

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514927

(P2005-514927A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-560171 (P2003-560171)	(71) 出願人	503089489
(86) (22) 出願日	平成15年1月14日 (2003. 1. 14)		ディヴァーサ コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月14日 (2004. 9. 14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/001189		1 2 1 サン ディエゴ ディレクターズ
(87) 国際公開番号	W02003/060084		プレイス 4 9 5 5
(87) 国際公開日	平成15年7月24日 (2003. 7. 24)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	60/348, 609		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成14年1月14日 (2002. 1. 14)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小川 信夫
(31) 優先権主張番号	60/348, 761	(74) 代理人	100084663
(32) 優先日	平成14年1月14日 (2002. 1. 14)		弁理士 箱田 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100093300
(31) 優先権主張番号	60/348, 764		弁理士 浅井 賢治
(32) 優先日	平成14年1月14日 (2002. 1. 14)	(74) 代理人	100114007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平山 孝二
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチドの製造方法及び二本鎖ポリヌクレオチドの精製方法

(57) 【要約】

本発明は塩基対ミスマッチ、挿入ノ欠失ループ及びノ又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの同定方法及び精製方法を提供する。本発明は核酸ビルディングブロックのライブラリー並びに合成遺伝子、アンチセンス構築物及びポリペプチドコーディング配列を含む、あらゆる核酸配列を生成するための方法を提供する。本発明はキメラ抗原結合分子及びそれらをコードする核酸を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを提供する工程 ;

(b) 複数の二本鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルを提供する工程 ;

(c) 工程 (b) の二本鎖ポリヌクレオチドを工程 (a) のポリペプチドと、工程 (a) のポリペプチドが工程 (b) の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップに特異的に結合する条件下で接触させる工程 ; および、

(d) 工程 (a) のポリペプチドへの特異的結合のない二本鎖ポリヌクレオチドを工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから分離し、それによって塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程、
を含む、塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを精製する方法。 10

【請求項 2】

二本鎖ポリヌクレオチドが二本鎖オリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

二本鎖ポリヌクレオチドが 3 ~ 約 300 塩基対の長さである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

二本鎖ポリヌクレオチドが 10 ~ 約 200 塩基対の長さである、請求項 3 記載の方法。 20

【請求項 5】

二本鎖ポリヌクレオチドが 50 ~ 約 150 塩基対の長さである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

塩基対ミスマッチが C:T ミスマッチを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

塩基対ミスマッチが G:A ミスマッチを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

塩基対ミスマッチが C:A ミスマッチを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

塩基対ミスマッチが G:U/T ミスマッチを含む、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 10】

二本鎖ポリヌクレオチド内の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループ及び / 又はヌクレオチドギャップに特異的に結合するポリペプチドが DNA 修復酵素を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

DNA 修復酵素がバクテリアの DNA 修復酵素である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

バクテリアの DNA 修復酵素が MutS DNA 修復酵素を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

MutS DNA 修復酵素が Taq MutS DNA 修復酵素を含む、請求項 12 記載の方法。 40

【請求項 14】

バクテリアの DNA 修復酵素が Fpg DNA 修復酵素を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

バクテリアの DNA 修復酵素が MutY DNA 修復酵素を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 16】

バクテリアの DNA 修復酵素が hexA DNA ミスマッチ修復酵素を含む、請求項 11 記載の方法。

【請求項 17】

バクテリアの DNA 修復酵素が Vsr ミスマッチ修復酵素を含む、請求項 11 記載の方法。 50

【請求項 18】

DNA修復酵素が哺乳動物DNA修復酵素である、請求項10記載の方法。

【請求項 19】

DNA修復酵素がG:U/Tミスマッチの塩基切除修復を開始するDNAグリコシラーゼである、請求項10記載の方法。

【請求項 20】

DNAグリコシラーゼがバクテリアのミスマッチ特異的ウラシル-DNAグリコシラーゼ(MUG) DNA修復酵素を含む、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

DNAグリコシラーゼが真核生物のチミン-DNAグリコシラーゼ(TDG)酵素を含む、請求項19記載の方法。 10

【請求項 22】

塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ又はヌクレオチドギャップに特異的に結合するポリペプチドが更にビオチン分子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 23】

塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ又はヌクレオチドギャップに特異的に結合するポリペプチドが更に抗体により特異的に結合され得るエピトープを含む分子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

挿入/欠失ループがステム-ループ構造を含む、請求項1記載の方法。 20

【請求項 25】

挿入/欠失ループが単一塩基対ミスマッチを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 26】

挿入/欠失ループが二つの連続の塩基対ミスマッチを含む、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

挿入/欠失ループが三つの連続の塩基対ミスマッチを含む、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

工程(d)において工程(a)のポリペプチドへの特異的結合のない二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドが特異的に結合する二本鎖ポリヌクレオチドから分離することが抗体の使用を含み、前記抗体は、前記特異的に結合したポリペプチドに特異的に結合するまたは前記特異的に結合したポリペプチドに特異的に結合したエピトープに特異的に結合することができ、前記特異的に結合したポリペプチドに前記抗体が特異的に結合する条件の下、または、前記特異的に結合したポリペプチドに結合したエピトープに前記抗体が特異的に結合する条件の下で、前記抗体が前記特異的に結合したポリペプチドと接触する、請求項1記載の方法。 30

【請求項 29】

抗体が固定化抗体である、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

抗体がビーズ又は磁化粒子に固定される、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

抗体が磁化ビーズに固定される、請求項30記載の方法。 40

【請求項 32】

抗体がイムノアッセイカラム中で固定され、かつ固定化抗体が特異的に結合したポリペプチド又は特異的に結合したポリペプチドに結合されたエピトープに特異的に結合することができる条件下で、サンプルがイムノアフィニティークラムに通される、請求項29記載の方法。

【請求項 33】

工程(d)において工程(a)のポリペプチドへの特異的結合のない二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから分離することがアフィニティークラムの使用を含み、前記カラムは前記特異的に結合したポリ 50

ペプチドに連結されたタグに特異的に結合し得る固定化された結合分子を含み、前記固定化抗体が前記特異的に結合したポリペプチドに連結したタグに特異的に結合し得る条件下でサンプルが前記アフィニティーカラムを通過する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

固定化結合分子がアビジンを含み、かつ特異的に結合されたポリペプチドに結合されたタグがビオチンを含む、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

工程 (d) の工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドからの工程 (a) の特異的に結合されたポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの分離がサイズ排除カラムの使用を含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3 6】

サイズ排除カラムがスピンカラムを含む、請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 7】

工程 (d) の工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドからの工程 (a) の特異的に結合されたポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの分離がサイズ排除ゲルの使用を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

サイズ排除ゲルがアガロースゲルを含む、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

二本鎖ポリヌクレオチドがポリペプチドコーディング配列を含む、請求項 1 記載の方法

20

【請求項 4 0】

ポリペプチドコーディング配列が融合タンパク質コーディング配列を含む、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

融合タンパク質がインテインの上流に目的ポリペプチドを含み、インテインがポリペプチドをコードする、請求項 4 0 記載の方法。

【請求項 4 2】

インテインポリペプチドが抗体又はリガンドを含む、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

インテインポリペプチドが酵素を含む、請求項 4 1 記載の方法。

30

【請求項 4 4】

酵素が Lac Z を含む、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

インテインポリペプチドがポリペプチド選抜可能マーカを含む、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 6】

ポリペプチド選抜可能マーカが抗生物質を含む、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

抗生物質がカナマイシン、ペニシリン又はハイグロマイシンを含む、請求項 4 6 記載の方法。

40

【請求項 4 8】

(a) 二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを提供する工程 ;

(b) 複数の二本鎖オリゴヌクレオチドを含むサンプルを提供する工程 ;

(c) 工程 (b) の二本鎖オリゴヌクレオチドを工程 (a) のポリペプチドと、工程 (a) のポリペプチドが工程 (b) の二本鎖オリゴヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップに特異的に結合する条件下で接触させる工程 ;

(d) 工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合していない二本鎖オリゴヌクレオチ

50

ドを工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドから分離し、それによって塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖オリゴヌクレオチドを精製する工程 ; および、

(e) 前記精製した塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖オリゴヌクレオチドを互いに連結し、それによって、塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを生成する工程、

を含む、二本鎖オリゴヌクレオチドをアッセンブルして塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを作製する方法。

10

【請求項 49】

オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドのライブラリーを含む、請求項 48 記載の方法。

【請求項 50】

オリゴヌクレオチドが二本鎖オリゴヌクレオチドのライブラリーを含む、請求項 49 記載の方法。

【請求項 51】

オリゴヌクレオチドマルチコドンビルディングブロックのライブラリーが複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムに少なくとも二つのコドン及びマルチコドンの 5' 末端および 3' 末端に隣接する IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、請求項 49 記載の方法。

20

【請求項 52】

(a) 二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを提供する工程 ;

(b) 複数の二本鎖オリゴヌクレオチドを含むサンプルを提供する工程 ;

(c) 工程 (b) の二本鎖オリゴヌクレオチドを互いに連結して二本鎖ポリヌクレオチドを生成する工程 ;

(d) 工程 (c) の二本鎖ポリヌクレオチドを工程 (a) のポリペプチドと、工程 (a) のポリペプチドが工程 (c) の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で接触させる工程 ;

30

(e) 工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合しない二本鎖ポリヌクレオチドを工程 (a) のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから分離し、それによって塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程、

を含む、二本鎖オリゴヌクレオチドをアッセンブルして塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループおよび / またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを作製する方法。

【請求項 53】

二本鎖オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドマルチコドンビルディングブロックのライブラリーを含み、そのライブラリーが複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムの少なくとも二つのコドン及びマルチコドンの 5' 末端及び 3' 末端に隣接する IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、請求項 52 記載の方法。

40

【請求項 54】

61 固定化スターターオリゴヌクレオチド、夫々の可能なアミノ酸コーディングトリプレットのための一つのオリゴヌクレオチドの組を用意し、オリゴヌクレオチドが基質に固定され、かつ IIS 型制限エンドヌクレアーゼにより生成された一本鎖オーバーハングに相当する一本鎖オーバーハングを有し、又は、オリゴヌクレオチドが基質に遠位の IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、一本鎖オーバーハングが IIS 型制限エンドヌクレア

50

ーゼによる消化により生成され；工程(a)のライブラリーからの第二オリゴヌクレオチドメンバーをIIS型制限エンドヌクレアーゼで消化して一本鎖オーバーハングを生成し、第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドの相補一本鎖塩基オーバーハングが対合し得る条件下でその消化された第二オリゴヌクレオチドメンバーを固定化第一オリゴヌクレオチドメンバーに接触させ、第二オリゴヌクレオチドを第一オリゴヌクレオチドにつなぎ、それにより二本鎖ポリヌクレオチドを生成することを更に含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】

(a) 二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループおよび／またはヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを提供する工程；

10

(b) 融合タンパク質をコードする複数の二本鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルを提供する工程であって、前記融合タンパク質をコードする配列が対象配列をマーカージョイントまたは選抜ポリペプチドをコードする配列の上流にインフレームで含んでいる、前記工程；

(c) 工程(b)のポリヌクレオチドを、工程(a)のポリペプチドが工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ、および／または、ヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で、工程(a)のポリペプチドと接触させる工程；

(d) 工程(a)のポリペプチドが特異的に結合しない二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドから分離し、それによって塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループおよび／またはヌクレオチドギャップを欠く二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程；

20

(e) 前記精製されたポリヌクレオチドを発現させ、前記選抜マーカージョイントポリペプチドを発現するポリヌクレオチドを選抜し、それによって、塩基対ミスマッチ無し、挿入／欠失ループ無し、および／または、ヌクレオチドギャップ無しの二本鎖ポリペプチドコード配列を生成する工程、を含む、塩基対ミスマッチ無し、挿入／欠失ループ無し、および／または、ヌクレオチドギャップ無しの二本鎖ポリペプチドコード配列を作製する方法。

【請求項56】

マーカージョイントまたは選抜ポリペプチドが自己スプライシングインテインを含み、かつ目的ポリペプチドの上流からのマーカージョイントまたは選抜ポリペプチドの自己スプライシング切り出しを更に含む、請求項55記載の方法。

30

【請求項57】

マーカージョイントまたは選抜ポリペプチドが酵素を含む、請求項55記載の方法。

【請求項58】

酵素がLac Zを含む、請求項57記載の方法。

【請求項59】

マーカージョイントまたは選抜ポリペプチドが抗生物質を含む、請求項58記載の方法。

【請求項60】

抗生物質がカナマイシン、ペニシリン又はハイグロマイシンを含む、請求項59記載の方法。

40

【請求項61】

精製二本鎖ポリヌクレオチドが塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを95%含まない、請求項1記載の方法。

【請求項62】

精製二本鎖ポリヌクレオチドが塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを98%含まない、請求項61記載の方法。

【請求項63】

精製二本鎖ポリヌクレオチドが塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを99%含まない、請求項62記載の方法。

50

【請求項 6 4】

精製二本鎖ポリヌクレオチドが塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを完全に含まない、請求項 6 3 記載の方法。

【請求項 6 5】

遺伝子部位飽和突然変異誘発 (GSSM) を含む方法により操作されたポリヌクレオチドを精製することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6 6】

合成連結反応再アッセンブル (SLR) を含む方法により操作されたポリヌクレオチドを精製することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6 7】

遺伝子部位飽和突然変異誘発 (GSSM)、段階的核酸再アッセンブル、エラー-プローン PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブル PCR、セクシュアル PCR 突然変異誘発、in vivo 突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発、指数的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル (SLR) 及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた方法により操作されたポリヌクレオチドを精製することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6 8】

組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾 DNA 突然変異誘発、ウラシル含有鑄型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれた方法により操作されたポリヌクレオチドを精製することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6 9】

合成ポリヌクレオチドを含む二本鎖核酸を精製することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7 0】

合成ポリヌクレオチドが親配列又は天然配列と同じである、請求項 6 9 記載の方法。

【請求項 7 1】

その方法が合成ポリヌクレオチド、組換え生成された核酸又は単離された核酸を含む二本鎖核酸を精製することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7 2】

ポリヌクレオチドが遺伝子を含む、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 3】

ポリヌクレオチドが染色体を含む、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

遺伝子が更に経路を含む、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 5】

遺伝子が調節配列を含む、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 6】

調節配列がプロモーター又はエンハンサーを含む、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】

ポリヌクレオチドがポリペプチドコーディング配列を含む、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 8】

ポリペプチドが酵素、抗体、受容体、ニューロペプチド、ケモキン、ホルモン、シグナル配列、又は構造遺伝子である、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

ポリヌクレオチドが非コーディング配列を含む、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 8 0】

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドがDNA、RNA又はこれらの組み合わせを含む、請求項1記載の方法。

【請求項81】

塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップを90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%又は100%即ち完全に含まない二本鎖DNA又はRNAのサンプル又は“バッチ”が生成される、請求項80記載の方法。

【請求項82】

二本鎖ポリヌクレオチドがiRNAを含む、請求項1記載の方法。

【請求項83】

二本鎖ポリヌクレオチドがDNAを含む、請求項1記載の方法。

【請求項84】

DNAが遺伝子を含む、請求項83記載の方法。

【請求項85】

DNAが染色体を含む、請求項84記載の方法。

【請求項86】

ジコドンビルディングブロックを含むオリゴヌクレオチドのライブラリーであって、複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムの二つのコドン（ジコドン）及びジコドンの5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含むことを特徴とする前記ライブラリー。

【請求項87】

ライブラリーが全ての可能なコドンダイマー（ジコドン）組み合わせを含むオリゴヌクレオチドメンバーを含む、請求項86記載のライブラリー。

【請求項88】

オリゴヌクレオチドメンバーが4096の可能なコドンダイマー（ジコドン）組み合わせを含む、請求項86記載のライブラリー。

【請求項89】

コドンがプロモーター、エンハンサー、調節モチーフ非コーディング配列、テロメア又は構造非コーディング配列をコードする、請求項86記載のライブラリー。

【請求項90】

ジコドンの5'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列がジコドンの3'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列とは異なる、請求項86記載のライブラリー。

【請求項91】

IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に3塩基一本鎖オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼに特異的である、請求項86記載のライブラリー。

【請求項92】

制限エンドヌクレアーゼがSapI制限エンドヌクレアーゼ又はそのイソ制限酵素を含む、請求項91記載のライブラリー。

【請求項93】

制限エンドヌクレアーゼがEarI制限エンドヌクレアーゼ又はそのイソ制限酵素を含む、請求項91記載のライブラリー。

【請求項94】

IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に2塩基一本鎖オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼに特異的である、請求項86記載のライブラリー。

【請求項95】

制限エンドヌクレアーゼがBseRI、BsgI及びBpmIからなる群から選ばれる、請求項94記載のライブラリー。

【請求項96】

IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に1塩基一本鎖オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼに特異的であ

10

20

30

40

50

る、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 9 7】

制限エンドヌクレアーゼが N. AlwI 及び N. BstNBI からなる群から選ばれる、請求項 96 記載のライブラリー。

【請求項 9 8】

IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識配列の両側で切断する制限エンドヌクレアーゼに特異的である、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 9 9】

制限エンドヌクレアーゼが BcgI、BsaXI 及び BspCNI からなる群から選ばれる、請求項 9 8 記載のライブラリー。 10

【請求項 1 0 0】

夫々のオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが実質的にタンデムの二つのコドン（ジコドン）及びジコドンの 5' 末端及び 3' 末端に隣接する IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識配列からなる、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 1】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが約 20 ~ 400 塩基対の長さである、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 2】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが約 40 ~ 200 塩基対の長さである、請求項 1 0 1 記載のライブラリー。 20

【請求項 1 0 3】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが約 100 ~ 150 塩基対の長さである、請求項 1 0 2 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 4】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

(NNN)(NNN) AGAAGAGC (配列番号 1)

(NNN)(NNN) TCTTCTCG (配列番号 2)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である) 30

を含む、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 5】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

(NNN)(NNN) TGAAGAGAG (配列番号 3)

(NNN)(NNN) ACTTCTCTC (配列番号 4)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である) 30

を含む、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 6】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列 40

(NNN)(NNN) TGAAGAGAG CT GCTACTAACT GCA (配列番号 5)

(NNN)(NNN) ACTTCTCTC GA CGATGATTG (配列番号 6)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である) 40

を含む、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 7】

オリゴヌクレオチドライブラリーが配列

CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC (配列番号 7)

GAGAGAAGT NNN NNN TCTTCTCG (配列番号 8)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である) 50

る)

を含む、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 8】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC GGGTCTTCCAAGTAGAGAATTCGATATCTGCA (配列番号 9)

GAGAGAAGT NNN NNN TCTTCTCG CCCAGAAGGTTGATCTCTTAAGCTATAG (配列番号 10)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である)

を含む、請求項 8 6 記載のライブラリー。

【請求項 1 0 9】

(a) 請求項 1 記載のコドンビルディングブロックオリゴヌクレオチドのライブラリーを提供する工程；

(b) 基体表面を提供する工程；

(c) 工程 (a) のライブラリーの第 1 のオリゴヌクレオチドメンバーを工程 (b) の基体表面に固定化し、IIS 型制限エンドヌクレアーゼで消化して一本鎖オーバーハングをコドン中に生成させる、または、工程 (a) のライブラリーの第 1 のオリゴヌクレオチドメンバーを IIS 型制限エンドヌクレアーゼで消化して一本鎖オーバーハングをコドン中に生成させ、コドンと反対側のオリゴヌクレオチド端で工程 (b) の基体表面に固定化する工程；

(d) 工程 (a) のライブラリーの第 2 のオリゴヌクレオチドメンバーを IIS 型制限エンドヌクレアーゼで消化して一本鎖オーバーハングをコドン中に生成させる工程；および、

(e) 工程 (d) の消化された第 2 のオリゴヌクレオチドメンバーと工程 (c) の固定化された第 1 のオリゴヌクレオチドメンバーと、前記第 1 及び第 2 のオリゴヌクレオチドの相補的な一本鎖塩基オーバーハングが対を形成し得る条件下で接触させ、前記第 2 のオリゴヌクレオチドを前記第 1 のオリゴヌクレオチドに連結させる工程、を含む、ジコドンビルディングブロックの反復アッセンブルによってコドンを含むポリヌクレオチドを構築する方法。

【請求項 1 1 0】

工程 (e) の固定化されたオリゴヌクレオチドを IIS 型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成することを更に含み、前記 IIS 型制限エンドヌクレアーゼが基質表面に遠位のオリゴヌクレオチド中の制限エンドヌクレアーゼ認識配列を認識する、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 1 1】

工程 (a) のライブラリーの別のオリゴヌクレオチドメンバーを IIS 型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成することを更に含む、請求項 1 1 0 記載の方法。

【請求項 1 1 2】

オリゴヌクレオチドの相補一本鎖塩基オーバーハングが対合することができる条件下で消化されたオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを消化され、固定化された第一オリゴヌクレオチドメンバーに接触させ、オリゴヌクレオチドをつなぎ、それによりジコドンビルディングブロックの反復アッセンブルによりコドンを含むポリヌクレオチドを構築することを更に含む、請求項 1 1 0 記載の方法。

【請求項 1 1 3】

反復して繰り返され、それによりコドンを含むポリヌクレオチドを構築する、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 1 4】

n 回反復して繰り返され、n が $2 \sim 10^6$ の整数である、請求項 1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 1 5】

n 回反復して繰り返され、n が $10^2 \sim 10^5$ の整数である、請求項 1 1 4 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 6】

ライブラリーのメンバーが反復アッセンブルにランダムに選ばれる、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 1 7】

ライブラリーの全てのメンバーがランダムに選ばれる、請求項 1 1 6 記載の方法。

【請求項 1 1 8】

ライブラリーのメンバーが反復アッセンブルに非確率的に選ばれる、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 1 9】

ライブラリーの全てのメンバーが非確率的に選ばれる、請求項 1 1 8 記載の方法。

10

【請求項 1 2 0】

オリゴヌクレオチドのライブラリーが全ての可能なコドンダイマー（ジコドン）組み合わせを含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 2 1】

オリゴヌクレオチドのライブラリーが 4096 のコドンダイマー（ジコドン）組み合わせからなる、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 2 2】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが約 100 ~ 150 塩基対の長さである、請求項 1 0 9 記載のライブラリー。

【請求項 1 2 3】

コドンが停止コドンではない、請求項 1 2 2 記載の方法。

20

【請求項 1 2 4】

基質表面が固体表面を含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 2 5】

基質表面がビーズを含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 2 6】

基質表面がポリスチレンを含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 2 7】

基質表面がガラスを含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

【請求項 1 2 8】

基質表面が二重オリフィス容器を含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

30

【請求項 1 2 9】

二重オリフィス容器が二重オリフィスカピラリーアレイを含む、請求項 1 2 8 記載の方法。

【請求項 1 3 0】

二重オリフィスカピラリーアレイが GIGAMATRIXTM キャピラリーアレイである、請求項 1 2 9 記載の方法。

【請求項 1 3 1】

工程 (b) の基質表面が固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドを更に含む、請求項 1 0 9 記載の方法。

40

【請求項 1 3 2】

固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドがコドンビルディングブロックオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを更に含み、オリゴヌクレオチドのライブラリーがジコドンビルディングブロックを含み、ライブラリーが複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムに二つのコドン（ジコドン）及びジコドンの 5' 末端及び 3' 末端に隣接する IIS 型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、請求項 1 3 1 記載の方法。

【請求項 1 3 3】

コドンビルディングブロックオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが平滑末端連結反応により固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドに固定される、請求項 1 3 2 記載の方

50

法。

【請求項 1 3 4】

固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの固定されていない末端に一本鎖塩基オーバーハングを含む、請求項 1 3 1 記載の方法。

【請求項 1 3 5】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが一本鎖塩基オーバーハングの塩基対合、続いて連結反応により固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドに固定される、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 3 6】

ジコドンの5'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列がジコドンの3'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列とは異なる、請求項 1 3 2 記載の方法。 10

【請求項 1 3 7】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に3塩基一本鎖オーバーハングを生成する、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 3 8】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがSapI制限エンドヌクレアーゼ又はそのイソ制限酵素を含む、請求項 1 3 7 記載の方法。

【請求項 1 3 9】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがEarI制限エンドヌクレアーゼ又はそのイソ制限酵素を含む、請求項 1 3 7 記載の方法。 20

【請求項 1 4 0】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に、2塩基一本鎖オーバーハングを生成する、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 4 1】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがBseRI、BsgI及びBpmIからなる群から選ばれる、請求項 1 4 0 記載の方法。

【請求項 1 4 2】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に1塩基一本鎖オーバーハングを生成する、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 4 3】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがN.AIwI及びN.BstNBIからなる群から選ばれる、請求項 1 4 2 記載の方法。 30

【請求項 1 4 4】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時にIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列の両側で切断する、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 4 5】

IIS型制限エンドヌクレアーゼがBcgI、BsaXI及びBspCNIからなる群から選ばれる、請求項 1 4 4 記載の方法。

【請求項 1 4 6】

夫々のライブラリーメンバーが実質的にタンデムの二つのコドン（ジコドン）及びジコドンの5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列からなる、請求項 1 3 2 記載の方法。 40

【請求項 1 4 7】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが約20～400塩基対の長さである、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 4 8】

ライブラリーメンバーが約40～200塩基対の長さである、請求項 1 4 7 記載の方法。

【請求項 1 4 9】

ライブラリーメンバーが約100～150塩基対の長さである、請求項 1 4 8 記載の方法。

【請求項 1 5 0】

50

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

(NNN)(NNN) AGAAGAGC (配列番号 1)

(NNN)(NNN) TCTTCTCG (配列番号 2)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 1】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

(NNN)(NNN) TGAAGAGAG (配列番号 3)

(NNN)(NNN) ACTTCTCTC (配列番号 4)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 2】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

(NNN)(NNN) TGAAGAGAG CT GCTACTAACT GCA (配列番号 5)

(NNN)(NNN) ACTTCTCTC GA CGATGATTG (配列番号 6)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 3】

オリゴヌクレオチドライブラリーが配列

CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC (配列番号 7)

GAGAGAAAGT NNN NNN TCTTCTCG (配列番号 8)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 4】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが配列

CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC GGGTCTTCCAAGTATCGATATCTGCA (配列番号 9)

GAGAGAAAGT NNN NNN TCTTCTCG CCCAGAAGGTTGATCTCTTAAGCTATAG (配列番号 10)

(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 5】

固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドが一般式

$(Y)_n$ (プロモーター) (制限部位) (一本鎖オーバーハング)

(式中、Yはあらゆるヌクレオチド塩基であり、かつnは2～50の整数である)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 6】

プロモーターがT6プロモーター、T3プロモーター及びSP6プロモーターからなる群から選ばれる、請求項 1 5 5 記載の方法。

【請求項 1 5 7】

固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドが配列

(NNN)(NNN) CGCGCG(Y)_n CGAATTGGAGCTC (配列番号 11)

(NNN)(NNN) GCGCGC(Y)_n GCTTAACCTCGAGCCCC (配列番号 12)

(式中、nは1以上の整数であり、Yはあらゆるヌクレオチドであり、かつ(NNN)はコドンである)

を含む、請求項 1 3 2 記載の方法。

【請求項 1 5 8】

10

20

30

40

50

固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドが配列

(NNN)(NNN) CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTC (配列番号13)

(NNN)(NNN) GCGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGCCCC (配列番号14)

を含む、請求項132記載の方法。

【請求項159】

固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドがプロモーターを含む、請求項131記載の方法。

【請求項160】

プロモーターがバクテリオファージプロモーターを含む、請求項159記載の方法。

【請求項161】

バクテリオファージプロモーターがT7プロモーターである、請求項160記載の方法。

【請求項162】

バクテリオファージプロモーターがT6プロモーター及びSP6プロモーターからなる群から選ばれる、請求項160記載の方法。

【請求項163】

オリゴヌクレオチドの連結反応がリガーゼの使用を含む、請求項135記載の方法。

【請求項164】

リガーゼがT4リガーゼ及び大腸菌リガーゼからなる群から選ばれる、請求項163記載の方法。

【請求項165】

構築されたポリヌクレオチドを配列決定することを更に含む、請求項109記載の方法。

【請求項166】

ポリヌクレオチド配列の全部又は一部がペプチド又はポリペプチドをコードするか否かを測定することを更に含む、請求項165記載の方法。

【請求項167】

ポリヌクレオチドを単離することを更に含む、請求項165記載の方法。

【請求項168】

構築されたポリヌクレオチドのポリメラーゼをベースとする増幅を更に含む、請求項109記載の方法。

【請求項169】

ポリメラーゼをベースとする増幅がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、請求項168記載の方法。

【請求項170】

構築されたポリヌクレオチドの転写を更に含む、請求項109記載の方法。

【請求項171】

基質が二重オリフィス容器を含む、請求項109記載の方法。

【請求項172】

二重オリフィス容器が二重オリフィスキャピラリーアレイを含む、請求項171記載の方法。

【請求項173】

二重オリフィスキャピラリーアレイがGIGAMATRIXTMキャピラリーアレイである、請求項172記載の方法。

【請求項174】

下記の成分：

(a)請求項1記載のオリゴヌクレオチドメンバーを含むライブラリー、及び

(b)基質表面に固定化された工程(a)の複数のオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを含む基質表面、
を含む、コドンビルディングブロックの反復アッセンブルによるコドンを含むポリヌクレオチドを構築するための多重系。

10

20

30

40

50

【請求項 175】

基質表面が二重オリフィスキャピラリーアレイを更に含む、請求項 174 記載の多重系。

【請求項 176】

二重オリフィスキャピラリーアレイがGIGAMATRIXTMキャピラリーアレイを含む、請求項 174 記載の多重系。

【請求項 177】

請求項 109 記載の方法を含む指示を更に含む、請求項 174 記載の多重系。

【請求項 178】

複数の抗原結合ポリペプチドをコードするキメラ核酸のライブラリーであって、以下の工程を含む方法によって作製される前記ライブラリー： 10

(a) ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)またはカッパ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)をコードする複数の核酸を提供する工程；

(b) J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程；

(c) ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)またはカッパ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)をコードする複数の核酸を提供する工程；

(d) 工程(a)の核酸、工程(c)の核酸および工程(b)のオリゴヌクレオチドを、前記工程(b)のオリゴヌクレオチドが前記工程(a)の核酸および前記工程(c)の核酸の間に位置するように連結してキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-J-Cキメラ核酸を生成する工程、および前記連結工程を反復してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コード配列のライブラリーを作製する工程。 20

【請求項 179】

抗原結合ポリペプチドが一本鎖抗体を含む、請求項 178 記載のライブラリー。

【請求項 180】

抗原結合ポリペプチドがFabフラグメント、Fdフラグメント又は抗原結合相補性決定領域(CDR)を含む、請求項 178 記載のライブラリー。

【請求項 181】

工程(a)のラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列又はカッパ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列が増幅反応により生成される、請求項 178 記載のライブラリー。 30

【請求項 182】

工程(c)のラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列又はカッパ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列が増幅反応により生成される、請求項 178 記載のライブラリー。

【請求項 183】

増幅反応が一对のオリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅反応を含む、請求項 181 又は 182 記載のライブラリー。

【請求項 184】

オリゴヌクレオチドプライマーが制限酵素部位を更に含む、請求項 183 記載のライブラリー。 40

【請求項 185】

ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列、カッパ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列、ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列又はカッパ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列が約99～約600塩基対残基の長さである、請求項 178 記載のライブラリー。

【請求項 186】

核酸コーディング配列が約198～約402塩基対残基の長さである、請求項 185 記載のライブラリー。

【請求項 187】

核酸コーディング配列が約300～約320塩基対残基の長さである、請求項186記載のライブラリー。

【請求項 188】

増幅される核酸が哺乳動物の核酸である、請求項181又は182記載のライブラリー。

【請求項 189】

増幅される哺乳動物の核酸がヒト核酸である、請求項188記載のライブラリー。

【請求項 190】

増幅される核酸がゲノムDNA、cDNA又はRNAである、請求項181又は182記載のライブラリー。 10

【請求項 191】

工程(b)のJ領域ポリペプチドドメインをコードするオリゴヌクレオチドが約9～約99塩基対残基の長さである、請求項178記載のライブラリー。

【請求項 192】

工程(b)のJ領域ポリペプチドドメインをコードするオリゴヌクレオチドが約18～約81塩基対残基の長さである、請求項191記載のライブラリー。

【請求項 193】

工程(b)のJ領域ポリペプチドドメインをコードするオリゴヌクレオチドが約36～約63塩基対残基の長さである、請求項192記載のライブラリー。 20

【請求項 194】

キメラ核酸を生成するための工程(d)の結合がDNAリガーゼ、転写又は増幅反応を含む、請求項178記載のライブラリー。

【請求項 195】

増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅反応を含む、請求項194記載のライブラリー。

【請求項 196】

増幅反応がオリゴヌクレオチドプライマーの使用を含む、請求項195記載のライブラリー。

【請求項 197】

オリゴヌクレオチドプライマーが制限酵素部位を更に含む、請求項196記載のライブラリー。 30

【請求項 198】

転写がDNAポリメラーゼ転写反応を含む、請求項194記載のライブラリー。

【請求項 199】

複数のキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするキメラ核酸のライブラリーであって、以下の工程を含む方法によって作製される前記ライブラリー：

(a) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする複数の核酸を提供する工程；

(b) D領域ポリペプチドドメイン(V_D)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程； 40

(c) J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程；

(d) 重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)をコードする複数の核酸を提供する工程；

(e) 工程(a)の核酸、工程(d)の核酸、並びに工程(b)および工程(c)のオリゴヌクレオチドを、工程(b)および工程(c)のオリゴヌクレオチドが工程(a)の核酸と工程(d)の核酸の間に位置するように連結してキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-D-J-Cキメラ核酸コード配列を生成する工程、および、前記連結工程を反復してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コード配列のラ 50

キメラ核酸を生成するための工程(e)の結合がDNAリガーゼ、転写又は増幅反応を含む、請求項199記載のライブラリー。

【請求項217】

増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅反応を含む、請求項216記載のライブラリー。

【請求項218】

増幅反応がオリゴヌクレオチドプライマーの使用を含む、請求項216記載のライブラリー。

【請求項219】

オリゴヌクレオチドプライマーが制限酵素部位を更に含む、請求項218記載のライブラリー。 10

【請求項220】

転写がDNAポリメラーゼ転写反応を含む、請求項216記載のライブラリー。

【請求項221】

請求項78又は199記載のライブラリーから選ばれるキメラ核酸を含む発現ベクター。 。

【請求項222】

請求項78又は199記載のライブラリーから選ばれるキメラ核酸を含む形質転換細胞。 。

【請求項223】 20

請求項221記載の発現ベクターを含む形質転換細胞。

【請求項224】

請求項78又は99記載のライブラリーから選ばれたキメラ核酸を含む非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項225】

(a)ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)又はカッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする核酸を提供する工程、

(b)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードするオリゴヌクレオチドを提供する工程、

(c)ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)又はカッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)をコードする核酸を提供する工程、 30

(d)工程(a)の核酸、工程(c)の核酸及び工程(b)のオリゴヌクレオチドを、工程(b)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(c)の核酸の間に置かれるように連結してキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-J-Cキメラ核酸コーディング配列を生成する工程、を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドの作製方法。

【請求項226】

(a)ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)又はカッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、

(b)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、 40

(c)ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)又はカッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、

(d)工程(a)の核酸、工程(c)の核酸及び工程(b)のオリゴヌクレオチドを、工程(b)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(c)の核酸の間に置かれるように連結してキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-J-Cキメラ核酸コーディング配列を生成し、この結合工程を繰り返してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コーディング配列のライブラリーを生成する工程

を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーの製造方法。

【請求項227】

以下の工程を含む、キメラ抗原結合ポリペプチドの作製方法： 50

(a) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン (V_H) を提供する工程 ;

(b) D 領域ポリペプチドドメイン (V_D) をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程 ;

(c) J 領域ポリペプチドドメイン (V_J) をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程 ;

(d) 重鎖定常領域ポリペプチドドメイン (C_H) をコードする複数の核酸を提供する工程 ;

(e) 工程 (a) の核酸、工程 (d) の核酸、並びに工程 (b) および工程 (c) のオリゴヌクレオチドを、工程 (b) および工程 (c) のオリゴヌクレオチドが工程 (a) の核酸と工程 (d) の核酸の間に位置するように連結してキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする V-D-J-C キメラ核酸コード配列を生成する工程。 10

【請求項 2 2 8】

以下の工程を含むキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーを作製する方法 :

(a) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン (V_H) を提供する工程 ;

(b) D 領域ポリペプチドドメイン (V_D) をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程 ;

(c) J 領域ポリペプチドドメイン (V_J) をコードする複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程 ;

(d) 重鎖定常領域ポリペプチドドメイン (C_H) をコードする複数の核酸を提供する工程 ; 20

(e) 工程 (a) の核酸、工程 (d) の核酸、並びに工程 (b) および工程 (c) のオリゴヌクレオチドを、工程 (b) および工程 (c) のオリゴヌクレオチドが工程 (a) の核酸と工程 (d) の核酸の間に位置するように連結してキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする V-D-J-C キメラ核酸コード配列を生成する工程、および、前記連結工程を反復してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コード配列のライブラリーを作製する工程。

【請求項 2 2 9】

発現されたキメラ抗原結合タンパク質を抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを更に含む、請求項 2 2 5、2 2 6、2 2 7 又は 2 2 8 記載の方法。

【請求項 2 3 0】 30

キメラ抗原結合ポリペプチドをコードする核酸コーディング配列を突然変異誘発することを更に含む、請求項 2 2 5、2 2 6、2 2 7 又は 2 2 8 記載の方法。

【請求項 2 3 1】

核酸が最適化された誘導進化系もしくは合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせを含む方法により突然変異誘発される、請求項 2 3 0 記載の方法。

【請求項 2 3 2】

核酸が遺伝子部位飽和突然変異誘発 (GSSM)、段階的核酸再アッセンブル、エラー-プロ- 40
 ーンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブルPCR、セ
 クシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ
 ・アンサンブル突然変異誘発、指数的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘
 発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル (SLR) 又はこれらの組み合わせ
 を含む方法により突然変異誘発される、請求項 2 3 0 記載の方法。

【請求項 2 3 3】

核酸が組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウラ
 シル含有鋳型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変
 異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘
 発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成
 、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成又はこれらの組み合わせを含む
 方法により突然変異誘発される、請求項 2 3 0 記載の方法。

【請求項 2 3 4】 50

突然変異誘発されたキメラ抗原結合ポリペプチドを、抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを更に含む、請求項 2 3 0 記載の方法。

【請求項 2 3 5】

抗原結合部位変種を、突然変異誘発の前のキメラ抗原結合ポリペプチドのアフィニティー又は特異性と較べて増大された抗原結合アフィニティー又は抗原結合特異性により同定することを含む、請求項 2 2 9 又は 2 3 4 記載の方法。

【請求項 2 3 6】

抗原結合ポリペプチドを、抗原結合部位ポリペプチドのファージディスプレイを含む方法により、抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを含む、請求項 2 2 9 又は 2 3 4 記載の方法。

10

【請求項 2 3 7】

抗原結合ポリペプチドを、液相中の発現される抗原結合部位ポリペプチドの発現を含む方法により、抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを含む、請求項 2 2 9 又は 2 3 4 記載の方法。

【請求項 2 3 8】

抗原結合ポリペプチドを、抗原結合部位ポリペプチドのリボソームディスプレイを含む方法により、抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを含む、請求項 2 2 9 又は 2 3 4 記載の方法。

【請求項 2 3 9】

キメラ抗原結合ポリペプチドを、固相中でポリペプチドを固定することを含む方法により抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを更に含む、請求項 2 2 5、2 2 6、2 2 7 又は 2 2 8 記載の方法。

20

【請求項 2 4 0】

キメラ抗原結合ポリペプチドを、キャピラリーアレイを含む方法により、抗原を特異的に結合する能力についてスクリーニングすることを含む、請求項 2 3 9 記載の方法。

【請求項 2 4 1】

キメラ抗原結合ポリペプチドを、二重オリフィス容器を含む方法により、抗原を特異的に結合する能力をスクリーニングすることを含む、請求項 2 4 0 記載の方法。

【請求項 2 4 2】

二重オリフィス容器が二重オリフィスキャピラリーアレイを含む、請求項 2 4 1 記載の方法。

30

【請求項 2 4 3】

二重オリフィスキャピラリーアレイが GIGAMATRIXTM キャピラリーアレイである、請求項 2 4 2 記載の方法。

【請求項 2 4 4】

以下の工程を含むキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーを作製する方法：

(a) 請求項 4 8 記載の方法によってキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする V-J-C キメラ核酸を提供する、または、請求項 5 0 記載の方法によってキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする複数の V-D-J-C キメラ核酸を提供する工程；

(b) 複数のオリゴヌクレオチドを提供する工程であって、前記各オリゴヌクレオチドは工程 (a) のキメラ核酸に相同な配列を含み、それによって前記キメラ核酸の特異的配列をターゲティングし、および、前記キメラ核酸の変種である配列を含み；

40

(c) 工程 (a) のキメラ核酸を工程 (b) のオリゴヌクレオチドで複製することによって非確率論的変種を含む数 n (n は整数) の子孫ポリヌクレオチドを生成し、それによってキメラ抗原結合ポリヌクレオチドのライブラリーを生成する工程。

【請求項 2 4 5】

キメラ核酸に相同な配列が x 塩基の長さであり、 x が 3 ~ 100 の整数である、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 4 6】

キメラ核酸に相同な配列が x 塩基の長さであり、 x が 5 ~ 50 の整数である、請求項 2 4

50

5 記載の方法。

【請求項 2 4 7】

キメラ核酸に相同な配列が x 塩基の長さであり、 x が 10 ~ 30 の整数である、請求項 2 4 6 記載の方法。

【請求項 2 4 8】

キメラ核酸の変種である配列が x 塩基の長さであり、 x が 1 ~ 50 の整数である、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 4 9】

キメラ核酸の変種である配列が x 塩基の長さであり、 x が 2 ~ 20 の整数である、請求項 2 4 8 記載の方法。

10

【請求項 2 5 0】

工程 (b) のオリゴヌクレオチドがキメラ核酸に相同の第二配列を含み、変種配列がキメラ核酸に相同な配列により隣接される、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 5 1】

キメラ核酸の変種である第二配列が x 塩基の長さであり、 x が 1 ~ 50 の整数である、請求項 2 5 0 記載の方法。

【請求項 2 5 2】

第二配列が x 塩基の長さであり、 x が 3、6、9 又は 12 である、請求項 2 5 0 記載の方法。

【請求項 2 5 3】

20

オリゴヌクレオチドがキメラ核酸コドンターゲットングする変種配列を含み、それにより複数の変種コドンを含む複数の子孫キメラポリヌクレオチドを生成する、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 5 4】

変種配列が、ターゲットングされるコドンについての全ての 19 の天然アミノ酸変種をコードする変種コドンを生成し、それにより前記ターゲットングされるコドンによりコードされる残基において全ての 19 の可能な天然アミノ酸変化を生じる、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 5 5】

オリゴヌクレオチドが複数のキメラ核酸コドンターゲットングする変種配列を含む、請求項 2 4 4 記載の方法。

30

【請求項 2 5 6】

変種配列を含むオリゴヌクレオチドがキメラ核酸中のコドンの全てを標的とし、それにより複数の子孫ポリペプチド（全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種である）を生成する、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 5 7】

変種配列がキメラ核酸コドンの全てについての全ての 19 の天然アミノ酸変種をコードする変種コドンを生成し、それにより複数の子孫ポリペプチド（全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種及びコドンの全てで全ての 19 の可能な天然アミノ酸の変種である）を生成する、請求項 2 4 4 記載の方法。

40

【請求項 2 5 8】

n が 1 ~ 約 10^{30} の整数である、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 5 9】

n が約 10^2 ~ 約 10^{20} の整数である、請求項 2 5 8 記載の方法。

【請求項 2 6 0】

n が約 10^2 ~ 約 10^{10} の整数である、請求項 2 5 9 記載の方法。

【請求項 2 6 1】

工程 (c) の複製が酵素をベースとする複製を含む、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 6 2】

酵素をベースとする複製がポリメラーゼをベースとする増幅反応を含む、請求項 2 6 1

50

記載の方法。

【請求項 2 6 3】

増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含む、請求項 2 6 2 記載の方法。

【請求項 2 6 4】

酵素をベースとする複製が無エラーポリメラーゼ反応を含む、請求項 2 6 3 記載の方法。

【請求項 2 6 5】

工程 (b) のオリゴヌクレオチドが一つ以上のヌクレオチド残基を鋳型ポリヌクレオチドに導入し得る核酸配列を更に含む、請求項 2 4 4 記載の方法。

【請求項 2 6 6】

工程 (b) のオリゴヌクレオチドが一つ以上の残基を鋳型ポリヌクレオチドから欠失し得る核酸配列を更に含む、請求項 2 6 5 記載の方法。

【請求項 2 6 7】

工程 (b) のオリゴヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドへの一つ以上の停止コドンの付加を更に含む、請求項 2 6 6 記載の方法。

【請求項 2 6 8】

(a) (i) ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン (V) 又はカッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン (V) をコードする核酸を提供し、J 領域ポリペプチドドメイン (VJ) をコードするオリゴヌクレオチドを提供し、ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン (C) 又はカッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン (C) をコードする核酸を提供し、工程 (a) の核酸、工程 (c) の核酸及び工程 (d) のオリゴヌクレオチドと一緒に連結して (工程 (b) のオリゴヌクレオチドが工程 (a) 及び工程 (c) の核酸の間に置かれる) キメラ抗原結合ポリペプチドをコードする V-J-C キメラ核酸コーディング配列を生成することを含む方法によりつくられるキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする x 個の V-J-C キメラ核酸、又は (ii) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン (VH) をコードする核酸を提供し、D 領域ポリペプチドドメイン (VD) をコードするオリゴヌクレオチドを提供し、J 領域ポリペプチドドメイン (VJ) をコードするオリゴヌクレオチドを提供し、(d) 重鎖定常領域ポリペプチドドメイン (CH) をコードする核酸を提供し、工程 (a) の核酸、工程 (d) の核酸並びに工程 (b) 及び工程 (c) のオリゴヌクレオチドと一緒に連結して (工程 (b) 及び工程 (c) のオリゴヌクレオチドが工程 (a) 及び工程 (d) の核酸の間に置かれる) キメラ抗原結合ポリペプチドをコードする V-D-J-C キメラ核酸コーディング配列を生成することを含む方法によりつくられるキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする x 個の V-D-J-C キメラ核酸を提供する工程、

(b) y 個のビルディングブロックポリヌクレオチドを用意する工程 (y は整数であり、ビルディングブロックポリヌクレオチドは前もって決められた配列で工程 (a) のキメラ核酸とクロスオーバー再アッセンブルするように設計され、かつキメラ核酸の変種である配列及びその変種配列に隣接するキメラ核酸に相同な配列を含む)、及び

(c) 少なくとも一つのビルディングブロックポリヌクレオチドを少なくとも一つのキメラ核酸と組み合わせ、その結果、ビルディングブロックポリヌクレオチドがキメラ核酸とクロスオーバー再アッセンブルして非確率的子孫キメラポリヌクレオチドを生成し、それによりキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのライブラリーを生成する工程、

を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーの製造方法。

【請求項 2 6 9】

x が 1 ~ 約 10^{10} の整数である、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 7 0】

x が約 10^1 ~ 約 10^2 の整数である、請求項 2 6 9 記載の方法。

【請求項 2 7 1】

x が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 からなる群から選ばれた整数である、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 7 2】

10

20

30

40

50

複数のビルディングブロックポリヌクレオチドを使用し、かつ変種配列がキメラ核酸コドンに標的として標的コドンの変種である複数の子孫ポリヌクレオチドを生成し、それによりキメラ核酸によりコードされたポリペプチド中の残基において複数の天然アミノ酸変化を生じる、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 7 3】

変種配列が標的コドンについての全ての 19 の天然アミノ酸変種をコードする変種コドン生成し、それによりキメラ核酸によりコードされたポリペプチド中の標的コドンによりコードされた残基において全ての 19 の可能な天然アミノ酸変化を生じる、請求項 2 7 2 記載の方法。

【請求項 2 7 4】

複数のビルディングブロックポリヌクレオチドが使用され、かつ変種配列が複数のキメラ核酸コドンに標的とし、それにより標的コドンの変種である複数のコドン及びキメラ核酸によりコードされたポリペプチド中の標的コドンによりコードされた複数の残基において複数の天然アミノ酸変化を生じる、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 7 5】

変種配列がキメラ核酸中のコドンの全て中で変種コドン生成し、それにより複数の子孫ポリペプチド（全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種である）を生成する、請求項 2 7 4 記載の方法。

【請求項 2 7 6】

変種配列がキメラ核酸コドンの全てについて 19 の全ての天然アミノ酸変種をコードする変種コドン生成し、それにより複数の子孫ポリペプチド（全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種及びコドンの全てで全ての 19 の可能な天然アミノ酸の変種である）を生成する、請求項 2 7 5 記載の方法。

【請求項 2 7 7】

抗原結合部位のコドンの全てが標的とされる、請求項 2 7 4 記載の方法。

【請求項 2 7 8】

ライブラリーが $1 \sim 10^{30}$ のメンバーを含む、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 7 9】

ライブラリーが $10^2 \sim 10^{20}$ のメンバーを含む、請求項 2 7 8 記載の方法。

【請求項 2 8 0】

ライブラリーが $10^3 \sim 10^{10}$ のメンバーを含む、請求項 2 7 9 記載の方法。

【請求項 2 8 1】

ビルディングブロックポリヌクレオチドの末端がキメラ核酸に相同な少なくとも約 6 のヌクレオチドを含む、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 8 2】

ビルディングブロックポリヌクレオチドの末端がキメラ核酸に相同な少なくとも約 15 のヌクレオチドを含む、請求項 2 8 1 記載の方法。

【請求項 2 8 3】

ビルディングブロックポリヌクレオチドの末端がキメラ核酸に相同な少なくとも約 21 のヌクレオチドを含む、請求項 2 8 2 記載の方法。

【請求項 2 8 4】

一つ以上のビルディングブロックポリヌクレオチドをキメラ核酸と組み合わせることがビルディングブロックポリヌクレオチドとキメラ核酸の間の z 回のクロスオーバーイベントを含み、 y が $1 \sim 10^{20}$ の整数である、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 8 5】

z が $10 \sim 10^{10}$ の整数である、請求項 2 8 4 記載の方法。

【請求項 2 8 6】

z が $10^2 \sim 10^5$ の整数である、請求項 2 8 4 記載の方法。

【請求項 2 8 7】

非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個の残基中でキメラ核酸とは異なり、 z が 1

10

20

30

40

50

～約 10^4 である、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 8 8】

非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個の残基中で鋳型ポリヌクレオチドとは異なり、 z が $10 \sim$ 約 10^3 である、請求項 2 8 7 記載の方法。

【請求項 2 8 9】

非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個の残基中で鋳型ポリヌクレオチドとは異なり、 z が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 からなる群から選ばれる、請求項 2 6 8 記載の方法。

【請求項 2 9 0】

非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個のコドン中でキメラ核酸とは異なり、 z が 1 ～ 約 10^4 である、請求項 2 6 8 記載の方法。 10

【請求項 2 9 1】

非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個のコドン中でキメラ核酸とは異なり、 z が $10 \sim$ 約 10^3 である、請求項 2 9 0 記載の方法。

【請求項 2 9 2】

非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個のコドン中でキメラ核酸とは異なり、 z が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 からなる群から選ばれる、請求項 2 6 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

本発明は一般に遺伝子操作及びタンパク質操作並びに分子生物学の分野に関する。特に、本発明は塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及びヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの同定方法及び精製方法を提供する。

本発明は一般にタンパク質操作及び遺伝子操作並びに分子生物学の分野に関する。一局面において、本発明はオリゴヌクレオチドのライブラリー並びに合成遺伝子、アンチセンス構築物及びポリペプチドコーディング配列を含む、あらゆる核酸配列の生成方法に関する。一局面において、本発明のライブラリーは制限エンドヌクレアーゼ制限部位、例えば、IIS型制限エンドヌクレアーゼ制限部位を含むオリゴヌクレオチドを含み、その制限エンドヌクレアーゼは認識配列の外部の一定位置で切断して一本鎖オーバーハングを生成する。ポリヌクレオチド構築方法は既製のマルチコドン（例えば、ジコドン）オリゴヌクレオチドビルディングブロックのライブラリー及びIIS型制限エンドヌクレアーゼの使用を含む。 30

一局面において、本発明は、例えば、抗体及び関連分子、例えば、抗原結合部位及びドメイン並びに一本鎖抗体及び二本鎖抗体を含む、その他の抗原結合フラグメントを含む、キメラ抗原結合分子をコードする核酸の、組又はライブラリーの生成方法に関する。本発明はそれらをコードする核酸を変化することにより、例えば、飽和突然変異誘発（saturation mutagenesis）、最適化誘導進化系（optimized directed evolution system）、合成連結反応再アッセンブル（synthetic ligation reassembly）、又はこれらの組み合わせにより新規又は変種キメラ抗原結合ポリペプチド、例えば、抗原結合部位、抗体及び抗体の特定ドメイン又はフラグメント（例えば、Fabドメイン又はFcドメイン）を生成する方法を提供する。 40

また、本発明は本発明の核酸ライブラリーによりコードされ、本発明の方法により生成されたキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーを提供する。これらの抗原結合ポリペプチドはあらゆる液体又は固体状態のスクリーニング方法、例えば、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイを使用して、キャピラリーアレイプラットフォーム等を使用して分析し得る。本発明の方法により生成されたポリペプチドは、例えば、抗原を分離もしくは同定するために *in vitro* で使用でき、又は、例えば、免疫応答を調節、刺激もしくは弱化するために、種々の疾患及び症状を治療もしくは診断するために *in vivo* で使用し得る。また、本発明は受動免疫を投与するためのキメラ免疫グロブリンの生成及び遺伝子 50

ワクチンのためのこれらのキメラ抗原結合分子をコードする核酸に関する。

【背景技術】

【0002】

合成オリゴヌクレオチドはポリペプチドコーディング配列及び遺伝子構築物を含む、核酸を構築するのに普通使用される。しかしながら、最良のオリゴヌクレオチドシンセサイザーでさえもが1%～5%のエラー率を有する。これらのエラーは不適切な塩基対配列をもたらすことがあり、これらがエラーのあるタンパク質配列の生成をもたらし得る。これらのエラーはまた、例えば、未成熟停止コドンを含む、適切に転写し得ない配列又は未翻訳配列をもたらし得る。これらのエラーを検出するために、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドを使用して生成された配列が配列決定される。しかしながら、核酸合成技術におけるエラーを検出するための配列決定は時間を浪費し、かつ高価である。

遺伝子、ポリペプチドコーディング配列及びその他のポリヌクレオチド分子の操作は親、又は鋳型の、DNA配列を分離、合成又は取り扱う必要により遅延されることがある。例えば、ポリヌクレオチド配列の操作を必要とする、細胞宿主中の最適の発現のためにコドン頻度を変えることが必要であるかもしれない。分子の更なる改変を必要とする、配列の操作を促進するために制限部位を分離、クローン化又は増幅されたポリヌクレオチドに加え、かつ/又は除去することが頻繁に望ましく、又は必要である。これらの操作の全てが労働コストを導入し、配列エラー及びクローニングエラーの潜在的な源である。

【0003】

利用し得る最良の品質のオリゴヌクレオチド合成系は1%までの(n-1)コンタミネーション及び(n-2)コンタミネーションを依然として含み、構築された核酸配列(例えば、遺伝子、遺伝経路、又は調節モチーフ)中の高いエラー率をもたらす。これらのエラーはそれら自体でフレームシフト又は停止コドンとして発現して、操作された遺伝子が発現される場合にトランケートタンパク質をもたらし得る。時折、20より多いクローンが配列決定され、エラーが修正されて(例えば、部位誘導突然変異誘発により)単一遺伝子又はコーディング配列に所望されるヌクレオチド配列を得る必要がある。キメラポリヌクレオチドライブラリーの場合、配列決定及び全てのエラーの修正は選択肢ではなく、オリゴをベースとする配列エラーがクローニング及びスクリーニング効率をかなり低下する。

抗原結合ポリペプチド、例えば、抗体が種々の治療適用にますます使用されている。例えば、免疫療法において、抗体が癌細胞の如き、標的細胞を直接死滅するのに使用される。それらは受動免疫を生じるのに投与し得る。また、抗原結合ポリペプチドが細胞傷害試薬又はイメージング試薬を送出するために担体として使用される。癌療法に認可されたモノクローナル抗体(mAbs)は現在フェーズII及びIII試験中である。抗体の抗原結合部位に結合する或る種の抗イディオタイプ抗体は外部抗原の三次元構造及び機能を有効に模擬することができ、活性特異的免疫療法のためのサロゲート抗原として使用し得る。両特異性抗体は免疫細胞活性化を腫瘍細胞認識と組み合わせる。こうして、腫瘍細胞又は腫瘍特異的抗原を発現する細胞(例えば、腫瘍血管系)が前もって特定されたエフェクター細胞により死滅される。抗体は直接結合により、又は分泌細胞を刺激もしくは抑制することによりサイトカイン又はホルモンのレベルを増大又は減少するのに投与し得る。それ故、癌特異的抗原の如き、所望の抗原に対する抗体のアフィニティー又は結合活性を増大することは、その標的に対する抗体の一層大きい特異性をもたらす、種々の治療利益、例えば、抗体を少なく含む医薬を投与する必要をもたらすであろう。

【発明の開示】

【0004】

塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖核酸の精製方法及び同定方法

本発明はヌクレオチドギャップ、塩基対ミスマッチ及び挿入/欠失ループを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの同定方法及び精製方法を提供する。一局面において、本発明は(a)二本鎖ポリヌクレオチド内の塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを用意する工程、(b)

10

20

30

40

50

複数の二本鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルを用意する工程、(c)工程(a)のポリペプチドが工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドと接触させる工程、及び(d)工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから特異的に結合された工程(a)のポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを分離し、それにより塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程を含むことを特徴とする塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの精製方法を提供する。一局面において、二本鎖ポリヌクレオチドが二本鎖オリゴヌクレオチドを含む。一局面において、二本鎖ポリヌクレオチドが二本鎖オリゴヌクレオチドからなる。

10

【0005】

別の局面において、二本鎖ポリヌクレオチドが約3～約300塩基対の長さ、10～約200塩基対の長さ、及び50～約150塩基対の長さである。別の局面において、二本鎖ポリヌクレオチド中のギャップが約1～30、約2～20、約3～15、約4～12及び約5～10ヌクレオチドの長さである。

別の局面において、塩基対ミスマッチがC:Tミスマッチ、G:Aミスマッチ、C:Aミスマッチ又はG:U/Tミスマッチを含む。

一局面において、二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合するポリペプチドがDNA修復酵素を含む。別の局面において、DNA修復酵素がバクテリアのDNA修復酵素、MutS DNA修復酵素、Taq MutS DNA修復酵素、Fpg DNA修復酵素、MutY DNA修復酵素、hexA DNAミスマッチ修復酵素、Vsrミスマッチ修復酵素、哺乳動物DNA修復酵素及び天然又は合成変化並びにこれらのイソ酵素である。一局面において、DNA修復酵素がG:U/Tミスマッチの塩基切除修復を開始するDNAグリコシラーゼである。DNAグリコシラーゼがバクテリアのミスマッチ特異的ウラシル-DNAグリコシラーゼ(MUG)DNA修復酵素又は真核生物のチミン-DNAグリコシラーゼ(TDG)酵素を含んでもよい。

20

一局面において、工程(d)の工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドからの工程(a)の特異的に結合されたポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの分離がイムノアフィニティーカラムの使用を含み、そのカラムが特異的に結合されたポリペプチド又は特異的に結合されたポリペプチドに結合されたエピトープに特異的に結合することができる固定化抗体を含み、固定化抗体が特異的に結合されたポリペプチド又は特異的に結合されたポリペプチドに結合されたエピトープに特異的に結合することができる条件下でサンプルがイムノアフィニティーカラムに通される。

30

一局面において、工程(d)の工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドからの工程(a)の特異的に結合されたポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの分離が抗体の使用を含み、その抗体が特異的に結合されたポリペプチド又は特異的に結合されたポリペプチドに結合されたエピトープに特異的に結合することができる、かつ抗体が特異的に結合されたポリペプチド又は特異的に結合されたポリペプチドに結合されたエピトープに特異的に結合することができる条件下で抗体が特異的に結合されたポリペプチドと接触させられる。抗体が固定化抗体であってもよい。抗体がビーズ又は磁化粒子もしくは磁化ビーズに固定し得る。

40

【0006】

一局面において、工程(d)の工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドからの工程(a)の特異的に結合されたポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの分離がアフィニティーカラムの使用を含み、そのカラムが特異的に結合されたポリペプチドに結合されたタグに特異的に結合することができる固定化結合分子を含み、固定化抗体が特異的に結合されたポリペプチドに結合されたタグに特異的に結合することができる条件下でサンプルがアフィニティーカラムに通される。固定化結合分子がアビジン又はその天然もしくは合成の変化又はホモログを含んでもよく、かつ特異的に結合され

50

たポリペプチドに結合されたタグがビオチン又はその天然もしくは合成の変化又はホモログを含んでもよい。

一局面において、工程(d)の工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドからの工程(a)の特異的に結合されたポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの分離がサイズ排除カラム、例えば、スピンカラムの使用を含む。また、分離がサイズ排除ゲル、例えば、アガロースゲルの使用を含んでもよい。

一局面において、二本鎖ポリヌクレオチドがポリペプチドコーディング配列を含む。ポリペプチドコーディング配列が融合タンパク質コーディング配列を含んでもよい。融合タンパク質がインテインの上流の関係するポリペプチドを含んでもよく、インテインがポリペプチドを含む。インテインポリペプチドが酵素、例えば、ベクターを同定し、又は陽性クローンを挿入するのに使用される酵素、例えば、Lac Zを含んでもよい。インテインポリペプチドが抗体又はリガンドを含んでもよい。一局面において、インテインポリペプチドがポリペプチド選抜可能なマーカー、例えば、抗生物質を含む。抗生物質がカナマイシン、ペニシリン又はハイグロマイシンを含んでもよい。

【0007】

本発明は(a)二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを用意する工程、(b)複数の二本鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルを用意する工程、(c)工程(a)のポリペプチドが工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドと接触させる工程、(d)工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから特異的に結合された工程(a)のポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを分離し、それにより塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程、及び(e)精製された塩基対ミスマッチ及び挿入/欠失ループを欠いている二本鎖オリゴヌクレオチドと一緒に連結し、それにより塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又はヌクレオチドギャップを欠いているポリヌクレオチドを生成する工程を含むことを特徴とする二本鎖オリゴヌクレオチドをアッセンブルして塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又はヌクレオチドギャップを欠いているポリヌクレオチドを生成する方法を提供する。

一局面において、二本鎖オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドのライブラリーを含み、例えば、本発明のライブラリーはマルチコドンを含むオリゴヌクレオチドを含む。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドはマルチコドン、例えば、ジコドン、ビルディングブロックを含むオリゴヌクレオチドのライブラリーを含んでもよい。一局面において、ライブラリーが複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムの二つ以上のコドン(例えば、ジコドン)及びマルチコドン(例えば、ジコドン、トリコドン、テトラコドン等)の5'末端および3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む。

【0008】

本発明は(a)二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを用意する工程、(b)複数の二本鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルを用意する工程、(c)工程(b)の二本鎖オリゴヌクレオチドと一緒に連結して二本鎖ポリヌクレオチドを生成する工程、(d)工程(a)のポリペプチドが工程(c)の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で工程(c)の二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドと接触させる工程、及び(e)工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから特異的に結合された工程(a)のポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを分離し、それにより塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程を含むことを特徴とする塩基対ミスマッチ、挿入/欠

失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを欠いているポリヌクレオチドの生成方法を提供する。一局面において、二本鎖ポリヌクレオチドがオリゴヌクレオチドマルチコドンビルディングブロックのライブラリーを含み、そのライブラリーが複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムの少なくとも二つのコドン及びマルチコドンの5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む。

一局面において、その方法が61固定化スターターオリゴヌクレオチド、夫々の可能なアミノ酸コーディングトリプレットのための一つのオリゴヌクレオチドの組を用意し、オリゴヌクレオチドが基質に固定され、かつIIS型制限エンドヌクレアーゼにより生成された一本鎖オーバーハングに相当する一本鎖オーバーハングを有し、又は、オリゴヌクレオチドが基質に遠位のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、一本鎖オーバーハングがIIS型制限エンドヌクレアーゼによる消化により生成され；工程(a)のライブラリーからの第二オリゴヌクレオチドメンバーをIIS型制限エンドヌクレアーゼで消化して一本鎖オーバーハングを生成し、第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドの相補一本鎖塩基オーバーハングが対合し得る条件下でその消化された第二オリゴヌクレオチドメンバーを固定化第一オリゴヌクレオチドメンバーに接触させ、第二オリゴヌクレオチドを第一オリゴヌクレオチドにつなぎ、それにより二本鎖ポリヌクレオチドを生成することを更に含む。

10

【0009】

本発明は(a)二本鎖ポリヌクレオチド内の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを用意する工程、(b)融合タンパク質をコードする複数の二本鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルを用意する工程（その融合タンパク質コーディング配列はマーカー又は選抜ポリペプチドのコーディング配列の上流にインフレームで対象とするポリペプチドのコーディング配列を含む）、(c)工程(a)のポリペプチドが工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で工程(b)の二本鎖ポリヌクレオチドを工程(a)のポリペプチドと接触させる工程、(d)工程(a)のポリペプチドが特異的に結合した二本鎖ポリヌクレオチドから特異的に結合された工程(a)のポリペプチドを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを分離し、それにより塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製する工程、(e)精製された二本鎖ポリヌクレオチドを発現させ、選抜マーカーポリペプチドを発現するポリヌクレオチドを選抜し、それにより塩基対ミスマッチを含まず、挿入／欠失ループを含まず、かつ／又はギャップを含まない二本鎖ポリペプチドコーディング配列を生成する工程を含むことを特徴とする塩基対ミスマッチを含まず、挿入／欠失ループを含まず、かつ／又はギャップを含まない二本鎖ポリペプチドコーディング配列の生成方法を提供する。

20

30

一局面において、マーカー又は選抜ポリペプチドが自己スプライシングインテインを含み、かつその方法が上流の関係するポリペプチドからのインテインマーカー又は選抜ポリペプチドの自己スプライシングアウトを更に含む。マーカー又は選抜ポリペプチドが酵素、例えば、インサート又はベクター-陽性クローンを同定するのに使用される酵素、例えば、Lac Z酵素を含んでもよい。マーカー又は選抜ポリペプチドがまた抗生物質、例えば、カナマイシン、ペニシリン又はハイグロマイシンを含んでもよい。

40

【0010】

本発明の別の局面において、これらの方法が塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップを90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%及び100%即ち完全に含まない精製オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチドのサンプル又は“バッチ”を生成する。

ランダムもしくは確率的方法、又は、非確率的、もしくは“誘導進化”を含む、あらゆる手段により操作又は変化された核酸が本発明の方法により“精製”又は“プロセッシング”でき、例えば、本発明の方法が塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以

50

上のヌクレオチドギャップを90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%及び100%即ち完全に含まない二本鎖オリゴヌクレオチド及び/又はポリヌクレオチドのサンプル又は“バッチ”を生成するのに使用でき、核酸(例えば、オリゴ、ポリヌクレオチド、遺伝子等)が確率的方法、又は、非確率的、もしくは“誘導進化”により操作されていた。例えば、本発明の方法が本明細書に記載された、飽和突然変異誘発、最適化誘導進化系、合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせにより操作された核酸を“精製”又は“プロセッシング”するのに使用し得る。本発明の方法が遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)を含む方法により操作された核酸を“精製”又は“プロセッシング”するのに使用し得る。本発明の方法が遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、段階的核酸再アッセンブル、エラー-ブローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブルPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ(recursive)・アンサンブル突然変異誘発、指数的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル(SLR)又はこれらの組み合わせにより操作された核酸を“精製”又は“プロセッシング”するのに使用し得る。本発明の方法が組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウラシル含有鑄型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成又はこれらの組み合わせにより操作された核酸を“精製”又は“プロセッシング”するのに使用し得る。

10

20

【0011】

一局面において、本発明の方法が合成核酸、自然に分離された核酸、又は組換えにより生成された核酸(ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド)を含む二本鎖核酸を精製することを含む。合成ポリヌクレオチドが親配列又は天然配列と同じであってもよい。一局面において、ポリヌクレオチドが遺伝子、染色体を含む。一局面において、遺伝子が更に経路を含む。一局面において、遺伝子が調節配列を含む。一局面において、ポリヌクレオチドがプロモーターもしくはエンハンサー又はポリペプチドコーディング配列を含む。ポリペプチドが酵素、抗体、受容体、ニューロペプチド、ケモキン、ホルモン、シグナル配列、又は構造遺伝子であってもよい。一局面において、ポリヌクレオチドが非コーディング配列を含む。

30

一局面において、本発明の方法により精製されるポリヌクレオチドはDNA(例えば、遺伝子又はコーディング配列)、RNA(例えば、iRNA、rRNA、tRNA又はmRNA)又はこれらの組み合わせを含む。例えば、本発明の方法が塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%及び100%即ち完全に含まない二本鎖DNA又はRNAのサンプル又は“バッチ”を生成するのに使用し得る。一局面において、二本鎖ポリヌクレオチドがiRNAを含む。二本鎖ポリヌクレオチドがDNA、例えば、遺伝子を含んでもよい。一局面において、DNAが染色体を含む。

【0012】

コドンビルディングブロックのアッセンブルによりポリヌクレオチドを作製するための組成物及び方法

40

本発明はオリゴヌクレオチドビルディングブロックの反復アッセンブルにより核酸を作製するための方法及び組成物を提供する。一局面において、本発明はマルチコドン(例えば、ジコドン、トリコドン)ビルディングブロックを含むオリゴヌクレオチドのライブラリーを提供する。一局面において、ライブラリーが複数の二本鎖オリゴヌクレオチドメンバーを含み、夫々のオリゴヌクレオチドメンバーがタンデムの二つ以上のコドン(例えば、ジコドン)及びマルチコドン(例えば、ジコドン、トリコドン、テトラコドン等)の5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む。

異なる局面において、本発明はX-mer(3から百万までのあらゆる整数であってもよい)であってもよいビルディングブロックを提供する。別の局面において、他のビルディングブロックとのアッセンブルの前にはジコドンではないが(それらがフレーム-シフトさ

50

れるので)、他のビルディングブロックとのアッセンブル後にコドンになり得るヘキサマーが使用し得る。別の局面において、意図される生成物はコーディング配列ではなく(例えば、プロモーター、エンハンサー、又はあらゆるその他の調節モチーフであってもよい)、従ってビルディングブロックが他のビルディングブロックとのアッセンブルの前又は後にコドンとして機能する必要はない。その他の局面において、アッセンブル生成物が、例えば、オペロン、遺伝子経路、染色体、又はゲノムであってもよい。こうして、“コドン”という用語は“非コーディング”配列、例えば、調節モチーフ(例えば、プロモーター、エンハンサー)、オペロン、構造配列(例えば、テロメア)等をコードする配列を含む、全ての核酸配列を含む。

【0013】

一局面において、ライブラリーが全ての可能なコドン組み合わせ、例えば、全ての可能なダイマー(ジコドン)組み合わせ、トリコドン組み合わせ、テトラコドン組み合わせ等を含むオリゴヌクレオチドメンバーを含む。一局面において、本発明のライブラリーが4096の異なる可能なコドンダイマー(ジコドン)組み合わせ(タンパク質が所定のDNA配列中の塩基トリプレット(コドン)に従って合成される;20の異なるアミノ酸をコードする61の異なるトリプレットがある)を含むオリゴヌクレオチドメンバーを含んでもよい。ライブラリーはあらゆるサイズのものであってもよく、1~4096の異なるメンバーからのいずれかを含んでもよく、例えば、ライブラリーが約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000又はそれ以上の異なるメンバーを含んでもよい。一局面において、コドンのいずれもが停止コドンではない。

一局面において、ジコドンの5'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列がジコドンの3'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列とは異なる。IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に、1塩基一本鎖オーバーハング、2塩基一本鎖オーバーハング、3塩基一本鎖オーバーハング、4塩基一本鎖オーバーハング等を含む塩基オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼに特異的であってもよい。制限エンドヌクレアーゼがSapI制限エンドヌクレアーゼ又はそのイソ制限酵素、又は、EarI制限エンドヌクレアーゼ又はそのイソ制限酵素を含んでもよい。一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に、2塩基一本鎖オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼに特異的である。制限エンドヌクレアーゼがBseRI、BsgI又はBpmI制限エンドヌクレアーゼであってもよい。一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列が、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に、1塩基一本鎖オーバーハングを生成する制限エンドヌクレアーゼに特異的である。制限エンドヌクレアーゼがN.AIwI又はN.BstNBI制限エンドヌクレアーゼであってもよい。

【0014】

一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列は、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に、IIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列の両側で切断する制限エンドヌクレアーゼに特異的である。制限エンドヌクレアーゼがBcgI、BsaXI又はBspCNI制限エンドヌクレアーゼであってもよい。

一局面において、夫々のオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは実質的にタンデムの二つのコドン(ジコドン)及びジコドンの5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列からなる。

別の局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは約20~400塩基対の長さ、約40~200塩基対の長さ又約100~150塩基対の長さである。

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは(相補塩基対合)配列(NNN)(NNN)AGAAGAGC(配列番号1)及び(NNN)(NNN)TCTTCTCG(配列番号2)(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)を含んでもよい。

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは(相補塩基対合)配列(NNN)(NNN)TGAAGAGAG(配列番号3)及び(NNN)(NNN)ACTTCTCTC(配列番号4)(式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)を含んでもよい。

【 0 0 1 5 】

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは（相補塩基対合）配列(NNN)(NNN) TGAAGAG AG CT GCTACTAACT GCA （配列番号 5）及び(NNN)(NNN) ACTTCTCTC GA CGATGATTG （配列番号 6）（式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である）を含んでもよい。

オリゴヌクレオチドライブラリーは（相補塩基対合）配列CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC （配列番号 7）及びGAGAGAAGT NNN NNN TCTTCTCG （配列番号 8）（式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である）を含んでもよい。

オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは（相補塩基対合）配列CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC GGGTCTTCCAAGTAGAGAATTCGATATCTGCA （配列番号 9）及びGAGAGAAGT NNN NNN TC TTCTCG CCCAGAAGGTTGATCTCTTAAGCTATAG （配列番号 10）（式中、(NNN)はコドンであり、かつ N は A、C、T もしくは G 又はこれらの均等物である）を含んでもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明はマルチコドン（例えば、ジコドン）ビルディングブロックの反復アッセンブルによるコドンを含むポリヌクレオチドの構築方法を提供する。一局面において、その方法が(a)本発明の二本鎖コドンビルディングブロックオリゴヌクレオチドのライブラリーを用意する工程、(b)基質表面を用意する工程、(c)工程(a)のライブラリーからの第一オリゴヌクレオチドメンバーを工程(b)の基質表面に固定し、IIS型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成し、又は工程(a)のライブラリーからの第一オリゴヌクレオチドメンバーをIIS型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成し、コドンの反対側のオリゴヌクレオチド末端により工程(b)の基質表面に固定する工程、(d)工程(a)のライブラリーからの第二オリゴヌクレオチドメンバーをIIS型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成する工程、及び(e)第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドの相補一本鎖塩基オーバーハングが対合することができる条件下で工程(d)の消化された第二オリゴヌクレオチドメンバーを工程(c)の消化され、固定化された第一オリゴヌクレオチドメンバーに接触させ、第二オリゴヌクレオチドを第一オリゴヌクレオチドにつなぎ、それによりマルチコドン（例えば、ジコドン）ビルディングブロックの反復アッセンブルによりコドンを含むポリヌクレオチドを構築する工程を含む。

本発明の方法が工程(e)の固定化されたオリゴヌクレオチドをIIS型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成することを更に含んでもよく、そのIIS型制限エンドヌクレアーゼが基質表面に遠位のオリゴヌクレオチド中の制限エンドヌクレアーゼ認識配列を認識する。本発明の方法が工程(a)のライブラリーからの別のオリゴヌクレオチドメンバーをIIS型制限エンドヌクレアーゼで消化してコドン中に一本鎖オーバーハングを生成することを更に含んでもよい。本発明の方法はオリゴヌクレオチドの相補一本鎖塩基オーバーハングが対合することができる条件下で消化されたオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを消化され、固定化されたオリゴヌクレオチドメンバーに接触させ、オリゴヌクレオチドをつなぎ、それによりマルチコドン（例えば、ジコドンビルディングブロックの反復アッセンブルによりコドンを含むポリヌクレオチドを構築することを更に含んでもよい。

【 0 0 1 7 】

一局面において、その方法が反復して繰り返され、それにより複数のコドンを含むポリヌクレオチドを構築する。その方法が n 回反復して繰り返されてもよく、n が $2 \sim 10^6$ 以上の整数である。その方法が n 回反復して繰り返されてもよく、n が $10^2 \sim 10^5$ の整数である。

一局面において、ライブラリーのメンバーがポリヌクレオチドへの反復アッセンブルにランダムに選ばれる。ポリヌクレオチドに加えられるライブラリーのメンバーの全て又はサブセットがランダムに選ばれてもよい。

一局面において、ライブラリーのメンバーがポリヌクレオチドへの反復アッセンブルに非確率的に選ばれる。ポリヌクレオチドに加えられるライブラリーのメンバーの全て又は

サブセットが非確率的に選ばれてもよい。

一局面において、オリゴヌクレオチドのライブラリーが全ての可能なコドン組み合わせ、例えば、ダイマー（ジコドン）組み合わせ、トリコドン組み合わせ等を含む。一局面において、オリゴヌクレオチドのライブラリーが4096のコドンダイマー（ジコドン）組み合わせからなる。一局面において、コドンは停止コドンではない。

一局面において、基質表面が固体表面を含む。固体表面がビーズを含んでもよい。固体表面がポリスチレン又はガラスを含んでもよい。一局面において、固体表面が二重オリフィス容器を含む。二重オリフィス容器が二重オリフィスキャピラリーアレイを含んでもよい。二重オリフィスキャピラリーアレイがGIGAMATRIXTMキャピラリーアレイであってもよい。

10

【0018】

一局面において、工程(b)の基質表面は固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドを更に含んでもよい。固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドが本発明のコドンビルディングブロックオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを更に含んでもよい。コドンビルディングブロックオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが平滑末端連結反応により固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドに固定し得る。

一局面において、固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドの固定されていない末端に一本鎖塩基オーバーハングを含む。オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは一本鎖塩基オーバーハングの塩基対合、続いて連結反応により固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドに固定し得る。

20

一局面において、マルチコドン（例えば、ジコドン）の5'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列はマルチコドン（例えば、ジコドン）の3'末端のIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列とは異なる。

一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に3塩基一本鎖オーバーハングを生成する。制限エンドヌクレアーゼがSapI制限エンドヌクレアーゼもしくはそのイソ制限酵素、又は、EarI制限エンドヌクレアーゼもしくはそのイソ制限酵素を含む。

一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に2塩基一本鎖オーバーハングを生成する。IIS型制限エンドヌクレアーゼがBseRI、BsgIもしくはBpmI制限エンドヌクレアーゼ又はこれらのイソ制限酵素であってもよい。

30

【0019】

一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に1塩基一本鎖オーバーハングを生成する。IIS型制限エンドヌクレアーゼがN.A1wIもしくはN.BstNBI制限エンドヌクレアーゼ又はこれらのイソ制限酵素であってもよい。

一局面において、IIS型制限エンドヌクレアーゼはオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時にIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列の両側で切断する。IIS型制限エンドヌクレアーゼがBcgI、BsaXIもしくはBspCNI制限エンドヌクレアーゼ又はこれらのイソ制限酵素であってもよい。

40

一局面において、夫々のオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは実質的にタンデムの二つのコドン（ジコドン）及びジコドンの5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列からなる。別の局面において、夫々のライブラリーメンバーがタンデムの三つ、四つ、五つ、六つ又はそれ以上のコドン及びマルチコドンの5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列であってもよい。

別の局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーが約20～400以上の塩基対の長さ、約40～200塩基対の長さ、約100～150塩基対の長さである。

一局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは配列(NNN)(NNN)AGAAGAGC（配列番号1）及び(NNN)(NNN)TCTTCTCG（配列番号2）（式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である）を含む。

50

一局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは配列(NNN)(NNN) TGAAGAG AG (配列番号3)及び(NNN)(NNN) ACTTCTCTC (配列番号4) (式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)を含む。

一局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは配列(NNN)(NNN) TGAAGAG AG CT GCTACTAACT GCA (配列番号5)及び(NNN)(NNN) ACTTCTCTC GA CGATGATTG (配列番号6) (式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)を含む。

一局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーは配列CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC (配列番号7)及びGAGAGAAGT NNN NNN TCTTCTCG (配列番号8) (式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)を含む。

10

【0020】

一局面において、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーは配列CTCTCTTCA NNN NNN AGAAGAGC GGGTCTTCCAAGTCTAGAGAATTCGATATCTGCA (配列番号9)及びGAGAGAAGT NNN NNN TCTTCTCG CCCAGAAGGTTGATCTCTTAAGCTATAG (配列番号10) (式中、(NNN)はコドンであり、かつNはA、C、TもしくはG又はこれらの均等物である)を含む。

一局面において、固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドは一般式：〔基質〕(リンカー)(プロモーター)(制限部位)(一本鎖オーバーハング)を含む。一局面において、固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドが一般式：(Y)_n(プロモーター)(制限部位)(一本鎖オーバーハング) (式中、Yはあらゆるヌクレオチド塩基であり、かつnは2~50、又はそれ以上の整数である)を含む。あらゆるプロモーター、例えば、構成的プロモーター又は誘導プロモーターが使用し得る。一局面において、プロモーターがT6プロモーター、T3プロモーター又はSP6プロモーターである。一局面において、プロモーターが基質に直接結合され、又はリンカー(これは(Y)_nヌクレオチド塩基であってもよい)により結合される。基質への結合(固定化)は直接又は間接であってもよく、例えば、共有結合又は相補塩基対のハイブリダイゼーションによるものであってもよい。

20

一局面において、固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドは配列(NNN)(NNN) CGCGCG(Y)_nCGAATTGGAGCTC (配列番号11)及び(NNN)(NNN) CGCGCG(Y)_nGCTTAACCTCGAGCCCC (配列番号12) (式中、nは1以上の整数であり、Yはあらゆるヌクレオチドであり、かつ(NNN)はコドンである)を含む。

【0021】

30

一局面において、固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドは配列(NNN)(NNN) CGCGCGTAA TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTC (配列番号13)及び(NNN)(NNN) CGCGCGATTATGCTGAGTGA TATCCCGCTTAACCTCGAGCCCC (配列番号14)を含む。

一局面において、固定化された二本鎖オリゴヌクレオチドはプロモーターを含む。プロモーターがバクテリオファージプロモーター、例えば、T7プロモーター、T6プロモーター又はSP6プロモーターを含んでもよい。

一局面において、オリゴヌクレオチドの連結反応は酵素、例えば、リガーゼの使用を含む。あらゆるリガーゼ、例えば、T4リガーゼ又はE. coliリガーゼを含む、哺乳動物又はバクテリアのDNAリガーゼが使用し得る。

一局面において、本発明の方法が構築されたポリヌクレオチドを配列決定することを更に含む。本発明の方法はポリヌクレオチド配列の全部又は一部がペプチド又はポリペプチドをコードするか否かを測定することを更に含んでもよい。本発明の方法が構築されたポリヌクレオチドを単離することを更に含んでもよい。本発明の方法が構築されたポリヌクレオチドのポリメラーゼをベースとする増幅を更に含んでもよい。ポリメラーゼをベースとする増幅がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)であってもよい。本発明の方法が構築されたポリヌクレオチドの転写を更に含んでもよい。

40

一局面において、固体基質が二重オリフィス容器を含む。二重オリフィス容器が二重オリフィスキャピラリーアレイを含んでもよい。二重オリフィスキャピラリーアレイがGIGA MATRIXTMキャピラリーアレイであってもよい。

本発明は下記の成分：(a)オリゴヌクレオチドメンバーを含むライブラリー(夫々のオ

50

リゴヌクレオチドメンバーはタンデムの多重コドン、例えば、タンデムの二つのコドン（ジコドン）、及びマルチコドン（例えば、ジコドン）の5'末端及び3'末端に隣接するIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む）、及び(b)基質表面に固定化された工程(a)の複数のオリゴヌクレオチドライブラリーメンバーを含む基質表面を含むコドンビルディングブロックの反復アッセンブルによるコドンを含むポリヌクレオチドを構築するための多重系を提供する。

本発明は下記の成分：(a)本発明のオリゴヌクレオチドのライブラリー、及び(b)基質表面に固定化された工程(a)の複数のオリゴヌクレオチドを含む基質表面を含むオリゴヌクレオチドの反復アッセンブルによるコドンを含むポリヌクレオチドを構築するための多重系を提供する。一局面において、基質表面が二重オリフィスキャピラリーアレイを更に含んでもよい。二重オリフィスキャピラリーアレイがGIGAMATRIXTMキャピラリーアレイを含んでもよい。本多重系は本発明の方法の全部又は一部を含む指示を更に含んでもよい。基質表面が複数のビーズ、例えば、磁性ビーズを含んでもよい。一局面において、複数のビーズはビーズの61組を含み、夫々がジコドンを含むオリゴヌクレオチド、夫々の可能なアミノ酸コーディングトリプレットのための一つのビーズ組を含む。

10

【0022】

本発明は複数のビーズ組を含むキットを提供し、夫々のビーズ組がマルチコドンを含む固定化されたオリゴヌクレオチドを含み、夫々のマルチコドンがその固定されていない末端でIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列により隣接される。

本発明はビーズの61組を含む複数のビーズを含むキットを提供し、夫々のビーズがアミノ酸コーディングトリプレットを含む固定化されたオリゴヌクレオチドを含み、夫々の可能なアミノ酸コーディングトリプレットについて一つのビーズ組であり、夫々の可能なアミノ酸コーディングトリプレットがその固定されていない末端でIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識配列により隣接される。一局面において、固定化されたオリゴヌクレオチドがプロモーターを含む。プロモーターがバクテリオファージプロモーター、例えば、T7プロモーター、T6プロモーター又はSP6プロモーターを含んでもよい。一局面において、キットが酵素、例えば、リガーゼ、例えば、T4リガーゼ又はE. coliリガーゼを含む、哺乳動物又はバクテリアのDNAリガーゼを更に含む。

20

これらの核酸はランダム方法もしくは確率的方法、又は、非確率的、もしくは“誘導進化”を含む、あらゆる手段により更に操作又は改変し得る。例えば、これらの核酸は本明細書に記載された、飽和突然変異誘発、最適化誘導進化系、合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせにより操作し得る。これらの核酸は遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、段階的核酸再アッセンブル、エラー-ブローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブルPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発、指数的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル(SLR)又はこれらの組み合わせを含む方法により操作し得る。これらの核酸は組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成又はこれらの組み合わせにより操作し得る。

30

40

【0023】

キメラ抗原結合分子並びにそれらの製造方法及び使用方法

本発明は複数のキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするキメラ核酸のライブラリーを提供し、そのライブラリーが(a)ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)又はカッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、(b)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、(c)ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)又はカッパー軽鎖定常領域ポリペ

50

ブチドドメイン(C)をコードする複数の核酸を用意する工程、(d)工程(a)の核酸、工程(c)の核酸及び工程(b)のオリゴヌクレオチドと一緒に連結し(工程(b)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(c)の核酸の間に置かれてキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-J-C核酸コーディング配列を生成する)、この結合工程を繰り返してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コーディング配列のライブラリーを生成する工程を含む方法によりつくられる。

本発明の別の局面において、抗原結合ポリペプチドが一本鎖抗体、Fabフラグメント、Fdフラグメント又は抗原結合相補性決定領域(CDR)を含む。

【0024】

工程(a)のラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列又はカップー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列が増幅反応により生成し得る。工程(c)のラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列又はカップー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列がまた増幅反応により生成し得る。あらゆる増幅反応又は系が使用し得る。増幅反応が一对のオリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を含んでもよい。増幅反応がリガーゼ連鎖反応(LCR)、転写増幅、自己持続配列複製、Qレプリカーゼ増幅及びその他のRNAポリメラーゼ媒介技術を含んでもよい。一局面において、オリゴヌクレオチドプライマーが一つ以上の制限酵素部位を更に含んでもよい。

別の局面において、ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列、カップー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V)核酸コーディング配列、ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列又はカップー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C)核酸コーディング配列が約99~約600塩基対残基の長さ、約198~約402塩基対残基の長さ、及び約300~約320塩基対残基の長さである。

一局面において、増幅される核酸が哺乳動物の核酸、例えば、ヒト核酸又はマウス核酸である。増幅される核酸がゲノムDNA、cDNA又はRNAであってもよい。

別の局面において、工程(b)のJ領域ポリペプチドドメインをコードするオリゴヌクレオチドが約9~約99塩基対残基の長さ、約18~約81塩基対残基の長さ及び約36~約63塩基対残基の長さである。

別の局面において、キメラ核酸を生成するための結合工程がDNAリガーゼ、転写又は増幅反応を含む。増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅反応、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写増幅、自己持続配列複製、Qレプリカーゼ増幅及びその他のRNAポリメラーゼ媒介技術を含んでもよい。増幅反応がオリゴヌクレオチドプライマーの使用を含んでもよい。オリゴヌクレオチドプライマーが制限酵素部位を更に含んでもよい。転写がDNAポリメラーゼ転写反応を含んでもよい。

【0025】

本発明は複数のキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするキメラ核酸のライブラリーを提供し、そのライブラリーが(a)抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、(b)D領域ポリペプチドドメイン(V_D)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、(c)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、(d)重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、(e)工程(a)の核酸、工程(d)の核酸並びに工程(b)及び工程(c)のオリゴヌクレオチドと一緒に連結し(工程(b)及び工程(c)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(d)の核酸の間に置かれてキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-D-J-Cキメラ核酸コーディング配列を生成する)、この結合工程を繰り返してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コーディング配列のライブラリーを生成する工程を含む方法によりつくられる。

別の局面において、抗原結合ポリペプチドが一本鎖抗体、Fabフラグメント、Fdフラグメント又は抗原結合相補性決定領域(CDR)を含む。抗原結合ポリペプチドがμ、 δ 、 ϵ 、 γ 、 α 、 β 又は λ 定常領域を含んでもよい。重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)又は重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)核酸コーディング配列が増幅

反応により生成し得る。増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅反応、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写増幅、自己持続配列複製、Q レプリカーゼ増幅及びその他のRNAポリメラーゼ媒介技術を含んでもよい。増幅反応が一对のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含んでもよい。オリゴヌクレオチドプライマーが制限酵素部位を更に含んでもよい。

【0026】

別の局面において、重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)核酸コーディング配列又は重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)核酸コーディング配列は約99～約600塩基対残基の長さ、約198～約402塩基対残基の長さ、又は約300～約320塩基対残基の長さである。

増幅される核酸が哺乳動物の核酸、例えば、ヒト核酸又はマウス核酸であってもよい。増幅される核酸がゲノムDNA、cDNA又はRNA、例えば、mRNAであってもよい。

別の局面において、工程(b)のD領域ポリペプチドドメイン又は工程(c)のJ領域ポリペプチドドメインをコードするオリゴヌクレオチドは約9～約99塩基対残基の長さ、約18～約81塩基対残基の長さ、又は約36～約63塩基対残基の長さである。

キメラ核酸を生成するための工程(e)の結合がDNAリガーゼ、転写又は増幅反応を含んでもよい。増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅反応、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写増幅、自己持続配列複製、Q レプリカーゼ増幅及びその他のRNAポリメラーゼ媒介技術を含む。増幅反応が一对のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含んでもよい。オリゴヌクレオチドプライマーが制限酵素部位を更に含んでもよい。転写がDNAポリメラーゼ転写反応を含んでもよい。

本発明は本発明のライブラリーから選ばれたキメラ核酸を含む発現ベクターを提供する。本発明は本発明のライブラリーから選ばれたキメラ核酸を含む形質転換細胞を提供する。本発明は本発明の発現ベクターを含む形質転換細胞を提供する。本発明は本発明のライブラリーから選ばれたキメラ核酸を含む非ヒトトランスジェニック動物を提供する。

【0027】

本発明は(a)ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)又はカッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_C)をコードする核酸を用意する工程、(b)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードするオリゴヌクレオチドを用意する工程、(c)ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)又はカッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_C)をコードする核酸を用意する工程、(d)工程(a)の核酸、工程(c)の核酸及び工程(b)のオリゴヌクレオチドと一緒に連結して(工程(b)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(c)の核酸の間に置かれる)キメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-J-Cキメラ核酸コーディング配列を生成する工程を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドの製造方法を提供する。

本発明は(a)ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)又はカッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_C)をコードする複数の核酸を用意する工程、(b)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、(c)ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)又はカッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_C)をコードする複数の核酸を用意する工程、(d)工程(a)の核酸、工程(c)の核酸及び工程(b)のオリゴヌクレオチドと一緒に連結して(工程(b)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(c)の核酸の間に置かれる)キメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-J-Cキメラ核酸コーディング配列を生成し、この結合工程を繰り返してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コーディング配列のライブラリーを生成する工程を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーの製造方法を提供する。

本発明は(a)抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする核酸を用意する工程、(b)D領域ポリペプチドドメイン(V_D)をコードするオリゴヌクレオチドを用意する工程、(c)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードするオリゴヌクレオチドを用意する工程、(d)重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)をコードする核酸を用意する工程、(e)工程(a)の核酸、工程(d)の核酸並びに工程(b)及び工程(c)のオリゴヌクレオチドと一緒に

連結して（工程(b)及び工程(c)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(d)の核酸の間に置かれる）キメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-D-J-Cキメラ核酸コーディング配列を生成する工程を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドの製造方法を提供する。

【0028】

本発明は(a)抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、(b)D領域ポリペプチドドメイン(V_D)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、(c)J領域ポリペプチドドメイン(V_J)をコードする複数のオリゴヌクレオチドを用意する工程、(d)重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)をコードする複数の核酸を用意する工程、(e)工程(a)の核酸、工程(d)の核酸並びに工程(b)及び工程(c)のオリゴヌクレオチドと一緒に連結して（工程(b)及び工程(c)のオリゴヌクレオチドが工程(a)及び工程(d)の核酸の間に置かれる）キメラ抗原結合ポリペプチドをコードするV-D-J-Cキメラ核酸コーディング配列のライブラリーを生成し、この結合工程を繰り返してキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーをコードするキメラ核酸コーディング配列のライブラリーを生成する工程を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーの製造方法を提供する。

本発明の方法はキメラ抗原結合ポリペプチドの一つ又はライブラリーをコードする核酸コーディング配列を発現することを更に含んでもよい。本発明の方法は、抗原を特異的に結合する能力について、発現されたキメラ抗原結合ポリペプチドをスクリーニングすることを更に含んでもよい。

本発明の方法は最適化された誘導進化系もしくは合成連結反応再アッセンブル、飽和突然変異誘発、又はこれらの組み合わせを含む方法によりキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする核酸コーディング配列を突然変異誘発することを更に含んでもよい。本発明の方法は、突然変異誘発されたキメラ抗原結合ポリペプチドを、抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、突然変異誘発されたキメラ抗原結合ポリペプチドを、抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、突然変異誘発された抗原結合部位変異体を、突然変異誘発前のキメラ抗原結合ポリペプチドのアフィニティー又は特異性と較べてその増大された抗原結合アフィニティー又は抗原結合特異性により同定することを更に含んでもよい。本発明の方法は、突然変異誘発されたキメラ抗原結合ポリペプチドを、抗原結合部位ポリペプチドのファージディスプレイを含む方法により抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、突然変異誘発されたキメラ抗原結合ポリペプチドを、液相中の発現される抗原結合部位ポリペプチドの発現を含む方法により抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、突然変異誘発されたキメラ抗原結合ポリペプチドを、抗原結合部位ポリペプチドのリボソームディスプレイを含む方法により抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、キメラ抗原結合ポリペプチドを、固相中でポリペプチドを固定する方法により抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、キメラ抗原結合ポリペプチドを、キャピラリーアレイを含む方法により抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。本発明の方法は、キメラ抗原結合ポリペプチドを、二重オリフィス容器を含む方法により抗原を特異的に結合するその能力についてスクリーニングすることを更に含んでもよい。二重オリフィス容器が二重オリフィスカピラリーアレイを含んでもよい。二重オリフィスカピラリーアレイはGIGAMATRIXTMキャピラリーアレイであってもよい。

【0029】

本方法は(a)請求項48記載の方法によりつくられたキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする複数のV-J-Cキメラ核酸又は請求項50記載の方法によりつくられたキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする複数のV-D-J-Cキメラ核酸を用意する工程、(b)複数のオリゴヌクレオチドを用意し（夫々のオリゴヌクレオチドは工程(a)のキメラ核酸に相同な配

列を含む)、それによりキメラ核酸の特定配列、及びキメラ核酸の変種である配列をターゲットティングする工程、及び(c)工程(a)のキメラ核酸を工程(b)のオリゴヌクレオチドで複製することにより非確率的配列変化を含む“n”数の子孫ポリヌクレオチドを生成し(nは整数である)、それによりキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーを生成する工程を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーの製造方法を提供する。

別の局面において、キメラ核酸に相同な配列がx塩基の長さであり、xが3~100、5~50及び10~30の整数である。一局面において、キメラ核酸の変種である配列がx塩基の長さであり、xが1~50又は2~20の整数であってもよい。工程(b)のオリゴヌクレオチドがキメラ核酸に相同の第二配列を更に含んでもよく、変種配列がキメラ核酸に相同な配列により隣接される。一局面において、キメラ核酸の変種である第二配列がx塩基の長さであり、xが1~50の整数であり、又はxが3、6、9もしくは12である。

一局面において、オリゴヌクレオチドがキメラ核酸コドンターゲットティングする変種配列を含んでもよく、それにより複数の変種コドンを含む複数の子孫キメラポリヌクレオチドを生成する。変種配列がターゲットティングされるコドンについての全ての19の天然アミノ酸変種をコードする変種コドンを生成することができ、それによりターゲットティングされるコドンによりコードされた残基において全ての19の可能な天然アミノ酸変化を生じる。オリゴヌクレオチドが複数のキメラ核酸コドンターゲットティングする変種配列を含んでもよい。オリゴヌクレオチドがキメラ核酸中の全てのコドンターゲットティングする変種配列を含んでもよく、それにより複数の子孫ポリペプチド(全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種である)を生成する。変種配列がキメラ核酸コドンの全てについての全ての19の天然アミノ酸変種をコードする変種コドンを生成することができ、それにより複数の子孫ポリペプチド(全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種及びコドンの全てで全ての19の可能な天然アミノ酸の変種である)を生成する。

【0030】

本発明の別の局面において、非確率的配列変化を含む“n”数の子孫ポリペプチドを生成する際に、“n”が1~約 10^{30} 、約 10^2 ~約 10^{20} 、又は約 10^2 ~約 10^{10} の整数である。

本発明の別の局面において、工程(c)の複製が酵素をベースとする複製、例えば、ポリメラーゼをベースとする増幅反応を含む。増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含んでもよい。酵素をベースとする複製が無エラーポリメラーゼ反応を含んでもよい。

これらの方法の一局面において、工程(b)のオリゴヌクレオチドが一つ以上のヌクレオチド残基を鋳型ポリヌクレオチドに導入し得る核酸配列を更に含む。工程(b)のオリゴヌクレオチドが一つ以上の残基を鋳型ポリヌクレオチドから欠失し得る核酸配列を更に含んでもよい。工程(b)のオリゴヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドへの一つ以上の停止コドンの付加を更に含んでもよい。

本発明は(a)請求項48記載の方法によりつくられたキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするx個のV-J-Cキメラ核酸、又は請求項50記載の方法によりつくられたキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするx個のV-D-J-Cキメラ核酸を用意する工程、(b)y個のビルディングブロックポリヌクレオチドを用意する工程(yは整数であり、ビルディングブロックポリヌクレオチドは前もって決められた配列で工程(a)のキメラ核酸とクロスオーバー再アッセンブルするように設計され、かつキメラ核酸の変種である配列及びその変種配列に隣接するキメラ核酸に相同な配列を含む)、及び(c)少なくとも一つのビルディングブロックポリヌクレオチドを少なくとも一つのキメラ核酸と組み合わせ、その結果、ビルディングブロックポリヌクレオチドがキメラ核酸とクロスオーバー再アッセンブルして非確率の子孫キメラポリヌクレオチドを生成し、それによりキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのライブラリーを生成する工程を含むことを特徴とするキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーの製造方法を提供する。

【0031】

方法の別の局面において、xが1~約 10^{10} 、もしくは約 10 ~約 10^2 の整数であり、又は

10

20

30

40

50

、 x が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 からなる群から選ばれた整数である。

一局面において、複数のビルディングブロックポリヌクレオチドが使用され、かつ変種配列がキメラ核酸コドンを経験的として経験的コドンの変種である複数の子孫ポリヌクレオチドを生成し、それによりキメラ核酸によりコードされたポリペプチド中の残基において複数の天然アミノ酸変化を生じる。一局面において、変種配列が経験的コドンについての全ての 19 の天然アミノ酸変種をコードする変種コドンを生成し、それによりキメラ核酸によりコードされたポリペプチド中の経験的コドンによりコードされた残基において全ての 19 の可能な天然アミノ酸変化を生じる。

一局面において、複数のビルディングブロックポリヌクレオチドが使用され、かつ変種配列が複数のキメラ核酸コドンを経験的とし、それにより経験的コドンの変種である複数のコドン及びキメラ核酸によりコードされたポリペプチド中の経験的コドンによりコードされた複数の残基において複数の天然アミノ酸変化を生じる。一局面において、変種配列がキメラ核酸中のコドンの全て中で変種コドンを生成し、それにより複数の子孫ポリペプチド（全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種である）を生成する。一局面において、変種配列がキメラ核酸コドンの全てについての全ての 19 の天然アミノ酸変種をコードする変種コドンを生成し、それにより複数の子孫ポリペプチド（全てのアミノ酸がキメラ核酸によりコードされたポリペプチドの非確率的変種及びコドンの全てで全ての 19 の可能な天然アミノ酸の変種である）を生成する。一局面において、抗原結合部位のコドンの全てが経験的とされる。

【0032】

別の局面において、ライブラリーが $1 \sim 10^{30}$ のメンバー、 $10^2 \sim 10^{20}$ のメンバー又は $10^3 \sim 10^{10}$ のメンバーを含む。別の局面において、ビルディングブロックポリヌクレオチドの末端がキメラ核酸に相同の少なくとも約 6 のヌクレオチド、キメラ核酸に相同の少なくとも約 15 のヌクレオチド又はキメラ核酸に相同な少なくとも約 21 のヌクレオチドを含む。

一局面において、一つ以上のビルディングブロックポリヌクレオチドをキメラ核酸と組み合わせることがビルディングブロックポリヌクレオチドとキメラ核酸の間の z のクロスオーバーイベントを含み、 y が $1 \sim 10^{20}$ 、 $10 \sim 10^{10}$ 、又は $10^2 \sim 10^5$ の整数である。

別の局面において、非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個の残基中でキメラ核酸とは異なり、 z が $1 \sim 10^4$ 、もしくは $10 \sim 10^3$ であり、又は z が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 である。

別の局面において、非確率的子孫キメラポリヌクレオチドが z 個のコドン中でキメラ核酸とは異なり、 z が $1 \sim 10^4$ であり、 z が $10 \sim 10^3$ であり、又は z が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 である。

別の局面において、本発明の方法が本発明のキメラ抗体コーディング配列の配列の全部又は一部の非確率的改変を更に含む。改変は、例えば、“飽和突然変異誘発”もしくは“GSSM”、“最適化誘導進化系”及び“合成連結反応再アッセンブル”即ち“SLR”又はこれらの方法のあらゆる組み合わせを含む、あらゆる方法によるものであってもよい。

【0033】

本発明のキメラ抗体をコードする核酸はランダム方法もしくは確率的方法、又は、非確率的方法、もしくは“誘導進化”を含む、あらゆる手段により更に操作又は変更し得る。例えば、本発明のキメラ抗体をコードする核酸は本明細書に記載された、段階的核酸再アッセンブル（下記の実施例 3 を参照のこと）、飽和突然変異誘発、最適化誘導進化系、合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせにより操作し得る。本発明のキメラ抗体をコードする核酸は遺伝子部位飽和突然変異誘発 (GSSM)、エラー-プローン PCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブル PCR、セクシュアル PCR 突然変異誘発、*in vivo* 突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発、指数的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル (SLR) 又はこれらの組み合わせを含む方法に

より操作し得る。これらの核酸が組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成又はこれらの組み合わせにより操作し得る。

本発明の一つ以上の実施態様の詳細が添付図面及び以下の記載に示される。本発明のその他の特徴、目的、及び利点が記載及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかであろう。

本明細書に引用された全ての刊行物、GenBankアクセッション参照番号（配列）、ATCC 10

【0034】

塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖核酸の精製方法及び同定方法

本発明はヌクレオチドギャップ、塩基対ミスマッチ及び挿入／欠失ループを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの同定方法及び精製方法を提供する。

特に特定されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は本発明が属する分野の当業者により普通に理解される意味を有する。本明細書に使用される以下の用語は特に明記されない限りそれらに特有の意味を有する。 20

“二本鎖ポリヌクレオチド中の一つ以上のヌクレオチドギャップ、塩基対ミスマッチ及び／又は挿入／欠失ループに特異的に結合するポリペプチド”という表現は二本鎖ポリヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド）中のヌクレオチド塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る、全ての天然又は合成のポリペプチドを含む。これらのポリペプチドとして、例えば、本明細書に更に詳しく記載される、DNA修復酵素、抗体、転写調節ポリペプチド等が挙げられる。特異的結合は非特異的ではない結合のアフィニティーのあらゆるレベルを意味する。

“塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠く”という表現は塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップを実質的に欠いており、又は完全に欠いていることを意味する。例えば、本 30
発明の方法は塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又はヌクレオチドギャップを90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%及び100%即ち完全に含まない精製オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチドのサンプル又は“バッチ”を生成し得る。

【0035】

“DNA修復酵素”という表現は二本鎖ポリヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド）中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る全てのDNA修復酵素及びこれらの天然又は合成（例えば、遺伝子再操作された）変化を含み、例えば、以下に更に詳しく記載される、DNAミスマッチ修復(MMR)酵素、Taq MutS酵素、Fpg酵素、MutY DNA修復酵素、hexA DNAミスマッチ修復酵素、Vsr 40
ミスマッチ修復酵素等を含む。

“MutS DNA修復酵素”という用語は、以下に更に詳しく記載されるように、ヌクレオシド塩基対ミスマッチ又は挿入／欠失ループを結合し得る、バクテリアの酵素の合成（例えば、遺伝子操作された）変化、及び真核生物（例えば、哺乳動物）のホモログを含む、全てのMutS DNA修復酵素を含み、例えば、テルムス・アクアティカス(Taq)及びシュードモナス・エルジノーサMutS DNA修復酵素を含む。

“Fpg DNA修復酵素”という用語は、以下に更に詳しく記載されるように、ヌクレオシド塩基対ミスマッチ又は挿入／欠失ループを結合し得る、バクテリアの酵素の合成（例えば、遺伝子操作された）変化、及び真核生物（例えば、哺乳動物）のホモログを含む、全てのFpg DNA修復酵素を含む。 50

“ MutY ”という用語は、以下に更に詳しく記載されるように、ヌクレオシド塩基対ミスマッチ又は挿入 / 欠失ループを結合し得る、バクテリアの酵素の合成（例えば、遺伝子操作された）変化、及び真核生物（例えば、哺乳動物）のホモログを含む、全てのMutY DNA修復酵素を含む。

“ DNAグリコシラーゼ ”という用語はG:U/Tミスマッチの塩基切除修復を開始する全ての天然又は合成のDNAグリコシラーゼ酵素を含む。天然DNAグリコシラーゼ酵素として、例えば、以下に更に詳しく記載されるような、バクテリアのミスマッチ特異的ウラシル-DNAグリコシラーゼ (MUG) DNA修復酵素及び真核生物のチミン-DNAグリコシラーゼ (TDG) 酵素が挙げられる。

“ インティン ”という用語は自己スプライシングである全てのポリペプチド配列を含む。インティンは、以下に更に詳しく記載されるように、自己スプライシングにより翻訳後に除去されるイントロン様要素である。

【 0 0 3 6 】

“ 飽和突然変異誘発 ”又は“ GSSM ”という用語は、本明細書に詳しく記載されるように、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを使用して点突然変異をポリヌクレオチドに導入する方法を含む。

“ 最適化誘導進化系 ”又は“ 最適化誘導進化 ”という用語は関連核酸配列、例えば、関連遺伝子のフラグメントを再アッセンブルするための方法を含み、本明細書に詳しく説明される。

“ 合成連結反応再アッセンブル ”即ち“ SLR ”という用語はオリゴヌクレオチドフラグメントを非確率的様式でつなぐ方法を含み、本明細書に詳しく説明される。

本明細書に使用される“ 核酸 ”及び“ ポリヌクレオチド ”という用語は一本鎖形態又は二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを表す。これらの用語は全ての核酸、例えば、オリゴヌクレオチド、及び天然ヌクレオチドの修飾類似体、例えば、修飾インターヌクレオシド結合を含む核酸を含む。これらの用語はまた合成主鎖を有する核酸様構造を含む。合成主鎖類似体として、例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオアセタール、メチレン（メチルイミノ）、3'-N-カルバメート、モルホリノカルバメート、及びペプチド核酸(PNA)が挙げられる。Oligo nucleotides and Analogues, a Practical Approach, F. Eckstein編集, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, 600巻, Baserga及びDenhardt編集(NYAS 1992); Milligan (1993) J. Med. Chem. 36:1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press)を参照のこと。PNAはノニオン性主鎖、例えば、N-(2-アミノエチル)グリシン単位を含み、プローブとして使用し得る（例えば、米国特許第5,871,902号を参照のこと）。ホスホロチオエート結合は、例えば、WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197に記載されている。その他の合成主鎖はメチル-ホスホネート結合又は交互のメチルホスホネート及びホスホジエステル結合（Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698）、並びにベンジルホスホネート結合（Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156）を含む。ヌクレアーゼに耐性である修飾インターヌクレオシド結合が、例えば、米国特許第5,817,781号に記載されている。核酸という用語は遺伝子、cDNA、mRNA、iRNA、tRNA、プライマー、プローブ、増幅産物等という用語と互換可能に使用し得る。

【 0 0 3 7 】

塩基対ミスマッチ-、挿入 / 欠失ループ-及びギャップ-結合ポリペプチド

本発明は二本鎖ポリヌクレオチド内の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループ及び / 又はヌクレオチドギャップに特異的に結合する複数のポリペプチドを用意することを含む塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループ及び / 又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの精製方法を提供する。本発明の方法は二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入 / 欠失ループ及び / 又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に

結合する天然又は合成の、あらゆるポリペプチドを使用し得る。これは二本鎖ポリヌクレオチド、例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る、天然又は合成の、あらゆるポリペプチドを含む。ポリペプチドは、例えば、酵素、構造タンパク質、抗体、これらの変化、又は完全に合成のデザイン、例えば、イン・シリコ(in silico)デザインのタンパク質であってもよい。これらのポリペプチドとして、例えば、DNA修復酵素及び転写調節ポリペプチド等が挙げられる。一局面において、ミスマッチ又は挿入／欠失ループが二本鎖核酸の極限の(extreme)5'末端又は3'末端内にない。

DNA修復酵素は二本鎖ポリヌクレオチド中の塩基対ミスマッチ、挿入／欠失ループ及び／又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得るあらゆるDNA修復酵素及びこれらの天然又は合成(例えば、遺伝子操作された)の変化を含んでもよい。例として、例えば、DNAミスマッチ修復(MMR)酵素(例えば、Hsieh (2001) *Mutat. Res.* 486(2):71-87を参照のこと)、Taq MutS酵素、Fpg酵素、MutY DNA修復酵素、hexA DNAミスマッチ修復酵素(例えば、Ren (2001) *Curr. Microbiol.* 43:232-237を参照のこと)、Vsrミスマッチ修復酵素(例えば、Mansour (2001) *Mutat. Res.* 485(4):331-338を参照のこと)等が挙げられる。例えば、Mol (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:101-128; Obmolova (2000) *Nature* 407(6805):703-710を参照のこと。

10

【0038】

MutS DNA修復酵素は、ヌクレオシド塩基対ミスマッチ又は挿入／欠失ループを結合し得る、バクテリアの酵素の合成(例えば、遺伝子操作された)変化、及び真核生物(例えば、哺乳動物)のホモログを含む、あらゆるMutS DNA修復酵素を含み、例えば、テルムス・アクアティカス(Taq)及びシュードモナス・エルジノーサMutS DNA修復酵素を含む。MutS DNA修復酵素は二量体の形態で使用し得る。例えば、それはMutSホモログ、例えば、ヒトMutSホモログ、マウスMutSホモログ、ラットMutSホモログ、ショウジョウバエMutSホモログ、酵母MutSホモログ、例えば、サッカロミセス・セレビジエMutSホモログのホモダイマーであってもよい。例えば、米国特許第6,333,153号; Pezza (2002) *Biochem J.* 361 (Pt 1):87-95; Biswas (2001) *J. Mol. Biol.* 305:805-816; Biswas (2000) *Biochem J.* 347 Pt3:881-886; Biswas (1999) *J. Biol. Chem.* 274:23673-23678を参照のこと。MutSは単一塩基の欠失を含む核酸ヘテロ二重らせんを優先的に結合することが示されていた。例えば、Biswas (1997) *J. Biol. Chem.* 272:13355-13364を参照のこと。また、Su (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:5057-5061; Malkov (1997) *J. Biol. Chem.* 272:23811-23817を参照のこと。

20

30

Fpg DNA修復酵素は、ヌクレオシド塩基対ミスマッチ又は挿入／欠失ループを結合し得る、バクテリアの酵素の合成(例えば、遺伝子再操作された)変化、及び真核生物(例えば、哺乳動物)のホモログを含む、あらゆるFpg DNA修復酵素を含み、例えば、エシェリキア・コリからのFpg酵素を含む。例えば、Leipold (2000) *Biochemistry* 39:14984-14992を参照のこと。

MutY DNA修復酵素は、ヌクレオシド塩基対ミスマッチ又は挿入／欠失ループを結合し得る、バクテリアの酵素の合成(例えば、遺伝子再操作された)変化、及び真核生物(例えば、哺乳動物)のホモログを含む、あらゆるMutY DNA修復酵素を含む(例えば、Porello (1998) *Biochemistry* 37:14756-14764; Williams (1999) *Biochemistry* 38:15417-15424を参照のこと)。

40

【0039】

DNAグリコシラーゼはG:U/Tミスマッチの塩基切除修復を開始するあらゆる天然又は合成のDNAグリコシラーゼ酵素を含む。天然DNAグリコシラーゼ酵素はG:U/Tミスマッチの塩基切除修復を開始するDNAグリコシラーゼ酵素の同族ファミリーを形成し、例えば、バクテリアのミスマッチ特異的ウラシル-DNAグリコシラーゼ(MUG)DNA修復酵素(例えば、Barrett (1999) *EMBO J.* 18:6599-6609)及び真核生物のチミン-DNAグリコシラーゼ(TDG)酵素(例えば、Barrett (1999) 上記文献; Barrett (1998) *Cell* 92:117-129)を参照のこと)を含む。また、Pearl (2000) *Mutat. Res.* 460:165-181; Niederreither (1998) *Oncogen*

50

e 17:1577-15785を参照のこと。

付加的なヌクレオチドギャップ結合ポリペプチドは、例えば、DNAポリメラーゼデルタ、例えば、硬骨魚ミスグルナス・フォシリス (*Misgurnus fossilis*) 中で単離されたDNAポリメラーゼデルタ (例えば、Sharova (2001) *Biochemistry (Mosc)* 66:402-409) ; DNAポリメラーゼベータ (例えば、Bhattacharyya (2001) *Biochemistry* 40:9005-9013を参照のこと) ; DNAトポイソメラーゼ、例えば、Belova (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6015-6020により記載された好高熱性生物メタノピルス・カンドレリ (*Methanopyrus kandleri*) に見られるような型IB DNAトポイソメラーゼV ; リボソームタンパク質、例えば、S3リボソームタンパク質、例えば、Hegde (2001) *J. Biol. Chem.* 276:27591-27596により記載されたショウジョウバエS3リボソームタンパク質を含む。

本発明の方法はミスマッチ-、挿入/欠失ループ-及び/又はギャップ-結合ポリペプチドが塩基対ミスマッチもしくは挿入/欠失ループ又は一つ以上のヌクレオチドギャップに特異的に結合し得る条件下で二本鎖ポリヌクレオチドを塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のギャップから精製すべきポリペプチドと接触させることを含む。これらの条件は、例えば、本明細書で引用された文献に記載されているように、当業界で公知であり、又は無用の実験をしないで当業者により決定又は最適化し得る。例えば、米国特許第6,333,153号がADP及び必要によりATPを含む結合溶液の存在下でMutS二量体及びミスマッチ二重らせんDNAを接触させることを含む方法を記載している。結合溶液中のATP (存在する場合) の濃度は約3マイクロモル未満である。MutS二量体がADPを結合し、MutS ADP結合された二量体が二重らせんDNAのミスマッチ領域と会合する。

10

20

【0040】

哺乳動物細胞中で、DNA中の最も変化された塩基が単一ヌクレオチドパッチ塩基切除修復メカニズムにより修復される。塩基切除修復は損傷された塩基を除去し、非塩基 (abasic) 部位 (AP部位) を生じるDNAグリコシラーゼにより開始される。このAP部位はAP部位に隣接するホスホジエステル結合を切断し、3'-OH末端及び5'-糖ホスフェート末端を含むストランド分解を生じるAPエンドヌクレアーゼ活性により更にプロセッシングされる。哺乳動物細胞中で、5'-糖ホスフェートがDNAポリメラーゼベータのAPリナーゼ活性により除去される。また、同酵素はギャップを充填し、DNA末端が最終的にDNAリガーゼにより再結合される。こうして、DNAポリメラーゼ、例えば、DNAポリメラーゼベータに加えて、本発明の方法はまたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド結合ポリペプチドとしてDNAグリコシラーゼを単独で、又はその他の塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチドと連係して使用し得る。例えば、Podlitsky (2001) *Biochemistry* 40:809-813を参照のこと。

30

マーカー及び選抜ポリペプチド

本発明は塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製することを含む方法を提供し、そのポリヌクレオチドはマーカー又は選抜ポリペプチドのためのコーディング配列の上流にインフレーションで対象ポリペプチドのコーディング配列を含む融合タンパク質コーディング配列をコードする。関係するポリペプチドの下流にインフレーションでマーカー又は選抜ポリペプチドコーディング配列を使用することは対象コーディング配列のポリペプチドが融合タンパク質配列の転写又は翻訳を阻止する欠陥を欠くことを確かめるように作用する。マーカー又は選抜ポリペプチドコーディング配列は関係するコーディング配列のポリペプチドの下流かつインフレーションであるので、あらゆるこのような欠陥はマーカー又は選抜ポリペプチドの転写及び/又は翻訳を阻止するであろう。例えば、このスキームはその配列の転写又は翻訳を阻止する欠陥を有するものから塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のギャップを欠いている関係するポリペプチドコーディング配列を分離又は精製するのに使用でき、その欠陥とは、例えば、塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のギャップを含む。

40

【0041】

選抜マーカーは表現型を与えるためにとり込まれて本発明により精製された配列で形質

50

転換された細胞の選抜を促進し得る。例えば、マーカー選抜ポリペプチドは酵素、例えば、ベータ-ガラクトシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするLacZを含んでもよく、これは、形質転換細胞中で発現され、適当な基質に暴露された場合に、検出し得るマーカー、例えば、色を生じるであろう。例えば、Jain (1993) Gene 133:99-102; St Pierre (1996) Gene 169:65-68; Pessi (2001) Microbiology 147(Pt 8):1993-1995を参照のこと。また、米国特許第5,444,161号、同第4,861,718号、同第4,708,929号、同第4,668,622号を参照のこと。選抜マーカーはエピソームの維持及び複製をコードすることができ、その結果、宿主ゲノムへの組み込みが必要とされない。選抜マーカーはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)をコードすることができる。酵素-基質反応が外在性電子キャリアー及びテトラゾリウム塩の添加により監視される。例えば、米国特許第6,225,074号を参照のこと。 10

マーカーはまた抗生物質、除草剤又は薬物耐性をコードして所望のDNA配列で形質転換された細胞の選抜を可能にし得る。例えば、抗生物質耐性は単純ヘルペスチミジンキナーゼ(ガンシクロバーに対する耐性を与える)、クロラムフェニコール耐性酵素(例えば、Harrod (1997) Nucleic Acids Res. 25:1720-1726を参照のこと)、カナマイシン耐性酵素、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(G418に対する耐性を与える)、ブレオマイシン耐性酵素、ハイグロマイシン耐性酵素等により与えられる。マーカーはまた除草剤、例えば、クロロスルフロン又はバスタ耐性をコードすることができる。ネオマイシン又はハイグロマイシンのような基質に対する耐性を与える選抜可能なマーカー遺伝子は組織培養でのみ利用し得るので、化学療法抵抗性遺伝子がまたin vitro及びin vivoの選抜可能なマーカーとして使用される。マーカーはまた薬物に対する耐性を与える酵素、例えば、オウバイン耐性(Na,K)-ATPase、MDR1マルチドラッグトランスポーター(或る種の細胞傷害薬物に対する耐性を与える)等をコードすることができる。種々の標的細胞がP-糖タンパク質、マルチドラッグ耐性関連タンパク質トランスポーター、ジヒドロ葉酸還元酵素、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、06-アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼ、又はアルデヒド還元酵素をコードする化学療法抵抗性遺伝子の移入により抗癌薬に耐性にされる。例えば、Licht (1995) Cytokines Mol. Ther. 1:11-20; Blondelet-Rouault (1997) Gene 190:315-317; Aubrecht (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:992-997; Licht (1997) Stem Cells 15:104-111; Yang (1998) Clin. Cancer Res. 4:731-741を参照のこと。また、キメラカナマイシン耐性遺伝子を記載している米国特許第5,851,804号、米国特許第4,784,949号を参照のこと。 20 30

【0042】

マーカー又は選抜ポリペプチドはまた既知の抗体に対するアフィニティーを有するポリペプチドをコードする配列を含んでアフィニティー精製、検出等を促進し得る。このような検出及び精製を促進するドメインとして、金属キレート化ペプチド、例えば、ポリヒスチントラクト及び固定化された金属による精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、例えば、固定化された免疫グロブリン又はストレプトアビジンによる精製を可能にするプロテインA又はビオチンドメイン、並びにFLAGS延長/アフィニティー精製系(イムネックス社、シアトルWA)に利用されるドメインが挙げられるが、これらに限定されない。関係するタンパク質と第二ドメインの間の切断可能なリンカー配列、例えば、因子Xa又はエンテロキナーゼ(インビトロゲン、サンジエゴCA)の封入がまた精製を促進するため、また関係するタンパク質を取り扱い、また使用することの容易さのために使用し得る。例えば、融合タンパク質が6ヒスチジン残基、続いてチオレドキシン及びエンテロキナーゼ切断部位を含んでもよい(例えば、Williams (1995) Biochemistry 34:1787-1797を参照のこと)。ヒスチジン残基は検出及び精製を促進し、一方、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質の残部から関係する所望のタンパク質を精製するための手段を与える。融合タンパク質をコードするベクター及び融合タンパク質の適用に関する技術が特許及び科学文献に良く記載されている。例えば、Kroll (1993) DNA Cell. Biol., 12:441-53を参照のこと。 40

【0043】

インティン

一局面において、マーカー又は選抜ポリペプチドコーディング配列は自己スプライシングインティンであってもよい。インティンは自己スプライシングにより翻訳後に除去されるイントロン様要素である。こうして、本発明の方法は関係するポリペプチドからのマーカー又は選抜ポリペプチドインティンコーディング配列の自己スプライシングアウトを更に含んでもよい。インティン配列は当業界で公知である。例えば、Colston (1994) *Mol. Microbiol.* 12:359-363; Perler (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127; Perler (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:292-299; Giriat (2001) *Genet. Eng. (NY)* 23:171-199を参照のこと。また、米国特許第5,795,731号、同第5,496,714号を参照のこと。例えば、インティンはイン-フレームタンパク質融合のように自然に生じるタンパク質スプライシング要素であるので、インティン配列は自然に生じるインティン配列について設計でき、又はベースとし得る。インティンは系統発生的に広がっており、全ての三つの生物界、真正細菌、始原生物及び真核生物に見られていた。また、それらは完全合成スプライシング配列であってもよい。インティン命名法はRNAスプライシングについてのそれと対応し、それにより遺伝子(エクステイン)のコーディング配列がタンパク質スプライシング要素(インティン)を特定する配列により中断される。

10

【0044】

エラーを含まないポリヌクレオチドの精製

一局面において、本発明の方法は塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製することを含む

20

。抗体、結合分子、サイズ排除等の使用を含む、あらゆる精製方法が使用し得る。

抗体及びイムノアフィニティーカラム

一局面において、抗体が塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製するのに使用される。例えば、抗体が塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチドに直接に特異的に結合するように設計でき、又は抗体が塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチドに結合されたエピトープに結合し得る。抗体はビーズ、例えば、磁化ビーズに結合し得る。例えば、米国特許第5,981,297号、同第5,508,164号、同第5,445,971号、同第5,445,970号を参照のこと。また、液体中に懸濁された磁気感受性物質を分離するための多段電磁気セパレーターを記載して

30

いる、米国特許第5,858,223号、同第5,746,321号、及びUSPN 6,312,910を参照のこと。分離はイムノアフィニティーカラムの使用を含んでもよく、そのカラムは特異的に結合された塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチド又は塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチドに結合されたエピトープに特異的に結合し得る固定化された抗体を含む。サンプルは固定化された抗体が特異的に結合されたポリペプチドもしくはエピトープ、又は特異的に結合されたポリペプチドに結合された“タグ”に特異的に結合することができる条件下でイムノアフィニティーカラムに通される。

【0045】

塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-結合及び/又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチドのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が使用し得る。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を産生する方法が当業者に知られており、科学文献及び特許文献に記載されており、例えば、Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (編集) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (第7編) Lange Medical Publications, Los Altos, CA (“Stites”); Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (第2編) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) *Nature* 256:495; Harlow (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照のこと。抗体はまた動物を使用する従来のin vivo方法に加えて、例えば、ファージディスプレイライブラリーを発現する組換え抗体結合部位を使用してin vitroで生成し得る。例えば、Huse (1989) *Science* 246:1275; Ward (1989)

40

50

Nature 341:544; Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45を参照のこと。

“抗体”という用語は抗原又はエピトープに特異的に結合し得る、一つ以上の免疫グロブリン遺伝子に由来し、後にモデル化され、又は実質的にコードされたペプチドもしくはポリペプチド、又はこれらのフラグメントを含む。例えば、Fundamental Immunology, 第3編, W.E. Paul編集, Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97を参照のこと。抗体という用語は抗原を結合する能力を保持する抗原結合部分、即ち、“抗原結合部位”(例えば、フラグメント、サブシーケンス、相補性決定領域(CDR))を含み、(i)VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる1価フラグメントである、Fabフラグメント、(ii)ヒンジ領域でジスルフィドブリッジにより結合された二つのFabフラグメントを含む2価フラグメントである、F(ab')₂フラグメント、(iii)VH及びCH1ドメインからなるFdフラグメント、(iv)抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFvフラグメント、(v)dAbフラグメント(Wardら, (1989) Nature 341:544-546)(これはVHドメインからなる)、及び(vi)単離された相補性決定領域(CDR)を含む。一本鎖抗体も“抗体”という用語に参照により含まれる。

10

【0046】

ビオチン/アビジン分離系

あらゆるリガンド/受容体モデルが塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリペプチドを精製するのに使用し得る。例えば、ビオチンが塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-及び/又はヌクレオチドギャップ結合ポリペプチドに結合でき、又はそれが塩基対ミスマッチ-、挿入/欠失ループ-及び/又はヌクレオチドギャップ-結合ポリペプチドを含む融合タンパク質の一部であってもよい。ビオチン結合アビジンは典型的には、例えば、ビーズ、磁性材料、カラム、ゲル等に固定される。ビーズは磁化し得る。例えば、精製技術における磁性粒子の製造及び使用について上記され、また種々のビオチン-アビジン結合系及びそれらの製造方法及び使用方法を記載している米国特許、米国特許第6,287,792号、同第6,277,609号、同第6,214,974号、同第6,022,688号、同第5,484,701号、同第5,432,067号、同第5,374,516号を参照のこと。

20

核酸の生成及び操作

本発明は塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの精製方法を提供する。本発明の方法により精製された核酸は増幅、クローン化、配列決定でき、又は更に操作でき、例えば、それらの配列がSLR、GSSR等により更に変化し得る。本発明の方法に使用されるポリペプチドは組換え発現され、合成され、又は天然源から単離し得る。本発明をつくり、使用するのに必要とされるこれらの核酸及びその他の核酸は細胞から単離され、組換え生成され、又は合成によりつくられる。これらの配列は、例えば、cDNAライブラリーのクローニング及び発現、PCRによるメッセージ又はゲノムDNAの増幅等により単離し得る。本発明の方法を実施する際に、遺伝子が本明細書に記載されたように鋳型核酸を操作することにより改変し得る。本発明は当業界で知られているあらゆる方法もしくはプロトコル又は装置と連係して実施でき、これらは科学文献及び特許文献に良く記載されている。

30

40

【0047】

一般技術

本発明を実施するのに使用される核酸(RNA、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルス又はこれらのハイブリッドを問わない)は、種々の源から単離され、遺伝子操作され、増幅され、かつ/又は発現され/組換えにより生成されてもよい。これらの核酸から生成された組換えポリペプチドは個々に単離又はクローン化され、所望の活性について試験し得る。バクテリア、哺乳動物、酵母、昆虫又は植物細胞発現系を含む、あらゆる組換え発現系が使用し得る。

また、これらの核酸は、例えば、Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 1

50

9:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号に記載されたような公知の化学合成技術によりin vitro合成し得る。

核酸の操作のための技術、例えば、サブクローニング、連結反応、標識プローブ（例えば、クレノーポリメラーゼを使用するランダム-プライマー標識、ニック翻訳、増幅）、配列決定、ハイブリダイゼーション等が科学文献及び特許文献に良く記載されている。例えば、Sambrook編集、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL(第二編), 1-3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel編集, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen編集, Elsevier, N.Y. (1993)を参照のこと。

核酸、ペプチド、キャプシド、ポリペプチド等は当業者に公知の幾つかの一般手段のいずれかにより分析され、定量し得る。これらとして、例えば、NMR、スペクトロフォトメトリー、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、及び高拡散クロマトグラフィー、種々の免疫学的方法、例えば、液体又はゲル沈殿反応、免疫拡散、イムノ電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着検定(ELISA)、イムノ蛍光アッセイ、サザン分析、ノーザン分析、ドット-プロット分析、ゲル電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、核酸もしくは標的又はシグナル増幅方法、放射能標識、シンチレーションカウンティング、及びアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。

【0048】

核酸の増幅

本発明の方法を実施するに際して、核酸は、例えば、増幅反応により生成され、再生し得る。増幅反応はまた核酸と一緒に連結して融合タンパク質コーディング配列を生成するのに使用し得る。増幅反応はまた配列をペプチドにクローン化するのに使用し得る。増幅反応はまたサンプル中の核酸の量を定量し、核酸を標識し（例えば、それをアレイ又はプロットに適用するために）、核酸を検出し、又はサンプル中の特定の核酸の量を定量するのに使用し得る。細胞又はcDNAライブラリーから分離されたメッセージが増幅される。当業者は好適なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択し、設計し得る。増幅方法はまた当業界で公知であり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、PCR（例えば、PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Innis編集, Academic Press, N.Y. (1990)及びPCR STRATEGIES (1995), Innis編集, Academic Press, Inc., N.Y.を参照のこと）、リガーゼ連鎖反応(LCR)（例えば、Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117を参照のこと）、転写増幅（例えば、Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173を参照のこと）、及び自己持続配列複製（例えば、Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874を参照のこと）、Q レプリカーゼ増幅（例えば、Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491を参照のこと）、自動化Q レプリカーゼ増幅アッセイ（例えば、Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271を参照のこと）並びにその他のRNAポリメラーゼ媒介技術（例えば、NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario）、またBerger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; 米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564を参照のこと）を含む。

【0049】

コドンビルディングブロックの反復アッセンブルによりポリヌクレオチドを作製するための組成物及び方法

本発明はコドンビルディングブロックの反復アッセンブルによりポリヌクレオチドを作製するための組成物及び方法を提供する。本発明はマルチコドン（例えば、ジコドン、トリコドン、テトラコドン等）を含む合成又は組換えオリゴヌクレオチドのライブラリーを

提供する。ライブラリーは制限エンドヌクレアーゼ制限部位、例えば、IIS型制限エンドヌクレアーゼ制限部位を含むオリゴヌクレオチドを含み、その制限エンドヌクレアーゼは認識配列の外部の一定位置で切断して一本鎖オーバーハングを生成する。一局面において、マルチコドン（例えば、ジコドン）が制限エンドヌクレアーゼ制限部位、例えば、IIS型制限エンドヌクレアーゼ制限部位により両末端で隣接される。

本発明はまたあるゆる核酸配列、例えば、合成遺伝子、アンチセンス構築物、自己スプライシングイントロン又は転写産物（例えば、リボザイム）及びポリペプチドコーディング配列の生成方法を提供する。ポリヌクレオチド構築方法は既製オリゴヌクレオチドビルディングブロックのライブラリー及びIIS型制限エンドヌクレアーゼの使用を含む。IIS型制限エンドヌクレアーゼは、オリゴヌクレオチドライブラリーメンバーの消化時に、3塩基、2塩基又は1塩基一本鎖オーバーハングを生成し得る。IIS型制限エンドヌクレアーゼとして、例えば、SapI、EarI、BseRI、BsgI、BpmI、N.AIwI、N.BstNBI、BcgI、BsaXIもしくはBspCNI又はこれらのイソ制限酵素が挙げられる。

10

【0050】

一局面において、合成は固体支持体、例えば、ビーズ、例えば、磁性ビーズ、又はキャピラリー、例えば、GIGAMATRIXTM（これに、“スターター”オリゴヌクレオチドフラグメントが固定される）で開始する。一局面において、“伸長フラグメント”のライブラリーが核酸配列連続コドン(codon by codon)を構築するのに使用される。“伸長フラグメント”がジコドンを含む場合、ライブラリーは全ての可能なヘキサマージコドン配列の合計、又は4096の“伸長フラグメントトリゴヌクレオチド”を有する。夫々の“伸長フラグメント”はIIS型制限エンドヌクレアーゼ認識部位により“埋め込まれ”、又は隣接される。クラスIIS制限エンドヌクレアーゼは特定の認識配列を有し、認識部位の外部の一定距離で切断する。消化が適合性オーバーハングを生じる。新たに付加されたフラグメントが固定オリゴヌクレオチド、又は成長オリゴヌクレオチドと較べてモル過剰で使用し得る。モル過剰が遊離末端を飽和し、連結反応を完結へと誘導する。未結合物質が洗浄されて除かれる。残っている5'オーバーハングがクレノーDNAポリメラーゼでフィルイン(fill in)されてそれらを後のサイクルで更なる伸長からブロックし得る。結合されたフラグメントが酵素によりつながれる。そのプロセスが繰り返され、夫々のサイクルで少なくとも一つのコドンを付加し得る。そのプロセスが反復して繰り返されてあらゆる長さのポリヌクレオチドを生成し得る。合成が遺伝子内の多くの位置で同時に開始し得る。次いで合成された部分遺伝子が固体支持体から、例えば、隣接領域中の制限部位の第二の組により放出され、結合されて所望の完全長生成物、例えば、ポリペプチドコーディング配列、5'及び3'非コーディング領域を含み、又は含まない転写産物、転写調節領域、遺伝子を形成し得る。

20

30

【0051】

本発明の方法において、スターター及び伸長オリゴヌクレオチドフラグメントの同じ組が夫々の合成に使用し得る。本発明の方法は非常に低いエラー頻度でポリヌクレオチドを生成し得る。固定化された“スターター”及び“伸長”オリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドビルディングブロックは制限フラグメントとしてプラスミドDNAから調製でき、又はそれらが核酸増幅（例えば、PCR）により生成し得る。

本発明の例示のポリヌクレオチド合成スキームは既製ビルディングブロックのライブラリーを使用してあらゆる所定のDNA配列を生成する。ライブラリーは全ての可能なジコドン組み合わせ、合計で4096のクローンを含んで61の“スターター”リンカーオリゴヌクレオチドフラグメントとともに使用し得る。以下の実施例1に記載されるように、一局面において、オリゴヌクレオチド“ブロック”を含む夫々のジコドンがクローン化され、配列が確認され、PCR増幅され、又は制限消化産物から調製され、IIS型制限エンドヌクレアーゼで予備切断（予備消化）される。

40

本発明の方法及びライブラリーを使用するオリゴヌクレオチドからの遺伝子構築は“親”又は鋳型DNAの必要を省き得る。連続コドン付加戦略の使用は“親”又は鋳型DNAを必要としないで遺伝子、アンチセンスコーディング配列、ポリペプチドコーディング配列等を含む、核酸配列の特注設計を可能にする。本発明の方法は一つ以上の特定の発現宿主に対

50

するコドン頻度が最適化されるように合成核酸を設計するのに使用し得る。制限部位が個々のクローニング要求に応じて設計し得る。本発明の方法及びライブラリーは発現の所望のレベル又は細胞特異的発現パターンを得るためにコーディング配列に結合された特注転写調節要素を設計し、組み込むのに使用し得る。本発明の組成物及び方法は“親”又は鋳型DNAを使用する方法を含む、あらゆるその他の方法と連係して使用し得る。

この例示の反復の連続コドン遺伝子構築プロトコルの要約について図1を参照のこと。一局面において、標的DNA配列は固体支持体（例えば、ビーズ又はキャピラリー）の上で合成される。図1で注目されるように、最初に少なくとも第一コドンを含む“スターター”フラグメントが支持体に固定される。“スターター”オリゴヌクレオチドは支持体、例えば、ビーズの上に既にある“フック”により固定し得る。次の工程で、マルチコドン（少なくとも二つのコドン、又はジコドン）を含む“伸長フラグメント”が付加される。この例において、第一“伸長フラグメント”は第一の二つのコドンを含む。しかしながら、本発明のその他の局面において、“スターター”フラグメントが少なくとも一つのコドンを含んでもよい。結合末端がつながれる。そのサイクルが制限酵素による切断後に完結されて5'オーバーハングを生成する。この例示の方法において、制限酵素がコドンを二つに切断し、その結果、そのサイクルが一つのコドンを夫々のサイクルで付加する。

10

【0052】

別の局面において、パリンドローム配列がフラグメントの自己連結反応を生じ得るので、5'オーバーハングがフィルインされ、クレノーDNAポリメラーゼを使用して平滑末端に変換されてそれらを後の伸長サイクルでアニールすることからブロックする。

20

本発明のビルディングブロックオリゴヌクレオチドライブラリーはベクター中で調製でき、こうして、本発明のビルディングブロックオリゴヌクレオチドライブラリーがクローニングビヒクル、例えば、ベクターを含み得る。本発明のライブラリーの調製において、ベクター及び宿主株の選択が重要であるかもしれず、ベクターは“ビルディングブロック”の調製に使用される制限部位を含まない。未改変DNAを生じる株は使用される必要がないかもしれない。何とならば、クラスIIS制限酵素の一部がメチル化に対し感受性であるからである。“ビルディングブロック”は種々の方法で、例えば、制限フラグメントとして、高忠実度PCR増幅により、合成化学により調製し得る。

一局面において、これらの方法が自動化された、高処理系として行なわれる。支援ソフトウェアが、例えば、配列決定されたクローンの記録及び/又は検索、クローンのアレイ又は所定の核酸配列についてのライブラリー中の必要なビルディングブロックの同定に使用し得る。あらゆるソフトウェアシステム、例えば、DNAカーペンターTMソフトウェア（ダイバーサ社、サンジエゴ、CA）の変化が使用し得る。あらゆるロボットシステムが自動化された、高処理系に使用し得る。

30

【0053】

定義

特に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は本発明が属する分野の当業者により普通に理解される意味を有する。本明細書に使用される、以下の用語は特に明記されない限りそれらに特有の意味を有する。

“IIS型酵素”又は“IIS型制限エンドヌクレアーゼ”という用語は認識配列の3'もしくは5'又は両側の、一つのストランド又は両方のストランドで認識配列の外部の一定位置で切断する非対称認識配列を有する全てのエンドヌクレアーゼ及び全てのIIS制限酵素を含む。IIS型酵素は非対称塩基配列を認識することができ、認識部位の外部の20以上の塩基対までの特定位置でDNAを切断することができる。一局面において、それらは二三のヌクレオチドを認識配列から開裂し得る（例えば、Bath (2001) *Biol. Chem. Nov 29*; epubを参照のこと）。両側で切断する例示の制限エンドヌクレアーゼとして、BclI（例えば、Kong (1998) *J. Mol. Biol.* 279:823-32を参照のこと）、BsaXI及びBspCNIが挙げられる。

40

3塩基一本鎖オーバーハングを生成する例示の制限エンドヌクレアーゼとして、EarI及びSapIが挙げられる。2塩基一本鎖オーバーハングを生成する例示の制限エンドヌクレアーゼとして、BseRI、BsgI（例えば、Ariazi (1996) *Biotechniques* 20:446-448, 450-451を

50

参照のこと)及びBpmIが挙げられる。1塩基一本鎖オーバーハングを生成する例示の制限エンドヌクレアーゼとして、Bmrl、EciI、HphI、MboI(例えば、Soundararajan (2001) J. Biol. Chem. Oct 17; epubを参照のこと)及びMnIIが挙げられる。一本鎖のみを切断する例示の制限エンドヌクレアーゼ(“ニッキング酵素”)として、N.AlwI及びN.BstNBIが挙げられる。例えば、BspMI(例えば、Gormley (2001) J. Biol. Chem. Nov. 29; epubを参照のこと)及びBcefl(例えば、Venetianer (1988) Nucleic Acids Res. 16:3053-3060を参照のこと)を含む、あらゆるIIS型酵素が本発明の方法に使用し得る。

“EarI”は5'-CTCTTC-3'を認識する全てのIIS型制限エンドヌクレアーゼ並びに同じ認識配列及び塩基切断パターンを有する全てのイソ制限酵素及び制限エンドヌクレアーゼを含む(イソ制限酵素はプロトタイプ制限エンドヌクレアーゼの特異性と同じ特異性を有する)。EarIは最初にエンテロバクター・エロゲネスから単離された。例えば、Polisson (1988) Nucleic Acids Res. 16:9872を参照のこと。

“SapI”は非パリンドローム7-塩基認識配列(GCTCTTC)を認識する全てのIIS型制限エンドヌクレアーゼ並びに同じ認識配列及び塩基切断パターンを有する全てのイソ制限酵素及び制限エンドヌクレアーゼを含む。例えば、Xu (1998) Mol. Gen. Genet. 260:226-231を参照のこと。

【0054】

“飽和突然変異誘発”又は“GSSM”という用語は、本明細書に詳しく記載されるように、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを使用して点突然変異をポリヌクレオチドに導入する方法を含む。

“最適化誘導進化系”又は“最適化誘導進化”という用語は関連核酸配列、例えば、関連遺伝子のフラグメントを再アッセンブルするための方法を含み、本明細書に詳しく説明される。

“合成連結反応再アッセンブル”即ち“SLR”という用語はオリゴヌクレオチドフラグメントを非確率的様式でつなぐ方法を含み、本明細書に詳しく説明される。

本明細書に使用される“核酸”及び“ポリヌクレオチド”という用語は一本鎖形態又は二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを含む。これらの用語は全ての核酸、例えば、オリゴヌクレオチド、及び天然ヌクレオチドの修飾類似体、例えば、修飾されたインターヌクレオチド結合を有する核酸を含む。これらの用語はまた合成主鎖を有する核酸様構造を含む。合成主鎖類似体は、例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオアセタール、メチレン(メチルイミノ)、3'-N-カルバメート、モルホリノカルバメート、及びペプチド核酸(PNA)を含む。Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, F. Eckstein編集, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Science, 600巻, Baserga及びDenhardt編集(NYAS 1992); Milligan (1993) J. Med. Chem. 36:1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press)を参照のこと。PNAはノニオン性主鎖、例えば、N-(2-アミノエチル)グリシン単位を含み得る。例えば、米国特許第5,871,902号を参照のこと。ホスホロチオエート結合が、例えば、WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197に記載されている。その他の合成主鎖はメチル-ホスホネート結合又は交互のメチルホスホネート結合及びホスホジエステル結合(Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698)、並びにベンジルホスホネート結合(Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156)を含む。ヌクレアーゼに耐性である修飾インターヌクレオチド結合が、例えば、米国特許第5,817,781号に記載されている。核酸及びポリヌクレオチドという用語は遺伝子、cDNA、mRNA、プローブ及び増幅産物という用語と互換可能に使用し得る。

【0055】

核酸の生成及び操作

本発明は核酸(オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチド)のライブラリー並びにこれらのライブラリーの製造方法及び使用方法を提供する。また、本発明は連続コドン構築技

10

20

30

40

50

術を使用する核酸の製造方法並びにクローニング、配列決定及びそれらの発現を含む、これらの核酸の更なる操作のための方法を提供する。本発明をつくり、使用するのに必要とされる個々の塩基、コドン、オリゴ等を含む、核酸は細胞から単離でき、組換え生成でき、又は合成によりつくられる。配列は、例えば、cDNAライブラリーのクローニング及び発現、PCRによるメッセージ又はゲノムDNAの増幅等により単離し得る。本発明は当業界で知られているあらゆる方法もしくはプロトコル又は装置と連係して実施でき、これらは科学文献及び特許文献に良く記載されている。

一般技術

本発明を実施するのに使用される核酸（個々の塩基、コドン、オリゴ等を含む）（RNA、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルス又はこれらのハイブリッドを問わない）は、種々の源から単離され、遺伝子操作され、増幅され、かつ／又は発現され／組換え生成されてもよい。これらの核酸から生成された組換えポリペプチドは個々に単離又はクローン化でき、所望の活性について試験し得る。バクテリア、哺乳動物、酵母、昆虫又は植物細胞発現系を含む、あらゆる組換え発現系が使用し得る。

10

【0056】

また、これらの核酸（個々の塩基、コドン、オリゴ等を含む）は、例えば、Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号に記載されているように、公知の化学合成技術によりin vitro合成し得る。

20

核酸の操作のための技術、例えば、サブクローニング、連結反応、標識プローブ（クレノーポリメラーゼを使用するランダム-プライマー標識、ニック翻訳、増幅）、配列決定、ハイブリダイゼーション等は科学文献及び特許文献に良く記載されている。例えば、Sambrook編集、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (第二編), 1-3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel編集, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen編集, Elsevier, N.Y. (1993)を参照のこと。

核酸、オリゴヌクレオチド、ベクター、キャプシド、ポリペプチド等は当業者に公知の幾つかの一般手段のいずれかにより分析され、定量し得る。これらとして、例えば、分析生化学的方法、例えば、NMR、スペクトロフォトメトリー、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、及び高拡散クロマトグラフィー、種々の免疫学的方法、例えば、液体又はゲル沈殿反応、免疫拡散、イムノ電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、免疫蛍光アッセイ、サザン分析、ノーザン分析、ドット-プロット分析、ゲル電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、核酸もしくは標的又はシグナル増幅方法、放射能標識、シンチレーションカウンティング、及びアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。

30

制限エンドヌクレアーゼ（例えば、型IISエンドヌクレアーゼ）、DNAリガーゼ、クレノーDNAポリメラーゼ等を含む、種々の酵素及び緩衝剤が本発明の方法及び系に使用し得る。夫々の工程について使用される緩衝剤及び反応条件、例えば、インキュベーション時間、温度、酵素及び核酸の量は、日常的な方法により夫々の工程について最適化し得る。

40

【0057】

核酸の増幅

本発明の方法を実施する際に、核酸及びオリゴヌクレオチドが増幅反応により操作され、配列決定され、クローン化され、再生される等し得る。増幅反応は核酸もしくはオリゴヌクレオチドと一緒にスプライシングし、又はそれらをベクターにクローン化するのに使用し得る。増幅反応はまたサンプル中の核酸の量を定量し、核酸を標識し（例えば、それをアレイ又はプロットに適用するために）、核酸を検出し、又はサンプル中の特定の核酸

50

の量を定量するのに使用し得る。当業者は好適なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択し、設計し得る。増幅方法はまた当業界で公知であり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、PCR (例えば、PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Innis編集, Academic Press, N.Y. (1990)及びPCR STRATEGIES (1995), Innis編集, Academic Press, Inc., N.Y.を参照のこと)、リガーゼ連鎖反応(LCR) (例えば、Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117を参照のこと)、転写増幅 (例えば、Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173を参照のこと)、及び自己持続配列複製 (例えば、Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874を参照のこと)、Q レプリカーゼ増幅 (例えば、Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491を参照のこと)、自動化Q レプリカーゼ増幅アッセイ (例えば、Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271を参照のこと)並びにその他のRNAポリメラーゼ媒介技術 (例えば、NASBA, Cingene, Mississauga, Ontario; またBerger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; 米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564を参照のこと)を含む。

【0058】

基質表面

本発明は基質表面を用意し、オリゴヌクレオチドを基質表面に固定することを含むマルチコドン、例えば、ジコドン、ビルディングブロックの反復アッセンブルによるポリヌクレオチドの構築方法を提供する。あらゆる基質表面が本発明を実施するのに使用し得る。例えば、基質表面は硬質、半硬質又は可撓性材料であってもよい。基質表面は平ら又は平面状であってもよく、ウェル、隆起領域、エッチングされたトレンチ、細孔、ビーズ、フィラメント等として成形されてもよい。基質表面はその上に“捕獲プローブ”が直接又は間接に結合し得るあらゆる材料のものであってもよい。例えば、好適な材料として、紙、ガラス (例えば、米国特許第5,843,767号を参照のこと)、セラミック、石英又はその他の結晶性基質 (例えば、ヒ化ガリウム)、金属、メタロイド、ポリアクリロイルモルホリド、種々のプラスチック及びプラスチックコポリマー、ナイロンTM、テフロンTM、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリスチレン/ラテックス、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、レーヨン、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、ポリニフッ化ビニリデン(PVDF) (例えば、米国特許第6,024,872号を参照のこと)、シリコーン (例えば、米国特許第6,096,817号を参照のこと)、ポリホルムアルデヒド (例えば、米国特許第4,355,153号、同第4,652,613号を参照のこと)、セルロース (例えば、米国特許第5,068,269号を参照のこと)、セルロースアセテート (例えば、米国特許第6,048,457号を参照のこと)、ニトロセルロース、種々の膜及びゲル (例えば、シリカエーロゲル、例えば、米国特許第5,795,557号を参照のこと)、常磁性又は超常磁性微粒子 (例えば、米国特許第5,939,261号を参照のこと)等が挙げられる。シラン (例えば、モノ-及びジヒドロキシアルキルシラン、アミノアルキルトリアルコキシシラン、3-アミノプロピル-トリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン)がアミン官能基との反応のためのヒドロキシル官能基を与えることができる。

【0059】

一局面において、本発明は61の“スターター”オリゴヌクレオチド、夫々の可能なアミノ酸コーディングトリプレットについて一つのビーズを含む、ビーズ、例えば、磁性ビーズ (例えば、常磁性又は超常磁性微粒子を含む)の組を提供する。別の局面において、本発明はこれらの61の“スターター”オリゴヌクレオチド及び4⁶即ち1096の可能なヘキサマージコドンオリゴヌクレオチドを含む系を提供する。先に説明したように、これらのジコドンオリゴヌクレオチドはエンドヌクレアーゼ認識部位、例えば、クラスIIIS制限部位のフレームワークに“埋め込まれ”、又はそれにより隣接される。61の“スターター”オリゴヌクレオチドがビーズ以外の様式、例えば、ウェル、ストランド、キャピラリー管 (以下を参照のこと、例えば、キャピラリーアレイ、例えば、GIGAMATRIXTM)、トラフ等に固定し得る。

キャピラリーアレイ

キャピラリーアレイ、例えば、GIGAMATRIXTM（ダイバーサ社、サンジエゴ、CA）が基質表面として使用し得る。キャピラリーアレイは本発明の方法を使用して核酸を固定し、構築するための別の系を与える。一旦構築されると、固定化された新たに構築されたポリペプチドがスクリーニングされ、キャピラリーアレイ内で発現し得る。複数のキャピラリーが隣接キャピラリーのアレイに形成でき、夫々のキャピラリーがオリゴヌクレオチドを保持するための管腔を形成する少なくとも一つの壁を含む。その装置はアレイ中の隣接キャピラリー間に配置された間隙物質、及びその間隙物質内に形成された一つ以上の基準表示を更に含んでもよい。サンプルをスクリーニングするためのキャピラリー（そのキャピラリーはキャピラリーのアレイ中で結合されるのに適している）は、サンプルを保持するための管腔を形成する第一の壁、及び管腔に与えられた励起エネルギーをフィルターしてサンプルを励起するためのフィルター材料から形成された第二の壁を含んでもよい。例えば、WO 0138583を参照のこと。

10

【0060】

例えば、核酸、例えば、コドンを含むライブラリーメンバーが、キャピラリーアレイのキャピラリーの少なくとも一部への第一成分に導入し得る。キャピラリーアレイの夫々のキャピラリーは第一成分を保持し、気泡を第一成分の後にキャピラリーに導入するための管腔を形成する少なくとも一つの壁を含んでもよい。第二成分（例えば、異なる緩衝剤、エンドヌクレアーゼ酵素、コドンを含むライブラリーメンバー）がキャピラリーに導入でき、第二成分が気泡により第一成分から分離される。サンプル（例えば、コドンを含むライブラリーメンバーを含む）が検出可能な粒子で標識された第一液体としてキャピラリーアレイのキャピラリーに導入でき、キャピラリーアレイの夫々のキャピラリーが第一液体及び検出可能な粒子を保持するための管腔を形成する少なくとも一つの壁を含み、その少なくとも一つの壁が検出可能な粒子を少なくとも一つの壁に結合するための結合材料で被覆される。その方法は第一液体をキャピラリー管から除去し（結合された検出可能な粒子がキャピラリー内に維持される）、第二液体をキャピラリー管に導入することを更に含んでもよい。

20

キャピラリーアレイは管腔を形成する少なくとも一つの外壁を含む複数の個々のキャピラリーを含んでもよい。キャピラリーの外壁は一緒に融着された一つ以上の壁であってもよい。同様に、壁が液体又はサンプルの保持のための管腔を形成する限り、壁は円筒形、正方形、六角形又はあらゆるその他の幾何学的形状である管腔を形成し得る。キャピラリーアレイのキャピラリーは接近して一緒に保持されて平面状構造を形成し得る。キャピラリーは、並んで融着され（例えば、キャピラリーがガラス製である場合）、接着され、結合され、又はクランプされることにより、一緒に結合し得る。キャピラリーアレイはあらゆる数の個々のキャピラリー、例えば、100から4,000,000までの範囲のキャピラリーから形成し得る。キャピラリーアレイは一緒に結合された約100,000以上の個々のキャピラリーを有するマイクロタイタ・プレートを形成し得る。

30

【0061】

核酸の改変

本発明の方法により生成された核酸は、本明細書に記載されたように、飽和突然変異誘発、最適化誘導進化系、合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせを含む、あらゆる手段により変化し得る。ランダムもしくは確率的方法、又は、非確率的、もしくは“誘導進化”方法が使用し得る。更に、先に説明したように、本発明の方法により生成された核酸は本明細書に記載された方法、例えば、本明細書に記載された塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドの精製方法により精製し得る。本発明の方法により生成された核酸は遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、エラー-プローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブルPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発、指數的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル(SLR)及びこれらの組み合わせを含む方法により変化し得る。本発明の方

40

50

法により生成された核酸は組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウラシル含有鋳型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成及びこれらの組み合わせを含む方法により変化し得る。

遺伝子のランダム突然変異のための方法は当業界で公知である。例えば、米国特許第5,830,696号を参照のこと。突然変異原は組換えにより修復を受けやすいDNA分解を誘発するために、例えば、紫外線もしくはガンマ放射線、又は化学的突然変異原、例えば、マイトマイシン、亜硝酸、光活性化プロソラレンを単独で、又は組み合わせて含む。その他の化学的突然変異原として、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン又はギ酸が挙げられる。その他の突然変異原はヌクレオチド前駆体の類似体、例えば、ニトロソグアニジン、5-プロモウラシル、2-アミノプリン、又はアクリジンである。これらの薬剤はヌクレオチド前駆体に代えてPCR反応に添加でき、それにより配列を突然変異し得る。挿入剤、例えば、プロフラビン、アクリフラビン、キナクリン等がまた使用し得る。

分子生物学の技術、例えば、ランダムPCR突然変異誘発（例えば、Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471を参照のこと）、又は、コンビナトリアル多重カセット突然変異誘発（例えば、Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196を参照のこと）が使用し得る。また、核酸、例えば、遺伝子が、ランダム、又は“確率的”断片化後に再アッセンブルし得る。例えば、米国特許第6,291,242号、同第6,287,862号、同第6,287,861号、同第5,955,358号、同第5,830,721号、同第5,824,514号、同第5,811,238号、同第5,605,793号を参照のこと。単離され、かつ/又は改変された核酸によりコードされたポリペプチドが細胞へのそれらの再挿入の前に、例えば、キャピラリーアレイプラットフォームを使用することにより活性についてスクリーニングし得る。例えば、米国特許第6,280,926号、同第5,939,250号を参照のこと。

【0062】

飽和突然変異誘発、又は、GSSM

本発明の一面において、非確率的遺伝子改変、“誘導進化方法”が本発明の方法により生成された核酸を改変するのに使用し得る。この方法の変化が“遺伝子部位飽和突然変異誘発”、“部位飽和突然変異誘発”、“飽和突然変異誘発”又は単に“GSSM”と称されていた。それはその他の突然変異誘発方法と組み合わせて使用し得る。例えば、米国特許第6,171,820号、同第6,238,884号を参照のこと。一面において、GSSMは鋳型ポリヌクレオチド及び複数のオリゴヌクレオチドを用意することを含み、夫々のオリゴヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドに相同な配列を含み、それにより鋳型ポリヌクレオチドの特定配列を標的とし、また相同遺伝子の変種である配列を含み、鋳型ポリヌクレオチドをオリゴヌクレオチドとともに複製することにより非確率的配列変化を含む子孫ポリヌクレオチドを生成し、それにより相同遺伝子配列変化を含むポリヌクレオチドを生成する。

別の局面において、部位飽和突然変異誘発が別の確率的又は非確率的手段、例えば、合成連結反応再アッセンブル（以下を参照のこと）、シャッフリング、キメラ化、組換え及びその他の突然変異誘発方法及び突然変異誘発剤と一緒に使用されて配列を変化し得る。本発明は反復様式の、飽和突然変異誘発を含む、一つ以上のあらゆる突然変異誘発方法の使用を提供する。

【0063】

合成連結反応再アッセンブル(SLR)

本発明の方法により生成された核酸を改変するのに使用し得る、別の非確率的遺伝子改変、“誘導進化方法”は“合成連結反応再アッセンブル”、又は単に“SLR”と称されていた。SLRはオリゴヌクレオチドフラグメントと一緒に非確率的につなぐ方法である。この方法は核酸ビルディングブロックがシャッフルされず、コンカテマー形成されず、又はランダムにキメラ化されず、むしろ非確率的にアッセンブルされるという点で確率的オリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドシャッフリングとは異なる。例えば、1999年6月14日に出願された“誘導進化における合成連結反応再アッセンブル”という発明の名称の米国特許出願第(USSN)09/332,835号(“USSN 09/332,835”)を参照のこと。一局面において、SLRは(a)鋳型ポリヌクレオチドを用意する工程(その鋳型ポリヌクレオチドは相同遺伝子をコードする配列を含む)、(b)複数のビルディングブロックポリヌクレオチドを用意する工程(そのビルディングブロックポリヌクレオチドは前もって決められた配列において鋳型ポリヌクレオチドとクロスオーバー再アッセンブルするように設計され、ビルディングブロックポリヌクレオチドは相同遺伝子の変種配列及び前記変種配列に隣接する鋳型ポリヌクレオチドに相同な配列を含む)、(c)ビルディングブロックポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドと合わせる工程(その結果、ビルディングブロックポリヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドとクロスオーバー再アッセンブルして相同遺伝子配列変化を含むポリヌクレオチドを生成する)を含む。

10

SLRは再配置されるポリヌクレオチド間の高度な相同性の存在に依存しない。こうして、この方法は 10^{100} を超える異なるキメラを含む子孫分子のライブラリー(又は組)を非確率的に生成するのに使用し得る。SLRは 10^{1000} を超える異なる子孫キメラを含むライブラリーを生成するのに使用し得る。こうして、本発明の局面は設計により選択される全体的なアッセンブル順序をシェーブする最終のキメラ核酸分子の組を生成する非確率的方法を含む。この方法は使用可能な相互に適合性の連結可能な末端を有する複数の特定核酸ビルディングブロックを設計により生成する工程、及びこれらの核酸ビルディングブロックをアッセンブルする工程(その結果、設計された全体的なアッセンブル順序が得られる)を含む。

20

【0064】

最適化誘導進化系

本発明の方法により生成された核酸はまた最適化誘導進化系を含む方法により改変し得る。最適化誘導進化は組換えによる核酸の誘導分子進化を可能にする還元的再構築、組換え及び選択の反復サイクルの使用に関する。最適化誘導進化は進化されたキメラ配列の大集団の生成を可能にし、生成された集団は前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有する配列について有意に濃縮される。クロスオーバーイベントは配列のシフトが一つの親変種から別の親変種に生じるキメラ配列中の位置である。このような位置は通常二つの親からのオリゴヌクレオチドが一緒につながれて単一配列を形成する接合部にある。この方法はオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にし、その結果、配列の最終のキメラ集団が選択された数のクロスオーバーイベントについて濃縮される。これは前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有するキメラ変種を選択することについて一層の制御を与える。

30

加えて、この方法は多量の可能なタンパク質変異体空間を研究するのに便利な手段を与える。最適化誘導進化系を使用することにより、核酸分子の集団が特別な数のクロスオーバーイベントを有するこれらの変異体について濃縮し得る。キメラ子孫ポリヌクレオチド配列を生じるための一つの方法は夫々の親配列のフラグメント又は部分に相当するオリゴヌクレオチドを生じることである。夫々のオリゴヌクレオチドはオーバーラップの固有な領域を含んでもよく、その結果、オリゴヌクレオチドと一緒に混合することにより正確な順序でアッセンブルされた夫々のオリゴヌクレオチドフラグメントを有する新しい変種が生じる。付加的な情報がまたWO 0077262、WO 0058517、WO 0046344に見られる。

40

【0065】

キメラ抗原結合分子並びにそれらの製造方法及び使用方法

本発明は新規なキメラ抗原結合ポリペプチド、それらをコードする核酸並びにそれらの製造方法及び使用方法を提供する。また、本発明はそれらをコードする核酸を飽和突然変異誘発、最適化誘導進化系、合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせにより変化することによりこれらのキメラ抗原結合ポリペプチドを更に改変する方法を提供する。これらの改変は抗体のこのような抗原結合部位もしくは特定ドメイン又はフラグメント、例えば、可変ドメインもしくは重鎖ドメイン、Fabドメイン又はFcドメイン或いはCDR

50

に集中し得る。

本発明はまた本発明の核酸ライブラリーによりコードされ、本発明の方法により生成されたキメラ抗原結合ポリペプチドのライブラリーを提供する。これらの抗原結合ポリペプチドはあらゆる液体又は固体状態のスクリーニング方法、例えば、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイを使用して、キャピラリーアレイプラットフォーム、例えば、GIGAMATRIXTM等を使用して分析し得る。

本発明の方法により生成されたキメラ抗原結合ポリペプチドは、例えば、抗原を単離し、その量を測定し、もしくはそれらを同定するのに *in vitro* で、又は、例えば、種々の疾患及び症状を治療もしくは診断し、又は免疫応答を調節、刺激もしくは弱化するのに *in vivo* で使用し得る。本発明の抗原結合ポリペプチドは触媒抗体であるように操作し得る。例えば、米国特許第6,326,179号、同第5,439,812号、同第5,302,516号、同第5,187,086号、同第5,126,258号を参照のこと。

10

【0066】

本発明はまたワクチンの分野に関する。本発明のライブラリー及び方法は、ポリペプチド抗体及び核酸を含む遺伝子ワクチンを含む、操作された抗原結合ポリペプチドを提供する。特定の抗原結合ポリペプチドは特別なワクチン投与目標のために本発明の方法による最適化に選択し得る。抗体は受動免疫を生じるための投与について設計し得る。これらの抗原結合ポリペプチドをコードする核酸は遺伝子ワクチンとして使用し得る。一局面において、本発明は関係する特別な組織又は細胞型への遺伝子ワクチンのターゲッティングを促進する抗原結合ポリペプチドを提供することにより遺伝子ワクチンの効力を改良する方法を提供する。

20

本発明は抗原結合部位を含むポリペプチド、例えば、抗体に抗原に対する改良された（例えば、増大又は減少された）アフィニティーを与えることにより生物学的治療薬の分野に関する。例えば、本発明の方法は、例えば、免疫治療薬又は診断薬中の使用のために抗原に対する変化又は増進されたアフィニティーの抗体を与える。本発明の方法により生成された抗体は細胞、例えば、癌細胞の成長を遅くし、もしくはそれらを死滅させ、又は、例えば、免疫応答を増進するため、もしくは組織再生のために、細胞分裂を刺激し、或いはあらゆる生物学的メカニズムもしくは応答を変化するのに治療上投与し得る。例えば、免疫エフェクターもしくは調節細胞、又はリンホカインもしくはサイトカインに結合する抗体の投与は体液性免疫応答又は細胞性免疫応答を変化、例えば、アップレギュレート、刺激又は弱化し得る。本発明はまた広範囲の抗原に対する有効な免疫応答を発生するのに使用し得る。

30

本発明は、例えば、Fc受容体、表面発現された（膜結合された）免疫グロブリン、T細胞受容体又はクラスI及びクラスII主要組織適合性(MHC)分子を含む、免疫応答の刺激及び調節に関係する分子に特異的なキメラ抗原結合ポリペプチドを提供することにより免疫応答の調節の分野に関する。例えば、一種以上のこれらの分子の発現を調節することにより、本発明の方法は自己反応性TCR反応を調節し、自己抗原に対する低下又は弱化された免疫応答を生じ、又は、例えば、病原体に対する増進された免疫応答を生じ得る。

【0067】

本発明はまたタンパク質工学の分野に関する。本発明は本発明のキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを改変するために誘導進化方法を使用する。突然変異誘発の方法が変化され、又は“改良”されるキメラ抗原結合ポリペプチドをコードする新規ポリヌクレオチドを生成するのに使用される。これらの方法として、非確率的ポリヌクレオチドキメラ化及び非確率的部位誘導点突然変異誘発が挙げられる。

40

一局面において、本発明は合成かつ非確率的である手段により一種以上のキメラ抗原結合ポリヌクレオチドの子孫ライブラリー、又は組を生成する方法に関する。一種以上の子孫抗原結合ポリヌクレオチドの設計は抗原結合ポリヌクレオチドの親の組及び/又は親ポリヌクレオチドにより相当してコードされたポリペプチドの分析により誘導される。別の局面において、本発明は徹底的、系統的、かつ非確率的である手段を使用して部位誘導突然変異誘発を行なう方法に関する。

50

本発明はまた末端選抜と称される方法により、子孫キメラ抗原結合分子の生成された組の中から特に望ましい種を含むサブセットを選抜することを含み、次いでそのサブセットが更にスクリーニングされてもよい。本発明はまた抗原結合ポリヌクレオチドの組のスクリーニングを含む。抗原結合ポリペプチドは有益な性質、例えば、抗原に対する増大されたアフィニティー（例えば、“アフィニティー強化”）又は減少されたアフィニティーを有し、又は酵素として作用するその能力を得、もしくは変化するように再設計し得る。

本発明の方法はキメラ抗体又は抗原結合部位の“アフィニティー強化”を与える。抗体定常領域（例えば、Fcドメイン）がまたFc受容体又は補体ポリペプチドに特異的に結合するそれらの能力について“アフィニティー強化され”得る。例えば、CDR、Fab、Fc、及び一本鎖抗体を含む、変種抗体の非常に大きい組、又はライブラリーが生成され、リガンド（例えば、抗原、補体、受容体等）への結合についてスクリーニングし得る。一局面において、変種ポリヌクレオチドが単離され、本明細書に記載された方法により更に操作され、例えば、シャッフルされて選択されたポリペプチド、一種以上のペプチド又はこれらの前もって決められた部分のアミノ酸配列をコンビナトリアルに組み換える。こうして、分子に対する所望の結合アフィニティーを有する抗体、抗原結合部位、Fcドメイン等が生成し得る。ペプチド又は抗体がその後にあらゆる好適な使用（例えば、治療医薬品、診断薬として、又はin vitro試薬として）のための通常的手段により大量に合成し得る。

10

【0068】

定義

特に特定されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は本発明が属する分野の当業者により普通に理解される意味を有する。本明細書に使用される以下の用語は特に明記されない限りそれらに特有の意味を有する。

20

“飽和突然変異誘発”又は“GSSM”という用語は、以下に詳しく記載されるように、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを使用して点突然変異をポリヌクレオチドに導入する方法を含む。一局面において、本発明の方法は“飽和突然変異誘発”又は“GSSM”による本発明のキメラ抗体コーディング配列の配列の全部又は一部の非確率的改変を更に含む。

“最適化誘導進化系”又は“最適化誘導進化”という用語は関連核酸配列、例えば、関連遺伝子のフラグメントを再アッセンブルするための方法を含み、以下に詳しく説明される。一局面において、本発明の方法は“最適化誘導進化系”による本発明のキメラ抗体コーディング配列の配列の全部又は一部の非確率的改変を更に含む。

30

“合成連結反応再アッセンブル”即ち“SLR”という用語はオリゴヌクレオチドフラグメントを非確率的様式でつなぐ方法を含み、以下に詳しく説明される。一局面において、本発明の方法は“合成連結反応再アッセンブル”即ち“SLR”による本発明のキメラ抗体コーディング配列の配列の全部又は一部の非確率的改変を更に含む。

“抗体”という用語は抗原又はエピトープに特異的に結合し得る、一つ以上の免疫グロブリン遺伝子に由来し、後にモデル化され、又は実質的にコードされたペプチドもしくはポリペプチド、又はこれらのフラグメントを含む。例えば、Fundamental Immunology, 第3編, W.E. Paul編集, Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97を参照のこと。抗体という用語は抗原を結合する能力を保持する抗原結合部分、即ち、“抗原結合部位”（例えば、フラグメント、サブシーケンス、相補性決定領域(CDR)）を含み、(i)VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる1価フラグメントである、Fabフラグメント、(ii)ヒンジ領域でジスルフィドブリッジにより結合された二つのFabフラグメントを含む2価フラグメントである、F(ab')₂フラグメント、(iii)VH及びCH1ドメインからなるFdフラグメント、(iv)抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFvフラグメント、(v)dAbフラグメント(Wardら, (1989) Nature 341:544-546)（これはVHドメインからなる）、及び(vi)単離された相補性決定領域(CDR)を含む。一本鎖抗体も“抗体”という用語に参照により含まれる。

40

【0069】

核酸の生成及び操作

本発明は複数のキメラ抗原結合ポリペプチドをコードするキメラ核酸のライブラリー及

50

びこれらのライブラリーを作製する方法を提供する。これらのライブラリーを作製することはラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)、カッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)、J領域ポリペプチドドメイン(VJ)、ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)、カッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)、抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(VH)、D領域ポリペプチドドメイン(VD)、J領域ポリペプチドドメイン(VJ)及び重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(CH)をコードする核酸を用意することを含む。

本発明をつくり、使用するのに必要とされるこれらの核酸及びその他の核酸は細胞から単離され、組換え生成され、又は合成により生成することができる。これらの配列は、例えば、cDNAライブラリーのクローニング及び発現、PCRによるメッセージ又はゲノムDNAの増幅等により単離し得る。本発明の方法を実施する際に、相同遺伝子が本明細書に記載されたように鋳型核酸を操作することにより改変し得る。本発明は当業界で知られているあらゆる方法もしくはプロトコル又は装置と連係して実施でき、これらは科学文献及び特許文献に良く記載されている。

10

20

30

40

50

【0070】

一般技術

本発明を実施するのに使用される核酸(RNA、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルス又はこれらのハイブリッドを問わない)は、種々の源から単離され、遺伝子操作され、増幅され、かつ/又は発現され/組換えにより生成されてもよい。これらの核酸から生成された組換えポリペプチドは個々に単離又はクローン化され、所望の活性について試験し得る。バクテリア、哺乳動物、酵母、昆虫又は植物細胞発現系を含む、あらゆる組換え発現系が使用し得る。

また、これらの核酸は、例えば、Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号に記載されたような公知の化学合成技術によりin vitro合成し得る。

核酸の操作のための技術、例えば、サブクローニング、連結反応、標識プローブ(例えば、クレノーポリメラーゼを使用するランダム-プライマー標識、ニック翻訳、増幅)、配列決定、ハイブリダイゼーション等が科学文献及び特許文献に良く記載されている。例えば、Sambrook編集、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (第二編), 1-3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel編集, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen編集, Elsevier, N.Y. (1993)を参照のこと。

核酸、ベクター、キャプシド、ポリペプチド等は当業者に公知の幾つかの一般手段のいずれかにより分析され、定量し得る。これらとして、例えば、分析生化学的方法、例えば、NMR、スペクトロフォトメトリー、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、及び高拡散クロマトグラフィー、種々の免疫学的方法、例えば、液体又はゲル沈殿反応、免疫拡散、イムノ電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着検定(ELISA)、イムノ蛍光アッセイ、サザン分析、ノーザン分析、ドット-プロット分析、ゲル電気泳動(例えば、SDS-PAGE)、核酸もしくは標的又はシグナル増幅方法、放射能標識、シンチレーションカウンティング、及びアフニティークロマトグラフィーが挙げられる。

【0071】

本発明の方法を実施するのに使用される核酸を得、操作する別の有益な手段はゲノムサンプルからクローン化し、所望により、例えば、ゲノムクローン又はcDNAクローンから単離又は増幅されたインサートをスクリーニングし、再クローン化することである。本発明

の方法に使用される核酸の源は、例えば、哺乳動物の人工染色体(MAC)(例えば、米国特許第5,721,118号、同第6,025,155号を参照のこと)、ヒト人工染色体(例えば、Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335を参照のこと)、酵母人工染色体(YAC)、バクテリア人工染色体(BAC)、P1人工染色体(例えば、Woon (1998) Genomics 50:306-316を参照のこと)、P1由来ベクター(PAC)(例えば、Kern (1997) Biotechniques 23:120-124を参照のこと)、コスミド、組換えウイルス、ファージ又はプラスミド中に含まれるゲノム又はcDNAライブラリーを含む。

核酸の増幅

本発明の方法を実施するに際して、ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)、
 カッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_C)、J領域ポリペプチドドメイン(V_J)
 、ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)、カッパー軽鎖定常領域ポリペプチド
 ドメイン(C_C)、抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)、D領域ポリペプチドドメ
 イン(V_D)、J領域ポリペプチドドメイン(V_J)及び重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)
 をコードする核酸が、例えば、増幅反応により生成され、再生し得る。増幅反応はまたこ
 れらのドメインと一緒に結合し、又は本発明のキメラ核酸をベクターにスプライシングす
 るのに使用し得る。増幅反応はまたサンプル中の核酸の量を定量し、核酸を標識し(例え
 ば、それをアレイ又はプロットに適用するために)、核酸を検出し、又はサンプル中の特
 定の核酸の量を定量するのに使用し得る。本発明の一面において、細胞又はcDNAライ
 ブラリーから分離されたメッセージが増幅される。当業者は好適なオリゴヌクレオチド増幅
 プライマーを選択し、設計し得る。増幅方法はまた当業界で公知であり、例えば、ポリメ
 ラーゼ連鎖反応、PCR(例えば、PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS,
 Innis編集, Academic Press, N.Y. (1990)及びPCR STRATEGIES (1995), Innis編集, Aca
 demic Press, Inc., N.Y.を参照のこと)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、Wu (1989)
 Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117
 を参照のこと)、転写増幅(例えば、Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173
 を参照のこと)、及び自己持続配列複製(例えば、Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA 87:1874を参照のこと)、Qレプリカーゼ増幅(例えば、Smith (1997) J. Cl
 in. Microbiol. 35:1477-1491を参照のこと)、自動化Qレプリカーゼ増幅アッセイ(
 例えば、Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271を参照のこと)並びにその他のRNA
 ポリメラーゼ媒介技術(例えば、NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario)、またBerger
 (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; 米国特許第4,683,195号及
 び同第4,683,202号; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564を参照のこと)を含む
 。

【0072】

免疫グロブリンコーディング配列

本発明はラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)、カッパー軽鎖可変領域ポリ
 ペプチドドメイン(V_C)、J領域ポリペプチドドメイン(V_J)、ラムダ軽鎖定常領域ポリ
 ペプチドドメイン(C_L)、カッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_C)、抗体重鎖可
 変領域ポリペプチドドメイン(V_H)、D領域ポリペプチドドメイン(V_D)、J領域ポリペプ
 チドドメイン(V_J)及び重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)を含むキメラ抗原結合ポリ
 ペプチド並びにそれらをコードするキメラ核酸を提供する。これらの配列はcDNA配列を含
 む、あらゆる遺伝子又はメッセージ配列からモデル化され、クローン化もしくは増幅され、
 又は誘導単離され得る。

B細胞の如き、リンパ球を含む、あらゆる細胞が抗原結合ポリペプチドコーディング配
 列の源として使用し得る。循環系、リンパ節又は脾臓中の再配置もしくは活性化されたB
 細胞又はプラズマ細胞が使用し得る。あらゆる脊椎動物が細胞源であってもよい。再配置
 遺伝子のレパートリーが前もって決められた結合特異性についてバイアスし得る。例えば
 、動物が再配置B細胞又はプラズマ細胞を分離する前に免疫し得る。これは高アフィニテ
 ーのリガンド結合ポリペプチドを生成する遺伝子物質について濃縮されたレパートリー
 を生成する。

【0073】

また、既に特性決定されたコーディング配列の後に免疫グロブリン配列をコードする核酸をモデル化でき、これらの多くが当技術分野で、例えば、Genbank配列として、又は、このような配列を単離するための配列もしくは方法について知られており、特性決定されている。例えば、米国特許第6,319,690号、同第6,291,161号、同第6,258,529号、同第6,214,984号、同第6,204,023号、同第6,068,840号、同第6,057,421号、同第5,891,438号、同第5,869,619号、同第5,861,499号、同第5,851,801号、同第5,821,123号を参照のこと。

核酸の改変

本発明の方法の一局面において、キメラ抗原結合ポリペプチドコーディング配列はそれらがコードするポリペプチドの性質を変化するように改変される。核酸は、本明細書に記載されたように、飽和突然変異誘発、最適化誘導進化系、合成連結反応再アッセンブル、又はこれらの組み合わせを含む、あらゆる手段により変化し得る。ランダムもしくは確率的方法、又は、非確率的、もしくは“誘導進化”方法が使用し得る。これらの核酸改変方法は特定ドメイン、例えば、ラムダ軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_L)、カッパー軽鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_C)、J領域ポリペプチドドメイン(V_J)、ラムダ軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_L)、カッパー軽鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_C)、抗体重鎖可変領域ポリペプチドドメイン(V_H)、D領域ポリペプチドドメイン(V_D)、J領域ポリペプチドドメイン(V_J)又は重鎖定常領域ポリペプチドドメイン(C_H)を標的とし得る。それらはまた標的抗原結合部位又はCDRをコードする特別な領域であってもよい。

更に、これらの抗体をコードする核酸は本明細書に記載された方法、例えば、本明細書に記載されたような塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又は一つ以上のヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製する方法により精製し得る。

【0074】

キメラ抗原結合ポリペプチドコーディング配列をコードする核酸は遺伝子部位飽和突然変異誘発(GSSM)、エラー-プローンPCR、シャッフリング、オリゴヌクレオチド誘導突然変異誘発、アッセンブルPCR、セクシュアルPCR突然変異誘発、in vivo突然変異誘発、カセット突然変異誘発、リカーシブ・アンサンブル突然変異誘発、指數的アンサンブル突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、遺伝子再アッセンブル、合成連結反応再アッセンブル(SLR)及びこれらの組み合わせを含む方法により変化し得る。本発明の方法により生成された核酸は組換え、リカーシブ配列組換え、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ウ

ラシル含有鑄型突然変異誘発、ギャップ二重らせん突然変異誘発、点ミスマッチ修復突然変異誘発、修復不全宿主株突然変異誘発、化学的突然変異誘発、放射性遺伝子突然変異誘発、欠失突然変異誘発、制限-選抜突然変異誘発、制限-精製突然変異誘発、人工遺伝子合成、アンサンブル突然変異誘発、キメラ核酸マルチマー生成及びこれらの組み合わせを含む方法により変化し得る。

遺伝子のランダム突然変異のための方法は当業界で公知である。例えば、米国特許第5,830,696号を参照のこと。例えば、突然変異原は組換えにより修復を受けやすいDNA分解を誘発するために、例えば、紫外線もしくはガンマ放射線、又は化学的突然変異原、例えば、マイトマイシン、亜硝酸、光活性化プロソラレンを単独で、又は組み合わせて含む。その他の化学的突然変異原として、例えば、重亜硫酸ナトリウム、亜硝酸、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン又はギ酸が挙げられる。その他の突然変異原はヌクレオチド前駆体の類似体、例えば、ニトロソグアニジン、5-プロモウラシル、2-アミノプリン、又はアクリジンである。これらの薬剤はヌクレオチド前駆体に代えてPCR反応に添加でき、それにより配列を突然変異し得る。インターカレーティング剤、例えば、プロフラビン、アクリフラビン、キナクリン等がまた使用し得る。

分子生物学の技術、例えば、ランダムPCR突然変異誘発(例えば、Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471を参照のこと)、又は、コンピナトリアル多重カセット突然変異誘発(例えば、Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196を参照のこと)が使用し得る。また、核酸、例えば、遺伝子が、ランダム、又は“確率的”断片化後に再アッセンブルし得る。例えば、米国特許第6,291,242号、同第6,287,862号、同第6,287,861

10

20

30

40

50

号、同第5,955,358号、同第5,830,721号、同第5,824,514号、同第5,811,238号、同第5,605,793号を参照のこと。単離され、かつ／又は改変された核酸によりコードされたポリペプチドが細胞へのそれらの再挿入の前に、例えば、キャピラリーアレイプラットフォームを使用することにより活性についてスクリーニングし得る。例えば、米国特許第6,280,926号、同第5,939,250号を参照のこと。

【0075】

飽和突然変異誘発、又は、GSSM

本発明の一局面において、非確率的遺伝子改変、“誘導進化方法”がキメラ抗原結合ポリペプチドコーディング配列を改変するのに使用し得る。この方法の変化が“遺伝子部位飽和突然変異誘発”、“部位飽和突然変異誘発”、“飽和突然変異誘発”又は単に“GSSM”と称されていた。それはその他の突然変異誘発方法と組み合わせて使用し得る。例えば、米国特許第6,171,820号、同第6,238,884号を参照のこと。一局面において、GSSMは鑄型ポリヌクレオチド及び複数のオリゴヌクレオチドを用意することを含み、夫々のオリゴヌクレオチドが鑄型ポリヌクレオチドに相同な配列を含み、それにより鑄型ポリヌクレオチドの特定配列を標的とし、また相同遺伝子の変種である配列を含み、鑄型ポリヌクレオチドをオリゴヌクレオチドとともに複製することにより非確率的变化を含む子孫ポリヌクレオチドを生成し、それにより相同遺伝子配列変化を含むポリヌクレオチドを生成する。

10

【0076】

一局面において、縮重N,N,G/T配列を含むコドンプライマーは、単一アミノ酸置換の全範囲が夫々のアミノ酸位置、例えば、改変されるように標的とされる酵素活性部位又はリガンド結合部位中のアミノ酸残基において提示される子孫ポリペプチドの組を生成するように、点突然変異をポリヌクレオチドに導入するのに使用される。これらのオリゴヌクレオチドは連続の第一相同配列、縮重N,N,G/T配列、及び、必要により、第二相同配列を含んでもよい。このようなオリゴヌクレオチドの使用からの下流の子孫翻訳産物はポリペプチドに沿って夫々のアミノ酸部位で全ての可能なアミノ酸変化を含む。何とならば、N,N,G/T配列の縮重が全ての20アミノ酸についてコドンを含むからである。

20

一局面において、一つのこのような縮重オリゴヌクレオチド（例えば、一つの縮重N,N,G/Tカセットを含む）が親ポリヌクレオチド鑄型中の夫々の元のコドンを含み、全範囲のコドン置換にかけるのに使用される。別の局面において、少なくとも二つの縮重カセットが親ポリヌクレオチド鑄型中の少なくとも二つの元のコドンを含み、全範囲のコドン置換にかけるのに使用される（同じオリゴヌクレオチド中、又は同じではないポリヌクレオチド中）。例えば、一つより多いN,N,G/T配列が一つのオリゴヌクレオチド中に含まれて一つより多い部位でアミノ酸突然変異を導入し得る。この複数のN,N,G/T配列は直接に連続であってもよく、又は一つ以上の付加的なヌクレオチド配列により分離し得る。別の局面において、付加及び欠失を導入するのに使用し得るオリゴヌクレオチドが単独で、又はN,N,G/T配列を含むコドンと組み合わせて使用されてアミノ酸付加、欠失、及び／又は置換のあらゆる組み合わせ又は順列を導入し得る。

30

【0077】

一局面において、二つ以上の連続アミノ酸位置の同時突然変異誘発が連続N,N,G/Tトリプレット、即ち、縮重(N,N,G/T)_n配列を含むオリゴヌクレオチドを使用して行なわれる。別の局面において、N,N,G/T配列よりも少ない縮重を有する縮重カセットが使用される。例えば、唯一のNを含む縮重トリプレット配列を使用する（例えば、オリゴヌクレオチド中で）ことが或る場合に望ましいかもしれない、前記Nはトリプレットの第一位置、第二位置又は第三位置にあってもよい。これらのあらゆる組み合わせ及び順列を含むあらゆるその他の塩基がトリプレットの残りの二つの位置で使用し得る。また、縮重N,N,Nトリプレット配列を使用する（例えば、オリゴ中で）ことが或る場合に望ましいかもしれない。

40

一局面において、縮重トリプレット（例えば、N,N,G/Tトリプレット）の使用がポリペプチド中の夫々の各アミノ酸位置への全範囲の可能な天然アミノ酸（合計20のアミノ酸について）の系統的かつ容易な生成を可能にする（別の局面において、この方法はまたアミノ酸残基、又はコドン、位置当りの全てより少ない可能な置換の生成を含む）。例えば、

50

100アミノ酸ポリペプチドについて、2000の異なる種（即ち、位置当り20の可能なアミノ酸X100のアミノ酸位置）が生成し得る。縮重N,N,G/Tトリプレットを含むオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの組の使用により、32の個々の配列が全ての20の可能な天然アミノ酸をコードし得る。こうして、親ポリヌクレオチド配列が少なくとも一つのこのようなオリゴヌクレオチドを使用して飽和突然変異誘発にかけられる反応容器中で、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成される。対照的に、部位誘導突然変異誘発における非縮重オリゴヌクレオチドの使用は反応容器当り唯一の子孫ポリペプチド産物をもたらす。非縮合オリゴヌクレオチドは必要により開示された縮重プライマーと組み合わせて使用されてもよい。例えば、非縮合オリゴヌクレオチドが研究ポリヌクレオチド中で特異的・点突然変異を生じるのに使用し得る。これは特異的サイレント点突然変異、相当するアミノ酸変化をもたらす点突然変異、及び停止コドンの生成及びポリペプチドフラグメントの相当する発現を生じる点突然変異を生じるための一つの手段を与える。

10

【0078】

一局面において、夫々の飽和突然変異誘発反応容器は少なくとも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み、その結果、全ての20の天然アミノ酸が親ポリヌクレオチド中で突然変異誘発されたコドン位置に相当する一つの特異アミノ酸位置で提示される（その他の局面は全ての20より少ない天然組み合わせを使用する）。夫々の飽和突然変異誘発反応容器から生成された32倍の縮重子孫ポリペプチドがクローン増幅にかけられ（例えば、発現ベクターを使用して、好適な宿主、例えば、E. coli宿主にクローン化され）、発現スクリーニングにかけられる。個々のポリペプチドが有利な性質の変化（親ポリペプチドと較べた場合、例えば、抗原に対する増大されたアフィニティー又は結合活性）を示すと同定される（例えば、スクリーニングにより）場合、それが配列決定されてその中に含まれる相当する有利なアミノ酸置換を同定し得る。

20

一局面において、本明細書に開示された飽和突然変異誘発を使用して親ポリペプチド中の夫々の各アミノ酸位置を突然変異誘発した後に、有利なアミノ酸変化が一つより多いアミノ酸位置で同定されることがある。これらの有利なアミノ酸置換の全部又は一部の組み合わせを含む一つ以上の新しい子孫分子が生成し得る。例えば、2つの特定の有利なアミノ酸変化がポリペプチド中の3つのアミノ酸位置の夫々で同定される場合、順列は夫々の位置（最初のアミノ酸からの変化なし、及び二つの有利な変化の夫々）及び3つの位置で3の可能性を含む。こうして、既に試験された7（6の単一点突然変異（3つの位置の夫々で2）及びいずれかの位置における変化なし）を含めて、3x3x3即ち合計27の可能性がある。

30

別の局面において、部位飽和突然変異誘発が配列を変化するための別の確率的手段又は非確率的手段、例えば、合成連結反応再アッセンブル（以下を参照のこと）、シャッフリング、キメラ化、組換え並びにその他の突然変異誘発方法及び突然変異誘発剤と一緒に使用し得る。本発明は反復様式の、飽和突然変異誘発を含む、あらゆる一つ以上の突然変異誘発方法の使用を提供する。

【0079】

合成連結反応再アッセンブル(SLR)

40

キメラ抗原結合ポリペプチドコーディング配列を改変するのに使用し得る、別の非確率的遺伝子改変、“誘導進化方法”は“合成連結反応再アッセンブル”、又は単に“SLR”と称されていた。SLRはオリゴヌクレオチドフラグメントを一緒に非確率的につなぐ方法である。この方法は核酸ビルディングブロックがシャッフルされず、鎖状体形成されず、又はランダムにキメラ化されないが、むしろ非確率的にアッセンブルされるという点で確率的オリゴヌクレオチドシャッフリングとは異なる。例えば、1999年6月14日出願された“誘導進化における合成連結反応再アッセンブル”という発明の名称の米国特許出願第(USSN)09/332,835号(“USSN 09/332,835”)を参照のこと。一局面において、SLRは(a)鋳型ポリヌクレオチドを用意する工程(その鋳型ポリヌクレオチドは相同遺伝子をコードする配列を含む)、(b)複数のビルディングブロックポリヌクレオチドを用意する工程(

50

そのビルディングブロックポリヌクレオチドは前もって決められた配列で鋳型ポリヌクレオチドとクロスオーバー再アッセンブルするように設計され、ビルディングブロックポリヌクレオチドは相同遺伝子の変種である配列及び変種配列に隣接する鋳型ポリヌクレオチドに相同な配列を含む)、(c)ビルディングブロックポリヌクレオチドを鋳型ポリヌクレオチドと一緒にする工程(その結果、ビルディングブロックポリヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドとクロスオーバー再アッセンブルして相同遺伝子配列変化を含むポリヌクレオチドを生成する)を含む。

SLRは再配置されるポリヌクレオチド間の高レベルの相同性の存在に依存しない。こうして、この方法は 10^{100} を超える異なるキメラを含む子孫分子のライブラリー(又は組)を非確率的に生成するのに使用し得る。SLRは 10^{100} を超える異なる子孫キメラを含むライブラリーを生成するのに使用し得る。こうして、本発明の局面は設計により選択される全体のアッセンブル順序をシェーブする最終のキメラ核酸分子の組を生成する非確率的方法を含む。この方法は使用可能な相互に適合性の連結可能な末端を有する複数の特定核酸ビルディングブロックを設計により生成する工程、及びこれらの核酸ビルディングブロックをアッセンブルする工程(その結果、設計された総合のアッセンブル順序が得られる)を含む。

10

【0080】

アッセンブルされる核酸ビルディングブロックの相互に適合性の連結可能な末端は、それらがビルディングブロックが前もって決められた順序で結合されることを可能にする場合に、このタイプの順序づけされたアッセンブルに“使用可能”であると考えられる。こうして、核酸ビルディングブロックが結合し得る全体のアッセンブル順序は連結可能な末端の設計により特定される。一つより多いアッセンブル工程が使用される場合、核酸ビルディングブロックが結合し得る全体のアッセンブル順序はまた一つ以上のアッセンブル工程の連続の順序により特定される。一局面において、アニールされたビルディング片が酵素、例えば、リガーゼ(例えば、T4 DNAリガーゼ)で処理されてビルディング片の共有結合を生じさせる。

20

一局面において、オリゴヌクレオチドビルディングブロックの設計は最終のキメラポリヌクレオチド分子の子孫組を生成するための基礎として利用できる前駆核酸配列鋳型の組を分析することにより得られる。こうして、これらの親オリゴヌクレオチド鋳型は突然変異誘発され、例えば、キメラ化され、又はシャッフルされる核酸ビルディングブロックの設計を助ける配列情報の源として利用できる。

30

この方法の一局面において、複数の親核酸鋳型の配列が一つ以上の境界画定点を選択するために整列される。境界画定点は相同性の領域に位置づけることができ、一つ以上のヌクレオチドを含む。これらの境界画定点は前駆鋳型の少なくとも二つにより共有されることが好ましい。境界画定点はそれにより親ポリヌクレオチドを再配置するために生成されるオリゴヌクレオチドビルディングブロックの境界を表すのに使用し得る。前駆分子中で同定され、選択された境界画定点は最終のキメラ子孫分子のアッセンブルにおいて潜在的なキメラ化位置として利用できる。境界画定点は少なくとも二つの親ポリヌクレオチド配列により共有された相同性の領域(少なくとも一つの相同ヌクレオチド塩基を含む)であってもよい。また、境界画定点は親ポリヌクレオチド配列の少なくとも半分により共有される相同性の領域であってもよく、又はそれは親ポリヌクレオチド配列の少なくとも2/3により共有される相同性の領域であってもよい。更に好ましくは、使用可能な境界画定点は親ポリヌクレオチド配列の少なくとも3/4により共有される相同性の領域であり、又はそれは親ポリヌクレオチド配列の殆ど全てにより共有し得る。一局面において、境界画定点は親ポリヌクレオチド配列の全てにより共有される相同性の領域である。

40

【0081】

一局面において、連結反応再アッセンブル方法は子孫キメラポリヌクレオチドの完全ライブラリーを生成するために網羅的に行なわれる。換言すれば、核酸ビルディングブロックの全ての可能な順序づけられた組み合わせが最終のキメラ核酸分子の組中で提示される。同時に、別の実施態様において、夫々の組み合わせにおけるアッセンブル順序(即ち、

50

夫々の最終のキメラ核酸の5'-3'配列中の夫々のビルディングブロックのアッセンブルの順序)は上記のような設計(又は非確率的)による。本発明の非確率的性質のために、望ましくない副生物の可能性が大いに低下される。

別の局面において、連結反応再アッセンブル方法は系統的に行なわれる。例えば、その方法は系統的に、例えば、一つづつスクリーニングし得る区画で、子孫分子の系統的に区画化されたライブラリーを生成するために行なわれる。換言すれば、本発明は、逐次段階的アッセンブル反応の選択的かつ慎重な使用と対にされた、特定の核酸ビルディングブロックの選択的かつ慎重な使用により、子孫産物の特定の組が幾つかの反応容器の夫々中でつくられる設計が得られることを提供する。これは系統的な試験及びスクリーニング操作が行なわれることを可能にする。こうして、これらの方法は潜在的に非常に多数の子孫分子が一層小さいグループで系統的に調べられることを可能にする。

特に低レベルの相同性が前駆分子間にある場合、高度に融通性であり、同様に徹底的かつ系統的である様式でキメラ化を行なうその能力のために、これらの方法は多数の子孫分子を含むライブラリー(又は組)の生成を与える。本発明の連結反応再アッセンブルの非確率的性質のために、生成された子孫分子は設計により選択される総合のアッセンブル順序を有する最終のキメラ核酸分子のライブラリーを含むことが好ましい。

飽和突然変異誘発及び最適化誘導進化方法はまたこれらの量の異なる子孫分子種を生成するのに使用し得る。

【0082】

本発明は境界画定点、核酸ビルディングブロックのサイズ及び数、並びに結合のサイズ及び設計の選択に関する選択及び制御の自由度を与えることが認められる。更に、分子間相同性に関する要件が本発明の操作性について高度に緩和されることが認められる。実際に、境界画定点は分子間相同性が殆ど又は全くない領域においてさえも選択し得る。例えば、コドンウォブル、即ち、コドンの縮重のために、ヌクレオチド置換が相当する前駆鋳型中に最初にコードされたアミノ酸を変化しないで核酸ビルディングブロックに導入し得る。また、コドンは最初のアミノ酸のコーディングが変化されるように変化し得る。本発明はこのような置換が分子間相同の境界画定点の発生率を増大し、こうして増大された数の結合がビルディングブロック間で得られるために核酸ビルディングブロックに導入し得ることを提供し、これは順に多数の子孫キメラ分子が生成されることを可能にする。

別の局面において、ビルディングブロックが生成される工程の合成的性質がその後に必要により *in vitro* の方法(例えば、突然変異誘発による)又は *in vivo* の方法(例えば、宿主生物の遺伝子スプライシング能力を利用することによる)で除去されてもよいヌクレオチド(例えば、一つ以上のヌクレオチド(これらは、例えば、コドンもしくはイントロン又は調節配列であってもよい))の設計及び導入を可能にする。多くの場合、これらのヌクレオチドの導入がまた使用可能な境界画定点を生じるという潜在的利益に加えて多くのその他の理由のために望ましいかもしれないことが認められる。

こうして、別の局面によれば、核酸ビルディングブロックがイントロンを導入するのに使用し得る。こうして、機能性イントロンが本明細書に記載された方法に従って製造された人工遺伝子に導入し得る。人工導入された一つ以上のイントロンは自然に生じるイントロンが遺伝子スプライシングに機能的に利用できる方法で遺伝子スプライシングについて宿主細胞中で大いに機能性であり得る。

【0083】

最適化誘導進化系(Optimized Directed Wvolution System)

本発明の方法を実施するに際して、抗原結合ポリペプチドをコードするキメラ核酸はまた最適化誘導進化系を含む方法により改変し得る。最適化誘導進化は組換えによる核酸の誘導分子進化を可能にする還元的再構築、組換え及び選択の反復サイクルの使用に関する。最適化誘導進化は進化されたキメラ配列の大集団の生成を可能にし、生成された集団は前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有する配列について有意に濃縮される。

クロスオーバーイベントは一つの親変種から別の親変種へ配列のシフトが生じるキメラ

配列中の位置である。このような位置は通常二つの親からのオリゴヌクレオチドが一緒につながれて単一配列を形成する結合点にある。この方法はオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にし、その結果、配列の最終のキメラ集団が選択された数のクロスオーバーイベントについて濃縮される。これは前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有するキメラ変種を選択することについて一層の制御を与える。

加えて、この方法はその他の系と較べて多量の可能なタンパク質変種スペースを研究するのに便利な手段を与える。既に、例えば、反応中に 10^{13} のキメラ分子を生成した場合、このような多数のキメラ変種を特別な活性について試験することは極めて困難であろう。更に、子孫集団のかなりの部分がおそらく増大されたレベルの特別な活性を有しそうなものタンパク質を生じる非常に多数のクロスオーバーイベントを有するであろう。これらの方法を使用することにより、キメラ分子の集団が特別な数のクロスオーバーイベントを有するこれらの変種について濃縮し得る。こうして、依然として反応中に 10^{13} のキメラ分子を生成することができるが、更なる分析に選ばれた分子の夫々がおそらく、例えば、三つのクロスオーバーイベントのみを有する。得られる子孫集団が前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有するように偏向されるので、キメラ分子間の機能性変動に関する境界が減少される。これは最初の親ポリヌクレオチドからのどのオリゴヌクレオチドが特別な形質に影響する原因となり得るのかを計算する場合に一層取り扱いやすい数の変動を与える。

10

【0084】

キメラ子孫ポリヌクレオチド配列を作製するための一つの方法は夫々の親配列のフラグメント又は部分に相当するオリゴヌクレオチドを作製することである。夫々のオリゴヌクレオチドはオーバーラップの固有な領域を含むことが好ましく、その結果、オリゴヌクレオチドと一緒に混合することにより正確な順序でアッセンブルされた夫々のオリゴヌクレオチドフラグメントを有する新しい変種が生じる。付加的な情報がまたUSSN 09/332,835に見られる。夫々の親変種について生成されたオリゴヌクレオチドの数は最終的に生じられるキメラ分子中に得られるクロスオーバーの合計数に対する関係を有する。例えば、三つの親ヌクレオチド配列変種が、例えば、高温で一層大きい活性を有するキメラ変種を見つけるために連結反応を受けるように用意し得る。一例として、50のオリゴヌクレオチド配列の組が夫々の親変種の夫々の部分に応じて生成し得る。それ故、連結反応再アッセンブル方法中に50までのクロスオーバーイベントがキメラ配列の夫々内にあり得る。生成されたキメラポリヌクレオチドの夫々が夫々の親変種からのオリゴヌクレオチドを交互の順序で含む可能性は非常に低い。夫々のオリゴヌクレオチドフラグメントが同じモル量で連結反応中に存在する場合、おそらく或る位置では、同じ親ポリヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドが次に互いにつながり、こうしてクロスオーバーイベントを生じない。夫々の親からの夫々のオリゴヌクレオチドの濃度がこの例で連結反応工程中に一定に保たれる場合、同じ親変種からのオリゴヌクレオチドがキメラ配列内につながり、クロスオーバーを生じないチャンスが(3つの親と仮定して)1/3ある。

20

30

それ故、可能性密度関数(PDF)が一定数の親変種、夫々の変種に相当するオリゴヌクレオチドの数、及び連結反応中の夫々の工程中の夫々の濃度を考慮して連結反応中の夫々の工程におそらく生じるクロスオーバーイベントの集団を予測するために測定し得る。PDFを測定した後の統計及び数学が以下に記載される。これらの方法を利用することにより、このような可能性密度関数を計算することができ、こうして特別な連結反応から生じるクロスオーバーイベントの前もって決められた数についてキメラ子孫集団を濃縮することができる。更に、目標数のクロスオーバーイベントが前もって決められ、次いでその系が前もって決められた数のクロスオーバーイベントに集中する可能性密度関数を生じるために連結反応中の夫々の工程中の夫々の親オリゴヌクレオチドの出発量を計算するようにプログラミングされる。

40

【0085】

これらの方法は組換えによりポリペプチドをコードする核酸の誘導分子進化を可能にする還元的再構築、組換え及び選択の反復サイクルの使用に関する。この系は進化したキメ

50

ラ配列の大集団の生成を可能にし、生成された集団は前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有する配列について有意に濃縮される。クロスオーバーイベントは配列のシフトが一つの親変種から別の親変種へと生じるキメラ配列中の位置である。このような位置は通常二つの親からのオリゴヌクレオチドが一緒につながれて単一配列を形成する結合部にある。この方法はオリゴヌクレオチド配列の正確な濃度の計算を可能にし、その結果、配列の最終のキメラ集団が選択された数のクロスオーバーイベントについて濃縮される。これは前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有するキメラ変種を選択することについて一層の制御を与える。

加えて、これらの方法はその他の系と較べて多量の可能なタンパク質変種スペースを研究するのに便利な手段を与える。本明細書に記載された方法を使用することにより、キメラ分子の集団が特別な数のクロスオーバーイベントを有するこれらの変種について濃縮し得る。こうして、依然として反応中に 10^{13} のキメラ分子を生成することができるが、更なる分析に選ばれた分子の夫々がおそらく、例えば、三つのクロスオーバーイベントのみを有する。得られる子孫集団が前もって決められた数のクロスオーバーイベントを有するように傾斜されるので、キメラ分子間の機能性変動に関する境界が減少される。これは最初の親ポリヌクレオチドからのどのオリゴヌクレオチドが特別な形質に影響する原因となり得るのかを計算する場合に一層取り扱いやすい数の変動を与える。

10

【0086】

一局面において、その方法は夫々の親配列のフラグメント又は部分に相当するオリゴヌクレオチドを生じることによりキメラ子孫ポリヌクレオチド配列を生じる。夫々のオリゴヌクレオチドはオーバーラップの固有な領域を含むことが好ましく、その結果、オリゴヌクレオチドと一緒に混合することにより正確な順序でアッセンブルされた夫々のオリゴヌクレオチドフラグメントを有する新しい変種が生じる。またUSSN 09/332,835を参照のこと。

20

夫々の親変種について生成されたオリゴヌクレオチドの数は最終的に生じられるキメラ分子中に得られるクロスオーバーの合計数に対する関係を有する。例えば、三つの親ヌクレオチド配列変種が、例えば、高温で一層大きい活性を有するキメラ変種を見つけるために連結反応を受けるように用意し得る。一例として、50のオリゴヌクレオチド配列の組が夫々の親変種の夫々の部分に応じて生成し得る。それ故、連結反応再アッセンブル方法中に50までのクロスオーバーイベントがキメラ配列の夫々内にあり得る。生成されたキメラポリヌクレオチドの夫々が夫々の親変種からのオリゴヌクレオチドを交互の順序で含む可能性は非常に低い。夫々のオリゴヌクレオチドフラグメントが同じモル量で連結反応中に存在する場合、おそらく或る位置では、同じ親ポリヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドが次に互いにつながり、こうしてクロスオーバーイベントを生じない。夫々の親からの夫々のオリゴヌクレオチドの濃度がこの例で連結反応工程中に一定に保たれる場合、同じ親変種からのオリゴヌクレオチドがキメラ配列内につながり、クロスオーバーを生じないチャンスが(3つの親と仮定して)1/3ある。

30

それ故、可能性密度関数(PDF)が一定数の親変種、夫々の変種に相当するオリゴヌクレオチドの数、及び連結反応中の夫々の工程中の夫々の変種の濃度を考慮して連結反応中の夫々の工程におそらく生じるクロスオーバーイベントの集団を予測するために測定し得る。PDFを測定した後の統計及び数学が以下に記載される。このような可能性密度関数を計算することができ、こうして特別な連結反応から生じるクロスオーバーの前もって決められた数についてキメラ子孫集団を濃縮することができる。更に、目標数のクロスオーバーイベントが前もって決められ、次いでその系が前もって決められた数のクロスオーバーイベントに集中する可能性密度関数を生じるために連結反応中の夫々の工程中の夫々の親オリゴヌクレオチドの発量を計算するようにプログラミングされる。

40

【0087】

クロスオーバーイベントの測定

本発明の実施態様は所望のクロスオーバー可能性密度関数(PDF)、再アッセンブルされる親遺伝子の数、及び再アッセンブル中のフラグメントの数をインプットとして受け取る

50

システム及びソフトウェアを含む。このプログラムのアウトプットは再アッセンブルされた遺伝子を生じるための処方を決めるのに使用し得る“フラグメントPDF”、及びこれらの遺伝子の推定クロスオーバーPDFである。本明細書に記載されたプロセッシングはMATLAB（登録商標）（The Mathworks, Natick, Massachusetts）、技術的演算のためのプログラミング言語及び開発環境で行なわれることが好ましい。

反復方法

本発明の方法を実施するのに際して、その方法は反復して繰り返し得る。例えば、変化された抗原結合性を担う核酸が同定され、再単離され、再度改変され、結合活性について再試験される。その方法は所望のポリペプチドが操作されるまで反復して繰り返し得る。本発明は単一ラウンドのスクリーニングのみに限定されない。どのオリゴヌクレオチドが所望の活性に最も関連しているのかを決める反復実施が特別な性質又は活性を与え得る可能なタンパク質変種の全ての一層有効な研究を可能にする。

10

【0088】

突然変異誘発されたオリゴヌクレオチド

最適化誘導進化方法はそれらの親ポリヌクレオチド配列に100%忠実度を有するオリゴヌクレオチドを使用し得るが、このレベルの忠実度は必要とされない。例えば、三つの関連親ポリヌクレオチドの組が、例えば、変化された結合アフィニティー又は特異性を有する抗体を生じるために連結反応再アッセンブルを受けるのに選ばれる場合、特異なオーバーラップ領域を有するオリゴヌクレオチドの組が通常の方法により合成し得る。しかしながら、突然変異誘発されたオリゴヌクレオチドの組がまた合成し得る。これらの突然変異誘発されたオリゴヌクレオチドがサイレント、保存的、又は非保存的アミノ酸をコードするように設計されることが好ましい。

20

サイレント突然変異に入るという選択がなされ、例えば、ヌクレオチド相同性の領域を二つのフラグメントに加えるが、最終の翻訳タンパク質に影響しないかもしれない。非保存的又は保存的置換はこのような変化が、得られるポリペプチドの機能を如何に変化するかを測定するためになされる。これは、例えば、一つのオリゴヌクレオチドフラグメント中の突然変異がペプチドの活性を増大するための原因であったことが測定される場合に行ない得る。突然変異誘発されたオリゴヌクレオチド（例えば、それらの親と異なるヌクレオチド配列を有するもの）を合成することにより、ペプチド又はタンパク質配列への得られる改変がペプチド又はポリペプチドの活性に如何に影響するかを制御された様式で研究することができる。

30

【0089】

突然変異誘発されたフラグメントを使用して核酸配列の変種を作製するための別法は最初に複数の核酸配列を整列して、前記変種の大半に保存されるが前記変種の全てには保存されない変種内の境界画定部位を決定することを含む。次いで保存された核酸配列の第一配列フラグメントの組が生成され、フラグメントが境界画定点で互いに結合する。保存されない核酸配列のフラグメントの第二組がその後、例えば、核酸シンセサイザーにより生成される。しかしながら、保存されない配列は第二フラグメントが前記第一フラグメントと同じヌクレオチド配列を境界画定部位に有するようにそれらの境界画定部位に突然変異を有するように生成される。これは保存されない配列が連結反応中に他の親配列に依然としてハイブリダイズすることを可能にする。フラグメントが一旦生成されると、クロスオーバーイベントの所望の数が変種の夫々について選ばれる。次いで第一フラグメント及び第二フラグメントの夫々の量が計算され、その結果、計算された量の第一フラグメント及び第二フラグメントの間の連結反応/インキュベーション反応が所望の数のクロスオーバーイベントを有する子孫分子を生じるであろう。

40

スクリーニング方法及び装置

本発明の方法を実施し、本発明のキメラ抗原結合ポリペプチドの性質を測定する際に、あらゆる方法又は装置が使用し得る。

キャピラリーアレイ

キャピラリーアレイ、例えば、GIGAMATRIXTM（ダイバーサ社、サンジエゴ、CA）が本発

50

明のポリペプチド及び核酸を含む種々の組成物をスクリーニングし、又は監視するのに使用し得る。キャピラリーアレイはサンプルを保持し、スクリーニングするのに有効な系を与える。例えば、サンプルスクリーニング装置は隣接キャピラリーのアレイに形成された複数のキャピラリーを含んでもよく、夫々のキャピラリーがサンプルを保持するための管腔を形成する少なくとも一つの壁を含む。その装置はアレイ中の隣接キャピラリーの間に配置された間隙材料、及び間隙材料内に形成された一つ以上の基準表示を更に含んでもよい。サンプルをスクリーニングするためのキャピラリー（そのキャピラリーはキャピラリーのアレイ中に結合されるのに適している）は、サンプルを保持するための管腔を形成する第一壁、及びサンプルを励起するために管腔に与えられる励起エネルギーをフィルターするための、フィルター材料から形成された第二壁を含んでもよい。

10

【0090】

ポリペプチド又は核酸、例えば、抗体がキャピラリーアレイのキャピラリーの少なくとも一部への第一成分に導入し得る。キャピラリーアレイの夫々のキャピラリーは第一成分を保持し、気泡を第一成分の後にキャピラリーに導入するための管腔を形成する少なくとも一つの壁を含んでもよい。第二成分がキャピラリーに導入でき、第二成分が気泡により第一成分から分離される。関係するサンプルが検出可能な粒子で標識された第一液体としてキャピラリーアレイのキャピラリーに導入でき、キャピラリーアレイの夫々のキャピラリーが第一液体及び検出可能な粒子を保持するための管腔を形成する少なくとも一つの壁を含み、その少なくとも一つの壁が検出可能な粒子を少なくとも一つの壁に結合するための結合材料で被覆される。その方法は第一液体をキャピラリー管から除去し（結合された検出可能な粒子がキャピラリー内に維持される）、第二液体をキャピラリー管に導入することを更に含んでもよい。

20

キャピラリーアレイは管腔を形成する少なくとも一つの外壁を含む複数の個々のキャピラリーを含んでもよい。キャピラリーの外壁は一緒に融着された一つ以上の壁であってもよい。同様に、壁が液体又はサンプルの保持のための管腔を形成する限り、壁は円筒形、正方形、六角形又はあらゆるその他の幾何学的形状である管腔を形成し得る。キャピラリーアレイのキャピラリーは接近して一緒に保持されて平面状構造を形成し得る。キャピラリーは、並んで融着され（例えば、キャピラリーがガラス製である場合）、接着され、結合され、又はクランプされることにより、一緒に結合し得る。キャピラリーアレイはあらゆる数の個々のキャピラリー、例えば、100から4,000,000までの範囲のキャピラリーから形成し得る。キャピラリーアレイは一緒に結合された約100,000以上の個々のキャピラリーを有するマイクロタイタ・プレートを形成し得る。

30

【0091】

アレイ、又は“バイオチップ”

本発明の一局面において、本発明のキメラポリペプチド又は核酸がアレイ、又は“バイオチップ”へのそれらの固定により分析し得る。また、抗原結合ポリペプチドが抗原をアレイに固定することによりスクリーニングし得る。本発明の方法を実施するのに際して、既知のアレイ及びアレイをつくり、使用方法が、例えば、米国特許第6,277,628号、同第6,277,489号、同第6,261,776号、同第6,258,606号、同第6,054,270号、同第6,048,695号、同第6,045,996号、同第6,022,963号、同第6,013,440号、同第5,965,452号、同第5,959,098号、同第5,856,174号、同第5,830,645号、同第5,770,456号、同第5,632,957号、同第5,556,752号、同第5,143,854号、同第5,807,522号、同第5,800,992号、同第5,744,305号、同第5,700,637号、同第5,556,752号、同第5,434,049号に記載されたように、全部もしくはは一部、又はこれらの変化で組み込まれてもよい。また、例えば、WO 99/51773、WO 99/09217、WO 97/46313、WO 96/17958を参照のこと。また、例えば、Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407; Bowtell (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32を参照のこと。また公表された米国特許出願第20010018642号、同第20010019827号、同第20010016322号、同第20010014449号、同第20010014448号、同第20010012537号、同第20010008765号を参照のこと。

40

50

【 0 0 9 2 】

抗体及びイムノプロット

本発明の一面において、動物が抗原結合配列をコードする核酸の単離前に免疫される。免疫化、抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体）の産生及び単離の方法が当業者に知られており、科学文献及び特許文献に記載されている。例えば、Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (編集) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (第7編) Lange Medical Publications, Los Altos, CA (“Stites”); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (第2編) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照のこと。抗体はまた、例えば、動物を使用する従来の *in vivo* 方法に加えて、ファージディスプレイライブラリーを発現する組換え抗体結合部位を使用して、*in vitro* で生成し得る。例えば、Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45を参照のこと。

10

細胞の源及び細胞の培養

あらゆる脊椎動物細胞が抗原結合ポリペプチドをコードする核酸の源として使用し得る。先に注目されたように、免疫グロブリンコーディング配列が免疫系の細胞、例えば、B細胞又はプラズマ細胞から単離し得る。キメラ又は改変抗原結合ポリペプチドコーディング配列が一旦生成されると、それがあらゆる細胞、例えば、バクテリア、始原菌、哺乳動物、酵母、菌類、昆虫又は植物の細胞中で発現し得る。一面において、細胞は個体、例えば、患者から採取された組織又は液体からのものであってもよい。細胞は、例えば、リンパもしくはリンパ節サンプル、血清、血液、帯血、CSF又は骨髓吸入、糞サンプル、唾液、涙、組織及び外科バイオプシー、針又はパンチバイオプシー等からのものであってもよい。

20

細胞を成長させ、管理するためのあらゆる装置、例えば、バイオリアクター又は発酵槽が使用し得る。例えば、米国特許第6,242,248号、同第6,228,607号、同第6,218,182号、同第6,174,720号、同第6,168,949号、同第6,133,022号、同第6,133,021号、同第6,048,721号、同第5,660,977号、同第5,075,234号を参照のこと。

【 0 0 9 3 】

遺伝子ワクチン

本発明は本発明のライブラリーから選ばれたキメラ核酸を含む遺伝子ワクチンを提供する。これらの遺伝子ワクチンは核酸又は免疫グロブリン媒介免疫調節に使用し得る。本発明は確率的（例えば、ポリヌクレオチドシャッフリング&中断合成）及び非確率的ポリヌクレオチド再アッセンブルによる遺伝子ワクチンの発生のための種々のアプローチを提供する。

30

遺伝子ワクチンはそれが導入される一種以上の哺乳動物細胞及び生物に医療上有益な表現型効果を生じる外因性ポリヌクレオチドである。遺伝子ワクチンは“裸”の核酸の形態であってもよく、又はベクターとしてであってもよい。ベクター又は核酸は複製起点を有してもよく、又は有しなくてもよい。例えば、患者への投与の前に十分な量のベクターを得るために複製起点をベクター中に含んでベクターの増殖を可能にすることが有益であるかもしれない。ベクターが宿主染色体DNAに組込み、又は宿主mRNAもしくはDNAに結合するように設計される場合、又は宿主中の複製がその他の点で望ましくない場合、複製起点が投与の前に除去でき、又はベクター生成に使用される細胞中で機能するが、標的細胞中で機能しない起点が使用し得る。しかしながら、本明細書に説明された状況の幾つかを含む、或る状況では、遺伝子ワクチンベクターが適当な宿主細胞中で複製し得ることが望ましい。

40

【 0 0 9 4 】

遺伝子ワクチン投与に使用されるベクターはウイルス又は非ウイルスであってもよい。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。例示のベクターとして、例えば、アデノウイルスをベースとするベクター（Cantwell (1996) Blood 88:4676-46

50

83; Ohashi (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1287-1292)、エプスタイン・バールウイルスをベースとするベクター (Mazda (1997) J. Immunol. Methods 204:143-151)、アデノウイルス関連ウイルスベクター、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) 及び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。非ウイルスベクター、典型的にはdsDNAは裸のDNAとして導入でき、又は導入増進ビヒクル、例えば、受容体認識タンパク質、リポソーム、リポアミン、もしくは陽イオン脂質と混在して導入し得る。このDNAは当業界で公知の種々の技術を使用して細胞に導入し得る。例えば、裸のDNAは細胞膜と融合し、又はエンドサイトーシスされるリポソームの使用により、即ち、エンドサイトーシスをもたらす細胞の表面膜タンパク質受容体に結合する、リポソームに結合され、又はDNAに直接結合されたリガンドを使用することにより送出し得る。また、細胞は透過可能にされて、宿主細胞を損傷しないで、細胞へのDNAの輸送を増進し得る。DNAを細胞に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を使用することができる。更に、DNAは機械的手段、例えば、圧力により送出手されるDNAで被覆された金又はその他の粒子による皮膚の衝撃により送出し得る。裸のDNAを細胞に送出手するためのこれらの操作がin vivoで有益である。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有し、又はそれ以外の点で特定の器官に優先的に誘導される場合に、リポソームを使用することにより、in vivoの標的細胞/器官へのDNAの導入を提供し得る。

10

20

【実施例】

【0095】

以下の実施例は特許請求された発明を説明するために示されるものであり、本発明を限定するためではない。

実施例1：本発明の例示のライブラリー及び方法を使用する遺伝子構築

下記の実施例には本発明の例示のオリゴヌクレオチドライブラリー及び方法を使用して、核酸、遺伝子を構築することが記載される。

本発明の方法を使用するポリヌクレオチドの構築はいかなる鋳型又は親DNAの取扱も必要としない。コドン頻度はあらゆる発現宿主に対して最適化し得る。制限部位はクローニング要求に応じて付加/変化し得る。

30

本発明のこの例示の系はオリゴヌクレオチドビルディングブロックのライブラリーを使用してDNA配列を生成する。オリゴヌクレオチドビルディングブロックを特注構築される夫々の配列について設計する。一局面において、ライブラリーは合計4096のクローン及び61のリンカーフラグメントで全ての可能なジコドン組み合わせからなる。オリゴヌクレオチドビルディングブロックを夫々の特注構築配列について設計することができる。夫々のオリゴヌクレオチドビルディングブロックをクローン化し、配列を確かめ、PCR増幅し(又は制限消化から調製し)、予備切断する。この例示の反復連続コドン遺伝子構築プロトコルの要約について図1を参照のこと。

【0096】

ビルディングブロックライブラリー構築

40

夫々のオリゴヌクレオチド(及びオリゴが挿入される相当するクローン)が一つの特定のジコドン配列を含む、4096の固有な“ビルディングブロック”オリゴヌクレオチドのライブラリーを構築する。“ビルディングブロック”オリゴヌクレオチドをPCR増幅する。固体支持体に結合される“スターター”フラグメントを3'コドンで予備切断する。“伸長フラグメント”を5'コドンで予備切断する。“スターター”フラグメント(固体支持体に結合される)及び“伸長フラグメント”を異なるIIS型制限エンドヌクレアーゼで切断する。例えば、“スターター”フラグメントをEarIで切断し、“伸長フラグメント”をSapIで予備切断し、またその逆を行う。一例において、“スターター”フラグメントを最初に“フック”への連結のためにBbsIで切断し、次いでフックへの結合後にEarIで切断する。“伸長フラグメント”をプライマーSapF及びT3(PCR中に導入されたSapI部位)で増幅し

50

、SapIで切断する。一つの例示的プロトコルにおいて、ビルディングブロックオリゴヌクレオチドのPCR増幅がSapI部位を付加し、EarI部位を欠失する。夫々の“ビルディングブロック”オリゴヌクレオチドをクローン化し、夫々のジコドン配列を確かめる。

この例示の方法において、夫々のオリゴヌクレオチドビルディングブロックが挿入されるクローニングベクターはpBluescriptII Ks(-)TM（ストラタジーン、サンジエゴ、CA）の改変である。下記の変更を行った：

ベクター特異的SapI部位及びEarI部位の除去：

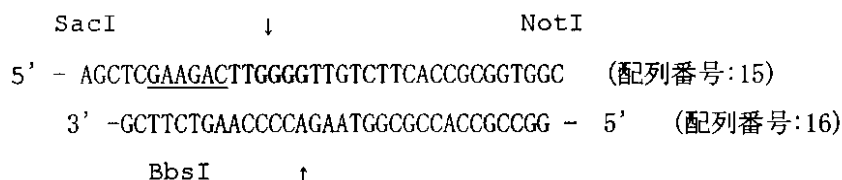
或る局面のように、SapI及びEarIを使用してビルディングブロックオリゴヌクレオチド中にオーバーハングを生成し、ベクター中のSapI及びEarI認識部位を除去することが必要である。この例において、pBluescriptII Ks(-)TMは三つのEarI部位（位置518、1038及び2842で）を含み、それらの一つが単一SapI部位（位置1038で）とオーバーラップする。例えば、ストラタジーンのクイックチェンジ部位誘導突然変異誘発TMキットを使用して、これらの部位を除去することができる。成功裏の変化はSapI及びEarIを使用する制限切断及び/又は配列決定により確かめることができる。この例において、修飾ベクターをpSEと称した。

単一BbsI部位の挿入：

“スターターフラグメント”は固体支持体に固定化された“フック”につながる必要があり、この例において、フックは磁性ビーズに固定化される。フラグメントの自己連結反応を避けるために非パリンドロームオーバーハング（例えば、5'-GGGG-3'）を使用することができる。その配列はSacI/NotIによるpSEベクター（上記を参照のこと）へのこの二本鎖フラグメントの挿入により利用できる。線状化ベクターに以下を挿入する：

【0097】

【化1】



30

【0098】

これはBbsI部位を導入して高い連結反応効率のためにGGGGオーバーハングを生じる（固体支持体上のフックフラグメントへの連結）。等モル量のPAGE精製オリゴヌクレオチド（例えば、インテグレートッドDNAテクノロジー、コラルビル、IAから）のアニーリングが先に示されたような二本鎖(ds)フラグメントを生じるであろう。成功裏の組込みはBbsIによる制限切断及び配列決定により確かめられる。5'-GGGGオーバーハングを生成するようにBbs部位を設計する。この修飾ベクターをpBbs4Gと称する。ライブラリーを作製するためにこのベクター（pBbs4G）を使用することができる。

Sma/PstIスペーサーの挿入

この例において、オリゴヌクレオチドライブラリーのインサートは一つの側にプラントエンド及び別の側にPstI適合性3'-オーバーハングを有し、SmaI/PstI切断ベクターへの更なる操作を用いずに誘導クローニングを可能にする。これらの部位がpBluescriptII Ks(-)TM（ストラタジーン、サンジエゴ、CA）ベクター中で互いに直接隣接して配置される。第一酵素の切断後、他方の認識配列はそのDNAの末端に非常に近くにある。PstI及びSmaIはDNA末端近くを有効に切断しない。この問題は、このdsDNAをSmaI及びHindIIIで切断され、脱リン酸化され、ゲル精製されたベクターpBbs4Gに挿入することにより、解決することができる。

pBbs4GをSmaI/HindIIIで切断し、以下を挿入する。

【0099】

40

【化 2】

SmaI (半分) PstI EcoRI HindIII

5' - GGGCATCATCATCATCTGCAGGAATTCGATATGA (配列番号:17)

3' - CCCGTAGTAGTAGTAGTAGACGTCCTTAAGCTATACTTCGA (配列番号:18)

【 0 1 0 0 】

SmaI及びPstIを分離して、二重切断を一層有効にする。先に注目されたように、相補5'-リン酸化オリゴヌクレオチドをアニールすることにより、フラグメントを生成することができる。成功裏の組込みを配列決定によりチェックすることができる。改変ベクターをpGB1と称する。ベクター改変を用いなくて、KpnI又はSacIをPstIに代えて使用することができるが、これは一層調製し難い極めて短いフラグメント（以下を参照のこと）をもたらすであろう（標準方法の効率は約70塩基対より下では低下する）。

ビルディングブロックの設計

この例示の操作において、幾つかの開始位置で同時に遺伝子合成をいずれかのコドンで開始するために、合計61の“スターター”及び4096の“伸長”フラグメントを使用する。全てのフラグメントをpGB1（上記を参照のこと）にクローン化することができる。ベクターをSmaI及びPstIで切断し、脱リン酸化し、ゲル精製することができる。

“スターターフラグメント”

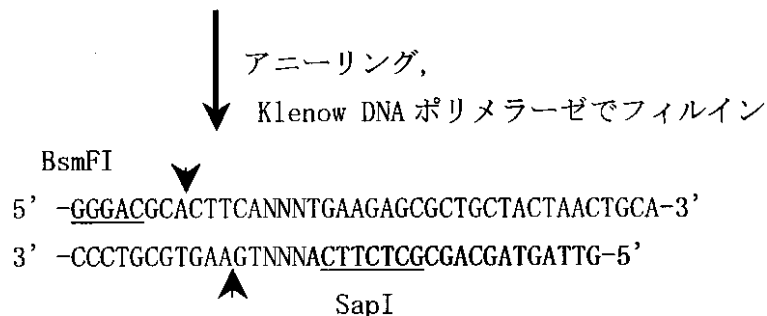
以下に説明されるように、二つの部分相補オリゴヌクレオチドをアニールすることにより、61の“スターター”クローンを作製することができる。5'オーバーハングをクレノーDNAポリメラーゼでフィルインし、その混合物を上記のようにpGB1にクローニングする。SapIを使用して第一伸長フラグメントの連結反応のためのオーバーハングを生成することができる。BsmFIを使用して部分遺伝子を固体支持体から遊離させ、これらをつないで完全長遺伝子を生成することができる。ベクターはSmaI/PstIで切断する。

【 0 1 0 1 】

【化 3】

5' -GGGACGCACTTCANNNTGAAGAGCGCTGCTACTAACTGCA-3'

ACTTCTCGCGACGATGATTG-5'



BbvI

~~~~~

BsmFI                      EarI    BbvI                      PstI

~~~~~                      ~~~~~    ~~~~~                      ~~~

5' -GGGACGTTCT TCGNNNNNT GAAGAGAGCT GCTACTAACT GCA (配列番号:19)

3' -CCCTGCAAGA AGCNNNNNA CTTCTCTCGA CGATGATTG - 5' (配列番号:20)

SapI

【 0 1 0 2 】

以下を “ フィルイン ” することによりオリゴヌクレオチドを作製することができる。

【 0 1 0 3 】

【 化 4 】

GGGACGTTCT TCGNNNNNN TGAAGAGAGCT GCTACTAACT GCA (配列番号:19)

ACTTCTCTCGA CGATGATTG (配列番号 20 の部分配列)

←= フィルイン

【 0 1 0 4 】

10

一局面において、96のコロニーをピックアップし、配列決定する。縮重プライマーに代えて配列特異的プライマーを使用して、ミッシング(missing)コドンを作製することができる。クローニング操作は先に概説したのと同じである。

“ 伸長フラグメント ”

全ての可能な4096のジコドン組み合わせ(全ての可能な2コドン組み合わせ)を含む “ 伸長フラグメント ” を上記操作に従って生成することができる。使用するオリゴは以下のとおりである。

【 0 1 0 5 】

20

【 化 5 】

5' -GGGACGCTCTTCANNNNNNTGAAGAGTGCTGCTACTAACTGCA-3'

ACTTCTCACGACGATGATTG-5'



アニーリング,
Klenow DNA ポリメラーゼでフィルイン

BsmFI

SapI

EarI

5' -GGGACGCTCTTCANNNNNNTGAAGAGTGCTGCTACTAACTGCA-3'

3' -CCCTGCTAGAAGTNNNNNACTTCTCACGACGATGATTG-5'

SapI

EarI

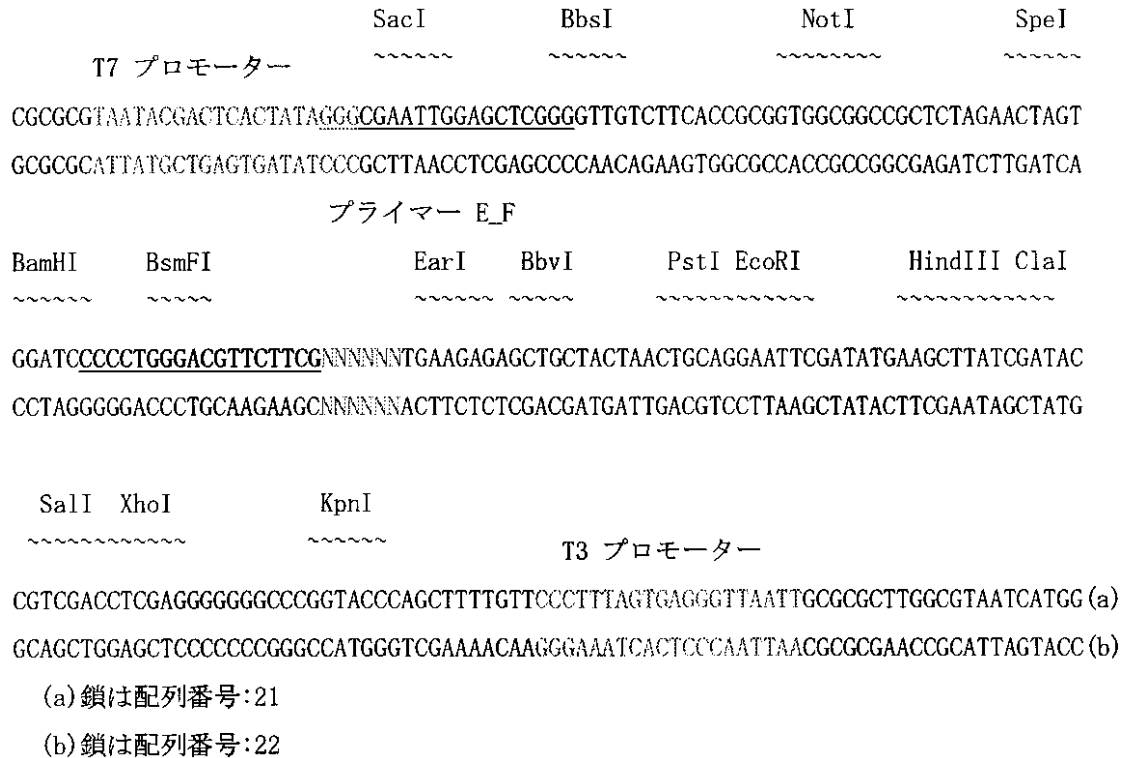
BbvI

30

【 0 1 0 6 】

このクローンは以下の設計を有する：

【化 6】



10

20

30

40

【0107】

SapIを使用して連結反応に先立って5'オーバーハングを生成する。EarIを使用して次のフラグメントの付加のために次のコドン中に5'オーバーハングを生じる。BsmFI及びBbvI制限部位を配置して合成DNAフラグメントの最初の二つのコドン及び最後の二つのコドン内の切断を可能にする。BsmFIを使用して部分遺伝子を固体支持体から遊離させる。BbvIを使用して固体支持体に結合された部分遺伝子の3'末端で適合性オーバーハングを生成する。

ライブラリーは4096のクローンを含む。クローンのうち二つ（配列CTCTTC及びGAAGAGをコードする）は、EarI認識配列をコードするのでアッセンブル処理に使用することができない。標的配列をこれに従って改変できるので問題ではない。全変異性を捕獲し、保存するために、10,000の単一コロニーを96ウェルプレート中に取り出す。自動化コロニーピッカーをこの目的のために使用することができる。一局面において、96の固有クローンを有することが充分である。一局面において、充分なクローンを配列決定して長さ1 kbpの人工遺伝子を合成することができる。

一局面において、4種の異なるクラスII制限酵素（SapI、EarI、BsmFI、BbvI）のみを使用して個々のビルディングブロックの連結反応のための適合性オーバーハングを生成する。SapI及びEarIは3塩基5'オーバーハングを生成し、BsmFI及びBbvIは4塩基5'オーバーハングを生成する。スターター/伸長クローンの設計が表2に示される。

【0108】

表2：ビルディングブロックの設計

【化 7】

開始クローン

T7 プライマー SacI BbsI NotI XbaI
TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCGAAGACTTGGGGTCTTACCGCGGTGGCGGCCGCTCTA
ATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGCTTCTGAACCCAGAAATGGCGCCACCGCCGGCGAGAT

BsmFI SapI BbvI PstI EcoRI
GAACTAGTGGATCCCCCGGGACGCACTTCANNNTGAAGAGCGCTGCTACTAACTGCAGGAATTCGATATG
CTTGATCACCTAGGGGGCCCTGCGTGAAGTNNNACTTCTCGCGACGATGATTGACGTCCTTAAGCTATAC

ClaI SalI XhoI KpnI
AAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTA
TTCGAATAGCTATGGCAGCTGGAGCTCCCCCGGGCCATGGGTGCGAAAACAAGGGAAATCACTCCCAAT

T3 primer

伸長クローン

T7 プライマー SacI BbsI NotI XbaI
TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCGAAGACTTGGGGTCTTACCGCGGTGGCGGCCGCTCTA
ATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGCTTCTGAACCCAGAAATGGCGCCACCGCCGGCGAGAT

【 0 1 0 9 】

スターフラグメント。インサートを制限フラグメント (BbsI/KpnI ; 140bp) として、又はT7/T3プライマーによる増幅 (210bp) 及びBbsIによる制限切断 (170bp) により回収することができる。

伸長フラグメント。インサートを制限フラグメント (SapI/KpnI ; 88bp) として、又はS1/T3プライマーによる増幅 (127bp) 及びSapIによる制限切断 (110bp) により回収することができる。

ビルディングブロックの調製 :

スター及び伸長フラグメントをPCRにより生成し、例えば、キアゲンPCR精製キットを使用することにより精製し、SapIにより消化し、キアゲンPCR精製キットを使用することにより再度精製することができる。これらの方法を96ウェルフォーマット、例えば、ベックマンBIOMEK 2000TMで行なうことができる。標準操作プロトコルを使用する。精製ビルディングブロックを96ウェルディープブロック (2mlまで) 中で標準化DNA濃度 (例えば、100ピコモル / μ l) で貯蔵することができる。

PCR導入ヌクレオチド置換が合成遺伝子中に有意な数の突然変異を生じることが予想されない。THERMALACETM DNAポリメラーゼ (インピトロゲン) を使用することができる。それは高忠実度 / 高効率酵素である。エラー率は $1/(6 \times 10^5)$ である。これは200bp PCR産物の1500のコピーのうちの一つ (600,000b:400b) が平均で一つのエラーを有することを意味する。夫々のフラグメントの6bp (12塩基) のみを合成に使用する。これらの塩基のうち

10

20

30

40

50

の一つが誤っている可能性は200bp産物についてわずかに3%である(12:400)。それ故、50,000のコピーのうちのわずかに一つがジコドン領域中に導入されたエラーを有する(=0.002%; 合成オリゴと較べて; 2-5%)。ジコドン領域外の突然変異は合成配列中に運ばない。

突然変異コドンを連結反応中に更に識別する。合成遺伝子及び遺伝子再アッセンブルプロジェクトからの数百のクローンを配列決定し、導入された塩基エラー又はミッシング/誤った塩基がオーバーハング領域に見られなかった。

プラスミド調製はPCR増幅の別法である。ビルディングブロックをプラスミドDNAの制限消化から調製することができる。フラグメントをサイズ分別カラムによりそのベクター主鎖から精製することができる。この方法はヌクレオチド置換が高い突然変異率を生じる場合の別法である。 10

【0110】

伸長プロトコル

一局面において、伸長サイクルは3工程：(1)DNAリガーゼによる新しいフラグメントの共有結合、(2)クレノーDNAポリメラーゼによる未連結オーバーハングのフィル-イン、及び(3)次のオーバーハングを生成するためのEarIによる制限消化を伴う。夫々の工程を別々に最適化し、次いで幾つかの短いDNA配列(30-60bp)を合成して全合成サイクルを試験し、最適化することができる。合成フラグメントをクローン化し、配列決定して伸長反応の効率及び忠実度を確かめることができる。

一局面において、固相支持体を使用する合成オリゴヌクレオチドからのDNA分子の再アッセンブルを遺伝子ファミリーの再アッセンブルに適用する。このプロトコルにおいて、30-50塩基のアニールされたオリゴヌクレオチドの段階的連結反応により完全長再アッセンブル遺伝子を得た。 20

ビルディングブロックの2種の異なる組がライブラリーの“保管された”クローンから調製される必要がある。

- スターターフラグメント
 - ・ 固体担体に結合し得る
 - ・ プライマー-E_F及びT3による増幅
 - ・ フックへの連結のためにBbsIで切断
 - ・ 結合後にEarIで切断
- 伸長フラグメント
 - ・ プライマー-SapF及びT3による増幅
 - ・ SapI部位をPCR中に導入した
 - ・ SapIで切断
 - ・ 一つのコドン/伸長サイクルによりスターターフラグメントを伸長するのに使用

30

【0111】

スターターフラグメントを固体支持体に連結するためのフック：フックフラグメントの固定化

ストレプトアビジンで被覆された常磁性ビーズをダイナールA.S.(オスロ、ノルウェー)から購入することができる。5'-ビオチン化フォワードオリゴ(5'-bio-GAACGATAATAAGC TTGATGACGAAGACAT-3')(配列番号23)及びリバースオリゴ(5'-CCCCATGTCTTCGTCATCAAGC TTATTATCGTTC-3')(配列番号24)を、例えば、インテグレートッドDNAテクノロジーズ社(コラルビル、IA)から購入することができる。その2種のオリゴヌクレオチドをアニールしてフックフラグメントを生成することができる。フックフラグメントを製造業者の指示(例えば、ダイナールプロトコル)に従ってビーズに固定することができる。 40

T7プロモーター

(NNN)x CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTC(配列番号25)

(NNN)x GCGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGCCCC(配列番号26)

“フック”の調製

- 長さ/配列可変

50

- in vitro転写 / 翻訳のためにプロモーター（例えば、T7）を含んでもよい
- スターターフラグメントの連結のための適合性オーバーハング

【0112】

別法：

配列が確認されたクローンに由来するPCRフラグメントを使用することに代えて、オリゴに由来する短い（約20～25塩基対(bp））二本鎖(ds)DNAフラグメントからビルディングブロックを合成する。下部ストランド（図を参照のこと）の3'末端にある3塩基のみが正確な配列を構築するのに重要である。

原理：

- > 固体支持体< --フック - スターターフラグメント --- コドン特異的オーバーハング
- スターターフラグメントを固体支持体に結合するためのフック：

T7プロモーター

(NNN)xCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTC（配列番号27）

(NNN)xGCGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCTCGAGCCCC（配列番号28）

スターターフラグメント：

BsmFI

GGGGATCCTGGGACGTTCTTCG（配列番号29）

TAGGACCCTGCAAGAAGCNNN（配列番号30）

ビルディングブロック：

NNNnnnTGAAGAGAGCTGCTACTAACTGCAGGAATTCGATATGAAGCTT（配列番号31）

nnnACTTCTCTCGACGATGATTGACGTCCTTAAGCTATACTTCGAA（配列番号32）

【0113】

要するに、図1に示されるように、本発明のこの例示の遺伝子構築方法の“伸長サイクル”は、基質へのスターターオリゴの“ローディング”、連結反応（いずれかのリガーゼ、例えば、T4リガーゼ又はE. coliリガーゼによる）、洗浄、末端のフィル-イン、洗浄、制限エンドヌクレアーゼによる切断、洗浄、反復（反復サイクル）を含む。プロトコル又は別のプロトコルのあらゆる型が使用し得る。条件の最適化を或る範囲のパラメーター、例えば、温度、時間、緩衝剤、伸長サイクルの数、どのリガーゼをしようするのか、固体基質（存在する場合）の選択等のルーチンスクリーニングにより行なうことができる。

【0114】

連結反応

酵素

一局面において、T4 DNAリガーゼを使用する。T4 DNAリガーゼはDNA連結反応に最も普通に使用される酵素である。T4 DNAリガーゼは高い比活性を有し、5'又は3'突出適合性オーバーハングを非常に有効に結合する。また、T4 DNAリガーゼは一層低い効率であるがプラントエンドフラグメントをつなぐ。ビルディングブロック（PCRにより生成される場合）が一つの側でプラントエンドにされ、フィル-イン反応から生じるその他のプラントエンドフラグメントにつながり得るので、このことは潜在的な問題を生じる。非リン酸化プライマーがPCRに使用されるので、ビルディングブロックの二量体化は問題ではないであろう。一局面において、これらの副反応を避けるために、E. coli DNAリガーゼがT4 DNAリガーゼの代替として使用し得る。大腸菌DNAリガーゼはNAD⁺依存性であり、DNAフラグメントの付着末端のみをつなぐ。大腸菌DNAリガーゼはT4 DNAリガーゼよりも1～2オーダの大きさだけ高い忠実度を有するが、T4 DNAリガーゼよりも低い比活性を有する。大腸菌DNAリガーゼは市販されている。ルーチンスクリーニングプロトコルを使用して、両方の酵素を評価して所望の条件下で最も有効な操作を決めることができる。

【0115】

最適化

ルーチンスクリーニングプロトコルを使用して、異なる条件下の連結反応効率を、例えば、所望の結果、物質及び/又は条件について最適化することができる。三つのパラメーター、DNA濃度、酵素単位、及び反応時間を最適化することができる。PCR反応において、

既知のジコドンクローンを鋳型として使用して、蛍光（例えば、6-Fam）標識T3プライマー（上記表2を参照のこと）を未標識S1プライマーとともに使用して、標識伸長フラグメントを生成することができる。幾つかの標識フラグメントを生成してオーバーハング中の異なるGC含量をカバーすることができる。これらのフラグメントを使用してプロトコル開発中の連結反応効率を監視することができる。夫々の反応において、標識フラグメントの一つを伸長鎖に付加される最後のものとして使用することができる（プロトコル開発の目的としては2～3のコドン）。反応の完結後に、フラグメントを固体支持体から遊離させることができ、とり込まれた標識を、例えば、ABIプリズム310遺伝子アナライザーTMで分析することができる。例えば、Liu (1997) Appl. Environ. Microbiol 63:4516-4522により記載された方法を使用することができる。

10

【0116】

フィル-イン反応

酵素

連結反応工程において、次のビルディングブロックをモル過剰で使用してビーズに結合されたフラグメントを飽和し、連結反応を完結まで誘導することができる。本発明の方法は多工程方法であってもよい。それ故、連結されていないフラグメントの痕跡量さえも最終生成物の正確さ及び品質を低下させ得る。連結されていないフラグメントをその後のサイクル（同じコドン）における伸長から防止するために、クレノーDNAポリメラーゼを夫々の連結反応工程後に使用して、連結されていないオーバーハングをフィルインすることができる。クレノーDNAポリメラーゼは殆ど全ての一般に使用される制限緩衝液中で活性であり、付加的な緩衝液交換を回避できるという利点を有する。一局面において、酵素を次の連結反応工程の前に不活化、例えば、熱不活化する。

20

【0117】

フィル-イン条件の最適化

ルーチンスクリーニングプロトコルを使用して、フィル-イン条件を、例えば、所望の結果、物質及び/又は条件について最適化することができる。一局面において、反応条件（全ての末端のフィルイン）を最適化するために、DNAフラグメント（30-40bp）をその反応のための基質としての3塩基5'オーバーハングとともに使用する。二つの相補オリゴを設計することができる。フォワードオリゴは5'蛍光（例えば、6-Fam）標識を含むことができる。リバープライマーはフォワードオリゴよりも5'側で3塩基長くてもよい。これらの二つのオリゴのアニールは3塩基5'オーバーハングを含む蛍光標識DNAフラグメントを生成するであろう。アニールされたフラグメントはフィル-イン反応の最適化のために基質として使用し得る。反応の完結後に、サンプルが、例えば、上記のABIプリズム310 GENETIC ANALYZERTMで分析されるであろう。

30

充填されていないフラグメント（フォワードオリゴと同じ長さ）、部分充填されたフラグメント（フォワードオリゴより1又は2塩基長い）、及び完全に充填されたフラグメント（リバーズオリゴと同じ長さ）の%を測定してフィル-イン反応の効率を評価することができる。フィル-イン反応は(1)酵素濃度、(2)緩衝液組成、(3)インキュベーション時間、及び(4)不活化温度/時間に関して最適化される必要がある。

【0118】

制限消化最適化

一局面において、EarIをフィル-イン反応後に使用して新しいオーバーハングを生成する。この工程の最適化は酵素濃度及びインキュベーション時間を含むことができる。連結反応の最適化に使用された戦略と同じ戦略がこの反応について使用されるであろう。標識ビルディングブロックを連結反応によりフックフラグメントに結合し、EarIで切断することができる。標識フラグメントの放出を、例えば、上記のABIプリズム310遺伝子アナライザーTMで分析することができる。

40

【0119】

ソフトウェア開発及び自動化

標的配列の操作

50

本発明の方法により合成される配列を操作するために、宿主最適化のため、かつ／又は配列（例えば、新たに合成された遺伝子）中のEarI、SapI、BsmFI及び／又はBbvIに関する制限部位の排除のためにサイレント突然変異を行なうことができる。一局面において、本発明の方法による合成のための準備の際に、ソフトウェア分析により配列操作を決定する。一局面において、コドン最適化及び制限部位操作の両方のためのサイレント突然変異を行なう。

ビルディングブロック調製に関する自動化

一局面において、既製のソフトウェア及び調製キットを使用して、ビルディングブロックの調製をベックマンBIOMEK 2000TMで行なう。これらの操作は現在では標準の操作である。更なる開発がそのプロトコルのこの工程を行なうのに必要とされない。

10

【0120】

利用できるビルディングブロックから配列を生成するためのソフトウェア

全てのビルディングブロックが利用できるとは限らない場合、利用できる材料から配列を構築することが必要であるかもしれない。利用できるビルディングブロックの配列決定結果を考慮し、実現可能な配列を生じるソフトウェアアプリケーションを書くことができる。そのソフトウェアは実験中に全てのウェル中をループし、相補配列を有する全ての他のウェルのデータベースを生成することができる。その配列を生成するために、ソフトウェアは開始ビルディングブロックを選び、それに付加し得るビルディングブロックを全てのビルディングブロックからランダムに選ぶことができる。この系は所望の長さに必要とされる多数のビルディングブロックのためにこの方法を繰り返すことができる。

20

【0121】

伸長プロトコルを実行するための自動化

伸長プロトコルを実行するために、遺伝子配列を含むファイルをメモリーに読み取り、ベックマンBIOMEK 2000TMロボットにプロトコル中の工程を行なうように指令する自動化システムを開発することができる。ビルディングブロックを選択するために、ソフトウェアは合成される配列中の第一コドン及び第二コドンを読み取ることができる。その配列はその後適当なビルディングブロック材料プレートからピペット操作し得るビルディングブロックを固有に同定する。ビルディングブロック材料をローディングした後、ロボットが伸長サイクルの残りを自動的に行なうことができる。次のビルディングブロックを配列中の第二コドン及び第三コドンから決定することができる。遺伝子が完成するまで、この方法を繰り返すことができる。

30

【0122】

人工遺伝子の合成

一局面において、約300残基の長さを有する人工タンパク質配列の遺伝子を利用できるジコドンクローンに基づいて生成する。遺伝子を、先に説明したような、最適化伸長プロトコルに従って合成することができる。効率を最大にするために、小さい、同等のサイズのフラグメントを並行して合成することができる（ラウンドI）。これらの部分遺伝子をラウンドIIでビルディングブロックとして使用して完全長遺伝子を生成することができる。ラウンドIにおけるフラグメント当りのコドンの数はサイクル（これは一つの出発点から行ない得る）の最大数により決めることができる（以下を参照のこと）。

40

本発明の例示のプロトコルを使用して、22までのフラグメントを結合した。300のコドンの遺伝子について、14のフラグメントを合成のラウンドIで並行して合成することができる。合成の第二ラウンドにおいて、13のフラグメントを第一フラグメントに逐次つなぐことができる。投入フラグメントの長さは連結反応効率に殆ど又は全く効果を有しないかもしれない。こうして、14のフラグメントの第二ラウンド合成の効率は第一ラウンド合成と同様であり得る。

オリゴ及び標準固相プロトコルを使用して、同じ人工遺伝子を合成することができる。オリゴを商用の供給源、例えば、インテグレートッドDNAテクノロジーズから注文することができ、つないで完全長遺伝子を合成することができる。この生成物を対照として使用して、従来の方法と比較して、本発明の方法の付加的な生成物の効率及び正確さを評価す

50

ることができる。夫々の実験からの少なくとも20のクローンを配列決定し、比較することができる。

【0123】

実施例2：抗体再アッセンブル

下記の実施例はキメラ抗原結合ポリペプチドを生成するための、本発明の抗体再アッセンブル方法の実施を記載する。

再アッセンブル戦略：

クローニングベクターを図1に図示されるように設計した。あらゆるリボソーム結合部位(RBS)配列又は緑色蛍光タンパク質コーディング配列(GFP)を使用することができ、これらの多くが当業界で公知である。

10

ラムダ軽鎖に関する再アッセンブル戦略：

ラムダ軽鎖を再アッセンブルするために、三つのドメインを用意した：

- ・ V_L ：10ファミリー中で38配列；長さ約300塩基対(bp)（約300bp）
- ・ J_L ：4配列；長さ約35塩基対(bp)（約35bp）
- ・ C_L ：1配列；長さ約320塩基対(bp)（約320bp）

$38 \times 4 \times 1 = 154$ の異なる組み合わせ

V_L 配列を遺伝子特異的プライマーでPCR増幅した：

5'オリゴをXhoI部位で設計する；3'プライマーを伸長/SapI部位で設計する（図2中のスキームを参照のこと）；

J_L 配列をオリゴから生成する（図2及び配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4を参照のこと）；

20

C_L 配列を5'末端にBsrDI部位及び3'末端にXbaI部位を含むオリゴでPCR増幅する。

一つの V_L 遺伝子のみが内部SapI部位を有するので：

$37 \times 4 \times 1 = 148$ の組み合わせ

【0124】

図2は本発明の方法に従ってラムダ軽鎖を再アッセンブルするための例示のスキームを図示する。J領域オリゴ（中央の陰影付きボックス中）は配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4である。

V及びCのPCR増幅のためのプライマーは以下のとおりである：

リバースプライマー-V アドオン：

CATCATGCTCTTCACACMNM（配列番号5）プラス遺伝子特異的配列（M = C又はA）

フォワードプライマー-C 5'アドオン：

CTACTAGGTCTCATCCTG（配列番号6）プラス遺伝子特異的配列；（J領域中の最後のコдонは大腸菌中のコドン頻度のためにCTAからCTGに変更した）

30

カッパー軽鎖に関する再アッセンブル戦略：

ラムダ軽鎖を再アッセンブルするために、三つのドメインを用意した：

- ・ V：7ファミリー中で49の配列；長さ約300塩基対(bp)（約300bp）
- ・ J：5配列；長さ約35塩基対(bp)（約35bp）
- ・ C：1配列；長さ約320塩基対(bp)（約320bp）

$49 \times 5 \times 1 = 245$ 組み合わせ

40

【0125】

図3は本発明の方法に従ってカッパー軽鎖を再アッセンブルするための例示のスキームを図示する。J領域オリゴ（中央の陰影付きボックス中）は配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11である。

V配列を遺伝子特異的プライマーでPCR増幅した：

5'オリゴをXhoI部位で設計し、3'プライマーを伸長BsrDI部位で設計する（図3中のスキームを参照のこと）；

J配列をオリゴから生成する（図3及び配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11を参照のこと）；

C配列を5'末端にBsaI部位及び3'末端にXbaI部位を含むオリゴを使用してPCR増幅す

50

る。

V_H 及び C_H の PCR 増幅のためのプライマーは以下のとおりである。

リバープライマー-V_H アドオン：

CATCATGCAATG (配列番号12) プラス遺伝子特異的部分 (最後のコドンの第一塩基がスキップされる)

フォワードプライマー-C_H 5'アドオン：

CTACTAGGTCTCAAA (配列番号13) プラス遺伝子特異的配列

【0126】

重鎖の再アッセンブル：

免疫グロブリン重鎖を四つのドメインで再アッセンブルした：

- ・ V_H：7ファミリー中で57配列；約300bp
- ・ D_H：116配列 (両配向、異なるリーディングフレームが含まれる)；約20bp
- ・ J_H：12配列；約60bp
- ・ C_H：1配列；約300bp

57x116x12x1=79344組み合わせ

再アッセンブル戦略：

- PCRがV_H遺伝子を遺伝子特異的プライマーで増幅する
- プライマーは5'末端にSacI部位を含む
- プライマーは3'末端にSapI部位を含んで最後のコドン中に3bpオーバーハングを生成する。最後のコドンは殆どの遺伝子 (57のうちの45) についてAGAである。
- V_D遺伝子及びV_J遺伝子をオリゴから合成する (下記のスキームを参照のこと)。第一ライブラリーはAGA結合部及びTAC結合部のみを標的とする (12Jのうちの7)。
- PCRがC_H遺伝子を増幅し、5'末端にBsaI又はBsmBI部位及び3'末端にSpeI部位を含む。

45x116x7x1=36540

V_H 及び C_H の PCR 増幅のためのプライマーは以下のとおりである：

リバープライマー-V_H アド-オン：

CATCATGCTCTTCA (配列番号14) プラス遺伝子特異的部分

フォワードプライマー-C_H アド-オン：

CTACTAGGTCTC (配列番号15) プラス遺伝子特異的部分

図4は本発明の方法に従って抗体重鎖を再アッセンブルするための例示のスキームを図示する。

【0127】

実施例3：段階的核酸再アッセンブル：タンデム再アッセンブルのためのアプローチ

下記の実施例は本発明の例示の操作を記載したものである。例えば、段階的核酸再アッセンブル (即ち、“タンデム再アッセンブル”) を本発明の核酸合成方法と連係して使用することができる。一局面において、段階的核酸再アッセンブルを使用して、本発明の組成物及び方法を使用してオリゴヌクレオチドビルディングブロックの反復アッセンブルによりつくられた核酸を再アッセンブルする。一局面において、段階的核酸再アッセンブルを使用して本発明のキメラ抗体を更に修飾する。一局面において、塩基対ミスマッチ、挿入/欠失ループ及び/又はヌクレオチドギャップを欠いている二本鎖ポリヌクレオチドを精製するための本発明の組成物及び方法を使用して、段階的核酸再アッセンブルの生成物を単離し、かつ/又は精製する。

この実施例は再アッセンブル核酸の例示の段階的適用を説明するために示される。この段階的アプローチは部分再アッセンブル生成物の構築 (又は再アッセンブル部分生成物もしくは中間体再アッセンブル生成物) が同時又は並行して生じることを可能にすることにより予想される生成物の構築を可能にし、これらの部分再アッセンブル生成物が次いで最終生成物にアッセンブルされることを可能にすることができる。下記の実施例は3種の部分生成物を使用するこの段階的再アッセンブルアプローチを記載したものであるが、本発明の異なる局面において、種々の数の部分生成物を使用することができる (例えば、2から百万までの各整数値に応じて)。このアプローチにおいて、再アッセンブルされる夫々

10

20

30

40

50

の遺伝子からの配列（又はその他の配列、例えば、遺伝子経路もしくは調節モチーフ）を含む核酸フラグメント（又は核酸ビルディングブロック）のプールを段階的につなぐが、完全長までつながない。

この実施例において、アッセンブル工程は配列内の三つの位置：5'-末端、内部位置（内部）及び3'-末端から開始した。連結点におけるオーバーハングを適当な制限部位を含むビオチン化フックを収容するように設計する（例えば、ダイナールA.S.（オスロ、ノルウェー）による固相プロトコル；Biomagnetic Techniques in Molecular Biology Technical Handbook, 第3編, “固相遺伝子アッセンブリ”と題する5.1節、135-137頁を参照のこと）。

【0128】

10

図6に示された例は3種のエステラーゼ遺伝子の再アッセンブル（3種のエステラーゼ遺伝子の再アッセンブルのための“3点連結反応アプローチ”）に関するものである。3種の親配列のアライメント後に、オーバーハングを設計し、相当するオリゴを合成した。再アッセンブルの前に、類似配列を一つのサンプルに溜め、核酸ビルディングブロックの19のプールを生じた（19の核酸ビルディングブロックをF1～F19と称した）。このプールを用いて標準操作に従って再アッセンブルを行なった。3種の部分生成物：F1-7、F8a-13及びF14-19を作製した。アッセンブル処理は遺伝子の5'-3'方向、又は、例えば、F14-19中間体生成物について、3'-5'方向で行なった。

3種の部分生成物が固相ビーズ支持体を使用して作製したならば、シフト制限酵素（図7Aを参照のこと）、例えば、BsaI又はBsbI（その他が同様に使用し得る）を使用して、F8a-13及びF14-19部分生成物をビーズから遊離させた。図7Aは、ビオチン化フック中で操作された別の制限部位を使用する、固体支持体からの再アッセンブルDNAの溶離を示す。溶離されたF1-7（レーン2-3）、溶離されたF8a-13（レーン4-5）、及び溶離されたF14-F19（レーン6）。DNAラダー（レーン1及び7）。

20

次いで遊離されたF8a-13をビーズに結合されたF1-7部分生成物にアッセンブルし、続いてF14-19部分生成物をアッセンブルした。部分生成物F8a-13及びF14-19をモル過剰で加えて完全長生成物の生成を促進することができる。図7Bは最終の再アッセンブル生成物の溶離を示す。図7Bは固体支持体からの最終の再アッセンブル生成物の溶離を示す（レーン4）。DNAラダー（レーン1、2、3、及び5）。意図される完全長生成物をクローニング及びライブラリー生成のためにゲル精製した。

30

【0129】

実施例4：例示のオリゴヌクレオチド精製プロトコル：“MutS処理”

この実施例は本発明の例示のオリゴヌクレオチド精製方法、“MutS処理”を記載する。
16580T5遺伝子の再アッセンブル

この実施例はMutSタンパク質をベースとするフィルタリング（又は精製）工程による再アッセンブルフラグメント（又は核酸ビルディングブロック）の処理が、本発明の核酸再アッセンブル方法から生じた無傷のオープンリーディングフレームの収率を実質的に増大したことを示す。これを実証するために、蛍光タンパク質の遺伝子を先のMutS処理により、又はその処理によらないで核酸ビルディングブロックから合成した。

蛍光タンパク質16580T5の732塩基対(bp)遺伝子配列から、好適な核酸ビルディングブロックを設計し、相当するオリゴヌクレオチド（長さ22～59塩基）を化学的に合成した。20の再アッセンブルフラグメントを20のフォワードオリゴヌクレオチド及び20のリバースオリゴヌクレオチドのアニーリングにより調製した。実験のアーーム(arm)において、核酸ビルディングブロック（濃度25ピコモル/μl）を未処理で残し、実験の別のアーームにおいて、核酸ビルディングブロックを下記のMutS処理プロトコルにかけた。

40

Mut-S処理：フラグメント（1000ピコモル）を反応混合物（20mMトリス/Cl pH 8.0、90mM KCl、1mM DTT、5mM MgCl₂、10% v/vのグリセロール）349μlに添加し、17.9μlのMutS（エピセクター、2mg/ml）を添加した。その反応混合物を室温で1時間インキュベートし、マイクロコンYM-100（ミリポア）濾過ユニットに移し、4,700gで20分間回転させた。フロースルーをYM-10（ミリポア）濾過ユニットに装填し、遠心分離により濃縮した（30分、1

50

3,800g)。レテンテートを回収し、最終オリゴヌクレオチド濃度約25ピコモル/μlに体積を調節した。

次いで固相支持体として磁性ビーズを使用し(使用した固相プロトコルはダイナールA.S.(オスロ、ノルウェー)に従った; Biomagnetic Techniques in Molecular Biology Technical Handbook, 第3編, “固相遺伝子アッセンブル”と題する5.1節、135-137頁を参照のこと)、一つの実験アームでMutS処理核酸ビルディングブロックを使用し、また別のアームで未処理核酸ビルディングブロックを使用して、本発明の核酸再アッセンブル方法を続けた。最終核酸再アッセンブル生成物を、アッセンブル及び未結合フラグメントを除去するための洗浄の段階的サイクルにより作製した。完全長生成物を制限消化によりビーズから切り離し、PCRにより増幅し、好適なベクターにクローン化し、大腸菌を形質転換した。MutS処理の影響を調べるために、夫々の再アッセンブル反応アームからの20のクローンをランダムに取り出し、夫々のプラスミドを単離し、挿入されたオープンリーディングフレームの保全性を配列決定によりチェックした。

10

結果: 配列比較はMutS処理が遺伝子16580T5に関する正確なオープンリーディングフレームの収率を実質的に増大することが明らかにされた。

【0130】

実施例5: 遺伝子再アッセンブル

下記の実施例は遺伝子再アッセンブルを使用する三つの関連親ヌクレオチド配列の操作を記載する。三つの関連親ヌクレオチド配列の夫々をコンピュータ中で整列して境界画定点を決定し、17のこのような位置を同定した。夫々の境界画定点が一旦決定されると、このシステムは夫々の親遺伝子を構成する18の異なるフラグメントの配列を決定した。親配列からの夫々のフラグメントは固有な5'及び3'オーバーハングを有し、こうして適切な順序の遺伝子のみをコンピュータにより再アッセンブルすることができた。18のフラグメント及び三つの親があったので、この系は分析すべき合計 $18 \times 3 = 54$ の全フラグメントを有していた。予備連結されるフラグメントの夫々の可能な組み合わせに相当するデータファイルを記憶するために、工程中のフラグメントの夫々を予備連結することがこの系にとって有利である。これは、その系が前もって決められたPDFを有する得られる子孫集団を発生するために連結反応における夫々の工程で夫々の予備連結されたフラグメントの適切な量を決めることを可能にする。こうして、この実施例において、コンピュータが夫々の親配列についてのそのメモリーへの下記の予備連結配列を決定し、保存した。それ故、下記の予備連結方法を夫々の親配列について行ない、得られるデータをコンピュータに保存する。

20

30

命名規則“F1_1”は選ばれた親配列からの第一フラグメントを表す。用語“F1_5”は、以下に示されるように、選ばれた親配列の第一、第二、第三、第四及び第五のフラグメントの組み合わせを含むデータ組に対応する。こうして、下記のリストはそのシステムが所定の親について夫々の可能な予備連結フラグメントを記憶するデータ組を発生し得ることを示す。次いでこのデータ組をそのシステムにより使用して夫々の予備連結フラグメントの適切な量を決めて子孫キメラ配列の所望の最終のクロスオーバー集団を生じる。

【0131】

40

$F1_1 = F1_1$
 $F1_2 = F1_1 + F2_2$
 $F1_3 = F1_1 + F2_2 + F3_3$
 $F1_4 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4$
 $F1_5 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5$
 $F1_6 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6$
 $F1_7 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7$
 $F1_8 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8$
 $F1_9 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9$
 $F1_10 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10$ 10
 $F1_11 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11$
 $F1_12 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12$
 $F1_13 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13$
 $F1_14 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14$
 $F1_15 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15$
 $F1_16 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15 + F16_16$ 20
 $F1_17 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15 + F16_16 + F17_17$
 $F1_18 = F1_1 + F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15 + F16_16 + F17_17 + F18_18$
 $F2_2 = F2_2$
 $F2_3 = F2_2 + F3_3$
 $F2_4 = F2_2 + F3_3 + F4_4$
 $F2_5 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5$
 $F2_6 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6$ 30
 $F2_7 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7$
 $F2_8 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8$
 $F2_9 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9$
 $F2_10 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10$
 $F2_11 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11$
 $F2_12 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12$
 $F2_13 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13$
 $F2_14 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14$ 40
 $F2_15 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15$
 $F2_16 = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15 + F16_16$

$$F2_{17} = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

$$F2_{18} = F2_2 + F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F3_3 = F3_3$$

$$F3_4 = F3_3 + F4_4$$

$$F3_5 = F3_3 + F4_4 + F5_5$$

$$F3_6 = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6$$

$$F3_7 = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7$$

$$F3_8 = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8$$

10

$$F3_9 = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9$$

$$F3_{10} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10}$$

$$F3_{11} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11}$$

$$F3_{12} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12}$$

$$F3_{13} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F3_{14} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$$F3_{15} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$$

$$F3_{16} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$$

20

$$F3_{17} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

30

40

50

$$F3_{18} = F3_3 + F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} \\ + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F4_4 = F4_4$$

$$F4_5 = F4_4 + F5_5$$

$$F4_6 = F4_4 + F5_5 + F6_6$$

$$F4_7 = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7$$

$$F4_8 = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8$$

$$F4_9 = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9$$

$$F4_{10} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10}$$

$$F4_{11} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11}$$

10

$$F4_{12} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12}$$

$$F4_{13} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F4_{14} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$$F4_{15} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$$

$$F4_{16} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$$

$$F4_{17} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

20

$$F4_{18} = F4_4 + F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F5_5 = F5_5$$

$$F5_6 = F5_5 + F6_6$$

$$F5_7 = F5_5 + F6_6 + F7_7$$

$$F5_8 = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8$$

$$F5_9 = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9$$

$$F5_{10} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10}$$

$$F5_{11} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11}$$

30

$$F5_{12} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12}$$

$$F5_{13} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F5_{14} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$$F5_{15} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$$

$$F5_{16} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$$

$$F5_{17} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

40

$$F5_{18} = F5_5 + F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$F6_6 = F6_6$
 $F6_7 = F6_6 + F7_7$
 $F6_8 = F6_6 + F7_7 + F8_8$
 $F6_9 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9$
 $F6_10 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10$
 $F6_11 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11$
 $F6_12 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12$
 $F6_13 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13$
 $F6_14 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14$
 $F6_15 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F$ 10
 15_15
 $F6_16 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F$
 $15_15 + F16_16$
 $F6_17 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F$
 $15_15 + F16_16 + F17_17$
 $F6_18 = F6_6 + F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F$
 $15_15 + F16_16 + F17_17 + F18_18$
 $F7_7 = F7_7$
 $F7_8 = F7_7 + F8_8$
 $F7_9 = F7_7 + F8_8 + F9_9$ 20
 $F7_10 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10$
 $F7_11 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11$
 $F7_12 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12$
 $F7_13 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13$
 $F7_14 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14$
 $F7_15 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15$
 $F7_16 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15 +$
 $F16_16$
 $F7_17 = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_10 + F11_11 + F12_12 + F13_13 + F14_14 + F15_15 +$
 $F16_16 + F17_17$ 30

40

$$F7_{18} = F7_7 + F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F8_8 = F8_8$$

$$F8_9 = F8_8 + F9_9$$

$$F8_{10} = F8_8 + F9_9 + F10_{10}$$

$$F8_{11} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11}$$

$$F8_{12} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12}$$

$$F8_{13} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F8_{14} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$$F8_{15} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$$

10

$$F8_{16} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$$

$$F8_{17} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

$$F8_{18} = F8_8 + F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F9_9 = F9_9$$

$$F9_{10} = F9_9 + F10_{10}$$

$$F9_{11} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11}$$

$$F9_{12} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12}$$

20

$$F9_{13} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F9_{14} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$$F9_{15} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$$

$$F9_{16} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$$

$$F9_{17} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

$$F9_{18} = F9_9 + F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F10_{10} = F10_{10}$$

$$F10_{11} = F10_{10} + F11_{11}$$

30

$$F10_{12} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12}$$

$$F10_{13} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F10_{14} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$$F10_{15} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$$

$$F10_{16} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$$

$$F10_{17} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$$

$$F10_{18} = F10_{10} + F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$$

$$F11_{11} = F11_{11}$$

$$F11_{12} = F11_{11} + F12_{12}$$

40

$$F11_{13} = F11_{11} + F12_{12} + F13_{13}$$

$$F11_{14} = F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$$

$F11_{15} = F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$
 $F11_{16} = F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$
 $F11_{17} = F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$
 $F11_{18} = F11_{11} + F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$
 $F12_{12} = F12_{12}$
 $F12_{13} = F12_{12} + F13_{13}$
 $F12_{14} = F12_{12} + F13_{13} + F14_{14}$
 $F12_{15} = F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$
 $F12_{16} = F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$
 $F12_{17} = F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$
 $F12_{18} = F12_{12} + F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$
 $F13_{13} = F13_{13}$
 $F13_{14} = F13_{13} + F14_{14}$
 $F13_{15} = F13_{13} + F14_{14} + F15_{15}$
 $F13_{16} = F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$
 $F13_{17} = F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$
 $F13_{18} = F13_{13} + F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$
 $F14_{14} = F14_{14}$
 $F14_{15} = F14_{14} + F15_{15}$
 $F14_{16} = F14_{14} + F15_{15} + F16_{16}$
 $F14_{17} = F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$
 $F14_{18} = F14_{14} + F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$
 $F15_{15} = F15_{15}$
 $F15_{16} = F15_{15} + F16_{16}$
 $F15_{17} = F15_{15} + F16_{16} + F17_{17}$
 $F15_{18} = F15_{15} + F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$
 $F16_{16} = F16_{16}$
 $F16_{17} = F16_{16} + F17_{17}$
 $F16_{18} = F16_{16} + F17_{17} + F18_{18}$
 $F17_{17} = F17_{17}$
 $F17_{18} = F17_{17} + F18_{18}$
 $F18_{18} = F18_{18}$

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

夫々の予備連結フラグメントの配列が一旦決定されると、このシステムは所望のPDFを生じるのに使用される夫々の予備連結配列の部分で推定し始める。先に説明したように、18のフラグメントを有する配列についての連結反応が18の別々の反応として起きることが好ましい。こうして、このシステムは18の別々の連結反応についての連結反応の出発組を生じる。夫々の連結反応工程が使用する予備連結分子は次第に少なくなること注目すべきである。これは、例えば、連結反応の第三工程がフラグメント1 “F1” 又はフラグメント2 (F2)から出発する予備連結フラグメントを必要としないという事実のためである。何とならば、これらのフラグメントは連結反応における第三工程によりその他のフラグメントに既につながれているからである。工程3で、夫々の親から第三フラグメントに結合するフラグメントの連結反応のみがあるべきである。

例えば、以下がコンピュータシステムのメモリー内で起きる例示の連結反応である。

連結反応工程の数：18

夫々の工程のシミュレートされた連結反応容積 (ul)：100

【 0 1 3 8 】

50

【表 1】

| ライゲーシオン
工程#1 | ライゲーシオン
工程#2 | ライゲーシオン
工程#3 | ライゲーシオン
工程#4 | ライゲーシオン
工程#5 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0.6μlのF1_1 | 0.7μlのF2_2 | 0.7μlのF3_3 | 0.8μlのF4_4 | 1.0μlのF5_5 |
| 1.2μlのF1_2 | 1.3μlのF2_3 | 1.5μlのF3_4 | 1.7μlのF4_5 | 1.9μlのF5_6 |
| 1.8μlのF1_3 | 2.0μlのF2_4 | 2.2μlのF3_5 | 2.5μlのF4_6 | 2.9μlのF5_7 |
| 2.3μlのF1_4 | 2.6μlのF2_5 | 2.9μlのF3_6 | 3.3μlのF4_7 | 3.8μlのF5_8 |
| 2.9μlのF1_5 | 3.3μlのF2_6 | 3.7μlのF3_7 | 4.2μlのF4_8 | 4.8μlのF5_9 |
| 3.5μlのF1_6 | 3.9μlのF2_7 | 4.4μlのF3_8 | 5.0μlのF4_9 | 5.7μlのF5_10 |
| 4.1μlのF1_7 | 4.6μlのF2_8 | 5.1μlのF3_9 | 5.8μlのF4_10 | 6.7μlのF5_11 |
| 4.7μlのF1_8 | 5.2μlのF2_9 | 5.9μlのF3_10 | 6.7μlのF4_11 | 7.6μlのF5_12 |
| 5.3μlのF1_9 | 5.9μlのF2_10 | 6.6μlのF3_11 | 7.5μlのF4_12 | 8.6μlのF5_13 |
| 5.8μlのF1_10 | 6.5μlのF2_11 | 7.4μlのF3_12 | 8.3μlのF4_13 | 9.5μlのF5_14 |
| 6.4μlのF1_11 | 7.2μlのF2_12 | 8.1μlのF3_13 | 9.2μlのF4_14 | 10.5μlのF5_15 |
| 7.0μlのF1_12 | 7.8μlのF2_13 | 8.8μlのF3_14 | 10.0μlのF4_15 | 11.4μlのF5_16 |
| 7.6μlのF1_13 | 8.5μlのF2_14 | 9.6μlのF3_15 | 10.8μlのF4_16 | 12.4μlのF5_17 |
| 8.2μlのF1_14 | 9.2μlのF2_15 | 10.3μlのF3_16 | 11.7μlのF4_17 | 13.3μlのF5_18 |
| 8.8μlのF1_15 | 9.8μlのF2_16 | 11.0μlのF3_17 | 12.5μlのF4_18 | |
| 9.4μlのF1_16 | 10.5μlのF2_17 | 11.8μlのF3_18 | | |
| 9.9μlのF1_17 | 11.1μlのF2_18 | | | |
| 10.5μlのF1_18 | | | | |

10

20

30

40

50

【表 2】

| ライゲーシヨン
工程#6: | ライゲーシヨン
工程#7 | ライゲーシヨン
工程#8 | ライゲーシヨン
工程#9 | ライゲーシヨン
工程#10 |
|--|--|--|--|--|
| 1. 1 μ 1のF6_6
2. 2 μ 1のF6_7
3. 3 μ 1のF6_8
4. 4 μ 1のF6_9
5. 5 μ 1のF6_10
6. 6 μ 1のF6_11
7. 7 μ 1のF6_12
8. 8 μ 1のF6_13
9. 9 μ 1のF6_14
11. 0 μ 1のF6_15
12. 1 μ 1のF6_16
13. 2 μ 1のF6_17
14. 3 μ 1のF6_18 | 1. 3 μ 1のF7_7
2. 6 μ 1のF7_8
3. 8 μ 1のF7_9
5. 1 μ 1のF7_10
6. 4 μ 1のF7_11
7. 7 μ 1のF7_12
9. 0 μ 1のF7_13
10. 3 μ 1のF7_14
11. 5 μ 1のF7_15
12. 8 μ 1のF7_16
14. 1 μ 1のF7_17
15. 4 μ 1のF7_18 | 1. 5 μ 1のF8_8
3. 0 μ 1のF8_9
4. 5 μ 1のF8_10
6. 1 μ 1のF8_11
7. 6 μ 1のF8_12
9. 1 μ 1のF8_13
10. 6 μ 1のF8_14
12. 1 μ 1のF8_15
1 3. 6 μ 1のF8_16
15. 2 μ 1のF8_17
16. 7 μ 1のF8_18 | 1. 8 μ 1のF9_9
3. 6 μ 1のF9_10
5. 5 μ 1のF9_11
7. 3 μ 1のF9_12
9. 1 μ 1のF9_13
10. 9 μ 1のF9_14
12. 7 μ 1のF9_15
14. 5 μ 1のF9_16
16. 4 μ 1のF9_17
18. 2 μ 1のF9_18 | 2. 2 μ 1のF10_10
4. 4 μ 1のF10_11
6. 7 μ 1のF10_12
8. 9 μ 1のF10_13
11. 1 μ 1のF10_14
13. 3 μ 1のF10_15
15. 6 μ 1のF10_16
17. 8 μ 1のF10_17
20. 0 μ 1のF10_18 |
| ライゲーシヨン
工程#11 | ライゲーシヨン
工程#12 | ライゲーシヨン
工程#13 | ライゲーシヨン
工程#14 | ライゲーシヨン
工程#15 |
| 2. 8 μ 1のF11_11
5. 6 μ 1のF11_12
8. 3 μ 1のF11_13
11. 1 μ 1のF11_14
13. 9 μ 1のF11_15
16. 7 μ 1のF11_16
19. 4 μ 1のF11_17
22. 2 μ 1のF11_18 | 3. 6 μ 1のF12_12
7. 1 μ 1のF12_13
10. 7 μ 1のF12_14
14. 3 μ 1のF12_15
17. 9 μ 1のF12_16
21. 4 μ 1のF12_17
25. 0 μ 1のF12_18 | 4. 8 μ 1のF13_13
9. 5 μ 1のF13_14
14. 3 μ 1のF13_15
19. 0 μ 1のF13_16
23. 8 μ 1のF13_17
28. 6 μ 1のF13_18 | 6. 7 μ 1のF14_14
13. 3 μ 1のF14_15
20. 0 μ 1のF14_16
26. 7 μ 1のF14_17
33. 3 μ 1のF14_18 | 10. 0 μ 1のF15_15
20. 0 μ 1のF15_16
30. 0 μ 1のF15_17
40. 0 μ 1のF15_18 |
| ライゲーシヨン
工程#16 | ライゲーシヨン
工程#17 | ライゲーシヨン
工程#18 | | |
| 16. 7 μ 1のF16_16
33. 3 μ 1のF16_17
50. 0 μ 1のF16_18 | 33. 3 μ 1のF17_17
66. 7 μ 1のF17_18 | 100. 0 μ 1のF18_18 | | |

10

20

30

【0140】

先行する連結反応の実施は計算されたPDFをもたす。こうして、PDFが所望の可能性関数にマッチするまで、このシステムはその後にシミュレートされた再アッセンブルの更なるラウンド中に夫々の予備連結フラグメントの量を調整することができる。子孫分子の大半は一つ又は二つのクロスオーバーイベントを有するにすぎない。以下に示されるような、連結反応の量の調節は、それが更に多くのクロスオーバーイベントを有する子孫分子に向かって移動するようにPDFを偏向するであろう。

40

【0141】

コンピュータシステム：

本発明の方法、特に、本発明の遺伝子再アッセンブル局面は、コンピュータシステムを使用して本明細書に記載された方法を行なうことができる。一局面において、コンピュータシステムは通常のパーソナルコンピュータ、例えば、インテルマイクロプロセッサをベースとし、Windows（登録商標）オペレーションシステムを実行するものである。コンピュータシステムのアウトプットは再アッセンブルされた子孫遺伝子を生じるための処方として使用し得るフラグメントPDF、及びこれらの遺伝子の推定クロスオーバーPDFである。本明細書に記載されたプロセッシングはMATLABTMプログラミング言語及び開発環境を使用するパーソナルコンピュータにより行ない得る。本発明は特別なハードウェア又はシフトウ

50

エア形態に限定されない。例えば、その他の公知のマイクロプロセッサ及び実行操作システムソフトウェア、例えば、UNIXTM、リナックス、MacOSTM等をベースとするコンピュータが意図されている。

図8は本発明の方法に使用される例示のソフトウェアプログラムを示す。この“ジーンカーペンターTM”ソフトウェアプログラムは遺伝子再アッセンブル制御ソフトウェアとして、特にコドンビルディングブロックの反復集合によりポリヌクレオチドを設計し、作製するための本発明の方法に使用し得る。

【0142】

実施例6：反復又はコンビナトリアルアプローチ

種々の局面において、本発明は点突然変異又はコドン突然変異（例えば、全ての可能なアミノ酸置換が夫々の位置で導入される場合、GSSMによる）、続いて、選ばれた生成物（例えば、陽性ヒット）及び/又は親配列間のキメラ化、必要により一つ以上の選抜及び/又はスクリーニング工程、及び必要により一つ以上の突然変異誘発工程で繰り返すことと組み合わせて、選抜及び/又はスクリーニングを含む方法を含む。本発明のスクリーニング又は選抜基準は下記の一つ以上の増大又は減少を含んでもよい：熱トレランス、例えば、熱による変性後に復元する能力（例えば、ボンベ熱量計の助けにより測定されるような）、貯蔵寿命（例えば、種々の温度における貯蔵寿命）、生物学的利用能、発現レベル、消化道分解又はプロテアーゼ媒介分解に対する耐性、及び異なる環境条件（例えば、異なるpH、圧力、塩度、溶媒等の条件への暴露）下の活性及び/又は安定性。

GSSMTM方法による進化。GSSMTM方法を使用して遺伝子BD7746中に点突然変異の包括的ライブラリーを作製した。高温での熱曝露後に酵素の残留活性を測定する熱耐性に関するスクリーニングを開発した。キシラナーゼ熱耐性スクリーニングと組み合わされたGSSMは改良された熱耐性を有する9種の固有な点突然変異体を同定した。部位誘導突然変異誘発を使用して、全ての9の突然変異を一つの遺伝子中に合わせて9X突然変異体酵素を生成した。

遺伝子再アッセンブル技術を使用するコンビナトリアルGSSMTM変異体の生成。9X変異体と較べて最高の熱耐性及び活性を有する9の点突然変異の変異体を同定するために、全ての可能な突然変異体組み合わせ(2⁹)の遺伝子再アッセンブルライブラリーを構築し、スクリーニングした。熱安定性を基準として使用して、9の突然変異の33の固有な組み合わせをアップ-ミュータントとして同定した。二次スクリーニングを行なって進化した9Xよりも高い活性/発現を有する変異体について選抜した。このスクリーニングは種々の組み合わせで6～8の突然変異を有する配列を有する10の変異体を生じた。全ての10の変異体は9X変異体よりも高い熱耐性及び改良された活性を有する。これらの酵素を続いて精製し、特性決定した。

【0143】

詳細なプロトコル：

BD7746の遺伝子部位飽和突然変異誘発及び活性スクリーニング。BD7746遺伝子をPCRにより増幅し、pTrcHis2 TOP0TMTAクローニング（登録商標）キット（インビトロゲン、カールスバッド、CA）を使用して発現ベクターpTrcHis2にクローン化した。64倍縮重オリゴヌクレオチドを使用してGSSMを既に記載されたように（Short, JM 2001）行なって、全ての可能なアミノ酸がコードされるように遺伝子中の夫々のコドンにおいてランダム化した。得られたGSSMライブラリーをスクリーニングのためにXL1-Blue（ストラタジーン、ラジョラ、CA）に形質転換した。

自動化コロニーピッカー（AutoGen、Ma）を使用して、個々のクローンをLB培地200μL及びアンピシリン100μg/mLを含む96ウェル・マイクロタイタ・プレート中でアレイした。四つの96ウェル・プレートをコドン当りスクリーニングした。プレートを37℃で一夜インキュベートした。96ウェル・ピンツールを使用してこれらのマスタープレートを抗生物質を含む新しい培地中に複製した。レプリカプレートをガス透過性接着フィルムでシールし、37℃で一夜インキュベートした。インキュベーション後、シールを除去し、プレートを10分間にわたって約3000gで遠心分離した。上澄みを除去し、細胞を100mM KClを含む100m

M クエン酸塩 / リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) (CP緩衝液) 45 μ L 中で再懸濁させた。次いでプレートに接着アルミニウムシールで覆い、80 $^{\circ}$ C で20分間インキュベートし、続いてCP緩衝液中で調製された2%のアゾ-キシラン30 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ C で一夜インキュベートした。インキュベーション後、100%のエタノール200 μ Lを添加し、プレートを10分間にわたって約3000gで遠心分離した。上澄みを新しいプレートに移し、590nmにおける吸光度を測定して残留酵素活性を定量した。

【0144】

部位誘導突然変異誘発を使用して、全ての9の突然変異を一つの遺伝子中で合わせて9X突然変異体酵素を生成した。N末端ヘキサヒスチジンタグを付加するように設計されたプライマーを使用して、9X遺伝子、野生型遺伝子及び全ての9の単一突然変異体遺伝子をPCR増幅した。PCR産物を上記のようにpTrcHis2にクローン化した。

遺伝子再アッセンブルTMライブラリー構築及びスクリーニング。591bpのXYL7746遺伝子(遺伝子プラスヘキサヒスチジン標識のためのコドン)をGSSMクローン中の突然変異の位置に応じて5のセグメントに分けた。このシナリオでは、セグメント1及び3が野生型遺伝子に相当し、一方、セグメント2及び4は夫々0-4のアミノ酸突然変異を含み、セグメント5は0-1の突然変異を含んでいた。セグメントの三つ、1、3及び5をPCRにより生成し、この場合、セグメント1及び3は野生型鋳型を使用し、また2種の異なる鋳型(野生型及び突然変異体S79P)を使用してセグメント5を作製した。夫々0-4の突然変異を含む合成オリゴヌクレオチドをアニールすることにより、セグメント2及び4の両方を作製した。全てのセグメントを作製した後に、最初にセグメント1、3及び5のPCR産物を消化してアニールされたオリゴマー2及び4のそれらと適合性のオーバーハングを生じることによりライブラリーを構築した。セグメント1-3及び4-5を別々に連結した。連結された1-3セグメントをPCRにより増幅し、生成物を消化し、セグメント4-5に連結した。最終ライブラリー(512の突然変異体;セグメント1-5)を単離し、pTrcHis2にクローン化し、XL1-Blue MRF'細胞(ストラタジーン、ラジョラ、CA)に形質転換し、100 μ g/mLのアンプシリンを含む固体LB培地に塗布した。約4000のコロニーを約40の96ウェル・プレートに自動ピッキングし(上記を参照のこと)、37 $^{\circ}$ C で一夜インキュベートした。再懸濁された細胞を60分間にわたって80 $^{\circ}$ C でインキュベートし、続いて基質を添加し、プレートを20分間にわたって37 $^{\circ}$ C でインキュベートした以外は、スクリーニングアッセイをGSSMTM突然変異体ライブラリーのスクリーニングについて上記したように行なった。

【0145】

本発明の幾つかの実施態様を記載してきた。しかしながら、種々の改良が本発明の精神及び範囲から逸脱しないでなし得ることが理解されるであろう。それ故、その他の実施態様も特許請求の範囲内である。

種々の図面中の同様の参照記号は同様の要素を示す。

【図面の簡単な説明】

【0146】

【図1】本発明の遺伝子構築方法の例示の“伸長サイクル”を図示し、その方法は実施例1に詳しく説明されたように基質へのスターターオリゴの“ローディング”、連結反応(あらゆるリガーゼ、例えば、T4リガーゼ又はE. coliリガーゼによる)、洗浄、末端のフィル-イン、洗浄、制限エンドヌクレアーゼによる切断、洗浄、繰り返し(反復サイクル)を含む。

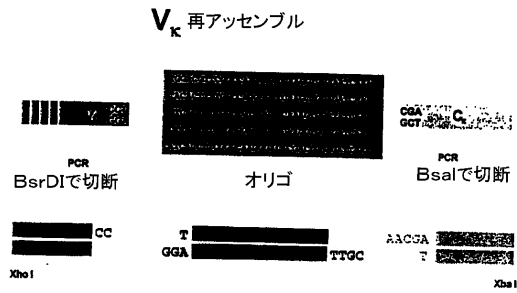
【図2】実施例2に説明されたような、本発明の方法に従って抗体軽鎖を再アッセンブルするように設計されたクローニングベクターを図示する。

【図3】実施例2に説明されたような、本発明の方法に従ってラムダ軽鎖を再アッセンブルするための例示のスキームを図示する。

【図4】実施例2に説明されたような、本発明の方法に従って銅重鎖を再アッセンブルするための例示のスキームを図示する。

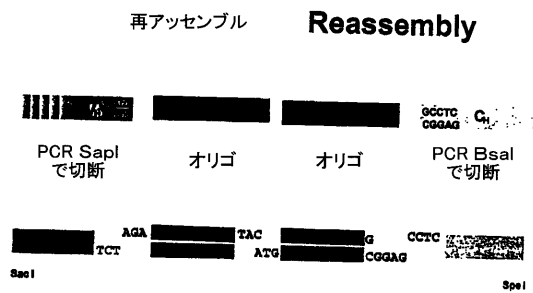
【図5】実施例2に説明されたような、本発明の方法に従って抗体重鎖を再アッセンブル

【 図 4 】



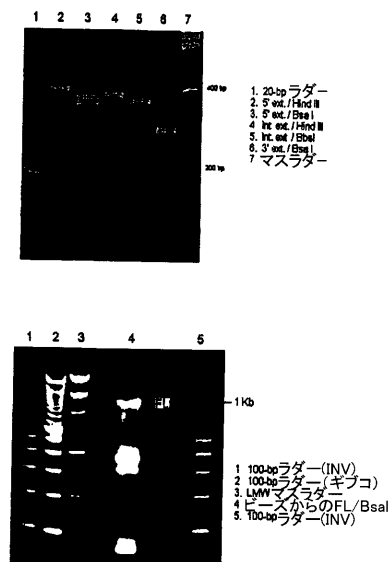
【 図 5 】

FIG. 5

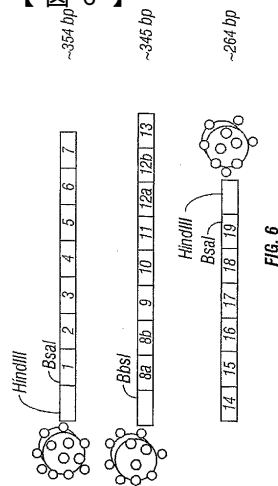


【 図 7 】

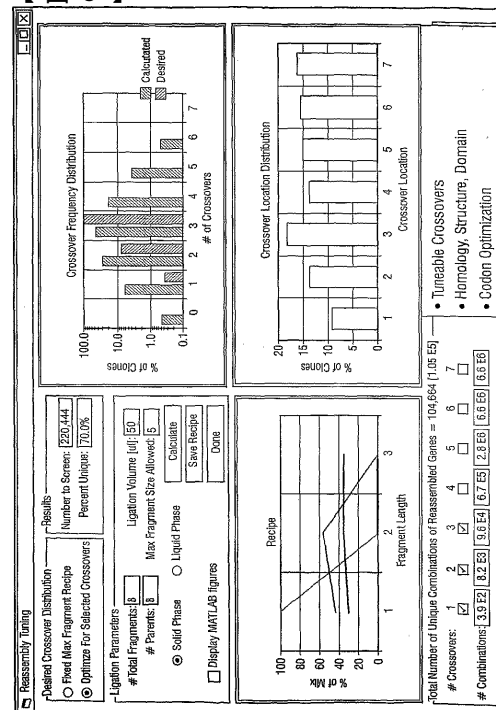
FIG. 7



【 図 6 】



【 図 8 】



【配列表】

2005514927000001.app

【 国際調査報告 】

| | | |
|---|---|--|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No.
PCT/US03/01189 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC(7) : C12Q 1/68
US CL : 435/6 | | |
| 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 | | |
| 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)
MEDLINE, CAPLUS, WEST 2.0 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A, P | US 6,365,355 B1 (MCCUTCHEN-MALONEY) 02 April 2002 (02.04.2002), see entire patent. | 1-85 |
| A | US 5,750,335 A (GIFFORD) 12 May 1998 (12.05.1998), see entire patent. | 1-85 |
| A | US 6,046,036 A (KELLEY et al) 04 April 2000 (04.04.2000), see entire patent. | 1-85 |
| A | US 6,114,115 A (WAGNER, JR.) 05 September 2000 (05.09.2000) see entire patent. | 1-85 |
| A | US 6,297,010 B1 (STEFANO) 02 October 2001 (02.10.2001) see entire patent. | 1-85 |
| A | US 6,294,325 B1 (WETMUR) 25 September 2001 (25.09.2001), see entire patent. | 1-85 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "B" | earlier application or patent published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "Z" document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| Date of the actual completion of the international search
17 May 2004 (17.05.2004) | | Date of mailing of the international search report
06 JUL 2004 |
| Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230 | | Authorized officer
Gary Benizion
Telephone No. (703) 308 0196 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/01189

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

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claim Nos.: 235-238
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-85

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/01189

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claim(s) 1-85, drawn to a method for purifying double-stranded polynucleotides.

Group II, claim(s) 87-108, 174-177 and 178-223, drawn to a library of nucleic acids.

Group III, claim(s) 109-173, drawn to a method for building a polynucleotide.

Group IV, claim(s) 224, drawn to transgenic animal.

Group V, claim(s) 225-234 and 239-292, drawn to a method of making a chimeric antigen binding polypeptide.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons. The first mentioned invention, Group I, claims 1-85 do not represent a contribution over the prior art because the prior art (Stefano, US 6,297,010 B1, October 2001, col. 4, lines 40-64 and col. 12, lines 46-54) teach a method for purifying double stranded polynucleotides lacking bases pair mismatches, insertion/deletion loops and/or a nucleotide gap or gaps. Thus the claims lack a special technical feature that is the same or that corresponds to a special feature of the other claimed inventions. Likewise, there is not a special technical feature linking the recited groups, as would be necessary to fulfilled the requirements for unity of invention.

Further Groups II (claims 87-108, 174-177 and 178-223) drawn to a library of nucleic acids and Group IV (claim 224) drawn to a transgenic animal are additionally drawn to distinct products lacking the same or corresponding special technical features. The library of nucleic acid are composed of nucleotides and function in e.g., methods of nucleic acid amplification and hybridization or nucleic acid cloning and sequencing whereas the transgenic animal is a complex organism that is employed in e.g., animal research methods. Such organism cannot be employed as a e.g., probe or primer, and it differs from the nucleic acids.

Further Groups III (claims 109-173) drawn to a method for building a polynucleotide and Group V (claims 225-292) draw to a method of making a chimer antigen binding polypeptide are distinct methods in that they have different objectives and require different process steps as well as different reagents and starting materials. Likewise, the different methods lack the same or common special technical feature.

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 5/10 | C 1 2 P 21/08 | |
| C 1 2 P 21/08 | G 0 1 N 30/48 | R |
| G 0 1 N 30/48 | G 0 1 N 30/88 | F |
| G 0 1 N 30/88 | C 1 2 N 5/00 | A |
| | C 1 2 N 15/00 | F |

(31)優先権主張番号 10/077,474

(32)優先日 平成14年2月14日(2002.2.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

リナックス

(72)発明者 フレイ ガーハード

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 9 サン ディエゴ ヴィア シマ ベルズ 1 3
7 6 8

(72)発明者 ショート ジェイ エム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 6 7 - 7 2 1 4 ランチャー サンタ フェ パセオ
デリシャス 6 8 0 1

(72)発明者 パーラ - ゲサート リリアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サン ディエゴ ウィップル アベニュー 7
0 2 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA01 DA06 EA04 GA11 HA14 HA15

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA26X AB01 BA02 CA23 CA25 CA44 CA46