

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 532431

(P2003 - 532431A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 0 7 K 5/00	2 G 0 4 5
C 0 7 K 5/00		7/00	4 B 0 2 4
	7/00	14/00	4 B 0 5 0
	14/00	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19		1/21	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 96数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 583186(P2001 - 583186)

(86)(22)出願日 平成13年5月11日(2001.5.11)

(85)翻訳文提出日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(86)国際出願番号 PCT/IB01/00810

(87)国際公開番号 W001/086293

(87)国際公開日 平成13年11月15日(2001.11.15)

(31)優先権主張番号 09/570,477

(32)優先日 平成12年5月12日(2000.5.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 スプラテック ファーマ インコーポレイ
ティド
カナダ国,ケベック エイチ9エス 5ティ-
8,ド-バル,フェネロン ブールバード 4
55,スイート 104

(71)出願人 バイオフィェイジ, インコーポレイティド
カナダ国,ケベック エイチ4ピー 2ア-ル
2,モントリオール,ロイヤルマウント 610
0

(72)発明者 ポブコフ, ミカイル
カナダ国,ケベック エイチ7エル 1ブイ1
,ラバル,テルフェ 1652

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 化合物のランダムライブラリーを設計およびスクリーニングする方法

(57)【要約】

変化する長さの分子を含んでなる新規な、有用な多次元ライブラリー (MDL) を製造する方法が提供され、ここで分子はターゲット分子と潜在的に相互作用する機能的単位と、構造単位とを含んでなる。また、新規なオリゴヌクレオチド、ペクター、形質転換およびトランスフェクトされた単細胞宿主、ならびにターゲット分子との相互作用について多次元ライブラリーの分子をスクリーニングするキットが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $(XY_n)_m$ の一般式：

〔式中、

(XY_n) は前記少なくとも1つの分子の反復単位であり、ここで

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは構造単位であり、

nは前記反復単位中の前記構造単位の数であり、そして

mは前記少なくとも1つの分子中の反復単位の数である〕

を有する少なくとも1つの分子を含んでなる、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするための多次元ライブラリー。

【請求項2】 前記少なくとも1つの分子が検出可能に標識化されている、請求項1に記載の多次元ライブラリー。

【請求項3】 前記検出可能な標識が放射性元素、蛍光性化学物質、または酵素を含んでなる、請求項2に記載の多次元ライブラリー。

【請求項4】 前記少なくとも1つの分子が単離されたオリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、またはそれらの組み合わせを含んでなる、請求項1に記載の多次元ライブラリー。

【請求項5】 前記少なくとも1つの分子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含んでなる、請求項1に記載の多次元ライブラリー。

【請求項6】 式中、

Xが少なくとも1つの分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yが構造ペプチド単位であり、

nが0 n 10であるような整数であり、そして

mが2 m 20であるような整数である、

請求項5に記載の多次元ライブラリー。

【請求項7】 前記少なくとも1つの分子が単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなる、請求項1に記載の多次元ライブラリー。

【請求項8】 前記機能的単位がヌクレオチド調節配列を含んでなり、そして前記構造単位が6～少なくとも60の隣接ヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項7に記載の多次元ライブラリー。

【請求項9】 前記ヌクレオチド調節配列がプロモーター、エンハンサー、シス作用性遺伝子座、トランス作用性遺伝子座、アテニュエーター、上流アクチベーター、または調節非翻訳可能領域配列を含んでなる、請求項8に記載の多次元ライブラリー。

【請求項10】 前記プロモーターがSV40初期プロモーター、RSウイルスの3'の長い末端反復の中に含有されるプロモーター、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、メタロチオネイン遺伝子の調節配列、 β -ラクタマーゼプロモーター、tacプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーター、膵腺房細胞中で活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域、膵細胞中で活性であるインスリン遺伝子制御領域、リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域、睾丸、乳房、リンパ系およびマスト細胞中で活性であるマウス乳腫瘍ウイルス制御領域、肝臓中で活性であるアルブミン遺伝子制御領域、肝臓中で活性であるフェトプロテイン遺伝子制御領域、肝臓中で活性である1抗トリプシン遺伝子制御領域、骨髄性細胞中で活性であるグロビン遺伝子制御領域、脳中のオリゴデンドロサイト細胞中で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域、骨格筋中で活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御、視床下部ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)プロモーター中で活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域、構成的RSV-LTRプロモーター、メタロチオネインIIa遺伝子プロモーター、RSV-LTRプロモーター、hCMVの前初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、または酵母接合

因子のプロモーターを含んでなる、請求項9に記載の多次元ライブラリー。

【請求項11】 ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリー(MDL)であって、前記少なくとも1つの多次元ペプチドは一般式 $(XY_n)_m$ を有し、式中、

Xは少なくとも1つの多次元分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である、

多次元ライブラリー(MDL)。

【請求項12】 $(XY_n)_m$ の一般式：

〔式中、

Xは少なくとも1つの多次元分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

前記単離されたオリゴヌクレオチドは $[(NNB)_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である〕

を有する少なくとも1つの多次元ペプチドをコードする単離されたオリゴヌクレオチド。

【請求項13】 複製起点と請求項12に記載の単離されたオリゴヌクレオチドとを含んでなるクローニングベクター。

【請求項14】 前記クローニングベクターが大腸菌(E. coli)、バクテリオファージ、プラスミド、およびpUCプラスミド誘導体から選択される、請求項1

3に記載のクローニングベクター。

【請求項15】 前記バクテリオファージが 誘導体をさらに含んでなり、前記プラスミドがpBR322誘導体さらに含んでなり、そして前記pUCプラスミド誘導体がpGEX、pmal - cベクター、またはp - FLAGベクターをさらに含んでなる、請求項14に記載のクローニングベクター。

【請求項16】 プロモーターと操作的にアソシエートした請求項12に記載の単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項17】 前記プロモーターがhCMVの前初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージ の主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、または酵母 接合因子のプロモーターを含んでなる、請求項16に記載の発現ベクター。

【請求項18】 請求項16に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主。

【請求項19】 前記単細胞宿主が大腸菌(*E. coli*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、バシラス(*Bacillus*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)、酵母、CHO、R1.1、B - W、L - M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10およびSf9細胞から成る群から選択される、請求項18に記載の単細胞宿主。

【請求項20】 ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリー(MDL)を発生させる方法であって、前記少なくとも1つの多次元ペプチドは一般式 $(XY_n)_m$ を有し、式中、

Xは少なくとも1つの多次元ペプチドとターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

前記方法は、工程：

(a) $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを準備し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

(b) 前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドがプロモーターと作用可能に関連付けるように、前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現ベクターの中に挿入し、

(c) 前記発現ベクターで単細胞宿主を形質転換し、そして

(d) 前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させる条件下に前記単細胞宿主を培養して、前記ターゲット分子に対するアフィニティーを有する前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを産生させる、
を含んでなる方法。

【請求項21】 少なくとも1つの多次元ペプチドが単細胞宿主の表面上で産生される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 工程：

(a) $(XY_n)_m$ の一般式：

[式中、

(XY_n) は前記少なくとも1つの分子の反復単位であり、ここで

Xは前記少なくとも1つの分子の機能的単位であり、

Yは前記少なくとも1つの分子の構造単位であり、

nは0 n 10であるような、前記反復単位中の前記構造単位の数であり、そして

mは2 m 20であるような、前記少なくとも1つの分子中の反復単位の数である

]

を有する少なくとも1つの分子を含んでなる多次元ライブラリー(MDL)を発生させ

- 、
- (b) 多次元ライブラリーを前記ターゲット分子と接触させ、そして
 - (c) 前記ターゲット分子と前記少なくとも1つの分子との結合を検出する、ことを含んでなる、ターゲット分子と相互作用する分子を同定する方法。

【請求項23】 前記少なくとも1つの分子が検出可能に標識化されている、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記検出可能な標識が放射性元素、蛍光性化学物質、または酵素を含んでなる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記少なくとも1つの分子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含んでなる、請求項22に記載の方法。

【請求項26】 多次元ライブラリーを発生させる工程が下記の工程：

(a) $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを準備し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは $0 \leq n \leq 10$ であるような整数であり、そして

mは $2 \leq m \leq 20$ であるような整数であり、

(b) 前記少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドがプロモーターと作用可能に関連付けるように、前記少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを発現ベクターの中に挿入し、

(c) 前記発現ベクターで単細胞宿主を形質転換し、そして

(d) 前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させる条件下に前記単細胞宿主を培養して、前記ターゲット分子に対するアフィニティーを有する前記少なくとも1つの多次元ペプチドを産生させる、ことを含んでなる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記プロモーターがhCMVの前初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイ

ルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、または酵母接合因子のプロモーターを含んでなる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記単細胞宿主が大腸菌(*E. coli*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、バシラス(*Bacillus*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)、酵母、CHO、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10およびSf9細胞から成る群から選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記少なくとも1つの多次元ペプチドが前記単細胞宿主の表面上で産生される、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 下記の構成成分：

(a) 前もって決定した量の多次元ライブラリー(MDL)、前記多次元ライブラリーはターゲット分子に対するアフィニティーを潜在的に有する少なくとも1つの分子を含んでなり、ここで少なくとも1つの分子は $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは構造単位であり、

nは0 $< n < 10$ であるような整数であり、

mは2 $< m < 20$ であるような整数である、

(b) 他の試薬、および

(c) キットの使用説明書；

を含んでなる、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするキット。

【請求項31】 前記少なくとも1つの分子が検出可能な標識である、請求項30に記載のキット。

【請求項32】 前記少なくとも1つの分子が単離されたオリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、またはそれらの組み合わせを含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項33】 前記少なくとも1つの分子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項34】 式中、

Xが少なくとも1つの多次元分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yが構造ペプチド単位であり、

nが0 $n \leq 10$ であるような整数であり、

mが2 $m \leq 20$ であるような整数である、

請求項30に記載のキット。

【請求項35】 前記少なくとも1つの分子が単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項36】 前記機能的単位がヌクレオチド調節配列を含んでなり、そして前記構造単位が6~少なくとも60の隣接ヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項37】 前記ヌクレオチド調節配列がプロモーター、エンハンサー、シス作用性遺伝子座、トランス作用性遺伝子座、アテニュエーター、上流アクチベーター、または調節非翻訳可能領域配列を含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項38】 下記の構成成分：

(a) プロモーターと作用可能に関連付けた少なくとも1つのオリゴヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主、ここで少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 $n \leq 10$ であるような整数であり、そして

mは2 $m \leq 20$ であるような整数である、

(b) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させるための試薬、

(c) 他の試薬、および

(d) キットの使用説明書；
を含んでなる、ターゲット分子と潜在的に相互作用する多次元ライブラリーの分子をスクリーニングするキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、一般に、タンパク質、ポリペプチド、および/またはMDLのメンバーである多次元ペプチド(MDP)と表示するペプチドを発生させ、ターゲット分子に対する結合特異性および所望のアフィニティーについてスクリーニングする方法に関する。

【0002】**発明の背景**

多数の分野、例えば、医療および農業において、広い範囲の生物学的プロセスを効果的にモジューレートする新しい分子を発見する必要性が増加しつつある。伝統的方法において、「不合理的薬物設計」、すなわち、大きいアンサンブルまたはレパートリーから適切な分子を選択するプロセスを利用する。一般に、このような方法は、簡単な結合反応から手の込んだ生理学的調製物まで複雑さが劇的に変化するアッセイを使用して、自然材料収集物、例えば、植物抽出物の発酵プロセス、または合成分子のライブラリーをスクリーニングすることを包含する。

【0003】

しばしば、これらのアッセイは主要な化合物のみを提供し、有効な化合物を同定する前に、経験的方法または化学的設計により大きい改良および洗練を必要とする。このプロセスは時間および費用のかかるが、合理的方法がターゲット分子の化学的構造の詳細な知識に基づくときでさえ、合理的方法により完全に置換されないようである。その上、不合理的薬物設計法はレパートリーの発生およびそれらの選択法の両方において連続的改良を必要とする。Kay他、Gene 128 : 59 - 65(1993)。

【0004】

最近、主要な発見のために化合物のライブラリーを提供するために、ペプチドまたはヌクレオチドを使用して、いくつかの開発がなされされてきている。一般に、ランダムペプチドライブラリーを構築する2つの異なる方法が存在する。1つのアプローチにおいて、ペプチドはいくつかのフォーマットでin vitroで化学的

に合成される。例えば、合成ペプチドの段階的検索の標準的系統的プロセスは現在種々の高度に複雑な方法を包含し、これらの方法において大きいアレイのペプチドを平行に合成し、蛍光またはまたはリポーター基で標識化されたアクセプター分子でスクリーニングする。有効なペプチドの配列をアレイ中のそのアドレスからデコードすることができる。(Geysen他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3998 - 4002(1984) ; Maeji他、J. Immunological Methods 146 : 83 - 90(1992) ; およびFodor他、Science 251 : 767 - 775(1991)。

【0005】

他のアプローチにおいて、ペプチドの組み合わせライブラリーを樹脂ビーズ上で合成する。次いでビーズを標識化されたアクセプター分子でスクリーニングする。結合したアクセプターを有するものを視的に検査し、次いで物理的に除去する。ペプチドを直接的配列分析により同定する。Lam他、Nature 354 : 82 - 84(1991)。この方法は、原理的には、他の化学的実在物とともに使用できるが、配列決定のために感度の高い方法を必要とし、こうして他の化学的実在物とともにそれを使用することを非常に困難とする。

【0006】

組み合わせのペプチドライブラリーを使用して同定する問題を解決する種々の方法は、ヘキサペプチドの使用を包含する。Houghten他、Nature 354 : 84 - 86(1991)。特に、20天然アミノ酸のヘキサペプチドを使用すると、400の配列ライブラリーが合成され、それらの各々は最初の2つのアミノ酸残基を固定して有し、ヘキサペプチドの残りの4つの位置はすべての可能な組み合わせにより占有されている。次いで結合または他の活性に対する競合に基づくアッセイを使用して、活性ペプチドを有するライブラリーを見出す。

【0007】

いったん活性ペプチドを有するライブラリーが探し出されると、20の新しいライブラリーを合成し、アッセイして第3位置において有効なアミノ酸残基を決定する。次いでペプチド中のすべての6つの位置が同定されるまで、このプロセスを反復する。しかしながら、この方法は本来時間がかかり、非効率的である。その上、アッセイできるペプチドのサイズは6アミノ酸残基に限定される。こうし

て、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの二次または三次構造のターゲット分子との結合に対する効果をアッセイするその能力は極端に制限される。

【0008】

最近、ヘキサペプチドを使用するアプローチが示唆された。特に、20アミノ酸を使用して出発すると、合計120(20×6)のペプチド混合物が合成される。20の混合物において、位置6はユニークアミノ酸を含有し、そして位置1~5はすべての天然アミノ酸の混合物を含有する。他の20の混合物において、位置5はユニークアミノ酸を含有し、そしてすべての他の位置はすべての20のアミノ酸の混合物とする、およびその他。いったん合成されると、120のペプチド混合物を同時に試験し、各位置を表す20の混合物の各々のうちで最も活性であるものを同定する。Houghten, Abstract, European Peptide Society 1992 symposium, Interlaken, Switzerland. この方法は活性ペプチドを見出す速度を増加させるが、それはまたヘキサペプチドの同定において固有の制限を有する。こうして、上で説明した方法と同様に、活性を有する化合物の三次構造は適切に探査することができない。

【0009】

組換えDNA技術を使用する第2アプローチは、可溶性融合タンパク質またはウイルスキャプシド融合タンパク質として *in vivo* においてペプチドを発現させることを包含する。特に、多数のペプチドライブラリーはM13ファージを使用する。M13はフィラメント状バクテリオファージであり、過去20年間に分子生物学研究所において広範に使用されてきている。このウイルス粒子は6つの異なるキャプシドタンパク質と、一本鎖環状DNA分子として、ウイルスゲノムの1つのコピーとを含んでなる。

【0010】

いったんM13 DNAが大腸菌(*E. coli*)のような宿主細胞の中に浸透すると、それは二本鎖の環状DNAに変換される。ウイルスDNAは第2複製起点を保持し、この複製起点はウイルス粒子の中に見出される一本鎖DNAを発生させるために使用される。ウイルス形態形成の間に、一本鎖DNAおよびウイルスタンパク質の順序づけられたアセンブリーが存在し、そしてウイルス粒子は分泌に非常に類似するプロセスにおいて細胞から排除される。M13ウイルスは他のバクテリオファージ(す

なわち、バクテリオファージ)のように溶原性または溶解性ではない。いったん感染すると、細胞は慢性的にウイルスを放出する。この特徴はより高い力価のウイルス感染培養物、すなわち、 10^{12} pfu/mlに導く。

【0011】

M13ファージのゲノムは約8000ヌクレオチド長さであり、そして完全に配列決定されている。ウイルスキャプシドタンパク質、タンパク質III(pIII)は細菌の感染に関係する。大腸菌(*E. coli*)において、F因子はピリントタンパク質をコードし、このタンパク質はpIIIと相互作用し、ファージ吸収に関係する。それゆえ、M13ウイルスのための大腸菌(*E. coli*)宿主はF因子を有するので、雄であると考えられる。突然変異の分析を使用して、研究者らは406アミノ酸の長いpIIIキャプシドタンパク質が2つのドメインを有することを決定した。C末端はタンパク質をウイルスコートに定着させるが、pIIIのN末端は大腸菌(*E. coli*)ピリントタンパク質との相互作用について必須である、CrissmanおよびSmith、*Virology* 132 : 445 - 455(1984)。

【0012】

pIIIタンパク質のN末端アンカーはウイルス感染に必要であることが示されたが、成熟タンパク質の極端のN末端は変更を許容しない。1985年において、Smithはウイルスコート表面上で異種タンパク質を発現する実験的系としてバクテリオファージM13のpIIIタンパク質を使用することを報告する実験を発表した、*Science* 228 : 1315 - 1317(1985)。後に、独立に2つのグループにより、M13ファージpIII遺伝子展示系は抗体エピトープをマッピングするために有用な道具であることができることが認識された。また、de La Cruz他、*J. Biol. Chem.* 263 : 4318 - 4322(1998)は、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)表面コートタンパク質をコードするcDNAのセグメントを遺伝子IIIの中にクローニングし、発現させ、そして組換えファージをポリクローナル抗体との免疫反応性について試験した。

【0013】

ParmleyおよびSmith、*Gene* 73 : 305 - 318(1988)は、大腸菌(*E. coli*) - ガラクトシダーゼ遺伝子のセグメントを遺伝子IIIの中にクローニングし、発現させ

、そして抗 - ガラクトシダーゼモノクローナル抗体のエピトープを保持する組換え体を同定した。また、これらの著者らは「バイオパニング(biopanning)」と呼ぶプロセスを記載した。このプロセスにおいて、組換えファージの混合物をピオチニル化モノクローナル抗体とインキュベートし、そしてファージ - 抗体複合体をストレプトアビジン被覆プラスチックプレートで特別に回収した。

【0014】

1989年において、ParmleyおよびSmith(Adv. Exp. Med. Biol. 251:215 - 218(1989))は、pIII遺伝子中にクローニングした短い、合成DNAセグメントがエピトープのライブラリーを発現できることを示唆した。線状エピトープはしばしば約6アミノ酸長さであるので、ランダム組換えDNAライブラリーを使用してすべての可能なヘキサペプチドを発現させて、抗体に結合できるエピトープを単離することは可能であろうと、これらの著者らは推論した。

【0015】

ScottおよびSmith(Science 249:286 - 390(1990))は、M13ファージの表面上でヘキサペプチドの「エピトープライブラリー」を構築し、発現させることを記載している。33塩基対のBg1 I消化オリゴヌクレオチド配列をSfi I消化ファージfd-tet、すなわち、fUSE 5 RFの中に挿入することによって、ライブラリーは作られた。33塩基対のフラグメントはランダムまたは「縮重」コード配列(NNK)₆を含有し、ここでNはG、A、TおよびCを表し、そしてKはGおよびTを表す。ライブラリーは 4×10^7 の異なるヘキサペプチドを発現する 2×10^8 の組換え体から成ることを著者らは述べている。理論的に、このライブラリーは 6.4×10^7 の可能なペプチドの69%を発現した(20⁶)。また、Cwirla他、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:6378 - 6382(1990)は、M13 fdファージの遺伝子pIII融合物として発現されたヘキサペプチドの多少類似するライブラリーを記載した。WO 91/19818、1991年12月26日発行(DowerおよびCwirla)には、ペンタマー~オクタマーのランダムアミノ酸配列が記載されている。

【0016】

さらに、Devlin他、Science 249:404 - 401(1990)は、オリゴヌクレオチド合成の(NNS)コーディングスキーム(ここでSはGまたはCである)を使用して発生させ

た約15残基のペプチドライブラリーを記載した。

【0017】

同様に、Christian他(J. Mol. Biol. 227:771-718(1992))は、デカペプチドを発現するファージ展示ライブラリーを記載した。自己相補的3'末端を有する縮重コドン(NN(G/T))₁₀を含んでなるオリゴヌクレオチドにより、出発DNAを発生させた。ヘアピンを形成するとき、この配列は自己プライミング複製部位をつくり、これはT4ポリメラーゼにより使用して相補的DNA鎖を発生させることができる。次いで二本鎖DNAを5'末端およびヘアピンにおけるSfiI部位で切断して、ScottおよびSmith、Science 249:286-390(1990)に記載されているFuse 5ベクターの中にクローニングした。

【0018】

これらのライブラリーは、種々の高分子、例えば、レセプター、ポリペプチド、酵素、炭水化物および抗体に対する潜在的ターゲットを表す、異なるペプチドの非常に大きいレパートリーを包含する。したがって、ファージ展示技術はターゲット分子に結合するペプチド配列を選択する非常に強力な道具であるように思われる。これらのペプチドは、例えば、ワクチン組成物中の抗原として、酵素インヒビターとして、レセプターに対するアンタゴニストまたはアゴニストとして、多数の用途を見出すことができる。しかしながら、前述のライブラリー中のペプチドの長さは制限されるために、ペプチドは天然タンパク質を模倣し、それらのコンフォメーションを採用することができない。例えば、Sato他、Infect. Immun. 46:422-428(1984)はモノクローナル抗体1B7を最初に記載し、初めて百日咳菌(B. pertussis)トキシン(PTX)に対して発生させた。

【0019】

この抗体はこのトキシンをin vitroで中和することができ、そしてビルレント百日咳菌(B. pertussis)を使用する頭蓋内チャレンジからマウスを保護することができる。1B7により認識されるエピトープは不連続であり、コンフォメーションに主として依存することが示された。このような不連続なエピトープを模倣するペプチド配列を得ることを希望して、Felici他、Gene 128:21-27(1993)は、主要なコートタンパク質(pIII)の中に挿入された9つのランダムアミノ酸から成

る2つのファージ展示ライブラリーを構築し、それらのナノペプチドは線状であるか、あるいは2つのシステイン残基によりフランクされている(環状)。

【0020】

2つのライブラリーを抗体1B7でスクリーニングした。陽性のクローンを配列決定し、線状ペプチドについてのみコンセンサス配列が得られた。しかしながら、PTXの三次元構造非存在下に、抗体1B7により認識される不連続なエピトープの構築において重要であるもとのタンパク質のアミノ酸残基にコンセンサスペプチド配列が対応する方法を決定することは非常に困難であった。この情報が欠如するにもかかわらず、選択したナノペプチドはもとのタンパク質の結合部位を十分に模倣して、PTXに対するワクチンの製造において抗原として働くことを著者らは期待した。

【0021】

しかしながら、彼らの期待と反対に、ペプチド1B7の結合部位についてPTXと競合させることができたが、PTXの不連続なエピトープを十分に模倣してもとの抗原PTXに対して特異的な抗体の産生を誘発することができなかった。その上、ファージ組換え体ペプチドは取り囲むファージ配列により支配されるコンフォメーションに適合することが決定された。そのコンフォメーションは抗体1B7により認識される。こうして、取り囲むファージ配列が存在しないペプチド単独を合成したとき、ペプチドは抗体1B7に結合する能力を損失する。

【0022】

同一グループLuzzago他、Gene 128 : 51 - 57(1993)は、同一ライブラリーを使用して抗体H107に結合するオリゴペプチドを選択した。抗体H107は組換えヒトフェリチンH - サブユニット(H - Fer)の自然コンフォメーションを認識する。しかしながら、このとき、H - Ferの三次元構造は知られていた。線状の選択されたペプチドについてのみ得られたコンセンサスペプチド配列を使用して、もとのタンパク質の中に特異的に位置するアミノ酸に、H - Ferエピトープのコンフォメーションにおいて推定される役割を割り当てた。もとのタンパク質ならびに取り囲むファージ配列を使用して合成されたタンパク質の中に位置する、取り囲む配列の存在下にペプチドを合成したとき、H107抗体でスクリーニングしたペプチドはも

とのタンパク質アセンブリーを模倣することができ、そして抗体H107に効果的に結合した。

【0023】

これらの結果は前述のライブラリーの予測不可能性を示す。特に、2つの異なる抗体を使用して選択されたペプチドを使用して、異なる結果が得られた。こうして、これらのライブラリーはすべての現存する抗原エピトープの選択において有望ではない。

【0024】

なお他のより短いペプチドライブラリーは下記の文献に記載されている：O'Neil他、Proteins : Structure, Function and Genetics 14 : 509 - 515(1992)。このライブラリーにおいて、ランダム環状ヘキサペプチド配列を構築し、それをp111ファージタンパク質の中に挿入した。次いでこのライブラリーを使用して、レセプター糖タンパク質IIb/IIIa(IIb 3)、すなわち、フィブリノゲンおよびフォン・ウィルブランド因子の結合を通して血小板凝集を仲介する細胞接着分子のインテグリンファミリーの1メンバー、に対するターゲットを選択した。

【0025】

この研究の目的は、アンタゴニストまたは抗血栓因子として使用できるターゲットを発見することであった。糖タンパク質IIb/IIIaは、RGD配列として普通に知られている非常に短い配列に結合する。環状ライブラリーを使用して、同一著者らはコンセンサス配列の同定に成功した。事実、著者らは、問題のファージを溶離するために使用するターゲットSK106760(ペプチドのアレイの広範な合成後に開発された環状ペプチド)よりもすぐれたアンタゴニストであるターゲットを同定した。また、彼らはアルギニンがリシンで置換された変異型RGD配列が驚くべきことには最良の抗凝集選択ペプチドの1つであることを発見した。

【0026】

また、Kay他、Gene 128 : 59 - 65(1993)はTSAR - 9ライブラリーを構築した。このライブラリーは成熟p111分子のN末端において36のランダムアミノ酸を発現する。このライブラリーは 10^8 の個々の組換え体を含む。この値は、その潜在的コーディング多様性(20^{36})と比較したとき、非常に小さいが、それは生物学的

に非常に多様である。例えば、わずかに 10^5 の40アミノ酸エクソンがヒトゲノムの中に存在することが推定された：Dorit他、Science 250 : 1377 - 1382(1990)。

【0027】

ライブラリーをストレプトアビジン、および常磁性ビーズにカップリングさせたポリクロナールヤギ抗マウスIgG Fc抗体調製物でパン(pan)した。ストレプトアビジンは、ファージ上で展示された15アミノ酸のランダムペプチドライブラリーを使用してDevlin他、Science 249 : 404 - 406(1990)により同定されたモチーフに類似する、アミノ酸モチーフ、HPQ/M、を発現するファージのクラスを選択した。ポリクロナールヤギ抗マウスIgG Fc抗体調製物は、マウスIgG Fcの領域に類似する配列を展示するファージを選択した。こうして、マウスIgG上で単一免疫優性エピトープが同定された。

【0028】

他の研究者らは、ファージ粒子表面上の非ウイルスDNA発現のために、他のウイルスキャプシドタンパク質を使用した。タンパク質pVIIIは主要なウイルスキャプシドタンパク質であり、そのC末端においてM13ウイルス粒子の一本鎖DNAと相互作用する。それは50アミノ酸長さであり、ほぼ2,700コピー/粒子で存在する(Cesareni G., FEBS Lett. 307 : 66 - 70(1992))。pVIII - 融合タンパク質の陰性作用を最小するために、ファージミド系が使用されてきている。ファージミドを保持する細菌細胞をヘルパーファージで感染させ、これらの細菌細胞は野生型および融合pVIIIキャプシド分子の両方の混合物を有するウイルス粒子を分泌する。また、遺伝子VIIIはM13ウイルス粒子表面上でペプチドを発現する部位として働いた：フィラメント状バクテリオファージfdの熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)の主要な表面抗原の異なるセグメントに対応する4および6アミノ酸配列(Greenwood他、J. Mol. Biol. 220 : 821 - 827(1991))。

【0029】

Leostra他、J. Immunol. Methods 152 : 149 - 157(1992)は、3'末端に8ヌクレオチド長さパリンドローム配列を有する約17または23縮重塩基のアニールグオリゴヌクレオチドを含んでなるライブラリーを構築して、細菌発現ベクター中で - ガラクトシダーゼタンパク質との融合タンパク質として、ランダムヘキサ -

またはオクタペプチドを発現させることを記載した。次いでDNAをクレノウDNAポリメラーゼで二本鎖形態に変換し、ベクターの中に平滑末端結合し、次いでトランケート - ガラクトシダーゼのC末端の発現ベクター中にクローニングして107組換え体を発生させた。次いでコロニーを溶解し、ニトロセルロースフィルター上にプロットし、いくつかの異なるモノクローナル抗体との免疫反応性についてスクリーニングした。多数のクローンを反復したラウンドのスクリーニングにより単離した。しかしながら、当業者は容易に認識できるように、このようなライブラリーを構築することは極めて労力を必要とし、こうして費用がかかる。結局、その応用は制限される。

【0030】

PasqualiniおよびRuoslahti、Nature 380 : 364 - 366(1996)は、ランダムペプチドライブラリーのin vivoスクリーニングに基づく器官選択ターゲティングを研究するアプローチを報告した。脳および腎臓の血管へのファージの選択的局在化を仲介することができるペプチドが同定され、これらのペプチドはこれらの器官に対して13倍までの選択性を示した。

【0031】

ライブラリーがそれ自体合成的である、ライブラリーを製造する特定の「遺伝学的」方法が記載された。活性オリゴヌクレオチド分子をアクセプター部位に結合させ、次いでポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅させる。PCRは系統的濃縮を可能とし、次いで活性分子の構造をPCR生成物から発生したクローンのDNA配列決定によりデコードする。しかしながら、レパートリーはヌクレオチドおよび自然ピリミジンおよびプリン塩基、または特異的Watson - Crick対合を保存し、ポリメラーゼによりコピーできる変更に限定される(Singer他、Nucleic Acids Res. 25 : 781 - 786(1997))。後に、このアプローチはヌクレオチドの種々の化学的誘導体を既に同定されたモチーフの中に導入することによってさらに進展された(Gold他、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 : 59 - 64(1997))。

【0032】

抗体をコードする合成オリゴヌクレオチドまたはDNAフラグメントのライブラリーをin vitro翻訳系を介してリボソームにおいて表示させる、「遺伝学的」方

法が記載された(Hanes他、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 : 4937 - 4942(1997)) ; (He他、Nucleic Acids Res. 25 : 5132 - 5134))。このアプローチは非常に大きい($10^{15} \sim 10^{18}$ までの)ライブラリーの有効な発現を可能とするが、ファージ展示系は通常 $10^{10} \sim 10^{12}$ 配列により制限される。

【0033】

これらの遺伝学的方法の主な利点はDNA配列のクローニングおよび増幅の能力にあり、これは系統的濃縮を可能とし、活性分子の構造をデコードする簡単かつ容易な方法を提供する。特定の分子からのペプチドを含んでなるライブラリーを使用するとき、このような結果を得ることができない。なぜなら、上に説明したように、暴露されたペプチドの長さおよびコンフォメーションは特定の分子に結合するペプチドを回収するために十分であり、しかも他の分子上のいっそう複雑な結合を効果的に模倣するペプチドの回収に適さないので、このようなライブラリーから得られた結果は予測不可能であるからである。

【0034】

しかしながら、ライブラリーを産生するこれらの遺伝学的方法の制限は、ペプチドライブラリーにより発現されるオリゴヌクレオチド中のTAG(停止)コドンの頻度を包含する。抑制を保持する宿主を使用して、この問題を改善する努力がなされてきている。しかしながら、この戦略はランダムペプチドをコードするオリゴヌクレオチド中の停止コドンの発現を回避するために100%効果的ではないことがある。その上、ランダムペプチドをコードするより長いオリゴヌクレオチドを発現させるとき、この問題は非常に重大となる。

【0035】

したがって、ターゲット分子に対する結合アフィニティーを最大するために機能的ペプチド単位の位置決定を促進する、ターゲット分子と相互作用する機能的ペプチド単位、および構造ペプチド単位を含んでなる、ランダムおよび非特定長さのペプチドのライブラリーを発生させる方法が要求されている。

また、種々のランダム長さのオリゴヌクレオチドを利用する、ランダムおよび非特定長さのペプチドのライブラリーを発生させる方法が要求されている。

【0036】

また、ペプチドがランダム長さであり、かつある種の長さに限定されない、ペプチドのライブラリーを発生させる方法が要求されている。結局、潜在的に結合性のペプチドおよびフランキングする配列においてMDPの機能的単位の1または2以上の実際の結合性部分の二次および/または三次構造を発生させる機会が得られる。固定された長さのオリゴヌクレオチドを使用するとき、このような複雑な構造の発生は不可能である。

さらに、種々のターゲットに対する結合特異性を有する多次元ペプチド(MDP)を同定するために、好都合にスクリーニングすることができるライブラリーが要求されている。

【0037】

その上、また、種々の長さのペプチドを発現し、かつライブラリーのオリゴヌクレオチド中のランダム停止コドンの陰性衝撃を効果的にかつ効率的に最小とすることができる方法が要求されている。

本明細書における参考文献の引用は、このような参考文献が本発明に対する「先行技術」として利用可能であることを認めることとして解釈すべきではない。

【0038】

発明の要約

本発明によれば、任意の方法で問題の分子または分子複合体(ターゲット)に結合するか、あるいはそれらと相互作用する特異的分子を選択する、新規な有効な多次元ライブラリー(MDL)が提供される。MDLは種々の天然または人工のポリマー化合物により代表され、下記のことを包含するが、これらに限定されない：単離されたオリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリ炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、またはそれらの組み合わせ。

【0039】

概括的に言えば、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするための多次元多次元ライブラリーに関し、ここでライブラリーは $(XY_n)_m$ の一般式を有する少なくとも1つの分子を含んでなり、式中、

(XY_n) は少なくとも1つの分子の反復単位であり、ここで

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは構造単位であり、

nは反復単位中の構造単位の数であり、

mは少なくとも1つの分子中の反復単位の数である。

【0040】

さらに、本発明は、少なくとも1つの分子が検出可能に標識化されている、多次元ライブラリーに関する。多数の検出可能な標識を本発明において使用することができ、当業者は容易に使用することができる。本発明において使用できる検出可能な標識の例は下記のを包含するが、これらに限定されない：放射性元素、蛍光性化学物質、発色団、酵素、または増幅可能なヌクレオチド配列。本発明において使用できる検出可能な標識の特定の例は後述される。

【0041】

前述したように、本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの分子は、多数の異なるタイプの分子、例えば、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリ炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、またはそれらの組み合わせから構成されることができる。少なくとも1つの分子がタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを含んでなる、特定の例において、Xは少なくとも1つの分子とターゲットとの間の相互作用に潜在的に参加する機能的ペプチド単位であり、Yは構造ペプチド単位であり、nは0 n 10であるような整数であり、そしてmは2 m 20であるような整数である。

【0042】

その上、上に説明したように、本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの分子は単離されたオリゴヌクレオチドであることができる。このような態様において、少なくとも1つの分子の機能的単位はヌクレオチド調節配列を含んでなり、そして構造単位は6～少なくとも60の隣接ヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる。多数のヌクレオチド調節配列を本発明において使用することができる。特定の例は下記のを包含するが、これらに限定されない：プロモーター、エンハンサー、シス作用性遺伝子座、トランス作用性遺伝子座、アテニュエーター、上流アクチベーター、または調節非翻訳可能領域配列。

【0043】

同様に、多数のプロモーターは本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドにおいて機能的単位として働くことができる。このようなプロモーターの特定の例は下記のを包含するが、これらに限定されない：SV40初期プロモーター、RSウイルスの3'の長い末端反復の中に含有されるプロモーター、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、メタロチオネイン遺伝子の調節配列、 β -ラクタマーゼプロモーター、tacプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーター、

【0044】

膵腺房細胞中で活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域、膵細胞中で活性であるインスリン遺伝子制御領域、リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域、睾丸、乳房、リンパ系およびマスト細胞中で活性であるマウス乳腫瘍ウイルス制御領域、肝臓中で活性であるアルブミン遺伝子制御領域、肝臓中で活性であるフェトプロテイン遺伝子制御領域、肝臓中で活性である1抗トリプシン遺伝子制御領域、骨髄性細胞中で活性であるグロビン遺伝子制御領域、脳中のオリゴデンドロサイト細胞中で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域、骨格筋中で活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御、

【0045】

視床下部ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)プロモーター中で活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域、構成的RSV-LTRプロモーター、メタロチオネインIIa遺伝子プロモーター、RSV-LTRプロモーター、hCMVの前初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、または酵母接合因子のプロモーター。

【0046】

さらに、本発明は、少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリーに関し、少なくとも1つの多次元ペプチドは一般式 $(XY_n)_m$ を含んでなり、式中、

Xは少なくとも1つの多次元分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

【0047】

ここで少なくとも1つの多次元ペプチドは少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドによりコードされ、単離されたオリゴヌクレオチドは $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である。

【0048】

当然、本発明は、多次元ライブラリーの少なくとも1つの分子をコードする単離されたオリゴヌクレオチドに関し、ここで単離されたオリゴヌクレオチドは $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である。

【0049】

必要に応じて、本発明の単離されたオリゴヌクレオチドは、さらに、単離されたオリゴヌクレオチドにより発現される多次元ペプチドを単細胞宿主の表面上で

発現させるシグナルを単細胞宿主に与える、後述する、シグナル配列を含んでなることができる。このようなシグナル配列は当業者によく知られており、そして日常の実験室技術により本発明の単離されたオリゴヌクレオチド上に適当な位置においてスプライスすることができる。

【0050】

さらに、本発明は、このような単離されたオリゴヌクレオチドを合成する多数の方法に関する。1つのこのような方法は、前述したようにオリゴヌクレオチドを合成する方法を包含し、ここでNはA、C、G、およびTの等モル混合物を表す；BはG、C、およびTの等モル混合物を表す。こうして、NNBモチーフは任意の可能な天然アミノ酸をコードし、ただ1つの停止コドン(TAG)を含有する；Fは単一の前もって合成したコドン、いくつかの単一コドンの組み合わせ、または前もって選択したアミノ酸の1つまたは組み合わせを生ずる、それらのランダムの前もって合成した配列を表す；nはアミノ酸の構造ブロックを生ずるコドンの数であり、ランダム値であり、そして例えば、0~10であることができる；mは機能的コドンの数であり、例えば、2~20であることができる。

【0051】

本発明に包含されるこのような単離されたオリゴヌクレオチドを合成する他の方法は、NNBコドンとしてすべての天然アミノ酸に対応する活性化された3ヌクレオチド、およびFコドンとして前もって選択されたアミノ酸の構造ブロックをコードする活性化されたポリヌクレオチドを使用することを含む。

【0052】

本発明に包含される前述の一般式を有するこのような単離されたオリゴヌクレオチドを合成するなお他の方法は、連続的分割および結合工程、すなわち、「スプリット-プル」合成法を含んでなる。「スプリット-プル」合成法を実行する方法は、下記の工程を含んでなる：

- (a) 樹脂支持体上でNNS構造を有する3ヌクレオチドを合成し、
- (b) 樹脂支持体をn+1画分に分割し、
- (c) 下記のスキームに従い樹脂支持体の各画分上で合成を続け、

画分1： 樹脂 - NNB

- 画分2： 樹脂 - NNB - (N1N2N3)
 画分3： 樹脂 - NNB - (N1N2N3)²
 画分4： 樹脂 - NNB - (N1N2N3)³
 画分n + 1： 樹脂 - NNB - (N1N2N3)ⁿ

ここでN1、N2、およびN3は前述のFコドンを生ずるヌクレオチドであり

(d) 脂支持体を一緒に混合し、工程(a)に記載するように合成を続けて、樹脂 - NNB - (N1N2N3)^{0 - n} - NNBを一般構造を有する化合物を生成し、

(e) $[\text{NNB} - (\text{N1N2N3})_0 - n]_m$ が得られるまで、工程(a) ~ (d)をm回続け、そして

(f) 樹脂支持体の画分からオリゴヌクレオチドを分離する。

【0053】

「スプリット - プル」合成法を使用すると、変異型コドンのためのNNS、NNK、およびNNB式を使用してLBTの中にしばしば見出されるGCヌクレオチドに富んだ合成されたオリゴヌクレオチドの使用が回避される。このようなオリゴヌクレオチドは適切に組立て、配列決定ことが困難である。

【0054】

当然、本発明は、さらに、本発明の単離されたオリゴヌクレオチドと、複製起点とを含んでなるクローニングベクターに関する。多数のクローニングベクターを本発明において使用することができ、例えば、大腸菌(*E. coli*)、バクテリオファージ、プラスミド、およびpUCプラスミド誘導体を包含する。本発明においてクローニングベクターとして使用できるバクテリオファージの特定の例は、誘導体を含んでなる。その上、プラスミドクローニングベクターはpBR322誘導体さらに含んでなり、そしてpUCプラスミド誘導体はpGEX、pMAL - cベクター、またはp - FLAGベクターをさらに含んでなる。

【0055】

本発明は、本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードする単離されたオリゴヌクレオチドを発現する発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターは、プロモーターと作用可能に関連付けた単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなり、ここで単離されたオリゴヌクレオチドは $[(\text{NNB})F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、
 BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、
 Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、
 nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そして
 mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である。

【0056】

多数の発現ベクターを本発明において使用することができる。特定の例を後述する。その上、多数のプロモーターを本発明の発現ベクターにおいて使用することができる。このようなプロモーターは下記のを包含するが、これらに限定されない：hCMVの前初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、または酵母接合因子のプロモーター。

【0057】

さらに、本発明は、本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードする単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなる発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主に関し、ここで単離されたオリゴヌクレオチドは $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、
 BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、
 Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、
 nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そして
 mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である。

【0058】

多数の単細胞宿主、例えば、大腸菌(*E. coli*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、バシラス(*Bacillus*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)、酵母、CHO、R1.1

、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10およびSf9細胞を本発明において使用することができる。

【0059】

他の態様において、本発明は、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリー(MDL)を発生させる方法に関し、少なくとも1つの多次元ペプチドは一般式 $(XY_n)_m$ を有し、式中、

Xは少なくとも1つの多次元ペプチドとターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である。

【0060】

このような方法は、工程：

(a) $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを準備し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

【0061】

(b) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドがプロモーターと作用可能に関連付けるように、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現ベクターの中に挿入し

、
(c) 発現ベクターで単細胞宿主を形質転換またはトランスフェクトし、そして

(d) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させる条件下に単細胞宿主を培養して、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つのオ

リゴヌクレオチドを産生させる、
を含んでなる。

【0062】

さらに、本発明は、ターゲット分子と相互作用する分子を同定する方法に関し、この方法は、工程：

(a) $(XY_n)_m$ の一般式を有する少なくとも1つの分子を含んでなる多次元ライブラリー(MDL)を発生させ、式中、

(XY_n) は少なくとも1つの分子の反復単位であり、ここで

Xは少なくとも1つの分子の機能的単位であり、

Yは少なくとも1つの分子の構造単位であり、

nは0 n 10であるような、反復単位中の構造単位の数であり、そして

mは2 m 20であるような、少なくとも1つの分子中の反復単位の数であり、

(b) 多次元ライブラリーをターゲット分子と接触させ、そして

(c) ターゲット分子と少なくとも1つの分子との結合を検出する、

を含んでなる。

【0063】

必要に応じて、少なくとも1つの分子を検出可能に標識化する。本発明において使用できる検出可能な標識は後述される。

上に説明したように、本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの分子は、多数の異なるタイプの分子、例えば、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリ炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、またはそれらの組み合わせから構成されることができる。

【0064】

少なくとも1つの分子がタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを含んでなる、特定の例において、Xは少なくとも1つの分子とターゲットとの間の相互作用に潜在的に参加する機能的ペプチド単位であり、Yは構造ペプチド単位であり、nは0 n 10であるような整数であり、そしてmは2 m 20であるような整数である。多次元ライブラリーが少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる、ターゲット分子と相互作用する多次元ライブラリーの分子を同定する方法におい

て、当業者は日常的固相ペプチド合成法を使用してライブラリーを発生させることができる。選択的に、このような本発明のスクリーニング法を発生させる工程は、また、下記の工程を含んでなる：

【0065】

(a) $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを準備し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

【0066】

(b) 少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドがプロモーターと作用可能に関連付けるように、少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを発現ベクターの中に挿入し、

(c) 発現ベクターで単細胞宿主を形質転換し、そして

(d) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させる条件下に単細胞宿主を培養して、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つの多次元ペプチドを産生させる。

【0067】

このような単離されたオリゴヌクレオチドを製造する法は本発明に包含され、前述され、そして後述される。

多数のプロモーターを本発明のこのような方法において使用することができる。特定の例は下記のを包含するが、これらに限定されない：hCMVの前初期プロモーター、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスの初期プロモーター、ワクシニアの初期プロモーター、ポリオーマの初期プロモーター、SV40の後期プロモーター、アデノウイルスの後期プロモーター、ワクシニアの後期プロモーター、ポリオーマの後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、

3 - ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、酸性ホスファターゼプロモーター、または酵母 接合因子のプロモーター。

【0068】

さらに、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリー(MDL)を発生させる方法において、多数の発現ベクターを使用することができる。このような発現ベクターの特定の例は後述される。

同様に、本発明の多次元ライブラリー(MDL)を発生させる方法において多数の単細胞宿主、例えば、大腸菌(E. coli)、シュードモナス(Pseudomonas)、バシラス(Bacillus)、ストレプトマイセス(Streptomyces)、酵母、CHO、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10およびSf9細胞。

【0069】

他の態様において、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするキットに関する。このようなキットは、下記の構成成分を含んでなる：

(a) 前もって決定した量の多次元ライブラリー(MDL)、多次元ライブラリーはターゲット分子に対するアフィニティーを潜在的に有する少なくとも1つの分子を含んでなり、ここで少なくとも1つの分子は $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは構造単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、

mは2 m 20であるような整数である、

(b) 他の試薬、および

(c) キットの使用説明書。

必要に応じて、本発明のキットの少なくとも1つの分子は検出可能な標識である。このような標識の特定の例は後述される。

【0070】

さらに、本発明は、少なくとも1つの分子が単離されたオリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、

またはそれらの組み合わせを含んでなる、前述の分子をスクリーニングするキットに関する。本発明の特定の態様において、少なくとも1つの分子はタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含んでなり、Xは少なくとも1つの多次元分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、Yは構造ペプチド単位であり、nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そしてmは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である。このような試薬の例は下記のを包含するが、これらに限定されない：インヒビター、PMSF、リン酸緩衝生理食塩水、TRISグリシン緩衝液、TRIS HCl緩衝液、およびその他、ここで試薬は生理学的pHで存在する。当業者によく知られている他のこのような試薬は、本発明において使用することができる。

【0071】

他の態様において、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する多次元ライブラリーの分子をスクリーニングするキットに関し、ここでキットは下記の構成成分を含んでなる：

(a) プロモーターと作用可能に関連付けた少なくとも1つのオリゴヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主、ここで少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そして

mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である、

(b) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させるための試薬、

(c) 他の試薬、および

(d) キットの使用説明書。

【0072】

このようなキットを使用して、単細胞宿主の中に挿入された少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを容易に発現させて、必要に応じて多次元ライブラリーの少なくとも1つの多次元ペプチドを製造することができる。次いで、こ

のライブラリーを容易に使用してターゲット分子との相互作用についてスクリーニングすることができる。必要に応じて、当業者によく知られている日常的生物学的技術を使用して、シグナル配列を少なくとも1つの多次元ペプチド上に配置することができる。

【0073】

本発明において使用できる試薬は、タンパク質がその自然コンフォメーションを維持することを促進するもの、例えば、前述の試薬、ならびに単細胞宿主の中に挿入された少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させるために使用されるものを包含する。このような試薬の特定の例は下記のものを含むが、これらに限定されない：PCR試薬、例えば、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプライマー、酵素、ゲル混合物、緩衝液、およびその他。

【0074】

さらに、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするキットに関し、ここでキットは下記の構成成分を含んでなる：

(a) 前もって決定した量の多次元ライブラリー(MDL)、多次元ライブラリーはターゲット分子に対するアフィニティーを潜在的に有する少なくとも1つの分子を含んでなり、ここで少なくとも1つの分子は $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

Xはターゲット分子と潜在的に相互作用するヌクレオチド調節配列を含んでなる機能的単位であり、

Yは5～少なくとも50の隣接ヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド配列構造単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、

mは2 m 20であるような整数である、

(b) 他の試薬、および

(c) キットの使用説明書。

【0075】

ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするために使用される多次元ライブラリー中の少なくとも1つの分子中の機能的単位として、多数のヌクレオチド調節配列を使用することができる。本発明において使用できる

特定のヌクレオチド調節配列は、プロモーター、エンハンサー、シス作用性遺伝子座、トランス作用性遺伝子座、アテニュエーター、上流アクチベーター、または調節非翻訳可能領域配列を含んでなる。

【0076】

その上、本発明は、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリー(MDL)に関し、少なくとも1つの多次元ペプチドは一般式 $(XY_n)_m$ を有し、式中、

Xは少なくとも1つの多次元分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である。

【0077】

このようなライブラリーは下記の工程を含んでなるプロセスを使用して作られる：

(a) $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを準備し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

【0078】

(b) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドがプロモーターと作用可能に関連付けるように、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現ベクターの中に挿入し、

(c) 発現ベクターで単細胞宿主を形質転換またはトランスフェクトし、そして

(d) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させる条件下に単細胞宿主を

培養して、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを産生させる。

【0079】

したがって、本発明の目的は、構成成分の全体のサイズならびに機能的単位および構造単位の数ライブラリーを展示するために使用するビヒクルによるのみ制限される、多次元ライブラリーを提供することである。

本発明の他の目的は、前もって選択されたターゲット分子との相互作用のアフィニティーおよび選択性の選択を可能とする、多次元ライブラリー(MDL)を提供することである。

本発明の他の目的は、再現性があり、急速であり、簡単であり、効率的であり、かつ比較的費用のかからない、問題の除去と相互作用する分子を同定する方法を提供することである。

【0080】

本発明の他の目的は、最小量の内部停止コドンを含むランダムサイズの単離されたオリゴヌクレオチドを使用して、多次元ライブラリーを製造する方法を提供することである。停止コドンの限定は、挿入されたオリゴヌクレオチドのサイズが大きい、例えば、約20コドンより大きいとき、等しく重要となる。例えば、100コドンの単離されたオリゴヌクレオチドにおいて、ペプチドライブラリーを製造する従来知られている「遺伝学的」方法を使用して、停止コドンを含まない可能性、オープンリーディングフレームを有する可能性は $(47/48)^{100}$ すなわち約12%であろう。しかしながら、本発明の方法を使用すると、リーディングフレームの中に停止コドンが存在する可能性は $(31/32)^{100}$ すなわちわずかに約4%であろう。

【0081】

本発明の他の目的は、多様なタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド分子の大きいライブラリーを発生させ、スクリーニングする方法を提供することである。

本発明のなお他の目的は、問題の特定のターゲットに対する新規なおよび/または改良された特異性、アフィニティーおよび安定性を有するものを同定するた

めに効率的にスクリーニングすることができる、複数のより長いタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを含んでなる、大きい多次元ライブラリーを製造する急速なかつ容易な方法を提供することである。

【0082】

本発明のしかもなお他の目的は、遺伝子を精製し、または単離する必要性を回避し、結合性配列の機能的部分、ターゲット結合性配列に関係するアミノ酸、またはMDPを製造するためにターゲットの結合に関係するアミノ酸の詳細な知識を必要としない、前述の多次元ライブラリーを製造するを提供することである。その上、MDPをin vitroでスクリーニングするので、MDP/ターゲット相互作用に係る溶媒の必要条件是水性溶媒に限定されない；こうして、in vivoにおいて見出される条件と異なる非生理学的相互作用および結合条件を利用することができる。

【0083】

本発明のしかもなお他の目的は、前述のスキームを使用して現在可能であるよりも大きい変動性を可能とする、変異型オリゴヌクレオチドを製造する方法を提供することである。

その上、それぞれの非天然アミノ酸を発現するように修飾されたtRNAを使用して供給された適当な発現系を使用する場合、非天然アミノ酸をまた本明細書に記載するMDLにおいて使用することができる。Sato他、Nucleic Acids Symp. Ser. 37 : 117 - 118(1997)。

本発明のこれらおよび他の面は、下記の図面および詳細な説明により十分に理解されるであろう。

【0084】

発明の詳細な説明

本発明は、驚くべきことには、また、予期せざることには、最大長さに限定されないランダム長さの分子を含んでなるライブラリーを容易にかつ効率よく構築することができるという発見に基づく。その上、このようなライブラリーは好都合にスクリーニングして、種々のターゲットに対して結合特異的を有する、本発明の多次元ライブラリーの分子を同定することができる。こうして、本発明のラ

ライブラリーは、ライブラリーの分子の長さが制限される、例えば、15より小さい、好ましくは約10~12アミノ酸である、従来知られているライブラリーに関して新規であり、有用でありかつ明らかでない。

【0085】

概括的に言えば、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするための多次元多次元ライブラリーに関し、ここで前記ライブラリーは $(XY_n)_m$ の一般式を有する少なくとも1つの分子を含んでなり、式中、

(XY_n) は少なくとも1つの分子の反復単位であり、ここで

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは構造単位であり、

nは反復単位中の構造単位の数であり、そして

mは少なくとも1つの分子中の反復単位の数である。

【0086】

本発明の多次元ライブラリーの分子中の構造単位および機能的単位の存在は、ターゲットに対するアフィニティーを潜在的に増加させ、in vivoにおいて見出される分子および化合物をいっそう正確に模倣する、分子の中に二次および/または三次構造を発生させる機会を提供する。このような複雑な構造の発生は、制限された長さのペプチドを利用するライブラリーにおいて不可能である。

【0087】

上に説明したように、本発明のMDLは種々の天然または人工のポリマー化合物により代表されることができ、これらのポリマー化合物は下記のを包含するが、これらに限定されない：単離されたオリゴヌクレオチド、例えば、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリ炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、またはそれらの組み合わせ。

【0088】

例えば、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするための多次元多次元ライブラリーに関し、ここでライブラリーは $(XY_n)_m$ の一般式を有する少なくとも1つの分子を含んでなり、かつライブラリーの少なくとも1つの分子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含んでなり、式中

、 (XY_n) は少なくとも1つの分子の反復単位であり、ここで

Xは少なくとも1つの分子とターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数である。

【0089】

他の例において、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするための多次元ライブラリーに関し、ここで前記ライブラリーは $(XY_n)_m$ の一般式を有する少なくとも1つの分子を含んでなり、式中、

(XY_n) は少なくとも1つの分子の反復単位であり、

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは6～少なくとも60の隣接ヌクレオチドを含んでなる構造単位である。

【0090】

その上、本発明は、ターゲット分子と潜在的に相互作用する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなる多次元ライブラリーに関し、ここで少なくとも1つの多次元ペプチドは $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

Xは少なくとも1つの分子とをターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造ペプチド単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、そして

mは2 m 20であるような整数であり、

ここでこのようなライブラリーは下記の工程を含んでなるプロセスにより作られる：

【0091】

(a) $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを準備し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そして

mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数であり、

【0092】

(b) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドはプロモーターと作用可能に関連付けるように、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現ベクターの中に挿入し

、

(c) 発現ベクターで単細胞宿主を形質転換し、そして

(d) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させる条件下に単細胞宿主を培養して、ターゲット分子に対するアフィニティーを有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを産生させる。

【0093】

さらに、上に説明したように、本発明は、なかでも、 $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含んでなるクローニングベクターおよび発現ベクターに関し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そして

mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である。

【0094】

さらに、本発明は、本発明のベクターでトランスフェクトされた単細胞宿主に関する。

本明細書および添付された特許請求の範囲を通じて使用される多数の用語および句を下記において定義する：

本明細書において使用するとき、「多次元ライブラリー」または「MDL」は、種々の天然または人工のポリマー化合物により代表されることができ、これらのポリマー化合物は下記のを包含するが、これらに限定されない：ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、ポリ炭水化物、ポリアミン、複素環式分子、ま

たはそれらの組み合わせ。

【0095】

本明細書において使用するとき、句「多次元ライブラリー」または「MDL」は($XY_n)_m$ の一般式はポリペプチドまたはペプチドを意味し、式中Xは少なくとも1つの分子とをターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、そしてYはターゲット分子との相互作用を最大とするように1または2以上の機能的ペプチド単位の位置決定に関係する1または2以上の構造ペプチド単位である。構造単位および機能的ペプチド単位の存在は、潜在的に結合性のタンパク質/ペプチドの中に、およびMDPの結合性ドメインの1または2以上の実際の結合性部分をフランクする配列の中に、二次および/または三次構造を発生させる機会を提供する。このような複雑な構造の発生は、制限された長さのペプチドを利用するライブラリーにおいて不可能である。

【0096】

MDPまたはその一部分対応するMDP組成物は、ターゲットと特異的に相互作用するペプチドまたはポリペプチドを使用することができる、任意のin vivoまたはin vitroの応用において使用することができる。こうして、MDPまたはMDP組成物は、細胞表面のレセプター、ウイルスレセプター、酵素、レクチン、インテグリン、接着因子、 Ca^{2+} 結合性タンパク質、金属結合性タンパク質、DNAまたはRNA結合性タンパク質、免疫グロブリン、ビタミンコファクター、あるいは任意の生物有機または無機化合物、およびその他を認識するペプチドの代わりに使用するか、あるいはそれに結合させることができる。

触媒活性を有する選択されたMDPIは、ターゲットを化学的に修飾する人工的酵素として使用することができる。

【0097】

ターゲットに対するアフィニティーのために、in vitroおよびin vivoにおいて使用するMDPまたはMDPまたはその一部分を含んでなる組成物は、化学的または生物学的に活性な部分、例えば、金属イオン、放射性同位体、ペプチド、トキシンまたはそのフラグメント、または酵素またはそのフラグメント、またはその医薬処方物を細胞の中のまたは上の特異的ターゲットに送達することができる。MD

Pは、また、モノクローナル抗体または他の特異的結合性分子と同様に、他の分子を検出し、定量し、分離するか、あるいは精製するために使用することができる。1つの態様において、多数のMDPまたはその結合性ドメインをマルチマー単位として組立てて、同一特異性を有する多数の結合性ドメイン構築し、生物学的または化学的活性を有する他の分子に融合させることができる。

【0098】

本発明の方法を使用して製造されるMDPIは高分子、例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の機能を置換し、これにより複雑なハイブリドーマ形成法およびin vivo抗体産生法の必要性を回避することができる。その上、MDPIはスクリーニングプロセスにおいて直接的かつ急速な検出を可能とする、容易に特性決定されかつ設計された活性を有することにおいて、MDPIは他の天然の結合性分子と異なる。さらに、いくつかのMDP分子は触媒活性を有し、したがって人工的酵素として使用することができることが期待される。

【0099】

本発明において使用するとき、MDPIは構造的および機能的因子を包含する、連結したタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを包含することを意図する。MDP分子の機能的因子のターゲットに対するアフィニティーは下記により特性決定される：1)特定した条件下のその結合強さ；2)特定した条件下のその結合性または他の相互作用の安定性；および、3)選択したターゲットに対するその選択的特異性。MDP分子の構造的因子は、機能的因子を分離し、互いに関して最も適当な配位でそれらを位置させるドメインである。

【0100】

本明細書において使用するとき、用語「ターゲット」または「ターゲット分子」は互換的に使用することができる、分子またはその一部分を包含する基質、あるいはそれに対するレセプターが天然に存在するか、あるいは本発明の方法により製造することができるいくつかの分子の複合体を意味する。特に、ターゲットは本発明のMDL分子の1または2以上の機能的単位と特異的に相互作用する物質であり、下記のを包含するが、これらに限定されない：化学的基、イオン、金属、タンパク質、糖タンパク質またはそれらの任意の部分、ペプチドまたはペプチ

ドの任意の部分、核酸または核酸の任意の部分、糖、炭水化物または炭水化物ポリマー、脂質、脂肪酸、きわめて重要な粒子またはその部分、膜小胞またはそれらの部分、細胞壁成分、合成有機化合物、生物化合物および無機化合物。

【0101】

ターゲットに結合することができるMDPIはレセプター、すなわち、ターゲットが適合しかつ結合するロックとして機能することができる；あるいはMDPIはターゲットがより大きいタンパク質分子であるとき、ターゲットに適合しかつ結合するキーとして機能することができる；あるいはMDPIはターゲットの化学的または生化学的クローニングベクターを加速または減速する触媒として機能することができる。本発明において、ターゲットはMDPIと特異的に相互作用するか、あるいはそれに結合する物質であり、下記のを包含するが、これらに限定されない：有機化学的基、イオン、金属または非金属の無機イオン、糖タンパク質、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物または炭水化物ポリマー、脂質、脂肪酸、きわめて重要な粒子、膜小胞、細胞壁成分、合成有機化合物、分子複合体または前述の任意のものの任意の部分。

【0102】

本明細書において使用するとき、単数の形態は、特記しない限り、複数の指示物を包含する。

その上、本発明によれば、慣用の微生物学、および技術水準内の組換えDNA技術を使用することができる。このような技術は文献において十分に説明されている。例えば、下記の文献を参照のこと：

【0103】

Sambrook、Fritsch、およびManiatis、Molecular Cloning : A Laboratory Manual、第2版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York(本明細書において「Sambrook他、1989」)；DNA Cloning : A Practical Approach、Vol. IおよびII(D.N. Glover編、1985)；Oligonucleotide Synthesis(M.J. Gait編、1984)；Nucleic Acid Hybridization、B.D. Hames & S.J. Higgins編(1985)；Transcription And Translation、B.D. Hames & S.J. Higgins編(1984)；Animal Cell Culture、R.I. Freshney編(1986)；Immobilized Cell

I And Enzymes、IRL Press(1986) ; B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning(1984) ; F.M. Ausubel他(編者)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons, Inc.(1994)。したがって、本明細書において現れる場合、下記の用語は後述される定義を有する。

【0104】

「ベクター」は、他のDNAセグメントを取り付けて取り付けられたセグメントの複製を生じさせる、レプリコン、例えば、プラスミド、ファージまたはコスミドである。「レプリコン」は、in vivo DNA複製の自律的単位として機能する、すなわち、それ自身の制御下に複製することができる、任意の遺伝学的因子(例えば、プラスミド、染色体、ウイルス)である。

「カセット」は、特定の制限部位においてベクターの中に挿入することができるDNAセグメントを意味する。DNAセグメントは問題のペプチドをコードし、そしてカセットおよび制限部位は転写および翻訳のために適切なリーディングフレームでカセットを挿入させるように設計される。

【0105】

このようなDNAが細胞の内部に導入されたとき、細胞は外因性または異種DNAにより「トランスフェクト」されている。トランスフェクトされたDNAが表現型を変化させたとき、細胞は外因性または異種DNAにより「形質転換」されている。好ましくは、形質転換性DNAは染色体DNAの中に組込まれて(共有結合して)細胞のゲノムを構築すべきである。

「異種DNA」は、細胞の中にまたは細胞の染色体部位の中に自然に位置しないDNAを意味する。こうして、多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードするオリゴヌクレオチド、ならびに本発明の多次元ライブラリーを構築するオリゴヌクレオチドは、細胞を形質転換/トランスフェクトするために使用するベクターの中に挿入されるとき、異種DNAである。

【0106】

「核酸分子」は、リボヌクレオチド(アデノシン、グアノシン、ウリジンまたはシチジン ; 「RNA分子」)またはデオキシリボヌクレオチド(デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン ; 「DNA

分子」)のホスフェートエステルのポリマーの形態、あるいは一本鎖の形態または二本鎖の形態の、それらの任意のホスホエステルアナログ、例えば、ホスホロチオエートおよびチオエステルを意味する。二本鎖DNA - DNA、DNA - RNAおよびRNA - RNAヘリックスは可能である。

【0107】

用語オリゴヌクレオチド、特にDNAまたはRNA、または単離された核酸分子は、分子の一次および二次構造のみを意味し、いかなる特定の三次形態にも限定されない。こうして、この用語は、なかでも、線状または環状のDNA分子(例えば、制限フラグメント)、プラスミド、および染色体の中に見出される、二本鎖DNAを包含する。特定の二本鎖DNA分子構造の説明において、配列はDNAの非転写鎖(すなわち、mRNAに対して相動的な配列を有する鎖)に沿って5' - 3'方向においてのみ配列を与える通常のコベンションに従い、本明細書において記載することができる。「組換えオリゴヌクレオチド」は微生物学的操作を行ったオリゴヌクレオチドである。

【0108】

核酸分子の一本鎖形態を温度および溶液イオン強度の適当な条件下に他の核酸分子にアニールできる時、核酸分子を他の核酸分子、例えば、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAに対して「ハイブリダイゼーション」することができる(Sambrook他、前掲、参照)。温度および溶液イオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。相動的なについて予備的にスクリーニングするために、55 °CのT_mに相当する、低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件(例えば、5×SSC、0.1%SDS、0.25%ミルク、および無ホルムアミド；または30%ホルムアミド、5×SSC、0.5%SDS)を使用することができる。中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件はより高いT_m、例えば、40%ホルムアミド、および5×または6×SSCに相当する。

【0109】

高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は最高のT_m、例えば、50%ホルムアミド、および5×または6×SSCに相当する。ハイブリダイゼーションは2つの核酸が相補的配列を含有することを必要とするが、ハイブリダイゼー

シヨンのストリンジェンシイに依存して、塩基間の誤対合が可能である。核酸をハイブリダイゼーションさせるために適当なストリンジェンシイは核酸の長さおよび相補性の程度、この分野においてよく知られている変数に依存する。2つのヌクレオチド配列間の類似性および相同性の程度が大きいほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドについての T_m 値は大きくなる。

【0110】

核酸のハイブリダイゼーションの相対的安定性(より高い T_m に相当する)は下記の順序で減少する: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。100ヌクレオチド長さより大きいハイブリッドについて、 T_m を計算する方程式が誘導された(Sambrook他、前掲、9.50 - 0.51参照)。より短い核酸、すなわち、オリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーションについて、誤対合の位置はいっそう重要となり、そしてオリゴヌクレオチドの長さはその特異性を決定する(Sambrook他、前掲、11.7 - 11.8参照)。好ましくはハイブリダイゼーション可能な核酸について最小長さは少なくとも約20ヌクレオチドである;好ましくは少なくとも約30ヌクレオチド;より好ましくは長さは少なくとも約40ヌクレオチドである;そしてより好ましくは少なくとも約50ヌクレオチドである。

【0111】

特定の態様において、用語「標準的ハイブリダイゼーション条件」は55 の T_m を意味し、そして前述の条件を利用する。好ましい態様において、 T_m は60 である;より好ましい態様において、 T_m は65 である。

「相同的組換え」は、ベクターの異質DNA配列を染色体の中に挿入することを意味する。好ましくは、ベクターは相同的組換えのために特異的染色体部位をターゲットとする。特異的相同的組換えについて、ベクターは染色体の配列に対して十分に長い領域を含有して、相補的結合および染色体の中へベクターの組込みを可能とする。より長い相同的領域、およびより大きい配列類似度は相同的組換えの効率を増加させることができる。

【0112】

DNA「コード配列」は、適当な調節配列の制御下に配置されたとき、in vitro またはin vivoにおいて細胞中でポリペプチドに転写および翻訳されるDNA配列で

ある。コード配列の境界は、5' (アミノ)末端において開始コドンおよび3' (カルボキシル)末端により決定される。コード配列は下記のことを包含するが、これらに限定されない：原核生物配列、真核生物mRNAからのcDNA、真核生物(例えば、哺乳動物)DNAからのゲノムDNA配列、およびさらに合成DNA配列。コード配列を真核細胞中の発現に意図する場合、ポリアデニル化シグナルおよび転写停止配列は通常コード配列に対して3'に位置する。

【0113】

転写および翻訳の制御配列は、宿主細胞中のコード配列の発現を提供する、ヌクレオチド調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、およびその他である。真核細胞において、ポリアデニル化シグナルは制御配列である。

【0114】

「プロモーター」は、細胞中でRNAポリメラーゼを結合し、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ヌクレオチド調節領域である。本発明を定義する目的で、プロモーター配列はその3'末端において転写開始部位により結合されており、そして上流(5'方向)に伸長して、バックグラウンドより上の検出可能なレベルにおいて転写を開始するために必要な最小数の塩基または因子を含む。プロモーター配列内に転写開始部位(例えば、ヌクレアーゼS1を使用するマッピングにより、好都合に定義される)、ならびにRNAポリメラーゼに係るタンパク質結合性ドメイン(コンセンサス配列)が存在するであろう。

RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写するとき、コード配列は転写および翻訳の制御配列の「制御下に」にあり、次いでトランス-RNAはスプライスされ、コード配列によりコードされるタンパク質に翻訳される。

【0115】

「シグナル配列」は、細胞表面上で発現させるべきタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのコード配列に開始点に含めることができる。この配列は、ポリペプチドを翻訳するように指令する、成熟ポリペプチドに対してN末端のシグナルペプチドをコードする。用語「翻訳シグナル配列」は、この種類のシグナル配列を意味するために本明細書において使用される。翻訳シグナル配列は真核生物

および原核生物に対して自然である種々のタンパク質と関連付けて見出すことができ、そして両方のタイプの生物において機能的である。

本明細書において使用するとき、句「ヌクレオチド調節配列」は特定遺伝子の発現の調節に関係するヌクレオチド配列を意味する。

【0116】

本明細書において使用するとき、用語「プロモーター」は細胞中でRNAポリメラーゼに結合し、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ヌクレオチド調節配列を意味する。本発明を定義する目的で、プロモーター配列はその3'末端において転写開始部位により結合されており、そして上流(5'方向)に伸長して、バックグラウンドより上の検出可能なレベルにおいて転写を開始するために必要な最小数の塩基または因子を含む。プロモーター配列内に転写開始部位が存在するであろう。

【0117】

本明細書において使用するとき、用語「エンハンサー」は近くの構造遺伝子の転写活性を増加させるヌクレオチド調節配列を意味する。エンハンサーは数千の塩基対の距離にわたって作用し、それらが影響を与えることができる遺伝子に対して5'または3'に位置することができる。

本明細書において使用するとき、句「シス作用性遺伝子座」はそれ自身のDNA分子上のDNA配列のみの活性に影響を与えるヌクレオチド調節配列を意味する；この性質は通常その遺伝子座がタンパク質をコードしないことを意味する。

【0118】

本明細書において使用するとき、句「トランス作用性遺伝子座」はそれ自身のDNA分子から5'または3'のDNA活性に影響を与えるヌクレオチド調節配列を意味する。

本明細書において使用するとき、用語「アテニュエーター」はRNAポリメラーゼの移行を調節し、こうして構造遺伝子の転写を制御することができる、いくつかのオペロンのプロモーターと構造遺伝子との間の調節ヌクレオチド配列を意味する。

本明細書において使用するとき、句「調節非翻訳可能領域配列」はタンパク質

またはそのフラグメントをコードしない調節ヌクレオチド配列を意味する。

【0119】

検出可能な標識

上に説明したように、検出可能な標識は本発明の種々の態様において使用することができる。特に、当業者によく知られている多数の標識を本明細書に記載するオリゴヌクレオチド、ならびに本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの分子とともに使用することができる。多次元ライブラリーのターゲット分子を日常的技術に従い検出可能に標識化することができる。

【0120】

適当な標識は下記のを包含する：酵素、発蛍光団(例えば、フルオレセインイソチシアネート(FTTC)、フィコエリトリン(PE)、テキサスレッド(TR)、ローダミン、遊離またはキレート化ランタニド系列の塩、特にEu³⁺、少数の例を挙げれば発蛍光団)、発色団、放射性同位体、キレート化剤、色素、コロイド状金、ラテックス粒子、リガンド(例えば、ビオチン)、化学発光物質、酵素、および増幅可能なヌクレオチド配列。対照マーカを使用するとき、同一であるか、あるいは異なる標識をレセプターおよび対照マーカについて使用することができる。

【0121】

放射性標識、例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、および¹⁸⁶Reを使用するとき、既知の現在利用可能なカウント手順を利用することができる。標識が酵素である場合、現在利用されている比色法、分光光度測定法、アンペア測定法またはガス定量法により検出を達成することができる。

【0122】

直接的標識は本発明に従い使用できる標識の1例である。直接的標識は、その自然状態において、肉眼に、または光学的フィルターおよび/または適用する刺激、例えば、蛍光を促進するために紫外線を使用して可視容易である、実在物として定義されてきている。本発明に従い使用できる、着色された標識の例は次の通りである：金属ゾル粒子、例えば、Leuving(米国特許第4,313,734号)が記載

するような金ゾル粒子；Gribnau他(米国特許第4,373,932号)およびMay他(WO 88/08534)が記載するような色素ゾル粒子；May、前掲、Snyder(EP - A 0 280 559および0 281 327)が記載するような染色されたラテックス；またはCampbell他(米国特許第4,703,017号)が記載するのようなりポソーム中に包膜された色素。

【0123】

他の直接的標識は、リボヌクレオチド、蛍光部分または発光性部分を包含する。これらの直接的標識化装置に加えて、酵素を含んでなる間接的標識もまた本発明に従い使用することができる。種々のタイプの酵素結合イムノアッセイ、例えば、アルカリ性ホスファターゼおよびセイヨウワサビペルオキシダーゼ、リゾチーム、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼはこの分野においてよく知られており、これらおよび他のアッセイは下記の文献に詳細に記載されている：Eva Engvall、Enzyme Immunoassay ELISA and EMTT、Methods in Enzymology、70：419 - 439(1980)および米国特許第4,857,453号。

【0124】

本発明において使用する他の標識は、磁気ビーズまたは磁気共鳴画像標識を包含する。

その上、本発明の多次元ライブラリーの分子はまた代謝標識化により標識化することができる。例えば、 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンまたは $[^{32}\text{P}]$ -オルトホスフェートのような代謝標識を補充した培地の存在下に1または2以上の多次元ペプチドを発現する細胞のin vitro培養の間に、代謝標識化は起こる。同様に、本発明の多次元ライブラリーの単離されたオリゴヌクレオチドは代謝標識の存在下に複製により代謝的に標識化することができる。

$[^{35}\text{S}]$ -メチオニンを使用する代謝的(または生合成)標識化に加えて、本発明は、さらに、 $[^{14}\text{C}]$ -アミノ酸および $[^4\text{H}]$ -アミノ酸(非不安定性位置においてトリチウム置換された)を使用する標識化を包含する。

【0125】

遺伝暗号中のコドンの縮重特質のために、本発明の多次元ライブラリーの1ま

たは2以上の多次元ペプチドは多数のオリゴヌクレオチドをコードすることができる。「縮重特質」は、遺伝暗号に関係する特定のアミノ酸を特定するために異なる3文字コドンを使用することを意味する。合計64コドンは特質が知られており、20の天然に存在するアミノ酸残基をコードするために互換的に使用できることは、この分野においてよく知られている。天然に存在するコドンのリストを後述する：

【0126】

【表1】

フェニルアラニン (Phe又はF)	UUU又はUUC
ロイシン (Leu又はL)	UUA又はUUG又はCUU又はCUC又はCUA又はCUG
イソロイシン (Ile又はI)	AUU又はAUC又はAUA
メチオニン (Met又はM)	AUG
バリン (Val又はV)	GUU又はGUC又はGUA又はGUG
セリン (Ser又はS)	UCU又はUCC又はUCA又はUCG又はAGU又はAGC
プロリン (Pro又はP)	CCU又はCCC又はCCA又はCCG
トレオニン (Thr又はT)	ACU又はACC又はACA又はACG
アラニン (Ala又はA)	GCU又はGCG又はGCA又はGCG
チロシン (Tyr又はY)	UAU又はUAC
ヒスチジン (His又はH)	CAU又はCAC
グルタミン (Gln又はQ)	CAA又はCAG
アスパラギン (Asn又はN)	AAU又はAAC
リジン (Lys又はK)	AAA又はAAG
アスパラギン酸 (Asp又はD)	GAU又はGAC
グルタミン酸 (Glu又はE)	GAA又はGAG
システイン (Cys又はC)	UGU又はUGC
アルギニン (Arg又はR)	CGU又はCGC又はCGA又はCGG又はAGA又はAGG
グリシン (Gly又はG)	GGU又はGGC又はGGA又はGGG
トリプトファン (Trp又はW)	UGG
終止コドン	UAA (ochre) 又はUAG (amber) 又はUGA (opal)

【0127】

本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードする単離されたオリゴヌクレオチドを合成する方法において、これらのコドンのうちの48を使用する。しかしながら、それらの48個のコドンはすべての20種類の天然に存在するアミノ

酸残基をコードする。以後説明するように、これらの48個のコドンは、ライブラリーのためのペプチドを製造する慣用法よりも、本発明のライブラリー天然に存在する多次元ペプチドに非常に大きい変動性を提供する。上に特定したコドンはRNA配列のためのものであることを理解すべきである。DNAについての対応するコドンはUの代わりにTを有する。

【0128】

クローニングベクター

さらに、本発明は、また、本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドと複製起点とを含んでなるクローニングベクターに関し、ここでMDPIは $(XY_n)_m$ の一般式を有し、Xは機能的ペプチド単位であり、Yは構造ペプチド単位であり、nは0 n 10であるような整数であり、そしてmは2 m 20であるような整数である。他の態様において、本発明のクローニングベクターは本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドと複製起点とを含んでなり、ここで単離されたオリゴヌクレオチドは $(XY_n)_m$ の一般式を有し、ここで (XY_n) は単離されたオリゴヌクレオチドの反復単位であり、Xはヌクレオチド調節配列を含んでなる機能的単位であり、Yは6~少なくとも60の隣接ヌクレオチドを含んでなる構造単位であり、nは0 n 10であるような反復単位中の構造単位の数である。

【0129】

この分野において知られている多数のベクター-宿主系を使用することができ、これらはプラスミドまたは修飾されたウイルスを包含するが、これらに限定されないが、ベクター系は使用する宿主細胞とコンパティブルでなくてはならない。ベクターの例は下記のを包含するが、これらに限定されない：大腸菌(E. coli)、バクテリオファージ、例えば、誘導体、またはプラスミド、例えば、pBR322誘導体またはpUCプラスミド誘導体、例えば、pGEXベクター、相補的付着末端を有するクローニングベクター中に単離されたオリゴヌクレオチドを結合することによって達成することができる。

【0130】

しかしながら、DNAフラグメント化するために使用する相補的制限部位がクロ

ーニングベクターの中に存在しない場合、DNA分子の末端は酵素的に修飾可能である。選択的に、DNA末端上にヌクレオチド配列(リンカー)を結合することによって、任意の所望の部位を生成することができる；これらの結合されたリンカーは制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする、特定の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含んでなることができる。

【0131】

本発明の多次元ライブラリーの少なくとも1つの多次元ペプチドをコードする単離されたオリゴヌクレオチドをトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスダクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション(リソソーム融合)、遺伝子ガンの使用、またはDNAベクタートランスポーター、およびその他を介して宿主細胞の中に導入し(例えば、下記文献を参照のこと、Wu他、1992、J. Biol. Chem. 267 : 963 - 967 ; WuおよびWu、1998、J. Biol. Chem. 263 : 14621 - 14624 ; Hartmut他、カナダ国特許出願第2,012,311号、1990年3月15日提出)、こうしてオリゴヌクレオチドの多数のコピーを発生させる。

【0132】

これは本発明の多次元ライブラリーを形成する単離されたオリゴヌクレオチドについて適用され、ここで単離されたオリゴヌクレオチドは $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

(XY_n) はオリゴヌクレオチドの反復単位であり、ここで、

Xはヌクレオチド調節配列を含んでなる機能的単位であり、

Yは6～少なくとも60のヌクレオチドを含んでなる構造単位であり、

nは前記反復単位中の前記構造単位の数であり、そして

mは前記少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチド中の反復単位の数である。

【0133】

発現ベクター

上に説明したように、本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを適当な発現ベクター、すなわち、挿入されたタンパク

質コード配列の転写および翻訳に必要な因子を含有するベクターの中に挿入することができる。このような因子は本明細書において「プロモーター」と呼ぶ。こうして、単離されたオリゴヌクレオチドを本発明の発現ベクター中のプロモーターと操作的にアソシエートさせる。発現ベクターは好ましくは複製起点をまた含む。

【0134】

必要な転写および翻訳のシグナルを組換え発現ベクター上に準備するか、あるいは組換えオリゴヌクレオチドにより供給することができる。

潜在的宿主 - ベクター系は下記のを包含するが、これらに限定されない：ウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、およびその他)で感染した哺乳動物細胞系；ウイルス(例えば、バキュロウイルス)で感染した昆虫細胞系；微生物、例えば、酵母ベクターを含有する酵母；またはバクテリオファージ、プラスミドDNA、またはコスミドDNAで形質転換した細菌。ベクターの発現因子はそれらの強度および特異性が変化する。利用する宿主 - ベクター系に依存して、多数の適当な転写および翻訳の因子の任意の1つを使用することができる。

【0135】

組換えによりコード配列を挿入した後、本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドを染色体的に発現させることができる。これに関して、多数の増幅系の任意のものを使用して、高いレベルの安定なオリゴヌクレオチドの発現を達成することができる(Sambrook他、1989、前掲、参照)。

細胞による1または2以上のオリゴヌクレオチドを提供する制御下に、1または2以上の多次元ペプチドを含んでなる1または2以上のオリゴヌクレオチドを含んでなる1または2以上の組換えベクターを含有する1または2以上の細胞を適当な細胞培地中で培養する。

【0136】

クローニングベクターの中にDNAフラグメントを挿入する従来記載された任意の方法を使用して、適当な転写/翻訳の制御シグナルを含んでなる1または2以上の多次元ペプチドをコードする1または2以上のオリゴヌクレオチドを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法はin vitro組換えDNAおよび

合成技術およびin vivo組換え(遺伝学的組換え)を包含することができる。

【0137】

本発明の多次元ライブラリーの1または2以上の多次元ペプチドを産生するための1または2以上のオリゴヌクレオチドの発現はこの分野において知られている任意のプロモーター/エンハンサー因子により制御することができるが、これらの調節因子は発現のために選択された宿主において機能的でなくてはならない。使用できるプロモーターは下記のを包含するが、これらに限定されない：

【0138】

SV40初期プロモーター領域(BenoistおよびChambon、1981、Nature 290 : 304 - 310)、RSウイルスの3'の長い末端反復の中に含有されるプロモーター(Yamamoto他、1980、Cell 22 : 787 - 797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner他、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 1441 - 1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster他、1982、Nature 296 : 39 - 42) ; 原核生物発現ベクター、例えば、
- ラクタマーゼプロモーター(Villa - Kamaroff他、1978、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 : 3727 - 3731)、またはtacプロモーター(DeBoer他、1983、80 : 21 - 25)、また、下記の文献を参照のこと : "Useful protein from recombinant bacteria"、Scientific American、1980、242 : 74 - 94 ;

【0139】

酵母または他の真菌からのプロモーター因子、例えば、Gal 4プロモーター、ADH(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーター ; および組織特異性を示しかつトランスジェニック動物において利用されてきている、転写制御領域 : 膵腺房細胞中で活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域(Swift他、1984、Cell 38 : 639 - 646 ; Ornitz他、1986、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50 : 399 - 409 ; MacDonald、1987、Hepatology 7 : 425 - 515) ;

【0140】

膵細胞中で活性であるインスリン遺伝子制御領域(Hanahan、1985、Nature 315 : 115 - 122)、リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl他、1984、Cell 38 : 647 - 658 ; Adames他、1985、Nature 318 : 533 - 53

8 ; Alexander他、1987、Mol. Cell. Biol. 7 : 1436 - 1444)、睾丸、乳房、リンパ系およびマスト細胞中で活性であるマウス乳腫瘍ウイルス制御領域(Leder他、1986、Cell 45 : 485 - 495)、肝臓中で活性であるアルブミン遺伝子制御領域(Pinkert他、1987、Genes and Develop. 1 : 268 - 276)、肝臓中で活性であるフェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf他、1985、Mol. Cell. Biol. 5 : 1639 - 1648 ; Hammer他、1987、Science 235 : 53 - 58)、肝臓中で活性である1抗トリプシン遺伝子制御領域(Kelsey他、1987、Genes and Develop. 1 : 161 - 171)、

【0141】

骨髄性細胞中で活性であるグロビン遺伝子制御領域(Mogam他、1985、Nature 315 : 338 - 340 ; Kollias他、1986、Cell 46 : 89 - 94)、脳中のオリゴデンドロサイト細胞中で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead他、1987、Cell 48 : 703 - 712)、骨格筋中で活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御(Sani、1985、Nature 314 : 283 - 286)、および視床下部で活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason他、1986、Science 234 : 1372 - 1378)。

【0142】

プロモーターと作用可能に関連付けた、 $[(NNB)F_n]_m$ の一般式、式中、
 NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、
 BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、
 Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、
 nは0 \leq n \leq 10であるような整数であり、そして
 mは2 \leq m \leq 20であるような整数である、
 を有する少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなる発現ベクターは、4つの一般的アプローチにより同定することができる：(a)所望のプラスミドDNAまたは特異的mRNAのPCR増幅、(b)核酸のハイブリダイゼーション、(c)選択マーカー遺伝子機能の存在または非存在、および(d)挿入された配列の発現。

【0143】

第1アプローチにおいて、単離されたオリゴヌクレオチドをPCRにより増幅して増幅された産物を検出することができる。第2アプローチにおいて、挿入された

マーカー遺伝子に対して相通的である配列を含んでなるプローブを使用する核酸のハイブリダイゼーションにより、発現ベクター中の異質オリゴヌクレオチドの存在を検出することができる。第3アプローチにおいて、組換えベクター/宿主系を同定し、ベクター中の外来遺伝子の挿入により引き起こされる、ある種の「選択マーカー」遺伝子機能(例えば、 - ガラクトシダーゼ活性、チミンキナーゼ活性、抗体に対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルス中の吸蔵体の形成、およびその他)の存在または非存在に基づいて選択することができる。

【0144】

本発明のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主

本発明の多次元ライブラリーを形成する単離されたオリゴヌクレオチド、または本発明の多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードする単離されたオリゴヌクレオチドを複製および/または発現させるとき、広範な種類の単細胞宿主/発現ベクターの組み合わせを使用することができる。例えば、有効な発現ベクターは染色体、非染色体および合成DNA配列のセグメントから成ることができる。適当なベクターは下記のを包含する：

【0145】

SV40および既知の細菌プラスミドの誘導体、例えば、大腸菌(E. coli)プラスミドcol E1、pCR1、pBR322、pMal - C2、pET、pGEX(Smith他、1988、Gene 67 : 31 - 41)、pMB9およびそれらの誘導体、プラスミド、例えば、RP4；ファージDNAs、例えば、ファージ の多数の誘導体、例えば、NM989、および他のファージDNA、例えば、M13およびフィラメント状一本鎖ファージDNA；酵母プラスミド、例えば、2 μ プラスミドまたはそれらの誘導体；真核細胞において有効なベクター、例えば、昆虫または哺乳動物細胞において有効なベクター；プラスミドおよびファージDNAの組み合わせから誘導されたベクター、例えば、ファージDNAまたは他の発現制御配列を使用するように修飾されたプラスミド；およびその他。

【0146】

例えば、バキュロウイルス発現系において、下記の非融合転移ベクターおよび融合転移ベクターの両方を使用することができる：非融合転移ベクター、例えば、pVL941(BamHIクローニング部位；Summers)、pVL1393(BamHI、SmaI、XbaI、Eco

RI、NotI、XmaIII、BglIII、およびPstIクローニング部位；Invitrogen)、pVL1932(BglIII、PstI、NotI、XmaIII、EcoRI、XbaI、SmaI、およびBamHIクローニング部位；SummersおよびInvitrogen)、および

【0147】

pBlueBacIII(BamHI、BglIII、PstI、NcoI、およびHindIIIクローニング部位、青色/白色の組換え体のスクリーニングが可能である；Invitrogen)、および融合転移ベクター、例えば、pAc700(BamHIおよびKpnIクローニング部位、ここでBamHI認識部位は開始コドンで開始する；Summers)、pAc701およびpAc702(pAc700と同一、異なるリーディングフレームを有する)、pAc360(ポリヘドリン開始コドンより36塩基対下流のBamHIクローニング部位；Invitrogen(195))、およびpBlueBacHisA、B、C(3つの異なるリーディングフレーム、BamHI、BglIII、PstI、NcoI、およびHindIIIクローニング部位を有する、ProBond精製のためのN末端ペプチド、およびファージの青色/白色の組換え体のスクリーニング；Invitrogen(220))。

【0148】

本発明において使用するために意図される哺乳動物発現ベクターは下記のものを包含する：誘導可能なプロモーターを有するベクター、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)プロモーター、例えば、DHFR発現ベクターを有する任意の発現ベクター、またはDHFR/メトトレキセート共増幅ベクター、例えば、pED(PstI、SalI、SbaI、SmaI、およびEcoRIクローニング部位、ベクターはクローニングされた遺伝子およびDHFRの両方を発現する；下記の文献を参照のこと：Kaufman、Current Protocols in Molecular Biology 16、12(1991))。

【0149】

選択的に、グルタミンシンターゼ/メチオニンスルフォキシイミン共増幅ベクター、例えば、pEE14(HindIII、XbaI、SmaI、SbaI、EcoRI、およびBclIクローニング部位、ここでベクターはグルタミンシンターゼおよびクローニングされた遺伝子を発現する；Celltech)。他の態様において、EBウイルス(EBV)の制御下にエピソーム発現を指令するベクター、例えば、下記のベクターを使用することができる：

【0150】

pREP4(BamHI、SfiI、XhoI、NotI、NheI、HindIII、NheI、PvuII、およびKpnIクローニング部位、構成的RSV - LTRプロモーター、ヒグロマイシン選択可能なマーカー ; Invitrogen)、pCEP4(BamHI、SfiI、XhoI、NotI、NheI、HindIII、NheI、PvuII、およびKpnIクローニング部位、構成的hCMV前初期遺伝子、ヒグロマイシン選択可能なマーカー ; Invitrogen)、pMEP4(KpnI、PvuI、NheI、HindIII、NotI、XhoI、SfiI、BamHIクローニング部位、誘導可能なIIa遺伝子プロモーター、ヒグロマイシン選択可能なマーカー ; Invitrogen)、pREP8(BamHI、XhoI、NotI、HindIII、NheI、およびKpnIクローニング部位、RSV - LTRプロモーター、ヒグロマイシン選択可能なマーカー ; Invitrogen)、pREP9(KpnI、NheI、HindIII、NotI、XhoI、SfiI、およびBamHIクローニング部位、RSV - LTRプロモーター、G418選択可能なマーカー ; Invitrogen)、およびpEBVHis(RSV - LTRプロモーター、ヒグロマイシン選択可能なマーカー、ProBondで精製可能であり、エンテロキナーゼで切断されたN末端のペプチド ; Invitrogen)、pRc/RSV(HindIII、SpeI、BstXI、NotI、XbaIクローニング部位、G418選択 ; Invitrogen)、およびその他。

【0151】

本発明に従い使用するワクシニアウイルス哺乳動物発現ベクター(Kaufman、1991、前掲、参照)は下記のを包含するが、これらに限定されない : pSC11(SmaIクローニング部位、TK - および - gal選択)、pMJ601(SalI、SmaI、AflI、NarI、BspMI、BamHI、ApaI、NheI、SacII、KpnI、およびHindIIIクローニング部位 ; TK - および - gal選択)、およびpTKgptF1S(EcoRI、PstI、SalI、AccI、HindIII、SbaI、BamHI、およびHpaクローニング部位、TKおよびXRRT選択)。

【0152】

また、酵母発現系を本発明の発現ベクターにおいて、ならびに本発明のライブラリーの1または2以上の多次元ペプチドをコードする1または2以上のオリゴヌクレオチドを発現させるために使用することができる。例えば、非融合pYES2ベクター(XbaI、SphI、ShoI、NotI、GstXI、EcoRI、BstXI、BamHI、SacI、KpnI、およびHindIIIクローニング部位 ; Invitrogen)または融合pYESHisA、B、C(XbaI、SphI、ShoI、NotI、BstXI、EcoRI、BamHI、SacI、KpnI、およびHindIIIクローニング部位、ProBond樹脂で精製され、エンテロキナーゼで切断されたN末端のペプ

チド)の両方を使用することができる。

【0153】

本発明において使用できるベクターの特定の例は次の通りである：バクテリオファージベクター、例えば、X174、I、M13およびその誘導體、fl、fd、Pfl、およびその他、ファージミドベクター、プラスミドベクター、昆虫ウイルス、例えば、バキュロウイルスベクター、哺乳動物細胞ベクター、例えば、パルボウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、酵母ベクター、例えば、Ty1、キラー粒子、およびその他。

いったん適当な宿主系および成長条件が確立されると、組換え発現ベクターを増殖させ、大量に調製した。

【0154】

前に説明したように、使用できる発現ベクターは下記のを包含するが、これらに限定されない：ヒトまたは動物のウイルス、例えば、ワクシニアウイルスまたはアデノウイルス；昆虫ウイルス、例えば、バキュロウイルス；酵母ウイルス；バクテリオファージベクター(例えば、)、およびプラスミドおよびコスミドDNA。

【0155】

さらに、挿入された配列の発現をモジューレートするか、あるいは所望の特定の方式で遺伝子産物を修飾しかつプロセッシングする、単細胞宿主細胞系統を選択することができる。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後のプロセッシングおよび修飾(例えば、グリコシル化、切断[例えば、遺伝子配列の])について特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。発現された外来タンパク質の所望の修飾およびプロセッシングを確実にするように、適当な細胞系統または宿主系を選択することができる。こうして、例えば、多次元ペプチドを宿主表面に転位させるように単細胞宿主に指令するシグナル配列を有するように、多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードする1または2以上のオリゴヌクレオチドを容易に修飾することができる。その上、他の修飾、例えば、グリコシル化を多次元ペプチドに対して行うことができる。

【0156】

上に説明したように、この分野において知られている方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスダクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション(リソソーム融合)、遺伝子ガンの使用、またはDNAベクタートランスポーターにより、ベクターを所望の細胞の中に導入することができる(例えば、下記文献を参照のこと、Wu他、1992、J. Biol. Chem. 267 : 963 - 967 ; WuおよびWu、1988、J. Biol. Chem. 263 : 14621 - 14624 ; Hartmut他、カナダ国特許出願第2,012,311号、1990年3月15日提出)。

【0157】

商用キット

他の態様において、本発明は、本明細書に記載する多次元ライブラリーを製造し、かつこのような多次元ライブラリーを使用して多次元ライブラリーの分子をスクリーニングして分子が特定のターゲット分子に対するアフィニティーを有するかどうかを決定するとき、使用するために適当な商用試験キットに関する。ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングする本発明の特定のキットは、下記の構成成分を含んでなる：

【0158】

(a) 前もって決定した量の多次元ライブラリー(MDL)、前記多次元ライブラリーはターゲット分子に対するアフィニティーを潜在的に有する少なくとも1つの分子を含んでなり、ここで少なくとも1つの分子は $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

Xはターゲット分子と相互作用する機能的単位であり、

Yは構造単位であり、

nは0 $< n < 10$ であるような整数であり、

mは2 $< m < 20$ であるような整数である、

(b) 他の試薬、および

(c) キットの使用説明書。

【0159】

ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするなお他のキ

ットは、下記の構成成分を含んでなる：

(a) 前もって決定した量の多次元ライブラリー(MDL)、前記多次元ライブラリーはターゲット分子に対するアフィニティーを潜在的に有する少なくとも1つの多次元ペプチドを含んでなり、ここで少なくとも1つの多次元ペプチドは $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

Xは少なくとも1つの多次元ペプチドとターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは構造単位であり、

nは0 n 10であるような整数であり、

mは2 m 20であるような整数である、

(b) 他の試薬、および

(c) キットの使用説明書。

【0160】

このようなキットにおいて使用できる試薬は、一般に、ペプチドの自然のコンフォメーションを維持するものである。このような試薬の例は下記のを包含するが、これらに限定されない：プロテアーゼインヒビター、例えば、PMSF、リン酸緩衝生理食塩水、TRISグリシン緩衝液、TRIS HCl緩衝液、およびその他、ここで試薬は生理学的pHを有する。

【0161】

このようなキットの他のクラスはオリゴヌクレオチドを使用する。例えば、特定の態様において、ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするなお他のキットは、下記の構成成分を含んでなる：

(a) 前もって決定した量の多次元ライブラリー(MDL)、前記多次元ライブラリーはターゲット分子に対するアフィニティーを潜在的に有する少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドを含んでなり、ここで少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドは $(XY_n)_m$ の一般式を有し、式中、

【0162】

Xは少なくとも1つの多次元単離されたオリゴヌクレオチドとターゲットとの間の相互作用に参加する機能的ペプチド単位であり、

Yは5～少なくとも50の隣接分子を含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる構造単位であり、

nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、

mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である、

- (b) 他の試薬、および
- (c) キットの使用説明書。

【0163】

本発明において使用できるヌクレオチド配列の特定の例は前述した。

ターゲット分子と潜在的に相互作用する分子をスクリーニングするなお他のキットは、下記の構成成分を含んでなる：

(a) プロモーターと作用可能に関連付けた少なくとも1つのオリゴヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主、ここで少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは $[(NNB)F_n]_m$ の一般式を有し、式中、

NはAまたはCまたはGまたはT/Uであり、

BはCまたはGまたはT/Uであるが、Aではなく、

Fは前もって決定したアミノ酸残基をコードするコドンであり、

nは0 ≤ n ≤ 10であるような整数であり、そして

mは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である、

- (b) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを発現させるための試薬、
- (c) 他の試薬、および
- (d) キットの使用説明書。

【0164】

このようなキットにおいて使用できる試薬の例は次の通りである：前述したようにタンパク質の自然のコンフォメーションの維持を促進する試薬、ならびにオリゴヌクレオチドを増幅および発現させるために使用する試薬、例えば、PCR試薬、例えば、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプライマー、酵素、ゲルマトリックス、緩衝液、およびその他。

このようなキットを使用すると、本明細書に記載する多次元ライブラリーを製造し、そして特定のターゲット分子と相互作用するライブラリーのメンバーを同

定するためにそれを使用することができる。

【0165】

MDPを同定する法およびMDLライブラリーの構築

ある態様において、MDPと命名する新規な化合物を急速にかつ効率よく同定する本発明の方法は2つの工程から成る：(a)複数のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび/またはペプチドをコードする、挿入された合成オリゴヌクレオチド配列を発現するベクターのライブラリーを、例えば、ベクターのアクセス可能な表面構造タンパク質に取り付けられた、融合タンパク質として構築する；および(b)発現された組換えベクターのライブラリーまたは複数をスクリーニングして、問題のターゲットに結合するタンパク質、ポリヌクレオチドおよび/またはペプチドのメンバーを単離する。単離されたベクターの挿入された合成オリゴヌクレオチドの核酸配列を決定し、そしてコード化されたアミノ酸配列を推定して、問題のターゲットに結合するMDP結合性ドメインを同定する。

【0166】

いったんライブラリーが本発明に従い構築されると、多数の選択した異なるターゲットでライブラリーを任意の回数でスクリーニングして、所定のターゲットに結合するMDPを同定することが、もちろん、理解される。このようなスクリーニング法もまた本発明の範囲内に入る。

【0167】

A. オリゴヌクレオチドの合成およびアセンブリー

複数の本発明によるタンパク質、ポリヌクレオチドおよび/またはペプチドMDPを発現するベクターのライブラリーを製造するために、in vitroにおいて下記のスキームに従いオリゴヌクレオチドの一本鎖の組を合成し、構築する。

【0168】

機能的単位および構造ペプチド単位をコードするように、合成オリゴヌクレオチド配列を設計する。機能的単位は変異型または予測されないオリゴヌクレオチドによりコードされる。構造単位は予測されない長さの非変異型ヌクレオチド配列でコードされるか、あるいは制限された数の前もって選択されたアミノ酸から構成された構造マイクロライブラリーを含んでなる変異型または非変異型長さの予

測されないヌクレオチド配列でコードすることができる。また、構造ペプチド単位のサイズはランダム化可能であり、こうしてライブラリーの全体の長さの多次元ペプチドに影響を与えることができる。

【0169】

一方の個々のメンバーが5' (NNB)_n3' により表され、そして他方のメンバーが3' (NNV)_m5' により代表される変異型ヌクレオチドの対を合成し、合成オリゴヌクレオチドにアセンブルし、式中NはA、C、GまたはTであり、BはG、TまたはCであり、VはG、AまたはCであり、nは10 < n < 100であるのような整数であり、そしてmは10 < m < 100であるのような整数である。本発明に従いアセンブルするとき、各挿入された二本鎖オリゴヌクレオチド配列の中にn + mの変異型コドンが存在する。

【0170】

当業者は理解するように、変異型ヌクレオチド位置はすべての20の天然に存在するアミノ酸をコードする潜在的能力を有し、それらの天然に存在するコドン(合計64)は前述された通りであり(適当な発現系を使用する場合、非天然アミノ酸をまた使用することができる)そして、本発明の方法により教示されるようにアセンブルされるとき、ただ1つの停止コドン、すなわち、TAGをコードする。本発明の変異型ヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列は予測されず、シグナル配列が実質的にランダムである。

【0171】

本発明のスキームに従う変異型オリゴヌクレオチドはすべての20の天然に存在するアミノ酸をコードするように選択するが、変異型ヌクレオチドを設計する本発明のスキームは慣用スキーム、例えば、式NNK(式中KはGまたはTである)(Cwirla他、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378 - 6382, 1990)またはNNS(式中SはGまたはCである)(Devlin他、Science 249: 404 - 401, 1990; ScottおよびSmith, Science 249: 386 - 390, 1990)(ここでわずかに32コドンを使用する)のスキームにおいて入手可能なものよりも大きい変動性を好都合に提供する。

【0172】

その上、合成されたオリゴヌクレオチドを1または2以上の発現ベクターの中に

挿入する場合、突然変異体宿主、例えば、大腸菌(*E. coli*)supEにおいてベクターのライブラリーを発現させることによって停止コドンTAGを抑制することができる。本発明において使用できる他の宿主は前述され、そしてSambrook、pp. 2. 55、2.57 - 0.59、4.13 - 4.15に記載されている。

【0173】

その上、当業者は理解するように、式NNKまたはNNSの変異型コドンの使用は、現在使用されているNNB式と同様に、ただ1つのタイプの停止コドン、すなわち、TAGをコードするであろう。サプレッサー、例えば、SupEの使用が単一の停止コドンを抑制するために100%効率的である場合、本発明のNNBスキームを使用するとき、慣用法により使用されるスキームを超えた差または利点は存在しないであろう。

【0174】

本明細書に記載するNNBスキームは、サプレッサー-tRNA遺伝子を欠如する宿主においてMDPを発現させるとき、追加の柔軟性を提供する。すなわち、NNBスキームは、強い分子遺伝的操作に暴露された宿主生物にのみ拘束されず、こうして宿主選択においてより大きい柔軟性を提供する。

コドントリップレットを使用することによって停止コドンを完全に回避できるが、各宿主のために理想的なコドン採択を知ることが必要であろう。

互いに特定の距離で変異型ヌクレオチドを位置させるように、非変異型ヌクレオチドはヌクレオチド配列中の特定の部位に位置決定される。

【0175】

3'末端の非変異型ヌクレオチド位置は、ヌクレオチドの2つの合成された一本鎖組を一緒にアニーリングし、二本鎖DNA(本明細書において合成された二本鎖オリゴヌクレオチド)に変換することを促進するために、6、9または12のヌクレオチドの相補的対である。

第1B図は、本発明の方法に従う一般的アセンブリープロセスを概略的に示す。オリゴヌクレオチドは下記の工程を含むプロセスによりアセンブルされる：下記式を有する3つの一本鎖ヌクレオチドを合成する：

- 1) 5' - 相補的部位1 - [(NNB)F_{0..n}]_m - 相補的部位2 - 3' (ON - 69)

2) 3' - 相補的部位1 - 5' (ON - 11)

3) 3' - 相補的部位2 - 5' (ON - 10)

【0176】

式中NNBは任意の20天然アミノ酸を生ずるコドンを表す；Fは単一の前もって合成したコドン、またはいくつかの単一のコドンの組み合わせ、または前もって選択した1つまたは組み合わせを生ずるランダム前もって合成した配列を表す；nはランダム値であり、かつ、例えば0～10であることができる、アミノ酸の構造ブロックを生ずるコドンの数である；mは例えば2～20であることができる機能的コドンの数である。

【0177】

このようなランダムオリゴヌクレオチドは、NがA、C、G、およびTの等モル混合物を表し、そしてBがG、C、およびTの等モル混合物を表す、合成により得ることができる。

ヌクレオチドの一本鎖組を合成する方法は適当であり、自動的ヌクレオチド合成装置の使用を包含する。合成装置は、等モルまたは非等モル比で変異型位置、すなわち、NまたはBとしてヌクレオチドを組み込むことができるように、プログラムすることができる。

【0178】

特定の例において、精製された一本鎖ヌクレオチド配列(ON - 69と表示する)を、2つの「半部位」オリゴヌクレオチド、ON - 10およびON - 11(これらはON - 69のそれぞれ3' および5' 位置に対して相補的である)に対してアニールした後、fUSE 5のSfiIの中に結合する。「半部位」オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドON - 69の5' および3' 末端にアニールして適当なSfiI付着末端を形成する。SfiIを使用する消化を必要としないで、これは適当なSfiI部位暴露して残し、こうして可変領域において出現することがあるSfiIの切断を回避する。

【0179】

本発明のライブラリーを構築するために使用する予測されないオリゴヌクレオチドの合成およびアセンブリーのスキームは、m変異型、式(NNB)_m(式中BはG、TまたはCであり、そしてmは2 ≤ m ≤ 20であるような整数である)の予測されない

ヌクレオチド配列を合成された一本鎖オリゴヌクレオチドの中に組込む。このようなスキームは、慣用ライブラリーでは得ることができない多数の重要な利点を提供する。アセンブリーされると、本発明の合成されたオリゴヌクレオチドは、48の異なるアミノ酸をコードするコドンを使用することによって、すべての20の天然に存在するアミノ酸をコードする。こうして、本発明のスキームは他の慣用スキームよりも大きい変動性を提供する。

【0180】

例えば、変異型ヌクレオチドが式NNK(式中KはGまたはTである)またはNNS(式中SはGまたはCである)を有するわずかに慣用スキームは、わずかに32の異なるコドンを使用する。より大きい数のアミノ酸をコードするコドンを使用すると、ライブラリーが発現される宿主のコドン採択に対する本発明のライブラリーの感受性はより低くなる。本発明のスキームおよび慣用のスキームの両方はただ1つの停止コドンを保持するが、現在教示するように、NNBを使用すると、慣用NNSまたはNNKスキームに比較して停止コドンの確率が減少した、合成されたオリゴヌクレオチドが好都合には得られる。

【0181】

さらに、本発明のスキームは、変異型コドンについてNNS式を使用するライブラリーの中にしばしば見出されるようなGCヌクレオチドに富んだ合成されたオリゴヌクレオチドの使用を回避する。この分野においてよく知られているように、GC残基に富んだヌクレオチド配列は適切にアSEMBルし、配列決定することが困難である。

【0182】

多分最も意味あることには、オリゴヌクレオチドを合成しかつアSEMBルする本発明のスキームは、いかなる以前の慣用ライブラリーとも異なる、ランダム長さの予測されないアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチド配列を提供する。本発明に従い構築するとき、本発明の合成された一本鎖オリゴヌクレオチドは相補的部をコードする少なくとも約27~681ヌクレオチド長さ、約0~10アミノ酸残基長さの約0~20構造ペプチド単位により分離されたMDP結合性ドメイン中の約2~20予測されないアミノ酸(機能的単位)とを含んでなる。特定の態様によ

れば、 n は $0 < n < 10$ であり、そして m は $2 < m < 20$ である。こうして、合成された一本鎖オリゴヌクレオチドは少なくとも27~687ヌクレオチドを含んでなり、そしてMDP中の機能的単位中の約2~20予測されないアミノ酸残基をコードする。特別に例示される例において、合成されたオリゴヌクレオチドはMDP結合性ドメイン中のそれぞれ約4~16アミノ酸残基をコードする。

【0183】

この分野における従来の教示は、挿入されたオリゴヌクレオチドの長さを小さく保持して、好ましくは15より小さい、最も好ましくは約6~8アミノ酸および固定長さをコードすべきであることである。逆に、本発明者らは、驚くべきことにはかつ予期せざることには、従来の教示と全く対照的に、変異型長さの産物をコードする多次元ライブラリーを構築することができるばかりでなく、かつまた好都合にスクリーニングして、種々のターゲットに対する結合特異性を有するMDPまたはタンパク質、ポリヌクレオチドおよび/またはペプチドを同定することができることを発見した。

【0184】

薬物開発のために結合性分子を同定するコンピューターモデリングを使用することに興味を抱く人たちの間で、非ペプチド模倣物を開発するための手掛かりとして使用するペプチドは最大約6~8アミノ酸までに保持すべきであるということが従来の知識であった。より大きいペプチドのコンピューターモデリングは実際的でないか、あるいは有益でないと思われてきた。それゆえ、短いペプチド配列のライブラリーのスクリーニングはいっそう生産的であると、従来考えられてきた。完全に対照的には、本発明は、変異型長さを有するペプチドのライブラリーを効率よく発生させ、スクリーニングして、また最も適当な柔軟性を有する構造ペプチド因子で最適な距離で分離された機能的ペプチドを含んでなるMDPを同定する方法を提供する。これは後にのようなコンピューターモデリング技術を使用する薬物開発に使用される。さらに、本発明の方法により同定されたMDPは薬物候補の全体の新しい展望を提供する。

【0185】

以後の実施例において証明されるように、発現ベクターの中に挿入されたオリ

ゴヌクレオチド中の可変長さの構造因子の可変長さおよび存在はMDPを同定する能力を提供し、ここで最適化された構造リンカーで分割されたアミノ酸の短い配列により、MDPは簡単なまたは複雑な結合部位を有するターゲットに対して最適な特異性および選択性を有することができる。

特定の応用、すなわち、大きいターゲット分子に対する結合特異性を有するMDPの同定において、本明細書に記載する多次元ライブラリーはわずかの隣接アミノ酸残基を包含するMDPばかりでなく、かつまた不連続なアミノ酸を包含するMDPを同定するか、あるいはマッピングする機会を提供する。

【0186】

さらに、本明細書に記載する多次元ライブラリーの挿入された合成オリゴヌクレオチド中において構造ペプチド単位で機能的ペプチド単位を分離することによって、機能的ペプチド単位の位置を最適化する可能性は、潜在的MDPにおいて、およびペプチド1または2以上の実際の機能的部分をフランクする配列において、二次および/または三次構造を発生させる機会を提供する。固定された長さのオリゴヌクレオチドのみを使用するとき、このような複雑な構造の発生は不可能である。

【0187】

B. 適当な発現ベクターの中への合成オリゴヌクレオチドの挿入

前述したように製造された適当なサイズの少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチド、特に複数のこのようなオリゴヌクレオチドを適当な発現ベクターの中に挿入する。適当な宿主の中に挿入するとき、このベクターはベクターの発現された成分を有するヘテロ機能的融合タンパク質として、複数のタンパク質、ポリペプチドおよび/またはタンパク質を発現する。これらはタンパク質、ポリペプチドおよび/またはタンパク質をスクリーニングして、選択したターゲットに対するアフィニティーを有するMDPを同定する。

【0188】

本発明の方法に従い種々のベクターを使用することができ、それらの例は前述された通りである。その上、適当なベクターはMDPの発現および/または検出を促進するMDPのエフェクタードメインをコードする遺伝子を含んでなる。リンカー

を含んでなる、このような遺伝子内に少なくとも2つの異なる制限酵素部位は好ましい。ベクター表面上で発現される融合タンパク質としてMDPを発現させるためにベクター(例えば、ファージまたはプラスミド)を使用するとき、ベクターのリンカー領域内に「スタッファーフラグメント」を含めることは特に有効である。

【0189】

本明細書において使用するとき、「スタッファーフラグメント」は、既知のターゲット、例えば、既知のモノクローナル抗体のエピトープにより認識される結合部位をコードするDNA配列をクローニングするために有用な、少なくとも2つの制限酵素部位により flank された、比較的短い(すなわち、約14ヌクレオチド)既知のDNA配列を包含することを意図する。スタッファーフラグメントの末端における制限酵素部位は、スタッファーフラグメントを欠失させる、合成された二本鎖オリゴヌクレオチドの挿入に有効である(ScottおよびSmith、Science 249 : 386 - 390、1990)。

【0190】

発現された異種融合タンパク質とスタッファーフラグメントに比較してファージまたはプラスミドベクターとの間の物理的結合のために、およびスタッファーフラグメントは検出容易でありかつ免疫学的に活性であるタンパク質(すなわち、免疫学的マーカー)をコードする既知のDNA配列を含んでなるので、DNA配列決定、PCRまたはハイブリダイゼーションによりヌクレオチドレベルで、またはアミノ酸レベルで、すなわち、免疫学的アッセイを使用して、スタッファーフラグメントの存在または非存在は容易に検出することができる。このような測定は、合成された二本鎖オリゴヌクレオチドおよび非組換えベクターの挿入により発生させた組換えベクター(MDP発現)ベクター間の急速な識別を可能とする。

【0191】

1つの好都合な面において、スタッファーフラグメントを使用すると、ベクター中の慣用ポリリンカーを使用するときしばしば直面する問題、すなわち、ポリリンカーの制限部位は密接し過ぎるので、隣接する部位を独立に切断できずかつ同時に使用できないという問題が回避される。

【0192】

特定の態様において、ベクターはフィラメント状バクテリオファージであるか、あるいはそれから誘導され、下記のを包含するが、これらに限定されない：M13、fl、fd、Pfi、およびその他、ファージ構造タンパク質をコードするベクター、好ましくはファージコートタンパク質、例えば、pIII、pVIII、およびその他。その上、フィラメント状ファージはfd誘導ファージベクター、例えば、ScottおよびSmith(Science 249 : 386 - 390、1990)であり、構造コートタンパク質pIIIをコードする。本発明において使用できる他のベクターは前述された通りである。

【0193】

ファージベクターは、複数の挿入された合成オリゴヌクレオチドがバクテリオファージ表面上で融合タンパク質として発現されるように、バクテリオファージ構造タンパク質をコードする遺伝子の5'領域に位置する複製起点を含有するか、あるいはを含有するように構築される。これは好都合に複数のアクセス可能な発現されたタンパク質/ペプチドばかりでなく、かつまたタンパク質/ペプチドと挿入されたオリゴヌクレオチドとの間の物理的結合を提供して、同定されたMDPのスクリーニングおよび配列決定を容易にする。

【0194】

さらに、特定の態様によれば、構造バクテリオファージタンパク質はpIIIである。Smith他により記載され、第1A図に図解されているfUSE 5ベクターは、N末端に導入された14bpの「スタッパーフラグメント」を有するpIII遺伝子を含有し、2つのSfiI制限部位によりフランクされており、節6において例示された実施例において使用された。複数の合成オリゴヌクレオチドを適当なベクターの成熟コートタンパク質、好ましくはpIIIタンパク質のN末端付近のクローニング部位の中にクローニングして、オリゴヌクレオチドをコートタンパク質 - 融合タンパク質として発現させることによって、このライブラリーを構築する。

【0195】

C. 適当な宿主におけるベクターの発現

上に説明したように、いったん適当な発現ベクターが調製されると、それらを適当な宿主の中に挿入するか、あるいは転写および翻訳系においてin vitroにお

いて使用する。宿主をトランスフェクトおよび形質転換する方法は前述された通りである。形質転換またはトランスフェクトされた単細胞宿主をコロニーまたはファージ産生に適切な培養条件下に培養することによって、オリゴヌクレオチドを発現させる。好ましくは、宿主細胞はプロテアーゼ欠如であり、サブレッサー tRNA 遺伝子を保持するか、あるいはを保持しないことができる。

【0196】

例えば、エレクトロポレートした細胞の小さいアリコートプレートし、コロニーまたはプラークの数をカウントして組換え体の数を決定する。組換えベクターの単一増幅のために、宿主細胞中の組換えベクターのライブラリーを高い密度でプレートする。

【0197】

その上、本発明の特定の態様において、本発明による合成された二本鎖オリゴヌクレオチドを含有するように操作された、組換え fd ベクター fUSE 5 をエレクトロポレーションにより MC1061 大腸菌 (*E. coli*) の中にトランスフェクトする。宿主大腸菌 (*E. coli*) 細胞から押出されたウイルスキャプシドの外表面上で発現された MDP はスクリーニング可能である。親 fUSE 5 ベクターは 14bp のスタッパーフラグメントを含有する。二本鎖合成オリゴヌクレオチドを 2 つの *Sfi*I 部位間に挿入するとき、スタッパーフラグメントを除去する。

【0198】

必要に応じて、大腸菌 (*E. coli*) のいくつかの株をエレクトロポレートして、同一ライブラリーの異なるバージョンを確立する。もちろん、スクリーニング実験の全体の組のために、同一大腸菌 (*E. coli*) 株を使用することが必要である。ペプチド - pIII 融合タンパク質の配列の特質のために個々の fd 組換え体のウイルスアセンブリー、分泌、および感染率について、陽性および陰性の両方の、*in vivo* 生物学的選択が恐らく存在するという考えに、この戦略は基づく。したがって、異なる遺伝子型 (すなわち、シャペロンの過剰発現、または増強された分泌) を有する大腸菌 (*E. coli*) は、微妙な、予測されない方法で異なるライブラリーを生ずるので、細菌宿主として働くであろう。

【0199】

D. MDPを同定する方法：MDLライブラリーのスクリーニング

いったん本発明の多次元ライブラリーが入手可能であると、それをスクリーニングして、選択したターゲットと相互作用するライブラリーの1または2以上の分子を同定することができる。前述したように、本発明において、ターゲットは、タンパク質レセプターが天然に存在するか、あるいは本発明の方法に従い製造することができる物質、例えば、分子複合体、分子またはそれらの部分を包含することを意図する。

【0200】

こうして、本発明において、ターゲットはMDPの機能的因子と特異的に相互作用する物質であり、下記のを包含するが、これらに限定されない：化学的基、イオン、金属、タンパク質、糖タンパク質またはそれらの任意の部分、ペプチドまたはペプチドの任意の部分、核酸または核酸の任意の部分、糖、炭水化物または炭水化物ポリマー、脂質、脂肪酸、きわめて重要な粒子またはその部分、膜小胞またはそれらの部分、細胞壁成分、合成有機化合物、生物化合物および無機化合物。

【0201】

本発明のMDLライブラリーのスクリーニングは、当業者に知られている種々の方法により達成することができる。

MDPを細胞表面分子を有する融合タンパク質として発現させる場合、スクリーニングは好都合にはベクターを固定化されたターゲットとインキュベートし、ターゲットに結合するベクターを収集することによって達成される。このような有効なスクリーニング法は、「パニング」技術と表示し、下記の文献に記載されている：Parmley他、Gene 73：305 - 318、1988。本発明のライブラリーをスクリーニングするために有効なパニング法において、ターゲットをプレート、ビーズ、例えば、磁気ビーズ、カラムにおいて使用するセファローズビーズ、およびその他上に固定化することができる。特定の態様において、固定化されたターゲットをFACSソーティングのために「タグ化」、すなわち、ビオチン、蛍光色素、およびその他を使用することができる。

【0202】

特定の態様において、MDPを発現するファージのライブラリー、例えば、ファージおよびファージミドのスクリーニングは次のようにして達成した：マイクロタイタープレートを使用して、ターゲットをまず希釈し、すなわち、100 mMのNaHCO₃、pH 8.5中で希釈し、ターゲット溶液の小さいアリコートマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させた(4 において一夜インキュベートすることによって)。BSA溶液(1 mg/ml、100 mMのNaHCO₃、pH 8.5中)を添加し、プレートを室温において1時間インキュベートした。

【0203】

マイクロタイタープレートの内容物をはじき飛ばし、ウェルを注意してPBS - 0.5%ツイーン20で洗浄した。プレートを反復洗浄して非結合ターゲットを除去した。ファージ溶液の小さいアリコート各ウェルの中に導入し、ウェルを室温において1~2時間インキュベートした。マイクロタイタープレートの内容物をはじき飛ばし、反復洗浄した。ファージを各ウェル中で洗浄溶液と室温において10分間インキュベートして、急速な解離定数を有する結合したファージを解放させる。次いでウェルをさらに5回洗浄して、すべての非結合ファージを除去した。

【0204】

ウェルに結合したファージを回収するために、pH変化を使用した。次いで、50 mMのグリシン - HCl(pH 2.2)、100 mg/mlのBSA溶液のアリコートを洗浄したウェルに添加して、タンパク質を変性し、結合したファージを解放した。10分後、内容物をきれいな管に移し、1 MのTris - HCl(pH 7.5)または1 MのNa₂HPO₄(pH 7.0)の小さいアリコートを添加してファージ試料のpHを中和した。次いでファージを、例えば、10⁻³ ~ 10⁻⁶に希釈し、アリコートを大腸菌(E. coli)K91Kan細胞とプレートして試料のプラーク形成単位の数を測定した。また、インプット試料の力価を比較のために測定した(希釈は一般に10⁻⁶ ~ 10⁻³である)。

【0205】

ライブラリーをスクリーニングする重要な面は溶離である。説明を明瞭するために、下記においてファージによるMDP発現について記載する；しかしながら、このような記載はMDPが表面融合分子上で発現される系に対して適用可能であることが容易に理解される。ファージ上で発現された複数のタンパク質から、ファ

ージの回収の間にペプチド - ターゲット相互作用を崩壊させる条件は所定のペプチド配列に対してさえ特異的であると考えられる。例えば、ある種の相互作用は酸性pHによる崩壊されるが、塩基性pHにより崩壊されないことがあり、逆もまた同じである。

【0206】

こうして、種々の溶離条件(下記のものを含むが、これらに限定されない : pH 2~3、pH 12~13、競合において過剰のターゲット、洗浄剤、温和なタンパク質変性剤、尿素、変化する温度、光、金属イオンの存在または非存在、キレート化剤、およびその他)を試験し、条件の各組について回収したファージ上で発現されたMDPタンパク質の一次構造を比較して、各ターゲット/MDPの組み合わせについて適当な条件を決定することが重要である。これらの条件のいくつかはファージ感染と不適合性であることがある。なぜなら、それらが細菌性であり、透析(すなわち、透析バッグ、Centricon/Amiconマイクロコンセントレーター)により除去することが必要であるからである。

【0207】

異なる条件下に溶離される異なる多次元ペプチドの能力は、ターゲットに対する結合に関係する特異的ペプチド領域の変性のためばかりでなく、かつまたフランキング領域におけるコンフォメーションの変化のためであることがある。また、これらのフランキング配列は実際の結合性配列と組み合わせて変性することができる ; これらのフランキング領域はまた溶離条件(すなわち、pH 2~3、pH 12~13、競合において過剰のターゲット、洗浄剤、温和なタンパク質変性剤、尿素、熱、冷たさ、光、金属イオン、キレート化剤、およびその他)に対する暴露にตอบสนองして、それらの二次または三次構造を変化させ、引き続いてターゲットに対する結合に関係するペプチドのコンフォメーション的変形に導く。

【0208】

E. MDPおよびMDP組成物の応用および使用

MDP産物は、任意の所定のターゲットに対して特異的なペプチドの結合性部分を使用する、任意の工業的または薬学上の応用において使用することができる。また、MDPIは、所定のターゲットに対する結合アフィニティー、特異性および結

合活性を有するように本発明の方法により産生され、選択される、単一機能的結合性ペプチドの製造における中間体であることができる。こうして、本発明によれば、MDPおよびMDP組成物は広範な種類の応用において使用され、このような応用は下記の分野を包含するが、これらに限定されない：生物医学；生物学的コントロールおよび有害生物の調節；農業；化粧品；環境的コントロールおよび廃棄物管理；化学；触媒；栄養および食品産業；軍事上の使用；気候のコントロール；薬学上の使用、およびその他。

【0209】

他のin vivo使用は、活性免疫化手順に有効な、ワクチンの免疫原としてのMDPおよびMDP組成物の投与を包含する。また、所定の細胞またはウイルスの分子ターゲットに対して特異的なMDPの第1系列を発生させ、次いで第1 MDPに結合するMDPの第2系列を発生させることによって、ワクチンの免疫原を開発するために、MDPを使用することができる、すなわち、第1 MDPをターゲットとして使用して第2系列のMDPを同定する。MDPの第2系列は最初の細胞またはウイルスの分子ターゲット部位を模倣するが、関係するペプチド結合性配列のみを含有し、無関係のペプチド配列を排除する。第2系列において発生した全MDP、または結合性ドメイン、またはその部分を活性ワクチンプログラムのための免疫原として使用することができる。

【0210】

in vitro応用において、MDPまたはMDP組成物は、動物および/またはヒトに、注射(すなわち、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、動脈内、乳房内、尿管内、およびその他)、局所的応用を包含する多数の経路により、あるいは上皮または粘膜皮膚の内層を通す吸収により投与することができる。生物調節および/またはコントロールのために、生物への直接的適用、生息環境における分散、取り囲む環境または取り囲む水への添加、およびその他により、植物、昆虫および原性生物に対する送達を達成することができる。

その上、化学産業において、MDPは分離、精製、調製法、触媒、およびその他において使用することができる。

【0211】

さらに、MDPはリンパ液、血液、糞便、唾液、汗、涙、粘膜、または任意の他の生理学的液または固体の中に存在するターゲットを検出する診断分野において使用することもできる。組織学および病理学の領域において、組織切片、器官切片、スミア中の、または巨視的または微視的に検査する他の標本中のターゲットを検出するためにMDPを使用することができる。また、MDPは他の診断において抗体の代替物として、例えば、ホルモン検出キットにおいて、または病原体検出キット、およびその他において使用することができ、ここで病原体は細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、原生動物、およびその他を包含する、任意の病原体であることができる。

【0212】

また、MDPはMDP結合に対するターゲットとしてモノクローナル抗体を使用することによってモノクローナル抗体が結合するエピトープを定めるために使用し、これによりモノクローナル抗体を発生させるために使用するもとの免疫原のエピトープを定める方法を提供することができる。こうして、MDPまたは結合性ドメインまたはそれらの部分はエピトープの模倣物および/またはミモトープとして働くことができる。

【0213】

他の応用は当業者にとって容易に明らかであり、そして本発明の範囲内に包含されることを意図する。

本発明は、本発明の例示として提供された、下記の非限定的実施例を参照することによってよりよく理解できるであろう。下記の実施例により、本発明の好ましい態様をいっそう完全に例示する。しかしながら、これらの実施例は本発明の広い範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【0214】

実施例

MDLを構築する方法の記載は次のように再分割することができる：(1)合成オリゴヌクレオチドの合成およびアセンブリー；(2)適当な発現ベクターの中へ合成ヌクレオチドの挿入、および(3)ベクター中のMDLライブラリーの発現。

【0215】

実施例において使用する試薬および株

SfiIおよびBglII制限エンドヌクラーゼ、T4 DNAリガーゼ、T4キナーゼ、クレノウポリメラーゼはベーリンガー・マンハイム(Boehringer Mannheim)から入手した。セクエナーゼT7はファーマシア(Pharmacia)から入手した。オリゴヌクレオチドはアプライド・バイオシステムス(Applied Biosystems)PCR - メイト・シンセサイザー(Mate Synthesizer)で合成し、ODCカラム上で精製した(ABI)。fUSE 5ベクターおよび大腸菌(*E. coli*)MC1061、K802、K91KanはGeorge Smith教授(University of Missouri、ミズリー州コロンビア)により提供され、そして下記の文献に記載されている: Smith他、Science 228: 1315 - 1317、1985およびParmleyおよびSmith、Gene 73: 305 - 318、1988。

【0216】

実施例1. オリゴヌクレオチドの合成およびアセンブリー

第1B図は、オリゴヌクレオチドの式およびMDLの構築において使用したアセンブリースキームを示す。アプライド・バイオシステムスPCR - メイト・シンセサイザーを使用して、オリゴヌクレオチドを合成した。5' - および3' - 末端は、シグナルペプチド部位の付近のああ配列を再構築するように選択した、固定配列を有する。中央部分は可変領域を含有し、これらの可変領域はオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを含んでなり、そしてまた可変配列の一方または両方の部位上のスペーサーリンガー溶液をコードすることができる。

【0217】

この配列をON - 69と表示し、2つの「半部位」オリゴヌクレオチド、ON - 10(5' - AAGCGCCACC - 3') (配列番号1)およびON - 11(5' - ACCGGCCCCGT - 3') (配列番号2) (これらはON - 69のそれぞれ5' - および3' - 位置に対して相補的である) に対するアニールした後、fUSE 5のSfiI部位の中に結合した。「半部位」オリゴヌクレオチドはON - 69オリゴヌクレオチドの5' - および3' - 末端に対してアニールして、適当なSfiI付着末端を形成する。

【0218】

これはSfiIを使用する消化を必要しないで適当なSfiI部位を暴露したまま残し、こうして可変領域の中に出現することがあるSfiI部位の切断を回避した。オリ

ゴヌクレオチドをT4キナーゼでリン酸化し、20 mMのTris - HCl、pH 7.5、2 mMのMgCl₂、50 mMのNaCl中で4 μgのON - 10および4 μgのON - 11を2.75 μgのON - 69と混合し、65 °Cに5分間加熱し、温室にゆっくり放冷することによってアニールした。これはほぼ1 : 10 : 10(ON - 69 : ON - 10 : ON - 11)のモル比を表す。

【0219】

実施例2. 「スプリット - プル」合成の戦略

ランダムオリゴヌクレオチドを製造する他の方法は、第2図に概略的に示す合成間に、連続的分割および結合工程(「スプリット - プル」合成)を使用することである。オリゴヌクレオチドは樹脂支持体上の出発リンカー配列5' - GGGCCGGT - N₁N₂N₃ - (配列番号3)を使用して合成した、ここでN₁はA、C、GおよびTである(公称等モル) ; N₂はA(31%)、C(19%)、G(19%)、およびT(31%)である ; N₃はC(39%)、G(39%)、およびT(22%)である。次いで樹脂支持体を4つの画分に分割し、下記のスキームに従い各画分において合成を別々に続けた :

【0220】

- 部1(30%) : 樹脂 - GGGCCGGT - N₁N₂N₃ - (配列番号3)
- 部2(17%) : 樹脂 - GGGCCGGT - N₁N₂N₃ - GGT - (配列番号4)
- 部3(23%) : 樹脂 - GGGCCGGT - N₁N₂N₃ - (GGT)₂ - (配列番号5)
- 部4(30%) : 樹脂 - GGGCCGGT - N₁N₂N₃ - (GGT)₃ - (配列番号6)

【0221】

すべての樹脂粒子を一緒に十分に混合し、ランダム - N₁N₂N₃ - 配列を添加することによって合成を続けて、樹脂 - GGGCCGGT - N₁N₂N₃ - (GGT)₃ - N₁N₂N₃ (配列番号7)を生じさせた。次いで、このプロトコルを4回反復した ; その後閉鎖リンカー配列 - GGTGGCGCTTCTG - (配列番号8)を添加した。最終混合物を樹脂から分離した。一般式5' - GGGCCGGT{ N₁N₂N₃ (GGT)₀₋₃ }N₁N₂N₃GGTGGCGCTTCTG - 3' のポリヌクレオチドの確率的収集物が得られた。この配列を、2つの「半部位」オリゴヌクレオチド、ON - 10(5' - AAGCGCCACC - 3')(配列番号1)およびON - 11(5' - ACCGGCCCCGT - 3')(配列番号2)(これらは配列のそれぞれ5' - および3' - 部分に対して相補的である)に対するアニールした後、fUSE 5のSfil部位の中に結合することができる。

【0222】

実施例3. MDLライブラリーの構築

ベクター fUSE 5 (100 μ g) を SfiI で完全に消化し、2 M の酢酸アンモニウムの存在下に2回エタノール沈降させた。このDNAは自己結合することができず、SfiI 部位間に位置する14bpの「スタッファー」が完全に除去されていることが示された(第1A図)。20 μ g の fUSE 5 ベクターの SfiI 消化物を200 ng のアニールしたオリゴヌクレオチドインサート(モル比1:5)と15 $^{\circ}$ Cにおいて1 ml のリガーゼ緩衝液(20 mM の Tris-HCl、pH 7.5、5 mM の MgCl₂、2 mM の DTT、1 mM の ATP) および4000 単位の T4DNA リガーゼ中で一夜インキュベートすることによって結合させた。結合したDNAを0.3 M の酢酸ナトリウムの存在下にエタノール沈降させ、40 μ l の水の中に再懸濁させ、エレクトロポレーションにより大腸菌(*E. coli*) MC1061 の中に形質転換させた。

【0223】

各々が80 μ l の細胞懸濁液(最終濃度 5×10^{10} 細胞/ml) および2 μ g の DNA (500 μ g/ml) を含有する、10 の電気形質転換を下記の文献に記載されているように1.25 kV/cm において5ミリ秒間パルスすることによって実行した: Dower 他、*Nucleic Acids Res.* 16: 6127 - 6145 (1988)。エレクトロポレーション後、0.2 mg/ml のテトラサイクリンを含む2 ml の SOC 培地(2% のバクトトリプトン、0.5% のバクト酵母エキス、10 mM の NaCl、2.5 mM の KC、10 mM の MgCl₂、10 mM の MgSO₄、20 mM の グルコースから成る; Hanahan 他、*J. Mol. Biol.* 166: 557 - 580 (1983)) 中で37 $^{\circ}$ C において大腸菌(*E. coli*) を1時間非選択的にアウトグロースさせた。次いで各形質転換体からの細胞のアリコート(20 μ l) を取出し、40 mg/ml のテトラサイクリンを含む LB プレート(Luria-Bertani 培地) 上に種々の希釈物をプレートして形質転換効率を評価した。細胞懸濁液の残部を使用して、テトラサイクリン(20 mg/ml) を含む1リットルの L-ブロス を接種し、37 $^{\circ}$ C においてほぼ10倍加を通して増殖させてライブラリーを増幅させた。

【0224】

上清を遠心(4 $^{\circ}$ C において10分間8000 RPM)により清浄し、ファージ粒子をプロピレングリコール(最終濃度3.3%のプロピレングリコール - 8000、0.4 M の NaCl)

で沈降させ、前述したように遠心することによって、液状培養物からファージを得た。ファージペレットをTBS(50 mMのTris-HCl、pH 7.5、150 mMのNaCl)の中に再懸濁させ、4 において貯蔵した。LBテトラサイクリンプレート(40 mg/ml)上に低密度でプレートしたK91Kan細胞をライブラリーの一部で感染させた。

【0225】

実施例4. MDLの特性決定

プロセシングしたpIIIのN末端上に展示されたペプチドのライブラリーを構築すると、シグナルペプチダーゼ切断部位の付近のアミノ酸が変更される。主要なコートタンパク質pVIIIの対応する領域におけるある種の変化はプロセシング効率を減少させ、ヴィリオンへのpVIIIの組込みを遅延または防止することが示された(Felici他、J. Mol. Biol. 222 : 301 - 310、1991)。すべてのpVIIIが同様に影響を受ける場合、ライブラリーの中に含有されるペプチドの多様性が減少されるであろう(ParmleyおよびSmith、Gene 73 : 305 - 313、1988)。ランダムに選択したファージの可変ペプチドの各位置に大部分のアミノ酸が出現するという発見は、プロセシングの欠陥がライブラリーの多様性に重要な拘束を付与しないことを示す。さらに、融合タンパク質の中に挿入された配列がバクテリオファージタンパク質の生物学的性質を悪く変更しないことをそれは示す。

【0226】

多分オリゴヌクレオチドのin vitro合成間に、または増殖性ファージによる発現間にin vivoで付与されるバイアスによる、いずれかのコーディングバイアスがこれらのライブラリーにより発現される変異型非予測ペプチドの中に存在するかどうかを決定するために、20のランダムに選択された単離物の挿入された合成オリゴヌクレオチドフラグメントをMDPライブラリーから検査した。感染性ファージを産生する個々のクローンを取り上げ、セクエナーゼT7キットおよびオリゴヌクレオチド配列決定プライマーfUSE³²P(5' - TGAATTTTCTGTATGAGG - 3') (配列番号9) (これはFuse 5ベクター中で第2 SfiI部位の3'側に対して32ヌクレオチドに位置する配列に対して相補的である)を使用して、それらの可変領域のDNAを配列決定した。

【0227】

第3図において、ランダムに選択した感染性ファージの試料のオリゴヌクレオチドインサートによりコードされるペプチドについてアミノ酸フラグメントが推定される。これまでライブラリーにおいて特性決定された挿入オリゴヌクレオチドの非常にわずか(<10%)が完全な欠失を示したことが観測される。種々の欠失の百分率は65%に等しい。これは、オリゴヌクレオチドをアセンブルするとき、1または2以上の構造ペプチド単位のコーディング部分中の高いG含量を恐らく反映する。第4図はライブラリー中のアミノ酸分布を示す。マイクロソフトEXCELプログラムを使用して、アミノ酸頻度を評価した。

【0228】

このような解析が示すように、ヌクレオチドコドンが発現されたタンパク質のMDPライブラリー中の大部分のアミノ酸をコードし、それゆえそれらのアミノ酸はライブラリーの中に期待された頻度で存在する。顕著な例外はロイシンおよびセリンであり、これらは過剰発現された(第4A図)。こうして、5アミノ酸に限定される構造ブロック組成物を除外して、可変ドメイン中の任意の位置は任意のアミノ酸を有することができる。したがって、配列は予測されないか、あるいはランダムである。構造ペプチド単位において、すべての5つのアミノ酸は20%に等しい理論的分布の2倍の限界内に分布する(第4B図)。構造ペプチド単位は1~3アミノ酸長さを有し、20%~50%間に分布する(第4C図)。

【0229】

実施例5. ターゲット結合性MDPの同定

ストレプトアビジンを0.1 MのNaHCO₃中で200 µg/mlに希釈し、50 µlの溶液を各ウェルに添加し、96ウェルのプレート(Nuncマクシソープ・マイクロタイタープレート)上のバイオパニングの連続的ラウンドによりMDLからクローンを選択するために使用した。次いでストレプトアビジンを4 においてプレートに一夜結合させた。次いでウェルをPBSで洗浄し、0.1 MのNaHCO₃中の1%BSAで室温において1時間ブロックした。ブロッキング後、ウェルを0.1%のツイーン20/TBS(T-TBS)で6回洗浄した。次いで2×10¹¹ファージ粒子/一次MDLのウェルを100 µlの0.1%BSA/T-TBSの中に添加し、プレートを室温において時間インキュベートした。

【0230】

次いでプレートをT-TBSで12回洗浄して非特異的ファージ(所望の特異性をもたないペプチドを発現するファージ)を除去し、残部の結合したファージを100 μ lの0.1 MのHCl(グリシンでpH 2.2に調節した)で10分間処理することによって溶離した。本質的にParmleyおよびSmith、Gene 73:305-318、1988に記載されているように、溶出液を中和し、滴定し、寒天培地上で増幅させた。結合および溶離反応を5回反復した。このプロセスからのファージの回収を第5図に示し、ここでファージの反復選択はストレプトアビジンに結合することができるファージを濃縮させる。これらの結果が示すように、より高いアフィニティーを有するファージを各パニング工程において優先的に濃縮された。

【0231】

5ラウンドのバイオパニングおよびファージ増幅後、パニングの第2、第3、および第4ラウンドから誘導される個々のファージを増殖させ、ペプチドをコードするそれらの領域を配列決定した。ストレプトアビジンに結合した、29ファージのアミノ酸配列を第6図に要約する。

【0232】

結論

これらの実施例の結果が容易に証明するように、本明細書に記載する本発明の方法は、サイズが変化し、粒子サイズに限定されない多次元ペプチドを含んでなる新規かつ有用な多次元ライブラリーを提供する。こうして、本明細書に記載するライブラリーは、ターゲット分子と相互作用する、特にそれに結合するタンパク質およびポリペプチドの能力に対するポリペプチドの二次および三次構造の効果の探査を可能とする。

【0233】

さらに、本明細書に記載する多次元ペプチドは機能的単位および構造ペプチド単位の両方を含んでなるので、多次元ペプチドの潜在的アフィニティーは最大となり、ターゲットと相互作用するタンパク質の正確なモデルを保証する。さらに、多次元ライブラリーの多次元ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを産生する新規かつ有用な方法は、本明細書に記載するように限定された量の停止コード

ンを有する多次元ペプチドを生じ、ランダムアミノ酸配列を有し、最大長さをもたない。結局、多次元ペプチドの数、こうしてターゲットと相互作用するために有効なライブラリーメンバーの数が最大となる。

本発明の範囲は本明細書に記載する特定の態様に限定されるべきでない。事実、本明細書に記載するものに加えて本発明の種々の変更は、以上の説明および添付図面から当業者にとって明らかであろう。このような変更は添付された特許請求の範囲の範囲内に入ることを意図する。

【0234】

核酸またはポリペプチドについて与えられた、すべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、およびすべての分子量または分子質量の値は概算値であり、そして説明のために提供されたことをさらに理解すべきである。

種々の出願が本明細書において引用されており、それらの開示はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

第1図は、線状オリゴヌクレオチドのライブラリーの構築の略図である。(A)ベクターfUSE 5は14塩基対の「スタッパーフラグメント」により分離された2つの非相補的SfiI部位を含有する。SfiIフラグメントの除去は、適当な付着末端を有するオリゴヌクレオチドの配向された結合を可能とする。(B)はオリゴヌクレオチドON - 69を2つの半部位フラグメントにアニールして、ベクター中のSfiI部位1および2に対して相補的である付着末端を形成する。一本鎖領域が可変16マーのコードン配列を含んでなる、ギャップド構造をベクターに長さし、大腸菌(*E. coli*)の中に電気的に形質転換した。

【図2】

第2図は「スプリット - プル」合成の略図である。 N_1 - 4ヌクレオチドの等モル混合物； N_2 - G(19%)、A(31%)、T(31%)およびC(19%)の混合物； N_3 - G(39%)、T(22%)およびC(39%)の混合物。

【図3】

第3図は、ライブラリーからランダムに選択される感染性ファージのpIIIのN末

端ペプチドのアミノ酸配列(DNA配列から推定された)を示す。個々の単離物をオリゴプライマー fUSE^{3'2}Pで配列決定した。fUSE^{3'2}PはfUSE 5の遺伝子IIIクローニング部位から下流の32ヌクレオチドである。構造ブロックに下線が引かれている。アミノ酸についての一文字コードは次の通りである：A(Ala)、C(Cys)、D(Asp)、E(Glu)、F(Phe)、G(Gly)、H(His)、I(Ile)、K(Lys)、L(Leu)、M(Met)、N(Asn)、P(Pro)、Q(Gln)、R(Arg)、S(Ser)、T(Thr)、V(Val)、W(Trp)、Y(Tyr)。

【図4】

第4図は、ランダムに選択した単離物中の分析した機能的ドメイン(A)および構造ブロック(B)におけるアミノ酸頻度を描写する；2Xは機能的ドメイン(A)について5%に等しくかつ構造ブロック(B)について20%に等しい最適頻度からの100%偏差を表す。第4C図はブロック長さの分布を示す。

【図5】

第5図は、ストレプトアビジンに結合するファージの選択を示す。MDLからのファージをストレプトアビジン被覆マイクロタイターウェルに結合させ、次いでグリシン/HCl緩衝液pH 2.2で溶離した。溶離後に回収されたファージの総数(n_1 、トランスデュースング単位で測定した)/第1ラウンドの選択後に回収されたトランスデュースング単位の数(n_1)として、濃縮を計算した。データは三重反復実験における平板培養からの平均値を表す(SEM < 10%)。

【図6】

第6図は、ストレプトアビジン被覆マイクロタイターウェル上のパニングの2、3、または4ラウンド後に回収された29クローンのpIIIのN末端ペプチドのアミノ酸配列(DNAセグメントから推定された)を示す。

【図1A】

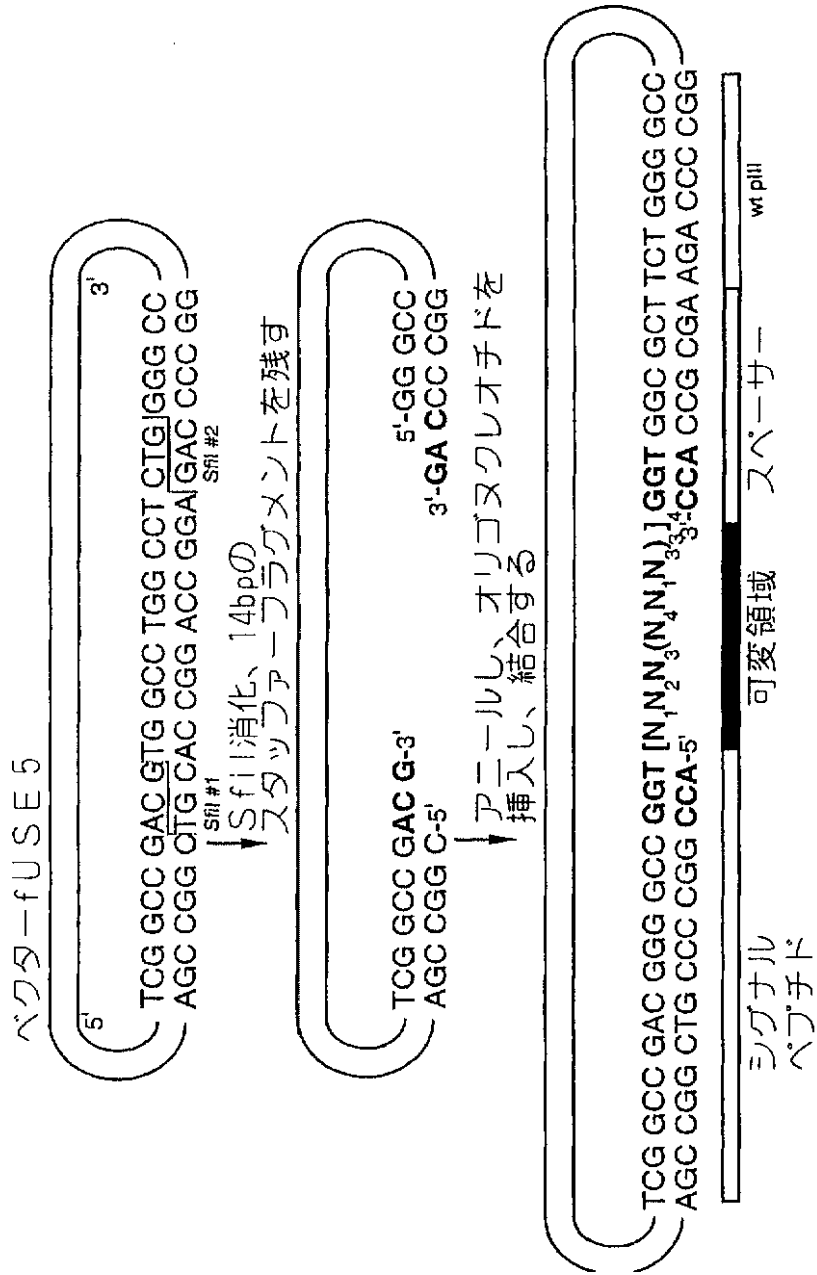


FIGURE 1A

オリゴヌクレオチドON-69

可変領域 スペーサー

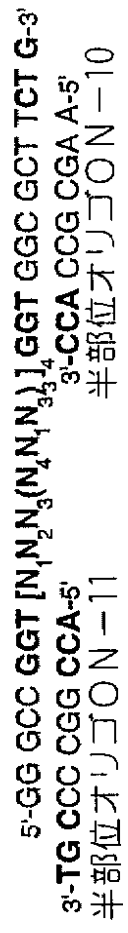


FIGURE 1B

【図2】

ランダムオリゴヌクレオチド			
5'-GG GCC GGT (N ₁ N ₂ N ₃ (GGT) ₀₋₃) N ₁ N ₂ N ₃ GGT GCC GCT ICT G-3'			
工程	配列		
1	5'-GGGCCGGT-		
2	N ₁ N ₂ N ₃		
3	下記の部で分割する		
	30%	17%	23%
	なし	-GGT-	-(GGT) ₂ -
4			-(GGT) ₃ -
5	部分1～4をブル		
6	工程2～5を4回反復する		
7	- N ₁ N ₂ N ₃ GGTGGCGCTTCTG-3'		

FIGURE 2

【図3】

配列	長さ
MCGYVDNCEVRGIEAA	16
DVVWSDSGVDDGQLDI	16
NGGECGVDEAAGCYNM	16
PRSNDRGQYAIVSE	16
AGGGVGEAWVTYGL	16
VEDGEGGRLWDVLP	16
QEKLSGVFEFESWLOGD	16
DGFYDVVSTVGDVVL	15
HSRDDLSSYGAVSKF	15
WAGDVR YFVAASSDS	15
PLGDRADVSTVFRA	14
YAFVVGYYDSN	11
IGGVRQPVAL	10
VLHDLDDVG	9
RFADQLCS	8
LADYAT	6
LYTEV	5
QS	2
DT	2
L	1

FIGURE 3

【圖4A】

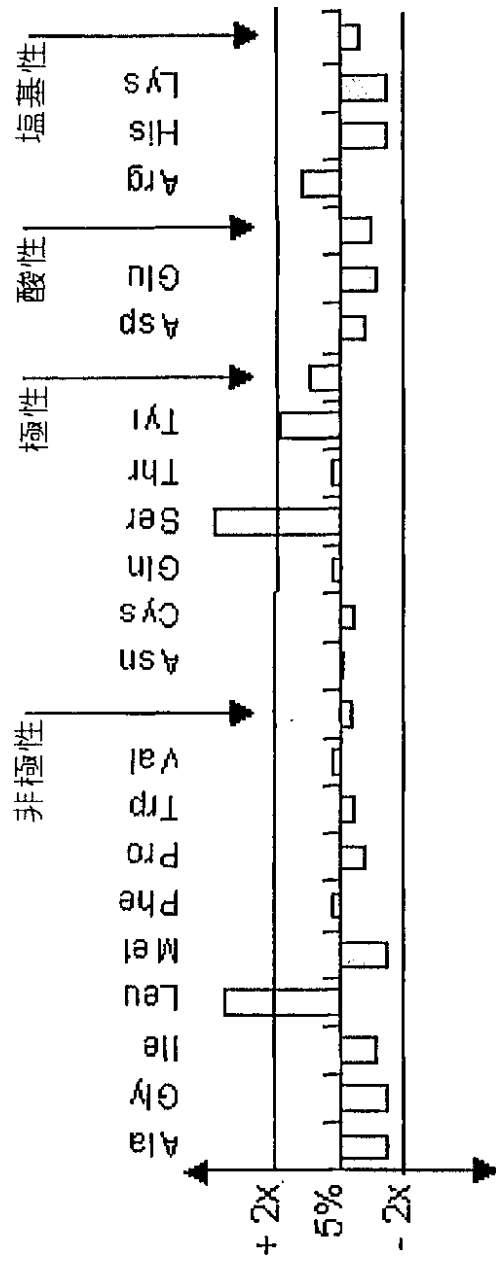


FIGURE 4A

【圖4B】

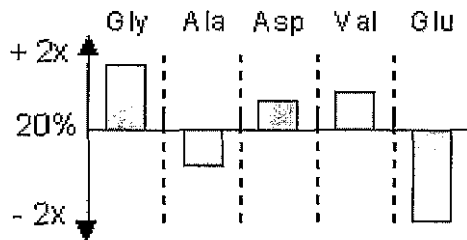


FIGURE 4B

【図4C】

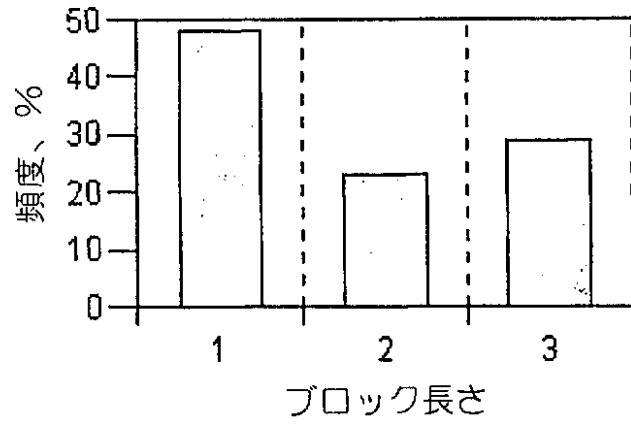


FIGURE 4C

【図5】

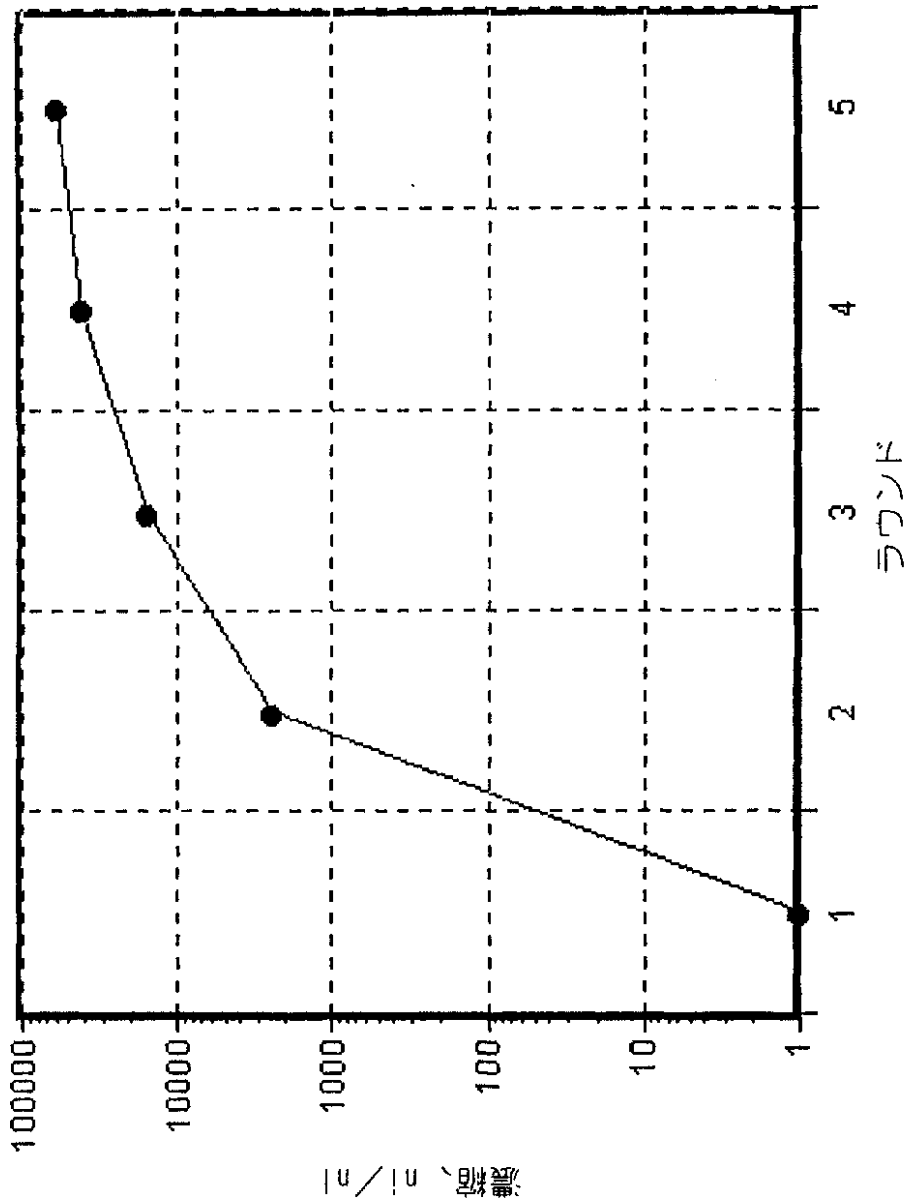


FIGURE 5

【図6】

単離物	ラウンド	展示ペプチド	頻度
S2.1	2	HPDLYCHHPQGDNHEVW	6/9
S2.2	2	NNGWWSWDLVFGAD	1/9
S2.3	2	MSRGWMRA	1/9
S2.4	2	LDGI	1/9
S3.1	3	HPDLYCHHPQGDNHEVW	10/10
S4.1	4	HPDLYCHHPQGDNHEVW	10/10

FIGURE 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	9/00	4 B 0 6 5
	5/10	C 1 2 P	21/02	C 4 H 0 4 5
	9/00	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 N A Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15	C 1 2 N	15/00	A
	33/50		5/00	B

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F
 , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,
 M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G
 M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z
 , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z ,
 M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M ,
 A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B
 Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K
 , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E ,
 G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J
 P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R
 , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K ,
 M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R
 O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J
 , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N ,
 Y U , Z A , Z W

(72)発明者 マンドビル, ローズモンド
 カナダ国, ケベック ジェイ7イー 4ピ
 -9, サ-ント-テレーズ, ティボール
 781

(72)発明者 ロマール, オレグ
 カナダ国, ケベック エイチ9エックス
 2ティ-4, ベ デュルフ, ゲイ セダー
 ル 20726

(72)発明者 アラコフ, パレリー
 カナダ国, ケベック エイチ9エックス
 3ブイ4, ベ デュルフ, デ-ビッド ケ
 ネディー 48

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB21 DA12
DA13 DA19 DA30 DA36 FB08
FB12

4B024 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06
CA09 CA10 DA02 DA06 DA07
DA08 DA09 DA12 EA03 EA04
FA02 FA06 GA11 GA18 GA19
HA03 HA08 HA12 HA14

4B050 CC03 LL03 LL10

4B063 QA01 QA18 QQ20 QR08 QR32
QR41 QR42 QR55 QR58 QR59
QR62 QR66 QR69 QR75 QR77
QR82 QS12 QS24 QS25 QS28
QS34 QS36 QS39 QX02

4B064 AG01 CA02 CA04 CA06 CA10
CA19 CC24 DA13

4B065 AA15X AA26X AA41X AA50X
AA72X AA90X AB01 AC14
BA02 CA24 CA60

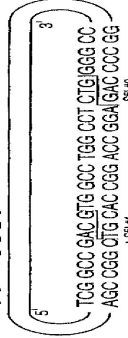
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA11
BA12 BA13 BA14 BA15 BA16
BA17 BA18 BA19 BA20 BA21
EA60 FA72 FA74

专利名称(译)	设计和筛选化合物随机文库的方法		
公开(公告)号	JP2003532431A	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	JP2001583186	申请日	2001-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	花键高科技制药股份有限公司雷开球德 生物噬菌体股份有限公司雷开球德		
申请(专利权)人(译)	Supuratekku制药股份有限公司雷开球德 生物噬菌体, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ポプコフミカイル マンドビルローズモンド ロマルオレグ アラコフバレリー		
发明人	ポプコフ,ミカイル マンドビル,ローズモンド ロマル,オレグ アラコフ,バレリー		
IPC分类号	G01N33/50 C07K5/00 C07K7/00 C07K14/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/10 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 C40B40/02 G01N33/15 G01N33/532		
CPC分类号	C12N15/1086 C12N15/1037 C40B40/02 G01N33/532		
FI分类号	C07K5/00 C07K7/00 C07K14/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.ZNA.Z G01N33/50.Z C12N15/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA19 2G045 /DA30 2G045/DA36 2G045/FB08 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA07 4B024/DA08 4B024 /DA09 4B024/DA12 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/LL03 4B050 /LL10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR75 4B063 /QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA04 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064 /CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA15X 4B065/AA26X 4B065/AA41X 4B065/AA50X 4B065 /AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA60 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA11 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045 /BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA21 4H045/EA60 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/570477 2000-05-12 US		
外部链接	Espacenet		

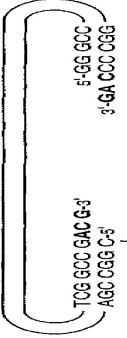
摘要(译)

提供了一种用于生产包括可变长度的分子的新颖的,有用的多维文库(MDL)的方法,其中所述分子是可能与靶分子和结构单元相互作用的功能单元。包含和。还提供了新颖的寡核苷酸,载体,转化和转染的单细胞宿主,以及用于在多维文库中筛选分子以与靶分子相互作用的试剂盒。

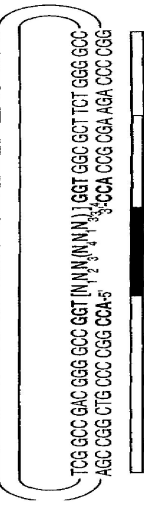
ヘアピン-fUSE 5



5' 1st
5' 2nd
↓ S11消化、14bpの
スタックアーラゲメントを残す



↓ アニールし、オリゴヌクレオチドを
挿入し、結合する



ニゲナル
ヘアピン
可変領域 スベーター
wPfl