔例えば、B7-1、B7-2、CD1、CD40、CD154（CD40に対するリガンド）、CD150（SLAM）〕またはサイトカインをコードするポリヌクレオチド配列を含む。これらの方法で用いられるスクリーニングステップは、例えば、該組換え核酸のライブラリーを含む遺伝的ワクチンベクターを細胞に導入すること、そして目的の免疫反応を調節する能力が増大しているか、もしくは

免疫調節性分子を発現する能力が増大している細胞を同定すること、を含み得る。例えば、組換えサイトカインコード核酸のライブラリーは、該核酸によりコードされるサイトカインの、該サイトカイン受容体を含む細胞を活性化する能力を試験することによりスクリーニングできる。該サイトカイン受容体は、該細胞にとって天然のものであってもよいし、あるいは該サイトカイン受容体をコードする異種核酸から発現されるものであってもよい。例えば、最適化された補助的刺激物質を試験して、細胞もしくは培養培地が主に T_H2 免疫反応を、または主に T_H1 免疫反応を誘導することができるものを同定することができる。

幾つかの実施形態において、免疫反応に調節効果を及ぼすポリヌクレオチドは、(1) 免疫反応の調節に関与する核酸または免疫反応の調節に関与する分子をコードする核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は互いに2個以上のヌクレオチドにおいて異なっている）；そして、(2) 該ライブラリーをスクリーニングして、該ライブラリーを構成させた一形態の核酸よりも増大した免疫反応調節能力を単独でまたはそのコードしたポリペプチドを介して示す、少なくとも1つの最適化された実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドを同定すること、によって得られる。さらなる最適化が望まれる場合、この方法は、さらに以下の工程を含み得る：(3) 少なくとも1つの最適化された実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドを、該第1および第2の形態と同一または相違する該核酸の別の形態と再集合させること（および／または本明細書に記載の1つ以上の定方向進化法に付すこと）により、実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドの別のライブラリーを作製すること；(4) 該別のライブラリーをスクリーニングして、該ライブラリーを構成させた一形態の核酸よりも増大した免疫反応調節能力を示す、少なくとも1つの別の最適化された実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドを同定すること；そして、(5) 必要に応じて、該別の最適化された実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオ

チドが、該ライブラリーを構成させた一形態の核酸の形態よりも更に増大した免疫反応調節能力を示すまで、(3)および(4)を繰り返すこと。

本発明の幾つかの実施形態において、実験的に (in vitro および／または in vivo で) 生成したポリヌクレオチドのライブラリーは、以下：コードされたペプチドまたはポリペプチドが複製可能な遺伝的パッケージの表面に提示されるタンパク質との融合体として産生されるように、該実験的に (in vitro および／または in vivo で) 生成したポリヌクレオチドを発現させること；該複製可能な遺伝的パッケージを、該受容体を提示する複数の細胞と接触させること；そして、該受容体により媒介される免疫反応の調節を示す細胞を同定すること、によりスクリーニングされる。

本発明はまた、細胞による抗原の輸送または提示を改善させるアクセサリー分子をコードするポリヌクレオチドを取得する方法を提供する。これらの方法は、該アクセサリー分子の全体または部分をコードする核酸を再集合（および／または本明細書に記載の1以上の別の定方向進化法）に付すことにより、実験的に (in vitro および／または in vivo で) 生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作製すること；そして、該ライブラリーをスクリーニングすることにより、細胞に、該細胞の表面に抗原を輸送または提示する能力の増大または低下（非組換え核酸によりコードされるアクセサリー分子と比較して）をもたらす組換えアクセサリー分子をコードする、最適化された実験的に (in vitro および／または in vivo で) 生成したポリヌクレオチドを同定すること、を含む。幾つかの実施形態において、このスクリーニングステップは、該実験的に (in vitro および／または in vivo で) 生成したポリヌクレオチドのライブラリーを、抗原をコードする遺伝的ワクチンベクターに導入して、ベクターのライブラリーを作製すること；該ベクターのライブラリーを哺乳動物細胞に導入すること；そして、該抗原に対する免疫原性が増大または低下している哺乳動物細胞を同定すること、を含む。

【0008】

本発明の幾つかの実施形態では、最適化されるサイトカインはインターロイキン-12であり、スクリーニングは、培養培地中で該遺伝的ワクチンベクターを含む哺乳動物細胞を増殖させ、T細胞の増殖もしくはT細胞の分化が該培養培地に

接触させることにより誘導されるか否かを検出することにより行われる。別の実施形態では、上記サイトカインはインタフェロン-であり、スクリーニングは、組換えベクターモジュールを、バクテリオファージの表面に提示される融合タンパク質として発現させてファージ提示ライブラリーを作り、B細胞系の増殖を阻害することができるファージライブラリーメンバーを同定することにより行われる。別の実施形態は、補助的刺激物質としてB7-1 (CD80) またはB7-2 (CD86) を用い、免疫反応を調節する能力に関して細胞または培養培地を試験する。

本発明は、最適化されていないベクターモジュールによりコードされる対応するポリペプチドと比較して免疫原性が低下しているサイトカインおよび他の補助的刺激物質をコードする最適化された組換えベクターモジュールを得るための、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび分断(interrupted)合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合の使用手法を提供する。免疫原性の低下は、上記組換えベクターモジュールによりコードされるサイトカインまたは補助的刺激物質を哺乳動物に導入し、そのサイトカインに対して免疫反応が誘導されるか否かを調べることにより検出できる。

本発明はまた、サイトカインアンタゴニストをコードする最適化された免疫調節性配列の取得手法を提供する。例えば、好適なサイトカインアゴニストとしては、欠損シグナル配列を有する可溶性のサイトカイン受容体および膜貫通サイトカイン受容体が含まれる。例としては、sIL-10RおよびsIL-4Rなどが挙げられる。

本発明は、標的細胞への遺伝的ワクチンの取込みまたは特異性を増大させるのに有用な細胞特異的結合分子の取得手法を提供する。この方法は、以下：核酸結合ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸および細胞特異的結合ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸を再集合させる（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付す）ことにより、実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作製すること；そして、該ライブラリーをスクリーニングして、核酸および細胞特異的受容体に結合可能な結合分子をコードする実験的に（in vitroおよび／またはin vivoで）生成したポリヌクレオチドを同定すること、を含む。特に目的となる標的細胞

胞としては、抗原提示細胞および抗原プロセッシング細胞、例えば筋肉細胞、単球、樹状細胞、B細胞、ランゲルハンス細胞、ケラチノサイト、およびM-細胞が挙げられる。

幾つかの実施形態では、標的細胞への遺伝的ワクチンの取込みまたは特異性を増大させるのに有用な細胞特異的結合部分を得るための本発明の方法は、

(1) 核酸結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む核酸の少なくとも第1および第2の形態、および目的の細胞の表面上のタンパク質に特異的に結合する細胞特異的リガンドを含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え結合部分コード核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；

(2) それぞれがa) 該核酸結合ドメインに特異的な結合部位と b) 該組換え結合部分コード核酸のライブラリーのメンバーとを含むベクターのライブラリーを宿主細胞集団にトランスフェクトすること（ここで、該組換え結合部分は発現され、結合部位に結合して、ベクター-結合部分複合体を形成する）；

(3) 該ベクター-結合部分複合体の結合を破壊しない条件下で該宿主細胞を溶解させること；

(4) 該ベクター-結合部分複合体を目的の標的細胞と接触させること；そして

(5) ベクターを含む標的細胞を同定し、最適化された組換え細胞特異的結合部分の核酸をこれらの標的細胞から単離すること、を含む。

さらなる最適化が望まれる場合には、この方法はさらに以下のステップを含み得る：

(6) 少なくとも1つの最適化された組換え結合部分コード核酸を、核酸結合ドメインをコードするポリヌクレオチドの別の形態および／または細胞特異的リガンドをコードするポリヌクレオチドの別の形態（これらは、上記の第1および第2の形態と同一または相違する）と再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え結合部分コード核酸の別のライブラリーを作製すること；

(7) a) 該核酸結合ドメインに特異的な結合部位と、2) 該組換え結合部分コード核酸とを含むベクターのライブラリーを宿主細胞集団にトランスフェクトすること（ここで、該組換え結合部分は発現され、該結合部位に結合して、ベクター-結合部分複合体を形成する）；

(8) 該ベクター-結合部分複合体の結合を破壊しない条件下で該宿主細胞を溶解させること；

(9) 該ベクター-結合部分複合体を目的の標的細胞と接触させ、該ベクターを含む標的細胞を同定すること；そして

(10) 該最適化された組換え結合部分核酸を、該ベクターを含む標的細胞から単離すること；そして

(11) 必要に応じて(6)～(10)を繰り返して、遺伝的ワクチンベクターの標的細胞への取込みまたは特異性を増大させるのに有用な、さらに最適化された細胞特異的結合部分を得ること。

本発明はまた、本発明の方法により得られる最適化された組換え結合部分コード核酸を宿主細胞内で発現させることにより生成される、細胞特異的組換え結合部分を提供する。

別の実施形態では、本発明は、

a) 核酸結合ドメインと細胞特異的リガンドとを含む、最適化された組換え結合部分、およびb) 結合部位を含むポリヌクレオチド配列、を含む遺伝的ワクチンであって、該核酸結合ドメインは該結合部位に特異的に結合可能である、該遺伝的ワクチンを提供する。

本発明の別の実施形態は、標的細胞に対する遺伝的ワクチンの取込み、有効性、または特異性を増大させるのに有用な、最適化された細胞特異的結合部分を得るための方法であって、

(1) エンテロトキシンまたは他の毒素の非毒性受容体結合部分をコードするポリヌクレオチドを含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；

(2) 該核酸のライブラリーを含むベクターを宿主細胞の集団にトランスフェクトすること（ここで、該核酸は発現されて組換え細胞特異的結合部分ポリペプチドを生成する）；

(3) 該組換え細胞特異的結合部分ポリペプチドを標的細胞の細胞表面受容体と接触させること；そして

(4) どの組換え細胞特異的結合部分ポリペプチドが該標的細胞への結合能の増大を示しているのかを測定すること、
による上記方法を提供する。これらの方法により生産される最適化された組換え細胞特異的結合部分で遺伝的ワクチンベクターをコートすることにより、標的細胞による該遺伝的ワクチンベクターの取込みを増大させる方法もまた、本発明により提供される。

本発明はまた、哺乳動物へ投与した際に選択した哺乳動物組織への増大した侵入能力を有する、または該増大した侵入能力をベクターに賦与する最適化された輸送ビヒクルまたは成分を得るための、ワクチン輸送ビヒクル、遺伝的ワクチンベクターまたはベクター成分を進化させる方法をも提供する。これらの方法は以下のステップを含む：

(1) ポリヌクレオチドのプールのメンバーを再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、実験的に（*in vitro*および／または*in vivo*で）生成されるポリヌクレオチドのライブラリーを作製すること；

(2) それぞれが提示ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能しうる形で連結された、実験的に（*in vitro*および／または*in vivo*で）生成されたポリヌクレオチドのライブラリーのメンバーを含む、複製可能な遺伝的パッケージのライブラリーを試験哺乳動物に投与すること（その際、該（*in vitro*および／または*in vivo*で）実験的に生成されたポリヌクレオチドおよび該提示ポリペプチドは、複製可能な遺伝的パッケージの表面に提示される融合タンパク質として発現される）；そして

(3) 投与後の適切な時間に、該試験動物の選択した組織中に存在する複製可能な遺伝的パッケージを回収すること（その際、回収された複製可能な遺伝的パッ

ケージは、哺乳動物に投与された際に、該選択した哺乳動物組織へ侵入する能力が増大している）。

上記輸送ビヒクルのさらなる最適化が望まれる場合、本発明の方法はさらに以下のステップを含む：

(4) 該選択した組織から回収した複製可能な遺伝的パッケージから得られる、少なくとも1つの実験的に（*in vitro*および／または*in vivo*で）生成されるポリヌクレオチドを含む核酸を、ポリヌクレオチドの別のプールと再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、実験的に（*in vitro*および／または*in vivo*で）生成されるポリヌクレオチドの別のライブラリーを作製すること；

(5) 複製可能な遺伝的パッケージのライブラリーを試験動物に投与すること（ここで、該複製可能な遺伝的パッケージの各々は、提示ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能しうる形で連結されている、実験的に（*in vitro*および／または*in vivo*で）生成されるポリヌクレオチドの別のライブラリーのメンバーを含んでおり、該実験的に（*in vitro*および／または*in vivo*で）生成されるポリヌクレオチドおよび該提示ポリペプチドは、該複製可能な遺伝的パッケージの表面に提示される融合タンパク質として発現される）；

(6) 投与後の適切な時間に、該試験動物の選択した組織に存在する複製可能な遺伝的パッケージを回収すること；そして

(7) 必要に応じて(4)～(6)を繰り返して、哺乳動物に投与された際に選択した哺乳動物組織に侵入する能力がさらに増大している、別の最適化された組換え輸送ビヒクルを得ること。特に関心が持たれる投与方法としては、例えば、経口、局所的および吸入が挙げられる。投与が静脈内である場合、目的とする哺乳動物組織としては、例えば、リンパ節および脾臓が挙げられる。

別の実施形態において、本発明は、抗原提示細胞に対する増大した特異性を有するか、またはその成分を含むベクターに該増大した特異性をもたらすように最適化された輸送ビヒクルまたはベクター成分を得るために、ワクチン輸送ビヒクル、遺伝的ワクチンベクターまたはベクター成分を進化させる方法であって、

(1) ポリヌクレオチドのプールのメンバーを再集合させて（および／または本

明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して)、実験的に(in vitroおよび／またはin vivoで)生成されるポリヌクレオチドのライブラリーを作製すること；

(2) 複製可能な遺伝的パッケージのライブラリーを作製すること(ここで、該複製可能な遺伝的パッケージの各々は、提示ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能しうる形で連結された、該実験的に(in vitroおよび／またはin vivoで)生成されるポリヌクレオチドのライブラリーのメンバーを含み、またその際、該実験的に(in vitroおよび／またはin vivoで)生成されるポリヌクレオチドおよび該提示ポリペプチドは、該複製可能な遺伝的パッケージの表面に提示される融合タンパク質として発現される)；

(3) 該複製可能な組換え遺伝的パッケージのライブラリーを非APCと接触させて、非APC特異的融合ポリペプチドを提示する複製可能な遺伝的パッケージを取り除くこと；そして

(4) 非APCに結合しない複製可能な組換え遺伝的パッケージをAPCと接触させ、APCに結合するものを回収すること(ここで、回収された複製可能な遺伝的パッケージはAPCに特異的に結合可能である)；

による上記方法を提供する。

さらなる実施形態において、本発明は、標的細胞への増大した侵入能力を有する、もしくはそのベクター成分を含むベクターに該増大した侵入能力を賦与する、最適化された輸送ビヒクルまたはベクター成分を得るために、ワクチン輸送ビヒクル、遺伝的ワクチンベクターまたはベクター成分を進化させる方法であって、

(1) インベーションポリペプチドをコードする核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて(および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付し)、組換えインベーション核酸のライブラリーを作製すること(ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている)；

(2) 組換えバクテリオファージのライブラリーを作製すること(ここで、該組換えバクテリオファージの各々は、提示ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能しうる形で連結された、組換えインベーション核酸を含むキメラ遺伝子

によりコードされる融合ポリペプチドを該バクテリオファージの表面に提示する)
);

(3) 該組換えバクテリオファージのライブラリーを標的細胞の集団と接触させること;

(4) 未結合のファージおよび該標的細胞の表面に結合しているファージを取り除くこと;そして

(5) 該標的細胞内に存在するファージを回収すること(ここで、回収されたファージは、該標的細胞へ侵入する能力が増大しているファージに富む)、
による上記方法を提供する。

幾つかの実施形態では、これらの方法を用いて得られる最適化された組換え遺伝的ワクチンベクター、輸送ビヒクルまたはベクター成分は、抗原提示細胞に侵入する能力が向上している。これらの方法はまた、トランスフェクションステップの後で該細胞を洗浄して、抗原提示細胞に侵入しなかったベクターを取り除くこと;トランスフェクション後の所定時間にわたって該細胞を培養すること;該抗原提示細胞を溶解させること;そして、最適化された組換え遺伝的ワクチンベクターを細胞溶解物から単離すること、を含み得る。

【0009】

最適化された組換え遺伝的ワクチンベクターを含む抗原提示細胞は、例えば、該ベクターに含まれるマーカー遺伝子の発現を検出することにより同定できる。

本発明はまた、標的細胞へ侵入する能力が増大している輸送ビヒクルを得るために、バクテリオファージ由来のワクチン輸送ビヒクルを進化させる方法を提供する。これらの方法は以下のステップ:

(1) インベーションポリペプチドをコードする核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて(および/または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付し)、組換えインベーション核酸のライブラリーを作製すること(ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている);

(2) 組換えバクテリオファージのライブラリーを作製すること(ここで、該組換えバクテリオファージの各々は、提示ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能しうる形で連結された組換えインベーション核酸を含むキメラ遺伝子に

よりコードされる融合ポリペプチドを該バクテリオファージの表面に提示する)
;

(3) 該組換えバクテリオファージのライブラリーを標的細胞集団と接触させる
こと;

(4) 未結合のファージおよび該標的細胞の表面に結合しているファージを取り
除くこと;そして

(5) 該標的細胞内に存在するファージを回収すること(その際、回収されたフ
ァージは、該標的細胞へ侵入する能力が増大しているファージに富む)、
を含む。ここでもまた、さらなる最適化が望まれる場合、上記方法は、以下のさ
らなるステップ:

(6) 標的細胞から回収されるバクテリオファージから得られる少なくとも1つ
の組換えインベーシオン核酸を含む核酸を、ポリヌクレオチドの別のプールと再集
合させて(および/または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して)、
組換えインベーシオンポリヌクレオチドの別のライブラリーを作製すること;

(7) 組換えバクテリオファージの別のライブラリーを作製すること(ここで、
該組換えバクテリオファージの各々は、提示ポリペプチドをコードするポリヌク
レオチドに機能しうる形で連結された、組換えインベーシオン核酸を含むキメラ遺
伝子によりコードされる融合タンパク質を該バクテリオファージの表面に提示す
る);

(8) 該組換えバクテリオファージのライブラリーを標的細胞集団と接触させる
こと;

(9) 未結合のファージおよび該標的細胞の表面に結合しているファージを取り
除くこと;

(10) 該標的細胞内に存在するファージを回収すること;そして

(11) 必要に応じて(6)~(10)を繰り返して、該標的細胞に侵入する能力がさら
に増大した、さらに最適化された組換え輸送ビヒクルを得ること、
を含み得る。

幾つかの実施形態において、上記の、標的細胞へ侵入する能力が増大している
輸送ビヒクルを得るために、バクテリオファージ由来のワクチン輸送ビヒクルを

進化させる方法は、さらに以下のステップ：

(12) 該最適化された組換え輸送ビヒクルに、目的の抗原をコードするポリヌクレオチドを挿入すること（ここで、目的の抗原は、第2の提示ポリペプチドを含む融合ポリペプチドとして発現される）；

(13) 該輸送ビヒクルを試験動物に投与すること；そして

(14) 該輸送ビヒクルが該試験動物内でCTL応答を誘導することができるか否かを測定すること、
を含み得る。

あるいはまた、以下のステップを用いることが可能である：

(12) 該最適化された組換え輸送ビヒクルに、目的の抗原をコードするポリヌクレオチドを挿入すること（ここで、目的の抗原は、第2の提示ポリペプチドを含む融合ポリペプチドとして発現される）；

(13) 該輸送ビヒクルを試験動物に投与すること；そして

(14) 該輸送ビヒクルが、目的の抗原を含む病原体に対する中和抗体を誘導することができるか否かを測定すること。これらの方法における目的とする標的細胞の例は抗原提示細胞である。

本発明は、第1の疾患関連ポリペプチドに由来する第1の抗原決定基と、第2の疾患関連ポリペプチドに由来する少なくとも第2の抗原決定基とを含む、組換え多価抗原性ポリペプチドを提供する。この疾患関連ポリペプチドは、癌抗原、自己免疫疾患に関連する抗原、炎症性症状に関連する抗原、アレルギー反応に関連する抗原、感染性因子に関連する抗原、および疾患症状に関連する他の抗原からなる群から選ばれ得る。

別の実施形態において、本発明は、抗原性ポリペプチドをコードする組換え核酸を含む組換え抗原ライブラリーを提供する。このライブラリーは、典型的には、疾患関連抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）、により得られる。

本発明の別の実施形態は、疾患症状に対する免疫反応を誘導する能力が向上している組換え抗原をコードするポリヌクレオチドを得るための方法を提供する。これらの方法は、以下のステップ：

(1) 疾患症状に関係する抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；そして

(2) 該ライブラリーをスクリーニングして、該疾患症状に対する免疫反応を誘導する能力が向上している最適化された組換え抗原性ポリペプチドをコードする、少なくとも1つの最適化された組換え核酸を同定すること、を含む。

これらの方法は、場合により、さらに以下のステップ：

(3) 少なくとも1つの最適化された組換え核酸を、該第1および第2の形態と同一または異なる該核酸の別の形態と再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸の別のライブラリーを作製すること；

(4) 該別のライブラリーをスクリーニングして、該疾患症状に対する免疫反応を誘導する能力が向上しているポリペプチドをコードする、少なくとも1つのさらに最適化された組換え核酸を同定すること；そして

(5) 必要に応じて、該さらに最適化された組換え核酸が、該疾患症状に対する免疫反応を誘導する能力が向上しているポリペプチドをコードするまで、(3)～(4)を繰り返すこと、を含む。

幾つかの実施形態において、上記の最適化された組換え核酸は多価抗原性ポリペプチドをコードし、また以下：上記組換え抗原がファージ粒子表面に提示されるファージポリペプチドとの融合タンパク質として発現されるように、上記組換え核酸のライブラリーをファージ提示発現ベクター内で発現させること；該ファージを、病原性物質の第1の血清型に特異的な第1の抗体と接触させ、該第1の抗

体に結合するファージを選択すること；そして、該第1の抗体に結合するファージを、病原性物質の第2の血清型に特異的な第2の抗体と接触させ、該第2の抗体に結合するファージを選択すること（その際、該第1の抗体および該第2の抗体に結合するファージは多価抗原性ポリペプチドを発現する）、により、スクリーニングが行われる。

【0010】

本発明はまた、細胞内で抗ウイルス性応答を誘導する能力が増大した組換えウイルスベクターを取得する方法を提供する。

遺伝的ワクチンに、哺乳動物内で所望の免疫反応を誘導する能力の増大をもたらす、組換え遺伝的ワクチン成分を取得する方法

別の実施形態において、本発明は、遺伝的ワクチンに哺乳動物における所望の免疫反応を誘導する能力の増大をもたらす、組換え遺伝的ワクチン成分の取得方法を提供する。これらの方法は、(1) 遺伝的ワクチンベクターを含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付し）、組換え遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを作製すること（ただし、該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；(2) 該組換えワクチンベクターのライブラリーを、末梢血T細胞、T細胞クローン、新たに単離した単球／マクロファージおよび樹状細胞からなる群から選ばれる哺乳動物細胞の集団にトランスフェクトすること；(3) 1以上のサイトカインの存在に関して該細胞を染色し、所望の免疫反応の指標となるサイトカイン染色パターンを示す細胞を同定すること；そして(4) 所望のサイトカイン染色パターンを示す細胞から組換えワクチンベクター核酸配列を得ること、を含む。

遺伝的ワクチンベクターの免疫反応調節能力を向上させる方法

また本発明により、遺伝的ワクチンベクターの免疫反応を調節する能力を向上させる方法であって、(1) 遺伝的ワクチンベクターを含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを作製する

こと（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；(2) 該組換え遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを、抗原提示細胞の集団にトランスフェクトすること；そして(3) 該細胞から、所望の免疫反応を調節する能力が増大している、最適化された組換え遺伝的ワクチンベクターを単離すること、による上記方法が提供される。

哺乳動物の皮膚に投与した際に該哺乳動物内で所望の免疫反応を誘導する能力が増大している組換え遺伝的ワクチンベクターの取得方法

本発明の別の実施形態は、哺乳動物の皮膚に投与した際に該哺乳動物内で所望の免疫反応を誘導する能力が増大している組換え遺伝的ワクチンベクターを取得する方法を提供する。これらの方法は、(1) 遺伝的ワクチンベクターを含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；(2) 該組換え遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを、哺乳動物の皮膚に局所的に適用すること；(3) 免疫反応を誘導するベクターを同定すること；そして(4) 免疫反応を誘導するベクターを含む皮膚細胞から遺伝的ワクチンベクターを回収すること、を含む。

【0011】

遺伝的ワクチンベクターを哺乳動物の皮膚に局所的に適用することによる、該哺乳動物における免疫反応の誘導方法（ここで、該遺伝的ワクチンベクターは、確率論的（例、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合の使用により局所的適用に対して最適化されている）

本発明はまた、遺伝的ワクチンベクターを哺乳動物の皮膚に局所的に適用することにより、該哺乳動物において免疫反応を誘導する方法を提供するものであり、ここで、該遺伝的ワクチンベクターは、確率論的（例、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合の使用により局所的適用に対して最適化されている。幾つかの実施形態では、該遺伝的ワクチンは、経皮パッチ、クリーム、むき出しのDNA、DNAの混合物およびトランスフェクション促進剤からなる群から選ばれる製剤として投与される。適切なトラ

ンスフェクション促進剤は、脂質、リポソーム、プロテアーゼおよびリパーセからなる群から選ばれる1つ以上の物質を含む。

あるいはまた、もしくはさらに、該遺伝的ワクチンは、皮膚を表皮剥脱または剃毛により前処理した後で投与され得る。

最適化された遺伝的ワクチン成分を含む遺伝的ワクチンに、該ワクチンが導入された細胞のアポトーシスを誘導または抑制する能力の増大をもたらす、該最適化された遺伝的ワクチン成分の取得方法

別の実施形態において、本発明は、最適化された遺伝的ワクチン成分を含む遺伝的ワクチンに、該ワクチンが導入された細胞のアポトーシスを誘導または抑制する能力の増大をもたらす、該最適化された遺伝的ワクチン成分を取得する方法を提供する。これらの方法は、(1) アポトーシス調節ポリペプチドをコードする核酸を含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換え核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；(2) 該組換え核酸のライブラリーを、哺乳動物細胞の集団にトランスフェクトすること；(3) 該細胞を、アポトーシス開始の指標である細胞膜の変化の存在に対して染色すること；そして(4) 所望のアポトーシス性の膜変化を示す細胞から、組換えアポトーシス調節遺伝的ワクチン成分を得ること、を含む。

遺伝的ワクチンに宿主哺乳動物内でのCTL免疫反応に対する感受性の低下をもたらす遺伝的ワクチン成分の取得方法

本発明の別の実施形態は、遺伝的ワクチンに宿主哺乳動物内でのCTL免疫反応に対する感受性の低下をもたらす遺伝的ワクチン成分を取得する方法を提供する。これらの方法は、(1) CTL免疫反応の阻害剤をコードする遺伝子を含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させて（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して）、組換えCTLインヒビター核酸のライブラリーを作製すること（ただし該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに異なっている）；(2) 該組換えCTLインヒビター核酸のライブラリーを含む遺伝的ワクチンベクターを、複数のヒト細胞に導入すること；(3) MHCク

ラス I 分子の発現が低下している細胞を選択すること；そして(4) 該選択された細胞から、最適化された組換えCTLインヒビター核酸を得ること、を含み得る。

【0012】

遺伝的ワクチンに、宿主哺乳動物内でのCTL免疫反応に対する感受性の低下を賦与する遺伝的ワクチン成分の取得方法

本発明はまた、遺伝的ワクチンに、宿主哺乳動物内でのCTL免疫反応に対する感受性の低下を賦与する、遺伝的ワクチン成分を取得する方法を提供する。これらの方法は、(1) CTL免疫反応のインヒビターをコードする遺伝子を含む核酸の少なくとも第1および第2の形態を再集合させ（および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付し）、ここで該第1および第2の形態は2個以上のヌクレオチドにおいて互いに相違しており、それによって、組換えCTLインヒビターの核酸ライブラリーを作製すること；(2) 該組換えCTLインヒビターの核酸ライブラリーを含むウイルスベクターを、哺乳動物細胞に導入すること；(3) 該導入後の所定の時間に、該ウイルスベクターに含まれるマーカー遺伝子を発現する哺乳動物細胞を同定すること、その際、該同定された細胞はCTL応答に抵抗性である；そして(4) 該同定された細胞から、該組換えCTLインヒビター核酸を該遺伝的ワクチン成分として回収すること、を含む。

本発明の概括的な目的は、PfEMP1タンパク質に由来するタンパク質およびポリペプチド、これらのタンパク質をコードする核酸、ならびにこれらのタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を提供することである。さらに別の目的は、マラリア寄生虫感染症の症状の発症の診断、治療または予防における、これらの種々の組成物の使用方法を提供することである。さらに別の目的は、これらの方法で用い得る別の組成物を同定するための、化合物のスクリーニング方法を提供することである。

1つの実施形態において、本発明は、PfEMP1タンパク質のアミノ酸配列と実質的に相同なアミノ酸配列を有する実質的に純粋なポリペプチド、またはその生物学的に活性な断片を提供する。

好ましい態様において、本発明のポリペプチドは、本明細書で例示、記載、および／または引用される（そして、参照により本明細書に組み入れられる）アミ

ノ酸配列、その生物学的に活性な断片もしくは類似体と実質的に相同である。また、これらのポリペプチドを含む医薬組成物も提供される。

別の実施形態において、本発明は、上記のポリペプチドをコードする核酸を提供する。特に好ましい核酸は、本明細書で例示、記載、および／または引用される（そして、参照により本明細書に組み入れられる）核酸の一部もしくは全体、または本明細書で例示、記載、および／または引用される（そして、参照により本明細書に組み入れられる）配列をコードする核酸と実質的に相同である。本発明はまた、これらの核酸配列を含む発現ベクターおよびそれを発現することができる細胞を提供する。

別の実施形態において、本発明は、PfEMP1ポリペプチドを認識し結合する抗体、またはその生物学的に活性なフラグメントを提供する。さらに好ましいものは、*P. falciparum*の2種以上の変異体による感染症に関連するPfEMP1タンパク質を認識し結合するペプチドである。

さらに別の実施形態において、本発明は、PfEMP1／リガンド複合体の形成を阻害する方法であって、PfEMP1またはそのリガンドを本発明のポリペプチドに接触させることを含む該方法を提供する。

関連する実施形態において、本発明は、マラリア感染症に罹患している患者における赤血球の壊死巣分離（sequestration）の抑制方法であって、該患者に、有効量の本発明のポリペプチドを投与することを含む該方法を提供する。そのような投与は、感染の前に行っても後に行ってもよい。

さらに別の実施形態において、本発明は、サンプル中のPfEMP1の存在の有無を検出する方法を提供する。この方法は、該サンプルを本発明の抗体にさらすこと、そして該抗体と該サンプルの成分との結合があるとしたらそれを検出すること、を含む。

さらに別の実施形態において、本発明は、試験化合物がPfEMP1／リガンド複合体形成のアンタゴニストであるか否かを調べる方法を提供する。この方法は、該複合体の形成を可能にする条件下で、該試験化合物をPfEMP1もしくはその生物学的に活性なフラグメントおよびそのリガンドと共にインキュベートすることを含む。該試験化合物の存在下で形成される複合体の量を測定し、該試験化合物の不

在下で形成される複合体の量と比較する。試験化合物の存在下で形成される複合体の量が低下すれば、該複合体がPfEMP1／リガンド複合体形成のアンタゴニストであることが示される。

【0013】

定方向進化法の概要

本発明はまた、概して、核酸工学、およびそれに対応してコードされる組換えタンパク質工学の分野に関する。さらに詳細には、本発明は、核酸の定方向進化、ならびに、その結果生じる関心のある活性（例えば、関心のある核酸活性および／または特定するタンパク質（特に酵素）の活性）に基づいて進化させた核酸を含むクローンのスクリーニングに関する。

本発明により提供される突然変異を起こした分子は、炭水化物、脂質、核酸および／またはタンパク質成分を含む生物学的分子のようなキメラ分子および点突然変異を有する分子を有し得るものであり、これらの具体的な（しかし非限定的な）例としては、抗生物質、抗体、酵素、ならびにステロイド系および非ステロイド系ホルモンが挙げられる。

本発明は、概して、1) 1つ以上の先祖または親世代の鋳型から、少なくとも1つの点突然変異、付加、欠失および／またはキメラ化を達成するように突然変異を起こしている子孫世代の分子（ポリヌクレオチド配列からなる分子、ポリペプチド配列からなる分子、および一部がポリヌクレオチド配列からなり一部がポリペプチド配列からなる分子を含む）を調製し；2) 該子孫世代の分子を、好ましくはハイスループット法を用いて、少なくとも1つの関心のある特性（酵素活性の向上または安定性の増大または新規な化学療法上の効果など）に関してスクリーニングし；3) 場合により、該親および／または子孫世代の分子に関する構造的および／または機能的な情報を取得および／または分類し；そして、4) 場合により、任意のステップ1)～3)を繰り返す、方法に関する。

好ましい実施形態において、（例えば、親ポリヌクレオチド鋳型から）—「コドン部位飽和突然変異誘発」と名付けられたものにおいて—子孫世代のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドの各々が、全てのコドン（または、同一のアミノ酸をコードする縮重コドンの全てのファミリー）が各コドン位置に呈示

されるように、少なくとも1セットで3つ以下の隣接する点突然変異（すなわち、新規なコドンを含む異なる塩基）を有する、該子孫世代のポリヌクレオチドが生成される。この子孫世代のポリヌクレオチドに対応して—およびこの子孫世代のポリヌクレオチドによりコードされるものとして—、それぞれが少なくとも1つの単一アミノ酸点突然変異を有する子孫ポリペプチドが1セット生成される。好ましい態様において、—「アミノ酸部位飽和突然変異誘発」と名付けられたものにおいて—該ポリペプチドに沿った各および全てのアミノ酸位置に、19種の天然にコードされるポリペプチド形成 α -アミノ酸置換の各々に対して1つの突然変異ポリペプチドがもたらされる。これにより、—該親ポリペプチドに沿った各および全てのアミノ酸位置において—元々のアミノ酸を含む全部で20種の異なる子孫ポリペプチド、または該20種の天然にコードされるアミノ酸の代わりに、もしくはそれに加えて別のアミノ酸が用いられた場合には、21種より多い異なる子孫ポリペプチドが得られることもある。

したがって、別の態様において、この方法はまたは、—上記20種の天然にコードされるポリペプチド形成 α -アミノ酸に加えて、および／またはそれらと組合せて—他の稀な、および／または天然にコードされるアミノ酸およびアミノ酸誘導体をふくむ突然変異体を生成するのに用い得る。さらに別の態様において、この方法はまた、（例えば、1つ以上の改変tRNA分子を有する宿主細胞内で）—好適な宿主の天然または未改変のコドン認識系に加えて、および／またはそれらと組合せて—改変コドン認識系、突然変異コドン認識系および／または設計コドン認識系を用いることにより、突然変異体を生成するのに用い得る。

さらに別の態様において、本発明は、組換え、さらに詳細には、部分的に相同な領域を含むポリヌクレオチド配列のin vivo再組合せ（re-assortment）の方法によりポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製し、該ポリヌクレオチドを再集合させて少なくとも1つのポリヌクレオチドを形成し、該ポリヌクレオチドを、有用な特性を有するポリペプチドの生成に関してスクリーニングする方法に関する。

さらに別の好ましい実施形態において、本発明は、達成される任意の突然変異的变化（特に飽和突然変異誘発を含む）の効果を—任意の分子特性（例、酵素活

性) または現行の技法により可能な特性の組合せについて一分析および分類するのに用い得る。したがって、親ポリペプチド中の各アミノ酸を少なくとも19種の可能性のある置換物の各々に変える効果を調べるための包括的な方法が提供される。このことにより、親ポリペプチド中の各アミノ酸が、該ポリペプチドの測定可能な特性に及ぼす潜在的効果の範囲にしたがって、特性決定でき、そして分類できるようになる。

別の態様において、本発明の方法は、分子同士を再結合させ、ならびに／または配列の複雑度および相同領域を有する反復配列もしくは連続配列の程度を低下させる減少性プロセス (reductive processes) を仲介する、という細胞の生来の特性を利用する。

本発明の目的とするところは、増大した活性を有する生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドをコードするハイブリッドポリヌクレオチドを生成する方法を提供することである。本発明の1つの態様によれば、これらおよび他の目的を達成する上で、ポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に導入し、ハイブリッドポリヌクレオチドを生成する条件下で該宿主細胞を増殖させるための方法が提供されている。

本発明の別の態様において、本発明は、ハイブリッドポリヌクレオチドによりコードされる生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドをスクリーニングするための方法を提供する。この方法は、増大した生物学的活性を有する生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドの同定を可能にする。

1.4. 図面の簡単な説明

(図面の簡単な説明については下記参照)

【0014】

2. 発明の説明

2.1 用語の定義

本明細書に記載した実施例の理解を容易にするために、一定の頻繁に用いられる方法および／または用語を説明する。

「作用物質(agent)」という用語は、本明細書で用いられる場合、化合物、化合物の混合物、空間的に局在化した化合物のアレイ (例えば、VLSIPSペプチドア

レイ)、ポリヌクレオチドアレイ、および／またはコンビナトリアル小分子アレイ)、生物学的巨大分子、バクテリオファージペプチド展示ライブラリー、バクテリオファージ抗体(例えばscFv)展示ライブラリー、ポリソームペプチド展示ライブラリー、または生物材料、例えば細菌細胞、植物細胞、真菌細胞、または動物(特に哺乳動物)細胞または組織などからの抽出物を示すものである。作用物質は、下記のスクリーニングアッセイに組み込まれることにより、抗腫瘍剤、抗炎症剤またはアポトーシスモジュレーターとしての潜在的な活性について評価される。作用物質は、下記のスクリーニングアッセイに組み込まれることにより、特異的なタンパク質相互作用インヒビター(すなわち、2つの所定のポリペプチド間の結合相互作用を選択的に阻害するが、実質的に細胞生存を妨害しない作用物質)としての潜在的な活性について評価される。

制限部位における「多義的塩基要求(ambiguous base requirement)」とは、完全に指定されていない、すなわち、1つの特定の塩基(例えば、限定するものではないが、A、C、GおよびTから選択される特定の塩基など)ではなく、少なくとも2個以上の塩基のうちのいずれか1つであり得るヌクレオチド塩基要求を意味する。当技術分野および本明細書で塩基の多義性を示すために用いられる一般に許容されている略語は下記のとおりである：R=GまたはA；Y=CまたはT；M=AまたはC；K=GまたはT；S=GまたはC；W=AまたはT；H=AまたはCまたはT；B=GまたはTまたはC；V=GまたはCまたはA；D=GまたはAまたはT；N=AまたはCまたはGまたはT。

分子配列に関する「アラインメント」は、2個以上の配列間の類似性を決定するための方法である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性アラインメントアルゴリズム、PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)の類似性サーチ方法、これらのアルゴリズムのコンピュートインプリメンテーション(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)または目視検査(一般的にはAusubelらを参照、後掲)によって行うことができる。

配列同一性および配列類似性のパーセンテージを決定するのに適したアルゴリズムの1つの例は、BLASTアルゴリズムであり、これはAltschulら, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990)に記載されている。BLAST解析を実施するソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から公的に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、クエリー配列内の長さWのショートワードを同定することによりハイスコアリング配列ペア(high scoring sequence pair, HSP)を同定することを含み、このショートワードは、データベース配列内の同じ長さのワードとアラインメントした場合にあるポジティブ値(positive-valued)閾値スコアTとマッチするか、それを満たすものである。Tは、近傍ワードスコア閾値と称される(Altschulら, 前掲)。これらの初期近傍ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるためのサーチ開始のための種として作用する。次いで、累積アラインメントスコアが増加し得る限り、ワードヒットを各配列に沿って両方向に伸ばす。累積スコアは、ヌクレオチド配列についてはパラメーターM(適合残基のペアに対する報酬スコア；常に0より大)およびN(不適合残基に対するペナルティスコア；常に0より小)を用いて計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアが計算される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大到達値から量Xだけ低下する場合；1個以上のネガティブスコアリング残基アラインメントの累積のための累積スコアがゼロ以下になる場合；またはいずれかの配列が末端に到達する場合に停止される。

BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルト値としてワード長(word length, W)11、期待値(E)10、カットオフ100、M=5、N=-4、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルト値としてワード長(W)3、期待値(E)10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを用いる(HenikoffおよびHenikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照)。

配列同一性のパーセンテージの計算に加えて、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計的分析も実行する(例えばKarlinおよびAltshul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムから提供される類似性の尺度の一つは最小合計確率(P(N))であり、これは2つのヌクレオチド配列間または2つのアミノ酸配列間のマッチングが偶然発生する確率の指標を提供するものである。例えば被験配列と参照配列との比較における最小合計確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、その核酸は参照配列と類似であるとみなされる。

二つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指標は、二つの分子がストリンジェント条件下で互いにハイブリダイズするということである。「特異的にハイブリダイズする」という語句は、一つの分子が特定のヌクレオチド配列に対してのみ、その配列が複合混合物(例えば細胞全体)、DNAまたはRNA中に存在する場合に、ストリンジェントな条件下で結合、二重鎖形成またはハイブリダイズすることを意味する。「実質的に結合する」とは、プローブ核酸と標的核酸との間の相補的ハイブリダイゼーションを意味し、ハイブリダイゼーション媒体のストリンジェンシーを低下させることにより、所望の標的ポリヌクレオチド配列の検出を得るように対処され得る少数のミスマッチを包含する。

「アミノ酸」という用語は、本明細書で用いる場合、アミノ基(-NH₂)およびカルボキシル基(-COOH)を、好ましくは遊離基としてあるいは縮合後にペプチド結合の一部として含む任意の有機化合物を意味する。「天然でコード化されたポリペプチドを形成する20種のα-アミノ酸」は当技術分野で知られており、アラニン(alaまたはA)、アルギニン(argまたはR)、アスパラギン(asnまたはN)、アスパラギン酸(aspまたはD)、システイン(cysまたはC)、グルタミン酸(gluまたはE)、グルタミン(glnまたはQ)、グリシン(glyまたはG)、ヒスチジン(hisまたはH)、イソロイシン(ileまたはI)、ロイシン(leuまたはL)、リシン(lysまたはK)、メチオニン(metまたはM)、フェニルアラニン(pheまたはF)、プロリン(proまたはP)、セリン(serまたはS)、トレオニン(thrまたはT)、トリプトファン(trpまたはW)、チロシン(tyrまたはY)、およびバリン(valまたはV)を意味する。

「増幅」という用語は、ポリヌクレオチドのコピー数が増大することを意味す

る。

「抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、完全な状態の免疫グロブリン分子、ならびにFab、Fab'、(Fab')₂、FvおよびSCAフラグメントなどの抗原のエピトープに対して結合能を有する免疫グロブリン分子のフラグメントを意味する。これらの抗体フラグメントは、該フラグメントの由来である抗体の抗原(例えばポリペプチド抗原)に選択的に結合するある程度の能力を維持しており、当技術分野で公知の方法を用いて作製できる(例えばHarlowおよびLane, 前掲を参照)。該フラグメントは、さらに下記のように説明される。

(1) Fabフラグメントは抗体分子の1価抗原結合フラグメントからなり、パパイン酵素により抗体分子全体を消化し、完全な状態のL鎖と、H鎖の一部分とからなるフラグメントを得ることにより作製し得る。

(2) 抗体分子のFab'フラグメントは、抗体分子全体をペプシンで処理した後に還元し、完全な状態のL鎖とH鎖の一部分とからなる分子を得ることにより取得できる。この方法で処理した抗体分子1分子当たり2つのFab'フラグメントが得られる。

(3) 抗体の(Fab')₂フラグメントは、抗体分子全体をペプシン酵素で処理し、その後還元を行わないことにより取得できる。(Fab')₂フラグメントは、2個のジスルフィド結合で互いに拘束された2つのFab'フラグメントからなる二量体である。

(4) Fvフラグメントは、2本の鎖として発現されるL鎖の可変領域とH鎖の可変領域を含む遺伝子工学的に操作されたフラグメントと定義される。

(5) 1本鎖抗体(「SCA」)は、適当なフレキシブルなポリペプチドリinkerで連結されたL鎖の可変領域とH鎖の可変領域とを含む遺伝子工学的に操作された1本鎖分子である。

【0016】

「応用分子進化」(Applied Molecular Evolution, 「AME」)という用語は、特定の有用な目標に対する進化設計アルゴリズムの応用を意味する。AMEのための多数の異なるライブラリーフォーマットがポリヌクレオチド、ペプチドおよびタンパク質(ファージ、lacIおよびポリソーム)について報告されているが、これら

のフォーマットはどれもコンビナトリアルライブラリーを意識的に作製するためのランダム乗換え(cross-over)による組換えに対応したものではない。

「キメラ特性」を有する分子は、1) 第1の参照分子に部分的に相同であり、部分的に非相同であり；2) それと同時に第2の参照分子に部分的に相同であり、部分的に非相同であり；3) それと同時にさらに1個以上の追加の参照分子に部分的に相同であり、部分的に非相同である可能性を排除するものではない分子である。ある非限定的な実施形態では、キメラ分子は、部分分子配列の再組合わせを構築することにより調製し得る。ある非限定的な態様では、キメラポリヌクレオチド分子は、複数の分子鋳型を用いてキメラポリヌクレオチドを合成することにより調製することができ、その結果得られたキメラポリヌクレオチドは、複数の鋳型の特性を有している。

「同族」という用語は、本明細書で用いる場合、種間で進化的かつ機能的に関連付けられる遺伝子配列を意味する。例えば、限定するものではないが、ヒトゲノムにおいては、ヒトCD4遺伝子はマウス3d4遺伝子に対する同族遺伝子である。なぜなら、これらの2つの遺伝子の配列および構造はそれらがかなり相同性が高いということを示しており、そしてそれらの遺伝子は両方ともMHCクラスII拘束性抗原認識によるT細胞活性化のシグナル伝達において機能するタンパク質をコードしているからである。

「比較ウィンドウ」とは、本明細書で用いる場合、少なくとも20個の連続したヌクレオチド位置の概念的なセグメントを意味し、ここで1つのポリヌクレオチド配列は、少なくとも20個の連続したヌクレオチドからなる参照配列と比較され得るものであって、比較ウィンドウに含まれる該ポリヌクレオチド配列の一部は、それらの2つの配列の最適アラインメントでは参照配列(これは付加または欠失を含まない)と比較して付加または欠失(すなわちギャップ)が20パーセント以下であり得る。比較ウィンドウをアラインメントするための配列の最適なアラインメントは、Smithの局所的相同アルゴリズム(SmithおよびWaterman, Adv Appl Math, 1981; SmithおよびWaterman, J Theor Biol, 1981; SmithおよびWaterman, J Mol Biol, 1981; Smithら, J Mol Evol, 1981)、Needlemanの相同アラインメントアルゴリズム(NeedlemanおよびWunsch, 1970)、Pearsonの類似性サーチ方法(

PearsonおよびLipman, 1988)、これらのアルゴリズムのコンピュータインプリメンテーション(GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI))、または検査によって行うことができ、種々の方法によって作製された中での最適アラインメント(すなわち比較ウィンドウ全体にわたって最大パーセンテージの相同性が得られる)が選択される。

本明細書で用いる場合、「相補性決定領域」および「CDR」という用語は、例えば、一般に超可変領域またはハイパー可変ループとしても知られているKabatおよびChothiaらのCDRの定義(ChothiaおよびLesk, 1987; Chothiaら, 1989; Kabatら, 1987; およびTramontanoら, 1990)に例示される当技術分野で認められている用語を意味する。可変領域ドメインは、一般に、天然免疫グロブリン鎖(例えばアミノ酸1~110)のアミノ末端側の約105~115アミノ酸を含むが、幾分短いまたは長い可変ドメインも、1本鎖抗体を形成するのに適している。

「保存的アミノ酸置換」とは、類似の側鎖を有する残基による互換性を意味する。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループはグリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループはセリンおよびトレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループはアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループはフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループはリシン、アルギニンおよびヒスチジンであり；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸のグループはシステインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換グループは、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミンである。

【0017】

特定のポリヌクレオチド配列の「保存的に改変された変異」は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに関して言い、あるいはそのポリヌクレオチドがアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列に関して言う。遺伝子コードの縮重により、多数の機能的に同一の核酸が

任意の所定のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGは全てアミノ酸アルギニンをコードする。

したがって、コドンによってアルギニンが指定されている全ての位置において、コード化されるポリペプチドを変更することなく、該コドンを記載した対応コドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は「サイレント変異」であり、「保存的に改変された変異」の一種である。また、ポリペプチドをコードする本明細書に記載したポリヌクレオチド配列も全て、特に定めた場合を除き、可能性のあるサイレント変異全てを記述するものである。

当業者は、標準的な技術によって核酸内の各コドン(通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUGを除く)を改変して機能的に同一の分子を得ることができることを認識するだろう。したがって、記載された各配列にはポリペプチドをコードする核酸の各「サイレント変異」が暗に含まれている。

さらに、当業者は、コード化配列における1個のアミノ酸または少数のアミノ酸(一般的には5%未満、より一般的には1%未満)を変更、付加または欠失させる個々の置換、欠失または付加は、その変更によって化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換が生じる場合、「保存的に改変された変異」であると認識するだろう。機能的に類似したアミノ酸を示す保存的置換テーブルは当技術分野では公知である。下記の5つのグループは、それぞれ、互いに保存的置換となるアミノ酸を含む：

脂肪族：グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)；

芳香族：フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；

硫黄含有：メチオニン(M)、システイン(C)；

塩基性：アルギニン(R)、リシン(K)、ヒスチジン(H)；

酸性：アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)。

また、アミノ酸のさらなるグループ分けについては、Creighton(1984)Proteins, W.H.FreemanおよびCompanyも参照されたい。さらに、コード化配列における1個のアミノ酸または少数のアミノ酸を変更、付加または欠失させる個々の置換、

欠失または付加も、「保存的に改変された変異」である。

「～に対応する」という用語は、本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部に相同(すなわち同一であるが、厳密には進化的に近縁でない)であるか、あるいはポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味する。一方、「～に相補的な」という用語は、本明細書で用いる場合、相補配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部に相同であることを意味する。例を挙げると、ヌクレオチド配列「TATAC」は参照配列「TATAC」に対応し、参照配列「GTATA」に相補的である。

「サイトカイン」という用語には、例えば、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、造血増殖因子、腫瘍壊死因子およびトランスフォーミング増殖因子が含まれる。一般に、これらは免疫系の細胞の成熟、活性化、増殖および分化を調節する分子量の小さいタンパク質である。

「分解有効量」という用語は、酵素と接触していない基質と比較して、基質の少なくとも50%を処理するのに必要な酵素の量を意味する。好ましくは、基質の少なくとも80%が分解される。

本明細書で用いる場合、「確定配列フレームワーク」という用語は、非ランダムな基準に基づいて、一般には実験データまたは構造データに基づいて選択される確定配列のセットを意味し、例えば、確定配列フレームワークは、 β -シート構造を形成すると予測されるアミノ酸配列のセット、または、特に、ロイシンジッパーヘプタッドリピートモチーフ、ジンクフィンガードメインを含み得る。「確定配列の核(kernel)」は、限定された多様性を含む配列のセットである。(1) 20個の通常アミノ酸からなる完全にランダムな10マー配列は、 $(20)^{10}$ 個の配列のうちのいずれかであり得るものであり、そして(2) 20個の通常アミノ酸からなる擬似ランダムな10マー配列は、 $(20)^{10}$ 個の配列のうちのいずれかであり得るが、特定の位置および／または全体における特定の残基に対して偏りがあるのに対して、(3) 確定配列の核は、各残基位置が許容できる20個の通常のアミノ酸(および／または許容できる通常とは異なるアミノ／イミノ酸)のいずれかであり得る場合の配列の部分集合である。確定配列の核は、一般に、個々の選択されたライブラリーのメンバー配列の一部または全長にわたって、可変および不変の残基位

置、および／またはアミノ酸残基の確定された部分集合から選択される残基を含み得る可変の残基位置などを含む。確定配列の核は、アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を意味する。例えば、例示するものであって限定するものではないが、配列 $(NNK)_{10}$ および $(NNM)_{10}$ (ここで、NはA、T、GまたはCであり、KはGまたはTであり、MはAまたはCである)が確定配列の核である。

【0018】

DNAの「消化」は、DNA中の特定の配列にのみ作用する制限酵素によるDNAの触媒的切断を意味する。本明細書で用いられる種々の制限酵素は市販されており、その反応条件、補因子およびその他の必要条件は、当業者に知られているように使用される。分析目的の場合、一般に、 $1\mu\text{g}$ のプラスミドまたはDNA断片が約2単位の酵素とともに約 $20\mu\text{l}$ のバッファー溶液中で用いられる。プラスミド構築用のDNA断片を単離する目的の場合、一般に、 $5\sim 50\mu\text{g}$ のDNAが20～250単位の酵素で大容量にて消化される。特定の制限酵素に適したバッファーおよび基質の量は、製造業者により指定されている。通常、インキュベーション時間は 37°C にて約1時間であるが、供給元の取り扱い説明書により様々であり得る。消化後、反応物を直接ゲル上で電気泳動させて所望の断片を単離する。

「指向性ライゲーション」とは、ポリヌクレオチドの5'末端と3'末端が、好ましいライゲーションの向きを指定するのに十分なほど相違しているライゲーションを意味する。例えば、2つの平滑末端を有する、特に処理および消化を行っていないPCR産物は、一般に、そのマルチクローニング部位に平滑末端をもたらすように消化されたクローニングベクターにライゲートする場合、好ましいライゲーションの方向性をもたず、よって、一般には指向性ライゲーションはこれらの状況下では呈示されない。これとは対照的に、5'EcoRI-処理末端および3'BamHI処理末端を有する消化されたPCR産物をEcoRIおよびBamHIで消化したマルチクローニング部位を有するクローニングベクターにライゲートする場合、一般に指向性ライゲーションが呈示される。

「DNAシャッフリング」という用語は、本明細書で用いる場合、実質的に相同であるが同一でない配列間の組換えを示すものであり、いくつかの実施形態では、DNAシャッフリングは、cer/loxおよび／またはflp/frt系などの非相同的組換

えによる乗換えを含み得る。

本発明で用いる場合、「エピトープ」という用語は、フィターゼペプチドなどの抗原の抗原決定基を意味し、これにフィターゼ特異的抗体などの抗体のパラトープが結合する。抗原決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面配置からなり、特異的な三次元構造特性ならびに特異的な荷電特性を有し得る。本明細書で用いる場合、「エピトープ」とは、抗体の可変領域結合部と相互作用する結合相互作用の形成能を有する抗原またはその他の巨大分子の一部を意味する。一般に、そのような結合相互作用は、CDRの1個以上のアミノ酸残基との分子間接触として現れる。

「外因性DNAセグメント」、「異種配列」または「異種核酸」とは、本明細書で用いる場合、特定の宿主細胞とは無関係の起源由来のもの、または同一起源由来のものである場合にはそのオリジナルの形態から改変されているものを意味する。したがって、宿主細胞中の異種遺伝子には、その特定の宿主細胞に内因的なものであるが、改変されている遺伝子が含まれる。本明細書に記載した用途における異種配列の改変は、一般に、確率論的(例えばポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合の使用によって生じる。よって、この用語は、その細胞に無関係であるかもしくは起源が異なるDNAセグメント、またはその細胞と同一起源であるが宿主細胞核酸内の該エレメントが通常見出されない位置に存在するDNAセグメントを意味する。

「外因性」DNAセグメントは発現されて外因性ポリペプチドを産生する。

「遺伝子」という用語は、生物学的機能と関連したDNAの任意のセグメントを意味するものとして広く用いられる。よって、遺伝子は、コード配列および／またはそれらの発現に必要な調節配列を含む。また遺伝子は、例えば、その他のタンパク質に対する認識配列を形成する非発現DNAセグメントも含む。遺伝子は、関心のある起源からのクローニングまたは公知または予測配列情報からの合成などによって種々の起源から取得でき、所望のパラメーターを有するように設計された配列も含み得る。

【0019】

「実験的に(in vitroおよび／またはin vivoで)作製したポリヌクレオチド」(

この用語は「組換えポリヌクレオチド」を含む)または「実験的に(in vitroおよび／またはin vivoで)作製したポリペプチド」(この用語は「実験的に作製したポリペプチドを含む)は、それぞれ2種以上の起源核酸またはポリペプチド由来の核酸またはアミノ酸配列を含む非天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドであり、この起源核酸またはポリペプチドは天然核酸またはポリペプチドであり得るかまたはそれ自体突然変異誘発または他のタイプの改変に付されたものであり得る。種々の核酸またはアミノ酸配列の由来である起源ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、相同のものである(すなわち、同一または類似の構造および／または機能を有するか、またはそれをコードするポリペプチドをコードする)場合もあり、例えば、生物のまたは種々の病態由来の様々な単離物、血清型、株、種に由来する場合が多い。

「断片」、「誘導体」および「類似体」という用語は、参照ポリペプチドを意味する場合、参照ポリペプチドと少なくとも本質的に同一の少なくとも1つの生物学的機能または活性を保持するポリペプチドを含む。さらに、「断片」、「誘導体」または「類似体」という用語は、切断によって改変して有意に高い活性を有する成熟酵素を生産し得る低活性プロタンパク質などの「プロ型」分子で例示される。

本発明は、鋳型ポリペプチドから、「単一アミノ酸置換の全レンジ」が各アミノ酸位置に呈示される子孫ポリペプチドのセットを取得する方法を提供する。本明細書で用いる場合、「単一アミノ酸置換の全レンジ」とは、本明細書で記載したように、天然でコードされているポリペプチドを形成する20個の α -アミノ酸に関するものである。

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖の産生に關与するDNAのセグメントを意味し、コード領域の前後の領域(リーダーおよびトレーラー)ならびに個々のコードセグメント(エキソン)間の介在配列(イントロン)を含む。

「遺伝子の不安定性」とは、本明細書で用いる場合、反復性の高い配列が一般に反復配列の欠落による配列の単純化を伴う短縮事象のプロセスにより欠落される自然的傾向を意味する。欠失は、1つの反復配列の1つのコピーの欠落および反復配列間の全ての欠落を伴う傾向がある。

「非相同」という用語は、1つの1本鎖核酸配列が別の1本鎖核酸配列またはその相補配列にハイブリダイズすることができないことを意味する。したがって、非相同の領域とは、ポリヌクレオチドの領域またはポリヌクレオチドが、その配列内に、別の核酸またはポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができない領域を有することを意味する。そのような領域は、例えば、突然変異の領域である。

「相同」または「同祖」という用語は、1つの1本鎖核酸配列が相補的な1本鎖核酸配列にハイブリダイズしうることを意味する。ハイブリダイゼーションの程度は、配列間の同一性の量、ならびに後に述べるような温度および塩濃度などのハイブリダイゼーション条件を含む多くの要因に依存し得る。好ましくは、同一性の領域は、約5bpよりも大きく、より好ましくは同一性の領域は10bpよりも大きい。

【0020】

免疫グロブリンのLまたはH鎖可変領域は、CDRとも呼ばれる、3つの超可変領域によって分断された「フレームワーク」領域からなる。フレームワーク領域の範囲およびCDRは正確に確定されており、"Sequences of Proteins of Immunological Interest"(Kabatら, 1987)を参照されたい。種々のLまたはH鎖のフレームワーク領域の配列は、同種において比較的保存されている。本明細書で用いる場合、「ヒトフレームワーク領域」は、天然ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に実質的に同一(約85以上、通常90~95以上)のフレームワーク領域である。抗体のフレームワーク領域、すなわち構成成分のL鎖とH鎖を組み合わせたフレームワーク領域は、CDRの位置決めおよびアラインメントに用いられる。CDRは、主に抗原のエピトープへの結合を担う。

本発明の利点は「商業上の用途」(または商業上のプロセス)にも及ぶ。この用語は、商工業そのもの(または単純な工業)ならびに非商業的な用途(例えば非営利組織における生物医学的研究)における用途を含むものとして用いられる。関連用途としては、診断、医薬、農業、製造業および学術の分野における用途が挙げられる。

「同一の」または「同一性」という用語は、2つの核酸配列が同一配列または

相補配列を有することを意味する。したがって、「同一性領域」とは、ポリヌクレオチドのある領域またはポリヌクレオチド全体が別のポリヌクレオチドのある領域または該ポリヌクレオチドと同一または相補的であることを意味する。

「同一の」または「同一性」のパーセンテージという用語は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関して用いられる場合、最大対応するように比較しアラインメントした際に、下記の配列比較アルゴリズムのうちの一つを用いてまたは目視検査によって測定されるように、同一であるか、あるいは同一であるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドについて明示されたパーセンテージを有する、2つ以上の配列または部分配列について言う。

配列比較のために、一般に、一つの配列が、被験配列と比較される参照配列としての役割を果たす。配列比較アルゴリズムを用いる場合、被験配列および参照配列をコンピュータにインプットし、必要に応じて部分配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメーターに基づいて参照配列に対する被験配列の配列同一性のパーセンテージを計算する。

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に「同一」であるというさらなる指標は、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であるか、あるいは該ポリペプチドに特異的に結合するということである。よって、あるポリペプチドは、一般に、例えば2つのペプチドが保存的置換によってのみ相違している場合、第2のポリペプチドと実質的に同一である。

「単離された」という用語は、その最初の環境(例えば天然物である場合にはその天然の環境)から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然ポリヌクレオチドまたは酵素は単離されていないが、天然系に共存している物質のいくつかまたは全てから分離された同ポリヌクレオチドまたは酵素は単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの一部であってもよく、および／またはそのようなポリヌクレオチドもしくは酵素は、組成物(composition)の一部であってもよい。さらに、そのようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部ではない場合に単離されるものであってよい。

「単離された」という用語は、核酸またはタンパク質について用いられる場合、該核酸またはタンパク質がその天然状態で関連しているその他の細胞成分を本質的に含まないことを示すものである。好ましくは均質状態で存在するが、乾燥体または水溶液中に存在してもよい。純度および均質性は、一般に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーのような分析化学技術を用いて測定される。調製物中に主な種として存在するタンパク質は、実質的に精製されている。特に、単離された遺伝子は、該遺伝子に隣接し、関心のある遺伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離されている。

「単離された核酸」とは、その由来の生物の天然ゲノム中に存在する場合には通常直ぐ隣接している5'および3'隣接配列と隣接していない核酸、例えばDNAまたはRNA分子を意味する。したがって、この用語は、例えば、ベクター、例えばプラスミドまたはウイルスベクターなどに組み込まれている核酸；異種細胞のゲノム(または同種細胞のゲノムの場合には天然部位とは異なる部位)に組み込まれている核酸；ならびに分離分子、例えばPCR増幅または制限酵素消化によって産生されたDNA断片または*in vitro*転写によって産生されたRNA分子として存在する核酸を記述するものである。またこの用語は、例えば、融合タンパク質の産生に用いることができる別のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部を形成する組換え核酸も記述するものである。

本明細書で用いる場合、「リガンド」とは、特定のレセプターによって認識される、ランダムペプチドまたは可変セグメント配列などの分子を意味する。当業者には理解されるように、分子(または巨大分子複合体)はレセプターでもリガンドでもあり得る。一般に、より小さい分子量の結合パートナーはリガンドと呼ばれ、より大きい分子量の結合パートナーはレセプターと呼ばれる。

「ライゲーション」とは、2つの2本鎖核酸断片間にホスホジエステル結合を形成させるプロセスを意味する(Sambrookら, 1982, p.146; Sambrook, 1989)。特に示さない限り、ライゲーションは、公知のバッファーを用い、ライゲートされるDNA断片をほぼ等モル量で含む0.5 μ gに対しT4 DNAリガーゼ(「リガーゼ」)を10単位という条件を用いて行うことができる。

【0021】

本明細書で用いる場合、「リンカー」または「スペーサー」とは、2つの分子、例えばDNA結合タンパク質とランダムペプチドを連結する分子または分子のグループを意味し、2つの分子を好ましい立体配置で、例えばランダムペプチドがDNA結合タンパク質に起因する立体障害が最小になるようにレセプターに結合し得るように配置させるのに役立つ。

「進化させるべき分子特性」とは、本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチド配列から構成される分子、ポリペプチド配列から構成される分子、一部にポリヌクレオチド配列を含み、一部にポリペプチド配列を含む分子に関するものを含む。特に関連のある（ただし限定するものではない）進化させるべき分子特性の例としては、特定の条件、例えば温度、塩度、圧力、pHならびにグリセロール、DM SO、界面活性剤および／または反応環境下で接触させる任意のその他の分子種の濃度などの条件における酵素活性が挙げられる。進化させるべき分子特性の特に関連のある（ただし限定するものではない）別の例としては、安定性、例えば、貯蔵中に発生し得るような特定の環境に一定時間曝された後に存在する残留する分子特性の量が挙げられる。

「多価抗原性ポリペプチド」または「組換え多価抗原性ポリペプチド」は、2以上の起源ポリペプチド由来のアミノ酸配列を含む非天然ポリペプチドであり、該起源ポリペプチドは一般に天然ポリペプチドである。種々のアミノ酸配列の領域の少なくともいくつかは、起源ポリペプチドを注射した哺乳動物に見出される抗体によって認識されるエピトープを構成する。種々のエピトープの由来である起源ポリペプチドは通常相同であり（すなわち同一または類似の構造および／または機能を有する）、例えば、生物のまたは種々の疾患状態由来の様々な単離物、血清型、株、種に由来する場合が多い。

「突然変異」という用語は、野生型または親核酸配列の配列内の変化またはペプチドの配列内の変化を含む。そのような突然変異は、トランジションまたはトランスバージョンなどの点突然変異であり得る。該突然変異は、欠失、挿入または重複であり得る。また、突然変異は「キメラ化」であってもよく、例えば、1つの親分子の配列の一部または全部ならびに少なくとも1つのその他の親分子の

配列の一部または全部を含むように作製された子孫分子が挙げられる。本発明は、キメラポリヌクレオチドおよびキメラポリペプチドの両方を提供する。

本明細書で用いる場合、縮重「N,N,G/T」ヌクレオチド配列は32個のトリプレットが考えられることを示す(ここで、「N」はA、C、GまたはTであり得る)。

「天然」という用語は、本明細書である対象物に対して用いる場合、その対象物が自然界に見出される事実を意味する。例えば、自然界の起源から単離され得る生物(例えばウイルス、細菌、原生動物、昆虫、植物または哺乳動物組織)中に存在し、実験室で人間によって意図的に改変されていないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は天然のものである。一般に、天然という用語は、非病的な(病気に罹患していない)個体に存在する、例えばその種にとって典型的であるような対象物を意味する。

「核酸」という用語は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドならびにその1本鎖または2本鎖形態のポリマーを意味する。特に限定しない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然ヌクレオチドに類似した様式で代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に示さない限り、特定の核酸配列は、明示された配列はむろんのこと、その保存的に改変された変異体(例えば縮重コドン置換)および相補配列も無条件に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1個以上の選択された(または全ての)コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を作製することによって得られる(Batzerら(1991)*Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsukaら(1985)*J Biol. Chem.* 260:2605-2608; Cassolら(1992)Rossoliniら(1994)*Mol. Cell. Probes* 8:91-98)。核酸という用語は、遺伝子、cDNAおよび遺伝子によってコードされるmRNAと互換的に用いられる。

「遺伝子から誘導された核酸」とは、その核酸を合成するために該遺伝子またはその部分配列を最終的に鋳型として用いた、前記核酸を言う。つまり、mRNA、mRNAから逆転写されたcDNA、そのcDNAから転写されたRNA、そのcDNAから増幅されたDNA、増幅DNAから転写されたRNA等は全て前記遺伝子から誘導されたものであり、そのような誘導産物の検出により、サンプル中の最初の遺伝子および／または遺伝子転写産物の存在および／または存在量が示される。

本明細書中で用いられる「核酸分子」は、少なくとも1塩基あるいは1塩基対（各々、それが一本鎖であるか二本鎖であるかによる）からなるものである。さらに核酸分子は、ヌクレオチド含有分子のいずれかのグループにもっぱら属するか、またはキメラとして属することもあり得る。そのヌクレオチド含有分子は、限定するものではないが、以下の核酸分子のグループによって例示されるものである：RNA、DNA、ゲノム核酸、非ゲノム核酸、天然核酸および天然に生じたものではない核酸、ならびに合成核酸。このヌクレオチド含有分子は、非限定的な例に過ぎないが、ミトコンドリアなどのオルガネラの関連核酸、リボソームRNA、および天然要素と共に1つ以上の非天然要素をキメラ的に含む核酸分子を含む。

【0022】

さらに、「核酸分子」は、限定するものではないがアミノ酸および糖質により例示される、1つ以上の非ヌクレオチドベースの構成要素を部分的に含み得る。したがって、例であって限定するものではないが、部分的にはヌクレオチドに基づいており部分的にはタンパク質に基づいているリボザイムは、「核酸分子」とみなされる。

また、例であって限定するものではないが、検出可能な部分（例えば放射性標識または代わりに非放射性標識など）によって標識された核酸分子は、同様に「核酸分子」とみなされる。

「（特定の酵素）をコードする核酸配列」または「（特定の酵素）の配列をコードするDNA」または「（特定の酵素）をコードするヌクレオチド配列」という用語、およびその他の同義の用語は、適切な調節配列の制御下に置かれれば転写され、酵素に翻訳されるDNA配列を言う。「プロモーター配列」は、細胞内でRNAポリメラーゼと結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。プロモーターはDNA配列の一部である。この配列領域はその3'末端に開始コドンを含む。プロモーター配列は、バックグラウンドを上回る検出可能なレベルでの転写を開始するために必要な構成要素を有している最小限の数の塩基を含む。しかしながら、RNAポリメラーゼが該配列に結合し、転写が開始コドン（プロモーターの3'末端）で開始された後は、転写は3'方向の下流へ進行する。該プロモーター配列内には、転写開始部位（S1ヌクレアーゼによ

るマッピングで首尾よく定められた)、およびRNAポリメラーゼの結合を司るタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)が見出されるであろう。

「酵素(タンパク質)をコードする核酸」または「酵素(タンパク質)をコードするDNA」または「酵素(タンパク質)をコードするポリヌクレオチド」という用語、およびその他の同義の用語は、該酵素をコードする配列のみを含むポリヌクレオチドだけでなく、更なるコード配列または非コード配列を含むポリヌクレオチドも包含する。

1つの好適な実施形態において、「特定の核酸分子種」は、限定するものではないが、一次配列により例示されるその化学構造によって定められるものである。別の好適な実施形態においては、特定の「核酸分子種」は、該核酸種の機能、または該核酸種から誘導された産物の機能によって定められる。したがって、非限定的な例に過ぎないが、「特定の核酸分子種」はそれに起因する1つ以上の活性または特性(その発現産物に起因する活性または特性も含む)により定められる。

「核酸ライブラリー中への実施中の核酸サンプルの集合」の本明細書中での定義は、核酸サンプルをベクターに基づくコレクションに組み込む工程(例えばベクター中へのライゲーションおよび宿主の形質転換などによる)を含む。適切なベクター、宿主、およびその他の試薬、並びにその非限定的な特定の実施例についての説明は後述する。また「核酸ライブラリー中への実施中の核酸サンプルの集合」の本明細書中での定義は、核酸サンプルを非ベクターに基づくコレクションに組み込む工程(例えばアダプターとの連結による)をも含む。好ましくは、該アダプターはPCRプライマーとアニールし、PCRによる増幅を促進することができるものである。

したがって、非限定的な実施形態において、「核酸ライブラリー」は、ベクターに基づく1つ以上の核酸分子のコレクションを包含する。異なる好適な実施形態においては、「核酸ライブラリー」は、非ベクターに基づく核酸分子のコレクションを包含する。更に異なる好適な実施形態においては、「核酸ライブラリー」は、部分的にベクターに基づき、部分的に非ベクターに基づき、核酸分子の混成コレクションを包含する。好ましくはライブラリーを構成する分子コレクショ

ンは検索可能で、かつ各核酸分子種毎に分離可能である。

本発明は、「核酸構築物」あるいは「ヌクレオチド構築物」あるいは「DNA構築物」を提供する。用語「構築物」は、本明細書中では、ベクターまたはベクターの一部などの1つ以上のさらなる分子部分と任意に化学結合させ得る、例えばポリヌクレオチド（例えばフィターゼポリヌクレオチド）などの分子を記述するために用いられる。特定の様態であって、しかし限定することを意味するものではない様態においては、ヌクレオチド構築物は、宿主細胞の形質転換に適したDNA発現構築物により例示される。

【0023】

「オリゴヌクレオチド」（または同義的に「オリゴ」）とは、化学合成されたものであり得る一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは相補二本鎖ポリデオキシヌクレオチドを言う。そのような合成オリゴヌクレオチドは、5'リン酸基を有するものもあるが、有しないものもある。5'リン酸基を有しないものは、キナーゼ存在下にてATPによりリン酸基を付加しない限り、他のオリゴヌクレオチドと連結することはない。合成オリゴヌクレオチドは脱リン酸化されていない断片と連結される。ポリメラーゼに基づく増幅（例えばPCRによる）を実現するために、

「順番に、少なくとも第1の相同配列、縮重N,N,G/T配列、および第2の相同配列、を含んでなる、32倍に縮重したオリゴヌクレオチド」が挙げられる。この文脈で用いられるように、「相同」は、ポリメラーゼに基づいて増幅される親ポリヌクレオチドと前記オリゴとの間の相同性に関する。

別の核酸配列との機能的関係性のうちに配置される場合、核酸は「機能しうる形で連結され」ている。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写を増加させるならば、該コード配列に機能しうる形で連結されているのである。

本明細書中で用いられる用語「機能しうる形で連結された」とは、機能的な関係にあるポリヌクレオチドのエLEMENTの連結を言う。核酸は、別の核酸配列との機能的関係性のうちに配置される場合、核酸は「機能しうる形で連結され」ている。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を及ぼすならば、該コード配列に機能しうる形で連結されているのである。

機能しうる形で連結された、とは、連結されたDNA配列が典型的に連続的であること、またタンパク質をコードする2つの領域を結合する必要がある場合には連続的かつリーディングフレーム内にあることを意味している。しかしながら、エンハンサーは一般的にプロモーターから数キロベース離れている場合でも機能し、またイントロン配列は様々な長さのものがあうるため、ポリヌクレオチドのエレメントの中には機能しうる形で連結されていても連続的でないものもあり得る。

RNAポリメラーゼが1つのmRNA中に前記2つのコード配列を転写し、次いで該mRNAが両方のコード配列に由来するアミノ酸配列を含む1つのポリペプチドに翻訳される場合、コード配列は別のコード配列に「機能しうる形で連結され」ている。発現される配列が最終的に所望のタンパク質を産生するようにプロセシングされるのであれば、該コード配列は互いに連続的である必要はない。

本明細書中で用いられる用語「親ポリヌクレオチドセット」は、1つ以上の異なるポリヌクレオチド種を含むセットである。通常この用語は、好ましくは親セットの突然変異誘発によって得られる子孫ポリヌクレオチドセットに関連して用いられ、この場合用語「親」「出発」および「鑄型」を互換的に用いることができる。

本明細書中で用いられる用語「生理学的条件」とは、生存生物に適合しており、および／または培養酵母生細胞もしくは培養哺乳動物生細胞において細胞内に典型的に存在する、温度、pH、イオン強度、粘性、および同様の生化学的パラメーターを言う。例えば、典型的な実験室培養条件下で増殖させる酵母細胞における細胞内条件は生理学的条件である。in vitroでの転写カクテルに対する適切なin vitro反応条件は、一般に生理学的条件である。一般に、in vitro生理学的条件は、50～200mM NaClまたはKCl, pH6.5～8.5, 20～45°C, および0.001～10mMの二価陽イオン（例えば Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ）；好ましくは、約150mM NaClまたはKCl, pH7.2～7.6, 5mM 二価陽イオンを含み、さらにしばしば0.01～1.0%の非特異的タンパク質（例えばBSA）を含む。非イオン性界面活性剤(Tween、NP-40、Triton X-100)が、通常約0.001～2%、典型的には0.05～0.2%(v/v)でしばしば存在する。特定の水性条件は、従来方法に従って当業者により選択され得る。一般的な指針

としては、以下の緩衝化水性条件を適用できる：10～250mM NaCl, 5～50mM Tris HCl, pH5～8, さらに任意に二価陽イオンおよび／または金属キレーターおよび／または非イオン性界面活性剤および／または膜画分および／または消泡剤および／またはシンチラントを含む。

二本鎖ポリヌクレオチドの配列を記載するために、本明細書中では標準規則（5'から3'へ）を用いている。

本明細書中で用いられる用語「群」は、例えばポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドの一部分、またはタンパク質などの構成要素のコレクションを意味する。

「混合群」とは、同じファミリーの核酸またはタンパク質に属する（すなわち、近縁である）がその配列は異なっており（すなわち、同一ではない）、したがってその生物学的活性も異なっている構成要素のコレクションを意味する。

「プロ型」を有する分子とは、参照とする該プロ型分子と比較して性質の違い（例えば活性の増加）を有するより成熟した分子型に至る途上において、共有結合性および非共有結合性の化学修飾（例えばグリコシル化、タンパク質加水分解切断、二量体化またはオリゴマー化、温度誘導性もしくはpH誘導性コンホメーション変化、補因子との結合など）を、1以上の任意の組み合わせで受ける分子を言う。成熟分子の生成の途中で2以上の化学修飾（例えば2回のタンパク質加水分解切断、またはタンパク質加水分解切断と脱グリコシル化）を区別できる場合には、該参照となる前駆体分子は「プレプロ型」分子と称される。

【0024】

本明細書中で用いられる用語「擬似ランダム」は、例えば、擬似ランダム部位以外の別の部位での残基変動性の程度はある程度の残基変動が許容されているものの制限されているような、制限された変動性を有する一連の配列に関して言う。

用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲルにおいて本質的に1本のバンドを生ずることを意味する。特に、核酸またはタンパク質が少なくとも約50%の純度であること、より好ましくは少なくとも約85%の純度であること、および最も好ましくは少なくとも約99%の純度であることを意味する。

本明細書中で用いられる、「擬反復単位」とは、再組合せされる反復配列を言

うが、これは定義上同一ではない。実際、同一の出発配列の突然変異誘発により作製された実質的に同一のコード単位に対してだけでなく、いくつかの領域でかなり相違している類似または近縁配列の再組合せに対しても前記方式が持ち出される。それでも、該配列がこのアプローチにより再組合せされるだけの十分な相同性を有するのであれば、それらの配列は「擬反復した」単位と称され得る。

本明細書中で用いられる「ランダムペプチドライブラリー」とは、1セットのランダムペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のセット、およびそれらのポリヌクレオチド配列によりコードされるランダムペプチドのセット、並びにそれらのランダムペプチドを含む融合タンパク質のセットを言う。

本明細書中で用いられる「ランダムペプチド配列」とは、2つ以上のアミノ酸モノマーを含み、確率論的すなわちランダムな方法により構築されたアミノ酸配列を言う。ランダムペプチドは不変配列を含み得るフレームワークモチーフまたは足場モチーフを含んでもよい。

本明細書中で用いられる「レセプター」とは、特定のリガンドに対して親和性を有する分子を言う。レセプターは天然分子または合成分子であり得る。レセプターは不変状態でまたは他種との会合体として用いられ得る。レセプターは結合メンバーと、直接にまたは特異的結合物質を介して、共有結合的にまたは非共有結合的に、結合し得る。レセプターの例としては、限定するものではないが、モノクローナル抗体および特定の抗原決定基（例えばウイルス、細胞、または他の物質上にある）と反応性のある抗血清を含む抗体、ならびに細胞膜受容体、複合糖質および糖タンパク質、酵素、ならびにホルモン受容体が挙げられる。

細胞に関して用いられる場合の用語「組換え」は、該細胞が異種核酸を複製すること、または異種核酸によりコードされるペプチドまたはタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、天然型（非組換え型）の細胞中にはみられない遺伝子を含むことができる。また組換え細胞は、天然型の細胞中にみられる遺伝子を改変し、人工的手段により該細胞内に再導入したものを含み得る。上記用語はまた、細胞から核酸を取り出すことなく改変された細胞内在性の核酸を含む細胞も包含する。そのような改変は、遺伝子置換、部位特異的突然変異、および関連技術により得られるものを含む。

「組換え酵素」とは、組換えDNA技術により産生される酵素、すなわち所望の酵素をコードする外来性DNA構築物により形質転換した細胞から産生される酵素を言う。「合成」酵素は、化学合成により作製されるものである。

「組換え発現カセット」または単に「発現カセット」は、組換え法または合成法により作製された、そのような配列に適合性のある宿主内で構造遺伝子の発現をもたらす核酸エレメントを含む、核酸構築物である。発現カセットは少なくともプロモーターを含み、任意に転写終結シグナルを含む。典型的には、組換え発現カセットは転写されるべき核酸（例えば、所望のポリペプチドをコードする核酸）、およびプロモーターを含む。発現をもたらす上で必要な、あるいはその助けとなる更なる要素も、本明細書に記載するように用いることができる。例えば発現カセットは、宿主細胞からの発現タンパク質の分泌を指令するシグナル配列をコードする、ヌクレオチド配列をも含むことができる。転写終結シグナル、エンハンサー、および遺伝子発現に影響を与える他の核酸配列もまた、発現カセットに含めることができる。

用語「近縁ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドのある領域または範囲が同一であって、該ポリヌクレオチドのある領域または範囲が非相同性であることを意味する。

【0025】

本明細書中で用いられる「減少性再組合せ」は、反復配列により媒介される欠失（および/または挿入）事象を通じて生ずる分子多様性の増大に関して言う。

以下の用語は、2種類以上のポリヌクレオチド間の配列の関連性を述べるために用いられる：「参照配列」「比較ウィンドウ」「配列同一性」「配列同一性のパーセンテージ」および「実質的同一性」。

「参照配列」は、配列比較の基準として用いられる確定配列である。参照配列は、例えば配列リストに挙げた完全長cDNAまたは遺伝子配列のセグメントのようにより大きな配列の部分配列であってもよく、または完全なcDNAまたは遺伝子配列を含んでもよい。一般的には、参照配列は、少なくとも20ヌクレオチド長、しばしば少なくとも25ヌクレオチド長、および多くの場合少なくとも50ヌクレオチド長である。2種類のポリヌクレオチドは、それぞれが(1)該2種類のポリヌク

レオチド間で類似した配列（すなわち完全なポリヌクレオチド配列の一部）を含み、また(2)該2種類のポリヌクレオチド間で相違している配列をさらに含むことから、該2種類（またはそれ以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は、典型的には「比較ウィンドウ」にわたって該2種類のポリヌクレオチドの配列を比較し配列の類似した局所領域を同定し比較することによって、行うことができる。

本明細書中で用いられる「反復指数(RI)」は、クローニングベクター中に含まれる擬反復単位の平均コピー数である。

用語「制限部位」とは、制限酵素が作用を現すのに必要であって、触媒的切断部位を含んでいる認識配列を言う。切断部位は、多義性の低い配列（すなわち、制限部位の出現頻度の主たる決定要因を含む配列）を含む制限部位の一部分に含まれても含まれていなくてもよいことは、理解されている。したがって多くの場合、適切な制限部位は、内部切断部位（例えばEcoRI部位では、G/AATTC）または直ぐ隣接した切断部位（例えばEcoRII部位では、/CCWGG）を有する、低多義性配列のみを含むものである。その他の場合で、適切な制限酵素[例えばEco57I部位すなわちCTGAAG(16/14)]は、低多義性配列（例えばEco57I部位ではCTGAAG配列）と外部切断部位（例えばEco57I部位のN₁₆部分にある）を含む。酵素（例えば制限酵素）がポリヌクレオチドを「切断」と言う場合、該制限酵素がポリヌクレオチドの切断を触媒または促進することを意味するということは、理解されよう。

用語「スクリーニング」は、一般に、最適な抗原を同定する工程を言う。抗原の発現、フォールディング、安定性、免疫原性およびエпитープの存在を含む抗原のいくつかの特性を、いくつかの近縁抗原からの選択およびスクリーニングに利用することができる。選択は、同定および物理的分離を選択マーカーの発現によって同時に行うものであって、いくつかの遺伝的条件の下で、該マーカーを発現している細胞は生き残れるが他の細胞は死滅する（あるいはこの逆もある）という、スクリーニングの一形態である。スクリーニングマーカーとしては、例えばルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼおよび緑色蛍光タンパク質が挙げられる。選択マーカーは薬剤および毒素耐性遺伝子などを含む。in vitroでの一次免疫反応の研究には限界があるため、in vivo研究は特に有用なスクリーニング方

法である。これらの研究においては、まず抗原を試験動物に導入し、続いてその免疫反応を、防御免疫反応の分析により、または免疫化動物由来のリンパ系細胞を用いて誘導された免疫反応の質もしくは強さを研究することにより、研究する。自然選択は自然進化の過程で起こり、また起こり得るが、本方法では選択が人間により行われる。

非限定的な1つの様態において、「選択可能なポリヌクレオチド」は、5'末端領域（すなわち端の領域）、中間領域（すなわち内部または中央の領域）、および3'末端領域（すなわち端の領域）からなる。この様態において用いる場合、5'末端領域は5'ポリヌクレオチド末端方向に位置する領域であり、したがってポリヌクレオチドの5'側半分の中に部分的にまたは全体として含まれる。同様に、3'末端領域は3'ポリヌクレオチド末端方向に位置する領域であり、したがってポリヌクレオチドの3'側半分の中に部分的にまたは全体として含まれる。本明細書の非限定的な実施例に示されるように、任意の2つの領域間または3つの領域全ての間でさえ、重複した配列が存在し得る。

用語「配列同一性」は、2種類のポリヌクレオチド配列が比較のウィンドウ全体にわたって同一である（すなわち、ヌクレオチド1つ毎に基づいて）ことを意味している。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウ全体にわたって最適にアラインした2つの配列を比較し、両方の配列中で同一な核酸塩基（例えば、A、T、C、G、UまたはI）の位置数を決定してマッチ位置数を出し、該マッチ位置数を比較ウィンドウ内の全位置数（すなわちウィンドウサイズ）で除算し、その結果を100倍して配列同一性のパーセンテージを出すことにより、算出されるものである。本明細書中で用いられるこの「実質的同一性」は、ポリヌクレオチド配列の1つの特性を示すものであり、ここで該ポリヌクレオチドは、少なくとも25～50ヌクレオチドである比較ウィンドウの参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の同一性、多くの場合90～95%の配列同一性、および最も一般的には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含み、またその配列同一性のパーセンテージは、欠失または付加を比較ウィンドウ全体にわたって参照配列の全部で20%以下で含み得るポリヌクレオチドと参照配列を比較することにより算出される。

当業界で公知の通り、2種類の酵素間の「類似性」は、一方の酵素のアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸置換を、もう一方の酵素の配列と比較することにより、決定される。類似性は当業界で周知の手法、例えばBLASTプログラム(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information)により決定することができる。

本明細書中で用いられる用語「一本鎖抗体」とは、通常はスパーサーペプチド(例えば[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_x)を介することが好まれるポリペプチド結合においてV_HドメインとV_Lドメインを含んでなるポリペプチドを言い、これはアミノ末端および/またはカルボキシル末端にさらなるアミノ酸配列を含んでもよい。例えば一本鎖抗体は、コード化ポリヌクレオチドに連結するためのつなぎ鎖(tether)セグメントを含み得る。例えば、scFvが一本鎖抗体である。一般に一本鎖抗体は、免疫グロブリンスーパーファミリーの遺伝子(例えば、WilliamsおよびBarclay, 1989, pp.361-368を参照のこと。これは参照により本明細書中に組み込まれる。)によって本質的にコードされている、最も多くの場合、げっ歯類、非ヒト霊長類、鳥類、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、またはヒトの重鎖または軽鎖の遺伝子配列によってコードされている少なくとも10個の連続したアミノ酸のポリペプチドセグメント1つ以上からなるタンパク質である。機能的な一本鎖抗体は、一般的に、特定の標的分子、典型的にはレセプターまたは抗原(エピトープ)に対する結合特性を維持するのに十分な、免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子産物の一部分を含む。

【0026】

「特異的に(または選択的に)抗体と結合する」または「～に対して特異的に(または選択的に)免疫反応性である」という語句は、タンパク質またはペプチドに関する場合には、タンパク質および他の生物製剤の雑多な集団の存在下で、上記タンパク質または上記タンパク質由来のエピトープの存在を決定する結合反応に関して言う。したがって、所定のイムノアッセイ条件下で、指定の抗体は特定のタンパク質と結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質と有意な量で結合することはない。多価抗原性ポリペプチドに対して産生された抗体は、通常1つ以上のエピトープが得られる該タンパク質と結合するであろう。そのような条

件下での抗体との特異的結合には、特定のタンパク質に対する特異性に関して選択された抗体が必要である。様々なイムノアッセイ様式を用いて、特定のタンパク質に対して特異的に免疫反応性である抗体を選択することができる。例えば、固相ELISAイムノアッセイ、ウェスタンブロット、または免疫組織化学は、あるタンパク質に対して特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために、日常的に用いられている。特異的な免疫反応性を決定するために用いられ得るイムノアッセイの様式および条件についての説明は、HarlowおよびLane(1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (「HarlowおよびLane」) を参照のこと。典型的な特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍、より一般的にはバックグラウンドの10~100倍を超えるであろう。

一对の分子（例えば抗体-抗原ペア、または核酸ペア）のメンバーは、それらが他の非特異的な分子より高い親和性で互いに結合する場合、互いに「特異的に結合する」と言われる。例えば、ある抗原（非特異的タンパク質に対するよりもより効率的に抗体が結合する）に対して産生された抗体は、該抗原と特異的に結合するというように記述され得る。（同様に核酸プローブは、それが塩基対形成相互作用により核酸標的と特異的な二重鎖を形成する場合、該核酸標的と特異的に結合するというように記述され得る（上記を参照のこと）。）

例えばリガンドとレセプターなどの2つの分子間の「特異的結合親和性」は、分子の混合物中での、一方の分子の他方への選択的な結合を意味する。該分子の結合は、その結合親和力が約 $1 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 、あるいはそれ以上であれば、特異的とみなすことができる。

「特異的ハイブリダイゼーション」は、本明細書中では、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチド（例えば、第1のポリヌクレオチドとは異なっているが本質的に同一の配列を有するポリヌクレオチド）の間でのハイブリッド形成として定義され、本質的に非近縁なポリヌクレオチド配列は混合物中でハイブリッドを形成しない。

用語「特定のポリヌクレオチド」は、特定の末端を有し、また特定の核酸配列を有するポリヌクレオチドを意味する。一方のポリヌクレオチドが他方のポリヌ

クレオチドの一部と同一の配列を有するが末端は異なっている場合の、それら2つのポリヌクレオチドは2つの異なる特定のポリヌクレオチドを含むものである。

T_m は、完全にマッチしたプローブに対し標的配列の50%がハイブリダイズする温度（所定のイオン強度およびpH下での）である。特定のプローブに対して、その T_m と同等になるように、非常にストリンジेंटな条件が選択される。サザンブロットまたはノーザンブロットにおける、フィルター上での100個を超える相補残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションに対する、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件の例としては、50%ホルムアミドおよびヘパリン1mgを42°Cにて用い、該ハイブリダイゼーションを一晩で行うものである。

「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件」は、その配列の間に少なくとも90%の同一性、好ましくは少なくとも95%の同一性、および最も好ましくは少なくとも97%の同一性が存在する場合のみ、ハイブリダイゼーションが起こるであろう場合を意味する。Sambrookら, 1989を参照のこと。それはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

高「ストリンジेंट」な洗浄条件の例として、0.15M NaClで72°Cにて約15分間、が挙げられる。ストリンジेंटな洗浄条件の例として、0.2×SSCでの65°Cにて15分間の洗浄が挙げられる（SSCバッファの記述に関して、Sambrook, 下記参照）。バックグラウンドのプローブシグナルを除去するために、しばしば高ストリンジエンシー洗浄より先に低ストリンジエンシー洗浄を行う。例えば100ヌクレオチドを超える二重鎖に対する中程度のストリンジエンシー洗浄の例としては、1×SSCで45°Cにて15分間である。例えば100ヌクレオチドを超える二重鎖に対する低ストリンジエンシー洗浄の例としては、4~6×SSCで40°Cにて15分間である。短いプローブ（例えば約10~50ヌクレオチド）については、ストリンジेंटな条件は、典型的には約1.0M以下の Na^+ イオン塩濃度、典型的にはpH7.0~8.3での約0.01~1.0M Na^+ イオン濃度（またはその他の塩）であって、その温度が典型的に少なくとも約30°Cであることを伴う。またストリンジेंटな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤を添加することによっても達成できる。一般に、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおいて、非近縁プローブに対してみら

れるよりも、シグナル対ノイズ比が2倍（またはそれ以上）大きいことは、特異的ハイブリダイゼーションを検出したことを示す。ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸であっても、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一であれば、実質的に同一である。例えば遺伝コードにより可能となる最大コドン縮重を利用して核酸のコピーが作製される場合、そのようなことが起こる。

サザンおよびノーザンハイブリダイゼーションのような核酸ハイブリダイゼーション実験に関連した「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーションの洗浄条件」は配列に依存し、また種々の環境パラメーター下で異なる。より長い配列は、より高温にて特異的にハイブリダイズする。

【0027】

核酸のハイブリダイゼーションに対する広範囲にわたる指針が、Tijssen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes 第I部第2章「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid prove assays」, Elsevier, New Yorkに見られる。一般的に、高ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、所定のイオン強度およびpHにて、個々の配列に対してその熱融解点(T_m)を約5℃下回るように選択される。典型的には、「ストリンジェントな条件」下で、プローブはその標的となる部分配列とハイブリダイズするがその他の配列とはハイブリダイズしない。

また、配列番号1の配列などの、フィターゼポリペプチドの配列と「実質的に同一」である配列を有するポリペプチドも、本発明に包含される。「実質的に同一」なアミノ酸配列は、保存的アミノ酸置換のみによって参照配列と異なっている配列である。この保存的アミノ酸置換とは、例えばアミノ酸1個を同じクラスの別のものに置換することである（例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、またはメチオニンなどの1個の疎水性アミノ酸をその別のアミノ酸に置換すること、またはアルギニンをリジンに置換、グルタミン酸をアスパラギン酸に置換、あるいはグルタミンをアスパラギンに置換というように、1個の極性アミノ酸を

別の極性アミノ酸に置換すること)。

2つの核酸またはポリペプチドに関する「実質的に同一」という語句は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いるかまたは目視による判断で、最大一致であるように比較しアラインした場合に、少なくとも60%、好ましくは80%、最も好ましくは90~95%のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一性を有する2つ以上の配列または部分配列に関して言う。好ましくはその実質的同一性が、少なくとも約50残基の長さの配列領域にわたり、より好ましくは少なくとも約100残基の領域にわたり存在するものである。さらに最も好ましくは、該配列が少なくとも約150残基にわたり実質的に同一なものである。いくつかの実施形態においては、該配列はコード領域の全長にわたり実質的に同一である。

「部分配列」とは、核酸またはアミノ酸（例えばポリペプチド）それぞれの、より長い配列の一部を含む核酸配列またはアミノ酸配列を言う。

さらに、「実質的に同一」なアミノ酸配列は、参照配列と1つ以上の非保存的置換、欠失、または挿入により相違している配列であって、特にそのような置換がその分子の活性部位ではない部位で起き、かつそのポリペプチドがその特性を本質的に保持している場合である。例えば、1個以上のアミノ酸がフィターゼポリペプチドから欠失し、その結果該ポリペプチドの構造が改変されるが、その生物学的活性に有意な変化がない場合であり得る。例えば、フィターゼの生物学的活性に必要なでないアミノ末端またはカルボキシル末端のアミノ酸は除去することができる。そのような改変によって、より小さな活性フィターゼポリペプチドを開発することができる。

本発明は、「実質的に純粋な酵素」を提供する。用語「実質的に純粋な酵素」は、本明細書中で、他のタンパク質、脂質、炭化水素、核酸、および天然には共に存在しているその他の生体物質を実質的に含まないポリペプチド（例えば、フィターゼポリペプチドまたはその断片）などの分子を記述するために用いられる。例えば、実質的に純粋な分子（例えばポリペプチド）は、目的の分子を乾燥重量で少なくとも60%含む得る。該ポリペプチドの純度は、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動（例えばSDS-PAGE）、カラムクロマトグラフィー（例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)）、およびアミノ末端アミノ酸配列分析を含む、

標準法を用いて測定できる。

本明細書中で用いられる「実質的に純粋」は、目的種が支配種として存在しており（すなわちモル基準で、目的種がその組成物中に他の各々の巨大分子種よりも大量に存在する）、さらに好ましくは実質的に精製した画分は、目的種が存在している巨大分子種全ての少なくとも約50%（モル基準で）からなるような組成物であることを意味する。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する巨大分子種全ての約80～90%以上からなる。最も好ましくは、目的種は、本質的に均一（混入種が従来の検出法では該組成物中に検出できない）になるまで精製され、該組成物は本質的に単一の巨大分子種からなる。溶媒種、小分子（500ダルトン未満）および元素イオン種は、巨大分子種とみなされない。

本明細書中で用いられる「可変セグメント」は、ランダム、擬似ランダム、または確定された核配列を含む初期ペプチドの一部を言う。「可変セグメント」は、ランダム、擬似ランダム、または確定された核配列を含む初期ペプチドの一部を言う。「可変セグメント」は、可変残基位置と不変残基位置を両方含み得るが、可変残基位置における残基変動性の程度は制限される。当業者の裁量で、両方の選択肢が選択される。典型的には、可変セグメントは約5～20アミノ酸残基長（例えば8～10）であるが、可変セグメントはより長くてもよく、また、抗体断片、核酸結合タンパク質、レセプタータンパク質などの抗体部分またはレセプタータンパク質を含んでもよい。

【0028】

用語「野生型」は、そのポリヌクレオチドが突然変異を全く含まないことを意味する。「野生型」タンパク質は、該タンパク質が天然にみられる活性レベルで活性を有し、また天然にみられるアミノ酸配列を含むことを意味する。

例えば「実施中のサンプル」中の用語「実施中の」は、単に、それが実施中であるサンプルのことである。同様に、例えば「実施中の分子」は、それが実施中である分子のことである。

【0029】

2.2. 組換えに対する一般的な検討および組換えの形式

成分モジュールは、有用な特性もしくは特徴の獲得または向上を遺伝的ワクチン

にもたらす

本発明は、1つ以上の成分モジュールを含む多成分遺伝的ワクチンを提供するものである。各成分モジュールは、遺伝的ワクチンの接種に有用な特性もしくは特徴の獲得または向上を遺伝的ワクチンにもたらすものである。

本発明では、従来から使用されている遺伝的ワクチンよりも有意な利益が得られる。多成分ワクチンを用いることにより、特定の用途に特に有効な免疫反応を得ることが可能である。多成分遺伝的ワクチンには、例えば、最適な抗原発現のために最適化された成分、並びに樹状細胞MHCクラスI分子上での抗原提示を高めることによって細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の活性化を向上させる成分が含まれる。更なる例を本明細書に記載する。

本発明は、ワクチン開発に「抗原ライブラリー免疫化」と呼ばれる新規なアプローチを提供する。他の技術はいずれも、関連抗原のライブラリーの構築または既知の防御抗原の最適化には利用不可能である。ハイスループットシーケンシング法または発現ライブラリー免疫化といった、既存の最も有力なワクチン抗原の同定法でも、病原体ゲノムから得られる配列の間隔を探索するに過ぎない。これらのアプローチは、一般に単一の病原体株しか標的とせず、また病原体が自身の免疫原性をダウンレギュレートするよう自然進化してきたため、十分でない場合が多い。対照的に、実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させた抗原ライブラリーを用いる本発明の免疫化プロトコルでは、新規な抗原配列を同定する手段が得られる。これらのプールからin vivoでのチャレンジモデルによって最も防御性の高い抗原を選択することができる。抗原ライブラリー免疫化によって、利用可能な免疫原配列の多様性が劇的に広がり、その結果、これらの抗原キメラ・ライブラリーでは、将来新たに出現する病原体の変異体から防御する手段も得られる。本発明の方法により、現存する多様な病原体に対して有効な防御をもたらす個々のキメラ抗原の同定が可能となり、軍隊および一般市民用の改良ワクチンが提供される。

本発明の方法では、特に、確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリング(shuffling)および断続的な(interrupted)合成)並び

に非確率論的ポリヌクレオチド再集合等の進化に基づくアプローチが得られ、このようなアプローチは、様々な抗原型の免疫原性を向上させるのに最適なアプローチである。例えば、このような方法からは、悪性疾患の予防および治療に有用な最適化された癌抗原を取得する手段が得られる。更に、数が増加した自己抗原(自己免疫疾患を引き起こす)並びにアレルゲン(アトピー、アレルギーおよび喘息を引き起こす)も特性決定されている。同様に、これらの抗原の免疫原性および生産も、本発明の方法で向上させることができる。

【0030】

本発明の抗原ライブラリー免疫法は、病原性因子に対する免疫反応の誘導能を向上させた組換え抗原の取得を可能にする手段を提供するものである。「病原性因子」とは、宿主細胞に感染する能力のある生物またはウイルスをいう。病原性因子は、典型的には、免疫原性を示す分子(通常、ポリペプチド)を含むおよび／またはコードするものであり、この免疫原性ポリペプチドに対して免疫反応が生起される。多くの場合、病原性因子のある血清型に由来する免疫原性ポリペプチドに対して生起される免疫反応は、病原性因子の別の血清型または他の近縁病原性因子を認識できず、従ってそれらに対し防御不可能である。他の場合では、病原性因子によって産生されるポリペプチドが、感染宿主に病原性因子に対して有効な免疫反応を起こさせるほど十分な量では産生されなかったり、十分な免疫原性を示さなかったりする。

これらの問題点は本発明の方法によって解消される。本発明の方法は、典型的には、病原性因子のポリペプチドまたは別の疾患もしくは症状に關与する抗原をコードする核酸の2つ以上の形態を再集合させる(および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法(directed evolution method)に付す)ことを含むものである。確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を含むこれらの再集合法では、基質として、相互に2個以上のヌクレオチドが異なる核酸形態を使用し、組換え核酸のライブラリーを得る。次いで該ライブラリーをスクリーニングし、病原性因子または他の症状に対する免疫反応の誘導能を向上させた最適化組換え抗原をコードする最適化された組換え核酸を少なくとも1つ同定

する。

得られた組換え抗原は、複数の病原体株に対して反応する抗体(Ab)で認識されるという点で多くの場合キメラであり、一般に広い範囲の免疫反応を誘導することも可能である。特異的な中和抗体は、目的のいくつかの病原体に対する防御を媒介することが知られているが、細胞傷害性Tリンパ球等の更なる機構が関与している可能性がある。本明細書中では、広範囲で反応する抗体応答を誘導する多価キメラ抗原の概念を更に説明する。

好適な実施形態では、抗原性ポリペプチドをコードする様々な形態の核酸を、近縁の病原性因子ファミリーのメンバーから取得する。

種々の生物に由来する核酸を使用して確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を実施する本概略をおおまかに本明細書に示す。従って、これらの確率論的ポリヌクレオチド再集合法(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合法によって、多価の交差防御(crossprotective)抗原を作製するための有効なアプローチが得られる。これらの方法は、ほとんどまたは全ての病原体変異体に対して有効に防御する個々のキメラを取得するのに有用である。

更に、実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させた抗原キメラのライブラリー全体またはプールを使用する免疫化でも、抗原の出発集団には含まれていなかった病原体変異体に対して防御するキメラ抗原を同定できる(例えば、実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させた、株Aおよび株Bのキメラ／突然変異体のライブラリーによって株Cに対して防御する)。

従って、前記抗原ライブラリー免疫化のアプローチによって、ほとんど特性決定されていない新たに出現した病原体変異体に対する免疫反応を誘導し得る免疫原性ポリペプチドの開発が可能となる。

配列再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)は、以下に詳述するように、多くの種々の形式および形式の順列において達成する

ことができる。これらの形式には、いくつかの共通する原則がある。例えば、獲得または向上すべき特性と同様、改変の標的も種々の用途に応じて変更される。特性を獲得するまたは特性を向上させるための候補標的の例としては、宿主生物に導入した際に免疫原性および／または毒素産生活性を示すタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

【0031】

前記方法では、出発標的の少なくとも2種の変異体形態を使用する。候補基質の変異体形態は、互いに実質的な配列類似性または二次構造類似性を示しうるが、同時に、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つの位置が異なるはずである。形態間の最初の多様性は、自然に変異した結果である場合もあり(例えば、様々な変異体形態(相同体)が生物の様々な個体または株から得られる)、あるいは、同一生物に由来する関連配列(例えば、対立遺伝子変異体)または異なる生物に由来する相同体(種間変異体)を構成する場合もある。

あるいは、最初の多様性を誘導することもできる。例えば、誤りがちのPCR、もしくはプルーフリーディング活性を欠くポリメラーゼ(Liao (1990) Gene 88:107-111を参照)の使用といった、第1変異体形態の誤りがちの転写によって、またはミューテーター株(ミューテーター宿主細胞については以下に詳述するが、一般には周知である)中での第1形態の複製によって、変異体形態を作製することができる。ミューテーター株としては、ミスマッチ修復の機能に欠陥がある任意の生物の任意の突然変異体が挙げられる。これらには、mutS、mutT、mutH、mutL、ovrD、dcm、vsr、umuC、umuD、sbcB、recJ等の突然変異体遺伝子産物が含まれる。機能の欠陥は、遺伝子突然変異、対立遺伝子置換、小さな化合物等の試薬の添加もしくはアンチセンスRNAの発現による選択的阻害、または他の技術によって行うことができる。注目した遺伝子の機能を欠陥させてもよいし、任意の生物の相同遺伝子の機能を欠陥させてもよい。最初の多様性を生み出す他の方法としては当業者に周知のものが挙げられ、例えば、化学的変異原または他の変異原による核酸処理法、自然突然変異による方法、および核酸を含む細胞内での誤りガリの修復系(例えば、SOS)の誘導による方法が挙げられる。基質間の最初の多様性は、ライブラリーを構築するための再集合(および／または本明細書に記載

の1以上の更なる定方向進化法)の後続の工程で著しく増加する。

【0032】

免疫原性に関与する特性

ポリヌクレオチド配列(該ポリヌクレオチドによってコードされる抗原の免疫原性に対して陽性または陰性に作用し得る)は、抗原遺伝子全体に散在している場合が多い。これらの因子のいくつかを本明細書中で概説する。確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を使用して抗原をコードするポリヌクレオチドの様々な形態を再集合させ(および/または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付し)、向上した免疫反応を誘導し得る抗原をコードするキメラポリヌクレオチドを選択することにより、抗原の免疫原性に陽性に作用する配列が主として得られる。抗原の免疫原性に陰性に作用する配列は排除される。関与する特定の配列は判明していなくてもよい。

本発明は、遺伝的ワクチンベクター上に存在する際に、直接または間接的に(即ち、ポリペプチドをコードすることによって)免疫反応を調節し得るポリヌクレオチド配列の取得方法を提供するものである。別の実施形態では、本発明は、抗原の輸送および提示を最適化する方法を提供する。本発明の方法を用いて得られる最適化された免疫調節性ポリヌクレオチドは、遺伝的ワクチンを含むワクチンとの併用に特に適している。遺伝的ワクチンの利点の一つは、サイトカイン、同時刺激性分子、および抗原の輸送と提示を向上させる分子といった免疫調節性分子をコードする遺伝子を、遺伝的ワクチンベクターへ組み込みうることである。これにより、遺伝的ワクチンによって発現された抗原に対して誘導される免疫反応を調節する機会が得られる。

【0033】

ライブラリーの作製、ライブラリーのスクリーニング、および特性を向上させた組換え核酸の使用による、より有効な遺伝的ワクチンに使用するための成分の取得

更なる実施形態では、本発明は、所望の免疫反応特性を遺伝的ワクチンへ賦与するのにより有効な遺伝的ワクチン(多成分ワクチンを含む)に使用するための成

分を取得する方法を提供する。この方法は、組換え核酸ライブラリーの作製と前記ライブラリーのスクリーニングを含み、所望の特性を遺伝的ワクチンへ賦与する能力が増大したライブラリーメンバーを同定するものである。特性を向上させた組換え核酸は、直接ポリヌクレオチドとして、または成分核酸の発現によって得られるタンパク質として、遺伝的ワクチンの成分として使用できる。

【0034】

向上の目標

獲得または向上させようとする特性または特徴は多様であり、基質の選択に当然依存する。遺伝的ワクチンの場合、向上の目標としては、より高い力価、より安定的な発現、安定性の向上、より高い特異性ターゲティング、組込み頻度の増減、ベクターもしくはその発現産物の免疫原性の低下、抗原の免疫原性の上昇、遺伝子産物のより高い発現等が挙げられる。最適化が望まれる他の特性としては、特定の用途に対して最も有効となるよう免疫反応を調整することが挙げられる。遺伝的ワクチン成分の例を本明細書中で説明、記載および／または引用する(参照により組み入れられるものも含む)。2つ以上の成分を1つのベクター分子に含ませてもよく、または、各成分を別々の分子として遺伝的ワクチン製剤に含ませてもよい。

【0035】

配列再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)は、いくつかの共通する原則を共有する様々な形式によって達成し得る

本発明の方法では、核酸の少なくとも2種の変異体形態を再集合させて(および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付して)組換え核酸ライブラリーを作製し、次いでこのライブラリーをスクリーニングし、特定のワクチン特性について最適化された組換え成分を少なくとも1つ同定する。多くの場合、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)と選択を1ラウンド行えば向上が達成される。配列再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)は、以下に詳述するように、多くの種々の形式および形式の順列で達成することができる。これらの形式には、いくつかの共通する原則がある。典型的には、互いに多少の配列同一性を有するが、突然変異

の存在位置が異なる核酸分子ファミリーを、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の基質として使用する。再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)は、いずれの所定のサイクルでも、in vivoまたはin vitroにて細胞内または細胞外で行うことができる。更に、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)によって得られる多様性は、突然変異誘発の既存方法(例えば、誤りがちのPCRもしくはカセット突然変異誘発)を、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の基質または産物のいずれかへ適用することで任意のサイクルで増加させることができる。場合によっては、配列の様々な変異体形態(生物の種々の個体もしくは株由来の相同体として)、または同一生物に由来する関連の配列(対立遺伝子変異体として)を使用した場合と同様、in vivoまたはin vitro再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を1サイクル行っただけで、新規のまたは向上した特性もしくは特徴が得られる。しかしながら、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の連続サイクルを必要とする反復配列再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を利用して、所望の特性を更に向上させたり、新規な(すなわち「別の」)特性を誘導したり、あるいは分子の多様性を更に生み出したりすることもできる。

目下好適な実施形態では、最適化された組換え抗原をコードするポリヌクレオチドに分子戻し交雑(molecular backcrossing)を行い、これにより実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させたキメラ／突然変異体を、最適化された免疫反応を示す表現型にとって重要な突然変異を保持しながらも、親または野生型配列に戻すように育種(breed)する手段を得ている。中立突然変異を除去する以外にも、分子戻し交雑を利用して、改良変異体に含まれる多くの突然変異のうち、改良表現型に対して最も寄与するものを特性決定することもできる。このようなことは、効率的なライブラリー様式では他のいずれの方法によっても達成は不可能である。戻し交雑は、改良配列を何モルも過剰な量の親配列と(本明細書に記載の他の定方向進化法と任意に組み合わせて)再集合させることで行う。

確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を使用し、様々な用途に対する各種特性を獲得または向上させるために多様な基質を使用して組換え核酸ライブラリーを取得する

【0036】

組換えライブラリーの作製

本発明には、ポリヌクレオチドの組換えライブラリーを作製し、続いてこのライブラリーをスクリーニングして所望の特性を示すライブラリーメンバーを同定することが含まれる。組換えライブラリーは、各種方法のいずれかを使用して作製することができる。

基質間の最初の多様性

再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)に使用する基質核酸は、特定の用途に応じて変更することができる。例えば、核酸結合ドメインまたは細胞特異的受容体に対するリガンドをコードするポリヌクレオチドを最適化しようとする場合には、核酸結合ドメインまたは細胞特異的受容体に対するリガンドの全部または一部をコードする核酸の様々な形態を、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)に付す。

目下好適な実施形態では、確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を利用して組換え核酸ライブラリーを得ている。本明細書に記載の確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合では、特定の特性を媒介する機構について詳細が判明していなくとも、所望の特性を最適化することができる。この改変、即ち進化のための基質は、獲得または向上させるべき特性と同様、種々の用途に応じて変更する。特性の獲得または向上のための候補基質の例としては、遺伝的ワクチンの接種に使用されるウイルス性ベクターおよび非ウイルス性ベクター、並びに免疫反応の特定の態様の媒介に関与する核酸が挙げられる。この方法には、出発基質の少なくとも2種の変異体形態が必要である。候補成分の変異体形態は、相互に実質的な配列類似性または二次構造類似性を示

しうるが、同時に、少なくとも2つの位置で異なっているはずである。形態間の最初の多様性は、自然に変異した結果である場合もあり(例えば、様々な変異体形態(相同体)が生物の種々の個体または株から得られる(地理学的変異体を含む)、または、同一生物に由来する関連の配列(例えば、対立遺伝子変異)を構成する場合もある。あるいは、最初の多様性を誘導することもできる。例えば、誤りがちのPCR、もしくはプルーフリーディング活性を欠くポリメラーゼ(Liao (1990) Gene 88:107-111を参照)の使用といった第1変異体形態の誤りがちの転写によって、またはミューテーター株(ミューテーター宿主細胞については以下に詳述する)中での第1形態の複製によって、第2変異体形態を生み出すことができる。基質間の最初の多様性は、反復配列再集合(および/または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の後続の工程で著しく増加する。

再集合(および/または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)サイクル後のスクリーニングまたは選択(in vitroおよびin vivo再集合(および/または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)サイクル後のスクリーニング)。

確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行って、組換え抗原をコードするポリヌクレオチドのライブラリーを得たら、このライブラリーを選択および/またはスクリーニングに付し、病原性因子に対する免疫反応の誘導能が向上した抗原性ペプチドをコードするライブラリーメンバーを同定する。免疫反応誘導能が向上したポリペプチドをコードする、実験的に作製したポリヌクレオチドの選択およびスクリーニングには、in vivo法およびin vitro法があるが、これらの方法を組み合わせることが最も多い。例えば、典型的な実施形態では、組換え核酸ライブラリーのメンバーを個々にまたはプールとして採取する。このクローンは直接分析にかけてもよく、または、発現させて対応するポリペプチドを産生させてもよい。目下好適な実施形態では、in vitroスクリーニングを行い、in vivo試験にとって最も良好な候補配列を同定する。あるいは、ライブラリーをin vivoでのチャレンジ試験に直接かけることもできる。該分析では、核酸自体(例えば、遺伝的ワクチンとして)、または核酸によってコードされ

るポリペプチドを使用することが可能である。典型的な手順の概略図を本明細書中で説明、記載および／または引用する(参照により組み入れられるものも含む)。in vitro法およびin vivo法の両者を以下に詳述する。

再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を1サイクル行った後、通常、所望の特性または特徴を有する分子のスクリーニングまたは選択を少なくとも1サイクル行う。再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の1サイクルをin vitroで行う場合には、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の産物、即ち組換えセグメントを、スクリーニング工程前に細胞中へ導入してもよい。スクリーニング前に、組換えセグメントを適切なベクターまたは他の調節性配列に連結することも可能である。

あるいは、in vitroで産生された再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の産物を、スクリーニング前にウイルス(ウイルスでは例えばバクテリオファージ)としてパッケージングしてもよい。再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)をin vivoで行う場合には、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の産物を、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を行った細胞中でスクリーニングしてもよい。他の用途では、スクリーニング前に、細胞から組換えセグメントを抽出し、任意にウイルスとしてパッケージングしてもよい。

【0037】

再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の産物とは異なる役割を有する成分配列

スクリーニングまたは選択の性質は、獲得すべき特性もしくは特徴、または向上すべき特性もしくは特徴に依存するものであり、以下に多数の例を記載する。通常、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の特定の産物(組換えセグメント)に、出発基質と比べて特性もしくは特徴を新たに獲得させたり、特性もしくは特徴を向上させたりする分子学的根拠を理解することは必要ではない。例えば、遺伝的ワクチンベクターは多くの成分配列を含む可

能性があり、各配列は意図する役割が異なっている(例えば、コード配列、調節配列、ターゲティング配列、安定性賦与配列、免疫調節性配列、抗原提示に作用する配列、および組み込みに作用する配列)。これらの成分配列の各々は同時に変異および再集合させる(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法に付す)ことができる。次いで、例えば、標的細胞中の増加したエピソードを維持する組換えセグメントについてスクリーニング／選択を行えばよく、このような向上がベクターの個々の成分配列のいずれかと関わっている必要はない。

【0038】

細菌細胞における初期スクリーニングと哺乳動物細胞における後期スクリーニングとの対比

所望の特性に使用される特定のスクリーニングプロトコルに応じて、トランスフェクション効率が高く、かつ培養が容易な細菌細胞でスクリーニングの初期ラウンドを行ってもよい。しかしながら、特に免疫原性活性を試験する場合には、ライブラリー発現とスクリーニングに試験動物を使用する。後期ラウンド、および細菌細胞でスクリーニングを実施できない他のタイプのスクリーニングは、通常、哺乳動物細胞(使用を意図した環境に近い環境で使用するために選択した細胞)にて行い、使用を意図した環境に近い環境で使用するための組換えセグメントを最適化する。スクリーニングの最終ラウンドは、使用を意図した細胞型(例えば、ヒト抗原提示細胞)で行うことができる。場合によっては、例えば、患者における免疫原性の問題を最小限に押さえる観点から、治療対象の患者から該細胞を取得することができる。一部の方法では、遺伝的ワクチンベクターを治療に用いること自体を、スクリーニングのラウンドとして利用することができる。即ち、ある患者の目的の標的細胞に連続的に取り込まれ、かつ／または発現された遺伝的ワクチンベクターを、該標的細胞から回収して別の患者の治療に使用する。ある患者の目的の標的細胞から回収された遺伝的ワクチンベクターは、特異的取込み、免疫原性、安定性等について特性もしくは特徴を向上または新たに獲得するよう進化したベクター、即ち、反復再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)によって改変されたベクターに富んでいる。

組換えセグメントのサブ集団の同定

スクリーニングまたは選択工程によって、遺伝的ワクチンの接種に有用な所望の特性を新たに獲得または向上させるように進化した組換えセグメントのサブ集団が同定される。スクリーニングに応じて、組換えセグメントは、細胞成分として、ウイルスもしくは他のベクターの成分として、または遊離の形態でスクリーニングすることができる。再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の各ラウンドの後に、スクリーニングまたは選択を2ラウンド以上行うことができる。

【0039】

再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の第2ラウンド

特性を更に向上させることが望まれる場合には、スクリーニング／選択の第1ラウンドを経た組換えセグメントの少なくとも1つ、通常は前記セグメントの集り(collection)を、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の更なるラウンドに付す。これらの組換えセグメントは、相互に、または元の基質もしくはその更なる変異体に該当する外来のセグメントと再集合させる(および／または本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付す)ことができる。再度、*in vitro*または*in vivo*にて再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を行ってもよい。先のスクリーニング工程で所望の組換えセグメントが細胞成分として同定される場合には、その成分を*in vivo*にて更に再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)に付すか、または*in vitro*にて更に再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)に付すか、あるいは*in vitro*再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を1ラウンド実施する前に単離することができる。逆に、先のスクリーニング工程で所望の組換えセグメントが剥き出しの状態またはウイルスもしくは他のベクターの成分として同定される場合には、これらのセグメントを細胞へ導入して*in vivo*再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)を1ラウンド行うことができる。再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の第2ラウンド

ドでは、どのように実施されるかに関わりなく、先のラウンドで生成した組換えセグメントに比べて多様性の増加した組換えセグメントが更に生成する。

組換えセグメントを十分に進化させるための再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)／スクリーニングの更なるラウンド

再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)の第2ラウンドを行った後、第1ラウンドについて上述した原理に従ってスクリーニング／選択の1ラウンドを更に行うことができる。スクリーニング／選択のストリレンジェンシーはラウンド間で上昇させることができる。また、1つよりも多くの特性の向上が望まれる場合、または1つよりも多くの新たな特性の獲得が望まれる場合には、スクリーニングの性質とスクリーニングすべき特性についてもラウンド間で変更してもよい。

次いで、組換えセグメントが十分に進化して、所望の特性もしくは機能が新たに獲得されるか、または向上するまで、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)とスクリーニングのラウンドを更に行うことができる。

本発明の実施には、組換え核酸の構築とトランスフェクトした宿主細胞における遺伝子の発現が必要である。これらの目的を達成する分子クローニング技術は当該技術分野で公知である。発現ベクター等の組換え核酸の構築に適した多種多様なクローニング法およびin vitro増幅法は当業者には周知である。突然変異誘発等の本発明に有用な分子生物学的技術を記載した一般的なテキストとしては、BergerおよびKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology第152巻、Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrookら, Molecular Cloning-A Laboratory Manual(第2版)第1～3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989(「Sambrook」)並びに Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubelら編, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.との合併企業(1998年より追加)(「Ausubel」)が挙げられる。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、Q-レプリカーゼ増幅およびRNAポリメラーゼが介在する他の技術(例えばNASBA)等のin vitro増幅法によ

って当業者が十分実施し得る技術の例は、Berger、SambrookおよびAusubel並びにMullisら(1987)米国特許第4,683,202号；PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innisら編) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990)(Innis); Antheirn & Levinson (1990年10月1日) C & EN 36-47; The Journal of NIH Research (1991) 3, 81-94; (Kwohら(1989) Proc. Natl. Acad Sci. USA 86, 1173; Guatelliら(1990) Proc. Natl. Acad Sci. USA 87, 1874; Lowellら(1989) J Clin. Chem 35, 1826; Landegrenら(1988) Science 241, 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8, 291-294; WuおよびWallace (1989) Gene 4, 560; Barringerら(1990) Gene 89, 117,並びにSooknananおよびMalek (1995) Biotechnology 13:563-564に提供されている。

in vitroで増幅した核酸をクローニングする改良法は、Wallaceら米国特許第5,426,039号に記載されている。PCRによって大きな核酸を増幅する改良法はChengら(1994)Nature 369:684-685およびその中で引用されている参考文献に要約されており、それにより最大40kbのPCRアンプリコンが生成する。当業者であれば、逆転写酵素とポリメラーゼを使用して、本質的に任意のRNAを、制限消化、PCR伸長および配列決定に適した二本鎖DNAへ変換できることは明らかであろう。Ausubel, SambrookおよびBerger(全て前掲)を参照されたい。

例えば、in vitro増幅法でプローブとして使用するオリゴヌクレオチド、遺伝子プローブとして使用するオリゴヌクレオチド、または再集合標的(例えば、合成遺伝子もしくは遺伝子セグメント)として使用するオリゴヌクレオチドは、典型的には、BeaucageおよびCaruthers (1981) Tetrahedron Letts., 22(20):1859-1862によって記載された固相ホスホルアミダイトトリエステル法に従って、例えば、Needham-VanDevanterら(1984) Nucleic Acids Res., 12:6159-6168に記載されているような自動合成機を使用して化学的に合成される。オリゴヌクレオチドは調製を依頼することもでき、当業者に公知の様々な市販元へ発注することもできる。

【0040】

実際に、本質的に、既知の配列を有する任意の核酸を、The Midland Certified Reagent Company (mcrc@oligos.com)、The Great American Gene Company (ht

tp://www.genco.com)、ExpressGen Inc. (www.expressgen.com)、Operon Technologies Inc., (Alameda, CA)等の様々な市販元およびその他多くの市販元のうち任意の所へ発注することができる。同様に、ペプチドおよび抗体も、PeptidoGenic (pkim@ccnet.com)、HTI Bio-products, Inc. (http://www.htibio.com)、BMA Biomedicals Ltd (U.K.)、Bio-Synthesis Inc.等の様々な市販元およびその他多くの市販元のうち任意の所へ発注することができる。

最小限の選択サイクル数で多数の突然変異を可能にし、かつ従来の方法で必要とされた膨大な分析および計算を必要としない再集合(および／または本明細書に記載の更なる定方向進化法)並びにスクリーニング／選択の実施には様々な形式が利用可能である

スクリーニング用の組換え核酸ライブラリーの作製には、多くの異なる形式が利用可能である。一部の実施形態では、本発明の方法には、再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)とスクリーニングまたは選択を実施して、個々の遺伝子、プラスミドもしくはウイルス全体、多重遺伝子クラスター、またはゲノム全体をも「進化」させることが必要である(Stemmer (1995) Bio/Technology 13:549-553)。再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)とスクリーニング／選択のサイクルを繰り返して実施し、目的の核酸を更に進化させることができる。このような技術では、ポリペプチド工学の従来の方法で必要とされた膨大な分析および計算は不要である。再集合の結果、(有性複製の際に生じるような)従来の対ごとの組換え事象(pairwise recombination event)とは対照的に、最小限の選択サイクル数で多数の突然変異の組み合わせが可能となる。このように、本明細書に記載の定方向進化技術は、任意のまたは全ての突然変異間に再集合(任意に本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法と併用)をもたらす点で特に有利であり、これにより、突然変異の様々な組み合わせが、所望の結果にどのように作用し得るかを探索する、非常に迅速な方法が得られる。しかしながら、場合によっては、配列再集合(および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法)にとっては不要であるものの、技術を改良する機会をもたらす構造および／または機能に関する情報を入手することができる。

免疫原性を向上させ、特異性を広げるための4つの異なるアプローチ：単一遺伝子上での再集合(任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と併用)、相同性遺伝子の配列比較、ゲノム全体の再集合、ポリペプチドをコードする遺伝子のコドン
改変

確率論的ポリヌクレオチド再集合法(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合法は、免疫原性を向上させ、特異性を広げるために、少なくとも4つの異なるアプローチのうちの1つ以上を含むことができる。第1に、確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的な合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合は、単一遺伝子上で行うことができる。第2に、既知の相同遺伝子との配列比較によって相同性の高い遺伝子を複数同定できる。これらの遺伝子を、所望の活性を有する組換え体を選択するために、相同体のファミリーとして合成し、かつ実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させることができる。実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させた遺伝子を、大腸菌、酵母、植物、真菌、動物の細胞といった適切な宿主細胞に導入し、本明細書に記載の方法によって所望の特性を有するものを同定することが可能である。第3に、ゲノム全体の再集合を行って、所望の特性を遺伝的ワクチンに賦与しうる遺伝子を(他のゲノム核酸と共に)シャフリングすることが可能である。ゲノム全体を再集合させるアプローチの場合には、どの遺伝子が実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化するのかを同定することは必ずしも必要ではない。その代わり、例えば細菌細胞またはウイルスゲノムを組み合わせて、実験的に(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)進化させ、核酸自体でまたはポリペプチドをコードすることによって、本明細書に記載のアッセイのいずれかで測定した際に免疫反応の誘導能の向上を示す組換え核酸を獲得する。第4に、ポリペプチドをコードする遺伝子は、天然に存在するいずれの遺伝子にも見られない突然変異による多様性を生み出すことができるようにコドンを

改変しうる。

【0041】

配列再集合(および/または本明細書中に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)の様式および実例、並びにその他の方法の様式および実例に関する参考文献

本明細書に記載のポリヌクレオチド再集合、遺伝子部位飽和突然変異誘発、断続的合成(interrupted synthesis)、および更なる定方向進化法の様式例および実例については、本発明者らおよび共同研究者らによる、特許許可された出願および同時係属中の出願(米国特許第5,965,408号(1999年10月12日発行)、同第5,830,696号(1998年11月3日発行)および同第5,939,250号(1999年8月17日発行)を含む)に記載されている。

実験的に作製されたポリヌクレオチドのライブラリーの取得方法の別法、並びに/または確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャuffling(shuffling)および断続的合成)並びに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を含む定方向進化の基質として使用される多様な核酸の取得方法の別法として、例えば、W098/42727; Smith, Ann.Rev.Genet.19:423-462(1985); BotsteinおよびShortle, Science 229:1193-1201(1985); Carter, Biochem.J237:1-7(1986); Nucleic acids & Molecular Biology, EcksteinおよびLilley編, Springer Verlag, Berlin (1987)に掲載されるKunkel, "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" が挙げられる。上記方法としては、オリゴヌクレオチドにより指令された突然変異誘発(ZollerおよびSmith, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500 (1982), Methods in Enzymol. 100:468-500 (1983)、およびMethods in Enzymol. 154:329-350(1987))、ホスホチオエート修飾型DNA突然変異誘発(Taylorら, Nucl.Acids Res.13:8749-8764(1985); Taylorら, Nucl.Acids Res. 13:8765-8787 (1985); NakamayeおよびEckstein, Nucl. Acids Res. 14:9679-9698 (1986); Sayersら, Nucl. Acids Res. 16:791-802 (1988); Sayersら, Nucl. Acid s Res. 16:803-814 (1988))、ウラシル含有鋳型を用いた突然変異誘発(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)およびKunkelら, Methods in Enzymol. 154:367-382); ギャップド(gapped)二本鎖DNAを用いた突然変異誘発(Kramerら, Nucl. Acids Res. 12:9441-9456(1984); KramerおよびFritz, Methods

in Enzymol. 154:350-367 (1987); Kramerら, Nucl. Acids Res. 16: 7207 (1988)); 並びに Fritzら, Nucl. Acids Res. 16:6987-6999(1988))が挙げられる。別の適した方法としては、点ミスマッチ修復(Kramerら, Cell 38:879-887(1984))、修復欠損(repair-deficient)宿主株を用いた突然変異誘発(Carterら, Nucl. Acids Res. 13:4431-4443(1985); Carter, Methods in Enzymol. 154:382-403 (1987))、欠失型突然変異誘発(EghtedarzadehおよびHenikoff, Nucl. Acids Res. 14:5115 (1986))、制限-選択および制限-精製(Wellsら, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317:415-423(1986))、全遺伝子合成による突然変異誘発(Nambiarら, Science 223:1299-1301(1984); SakamarおよびKhorana, Nucl. Acids Res. 14:6361-6372(1988); Wellsら, Gene 34:315-323(1985); 並びにGrundstromら, Nucl. Acids Res. 13:3305-3316(1985)) が挙げられる。突然変異誘発用キットは市販されている(例えば、Bio-Rad、Amersham International、Anglian Biotechnology)。

出発材料に対して多様性を高めるために再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)を行うには、出発材料は互いと少なくとも2ヌクレオチド位置において異ならなければならない

再集合法は、相互に実質的な配列同一性(即ち、少なくとも約30%、50%、70%、80%または90%の配列同一性)を概して示すが、特定の位置においては相互に異なる少なくとも2つの基質から出発する。この違いは、例えば、置換、挿入および欠失など任意の種類の突然変異によるものである。異なるセグメントは約5~20箇所において相互に異なることが多い。出発材料に対して多様性を高めるために再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)を行うには、出発材料は相互に少なくとも2ヌクレオチド位置において異ならなければならない。つまり、もし2つの基質しかない場合、少なくとも2つの分岐(divergent)位置がなければならない。もし3つの基質がある場合、例えば、1つの基質は2つ目の基質とある単一の位置において異なり、2つ目は別の単一の位置において3つ目と異なりうる。出発DNAセグメントは、互いの天然変異体(例えば、対立遺伝子または種変異体)でもよい。また、セグメントは、ある程度の構造関連性(通常、機能関連性)を示す非対立遺伝子(例えば、エルジニアV抗原(

Yersinia V-antigens)ファミリーなどの同じスーパーファミリーに属する異なる遺伝子)に由来するものでもよい。また、出発DNAセグメントは、互いの誘導変異体であってもよい。例えば、一方のDNAセグメントは、他方のセグメントをerror-prone PCR複製に供することにより生成されてもよい。核酸を、化学変異原もしくは他の変異原で処理してもよいし、または変異原カセットの置換により処理してもよい。また、誘導型変異体は、一方(もしくは両方)のセグメントを変異原株内で増殖させることにより生成してもよいし、または細胞内で誤りがちな修復系を誘導することにより生成してもよい。

【0042】

出発材料を形成する異なるセグメントは関連性を有し、その長さは同等であってもなくてもよい

これらの状況において、厳密に言えば、第2のDNAセグメントは、単一のセグメントではなく、関連性のあるセグメントからなる大きなファミリーである。出発材料を形成する異なるセグメントは、同じ長さのものであるか、または実質的に同じ長さのものである場合が多い。しかし、この場合に限らない。例えば、一方のセグメントは他方のセグメントの部分配列であってもよい。これらのセグメントは、ベクターなどの大きな分子の一部であってもよいし、単離形態であってもよい。

出発DNAセグメントを再集合させて(および/または本明細書に記載の1つ以上の定方向進化法に供して)、完全長コード配列および任意の必須調節配列を含む、大きさの異なる組換えDNAセグメントのライブラリーを作製する

本明細書に記載の任意の配列再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)の様式により、出発DNAセグメントを再集合して(および/または本明細書に記載の1つ以上の定方向進化法に供して)、組換えDNAセグメントの多様なライブラリーを作製する。このようなライブラリーは、 10^5 未満から 10^5 、 10^9 、 10^{12} 以上のメンバーまでその大きさの範囲が幅広い。一部の実施形態では、出発セグメントおよび作製した組換えライブラリーは、完全長コード配列、および発現に必要な任意の必須調節配列(プロモーターおよびポリアデニル化配列など)を含む。別の実施形態では、ライブラリー中の組換えDNAセグメントは、

スクリーニング/選択を行う前に、発現に必要な配列を提供する共通のベクターに挿入してもよい。

【0043】

再集合PCRを用いて、遺伝子などの完全長核酸鋳型に別個に進化した複数のセグメントを集合させる

核酸配列における突然変異を組み換えるための更なる方法では、「再集合PCR」を使用する。この方法は、遺伝子などの完全長核酸鋳型に別個に進化した複数のセグメントを集合させるために使用できる。本方法は、都合の良い突然変異体のプールが、先の研究により既知である場合、または当該分野で公知の任意の突然変異誘発技術(PCR突然変異誘発、カセット突然変異誘発、ドーピング(doped)オリゴ突然変異誘発、化学的突然変異誘発、もしくはミューテーター株におけるDNA鋳型のin vivo増殖など)により作製されてもよい突然変異体をスクリーニングして同定されている場合に行われる。目的の核酸配列のセグメントを規定する境界線は、遺伝子間領域、イントロン、または目的の突然変異がないと思われる遺伝子領域に存在することが好ましい。

目的の核酸配列のセグメントのPCR増幅のために、2つのセグメントの接合部において、典型的に約10~100ヌクレオチドにわたって重なるようにオリゴを合成する

目的の核酸配列のセグメントのPCR増幅のためにオリゴヌクレオチドプライマー(オリゴ)を合成する際に、オリゴヌクレオチドの配列が2つのセグメントの接合部に重なることが好ましい。この重複領域は、典型的に約10~100ヌクレオチドの長さである。このようなプライマーのセットを用いてそれぞれのセグメントを増幅する。次いで、PCR産物を、本明細書に記載のような集合プロトコールにより「再集合」させて、非確率論的に生成された核酸構造要素および/または無作為に断片化された遺伝子を集合させる。簡単に言うと、集合プロトコールによれば、例えばゲル電気泳動またはサイズ排除クロマトグラフィーにより、まずPCR産物をプライマーから精製する。精製生成物を混合し、ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)、並びに適切な緩衝塩の存在下、かつ追加プライマーの不在下(「自己プライミング(self-priming)」)にて、約1~10サイクルの

変性、再アニーリングおよび伸長に供する。その後、遺伝子に隣接するプライマーを用いたPCRにより、(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により)完全に再集合されて実験的に進化した遺伝子の収量を増幅する。

PCRプライマーを使用して、目的の遺伝子に変異を導入し、核酸配列の相同体を配列決定することにより、目的の部位における変異をスクリーニングまたは選択する

更なる実施形態では、目的の遺伝子に変異を導入するために、目的の核酸配列のセグメントを増幅するためのPCRプライマーを以下に記載するように使用する。核酸配列の目的の部位における突然変異は、スクリーニングもしくは選択、および核酸配列の相同体を配列決定することなどにより同定される。

(野生型または突然変異型情報をコードする)オリゴヌクレオチドPCRプライマーをPCRに使用して、該情報の順列(permutations)をコードする完全長遺伝子のライブラリーを作製する(代替となるスクリーニングまたは選択方法が費用および手間がかかるか、または非現実的である場合)

次いで、目的の部位にある野生型または突然変異型情報をコードするオリゴヌクレオチドPCRプライマーを合成する。次に、これらのプライマーを、PCR突然変異誘発に使用して、指定位置における野生型および突然変異型情報の順列(permutations)をコードする完全長遺伝子からなるライブラリーを作製する。この技術は、スクリーニングまたは選択方法が費用および手間がかかり、または目的の突然変異体の遺伝子を配列決定し、変異原オリゴヌクレオチドを合成する費用が非現実的な場合に、典型的に都合がよい。

【0044】

2.3. 遺伝的ワクチン投与に使用されるベクター

確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合による、遺伝的ワクチンおよび成分の進化

本発明は、多成分遺伝的ワクチン、および核酸仲介型免疫調節に使用するために遺伝的ワクチンの能力を改善する遺伝的ワクチン成分の取得方法を提供する。

確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合による遺伝的ワクチンおよび成分の進化のための一般的なアプローチを、本明細書中で説明している。

複製起点の含有は、患者に投与する前に十分量のベクターを得るために有用であるが、ベクターが宿主染色体DNAに組み込まれるように設計されている場合、またはベクターが宿主mRNAもしくはDNAに結合するように設計されている場合には望ましくないかもしれない

遺伝的ワクチンベクターは、通常、該ベクターを導入された哺乳動物細胞および生物に対して医療上有用な表現型効果をもたらす外因性ポリヌクレオチドである。ベクターは、複製起点を有していても有していなくてもよい。例えば、患者に投与する前に十分量のベクターを得るためにベクターを増殖させるには、ベクターが複製起点を含むことが有用である。ベクターが、宿主染色体DNAに組み込まれるように設計されている場合、ベクターが宿主mRNAもしくはDNAに結合するように設計されている場合、または宿主における複製が望ましくない場合、投与前に複製起点を取り除いても良いし、またはベクター作製に使用する細胞においては機能するが標的細胞では機能しない起点を使用してもよい。しかし、本明細書に記載する状況も一部含まれる特定の状況においては、遺伝的ワクチンベクターが適切な宿主細胞で複製可能であることが好ましい。

確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合により改変される核酸を、遺伝的ワクチン投与に使用するウイルスベクターに組み込む

遺伝的ワクチン投与に使用されるベクターは、ウイルスベクターでも非ウイルスベクターでもよい。ウイルスベクターは、通常、ウイルスの成分として患者に導入される。本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合法(例えば、ポリヌクレオチドのシャフリングおよび断続的合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法により改変した核酸を組み込むことのできる例示のウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルス系ベクター(Cantwell(1996) Blood 88:4676-4683; Ohashi(1997) Proc. Natl. Acad. Sci USA 94:1287-1292)、エプスタイン

-バーウイルス系ベクター(Mazda(1997) J.Immunol. Methods 204:143-151)、アデノウイルス随伴ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター(Strong(1997) Gene Ther. 4:624-627)、単純ヘルペスウイルスベクター(Kennedy (1997) Brain 120:1245-1259)並びにレトロウイルスベクター(Schubert (1997) Curr. Eye Res. 16:656-662)が挙げられる。

【0045】

DNAを細胞に導入するためのin vivoで有用な方法(細胞膜に融合するリポソームまたはエンドサイトーシスによって取込まれるリポソームを使用してネイキッドDNAを送達する；細胞を膜透過性にして、DNA結合タンパク質を使用して細胞に輸送する；DNAで被覆された粒子を皮膚衝撃により機械的に送達する)

非ウイルスベクター(典型的にdsDNA)は、ネイキッドDNAとして、または導入増強ビヒクル(受容体認識タンパク質、リポソーム、リポアミンまたは陽イオン性脂質)を伴って導入できる。このDNAは、当該分野で周知の様々な方法を用いて細胞に導入できる。例えば、ネイキッドDNAを、細胞膜と融合するリポソーム、またはエンドサイトーシスによって取り込まれる(endocytose)(つまり、リポソームに結合した、またはDNAに直接結合した、細胞の表面膜タンパク質受容体に結合するリガンドを利用してエンドサイトーシスを生じさせる)リポソームを用いて送達できる。あるいはまた、細胞を膜透過性にして、宿主細胞を傷つけることなく細胞へのDNA輸送を増強させることも可能である。細胞にDNAを輸送することが知られているDNA結合タンパク質(例えば、HBGF-1)を使用することもできる。更に、DNAで被覆された金または他の粒子の皮膚衝撃により、機械的手段(例えば、圧力)でDNAを送達してもよい。細胞にネイキッドDNAを送達するための上記方法は、in vivoにおいて有用である。例えば、特にリポソーム表面が標的細胞に特異的なリガンドを担持している場合、あるいはまたリポソームが特定の器官に優先的に方向づけられている場合に、リポソームを使用することにより、標的細胞/器官にDNAをin vivo導入できる。

【0046】

2.3.1. ウイルスベクター

ウイルスベクターの構造は、改変ウイルスゲノムおよびそれを包むコート構造(

遺伝的ワクチン投与用に設計されたベクターの中のウイルス核酸に応じて様々に変えることができる構造)からなることが多い

レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルスなどの種々のウイルスベクターが、遺伝的ワクチン投与に一般的に使用されている。ウイルスベクターは、2つの成分(改変ウイルスゲノムおよびそれを包むコート構造)からなる場合が多い(概要については、Smith(1995) *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 807-838を参照)。ただし、ウイルスベクターは、ネイキッド形態で導入されたり、またはウイルスタンパク質以外のタンパク質で被覆されて導入されることもある。最新のウイルスベクターは、野生型ウイルスに類似したコート構造を有する。この構造により、ウイルス核酸がパッケージングおよび保護され、標的細胞に結合して侵入する手段が得られる。対照的に、遺伝的ワクチン投与のために設計されたベクターの中のウイルス核酸は、様々に変化させることができる。このような変化の最終目的は、例えば、利用可能なパッケージングまたはヘルパー細胞においてウイルスがベクター形態で増殖する能力を維持したまま、標的細胞中でのウイルス複製を増強または低減し、目的の遺伝子をコードしその適切な発現を可能にする新しい配列(例えば、抗原コード遺伝子)を取り込み、ウイルスベクター自体の免疫原性を変化させることである。ウイルスベクター核酸は、通常2つの成分(ヘルパー系における複製およびパッケージングのための必須シス作動性ウイルス配列、並びに外因性遺伝子のための転写ユニット)を含む。他のウイルス機能は、特定のパッケージングまたはヘルパー細胞系においてin transで発現されてもよい。

【0047】

2.3.1.1. アデノウイルス

アデノウイルスの正常なライフサイクルおよび増殖性感染サイクル

アデノウイルスは、線状二本鎖DNAを含むエンベロープを持たないウイルスの大きいクラスを含む。このウイルスの正常なライフサイクルには、細胞分裂は必要ではなく、許容細胞において大量のウイルスが蓄積される増殖性感染が関与する。増殖性感染サイクルは、細胞培養物中で約32～36時間かかり、前期(ウイルスDNA合成前)および後期(この間、構造タンパク質およびウイルスDNAが合成され

、集合してビリオンとなる)の2期からなる。

一般的に、アデノウイルス感染は、ヒトにおいて軽度の疾患を伴う

研究中のE3欠失型ベクター；培養細胞中での複製はE3領域を必要とせず、外因性DNA配列の挿入を可能にし、比較的大量の被コードタンパク質の一過性合成および増殖性感染が可能なベクターを産生する

アデノウイルスベクターは、レトロウイルスまたはAAVベクターよりも幾分か大きくより複雑である。これは、一部には、ほとんどの既存のベクターからはウイルスゲノムの小さな画分しか取られていないためである。もし更なる遺伝子が採取されれば、それらをin transで供給してベクターを作製することができるが、これは困難であることがこれまでに証明されている。代わりに、2つの一般的な種類のアデノウイルス系ベクターであるE3欠失型ベクターおよびE1欠失型ベクターが研究されている。実験用の野生型株(stocks)の一部のウイルスはE3領域を欠き、ヘルパー不在下で増殖できる。この能力は、E3遺伝子産物が野生型において必要でないということを意味するものではなく、ただ培養細胞における複製には必要でないことを意味する。E3領域の欠失により、外因性DNA配列が挿入可能となり、比較的大量の被コードタンパク質の一過性合成および増殖性感染が可能なベクターを産生できる。

アデノウイルスが関与する殆どの遺伝子治療用途に利用される293細胞中で増殖させたE1置換型ベクター

E1領域の欠失はアデノウイルスを不能にするが、このようなベクターを増殖させることは可能である。というのは、Ad5のE1領域を含み、E1タンパク質を構成的に発現する樹立ヒト細胞系(「293」と称される)が存在するからである。アデノウイルスが関与する最新の遺伝子治療用途では、293細胞中で増殖させたE1置換型ベクターが利用されている。

【0048】

効率的なエピソーム遺伝子導入が可能で、かつ増殖しやすいアデノウイルスベクターを、抗原送達のために局所的に皮膚に塗布すると、抗原特異的免疫反応の誘導が認められるが、宿主反応により、発現の持続時間、および一次生成ベクターが高用量であった場合に投与を繰り返す能力が限られる

アデノウイルスベクターの主な利点は、広範囲にわたる細胞および組織において効率的なエピソーム遺伝子導入が可能であり、簡単に大量増殖しやすいことである。また、アデノウイルス系ベクターは、皮膚に局部塗布して抗原を送達するためにも使用できる。皮膚への送達後、抗原特異的免疫反応の誘導が認められる(Tangら (1997) Nature 388:729-730)。主な欠点は、ウイルスに対する宿主反応が現れて、発現の持続時間、および少なくとも一次生成ベクターが高用量である場合に投与を繰り返す能力が限られることである。

本発明は、10キロベースを超える大きいDNAインサートをクローニングでき、この大きいインサートに対応するssDNAをin vitroおよびin vivoで生成できるファージミド系を初めて提供する

一実施形態では、本発明の定方向進化法を使用して、10キロベースを超える大きさのDNAインサートをパッケージングできる新規のアデノウイルス-ファージミドを構築する。また、本発明の方法を使用してプラスミドにファージ起点を組み込むことにより、ヒトアデノウイルスの36kbファミリーなどのウイルスの全ゲノムを進化できる新規のin vivo再集合またはシャフリング様式が得られる。幅広く使用されているヒトアデノウイルス5型(Ad5)は、ゲノムサイズが36kbである。高い確率で非生存組換え変異体を生じてしまうような膨大な数の改変を行わずに、この大きなゲノムをin vitroでシャフリングするのは困難である。この問題を最小限にし、Ad5の全ゲノム再集合を達成するために、アデノウイルス-ファージミドを構築した。Ad-ファージミドは、15および24キロベースの大きさのインサートを許容し、その大きさのssDNAを効果的に生成することが証明されている。更なる実施形態では、50～100kbの大きさの更に大きいDNAインサートを、本発明のAd-ファージミドに挿入し、これらの大きいインサートに対応する完全長ssDNAを生成する。このような大きいssDNAの非確率論的に生成された核酸構造要素および/または断片を生成することにより、ウイルスゲノム全体を進化させる手段、即ち、本発明の反復的再集合方法(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる反復的定方向進化法)により改変を行う手段を提供する。従って、本発明は、大きいDNAインサート(>10KB)をクローニングでき、これらの大きいインサートに対応するssDNAをin vitroおよびin vivoで生成できる独特のファージミド

系を初めて提供する。

ヒトアデノウイルスの関連血清型のゲノムを、系を用いてin vivo再集合または
シャフリングすることは、複数の遺伝子を変化させた組換えアデノウイルス変異
体の作製に有用である

国際出願第PCT/US97/17302号(公報第W098/13485)に記載のように、この独特のファージミド系を使用して、(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘導により)ヒトアデノウイルスの関連血清型のゲノムを実験的にin vivoで進化させた。まず、ゲノムDNAをファージミドベクターにクローニングし、得られたプラスミド(「Admid」と称する)を使用し、ヘルパーM13ファージを用いて一本鎖(ss)Admidファージを作製する。in vivo再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)を行うために、相同なヒトアデノウイルスのゲノムを含むssAdmidファージを使用して、F⁺MutS大腸菌細胞を高い感染多重度(MOI)で感染させた。ssDNAは、再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)酵素(RecAなど)に対してより良好な基質である。高いMOIにより、感染するssAdmid DNAのコピー間で複数の交差が存在する確率が確実に高くなる。(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘導により)実験的に進化させたアデノウイルスゲノムは、感染細胞から二本鎖Admid DNAを精製し、ヒト許容細胞系に導入してアデノウイルスライブラリーを作製することによって作られる。このゲノム再集合法は、複数の遺伝子を変化させた組換えアデノウイルス変異体を作製するのに有用である。これにより、複数遺伝子における変異の組み合わせにより生じる組換え変異表現型のスクリーニングまたは選択が可能になる。

【0049】

2.3.1.2. アデノ随伴ウイルス(AAV)

AAVは、線状一本鎖DNAを含む小さくかつ単純な非自律性ウイルスである。Muzycka, Current Topics Microbiol. Immunol. 158, 97-129 (1992)を参照。このウイルスは、複製を行うには、アデノウイルスまたはその他の特定のウイルスとの同時感染を必要とする。AAVは、該ウイルスに対する抗体が証明するようにヒト集団に広がっているが、いずれの公知疾患とも関連付けられていない。AAVのゲ

ノム構成は、2つの遺伝子(repおよびcap)のみを含み、単純明快である。ゲノムの末端は、約145ヌクレオチドの末端反復(ITR)配列を含む。

AAVの増殖は扱いにくく、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスが必要である場合が多い

AAV系ベクターは、典型的に、目的の転写ユニットに隣接するITR配列のみを含む。ベクターDNAの長さは、4680ヌクレオチドのウイルスゲノム長を大幅に超えることができない。現在、AAVベクターの増殖は扱いにくく、宿主細胞に、ベクター自体だけではなく、ヘルパー機能を得るためにrepおよびcapをコードするプラスミドも導入する必要がある。ヘルパープラスミドは、ITRを欠くために複製およびパッケージングを行うことができない。更に、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスが必要である場合が多い。

利点：非分裂細胞における長期発現

AAVベクターの潜在的な利点は、必ずしもではないがおそらくウイルスDNAが組み込まれるために、非分裂細胞において長期発現が可能と思われることである。ベクターは構造的に単純であるために、アデノウイルスよりも引き起こす宿主細胞反応が低い。

2.3.1.3. パピローマウイルス

パピローマウイルスは、扁平上皮細胞の核で複製し、小さく、エンベロープをもたない正二十面体DNAウイルスである。パピローマウイルスは、72個のカプソマーからなる球形のタンパク質コートに包まれた約8000bpの大きさの二本鎖環状DNAの単分子からなる。このようなパピローマウイルスは、感染対象の種(例えば、ウシ、ヒト、ウサギ)および種における型に基づいて分類される。50を超える異なるヒトパピローマウイルス(「HPV」)が記載されている。例えば、Fields Virology(第3版, Fieldsら編, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996)を参照。

上皮細胞に対する細胞親和性

パピローマウイルスは、上皮細胞に対して顕著な細胞親和性を示す。特定のウイルス型は、皮膚上皮細胞または粘膜上皮細胞のいずれかに対して優先性を有する。

良性のHPV、危険性の低いHPV、中度の危険性のHPV、および危険性の高いHPV

全てのパピローマウイルスは、細胞増殖を誘導する能力を有している。増殖の最も一般的な臨床的徴候は、良性いぼの形成である。しかし、多くのパピローマウイルスは一部の個体において腫瘍を形成する能力を有し、一部のパピローマウイルスは高い腫瘍形成能を有する。ほとんどのヒトパピローマウイルス(HPV)は、関与する病変の病理に基づき4つの主要グループのうちのいずれか1つに分類される。即ち、良性、低い危険性、中度の危険性、および高い危険性(Fields Virology, (Fieldsら編, Lippincott-Raven, Philadelphia, 第3版, 1996; (Encyclopedia of Cancer, Academic Press) Vol. 1, p520-531に掲載のDNA Tumor Viruses: Papilloma)。例えば、ウイルスHPV-1、HPV-2、HPV-3、HPV-4およびHPV-27は、良性皮膚病変に関与する。ウイルスHPV-6およびHPV-11は、外陰、陰茎および咽頭いぼに関与し、浸潤癌を伴うことはまれであるために危険性の低いウイルスと考えられている。ウイルスHPV-16、HPV-18、HPV-31およびHPV-45は、子宮頸の腺癌および扁平上皮癌を高頻度で伴うために危険性の高いウイルスと考えられている。ウイルスHPV-5およびHPV-8は、多因子性疾患である疣贅状表皮発育異常症(EV)の良性皮膚病変に関与する。しかし、このような病変は、扁平上皮癌に進行する可能性がある。

既に分類されたHPVと比較した場合の癌性病変の頻度に基づいて、HPVをその危険性について分類する

これらのウイルスは、4つの主要危険性グループの1つに分類されない。既に危険性について分類されたHPVと比較した場合の癌性病変の頻度に基づいて、新たに発見されたHPVをその危険性について分類できる。

HPVベクターに対して、再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)およびスクリーニングの反復サイクルを、改善された特質を有するベクターを得る目的で行うことができる。改善される特質としては、組織特異性の増加、組織特異性の変化、発現レベルの増加、持続発現の延長、エピソームコピー数の増加、染色体への組込み能の増加または低減、取込み能の増加、および本明細書に記載しているその他の特質が上げられる。再集合(任意に、本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせてもよい)のための出発材料は、

典型的に、上記したようなヒトパピローマウイルスの異なる株から構築したベクター、または例えばerror-prone PCRもしくはカセット突然変異誘発により產生される同様のベクターのセグメントもしくは変異体である。ヒトパピローマウイルス、または少なくともそのE1およびE2コード領域は、ヒト皮膚パピローマウイルスであることが好ましい。

【0051】

2.3.1.4. レトロウイルス

正常ウイルスライフサイクルおよびウイルスゲノム構造

レトロウイルスは、ウイルスゲノムとして一本鎖RNAを含むエンベロープを有するウイルスの大きなクラスを含む。正常なウイルスライフサイクルの間、ウイルスRNAは逆転写されて、二本鎖DNAを産生する。この二本鎖DNAは、宿主ゲノムに組み込まれ、長期間にわたって発現される。その結果、感染細胞は、宿主細胞に明らかな害を及ぼすことなく、継続的にウイルスを出芽する。ウイルスゲノムは小さく(約10 kb)、基本構造は極めて単純であり、gag(群特異的抗原またはコアタンパク質)、pol(逆転写酵素)、およびenv(ウイルスエンベロープタンパク質)をコードする3つの遺伝子を含む。RNAゲノムの末端は、長い末端反復配列(LTR)と称され、組み込みに関与するプロモーターおよびエンハンサーの活性と配列を含む。また、このゲノムは、ウイルスRNAをパッケージングするのに必要な配列と、別個のエンベロープmRNAを生成するためのスプライス受容部位およびスプライス供与部位も含む。殆どのレトロウイルスは複製細胞にしか組み込むことができないが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は例外であると思われる。

欠如しているウイルス機能をレトロウイルスベクターに与え、別の特徴を追加/除去して、ベクターをより有効にするか、ヘルパーウイルスによる汚染の可能性を低減する

レトロウイルスベクターは比較的単純であり、5' および3' LTR、パッケージング配列、並びに目的の遺伝子からなる転写ユニット(典型的には、発現カセット)を含む。このようなベクターを増殖させるためには、いわゆるパッケージング細胞系を用いて、欠如しているウイルス機能をin transで与える必要がある。このような細胞は、gag、polおよびenvの組み込まれたコピーを含むが、パッケ

ージングシグナルを欠くことでヘルパーウイルス配列がカプシドで包被されないように遺伝子操作される。別の特徴を、ベクターおよびパッケージング細胞系に追加またはそれらから除去することは、ベクターをより有効にするか、またはヘルパーウイルスによる汚染の可能性を低減する試みによるものである。

長期発現の潜在的能力によって大量増殖が可能になるが、ヘルパーウイルスが存在してはならない

一部の遺伝的ワクチン用途では、レトロウイルスベクターは染色体への組込みが可能であるため、長期発現が潜在的に可能であるという利点を有する。このようなベクターは比較的大量に増殖し得るが、ヘルパーウイルスが存在しないように注意する必要がある。

【0052】

2.3.2. 非ウイルス遺伝的ワクチンベクター

遺伝的ワクチン投与で使用する非ウイルス核酸ベクターとしては、プラスミド、RNA、ポリアミド核酸、および酵母人工染色体(YAC)などが挙げられる。

ベクター構造；エンハンサー配列の挿入により転写が高まる

このようなベクターは、典型的に、免疫反応を誘導させるポリペプチドを発現するための発現カセットを含む。このような発現カセットのプロモーターは、構成的、細胞型特異的、段階特異的、および/または調節可能(例えば、テトラサイクリン摂取(ingestion)により；テトラサイクリン反応性プロモーター)であってよい。このベクターにエンハンサー配列を挿入することにより転写を高めることができる。エンハンサーとは、プロモーターによる転写を高めるシス作動性配列(典型的に10～300塩基対の長さ)である。エンハンサーは、転写ユニットの5'または3'側のいずれかにある場合、効果的に転写を高めることができる。また、エンハンサーは、イントロン内またはコード配列自体中に配置させても有効である。典型的に使用されるウイルスエンハンサーとしては、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスエンハンサー、ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。マウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーなどの哺乳動物系由来のエンハンサー配列も、一般的に使用される。

非ウイルスベクターを動物に導入する方法

リポフェクション、バイオリスティック(biolistic)、ウイルス、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン：核酸複合体、ネイキッドDNA感染、人工ビリオン、薬物で増強されたDNAの取込み、およびex vivo形質導入などの手段により、遺伝子治療に有用な産物をコードする非ウイルスベクターを動物に導入できる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号および同第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている(例えば、Transfectam™およびLipofectin™)。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適した陽イオン性脂質および中性脂質としては、Felgner, W091/17424、W091/16024のものが挙げられる。ネイキッドDNA遺伝的ワクチンは、例えば米国特許第5,589,486号に記載されている。

【0053】

2.4. 多成分遺伝的ワクチン

2つ以上の別個の免疫感作用遺伝的ワクチン成分を使用して、異なる細胞型において異なる反応を引き出す手段を得る

本発明は、哺乳動物に投与された際に最適な免疫反応を得られるように設計された多成分遺伝的ワクチンを提供する。これらのワクチンでは、好ましくは同じ製剤中で2つ以上の異なる遺伝的ワクチン成分を免疫感作のために使用する。それぞれの成分は、一部の細胞においては生じるがその他の細胞においては生じない特定の機能のために最適化することが可能であり、異なる細胞型において異なる反応を引き出す手段が得られる。1つのプラスミドを使用することによって互いに不和合となる場合には、これらの活性を、in vivoにおいて異なる運命および作用を有する異なるベクターに分散させる。遺伝的ワクチンは、生物活性を有する複数の構成要素を1つの調製物に製剤化するのに理想的である。ベクターは、全て同じ化学型(chemical type)であることが好ましく、これにより、この種的不和合性をなくして、全てのベクターを同じ化学的および/または生物学的プロセスによって製造することができる。ワクチン調製物は、正確かつ繰り返し製剤化し得る、規定モル比の別個のベクター成分からなっているもよい。

特定の特徴を制御する機構、または改変すべき特性を認識せずにベクター成分を開発する

多成分遺伝的ワクチンの成分として使用できる複数の遺伝的ワクチンベクター成分を以下に記載する。本発明の方法により、このようなベクター成分の開発が大幅に簡易化される。なぜなら、特定の特徴を制御する機構、および該特徴を増強するために改変すればよい分子の特性を認識する必要がないからである。このような認識が無くても、本発明の再集合法(および/または本明細書に記載の1つ以上の更なる定方向進化法)およびスクリーニング方法を行うことにより、列挙するそれぞれの特質について改善されたベクター成分を得ることができる。

【0054】

2.4. 最適抗原放出を得るために設計されたベクター「AR」

抗原提示細胞(APC)により認識され、該細胞に取り込まれて、細胞内プロセッシングおよびTヘルパー(T_H)細胞に対する提示を効率的にする形態の抗原の最適放出を得るために、遺伝的ワクチンベクター成分「AR」を設計した。ARプラスミドでトランスフェクトされた細胞は、APCの抗原生産工場と考えることができる。

典型的に、ARプラスミドは、以下の特質のうちの1つ以上を有する。これらの特質はそれぞれ、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法により最適化できる。

選択抗原を発現する細胞(例えば、筋内免疫感作のためには筋細胞、または粘膜免疫感作のためには上皮細胞)に結合し取り込まれる最適プラスミド

この特質は、多成分DNAワクチンにおいて、ARを他のベクター成分と区別する重要である。標的細胞と結合した最適ベクターには、非常に強力な結合およびその後の標的細胞への取込みという目的だけではなく、他の細胞に結合し侵入することを相対的に不可能にするという目的も含まれる。所望の結合と所望でない結合との比を最適化することにより、トランスフェクトされる標的細胞の数を有意に増加させる。この特質は、本明細書に記載の本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合により最適化できる。例えば、確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、非確率論的ポリヌクレオチド再集合、ベクター成分の組み合わせ集合、ランダム

オリゴヌクレオチド配列の挿入などにより得た変異体ベクター成分配列を、まず、標的細胞に結合するものについて選択し、その後この細胞集団を他の細胞に結合するものについて枯渇させる。遺伝的ワクチンベクターを特定の細胞型に標的化させるベクター成分、および改善された標的化を得る方法を以下に記載する。

(a) 核へのベクターDNAの最適な輸送(trafficking)

繰り返すが、本発明は、上記特質に最適な遺伝的ワクチン成分を得られる方法を提供する。

(b) 抗原遺伝子の最適な転写

これには、例えば、最適化されたプロモーター、エンハンサー、イントロンなどの使用が関与しうる。好ましい実施形態では、ベクターが標的細胞型の核内にあるときにのみに遺伝子を転写する細胞特異的プロモーターが使用されている。この場合、特異性は、標的細胞への選択ベクター侵入にのみ誘導されるものではない。

(c) mRNAの細胞質への最適な輸送、および細胞質内でのmRNAの最適な寿命

この特質を得るためには、本発明の方法を用いて、mRNAの最適な3'および5'側非翻訳領域を得る。

(d) mRNAの最適な翻訳

繰り返すが、確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法を使用して、翻訳機構の最適ナリボソーム結合および集合、ならびに最適なコドン選択を示す最適化された組換え配列を得る。

(e) APCによる効率的な取込みのために最適な抗原構造

少なくとも5つの機構(ただし、これらに限定されない)により、細胞外抗原はAPCに取り込まれる。1つの機構は、小胞の微飲作用およびインターナリゼーションによる外部液相のサンプリングである。

さらなる機構的考慮

第1の機構は、これまで知られている限りでは、液相中の抗原に対する構造的な要求がなく、従って、抗原構造の設計の際の考慮とは無関係である。第2の機構は、抗原とAPC表面上の受容体との結合が関与する。このような結合は、現在や

っと研究されている規則に従って生じる(これらの受容体は、免疫グロブリンファミリーのメンバーではなく、異なるクラスの細胞外タンパク質/糖タンパク質に結合できるタンパク質および糖タンパク質のいくつかのファミリーを代表すると思われる)。この種の結合の後には、同じく小胞による受容体仲介型インターナリゼーションが続く。この機構は現在よく理解されていないため、抗原設計の要素を合理的な設計プロセスに取り入れることはできない。しかし、確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(APCへの侵入が最も成功している変異型DNA分子の選択の経験的アプローチ)により、この機構全体が改善された変異体について選択できる。

他の3つの機構は、全て、細胞外抗原の特異的抗原認識に関連する。第1の機構には、細胞表面上のFc受容体に結合したIgGを介した特異的抗原の免疫グロブリン仲介認識が関与する。単球、マクロファージおよび樹状細胞などのAPCは、多様な特異性の表面膜IgGで修飾されてもよい。一次応答では、この機構は働かない。予め免疫感作された動物では、APCの表面上のIgGは、細胞外抗原を特異的に結合し、細胞内エンドソーム画分への結合抗原の取込みを仲介できる。別の機構は、各B細胞上に存在するクローニングにより得た表面膜免疫グロブリン(一次B細胞であればIgM、動物が前もって抗原に曝されている場合にはIgG)への結合が関与する。B細胞は、有効なAPCである。細胞外抗原は、表面Igに特異的に結合でき、膜画分にインターナリゼーションされプロセッシングされて、B細胞表面に提示される。最後に、細胞外抗原は、特異的可溶性免疫グロブリン(一次免疫感作であればIgM、動物が予め免疫されている場合にはIgG)により認識される。Igと複合化することにより、APCの表面への結合(IgGの場合にはFc受容体認識を介する)、およびインターナリゼーションが生じる。

【0055】

後半の3つの機構のそれぞれにおいては、抗原の立体配座が、既存の抗体の認識特異性と同じである程度が、抗原提示プロセスの効率にとって重要となる。抗体は、線状タンパク質エピトープ、およびタンパク質抗原の三次元構造によって決定する立体配座エピトープを認識できる。細胞外ウイルスまたは細菌性病原体

を認識し、その表面に結合して感染を防止したり、その免疫破壊を仲裁(補体仲介型溶解、免疫複合体形成および食作用)したりする防御抗体は、病原体の表面に提示された天然構造を有するタンパク質上の立体配座決定基に対してもっぱら作られる。従って、宿主防御体液性免疫を生成するためには、病原体上に存在する立体配座エピトープに特異的な抗体を担持する天然B細胞を、抗原の細胞内プロセッシングおよびMHCクラスIIと関連した分解ペプチドの提示の後にTヘルパー細胞と直接接触させて刺激する必要がある。このTヘルパーは、関連するB細胞を選択的に増殖して、抗体の突然変異、特異性の増加した抗体についての抗原により誘導される選択、および抗体クラススイッチをもたらす。

まとめると、体液性免疫および特異的CD4⁺細胞傷害性T細胞を引き出すためのAPCによる抗原の最適な取込みは、抗原が天然タンパク質立体配座をとり(自然感染の際の免疫系について以下に示すように)、適切な膜抗体を担持する純粋なB細胞により認識されることを必要とする。天然タンパク質立体配座には、適切なタンパク質フォールディング、グリコシル化、ならびにAPC上の受容体(免疫グロブリン、および場合により非免疫グロブリン)との最適反応のために必要なその他の任意の翻訳後改変が含まれる。特異的な抗体により認識されて必要な免疫応答を引き出すのに必要な発現抗原の三次元構造に加えて、免疫細胞(APCを含む)により認識される時点まで、発現細胞の外部におけるタンパク質の安定性を高めるために、構造(および配列)を最適化してもよい。本発明の再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の別の定方向進化法)ならびにスクリーニング方法を採用して、その後のAPCによる取込み後のプロセッシングのために抗原構造(および配列)を最適化し、細胞内プロセッシングにより、APC上でのクラスIまたはクラスIIによる提示、および所望の免疫応答に必要なペプチド断片の誘導が生じるようにする。

(f) 所望の細胞下画分を得るための新生抗原の最適な分画

これは、抗原配列に含まれるシグナルおよび輸送シグナルにより指令することができる。全ての抗原がこれらの細胞から分泌されることが望ましいかもしれない。あるいはまた、全ての抗原または一部の抗原が、これらの生産工場細胞の細胞表面上で発現されるように命じられてもよい。抗原を含む小胞を、翻訳後改変

(グリコシル化を含む)のために別の細胞下画分に方向づけるためのシグナルは、抗原配列に含まれても良い。

(g) 細胞表面上での最適な抗原提示、または細胞からの最適抗原放出

(f)および(g)項に対する改変として、生産工場細胞の細胞質内における抗原の発現、その後の該細胞の溶解による可溶性抗原の放出を設計する。細胞死は、アポトーシスを引き出す細胞内タンパク質を同じ遺伝的ワクチンベクター上で発現させることにより操作できる。この場合、細胞死のタイミングは、細胞が抗原を産生する必要性と、設計されたプロセスにおいて一部の細胞を殺す潜在的な有害影響との間でバランスを取る。

(a)～(h)項を組み合わせることにより、抗原発現の寿命および程度を最適化するための様々なシナリオが得られる。抗原が、最高レベルで最長時間発現されることが望ましいとは限らない。特定の臨床用途においては、短時間で低発現、短時間で高発現、長時間で低発現、長時間で高発現、またはこれらの中間の抗原発現を得ることが重要となる。

単一抗原遺伝子の変異体を1つ以上発現するために、またはいくつかのかなり異なる免疫感作用標的を発現するためにプラスミドARを設計してもよい。遺伝的ワクチンに使用する最適化抗原を得るための方法は、本明細書に記載されている。モノシストロン性またはマルチシストロン性(multicistronic)形態のベクターから多数の抗原を発現できる。

【0056】

2.4.2. 最適なCTL生成のために設計されたベクター成分「CTL-DC」、「CTL-LC」および「CTL-MM」

遺伝子ベクター成分「CTL-DC」、「CTL-LC」および「CTL-MM」を設計して、樹状細胞(CTL-DC)、ランゲルハンス細胞(CTL-LC)、ならびに単球およびマクロファージ(CTL-MM)による、細胞傷害性CD8⁺リンパ球(CTL)の最適生成を指令する。これらのベクター成分は、MHCクラスIと会合した最適な抗原断片の提示を命じ、最大細胞傷害性T細胞免疫応答を確実にする。CTLベクター成分によりトランスフェクトされた細胞は、ウイルス性疾患に対する防御に通常非常に重要となる特異的免疫性のアームの直接的なアクチベーターであると考えられる。

CTLベクター成分は、典型的には、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法を採用してそれぞれ最適化できる以下の特質を1つ以上有するように設計される。

(a) 選択された抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、単球/マクロファージ、ランゲルハンス細胞)に結合し、かつ取り込まれる最適ベクター

この特質は、多成分DNAワクチンの中で、CTLシリーズのベクターを他のベクターと区別するために重要である。CTLシリーズベクターは、細胞外抗原発現宿主として選択された細胞にARベクターを介して結合したり、侵入しないことが好ましい。このような機能の分離は重要となる。なぜなら、抗原発現細胞から放出された後の免疫細胞の刺激のために予め定められた抗原の細胞内での運命および輸送は、MHCクラスIと会合して細胞表面上に提示されるように定められた抗原の運命とかなり異なるからである。前者の場合、抗原は無傷のまま、シグナル分泌配列を介して、粗面小胞体(RER)の管腔に送達され、分泌されるように指令される。後者の場合、抗原は細胞質中に留まり、そこでプロテアソーム系(proteasomal system)によりペプチド断片に分解され、その後RERの管腔に送達されてMHCクラスIと会合するように指令される。次いで、ペプチドとMHCクラスIとのこれらの複合体は、細胞表面に送達されて、CD8⁺細胞傷害性T細胞と特異的に相互作用する。所望の細胞型を標的とするように最適化されたベクター成分、および最適化されたベクター成分を得る方法は記載されている。

抗原遺伝子の転写の最適化

これは、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどを、本明細書に記載のように最適化することにより達成できる。このようなベクターにおいて、細胞特異的プロモーターは別の選択レベルとして有益である。

(b) mRNAの最適な寿命

本発明の方法を採用して、mRNAの最適な3'および5'非翻訳領域を得ることができる。

(c) mRNAの最適な翻訳

繰り返すが、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合(例えば、ポリヌクレ

オチドシャッフリングおよび中断合成)および選択方法、ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合および選択方法を使用して、翻訳機構に最適ナリボソーム結合および集合、ならびに最適コドン選択のためのポリヌクレオチド配列を得ることができる。

(d) 最適なタンパク質立体配座

この場合、最適なタンパク質立体配座は、APC表面上の特異的抗体または他の受容体と相互作用する立体配座よりも、MHCクラスI上での提示のために適切な細胞質タンパク質分解および正確なペプチドの産生をもたらし、ならびに所望の特異的CTL応答を引き出すものである。

(e) 正確なペプチドを産生するために最適なタンパク質分解

特異的なタンパク質分解による切断の順番は、タンパク質フォールディングの性質、および細胞質またはプロテアソームのいずれかにおけるプロテアーゼの性質に応じる。

(f) 小胞体膜を貫通してRER管腔へ送達される抗原ペプチドの最適な輸送

これは、TAPタンパク質または他の膜輸送体によるペプチドの認識により仲介できる。

(h) ペプチドとクラスI-2ミクログロブリン複合体との最適な会合、および分泌経路を介した細胞表面への輸送

(i) 特異的CTLによる認識のための関連アクセサリー分子(associated accessory molecules)を有するMHC-ペプチド複合体の最適提示

単一抗原遺伝子の変異体を1つ以上、またはいくつかの異なる免疫感作用標的を発現するためにベクターCTLを設計できる。モノシストロン性またはマルチシストロン性(multicistronic)形態のベクターから多数の最適化抗原を発現できる。

【0057】

2.4.3. 最適な免疫モジュレーター放出のために設計されたベクター「M」

ベクター「M」を設計して、標的細胞から免疫モジュレーター(サイトカインおよび他の増殖因子など)の最適な放出を指令する。標的細胞は、免疫された組織における優勢細胞型、または樹状細胞(M-DC)、ランゲルハンス細胞(M-LC)、単球

およびマクロファージ(M-MM)などの免疫細胞のいずれかである。これらのベクターは、いくつかの免疫細胞「モジュレーター」(サイトカイン、増殖因子など)の最適レベルでの同時発現を、免疫応答が所望の種類または種類の組み合わせで、かつ所望のレベルのものであるように方向づける。Mベクターでトランスフェクトされた細胞は、ワクチン免疫応答(CTL対 T_H1 対 T_H2 対NK細胞など)の性質およびその強さの指令装置であると考えられる。これらのベクターの特質は、細胞の性質を反映し、該細胞の中で機能するようにベクターは設計される。例えば、ベクターは、所望の細胞型に結合して侵入するように設計され、および/または所望の細胞型における転写を誘導する細胞特異的調節プロモーターを有していてもよい。また、ベクターは、最大合成、および標的細胞から細胞モジュレータータンパク質を所望の割合で放出するのを指令するように操作されてもよい。

「M」遺伝的ワクチンベクターは、典型的に、以下の特質の1つ以上を有するように設計される。これらの特質はそれぞれ、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法により最適化できる。

(a) 選択されたモジュレーター発現細胞に結合し、取り込まれる最適ベクター

適切な発現細胞としては、例えば、筋細胞、上皮細胞、または標的組織中のその他の(数の点で)優勢な細胞型、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、単球/マクロファージ、ランゲルハンス細胞)が挙げられる。この特性は、Mシリーズベクターを、他の細胞に結合し侵入するように設計されたその他のベクターと区別するために重要である。

(b) 免疫モジュレーター遺伝子の最適な転写

繰り返すが、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどを、本発明の方法により最適化できる。細胞特異的プロモーターは、本発明において、別の選択レベルとして非常に有益である。

(c) 最適なmRNAの寿命

本発明の方法を採用して、mRNAの最適3'および5'非翻訳領域を得ることができる。

(d) 最適なmRNA翻訳

繰り返すが、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合および選択方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合および選択方法を使用して、翻訳機構の最適ナリボソーム結合および集合、加えて最適コドン選択を達成するためのポリヌクレオチド配列を得ることができる。

(e) RERの管腔へのモジュレーターの(シグナル分泌配列を介した)最適な輸送

免疫応答の代替的な調節方法では、可溶性モジュレーターの分泌ではなく、膜結合型モジュレーターを使用する。結合型モジュレーターは、例えば疎水性テイルおよびホスホイノシトール多糖結合により、合成細胞の表面に留まることができる。

(f) 各モジュレーターに最適なタンパク質立体配座

この場合、最適なタンパク質立体配座とは、細胞外モジュレーターおよび/または細胞膜結合型モジュレーターを、関連する受容体と相互作用させるものである。

(g) モジュレーターの比率および種類は、経験的に決定できる

免疫応答を例えば T_H 応答(例えば、IL-2および/またはIFNの産生)または T_H2 応答(例えば、IL-4、IL-5、IL-13)に方向づけるために、協働して機能することが知られているモジュレーターのセットを試験する。ベクターMを設計して、1つ以上のモジュレーターを発現させてもよい。最適化された免疫モジュレーター、および最適化免疫モジュレーターを得るための方法は、本明細書に記載している。これらの最適化免疫調節配列は、本発明の多成分遺伝的ワクチンの成分としての使用に特に適している。モノシストロン性またはマルチシストロン性(multicistronic)形態のベクターから、多数のモジュレーターを発現させることもできる。

【0058】

2.4.4. ケモカイン放出を指令するために設計されたベクター「CK」

「CK」と称される遺伝的ワクチンベクターを設計して、標的細胞からの最適なケモカイン放出を指令する。標的細胞は、免疫された組織において優勢な細胞型、

または樹状細胞(CK-DC)、ランゲルハンス細胞(CK-LC)、もしくは単球およびマクロファージ(CK-MM)などの免疫細胞のいずれかである。これらのベクターは、典型的に、免疫感作部位への免疫細胞の補充が最適であるように、いくつかのケモカインの最適レベルでの同時発現を指令する。CKベクターでトランスフェクトされた細胞は、ワクチン免疫応答に重要な免疫細胞を調節する交通警察であると考えられる。これらのベクターの特質は、細胞の性質を反映し、該細胞中で作用するようにベクターは設計される。例えば、ベクターを、所望の細胞型に結合し侵入するように設計し、および/または所望の細胞型における転写を促す細胞特異的調節プロモーターを有するようにしてもよい。また、ベクターは、ケモカインの最大合成、および標的細胞からの所望の比率でのケモカイン放出を生じるようにも操作される。最適なケモカイン放出をもたらす遺伝的ワクチン成分、および該成分を得るための方法は、本明細書に記載されている。

CKベクターは、典型的に、以下の特質のうち1つ以上を有するように設計されている。これらの特質はそれぞれ、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、および非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法を採用して最適化できる。

(a) 選択したケモカイン発現細胞に結合し、取り込まれる最適ベクター

適切な細胞としては、例えば、筋細胞、上皮細胞、または特定の目的の組織において(数の点で)優勢である細胞型が挙げられる。また、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、単球およびマクロファージ、ランゲルハンス細胞)も適している。この特質は、CKシリーズベクターを、他の細胞に結合し侵入するように設計されたベクターと区別するために重要である。

(b) ケモカイン遺伝子の最適転写

繰り返すが、プロモーター、エンハンサー、イントロンなどは、本発明の方法により最適化できる。

本発明において、細胞特異的プロモーターは別の選択レベルとして非常に有益である。

(c) mRNAの最適な寿命

本発明の方法を採用して、mRNAの最適3'および5'非翻訳領域を得ることがで

きる。

(d) mRNAの最適な翻訳

繰り返すが、本発明の確率論的ポリヌクレオチド再集合および選択方法(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合および選択方法を使用して、翻訳機構の最適ナリボソーム結合および集合、ならびに最適コドン選択を達成するためのポリヌクレオチド配列が得られる。

(e) RERの管腔へのケモカインの(シグナル分泌配列を介した)最適輸送

細胞の補充による免疫応答の代替的な調節方法では、可溶性ケモカインの分泌ではなく、膜結合型ケモカインを使用する。結合型ケモカインは、例えば疎水性テイルおよびホスホイノシトール多糖結合により、合成細胞の表面に留まることができる。

(f) 各ケモカインについての最適なタンパク質立体配座

この場合、最適なタンパク質立体配座とは、細胞外ケモカイン/細胞膜結合型ケモカインが、関連受容体と相互作用できるようにするものである。

(g) 多様なケモカインの比率は、経験的に決定できる

CTL、T_H細胞、B細胞、単球/マクロファージ、好酸球、および/または好中球を適切に直接補充するために協働することが知られているケモカインのセットを試験することができる。

ベクターCKを設計して、1つ以上のケモカインを発現させることができる。モノシストロン性またはマルチシストロン性(multicistronic)形態のベクターから複数のケモカインを発現できる。

【0059】

2.4.5. 他のベクター

1つ以上の別の成分ベクター部分を含む遺伝的ワクチンも本発明により提供される。例えば、遺伝的ワクチンは、樹状細胞およびランゲルハンス細胞に特異的に侵入し、流出中のリンパ節まで移動するように設計されたベクターを含んでも良い。

このベクターは、標的抗原の発現、ならびに節において所望の免疫応答を引き出

すのに関連するサイトカインおよびケモカインの混合物を提供するように設計される。

臨床的な最終目的および抗原の性質に応じて、標的抗原の比較的長命の発現のためにベクターを最適化し、節における免疫系の刺激が延長されるようにできる。別の例としては、B細胞におけるMHC発現を特異的に調節するベクターがある。このようなベクターは、B細胞、注射部位内に存在する細胞、または注射部位に引き寄せられる細胞に特異的に結合し侵入するように設計される。B細胞内で、このベクターは、細胞のエンドサイトーシス画分に抗原を特異的に取り込むことにより得た抗原ペプチドの会合を、クラスIまたはクラスIIのいずれかとの会合を方向づけることにより、CD4⁺Tヘルパー細胞またはCD8⁺細胞傷害性リンパ球を介した特異的免疫性の誘発を指令する。本明細書に記載したプロセッシングされたペプチドの運命を細胞内に方向付けるためにいくつかの手段が存在する。

クラスI提示を指令する分子の例としては、タパシン(tapasin)、TAP-1およびTAP-2(Koopmanら(1997) Curr. Opin. Immunol. 9:80-88)が挙げられ、クラスII提示を生じるものとしては、例えば、エンドソーム/リソソームプロテアーゼ(Peters (1997) Curr. Opin. Immunol. 9:89-96)が挙げられる。最適化されたクラスI提示をもたらす遺伝的ワクチン成分、および成分を得るための方法は、本明細書に記載されている。最適なDNAワクチンは、例えば、ARベクター(抗原放出)、CTL-DCベクター(MHCクラスI上の抗原ペプチドの樹状細胞提示を介したCTL活性化)、内在している組織マクロファージからのIL-12およびIFN γ の放出のためのM-MMベクター、ならびにT_H細胞を免疫部位に補充するためのCKベクターを組み合わせても良い。

【0060】

定方向進化は以下のDNAワクチン投与目的を助ける

DNAワクチン接種は、多様な目的のために使用できるが、とりわけ以下のものが含まれる。

- ・遠い未来のある時点において侵入する細菌またはウイルス病原体に対して迅速かつ攻撃的に反応し易くするための、CTL応答および/または体液性応答の刺激。

・ アレルゲンに対する不適切な反応を予防するための継続的だが非攻撃的な応答。

・ 自己免疫疾患における自己抗原に対する、継続的、非攻撃的な免疫寛容化。

・ 腫瘍細胞抗原に対する可能な限り迅速な攻撃性CTL応答の誘導。

・ 免疫応答を、進行中の慢性感染に対する強力だが不適切な免疫応答から、所望の反応へと再度方向づけて、病原体を無くすおよび/または病理学的予防を施す。

特に競合する目的が1つのDNA配列において具現化される場合には、単一ベクターDNAワクチンの形態で上記目的が果たせるとは限らない。多成分形態により、DNAワクチンベクターのポートフォリオ(portfolio)が作製できる。その一部は各ケースに応じて再構築される(例えば、抗原を含むベクター)が、その他のものは膨大な数の異なる臨床的用途のために十分に特徴決定され理解された試薬として使用される(例えば、同じケモカイン発現ベクターを異なる状況で用いることができる)。

【0061】

2.5. スクリーニング方法

スクリーニングアッセイは、改善が求められる特質に応じて異なる

本明細書に記載の方法により得られる組換え核酸ライブラリーをスクリーニングして、遺伝的ワクチン接種に望ましい特質を有するDNAセグメントを同定する。採用される特定のスクリーニングアッセイは、以下に記載するように、改善が求められる特定の特質に応じて異なる。典型的に、(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により)実験的に進化させた核酸ライブラリーを、スクリーニング前に細胞に導入する。もし採用された確率論的ポリヌクレオチド再集合形態(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)、ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合形態がin vivo形態で行われる場合、作製された組換えDNAセグメントのライブラリーは既に細胞に存在する。配列再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の別の定方向進化法)がin vitroで行われる場合、組換えライブラリーは、スクリーニング/選択の前に、所望の細胞型に導入されることが好ましい。組換えライブラ

リーのメンバーは、導入前にエピソームまたはウイルスと結合されてもよいし、直接導入されてもよい。

細胞型

幅広い種類の細胞型を、進化させた遺伝子のレシピエントとして使用できる。特に関心のある細胞としては、ワクチンまたはワクチン抗原を送達するのに用いられる多くの細菌細胞型(Courvalinら (1995) C.R. Acad. Sci. 11118: 1207-12)、Salmonella(Attridgeら (1997) Vaccine 15:155-62)、clostridium(Foxら (1996) Gene Ther. 3: 173-8)、lactobacillus、shigella(Sizemoreら (1995) Science 270: 299-302)、大腸菌、streptococcus (OggioniおよびPozzi(1996) Gene 169:85-90)などのグラム陰性およびグラム陽性の両方、ならびにヒト細胞を含む哺乳動物細胞が挙げられる。本発明の一部の実施形態では、ライブラリーを第1の宿主で増幅し、その後その宿主から回収して、発現、選択、スクリーニングまたはその他の所望のパラメーターにより適した第2の宿主に導入する。ライブラリーを細胞型に導入する手法は、細胞型のDNA取込み性質(例えば、接合可能なまたは自然にコンピテントなウイルス受容体を有している)に応じる。細胞型が、天然型および化学誘導によってはコンピテントとなりにくいが、電気穿孔を受けやすい場合、通常電気穿孔を採用すれば良い。細胞型が電気穿孔も受けにくい場合、バイオリスティック(biolistics)を採用するであろう。biolistic PDS-1000 Gene Gun(Biorad, Hercules, CA)は、ヘリウム気圧を用いてDNAを被覆した金またはタングステンの微小担体を標的細胞に向けて加速する。

【0062】

コンピテントな組織、または潜在的にコンピテントな組織

このプロセスは、植物、細菌、菌類、藻類、無傷の動物組織、組織培養細胞、および動物胚を含む幅広い種類の組織に対して適用可能である。本質的に動物および患者内の生存組織用である緩やかな電気穿孔様式の電気パルス送達を採用してもよい(Zhao, Advanced Drug Delivery Reviews 17:257-262 (1995))。細胞をコンピテントにする新規方法は、国際特許出願PCT/US97/04494(公報第W097/35957号)に記載されている)。組換えDNA遺伝子のライブラリーの導入後、細胞を任意に増殖させて、遺伝子を発現させることができる。

選択マーカー遺伝子の含有を介した、ベクターを含む細胞の同定

多くのアッセイにおいて、特定のベクターを含む細胞を同定する手法が必要である。全ての種類の遺伝的ワクチンベクターに、選択マーカー遺伝子を含ませることができる。選択条件下において、選択マーカーを発現する細胞のみが生存できる。

選択マーカー遺伝子の例

適切なマーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(DHFR)、チミジンキナーゼ遺伝子(TK)、または薬物耐性を付与する原核生物遺伝子、ミコフェノール酸で選択できるgpt(キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ)；G418、ハイグロマイシンまたはピューロマイシンで選択できるneo(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ)；ならびにメトトレキセートで選択できるDHFR(ジヒドロ葉酸レダクターゼ)が挙げられる(Mulliganおよび#0000；SouthernおよびBerg(1982) J Mol. Appl. Genet. 1:327)。

スクリーニング可能なマーカー遺伝子の含有を介した、ベクターを含む細胞の同定

遺伝的ワクチンベクターは、選択マーカーの代替として、または選択マーカーに加えて、発現されるとベクター含有細胞に対して容易に同定可能な表現型を付与するスクリーニング可能なマーカーを含んでも良い。例えば、宿主細胞に通常存在しない細胞表面抗原をコードする遺伝子が適している。検出手段は、例えば、細胞表面抗原に特異的に結合する抗体またはその他のリガンドである。適切な細胞表面抗原の例として、宿主特異的抗体に認識されない、宿主細胞以外の種由来のCD(分化抗原)抗原(CD1～CD163)が挙げられる。その他の例としては、緑色蛍光タンパク質(GFP、例えば、Chalfieら(1994) Science 263:802-805；Crameriら(1996) Nature Biotechnol. 14:315-319；Chalfieら(1995) Photochem. Photobiol. 62:651-656；Olsonら(1995) J Cell. Biol. 130:639-650を参照)ならびに関連抗原が挙げられる。これらのいくつかは市販されている。

【0063】

2.5.1. ベクターの寿命または所望の組織へのトランスロケーションについてのスクリーニング

幾つかの用途では、DNAなどの最も長い寿命を有するベクターを同定すること、または注入部位から離れた組織に到達するベクターを同定することが望ましい。これは、選ばれた投与経路により組換え遺伝的ワクチンベクターの集団を動物に投与した後、様々な時間で標的組織を摘出してこの組織から標準的な分子生物学的手法によりベクターを回収することにより、達成することができる。回収したベクター分子を例えば大腸菌中で、および/またはin vitroでのPCRにより増幅することができる。PCR増幅は、さらなるポリヌクレオチド（例えば遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロン等）の再集合を（場合により本明細書中に記載された他の定方向進化法と組合せて）伴うことができ、その後で得られた選択された集団を、動物への再投与およびベクターの更なる改良に使用することができる。この処理を数回行ったあと、選択されたベクターを、該ベクターをin vivoで選択したときと同じ条件下において正しい立体配座で抗原を発現する能力について検査することができる。

所望の抗原を発現する細胞のin vitro同定方法

抗原発現は、上記の選択またはスクリーニング方法の一部ではないので、得られたベクター全てが所望の抗原を発現できるわけではない。この欠点を克服するため、本発明は、in vivoでのDNA完全体の所望の組織局在化および寿命だけでなく、最も効果的な抗原発現（またはサイトカイン、ケモカイン、細胞表面アクセサリー分子、MHCなどの他の遺伝子の発現）の保持も示す、遺伝的ワクチン集団におけるこれらのベクターの同定方法を提供する。

この方法は、必要に応じて非常に少数の細胞の回収および異なるレベルの抗原発現を有する細胞の量的選択を可能にする条件下において、選ばれた組織から精製した細胞を用いて、所望の分子を発現する細胞をin vitroで同定する工程を含む。

本発明の2つの実施形態が記載されるが、これらはそれぞれ遺伝的ワクチンベクターのライブラリーをその出発点として使用する。各方法の目的は、in vivoにて所望の生物学的特性を示すベクターを同定することである。組換えライブラリーは、公知の意味で異なるベクターの集団（例えば異なる機能的モジュールからなるコンビナトリアルベクターライブラリー）を表わすか、または無作為なヌ

クレオチドストレッチの挿入により生成される多様性を無作為に生成したものであるか、またはベクターの全体または一部に低レベル突然変異を導入するために（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）in vitroにて実験的に進化させたものである。

【0064】

2.5.1.1. 細胞表面局在化抗原の発現についての選択

第1の実施形態において、本発明の方法は細胞表面局在化抗原の発現についての選択を含む。抗原遺伝子をワクチンベクターライブラリーの中で、細胞膜にターゲティングされるアミノ酸の領域を有するように遺伝子操作する。例えばこの領域は、発現されたタンパク質上へのホスホイノシトール-グリカン（PIG）末端の付着を合図し、該タンパク質をトランスフェクトされた細胞の表面で発現させるよう指令するC末端アミノ酸の疎水性ストレッチをコードすることができる。天然で可溶性タンパク質である抗原を用いると、この方法は新しいC末端とこの遺伝子操作による融合体におけるタンパク質の3次元の折畳みにほとんど影響を与えない。天然で膜貫通タンパク質（例えば病原性ウイルス、細菌、原生生物または腫瘍細胞上の表面膜タンパク質等）である抗原を用いた場合、少なくとも2つの可能性がある。まず第1は、細胞外ドメインを遺伝子操作してPIG結合シグナリングのためにC末端配列と融合させることができる。第2には、このタンパク質を、これを細胞表面へと効果的にし向ける宿主細胞のシグナリングによってまとめて（in toto）発現させることができる。まれではあるが、発現する抗原は、内因性PIG末端結合を有する場合がある（例えば病原性原生生物の幾つかの抗原など）。

標的細胞の収集、精製、同定および分離

ベクターライブラリーをin vivo送達して適当な時間をおいたあと、その動物の様々な標的部位から組織および/または細胞を収集する。アフィニティー試薬として細胞特異的表面反応性モノクローナル抗体を用いた手法等の標準的な細胞生物学的手法を用いて、組織から細胞を精製することができる。上皮細胞を植えておいた粘膜部位から単離した上皮細胞を精製したり、筋肉から筋芽細胞を精製したりすることは、比較的容易である。幾つかの実施形態において、分析前

に最少限の物理的精製が行われる。脾臓、肝臓、骨髓、リンパ節および血液などの様々な組織から、特定の細胞集団を同定および分離することが望ましい場合もある。血液細胞は、多様な蛍光モノクローナル抗体試薬を用いて、FACSにより容易に分画し、B細胞、CD4⁺、またはCD8⁺T細胞、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、単球等を分離することができる。

抗原を発現する細胞の同定および精製

抗原を発現する細胞を、PIGに結合した表面抗原上のC末端配列に特異的な蛍光モノクローナル抗体を用いて同定することができる。FACS分析により、細胞集団上における正しい形態の抗原の発現レベルの定量分析が可能である。最大レベルの抗原を発現する細胞を選別し、標準的な分子生物学的手法を用いてこの反応性を付与したプラスミドDNAワクチンベクターを回収する。抗原を発現する細胞全ての精製を可能とする（および抗原発現細胞が非常に小さな少数集団であり得るために細胞分別装置に載せる前に有用であり得る）他の手法は、表面抗原を発現する細胞をロゼット形成（rosette）またはpan精製（pan-purify）することである。ロゼットは、抗原発現細胞と、関連する抗原に共有結合する抗体を保持する赤血球との間に形成され得る。これらは、ユニット重力沈降法により簡単に精製される。関連する抗原に特異的な固定化されたモノクローナル抗体を保持するペトリ皿での細胞集団のパンニングを使用して不要な細胞を除去することもできる。

必要な立体配座構造の標的抗原を発現する細胞は、標的病原体上に発現されるものと同じ構造に特異的に反応することが知られる特異的立体配座依存性モノクローナル抗体を用いて同定することができる。

【0065】

高い親和性で診断用抗体と反応するが正しい立体配座を生じない抗原の可能性を最少にするために、選択過程において幾つかのモノクローナル抗体を使用する

1つのモノクローナル抗体では標的抗原の正しい折畳みの全ての状況を決めることができないので、高い親和性で診断用抗体と反応するが、その抗原が標的病原体の表面上で見られる立体配座として定義され、または標的病原体から分泌されるような正しい立体配座を生じない抗原の可能性を最少にすることができる。

この可能性を最少にする1つの方法は、それぞれが正しく折り畳まれたタンパク質中の異なる立体配座エピトープと反応することが分かっている幾つかのモノクローナル抗体を、選択プロセスにおいて使用することである。これは例えば二次FACS選別により達成することができる。

次に、所望の時間に正しい体内部位で十分な抗原を首尾良く発現した富化されたプラスミド集団を、多様性を拡張するために（場合により本明細書に記載される他の定方向進化法と組合せた）遺伝子再集合を組み入れたさらなる選択を行うときの出発集団として使用する。このようにして、DNAワクチンで免疫した動物の組織から得たプラスミドによりコードされる所望の生物学的活性を回収する。

この方法は、DNAワクチン構築物に組み込みたい免疫アクセサリ分子を発現する、*in vivo*で選択された最良のベクターを提供することもできる。例えば、アクセサリタンパク質B7.1またはB7.2を（T細胞に抗原を首尾良く提示させるために）抗原提示細胞（APC）中で発現させたい場合、機能的B7タンパク質を認識する市販のモノクローナル抗体を用いて（接種部位または異なる部位の）種々の組織から単離したAPCを選別することができる。

2.5.1.2. 分泌された抗原/サイトカイン/ケモカインの発現についての選択

誘導された*in vivo*免疫反応の質的および量的性質に影響を及ぼすことができる

可溶性タンパク質の分泌の誘導に最適なベクターの選択

本発明は、誘導された免疫反応の質的および量的性質に影響することができる可溶性タンパク質の分泌において最適な、遺伝的ワクチンベクター集団におけるプラスミドを同定するための方法も提供する。例えばこれらの方法は、特定のサイトカイン、増殖因子およびケモカインの分泌に最適なベクターの選択に有用である。この選択の目的は、サイトカイン、ケモカインおよび増殖因子と、異なるプロモーター、エンハンサー、ポリA領域（tracts）、イントロン等とのどの特定の組合せが、必要とされる*in vivo*免疫反応を誘導するのかを決めることである。

典型的にはポリペプチドをコードする遺伝子は、最適なシグナル分泌配列と共にワクチンベクターライブラリー中に存在する（タンパク質は細胞から分泌される）

目的の可溶性タンパク質の遺伝子の組合せを、ベクターの中に存在させることができる。転写は単一のプロモーターからも可能であり、また該遺伝子はシストロン性配置に置かれてもよい。典型的には、該ポリペプチドをコードする遺伝子は、発現されたタンパク質がその細胞から分泌されるように、最適なシグナル分泌配列とともに該ワクチンベクターライブラリー中に存在する。

in vitroで可溶性因子の種々の組み合わせを分泌することができ且つ所望の時間の間これらの因子を発現することができるベクターの作成

これらの方法における第1ステップは、in vitroで可溶性因子の種々の組合せを高レベル（低レベルの場合もある）で分泌することができ且つこれらの因子を必要に応じて短時間または長時間の間発現するベクターを作成することである。この方法により、既知の時間の既知の組織中における既知のパターンの可溶性タンパク質発現により特徴付けられるプラスミドを選択し、該プラスミドの在庫品（inventory）を保持することができる。次に、これらのベクターを、適当な発現構築物中に遺伝的ワクチン抗原と組み合わせて配置したあと、in vivoでの効力について別々に試験することができる。

同定に先立つ細胞集団分離のためのFACS選別、アフィニティーパンニング、ロゼット形成、または磁気ビーズ分離を用いたベクターライブラリーの送達およびそれに続く収集、試験および精製

ベクターライブラリーを試験動物に送達し、選ばれた時間をおいたあと、その動物の様々な部位から組織および/または細胞を収集する。標準的な細胞生物学的手法（しばしばアフィニティー試薬として細胞特異的表面反応性モノクローナル抗体の使用を伴う）を用いて組織から細胞を精製する。上記細胞表面抗原の場合と同じように、所望のタンパク質を発現する細胞を同定する前に、別々の細胞集団の物理的な精製を行うことができる。これらの研究では、サイトカインの発現のための標的細胞はたいてい、筋細胞や上皮細胞ではなくAPCまたはB細胞またはT細胞である。このような場合において、異なる細胞型の分離には、確立された方法によるFACS選別が好ましい。上記の異なる細胞型は、マウス免疫細胞の表面膜の表現型を決めることが知られている既存のモノクローナル抗体のパネルを使用したアフィニティーパンニング、ロゼット形成または磁気ビーズ分離を用い

て比較的純粋な画分へと分離することもできる。

【0066】

多様性を拡張するために遺伝子再集合を組み込んだ（場合により本明細書中に記載される他の定方向進化法を組合せた）さらなる選択に使用するための、目視検査またはフローサイトメトリーによる精製細胞の同定および選択

精製された細胞を、細胞の生存能力を維持する条件下で寒天プレートの上に乗せる。標的病原体上で発現したときと同じ構造に特異的に反応することが知られている立体配座依存性モノクローナル抗体を用いて、必要な立体配座構造の標的抗原を発現する細胞を同定する。細胞からの関連する可溶性タンパク質の放出は、モノクローナル抗体とインキュベートした後に肉眼で見えるシグナル（金析出、発色、蛍光、発光）を出す二次試薬と共にインキュベートすることにより検出する。最大レベルの抗原を発現する細胞は、目視検査、拾い出した細胞または細胞コロニー、およびこの反応性を付与したプラスミドDNAワクチンベクターを回収するために使用される標準的な分子生物学的手法により同定することができる。あるいは、フローサイトメトリーを使用して、高レベル遺伝子発現を誘導するプラスミドを含む細胞を同定および選択することができる。つぎに、所望の時間の間、正しい体内部位で十分な可溶性因子を首尾良く発現した富化されたプラスミド集団を、さらに改良が必要な場合、多様性を拡張するために遺伝子再集合を組み込んだ（場合により本明細書中に記載される他の定方向進化法と組合せた）さらなる選択のための出発集団として使用する。このように、DNAワクチンで免疫した動物の組織から得たプラスミドによりコードされる所望の生物学的活性を回収する。

スクリーニングの最初の結果が幾つかの立体配座エピトープがプローブされる場合にも維持されることを、モノクローナル抗体を用いて確認する

正しく折畳まれたサイトカイン、ケモカインまたは増殖因子における異なる立体配座エピトープと反応することが各々知られている幾つかのモノクローナル抗体を用いて、1つのモノクローナル抗体試薬を用いたスクリーニングから得た最初の結果が幾つかの立体配座エピトープがプローブされる場合にも維持され得ることを確認することができる。幾つかのケースにおいて、寒天中の細胞/細胞コ

ロニーから放出される機能的サイトカインのための一次プローブはコグネート受容体の可溶性ドメインでもよい。

【0067】

2.5.2. フローサイトメトリー

ベクターモジュール・ライブラリーの多くをフローサイトメトリーによりアッセイして、所望の特性が最も改良された実験的に生成された核酸配列を含む個々のヒト組織培養細胞を選択することができる

フローサイトメトリーは、数百万もの個々の細胞の機能的特性を効率的に分析するための手段である。照明ゾーンに細胞を通過させ、そこで該細胞にレーザービームを当てて、散乱光および蛍光を、コンピューターに接続した検出器により分析する。フローサイトメトリーは、他の細胞集団分析方法よりも有利な点を幾つか提供する。1秒あたり数千個の細胞を高精度且つ高感度で分析することができる。細胞集団のゲーティング (gating) により、各サンプルのマルチパラメータ分析が可能となる。細胞の大きさ、生存能力、および形態を、染色せずに分析することができる。染料および標識抗体を使用する場合、DNA内容物、細胞表面タンパク質および細胞質内タンパク質を分析し、細胞型、活性化状態、細胞周期段階を同定し、アポトーシスを検出することができる。最大4色まで（したがって異なる蛍光標識で染色した4つの別々の抗原）および光散乱特性を同時に分析することができる（4色は2レーザー装置を必要とし、1レーザー装置は3色を分析することができる）。幾つかの遺伝子の発現レベルを同時に分析し、重要なことに、フローサイトメトリーに基づく細胞選別（FACS選別）により所望の表現型を有する細胞の選択が可能になる。プロモーター、エンハンサー、イントロン、エピソードの複製起点、抗原の発現レベルの様子、細菌起源および細菌性マーカーを含むベクターモジュールライブラリーの多くは、フローサイトメトリーにより分析して、所望の特性が最も改良された、再集合した（および/または本明細書中に記載される1以上の定方向進化法にかけた）核酸配列を含む個々のヒト組織培養細胞を選択することができる。この選択は典型的に、本明細書で図解したように、表面抗原または代理マーカータンパク質の高レベル発現のために行われる。最適な各配列からなるプールを、フローサイトメトリーに基づく選別によ

り選択した細胞から回収する。このアプローチの利点は、非常に多数 ($>10^7$) を1回のバイアル実験で評価することができることである。

【0068】

2.5.3. さらなるin vitroスクリーニング法

改良されたアジュバント活性および免疫刺激特性についてのスクリーニング等の
様々なin vitro試験法を用いた、改良されたワクチン接種特性についてのスクリー
ニング

当業者に公知である様々なin vitro検査法を用いて、遺伝的ワクチンベクターおよびベクターモジュールを、改良されたワクチン接種特性についてスクリーニングすることができる。例えば、最適化された遺伝的ワクチンを、目的の特定のリンパ球型（例えばB細胞、T細胞、T細胞系およびT細胞クローンなど）の増殖の誘導に及ぼす影響について試験することができる。改良されたアジュバント活性および免疫刺激特性についてのこのタイプのスクリーニングは、例えばヒトまたはマウス細胞を用いて行うことができる。

サイトカイン産生のスクリーニング（ELISAおよび/または細胞質サイトカイン染色およびフローサイトメトリー）などの種々のin vitro試験法を用いた改良され
たワクチン接種特性のスクリーニングまたは T_H1/T_H2 分化を指令するベクターの
能力における変化のスクリーニング

例えばポリヌクレオチド再集合（場合により本明細書中に記載された他の定方向進化法と組合せて）により得られた遺伝的ワクチンベクターのライブラリー、またはサイトカイン、共刺激分子などをコードする遺伝子を保持するベクターのライブラリーを、B細胞、T細胞、単球/マクロファージ、全ヒトPBMCまたは（希釈した）全血により、サイトカイン産生（例えばIL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 産生）についてスクリーニングすることができる。サイトカインは、ELISAおよび/または細胞質サイトカイン染色およびフローサイトメトリー（単一細胞分析）により測定することができる。サイトカイン産生プロファイルに基づいて、 T_H1/T_H2 分化を指令するベクターの能力における変化をスクリーニングすることができる（例えばIL-4/IFN- γ 、IL-4/IL-2、IL-5/IFN- γ 、IL-5/IL-2、IL-13/IFN- γ 、IL-13/IL-2の比における変化により示される）。A

PC活性化の誘導は、活性化抗原（例えばB7-1（CD80）、137-2（CD86）、MHCクラスIおよびII、CD14、CD23およびFc受容体など）の表面発現レベルにおける変化に基づいて検出することができる。

感染したマウスの脾臓細胞を単離しおよび細胞障害性Tリンパ球が感染した自己由来標的細胞を溶解する能力を検査することにより、遺伝的ワクチンベクターのT細胞活性化誘導能について分析する

幾つかの実施形態において、遺伝的ワクチンベクターのT細胞活性化誘導能について分析する。より詳細には、注射したマウスから得た脾臓細胞を単離し、細胞傷害性Tリンパ球が感染した自己由来標的細胞を溶解する能力について検査する。脾臓細胞を特定の抗原でin vitroで再活性化させる。さらに、ヘルパーT細胞の分化を、ELISAにより、ならびに細胞質サイトカイン染色およびフローサイトメトリーによりTC4⁺T細胞中で直接、T_H1（IL-2およびIFN- γ ）およびT_H2（IL-4およびIL-5）サイトカインの増殖または産生について測定することにより、分析する。

例えば免疫した個体から得た末梢Bリンパ球を用いたアッセイまたは標的細胞による抗原発現の検出を伴うアッセイで、体液性免疫応答を誘導する能力について試験する

遺伝的ワクチンおよびワクチン成分は、体液性免疫応答を誘導する能力（例えば目的の抗原に特異的な抗体のB細胞産生の誘導により示される）について試験することもできる。これらのアッセイは、例えば免疫した個体から得た末梢Bリンパ球を用いて行うことができる。このようなアッセイ法は、当業者に公知である。他のアッセイは、標的細胞による抗原発現の検出を伴う。例えばFACS選択は、その細胞表面に所望の抗原を産生する細胞を同定する最も効率的な方法を提供する。FACS選択の他の利点は、異なるレベルの発現（より低い発現が望ましい場合もある）について選別することができることである。他の方法は、プレート上でのモノクローナル抗体を用いたパンニングを伴う。この方法により、短時間で大量の細胞を操作することができるが、この方法は、最も高い発現レベルについてのみ選択する。モノクローナル抗体でコーティングした磁気ビーズによる捕捉は、特定の抗原を発現する細胞を同定する他の方法を提供する。

in vitroでの腫瘍細胞系の増殖を阻害する能力についてのスクリーニング

癌細胞に対抗する遺伝的ワクチンおよびワクチン成分は、in vitroでの腫瘍細胞系の増殖を阻害するその能力についてスクリーニングすることができる。このようなアッセイは、当分野において公知である。例えば癌または自己免疫疾患に対する遺伝的ワクチンの効力の指標は、ベクターを患者または試験動物の皮膚に注射したときの皮膚の炎症の程度である。重度の炎症は、抗原特異的T細胞の強力な活性化に関係する。腫瘍特異的T細胞の活性化の向上は、腫瘍の中和 (killing) の強化につながり得る。自己抗原の場合、 T_H2 に対する応答をそらす免疫調節剤を添加することができる。皮膚の生検を行い、各注射部位で生じる免疫応答のタイプの詳細な検査を行うことができる（マウスでは多くの注射/ベクターを分析することができる）。他の好適なスクリーニング法は、遺伝的ワクチンベクターのライブラリーによりチャレンジした細胞による、サイトカイン、ケモカイン、アクセサリー分子などの発現における変化の検出を含むことができる。

【0069】

複製可能な遺伝的パッケージの表面に提示 (display) されるタンパク質との融合体としての組換えペプチドまたはポリペプチドの発現

特定の用途のための様々なスクリーニング法をここに記載する。幾つかの例において、スクリーニングは、複製可能な遺伝的パッケージの表面に提示されるタンパク質との融合体として実験的に生成したライブラリーのポリヌクレオチドによりコードされる組換えペプチドまたはポリペプチドの発現を伴う。例えばフェージ提示を使用することができる。例えばCwirlら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 87: 6378-6382(1990); Devlinら、Science 249: 404-406 (1990), Scott � Ladnerら、米国特許第5,571,698号を参照されたい。他の複製可能な遺伝的パッケージには、例えば細菌、真核ウイルス、酵母および胞子が含まれる。

組換え核酸およびポリペプチドの精製およびin vitro分析

確率論的（例えばポリヌクレオチドのシャフリングおよび中断合成）および/または非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行ったら、最も有望な候補組換え核酸を同定するために、実験的に生成されたポリヌクレオチドの得られたライブラリーを精製およびin vitroでの事前分析にかけることができる。アッセイは、高

スループット形式で行うことが有利である。例えば、（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた各組換え抗原を精製するために、クローンをロボットで96ウェル・フォーマットに取り出し、増殖し、必要であれば保存用に冷凍することができる。

全細胞溶解物（V-抗原）、細胞周辺エキス、または培養上清（トキシン）を、以下に記載するようにELISAにより直接アッセイすることができるが、高スループット精製をさらに必要とする場合もある。固定化抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーまたは小さな固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを用いた非免疫原性アフィニータグ（例えばヘキサヒスチジンペプチド等）の取りこみにより、タンパク質の高速精製が可能になる。96-ウェルフィルター底プレートを用いた高結合能試薬は、高スループット精製法を提供する。培養および精製のスケールは、タンパク質収量によって異なるが、最初の検査では、タンパク質50 μ g未満が必要であろう。改良された特性を示す抗原は、再アッセイおよび動物チャレンジ試験のためのFPLCにより、より大きなスケールで精製することができる。

幾つかの実施形態において、（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた抗原をコードするポリヌクレオチドを、遺伝的ワクチンとしてアッセイする。（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた抗原配列を含む遺伝的ワクチンベクターは、ロボットによるコロニーのピッキングおよびそれに続くロボットによるプラスミド精製により調製することができる。1日に600～800プラスミドの精製を可能とするロボットによるプラスミド精製プロトコルが利用できる。このDNAの量および純度も、例えば96ウェルプレートで分析することができる。現在のところ好適な実施の形態において、各サンプル中のDNAの量はロボットにより平均化し、これにより異なるバッチのベクター間のばらつきを大幅に減少することができる。

タンパク質および/または核酸を必要に応じてピッキングおよび精製したら、これらを任意の多数のin vitro分析法にかけることができる。このようなスクリーニング法には、例えば効率的に発現され且つ複数のエピトープと適切な折畳み

パターンを有する抗原を同定するためのELISAアッセイ、フローサイトメトリー、およびファージ提示アッセイが含まれる。細菌性トキシンの場合、このライブラリーは、哺乳動物細胞における毒性の減少についてスクリーニングすることもできる。

1つの例として、交差反応する組換え抗原を同定するために、モノクローナル抗体のパネルをスクリーニングに使用することができる。体液性免疫応答は一般に、抗原タンパク質の複数の領域をターゲティングする。したがって、免疫原性タンパク質の種々の領域に対してモノクローナル抗体を作成することができる (Alvingら (1995) *Immunol. Rev.* 145:5)。さらに、所与の病原体1株のみを認識するモノクローナル抗体の幾つかの例があり、よって当然、異なる抗原型の病原体は、異なるセットの抗体により認識される。例えば、モノクローナル抗体のパネルは、VEEエンベロープタンパク質に対して作成され、これにより異なる複数の亜種のウイルスを認識する手段を提供していた (RoehrigおよびBolin(1997) *J. Clin. Microbiol.* 35: 1887)。このような抗体は、ファージ提示およびELISAスクリーニングと組合せて、複数の病原体株から得たエピトープを有する組換え抗原を富化するために使用することができる。フローサイトメトリーに基づく細胞選別は、最も効率良く発現される変異体の選択をさらに可能にする。

【0070】

ファージ提示は、大きなライブラリーから目的のタンパク質を選択するための強力な方法を提供する (Bassら (1990) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 8: 309; LowmanおよびWells(1991) *Methods: A Companion to Methods Enz.* 3(3): 205-216. LowmanおよびWells(1993) *J. Mol. Biol.* 234:564-578)。ファージ提示技法についての最近の幾つかの概説としては、例えばMcGregor(1996) *Mol Biotechnol.* 6(2): 15 5-62; Dunn (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* 7(5): 547-53; Hillら (1996) *Mol Microbiol* 20(4):685-92; *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*. BK. Kay, J. Winter, J. McCafferty 編, Academic Press 1996; O'Neilら (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5(4): 443-9; Phizickyら (1995) *Microbiol Rev.* 59(1): 94-123; Clacksonら (1994) *Trends Biotechnol* 12(5)173-84; Feliciら (1995) *Biotechnol. Annu. Rev.* 1:1

49-83; Burton (1995) Immunotechnology 1(2): 87-94.が挙げられる。またCwirllaら、Proc. Natl. Acad Sci. USA87: 6378-6382(1990); Devlinら、Science 249: 404-406(1990)、Scott & Smith, Science 249: 386-388(1990); Ladnerら、米国特許第5,571,698号も参照されたい。各ファージ粒子はその表面にユニークな変異体タンパク質を提示し、その特定の変異体をコードする遺伝子をパッケージングする。(例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により) 実験的に進化させた該抗原のための遺伝子を、該ファージ表面に発現されるタンパク質に融合させ(例えばファージM13のIII遺伝子など)、ファージミドベクター中にクローニングする。現在のところ好適な実施形態において、抑制できる(suppressible) 停止コドン(例えばアンバー停止コドン)は、大腸菌の抑制された株において、M13ヘルパーファージに感染させたときに抗原-gIIIp融合体を産生し、ファージ粒子の中に取り込まれるように、該遺伝子を分離する。同ベクターは、タンパク質精製のために、抑制されていない大腸菌中において融合されていない抗原のみの産生を指令することができる。提示ライブラリーのために最も良く使用される遺伝的パッケージ

提示ライブラリーで最も良く使用される遺伝的パッケージは、バクテリオファージ(特に線状ファージ) および特にファージM13、FdおよびF1である。多くの研究は、提示されるべきポリペプチドをコードするライブラリーをこれらのファージのgIIIまたはgVIII中に挿入して融合タンパク質を形成する工程を含む。例えばDowerの国際特許出願W091/19818号; Devlinの国際特許出願W091/18989号; MacCaffertyの国際特許出願W092/01047号(III遺伝子); Huseの国際特許出願92/06204号; Kangの国際特許出願W092/18619号(VIII遺伝子)を参照されたい。このような融合タンパク質は、通常はファージコートタンパク質由来の(ただし必ずしもこれに由来するわけではない) シグナル配列、提示されるポリペプチドおよびIII遺伝子またはVIII遺伝子タンパク質のいずれかまたはその断片を含む。外因性コード配列はしばしばIII遺伝子またはVIII遺伝子のN末端またはその付近に挿入されるが、他の挿入位置も可能である。

【0071】

ポリペプチドを提示するための真核ウイルスの使用

真核生物ウイルスを使用して、同様にポリペプチドを提示することができる。例えば、モロニー Maus 白血病ウイルスの gp70 に融合された ヒト ヘレグリン (he regulin) の提示は、Han らの Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751(1995) に報告されている。複製可能な遺伝的パッケージとして胞子を使用することもできる。この場合、ポリペプチドは胞子の外側表面から提示される。例えば *B. subtilis* から得た胞子が好適であると報告されている。これらの胞子のコートタンパク質の配列は、Donovan ら、J. Mol. Biol. 196, 1-10(1987) により提供されている。細胞を複製可能な遺伝的パッケージとして使用することもできる。提示されるポリペプチドを、その細胞表面上に発現される細胞タンパク質をコードする遺伝子中に挿入する。*Salmonella typhimurium*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Vibrio cholerae*、*klebsiella pneumonia*、*Neisseria gonorrhoea*、*Neisseria meningitidis*、*Bacteroides nodosus*、*Moraxella bovis*、および特に *Escherichia coli* を含む細菌細胞が好ましい。外側表面タンパク質の詳細は、Ladner らの米国特許第 5,571,698 号およびそこに引用された参考文献により記載されている。例えば大腸菌のタンパク質である lamB が好適である。

ポリペプチドとその遺伝的物質との物理的な会合の確立

ファージまたは他の複製可能な遺伝的パッケージを使用する提示方法の基本的な概念は、スクリーニングされるポリペプチドをコードする DNA とそのポリペプチドとの間の物理的な会合の確立である。この物理的な会合は、複製可能な遺伝的パッケージにより提供され、該パッケージは該ファージのゲノムを包むキャプシドまたは他のパッケージの一部としてポリペプチドを提示する。ここで、該ポリペプチドは該ゲノムによりコードされる。ポリペプチドとその遺伝的物質との間の物理的な会合の確立により、異なるポリペプチドを保持する多量のファージを同時に大量スクリーニングすることが可能になる。標的（例えばレセプターなど）に対して親和性を有するポリペプチドを提示するファージはその標的に結合し、これらのファージは該標的へのアフィニティスクリーニングにより富化される。これらのファージから提示されたポリペプチドのアイデンティティは、これらそれぞれのゲノムから決定することができる。

次に、これらの方法を用いて、所望の標的に対する結合親和性を有すると同定

されたポリペプチドを従来法により大量合成することができる。あるいは、該ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを遺伝的ワクチンの一部として使用することができる。

特異的結合特性を有する変異体（この場合はファミリー特異的抗体への結合）は、固定化抗体を用いたパンニングにより簡単に富化される。その抗原ファミリーから複数のエピトープを有する変異体を簡単に選択するために、単一のファミリーに特異的な抗体をパンニングの各回毎に使用する。例えばAファミリー特異的抗体を使用して、（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたA特異的エピトープを提示するクローンを、初回のパンニングで選択することができる。B特異的抗体を用いた2回目のパンニングでは“A”クローンからA-特異的エピトープおよびB-特異的エピトープの両方を提示するクローンを選択する。C特異的抗体を用いた3回目のパンニングでは、A、BおよびCエピトープを有する変異体を選択する。大腸菌中で良く発現しかつ選択の間安定であるクローンの場合は、このプロセスの間に継続的な選択が行われる。転写、翻訳、分泌、折畳みおよび安定性などの要因の向上がしばしば観察され、ワクチン作成に使用するために選択されたクローンの有用性を強化するであろう。

ファージELISA法を使用して、個々の変異体を素早く特徴付けることができる。これらのアッセイは、各タンパク質を精製することなく変異体の定量を素早く行うための方法を提供する。個々のクローンを96ウェルプレート中に並べ、増殖し、保存のために冷凍する。2枚作成したプレート中の細胞をヘルパーファージに感染させ、一晚増殖させ、遠心分離によりペレット化する。特定の変異体を提示するファージを含む上清を固定化抗体と共にインキュベートし、結合したクローンを抗M13抗体コンジュゲートにより検出する。ファージ粒子の滴定シリーズ（titration series）、固定化抗原、および/または可溶性抗原競合結合検査は全て、タンパク質結合を定量する非常に効果的な手段である。複数のエピトープを提示する変異体抗原を、適当な動物チャレンジモデルにおいてさらに検査する。

幾つかのグループは、大きなライブラリーからの所望の特性を有する突然変異

タンパク質のスクリーニングおよび選択のためのin vitroリボソーム提示システムについて報告している。この技法をファージ提示に同様に使用して、改良された特性（例えば抗体への広い交差反応性および改善された折畳み）を有する変異体抗原を選択または富化することができる（例えばHanesら(1997) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94(10):4937-42; Mattheakisら(1994) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91(19):9022-6; Heら(1997) Nucl. Acids Res. (24):5132-4; Nemotoら(1997) FEBS Lett. 414(2):405-8）。

【0072】

他の提示方法は、改良された特性（例えば増加した発現レベルや広い交差反応性、折畳みや安定性の強化等）について抗原をスクリーニングするためのものである。これらの方法には、無傷の大腸菌または他の細胞上へのタンパク質の提示があるが、これらに限定されない（例えばFranciscoら(1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 1044-10448; Luら(1995) Biotechnology 13:366-372など）。

（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた抗原のDNA結合タンパク質への融合によって、発現ベクター中で該抗原タンパク質をその遺伝子に結合することができる（Schatzら(1996) Methods Enzymol. 267: 171-91; Gatesら(1996) J. Mol. Biol. 255:373-86）。様々な提示方法およびELISAアッセイを使用して、（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた、改良された特性（例えば複数のエピトープの提示、改良された免疫原性、発現レベルの増強、折畳み速度および効率の向上、温度、緩衝液、溶媒などの要因に対する安定性の向上、精製特性の向上等）を有する抗原をスクリーニングすることができる。様々なクロマトグラフィー条件下において、（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた、発現、折畳み、安定性および精製プロフィールが改良された抗原の選択は、ワクチン製造方法に組みこまれる非常に重要な改良であり得る。宿主細胞において向上された発現を示す組換え抗原ポリペプチドを同定するためには、フローサイトメトリーが有用な技法である。

フローサイトメトリーは、数百万もの個々の細胞の機能的な特性を効率的に分

析するための方法を提供する。幾つかの遺伝子の発現レベルを同時に分析することができ、およびフローサイトメトリーに基づく細胞選別により、細胞表面上または細胞質中に適切に発現された抗原変異体を提示する細胞の選択が可能となる。非常に多数 ($>10^7$) の細胞を一回のバイアル実験で評価することができ、最良の各配列からなるプールをこの選別した細胞から回収することができる。これらの方法は、例えば一般に哺乳動物細胞中における発現が非常に乏しいHantaanウイルス糖タンパク質の場合に、特に有用である。このアプローチは、哺乳動物細胞における病原体抗原の発現レベル（遺伝的ワクチンの機能にとって非常に重大な現象である）を向上させるための一般的な解決策を提供する。

細胞表面上に発現されないポリペプチドを分析するためにフローサイトメトリーを使用するために、ライブラリー中で実験的に生成したポリヌクレオチドを遺伝子操作して、該ポリヌクレオチドを細胞膜にターゲッティングされるアミノ酸の領域を有する融合タンパク質として発現させることができる。例えば、この領域は、発現されたタンパク質へのホスホイノシトール-グリカン (PIG) 末端の付着を合図して該タンパク質をトランスフェクトされた細胞の表面上に発現させるよう指令するC末端アミノ酸の疎水性ストレッチをコードすることができる (Whitehornら (1995) *Biotechnology* (NY) 13:1215-9)。天然で可溶性タンパク質である抗原を用いる場合、この方法はこの遺伝子操作した新しいC末端との融合においてタンパク質の3次元折畳みにほとんど影響を及ぼさない。天然で膜貫通タンパク質である抗原（例えば病原性ウイルス、細菌、原生生物または腫瘍細胞上の表面膜タンパク質等）を用いた場合、少なくとも2つの可能性がある。

第1は、細胞外ドメインを遺伝子操作してPIG結合を合図するためのC末端配列と融合させることができる。第2は、タンパク質を宿主細胞のシグナリングによってまとめて (in toto) 発現させて、これを細胞表面に効率的に仕向けることができる。まれではあるが、発現させる抗原が内因性PIG末端結合を有することもある（例えば病原性原生生物の幾つかの抗原など）。

抗原を発現する細胞は、PIGが結合した状態の表面抗原上のC末端配列に特異的な蛍光モノクローナル抗体を用いて同定することができる。FACS分析により、細胞集団上の正しい形態の抗原の発現レベルの定量的評価が可能である。最大レベ

ルの抗原を発現する細胞を選別し、標準的な分子生物学的方法を使用して、この反応性を付与したプラスミドDNAワクチンベクターを回収する。該抗原を発現する細胞全てを精製することができる（および抗原発現細胞は非常に小さな少数集団であり得るため細胞選別器に載せる前に有用であろう）他の方法は、表面抗原を発現する細胞をロゼット形成またはpan精製することである。ロゼットは、抗原発現細胞と関連する抗原に共有結合した抗体を保持する赤血球との間に形成することができる。これらはユニット重力沈降法により簡単に精製される。関連する抗原に特異的な固定化されたモノクローナル抗体を載せたペトリ皿での細胞集団のパンニングを使用して不要な細胞を除去することもできる。

【0073】

本発明の高スループットアッセイでは、（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた数千もの異なる変異体を一日でスクリーニングすることが可能である。例えば、マイクロタイタープレートの各ウェルを使用して別々のアッセイを行うことができる。あるいは、濃度またはインキュベーション時間の影響を観測する場合は、5～10ウェル毎に1種類の変異体を検査することができる。このように、1つの標準的なマイクロタイタープレートで約100（例えば96）の反応をアッセイすることができる。1536ウェルプレートを使用する場合であれば、単一のプレートで約100～約1500の異なる反応を簡単にアッセイすることができる。一日に幾つかの異なるプレートをアッセイすることが可能である。本発明の統合システムを用いれば、約6,000～20,000までの異なるアッセイ（すなわち異なる核酸、コードされたタンパク質、濃度等を含む）のためのアッセイスクリーニングが可能である。より最近では、試薬の取扱いのためのマイクロフルイド法（microfluidic approach）が開発された（例えばCaliper Technologies (Palo Alto, CA)）。

一つの態様において、ライブラリーメンバー（例えば細胞、ウイルスプラークなど）を固体培地上で分離して、各コロニー（またはプラーク）を生成する。自動コロニーピッカー（例えばQボット、Genetix、UK）を用いて、コロニーまたはプラークを同定し、拾い出し、10,000までの異なる変異体を96ウェルマイクロタイター皿（場合により凝集を防ぐためにガラスボールをウェル中に含む）に接種

する。Qボットはコロニー全体を取り出すわけではなく、コロニーの中心にピンを挿して細胞（またはプラークの場合はウイルス）を少量サンプリングするものである。ピンをコロニーに入れる時間、培養培地を接種するディップの数、およびピンをその培地中に入れる時間はそれぞれ接種物の大きさに影響を及ぼし、それぞれ調節および最適化することができる。Qボットの均一なプロセスにより、人間の操作ミスを減らし、培養物を作成する速度があがる（だいたい10,000/4時間）。つぎにこれらの培養物を、温度および湿度を調節したインキュベーター中で振蕩する。マイクロタイタープレート中のガラスボールは、発酵装置のブレードと同様に、細胞分散の均一な空気混和（uniform aeration）等を促進する機能を果たす。目的の培養物から得たクローンを限界希釈法によりクローニングする。ライブラリーを構成するプラークまたは細胞は、ハイブリダイゼーション、タンパク質活性、または抗体へのタンパク質結合などの検出により、タンパク質の産生について直接スクリーニングすることもできる。

（例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたライブラリーメンバーの性能が親株の性能よりも僅かに増加したことを検出する能力は、そのアッセイの感度による。免疫応答を誘導する能力が向上した生物を発見する可能性は、そのアッセイによりスクリーニングできる個々の変異体の数により増大する。十分なサイズのプールを同定する可能性を増大させるために、処理された変異体の数を10倍に増加する事前スクリーニングを使用することができる。事前スクリーニングの目的は、親株以上の産生値（product titer）を有する変異体を素早く同定すること、およびこれらの変異体のみを液体細胞培地に移して分析すること、である。

沢山の周知のロボットシステムが、アッセイシステムで有用な溶液相化学のために開発されてきた。これらのシステムには、武田薬品工業株式会社（日本国大阪府）により開発された自動合成装置のような自動化ワークステーション、ならびに科学者が行う手動合成操作を真似たロボットアームを使用した多くのロボットシステム（Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.）が含まれる。上記デバイスはいずれも本発明で使用するのに適しており、例えばコドンが変化した核酸によりコードされる分

子の高スループットスクリーニングに適している。統合システムに言及して本明細書中に記載されるような動作を行うことができるようにこれらのデバイスに（あるとすれば）施される改変の性質および実行は、当業者には自明であろう。

高スループットスクリーニングシステムは、市販されている（例えばZymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA等を参照されたい）。これらのシステムは一般に、サンプルおよび試薬のピペッティング、液体分配、時間調節したインキュベーション、およびそのアッセイに適した検出器でのマイクロプレートの最終的な読出しを全て含む全処理工程を、自動で行うものである。これらのコンフィギュレーション可能（configurable）システムは、スループットが高くて立ち上がりが速く、且つフレキシビリティおよびカスタム化の度合いが高い。

【0074】

このようなシステムの製造は、様々な高スループットの詳細なプロトコールを提供する。このように、例えばZymark Corp.は、遺伝子転写やリガンド結合等の変調を検出するためのスクリーニングシステムについて記載する技術公報を提供する。試薬操作のためのマイクロフルイド法も、開発されている（例えばCaliper Technologies(Palo Alto, CA)）。

カメラまたは他の記録装置（例えばフォトダイオードおよびデータ記憶装置）でとらえた（および場合により記録された）光学画像は、場合により本明細書中の実施形態のいずれかにおいてさらに処理される。例えばその画像をデジタル化し、および/またはその画像を格納してコンピュータで分析する。先に記載したように、幾つかの用途において、アッセイで得られたシグナルは蛍光シグナルであり、これらのケースに適した光学検出法を行う。デジタル化、デジタルビデオもしくはデジタル化光学画像の格納および分析には、市販されている様々な周辺機器およびソフトウェアが利用可能である。例えばPC（Intel×86またはペンティアムチップ適合性のDOS、OS2 Windows, Windows NTまたはVIMOWS95ベースのマシン）、マッキントッシュ、またはLTNIXベースの（例えばSLJNワークステーション）コンピュータを用いる。

1つの従来システムは、アッセイ装置から冷却した電荷結合素子（CCD）カメラ（当分野で通常使用されている）に光を送る。CCDカメラは画素（ピクセル）のアレイを含む。試料からの光をCCDカメラで画像化する。試料の領域（例えば生物学的ポリマーのアレイ上の各ハイブリダイゼーション部位等）に対応する特定のピクセルをサンプリングし、各位置で光強度を読み取る。複数のピクセルを並行処理して処理速度を上げる。本発明の装置および方法は、例えば蛍光または暗視野顕微鏡法でサンプルを観察するために容易に使用される。

本発明の分析用の統合システムは一般にデジタルコンピュータを含み、このデジタルコンピュータは、高スループット液体制御ソフトウェアと、画像解析ソフトウェアと、データ解析ソフトウェアと、該デジタルコンピュータに操作可能にリンクされた目的地にソースから溶液を移すためのロボット液体制御アーマチュアと、該ロボット液体制御アーマチュアによる高スループット液体輸送を制御するためにデータを該デジタルコンピュータに入力するための入力装置（例えばコンピュータのキーボード）と、および任意で、標識したアッセイ成分からの標識シグナルをデジタル化するための画像スキャナと、を備える。画像スキャナは画像解析ソフトウェアとインターフェースして光学強度の測定を行う。一般に、強度測定はデータ解析ソフトウェアにより解析し、最適化された組換え抗原ポリペプチド産物が産生されたどうかを示す。

【0075】

2.5.4 抗原ライブラリー免疫化

現時点で好ましい実施形態においては、免疫原性が向上した最適化された組換え抗原を同定するために抗原ライブラリー免疫化(ALI)を用いる。ALIでは、組換え抗原をコードする核酸のライブラリー、または(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた核酸によってコードされる組換え抗原の試験動物への導入を実施する。次に、その動物を生きた病原体を用いてin vivoチャレンジにかける。全ライブラリー、プール、及び／または個々の抗原変異体で免疫化した後、中和抗体及び交差防御免疫応答を調べる。

試験動物の免疫化方法は当業者によく知られている。現時点で好ましい実施形

態においては、試験動物を2週間の間隔をおいて2回または3回免疫化する。最後の免疫化の1週間後、その動物に生きた病原体(または病原体の混合物)をチャレンジさせ、その動物の生存及び症状を追跡する。試験動物チャレンジを用いる免疫化については、例えばRoggenkampら (1997) *Infect. Immun.* 65: 446; Woodyら (1997) *Vaccine* 2: 133; Agrenら (1997) *J. Immunol.* 158: 3936; Konishiら (1992) *Virology* 190: 454; Kinneyら (1988) *J. Virol.* 62: 4697; Iacono-Connorsら (1996) *Virus Res.* 43: 125; Kochelら (1997) *Vaccine* 15: 547; 及びChuら (1995) *J. Virol.* 69: 6417に記載されている。

前記免疫化は、実験的に作り出したポリヌクレオチド自体のいずれかを遺伝的ワクチンとして注射するか、または実験的に作り出したポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドで動物を免疫化することによって実施することができる。細菌抗原は、典型的には、主に組換えタンパク質としてスクリーニングし、ウイルス抗原は好ましくは遺伝的ワクチン接種を利用して分析する。

免疫原性が向上した個々の抗原を同定するために必要な実験の数を大幅に減らすため、本明細書に示すように、プーリング及びデコンボリューションを用いることができる。組換え核酸または組換え核酸によってコードされたポリペプチドのプールを用い試験動物を免疫化する。次に、病原体チャレンジに対する防御を生じたプールをさらに分割し、さらに分析する。上述の高スループット *in vitro* 法を用いて *in vivo* 試験のために最良の候補配列を同定することができる。

防御抗原のスクリーニングに用いることができるチャレンジモデルとしては、エルシニア属細菌、細菌毒素(例えばブドウ球菌及び連鎖球菌性腸毒素、大腸菌／ビブリオコレラ腸毒素)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEE)、フラビウイルス(日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、デング熱ウイルス)、ハンターンウイルス、単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス(例えばインフルエンザA型ウイルス)、水疱性ステアタイトウイルス(Vesicular Steatitis Virus)、緑膿菌、サルモネラチフィウム、大腸菌、肺炎杆菌、トキソプラズマゴンデ、プラスモディウムヨエリー(*Plasmodium yoelii*)、単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス(例えばインフルエンザA型ウイルス)、及び水疱性ステアタイトウイルス(Vesicular Steatitis Virus)等の病原体及び毒素モデルが

挙げられる。しかし、試験動物を腫瘍細胞によりチャレンジして悪性腫瘍に対し有効な防御を与える抗原のスクリーニングを可能にすることもできる。(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた個々の抗原または抗原のプールを、動物の皮内、筋肉内、静脈内、気管内に、あるいは経肛門、経膈、経口で、または腹腔内に導入し、必要な場合、疾病に対する防御が可能な抗原を、さらに(任意に本明細書に記載したその他の定方向進化法と組み合わせた)再集合及び選択するために選択する。最終的には、試験動物におけるin vivoデータ及び動物及びヒトにおける比較in vitro試験に基づいて、最も強力な抗原をヒトにおける臨床試験のために選択し、そのヒト疾病の予防及び治療能力を調べる。

ある実施形態においては、抗原ライブラリー免疫化及び個々のクローンのプーリングを用いて、そのライブラリーの作製のために用いられた配列に含まれていなかった病原体株に対する免疫化を行う。所与の病原体の異なる株によって与えられる交差防御の水準は、有意であり得る。しかし、同種の力価は、異種の力価より常に高い。プーリング及びデコンボリューションは、(任意に本明細書に記載するその他の定方向進化法と組み合わせて行う)再集合のための開始物質として用いられる野生型抗原によって最小限の防御が与えられているモデルにおいて特に有効である。この方法は、例えばエルシニア属またはハンターウイルス糖タンパク質のV抗原を開発する際に用いることができる。

ある実施形態においては、所望のスクリーニングにおいて、当業者によく知られた免疫学的アッセイをベースにした免疫応答の分析を行う。典型的には、初めに試験動物を免疫化し、例えば最後の免疫化の1~2週間後に血液または組織のサンプルを採取する。これらの試験によって、抗原または抗原のプールが防御免疫を与えるかどうかを決定することに加えて、例えば特定の抗体(特にIgG)の誘導や特定のTリンパ球応答の誘導のような、防御免疫と相互関係を有する免疫パラメータを測定することが可能となる。

【0076】

脾臓細胞または末梢血単核細胞を免疫化した試験動物から単離し、抗原特異的T細胞の存在及びサイトカイン合成の誘導について測定することができる。ELISA

、ELISPOT及び細胞質内サイトカイン染色をフローサイトメトリーと組み合わせることにより、1個の細胞のレベルでそのような情報を得ることができる。

免疫化の有効性を同定するために用いることができる一般的な免疫学的試験としては、抗体測定、中和アッセイ、及び活性化レベル、あるいは抗原提示細胞頻度または抗原もしくは病原体に特異的なリンパ球頻度の分析等が挙げられる。そのような試験において用いることができる試験動物としては、以下に限定するものではないが、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、サル等を挙げることができる。

サルとヒトのMHC分子が非常に類似していることから、サルは特に有用な試験動物である。ウイルス中和アッセイは、病原体に特異的に結合するのみならず、ウイルスの機能も中和する抗体の検出のために有用である。これらのアッセイは、典型的には、免疫化した動物の血清における抗体の検出と、組織培養細胞におけるウイルスの増殖を阻害する能力についてのこれらの抗体の分析をベースとするものである。それらのアッセイは当業者に公知である。ウイルス中和アッセイの一例が、Dolin R (J. Infect. Dis. 1995, 172:1175-83)に記載されている。ウイルス中和アッセイは、防御免疫も与える抗原をスクリーニングするための手段となる。

ある実施形態においては、(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた抗原を、in vivoでT細胞の活性化を誘導するその能力についてスクリーニングする。より具体的には、注射したマウスから末梢血単核細胞または脾臓細胞を単離することができ、細胞傷害性Tリンパ球の感染した自己標的細胞を溶解する能力を調べる。脾臓細胞は、in vitroで特異的抗原を用いて再活性化することができる。さらに、Tヘルパー細胞の活性化及び分化は、細胞の増殖または T_H (IL-2及びIFN-)及び T_H2 (IL-4及びIL-5)サイトカインの産生をELISAによって測定することにより分析することができ、また細胞質内サイトカインの染色及びフローサイトメトリーによって直接CD4⁺T細胞において分析することができる。サイトカインの産生プロファイルに基づき、(例えばIL-4/IFN-、IL-4/IL-2、IL-5/IFN-、IL-5/IL-2、IL-13/IFN-、IL-13/IL-2の比の変化によって証明されるような)抗原の T_H

1/T_H2分化を指令する能力の変化についてスクリーニングすることもできる。in vivoでの特異的なT細胞の強力な活性化は防御免疫の誘導と相互関係があることから、抗原変異体によって誘導されるT細胞活性化の分析は非常に有用なスクリーニング方法である。

in vivoでの抗原特異的CD8+T細胞の頻度は、対応する病原体の抗原に由来する特異的なペプチドを発現するMHCクラスI分子の四量体を用いて直接分析することもできる(Ogg及びMcMichael, Curr. Opin. Immunol. 1998, 10:393-6; Altmanら, Science 1996, 274:94-6)。四量体の結合はフローサイトメトリーを用いて検出でき、(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた抗原の、特異的なT細胞の活性化を誘導する効能についての情報を与える。例えば、フローサイトメトリー及び四量体染色は、所定の抗原またはペプチドに特異的なT細胞を同定する効率的な方法となる。別の方法では、特異的なペプチドを含む四量体をコーティングしたプレートを用いてパンニングを行う。この方法により、短時間に多数の細胞を取り扱うことができるが、前記方法では最高の発現レベルを選択することしかできない。in vivoでの抗原特異的T細胞の頻度が高くなると、免疫化はより効率的になり、最も強力な防御免疫応答を誘導する能力を有する抗原変異体の同定が可能となる。ヒトのMHCクラスI分子は、マウスのものより他の霊長類の分子により類似していることから、これらの試験はサルやその他の霊長類に対して行う場合に特に有用である。

【0077】

抗原変異体による免疫化に応答する抗原提示細胞(APC)の活性化を測定することは、別の有用なスクリーニング方法である。APCの活性化の誘導は、活性化抗原、例えば137-1(CD80)、137-2(CD86)、MHCクラスI及びII、CD14、CD23及びFc受容体等の表面発現レベルの変化に基づいて検出することができる。

癌細胞を死滅させる能力を有する細胞傷害性T細胞を誘導する、(例えばポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた抗原は、免疫化動物に由来するT細胞のin vitroで癌細胞を死滅させる能力を測定することによって同定することができる。典型的には

、初めに癌細胞を放射性アイソトープで標識し、放射能の放出が、免疫化動物に由来するT細胞の存在下でインキュベートした後の腫瘍細胞の死滅を示すことになる。そのような細胞傷害性アッセイは当分野で公知である。

例えば癌抗原、アレルゲン、自己抗原等の特異的なT細胞を活性化する抗原の効能は、抗原を被験者または試験動物の皮膚に注射したときの皮膚の炎症の程度によっても示される。強度の炎症は抗原特異的T細胞の強い活性化と相互に関係する。腫瘍特異的T細胞の活性化の改善は、腫瘍の死滅の促進をもたらす得る。自己抗原の場合には、 T_H2 に対してより多く応答するようにする免疫調節剤を加えることができ、アレルゲンの場合には T_H1 応答が望まれる。皮膚の生検材料を採取することによって、各注射部位において生ずる免疫応答の種類について詳細に研究することが可能となる(マウス及びサルにおいては多数回の注射/抗原を分析することができる)。そのような研究としては、抗原を皮膚に注射した際の細胞によるサイトカイン、ケモカイン、アクセサリー分子等の発現の変化の検出等がある。

抗原特異的T細胞を活性化する最適な能力を有する抗原をスクリーニングするために、あらかじめ感染または免疫化したヒト個体に由来する末梢血単核細胞を利用することができる。抗原ペプチドを提示するMHC分子がヒトMHC分子であることから、この方法は特に有用な方法である。あらかじめワクチン接種または感染させた個体から、または対象の病原体による急性感染症を有する患者から、末梢血単核細胞または精製専門抗原提示細胞(APC)を単離することができる。これらの個体では循環血液中の病原特異的T細胞の発生頻度が増加しているので、これらの個体の精製されたAPCまたはPBMCで発現された抗原は、抗原特異的 $CD4^+$ 及び $CD8^+$ T細胞によるサイトカインの産生及び増殖を誘導する。従って、複数の抗原のエピトープを同時に有する抗原は、種々の病原体抗原、癌抗原、自己抗原またはアレルゲンで免疫化されるか感染した様々な患者からのT細胞を刺激するその抗原の能力によって認識することができる。血液ドナーに由来するあるバフィーコートは、血液0.5リットル中に含まれる量のリンパ球を含み、また最大 10^4 個のPBMCを得ることができ、これによって1のドナーからのT細胞を用いて非常に大規模なスクリーニング実験を行うことができる。

ワクチン接種を受けた健常な個体(実験ボランティア)を試験する場合、これらの個体からEBウイルスで形質転換したB細胞系を調製することができる。これらの細胞系は、後の同じドナーからの血液を用いる実験において抗原提示細胞として用いることができ、これによってアッセイ間およびドナー間のばらつきを減らすことができる。さらに、抗原特異的T細胞クローンを作製することができ、その後抗原変異体をEBV形質転換B細胞に導入する。次に、形質転換されたB細胞が特異的T細胞クローンの増殖を誘導する効率について調べる。特異的なT細胞クローンをを用いて行う場合、増殖及びサイトカイン合成反応は、全PBMCを用いたときより極めて高レベルとなり、これはPBMC中の抗原特異的T細胞の頻度が非常に低いことによる。

【0078】

クラスI主要組織適合複合体(MHC)表面糖タンパク質は広く発現されることから、CTLエピトープは大抵の種類の細胞によって提示され得る。従って、適当な発現ベクター中の(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた抗原の配列のライブラリーによる培養中の細胞へのトランスフェクションによって、クラスIエピトープの提示が生じ得る。所定のエピトープに対する特異的CTLが個体から単離された場合、エピトープが提示されているならば、トランスフェクトされた提示細胞とCTLとの同時培養によって例えばIL-2、IFN- γ 、またはTNFのようなサイトカインがCTLによって放出されることがあり得る。より大量のTNFが放出されることは、(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた進化配列からのクラスIエピトープのより効率的なプロセッシング及び提示に対応する。感染細胞を死滅させる能力を有する細胞傷害性T細胞を誘導する、(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた抗原は、免疫化動物に由来するT細胞のin vitroで感染細胞を死滅させる能力を測定することによって同定することもできる。典型的には、初めに標的細胞を放射性アイソトープで標識し、放射能が放出されることにより、免疫化動物に由来するT細胞の存在下でインキュベートした後に標的細胞が死滅したことが示さ

れる。そのような細胞毒性アッセイは当分野で公知である。

最適なCTLエピトープを同定するための第2の方法では、エピトープと反応するCTLの単離は不要である。この方法では、クラスI MHC表面糖タンパク質発現細胞を、上述のような進化配列のライブラリーでトランスフェクトする。適当にインキュベートしてプロセッシング及び提示が行われるようにした後、各細胞培養物から界面活性剤に可溶な抽出物を調製し、MHC-エピトープ複合体の部分的な精製(おそらく任意のもの)の後、産物を質量分析にかける(Hendersonら(1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 10275-10279)。提示が増加されるエピトープの配列が知られていることから、質量分析のキャリブレーションによりこのペプチドを同定することができる。さらに、細胞タンパク質を内部キャリブレーションに用いて定量的な結果を得ることができる。内部キャリブレーションに用いる細胞タンパク質はMHC分子自体でもよい。従って、MHC分子に比例して結合するペプチドエピトープの量を測定することができる。

2.5.5 防御免疫の最適な誘導のスクリーニング

効率的な防御免疫を提供し得るベクターの選択を致死感染モデルを用いて行い、疾病を予防し得るベクターを選択し、(任意に本明細書に記載した他の定方向進化法と組み合わせて行う)再集合及び選択をさらに行う

効率的な防御免疫を提供する遺伝的ワクチンベクターを選択するため、例えば緑膿菌、サルモネラチフィウム、大腸菌、肺炎杆菌、トキソプラズマゴンデ、プラスモディウムヨエリー(Plasmodium yoelii)、単純ヘルペス、インフルエンザウイルス(例えばインフルエンザA型ウイルス)、及び水疱性ステアタイトウイルス(Vesicular Steatitis Virus)等の致死感染モデルを用いて、試験用哺乳動物においてベクターライブラリーのスクリーニングを行うことができる。遺伝的ワクチンベクターまたは個々のベクターのプールを、その動物の皮内、筋肉内、静脈内、気管内に、あるいは経肛門、経膈、経口で、または腹腔内に導入し、(任意に本明細書に記載する他の定方向進化法と組み合わせて)再集合及び選択をさらに行うための疾病を予防し得るベクターを選択する。

【0079】

実施例：抗IL-4 mAbsまたは組換えIL-12；組換えIL-12 (後者のモデルの利点は

、ヒトの病原体侵入の通常の経路である肺を通して感染する点である)

例えば、熱帯リーシュマニア寄生体(*Leishmania major* parasites)を感染させたマウスにおいて最適ベクターをスクリーニングすることができる。BALB/cマウスの足蹠に注射すると、これらの寄生体によって進行性の感染症が発症した後、致死的な播種性疾病となるが、これは抗IL-4 mAbまたは組換えIL-12によって予防することができる(Chatelainら (1992) J. Immunol. 148: 1182-1187)。プラスミドのプールを、これらのマウスの静脈内、腹腔内または足蹠に注射することができ、疾病を予防し得るプールをさらに分析するために選択し、既存の感染症を治療し得るベクターをスクリーニングする。足蹠の腫脹のサイズを目視により追跡することによって、簡単ではあるが正確な疾病の進行のモニタリングを行うことができる。マウスにクレブシェラ肺炎杆菌を気管内に感染させて、致死的な肺炎を生じさせることができ、これは組換えIL-12によって予防することができる(Greenbergerら (1996) J Immunol. 157: 3006-3012)。このモデルの利点は、ヒトの病原体侵入の通常の経路である肺を通して感染する点である。前記ベクターは、病原体とともに肺に与えることができ、あるいは確立した感染症を治療できるベクターをスクリーニングするために症状が明らかになった後に投与することができる。

実施例:非常に少量のDNA及び／または高いウイルス濃度において防御を与えるベクターをスクリーニングするための方法をインフルエンザ-が提供し、それにより in vivoで誘導された抗原特異的Ab及びCTLのレベルを分析することも可能となる

別の実施例では、遺伝的ワクチンが、インフルエンザA型ウイルスのマウスワクチン接種モデルである。インフルエンザは、遺伝的ワクチンの有効性が立証された最初のモデルの1つであった(Ulmerら (1993) Science 259: 1745-1749)。いくつかのインフルエンザ株はマウスにおいて致死的であり、遺伝的ワクチンの有効性をスクリーニングするための簡単な手段となる。

例えば、American Type Culture Collectionから入手可能な(ATCC VR-95)、インフルエンザウイルス株A/PR/8/34は致死の感染症を引き起こすが、マウスをインフルエンザ血球凝集素(HA)遺伝的ワクチンで免疫化すると100%の生存率を得る

ことができる(Deckら (1997) Vaccine 15: 71-78)。このモデルは、非常に少ない量のDNA及び／または高いウイルス濃度において防御を与えるベクターをスクリーニングする方法を提供し、またin vivoで誘導された抗原特異的Ab及びCTLのレベルを分析することも可能とする。

【0080】

実施例:結核菌(部分的防御、大きな改善が必要)

遺伝的ワクチンベクターを、結核菌の感染に対する防御を与えるそれらの能力についても分析することもできる。これは、遺伝的ワクチンが部分的防御を与え、大きな改善が必要である状況の一例である。

さらに試験を行う前の候補ベクターの同定

多数の候補ベクターが同定された後、それらのベクターを別のモデルにおいてさらに詳細に分析することができる。他の感染症モデル(例えばHSV、マイコプラズマ-プルモニス、RSV及び／またはロタウイルス)における試験によって、各感染症において最適なベクターを同定することができる。

1回目のスクリーニングで得られた最適化されたプラスミドを、次の開始物質として用い、良い結果が得られたベクターを配列決定し、対応するヒト遺伝子を、所望の形質の分化を誘導するそれらの能力についてin vitroで特性評価された遺伝的ワクチンベクターにクローン化する

各場合において、1回目のスクリーニングで得られた最適プラスミドを、次の(任意に本明細書に記載した他の定方向進化法と組み合わせた)再集合、集合及び選択の開始物質として用いることができる。動物モデルにおいて良い結果が得られたベクターを配列決定し、対応するヒト遺伝子を遺伝的ワクチンベクターにクローン化する。次にこれらのベクターを、 T_H1/T_H2 細胞の分化、 T_H 細胞の活性化、細胞傷害性Tリンパ球及び単球／マクロファージを誘導するそれらの能力、またはその他の所望の形質についてin vitroで特性評価する。最終的に、マウスにおけるin vivoデータ及びマウス及びヒトにおける比較in vitro試験に基づき、ヒトでの試験のために最も強力なベクターを選択し、様々なヒトの感染症を阻止するそれらの能力を調べる。

防御免疫と相互関係を有する免疫パラメータの測定方法

ベクターのプールが防御免疫を与えるか否かを決定することに加えて、防御免疫と相互関係を有する免疫パラメータ、例えば特異的抗体(特にIgG)の誘導及び特異的なCTL応答の誘導等を測定することができる。脾細胞をワクチン接種したマウスから単離し、抗原特異的T細胞の存在及び T_H1 サイトカイン合成プロフィールの誘導について測定する。ELISA及び細胞質サイトカイン染色をフローサイトメトリーと組み合わせて、1個の細胞レベルでのそのような情報を得ることができる。

2.5.6 ヒト抗原特異的リンパ球応答を活性化する遺伝的ワクチンベクターのスクリーニング

ヒト免疫系に対する最適な免疫刺激特性を有するベクターをスクリーニングするためのPBMCまたはAPCの単離

ヒト免疫系に対する最適な免疫刺激特性を有するベクターをスクリーニングするために、前もってワクチン接種した個体もしくは感染した個体、または目的の病原体による急性の感染症を有する患者から末梢血単核細胞(PBMC)または精製された専門抗原提示細胞(APC)を単離することができる。

個体が特異的なT細胞を有する抗原をコードする遺伝的ワクチンをPBMCにトランスフェクトすることができ、T細胞増殖及びサイトカイン合成の誘導を測定することができ、また遺伝的ワクチンベクターのAPCへの自発的移入をスクリーニングすることが可能である

これらの個体は、循環血液中の病原体特異的T細胞の頻度が増加しているため、これらの個体のPBMC または精製されたAPCにおいて発現される抗原が、抗原特異的CD4+及びCD8+T細胞による増殖及びサイトカイン産生を誘導する。従って、それに対する特異的なT細胞を個体が有する抗原をコードする遺伝的ワクチンベクターを、その個体のPBMCにトランスフェクトすることができ、その後T細胞の増殖及びサイトカイン合成の誘導を測定することができる。あるいは、遺伝的ワクチンベクターのAPCへの自発的移入をスクリーニングすることができ、従ってトランスフェクション効率の改善、抗原の発現の向上、及び特異的T細胞の活性化誘導の向上について同時にスクリーニングするための手段が得られる。最も強力な免疫刺激性を有するベクターを、B細胞増殖及び免疫グロブリン合成を誘導

するそれらの能力に基づいてスクリーニングすることができる。血液のドナーに由来するあるバフィーコートは、0.5リットルの血液中から得られたPBMCリンパ球を含み、最大 10^4 個のPBMCが得られ、1人のドナーからのT細胞を用いて非常に大規模なスクリーニング実験を行うことが可能となる。

【0081】

以降の実験のための、ワクチン接種した健常個体からのEBVで形質転換したB細胞系の製造

ワクチン接種した健常個体(実験ボランティア)について試験する場合、これらの個体からEBVで形質転換したB細胞系を製造することができる。これらの細胞系は、同一のドナーからの血液を用いて後に実験を行う際に抗原提示細胞として用いることができる。これによりアッセイ間及びドナー間でのばらつきを減じることができる。さらに、抗原特異的T細胞クローンを作製し、その後遺伝的ワクチンをEBVで形質転換したB細胞にトランスフェクトすることができる。

形質転換されたB細胞が特異的T細胞クローンを誘導する効率

次に、形質転換されたB細胞が特異的T細胞クローンの増殖を誘導する効率について調べる。特異的T細胞クローンを使用すると、増殖及びサイトカイン合成反応は全PBMCを用いるときより有意に高いものとなり、これはPBMC中の抗原特異的T細胞の頻度が非常に低いからである。

適当な発現ベクター中の(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させたDNA配列のライブラリーによる培養物中の細胞へのトランスフェクションによってクラスIエペトープの提示が生じ得る

クラスI主要組織適合複合体(MHC)表面糖タンパク質は広く発現されることから、CTLエペトープは、大抵の種類の細胞によって提示され得る。従って、適当な発現ベクター中の(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させたDNA配列のライブラリーによる培養物中の細胞へのトランスフェクションによって、クラスIエペトープの提示が生じ得る。所定のエペトープに対する特異的CTLが個体から単離された場合、エペトープが提示されているならば、トランスフェクトされた提示細

胞とCTLとを同時培養することにより例えばIL-2、IFN-、またはTNFのようなサイトカインがCTLによって放出され得ることになる。より多量のTNFが放出されることは、(例えば、ポリヌクレオチドの再集合及び／またはポリヌクレオチドの部位飽和突然変異誘発によって)実験的に進化させた、進化配列からのクラスIエピトープのより効率的なプロセッシング及び提示に対応する。

クラスI MHC表面糖タンパク質発現細胞に進化配列のライブラリーをトランスフェクトし、界面活性剤に可溶性の抽出物を調製し、MHC-エピトープ複合体を部分的に精製した後、産物を質量分析にかける

最適なCTLエピトープを同定するための第2の方法では、そのエピトープと反応するCTLの単離は不要である。この方法では、クラスI MHC表面糖タンパク質発現細胞に、上述のように進化させた配列のライブラリーをトランスフェクトする。プロセッシング及び提示を可能とする適当なインキュベーションの後、各細胞培養物から界面活性剤に可溶性の抽出物を調製し、MHC-エピトープ複合体の部分的な精製(おそらく任意のものである)の後、産物を質量分析にかける(Hendersonら(1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 10275-10279)。提示が増加するエピトープの配列が知られていることから、質量分析をキャリブレーションしてこのペプチドを同定することができる。さらに、細胞タンパク質を内部キャリブレーションのために用いて定量的な結果を得ることができる。内部キャリブレーションのために用いられる細胞タンパク質はMHC分子自体でもよい。従って、MHC分子に比例して結合するペプチドエピトープの量を測定することができる。

2.5.7. ワクチン接種試験のためのSCIDヒト皮膚モデル

ワクチン研究においてマウスモデルを用いることは、マウス及びヒトのMHC分子が実質的に相違しており、即ちマウスにおいて防御的免疫応答を効率的に誘導するタンパク質及びペプチドがヒトでは必ずしも機能しないという点で限界がある

遺伝的ワクチン接種を成功させるためには、ベクターの注射後の標的細胞のトランスフェクション、所望の抗原の発現、抗原提示細胞におけるその抗原のプロセッシング、MHC分子との関係における抗原ペプチドの提示、T細胞受容体によるペプチド／MHC複合体の認識、T細胞のB細胞及び専門APCとの相互作用、ならびに特異的T細胞及びB細胞反応の誘導が必要である。これらの事象の制御はいずれも

マウスとヒトとは異なっている可能性がある。ワクチン研究におけるマウスモデルの限界は、マウス及びヒトのMHC分子が実質的に異なるという事実にある。従って、マウスにおいて防御的免疫応答を効率的に誘導するタンパク質及びペプチドはヒトでは必ずしも機能しない。

【0082】

トランスフェクション効率、導入配列及び遺伝子発現レベルの研究を目的として、ヒトの組織をマウスにおいてin vivoで研究するためにマウスモデルを用いることができる

これらの限界を克服するために、ヒト組織をマウスにおいてin vivoで研究するためにマウスモデルを用いることができる。生きたヒトの皮膚片を、免疫不全マウス、例えばSCIDマウスの背中に異物移植することにより、ベクターのライブラリーをin vivoでのヒト細胞における最適な特性についてスクリーニングすることが可能となる。エピソームベクターの帰納的な選択により、依然エピソームベクターでありながら高レベルの遺伝子発現が可能なベクターについて強い選択圧を加えることができる。これらのマウスは、トランスフェクション効率、導入配列及び遺伝子発現レベルの研究のための優れたモデルとなる。さらに、専門APCに供給される抗原のレベルの評価、及びこれらの細胞が抗原を提示し、抗原特異的CD4+及びCD8+T細胞の活性化を誘導する能力についてのin vitroでの研究のために、これらのマウスに由来する抗原提示細胞(APC)を用いることもできる。特に、SCIDマウスはT細胞及びB細胞成分をかなり欠損しているが、これらのマウスにおける抗原提示細胞(樹状細胞及び単球)は比較的正常である。

ヒト組織の移植を補助するために免疫応答性マウスを免疫不全状態にし、in vivo免疫抑制の一過性の性質により、同様に遺伝的に正常な免疫系を有するマウスへのヒトの皮膚の異物移植におけるワクチン試験を可能にする

このモデル系のある実施形態においては、ヒト組織の移植を可能にするために免疫応答性マウスを免疫不全状態にする。例えば、CD28及びCD40経路を遮断することにより、マウスにおける同種皮膚移植片の長期間の生存が促進される(Larsenら (1996) Nature 381: 434)。in vivo免疫抑制が一過性であることから、このモデルによって遺伝的に正常な免疫系を有するマウスへのヒトの皮膚の異物移植

におけるワクチン試験も可能となる。例えば、中和抗B7-1及び137-2抗体、可溶性CTLA-4、CTLA-4の細胞外部分の可溶性形態、CTLA-4及びIgG分子のFc部分を含む融合タンパク質、及び中和抗CD-40または抗CD40リガンド抗体の投与等を含む、CD28-137相互作用及びCD40-CD40リガンド相互作用を遮断するいくつかの方法が当業者に公知である。一過性の免疫抑制を向上させることができる別の方法として、以下の試薬、即ちシクロスポリンA、抗IL-2受容体-鎖Ab、可溶性IL-2受容体、IL-10、及びこれらの組合せのうち1種以上を投与することが挙げられる。

ヒトの皮膚を移植したSCIDマウスにHLAの一致したPBMCを注射するモデルを、*in vivo*での長期間持続する発現を与えるベクターを分析するために用いることができる。このモデルでは、ベクターをヒトの皮膚に注射するかあるいは局所投与する。

マウスに注射されたHLAの一致したPBMCがベクターに特異的なリンパ球を含む場合、トランスフェクトされた細胞はそれらのベクター特異的なリンパ球によって認識されて最終的に破壊され、効率的に破壊を免れるベクターをスクリーニングする可能性が得られる

その後、HLAの一致したPBMCをこれらのマウスに注射する。PBMCがそのベクターに特異的なリンパ球を含む場合、トランスフェクト細胞はこれらのベクター特異的なリンパ球によって認識されて最終的に破壊される。従って、このモデルにより免疫細胞による破壊を効率的に免れるベクターをスクリーニングする可能性が得られる。ヒトの皮膚を移植したマウスに注射されたヒトPBLは、臓器に対して拒絶反応を起こすことが分かったが、これはこのモデルにおいてCTLが皮膚に達していることを示している。HLAの一致した皮膚及び血液を得ることは可能である(例えば、悪性腫瘍のために皮膚の除去を受けた患者からの血液サンプル及び皮膚移植片、または同じ乳児からの血液及び包皮)。

SCIDhuマウスモデル：さらに、ヒトの皮膚を移植することによって皮膚に注射した後の遺伝的ワクチンベクターの有効性について試験することが可能となる

本明細書に記載したようなスクリーニングに適した別のモデルは、改変型SCIDhuマウスモデルであり、このモデルではヒト胎児胸腺、肝臓及び骨髓の部分がSCIDマウスに移植され、マウスにおいて機能的なヒト免疫系が与えられている(Ron

caroloら (1996) Semin. Immunol. 8: 207)。機能的なヒトB細胞及びT細胞及びAPCをこれらのマウスにおいて観察することができる。さらにヒトの皮膚を移植すると、皮膚に注射した後の遺伝的ワクチンベクターの有効性について試験できる可能性が高い。皮膚の同時移植により追加的な専門APCのソースが与えられるために、モデルが改善される可能性が高い。

【0083】

2.5.8 ヒト筋肉細胞のトランスフェクション及びin vivoでのヒト免疫応答誘導における遺伝的ワクチンの効率を研究するためのマウスモデル

遺伝的ワクチンの有効性を研究するための適当なin vivoモデルは存在せず、大半の研究はマウスモデルにおいて実施されるが、遺伝的ワクチン接種後に生ずる事象の複雑さのために、得られた結果がヒトにおける同様のワクチン接種について信頼性のある予測をするものであるか否かを予測することが困難なことがある

適当なin vivoモデルが存在しないことが、ヒト筋肉細胞における抗原の発現の誘導及び特異的なヒト免疫応答の誘導における遺伝的ワクチンの効率の研究の妨げとなってきた。遺伝的ワクチンの筋肉細胞にトランスフェクトする能力及びin vivoで特異的な免疫応答を誘導する能力についての大半の研究では、マウスモデルが用いられてきた。しかし、遺伝的ワクチン接種後に生ずる事象の複雑さのために、マウスモデルにおいて得られた結果がヒトにおける同様のワクチン接種の結果を信頼性をもって予測するものであるか否かを予測することが困難なことがある。遺伝的ワクチン接種を成功させるために必要な事象としては、プラスミド送達後の細胞のトランスフェクション、必要な抗原の発現、抗原提示細胞における抗原のプロセッシング、MHC分子に関しての抗原ペプチドの提示、T細胞受容体によるペプチド/MHC複合体の認識、T細胞のB細胞及び専門抗原提示細胞との相互作用、及び最終的には特異的なT細胞及びB細胞応答の誘導等が挙げられる。これらの事象はいずれもマウスとヒトとではいくらか異なる形で制御されている可能性が高い。

本発明は、ヒト筋肉細胞トランスフェクションのためのin vivoモデルを提供する

例えば屍体から得られた筋肉組織を、拒絶反応を起こすことなく他の種の組織

を移植することが可能な免疫不全マウスの皮下に移植する。このモデル系は、正常な筋肉細胞のために利用できるin vitro培養系が存在しないことから、特に価値がある。例えば屍体から得られた筋肉組織を免疫不全マウスの皮下に移植する。免疫不全マウスには拒絶反応を起こすことなく他の種の組織を移植することができる。異物移植に適したマウスとしては、限定するものではないが、SCIDマウス、ヌードマウス、及びRAG1またはRAG2遺伝子をコードする遺伝子を欠損させたマウス等が挙げられる。SCIDマウス及びRAG欠損マウスは機能的T及びB細胞を欠いており、従ってかなり免疫無防備状態にあり、移植された器官に対して拒絶反応を起こすことができない。従来の研究により、これらのマウスには、ヒト組織、例えば皮膚、脾臓、肝臓、胸腺または骨等を拒絶反応を起こすことなく移植できることが示されている(Roncaroloら (1996) Semin. Immunol. 8: 207)。ヒト胎児のリンパ組織をSCIDマウスに移植すると、これらのマウスにおいて機能的ヒト免疫系の存在が示され、このモデルは通常SCID-huマウスと称される。ヒト筋肉組織をSCID-huマウスに移植すると、トランスフェクション効率及び所望の抗原の発現を調べることができるのみならず、in vivoで遺伝的ワクチンによって誘導された特異的なヒト免疫応答の誘導を試験することもできる。この場合、同一ドナーからの筋肉及びリンパ器官を用いる。胎児の筋肉も、ドナー起源の成熟リンパ球を殆ど含まず、移植片対宿主反応が生じる可能性が低いという点で有利である。

目的の抗原の発現を調べるために遺伝的ワクチンベクターをヒト筋肉組織内に導入する

ヒト筋肉組織をマウス中に確立後、目的の抗原の発現を調べるために遺伝的ワクチンベクターをそのヒト筋肉組織内に導入する。トランスフェクション効率のみを調べるときにはRAG欠損マウスが好ましく、これはこれらのマウスは循環血液中に成熟B細胞またはT細胞を有していないからである。一方では、移植効率の変化を引き起こし得るSCID表現型の「漏出(leakiness)」が明らかにされた。

モデルは、マウスにおける組織の生存率は限られているにもかかわらずin vivoでヒト筋肉細胞の遺伝子発現を調べるための効率的な手段を提供する

マウスにおけるヒト筋肉組織の生存率は、免疫無防備状態のマウスにおいてで

あっても限られたものとなる可能性が高い。しかし発現の試験は1、2日内で行うことができることから、このモデルはin vivoでヒト筋肉細胞の遺伝子発現を調べるための効率的な手段となる。改変型SCID-huマウスモデルにヒトの筋肉を移植したものを、マウスにおけるin vivoでのヒトの免疫応答を調べるために用いることができる。

【0084】

2.5.9改善されたワクチン送達のためのスクリーニング

特定の形態での投与が可能な遺伝的ワクチンベクターの同定

一定の用途については、例えば経口投与または経皮投与等の特定の形態での投与が可能な遺伝的ワクチンベクターを同定することが望ましい。以下のスクリーニング方法は適当なアッセイを提供する。即ち、追加的なアッセイを、そのアッセイが特に適している特定の遺伝的ワクチンの特性と共に本明細書に記載する。

(Caco-2細胞をベースにした)in vitroまたはin vivoでの経口送達のためのスクリーニング

経口送達のためのスクリーニングはin vitroまたはin vivoの何れかで行うことができる。in vitroの方法の一例は、組織培養で増殖するCaco-2(ヒト大腸腺癌)細胞をベースにした方法である。半透性フィルタ上で増殖させると、これらの細胞はヒト小腸上皮に構造的にも機能的にも類似した細胞に自発的に分化する。遺伝的ワクチンライブラリー及び／またはベクターをCaco-2細胞層の一方の側に置くことができ、その細胞の層を通過し得るベクターをその層の反対側で検出する。

ライブラリーを、経口送達に対する許容性についてin vivoでスクリーニングすることもできる。例えば、ベクターのライブラリーを経口投与することができ、その後に標的の組織をベクターの存在についてアッセイする。腸の上皮、肝臓及び血流は、ライブラリーのメンバーの存在について試験し得る組織の例である。標的の組織へ到達するのに成功したベクターを回収し、さらに改善が必要な場合には、(任意に本明細書に記載する他の定方向進化法と組み合わせて行う)その後の再集合及び選択に用いることができる。

多数のベクターを効率的にスクリーニングでき、in vivoで多数の作用物質の効

果を調べるために用いることができる装置

遺伝的ワクチンベクターのライブラリーを、皮膚または筋肉に注射した際に細胞をトランスフェクトする能力についてスクリーニングするために、本発明は、多数のベクターを効率的にスクリーニングできる装置を提供する。この装置は、96-ウェル形式のもので、マイクロタイタープレートから例えばマウス及びラットのような実験動物の皮膚または筋肉に少容量(2~5 μ l)を移すように設計されたものである。さらに、免疫不全マウスに移植されたヒトの筋肉または皮膚に注射をすることもできる。

前記装置は、その先端部がマイクロタイタープレートに適合するように動く形に設計されている。プレートから目的の試薬を採った後、先端部間の距離は2~3 mmまで小さくなり、96の試薬を1.6 cm $\times$ 2.4 cm~2.4 cm $\times$ 3.6 cmの領域に移すことが可能となる。移される各サンプルの容積は電子的に制御する。各試薬をマーカ試薬または色素と混合して、組織の注射部位を認識できるようにする。例えば、異なるサイズ及び形状の金の粒子を目的の試薬と混合し、顕微鏡及び免疫組織化学を用いて各注射部位を同定し、各試薬によって誘導された反応を調べることができる。筋肉組織に注射したときには、注射部位は初めに外科手術によって明らかにする。

この装置は、in vivoで多数の試薬の効果を調べるために用いることができる。例えば、この装置を用いて、多数の異なるDNAワクチンベクターの、免疫不全マウスに移植されたヒトの皮膚または筋肉細胞をトランスフェクトする効率をスクリーニングすることができる。

【0085】

2.5.10. 細胞中への遺伝的ワクチンベクターの侵入の増大

確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合によりヒト細胞の細胞質中およびそれに続く核中へのDNAの侵入能力を効率的に改良する

この方法には、細胞中への侵入に関与するポリヌクレオチドを、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付すことが含まれる。このようなポリヌクレオチドは、

本明細書中では、「トランスファー配列」または「トランスファーモジュール」と称される。細胞特異的な様式で移入を増大させるかまたはより一般的な様式で作用するトランスファーモジュールを取得することができる。DNAの結合および移入に影響を及ぼす正確な配列は分からない場合が多いので、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合は、ヒト細胞の細胞質中およびそれに続く核中へのDNAの侵入能力を改良する唯一の効率的な方法であろう。

本発明の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合法は、細胞中への侵入能力をベクターに賦与すべくDNA配列およびプラスミドの三次元構造を最適化する手段を、たとえ、こうした効果を達成する機構に関する詳細な情報が得られない場合でさえも提供する

この方法には、トランスファー配列を含有する少なくとも第1および第2の形態の核酸を再集合すること(および／または本明細書中に記載の1以上の定方向進化法に付すこと)が含まれる。第1および第2の形態は、2個以上のヌクレオチドが互いに異なっている。好適な基質としては、例えば、転写因子結合部位、CpG配列、ポリA、C、G、Tオリゴヌクレオチド、非確率論的に生成した核酸ビルディングブロック、およびランダムDNA断片(例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物種由来のゲノムDNA)が挙げられる。マクロファージのスカベンジャー受容体のような細胞表面タンパク質は、特異的DNA結合に対する受容体として作用する可能性があるとの提案がなされている(Pisetsky (1996) Immunity 5: 303)。これらの受容体が特異的DNA配列を認識するか否かまたは配列非特異的な様式でDNAに結合するか否かについては、分かっていない。しかしながら、GGGGテトラドは細胞表面へのDNAの結合を促進することが明らかにされた(同上)。DNA配列のほかに、プラスミドの三次元構造もまた、細胞中へのこれらのプラスミドの侵入能力に寄与している可能性がある。本発明の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合法は、細胞中への侵入能力をベクターに賦与すべくこれらの配列を最適化する手段を、たとえ、こうした効果を達成する機構に関する詳細な情報が得られない場合でさ

えも提供する。

組換えセグメントを有するベクターのクローン単離体を別々の細胞培養物に感染させ、次いで、例えば、トランスフェクションの過程でベクターにより発現されるマーカーを発現している細胞の数をカウントすることによって、細胞に侵入したベクターのパーセントを求める

こうして得られる組換えトランスファーモジュールのライブラリーをスクリーニングして、目的の細胞中へのトランスファーモジュール含有ベクターの侵入能力を増大させる最適化された組換えトランスファーモジュールを少なくとも1つ同定する。例えば、細胞中へのベクターの侵入を促進する条件下で、組換えトランスファーモジュールを有するベクターを細胞の集団と接触させ、その後、この集団の中で核酸ベクターを含有している細胞のパーセントを求める。好ましくは、ベクターには、ベクターを含有する細胞の同定が容易に行えるように、選択可能またはスクリーニング可能なマーカーが含まれるであろう。好ましい実施形態では、組換えセグメントを有するベクターのクローン単離体を別々の細胞培養物に感染させる。この場合、細胞に侵入したベクターのパーセントは、例えば、トランスフェクションの過程でベクターにより発現されるマーカーを発現している細胞の数をカウントすることによって求めることができる。

【0086】

必要に応じて、移入を増大させるのに十分な能力を有するトランスファーモジュールが得られるまで、再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）および再スクリーニングの処理を繰り返すことが可能である

典型的には、再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）の処理は、組換えトランスファーモジュールの更なるライブラリーを作製すべく、少なくとも1つの最適化されたトランスファー配列を更なる形態のトランスファー配列と再集合させることにより（および／または本明細書中に記載の1以上の定方向進化法に付することにより）繰り返行われる。この更なる形態は、第1および第2の形態と同じものでもまたは異なるものでも良い。新しいライブラリーをスクリーニングして、最適化されたトランスファーモジュールを有する遺伝的ワクチンベクターの目的の細胞中への侵入能力を増大させる少なくとも

1つの更なる最適化された組換えベクターモジュールを同定する。

必要に応じて、移入を増大させるのに十分な能力を有するトランスファーモジュールが得られるまで、再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）および再スクリーニングの処理を繰り返すことが可能である。再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）およびスクリーニングを1回以上行った後、最適化されたモジュールを含有しない対照ベクターの場合よりも少なくとも約50%多い標的細胞中に、より好ましくは少なくとも約75%多い、最も好ましくは少なくとも約95もしくは99%多い標的細胞中に侵入する能力を核酸ベクターに賦与することのできるベクターモジュールが得られる。

相同的組換えによる組込みの場合、重要な因子は、染色体配列に対する相同の度合いおよび長さ、ゲノム中におけるこのような配列の頻度、ならびに相同的組換えを媒介する特異的配列である：非相同的、変則的、および部位特異的組換えの場合、組換えは、細胞によりコードされた組換えタンパク質と相互作用する治療ベクター上の特異的部位によって媒介される

ワクチンに使用する場合、一般に、非組込みベクターが好ましいが、いくつかの用途では、組込みベクターを使用することが望ましいこともあり、こうした用途では、組込みの効率に直接的または間接的な影響を及ぼすDNA配列を遺伝的ワクチンベクター中に含有させることができる。相同的組換えによる組込みの場合、重要な因子は、染色体配列に対する相同の度合いおよび長さ、ならびにゲノム中におけるこのような配列の頻度である（例えば、Aluリピート）。また、転写活性DNAでは組込みが容易に起こるので、相同的組換えを媒介する特異的配列も重要である。相同的ターゲッティング構築物を構築するための方法と材料については、例えば、Mansour (1988) Nature 336:348; Bradley (1992) Bio/Technology 10:534に記載されている。非相同的、変則的、および部位特異的組換えの場合、組換えは、細胞によりコードされた組換えタンパク質と相互作用する治療用ベクター上の特異的部位によって媒介される（Cre/Lox系、Flp/Frt系など）。例えば、Baubonis (1993) Nucleic Acids Res. 21:2025-2029を参照されたい。この文献によると、LoxP部位を含むベクターは、Creリコンビナーゼ酵素の存在下

では染色体DNAのLoxP部位に組み込まれたものとなる。

【0087】

2.6. 遺伝的ワクチン成分の最適化

哺乳動物系において免疫反応の調節における遺伝的ワクチンの効力に影響を及ぼしうる性質を最適化する

免疫反応の調節における遺伝的ワクチンの効力に影響を及ぼしうる因子は、多数存在する。例えば、細胞中へのベクターの侵入能力は、免疫反応におけるベクターの調節能力にかなりの影響を及ぼす。また、免疫反応の強さは、遺伝的ワクチンベクターにより発現される抗原の免疫原性および抗原が発現されるレベルによって媒介される。遺伝的ワクチンベクターにより産生される補助的刺激分子が存在するか否かによって、ベクターを哺乳動物中に導入することにより生じる免疫反応の強さが影響を受けるだけでなく、その免疫反応のタイプも影響を受ける可能性がある。生物中におけるベクターの残存性を増大させると、免疫調節の時間を長くすることができるとともに、長期間にわたり保護を持続させるための多数回投与を行う必要のない便利な自己追加免疫性ベクターを作製することが可能になる。本発明は、これらの性質のうちの多くを最適化する方法を提供する。その結果として、哺乳動物の免疫系に所望の効果を引き起こす改良された能力を呈する遺伝的ワクチンベクターが得られる。

合理的にアプローチすることができないすべての偶発的かつ複雑な機構を最大限に利用すべく、再集合の再帰的サイクルを用いて（場合により、本明細書中に記載の他の定方向進化法と併用して）大きなライブラリーからの選択を行う

遺伝的ワクチンは、様々な機能的成分を含有することができる。これらの成分の好ましい配列は、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合により、すなわち、本明細書中に記載の経験的配列進化により、最も適切に決定される。本発明の方法には、一般に、多数の相同的出発配列の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合により、または組換え体の集団を生成する他の方法により、主要なベクター成分のそれぞれに対して別々のライブラリーを構築し、その結果キメラ配列の複雑な混合物

を得ることが含まれる。最良の配列は、以下に記載の高スループットアッセイを用いて、これらのライブラリーから選択される。それぞれの単一モジュールライブラリーからの選択のサイクルを1回以上行った後、スクリーンに適合性がある場合に関り、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合によって、異なるモジュールの最良の配列のプールを一緒にできる。実際に、プロモーター、エンハンサー、イントロン、トランスファー配列、哺乳動物の複製起点、細菌の複製起点、および細菌のマーカーなどに対するスクリーンを一緒にすることができ、その結果、それぞれの配列の内容が同時に最適化される。これらの実験で重要な点は、合理的にアプローチすることができないすべての偶発的かつ複雑な機構(例えば、細胞中へのDNAの移入)を最大限に利用すべく、再集合の再帰的サイクルを用いて(場合により、本明細書中に記載の他の定方向進化法と併用して)大きなライブラリーからの選択を行うことである。

集合PCRおよびコンビナトリアル分子生物学を用いて、プロモーター、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、ケモカイン、免疫刺激配列、および補助的刺激分子を提供するベクターモジュールを集合させることにより、異なるベクターのライブラリーを作製することができる

集合PCRとは、遺伝子、非確率論的に生成した核酸ビルディングブロック、プラスミドの断片などの長いDNA配列を集合させる方法である。PCRとは対照的に、集合させる対象となる非確率論的に生成した核酸ビルディングブロックおよび／または断片は互いにプライムし合うので、プライマー、鋳型という区別は存在しない。本明細書中の記載に従って得られたベクターモジュールのライブラリーは、プロモーターと融合させることができるが、このプロモーター自体も、本発明の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合法により最適化することが可能である。こうして得られた遺伝子は、DNAワクチンベクター中にコンビナトリアル的に集合させることができ、この場合、各遺伝子は、異なるプロモーター(例えば、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により進化させた)CMVプロモーターのライブラリーか

ら誘導されたプロモーター)の下で発現され、ベクターライブラリーは、免疫系に対して所望の効果を呈するベクターを同定すべく、本明細書中の記載に従ってスクリーニングされる。

ワクチンの効力または妥当性に影響を及ぼす性質

本発明の方法は、ワクチンの効力または妥当性に影響を及ぼす多くの性質のうちの1つ以上が最適化された遺伝的ワクチンを取得するのに有用である。これらの性質としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0088】

2.6.1. エピソーム的ベクターの保持

エピソーム的複製ベクターは、より長い期間にわたって細胞中に保持され、自己追加免疫性ワクチンの開発を可能にする

本発明の配列再集合法を用いて最適化することのできる性質の1つは、哺乳動物細胞における遺伝的ワクチンベクターのエピソーム的複製能力である。ワクチンベクターのエピソーム的複製は、多くの状況下で有利である。例えば、エピソーム的複製ベクターは、非複製ベクターよりも長い期間にわたって細胞中に保持されるので、その結果として、免疫反応調節の期間が長くなるか、または治療上有用なタンパク質の送達が増大する。また、エピソーム的複製は、従来のワクチンと違って多数回ワクチン投与を必要としない自己追加免疫性ワクチンの開発を可能にする。例えば、自己追加免疫性ワクチンベクターは、特異的刺激に対する抗原発現の誘導およびそれに伴う免疫反応の誘導を可能にする誘導的制御エレメントの制御下に抗原をコードする遺伝子を含む。しかしながら、性質の改良された突然変異体を合理的にデザインすべく、従来のアプローチまたは試みにより、エピソーム的保持性を増大させる天然に存在するベクターモジュールをスクリーニングするには、多くの人手と年月を要する研究を行わなければならないであろう。本発明は、短期間に何倍も多くの多種多様なモジュールを生成およびスクリーニングする方法を提供する。

哺乳動物細胞中で自律的に複製する能力を遺伝的ベクターに賦与することのできる核酸の少なくとも2つの形態を組み換えるために、確率論的(例えば、ポリヌ

クレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を用いる

哺乳動物細胞中で自律的に複製する能力を遺伝的ベクターに賦与することのできる核酸の少なくとも2つの形態を組み換えるために、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を用いて、遺伝的ワクチンベクターのエピソーム的複製能力を最適化することができる。2つ以上の形態のエピソーム的複製ベクターモジュールは、2個以上のヌクレオチドが互いに異なっている。組換えエピソーム的複製ベクターモジュールのライブラリーを作製し、このライブラリーをスクリーニングすることにより、遺伝的ワクチンベクター中に配置されたときに最適化されていないエピソーム的複製ベクターモジュールを含むベクターと比較して増大された自律的複製能力をベクターに賦与する1つ以上の最適化された複製ベクターモジュールを同定する。

確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合処理を少なくとも1回繰り返して、モジュールを含むベクターにエピソーム的保持性を賦与する能力の増大しているモジュールを同定する

1実施形態では、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合の前のラウンドから得られた最適化されたエピソーム的複製ベクターモジュールを基質として用いて、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合処理を少なくとも1回繰り返す。以前のラウンドで得られた最適化されたベクターモジュールを、以前のラウンドで使用したものと同一形態であってもよいしエピソーム的複製エレメントとして機能する異なる形態の核酸であってもよい更なる形態のベクターモジュールと再集合させる(および/または本明細書中に記載の1以上の定方向進化法に付す)。再度、組換えエピソーム的複製ベクターモジュールのライブラリーを作製し、スクリーニング処理を繰り返すことにより、モジュールを含むベクターにエピソーム的保持性を賦与する能力の増大しているエピソーム的複製モジュールを同定する。

真核生物細胞の場合の自律的複製能力

確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を用いてエピソーム的複製能力を最適化するための基質として有用な核酸としては、真核生物の細胞中における自律的複製能力をベクターに賦与することに関与する任意の核酸が挙げられる。例えば、パピローマウイルスの配列EIおよびE2、シミアンウイルス40(SV40)の複製起点など。

ヒトパピローマウイルス由来の遺伝子は、模範的なエピソーム的複製ベクターモジュールである

本発明の方法を用いて最適化することのできる模範的なエピソーム的複製ベクターモジュールは、エピソーム的複製に関与するヒトパピローマウイルス(HPV)由来の遺伝子である。HPVは、皮膚中でエピソーム的に複製し、in vivoで何年にもわたって安定して発現される非腫瘍原性ウイルスである。BernardおよびApt (1994) Arch. Dermatol. 130: 210。

【0089】

エピソーム的複製に関与するHPV遺伝子のエピソーム的保持性を定方向進化を用いて増大させる

こうしたin vivo特性があるにもかかわらず、複製不足のため組織培養でエピソーム的にHPVを保持することはできなかった。本発明は、遺伝的ワクチンベクターにおいて使用すべく、エピソーム的保持に関与するHPV遺伝子を最適化することのできる方法を提供する。エピソーム的複製に関与するHPV遺伝子としては、例えば、E1およびE2遺伝子が挙げられる。従って、本発明の1実施形態によれば、HPV E1およびE2遺伝子の一方または両方を確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付すことにより、核酸ワクチンベクター中に配置したときに哺乳動物細胞中のベクターの保持性の増大した組換えエピソーム的複製モジュールを取得する。好ましい実施形態では、異なっているが関連性の強い良性のHPVに由来するHPV E1およびE2遺伝子が、本明細書(参照により組み入れたものも含む)中で提示、説明、および／または参照したポリヌクレオチド再集合手順で使用される。例えば、密接に関連したHPV株(例えば、HPV 2、27、57など)に由来するHPV E1お

よびE2遺伝子のポリヌクレオチドシャッフリングを行うことにより、組換えE1およびE2遺伝子のライブラリーを取得し、次いで、これを適切なスクリーニング法に付して、エピソーム的保持性の改良された遺伝子を同定することができる。

エピソーム的保持を媒介する能力の改良された組換えエピソーム的複製ベクターモジュールの同定、選択、富化

エピソーム的保持を媒介する能力の改良された組換えエピソーム的複製ベクターモジュールを同定するために、組換えベクターモジュールのライブラリーのメンバーを、哺乳動物の細胞に導入されるベクター中に挿入する。少なくとも数世代にわたり細胞を増殖させた後、ベクターを保持した細胞を同定する。同定は、例えば、選択可能なマーカを含むベクターを利用して行うことができる。選択可能なマーカに対する選択を行わずにライブラリーのメンバーを含む細胞を少なくとも数世代にわたり増殖させ、その後、選択圧を加える。選択で生存した細胞は、エピソーム的に複製するベクターの能力を増大させる組換えベクターモジュールを含むベクターを内蔵する細胞が富化されたものである。選択された細胞からDNAを回収して細菌宿主細胞中に導入すると、エピソーム的非組込みベクターの回収が可能になる。

発現されたときに細胞の表面上に存在する抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するベクター中に導入することによりスクリーニングを行う

本発明のもう1つの実施形態では、発現されたときに細胞の表面上に存在する抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するベクター中に、組換えエピソーム的複製ベクターモジュールのライブラリーのメンバーを導入することにより、スクリーニングステップを行う。ベクターのライブラリーを哺乳動物の細胞中に導入し、これを少なくとも数世代にわたり増殖させ、その後、細胞表面上に細胞表面抗原を展示する細胞を同定する。そのような細胞は、ベクターの自律的複製能力を増大させる遺伝的ワクチンベクターを内蔵している可能性が高い。

最適化された組換えエピソーム的複製ベクターモジュールを用いて遺伝的ワクチンベクターを作製する

エピソーム的に保持されたベクターを含む細胞を同定した後、最適化された組換えエピソーム的複製ベクターモジュールを取得し、これを用いて遺伝的ワクチ

ンベクターを構築する。スクリーニング法で使用するのに好適な細胞表面抗原は、先に記載した通りであるが、それ以外にも当業者に公知の細胞表面抗原がある。好ましくは、便利な検出手段が利用できる抗原を使用する。

スクリーニング法で使用するのに好ましい細胞

スクリーニング法で使用するのに好適な細胞としては、培養された哺乳動物細胞および動物中に存在する細胞の両方が挙げられる。ヒトに使用することを目的とした組換えベクターモジュールをスクリーニングする場合、スクリーニング用の好ましい細胞は、ヒト細胞である。一般に、最初のスクリーニングは、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により進化させた)物質の大きなライブラリーを処理することのできる細胞培養によって行われる。好ましい実施形態では、ベクターによりコードされた細胞表面抗原を細胞表面上に展示する細胞を、蛍光発色細胞選別法などのフローサイトメトリーに基づく細胞選別法によって同定する。この手法を用いると、1回のバイアル実験で非常に多数(>107個)の細胞を評価することができる。

【0090】

動物モデルでin vivo耐久性を更に調べる

細胞培養で自律的に複製して強いマーカー遺伝子発現を引き起こす構築物のin vivo耐久性を、動物モデルで更に調べるができる。例えば、マウス中においてin vivoでヒト組織を調べるためのマウスモデルが、本明細書中に記載されている。ヒト皮膚の生きている試験片をSCIDマウスの背に異種移植することにより、in vivoでヒト細胞において最適である特性について、ベクターライブラリーのスクリーニングができるようになる。エピソーム的ベクターの再帰的選択を行うことにより、エピソーム性を保持しつつ高レベルの遺伝子発現を提供するベクターに関する、強い選択圧をもたらすであろう。

機能的ヒト免疫系を有する哺乳動物に遺伝的ワクチンベクターを導入し、抗原に対する免疫反応の存在を調べる

もう1つの実施形態では、スクリーニングステップには、組換えエピソームの複製ベクターモジュールと、抗原または製薬上有用なタンパク質をコードするポ

リヌクレオチドとを含有する遺伝的ワクチンベクターを、機能的ヒト免疫系を有する哺乳動物に導入することが含まれる。次に、抗原に対する免疫反応が動物中に存在するかを調べる。好ましい実施形態では、このようなアッセイに使用される哺乳動物は、機能的ヒト免疫系を有する非ヒト哺乳動物である。例えば、免疫不全マウス中において、肝臓、胸腺、および骨髄からなる群より選択されるヒト胎児組織を1以上導入することにより、機能的ヒト免疫系を形成することができる(Roncaroloら、(1996) Semin. Immunol. 8: 207)。

エピソーム的に保持されたベクターを用いると、FACS選択で高SN比が得られるとともに、選択された少数の細胞からプラスミドを回収できる可能性が有意に増大される

本発明の方法を用いて得られる安定なエピソーム的ベクターは、遺伝的ワクチンとして有用なだけでなく、他のライブラリスクリーニング用途においても有用なツールでもある。ランダム組込みおよび一過性のベクターを用いた場合とは対照的に、エピソーム的に保持されたベクターを用いた場合、FACS選択で高SN比が得られるとともに、選択された少数の細胞からプラスミドを回収できる可能性が有意に増大される。

【0091】

2.6.2. 抗原の発現に関して最適化されたプロモーターの進化

遺伝的ワクチン接種の効力の向上、防御免疫に必要なDNA量の減少およびそれに伴うワクチン接種のコストの削減、遺伝子が発現される細胞のタイプおよび／または抗原発現のタイミングの制御のためにプロモーターおよび／または他の制御配列を最適化する

もう1つの実施形態では、本発明は、プロモーターや他の遺伝子発現制御シグナルなどのベクターモジュールを最適化する方法を提供する。通常、遺伝的ワクチンによって送達される抗原をコードする配列は、その発現を保証すべく、調節配列などの追加配列に機能しうる形で連結される。これらの調節配列は、1以上の以下の配列を含有することができる：エンハンサー、プロモーター、シグナルペプチド配列、イントロン、および／またはポリアデニル化配列。望ましい目標は、機能的発現産物の発現レベルを従来のベクターで達成されるレベルよりも増

大させることである。遺伝的ワクチンベクターの効力は、多くの場合、ワクチンベクターによる抗原の発現レベルに依存する。プロモーターおよび／または他の制御配列が最適化されると、遺伝的ワクチン接種の効力が向上し、防御免疫に必要なDNA量が減少して、それによりワクチン接種のコストが削減される可能性がある。

更に、遺伝子が発現される細胞のタイプおよび／または抗原発現のタイミングの制御を行うことが望ましいこともある。本発明の方法は、プロモーターおよび他の制御配列による影響を受けるこれらのおよび他の因子の最適化を提供する。

遺伝子発現の制御に関与するポリヌクレオチドの確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を用いて、発現産物の産生速度を増大させるか、発現産物の分解速度を減少させるか、または発現産物とその目的とする機能を果たす能力を向上させることにより、発現を改良する

選択マーカーの発現の改良は、例えば、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行うことにより、達成できる。発現産物の産生速度を増大させるか、発現産物の分解速度を減少させるか、または発現産物とその目的とする機能を果たす能力を向上させることを含めて、様々な手段により、効率的に発現を改良することができる。この方法には、遺伝子発現の制御に関与するポリヌクレオチドを確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付すことが含まれる。先に記載したように、制御配列を含有し2個以上のヌクレオチドが互いに異なっている少なくとも第1および第2の形態の核酸を再集合させる（および／または本明細書中に記載の1以上の定方向進化法に付す）。こうして得られた組換えトランスファーモジュールのライブラリーをスクリーニングして、強度、誘導性、または特異性の増大した少なくとも1つの最適化された組換え制御配列を同定する。

断片（非確率論的に生成した断片および／またはランダムに生成した断片）レベルおよびin vitroでの組換えセグメントの導入

再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）に用

いる基質は、コード配列および／またはコード配列に機能しうる形で連結された調節配列を含む全長ベクターまたはその断片であり得る。基質は、ベクター中に存在する調節配列および／またはコード配列(1以上)のうちの任意の配列の変異体を含有することができる。再集合(および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法)を断片レベルで行う場合、スクリーニングの前にベクター中に組換えセグメントを再挿入しなければならない。再集合(および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法)をin vitroで行う場合、組換えセグメントを含有するベクターを、通常、スクリーニングの前に細胞中に導入する。実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により進化させた)プロモーターおよび他の調節領域のスクリーニングに使用するのに好適なベクターの例は、本明細書(参照により組み入れたものも含む)中で、提示、説明、および／または参照されている。

追加または代替のマーカーが必要な場合、容易に検出される選択マーカー(グリーン蛍光タンパク質、細胞表面タンパク質)を使用する

選択マーカーによりコードされた遺伝子の発現を検出することによって、組換えセグメントを含有する細胞をスクリーニングできる。選択および／またはスクリーニングの目的では、ベクターから発現される遺伝子産物は、実際の治療目的を有する産物ではなく、グリーン蛍光タンパク質(Cramer (1996) Nature Biotechnol. 14: 315-319を参照されたい)や細胞表面タンパク質などの容易に検出されるマーカーの場合がある。例えば、このマーカーがグリーン蛍光タンパク質の場合、フローサイトメトリーに基づく細胞選別法によって、最も高い発現レベルの細胞を同定することができる。マーカーが細胞表面タンパク質の場合、抗体などのタンパク質に対して親和性を有する試薬で細胞を染色し、次いで、この場合にも同様に、フローサイトメトリーに基づく細胞選別法によって分析する。しかしながら、治療目的を有するいくつかの遺伝子、例えば、薬剤耐性遺伝子は、それ自体、選択可能なマーカーを提供するため、追加や代替のマーカーは必要でない。このほか、遺伝子産物は、検出および選択マーカーの任意の組合せも含む融合タンパク質であってよい。コピー数や挿入部位の変動を検出および補償するた

めに、ベクターに内部参照マーカー遺伝子を含有させることができる。

再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）ならびにスクリーニングの更なるラウンド

更に改良が望まれる場合、再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）ならびにスクリーニングの更なるラウンドにおいて、基質の一部分または全部として、マーカー遺伝子の最大の発現を示す細胞に由来する組換えセグメントを使用することができる。

【0092】

2.6.2.1 構成的プロモーター

制御配列(プロモーター、エンハンサーなど)を進化させることにより、進化しない制御配列に機能しうる形で連結される遺伝子よりも高レベルで目的の遺伝子を発現させる

本発明は、制御配列に機能しうる形で連結された目的の遺伝子の構成的発現を指令することのできるヌクレオチド配列を進化させる方法を提供する。典型的には、進化しない制御配列に機能しうる形で連結される遺伝子よりも高レベルで目的の遺伝子を発現させるように、プロモーター、エンハンサーなどを含み得る制御配列を進化させる。強度の増大した制御配列のスクリーニングを行うために、細胞の集団中に制御配列の組換えライブラリーを導入し、制御配列に機能しうる形で連結された検出可能なマーカーの発現レベルを決定できる。好ましくは、最適化されたプロモーターは、対照のプロモーター構築物のレベルよりも少なくとも約30%高いレベルで、機能しうる形で連結された遺伝子を発現することができ、より好ましくは、最適化されたプロモーターは、対照よりも少なくとも約50%強力であり、最も好ましくは、対照のプロモーターよりも少なくとも約75%、またはそれ以上強力である。

改良されたCMVプロモーター/エンハンサーエレメント(SV40およびSra)を用いて、動物モデルおよび臨床用途の両方において外来遺伝子を発現させる

これらの方法で基質として使用可能なプロモーターの例としては、目的の宿主細胞中で機能する任意の構成的プロモーターが挙げられる。プロモーターおよびエンハンサー配列(プロモーター/エンハンサー領域)を含めて、サイトメガロウ

イルス(CMV)の主要な前初期(IE)領域転写調節エレメントは、広範にわたる細胞タイプにおいて活性が高いため、遺伝子療法に使用されるベクターの転写を調節するために広く使用されている。増大したレベルの抗原発現を指令する最適化されたCMV転写調節エレメントは、本発明の再帰的な再集合（および／または本明細書中に記載の1以上の他の定方向進化法）によって生成され、この結果、遺伝子療法の効力が改良される。CMVプロモーターおよびエンハンサーはヒトおよび動物の細胞中で活性であるため、改良されたCMVプロモーター/エンハンサーエレメントは、動物モデルおよび臨床用途の両方において外来遺伝子を発現するために使用される。特許請求の範囲に記載された本発明の方法で使用するのに適した他の構成的プロモーターとしては、例えば、SV40およびSRに由来するプロモーターならびに当業者に公知の他のプロモーターが挙げられる。

CMVの5種の関連株のうちの2以上に由来する野生型配列の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合により、キメラ転写調節エレメントのライブラリーを作製し、CMV株のPCRにより、プロモーター、エンハンサー、およびIE領域の第1イントロン配列を取得する

好ましい実施形態では、CMVの5種の関連株のうちの2以上に由来する野生型配列の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合により、キメラ転写調節エレメントのライブラリーを作製する。プロモーター、エンハンサー、およびIE領域の第1イントロン配列は、次のCMV株、すなわち、ヒトVR-53 8株AD169 (Rowe (1956) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92:418)、ヒトV-977株Towne (Plotkin (1975) Infect. Immunol. 12:521-527)、アカゲザルVR-677株68-1 (Asher (1969) Bacteriol. Proc. 269:91)、ベルベットモンキーVR-706株CSG (Black (1963) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112:601)、およびリスザルVR-1398株SqSHV (Rangan (1980) Lab. Animal Sci. 30:532)からPCRにより得られる。ヒトCMV株のプロモーター/エンハンサー配列は95%の相同性があり、サル単離体の配列と70%の相同性を共有しているため、ポリヌクレオチド再集合（場合により、本明細書中に記載の他の定方向進化法と併用して）を用いて非常に多様性のあるライブラリーを作製することがで

きる。再集合（場合により、本明細書中に記載の他の定方向進化法と併用して）の後、ライブラリーをプラスミドのバックボーン中にクローン化し、これを用いて哺乳動物細胞中でマーカー遺伝子の転写を指令する。典型的には、天然のプロモーターの制御の下にある内部マーカーが、プラスミドベクター中に含まれており、これによって、同数のベクターを内蔵している細胞の分析および選別ができるであろう。

グリーン蛍光タンパク質(GFP)やCD86 (B7.2としても知られている。Freeman (1993) J Exp. Med 178:2185, Chen (1994) J Immunol. 152:4929を参照されたい)などの発現マーカーもまた、使用可能である。更に、SV40 T抗原で形質転換された細胞のトランスフェクションを用いて、SV40の複製起点を含むベクターを増幅することができる。トランスフェクトされた細胞をFACS選別によりスクリーニングし、マーカー遺伝子を高レベルで発現させている細胞を同定し、内部マーカーで規格化して細胞1個あたりのベクターのコピー数の差を調べる。所望により、再帰的に再集合された（および／または本明細書中に記載の1以上の定方向進化法に付された）最適プロモーター配列を有するベクターを回収し、再集合（場合により、本明細書中に記載の他の定方向進化法と併用して）および選択の更なるサイクルに付す。

【0093】

2.6.2.2. 細胞特異的プロモーター

宿主細胞中への外来抗原の導入に続く自己免疫疾患のリスクを減少させ、樹状細胞やマクロファージなどのプロフェッショナルAPC中での遺伝的ワクチンの発現を介して防御免疫の効率的な誘導を提供する

遺伝的ワクチンに関連した安全上の問題点の1つは、宿主細胞中への外来抗原の導入に続いて自己免疫疾患が起こる可能性があることであった。このリスクは、適切な補助的刺激分子を発現するプロフェッショナルAPC中で病原体抗原を特異的に発現すれば、低減させることができる。遺伝的ワクチン接種に続いて病原体抗原を発現する最も重要な細胞がどの細胞であるのかに関していくらか議論の余地はあるが、プロフェッショナルAPCが関与している可能性が高いと思われる。遺伝的ワクチンベクターの筋肉内注射に続いて血液単球が抗原を発現すること、お

よびワクチン接種された動物のリンパ節に由来する樹状細胞が効率的に抗原特異的T細胞活性化を誘導することが明らかにされた(C. Bona, The First Gordon Conference on Genetic Vaccines, Plymouth, NH, July 21, 1997)。これらのデータと従来の研究とを合わせると、抗原または抗原ペプチドを発現する樹状細胞が少数存在すれば、抗原特異的T細胞の活性化を誘導するのに十分であることが示唆されることから(ThomasおよびLipsky, Stem Cells 14:196, 1996)、樹状細胞やマクロファージなどのプロフェショナルAPC中で特異的に発現される遺伝的ワクチンを用いると、副作用の発生を最小限に抑えつつ防御免疫を効率的に提供できる可能性が高いという結論が支持される。

確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合用の基質の供給源として多様性のある天然物を活用して、プロフェショナルAPC中で高い発現レベルを特異的に誘導するプロモーターおよびエンハンサーを取得する方法

本発明は、プロフェショナルAPC中で高い発現レベルを特異的に誘導するプロモーターおよびエンハンサーを取得する方法を提供する。既存のAPC特異的ベクターでは、遺伝的ワクチン接種の後で十分な発現レベルは得られなかった。本発明の方法には、APC特異的プロモーターまたは他の制御シグナルを含有する異なる形態の核酸を基質として使用し、先に記載したように、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行うことが含まれる。好適なプロモーターとしては、例えば、MH CクラスII、ならびにCD11b、CD11c、およびCD40プロモーターが挙げられる。天然の多種多様なプロモーターは、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合用の基質の非常に適切な供給源として活用できる。例えば、サル、ブタ、イヌ、ウシ、ネコ、ウサギ、ラット、およびマウスに由来するゲノムDNAを取得することができ、更に、既知の配列情報に基づいて最も保存された領域に特異的な多数のPCRプライマーを使用することにより、適切な配列を取得することができる。最適プロモーターの選択は、単核細胞系またはB細胞系、例えば、U937、HL60、またはJijoyeにおいて、FACS選別を用いて行うことができる。このほか、プラスミドの回収

率を改良するために、COS-1やCOS-7などのSV40+細胞系を使用することもできる。既に報告されているように、IL-4およびGM-CSFの存在下で末梢血単球を培養することによって得られるヒト樹状細胞中で更なる解析を行うことが可能である(C hapuisら、(1997) Eur. J Immunol. 27: 43 1)。

【0094】

2.6.2.3. 誘導性プロモーター

テトラサイクリンおよびホルモン誘導的発現系などの2つの基質の確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行って、プロモーター制御トランスジーン発現のin vivoにおける発現レベルおよび誘導性を増大させる

遺伝的ワクチンの特に望ましい性質は、無害の経口薬を単に摂取するだけでプロモーター制御トランスジーン発現を誘導し、その結果として、免疫反応を増大させる能力であろう。誘導性プロモーターに対する必須の要件は、低ベースライン発現および強い誘導性である。強力なin vitro調節を示すいくつかのプロモーターが存在するが、それぞれの発現レベルおよび誘導性は低すぎてin vivoで使用することはできない。本発明は、誘導的制御配列として機能する核酸の2以上の変異体を基質として用いて、確率論的(例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび中断合成)ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行うことにより、これらの問題を克服する。好適な基質としては、例えば、テトラサイクリンおよびホルモン誘導的発現系などが挙げられる。遺伝子発現を調節するために使用されてきたホルモンとしては、例えば、エストロゲン、タモキシフェン(tamoxifen)、トレミフェン、およびエクジソンが挙げられる(RamkumarおよびAdler (1995) Endocrinology 136: 536-542)。組換え誘導性プロモーターのライブラリーは、先に記載したように、インデューサーの存在下または不在下でスクリーニングされる。

テトラサイクリン応答系は、遺伝子発現の誘導および停止を行う可能性を提供する(エクジソン応答エレメントはもう1つの候補である)

最も一般に使用されている誘導性遺伝子発現プロトコルは、遺伝子発現の誘導および停止の両方を行う可能性を提供するテトラサイクリン応答系である(Gosse

nおよびBujard (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89: 5547; Gossenら、(1995) Science 268: 1766)。リプレッサー遺伝子は、プラスミド上に位置し、プロモーター中でオペレーターに結合する。テトラサイクリンまたはドキシサイクリンは、リプレッサーの結合能力を調節する。興味深いことに、4個のアミノ酸が変化すると、リプレッサーはアクチベーターに変換される。テトラサイクリン応答系のほかに、誘導性プロモーター進化に対する他の候補としては、エクジソン応答エレメントが挙げられる(Noら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93:3346,1997)。

誘導性プロモーターは、誘導性プロモーターの誘導を引き起こす薬剤を単に摂取するだけで最初の投与に続いてワクチン用量を投与することのできる手段を提供する

本発明の方法を用いて得られるような誘導性プロモーターは、自己追加免疫性ワクチンに有用である。特に、先に述べたようにして得られる安定に保持されるエピソーム的ベクターと組み合わせた場合、誘導性プロモーターは、誘導性プロモーターの誘導を引き起こす薬剤を単に摂取するだけで最初の投与に続いてワクチン用量を投与することのできる手段を提供する。誘導性プロモーターの最適化に好適なフローサイトメトリーに基づくスクリーニングプロトコルが、本明細書中に図示されている。

マウスモデルで自己追加免疫性ワクチンの機能を試験する

先に記載したようなマウスモデルにおいて自己追加免疫性ワクチンの機能を試験することができる。遺伝的ワクチンベクターを、正常マウスの皮膚中およびSCIDヒト皮膚マウスのヒト皮膚中に注入する。B型肝炎表面抗原(HBsAg)または他の表面抗原をコードする遺伝子を、これらのベクター中に組み入れる。この場合、細胞培養物の上清およびマウスの循環系のHBsAgレベルを測定できるので、産生された抗原のレベルを直接測定できる。抗原の発現を誘導する薬剤を、1、2、4、及び6週間後に与え、HBsAgの発現レベルを調べる。更に、抗HBsAg抗体のレベルを測定する。また、ELIにより見出された病原体抗原を含有するベクターをマウスに注入し、特異的免疫反応を追跡する。

SCIDヒト皮膚モデルとSCID-huマウスモデルとを併用して、ヒト免疫系での自

己追加免疫性遺伝的ワクチンの機能をin vivoで評価する

SCIDヒト皮膚モデルと従来のSCID-huマウスモデルとを併用すると (Roncarolo et al., Semin. Immunol. 8: 207, 1996)、ヒト免疫系での自己追加免疫性遺伝的ワクチンの機能をin vivoで評価できるとともに、ヒトAb応答をin vivoで測定できる。また、このモデルを用いると、HBsAgをコードする遺伝子を内蔵した新規な遺伝的ワクチンベクターの経口追加免疫を行った後のHBsAgの産生を評価できる。

【0095】

2. 6. 3. 遺伝的ワクチンの特異性および効力を増強する結合性ポリペプチドの進化

本発明は遺伝的ワクチンの標的細胞に入る能力を増強することができるポリペプチドをコードする組換え核酸を取得するための方法をも提供する。DNA取込みに関与する機構はよくわかっていないが、本発明によれば、細胞および適切な細胞区画への進入が増強された遺伝的ワクチンを取得することが可能になる。

遺伝的ワクチン核酸に結合すると同時に標的細胞にも結合する能力がある進化させたタンパク質で核酸をコーティングすることによる、遺伝的ワクチン核酸の所定の細胞型による取込みの効率および特異性の増強

1実施形態において、本発明は、遺伝的ワクチン核酸に結合すると同時に標的細胞にも結合する能力がある進化させたタンパク質で核酸をコーティングすることによる、遺伝的ワクチン核酸の所定の細胞型による取込み効率および特異性を増強する方法を提供する。ベクターをin vitroまたはin vivoでタンパク質と接触させることができる。後者の状況では、そのベクターを含有する細胞中で、場合によってはそのベクター内の1コード配列から、タンパク質を発現させる。進化させる核酸結合タンパク質は通常は核酸に結合する活性を有するが、必ずしも核酸DNAの取込みを増強または変更する何らかの既知の能力を持つ必要はない。

これらの方法で 사용할 ことができるDNA結合タンパク質

これらの方法で 사용할 ことができるDNA結合タンパク質として、限定するわけではないが、転写調節因子、DNA複製（例えばrecA）ならびに再集合（および／または本明細書に記載する1以上のさらなる定方向進化法）に関与する酵素、

ならびにDNA上で構造的機能を果たすタンパク質（例えばヒストン、プロタミン）が含まれる。使用することができるその他のDNA結合タンパク質として以下のものが含まれる：ファージ434リプレッサー、ラムダファージcIおよびcroリプレッサー、大腸菌CAPタンパク質、myc、ロイシンジッパーならびにfosおよびjunなどのDNA結合基本ドメインを有するタンパク質、Drosophilaの一对のタンパク質などの'POU'ドメインを有するタンパク質、TFIIIA中に見出だされるCys 2 His 2 亜鉛フィンガー、酵母Gal4中に見出だされるようなZn 2 (Cys) 6 クラスター、レトロウイルスヌクレオキャプシドタンパク質中に見出だされるCys 3 Hisボックス、ならびに核ホルモン受容体型タンパク質中に見出だされるZn 2 (Cys) 8 クラスターなどの、構造が金属イオンキレートに依存するドメインを有するタンパク質、ファージP22 ArcおよびMntリプレッサー（Knightら(1989) J Biol.Chem.264:3639-3642およびBowie & Sauer(1989) J Biol.Chem.264:7596-7602参照）。RNA結合タンパク質はBurd & Dreyfuss(1994) Science 265:615-621に総括されており、これにはHIV TatおよびRevが含まれる。

再集合(および／または本明細書に記載する1以上のさらなる定方向進化法)を実施するための形式

本発明の別の方法と同様に、改善または変更された取込み効率の獲得に向けたDNA結合タンパク質の進化は再集合（および／または本明細書に記載する1以上のさらなる定方向進化法）ならびにスクリーニングの1以上のサイクルによって、効果が上がる。出発基質は上記のような核酸結合タンパク質の1つの天然または誘導変異体をコードする核酸セグメントとすることができる。核酸セグメントは再集合（および／または本明細書に記載する1以上のさらなる定方向進化法）ステップのためにベクター中にまたは単離された形態で存在させることができる。再集合（および／または本明細書に記載する1以上のさらなる定方向進化法）は本明細書に記載するどの形式によっても進行させることができる。

スクリーニングの目的では、再集合された（および／または本明細書に記載する1以上の定方向進化法に付した）核酸セグメントは、典型的にはベクター中に挿入される。ただしその再集合（および／または本明細書に記載する1以上のさらなる定方向進化法）ステップ中にすでにそうしたベクター中に存在するように

なっていない場合である。

特異的結合部位を認識するDNA結合タンパク質のためのベクター中への結合部位の導入

ベクターは一般的に取込みが要望される細胞型中で発現され得る選択マーカーをコードする。進化させるDNA結合タンパク質がある特異的結合部位を認識する（例えばlacI結合タンパク質はlacOを認識する）ならば、ベクター中にその結合部位を含ませることができる。場合によって、ベクターに複数の結合部位を縦列に含ませることができる。

組換えセグメントを含有するベクターの宿主細胞中への形質転換およびDNA結合タンパク質へのベクターの結合を分断しない温和な条件下での細胞の溶解

各種の組換えセグメントを含有するベクターを宿主細胞、通常は大腸菌中に形質転換し、組換えタンパク質を発現させ、そしてその遺伝子物質をコードするベクターに結合させる。大部分の細胞は単一のベクターのみを取り込むので、形質転換の結果、大部分が単一種のベクターを含有する細胞の一集団が生成する。発現および結合させるために適切な期間の後、DNA結合タンパク質へのベクターの結合を分断しない温和な条件下で、細胞を溶解させる。例えば、35 mM HEPES (KOHによってpH 7.5に調整)、0.1 mM EDTA、100 mM グルタミン酸Na、5%グリセロール、0.3 mg/ml BSA、1 mM DTTおよび0.1 mM PMSFプラスリゾチーム (10 mg/mlを0.3-ml) からなる溶解バッフ寒天好適である (Schatzら、US5,338,665 参照)。次にベクターと核酸結合タンパク質の複合体を取込みに好適な条件下で、取込みの改善または変更が要請される型の細胞と接触させる。好適なレシピエント細胞としては、DNAワクチン導入の一般的な標的であるヒト細胞型が挙げられる。これらの細胞としては、筋細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、B細胞、ランゲルハンス細胞、角化細胞および腸管のM細胞が挙げられる。スクリーニングのために、例えばヒト、マウスおよびサルを含む哺乳類からの細胞を使用することができる。初代培養細胞および細胞系から取得された細胞の両方が好適である。

【0096】

マーカーを発現する細胞の回収およびその後の選択ラウンドのための組換えセグ

メントの富化

インキュベート後、細胞をプレーティングし、組換えセグメントを含有するベクター中に存在する選択マーカーの発現について選別する。マーカーを発現する細胞を回収する。これらの細胞を、相当する組換えセグメントをコードするベクターの取込みを増強する核酸結合タンパク質をコードする組換えセグメントについて、富化する。次に、マーカーを発現する細胞からの組換えセグメントを、その後の選択ラウンドにかける。通常、組換えセグメントを最初に例えばPCR増幅または全ベクターの回収によって、細胞から回収する。次に組換えセグメントを互いに若しくは別の起源のDNA結合タンパク質変異体と再集合させ（および／または1以上の本発明に記載する定方向進化法に付し）、新たな組換えセグメントを作製する。この新たな組換えセグメントを前記と同様の方法でスクリーニングする。

細胞中へのDNA導入の効率を増大させる目的で特にヒストンタンパク質のカルボキシおよびアミノ末端ペプチドの伸長部を進化させるための、確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合の使用

最適化した核酸結合ドメインを進化させるための方法の1例には、ヒストン遺伝子の（場合によって本明細書に記載するさらなる定方向進化法と組合せた）再集合が含まれる。ヒストンが縮合したDNAは細胞中への遺伝子の導入の増強をもたらすことができる。例えばFritzら（1996）Human Gene Therapy 7:1395-1404を参照されたい。そこで、ヒストンタンパク質、特にカルボキシおよびアミノ末端ペプチドの伸長部を進化させるために、確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を使用して、細胞中へのDNA導入の効率を増強することができる。この手法において、そのヒストンはこれが結合することになるDNA中にコードされている。

ヒストンライブラリーの構築

ヒストンライブラリーを例えば1) 天然の多様種からの多くの関連するヒストン遺伝子の（場合によって本明細書に記載するその他の定方向進化法と組合せた）再集合、2) ヒストンのN-およびC-末端配列でのランダムまたは部分的にラン

ダム化したペプチドの付加、3) N-またはC-末端への、全cDNAライブラリー、核酸タンパク質リガンドライブラリーなどの予備選択したタンパク質コード領域の付加、によって構築することができる。これらのタンパク質を部分的にランダム化し、リンカーのライブラリーによってヒストンに連結することができる。

核酸結合部位を進化させるための出発基質が別種の結合部位を含有し、これらの部位の組換え体形態を核酸結合タンパク質をもコードするベクターの成分としてスクリーニングする

上記の操作の変法において、核酸結合性タンパク質の代わりに、またはそれとともに、その核酸結合タンパク質によって認識される結合部位を進化させることができる。核酸結合部位は、その出発基質が別種の結合部位を含有し、これらの部位の組換え体形態を核酸結合性タンパク質をもコードするベクターの成分としてスクリーニングする以外は、核酸結合タンパク質に類似の操作法で進化させる。

進化させたDNA結合タンパク質が高度の配列特異性を持たず、またスクリーニングに使用するベクターのどの部位がそのタンパク質に結合するかが明確に分かっていない場合は、ワクチン導入または治療に効果を上げるのに必要な付加的配列とともにスクリーニングベクター配列の全部または大部分をベクターに含ませるべきである

DNA結合タンパク質をコードする進化させた核酸セグメントおよび／または進化させたDNA結合部位を遺伝的ワクチンベクター中に含ませることができる。DNA結合タンパク質の親和性が既知のDNA結合部位に対して特異的ならば、遺伝子治療に効果を上げるために必要とされるその他のコード配列および調節配列とともに、その結合部位およびDNA結合性タンパク質をコードする配列を遺伝的ワクチンベクター中に含ませれば十分である。いくつかの例において、進化させたDNA結合タンパク質が高度の配列特異性を持たず、またスクリーニングに使用するベクターのどの部位がそのタンパク質に結合するかが明確に分かっていないことがある。これらの状況では、ワクチン導入または治療に効果を上げるのに必要な付加的配列とともに、スクリーニングベクター配列の全部または大部分をベクターに含ませるべきである。M13タンパク質VIIIを利用する代表的な選択スキームを

本明細書に示し、説明し、そして／または引用する（参照により組み込むものを含む）。

対象の標的細胞

対象の標的細胞として、例えば筋細胞、単球、樹状細胞、B細胞、ランゲルハンス細胞、角化細胞および腸管のM細胞などが含まれる。細胞型のそれぞれについて使用するのに好適な細胞特異的リガンドは当業者に知られている。例えば、抗原提示細胞への結合を導く好適なタンパク質として、CD2、CD28、CTLA-4、CD40リガンド、フィブリノーゲン、X因子、ICAM-1、-グリカン（ザイモサン）、および免疫グロブリンGのFc部分が含まれる（Weir's Handbook of Experimental Immunology, L.A. Herzenberg, D.M. Weir, L.A. Herzenberg, C. Blackwell (編), 第5版、第IV巻、第156および174章）。なぜならば、これらのそれぞれのリガンドは樹状細胞、単球／マクロファージ、B細胞およびランゲルハンス細胞を含むAPC上に存在するからである。細菌エンテロトキシンまたはそのサブユニットも標的の目的の対象である。

【0097】

LPSはベクターと単球間の相互作用を促進し、またおそらくアジュバントとしても作用して、免疫応答の能力をさらに高める

単球などのAPCに進入して活性化するベクターの能力はベクターを少量のリポ多糖類（LPS）でコーティングすることによっても強化することができる。

これはベクターと単球間の相互作用を促進する。単球がLPSのための細胞表面受容体を持っているからである。この免疫刺激活性によって、LPSはおそらくアジュバントとしても作用して、免疫応答の能力をさらに高める。

細胞表面受容体への付着の改善、腸上皮細胞への進入およびそれを通過する輸送の改善、ならびにB細胞若しくはその他のAPC類への結合の改善およびその活性化のために、エンテロトキシンの受容体結合成分を進化させることができる

ある種の病原性細菌によって産生されるエンテロトキシンは、細胞に結合することによってワクチン、抗原、遺伝子治療用ベクターおよび医薬タンパク質の送達を強化する薬剤として有用である。本発明の代表的な1実施形態において、細胞表面受容体への付着の改善ならびに腸上皮細胞への進入およびそれを通過する

輸送の改善のために、*Vibrio cholerae*および大腸菌のエンテロトキシン原株由来のエンテロトキシンの受容体結合成分を進化させる。その上、B細胞若しくはその他のAPC類への結合およびその活性化の改善のために、これらを進化させることができる。対象とする抗原をこれらのトキシンサブユニットに融合させて、タンパク質の経口送達におけるこの手法の実現性を例証し、また進化させたエンテロトキシンサブユニットのスクリーニングを促進することができる。こうした抗原の例として、成長ホルモン、インスリン、ミエリン塩基性タンパク質、コーゲンおよびウイルス外被タンパク質が含まれる。

組換えエンテロトキシンの結合部分の核酸のライブラリーを含有するベクターを宿主細胞の集団にトランスフェクトし、そこで組換えエンテロトキシンの結合部分の核酸を発現させて組換えエンテロトキシンの結合部分のポリペプチドを形成させる

これらの方法には、エンテロトキシンの好ましくは非毒性の受容体結合部分をコードするポリヌクレオチドを含む核酸の少なくとも第1および第2形態の再集合（ならびに／または本明細書に記載する1以上の定方向進化法の実施）が含まれる。第1および第2形態は2以上のヌクレオチドが互いに異なっているので、確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合の結果、組換えエンテロトキシンの結合部分の核酸のライブラリーが生成する。好適なエンテロトキシンとして、例えば *V. cholerae* エンテロトキシン、大腸菌のエンテロトキシン原株由来のエンテロトキシン、サルモネラトキシン、シゲラトキシンおよびカンピロバクタートキシンが含まれる。組換えエンテロトキシンの結合部分の核酸のライブラリーを含有するベクターを宿主細胞の集団にトランスフェクトし、そこで組換えエンテロトキシンの結合部分の核酸を発現させて組換えエンテロトキシンの結合部分のポリペプチドを形成させる。好ましい実施形態において、組換えエンテロトキシンの結合部分のポリペプチドをバクテリオファージ粒子の表面上の融合タンパク質として発現させる。このライブラリーを標的細胞の細胞表面受容体と接触させて、どの組換えエンテロトキシンの結合部分のポリペプチドが標的細胞受容体との結合能力の増強を示すかを決定することによって、組換えエンテロトキシンの結合部

分のポリペプチドをスクリーニングすることができる。細胞表面受容体は標的細胞自体の表面に存在させても、別の細胞に付着させてもよく、あるいは細胞に結合していない細胞表面受容体を使用して結合を試験することもできる。好適な細胞表面受容体の例として、例えばGmIが含まれる。同様に、T細胞受容体およびMHCクラスII分子への結合の変更（増大または減少）のために細菌の超抗原を進化させることができる。これらの超抗原は抗原非特異的にT細胞を活性化する。

T細胞受容体/MHCクラスII分子に結合する超抗原としてスタフィロコッカスエンテロトキシンB、*Urtica dioica*超抗原（Musetteら(1996) *Eur. J Immunol.* 26:618-22）およびスタフィロコッカスエンテロトキシンA（Bavariら(1996) *J Infect. Dis.* 174:338-45）が含まれる。MHCクラスII分子に結合する超抗原を選別する際に、ファージ展示が効果的であることが示された（WungおよびGascoigne(1997) *J Immunol. Methods.* 204:33-41）。

CTおよびCT-Bの両方がin vivoで強力なアジュバント活性を有することが示され

、またこれらは抗原およびワクチンの経口送達後の免疫応答を強化する

コレラトキシン（CT）は5個のBサブユニット（CT-B）に共有結合した1個の毒性のAサブユニット（CT-A）からなる84,000ダルトンのオリゴマータンパク質である。CT-Bは受容体結合成分として機能し、哺乳動物細胞表面のGM1、ガングリオシド受容体に結合する。毒性のAサブユニットはCTの機能にとって必須ではなく、CT-Aの不在下では機能性のCT-Bの5量体が形成され得る（LebensおよびHolingren(1994) *Dev. Biol. Stand.* 82:215-227）。CTおよびCT-Bの両方がin vivoで強力なアジュバント活性を有することが示され、またこれらは抗原およびワクチンの経口送達後の免疫応答を強化する（Czerkinskyら(1996) *Ann. NY Acad. Sci.* 778:185-93；Van Cottら(1996) *Vaccine* 14:392-8）。その上、ミエリン塩基性タンパク質とコンジュゲートさせたCT-Bの単回投与で、自己免疫脳脊髄炎（EAE）、マウスモデルの多発性硬化症の発症が予防された（Czerkinskyら、上記）。さらに、臨床症状の開始後（7日）のCT-Bとコンジュゲートしたミエリン塩基性タンパク質の動物への給餌で、これらの動物の症状が軽減された。大腸菌のエンテロトキシン、サルモネラトキシン、シゲラトキシンおよびカンピロバクタートキシンなどのその他の細菌トキシンはCTと構造的に類似している。大腸菌のエ

ンテロトキシンはCTと同一のA-B構造を持ち、また配列相同性をも持ち、機能的類似性を共有している。

ファミリー内の確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合は各種の細菌種からのエンテロトキシンをコードする核酸間で実現性がある

ポリヌクレオチド（例えば遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロンなど）の再集合（場合によって本発明に記載するその他の定方向進化法と組合せた）によって、細菌エンテロトキシンを親和性および細胞への進入を改善するために進化させることができる。大腸菌由来のエンテロトキシンサブユニットとCT-B間の類似性は78%であり、9ヌクレオチド以上の完全に保存された領域がいくつか見られる。大腸菌の2つの異なる株からのBサブユニットは配列およびタンパク質レベルの両方で98%の相同性を有する。このように、ファミリー内の確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合は各種の細菌種からのエンテロトキシンをコードする核酸間で実現性がある。

【0098】

トキシンに融合させた抗原に特異的なモノクローナル抗体の存在下で寒天中で細菌を培養することによる、V choleraeによるキメラタンパク質の分泌のスクリーニング

実験によって進化させた（例えばポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）トキシンサブユニットのライブラリーをV choleraeなどの好適な宿主細胞中で発現させることができる。安全性の理由により、毒性のCT-Aを欠損した株が好ましい。対象とする抗原を受容体結合サブユニットに融合させることができる。トキシンに融合させた抗原に特異的なモノクローナル抗体の存在下で寒天中で細菌を培養することによって、V choleraeによるキメラタンパク質の分泌をスクリーニングすることができ、そして分泌のレベルをコロニーの周囲の寒天中の免疫沈降として検出する。

GM1、ガングリオシド受容体およびその他の受容体への結合を向上させるための進化、ならびにトキシンに融合させた抗原に特異的なモノクローナル抗体によ

る受容体とキメラ融合タンパク質間の結合の検出

機能性エンテロトキシンサブユニットを分泌するコロニーを検出するために、GM1、ガングリオシド受容体を寒天に添加することもできる。次に、有意なレベルの融合タンパク質を産生するコロニーを96ウェルプレート中で培養し、細胞または溶液中の受容体に結合することができる分子の存在について、培地を試験する。細胞表面上または溶液中のGM1、ガングリオシド受容体へのキメラ融合タンパク質の結合は、トキシンに融合させた抗原に特異的なモノクローナル抗体によって検出することができる。細胞全体を使用するアッセイはGM1、ガングリオシド受容体以外の受容体に対する結合も向上させるように進化させることができるという利点がある。これらのアッセイに野生型エンテロトキシンの濃度を増加させながら添加すると、受容体に結合する親和性が向上した突然変異体を検出することができる。トキシンの親和性および特異性は表面プラスモン共鳴（Kuziemkoら(1996) Biochemistry 35:6375-84）によって決定することもできる。

細菌発現系における、大規模生産の利点およびファージ上での発現に関する問題の回避

細菌発現系の利点は、大規模生産で使用する可能性がある細菌によって融合タンパク質が分泌されることである。さらに、融合タンパク質は選別中に溶液中にあるので、ファージ上での発現に関係して生じ得る問題（ファージ上でのみ機能する突然変異体の選択の傾向など）を回避することができる。

親和性が向上したエンテロトキシンを同定するためのスクリーニングの場合、ファージ展示によって、突然変異体をin vivoアッセイで簡単にさらに選択することができる

それでも、ファージ展示は親和性が向上したエンテロトキシンを同定するためのスクリーニングにとって有用である。実験によって進化させた（例えばポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）突然変異体のライブラリーをM13などのファージ上で発現させることができ、親和性が向上した突然変異体を例えば溶液中または細胞表面上のGM1、ガングリオシド受容体への結合に基づいて選択することができる。この手法の利点は、突然変異体を下記のようなin vivoアッセイで簡単にさらに選択することがで

きる点である。M13タンパク質VIIIへの融合を使用するスクリーニング手法を本明細書に図示する。

組換え結合部分が細胞中で発現し、核酸結合ドメインに結合して、ベクター結合部分複合体を形成する

最後に、生成する進化したエンテロトキシンをDNA結合タンパク質と融合させて、遺伝的ワクチンベクターをこの融合タンパク質でコーティングすることができる。確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合を別々に、その際再集合（場合によって本明細書に記載する別の定方向進化法と組み合わせた）後に2つのドメインを集合させるか、あるいは組合せた反応によって実施することができる。再集合（場合によって本明細書に記載する別の定方向進化法と組み合わせた）の結果、組換え結合部分の核酸のライブラリーが産生され、これはそのライブラリーとともにその核酸結合ドメインに特異的な結合部位を含有するベクターを宿主細胞の集団中にトランスフェクトすることによって、スクリーニングすることができる。結合部分が細胞中で発現し、核酸結合ドメインに結合してベクター結合部分複合体を形成する。次に、このベクター結合部分複合体の結合を破壊しない条件下で、宿主細胞を溶解することができる。

ベクターを含有する細胞から、最適化された組換え結合部分の核酸を単離する

次に対象とする細胞とベクター結合部分複合体を接触させ、その後ベクターを含有する細胞を同定し、そして該細胞から最適化された組換え結合部分の核酸を単離する。

当初同一のDNAを取込む細胞（哺乳動物細胞）中に取り込まれる標的DNAのコピー数の増加

本発明によって、哺乳動物細胞による標的DNAの強化された取込みを獲得するための別の方法も提供される。特定すると、その方法は当初同一のDNAを取込む細胞中に取り込まれる標的DNAのコピー数を増加するものである。

【0099】

DNAの標的分子を取込む細胞（膜に結合したDNA結合ドメインの細胞表面での発現）はその因子を発現し、細胞外に残留する標的DNAに対する特異的親和性が増加

するが、DNAを取込まなかった細胞は競合的には不利となる。なぜならば、これらは特異的に媒介されるDNAの取込みに必要な細胞表面の標的DNAに特異的な結合ドメインを産生しないからである

この方法は、標的DNA配列中にコードされている、例えば転写因子の膜に結合したDNA結合ドメインの細胞表面の発現に有用である。これには結合ドメインのための同族体認識配列も含まれる。細胞中への標的DNAの1分子の取込み（任意の方法、受動的取込み、エレクトロポレーション、浸透圧ショック、その他のストレスによる）はポリヌクレオチド結合ドメインをコードする遺伝子の転写をもたらす。結合ドメインをコードする遺伝子を、該結合ドメインが膜に固定された形態で発現するように、遺伝子工学的に操作する。例えば、結合ドメインのカルボキシル末端にアミノ酸の疎水性ストレッチをコードさせて、この末端配列の部分的開裂後にホスホイノシトールグリカン（PIG）コンジュゲーションをもたらすことができる。これは次に結合ドメインの細胞表面への移動および配置をもたらす。DNAの第1の分子を取込んだ同一の細胞はその因子を発現し、細胞外に残留する標的DNAに対する特異的親和性が増加する。DNAを取込まなかった細胞は競合的には不利となる。なぜならば、これらは特異的に媒介されるDNAの取込みに必要な細胞表面の標的DNAに特異的な結合ドメインを産生しないからである。

標的DNAの標的細胞への増強された結合は、DNAの内在化の効率および所望の細胞内機能を増強する。このプロセスは最初にDNAを取込む細胞中へのDNAの取込みの増加について正のフィードバックを示す。

任意の特定の標的DNAについてどの転写因子または因子の組合せを使用すべきかを決定するための実用的手段

環状若しくは線状プラスミド、オリゴヌクレオチド、細菌若しくは哺乳動物染色体断片、のいずれかの標的DNAを遺伝子工学的に操作して、哺乳動物若しくは細菌転写因子のDNA認識配列の1以上のコピーを生成させる。多くの標的配列は元来そうしたモチーフの1以上を生成するはずであり、これらを配列解析によって同定することができる。これらの因子によって認識される内在性モチーフも、その標的DNAが転写因子の1以上のパネルに結合することを適切なアッセイ形式において証明することによって、実験によって同定することができる。これによ

って、任意の特定の標的DNAについてどの転写因子または因子の組合せを使用すべきかを決定するための実用的手段が提供される。

小さなオリゴヌクレオチド若しくはDNAプラスミドの場合、および細胞表面に2つ以上のDNA結合タンパク質を発現させようとする場合のモチーフ

小さなオリゴヌクレオチド若しくはDNAプラスミド（DNAワクチンに使用するものなど）の場合、適切なモチーフを配列中で遺伝子工学的に操作することができる。標的配列中に、特定のモチーフの1個以上のコピーを縦列にまたは分散させて遺伝子工学的に操作することができる。あるいは、細胞表面に2以上のDNA結合性タンパク質を発現させようとする場合、1セットの異なるモチーフを縦列にまたは離して遺伝子工学的に操作することができる。

【0100】

2. 6. 4. バクテリオファージベクターの進化

高度に新規で、強力な遺伝的ワクチンベヒクルを迅速に進化させるための、確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフリングおよびインターラプテッド合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合、ファージ遺伝学ならびに展示技術の使用

本発明は遺伝的ワクチンベクターとして使用するための所望の性質を示すバクテリオファージベクターを取得するための方法を提供する。本発明によって提供される手法の背後にある原理は、高度に新規で、強力な遺伝的ワクチンベヒクルを迅速に進化させるために、確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフリングおよびインターラプテッド合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合の力と、バクテリオファージ遺伝学の驚くべき威力およびファージ展示技術の細菌の進歩の成果とを組み合わせるものである。

ワクチンに対する免疫応答の反応速度論および能力を増大させることによって効率を最大にする、病原体からの抗原の専門化APCへの送達のための方法

進化させたワクチンベヒクルは、(1)抗体反応の誘導のため、これらのAPCの表面上に天然型で抗原を提示するか、または(2)細胞内発現、プロセッシングおよびCTLへの提示のため、APCに選択的に侵入してDNAワクチン構築物をAPCに送達する。病原体からの抗原の専門化APCへの送達のためのさらに有効な方法は、ワクチ

ン に対する免疫応答の反応速度論および能力を増大させるものである。

病原性抗原を中和するのに十分な親和性を有する抗体の産生のために必須の親和性成熟プロセスが胚中心（脾臓）中で発生し、そこで小胞樹状細胞がタンパク質抗原をB細胞に提示し、そして処理された抗原フラグメントをT細胞に提示し、それによって免疫感作する抗原に対する免疫応答の反応速度論および能力を増大させるのに必須のFDCへの抗原の効率的な送達が行われる

本発明の方法にしたがって進化させる遺伝的ワクチン送達用ベヒクルは、超抗原若しくはコレラトキシンなどのウイルスエピトープ若しくは病原性トキシンを効果的に中和することができる高親和性抗体の迅速な誘導のために特に価値がある。高親和性抗体は低親和性一次応答抗体の体細胞突然変異によって生成される。このいわゆる親和性成熟プロセスは病原性抗原を中和するのに十分な親和性を有する抗体の産生のために必須である。親和性成熟は脾臓中の胚中心で発生し、そこで専門化抗原提示細胞である小胞樹状細胞（FDC）がタンパク質抗原をB細胞に提示し、また処理された抗原フラグメントをT細胞に提示する。体細胞突然変異を起こし、クローンとして拡張しているB細胞集団を、抗原に対する親和性が向上した抗体を発現する突然変異B細胞に関して選択する。こうして、FDCへの抗原の効率的な送達は、免疫感作抗原に対する免疫応答の反応速度論および能力を増大させる。その上、抗原特異的T細胞を刺激するためにはMHCに結合した処理された抗原が必要とされる。遺伝的ワクチンはクラスI MHC制限応答の感作において、特に有効である。それは抗原の細胞内発現の結果、抗原フラグメントがクラスI MHC経路に移動するためである。このように、遺伝的ワクチン構築物またはタンパク質抗原をFDCに送達することができる侵入性バクテリオファージは有用である。

進化の目的のために好ましいバクテリオファージは、遺伝的に十分特性決定されており、外来タンパク質エピトープの展示のために開発されたものである（特に注目したのはM13バクテリオファージである。これは対象とする細胞標的へのタンパク質若しくはDNAワクチンベヒクルの効率的で標的化した送達のために多目的性で高度に進化し得るベヒクルである小さな繊維状ファージである）

いくつかのバクテリオファージのいずれでも本発明の方法に従って進化させる

ことができる。これらの目的のために好ましいバクテリオファージは遺伝的に十分特性決定されており、外来タンパク質エピトープの展示のために開発されたものである。これらとして、例えばラムダ、T7、およびM13バクテリオファージが含まれる。繊維状ファージM13が本発明の方法での使用のために特に好ましいベクターである。M13はバクテリオファージ粒子の表面上で機能性の折畳み形態でポリペプチドフラグメントを展示させるために広く使用されてきた小さな繊維状ファージである。こうした展示目的のため、遺伝子IIIおよび遺伝子VIIIコートタンパク質の両方にポリペプチドを融合させた。このように、M13は対象とする細胞標的へのタンパク質若しくはDNAワクチンベヒクルの効率的で標的化した送達のために多目的性で高度に進化し得るベヒクルである。

【0101】

バクテリオファージベクターについて例示され、その他のタイプの遺伝的ワクチンベクターにも適用し得る方法（実験によって進化させた（例えばポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）細菌侵入性タンパク質を使用する、効率的なファージの送達、APCへのホーミング(homing)、および標的細胞への侵入）の改善

以下の3つの特性はバクテリオファージ遺伝的ワクチンベクターを進化させるために本発明の方法の使用によって達成することができる改善のタイプの例である：実験によって進化させた（ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）細菌侵入性タンパク質を使用する、(1)吸入または経口送達による血流へのファージの効率的な送達、(2)APCへの効率的なホーミング、ならびに(3)標的細胞への効率的な侵入。M13を使用する場合、遺伝子IIIおよび遺伝子VIIIコートタンパク質の両方に融合させることによって、2つの進化させた特性を単一のファージ粒子中に組合せることができる。これらの研究を実験用マウスなどの試験用動物において実施して、進化させた構築物をワクチンベヒクルとしてのその効力について迅速に特性決定することができるようにすることができる。進化させた吸入性および／または経口送達性ベヒクルならびに進化させたインベージョンはそのままヒト細胞での使用に転換することができ、一方試験動物のAPCにホーミングする能力の進化において開発された原理

は、ヒトAPCについて類似の選択を実施することによって、容易にヒト細胞に転換され得る。これらの方法はバクテリオファージについての代表例であるが、この方法をその他のタイプの遺伝的ワクチンベクターに適用することもできる。

【0102】

2. 6. 4. 1. 吸入または経口送達によるバクテリオファージベヒクルの効率的な送達の進化

肺を経由して血流中に吸収させることができる吸入性コロイドへのタンパク質の製剤化方法（本発明に包含される調製方法）

本発明は吸入または経口適用による投与時に効率的に血流中に送達することができる遺伝的ワクチンベクターを取得するための方法を提供する。肺を経由して血流中に吸収させることができる吸入性コロイドへのタンパク質の製剤化方法が開発された。タンパク質が血流中に輸送される機構は明確には解明されていないので、進化による方法によって容易に改善を達成し得る。1例としてM13を使用すると、本発明は、例えばペプチドリガンド、接着分子、細菌エンテロトキシンおよびランダムに断片化したcDNAのライブラリーの調製を包含する。これらを例えばM13の遺伝子IIIに融合させる。 $>10^{10}$ の個々の融合物のライブラリーはこの技術を用いて容易に達成され得る。

血流中に入るM13を、回収し、大腸菌細胞中で増幅し、富化のラウンドをいくつ
か通過させ、そして全ファージゲノムを配列決定および再集合（場合によって本
明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せて）させ、またそのファージ
を送達、回収、増幅および再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の
定方向進化方法と組合せた）の反復サイクルにかけることによって、さらに特性
決定および進化させることができる

スクリーニングには、マウスなどの試験動物に鼻腔内送達する標準的なコロイド製剤中の高力価原液（好ましくは $>10^{12}$ ファージ粒子）の調製が含まれる。確認日の過程にわたって、血液サンプルを採取し、循環するファージを大腸菌中で増幅させる。M13は静脈注射後に血液で長期間循環することが確認されているので、肺を経由して血流中に入るのに成功するファージを効率的に回収して大腸菌細胞中で増幅させ得ることを期待するのは合理的である。好ましい実施形態

において、鼻腔内送達して血流中に効率的に入ることができるファージを富化するために、当初のライブラリーに何回かの富化ラウンドを適用する。候補クローンをその相対的進入効率について典型的には個別に試験し、最良のクローンを配列決定によってさらに特性決定し、効率的な送達（cDNAライブラリーから特定の目的の）を与える融合物の性質を同定することができる。全ファージゲノムを再集合させ（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せて）、またそのファージを送達、回収、増幅および再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた）の反復サイクルにかけることによって、選択したクローンを進入の改善のためにさらに進化させることができる。

経口摂取した時に有効なワクチンベクターを取得するために、再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた）によって調製した組換えベクターを投与し、生存している安定なベクターを胃から回収し、そして血流および／またはリンパ組織に効率的に進入するベクターを血液／リンパから回収することができる

経口送達した時に有効なワクチンベクターを取得するために、類似の方法を使用する。遺伝的ワクチンベクターライブラリーを確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合によって調製する。その組換えベクターをパッケージングし、試験動物に投与する。例えば生存しているベクターを胃から回収することによって、胃／腸環境で安定なベクターを回収する。血液／リンパに到達するベクターを回収することによって、血流および／またはリンパ組織に効率的に進入するベクターを同定することができる。この選択方法の図式説明を本明細書に示し、説明し、および／または引用する（参照により組み込むものを含む）。

【0103】

2. 6. 4. 2. バクテリオファージベヒクルのAPCへの効率的なホーミングのための進化

2つの選択形式：第1はAPCに選択的に結合するファージについて 上記の(A)で
使用したランダムペプチドリガンドおよびcDNAのライブラリーを、負または正の

選択のいずれかを使用して富化することからなり、第2はファージライブラリーを静脈注射し、目的の標的器官を採取し、音波処理によってファージを遊離させ、さらに増幅および富化することからなる

本発明は専門化抗原提示細胞への効率的なホーミングのために、バクテリオファージベクターをその他のタイプの遺伝的ワクチンベクターと同様に進化させる方法をも提供する。APCに選択的に結合するファージについて、上記の(A)で使
用したランダムペプチドリガンドおよびcDNAのライブラリーを、最初は非APC細胞型への結合に関する負の選択により、次いで、APCへの結合に関する正の選択によって富化する。選択は典型的には、ライブラリーからのファージの高力価原液($>10^{12}$ ファージ粒子)を細胞($\sim 10^7$ 細胞/選択サイクル)と混合し、細胞ペレットから非結合ファージ(負の選択)または結合ファージ(正の選択)のいずれかを取り出すことによって実施する。別の選択形式は、ファージライブラリーを静脈注射し、そのライブラリーを数時間循環させて、目的の標的器官(リンパ節、脾臓)を採取し、音波処理によってファージを遊離させることからなる。さらに最適化が所望される場合は、正の選択をしたファージを大腸菌中で増幅させ、そして富化のラウンドをさらに(3~5ラウンド)実施することができる。選定した回数
のラウンドの後、個々のファージをリンパ器官にホーミングする能力について特性決定する。最良の2、3の候補を選択、増幅および再集合(場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた)の反復ラウンドによって、さらに進化させることができる。

【0104】

2. 6. 4. 3. APCへの侵入のためのバクテリオファージの進化

本発明の方法は標的細胞への侵入のためのバクテリオファージおよびその他の遺伝的ワクチンベヒクルの進化にも有用である。これによって、内在化したタンパク質抗原、または進化させたベクターによって運びこまれたDNAワクチンベヒクルによって発現された抗原のいずれかによって、クラスI MHC抗原プロセッシング経路をターゲティングする可能性が開かれる。

インベシンのインテグリンとの相互作用を介した病原性細菌の効率的な内在化

インベシンはインテグリンと相互作用する細菌タンパク質の大きなファミリ

ーを含んでおり、サルモネラなどの病原性細菌の効率的な内在化を促進する。

インベシオンをコードする各種形態のポリヌクレオチドの再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた）、M13遺伝子VIIIコートタンパク質遺伝子への融合物としてのクローニング、ライブラリーの調製およびこれらのライブラリーの標的APCとの混合

本発明のこの実施形態には、インベシオンをコードする各種形態のポリヌクレオチドの再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた）が含まれる。例えば、インベシオンファミリーのタンパク質をコードする2以上の遺伝子を（例えばポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発による）実験によって進化させることができる。この（例えばポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発による）実験によって進化させたポリヌクレオチドを、例えばM13遺伝子VIIIコートタンパク質遺伝子への融合物としてクローニングし、このようなライブラリーの高力価原液を調製することができる。バクテリオファージのこれらのライブラリーを標的APCと混合することができる。

遊離のファージおよび細胞表面に結合したファージの除去

インキュベート後、細胞を徹底的に洗浄して遊離のファージを除去し、細胞の表面に結合したファージを、ポリクローナル抗M13抗体に対してパンニングすることによって除去することができる。

好成績のファージの取得、増幅、再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた）および選択、相対的侵入性に関する特性決定、遺伝子III融合物(対象の病原体エピトープをコードする)との結合、ならびに病原体抗原に対するCTL応答を誘発する相対的能力に関する試験

次に細胞を音波処理することによって、標的細胞にうまく入った（したがってポリクローナル抗M13抗血清から標的細胞を保護する）ファージを遊離させる。所望ならば、これらのファージを増幅し、（例えばポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）実験によって進化させ、選択用サイクルを例えば3回反復して実施する。次に最終サイクルからの個々のファージをその相対的侵入性に関して特性決定することができる。次に最

良の候補を、対象の病原体エピトープをコードする遺伝子III融合物に結合させることができる。これらのファージをマウスに注入して病原体抗原に対するCTL応答を誘発する相対的能力について試験することができる。

上記の方法にしたがってマウス中の活性について進化させたバクテリオファージワクチンベヒクルは、有力なヒトワクチンのための同様のベヒクルの進化のための原理を確立することになる。こうしたベヒクルによるより迅速で有力なCTLを誘導して抗体反応を中和する能力は、目的の病原体に対する対策の改善のための進化にとって、重要で新規な手段である。

【0105】

2. 6. 5. 改善された免疫調節配列の進化

サイトカインはマクロファージの活性化およびTH1/TH2細胞の分化に劇的に影響を与え、それによって感染性疾患の発症に大きな影響を及ぼすことができる。その上、最近の研究で、DNA自身が免疫系の細胞を活性化することによってアジュバントとして作用できることが強く示唆されている。特定すると、メチル化されていないCpGに富むDNA配列がTH1細胞分化を強化し、単球によるサイトカインの合成を活性化し、Bリンパ球の増殖を誘導することが示された。したがって本発明は、(a)DNA自体の刺激特性を進化させること、ならびに(b)サイトカインおよび免疫系の調節に関与する関連分子をコードする遺伝子を進化させることによって、遺伝的ワクチンの免疫調節特性を強化する方法を提供する。

特に対象となるのは、IFN- (x) およびIL-12であり、これらは免疫応答をTヘルパー I (TH1) 細胞表現型の方に向けることによって、病原体の侵入に対抗する宿主の許容力を向上させる。また、抗原特異的T細胞の活性化、分化若しくはアネルギーを阻害または強化する能力がある改善された免疫調節性核酸を取得する方法をも提供する。構造およびこれらの事象を調節する機構に関する情報が限定されているため、本発明の分子育種のC71技法は推論的設計よりもはるかに速い解決法を提供する。

本発明の方法には典型的に、実験的に作製した (in vitro および/または in vivo で) ポリヌクレオチドのライブラリーを作製するための、確率論的 (例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成) ならびに非確率論的ポ

リヌクレオチド再集合またはその他の方法の使用が含まれる。次に、遺伝的ワクチンベクター内に含ませるか、または遺伝的ワクチンとともに投与した時に、そのベクターによって誘導される免疫応答を強化するか、または別様に変更することができる、実験的に作製しライブラリー中のポリヌクレオチドを同定するために、該ライブラリーをスクリーニングする。ある実施形態では、スクリーニングステップに、実験的に作製したポリヌクレオチドを含む遺伝的ワクチンベクターを哺乳動物細胞中に導入し、その細胞、またはその細胞を増殖させることによって取得した培地が免疫応答を調節することができるかどうかを判定することを含ませることができる。

ポリヌクレオチドの再集合（および／または本明細書中に記載する1以上のさらなる定方向進化法）によって取得した最適化された組換えベクターモジュールは、遺伝的ワクチンベクターの成分としてばかりでなく、哺乳動物に投与して免疫応答を強化または変動させることができる、例えば改変したサイトカインなどのポリペプチドの製造のためにも有用である。本発明の確率論的（例えばポリヌクレオチドシャッフルおよびインターラプト合成）ならびに非確率論的ポリヌクレオチド再集合方法を使用して取得したポリヌクレオチド配列を、遺伝的ワクチンの成分として使用するか、またはサイトカインおよびそのまま治療若しくは予防用薬剤として使用することができるその他の免疫調節性ポリペプチドの製造のために使用することができる。所望ならば、最適化した免疫調節性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列を決定し、それから推定したアミノ酸配列を使用し、当業者に知られた方法を使用して、ポリペプチドを製造することができる。

【0106】

2. 6. 5. 1 免疫刺激性DNA配列

本発明は哺乳動物中に導入した時に免疫刺激性であるポリヌクレオチドを取得する方法を提供する。2個の5'プリン（GpAまたはApA）および2個の3'ピリミジン（TpCまたはTpT）に隣接した中心CpGを有するヘキサマーを含有するオリゴヌクレオチドは、*in vitro*でサイトカインの合成およびB細胞の増殖を効率的に誘導し（Kriegら(1995) *Nature* 374:546；Klinmanら(1996) *Proc.Nat'l.Acad.Sci.*

USA 93:2879; Pisetsky(1996) Immunity 5:303-10)、in vivoではアジュバントとして作用する。免疫刺激性配列 (ISS) を含有するオリゴ体を挿入した遺伝的ワクチンベクターは、DNAワクチン導入後の抗原特異的抗体反応を強化する能力が増大した。in vitroでの機能的活性のためのISSオリゴヌクレオチドの最小の長さは8である (Klinmanら、上記)。3個のCGモチーフを有する20マーが2個のCGモチーフを有する15マーよりもサイトカイン合成の誘導において有意により効率的であることがわかった (Id.)。GGGGの4個はDNAの細胞表面への結合に関与することが示唆された (マクロファージ発現受容体。例えばDNAに結合するスカベンジャー受容体) (Pisetskyら、上記)。

本発明にしたがって、ランダムDNA (例えばヒト、マウスまたはその他のゲノムDNAの断片)、既知のISSを含有するオリゴヌクレオチド、ポリA、C、G若しくはT配列、またはそれらの組合せを再集合 (および/または本明細書中に記載するさらなる定方向進化法) に付することによって、ライブラリーを作製する。互いに2以上のヌクレオチドが異なっている少なくとも第1および第2形態を含むDNAを再集合し (および/または本明細書中に記載するその他の定方向進化法に付し)、実験的に作製したポリヌクレオチドのライブラリーを製造する。

次に、該ライブラリーをスクリーニングして、免疫調節特性を示す、実験的に作製したポリヌクレオチドを同定する。例えば、該ライブラリーを、適切な細胞型中へのそのライブラリーの誘導時にin vitroでサイトカインの産生を誘導する点についてスクリーニングすることができる。本明細書中にこの方法の図式を示し、説明し、および/または引用する (参照により組み込んだものを含む)。免疫刺激性活性の指示物質として使用することができるサイトカインの中には、例えばIL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15およびIFN- γ がある。また、IL-4/IFN- γ 、IL-4/IL-2、IL-5/IFN- γ 、IL-5/IL-2、IL-13/IFN- γ 、IL-13/IL-2の比率の変更について試験することもできる。スクリーニングの別法はB細胞、T細胞、単球/マクロファージ、総PBLなどの免疫応答に関与する細胞の増殖を誘導する能力の判定である。その他のスクリーニングとして、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、MHCクラスIおよびII、ならびにCD14などの表面抗原の発現レベルにおける変化に基づいたAPC活性化の誘導を検出するものが含まれる。

その他の有用なスクリーニングとして、T細胞の増殖を誘導する実験的に作製しポリヌクレオチドの同定が含まれる。ISS配列はB細胞の活性化を誘導し、またT細胞およびB細胞によって発現される表面抗原間にはいくつかの相同性があるので、T細胞上での刺激活性を有するポリヌクレオチドを取得することができる。

実験的に作製したポリヌクレオチドのライブラリーを、CTLおよびin vivoでの抗体反応の改善、ならびに感染、癌、アレルギーまたは自己免疫からの防御の改善についてスクリーニングすることもできる。所望の特性を示す実験的に作製したポリヌクレオチドを細胞から回収し、さらに改善を所望するならば、再集合（場合によって本明細書中に記載するその他の定方向進化法と組合せた）およびスクリーニングを反復することができる。最適化されたISS配列を実際のワクチンとは別にアジュバントとして使用するか、または対象のDNA配列を遺伝的ワクチンベクターに融合させることができる。

2.6.5.2. サイトカイン、ケモカイン、およびアクセサリー分子

本発明はまた、免疫反応を指令し、阻害し、または増強する最適化したサイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、ケモカイン、およびその他のアクセサリー分子を得るための方法をも提供する。例えば、本発明の方法は、哺乳動物に投与すると免疫反応を改良または改変する遺伝的ワクチンおよびその他の試薬(例えば、最適化サイトカインなど)を得るために用いることができる。これらの最適化した免疫調節物質は、感染性疾患ならびに炎症性疾患などのその他の症状の治療のために、抗原非特異的な様式で用いることができる。

例えば、本発明の方法はアレルギーの治療のための最適化免疫調節分子の開発に用いることができる。最適化された免疫調節分子は単独で、または抗原特異的遺伝的ワクチンと共に、アレルギーの予防または治療に用いることができる。アレルギーの特異的免疫療法を行うには4種類の基本的機作を利用することができる。第1はアレルギー特異的な T_H2 細胞を減少させる試薬の投与である。第2はアレルギー特異的 T_H1 細胞を増加させる試薬の投与である。第3はサプレッサー $CD8^+$ T細胞の増加を指令することである。

最後に、アレルギーはアレルギー特異的T細胞のアネルギーを誘導することに

よって治療することができる。この例においては、上記の免疫治療の目的の1つ以上の達成に有効な試薬を得るために、本発明の方法を用いてサイトカインが最適化される。本発明の方法は、天然のサイトカインより低い投与量で有効となるような、比活性の改良、標的細胞中への導入後の分泌の改良などの1つ以上の特性を有し、副作用がより少ない抗アレルギー性サイトカインを得るために用いられる。特に対象とする標的としてはインターフェロン(/), IL-10、IL-12、ならびにIL-4およびIL-13のアンタゴニストが挙げられる。

【0107】

最適化した免疫調節物質、または免疫調節物質をコードする最適化した実験的に生成させたポリヌクレオチドは、単独でまたはその他のアクセサリ分子と組み合わせて投与することができる。適切な分子が最適な濃度で関与することにより所望の免疫反応を増強することができ、および/または特定のタイプの免疫反応の誘導もしくは抑制を指令することができる。最適化した分子をコードするポリヌクレオチドを遺伝的ワクチンベクター中に含ませることができ、またはその遺伝子によってコードされる最適化された分子をポリペプチドとして投与することができる。

本発明の方法においては、免疫調節物質をコードする実験的に生成させたポリヌクレオチドのライブラリーは、基質核酸を、確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法などの再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の追加の定方向進化法)プロトコルに供すること、または当業者に公知のその他の方法によって作製される。基質核酸は、典型的には対象の免疫調節物質をコードする2つ以上の形の核酸である。

サイトカインは本発明の方法を用いて改良しうる免疫調節物質の1種である。サイトカインがどのように合成されるかは、宿主がウイルス性、細菌性、および寄生虫性の感染に対抗する能力において極めて重要な役割を果たし、サイトカインは遺伝的ワクチンの有効性および感染症の成り行きに劇的な影響を及ぼしうる。いくつかのサイトカイン、例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL

-18、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IFN- β 、TGF- β 、TNF- α 、TNF- β 、IL-20(MDA-7)などのサイトカイン、およびflt-3リガンドは、in vitroまたはin vivoで免疫反応を刺激することが示されている。適切なサイトカインを用いて増強される免疫機能としては、例えば、B細胞の増殖、免疫グロブリンの合成、免疫グロブリンのアイソタイプスイッチ、T細胞の増殖およびサイトカイン合成、T_H1およびT_H2細胞の分化、CTLの活性化と増殖、単球/マクロファージ/樹状細胞による活性化およびサイトカイン産生、単球/マクロファージからの樹状細胞の分化が挙げられる。

いくつかの実施形態においては、本発明はT_H1およびT_H2の反応をもたらす免疫反応を指令する、最適化された免疫調節物質を得る方法を提供する。このやり方での免疫反応の指令方向に影響を及ぼす能力は、遺伝的ワクチンの開発において非常に重要である。T_H反応のタイプを変えることによって感染症の成り行きを基本的に変えることができる。T_H1細胞が高頻度であれば、一般的に細胞内病原体による致死的な感染からの防御が行われるが、これに対してT_H2表現型が優勢の場合には、しばしば播種性で慢性の感染をもたらす。例えば、ヒトにおいては、T_H1表現型はハンセン病の類結核(抵抗性)型に存在し、一方T_H2表現型はらい腫型、多細菌型(感受性の)病巣で認められる(Yamamuraら(1991) Science 254:277)。後期のAIDS患者はT_H2表現型を有している。家族構成員についての研究では、髄膜炎菌性敗血症からの生存はPBLがどのようなサイトカインを合成するかということに依存しており、高レベルのIL-10合成は死に至る高リスクと関連しており、高レベルのTNFは低リスクと関連していることが示されている。同様の例はマウスでも見られる。例えば、BALB/cマウスは森林型熱帯リーシュマニア(*Leishmania major*)感染を起こすが、このマウスはT_H2表現型を有し、播種性の致死的な疾病を発症する。抗IL-4モノクローナル抗体またはIL-12による治療は、T_H1反応を誘導し、治癒をもたらす。抗インターフェロン- γ モノクローナル抗体は疾病を悪化させる。いくつかの適用においては、T_H2反応をもたらすような免疫反応を指令することが好ましい。

例えば、防御免疫等の粘膜性免疫の増大が望ましい場合には、T_H2反応の増強は抗体、とりわけIgAの産生の増加をもたらさう。ヘルパーT(T_H)細胞はおそら

くは最も重要な免疫系の調節役であろう。 T_H 細胞はそのサイトカイン合成パターンに基づいて2つのサブセットに分けられる(MosmannとCoffman(1989) Adv. Immunol. 46:111)。 T_H1 細胞は高レベルのサイトカインIL-2およびIFN- γ を産生し、IL-4、IL-5およびIL-13は産生しないかまたはごく少量産生する。これに対して T_H2 細胞は高レベルのIL-4、IL-5およびIL-13を産生するが、IL-2およびIFN γ の産生は非常に低いかまたは見られない。 T_H1 細胞はマクロファージ、樹状細胞を活性化し、 $CD8^+$ 細胞傷害性Tリンパ球およびナチュラルキラー(NK)細胞の細胞溶解活性を引き出す(PaulとSeder, (1994) Cell 76:241)、 T_H2 細胞はB細胞への有効な助力をし、またIgEアイソタイプスイッチングおよびB細胞のIgE分泌細胞への分化を誘導することのできる T_H2 細胞の能力によってアレルギー反応を媒介する(Punnonenら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3730)。

改良されたサイトカイン、ケモカインおよびその他のアクセサリ分子をスクリーニングする方法は、一般に、対応するサイトカイン、ケモカイン、またはその他のアクセサリ分子それぞれに対して感受性の標的細胞に対する比活性の改良を示す改変された分子を同定することに基づいている。組換えサイトカイン、ケモカインまたはその他のアクセサリ分子の核酸のライブラリーはファージ上で発現させるか、または精製タンパク質とすることができ、例えばin vitro細胞培養アッセイを用いて試験する。重要なことは、DNAワクチンの成分としての組換え核酸を分析する際には、(タンパク質産物の機能に加えて)免疫刺激性、トランスフェクション効率、およびベクターの安定性を改良する能力に関して最も適したDNA配列を同定することができることである。次いで、同定された最適化組換え核酸は再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせる)および選択の新ラウンドに供することができる。

【0108】

本発明の1実施形態においては、サイトカインは T_H1 細胞の分化を指令するように進化させる。インターフェロン- γ (IFN- γ)およびインターロイキン-12(IL-12)には T_H1 表現型への免疫反応の方向を曲げる能力があるので、最大の比活性および遺伝的ワクチンにおいてアジュバントとして働く能力を得るためには、それらをコードする遺伝子は再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の追加の

定方向進化法)および選択に好ましい基質である。IFN- は、免疫系、腫瘍細胞の増殖およびウイルスの複製に影響するため、本発明の方法を用いる最適化のための標的として特に好ましい。これらの活性を持つため、IFN- は医療現場において用いられた最初のサイトカインとなった。今日ではIFN- は広範な適応に用いられており、それらとしては数種類の癌およびウイルス疾患が挙げられる。IFN- はまた、ヒトT細胞をT_H1表現型へと有効に分化させる(Parronchiら(1992) J. Immunol. 149:2977)。しかし、ヒトの系とは異なり、IFN- はマウスではT_H1分化に影響を及ぼさないので、IFN- はワクチンモデルでは十分には検討されていない。

種間の相異は、最近では、IL-12と同様IFN- はヒト細胞中ではSTAT4の活性化を誘導するが、マウス細胞では誘導しないこと、およびSTAT4はIL-12が媒介するT_H1分化において必要とされることを示したデータによって説明された(Thierfelderら(1996) Nature 382:171)。

ファミリー確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法は、哺乳動物IFN- 遺伝子(これらは85~97%相同である)を基質として用いて、IFN- を最適化するための好ましい方法である。これらの遺伝子の天然の多様性から 10^{26} 個以上の別々の組換え体を生成しうる。組換えインターフェロンの迅速なパラレル分析が行えるように、それらの発現のための高スループットの方法およびバクテリオファージで融合タンパク質として生物学的アッセイを行うことができる。

効力と選択性が改良された組換え体は活性の改良のために選択的に育てられる。IFN- 受容体との結合の改良を示した変異体が、T_H1分化を指令する最適な能力についての変異体スクリーニングを用いてさらに分析するために選択することができる。より特定して述べれば、IFN- 変異体の、in vitro ヒトTリンパ球培養中でのIL-2およびIFN- 産生能力をサイトカイン特異的ELISAおよび細胞質サイトカイン染色およびフローサイトメトリーで調べることができる。

IL-12はT_H1反応を指令するサイトカインとしておそらく最も強力なサイトカインであり、また、アジュバントとして働き、遺伝的ワクチン接種後のT_H1反応を増強することが示されている(Kimら (1997) J. Immunol. 158:816)。IL-12は構

造の点からも機能の点からもユニークなサイトカインである。IL-12はこれまでに知られているサイトカインで唯一ヘテロ2量体であり、35kDの軽鎖(p35)と40kDの重鎖(p40)からなる(Kobayashiら (1989) J. Exp. Med. 170:827; Stemら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6808)。

最近、Lieschkeら((1997) Nature Biotech. 15:35)は、p35遺伝子とp40遺伝子を融合させることによってそれら2つの遺伝子を別々に発現させたものの活性に比肩する活性を有する単一の遺伝子が得られることを示した。これらのデータは、IL-12遺伝子を1つのものとして再集合させることが可能であり、それは再集合プロトコル(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)をデザインするために有益であることを示している。IL-12はT細胞増殖促進活性を有するので、正常ヒト末梢血T細胞を最も活性の高いIL-12遺伝子の選択に用いることができ、それによってヒトT細胞に対して最も強力な活性を有するIL-12変異体の直接的な選択が可能となる。IL-12変異体は例えばCHO細胞中で発現させることができ、上清のT細胞増殖誘導能を測定できる。上清中のIL-12の濃度は実験的に作製された(例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)IL-12分子と融合させたタグを検出する特異的ELISAに基づいて規格化することができる。

進化させたIFN- および/またはIL-12遺伝子を遺伝的ワクチンベクター中へ組み込むことは安全であると考えられる。IFN- の安全性は多数の臨床試験および毎日の病院での実地使用によって実証済みである。腎細胞癌患者の治療におけるIL-12のフェーズII試験では数例の予期していなかった有害作用が生じた(Taharaら(1995) Human Gene Therapy 6:1607)。しかし、遺伝的ワクチンの成分としてのIL-12遺伝子は局所的な高発現レベルを狙っており、循環血液中に認められるレベルは全身ボラス注射後のレベルと比べて極めて低い。さらに、IL-12の全身的治療での有害作用のいくつかはIL-12の特別に長い半減期(サルで48時間に及ぶ)に関連しているものと考えられる。確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合によってより半減期の短いものを選択することが可能となり、それによって高投与量をボラス投与した後でもその毒性が低減されるであろう。

【0109】

その他の場合では、 T_H2 反応を誘導しうる遺伝的ワクチンが、特に抗体産生の改良が望まれる場合には好ましい。1例として、IL-4は T_H2 細胞の分化を指令することが示されている(T_H2 細胞は高レベルのIL-4、IL-5、およびIL-13を産生し、アレルギー性免疫反応を媒介する)。遺伝的ワクチンを自己免疫疾患に対して予防的に免疫するために用いる場合には、 T_H2 表現型に向けて向きを変えた免疫反応が好ましい。既に存在している自己免疫反応を治療および調節するためにワクチンを用いる場合には、自己反応性T細胞は一般的に T_H1 表現型であるので(Liblauら(1995) Immunol. Today 16:34-38)、 T_H1 反応も好ましい。IL-4もまたIgE合成の誘導において最も強力なサイトカインである；IL-4欠損マウスはIgEを産生することができない。喘息とアレルギーはIL-4産生細胞の出現頻度の増加を伴い、遺伝的にはIL-4をコードする座と関連しているが、その座は第5染色体上にある(IL-3、IL-5、IL-9、IL-13、およびGM-CSFをコードする遺伝子の近傍にある)。IL-4は活性化T細胞、好塩基球、および肥満細胞で産生される、アミノ酸153個のタンパク質で2個所のN-グリコシル化可能部位を有する。ヒトIL-4はマウスIL-4と50%のみ同一であり、IL-4活性は種特異的である。ヒトでは、IL-13はIL-4と同様の活性を有するが、IL-13はIgE合成の誘導においてはIL-4よりも活性が弱い。IL-4は T_H2 分化を指令するものとしては既知のもので唯一のサイトカインである。

改良されたIL-2アゴニストも T_H2 細胞の分化の指令に有用であるが、改良されたIL-4アンタゴニストは T_H1 細胞の分化を指令することができる。改良されたIL-4アゴニストおよびアンタゴニストはIL-4または可溶性IL-4受容体の再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)によって生成させることができる。IL-4受容体は1本のIL-4R 鎖(140kD 高アフィニティー結合ユニット)および1本のIL-2R 鎖からなる(これらのサイトカイン受容体は共通の γ -鎖を有している)。IL-4R 鎖はIL-4およびIL-13受容体複合体によって共有されている。IL-4およびIL-13の双方ともIL-4R鎖のリン酸化を誘導するが、トランスフェクトされたもののIL-4R 鎖の発現単独では機能を有するIL-4Rを供給するには十分ではない。可溶性IL-4受容体は現在アレルギーの治療用として臨床試験が行わ

れている。本発明の確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法を用いることにより、IL-4に対するアフィニティーが改良された進化した可溶性IL-4受容体を作ることができる。そのような受容体は喘息およびその他の重症のアレルギーなどの T_H2 細胞によって媒介される疾患の治療に有用である。再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)反応はヒトおよびその他の霊長類から得た活性化T細胞から得たcDNAライブラリー中に存在する天然の多様性の利点を生かすことができる。典型的な1実施形態においては、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)IL-4R 鎖ライブラリーはファージで発現され、IL-4との結合のアフィニティーが改良された変異体が同定される。次いで、選択された変異体の生物学的活性は細胞ベースのアッセイ法を用いてアッセイされる。

IL-2およびIL-15も遺伝的ワクチンでの使用に特に興味深い。IL-2は活性化BおよびT細胞の増殖因子として作用し、またIL-2はNK細胞の機能を調節する。IL-2は主に T_H1 様T細胞クローンによって産生され、従ってIL-2は遅延型過敏性反応において主に機能するものと考えられる。しかし、IL-2はまたB細胞の増殖と免疫グロブリン合成に強力かつ直接的な影響を与える。IL-2の複雑な免疫調節性はIL-2欠損マウスの表現型に反映されており、そのマウスでは若年での高死亡率および自発性の炎症性腸疾患などを含む免疫機能の多重欠損を有する。IL-15は複数の細胞タイプによって産生される、より最近になって同定されたサイトカインである。IL-15は全てではないがいくつかの活性についてIL-2と共通するものがある。IL-2およびIL-15は共にB細胞の増殖と分化を誘導する。しかし、IL-2欠損マウスでのIL-15産生が正常であると仮定すると、これらのマウスが多重免疫欠損を有しているので、IL-15がin vivoでのIL-2の機能を代替し得ないことは明らかである。IL-2は、抗CD40モノクローナル抗体の存在下でのIL-10誘発ヒト免疫グロブリン産生を協調的に増強するが、IL-2はIL-4の効果をアンタゴナイズすることが示されている。また、IL-2は精製B細胞によるIL-4依存性IgE合成を増強する。他方、IL-2はIL-4依存性マウスIgG1およびIgE合成をin vitroおよびin vivoの双方で阻害することも示されている。同様に、IL-2は未分画のヒトPBMC

によるIL-4依存性ヒトIgE合成を阻害するが、その効力はIFN- またはIFN- ほど顕著なものではない。IL-2およびIL-15はB細胞およびT細胞の双方を活性化する能力があるので、ワクチン接種において有用である。事実、IL-2は、タンパク質として、および遺伝的ワクチンの1成分として、ワクチン接種の有効性を改良することが示されている。比活性および/または発現レベル/IL-2およびIL-15の動態を本発明の確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法を用いて改良することによって、野生型IL-2およびIL-15に比較して有利な効果が増大する。

本発明の方法に従って最適化して遺伝的ワクチンで使用するために特に対象とする別のサイトカインはインターロイキン-6である。IL-6は、単球由来のサイトカインであり、活性化B細胞によって分泌される免疫グロブリンレベルを増強させる能力を有するので、もとはB細胞分化因子またはB細胞刺激因子2と呼ばれていたものである。

【0110】

IL-6もまたIL-4誘発IgE合成を増強することが示されている。また、抗IL-6モノクローナル抗体を中和するとIL-4誘発IgE合成を完全にブロックしてしまうので、IL-6がヒトIgE合成のための不可欠な因子であることも提案されている。IL-6欠損マウスではIgA産生能が障害されている。IL-6はB細胞の分化に強力な活性を示すので、IL-6はワクチン接種後に産生される特異的抗体のレベルを増強させることができる。IL-6は高い局所濃度を達成することができるのでDNAワクチンの1成分としては特に有用であり、それによって、免疫原性を有する抗原を発現しているトランスフェクトされた細胞に近接した細胞に対して最も強力な作用を提供する。確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法によって得られる、比活性が改良され、および/または発現レベルが改良されたIL-6は、野生型IL-6より多くの有益な効力を有しているであろう。

インターロイキン-8は、本発明の方法にしたがって改変すれば、遺伝的ワクチンにおいて有用となるサイトカインの別の1例である。IL-8はそもそもは単球由来好中球走化性および活性化因子として同定されたものである。その後、IL-8は

T細胞に対しても走化性であり好塩基球を活性化してT細胞からのヒスタミンおよびロイコトリエンの放出の増加をもたらすことが示された。さらに、IL-8はサイトカインによって活性化された内皮細胞単層への好中球の接着を阻害して好中球が媒介する傷害から内皮細胞を防御する。従って、内皮細胞由来のIL-8は血管壁の近傍で起こる炎症性のイベントを減弱させることが示唆された。IL-8はまた、免疫グロブリン産生を調節し、未分画ヒトPBMCおよび精製B細胞の双方によるin vitroでのIL-4が誘発するIgG4およびIgEの合成を阻害する。この阻害効果はIFN- γ 、IFN- β またはプロスタグランジンE₂とは独立したものである。さらにIL-8はアトピー患者から得られたPBMCによる自発IgE合成を阻害した。IL-8は炎症細胞を誘引する能力を有するため、他の走化性剤同様DNAワクチン等のワクチンの機能的性質を増強する(アジュバントとして働く)のに有用である。IL-8の有益な作用は本発明の確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法を用いて改良し、比活性の改良されたおよび/または標的細胞中での発現が改良されたIL-8を得ることができる。

インターロイキン-5およびそのアンタゴニストもまた、遺伝的ワクチン中に用いるために本発明の方法を用いて最適化することができる。IL-5は主としてT_H2タイプのT細胞によって産生され、好酸球症を誘発する能力があるのでアレルギー疾患の病因に重要な役割を果たしているものと考えられる。IL-5はマウスおよびヒトにおいて好酸球分化および生存因子として働く。マウスモデルで、中和モノクローナル抗体の使用によってIL-5活性をブロックすると、肺好酸球症および高活性を強く阻害し、IL-5欠損マウスは好酸球症を発症しない。これらのデータはまた、IL-5アンタゴニストがアレルギー性好酸球症の治療において治療効果を有する可能性を示唆している。

IL-5は活性化されたマウスおよびヒトのB細胞の増殖およびそれらによる免疫グロブリン合成を増強させることが示されている。しかし、他の研究では、IL-5は好酸球を活性化させるがヒトB細胞の増殖には影響を及ぼさないことが示唆されている。IL-5は従来型のB細胞の成熟と分化に決定的に重要なものではないことは、IL-5欠損マウスの抗体反応が正常であることから明らかである。しかし、

これらのマウスにはCD5⁺B細胞の発生欠損があり、このことはIL-5がマウスのこのB細胞サブセットの正常な分化に必要であることを示唆している。IL-4の最適濃度未満の状態では、IL-5はin vitroでのヒトB細胞によるIgE合成を増加させることが示された。さらに最近の研究ではIL-5のヒトB細胞に対する効果は、B細胞刺激の様式に依存することが示唆された。IL-5はモラクセラ(*Moraxella catarrhalis*)で刺激されたB細胞によるIgM合成を顕著に増加させた。さらに、IL-5は最適濃度未満のIL-2と協調するが、SACで活性化させたB細胞による免疫グロブリン(I-)合成に影響を及ぼさなかった。活性化されたヒトB細胞もIL-5のmRNAを発現しており、このことはIL-5がおそらく、IgE合成を含むB細胞の機能もオートクリン機構によって調節していることを示している。

本発明はIL-5またはその受容体と効率的に結合して中和するIL-5アンタゴニストを作製する方法を提供する。このようなアンタゴニストはアレルギーの予防および治療のためのワクチンの成分として有用である。例えばヒトおよびその他の哺乳動物から得たIL-5をコードする核酸を実験的に進化させ(例えばポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)、一次スクリーニングとして固定化IL-5Rに対する結合についてスクリーニングする。一次スクリーニングアッセイで所望の効果を示したポリペプチドを、次いで、組換え野生型IL-5の存在下で培養したIL-5依存性細胞株の増殖の阻害などのアッセイを用いて、最も高い生物学的活性を持つものをスクリーニングしうる。あるいはまた、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)IL-5R-鎖をIL-5との結合性の改良についてスクリーニングする。

【0111】

腫瘍壊死因子(および)およびその受容体もまた、改変して遺伝的ワクチン中で用いるための標的として適したものである。TNF- はもともとはその腫瘍を壊死させる能力からカケクチンと呼ばれており、人体のほとんど全ての細胞で活性化後に少量産生される、17kDaのタンパク質である。TNF- は内在性発熱性物質として働き、いくつかのプロ炎症性サイトカインの合成を誘導し、急性期タンパク質の産生を刺激し、線維芽細胞の増殖を誘発する。TNF- はエンドトキシンシ

ショックの病因において主要な役割を果たす。膜に結合した形のTNF- (mTNF-)はB細胞とT細胞の間の相互作用に関与しているが、それはT細胞活性化から4時間以内に急速にアップレギュレートされる。mTNFはHIVに感染した患者で認められるポリクローナルなB細胞活性化においてある役割を果たしている。mTNFまたはp55 TNF- 受容体に特異的なモノクローナル抗体は、活性化CD4⁺T細胞クローンまたはその膜によって誘導されるIgE合成を強く阻害する。p55 TNF- Rの欠損したマウスはエンドトキシンショックに対して抵抗性で、可溶性TNF- RはNODマウスにおいて自己免疫性糖尿病を予防する。sTNF- Rを慢性関節リウマチの治療に用いる臨床試験はフェーズII試験において好結果が得られた後、フェーズIII試験が現在進められている。

本発明の方法は例えば、アフィニティーが改良され、その結果TNF活性に対するアンタゴニストとして働くことができる可溶性TNF- Rを作製するために用いることができる。TNF- R をコードし、ヒトおよびその他の霊長類の活性化されたT細胞から得たcDNAライブラリー中に見られる天然の多様性等のような配列の多様性を示す核酸は、実験的に作製される(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)。実験的に作製された(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)核酸は、例えばファージ上で発現され、その後、改良されたアフィニティーでTNF- と結合する変異体を選択される。所望により、その改良された変異体はさらに生物学的活性を用いてアッセイすることができ、実験的に作製された(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)遺伝子は1ラウンド以上の再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)およびスクリーニングに供することができる。

本発明の方法の適用の対象とする別の標的としては、インターフェロン- γ 、およびこのサイトカインのアンタゴニストの進化がある。IFN- γ の受容体は、90 kDの結合成分である糖蛋白質、228個のアミノ酸を有する細胞外部分、膜貫通領域、および222個のアミノ酸を有する細胞内領域からなる。機能活性にグリコシル化は必要ではない。単一の鎖で高アフィニティー($10^{-9} \sim 10^{-10}$ M)が得られ

るが、シグナル伝達には十分ではない。受容体成分はリガンド結合の際に二量体化する。

マウスIFN- 受容体はアミノ酸レベルではマウスのそれと53%の同一性がある。ヒトおよびマウスの受容体はそれぞれヒトおよびマウスIFN- としか結合しない。ワクシニア、牛痘、およびラクダ痘疹ウイルスはsIFN- Rの相同体を有しており、それらの間のアミノ酸配列の類似性は比較的低い(～20%)、in vitro でIFN- を効率的に中和することができる。これらの相同体はヒト、ウシ、ラット(しかしマウスとは結合しない)のIFN- と結合し、おそらくIFN- アンタゴニストとしてのin vivoでの活性を有している。8個のシステインは全て、ヒト、マウス、粘液腫およびショープ線維腫ウイルス(ワクシニアウイルス中の6種)のIFN- Rポリペプチド中で保存されており、このことはそれらが類似の立体構造を持っていることを示している。100～300pM kDのmIFN- Rの細胞外部分が昆虫細胞で発現されている。NZB/Wマウス(ヒトSLEのマウスモデル)をmsIFN- 受容体(100mgを週3回腹腔内投与)で処置すると、糸球体腎炎の発症が阻害される。sIFN- または抗IFN- -モノクローナル抗体で処置したマウスは、全例が処置を停止した後4週間生存したが、これに比べ、プラシーボ群では50%、IFN- 処置群マウスでは78%が死亡した。

【0112】

本発明の方法はアフィニティーを改良した可溶性IFN- R受容体ポリペプチドを作製するため、および比活性が改良され、細胞性免疫反応を活性化する能力が改良されたIFN- を作製するために用いることができる。各々の場合でそれぞれのポリペプチドをコードし、配列の多様性(例えば、ヒトおよびその他の霊長類から得た活性化T細胞から得たcDNAライブラリー中に認められるものなど)を示す核酸を再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の追加の定方向進化法)させ、活性が改良されているポリペプチドをコードする組換え核酸を同定するためにスクリーニングする。実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)IFN- Rの場合には、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)核酸のライブラリーはファー

ジ上で発現させることができ、これをIFN- との結合のアフィニティーが改良された変異体を同定するためにスクリーニングする。IFN- の場合には、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)ライブラリーを比活性の改良されたものおよび免疫系活性化の改良されたものについて、例えば単球/マクロファージの活性化をアッセイとして用いることによって分析する。進化したIFN- 分子はワクチン接種の効力を改良することができる(例えばアジュバントとして用いて)。本発明の方法を用いて得られる高アフィニティーsIFN- Rポリペプチドを用いて治療する疾患としては、例えば、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス(SLE)、治療後の臓器拒否反応、移植片対宿主病を含む。例えば、多発性硬化症は患者の脳内でのIFN- の発現の増加、およびin vitroでの患者のT細胞によるIFN- 産生の増加によって特徴づけられる。IFN- による治療はこの疾患を顕著に悪化させることが(マウスにおけるEAEとは対照的に)示されている。

トランスフォーミング増殖因子(TGF)- は本発明の方法を用いて遺伝的ワクチンに用いるために最適化することのできる、別のサイトカインである。TGF- は本質的には全てのタイプの細胞に対して増殖調節活性を有し、また、免疫系の細胞に対して複雑な調節効果を有することも示されている。TGF- はB細胞およびT細胞の双方の増殖を阻害し、また細胞傷害性T細胞およびNK細胞の発生と分化を抑制する。TGF- はマウスおよびヒトB細胞の双方でIgAスイッチングを指令することが示されている。TGF- はまた、マウスおよびヒトのB細胞において生殖細胞株の転写を誘導することが示されているが、このことはTGF- がIgAスイッチングを特異的に誘導することができるという結論を支持するものである。

TGF- にはIgAスイッチングを指令する能力があるので、TGF- は強力な粘膜性免疫を誘導することを狙ったDNAワクチン、例えば下痢のためのワクチンなどの成分として有用である。また、その強力な抗増殖効果の故に、TGF- は治療用癌ワクチンの成分としても有用である。比活性が改良されおよび/または発現レベル/動態が改良されたTGF-は野生型TGF- に比べ有用性が高い。

本発明の方法を用いて最適化されうるサイトカインとしては、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をも含

む。これらのサイトカインは骨髄幹細胞の顆粒球/マクロファージへの分化を誘導する。G-CSFおよびGM-CSFの投与によって、骨髄(BM)移植および放射線療法からの回復が著しく改善され、これにより感染が減少し、患者の入院期間が低減される。GM-CSFはDNAワクチン接種後の抗体産生を増大させる。G-CSFは175個のアミノ酸を有するタンパク質であり、GM-CSFは127個のアミノ酸を有するタンパク質である。ヒトG-CSFはマウスG-CSFとアミノ酸のレベルでは73%同一であり、この2つのタンパク質は種間交差反応性を示す。G-CSFの受容体はホモダイマー(2量体は ~ 200 pMのkD、単量体は ~ 2.4 nM)であり、GM-CSFの受容体は3個のサブユニットの複合体である。G-CSF RをコードするcDNAでトランスフェクトした細胞株はG-CSFに応答して増殖する。GM-CSFに依存性の細胞株もある(TF-1など)。G-CSFは無毒性で、現在医薬品として非常によく使われている。しかし、その治療は高価であり、より強力なG-CSFがあれば患者負担およびヘルスケアにおけるコストが低減されるであろう。これらのサイトカインを用いた治療は、典型的には短期間であり、患者は同じ治療を2度と必要としない可能性が高く、そのことが免疫原性に伴う問題が起こる可能性を少なくしている。

【0113】

本発明の方法は、比活性が改良されたG-CSFおよび/またはGM-CSF、ならびにG-CSFおよび/またはGM-CSF活性を有するその他のポリペプチドを作製するために有用である。例えば多様な動物種から得たcDNAライブラリーから得られたもののような配列多様性を有するG-CSFおよび/またはGM-CSFの核酸を、実験的に進化させて(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)G-CSFおよび/またはGM-CSF遺伝子のライブラリーを作製することができる。これらのライブラリーは、例えば、コロニーを取り、そのプラスミドを適切な宿主細胞(例えばCHO細胞)中にトランスフェクトし、上清を受容体陽性細胞株を用いてアッセイすることによってスクリーニングすることができる。あるいはまた、ファージディスプレイまたは関連技法を、ここでも受容体陽性細胞株を用いて行うことができる。また別のスクリーニング法には、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオ

チド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)遺伝子をG-CSF/GM-CSF依存性細胞株中にトランスフェクトすることが含まれる。その細胞を1ウェルあたり1個および/または大きなフラスコに非常に低い密度で増殖させ、最も早く増殖する細胞を選択する。これらの細胞から得た実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)遺伝子を単離する；必要があれば、それらの遺伝子を再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)および選択のさらなるラウンドに用いることができる。

毛様体神経栄養因子(CNTF)は本発明の方法を適用する別の適切な標的である。CNTFは200個のアミノ酸を有し、ラットとウサギのCNTFポリペプチドは80%の配列同一性を示す。CNTFはIL-6様の炎症効果を有し、急性期タンパク質の合成を誘導する。CNTFはIL-6/IL-11I/LIF/オンコスタチンM-ファミリーに属する細胞質ゾルのタンパク質で、細胞性の病変または未知の放出機作によって利用可能になった後にのみ生物学的に活性となる。CNTFはシュワン細胞、星状細胞、および坐骨神経を有髄化することにより発現する。

構造的にはCNTFは新規の逆平行構成のサブユニットを持つ2量体のタンパク質である。各サブユニットはダブルクロスオーバー4ヘリックスバンドルフォールドにあてはまり、そこでは2本のヘリックスが2量体のインターフェイスに寄与している。Lys-155変異体は活性を欠き、Glu-153変異体のいくつかは5~10倍高い生物学的活性を有している。CNTFの受容体は特異的なCNTF受容体鎖、gp130、およびLIF- 受容体からなっている。CNTFR- 鎖は膜貫通ドメイン部分を欠いており、その代わりにGPI- アンカーを有している。高濃度では、CNTFはCNTFR非依存性の反応を媒介する。可溶性CNTFRはCNTFと結合し、その後LIFRと結合してgp130を経由するシグナル伝達を誘導することができる。CNTFはいくつかのタイプのニューロンの生存率を増加させ、ハンチントン病の動物モデルのニューロンを防護する(NGF、神経栄養因子、およびニューロトロフィン-3とは異なり)。CNTF受容体ノックアウトマウスは出生時に重篤な運動ニューロン欠損を有し、CNTFノックアウトマウスは出生後もその欠損を示す。またCNTFはマウスモデルで肥満を減少させる。精神病患者では時にCNTFの発現の減少が認められる。ALSの患者(年間

発症率～1/100,000、家族例5%、90%が6年以内に死亡)におけるフェーズI試験では、5mg/kg/dayを超える皮下投与後には顕著な副作用が認められた(副作用としては食欲不振、体重減少、単純ヘルペスウイルス(HSV1)の再活性化、咳、口腔内分泌の増加を含む)。CNTFに対する抗体はほとんど全ての患者で検出され、このことは異なる免疫学的性質を有する代替CNTFの必要性を示している。

本発明の再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の追加の定方向進化法)およびスクリーニング法は、in vivoで免疫原性の低減を示す改変CNTFポリペプチドを得るために用いることができる；免疫原性がより高いものも本方法を用いて得られる。再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)はCNTFをコードする核酸を用いて行われる。好ましい実施形態においては、IL-6/LIF/(CNTF)ハイブリッドはCNTFの受容体結合部位をコードするオリゴヌクレオチドの過剰量を用いて再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)させることによって得られる。次いでIL-6/LIF受容体に対する結合が欠如していることを調べるためにファージディスプレイを用いることができる。

この初回スクリーニングに引き続き、CNTF受容体への結合に高いアフィニティを有するものを調べ、所望によりCNTF反応性細胞株を用いて機能アッセイを行う。実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)CNTFポリペプチドは、哺乳動物への投与において免疫原性が低減されたものを同定するために試験することができる。

CNTFを最適化するために用いる本発明の再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の追加の定方向進化法)およびスクリーニングの別の方法は、ポリペプチドの分泌を改良することである。CNTF cDNAが機能しうる形でhNGFのリーダー配列に連結されているときは、産生されたCNTFの全量の35～40%が分泌されるにすぎない。

【0114】

DNAワクチンのように、発現ベクター中にある実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘

発によって)遺伝子、または精製タンパク質のいずれかを用いて、最適化CNTFで治療する標的疾患としては、肥満、筋萎縮性側索硬化症(ALS、ルーゲーリック病)、糖尿病性神経障害、卒中、および脳手術が挙げられる。

ケモカインをコードするポリヌクレオチドも本発明の方法を用いて最適化することができ、遺伝的ワクチンベクターに含ませることができる。構造に基づいて少なくとも3つのクラスのケモカインが知られている：C ケモカイン(リンホタクチンなど)、C-C ケモカイン(MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MIP-1a、MIP-1b、RANTESなど)、C-X-C ケモカイン(IL-8、SDF-1、ELR、Mig、IP10など)(PremackとSchall (1996) Nature Med. 2:1174)。ケモカインは免疫および炎症機能を媒介する他の細胞を誘引することができ、そのことによって免疫反応を増強する。異なるタイプのケモカインによって誘引される細胞としては、例えば、リンパ球、単球および好中球が挙げられる。一般に、C-X-C ケモカインは好中球の化学誘引剤であるが、単球の化学誘引剤ではなく、C-C ケモカインは単球およびリンパ球を誘引するが、好中球は誘引せず、C ケモカインはリンパ球を誘引する。

遺伝的ワクチンベクターには、実験的に作製した最適化ポリヌクレオチドであって、免疫反応の調節および増強に関与するものなどの表面結合性アクセサリ分子をコードするものを含ませることもできる。そのような分子としては、例えば、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD40、CD40のリガンド、CTLA-4、CD28、およびCD150(SLAM)などがあり、それらに確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を行って、活性を変えたおよび/または改良した変異体を得ることができる。

CD1分子をコードする実験的に作製した最適化ポリヌクレオチドも適用によっては遺伝的ワクチンベクター中に用いると有用である。CD1は構造的および機能的にMEC分子と関連している非多型分子である。重要なことは、CD1はMHC様活性を有し、抗原提示分子として働くことである(Porcelli(1995) Adv. Immunol. 59:1)。CD1は樹状細胞上で高度に発現されており、その樹状細胞は非常に効率の高い抗原提示細胞である。CD1および対象の抗原をコードするDNAワクチンベクターで標的細胞を同時にトランスフェクションすると、免疫反応をブーストするものと考えられる。CD1細胞はMHC分子とは異なり、異型交配集団において対立遺

伝子の多様性は限定的なものであるので(Porcelli, 同上)、異なる遺伝的背景を有する個人の大きな集団を1つのCD1対立遺伝子でワクチン接種することができる。CD1分子の機能的性質を本発明の確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法で改良することができる。

最適化された組換えTAP遺伝子および/または遺伝子産物を遺伝的ワクチンベクター中に含ませることもできる。TAP遺伝子および種々の目的でのその最適化については下記に詳細に述べる。さらに、HSP70などのヒートショックタンパク質(HSP)も、抗原の提示と処理を改良するために進化させることができる。HSP70はCD8⁺T細胞活性化の誘導のためのアジュバントとして働くことが示されており、特定の抗原ペプチドの免疫原性を増強する(Blachereら (1997) J. Exp. Med. 186:1315-22)。HSP70が遺伝的ワクチンベクターによってコードされていれば、抗原ペプチドの提示と処理を増強するものと考えられ、それによって遺伝的ワクチンの効力を改良する。確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法を、HSP70などのヒートショックタンパク質の、アジュバント活性を含む性質をさらに改良するために用いることができる。

組換えにより作製したサイトカイン、ケモカインおよびアクセサリ分子ポリペプチド、ならびにそれらの分子のアンタゴニストを、与えられた刺激に対する免疫反応のタイプに影響を及ぼすために用いることができる。しかし、ポリペプチドの投与には時に欠点があり、このような欠点としては、半減期が短いこと、高価であること、保存が困難であること(4℃で保存しなければならない)、および大容量が必要なことが挙げられる。また、ボーラス注射によって時に副作用がおこる。組換えサイトカインまたはその他の分子をコードするポリヌクレオチドの投与によって、これらの問題点の大部分または全てを克服しうる。例えば、DNAは高純度で調製することができ、このようなDNAは、安定で、温度抵抗性で、非感染性で、作製が容易である。さらに、ポリヌクレオチドを介するサイトカインの投与によって、長時間持続する一定の発現が得られ、ポリヌクレオチドの投与は一般的に安全であると考えられている。

【0115】

サイトカイン、ケモカインおよびアクセサリー分子の機能は余分なものがあり、多面的であるので、どのサイトカインまたはサイトカインの組み合わせがワクチン接種後の抗原特異的免疫反応の誘導および増強に最も強力であるかを決めることは困難である。さらに、最も有用なサイトカインおよびアクセサリー分子の組み合わせは、典型的には、ワクチン接種後に望まれる免疫反応のタイプの如何によって異なる。1例として、IL-4は T_H2 細胞(この細胞は高レベルのIL-4、IL-5、およびIL-13を産生し、アレルギー性免疫反応を媒介する)の分化を指令するが、IFNおよびIL-12は T_H1 細胞(この細胞は高レベルのIL-2およびIFN- γ を産生する)の分化を指令し、遅延型免疫反応を媒介する。さらに、サイトカインおよびアクセサリー分子の最も有用な組み合わせは、ワクチン接種に用いる抗原の如何にもよるものと考えられる。本発明は最適化された遺伝的ワクチンカクテルを得ることの問題点に解決法を提供する。本明細書に記載の方法を用いて、異なる組み合わせのサイトカイン、ケモカイン、およびアクセサリー分子がベクター中に組み立てられる。これらのベクターについては、次いでin vivoおよびin vitroで免疫反応を誘導する能力をスクリーニングする。

ポリヌクレオチド(例えば遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロンなど)再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)および組み合わせ分子生物学によって作製したベクターの大きなライブラリーについて、所望の、例えば T_H1 または T_H2 表現型に向けた免疫反応を指令する能力が最大のものをスクリーニングする。異なるベクターのライブラリーを、別々の、進化させたプロモーター、(進化させた)サイトカイン、(進化させた)サイトカインアンタゴニスト、(進化させた)ケモカイン、(進化させた)アクセサリー分子、および免疫刺激性配列を組み立てることによって作製することができ、それらの各々は本明細書に記載の方法を用いて作製することができる。トランスフェクションおよび発現を容易にするようなDNA配列および化合物を含ませることができる。病原体が既知のものであれば、その病原体から得られる免疫原性を有する抗原をコードする特異的DNA配列をそれらのベクター中に組み入れて、その病原体に対する防御免疫を提供することができる(遺伝的ワクチンとして)。

初回スクリーニングは好ましくはin vitroで行う。例えば、そのライブラリーを細胞中に導入し、所望の免疫反応のタイプを示すサイトカインを産生することのできるT細胞の分化を誘導する能力について調べることができる。例えば、 T_H1 反応については、該ライブラリーはIL-2およびIFN- γ を産生するT細胞を誘導する能力のある実験的に作製されたポリヌクレオチドを同定するためにスクリーニングされ、一方、 T_H2 反応に向けた実験的に作製されたポリヌクレオチドを同定するためにT細胞のIL-4、IL-5、およびIL-13産生の誘導についてスクリーニングする。

スクリーニングはin vivoで動物モデルを用いても行うことができる。例えば、本発明の方法を用いて製したベクターを、致死感染に対する防御能について調べることができる。別のスクリーニング法は、森林型熱帯リーシュマニア寄生虫をBALB/c マウス(非治癒性)の足裏に注射することを含む。プラスミドのプールをこれらのマウスに静注、腹腔内、または足裏中へ注射し、足裏の腫脹の大きさを観察する。また別のin vivoスクリーニング法は、ニッポストロンギルス・ブラジリエンシス(*Nippostrongylus brasiliensis*)での感染後にIgEの検出を行うことを含む。高レベルのIgEは T_H2 反応を示し、低レベルのIgEは T_H1 反応を示す。

動物モデルでの良い結果はヒトにおいて容易に確かめることができる。in vitroスクリーニングをヒト T_H1 もしくは T_H2 表現型またはその他の望ましい反応を調べるために行うことができる。ベクターもまた、ヒトにおける感染に対する防御を誘導する能力について調べることができる。種々の多様な感染において免疫機能の原理は同様であるので、免疫刺激性のDNAワクチンベクターは多数の感染症の治療において有用であるばかりでなく、それらのベクターを病原体の侵入部位(例えば肺、または腸)へ送達すると、感染の防御にも有用である。

2.6.5.3. 細胞性受容体のアゴニストまたはアンタゴニスト

本発明はまた、免疫反応の媒介に関わる細胞性受容体と相互作用しうるペプチドまたはポリペプチドをコードする、実験的に作製した最適化ポリヌクレオチドを得る方法をも提供する。実験的に作製した最適化ポリヌクレオチドは、その受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる。

【0116】

サイトカインアンタゴニストは遺伝的ワクチンカクテルの成分として用いることができる

単一のプロ炎症性サイトカインを添加するよりはむしろ免疫抑制性のサイトカインをブロックすることが、より一般的な形で免疫反応を増強することとなるようであるが、それはいくつかの経路が同時に増強されるからであろう。アンタゴニストの適切なものを選択することによって、所望の効果を達成するための最も有効な反応を得るために、遺伝的ワクチンによって誘導される免疫反応を調節することができる。適切なものであれば、どのようなサイトカインに対するアンタゴニストも用いることができる：ブロッキングのためのサイトカインとして特に対象とするものとしては、例えば、IL-4、IL-13、IL-10などが挙げられる。

本発明は、それぞれのサイトカインの作用をブロックすることにおいてより有効性を示すサイトカインアンタゴニストを得る方法を提供する。改良されたサイトカインアンタゴニストをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド(例えば遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロンなど)再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)を用いてポリヌクレオチドの組換えライブラリーを作製し、次いで、改良されたアンタゴニストをコードするポリヌクレオチドについてスクリーニングすることにより得ることができる。確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的なポリヌクレオチド再集合法のための基質として、例えば、それぞれのサイトカインの受容体をコードするポリヌクレオチドを用いることができる。再集合(および/または本明細書に記載の1つ以上の追加の定方向進化法)反応液中には少なくとも2つの形の基質が存在し、各々の形のものは他方のものと少なくとも1個所のヌクレオチドの位置で異なっている。好ましい実施形態においては、異なる形のポリヌクレオチドは異なる生物体から得た相同なサイトカイン受容体遺伝子である。この結果得られる、実験的に作製したポリヌクレオチドのライブラリーを、次いで、所望のアフィニティーと生物学的活性を有するサイトカインアンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを同定するためにスクリーニングする。

遺伝的ワクチンカクテル中にサイトカインアンタゴニストを含めることによっ

て達成しうる効果のタイプの1例として、ならびに本発明の確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法を用いてその効果がどのように改良できるかの1例として、IL-10について論じる。その他のサイトカインのアンタゴニストを得てそれを用いることに同じ理論が応用しうる。インターロイキン-10(IL-10)はおそらく今日知られている最も強力な抗炎症性サイトカインであろう。IL-10は、炎症性反応を増強する多数の経路を阻害する。IL-10の生物学的活性としては、単球でのMHCクラスII発現の阻害、単球/マクロファージによるIL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 産生の阻害、およびTリンパ球の増殖阻害およびIL-2産生の阻害が挙げられる。免疫および炎症反応の調節分子としてのIL-10の重要性はIL-10欠損マウスにおいて明確に示された。

これらのマウスは成長遅滞、貧血性であり、炎症性腸疾患を自発的に発症する(Kuhnら(1993) Cell 75:263)。さらに、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)に対する先天性および後天性免疫は、IL-10欠損マウスでは上昇していることが示されている(Daiら(1997) J. Immunol. 158:2259)。IL-10産生レベルの遺伝的相異は合併症の髄膜炎菌(*meningococcal*)によって患者が死亡する危険性に影響を及ぼす可能性があることが示唆されている。IL-10産生量が高い家族では髄膜炎菌による疾病で死に至る危険性が20倍増大していた(Westendorpら(1997) Lancet 349:170)。

IL-10は正常および悪性のB細胞をin vitroで活性化することが示されているが、IL-10欠損マウスでは循環血液中でのBリンパ球数および免疫グロブリンは正常のレベルであるので、IL-10が正常B細胞のin vivoでの増殖促進サイトカインの主要なものであるとは思えない。事実、IL-10が、単球のアクセサリー細胞機能の阻害を通じて、間接的にB細胞の機能をダウンレギュレートしていることの証拠がある。しかし、IL-10は悪性のB細胞の増殖と拡大においてある役割を果たしていると考えられる。抗IL-10モノクローナル抗体およびIL-10アンチセンスオリゴヌクレオチドは、in vitroでのEBVによるB細胞の形質転換を阻害することが示されている。さらに、B細胞性リンパ腫はEBVと関連しており、大部分のEBV⁺のリンパ種は高レベルのIL-10を産生するが、それはヒト遺伝子から、お

よびEBVによってコードされるIL-10と相同のものからの双方に由来するものである。AIDS関連のB細胞リンパ腫も高レベルのIL-10を分泌する。さらに、中程度/高度の非ホジキンリンパ腫の患者で診断時に血清IL-10が検出可能であった患者は生存期間が短く、このことはB細胞悪性腫瘍の病因におけるIL-10の役割を示唆している。

【0117】

in vivoでIL-10をアンタゴナイズすることはいくつかの感染および悪性腫瘍、ならびにワクチン接種に有益となりうる。IL-10をブロックすることの効果は免疫反応の特異性とは無関係な免疫反応の増強である。このことはワクチン接種および重篤な感染症の治療に有用である。さらに、IL-10アンタゴニストは、IL-10およびウイルス性IL-10の過剰産生を示すB細胞悪性腫瘍の治療に有用であり、また、癌患者における総体的な抗腫瘍免疫反応をブーストすることにも有用であろう。腫瘍細胞に対して最大の免疫反応を得るために、IL-10アンタゴニストと遺伝子治療ベクターとを組み合わせることは、腫瘍細胞の遺伝子治療に有用であろう。IL-10の再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)によって比活性が改良されたIL-10が得られるとすれば、このIL-10分子は自己免疫疾患および炎症性腸疾患の治療に用いる可能性があるであろう。比活性の改良されたIL-10はまた、遺伝子治療ベクターの成分として用ると、メモリー細胞に認識されるベクターに対する免疫反応を低減させ、また、これらのベクターの免疫原性も低減させるであろう。

IL-10のアンタゴニストはIL-10受容体の可溶性型を作製することによって作られた(sIL-10R; Tanら(1995) J. Biol. Chem. 270:12906)。しかし、sIL-10Rは560pMのKdのIL-10と結合するのに対して、野生型表面結合受容体は35~200 pMに対してアフィニティーを有する。従って、IL-10の生物学的機能の最大値の半分を阻害するためには150倍過剰のモル濃度のsIL-10Rが必要である。さらに、ウイルス性IL-10(Epstein-BarrウイルスによってコードされるIL-10相同体)のsIL-10Rに対するアフィニティーはhIL-10のアフィニティーに比べて1000分の1未満であり、EBV関連B細胞悪性腫瘍の治療の際など、状況によっては、ウイルス性IL-10の機能をブロックすることができるならば有益であろう。これらを考慮すると、

このIL-10Rの可溶性型がin vivoでIL-10をアンタゴナイズすることに有効であるとは考えられない。

in vivoで機能するために十分なアフィニティーとアンタゴニスト活性を有するIL-10アンタゴニストを得るためには、確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法を、IL-10受容体をコードするポリヌクレオチドを用いて行うことができる。通常のアフィニティーより高いアフィニティーを有するIL-10受容体は、機能を有する野生型IL-10Rとの結合に利用可能なIL-10の量を顕著に低減させるので、IL-10アンタゴニストとして働くであろう。好ましい実施形態においては、IL-10Rは、ヒトおよびその他の哺乳動物種に由来するIL-10Rをコードする相同cDNAを用いて実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)。

アフィニティーを改良したIL-10受容体を進化させるに際してのファミリー確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法の実現可能性を説明するために、ヒトおよびマウスIL-10受容体配列のアラインメントは、本明細書中に示し、説明しおよび/または参照されている(参照による組み込みを含む)。IL-10受容体組換え体のファージライブラリーについて、実験的に進化させた(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)IL-10Rのヒトまたはウイルス性IL-10に対する結合性が改良されたものをスクリーニングすることができる。野生型IL-10および/またはウイルス性IL-10を、高いアフィニティーが必要なため、濃度を増加させつつ添加する。IL-10に結合したファージは抗IL-10モノクローナル抗体を用いて回収することができる。所望により、シャフリングを1回以上繰り返すことができ、その後、作製した可溶性IL-10RをそのIL-10/ウイルス性IL-10の生物学的活性を中和する能力について機能アッセイで分析する。より特定して述べれば、単球によるサイトカイン合成およびMHCクラスII発現、T細胞による増殖に対するIL-10の阻害効果をブロックする能力、および抗CD40モノクローナル抗体によって活性化されるB細胞の増殖に対するIL-10の増強効果を阻害する能力について、作製した可溶性IL-10Rを調べる。

IL-10アンタゴニストはまた、IL-10を進化させて、野生型のアフィニティーより高いIL-10Rへの結合を示すが受容体の活性化は示さないような変異体を得ることによっても作製することができる。このアプローチの利点は、比活性の改良されたIL-10分子を同じ方法で作製することができる点である。好ましい実施形態においては、IL-10はヒトおよびその他の哺乳動物種に由来するIL-10をコードする相同cDNAを用いて実験的に進化(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって)される。さらに、ウイルス性IL-10をコードする遺伝子を再集合(場合により本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせて)中に含めることができる。IL-10組換え体のライブラリーを、ヒトIL-10受容体への結合の改良についてスクリーニングする。IL-10Rに結合するライブラリーのメンバーを抗IL-10Rモノクローナル抗体で回収する。このスクリーニングプロトコールでは、アンタゴニスト活性およびアゴニスト活性の双方を有するIL-10分子が得られると考えられる。一次スクリーニングには高いアフィニティーが必要であるので、アゴニストのある部分は野生型ヒトIL-10と比較すると比活性の改良されたものであると考えられる。変異IL-10分子の機能的性質は、超高アフィニティーIL-10受容体について上述したものと同様な生物学的アッセイ(単球によるサイトカイン合成およびMHCクラスII発現、B細胞およびT細胞の増殖)で測定される。アンタゴニスト活性を有するIL-4変異体は既に作製されており、それはこのアプローチの一般的な実現可能性を示している(Kruseら(1992) EMBO J. 11:3237-3244)。IL-4中のアミノ酸1個の変異によってIL-4Rのα鎖と効率的に結合するがIL-4様のアゴニスト活性は非常に低い分子が得られた。

【0118】

IL-10アンタゴニストの別の例はIL-20/mda-7であり、それは206個のアミノ酸を有する分泌タンパク質である。このタンパク質はもともとはmda-7として特徴づけられており、それはメラノーマ細胞由来の腫瘍細胞増殖の負の調節剤である(Jiangら(1995) Oncogene 11:2477; (1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9160)。IL-20/mda-7は構造的にはIL-10と関連しており、IL-10のいくつかの機能をアンタゴナイズする(13th European Immunology Meetingの予稿集、Amsterdam,

22-25, June 1997)。IL-10とは異なり、IL-20/mda-7はヒト単球のCD80(B7-1)およびCD86(B7-2)の発現を増強し、TNF- およびIL-6の産生をアップレギュレートする。IL-20/mda-7はまた、PHAで活性化されたPBMCによるIFN- の産生を増強する。本発明は遺伝的ワクチンベクター中にIL-20/mda-7遺伝子を取り込むことによって遺伝的ワクチンを改良する方法を提供する。本発明の方法はIL-10活性をアンタゴナイズする能力の改良を示すIL-20/mda-7変異体を得るために用いることができる。

サイトカインアンタゴニストをDNAワクチンの成分または遺伝子治療ベクターの成分として用いる場合には、局所効果が最大限であることが望ましい。従って、サイトカインアンタゴニストが可溶性の形であることに加えて、そのアンタゴニストの膜貫通型を作製することができる。可溶性型は患者へ精製されたポリペプチドの形で、例えば静脈内注射によって投与することができる。あるいはまた、サイトカインアンタゴニストをコードするポリヌクレオチドを遺伝的ワクチンまたは遺伝子治療ベクターの成分として用いることができる。この場合には、可溶性型および膜貫通型のいずれかまたは双方を用いることができる。可溶性型と膜貫通型のアンタゴニストの双方が同じベクターによってコードされる場合には、標的細胞は双方の型を発現し、その結果、標的細胞表面上およびそのごく近傍でサイトカイン機能の阻害が最大となる。

これらの方法を用いて得られたペプチドまたはポリペプチドは、その受容体を介して免疫系に影響を及ぼす能力に関して、サイトカインまたはその他の共刺激性分子などの、受容体の天然のリガンドに取って代わることができる。サイトカインまたはその他の共刺激性分子自体を投与することによって生じる不利な点は、関連してはいるが別個の分子を用いると、耐容性を壊す(天然のサイトカインまたはその他の分子を用いる場合)ため、または交差反応性免疫(液性または細胞性)を誘導することのどちらかによって、天然の分子に対する自己免疫反応が誘導されうることである。本発明の方法を用いることによって、これらの欠点の可能性を避けられるアゴニストまたはアンタゴニストを得ることができる。例えば、天然の免疫調節剤の活性を真似ることのできるアゴニストとして比較的小さなペプチドを用いることができ、または天然分子に対する交差反応性免疫を誘導

することなく活性をアンタゴナイズすることができる。現在のところ好ましい実施形態においては、本発明の方法を用いて得られる最適化されたアゴニストまたはアンタゴニストは長さがアミノ酸50個以下で、より好ましくはアミノ酸約30個以下、最も好ましくは長さがアミノ酸約20個以下である。そのアゴニストまたはアンタゴニストペプチドは、好ましくは長さが少なくともアミノ酸約4個であり、より好ましくは長さが少なくともアミノ酸約8個である。模倣体ペプチドのコード配列の近傍のポリヌクレオチドも本発明の方法を用いてその発現、コンホメーション、またはその模倣体ペプチドの活性を最適化することができる。

最適化されたアゴニストまたはアンタゴニストのペプチドまたはポリペプチドは、実験的に作製したポリヌクレオチドのライブラリーの作製、および免疫反応を調節する能力の増大を示したペプチドまたはポリペプチドをコードするものを同定するためにそのライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。ライブラリーは確率論的(例えばポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成)および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法またはその他の本明細書に記載の方法または当業者に公知の方法を用いて作製することができる。スクリーニングは、ライブラリーのメンバーによってコードされるペプチドを複製可能な遺伝的パッケージの集団の表面上で発現させ、対象の標的、例えば受容体に結合するメンバーを同定することによって都合よく行われる。

【0119】

本発明の方法を用いて得られる実験的に生成させた最適化ポリヌクレオチドはいくつかの方法で用いることができる。例えば、該ポリペプチドは遺伝的ワクチンベクター内に、そのベクターが哺乳動物の体内に導入されて模倣ペプチドが発現されるように適切な発現制御配列の調節のもとにおくことができる。所望により、その模倣体のコンホメーションを保持するために、ポリヌクレオチドは表面タンパク質のコード配列(例えばgeneIIIまたはgeneVIII)中に埋め込まれるベクター中に入れておくことができる。あるいはまた、模倣体をコードするポリヌクレオチドを遺伝的ワクチンの抗原コード配列中に直接的に挿入して「抗原上ミモトープ(mimotope-on-antigen)」構造をコードする配列を形成することができる。抗原上ミモトープ構造をコードするポリヌクレオチドは遺伝的ワクチン内で

用いることができ、またはそれ自体をワクチンとして投与しうるタンパク質を発現するために用いることができる。このタイプの適用の1例として、模倣ペプチドのコード配列をB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)タンパク質の「M-ループ」をコードするポリヌクレオチド中に導入する。M-ループとはシステイン残基で結ばれたアミノ酸6個のペプチド配列で、アミノ酸139-147(Sタンパク質配列内の番号)の位置に見出される。天然のHBsAgタンパク質のM-ループはモノクローナル抗体RFHB7で認識される(Chenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1997-2001(1996))。Chenらによれば、M-ループはHBsAgの1エピトープを形成し、それはHBsAgのその他の少なくとも4つのエピトープとはオーバーラップせず、分離している。

このタンパク質の親水性部分中にCys-Cysジスルフィド結合がおそらくあると思われるので、アミノ酸139-147は環状コンホメーション中にあるのであろう。従って、この構造はフィラメント状のファージタンパク質pIIIおよびpVIIIの領域(そこにはミモトープ配列がおかれている)に見出されるものと同様なものである。従って、本発明の方法を用いて得られたミモトープ(mimotope)をHBsAgアミノ酸配列のこの領域中に挿入することができる。

ケモカイン受容体CCR6は本発明の方法を用いて得られるペプチド模倣体の適切な標的の1例である。CCR6受容体は、未熟な樹状細胞(それは血中に見出され抗原取り込みの部位に移動する(Dieuら, J. Exp. Med. 188:373-386(1998))の化学的誘引性(chemoattraction)に関与する、7-膜貫通ドメインタンパク質である(Dieuら, Biochem. Biophys. Res. Comm. 236:212-217(1997)およびJ. Biol. Chem. 272:14893-14898(1997))。CCR6はケモカインMIP3と結合するので、CCR6を活性化する能力のある模倣ペプチドは、与えられた抗原に対してさらなる化学誘引物質機能を提供することができ、抗原-抗原模倣体の融合体または抗原を発現するDNAベクターで免疫した後の樹状細胞による取り込みを促進する。

本発明の方法の別の適用は、マクロファージスカベンジャー受容体(MSR; Wlochら, Hum. Gene Ther. 9:1439-1447(1998)を参照せよ)に対するアゴニストとして作用しうる分子を得ることである。MSRは種々の免疫調節剤の効果を媒介することに関与している。そのようなものとしては、DNAワクチン接種に用いるプラスミドを含む細菌性DNA、およびオリゴヌクレオチドがあり、それらはしば

しば強力な免疫刺激剤となる。

特定の化学構造を有するオリゴヌクレオチド(例えば、ホスホチオオリゴヌクレオチド)は特に強力であるが、一方細菌性またはプラスミドDNAは効果を生じさせるためには比較的大量を用いなければならない。MSRによって媒介されるものとしてはまた、dG残基を含有するオリゴヌクレオチドのB細胞刺激および免疫刺激性CpGモチーフの活性を増強する能力、ならびにリポ多糖のマクロファージ活性化の能力がある。これらの活性のいくつかは毒性のあるものである。これらの免疫調節剤の各々は、多様なポリ陰イオン性リガンドとともにMSRに結合する。本発明の方法は、MSRに高いアフィニティーで結合するが毒性のない、これらの免疫調節剤の1つ以上の模倣体を得るために用いることができる。このような模倣ペプチドは免疫刺激剤またはアジュバントとして有用である。

MSRは3量体の複合膜糖蛋白質である。3個所の細胞外C末端のシステインに富む領域は、1つのヘリカルコイルと1つのコラーゲン様トリプルヘリックスで構成されている線維状領域によって膜貫通ドメインに接続されている(Kodamaら, Nature 343:531-535(1990)を参照せよ)。従って、実験的に生成させたポリヌクレオチドのライブラリーのスクリーニングは、細胞外受容体構造を発現させ、それを人工的にプラスチック表面に付着させることによって行うことができる。そのライブラリーは、例えばファージディスプレイによって発現させることができ、スクリーニングして受容体と高いアフィニティーで結合するものを同定することができる。

本発明の方法によって同定された、実験的に生成された最適化ポリヌクレオチドは、抗原コード配列中に組み入れて、その免疫反応への調節効果を評価することができる。

【0120】

2.6.5.4 抗原特異的T細胞の活性化、分化、またはアネルギーを抑制または増大する能力のある共刺激 (costimulatory) 分子

また、発現されると抗原特異的T細胞の活性化、分化、またはアネルギーを抑制または増大する能力のある、最適化された実験的に生成したポリヌクレオチドを取得する方法も提供される。T細胞が、単球、樹状細胞(DC)、ランゲルハン

ス細胞またはB細胞のような抗原提示細胞（APC）の原形質膜上に、MHC分子との関連でそれらに特異的な抗原ペプチドを認識すると、T細胞活性化が開始される。CD4⁺T細胞の活性化はT細胞受容体（TCR）によるMHCクラスII分子と関連づけた抗原ペプチドの認識が必要であるが、CD8⁺T細胞はMHCクラスI分子との関連でペプチドを認識する。

しかし、重要なことは、T細胞増殖およびサイトカイン合成を誘導するのに、抗原ペプチドの認識だけでは十分でない。さらなる共刺激シグナル、すなわち「第2シグナル」が必要である。共刺激シグナルは、典型的には抗原提示細胞上に発現されるそのリガンドB7-1（CD80）またはB7-2（CD86）と結合するCD28を経由して伝えられる。共刺激シグナル不存在下では、T細胞活性化は起らないかまたはT細胞はアネルギー性となる。CD28に加えて、CTLA-4（CD152）もB7-1およびB7-2のリガンドとして機能する。しかし、CD28とは対照的に、CTLA-4はT細胞に対するネガティブ調節シグナルを伝え、および/またはアネルギーおよび耐性を誘発する（Walunasら, (1994) *Immunity* 1:405; Karandikarら, (1996) *J Exp. Med.* 184: 783）。

B7-1およびB7-2は複数の免疫応答を調節できることが示されており、これらはワクチン接種、アレルギー、自己免疫および癌における免疫調節に重要であることが示唆されている。B7-1および/またはB7-2を発現する遺伝子治療および遺伝的ワクチンベクターも、上記疾患の治療および遺伝的ワクチンの効力改善に治療効果を有する可能性が示されている。

図39は、APCとCD4⁺T細胞との相互作用を示すが、同じ原理は、T細胞がMHCクラスI分子との関連で抗原ペプチドを認識することを除くと、CD8⁺T細胞でも成立する。B7-1とB7-2の両方はCD28およびCTLA-4と結合するが、これら4つの分子間の配列類似性は非常に限られている（20–30%）。B7-1とB7-2に、1つのリガンドとの結合にのみ影響を与えるが他のリガンドに影響を与えない、または1つのリガンドを介する活性を改善するが他のリガンドを介する活性は低下させるような突然変異を得ることが望ましい。さらに、B7分子のリガンドに対するアフィニティは相対的に低いので、該分子の活性を改善および/または改変する突然変異を見出すことも望ましいであろう。しかし、該分子は複雑であるので、合理的

設計による有用な突然変異の予測はできない。

本発明は、これらの困難を克服し、T細胞活性化、分化、サイトカイン産生、アネルギーおよび/または耐性を誘導する相対的能力が改変された、機能的に異なるB7分子を生成しかつ同定することを可能にする方法を提供する。本発明の方法を使用することによって、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合による、1つのリガンドとの結合にのみ影響を与えるが他には影響を与えない、または1つのリガンドを介する活性を改善するが他を介する活性は低下させるB7-1およびB7-2の突然変異が、CD28およびCTLA-4との相対的結合能力の改変された新しいB7変異体を発見するための恐らく最も強力な方法であることがわかるであろう。改善された活性でCD28を介して作用する（そしてCTLA-4を介した活性が低下した）B7変異体は、T細胞の活性化を誘導する改善された能力を有すると予測される。対照的に、改善された活性でCTLA-4を介して結合し、作用する（そしてCD28を介した活性が低下した）B7変異体は、T細胞機能の強力なネガティブレギュレーターであり、耐性およびアネルギーを誘発すると予測される。

確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合または他の再集合（および/または本明細書記載の1つ以上の追加の定方向進化法）方法を使って、野生型B7分子と比較するとCD28およびCTLA-4を介して作用する相対的能力の改変されたB7（例えば、B7-1/CD80およびB7-2/CD86）変異体を生成する。好ましい実施形態においては、再集合（および/または本明細書記載の1つ以上の追加の定方向進化法）反応に使われる基質の様々な形態は、様々な種由来のB7 cDNAである。このようなcDNAは、RT-PCRを含む当業者に公知の方法により取得することができる。典型的には、これらの変異体B7分子をコードする遺伝子を、抗原をコードする遺伝的ワクチンベクターに組みこんで、該ベクターを使って抗原特異的T細胞応答を改変できるようにする。CD28を介して効率よく作用するB7遺伝子を保持するベクターは、例えば防御免疫応答を生起するのに有用であるが、一方CTLA-4を介して効率よく作用するB7遺伝子をコードする遺伝子を保持するベクターは、例えばアレルゲン-または自己抗原特異的T細胞の耐性およびアネルギーを誘発するのに有用である。腫

瘍細胞または自己免疫応答を生起する細胞のような場合には、抗原は既に標的細胞の表面に存在する場合があります、変異型B7分子は追加の外因性抗原遺伝子の非存在下でトランスフェクトすることができる。T細胞活性化またはアネルギーを誘発する能力の増大したB7-1 (CD80) および/またはB7-2 (CD86) 変異体を同定するために使うことができるスクリーニングプロトコルは、本明細書に図示され、この戦略の応用は本明細書にさらに詳細に記載されている。

【0121】

変異体のスクリーニングには、いくつかのアプローチをとることができる。例えば、フローサイトメトリーに基く選択システムを使うことができる。B7-1およびB7-2分子のライブラリーを、通常これらの分子を発現しない細胞（例えば、COS-7細胞、またはB7リガンド結合についてヒトと限られた交差反応性しかないか全く交差反応性のない異なる種からの任意の細胞系）にトランスフェクトする。細胞1つ当りのコピー数を分析する目的で、内部マーカー遺伝子を組みこむことができる。フローサイトメトリー実験で使うために可溶性CTLA-4およびCD28分子を生成することができる。典型的には、これらは、van der Merweら (J. Exp. Med: 185: 393, (1997)) が記載したように、IgG分子のFc部分と融合させて、分子の安定性を改善し、かつ標識した抗IgG mAbによる容易な染色を可能にするであろう。B7分子のライブラリーでトランスフェクトした細胞wo、その後、可溶性CTLA-4およびCD28分子を用いて染色する。CTLA-4/CD28結合比の増加または低下を示した細胞をソーティングする。その後、該プラスミドを回収し、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたB7変異体をコードする配列を同定する。その後、これらの選択されたB7変異体を、新しいラウンドの再集合（場合によっては本明細書記載の他の定方向進化法と組み合わせて）および選択に付することができ、および/または以下に記載の機能的アッセイを使ってさらに分析することができる。

B7変異体はまた、その機能的特性に基づいて直接選択することもできる。in vivo研究のために、B7分子はまた、マウス細胞上で機能するように進化させることもできる。変異型B7分子をもつプラスミドの細菌コロニーを拾い、プラスミド

を単離する。その後、これらのプラスミドを樹状細胞のような抗原提示細胞にトランスフェクトし、これらの変異体のT細胞を活性化する能力を分析する。この手法の利点の1つは、既知のリガンドに対する結合アフィニティまたは特異性について何の仮定もされていないことであり、まだ同定されていないリガンドを介したおそらくは新しい活性を発見しうることである。「第1のT細胞シグナル」が例えば抗CD3モノクローナル抗体により誘導される場合には、樹状細胞に加えて、相対的にトランスフェクトするのが容易な他の細胞（例えば、U937またはCOS-7）をスクリーニングに使うことができる。T細胞活性化は、例えば増殖測定、サイトカイン産生、CTL活性またはIL-2受容体、CD69もしくはHLA-DR分子のような活性化抗原の発現を含む、当業者に公知の方法により分析することができる。ハウスダストダニ抗原Der p Iに特異的なT細胞のような抗原特異的なT細胞クローンの使用は、抗原特異的なT細胞活性化の分析を可能にするであろう（Ysselら, (1992) J Immunol. 148: 738-745）。T細胞増殖を増大もしくは抑制、またはCTL応答を増大もしくは抑制することができる変異体は同定される。同様に、サイトカイン産生または活性化抗原の発現を誘導する能力の改変された変異体は、例えばサイトカイン特異的ELISAまたはフローサイトメトリーにより測定して、同定することができる。

B7変異体は、自己免疫疾患、アレルギー、癌、感染性疾患およびワクチン接種における免疫応答をモジュレートするのに有用である。改善された活性でCD28を介して作用する（そしてCTLA-4を介した活性が低下した）B7変異体は、T細胞の活性化を誘導する改善された能力を有するであろう。対照的に、改善された活性でCTLA-4を介して結合して作用する（そしてCD28を介した活性が低下した）B7変異体は、T細胞機能の強力なネガティブレギュレーターであり、耐性およびアレルギーを誘発するであろう。したがって、これらの変異体B7分子をコードする遺伝子を、抗原をコードする遺伝的ワクチンベクターに組みこむことにより、抗原特異的なT細胞応答を改変することが可能である。CD28を介して効率的に作用するB7遺伝子を保持するベクターは、例えば防御免疫応答を生起するのに有用である一方、CTLA-4を介して効率的に作用するB7遺伝子をコードする遺伝子を保持するベクターは、例えばアレルギーにまたは自己抗原に特異的なT細胞の耐

性およびエネルギーを誘発するのに有用である。腫瘍細胞または自己免疫応答を生起する細胞におけるようないくつかの状況では、抗原は既に標的細胞の表面上に存在し得るので、変異体B7分子を追加の外因性抗原遺伝子の非存在下でトランスフェクトすることができる。

本発明の方法はまた、 T_H1 または T_H2 いずれかの細胞分化を指令するのに増大した効力を有するB7変異体を取得するために有用である。 T ヘルパー (T_H) 細胞分化の調節において、B7-1およびB7-2分子には区別された役割が観察されている (Freemanら, (1995) *Immunity* 2: 523; Kuchrooら, (1995) *Cell* 80: 707)。 T_H 細胞分化は、特定の変異体によりそれぞれ誘導されるサイトカイン産生プロファイルを分析して測定することができる。高レベルのIL-4、IL-5および/またはIL-13は、効率的な T_H2 細胞分化を示す一方、高レベルのIFN- またはIL-2産生は、 T_H1 細胞分化のマーカーとして使うことができる。 T_H1 または T_H2 細胞分化を誘導する能力を改変したB7変異体は、例えばアレルギー性疾患、悪性疾患、自己免疫疾患および感染性疾患の治療ならびにワクチン接種に有用である。

本発明はまた、抗原特異的なT細胞によるIL-10産生を誘導する能力が増大している、B7変異体を取得する方法を提供する。IL-10の産生の上昇は、調節性T細胞の特徴であり、抗原特異的CD4⁺T細胞の増殖を抑制することができる (Grouxら, (1997) *Nature* 389: 737)。確率論的 (例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を、前記のように実施し、その後、IL-10誘導能が増大しているB7変異体をコードする組換え核酸を、例えば、ELISAまたは細胞質内サイトカイン染色を使うフローサイトメトリーにより同定することができる。高レベルのIL-10産生を誘導する変異体は、アレルギー性疾患および自己免疫疾患の治療に有用である。

【0122】

2.6.6. ワクチン接種効力の増加およびワクチン接種の容易さのための遺伝的ワクチンベクターの進化

この節は、遺伝的ワクチン接種における、複数の特定の到達目標に対する本発明の応用を考察する。これらの到達目標の多くは、ワクチン送達に使われるベクターの改善に関する。他に断りのない限り、これらの方法はウイルスベクターお

よび非ウイルスベクターの両方に応用可能である。

2.6.6.1 遺伝的ワクチンベクターの局所適用

局所適用の低い効率；防御免疫応答は実証されていない

本発明は、遺伝的ワクチンベクターの局所適用後に、所望の応答を誘導する能力を改善する方法を提供する。裸の皮膚に局所的に適用したアデノウイルスベクターは、ワクチン抗原送達ビヒクルとして作用する能力のあることが示されている（Tangら，(1997) Nature 388:729-730）。癌胎児性抗原（CA）をコードしたアデノウイルスベクターは、皮膚に適用した後、CAに特異的な抗体を誘導することが示された。しかし、局所適用の効率は、一般的に全く低く、局所適用後の防御免疫応答は実証されていない。

本発明の方法を使って局所適用効率を最適化する

本発明は、局所的に投与したときに改善された効率を表すベクターを取得する方法を提供する。複数の因子が局所適用効率に影響を与えることが可能であり、そのそれぞれは本発明の方法を使って最適化することができる。例えば、本発明は、皮膚細胞に対するベクターアフィニティを改善する方法、改善された皮膚細胞トランスフェクション効率、改善された皮膚細胞におけるベクターの残留性（改善された複製を介してまたは免疫細胞による破壊の回避を介して双方による）、および皮膚細胞における抗原発現の改善、ならびに免疫応答の生起の改善を提供する。

再集合（任意に本発明に記載の他の定方向進化法と組合せて）、選択、およびスクリーニングの方法

これらの方法は、基質としてプラスミド、裸のDNAベクター、または例えばアデノウイルスベクターを含むウイルスベクター核酸を使う、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合の実施に関わる。（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた核酸のライブラリーをスクリーニングして、ベクターの局所投与時に免疫応答を生起する能力を増大させる核酸を同定する。スクリーニングは、例えば、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により

）実験的に進化させたベクターのライブラリーを、マウスの皮膚、サル（ヒト）の皮膚、または免疫不全マウスもしくは正常なヒトの皮膚に *in vivo* で移植したヒトの皮膚、のいずれかの皮膚に局所的に適用することによって実施することができる。効率的なかつ長期継続するマーカー遺伝子の発現を持続し、および／または与えるベクターを、皮膚サンプルから回収する。好ましい実施形態においては、所望の細胞を、最初に細胞ソーティング、磁性ビーズ、またはパンニングにより選択する。例えば、回収は、マーカー遺伝子（例えば、GFP）の発現を介して実施することができる、蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーを使ってトランスフェクトした細胞を検出する。マーカー遺伝子を発現する細胞は、フローサイトメトリーに基づく細胞ソーティングを用いて単離することができる。スクリーニングはまた、試験哺乳動物に投与した時に最高の特異的な抗体またはCTL応答を生起するベクターの選択、または対応する病原体を用いたチャレンジに対する防御免疫応答を増大させるベクターの同定を包含する。その後、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたポリヌクレオチドを、例えばポリメラーゼ連鎖反応により回収し、または全体のベクターをこれらの選択した細胞から精製することができる。もし所望であれば、回収した（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたポリヌクレオチドを新しいラウンドの再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）および選択に付することによって、局所適用の効率をさらに最適化することができる。

局所適用のために最適化された遺伝的ワクチンベクターの投与

局所適用のために最適化された遺伝的ワクチンベクターは、局所的に皮膚に、または筋肉内、静脈内、皮内、経口、肛門、または腔送達により適用することができる。ベクターは、パッチ、クリームのような当業者に公知の任意の適当な形態で、裸のDNAとしてまたはDNAと1つ以上のリポソームおよび／もしくは脂質のようなトランスフェクション増強剤の混合物として送達することができる。好ましい実施形態においては、遺伝的ワクチンベクターは、例えば、機械的磨耗、毛の除去（例えば、Nair（商標）、Neet（商標）など）のような市販製品を用いた処理

による)により、皮膚または他の標的のベクターの取込みに対する感受性を高めた後に適用する。ある実施形態においては、皮膚をプロテアーゼまたはリパーゼを用いて前処理してDNA送達の影響性を高める。さらに、DNAをプロテアーゼまたはリパーゼと混合して遺伝子伝達を増加することもできる。あるいは、ベクターおよび(もしあれば)他のワクチン成分を含有する滴を単に皮膚に投与することができる。

【0123】

2.6.6.2 宿主免疫系を逃れるための能力の増大

標的細胞に入りこむ前のウイルスベクターに対する宿主免疫応答の制限

ウイルスベクターにおいて免疫原性は特に重要である、というのは、宿主免疫応答が、ウイルスが意図する標的に到達するのを、特に繰返し投与において防止できるからである。遺伝的ワクチンの接種および遺伝子送達に使われるいくつかのウイルスベクターの効力は、ウイルスベクターに対する宿主免疫応答により制限される。例えば、ほとんどの個体はアデノウイルスに対する既存の抗体を有する。アデノウイルスベクターは、時々アデノウイルスベクターを保持する細胞を破壊し、または標的細胞に入り込む前でさえ、宿主からのアデノウイルスベクターを取り除くことができる、強い免疫応答を誘導し得る。細胞免疫応答はまた、裸の形態でまたはリポソームのようなコートで遮蔽して投与された非ウイルスベクターに対しても誘導され得る。

体液性および細胞性免疫系を回避する改善された能力をもつ遺伝的ワクチンベクターを作製する方法

本発明は、そうしなければ所望の効果をj得るのに有害である免疫応答を逃れることができる遺伝的ワクチンベクターを作製する方法を提供する。これらの方法は、遺伝的ワクチンベクターによる病原体抗原または製薬上有用なタンパク質の発現および分泌を延長するために有用である。体液性(Ab)および細胞性(CTL)免疫系を回避する遺伝的ワクチンベクターの能力を改善することができる複数の戦略を提供する。これらの戦略は、アデノウイルスのような高免疫原性ベクターに対して必要とされ得る最適の回避をj得るために組合せて使うことができる。

宿主CTL免疫応答を逃れる能力のあるウイルスベクターを取得するための、ペプ

チド輸送および/またはMHCクラスI発現を阻害する1つ以上の成分の遺伝的ワクチンへの組み込み

ある実施形態においては、本発明は、宿主CTL免疫応答を逃れる能力のあるウイルスベクターを取得する方法を提供する。この方法は、体液性応答を逃れることができる遺伝的ワクチンベクターを取得する方法と共に使うことができる。異なるウイルス血清型はしばしば共通したCTLエпитープを有し、抗体が認識しないウイルス変異体でもCTLにより恐らく認識されると考えられるので、複数のアプローチの組合わせはしばしば望ましい。本発明のこの実施形態は、遺伝的ワクチン中に、ペプチド輸送および/またはMHCクラスI発現を阻害する1つ以上の成分を組みこむことを含む。細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答の活性化に必須の要素は、CTL上のT細胞受容体と抗原提示細胞上の抗原ペプチド-MHCクラスI分子複合体との間の相互作用である。胸腺細胞および抗原提示細胞上のMHCクラスI分子の発現は、抗原特異的CD8⁺Tリンパ球の成熟と活性化のための要件である。したがって、MHCクラスI介在抗原提示の阻害剤をコードする遺伝子を（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）本明細書に記載のとおり実験的に進化させ、ウイルスベクター中に置いて、該ベクターが標的細胞中に存在するときは免疫系細胞による標的細胞の破壊を誘導しないベクターを取得することができる。これにより、病原体抗原を発現するもの、ならびに製薬上有用なタンパク質を発現するベクターを含む遺伝的ワクチンベクターを保持する細胞の生存の延長をもたらすことができる。遺伝的ワクチンの場合、MHCクラスI分子の発現の減少により病原体抗原の分泌が可能になり、その後、病原体抗原はよその専門の抗原提示細胞により提示されるであろう。薬剤タンパク質をコードするベクターの場合、MHCクラスI分子発現の減少により、免疫系による認識が避けられ、遺伝子を発現する細胞の生存が延長される。

【0124】

最適化されたTAPインヒビターをコードする遺伝子を取得するための、TAP活性のインヒビターをコードする遺伝子の再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）

MHCクラスI分子発現および抗原提示に関わるタンパク質の中に、前記のTAP遺

伝子（抗原プロセッシング関連トランスポーター）によりコードされるタンパク質がある。本発明のある実施形態においては、TAP活性のインヒビターをコードする遺伝子を、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させて、最適化TAPインヒビターをコードする遺伝子を取得する。これらの方法のための対象（substrate）としては、例えば、MHCクラスI分子発現レベルを調節することが知られる1つ以上のウイルス遺伝子を含むことができる。アデノウイルス12により形質転換された細胞中では、TAP1およびTAP2遺伝子発現はそれぞれ5-10倍および100倍低下し、これによりクラスI発現の低下をもたらし、その結果、ウイルス特異的細胞傷害性Tリンパ球応答の低下が起る。同様に、TAP遺伝子発現は、HPV-16⁺頸癌（cervical carcinomas）の49%でダウンレギュレーションされる（Seligerら, (1997) Immunol. Today 18:292）。したがって、アデノウイルスおよびHPVウイルス核酸は、本発明の方法を実施するための適当な対象の例である。本発明のこの実施形態に対する、さらなる適当な確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合対象の例として、MHCクラスI分子発現をダウンレギュレーションすることができるヒトサイトメガロウイルス（CMV）にコードされた遺伝子US2、US3およびUS11が挙げられる（Wiertzら, (1996) Nature 384: 432およびCell (1996) 84:769；Ahnら, (1996) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93:10990）。TAP依存性ペプチド転座のインヒビターをコードする他のヒトCMV遺伝子はUS6である（Lehnerら, (1997) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:6904-9）。US6でトランスフェクトした細胞は、その表面上でのMHCクラスI分子の発現が低下し、細胞傷害性Tリンパ球を活性化する能力が低下した。

動物モデルの生成にも使うことができる、MHCクラスI分子の発現を阻害する最も強力な配列を見出すための、この7kbクラスターの遺伝子の再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）

したがって、ある実施形態においては、本発明は、MHCクラスI分子の発現を阻害する上で最も強力な配列を同定するための、遺伝子のこのクラスター（約7kb）またはその断片の確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中

断合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を包含する。このような最適化されたTAPインヒビターポリヌクレオチド配列は、CTL免疫応答を逃れることができるベクターを構築するのみでなく、通常、実験動物ではその免疫原性のために消滅するヒトウイルスを用いて使う動物モデルの作製にも有用である。TAPインヒビターの所望の発現レベルおよび機能的特性は、遺伝的ワクチンベクター、遺伝子治療ベクターまたは動物モデルのどれを進化させるかによって変りうる。

MHCクラスI分子の発現および/または抗原提示のダウンレギュレーションに関わる他の遺伝子の再集合 (任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて)

本発明の別の実施形態は、MHCクラスI分子の発現および/または抗原提示のダウンレギュレーションに関わる他の遺伝子の確率論的 (例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を包含する。他の可能な標的遺伝子の例としては、アデノウイルスE3タンパク質、単純疱疹ICP47タンパク質、およびタパシン (tapasin) アンタゴニストをコードする遺伝子が挙げられる (Seligerら, (1997) Immunol. Today 18:292-299; Galonchaら, (1997) J Exp. Med. 185:1565-1572; Liら, (1997) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:8708-8713; Ortmannら, (1997) Science 277:1306-1309)。

NK細胞機能を阻害するがTリンパ球に抗原を提示する能力のないMHC様分子をコードする遺伝子

細胞表面上のMHCクラスI分子の発現低下はNK細胞に対する刺激として作用するので、遺伝的ワクチンベクター中にNK細胞機能を阻害するがTリンパ球に抗原を提示する能力のないMHC様分子をコードする遺伝子を含むことは有用であり得る。このような分子の例は、サイトメガロウイルスによりコードされるMHCクラスI同族体である (Farrellら, (1997) Nature 386: 510-514)。

CD4⁺Tリンパ球による攻撃を回避する能力の増大したウイルスベクターの取得

本発明はまた、CD4⁺Tリンパ球による攻撃を回避する能力の増大したウイルスベクターを取得する方法を提供する。このようなベクターは、ワクチン接種および免疫系の細胞を標的とする遺伝子治療の場合のような、標的細胞がMHCクラスI分子を発現する能力を有する場合に特に有用である。確率論的 (例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成) および非確率論的ポリヌクレオチド

再集合のための対象として、例えば、IL-10およびIFN γ のアンタゴニスト（可溶性IFN γ 受容体等）のようなMHCクラスII分子のインヒビターをコードする遺伝子が挙げられる。

【0125】

MHCクラスI発現、MHCクラスII発現の阻害をもたらす配列、およびMHCクラスI分子の同族体をコードする追加の配列の改善

宿主免疫系から逃れる最高能力を有するベクターは、典型的には、MHCクラスI発現およびMHCクラスII発現の阻害をもたらすDNA配列、ならびにMHCクラスI分子の同族体をコードする追加の配列を含む。これら全ての性質は、さらに、本発明の方法による確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合により改善することができる。

宿主免疫応答に所望の効果を表すポリヌクレオチドを同定するためにライブラリーをスクリーニングする方法

（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたDNA分子のライブラリーを取得すると、複数の方法のいずれかを利用して該ライブラリーをスクリーニングすることにより、ウイルスベクター中に（または動物モデルに）存在すると宿主免疫応答に所望の効果を表すポリヌクレオチドを同定することができる。例えば、MHCクラスI発現および/または抗原提示を阻害する、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたポリヌクレオチドを取得するために、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた遺伝子のライブラリーを遺伝的ワクチンまたは遺伝子治療ベクター中に組み込み、例えば、HeLa,U937またはJijoyeのようなヒト細胞系に、単試験管トランスフェクション（single tube transfection）でトランスフェクトすることができる。ヒト臍帯血細胞または単球をIL-4およびGM-CSFの存在下で培養することによって生成した1次ヒト単球または樹状細胞も好適である。最初のスクリーニングはFACSによるソーティングを使って行うことができる。

最低レベルのMHCクラスI分子を発現する細胞は、最低のCTL応答誘導能を有する

と予測される。

最低レベルのMHCクラスI分子を発現する細胞を選択し、MHCインヒビターをコードするポリヌクレオチド、または該配列を含有する全プラスミドを回収する。もし所望であれば、選択した配列を新しいラウンドの再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）および選択に付することができる。最低レベルのMHCクラスI分子を発現する細胞は、最低のCTL応答誘導能を有すると予測される。

スクリーニング法：HPVベクターに組みこまれたMHCクラスI発現のインヒビターをコードする（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたポリヌクレオチドのライブラリーを注入する

他のスクリーニング法は、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた、MHCクラスI発現のインヒビターをコードするポリヌクレオチドのライブラリーをヒトパピローマウイルス（HPV）ベクターに組込むことを包含する。このライブラリーをマウスの皮膚に注射する。

通常、HPVを発現するマウス細胞は宿主免疫系により破壊される。ペプチド輸送および/またはMHCクラス発現の強力なインヒビターを発現する細胞は、免疫応答を逃れることができるであろう

しかし、ペプチド輸送および/またはMHCクラス発現の強力なインヒビターを発現する細胞は、免疫応答を逃れることができるであろう。GFPのような、ベクター上に存在するマーカー遺伝子を長時間発現する細胞を選択し、該配列または全プラスミドを回収し、そして、さらに最適化が所望であれば、選択した配列を新しいラウンドの再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）および選択に付する。マウスにおけるHPVの長時間維持により、今までマウスにおいてHPVの高免疫原性によって不可能であった薬物スクリーニングおよびワクチン研究が可能になる。

進化したインヒビターは免疫原性ペプチドの効率的な提示を遮断し、それによって、抗原特異的CTLの活性化を強くダウンレギュレーションし、in vivoでの長期

存続トランスジーン発現を可能にするであろう

他の実施形態においては、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた、MHCクラスI発現のインヒビターをコードするポリヌクレオチドのライブラリーを、ヒトアデノウイルスベクターに組込む。このライブラリーを、HeLa細胞のようなヒト細胞系にトランスフェクトし、最低レベルのMHCクラスI分子を発現する細胞を前記のように選択する。最低レベルのMHCクラスI発現を与える該配列をさらに試験し、進化したMHCクラスI発現インヒビターを保持するアデノウイルスでトランスフェクトした抗原提示細胞の、特異的T細胞系またはクローンを活性化する能力を分析する。これらのインヒビターは、免疫原性ペプチドの効率的な提示を遮断し、それによって抗原特異的CTLの活性化を強くダウンレギュレーションし、*in vivo*の長期存続トランスジーン発現を可能にするであろう。

インヒビターのスクリーニング方法

改善されたMHCクラスII発現インヒビターをスクリーニングする方法は、蛍光標識した特異的モノクローナル抗体、蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリーによる標的細胞表面上のMHCクラスII分子の検出を含む。さらに、該インヒビターは、MHCクラスIIに拘束された抗原に特異的なCD4⁺Tリンパ球の活性化を遮断するインヒビター的能力を研究して、機能的アッセイで分析することができる。例えば、MHCクラスIIインヒビターをコードする遺伝子を保持するかまたはインヒビターを含有する上清で処理した、単球、樹状細胞、B細胞またはEBVで形質転換したB細胞系のような自己抗原提示細胞によって誘導されるCD4⁺T細胞増殖の誘導を阻害するインヒビター的能力を測定することができる。

【0126】

2.6.6.3. 抗ウイルス活性の増大

細胞内の抗ウイルス応答を生起する能力の増大した組換えウイルスベクターの取得

本発明はまた、細胞内の抗ウイルス応答を生起する能力の増大した組換えウイルスベクターを取得する方法を提供する。これらの方法は、次のステップを含むことができる：

- (1) ウイルスベクターを含んでなる核酸の少なくとも第1および第2の型を再集合させ（および/または1つ以上の本明細書に記載の定方向進化法にかけて）、ここで、第1および第2の型は、2個以上のヌクレオチドにおいて互いに相違し、組換えウイルスベクターのライブラリーを作製すること；
- (2) 組換えウイルスベクターのライブラリーを、哺乳動物細胞のある集団にトランスフェクトすること；
- (3) Mxタンパク質の存在に対して細胞を染色すること；および
- (4) Mxタンパク質に対して染色ポジティブである細胞から組換えウイルスベクターを単離すること（ここにポジティブ染色細胞からの組換えウイルスベクターは抗ウイルス応答を生起する能力の増大を表す）。

確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を使って組換えウイルスベクターのライブラリーを作製する。該ライブラリーを哺乳動物細胞のある集団にトランスフェクトし、その後、抗ウイルス応答を生起する能力を試験する。1つの適当な試験は、抗ウイルス応答を表す細胞により産生されるMxタンパク質の存在に対して細胞を染色することを包含する（例えばHallimenら, (1997) *Pediatric Research* 41: 647-650; Melenら, (1994) *J Biol. Chem.* 269: 2009-2015を参照すること）。

Mxタンパク質に対して染色ポジティブである細胞から、組換えウイルスベクターを単離することができる。ポジティブ染色細胞からのこの組換えウイルスベクターを、抗ウイルス応答を生起する能力の増大したものについて濃縮する。この方法が有用であるウイルスベクターとして、例えば、インフルエンザウイルスが挙げられる。

【0127】

2.6.6.4. 生産細胞中に増加したコピー数を有するベクターの進化

特に大量規模で製造するときに、全エレメントをベクター中にクローニングした後でプラスミドコピー数を増加する方法の望ましさ

本発明は、遺伝的ワクチンベクター（プラスミドのような）中に存在すると、ベクターを生産するために使う細胞内に高コピー数を複製する能力をもたらしベクター成分を取得する方法を提供する。プラスミドは、様々な異種DNA配列を組

込むことができるが、所与のプラスミドベクター中にクローニングされた配列のサイズと性質によって、ベクターを伝播する細菌内で該ベクターの高コピー数を増殖する能力が低下することがある。したがって、全エレメントをベクター中にクローニングした後にプラスミドコピー数を増加する方法を持つことが望ましい。これは、プラスミドを遺伝的ワクチンのように大規模で製造するときに、特に重要である。

プラスミド中に、そうしなければ細菌に有毒であるタンパク質と結合する1つ以上のポリヌクレオチド配列を組み込むこと

本発明の方法は、プラスミド中に、そうしなければ細菌に有毒であるタンパク質と結合する1つ以上のポリヌクレオチド配列を組み込むことを包含する。1つの適当な毒性部分と結合部位の組合わせは、転写因子GATA-1とその認識部位である。GATA-1のDNA結合断片の発現は、細菌にとって有毒であり；この毒性は明らかに細菌DNA複製の阻害からもたらされることが示された。Trudelら（(1996) *Bio techniques* 20: 684-693）は、GATA-1のZ2B2領域をGST融合タンパク質として発現するプラスミド（pGATA）を記載している。このプラスミドにおける該融合タンパク質の発現はIPTG誘導性lacプロモーターの制御下にある。GST-GATA-1断片はまた、マウス-グロビン遺伝子プロモーターからの配列、ならびに β -グロビン遺伝子3'エンハンサーからのCオリゴヌクレオチドと強く結合し；これらのいずれかまたは両方は、本発明の方法における結合部位として使うのに適当である。

（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたライブラリー中に顕著な多様性を達成するため、シャフリング反応に単一の型の選択マーカーのみを含め、増殖特性が改善されしかもプラスミドの適当な選択機能を全て保持するプラスミドを回収する

プラスミドは好ましくは、例えば、カナマイシン耐性（アミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(EC2.7.1.95)）などのような選択マーカーも含む。プラスミド主鎖ポリヌクレオチド配列が本明細書に記載の確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付されると、様々な主鎖配列および恐らくは様々なスーパーコイル密度を有するプラスミドのライブラリーを生成する。改善された機能を探すのに十分

な配列多様性を導入するために、ファミリー確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を実施するのが好ましい。これは、本発明に関連して、再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）反応において単一型の選択マーカーのみを含むことにより達成することができる。この方法で、増殖特性が改善されかつプラスミドの適当な選択機能を全て保持するプラスミドを回収する、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたライブラリー中に、顕著な多様性を達成することができる。

高コピー数プラスミドの選択

高コピー数プラスミドの選択は、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させた組換えプラスミドのライブラリーを望ましい宿主細胞に導入することによって実施される。該宿主細胞はまた、好ましくは誘導可能なプロモーターの制御下で、毒性部分を発現する。例えば、pGATAプラスミドは大腸菌（E.coli）宿主細胞中の使用に適當である。（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）実験的に進化させたプラスミドを非誘導条件のもとで該細胞に導入する。その後、形質転換した細胞を毒性部分の発現を誘導する条件のもとに置く。例えば、pGATAを含有する大腸菌（E.coli）細胞を、高濃度のIPTGを含有する培地に置くとよい。細菌内で高コピー数に増殖する標的プラスミドは、対応して、より高い数のGATA-1結合配列を発現するであろう。該標的プラスミドは、GST-GATA-1融合タンパク質と結合し、かくして細菌に対する毒性影響を中和するであろう。最高コピー数をもつプラスミドは、誘導物質を含有する増殖培地上の細菌に最高の増殖を与えるプラスミドとして検出される。このようなプラスミドを回収し、毒性部分をコードする遺伝子を欠く細菌に形質転換することができ；これらのプラスミドは高コピー数の特徴を維持するに違いない。さらなるラウンドの再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）を使って、上記の選択工程により高コピー数プラスミドを単離することができる。あるいは、この外来のプラスミドの存在によるなんらかの影響を避け

るために、毒性部分をコードするプラスミドを欠く、選択対象の細菌宿主についてマニュアルスクリーニングを行うことができる。

2.7. 抗原の輸送および提示の最適化

本発明はまた、抗原ペプチドの輸送および提示を改善することができる遺伝的ワクチンおよび付属分子を取得する方法を提供する。実験的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーを作製し、スクリーニングして、野生型対応体と比較して改善された特性を持つ分子をコードするポリヌクレオチドを同定する。ポリヌクレオチド自身を遺伝的ワクチンに使うことができるし、あるいはポリヌクレオチドの遺伝子産物を治療または予防の応用に利用することができる。

【0128】

2.7.1. プロテアソーム

主要組織適合性 (MHC) 複合体分子上に提示されるクラスIペプチドは、細胞プロテアソームにより生成される。インターフェロン- γ は抗原提示を刺激することができ、そして、インターフェロンの作用機序の一部は、相同的な β サブユニットY(δ)およびX(ϵ)と置き換わるプロテアソーム β サブユニットLMP2およびLMP7の誘導による可能性がある。このような置換は、プロテアソームのペプチド開裂特異性を変化させ、クラスIエペトープの免疫原性を増大することができる。Y(δ)およびX(ϵ)サブユニット、ならびに最近発見された他のMECL-1同族体MC14のようなプロテアソームサブユニットは、抗原提示に特定化されない細胞の特徴である。したがって、LMP2、LMP7、MECL-1および/または他のエペトープ提示特異的でかつ潜在的インターフェロン誘導性のサブユニットのDNAトランスファーによる細胞への取り込みは、エペトープ提示を増加することができる。恐らくは、インターフェロン誘導性サブユニットを含有するプロテアソームにより生成したペプチドは、TAP分子により小胞体に輸送されるのであろう。

本発明は、特異的にMHCクラスIエペトープをプロセッシングする能力の増大または低下を表すプロテアソームを取得する方法を提供する。該方法によれば、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を使って、プロテアソームと結合すると複数のタンパク質の免疫原性を増大するおよび/または該サブユニットの活性を増大する新し

い特異性のいずれかを有しうる進化したタンパク質が取得される。非特異的プロテアソームからクラスIエピトープ特異的プロテアソームへの遷移は、複数の状態（全てではないが複数のインターフェロン誘導性サブユニットがプロテアソームに関連する）を通過しうるので、多くの異なるタンパク質分解特異性を獲得しうる可能性がある。したがって、特異的LMP様サブユニットを進化させることにより、エピトープ提示機能の増大した新しいプロテアソーム組成物を作ることができる。

該方法は、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を、基質としてプロテアソーム成分をコードしかつ少なくとも1つのヌクレオチドにおいて相違している2つ以上のポリヌクレオチドの型を使って実施することを包含する。再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）は、本明細書に記載のとおり、例えば、LMP2、LMP7、MECL-1およびクラスIエピトープ提示に特異的に関わる他の個々のプロテアソーム成分を含む、1つ以上の各種プロテアソーム成分をコードするポリヌクレオチドを使って実施する。適当な基質の例は、例えば、Stoliwasserら（(1997) Eur. J Immunol. 27: 1182-1187）およびGaczynskaら（(1996) J Biol. Chem. 271: 17275-17280）が記載している。ある好ましい実施形態においては、様々な基質が様々な種由来のプロテアソーム成分をコードするポリヌクレオチドである、ポリヌクレオチド再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）が使われる。

再集合（および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法）反応が完了した後、得られた実験的に生成したポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングし、クラスIエピトープ産生に所望の効果を有するプロテアソーム成分をコードするポリヌクレオチドを同定する。例えば、実験的に生成したポリヌクレオチドを、対象のある特定の抗原もコードする遺伝的ワクチンベクター中に導入することができる。その後、ベクターのライブラリーを哺乳動物細胞中に導入し、その後、該ライブラリーをスクリーニングして増大した抗原特異的免疫原性を示す細胞を同定することができる。プロテアソーム活性を分析する方法は、例えば、Groettrupら（(1997) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:8970-8975

）およびGroettrupら（(1997) Eur. J. Immunol. 26: 863-869）が記載している。

あるいは、本発明の方法を使って、プロテアソームと強く結合するが活性は低いか全くなく、かくしてプロテアソーム活性と拮抗しクラスI分子を提示する細胞能力を低下させるタンパク質を進化させることができる。このような分子は、遺伝子治療の結果として細胞内に発現され、そのままではプロセシングされてクラスIを提示し該細胞が免疫系により認識されるような外因性タンパク質の免疫原性低下が所望である、遺伝子治療のプロトコルに応用することができる。このような高アフィニティ低活性LMP様サブユニットは、非自己タンパク質を発現する細胞を免疫応答から保護する必要のある、他の治療プロトコルにも有用である免疫抑制効果を示すであろう。

プロテアソームおよびTAP分子の特異性（以下に考察する）は、天然で同時進化していることがある。したがって、クラスIプロセシング系の2つの経路は機能的に整合していることが重要であろう。本発明のさらなる態様は、適当な整合したタンパク質分解および輸送特異性を発見するために、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を、2つの遺伝子ファミリーに対して同時に実施し、その後、2つを無作為に組み合わせることにより実施することを包含する。

【0129】

2.7.2. 抗原輸送

本発明は、抗原ペプチドの、サイトゾル区画から小胞体、それを経てMHCクラスI分子に関連した細胞表面までの輸送を改善する方法を提供する。抗原ペプチド発現の増大は、免疫応答の増大、特にCD8⁺細胞傷害性リンパ球の活性化の改善をもたらす。これは、DNAワクチンの開発におよび遺伝子治療に有用である。

ある実施形態においては、本発明は、改善された抗原提示を表す遺伝子を取得するためのTAP遺伝子（抗原プロセシング関連輸送体）を進化させることを包含する。TAP遺伝子は、膜転座体（membrane translocator）のATP結合カセットファミリーのメンバーである。これらのタンパク質は、MHCクラスI分子へ抗原ペプチドを輸送し、細胞表面におけるMHCクラスI分子の発現および安定性に関わる。

2つのTAP遺伝子、TAP1およびTAP2が現在クローニングされている (Powisら, (1996) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89: 1463-1467; Koopmanら, (1997) Curr. Opin. Immunol. 9: 80-88; Monaco (1995) J Leukocyte Biol. 57: 543-57) 。 TAP1およびTAP2はヘテロ2量体を形成し、これらの遺伝子は、該ペプチドがMHCクラスI分子と結合する場所である小胞体へペプチドを輸送するために必要である。抗原ペプチドの提示におけるTAP遺伝子産物の本質的な役割は、破壊されたTAP遺伝子をもつマウスにおいて実証された。TAP-1遺伝子欠損マウスはMHCクラスIの表面発現のレベルが著しく低下し、胸腺におけるCD8⁺Tリンパ球のポジティブ選択が非常に低下する。したがって、TAP欠損マウスの末梢におけるCD8⁺Tリンパ球の数は極端に低い。これらの細胞にTAP遺伝子を戻しトランスフェクションすると、MHCクラスI発現のレベルは回復する。

TAP遺伝子は、天然の多形性があるので、また、ヒト (Beckら, (1992) J Mol. Biol, 228: 433-441; Genbank受託番号Y13582; Powisら, 前掲) ; ギリラTAP1 (Laudら, (1996) Human Immunol. 50:91-102) ; マウス (Reiserら, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2255-2259; Marusinaら, (1997) J Immunol, 158:5251-5256、TAP1:Genbank受託番号U60018、U60019、U60020、U60021、U60022、およびL76468-L76470; TAP2: Genbank受託番号U60087、U60088、U60089、U60090、U60091およびU60092) ; ハムスター (TAP1、Genbank受託番号AF001154およびAF001157; TAP2、Genbank受託番号AF001156およびAF001155) を含む複数哺乳動物種のこれらの遺伝子はクローニングされ配列決定されているので、ポリヌクレオチド (例えば、遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロンなど) 再集合 (任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて) のための良い標的である。さらに、TAP遺伝子の点突然変異は、ペプチド特異性およびペプチド提示の改変をもたらしていることが示されている。また、様々な種から誘導されるTAP遺伝子の機能の差が観察されている。例えば、rTA.P2a対立遺伝子を含有するヒトTAPとラットTAPはかなり雑多であるが、マウスTAPはC末端の小極性/疎水性または正荷電アミノ酸をもつペプチドに対して拘束的かつ閉鎖的である。この選択性の基本原理は未だ知られていない。

本発明の方法は、TAP1およびTAP2遺伝子の確率論的 (例えば、ポリヌクレオチ

ドシャフリングおよび中断合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を、基質として少なくとも1つのヌクレオチド位置において相違している少なくとも2つの型のTAP1および/またはTAP2ポリヌクレオチド配列を使って実施することを包含する。好ましい実施形態においては、複数の哺乳動物種から誘導されたTAP配列を、再集合(任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて)の基質として使う。

遺伝子の天然の多形は、追加の基質多様性を提供することができる。もし所望であれば、1ラウンドの再集合(任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて) およびスクリーニングから得た最適化されたTAP遺伝子を、追加の再集合(任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて) /スクリーニングのラウンドにかけて、さらに最適化されたTAPをコードするポリヌクレオチドを取得することができる。

組換えTAP遺伝子のライブラリーから最適化されたTAPをコードするポリヌクレオチドを同定するために、該遺伝子を対象の標的抗原と同じプラスミド上に発現させることができる。もしこのステップが抗原提示の程度を制限しているのであれば、CD8⁺CTLへの提示が増加されるであろう。TAPの突然変異体は、そうしなければ発現レベルが制限される、特定の抗原ペプチド断片の発現増加に選択的に作用するか、または、通常、決してRERに伝達されないペプチドの輸送を引き起し、MHCクラスIとの結合に利用できるようにするであろう。

癌治療の遺伝子治療ベクターに関連して使うとき、進化したTAP遺伝子は、MHCクラスI分子の腫瘍細胞上の発現を増加して抗原性腫瘍特異的ペプチドの効率的な提示を得る手段を提供する。したがって、進化したTAP遺伝子を含有するベクターは、悪性細胞に対する強力な免疫応答を生起する。(例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により) 実験的に進化させたTAP遺伝子は、レトロウイルスベクターまたはエレクトロポレーションを使って、低レベルのMHCクラスI分子を発現する悪性細胞系にトランスフェクトすることができる。

トランスフェクション効率は、TAP遺伝子と同じベクターによりコードされた緑色蛍光タンパク質のようなマーカー遺伝子を使ってモニターすることができる

。効率的なTAP遺伝子のマーカーとして、等レベルの緑色蛍光タンパク質であるが最高レベルのMHCクラスI分子を発現する細胞を、その後、フローサイトメトリーを使ってソーティングし、さらにその進化したTAP遺伝子を、例えばPCRによりまたは全ベクターを回収することによって回収する。

もしさらなる最適化が所望であれば、その後、これらの配列を新しいラウンドの再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）、選択および回収に付することができる。TAP遺伝子の分子的進化を所望の抗原の同時進化と組合せることができる。所望の抗原の同時進化は、DNAワクチン接種後の抗原ペプチドの提示効率をさらに改善することができる。該抗原を、ポリヌクレオチド再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）を使い、最適TAP遺伝子が発現されると所望の抗原ペプチドの最適提示がなされる構造を有するように、進化させることができる。ある所与の抗原の抗原ペプチド提示に最適であるTAP遺伝子は、他の抗原の抗原ペプチド提示に最適であるTAP遺伝子と異なりうる。ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子、プロモーター、エンハンサー、イントロンなど）再集合（任意に本明細書に記載の他の定方向進化法と組合せて）技術は、このタイプの問題を解決するための理想的でありかつ恐らく唯一の方法である。例えばサイトカイン産生またはTリンパ球のCTL活性を当業者に公知の方法を使用して測定することにより、特異的な細胞傷害性Tリンパ球を使って、所望の抗原ペプチドの効率的な提示を分析することができる。

【0130】

2.7.3. 細胞傷害性T細胞誘導配列および免疫原性アゴニスト配列

ある特定のタンパク質は、クラスIエピトープ提示に必要なプロセッシングに関わる細胞機構がより容易に使うことができるので、他のタンパク質よりMHCクラスIエピトープをより良く運ぶことができる。本発明は、クラスIエピトープ提示に導く様々な生合成および分解ステップを横断するのに特に効率的である発現ポリペプチドを同定する方法、および他のタンパク質からのCTLエピトープ提示を増大するためのこれらのポリペプチドの使用を提供する。

ある実施形態においては、本発明は、異種エピトープが誘導された病原体に対してワクチン接種する目的で、異種クラスIエピトープを運ぶために使うことが

できる細胞傷害性T細胞誘導配列（CTIS）を提供する。CTISの1例は、B型肝炎表面抗原（HBsAg）から得られ、該抗原は、ある特定条件下でタンパク質として送達されるとそれ自身のCTLエピトープに対する有効な担体であることが示されている。HBsAgを発現するプラスミドを用いるDNA免疫感作はまた、高レベルのCTL活性を誘導する。本発明は、CTL活性を誘導するのに非常に効率よく機能し、かつHBsAgタンパク質を用いるかまたは全長HBsAgポリペプチドをコードするプラスミドを用いるより高いCTL誘導レベルを達成する、HBsAgポリペプチドのより短い末端切断断片を提供する。HBsAgから誘導されるCTISの合成を実施例3に記載し；CTISのダイアグラムを本明細書に示し、記載しおよび/または参照した（参照により組み入れられたものを含む）。

該末端切断ポリペプチドのER局在化は、CTLエピトープを含有するペプチドの適当なタンパク質分解放出を達成するのに重要である（Cresswell & Craiuら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94: 10850-10855、を参照）。preS2領域および、膜貫通領域は、強い細胞傷害性免疫応答の生起に重要であるTヘルパーエピトープを提供する。末端切断CTISポリペプチドは簡単な構造を有するので、何らかの特定のタンパク質コンフォメーションを維持する必要なしに1つ以上の異種クラスIエピトープ配列をポリペプチドのC末端に結合することが可能である。このような配列は、その後、クラスIエピトープのプロセッシング機構に利用可能である。ポリペプチドのサイズは、本来のHBsAg構造の通常の拘束にかからない。したがって、異種配列の長さおよび含まれるCTLエピトープの数はフレキシブルである。本明細書にはこれを模式図で示している。多重で個別のクラスI配列、または代りに単一CTL配列の様々な変型のいずれかを含有する長い配列を含む能力により、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合手法を応用することが可能になる。

本発明はまた、天然エピトープ配列を発現する細胞の特異的な溶解能力をもつCTLを誘導する免疫原性アゴニスト配列（IAS）を取得する方法を提供する。複数の事例で、その反応性は、該CTL応答が天然エピトープによって誘導されるより大きい。このようなIASに誘導されるCTLを、天然配列により誘導されるのとは異

なるT細胞レパートリーから引き出すことができる。この方法で、所与のエピトープに対する乏しい応答性は、より大きなプールからのT細胞の採用により克服することができる。このようなIASを発見するために、CTLを誘導するペプチドの各位置のアミノ酸を（いわゆるアンカー残基の位置は多分除いて）、該位置に通常は存在しない19個のアミノ酸の範囲で変化させることができる。確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャフリングおよび中断合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合手法を使って、大きな範囲の配列可能性を走査することができる。

各コピーが少数のヌクレオチド変化をもつように、元のエピトープ配列の多重コピーを含有する合成遺伝子セグメントを調製することができる。遺伝子セグメントを実験的に進化させて（例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発により）多様な範囲のCTLエピトープ配列を作ることが可能であり、それらのいくつかはIASとして機能するに違いない。このプロセスを本明細書で説明する。

実施にあたっては、オリゴヌクレオチドを、典型的には上記の設計によって構築し、酵素的に重合して連鎖状（concatenated）エピトープの合成遺伝子セグメントを形成する。制限酵素切断部位をオリゴヌクレオチドの画分中に組み込み、そのほとんどが異なる配列を有しかつ潜在的IASである連鎖状エピトープの与えられたサイズ範囲の開裂と選択を可能にすることができる。エピトープを含有する遺伝子セグメントは、適当なクローニング法によりHBsAgのようなCTISに接合することができる。得られたプラスミド構築物をDNAに基くC免疫感作およびCTL誘導に使うことができる。

【0131】

2.8. 遺伝的ワクチン医薬組成物および投与の方法

遺伝的ワクチンを感染性疾患、自己免疫疾患、他の炎症性症状、アレルギー、喘息、および癌の予防および治療、および転移防止に使う

本発明のベクター成分および多成分遺伝的ワクチンは、様々な疾患および他の症状を治療および/または予防するのに有用である。例えば、本発明の方法により得られる試薬を用いる遺伝的ワクチンは、任意の細菌、真菌、ウイルス、また

は他の哺乳動物病原体より引き起される疾患を含む感染性疾患の予防および治療の両方に有用である。本発明を使って得られる試薬はまた、例えば、慢性関節リウマチ、SLE、糖尿病、重症筋無力症、活性関節炎、強直性脊椎炎、および多発性硬化症を含む自己免疫疾患の治療に使うことができる。IBD、乾癬、膵炎、および様々な免疫不全症を含むこれらのおよび他の炎症性症状は、本発明の方法を使って得られるベクターおよび他の成分を含む遺伝的ワクチンを使って治療することができる。本発明の方法を使って得られる遺伝的ワクチンベクターおよび他の試薬を使ってアレルギーおよび喘息を治療することができる。さらに、遺伝的ワクチンの使用は癌の治療および転移防止に非常に有望である。癌細胞に対する免疫応答を生起することにより、身体の免疫系は癌を減少または消滅するための助けとなることができる。

組換え多価抗原の使用

本発明の多価抗原は、それぞれの抗原が関連する様々な疾患および症状を治療および/または予防するのに有用である。例えば、多価抗原は適当な宿主細胞内に発現させることができるし、また、ポリペプチド形態で投与される。ワクチン送達のための適当な製剤および投与体制は、当業者に周知である。本発明の改善された免疫調節ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、それぞれの抗原が関連する様々な疾患および症状を治療および/または予防するのに有用である。

特定の症状に対する抗原は、本明細書に記載の方法と類似の再集合（および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法）および選択方法を使って最適化することができる。

本発明の好ましい実施形態においては、本発明を使って得られる試薬（例えば、改善されたアレルゲンをコードする最適化された実験的に生成したポリヌクレオチド）は、遺伝的ワクチンと共に使われる。ベクターおよび成分の選択はまた、アレルギーまたは他の症状を治療する特定の目的に対して最適化することができる。本発明の好ましい実施形態においては、最適化された遺伝的ワクチン成分は、他の最適化された遺伝的ワクチン試薬と共に使われる。例えば、特定の症状に有用な抗原は、本明細書に記載の再集合（および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法）およびスクリーニング方法と類似の方法により最適

化することができる。

組換え抗原ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーター、例えば、高活性または組織特異的プロモーターの制御下に置くことができる。抗原ポリペプチドを発現するために使われるプロモーターは、国際特許出願PCT/US97/17300号（国際特許公開WO 98/13487号）に記載されたような、本明細書に記載の方法と類似した再集合（および／または本明細書に記載の1以上の更なる定方向進化法）および選択方法を使って、それ自身最適化することができる。

該ベクターは、本明細書に記載のような免疫刺激性配列を含有することができる。T_H1応答を指令する遺伝子操作されたベクターは、本明細書に記載の抗原が介在する免疫応答の多くにとって好ましい。本発明の方法を使って得られる試薬はまた、所望の効果を達するために最も適当なように免疫応答を調節する能力のある多成分遺伝的ワクチンと共に使うことができる。あるときには、特定の標的細胞型（例えば、抗原提示細胞または抗原プロセッシング細胞）を標的とする遺伝的ワクチンを利用することが有利であり；適当なターゲッティング方法は本明細書に記載されている。

【0132】

in vivoおよびex vivoでの哺乳動物への遺伝的ワクチンの送達および送達ビヒクル

遺伝的ワクチン（例えば、本明細書に記載の多成分抗原をコードする遺伝的ワクチンのような、本明細書に記載のとおり得られた最適化され実験的に生成したポリヌクレオチドを含む遺伝的ワクチンで、本明細書に記載の多成分遺伝的ワクチンを含む）を（ヒトを含む）哺乳動物に送達して治療または予防免疫応答を生起することができる。ワクチン送達ビヒクルは、典型的には全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋内、皮下、脳内、肛門、膣、経口、バツカル経路または吸入させることができる）により個々の患者に投与することによってin vivoで送達することができるし、または局所適用により投与することができる。

あるいは、ベクターを、個々の患者から外植した細胞（例えば、リンパ球、骨髓穿刺液（bone marrow aspirate）、組織生検）または一般ドナー造血幹細胞のような細胞にex vivoで送達し、その後、通常、該ベクターを組み込んだ細胞を

選択した後に、患者に該細胞の再移植を行うことができる。

送達方法および参考文献

多数の送達方法が当業者に周知である。そのような方法は、例えばリポソーム系 (liposome-based) 遺伝子送達 (DebsおよびZhu (1993) 国際公開公報第W093/24640号; ManninoおよびGould-Fogerite (1988) バイオ技術 (Bio Techniques) 6(7): 682-691; Roseの米国特許第5,279,833号; Brigham (1991) 国際公開公報第W091/06309号; およびFelgnerら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414)、並びにウイルスベクター (例えば、アデノウイルス (例えば、Bernsら (1995) Ann. NY Acad Sci. 772: 95-104; Aliら (1994) Gene Ther. 1: 367-384; および概説としては (for review) Haddadら (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3): 297-306を参照されたい))、乳頭腫ウイルス、レトロウイルス (例えば、Buchscherら (1992) J Virol. 66(5): 2731-2739; Johannら (1992) J Virol. 66(5): 1635-1640 (1992); Sommerfeltら, (1990) Virol. 176:58-59; Wilsonら (1989) J Virol. 63:2374-2378; Millerら, J Virol. 65: 2220-2224 (1991); Wong-Staalら, 国際出願第PCT/US94/05700号、およびRosenburgおよびFauci (1993) 基礎免疫学 (Fundamental Immunology)、第3版 Paul (編集) Raben Press, Ltd.発行, New York中およびその中の参考文献、並びに上記Yuら, 遺伝子治療 (Gene Therapy) (1994)を参照されたい) およびアデノ関連ウイルスベクター (Westら (1987) Virology 160:38-47; Carterら (1989)の米国特許第4,797,368号; Carterらの国際公開公報第W093/24641号 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Muzyczka (1994) J Clin. Invest. 94:1351およびAAVベクターに関する総説としては、Samulski (上記) を参照されたい; また、Lebkowskiの 米国特許第5,173,414号; Tratschinら (1985) Mol. Cell Biol. 5(11):3251-3260; Tratschinら (1984) Mol. Cell Biol., 4:2072-2081; HermonatおよびMuzyczka (1984) Proc. Natl. Acad Sci. USA, 81:6466-6470; McLaughlinら (1988) およびSamulskiら (1989) J Virol., 63:03822-3828を参照されたい) の使用などが挙げられる。

遺伝的ワクチンを含む「むき出しの」DNAおよび／またはRNAの、組織への直接導入またはin vivoおよびex vivoの両方での「微粒子銃 (biolistic)」または粒

子媒介形質転換を用いた導入

遺伝的ワクチンを含む「むき出しの」DNAおよび／またはRNAは、筋肉などの、組織に直接に導入できる。例えば、米国特許第5,580,859号を参照されたい。「微粒子銃」または粒子媒介形質転換（例えば、Sanfordらの 米国特許第4,945,050号；米国特許第5,036,006号を参照されたい）などの他の方法も、本発明による哺乳動物の細胞中への遺伝的ワクチンの導入に好適である。これらの方法は、哺乳動物へのDNAのin vivoでの導入だけでなく、哺乳動物に再導入するための細胞のex vivoでの改質にも有用である。遺伝的ワクチンを送達する他の方法に関しては、必要ならば、免疫調節の所望のレベルを維持するためにワクチン投与を繰り返す。

【0133】

in vivoでの細胞の形質導入のための哺乳動物中のパッケージされた核酸の投与方法

遺伝的ワクチンベクター（例えば、アデノウイルス、リポソーム、乳頭腫ウイルス、レトロウイルス等）は、in vivoでの細胞の形質導入のために哺乳動物に直接投与できる。本発明の方法を用いて取得された遺伝的ワクチンは、非経口（例えば、皮下、筋肉内、皮内、または静脈内）、局所的、経口、くも膜下腔内、口内（例えば、舌下）、または予防および／または治療処置のために、エアロゾルまたは経皮的になどの、局所投与を含む、任意の好適な様式で投与するための医薬組成物として製剤できる。例えば、脱毛剤の使用による皮膚の前処置は、経皮的送達において有用であろう。そのようなパッケージされた核酸を投与する好適な方法が利用可能であり、当業者に周知であり、そして、1以上の経路が特定組成物を投与するために使用できるけれども、特定経路は、別の経路よりも、しばしばより即効性でより効果的な反応を提供し得る。

医薬的に許容可能な担体は、投与される特定組成物によって、並びにその組成物を投与するのに使用される特定の方法によってある程度決定される。従って、本発明の医薬組成物には広く多様な好適製剤がある。多様な水性担体を使用でき、例えば、緩衝生理食塩水などである。これらの溶液は滅菌されており、一般に望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来周知の滅菌技術によって

滅菌され得る。組成物は、pH調整試薬および緩衝試薬、毒性調整試薬などの生理的状态に近づけるために必要な医薬的に許容可能な補助物質（例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど）を含むことができる。これらの製剤中の遺伝的ワクチンベクターの濃度は、広範囲に変動させることができ、選択された特定の投与様式および患者のニーズに従って、液量、粘度、体重などに基づいて主として選択されるであろう。

経口投与に好適な製剤は、(a)水、生理食塩水またはPEG 400などの、希釈剤中に懸濁された有効量のパッケージされた核酸などの、液体溶液；(b)液体、固体、顆粒またはゼラチンとして、それぞれ所定量の有効成分を含む、カプセル、小袋（sachets）または錠剤；(c)適当な液体中の懸濁液；および(d)好適なエマルジョンからなることができる。錠剤形態のものは、乳糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシ澱粉、ジャガイモ澱粉、トラガカント、微結晶性セルロース、アラビアゴム、ゼラチン、コロイド状二酸化珪素、クロスカネロースナトリウム（croscannellose sodium）、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色料、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝試薬、湿潤剤、防腐剤、調味剤（flavoring agents）、染料、崩壊剤（disintegrating agents）、並びに医薬的に適合性の担体の1種以上を含むことができる。

トローチ剤（lozenge）形態のものは、香料、通常はショ糖およびアラビアゴムまたはトラガカント中に有効成分を含むことができ、同様に、芳香製剤（pastilles）は不活性基剤（ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖など）中に有効成分を含み、およびアラビアゴムエマルジョン、ゲルなどは、有効成分に加えて当業界で公知の担体を含む。遺伝的ワクチンは、経口的に投与された場合、消化から保護されていなければならないことは認知されている。これは、ワクチンベクターを酸および酵素的加水分解に抵抗させる組成物と複合化することによって、またはベクターをリポソームなどの適切な抵抗性を有する担体中にパッケージすることによってのいずれかによって一般に達成される。消化からベクターを保護する手段は当業界で周知である。医薬組成物は、例えば、リポソーム中、または有効成分に徐放性を与える製剤中でカプセルに包まれることができる。

パッケージされた核酸は、単独または他の好適な構成要素との組み合わせで、吸入によって投与されるエアロゾル製剤（例えば、それらは「噴霧」され得る）にすることができる。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの、加圧された許容可能な噴霧剤中に入れることができる。直腸投与に好適な製剤は、例えば、座薬基剤で包まれた核酸からなる座薬を含む。好適な座薬基剤としては、天然若しくは合成のトリグリセリドまたはパラフィン炭化水素が挙げられる。さらに、例えば、液状トリグリセリド、ポリエチレングリコール、およびパラフィン系炭化水素を含む、基剤で包まれた核酸の組み合わせからなるゼラチン直腸カプセルを使用することも可能である。

例えば、（関節中の）関節内、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下経路によるなどの、非経口投与に好適な製剤は、抗酸化剤、バッファー、静菌剤を含むことができ、その製剤が意図された受容者の血液と等張になるように溶解するための水性および非水性の等張滅菌注射溶液、および懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤および防腐剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁液を含む。本発明の実施において、組成物は、静脈内注入、経口的、局所的、腹腔内、膀胱内またはくも膜下腔内によって投与され得る。

非経口投与および静脈内投与は、好ましい投与方法である

パッケージされた核酸の製剤は、アンプルおよびバイアルなどの、単回用量または複数回用量を密封した容器で提供できる。注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、および前記の種類の錠剤から製造できる。パッケージされた核酸によって形質導入された細胞を、静脈内または非経口的に投与することもできる。

【0134】

用量サイズ

患者に投与される用量は、本発明の関係から、一定時間に渡って患者の有益な治療応答をもたらすのに充分なはずである。用量は、利用した特定ベクターの効率および患者の症状、並びに治療される患者の体重または血管表面積によって決定されるであろう。用量サイズは、特定ベクターの投与に伴う不利な副作用の存在、性質、および程度、または特定患者に形質導入された細胞のタイプによっても決定されるであろう。

感染若しくは他の症状の治療または予防において投与されるベクターの有効量の決定においては、医師は、ベクターの毒性、疾病の進行度合い、および、もしあれば、抗ベクター抗体の産生を評価する。一般に、ベクター由来のむき出しの核酸に相当する用量は、標準的な70 kgの患者に対して約1 μ g～1 mgであり、核酸を送達するのに使用されるベクターの用量は、治療的な核酸の等価量を与えるように計算される。投与は、単回または分割された用量で達成できる。

治療適用においては、組成物は疾病（例えば、感染症または自己免疫疾患）に罹っている患者に、疾病およびその合併症を治療または少なくとも部分的に制止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適当な量は、「治療的に有効な用量」として定義される。この使用に有効な量は、疾病の重症度および患者の健康の一般的状態に依存するであろう。患者に必要であり耐えられる服用量および頻度に依存して、組成物を単回または複数回投与することができる。いずれにしても、組成物は、患者を有効に治療するのに十分な量の本発明のタンパク質を提供するはずである。

予防的適用においては、組成物は、感染症または他の症状の確立に対する保護を促進することができる免疫応答を誘導するためにヒトまたは他の哺乳動物に投与される。

毒性及び治療効率を決定する能力

本発明によって提供される遺伝的ワクチンベクターの毒性および治療効率は、細胞培養または実験動物での標準医薬手順を用いて決定される。本明細書中に記載された手順および当業者に公知の他のものを用いてLD₅₀（集団の50%が致死する用量）およびED₅₀（集団の50%で治療的に有効な用量）を決定できる。

服用量に関する詳細

静脈内投与のための典型的な医薬組成物は、約0.1～10 mg／患者／1日である。特に薬物を血液が入らない隔離された部位に投与する場合（体腔中に、または臓器の管腔中に）は、0.1～約100 mg／患者／1日の服用量が使用できる。実質的に高い服用量は、局所的投与で可能である。非経口的に投与可能な組成物を製造する実際的な方法は、当業者に公知であるか、または明らかであろうし、レミントンの医薬科学（Remington's Pharmaceutical Science），第15版，Mack P

ublishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)などの出版物に、より詳細に記載されている。

【0135】

包装／調剤 (dispenser) 装置

本発明の方法を使用して取得される遺伝的ワクチン（例えば、本発明の多価抗原性ポリペプチド、およびそのポリペプチドを発現する遺伝的ワクチン）は、包装 (packs)、調剤装置、および哺乳動物に遺伝的ワクチンを投与するためのキット中にパッケージすることができる。例えば、1以上の単位服用量形態を含む包装または調剤装置が提供される。一般的には、化合物の投与のための指示書 (instructions) が、その化合物が、示された症状の治療に好適であることをラベル上の適切な表示に沿った包装と共に提供されるであろう。例えば、そのラベルには包装中の活性化合物が特定の感染症、自己免疫疾患、腫瘍の治療に、または哺乳動物の免疫応答によって媒介されるか、若しくはそれに潜在的に感受性がある他の疾病若しくは症状を予防または治療するために有用であることを記載することができる。

2.9. 遺伝的ワクチンの使用

本発明による、最適化されたベクターモジュールおよび他の試薬を含む遺伝的ワクチンは、多くの疾病および哺乳動物免疫系によって媒介されるか、または適当な免疫応答による治療に感受性のいずれかである他の症状に有用である。これらの疾病およびそれぞれに適した抗原の代表例を、下記に列挙するか、本明細書中に記載するか、または参考文献によって組み入れる。

最適化された組換え抗原の進化 (evolution) のための基質 (substrates)

本発明は、病原性試薬に対する免疫応答を誘導する改善された能力を示す抗原をコードする、実験的に生成されたポリヌクレオチドを取得する方法を提供する。この方法は、潜在的な細菌戦争試薬および他の生物並びにヒトおよび他の動物で疾病および毒性を引き起こすことができるポリペプチドを含む、広範囲の病原性試薬に適用できる。以下の例は、単なる例証であり、これらに限定されない。

2.9.1. 感染症

本発明の方法に従って取得された遺伝的ワクチンベクターは、任意の細菌、真

菌、ウイルス、または哺乳動物の他の病原体によって引き起こされるものを含む、感染症の予防および治療の両方において有用である。幾つかの実施態様では、保護は、関心のある病原体の抗原（液性抗原若しくはT細胞抗原のいずれかまたは両者）を発現するであろう遺伝的ワクチンベクターの使用によって与えられる。好ましい実施態様では、抗原は本明細書中に記載されるような最適化された抗原を取得するために本発明の方法を用いて進化される。ベクターは、その抗原に対する免疫応答を誘導する。1種若しくは数種の抗原または抗原断片を、1つの遺伝的ワクチン送達媒体中に含せることができる。病原体およびそれから抗原を取得することができる対応するポリペプチドの例としては、これらに限定されないが、HIV (gp120、gp160)、B、C、D、E型肝炎（表面抗原）、狂犬病（糖タンパク質）、マンソニア属住血吸虫（*Schistosoma mansoni*）（カルパイン；Jankovic (1996) J Immunol. 157:806-14）を含む。遺伝的ワクチンベクターを用いて治療し得る他の病原体感染は、例えば、帯状疱疹、単純ヘルペス-1および2、結核（慢性、薬物耐性を含む）、ライム病（ボレリア・ブルゴルフェリイ（*Borrelia burgorgerii*））、梅毒、パルボウイルス、狂犬病、ヒト乳頭腫ウイルスなどが挙げられる。

【0136】

2.9.1.1. 細菌性病原体および毒素

幾つかの実施態様では、本発明の方法は、細菌性病原体、並びに細菌および他の生物によって産生された毒素に適用される。その病原体に対する免疫応答を誘導できる実験的に生成されたポリペプチド、並びに天然の毒素ポリペプチドよりも毒性の低い組換え毒素を取得するために、この方法を使用することができる。しばしば、関心のあるポリヌクレオチドは、病原性生物の表面に存在するポリペプチドをコードしている。病原体のうち、保護的免疫原性の実験的に生成されたポリペプチドを産生するのに本発明の方法にとって有用なのは、エルシニア種（*Yersinia species*）である。

ペストの原因物質であるペスト菌（*Yersinia pestis*）は、10種未満の細菌を有するマウスでのLD₅₀値によって知られる最も有毒な細菌の一種である。疾病の肺炎形態は、噴霧（aerosol）または感染性飛沫によってヒトの間に容易に蔓延

し、数日間で死を招くことができる。エルシニアの感染に対して保護できる実験的に生成されたポリペプチドを取得するために特に好ましい標的は、V抗原であり、それは37 kDaの毒性因子であり、保護的な免疫応答を誘導し、目下サブユニットワクチンとして評価されている (Brubaker (1991) エルシナエ (Yersinae) の微生物学の最新研究 (Current Investigations of the Microbiology of Yersinae, 12:127))。V抗原単独では毒性ではないが、V抗原を欠くペスト菌 (Y pestis) 単離物は、非病原性 (avirulent) である。幾つかのグループが、大腸菌でのエルシニアV抗原の製造に成功している (Learyら (1995) Infect. Immun. 3:2854))。V抗原を認識する抗体は、同種の株に対する受動的な保護を提供できるが、異種の株に対しては保護を提供できない。同様に、精製されたV抗原による免疫は、同種株に対してのみ保護する。交叉保護的 (cross-protective) 組換えV抗原を取得するために、好ましい実施態様では、種々のエルシニア種由来のV抗原遺伝子をポリヌクレオチド再集合 (reassembly) (任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法との組み合わせで) に付す。ペスト菌 (ワイ・ペスティス)、ワイ・エンテロコリチカ (Y. enterocolitica)、および仮性結核菌 (ワイ・シュードツベルクローシス) (Y. pseudotuberculosis) 由来のV抗原をコードする遺伝子は、例えば、DNAレベルで92-99%同一であり、本発明の方法によるファミリー再集合 (任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法との組み合わせで) を用いて最適化するのを理想的にする。再集合後 (任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法との組み合わせで)、組換え核酸のライブラリーをスクリーニングし、および／または改善された免疫応答を誘導でき、および／またはより大きな交叉保護性 (cross-protectivity) を有することができる組換えV抗原ポリペプチドをコードするものを選択する。

炭疽の原因物質である炭疽菌 (Bacillus anthracis) は、それに対して本発明の方法が有用である細菌標的のもう1つの例である。炭疽保護抗原 (PA) は、試験動物において保護的な免疫応答を与え、PAに対する抗体も幾らかの保護を与える。しかしながら、PAの免疫原性は、比較的乏しく、野生型PAを用いる場合には一般に複数回の注射が必要である。致死因子 (LF) との同時ワクチン接種 (co-vaccination) は、野生型PAワクチンの効力を改善するが、毒性が制限要因となる。

従って、本発明の確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続（interrupted）合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合並びに抗原ライブラリー免疫法は、非毒性LFを取得するために使用できる。種々の炭疽菌（*B. anthracis*）株由来のLFをコードするポリヌクレオチドは、ファミリー再集合（任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法と組み合わせて）に付される。次いで、得られた組換えLF核酸のライブラリーは、低下した毒性を示す組換えLFポリペプチドをコードするものを同定するためにスクリーニングすることができる。例えば、PAの存在下に組織培養細胞に、組換えLFポリペプチドを接種し、細胞が生き残るそれらのクローンを選択することができる。所望ならば、次いで、非毒性LFポリペプチドを戻し交配して、LFの免疫原性エピトープを維持することができる。最初のスクリーニングによって選択されたものは、次いで、第2のスクリーニングに付すことができる。例えば、マウスのような試験動物での免疫応答（例えば、CTLまたは抗体応答）を誘導する組換え非毒性LFポリペプチドの能力を試験できる。好ましい実施態様では、次いで、組換え非毒性LFポリペプチドの、炭疽菌の異なる株による攻撃（challenge）に対する試験動物での保護免疫を誘導する能力が試験される。

炭疽菌の保護抗原は、本発明の方法の好適な標的でもある。炭疽菌の種々の株由来のPAをコードする核酸は、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付される。次いで、ポリクローナル抗体を用いた、例えば、大腸菌中での適切な折り畳み（folding）をスクリーニングできる。試験動物での広域スペクトル抗体を誘導する能力のスクリーニングはまた、単独または予備的なスクリーニング方法に加えてのいずれかで一般的に使用される。目下のところ好ましい実施態様では、所望の特性を示す実験的に生成されたポリヌクレオチドは、免疫原性エピトープを維持するように戻し交配することができる。最後に、選択された組み換え体の、試験動物における炭疽菌の異なる株に対する保護免疫を誘導する能力を試験する。

【0137】

黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）および連鎖球菌毒素（*Streptococcus* toxins）は、本発明の方法を用いて改変（altered）され得る標的ポリペプチ

ドのもう1つの例である。黄色ブドウ球菌および連鎖球菌グループA (group A *Streptococci*) の株は、食中毒、毒素性ショック症状、猩紅熱および種々の自己免疫疾患を含む、疾病の範囲に含まれる。それらは多様な毒素を分泌し、そして少なくとも5種の細胞溶解毒素類、コアグラーゼ、および多様なエンテロトキシン類を含んでいる。エンテロトキシン類は、MHCクラスII分子とT細胞受容体とを架橋して、構成的T細胞活性化を引き起こすスーパー抗原として分類される (Fieldsら (1996) *Nature* 384:188)。このサイトカインの病原性レベルの集積の結果は、複合臓器不全および死を導くことができる。少なくとも30種の関連しているが、異なるエンテロトキシンが配列決定されており、それらはファミリーに系統的にグループ分けできる。結晶構造は、幾つかのメンバー単独およびMHCクラスII分子との複合について得られている。MHCクラスIIが毒素を結合する部位での突然変異は、それらの毒性を強く低下させ、弱毒化ワクチンの基礎を形成することができる (Woodyら (1997) *Vaccine* 15:133)。しかしながら、1つのタイプの毒素に対して奏効する免疫応答は、近縁のファミリーのメンバーに対する保護を与えることができるが、他のファミリー由来の毒素に対する保護は殆ど観察されない。種々のファミリーのメンバー由来のエンテロトキシン遺伝子の科の再集合 (任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法との組み合わせで) は、低下した毒性を有し、交叉保護免疫応答を誘導できる組換え毒素分子を取得するために使用できる。実験的に (例えば、ポリヌクレオチド再集合および/またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって) 進化された抗原は、マウスまたはサルなどの適当な動物モデルにおいて抗体の中和を誘導する抗原を同定するためにスクリーニングすることもできる。そのようなアッセイの例は、誘導された抗体が、エンテロトキシンのMHC複合体および/または細胞若しくはその精製された形態上のT細胞受容体への結合を抑制するELISA構成 (format) を含む。これらのアッセイは、添加された抗体が適当な抗原提示細胞に架橋されているT細胞を抑制する構成をも含む。

コレラは、古来から、細菌であるコレラ菌によって引き起こされる強力な致死疾病であり、その予防に有効なワクチンは未だ得られていない。この疾病の病原性の多くは、コレラエンテロトキシンによって引き起こされる。 μg 量のコレラ

毒素の摂取で、10リットルの体液の喪失を引き起こすひどい下痢を誘導できる。

コレラ毒素は、単一の触媒Aサブユニットと同一のBサブユニットの5量体の環からなる複合体である。各サブユニットは、単独では不活性である。Bサブユニットは、腸管上皮細胞表面の特異的ガングリオシド受容体に結合し、Aサブユニットがその細胞に入るきっかけとなる。Aサブユニットは、大量の電解質および水の腸管管腔への持続的な流出を引き起こして、極端な下痢をもたらすイベントのカスケードを開始する調節Gタンパク質をADP-リボシル化する。

コレラ毒素のBサブユニットは、多数の理由から興味あるワクチン標的である。それは、コレラ感染の間に生成される保護抗体の主標的であり、抗体を中和する抗毒素のエピトープを含んでいる。それは、Aサブユニットが無いと無毒性であり、経口的に有効であり、そしてコレラおよびコレラ毒素に対する保護に必須の、強力なIgA優勢の消化管粘膜免疫応答の産生を刺激する。Bサブユニットもまた、他のワクチン製造におけるアジュバントとしての使用について研究されており、それ故、進化された毒素は、多様な異なるワクチンの一般的な改善を提供することができる。腸内毒素原性大腸菌株由来の熱不安定性のエンテロトキシン類(LH)は、コレラ毒素と構造的に関係しており、DNA配列レベルでは75%同一である。低下した毒性およびコレラ菌および大腸菌に対して保護する向上された免疫応答を誘導する能力を示す最適化された組換え毒素分子を取得するためには、関連する毒素をコードする遺伝子を、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付す。

次いで、組換え毒素は、幾つかの好ましい特性の1種以上について試験される。例えば、組換え毒素ポリペプチドに対して産生された抗体の改善された交叉反応性、細胞培養アッセイでの毒性の欠如、および病原体に対するおよび／または毒素それ自身に対する保護免疫応答を誘発する能力をスクリーニングできる。実験的に（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）進化されたクローンは、ファージディスプレイによって選択し、および／または異なる血清型由来のエピトープの存在をファージELISAおよびELISAアッセイによってスクリーニングすることができる。次いで、複数のエピトープを有する変異（variant）タンパク質を精製し、マウスまたは他

の試験動物を免疫するのに使用できる。次いで、動物血清を、異なるB鎖サブタイプに対する抗体に関してアッセイし、広域の交叉反応応答を誘導する変異体 (variants) を毒性攻撃モデルでさらに評価する。大腸菌およびコレラ菌毒素は、粘膜免疫を高めることができ、ワクチンおよびタンパク質の経口送達が可能なアジュバントとして作用することもできる。

【0138】

従って、組換え毒素のライブラリーのアジュバント活性の増強を試験できる

実験的に（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）進化された抗原は、6量体複合体中のA鎖の存在下のときよりも不安定かも知れないB鎖5量体の改善された発現レベルおよび安定性をスクリーニングすることもできる。加熱処理工程または塩類、尿素、および／または塩酸グアニジンなどの変性剤の追加を、適当な抗体による正しく折り畳まれた分子の収量を測定するELISAアッセイの前に含ませることができる。例えば、単量体B鎖は結合するが、5量体B鎖は結合しない抗体を用いたELISA構成において、安定な単量体B鎖分子をスクリーニングすることは時として好ましい。さらに、実験的に（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）進化された抗原が、マウスまたはサルなどの適当な動物モデルでの抗体の中和を誘導する能力をスクリーニングすることができる。例えば、B鎖に結合し、腸管上皮細胞の表面のその特異的ガングリオシド受容体への結合を妨げる抗体は、疾病を予防する。同様に、B鎖に結合し、その5量体化を妨げるか、またはA鎖結合をブロックする抗体は、疾病を予防するのに有用であり得る。

ワクチンとしての使用のために、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合によって改善され得る細菌抗原としては、これらに限定されないが、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 抗原CagAおよびCacA (Blaser (1996) *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1:73-7; BlaserおよびCrabtree (1996) *Am. J Clin. Pathol.* 106:565-7; Censiniら (1996) *Proc. Nat'l, Acad. Sci. USA* 93:14648-14643) も挙げられる。

他の好適なヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) 抗原としては、例えば、Chathaら (1997) *Indian J Med. Res.* 105:170-175によって報告された45-65 kDaの4つの免疫反応性タンパク質およびヘリコバクター・ピロリGroES相同体 (HspA) (Kansauら (1996) *Mol. Microbiol.* 22:1013-1023) が挙げられる。他の好適な細菌性抗原としては、これらに限定されないが、ピー・ギンギバリス (*P. gingivalis*) (Boutsら (1996) *Oral Microbiol. Immunol.* 11:236-241) の43-kDaおよびフィムブリリン (fimbriin) (41 kDa) タンパク質；肺炎球菌表面タンパク質A (Brilesら (1996) *Ann. NY Acad. Sci.* 797:118-126) ；オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*) 抗原であり、80-90 kDaタンパク質および110 kDaタンパク質 (Buendiaら (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* 150:113-9) ；クラミジアエキソ糖脂質 (exoglycolipid) 抗原 (GLXA) (Whittum-Hudsonら (1996) *Nature Med.* 2:1116-1121) ；92-98、51-55、43-46および31.5-33 kDaの分子量範囲のクラミジア肺炎 (*Chlamydia pneumoniae*) 種特異的抗原および12、26および5-70 kDaの範囲の属特異的抗原 (Halmeら (1997) *Scand. J Immunol.* 45:378-84) ；淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) (GC) または大腸菌 (*Escherichia coli*) の相可変 (phase-variable) 不透明 (Opa) タンパク質 (ChenおよびGotschlich (1996) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93:14851-14856) であり、CuttsおよびWilson (1997) *Parasitology* 114:245-55によって記載されたシストソーマ・マンソニ (*Schistosoma mansoni*) (分子量が14~208 kDaの範囲) の12個の免疫優性タンパク質のいずれか；ブルセラ・アボルタス (*Brucella abortus*) (De Motら (1996) *Curr. Microbiol.* 33:26-30) の17-kDaタンパク質抗原；ノカルジオホーム (nocardioform) 放線菌ロドコッカス・エスピーN186/21 (De motら (1996) *Curr. Microbiol.* 33:26-30) 中で同定されたグラム陰性病原体であるブルセラ・アボルタスの17-kDaタンパク質抗原の遺伝子相同体；ブドウ球菌エンテロトキシン類 (SE類) (Woodら (1997) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 17:1-10) であって、42-kDaのエム・ハイオプネウニオニア (*M. hyopneumoniae*) NrdFリボヌクレオチドレダクターゼR2タンパク質またはエム・ハイオプネウニオニアの15-kDaのサブユニットタンパク質 (Fanganら (1997) *Infect. Immun.* 65:2502-2507) ；髄膜炎菌抗原PorAタンパク質 (Feaversら (1997) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*

3:444-50) ; 肺炎球菌表面タンパク質A (PspA) (McDanielら (1997) Gene Ther. 4:375-377) ; エフ・ツラレンシス (*F. tularensis*) 外膜タンパク質FopA (Fulopら (1996) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13:245-247) ; アクチノバチルス属株内の主外膜タンパク質 (Hartmannら (1996) Zentralbl. Bakteriologie 284:255-262) ; リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) のp60またはリステリオリジン (Hly) 抗原 (Hessら (1996) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93:1458-1463) ; 腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) およびエス・プロルム (*S. pullorum*) (HoltおよびChaubal (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1016-1020) に関して観察された鞭毛 (G) 抗原; 炭疽菌保護抗原 (PA) (Ivinsら (1995) Vaccine 13:1779-1784) ; 単包条虫 (*Echinococcus granulosus*) 抗原5 (Jonesら (1996) Parasitology 113:213-222) ; 赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) Iおよび大腸菌K-12のrol遺伝子 (Kleeら (1997) J. Bacteriol. 179:2421-2425) ; 連鎖球菌グループBの細胞表面タンパク質Ribおよび α (GLXA) (Larssonら (1996) Infect. Immun. 64:3518-3523) ; 病原性エルシニア・エスピーピー (*Yersinia* spp.) の70 kbの病原性プラスミド上にコードされた37 kDaの分泌ポリペプチド (Learyら (1995) Contrib. Microbiol. Immunol. 13:216-217およびRoggenkampら (1997) Infect. Immun. 65:446-51) ; ライム病スピロヘータボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) のOspA (外表面タンパク質A) (Liら (1997) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:3584-3589、Padillaら (1996) J Infect. Dis. 174:739-746、およびWallichら (1996) Infection 24:396-397) ; Omp28をコードするブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*) グループ3抗原遺伝子 (Lindlerら (1996) Infect. Immun. 64:2490-2499) ; ストレプトコッカス・ミュータンズ (*Streptococcus mutans*) のPac抗原 (Murakamiら (1997) Infect. Immun. 65:794-797) ; ニューモリジン (pneumolysin)、肺炎球菌性ノイラミニダーゼ類、自己融解素、ヒアルロニダーゼ、および37 kDaの肺炎球菌性表面付着因子A (Patonら (1997) Microb. Drug Resist. 3:1-10) ; サルモネラ・ティフィ (*Salmonella typhi*) の分子量29-32、41-45、63-71 $\times 10^3$ の抗原 (Perezら (1996) Immunology 89:262-267) ; 肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) のマーカーとしてのK抗原 (PriamukhinaおよびMorozova (1996) Klin. Lab. Diagn. 47-9) ; 分子質

量約60、40、および15-10 kDaのノカルジア (nocardial) 抗原 (Prokesovaら (1996) *Int. J Immunopharmacol.* 18:661-668) ; 黄色ブドウ球菌抗原ORF-2 (Rienckら (1997) *Biochim. Biophys Acta* 1350:128-132) ; ボレリア・ヘルムシイのGlpQ抗原 (Schwanら (1996) *J Clin. Microbiol.* 34:2483-2492) ; コレラ保護抗原 (CPA) (Sciortino (1996) *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14:16-26) ; ストレプトコッカス・ミュータンスの190-kDaタンパク質抗原 (Senpukuら (1996) *Oral Microbiol. Immunol.* 11:121-128) ; 炭疽毒素 (Anthrax toxin) 保護抗原 (PA) (Sharmaら (1996) *Protein Expr. Purif.* 7:33-38) ; ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 抗原および類毒素 (Stromら (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:1095-1096) ; 腸炎菌のSEF 14海馬采抗原 (Thornsら (1996) *Microb. Pathog.* 20:235-246) ; ペスト菌莢膜抗原 (FI抗原) (Titballら (1997) *Infect. Immun.* 65:1926-1930) ; ライ菌の35-kDaタンパク質 (Triccasら (1996) *Infect. Immun.* 64:5171-5177) ; モラクセラ (*Moraxella*) (ブランハメラ (*Branhamella*)) ・カタラーリス (*catarrhalis*) から抽出された主外膜タンパク質であるCD (Yangら (1997) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 17:187-199) ; ペスト菌のpH 6抗原 (PsaAタンパク質) (Zav'yalovら (1996) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14:53-57) ; リーシュマニア・メジャー (*Leishmania major*) の主表面糖タンパク質であるgp63 (XuおよびLiew (1994) *Vaccine* 12:1534-1536; XuおよびLiew (1995) *Immunology* 84:173-176) ; 放線菌熱ショックタンパク質65である、放線菌抗原 (ライ菌hsp65) (Lowrieら (1994) *Vaccine* 12:1537-1540; Ragnoら (1997) *Arthritis Rheum.* 40:277-283; Silva (1995) *Braz. J Med. Biol. Res.* 28:843-851) ; 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 抗原85 (Ag85) (Huygenら (1996) *Nat. Med.* 2:893-898) ; 結核菌、エム・ボビス (*M. bovis*) およびBCGの45/47 kDa抗原複合体 (APA) (Hornら (1996) *J Immunol. Methods* 197:151-159) ; 放線菌抗原である65-kDaの熱ショックタンパク質hsp65 (Tasconら (1996) *Nat. Med.* 2:888-892) ; 放線菌抗原MPB64、MPB70、MPB57および α 抗原 (Yamadaら (1995) *Kekkaku* 70:639-644) ; 結核菌38 kDaタンパク質 (Vordenneierら (1995) *Vaccine* 13:1576-1582) ; 結核菌由来のMPT63、MPT64およびMPT59抗原 (Mancaら (1997) *Infect. Immun.* 65:16-263; Oettingerら (1997) *Scand. J I*

mmunol. 45:499-503 ; Wilckeら (1996) Tuber. Lung Dis. 77:250-256) ; ライ菌の35-kDaタンパク質 (Triccasら (1996) Infect. Immun. 64:5171-5177) ; 病原性放線菌のESAT-6抗原 (Brandtら (1996) J Immunol. 157:3527-3533 ; PollockおよびAndersen (1997) J Infect. Dis. 175:1251-1254) ; 結核菌16-kDa抗原 (Hsp16.3) (Changら (1996) J Biol. Chem. 271:7218-7223) ; およびライ菌の18-kDaタンパク質) Baumgartら (1996) Infect. Immun. 64:2274-2281) が挙げられる。

【0139】

2.9.1.2. ウイルス病原体

本発明の方法は、ウイルス病原体に対する免疫応答の誘導能力が増強された組換え核酸およびポリペプチドを取得するのにも有用である。上記の細菌組み換え体は、一般にポリペプチド形態で投与されるが、ウイルス保護を与える組み換え体は、遺伝的ワクチンとして、核酸形態で投与されるのが好ましい。

1つの事例は、ハンタンウイルス (Hantaan virus) である。このウイルスの糖タンパク質は、一般に感染された細胞のゴルジ装置の膜に蓄積される。この糖タンパク質の発現が乏しいと、これらのウイルスに対する効率的な遺伝的ワクチンの開発を妨げる。本発明の方法は、この問題を、糖タンパク質をコードする核酸上での確率論的 (例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合を実行し、宿主細胞中でのおよび／または遺伝的ワクチンとして投与されたときの改善された免疫原性のための増強された発現を示す、それらの組み換え体を同定することによって解決する。これらの方法の便利なスクリーニング方法は、宿主細胞表面上のポリペプチドのディスプレイをもたらす、PIGへの融合タンパク質として実験的に生成されたポリヌクレオチドを発現させることである (Whitehornら (1995) Biotechnology (NY) 13:1215-9) 。次いで、蛍光発色セルソーティング (Fluorescence-activated cell sorting) を使用して、抗原性ポリペプチドの増大された量を発現させるそれらの細胞を仕分けし、回収する。この予備的スクリーニングは、マウスなどの哺乳動物での免疫原性試験の後に行うことができる。最後に、好ましい実施態様では、それらの組換え核酸は、遺伝的ワクチンとしてそれらのウイルスによる攻

撃に対して試験動物を保護する能力が試験される。

フラビウイルス (flaviviruses) は、本発明の方法がウイルス病原体に対して有効な実験的に生成されたポリペプチドまたは遺伝的ワクチンを取得するのに有用なウイルス病原体のもう1つの例である。フラビウイルスは、抗原的に関連したウイルスの3つのクラスター、すなわち、デング熱1-4 (62-77%同一)、ジャパニーズ・セントルイス・アンド・マーレイ・バレイ脳炎ウイルス (Japanese, St. Louis and Murray Valley encephalitis viruses) (75-82%同一)、およびダニ媒介性脳炎ウイルス (77-96%同一) からなる。デング熱ウイルスは、SLE および黄熱病 (40-50%同一) に対する保護抗体を誘導することができるが、入手できる有効なワクチンは殆どない。増進された交叉反応性および免疫原性を示す遺伝的ワクチンおよび実験的に生成されたポリペプチドを取得するためには、関連ウイルスのエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、確率論的 (例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合に付す。得られた実験的に生成されたポリヌクレオチドは、遺伝的ワクチンとして、または発現されたポリペプチドを用いてのいずれかで、広範に反応する中和化抗体応答を誘導する能力を試験できる。最後に、予備的スクリーニングに都合の良いそれらのクローンは、ウイルスの攻撃に対して試験動物を保護する能力を試験できる。

ワクチンとしての改善された活性に関して、確率論的 (例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成) および非確率論的ポリヌクレオチド再集合によって進化され得るウイルス抗原としては、これらに限定されないが、A型インフルエンザウイルスN2ノイラミニダーゼ (Kilbourneら (1995) Vaccine 13:1799-1803) ; デング熱ウイルスエンベロープ (E) およびプレメンブラン (premembrane) (prM) 抗原 (Feighnyら (1994) Am. J Trop. Med. Hyg. 50:322-328 ; Putnakら (1996) Am. J Trop. Med. Hyg. 55:504-10) ; HIV抗原Gag、Pol、VifおよびNef (Vogtら (1995) Vaccine 13:202-208) ; HIV抗原gp 120およびgp 160 (Achourら (1995) Cell. Mol. Biol. 41:395-400 ; Honeら (1994) Dev. Biol. Stand. 82:159-162) ; ヒト免疫不全ウイルスのgp41エピトープ (Eckhartら (1996) J Gen. Virol. 77:2001-2008) ; ロタウイルス抗原VP4 (Mattionら (1995) J

Virol. 69:5132-5137) ; ロタウイルスタンパク質VP7またはVP7sc (Emslieら (1995) J virol. 69:1747-1754 ; Xuら (1995) J Gen. Virol. 76:1971-1980) ; 単純ヘルペスウイルス (HSV) 糖タンパク質gB、gC、gD、gE、gG、gH、およびgI (Fleckら (1994) Med. Microbiol. Immunol. (Berl) 183:87-94 [Mattion, 1995] ; Ghiasiら (1995) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36:1352-1360 ; McLeanら (1994) J Infect. Dis. 170:1100-1109) ; 1型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) の前初期タンパク質ICP47 (Banksら (1994) Virology 200:236-245) ; 単純ヘルペスウイルスの前初期 (IE) タンパク質ICP27、ICP0、およびICP4 (Manickanら (1995) J Virol. 69:4711-4716) ; インフルエンザウイルス核タンパク質および血球凝集素 (Deckら (1997) Vaccine 15:71-78 ; Fuら (1997) J Virol. 71:2715-2721) ; B 19パルボウイルスカプシドタンパク質VP1 (Kawaseら (1995) Virology 211:359-366) またはVP2 (Brownら (1994) Virology 198:477-488) ; B型肝炎ウイルスおよびe抗原 (Schodelら (1996) Intervirology 39:104-106) ; B型肝炎表面抗原 (ShiauおよびMurray (1997) J Med. Virol. 51:159-166) ; B型肝炎ウイルスのコア抗原 (Id.) に融合されたB型肝炎表面抗原 ; B型肝炎ウイルスコア-preS2顆粒 (Nemeckovaら (1996) Acta Virol. 40:273-279) ; HBV preS2-Sタンパク質 (Kutinovaら (1996) Vaccine 14:1045-1052) ; VZV糖タンパク質I (Kutinovaら (1996) Vaccine 14:1045-1052) ; 狂犬病ウイルス糖タンパク質 (Xiangら (1994) Virology 199:132-140 ; Xuanら (1995) Virus Res. 36:151-161) またはリボ核カプシド (Hooperら (1994) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:10908-10912) ; ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 糖タンパク質B (LTL55) (Brittら (1995) J Infect. Dis. 171:18-25) ; 分泌型または非分泌型の、またはB型肝炎ウイルス (HBV) の中間 (pre-S2およびS) 若しくは主 (S) 表面抗原との融合タンパク質としてのC型肝炎ウイルス (HCV) ヌクレオカプシドタンパク質 (Inchauspeら (1997) DNA Cell Biol. 16:185-195 ; Majorら (1995) J Virol. 69:5798-5805) ; C型肝炎ウイルス抗原、すなわちコアタンパク質 (pC) ; E1 (pE1) およびE2 (pE2) 単独または融合タンパク質として (Saitoら (1997) Gastroenterology 112:1321-1330) ; 呼吸器合胞体ウイルス (RSウイルス) 融合タンパク質 (FPF-2) (FalseyおよびWalsh (1996) Vaccine 14:1214-1218 ; Piedraら (1996

) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 15:23-31) ; ロタウイルスのVP6およびVP7 (Choiら (1997) *Virology* 232:129-138 ; Jinら (1996) *Arch. Virol.* 141:2057-2076) ; ヒトパピローマウイルスのE1、E2、E3、E4、E5、E6およびE7タンパク質 (Brownら (1994) *Virology* 201:46-54 ; Dillnerら (1995) *Cancer Detect. Prev.* 19:381-393 ; Krulら (1996) *Cancer Immunol. Immunother.* 43:44-48 ; Nakagawaら (1997) *J Infect. Dis.* 175:927-931) ; ヒトI型Tリンパ指向性ウイルスgagタンパク質 (Porterら (1995) *J Med Virol.* 45:469-474) ; エプスタイン・バーウイルス (EBウイルス) (EBV) gp340 (Mackettら (1996) *J Med. Virol.* 50:263-271) ; エプスタイン・バーウイルス (EBV) 潜在性 (latent) 膜タンパク質 LMP2 (Leeら (1996) *Eur. J Immunol.* 26:1875-1883) ; エプスタイン・バーウイルス核抗原1および2 (ChenおよびCooper (1996) *J Virol.* 70:4849-4853 ; Khannaら (1995) *Virology* 214:633-637) ; 麻疹ウイルス核タンパク質 (N) (Fooksら (1995) *Virology* 210:456-465) ; およびサイトメガロウイルス糖タンパク質gB (Marshallら (1994) *J Med. Virol.* 43:77-83) または糖タンパク質gH (Rasmussenら (1994) *J Infect. Dis.* 170:673-677) が挙げられる。

【0140】

2.9.2. 炎症性および自己免疫疾患

自己免疫疾患は、自身の身体の組織若しくは細胞を攻撃する免疫応答、または自身の組織若しくは細胞にも有害な病原体特異的免疫応答、または自身の組織若しくは細胞に有害な非特異的免疫活性化によって特徴付けられる。自己免疫疾患の例としては、これらに限定されないが、慢性関節リウマチ、SLE、真性糖尿病、重症筋無力症、反応型関節炎 (reactive arthritis)、強直性脊椎関節炎、および多発性硬化症が挙げられる。これらおよびIBD、乾癬、瘧疾、および種々の免疫不全症を含む他の炎症症状は、本発明の方法を用いて（例えば、本発明の方法を用いて最適された抗原を用いて）得られたベクターおよび他の構成要素を含む遺伝的ワクチンを用いて治療できる。

これらの症状は、炎症部位での、リンパ球、マクロファージ、および好中球などの炎症性細胞の蓄積によってしばしば特徴付けられる。増加したサイトカイン産生レベルと共に、改変されたサイトカイン産生レベルがしばしば観察される。

糖尿病および慢性関節リウマチを含む、幾つかの自己免疫疾患は、ある種のMHCハプロタイプに関係している。反応型関節炎などの、他の自己免疫型障害は、エルシニア属および赤痢菌属などの細菌によって誘発されることが示されており、証拠（evidence）は、糖尿病、多発性硬化症、慢性関節リウマチなどの、幾つかの他の自己免疫疾患もまた、遺伝子的に感受性のある固体においてウイルスまたは細菌感染によって開始されるかも知れないことを示唆している。

最新の治療戦略は、一般に、NSAIDやシクロスポリンなどの抗炎症薬、およびメトトレキセートなどの抗増殖薬を含む。これらの治療法は、非特異的であり、それ故、より高い特異性を有する治療法、および自己免疫プロセスを阻害する方向に免疫応答を向ける手段が必要とされている。

本発明は、これらの要求を満足できる幾つかの戦略を提供する。第1に、本発明は、寛容原性抗原の送達性が改善されたワクチン（例えば、より高い寛容原性および／または改善された抗原性を有する抗原を取得する方法）、改善された抗原性を有する抗原、遺伝的ワクチン媒介寛容性、および適当なアクセサリ分子の包含による免疫応答を調節する方法を提供する。好ましい実施態様では、本発明によって製造されたワクチン（例えば、最適化された抗原）は、経口送達によって寛容性誘導の改善を示す。

経口による寛容性は、大量の抗原の経口投与による免疫学的寛容の誘導によって特徴付けられる（Chenら（1995）*Science* 265:1237-1240；Haqら（1995）*Science* 268:714-716）。動物モデルでは、このアプローチが、自己免疫疾患を治療するための非常に有望なアプローチであることが証明されており、慢性関節リウマチおよび多発性硬化症などのヒト自己免疫疾患の治療におけるこのアプローチの有効性を扱う（address）臨床試験が進行中である（Chenら（1994）*Science* 265:1237-40；Whitacreら（1996）*Clin. Immunol. Immunopathol.* 80:S31-9；Hoholら（1996）*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 778:243-50）。遺伝子治療で用いられるウイルスに対する経口による寛容性の誘導は、遺伝子治療ベクターの免疫原性を低下させられるかも知れないことも示唆されている。

しかしながら、経口による寛容性の誘導に必要な抗原の量は、非常に多く、抗原性タンパク質の経口送達のための改善された方法が、経口による寛容性の誘導

の効率を顕著に改善するだろう。

発現ライブラリー免疫法 (Barryら (1995) Nature 377:623) は、遺伝的ワクチンで使用するための最適な抗原をスクリーニングする特に有用な方法である。例えば、エルシニア属、赤痢菌属などに存在する自己抗原を同定するためには、HLA-B27陽性個体でのT細胞応答の誘発をスクリーニングすることができる。細菌抗原および自己免疫疾患と関連するMHC分子 (例えば、エルシニア属抗原と関連するHLA-B27) のエピトープを含む複合体は、HLA-B27陽性個体での反応型関節炎および強直性脊椎炎の予防に使用できる。

自己免疫および炎症症状の治療は、寛容性抗原の投与だけでなく、サイトカイン類、共刺激分子などの組み合わせの使用を含むことができる。そのようなカクテル (cocktails) は、有利な免疫応答の誘導、一般には自己抗原特異的寛容性の誘導のために製剤される。カクテルはまた、例えば、T細胞のサブセットによる自己の抗原の認識を決定的に必要とするCD1 (Porcelli (1995) Adv. Immunol. 59:1) を含むこともできる。T_H2に向かう免疫応答を歪曲する遺伝的ワクチンベクターおよびカクテルは、抗原特異的および抗原非特異的ベクターの両者と共に、自己免疫および炎症症状の治療にしばしば用いられる。

遺伝的ワクチンおよびアクセサリ分子 (例えば、最適化された抗原) のスクリーニングは、当業者に公知の動物モデルで行うことができる。種々の条件に対する好適なモデルの例としては、コラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis)、ヒトシェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome) のNFS/sldマウスモデル；ヒト細胞骨格タンパク質であるフォドリンのアナログとして最近同定された120 kDの臓器特異的自己抗原 (Hanejiら (1997) Science 276:604)、ヒトSLEのニュージーランドブラック／ホワイトF1雑種マウスモデル、NODマウス、ヒト真性糖尿病のマウスモデル、自己免疫およびリンパ増殖性障害を同時に発病するfas/fasリガンド突然変異マウス (Watanabe-Fukunagaら (1992) Nature 356:314)、およびミエリン塩基性タンパク質がヒト多発性硬化症と似た病気を誘導する実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) が挙げられる。

【0141】

(本発明の方法によって (例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポ

リヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）実験的に進化され得る）多発性硬化症を治療するための遺伝的ワクチンで有用な自己抗原としては、これらに限定されないが、ミエリン塩基性タンパク質（Stinissenら（1996）J Neurosci. Res. 45:500-511）またはミエリン塩基性タンパク質と多発性硬化症のプロテオリピッドタンパク質との融合タンパク質（Elliottら（1996）J Clin. Invest. 98:1620-1612）、プロテオリピッドタンパク質（PLP）（Rosenerら（1997）J Neuroimmunol. 75:28-34）、2',3'-サイクリックヌクレオチド 3-ホスホジエステラーゼ（CNPase）（Rosenerら（1997）J Neuroimmunol. 75:28-34）、多発性硬化症でのエプスタイン・バーウイルス核抗原-1（EBNA-1）（Vaughanら（1996）J Neuroimmunol. 69:95-102）、多発性硬化症でのHSP70（Salvettiら（1996）J Neuroimmunol. 65:143-53；Feldmannら（1996）Cell 85:307）が挙げられる。

本発明の方法による再集合後（任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法との組み合わせで）、強皮症、全身性硬化症、および全身性エリテマトーデスを治療するのに使用できる標的抗原としては、例えば、-2-GPI、50 kDa糖タンパク質（Blankら（1994）J Autoimmun. 7:441-455）、Ku（p70/p80）自己抗原、またはその80-kdサブユニットタンパク質（Hongら（1994）Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35:4023-4030；Wangら（1994）J Cell Sci. 107:3223-3233）、核自己抗原La（SS-B）およびRo（SS-A）（Huangら（1997）J Clin. Immunol. 17:212-219；Lgarashiら（1995）Autoimmunity 22:33-42；Keechら（1996）Clin. Exp. Immunol. 104:255-263；Manoussakisら（1995）J Autoimmun. 8:959-969；Topferら（1995）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:875-879）、プロテアソームタイプサブユニットC9（Feistら（1996）J Exp. Med. 184:1313-1318）、強皮症抗原Rpp 30、Rpp 38またはScl-70（Ederら（1997）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:1101-1106；Hietarintaら（1994）Br. J Rheumatol. 33:323-326）、中心体自己抗原PCM-1（Baoら（1995）Autoimmunity 22:219-228）、多発性筋炎－強皮症自己抗原（PM-Scl）（Khoら（1997）J Biol. Chem. 272:13426-13431）、強皮症（および他の全身性自己免疫疾患）自己抗原CENP-A（Muroら（1996）Clin. Immunol. Immunopathol. 78:86-89）、核内低分子リボ核タンパク質（snRNP）であるU5（Okanoら（1996）Clin. Immunol. Immunopathol. 81:41-47）、PM-Scl自己抗

原の100-kdタンパク質 (Geら (1996) *Arthritis Rheum.* 39:1588-1595)、核小体U3ーおよびTh(7-2)リボ核タンパク質 (Verheijenら (1994) *J. Immunol. Methods* 169:173-182)、リボソームタンパク質L7 (Neuら (1995) *Clin. Exp. Immunol.* 100:198-204)、hPop 1 (Lygerouら (1996) *EMBO J.* 15:5936-5948)、および核基質抗原由来の36-kdタンパク質 (Dengら (1996) *Arthritis Rheum.* 39:1300-1307) が挙げられる。

肝性自己免疫疾患も、本明細書中に記載された方法によって製造された改善された組換え抗原を用いて治療できる。そのような治療に有用な抗原には、チトクロームP450およびUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (Obermayer-Straub および Manns (1996) *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 10:501-523)、チトクロームP450 2C9およびP450 1A2 (Bourdiら (1996) *Chem. Res. Toxicol.* 9:1159-1166; Clementeら (1997) *J Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1353-1361)、LC-1抗原 (Kleinら (1996) *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 23:461-465)、および230-kDaのゴルジ関連タンパク質 (Funakiら (1996) *Cell Struct. Funct.* 21:63-72) がある。

皮膚の自己免疫疾患の治療に有用な抗原としては、これらに限定されないが、450 kDヒト上皮性自己抗原 (Fujiwaraら (1996) *J Invest. Dermatol.* 106:1125-1130)、230 kDおよび180 kDの水疱性類天疱瘡抗原 (Hashimoto (1995) *Keio J Med.* 44:115-123; Murakamiら (1996) *J Dermatol. Sci.* 13:112-117)、落葉状天疱瘡抗原 (デスモグレイン1)、尋常性天疱瘡抗原 (デスモグレイン3)、BP Ag2、BPAg1、およびVII型コラーゲン (Batteuxら (1997) *J Clin. Immunol.* 17:228-233; Hashimotoら (1996) *J Dermatol. Sci.* 12:10-17)、瘢痕性類天疱瘡の患者のサブセット中の168-kDa粘膜抗原 (Ghohestaniら (1996) *J Invest. Dermatol.* 107:136-139)、および218-kd核タンパク質 (218-kd Mi-2) (Seeligら (1995) *Arthritis Rheum.* 38:1389-1399) が挙げられる。

本発明の方法は、これらに限定されないが、インシュリン、プロインシュリン、GAD65およびGAD67、熱ショックタンパク質65 (hsp65)、および島細胞抗原69 (ICA69) (Frenchら (1997) *Diabetes* 46:34-39; Roep (1996) *Diabetes* 45:1147-1156; Schlootら (1997) *Diabetologia* 40:332-338)、GAD65に相同なウイル

スタンパク質 (JonesおよびCrosby (1996) *Diabetologia* 39:1318-1324)、島細胞抗原関連タンパク質—チロシンホスファターゼ (PTP) (Cuiら (1996) *J. Biol. Chem.* 271:24817-24823)、GM2-1ガングリオシド (Cavalloら (1996) *J. Endocrinol.* 150:113-120; Dottaら (1996) *Diabetes* 45:1193-1196)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) (Nepom (1995) *Curr. Opin. Immunol.* 7:825-830; Panina-Bordignonら (1995) *J. Exp. Med.* 181:1923-1927)、島細胞抗原 (ICA69) (Kargesら (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1360:97-101; Roepら (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:1285-1289)、糖尿病患者由来のT細胞によって認識される単一のT細胞エピトープであるTep69 (Kargesら (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1360:97-101)、I型糖尿病の自己抗原であるICA 512 (Solimenaら (1996) *EMBO J.* 15:2102-2114)、島細胞タンパク質チロシンホスファターゼおよびI型糖尿病のそれから誘導された37-kDa自己抗原 (IA-2、IA-2を含む) (La Gasseら (1997) *Mol. Med.* 3:163-173)、島細胞表面抗体 (ICSA) を有する患者由来の血清で免疫沈降するIn-111細胞またはヒト甲状腺濾胞細胞由来の64 kDaタンパク質 (Igawaら (1996) *Endocr. J.* 43:299-306)、ヒト膜貫通タンパク質チロシンホスファターゼの相同体であるフォグリン (phogrin)、I型糖尿病の自己抗原 (Kawasakiら (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227:440-447)、40 kDaおよび37 kDaのトリプティック断片 (tryptic fragments) およびそれらのIA-2前駆体およびIDDM中のIA-2 (Lampasonaら (1996) *J. Immunol.* 157:2707-2711; Notkinsら (1996) *J. Autoimmun.* 9:677-682)、インシュリンまたはコレラ類毒素—インシュリンコンジュゲート (Bergerotら (1997) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 94:4610-4614)、ラットのハイマン腎炎の誘発に含まれる腎臓上皮糖タンパク質であるgp330のヒト相同体であるカルボキシペプチダーゼH、および38-kD小島ミトコンドリア自己抗原 (Ardenら (1996) *J. Clin. Invest.* 97:551-561) を含む、1種以上の抗原インシュリン依存性真性糖尿病を治療するための改善された抗原を取得するのにも有用である。

【0142】

慢性関節リウマチは、本発明に従って製造された最適化された抗原を用いて治療し得るもう1つの症状である。慢性関節リウマチ治療に有用な抗原は、これら

に限定されないが、特に若年性慢性関節リウマチおよび虹彩毛様体炎の発症における45 kDa DEK核抗原 (Murrayら (1997) *J Rheumatol.* 24:560-567)、慢性関節リウマチにおける自己抗原であるヒト軟骨糖タンパク質39 (Verheijdenら (1997) *Arthritis Rheum.* 40:1115-1125)、慢性関節リウマチ68k自己抗原 (Blassら (1997) *Ann. Rheum. Dis.* 56:317-322)、コラーゲン (Rosloniecら (1995) *J Immunol.* 155:4504-4511)、II型コラーゲン (Cookら (1996) *Arthritis Rheum.* 39:1720-1727; Trentham (1996) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 778:306-314) 軟骨結合 (link) タンパク質 (Guerassimovら (1997) *J Rheumatol.* 24:959-964)、慢性関節リウマチの自己免疫抗原であるエズリン、ラディキシンおよびモエシン (Wagatsumaら (1996) *Mol. Immunol.* 33:1171-1176)、および放線菌熱ショックタンパク質65 (Ragnoら (1997) *Arthritis Rheum.* 40:277-283) を含む。

また、治療に好適な改善された抗原を取得することができる症状には、自己免疫甲状腺疾患がある。これらの適用に有用な抗原は、例えば、甲状腺ペルオキシダーゼおよび甲状腺刺激ホルモン受容体 (TandonおよびWeetman (1994) *J R. Coll. Physicians Lond.* 28:10-18)、ヒトグレース甲状腺組織由来の甲状腺ペルオキシダーゼ (Gardasら (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234:366-370; Zimmerら (1997) *Histochem. Cell. Biol.* 107:115-120)、甲状腺関連眼障害と関係する64-kDa抗原 (Zhangら (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80:236-244)、ヒトTSH受容体 (Nicholsonら (1996) *J Mol. Endocrinol.* 16:159-170) および小島細胞表面抗体 (ICSA) を有する患者由来の血清で免疫沈降されるIn-111細胞またはヒト甲状腺濾胞細胞由来の64 kDaタンパク質 (Igawaら (1996) *Endocr. J.* 43:299-306) を含む。

他の症状および関連抗原としては、これらに限定されないが、シェーグレン症候群 (ーフォドリン; Hanejiら (1997) *Science* 276:604-607)、重症筋無力症 (ヒトM2アセチルコリン受容体またはその断片、特にヒトM2アセチルコリン受容体の第2の細胞外ループ; Fuら (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 78:203-207)、白斑 (チロシナーゼ; Fishmanら (1997) *Cancer* 79:1461-1464)、水疱形成性皮膚病を有する個体由来の血清によって認識される450 kDヒト上皮自己抗原、および潰瘍性大腸炎 (染色体タンパク質HMG1およびHMG2; Sobajimaら (1997

) Clin. Exp. Immunol. 107:135-140) が挙げられる。

【0143】

2.9.3. アレルギーおよび喘息

本発明は、アレルギーを治療するのに有用な試薬を取得する方法も提供する。ある実施態様では、この方法は、アレルゲンをコードする実験的に生成されたポリヌクレオチドのライブラリーを作ること、およびアレルギーを治療するための免疫療法剤として使用したときに、改善された特性を示す実験的に生成されたポリヌクレオチドを同定するためにスクリーニングすることを含む。例えば、天然抗原を用いるアレルギーの特異的免疫療法は、マスト細胞上の高親和性IgE受容体の架橋によって開始され得るアナフィラキシーを誘導する危険がある。それ故、現存するIgEによって認識されないアレルゲンが望ましい。本発明の方法は、そのようなアレルゲン変異体を取得することができる方法を提供する。もう1つの目的とする改善された特性は、安全性および有効性が向上された、より広範囲の免疫応答の誘導である。

遺伝的ワクチンベクターおよび本発明の方法を用いて得られる他の試薬は、アレルギーおよび喘息の治療に使用できる。アレルギー性の免疫応答は、B細胞、T細胞、プロフェッショナル (professional) 抗原提示細胞 (APC)、好酸球およびマスト細胞の間の複雑な相互作用の結果である。これらの細胞は、免疫応答のモジュレーターとしてアレルギー性免疫応答に関与し、またアレルギー性応答の開始および維持に直接含まれる産生因子 (producing factors) にも含まれる。

ポリクローナルのアレルゲン特異的IgEの合成は、B細胞、T細胞およびプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) の間の複合的な相互作用を必要とする。

未経験の (naive) 初回抗原刺激を受けていないB細胞の活性化は、特異的なB細胞が細胞表面免疫グロブリン (sIg) によってアレルゲンを認識したときに開始される。しかしながら、B細胞のIgE分泌原形質細胞への分化には、溶解性であり、膜結合形態の活性化されたT細胞によって発現される共刺激分子が必要である。Tヘルパー細胞の活性化は、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞または初回抗原刺激を受けたB細胞などのAPCの原形質膜上のMHCクラスII分子との関係で (in the context of) 抗原性ペプチドの認識が必要である。プロフェッショナル

ルAPCは、抗原を効率的に捕獲でき、ゴルジ装置後の (post-Golgi) 、タンパク質分解性細胞内コンパートメント中でペプチド-MHCクラスII複合体が形成され、次いで、それらがT細胞受容体 (TCR) によって認識される場である、原形質膜に搬出される (Monaco (1995) J Leuk. Biol. 57:543-547) 。さらに、活性化されたB細胞は、CD28の逆 (counter) 受容体であり、T細胞活性化のための共刺激シグナルを与えてT細胞増殖およびサイトカイン合成をもたらすCD80 (B7-1) およびCD86 (B7-2、B70) を発現する (Bluestone (1995) Immunity 2:555-559) 。アトピー性個体由来のアレルゲン特異的T細胞は、一般に T_H2 細胞サブセットに属しているので、これらの細胞の活性化は、活性化されたTヘルパー細胞によって発現される膜結合共刺激分子と共に、IgE分泌原形質細胞へのB細胞分化を指令するIL-4およびIL-3の産生をも導く (de VriesおよびPunnonen, 体液性免疫のサイトカイン調節中：基礎的および臨床的局面 (Cytokine Regulation of Humoral Immunity: Basic and Clinical Aspects) , CM Snapper編集, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, p.195-215, 1996)) 。

マスト細胞および好酸球は、標的臓器のアレルギー症状を誘導する鍵となる細胞である。マスト細胞、好塩基球または好酸球上の高親和性IgE受容体に結合されたIgEによる特異的抗原の認識は、細胞の脱顆粒およびヒスタミン、プロスタグランジン類およびロイコトリエン類などの、アレルギー症状を引き起こすメディエーター分子の迅速な放出を導く受容体の架橋をもたらす。

アレルギー疾患の免疫療法は、現在のところ、患者に注射されるアレルゲンの用量を増加することによる脱感作治療を含む。これらの治療は、 T_H1 表現型に向かう免疫応答を歪曲 (skewing) させ、アレルゲンに特異的なIgG/IgE抗体の割合を増加させる。これらの患者は、循環するアレルゲンに特異的なIgE抗体を有しているので、これらの治療はアナフィラキシー反応の重大な危険性を含んでいる。

これらの反応では、遊離の循環するアレルゲンは、マスト細胞および好酸球上の高親和性IgE受容体に結合しているIgE分子によって認識される。アレルゲンの認識は、アレルギー症状、場合によってはアナフィラキシー反応を引き起こす、ヒスタミン、プロスタグランジン類、およびロイコトリエン類などのメディエー

ターの放出を導く受容体の架橋をもたらす。脱感作に関連する他の問題点は、効力が低いことおよびアレルゲン抽出物を再現可能に産生することが難しいことを含む。

遺伝的ワクチンは、すでに知られている脱感作療法の有用性を制限する問題を回避する手段を提供する。例えば、筋細胞などの細胞の表面の抗原を発現させることによって、アナフィラキシー反応の危険性が顕著に低下する。これは、アレルゲンの膜貫通形態をコードする遺伝的ワクチンベクターを用いることによって達成できる。アレルゲンが膜貫通形態で効率的に発現され、さらにアナフィラキシー反応の危険性を低下するように、アレルゲンを改質することもできる。脱感作のための遺伝的ワクチンの使用によって与えられるもう1つの利点は、遺伝的ワクチンが、さらに T_H1 表現型に向かう免疫応答を指令し、それによって産生されるIgE抗体の量を低下させ、治療の有効性を増加する、サイトカイン類およびアクセサリー分子類を含むことができることである。IgE応答を殆どまたは全く伴わずに、IgGおよびIgM応答を主に誘導するためにベクターを進化させることもできる。

さらに、確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合は、*in vivo*に既存の特異的IgEによって認識されず、しかし、アレルゲン特異的T細胞の効率的な活性化を誘導できるアレルゲンを産生するために使用できる。例えば、ファージディスプレイ選択法（phage display selection）を用いて、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）実験的に進化されたアレルゲンをファージ上に発現でき、かつ特異的IgE抗体によって認識されないもののみが選択される。これらは、さらに特異的T細胞の活性化を誘導するそれらの能力でスクリーニングされる。有効なT細胞応答は、特異的抗体結合の欠如によって示されるように、B細胞エピトープは改変されているが、T細胞エピトープが機能的に無傷であることを示す。

【0144】

これらの方法では、公知のアレルゲンをコードするポリヌクレオチド、またはそれらの相同体若しくは断片（例えば、免疫原性ペプチド）は、DNAワクチンベ

クター中に挿入され、アレルギーおよび喘息の個体を免疫するのに使用される。あるいは、（例えば、ポリヌクレオチド再集合および／またはポリヌクレオチド部位飽和突然変異誘発によって）実験的に進化されたアレルゲンは、大腸菌または酵母細胞などの製造細胞（manufacturing cells）中で発現され、次いで、精製され、患者の治療またはアレルギー疾患の予防に使用される。確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合は、T細胞を活性化するが、アナフィラキシー反応を誘導できない抗原を取得するために使用できる。例えば、アレルゲン変異体をコードする実験的に生成されたポリヌクレオチドのライブラリーは、アトピー性患者由来のPBMCまたはT細胞クローンと接触する、抗原提示細胞などの細胞中で発現され得る。アトピー性患者由来の、効率的にT_H細胞を活性化するそれらのライブラリーメンバーは、T細胞増殖をアッセイすることによって、またはサイトカイン合成（例えば、IL-2、IL-4、IFN- γ ）によって同定できる。次いで、in vitro試験では陽性であるそれらの組換えアレルゲン変異体を、in vivo試験に付すことができる。

治療できるアレルギーの例としては、これらに限定されないが、イエダニ、芝生（grass）花粉、カバノキ花粉、ブタクサ花粉、ハシバミ花粉、ゴキブリ、コメ、オリーブ花粉、真菌類、カラシナ、ハチ毒に対するアレルギーが挙げられる。

関心のある抗原としては、アレルゲン der p1 (Scobieら (1994) Biochem. Soc. Trans. 22:448S ; Ysselら (1992) J Immunol. 148:738-745)、der p2 (Chuaら (1996) Clin. Exp. Allergy 26:829-837)、der p3 (SmithおよびThomas (1996) Clin. Exp. Allergy 26:571-579)、der p5, der p V (Linら (1994) J Allergy Clin. Immunol. 94:989-996)、der p6 (BennettおよびThomas (1996) Clin. Exp. Allergy 26:1150-1154)、der p7 (Shenら (1995) Clin. Exp. Allergy 25:416-422)、der f2 (Yuukiら (1997) Int. Arch. Allergy Immunol. 112:44-48)、der f3 (Nishiyamaら (1995) FEBS Lett. 377:62-66)、der f7 (Shenら (1995) Clin. Exp. Allergy 25:1000-1006)、Mag 3 (Fujikawaら (1996) Mol. Immunol. 33:311-319) などを含むダニ（例えば、ヤケヒョウヒダニ (Dermatophagoides pteronyssinus)、ダーマトファゴイデスファリネ (Dermatophagoides f

arinae)、ブロミア・トロピカリス (*Blomia tropicalis*)) を含む動物のものが挙げられる。また、関心のある抗原としては、イエダニアレルゲン類Tyr p2 (Erikssonら (1998) *Eur. J Biochem.* 251:443-447)、Lep d 1 (Schmidtら (1995) *FEBS Lett.* 370:11-14)、およびグルタチオンS-トランスフェラーゼ (O'Neillら (1995) *Immunol Lett.* 48:103-107) ; グルタチオンS-トランスフェラーゼと相同性を有する25,589 Daの、219個のアミノ酸ペプチド (O'Neillら (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* 1219:521-528) ; Blo t 5 (Arrudaら (1995) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:456-457) ; ハチ毒ホスホリパーゼA2 (Carballidoら (1994) *J Allergy Clin. Immunol.* 93:758-767; Jutelら (1995) *J Immunol.* 154:4187-4194) ; ウシ真皮/皮あか抗原類BDA 11 (Rautiainenら (1995) *J. Invest. Dermatol.* 105:660-663) およびBDA20 (Mantyläら (1996) *J Allergy Clin. Immunol.* 97:1297-1303) ; ウマ主アレルゲン (major horse allergen) Equ c1 (Gregoireら (1996) *J Biol. Chem.* 271:32951-32959) ; ジャンパーアリ (Jumper ant) エム・ピロスラ (*M. pilosula*) アレルゲンMyr p 1およびその相同なアレルギー性ペプチド類Myr p2 (Donovanら (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39:877-885) ; ダニ、ブロミア・トロピカリスの1-13、14、16 kDのアレルゲン類 (Caraballoら (1996) *J Allergy Clin. Immunol.* 98:573-579) ; ゴキブリアレルゲン類Bla g Bd90K (Helmら (1996) *J Allergy Clin. Immunol.* 98:172-80) およびBla g 2 (Arrudaら (1995) *J Biol. Chem.* 270:19563-19568) ; ゴキブリCr-PIアレルゲン類 (Wuら (1996) *J Biol. Chem.* 271:17937-17943) ; ファイアアリ (fire ant) 毒液アレルゲンSol i 2 (Schmidtら (1996) *J Allergy Clin. Immunol.* 98:82-88) ; 昆虫、キロノムス・スミニ (*Chironomus thumini*) の主アレルゲンChi t 1-9 (Kippら (1996) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110:348-353) ; イヌアレルゲンCan f 1またはネコアレルゲンFel d 1 (Ingramら (1995) *J Allergy Clin. Immunol.* 96:449-456) ; 例えば、ウマ、イヌまたはネコから誘導されたアルブミン (Goubran Botrosら (1996) *Immunology* 88:340-347) ; 22 kD、25 kDまたは60 kDの分子質量を有するシカアレルゲン類 (Spitzauerら (1997) *Clin. Exp. Allergy* 27:196-200) ; およびウシの20 kDの主アレルゲン (Ylonenら (1994) *J Allergy Clin. Immunol.* 93:851-858) が挙げられる

。花粉および芝生アレルゲンは、ワクチン、特に本発明の方法による抗原の最適化後のワクチンにおいても有用である。そのようなアレルゲンとしては、例えば、Hor v9 (AstwoodおよびHill (1996) Gene 182:53-62)、Lig v 1 (Bataneroら (1996) Clin. Exp. Allergy 26:1401-1410) ; Lol p 1 (Mullerら (1996) Int. Arch. Allergy Immunol. 109:352-355)、Lol p II (Tamboriniら (1995) Mol. Immunol. 32:505-513)、Lol pVA、Lol pVB (Ongら (1995) Mol. Immunol. 32:295-302)、Lol p 9 (Blaherら (1996) J Allergy Clin. Immunol. 98:124-132) ; Par J I (Costaら (1994) FEBS Lett. 341:182-186 ; Sallustoら (1996) J Allergy Clin. Immunol. 97:627-237)、Par j 2.0101 (Duroら (1996) FEBS Lett. 399:295-298) ; Bet v1 (Faberら (1996) J Biol. Chem. 271:19243-19250)、Bet v2 (Rihsら (1994) Int. Arch. Allergy Immunol. 105:190-194) ; Dac g3 (Guerin-Marchandら (1996) Mol. Immunol. 33:797-806) ; Phl p 1 (Petersenら (1995) J Allergy Clin. Immunol. 95:987-994)、Phl p 5 (Mullerら (1996) Int. Arch. Allergy Immunol. 109:352-355) Phl p 6 (Petersenら (1995) Int. Arch. Allergy Immunol. 108:55-59) ; Cry j I (Soneら (1994) Biochem, Biophys. Res. Commun. 199:619-625)、Cry j II (Nambaら (1994) FEBS Lett. 353:124-128) ; Cor a 1 (Schenkら (1994) Eur. J Biochem. 224:717-722) ; cyn d 1 (Smithら (1996) J Allergy Clin. Immunol. 98:331-343)、cyn d 7 (Suphiogluら (1997) FEBS Lett. 402:167-172) ; Pha a 1およびPha a 5のアイソフォーム類 (isoforms) (SuphiogluおよびSingh (1995) Clin. Exp. Allergy 25:853-865) ; Cha o 1 (Suzukiら (1996) Mol. Immunol. 33:451-460) ; 例えば、オオアワガエリ (timothy grass) またはカバノキ花粉から誘導されたプロフィリン (Valentaら (1994) Biochem, Biophys. Res. Commun. 199:106-118) ; P0149 (Wuら (1996) Plant Mol. Biol. 32:1037-1042) ; Ory s1 (Xuら (1995) Gene 164:255-259) ; およびAmb a VおよびAmb t5 (Kimら (1996) Mol. Immunol. 33:873-880 ; Zhuら (1995) J Immunol. 155:5064-5073) が挙げられる。

【0145】

本発明の方法を用いて、食物アレルゲンに対するワクチンも開発できる。再集合（任意に、本明細書中に記載された他の定方向進化法との組み合わせで）のた

めに好適な抗原は、例えば、プロフィリン (Rihsら (1994) Int. Arch. Allergy Immunol. 105:190-194) ; α -アミラーゼ/トリプシン阻害剤遺伝子ファミリーに属するコメアレルギー性cDNA類 (Alvarezら (1995) Biochim Biophys Acta 1251:201-204) ; オリーブ主アレルゲン (main olive allergen) であるOle e I (Lombarderoら (1994) Clin Exp Allergy 24:765-770) ; カラシナ由来の主アレルゲンであるSin a 1 (Gonzalez De La Penaら (1996) Eur J Biochem. 237:827-832) ; サケの主アレルゲンであるパルブアルブミン (Lindstromら (1996) Scand. J Immunol. 44:335-344) ; 主アレルゲンMal d 1などのリンゴアレルゲン類 (Vanek-Krebitzら (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:538-551) ; およびAra h Iなどのピーナッツアレルゲン類 (Burksら (1995) J Clin. Invest. 96:1715-1721) が挙げられる。

本発明の方法は、真菌に対するアレルギーに有効な組換え抗原を開発するのにも使用できる。これらのワクチンに有用な真菌のアレルゲン類としては、これらに限定されないが、クラドスポリウム・ヘルバルム (*Cladosporium herbarum*) のアレルゲンであるCla h III (Zhangら (1995) J Immunol. 154:710-717) ; 担子菌プシロシーベ・キューベンシス (*Psilocybe cubensis*) 由来の真菌性サイクロフィリンである、アレルゲンPsi c 2 (Homerら (1995) Int. Arch. Allergy Immunol. 107:298-300) ; クラドスポリウム・ヘルバルムのcDNAライブラリーからクローン化されたhsp 70 (Zhangら (1996) Clin Exp Allergy 26:88-95) ; アオカビ (*Penicillium notatum*) の68 kDのアレルゲン (Shenら (1995) Clin. Exp. Allergy 26:350-356) ; アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) (Achatzら (1995) Mol Immunol. 32:213-227) ; エノラーゼ (Achatzら (1995) Mol. Immunol. 32:213-227) ; YCP4 (Id.) ; 酸性リボソームタンパク質P2 (Id.) を含む。

本発明の方法で使用する他のアレルゲンは、天然ゴムラテックス由来の主アレルゲン (Hev b 5) などのラテックスアレルゲン (Akasawaら (1996) J Biol. Chem. 271:25389-25393 ; Slaterら (1996) J Biol. Chem. 271:25394-25399) が挙げられる。

本発明は、アレルギーおよび喘息の治療剤としての遺伝的ワクチンのもう1つの欠点の解決法も提供する。遺伝的ワクチンは、まず、CD8⁺T細胞応答を誘導す

るが、アレルゲン特異的IgEの誘導は、CD4⁺T細胞およびそれらのB細胞に対する補助に依存する。T_H2型細胞は、IgアイソタイプのIgE合成への切り替えを指令する、高濃度のIL-4、IL-5およびIL-13を分泌するので、IgE合成の誘導に特に有効である。IL-5も、好酸球を誘導する。本発明の方法は、CD4⁺T細胞応答を効率的に誘導し、これらの細胞のT_H1表現型への分化を指令する遺伝的ワクチンを開発するのに使用できる。

本発明は、遺伝的ワクチンベクターによって放出された抗原の濃度を調節する方法も提供する。抗原用量の調節は、安全性のために、脱感作の開始時に極めて重要である（crucial）。最初は低い濃度の抗原を使用するのが好ましく、その抗原がその個体中で副作用を誘導しないという証拠が得られたら、抗原濃度を増加させる。本発明の確率論的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリングおよび断続合成）および非確率論的ポリヌクレオチド再集合法は、異なる（高いおよび低い）濃度の抗原の発現を誘導する遺伝的ワクチンベクターを産生させる。例えば、2以上の異なる進化されたプロモーターが、抗原発現に使用できる。あるいは、抗原遺伝子それ自身は、例えばコドン使用頻度を変えることによって異なる発現濃度に進化できる。異なる抗原発現濃度を誘導するベクターは、特異的モノクローナル抗体、およびセルソーティング（例えば、FACS）を使用してスクリーニングできる。

【0146】

2.9.4. 癌

免疫療法は癌の治療および転移の予防に関して大変有望である。癌細胞に対する免疫応答を誘発することにより、身体の免疫系が協力して癌の縮小または排除することができる（例えば、本発明の方法を用いて得られた改良抗原の使用）。本発明の方法により製造した遺伝的ワクチン、ならびに本明細書記載のアクセサリ分子は、現在利用可能な療法と比較して有効性がより高い癌の免疫療法を提供する。

癌の免疫療法の1つの試みとして、腫瘍細胞に特異的な抗原を包含もしくはコードする遺伝的ワクチンを用いる、または患者への精製組換え癌抗原の注射によるワクチン接種がある。本発明の方法は、公知の腫瘍特異的抗原に対する免疫応

答の増強作用(を示す抗原の取得)、および新規の防御抗原配列の探索に使用できる。本明細書に記載のように、最適化された抗原発現、プロセッシング、提示を示す遺伝的ワクチンが得られる。本発明の方法はまた、最適化されたサイトカイン、補助的刺激分子、および抗腫瘍性免疫応答の誘導に有効なその他のアクセサリ分子を得るため、ならびに最適の組み合わせに存在するこれらおよび他の成分を包含する遺伝的ワクチンおよびカクテルを得るために好適である。それぞれの特殊な癌に対して用いられるアプローチは一樣ではない。ホルモン感受性癌(例えば、乳癌および前立腺癌)の治療では、最適化されたホルモンアンタゴニストを得るために本発明の方法を使用できる。メラノーマを含む、免疫原性の高い腫瘍のためには、所望により腫瘍に対する免疫応答を増大させる遺伝的ワクチンベクター(組換え抗原)をスクリーニングできる。

これに対し、乳癌は比較的免疫原性が低く、かつ進行が遅いので、個々の治療はそれぞれの患者のために設計できる。転移の予防も遺伝的ワクチン設計の目標である。

腫瘍特異的抗原のうち(所望により、本明細書に記載の他の定方向進化法と組み合わせ)、本発明の抗原再集合法に使用できるものは：水疱性類天疱瘡抗原2、前立腺ムチン抗原(PMA)(BeckettおよびWright(1995) Int. J Cancer 62:703-710)、腫瘍関連Thomsen-Friedenreich抗原(Dahlenborgら、(1997) Int. J Cancer 70:63-71)、前立腺特異的抗原(PSA)(Dannullおよび Belldegrun(1997) Br. J Urol. 1:97-103)、乳癌および膀胱移行性細胞癌(TCC)の管腔上皮抗原(LEA.135)(Jonesら、(1997) Anticancer Res. 17:685-687)、癌関連血清抗原(CASA)および癌抗原125(CA125)(Kierkegaardら(1995) Gynecol. Oncol. 59:251-254)、上皮糖タンパク質40(EGP40)(Kievitら、(1997) Int. J Cancer 71:237-245)、扁平上皮細胞癌抗原(SCC)(Lozzaら、(1997) Anticancer Res. 17:525-529)、カテプシンE(Motaら、(1997) Ant. J Pathol. 150:1223-1229)、メラノーマ中のチロシナーゼ(Fishmanら、(1997) Cancer 79:1461-1464)、大脳cavemomasの細胞核抗原(PCNA)(Noteletら、(1997) Surg. Neurol. 47:364-370)、DF3/MUCI乳癌抗原(Apostolopoulosら、(1996) Immunol. Cell. Biol. 74:457-464; Pandeyら、(1995) Cancer Res. 55:4000-4003)、癌胎児性抗原(Paoneら、(1996) J Cancer Res. Clin. Oncol. 122:499-503;

Schlomら,(1996)Breast Cancer Res. Treat. 38:27-39)、腫瘍関連抗原CA19-9(TolliverおよびO'Brien(1997)South Med. J. 90:89-90; Tsurutaら(1997)Urol. Int. 58:20-24)、ヒトメラノーマ抗原MART-I/Melan-A27およびgp100(KawakamiおよびRosenberg(1997)Int. Rev. Immunol. 14:173-192; Zajacら,(1997)Int. J. Cancer 71:491-496)、TおよびTn 汎発性癌(CA)糖ペプチドエピトープ(Springer(1995)Crit. Rev. Oncog. 6:57-85)、乳頭状甲状腺癌における35kD腫瘍関連自己抗原(Lucasら,(1996)Anticancer Res. 16:2493-2496)、KH-I腺癌抗原(DeshpandeおよびDanishefsky(1997)Nature 387:164-166)、A60マイコバクテリア抗原(Maesら,(1996)J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122:296-300)、熱ショックタンパク質(HSPs)(BlachereおよびSrivastava(1995)Semin. Cancer Biol. 6:349-355)、ならびにMAGE、チロシナーゼ、melan-Aおよびgp75および突然変異型癌遺伝子産物(例えば、p53,ras、およびHER-2/neu(BuelerおよびMulligan(1996)Mol. Med.2:545-555; LewisおよびHoughton(1995)Semin. Cancer Biol.6:321-327; Theobaldら(1995)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:11993-11997)である。

【0147】

2.9.5. 寄生虫

本発明の方法により、寄生虫由来の抗原も最適化できる。限定されるものではないがこれらには、マンソン住血吸虫、ビルハルツ住血吸虫、または日本住血吸虫の住血吸虫消化管関連抗原CAA(循環陽極抗原)およびCCA(循環陰極抗原)(Deelderら(1996)Parasitology 112:21-35); 寄生虫であるマンソン住血吸虫由来の2つの異なる防御抗原からなる多抗原性ペプチド(MAP)(Ferruら(1997)Parasite Immunol. 19:1-11); リーシュマニア寄生虫表面分子(Lezama-Davila(1997)Arch. Med. Res. 28:47-53); L.loaの第3段階幼虫(L3)抗原(Akueら(1997)J Infect. Dis. 175:158-63); 地中海または熱帯タイレリア症を引き起こす種(Ta)の、30および32-kDaの主要メロゾイト表面抗原をコードするTams1-1およびTams1-2遺伝子(d'Oliveiraら(1996)Gene 172:33-39); 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面抗原1または2(al-Yamanら(1995)Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89:555-559; Beckら(1997)J Infect. Dis. 175:921-926; Rzepczykら(1997)Infect. Immun. 65:1098-1100); Plasmodium berghei由来のTヘルパーエピトープKQIRDSITEEWSに加え

て、同マラリア原虫由来(PPPNPND)2およびyoeliiマラリア原虫由来(QGPGAP)3QGの環状スポロゾイト(CS)タンパク質に基づくBエピトープ (Reedら(1997)Vaccine 15:482-488)；寄生虫の生活サイクルのスポロゾイトステージ(環状スポロゾイトタンパク質およびスポロゾイト表面タンパク質2)、肝臓ステージ(肝臓ステージ抗原1)、血液ステージ(メロゾイト表面タンパク質1、セリン反復抗原、および頂端膜タンパク質抗原1)、ならびに有性ステージ(25-kDa有性ステージ抗原)に由来するNYVAC-Pf7コード熱帯熱マラリア原虫抗原（一本鎖NYVACゲノムに挿入されNYVAC-Pf7を産生する）(Tineら(1996)Infect. Immun. 64:3833-3844)；熱帯熱マラリア原虫抗原Pfs230(Williamsonら(1996) Mol. Biochem. Parasitol. 78:161-169)；熱帯熱マラリア原虫頂端膜抗原(AMA-1)(Lalら(1996) Infect. Immun. 64:1054-1059)；熱帯熱マラリア原虫タンパク質Pfs28およびPfs25(DuffyおよびKaslow(1997) Infect. Immun. 65:1109-1113)；熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面タンパク質MSP1(Huiら(1996)Infect. Immun. 64:1502-1509)；マラリア抗原Pf332(Ahlborgら(1996) Immunology 88:630-635)；熱帯熱マラリア原虫赤血球膜タンパク質I(Baruchら(1995)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93:3497-3502；Baruchら(1995)Cell 82:77-87)；熱帯熱マラリア原虫メロゾイト表面抗原PfMSP-1(Eganら(1996)J Infect. Dis. 173:765-769)；熱帯熱マラリア原虫抗原SERA、EBA-175、RAP1およびRAP2(Riley(1997) J Pharm. Pharmacol. 49:21-27)；日本住血吸虫パラミオシン(Sj97)またはその断片(Yangら(1995) Biochem. Biophys. Res. Commun 212:1029-1039)；ならびに寄生虫中のHsp70(MarescaおよびKobayashi(1994) Experimentia 50:1067-1074)が含まれる。

【0148】

2.9.6. 避妊

本発明の方法により得られた最適化された抗原を含む遺伝的ワクチンは、避妊においても有用である。例えば、精子細胞に特異的な抗原をコードする遺伝的ワクチンが得られ、これにより抗精子免疫応答を誘発する。例えば、精子抗原を発現するサルモネラ菌のような組換え菌株の投与、ならびにヒト絨毛膜ゴナドトロピン(hCG)またはその断片をコードするDNAワクチンの接種による抗hCG抗体の中和の誘導によりワクチン接種が達成できる。

遺伝的ワクチン中で使用できる精子抗原には、例えば乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH-4)、ガラクトシルトランスフェラーゼ(GT)、SP-10、ウサギ精子自己抗原(RSA)、モルモット(g)PH-20、切断シグナルタンパク質(CS-1)、HSA-63、ヒト(h)PH-20およびAgX-1(ZhuおよびNaz(1994)Arch. Androl. 33:141-144)、合成精子ペプチド、P10G(0'Randら(1993) J Reprod. Immunol. 25:89-102)、精子の135kD、95kD、65kD、47kD、41kDおよび23kDのタンパク質、およびFA-1抗原(Nazら(1995)Arch. Androl. 35:225-231)、およびサイトケラチン1の35kD断片(Lucasら(1996)Anticancer Res. 16:2493-2496)が含まれる。

本発明の方法はまた、精巣で特異的に発現される遺伝的ワクチンを得るために使用できる。例えば、精巣に特異的な遺伝子の発現を指令するポリヌクレオチド配列を使用できる(例えば、受精抗原-1など)。精子抗原に加え、卵母細胞上に発現された抗原または生殖調節ホルモンが、避妊ワクチンの有用な標的となり得る。例えば、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、または透明帯タンパク質に対する抗体を生成するために遺伝的ワクチンを使用できる(Millerら(1997) Vaccine 15:1858-1862)。これらの分子を用いるワクチン接種は、動物モデルにおいても有効であることが示されてきた(Millerら(1997) Vaccine 15:1858-1862)。遺伝的避妊ワクチンの有用な成分のもう1つの例は、卵巣の透明帯の糖タンパク質ZP3である(Tungら(1994) Reprod Fertil. Dev. 6:349-355)。

【0149】

2.10. マラリア抗原およびワクチン

本発明は全般的に熱帯熱マラリア原虫の赤血球膜タンパク質1("PfEMP1")、PfEMP1をコードする核酸、およびPfEMP1を特異的に認識する抗体に関する。該ポリペプチド、抗体および核酸は、ワクチン接種を含む治療、予防、診断およびスクリーニングへの適用を含む種々の適用において有用である。

本明細書に記載のデータは、ともに熱帯熱マラリア原虫の特異的な毒性および病因の中核である、抗原性の変異とPE上の受容体の性質の双方にPfEMP1が関与していることを示す。本明細書に記載のように熱帯熱マラリア原虫の生態学における、微小血管の内皮上の宿主タンパク質に対するマラリア粘着性受容体としてのPfEMP1の主要な役割は、予防薬の設計において、また急性大脳マラリアにおける

PE粘着性を消失させる治療の標的としても、マラリアワクチンにおけるその有用性を示す(Howardおよび Gilladoga,1989)。

【0150】

2.10.1. マラリアポリペプチド

可溶性のPfEMP1は、CD36、TSPおよびICAM-1に結合することが報告されており、PE表面から切断されたPfEMP1のトリプシン断片は、TSPまたはCD36に結合することが示されている(Baruchら, Molecular Parasitology Meeting at Woods Hole, Sept 18-22,1994)。従って、1つの態様において、本発明は実質的に純粋なPfEMP1ポリペプチド、その類似体または生物学的に活性な断片を提供する。

「実質的に純粋な」または「単離された」という表現は相互に置き換えることができるが、それらが天然で結合しているタンパク質または他の混在物から分離されたタンパク質、ポリペプチドおよび核酸についていう。タンパク質またはポリペプチドは、該タンパク質を含む組成物の総タンパク含量の約50%以上、および典型的には総タンパク質含量の約60%以上を該タンパク質が占める場合に、実質的に純粋であるとみなされる。より典型的には、実質的に純粋なタンパク質は総タンパク質の約75～約90%を占める。該タンパク質は約90%以上を占めることが好ましく、より好ましくは、組成物中の総タンパク質の約95%以上を占める。

本明細書において用語、「生物学的に活性な断片」とは、その部分が特定の生物学的活性、例えば全長PfEMP1ポリペプチドに認められる1以上の活性を有する、例えばPfEMP1由来のポリペプチドのような、タンパク質またはポリペプチドの1部分を表す。例えば、かかる生物学的活性には、特定のタンパク質、基質、またはリガンドへの結合能力、PE、PfEMP1、その組換えタンパク質または断片と反応性の抗体を生起する能力、2つのタンパク質間、酵素とその基質間、エピトープと抗体間の相互作用を遮断、逆行もしくは別の方法によって阻害する能力、または特定の触媒活性も含まれ得る。本発明のポリペプチドに関しては、特に好ましいポリペプチドまたは生物学的に活性な断片として、例えばCD36、TSP、ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1、コンドロイチン硫酸などのPfEMP1のリガンドに結合する能力、またはPfEMP1と1以上のそのリガンドとの結合を阻害する能力またはポリペプチド断片中のかかる断片に対する抗体を生ぜしめる抗原決定基の存在により結

合を阻害する能力のような、1以上の前記の生物学的活性を有するポリペプチドが挙げられる。

本発明のポリペプチドはまた、PfEMP1タンパク質またはポリペプチドに対して生じた抗体に対するそれらの免疫応答性により特徴づけられ得る。特に好ましい態様において、該ポリペプチドはPfEMP1タンパク質とPfEMP1タンパク質に対して生じた抗体間の相互作用を阻害できる。それに加えて、または選択的に、該断片はPfEMP1タンパク質に対して生じた抗体に対して特異的な免疫応答性を有し得る。また該断片を、本明細書において「免疫学的に活性な断片」と表す。一般に、これらの生物学的に活性な断片の長さは約5～約500アミノ酸である。

典型的には、これらのペプチドの長さは約20～約250アミノ酸であり、好ましくは約50～約200アミノ酸である。

一般に断片の長さは、幾分かは特定のペプチドを用いようとする適用に依存してもよい。例えば抗体を産生させる場合には、該ペプチドは短めの長さ、例えば約5～約50アミノ酸の長さでもよく、一方結合させる場合には、該ペプチドは長めの長さ、例えば約50～約500アミノ酸の長さ、好ましくは約100～約250アミノ酸の長さでもよく、より好ましくは約100～約200アミノ酸の長さでもよい。

本発明のポリペプチドは一般に、当技術分野で十分公知の組換え法または合成法により製造してもよい。組換え技術は一般にSambrookら, Molecular Cloning : A Laboratory Manual. (第2版)第1-3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)に記載されている。ポリペプチドの合成に関する技術は一般にMerrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2456(1963), Athertonら, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press(1989), およびMerrifield, Science 232:341-347(1986)に記載されている。

【0151】

好ましい態様において、以下により詳細に記載するように、本発明の核酸をトランスフェクトされた好適な宿主細胞により、本発明のポリペプチドを発現させてもよい。一般に当技術分野に十分公知の方法により、本発明のポリペプチドの単離および精製を実施できる。例えば、所望の純度を得るために、例えばイオン交換、疎水性相互作用、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーのような

容易に利用可能なクロマトグラフィー法により該ポリペプチドを精製してもよい。アフィニティークロマトグラフィーは、研究者が所望のペプチドの特異的生物学的活性、例えば、リガンド結合、抗原決定基の存在などを利用できるため、特に魅力的である。

本発明の典型的なポリペプチドは、一般に、PfEMP1タンパク質のアミノ酸配列と実質的に相同なアミノ酸配列、もしくはそれらの生物学的に活性な断片を含んでなるか、または相同な構造をとる配列を含んでよい。特に好ましい態様においては、本発明のポリペプチドは本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)アミノ酸配列と実質的に相同なアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性な断片を含んでなる。

「実質的に相同である」とは、PfEMP1のアミノ酸配列またはその生物学的に活性な断片と少なくとも約50%の相同性を有するアミノ酸配列を意味し、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%の相同性を有する。ある態様においては、実質的に相同であるとは、少なくとも50%が相同である配列を含んでよいが、それは相同な三次元構造を有する、すなわち実質的に類似した表面電荷または疎水性基の提示を含む。

好ましいポリペプチドの例には、本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)MC PfEMP1アミノ酸配列、および本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)他の熱帯熱マラリア原虫系統のPfEMP1アミノ酸配列と実質的に相同なアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにこれらのポリペプチドの生物学的に活性な断片を含む。好ましいペプチドは、寄生された赤血球の隔絶(sequestration)に関与するPfEMP1のペプチド断片を含む。これらの好ましいペプチドの例には、本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)PfEMP1のアミノ酸配列576から755と実質的に相同なアミノ酸配列を含んでなるペプチドが含まれる。

また、本発明の特に好ましいペプチドは、熱帯熱マラリア原虫の変異体系統間で比較的保存され、または他の系統由来でPfEMP1と高度に相同性の領域を包含するPfEMP1ペプチドおよびペプチド断片である。「比較的保存された」とは、一般

に本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)アミノ酸配列の一部分と実質的に相同なアミノ酸配列を表す。しかしながら、この用語の定義には、プライマープローブおよび特に、PfEMP1核酸配列由来の万能プライマーのPCR産物である核酸によりコードされたペプチドも含まれる。特に、プライマーは本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)核酸配列由来のプローブであり、他の系統の熱帯熱マラリア原虫由来の核酸を増幅するために用いてよい。特に好ましいプライマー配列には、以下の表1に示したプライマー配列が含まれる。同様に、表1に示し以下にその詳細を記載する万能プライマー組成物も、本発明のペプチドをコードする配列を増幅するために用いてよい。

比較的保存されたペプチドの特定の例には、本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)MC PfEMP1のアミノ酸配列の、576から755アミノ酸に相当するPfEMP1タンパク質の領域に含まれるペプチドが包含される。

【0152】

多くの熱帯熱マラリア原虫系統において類似の領域が詳細に解明されてきている(本明細書に記載)。一般にこれらに相当する領域は、以下に記載する万能プライマー配列によりコードされるアミノ酸配列を包含していると記載してよい。一般に、これらのアミノ酸配列は1以上の以下に示す一般構造を有する：

TTIDKX₁LX₂HEおよび／またはFFWX₃WVX₄X₅ML

(式中X₁はロイシンまたはイソロイシンから、X₂はグルタミンおよびアスパラギンから、X₃はメチオニン、リシンおよびアスパラギン酸から、X₄はヒスチジン、トレアニンおよびチロシンから、ならびにX₅はアスパラギン酸、グルタミン酸およびヒスチジンから選択される)。特に好ましい態様において、該ポリペプチドは前記の一般的なアミノ酸配列の双方を含んでよい。特に好ましいアミノ酸配列は、本明細書で例示、記載および／または参照された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)種々の断片中に示される、保存的アミノ酸配列を有するであろう。特に、多様な熱帯熱マラリア原虫系統と交差反応する抗体の産生のためのエピトープとして、本明細書で例示、記載および／または参照された(参照に

より本明細書に組み入れたものを含む)6アミノ酸またはそれ以上の保存的アミノ酸配列を用いてよい。

本発明のペプチドは、遊離または連結されているか、または該ポリペプチドの存在を検出するための標識基を包含していてもよい。好適な標識としては、当技術分野で十分公知であり、実質的に本明細書中で記載された、例えばシグナル酵素、化学的レポーター基、ポリペプチドシグナル、ビオチンなどの放射性、蛍光および触媒標識基が含まれる。これに加えて該ペプチドは、例えばアシル化N末端またはアミド化C末端のような、ペプチドのNおよびC末端の修飾を有していてもよい。

前記のポリペプチドのアミノ酸変異体も本発明に包含される。これらの変異体には、挿入、欠損および他のアミノ酸との置換が含まれてよい。例えば、ある態様においてアミノ酸は例えば総電荷、疎水性など類似の構造的特徴を有する異なるアミノ酸と置換されてよい。例えば、フェニルアラニンは同じ疎水性残基としてチロシンと置換してよい。グリコシル化修飾の量的増加または減少どちらかの変化、ならびに他の配列修飾もまた意図される。

天然のアミノ酸のみからなる前記のポリペプチドに加えて、本発明のポリペプチドのペプチド模倣体もまた提供される。製薬産業において、ペプチド類似体もまた、それらの鑄型ペプチドと類似の特性を有する非ペプチド薬として一般的に使用される。これらのタイプの非ペプチド化合物は「ペプチド模倣体」と称され (Fauchere, J. (1986) Adv. Drug Res. 15:29; Veber および Freidinger (1985) TINS p.392; および Evans ら (1987) J. Med. Chem 30:1229)、通常コンピューター化された分子モデリングを用いて開発される。治療上有用なペプチドと構造的に類似しているペプチド模倣体を、同等の治療効果または予防効果を得るために使用し得る。一般に、ペプチド模倣体は、天然に存在する受容体結合ポリペプチドなどの範例ペプチド(すなわち生物学的または薬理学的活性を有するポリペプチド)と構造上類似するが、所望によって当技術分野で十分公知の方法により、 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (シスおよびトランス)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、および $-\text{CH}_2\text{SO}-$ からなる群より選択される結合で置換し得る1以上のペプチド結合を有し、以下の参考文献にさらに記載されている: Spatola, A.F. Chemistry

and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p.267(1983); Spatola, A.F., Vega Data(March 1983), Vol.1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications"(一般総論); Morley, J.S., Trends Pharm Sci (1980)pp463-468(一般総論); Hudson, D.ら, Int J Pept Prot Res(1979)14:177-185($-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$); Spatola, A.F.ら Life Sci (1986)38:1243-1249($-\text{CH}_2\text{S}-$); Hann, M.M., J Chem Soc Perkin Trans I (1982)307-314($-\text{CH}-\text{CH}-$ シスおよびトランス); Almquist, R.G.ら J Med Chem(1980)23:1392-1398($-\text{COCH}_2-$); Jennings-White, C.ら Tetrahedron Lett(1982)23:2533($-\text{COCH}_2-$); Szelke, M.ら European Appln. EP 45665(1982)CA:97:39405(1982)($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$); Holladay, M.W.ら Tetrahedron Lett(1983)24:4401-4404($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$); および Hruby, V.J., Life Sci(1982)31:189-199($-\text{CH}_2\text{S}-$)。ペプチド模倣体は、ポリペプチドの実施形態において、例えばより経済的な生産、化学的安定性の向上、薬理的性質の増大(半減期、吸収、効力、有効性など)、特異性の変化(例えば、広範囲の生物学的活性)、抗原性の低下などを含む重要な利点を有し得る。

【0153】

ペプチド模倣体の標識は通常、1以上の標識の、定量構造-活性データおよび/または分子モデリングにより推定されたペプチド模倣体の非干渉位置との直接的またはスペーサー(例えばアミド基)を介した共有結合を伴う。一般にこの非干渉位置はペプチド模倣体が結合して治療効果を発揮する分子(例えばCD36)とは直接接触を持たない位置である。ペプチド模倣体の誘導体化(例えば標識)は、該ペプチド模倣体の所望の生物学的または薬理的活性を実質的に妨げるべきではない。一般に、本発明のペプチド模倣体はそれらのリガンド(例えばCD36)と高い親和性で結合し、検出可能な生物学的活性を有する(すなわち、リガンドが媒介する1以上の表現型の変化に対して作動性または拮抗性である)。

より安定なペプチドを製造するために、共通配列の1以上のアミノ酸と、同タイプのD-アミノ酸との系統的な置換(例えば、L-リシンに代わってD-リシン)を行ってよい。これに加えて、当技術分野で公知の方法により(RizoおよびGierasch(1992)Ann. Rev. Biochem. 61:387; 例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド)

イド架橋を形成できる内部システイン残基を加えることにより)、共通配列または実質的に同一な共通配列変異体を含んでなる強制的なペプチドを製造してもよい。

本発明のポリペプチドはまた、PfEMP1またはその断片に対して生じた抗体に結合する能力により特徴付けられ得る。これらの抗体は、多数の熱帯熱マラリア原虫の変異体由来のPfEMP1タンパク質に相同なポリペプチドドメインを認識するのが好ましい。これら相同性ドメインは、一般にPfEMP1タンパク質ファミリーにわたって存在する。特定のタンパク質またはドメインと特異的に免疫応答する抗体を選択するために、種々の免疫アッセイ法を使用し得る。例えば、タンパク質と特異的に免疫応答するモノクローナル抗体を選択するためには、固相ELISA免疫アッセイが日常的に用いられる。特異的な免疫応答性の測定に使用できる免疫アッセイ法と条件に関する記載については、HarlowおよびLane(1988)Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照されたい。PfEMP1およびその断片に対する抗体に関しては、以下でより詳しく検討する。本明細書で「ポリペプチド」または「ペプチド」とは、相互に置換可能に使用され、前記のペプチド、ペプチド模倣体、類似体などを表す。

本発明のポリペプチドはまた、単離されたポリペプチドとして使用してよく、または融合タンパク質として存在してもよい。「融合タンパク質」とは一般に、通常は単一タンパク質としてはともに融合されることのない、2以上の分離した、異種のタンパク質から生成された複合タンパク質を表す。

このように、融合タンパク質は、通常はともに融合しない2以上の異種または相同配列の融合を含んでなる。一般に融合タンパク質は組換え核酸法により（すなわちPfEMP1タンパク質を含んでなるポリペプチドをコードするセグメントと、1以上の異種タンパク質をコードするセグメントを含んでなる遺伝子融合の転写および翻訳の結果として）、または当技術分野で十分公知の化学的合成法のいずれかにより作製される。

【0154】

2.10.2. 同じ発現をする能力のあるマラリアの核酸および細胞

本発明はまた、前記のポリペプチドおよび生物学的に活性な断片をコードする

単離された核酸配列を提供する。典型的には、かかる核酸配列は、本明細書で例示、記載および／または引用された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)核酸配列の部分もしくは断片と実質的に相同なセグメントを含みうる。好ましくは、本発明の核酸はヌクレオチド配列由来の、少なくとも約15個の連続する核酸のヌクレオチドを含んでなり、より好ましくは少なくとも約20個の隣接ヌクレオチド、さらにより好ましくは、少なくとも約30個の隣接ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも約50個の隣接ヌクレオチドを含んでなる。

核酸という記載において実質的相同性とは、セグメントまたはそれらの相補鎖を比較した場合、適切なヌクレオチド挿入または欠失を伴って適当に並べた際に、少なくとも約60%のヌクレオチド、典型的には少なくとも約70%、より典型的には少なくとも約80%、通常は少なくとも約90%、およびより通常には少なくとも約95%～約98%のヌクレオチドが同一である。あるいは、該セグメントが、典型的にPfEMP1核酸配列由来の少なくとも約15個の隣接したヌクレオチド配列を用いて、選択的ハイブリダイゼーション条件下で1本鎖またはその相補体にハイブリダイズした場合に実質的相同性が存在する。しかしながら、通常、より大きいセグメントが好ましく、例えば少なくとも約20個の隣接したヌクレオチド、より一般的には約40個の隣接ヌクレオチド、そして約50個以上の隣接ヌクレオチドが好ましい。特異性の全体的な欠如よりも高い選択性のハイブリダイゼーションが起こった場合に選択的ハイブリダイゼーションとなる。Kanchisa, Nucleic Acid Res.12:203-213(1984)を参照のこと。

本発明の核酸には、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合成型および混合されたポリマー、センスおよびアンチセンス鎖の双方が含まれる。さらに、それぞれのイソ型の種々の対立遺伝子も含まれる。本発明はまた、天然には存在しない組換え核酸を提供する。本発明に含まれる核酸は典型的には、RNAもしくはDNAまたは混合されたポリマーを含む。このDNA組成は一般に、PfEMP1タンパク質のアミノ酸配列と実質的に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、コード領域を含む。より好ましいのは、PfEMP1タンパク質のCD36結合フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含んでなるDNAセグメントである。

本発明のポリペプチドまたはその断片をコードするcDNAは、本発明のPfEMP1ポ

リペプチドをコードする遺伝子を得るために有用なプローブとして容易に使用され得る。一般に公知の方法により、これらのプローブの製造を行いうる。例えば、PfEMP1タンパク質のアミノ酸配列からcDNAプローブを製造しうる。特に、比較的小さい数の縮重を有するアミノ酸配列のセグメントに基づいて、すなわち該セグメントをコードする、2,3または1個の可能性のある核酸配列を製造すればよい。

次いで、例えば、BeaucageおよびCarruthers, Tetra. Letts.22:1859-1862(1981)により記載されたホスホルアミダイト法により、好適な合成DNA断片を製造してもよい。あるいは、種々の熱帯熱マラリア原虫系のPfEMP1コード配列の中で、比較的保存されたヌクレオチド配列は好適なプローブとして使用できる。次いで、相補鎖を合成するかその鎖を適当な条件下でハイブリダイズさせることにより、あるいはDNAポリメラーゼを用いて適当なプライマー配列に相補鎖を付加することにより、2本鎖プローブが得られる。かかるcDNAプローブは、例えば、公知のPCR法を用いて、かかる遺伝子のスクリーニングおよびクローニングのための、オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマーの設計に使用してもよく、またあるいは、細胞中のPfEMP1遺伝子の存在の有無を検出するために用いてもよい。かかる核酸または断片は、本発明のポリペプチドをコードするcDNA配列の一部または全部を含んでなっておりよい。有効なcDNAプローブは、cDNA配列中に15個位の少ない連続するヌクレオチドを含むが、しばしばより長いセグメントを含みうる。さらに、これらのプローブは、クローニングのための転写プライマー配列、または相補配列の同定と限局化を容易にするための検出基のような、付加的なヌクレオチド配列を更に含んでもよい。

【0155】

新規な対立遺伝子または関連配列に関して、前記のプローブを用いて種々のタイプのcDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングしてよい。通常、cDNAライブラリーの選択は、所望のポリペプチドのmRNAが豊富な組織源に相当する。通常、例えばgt11といったファージライブラリーが好ましいが、プラスミドまたはYACライブラリーも用いてもよい。ライブラリーのクローンをプレート上にまい、スクリーニングのために基質へ移し、変性させて所望の配列の存在を探す。

関連する態様において、本発明の核酸は前記のプライマープローブを用いて産生されたPCR産物またはRT-PCR産物も含む。例えば、本明細書で例示、記載および／または引用された(参照により本明細書に組み入れたものを含む)ヌクレオチド配列由来のプライマープローブを、種々のマラリア寄生虫、特に熱帯熱マラリア原虫の異種系統由来の配列の増幅に用いてもよい。

本発明の核酸は、完全な細胞中、細胞溶解物中、あるいは部分的に純粋もしくはは実質的に純粋または単離された形態で存在しうる。これらの核酸の「実質的に純粋」または「単離された」形態とは、一般に、例えば脂質、タンパク質および他の核酸などの通常結合している不純物から分離された核酸を意味する。本発明の核酸は約50%以上の純度である。典型的には、該核酸は約60%以上の純度、より典型的には約75%～約90%の純度であり、好ましくは約95%～約98%の純度である。

本発明はまた、実質的に類似する核酸配列、対立遺伝子変異体、および前記核酸の天然または誘導配列、ならびに例えば、修飾されたヌクレオチド塩基を組み込んだ核酸または標識基を組み込んだ核酸のような、化学的に修飾および置換された核酸を提供する。PfEMP1タンパク質またはその断片をコードするセグメントに加え、本発明の核酸はまた、異種タンパク質をコードするセグメントを含み、それにより、その遺伝子が発現して実質的に前述したように2つのタンパク質が融合タンパク質として産生される。

プローブとしての使用に加えて、本発明の核酸は前記のように本発明のポリペプチドの製造にも使用できる。本発明のポリペプチドをコードするDNAは、*in vitro*細胞培養物に導入され、発現する能力のあるDNA構築体に組み込まれるのが典型である。しばしば、本発明の核酸は好適な組換え宿主細胞の産生にも使用され得る。

具体的には、DNA構築体は、例えば大腸菌、ウイルスまたは酵母などの細菌のような単一細胞宿主における複製に好適であるが、哺乳動物、植物、昆虫または他の真核細胞系の培養物への導入も意図してよい。細菌または酵母への導入用に製造されたDNA構築体は、典型的には宿主により認識される複製系、所望のポリペプチドをコードする意図されたDNAセグメント、ポリペプチドをコードするセグメントに機能しうる形で連結された転写、翻訳の開始および終結調節配列を含

む。DNAセグメントは、別のDNAセグメントとともに機能的関係に置かれた場合に、作動可能なように連結される。例えば、プロモーターまたはエンハンサーが配列の転写を刺激する場合に、コード配列に機能しうる形で連結される；シグナル配列のDNAは、ポリペプチドの分泌にあずかるプレタンパク質として発現される場合に、ポリペプチドをコードするDNAに機能しうる形で連結される。一般に、機能しうる形で連結されるDNA配列は隣接しており、シグナル配列の場合は隣接し、かつリーディングフェーズ（reading phase）にある。しかしながら、エンハンサーは、それが転写を制御するコード配列と隣接している必要はない。連結は、都合のよい制限部位、またはそれらの代わりに挿入されたアダプターもしくはリンカーにおける連結により行われる。適当なプロモーター配列の選択は一般に、DNAセグメントの発現のために選択された宿主細胞に依存する。

【0156】

好適なプロモーター配列の例としては、当技術分野に公知の原核生物および真核生物のプロモーターが含まれる。例えばSambrookら、前記を参照のこと。転写調節配列は典型的には、宿主により認識される異種エンハンサーまたはプロモーターを含む。適当なプロモーターの選択は宿主に依存するが、trp、lacおよびファージプロモーター、tRNAプロモーターおよび解糖酵素プロモーターのようなプロモーターが公知であり利用できる。Sambrookら、前記を参照のこと。

PfEMP1ポリペプチドをコードするセグメントのための挿入部位とともに複製系および転写、翻訳調節配列を包含する、便宜に利用できる発現ベクターを使用すればよい。実施可能な細胞系の組み合わせおよび発現ベクターの例としては、Sambrookら、前記およびMetzgerら、Nature 334:31-36（1988）に記載されている。

用いる宿主のタイプにより変化する公知の方法により、例えばPfEMP1タンパク質またはその断片を含むポリペプチドをコードする、目的のDNAセグメントを含むベクターを宿主細胞に導入できる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞に一般的に用いられるが、他の宿主に対してはリン酸カルシウム処理が用いられる。Sambrookら、前記を参照のこと。本明細書において用いられる「形質転換細胞」という用語は、最初に形質転換された細胞の子孫細胞も含

む。

本発明のポリペプチドをコードする核酸の操作技術、すなわち核酸の発現ベクター中へのサブクローニング、プローブ標識、DNAハイブリダイゼーションなどは一般にSambrookら（前記）に記載されている。組換え法において、一般に本発明のペプチドをコードする核酸は、最初に発現ベクター中への連結に好適な形態でクローン化または単離される。連結後、該核酸断片またはインサートを含むベクターを、好適な宿主細胞へ導入し、本発明のポリペプチドを発現させる。次いでポリペプチドを宿主細胞から精製または単離する。オリゴヌクレオチドの合成製造法は一般にGait, *Oligonucleotide Synthesis; A Practical Approach*, IRL Press(1990)に記載されている。

本発明のポリペプチドをコードする核酸の単離法は様々なものがある。典型的には、所望のDNA中の配列に特異的な標識オリゴヌクレオチドプローブを用いてゲノムまたはcDNAライブラリーからDNAを単離する。これらのタンパク質の結合ドメインをコードするDNAの単離には、適当な遺伝子を包含するゲノムDNAまたはcDNAの制限エンドヌクレアーゼによる消化を用いることができる。示されるPfEMP1配列(本明細書に記載)から、所望の領域のDNAを切断、すなわちPfEMP1タンパク質の生物学的に活性な断片をコードするセグメントを得るための制限エンドヌクレアーゼのパネルが構築できる。制限エンドヌクレアーゼによる消化の後、例えばサザンブロット法における核酸プローブでハイブリダイズする能力により、本発明のポリペプチドをコードするDNAを同定する。次いでこれらの領域を標準法により単離する。例えばSambrookら、前記を参照のこと。

ポリメラーゼ連鎖反応、すなわち「PCR」も、本発明のポリペプチドをコードする核酸の製造に使用してよい。所望の核酸の核酸配列、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを、mRNA、cDNAまたはゲノムもしくはcDNAライブラリーから直接的に増幅するにはPCR技術が使用される。

本明細書記載の核酸を増幅するための適当なプライマーおよびプローブは、本明細書および表1において例示、記載および／または引用された（参照として本明細書に組み入れたものも含む）、PfEMP1オリゴヌクレオチド配列の分析から作出してもよい。簡単に述べると、増幅すべきDNA領域の、2つの31境界に相補的な

オリゴヌクレオチドプライマーを合成する。次いで2つのプライマーを用いてPCRを行う。PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J.および White, T.編)Academic Press(1990)を参照のこと。PfEMP1オリゴヌクレオチド配列から種々の大きさのセグメントを増幅するためにプライマーを選択できる。該プライマーはまた、プライマー上に存在する制限部位を用いる、適当な発現ベクター中へのインサートの「フレーム内」クローニングを可能にするために制限部位および付加的な塩基を含んでもよい。

【0157】

2.10.3. 抗体

本発明の核酸およびポリペプチド、またはその断片は、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体の産生においても有用である。これらの抗体は、本発明のポリペプチドもしくはその断片、または本発明の核酸を単独もしくは付属物とともに含むプラスミドDNAを用いて、例えばラット、マウス、ウサギまたはヤギなどの適当な脊椎動物宿主を免疫して産生させる。通常、2回以上の免疫が必要で、最後の注射から2、3日後に宿主の血液または脾臓を採取する。

ポリクローナル抗体産生のためには、典型的にはマウスまたはウサギであるが、ヤギ、ヒツジ、ウシ、モルモット、サルおよびラットも含まれる適当な標的免疫系を選択する。実質的に精製された抗原またはプラスミドを、動物に適当な方法により所定の様式で免疫系に投与する。これらおよび他のパラメーターは免疫学者に公知である。典型的にはフットパッド、筋肉内、皮内または腹腔内に注射する。宿主により産生された免疫グロブリンを、アフィニティー精製を含む常法により沈降、単離および精製しうる。

モノクローナル抗体に関しては、適当な動物を選択して所望の免疫プロトコルに従う。適当な期間の後、これらの動物の脾臓を摘出し、適当な選択条件下で個々の脾臓細胞を、典型的には不朽化した骨髓腫細胞と融合させる。その後、該細胞をクローンとして分離し、所望の抗原領域に特異的な適当な抗体産生に関して、各クローンの上清を試験する。抗体産生技術は、当技術分野に公知である。例えば、Godingら, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice(第2版)Acad. Press, N.Y., および Harlow および Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Col

d Spring Harbor Laboratory, New York(1988)を参照のこと。他の好適な方法には、リンパ球をin vitroで抗原ポリペプチドに曝露する方法、または別法としてファージもしくは類似のベクター中の抗体ライブラリーの選択が含まれる。Huseら, Generation of Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda, Science 246:1275-1281(1989)。 10^8 リットル／モルの親和性、好ましくは $10^9 \sim 10^{10}$ もしくはそれ以上の親和性を有するモノクローナル抗体がこれらの方法により産生される。

生成された抗体は、診断、治療、またはマラリア感染症および特に熱帯熱マラリア原虫感染症の種々の態様のメカニズムのさらなる解明のための研究において、例えばイムノアッセイにおけるプローブとして、PfEMP1のリガンド結合の阻害、それによる赤血球の壊死巣分離の阻害または低減といった多くの目的に使用できる。本発明の抗体は、修飾でも非修飾でも使用できる。しばしば、検出可能なシグナルを供する物質を共有結合または非共有結合で結合させて該抗体を標識する。かかる標識には、本発明のポリペプチドに関して既に記載された標識のような、当技術分野に公知のものが含まれる。それに加えて、本発明の抗体は、それらの可能性のある抗原性を低下させるために、それらの標的に対する親和性を損なうことなく、キメラ、ヒト様またはヒト化されたものであってもよい。キメラ、ヒト様、ヒト化抗体は一般に当技術分野で記載されている。一般に、かかるキメラ、ヒト様またはヒト化抗体は、例えば哺乳類動物、すなわちマウス由来の相補性決定領域(CDR)(ヒト化抗体)、およびヒトフレームワーク領域のような可変領域を含む。ハイブリッド抗体中にできるだけ小さな外来配列を組み込むことにより、抗原性が低下する。これらのハイブリッド抗体の製造は、当技術分野に公知の方法により行うことができる。

好ましい抗体は、本発明のポリペプチドおよびその免疫学的に活性な断片と特異的に免疫反応する。本発明の抗体と特定のタンパク質の相互作用を表す場合の「特異的免疫反応性」とは、抗体が特定のタンパク質を比較的高い親和性で特異的に認識し、結合した結果、この結合がタンパク質の異種集団および他の生物集団中における該タンパク質の存在の決定因子となる抗体を表す。このように、設計されたイムノアッセイ条件下において、例示された抗体は特定のタンパク質に

結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質には有意な量が結合しない。特定のタンパク質と特異的に免疫反応をする抗体を選択するためには、種々のイムノアッセイ形式が使用され得る。例えば、タンパク質と特異的に免疫反応するモノクローナル抗体の選択には固相ELISAイムノアッセイを日常的に用いる。特異的免疫反応性の決定に使用できるイムノアッセイの形式および条件に関しては、HarlowおよびLane(1988)Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照のこと。

産生された抗体は、例えば診断もしくは治療または赤血球の壊死巣分離などのマラリア病理学のメカニズムのさらなる解明のための研究において、例えばイムノアッセイにおいてはプローブとして、PfEMP1タンパク質と、CD-36、TSP、ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1またはコンドロイチン硫酸などのリガンドとの相互作用を阻害し、それによってPfEMP1ーリガンド相互作用を阻害またはそのレベルを低下させるといった多くの目的に使用できる。本発明のポリペプチドと、結合しているリガンドもしくはPEとの相互作用を遮断または逆転させるために抗体を使用する場合、一般に該抗体は「ブロッキング抗体」と呼ばれる。好ましい抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識して結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。従って、これらの好ましい抗体は、本明細書において例示、記載および／または引用された（参照として本明細書に組み入れたものも含む）関連するアミノ酸配列またはその免疫学的に活性な断片と実質的に相同な、アミノ酸配列を有するポリペプチドを特異的に認識し、結合する。さらにより好ましい抗体は、PfEMP1配列の比較的保存されたポリペプチド断片と抗体ーリガンド複合体を形成でき、それゆえに種々の熱帯熱マラリア原虫系由来のPfEMP1とPfEMP1リガンドとの相互作用を遮断できる。

【0158】

2.10.4. 使用法

本発明のポリペプチド、抗体および核酸は、限定されるものではないが、診断、スクリーニング、ワクチン接種を含む予防学的適用および治療学的適用を含むさまざまな重要な用途がある。

2.10.4.1. 診断学的適用

特に好ましい態様において、本発明は、サンプル中のPfEMP1の存在の検出に有用な方法および試薬を提供する。これらの検出法は、患者におけるマラリア感染症の診断に特に有用である。例えば、特に好ましい態様において、本発明の抗体をサンプル中のPfEMP1の存在の有無をアッセイするために用いてもよい。特定の抗原検出のためのイムノアッセイ法は当技術分野において公知である。一般的な免疫学的方法およびイムノアッセイ法の総説は、Basic and Clinical Immunology、第7版(D. StitesおよびA. Terr編)1991を参照のこと。

さらに、本発明のイムノアッセイは、Enzyme Immunoassay, E.T. Maggio, 編/CRC Press, Boca Raton, Florida(1980); "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," P. Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam(1985); ならびに HarlowおよびLane, Antibodies, A Laboratory Manual (前記)で広範囲にわたって論じられている任意のいくつかの形式で行ってもよい。一般に、これらの方法は、抗体を試験するサンプルと接触させ、サンプル中のタンパク質と抗体との間のあらゆる特異的な結合を検出することを含む。典型的には、これは例えばウエスタンブロットのようなブロット形式、またはELISA形式である。これらのアッセイ形式を行う方法は、当技術分野に公知である。例えば、Basic and Clinical Immunology, 第7版(D. StitesおよびA. Terr, 編, 1991)を参照のこと。

典型的には、これらの診断法は、本明細書に記載の通りサンプルをPfEMP1に対する抗体と接触させ、抗体がサンプルの何れかの部分と結合するか否かを決定することを含む。ヒト診断法の場合は、サンプルは全血サンプル、または例えば赤血球を含有するサンプルのような、ある分画であってよい。一般に、かかる診断法は当技術分野に公知であり、前記の参考文献に記載されている。抗体の、サンプルとの免疫反応性は、サンプル中にPfEMP1が存在することを示し、サンプルが患者由来の場合はマラリア感染症の可能性を示唆する。

別法として、患者におけるPfEMP1に対する抗体の存在の有無を検出する際に、本発明の標識ポリペプチドを診断試薬として使用してもよい。患者体内に抗体が存在していることは、患者が抗原応答を起こすのに十分なマラリア寄生虫にさらされていたことを示す。

同様に、本発明の核酸プローブを同様に、すなわちサンプル中のPfEMP1ポリペプチドをコードするDNAセグメントの存在の同定、またはPCRもしくはRT-PCRプライマーとして、増幅、次いでPfEMP1をコードする核酸セグメントを検出するために用いてもよい。かかるアッセイは、本明細書に記載のように、典型的にはサンプル中の核酸の固定化、その後に化学的に標識したオリゴヌクレオチドプローブと、固定化配列とのハイブリダイゼーションの可否を調べること（interrogation?）を含む。固定化されたサンプルとプローブのハイブリダイゼーションは、PfEMP1をコードするDNAセグメントが存在すること、つまりマラリア感染を意味する。前記のごとく、アッセイはマラリア寄生虫の存在のみでなく、存在する寄生虫の系統も指示するようにさらに設計しうる。溶液ベースのオリゴヌクレオチドプローブによる固定化サンプルの探索の点から記載したが、一般に当技術分野に公知の、幅広く多様なアッセイ形態を適用してよい。

【0159】

2.10.4.2. スクリーニングの適用

もう1つの特に好ましい態様において、本発明は特定の化合物がマラリア感染の症状のアンタゴニストであるかどうかを決定するための化合物スクリーニング法を提供する。特に、本発明のスクリーニング法は、試験化合物が、熱帯熱マラリア原虫によるマラリア病に関連する赤血球壊死巣分離のアンタゴニストであるか否かを決定するために用いてよい。より詳細には、該スクリーニング法は、化合物がPfEMP1／リガンドの相互作用のアンタゴニストであるか否かを決定できる。PfEMP1のリガンドには、一般に、例えばCD36、TSP、ELAM-1、ICAM-1、VCAM-1またはコンドロイチン硫酸が含まれる。

一般に、本発明のスクリーニング法は、PfEMP1タンパク質もしくはその断片、および／またはリガンドタンパク質と、スクリーニングされる化合物(試験化合物)との接触を含む。次いで形成されたPfEMP1／リガンド複合体のレベルを検出し、例えば試験化合物不在下の対照と比較しうる。PfEMP1／リガンド相互作用のレベルの低下は、試験化合物がその相互作用のアンタゴニストであることを示す。

試験化合物は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的高分子、あるいは

細菌、ファージ、酵母、植物、真菌、動物の細胞または組織などの生物学的材料からの抽出物であってよい。試験化合物は、PfEMP1／リガンド相互作用のアンタゴニストとしての、可能性のある活性に関して、本明細書に記載のスクリーニングアッセイを包含する方法により評価される。「アンタゴニスト」とは、PfEMP1／リガンド相互作用のレベルを制御して減少させる化合物を表す。

しばしば、本発明のスクリーニングアッセイにおいては、PfEMP1またはリガンドタンパク質のどちらかを固相支持体に固定化しておくことが望ましい。好適な固相支持体としては、例えばアガロース、セルロース、デキストラン、セファデックス、セファロース、カルボキシメチルセルロース、ポリスチレン、濾紙、ニトロセルロース、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、ガラスビーズ、ポリアミンメチルビニルエーテルマレイン酸コポリマー、アミノ酸コポリマー、エチレンマレイン酸コポリマー、ナイロン、絹などが挙げられる。支持体は、例えば試験管、マイクロタイタープレート、ビーズ、試験ストリップ、ブロットティングフォーマットのような平らな表面などの形態であってよい。PfEMP1ポリペプチドまたはそのリガンドと、特定の固相支持体との反応は、例えば固定化された抗PfEMP1抗体への結合、または予め誘導体化された固相支持体への結合などの、当技術分野で公知の方法により行ってよい。

前記に加えて、一方のタンパク質ともう一方のタンパク質との結合の検出を容易にするために、PfEMP1またはそのリガンドの何れかを好適な検出基に連結するのも望ましい。有用な検出基、または標識は一般に当技術分野に公知である。たとえば、検出基は、 ^{125}I 、 ^{32}P もしくは ^{35}S などの放射性標識、または蛍光基もしくは化学発光基であってよい。

あるいは、検出基は、アッセイされうる基質、コファクター、インヒビター、親和性リガンド、抗体結合エピトープタグまたは酵素であってよい。好適な酵素としては、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、または他の容易にアッセイできる酵素が挙げられる。これらの酵素群は化学的方法によりPfEMP1ポリペプチドもしくはその断片に結合させるか、または既に記載されている融合タンパク質として発現させてよい。

一般に、例えばPfEMP1リガンドのような前記の一方のタンパク質が固相支持体

上に固定化される場合、例えばPfEMP1またはその断片のようなもう一方のタンパク質を適当な検出基で標識する。化合物が2種のタンパク質の相互作用のアンタゴニストであるか否かをアッセイするために、次いで2つ種タンパク質が特異的に結合できる条件下で、標識PfEMP1ポリペプチドまたは断片を、試験化合物の存在下で固定化リガンドと接触させる。固相支持体に結合した標識の量を、試験化合物を全く加えない対照と比較する。試験化合物によって固相支持体に結合した標識量の減少が認められた場合、その化合物はPfEMP1／リガンド相互作用のアンタゴニストである。

【0160】

2.10.4.3. 治療学および予防学的用途

前記の使用法に加えて、本発明のポリペプチドはまた、治療学的用途、ヒトおよび／または非ヒト哺乳動物被験体の治療に用いてよい。本発明のポリペプチドの治療学的使用には、実在する疾患の症状の治療ならびに予防学的用途が含まれる。「予防学的」とは、特定疾患または特定疾患の症状の予防を意味する。このように、予防学的治療は一般に、マラリア感染等の特定疾患またはその症状の予防に能動的にかかわる薬物を含む。予防学的用途にはまた、例えばワクチン接種の場合の免疫学的反応を含む、患者から予防的反応を引き出す治療が含まれる。

典型的には治療学および予防学的用途の双方は、マラリア寄生虫感染症の発症または症状の治療または予防のために有効量の本発明の組成物を患者へ投与することを含んでなる。本明細書において「有効量」とは、所望の目標、すなわち症状の緩和、症状もしくは感染の予防、または疾患の治療を達成するのに必要な組成物の量と定義される。

予防学的用途において、本発明のポリペプチドをさまざまな治療に使用し得る。例えば、本発明のポリペプチドは特に、PfEMP1特異的抗体の産生等の患者による免疫学的反応を引き出すためのワクチンとして有用である。特に、かかるワクチン用途は一般に、PfEMP1タンパク質またはその生物学的活性断片の宿主または患者への投与に関与する。

この投与に反応して、患者の免疫系は導入された特定のPfEMP1タンパク質または断片に対する抗体を生成するであろう。患者における免疫学的反応を引き起こ

すのに十分なポリペプチド量は「免疫原性的有効量」と称される。このように、本発明のワクチンは免疫学的に有効な量の本発明のポリペプチドを含有する。患者の免疫反応には、抗体の生成、例えばPE等のポリペプチドを発現する細胞に対する細胞傷害性Tリンパ球の活性化、または当業者に公知の他のメカニズムが含まれてよい。例えば、Paul, Fundamental Immunology, 第2版, Raven Pressを参照。当技術分野で十分に公知である有用な担体としては、例えばチログロブリン、ヒト血清アルブミン等のアルブミン、破傷風毒素、ポリ(D-リシン; D-グルタミン酸)等のポリアミノ酸、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコアタンパク質、B型肝炎ウイルス組換えワクチンが挙げられる。このワクチンには、水、緩衝水、緩衝生理食塩水、生理食塩水等の生理的に許容される希釈剤も含有でき、典型的にはさらにフロイント不完全アジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバン等のアジュバント、または当技術分野で十分に公知である他の材料も含まれてよい。

あるいは、本発明の核酸はマラリア寄生虫によるマラリアの症状および／または感染の予防のためのワクチンとして使用してよい。Sedegahら、Proc Nat'l Acad. Sci. (1994) 91:9866-9870を参照。

例えば、本発明の核酸を含んでなるプラスミドDNAを直接患者に投与してよい。この「裸の」DNAの発現は、前記のとおり、実際のポリペプチドの注射と類似の効果を有するであろう。具体的には、該DNAにより発現されたタンパク質の存在に対する患者の免疫反応の結果、そのタンパク質に対する抗体の産生が起こるであろう。本核酸はまた、寄生された赤血球におけるpfEMP1ペプチドの転写を妨害するアンチセンスプローブの設計に使用してよい。

アンチセンス法は一般に当技術分野で十分に公知である。本発明のポリペプチドおよびその類似体もマラリア感染の症状の発症を予防するための予防学的治療に用い得る。例えば、ポリペプチドの投与により、熱帯熱マラリア原虫感染患者の赤血球の隔絶を直接阻害、遮断または逆転できる。特に、CD36との結合においてPE関連PfEMP1と競合または置き換えるために本発明のポリペプチドを用いてよい。

隔絶の遮断または逆転は、宿主によるPEの破壊を再度もたらし得る、このタイ

プのマラリアの病理学に一般に関連する微小血管の閉塞を減少または除去する。本発明の抗体はまた、同様の方法で用いてよい。特に、本発明のポリペプチドと結合できる抗体を患者に直接投与してよい。PfEMP1との結合により、本発明の抗体は例えば赤血球の隔絶等のPfEMP1により媒介される相互作用の遮断、減少または逆転に有効である。キメラ抗体、ヒト様抗体またはヒト化抗体は特に人間の患者に投与するのに有用である。それに加えて、かかる抗体はまた、以前に抗A型肝炎感染症に用いられたときと同様の短期間の免疫法を被験者に供する、受動ワクチン接種法として使用してよい。

【0161】

もう1つの態様において、本発明のポリペプチド、抗体および核酸は、すでにマラリアに感染している患者の治療に用いてよい。特に、感染による症状を治療するためにマラリア感染患者に本発明の組成物を投与してよい。より詳細には、マラリア感染、より明確には熱帯熱マラリア原虫感染に関連する赤血球の隔絶、およびその結果起こる微小血管の閉塞を予防または低減させるために、患者にこれらの組成物を投与し得る。

治療および予防的用途のために本発明のポリペプチド、核酸および抗体を単独投与してもよいが、これらのエレメントは一般に、例えば医薬上許容される担体と組み合わせて医薬組成物の一部分として投与する。典型的には単一組成物を治療学的および予防学的用途の双方に使用し得る。本発明における使用に好適な医薬組成物は、一般にRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 17th ed.(1985)に記載されている。

本発明の医薬組成物は非経口、局所、経口または局所投与が意図される。該医薬組成物を非経口投与する場合、本発明は、例えば医薬上許容される担体、好ましくは水性担体に溶解または懸濁した本発明のポリペプチド等の、前記の薬物溶液を含んでなる医薬組成物を提供する。例えば、水、緩衝水、グリシン生理食塩水などの種々の水性担体を使用してよい。これらの組成物は例えば滅菌濾過等の通常の十分に公知である方法により滅菌されてよい。得られた水溶液はそのまま使用のために包装するか、または投与前に滅菌溶液と混合するために凍結乾燥してよい。該組成物は、pH調整剤および緩衝化剤、浸透圧調整剤、湿潤剤など、生

理状態に近づけるために必要な、医薬上許容される補助物質（例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリル酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン）を含んでよい。

固体組成物のためには、例えば医薬等級のマニトール、乳糖デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどの通常は無毒性の固体担体を使用してよい。経口投与のためには、従前に記載した担体等の通常使用される賦形剤の何れか、および一般に10～95%の有効成分、およびより好ましくは25～75%の有効成分を包含することにより、医薬上許容される無毒性の組成物を形成し得る。それに加え、ペプチドに基づく化合物の経口投与用に、その医薬組成物は、例えば当技術分野で十分に公知である方法に従ってリポソーム組成物中に医薬組成物を供するなど、消化過程による有効成分のタンパク質分解を防ぐためにマトリックスの一部として有効成分を包含してよい。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 17th Ed. (1985)を参照。

エアロゾル投与用には、該ポリペプチドは一般に、界面活性剤または噴射剤とともに、微細に分割された形態で供給される。界面活性剤は噴射剤に可溶であることが好ましい。かかる薬物の典型例としては、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン酸(olestic acid)、オレイン酸等の、6～22の炭素原子を含有する脂肪酸と、脂肪族多価アルコールまたはその環状無水物のエステルまたは部分エステルがある。混合または天然グリセリド等の混合エステルを用いてもよい。担体も含まれてよく、所望により例えば鼻腔内送達のためにはレシチンを包含してよい。前記の組成物は単回投与または連続投与に好適である。例えばワクチン追加免疫として連続投与した場合、最初の投与に続く接種は免疫応答を追加するために投与し、典型的には追加接種と称される。

【0162】

患者に投与する上記組成物の量は、何を患者に投与するか、患者の状態、投与方法、および例えば治療学的または予防学的用途といった特定の用途により変化する。治療学的用途においては、すでにマラリアに感染した患者に、赤血球を介

する寄生虫が広がるのを防ぐために十分な量の該組成物を投与し、それにより疾病の症状および付随する合併症を治療または少なくとも部分的に抑える。

これを達成するために適切な量は「治療学的有効量」と称される。この使用方法のために有効な量は、疾病の重篤度、患者の体重および全般的な状態に依存するが、一般に70kgの患者に対しては、1日あたり有効成分約1mg～約5gの範囲、好ましくは約50mg～約500mg、より好ましくは約50mg～約100mgである。

予防学的用途に関しては、免疫原性的有効量はまた、その組成、投与方法および患者の体重と全般的な状態、ならびに医師の判断に依存する。ペプチド、ペプチド類似体および抗体に基づく医薬組成物に関しては、初回免疫(予防学的または治療学的用途いずれにおいても)のための一般的な範囲は、70kgの患者に対しては約100 μ g～約1gのポリペプチドであり、続いて例えば患者の血液中の寄生虫または抗体のレベルを測定し、患者の反応と病状に依存して数週間から数ヶ月にわたり、追加免疫レジメに従い、約1 μ g～約1mgのポリペプチドの追加免疫投与を行う。核酸に関しては、典型的には70kgの患者に対しては約30～約100 μ gの核酸、より典型的には約50～約150 μ gの核酸を注射し、適切に追加療法を行う。

以下、本発明を実施例によりさらに説明する。これらの実施例は本発明の例示的な態様であり、本発明を限定することを意図するものではない。

【0163】

2.11. 定方向進化法

ある態様では、本明細書に記載の発明は、高度に複雑な直線配列(DNA、RNAまたはタンパク質等)の組換えを介した定方向分子進化を可能とする、減少性再組合せ、組換えおよび選択という反復サイクルの使用に向けられる。

in vivoでの分子のシャッフリングは、細胞の、多量体を組み換えるという天然の性質を利用して成し遂げられる。in vivoでの組換えは分子の多様性への主要な天然の経路を提供してきたが、他方、遺伝子の組換えは、1)相同性の認識、2)鎖の開裂、鎖の侵入および組換えキアズマの発生を導く代謝ステップならびに最後に、3)別々の組換え分子へのキアズマの分離を含む相対的に複雑な工程のままである。染色体交差の形成には相同配列の認識が必要とされている。

好ましい実施形態では、本発明は少なくとも第1ポリヌクレオチドおよび第2

ポリヌクレオチドからハイブリッドポリヌクレオチドを作製する方法に関する。本発明を使用して、少なくとも1つの部分的な相同配列領域を共有する少なくとも第1ポリヌクレオチドおよび第2ポリヌクレオチドを好適な宿主細胞に導入することによりハイブリッドポリヌクレオチドを作製できる。部分的な相同配列領域はハイブリッドポリヌクレオチドを作製する配列再編成に帰するプロセスを助長する。本明細書において、「ハイブリッドポリヌクレオチド」とは本発明の方法に起因し、かつ少なくとも2つのオリジナルのポリヌクレオチド配列に由来する配列を含むヌクレオチド配列のいずれでもある。かかるハイブリッドポリヌクレオチドはDNA分子間の配列統合を促進する分子間組換えという事象に起因し得る。さらに、かかるハイブリッドポリヌクレオチドはDNA分子内のヌクレオチド配列を変化させるために反復配列を利用する分子内減少性再組合せプロセスにも起因し得る。

本発明は、生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドをコードし得るハイブリッドポリヌクレオチドを作製する手段を提供する。ある態様では、オリジナルのポリヌクレオチドは生物学的に活性なポリペプチドをコードする。本発明の方法は細胞プロセスを利用することによって新規のハイブリッドポリペプチドを製造する。これはオリジナルのポリヌクレオチド配列を統合し、その結果得られるハイブリッドポリヌクレオチドがオリジナルの生物学的に活性なポリペプチドに由来する活性を示すポリペプチドをコードするものである。例えば、オリジナルのポリヌクレオチドは異なる微生物に由来する特定の酵素をコードし得る。例えば、ある生物に由来する第1ポリヌクレオチドにコードされる酵素は、特定の環境条件下、例えば高塩分濃度で効果的に機能するものであってもよい。異なる生物に由来する第2ポリヌクレオチドにコードされる酵素は極端な高温などの異なる環境条件下で効果的に機能するものであってもよい。オリジナルの第1および第2ポリヌクレオチドに由来する配列を含むハイブリッドポリヌクレオチドはオリジナルのポリヌクレオチドにコードされる酵素双方の特性を示す酵素をコードし得る。従ってハイブリッドポリヌクレオチドにコードされる酵素は第1および第2ポリヌクレオチドにコードされる各々の酵素により共有される環境条件下、例えば高塩分濃度かつ高温で効果的に機能し得る。

本発明のオリジナルのポリヌクレオチドにコードされる酵素としては、限定されるものではないが、酸化還元酵素、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼおよびリガーゼが挙げられる。本発明の方法により得られるハイブリッドポリペプチドはオリジナルの酵素では示されない特殊化した酵素活性を示し得る。例えば、加水分解酵素活性をコードするポリヌクレオチドの組換えおよび／または減少性再組合せに続いて、各々のオリジナルの酵素から得た特殊化した加水分解酵素活性、すなわち加水分解酵素が作用する結合の種類および加水分解酵素が機能する温度に関して、ハイブリッドポリヌクレオチドによりコードされる得られるハイブリッドポリペプチドをスクリーニングできる。従って、例えば、加水分解酵素は、オリジナルの加水分解酵素からハイブリッド加水分解酵素を区別するそれらの化学的機能性、例えば(a)アミド（ペプチド結合）すなわちプロテアーゼ、(b)エステル結合すなわちエステラーゼおよびリパーゼ、(c)アセタールすなわちグリコシダーゼ、ならびに例えばハイブリッドポリペプチドが機能する温度、pHまたは塩濃度などを確認して、加水分解酵素をスクリーニングし得る。

オリジナルのポリヌクレオチドの供給源は個々の生物（「単離体」）、所定の培地で増殖させた生物の集合（「富化培養物」）または最も好ましくは、培養されていない生物（「環境サンプル」）から単離し得る。培養をしないアプローチを使用して環境サンプルから新規の生物活性をコードするポリヌクレオチドを得ることが最も好ましいが、これは、そうすることで未開発の生物多様性資源を利用できることになるからである。

【0164】

「環境ライブラリー」は環境サンプルから作製され、これは好適な原核生物の宿主中で増殖し得るクローニングベクターに保持される天然の生物の集成的ゲノム(collective genome)を意味する。クローン化DNAは最初環境サンプルから直接抽出されるので、ライブラリーが純粋培地で増殖し得る原核生物の小画分に制限されることはない。さらに、これらのサンプルに存在する環境DNAを標準化することにより、オリジナルのサンプルに存在するすべての種に由来するDNAをより平等に提示することができるであろう。これにより、優性種と比較して数倍低く

提示されるサンプルの微量構成要素に由来する、興味深い遺伝子を発見する効率を大いに高めることができる。

例えば、1種以上の培養されていない微生物から作製した遺伝子ライブラリーを目的の活性に関してスクリーニングする。まず、原核細胞において、目的の生物活性分子をコードする可能性ある経路を遺伝子発現ライブラリーの形で捕らえる。かかるライブラリーから目的の活性をコードするポリヌクレオチドを単離し宿主細胞に導入する。この宿主細胞を、新規なまたは増強された活性を有する可能性のある有効な生体分子を作製する組換えおよび／または減少性再組合せを促進する条件下で増殖させる。

ポリヌクレオチドを調製する元となる微生物としては、真正細菌および古細菌などの原核微生物ならびに真菌類などの下等真核微生物、いくつかの藻類および原生動物が挙げられる。ポリヌクレオチドは、核酸が生物を培養せずに回収できる場合、または1種以上の培養生物から回収できる場合に環境サンプルから単離できる。ある態様では、かかる微生物は超好熱菌、好冷菌、耐冷菌、好塩菌、好圧菌および好酸菌などの極限微生物であり得る。極限環境を好む微生物から単離された酵素をコードするポリヌクレオチドが特に好ましい。かかる酵素は陸上の温泉および深海の熱水口において100℃以上の温度で、北極の水における0℃以下の温度で、深海の飽和塩環境で、石炭堆積物および富硫黄地熱泉における約0のpH値で、または下水汚泥における11以上のpH値で機能し得る。例えば、極限環境を好む生物からクローン化され発現されるいくつかのエステラーゼおよびリパーゼは広範囲の温度およびpHを通して高い活性を示す。

前記のように選択し単離したポリヌクレオチドを好適な宿主細胞に導入する。好適な宿主細胞は組換えおよび／または減少性再組合せを促進し得る細胞の任意のものである。選択されたポリヌクレオチドは適当な制御配列を含むベクター中にすでにあることが好ましい。宿主細胞は哺乳動物細胞などの高等真核細胞、酵母細胞などの下等真核細胞であってもよく、または好ましくは宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞であってもよい。宿主細胞への構築物の導入はリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションまたはエレクトロポレーション(Davisら, 1986)により達成される。

適当な宿主の典型的な例として、大腸菌、放線菌、ネズミチフス菌などの細菌細胞、酵母などの真菌細胞、キイロショウジョウバエS2およびスポドプテラ(Spodoptera) Sf9などの昆虫細胞、CHO、COSまたはBowes黒色腫などの動物細胞、アデノウイルスおよび植物細胞が挙げられる。適当な宿主の選択は、本明細書の教示に基づいた当業者には自明な技術範囲内にあると考えられる。

特に、組換えタンパク質を発現するのに用いられる種々の哺乳動物細胞培養系に関しては、哺乳動物発現系の例として、「SV-40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants」(Gluzman, 1981)に記載されるサル腎臓繊維芽細胞のCOS-7系および適合ベクターを発現できる他の細胞系、例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは複製起点、好適なプロモーターおよびエンハンサー、そしてまた、あらゆる必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシング供与および受容部位、転写終結配列および5'フランキング非転写配列を含んでなる。SV40スプライシング部位およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を使用して所望の非転写遺伝子エレメントを得ることができる。

目的のポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、プロモーターの活性化のために、形質転換体の選択のために、または遺伝子の増幅のために適当なように改変した従来の栄養培地で培養できる。温度、pH等などの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞に関してこれまでに使用されたものであり、これは当業者には明らかであろう。次いで、特定の酵素活性を有すると同定されるクローンを配列決定して、増強された活性を有する酵素をコードするポリヌクレオチド配列を同定する。

【0165】

もう1つの態様では、本発明の方法を使用して1個以上のオペロンまたは遺伝子クラスターもしくはその部分に由来する生化学経路をコードする新規ポリヌクレオチドを作製できると考えられる。例えば、細菌および多くの真核生物は、遺伝子(その産物が関連プロセスに関与するもの)を制御するための協調機構を有する。遺伝子は単一の染色体上の「遺伝子クラスター」と呼ばれる構造中に集中しており、クラスター全体の転写を開始する単一のプロモーターを含む、単一の調

節配列の制御下でともに転写される。このように、遺伝子クラスターとは、通常その機能により同一であるかまたは関連する、隣接する遺伝子の集団である。遺伝子クラスターによりコードされる生化学経路の例としてはポリケチドがある。ポリケチドは、抗生物質（テトラサイクリンおよびエリスロマイシンなど）、抗癌剤（ダウノマイシン）、免疫抑制剤（FK506およびラパマイシン）および獣医用製剤（モネンシン）を含む生物活性物質の非常に豊富な供給源である分子である。多数のポリケチド（ポリケチドシンターゼにより産生される）は治療薬として価値がある。ポリケチドシンターゼは多機能酵素であり、長さならびに機能性パターンおよび環化パターンの異なる非常に多くの種類の炭素鎖の生合成を触媒する。ポリケチドシンターゼ遺伝子は遺伝子クラスター内にあり、ポリケチドシンターゼの少なくとも1つの種（タイプIと称される）は大きなサイズの遺伝子および酵素を有しており、これが遺伝子操作およびin vitroでのこれらの遺伝子／タンパク質の研究を複雑にしている。

研究用の新規ポリケチドを作製するために、ポリケチドまたはその断片、およびポストポリケチド生合成遺伝子のライブラリーから所望の構成要素を選択し、組み合わせることができるのは魅力的である。本発明の方法は分子間組換えを介した新規ポリケチドシンターゼの生成を促進可能とする。

好ましくは、遺伝子クラスターDNAを異なる生物から単離し、ベクター、特に、連結された遺伝子クラスターから検出可能なタンパク質またはタンパク質関連アレイ活性の産生を制御および調節し得る発現調節配列を含むベクターに連結する。かかる遺伝子クラスターとともに使用するには、外来DNA導入に関して非常に大きな能力を有するベクターの使用が特に適当であり、例として、大腸菌のf-因子（すなわち稔性因子）が含まれることを本明細書に記載する。この大腸菌のf-因子は接合の際にそれ自身の高頻度導入に影響を及ぼすプラスミドであり、混合された微生物サンプルに由来する遺伝子クラスターなどの大きなDNA断片を獲得し安定に増殖させるための理想のものである。一旦、適当なベクターに連結されれば、異なるポリケチドシンターゼ遺伝子クラスターを含む2個以上のベクターを好適な宿主細胞に導入できる。遺伝子クラスターに共有される部分的な相同配列領域はハイブリッド遺伝子クラスターをもたらす配列再編成という結果とな

るプロセスを促進する。さらに、オリジナルの遺伝子クラスターには見られない増強された活性に関して新規ハイブリッド遺伝子クラスターをスクリーニングできる。

従って、好ましい実施形態では、本発明は、生物学的に活性なハイブリッドポリペプチドを作製し、かかるポリペプチドを増加された活性に関してスクリーニングする方法であって、

1)少なくとも、機能しうる形で連結された第1のポリヌクレオチドおよび機能しうる形で連結された第2ポリヌクレオチド（かかる第1ポリヌクレオチドおよび第2ポリヌクレオチドは少なくとも1個の部分的な相同配列領域を共有している）を適切な宿主細胞に導入し、

2)機能しうる形で連結されるハイブリッドポリヌクレオチドをもたらず配列再編成を促進する条件下で宿主細胞を増殖させ、

3)ハイブリッドポリヌクレオチドによりコードされるハイブリッドポリペプチドを発現させ、

4)増強された生物学的活性の同定を促進する条件下でハイブリッドポリペプチドをスクリーニングし、さらに

5)ハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離することによる方法に関する。

【0166】

種々の酵素活性をスクリーニングする方法は当業者に公知であり、本明細書中で論ぜられている。本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを単離する場合にはかかる方法を使用し得る。

使用できる発現ベクターの典型的な例としては、ウイルス粒子、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、ホスミド、細菌人工染色体、ウイルスDNA（例えばワクシニア、アデノウイルス、ファウルポックスウイルス、偽狂犬病ウイルスおよびSV40の誘導體）、P1を基にした人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および目的の特定の宿主（桿菌、コウジカビ属菌および酵母など）に特異的なその他のベクターのいずれをも記載できる。従って、例えば、DNAは、ポリペプチド発現のための種々の発現ベクターの任意のも

のに含まれ得る。かかるベクターとしては染色体、非染色体および合成DNA配列が挙げられる。多数の好適なベクターが当業者に公知であり、また市販されている。以下のベクターを例として示す：細菌性のもの；pQEベクター(Qiagen)、pBluescriptプラスミド、pNHベクター、 λ -ZAPベクター(Stratagene)、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T(Pharmacia)、真核生物性のもの；pXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLSV40(Pharmacia)。しかしながら、他のプラスミドまたは他のベクターの任意のものを、それらが宿主中で複製可能であり、かつ生存可能である限りは使用できる。コピー数の少ないベクターまたはコピー数の多いベクターを本発明に関して使用することができる。

本発明に使用するのに好ましい種類のベクターはf-因子複製起点を含む。大腸菌のf-因子（すなわち稔性因子）は接合の際にそれ自身の高頻度導入に影響を及ぼすプラスミドであり、細菌染色体自体は低い頻度でしか導入しない。特に好ましい実施形態では、「ホスミド」と呼ばれるクローニングベクターまたは細菌人工染色体(BAC)ベクターを使用する。これらは大腸菌f-因子に由来し、ゲノムDNAの大きなセグメントを安定に組み込むことができる。混合し培養されていない環境サンプルに由来するDNAとともに組み込まれる場合には、これにより大きなゲノム断片を安定な「環境DNAライブラリー」の形にすることができる。

本発明において使用するのに好ましいもう1つの種類のベクターはコスミドベクターである。コスミドベクターは本来、ゲノムDNAの大きなセグメントをクローン化し増殖させるために設計された。コスミドベクターへのクローニングは「Molecular Cloning: A laboratory Manual」(Sambrookら, 1989)に詳細に記載されている。

発現ベクター中のDNA配列はRNA合成を指令する適当な発現制御配列（プロモーター）に機能しうる形で連結されている。特に有名な細菌性プロモーターとしてlacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λP_R 、 P_L およびtrpが挙げられる。真核生物のプロモーターとしてはCMV極初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTRおよびマウスメタロチオネイン-Iが挙げられる。適当なベクターおよびプロモーターの選択は十分に当業者の水準の範囲内にある。発現ベクターはまた翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含

む。ベクターはまた、発現を増幅させるのに適当な配列も含み得る。プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを用いて所望の遺伝子のいずれからも選択できる。

さらに、発現ベクターは好ましくは、真核細胞培養に関してはジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性などの、または大腸菌においてはテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性などの、形質転換された宿主細胞を選択するための表現型特性を提供する1個以上の選択マーカー遺伝子を含む。

一般に、組換え発現ベクターは宿主細胞の形質転換を可能にする複製起点および選択マーカー、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子および*S. セレビス* *TRP1* 遺伝子、ならびに下流の構造配列の転写を指令する高率発現遺伝子に由来するプロモーターを含む。かかるプロモーターは特に3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、 α -因子、酸ホスファターゼなどの解糖酵素または熱ショックタンパク質をコードするオペロンから誘導できる。異種構造配列は適当な相において翻訳開始および終結配列、ならびに好ましくは翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔または細胞外の培地への分泌を指令できるリーダー配列と結合される。

クローニング戦略によっては導入されたベクターと内因性プロモーターの双方を介する発現を可能にすることができ、ベクターによる促進は、その内因性プロモーターが大腸菌において機能しない遺伝子の発現に関して重要なものとなり得る。

【0167】

微生物から単離されたまたは誘導されたDNAは、選択されたDNAを探る前にベクターまたはプラスミドに挿入されることが好ましい。かかるベクターまたはプラスミドは、プロモーター、エンハンサー等をはじめとする発現調節配列を含むものであることが好ましい。かかるポリヌクレオチドはベクターおよび／または構成物の一部であってもよく、また単離されたままのものであってもよい。なぜなら、かかるベクターまたは構成物はその天然環境の一部ではないからである。特に好ましいファージまたはプラスミド、およびそれらに導入し、パッケージングする方法は、本明細書に示されるプロトコールに詳細に説明されている。

クローニングベクターの選択は採用されるアプローチに依存し、例えば、宿主細胞にうまく形質転換され、選択され得る多様に反復する配列のコピーまたは多重配列に関しては、ベクターは十分な能力を有するいずれのクローニングベクターでもよい。かかるベクターの1つの例が「Polycos vectors:a system for packaging filamentous phage and phagemid vectors using lambda phage packaging extracts」(Alting-MecsおよびShort,1993)に記載されている。増殖／維持は抗生物質耐性によってクローニングベクターにより行われる。増殖期間の後、自然に短縮された分子を回収し、ゲルまたはカラムでのサイズ分画によって同定するか、または直接増幅する。利用されるクローニングベクターは長い構築物の挿入によって分断されている選択可能な遺伝子を含む場合もある。減少性再組合せが進行するにつれて、反復単位数が減少し、割り込まれた遺伝子が再び発現され、従って処理された構築物に関する選択を行うことができる。所望の生物学的特性を有する発現産物の選択を可能にするベクターは、発現／選択ベクターであってもよい。インサートは機能的プロモーターの下流に位置してもよく、適当な手段によって所望の特性をスクリーニングする。

in vivo再編成は、ひとまとめにして「組換え」と呼ばれる「分子間」プロセスに集中され、これは細菌では一般に「RecA-依存性」現象として観察される。本発明は、宿主細胞の配列を組換え、再組合せさせる組換えプロセス、または減少プロセスを媒介して欠失により細胞中の擬反復配列の複雑性を減少させる細胞の能力に依存する。「減少性再組合せ」というこのプロセスは「分子間」RecA依存性プロセスにより起こる。

従って、本発明の別の態様では、減少性再組合せのプロセスによって新規ポリヌクレオチドを作製できる。この方法は連続配列（元のコード配列）を含む構築物の作製、それらの適当なベクターへの挿入およびそれに続く適当な宿主細胞への導入を含む。個々の分子の同一性の再組合せは相同領域を有する構築物中の連続配列間または擬反復単位間の組合せプロセスにより起こる。再編成プロセスにより組換え、ならびに／または複雑性および反復配列の程度が減少し、結果として新規分子種の産生をもたらす。種々の処理を適用して再編成率を高めることができる。これらには紫外線光またはDNAに損傷を与える化学物質を用いる処理お

よび／または増強されたレベルの「遺伝的不安定性」を示す宿主細胞系の使用が含まれうる。従って、再組合せプロセスは、それら自身の進化を指令する相同組換え、または擬反復配列という天然の特性を含み得る。

【0168】

反復配列または「擬反復」配列は遺伝子の不安定性において役割を果たす。本発明では、「擬反復」とはそれらの元の単位構造を制限しない反復である。擬反復単位は構築物中の配列のアレイ、すなわち同様の配列の連続単位として提供される。ひと度連結されれば、連続配列間の接合点は本質的にはそれとわからないものになり、分子レベルではもはや得られる構築物の擬反復特性が連続するものとなる。得られる構築物の複雑性を減少させるよう細胞が行う欠失プロセスは擬反復配列間に作用する。擬反復単位により事実上制限のない鋳型レパートリーが提供され、そこでずれという事象が起こり得る。従って、擬反復を含む構築物は、欠失（および可能性としては挿入）事象が擬反復単位内の実質的にどこでも起こり得るという十分な分子適応性を効果的に示す。

擬反復配列がすべて同じ向きに、例えば頭対尾、またはその逆に連結される場合には、細胞は個々の単位を区別できない。従って、縮小プロセスが配列中で起こり得る。対照的に、例えば、単位が頭対尾ではなく頭対頭を示す場合には、転換は隣接単位の終点を描き出し、その結果、欠失形成は不連続単位の消失に傾く。従って、本方法に関しては配列が同じ方向にあることが好ましい。任意の方向の擬反復配列は再組合せ効率の損失をもたらす、他方、一定方向の配列は高効率を提供する。しかしながら、少数の連続配列しか同一方向に持たないことは効率を低下させるものの、新規分子の効率的な回収にまだ十分な適応性を示すことができる。構築物を同一方向にある、ある程度反復された配列で構成して高効率とすることができる。

配列は以下のものを含む、種々の方法のいずれかを用いてヘッドからテール方向に集合させることができる：

a) 作成時に一本鎖が方向をなすポリ A ヘッドおよびポリ T テールを含むプライマーが利用できる。これは RNA から作られるプライマーの最初の数塩基を持つことにより達成され、従って RNアーゼ H が容易に除去される。

b) 特有の制限切断部位を含むプライマーが利用できる。複数の部位、一連の特有の配列、ならびに反復合成および連結工程が必要とされる。

c) プライマー内部の数塩基をチオレート化することができ、エキソヌクレアゼを用いて適切なテールを有する分子を作製することができた。

再組合せされた配列の回収は縮小RIによってクローニングベクターを同定することによる。再組合せされたコード配列をその後増幅して回収することができる。その産物を再びクローン化して発現させる。縮小RIを用いたクローニングベクターの回収は、下記により行われる。

- 1) 構築物が複雑性を減少させた際に唯一安定して維持されるベクターの使用。
- 2) 物理的手段によって短縮されたベクターの物理的回収。この場合、クローニングベクターは標準的なプラスミド単離法を用いて回収され、アガロースゲル、または標準法を利用して低分子量を排除するカラムのいずれかによりサイズ分画する。
- 3) インサートのサイズが小さくなった場合に選択可能な、分断された遺伝子を含むベクターの回収。
- 4) 発現ベクターと適切な選択を用いた直接選択技術の使用。

近縁生物に由来するコード配列（例えば遺伝子）は、高度の相同性を示し、かつ全く異なったタンパク質産物をコードする。これらの型の配列は本発明において、擬反復型として特に有用である。しかしながら、以下に示される実施例では、ほぼ同じ原型のコード配列（擬反復）の再組合せが示されているが、このプロセスはこのようなほぼ同じ反復に限られるものではない。

以下の実施例は本発明の方法を示すものである。3つの特有の種に由来する核酸をコードする配列（ある程度の反復）を示す。各配列は一組の異なる特性を持つタンパク質をコードする。この配列はそれぞれ、「A」、「B」および「C」と表される配列内の特有の位置の1つまたは数個の塩基対が異なっている。擬反復配列は個別にまたはまとめて増幅され、連結されて、連結した分子集団中ですべての可能な順列および組合せが得られるような無作為な集合体となる。擬反復単位の数には構築条件によって制御できる。ある構築物での擬反復単位の平均数を反

復指数 (RI) と定義する。

【0169】

一度形成されれば構築物は、公開されているプロトコルに従ってアガロースゲルでサイズ分画してもしなくともよく、クローニングベクターへ挿入し、適当な宿主細胞にトランスフェクトする。次いでこの細胞を増殖させて、「減少性再組合せ」を行う。減少性再組合せ過程の速度は、所望によりDNA損傷を導入することで刺激され得る。RIの縮小が、「分子内」機構によって反復配列間で欠失が形成されることによるものか、「分子間」機構を通じて組換えに似た結果が起こることによるものかは重要ではない。最終的な結果はあり得るすべての組合せへ分子を再編成することである。

場合によって本方法は、例えばタンパク質性受容体、ペプチドオリゴ糖、ビリオン(viron)、または他の所定の化合物または構造物といった所定の高分子と結合するか、または相互作用する（例えば、触媒性抗体など）能力を持つ個々のシャッフルされたライブラリーメンバーを同定するためのシャッフルされたプールのライブラリーメンバーをスクリーニングするさらなる工程を含んでなる。

かかるライブラリーから同定された展示ポリペプチド、抗体、模倣ペプチド抗体、および可変領域配列は、治療、診断、研究、および関連する目的（例えば、触媒、水溶液の浸透性を上昇させる溶質など）に使用でき、および／または1以上のさらなるシャッフリングおよび／または親和性選択のサイクルに付すことが可能である。本方法は、表現型（例えば、触媒活性、安定性、酸化耐性、薬剤耐性、または宿主細胞に付与される検出可能な表現型）の特徴を選択する工程が所定の分子に対する結合親和性以外のものとなり得るように改変することができる。

本発明は親和性相互作用スクリーニングに好適な展示抗体のライブラリーを製作する方法を提供する。この方法は、(1) まず、展示抗体および該展示抗体をコードする関連ポリヌクレオチドを含んでなる、複数の選択されるライブラリーメンバーを取得し、さらに該展示抗体をコードする該関連ポリヌクレオチドを取得して、該関連ポリヌクレオチドまたはそのコピーを取得すること（ここで、該関連ポリヌクレオチドは実質的に同一の可変領域枠組み配列の領域を含んでなる

)、および(2)該ポリヌクレオチドを好適な宿主細胞に導入し、組換えおよび減少性再組合せを促進しシャッフルされたポリヌクレオチドを得る条件下でこの細胞を増殖させること、を含んでなる。このシャッフルされたプールに包含されるCDRの組合せは最初の複数の選択ライブラリーメンバーには存在せず、該シャッフルされたプールはCDR置換を含んでなる展示抗体ライブラリーを構成し、親和性相互作用スクリーニングに適している。場合により、該シャッフルされたプールを親和性スクリーニングに付し、所定のエピトープ(抗原)に結合するライブラリーメンバーを選択し、それにより複数の選択されたシャッフルされたライブラリーメンバーを選択する。さらに、複数の選択的にシャッフルされたライブラリーメンバーをシャッフルし、所望の結合親和性を有するライブラリーメンバーが得られるまで1~1000サイクル、または望むだけ繰り返しスクリーニングすることができる。

本発明の別の態様では、組換えまたは再編成の前またはその間に、本発明の方法により作製したポリヌクレオチドを、元のポリヌクレオチドへの突然変異の導入を促進する薬剤またはプロセスに付し得るものと考えられる。かかる突然変異の導入は、得られるハイブリッドポリヌクレオチドおよびそれからコードされるポリペプチドの多様性を高めるであろう。突然変異誘発を促進する薬剤またはプロセスとしては、限定されるものではないが、(+)-CC-1065、または(+)-CC-1065-(N3-アデニン)(SunおよびHurley, 1992を参照)のような合成類似体、DNA合成を阻害することができるN-アセチル化または脱アセチル化4'-フルオロ-4-アミノビフェニル付加物(例えば、van de Pollら, 1992を参照)、またはDNA合成を阻害することができるN-アセチル化または脱アセチル化4-アミノビフェニル付加物(これもvan de Pollら, 1992, 751-758頁を参照)、三価クロム、三価クロム塩、7-ブロモメチル-ベンズ[a]アントラセン(「BMA」)、トリス(2,3-ジブロモプロピル)ホスフェート(「Tris-BP」)、1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン(「DBCP」)、2-ブロモアクロレイン(2BA)、ベンゾ[a]ピレン-7,8-ジヒドロジオール-9-10-エポキシド(「BPDE」)、プラチナ(II)ハロゲン塩、N-ヒドロキシ-2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]-キノリン(「N-ヒドロキシ-IQ」)、およびN-ヒドロキシ-2-アミノ-1-メチル-6-フェニルイミダゾ[4,5-f]-ピリジン(「N-ヒドロキシ-PhIP」)

などのDNA複製を阻害することができる多環式芳香族炭化水素(「PAH」)DNA付加物である。特に望ましいのは紫外線(+)-CC-1065および(+)-CC-1065-(N3-アデニン)からなるPCR増幅を減退もしくは停止する手段である。特に包含される手段としては、DNA付加物、またはポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプールから得られたDNA付加物を含んでなるポリヌクレオチドがあり、これはさらなるプロセッシングに先立ちポリヌクレオチドを含んでなる溶液を加熱することを含む工程により遊離もしくは除去することが可能である。

【0170】

別の態様では、本発明はハイブリッドポリヌクレオチドまたは再組合せポリヌクレオチドの製造を提供する本発明に従う条件下で、野生型タンパク質をコードする二本鎖の鋳型ポリヌクレオチドを含んでなるサンプルを処理することにより、生物学的活性をもつ組換えタンパク質を製造する方法に向けられる。

本発明はまた、ウイルス遺伝子(例えばキャプシドタンパク質、スパイク糖タンパク質、ポリメラーゼ、およびプロテアーゼ)またはウイルスゲノム(例えばパラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レオウイルスおよびライノウイルス)の集団をシャッフルするためのポリヌクレオチドシャッフルの使用を提供する。ある実施形態では、本発明は、組換えにより作製された新規なエピトープと同様にエピトープの新規な組合せを作製するため、免疫原性ウイルスタンパク質のすべてまたは一部をコードする配列をシャッフルする方法を提供するものであるが、かかるシャッフルされたウイルスタンパク質はエピトープもしくはエピトープの組合せ、ならびに組換えによって作製された新規なエピトープを含んでなり、かかるシャッフルされたウイルスタンパク質は、ウイルス進化の結果として自然環境で生じ得るエピトープ、またはエピトープの組合せ(例えば、インフルエンザウイルス株の組換えなど)を包含する。

本発明はまた、遺伝子治療ベクターおよび複製欠陥遺伝子治療構築物を作製するためのポリヌクレオチド配列のシャッフリングに好適な方法を提供する。かかる方法を、DNAに基づくワクチン導入のためのワクチンベクター、ならびに抗腫瘍遺伝子治療およびその他の一般的治療方式を含む、ヒト遺伝子治療に使用する

ことができるが、それらに限定されない。

本明細書で用いられるポリペプチドの注釈としては、標準的な用法および慣例に従い、左手方向がアミノ末端方向で、右手方向がカルボキシ末端方向である。同様に、特に断りのない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側の末端が5'末端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向を5'方向とする。未完成のRNA転写物の5'→3'付加の方向を転写方向と呼び、RNAと同じ配列を持つDNA鎖上の配列領域でRNA転写物の5'→5'末端であるものを「上流配列」と呼び、RNAと同じ配列を持つDNA鎖上の配列領域でコード鎖RNA転写物の3'→3'末端であるものを「下流配列」と呼ぶ。

【0171】

2.11.1. 飽和突然変異誘発

1つの態様では、本発明は、ポリヌクレオチドに点突然変異を導入し、単一のアミノ酸置換の全範囲が各アミノ酸の位置で表される一連の子孫ポリペプチドを作出するための特許コドンプライマー（縮重したN、N、G/T配列を含む）の使用を提供する。使用されるオリゴは第1の相同配列、縮重したN、N、G/T配列、および好ましいが必ずしも必要ではない第2の相同配列を隣接して包含する。N、N、G/T配列の縮重は20種類のアミノ酸すべてのコドンを含むので、かかるオリゴの使用から得られる下流の子孫翻訳産物は、ポリペプチドに沿ったそれぞれのアミノ酸部位で可能性のあるすべてのアミノ酸変化を含む。

1つの態様では、かかる1つの縮重オリゴ（1つの縮重N、N、G/Tカセットを含んでなる）は、親ポリヌクレオチド鋳型中の各原型コドンに全範囲のコドン置換を受けさせるのに用いられる。別の態様では、同じオリゴ内であろうとなかろうと、少なくとも2つの縮重N、N、G/Tカセットを使用して、親ポリヌクレオチド鋳型の少なくとも2つの原型コドンに全範囲のコドン置換を受けさせる。このように、2以上のN、N、G/T配列が1つのオリゴに含まれれば、2以上の部位でアミノ酸突然変異を導入することができる。この複数のN、N、G/T配列は直接隣接していてもよいし、または1以上のさらなるヌクレオチド配列により分離されていてもよい。もう1つの態様では、付加および欠失の導入に役立つオリゴを、単独でまたはN、N、G/T配列を含むコドンと組み合わせて用い、アミノ酸の付加

、欠失および／もしくは置換のいずれかの組合せまたは順列を導入することができる。

特に例示すれば、隣接するN、N、G/Tトリプレット、すなわち縮重した(N、N、G/T)_n配列を含むオリゴを用いて、2以上の隣接するアミノ酸位置に同時に突然変異を誘発することが可能である。

もう1つの態様では、本発明は、N、N、G/T配列よりも縮重の少ない縮重カセットの使用を提供する。例えば、いくつかの例では、1個のN（このNはトリプレットの1番目、2番目または3番目の位置に存在し得る）のみを含む縮重トリプレット配列を使用する（例えばオリゴ内で）ことが望ましい。いずれかの組合せおよびその順列を含む他の塩基はいずれもトリプレットの2つの位置を残して使用できる。あるいは、いくつかの例では、縮重したN、N、Nトリプレット配列またはN、N、G/Cトリプレット配列を使用する（例えばオリゴ内で）のが望ましい。

しかし、本発明で開示されるように縮重トリプレット(N、N、G/TまたはN、N、G/Cトリプレット配列など)の使用にはいくつかの理由で利点があると考えられる。1つの態様では、本発明は、可能性のあるアミノ酸(20種類のアミノ酸の全て)の全範囲の、ポリペプチド中の各アミノ酸への、またアミノ酸の位置ごとの置換を系統的かつ極めて容易にもたらす手段を提供する。従って、100のアミノ酸ポリペプチドに対して本発明は、2000の異なる種(すなわち、位置につき20の可能性あるアミノ酸×100のアミノ酸位置となる)を系統的かつ極めて容易に作出する手段を提供する。縮重N、N、G/TまたはN、N、G/Cトリプレット配列を含むオリゴを使うことにより、20種類の可能性あるアミノ酸をコードする32の独立する配列が提供されることが考えられる。従って、かかる1つのオリゴを用いて親ポリヌクレオチド配列が飽和突然変異誘発を受ける反応槽内では、20の異なるポリペプチドをコードする32の異なる子孫ポリヌクレオチドが生じる。これに対し、部位特異的突然変異誘発で非縮重オリゴを使用すると、反応槽につきたった1つの子孫ポリペプチド産物しか得られない。

【0172】

本発明はまた、場合により開示された縮重プライマーと併用できる非縮重オリ

ゴの使用を提供する。状況によっては、非縮重オリゴを用いて実施中のポリヌクレオチドに特異的な点突然変異を作製することが有利であると考えられる。これは特異的なサイレント点突然変異、対応するアミノ酸を変化をもたらす点突然変異、および停止コドンの生成と対応するポリペプチド断片の発現を引き起こす点突然変異を作出する手段を提供する。

従って、本発明の好ましい実施形態では、各々の飽和突然変異誘発反応槽は、少なくとも20の子孫ポリペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含有するので、20のアミノ酸すべてが親ポリヌクレオチド内で突然変異を誘発したコドンの位置に対応する1つの特異的なアミノ酸位置で表される。各々の飽和突然変異誘発反応槽から生じた32倍の縮重した子孫ポリペプチドをクローン増幅に付し（例えば、発現ベクターを用いて好適な大腸菌宿主へクローン化する）、発現スクリーニングに付すことができる。スクリーニングにより個々の子孫ポリペプチドが、（親ポリペプチドと比較して）好ましい特性変化を示すことが同定されると、それに応じてそこに含有される好ましいアミノ酸置換の同定のために配列決定することが可能である。

本明細書で開示された飽和突然変異誘発を用いた親ポリペプチド内で、各アミノ酸の位置、またアミノ酸ごとに突然変異を誘発する上で、好ましいアミノ酸変化を2以上のアミノ酸位置で同定することができると考えられる。これらの好ましいアミノ酸置換のすべてまたは一部の組合せを含む1以上の新しい子孫分子を作出できる。例えば、もし2つの特異的かつ好ましいアミノ酸変化が、ポリペプチド内の3つのアミノ酸の位置の各々で同定されるならば、各位置（元のアミノ酸からは変化せず、かつ、2つはそれぞれ好ましい変化）で3通りの可能性および3つの位置が順列に含まれる。従って、これまでに調べた7つ、すなわち6個の単一点突然変異（すなわち、3つの位置の各々で2つ）といずれの位置でも変化していないものを含め、 $3 \times 3 \times 3$ 通りすなわち全体で27通りの可能性がある。

さらにもう1つの態様では、部位飽和突然変異誘発はスクリーニングとともに、シャッフリング、キメラ化、組換えおよび他の突然変異誘発プロセスと併用できる。本発明は飽和突然変異誘発を含む反復法による任意の突然変異誘発法の使用を提供する。1つの例としては、任意の突然変異誘発法の反復使用がスクリー

ニングと併用される。

従って、限定されるものではないが例として、本発明は、ハイブリッドポリヌクレオチドが組換えおよび減少性再組合せにより生じるように、2以上の関連ポリヌクレオチドを好適な宿主細胞へ導入する方法など、さらなる突然変異誘発法と組み合わせた飽和突然変異誘発の使用を提供する。

ある遺伝子の全配列に沿って突然変異誘発を行うことに加えて、本発明は、ポリヌクレオチド配列内の任意の数の塩基をそれぞれ置換するのに使用することができる突然変異誘発を提供し、ここでは突然変異が誘発される塩基数は、15から100,000までのすべての整数であることが好ましい。従って、分子に沿って位置ごとに突然変異を誘発する代わりに、不連続な塩基数（好ましくは総計15から100,000までの部分集合）ごとに突然変異を起こすことが可能である。好ましくは、ポリヌクレオチド配列に沿ってそれぞれの位置あるいは位置の群を突然変異誘発するのに別個のヌクレオチドを使用する。突然変異誘発される3つの位置の1群は1つのコドンであってよい。突然変異は好ましくは突然変異誘発カセットとも呼ばれる異種カセットを含む突然変異誘発プライマーを用いて導入される。好ましいカセットは1~500塩基を持ち得る。かかる異種カセットのそれぞれのヌクレオチド位置はN、A、C、G、T、A/C、A/G、A/T、C/G、C/T、G/T、C/G/T、A/G/T、A/C/T、A/C/GまたはEであり、EはA、C、GまたはT以外のいずれの塩基でもよい（Eはデザイナーオリゴ(designer oligo)と呼び得る）。下記の表は例示的なトリヌクレオチドカセットを示している（N、N、G/T；N、N、NおよびN、N、A/Cの他に3000を超える可能性がある）。

【0173】

一般的な意味において、飽和突然変異誘発は、変異誘発させる規定のポリヌクレオチド配列（ここで変異誘発させる配列は好ましくは15~100,000塩基長である）内の完全なセットの突然変異誘発カセット（各カセットは好ましくは1~500塩基長である）を変異誘発することを含む。従って、突然変異群（1~100の突然変異にわたる）が各カセットに導入されて変異誘発される。飽和突然変異誘発を1回おこなう間、1つのカセットへ導入される突然変異の群は、第2のカセットへ導入される第2の突然変異の群と異なってもよいし、あるいは同じであっ

てもよい。かかる群の例としては、欠失、付加、特定のコドンの群、および特定のヌクレオチドカセットの群が挙げられる。

変異誘発させる規定の配列（図20を参照）としては、好ましくは遺伝子全体、経路、cDNA、全オープンリーディングフレーム（ORF）、および完全なプロモーター、エンハンサー、リプレッサー／トランスアクチベーター、複製起点、イントロン、オペレーター、または任意のポリヌクレオチド官能基が挙げられる。一般に、この目的に好ましい「規定の配列」は15塩基のポリヌクレオチド配列および15塩基～15,000塩基長のポリヌクレオチド配列（本発明はこの間の全ての整数に特に名前をつけている）を有する任意のポリヌクレオチドであってよい。コドンの群を選択するときには、縮重突然変異誘発カセットによりコードされるアミノ酸の種類を考慮する。

突然変異誘発カセット（表1-85を参照）に導入可能な突然変異の群の特に好ましい例では、本発明は特に、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および20のアミノ酸を各位置にコードする縮重コドン置換（縮重オリゴを用いる）、およびそれによりコードされるポリペプチドライブラリーを提供する。

【0174】

表1～85の概略図

これらの表は、限定するものではないが、非確立論的な、かつ縮重している、3塩基長の突然変異誘発カセットの好ましい例を示す。

表番号	トリプレット配列	位置1	位置2	位置3
1.	N,N,G/T	N	N	G/T
2.	N,N,G/C	N	N	G/C
3.	N,N,G/A	N	N	G/A
4.	N,N,A/C	N	N	A/C
5.	N,N,A/T	N	N	A/T
6.	N,N,C/T	N	N	C/T
7.	N,N,N	N	N	N
8.	N,N,G	N	N	G
9.	N,N,A	N	N	A
10.	N,N,C	N	N	C
11.	N,N,T	N	N	T
12.	N,N,C/G/T	N	N	C/G/T
13.	N,N,A/G/T	N	N	A/G/T
14.	N,N,A/C/T	N	N	A/C/T
15.	N,N,A/C/G	N	N	A/C/G
16.	N,A,A	N	A	A
17.	N,A,C	N	A	C
18.	N,A,G	N	A	G
19.	N,A,T	N	A	T
20.	N,C,A	N	C	A
21.	N,C,C	N	C	C
22.	N,C,G	N	C	G
23.	N,C,T	N	C	T
24.	N,G,A	N	G	A
25.	N,G,C	N	G	C
26.	N,G,G	N	G	G
27.	N,G,T	N	G	T
28.	N,T,A	N	T	A
29.	N,T,C	N	T	C
30.	N,T,G	N	T	G
31.	N,T,T	N	T	T
32.	N,A/C,A	N	A/C	A
33.	N,A/G,A	N	A/G	A
34.	N,A/T,A	N	A/T	A
35.	N,C/G,A	N	C/G	A
36.	N,C/T,A	N	C/T	A
37.	N,T/G,A	N	T/G	A
38.	N,C/G/T,A	N	C/G/T	A
39.	N,A/G/T,A	N	A/G/T	A
40.	N,A/C/T,A	N	A/C/T	A
41.	N,A/C/G,A	N	A/C/G	A
42.	A,N,N	A	N	N
43.	C,N,N	C	N	N
44.	G,N,N	G	N	N
45.	T,N,N	T	N	N
46.	A/C,N,N	A/C	N	N

表番号	トリプレット配列	位置 1	位置 2	位置 3
47.	A/G,N,N	A/G	N	N
48.	A/T,N,N	A/T	N	N
49.	C/G,N,N	C/G	N	N
50.	C/T,N,N	C/T	N	N
51.	G/T,N,N	G/T	N	N
52.	N,A,N	N	A	N
53.	N,C,N	N	C	N
54.	N,G,N	N	G	N
55.	N,T,N	N	T	N
56.	N,A/C,N	N	A/C	N
57.	N,A/G,N	N	A/G	N
58.	N,A/T,N	N	A/T	N
59.	N,C/G,N	N	C/G	N
60.	N,C/T,N	N	C/T	N
61.	N,G/T,N	N	G/T	N
62.	N,A/C/G,N	N	A/C/G	N
63.	N,A/C/T,N	N	A/C/T	N
64.	N,A/G/T,N	N	A/G/T	N
65.	N,C/G/T,N	N	C/G/T	N
66.	C,C,N	C	C	N
67.	G,G,N	G	G	N
68.	G,C,N	G	C	N
69.	G,T,N	G	T	N
70.	C,G,N	C	G	N
71.	C,T,N	C	T	N
72.	T,C,N	T	C	N
73.	A,C,N	A	C	N
74.	G,A,N	G	A	N
75.	A,T,N	A	T	N
76.	C,A,N	C	A	N
77.	T,T,N	T	T	N
78.	A,A,N	A	A	N
79.	T,A,N	T	A	N
80.	T,G,N	T	G	N
81.	A,G,N	A	G	N
82.	G/C,G,N	G/C	G	N
83.	G/C,C,N	G/C	C	N
84.	G/C,A,N	G/C	A	N
85.	G/C,T,N	G/C	T	N

【表1】 突然変異誘発カセット : N, N, G/T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGU	あり	グリシン	2	中性 非イオン化 (NPL)	15
GGC	なし				
GGA	なし				
GGG	あり				
GCU	あり	アラニン	2		
GCC	なし				
GCA	なし				
GCG	あり				
GUU	あり	バリン	2		
GUC	なし				
GUA	なし				
GUG	あり				
UUA	なし	ロイシン	3		
UUG	あり				
CUU	なし				
UUC	なし				
CTA	なし	イソロイシン	1		
CTG	あり				
ATT	あり				
AUC	なし				
AUA	なし	メチオニン	1		
ATG	あり				
TTT	あり	フェニルアラニン	1		
TTG	なし				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	あり				
CCC	なし				
CTA	なし				
CCG	あり	セリン	3	陽性 非イオン化 (POL)	9
TCT	あり				
TCC	なし				
TCA	なし				
TGG	あり	システイン	1		
AGT	あり				
AGC	なし				
TGT	あり				
TGC	なし	アスパラギン	1		
AAT	あり				
AAC	なし				
CAA	なし	グルタミン	1		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	1		
TAC	なし				
ACT	あり	トレオニン	2		
ACC	なし				
ACA	なし				
ACG	あり				
GAT	あり	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	2
GAC	なし				
GAA	なし	グルタミン酸	1		
GAG	あり				
AAA	なし	リジン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	5
AAG	あり				
CGT	あり	アルギニン	3		
CGC	なし				
CGA	なし				
CGG	あり				
AGA	なし				
AGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	1		
CAC	なし				
TAA	なし	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
TAG	あり				
TGA	なし				
64	32	20 種のアミノ酸が呈示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 15: 9: 2: 5: 1	

計

【表2】 突然変異誘発力セット：N, N, G/C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	なし	グリシン	2	非極性 (NPL)	15
GGC	あり				
GGA	なし				
GGG	あり				
GCT	なし	アラニン	2		
GCC	あり				
GCA	なし				
GCG	あり				
GTT	なし	バリン	2		
GTC	あり				
GTA	なし				
GTG	あり				
TTA	なし	ロイシン	3		
TTG	あり				
CTT	なし				
CTC	あり				
CTA	なし				
CTG	あり				
ATT	なし	イソロイシン	1		
ATC	あり				
ATA	なし				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	なし	フェニルアラニン	1		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	なし	プロリン	2		
CCC	あり				
CCA	なし				
CCG	あり				
TCT	なし				
TCC	あり	セリン	3	極性 非イオン化 (POL)	9
TCA	なし				
TCG	あり				
AGT	なし				
AGC	あり				
TGT	なし	システイン	1		
TGC	あり				
AAT	なし	アスパラギン	1		
AAC	あり				
CAA	なし	グルタミン	1		
CAG	あり				
TAT	なし	チロシン	1		
TAC	あり				
ACT	なし	トレオニン	2		
ACC	あり				
ACA	なし				
ACG	あり				
GAT	なし	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	2
GAC	あり				
GAA	なし	グルタミン酸	1		
GAG	あり				
AAA	なし	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	5
AAG	あり				
CGT	なし	アルギニン	3		
CGC	あり				
CGA	なし				
CGG	あり				
AGA	なし				
AGG	あり				
CAT	なし	ヒスチジン	1		
CAC	あり				
TAA	なし	終止コドン	1		
TAG	あり				
TGA	なし				
64	32	20 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 15: 9: 2: 5: 1	

【表3】 突然変異誘発力セット：N, N, G/A

コドン	呈示	アミノ酸 (頻度)	分類 (頻度)
GGT	なし	グリシン 2	非極性 (NPL) 15
GGC	なし		
GGA	あり		
GGG	あり		
GCT	なし	アラニン 2	
GCC	なし		
GCA	あり		
GCG	あり		
GTT	なし	バリン 2	
GTC	なし		
GTA	あり		
GTG	あり		
TTA	あり	ロイシン 4	
TTG	あり		
CTT	なし		
CTC	なし		
CTA	あり		
CTG	あり		
ATT	なし	イソロイシン 1	
ATC	なし		
ATA	あり		
ATG	あり	メチオニン 1	
TTT	なし	フェニルアラニン 0	
TTC	なし	トリプトファン 1	
TGG	あり		
CCT	なし	プロリン 2	
CCC	なし		
CCA	あり		
CCG	あり		
TCT	なし	セリン 2	極性 非イオン化 (POL) 6
TCC	なし		
TCA	あり		
TCG	あり		
AGT	なし	システイン 0	
AGC	なし		
TGT	なし		
TGC	なし		
AAT	なし	アスパラギン 0	
AAC	なし	グルタミン 2	
CAA	あり		
CAG	あり	チロシン 0	
TAT	なし		
TAC	なし	トレオニン 2	
ACT	なし		
ACC	なし		
ACA	あり		
ACG	あり	アスパラギン酸 0	
GAT	なし		
GAC	なし		
GAA	あり		
GAG	あり	グルタミン酸 2	
AAA	あり	リシン 2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS) 6
AAG	あり		
CGT	なし	アルギニン 4	
CGC	なし		
CGA	あり		
CGG	あり		
AGA	あり		
AGG	あり		
CAT	なし	ヒスチジン 0	
CAC	なし		
TAA	あり	終止コドン 3	終止シグナル (STP) 3
TAG	あり		
TGA	あり		
64	32	14 種のアミノ酸が呈示される	NPL: POL: NEG: POS: STP = 15: 6: 2: 6: 3

【表4】 突然変異誘発力セット：N, N, A/C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	なし	グリシン	2	非極性 (NPL)	14
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	なし				
GCT	なし	アラニン	2		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	なし				
GTT	なし	バリン	2		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	なし				
TTA	あり	ロイシン	3		
TTG	なし				
CTT	なし				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	なし				
ATT	なし	イソロイシン	2		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	なし	メチオニン	0		
TTT	なし	フェニルアラニン	1		
TTC	あり				
TGG	なし	トリプトファン	0		
CCT	なし	プロリン	2		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	なし				
TCT	なし				
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	なし				
AGT	なし				
AGC	あり				
TGT	なし	システイン	1		
TGC	あり				
AAT	なし	アスパラギン	1		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	1		
CAG	なし				
TAT	なし	チロシン	1		
TAC	あり				
ACT	なし	トレオニン	2		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	なし				
GAT	なし	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	2
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	1		
GAG	なし				
AAA	あり	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	5
AAG	なし				
CGT	なし	アルギニン	3		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	なし				
AGA	あり				
AGG	なし				
CAT	なし	ヒスチジン	1		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TAG	なし				
TGA	あり				
64	32	18 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 14: 9: 2: 5: 2	

計

【表5】 突然変異誘発力セット：N, N, A/T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
GGT	あり	グリシン	2	非極性 (NPL)	14		
GGC	なし						
GGA	あり						
GGG	なし						
GCT	あり	アラニン	2				
GCC	なし						
GCA	あり						
GCG	なし						
GTT	あり	バリン	2				
GTC	なし						
GTA	あり						
GTG	なし						
TTA	あり	ロイシン	3				
TTG	なし						
CTT	あり						
CTC	なし						
CTA	あり	イソロイシン	2				
CTG	なし						
ATT	あり						
ATC	なし						
ATA	あり	メチオニン	0				
ATG	なし						
TTT	あり						
TTC	なし						
TGG	なし	フェニルアラニン	1				
CCT	あり	トリプトファン	0				
CCC	なし						
CCA	あり						
CCG	なし						
TCT	あり	セリン	3	極性 非イオン化 (POL)	9		
TCC	なし						
TCA	あり						
TCG	なし						
AGT	あり						
AGC	なし						
TGT	あり	システイン	1				
TGC	なし						
AAT	あり						
AAC	なし						
CAA	あり	アスパラギン	1				
CAG	なし						
TAT	あり						
TAC	なし						
ACT	あり	グルタミン	1				
ACC	なし						
ACA	あり						
ACG	なし						
GAT	あり	チロシン	1				
GAC	なし						
GAA	あり						
GAG	なし						
AAA	あり	トレオニン	2				
AAG	なし						
CGT	あり						
CGC	なし						
CGA	あり	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	2		
CGG	なし						
AGA	あり						
AGG	なし						
CAT	あり	グルタミン酸	1				
CAC	なし						
TAA	あり			リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	5
TAG	なし						
TGA	あり						
64	32	18 種のアミノ酸が表示される	NPL: 14: POL: 9: NEG: 2: POS: 5: STP: 2				

計

【表6】 突然変異誘発カセット：N, N, C/T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	2	非極性 (NPL)	14
GGC	あり				
GGA	なし				
GGG	なし				
GCT	あり	アラニン	2		
GCC	あり				
GCA	なし				
GCG	なし				
GTT	あり	バリン	2		
GTC	あり				
GTA	なし				
GTG	なし				
TTA	なし	ロイシン	2		
TTC	なし				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	なし				
CTG	なし				
ATT	あり	イソロイシン	2		
ATC	あり				
ATA	なし				
ATG	なし	メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	なし	トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	2		
CCC	あり				
CCA	なし				
CCG	なし				
TCT	あり	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	12
TCC	あり				
TCA	なし				
TCG	なし				
AGT	あり				
AGC	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	なし	グルタミン	0		
CAG	なし				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
ACT	あり	トレオニン	2		
ACC	あり				
ACA	なし				
ACG	なし				
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	2
GAC	あり				
GAA	なし	グルタミン酸	0		
GAG	なし				
AAA	なし	リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
AAG	なし				
CGT	あり	アルギニン	2		
CGC	あり				
CGA	なし				
CGG	なし				
AGA	なし				
AGG	なし				
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	なし	終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
TAG	なし				
TGA	なし				
64	32	15 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 14: 12: 2: 4: 0	

計

【表7】 突然変異誘発カセット：N, N, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	29
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり	イソロイシン	3		
ATT	あり				
ATC	あり				
ATA	あり	メチオニン	1		
ATG	あり				
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	6	極性 非イオン化 (POL)	18
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
AGT	あり				
AGC	あり	システイン	2		
TGT	あり				
TGC	あり				
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	10
AAG	あり				
CGT	あり	アルギニン	6		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり				
AGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
64	64	20 種のアミノ酸が表示される		NPL: 29: POL: 18: NEG: 4: POS: 10: STP: 3	

【表8】 突然変異誘発カセット：N, N, G

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	なし	グリシン	1	非極性 (NFL)	8
GGC	なし				
GGA	なし				
GGG	あり				
GCT	なし	アラニン	1		
GCC	なし				
GCA	なし				
GCG	あり				
GTT	なし	バリン	1		
GTC	なし				
GTA	なし				
GTG	あり				
TTA	なし	ロイシン	2		
TTG	あり				
CTT	なし				
CTC	なし				
CTA	なし				
CTG	あり				
ATT	なし	イソロイシン	0		
ATC	なし				
ATA	なし				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	なし	フェニルアラニン	0		
TTC	なし				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	なし	プロリン	1		
CCC	なし				
CCA	なし				
CCG	あり				
TCT	なし	セリン	1	極性 非イオン化 (POL)	3
TCC	なし				
TCA	なし				
TCG	あり				
AGT	なし				
AGC	なし				
TGT	なし	システイン	0		
TGC	なし				
AAT	なし	アスパラギン	0		
AAC	なし				
CAA	なし	グルタミン	1		
CAG	あり				
TAT	なし	チロシン	0		
TAC	なし				
ACT	なし	トレオニン	1		
ACC	なし				
ACA	なし				
ACG	あり				
GAT	なし	アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAC	なし				
GAA	なし	グルタミン酸	1		
GAG	あり				
AAA	なし	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	3
AAG	あり				
CGT	なし	アルギニン	2		
CGC	なし				
CGA	なし				
CGG	あり				
AGA	なし				
AGG	あり				
CAT	なし	ヒスチジン	0		
CAC	なし				
TAA	なし	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
TAG	あり				
TGA	なし				
64	16	13 種のアミノ酸が表示される		NFL: 8: 3: 1: 3: 1 POL: 3: 1: 3: 1	

【表9】 突然変異誘発カセット：N,N,A

コドン	表示	アミノ酸 (頻度)	分類 (頻度)									
GGT	なし	グリシン 1	非極性 (NPL) 7									
GGC	なし											
GGA	あり											
GGG	なし											
GCT	なし	アラニン 1										
GCC	なし											
GCA	あり											
GCG	なし											
GTT	なし	バリン 1										
GTC	なし											
GTA	あり											
GTG	なし											
TTA	あり	ロイシン 2										
TTG	なし											
CTT	なし											
CTC	なし											
CTA	あり											
CTG	なし											
ATT	なし	イソロイシン 1										
ATC	なし											
ATA	あり											
ATG	なし	メチオニン 0										
TTT	なし	フェニルアラニン 0										
TTC	なし											
TGG	なし	トリプトファン 0										
CCT	なし	プロリン 1										
CCC	なし											
CCA	あり											
CCG	なし											
TCT	なし	セリン 1	極性 非イオン化 (POL) 3									
TCC	なし											
TCA	あり											
TCG	なし											
AGT	なし											
AGC	なし	システイン 0										
TGT	なし											
TGC	なし	アスパラギン 0										
AAT	なし											
AAC	なし	グルタミン 1										
CAA	あり											
CAG	なし	チロシン 0										
TAT	なし											
TAC	なし	トレオニン 1										
ACT	なし											
ACC	なし											
ACA	あり											
ACG	なし	アスパラギン酸 0										
GAT	なし											
GAC	なし						グルタミン酸 1					イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG) 1
GAA	あり											
GAG	なし	リシン 1					イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS) 3					
AAA	あり											
AAG	なし											
CGT	なし			アルギニン 2								
CGC	なし											
CGA	あり											
CGG	なし											
AGA	あり											
AGG	なし	ヒスチジン 0										
CAT	なし											
CAC	なし											
TAA	あり	終止コドン 2			終止シグナル (STP) 2							
TAG	なし											
TGA	あり											
64	16	12 種のアミノ酸が表示される	NPL: 7: POL: 3: NEG: 1: POS: 3: STP = 2									

計

【表10】 突然変異誘発カセット：N,N,C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	なし	グリシン	1	非極性 (NPL)	7
GGC	あり				
GGA	なし				
GGG	なし				
GCT	なし	アラニン	1		
GCC	あり				
GCA	なし				
GCG	なし				
GTT	なし	バリン	1		
GTC	あり				
GTA	なし				
GTG	なし				
TTA	なし	ロイシン	1		
TTG	なし				
CTT	なし				
CTC	あり				
CTA	なし				
CTG	なし				
ATT	なし	イソロイシン	1		
ATC	あり				
ATA	なし				
ATG	なし	メチオニン	0		
TTT	なし	フェニルアラニン	1		
TTC	あり				
TGG	なし	トリプトファン	0		
CCT	なし	プロリン	1		
CCC	あり				
CCA	なし				
CCG	なし				
TCT	なし	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	6
TCC	あり				
TCA	なし				
TCG	なし				
AGT	なし				
AGC	あり				
TGT	なし	システイン	1		
TGC	あり				
AAT	なし	アスパラギン	1		
AAC	あり				
CAA	なし	グルタミン	0		
CAG	なし				
TAT	なし	チロシン	1		
TAC	あり				
ACT	なし	トリオニン	1		
ACC	あり				
ACA	なし				
ACG	なし				
GAT	なし	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAC	あり				
GAA	なし	グルタミン酸	0		
GAG	なし				
AAA	なし	リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
AAG	なし				
CGT	なし	アルギニン	1		
CGC	あり				
CGA	なし				
CGG	なし				
AGA	なし				
AGG	なし				
CAT	なし	ヒスチジン	1		
CAC	あり				
TAA	なし	終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
TAG	なし				
TGA	なし				
64	16	15 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 7: 6: 1: 2: 0	

【表11】 突然変異誘発カセット：N, N, T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	7
GGC	なし				
GGA	なし				
GGG	なし				
GCT	あり	アラニン	1		
GCC	なし				
GCA	なし				
GCG	なし				
GTT	あり	バリン	1		
GTC	なし				
GTA	なし				
GTG	なし				
TTA	なし	ロイシン	1		
TTG	なし				
CTT	あり				
CTC	なし				
CTA	なし				
CTG	なし				
ATT	あり	イソロイシン	1		
ATC	なし				
ATA	なし				
ATG	なし	メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	1		
TTC	なし				
TGG	なし	トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	1		
CCC	なし				
CCA	なし				
CCG	なし				
TCT	あり			セリン	2
TCC	なし				
TCA	なし				
TCG	なし				
AGT	あり	システイン	1		
AGC	なし				
TGT	あり	アスパラギン	1		
TGC	なし				
AAT	あり	グルタミン	0		
AAC	なし				
CAA	なし	チロシン	1		
CAG	なし				
TAT	あり	トレオニン	1		
TAC	なし				
ACT	あり				
ACC	なし				
ACA	なし	アスパラギン酸	1		
ACG	なし				
GAT	あり				
GAC	なし				
GAA	なし	グルタミン酸	0		
GAG	なし				
AAA	なし	リシン	0		
AAG	なし				
CGT	あり	アルギニン	1		
CGC	なし				
CGA	なし				
CGG	なし				
AGA	なし				
AGG	なし				
CAT	あり	ヒスチジン	1		
CAC	なし				
TAA	なし	終止コドン	0		
TAG	なし				
TGA	なし				
64	16	15 種のアミノ酸が表示される		NPL: 7; POL: 6; NEG: 1; POS: 2; STP: 0	

計

【表12】 突然変異誘発カセット：N, N, C/G/T

コドン	表示	アミノ酸 (頻度)	分類 (頻度)
GGT	あり	グリシン 3	非極性 (NPL) 22
GGC	あり		
GGA	なし		
GGG	あり		
GCT	あり	アラニン 3	
GCC	あり		
GCA	なし		
GCG	あり		
GTT	あり	バリン 3	
GTC	あり		
GTA	なし		
GTG	あり		
TTA	なし	ロイシン 4	
TTG	あり		
CTT	あり		
CTC	あり		
CTA	なし		
CTG	あり		
ATT	あり	イソロイシン 2	
ATC	あり		
ATA	なし		
ATG	あり	メチオニン 1	
TTT	あり	フェニルアラニン 2	
TTC	あり		
TGG	あり	トリプトファン 1	
CCT	あり	プロリン 3	
CCC	あり		
CCA	なし		
CCG	あり		
TCT	あり	セリン 5	極性 非イオン化 (POL) 15
TCC	あり		
TCA	なし		
TCG	あり		
AGT	あり		
AGC	あり		
TGT	あり	システイン 2	
TGC	あり		
AAT	あり	アスパラギン 2	
AAC	あり		
CAA	なし	グルタミン 1	
CAG	あり		
TAT	あり	チロシン 2	
TAC	あり		
ACT	あり	トレオニン 3	
ACC	あり		
ACA	なし		
ACG	あり		
GAT	あり	アスパラギン酸 2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG) 3
GAC	あり		
GAA	なし	グルタミン酸 1	
GAG	あり		
AAA	なし	リシン 1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS) 7
AAG	あり		
CGT	あり	アルギニン 4	
CGC	あり		
CGA	なし		
CGG	あり		
AGA	なし		
AGG	あり		
CAT	あり	ヒスチジン 2	
CAC	あり		
TAA	なし	終止コドン 1	終止シグナル (STP) 1
TAG	あり		
TGA	なし		
64	48	20 種のアミノ酸が表示される	NPL: POL: NEG: POS: STP = 22: 15: 3: 7: 1

計

【表13】 突然変異誘発カセット：N,N,A/G/T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	3	非極性 (NPL)	22
GGC	なし				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	3		
GCC	なし				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	3		
GTC	なし				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	5		
TIG	あり				
CTT	あり				
CTC	なし				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	2		
ATC	なし				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	1		
TTC	なし				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	あり	プロリン	3		
CCC	なし				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり			セリン	4
TCC	なし				
TCA	あり				
TCG	あり				
AGT	あり				
AGC	なし				
TGT	あり	システイン	1		
TGC	なし	アスパラギン	1		
AAT	あり				
AAC	なし	グルタミン	2		
CAA	あり				
CAG	あり	チロシン	1		
TAT	あり				
TAC	なし	トレオニン	3		
ACT	あり				
ACC	なし				
ACA	あり				
ACG	あり	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	3
GAT	あり				
GAC	なし				
GAA	あり				
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	8
AAG	あり				
CGT	あり	アルギニン	5		
CGC	なし				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり				
AGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	1		
CAC	なし				
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
64	48	20 種のアミノ酸が表示される		NPL: 22: POL: 12: NEG: 3: POS: 8: STP: 3	

計

【表14】 突然変異誘発カセット：N, N, A/C/T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
GGT	あり	グリシン	3	非極性 (NPL)	21		
GGC	あり						
GGA	あり						
GGG	なし						
GCT	あり	アラニン	3				
GCC	あり						
GCA	あり						
GCG	なし						
GTT	あり	バリン	3				
GTC	あり						
GTA	あり						
GTG	なし						
TTA	あり	ロイシン	4				
TTG	なし						
CTT	あり						
CTC	あり						
CTA	あり						
CTG	なし	イソロイシン	3				
ATT	あり						
ATC	あり						
ATA	あり	メチオニン	0				
ATG	なし						
TTT	あり	フェニルアラニン	2				
TTC	あり						
TGG	なし	トリプトファン	0				
CCT	あり	プロリン	3				
CCC	あり						
CCA	あり						
CCG	なし						
TCT	あり	セリン	5	極性 非イオン化 (POL)	15		
TCC	あり						
TCA	あり						
TCG	なし						
AGT	あり						
AGC	あり	システイン	2				
TGT	あり						
TGC	あり	アスパラギン	2				
AAT	あり						
AAC	あり	グルタミン	1				
CAA	あり						
CAG	なし	チロシン	2				
TAT	あり						
TAC	あり	トレオニン	3				
ACT	あり						
ACC	あり						
ACA	あり						
ACG	なし	アスパラギン酸	2				
GAT	あり						
GAC	あり	グルタミン酸	1				
GAA	あり						
GAG	なし	リジン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	7		
AAA	あり						
AAG	なし						
CGT	あり					アルギニン	4
CGC	あり						
CGA	あり						
CGG	なし						
AGA	あり						
AGG	なし	ヒスチジン	2				
CAT	あり						
CAC	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2		
TAA	あり						
TAG	なし						
TGA	あり	18 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 21: 15: 3: 7: 2			
64	48						

【表15】 突然変異誘発カセット：N, N, A/C/G

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
GGT	なし	グリシン	3	非極性 (NPL)	22		
GGC	あり						
GGA	あり						
GGG	あり						
GCT	なし	アラニン	3				
GCC	あり						
GCA	あり						
GCG	あり						
GTT	なし	バリン	3				
GTC	あり						
GTA	あり						
GTG	あり						
TTA	あり	ロイシン	5				
TTG	あり						
CTT	なし						
CTC	あり						
CTA	あり						
CTG	あり						
ATT	なし	イソロイシン	2				
ATC	あり						
ATA	あり	メチオニン	1				
ATG	あり						
TTT	なし	フェニルアラニン	1				
TTC	あり						
TGG	あり	トリプトファン	1				
CCT	なし	プロリン	3				
CCC	あり						
CCA	あり						
CCG	あり						
TCT	なし	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	12		
TCC	あり						
TCA	あり						
TCG	あり						
AGT	なし						
AGC	あり	システイン	1				
TGT	なし						
TGC	あり	アスパラギン	1				
AAT	なし						
AAC	あり	グルタミン	2				
CAA	あり						
CAG	あり	チロシン	1				
TAT	なし						
TAC	あり	トレオニン	3				
ACT	なし						
ACC	あり						
ACA	あり						
ACG	あり	アスパラギン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	3		
GAT	なし						
GAC	あり	グルタミン酸	2				
GAA	あり						
GAG	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	8		
AAA	あり						
AAG	あり						
CGT	なし					アルギニン	5
CGC	あり						
CGA	あり						
CGG	あり						
AGA	あり						
AGG	あり						
CAT	なし	ヒスチジン	1				
CAC	あり						
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3		
TAG	あり						
TGA	あり						
64	48	20 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 22: 12: 3: 8: 3			

計

【表16】 突然変異誘発カセット：N, A, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	1
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAA	あり	グルタミン酸	1		
AAA	あり	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
計	4	3 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 0: 1: 1: 1: 1	

【表17】 突然変異誘発カセット：N, A, C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
AAC	あり	アスパラギン	1		
		グルタミン	0		
TAC	あり	チロシン	1		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAC	あり	アスパラギン酸	1		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
		リシン	0		
		アルギニン	0		
CAC	あり	ヒスチジン	1	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
計	4	4種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 0: 2: 1: 1: 0	

【表18】 突然変異誘発カセット：N, A, G

コドン	表示	アミノ酸 (頻度)	分類 (頻度)
		グリシン 0	非極性 (NPL) 0
		アラニン 0	
		バリン 0	
		ロイシン 0	
		イソロイシン 0	
		メチオニン 0	
		フェニルアラニン 0	
		トリプトファン 0	
		プロリン 0	
		セリン 0	極性 非イオン化 (POL) 1
		システイン 0	
		アスパラギン 0	
CAG	あり	グルタミン 1	
		チロシン 0	
		トレオニン 0	
		アスパラギン酸 0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG) 1
GAG	あり	グルタミン酸 1	
AAG	あり	リシン 1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS) 1
		アルギニン 0	
		ヒスチジン 0	
TAG	あり	終止コドン 1	終止シグナル (STP) 1
計	4	3種のアミノ酸が表示される	NPL: POL: NEG: POS: STP = 0: 1: 1: 1: 1

【表19】 突然変異誘発カセット：N, A, T

コドン	表示	アミノ酸 (頻度)	分類 (頻度)
		グリシン 0	非極性 (NPL) 0
		アラニン 0	
		バリン 0	
		ロイシン 0	
		イソロイシン 0	
		メチオニン 0	
		フェニルアラニン 0	
		トリプトファン 0	
		プロリン 0	
		セリン 0	極性 非イオン化 (POL) 2
		システイン 0	
AAT	あり	アスパラギン 1	
		グルタミン 0	
TAT	あり	チロシン 1	
		トレオニン 0	
		アスパラギン酸 1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG) 1
GAT	あり	グルタミン酸 0	
		リシン 0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS) 1
		アルギニン 0	
CAT	あり	ヒスチジン 1	
		終止コドン 0	終止シグナル (STP) 0
計	4	4種のアミノ酸が表示される	NPL: POL: NEG: POS: STP = 0: 2: 1: 1: 0

【表20】 突然変異誘発カセット：N, C, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	2
GCA	あり	アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCA	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACA	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 2: 2: 0: 0: 0	

【表21】 突然変異誘発カセット：N, C, C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	2
GCC	あり	アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCC	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TCC	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACC	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 2: 2: 0: 0: 0	

【表22】 突然変異誘発カセット：N, C, G

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	2
GCG	あり	アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCG	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TCG	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACG	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 2: 2: 0: 0: 0	

【表23】 突然変異誘発カセット：N, C, T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	2
GCT	あり	アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TCT	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACT	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リジン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 2: 2: 0: 0: 0	

【表24】 突然変異誘発カセット：N, G, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	1
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり				
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	1
TGA	あり	終止コドン	1		
計	4	2 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 1: 0: 0: 2: 1	

【表25】 突然変異誘発カセット：N, G, C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGC	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	1
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
AGC	あり	セリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TGC	あり	システイン	1		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
CGC	あり	アルギニン	1		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 1: 2: 0: 1: 0	

【表26】 突然変異誘発カセット：N, G, G

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGG	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	2
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
CGG	あり	リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
AGG	あり	アルギニン	2		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	3 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 2: 0: 0: 2: 0	

【表27】 突然変異誘発カセット：N, G, T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	1
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TGT	あり	システイン	1		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
CGT	あり	アルギニン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 1: 2: 0: 1: 0	

【表28】 突然変異誘発カセット：N, T, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	3種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 4: 0: 0: 0: 0	

【表29】 突然変異誘発カセット：N, T, C

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
GTC	あり	バリン	1		
CTC	あり	ロイシン	1		
ATC	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
TTC	あり	フェニルアラニン	1		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 4: 0: 0: 0: 0	

【表30】 突然変異誘発力セット：N, T, G

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
GTG	あり	バリン	1		
TTG	あり	ロイシン	2		
CTG	あり				
		イソロイシン	0		
ATG	あり	メチオニン	1		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
計	4	3 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 4: 0: 0: 0: 0	

【表31】 突然変異誘発力セット：N, T, T

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
GTT	あり	バリン	1		
CTT	あり	ロイシン	1		
ATT	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	1		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 4: 0: 0: 0: 0	

【表32】 突然変異誘発カセット：N, A/C, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GCA	あり	グリシン	0	非極性 (NPL)	2
		アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCA	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	3
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0		
ACA	あり	トレオニン	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
		アスパラギン酸	0		
GAA	あり	グルタミン酸	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
AAA	あり	リシン	1		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
	8	7種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 2: 3: 1: 1: 1	

計

【表33】 突然変異誘発カセット：N, A/G, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	1
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	1
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
		アスパラギン酸	0		
GAA	あり	グルタミン酸	1		
AAA	あり	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	3
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり				
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TGA	あり				
	8	5 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 1: 1: 1: 3: 2	

計

【表34】 突然変異誘発カセット：N, A/T, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	1
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAA	あり	アスパラギン酸 グルタミン酸	1		
AAA	あり	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
計	8	6種のアミノ酸が表示される		NPL: 4: POL: 1: NEG: 1: POS: 1: STP: 1	

【表35】 突然変異誘発カセット：N, C/G, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	3
GCA	あり	アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCA	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	2
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACA	あり	トレオニン	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
		リシン	0		
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり			終止シグナル (STP)	1
		ヒスチジン	0		
TGA	あり	終止コドン	1		
計	8	6 種のアミノ酸が表示される		NPL: 3: POL: 2: NEG: 0: POS: 2: STP: 1	

【表36】 突然変異誘発力セット：N, C/T, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	6
GCA	あり	アラニン	1		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
CCA	あり	プロリン	1		
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACA	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	8	7種のアミノ酸が表示される		NPL: 6: POL: 2: NEG: 0: POS: 0: STP: 0	

【表37】 突然変異誘発力セット：N, T/G, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	5
		アラニン	0		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり				
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	1
TGA	あり	終止コドン	1		
計	8	5 種のアミノ酸が表示される		NPL: 5: POL: 0: NEG: 0: POS: 2: STP: 1	

【表38】 突然変異誘発力セット：N, C/G/T, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	7
GCA	あり	アラニン	1		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		トリプトファン	0		
CCA	あり	プロリン	1		
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
ACA	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり			イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
		ヒスチジン	0		
TGA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
計	12	9 種のアミノ酸が表示される		NPL: 7; POL: 2; NEG: 0; POS: 2; STP: 1	

【表39】 突然変異誘発力セット：N, A/G/T, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	5
		アラニン	0		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0	極性 非イオン化 (POL)	1
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	3
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAA	あり	グルタミン酸	1		
AAA	あり	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	3
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり			イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	3
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TGA	あり			終止シグナル (STP)	2
計	12	8 種のアミノ酸が表示される		NPL: 5; POL: 1; NEG: 1; POS: 3; STP: 2	

【表40】 突然変異誘発カセット：N, A/C/T, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	6
GCA	あり	アラニン	1		
GTA	あり	バリン	1		
TTA	あり	ロイシン	2		
CTA	あり				
ATA	あり	イソロイシン	1		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0	極性 非イオン化 (POL)	3
CCA	あり	プロリン	1		
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0		
ACA	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
GAA	あり	グルタミン酸	1		
AAA	あり	リシン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	1
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
計	12	10 種のアミノ酸が表示される		NPL: 6; POL: 3; NEG: 1; POS: 1; STP = 1	

【表41】 突然変異誘発カセット：N, A/C/G, A

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGA	あり	グリシン	1	非極性 (NPL)	3
GCA	あり	アラニン	1		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCA	あり	プロリン	1	極性 非イオン化 (POL)	3
TCA	あり	セリン	1		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	1		
		チロシン	0		
ACA	あり	トレオニン	1		
		アスパラギン酸	0		
GAA	あり	グルタミン酸	1	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	1
AAA	あり	リジン	1	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	3
CGA	あり	アルギニン	2		
AGA	あり				
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	2
TAA	あり	終止コドン	2		
TGA	あり				
計	12	9 種のアミノ酸が表示される		NPL: 3: POL: 3: NEG: 1: POS: 3: STP = 2	

【表42】 突然変異誘発カセット：A,N,N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL.)	4
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	8
AGC	あり				
		システイン	0		
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
AAG	あり				
AGA	あり	アルギニン	2		
AGG	あり				
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
	16	7種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 4: 8: 0: 4: 0	

【表43】 突然変異誘発カセット：C, N, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	8
		アラニン	0		
		バリン	0		
CTT	あり	ロイシン	4		
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6
CGT	あり	アルギニン	4		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
CAT	あり	ヒスタジン	2		
CAC	あり				
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	16	5 種のアミノ酸が表示される		NPL: 8: POL: 2: NEG: 0: POS: 6: STP: 0	0

計

【表44】 突然変異誘発カセット：G,N,N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	12
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	16	5 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 12: 0: 4: 0: 0	

計

【表45】 突然変異誘発カセット：T,N,N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	5
		アラニン	0		
		バリン	0		
TTA	あり	ロイシン	2		
TTG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	8
TCT	あり	セリン	4		
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり			イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	3
TAA	あり	終止コドン	3		
TAG	あり				
TGA	あり			NPL: POL: NEG: POS: STP = 5: 8: 0: 0: 3	
	16	6種のアミノ酸が呈示される			

計

【表46】 突然変異誘発カセット：A/C, N, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
		グリシン	0	非極性 (NPL)	12		
		アラニン	0				
		バリン	0				
CIT	あり	ロイシン	4				
CTC	あり						
CTA	あり						
CTG	あり						
ATT	あり	イソロイシン	3				
ATC	あり						
ATA	あり						
ATG	あり	メチオニン	1				
		フェニルアラニン	0				
		トリプトファン	0				
CCT	あり	プロリン	4				
CCC	あり						
CCA	あり						
CCG	あり						
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	10		
AGC	あり						
		システイン	0				
AAT	あり	アスパラギン	2				
AAC	あり						
CAA	あり	グルタミン	2				
CAG	あり						
		チロシン	0				
ACT	あり	トレオニン	4				
ACC	あり						
ACA	あり						
ACG	あり						
		アスパラギン酸	0			イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	10		
AAG	あり						
CGT	あり					アルギニン	6
CGC	あり						
CGA	あり						
CGG	あり						
AGA	あり						
AGG	あり						
CAT	あり	ヒスチジン	2				
CAC	あり						
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0		
	32	11 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 12: 10: 0: 10: 0			

計

【表47】 突然変異誘発カセット：A/G, N, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	16
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
		ロイシン	0		
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	8
AGC	あり				
		システイン	0		
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACT	あり	トリプトニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり	グルタミン酸	2		
GAA	あり				
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
AAG	あり	アルギニン	2		
AGA	あり				
AGG	あり				
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
	32	12 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 16: 8: 4: 4: 0	

計

【表48】 突然変異誘発力セット：A/T, N, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	9
		アラニン	0		
		バリン	0		
TTA	あり	ロイシン	2		
TTG	あり	イソロイシン	3		
ATT	あり				
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり	トリプトファン	1		
TGG	あり				
		プロリン	0		
TCT	あり	セリン	6	極性 非イオン化 (POL)	16
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
AGT	あり				
AGC	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
		グルタミン	0		
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
AAG	あり				
AGA	あり	アルギニン	2		
AGG	あり				
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
	32	12 種のアミノ酸が呈示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 9: 16: 0: 4: 3	

【表49】 突然変異誘発カセット：C/G,N,N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	20
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
CTT	あり	ロイシン	4		
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6
CGT	あり	アルギニン	4		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	32	10 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 20: 2: 4: 6: 0	

計

【表50】 突然変異誘発カセット：C/T, N, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	13
		アラニン	0		
		バリン	0		
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
		イソコイシン	0		
		メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	10
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6
CGT	あり	アルギニン	4		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
	32	10 種のアミノ酸が呈示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 13: 10: 0: 6: 3	

計

【表51】 突然変異誘発カセット：G/T, N, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	17
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	2		
TTG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0		
TCT	あり	セリン	4	極性 非-イオン化 (POL)	8
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
	32	11 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 17: 8: 4: 0: 3	

【表52】 突然変異誘発カセット：N, A, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	6
		システイン	0		
		アスパラギン	2		
AAT	あり	グルタミン	2		
AAC	あり				
CAA	あり				
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり	トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり	グルタミン酸	2		
GAA	あり				
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
AAG	あり	アルギニン	0		
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TAA	あり				
TAG	あり				
	16	7 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 0: 6: 4: 4: 2	

【表53】 突然変異誘発カセット：N, C, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
		グリシン	0	非極性 (NPL)	8		
GCT	あり	アラニン	4				
GCC	あり						
GCA	あり						
GCG	あり						
		バリン	0				
		ロイシン	0				
		イソロイシン	0				
		メチオニン	0				
		フェニルアラニン	0				
		トリプトファン	0				
CCT	あり	プロリン	4				
CCC	あり						
CCA	あり						
CCG	あり						
TCT	あり	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	8		
TCC	あり						
TCA	あり						
TCG	あり						
		システイン	0				
		アスパラギン	0				
		グルタミン	0				
		チロシン	0				
ACT	あり	トレオニン	4				
ACC	あり						
ACA	あり						
ACG	あり						
		アスパラギン酸	0			イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0				
		リシン	0			イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0				
		ヒスチジン	0				
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0		
	16	4 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 8: 8: 0: 0: 0			

計

【表54】 突然変異誘発カセット：N, G, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	5		
GGC	あり						
GGA	あり						
GGG	あり						
		アラニン	0				
		バリン	0				
		ロイシン	0				
		イソロイシン	0				
		メチオニン	0				
		フェニルアラニン	0				
TGG	あり	トリプトファン	1				
		プロリン	0				
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	4		
AGC	あり						
TGT	あり	システイン	2				
TGC	あり						
		アスパラギン	0				
		グルタミン	0				
		チロシン	0				
		トレオニン	0				
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0		
		グルタミン酸	0				
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6		
CGT	あり	アルギニン	6				
CGC	あり						
CGA	あり						
CGG	あり						
AGA	あり						
AGG	あり						
		ヒステジン	0	終止シグナル (STP)	1		
TGA	あり	終止コドン	1				
	16	5 種のアミノ酸が表示される		NPL: 5: POL: 4: NEG: 0: POS: 6: STP = 1			

【表55】 突然変異誘発カセット：N, T, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	16
		アラニン	0		
GIT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
		トリプトファン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
	16	5 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 16: 0: 0: 0: 0	

【表56】 突然変異誘発力セット：N, A/C, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	8
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	14
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
		システイン	0		
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
AAG	あり				
		アルギニン	0		
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TAG	あり				
	32	11 種のアミノ酸が表示される		NPL: 8: POL: 14: NEG: 4: POS: 4: STP = 2	

計

【表57】 突然変異誘発カセット：N, A/G, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	5
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	10
AGC	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2		
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	10
AAG	あり				
CGT	あり	アルギニン	6		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり				
AGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
	32	12 種のアミノ酸が表示される		NPL: 5 POL: 10 NEG-POS: 4 STP: 3	

計

【表58】 突然変異誘発カセット：N, A/T, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	16
		アラニン	0		
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0		
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2		
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
AAA	あり	リジン	2		
AAG	あり				
		アルギニン	0		
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	2		
TAG	あり				
	32	12 種のアミノ酸が表示される		NPL: 16: POL: 6: NEG: 4: POS: 4: STP = 2	

【表59】 突然変異誘発カセット：N, C/G, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)		
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	13		
GGC	あり						
GGA	あり						
GGG	あり						
GCT	あり	アラニン	4				
GCC	あり						
GCA	あり						
GCG	あり						
		バリン	0				
		ロイシン	0				
		イソロイシン	0				
		メチオニン	0				
		フェニルアラニン	0				
TGG	あり	トリプトファン	1				
CCT	あり	プロリン	4				
CCC	あり						
CCA	あり						
CCG	あり						
TCT	あり	セリン	6	極性 非イオン化 (POL)	12		
TCC	あり						
TCA	あり						
TCG	あり						
AGT	あり	システイン	2				
AGC	あり						
TGT	あり						
TGC	あり						
		アスパラギン	0				
		グルタミン	0				
		チロシン	0				
ACT	あり	トレオニン	4				
ACC	あり						
ACA	あり						
ACG	あり						
		アスパラギン酸	0			イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0				
		リシン	0			イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6
CGT	あり	アルギニン	6				
CGC	あり						
CGA	あり						
CGG	あり						
AGA	あり						
AGG	あり						
		ヒスチジン	0				
TGA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1		
	32	8 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 13: POL: 12: NEG: POS: STP = 0: 6: 1			

計

【表60】 突然変異誘発カセット：N, C/T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	24
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	8
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	32	9 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 24: POL: 8: NEG: 0: POS: 0: STP = 0	

計

【表6 1】 突然変異誘発カセット：N, G/T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	21
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
		アラニン	0		
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	4
AGC	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6
CGT	あり	アルギニン	6		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり				
AGG	あり				
		ヒスチジン	0		
TGA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
	32	10 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 21: POL: 4: NEG:POS: STP = 0: 6: 1	

計

【表62】 突然変異誘発カセット：N, A/C/G, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	13
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	6	極性 非イオン化 (POL)	18
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
AGT	あり	システイン	2		
AGC	あり				
TGT	あり				
TGC	あり				
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり				
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり				
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	10
AAG	あり				
CGT	あり	アルギニン	6		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり	ヒスチジン	2		
AGG	あり				
CAT	あり				
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
	48	15 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 13: POL: 18: NEG: 4: POS: 10: STP = 3	

【表63】 突然変異誘発カセット：N, A/C/T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	24
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	4	極性 非イオン化 (POL)	14
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
		システイン	0		
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
AAG	あり				
		アルギニン	0		
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TAG	あり				
	48	16 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 24; POL: 14; NEG: 4; POS: 4; STP: 2	

計

【表64】 突然変異誘発カセット：N, A/G/T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	21
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
		アラニン	0		
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTG	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	10
AGC	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	10
AAG	あり				
CGT	あり	アルギニン	6		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり				
AGG	あり				
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり				
TAA	あり	終止コドン	3	終止シグナル (STP)	3
TAG	あり				
TGA	あり				
	48	17 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 21: POL: 10: NEG: POS: 4: STP: 3	

計

【表65】 突然変異誘発カセット：N, C/G/T, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	29
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
TTA	あり	ロイシン	6		
TTC	あり				
CTT	あり				
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
ATT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
TIT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
TGG	あり	トリプトファン	1		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
TCT	あり	セリン	6	極性 非イオン化 (POL)	12
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
AGT	あり				
AGC	あり				
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	6
CGT	あり	アルギニン	6		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
AGA	あり				
AGG	あり				
		ヒスチジン	0		
TGA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
	48	13 種のアミノ酸が表示される		NPL: 29; POL: 12; NEG-POS: 0; STP = 6; 1	

計

【表66】 突然変異誘発カセット：C, C, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4		
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 4; POL: 0; NEG: 0; POS: 0; STP: 0	

【表67】 突然変異誘発カセット：G, G, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	4
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	0	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 4; POL: 0; NEG: 0; POS: 0; STP = 0

【表68】 突然変異誘発カセット：G, C, N

コドン	显示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
計	4	1 種のアミノ酸が表示される		NPL: POL: NEG:POS: STP = 4: 0: 0: 0: 0	

【表69】 突然変異誘発カセット：G, T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: POL: NEG:POS: STP = 4: 0: 0: 0: 0	

【表70】 突然変異誘発カセット：C, G, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
CGT	あり	アルギニン	4	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	1 種のアミノ酸が表示される		NPL: 0: POL: 0: NEG: POS: STP = 0: 4: 0	

【表71】 突然変異誘発カセット：C, T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
		バリン	0		
CTT	あり	ロイシン	4		
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 4: POL: 0: NEG: POS: STP = 0: 0: 0: 0	

【表7 2】 突然変異誘発力セット：T, C, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	4
TCT	あり	セリン	4		
TCC	あり				
TCA	あり				
TCG	あり				
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0	終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
計	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 0: POL: 4: NEG: POS: STP = 0: 0: 0: 0	

【表7 3】 突然変異誘発力セット：A, C, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	4
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
ACT	あり	トレオニン	4		
ACC	あり				
ACA	あり				
ACG	あり				
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 0: POL: 4: NEG: POS: 0: STP: 0	

【表74】 突然変異誘発カセット：G, A, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2		
GAG	あり				
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	2種のアミノ酸が表示される		NPL: 0: POL: 4: NEG: POS: STP = 0: 0: 0: 0	

【表75】 突然変異誘発カセット：A, T, N

コドン	表示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
AIT	あり	イソロイシン	3		
ATC	あり				
ATA	あり				
ATG	あり	メチオニン	1		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	2種のアミノ酸が表示される		NPL: 4: POL: 0: NEG: POS: STP = 0: 0: 0: 0	

【表76】 突然変異誘発カセット：C, A, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
		リシン	0		
		アルギニン	0		
CAT	あり	ヒスチジン	2		
CAC	あり			終止シグナル (STP)	0
		終止コドン	0		
計	4	2 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 0: POL: 2: NEG: 0: POS: 2: STP: 0	

【表77】 突然変異誘発カセット：T, T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	4
		アラニン	0		
		バリン	0		
TTA	あり	ロイシン	2		
TIG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
TTT	あり	フェニルアラニン	2		
TTC	あり				
		トリプトファン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		プロリン	0		
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	2 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 4: POL: 0: NEG: 0: POS: 0: STP: 0	

【表78】 突然変異誘発カセット：A, A, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
AAT	あり	アスパラギン	2		
AAC	あり				
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
				イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
AAA	あり	リシン	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
AAG	あり				
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	4	2 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 0: POL: 2: NEG: 0: POS: 2: STP: 0	

【表79】 突然変異誘発カセット：T, A, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
TAT	あり	チロシン	2		
TAC	あり				
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TAA	あり	終止コドン	2	終止シグナル (STP)	2
TAG	あり				
計	4	1 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 0: POL: 2: NEG: 0: POS: 0: STP: 2	

【表80】 突然変異誘発カセット：T, G, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	1
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
TGG	あり	トリプトファン	1		
		プロリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		セリン	0		
TGT	あり	システイン	2		
TGC	あり				
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		リシン	0		
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
TGA	あり	終止コドン	1	終止シグナル (STP)	1
計	4	2種のアミノ酸が呈示される		NPL: 1: POL: 2: NEG: 0: POS: 0: STP = 1	

【表81】 突然変異誘発カセット：A, G, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NFL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
AGT	あり	セリン	2	極性 非イオン化 (POL)	2
AGC	あり				
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
AGA	あり	アルギニン	2		
AGG	あり				
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	4	2種のアミノ酸が呈示される		NFL: 0: POL: 2: NEG: 0: POS: 2: STP = 0	

計

【表82】 突然変異誘発カセット：G/C, G, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
GGT	あり	グリシン	4	非極性 (NPL)	4
GGC	あり				
GGA	あり				
GGG	あり				
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		アスパラギン酸	0		
		グルタミン酸	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	4
		リシン	0		
CGT	あり	アルギニン	4		
CGC	あり				
CGA	あり				
CGG	あり				
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	8	2 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 4; POL: 0; NEG: 0; POS: 4; STP: 0	

【表83】 突然変異誘発カセット：G/C, C, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	8
GCT	あり	アラニン	4		
GCC	あり				
GCA	あり				
GCG	あり				
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
CCT	あり	プロリン	4	極性 非イオン化 (POL)	0
CCC	あり				
CCA	あり				
CCG	あり				
		セリン	0		
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
	8	2種のアミノ酸が呈示される		NPL: 8; POL: 0; NEG: 0; POS: 0; STP: 0	

【表84】 突然変異誘発カセット：G/C, A, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	0
		アラニン	0		
		バリン	0		
		ロイシン	0		
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	2
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
CAA	あり	グルタミン	2		
CAG	あり				
		チロシン	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	4
		トレオニン	0		
GAT	あり	アスパラギン酸	2		
GAC	あり				
GAA	あり	グルタミン酸	2	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	2
GAG	あり				
		リシン	0		
		アルギニン	0		
CAT	あり	ヒスチジン	2	終止シグナル (STP)	0
CAC	あり				
		終止コドン	0		
計	8	4種のアミノ酸が呈示される		NPL: POL: NEG: POS: STP = 0: 2: 4: 2: 0	

【表85】 突然変異誘発カセット：G/C, T, N

コドン	呈示	アミノ酸	(頻度)	分類	(頻度)
		グリシン	0	非極性 (NPL)	8
		アラニン	0		
GTT	あり	バリン	4		
GTC	あり				
GTA	あり				
GTG	あり				
CTT	あり	ロイシン	4		
CTC	あり				
CTA	あり				
CTG	あり				
		イソロイシン	0		
		メチオニン	0		
		フェニルアラニン	0		
		トリプトファン	0		
		プロリン	0		
		セリン	0	極性 非イオン化 (POL)	0
		システイン	0		
		アスパラギン	0		
		グルタミン	0		
		チロシン	0		
		トレオニン	0		
		アスパラギン酸	0	イオン化: 酸性 陰電荷 (NEG)	0
		グルタミン酸	0		
		リシン	0	イオン化: 塩基性 陽電荷 (POS)	0
		アルギニン	0		
		ヒスチジン	0		
		終止コドン	0	終止シグナル (STP)	0
計	8	2 種のアミノ酸が呈示される		NPL: 8: POL: 0: NEG: 0: POS: 0: STP: 0	

【0175】

2. 11. 2. キメラ形成

2. 11. 2. 1. 「シャッフリング」

核酸シャッフリングは、一つもしくは複数のポリヌクレオチドを生成するための、短いまたは小さいポリヌクレオチドのプールのin vitroまたはin vivo相同的組換え方法である。近縁の核酸配列またはポリヌクレオチドの混合物を有性PCRに付して、ランダムヌクレオチドを作製し、再集合させて、組換え体ハイブリッド核酸分子またはポリヌクレオチドのライブラリーもしくは混合集団を取得する。

カセット突然変異誘発とは対照的に、シャッフリングおよび誤りがちな（Error-prone）PCRだけが、配列のプールをブラインド方式で（プライマー以外の配列情報なしに）突然変異させることができる。

反復選択を目的とする誤りがちなPCR単独に対する、本発明の突然変異誘発シャッフリングの利点は、抗体工学からの一例により、極めて明瞭に説明することができる。誤りがちなPCR（有性PCRではない）と比較して、DNAシャッフリングを考える。選択したプール配列の初期ライブラリーは、多様な起原（すなわち、ナイーブmRNA由来の抗体）の近縁配列から成るか、あるいは、単一の抗体遺伝子のあらゆるタイプの突然変異誘発（シャッフリングを含む）によって得ることができる。1回目の親和性選択の後に、選択した相補性決定領域（CDR）のコレクションを得る。図では、濃厚なCDRが、抗体分子に、抗原に対する高い親和性を賦与する。シャッフリングにより、例えば、CDR1のすべてとCDR2のすべてとの、CDR3のすべてとの自由な組合せ会合が可能になる。

この方法は、逆連鎖反応であるという点で誤りがちなPCRとは異なる。誤りがちなPCRでは、ポリメラーゼ出発部位の数と、分子の数が、指数関数的に増加する。しかし、ポリメラーゼ出発部位の配列と、分子の配列は、実質的に同じままである。これに対し、ランダムポリヌクレオチドの核酸再集合もしくはシャッフリングでは、出発部位の数およびランダムポリヌクレオチドの数（ただし、サイズではない）は、時間の経過と共に減少する。全プラスミド由来のポリヌクレオチドについては、理論上の終点は、単一の、大きな鎖状体（コンカテマー）分子である。

交差は、相同性領域に起こることから、組換えは、第一に、同じ配列ファミリーのメンバー間に起こる。これによって、著しく不適合の（例えば、同じ抗原の

異なるエピトープに対して向けられた) C D Rの組合せがなくなる。同じ反応で、複数の配列ファミリーをシャッフルすることも可能である。さらに、シャッフリングは、一般に、例えば、CDR1が、CDR2の位置には存在しないように、相対順序を保存する。

希有シャフラントは、多数の最良（例えば、親和性が最も高い）C D Rを含む可能性がある。これらの希有シャフラントは、その高い親和性に基づいて、選択することができる。

選択された100個の異なる抗体配列のプールからのCDRは、最高1,006通りの順列を入れ替えることができる。この多数の順列は、DNA配列の単一ライブラリーに呈示され得ない。従って、所望の配列長さおよび配列多様性に応じて、複数サイクルのDNAシャッフリングおよび選択が必要であると考えられる。

これに対し、誤りがちなP C Rは、同じ相対配列中に選択したC D Rすべてを保持し、はるかに小さい突然変異体クラウド(cloud)を生成する。

【0176】

本発明の方法に使用できる鋳型ポリヌクレオチドは、DNAもしくはRNAでよい。それは、組換えまたは再集合しようとする遺伝子のサイズ、または、より短いもしくはより小さいポリヌクレオチドのサイズに応じて、長さは違ってくる。好ましくは、鋳型ポリヌクレオチドは、50bp~50kbである。関心のあるタンパク質をコードする核酸を含有する全ベクターを本発明の方法で 사용할 ことができ、実際に、好適に使用されている。

鋳型ポリヌクレオチドは、P C R反応（米国特許第4,683,202号及び同第4,683,195号）を用いた増幅、または、その他の増幅もしくはクローニング方法によって、得ることができる。しかし、P C R産物のプーリングおよび有性P C Rに付す前に、P C R産物からの遊離プライマーを除去することにより、さらに効率的な結果が得られる。有性P C Rの前に、元のプールからプライマーを適切に除去しなかった場合には、交差クロンの頻度の低下を招く恐れがある。

鋳型ポリヌクレオチドは、多くの場合二本鎖とすべきである。二本鎖核酸分子は、得られた一本鎖ポリヌクレオチドが、互いに相補的であり、従って、ハイブリダイズして、二本鎖分子を形成するのを確実にする上で、推奨される。

鋳型ポリヌクレオチドに対する同一性領域および鋳型ポリヌクレオチドに対する異種性領域を有する一本鎖または二本鎖の核酸ポリヌクレオチドは、このステップで、鋳型ポリヌクレオチドに添加することができる。また、このステップで、二つの異なるが、近縁のポリヌクレオチド鋳型を混合することも考えられる。

二本鎖ポリヌクレオチド鋳型、ならびに、あらゆる添加した二本鎖または一本鎖ポリヌクレオチドに、減速または停止を含む有性PCRを実施することにより、約5bp～5kb以上の混合物を得る。好ましくは、ランダムポリヌクレオチドのサイズは、約10bp～1,000bp、さらに好ましくは、ポリヌクレオチドのサイズは、約20bp～500bpである。

あるいは、本発明の方法で、複数のニックを有する二本鎖核酸を使用してもよい。ニックは、二本鎖核酸の一本鎖部分の切れ目である。ニック間の距離は、好ましくは、5bp～5kb、さらに好ましくは、10bp～1,000bpである。これは、自己プライマー化領域をもたらし、例えば、ランダムプライマーから得られるポリヌクレオチドと共に含めるべき、さらに短い、もしくは、小さいポリヌクレオチドを生成することができる。

いずれの特異的ポリヌクレオチドの濃度も、ポリヌクレオチド全量の1重量%以下、さらに好ましくは、いずれの特定核酸配列の濃度も、核酸全量の0.1重量%以下とする。

混合物中の様々な特異的ポリヌクレオチドの数は、少なくとも約100、好ましくは、少なくとも約500、さらに好ましくは、約1,000である。

このステップで、合成もしくは天然に拘わらず、一本鎖または二本鎖のポリヌクレオチドを、ランダム二本鎖の短いまたは小さいポリヌクレオチドに添加し、ポリヌクレオチド混合物の不均質性を高めることができる。

また、このステップで、二本鎖の、ランダムに切断されたポリヌクレオチドの集団を、有性PCR工程で得たポリヌクレオチドと混合または組み合わせて、任意で、1以上の追加の有性PCRサイクルに付してもよい。

【0177】

鋳型ポリヌクレオチドへの突然変異の挿入を望む場合には、鋳型ポリヌクレオチドに対する同一性領域、ならびに、鋳型ポリヌクレオチドに対する異種性領域

を有する一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドを、全核酸に対して20倍過剰の量で添加する。さらに好ましくは、一本鎖ポリヌクレオチドを、全核酸に対して10倍過剰の量で添加する。

異なるが、近縁の鋳型ポリヌクレオチドの混合物を望む場合には、各々の鋳型に由来するポリヌクレオチドの集団を、約1：100より低い比で組み合わせる。この比は、さらに好ましくは、約1：40より低くする。中立突然変異（例えば、選択される表現型の特性に不要な変化をもたらす突然変異）を除去するために、例えば、突然変異したポリヌクレオチド集団を用いた、野生型ポリヌクレオチドの戻し交雑が望ましい場合もある。このような例では、ランダムに提供された有性PCRサイクルハイブリッドポリヌクレオチドに添加できる、ランダムに提供された野生型ポリヌクレオチドの比は、約1：1から約100：1、さらに好ましくは、1：1から40：1である。

ランダムポリヌクレオチドの混合集団を変性し、一本鎖ポリヌクレオチドを形成した後、再アニーリングする。他の一本鎖ポリヌクレオチドとの相同性領域を有する一本鎖ポリヌクレオチドだけが、再アニーリングする。

ランダムポリヌクレオチドは、加熱により変性することができる。当業者であれば、二本鎖核酸を完全に変性するのに必要な条件を決定することができるだろう。好ましくは、温度は80～100℃、さらに好ましくは、90～96℃の間である。これ以外に、ポリヌクレオチドを変性するのに用いられる手段としては、圧力（36）およびpHがある。

ポリヌクレオチドは、冷却により再アニーリングしてもよい。好ましくは、温度は、20℃～75℃、さらに好ましくは、40℃～65℃の間である。平均4個のみの相同性の連続した塩基に基づいて、高い頻度の交差が必要な場合には、低いアニーリング温度を用いて、組換えを強制的に実施することができるが、この方法は難しくなる。後に起こる復元の度合いが、一本鎖ポリヌクレオチドの集団間の相同性の度合いに左右されるだろう。

復元は、ポリエチレングリコール（PEG）または塩の添加により加速することができる。塩濃度は、好ましくは、0mM～200mM、さらに好ましくは、塩濃度は、10mM～100mMである。塩は、KClまたはNaClでよい。PEGの濃度は

、好ましくは、0%~20%、さらに好ましくは、5%~10%である。

次に、アニーリングしたポリヌクレオチドを、核酸ポリメラーゼとdNTP（すなわち、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP）の存在下にインキュベートする。核酸ポリメラーゼは、クレノウ断片、Taqポリメラーゼ、または、その他の当業者には公知のDNAポリメラーゼでよい。

集合（assembly）に用いる手法は、まだ交差をもたらすであろう最小限度の相同性に依りて異なる。同一性の領域が広い場合には、Taqポリメラーゼを使用し、アニーリング温度を45~65℃とする。同一性領域が狭い場合には、クレノウポリメラーゼを用いて、アニーリング温度を20~30℃にする。当業者であれば、アニーリング温度を調節して、達成する交差の数を増やすことができるだろう。

ポリメラーゼは、アニーリングの前、アニーリングと同時に、あるいはアニーリング後に添加することができる。

変性、復元、ならびに、ポリメラーゼの存在下でのインキュベートのサイクルをここでは、核酸のシャッフリングもしくは再集合と呼ぶ。このサイクルを所望の回数だけ繰り返す。好ましくは、このサイクルを2~50回、さらに好ましくは、10~40回繰り返す。

得られる核酸は、約50bp~約100kbの大きい二本鎖ポリヌクレオチド、好ましくは、この大きいポリメラーゼは、500bp~50kbである。

この大きいポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドと同じサイズのポリヌクレオチドのコピーをタンデムで含んでいる可能性がある。次に、この鎖状体ポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドの単一コピーに変性する。その結果、サイズが鋳型ポリヌクレオチドとほぼ同じポリヌクレオチドの集団が得られる。この集団は、同一性領域と異種性領域を有する一本または二本鎖ポリヌクレオチドが、シャッフリング前に鋳型ポリヌクレオチドに添加された混合集団である。次いで、これらのポリヌクレオチドを、適したベクターにクローニングし、連結反応混合物を用いて、細菌を形質転換する。

【0178】

鎖状体（コンカテマー）の消化ではなく、PCR（米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号）を含む様々な方法により、クローニング前に、単一ポリ

ヌクレオチドを増幅することによって、大きい鎖状体ポリヌクレオチドから、単一ポリヌクレオチドを作製することができると考えられる。

クローニングに用いるベクターは、所望のサイズのポリヌクレオチドを受容するものであれば、特に限定しない。特定のポリヌクレオチドの発現を所望する場合には、クローニング運搬体は、宿主細胞中のポリヌクレオチドの発現を可能にするために、ポリヌクレオチドの挿入部位に隣接して、転写および翻訳シグナルを含んでいなければならない。好ましいベクターとして、プラスミドのpUC系列およびpBR系列がある。

このようにして得られる細菌集団は、ランダム突然変異を有する多数の組換え体ポリヌクレオチドを含む。この混合集団を試験して、所望の組換え体ポリヌクレオチドを同定することができる。この選択方法は、所望するポリヌクレオチドに応じて異なる。

例えば、リガンドに対する結合効率が高いタンパク質をコードするポリヌクレオチドを所望する場合には、集団またはライブラリー中のポリヌクレオチドの各部分により発現されるタンパク質が、リガンドに結合する能力を、当業者には公知の様々な方法（すなわち、パンニング、アフィニティ・クロマトグラフィー）で試験される。薬剤耐性の高いタンパク質をコードするポリヌクレオチドを所望する場合には、集団またはライブラリー中のポリヌクレオチドの各々によって発現されるタンパク質が、宿主生物に薬剤耐性を賦与する能力を試験される。当業者にとって、所望するタンパク質の情報が得られれば、上記集団を試験することによって、該タンパク質に所望の特性を賦与するポリヌクレオチドを同定することは容易であろう。

当業者は、タンパク質の断片をファージ表面に融合タンパク質として発現するファージ展示系（Pharmacia、ウィスコンシン州ミルウォーキー）を使用することができる。融合タンパク質（その一部が組換え体DNA分子によってコードされる）の転写を起こす部位で、該組換え体DNA分子をファージDNAにクローニングする。組換え体核酸分子を含むファージは、細胞内で、複製および転写を受ける。融合タンパク質のリーダー配列は、融合タンパク質の輸送を、ファージ粒子の先端に向ける。このようにして、組換え体DNA分子により部分的にコー

ドされる融合タンパク質がファージ粒子上に展示され、前述の方法により検出および選択する。

さらに、所望の組換え体タンパク質をコードするDNAを含む第1集団のサブ集団由来のポリヌクレオチドに対して、複数の核酸シャッフリングサイクルを実施してもよい。この方法では、これまでより高い結合親和性もしくは酵素活性を有するタンパク質を達成できる可能性がある。

また、野生型ポリヌクレオチドと、第1ラウンド、もしくは、それに続くラウンドの核酸シャッフリングから得た核酸サブ集団との混合物に対して、複数の核酸シャッフリングサイクルを実施することにより、サブ集団からサイレント突然変異を除去することも可能である。

精製された状態のあらゆる核酸の供給源を出発核酸として使用することができる。従って、この方法では、DNA、または、メッセンジャーRNAを含むRNAを使用することができ、また、これらDNAもしくはRNAは、一本鎖でも二本鎖でもよい。さらに、それぞれの一本鎖を含むDNA-RNAハイブリッドを用いてもよい。核酸配列は、突然変異を起こそうとする核酸配列のサイズに応じて、長さが違ってくる。好ましくは、特定核酸配列は、50～50,000塩基対である。本発明の方法に、関心のあるタンパク質をコードする核酸を含むベクターを使用することも考えられる。

核酸は、あらゆる供給源、例えば、pBR322のようなプラスミド、クローン化したDNAまたはRNA、もしくは、細菌、酵母、ウイルス、ならびに、植物や動物等の高等生物を含むあらゆる採取源からの天然DNAまたはRNAから取得してもよい。DNAまたはRNAは、血液または組織材料から採取してもよい。鋳型ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド連鎖反応を用いた増幅（PCR、米国特許第4,683,202号および同第4,683,195号）により得ることができる。あるいは、ポリヌクレオチドは、細胞に存在するベクターに含まれるものでもよく、細胞を培養し、当業者には公知の方法により、細胞から核酸を採取することによって、十分な核酸を得ることができる。

【0179】

どのような特定の核酸配列も、本発明の方法によりハイブリッド集団を生成す

るのに使用することができる。唯一必要なのは、特定核酸配列のハイブリッド配列の小集団が、本方法の前に存在する、もしくは作製されることである。

突然変異を有する特定核酸配列の初期小集団は、多数の様々な方法によって作製することができる。突然変異は、誤りがちなPCRによって発生させてもよい。誤りがちなPCRは、忠実度の低い重合条件を用いて、長い配列にわたって、低いレベルの点突然変異をランダムに導入する。あるいは、突然変異は、オリゴヌクレオチド指令突然変異誘発によって、鋳型ポリヌクレオチドに導入することもできる。オリゴヌクレオチド指令突然変異誘発では、ポリヌクレオチドから、制限酵素消化を用いて、短い配列のポリヌクレオチドを除去し、合成ポリヌクレオチドと置換する。この合成ポリヌクレオチドでは、元の配列から、様々な塩基が変化させてある。また、上記ポリヌクレオチド配列は、化学的突然変異誘発によって変化させることも可能である。化学的突然変異誘発原には、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジンまたはギ酸等が含まれる。ヌクレオチド前駆体の類似体であるその他の薬剤として、ニトロソグアニジン、5-ブロモウラシル、2-アミノプリン、もしくはアクリジンが挙げられる。一般に、これら薬剤は、ヌクレオチド前駆体の代わりに、PCR反応に添加し、これによって、配列に突然変異を起こす。また、プロフラビン、アクリフラビン、キナクリン等のインターカレート剤を使用してもよい。ポリヌクレオチドのランダム突然変異誘発は、X線または紫外線の照射により達成することもできる。一般に、このように突然変異を誘発させたプラスミドポリヌクレオチドを大腸菌(*E. coli*)に導入し、ハイブリッドプラスミドのプールまたはライブラリーとして増殖させる。

あるいは、特定核酸の小混合集団は、自然界に見いだすことができ、この場合、これら核酸は、同じ遺伝子、もしくは、異なる近縁種由来の同じ遺伝子（すなわち、コグネイト遺伝子）の様々な対立遺伝子から成り得る。あるいはまた、これら核酸は、例えば、免疫グロブリン遺伝子等、1つの種に認められる類縁DNA配列であることもある。

特定核酸配列の混合集団を生成したら、ポリヌクレオチドを直接使用するか、もしくは、当業者には公知の方法で、適切なクローニングベクターに挿入するこ

とができる。

ベクターの選択は、ポリヌクレオチド配列のサイズ、ならびに、本発明の方法で用いる宿主細胞に応じて行う。本発明の鋳型は、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス（例えば、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヘルペルウイルス、レオウイルス、パラミクソウイルス等）、あるいはそれらの選択部分（例えば、コートタンパク質、スパイク（spike）糖タンパク質、キャプシドタンパク質）でよい。例えば、突然変異を起こそうとする特定核酸配列が大きい場合には、コスミドおよびファージミドが好ましい。というのは、これらのベクターは、大きなポリヌクレオチドを安定して増やすことができるからである。

特定核酸配列の混合集団をベクターにクローニングする場合には、宿主細胞に各ベクターを挿入し、宿主細胞にベクターを増幅させることによって、クローン的に増幅することができる。これは、核酸配列の絶対数が増加するのに対し、ハイブリッドの数は増えないために、クローン増幅と呼ばれる。発現ポリヌクレオチドをスクリーニングすることにより、有用性を容易に判定することができる。

本発明のDNAシャッフリング法は、未知の配列のプールについて、ブラインド方式で実施することができる。再集合混合物にオリゴヌクレオチド（再集合させる配列と相同性の末端を有する）を添加することにより、どんな特定の位置でも、あらゆる配列混合物を別の配列混合物に組み込むことができる。従って、合成オリゴヌクレオチドの混合物、PCRポリヌクレオチドの混合物、あるいは、全遺伝子の混合物さえも、規定した位置で、別の配列ライブラリーに混合することができると考えられる。1つの配列の挿入（混合）は、鋳型の別の部分への配列の挿入とは無関係である。このように、組換え度、要求される相同性、ならびに、ライブラリーの多様性は、再集合したDNAの長さに沿って、独立してかつ同時に変えることができる。

二つの遺伝子を混合するこの手法は、マウスハイブリドーマ由来の抗体のヒト化に有用である。二つの遺伝子を混合する、もしくは、代替配列を遺伝子に挿入する手法は、治療に用いられているあらゆるタンパク質、例えば、インターロイキンI、抗体、tPAおよび成長ホルモンに有用である。また、この手法は、発現

を高める、あるいはタンパク質の発現の特異性を变化させる上で、あらゆる核酸、例えば、プロモーターもしくはイントロン、または、遺伝子の3'非翻訳領域または5'非翻訳領域において有用である。また、この手法を使用して、リボザイムまたはアプタマーに突然変異を起こすこともできる。

シャッフリングには、多様性領域を分離する相同性領域の存在が必要である。シャッフリングには、スカフォールド (scaffold) 様タンパク質構造が特に適している。保存されたスカフォールドが、自己会合による全体的なフォールディングを決定すると同時に、特異的結合を媒介する比較的制限されていないループを展示する。このようなスカフォールドの例として、当業者には公知の免疫グロブリンβバレル、ならびに4ヘリックス束がある。このシャッフリングを使用して、結合のための突然変異配列の様々な組合せを有するスカフォールド様タンパク質を生成することができる。

【0180】

In vitroシャッフリング

いくつかの標準的遺伝子接合と同様のことをin vitroシャッフリングにより実施することもできる。例えば、「分子戻し交雑」は、ハイブリッドの核酸を野生型核酸と繰り返し混合すると同時に、関心のある突然変異を選択することにより、実施することができる。伝統的な育種と同様、この手法を用いて、様々な供給源由来の表現型を組み合わせ、好適なバックグラウンドとすることができる。これは、例えば、選択していない特徴（すなわち、免疫原性）に作用する中立突然変異の除去に有用である。従って、上記の手法は、タンパク質におけるどの突然変異が、増加した生物学的活性に関与し、どれが関与しないのかを決定する上で有用であり、これは、誤りがちな突然変異誘発もしくはカセット突然変異誘発法により達成されなかった利点である。

大きな機能遺伝子は、小さなランダムポリヌクレオチドの混合物から正確に集合させることができる。この反応は、化石の高度に断片化したDNA由来の遺伝子の再集合に有用である。さらに、化石から採取したランダム核酸断片を、近縁種由来の類似した遺伝子からのポリヌクレオチドと組み合わせてもよい。

また、本発明の方法は、各種研究や診断分野でのニーズに応じて、単一細胞由

来の全ゲノムのin vitro増幅に使用することができると考えられる。PCRによるDNA増幅は、実際には、長さ約40kbまでに制限される。PCRによる大腸菌(5,000kb)のような全ゲノムの増幅には、125本の40kbポリヌクレオチドを生成する約250個のプライマーを必要とすることになる。この手法は、十分な配列データが入手できないことから、実用的ではない。これに対し、有性PCRサイクルを用いたゲノムのポリヌクレオチドのランダム産生と、これに続く小さなポリヌクレオチドのゲル精製は、可能性がある多数のプライマーをもたらすであろう。ランダムな小ポリヌクレオチドの混合物をPCR反応のプライマーとして、単独で、あるいは、鋳型としての全ゲノムと共に使用することにより、該ゲノムの多数のコピーを含む単一鎖状体を理論上の終点とする、逆連鎖反応が確実に起こる。

ランダムポリヌクレオチドのみを用いた場合には、コピー数の100倍増幅と、50kbより大きい平均ポリヌクレオチドのサイズを実現することができる。多数の小さいポリヌクレオチドのオーバーラップによって、さらに大きい鎖状体が生成されることが考えられる。合成プライマーを用いて得られた特定のPCR産物の品質は、増幅していないDNAから得た産物と見分けがつかないであろう。この手法は、ゲノムのマッピングに有用であると予想される。

シャッフリングしようとするポリヌクレオチドは、実験者の判断で、ランダムまたは非ランダムポリヌクレオチドとして生成することができる。さらに、本発明は、広い範囲のポリヌクレオチドのサイズおよびタイプに適用可能なシャッフリング方法を提供し、この方法は、大きいポリヌクレオチドの再集合においてビルディングブロックとして使用するポリヌクレオチドモノマーを生成するステップを含む。例えば、上記ビルディングブロックは、遺伝子の断片でも、あるいは、全遺伝子もしくは遺伝子経路、またはそれらの組合せから成るものでもよい。

【0181】

In vivoシャッフリング

in vivoシャッフリングの実施形態では、少なくとも二つの異なる核酸配列が、各宿主細胞に存在する条件下で、細菌または真核細胞中に特定核酸配列の混合集団を導入する。ポリヌクレオチドは、様々な方法で、宿主細胞中に導入するこ

とができる。宿主細胞は、当業者には公知の方法、例えば、塩化カルシウムによる処理を用いて、小さいポリヌクレオチドで形質転換することができる。ポリヌクレオチドをファージゲノムに挿入する場合には、特定核酸配列を有する組換え体ファージゲノムで、宿主細胞をトランスフェクションすることができる。あるいは、電気穿孔、トランスフェクション、リポフェクション、バイオリスティックス (biolistics)、接合等の手段を用いて、核酸配列を導入することも可能である。

一般に、この実施形態では、特定核酸配列は、宿主細胞内で該配列を安定して複製することのできるベクター中に存在する。さらに、ベクターは、ベクターを有する宿主細胞が選択されるように、マーカー遺伝子をコードすると考えられる。これによって、宿主細胞への導入の後、突然変異した特定核酸配列の回収が確実に達成される。しかし、特定核酸配列の混合集団全体が、ベクター配列上に存在する必要はないと考えられる。むしろ、宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入後に、各宿主細胞が、そこに存在する少なくとも1つの特定核酸配列を有する一つのベクターを確実に含むようにするために、十分な数の配列をベクターにクローニングする必要がある。また、特定核酸配列の集団のサブセットをベクターにクローニングするのではなく、このサブセットを宿主細胞に安定した状態で組み込んでもよい。

同一性領域を有する二つのポリヌクレオチドを宿主細胞に挿入すると、両ポリヌクレオチド間に相長的組換えが起こることがわかっている。二つの突然変異した特定核酸配列間で起こるこのような組換えの結果、状況に応じて、二重または三重ハイブリッドが生成される。

また、突然変異を起こした特定核酸配列のいくつかは、直鎖状核酸分子上に存在する場合には、組換えの頻度が高くなることも認められている。従って、好ましい実施形態では、特定核酸配列のいくつかは、直鎖状ポリヌクレオチド上に存在する。

形質転換の後、宿主細胞形質転換体を選択に付し、所望の品質を有する突然変異した特定核酸を含む宿主細胞形質転換体を同定する。例えば、特定の薬剤に対して、高い耐性を望む場合には、形質転換した宿主細胞を、高濃度の該当する薬

剤にさらし、高い薬剤耐性を賦与できる突然変異タンパク質を産生する形質転換体を選択する。特定タンパク質の受容体に結合する高い能力を望む場合には、該タンパク質の発現を形質転換体から誘発し、こうして得られたタンパク質を、当業者には公知の方法によりリガンド結合アッセイで検定して、リガンドへの高い結合を示す突然変異集団のサブセットを同定する。あるいは、タンパク質を別の系で発現させて、適切なプロセッシングを確実にすることもできる。

所望の特徴を有する第1の組換え特定核酸配列（娘配列）のサブセットを同定した後、第2ラウンドの組換えに付す。

第2サイクルの組換えでは、組換え特定核酸配列を、元の突然変異特定核酸配列（親配列）と混合し、サイクルを前述と同様に繰り返す。この方法では、性質が増強された、あるいは、性質が増強されたタンパク質をコードする第2の組換え特定核酸配列のセットを同定することができる。このサイクルは、所望する回数だけ繰り返すことができる。

また、第2またはそれに続く組換えサイクルにおいて、戻し交雑を実施することも考えられる。分子戻し交雑は、少なくとも1つの野生型核酸配列と、突然変異を起こした核酸配列が、形質転換後に同じ宿主細胞内に存在するように、所望の特定核酸配列を、多数の野生型配列と混合することにより、実施することができる。野生型の特定核酸配列を用いた組換えは、免疫原性のような選択していない特徴には作用するが、選択した特徴には作用しない中立突然変異を排除する。

本発明の別の実施形態では、第1ラウンドの間に、特定核酸配列のサブセットを、宿主細胞への導入の前に、PCR増幅を減速または停止することにより、小さいポリヌクレオチドとして生成することができる。ポリヌクレオチドのサイズは、他の配列と相同的に組換えできるように、他の配列との同一性領域をいくつか含有するのに十分大きいものでなければならない。ポリヌクレオチドのサイズは、0.03kb～100kb、さらに好ましくは0.2kb～10kbの範囲である。また、後続のラウンドでは、前のラウンドから選択した配列を除くすべての特定核酸配列を使用して、宿主細胞への導入前に、PCRポリヌクレオチドを生成することも考えられる。

短いポリヌクレオチド配列は、一本鎖または二本鎖のいずれでもよい。元々一

本鎖だった配列が、二本鎖になった場合には、宿主細胞への挿入の前に、熱、化学薬品、もしくは酵素を用いて、変性することができる。核酸鎖を分離するのに適した反応条件は、当業者には公知である。

この方法のステップは無限に繰り返すことができるが、達成できるハイブリッドの数だけには制限される。サイクルを所定回数繰り返した後、見込まれるすべてのハイブリッドが達成されると、それ以上のサイクルは余剰である。

ある実施形態では、突然変異を起こした同じ鋳型核酸を繰り返し組換えて、得られた組換え体を所望の特徴について選択する。

従って、突然変異鋳型核酸の初期プールまたは集団は、大腸菌等の細菌内で複製することのできるベクターにクローニングされる。ベクターは、大腸菌内で自律複製が可能であれば、特に限定しない。好ましい実施形態では、ベクターは、該ベクターに結合された、突然変異を起こした特定核酸によりコードされるタンパク質の発現および産生を可能にするよう設計される。また、ベクターは、選択マーカーをコードする遺伝子を含むことが好ましい。

突然変異を起こした核酸配列のプールを含むベクターの集団を、大腸菌宿主細胞中に導入する。ベクター核酸配列は、形質転換、トランスフェクション、または、ファージの場合には感染により、導入することができる。細菌を形質転換するのに使用するベクターの濃度は、多数のベクターが各細胞に導入されるような濃度とする。いったん細胞内に存在すると、相同的組換え効率は、各種ベクター間に相同的組換えが起こるようなものとする。これによって、突然変異を起こした元の親配列とは異なる突然変異の組合せを有するハイブリッド（娘）が生成される。

次に、宿主細胞をクローン的に複製し、ベクターに存在するマーカー遺伝子について選択する。この選択のもとでは、プラスミドを有する細胞だけが増殖することになる。

【0182】

次に、ベクターを含む宿主細胞を、好ましい突然変異の存在について試験する。例えば、選択しようとする遺伝子が、薬剤耐性が向上した遺伝子である場合には、このような試験は、細胞を選択的圧力下に置くことから成る。ベクターが、

突然変異を起こした核酸配列によりコードされたタンパク質の発現を可能にする場合には、このような選択は、こうしてコードされたタンパク質の発現、該タンパク質の単離、ならびに、該タンパク質が、関心のあるリガンドに高い効率で結合するかどうかを決定するための試験等を含む。

所望の特徴を賦与する、突然変異を起こした特定の娘核酸配列を同定した後、すでにベクターに結合した、あるいは該ベクターから分離した上記核酸を単離する。次に、この核酸を核酸の第1または親集団と混合した後、サイクルを繰り返す。

この方法により、所望の性質が増強された核酸配列を選択できることが明らかになっている。

別の実施形態では、ハイブリッドの第1世代を細胞内に保持し、突然変異を起こした親配列を再び該細胞に添加する。従って、実施形態Iの第1サイクルを前述同様に実施する。ただし、娘核酸配列を同定した後、これら配列を含む宿主細胞を保持する。

突然変異を起こした親特定核酸集団は、ポリヌクレオチドとして、あるいは、同じベクターにクローニングして、娘核酸をすでに含む宿主細胞中に導入する。細胞内で組換えが起こるようにし、次世代の組換え体、すなわち孫娘を、前述した方法により選択する。

このサイクルは、所望の特徴を有する核酸またはペプチドが得られるまで、多数回繰り返すことができる。後続のサイクルでは、好ましいハイブリッドに添加される、突然変異を起こした配列の集団は、親ハイブリッド、または、後続するいずれの世代に由来するものでもよい。

別の実施形態では、本発明は、得られた組換え特定核酸の「分子」戻し交雑を実施して、あらゆる中立突然変異を排除する方法を提供する。中立突然変異とは、核酸またはペプチドに所望の性質を賦与しない突然変異のことである。ところが、このような突然変異は、核酸またはペプチドに望ましくない特性を与えかねない。従って、これらの中立突然変異を排除することが好ましい。本発明の方法は、それを実施する手段を提供する。

この実施形態では、所望の特徴を有するハイブリッド核酸をこの実施形態の方

法により取得した後、核酸、核酸を有するベクター、または、ベクターおよび核酸を含む宿主細胞を単離する。

次に、核酸またはベクターを、大過剰量の野生型核酸を含む宿主細胞に導入する。ハイブリッドの核酸と、野生型配列の核酸が、組換えを起こす。得られた組換え体を、ハイブリッド核酸と同じ選択下に置く。所望の特徴を保持した組換え体だけが選択されることになる。野生型DNAとの組換えにより、所望の特徴を賦与しないサイレント突然変異は消失する。このサイクルは、サイレント突然変異がすべて排除されるまで、多数回繰り返すことができる。

このように、本発明の方法を分子戻し交雑に用いて、不必要な突然変異またはサイレント突然変異を排除することができる。

【0183】

2. 11. 2. 3. エキソヌクレアーゼ媒介の再集合

ある実施形態では、本発明は、少なくとも二つのポリヌクレオチドのシャッフリング、集合、再集合、組換え、および／または鎖状体化を行なって、子孫ポリヌクレオチド（例えば、発現して、ポリペプチドもしくは遺伝子経路を形成することのできるキメラ子孫ポリヌクレオチド）を生成する方法を提供する。ある実施形態では、二本鎖のポリヌクレオチド末端（例えば、互いをハイブリダイゼーションの相手としてハイブリダイズした二つの一本鎖配列）をエキソヌクレアーゼで処理し、二本の鎖の一方からヌクレオチドを遊離させ、その元の相手を含まない残った鎖を残存させ、所望であれば、残った鎖を、別の相手とのハイブリダイゼーションを達成するのに使用することができる。

具体的には、二本鎖のポリヌクレオチド末端（ポリヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド配列の一部であるか、もしくは、これらに接続されている場合もある）をエキソヌクレアーゼ活性源にさらす。有用なエキソヌクレアーゼ活性源としては、3'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素、5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素、3'エキソヌクレアーゼ活性および5'エキソヌクレアーゼ活性の両方を有する酵素、ならびに、これらのうちいずれかの組合せが挙げられる。エキソヌクレアーゼを用いて、線状二本鎖のポリヌクレオチドの一端または両端から、ならびに、3つ以上の末端を有する分枝ポリヌクレオチドの一端～全末端から、

ヌクレオチドを遊離させることができる。この遊離作用のメカニズムは、末端ヌクレオチドの酵素触媒による加水分解から成るものと考えられ、時間依存的に進行させ、酵素処理の進行を実験的に制御することができる。

これに対し、非酵素的方法を使用して、ポリヌクレオチドビルディングブロックのシャッフリング、集合、再集合、組換え、および／または鎖状体化を行なうことができるが、これは、実施サンプルを変性（もしくは「融解」）条件（例えば、温度、pH、および／または塩度条件を変えることによる）に付し、二本鎖ポリヌクレオチドの実施セットをポリヌクレオチド一本鎖に融解することから成る。シャッフリングのためには、ポリヌクレオチド一本鎖が、ある程度まで、異なるハイブリダイゼーション相手とのアニールメントに参加する（すなわち、変性ステップの前に、前の相手であった者同士の間での排他的再アニールメントに単に逆戻りしない）ことが望ましい。しかし、反応容器中の、前のハイブリダイゼーション相手の存在は、元の二本鎖ポリヌクレオチドを再形成するための前の相手と一本鎖ポリヌクレオチドとの再アニールメントを妨害するわけではなく、時には、有利に働く場合もある。

二本鎖ポリヌクレオチドのビルディングブロックを変性に付した後、アニールメントを実施することから成る上記の非酵素的シャッフリング方法とは対照的に、本発明は、さらに、変性を必要としないエキソヌクレアーゼに基づく手法を提供する。むしろ、変性条件の回避、ならびにアニールした（すなわち非変性）状態での二本鎖ポリヌクレオチド基質の維持が、エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼIIIとred α 遺伝子産物）の作用に必要な条件である。さらに、対照的に、他の一本鎖ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができる一本鎖ポリヌクレオチド配列の生成は、一方のハイブリダイゼーション相手における共有結合切断（従って、配列の破壊）の結果、起こる。例えば、エキソヌクレアーゼIII酵素を用いて、一本のハイブリダイゼーション鎖の3'末端ヌクレオチドを酵素により遊離させる（これによって、該ポリヌクレオチド鎖において共有結合加水分解を達成する）ことができる。これが、残った一本鎖と、新しい相手とのハイブリダイゼーションを促進する（前の相手は、共有結合切断にかけられたため）。

さらに詳しく説明すると、3'エキソヌクレアーゼの例として、特定のエキソヌクレアーゼ、すなわち、エキソヌクレアーゼIIIが挙げられる。しかし、5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素および3'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素、ならびに、まだ発見されていない酵素およびまだ開発されていない酵素等、その他のエキソヌクレアーゼを用いてもよい。特に、上に開示した手法のために、反応速度がさらに最適で、および／または、特異的活性がさらに高く、および／または、不要活性がさらに少ない、酵素の発見、最適化（例えば、定方向進化による）、あるいは発見および最適化の両方が可能であることに特に留意すべきである。実際、本発明が、このようなデザイナー酵素の発見および／または開発を奨励すると予想される。すなわち、本発明は、現在入手可能な多様なエキソヌクレアーゼ酵素、さらには、まだ発見されていない酵素や、まだ開発されていない酵素を用いて、実施可能である。

エキソヌクレアーゼIIIのエキソヌクレアーゼ作用は、平滑であるか、あるいは5'突出部（overhang）を有する実施二本鎖ポリヌクレオチド末端を必要とし、エキソヌクレアーゼ作用は、酵素により、3'末端ヌクレオチドを遊離させて、一本鎖5'末端を残す。この5'末端は、エキソヌクレアーゼ作用が進行するほど、長くなる（図1参照）。この手法により生成された5'突出部を用いて、ハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な相同性を共有する別の一本鎖ポリヌクレオチド配列（これもまた一本鎖ポリヌクレオチドでもよいし、あるいは、部分的に二本鎖のポリヌクレオチドの末端突出部でもよい）にハイブリダイズすることもできる。これらエキソヌクレアーゼIIIにより生成した一本鎖配列（例えば、5'突出部における）が、他の一本鎖配列にハイブリダイズする能力によって、2つ以上のポリヌクレオチドのシャッフリング、集合、再集合、および／または鎖状化が可能となる。

【0184】

さらに、必要に応じて、二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護する、あるいは、該末端が、有用なエキソヌクレアーゼの所望の酵素作用を受けやすくなるようにすることができる。例えば、3'突出部を有する二本鎖ポリヌクレオチド末端は、エキソヌクレアーゼIIIのエキソヌクレアーゼ作用を受けにくい。しかし、様

々な手段により、これが、エキソヌクレアーゼIIIのエキソヌクレアーゼ作用を受けやすくなるようにすることができる。例えば、該ポリヌクレオチドをポリメラーゼを用いた処理により平滑末端化する；該ポリヌクレオチドを切断して、平滑末端または5'突出部を与える；別の二本鎖ポリヌクレオチドに結合（連結またはハイブリダイズ）して、平滑末端または5'突出部を与える；一本鎖ポリヌクレオチドにハイブリダイズして、平滑末端または5'突出部を与える；あるいは、様々な手段のいずれかにより修飾する。

ある形態によれば、エキソヌクレアーゼを、線状二本鎖ポリヌクレオチドの一端または両端で作用させ、完全に、ほぼ完全に、もしくは部分的に進行させる。エキソヌクレアーゼ作用を完全に進行させると、各5'突出部の長さが、「ランデブーポイント（rendezvous point）」（ポリヌクレオチド中心点近傍）と考えられる方向に、ポリヌクレオチドの中央領域に向かって、長く延びてくる。最後には、各々が、元の二本鎖ポリヌクレオチドの長さの約半分の一本鎖ポリヌクレオチド（解離することもできる）が生成される（図1）。あるいは、完全に進行させる前に、エキソヌクレアーゼ仲介反応を終了することも可能である。

このように、このエキソヌクレアーゼ仲介手法は、ポリヌクレオチドのビルディングブロックのシャッフリング、集合、および／または再集合、組換え、ならびに鎖状体化を行なう上で有用である。尚、このポリヌクレオチドビルディングブロックは、10個までの塩基長、数十個の塩基長、数百個の塩基長、数千個の塩基長、数万個の塩基長、数十万個の塩基長または数百万個の塩基長、あるいは、それ以上の塩基長のものでもよい。

このエキソヌクレアーゼ仲介手法は、大腸菌エキソヌクレアーゼIIIの二本鎖DNA特異的エキソデオキシリボヌクレアーゼ活性の作用に基づく。エキソヌクレアーゼIIIの基質は、二本鎖ポリヌクレオチドを断片化することにより生成することができる。断片化は、機械的手段（例えば、剪断、超音波処理等）、酵素的手段（例えば、制限酵素の使用）、ならびに、これらのいずれかの組合せにより達成することができる。これより大きいポリヌクレオチドの断片も、ポリメラーゼ仲介合成により得られる。

エキソヌクレアーゼIIIは、28Kモノマー酵素、すなわち、大腸菌のxthA遺伝

子の産物であり、次の4つの既知の活性を有する：エキソデオキシリボヌクレアーゼ（本書では、代わって、エキソヌクレアーゼと呼ぶ）、RNaseH、DNA-3'-ホスファターゼ、ならびにAPエンドヌクレアーゼ。エキソデオキシリボヌクレアーゼ活性は、二本鎖DNAに特異的である。作用のメカニズムは、3'末端から徐々に5'方向に向かってDNAの酵素加水分解を起こし、ヌクレオシド5'-リン酸と、残った一本鎖を形成すると考えらる。この酵素は、一本鎖DNA、一本鎖RNA、または二本鎖RNAの効率的な加水分解を示さないが、DNA-RNAハイブリッド中のRNAを分解してヌクレオシド5'-リン酸を放出する。この酵素はまた、DNAの3'ホスホモノエステル基から特異的に無機リン酸を放出するが、RNAまたは短いオリゴヌクレオチドからは放出しない。これらの基を除去することにより、末端がDNAポリメラーゼ作用のためのプライマーに変換される。

エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の別の例として、レッドアルファおよびヘビ毒ホスホジエステラーゼがある。レッドアルファ（red α ）遺伝子産物（ラムダエキソヌクレアーゼとも呼ばれる）は、バクテリオファージ λ に由来する。red α 遺伝子は、左方向のプロモーターから転写され、その産物は組換えに関与する（24kD）。レッドアルファ遺伝子産物は、5'-リン酸化末端から前進的に作用して、二本鎖DNAからモノヌクレオチドを遊離させる（高橋および小林、1990）。ヘビ毒ホスホジエステラーゼ（Laskowski、1980）は、スーパーコイルドDNAを急速に開くことができる。

【0185】

2. 11. 2. 3. 非確率論的連結再集合

ある形態では、本発明は、合成連結再集合（SLR）と呼ばれる非確率論的方法を提供する。これは、核酸ビルディングブロックをランダムにシャッフリングまたは鎖状体化もしくはキメラ化するのではなく、非確率論的に集合させることを除けば、確率論的シャッフリングに幾分近い。

特にはっきりとした違いは、このSLR法が、シャッフリングしようとするポリヌクレオチド間に高いレベルの相同性があるかどうかによって左右されないことである。対照的に、従来の方法、特に、従来の確率論的シャッフリング方法は、シャ

ップリングしようとするポリヌクレオチド間、特に、連結部位に、高いレベルの相同性を必要とした。従って、これら従来の方法は、元の前駆分子の再生成に有利であり、また、多数の新しい子孫キメラ、特に、完全長さの子孫の生成には改善の手段であった。これに対し、本発明を用いて、 10^{100} を超える異なるキメラから成る子孫分子のライブラリー（またはセット）を非確率論的に生成することができる。また、SLRを用いて、 10^{100} 以上の異なる子孫キメラ（知る限り、上限はない）から成るライブラリーを生成することもできると考えられる。

従って、ある態様では、本発明は、設計により選択される全体集合順序を有する最終的キメラ核酸分子のセットを生成する非確率論的方法であって、有用で、互いに適合する連結可能な末端を有する複数の特異的核酸ビルディングブロックを設計により生成するステップと、設計した全体集合順序が達成されるように、上記核酸ビルディングブロックを集合させるステップから成る方法を提供する。

集合させようとする核酸ビルディングブロックの互いに適合する連結可能な末端は、これら末端が、該ビルディングブロックを予め決められた順序で結合させることができれば、このタイプの定序集合に「有用である」とみなす。従って、一形態では、核酸ビルディングブロックを結合できる全体構成順序は、連結可能な末端の設計によって定められる。1つ以上の集合ステップを用いる場合には、核酸ビルディングブロックを結合する全体集合順序も、集合ステップの逐次順序によって定められる。図4、パネルCは、5つの核酸ビルディングブロックについて、設計された（非確率論的）全体集合順序を達成するための2つの連続したステップから成る集合方法を例示する。本発明の好ましい態様では、アニーリングした構成要素を、リガーゼ（例えば、T4DNAリガーゼ）で処理し、構成要素の共有結合を達成する。

好ましい実施形態では、最終的キメラ核酸分子の子孫セットを生成するための基礎として働く前駆核酸鋳型セットの配列を分析することにより、核酸ビルディングブロックの設計が得られる。これらの前駆核酸鋳型は、突然変異誘発を起こそうとする、すなわち、キメラ化もしくはシャッフリングしようとする核酸ビルディングブロックの設計に役立つ配列情報源としての役割を果たす。

ある態様では、本発明は、近縁の遺伝子ファミリーと、これら近縁産物のコー

ドされたファミリーのキメラ化に関する。具体的には、コードされた産物とは酵素である。本発明の態様に従い、突然変異誘発を起こすことのできる酵素グループの代表例として、下記の酵素およびそれらの機能を挙げる事ができる。

【0186】

1 リパーゼ／エステラーゼ

a. エステル（脂質）／チオエステルの対掌選択的加水分解

- 1) ラセミ混合物の分割
- 2) メソジエステル由来の光学活性酸またはアルコールの合成

b. 選択的合成

- 1) 炭水化物エステルの位置特異的加水分解
- 2) 環状第2級アルコールの選択的加水分解

c. 光学活性エステル、ラクトン、酸、アルコールの合成

- 1) 活性化／非活性化エステルのエステル交換反応
- 2) インターエステリフィケーション
- 3) ヒドロキシエステル由来の光学活性ラクトン
- 4) 無水物の位置および対掌選択的開環

d. デタージェント

e. 脂肪／油変換

f. チーズの熟成

2 プロテアーゼ

a. エステル／アミド合成

b. ペプチド合成

c. アミノ酸エステルのラセミ混合物の分割

d. 非天然アミノ酸の合成

e. デタージェント／タンパク質加水分解

3 グリコシダーゼ／グリコシルトランスフェラーゼ

a. 糖／ポリマー合成

b. モノ、ジ、およびオリゴサッカリドを生成するためのグリコシド結合の切断

- c. 複合オリゴサッカリドの合成
 - d. UDP-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いたグリコシド合成
 - e. ジサッカリド、グリコシルフロリド、アリールガラクトシドのグリコシル転移
 - f. オリゴサッカリド合成におけるグリコシル転移
 - g. β グルコシルスルフォキシドのジアステレオ選択性切断
 - h. 非対称グリコシル化
 - i. 食品加工
 - j. 紙加工
- 4 ホスファターゼ／キナーゼ
- a. リン酸エステルの合成／加水分解
 - 1) 位置一、対掌選択的リン酸化
 - 2) リン酸エステルの導入
 - 3) ホスホリピッド前駆体の合成
 - 4) 制御されたポリヌクレオチド合成
 - b. 生物学的分子の活性化
 - c. 保護基を用いない選択性リン酸結合の形成
- 5 モノ／ジオキシゲナーゼ
- a. 活性化していない有機基質の直接オキシ官能化
 - b. アルカン、芳香族、ステロイドのヒドロキシル化
 - c. アルケンのエポキシド化
 - d. 対掌選択的スルホキシド化
 - e. 位置一および立体選択性Bayer-Villiger酸化
- 6 ハロペロキシダーゼ
- a. 求核部位へのハロゲン化物イオンの酸化的付加
 - b. オレフィン結合への次亜ハロゲン酸の付加
 - c. シクロプロパンの環切断
 - d. オルトおよびパラ誘導体に変換された活性化芳香族基質
 - e. 2-ハロー誘導体に変換された1, 3ジケトン

- f. 基質を含む硫黄および窒素の異種原子酸化
- g. エノールアセテート、アルキンおよび活性化芳香族環の酸化
- 7 リグニンペロキシダーゼ／ジアリールプロパンペルオキシダーゼ
 - a. C-C結合の酸化的切断
 - b. ベンジル性アルコールのアルデヒドへの酸化
 - c. ベンジル炭素のヒドロキシル化
 - d. フェノール二量化
 - e. 二重結合のヒドロキシル化によるジオールの生成
 - f. リグニンアルデヒドの切断
- 8 エポキシドヒドロラーゼ
 - a. 対掌的に純粋な生物学的活性化合物
 - b. エポキシドの位置—および対掌選択的加水分解
 - c. モノオキシジナーゼによる芳香族およびオレフィンエポキシド化によるエポキシドの生成
 - d. ラセミエポキシドの分割
 - e. ステロイドエポキシドの加水分解
- 9 ニトリルヒドラターゼ／ニトリラーゼ
 - a. 脂肪族ニトリルの加水分解によるカルボキシアミドの生成
 - b. 芳香族、複素環式、不飽和脂肪族ニトリルの加水分解による対応する酸の生成
 - c. アクリロニトリルの加水分解
 - d. 芳香族およびカルボキシアミド、カルボン酸（ニコチンアミド、ピコリンアミド、イソニコチンアミド）の生成
 - e. アクリルジニトリルの位置選択性加水分解
 - f. α -ヒドロキシニトリルからの α -アミノ酸
- 10 トランスアミナーゼ
 - a. アミノ基のオキソ酸への転移
- 11 アミダーゼ／アシラーゼ
 - a. アミド、アミジン、およびその他のC-N結合の加水分解

b. 非天然アミノ酸分割および合成

【0187】

これらの例示事項は、本発明のある特定の特徴を示すが、制限を意味するのではなく、また、開示した本発明の範囲を限定するものでもない。

従って、本発明の一形態によれば、複数の前駆核酸鋳型の配列を整列させて、1つ以上の境界点(demarcation points)を選択する。この境界点は、相同性領域に位置していてもよく、1つ以上のヌクレオチドから成り、さらに、上記前駆鋳型の少なくとも2つによって共有される。境界点を用いて、生成しようとする核酸ビルディングブロックの限界を画定することができる。このように、前駆分子中で同定し、選択した境界点は、子孫分子の集合における見込みキメラ形成点として役立つ。

好ましくは、有用な境界点は、少なくとも2つの前駆鋳型が共有する相同性領域（少なくとも、一つの相同ヌクレオチド塩基から成る）である。さらに好ましくは、有用な境界点は、前駆鋳型の少なくとも半分が共有する相同性領域である。またさらに好ましくは、有用な境界点は、前駆鋳型の少なくとも三分の二が共有する相同性領域である。さらに好ましくは、有用な境界点は、前駆鋳型の少なくとも四分之三が共有する相同性領域である。さらに好ましくは、有用な境界点は、前駆鋳型のほぼすべてが共有する相同性領域である。さらに好ましくは、有用な境界点は、前駆鋳型のすべてが共有する相同性領域である。

核酸ビルディングブロックの設計、ならびに、集合させようとする核酸ビルディングブロックの互いに適合する連結可能な末端を、図6および7に示す。図示したように、前駆鋳型のセットを一行に並べることによって、自然に発生した複数の境界点が明らかになり、これら鋳型が共有する境界点の同定は、生成して、子孫キメラ分子の生成に使用されるビルディングブロックを非確率論的に決定するのに役立つ。

好ましい実施形態では、本発明は、完全ライブラリーを作製するために、連結再集合方法を徹底して実施することを特徴とする。言い換えれば、考えられるあらゆる順序の組合せの核酸ビルディングブロックを、最終的キメラ核酸分子のセットとして呈示する。同時に、特に好ましい実施形態では、各組合せにおける集

合順序（すなわち、各最終的キメラ核酸の5'→3'配列における各ビルディングブロックの集合順序）は、設計によるもの（もしくは、非確率論的）である。本発明の非確率論的性質によって、不要な副産物の可能性が大幅に減少する。

別の好ましい実施形態では、本発明は、連結再集合方法を体系的に実施し、例えば、体系的にコンパートメント化したライブラリーを形成し、コンパートメントが、例えば1つずつ、体系的に選別できることを特徴とする。言い換えれば、本発明は、特定核酸ビルディングブロックの選択的かつ賢明な使用と、順次段階を追った集合反応の選択的かつ賢明な使用とを組み合わせることにより、子孫産物の特定セットが、複数の反応容器の各々に生成される実験的設計を達成することができる。これによって、体系的検定およびスクリーニング手順を実施することが可能になる。従って、これにより、恐らく非常に多くの子孫分子を、これまでより小さなグループで体系的に検定することができる。

特に、前駆分子間の相同性が低い場合に、極めて柔軟で、しかも徹底かつ体系的な方法で、キメラ化を実施する能力があることから、上記発明は、多数の子孫分子から成るライブラリー（またはセット）の生成に関する。上記連結再集合の発明の非確率論的性質によって、生成される子孫分子は、設計により選択された全体集合順序を有する最終的キメラ核酸分子のライブラリーから成るのが好ましい。この発明の特に好ましい実施形態では、生成されたライブラリーは、好ましくは、 10^3 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^5 以上の異なる子孫分子種、またさらに好ましくは、 10^{10} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{15} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{20} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{30} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{40} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{50} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{60} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{70} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{80} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{100} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{110} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{120} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{130} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{140} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{150} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ま

しくは、 10^{175} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{200} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{300} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{400} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{500} 以上の異なる子孫分子種、さらに好ましくは、 10^{1000} 以上の異なる子孫分子種から成る。

【0188】

一形態によれば、前述のように生成した最終的キメラ核酸分子のセットは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから成る。1つの好ましい実施形態によれば、このポリヌクレオチドは遺伝子であり、合成遺伝子でもよい。別の好ましい実施形態では、このポリヌクレオチドは遺伝子経路であり、合成遺伝子経路でもよい。この発明は、本発明により生成された1つ以上の合成遺伝子を、真核生物（植物を含む）内で操作可能な経路等の合成遺伝子経路に組み込むことを特徴とする。

境界点の選択、核酸ビルディングブロックのサイズと数、ならびに結合のサイズと設計に関して、選択および制御に大きな自由があるため、本発明の能力は極めて優れていることに留意されたい。さらに、本発明の操作性のために、分子間相同性の要件が非常に緩和されることにも留意すべきである。実際、分子間相同性がほとんどもしくは全くない領域でも、境界点を選択することもできる。例えば、コドンのゆらぎ、すなわち、コドンの縮重のために、対応する前駆鋳型に元々コードされていたアミノ酸を変化させることなく、ヌクレオチド置換を核酸ビルディングブロックに導入することができる。あるいは、元のアミノ酸のコーディングが変化するように、コドンを変化させることも可能である。この発明は、このような置換を核酸ビルディングブロックに導入して、分子間で相同性の境界点の発生率を高め、従って、ビルディングブロック間で達成される結合の数を増加することにより、今度は、生成しようとする子孫キメラ分子の数を増やすことを特徴とする。

別の態様では、ビルディングブロックを生成するステップの合成の種類によって、ヌクレオチド（例えば、コドンまたはイントロンもしくは調節配列等の、1つ以上のヌクレオチド）の設計および導入が可能になる。尚、これらヌクレオチドは、*in vitro*法（例えば、突然変異誘発により）や*in vivo*法（例えば、宿主

生物の遺伝子スプライシング能力を利用して)で、後に任意で除去することができる。多数の態様において、有用な境界点を形成するという利点が見込まれる以外に、多くの理由から、これらヌクレオチドの導入が好ましいことに留意すべきである。

従って、別の実施形態によれば、本発明は、核酸ビルディングブロックを用いて、イントロンを導入することを特徴とする。従って、本発明は、機能性イントロンを本発明の合成遺伝子に導入することを特徴とする。本発明はまた、機能性イントロンを本発明の合成遺伝子経路に導入することを特徴とする。従って、本発明は、1つ(以上)の人工的に導入したイントロンを含む合成遺伝子であるキメラポリヌクレオチドの生成に関する。

従って、本発明はまた、1つ(以上)の人工的に導入したイントロンを含む合成遺伝子経路であるキメラポリヌクレオチドの生成に関する。好ましくは、人工的に導入したイントロンは、天然イントロンが、遺伝子スプライシングで機能的に働くのと同様に、遺伝子スプライシングについて、1つ以上の宿主細胞内で機能的である。本発明は、組換えおよび/またはスプライシングのために、宿主生物に導入しようとする合成イントロン含有ポリヌクレオチドの生成方法を提供する。

前駆体分子間に相同性がほとんどまたは全くない領域で、本明細書に記載したカップリングを用いて、キメラ化を達成する能力は、新しい遺伝子経路の集合に有用で、しかも、実際には不可欠である。本発明は、従って、合成連結再集合を用いた新しい合成遺伝子経路の生成に関する。ある形態では、これは、目的とする宿主内で操作可能な調節配列(プロモーター等)の導入により達成され、該配列が目的とする宿主に導入されると、新しい遺伝子経路に操作性が付与される。ある態様では、本発明は、複数の目的とする宿主(例えば、微生物や植物細胞)内で操作可能な新規の合成遺伝子経路の生成に関する。これは、例えば、第1目的の宿主内で操作可能な調節配列と、第2目的の宿主内で操作可能な調節配列から成る複数の調節配列の導入により、達成することができる。同様の方法を実施して、第3の目的の宿主種等において、遺伝子経路の操作性を達成することができる。目的とする宿主種の数、それぞれ、1~10の間の整数、もしくは10以上の整数

でもよい。あるいはまた、例えば、複数の目的宿主における遺伝子経路の操作性は、複数の目的宿主内に固有操作性を有する調節配列の導入により、達成することができる。

従って、ある実施形態によれば、本発明は、核酸ビルディングブロックを用いて、調節配列、特に、遺伝子発現のための調節配列を導入することを特徴とする。好ましい調節配列には、限定しないが、合成のもの、ならびに、古細菌、細菌、真核（ミトコンドリアを含む）、ウイルス、およびプリオンまたはプリオン様生物に存在するものが含まれる。好ましい調節配列としては、限定しないが、プロモーター、オペレーター、ならびに活性化因子結合部位が挙げられる。従って、本発明は、機能的調節配列を本発明の合成遺伝子に導入することを特徴とする。本発明はまた、機能的調節配列を本発明の合成遺伝子経路に導入することを特徴とする。

このように、本発明は、1つ（以上）の人工的に導入した調節配列を含む合成遺伝子であるキメラポリヌクレオチドの生成に関する。従って、本発明はまた、1つ（以上）の人工的に導入した調節配列を含む合成遺伝子経路であるキメラポリヌクレオチドの生成に関する。好ましくは、人工的に導入した調節配列は、合成ポリヌクレオチドの一つ以上の遺伝子に機能しうるように結合され、1つ以上の宿主細胞内で機能的である。

【0189】

本発明に有用な好ましい細菌プロモーターとしては、lacI、lacZ、T₃、T₇、gpt、ラムダR_R、P_Lおよびtrpが挙げられる。有用な真核プロモーターには、CMV即時型初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、ならびにマウスメタロチネイン-Iがある。具体的な植物調節配列として、植物またはその一部の使用に応じて、構成的にあるいは段階および／または組織特異的のうちいずれかで、植物における転写指令に活性なプロモーターが挙げられる。これらのプロモーターには、限定しないが、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）（Guilleyら、1982）等の35Sプロモーター；リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子（Coruzziら、1984）のプロモーター等の、葉特異的発現のためのプロモーター；グルタミンスインターゼ遺伝子（Ting

eyら、1987) 由来のプロモーター等、根特異的発現のためのプロモーター；*Brassica napus*由来のアブラナ科Aプロモーター (Ryanら、1989) 等の、種子特異的発現のためのプロモーター；ジャガイモ由来のクラス I パタチンプロモーター (Rocha-Sasaら、1989；Wenzlerら、1989) 等の、塊茎特異的発現のためのプロモーター、あるいは、トマト由来のポリガラクトナーゼ (PG) プロモーター (Birdら、1988) 等の、果実特異的発現のためのプロモーターが挙げられる。

本発明に好ましいその他の調節配列には、ターミネーター配列およびポリアダニル化シグナル、ならびに、植物で機能するあらゆる配列があるが、その選択は、当業者が問題なく行うことができる。このような配列の一例は、*Agrobacterium tumefaciens*のノパリンシンターゼ (nos) 遺伝子の3'フランキング領域である。また、調節配列には、CaMVの35Sプロモーターに存在するようなエンハンサー配列、ならびに、アルファルファモザイクウイルス (AIMV) RNA 4のリーダー配列 (Brederodeら、1980) 等のmRNA安定化配列、あるいは、同様に機能するその他の配列も含まれる。

本発明を用いて生成される合成遺伝子は、別の核酸との組換えのための基質としても使用することができる。同様に、本発明を用いて生成される合成遺伝子経路は、別の核酸との組換えのための基質としても使用することができる。好ましい例では、組換えは、合成イントロン含有遺伝子と、組換え相手として働く核酸との間の相同性領域により促進される、あるいは、該領域で起こる。特に好ましい例では、組換え相手は、合成遺伝子または合成遺伝子経路等、本発明により生成した核酸でもよい。組換えは、合成遺伝子に人工的に導入した1つ (以上) のイントロンに存在する相同性領域により促進される、あるいは、該領域で起こる。

本発明の合成連結再集合方法は、複数の核酸ビルディングブロックを利用するが、これらブロックの各々は、二つの連結可能な末端を有するのが好ましい。各核酸ビルディングブロックの二つの連結可能な末端は、二つの平滑末端 (すなわち、各々がゼロヌクレオチドの突出部を有する)、もしくは、好ましくは、一つの平滑末端と一つの突出部、あるいは、さらに好ましくは、やはり二つの突出部である。

この目的のための有用な突出部は、3'突出部または5'突出部である。したがって、核酸ビルディングブロックは、3'突出部または5'突出部、あるいは、二つの3'突出部または二つの5'突出部である。核酸ビルディングブロックを集合させて、最終的キメラ核酸分子を形成する全体順序は、意図的な実験設計により決定するものとし、ランダムではない。

ある好ましい実施形態によれば、二つの一本鎖核酸（一本鎖オリゴとも呼ぶ）を化学合成し、これらを接触させて、アニーリングし、二本鎖核酸ビルディングブロックを形成することにより、核酸ビルディングブロックを生成する。

二本鎖核酸ビルディングブロックは、様々なサイズでよい。これらビルディングブロックのサイズは、実験者の選択によって、変えることができる。ビルディングブロックの好ましいサイズは、1塩基対（突出部を含まない）～100,000塩基対（突出部を含まない）の範囲である。これ以外にも、下限が1 bp～10,000bp（この範囲にあるすべての整数値を含む）、上限が2 bp～100,000bp（この範囲にあるすべての整数値を含む）とするサイズの範囲も提供される。

ポリメラーゼに基づくこれらの増幅法を用いて、数万個の塩基対でなければ、高い忠実度で、長さが最大数千個までの塩基対の二本鎖核酸を生成できることに留意されたい。化学合成（例えば、ホスホロアミダイドに基づく）を用いて、高い忠実度で、長さが最大数百ヌクレオチドまでの核酸を生成することができる。しかし、所望であれば、これらを、例えば、突出部または付着末端を用いて、構成し、数万個の塩基対でなければ、長さが最大数千個の塩基対の二本鎖核酸を形成することができる。

【0190】

また、本発明に従い、各方法を組み合わせて（例えば、ホスホロアミダイドに基づく化学合成とPCR）使用することも可能である。従って、様々な方法により作製した核酸ビルディングブロックを組み合わせて用いて、本発明の子孫分子を生成することもできる。

核酸ビルディングブロックを生成する化学合成の使用は、本発明で特に好ましく、同時に、工程上の安全および容易さ等の他の理由からも有利である。生体サンプルのクローニングまたは採取もしくは実際の取り扱いは一切必要ない。核酸

ビルディングブロックの設計は、紙の上で実施することができる。従って、この発明は、組換え技術における工程の安全面で利点を有することがわかる。

しかし、ある好ましい実施形態によれば、本発明に従う二本鎖核酸ビルディングブロックは、ポリヌクレオチド鋳型のポリメラーゼに基づく増幅により生成することもできる。図2に示す非制限的实施例では、プライマーの第1セット、 F_2 および R_1 を用いた第1ポリメラーゼ増幅反応を実施し、産物Aとほぼ同じである平滑末端産物（標識化反応1、産物1）を生成する。プライマーの第2セット、 F_1 および R_2 を用いて第2ポリメラーゼ増幅反応を実施し、産物Bとほぼ同じである平滑末端産物（標識化反応2、産物2）を生成する。これら二つの産物を混合し、融解およびアニーリングさせて、二つの突出部を持ち、有用であることが見込まれる二本鎖核酸ビルディングブロックを生成する。図2の例では、エキソヌクレアーゼIII等の3'作用性エキソヌクレアーゼを用いた他の三つの産物のヌクレアーゼベースの分解により、3'突出部を持つ産物（産物C）が選択される。また、5'作用性エキソヌクレアーゼ（例えば、レッドアルファ）を用いて、例えば、代わりに産物Dを選択できることに留意されたい。さらに、ハイブリダイゼーションに基づく手段等、上記以外の選択手段を用いてもよいし、これらの手段に、磁気ビーズ手段等の別の手段を組み込み、所望の産物の分離を促進することもできる。

上記以外にも、本発明に有用な二本鎖核酸ビルディングブロックを生成する方法は多数存在する。これらは、当業者には公知であり、また、容易に実施することができる。

特に好ましい実施形態によれば、本発明に有用な二本鎖核酸ビルディングブロックは、まず、二つの一本鎖核酸を生成し、次に、これらをアニーリングして、二本鎖核酸ビルディングブロックを形成する。二本鎖核酸ビルディングブロックの二本の鎖は、突出部を形成するものを除いて、ヌクレオチド毎に相補的であり、従って、突出部を除いて、ミスマッチを一切含まない。別の実施形態によれば、二本鎖核酸ビルディングブロックの二本の鎖は、突出部を形成するものを除いて、ヌクレオチド毎よりも少ない割合で相補的である。従って、この態様によれば、二本鎖核酸ビルディングブロックを用いて、コドン縮重を導入する。好まし

くは、コドン縮重は、本書に記載した部位飽和突然変異誘発を用いて、一つ以上のN,N,G/Tカセットを用いて、あるいは、一つ以上のN,N,Nカセットを用いて導入する。

本発明に従う順序立った集合を達成するための実験設計の例として、下記のものが挙げられる：

- 1) 特異的核酸ビルディングブロックの設計、
- 2) 各核酸ビルディングブロックの特異的連結末端の設計、
- 3) 核酸ビルディングブロックの構成の特定順序の設計。

突出部は、3'突出部または5'突出部でよい。突出部はまた、末端リン酸基を有してもよいし、あるいは、末端リン酸基がなくてもよい（代わりに、例えば、ヒドロキシル基を有する）。突出部は、何個のヌクレオチドから成るものでもよい。好ましくは、突出部は、0個のヌクレオチド（平滑末端のように）～10,000個のヌクレオチドから成る。従って、突出部のサイズは、広い範囲で使用可能である。従って、下限は、1～200までの整数、また上限は2～10,000までの整数でよい。ある特定の例によれば、突出部は、1ヌクレオチド～200ヌクレオチドのうちのいずれからでも構成することができる（該範囲内の整数すべてを含む）。

最終的な（final）キメラ核酸は、指定したビルディングブロックすべてが集合するまで、2つ以上のビルディングブロックを順次集合させることにより、生成することができる。二つの集合ステップの実施の間に、実施サンプルを、サイズ選択または精製工程、もしくはその他の選択または富化工程に任意で付してもよい。あるいは、一ステップで一度に全指定ビルディングブロックを集合させることにより、最終的キメラ核酸分子を生成することもできる。

【0191】

有用性

本発明のin vivo組換え法は、特定ポリヌクレオチドまたは配列の未知ハイブリッドまたは対立遺伝子のプールについて、ブラインド方式で実施することができる。しかし、特定ポリヌクレオチドの実際のDNAまたはRNA配列を知る必要がない。

遺伝子の混合集団内で組換えを用いる手法は、あらゆる有用なタンパク質、例

えば、インターロイキン I、抗体、tPA および成長ホルモンの生成に有用である。この手法は、変化させた特異性または活性を有するタンパク質の生成に用いることができる。この手法は、遺伝子のハイブリッド核酸配列、例えば、プロモーター領域、イントロン、エクソン、エンハンサー配列、31 非翻訳領域または 51 非翻訳領域の生成にも有用である。従って、この手法は、発現の速度が高い遺伝子を生成するのに使用することができる。また、この手法は、反復 DNA 配列の研究にも有用である。最後に、この手法は、リボザイムまたはアプタマーを突然変異する上で有用である。

多様性領域を分離するスカフォールド(scaffold)様領域は、特に、この発明の方法に適している。保存されたスカフォールドは、自己会合により全体フォールディングを決定すると共に、特異的結合を仲介する比較的制限されていないループを展示する。このようなスカフォールドの例として、免疫グロブリン β バレル、および 4 ヘリックス束がある。本発明の方法を用いて、結合のための、突然変異を起こした配列の様々な組合せを有するスカフォールド様タンパク質を生成することができる。

本発明の方法により、同様の標準的遺伝子の接合を実施することも可能である。例えば、ハイブリッドの核酸と、野生型核酸との混合により、「分子」戻し交雑を繰り返すと共に、関心のある突然変異の選択をする。伝統的育種同様、この手法を用いて、様々な採取源由来の表現型を、選択バックグラウンドに組み込むことができる。これは、例えば、選択していない特徴（すなわち、免疫原性）に影響する中立突然変異の除去に有用である。従って、タンパク質中のどの突然変異が、増大した生物学的活性に関与し、どれが関与しないかを決定するのに有用である。

2. 11. 2. 4. 末端選択

本発明は、ポリヌクレオチドの出発セットから、ポリヌクレオチドのサブセットを選択する方法であり、実施ポリヌクレオチドのどこにでも存在する 1 つ以上の選択可能な特徴（すなわち選択マーカー）を識別する能力に基づいて、各選択可能なポリヌクレオチドの受容（正の）および／または拒絶（負の）選択が実施できるようにする方法を提供する。好ましい形態では、末端選択と呼ばれる方法

が提供されるが、この方法は、選択可能なポリヌクレオチドの末端領域に一部もしくは全体が位置する選択マーカの使用に基づくものであり、このような選択マーカを「末端選択マーカ」と呼ぶこともある。

末端選択は、たとえ同一ポリヌクレオチド内でも、天然配列の検出、または、実験（本明細書に記載した、もしくは記載されていないあらゆる突然変異誘発方法を含む）により導入した配列の検出、あるいは、両方に基づくものである。末端選択マーカは、構造的選択マーカまたは機能的選択マーカ、あるいは構造的および機能的選択マーカの両方のいずれでもよい。末端選択マーカは、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列、もしくは、化学的構造、あるいは生物学的または生化学的タグから成るものでよく、放射能検出、酵素活性、蛍光、光学的特徴、磁気特性（磁気ビーズを用いて）、免疫反応性、ならびにハイブリダイゼーションの検出に基づく方法を用いて選択できるマーカが含まれる。

末端選択は、突然変異誘発の実施に有用なあらゆる方法と組み合わせて使用することもできる。このような突然変異誘発法には、限定しないが、本明細書に記載した方法（前述および後述）が含まれる。このような方法の非制限的な例として、次の用語で呼ばれる、本明細書に記載した、あるいは、他の文献に記載されているあらゆる方法が挙げられる：「飽和突然変異誘発」、「シャッフリング」、「組換え」、「再集合」、「誤りがちな(error-prone)PCR」、「集合PCR」、「セクシャルPCR」、「乗換えPCR」、「オリゴヌクレオチドプライマー特異的突然変異誘発」、「周期的（および／または指数）アンサンブル突然変異誘発（ArkinおよびYouvan、1922を参照）」、「カセット突然変異誘発」、「in vivo突然変異誘発」、「in vitro突然変異誘発」。さらに、末端選択は、あらゆる突然変異誘発および／または増幅方法（例えば、Arnold、1993；CardwellおよびJoyce、1992；Stemmer、1994を参照；望ましい子孫分子の選択（これら分子の存在のスクリーニングも含む）をする上で、使用することが好ましい方法）により生成された分子について実施することもできる。

さらに、末端選択は、突然変異誘発法以外にも、ポリヌクレオチドに使用することができる。好ましい実施形態では、本明細書に記載した末端選択を用いて、

別のポリヌクレオチドへの連結ステップ（ベクターへの連結を含む）等、クローニングステップを促進することができる。従って、本発明は、ライブラリーの作製、望ましいポリヌクレオチドの選択および／または強化、ならびに一般的クローニングを促進するための有用な手段としての末端選択に関する。

【0192】

特に好ましい実施形態では、末端選択は、ポリヌクレオチドの（正の）選択、あるいはポリヌクレオチドの（負の）選択に基づく。さらには、末端選択は、（正の）選択および（負の）選択の両方に基づく。末端選択は、他の選択および／またはスクリーニング法と共に、同様の、もしくは異なる選択および／またはスクリーニング法、ならびに有用な突然変異誘発法と組み合わせて、相互作用的に実施することができる。これらの方法はすべて、相互作用的に、しかも、どんな順序、組合せ、ならびに順列で行ってもよい。

また、本発明のある実施形態によれば、末端選択を用いて、少なくとも一部が、環状のポリヌクレオチド（例えば、プラスミドまたはその他の環状ベクター、もしくは、部分的に環状のその他プラスミド）、および／または分枝、および／または、化学基または部分で、修飾した、もしくは、置換したポリヌクレオチドを選択することもできる。この実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、中間または中央領域から成る環状分子である。該領域は、5'フランキンク領域（これは、末端選択のために、非環状ポリヌクレオチドの5'末端領域と同様の働きをする）により5'側に、また、3'末端領域（これは、末端選択の目的のために、非環状ポリヌクレオチドの3'末端領域と同様の働きをする）によって3'側に存在する。この非制限的例で用いられるように、いずれか二つの領域間に、あるいは三つすべての領域間でも、配列のオーバーラップがある可能性がある。

本発明の非制限的形態では、線状ポリヌクレオチドの末端選択は、ポリヌクレオチド末端または複数の末端（5'末端または3'末端のいずれでもよい）、あるいはその近傍に位置する少なくとも一つの末端選択マーカの存在に基づく一般的手法を用いて実施する。ある非制限的例では、末端選択は、ポリヌクレオチド配列を認識する酵素に認識される配列等（しかし、これに制限されない）の末端またはその近傍の特定配列の選択に基づく。ポリヌクレオチドの化学的修飾を認識

し、触媒する酵素は、本書では、ポリヌクレオチド作用酵素と呼ぶ。好ましい態様では、有用なポリヌクレオチド作用酵素の非制限的例として、ポリヌクレオチド切断活性を有する酵素、ポリヌクレオチドメチル化活性を有する酵素、ポリヌクレオチド連結活性を有する酵素、ならびに、複数の異なる酵素活性を有する（非制限的に、例えば、ポリヌクレオチド切断活性とポリヌクレオチド連結活性の両方を有するもの等）酵素が挙げられる。

従って、該当するポリヌクレオチド活性酵素には、市場で入手可能な、または、入手できないポリヌクレオチドエンドヌクレアーゼ、ならびにそのコンパニオンメチラーゼも含まれ、ウェブサイト<http://www.neb.com/rebase>で閲覧できるもの、ならびに下に引用する文献（RobertsおよびMaceli、1996）に記載されているものが挙げられる。好ましいポリヌクレオチドエンドヌクレアーゼとしては、限定しないが、II型制限酵素（IIS型を含む）があり、二本鎖ポリヌクレオチドの両方の鎖を切断する酵素（例えば、5'...GC/GGCCGC...3'で両方の鎖を切断するNotI）や、二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖だけを切断する酵素、すなわち、ポリヌクレオチドローニッキング活性を有する酵素（例えば、5'...GAGTCNNNN/N...3'で一方の鎖だけを切断するN.BstNBI）を挙げることができる。また、該当するポリヌクレオチド作用酵素には、III型制限酵素も含まれる。

さらに、該当するポリヌクレオチド作用酵素には、現在は入手できないが、将来開発される可能性のある酵素で、ポリヌクレオチドに、連結適合末端、特に、付着末端を生成するのに有用な酵素が含まれる。

好ましい一例では、有用な選択マーカーは、ポリヌクレオチドの制限部位で、この部位は、対応するII型（またはIIS型）制限酵素に、ポリヌクレオチド末端を切断させ、ポリヌクレオチド内の所望の内部配列を破壊することのないように、ポリヌクレオチドの内部を切断することなく、所望の連結反応に有用な連結可能末端（少なくとも一つの塩基突出部を有する平滑末端または付着末端を含む）を提供する。従って、対応する制限酵素の使用が、実施ポリヌクレオチドを内部で切断することを目的としない場合には、該当する制限部位の中でも、実施する特定のポリヌクレオチド内で、内部に存在しない（すなわち、末端以外には存在しない）部位が好ましい。これによって、使用するポリヌクレオチドの不要な内

部切断を招くことなく、制限消化反応を完了、もしくは完了近くまで実施することができる。

【0193】

従って、好ましい形態によれば、末端選択に付そうとするポリヌクレオチドの内部に含まれない、または、含まれないと予想される、あるいは含まれないと思われる（例えば、実施ポリヌクレオチドに関する配列情報が不完全な場合）制限部位を使用するのが好ましい。この形態によれば、よく存在するものよりも、比較的稀にしか存在しない制限部位の方が、通常好ましいことに留意されたい。これに対し、例えば、末端選択と共に、組換え、もしくはその他の突然変異誘発方法を実施するために、ポリペプチドの内部切断を所望する場合もある。

また、この発明によれば、不要な内部制限部位を除去するための方法（例えば、突然変異誘発方法）を使用することもできる。さらに、部分的消化反応（すなわち、部分的完了まで進行する消化反応）を用いて、末端領域の認識部位で消化を達成すると同時に、ポリペプチドの内部に発生し、しかも、同じ酵素により認識される感受性の高い制限部位を共有する。ある形態では、特定の酵素が、認識配列が発生する位置および環境に応じて、同じ認識配列の好ましい切断を提示することから、部分的消化が有用である。例えば、 λ DNAは、5つのEcoRI部位を有するが、右末端に最も近い部位の切断は、分子の中央にある部位の10倍以上の速さで発生することが報告されている。また、例えば、Sac IIは λ DNAに4つの部位を有するが、そのうちの3つは中央にクラスター化し、末端に最も近い残った部位（ヌクレオチド40,386での）よりも50倍速く切断される。すなわち、多くの研究者が、各種酵素について、部位優先を報告している（例えば、ThomasおよびDavis、1975；Forsblumら、1976；NathおよびAzzolina、1981；BrownおよびSmith、1977；GingerasおよびBrooks、1983；Krugerら、1988；ConradおよびTopal、1989；Ollerら、1991；Topal、1991；ならびにPein、1991；ほんの一例を挙げたにすぎない）。現在入手可能か、あるいは、将来入手可能かに拘わらず、使用するポリヌクレオチド作用酵素による部位優先の、経験による観察、ならびに、機械論的知識が、本発明による末端選択に役立つであろう。

保護方法を用いて、酵素による不要な消化から指定制限部位（例えば、内部部

位)を選択的に保護することができるが、保護しない場合には、該酵素は、これらの部位の存在に応答して、実施中のポリヌクレオチドを切断する恐れがある。このような保護方法には、不要な酵素活性を阻害する、メチル化や塩基置換(例えば、Tの代わりにU)等の修飾が含まれる。大きな(例えば、長さがメガ単位の)制限フラグメントを作製するのに十分希有な(例えば、非常に長い認識配列を有する)制限酵素の数は限られており、酵素切断部位の希有性を高めるためには、保護手法(例えば、メチル化による)が有用であることに留意すべきである。NotIの見掛け希有性を高めるためのM.FnuII(mCGCG)の約二倍使用は、多数のうちの一例にすぎない(Qiangら、1990; Nelsonら、1984; MaxamおよびGilbert、1980; RaleighおよびWilson、1986)。

本発明の好ましい形態によれば、一般に、希有な切断部位の使用が好ましいことを特徴とする。一般には、制限部位の発生頻度は、そこに含まれるヌクレオチドの数、ならびに、そこに含まれる塩基要求の多義性によって決定される。従って、非制限的例では、例えば、8つの特異的ヌクレオチドから成る制限部位(例えば、 4^8 に1、すなわち、65,536に1の推定相対発生率を有するNotI部位すなわちGC/GGCCGC、ランダム8-mers)は、例えば、6つのヌクレオチドから成るもの(例えば、 4^6 に1、すなわち、4,096に1の推定相対発生率を有するSmaI部位すなわちCCC/GGG、ランダム6-mers)よりも比較的頻度が低く、例えば、4つのヌクレオチドから成るもの(例えば 4^4 に1、すなわち、256に1の推定相対発生率を有するMsp I 部位すなわちC/CGG、ランダム4-mers)よりも比較的頻度が低い。さらに、別の非制限的例では、一般に、多義性の(しかし非常に特異的な)塩基要求を持たない制限部位(例えば、 4^5 に1、すなわち、1024に1の推定相対発生率を有するFinI部位すなわちCTCCC、ランダム5-mers)は、多義性W(ただし、W=AまたはT)塩基要件を有するもの(例えば、 $4 \times 4 \times 2 \times 4 \times 4$ に1、すなわち、512に1の推定相対発生率を有するAvaII部位すなわちG/GWCC—ランダム5-mers)より比較的頻度が低いが、多義性N(ただし、N=AまたはCまたはGまたはT)塩基要求を有するもの(例えば、 $4 \times 4 \times 1 \times 4 \times 4$ に1、すなわち、256に1の推定相対発生率を有するAsu I 部位すなわちG/GNCC—ランダム5-mers)より比較的頻度が低い。これらの相対発生率は、特異的ヌクレオチド塩基(特異的ヌク

レオチド配列はいうまでもなく)が、特異的ポリヌクレオチド、特異的種の生物、ならびに特異的グループの生物に、異なる頻度で発生することが認められるため、実際ポリヌクレオチドの大まかな推定値と考えられる。例えば、異なる種の生物の%G+C含有率は、非常に異なることが多く、しかも広い範囲で変動する。

【0194】

選択標識として使用する比較的稀な制限部位には、非制限的に、好ましくは、少なくとも4ヌクレオチド配列から成る部位、さらに好ましくは、少なくとも5ヌクレオチド配列から成るもの、さらに好ましくは、少なくとも6ヌクレオチド配列から成るもの(例えば、BamHI部位すなわちG/GATCC、BglII部位すなわちA/GATCT、PstI部位すなわちCTGCA/G、ならびにXbaI部位すなわちT/CTAGA)、さらに好ましくは、少なくとも7ヌクレオチド配列から成るもの、さらに好ましくは、少なくとも8ヌクレオチド配列から成るもの(例えば、AscI部位すなわちGG/CGCGCC、NotI部位すなわちGC/GGCCGC、PacI部位すなわちTTAAT/TAA、PmeI部位すなわちGTTT/AAAC、SrfI部位すなわちGCCC/GGGC、Sse838I部位すなわちCCTGCA/GG、ならびにSwaI部位すなわちATTT/AAAT)、さらに好ましくは、9ヌクレオチド配列から成るもの、さらに好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド配列から成るもの(例えば、BspGI部位すなわちCG/CGCTGGAC)が含まれる。さらに、いくつかの制限部位(例えば、クラスIIS酵素)は、特異性が比較的高い部分(すなわち、制限部位の発生頻度の主な決定因子を含む部分)と、特異性が比較的低い部分とから構成されること、また、切断部位は、特異性が比較的低い部分に含まれる、もしくは含まれないことが考えられる。例えば、Eco57I部位すなわちCTGAAG(16/14)には、特異性が比較的高い部分(すなわち、CTGAAG部分)と、切断部位を含む特異性が比較的低い部分(すなわち、N16配列)がある。

本発明の別の好ましい態様では、有用な末端選択標識は、特異的ポリヌクレオチド配列を認識するポリヌクレオチド作用酵素により認識される末端配列である。本発明の好ましい形態では、有用な末端選択標識は、従来のII型制限酵素に加えて、他の酵素も含む。この本発明の好ましい形態によれば、有用なポリヌクレオチド作用酵素には、ジャイレース、ヘリカーゼ、リコンビナーゼ、レラクサー

ぜ、ならびに、これらに近縁の酵素が含まれる。

好ましい例としては、中でも、トポイソメラーゼ（一部が、ジャイレースのサブセットとして類別される）、ならびに、ポリヌクレオチド切断活性（好ましくは、ポリヌクレオチドニッキング活性を含む）および／またはポリヌクレオチド連結活性を有するその他のあらゆる酵素が挙げられる。好ましいトポイソメラーゼ酵素としては、特に、市販の入手源（Epicentre Technologies、ウィスコンシン州マジソン；Invitrogen、カリフォルニア州カールスバート；Life Technologies、メリーランド州ガテスバーク）から、また恐らく、個人的採取源からも、入手可能なトポイソメラーゼ I 酵素が挙げられる。本書に記載した末端選択に有用な類似酵素が、将来開発されることも考えられる。特に好ましいトポイソメラーゼ I 酵素は、ワクシニアウイルスを起原とするトポイソメラーゼ I 酵素であり、これは、特異的認識配列（例えば、5'...AAGGG...3'）を有し、ポリヌクレオチドニッキング活性とポリヌクレオチド連結活性の両方を備えている。この酵素の特異的ニッキング活性（一方の鎖の切断）により、内部認識部位は、切断された末端部位の変性を起こす温度では、ニッキング活性によって起こるポリヌクレオチド破壊を被りにくい（むしろ、アニーリングされた状態を保つ）。従って、末端切断に使用する際、トポイソメラーゼに基づく末端選択のためのニッキング部位は、末端から100ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から50ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から25ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から20ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から15ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から10ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から8ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から6ヌクレオチド以下、さらに好ましくは、末端から4ヌクレオチド以下であるのが好ましい。

非制限的で、あくまで例示のための特に好ましい態様では、トポイソメラーゼに基づく末端選択用のニッキング部位が、末端から4ヌクレオチドの時、ニッキングにより、4塩基（末端領域で）の一本鎖オリゴを生成するが、このオリゴは、末端選択可能ポリヌクレオチドにおけるその相補鎖から変性することができる。これによって、続く連結反応に有用なポリヌクレオチドの付着末端（4塩基から成る）が形成される。クローニングベクター（好ましくは、発現ベクター）と

の連結反応を達成するため、制限酵素に基づく手段等のいずれかの手段により、クローニングベクターに、適合付着末端を生成することができる。末端選択可能ポリヌクレオチド末端における末端ヌクレオチド（この具体例では、4末端塩基から成る）を賢明に選択することによって、ポリヌクレオチドを連結しようとするクローニングベクターに生成された付着末端に、適合性を付与することができる。

これに対し、例えば、末端から500塩基の、末端選択可能ポリヌクレオチドの内部ニックングは、500塩基の一本鎖オリゴを生成し、このオリゴは、その相補鎖から容易に変性されないが、むしろ修復に有用である（例えば、ニックを発生する同じトポイソメラーゼ酵素）。

従って、本発明は、実施するポリヌクレオチドニックング付着末端を生成するための一例え、ワクシニアトポイソメラーゼに基づく、および／またはII（もしくはIIS）型制限エンドヌクレアーゼに基づく、および／または、III型制限エンドヌクレアーゼに基づく、および／またはニックング酵素に基づく（例えば、N.BstNBIを用いて）一方法であって、上記末端は連結適合性であり、少なくとも1塩基突出部から成る方法を提供する。好ましくは、このような付着末端は、少なくとも2塩基突出部から成り、さらに好ましくは、この付着末端は、少なくとも3塩基突出部から成り、さらに好ましくは、この付着末端は、少なくとも4塩基突出部から成り、さらに好ましくは、この付着末端は、少なくとも5塩基突出部から成り、さらに好ましくは、この付着末端は、少なくとも6塩基突出部から成る。また、上記付着末端は、少なくとも7塩基突出部、または、少なくとも8塩基突出部、または、少なくとも9塩基突出部、または、少なくとも10塩基突出部、または、少なくとも15塩基突出部、または、少なくとも20塩基突出部、または、少なくとも25塩基突出部、または、少なくとも30塩基突出部から成るものでもよい。これらの突出部は、A、C、GまたはTを含むいずれの塩基から構成されてもよい。

【0195】

トポイソメラーゼまたはニックング酵素（例えば、N.BstNBIを用いて）を用いて導入した付着末端突出部は、連結反応環境に独特の設計とし、自己二量体化お

よびその他不必要な鎖状体化等、不要なフラグメントの再集合を防止することができる。

本発明のある形態によれば、ポリメラーゼに基づく反応の使用により、末端選択可能ポリヌクレオチドの末端領域に、複数の配列（オーバーラップしてもよいが、必ずしもオーバーラップする必要はない）を導入することができる。該当するが、決して制限的ではない例では、このようなオリゴを用いて、トポイソメラーゼ I に基づく末端選択に有用な好ましい5'末端領域を達成することができる。このオリゴは、付着末端に変換可能な（好ましくは、ワクシニアトポイソメラーゼ I により）1～10塩基配列、リボソーム結合部位（すなわち、「RBS」で、好ましくは、発現クローニングに有用なもの）、ならびに、任意のリンカー配列と、これに続くATG出発部位および0～100塩基の鋳型特異的配列（ポリメラーゼに基づく反応での鋳型へのアニーリングを促進するため）から構成される。従って、この態様によれば、有用なオリゴ（フォワードプライマーと呼ばれる）は、次の配列を有する：5' [末端配列=(N)₁₋₁₀] [トポイソメラーゼ I 部位およびRBS=AAGGGAGGAG] [リンカー=(N)₁₋₁₀₀] [出発コドンおよび鋳型特異的配列=ATG(N)₀₋₁₀₀] 3'。

同様に、該当するが、決して制限的ではない例では、オリゴを用いて、トポイソメラーゼ I に基づく末端選択に有用な好ましい3'末端領域を達成することができる。このオリゴは、付着末端に変換可能な（好ましくは、ワクシニアトポイソメラーゼ I により）1～10塩基配列、ならびに、任意のリンカー配列と、これに続く0～100塩基の鋳型特異的配列（ポリメラーゼに基づく反応での鋳型へのアニーリングを促進するため）から構成される。従って、この態様によれば、有用なオリゴ（リバースプライマーと呼ばれる）は、次の配列を有する：5' [末端配列=(N)₁₋₁₀] [トポイソメラーゼ I 部位=AAGGG] [リンカー=(N)₁₋₁₀₀] [鋳型特異的配列=ATG(N)₀₋₁₀₀] 3'。

末端選択を用いて、子孫分子（例えば、突然変異誘発により生成されたもの）から、親鋳型分子（例えば、突然変異誘発を実施すべきもの）を識別および分離することができる。例えば、トポイソメラーゼ I 認識部位がないプライマーの第1セットを用いて、親分子の末端領域（例えば、ポリメラーゼに基づく増幅）を

修飾することができる。その後、上記とは別の第2セットのプライマー（例えば、トポイソメラーゼ I 認識部位を有する）を用いて、増幅した鋳型分子から、突然変異させた子孫分子を生成することができる（例えば、合成の中断、鋳型スィッチングポリメラーゼに基づく増幅、または合成の中断等のポリヌクレオチドキメラ化方法；または、飽和突然変異誘発；あるいは、本書に記載したように、トポイソメラーゼ I 認識分子を、突然変異誘発させた子孫分子に導入するその他のいずれかの方法を用いて）。次に、トポイソメラーゼ I に基づく末端選択を使用して、識別だけではなく、所望の子孫分子の、選択的トポイソメラーゼ I に基づく連結反応を促進することができる。

従って、増幅した親分子に対する第2組のプライマーのアニーリングは、第1組のプライマー（すなわち、一組の親部位を増幅するのに使用されるプライマー）に、トポイソメラーゼ I 認識部位に類似しているが、機能トポイソメラーゼ I 酵素の認識を阻害するのに十分異なる配列を組み込むことにより促進することができる。例えば、AAGGG部位のいずれかの1塩基～全5塩基を変えた配列を第1セットのプライマー（突然変異誘発に付す前に、親鋳型の増幅に使用するもの）に組み込むことができる。具体的かつ非制限的形態では、親分子は、例として以下に示すが、決して制限的ではない組のフォワードおよびリバースプライマーを用いて増幅することができる。

フォワードプライマー：5'CTAGAAGAGAGGAGAAAACCATG(N)₁₀₋₁₀₀3'、および

リバースプライマー：5'GATCAAAGGCGCGCCTGCAGG(N)₁₀₋₁₀₀3'

第1組のプライマーの上記例によれば、(N)₁₀₋₁₀₀は、好ましくは10～100ヌクレオチド長さの鋳型特異的配列、さらに好ましくは、10～50ヌクレオチド長さの鋳型特異的配列、さらに好ましくは、10～30ヌクレオチド長さの鋳型特異的配列、さらに好ましくは、15～25ヌクレオチド長さの鋳型特異的配列を示す。

具体的かつ非制限的形態によれば、この増幅（真のトポイソメラーゼ I 認識部位が欠如した上記第1セットのプライマーを用いて）の後、増幅した親分子を、真のトポイソメラーゼ I 認識部位を有する1セット以上のフォワードおよびリバースプライマーを用いて、突然変異誘発にかけることを特徴とする。従って、具体的かつ非制限的形態では、例として以下に示すが、決して制限的ではない第2

組の前進およびリバースプライマーを用いて、親分子を、突然変異誘発した子孫分子を生成するための鋳型として使用することを特徴とする。

フォワードプライマー：5'CTAGAAGGGAGGAGAAAACCATG3'

リバースプライマー：5'GATCAAAGGCGCGCCTGCAGG3' (AscI認識部位配列を含む)

【0196】

本発明に従う末端選択用の第1、第2、あるいは、これに続くセットのプライマーとして、特に記載していない異なるプライマーを何セットでも使用することも可能である。II型制限酵素部位を組み込んでもよいことに留意すべきである（例えば、前述の例にAscI部位）。また、実施ポリヌクレオチドを飽和突然変異誘発に付すために、実験者は、記載した他の配列以外にも、一つ以上のN、N、G/Tトリプレットを有用なプライマーに組み込むことができる。すなわち、第2セットおよび／または続くセットのプライマーを使用することにより、トポイソメラーゼI部位の導入と、子孫ポリヌクレオチドにおける突然変異の誘発という二つの目的を達成することができる。

従って、提供される一態様によれば、有用な末端選択標識とは酵素認識部位であり、この部位が、酵素に、指定部位でポリヌクレオチドを切断（ニックを含む）させ、生成された一本鎖オリゴが変性すると同時に、連結反応適合末端を形成する。次に、形成されたポリヌクレオチド末端の連結反応を、同じ酵素（例えば、ワクシニアウイルスの場合には、トポイソメラーゼI）、あるいは別の酵素を使用して達成することができる。本発明のある形態によれば、ポリヌクレオチドを選択するために、同種（例えば、二つのワクシニアウイルストポイソメラーゼI認識部位）または異種（例えばクラスII制限酵素認識部位およびワクシニアウイルストポイソメラーゼI認識部位）に拘わらず、あらゆる末端選択標識を組み合わせる用いることが可能である。従って、各選択可能ポリヌクレオチドは、1種以上の末端選択標識を有し、これら標識は、同種または異種末端選択標識のいずれでもよい。具体例では、複数の末端選択標識をポリヌクレオチドの一方の末端に位置させ、互いにオーバーラップ配列を持つようにすることができる。

本発明に従う末端選択では、現在存在するか、将来開発されるかに拘わらず、

何種類の酵素でも有用であることに特に留意すべきである。例えば、本発明の具体的態様では、末端選択を達成するために、ポリヌクレオチド連結活性源と共に、ニッキング酵素（例えば、5'...GAGTCNNNN/N...3'で、一方の鎖だけを切断するN.BstNBI）を用いることができる。この態様によれば、N.BstNBIの認識部位（トポイソメラーゼ I の認識部位ではなく）は、末端選択可能ポリヌクレオチドに組み込まなければならない（突然変異を誘発させた子孫分子の選択に末端選択を用いるかどうか、もしくは、突然変異誘発手順とは別に末端選択を用いるかどうかに関わらず）。トポイソメラーゼに基づくニッキングおよび連結反応を用いたこの末端選択手法は、従来の選択方法に対して、いくつかの利点を有する。すなわち、この手法は、指向性クローニング（発現クローニングを含む）の達成を可能にする。特に、この手法を用いて、下記事項を達成することができる：直接連結反応（すなわち、伝統的な制限－精製－連結反応に付す必要がない。これは、開始制限反応から、T4DNAリガーゼの使用に依存する連結反応まで、多く問題を被りやすい）；元の鋳型分子（例えば、トポイソメラーゼ I 部位が欠如した元の鋳型分子であり、該部位は、突然変異誘発後まで、導入されない）からの子孫分子の分離；サイズ分離段階（例えば、ゲルクロマトグラフィーまたはその他の電気泳動手段、あるいは、サイズ排除膜の使用により）の必要がなくなる；内部配列の保存（トポイソメラーゼ I が存在する場合でも）；連結反応（例えば、特に、不要な残留制限酵素活性の存在下で、T4DNAリガーゼの使用に依存した）がうまくいかない心配が不要になる；ならびに発現クローニングの促進（フレームシフトの心配がなくなる等）。また、トポイソメラーゼに基づくニッキングおよび連結反応を用いた上記末端選択法により、不要な制限酵素に基づく切断についての心配－特に、実施するポリヌクレオチドの内部制限部位での（あるいは、不要なスター活性のしばしば予測不可能な部位でも）－もなくすることができる。この切断は、実施ポリヌクレオチドの破壊部位となる恐れがある。

【0197】

2. 11. 3. 追加スクリーニング方法

ペプチド展示方法

本発明を用いて、前記方法のいずれか、ならびにいずれかの組合せを用いたin

vitroおよび／またはin vivo組換えによって、ペプチド展示方法により選択されたポリヌクレオチド配列をシャッフルすることができる。上記ペプチド展示方法は、会合ポリヌクレオチドが、ある表現型（例えば、予め決められた受容体（リガンド）の親和性）について選別される展示ペプチドをコードすることを特徴とする。

益々重要性が高まる生物薬剤学的薬剤開発および分子生物学の側面は、ペプチド構造の同定であり、これには、生物学的高分子と相互作用するペプチドまたは偽ペプチドの1次アミノ酸配列が含まれる。予め決められた生物学的高分子（例えば、受容体）との結合等、所望の構造または機能特性を有するペプチドを同定する方法は、ペプチドのアミノ酸配列が付与した所望の構造または機能特性を有する個別ライブラリーのメンバーについて、大きなライブラリーまたはペプチドをスクリーニングすることを含む。

ペプチドライブラリーを生成する指向性化学合成方法以外に、いくつかの組換えDNA方法も報告されている。そのうちの一つは、バクテリオファージ粒子または細胞の表面に、ペプチド配列、抗体、またはその他のタンパク質を展示することから成る。一般に、これらの方法では、各バクテリオファージ粒子または細胞は、天然のバクテリオファージまたは細胞タンパク質配列に加えて、単一種の展示ペプチドを展示する個別ライブラリーメンバーとしての役割を果たす。各バクテリオファージまたは細胞は、特定の展示ペプチド配列をコードするヌクレオチド配列情報を含む。従って、展示ペプチド配列は、単離したライブラリーメンバーのヌクレオチド配列決定によりみいだすことができる。

周知のペプチド展示方法は、典型的には、バクテリオファージコートタンパク質との融合のように、繊維状バクテリオファージの表面に、ペプチド配列を展示することを含む。バクテリオファージライブラリーは、固定化した予定高分子または小分子（例えば、受容体）とインキュベートし、固定化した高分子に結合するペプチド配列を示すバクテリオファージ粒子を、予め決められた高分子に結合するペプチド配列を示さないものから、区分することができる。次に、固定化した高分子に結合したバクテリオファージ粒子（すなわち、ライブラリーメンバー）を回収し、複製して、選択されたバクテリオファージ小集団を増幅し、これを

、次のラウンドの親和性富化およびファージ複製に付す。親和性富化およびファージ複製を数回繰り返した後、このようにして選択されたバクテリオファージライブラリーメンバーを単離し、展示ペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を決定することによって、予め決めた高分子（例えば、受容体）に結合するペプチドの配列を同定する。このような方法は、PCT特許公報W091/17271、W091/18980、W091/19818およびW093/08278号にさらに詳しく記載されている。

後者のPCT公報には、ペプチドリガンド展示のための組換えDNA方法が記載されており、この方法は、融合タンパク質のライブラリー生成から成る。該融合タンパク質は各々、予め決めた高分子への結合に利用可能な、様々な配列を含む第1ポリペプチド部分と、個々の融合タンパク質をコードするDNAベクター等のDNAに結合する第2ポリペプチド部分とから構成されている。融合タンパク質の発現を可能にする条件下で、形質変換された宿主細胞を培養すると、融合タンパク質は、それをコードするDNAベクターに結合する。この宿主細胞を溶解すると、ファージに基づく展示系でバクテリオファージ粒子を選別するのとはほぼ同じように、予め決めた高分子に対して、融合タンパク質／ベクターDNA複合体を選別することができる。このようにして、選択された融合タンパク質／ベクターDNA複合体におけるDNAベクターの複製および配列決定が、選択したライブラリーペプチド配列の同定のための基準として役立つ。

ペプチドのライブラリー、ならびに同様のポリマーを生成するその他の系は、組換え体およびin vitro化学合成方法の両方の特徴を有する。これらハイブリッド方法では、無細胞酵素機構を用いて、ライブラリーメンバー（すなわち、ペプチドまたはポリヌクレオチド）のin vitro合成を達成する。ある方法では、選択およびPCR増幅サイクルを交互に実施することにより、予定したタンパク質または予め決めた色素分子を結合する能力を有するRNA分子を選択した（TuerkおよびGold、1990；EllingtonおよびSzostak、1990）。同様の方法を用いて、予め決めたヒト転写因子を結合するDNA配列を同定した（ThiesenおよびBach、1990；BeaudryおよびJoyce、1992；PCT特許公報W092/05258およびW092/14843号）。同様に、in vitro翻訳技術を用いて、目的タンパク質が合成されており、この技術は、ペプチドの大きなライブラリーを形成する方法として提案されてい

る。一般に、安定化したポリソーム複合体を含む、in vitro翻訳に基づいたこれらの方法は、PCT特許公報W088/08453、W090/05785、W090/07003、W091/02076、W091/05058、ならびにW092/02536号にさらに詳しく記載されている。出願人は、ライブラリーメンバーが、DNA結合活性を備えた第1ポリペプチド部分を有する融合タンパク質と、ライブラリーメンバー独特のペプチド配列を有する第2ポリペプチド部分とを含む方法を記載している。このような方法は、中でも、無細胞in vitro選択フォーマットでの使用に適している。

展示したペプチド配列は様々な長さでよく、典型的に、3～5,000アミノ酸長、またはそれ以上の長さで、多くの場合、5～100アミノ酸長、さらには8～15アミノ酸長である。ライブラリーは、様々な長さの展示ペプチド配列を有するライブラリーメンバーから構成されることができ、あるいは、一定長さの展示ペプチド配列を有するライブラリーメンバーからなるものでもよい。展示されたペプチド配列の一部または全部は、ランダム、擬似ランダム、規定セット核 (kernel)、一定のもの等のいずれでもよい。この展示方法は、ポリソーム上の初期scFv、または、ファージ上に展示されるscfv等の一本鎖抗体のin vitroおよびin vivo展示方法を含むが、これらの展示方法は、非常に多様な可変領域配列および結合特異性を有するscfvライブラリーの大規模なスクリーニングを可能にする。

本発明は、また、ランダム、擬似ランダム、ならびに規定配列フレームワークペプチドライブラリーを提供すると共に、これらのライブラリーを生成およびスクリーニングして、ペプチドまたはRNAを所望のように修飾する受容体分子または目標エピトープ、または遺伝子産物に結合する有用な化合物（例えば、一本鎖抗体を含むペプチド）を同定する方法を提供する。ランダム、擬似ランダム、ならびに規定配列フレームワークペプチドは、ペプチドライブラリーメンバーのライブラリーから生成する。該メンバーは、展示ペプチドが合成されたポリヌクレオチド鋳型に結合した展示ペプチドまたは展示一本鎖抗体を含む。結合方法は、選択した本発明の具体的態様に応じて変えてよく、ファージ粒子中の包膜や、細胞への組込み等が挙げられる。

【0198】

親和性富化方法により、ペプチドおよび一本鎖抗体の非常に大きいライブラリ

ーをスクリーニングすることができ、所望のペプチドまたは一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチド配列を選択することができる。次に、ポリヌクレオチドを単離、シャッフルして、選択したペプチド（または予め定めたその一部）もしくは一本鎖抗体（または、そのVH I、VL IまたはCDR部分のみ）のアミノ酸配列を複合的に組み換える。これらの方法を用いて、一分子について所望の結合親和性を有するものとして、ペプチドまたは一本鎖抗体を同定することができ、シャッフリング方法を利用して、急速に、所望の高親和性ペプチドまたはscfvに収斂することが可能である。次に、ペプチドまたは抗体を合成して、適した用途（例えば、薬剤または診察用薬剤）のための従来の手段により大量合成することができる。

本発明の重要な利点は、目的のペプチドリガンドまたは抗体を単離するのに、予想されるリガンド構造に関する予備情報を必要としないことである。同定したペプチドは、生物学的活性を有する、すなわち、選択した受容体分子について少なくとも特異的な結合親和性を含むが、さらには、他の化合物の結合を阻止する能力、代謝経路を刺激または阻害する能力、信号またはメッセンジャーとして働く能力、細胞活性を刺激または阻止する能力等を含むことになる。

本発明はまた、予め決めた受容体（例えば、ペプチド性ホルモン受容体、細胞表面受容体、他のタンパク質と結合して、ヘテロ二量体等の細胞間タンパク質複合体を形成する細胞間タンパク質のような哺乳動物のタンパク質性受容体）またはエピトープ（例えば、固定化タンパク質、糖タンパク質、オリゴ糖等）に結合するライブラリーメンバーについて、初期ペプチド（一本鎖の抗体）を展示するポリソームのライブラリーをアフィニティースクリーニングすることにより、選択されたポリヌクレオチド配列のプールをシャッフルする方法を提供する。

これら方法のいずれかによって、第1選択ラウンド（典型的には、受容体（例えば、リガンド）への結合についてのアフィニティ選択により）で選択されたポリヌクレオチド配列をプールし、該プールをin vitroおよび／またはin vivo組換えによりシャッフルして、組換えた選択ポリヌクレオチド配列の集団を含むシャッフリングプールを生成する。組換えた選択ポリヌクレオチド配列を、少なくとも1回次の選択ラウンドにかける。後の選択ラウンドで選択したポリヌクレオ

チド配列を直接使用して、配列決定し、および／または1回以上のシャッフリングおよび次の選択ラウンドに付す。選択した配列は、中立配列（すなわち、結合に不要な機能作用を及ぼす）をコードするポリヌクレオチド配列で、戻し交雑することもできる。この戻し交雑は、例えば、選択配列とほぼ同じ野生型または自然発生配列を用いた戻し交雑により実施して、免疫原性の低い、天然様の機能ペプチドを生成することができる。一般に、戻し交雑の間に、次の選択ラウンドを実施して、予め定めた受容体（リガンド）への結合特性を保持する。

選択した配列のシャッフリングの前、または、これと同時に、配列に突然変異を誘発することができる。ある態様では、選択されたライブラリーメンバーを原核ベクター（例えば、プラスミド、ファージミド、またはバクテリオファージ）でクローン化する。この態様では、個々別々のライブラリーメンバーを表す個別のコロニー（またはプラーク）集団が生成される。次に、個別の選択ライブラリーメンバーを操作して（例えば、部位指向性突然変異誘発、カセット突然変異誘発、化学的突然変異誘発、PCR突然変異誘発等）、選択したライブラリーメンバーの配列に基づく配列多様性の核を呈示するライブラリーメンバーの集団を生成することができる。個別の選択ライブラリーメンバーまたはプールの配列を操作して、部分的に、あるいは、個別選択ライブラリーメンバー配列の全長にわたって、ランダム突然変異、擬似ランダム突然変異、規定核突然変異（すなわち、可変および不変残基位置を含む、および／または、規定サブセットのアミノ酸残基から選択した残基を含有する可能性のある可変残基位置を含む）、コドンに基づく突然変異等を組み込むことができる。次に、突然変異を誘発した選択ライブラリーメンバーを、本文に記載したin vitroおよび／またはin vivo組換えシャッフリングによりシャッフルする。

本発明はまた、複数の本発明の個別ライブラリーメンバーを含むペプチドライブラリーであって、(1) 該複数の個別ライブラリーメンバーの各々が、選択された配列のプールをシャッフリングして生成された配列を含み、(2) 各個別ライブラリーメンバーが、上記複数のメンバーにおける他の個別ライブラリーメンバーの可変ペプチドセグメント配列または一本鎖抗体配列とは異なる可変ペプチドセグメント配列または一本鎖抗体セグメント配列を含む（しかし、ライブラリ

一メンバーの中には、不均質な増幅、確率論的確率等により、1ライブラリー当たり1つ以上存在するものもある）ことを特徴とするペプチドライブラリーを提供する。

【0199】

さらに、本発明は、工程毎の産物であって、予め決めた結合特異性が次の方法により形成されることを特徴とする産物を提供する：(1) 予め決めた受容体（例えば、リガンド）またはエピトープ（例えば、抗原高分子）に対して、展示されるペプチドもしくは展示される一本鎖抗体ライブラリーをスクリーニングし、予め決めた受容体またはエピトープに結合するライブラリーメンバーを同定および／または富化して、選択ライブラリーメンバーのプールを生成し、(2) 予め決めたエピトープに結合し、これによって、ライブラリーから単離および／または富化されている該選択ライブラリーメンバー（もしくは、増幅またはクローン化したそのコピー）を、組換えによりシャッフリングして、シャッフルライブラリーを生成し、(3) 予め定めた受容体（例えば、リガンド）またはエピトープ（例えば、抗原高分子）に対して、該シャッフルライブラリーをスクリーニングし、予め定めた受容体またはエピトープに結合するシャッフルライブラリーメンバーを同定および／または富化して、選択されたシャッフルライブラリーメンバーのプールを生成する。

抗体展示およびスクリーニング法

本発明を用いて、記載した方法のいずれか、ならびに、いずれかの組合せによるin vitroおよび／またはin vitro組換えによって、抗体展示方法により選択されるポリヌクレオチド配列をシャッフルすることができ、ここで、会合ポリヌクレオチドは、予め決めた抗体（リガンド）を結合する表現型（例えば親和性）についてスクリーニングした展示抗体をコードする。

免疫グロブリン鎖に存在し得る膨大な数の個別可変領域によって示される広大な免疫レパートリーを獲得するために、様々な分子遺伝子的手法が考案されてきた。自然に発生する生殖系列免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、縦列の多様性セグメント遺伝子上流に位置する個別縦列の可変セグメント遺伝子から構成される。尚、上記多様性セグメント遺伝子自体は、縦列の連関(i)領域遺伝子上流に

位置し、この連関領域遺伝子は、定常領域遺伝子の upstream に位置する。Bリンパ球発生の間、V-D-J転位が起こるが、このとき、融合Dセグメントを形成する転位、続いて、V-D-J結合産物遺伝子を形成するVセグメントでの転位により、重鎖可変領域遺伝子（VH）が形成される。尚、上記V-D-J結合産物遺伝子は、生産的に転位されれば、重鎖の機能的可変領域（VH）をコードする。同様に、軽鎖遺伝子座は、複数のVセグメントの一つを、複数のJセグメントの一つで再構成して、軽鎖の可変領域（VL）をコードする遺伝子を形成する。

免疫グロブリンに生じ得る可変領域の広大なレパートリーは、B細胞発生における再構成中の、連関Vおよびiセグメント（ならびに、重鎖遺伝子座の場合には、Dセグメント）の多数の組合せの可能性の一部が由来する。これ以外に、重鎖可変領域の配列の多様性は、V-D-J結合中のDセグメントの非均質な再構成、ならびに、N領域の付加に由来するものである。さらに、特異的B細胞クローンの抗体選択は、重鎖および軽鎖可変領域の一方または両方に、非生殖系列突然変異を有する、親和性がより高い変異型を選択する（「親和性成熟」または「親和性シャープニング」と呼ばれる現象）。典型的に、これら「親和性シャープニング」突然変異は、可変領域の特異的領域、最も一般的には、相補性決定領域（CDR）にクラスター形成する。

抗原刺激β細胞発生（すなわち、免疫）を介した高親和性免疫グロブリンの生成および同定における多数の制限事項を解決するために、様々な原核発現系が開発されてきたが、これらを操作して、特異的抗原に対する高親和性抗体を選別するためにスクリーニングされる組合せ抗体ライブラリーを生成することができる。大腸菌およびバクテリオファージ系での抗体の発現における近年の進歩（後述する「代替的ペプチド展示方法」を参照）により、特性決定したハイブリドーマから抗体遺伝子をクローニングすることによって、あるいは抗体遺伝子ライブラリー（例えばIg cDNA由来の）を用いたde novo選択のいずれかによって、ほぼすべての特異性が得られる可能性が出てきた。

抗体の組合せライブラリーは、バクテリオファージプラークまたは溶原菌のコロニーとしてスクリーニングできるバクテリオファージ発現系で生成されてきた（Huseら、1989；CantonおよびKoprowski、1990；Mullinaxら、1990；Persson

ら、1991)。バクテリオファージ抗体展示ライブラリーおよび入ファージ発現ライブラリーの様々な態様が記載されている (Kangら、1991; Clacksonら、1991; McCaffertyら、1990; Burtonら、1991; Hoogenboomら、1991; Changら、1991; Breittlingら、1991; Marksら、1991、p.581; Barbasら、1992; HawkinsおよびWinter、1992; Marksら、1992、p.779; Marksら、1992、p.16007; ならびに、Lowmanら、1991; Lernerら、1992; これらは、すべて、参照として本文に組み込む)。典型的には、バクテリオファージ抗体展示ライブラリーは、固定化した (例えば、クロマトグラフィー樹脂に共有結合して、アフィニティクロマトグラフィーによって反応性ファージを富化することにより)、および/または標識した (例えば、プラークまたはコロニーリフト (lifts) を選別するために) 受容体 (例えば、ポリペプチド、炭水化物、糖タンパク質、核酸) を用いてスクリーニングする。

【0200】

特に有利な手法は、いわゆる一本鎖フラグメント可変 (scfv) ライブラリーの使用である (Marksら、1992、p.779; WinterおよびMilstein、1991; Clacksonら、1991; Marksら、1991、p.581; Chaudharyら; Chiswellら、1992; McCaffertyら、1990; ならびに、Hustonら、1988)。バクテリオファージコートタンパク質に展示される scfv ライブラリーの様々な態様が記載されている。

1988年から、Fvフラグメントおよびそれらの融合タンパク質の一本鎖類似体が、抗体工学法により高い信頼度で生成されている。第1ステップは、一般に、所望の結合特性を有するVHおよびVLをコードする遺伝子を得ることから成る。これらのV遺伝子は、組合せV遺伝子ライブラリーから選択された、あるいは、V遺伝子合成により作製された特異的ハイブリドーマ細胞系から単離することができる。一本鎖Fvは、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)3または同等のリンカーペプチド等の、適切に設計されたリンカーペプチドをコードするオリゴヌクレオチドと、成分V遺伝子とを結合することにより形成される。リンカーは、第1のV領域のC末端と、第2領域のN末端とを、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VH'のいずれかの順に架橋する。原則として、scfv結合部位は、その親抗体結合部位の親和性および特異性の両方を忠実に複製することができる。

従って、scfvフラグメントは、柔軟なリンカーペプチドによりポリペプチド一本鎖に結合したVHおよびVLドメインから構成される。scfv遺伝子を構成した後、これらをファージミドにクローン化し、バクテリオファージPIII（遺伝子3）コートタンパク質を含む融合タンパク質として、M13ファージ（または類似した繊維状バクテリオファージ）の先端に発現させる。関心のある抗体を発現するファージの富化は、予め決めたエピトープ（例えば、標的抗原、受容体）への結合のための集団scfvを展示する組換え体ファージを選別することにより達成される。

ライブラリーメンバーの結合ポリペプチドは、スクリーニングまたは選択手順の後に、ライブラリーメンバーの複製の基礎をもたらすと共に、展示されたペプチド配列またはVHおよびVLアミノ酸配列の同一性決定のための基礎を提供する。展示されたペプチド配列、または一本鎖抗体（例えばscfv）および／またはそのVHおよびVHドメイン、あるいはそれらのCDRをクローン化し、適した発現系で発現することができる。一般に、単離したVHおよびVLドメインをコードするポリヌクレオチドは、定常領域（CHおよびCL）をコードするポリヌクレオチドに連結することにより、完全抗体（例えば、キメラ、もしくは、完全にヒトの）、抗体フラグメント等をコードするポリヌクレオチドを作製する。また、一般に、単離したCDRをコードするポリヌクレオチドは、適した可変領域フレームワーク（および任意で、定常領域）をコードするポリヌクレオチドに移植することにより、完全抗体（例えば、ヒト化した、もしくは、完全にヒトの）、抗体フレームワーク等をコードするポリヌクレオチドを作製する。抗体を用いて、免疫アフィニティクロマトグラフィーにより、抗原の調製量を分離することができる。上記以外のこれらの抗体の各種用途として、疾病（例えば、腫瘍新生）の診察および／または病期分類、疾病（例えば、腫瘍新生、自己免疫疾患、AIDS、心臓血管疾患、感染等）の治療のための使用がある。

結合する種のレパートリー（イディオタイプスペクトル）を拡大するために、scfvライブラリーの組合せ多様性を増加する様々な方法が報告されている。PCRを使用することにより、可変領域が、特異的ハイブリドーマ源から、または非免疫細胞からの遺伝子ライブラリーとして、急速にクローン化することができ、

結合させることのできるVHおよびVLカセットの配列の組合せ多様性をもたらす。さらに、VHおよびVLカセットは、ランダム、擬似ランダム、または指向性突然変異誘発等により、それ自体で、多様化することができる。典型的には、VHおよびVLカセットは、相補性決定領域(CDR)内または近傍で多様化するが、第3CDR、すなわち、CDR3で多様化することが多い。酵素によるインバースPCR突然変異誘発は、誤りがちなPCRや化学的突然変異誘発(Dengら、1994)と同様に、scfv部位指向性ハイブリッドの比較的大きなライブラリーを形成するための、単純かつ信頼度の高い方法であることが明らかにされている(Stemmerら、1993)。Riechmann(Riechmannら、1993)は、縮合オリゴヌクレオチドPCR、次に、得られたscfvハイブリッドのファージ展示による部位指向性ランダム化を用いた、抗体scfvフラグメントの半合理的設計を明らかにした。Barbas(Barbasら、1992)は、ヒト破傷風トキソイド結合Fabの合成CDR領域内の配列をランダム化することにより、偏った可変領域配列の使用に起因するレパートリーサイズの制限に関する問題を解決しようとした。

CDRランダム化によって、重鎖CDR3だけについて約 1×10^{20} 個のCDR、ほぼ同じ数の重鎖CDR1およびCDR2の変異型、ならびに軽鎖CDR1-3変異体が産生する可能性がある。個別または一緒に用いた、重鎖および／または軽鎖のCDRランダム化の組合せの可能性は、非常に多数のバクテリオファージクローンを生成して、あらゆる可能な組合せを呈示するクローンライブラリーを作製することを必要とする。これらの大部分は、非結合性である。このように膨大な数の主要形質転換細胞を生成することは、現在の形質転換技術およびバクテリオファージ展示系では実現不可能である。例えば、Barbas(Barbasら、1992)は、 5×10^7 の形質転換細胞しか生成しなかったが、これは、完全にランダム化したCDRライブラリーの潜在的多様性のごく一部を呈示するに過ぎない。

【0201】

これらの重大な制限にも拘わらず、scfvのバクテリオファージ展示によって、様々な有用な抗体および抗体融合タンパク質がすでに得られている。二重特異性一本鎖抗体が、効率的な腫瘍細胞の溶菌を仲介することがわかっている(Gruberら、1994)。抗Rev scfvの細胞内発現は、in vitro HIV-1ウイルス複製を阻害し

(Duanら、1994)、抗p21rar、scfvの細胞内発現が、アフリカツメガエルの卵母細胞の減数分裂を阻害することが明らかにされている(Bioccaら、1993)。また、H I V感染を診断するのに使用することができる組換えscfvも報告されており、scfvの診断有用性を証明している(Lilleyら、1994)。毒素や繊維素溶解アクチベータータンパク質等、第2ポリヌクレオチドにscFvを結合する融合タンパク質も報告されている(Holvostら、1992; Nichollsら、1993)。

広範な抗体多様性を有し、そして見込まれる配列組合せのごく一部しか扱えない従来のC D R突然変異誘発およびランダム化方法の制限事項の多くを解決するscFvを生成することができれば、治療および診断に使用するのに適したscfvの数および品質を大幅に改善できるであろう。この課題に取り組むため、本発明のin vitroおよびin vivoシャッフリング方法を用いて、選択した展示抗体由来の核酸から取得した(典型的には、P C R増幅またはクローニングを通して)C D Rを組み換える。このような展示抗体は、細胞、バクテリオファージ粒子、ポリソーム、あるいは、抗体が、そのコード核酸を伴うあらゆる適切な抗体展示系に展示することができる。ある態様では、C D Rは、初め、抗体産生細胞(例えば、免疫された野性型マウス、ヒト、あるいは、W092/03918、W093/12227およびW094/25585号に記載されているように、ヒト抗体を産生可能なトランスジェニックマウス由来のプラズマ細胞/脾細胞)(これらに由来するハイブリドーマを含む)からのmRNA(またはc DNA)から取得する。

上記方法のいずれかにより、第1選択ラウンドで選択したポリヌクレオチド配列(典型的には、抗原(例えば、リガンド)に結合する展示抗体の親和性選択による)をプールし、このプールを、in vitroおよび/またはin vivo組換え、特に、C D Rのシャッフリング(典型的には、重鎖C D Rを他の重鎖C D Rで、軽鎖C D Rを他の軽鎖C D Rでシャッフリングする)によりシャッフルして、組換え選択ポリヌクレオチド配列の集団から成るシャッフル済プールを生成する。組換え選択ポリヌクレオチド配列は、展示抗体として、選択フォーマットに発現させ、次に、少なくとも1回の選択ラウンドに付す。後の選択ラウンドで選択したポリヌクレオチド配列を直接使用し、配列決定し、および/または、所望の結合親和性が得られるまで、1回以上のシャッフリングおよび選択の追加ラウンドに

付す。選択した配列は、例えば、ヒト可変領域フレームワークを用いた戻り交雑により、中立抗体フレームワーク配列（すなわち、抗原結合に不要な機能的作用を及ぼすもの）をコードするポリヌクレオチド配列で戻り交雑して、ヒト様配列抗体を産生することも可能である。一般に、戻り交雑の間、次の選択を実施して、予め決めた抗原に対する結合特性を保持する。

これに代わり、あるいは、上記態様と組み合わせて、標的エピトープの抗体価を変えて、選択したscfvライブラリーメンバーの平均結合親和性を制御することも可能である。標的エピトープを、競合エピトープの含有、希釈、またはその他の当業者には公知の方法等によって、密度を変えながら、表面または基質に結合することができる。低密度（抗体価）は、親和性が高い方のscfvライブラリーメンバーを優先的に富化するのに対し、高密度（抗体価）の予め決定したエピトープを用いて、親和性が比較的低いscfvライブラリーメンバーを富化することができる。

多様な可変セグメントを生成するために、ランダム、擬似ランダム、またはペプチド配列の規定配列核セットをコードする合成オリゴヌクレオチドの集団を連結反応により、予め決めた部位（例えば、CDR）に挿入することができる。同様に、部位指向性突然変異誘発やCDR置換等で、CDRを突然変異させることにより、一本鎖抗体カセットの一つ以上のCDRの配列多様性を拡大することも可能である。シャッフリング前のクローニングおよび増幅のために、得られたDNA分子を宿主中で増殖させる、あるいは、直接使用する（すなわち、宿主細胞中の増殖時に起こり得る多様性の損失を回避する）ことができ、次に、選択したライブラリーメンバーをシャッフルする。

関心のある可変セグメントペプチド配列、または関心のある一本鎖抗体をコードする展示ペプチド／ポリヌクレオチド複合体（ライブラリーメンバー）を、親和性富化方法により、ライブラリーから選択する。これは、受容体やその他の高分子、あるいは、その他のエピトープ種等、関心のあるペプチド配列について特異的な固定化高分子またはエピトープを用いて、達成する。親和性選択手順を繰り返すことにより、所望の配列をコードするライブラリーメンバーの富化が達成され、これらメンバーを単離して、プールおよびシャッフリング、配列決定、お

よび／または、更なる増幅ならびに親和性富化が可能である。

所望の特異性を持たないライブラリーメンバーは、洗浄により除去する。必要な洗浄の度合いおよびストリンジェンシーは、各ペプチド配列または関心のある一本鎖抗体、ならびに、固定化され予め決定した高分子またはエピトープに応じて、決定する。結合インキュベーションの条件および後の洗浄を調節することにより、回収した発生ペプチド／DNA複合体の結合特性に対し、ある程度の制御を及ぼすことができる。温度、pH、イオン強度、二価カチオン濃度、ならびに、洗浄の量および時間は、固定された高分子の親和性の特定範囲内で、発生ペプチド／DNA複合体について選択する。遅い解離速度に基づく選択は、通常、高い親和性を予測させるが、最も実用的な方法であることが多い。これは、飽和量の予め決めた遊離高分子の存在下での連続的インキュベーション、あるいは、洗浄の量、回数、および時間の増加のいずれかにより、実施できる。いずれの場合にも、解離した初期ペプチド／DNAまたはペプチド／RNA複合体の結合が阻害され、時間を引き延ばすほど、親和性の高い発生ペプチド／DNAまたはペプチド／RNA複合体が回収される。

結合および洗浄手順をさらに変更して、特殊な特徴を有するペプチドを取得することもできる。親和性が、イオン強度もしくは陽イオン濃度に左右されるペプチドもある。これは、ペプチドからタンパク質を除去するのに、穏やかな条件が求められるとき、各種タンパク質の親和性精製に用いられるペプチドについて、有用な特徴である。

【0202】

ある態様では、複数の結合標的（複数のエピトープ種、複数の受容体種）を使用することにより、様々な結合特異性を有する多数のscfvについて、scfvライブラリーを同時にスクリーニングすることができる。scfvライブラリーのサイズが、見込まれるscfv配列の多様性を制限することから、典型的には、サイズが可能な限り大きなscfvライブラリーを用いるのが望ましい。所定数の非常に大きなポリソームscfv表示ライブラリーを生成する上での時間および経済的要件は、膨大なものになる。この重大な問題を避けるために、複数の予め決めたエピトープ種（受容体種）を単一ライブラリーで、同時にスクリーニングする、あるいは、所

定数のエピトープ種に対する逐次的スクリーニングを実施することができる。ある態様では、それぞれ個別のビーズ（もしくはビーズのサブセット）にコードされた多数の標的エピトープ種を混合し、適切な結合条件下でポリソーム表示scfvライブラリーとインキュベートすることができる。複数のエピトープ種を含むビーズの集団を用いて、親和性選択によりscfvライブラリーメンバーを単離することができる。一般に、後の親和性スクリーニングラウンドは、ビーズの同じ混合物、そのサブセット、あるいは、一つまたは二つの個別エピトープ種を含むビーズを含み得る。この手法は、効率的スクリーニングを可能にし、研究室の自動化、バッチ処理、ならびにハイスループットスクリーニング法と両立するものである。

本発明においては、様々な方法を用いて、ペプチドライブラリーまたは一本鎖抗体ライブラリーを多様化する、あるいは、シャッフリング前またはこれと同時に、初期選別ラウンドで得られるほぼ可変のセグメントペプチドを多様化して、予め決めた高分子またはエピトープに対する十分な結合活性を得ることができる。ある手法では、ポジティブな選択ペプチド／ポリヌクレオチド複合体（親和性強化の初期ラウンドで同定されたもの）を配列決定して、活性ペプチドのアイデンティティを決定する。次に、一次オリゴヌクレオチド配列の軽度の変異を生成するための各ステップで組み込まれた低レベルの全塩基を用いて、これらの活性ペプチド配列に基づき、オリゴヌクレオチドを合成する。適した位置でのこの（軽度）縮合オリゴヌクレオチドの混合物を可変セグメント配列中にクローニングする。この方法は、出発ペプチド配列の、体系的な、制御された変異を生成し、次にこれをシャッフリングすることができる。しかし、これには、個別のポジティブな初期ペプチド／ポリヌクレオチド複合体を突然変異誘発前に配列決定する必要があり、従って、回収した少数の複合体の多様性を拡大し、親和性および／または結合特異性がより高い変異体を選択するのに有用である。ある態様では、ポジティブな選択ペプチド／ポリヌクレオチド複合体（特に、可変領域配列の複合体であり、その増幅産物は、スクリーニングの1以上の追加ラウンドで、in vitroおよび／またはin vivoでシャッフリングする）の突然変異誘発PCR増幅は、配列決定の前に実施する。同じ一般的手法を一本鎖抗体と共に用いて、典型

的には、シャッフリングの前またはこれと同時に、CDRまたは隣接するフレームワーク領域を多様化することにより、多様性を拡大し、結合親和性／特異性を増大することができる。所望であれば、シャッフリング反応を、選択ライブラリーメンバーによるin vitro組換えが可能な突然変異原性オリゴヌクレオチドで強化してもよい。従って、合成オリゴヌクレオチドおよびPCR生成ポリヌクレオチド（エラー-プローン法、もしくは忠実度の高い方法で合成した）をin vitro シャッフリングミックスに添加し、得られるシャッフリング済ライブラリーメンバー（シャフラント）に組み込むことができる。

本発明のシャッフリングは、CDR突然変異体一本鎖抗体の膨大なライブラリーの生成を可能にする。このような抗体を生成する一つの方法は、シャッフリングの前、もしくは、これと同時に、合成CDRを、一本鎖抗体および／またはCDRランダム化に挿入することである。合成CDRカセットの配列は、ヒトCDRの既知の配列データを参照して、選択すると共に、次の指針に従い、実験者の判断で選択する：合成CDRは、既知のCDR配列に対して、少なくとも40%位置配列同一性を有し、好ましくは、既知のCDR配列に対して、少なくとも50～70%位置配列同一性を有する。例えば、Kabat（Katatら、1991）に列挙された自然発生のヒトCDR配列に基づいて、オリゴヌクレオチド配列の集団を合成することにより、合成CDR配列の集団を生成することができる。合成CDR配列のプールを計算し、少なくとも一つの既知自然発生ヒトCDR配列に対して、少なくとも40%の配列同一性を有するCDRペプチド配列をコードする。あるいは、自然発生CDR配列の集団を比較して、共通配列を生成することにより、残基位置でよく用いられるアミノ酸（既知CDR配列の少なくとも5%）を対応する位置で、合成CDRに組み込む。典型的には、複数（例えば、3～約50）の既知CDR配列を比較し、既知のCDR間に認められる天然配列の多様性について表を作成する。次いで、認められた天然配列多様性の全部もしくは、ほとんどの順列を包含するCDRペプチド配列をコードするオリゴヌクレオチドの集団を合成する。非制限的例として、ヒトVH CDR配列の集団が、Tyr、Val、Phe、またはAspのいずれかであるカルボキシ末端アミノ酸を有する場合には、カルボキシ末端CDR残基が、上記アミノ酸のいずれかとなるように、合成CDRオリゴヌクレオ

チド配列のプールを設計する。いくつかの態様では、CDR配列の集団において残基位置で自然に発生するもの以外の残基が組み込まれる。同類アミノ酸置換が組み込まれることが多く、5つまでの残基位置が、既知の自然発生CDR配列と比較して、非同類アミノ酸置換を組み込むように変化され得る。このようなCDR配列は、一次ライブラリーメンバーで使用する（第1選択ラウンド前に）および／または、選択したライブラリーメンバー配列のin vitroシャッフリング反応をスパイクするのに使用することができる。規定および／または縮重配列のこのようなプールの構築は、当業者であれば、容易に達成するであろう。

【0203】

合成CDR配列の集団は、自然発生のCDR配列であることが知られていない、少なくとも1つのメンバーを含んでいる。実験者の判断で、重鎖CDRへのN領域付加に対応するランダムまたは擬似ランダム配列の一部を含んでもよいし、また、含まなくてもよい。尚、N領域配列は、V-DおよびD-J結合部に発生する1ヌクレオチド～約4ヌクレオチドの範囲である。合成重鎖CDR配列の集団は、少なくとも約100ユニークCDR配列、典型的には、少なくとも約1,000ユニークCDR配列、好ましくは少なくとも約10,000ユニークCDR配列、多くの場合、50,000以上のユニークCDR配列を含むが、 1×10^6 を超えるユニークCDR配列は該集団に含まれない。しかし、場合によっては、特に、自然発生のヒトCDR中の位置において、同類アミノ酸置換が存在しない、あるいは稀である（すなわち、0.1%以下）位置で、同類アミノ酸置換可能な場合、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ ユニークCDR配列が存在する。一般には、ライブラリーに含まれるユニークCDRの数は、ライブラリー中の一次形質転換細胞の予測数を因数10以上超えてはならない。このような一本鎖抗体は、一般に、少なくとも、約 1×10^6 、好ましくは、少なくとも約 5×10^7 M⁻¹、さらに好ましくは、少なくとも 1×10^8 M⁻¹～ 1×10^9 M⁻¹、時には 1×10^{10} M⁻¹まで、またはそれ以上の親和性で結合する。多くの場合、予め決めた抗原は、例えば、ヒト細胞表面抗原（例えば、CD4、CD8、IL-2受容体、EGF受容体、PDGF受容体）、その他のヒト生物学的高分子（例えば、トロンボモジュリン、タンパク質C、炭水化物抗原、シアリルルイス抗原、Lセレクトリン）等のヒトタンパク質、あるいは、非ヒト疾病関連高分子

(例えば、細菌性LPS、ビリオンカプシドタンパク質またはエンベロープ糖タンパク質) 等である。

所望の特異性を有する高親和性一本鎖抗体を操作し、様々な系で発現させることができる。例えば、scfvは、植物中で生成されており (Firekら、1993)、原核細胞の系でも容易に生成させることができる (QwensおよびYoung、1994; JohnsonおよびBird、1991)。さらに、一本鎖抗体を、全抗体もしくはその各種フラグメントを形成するための基礎として用いることもできる (Kettleboroughら、1994)。配列をコードする可変領域を単離し (例えば、PCR増幅またはサブクローニングにより)、免疫原性が好ましく最小限になるヒトの治療用途にさらに適したヒト配列抗体をコードするように、所望のヒト定常領域をコードする配列にスプライスする。得られた完全にヒトのコーディング配列を有するポリヌクレオチドを宿主細胞 (例えば、哺乳動物細胞の発現ベクター由来の) に発現させ、薬剤配合物調製のために精製することができる。

DNA発現構築物には、典型的に、自然付随または異種プロモーター領域を含むコーディング配列に操作可能に結合した発現制御DNA配列が含まれる。好ましくは、この発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換もしくはトランスフェクトすることが可能なベクターにおける真核プロモーター系である。ベクターを適切な宿主に組み込んだ後、ヌクレオチド配列の高レベル発現に適した条件に宿主を維持し、突然変異体「操作」抗体を回収および精製する。

既に述べたように、DNA配列は、該配列を発現制御配列に操作可能に結合した (すなわち、構造遺伝子の転写および翻訳を確実にするように配置させた) 後、宿主中で発現させる。これらの発現ベクターは、典型的に、エピソードまたは宿主染色体DNAの一部のいずれかとして、宿主生物で複製可能である。一般に、発現ベクターは、選択マーカー、例えば、テトラサイクリンまたはネオマイシンを含む、所望のDNA配列で形質転換した細胞の検出を可能にする (例えば、USPN第4,704,362号を参照。尚この文献は、参照として本文に組み込む)。

【0204】

酵母等の真核微生物の他に、哺乳動物の組織細胞培養を用いて、本発明のポリペプチドを生成することもできる (Winnacker、1987を参照。尚、この文献は参

照として本文に組み込む)。無傷の免疫グロブリンを分泌できる適切な宿主細胞系がいくつか開発されていることから、実際には、真核細胞が好ましい。この真核細胞には、CHO細胞系、各種COS細胞系、HeLa細胞、ならびに骨髓腫細胞系が含まれるが、形質転換したB細胞またはハイブリドーマが好ましい。これら細胞の発現ベクターとしては、複製起点、プロモーター、エンハンサー等の発現制御配列(Queenら、1986)、ならびに、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネーター配列等の必要処理情報部位が挙げられる。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス等に由来するプロモーターである。

真核DNA転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより、増加させることができる。エンハンサーは、プロモーターによる転写を増加する10～300bpのシス作用配列である。エンハンサーは、転写ユニットに対して51または31のいずれかのとき、転写を効果的に増加する。これらのエンハンサーはまた、イントロン内、あるいは、コーディング配列自体内に位置するときも、効果的である。典型的に、ウイルスエンハンサーを用いるが、これらには、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、ならびにアデノウイルスエンハンサーが含まれる。また、マウス免疫グロブリン重鎖エンハンサー等、哺乳動物系由来のエンハンサー配列もよく用いられている。

哺乳動物発現ベクター系はまた、典型的に、選択可能な標識遺伝子を含む。適した標識の例として、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(DHFR)、チミジンキナーゼ遺伝子(TK)、あるいは、薬物耐性を付与する原核細胞遺伝子が挙げられる。初めの二つの標識遺伝子は、増殖培地にチミジンを添加せずには増殖する能力がない変異体細胞系を使用するのが好ましい。次に、非補充培地での増殖能力によって、形質転換した細胞を同定する。標識として有用な原核の薬物耐性遺伝子の例として、G418に耐性を賦与する遺伝子、ミコフェノール酸およびハイグロマイシンがある。

目的のDNAセグメントを含むベクターを、細胞宿主の種類に応じて、周知の方法により宿主細胞に移入させることができる。例えば、原核細胞には、一般に

、塩化カルシウムトランスフェクションを使用するが、他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理、リポフェクション、もしくは、電気穿孔を用いてもよい。哺乳動物細胞を形質転換するのに使用される他の方法には、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、電気穿孔、ならびに、マイクロインジェクション（概要は、Sambrookら、1982および1989を参照）等が挙げられる。

発現した後、本発明に従う突然変異を起こした個々の免疫グロブリン鎖、突然変異を起こした抗体フラグメント、ならびに、その他の免疫グロブリンポリペプチドを、硫酸アンモニウム沈殿、フラクションカラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等の標準的手順に従って精製することができる（概要は、Scopes、1982を参照）。所望により、部分的に、あるいは均一になるまで精製した後、ポリペプチドを、治療のために使用したり、もしくは、検定手順、免疫蛍光染色等を開発および実施するのに使用することができる（概要は、LefkovitsおよびPernis、1979および1981；Lefkovits、1997を参照）。

本発明の方法により生成した抗体は、診断および治療に使用できる。非制限的な例として、これら抗体を用いて、癌、自己免疫疾患、もしくはウイルス感染を処置することができる。癌の処置のためには、上記抗体は、典型的に、erbB-2、CEA、CD33、ならびに、当業者には周知のその他多数の抗原および結合メンバー等、癌細胞に優先的に発現した抗原に結合する。

【0205】

2-ハイブリッドに基づくスクリーニング検定

また、シャッフリングを用いて、2-ハイブリッドスクリーニング系をスクリーニングすることにより得られた選択ライブラリーメンバーのプールを組換えにより多様化して、予め決められたポリペプチド配列に結合するライブラリーメンバーを同定することができる。選択したライブラリーメンバーをプールし、in vitroおよび／またはin vivo組換えによりシャッフリングする。次に、シャッフリングしたプールを、酵母2-ハイブリッド系でスクリーニングして、上記の予め決定されたポリペプチド配列（例えば、SH2ドメイン）、もしくは、代替の予め決められたポリペプチド配列（例えば、別のタンパク質種由来のSH2ドメイン）に結合するライブラリーメンバーを選択することができる。

予め決められたポリペプチド配列に結合するポリペプチド配列を同定する手法は、予め決められたポリペプチド配列が融合タンパク質に存在するいわゆる「2-ハイブリッド」系を使用することであった（Chienら、1991）。この手法は、転写活性化因子（FieldsおよびSongら、1989）、すなわち酵母Gal4転写タンパク質の再構成を通して、*in vivo*でタンパク質-タンパク質相互作用を同定する。この方法は、典型的に、酵母Gal4タンパク質の性質に基づくものである。該タンパク質は、DNA結合および転写活性化を担う分離可能なドメインから成る。二つのハイブリッドタンパク質（一つは、既知のタンパク質のポリペプチド配列に融合した酵母Gal4DNA結合ドメインから成り、他方は、第2タンパク質のポリペプチド配列に融合したGal4活性化ドメインから成る）をコードするポリヌクレオチドを作製し、酵母宿主細胞に導入する。二つの融合タンパク質同士の分子間結合により、Gal4活性化ドメインを有するGal4結合ドメインが再構成され、これによって、Gal4DNA結合部位に操作可能に結合されたレポーター遺伝子（例えば、*lacZ*、*HIS3*）の転写活性化が起こる。典型的に、2-ハイブリッド法を用いて、既知のタンパク質と相互作用する新規のポリペプチド配列を同定する（SilverおよびHunt、1993；Durfeeら、1993；Yangら、1992；Lubanら、1993；Hardyら、1992；Bartelら、1993；ならびにVojtekら、1993）。しかし、第2の既知タンパク質に対する結合に影響する既知タンパク質の突然変異を同定するのに、2-ハイブリッド法の変形例が用いられている（LiおよびFields、1993；Laloら、1993；Jacksonら、1993；ならびにMaduraら、1993）。また、2-ハイブリッド系は、二つの公知のタンパク質の相互作用構造ドメインの同定（Bardwellら、1993；Chakrabartyら、1992；Staudingerら、1993；ならびにMilneおよびWeaver1993）；あるいは、単一タンパク質のオリゴマー化の原因であるドメインの同定（Iwabuchiら、1993；Bogerdら、1993）にも使用されている。タンパク質分解酵素の*in vivo*活性の研究に、2-ハイブリッド系の変形が使用されている（Dasmahapatraら、1992）。あるいは、大腸菌（*E.coli*）／BCCP相互作用スクリーニング系（Germinoら、1992；Guarente、1993）を用いて、相互作用タンパク質配列（すなわち、ヘテロ二量体化する、もしくは、さらに高次のヘテロ多量体を形成するタンパク質配列）を同定することもできる。2-ハイブリッド系により選択した

配列をプールし、シャッフリングした後、2-ハイブリッド系に導入して、1ラウンド以上の更なるスクリーニングに供し、予め決めた結合配列を含むハイブリッドに結合するポリペプチドハイブリッドを同定することも可能である。このようにして同定した配列を比較して、共通配列および共通配列の核(kernal)を同定する。

一般に、組換えDNA技術の標準的方法は、様々な文献に記載されている(例えば、Sambrookら、1989; Ausubelら、1987; ならびにBergerおよびKimmel、1987; いずれも参照として全文を本書に組み込む)。ポリヌクレオチドを修飾する酵素は、製造者の推奨事項に従って使用した。ABI化学薬品を用いて、Applied Biosystems Inc.の394型DNA合成装置で、オリゴヌクレオチドを合成した。所望であれば、予め決めたDNA配列を増幅するために、実験者の判断で、PCR増幅装置を選択してもよい。

1マイクログラムの鋳型DNAのサンプルを採取し、UV光線で処理することにより、TT二量体、特にプリン二量体等を作製する。UV暴露は、鋳型DNAサンプルの遺伝子毎に、わずかな光産物しか生成されないように、制限する。時間を変えながら、複数のサンプルをUV光線で処理し、UV暴露による可変数の二量体を有する鋳型DNAサンプルを作製する。

非校正ポリメラーゼ(例えば、Stratagene Cloning Systems製のPrime-ItIIランダムプライマーラベリングキット)を用いたランダムプライミングキットを使用して、UV光線で作製した(上記の通り)鋳型のランダム部位でプライミングし、鋳型に沿って伸長させることにより、様々なサイズのポリヌクレオチドを生成する。プライマーの伸長には、上記のようなPrime-ItIIランダムプライマーラベリングキット等のプライミングプロトコルを使用してよい。UV暴露により作製した二量体は、非校正ポリメラーゼによる伸長のためのロードブロックとして役立つ。従って、ランダムプライマーによる伸長が完了すると、ランダムなサイズのポリヌクレオチドのプールが存在する。

本発明はさらに、典型的には、増幅および/またはクローニングしたポリヌクレオチドの形態の、選択された突然変異体ポリヌクレオチド配列(もしくは、選択されたポリヌクレオチド配列の集団)を生成し、これにより、選択されたポリ

ヌクレオチド配列が、選択することができる少なくとも一つの所望の表現型特徴（例えば、ポリペプチドをコードする、結合したポリヌクレオチドの転写を促進する、タンパク質を結合する等）を有することを特徴とする方法に関する。予め決めた生物学的高分子（例えば、受容体）への結合等、所望の構造または機能的性質を有するハイブリッドポリペプチドを同定する一つの方法は、ポリペプチドのアミノ酸配列が賦与した所望の構造または機能的性質を有する個別のライブラリーメンバーについて、ポリペプチドの大きなライブラリーをスクリーニングすることを包含する。

【0206】

ある態様では、本発明は、親和性相互作用スクリーニングまたは表現型スクリーニングに適した展示ポリペプチドもしくは展示抗体のライブラリーを生成する方法を提供する。この方法は、(1) 展示ポリペプチドまたは展示抗体と、該展示ポリペプチドまたは展示抗体をコードする会合ポリヌクレオチドとを含む選択されたライブラリーメンバーの第1集団を作製し、上記会合ポリヌクレオチドが、ほぼ同じ配列の領域を含む上記会合ポリヌクレオチドまたはそのコピーを作製し、上記ポリヌクレオチドまたはコピーに突然変異を最適に導入し、(2) ポリヌクレオチドまたはコピーをプールし、(3) ランダムまたは特殊化プライミングおよび合成方法もしくは増幅方法を中断することにより、さらに小さいもしくは短いポリヌクレオチドを生成し、(4) 増幅、好ましくはPCR増幅、ならびに、任意で突然変異誘発を実施することにより、新たに合成したポリヌクレオチドを相同的に組換えることから成る。

本発明の特に好ましい目的は、下記を含む一連のステップにより有用なハイブリッドポリペプチドを発現するハイブリッドポリヌクレオチドを生成する方法を提供することである：

(a) 増幅または合成を停止または中断する手段を用いて、ポリヌクレオチド増幅もしくは合成工程を中断することにより、ポリヌクレオチドを生成し、これによって、ポリヌクレオチドの複製が様々な完了段階にあるために、小さいまたは短い複数のポリヌクレオチドを作製し；

(b) 得られた一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドの集団に、1つ以上の一

本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドを付加するが、このとき、該付加オリゴヌクレオチドは、上記集団の1つ以上の一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドに対する異種性領域に同一領域を含み；

(c) 得られた一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドを変性して、一本鎖ポリヌクレオチドの混合物を生成し、任意で、小さい、または短いポリヌクレオチドを、様々な長さを有するポリヌクレオチドのプール中に分離し、さらに任意で、該ポリヌクレオチドをPCR工程に付して、上記ポリヌクレオチドプールの少なくとも1つに含まれる1つ以上のオリゴヌクレオチドを増幅し；

(d) 複数の上記ポリヌクレオチド、または、上記ポリヌクレオチドの少なくとも1つのプールをポリメラーゼとインキュベートするが、その際の条件を、一本鎖ポリヌクレオチド間の同一領域で、上記一本鎖ポリヌクレオチドのアニーリングが起こり、これによって、突然変異を誘発した二本鎖ポリヌクレオチド鎖が形成されるようなものとし；

(e) 任意で、上記ステップ(c)および(d)を繰り返す；

(f) 上記ポリヌクレオチド鎖から少なくとも一つのハイブリッドポリペプチドを発現させ；

(g) 有用な活性について、少なくとも一つのハイブリッドポリペプチドをスクリーニングする。

本発明の好ましい態様では、増幅または合成工程を停止または中断する手段は、UV光線、DNA付加物、DNA結合タンパク質の使用によるものである。

本発明のある態様では、DNA付加物、もしくはDNA付加物を含むポリヌクレオチドは、更なる処理の前に、DNAフラグメントを含有する溶液を加熱する工程を包含する方法等により、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプールから除去する。

以上、本発明の例示的態様を開示してきたが、これらの態様は例示のために過ぎず、他の代替案、調整および変更を本発明の範囲内で実施できることに留意すべきである。従って、本発明は、本書に示した具体的態様に制限されない。

これ以上詳述することなく、これまでの説明に従い、当業者が、本発明をその完全な範囲まで利用できると思われる。以下に示す実施例は、例示として考える

べきであり、これら以外の開示を何ら制限するものではない。

【0207】

実施例1

UV誘発光化学生成物を用いたランダムサイズポリヌクレオチドの生成

1 マイクログラムの鋳型DNAサンプルを採取し、UV光で処理することにより、TT二量体、特にプリン二量体等の二量体を形成させる。UV暴露は、鋳型DNAサンプルの遺伝子毎に生成される光化学生成物がごく少数であるように、制限する。複数のサンプルを時間を変えながらUVで処理し、UV暴露から可変数の二量体を有する鋳型DNAサンプルを得る。

非校正ポリメラーゼ（例えば、Stratagene Cloning Systems製のPrime-ItIIランダムプライマーラベリングキット）を用いたランダムプライミングキットを使用して、UVで作製した（上記の通り）鋳型のランダム部位でプライミングし、鋳型に沿って伸長することにより、様々なサイズのポリヌクレオチドを生成する。プライマーの伸長には、上記のようなPrime-ItIIランダムプライマーラベリングキット等のプライミングプロトコルを使用してよい。UV暴露により作製した二量体は、非校正ポリメラーゼによる伸長のための障害物（roadblock）として働く。従って、ランダムプライマーによる伸長が終了すると、ランダムサイズのポリヌクレオチドのプールが存在する。

【0208】

実施例2

ランダムサイズポリヌクレオチドの単離

実施例1で作製した目的のポリヌクレオチドを、1.5%アガロースゲルでゲル単離する。100~300bpレンジのポリヌクレオチドをゲルから切り抜き、3容量の6M NaIをこのゲルスライスに添加する。混合物を10分間50℃でインキュベートし、10μlのガラスミルク（Bio 101）を添加する。混合物を1分間回転させ、上澄みを傾捨する。このペレットを500μlのカラムウォッシュ（カラムウォッシュは、50%エタノール、10mM Tris-HCl pH7.5、100mM NaClおよび2.5mM EDTA）で洗浄し、1分間回転させた後、上澄みを傾捨する。次に、洗浄、回転および傾捨を繰り返す。ガラスミルク（glass milk）ペレットを20μlのH₂

Oに再懸濁し、1分間回転させる。DNAを水相に維持する。

【0209】

実施例3

単離したランダムサイズ100～300bpポリヌクレオチドのシャッフリング

実施例2で作製した100～300bpポリヌクレオチドを、プライマーを添加せずに、アニーリング混合物（0.2mMの各dNTP、2.2mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH8.8、0.1% Triton X-100、0.3μl；TaqDNAポリメラーゼ、全量50μl）中で再結合させた。アニーリングステップは、Stratagene製のRobocyclerを用い、次の手順で実施した：30秒間95℃、25～50サイクルの〔30秒間95℃、30秒間50～60℃（好ましくは58℃）、および30秒間72℃〕、ならびに、5分間72℃。このようにして、100～300bpポリヌクレオチドが結合し、これまでより長い配列の二本鎖ポリヌクレオチドが得られた。再集合二本鎖ポリヌクレオチドを分離し、これらを変性して、一本鎖ポリヌクレオチドを形成した後、任意で、鋳型としての一本鎖とプライマーを用いたサンプル、ならびに、一本鎖に加えてランダムプライマーDNAを用い、別のサンプルで、サイクルを繰り返す。

【0210】

実施例4

シャッフリングしたポリヌクレオチドのスクリーニング

実施例3のポリヌクレオチドを分離し、そこからポリペプチドを発現させる。元の鋳型DNAを、そこから比較ポリペプチドを作製することにより、比較対照として用いる。実施例3のシャッフリング済ポリペプチドから得られたポリペプチドを、元の鋳型から得られたポリペプチドの活性についてスクリーニングし、対照の活性レベルと比較する。スクリーニング中に発見した目的のポリペプチドをコードするシャッフリング済ポリヌクレオチドを、望ましい二次性質について比較する。目的のものとは異なるスクリーニングされたポリペプチドに対応するシャッフリングされたポリヌクレオチドを再シャッフリングに付す。

【0211】

実施例5

飽和突然変異誘発による酵素の定方向進化

部位飽和突然変異誘発：部位飽和突然変異を達成するために、下記のように、32倍縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いた部位定方向突然変異により、デハロゲナーゼ酵素の各残基（316）を全20個のアミノ酸に変換した。

1. デハロゲナーゼ発現構築物の培養物を培養し、プラスミドの調製を行った。
2. 各コドンランダム化させるためのプライマーを作製した。これらは、共通の構造： $X_{20}NN(G/T)X_{20}$ を有する。
3. 約50ngのプラスミド鋳型、125ngの各プライマー、1XネイティブPfuバッファー、200 μ Mの各dNTP、ならびに2.5UネイティブPfuDNAポリメラーゼを含む25 μ lの反応混合物を調製した。
4. Robo96 Gradient Cyclerで、以下のようなサイクル反応を行った：
1 分間95°Cで初期変性、
45秒間95°C、1 分間53°C、11分間72°Cのサイクルを20回
10分間、72°Cで最終伸長ステップ。
5. 10UのDpnIを用いて、37°Cで1時間反応混合物を消化させて、メチル化鋳型DNAを消化した。
6. 2 μ lの反応混合物を用いて、50 μ lのXL1-BlueMRF'細胞を形質転換し、全形質転換ミックスを大型のLB-Amp-Metプレート上に平板培養し、200~1000のコロニーを取得した。
7. LB-Amp-IPTGを含有する96ウェルマイクロプレートのウェルに、個々のコロニーをツマヨウジで移し、一晚増殖させた。
8. これらプレート上のクローンを翌日検定した。

スクリーニング：下記のように、各位置について突然変異体の約200クローンを液体培地（384ウェルマイクロプレート）で増殖し、スクリーニングした。

1. 384ウェルプレートに一晩放置した培養物を遠心分離にかけ、培地を除去した。各ウェルに、0.06mL 1mM Tris/ SO_4^{2-} pH7.8を添加した。
2. 0.02mL細胞懸濁液から成る各親培養プレートから2つの検定プレートを作製した。
3. 所定時間（初め30分間）、一方の検定プレートを室温に、他方は、上昇させた温度（初期スクリーニングでは55°C）に置いた。

4. 規定時間後、0.08mL室温基質（1.5mM NaN_3 および0.1mMプロモチモールブルーを含むTCP飽和1mM Tris/ SO_4^{2-} pH7.8）を各ウェルに添加した。
5. 各時点で、620nmでの測定を実施し、各ウェルについてプログレス曲線を作成した。
6. データを分析し、非加熱のものと、加熱細胞の速度論を比較した。各プレートには、1～2カラム（24ウェル）の突然変異していない20F12対照を含有させた。
7. 安定性が向上したと思われるウェルを再培養した後、同じ条件下で試験した。

この手順によれば、9つの単一部位突然変異が、酵素に対して増大した熱安定性を賦与していることがわかった。配列分析を実施して、具体的に改良の原因となった各位置での厳密なアミノ酸変化を測定した。すなわち、改良は、7つの部位では一つのアミノ酸変化だけにより、8番部位では2つのアミノ酸変化の各々により、9番部位では3つのアミノ酸変化の各々により賦与されていた。次に、各々が、これら9つの有利な部位突然変異のうちの複数を併せ持つ突然変異体をいくつか作製した。そのうちの二つの突然変異体が、単一点突然変異を含む他の突然変異体すべてと比較して優れていることがわかった。

実施例6

末端選択を用いた直接発現

5'ホスホリル化プライマーを用いて、標準PCR反応で、エステラーゼ遺伝子を増幅した（10ng鋳型；PCR条件：3分間94℃；[1分間94℃；1分間50℃；1分間30秒68℃] x 30；10分間68℃）。

順方向プライマー=9511TopF

(CTAGAAGGGAGGAGAATTACATGAAGCGGCTTTTAGCCC)

逆方向プライマー=9511TopR (AGCTAAGGGTCAAGGCCGCACCCGAGG)

得られたPCR産物（約1000bp）を、ゲル精製および定量化した。

発現クローニングのためのベクター、pASK3 (Institut fuer Bioanalytik, Goettingen、ドイツ) をXba IおよびBgl IIで切断し、CIPで脱リン酸した。

0.5pモルのVaccina Topoisomerase I (Invitrogen、カリフォルニア州カール

スバード) を、全量5 μ lのバッファーNEBI (NewEngland Biolabs、マサチューセッツ州ベバーリー) 中で、5分間37°C、60ng (約0.1pmole) 精製PCR産物に添加した。

トポゲートした (topogated) PCR産物を、室温で5分間、ベクターpASK3 (NEBI中の5 μ l、約200ng) 中にクローニングした。

混合物をH₂Oに対し30分間透析した。

2 μ lを用いて、DH10B細胞の電気穿孔を実施した (Gibco BRL、メリーランド州Geithersburg)。

効率：実際のクローンの数によれば、この方法は、 μ gベクター当たり 2×10^6 クローンを産生することができる。試験した組換え体はすべて、アンヒドロテトラサイクリンによる誘発の後、エステラーゼ活性を示した。

【0212】

実施例7

デハロゲナーゼ熱安定性

本発明は、定方向進化により生成される望ましい性質が、苛酷な環境と考えられるもの等の、変化させた環境に特定時間供した後、分子の改良された残存活性 (例えば、酵素活性、免疫反応性、抗生物質活性等) により、制限的に実現されることを特徴とする。このような苛酷な環境には、下記のいずれかの組合せを含むことができる (反復または反復しなくても、どんな順序もしくは順列でもよい) : 温度上昇 (実施酵素の変性を起こし得る温度を含む)、温度低下、塩濃度上昇、塩濃度低下、pH上昇、pH低下、圧力上昇、圧力低下、ならびに放射線源暴露の変化 (紫外線、可視光線、ならびに、全電磁スペクトルを含む)。

以下の実施例は、上昇させた温度に暴露後に、酵素が活性を回復および／または保持する能力を進化させるための、定方向進化の使用を示す。

デハロゲナーゼ酵素の各残基 (316) を、32倍縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いて部位特異的突然変異により全20アミノ酸に変換した。これら突然変異を、すでに速度改善した変異体Dh1a20F12に導入した。各位置の約200のクローンを液体培地 (384ウェルマイクロプレート) で培養し、スクリーニングした。スクリーニング手順は、次の通りである：

1. 384ウェルプレートに一晩放置した培養物を遠心分離にかけ、培地を除去した。各ウェルに、0.06mL 1mM Tris/ SO_4^{2-} pH7.8を添加した。
2. 0.02mL細胞懸濁液から成る各親培養プレートから2つの検定プレートをロボットにより作製した。
3. 所定時間（初め30分間）、一方の検定プレートを室温に、他方は、上昇させた温度（初期スクリーニングでは55℃）に置いた。
4. 規定時間後、0.08mL室温基質（1.5mM NaN_3 および0.1mMブロモチモールブルーを含むTCP飽和1mM Tris/ SO_4^{2-} pH7.8）を各ウェルに添加した。TCP＝トリクロロプロパン。
5. 各時点で、620nmでの測定を実施し、各ウェルについてプログレス曲線を作成した。
6. データを分析し、非加熱のものと、加熱細胞の速度論を比較した。各プレートには、1～2カラム（24ウェル）の突然変異していない20F12対照を含有させた。
7. 安定性が向上したと思われるウェルを再培養した後、同じ条件下で試験した。

この手順によれば、9つの単一部位突然変異が、Dh1a-20F12に対して増大した熱安定性を賦与することがわかった。配列分析から、次の変化が有利であることが明らかになった。

D89G

F91S

T159L

G189Q、G189V

I220L

N238T

W251Y

P302A、P302L、P302S、P302K

P302R/S306R

【0213】

二つの部位(189および302)だけが、一つ以上の置換を有した。上記リストの最初の5つは、単一遺伝子(この突然変異体は、「Dh1a5」と呼ぶ)に(G189Qを用いて)統合された。S306Rを除くすべての変化は、Dh1a8と呼ばれる別の変異体に組み込まれた。

熱安定性は、所定時間、上昇させた温度(55°Cおよび80°C)で酵素をインキュベートすることにより評価し、活性検定を30°Cで実施した。高い方の温度で、初期速度を、時間毎に記録した。酵素は、インキュベーションおよび検定の両方で、50mM Tris/ SO_4^{2-} pH7.8に含有させた。 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ および HgSCN を用いた標準方法により産物(Cl^-)を検出した。de facto野生型としてDh1a20F12を用いた。指数的崩壊関数にデータを当てはめることにより、見掛け半減期($T_{1/2}$)を計算した。

【0214】

3. 参考文献

特に指摘しない限り、本明細書に記載された全ての文献(上記および下記の)は、その全体が参照により本明細書に組み入れられるものとする。

Barret AJら(編)、Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.(「酵素命名法：国際生化学分子生物学連合の命名委員会勧告」)、San Diego: Academic Press, Inc., 1992.

Boyce COL(編)、Novo's Handbook of Practical Biotechnology.(「実用バイオテクノロジーに関するノボのハンドブック」)、第2版、Bagsvaerd, Denmark, 1986.

Drauz K, Waldman H(編)、Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook.(「有機合成における酵素触媒：総合ハンドブック」)、第1巻、New York: VCH Publishers, 1995.

Drauz K, Waldman H(編)、Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook.(「有機合成における酵素触媒：総合ハンドブック」)、第2巻、New York: VCH Publishers, 1995.

Foster GD, Taylor SC(編)、Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance.(「植物ウイルス学プロトコル：ウイルスの単離からトランスジェニック耐性まで」)、Methods in Molecular Biology、第81巻、New Jersey: Humana Press Inc., 1998.

Franks F(編)、Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization.(「タンパク質のバイオテクノロジー：単離、特性評価、および安定化」)、New Jersey: Humana Press Inc., 1993.

Godfrey T, West S(編)、Industrial Enzymology.(「工業酵素学」)、第2版、London: Macmillan Press Ltd, 1996.

Gottschalk G、Bacterial Metabolism.(「細菌代謝」)、第2版、New York: Springer-Verlag Inc., 1986.

Gresshoff PM(編)、Technology Transfer of Plant Biotechnology.(「植物バイオテクノロジーの技術導入」)、Current Topics in Plant Molecular Biology. Boca Raton: CRC Press, 1997.

Griffin HG, Griffin AM(編)、PCR Technology: Current Innovations.(「PCR技術：最新の考案」)、Boca Raton: CRC Press, Inc., 1994.

Hansen G, Chilton MD、「所与の微生物による植物への遺伝子導入における課題」、Curr Top Microbiol Immunol 240:21-57, 1999.

Hartmann HT(編)、Plant Propagation: Principles and Practices.(「植物の繁殖：原理と実践」)、第6版、New Jersey: Prentice Hall, Inc., 1997.

Perun TJ, Propst CL(編)、Computer-Aided Drug Design: Methods and Applications.(「コンピューターを援用した薬物設計：方法および応用」)、New York: Marcel Dekker, Inc., 1989.

Owen MRL, Pen J、Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins.(「トランスジェニック植物：工業的、製薬学的タンパク質のための生産システム」)、Chichester: John Wiley & Sons, 1996.

Segel IH、Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.(「酵素反応速度論：酵素系の急速な平衡および

び定常状態の振る舞いおよび分析」)、New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.

White JS, White DC、Source Book of Enzymes.(「酵素原典」)、Boca Raton: CRC Press, 1997.

Wong CH, Whitesides GM、Enzymes in Synthetic Organic Chemistry.(「合成有機化学における酵素」)、第12巻、New York: Elsevier Science Publications, 1995.

WO 97/35966、1997年3月20日出願、1997年10月2日公開、Minshull J, Stemmer WP、「細胞工学および代謝工学のための方法および組成物」

WO 98/31837、1998年1月16日出願、1998年7月23日公開、Delcardayre SB, Tobin MB, Stemmer WP, Minshull, J、「帰納的配列組換えによる全細胞および生物の進化」

WO 98/37223、1998年2月18日出願、1998年8月27日公開、Pang SZ, Gonsalves D, Jan FJ、「植物に複数の形質を付与するためのDNA構築物」

Alting-Mecs MA and Short JM、「ポリコスベクター：λファージパッケージング抽出物を用いた線維状ファージおよびファージミドベクターのパッケージング系」、Gene 137:1, 93-100, 1993.

Arkin APおよびYouvan DC、「タンパク質工学のためのアルゴリズム：帰納的アンサンブル突然変異誘発のシミュレーション」、Proc Natl Acad Sci USA 89(16):7811-7815, (Aug 15) 1992.

Arnold FH、「異常環境のためのタンパク質工学」、Current Opinion in Biotechnology 4(4):450-455, 1993.

Ausubel FMら(編)、Current Protocols in Molecular Biology (「分子生物学の最新プロトコル」)、第1巻および第2巻および補遺、(別名「赤本」)、Greene Publishing Assoc., Brooklyn, NY、(著作権)、1987.

Ausubel FMら(編)、Current Protocols in Molecular Biology (「分子生物学の最新プロトコル」)、第1巻および第2巻および補遺、(別名「赤本」)、Greene Publishing Assoc., Brooklyn, NY、(著作権)、1989.

Ausubel FMら(編)、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of

- Methods from Current Protocols in Molecular Biology. (「分子生物学のショートプロトコル：分子生物学の最新プロトコルからの方法の概論」)、Greene Publishing Assoc., Brooklyn, NY、(著作権)、1989.
- Ausubel FMら(編)、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. (「分子生物学のショートプロトコル：分子生物学の最新プロトコルからの方法の概論」)、第2版、Greene Publishing Assoc., Brooklyn, NY、(著作権)、1992.
- Barbas CF 3世, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA、「半合成コンビナトリアル抗体ライブラリー：多様な問題に対する化学的解決策」、Proc Natl Acad Sci U SA 89(10):4457-4461, 1992.
- Bardwell AJ, Bardwell L, Johnson DK, Friedberg EC、「酵母のDNA組換えおよび修復タンパク質Rad1およびRad10は、in vivoで局在化疎水性ドメインを介した複合体を構成する」、Mol Microbiol 8(6):1177-1188, 1993.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S、「2-ハイブリッド系の使用において生じる偽陽性の消失」、Biotechniques 14(6):920-924, 1993.
- Beaudry AAおよびJoyce GF、「RNA酵素の定方向進化」、Science 257(5070):635-641, 1992.
- BergerおよびKimmel、Methods in Enzymology (「酵素学における方法」)、第152巻、「分子クローニング技術へのガイド」、Academic Press, Inc., San Diego, CA、(著作権)、1987。(累積標題索引：第135-139巻、第141-167巻、1990、第272頁)
- Bevan M、「植物の形質転換のためのバイナリーアグロバクテリウムベクター」、Nucleic Acids Research 12(22):8711-21, 1984.
- Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A、「抗p21ras単鎖Fvフラグメントの細胞内発現は、アフリカツメガエル卵母細胞の減数分裂成熟を阻害する」、Biochem Biophys Res Commun 197(2):422-427, 1993.
- Birdら、Plant Mol Biol 11:651, 1988..
- Bogerd HP, Fridell RA, Blair WS, Cullen BR、「1型および2型ヒト免疫不全ウイルスのTatタンパク質は真核細胞の核において多量体化し得るという遺伝的根

抛」、J Virol 67(8):5030-5034, 1993.

Brederode FT, Koper-Zawrthoff EC, Bol JF、「アルファルファモザイクウイルスRNA 4の全ヌクレオチド配列」、Nucleic Acids Research 8(10):2213-23, 1980.

Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M、「抗体スクリーニングのための表面発現ベクター」、Gene 104(2):147-153, 1991.

Brown NL, Smith M、「Haemophilus gallinarum (Hga I)から単離された制限エンドヌクレアーゼの切断特異性」、Proc Natl Acad Sci U S A 74(8):3213-6, (Aug) 1977.

Burton DR, Barbas CF 3世, Persson MA, Koenig S, Chanock RM, Lerner RA、「無症状性血清陽性個体のコンビナトリアルライブラリーに由来する1型ヒト免疫不全ウイルスに対するヒトモノクローナル抗体の巨大アレイ」、Proc Natl Acad Sci U S A 88(22):10134-7, (Nov 15) 1991.

Caldwell RCおよびJoyce GF、「PCR突然変異誘発による遺伝子の無作為化」、PCR Methods Appl 2(10):28-33, 1992.

Caton AJおよびKoprowski H、「コンビナトリアル発現ライブラリーから単離されたインフルエンザウイルス赤血球凝集素特異的抗体は、供与体の免疫応答に密接に関与する」、Proc Natl Acad Sci USA 87(16):6450-6454, 1990.

Chakraborty T, Martin JF, Olson EN、「2-ハイブリッドアッセイ系を用いたin vivoにおけるミオゲニンおよびE2A産物のオリゴマー化の分析」、J Biol Chem 267(25):17498-501, 1992.

Chang CN, Landolfi NF, Queen C、「バクテリオファージ表面上での抗体Fabドメインの発現、抗体選択のための使用可能性」、J Immunol 147(10):3610-4, (Nov 15) 1991.

Chaudhary VK, Batra JK, Gallo MG, Willingham MC, FitzGerald DJ, Pastan I、「単鎖イムノトキシンとしての大腸菌の機能性可変領域抗体遺伝子を迅速にクローニングする方法」、Proc Natl Acad Sci USA 87(3):1066-1070, 1990.

Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S、「2-ハイブリッド系：目的のタンパク質と相互作用するタンパク質の遺伝子を同定およびクローニングするた

- めの方法」、Proc Natl Acad Sci USA 88(21):9578-9582, 1991.
- Chiswell DJ, McCafferty J, 「ファージ抗体：新しい「コリクローナル」抗体はモノクローナル抗体に取って代わるか?」、Trends Biotechnol 10(3):80-84, 1992.
- Chothia CおよびLesk AM, 「免疫グロブリンの超可変領域の基準構造」、J Mol Biol 196(4):901-917, 1987.
- Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sherif S, Padlan EA, Davies D, Tulip WRら, 「免疫グロブリン超可変領域のコンホメーション」、Nature 342(6252):877-883, 1989.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G, 「ファージ展示ライブラリーを用いた抗体フラグメントの作製」、Nature 352(6336):624-628, 1991.
- Conrad M, Topal MD, 「DNAおよびスぺルミジンは、制限酵素Nae Iの活性を調節するためのスイッチ機構を提供する」、Proc Natl Acad Sci U S A 86(24):9707-11, (Dec) 1989.
- Coruzzi G, Broglie R, Edwards C, Chua NH, 「リブローズ - 1,5 - ビスリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットをコードするエンドウ豆核遺伝子の組織特異的で光調節型の発現」、EMBO J 3(8):1671-9, 1984.
- Dasmahapatra B, DiDomenico B, Dwyer S, Ma J, Sadowski I, Schwartz J, 「タンパク質分解酵素の活性を研究するための遺伝系」、Proc Natl Acad Sci USA 89(9):4159-4162, 1992.
- Davis LG, Dibner MD, Battey JF, Basic Methods in Molecular Biology.(「分子生物学の基本的な方法」)、Elsevier, New York, NY、(著作権)、1986.
- Delegrave SおよびYouvan DC. Biotechnology Research 11:1548-1552, 1993.
- DeLong EF, Wu KY, Prezelin BB, Jovine RV, 「南極海ピコプランクトン中の大量の古細菌」、Nature 371(6499):695-697, 1994.
- Deng SJ, MacKenzie CR, Sadowska J, Michniewicz J, Young NM, Bundle Dr, Narang SA, 「ファージ展示による、改善された炭水化物結合を用いた抗体単鎖可変フラグメントの選択」、J Biol Chem 269(13):9533-9538, 1994.
- Duan L, Bagasra O, Laughlin MA, Oakes JW, Pomerantz RJ, 「細胞内抗Rev単

- 鎖抗体によるヒト免疫不全ウイルス1型の複製の強力な阻害」、Proc Natl Acad Sci USA 91(11):5075-5079, 1994.
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ、「網膜芽腫タンパク質は、1型タンパク質ホスファターゼ触媒ユニットに結合する」、Genes Dev 7(4):555-569, 1993.
- Ellington ADおよびSzostak JW、「特異的リガンドに結合するRNA分子のin vitroにおける選択」、Nature 346(6287):818-822, 1990.
- Fields SおよびSong O、「タンパク質間相互作用を検出するための新規遺伝系」、Nature 340(6230):245-246, 1989.
- Firek S, Draper J, Owen MR, Gandeche A, Cockburn B, Whitelam GC、「トランスジェニックタバコ植物および細胞懸濁培養における機能性単鎖Fvタンパク質の分泌」、Plant Mol Biol 23(4):861-870, 1993.
- Forsblom S, Rigler R, Ehrenberg M, Philipson L、「制限エンドヌクレアーゼEco RIによるアデノウイルスDNAの切断に関する反応速度論的研究」、Nucleic Acids Res 3(12):3255-69, (Dec) 1976.
- Germino FJ, Wang ZX, Weissman SM、「in vivoにおけるタンパク質間相互作用のスクリーニング」、Proc Natl Acad Sci USA 90(3):933-937, 1993.
- Gingeras TR, Brooks JE、「Pseudomonas aeruginosa由来クローン化制限／修飾系」、Proc Natl Acad Sci USA 80(2):402-6, 1983 (Jan).
- Gluzman Y、「SV40により形質転換されたサル細胞は、初期SV40突然変異体の複製を支持する」、Cell 23(1):175-182, 1981.
- Gruber M, Schodin BA, Wilson ER, Kranz DM、「大腸菌で発現された二重特異性単鎖抗体を介した効率的な腫瘍細胞溶解」、J Immunol 152(11):5368-5374, 1994.
- Guarente L、「相互作用タンパク質の同定のための戦略」、Proc Natl Acad Sci USA 90(5):1639-1641, 1993.
- Guilley H, Dudley RK, Jonard G, Balazs E, Richards KE、「カリフラワーモザイクウイルスDNAの転写：プロモーター配列の検出および転写物の特性付け」、Cell 30(3):763-73, 1982.

Hardy CF, Sussel L, Shore D, 「転写沈黙化およびテロメア長調節に関与するR AP1相互作用タンパク質」、Genes Dev 6(5):801-814, 1992.

Hawkins REおよびWinter G, 「種々の遺伝子ライブラリーから抗体を作製するための細胞選択戦略：記憶プールのトラッピング」、Eur J Immunol 22(3):867-870, 1992.

Holvoet P, Laroche Y, Lijnen HR, Van Hoef B, Brouwers E, De Cock F, Lauwereys M, Gansemans Y, Collen D, 「フィブリン特異的抗体の単鎖Fvフラグメントおよび単鎖ウロキナーゼからなる単鎖キメラプラスミノゲンアクチベーターの生化学的特性付け」、Eur J Biochem 210(3):945-952, 1992.

Honjo T, Alt FW, Rabbitts TH (編)、Immunoglobulin genes. Academic Press: San Diego, CA, pp. 361-368, (著作権)、1989.

Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Judson P, Winter G, 「糸状ファージの表面上の多サブユニットタンパク質：抗体(Fab)重鎖および軽鎖の提示方法」、Nucleic Acids Res 19(15):4133-4137, 1991.

Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA, 「ファージλにおける免疫グロブリンレパートリーの大規模コンビナトリアルライブラリーの作製」、Science 246(4935):1275-1281, 1989.

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotney J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea Rら, 「抗体結合部位のタンパク質工学：大腸菌において産生される抗ジゴキシン単鎖Fv類似体の特異的活性の回復」、Proc Natl Acad Sci USA 85(16):5879-5883, 1988.

Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S, 「オリゴマー化に関与するp53のドメインを同定するための2-ハイブリッド系の使用」、Oncogene 8(6):1693-1696, 1993.

Jackson AL, Pahl PM, Harrison K, Rosamond J, Sclafani RA, 「Dbf4タンパク質との結合による酵母Cdc7タンパク質キナーゼの細胞周期調節」、Mol Cell Biol 13(5):2899-2908, 1993.

Johnson SおよびBird RE、Methods Enzymol 203:88, 1991.

Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest (「免疫学的目的のタンパク質の配列」)、第4版、U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD (1987)

Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ, Lerner RA、「ファージ表面にコンビナトリアル抗体Fabライブラリーを組み立てることによる、認識機能と複製機能の連結」、Proc Natl Acad Sci USA 88(10):4363-4366, 1991.

Kettleborough CA, Ansell KH, Allen RW, Rosell-Vives E, Gussow DH, Bendig MM、「ファージ抗体ライブラリーを用いた免疫感作マウスからの腫瘍細胞特異的単鎖Fvの単離およびこれらの抗体フラグメントからの全抗体の再構築」、Eur J Immunol 24(4):952-958, 1994.

Kruger DH, Barcak GJ, Reuter M, Smith HO、「EcoRIIは、抵抗性DNA認識部位を切断するように活性化され得る」、Nucleic Acids Res 16(9):3997-4008, (May 11) 1988.

Lalo D, Carles C, Sentenac A, Thuriaux P、「酵母RNAポリメラーゼIおよびIIの3つの共通サブユニット間の相互作用」、Proc Natl Acad Sci USA 90(12):5524-5528, 1993.

Laskowski M Sr、「ヘビ毒ホスホジエステラーゼの精製および特性」、Methods Enzymol 65(1):276-84, 1980.

Lefkovits IおよびPernis B(編)、Immunological Methods (「免疫学的方法」)、第I巻および第II巻、Academic Press, New York, NY.、第III巻(Orlandoにて刊行)、ならびに第IV巻(San Diegoにて刊行)、(著作権)、1979-.

Ivan Lefkovits(編)、Immunology methods manual : the comprehensive source book of techniques. (「免疫学的方法マニュアル：総合技術原典」)、Academic Press, San Diego, (著作権)、1997.

Lerner RA, Kang AS, Bain JD, Burton DR, Barbas CF 3世、「免疫感作のない抗体」、Science 258(5086):1313-1314, 1992.

Leung, D.W.ら、Technique, 1:11-15, 1989.

Li BおよびFields S、「酵母2-ハイブリッド系を用いた、SV40ラージT抗原への

- p53の結合に影響するp53の突然変異の同定」、FASEB J 7(10):957-963, 1993.
- Lilley GG, Doelzal O, Hillyard CJ, Bernard C, Hudson PJ、「HIVの迅速な診断のための大腸菌で発現された組換え単鎖抗体ペプチドコンジュゲート」、J Immunol Methods 171(2):211-226, 1994.
- Lowman HB, Bass SH, Simpson N, Wells JA、「一価ファージ展示による高親和性結合タンパク質の選択」、Biochemistry 30(45):10832-10838, 1991.
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP、「1型ヒト免疫不全ウイルスのGagタンパク質は、シクロフィリンAおよびBに結合する」、Cell 73(6):1067-1078, 1993.
- Madura K, Dohmen RJ, Varshavsky A、「N末端則経路におけるN-レコグニン/Ubc2相互作用」、J Biol Chem 268(16):12046-54, (Jun 5) 1993.
- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G、「バイパス免疫：V遺伝子のファージ展示ライブラリーに由来するヒト抗体」、J Mol Biol 222(3):581-597, 1991.
- Marks JD, Griffiths Ad, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM, Winter G、「バイパス免疫：鎖シャッフリングによる高親和性ヒト抗体の構築」、Biotechnology (N Y) 10(7):779-783, 1992.
- Marks JD, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G、「糸状ファージ上のタンパク質の分子進化：免疫系の戦略の模倣」、J Biol Chem 267(23):16007-16010, 1992.
- Maxam AM, Gilbert W、「塩基特異的化学切断を用いた末端標識DNAの配列決定」、Methods Enzymol 65(1):499-560, 1980.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ、「ファージ抗体：抗体可変ドメインを展示する糸状ファージ」、Nature 348(6301):552-554, 1990.
- Miller JH., A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (「細菌遺伝学の短期講座：大腸菌および関連細菌に関する実験室マニュアルおよびハンドブック」)、(445頁も参照のこと)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N Y, (著作権)、1992.

Milne GTおよびWeaver DT、「RAD52の優性ネガティブ対立遺伝子は、Rad51およびRad52を含むDNA修復／組換え複合体を明らかにする」、*Genes Dev* 7(9):1755-1765, 1993.

Mullinax RL, Gross EA, Amberg JR, Hay BN, Hogrefe HH, Kubtiz MM, Greener A, Alting-Mees M, Ardourel D, Short JMら、「バクテリオファージ入免疫発現ライブラリーにおける破傷風トキソイドに特異的なヒト抗体フラグメントクローンの同定」、*Proc natl Acad Sci USA* 87(20):8095-9099, 1990.

Nath K, Azzolina BA、*Gene Amplification and Analysis*(Chirikjian JG(編))、第1巻、p. 113, Elsevier North Holland, Inc., New York, New York,(著作権)、1981.

Needleman SBおよびWunsch CD、「2種のタンパク質のアミノ酸配列における類似性を検索するために適用可能な一般的方法」、*J Mol Biol* 48(3):443-453, 1970.

Nelson M, Christ C, Schildkraut I、「DNAメチラーゼによる見掛け上の制限エンドヌクレアーゼ認識特異性の変化」、*Nucleic Acids Res* 12(13):5165-73, 1984 (Jul 11).

Nicholls PJ, Johnson VG, Andrew SM, Hoogenboom HR, Raus JC, Youle RJ、「in vitroでウサギ網状赤血球溶解物において産生される単鎖抗体(sFv) - トキシン融合タンパク質の特性評価」、*J Biol Chem* 268(7):5302-5308, 1993.

Oller AR, Vanden Broek W, Conrad M, Topal MD、「いくつかの細菌種に由来する制限エンドヌクレアーゼの活性に影響するDNAおよびスperlミジンの能力」、*Biochemistry* 30(9):2543-9, (Mar 5) 1991.

Owens RJおよびYoung RJ、「モノクローナル抗体の遺伝子工学」、*J Immunol Methods* 168(2):149-165, 1994.

Pearson WRおよびLipman DJ、「生物学的配列比較のための改善されたツール」、*Proc Natl Acad Sci USA* 85(8):2444-2448, 1988.

Pein CD, Reuter M, Meisel A, Cech D, Kruger DH、「制限エンドヌクレアーゼEcoRIIの活性化は、刺激因子DNAの切断に依存しない」、*Nucleic Acids Res* 19(19):5139-42, (Oct 11) 1991.

Persson MA, Caothien RH, Burton DR, 「レパトリークローニングによる多様な高親和性ヒトモノクローナル抗体の作製」、Proc Natl Acad Sci USA 88(6): 2432-2436, 1991.

Queen C, Foster J, Stauber C, Stafford J, 「プロモーターおよびエンハンサーエレメントによる κ -免疫グロブリン遺伝子の細胞型特異的調節」、Immunol Rev 89:49-68, 1986.

Qiang BQ, McClelland M, Poddar S, Spokauskas A, Nelson M, 「NotI (5'-GCGGCCGC-3')の見掛け上の特異性は、M.FnuDIIまたはM.BepIメチルトランスフェラーゼ(5'-mCGCG-3')により増強される：細菌染色体の、いくつかの大きい断片への切断」、Gene 88(1):101-5, (Mar 30) 1990.

Raleigh EA, Wilson G, 「大腸菌K-12株は、5-メチルシトシン含有DNAを制限する」、Proc Natl Acad Sci U S A 83(23):9070-4, (Dec) 1986.

Reidhaar-Olson JFおよびSauer RT, 「タンパク質配列の情報内容のプローブとしてのコンビナトリアルカセット突然変異誘発」、Science 241(4861):53-57, 1988.

Riechmann LおよびWeill M, 「部位特異的ランダム単鎖抗体Fvフラグメントの親和性の改善のための該フラグメントのファージ展示および選択」、Biochemistry 32(34):8848-8855, 1993.

Roberts RJ, Macelis D, 「REBASE - 制限酵素およびメチラーゼ」、Nucleic Acids Res 24(1):223-35, (Jan 1) 1996.

Ryan AJ, Royal CL, Hutchinson J, Shaw CH, 「アブラナ(*Brassica napus*すなわちjet neuf).由来12S種子保存タンパク質のゲノム配列」、Nucl Acids Res 17(9):3584, 1989.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (「分子クローニング：実験室マニュアル」)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (著作権)、1982.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (「分子クローニング：実験室マニュアル」)、第2版、Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (著作権)、1989.
- Scopes RK., Protein Purification: Principles and Practice.(「タンパク質の精製：原理と実践」)、Springer-Verlag, New York, NY, (著作権)、1982.
- Silver SCおよびHunt SW 3世、「相互作用転写調節タンパク質をコードするcDNAのクローニング技術」、Mol Biol Rep 17(3):155-165, 1993.
- Smith TF, Waterman MS. Adv Appl Math 2: 482-論文の最終頁, 1981.
- Smith TF, Waterman MS、「重複遺伝子および情報理論」、J Theor Biol 91(2):379-80, (Jul 21) 1981.
- Smith TF, Waterman MS、「共通分子サブ配列の同定」、J Mol Biol 147(1):19-5-7, (Mar 25) 1981.
- Smith TF, Waterman MS, Fitch WM、「比較生物配列メトリックス」、J Mol Evol 18(1):38-46, 1981.
- Staudinger J, Perry M, Elledge SJ, Olson EN、「2 - ハイブリッド系を用いた酵母における脊椎動物ヘリックス - ループ - ヘリックスタンパク質間の相互作用」、J Biol Chem 268(7):4608-4611, 1993.
- Stemmer WP, Morris SK, Wilson BS、「酵素的逆方向PCRにより調製されたタンパク質リンカーライブラリーに由来する活性単鎖Fv抗体の選択」、Biotechniques 14(2):256-265, 1993.
- Stemmer WP、「ランダム断片化および再構成によるDNAシャッフリング：分子進化のためのin vitroでの組換え」、Proc Natl Acad Sci USA 91(22):10747-10751, 1994.
- Sun D, Hurley LH、「大腸菌DNAポリメラーゼを介するin vitro DNA合成に対する(+)-CC-1065-(N3-アデニン)DNA付加物の効果」、Biochemistry 31:10, 2822-9, (Mar 17) 1992,
- Tague BW, Dickinson CD, Chrispeels MJ、「植物液胞タンパク質フィトヘマグルチニンの短いドメインは、酵母液胞のインベルターゼを標的にする」、Plant Cell 2(6):533-46, (June) 1990.
- Takahashi N, Kobayashi I、「バクテリオファージ入組換えの2本鎖破壊修復モデルの根拠」、Proc Natl Acad Sci U S A 87(7):2790-4, (Apr) 1990.

Thiesen HJおよびBach C、「標的検出アッセイ (TDA): SP1タンパク質で実証されたようなDNA結合部位を決定するための万能法」、*Nucleic Acids Res* 18(11):3203-3209, 1990.

Thomas M, Davis RW、「EcoRI制限エンドヌクレアーゼによるバクテリオファージ入の切断に関する研究」、*J Mol Biol* 91(3):315-28, (Jan 25) 1975.

Tingey SV, Walker EL, Corruzzi GM、「エンドウ豆グルタミン合成酵素遺伝子は、葉、根、および節で特異的に発現される異なるポリペプチドをコードする」*EMBO J* 6(1):1-9, 1987.

Topal MD, Thresher RJ, Conrad M, Griffith J、「pBR322のDNAに結合するNaeIエンドヌクレアーゼは、ループ化を誘導する」、*Biochemistry* 30(7):2006-10, (Feb. 19) 1991.

Tramontano A, Chothia C, Lesk AM、「構造残基71は、免疫グロブリンのVHドメインにおける第2の超可変領域の位置およびコンホメーションの主要な決定基である」、*J Mol Biol* 215(1):175-182, 1990.

Tuerk CおよびGold L、「指数的富化によるリガンドの系統進化: バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼに対するRNAリガンド」、*Science* 249(4968):505-510, 1990.

van de Poll ML, Lafleur MV, van Gog F, Vrieling H, Meerman JH、「N-アセチル化およびデアセチル化4'-フルオロ-4'-アミノビフェニルおよび4'-アミノビフェニル付加物は、1本鎖M13のin vitroにおけるDNA複製および大腸菌における1本鎖φX174のDNA複製を阻害するその能力において異なる」、*Carcinogenesis* 13(5):751-8, (May) 1992.

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA、「哺乳動物のRasは、セリン／トレオニンキナーゼRafと直接的に相互作用する」、*Cell* 74(1):205-214, 1993.

Wenzler H, Mignery G, Fisher L, Park W、「トランスジェニックタバコ植物の葉におけるキメラジャガイモ塊茎遺伝子のスクロース調節性発現」、*Plant Mol Biol* 13(4):347-54, 1989.

WilliamsおよびBarclay, *Immunoglobulin Genes, The Immunoglobulin Gene Superfamily* (「免疫グロブリン遺伝子、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリー

」)

Winnacker EL., From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology.(「遺伝子からクローンまで：遺伝子技術入門」)、VCH Publishers, New York, NY, (著作権)、1987.

Winter GおよびMilstein C、「人工抗体」、Nature 349(6307):293-299, 1991.

Yang X, Hubbard EJ, Carlson M、「2-ハイブリッド系により同定されたタンパク質キナーゼ基質」、Science 257(5070):680-2, (Jul 31) 1992.

米国特許第4,683,195号; 1986年2月7日出願, 1987年7月28日発行. Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N, Horn GT, Saiki RK, Scharf SJ、「核酸配列を増幅、検出、および／またはクローニングするための方法」

米国特許第4,683,202号; 1985年10月25日出願, 1987年7月28日発行. Mullis KB、「核酸配列を増幅するための方法」

米国特許第4,704,362号; 1979年11月5日出願, 1987年11月3日発行. Itakura K, Riggs AD、「組換えクローニングベヒクル微生物ポリペプチドの発現」

WO 88/08453; 1988年4月14日出願, 1988年11月3日公開. Alakhov JB, Baranov, VI, Ovodov SJ, Ryabova LA, Spirin AS、「無細胞翻訳系におけるポリペプチドの取得方法」

WO 90/05785; 1989年11月15日出願, 1990年5月31日公開. Schultz P、「タンパク質中に非天然アミノ酸を部位特異的に組み込むための方法」

WO 90/07003; 1989年1月27日出願, 1990年6月28日公開. Baranov VI, Morozov I J, Spirin AS、「無細胞系のコンジュゲートされた転写／翻訳における遺伝子の予備的発現のための方法」

WO 91/02076; 1990年6月14日出願, 1991年2月21日公開. Baranov VI, Ryabova LA, Yarchuk OB, Spirin AS、「無細胞系におけるポリペプチドの取得方法」

WO 91/05058; 1989年10月5日出願, 1991年4月18日公開. Kawasaki G、「新規遺伝子およびポリペプチドの無細胞系および単離」

WO 91/17271; 1990年5月1日出願, 1991年11月14日公開. Dower WJ, Cwirla SE、「組換えライブラリーのスクリーニング方法」

WO 91/18980; 1991年5月13日出願, 1991年12月12日公開. Devlin JJ、「生物学

的活性分子を同定するための組成物および方法」

WO 91/19818; 1990年6月20日出願, 1991年12月26日公開. Dower WJ, Cwirla SE, Barrett RW, 「ペプチドライブラリーおよびスクリーニング系」

WO 92/02536; 1991年8月1日出願, 1992年2月20日公開. Gold L, Tuerk C, 「逆翻訳による系統的ポリペプチド進化」

WO 92/03918; 1991年8月28日出願, 1992年3月19日公開. Lonberg N, Kay RM, 「異種抗体を産生し得るトランスジェニック非ヒト動物」

WO 92/03918; 1991年8月28日出願, 1992年3月19日公開. Lonberg N, Kay RM, 「異種抗体を産生し得るトランスジェニック非ヒト動物」

WO 92/05258; 1991年9月17日出願, 1992年4月2日公開. Fincher GB, 「オオムギ酵素をコードする遺伝子」

WO 92/14843; 1992年2月21日出願, 1992年9月3日公開. Toole JJ, Griffin LC, Bock LC, Latham JA, Muenchau DD, Krawczyk S, 「生物分子特異的アプタマーおよびその作製方法」

WO 93/08278; 1992年10月15日出願, 1993年4月29日公開. Schatz PJ, Cull MG, Miller JF, Stemmer WP, 「ペプチドライブラリーおよびそのスクリーニング方法」

WO 93/12227; 1992年12月17日出願, 1993年6月24日公開. Lonberg, N; Kay RM, 「異種抗体を産生し得るトランスジェニック非ヒト動物」

WO 93/12227; 1992年12月17日出願, 1993年6月24日公開. Lonberg N, Kay RM, 「異種抗体を産生し得るトランスジェニック非ヒト動物」

WO 94/25585; 1994年4月25日出願, 1994年11月10日公開. Lonberg, N, Kay RM, 「異種抗体を産生し得るトランスジェニック非ヒト動物」

WO 94/25585; 1994年4月25日出願, 1994年11月10日公開. Lonberg N, Kay RM, 「異種抗体を産生し得るトランスジェニック非ヒト動物」

Arslan T, Abraham AT, Hecht SM, 「構造的に変化したDNAトポイソメラーゼIの基質 1個の3' - デオキシヌクレオチドを切れやすい鎖に含有させる効果」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):515-30.

Aupeix K, Toulme JJ, 「RNAヘアピンの2本鎖基部への化学修飾オリゴヌクレオ

チドの結合」、Nucleosides Nucleotides 1999 Jun-Jul;18(6-7):1647-50.

Bazzanini R, Manfredini S, Durini E, Groschel B, Cinatl J, Balzarini J, De Clercq E, Imbach JL, Perigaud C, Gosselin G, 「S-アシル-2-チオエチル (SATE)生物的不安定リン酸保護基を有するAra-CMPおよびAra-AMPのプロドラッグ：合成および生物学的評価」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):971-2.

Blackburn GM, Liu X, Rosler A, Brenner C, 「ヒト脆弱ヒスチジン三価タンパク質(Fhit)に関する研究のためのジアデノシン5',5''' - P1,P3 - 三リン酸の2つのヒドロラーゼ耐性類似体」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):301-8.

Bridson PK, Lin X, Melman N, Ji XD, Jacobson KA, 「7 - β - D - リボフラノシルキサンチンの合成およびアデノシン受容体親和性」、Nucleosides Nucleotides 1998 Apr;17(4):759-68.

Brodin P, Gottikh M, Auclair C, Mouscadet JF, 「一官能性および二官能性三重らせん形成オリゴヌクレオチドによるHIV-1組込みの阻害」、Nucleosides Nucleotides 1999 Jun-Jul;18(6-7):1717-8.

Creighton TE, Proteins Structures and Molecular Principles.(「タンパク質構造と分子的原理」)、New York: W. H. Freeman and Co., 1984.

De Clercq E, 「S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ阻害剤および抗ウイルス剤としてのカルボサイクリックアデノシン類似体：最近の進歩」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):625-34.

de Zwart M, Link R, von Frijtag Drabbe Kunzel JK, Cristalli G, Jacobson KA, Townsend-Nicholson A, IJzerman AP, 「アデノシンA2B受容体におけるアデノシン類似体の機能的スクリーニング：強力なアゴニストの探索」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jun;17(6):969-85.

Egron D, Arzumanov AA, Dyatkina NB, Krayevsky A, Imbach JL, Aubertin AM, Gosselin G, Perigaud C, 「3'-アジド-2',3'-ジデオキシチミジン5'-フルオロリン酸の合成、抗HIV活性および安定性に関する研究」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):983-4

Gianolio DA, McLaughlin LW, 「拡張機能を有するピリミジン誘導体の合成およびトリプレックス形成特性」、Nucleosides Nucleotides 1999 Aug;18(8):1751-69.

Gottikh MB, Volkov EM, Romanova EA, Oretskaya TS, Shabarova ZA, 「HIV-1のDNA組込みを阻害し得るオリゴヌクレオチド挿入剤コンジュゲートの合成」、Nucleosides Nucleotides 1999 Jun-Jul;18(6-7):1645-6.

Hotoda H, Koizumi M, Ohmine T, Furukawa H, Nishigaki T, Abe K, Kosaka T, Tsutsumi S, Sone J, Kaneko M, 「生物学的活性オリゴデオキシリボヌクレオチド 10：グリセロール骨格を有する修飾ヘキサヌクレオチドの抗HIV-1活性および安定性」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):243-52.

JP10113194; 1997年10月22日出願, 1998年5月6日公開, Donnelly, JJ ;Dwarki, VJ ;Liu, MA ;Montgomery, DL ;Parker, S ;Shiver, JW ;Ulmer JB, 「核酸調製法」

Kang SH, Sinhababu AK, Cho MJ, 2' - デオキシウリジン5' - 一リン酸のビス(ピバロイルオキシメチル)エステルの合成およびその生物学的活性」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jun;17(6):1089-98.

Krayevsky A, Arzumanov A, Shirokova E, Dyatkina N, Victorova L, Jasko M, Alexandrova L, 「三リン酸残基で修飾したdNTP：DNAポリメラーゼに対する基質特性およびヒト血清における安定性」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):681-93.

Krayevsky AA, Dyatkina NB, Semizarov DG, Victorova LS, Shirokova EA, Theil F, Von Janta Lipinski MJ, Gosselin G, Imbach JL, 「DNA生合成における修飾L-dNTPの基質活性の理由および限界」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):863-4.

Kvasyuk EI, Mikhailopulo IA, Suhadolnik RJ, Henderson EE, Muto NF, Iacono KT, Homon J, Pfeleiderer W, 「5' - 末端5' - アミノ - 5' - デオキシ - および5' - アミノ - 3', 5' - ジデオキシアデノシン誘導体を含む2', 5' - オリゴアデニル酸三量体の合成およびその生物学的活性」、Nucleosides Nucleotides 1999 Jun-Jul;18(6-7):1483-4.

Liu J, Skradis A, Kolar C, Kolath J, Anderson J, Lawson T, Talmadge J, G
meiner WH, 「5 - FUと比較したFdUMP[10]の増大した細胞毒性および減少したin
vivo毒性」、Nucleosides Nucleotides 1999 Aug;18(8):1789-802.

Lutz MJ, Will DW, Breipohl G, Benner SA, Uhlmann E, 「単荷電ペプチド核酸
(PNA)類似体の合成およびDNAポリメラーゼによる基質としてのその認識」、Nucl
eosides Nucleotides 1999 Mar;18(3):393-401.

Monaco V, van de Wetering KI, Meeuwenoord NJ, van den Elst HA, Stuivenbe
rg HR, Visse R, van der Kaaden JC, Moolenaar GF, Verhoeven EE, Goosen N,
van der Marel GA, van Boom JH, 「大腸菌におけるヌクレオチド切出し修復に
関する研究のための修飾DNA断片の合成および生物学的評価」、Nucleosides Nuc
leotides 1999 Jun-Jul;18(6-7):1339-41.

Morozova OV, Kolpashchikov DM, Ivanova TM, Godovikova TS, 「新規光架橋5
- C塩基置換UTP類似体の合成およびダニ媒介脳炎ウイルスRNAレプリカーゼタン
パク質の高選択的親和性標識におけるその適用」、Nucleosides Nucleotides 19
99 Jun-Jul;18(6-7):1513-4.

Nguyen-Ba N, Chan L, Quimpere M, Turcotte N, Lee N, Mitchell H, Bedard J
、 「強力な抗HCMV剤としてのヌクレオチド類似体の新規クラスの設計およびSAR
研究」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):821-7.

Pandolfi D, Rauzi F, Capobianco ML, 「3' - および5' - エキソヌクレアーゼに
対するオリゴヌクレオチドの安定性に関する異なる型の末端キャッピング修飾の
評価」、Nucleosides Nucleotides 1999 Sep;18(9):2051-69.

Pankiewicz KW, Lesiak-Watanabe K, 「強力な抗癌剤および細胞分化誘導剤とし
ての新規ミコフェノールアデニンビス(リン酸)」、Nucleosides Nucleotides 19
99 Apr-May;18(4-5):927-32.

Perrin DM, Garestier T, Helene C, 「核酸触媒の触媒レパートリーの拡張：ア
ンモニウムおよびイミダゾリル官能基を有する2つの修飾デオキシリボヌクレオ
シド三リン酸の同時組込み」、Nucleosides Nucleotides 1999 Mar;18(3):377-9
1.

Pfundheller HM, Koshkin AA, Olsen CE, Wengel J, 「2つの新規2' - O - メチル

修飾ヌクレオチドモノマーを含むオリゴヌクレオチドの評価：3' - C - アリルおよび2' - O, 3' - C結合二員環誘導体」、Nucleosides Nucleotides 1999 Sep;18(9):2017-30.

Ramasamy KS, Stoisavljevic V, 「非環式アミノアルコールヌクレオシド類似体を含む修飾オリゴヌクレオチドの合成およびその生物物理学的研究」、Nucleosides Nucleotides 1999 Aug;18(8):1845-61.

Schinazi RF, Lesnikowski ZJ, 「ハウ素含有オリゴヌクレオチド」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):635-47.

Secrist JA 3世, Parker WB, Allan PW, Bennett LL Jr, Waud WR, Truss JW, Fowler AT, Montgomery JA, Ealick SE, Wells AH, Gillespie GY, Gadi VK, Sorscher EJ, 「癌の遺伝子療法：大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼによるヌクレオシドプロドラッグの活性化」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):745-57.

Shirokova EA, Shipitsin AV, Victorova LS, Dyatkina NB, Goryunova LE, Bealashvili RS, Hamilton CJ, Roberts SM, Krayevsky AA, 「新型抗ウイルス剤としての修飾ヌクレオシド5' - 三リン酸」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):1027-8.

Srivastava TK, Friedhoff P, Pingoud A, Katti SB, 「セラチア菌エンドヌクレアーゼによるホスホジエステル加水分解に関する研究におけるメチルホスホン酸オリゴヌクレオシドの応用」、Nucleosides Nucleotides 1999 Sep;18(9):1945-60.

Stattel JM, Yanachkov I, Wright GE, 「N²-(p-n-ブチルフェニル)-2'-デオキシグアノシン5'-(α , β - イミド)三リン酸(BuPdGMPNHPP)の合成および生化学的研究：BファミリーDNAポリメラーゼの非基質阻害剤」、Nucleosides Nucleotides 1998 Aug;17(8):1505-13.

Terato H, Morita H, Ohyama Y, Ide H, 「水溶液におけるシステイン誘導体による5 - ホルミルウラシルの新規改変」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):131-41.

Tomikawa A, Seno M, Sato-Kiyotaki K, Ohtsuki C, Hirai T, Yamaguchi T, Ka

waguchi T, Yoshida S, Saneyoshi M, 「合成ヌクレオシドおよびヌクレオチド. 40;9-(β -D-アラビノフラノシル)-2-(p-n-ブチルアニリノ)アデニン 5'-三リン酸 (BuAaraATP)およびその2'-upアジド類似体による真核生物DNAポリメラーゼ α の選択的阻害：合成および酵素的評価」、Nucleosides Nucleotides 1998 Jan-Mar;17(1-3):487-501.

米国特許第5,580,859号；1994年3月18日出願，1996年12月3日発行．Felgner, PL. ;Wolff, JA. ;Rhodes, GH. ;Malone, RW. ;Carson, DA., 「哺乳動物における外因性DNA配列の送達」

米国特許第5,589,466号；1995年1月26日出願，1996年12月31日発行．Felgner, P L. ;Wolff, JA. ;Rhodes, GH. ;Malone, RW. ;Carson, DA., 「DNA配列の注入による哺乳動物における保護免疫応答の誘導」

米国特許第5,641,665号；1994年11月28日出願，1997年6月24日発行．Hobart, PM. ;Margalith, M ;Parker, SE. ;Khatibi, S, 「IL-2の発現に適したプラスミド」

米国特許第5,693,622号；1995年6月7日出願，1997年12月2日発行．Wolff, JA. ;Duke, DJ. ;Felgner, PL., 「哺乳動物の心筋における外因性ポリヌクレオチド配列の発現」

米国特許第5,703,055号；1994年1月26日出願，1997年12月30日発行．Felgner, P L. ;Wolff, JA ;Rhodes, GH. ;Malone, RW ;Carson, DA., 「脂質媒介性DNA送達による抗体の作製」

米国特許第5,846,946号；1996年6月14日出願，1998年12月8日発行．Huebner, RC. ;Norman, JA. ;Liang, X ;Carner, KR. ;Barbour, AG. ;Luke, CJ., 「ボレリアDNAを投与するための組成物および方法」

米国特許第5,910,488号；1995年12月1日出願，1999年6月8日発行．Nabel, GJ. ;Nabel, EG. ;Lew, D ;Marquet, M, 「遺伝子療法に適したプラスミド」

Victorova LS, Semizarov DG, Shirokova EA, Alexandrova LA, Arzumanov AA, Jasko MV, Krayevsky AA, 「ヒトDNAポリメラーゼおよびレトロウイルス逆転写酵素：三リン酸残基で修飾されたdNTPsに関する選択性」、Nucleosides Nucleotides 1999 Apr-May;18(4-5):1031-2.

von Janta-Lipinski M, Gaertner K, Lehmann C, Scheer H, Schildt J, Matthes E, 「修飾オリゴヌクレオチドに対する標的としてのヒトテロメラーゼのタンパク質およびRNA」、Nucleosides Nucleotides 1999 Jun-Jul;18(6-7):1719-20 W09011092; 1990年3月21日出願, 1990年10月4日A1公開. Felgner, PL. ;Wolff, JA;Rhodes, GH. ;Malone, RW ;Carson, DA., 「脊椎動物における外因性ポリヌクレオチド配列の発現」

W09314778; 1993年1月21日, 1993年8月5日A1公開. Rhodes, GH. ;Dwarki, VJ.;Felgner, PL;Wang-Felgner, J;Manthorpe, M, 「ex vivoにおける遺伝子導入」 W09421797; 1994年3月14日, 1994年9月29日A1公開. Donnelly, JJ. ;Dwarki, VJ. ;Liu, MA. ;Montgomery, DL. ;Parker, SE. ;Shiver, JW. ;Ulmer, JB., 「核酸医薬」

W09633736; 1996年4月26日出願, 1996年10月31日A1公開. Baruch DI; Pasloske BL; Howard, RJ, 「マラリアペプチドおよびワクチン」

W09735992; 1997年3月17日出願, 1997年10月2日A1公開. Hobart, PM. ;Liang, X, 「テトラサイクリン誘導／抑制系」

W09926663; 1998年11月20日出願, 1999年6月3日A2公開. Horton, H ;Parker, S; Manthorpe, M; Felgner, P, 「サイトカイン発現ポリヌクレオチドおよびそのための組成物を用いた癌の治療」

W09941368; 1999年2月10日出願, 1999年8月19日A2公開. Punnonen J, Stemmer W P, Whalen RG; Howard, R, 「遺伝子ワクチンの免疫調節特性の最適化」

W09941369; 1999年2月10日出願, 1999年8月19日A2公開. Punnonen J, Stemmer W P, Whalen RG; Howard, R, 「遺伝子ワクチンベクター工学」

W09941383; 1999年2月10日出願, 1999年8月19日A1公開. Punnonen J, Bass, SH, Whalen, RG, Howard, R, Stemmer, WP, 「抗原ライブラリー免疫感作」

W09941402; 1999年2月10日出願, 1999年8月19日A2公開. Punnonen J, Stemmer, WP, Howard R, Patten PA, 「遺伝子ワクチンベクターのターゲッティング」

【図面の簡単な説明】

【図1】

エキソヌクレアーゼ活性。図1は、酵素エキソヌクレアーゼIIIの活性を示す

。これは、ポリヌクレオチドビルディングブロックをシャッフル、集合、再集合、再結合および／または連鎖（concatenate）させるのに用い得る典型的な酵素である。星印は、この酵素が該ポリヌクレオチド基質の3'方向から5'方向へと作用することを表わしている。

【図2】

ポリメラーゼに基づく増幅による核酸ビルディングブロックの作製。図2は、ポリメラーゼに基づく増幅反応（例えば、PCR）を用いた、2つの突出部を有する二本鎖核酸ビルディングブロックの作製方法を示す。図示のように、第1のプライマーセット（F2およびR1）を用いる第1のポリメラーゼに基づく増幅反応を用いて、平滑末端化した産物（反応1、産物1と記載）が得られ、これは本質的に産物Aと同一である。第2のプライマーセット（F1およびR2）を用いる第2のポリメラーゼに基づく増幅反応を用いて、平滑末端化した産物（反応2、産物2と記載）が得られ、これは本質的に産物Bと同一である。次に、これら2つの産物を混合し、融解およびアニーリングさせて、有用である可能性のある、2つの突出部を有する二本鎖核酸ビルディングブロックを得る。図1の例において、3'作用性エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼIII）を用いた他の3つの産物のヌクレアーゼに基づく分解により、3'突出部を有する産物（産物C）が選択される。図示のように、用い得るプライマーが重複してもよいこと、そしてさらに、用い得るプライマーが異なる長さであってもよいことを示すために、代替のプライマーを括弧内に示す。

【図3】

ユニークな突出部およびユニークなカップリング（coupling）。図3は、各サイズのユニークな突出部の数（例えば、1個または2個または3個などのヌクレオチドからなるユニークな突出部の総数）が、そのサイズのユニークな突出部全てを用いて生じる可能性があるユニークなカップリングの数を超えることを示す。例えば、単一のヌクレオチドからなるユニークな3'突出部が4つ、および単一のヌクレオチドからなるユニークな5'突出部が4つある。しかし、これら8つのユニークな単一ヌクレオチドの3'突出部および単一ヌクレオチドの5'突出部の全てを用いて作製可能なユニークなカップリングの総数は4つである。

【図4】

ビルディングブロックを逐次カップリングすることにより達成されるユニークな全体的集合順序。 図4は、全部で n 個の核酸ビルディングブロックを集合させるためには、 $n-1$ 個のカップリングが必要である、という事実を示す。しかし、使用において可能なユニークなカップリングの数が $n-1$ の値よりも少ない場合もある。これらおよびその他の状況から鑑みて、ストリンジェントな非確率論的な全体的集合順序は、一連のステップにおいて集合プロセスを実施することによっても達成可能である。この例では、5つの核酸ビルディングブロックについて設計された全体的集合順序を達成するために、2つの連続するステップが用いられる。この説明では、その5つの核酸ビルディングブロックについて設計された全体的集合順序は、 $5'-(\#1-\#2-\#3-\#4-\#5)-3'$ （ここで、 $\#1$ はビルディングブロック番号1を表わす、等々）である。

【図5】

ヌクレオチド2個からなる $3'$ 突出部を用いて可能なユニークなカップリング。図5はさらに、各サイズのユニークな突出部の数（ここでは、例えば、ヌクレオチド2個からなるユニークな突出部の総数）が、そのサイズのユニークな突出部全てを用いて生じる可能性のあるユニークなカップリングの数を超えることを示す。例えば、図示するように、2個のヌクレオチドからなるユニークな $3'$ 突出部が16、および2個のヌクレオチドからなるユニーク $5'$ 突出部が別に16、合計で32ある。しかし、これら32のユニークなヌクレオチド2個の $3'$ 突出部およびヌクレオチド2個の $5'$ 突出部の全てを用いて作製可能なユニークで非自己結合性のカップリングの総数は12である。幾つかの明らかにユニークなカップリングは「同一のツイン」を有し（同じ陰影付でマークしてある）、この図において視覚的にすぐわかる。さらに別の突出部は、図示のように、そしてこの図中で表示されているように、パリンドロームのような様式で自己結合し得るヌクレオチド配列を含む。したがって、それらは、全体的集合順序に高いストリンジェンシーをもたらさない。

【図6】

合成連結再集合によるキメラの組合せを網羅するセット (exhaustive set) の

作製。図6は、本例で設計される核酸ビルディングブロックの可能性のある全ての組合せを網羅的かつ系統的に作製する能力における本発明の効果を明確に示すものである。特に子孫キメラ分子の大きなセット（またはライブラリー）を作製することができる。この方法は網羅的かつ系統的に実施することができるので、この方法の適用は、新たな境界点（demarcation points）を選び、それに対応して新たに設計した核酸ビルディングブロックを用いることにより繰り返すことが可能であり、前に検討されて排除された分子種を再度作製し再度スクリーニングするという負担がなくなる。コドンの揺らぎを用いて、境界点の頻度を有利に増大させることができることが理解される。つまり、コドンの縮重のために、前駆コドン（つまり、ここで改変されているコドン）によりコードされるアミノ酸を改変させることなしに、特定の塩基を核酸ビルディングブロックに置き換えることがしばしば可能である。図示のように、境界点は、8つの前駆鋳型のアラインメント上で選ぶ。次に、突出部を含む核酸ビルディングブロック（順序どおりのカップリングの形成に用い得る）を設計し、合成する。この例では、8つの前駆鋳型の各々の配列に基づいて18の核酸ビルディングブロックが作製され、全部で144の核酸ビルディングブロック（すなわち、二本鎖オリゴ）が得られる。次に、連結合成手法を行うことにより、収量が 8^{18} 個（つまり、 1.8×10^{16} 個を超える数）のキメラを含む子孫分子のライブラリーが得られる。

【図7】

オリゴからの合成遺伝子。本発明の1つの実施形態によれば、複数の前駆核酸鋳型のアラインメントをとることにより、二本鎖核酸ビルディングブロックが設計される。好ましくは、これらの鋳型は、ある程度の相同性およびある程度の異種性（heterology）を含む。該核酸は、関連酵素のような近縁タンパク質をコードし得るものであり、その関係は機能もしくは構造またはそれらの双方に基づき得る。図7は、3つのポリヌクレオチド前駆鋳型のアラインメント、および全ての前駆分子に共通する境界点（四角枠で囲む）の選択を示す。この特定の例では、該前駆鋳型の各々から誘導された核酸ビルディングブロックは、長さが約30～50ヌクレオチドとなるように選択した。

【図8】

合成連結遺伝子再集合のための核酸ビルディングブロック。図8は、図7の例からの核酸ビルディングブロックを示す。ここでは、核酸ビルディングブロックは、それらの互換性の突出部（5'突出部および3'突出部の両方を含む）と共に概略的に示している。3つの前駆鋳型の各々から誘導された核酸ビルディングブロックが全部で22ある。したがって、連結合成手段により、収量が 3^{22} 個（つまり 3.1×10^{10} 個を超える数）のキメラを含む子孫分子のライブラリーを作製することができる。

【図9】

合成連結再集合によるイントロンの付加。図9は、核酸ビルディングブロックによりイントロンがキメラ子孫分子に導入され得ることを概略的に示す。イントロンは、それら自体を作動性にするために、両末端にコンセンサス配列を持つ場合が多いことが理解される。また、イントロンは、遺伝子のスプライシングを可能にすることに加えて、他の核酸に相同な部位を提供して相同組換えを可能にする、という別の目的にも役立つことが理解される。この目的のために、そしておそらく他の目的のために、イントロンを導入するための大きな核酸ビルディングブロックを作製することが望ましい場合もある。そのサイズが非常に大きくて、2本の一本鎖オリゴの直接的な化学合成により容易に作製される場合には、そのような特殊化した核酸ビルディングブロックはまた、2本より多い一本鎖オリゴの直接的な化学合成により、または本明細書に例示、記載、および／または引用される（そして参照により本明細書中に組み入れられる）ポリメラーゼに基づく増幅反応を用いることにより作製してもよい。

【図10】

突出部のヌクレオチド全部を用いない連結再集合。図10は、カップリングが、関係する突出部の全てのヌクレオチドを用いない様式で起こることを示す。このカップリングは、リガーゼ酵素で処理することにより補強されて「ギャップ連結」または「ギャップ形成連結(gapped ligation)」と呼べるものを形成した場合に、（例えば、形質転換した宿主内で）特に活発に生存する。示されるように、このタイプのカップリングは、望ましくないバックグラウンド産物の生成となる可能性があるが、設計された連結再集合により得られる子孫ライブラリーの多様

性を有利に増大させることにも用い得ることが理解される。

【図11】

パリンドローム様カップリングにおける望ましくない自己連結の防止。 上述し、本明細書に例示、記載、および／または引用されるように（そして参照により本明細書に組み入れられる）、ある特定の突出部は自己カップリングを受けて、パリンドローム様のカップリングを形成する可能性がある。カップリングは、リガーゼ酵素で処理することにより補強されると、実質的に強化される。したがって、示すように、これらの突出部における5'リン酸の欠如は、このタイプのパリンドローム様自己連結を有利に防止するのに用い得ることが理解される。したがって、本発明は、連結再集合プロセスにおけるパリンドローム様自己連結を防止するために、5'リン酸基が欠損した（あるいは、それらは、例えば仔ウシ腸アルカリホスファターゼ（CIAP）のようなホスファターゼ酵素で処理することにより除去できる）、化学的に作製（または並べることが）できる核酸ビルディングブロックを提供する。

【図12】

ポリメラーゼベースの伸長による部位特異的突然変異誘発。
パネルA。 この図は、多くの部位特異的突然変異誘発法のうち、部位飽和突然変異誘発を実施するのに用い得る1つの部位特異的突然変異誘発法を示す。セクション(1)は、閉じた環状二本鎖プラスミドにアニーリングさせた第1および第2の突然変異誘発性プライマーを示す。点および開いた側にある三角は、この突然変異誘発性プライマー内の突然変異誘発部位を表わす。矢印は合成の方向を表わす。セクション(2)は、互いにアニーリングした、新たに合成された（突然変異を起こした）DNA鎖を示す。親DNAは選択酵素で処理可能である。これらの突然変異を起こしたDNA鎖は、アニーリングされて突然変異を起こした二本鎖環状DNA中間体を形成している様子が示されている。点および開いた側にある三角は、この実験的に作製された子孫（突然変異を起こした）DNA鎖内の突然変異誘発部位を表わす。この突然変異を起こしたDNA鎖上の互い違いに配置されている開口部分が「付着」末端を形成していることに注目されたい。セクション(3)は、セクション(2)の突然変異を起こしたDNA鎖にアニーリングさせた第1および第2の突然変異

誘発プライマーを示す。矢印は合成の方向を示す。この突然変異を起こしたDNA鎖の各々の鎖上の開口部分（すなわち、それらは連結されていないこと）に注目されたい。セクション(4)は、「ギャップ形成産物」を示しており、これは、鋳型として突然変異を起こしたDNA鎖（ステップ(2)で示すもの）を用いて合成される、第2世代の突然変異を起こしたDNA鎖から構成される。これらの「ギャップ形成産物」のDNA鎖は、アニーリングされて突然変異を起こした二本鎖環状DNA中間体を形成している様子が示されている。点および開いた側にある三角は、この突然変異を起こしたDNA鎖内の突然変異誘発部位を表わす。その突然変異を起こしたDNA鎖の各々にある大きなギャップに注目されたい。セクション(5)は、親（突然変異を起こしていない）プラスミドにアニーリングさせた「ギャップ形成産物」を示し、ポリメラーゼベースの合成が起こり得るようになっている。矢印は合成の方向を示す。セクション(6)は、新たに合成されたDNA鎖同士がアニーリングされて突然変異を起こした二本鎖環状DNA産物を形成している様子が示されている。点および開いた側にある三角は、この突然変異を起こしたDNA鎖内の突然変異誘発部位を表わす。突然変異を起こしたDNA鎖上の互い違いに配置されている開口部分に注目されたい。また、突然変異を起こしたDNA鎖の各々にある両者の突然変異誘発部位の存在にも注目されたい。

パネルB。この図は、図12Aの増幅ステップから得られる、可能性のある2つの分子構造を示す。分子(A)は、図12Aのセクション(2)にも示されている。分子(B)は、図12Aのセクション(6)にも示されている。

【図13】

ポリメラーゼベースの伸長およびリガーゼに基づく連結による部位特異的突然変異誘発。

パネルA。この図は、多くの部位特異的突然変異誘発法のうち、部位飽和突然変異誘発を実施するのに用い得る1つの部位特異的突然変異誘発法を示す。セクション(1)は、閉じた環状二本鎖プラスミドにアニーリングさせた第1および第2の突然変異誘発プライマーを示す。点および開いた側にある三角は、この突然変異誘発プライマー内の突然変異誘発部位を表わす。矢印は合成の方向を表わす。セクション(2)は、互いにアニーリングした、新たに合成された（突然変異を起こ

した) DNA鎖を示す。親DNAは選択酵素で処理可能である。これらの突然変異を起こしたDNA鎖は、アニーリングされて突然変異を起こした二本鎖環状DNA中間体を形成している様子が示されている。点および開いた側にある三角は、この実験的に作製された子孫(突然変異を起こした) DNA鎖内の突然変異誘発部位を表わす。この突然変異を起こしたDNA鎖上の互い違いに配置されている開口部分が「付着」末端を形成していることに注目されたい。セクション(3)は、セクション(2)の突然変異を起こした二本鎖環状DNA中間体を(例えばT4 DNAリガーゼで)連結した後で生じる、結果的に得られる突然変異を起こした二本鎖環状DNA分子を示す。セクション(4)は、セクション(3)の突然変異を起こしたDNA鎖にアニーリングさせた第1および第2の突然変異誘発プライマーを示す。矢印は合成の方向を示す。セクション(5)は、新たに得られた(青色)突然変異を起こしたDNA鎖が、アニーリングされて突然変異を起こした二本鎖環状DNA中間体を形成している様子を示している。点および開いた側にある三角は、該新たに得られた突然変異を起こしたDNA鎖(青色)内の突然変異誘発部位を表わす。突然変異を起こしたDNA鎖上の互い違いに配置されている開口部分が「付着」末端を形成していることに注目されたい。また、2つの新たに得られた突然変異を起こしたDNA鎖(青色)の各々にある両者の突然変異誘発部位の存在にも注目されたい。突然変異を起こしたDNA鎖の各々にある開口部分(すなわち、それらは連結されていない)に注目されたい。セクション(6)は、セクション(5)の突然変異を起こした二本鎖環状DNA中間体を(例えばT4 DNAリガーゼを用いて)連結した後で生じる、結果として得られる突然変異を起こした二本鎖環状DNA分子を示す。点および開いた側にある三角は、この突然変異を起こしたDNA分子内の突然変異誘発部位を表わす。ここでもまた、突然変異を起こしたDNA鎖の各々にある両者の突然変異部位の存在に注目されたい。

パネルB。この図は、図13Aの増幅ステップから得られる、2つの分子構造を示す。分子(A)は、図13Aのセクション(3)にも示されている。分子(B)は、図13Aのセクション(6)で得られる。

【図14】

遺伝的ワクチンの侵入を容易にする核酸結合タンパク質を取得および使用する

ための戦略。

ここで示すものは、標的細胞への遺伝的ワクチン、特にむき出しのDNA、の侵入を容易にする核酸結合タンパク質を取得および使用するための戦略である。本明細書中に記載の定方向進化法により得られるライブラリーのメンバーは、M13タンパク質VIIIのコード領域に結合し、融合タンパク質がファージ粒子の表面に展示される。目的の標的組織に効率的に侵入するファージを同定し、次に、その融合タンパク質を用いて遺伝的ワクチン核酸をコーティングする。

【図15】

複数の抗原由来の免疫原性領域を有するキメラ多価抗原の作製方法の概略図。

非キメラ親免疫原性ポリペプチドの各々に対する抗体は、それぞれの生物（A、B、C）に特異的である。しかし、本発明の定方向進化および選択の方法を行った後では、これら3種の親免疫原性ポリペプチドの各々に対して生起される抗体により認識されるキメラ免疫原性ポリペプチドが得られる。

【図16】

広範囲の免疫反応を誘導可能な非確率論的に生成されるポリペプチドの取得方法。

ここで示すものは、広範囲の免疫反応を誘導可能な、非確率論的に生成されたポリペプチドを取得できる方法の概略である。図16Aにおいて、病原体A、BおよびC由来の野生型免疫原性ポリペプチドは、対応する病原体（該ポリペプチドが由来する）に対して防御をもたらすが、他の病原体に対する交差防御（cross-protection）はほとんど、または全くもたらさない（左のパネル）。進化させた後、3種の病原体のタイプ全てに対して防御的免疫反応を誘導することのできるA/B/Cキメラポリペプチドが得られる（右のパネル）。図16Bでは、2種の病原体株（A、B）に由来する基質核酸を用いた定方向進化が用いられており、これらの核酸は対応する病原体に対してのみ防御的であるポリペプチドをコードする。定方向進化の後、得られたキメラポリペプチドは、これら2種の親病原体株だけでなく第3の病原体株（C）に対しても有効な免疫反応を誘導できる。

【図17】

特定のポリヌクレオチドが所望の特性を有する免疫原性ポリペプチドをコード

するか否かを判定可能な因子。

ここで示すものは、特定のポリヌクレオチドが所望の特性（例えば、増大した免疫原性および／または交差反応性）を有する免疫原性ポリペプチドをコードするか否かを判定することができる可能性のある因子の幾つかである。特定の特性に正の影響を及ぼす配列領域は抗原遺伝子に沿ってプラスの印で示し、負の作用を及ぼす配列領域はマイナスの印で示す。近縁の抗原遺伝子のプールは、本明細書に記載の方法を用いて非確率論的に生成され、スクリーニングして、正の配列領域を獲得し、負の領域は損失している進化させた核酸を得る。特定の特性（trait）に関してどの領域が正または負であるのか、についての既存の知識は全く必要ない。

【図18】

抗原ライブラリースクリーニングのためのスクリーニング方法。

ここで示すものは、抗原ライブラリースクリーニングのためのスクリーニング方法の概略図である。

【図19】

抗原ライブラリースクリーニングで用いられるプールおよびデコンボリュートする（deconvolution）ための方法。

ここで示すものは、抗原ライブラリースクリーニングで用いられるプールおよびデコンボリュートする（deconvolution）ための方法の概略図である。

【図20】

部位飽和突然変異誘発の好ましい実施形態。

【図21】

マルチモジュール遺伝的ワクチンベクターの概略図。

ここで示すものは、マルチモジュール遺伝的ワクチンベクターの概略図である。典型的な遺伝的ワクチンベクターは、示すような成分を1つ以上含み、該成分の各々は生来のものであってもよいし、あるいは本明細書に記載の定方向進化法を用いて最適化されていてもよい。これらの定方向進化法は、本明細書に記載の「遺伝子部位飽和突然変異誘発」を含む、確率論的方法および／または非確率論的方法による点突然変異の導入を含み得る。これらの定方向進化法はまた、例えば

(米国特許第5965408号に記載のような)断続的な合成(interrupted synthesis)による、確率論的ポリヌクレオチド再集合法も含み得る。これらの定方向進化法はまた、本明細書に記載の合成連結ポリヌクレオチド再集合を含む、本明細書に記載の非確率論的ポリヌクレオチド再集合法も含み得る。上記成分は、同一のワクチンベクター上に存在してもよいし、あるいは別個の分子として遺伝的ワクチン中に含まれていてもよい。

【図22】

複数のT細胞エピトープを有するベクターの作製。ここで示すものは、例えば定方向進化により得られる複数のT細胞エピトープを含むベクターを作製するための2つの異なる方法である。図60Aでは、非確率論的に生成されたエピトープをコードする遺伝子の各々が単一のプロモーターに連結されており、複数のプロモーター-エピトープ遺伝子構築体が単一のベクターに配置される。本明細書に例示、記載、および／または引用されている(参照により本明細書に組み入れられるものを含む)スキームは、複数のエピトープをコードする遺伝子を単一のプロモーターに連結することを含む。

【図23】

定方向進化による最適化された遺伝的ワクチンの生成。ここで示すものは、最適化された遺伝的ワクチンの生成への定方向進化の適用の図である。既知の機能的特性(例えば、調節、コード、など)を有するポリペプチドの様々な形態を進化させ、スクリーニングして、遺伝的ワクチンとしての使用にとって向上した特性を示す変異体を同定する。

【図24】

フローサイトメトリーによるスクリーニング法の一例としての、定方向進化および進化させたプロモーター配列の選択の反復的な適用。ここで示すものは、本明細書に記載の定方向進化法の反復的適用を用いて進化させた最適化プロモーター配列を選択するための、フローサイトメトリーによるスクリーニング方法(FACS)の図である。例として、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを用いる。

【図25】

皮膚および筋肉のマイクロインジェクションのための装置。ここで示すものは、皮膚および筋肉のような組織への遺伝的ワクチンおよび他の試薬のマイクロインジェクションに適する装置である。この装置は、多数の物質をin vivoでスクリーニングするのに特に有用であり、96ウェル形式をベースとしている。この装置の先端は、該先端がマイクロタイタープレートに適合するよう調節可能なように可動式になっている。プレートから目的の試薬を得た後、該先端は約2～3mmの距離だけ離れるように調節されて、96個の異なるサンプルが約1.6cm×2.4cmから約2.4cm×3.6cmの領域への移動を可能にする。所望により、移動させる各サンプルの容量は電子的に制御できる。典型的には、移動させる容量は約2 μ lから約5 μ lの範囲である。各試薬はマーカー物質または色素と混合して、組織内の注射部位が容易に認知されるようにしてもよい。例えば、異なるサイズおよび形状の金粒子を目的の試薬と混合し、顕微鏡および免疫組織化学を用いて各注射部位を同定したり、各試薬により誘導される反応を調べることができる。筋肉組織に注射した場合、注射部位はまず外科的手術により明らかになる。

【図26】

ポリヌクレオチド再集合。パネルAに示すのは、定方向進化の一例である。この図では、ウイルスのn種の異なる株を用いているが、この方法は、あらゆる単一核酸、ならびに、それに関して異なる株、種または遺伝子ファミリーが、他の相同な核酸と比較して1以上のヌクレオチド変化を有する相同な核酸を有する、あらゆる核酸に適用可能である。この異なる変異核酸は実験的に、好ましくは本明細書に記載のように非確率論的に生成され、所望の特性を示す変異体を同定するためにスクリーニングまたは選択される。この定方向進化法およびスクリーニングは、さらなる改良を達成するために、1回以上繰り返してよい。パネルBは、定方向進化を連続ラウンド行うことにより、特性を徐々に増大し得ること、および、個々の有益な突然変異を組合せることにより、個々の有益な突然変異によってのみ達成される改良と比べて増大した改良を導き得ること、を示している。

【図27】

プロモーター進化のためのベクター。ここで示すものは、本明細書に記載の定方向進化法を用いて進化させたプロモーター核酸のライブラリーから改良された

プロモーターを同定するためのスクリーニングに有用なベクターの一例である。実験的に作製された推定プロモーターをベクターに、発現を容易に検出するためのレポーター遺伝子の上流において挿入する。多くの適用では、高レベルのレポーター遺伝子を発現する細胞が、該レポーター遺伝子産物を用いたフローサイトメトリーによるセルソーティングを用いて分別されるように、レポーター遺伝子の産物は細胞表面タンパク質であることが望ましい。好適なレポーター遺伝子の例としては、例えば、B7-2およびmAb179エピトープが含まれる。ポリアデニル化領域は典型的には、レポーター遺伝子の下流に配置される（SV40のポリAが図示されている）。このベクターはまた、第2のレポーター遺伝子、つまり内部コントロール（GFP；緑色蛍光タンパク質）を含み得る。この遺伝子はプロモーター（SR p）に連結される。このベクターはまた、典型的には、選択マーカー（カナマイシン／ネオマイシン耐性が示されている）および哺乳動物細胞内（SV40 ori）および／または細菌細胞内（pUC ori）で機能性な複製起点も含む。

【図28】

定方向進化およびフローサイトメトリーによる選択を用いた誘導性プロモーターの反復進化。ここで示すものは、本明細書に記載の定方向進化法およびフローサイトメトリーによる選択を用いた誘導性プロモーターの反復進化のスキームの図である。適当なベクターに存在する、実験的に作製した（すなわち、本明細書に記載の1以上の定方向進化法により生成した）プロモーター核酸のライブラリーを細胞にトランスフェクトし、非誘導条件下で増殖させた場合に最も低いマーカー抗原の発現を示す細胞を選択する。ベクター（および／またはそれらを含む細胞）を回収し、該ベクターを細胞に導入し（既に細胞に含まれていない場合）、誘導的条件下で増殖させる。最も高レベルのマーカー抗原を発現する細胞を選択する。

【図29】

経口、静脈内、筋肉内、皮内、肛門内、腔内または局所的送達のための遺伝的ワクチンベクターの進化。図示しているものは、各種の組織の所望のターゲティングのためにM13ライブラリー（例えば、本明細書に記載の定方向進化を用いて実験的に作製されたもの）をスクリーニングするための方法である。ここで示

す特定の例は、改良された経口送達用の遺伝的ワクチンベクターを進化させるための方法の概略図である。これは、胃の酸性条件下での安定性および消化管の他の分解因子に対する耐性に関して選択することを含み得る。この図示している特定の例は、改良された経口送達のためのスクリーニングに関するものであるが、静脈内、筋肉内、皮内、肛門内、腔内または局所的を含む他の経路で投与されたライブラリーにも同じ原理を適用する。試験動物に送達した後、M13ファージ（またはその産物）を関心のある組織から回収する。さらなる最適化を達成するために、この手法を繰り返してもよい。

【図30】

2種のヒトCMV株および1種のサル系統のヌクレオチド配列のアラインメント

。ここで示すものは、2種のヒト・サイトメガロウイルス（CMV）株および1種のサル（アカゲザル）系統のヌクレオチド配列のアラインメントである。このアラインメントは、非確率論的ポリヌクレオチド再集合の実施に用い得る。2つの配列間で共通するヌクレオチド配列は青字とし、3つの配列間で共通するヌクレオチド配列は赤字として、再集合点の好ましい（しかし非限定的な）例を示している。

【図31】

3種の種（ヒト、霊長類およびイヌ科）由来のIL-4のヌクレオチド配列のア

ラインメント。ここで示すものは、ヒト、イヌおよび霊長類の種のIL-4のヌクレオチド配列のアラインメントである。このアラインメントは、非確率論的ポリヌクレオチド再集合の実施に用い得る。2つの配列間で共通するヌクレオチド配列は青字とし、3つの配列間で共通するヌクレオチド配列は赤字として、再集合点の好ましい（しかし非限定的な）例を示している。

【図32】

対応する推定ポリヌクレオチドを（in vivoまたはin vitroで）合成し、該推定ポリヌクレオチドを定方向進化に付し、続いて発現されるポリペプチドを発現スクリーニングすることによるポリペプチドの進化。

【図33】

オリゴにより指令されたCpGノックアウトの非確率論的再集合。ここで示すも

のは、不必要なCpG配列が欠損しており、有用な可能性のあるCpG配列が付加されており、かつ置き換え不可能なCpG配列が同定されているプロモーター配列を得るための、本明細書に記載の非確率論的方法の使用の概略図である。さらに、他の配列（CpG配列以外）は実施中のポリヌクレオチドにおいて置換、付加および／または欠失されていてもよい。

【図34】

HbsAgポリペプチド（PreS2+S領域）から得られるCTISの例。ここで示すものは、HBsAgポリペプチド（PreS2+S領域）から得られる細胞傷害性T細胞誘導配列（CTIS）の例である。

【図35】

細胞質部分に結合させた異種エпитープを有するCTIS。ここで示すものは、細胞質部分に結合させた異種エпитープを有するCTISである。

【図36】

免疫原性アゴニスト配列（IAS）の調製方法。ここで示すものは、免疫原性アゴニスト配列（IAS）の調製方法である。関心のあるポリペプチドをコードする核酸の野生型（WT）および突然変異型を集合させ、非確率論的再集合に付して、可能性のあるアゴニスト配列を含むポリエпитープ領域をコードする核酸を得る。

【図37】

定方向進化を用いた免疫刺激配列（ISS）の改良。ここで示すものは、本明細書に記載の定方向進化法を用いた免疫刺激配列を改良するためのスキームである。オリゴヌクレオチドビルディングブロック（例えば、合成により作製されたもの）、既知のISSを有するオリゴ、CpG含有ヘキサマー、および／またはCpG含有ヘキサマーを含むオリゴ（ポリA、C、G、T等）を集合させることができる。次いで、その結果得られた分子は、本明細書に記載の1以上の定方向進化法に付してもよい。

【図38】

T細胞の増殖を誘導する能力が増大した組換えIL-12をコードするIL-12遺伝子を同定するためのスクリーニング。ここで示すものは、T細胞の増殖を誘導す

る能力が増大したIL-12の進化させた形態をコードする進化させたIL-12遺伝子を同定するために、実験的に作製された分子（例えば、非確率論的に作製されたヒトIL-12遺伝子のライブラリー）をスクリーニングできる手法の図である。

【図39】

異なるCD80変異体および／またはCD86変異体をコードする遺伝的ワクチンベクターによるT細胞の活性化またはアネルギーの誘導モデル。ここで示すものは、どのようにしてT細胞の活性化またはアネルギーが異なるB7-1（CD80）変異体および／またはB7-2（CD86）変異体をコードする遺伝的ワクチンベクターにより誘導され得るのか、を示すモデルである。

【図40】

T細胞の活性化またはアネルギーを誘導する能力が向上したCD80／CD86変異体のスクリーニング。ここで示すものは、T細胞の活性化またはアネルギーを誘導する能力が向上したCD80／CD86変異体を得るための、本明細書に記載の定方向進化の使用方法である。

【図41】

ヒトおよび霊長類の種からの、2種のCMV由来のヌクレオチド配列のアラインメント。ここで示すものは、ヒトおよび霊長類の種の、2種のCMV由来のヌクレオチド配列のアラインメントである。このアラインメントは、非確率論的ポリヌクレオチド再集合を実施するのに利用可能である。2つの配列間で共通するヌクレオチド配列は赤字として、再集合点の好ましい（しかし非限定的な）例を示している。

【図42】

ヒト、ネコ、齧歯類の種からの、IFN- γ ヌクレオチド配列のアラインメント。ここで示すものは、ヒト、ネコ、齧歯類の種からの、IFN- γ ヌクレオチド配列のアラインメントである。このアラインメントは、非確率論的ポリヌクレオチド再集合を実施するのに利用可能である。2つの配列間で共通するヌクレオチド配列は青字とし、3つの配列間で共通するヌクレオチド配列は赤字として、再集合点の好ましい（しかし非限定的な）例を示している。

【図1】

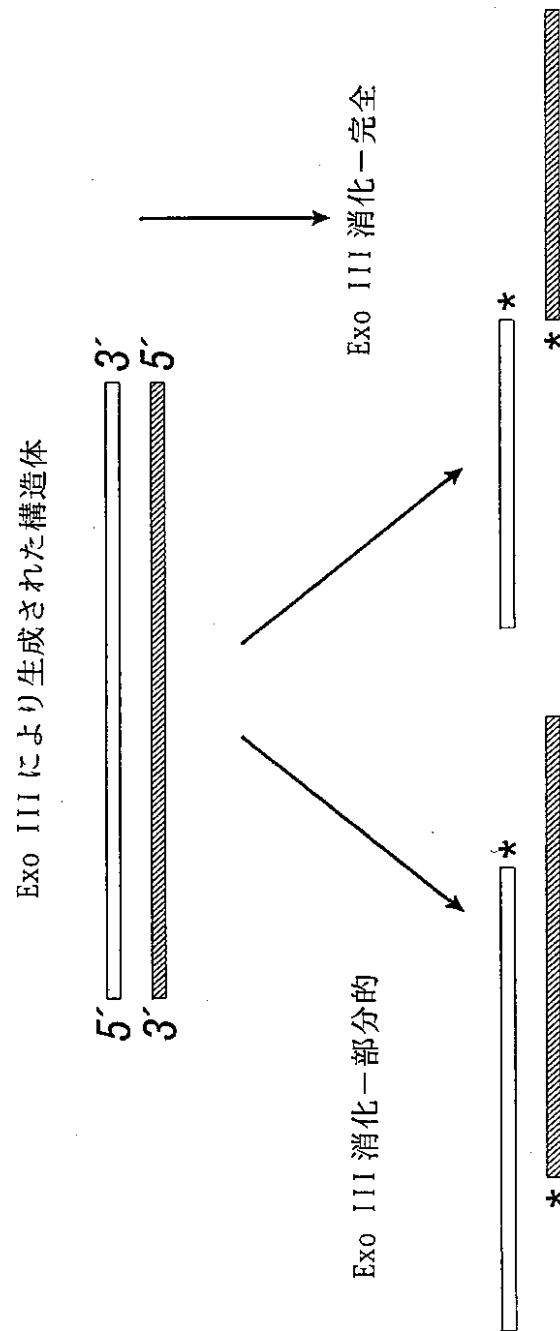


FIG. 1

【図2】

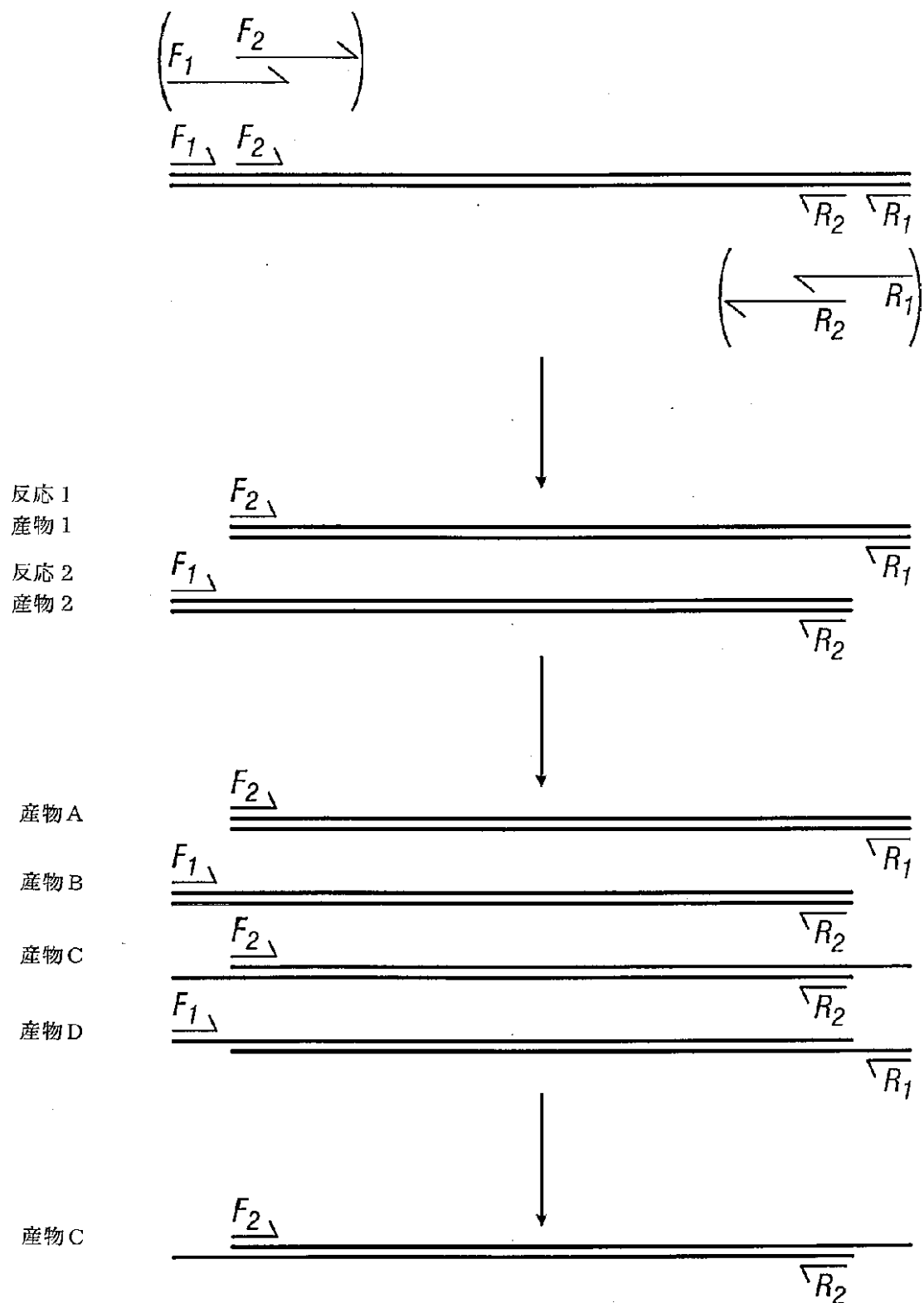
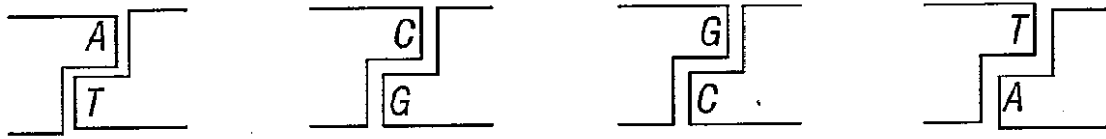


FIG. 2

【図3】

パネルA



パネルB



パネルC



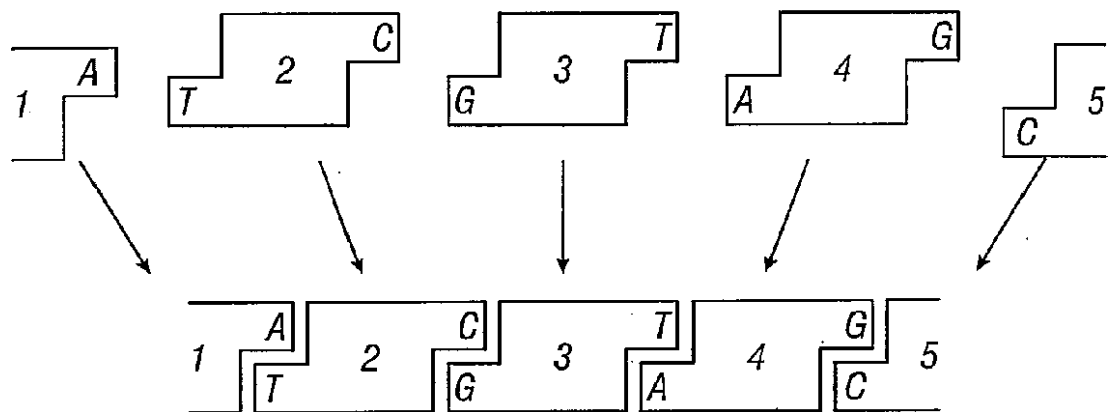
パネルD



FIG. 3

【図4A】

パネルA



パネルB



FIG. 4A

【図4B】

パネルC

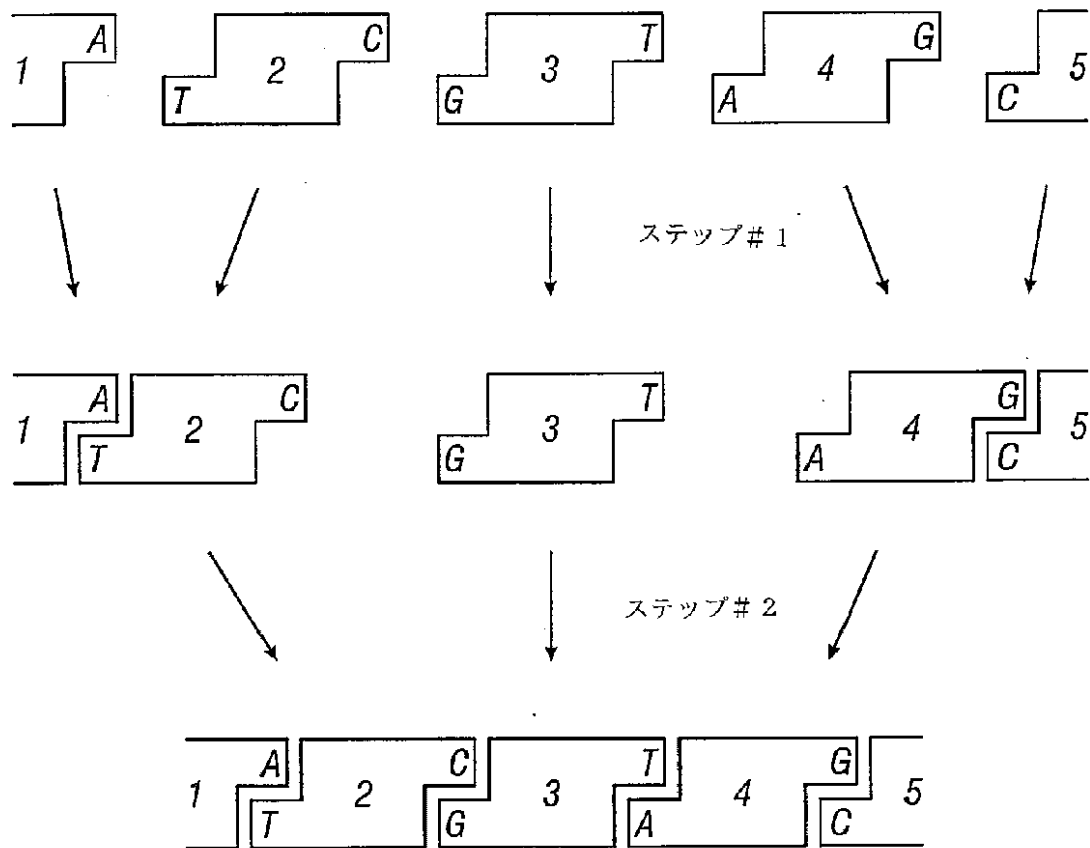


FIG. 4B

【図5】

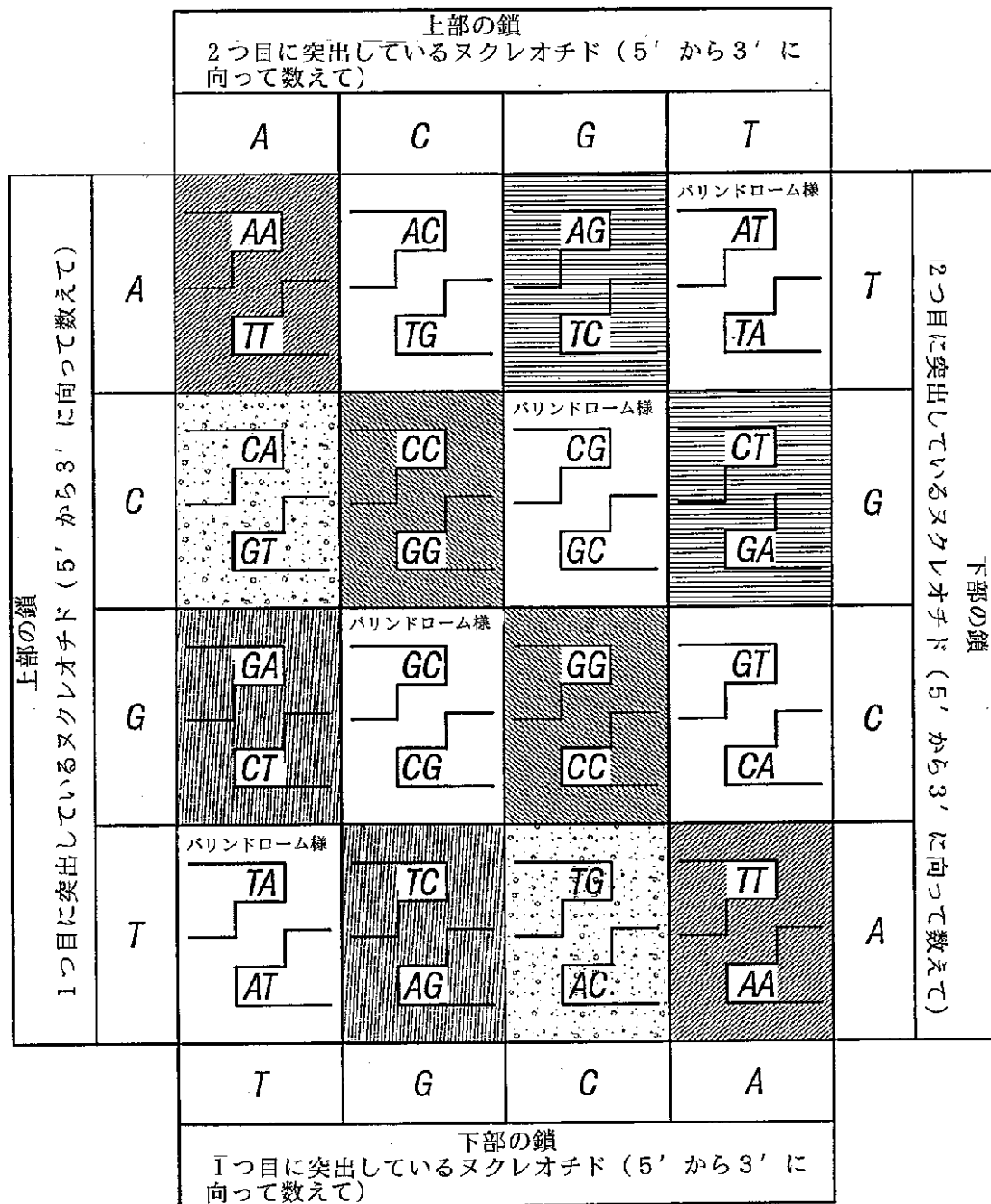


FIG. 5

【図6A】

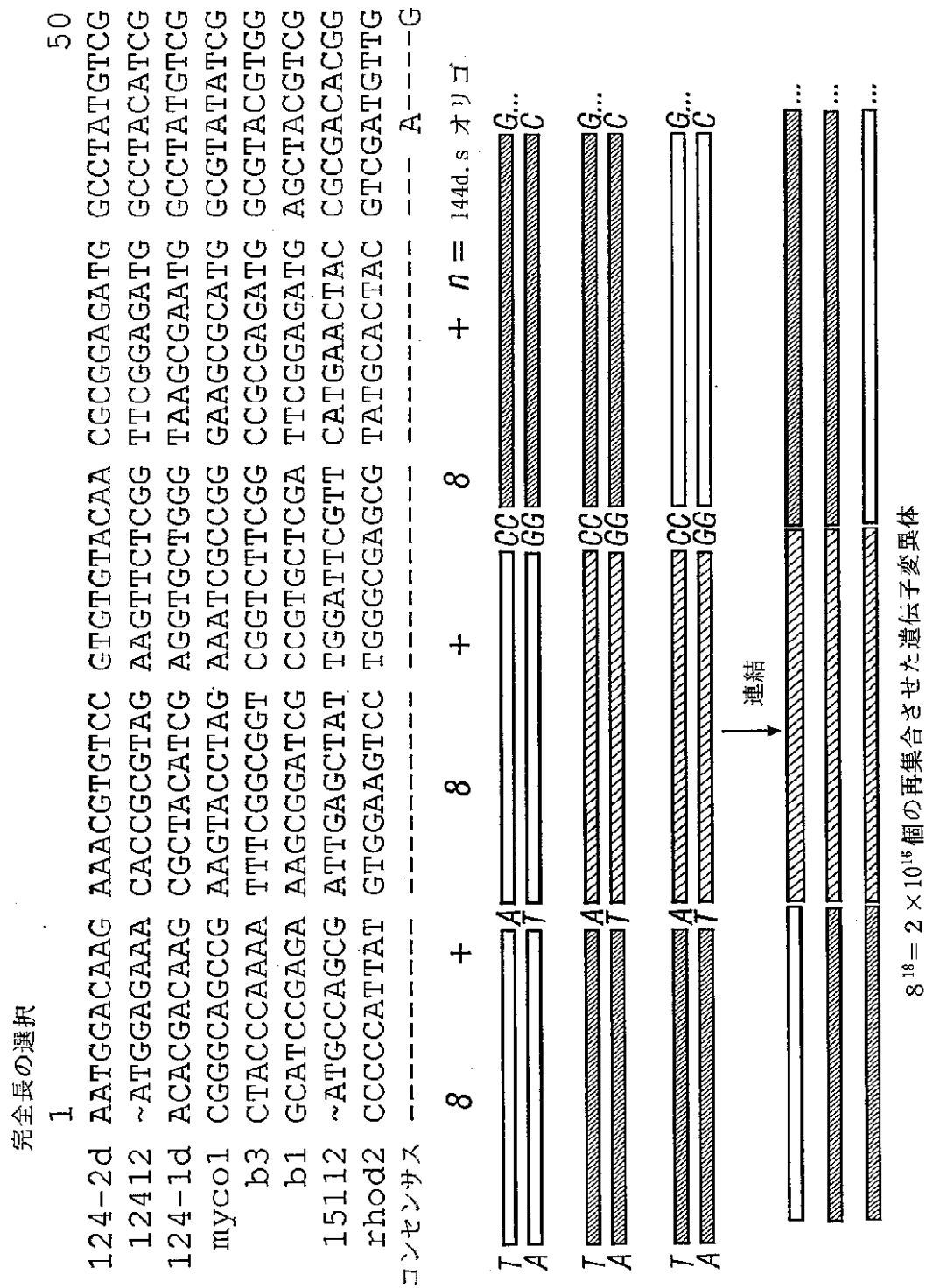


FIG. 6A

【図6B】

```

100
ACACGGGCCA GGGTGATTCC GTTCTGTTTC TTCACGGCAA CCCGACGTCG
ACGTGGGAGA GGGCGACCCG ATCGTGTTCC TCCACGGAAA TCCACGTCG
AGATGGGCGA GGGTGATCCC ATCATTTTCC AACACGGCAA TCCGACCTCA
ACGAAGGCAA GGGTGACGCC ATCGTCTTTC AGCACGGCAA CCCACGTCG
AAGTGGGACG GGGCGACCCC ATCGTACTCT TGCACGGCAA CCCACCTCG
ATACCGGCGA GGGAGCGCCG ATCGTGTTCC TTCACGGCAA CCGGACTTCC
GCGTCGGCGA T...CTTCCC GTCGTGTTCC TGCACGGCAA CCCACGTCG
GACCGCGGGA TGGCACGCCT GTGCTGTTCC TGCACGGTAA CCGGACCTCG
-----G--- -T--T--T-- --CACG-AA -CC-AC-TC-

```

FIG. 6B

【図6C】

遺伝子の15%を表わす

150

TCGTA	TCGT	GGAGG	GGCGT	AATGC	CTTTT	GTGAC	GGACG	TCGCC	CGATG
TCGT	ACCTGT	GGCGA	ACGT	GATT	CCCCAC	GTTGC	CGGCT	TGGAC	CGCTG
TCGT	ACCTGT	GGCGA	AACAT	CATG	CCCCAT	GTGCA	AACAGC	TCGGT	CGCTG
TCTT	ACTTGT	GGCGA	AACAT	CATG	CCGCAC	TTGGA	AGGGC	TGGCC	CGGCT
TCGT	ACCTCT	GGCGA	ACGT	GTTG	CCGCAC	CTGGC	CGCCGT	TAGGC	CGCTG
TCCT	ATCTTT	GGCGA	AACAT	CATC	CCCTAT	CTCGC	GGATC	ACGGC	AGATG
TCTC	ACGTCT	GGCGA	ACGT	GATC	CCGCAC	GTCGT	TGCC	AGCAC	CGGTG
TCCT	ACCTGT	GGCGA	AACAT	CATC	CCGCAT	GTAGC	ACCGA	GTCA	TCGGTG
TC--A	--T-T	GG-G	--C-T	--T-CC	----	-T-----	-----	-G----	

FIG. 6C

【図7B】

150am13_00	TCGCTCACCG	GCGAACGTCA	CGAGGAACAT	CCGAAGAAAG	AAAG C	CGCCCTACAA
150AM7_001	TCGCTGACCG	GCGAGCGCCA	CGAGGAGCAT	CCCAATAAAG		CGCCGTACAA
431am7_002	TCGCTGACCG	GCGAGCGCCA	CGAAGAGCAC	CCGAACAAGG		CGCCGTACAA
					CAG AA	
150am13_00	CACGCTGATC	CTGATGAACG	ACAAGGGCGA	GGTGGTC	CAG	AAATACCGCA
150AM7_001	CACCTTGATC	CTGATGAACG	ACAAGGGTGA	AGTCGTT	CAG	AAATATCGCA
431am7_002	CACGCTCATC	CTGATGAACA	ACAAGGGCGA	GATCGTG	CAG	AAGTACCGCA
				GGTA		
150am13_00	AGATCATGCC	GTGGGTTCCG	ATCGAGGGCT	GGTA	CCCCCG	CAACTGCACC
150AM7_001	AGATCATGCC	GTGGGTGCCG	ATCGAAGGCT	GGTA	TCCCCG	CAACTGCACC
431am7_002	AGATCATGCC	CTGGGTGCCG	ATCGAAGGCT	GGTA	TCCCCG	CGATTGCACC
			TGAAG			
150am13_00	TACGTCTCCG	ACGGGCCGAA	GGGCA	TGAAG		TCATCTGCCA
150AM7_001	TACGTCTCCG	AAGGCCCGAA	GGGCA	TGAAG		TCATCTGCCA
431am7_002	TATGTGTCCG	AAGCCCCCAA	GGGACTGAAG	ATCAGCCTCA		TCATCTGCCA
			TCTGGCG			
150am13_00	TGACGGCAAC	TATCCGGAAA	TCTGGCG	CGA	CTGCGCCATG	AAGGGCGCCG
150AM7_001	CGACGGCAAC	TACCCGGAAA	TCTGGCG	TGA	CTGCGCGATG	AAGGGCGCCG
431am7_002	CGACGGCAAT	TACCCCGAGA	TCTGGCG	CGA	TTGCGCCATG	CGCGGCGCCG
		CCAG				
150am13_00	AGCTGATCGT	GCGCTGCCAG	GGCTACATGT	ATCCGGGCCAA		GGACCAGCAG
150AM7_001	AACTGATCAT	CCGCTGCCAG	GGCTACATGT	ATCCGGGCCAA		GGATCAGCAG
431am7_002	AGCTGATCGT	GCCTTGCCAG	GGATACATGT	ACCCGGGCCAA		GGACCAGCAG

FIG. 7B

【図7C】

150am13_00	GTCA	TCA	TG	G	GC	CGA	AGG	CGAT	GGCGTGGCG	AATAATTGTT	ACGTCGCGGT
150AM7_001	GTGCTG	ATGG	CGAAAGCAAT	GGCCTGGCC	AACAACGTTT	ATGTCGCGGT					
431am7_002	GTCA	TG	GTGT	CCAAGG	GCAT	GGCGTGGATG	AACAACGTCT	ACGTGCGCGT			
				GGGCTTCG							
150am13_00	TTCCAATGCC	GGGGCTTCG	ATGGCGTCTA	TTCGTATTTC	GGCCACTCGG						
150AM7_001	CGCCAATGCC	TCGGGCTTCG	ACGGCGTCTA	CTCGTATTTC	GGCCATTTCG						
431am7_002	GGCCAATGCC	GGGGGCTTCG	ACGGCGTGTA	TTCTCTACTTC	GGCCATTTCG						
			TTCGA								
150am13_00	CGATCA	TCCG	CTTCGATGGC	CGCACGCTCG	GCGAATGCGG	CGAGGAAGAA					
150AM7_001	CGATCA	TCCG	CTTCGACGGC	CGTACCCCTCG	GCGAATGCGG	CGAGGAGGAT					
431am7_002	CCATCA	TCCG	CTTCGACGGC	CGCACGCTGG	GCGAATGCGG	TGAAGAAGAC					
			C AGTA								
150am13_00	TACGGCA	TCC	AGTATGCCCA	GCTTTCGAAG	ATGCTGATCC	GCGACGCCCG					
150AM7_001	TATGGCA	TCC	AGTATGCCGC	CATCTCCAAG	TCGCTGATCC	GCGACGCCCG					
431am7_002	ATGGGCGTGC	AGTACGCCGA	GCTCTCCACC	AGCCTGATCC	GCGACGCCCG						
			CAATC								
150am13_00	CCGCACCGGA	CAATCGGAAA	ACCATCTCTT	CAAGCTGGTG	CATCGTGGCT						
150AM7_001	CCGCACCGGC	CAATCGGAAA	ACCATCTCTT	CAAGCTGGTG	CACCGTGGCT						
431am7_002	CAAGAACATG	CAGTCGCAGA	ACCACTTGT	CAAGCTGGTG	CACCGCGGCT						
			GATCAA								
150am13_00	ACACCGGGTT	GATCAACTCC	GGCGAGGGCG	ACCGCGGTCT	CGCGGCCCTGT						
150AM7_001	ACACCGGCAT	GATCAATTCC	GGCGAGGGCG	ACCGCGGTGT	CGCGGCTTGC						
431am7_002	ACACCGGCCAA	GATCAATTCC	GGCGAAGAGG	CCACCGGCGT	CGCGGCATGC						

FIG. 7C

【図 7 D】

150am13_00	CTTATGAGT	TCTACAACAA	ATGGATCGCC	GATCCGGAAG	GCACCCGCGA
150AM7_001	CCGTATGATT	TCTATTTCGAA	ATGGATCGCC	GATCCCGAGG	GTACACGCGA
431am7_002	CCGTACAAC	TCTACGCCAA	CTGGATCAAC	GATCCGGAGG	GCACGCGCAA
	ATGGT				
150am13_00	AATGGTCGAG	TCCTTTACCC	GGCCGACGGT	GGGAACCGAT	GAAAGCGCCCA
150AM7_001	GATGGTGGAA	TCCTTTCACGC	GTCCGACGGT	GGGTGTGGAG	GAATGCCCCGA
431am7_002	GATGGTCGAA	TCCTTTCACCC	GTCCACCCGT	GGCACGCCG	GAGTGCCCCCA
	TCGAG				
150am13_00	TCGAAAGGCAT	CCCGAACAAAG	GTCCGGGTGC	ACCGCTGA	aagct
150AM7_001	TCGAGGGCAT	TCCGAACAAG	GCCACCACGC	ACCGCTGA	aagct
431am7_002	TGGACGGCAT	CCCCAACGAG	GACGCCAAGC	ACCGCTAG	aagct
					HindIII

FIG. 7D

【図8】

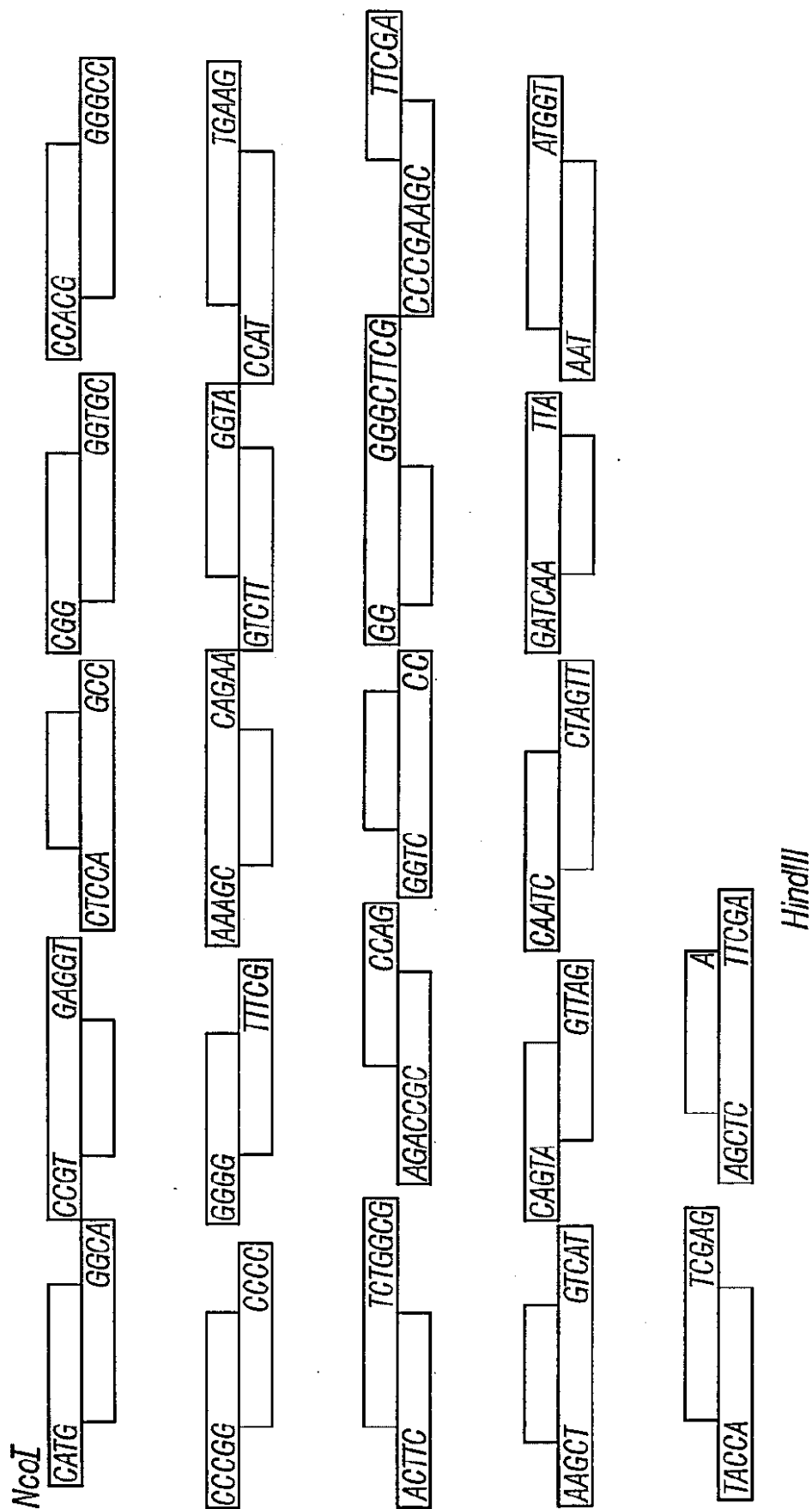


FIG. 8

【図9】



FIG. 9

【図10】

ギャップの連結

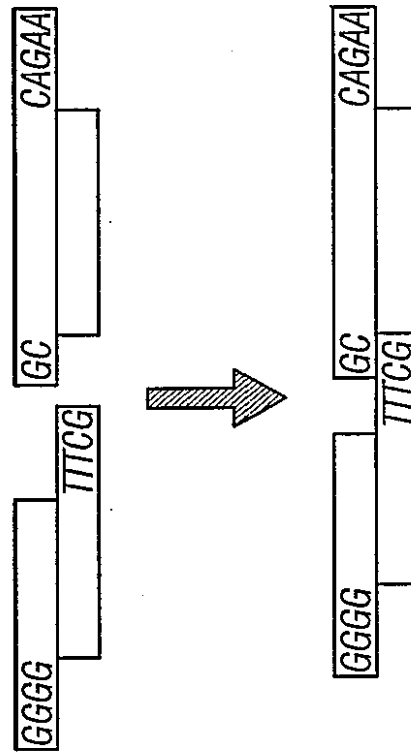


FIG. 10

【図11】

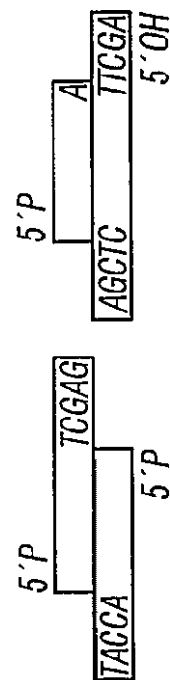
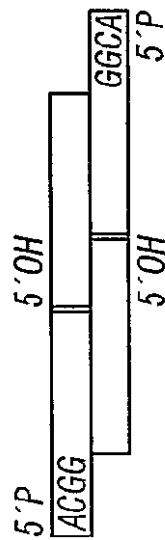
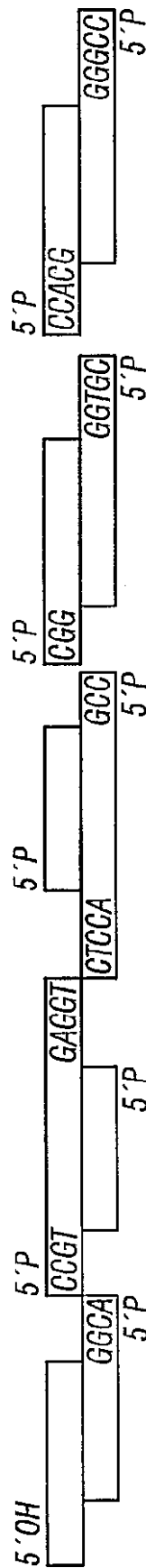
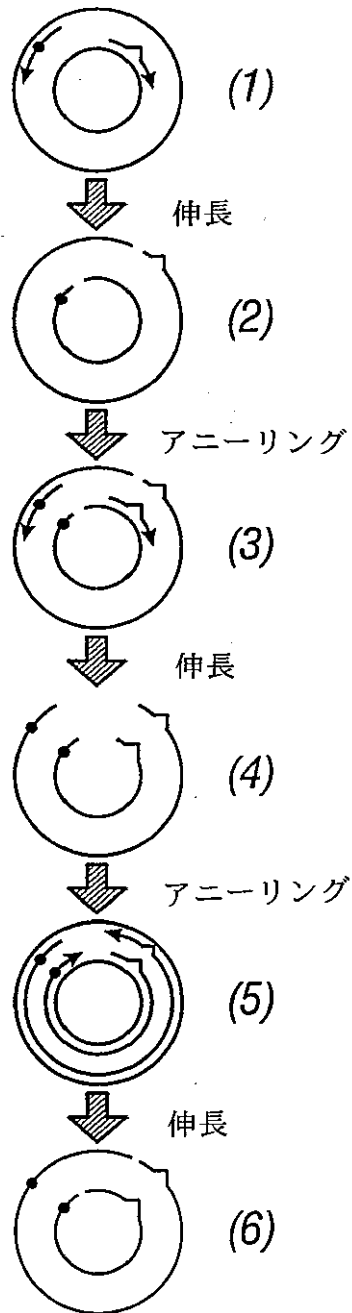


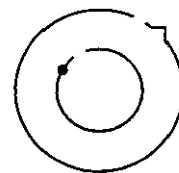
FIG. 11

【図12】

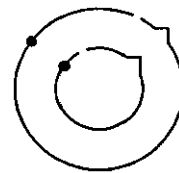
パネルA



パネルB



分子 (A)



分子 (B)

FIG. 12

【図13】

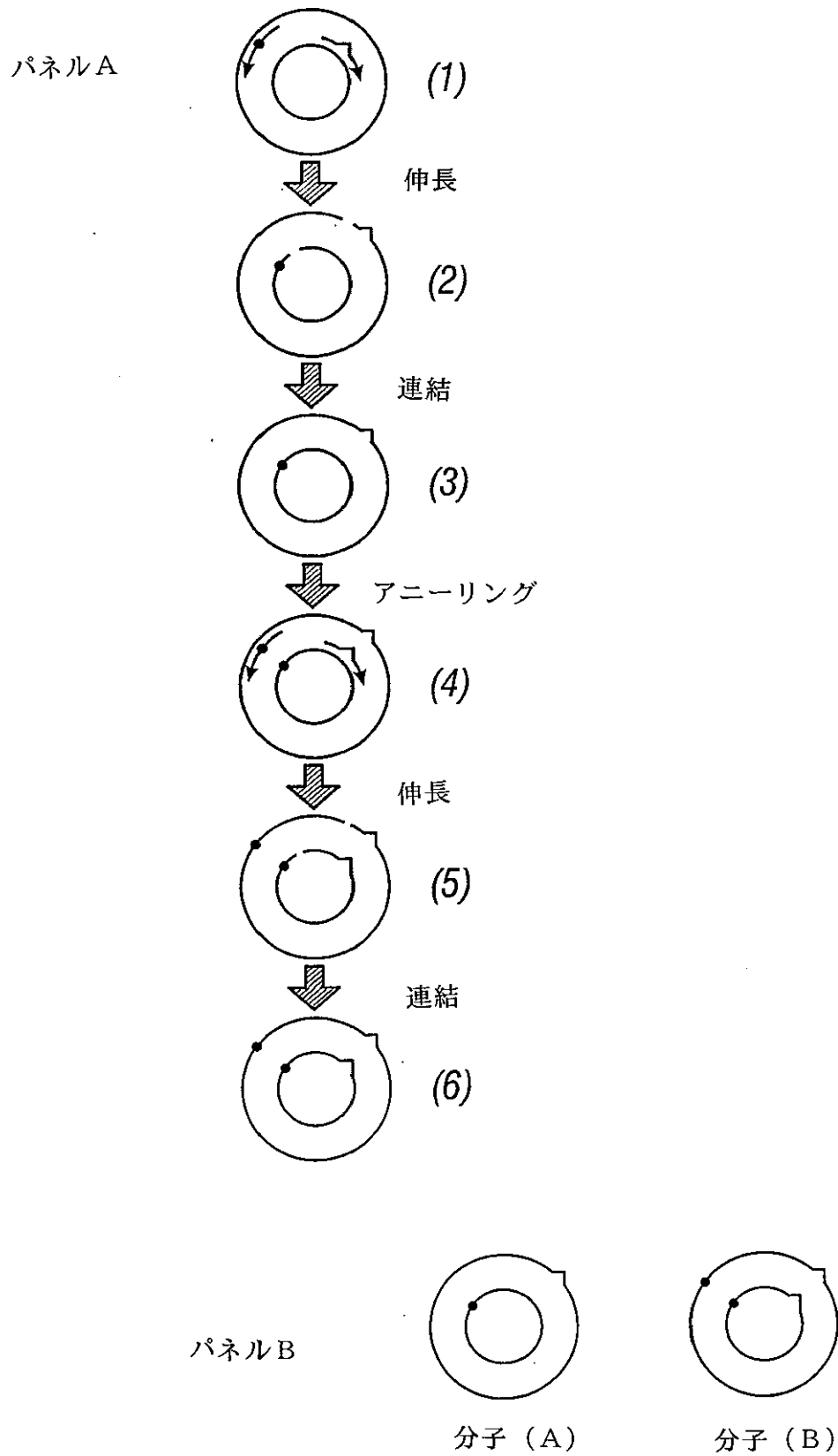


FIG. 13

【図14】

M13 フォーマットでの進化

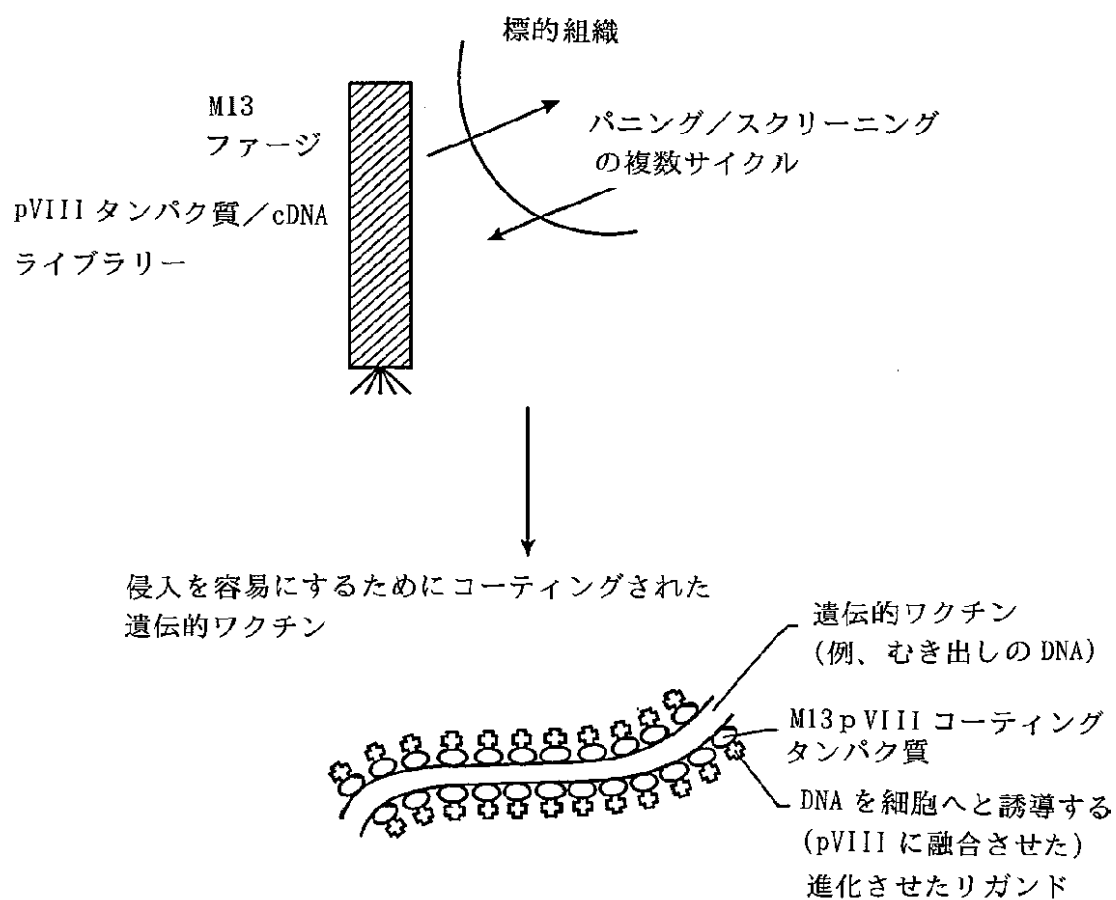


FIG. 14

【図15】

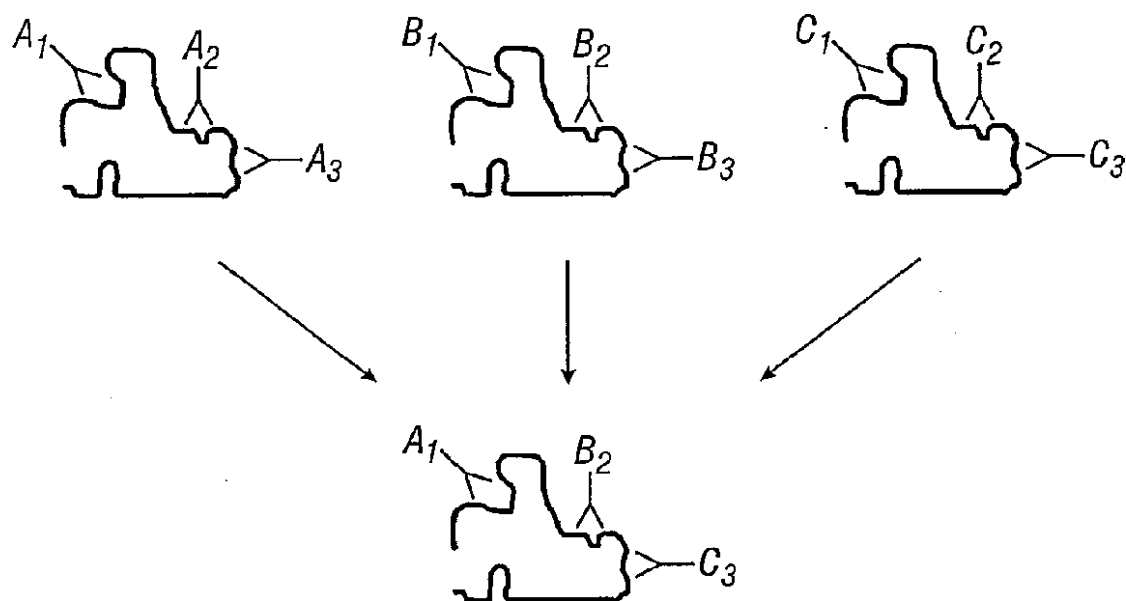


FIG. 15

【図16】

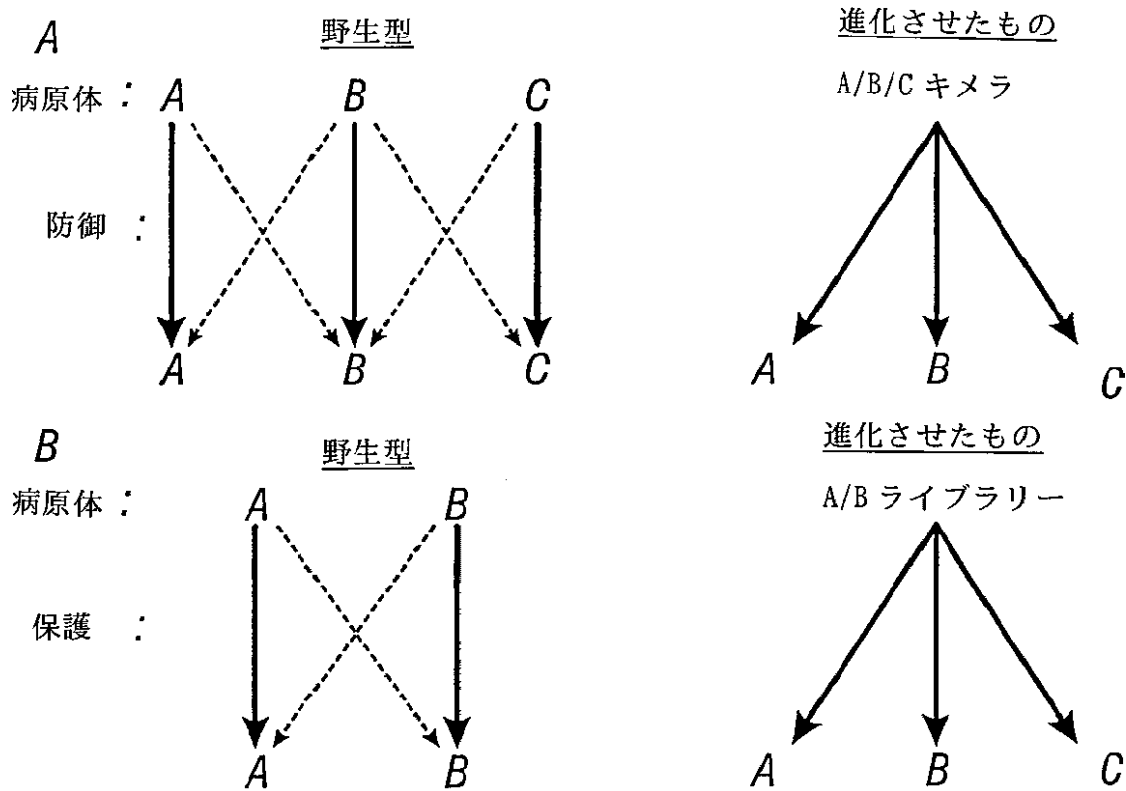


FIG. 16

【図17】

DNA-mRNA-タンパク質-プロセッシング 生成している抗原の質	転写	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mRNA の安定性	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
	翻訳	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	コドンの使用	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	タンパク質の折りたたみ	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
	タンパク質の安定性	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	B細胞エピトープ	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
	T細胞エピトープ	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	抗原プロセッシング	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	TAP 結合	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	HSP 結合	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	ペプチド-ER 輸送	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	ペプチド-MHC 結合	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
	スクリーニング																			
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

近縁抗原遺伝子のプール

FIG. 17

【図18】

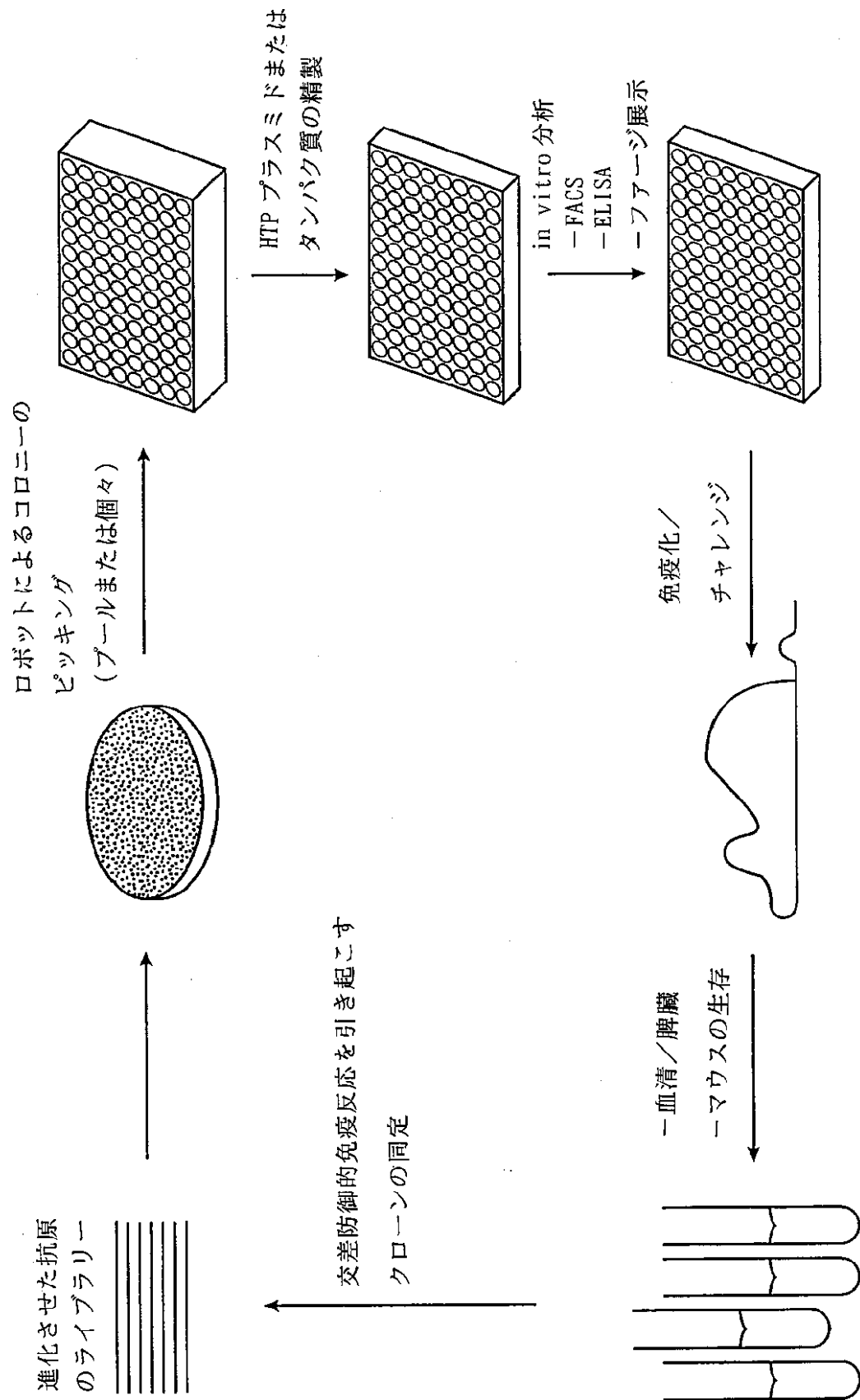


FIG. 18

【図19】

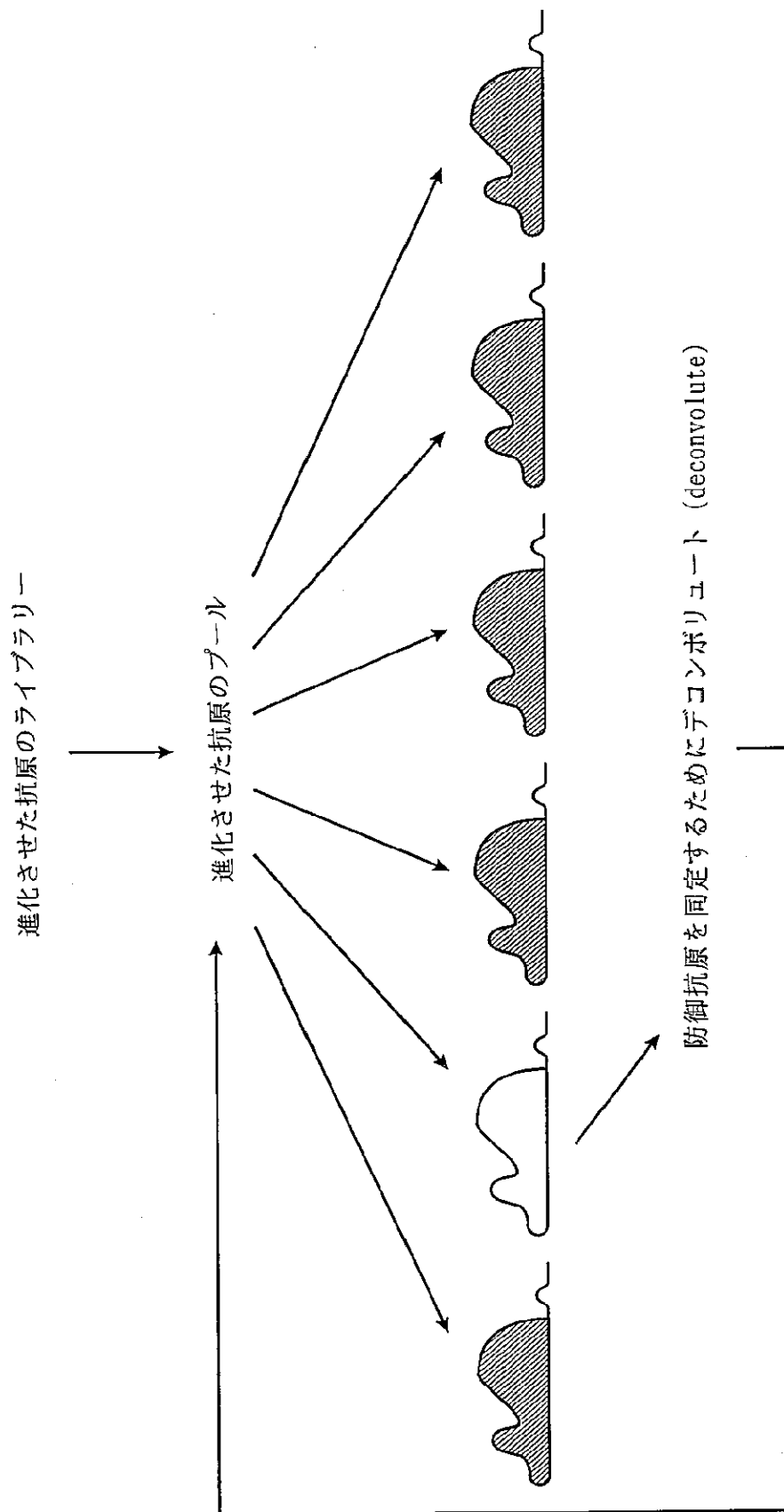


FIG. 19

【図20】

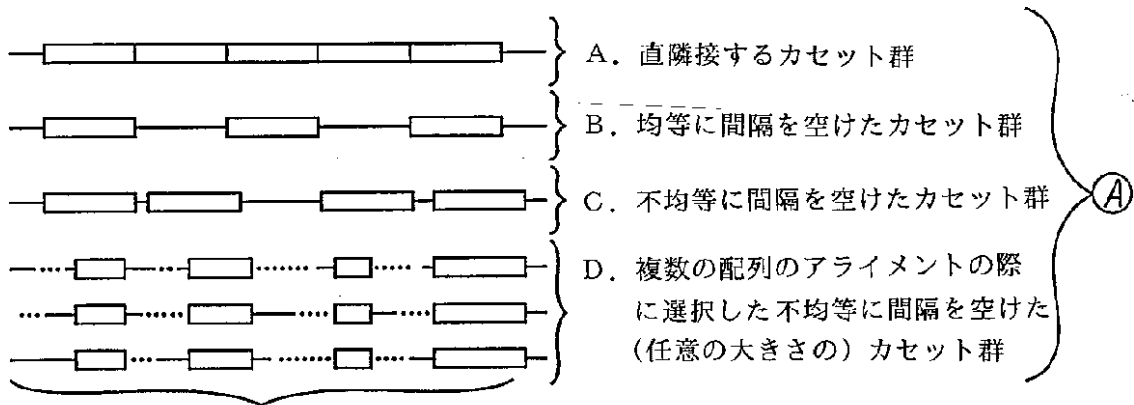


FIG. 20

【図21】

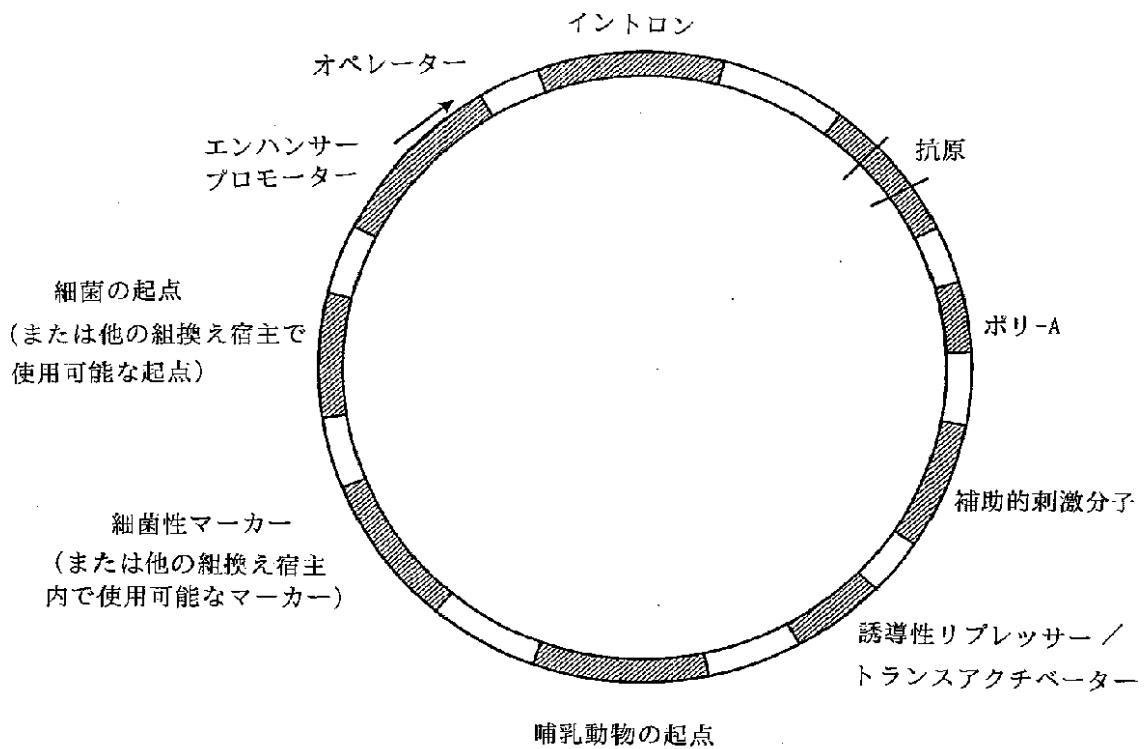


FIG. 21

【図22A】

実験的に生成したポリヌクレオチドのライブラリー

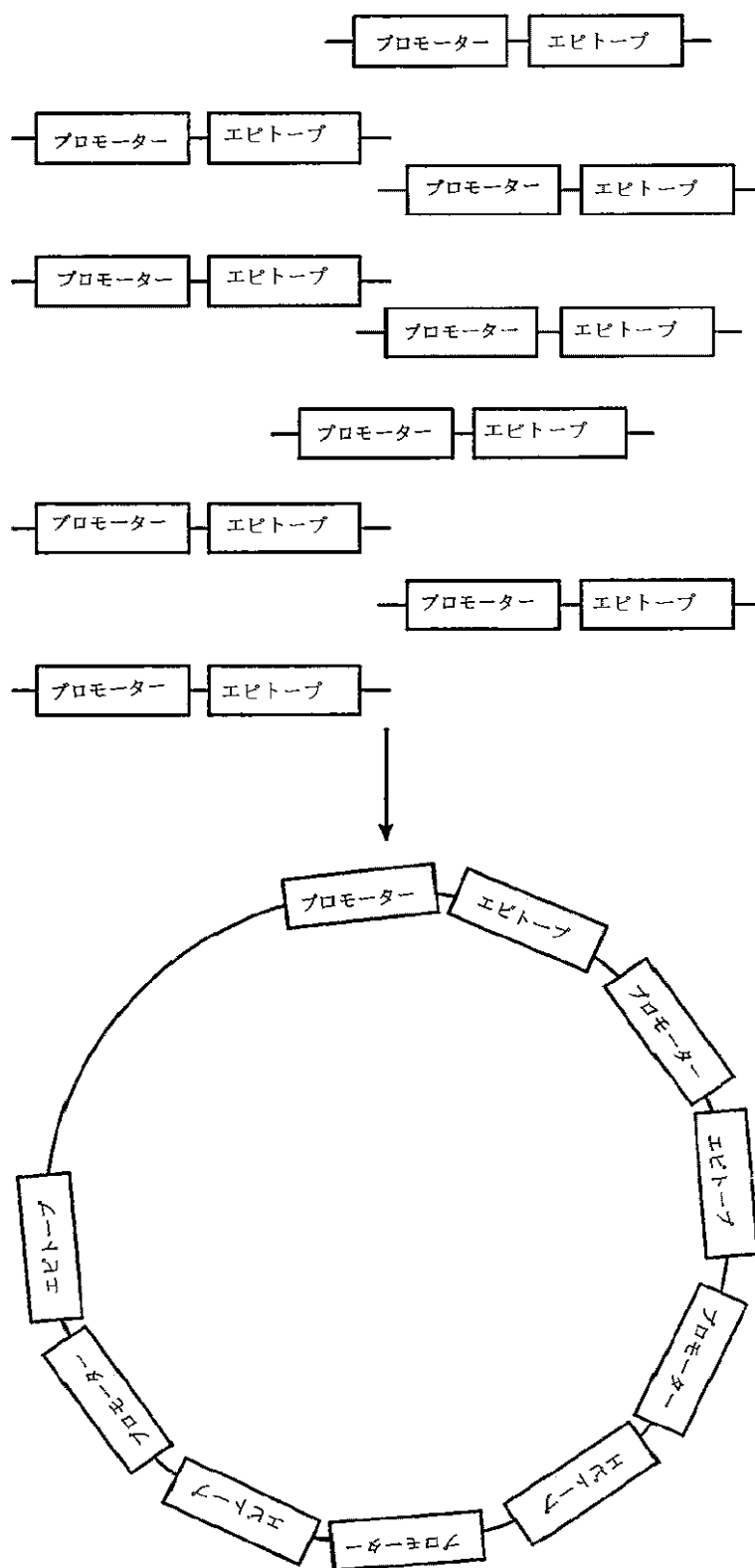


FIG. 22A

【図22B】

実験的に生成したポリヌクレオチドのライブラリー

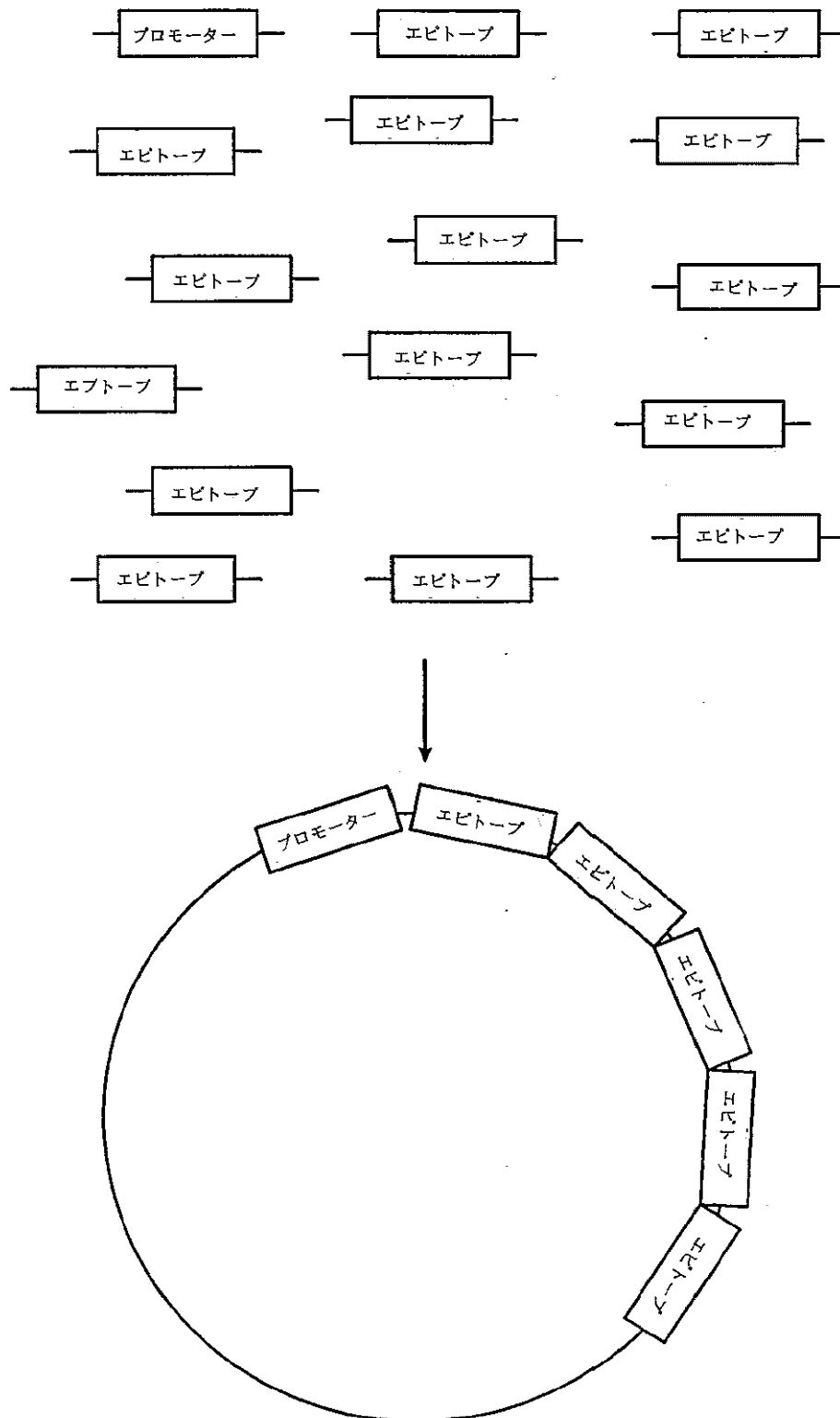


FIG. 22B

【図23】

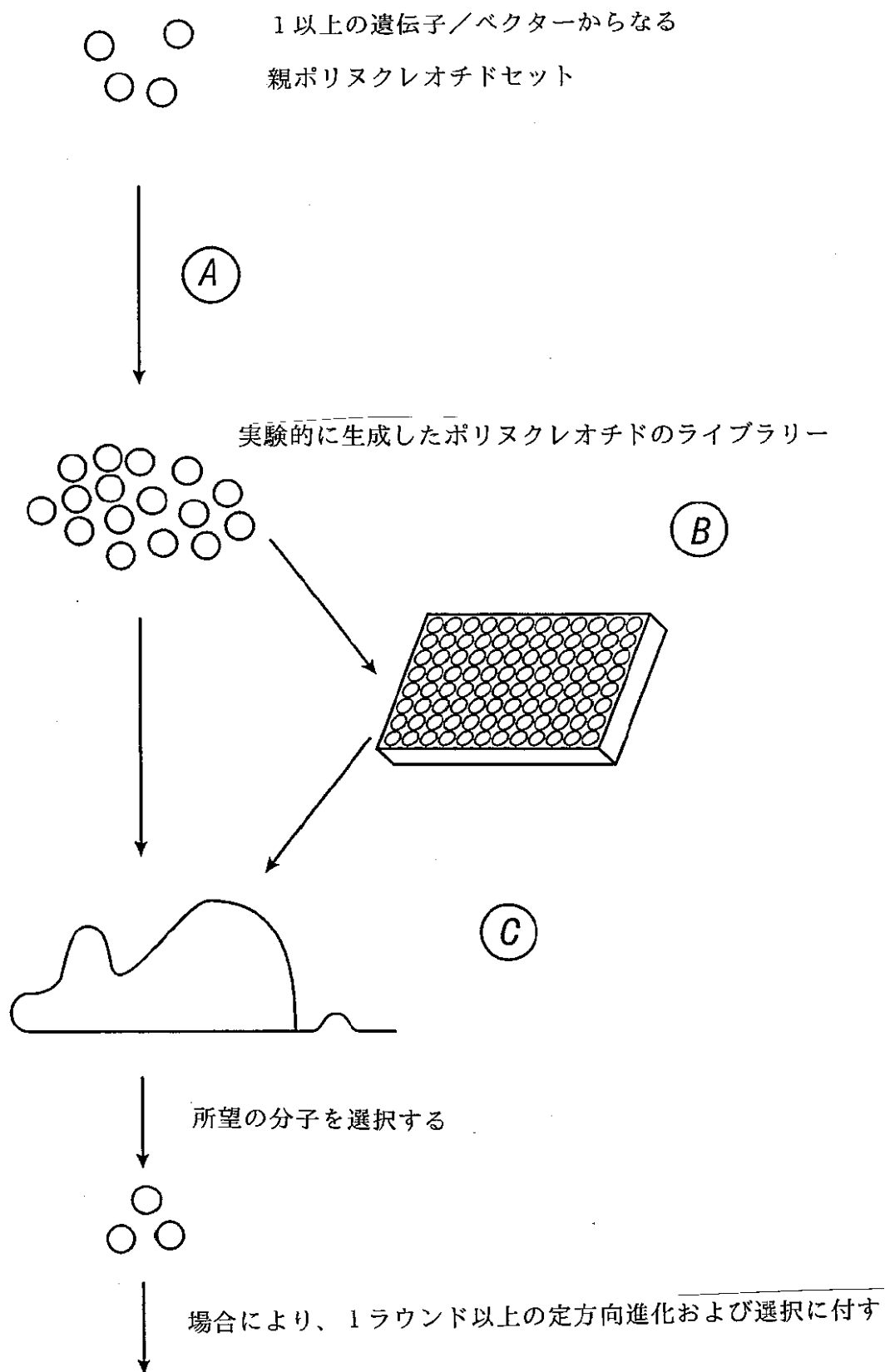


FIG. 23

【図24】

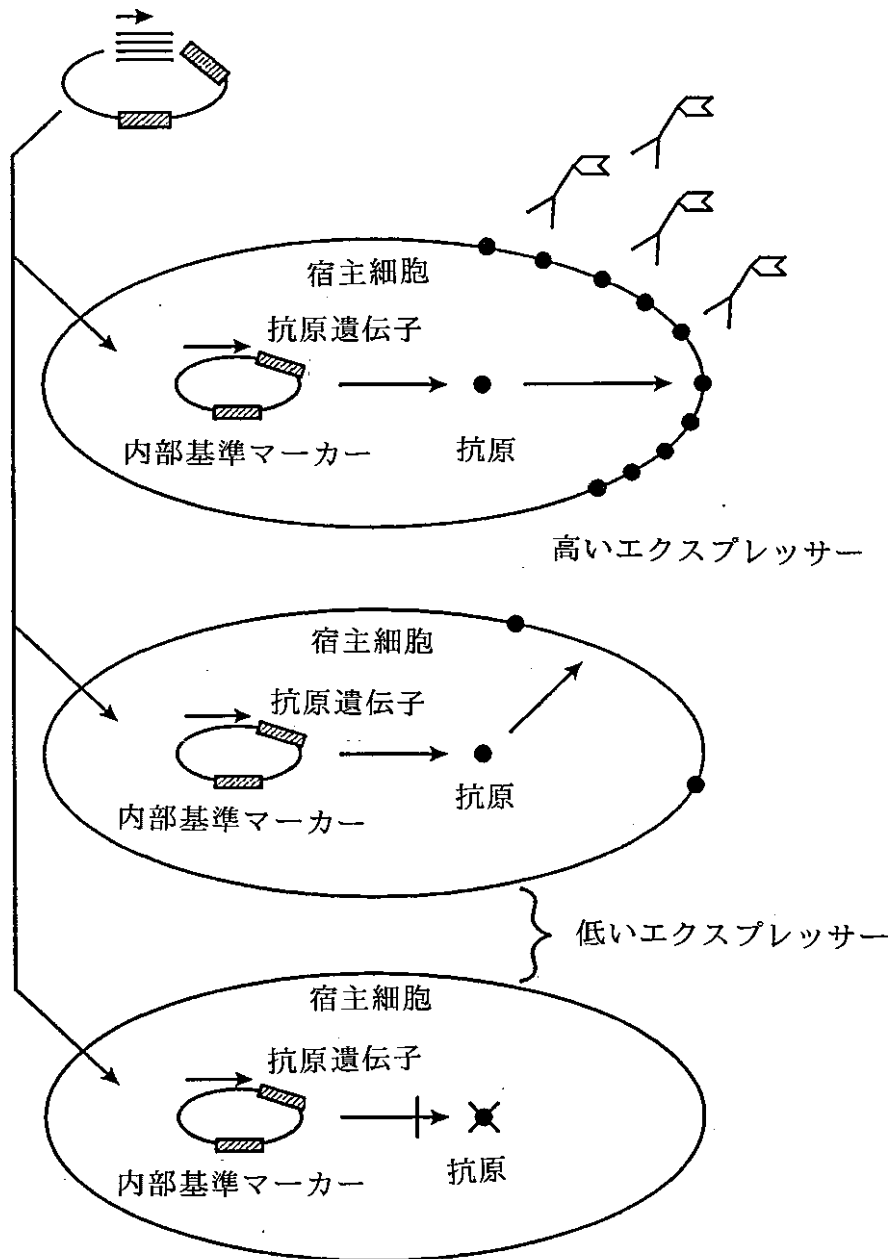


FIG. 24

【図25】

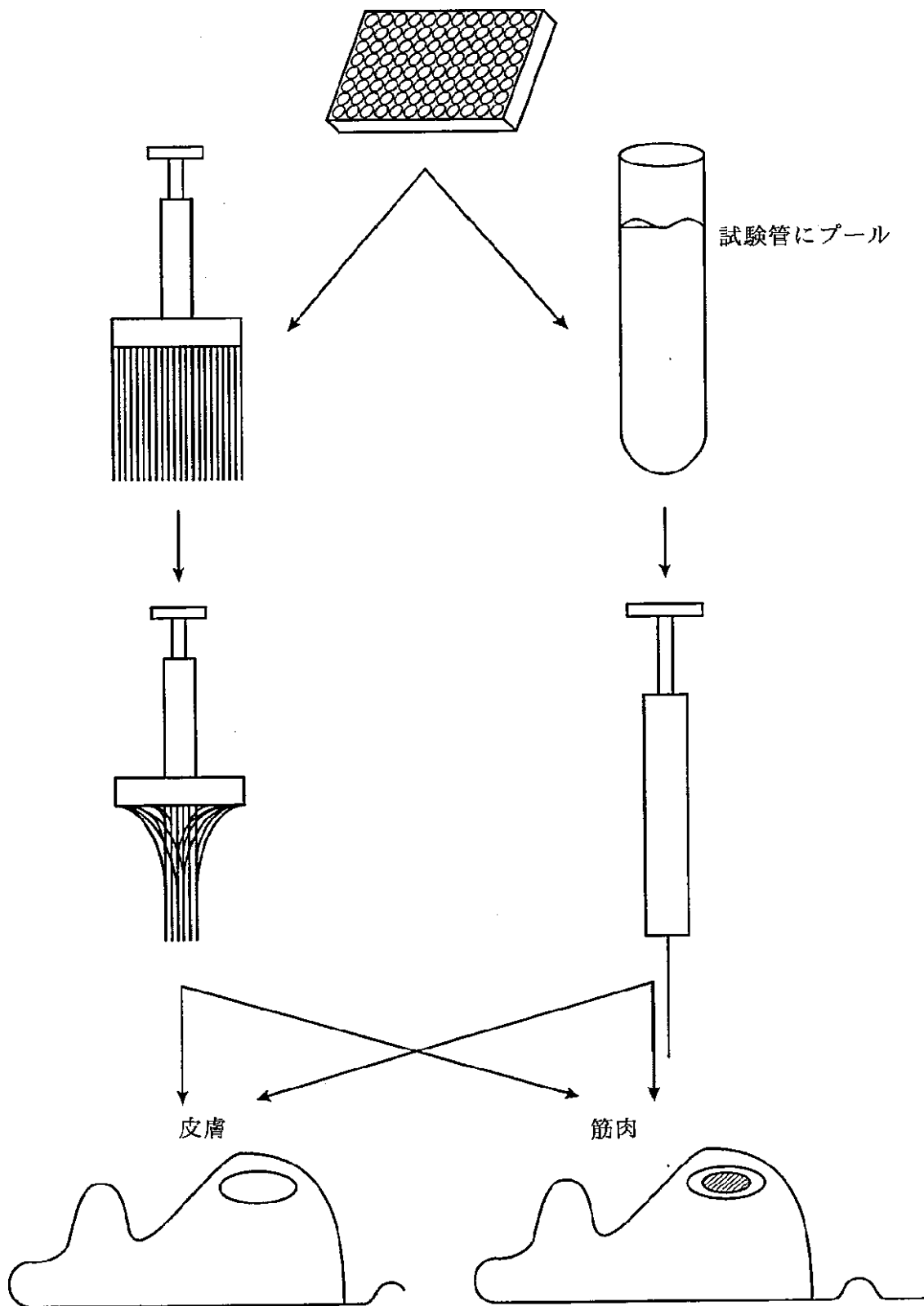


FIG. 25

【図26A】

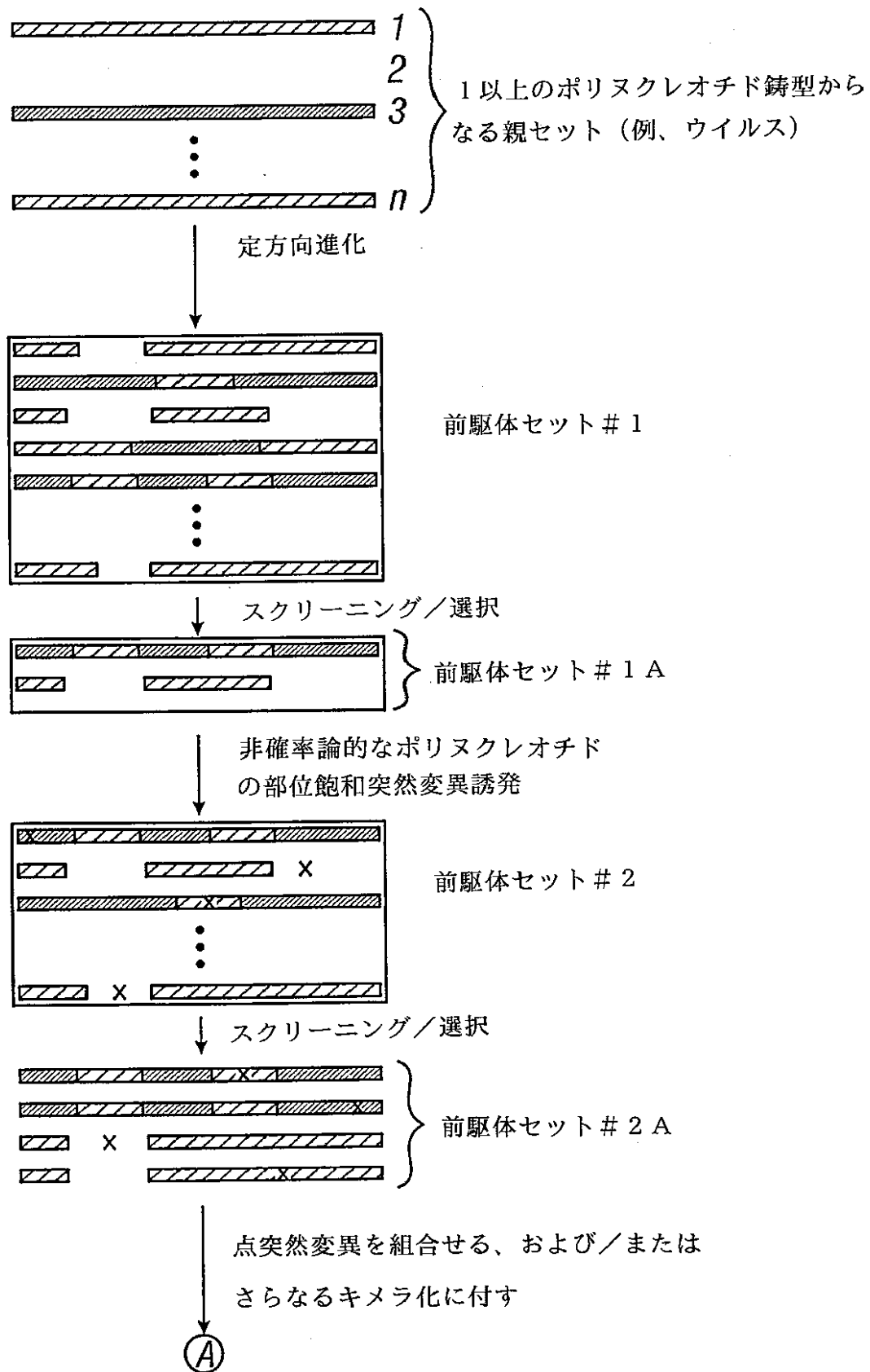


FIG. 26A

【図26A-1】

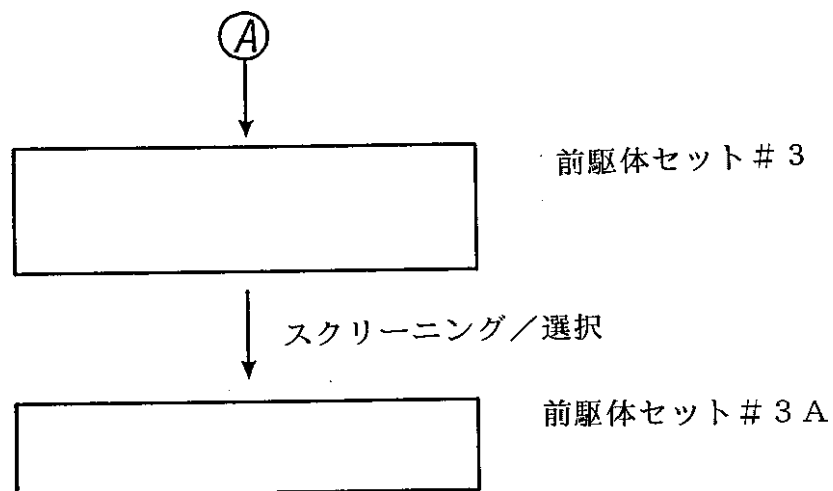


FIG. 26A-1

【図26B】

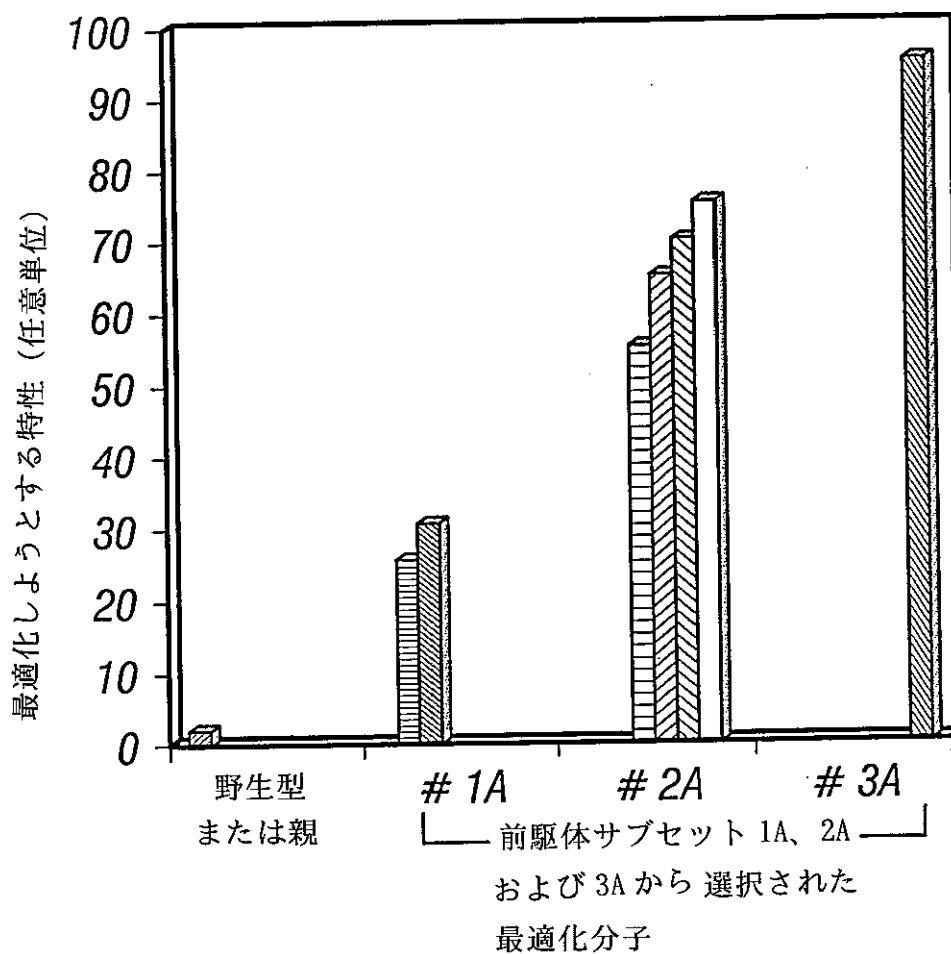


FIG. 26B

【図27】

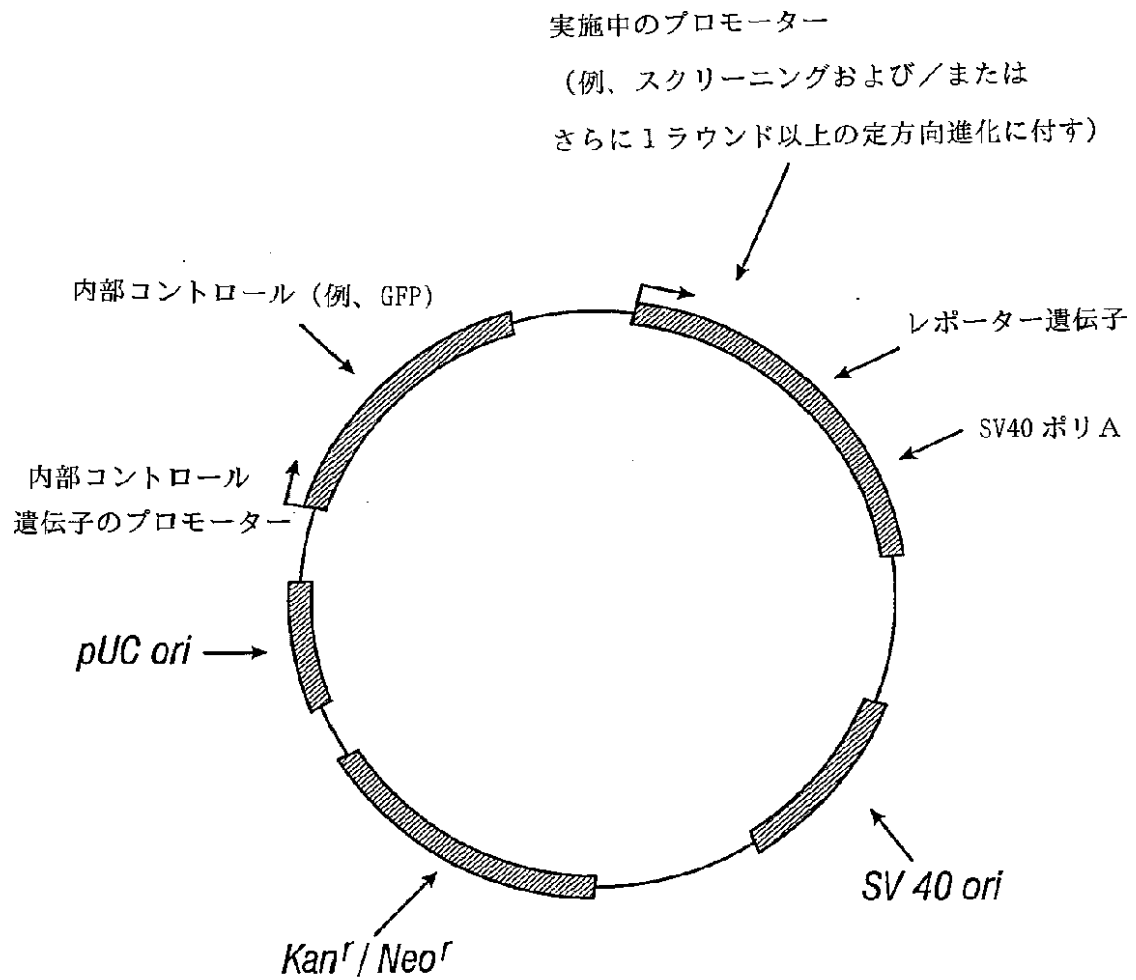


FIG. 27

【図28】

実験的に生成したプロモーター
核酸のライブラリー

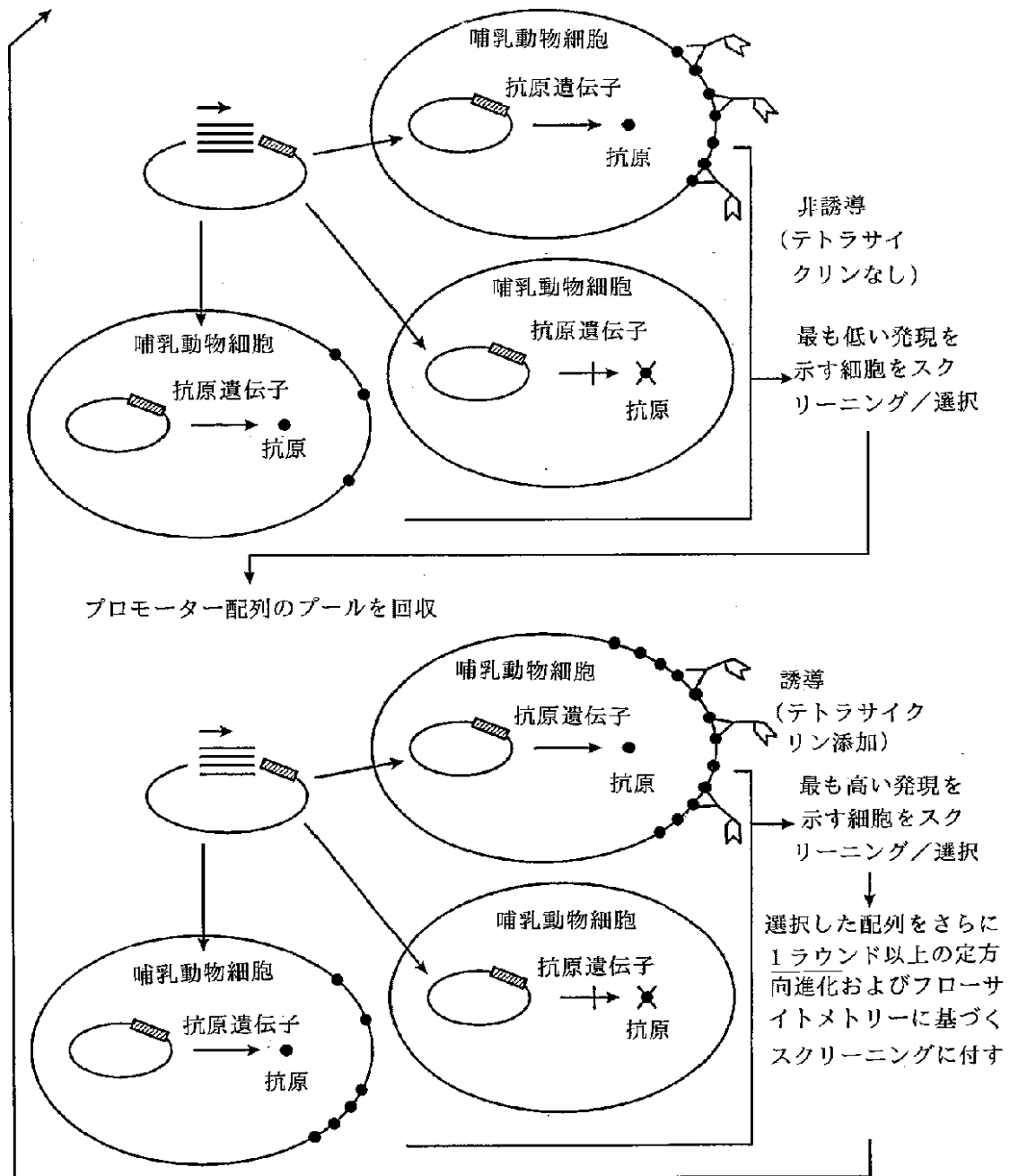


FIG. 28

【図29】

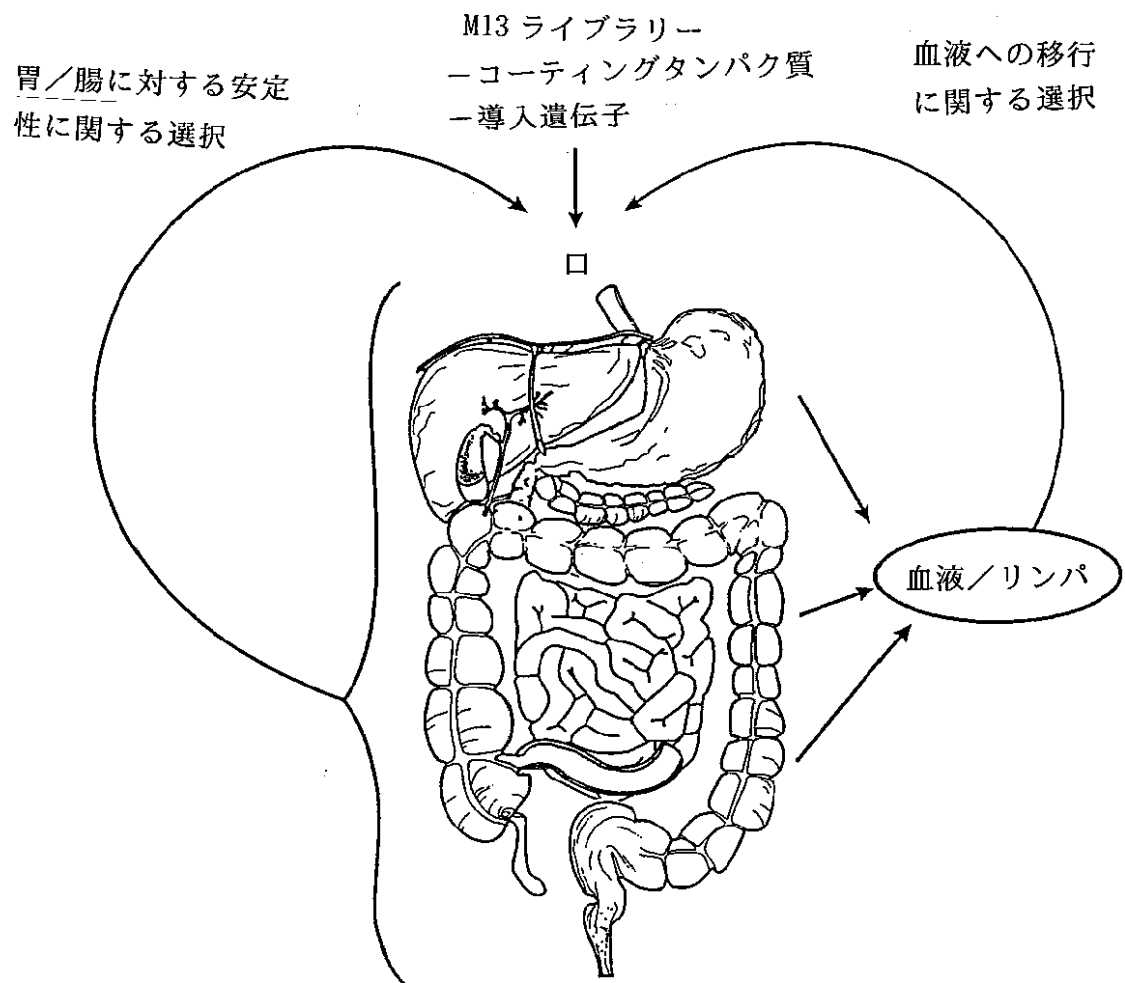


FIG. 29

【図30A】

AF026939CMV AF047524humUL104 AF078102Rhesus	(1)	1	50	-----GTGGAAACCTC-----TTCAGCATTT-GCTTGGATCAGTAAG
	(1)			--CTAGTGAATCCGTATGACCTCCAGCACGCCGCCGATCATCAGGGCC
	(1)			ATCGATTAAA-CTGCCCGA--TTGAGGTGTCGCTGACACTTTGTGA
AF026939CMV AF047524humUL104 AF078102Rhesus	(38)	51	100	CTAFAAAACAATAACAACCGGACCCCAGCTTTTCAGAACTGCAAGGAAA-
	(49)			TCCATTTCGAAATCGGC--CGACAC--GCTCTGG-GCCCGCCGCTCCTC
	(47)			GTCCTTTTCGAAGGTAGATATGACACT-GCTTTCAGAAAGTCCCGCTGAA-
AF026939CMV AF047524humUL104 AF078102Rhesus	(87)	101	150	--CAGCCATCATGAGTGAGGTCAACAAGATTCCTTGGAATAATCCT--
	(94)			GTCGCGGTGATCAGGCGGCGGCGCG--GACCTTTCAAGCGTTCCCTGG
	(95)			GCCCTGGGTACATATCTGAAGCAGCGAGATGAGCGTCC-GAGGACGTTGA
AF026939CMV AF047524humUL104 AF078102Rhesus	(133)	151	200	CCAACAAGCTGAATGCCATTTCAC---CTGGAACCTTATTCAAGGAAGACA
	(142)			GCCGCCTGCT-CGAGGCAATTCCCTTTCTGGCACTCCGCCGCCCGTTCCG
	(144)			TACCGTGGCACTACGGCGTCTTCAAGTTTGCCTAATCT-CGTGTTCCAAACG
AF026939CMV AF047524humUL104 AF078102Rhesus	(180)	201	250	GTGCTCTCA-AGGCACTAGAAAGATAGAGTGTG--T---AACCAGATTGA
	(191)			CGG-CTCATTTGGCGTCCGCCGCCCTTCTCGCGGCTGCAATCAGCTCCA
	(193)			TGCTCTGACTATGTTACAGGGTGTTTATCTGCCGAC---AATACGATCAA

FIG. 30A

【図30B】

AF026939CMV	(223) A --- TTTTAAACACCTGAGTTTCAAAGCTACAATGTAACAAC	251	300
AF047524humUL104	(240) C -GTATCCGCAAAACCTTGCCTCTGTCGTAGCGCGGCCACGATCTCGCC		
AF078102Rhesus	(239) CCGTGTTTACCAACAATAATATAAAGAAATTCCTGGTACTATCATTCCTGTT		
		301	350
AF026939CMV	(269) TACATAAACAACCTAGATGGTAAACAACGAGCAGCCCTGGAAAT -GCTTAC		
AF047524humUL104	(289) GAGGAGAGCTGCAGGTAGGCCCTCGGTACCG -GGTCCAGCGT -GCCCAG		
AF078102Rhesus	(289) GCGCAACCCCTGTAGCT -GGTTTCCTCGTCTTCGCTCTGGTATAGATATT		
		351	400
AF026939CMV	(318) GGCAGCTGAGAGCTTA --- ATCCAGCAAGACATGCTGACCAAGCAGA		
AF047524humUL104	(337) CGCCAGGATGIGACACA --- GATAGGCAGGCTCACGCGCTCTACCGTGT		
AF078102Rhesus	(338) CCCCAGGTAGAAACCCGTTCTGTCGACGAGTATCTTT -GCTGCCAAGAGA		
		401	450
AF026939CMV	(364) AATCAGA -AGTCTA -GTCACTTGGGGAACCT -ACGCCCTGG -GTCTACT		
AF047524humUL104	(384) AATTGGAGTAGACGATGGCCTCTTTCGGCCCCCTGATGCGTGA -CCAGAC		
AF078102Rhesus	(387) AATTGGA -AGCACTGGGAATATTGGGGGTCCAGTTGCCGTGATGGCAGTG		
		451	500
AF026939CMV	(408) ATCACTTGGCA --- GACTCTCAATGCTCAGATTT --- ATGTAGATAA		
AF047524humUL104	(432) GCCGCAAGCGAA --- AGGTGCGCAATACTCGTTTCCACAGCTGCG -T		
AF078102Rhesus	(435) ATCGCAAAAATAATCCAGGAGACTACGTGTGTGGTCTCTGCTGGGAAGCTAT		

FIG. 30B

【図30C】

```

501
AF026939CMV (451) GGTGAAGCAAAACCTGCAAGAAATTTTCAAAATCCATACAGTATTGAGTATT 550
AF047524humUL104 (478) GAGGAAGCGTTCCAGGCACTCGGTGCGGCGACGAACTGC-GAAGAAAG
AF078102Rhesus (485) GGATTGTGTACGTGTATGACTGGGACAGTGACGCACTCT-TTCAGATAG
551
AF026939CMV (501) CTGAACCTTGACTGTAGGAAGGGTGCACAACTGAAGTGTGGAAAGAAAT 600
AF047524humUL104 (527) CTC--TTGGCCACCAGG--CGGTTGTCTCCACCCGCC-AACGGACG-GAA
AF078102Rhesus (534) GTA--CCTCACTGAAG--AACTCCGCCACCACGGTT-TACTGACATGTG
601
AF026939CMV (551) CAAGGGCGAAGCTGTGTTTGTAGAAAGGCTCT---GCAAGAA-AAGCCCA
AF047524humUL104 (571) AGGCGCCGCGTCGCGCGCCTTGCGCACGCGCT---CCAACAC-GGGC--A
AF078102Rhesus (579) AATCGGTATATCGGCATCC--GCAAAACGCCCTTCTCCACCAACCGAGCCTC
651
AF026939CMV (597) ACAACCCAGAAATTCTCC-TCTGCACTGGCAATTGCGATGTACCATCTGGA
AF047524humUL104 (615) GGTG---GTAGAG----TTCGGCGTCGCGCGCGCCAGGCTCATGGAGT
AF078102Rhesus (627) GTTTTCAAGTCGAGAAATGTGTGTCTCGATCCGACAGACGCACTGTGT
701
AF026939CMV (646) T-AATCAACCCAGAGAAACAGTTCTCTACTGATGTTTGAAG-----CAG
AF047524humUL104 (657) CCTCGCGGCGCGAGGCGTAGCGCGTGA-GCAGGTCGCGAGTTCGCGCAC
AF078102Rhesus (677) C-TAGCTAAGACCGCAGAGAGAGTTTCAATGGCGTTAAACGTAGTA-GTGAAGA

```

FIG. 30C

【図30D】

AF026939CMV	(689)	GCCATTGAGCTGAGTCCTGATAAACCAAT--ACGTCAAAGGTTCTCTTGGG	751	800
AF047524humUL104	(706)	CGGATTCTCCAGGTCCTGGTGAAGGTCCTGGATCTCGTCTA		
AF078102Rhesus	(725)	ACCCCTGGGCGGATCGGAGGCCGATCCCTTGGTCCCTCTGGGCTACTGTGGA		
			801	850
AF026939CMV	(736)	CCTGAAACTGCAAGAGATGAATAAGA--AGCTGAAGGAGAGCAAGTTTGT		
AF047524humUL104	(756)	CCTGCCACTGCACTCGCTCCCTCCAGGC--ACTTGAAT--GACCTGCTTCT		
AF078102Rhesus	(775)	GAGCTACGTCAAAATGATCCCTTTGCTAAATGA---GAGCTGATAAAC		
			851	900
AF026939CMV	(784)	TGAAGAAGCCTTGGAAAGTCTCCTTGCCAAGACAGATGTCCTCCGCAGTG		
AF047524humUL104	(801)	TAAACAGGTCGCGGATG-TCCCGCTCGGGCGCGCCCGCGCCG--GGTG-G		
AF078102Rhesus	(821)	TTAGTAATCTCATAAA-GTATATTAAT-CAACGCATGT-----GTTC-C		
			901	950
AF026939CMV	(834)	CAGCCAAATTTTATCAGAGAGAAAGGTGACCTAGACAAAGCTATTGAACCTG		
AF047524humUL104	(847)	CGGCGGACGACGCCGACGTGGCCCGCGGCTCTCCCA-CCACGGCAACCG		
AF078102Rhesus	(863)	CGATGGTACGTAATTTGGTGTACTGGCCGTTACGCTAA-TTTTGGAAATTT		
			951	1000
AF026939CMV	(884)	TTTCAACGGGTGTTGGAATCCACACCAACACATGGCTACCTCTATCAACCA		
AF047524humUL104	(896)	CCGGGCCCC-----ACCAAGCCGGGTCCACCCGACCCGACCGCGGTACCA		
AF078102Rhesus	(912)	TGCTGACCTGTGGAATAATTTCTTGGACGAGTGGCGGTGT-TATGT		

FIG. 30D

【図30E】

```

1001
AF026939CMV (934) GATTCGGCTGCTGCTACACAGCAAAAGTAAGACAAATGCAGATATACAGGAG 1050
AF047524humUL104 (942) GACGGTTTTGGTCCACACAGCAAGCGTCAAGTCCGTCAGG-----AAG
AF078102Rhesus (961) CCTGAGCAATCCACCA-AGCGACGTGTTTC-GTCTAGCCGAT-----AAC 1100
1051
AF026939CMV (984) AATCTGAGCTAGTGGAAATAAAGATG--ATTGAAGCACTAAAGCAAT
AF047524humUL104 (986) GACTCGACGCTGTCTCGATGCCGATGCCGATTGCTGTCCGAGACGTT
AF078102Rhesus (1004) ATCCAAATGTGTTCAGATGCCGCTTTC---TTAAGCTCCGTGGCATT 1150
1101
AF026939CMV (1032) ATGCTATGGACTATTCGAAATAAAGCTCTTTGAGAGAGGACCTGAATCCTCTG
AF047524humUL104 (1036) AAGCAAAACCTTCATAATGGACTTTT-TGGCGTCGCT-GCCCGGTCGTG
AF078102Rhesus (1049) ACGCAT---TTGACCGCGGATTCGCTGGCGAGGCTCGTCTCGAGAGTG 1200
1151
AF026939CMV (1082) ATGCA TACTCCGATCTCGCTGAG-TTCTTGAGACGGAAATGTTATCAGA
AF047524humUL104 (1084) C-TGC-TCCATC-ATCTCCACCAAGCTTCTTGCACTGAGCTCTGGCCGC
AF078102Rhesus (1095) AGTGC-TACTGCTATCACCCTGCGCCGTAAAGCAAGATCT-CTCTTGGTCT 1250
1201
AF026939CMV (1131) CACCATTCAAATAGGAAGTCCCTGAT--GCTGAAAAGCAACAATC-----C
AF047524humUL104 (1131) TGGCGGTACCCAC---TTTCACAGGAAAGGTTATTGAGCAACTGGCAGATC
AF078102Rhesus (1143) CTATGGTCAACAC---AGTTACCGCC-----GAGCAGCTC-----

```

FIG. 30E

【図30F】

```

1251      AF026939CMV (1175) CA[CA][CG]-[TA][CT][CA][CC][TT][CA]-[GAA][ATA][TAAT][GG][CAAGTCT][GAAGA]
1300
1251      AF047524humUL104 (1178) TTTTGGTGGCCG[CA][AG][AC][CC][GT][CT][GTA][CCG][CAG]-[AAT][CT][C]-[CTCGT][GCAGG]
1301
1251      AF078102Rhesus (1175) -[TG][GGT][G]-[CGTAC][GACT][GGCT][CAG]-[CCG][CAGTAA][TCGC][CTCAT][GATA][A]
1350
1251      AF026939CMV (1222) CA[CT][GCT][GT][CA][CA][TGGT][TTAGAGG]-[GT][TTGTC]-[CATAA][GCA][AAA]
1301
1251      AF047524humUL104 (1226) TGTGCCAC--[CGC][CTGGT][GAA][CAG][CAGCTT][GT][CGC][GCT][CATAAGCC][AGC]
1351
1251      AF078102Rhesus (1222) AATA[CCTA]-[CCA][CTT][GTT][GTT][GCGG][CC][TAGT]-[GAT][TTGAT][GCC][TAC]
1400
1251      AF026939CMV (1266) AATCAAC[TGA][CAAG]-[GAA][GAGATCA][A][GAC][CAAC][ACAG][ATGTA][TCC][GA]
1351
1251      AF047524humUL104 (1274) GGTTCGGTCCGCAC-[GT][AC][AAG][CGGAT][GT][GCTT][CCCG][CGCAGCTG][CGCCT]
1401
1251      AF078102Rhesus (1267) CCGAGTA[TTC][CAAG][GAA][TCA][GAA][TTG][TGCTT][TCCG][TGGAGGAGTGT][CA]
1450
1251      AF026939CMV (1315) AA[AT][CTGCTT][CCACA][AAATG][CACC][CAAA][TTAT][TG]-[GTAT][CTTCA][AGGA]
1351
1251      AF047524humUL104 (1323) CCAGCCGCTCC---[CAG][CGAC][CTTCTT][GAA][GAC][CGTAC][CT]-[CGGGC]
1401
1251      AF078102Rhesus (1317) C--[GGT][TCTAC]-[AAG][GC][CCCA][AGCG][TG]-[CGT][GGCA]-[AGAAA]
1451
1251      AF026939CMV (1361) TT[TAAT]TCA[TAAGCA][GATG][GAGATCTGCTGCAAGCAGCCAAATGTTATCA]
1351
1251      AF047524humUL104 (1367) GCGT[TGGCTAC][CGGCA]-[CAGCT][CCAG][CGGCTG][GGCCTTCC][TGCAGCA]-
1401
1251      AF078102Rhesus (1356) ATGATGAGTT[ACCGGA]-[GAA][AA][CGTCTGATCGTACTGTTGATGTTTCCGT]
1451

```

FIG. 30F

【 30G】

```

1501
AF026939CMV (1411) GAAGGAACTGGGCCCTGC -- TAAGGATGCCCTTCAGGCAT -- AGGC
AF047524humUL104 (1413) GCAGCGCAGGTTAGCCTGCAGGTCCAGCGGTGTCT - C
AF078102Rhesus (1403) GTAGACAGAGGTTTTCTCC -- CAGAACCGTAAAGTTCGAGGTGAAAGC
1551
AF026939CMV (1457) AGTATTTTCTGTCAGCATCTGAGCTTGACGATGGT - AGTGAGCAAATGG
AF047524humUL104 (1462) GGTGGCT - CCCTGCAC - GCCCGCTACAATTGC -- GCCCGCTCGGC
AF078102Rhesus (1451) GATGACTACAGAGAGAGATGATGATAACCAGTCAGAAAC
1601
AF026939CMV (1506) GCCAGGC - GCAGTCAGCTCA -- GTCCCAGAGCTCTCTCTAACTC
AF047524humUL104 (1508) GCCTC - GC - TCGGCTGTCTTCACGTCCAGCAGCGTAC -- CAGTCC
AF078102Rhesus (1501) CCCTCAGCATCAGCCTGTGTCATTGTTCACAT - GAAAC -- AAACGC
1651
AF026939CMV (1552) AGAGCAACTGAACTGACAGAGAGAAACAGAGC -- ATCAGAAGCCT
AF047524humUL104 (1553) ACCGTTAC - GCACAATCCACGTAGAGACCATAGTCGTCGTATCGCGT
AF078102Rhesus (1547) AGTGTTG -- -- -- -- ATTCTTATGATGATGAGAGTGA -- GTCATCTCTGT
1701
AF026939CMV (1600) GCAGTGGTGTTGACGGGTAGAGATAGAGACAG - GCGGCCCAA
AF047524humUL104 (1602) ACTGATATAA - ATGTCGCG -- -- GAGCCCCCAG - C -- ACGCCCGTT
AF078102Rhesus (1587) CTCAGATACCCATGATCC -- -- -- -- ACCACCCCAGACATTATGGCCATA

```

FIG. 30G

【図30H】

```

1751      AF026939CMV (1649) CC---TGGGATTGCTGAGCAGGGAAGCTTTGCATGTTGCTCTAAGGTACA      1800
AF047524humUL104 (1644) GC---ACGCTCTG---CCGCAACGAGGC---GCTCCACACCAACAGATACT
AF078102Rhesus (1632) TCCAAAGGAATG---GCAAAACGAAGA---GCCGGTTACCAAT-GAAGAG
1801
1801      AF026939CMV (1696) TTTTAAACAGTTGTTTGTGGCCGGCGAGTGGCTCATGCC-T--GTAA
AF047524humUL104 (1686) GCTCCAGGTCCTCTTCGTCCAGCGCGGTAGGAAACAGCCCGCGTGC
AF078102Rhesus (1676) GA---ATTGTTACTGCGCGGTGCAACGACG-AGCTAAACATAT---GAAA
1851
1851      AF026939CMV (1744) TCACAGCACTTTGGAGGCCGAGGTTGGCGGATCACGAGGCTCTGGAGT-T
AF047524humUL104 (1736) AACTTTCACACTCTTCGGCCACCGCGCCGACCGTGAAGGTGTCAAGAGCGGT
AF078102Rhesus (1718) AAGTGGCAATTTGTTCC-----CTGGAAAGGGTTAGCATTTATGACCC
1901
1901      AF026939CMV (1793) TGAGACCAATCCTGGCTAACACAGTGAATCCCGTCTCTACTAAATAATACA
AF047524humUL104 (1786) TTTGCACACTCCGTAGAGCAGCTGCTTGCAGCAGCAGGTCGCCCA
AF078102Rhesus (1760) TT-GAATGCTAATATTCACCTGCTTTGATTAACAATGCAATTGTATTTCAA
1951
1951      AF026939CMV (1843) AAATAATTAGCCAGGCGTGGTGGCTGGCACCTGTAGTCCCAGCTACTTGGG
AF047524humUL104 (1836) GCACCTGGTGCATGCTTTGGCCGCGACACGTC---CCCAGAAAGCCGTG
AF078102Rhesus (1809) TTATCTAATTCCGGTGTGTA---CCGTGTCATTTC-----TCCATGCGAGTGGTG

```

FIG. 30H

【図30I】

```

2001                2050
AF026939CMV (1893) AGGCTGAGGCAGGA---GAATGGCGTGAACCTGGAAAGGAACAGGTTCAG
AF047524humUL104 (1882) CAGCAACCGCAGGAAGCTCATCGTCTGCCCCTGG-GGAAATATGTCGATG
AF078102Rhesus (1853) --GGAAACAATTA---CATATTAGACACACGT-ATCACTTGT-----G
2051                2100
AF026939CMV (1940) TGAGCCAAAGATT---GGGCCCTTGC--ACTCCAGCCCTGGG-CAACAGAGC
AF047524humUL104 (1931) ACGGCCCTCGTCAATCCACACCGCGGCCACGCCCAAAGTACGACGACGCCCTT
AF078102Rhesus (1892) AAAGCTGAGTCA--ACATC-----ATGCNAATTGTCCGACGAGGTCCG
2101                2150
AF026939CMV (1984) AAGACTCGGAATTCCTGCAAGCCCGGGGATCQACT--ATTCTAGAGCGGCC
AF047524humUL104 (1981) GATCCTCAACCTCTCGTCTGGCCGCCAAGCATCGAATCGTCGACAAAG
AF078102Rhesus (1932) GGTGCTTCCT-TCTGTGTTTCHGTACGAGTTTAC--ATTTTATTATGGT
2151                2200
AF026939CMV (2032) GCAACGGCCGTGGAGTCCAGAGATG-----
AF047524humUL104 (2031) TCAAGTCCCTCTCGCCGAGCGCTTTCGCCCGAGGATTTTCGTTCCAG
AF078102Rhesus (1979) TCAAAAGTCTTCTAATTCTTA-----
2201                2214
AF026939CMV (2057) -----
AF047524humUL104 (2081) TGGTTTCGCTCCAT
AF078102Rhesus (1999) -----

```

FIG. 30I

【図31A】

```

1      50
AF187322CanisIL-4 (1) TGCATCGTTAGCGTCTCCCTAGTAAACTGATTGTCTCTGCTATTGTCACTGC
NM_000589HomoSapienIL-4 (1) TGCATCGTTAGCGTCTCCCTAGTAAACTGATTGTCTCTGCTATTGTCACTGC
_U19838CercopithecusIL-4 (1) -----
101
AF187322CanisIL-4 (51) AAATAGAGATCTATTAAATGGGTCTCACCTCCCAACTGATTCCAACTCTCTGG
NM_000589HomoSapienIL-4 (50) AAATCGACACCTATTAAATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGT
_U19838CercopithecusIL-4 (1) -----ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGT
151
AF187322CanisIL-4 (101) TCTCCTTACTAGCACTCACCGGACCTTTGTCCACGGACATTAACCTTCAAT
NM_000589HomoSapienIL-4 (100) TCTTCCCTGCTAGCATGTGCCGGCAACTTTGTCCACGGACACAAAGTGGCGAT
_U19838CercopithecusIL-4 (35) TCTTCCCTGCTAGCATGTGCCGGCAACTTTGTCCCAATGGACACAACTGGCQAT
151
AF187322CanisIL-4 (151) ATTACATATTAAAGAGATCATCAAAAATGTTGAACAATCCTCACAGCGGAGAAAT
NM_000589HomoSapienIL-4 (150) ATCACCTTACAGGAGATCATCAAAAATGTTGAACAAGCCTCACAGAGC-AGA
_U19838CercopithecusIL-4 (85) ATCGCCTTAQCGGAGATCATCGAAACATCTGAACAGCCTCACAGAGC-AGA
201
AF187322CanisIL-4 (201) CGACTC-GTGCATGGAGCTGACTGTCAAGGACGCTCTTCACTGCTCQAAAG
NM_000589HomoSapienIL-4 (199) AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACATCTTTGCTGCCCTCCAAG
_U19838CercopithecusIL-4 (134) AGACTCTGTGCACCGAAGTTGACCAATAACGGACATCCTTGTGCTGCCCTCCAAG

```

FIG. 31A

【図31B】

AF187322CanisIL-4(250)AACACAAGCGA[AAGGAAA]CTTCTGCAGAGCTGCTACTGTACTGCGGCA 300
 NM_000589HomoSapienIL-4(249)AACACAACCTGAGAAAGGAAACCTTCTGCAGGCTGCCACTGTGCTCCGGCA
 U19838CercococebusIL-4(184)AACACAACCTGAGAAAGGAAACCTTCTGCAGGCTGCCACTGTGCTCCGGCA 350
 AF187322CanisIL-4(300)GATCTA[AACACAA]-----CTGC-----
 NM_000589HomoSapienIL-4(299)GTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCCTGGGTCCGACTGCAC
 U18938CercococebusIL-4(234)GTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCCTGGGTCCGACTGCAC 400
 AF187322CanisIL-4(319)-----TCCA-----ACA-----GATATCTCAGAGACTCTTAC
 NM_000589HomoSapienIL-4(349)AGCAGTTCCACAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTCTGAAACGGCTCGAC
 U19838CercococebusIL-4(284)AGCAGTTCCACAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTCTGAAACGGCTCGAC 450
 AF187322CanisIL-4(346)AGGAACCTCAGCAGGATGGGAAACAAAGCA---CCTGTCTTA TGAAATGAAAT
 NM_000589HomoSapienIL-4(399)AGGAACCTCTGGGGCCCTGGCGGGCTTGAAATTCCTGTCCCTGTGAAGGAAGC
 U19838CercococebusIL-4(334)AGGAACCTCTGGGGCCCTGGCGGGCTTGAAATTCCTGTCCCTGTGAAGGAAGC

FIG. 31B

【図31C】

```

451                                     500
AF187322CanisIL-4(393)CAAAGAGAGTACACTGAAGAGACTTCTTGGAAAGGCTAAAAGTGATCAATGC
NM_000589HomoSapienIL-4(449)CAACCAGAGTACGTTGGAAAACTTCTTGGAAAGGCTAAAAGACGATCAATGA
U19838CercocoebusIL-4(384)CAGCCAGAGTACGTTGGAAAGACTTCTTGGAAAGGCTAAAAGACGATCAATGA
501                                     550
AF187322CanisIL-4(443)AGAGAGAAATACACAGGCAATTGAAGCTGAATATTTTAATTTATGAGTTT
NM_000589HomoSapienIL-4(499)GACAGAGAAATATTCAAAAGTGTTTCGAGCTGAATATTTTAATTTATGAGTTT
U19838CercocoebusIL-4(434)GAGAGAGAAATATTCAAAAGTGTTTCGAGCTGAA-----
551                                     600
AF187322CanisIL-4(493)TACATAGCTTTTATTTTAAAGATATTATATAATTTATA-----CATATA
NM_000589HomoSapienIL-4(549)TGATAGCTTTTATTTTAAAGTATTATATAATTTATAACTCATCATATA
U19838CercocoebusIL-4(464)-----
601                                     637
AF187322CanisIL-4(536)TAA--TATATATAGACTCTAAATATAAAAAAAAAAAAA
NM_000589HomoSapienIL-4(598)TAAAGTATATATAGAACTCTAA-----
U19838CercocoebusIL-4(464)-----

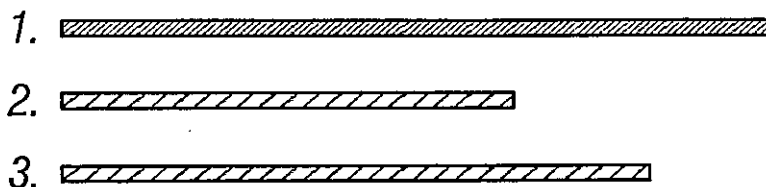
```

FIG. 31C

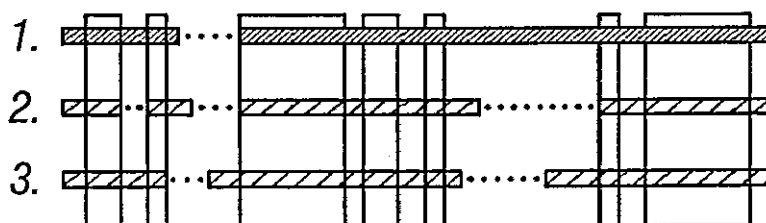
【図32A】

ゲノム DNA または cDNA のライブラリー

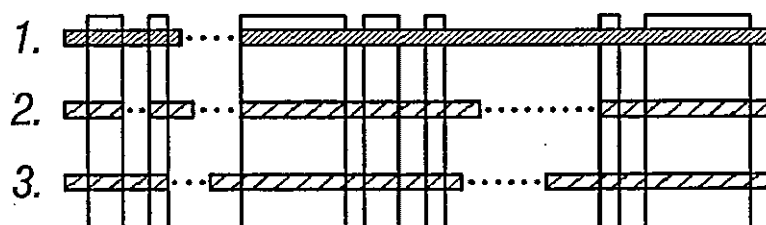
ライブラリーの産物（例、ライブラリー中の
遺伝子により発現されるポリペプチド）を
↓
発現スクリーニングする



↓
ポリペプチドのアライメントをとる



↓
各コンセンサスアミノ酸の同一コドンを用いて推定コード配列を決定

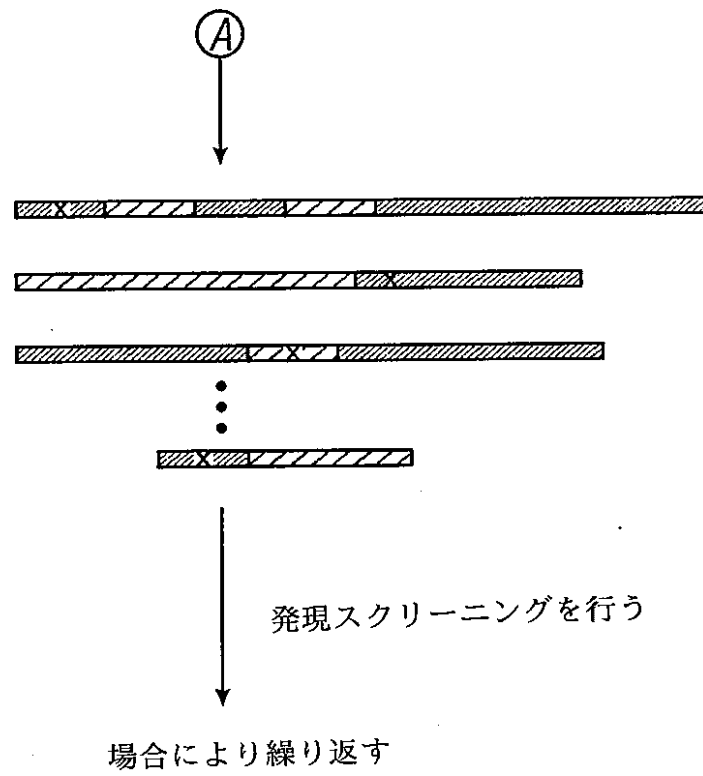


- ↓
- 1) 非確率論的なポリヌクレオチド再集合；
および／または
 - 2) および／または非確率論的な部位飽和
突然変異誘発

↓
による定方向進化に付す
Ⓐ

FIG. 32A

【図32B】

**FIG. 32B**

【図33】

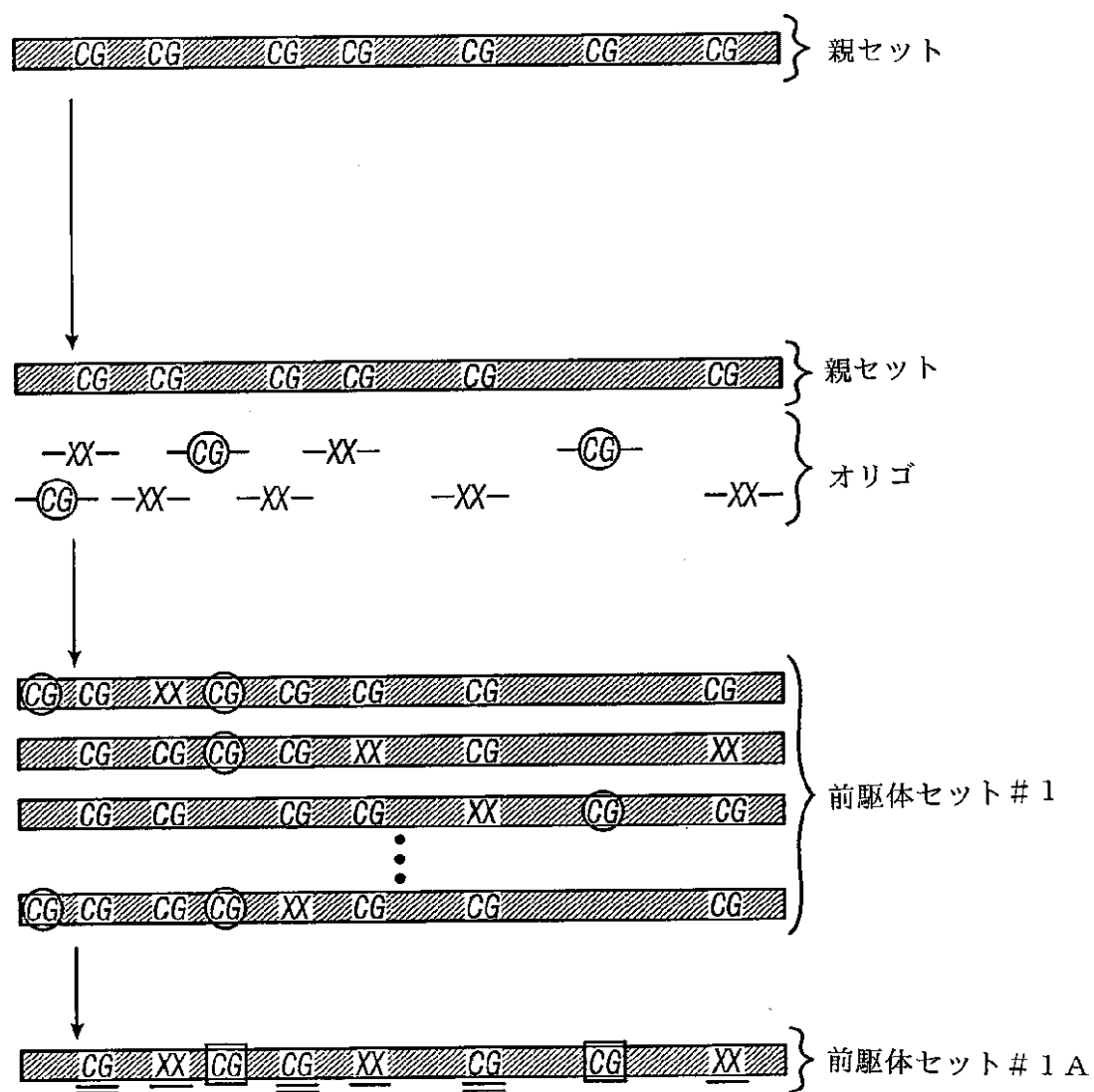


FIG. 33

【図34】

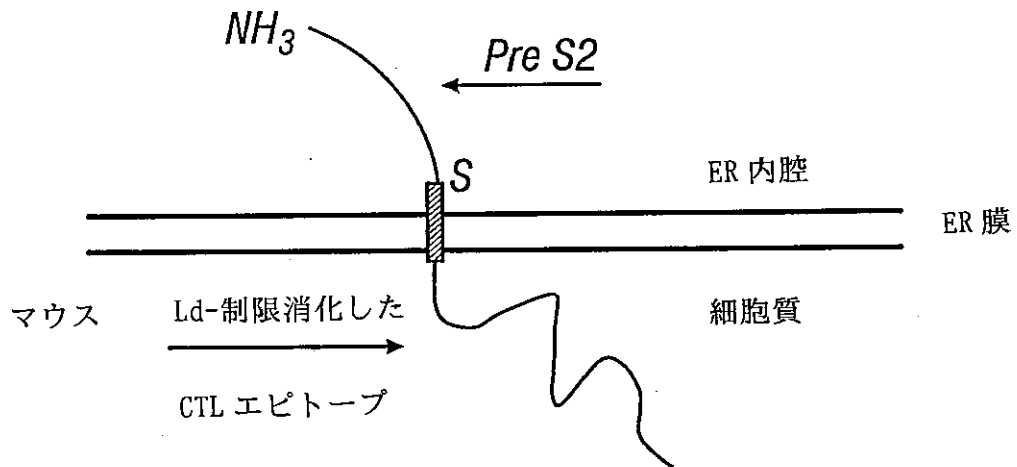


FIG. 34

【図35】

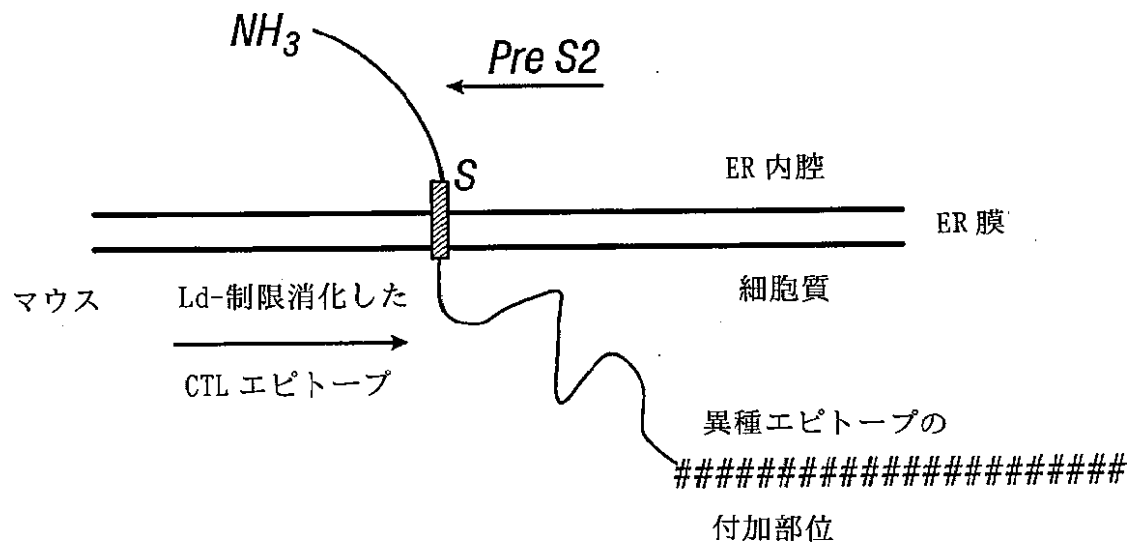
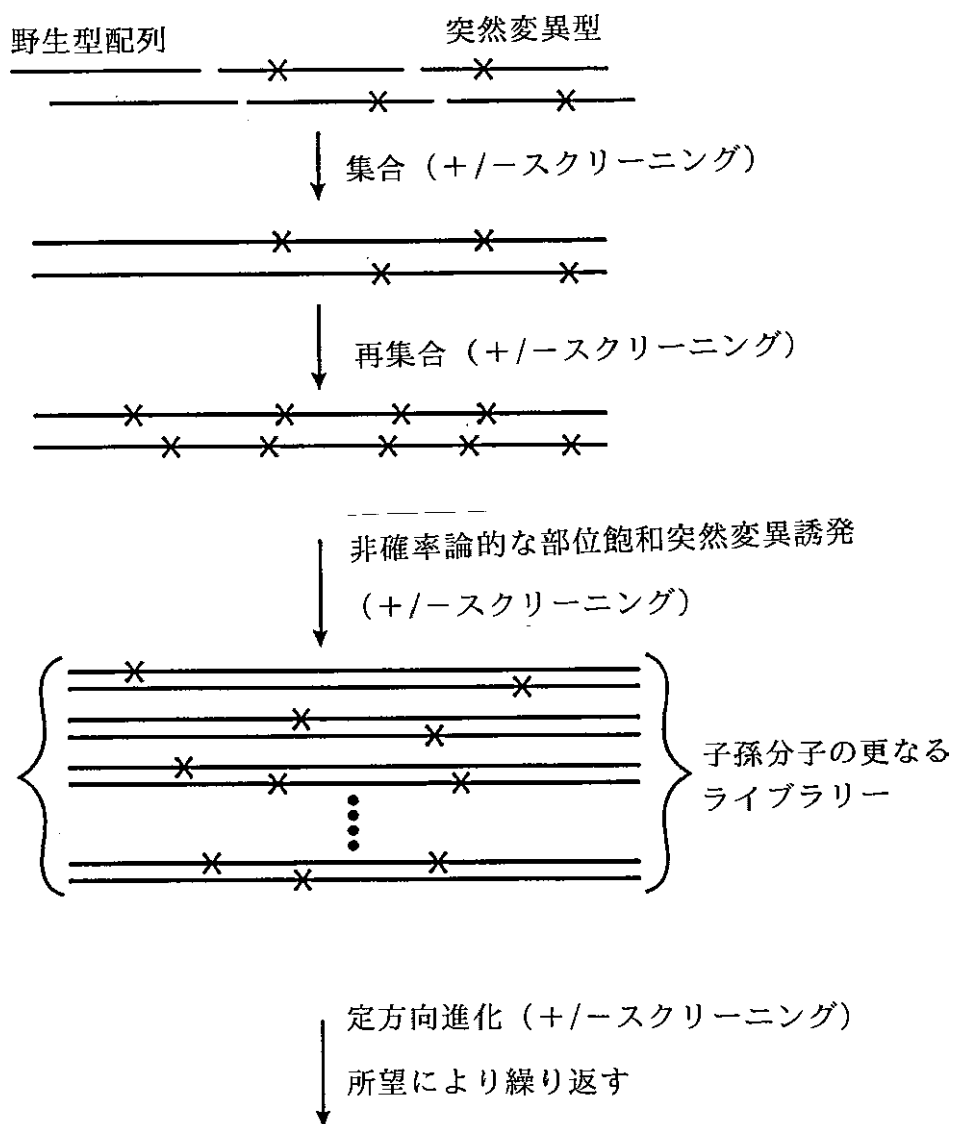
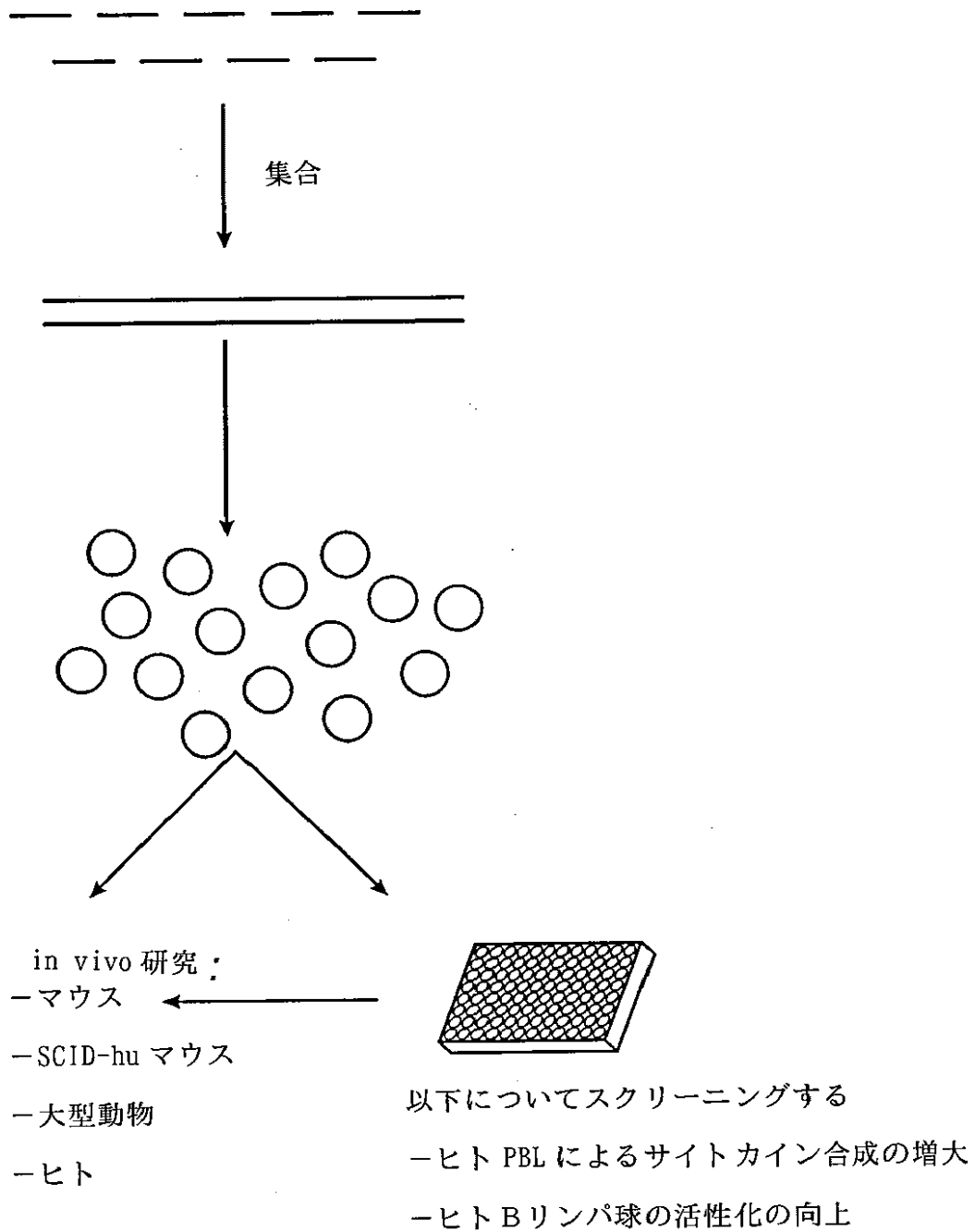


FIG. 35

【図36】

**FIG. 36**

【図37】

**FIG. 37**

【図38】

実施中の前駆鑄型

IL-12 遺伝子のライブラリー

(p35/p40 融合体)

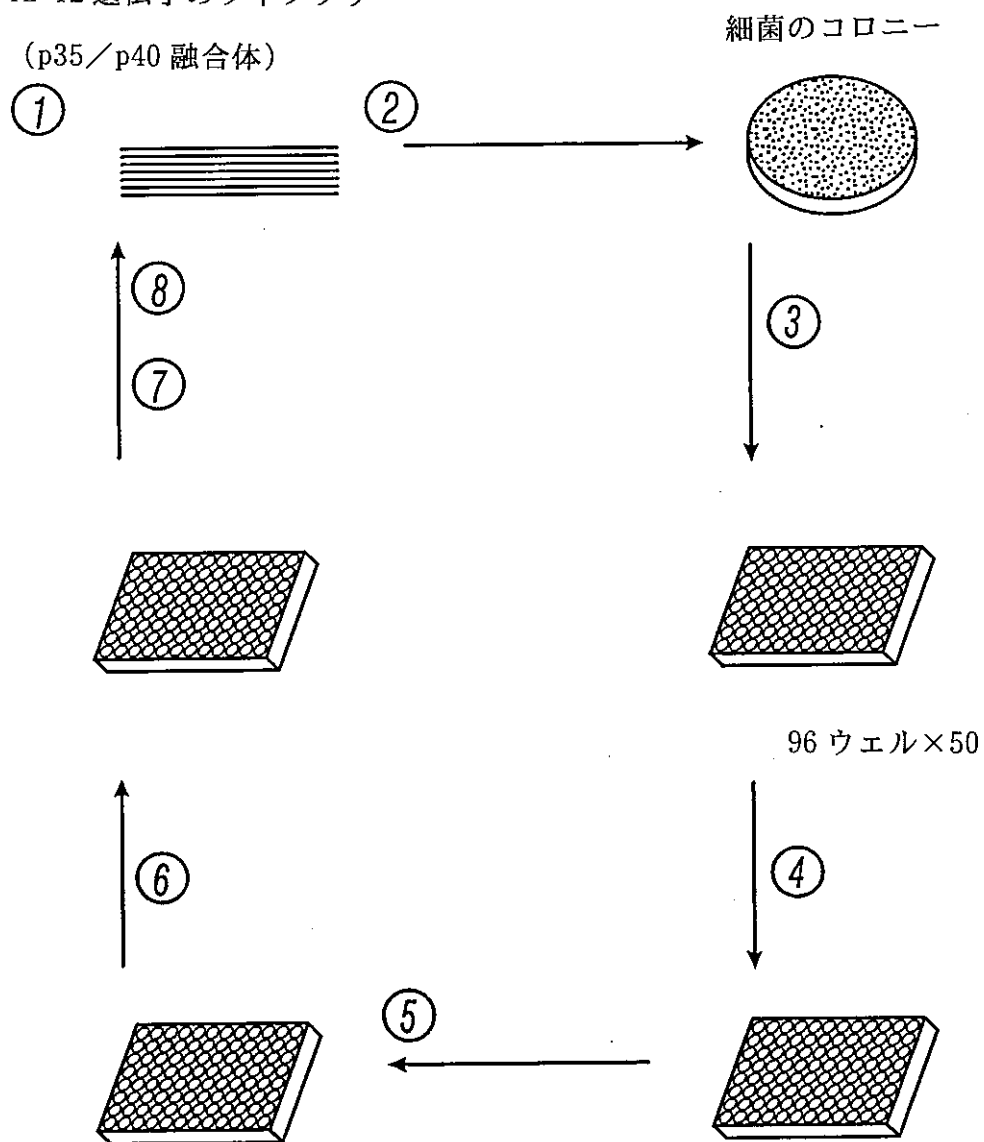


FIG. 38

【図39】

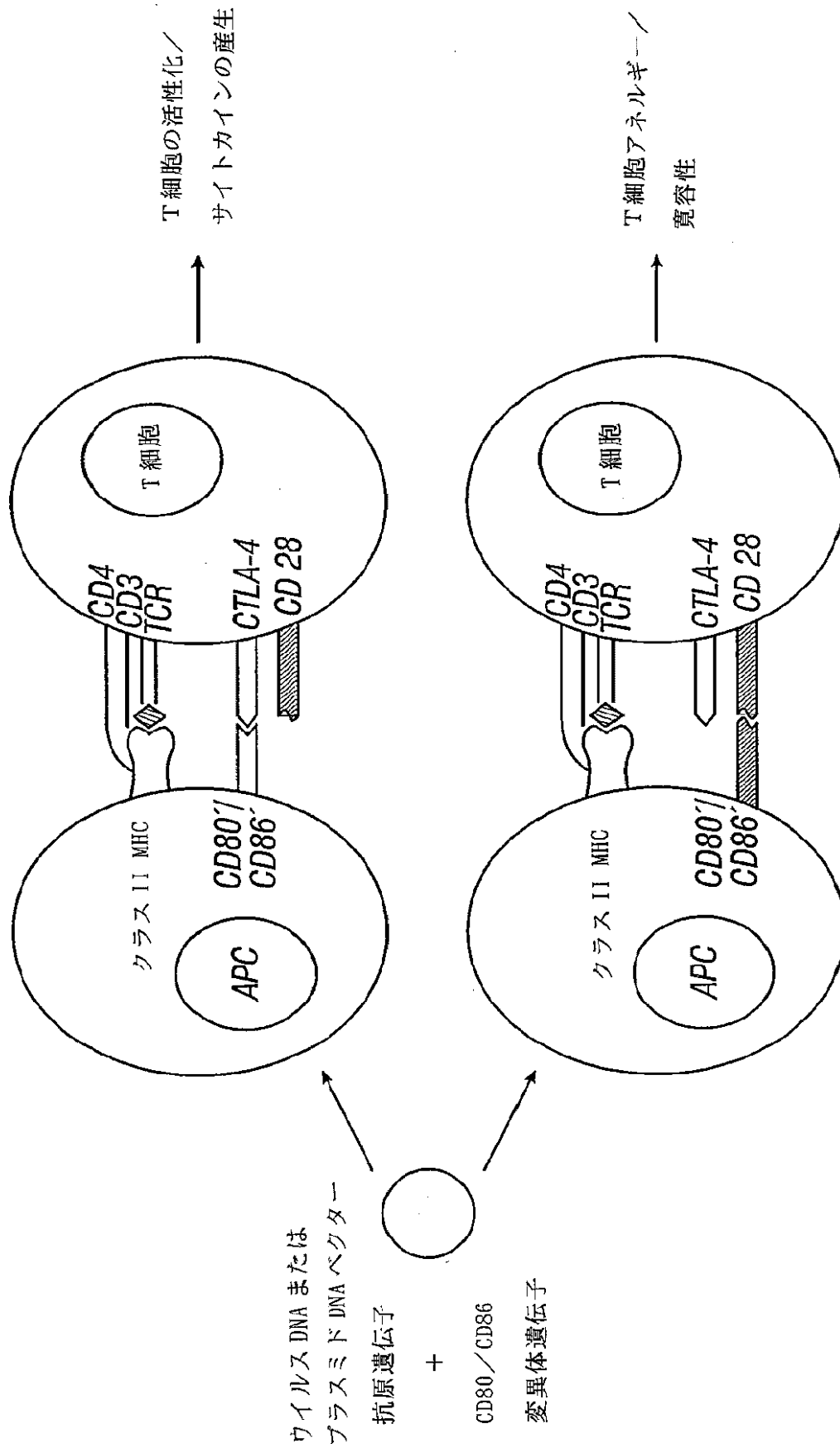


FIG. 39

【図40】

①

CD80 および／または CD86 遺伝子
の実施中の前駆鋳型のライブラリー

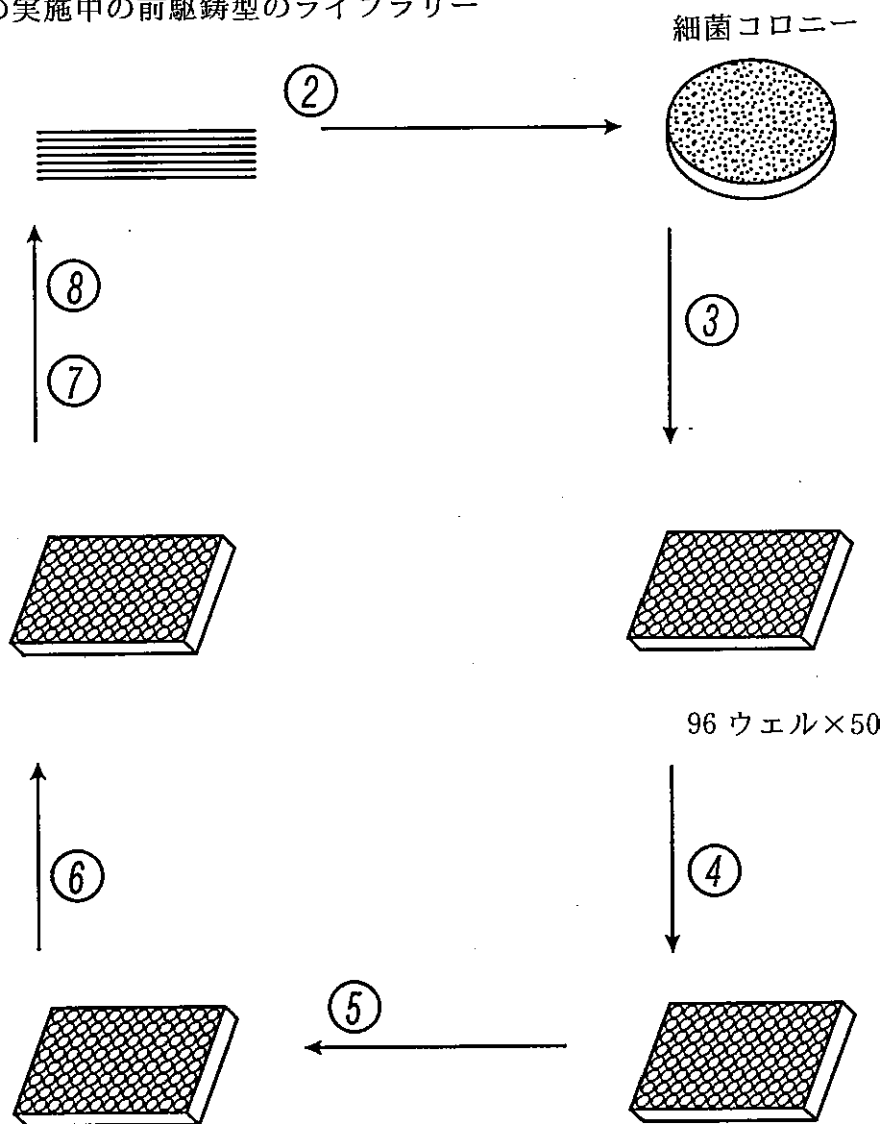


FIG. 40

【図41A】

AF078102 Rhesus M67443 Towne	(1)	1	ATCGATTTAACGCCCCGATTGAGGTTGTCCGCTGAACA	50
		(1)	-----GCCATGGCAATCCGTA	100
AF078102 Rhesus M67443 Towne	(50)	51	TTTCGAAAGTATGATATGACACTGCTTCCAGAA	100
		(24)	CATTTCGGGGCACGTGCTGAAGAGCCCTGTTAGTC	150
AF078102 Rhesus M67443 Towne	(99)	101	GGGTACATATCTGAAGCAGCCGAGATGAGCGTCCCG	150
		(73)	GTG-----CTGCCGCA-CGAGACCGCACTCCCTG	200
AF078102 Rhesus M67443 Towne	(148)	151	TGCCGACTACGGC-GTCTTCAGTTTCGTAATCTCGT	200
		(114)	CGTGGCGGTGAGCCAGCCCTCGCTGATCCTGGT	250
AF078102 Rhesus M67443 Towne	(196)	201	TCT-GAC--TATGTTACAG-GGTGTTTATCTGCGA	250
		(164)	ACTCGACGCCATGCCACCGCGCGGACATCAAGCTG	300
AF078102 Rhesus M67443 Towne	(242)	251	TG-TTTACGAGAAATATAATAAAGAAATCTGGTA	300
		(214)	TACTTTACGGGCAAGCGAGGTGGAGAACGTCGGT	350
AF078102 Rhesus M67443 Towne	(291)	301	GCAACCCCTGTAGCTGGTTTCTCGTCCTTCGCTCT	350
		(257)	ACAACCCCAACGGCCGGA-----GC-----	400

FIG. 41A

【図41B】

```

351                                400
AF078102 Rhesus (341) CAGGTA GA AACCQGT-TCGTT C GACAGTAT-CTTTGCT GCAAAGAGAA
M67443 Towne (285) CAGCC AAGAGCCCA TGTCCGATCTATGTGTACGCGCTGCCGCTCA-AGATG
401                                450
AF078102 Rhesus (389) TTGG AAGCAC TGGCAATATTGGGGTGCACCTTCGTCGATGGCAGT-GATC
M67443 Towne (334) CTGA AACA TCCCA GCA TCAACGTGCACCACTACCC-GTGGCGCCGAGC
451                                500
AF078102 Rhesus (438) GCAAAA A AATC CAGGACAC TACGTGTGCTCTCTGCTGGGAAGCTATCGA
M67443 Towne (383) GCAAA A CACC GACACCTTGC CCGTAGCTGACGCTGTGATTC-AAGCGTCCGG
501                                550
AF078102 Rhesus (488) TTTGTGT ACGTGTATGACTGC---GACAGTGACGG-ACTCTTTCAGATAG
M67443 Towne (432) CAAGCAGATGTGGCAGGCGCGCTCTCA CGGTCTCGGACTGGCCTGGACGC
551                                600
AF078102 Rhesus (534) GT-ACCTCACTCAAAGAACTCCGCA CACCGCTTTACTG-ACATGTGAAT
M67443 Towne (482) GTCA GCA GAAAC CAGTGGA AAGAGCCCGACG-TCTACTACACGTCAGCGT
601                                650
AF078102 Rhesus (582) CCGTA TATCGCCATCCGCA AACCCTTCTCCACCA CCGAGCTCGTTT
M67443 Towne (530) TCGTGTTTC-----CCACCAAGGACGTTGG--CACTCGGGCACTGGTGTG
651                                700
AF078102 Rhesus (632) CAAGTCGAGAAATTTGTTGTGTCCTCGATCCGACAGACGCACGTGGTCTAGC
M67443 Towne (573) CGCG-CACGAGCTGGTT-TG-CTCCATGGAGAAACACGCGCGCAACCAAGA

```

FIG. 41B

【図41C】

AF078102 Rhesus	(682)	TAA	ACC	CAGA	AGAG	TTT	CA	TGG	CGT	TAA	C	GT	AGTA	GTGA	AA	CCC	-CT	750						
M67443 Towne	(620)	T	-	G	CAG	GTGAT	AG	GTGAC	CA	GTA	CGT	CAA	GGT	GTAC	CTG	AGT	CTT	CT	800					
AF078102 Rhesus	(731)	GGG	GAT	CGG	AG	CCG	GAT	CC	CTT	GCT	CC	TT	CT	GG	-	GT	ACT	GTGG	AG	AAG				
M67443 Towne	(668)	GGG	AG	CGT	-	G	CC	T	CCG	CAA	GCT	CTT	A	TG	CAC	GT	CAC	GT	GG	CTC				
AF078102 Rhesus	(779)	CT	ACG	CA	AA	TG	TAT	CC	CTT	GC	T	AA	AAT	GAG	AG	CT	GAT	AA	CT	TT	AGTAA			
M67443 Towne	(717)	TG	ACG	TGG	AA	GAG	GA	CC	TGAC	GA	TG	ACC	CG	CA	ACC	CG	CA	CC	CT	CA	TGC			
AF078102 Rhesus	(829)	T	CT	C	-	A	TAA	CA	ACG	CAT	GT	GT	GC	GA	-	-	-	-	-	-	TGGTA			
M67443 Towne	(767)	G	CC	CC	AC	GA	CC	GA	CC	GG	CTT	AC	GG	GT	GT	GT	CC	CA	AA	ATA	TGATA			
AF078102 Rhesus	(871)	-	-	CGT	ACT	TTGG	TGTTA	-	CT	GGC	-	CGT	AC	GC	TAA	AT	TT	GG	AA	TTT	TGCTG			
M67443 Towne	(817)	AT	CAA	AC	CGG	CAAG	AT	CT	CG	CA	CA	TCA	TCA	TG	GA	TT	GT	GG	CT	TTT	TACCTC			
AF078102 Rhesus	(917)	AC	CT	GT	GA	ATA	TT	CT	GT	TG	CAC	AG	TC	GG	CG	GT	GT	GT	AT	GT	GC	-TGA		
M67443 Towne	(867)	AC	AC	GG	AG	CA	TT	-	TT	GG	GG	CT	GT	-	GT	GT	CC	CA	AG	CA	CC	GG	CG	CTGA
AF078102 Rhesus	(966)	GA	AT	CG	AC	CAA	AC	CG	AC	GT	GT	TT	-	CG	TC	AG	CC	GAT	AA	CA	TCC	AA	AT	GT
M67443 Towne	(914)	GC	AT	CT	CAG	GTAA	AC	CT	AT	TC	AT	TC	AT	TC	AT	TC	AT	TC	AT	TC	AT	TC	AT	TC

FIG. 41C

【図41D】

AF078102 Rhesus	1051	1100
M67443 Towne	(1014) TGTTCAGATGCGGCTTTCTTAAGCTCCGTGGCAATAACGCCAATTTCACCGC	
	(962) TGC---AAGCGA--TAAGCGAGA-CCGTGGAACTCCGTCAAT--AC---	1150
AF078102 Rhesus	1101	
M67443 Towne	(1064) GGATTCGCTGGCGAGGCTCGTCTG----GAGAGTGAGT--GCTACTGCTAT	
	(1000) -GATCCCGTGGCTGCGCTCTCTTTTTCGATATCGAATTCGCTGCTGC-AG	1200
AF078102 Rhesus	1151	
M67443 Towne	(1109) CACGGTGCCTGTAAGCAAAGATCTCTCTTGGTGCCTCTATGCTCAACACAGT	
	(1048) CGCGGCTTCAGTACAGCGAACAACCCACCTTCAACA--GCCAGTATCGC	1250
AF078102 Rhesus	1201	
M67443 Towne	(1159) TACCGCCGAGCAGCTCTGCTGGCT-ACGACTGGCTOACGCCAGTATAT	
	(1096) ATCCA--GGCAAGCTTGAGTACCGACAACCTGGG--ACCGGCAACGACG	1300
AF078102 Rhesus	1251	
M67443 Towne	(1208) CGCGCTCATGATAAATAACCTACCAAGTCTCTTGGGGACGTTAGTATTT	
	(1142) AEGGTGCGCCCAAGGGCGACGACCAAGTCTTGACCAAGCGGATCGGACTCC	1350
AF078102 Rhesus	1301	
M67443 Towne	(1258) GATGCCCTACCGAGTATTGCAAGAGAAATCAGATTTGGTGCCTTCCGTGGA	
	(1192) GACGAGGAATC-GTAACCAACGAGCGCAAGACGCCCCCGCTTACCGGCG	1400
AF078102 Rhesus	1351	
M67443 Towne	(1308) GCAGTGTCAAGGTTCTATAAAGGGCC-CCAAAGCGGTGCGTGCAGAA--GAA	
	(1241) GCGCGCGCAATGG-----CGGGCGCTCCACTTCCGCGGCGCGCAAAACGCA	

FIG. 41D

【図41E】

AF078102 Rhesus	1401	(1355) AATGATGAGTAAACCGAGAAACGCTCTGATGGTACTGTGATGTTTTCGTGT	1450
M67443 Towne	1451	(1286) AATCAGCA-TTCCTCGCCGACGCGCTGCACCGCGGGCGTTATGACACGCGG	1500
AF078102 Rhesus	1401	(1405) A-GACAGAGGTTTTCCTCCAGAACCGTAAAGTTCGAGGGTGAAGAGCGAT	1450
M67443 Towne	1501	(1335) CCGCCCTTAAGGCCGAGTCC---ACCGTCGCGCCCGAAGAGACACCGAC	1550
AF078102 Rhesus	1401	(1454) GACTACACAGAGAGGAGGAAAGATGATGATTAACCTAGTCAAGAAAGAACCC	1450
M67443 Towne	1551	(1381) GAGGATTCGAGCAACCGA---AATCC---ACCAATCCGCGCGTGTTCACCTG	1600
AF078102 Rhesus	1401	(1504) TCAGCATCAGGCTGTTGTTCATGTTTCAATCAAAACAAACGGCAGTGTTC	1450
M67443 Towne	1601	(1425) GCCGCCCTGGCAGGCCGCGCATCCGCGCAACCTGGTGCCCATGTGTTC	1650
AF078102 Rhesus	1401	(1554) ATTCTTATGATGATGAGAGTGAATCAT-TCTCTG---TCTT-CAGATACCCA	1450
M67443 Towne	1651	(1475) CTACCGGTTCAGGCTCAGAACTCTCAAGTACCAAGAGTCTTCTTCTGGGACGCC	1700
AF078102 Rhesus	1401	(1600) TGATCCACCAACCCAGACATTAAGGCCATTAATCCAAAGGAATGGCA--	1450
M67443 Towne	1701	(1525) --AAGGACATCTAACC--CATCTTCGCCGATTTGGAAAGGCGTATGGCAGC	1750
AF078102 Rhesus	1401	(1648) -----AAACGAAGAGCCGGTTACCAATGAAGAAGAAATGTTACTTGC	1450
M67443 Towne	1751	(1571) CCGCTGCGCAACCCCAACGTCGCGCGCACCGGCAAGACGCCCT-TGCCCGCG	1800

FIG. 41E

【図41F】

AF078102 Rhesus	1751	1800
M67443 Towne	(1689) GCGGTGCA---CGACGA-GCTAACAATATGAATAAGTGGCATTGTTCCCT	
	(1620) CCAATGCATCGCTCGACGCCAAAGACACCGAGGTTGAGCCACCCGCGC	1850
AF078102 Rhesus	1801	1850
M67443 Towne	(1735) GGAAGGGTTAGCA-----TTTATGACCCCTTGAATGCTAATATTCACT	
	(1670) CGCAAGCCTTAGGACGACTCTATAAACAACCCACGTCCACTCAGACACGCG	1900
AF078102 Rhesus	1851	1900
M67443 Towne	(1779) GCTTTGATTAAACAATGCAATTGTATTCAAATTATCTAATTCCGGT--GTA	
	(1720) ACTTTTGGCCGCCA---CACCTGTCCCGCTGCTATATTTCGACAGTTG	1950
AF078102 Rhesus	1901	1950
M67443 Towne	(1827) CCGTGTCTATTTCTCCATTCQAGTGCTCGCAACAACAATTACATATTAGACA	
	(1767) CCGGAACCCCTTCCCGA--CTCCACAGAGACCCGTT-CACCTTTGCCGA	2000
AF078102 Rhesus	1951	2000
M67443 Towne	(1877) -CACGTTATCACTTGTGAAGCTGAGTCAACATCATGCAATGTCGACGA	
	(1814) TCCCTTGACCCCCCC---CTCATCCCGCTTCGCGATGCTCAGGCAT	2050
AF078102 Rhesus	2001	2050
M67443 Towne	(1926) GGTCCGGGTGGTTCGTTCTGTGTTTCT-GTTACGAGTTTACATTTTATTA	
	(1860) CGTCC---TCGCCCGGTGAGGACCCCTCGTCCGAAGCCGCCGCCATCAGC	2077
AF078102 Rhesus	2051	2077
M67443 Towne	(1975) TGGTTCAAGTCTTCTATTCTTA---A	
	(1907) GAGGCAGAGCCGCC-AGCGGAAGCTT	

FIG. 41F

【図42A】

AF081502Marmota monax	IFN- γ	1	50
D30619 Felis catus	IFN- γ	(1)	GGCCTAACTCTCTCTGAAACGATGAATATAC
X87308 Homo sapien	IFN- γ	(1)	CTACTGATTCAAATCTCTTTGGCCTAACTCTC-CGAAACGATGAATATAC
		(1)	-----
AF081502Marmota monax	IFN- γ	51	100
D30619 Felis catus	IFN- γ	(31)	ACAAAGTTATTTCTTGGCTTTTCAGCTGTGCATCATTTTGGGTTCTCTCTAG
X87308 Homo sapien	IFN- γ	(49)	ACAAAGTTTATTTTGGCTTTTCAGCTTTGCATATAATTTGTGTTCTCTCTGG
		(1)	-----
AF081502Marmota monax	IFN- γ	101	150
D30619 Felis catus	IFN- γ	(81)	CTGTACTCCAGGACACAGTTTAAATAAGAAATAGAAGATTATAAAGGAT
X87308 Homo sapien	IFN- γ	(99)	TATTTACTGTTCAGGCCCATCTTTTATAAGAAATAGAAGACCTAAAGGGAT
		(1)	TGTTACTGCCAGGACCCATATCTTATAAGAAAGAGAGAPZCCTTAACAAAT
AF081502Marmota monax	IFN- γ	151	200
D30619 Felis catus	IFN- γ	(131)	ATTTTAATGCAAGTAATTCATATGTATCAGATGGCGGGTCTCTCTTCTTTG
X87308 Homo sapien	IFN- γ	(149)	ATTTTAATGCAAGTAATTCAGATGTAGCAGATGGTGGTCTGCTTTTCTGTA
		(50)	ATTTTAATGCCAGCTTATTCAGATGTAGCCGATAAATGGAACTCTTTCTTTA
AF081502Marmota monax	IFN- γ	201	250
D30619 Felis catus	IFN- γ	(181)	GATATTTTGGATTAATGGAAAGAGGAGAGTGACAAAAAACTAATCCAGAG
X87308 Homo sapien	IFN- γ	(199)	GACATTTTGAAGAACTGGAAAGAGGAGAGTGATATAAACAATAATTCAPAG
		(100)	GGCATTTTGAAGAAATGGAAAGAGGAGAGTGACCAAAAAATAATCCAGAG
AF081502Marmota monax	IFN- γ	251	300
D30619 Felis catus	IFN- γ	(231)	CCAAATTTGTCTCTTTCTACTTCAAACTCTTTGAACTTTAAAGACAA
X87308 Homo sapien	IFN- γ	(249)	CCAAATTTGTCTCTCTTCTACTCTTCAAACTTTGAAACCTTTGAAAGATGATG
		(150)	CCAAATTTGTCTCTCTTTTACTTCAAACTTTTATGAAACTTTTAAAGATGA

FIG. 42A

【図42B】

AF081502Marmota monax	IFN- γ	(279) -CAAGATCATCCAAAGGAGCATGGACACCATCAAGGGGATCTTTTTCCT	301
		(299) ACCAGCGCATTCAAAGGAGCATGGACACCATCAAGGAAGACATGCTTGA	350
		(198) -CCAGAGCATCCAAAGAGATGTGGACACCATCAAGGAAGACATGAATGTC	351
AF081502Marmota monax	IFN- γ	(328) AAGTTCTTCAACAGCAGTACCAATAAGCTGGACGACTTCCTAAAGGTG	401
		(349) AAGTTCTTAAATACCAGCTCCAGTAAACGGGATGACTTCCTCAAGCTGAT	450
		(247) AAGTTTTCATAGCTACAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAGCTGAC	451
AF081502Marmota monax	IFN- γ	(378) TCAAGTTCAGGTAAATGACCTGAAGATCCAGCGTAAAGCACTGCTGAAC	501
		(399) TCAATATCCCTGTGAATGATCTGCAAGTCCAGCGCAAGCAATAAATGAAC	550
		(297) TATTTATTCGGTAACTGACTTGAAATGTCCAACGCAAGCAATACATGAAC	551
AF081502Marmota monax	IFN- γ	(428) TCAAGAAAGTGATGAATGATCTGTACCACACTCTACCTAAGGAAGCGA	551
		(449) TCTTCAAAAGTGATGAATGATCTCTCACCAACATCTAACCTCAGGAAGCGG	551
		(347) TCATCCAAAGTGATGGCTGAACTGTGCTGCCAGCGCTCTAAACATGGGAAGCGG	551
AF081502Marmota monax	IFN- γ	(478) AAAAGGAGTCAGTCTTCTGATTCGGGGTCCGAGAGCATCCAAATAACAGTC	551
		(499) AAAAGGAGCCAGAACTCTGTTCCAGGCGGAGAGCATCGAAATAATGGTT	551
		(397) AAAAGGAGTCAGATGCTGTCTTCCAGGTCCGAGAGCATCCAG-----	551
AF081502Marmota monax	IFN- γ	(528) CTGATGCTTGC-----	551
		(549) GTCTGCTTGCATATTG	551
		(439) -----	551

FIG. 42B

【手続補正書】

【提出日】 平成14年9月20日（2002. 9. 20）

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫反応に最適化された調節効果を及ぼす、または免疫反応に最適化された調節効果を及ぼすポリペプチドをコードする、最適化されたポリヌクレオチドを取得する方法であって、

a) 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを、非確率論的な定方向進化法により親ポリヌクレオチドを進化させることにより作製し、ここで、定方向進化法は、(i)非確率論的な遺伝子部位飽和突然変異誘発、および/または(ii)非確率論的なポリヌクレオチドの再集合、および/または(iii)非確率論的な合成リガンド再集合を、任意の順序で含むものであり、そして、

b) 上記の進化した子孫ポリヌクレオチドをスクリーニングして免疫反応に調節効果を及ぼすポリヌクレオチドを同定することによって、免疫反応に調節効果を及ぼす最適化されたポリペプチドを取得する、ことを含んでなる、上記方法。

【請求項2】 進化が、該ライブラリーの由来となった親ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに比べて免疫反応を調節する能力の増大を示すポリペプチドをコードする子孫ポリヌクレオチドを同定するためのスクリーニングを含んでなる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 免疫反応に最適化された調節効果が遺伝子ワクチンにより誘導されることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項4】 最適化されたポリヌクレオチドをベクターに挿入することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 ライブラリーが、遺伝子再集合、および/またはオリゴヌクレオチド特異的遺伝子部位飽和突然変異誘発からなる群より選択される過程を利用して作られる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 進化が、少なくとも2つの親鋳型ポリヌクレオチドを再集合させることを含んでなり、

ここで、それぞれの親鋳型は、免疫反応を調節するか、免疫反応を調節するポリペプチドをコードするものであり、2つの親ポリヌクレオチドはその配列において2個以上のヌクレオチドが相違していることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 さらに、

a) 請求項1で取得した最適化されたポリヌクレオチドを、少なくとも2つの親鋳型ポリヌクレオチドと同一であるかまたはこれと異なる少なくとも1つの追加のポリヌクレオチドとの非確率論的再集合に付すことにより、第2のライブラリーを作製し、

b) 該第2ライブラリーをスクリーニングすることにより、該第2ライブラリーが由来するポリヌクレオチドと比較して、免疫反応を調節する能力の増大を示す少なくとも1つのさらなる最適化されたポリヌクレオチドを同定し；そして、

c) 必要に応じてステップa)および/またはb)を繰り返す、
ことを含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】 最適化されたポリヌクレオチドが、免疫反応の制御に関与する細胞受容体をコードしており、該ポリペプチドが該受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項9】 受容体がマクロファージのスカベンジャー受容体である、請求項8記載の方法。

【請求項10】 受容体がサイトカイン受容体およびケモカイン受容体からなる群より選択される、請求項8記載の方法。

【請求項11】 ケモカイン受容体がCCR5またはCCR6である、請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記ポリペプチドが該受容体の天然リガンドの結合活性を

模倣する、請求項8記載の方法。

【請求項13】 前記スクリーニングが、

i) ポリペプチドが複製可能な遺伝子パッケージの表面に展示された融合タンパク質として産生されるように、子孫ポリヌクレオチドを発現させ、

ii) 該複製可能な遺伝子パッケージを、該受容体を展示する複数の細胞に接触させ、そして、

iii) 免疫反応の調節を示す細胞を同定する、
ことを含む、請求項8記載の方法。

【請求項14】 複製可能な遺伝子パッケージがバクテリオファージ、細胞、胞子およびウイルスからなる群より選択される、請求項13記載の方法。

【請求項15】 複製可能な遺伝子パッケージがM13バクテリオファージであり、かつ融合タンパク質がgeneIIIまたはgeneVIIIにより一部コードされる、請求項13記載の方法。

【請求項16】 最適化されたポリヌクレオチドをワクチンに挿入することをさらに含み、該ポリペプチドが発現されることを特徴とする、請求項8記載の方法。

【請求項17】 最適化されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを産生させることをさらに含む、請求項8記載の方法。

【請求項18】 最適化されたポリヌクレオチドがワクチンの抗原をコードするヌクレオチド配列に挿入される、請求項8記載の方法。

【請求項19】 抗原をコードするヌクレオチド配列が、HbsAgポリペプチドのMループをコードする、請求項18記載の方法。

【請求項20】 最適化されたポリヌクレオチドが非メチル化CpGに富むヌクレオチド配列を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項21】 最適化されたポリヌクレオチドがアレルギー反応を抑制するポリペプチドをコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項22】 前記ポリペプチドがインターフェロナーα、インターフェロナーγ、IL-10、IL-12、IL-4のアンタゴニスト、IL-5のアンタゴニスト、およびIL-13のアンタゴニストからなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項23】 最適化されたポリヌクレオチドがIL-10のアンタゴニストをコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項24】 IL-10のアンタゴニストが、可溶性IL-10、欠損IL-10受容体またはIL-20/MDA-7ポリペプチドである、請求項23記載の方法。

【請求項25】 最適化されたポリヌクレオチドが補助的刺激物質をコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項26】 補助的刺激物質がB7-1(CD80)またはB7-2(CD86)、CD1、CD40、CD154(CD40に対するリガンド)またはCD150(SLAM)である、請求項25記載の方法。

【請求項27】 補助的刺激物質がサイトカインである、請求項25記載の方法。

【請求項28】 サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、GM-CSF、G-CSF、TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ およびIL-20(MDA-7)からなる群より選択される、請求項27記載の方法。

【請求項29】 スクリーニングが、ポリヌクレオチドによりコードされるサイトカインが、該サイトカインの受容体を発現する細胞を活性化するか否かを試験することを含む、請求項28記載の方法。

【請求項30】 前記細胞が該サイトカインの受容体をコードする異種核酸を含む、請求項29記載の方法。

【請求項31】 サイトカインがインターロイキン-12であり、スクリーニングが、該細胞の培養培地との接触によりT細胞増殖またはT細胞分化が誘導されるか否かを検出することを含む、請求項29記載の方法。

【請求項32】 サイトカインがインターフェロン- α であり、スクリーニングが、

- a) 複製可能な遺伝子パッケージの表面に展示された融合タンパク質として進化したポリヌクレオチドを発現させ、
- b) 該複製可能な遺伝子パッケージを複数のB細胞に接触させ、そして、

c) B細胞の増殖を阻害するライブラリーのメンバーを同定する、
ことを含む、請求項29記載の方法。

【請求項33】 スクリーニングが、T細胞の集団を、サイトカインをコードするポリヌクレオチドに接触させて、サイトカインがIL-2およびインターフェロン- α を産生するT細胞を誘導するか否かを判定することを含む、請求項29記載の方法。

【請求項34】 サイトカインが、進化に付していないポリヌクレオチドによってコードされるサイトカインに比べて免疫原性の低下を示すことを特徴とする、請求項28記載の方法。

【請求項35】 免疫原性の低下が、非確率論的に生成したポリヌクレオチドによってコードされるサイトカインを哺乳動物に導入して、サイトカインに対して免疫反応が誘導されるか否かを判定することにより検出される、請求項34記載の方法。

【請求項36】 補助的刺激物質がB7-1(CD80)またはB7-2(CD86)であり、前記細胞が免疫反応を共刺激する能力について試験される、請求項29記載の方法。

【請求項37】 最適化されたポリヌクレオチドがサイトカインアンタゴニストをコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項38】 サイトカインアンタゴニストが可溶性のサイトカイン受容体および欠損シグナル配列をもつ膜貫通サイトカイン受容体からなる群より選択される、請求項37記載の方法。

【請求項39】 サイトカインアンタゴニストがIL-1およびIL-4Rまたはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項37記載の方法。

【請求項40】 最適化されたポリヌクレオチドが、主に T_H1 免疫反応を誘導することができるポリペプチドをコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項41】 最適化された非確率論的に生成したポリヌクレオチドが主に T_H2 免疫反応を誘導することができるポリペプチドをコードする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項42】 免疫反応への最適化された調節効果が、免疫反応への望ましくない調節効果の低下である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項43】 免疫反応への最適化された調節効果が、免疫反応への望ましい調節効果の増加である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項44】 免疫反応への最適化された調節効果が、免疫反応への第1の望ましくない調節効果の低下と、免疫反応への第2の望ましい調節効果の増加の双方である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項45】 免疫反応への第1および第2の調節効果が、ワクチンの第1配列および第2配列それぞれについて進化したものである、請求項44記載の方法。

【請求項46】 配列が、抗原コード配列、ポリアデニル化配列、共刺激分子のコード配列、誘導性のリプレッサーまたはトランスアクチベーターをコードする配列、真核生物の複製起点または複製配列、原核生物の複製起点または複製配列、原核生物のマーカをコードする配列、エンハンサー配列、プロモーター配列、オペレーター配列、イントロン配列、およびこれらの任意のフラグメント、誘導体または類似体からなる群より選択される、請求項45記載の方法。

【請求項47】 免疫反応への最適化された調節効果が、それによってコードされるポリペプチドの安定性の増加からなる、請求項1または2記載の方法。

【請求項48】 ポリヌクレオチドまたはそれによってコードされるポリペプチドがヒト宿主レシピエントの免疫反応に最適化された調節効果を有することを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

【請求項49】 ポリヌクレオチドまたはそれによってコードされるポリペプチドが動物宿主レシピエントの免疫反応に最適化された調節効果を有することを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

【請求項50】 細胞による抗原の輸送または提示を向上させるアクセサリー分子をコードする最適化されたポリヌクレオチドを取得する方法であって、

a) 1つ以上のアクセサリー分子の全部または一部をコードする親ポリヌクレオチドから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを、非確率論的な定方向進化法により親ポリヌクレオチドを進化させることにより作製し

、ここで、定方向進化法は、(i)非確率論的な遺伝子部位飽和突然変異誘発、および/または(ii)非確率論的なポリヌクレオチドの再集合、および/または(iii)非確率論的な合成リガンド再集合を、任意の順序で含んでなり、そして、

b) 上記の進化した子孫ポリヌクレオチドをスクリーニングして、進化に付していない親ポリヌクレオチドによりコードされるアクセサリー分子と比べて、細胞表面上に抗原を輸送または提示する能力の向上または低下を細胞に賦与する組換えアクセサリー分子をコードする最適化されたポリヌクレオチドを同定する、ことを含んでなる上記方法。

【請求項51】 スクリーニングが、

i) ライブラリーを抗原をコードする配列をさらに含むワクチンベクターに挿入して、ワクチンベクターのライブラリーを作製し、該ベクターのライブラリーを哺乳動物細胞に導入し、そして、

ii) 該抗原に対する免疫原性の増加または低下を示す哺乳動物細胞を同定する、

ことを含む、請求項50記載の方法。

【請求項52】 アクセサリー分子がプロテアソームまたはTAPポリペプチドを含む、請求項50記載の方法。

【請求項53】 アクセサリー分子が細胞傷害性T細胞を誘導する配列を含む、請求項50記載の方法。

【請求項54】 細胞傷害性T細胞を誘導する配列がB型肝炎表面抗原に由来するものである、請求項53記載の方法。

【請求項55】 アクセサリー分子が免疫原性アゴニスト配列を含む、請求項50記載の方法。

【請求項56】 組換え体発現宿主において最適化された発現を示す免疫調節性ポリヌクレオチドを取得する方法であって、

a) 親ポリヌクレオチドのセットから非確率論的に生成した子孫ポリヌクレオチドのライブラリーを、非確率論的な定方向進化法により親ポリヌクレオチドを進化させることにより作製し、ここで、定方向進化法は、(i)非確率論的な遺伝子部位飽和突然変異誘発、および/または(ii)非確率論的なポリヌクレオチドの

再集合、および/または (iii) 非確率論的な合成リガンド再集合を、任意の順序で含んでなり、

b) 上記の進化した子孫ポリヌクレオチドをスクリーニングして、組換え体発現宿主において最適化された発現を示すポリヌクレオチドを同定することによって、組換え体宿主において最適化した発現を示す免疫調節ポリヌクレオチドを取得する、

ことを含んでなる、上記方法。

【請求項57】 組換え体発現宿主が原核生物である、請求項56記載の方法。

【請求項58】 組換え体発現宿主が真核生物である、請求項56記載の方法。

【請求項59】 組換え体発現宿主が植物である、請求項56記載の方法。

【請求項60】 組換え体発現宿主が単子葉植物である、請求項59記載の方法。

【請求項61】 組換え体発現宿主が双子葉植物である、請求項59記載の方法。

【請求項62】 非確率論レンジの単一アミノ酸置換が各アミノ酸位置に呈示される子孫ポリペプチドのセットを作る方法であって、

a) コドン含有鋳型ポリヌクレオチドを、突然変異を起こそうとする各コドンについての縮重オリゴヌクレオチドを用いてポリメラーゼ増幅反応に付すことにより、非確率論レンジの単一アミノ酸置換が各アミノ酸位置に呈示されている子孫ポリヌクレオチドのセットを作り、ここで、縮重オリゴヌクレオチドのそれぞれは鋳型ポリヌクレオチドに相同的な第1配列と縮重オリゴヌクレオチドカセットを含み、

b) 該子孫ポリヌクレオチドのセットを発現させることにより、それによりコードされるポリペプチドを産生させ、ここで、非確率論レンジの単一アミノ酸置換が、ポリペプチドの各アミノ酸位置で置換されるべき予め決められた数のアミノ酸を含むものである、

ことを含んでなる上記方法。

【請求項63】 該縮重オリゴヌクレオチドカセットが第2相同配列をさらに含む、請求項62記載の方法。

【請求項64】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1モノヌクレオチドカセットを含み、

該縮重オリゴヌクレオチドカセットがさらに第2および第3モノヌクレオチドカセットを含み、そのそれぞれが、

縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、

非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項62記載の方法。

【請求項65】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項62記載の方法。

【請求項66】 縮重オリゴヌクレオチドが複数のオリゴヌクレオチドカセットをさらに含み、子孫ポリペプチドが同時に複数の単一アミノ酸変化を含有する、請求項62記載の方法。

【請求項67】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1モノヌクレオチドカセットを含み、
該縮重オリゴヌクレオチドカセットがさらに第2および第3モノヌクレオチド

カセットを含み、そのそれぞれが、

縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、
非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、

からなる群より選択される、請求項66記載の方法。

【請求項68】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、

からなる群より選択される、請求項62記載の方法。

【請求項69】 縮重オリゴヌクレオチドが複数のオリゴヌクレオチドカセットおよび第2相同配列をさらに含む、請求項62記載の方法。

【請求項70】 非確率論レンジの単一アミノ酸置換が各アミノ酸位置に呈示される子孫ポリペプチドのセットを作り、該子孫分子のなかでアミノ酸置換ま

たはその組合せを同定する方法であって、

a) コドン含有鋳型ポリヌクレオチドを、突然変異を起こそうとする各コドンについての縮重オリゴヌクレオチドカセットを用いてポリメラーゼ増幅反応に付すことにより、非確率論レンジの単一アミノ酸置換が各アミノ酸位置に呈示される子孫ポリヌクレオチドのセットを作り、ここで、縮重オリゴヌクレオチドのそれぞれは、鋳型ポリヌクレオチドに相同的な第1配列と縮重オリゴヌクレオチドカセットからなり、

b) 該子孫ポリヌクレオチドのセットを発現させることにより、子孫ポリペプチドのセットを作り、ここで、非確率論レンジの単一アミノ酸置換がポリペプチドの各アミノ酸位置で置換されるべき予め決められた数のアミノ酸を含んでおり、

c) 発現された子孫ポリペプチドをスクリーニングに付して、鋳型ポリペプチドによりコードされるポリペプチドによって呈示される同一の特性と比較して、特性の増大を呈する1つ以上の子孫ポリペプチドを同定し、そして、

d) 同定された子孫ポリペプチドのアミノ酸配列を決定する、
ことを含んでなる、上記方法。

【請求項71】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1ヌクレオチドを含み、

該縮重オリゴヌクレオチドカセットがさらに第2および第3モノヌクレオチドカセットを含み、そのそれぞれが、

縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、
非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および
非縮重Tモノヌクレオチドカセット、

からなる群より選択される、請求項70記載の方法。

【請求項72】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、

からなる群より選択される、請求項70記載の方法。

【請求項73】 縮重オリゴヌクレオチドが複数のオリゴヌクレオチドをさらに含み、かつ子孫ポリペプチド同時に複数の単一アミノ酸の変化を含む、請求項70記載の方法。

【請求項74】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、および
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される第1モノヌクレオチドカセットを含み、
該縮重オリゴヌクレオチドカセットがさらに第2および第3モノヌクレオチド
カセットを含み、そのそれぞれが、
縮重A/Cモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重A/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/G/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Tモノヌクレオチドカセット、
縮重A/C/Gモノヌクレオチドカセット、
縮重NまたはA/C/G/Tモノヌクレオチドカセット、
非縮重Aモノヌクレオチドカセット、
非縮重Cモノヌクレオチドカセット、
非縮重Gモノヌクレオチドカセット、および

非縮重Tモノヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項70記載の方法。

【請求項75】 縮重オリゴヌクレオチドカセットが、
縮重N,N,Nトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Tトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,G/Cトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/C/Gトリヌクレオチドカセット、
縮重N,N,A/G/Tトリヌクレオチドカセット、および
縮重N,N,C/G/Tトリヌクレオチドカセット、
からなる群より選択される、請求項70記載の方法。

【請求項76】 宿主の免疫反応を生起する能力の低下を示す最適化されたポリペプチドであって、宿主はヒトまたは動物であり、ポリペプチドは請求項1～75のいずれか1項に記載の方法によって産生されたものである、上記ポリペプチド。

【請求項77】 請求項1～75のいずれか1項に記載の方法によって産生されたポリペプチドの少なくとも1つの宿主レシピエントについて抗原性の減少を示す最適化されたポリペプチド。

【請求項78】 宿主の免疫反応を生起する能力の増大を示す最適化されたポリペプチドであって、宿主はヒトまたは動物であり、ポリペプチドは請求項1～75のいずれか1項に記載の方法によって産生されたものである、上記ポリペプチド。

【請求項79】 該ポリペプチドの第1宿主レシピエントの第1免疫反応を生起する能力の低下および該ポリペプチドの第2宿主レシピエントの第2免疫反応を生起する能力の増大の両方を示す、請求項1～75のいずれか1項に記載の方法によって産生された最適化ポリペプチド。

【請求項80】 *ex vivo*の安定性の向上を示す、請求項1～75のいずれか1項に記載の方法によって産生された最適化ポリペプチド。

【請求項81】 *in vivo*の安定性の向上を示す、請求項1～75のいずれか1項に記載の方法によって産生された最適化ポリペプチド。

【請求項82】 最適化ポリヌクレオチドがサイトカイン、癌抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原または自己抗原をコードする、請求項1～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項83】 体液性免疫反応もしくは細胞性免疫反応、またはこの両方である免疫反応が生起される、請求項1～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項84】 子孫ポリヌクレオチドによる調節効果の呈示がin vitroまたはin vivoで測定される、請求項1～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項85】 請求項76～81のいずれか1項に記載の最適化ポリペプチドの、薬物の調剤における使用。

【請求項86】 治療に有効な量の、請求項76～81のいずれか1項に記載の最適化ポリペプチドの、治療を必要とする患者の治療における使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/03086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12N 15/09; C07H 21/02; A61K 39/00 US CL : 435/6, 69.3; 536/23.1; 424/184.1 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. : 435/6, 69.3; 536/23.1; 424/184.1; 435/7.6, 69.1, 69.7; 530/350 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) DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, US PATENTS, immunomodulatory polynucleotide, library, non-stochastic, mutagenesis, genetic vaccine		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,959,312 A (SIROTKIN) 25 September 1990, Abstract.	1-85
Y	CWIRLA et al. Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. August 1990, Vol. 87, pages 6378-6382, especially page 6378, Materials and Methods.	1-85
Y	HILL et al. Mutagenesis with Degenerate oligonucleotides: An Efficient Method for Saturating a Defined DNA Region with Base Pair Substitutions. Methods in Enzymology. 1987, Vol. 155, pages 558-568, especially pages 561-563.	1-85
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 JULY 2000		Date of mailing of the international search report 04 AUG 2000
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 HANKYEL T. PARK, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/03086

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MURRAY et al. Saturation mutagenesis of a major histocompatibility complex protein domain: Identification of a single conserved amino acid important for allorecognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. May 1988, Vol. 85, pages 3535-3539, especially pages 3535-3536.	1-85

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 4
	1/21	C 1 2 P	21/02	C 4 C 0 8 5
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/02		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566		5/00	C
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW				
Fターム(参考)	2G045 AA35 DA13 FB02 FB03			
	4B024 AA01 AA11 BA21 BA63 CA04			
	DA02 EA04 GA11 HA01 HA11			
	HA17			
	4B063 QA01 QQ08 QQ42 QR32 QR55			
	QR62 QS05 QS34			
	4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA01			
	DA13			
	4B065 AA90X AA99Y AB01 BA01			
	CA24			
	4C084 AA13 BA44 DA01 DA12 DA13			
	DA14 DA15 DA16 DA17 DA18			
	DA19 DA21 DA25 NA10 ZB091			
	ZB092 ZC752			
	4C085 AA03 BB23 DD62 DD86 EE01			
	EE03 EE06 FF13			

专利名称(译)	非随机生成基因疫苗和酶		
公开(公告)号	JP2003524392A	公开(公告)日	2003-08-19
申请号	JP2000597406	申请日	2000-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	戴弗萨公司		
申请(专利权)人(译)	Diberusa公司		
[标]发明人	ショートジェイエム		
发明人	ショート、ジェイ、エム.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61P33/06 C07K14/445 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/02 C12N5/10 C12N9/00 C12N9/16 C12N9/24 C12N9/38 C12N15/01 C12N15/10 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/53 A61P33/06 C07K14/445 C12N9/00 C12N9/14 C12N9/16 C12N9/88 C12N15/102 C12N15/1027 C12N15/1034 C12N15/1058 C12Y301/11002 Y02A50/412 Y02A50/58		
FI分类号	A61K39/00.H A61K39/39 A61K48/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.C		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS05 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/DA12 4C084/DA13 4C084/DA14 4C084/DA15 4C084/DA16 4C084/DA17 4C084/DA18 4C084/DA19 4C084/DA21 4C084/DA25 4C084/NA10 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZC752 4C085/AA03 4C085/BB23 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF13		
优先权	09/246178 1999-02-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过使用直接进化TM的非随机方法获得新的多核苷酸和编码的多肽的方法。 这些方法包括非随机多核苷酸位点饱和和诱变 (基因位点饱和和诱变 TM) 和非随机多核苷酸重组 (基因重组 TM)。 本发明的方法可用于使遗传疫苗, 酶和其他所需分子向所需特性进化。 例如, 获得了作为基因疫苗具有更高效力的疫苗载体。 通过这种方法获得的载体可以表现出例如增加的抗原表达, 增加的细胞摄取, 增加的细胞内稳定性, 调节免疫应答的能力等。 本发明提供了获得具有优化的物理和/或生物学特性的新型酶的方法。 此外, 本发明提供了一种在抗生素, 药物治疗和转基因性状领域中获得各种新颖的生物活性分子的方法。

表番号	トリプレット配列	位置 1	位置 2	位置 3
1.	N,N,G/T	N	N	G/T
2.	N,N,G/C	N	N	G/C
3.	N,N,G/A	N	N	G/A
4.	N,N,A/C	N	N	A/C
5.	N,N,A/T	N	N	A/T
6.	N,N,A/G	N	N	A/G
7.	N,N,N	N	N	N
8.	N,N,G	N	N	G
9.	N,N,A	N	N	A
10.	N,N,C	N	N	C
11.	N,N,T	N	N	T
12.	N,N,C/G/T	N	N	C/G/T
13.	N,N,A/G/T	N	N	A/G/T
14.	N,N,A/C/T	N	N	A/C/T
15.	N,N,A/C/G	N	N	A/C/G
16.	N,A,A	A	A	A
17.	N,A,C	A	A	C
18.	N,A,G	A	A	G
19.	N,A,T	A	A	T
20.	N,C,A	C	A	A
21.	N,C,C	C	C	C
22.	N,C,G	C	C	G
23.	N,C,T	C	C	T
24.	N,G,A	G	A	A
25.	N,G,C	G	A	C
26.	N,G,G	G	G	G
27.	N,G,T	G	T	T
28.	N,T,A	T	A	A
29.	N,T,C	T	C	C
30.	N,T,G	T	G	G
31.	N,T,T	T	T	T
32.	N,A/C,A	A	A	A
33.	N,A/G,A	A	A	A
34.	N,A/T,A	A	A	A
35.	N,C/G,A	C	A	A
36.	N,C/T,A	C	A	A
37.	N,T/G,A	T	A	A
38.	N,C/G/T,A	A	A	A
39.	N,A/G/T,A	A	A	A
40.	N,A/C/T,A	A	A	A
41.	N,A/C/G,A	A	A	A
42.	A,N,N	A	N	N
43.	G,N,N	G	N	N
44.	T,N,N	T	N	N
45.	A/C,N,N	A	N	N