(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2005-528107
(P2005-528107A)
(43)公表日　平成17年9月22日(2005.9.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	A01K 67/027		4B065
A61K 38/00	A61K 39/385		4C076
A61K 39/385	A61K 39/395	Y	4C084
A61K 39/395	A61K 47/48		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 105 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-510425 (P2004-510425)
(86)(22)出願日　平成15年5月30日 (2003.5.30)
(85)翻訳文提出日　平成17年1月31日 (2005.1.31)
(86)国際出願番号　PCT/AU2003/000667
(87)国際公開番号　WO2003/102187
(87)国際公開日　平成15年12月11日 (2003.12.11)
(31)優先権主張番号　60/384,878
(32)優先日　平成14年5月31日 (2002.5.31)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504441303
シェジェン　ピーティーワイ　リミテッド
オーストラリア国　ウエスタン　オーストラリア　ウエスト　パース　パーラメント　プレイス　３２
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100108774
弁理士　橋本　一憲
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(72)発明者　コーエントジェン　フランク
オーストラリア国　ウエスタン　オーストラリア　ノース　ビーチ　ウエスト　コースト　ドライブ　１４１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】膜転位置配列由来の自己合体または自己凝集キメラタンパク質

(57)【要約】
本発明は、分子を自己合体エレメントと連結、融合または異なる方法で会合させ、それにより、そのように形成されたキメラ分子がより高分子量凝集体へ自己集合することによる、分子の活性を増強させるための、または異なる分子の個々の活性を組み合わせるための方法を開示する。本発明はまた、そのようなキメラ分子それ自体、ならびに治療的、予防的および化学過程の適用におけるそれらの使用も開示する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる、および対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、かつ個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子が：前駆体の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外である、凝集体。
【請求項２】
自己合体エレメントが長さが約8個から約35個のアミノ酸残基である、請求項1記載の凝集体。
【請求項３】
自己合体エレメントのアミノ酸配列が約60 %から約95 %の小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはそれらの修飾型を有する、請求項1記載の凝集体。
【請求項４】
自己合体エレメントが膜転位置配列である、請求項1記載の凝集体。
【請求項５】
膜転位置配列が、生理的条件下でより高次の凝集体へ凝集する能力をもつ、天然に存在するシグナル配列またはその変異体である、請求項4記載の凝集体。
【請求項６】
膜転位置配列が細菌、放線菌、ウイルス、原生動物、酵母、植物および動物からなる群より選択される生物体から得られる、請求項4記載の凝集体。
【請求項７】
膜転位置配列が昆虫、鳥、爬虫類、魚および哺乳動物からなる群より選択される動物から得られる、請求項4記載の凝集体。
【請求項８】
膜転位置配列が細菌から得られる、請求項4記載の凝集体。
【請求項９】
膜転位置配列が配列番号：12～90およびそれらの生物学的活性断片からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の凝集体。
【請求項１０】
膜転位置配列が配列番号：67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、83、84、85および87ならびにそれらの生物学的活性断片からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の凝集体。
【請求項１１】
膜転位置配列が配列番号：91～132からなる群より選択される配列に少なくとも低ストリンジェント性条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の凝集体。
【請求項１２】
膜転位置配列が配列番号：126～132からなる群より選択される配列に少なくとも低ストリンジェント性条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の凝集体。
【請求項１３】
対象となる分子が薬物、代謝産物、殺虫剤および除草剤からなる群より選択される有機化合物である、請求項1記載の凝集体。
【請求項１４】
対象となる分子が有機ポリマーである、請求項1記載の凝集体。

【請求項１５】
有機ポリマーがポリペプチドおよびポリヌクレオチドからなる群より選択される、請求項14記載の凝集体。
【請求項１６】
対象となる分子が酵素、受容体、抗原結合分子、リガンド結合ポリペプチド、金属結合ポリペプチド、集光性ポリペプチド、光スペクトル改変ポリペプチド、制御ポリペプチド、ケモカイン、サイトカイン、インターロイキン、成長因子、インターフェロン、代謝性ポリペプチド、免疫増強ポリペプチド、免疫抑制ポリペプチド、血管形成性ポリペプチド、抗血管形成性ポリペプチド、抗原性ポリペプチドおよびそれらの生物学的活性断片からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1記載の凝集体。
【請求項１７】
対象となる分子がサイトカイン、成長因子およびホルモンからなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1記載の凝集体。
【請求項１８】
ポリペプチドがインターフェロン-α、インターフェロン-β、インターフェロン-γ、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12、インターロイキン-13、インターロイキン-14、インターロイキン-15、インターロイキン-16、エリスロポエチン、コロニー刺激因子-1、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、白血病抑制因子、腫瘍壊死因子、リンホトキシン、血小板由来成長因子、線維芽細胞成長因子、血管内皮細胞成長因子、上皮細胞成長因子、トランスフォーミング成長因子-β、トランスフォーミング成長因子-α、トロンボポエチン、幹細胞因子、オンコスタチンM、アンフィレギュリン、ミュラー管阻害物質、B細胞成長因子、マクロファージ遊走阻止因子、単球化学誘引物質タンパク質、エンドスタチンおよびアンジオスタチン、ならびにそれらの生物学的活性断片からなる群より選択される、請求項17記載の凝集体。
【請求項１９】
対象となる分子がポリペプチド抗原である、請求項1記載の凝集体。
【請求項２０】
ポリペプチド抗原がウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、微生物抗原、腫瘍抗原および自己抗原からなる群より選択される、請求項19記載の凝集体。
【請求項２１】
ポリペプチド抗原がヒト免疫不全ウイルス(HIV)、パピローマウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルス、ラウス肉腫ウイルス、脳炎を引き起こすウイルス、ヘルペスウイルスおよび肝炎ウイルスからなる群より選択されるウイルス由来である、請求項19記載の凝集体。
【請求項２２】
ポリペプチド抗原がナイセリア(Neisseria)種、髄膜炎菌の(Meningococcal)種、ヘモフィルス(Haemophilus)種、サルモネラ(Salmonella)種、連鎖球菌の(Streptococcal)種、レジオネラ(Legionella)種およびマイコバクテリウム(Mycobacterium)種からなる群より選択される細菌由来である、請求項19記載の凝集体。
【請求項２３】
ポリペプチド抗原がプラスモディウム(Plasmodium)種、住血吸虫(Schistosoma)種、リーシュマニア(Leishmania)種、トリパノソーマ(Trypanosoma)種、トキソプラズマ(Toxoplasma)種およびジアルジア(Giardia)種からなる群より選択される原生動物由来である、請求項19記載の凝集体。
【請求項２４】
ポリペプチド抗原が黒色腫、肺癌、乳癌、子宮頚癌、前立腺癌、大腸癌、膵癌、胃癌、膀胱癌、腎臓癌、移植後リンパ球増殖性疾患(PTLD)およびホジキンリンパ腫からなる群よ

り選択される癌または腫瘍由来である、請求項19記載の凝集体。
【請求項２５】
対象となる分子が化合物吸収ポリペプチド、化合物結合ポリペプチド、化合物取り込みポリペプチド、化合物排出ポリペプチド、化合物分配ポリペプチド、化合物輸送ポリペプチド、化合物処理ポリペプチド、化合物転化ポリペプチドおよび化合物分解ポリペプチドからなる群より選択される代謝性ポリペプチドである、請求項1記載の凝集体。
【請求項２６】
代謝性ポリペプチドが薬物代謝ポリペプチド、薬物結合ポリペプチド、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸シンセターゼ、グルタミンシンセターゼ、グリコーゲンシンセターゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、グルコキナーゼ、インスリン、ピルビン酸キナーゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、脂肪酸シンセターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フェリチン、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、P450酵素およびアルコールデヒドロゲナーゼからなる群より選択される、請求項25記載の凝集体。
【請求項２７】
対象となる分子がT細胞エピトープ、B細胞エピトープ、サイトカインペプチド、ケモカインペプチド、神経ペプチド、抗炎症性ペプチドおよび受容体リガンドペプチドからなる群より選択されるペプチドである、請求項1記載の凝集体。
【請求項２８】
対象となる分子がホルモンである、請求項1記載の凝集体。
【請求項２９】
ホルモンが成長ホルモン、性ホルモン、甲状腺ホルモン、下垂体ホルモンおよびメラニン細胞刺激ホルモンからなる群より選択される、請求項28記載の凝集体。
【請求項３０】
ホルモンがエストロゲン、抗エストロゲン、プロゲスチン、抗プロゲスチン、アンドロゲンおよび抗アンドロゲンからなる群より選択される、請求項28記載の凝集体。
【請求項３１】
ホルモンがトリヨードサイロニン、サイロキシン、プロピルチオウラシル、メチマゾールおよびヨージキソドからなる群より選択される甲状腺ホルモンである、請求項28記載の凝集体。
【請求項３２】
ホルモンがガストリン、グルカゴン、セクレチン、コレシストキニン、胃抑制ペプチド、血管作動性腸ペプチド、サブスタンスP、グルカゴン様免疫反応性ペプチド、ソマトスタチン、ボンベシンおよびニューロテンシンからなる群より選択される胃腸ホルモンである、請求項28記載の凝集体。
【請求項３３】
ホルモンがコルチコトロピン、スムトトロピン、オキシトシンおよびバソプレシンからなる群より選択される下垂体ホルモンである、請求項28記載の凝集体。
【請求項３４】
ホルモンが副腎皮質刺激ホルモン、アルドステロン、コルチゾール、コルチコステロン、デオキシコルチコステロンおよびデヒドロエピアンドロステロンからなる群より選択される副腎皮質ホルモンである、請求項28記載の凝集体。
【請求項３５】
ホルモンがプレドニゾン、ベータメタゾン、ベタメタゾン、コルチゾン、デキサメタゾン、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、酢酸パラメタゾン、プレドニゾロンおよびトリアムシノロン　フルドロコルチゾンからなる群より選択される、請求項28記載の凝集体。
【請求項３６】
同一のまたは実質的に類似した、対象となる分子を含む、請求項1記載の凝集体。
【請求項３７】

対象となる異なる分子を含む、請求項1記載の凝集体。
【請求項３８】
キメラ分子が化学合成により形成される、請求項1記載の凝集体。
【請求項３９】
自己合体エレメントが化学的架橋により対象となる分子に共有結合的に付着している、請求項1記載の凝集体。
【請求項４０】
自己合体エレメントが化学的架橋剤を用いて対象となる分子に化学的架橋される、請求項39記載の凝集体。
【請求項４１】
自己合体エレメントがホモ二官能性架橋剤を用いて対象となる分子に化学的架橋される、請求項39記載の凝集体。
【請求項４２】
自己合体エレメントがヘテロ二官能性架橋剤を用いて対象となる分子に化学的架橋される、請求項39記載の凝集体。
【請求項４３】
キメラ分子が組換え手段により形成される、請求項1記載の凝集体。
【請求項４４】
キメラ分子のより高次の凝集体への自己集合において、対象となる分子が凝集体の外部に露出されるように、自己合体エレメントが対象となる分子に付着している、請求項1記載の凝集体。
【請求項４５】
自己合体エレメントがリンカーまたはスペーサー分子により対象となる分子から間隔をあけられている、請求項1記載の凝集体。
【請求項４６】
対象となる分子の本来の折り畳みが促進するように、リンカーまたはスペーサー分子が対象となる分子を自己合体エレメントから間隔を十分にあける、請求項45記載の凝集体。
【請求項４７】
キメラ分子が他のキメラ分子と凝集体を形成する場合、対象となる分子が所望の活性を保持するように、リンカーまたはスペーサー分子が対象となる分子を自己合体エレメントから十分に間隔をあける、請求項45記載の凝集体。
【請求項４８】
リンカーまたはスペーサー分子が長さが約1個から約100個の原子である、請求項45記載の凝集体。
【請求項４９】
リンカーまたはスペーサー分子が長さが約1個から約50個のアミノ酸残基である、請求項45記載の凝集体。
【請求項５０】
リンカーまたはスペーサー分子が配列番号：167、169、171、173、175、179、181および183からなる群より選択されるアミノ酸配列である、請求項45記載の凝集体。
【請求項５１】
膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる、および対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、かつ個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：前駆体の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外であり、かつ該自己合体エレメントが以下の式により表される、

凝集体：

$$B_1–X_1\,[X_j]_n\,X_2\,X_3\,X_4\,X_5\,[X_k]_n\,X_6\,[X_l]_n\,X_7\,X_8\,X_9–Z_1 \qquad (I)$$

[配列番号：1]
式中：
B_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約50個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_1は、疎水性、小型、中性もしくは塩基性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_j]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは0個から2個のアミノ酸残基であり、配列X_jは、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_2は、疎水性、小型もしくは極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_3は、疎水性、小型もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_4は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_5は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_k]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは4個から6個のアミノ酸残基であり、配列X_kは、疎水性、小型、極性もしくは中性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_6は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_l]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは2個から4個のアミノ酸残基であり、配列X_lは、疎水性、小型もしくは極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_7は、疎水性、小型、荷電もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_8は、中性/極性、荷電、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_9は、選択的であり、存在する場合、小型もしくは荷電のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
Z_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約50個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【請求項５２】
B_1が存在する場合、それが約1個から約20個のアミノ酸残基の配列である、請求項51記載の凝集体。

【請求項５３】
B_1が存在する場合、それが以下の式により表される、請求項51記載の凝集体：
$B_2J_1[X_i]_n$ (II) [配列番号：2]
式中：
B_2は、存在しない、または、J_1もまた存在する条件下で、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約15個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
J_1は、存在しない、または、$[X_i]_n$もまた存在する条件下で、疎水性、荷電、中性/極性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；および
$[X_i]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは2個から5個のアミノ酸残基であり、配列X_iは、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【請求項５４】
J_1がPheもしくはIleから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項53記載の凝集体。

【請求項５５】
J_1がHis、Lysもしくは Argから選択される塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項53記載の凝集体。

【請求項５６】

J_1がAsnまたはその修飾型である、請求項53記載の凝集体。
【請求項５７】
J_1がSerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項53記載の凝集体。
【請求項５８】
$[X_i]_n$が以下の式により表される、請求項53記載の凝集体：
$O_1O_2O_3O_4O_5$ (III) [配列番号：3]
式中：
O_1～O_5の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：
O_1は、疎水性、荷電、中性/極性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_2は、小型もしくは塩基性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_3は、荷電、中性/極性、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_4は、荷電、中性/極性、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
O_5は、荷電、中性/極性、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項５９】
$[X_i]_n$が以下の式により表される、請求項53記載の凝集体：
$O_1O_2O_3O_4O_5$ (III) [配列番号：3]
式中：
O_1～O_5の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：
O_1は、Leu、Ile、Arg、AsnもしくはAlaまたはその修飾型から選択される；
O_2は、ThrもしくはLysまたはその修飾型から選択される；
O_3は、Arg、Lys、Asn、Ile、Val、LeuもしくはAlaまたはその修飾型から選択される；
O_4は、Arg、Lys、Gln、Asn、Phe、Ile、Val、Leu、Ala、Gly、Ser、Thrまたはその修飾型から選択される；および
O_5は、Arg、Lys、Asn、Phe、Ile、Val、Leu、Ala、Gly、Ser、Thrまたはその修飾型から選択される。
【請求項６０】
X_1がLeu、Met、Phe、IleもしくはValから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項６１】
X_1がGly、Ala、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項６２】
X_1がCys、LysもしくはHisまたはその修飾型から選択される、請求項51記載の凝集体。
【請求項６３】
$[X_j]_n$がAla、Arg、AsnもしくはValまたはその修飾型から選択される単一のアミノ酸残基である、請求項51記載の凝集体。
【請求項６４】
$[X_j]_n$が2個のアミノ酸残基の配列であり、第一アミノ酸残基がLys、Asp、Leu、Asn、Ala、ValもしくはPheまたはその修飾型から選択され、かつ第二アミノ酸残基がSer、Ala、Lys、Gln、AsnもしくはLeuまたはその修飾型から選択される、請求項51記載の凝集体。
【請求項６５】
X_2がVal、Leu、Tyr、IleもしくはPheから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項６６】
X_2がPro、Ala、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾

型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項６７】
X_2がAsnもしくはArgまたはその修飾型から選択される、請求項51記載の凝集体。
【請求項６８】
X_3がAlaまたはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項６９】
X_3がMet、Leu、Val、IleもしくはPheから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項７０】
X_3がCysまたはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項７１】
X_4がVal、Leu、IleもしくはTrpから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項７２】
X_4がAla、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項７３】
X_5がAla、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項７４】
X_5がLeu、Phe、Val、Ileから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項７５】
$[X_k]_n$が以下の式により表される、請求項51記載の凝集体：
$B_3O_6O_7O_8O_9B_4$ (IV) [配列番号：4]
式中：
B_3は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_6～O_9の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：
O_6は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_7は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_8は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
O_9は、小型、疎水性、塩基性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；ならびに
B_4は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項７６】
B_3がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、Val、LeuもしくはCysまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の凝集体。
【請求項７７】
O_6がAla、Gly、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、MetもしくはCysまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の凝集体。
【請求項７８】
O_7がAla、Ser、PheもしくはAsnまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の凝集体。
【請求項７９】
O_8がThr、Ala、Ser、Ile、Leu、Val、Met、Phe、TyrもしくはTrpまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の凝集体。
【請求項８０】

O_9がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、Ile、Leu、Val、Phe、HisもしくはCysまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の凝集体。

【請求項８１】

B_4がAla、Ser、Thr、Ile、Val、Leu、Met、TyrもしくはPheまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の凝集体。

【請求項８２】

X_6がLeu、Val、MetもしくはTyrから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項８３】

X_6がPro、Ala、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項８４】

$[X_1]_n$が以下の式により表される、請求項51記載の凝集体：

$B_5O_{10}O_{11}O_{12}$ (V) [配列番号：5]

式中：

B_5は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；

O_{10}～O_{12}の少なくとも1個は存在し、ここにおいて：

O_{10}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；

O_{11}は、小型アミノ酸残基である；および

O_{12}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。

【請求項８５】

B_5がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、Ile、Leu、Val、Phe、MetもしくはGlnまたはその修飾型から選択される、請求項84記載の凝集体。

【請求項８６】

O_{10}がGly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Met、Phe、Cys、AsnもしくはGlnまたはその修飾型から選択される、請求項84記載の凝集体。

【請求項８７】

O_{11}がProまたはその修飾型である、請求項84記載の凝集体。

【請求項８８】

O_{12}がAla、Gly、Ser、Thr、Ile、Leu、Val、Tyr、TrpもしくはCysまたはその修飾型から選択される、請求項84記載の凝集体。

【請求項８９】

X_7がLeu、Ile、ValもしくはMetから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項９０】

X_7がPro、Ala、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項９１】

X_7が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項９２】

X_7がAspもしくはArgから選択される塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項91記載の凝集体。

【請求項９３】

X_7がAsnまたはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項９４】

X_8がGln、AsnもしくはCysから選択される中性/極性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。

【請求項９５】
X_8がHisもしくはGluから選択される塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項９６】
X_8がVal、Metもしくは Trpから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項９７】
X_8がAlaもしくはSerから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項９８】
X_9がAla、Gly、Serもしくは Thrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項９９】
X_9が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の凝集体。
【請求項１００】
X_9が酸性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項100記載の凝集体。
【請求項１０１】
X_9がGluまたはその修飾型である、請求項100記載の凝集体。
【請求項１０２】
Z_1が以下の式により表される、請求項51記載の凝集体：
$J_2J_3J_4Z_2$ (VI) [配列番号：6]
式中：
J_2は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
J_3は、存在しない、または、J_2も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_4は、存在しない、または、J_3も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；および
Z_2は、存在しない、または、J_4も存在する条件下で、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約15個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。
【請求項１０４】
J_2がThrまたはその修飾型である、請求項103記載の凝集体。
【請求項１０５】
J_3が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項103記載の凝集体。
【請求項１０６】
J_3がLysまたはその修飾型である、請求項103記載の凝集体。
【請求項１０７】
J_4が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項103記載の凝集体。
【請求項１０８】
J_4がLysまたはその修飾型である、請求項103記載の凝集体。
【請求項１０９】
Z_1が少なくとも1個の荷電アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項51記載の凝集体。
【請求項１１０】
Z_1が少なくとも1個の塩基性アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項51記載の凝集体。
【請求項１１１】
Z_2が少なくとも1個の荷電アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項103記載の凝集

体。
【請求項１１２】
Z_2が少なくとも1個の塩基性アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項103記載の凝集体。
【請求項１１３】
膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せ、かつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：前駆体の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外であって、かつ該自己合体エレメントが以下の式により表される、凝集体：

$$B_2 J_1 [X_i]_n X_1 [X_j]_n X_2 X_3 X_4 X_5 [X_k]_n X_6 [X_l]_n X_7 X_8 X_9 Z_1 \quad (VII)$$

[配列番号：7]
式中：
B_2、J_1および$[X_i]_n$は、請求項53に定義されているとおりである；ならびに$[X_j]_n$、$[X_k]_n$、$[X_l]_n$、X_{1-9}およびZ_1は、請求項51に定義されているとおりである。
【請求項１１４】
膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せ、かつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：前駆体の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外であって、かつ該自己合体エレメントが以下の式により表される、凝集体：

$$B_1\text{–}X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 [X_m]_n X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16}\text{–}Z_1 \quad (VIII)$$

[配列番号：8]
式中：
B_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約5個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸を含む；
X_1は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_2は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_3は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_4は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
X_5は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；および
$[X_m]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約0個から約2個のアミノ酸残基であり、配列X_mは、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_6は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_7は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_8は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；

X_9は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{10}は、疎水性、小型もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{11}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{12}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{13}は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{14}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{15}は、中性/極性、酸性もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{16}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；および
Z_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約20個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【請求項１１５】
B_1が存在する場合、それが以下の式により表される、請求項114記載の凝集体：
$J_1J_2J_3J_4J_5$ (IX) [配列番号：9]
式中：
J_1は、存在しない、または、J_2も存在する条件下で、疎水性アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_2は、存在しない、または、J_3も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_3は、存在しない、または、J_4も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_4は、存在しない、または、J_5も存在する条件下で、小型、荷電もしくは中性/極性のアミノ酸残基、もしくはその修飾型から選択される；および
J_5は、存在しない、または、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基、もしくはその修飾型から選択される。

【請求項１１６】
J_1がMetまたはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１１７】
J_2が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１１８】
J_2がLysまたはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１１９】
J_3が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２０】
J_3がLysもしくはArgまたはその修飾型から選択される、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２１】
J_4がThrまたはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２２】
J_4が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２３】
J_4が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２４】
J_4がLysもしくはArgまたはその修飾型から選択される、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２５】
J_4がGlnまたはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２６】
J_5がAlaもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２７】
J_5がLeuまたはその修飾型である、請求項115記載の凝集体。

【請求項１２８】
X_1がIle、ValもしくはLeuまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の凝集体。
【請求項１２９】
X_2がThr、GlyもしくはAlaまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３０】
X_3がIleもしくはLeuまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３１】
X_4がValもしくはTrpから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３２】
X_4がAla、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３３】
X_5がIle、PheもしくはValまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３４】
$[X_1]_n$が以下の式により表される、請求項114記載の凝集体：
J_6J_7 (X) [配列番号：10]
式中：
J_6およびJ_7の少なくとも1個は存在し、
J_6は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
J_7は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項１３５】
J_6がLeuもしくはGlyまたはその修飾型である、請求項134記載の凝集体。
【請求項１３６】
J_7がSerもしくはLeuまたはその修飾型である、請求項134記載の凝集体。
【請求項１３７】
X_6がAlaまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３８】
X_6がValもしくはLeuから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１３９】
X_7がAla、GlyもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４０】
X_7がLeuまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４１】
X_8がLeuもしくはValから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４２】
X_8がAlaもしくはSerから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４３】
X_9がValもしくはLeuから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４４】
X_9がAlaもしくはGlyから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４５】
X_{10}がGlnまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。
【請求項１４６】

X_{10}がIle、Valもしくは Pheから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１４７】

X_{11}がPro、Alaもしくは Thrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１４８】

X_{11}がPheまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１４９】

X_{11}がGlnまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５０】

X_{12}がAla、Serもしくは Thrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５１】

X_{13}がVal、Ileもしくは Metから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５２】

X_{13}がAlaまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５３】

X_{14}がProもしくは Alaまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５４】

X_{15}がGlnまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５５】

X_{15}がAspまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５６】

X_{15}がLeuまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５７】

X_{16}がAlaまたはその修飾型である、請求項114記載の凝集体。

【請求項１５８】

Z_1が以下の式により表される、請求項114記載の凝集体：

$J_8J_9J_{10}$ (XI) [配列番号：11]

式中：

J_8は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；

J_9は、存在しない、または、J_8も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；および

J_{10}は、存在しない、または、J_9も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である。

【請求項１５９】

J_8がThrまたはその修飾型である、請求項158記載の凝集体。

【請求項１６０】

J_9が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項158記載の凝集体。

【請求項１６１】

J_9がLysまたはその修飾型である、請求項158記載の凝集体。

【請求項１６２】

J_{10}が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項158記載の凝集体。

【請求項１６３】

J_{10}がLysまたはその修飾型である、請求項158記載の凝集体。

【請求項１６４】

対象となる分子と融合、付着または異なる方法で会合している、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる自己合体エレメントを含む、単離または精製されたキメラ分子。

【請求項１６５】
対象となる分子の本来の折り畳みが促進するように、対象となる分子と自己合体エレメントの間隔を十分にあけるリンカーまたはスペーサー分子をさらに含む、請求項164記載のキメラ分子。
【請求項１６６】
キメラ分子が他のキメラ分子と凝集体を形成する場合、対象となる分子が所望の活性を保持するように、対象となる分子を自己合体エレメントから十分に間隔をあけるリンカーまたはスペーサー分子をさらに含む、請求項165記載のキメラ分子。
【請求項１６７】
リンカーまたはスペーサー分子が自己合体エレメントの対象となる分子からのいかなる細胞内切断も防ぐまたは低減させる、請求項165記載のキメラ分子。
【請求項１６８】
リンカーまたはスペーサー分子が長さが約1個から約100個の原子である、請求項165記載のキメラ分子。
【請求項１６９】
リンカーまたはスペーサー分子が長さが約1個から約50個のアミノ酸残基である、請求項165記載のキメラ分子。
【請求項１７０】
リンカーまたはスペーサー分子が配列番号：167、169、171、173、175、179、181および183からなる群より選択されるアミノ酸配列である、請求項165記載のキメラ分子。
【請求項１７１】
請求項164～170のいずれか一項記載のキメラ分子をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。
【請求項１７２】
制御エレメントに作動可能に連結された、請求項164～170のいずれか一項記載のキメラ分子をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１７３】
制御エレメントに作動可能に連結された、請求項164～170のいずれか一項記載のキメラ分子をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞。
【請求項１７４】
制御エレメントに作動可能に連結された、請求項164～170のいずれか一項記載のキメラ分子をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む細胞を有する遺伝子改変の動物。
【請求項１７５】
対象となる分子の活性を増強するための、または対象となる異なる分子の別個の活性を組み合わせるための方法であって、方法が、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる自己合体エレメントと個々の対象となる分子を連結、融合または異なる方法で会合させることを含み、このように作製されたキメラ分子が、自己合体エレメントによって他のキメラ分子と合体しより高分子量凝集体になる、方法。
【請求項１７６】
請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の凝集体ならびに担体を含む薬学的または獣医学的組成物。
【請求項１７７】
請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の凝集体、ならびに選択的にアジュバントを含む免疫増強組成物。
【請求項１７８】
請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の凝集体の有効量を投与することを含む、患者における疾患もしくは状態を処置または予防する方法。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、一般的には、活性分子について、およびより具体的には、分子を自己合体エレメントと連結、融合、または異なる方法で会合させ、それにより、そのように形成されたキメラ分子が高分子量凝集体へと自己集合することにより、分子の活性を増強する、または異なる分子の個々の活性を組み合わせるための方法に関する。本発明はまた、それらのキメラ分子それ自体、および治療的、予防的および化学過程の適用におけるそれらの使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
新規なまたは増強された性質をもつタンパク質を生成するために生化学的または分子生物学的技術を用いることに多くの関心がもたれている。一つの所望の性質は、それの循環半減期または免疫原性を増加させるようなタンパク質の生物学的活性を増強させることである。
【０００３】
いくつかの方法がタンパク質の生物学的活性を増強するために用いられてきており、これらは、しばしば、分子の大きさを増加させることに焦点を合わせている。タンパク質の大きさを増加させる一つの方法は、別のタンパク質との化学的架橋を通してである。例えば、タンパク質の免疫原性を増加させるために、化学的架橋剤が、対象となる抗原を担体タンパク質に結合させるために用いられる。担体は、Tヘルパー細胞活性を非特異的に刺激し、かつ抗原提示細胞(例えば、樹状細胞のようなプロフェッショナル抗原提示細胞)へその抗原を向ける役割を果たし、その抗原は処理されて、主要組織適合複合体(MHC)と関連して細胞表面に提示される。
【０００４】
いくつかの担体系が、この目的のために開発されてきた。例えば、低分子ペプチド抗原は、しばしば、免疫応答を高めるために、破傷風トキソイド(Mullerら、1982、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:569-573)、スカシガイのヘモシアニン(Bittleら、1982、Nature 298:30-33)、卵白アルブミンおよびマッコウクジラミオグロビンのようなタンパク質担体に結合される。しかしながら、担体は、ペプチド抗原に関連のない強い免疫性を誘発する可能性が高く、これは、二次免疫化においてペプチドワクチンに対する免疫応答を阻害しうる(Schutzeら、J. Immunol. 135:2319-2322)。
【０００５】
抗原送達系もまた、粒子担体に基づいてきた。例えば、行われる粒子は、抗原が結合され、かつ組み入れられるプラットフォームとして用いられた。プロテオソーム(Lowellら、1988、Science 240:800-802)、免疫刺激性複合体(Morein 1984、Nature 308:457-460)、ならびにHBsAg(Neurathら、1989、Mol. Immunol. 26:53-62)およびロタウイルス内部キャプシドタンパク質(Redmondら、1991、Mol. Immunol. 28:269-278)のようなウイルス粒子に基づく系が開発された。
【０００６】
他の担体系は、それぞれ、ウイルス様粒子(VLP)もしくはウイルスコア様粒子(CLP)へと自己集合する、組換えで作製されたキメラのウイルスキャプシドタンパク質またはウイルスコアタンパク質を用いて考案された。この型の代表的なキメラ粒子は、酵母Tyタンパク質(KingsmanおよびKingsman 1988、Vacc. 6:304-306)、HBsAg(Valenzuela、1985、Bio/Technol. 3:323-326；米国特許第4,722,840号；Delpeyrouxら、1986、Science 233:472-475)、B型肝炎ウイルスコア抗原(Clarkeら、Vaccines 88(H. Ginsbergら編、1988)pp. 127-131)、ポリオウイルス(Burkeら、1988、Nature 332:81-82)またはパルボウイルス(Brownら、1994、Virology 198:477-488)由来のキャプシドタンパク質、ならびにパピローマウイルスのL1およびL2キャプシドタンパク質(米国特許第5,618,536号)に基づいたものを含む

。しかしながら、これらの担体は、粒子構築に干渉することなく構造タンパク質へ挿入されうる抗原の限定された大きさによって、それらの有用性において制限されている。

【０００７】

ペプチドリンカーのような代替は、2つまたはそれ以上の異なるタンパク質の組み合わされた生物学的活性を増強するために用いられた。例えば、米国特許第5,073,627号は、融合タンパク質を形成するように顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)タンパク質分子をインターロイキン-3(IL-3)タンパク質分子に連結するペプチドリンカーの使用を記載し、その融合タンパク質は、GM-CSFもしくはIL-3単独または組み合わせにおいてより生物学的活性が高かった。しかしながら、通常のペプチドリンカーは、堅くて曲げられなくありうる。結果として、連結されたタンパク質は、しばしば、野生型タンパク質により示される所望の生物学的活性のある高次構造へ「曲げる」ことができない、または架橋剤もしくは担体タンパク質が生物学的活性を妨げる。

【０００８】

シグナルペプチド配列(リーダー配列としても知られている)は、膜転位置配列であり、タンパク質の分泌を様々な細胞内区画または細胞外環境へと仲介する。典型的には、シグナル配列は、約15個～35個の残基を含み、正荷電アミノ末端、中央の疎水性領域、およびカルボキシル末端における短鎖アミノ酸から構成される。タンパク質を特定の位置へターゲットするために用いられるシグナル配列は、原核生物および真核生物の両方の細胞において見出された。細菌において、主要および微量コートタンパク質についてのファージfdシグナル配列は、それらのタンパク質を内膜へ向ける。pBR322のβ-ラクタマーゼタンパク質は、異なるシグナル配列により細胞質周辺腔へと向けられ、OmpAのような外膜タンパク質は、他のシグナル配列により、それらの割り当てられた行き先へと向けられる。小胞体へのタンパク質の転位置を方向づける真核生物のシグナル配列は、ヒトのプレプロインスリン、ウシの成長ホルモンおよびキイロショウジョウバエ膠タンパク質のそれを含む。そのような配列のN末端近くには、2～3個の極性残基があり、シグナル配列内には、疎水性アミノ酸からなる疎水性コアがある。他の配列の保存は観察されていなかった(Lewin, B.、1994、Genes V、Oxford University Press、p.290；Watson, M.、1984、Nucl. Acids. Res. 12:5145-5164)。

【０００９】

生物学的膜輸送は、タンパク質発現およびトランスフェクションされたまたは形質転換された細胞からの輸出のために活用された。通常はサイトゾルに留まっているグロビンタンパク質のようなタンパク質の分泌は、タンパク質のN末端にシグナル配列を付加することにより達成された(Lewin, B.、1994、前記)。例えば、グラム陰性細菌の増殖培地へ遺伝子産物を輸出するための方法を開示する米国特許第5,156,959号に記載されているように、外来遺伝子は、発現および細菌細胞からの分泌のために組換えDNA構築物へと挿入された。米国特許第5,380,653号は、バチルス種における細胞内タンパク質産生のための発現ベクターおよび方法を記載している。米国特許第5,712,114号は、ヒトプレプロコラーゲンα-1タンパク質のシグナル配列を利用する、発現されたタンパク質の分泌のための組換えDNA構築物、特にハンセヌラ　ポリモルファ(Hansenula polymorpha)細胞由来の、を記載している。

【００１０】

国際公開公報第97/35887号は、B細胞有糸分裂促進因子前駆体および抗原特異的触媒抗体の産生のためのそれの使用を記載している。前駆体は、B細胞表面分子結合部としてのペプトストレプトコッカス　マグナス(Peptostreptococcus magnus)のプロテインL由来の一対の免疫グロブリン結合ドメイン(L)に隣接した、雌鳥卵リゾチーム(HEL)由来のT細胞表面分子結合部(H)を含む。触媒B細胞に対するLHL構築物の特異性は、免疫グロブリン結合ドメインを遮蔽する抗原により提供される。抗原の触媒的切断は、免疫グロブリン結合ドメインを露出して、B細胞表面上の免疫グロブリン分子を結合し、それにより、B細胞による触媒抗体産生を可能にする。有糸分裂促進因子前駆体の組換え産生について、OmpAシグナルペプチドは、細菌の細胞膜周辺腔へ前駆体の発現をターゲットするための手段とし

て、B細胞有糸分裂促進因子前駆体と融合させた。しかしながら、結果として生ずる融合タンパク質は、意外にも、より高分子量の凝集体へと自己集合することが見出された。OmpAシグナルペプチドの多量体化能力は、任意のB細胞の表面上の免疫グロブリン分子を架橋する非特異的B細胞有糸分裂促進因子を設計するために活用された。このB細胞有糸分裂促進因子は、OmpAシグナルペプチドをプロテインL由来の免疫グロブリン結合ドメインのC末端へ融合させることにより構築された。

【００１１】

それゆえに、基本的には、シグナル配列は、タンパク質発現系に関連して用いられてきた。それらはまた、B細胞の表面上の免疫グロブリン分子を架橋するための手段として用いられた。しかしながら、一般的に、分子の生物学的活性を増強する(例えば、より長い循環半減期、より高い効力または増強された免疫原性)ための、または異なる分子の個々活性を組み合わせるためのシグナル配列の使用は、今まで記載されたことはない。

【発明の開示】

【００１２】

発明の概要

本発明の一つの局面は、対象となる分子の活性を増強するための、または対象となる異なる分子の別個の活性を組み合わせるための方法を提供する。これらの方法は、一般的に、個々の対象となる分子を、膜転位置配列(MTS)もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる自己合体エレメント(SCE)と連結、融合または異なる方法で会合させることを含む。この工程により形成されたキメラ分子は、非凝集分子に比較して増強されたまたは改善された性質をもつより高分子量の凝集体へと他のそのような分子と合体するように、SCEにより引き起こされる。

【００１３】

対象となる分子は、任意の化合物、有機または無機の、から選択されうるが、通常は、ポリマーであり、典型的には、酵素的、抗原性または治療的活性を含む所望の生物学的活性をもつポリペプチドである。このように、本発明はまた、対象となるポリペプチドと融合、連結または異なる方法で会合し、かつ個々のキメラ分子が凝集に好ましい条件下においてより高次の凝集体へと他のキメラ分子と合体するのを引き起こす、上でおおざっぱに記載されているようなSCEを含むキメラポリペプチドを企図する。関連局面において、本発明は、複数のそのようなキメラ分子を含む、単離または精製されたより高次の凝集体に及ぶ。

【００１４】

本発明はまた、本発明のキメラ分子を作製するための工程にも及ぶ。特定の態様において、キメラ分子は、化学合成により作製される。他の態様において、キメラ分子は、SCEを個々の対象となる分子と化学的に融合することにより作製される。さらに他の態様において、キメラ分子は、組換え手段により作製され、このことについては、発現ベクターおよび宿主細胞、加えて、宿主細胞または遺伝子改変の動物において、キメラポリペプチドを産生する方法もまた、本発明により含まれる。

【００１５】

本発明はまた、化学的、治療的および予防的適用を含む適用の範囲において、本明細書に記載されるより高次の凝集体を用いる方法にも及ぶ。一つの態様において、より高次の凝集体は、同一のみの、または実質的に類似した、対象となる分子を含み、それにより、そのような「ホモ凝集体」は、非凝集の親の対象となる分子と同じ様式で、特に増加した生物学的活性が望ましいところにおいて、使用可能である。例えば、非凝集のGM-CSFと比較してより高いGM-CSF効力をもつGM-CSF-SCEキメラポリペプチドを含むより高次の凝集体は、下に記載されるように、様々な造血性状態を処置するために用いられうる。もう一つの態様において、2つまたはそれ以上の別個の生物学的活性を含むより高次の凝集体は、それらの活性の産物に起因する所望の生物学的結果を生じるために用いられうる。例えば、第一キメラポリペプチドがインターロイキン-2(IL-2)を含み、かつ第二キメラポリペプチドがFasリガンドを含む、一対のキメラポリペプチドが構築されうる。これらのキメラ

ポリペプチドを含むより高次の凝集体は、特定の白血病もしくはリンパ腫の細胞、または高親和性IL-2RおよびFasの両方をもつ最近活性化されたT細胞をターゲットするのに有用である。集合的活性が生物学的効果を達成するために必要とされる別個のキメラポリペプチドの複数を含む凝集体は、一般的に、別個の対象となるポリペプチドの密接により、結果として生物学的効果を生じる過程の速度および/または効率を増加させるものである。このように、2つまたはそれ以上の異なるポリペプチドを含む「ヘテロ凝集体」は、相乗的特徴を示し、それに従って、もし各ポリペプチド成分が単独で用いられることになっているならば、ヘテロ凝集体に見出される同様の量の各ポリペプチドにより示されるであろう活性より高い活性を示しうる。

【００１６】

配列の簡単な説明

（表Ａ）

配列番号	配列	長さ
配列番号:1	式 I	14サブユニット
配列番号:2	式 II	3 サブユニット
配列番号:3	式 III	5 サブユニット
配列番号:4	式 IV	6 サブユニット
配列番号:5	式 V	4 サブユニット
配列番号:6	式 VI	4 サブユニット
配列番号:7	式 VII	16サブユニット
配列番号:8	式 VIII	19サブユニット
配列番号:9	式 IX	5 サブユニット
配列番号:10	式 X	2 サブユニット
配列番号:11	式 XI	3 サブユニット
配列番号:12	P.69 外膜タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - ボルデテラ　ペルツシス (*Bordetella pertussis*) -- GenBank アクセッション番号 AAA22980	34 残基
配列番号:13	主要外膜タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - クラミジア　トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) -- GenBank アクセッション番号 AAA23142	22 残基
配列番号:14	主要外膜タンパク質 (MOMP) 前駆体に関するシングルペプチド - クラミドフィラプシタシ (*Chlamydophila psittaci*) -- GenBank アクセッション番号 AAA23146	22 残基
配列番号:15	B12 受容体タンパク質 BtuB に関するシグナルペプチド - 大腸菌 (*Escherichia coli*) -- GenBank アクセッション番号 AAA23524	20 残基
配列番号:16	外膜タンパク質に関するシグナルペプチド - 大腸菌 (*Escherichia coli*) -- GenBank アクセッション番号 AAA24243	21 残基
配列番号:17	Pro-OmpF 外膜タンパク質に関するシグナルペプチド - 大腸菌 (*Escherichia coli*) -- GenBank アクセッション番号 AAA24244	22 残基
配列番号:18	外膜タンパク質 X 前駆体に関するシグナルペプチド - エンテロバクター　クロアカエ (*Enterobacter cloacae*) -- GenBank アクセッション番号 AAA24808	27 残基

配列番号	配列	長さ
配列番号:19	15kd ペプチドグリカン関連外膜リポタンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*) – GenBank アクセッション番号 AAA24938	24 残基
配列番号:20	PC タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) – GenBank アクセッション番号 AAA24940	23 残基
配列番号:21	外膜タンパク質 p1 前駆体に関するシグナルペプチド - インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) – GenBank アクセッション番号 AAA24990	21 残基
配列番号:22	外膜タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) – GenBank アクセッション番号 AAA24993	20 残基
配列番号:23	主要外膜タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - 淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*) – GenBank アクセッション番号 AAA25458	22 残基
配列番号:24	リポタンパク質 I 前駆体に関するシグナルペプチド - シュードモナス　オールギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) – GenBank アクセッション番号 AAA25880	24 残基
配列番号:25	ポリンタンパク質 F 前駆体に関するシグナルペプチド - シュードモナス　オールギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) – GenBank アクセッション番号 AAA25973	24 残基
配列番号:26	外膜タンパク質に関するシグナルペプチド - セラチア　マルセセンス(*Serratia marcescens*) – GenBank アクセッション番号 AAA26566	25 残基
配列番号:27	セリンプロテアーゼ前駆体に関するシグナルペプチド - セラチア　マルセセンス (*Serratia marcescens*) – GenBank アクセッション番号 AAA26572	27 残基
配列番号:28	外膜タンパク質前駆体 II に関するシグナルペプチド - サルモネラ　タイフィムルウム (*Salmonella typhimurium*) – GenBank アクセッション番号 AAA27169	21 残基
配列番号:29	陽イオン外膜タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド (gtg 開始コドン) - サルモネラ　タイフィムリウム(*Salmonella typhimurium*) – GenBank アクセッション番号 AAA27170	20 残基
配列番号:30	フェリエンテロケリン受容体タンパク質に関するシグナルペプチド - 大腸菌 (*Escherichia coli*) – GenBank アクセッション番号 AAA65994	22 残基
配列番号:31	外膜タンパク質 A に関するシグナルペプチド - クローニングベクター pINIIIompA3 – GenBank アクセッション番号 AAA82946	21 残基
配列番号:32	ラムダ受容体タンパク質に関するシグナルペプチド - 大腸菌(*Escherichia coli*) – GenBank アクセッション番号 AAB59058	25 残基
配列番号:33	周辺質のマルトース結合タンパク質に関するシグナルペプチド - 大腸菌 (*Escherichia coli*) – GenBank アクセッション番号 AAB59056	26 残基
配列番号:34	Opal 1 に関するシグナルペプチド - 髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*) – GenBank アクセッション番号 AAC44565	32 残基
配列番号:35	Opal 2 に関するシグナルペプチド - 髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*) – GenBank アクセッション番号 AAC44566	26 残基
配列番号:36	H.8 外膜タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド - 淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*) – GenBank アクセッション番号 P07211	21 残基

配列番号	配列	長さ
配列番号:37	イムノグロブリンA1プロテアーゼ前駆体(IgA1プロテアーゼ)に関するシグナルペプチド-インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)－GenBankアクセッション番号P42782	25残基
配列番号:38	外膜ポリンOmpC前駆体に関するシグナルペプチド-大腸菌(*Escherichia coli*)－GenBankアクセッション番号MMECPC	21残基
配列番号:39	HrpAに関するシグナルペプチド-ラルストニア　ソラナセアルム(*Ralstonia solanacearum*)－GenBankアクセッション番号CAB58261	16残基
配列番号:40	推定の分泌タンパク質に関するシグナルペプチド-ストレプトマイセス　コエリコロルA3(2)(*Streptomyces coelicolor*)－GenBankアクセッション番号CAB92608	23残基
配列番号:41	外膜ポリンOmpF前駆体に関するシグナルペプチド-大腸菌(*Escherichia coli*)－GenBankアクセッション番号MMECF	22残基
配列番号:42	ORF2a前駆体に関するシグナルペプチド-ウシ流産菌(*Brucella melitensis* biovar Abortus)－GenBankアクセッション番号AAA83993	22残基
配列番号:43	IgA特異的セリンエンドペプチダーゼ前駆体に関するシグナルペプチド-淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)－GenBankアクセッション番号AZNHG	27残基
配列番号:44	マルトポリン前駆体(マルトース誘導性ポリン)に関するシグナルペプチド-大腸菌(*Escherichia coli*)－GenBankアクセッション番号P02943	25残基
配列番号:45	接着および浸透タンパク質前駆体に関するシグナルペプチド-インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)－GenBankアクセッション番号P45387	25残基
配列番号:46	接着および浸透タンパク質前駆体2に関するシグナルペプチド-インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)－GenBankアクセッション番号P44596	25残基
配列番号:47	外膜タンパク質F前駆体(ポリンOmpF)に関するシグナルペプチド-大腸菌(*Escherichia coli*)－ GenBankアクセッション番号P02931	22残基
配列番号:48	外膜タンパク質C前駆体に関するシグナルペプチド(ポリンOmpC)-大腸菌(*Escherichia coli*)－ GenBankアクセッション番号P06996	21残基
配列番号:49	ポリン様タンパク質BU359前駆体に関するシグナルペプチド-ブッハネラ　アフィディコラ(*Buchnera aphidicola*)(*Acyrthosiphon pisum*)－GenBankアクセッション番号P57440	26残基
配列番号:50	外膜タンパク質C前駆体に関するシグナルペプチド(ポリンOmpC)-サルモネラ　タイフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)－GenBankアクセッション番号O52503	21残基
配列番号:51	外膜孔タンパク質E前駆体に関するシグナルペプチド-大腸菌(*Escherichia coli*)－GenBankアクセッション番号P02932	23残基

配列番号	配列	長さ
配列番号:52	外膜ポリンタンパク質LC前駆体に関するシグナルペプチド-バクテリオファージPA-2 – GenBankアクセッション番号P07238	23残基
配列番号:53	外膜ポリンタンパク質OmpD前駆体に関するシグナルペプチド-サルモネラ タイフィムリウム(*Salmonella typhimurium*) – GenBankアクセッション番号P37592	21残基
配列番号:54	外膜タンパク質2に関するシグナルペプチド-サルモネラ エンテリカ(*Salmonella enterica*)亜種エンテリカ(enterica)血液型亜型タイフィ(Typhi) – GenBankアクセッション番号NP_456059	22残基
配列番号:55	外膜タンパク質S1に関するシグナルペプチド-サルモネラ エンテリカ(*Salmonella enterica*)亜種エンテリカ(enterica)血液型亜型タイフィ(Typhi) – GenBankアクセッション番号NP_456554	22残基
配列番号:56	外膜タンパク質Cに関するシグナルペプチド-サルモネラ エンテリカ(*Salmonella enterica*)亜種エンテリカ(enterica)血液型亜型タイフィ(Typhi) – GenBankアクセッション番号NP_456812	22残基
配列番号:57	外膜タンパク質F前駆体に関するシグナルペプチド-サルモネラ タイフィ(*Salmonella typhi*) – GenBankアクセッション番号Q56113	22残基
配列番号:58	外膜孔タンパク質E前駆体2に関するシグナルペプチド-サルモネラ タイフィ(*Salmonella typhi*) – GenBankアクセッション番号Q56119	23残基
配列番号:59	外膜タンパク質1b (Ib;c)に関するシグナルペプチド- 大腸菌(*Escherichia coli*)O157:H7 EDL933 – GenBankアクセッション番号NP_288795	22残基
配列番号:60	外膜タンパク質C2に関するシグナルペプチド-ペスト菌(*Yersinia pestis*) – GenBankアクセッション番号NP_404809	22残基
配列番号:61	外膜タンパク質C、ポリンに関するシグナルペプチド-ペスト菌(*Yersinia pestis*) – GenBankアクセッション番号NP_404824	25残基
配列番号:62	推定の外膜ポリンCタンパク質に関するシグナルペプチド-ペスト菌(*Yersinia pestis*) – GenBankアクセッション番号NP_405004	23残基
配列番号:63	外膜タンパク質F前駆体に関するシグナルペプチド-サルモネラ エンテリカ(*Salmonella enterica*)亜種エンテリカ(enterica)血液型亜型タイフィ(Typhi) – GenBankアクセッション番号NP_455485	23残基
配列番号:64	外膜タンパク質S2前駆体に関するシグナルペプチド-サルモネラ タイフィ(*Salmonella typhi*) – GenBankアクセッション番号Q56111	21残基
配列番号:65	外膜タンパク質S1前駆体に関するシグナルペプチド-サルモネラ タイフィ(*Salmonella typhi*) – GenBankアクセッション番号Q56110	21残基
配列番号:66	外膜タンパク質C前駆体に関するシグナルペプチド-サルモネラ タイフィ(*Salmonella typhi*) – GenBankアクセッション番号P09878	23残基
配列番号:67	外膜タンパク質A前駆体に関するシグナルペプチド–クレブジーラ ニューモリエ(*Klebsiella pneumoniae*) – GenBankアクセッション番号JC6558	22残基

配列番号	配列	長さ
配列番号 :68	外膜タンパク質 ompA に関するシグナルペプチド－サルモネラ　タイフィムリウム(*Salmonella typhimurium*)－ GenBank アクセッション番号 CAA26037	22 残基
配列番号 :69	OmpA タンパク質に関するシグナルペプチド－エンテロバクター　エーロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)－ GenBank アクセッション番号 CAA25062	22 残基
配列番号 :70	外膜タンパク質 3a (ll*;G;d) に関するシグナルペプチド－大腸菌 (*Escherichia coli*)－ GenBank アクセッション番号 NP_286832	22 残基
配列番号 :71	外膜タンパク質 A 前駆体 2 に関するシグナルペプチド－シゲラ　ディセンテリエ(*Shigella dysenteriae*)－ GenBank アクセッション番号 MMEBAD	22 残基
配列番号 :72	外膜タンパク質 ompA 前駆体に関するシグナルペプチド－セラチア　マルセスセンス(*Serratia marcescens*)－ GenBank アクセッション番号 S07298	22 残基
配列番号 :73	推定の外膜タンパク質 A に関するシグナルペプチド－エルウィニア　カロトボラ(*Erwinia carotovora*)－ GenBank アクセッション番号 CAB57308	22 残基
配列番号 :74	推定の外膜ポリン A タンパク質に関するシグナルペプチド－ペスト菌 (*Yersinia pestis*)－ GenBank アクセッション番号 NP_405026	22 残基
配列番号 :75	OmpA に関するシグナルペプチド－パスツレラ　ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)－ GenBank アクセッション番号 AAK61593	22 残基
配列番号 :76	外膜タンパク質 A 前駆体 3 に関するシグナルペプチド－ブッハネラ種 APS (*Buchnera* sp.)－ GenBank アクセッション番号 NP_240151	22 残基
配列番号 :77	OmpA2 に関するシグナルペプチド－ヘモフィルス　デュクレイ (*Haemophilus ducreyi*)－ GenBank アクセッション番号 AAB4927	25 残基
配列番号 :78	外膜タンパク質に関するシグナルペプチド－ヘモフィルス種(*Haemophilus* sp.)－ GenBank アクセッション番号 CAA07454	22 残基
配列番号 :79	外膜タンパク質 A 2 に関するシグナルペプチド－枯草菌(*Bacillus subtilis*)－ GenBank アクセッション番号 I39969	27 残基
配列番号 :80	主要外膜タンパク質に関するシグナルペプチド－ヘモフィルス　デュクレイ (*Haemophilus ducreyi*)－ GenBank アクセッション番号 AAB49273	25 残基
配列番号 :81	仮定的タンパク質に関するシグナルペプチド－ビブリオ種(*Vibrio* sp.) － GenBank アクセッション番号 CAC40971	22 残基
配列番号 :82	外膜タンパク質 P5 (ompA) に関するシグナルペプチド－インフルエンザ菌 Rd (*Haemophilus influenzae* Rd)－ GenBank アクセッション番号 NP_439322	22 残基
配列番号 :83	海馬采タンパク質に関するシグナルペプチド－インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)－ GenBank アクセッション番号 AAA24959	22 残基
配列番号 :84	シグナルペプチド配列に関するシグナルペプチド－パスツレラ　ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)－ GenBank アクセッション番号 NP_245723	22 残基
配列番号 :85	外膜タンパク質 PomA に関するシグナルペプチド－マンハイミア ヘモリティカ (*Mannheimia haemolytica*)－ GenBank アクセッション番号 AAD53408	25 残基

配列番号	配列	長さ
配列番号:86	仮説的シグナルペプチドタンパク質に関するシグナルペプチド－シノリゾビウム　メリロティ(*Sinorhizobium meliloti*)－GenBankアクセッション番号NP_385333	24 残基
配列番号:87	外膜タンパク質34; Omp34に関するシグナルペプチド－アクチノバチルスアクチノミセテムコミタンス(Actinobacillus actinomycetemcomitans)－GenBankアクセッション番号AAC00068	22 残基
配列番号:88	米国特許第5,284,768号に関するシグナルペプチド－人工配列	22 残基
配列番号:89	米国特許第5,712,114-1号に関するシグナルペプチド－人工配列	22 残基
配列番号:90	米国特許第5,712,114-2号に関するシグナルペプチド－人工配列	22 残基
配列番号:91	配列番号:3に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	102 塩基
配列番号:92	配列番号:4に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:93	配列番号:5に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:94	配列番号:6に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	60 塩基
配列番号:95	配列番号:7に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	63 塩基
配列番号:96	配列番号:8に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:97	配列番号:9に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	81 塩基
配列番号:98	配列番号:10に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	72 塩基
配列番号:99	配列番号:11に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	69 塩基
配列番号:100	配列番号:12に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:101	配列番号:13に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	60 塩基
配列番号:102	配列番号:14に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:103	配列番号:15に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	72 塩基
配列番号:104	配列番号:16に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	72 塩基

配列番号	配列	長さ
配列番号:105	配列番号:17に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	75 塩基
配列番号:106	配列番号:18に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	81 塩基
配列番号:107	配列番号:19に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	63 塩基
配列番号:108	配列番号:20に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	60 塩基
配列番号:109	配列番号:21に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:110	配列番号:22に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	63 塩基
配列番号:111	配列番号:23に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	75 塩基
配列番号:112	配列番号:24に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	78 塩基
配列番号:113	配列番号:25に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	98 塩基
配列番号:114	配列番号:26に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	78 塩基
配列番号:115	配列番号:30に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	48 塩基
配列番号:116	配列番号:31に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	69 塩基
配列番号:117	配列番号:33に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:118	配列番号:45に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:119	配列番号:46に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:120	配列番号:47に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:121	配列番号:50に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:122	配列番号:59に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:123	配列番号:60に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基

配列番号	配列	長さ
配列番号:124	配列番号:64に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:125	配列番号:66に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:126	配列番号:68に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	75 塩基
配列番号:127	配列番号:69に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:128	配列番号:71に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	75 塩基
配列番号:129	配列番号:72に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	84 塩基
配列番号:130	配列番号:74に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:131	配列番号:76に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	75 塩基
配列番号:132	配列番号:78に示されるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列	66 塩基
配列番号:133	移動可能なN末端SCE	36 残基
配列番号:134	移動可能なC末端SCE	36 残基
配列番号:135	N-SCEをコードする核酸配列	63 塩基
配列番号:136	N-SCE	21 残基
配列番号:137	SCE-Cをコードする核酸配列	63 塩基
配列番号:138	SCE-C	21 残基
配列番号:139	マウスGM-SCFをコードする核酸配列	420 塩基
配列番号:140	マウスGM-SCFについてのアミノ酸配列	140 残基
配列番号:141	ヒトGM-CSFをコードする核酸配列	429 塩基
配列番号:142	ヒトGM-CSFについてのアミノ酸配列	143 残基
配列番号:143	マウスIFN-βをコードする核酸配列	543 塩基
配列番号:144	マウスIFN-βについてのアミノ酸配列	181 残基
配列番号:145	ヒトIFN-β をコードする核酸配列	558 塩基
配列番号:146	ヒトIFN-βについてのアミノ酸配列	186 残基
配列番号:147	マウスIL-1Raをコードする核酸配列	531 塩基

配列番号	配列	長さ
配列番号:148	マウスIL-1Raについてのアミノ酸配列	177残基
配列番号:149	ヒトIL-1Raをコードする核酸配列	528塩基
配列番号:150	ヒトIL-1Raについてのアミノ酸配列	176残基
配列番号:151	マウスIL-2をコードする核酸配列	504塩基
配列番号:152	マウスIL-2についてのアミノ酸配列	152残基
配列番号:153	ヒトIL-2をコードする核酸配列	396塩基
配列番号:154	ヒトIL-2についてのアミノ酸配列	132残基
配列番号:155	マウスFasリガンドをコードする核酸配列	834塩基
配列番号:156	マウスFasリガンドについてのアミノ酸配列	278残基
配列番号:157	ヒトFasリガンドをコードする核酸配列	840塩基
配列番号:158	ヒトFasリガンドについてのアミノ酸配列	280残基
配列番号:159	HELをコードする核酸配列	438塩基
配列番号:160	HELについてのアミノ酸配列	146残基
配列番号:161	Flagタグをコードする核酸配列	24塩基
配列番号:162	Flagタグについてのアミノ酸配列	8残基
配列番号:163	Hisタグをコードする核酸配列	18塩基
配列番号:164	Hisタグについてのアミノ酸配列	6残基
配列番号:165	Strepタグをコードする核酸配列	27塩基
配列番号:166	Strepタグについてのアミノ酸配列	9残基
配列番号:167	スペーサー(Spacer)1についてのアミノ酸配列	5-55残基
配列番号:168	スペーサー2についてのアミノ酸配列	3残基
配列番号:169	スペーサー3についてのアミノ酸配列	5-55残基
配列番号:170	スペーサー1、n=0をコードする核酸配列	15塩基
配列番号:171	スペーサー1、n=0についてのアミノ酸配列	5残基
配列番号:172	スペーサー1、n=1をコードする核酸配列	30塩基
配列番号:173	スペーサー1、n=1についてのアミノ酸配列	10残基
配列番号:174	スペーサー1、n=2をコードする核酸配列	45塩基
配列番号:175	スペーサー1、n=2についてのアミノ酸配列	15残基
配列番号:176	スペーサー1、n≧3をコードする核酸配列	60+塩基

配列番号	配列	長さ
配列番号:177	スペーサー2をコードする核酸配列	9 塩基
配列番号:178	スペーサー3、n＝0をコードする核酸配列	15 塩基
配列番号:179	スペーサー3、n＝0についてのアミノ酸配列	5 残基
配列番号:180	スペーサー3、n＝1をコードする核酸配列	30 塩基
配列番号:181	スペーサー3、n＝1についてのアミノ酸配列	10 残基
配列番号:182	スペーサー3、n＝2をコードする核酸配列	45 塩基
配列番号:183	スペーサー3、n＝2についてのアミノ酸配列	15 残基
配列番号:184	スペーサー3、n ≧3をコードする核酸配列	60+ 塩基
配列番号:185	自己合体マウスGM-CSFキメラ構築物をコードする核酸配列	552 塩基
配列番号:186	配列番号:185によりコードされるアミノ酸配列	182 残基
配列番号:187	自己合体ヒトGM-CSFキメラ構築物をコードする核酸配列	579 塩基
配列番号:188	配列番号:187によりコードされるアミノ酸配列	191 残基
配列番号:189	自己合体マウスIFN-ベータキメラ構築物をコードする核酸配列	732 塩基
配列番号:190	配列番号:190によりコードされるアミノ酸配列	242 残基
配列番号:191	自己合体ヒトIFN-ベータキメラ構築物をコードする核酸配列	708 塩基
配列番号:192	配列番号:191によりコードされるアミノ酸配列	234 残基
配列番号:193	自己合体マウスIL-1Raキメラ構築物をコードする核酸配列	723 塩基
配列番号:194	配列番号:193によりコードされるアミノ酸配列	239 残基
配列番号:195	自己合体ヒトIL-1Raキメラ構築物をコードする核酸配列	642 塩基
配列番号:196	配列番号:195によりコードされるアミノ酸配列	212 残基
配列番号:197	自己合体マウスIL-2キメラ構築物をコードする核酸配列	642 塩基
配列番号:198	配列番号:197によりコードされるアミノ酸配列	212 残基
配列番号:199	自己合体ヒトIL-2キメラ構築物をコードする核酸配列	513 塩基
配列番号:200	配列番号:199によりコードされるアミノ酸配列	169 残基
配列番号:201	自己合体マウスFas-Lキメラ構築物をコードする核酸配列	960 塩基

配列番号	配列	長さ
配列番号:202	配列番号:201によりコードされるアミノ酸配列	318 残基
配列番号:203	自己合体ヒトFas-Lキメラ構築物をコードする核酸配列	993 塩基
配列番号:204	配列番号:203によりコードされるアミノ酸配列	329 残基
配列番号:205	自己合体HELキメラ構築物をコードする核酸配列	633 塩基
配列番号:206	配列番号:205によりコードされるアミノ酸配列	209 残基
配列番号:207	自己合体マウスMCP-1をコードする核酸配列	282 塩基
配列番号:208	配列番号:207によりコードされるアミノ酸配列	94 残基
配列番号:209	自己合体ヒトMCP-1をコードする核酸配列	294 塩基
配列番号:210	配列番号:209によりコードされるアミノ酸配列	98 残基
配列番号:211	自己合体マウスMCP-1キメラ構築物をコードする核酸配列	402 塩基
配列番号:212	配列番号:211によりコードされるアミノ酸配列	132 残基
配列番号:213	自己合体ヒトMCP-1キメラ構築物をコードする核酸配列	405 塩基
配列番号:214	配列番号:213によりコードされるアミノ酸配列	133 残基
配列番号:215	NCE-2のアミノ酸配列	20 残基
配列番号:216	ヒトACTHキメラペプチドのアミノ酸配列	69 残基
配列番号:217	マウスACTHキメラペプチドのアミノ酸配列	65 残基
配列番号:218	ヒトアルファMSHキメラペプチドのアミノ酸配列	44 残基
配列番号:219	ヒトベータMSHキメラペプチドのアミノ酸配列	47 残基
配列番号:220	マウスベータMSHキメラペプチドのアミノ酸配列	52 残基
配列番号:221	ヒトガンマMSHキメラペプチドのアミノ酸配列	37 残基
配列番号:222	ヒトアンジオテンシンIキメラペプチドのアミノ酸配列	40 残基
配列番号:223	ヒトアンジオテンシンIIキメラペプチドのアミノ酸配列	39 残基
配列番号:224	ヒトアンジオテンシンIIIキメラペプチドのアミノ酸配列	37 残基
配列番号:225	ヒトGHRHキメラペプチドIのアミノ酸配列	55 残基
配列番号:226	ヒトGHRHキメラペプチドIのアミノ酸配列	70 残基
配列番号:227	マウスGHRHキメラペプチドのアミノ酸配列	67 残基
配列番号:228	ヒトIL-1ベータキメラペプチドIのアミノ酸配列	35 残基

配列番号	配列	長さ
配列番号:229	ヒトIL-1ベータキメラペプチドIIのアミノ酸配列	60残基
配列番号:230	ヒトIL-2キメラペプチドIのアミノ酸配列	38残基
配列番号:231	ヒトIL-2キメラペプチドIIのアミノ酸配列	44残基
配列番号:232	ヒトIL-2キメラペプチドIIIのアミノ酸配列	41残基
配列番号:233	ヒトTNF-アルファキメラペプチドIのアミノ酸配列	43残基
配列番号:234	ヒトTNF-アルファキメラペプチドIIのアミノ酸配列	52残基
配列番号:235	ヒトTNF-アルファキメラペプチドIIIのアミノ酸配列	46残基
配列番号:236	ヒトCys-BAFF-Rキメラペプチドのアミノ酸配列	54残基
配列番号:237	ヒトCys-BAFF-Rキメラペプチドのアミノ酸配列	56残基
配列番号:238	ヒトP55-TNF-Rキメラペプチドのアミノ酸配列	42残基
配列番号:239	ヒトP75-TNF-Rキメラペプチドのアミノ酸配列	51残基
配列番号:240	ヒトIL-6-Rキメラペプチドのアミノ酸配列	43残基
配列番号:241	L-セレクチンキメラペプチドのアミノ酸配列	47残基
配列番号:242	MUC-1キメラペプチドのアミノ酸配列	50残基
配列番号:243	卵白アルブミンキメラペプチドIのアミノ酸配列	48残基
配列番号:244	卵白アルブミンキメラペプチドIIのアミノ酸配列	38残基
配列番号:245	HIV gp120キメラペプチドIのアミノ酸配列	51残基
配列番号:246	HIV gp120キメラペプチドIIのアミノ酸配列	49残基
配列番号:247	HIV gp120キメラペプチドIIIのアミノ酸配列	54残基
配列番号:248	HIV gp41キメラペプチドのアミノ酸配列	66残基

【００１７】

発明の詳細な説明

1．定義

他に定義がない限り、本明細書に用いられるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野における業者により一般に理解されるのと同じ意味をもつ。本明細書に記載されるものと類似または等価のいずれの方法および材料も本発明の試験の実施において用いられうるが、好ましい方法および材料が記載されている。本発明の目的のために、以下の用語が下に定義される。

【００１８】

冠詞「一つの(a)」および「一つの(an)」は、その冠詞の文法的対象の一つまたは一つより多い(すなわち、少なくとも一つの)ものを指すように本明細書に用いられる。例として、「一つのエレメント」とは、一つのエレメントまたは一つより多いエレメントを意味する。

【００１９】

本明細書に用いられる場合、用語「約」は、参照の数量、レベル、値、寸法、大きさまたは量に対して30％ほど、好ましくは20％ほど、およびより好ましくは10％ほど変動する数量、レベル、値、寸法、大きさまたは量を指す。

【００２０】
本明細書に用いられる場合の用語「活性」は、非凝集の対象となる分子の活性を記載する。このように、例えば、対象となる分子のより高次の凝集体は、その凝集体が非凝集の分子の活性を示す場合に活性をもつ。
【００２１】
「二官能性架橋試薬」は、2つの反応性基を含む試薬を意味し、それにより試薬は2つの標的基を共有結合的に連結する能力をもつ。架橋試薬における反応性基は、典型的には、スクシンイミジルエステル、マレイミドおよびヨードアセトアミドのようなハロアセトアミドを含む官能基のクラスに属する。
【００２２】
「生物学的活性断片」とは、断片が完全長親ポリペプチドの活性を保持している、完全長親ポリペプチドの断片を意味する。例えば、自己合体エレメントの生物学的活性断片は、より高次の凝集体へとお互いの共凝集を可能にする同一のまたは十分に類似した適合性自己合体エレメントと合体する。本明細書に用いられる場合、用語「生物学的活性断片」は、親ポリペプチドの活性を含んでいる、欠失突然変異体、および例えば、少なくとも6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個の連続したアミノ酸の低分子ペプチドを含む。この型の断片は、標準的組換え核酸技術の適用を通して得られうる、または通常の液相もしくは固相合成技術を用いて合成されうる。例えば、Blackwell Scientific Publicationsに出版されかつNicholsonにより編集された「Synthetic Vaccines」と題する刊行物に含まれるAthertonおよびShephardによる「Peptide Synthesis」と題する9章に記載されるように、液相合成または固相合成が参照されうる。または、ペプチドは、エンドLys-C、エンドArg-C、エンドGlu-Cおよびスタフィロコッカス(staphylococcus)V8-プロテアーゼのようなプロテイナーゼでの本発明のポリペプチドの消化により作製されうる。消化された断片は、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)技術により精製されうる。
【００２３】
本明細書を通じて、文脈が異なる方法で要求しない限り、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」および「含むこと(comprising)」という語は、述べられている段階もしくは要素、または段階もしくは要素の群の包含を意味するが、いずれの他の段階もしくは要素、または段階もしくは要素の群の排除も意味しないことを理解されているものと思われる。
【００２４】
「発現ベクター」とは、ベクターによりコードされるタンパク質の合成を方向づけることができる任意の自律性遺伝的要素を意味する。そのような発現ベクターは、当業者に知られている。
【００２５】
「に対応する(corresponds)」または「に対応すること(corresponding)」とは、(a)参照ポリヌクレオチド配列のすべてもしくは部分に実質的に同一もしくは相補的であるヌクレオチド配列をもつ、または(b)ペプチドもしくはタンパク質におけるアミノ酸配列に同一のアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチドを意味する。この句はまた、参照ペプチドもしくはタンパク質におけるアミノ酸の配列に実質的に同一であるアミノ酸配列をもつペプチドまたはポリペプチドをそれの範囲内に含む。
【００２６】
「誘導体」とは、修飾、例えば、当技術分野において理解されているものと思われるような、他の化学的部分との結合もしくは複合化により、または翻訳後修飾技術により、基本配列から誘導されたポリペプチドを意味する。用語「誘導体」はまた、機能的に等価の分子を与える付加または欠失を含む親配列になされた変化をそれの範囲内に含む。
【００２７】
活性を調節する、または状態を処置もしくは予防することの関係における「有効量」と

は、その効果の調節、またはその状態の処置もしくは予防に有効である、単一用量においてまたは一連の一部としてのいずれかで、そのような調節、処置または予防を必要としている個体への活性のあるその量の投与を意味する。有効量は、処置される個体の健康および身体的状態、処置される個体の分類学的群、組成物の剤形、医学的状況の評価、ならびに他の関連性のある因子に依存して変化するものである。量は、日常的試験を通して決定されうる比較的広い範囲になるものと予想される。

【００２８】

「ホモ二官能性架橋試薬」は、2つのチオールまたは2つのアミンのような同標的群を連結するために主に用いられる同一の反応性基を含む試薬を意味する。

【００２９】

「ヘテロ二官能性架橋試薬」は、異なる化学的性質をもつ反応性基を含み、それにより、異なった官能基間の架橋の形成を可能にする試薬を意味する。

【００３０】

「より高次の」とは、少なくとも10個、12個、15個、20個、25個、50個、75個、100個、150個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個の分子の凝集体を意味する。

【００３１】

「ハイブリダイゼーション」とは、DNA-DNAハイブリッドまたはDNA-RNAハイブリッドを生じる相補的ヌクレオチド配列の対形成を意味するために本明細書に用いられる。相補的塩基配列は、塩基対形成ルールにより結びつけられる配列である。DNAにおいて、AはTと対になり、CはGと対になる。RNAにおいて、UはAと対になり、CはGと対になる。これに関しては、本明細書に用いられる場合の用語「マッチ」および「ミスマッチ」とは、相補的核酸鎖における対のヌクレオチドのハイブリダイゼーション可能性を指す。上で言及されている古典的なA-TおよびG-C塩基対のような、マッチしたヌクレオチドは効率的にハイブリダイズする。ミスマッチは、効率的にはハイブリダイズしないヌクレオチドの他の組み合わせである。

【００３２】

「単離された」とは、それの天然状態において普通それに付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない材料を意味する。例えば、本明細書に用いられる場合の「単離されたポリヌクレオチド」は、天然に存在している状態でそれに隣接する配列を取り去って精製されているポリヌクレオチドを指し、例えば、その断片に普通、隣接している配列から離されたDNA断片である。または、本明細書に用いられる場合の「単離されたペプチド」または「単離されたポリペプチド」などは、それの天然の細胞環境から、かつ特に、細胞の他の成分との会合からの、ペプチドもしくはポリペプチド分子のインビトロでの単離および/または精製を指し、すなわち、それは、インビボでの物質と付随していない。

【００３３】

「マーカー遺伝子」とは、マーカー遺伝子を発現する細胞へ明瞭な表現型を与える遺伝子を意味し、それに従って、そのように形質転換された細胞がマーカーを有しない細胞から識別されるのを可能にする。選択可能マーカー遺伝子は、選択試薬(例えば、除草剤、抗生物質、放射線、熱、または非形質転換細胞への他の処理損傷化)に対する耐性に基づいて「選択」できる形質を与える。スクリーニング可能マーカー遺伝子(またはレポーター遺伝子)は、観察または試験を通して、すなわち、「スクリーニング」(例えば、β-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼまたは非形質転換細胞に存在しない他の酵素活性)により、同定できる形質を与える。

【００３４】

本明細書に用いられる場合、「膜転位置配列」は、細胞内区画もしくは位置へまたは細胞外環境へのポリペプチドの輸送を仲介することができるアミノ酸配列である。

【００３５】

「から得られた」とは、例えば、核酸抽出物またはポリペプチド抽出物のような試料が、特定の供給源から単離されるまたは取り出されることを意味する。例えば、抽出物は、

限定されるものではないが、細菌、酵母および植物、加えて、哺乳動物、鳥、爬虫類、魚および昆虫を含む動物のような、任意の膜転位置配列を含む生物体から直接的に単離されうる。

【００３６】

本明細書に用いられる場合の用語「オリゴヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合により連結された多数のヌクレオチド単位(デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの関連構造変異体もしくは合成類似体)から構成されるポリマー(またはそれらの関連構造変異体もしくは合成類似体)を指す。このように、用語「オリゴヌクレオチド」は、典型的には、ヌクレオチドおよびそれらの間の結合が天然に存在しているヌクレオチドポリマーを指すが、その用語はまた、限定されるものではないが、ペプチド核酸(PNA)、ホスホラミデート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、2-0-メチルリボ核酸などを含む様々な類似体もそれの範囲内に含む。分子の正確な大きさは、特定の適用に依存して変化しうる。オリゴヌクレオチドは、典型的には、長さはやや短く、一般的には約10ヌクレオチドから30ヌクレオチドまでであるが、その用語は、任意の長さの分子を指すことができる、しかし、用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、典型的には、大きなオリゴヌクレオチドについて用いられる。

【００３７】

「作動可能に連結された」とは、転写および翻訳制御核酸が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して、ポリヌクレオチドが転写されかつポリペプチドが翻訳されるような様式で位置していることを意味する。

【００３８】

本明細書で交換可能に用いられる用語「対象」または「個体」または「患者」は、治療または予防が望まれる任意の対象、特に脊椎動物対象、およびよりいっそう特に哺乳動物対象、を指す。本発明の範囲の中に含まれる適する脊椎動物は、限定されるものではないが、霊長類、鳥、魚、爬虫類、家畜動物(例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ブタ)、実験用試験動物(例えば、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター)、伴侶動物(例えば、ネコ、イヌ)、および捕らわれの野生動物(例えば、キツネ、シカ、ディンゴ)を含む。しかしながら、前記の用語は症状が存在することを意味しないことは、理解されているものと思われる。

【００３９】

「薬学的に許容される担体」とは、患者への局所的または全身的投与において安全に用いられることができる、固体もしくは液体の賦形剤、希釈剤または封入物質を意味する。

【００４０】

本明細書に用いられる用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、mRNA、RNA、cRNA、cDNAまたはDNAを示す。その用語は、典型的には、30ヌクレオチド長より大きいオリゴヌクレオチドを指す。

【００４１】

用語「ポリヌクレオチド変異体」および「変異体」は、下に定義されるストリンジェントな条件下において参照配列とハイブリダイズする、参照ポリヌクレオチド配列またはポリヌクレオチドと実質的な配列同一性を示すポリヌクレオチドを指す。これらの用語はまた、1個または複数のヌクレオチドが付加もしくは欠失した、または異なるヌクレオチドと置換されたポリヌクレオチドを含む。この事については、突然変異、付加、欠失および置換を含むある特定の改変が参照ポリヌクレオチドになされうり、それにより改変されたポリヌクレオチドが参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保持していることは、当技術分野においてよく理解されている。用語「ポリヌクレオチド変異体」および「変異体」はまた、天然に存在する対立遺伝子の変異体を含む。

【００４２】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーならびにその同じものの変異体および合成類似体を指すために本明細書で交換可能に用いられる。このように、これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存

在するアミノ酸の化学的類似体のような合成の天然に存在しないアミノ酸であるアミノ酸ポリマー、および天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。

【００４３】

用語「ポリペプチド変異体」は、少なくとも1個のアミノ酸の付加、欠失または置換により参照ポリペプチドから識別されるポリペプチドを指す。特定の態様において、ポリペプチド変異体は、保存的または非保存的でありうる1つまたは複数の置換により、参照ポリペプチドから識別される。特定の態様において、ポリペプチド変異体は、保存的置換を含み、この事については、いくつかのアミノ酸が、ポリペプチドの活性の性質を変化させることなく、おおまかに類似した性質をもつ他のものへ変えられうることは当技術分野においてよく理解されている。ポリペプチド変異体はまた、1個または複数のアミノ酸が付加もしくは欠失した、または異なるアミノ酸残基と置換されたポリペプチドを含む。

【００４４】

「プライマー」とは、DNAの鎖と対形成された場合、適する重合化剤の存在下においてプライマー伸長産物の合成を開始することができるオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーは、好ましくは、増幅における最高効率のために一本鎖であるが、代替として二本鎖でありうる。プライマーは、重合化剤の存在下において伸長産物の合成をプライムするのに十分に長くなければならない。プライマーの長さは、適用、使用される温度、鋳型反応条件、他の試薬、およびプライマーの供給源を含む多くの因子に依存する。例えば、標的配列の複雑性に依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、15個～35個、またはそれ以上のヌクレオチド残基を含むが、より少ないヌクレオチド残基を含みうる。プライマーは、約35ヌクレオチドから数キロベースまでまたはそれ以上のような大きなポリヌクレオチドでありうる。プライマーは、それがハイブリダイズするように予定されている鋳型における配列に「実質的に相補的」であり、かつ合成の開始のための部位としての役割を果たすように選択されうる。「実質的に相補的」とは、プライマーが標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズするのに十分に相補的であることを意味する。好ましくは、プライマーは、それがハイブリダイズするように予定されている鋳型とのミスマッチを含まないが、これは必須ではない。例えば、非相補的ヌクレオチド残基がプライマーの5'末端に付着されうり、プライマー配列の残りが鋳型に相補的である。または、プライマー配列が、鋳型の配列と十分な相補性をもち、それとハイブリダイズし、それによりプライマーの伸長産物の合成のための鋳型を形成するという条件で、非相補的ヌクレオチド残基またはひと続きの非相補的ヌクレオチド残基が、プライマーへ散在しうる。

【００４５】

「プローブ」は、もう一つの分子の特定の配列もしくは部分配列または他の部分に結合する分子を指す。他に規定がない限り、用語「プローブ」は、典型的には、相補的塩基対形成を通して、「標的ポリヌクレオチド」としばしば呼ばれるもう一つのポリヌクレオチドに結合するポリヌクレオチドプローブを指す。プローブは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェント性に依存して、プローブとの完全な配列相補性を欠く標的ポリヌクレオチドを結合することができる。プローブは、直接的にまたは間接的に標識されうる。

【００４６】

用語「精製されたポリペプチド」または「精製されたタンパク質」などは、ポリペプチドまたはタンパク質が、そのタンパク質が由来する細胞もしくは組織供給源からの細胞物質または他の混入しているタンパク質を実質的に含まない、または化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことを意味する。「実質的に含まない」とは、本発明のキメラポリペプチドの調製物が少なくとも10 %純粋であることを意味する。特定の態様において、キメラポリペプチドの調製物は、約30 %、20 %、10 %およびより好ましくは5 %(乾燥重量による)未満の非キメラポリペプチドタンパク質(本明細書では「混入しているタンパク質」とも呼ばれている)、または化学的前駆体もしくは非キメラポリペプチド化学物質を有する。本発明は、乾燥重量での少なくとも0.01、0.1、1.0および10ミリグラムの単離または精製された調製物を含む。

【００４７】

本明細書に用いられる場合の用語「組換えポリヌクレオチド」は、天然において普通には見出されない型への核酸の操作によりインビトロで形成されたポリヌクレオチドを指す。例えば、組換えポリヌクレオチドは、発現ベクターの形をとりうる。一般的に、そのような発現ベクターは、ヌクレオチド配列に作動可能に連結された転写および翻訳制御核酸を含む。

【００４８】

「組換えポリペプチド」とは、組換え技術を用いて、すなわち、組換えまたは合成ポリヌクレオチドの発現を通して、作製されたポリペプチドを意味する。キメラポリペプチドまたはその生物学的活性部分が組換え的に産生される場合、それはまた、好ましくは、実質的に、培地を含まない、すなわち、培地は、タンパク質調製物の容量の約20 %未満、より好ましくは約10 %未満、および最も好ましくは約5 %未満を示す。

【００４９】

2つもしくはそれ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列関係を記載するために用いられる用語は、「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」および「実質的同一性」を含む。「参照配列」は、長さが少なくとも12個だが、頻繁には15個～18個、およびしばしば少なくとも25個の、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基を含めての単量体単位である。2つのポリヌクレオチドは、それぞれ、(1)2つのポリヌクレオチド間で類似している配列(すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の部分のみ)、および(2)2つのポリヌクレオチド間で互いに異なる配列を含みうるため、2つ(またはそれ以上)のポリヌクレオチド間の配列比較は、典型的には、配列類似性の局所的領域を同定かつ比較する「比較ウィンドウ」を通じて2つのポリヌクレオチドの配列を比較することにより行われる。「比較ウィンドウ」は、2つの配列が最適に整列した後に配列が連続した位置の同じ数の参照配列と比較される、少なくとも50個の連続した位置、通常には約50個～約100個、より通常には約100個～約150個の概念的区域を指す。比較ウィンドウは、2つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較した場合、約20 %またはそれ未満の付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含みうる。比較ウィンドウを整列させるための配列の最適なアラインメントは、アルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、WI、USAにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)のコンピューター化された手段により、または検査により、行われうり、最良のアラインメント(すなわち、結果として、比較ウィンドウを通じて最高のパーセンテージ相同性を生じている)が選択された様々な方法のいずれかにより生じうる。参照はまた、例えば、Altschulら、1997、Nucl. Acids Res. 25:3389により開示されているように、プログラムのBLASTファミリーに対してなされうる。配列分析の詳細な考察は、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons Inc.、1994-1998、15章のUnit 19.3に見出されうる。

【００５０】

用語「自己合体する」は、同一のポリペプチドと、およびまた、自己合体エレメントのアミノ酸配列において決して完全な同一性ではない、高類似性(例えば、20 %未満およびより好ましくは10 %未満の配列相違)をもつポリペプチドと合体することが予測されうる自己合体エレメントを指すために本明細書に用いられる。

【００５１】

「自己合体エレメント」、「SCE」などは、対象となる分子に結合された場合、分子がより高次の凝集体へと類似の分子と合体するのを引き起こすことができる任意のアミノ酸配列を意味する。

【００５２】

本明細書に用いられる場合の用語「配列同一性」は、比較のウィンドウを通じて、ヌクレオチドずつを基本としてまたはアミノ酸ずつを基本として配列が同一である程度を指す。このように、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウィンドウを通じて2つの最適に整列した配列を比較し、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、I)または同一のアミ

ノ酸残基(例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、CysおよびMet)が両方の配列に生じている位置の数を決定してマッチした位置の数をもたらし、マッチした位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で割り、そしてその結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージをもたらすことにより、計算される。本発明の目的ために、「配列同一性」は、ソフトウェアに付属する参照マニュアルに用いられているような標準デフォルトを用いて、DNASISコンピュータープログラム(windows用バージョン2.5；Hitachi Software engineering Co., Ltd.、South San Francisco、California、USA)により計算された「マッチパーセンテージ」を意味することは理解されているものと思われる。

【００５３】

「類似性」は、下記の表Bに定義されているような、同一であるまたは保存的置換を構成しているアミノ酸のパーセンテージ数を指す。類似性は、GAP(Deverauxら、1984、Nucleic Acids Research 12、387-395)のような配列比較プログラムを用いて決定されうる。この方法において、本明細書に引用されているものと類似した、または実質的に異なる長さの配列は、アラインメントへのギャップの挿入により比較されうり、そのようなギャップは、例えば、GAPにより用いられた比較アルゴリズムにより、決定される。

【００５４】

本明細書に用いられる「ストリンジェント性」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程中における、温度およびイオン強度条件、ならびに特定の有機溶媒の存在もしくは存在を指す。ストリンジェント性が高ければ高いほど、固定化された標的ヌクレオチド配列と洗浄後標的にハイブリダイズしたままである標識プローブポリヌクレオチド配列の間の相補性の程度は高くなるものである。

【００５５】

「ストリンジェントな条件」は、高頻度の相補塩基を有するヌクレオチド配列のみがハイブリダイズする温度およびイオン条件を指す。必要とされるストリンジェント性は、ヌクレオチド配列依存性であり、ハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄中に存在する様々な成分ならびにこれらの工程に与えられる時間に依存する。一般的に、ハイブリダイゼーション率を最大にするために、ストリンジェントではないハイブリダイゼーション条件が選択される；融解温度(T_m)より低い約20～25℃。T_mは、規定されたイオン強度およびpHにおける溶液中において、特定の標的配列の50 %が完全に相補的なプローブにハイブリダイズする温度である。一般的に、ハイブリダイズされる配列の少なくとも約85 %ヌクレオチド相補性を要求するために、T_mより約5～15℃低い高ストリンジェントな洗浄条件が選択される。ハイブリダイズされる配列の少なくとも約70 %ヌクレオチド相補性を要求するために、T_mより約15～30℃低い中位にストリンジェントな洗浄条件が選択される。高度に許容的な(低ストリンジェントな)洗浄条件は、ハイブリダイズされる配列間の高レベルのミスマッチを許す、T_mより50℃くらい低くくありうる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄段階における他の物理的および化学的パラメーターもまた、標的とプローブ配列間の相同性の特定のレベルからの検出可能なハイブリダイゼーションシグナルの結果に影響を及ぼすように変えられうることは、当業者が認識しているものと思われる。ストリンジェント性条件の他の例は、セクション3.3に記載されている。

【００５６】

用語「形質転換」は、外来または内因性核酸の導入による生物体、例えば、細菌、酵母または植物、の遺伝子型の改変を意味する。

【００５７】

用語「導入遺伝子」は、細胞、特に生きている動物の細胞、のゲノムへ人工的に挿入されたまたは挿入されようとしている遺伝物質を記載するために本明細書に用いられる。導入遺伝子は、永久的または一過性遺伝子変化、望ましくは永久的遺伝子変化、が外因性核酸(通常はDNA)の取り込み後に細胞に導入されることを意味する、細胞を形質転換するために用いられる。永久的遺伝子変化は、一般的に、細胞のゲノムへのDNAの導入により達成される。安定的組込みのためのベクターは、プラスミド、レトロウイルスおよび他の動

物ウイルス、YAC(酵母人工染色体)、BAC(細菌人工染色体)などを含む。導入遺伝子は、適切には、限定されるものではないが、齧歯類、ヒト、非ヒト霊長類、ヒツジ、ウシ、反芻動物、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類などのような脊椎動物、好ましくは哺乳動物、を含む動物に由来する。

【００５８】

本明細書に用いられる場合の用語「トランスジェニック」は、内因性ゲノムが外来遺伝子もしくは配列のランダムなまたは部位特異的組込みにより補充または改変されている遺伝子改変の動物を指す。

【００５９】

本発明の「トランスジェニック動物」は、動物の生殖系列のゲノムの実験操作により適当に作製される。これらの遺伝子操作された動物は、胚性標的細胞への核酸(通常はDNA)を含む「導入遺伝子」の導入、または人間の介入による動物の体細胞および/もしくは生殖系列細胞の染色体への組込みを含むいくつかの方法により作製されうる。トランスジェニック動物は、ゲノムが導入遺伝子の導入により変化している動物である。

【００６０】

「ベクター」とは、ポリヌクレオチドが挿入されうるまたはクローニングされうる、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、酵母またはウイルス由来のポリヌクレオチド分子、好ましくはDNA分子を意味する。ベクターは、好ましくは、1つまたは複数の固有の制限酵素切断部位を含み、標的細胞もしくは組織またはその前駆細胞もしくは組織を含む限定された宿主細胞において自己複製の能力がありうる、またはクローニングされた配列が再現性があるように限定された宿主のゲノムと統合可能でありうる。従って、ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、複製が染色体の複製から独立している、染色体外の実体として存在するベクター、例えば、線状もしくは閉環状プラスミド、染色体外要素、ミニ染色体、または人工染色体でありうる。ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含みうる。または、ベクターは、宿主細胞へ導入された場合、ゲノムへ組込まれ、それが組込まれている染色体と共に複製されるものでありうる。ベクター系は、宿主細胞のゲノムへ導入される全DNAを共に含む、単一ののベクターもしくはプラスミド、2つまたは複数のベクターもしくはプラスミド、またはトランスポゾンを含みうる。ベクターの選択は、典型的には、ベクターが導入される予定である宿主細胞とのベクターの適合性に依存するものである。本件において、ベクターは、好ましくは、動物および好ましくは哺乳動物細胞において作動可能に機能しうる、ウイルスのまたはウイルス由来のベクターである。そのようなベクターは、ポックスウイルス、アデノウイルスまたは酵母由来でありうる。ベクターはまた、適した形質転換体の選択のために用いられうる抗生物質耐性遺伝子のような選択マーカーを含みうる。そのような耐性遺伝子の例は、当業者に知られており、抗生物質カナマイシンおよびG418(Geneticin(登録商標))に対する耐性を与えるnptII遺伝子、ならびに抗生物質ハイグロマイシンBに対する耐性を与えるhph遺伝子を含む。

【００６１】

2．本発明のより高次の凝集体

本発明は、シグナルペプチド生物学の適用をタンパク質発現系の関係を越えて拡大し、シグナルペプチドの自己合体性質を用いる多様かつ実用的な適用を提供する。何か一つの特定の理論または働きの様式に結びつけられることを望まないが、シグナルペプチドの大部分的に疎水性である性質が、少なくとも一部分、そのペプチドが他の同様のペプチドとより高次の多量体または凝集体へと合体するのを引き起こすと考えられる。このように、シグナルペプチドの自己凝集性質は、複数の同じまたは異なる分子を、新規なまたは増強された性質をもつより高次の凝集体へと合体させるために広く利用されうることが、本発明により提案される。本発明の凝集体は、以下に記載されているように、化学的、治療的および予防的適用を含む適用の範囲において有用性を見出す。

【００６２】

同一のみのまたは実質的に類似した対象となる分子を含む凝集体を記載するにおいて、接頭辞「ホモ」が用いられる。より高次のホモ凝集体に関して用いられる場合、増強され

た活性は、延長した半減期(例えば、天然に存在するまたは親の対象となる分子に対してより長い半減期)またはより高い効力(例えば、活性の特定されたレベルに達するのに天然に存在するまたは親の分子に対してより少ない量を必要とする)を含みかつ包含する。増強された活性はまた、上記の活性の組み合わせを含みうり、例えば、延長した半減期も示すより高い効力をもつより高次の凝集体である。対象となる分子に特異的である活性を測定するための試験は、当業者に周知である。

【００６３】

シグナルペプチドの自己合体性質はまた、対象となる異なる分子をより高次の凝集体へ合体するために利用されうる。1つより多い種類の対象となる分子を含む凝集体を記載するにおいて、接頭辞「ヘテロ」が用いられる。例えば、ヘテロ凝集体は、それらの分子の1つまたは複数が残りの分子の1つまたは複数とは異なっている、2つまたはそれ以上の対象となる分子を含む。そのようなヘテロ凝集体は、非凝集の対象となる分子の活性の合計を示しうる。または、ヘテロ凝集体は、相乗的特性を示し、それに従って、もし各分子成分が単独で用いられることになっていたならば、その凝集体に見出される対象となる各分子の類似した量により示されたであろう活性より大きい活性を示す。

【００６４】

このように、本発明の一つの局面において、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体が提供され、各キメラ分子は、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せ、かつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを含み、そのまたはそれぞれの自己合体エレメントは、個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下において他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体になることができる。適切には、凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は、以下のものから選択されるキメラ分子以外である：(1)B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；または(2)プロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、それぞれは、米国特許第6,521,741号に記載されている。

【００６５】

凝集体のキメラ分子は、同じまたは異なりうり、この点について、キメラ分子は、対象となる同じもしくは異なる分子、または同じもしくは異なる自己合体エレメント(SLE)を含みうる。好ましい態様において、対象となる分子はポリペプチドであり、このような関係においては：(1)用語「より高次の」は、ポリペプチド二量体、四量体、または活性複合体における他の少数のポリペプチドサブユニットを含むことが知られている多くのタンパク質を排除することになっている、(2)用語「より高次の凝集体」は、非生理的条件において形成することができる変性タンパク質のランダムな凝集を排除することになっている；および(3)用語「自己合体する」は、本明細書に教示されているような適切な条件下において同一のアミノ酸配列をもつポリペプチドと規則正しい凝集体を形成するポリペプチドの性質を指し、合体があらゆる濃度またはあらゆる条件のセットの下で自然に発生することを意味するものではない。

【００６６】

2.1 自己合体エレメント

自己合体エレメント(SCE)は、約60 %から約95 %まで、およびより適切には約70 %から約90 %までが小型もしくは疎水性アミノ酸残基またはそれらの修飾型である、約8個～約35個のアミノ酸残基、より好ましくは約15個～約30個のアミノ酸残基、から本質的になりうる。通常には、1つもしくは複数の極性または荷電アミノ酸が、SCEの一方または両方の末端へ接近して隣接するように位置している(約5個のアミノ酸残基内に)。SCEのカルボキシル末端に、または接近して隣接するように、位置している小型アミノ酸残基もまた望ましい。この保存は、例えば、図1において図示されており、広くかつ多様な種の選択からの様々な膜転位置アミノ酸配列のアラインメントを示す。より明白な保存は、図2に示されており、細菌の外膜タンパク質の膜転位置アミノ酸配列のアラインメントを示す。

【００６７】

一つの態様において、SCEは、以下の式により表される：

$$B_1–X_1\,[X_j]_n\,X_2\,X_3\,X_4\,X_5\,[X_k]_n\,X_6\,[X_l]_n\,X_7\,X_8\,X_9–Z_1 \qquad (I)$$

[配列番号：1]
式中：
B_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約50個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_1は、疎水性、小型、中性もしくは塩基性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_j]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは0個から2個のアミノ酸残基であり、配列X_jは、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_2は、疎水性、小型もしくは極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_3は、疎水性、小型もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_4は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_5は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_k]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは4個から6個のアミノ酸残基であり、配列X_kは、疎水性、小型、極性もしくは中性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_6は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_l]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは2個から4個のアミノ酸残基であり、配列X_lは、疎水性、小型もしくは極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_7は、疎水性、小型、荷電もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_8は、中性/極性、荷電、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_9は、選択的であり、存在する場合、小型もしくは荷電のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
Z_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約50個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【００６８】
適切には、B_1が存在する場合、それは、約1個から約20個のアミノ酸残基の配列である。この型の一つの態様において、B_1は、以下の式により表される：

$B_2J_1[X_i]_n$ （II） [配列番号：2]

式中：
B_2は、存在しない、または、J_1もまた存在する条件下で、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約15個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
J_1は、存在しない、または、$[X_i]_n$もまた存在する条件下で、疎水性、荷電、中性/極性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；および
$[X_i]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは2個から5個のアミノ酸残基であり、配列X_iは、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【００６９】
いくつかの態様において、J_1は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、J_1は、PheおよびIle、またはその修飾型から選択される。他の態様において、J_1は、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基である、例えば、J_1は、His、LysもしくはArg、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、J_1は、中性/極性アミノ酸残基、例えばAsn、またはその修飾型である。さらに他の態様において、J_1は、小型アミノ酸残基である、例えば、J_1は、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される。

【００７０】
特定の態様において、$[X_i]_n$は、以下の式により表される：

$O_1O_2O_3O_4O_5$ (III) [配列番号：3]
式中：
O_1～O_5の少なくとも2個が存在し、ここにおいて：
O_1は、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_1は、LeuもしくはIle、またはその修飾型から選択される)、荷電アミノ酸残基、典型的には塩基性アミノ酸残基(例えば、Argまたはその修飾型)、中性/極性アミノ酸残基(例えば、Asnまたはその修飾型)、または小型アミノ酸残基(例えば、Alaまたはその修飾型)から選択される。
O_2は、小型アミノ酸残基(例えば、Thrまたはその修飾型)、または塩基性アミノ酸残基(例えば、Lysまたはその修飾型)から選択される；
O_3は、荷電の(典型的には塩基性の)アミノ酸残基(例えば、O_3は、ArgもしくはLys、またはその修飾型から選択される)、中性/極性アミノ酸残基(例えば、Asnまたはその修飾型)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_3は、Ile、ValもしくはLeu、またはその修飾型)、または小型アミノ酸残基(例えば、Alaまたはその修飾型)から選択される；
O_4は、荷電の(典型的には塩基性の)アミノ酸残基(例えば、O_4は、ArgもしくはLys、またはその修飾型から選択される)、中性/極性アミノ酸残基(例えば、O_4は、GlnもしくはAsn、またはその修飾型から選択される)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_4は、Phe、Ile、ValもしくはLeu、またはその修飾型から選択される)、または小型アミノ酸残基(例えば、O_4は、Ala、Gly、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される)から選択される；および
O_5は、荷電の(典型的には塩基性の)アミノ酸残基(例えば、O_5は、ArgもしくはLys、またはその修飾型から選択される)、中性/極性アミノ酸残基(例えば、Asnまたはその修飾型)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_5は、Phe、Ile、ValもしくはLeu、またはその修飾型から選択される)、または小型アミノ酸残基(例えば、O_5は、Ala、Gly、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される)から選択される。

【００７１】
いくつかの態様において、X_1は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_1は、Leu、Met、Phe、IleもしくはVal、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_1は、小型アミノ酸残基である、例えば、X_1は、Gly、Ala、Ser、もしくはThr、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_1は、Cys、LysもしくはHis、またはその修飾型から選択される。

【００７２】
特定の態様において、$[X_j]_n$は、単一のアミノ酸残基であり、適切には、Ala、Arg、AsnもしくはVal、またはその修飾型から選択される。他の態様において、$[X_j]_n$は、2個のアミノ酸残基の配列であり、第一のアミノ酸残基は、適切には、Lys、Asp、Leu、Asn、Ala、ValもしくはPhe、またはその修飾型から選択され、第二のアミノ酸残基は、適切には、Ser、Ala、Lys、Gln、AsnもしくはLeu、またはその修飾型から選択される。

【００７３】
いくつかの態様において、X_2は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_2は、Val、Leu、Tyr、IleもしくはPhe、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_2は、小型アミノ酸残基である、例えば、X_2は、Pro、Ala、Gly、Ser、もしくはThr、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_2は、AsnもしくはArg、またはその修飾型から選択される。

【００７４】
いくつかの態様において、X_3は、小型アミノ酸残基である、例えば、X_3は、Alaまたはその修飾型である。他の態様において、X_3は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_3は、Met、Leu、Val、IleもしくはPhe、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_3は、Cysまたはその修飾型である。

【００７５】
いくつかの態様において、X_4は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_4は、Val、Leu、IleもしくはTrp、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_4は、小型ア

ミノ酸残基である、例えば、X_4は、Ala、Gly、Ser、もしくはThr、またはその修飾型から選択される。

【００７６】

いくつかの態様において、X_5は、小型アミノ酸残基である、例えば、X_5は、Ala、Gly、Serもしくは Thr、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_5は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_5は、Leu、Phe、Val、Ile、またはその修飾型から選択される。

【００７７】

特定の態様において、$[X_k]_n$は以下の式により表される：

$B_3O_6O_7O_8O_9B_4$ (IV) [配列番号：4]

式中：

B_3は、小型アミノ酸残基(例えば、Pro、Ala、Gly、Serもしくは Thr、またはその修飾型)、疎水性アミノ酸残基(例えば、Valもしくは Leu、またはその修飾型)、または中性/極性アミノ酸残基(例えば、Cysまたはその修飾型)から選択される；

O_6～O_9の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：

O_6は、小型アミノ酸残基(例えば、O_6は、Ala、Gly、Serもしくは Thr、またはその修飾型から選択される)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_6は、Val、Leu、Ileもしくは Met、またはその修飾型から選択される)、または中性/極性アミノ酸残基(例えば、Cysまたはその修飾型)から選択される；

O_7は、小型アミノ酸残基(例えば、O_7は、Alaもしくは Ser、またはその修飾型から選択される)、疎水性アミノ酸残基(例えば、Pheまたはその修飾型)、または中性/極性アミノ酸残基(例えば、Asnまたはその修飾型)から選択される；

O_8は、小型アミノ酸残基(例えば、O_8は、Thr、Alaもしくは Ser、またはその修飾型から選択される)、または疎水性アミノ酸残基(例えば、O_8は、Ile、Leu、Val、Met、Phe、Tyrもしくは Trp、またはその修飾型から選択される)から選択される；

O_9は、小型アミノ酸残基(例えば、O_9は、Pro、Ala、Gly、Serもしくは Thr、またはその修飾型から選択される)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_9は、Ile、Leu、Valもしくは Phe、またはその修飾型から選択される)、塩基性アミノ酸残基(例えば、Hisまたはその修飾型)、または中性/極性アミノ酸残基(例えば、Cysまたはその修飾型)から選択される；および

B_4は、小型アミノ酸残基(例えば、Ala、Serもしくは Thr、またはその修飾型)、または疎水性アミノ酸残基(例えば、Ile、Val、Leu、Met、Tyrもしくは Phe、またはその修飾型)から選択される。

【００７８】

いくつかの態様において、X_6は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_6は、Leu、Val、Metもしくは Tyr、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_6は、小型アミノ酸残基である、例えば、X_6は、Pro、Ala、Gly、Serもしくは Thr、またはその修飾型から選択される。

【００７９】

特定の態様において、$[X_l]_n$は、以下の式により表される：

$B_5O_{10}O_{11}O_{12}$ (V) [配列番号：5]

式中：

B_5は、小型アミノ酸残基(例えば、Pro、Ala、Gly、Serもしくは Thr、またはその修飾型)、疎水性アミノ酸残基(例えば、Ile、Leu、Val、Pheもしくは Met、またはその修飾型)、または中性/極性アミノ酸残基(例えば、Glnまたはその修飾型)から選択される；

O_{10}～O_{12}の少なくとも1個は存在し、ここにおいて：

O_{10}は、小型アミノ酸残基(例えば、O_{10}は Gly、Ala、Serもしくは Thr、またはその修飾型から選択される)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_{10}は Val、Leu、Metもしくは Phe、またはその修飾型から選択される)、中性/極性アミノ酸残基(例えば、O_{10}は Cys、Asnもしくは Gln、またはその修飾型から選択される)から選択される；

O_{11}は、小型アミノ酸残基、例えばProまたはその修飾型、である；および
O_{12}は、小型アミノ酸残基(例えば、O_{12}はAla、Gly、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される)、疎水性アミノ酸残基(例えば、O_{12}はIle、Leu、Val、TyrもしくはTrp、またはその修飾型から選択される)、または中性/極性アミノ酸残基(例えば、Cysまたはその修飾型)から選択される。

【００８０】

いくつかの態様において、X_7は、疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_7は、Leu、Ile、ValもしくはMet、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_7は、小型アミノ酸残基である、例えば、X_7は、Pro、Ala、Gly、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_7は荷電アミノ酸残基である、例えば、X_7は、AspもしくはArg、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_7は、中性/極性アミノ酸残基、例えば、Asnまたはその修飾型、である。

【００８１】

いくつかの態様において、X_8は中性/極性アミノ酸残基である、例えば、X_8はGln、AsnもしくはCys、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_8は荷電アミノ酸残基である、例えば、X_8は、HisもしくはGlu、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_8は疎水性アミノ酸残基である、例えば、X_8は、Val、MetもしくはTrp、またはその修飾型から選択される。さらに他の態様において、X_8は小型アミノ酸残基である、例えば、X_8は、AlaもしくはSer、またはその修飾型から選択される。

【００８２】

いくつかの態様において、X_9は小型アミノ酸残基である、例えば、X_9は、Ala、Gly、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_9は、荷電アミノ酸残基、より適切には酸性アミノ酸残基、例えば、Gluまたはその修飾型、である。

【００８３】

特定の態様において、Z_1は、以下の式により表される：
$J_2J_3J_4Z_2$ (VI) [配列番号：6]
式中：
J_2は、小型アミノ酸残基、例えば、Thrまたはその修飾型、である；
J_3は、存在しない、または、J_2も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基、例えば、Lysもしくはその修飾型、である；
J_4は、存在しない、または、J_3も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基、例えば、Lysもしくはその修飾型、である；および
Z_2は、存在しない、または、J_4も存在する条件下で、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約15個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【００８４】

望ましくは、Z_1またはZ_2は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個の荷電アミノ酸残基を含み、典型的には、排他的ではないが、塩基性アミノ酸残基である。荷電アミノ酸残基は、お互いに隣接して位置しうる、または1個もしくは複数の他の(非荷電の)アミノ酸残基によりお互いから間隔をあけられうる。

【００８５】

もう一つの態様において、SCEは、以下の式により表される：

$$B_2J_1[X_i]_nX_1[X_j]_nX_2X_3X_4X_5[X_k]_nX_6[X_l]_nX_7X_8X_9Z_1 \quad (VII)$$

[配列番号：7]
式中：
B_2、J_1、$[X_i]_n$、$[X_j]_n$、$[X_k]_n$、$[X_l]_n$、X_{1-9}およびZ_1は、上で定義されているとおりである。

【００８６】

なおもう一つの態様において、SCEは、以下の式により表される：

B_1–$X_1X_2X_3X_4X_5[X_m]_nX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$–$Z_1$ (VIII)

[配列番号：8]
式中：
B_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約5個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じもしくは異なるアミノ酸を含む；
X_1は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_2は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_3は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_4は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基、またはその修飾型から選択される；
X_5は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；および
$[X_m]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約0個から約2個のアミノ酸残基であり、配列X_mは、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基、またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_6は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_7は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_8は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_9は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_{10}は、疎水性、小型もしくは中性/極性のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_{11}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_{12}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{13}は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_{14}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{15}は、中性/極性、酸性もしくは疎水性のアミノ酸残基、またはその修飾型である；
X_{16}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；および
Z_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約20個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じもしくは異なるアミノ酸残基を含む。

【００８７】
B_1が存在する場合の特定の態様において、それは、以下の式により表される：
$J_1J_2J_3J_4J_5$ (IX) [配列番号：9]
式中：
J_1は、存在しない、または、J_2も存在する条件下で、疎水性アミノ酸残基、例えば、Metもしくはその修飾型、である；
J_2は、存在しない、または、J_3も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基、例えば、Lysもしくはその修飾型、である；
J_3は、存在しない、または、J_4も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基であり、例えば、J_3はLysもしくはArg、またはその修飾型から選択される；
J_4は、存在しない、または、J_5も存在する条件下で、小型アミノ酸残基(例えば、Tまたはその修飾型)、もしくは荷電アミノ酸残基、典型的には塩基性アミノ酸残基(例えば、J_4はLysもしくはArg、またはその修飾型から選択される)、もしくは中性/極性アミノ酸残基(例えば、Glnまたはその修飾型)から選択される；および
J_5は、存在しない、または小型アミノ酸残基(例えば、J_5はAlaもしくはThr、またはその修飾型から選択される)もしくは疎水性アミノ酸残基(例えば、Leuまたはその修飾型)から選択される。

【００８８】
いくつかの態様において、X_1は、Ile、Valもしくは Leu、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_2は、Thr、Glyもしくは Ala、またはその修飾型から選

択される。いくつかの態様において、X_3は、IleもしくはLeu、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_4は、疎水性アミノ酸残基であり、適切には、ValもしくはTrp、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_5は、Ile、Phe、もしくはより典型的にはVal、またはその修飾型から選択される。

【００８９】

特定の態様において、$[X_1]_n$は、以下の式により表される：

J_6J_7 (X) [配列番号：10]

式中：

J_6およびJ_7の少なくとも1個は存在し、

J_6は、疎水性アミノ酸残基(例えば、Leuまたはその修飾型)、または小型アミノ酸残基(例えば、Glyまたはその修飾型)から選択される；および

J_7は、小型アミノ酸残基(例えば、Serまたはその修飾型)、または疎水性アミノ酸残基(例えば、Leuまたはその修飾型)から選択される。

【００９０】

いくつかの態様において、X_6は、小型アミノ酸残基であり、適切には、Alaまたはその修飾型である。他の態様において、X_6は、疎水性アミノ酸残基であり、適切には、ValもしくはLeu、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_7は、小型アミノ酸残基であり、適切には、Ala、GlyもしくはThr、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_7は、Leuまたはその修飾型である。いくつかの態様において、X_8は、疎水性アミノ酸残基であり、適切には、LeuもしくはVal、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_8は、小型アミノ酸残基であり、適切には、AlaもしくはSer、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_9は、疎水性アミノ酸残基であり、適切には、ValもしくはLeu、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_9は、小型アミノ酸残基であり、適切には、AlaもしくはGly、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_{10}は、Glnまたはその修飾型である。他の態様において、X_{10}は、疎水性アミノ酸残基であり、適切には、Ile、ValもしくはPhe、またはその修飾型から選択される。

【００９１】

いくつかの態様において、X_{11}は、小型アミノ酸残基であり、適切には、Pro、AlaもしくはThr、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_{11}は、Pheまたはその修飾型である。さらに他の態様において、X_{11}は、Glnまたはその修飾型である。いくつかの態様において、X_{12}は、小型アミノ酸残基であり、適切には、Ala、SerもしくはThr、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_{13}は、疎水性アミノ酸残基であり、適切には、Val、IleもしくはMet、またはその修飾型から選択される。他の態様において、X_{13}は、小型アミノ酸残基、例えば、Alaまたはその修飾型、である。いくつかの態様において、X_{14}は、ProもしくはAla、またはその修飾型から選択される。いくつかの態様において、X_{15}は、中性/極性アミノ酸残基、例えば、Glnまたはその修飾型、である。他の態様において、X_{15}は、酸性アミノ酸残基、例えば、Aspまたはその修飾型、である。さらに他の態様において、X_{15}は、疎水性アミノ酸残基、例えば、Leuまたはその修飾型、である。いくつかの態様において、X_{16}は、Alaまたはその修飾型である。

【００９２】

特定の態様において、Z_1は、以下の式により表される：

$J_8J_9J_{10}$ (XI) [配列番号：11]

式中：

J_8は、小型アミノ酸残基、例えば、Thrまたはその修飾型、である；

J_9は、存在しない、または、J_8も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基、例えば、Lysもしくはその修飾型、である；および

J_{10}は、存在しない、または、J_9も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基、典型的には、塩基性アミノ酸残基、例えば、Lysもしくはその修飾型、である。

【００９３】

SCEにおけるアミノ酸は、遺伝子もしくはその類似体またはそのD-異性体によりコードされるものでありうる。本発明の範囲内の化合物は、多数の方法において開示された式を改変することにより得られうるが、このように得られたSCEの活性を保存している。例えば、これらの化合物のアミノ酸は、普通には、天然のL光学異性体型であるが、1個または複数、通常には2個またはそれ未満、および好ましくは1個のアミノ酸が光学異性体D型と置換されうる、またはD,L-ラセミ混合物がSCEを含む分子に提供されうる。一つの態様において、SCEは、残基のすべてがD配置である形をとり、それに伴って、自己合体する性質を保持しながら、プロテアーゼ活性に対する耐性を与える。その結果生じた分子は、それ自身、天然のL-アミノ酸含有型の鏡像異性体である。

【００９４】

SCEを記載するために用いられる名称は、アミノ基が各アミノ酸残基の左側に、カルボキシ基が右側に、提示される通常の慣例に従う。本発明の選択された特定の態様を表す式において、アミノ-(N-)およびカルボキシ-(C-)末端基は、明確に示されていないが、他に特定されない限り、それらが生理的pH値において呈するであろう形をとるものと理解されているものと思われる。アミノ酸構造式において、各残基は、一般的に、以下の表に従って、アミノ酸の慣用名に対応する、一文字表示により表され、その表において、各残基についての三文字表示もまた示されている：

【００９５】

（表Ｂ）アミノ酸についての省略形

アミノ酸	一文字記号	三文字記号	アミノ酸	一文字記号	三文字記号
アラニン	A	Ala	ロイシン	L	Leu
アルギニン	R	Arg	リシン	K	Lys
アスパラギン	N	Asn	メチオニン	M	Met
アスパラギン酸	D	Asp	フェニルアラニン	F	Phe
システイン	C	Cys	プロリン	P	Pro
グルタミン	Q	Gln	セリン	S	Ser
グルタミン酸	E	Glu	スレオニン	T	Thr
グリシン	G	His	トリプトファン	W	Trp
ヒスチジン	H	Ile	チロシン	Y	Tyr
イソロイシン	I		バリン	V	Val

【００９６】

本発明のSCEは、ペプチド、または指定クラスのアミノ酸残基によって部分的に定義されるペプチド様化合物である。アミノ酸残基は、一般的に、以下のように、主要なサブクラスへと下位分類化されうる：

【００９７】

酸性：残基は、生理的pHにおいてHの喪失による負電荷をもち、ペプチドが生理的pHにおいて水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドの立体配座において表面位置を求めるように水溶液に引きつけられる。酸性側鎖を有するアミノ酸は、グルタミン酸およびアスパラギン酸を含む。

【００９８】

塩基性：残基は、生理的pHまたはその1もしくは2のpH単位内(例えば、ヒスチジン)において、Hとの結合による正電荷をもち、ペプチドが生理的pHにおいて水性媒体中にある場

合、残基は、それが含まれているペプチドの立体配座において表面位置を求めるように水溶液に引きつけられる。塩基性側鎖を有するアミノ酸は、アルギニン、リシンおよびヒスチジンを含む。

【００９９】

荷電：残基は、生理的pHにおいて荷電しており、それゆえに、酸性または塩基性側鎖を有するアミノ酸を含む(すなわち、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リシンおよびヒスチジン)。

【０１００】

疎水性：残基は、生理的pHにおいて荷電しておらず、ペプチドが水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドの立体配座において内部位置を求めるように水溶液に反発される。疎水性側鎖を有するアミノ酸は、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニンおよびトリプトファンを含む。

【０１０１】

中性/極性：残基は、生理的pHにおいて荷電していないが、ペプチドが水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドの立体配座において内部位置を求めるように水溶液に十分には反発されない。中性/極性の側鎖を有するアミノ酸は、アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジン、セリンおよびスレオニンを含む。

【０１０２】

この記載はまた、側鎖が、たとえ極性基を欠いているとしても、疎水性を与えるのに十分には大きくないという故に「小型」として特定のアミノ酸を特徴付ける。プロリンを除いては、「小型」アミノ酸は、少なくとも1つの極性基が側鎖上にある場合には4個の炭素またはそれ未満、およびそうでない場合には3個の炭素またはそれ未満をもつものである。小さい側鎖を有するアミノ酸は、グリシン、セリン、アラニンおよびスレオニンを含む。遺伝子コード化二級アミノ酸プロリンは、ペプチド鎖の二次配座へのそれの既知の影響のために特別な場合である。プロリンの構造は、それの側鎖が、α-炭素に加えて、α-アミノ基の窒素に結合されているという点においてすべての他の天然に存在するアミノ酸と異なる。しかしながら、いくつかのアミノ酸類似性マトリックス(例として、例えば、Dayhoffら、(1978) A model of evolutionary change in proteins. Matrices for determining distance relationships、M. O. Dayhoff(編)、Atlas of protein sequence and structure、5巻、pp. 345-358、National Biomedical Research Foundation、ワシントンDC；およびGonnetら、1992、Science 256(5062):1443-1445により開示されているような、PAM120マトリックスおよびPAM250マトリックス)は、グリシン、セリン、アラニンおよびスレオニンと同じ群にプロリンを含む。従って、本発明の目的のために、プロリンは、「小型」アミノ酸として分類される。

【０１０３】

極性または非極性としての分類のために必要とされる引力または斥力の度合いは、任意であり、それゆえに、本発明により特に企図されるアミノ酸は、どちらか一方として分類された。特に名付けられていないたいていのアミノ酸は、既知の挙動に基づいて分類されうる。

【０１０４】

アミノ酸残基は、残基の側鎖置換基に関して、環状または非環状の、および芳香族または非芳香族の、自明の分類として、ならびに小型または大型として、さらに下位分類化されうる。残基は、もし付加の極性置換基が存在しているとすれば、カルボキシル基の炭素を含めて合計4個の炭素原子またはそれ未満；もしそうでなければ、3個またはそれ未満、をそれが含む場合には、小型とみなされる。小型残基は、もちろん、常に非芳香族である。それらの構造的性質に依存して、アミノ酸残基は、2つまたはそれ以上のクラスに分けられうる。

【０１０５】

天然に存在するタンパク質アミノ酸について、前記のスキームに従う下位分類化は、以下の表に提示されている。

【０１０６】
（表Ｃ）アミノ酸下位分類化

サブクラス	アミノ酸
酸性	アスパラギン酸、グルタミン酸
塩基性	非環状：アルギニン、リシン；環状：ヒスチジン
荷電	アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン
小型	グリシン、セリン、アラニン、スレオニン、プロリン
極性/中性	アスパラギン、ヒスチジン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン
極性/大型	アスパラギン、グルタミン
疎水性	チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン
芳香族	トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン
鎖配向に影響を及ぼす残基	グリシンおよびプロリン

【０１０７】
SLEに含まれうる「修飾された」アミノ酸は、例えば、メチル基の付加または他の置換基への共有結合を通じての誘導体化または酸化または還元または他の共有結合的修飾により、遺伝子の翻訳後に加工されている遺伝子コード化アミノ酸である。その結果生じた修飾されたアミノ酸が分けられる分類は、修飾型の特性により決定されるものである。例えば、リシンがε-アミノ基をアシル化することにより修飾されたならば、その修飾型は、塩基性としてではなく、極性/大型として分類されるであろう。
【０１０８】
遺伝暗号によりコード化されていない、若干数の一般に遭遇するアミノ酸は、例えば、3-アミノプロピオニック、2,3-ジアミノプロピオニック(2,3-diaP)、4-アミノブチリックなどのようなβ-アラニン(β-Ala)または他のオメガ-アミノ酸、α-アミノイソ酪酸(Aib)、サルコシン(Sar)、オルニチン(Orn)、シトルリン(Cit)、t-ブチルアラニン(t-BuA)、t-ブチルグリシン(t-BuG)、N-メチルイソロイシン(N-MeIle)、フェニルグリシン(Phg)、およびシクロヘキシルアラニン(Cha)、ノルロイシン(Nle)、2-ナフチルアラニン(2-Nal)；1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸(Tic)；β-2-チエニルアラニン(Thi)；メチオニンスルホキシド(MSO)；ならびにホモアルギニン(Har)を含む。これらもまた、便利なように、特定のカテゴリーへと分類される。
【０１０９】
上記の定義に基づいて、Sar、β-AlaおよびAibは小型である；t-BuA、t-BuG、N-MeIle、Nle、Mvl、Cha、Phg、Nal、ThiおよびTicは疎水性である；2,3-diaP、OrnおよびHarは塩基性である；Cit、アセチルLysおよびMSOは中性/極性/大型である。様々なオメガ-アミノ酸は、小型として(β-Alaおよび3-アミノプロピオニック)、または大型および疎水性として(他すべて)、大きさによって分類される。
【０１１０】
遺伝子においてコード化されたものについての他のアミノ酸置換もまた、本発明の範囲内のSCEに含まれうり、それらの構造によってこの一般的スキーム内に分類されうる。
【０１１１】
本発明のSCEにおいて、1つまたは複数のアミド結合(-CO-NH-)は、選択的に、$-CH_2NH-$、$-CH_2S-$、$-CH_2CH_2$、-CH=CH-(シスおよびトランス)、$-COCH_2-$、$-CH(OH)CH_2-$、および$-CH_2SO-$のような同配体である別の結合と置換されうる。この置換は、当技術分野において公知の方法によりなされうる。以下の参照文献は、これらの代替結合部分を含むペプチド類似

体の調製を記載する：Spatola, A. F.、Vega Data(1983年3月)、1巻、第3刷、「Peptide Backbone Modifications」(一般評論)；Spatola, A. F.、「Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins」、B. Weinstein編、Marcel Dekker、ニューヨーク、p. 267 (1983)(一般評論)；Morley, J. S.、Trends Pharm Sci (1980) pp. 463-468(一般評論)；Hudson, D.ら、Int J Pept Prot Res (1979) 14:177-185(-CH_2NH-、-CH_2CH$_2$-)；Sptaola, A. F.ら、Life Sci(1986) 38:1243-1249 (-CH_2-S)；Hann, M. M. 、J Chem Soc Perkin Trans I(1982) 307-314 (-CH-CH-、シスおよびトランス)；Almiquist, R. G.ら、J Med Chem (1980) 23:1392-1398 (-$COCH_2$-)；Jennings-White, C.ら、Tetrahedron Lett(1982) 23:2533 (-$COCH_2$-)；Szelke, M.ら、欧州特許出願第45665号 (1982) CA:97:39405 (1982) (-CH(OH)CH_2-)；Holladay, M. W.ら、Tetrahedron Lett (1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH_2-)；およびHruby, V. J.、Life Sci (1982) 31:189-199 (-CH_2-S-)。

【０１１２】

SCE内に、および特にカルボキシまたはアミノ末端に含まれるアミノ酸残基もまた、アミド化、アセチル化、または、例えば、化合物の溶解性をそれらの活性に影響を及ぼすことなく変化させることができる他の化学基との置換により修飾されうる。

【０１１３】

典型的なSCEアミノ酸配列は、細胞の内部のような生理的条件下においてより高次の凝集体へと凝集する能力をもつ、典型的には、しかし排他的ではないが、天然に存在するシグナル配列またはその変異体から選択可能である、任意の天然に存在する膜転位置配列(MTS)の配列を含む。天然に存在するMTSは、限定されるものではないが、細菌、放線菌、ウイルス、原生動物、酵母、植物、ならびに昆虫、鳥、爬虫類、魚および哺乳動物のような動物を含む任意の適した生物体から得られうる。適切には、天然に存在するMTSは、細菌から得られる。有利的には、天然に存在するMTSアミノ酸配列は、配列番号：12～90から選択される。特定の態様において、天然に存在するMTSアミノ酸配列は、配列番号：67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、83、84、85および87から選択される。

【０１１４】

他の態様において、SCEアミノ酸配列は、凝集行動の原因であるMTSのその部分のみの配列を含む。このように、本発明は、本発明のMTS配列の生物学的活性断片を企図する。当業者は、そのような断片を作製するための多数の技術があることを認識しているものと思われる。例えば、参照MTSの断片は、例えば、酵素的消化により得られうる、アミノおよび/またはカルボキシル末端欠失、加えて内部欠失により作製されうる。その後、断片は、対象となるポリペプチドに結合され、そのように作製されたキメラポリペプチドは、その後、より高次の凝集体を形成する能力について試験される。そのような試験は、限定されるものではないが、超遠心分離、電気泳動(例えば、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動)およびサイズ分離(例えば、ゲル濾過、限外濾過)を含む、分子量の定性的または定量的測定を提供するアッセイ法を用いうる。例えば、より高次の凝集は、下により詳細に記載されているように、サイズ排除クロマトグラフィーにより試験される。もう一つの態様において、MTS断片の生物学的活性は、MTS断片および対象となるポリペプチドを含むキメラポリペプチドが翻訳されうるポリヌクレオチドを細胞へ導入し、その断片が生物学的活性断片であることを示す、より高次の凝集体の存在を検出することにより試験される。

【０１１５】

または、SCEまたはそれの断片は、配列番号：12～90における対応する配列と異なりうる。このように、本発明はまた、天然に存在するもしくは親のSCEアミノ酸配列またはそれらの生物学的活性断片の変異体を企図し、変異体は、1個もしくは複数のアミノ酸の付加、欠失または置換により親配列から識別される。一般的に、変異体は、例えば、配列番号：12～90に示されるような親SCE配列との少なくとも50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %類似性を示す。適切には、変異体は、例えば、配列番号：12～90のいずれか一つに示されるよ

うな親SCE配列との少なくとも50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %配列同一性をもつものである。なおさらに、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個もしくはそれ以上のアミノ酸の付加、欠失または置換により天然または親の配列とは異なるが、自己合体性質および対象となる分子へより高次の凝集を与える能力を保持する配列が企図される。本発明のポリペプチドは、下に記載されているように、本発明のポリヌクレオチド配列またはそれらの非コード鎖に、ストリンジェントな、好ましくは高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含む。一つの態様において、それは、少なくとも1個だが、15個、10個、8個、6個、5個、4個、3個、2個または1個未満のアミノ酸残基だけ異なる。もう一つの態様において、それは、少なくとも1個の残基だが、残基の20 %、15 %、10 %または5 %未満だけ、配列番号：12～90における対応する配列と異なる。(この比較がアラインメントを必要とする場合には、配列は、最高の類似性のために整列されるべきである。欠失もしくは挿入から「ループを作る」配列、またはミスマッチは、違いとみなされる。)違いは、適切には、非本質的残基における違いもしくは変化、または保存的置換である。

【０１１６】

「非本質的」アミノ酸残基は、SCEの野生型配列から、それの自己合体活性を消失させるまたは実質的に変化させることなく、変化することができる残基である。適切には、変化は、自己合体活性を実質的に変化させない、例えば、活性は、野生型の少なくとも20 %、40 %、60 %、70 %または80 %である。「本質的」アミノ酸残基は、SCEの野生型配列から変化した場合、結果として、野生型活性の20 %未満が存在しているように自己合体活性の消失を生じる残基である。図1および図2に示されるSCEの配列比較の検討から、SCEのアミノ酸残基のどれも、それらの図において提示されているSCEに渡って完全には保存されていないことは明らかである。従って、SCEのすべてのアミノ酸残基は、変化、特に保存的アミノ酸置換を受け入れられるものと考えられる。

【０１１７】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似した側鎖を有するアミノ酸残基と置換されているものである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されており、特定のサブクラスは、上で表Cにおいて記載されている。好ましい変異体SCEは、保存されたアミノ酸置換をもつものである。保存的置換の例は、以下のものを含む：酸性アミノ酸としてアスパラギン酸(aspartic)-グルタミン酸(glutamic)；塩基性アミノ酸としてリシン/アルギニン/ヒスチジン；小型アミノ酸としてセリン/グリシン/アラニン/スレオニン；疎水性アミノ酸としてロイシン/イソロイシン、メチオニン/バリン、アラニン/バリン。保存的アミノ酸置換はまた、側鎖に基づいた群分けを含む。例えば、脂肪族の側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンである；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびスレオニンである；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンである；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンである；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リシン、アルギニンおよびヒスチジンである；ならびにイオウ含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンと、アスパラギン酸のグルタミン酸と、スレオニンのセリンとの置換、またはアミノ酸の構造的同類のアミノ酸との類似した置換が、その結果生じた変異体ポリペプチドの性質に重要な影響を及ぼさないと予測することは理にかなっている。アミノ酸変化が結果として機能的SCEを生じるかどうかは、変異体SCEの特定の合体または凝集活性をアッセイすることにより容易に決定されうる。保存的置換は、下記の表Dにおいて典型的置換の項の下に示されている。より好ましい置換は、好ましい置換の項の下に示されている。本発明の範囲内にあるアミノ酸置換は、一般的に、(a)置換の領域におけるペプチドバックボーンの構造、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさを維持することへのそれ

らの効果に有意には異ならない置換を選択することにより達成される。置換が導入された後、変異体は、生物学的活性についてスクリーニングされる。

【０１１８】

（表Ｄ）典型的および好ましいアミノ酸置換

本来の残基	典型的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

【０１１９】

または、保存的置換を生じるための類似したアミノ酸は、側鎖の同一性に基づいた3つのカテゴリーへ分類されうる。Zubay, G.、Biochemistry、第三版、Wm.C. Brown Publishers (1993)に記載されるように、第一群は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リシン、ヒスチジンを含み、すべて荷電側鎖を有する；第二群は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、グルタミン、アスパラギンを含む；および第三群は、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンを含む。

【０１２０】

このように、SCEにおける推定の非本質的アミノ酸残基は、典型的には、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基と置換される。または、もう一つの態様において、突然変異は、飽和突然変異誘発によるような、SCEコード配列のすべてまたは一部にそってランダムに導入されうり、結果として生じる突然変異体は、活性を保持する突然変異体を同定するために自己合体活性についてスクリーニングされうる。そのようなコード配列の突然

変異誘発後、コードされたペプチドは、組換え的に発現されうり、ペプチドの活性が測定されうる。

【０１２１】

他の態様において、SCEは、配列番号：12～90の対応する配列に少なくとも約50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %またはそれ以上の類似性をもつアミノ酸配列を含み、かつ自己合体活性をもつ。

【０１２２】

本発明のSCEは、例えば、図1および図2に描かれているように、有意な数のお互いに共通の構造的特性を含む。本発明のタンパク質および核酸分子に関連している場合の用語「ファミリー」は、共通の構造的ドメインまたはモチーフを有し、かつ本明細書に定義されるような十分なアミノ酸またはヌクレオチド配列同一性をもつ、2個もしくはそれ以上のタンパク質または核酸分子を意味する。そのようなファミリーメンバーは、天然に存在するまたは天然に存在しなくありうり、同じまたは異なる種由来のいずれかでありうる。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能的特性をもちうる。

【０１２３】

少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、付加または欠失により親SCE配列とは異なる変異SCE配列は、当技術分野において知られているような溶液または固相ペプチド合成技術を用いて、新規に合成されうる。または、天然に存在するSCE配列の変異体を含むそのような変異体は、それらのコード配列の突然変異誘発により便利に得られうる。変異体の発現のために構築されるヌクレオチド配列における突然変異は、もちろん、コード配列の読み枠相を保存しなければならず、適切には、mRNAの翻訳に不利に影響を及ぼすループまたはヘアーピンのような二次mRNA構造を生じるようにハイブリダイズしうる相補的領域を創造しない。突然変異部位はあらかじめ決定されうるが、突然変異それ自体の性質があらかじめ決定される必要はない。例えば、所定の部位における突然変異体の最適な特性について選択するために、ランダム突然変異誘発が標的コドンにおいて行われ、発現された突然変異体は、合体の活性についてスクリーニングされうる。

【０１２４】

一つの態様において、突然変異は、天然の配列の断片へのライゲーションを可能にする制限酵素切断部位に隣接された所望のアミノ酸残基をコードするオリゴヌクレオチドを合成することにより特定の座に導入されうる。ライゲーション後、その結果生じた再構築された配列は、所望のアミノ酸挿入、置換または欠失をもつ変異体をコードする。または、オリゴヌクレオチド指向性部位特異的突然変異誘発方手順が、要求される置換、欠失または挿入に従って変化した特定のコドンを有する改変ヌクレオチド配列を与えるために使用されうる。上に示された変化を生じる典型的方法は、Walderら、(1986、Gene 42:133)；Bauerら、(1985、Gene 37:73)；Craik(1985、BioTechniques Jan. 12-19)；Smithら、(Genetic Engineering: Principles and Methods、Plenum Press、1981)；ならびに米国特許第4,518,584号および第4,737,462号により開示される。

【０１２５】

本発明のもう一つの変形において、本発明のSCEアミノ酸配列は、配列番号：12～90に示されるようなSCEアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；またはこれらの配列に相補的な非コード鎖に、本明細書に記載されるストリンジェント性条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる。好ましい態様において、SCEアミノ酸配列は、本明細書に記載されるストリンジェント性条件下において配列番号：91～132に示されるようなヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる。本明細書に用いられる場合、「低いストリンジェント性、中位のストリンジェント性、高いストリンジェント性、または非常に高いストリンジェント性条件下においてハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を記載する。ハイブリダイゼーション反応を行うための手引きは、Ausubelら、(1998、前記)、セクション6.3.1-6.3.6に見出されうる。水性および非水性の方法は、その参照文献に

記載され、いずれでも用いられうる。

【０１２６】

一つの態様において、本発明は、少なくとも低いストリンジェント性条件下において本発明のSCEアミノ酸配列をコードする参照ポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを企図する。低いストリンジェント性条件への本明細書での言及は、42℃でのハイブリダイゼーションについて、少なくとも約1 % v/vから少なくとも約15 % v/vのホルムアミド、および少なくとも約1 Mから少なくとも約2 Mの塩、ならびに42℃での洗浄について、少なくとも約1 M～少なくとも約2 M塩を含みかつ包含する。低いストリンジェント性条件はまた、65℃でのハイブリダイゼーションについて、1 % ウシ血清アルブミン(BSA)、1 mM EDTA、0.5 M $NaHPO_4$ (pH 7.2)、7 % SDS、および室温での洗浄について、(i)2xSSC、0.1 % SDS；または(ii)0.5 % BSA、1 mM EDTA、40 mM $NaHPO_4$(pH 7.2)、5 % SDSを含みうる。低いストリンジェント性条件の一つの態様は、約45℃での6X 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)におけるハイブリダイゼーション、続いて少なくとも50℃(洗浄の温度は、低いストリンジェント性条件について、55℃まで増加しうる)での0.2X SSC、0.1 % SDSにおける2回の洗浄を含む。

【０１２７】

もう一つの態様において、本発明は、少なくとも中位のストリンジェント性条件下において参照SCEコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを企図する。中位のストリンジェント性条件は、42℃でのハイブリダイゼーションについて、少なくとも約16 % v/vから少なくとも約30 % v/vのホルムアミド、および少なくとも約0.5 Mから少なくとも約0.9 Mの塩、ならびに55℃での洗浄について、少なくとも約0.1 M～少なくとも約0.2 M塩を含みかつ包含する。中位のストリンジェント性条件はまた、65℃でのハイブリダイゼーションについて、1 % ウシ血清アルブミン(BSA)、1 mM EDTA、0.5 M $NaHPO_4$ (pH 7.2)、7 % SDS、および60～65℃での洗浄について、(i)2xSSC、0.1 % SDS；または(ii)0.5 % BSA、1 mM EDTA、40 mM $NaHPO_4$(pH 7.2)、5 % SDSを含みうる。中位のストリンジェント性条件の一つの態様は、約45℃での6X SSCにおいてハイブリダイズすること、続いて60℃での0.2X SSC、0.1 % SDSにおける1回または複数回の洗浄を含む。

【０１２８】

もう一つの態様において、本発明は、高いストリンジェント性条件下において参照SCEコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを企図する。高いストリンジェント性条件は、42℃でのハイブリダイゼーションについて、少なくとも約31 % v/vから少なくとも約50 % v/vのホルムアミド、および約0.01 Mから約0.15 Mの塩、ならびに55℃での洗浄について、約0.01 M～約0.02 M塩を含みかつ包含する。高いストリンジェント性条件はまた、65℃でのハイブリダイゼーションについて、1 % BSA、1 mM EDTA、0.5 M $NaHPO_4$ (pH 7.2)、7 % SDS、および65℃を超過する温度での洗浄について、(i)0.2xSSC、0.1 % SDS；または(ii)0.5 % BSA、1 mM EDTA、40 mM $NaHPO_4$(pH 7.2)、1 % SDSを含みうる。高いストリンジェント性条件の一つの態様は、約45℃での6X SSCにおいてハイブリダイズすること、続いて65℃での0.2X SSC、0.1 % SDSにおける1回または複数回の洗浄を含む。

【０１２９】

特定の態様において、本発明の単離された核酸分子は、非常に高いストリンジェント性条件下においてハイブリダイズする。非常に高いストリンジェント性条件の一つの態様は、65℃での0.5 M リン酸ナトリウム、7 % SDSにおいてハイブリダイズすること、続いて65℃での0.2X SSC、1 % SDSにおける1回または複数回の洗浄を含む。

【０１３０】

他のストリンジェント性条件は、当技術分野においてよく知られており、熟練した聞き手は、様々な因子がハイブリダイゼーションの特異性を最適化するために操作されうることを認識しているものと思われる。最終の洗浄のストリンジェント性の最適化は、高程度のハイブリダイゼーションを保証するために役立ちうる。詳細な例として、Ausubelら、前記、ページ2.10.1～2.10.16、およびSambrookら、(1989、前記)、セクション1.101～1.

104を参照されたい。

【０１３１】

ストリンジェントな洗浄は、典型的には、約42℃から68℃の温度で行われるが、他の温度がストリンジェントな条件に適しうることを当業者は理解しているものと思われる。最大のハイブリダイゼーション率は、典型的には、DNA-DNAハイブリッドの形成についてT_mより約20℃～25℃低いところで起こる。T_mが、融解温度、または2つの相補的ポリヌクレオチド配列が解離する温度であることは、当技術分野においてよく知られている。T_mを推定するための方法は、当技術分野においてよく知られている(Ausubelら、前記、ページ2.10.8を参照)。

【０１３２】

一般的に、完全にマッチしたDNAの二本鎖は、以下の式により近似値として予測されうる：

$T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10}M) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\%ホルムアミド) - (600/長さ)$

Mは、Na^+の濃度であり、好ましくは0.01モル～0.4モルの範囲である；%G＋Cは、塩基の総数のパーセンテージとしてのグアノシンおよびシトシン塩基の合計であり、30 %G＋Cと75 %G＋Cの間の範囲内である；%ホルムアミドは、体積パーセントホルムアミド濃度である；長さは、DNA二本鎖における塩基対の数である。

【０１３３】

二本鎖DNAのT_mは、ランダムにミスマッチした塩基対の数における1 %の増加毎に約1℃だけ減少する。洗浄は、一般的に、高いストリンジェント性についてはT_m－15℃において、中位のストリンジェント性についてはT_m－30℃において行われる。

【０１３４】

好ましいハイブリダイゼーション手順において、固定されたDNAを含む膜は、標識プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(50 % 脱イオン化ホルムアミド、5x SSC、5xデンハルト液(0.1 % フィコール、0.1 % ポリビニルピロリドンおよび0.1 % ウシ血清アルブミン)、0.1 % SDSおよび200 mg/mL 変性サケ精子DNA)において42℃で一晩、ハイブリダイズされる。膜は、その後、2回の逐次的中位のストリンジェント性洗浄(すなわち、2x SSC、0.1 % SDS、45℃で15分間、続いて2x SSC、0.1 % SDS、50℃で15分間)、続いて2回の逐次的より高いストリンジェント性洗浄(すなわち、0.2x SSC、0.1 % SDS、55℃で15分間、続いて0.2x SSCおよび0.1 % SDS溶液、65～68℃で12分間)にかけられる。

【０１３５】

また、少なくとも1つのSCEアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供され、ポリヌクレオチドのSCEコード化部分は、例えば、配列番号：91～132に示されるような参照SCEコード化ポリヌクレオチドと、それの完全長に対して少なくとも約99 %、少なくとも約98 %、少なくとも約95 %、少なくとも約90 %、少なくとも約85 %、少なくとも約80 %、少なくとも約75 %、少なくとも約70 %同一である。天然または人工の配列は、当業者に公知の任意の適した方法によりSCE性質についてスクリーニングされうる。例えば、天然または人工の配列を、その配列を対象となるポリペプチドに結合し、その後、より高次の凝集体を形成する能力について定性的または定量的分子量測定を提供するアッセイ法においてそのように作製されたキメラポリペプチドを試験することにより、より高次の凝集体を形成する能力について試験しうる。適切には、そのようなキメラ分子のより高次の凝集体は、下により詳細に記載されているようにサイズ排除クロマトグラフィーにより試験されうる。

【０１３６】

2.2 対象となる分子

対象となる分子は、有機および無機の化合物を含む任意の化合物から選択されうる。特定の態様において、対象となる分子は、限定されるものではないが、薬物(例えば、抗生物質、ホルモン、および癌、糖尿病、炎症、心血管疾患、性的不全、神経精神学的疾患などのような状態を処置するための薬物)、代謝産物ならびに殺虫剤および除草剤のような農薬の化合物を含む有機化合物から選択される。典型的には、対象となる分子は、有機ポ

リマー、望ましくはポリヌクレオチドまたはポリペプチドのような生物学的起源のポリマーである。この型の一つの態様において、対象となる分子は、酵素的、治療的または抗原性活性をもつポリペプチドである。このように、この態様において、キメラ分子は、「対象となるポリペプチド」に融合、連結または異なる方法で会合しているSCEを含むキメラポリペプチドである。「キメラポリペプチド」とは、単一のタンパク質としていっしょには天然に存在していない少なくとも2つの別個のポリペプチドセグメント(ドメイン)を含むポリペプチドを意味する。好ましい態様において、各ドメインは、ポリペプチドに別個かつ有用な性質を与えている。キメラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、少なくとも2つの別個のセグメントをコードするポリヌクレオチドを合成、増幅および/または単離し、かつそれらをいっしょに連結する通常の組換えDNA技術を用いて構築されうる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning － A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press (1989)；およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons, Inc. (1998)を参照されたい。

【０１３７】

対象となるポリペプチドは、工業用または実用的対象となる、かつ典型的には、しかし排他的ではないが、普遍的な遺伝暗号のコドンによりコード化可能であるアミノ酸配列を含む、任意のポリペプチドから選択されうる。対象となる典型的ポリペプチドは以下のものを含む：化学的(例えば、環状二級アルコールの選択的加水分解または活性化/不活性化エステルのエステル交換のための酵素)、食品加工(例えば、アミラーゼ)、または他の工業用適用(洗剤酵素)に有用性をもちうる酵素；DNAおよびRNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ペプチダーゼ、ならびに他のDNAおよびタンパク質修飾酵素を含む、バイオテクノロジー適用に有用性をもつ酵素；他のポリペプチド、ステロイド、糖質もしくは他の生物学的分子に対する細胞内または細胞表面受容体として作用するポリペプチドのような、対象となる組成物に特異的に結合することができるポリペプチド；抗原結合分子の少なくとも1つの抗原結合ドメインを含むポリペプチド；リガンド結合タンパク質のリガンド結合ドメイン(例えば、細胞表面受容体のリガンド結合ドメイン)を含むポリペプチド；金属結合タンパク質(例えば、フェリチン(アポフェリチン)、メタロチオネインおよび他の金属結合タンパク質)、金属の回収または溶液の浄化のためにそれらを含む溶液から金属を単離/精製するのに有用である；集光性タンパク質(例えば、色素を結合する光合成に用いられるタンパク質)；スペクトル的に光を変化させうるタンパク質(例えば、一つの波長における光を吸収し、かつ別の波長における光を放射する光スペクトル改変ポリペプチド)；転写因子および翻訳因子のような制御タンパク質；ならびに、ケモカイン、サイトカイン、インターロイキン、成長因子、インターフェロン、代謝性ポリペプチド、免疫賦活剤および免疫抑制剤、血管形成性または抗血管形成性ペプチドおよび抗原のような治療的価値のポリペプチド。

【０１３８】

いくつかの態様において、対象となるポリペプチドは、サイトカイン、成長因子、およびホルモンから選択され、限定されるものではないが、以下のものを含む：インターフェロン-α、インターフェロン-β、インターフェロン-γ、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12、インターロイキン-13、インターロイキン-14、インターロイキン-15、インターロイキン-16、エリスロポエチン、コロニー刺激因子-1、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、白血病抑制因子、腫瘍壊死因子、リンホトキシン、血小板由来成長因子、線維芽細胞成長因子、血管内皮細胞成長因子、上皮細胞成長因子、トランスフォーミング成長因子-β、トランスフォーミング成長因子-α、トロンボポエチン、幹細胞因子、オンコスタチンM、アンフィレギュリン、ミュラー管阻害物質、B細胞成長因子、マクロファージ遊走阻止因子、単球化学誘引物質タンパク質(例えば、MCP-1)、エンドスタチンおよびアンジオスタチン、加えてそれらの作用物質および拮抗物質。

【０１３９】
いくつかの態様において、対象となるポリペプチドは、限定されるものではないが、ウイルスの、細菌の、原生動物の、微生物の、腫瘍の抗原、および自己抗原を含む任意の外来または自己の抗原から選択されうる抗原である。適するウイルスの抗原は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、パピローマウイルス、ポリオウイルスおよびインフルエンザウイルス、ラウス肉腫ウイルスもしくは日本脳炎ウイルスのような脳炎を引き起こすウイルス、限定されるものではないが、単純ヘルペスウイルスおよびエプスタイン-バールウイルス、サイトメガロウイルスを含むヘルペスウイルス、パルボウイルス、または限定されるものではないが、肝炎系統A型、B型およびC型を含む肝炎ウイルス由来である。所望の細菌の抗原は、限定されるものではないが、ナイセリア(Neisseria)種、髄膜炎菌の(Meningococcal)種、ヘモフィルス(Haemophilus)種、サルモネラ(Salmonella)種、連鎖球菌の(Streptococcal)種、レジオネラ(Legionella)種およびマイコバクテリウム(Mycobacterium)種由来のものを含む。適する原生動物の抗原は、限定されるものではないが、プラスモディウム(Plasmodium)種、住血吸虫(Schistosoma)種、リーシュマニア(Leishmania)種、トリパノソーマ(Trypanosoma)種、トキソプラズマ(Toxoplasma)種およびジアルジア(Giardia)種由来のものを含む。いずれの癌または腫瘍抗原も本発明により企図されている。例えば、そのような抗原は、黒色腫、肺癌、乳癌、子宮頚癌、前立腺癌、大腸癌、膵癌、胃癌、膀胱癌、腎臓癌、移植後リンパ球増殖性疾患(PTLD)、ホジキンリンパ腫など由来でありうる。

【０１４０】
いくつかの態様において、対象となるポリペプチドは、限定されるものではないが、化合物の吸収、結合、取り込み、排出、分配、輸送、処理、転化または分解のような化合物の生体内変化に関与するポリペプチドを含む代謝性ポリペプチドである。例えば、代謝性ポリペプチドは、限定されるものではないが、薬物代謝ポリペプチド、薬物結合ポリペプチド、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸シンセターゼ、グルタミンシンセターゼ、グリコーゲンシンセターゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、グルコキナーゼ、インスリン、ピルビン酸キナーゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、脂肪酸シンセターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フェリチン、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、P450酵素、またはアルコールデヒドロゲナーゼを含む。

【０１４１】
他の態様において、対象となる分子はペプチドであり、適切には、抗原性ペプチド(T細胞エピトープ、B細胞エピトープを含む)、サイトカイン活性をもつサイトカイン由来ペプチド、ケモカイン活性をもつケモカイン由来ペプチド、神経ペプチド、抗炎症性ペプチド、および凝集体型において受容体機能を遮断することができる受容体リガンドペプチドから選択される。

【０１４２】
さらに他の態様において、対象となる分子はホルモンであり、脊椎動物においてそれらが様々な生理的および代謝的活性を制御している様々な標的器官へ、血液を含む生物学的液体により運ばれる化学的メッセンジャーとしての役割を果たす、様々な内分泌腺により生成される微量物質を含む。適するホルモンは、成長ホルモン、性ホルモン、甲状腺ホルモン、下垂体ホルモンおよびメラニン細胞刺激ホルモンを含む。例えば、ホルモンは、エストロゲン(例えば、エストラジオール、エストロン、エストリオール、ジエチルスチベストロール、キネストロール、クロロトリアニセン、エチニルエストラジオール、メストラノール)、抗エストロゲン(例えば、クロミフェン、タモキシフェンのような)、プロゲスチン(例えば、メドロキシプロゲステロン、ノルエチンドロン、ヒドロキシプロゲステロン、ノルゲストレル)、抗プロゲスチン(例えば、ミフェプリストン)、アンドロゲン(例えば、テストステロン、テストステロンシピオネート、ジヒドロテストステロン、フルオキシメステロン、ダナゾール、テストラクトン)、抗アンドロゲン(例えば、酢酸シプロテロン、フルタミド)などから選択されうる。または、ホルモンは、甲状腺ホルモン(例えば

、トリヨードサイロニン、サイロキシン、プロピルチオウラシル、メチマゾールおよびヨージキソド)および胃腸ホルモン(例えば、ガストリン、グルカゴン、セクレチン、コレシストキニン、胃抑制ペプチド、血管作動性腸ペプチド、サブスタンスP、グルカゴン様免疫反応性ペプチド、ソマトスタチン、ボンベシン、ニューロテンシンなど)から選択されうる。ホルモンはまた、下垂体ホルモン(例えば、コルチコトロピン、スムトトロピン、オキシトシンおよびバソプレシン)および副腎皮質のホルモン(副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、アルドステロン、コルチゾール、コルチコステロン、デオキシコルチコステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン)から選択されうる。他のホルモンは、プレドニゾン、ベータメタゾン、ベタメタゾン、コルチゾン、デキサメタゾン、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、酢酸パラメタゾン、プレドニゾロン、トリアムシノロン　フルドロコルチゾンなどを含む。

【０１４３】

さらに他の態様において、対象となる分子は、対象となる分子と異なる活性を含む補助的分子に連結されるまたは異なる方法で会合される。いくつかの態様において、補助的分子の活性は、対象となる分子の望ましくない活性(または副作用)を改善するまたはさもなければ低下させる。例えば、補助的分子は、例えば米国特許第6,228,373号および米国特許第5,466,669号に開示されるような免疫賦活性分子、または例えば米国特許第5,679,640号に開示されるような免疫抑制性分子でありうり、凝集体型である場合の対象となる分子についての、その凝集体が投与された動物に対象となる分子に対する抗原特異的免疫応答を起こす能力を、それぞれ、増強させるまたは低下させる。

【０１４４】

3．本発明のキメラ分子を作製する方法

SCEおよび対象となる分子を含むキメラ分子は、当業者に公知の任意の適する技術により作製されうる。それゆえに、本発明は、SCEを対象となる分子と結合させるためのいずれの一つの特定の技術にも依存しない、かつ方向づけられない。

【０１４５】

SCEの対象となる分子への付着の様式は、SCEの自己合体性質が損なわれないように、およびまた、キメラ分子のより高次の凝集体への自己集合において、対象となる分子が凝集体の外部に露出され、その分子の、同族の結合または相互作用パートナー分子との相互作用を可能にするようにすべきである。リンカーまたはスペーサーは、SCEを対象となる分子から空間的に引き離すためにSCEと対象となる分子の間に含まれうる。リンカーまたはスペーサー分子は、長さが約1個から約100個の原子でありうる。いくつかの態様において、リンカーまたはスペーサー分子は、1個または複数のアミノ酸残基(例えば、約1個から約50個のアミノ酸残基、および望ましくは1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個のアミノ酸残基)を含む。そのようなリンカーまたはスペーサーは、対象となる分子の本来の折り畳みを促進し、それが、キメラ分子が全体として、他のキメラのSCE含有分子と凝集体を形成した場合でさえも所望の活性を保持することを保証しうる。SCEおよび対象となる分子は、どちらの順序でもありうる、すなわち、対象となる分子は、SCEのアミノ末端またはカルボキシル末端に結合されうる。

【０１４６】

適切には、対象となる分子は、SCEに共有結合的に付着している。共有結合的付着は、当業者に公知の任意の適する手段により達成されうる。例えば、キメラポリペプチドは、架橋試薬を用いてポリペプチドを連結することにより調製されうる。そのような架橋剤の例は、限定されるものではないが、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル))カルボジイミド　(CMC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド　(EDC)および1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドのようなカルボジイミドを含む。この型の典型的な架橋剤は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル))カルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)および1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドからなる群より選択される。他の適する架橋剤の例は、臭化シアン、グルタルアルデヒドおよび無水コハク酸

である。

【０１４７】

一般的に、ホモ二官能性アルデヒド、ホモ二官能性エポキシド、ホモ二官能性イミドエステル、ホモ二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ二官能性マレイミド、ホモ二官能性ハロゲン化アルキル、ホモ二官能性二硫化ピリジル、ホモ二官能性ハロゲン化アリル、ホモ二官能性ヒドラジド、ホモ二官能性ジアゾニウム誘導体およびホモ二官能性光反応性化合物を含む多数のホモ二官能性試薬のいずれかが用いられうる。また、ヘテロ二官能性化合物も含まれ、例えば、アミン反応性およびスルフヒドリル反応性基を有する化合物、アミン反応性および光反応性基を有する化合物、ならびにカルボニル反応性およびスルフヒドリル反応性基を有する化合物である。

【０１４８】

ホモ二官能性試薬は、少なくとも2つの同一の官能基を有する分子である。試薬の官能基は、一般的に、タンパク質上の官能基の1つ、典型的にはアミノ基、と反応する。そのようなホモ二官能性試薬の特定の例は、二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、スベリン酸ジスクシンイミジルおよび酒石酸ジスクシンイミジル；二官能性イミドエステル、ジメチルアジピミデート、ジメチルピメリミデートおよびジメチルスベリミデート；二官能性スルフヒドリル反応性架橋剤、1,4-ジ-[3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン、ビスマレイミドヘキサンおよびビス-N-マレイミド-1、8-オクタン；二官能性ハロゲン化アリル、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンおよび4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン；ビス-[b-(4-アジドサリシルアミド)エチル]ジスルフィド；二官能性アルデヒド、ホルムアルデヒド、マロンジアルデヒド、スクシンアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびアヂプアルデヒド；1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルのような二官能性エポキシド、二官能性ヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジドおよびコハク酸ジヒドラジド；二官能性ジアゾニウム、o-トルイジン、ジアゾ化およびビス-ジアゾ化ベンジジン；二官能性ハロゲン化アルキル、N,N'-エチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、N,N'-ヘキサメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、N,N'-ウンデカメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、加えて、それぞれ、α,α'-ジヨード-p-キシレンスルホン酸およびトリ(2-クロロエチル)アミンのようなハロゲン化ベンジルおよびハロマスタードを含む。ホモ二官能性架橋試薬を用いる方法は、当業者に知られている。例えば、架橋剤としてのグルタルアルデヒドの使用は、例えば、Poznanskyら(1984、Science、223:1304-1306)により記載されている。架橋剤としてのジイミデートの使用は、例えば、Wangら(1977、Biochemistry、16:2937-2941)により記載されている。

【０１４９】

本発明に従ってキメラポリペプチドを形成する目的のためにホモ二官能性架橋試薬を用いることは可能であるが、これらの試薬での規則正しい様式において異なるタンパク質を付着させることはより困難であることを当業者は理解しているものと思われる。このことについては、ホモ二官能性試薬を用いて第一タンパク質を第二タンパク質と連結させる試みにおいて、第一タンパク質のお互いへ、および第二タンパク質のお互いへの連結を防ぐことはできない。従って、ヘテロ二官能性架橋試薬は、反応の順序を制御し、かつ意のままにタンパク質を結合させることができるため、好ましい。ヘテロ二官能性試薬は、このように、2つのポリペプチドを連結するためのより高性能の方法を提供する。これらの試薬は、連結される分子の一方(以下、パートナーBと呼ばれる)が、他方(以下、パートナーAと呼ばれる)に見出されない反応性基を有することを必要とする、でなければ、2つの官能基の一方がブロックされている、または別な方法で反応性において大いに低下しているが、他方の基はパートナーAと反応することを必要とする。ヘテロ結合体を形成するための典型的な2段階工程において、パートナーAは、ヘテロ二官能性試薬と反応して、誘導体化パートナーA分子を形成する。架橋剤の未反応の官能基がブロックされている場合には、それは、その後、脱保護される。脱保護後、パートナーBは、誘導体化パートナーAに結合され、結合体を形成する。パートナーA上の一級アミノ基は、誘導体化段階において架

橋剤上の活性化カルボキシル基またはイミド基と反応する。架橋剤の他方の末端における反応性チオール、またはブロックかつ活性化されたチオールは、パートナーB上において、それぞれ、求電子基と、または反応性チオールと反応する。架橋剤が反応性チオールを有する場合、パートナーB上の求電子基は、好ましくは、ブロックかつ活性化されるチオール、マレイミドまたはハロメチレンカルボニル(例えば、ブロモアセチルまたはヨードアセチル)基である。生物学的高分子は、天然では、そのような求電子基を含まないため、それらは、別途の誘導体化反応によりパートナーBへ付加されなければならない。架橋剤が、ブロックかつ活性化されるチオールを有する場合、それが反応するパートナーB上のチオールは、パートナーB本来のものでありうる。

【０１５０】

ヘテロ二官能性試薬の例は、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)である(例えば、Carlssonら、1978、Biochem. J.、173:723-737を参照)。タンパク質を連結するための他のヘテロ二官能性試薬は、例えば、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)(Yoshitakeら、1979、Eur. J. Biochem、101:395-399)、2-イミノチオラン(IT)(Jueら、1978、Biochemistry、17:5399-5406)、およびS-アセチルメルカプト無水コハク酸(SAMSA)(KlotzおよびHeiney、1962、Arch. Biochem. Biophys.、96:605-612)を含む。3つすべては、優先的に一級アミン(例えば、リシン側鎖)と反応し、接続する短いスペーサーアーム、長さが1個～3個の炭素原子、を介して誘導体化分子(例えば、異種抗原)へチオールを連結するアミドまたはアミジン基を形成する。

【０１５１】

ヘテロ二官能性試薬のもう一つの例は、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート(SPDB)(Worrellら、1986、Anti-Cancer Drug Design、1:179-188)であり、それは、2-チオピリジンによりブロックかつ活性化されるイオウ原子に対してアルファ位に1つのメチル基分枝を含むことを除いてはSPDPと構造において同一である。Thorpeら(1987、Cancer Research、47:5924-5931)により記載されるSMPTおよびSMBTは、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化カルボキシル基とブロックされたチオールの間にフェニルメチルスペーサーアームを含む；チオールおよび1つのメチル基分枝の両方は、スペーサーアームの脂肪族炭素へ付着している。これらのヘテロ二官能性試薬は、結果として、枝なし架橋剤よりも容易には切断されないジスルフィド結合を生じる。

【０１５２】

反応性ジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性試薬のいくつかの他の例は、S-4-スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチルベンジルチオ硫酸ナトリウム、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-α-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエンを含む。

【０１５３】

チオール基と反応する二重結合を有する反応性基を含むヘテロ二官能性試薬の例は、上で挙げられているSMCC、スクシンイミジルm-マレイミドベンゾエート、スクシンイミジル3-(マレイミド)プロピオネート、スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を含む。好ましい態様において、MBSが、結合体を作製するために用いられる。

【０１５４】

2つのタンパク質の結合体を形成するための他のヘテロ二官能性試薬は、例えば、米国特許第4,671,958号におけるRodwellら、および米国特許第5,241,078号におけるMorelandらにより記載されている。

【０１５５】

SCEと対象となる分子の架橋は、還元型アミノ化によりカルボニル基をアミン基またはヒドラジド基に結合することにより達成されうる。

【０１５６】

または、キメラポリペプチドは、例えば、AthertonおよびShephard(前記)の9章ならび

にRobergeら(1995)に記載されているように、液相合成または固相合成を用いて合成されうる。本発明のペプチドは、当技術分野において知られているように、液相または固相合成法により合成されうる。例えば、実験的手順を含め、広く用いられているメリフィールド(Merrifield)固相合成法は、以下の参照文献に記載されている：Stewartら(1969、Solid Phase Peptide Synthesis、W. H. Freeman Co.、サンフランシスコ)；Merrifield(1963、J Am Chem Soc 85:2149)；Meienhofer(1973、Int J Pept Pro Res 11:246)；ならびにBaranyおよびMerrifield(1980、The Peptides、E. GrossおよびF. Meinenhofer編、2巻、Academic Press、pp. 3-285)。合成は、手動技術を用いうる、または、例えば、Applied BioSystems 431A Peptide Synthesizer(フォスターシティー、カリフォルニア)またはBiosearch SAM II自動化ペプチド合成機(Biosearch, Inc.、サンラフェル、カリフォルニア)を使用し、製造会社により供給された使用説明マニュアルおよび試薬に提供されている指示に従って、完全に自動化されうる。Cys残基間のジスルフィド結合は、例えば、米国特許第4,757,048号のCol. 20で教示されているように、KCNによる線状ペプチドの穏やかな酸化により導入されうる。

【０１５７】

もう一つの態様において、キメラペプチドは、組換え核酸に基づく方法を用いて作製される。従って、本発明のもう一つの局面は、キメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された合成または組換えポリヌクレオチドを提供し、ポリヌクレオチドは、上でおおまかに記載されているような少なくとも1つの自己合体エレメント(SCE)をコードし、かつ少なくとも1つの対象となるポリペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列とインフレームで融合されている第一ヌクレオチド配列を含む。「インフレーム」とは、ポリヌクレオチドが宿主細胞へ形質転換される場合、細胞が、ポリヌクレオチド配列を、SCEアミノ酸配列および少なくとも1つの対象となるポリペプチドの両方を含む単一のポリペプチドへと転写および翻訳することができることを意味する。例えば、キメラポリペプチドをコードする核酸分子は、容易に入手できる機械類を用いて新規合成されうる。DNAの逐次合成は、例えば、米国特許第4,293,652号に記載されている。新規合成の代わりに、異なるSCEコード化ポリヌクレオチドを切断するための制限エンドヌクレアーゼの使用および対象となる分子をコードする切断されたポリヌクレオチドを同じ読み枠においていっしょにライゲーションするためのリガーゼの使用を含め、組換え技術が用いられうる。適する組換え技術は、例えば、Ausubelら(前記)およびSambrookら(前記)の関連セクションに記載されている。適切には、合成ポリヌクレオチドは、例えば、Hortonら(1990、Biotechniques 8(5):528-535；1995、Mol Biotechnol. 3(2):93-99；および1997、Methods Mol Biol. 67:141-149)により記載されているように、重複伸長によるスプライシング(SOEing)を用いて構築される。しかしながら、本発明が、合成構築物を構築するためのいずれの一つの特定の技術にも依存しない、かつ方向づけられないことは、留意されるべきである。

【０１５８】

ヌクレオチド配列は直接的に結合されうる；またはヌクレオチド配列は追加のコドンにより分離されうることが企図される。例えば、追加のコドンはまた、SCEアミノ酸配列を対象となるポリペプチドから空間的に引き離す役割を果たすリンカーアミノ酸配列を供給するために、SCEアミノ酸配列をコードする配列と少なくとも1つの対象となるポリペプチドをコードする配列の間に含まれうる。そのようなリンカーは、対象となるポリペプチドの本来の折り畳みを促進し、キメラポリペプチドが全体として、SCEアミノ酸配列を含む他のキメラポリペプチドと凝集体を形成した場合でさえも、所望の生物学的活性を保持することを保証しうる。いくつかの態様において、特に、対象となるポリペプチドがそれのアミノ末端において、または接近して隣接した、荷電アミノ酸を含まない場合、リンカーは、適切には、キメラポリペプチドから細胞内で切断されうるSCEアミノ酸配列の能力を妨げるまたは低下させる、1個、2個、3個、4個、5個またはそれ以上の荷電した、典型的には塩基性の、アミノ酸残基を含む。望ましくは、これらの荷電アミノ酸残基は、対象となるポリペプチドのアミノ末端に、または接近して隣接するように、配置される(例えば

、アミノ末端から約1個、2個、3個、4個、5個のアミノ酸残基以内に)。また、追加のコドンは、ライゲーションおよび制限エンドヌクレアーゼ消化、ならびに制限エンドヌクレアーゼ認識配列のポリヌクレオチドへの戦略的導入のような、単にクローニング技術の結果として含まれうる。

【０１５９】

ポリヌクレオチドのコード配列は、どちらの順序でもありうる、すなわち、SCEアミノ酸コード配列は、少なくとも1つの対象となるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の上流(5')または下流(3')でありうり、それで、結果として生じるキメラポリペプチドのSCEアミノ酸配列は、少なくとも1つの対象となるポリペプチドに対してアミノ末端位またはカルボキシル末端位に配置される。好ましい態様において、SCEをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの対象となるポリペプチドをコードする配列の下流(3')に配置される。2つまたはそれ以上の対象となるポリペプチドをコードする配列を含む態様において、SCEコード配列は、2つの対象となるポリペプチドの間に配置されうる。

【０１６０】

そのような配列が上記の組換えポリヌクレオチドにすでに内在しているのではない範囲では、そのようなポリヌクレオチドは、適切には、限定されるものではないが、コード配列の上流(5')にインフレームで融合される翻訳開始コドン、およびコード配列の下流(3')にインフレームで融合される翻訳停止コドンのような制御エレメントをさらに含むことは、理解されているものと思われる。そのようなポリヌクレオチドは、適する宿主細胞における組換えキメラポリペプチドの発現に有用である。例えば、本発明による組換えキメラポリペプチドは、(a)少なくとも1つの対象となるポリペプチドと融合された自己合体エレメントを含むキメラポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドを調製する段階であり、ヌクレオチド配列が1つまたは複数の制御エレメントに作動可能に連結されている、段階；(b)組換えポリヌクレオチドを適する宿主細胞へ導入する段階；(c)その組換えポリヌクレオチドから組換えポリペプチドを発現させるために宿主細胞を培養する段階；および(d)細胞または細胞培地から組換えキメラポリペプチドを単離する段階を含む手順により調製されうる。このように、組換えポリヌクレオチドを含むベクター、およびポリヌクレオチドを含むまたはベクターを含む宿主細胞もまた、本発明の一部として意図される。ベクターは、宿主細胞においてポリヌクレオチドを増幅するのに有用である。好ましいベクターは、ベクターで形質転換またはトランスフェクションされた宿主細胞においてコード化されたキメラタンパク質の発現を可能にするために適切な制御エレメントを含む、発現ベクターを含む。発現ベクターは、限定されるものではないが、プラスミドのような自己複製染色体外ベクター、または宿主ゲノムへ統合されるベクターを含む。制御エレメントは、一般的に、発現に用いられる宿主細胞に適切なものである。適切な発現ベクターおよび適する制御配列の多数の型は、様々な宿主細胞について、当技術分野において知られている。典型的には、制御エレメントは、限定されるものではないが、プロモーター配列、リーダーまたはシグナル配列、リボソームの結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含む。当技術分野において公知の恒常的または誘導性プロモーターが、本発明により企図される。プロモーターは、天然に存在するプロモーターか、または1つより多いプロモーターのエレメントを結合するハイブリッドプロモーターでありうる。

【０１６１】

いくつかの態様において、発現ベクターは、形質転換またはトランスフェクションされた宿主細胞の選択を可能にする選択可能マーカー遺伝子を含む。選択遺伝子は、当技術分野においてよく知られており、用いられる宿主細胞によって異なるものである。

【０１６２】

発現ベクターはまた、融合パートナー(典型的には、発現ベクターにより供給される)を含みうり、それで、本発明の組換えポリペプチドは、その融合パートナーとの融合ポリペプチドとして発現される。融合パートナーの主要な利点は、それらがその融合ポリペプチドの単離および/または精製を援助することである。その融合ポリペプチドを発現するた

めに、融合パートナーおよびポリヌクレオチドの翻訳読み枠が一致するように本発明によるポリヌクレオチドを発現ベクターへライゲーションすることが必要である。融合パートナーのよく知られた例は、限定されるものではないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ヒトIgGのFc部、マルトース結合タンパク質(MBP)およびヘキサヒスチジン(HIS_6)を含み、特に、アフィニティークロマトグラフィーによる融合ポリペプチドの単離に有用である。アフィニティークロマトグラフィーによる融合ポリペプチド精製の目的のために、アフィニティークロマトグラフィーについての関連するマトリックスは、それぞれ、グルタチオン-、アミロース-、およびニッケル-またはコバルト-結合型樹脂である。多くのそのようなマトリックスは、(HIS_6)融合パートナーについて有用なQIAexpress(商標)系およびPharmacia GST精製系のような「キット」型で入手可能である。好ましい態様において、組換えポリヌクレオチドは、下により完全に記載されているような商業的ベクターpFLAGに発現される。当技術分野においてよく知られたもう一つの融合パートナーは、緑色蛍光タンパク質(GFP)である。この融合パートナーは、本発明の融合ポリペプチドが蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーにより同定されることを可能にする蛍光性「タグ」として役立つ。GFPタグは、本発明の融合ポリペプチドの細胞下の局在性を評価する場合、または本発明の融合ポリペプチドを発現させる細胞を単離するために、有用である。蛍光活性化セルソーター(FACS)のようなフローサイトメトリー法は、特に、この後者の適用において有用である。好ましくは、融合パートナーはまた、ファクターX_aまたはトロンビンのようなプロテアーゼ切断部位を有し、関連するプロテアーゼが本発明の融合ポリペプチドを部分的に消化し、それにより、そこから本発明の組換えポリペプチドを遊離させることを可能にする。遊離されたポリペプチドは、その後、次のクロマトグラフィーの分離により融合パートナーから単離されうる。本発明による融合パートナーはまた、特異的な抗体が利用できる通常短いペプチド配列である、「エピトープタグ」をそれらの範囲内に含む。特異的なモノクローナル抗体が容易に利用できるエピトープタグのよく知られた例は、c-Myc、インフルエンザウイルス、赤血球凝集素およびFLAGタグを含む。

【０１６３】

もう一つの態様において、ポリヌクレオチドは、生物体のゲノムにおける領域と実質的な配列相同性をもつ5'および3'フランキング領域を含み、相同的組換えによるポリヌクレオチドのゲノムへの導入を促進することができる。

【０１６４】

組換えポリヌクレオチドは、トランスフェクションおよび形質転換を含む任意の適する方法により宿主細胞へ導入されうり、方法の選択は、用いられる宿主細胞に依存するものである。このように、本発明のもう一つの局面は、本発明によるキメラポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクションされた宿主細胞を提供する。そのような宿主細胞は、インビトロまたはインビボで凝集に好都合な条件下において他の同様のキメラポリペプチドと凝集し、より高次のホモ凝集体を形成することができる、本発明のキメラポリペプチドを産生することができる。代わりの態様において、本発明は、本発明によるキメラポリペプチドをコードする少なくとも2つの組換えポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクションされた宿主細胞を企図し、少なくとも2つのポリヌクレオチドは、適合性SCEアミノ酸配列および別個の対象となるポリペプチドをコードする。そのような宿主細胞は、インビトロまたはインビボで凝集に好都合な条件下においてお互いと凝集し、より高次の凝集体を形成することができる、本発明の少なくとも2つのキメラポリペプチドを産生することができる。そのようなヘテロ凝集体は、有利なことには、例えば、疾患もしくは状態に対して宿主を免疫強化するための複数の抗原を供給するために、または多段階化学反応の触媒作用のための複数の酵素活性を供給するために、用いられうる。「適合性」SCEアミノ酸配列とは、より高次の凝集体へのお互いとの共凝集を可能にするのに同一かまたは十分に類似したかのいずれかであるSCEアミノ酸配列を意味する。望ましくは、2つまたはそれ以上の対象となるポリペプチドは、より高次の凝集体においてそれらの本来の生物学的活性(例えば、抗原性活性、結合活性；酵素活性)を保持する。

【０１６５】
発現に適した宿主細胞は、原核生物または真核生物でありうる。宿主細胞は、ポリヌクレオチドのSCEアミノ酸配列が由来している生物体と同じ界(原核生物、動物、植物、真菌、原生生物など)由来、または異なる界由来でありうる。好ましい態様において、宿主細胞は、ポリヌクレオチドのSCEアミノ酸配列が由来している生物体と同じ種由来である。本発明によるポリペプチドの発現のための一つの好ましい宿主細胞は、細菌である。用いられる細菌は大腸菌でありうる。または、宿主細胞は、例えば、バキュロウイルス発現系で利用されうるSF9細胞のような昆虫細胞でありうる。
【０１６６】
さらにもう一つの局面において、本発明は、上でおおまかに記載されているような宿主細胞を含む細胞培養を企図し、細胞は、上でおおまかに記載されているようなポリヌクレオチドによりコードされるキメラポリペプチドを発現し、かつ細胞培養は、キメラポリペプチドがより高次の凝集体の形をとって存在している細胞を含む。
【０１６７】
組換えキメラポリペプチドは、都合のよいことには、例えば、Sambrookら、1989、特にセクション16および17；Ausubelら、(1994-1998)、特に10章および16章；ならびにColiganら、(1995-1997)、特に1章、5章および6章に記載されているように、標準的プロトコールを用いて当業者により調製されうる。例えば、そのようなポリペプチドは、上でおおまかに記載されているような組換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することにより調製されうる。このように、もう一つの局面において、本発明は、本発明の少なくとも1つの組換えポリヌクレオチドで細胞を形質転換またはトランスフェクションすること；および結果として少なくとも1つのキメラポリペプチドの発現を生じる条件下において細胞を増殖することを含む、本明細書に定義されているようなキメラポリペプチドを産生するための方法を企図する。好ましい態様において、方法は、キメラポリペプチドを細胞または細胞の増殖培地から単離する段階をさらに含む。
【０１６８】
本発明はまた、付随した天然のタンパク質グリコシル化を含むまたは含まない組換えまたは合成のキメラポリペプチドを企図する。大腸菌のような細菌における上でおおまかに記載されているような組換えポリヌクレオチドの発現は、非グリコシル化分子を供給する。不活性化N-グリコシル化部位を有する機能的突然変異の変異体キメラポリペプチドは、オリゴヌクレオチド合成およびライゲーションにより、または部位特異的突然変異誘発技術により、作製されうる。これらの変異体ポリペプチドは、酵母発現系を用いて、好収量で、均質な還元糖型に産生されうる。真核生物のタンパク質におけるN-グリコシル化は、アミノ酸三つ組Asn-A_1-Zを特徴とし、A_1は、Proを除く任意のアミノ酸であり、Zは、SerまたはThrである。この配列において、アスパラギン(Asn)は、糖の共有結合的付着のための側鎖アミノ基を供給する。そのような部位は、Asnもしくは残基Zの代わりに別のアミノ酸を用いること、AsnまたはZを欠失させること、またはA_1とZの間に非Zアミノ酸を、もしくはAsnとA_1の間にAsn以外のアミノ酸を挿入することにより、除去されうる。
【０１６９】
組換えキメラポリペプチドはまた、遺伝子改変の、典型的には非ヒトの、動物を用いて調製されうる。従って、本発明は、本発明のキメラ分子をコードするポリヌクレオチドを発現する遺伝子改変の動物に向けられる。遺伝子改変は、一般的に、導入遺伝子の形をとり、従って、本発明の遺伝子改変動物は、上でおおまかに記載されているような少なくとも1つのキメラ分子をコードし、かつ一般的に転写制御エレメントを含む制御エレメントに作動可能に連結されている、少なくとも1つの導入遺伝子をそれの細胞に含むトランスジェニック動物である。導入遺伝子は、適切には、動物の体細胞内に含まれるが、またそれの生殖細胞内に含まれる場合がある。通常には、トランスジェニック動物は、哺乳動物であり、適切には齧歯類目から選択される。いくつかの態様において、トランスジェニック哺乳動物は、マウスであるが、ラットもまた特定の有用性をもつ。しかしながら、本発明がこれらの種に限定されないことは、理解されているものと思われる。例えば、トラン

スジェニック動物は、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、モルモットまたはトリでありうる。

【０１７０】

本発明の遺伝子改変動物は、かなり多数の手段により調製されうる。一つの方法において、核酸ターゲティング構築物またはベクターは、導入遺伝子に隣接する2つの領域を含み、領域が、それらの部分と相同組換えを起こすのに動物のゲノムの部分と十分に相同的である。または、ランダムな組込みのための構築物は、組換えを媒介するために相同性の領域を含む必要はない。便利には、陽性および陰性の選択のためのマーカーが、組換え宿主細胞の選択を可能にするために構築物に含まれる。ターゲティングDNA構築物は、一般的に、胚幹(ES)細胞またはES細胞系へ導入される。相同組換えを通して遺伝子改変をもつ細胞を作製するための方法は、当技術分野において知られている。

【０１７１】

4．より高次の凝集体の作製

本発明はまた、より高次の凝集体を作製する方法を含む。方法は、特定の活性をもつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合される、本明細書に定義されているような少なくとも1つのSCEを含むキメラ分子を供給することを含む。キメラ分子の少なくとも1つのSCEは、凝集に好都合な条件下において他のキメラ分子のSCEと合体することができ、それにより、キメラ分子の凝集は、結果として、対象となる非凝集の分子に対して増強した活性をもつより高次の凝集体(すなわち、ホモ凝集体)を形成する。好ましい態様において、対象となる分子はポリペプチドであり、ポリペプチドを含むより高次のホモ凝集体は、凝集に好都合な条件下での宿主細胞におけるキメラ分子の発現により作製される。

【０１７２】

もう一つの態様において、本発明は、2つまたはそれ以上の別個の活性を含むより高次の凝集体を作製する方法を提供する。方法は、少なくとも2つのキメラ分子を供給することを含み、個々のキメラ分子は、他方のキメラ分子のSCEと適合性があり、かつ他方のキメラ分子に対応する対象となる他の分子の活性とは異なる活性をもつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している、本明細書に定義されているような少なくとも1つのSCEを含む。第一および第二のキメラ分子のSCEは、前記の別個の活性を含むより高次の凝集体(すなわち、ヘテロ凝集体)へのキメラ分子の集合を促進するように凝集に好都合な条件下でお互いに合体する。特に好ましい態様において、対象となる分子は、ポリペプチドであり、これらのポリペプチドを含むヘテロ凝集体は、凝集に好都合な条件下で宿主細胞において、少なくとも2つのキメラ分子の共発現により作製される。

【０１７３】

有利には、上の方法は、より高次の凝集体を細胞または細胞の増殖培地から単離する段階をさらに含む。

【０１７４】

一つの態様において、SCEおよび対象となるポリペプチドを含む各キメラタンパク質は、別々の異なる宿主細胞系において産生され、回収(精製および単離)される。タンパク質は、可溶性型で回収されるかまたは可溶化される。(完全な精製は、次の凝集にとって望ましいが、必須ではない。)その後、2つまたはそれ以上のポリペプチドの所望の混合物が作製され、凝集または重合を可能にする条件にさらされる。そのような条件は、生理的条件を含む、または、例えば、タンパク質凝集体について「種を蒔くこと」、タンパク質のモル濃度を増加させるために混合物を濃縮すること、または塩度、酸度もしくは他の因子を変化させることによる凝集の誘導を含みうる。所望の混合は、1:1でありうる、または1つのキメラタンパク質に一方的に有利になっている(例えば、集合的活性が生物学的結果を達成するために必要とされる、もう一つのポリペプチドより低いそれの結合または相互作用パートナーとの会合定数をもつポリペプチドに一方的に有利になっている)比率でありうる。異なるキメラタンパク質は、適合性SCEドメイン、最も好ましくは同一のSCEドメイン、を含むため、種と、およびお互いに、共重合する。

【０１７５】

もう一つの態様において、少なくとも2つの別個の宿主細胞系は、共培養され、キメラ

タンパク質は、共有の培地へ分泌される。タンパク質は、培地から共精製されうる、または事前の精製なしに、より高次の凝集体を形成するために凝集に好都合な条件にさらされうる。

【０１７６】

さらにもう一つの態様において、2つまたはそれ以上の組換えキメラポリペプチドのための導入遺伝子は、単一のポリヌクレオチド構築物かまたは複数の構築物かのいずれかにおいて、同じ宿主細胞へ同時トランスフェクションされる。そのような宿主細胞は、両方の組換えポリペプチドを産生し、凝集に好都合な条件下においてインビボでより高次の凝集体を形成する。または、両方の組換えポリペプチドは、可溶性型で回収されて、より高次の凝集体を形成するためにインビトロで凝集に好都合な条件にさらされうる。

【０１７７】

本発明のホモまたはヘテロ凝集体の生物学的活性は、当業者に公知の標準的技術を用いてアッセイされうる。例えば、抗原性凝集体は、凝集体で動物を免疫し、そのような抗原を攻撃するように初回抗原刺激を受けた動物の免疫細胞が、数、活性およびそれらの抗原を検出かつ破壊する能力において増加しているかどうかを評価することにより免疫原性について試験されうる。免疫応答の強さは、以下のものを含む標準的試験により測定される：当技術分野に公知の手段による末梢血リンパ球の直接的測定；ナチュラルキラー細胞細胞障害性アッセイ法(例えば、Provinciali Mら(1992、J. Immunol. Meth. 155:19-24)を参照)、細胞増殖アッセイ法(例えば、Vollenweider, I.およびGroseurth, P. J. (1992、J. Immunol. Meth. 149:133-135)を参照)、免疫細胞およびサブセットの免疫アッセイ法(例えば、Loeffler, D. A.ら(1992、Cytom. 13:169-174)；Rivoltini, L.ら(1992、Can. Immunol. Immunother. 34:241-251)を参照)；または細胞性免疫についての皮膚試験(例えば、Chang, A. E.ら(1993、Cancer Res. 53:1043-1050)を参照)。または、サイトカイン凝集体は、サイトカインの活性を与えるそれらの能力、例えば、インビボで顆粒球およびマクロファージの増殖を刺激するSCE-GM-CSFの能力、について試験されうる。そのような技術は、当業者によく知られている。

【０１７８】

5．適用

本発明はまた、本発明のより高次の凝集体の実際的な適用を提供する。適切には、本発明は、治療的、予防的および化学過程の適用を含む適用の範囲においてより高次のホモ凝集体の使用を企図する。この型の一つの態様において、ホモ凝集体は、特定の疾患もしくは状態を処置または予防するための治療的ポリペプチドを含む。例えば、治療的ポリペプチドは、骨髄細胞およびそれらの前駆体、特に好中性および好酸性顆粒球ならびに単球/マクロファージ、の生存、増殖、分化および機能を刺激する造血成長因子である、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)のようなサイトカインでありうる。GM-CSFは、後天性免疫不全症候群(AIDS)および感染症のような骨髄抑制性疾患を含む様々な造血性状態を処置するのに有用である。それはまた、黒色腫のような癌を処置するのに有用である。より高次のGM-CSF凝集体は、本発明に従って、増強した活性(例えば、より高い効力および/または延長した循環半減期)をもつものであるため、それらが使用もしくは投与されなければならない回数は低減される、または有効量に達するのに使用もしくは投与される量は低減される。例えば、骨髄細胞のような造血性前駆細胞の増殖、分化および機能的活性化のために、GM-CSFの非凝集型が単独で用いられたならば異なる方法で必要であろうものより、凝集体の低減された量が処置の経過を通して必要となる。本発明に従ってホモ凝集体を形成するのに用いられうる治療的に有用なタンパク質の他の例は、ケモカインタンパク質、例えば単球化学誘引物質タンパク質-1(MCP-1)、であり、とりわけ癌処置のためにも用いられうる。

【０１７９】

代わりの態様において、ホモ凝集体は、酵素的活性、特に、化学過程において触媒的価値があるとみなされる活性、をもつポリペプチドを含む。そのようなポリペプチドを含むより高次の凝集体は、化学過程を行うための触媒的基質として用いられうる。

【０１８０】
または、本発明は、より高次のヘテロ凝集体の使用を企図する。この型の一つの態様において、より高次のヘテロ凝集体は、個体において免疫応答を調節するための複数の抗原を含む。そのような多価の免疫調節組成物は、単独で、または組成物の効力を増強させるアジュバントと組み合わせて、投与されうる。特定の態様において、より高次の凝集体は、本来、粒子性であり、有利なことには、抗原提示細胞、特に樹状細胞を、これらの細胞のMHCクラスIおよび/またはMHCクラスIIの両方の経路への抗原の高効率送達として、初回抗原刺激するために用いられうる。この態様において、処理された樹状細胞は、強い免疫応答を誘発し、抗原特異的CTLおよびTヘルパー細胞を非常に効率的に産生する。本発明の凝集体で初回抗原刺激されうる他の抗原提示細胞は、単球、マクロファージ、骨髄性系統の細胞、B細胞、樹状細胞またはランゲルハンス細胞を含む。抗原初回刺激を受けた細胞を産生するための方法は、例えば、米国特許第5,994,126号におけるSteinmanらにより記載されている。
【０１８１】
もう一つの態様において、より高次のヘテロ凝集体は、インターロイキン-2(IL-2)を含む第一キメラポリペプチド、およびFasリガンドを含む第二キメラポリペプチドを含む。そのようなより高次の凝集体は、特定の白血病もしくはリンパ腫細胞、または高親和性IL-2RおよびFasの両方をもつ最近活性化されたT細胞を標的にするのに有用でありうる。
【０１８２】
もう一つの態様において、規則正しい凝集体は、化学過程の一段階を触媒する第一酵素および第一酵素反応からの「代謝」生成物を含む下流段階を触媒する第二酵素のような、2つまたはそれ以上の酵素を含めて作製される。そのような凝集体は、一般的に、第一反応生成物および第二触媒酵素の近接により、化学過程の速度および/または効率を増加させるものである。
【０１８３】
前記より、より高次の凝集体が医師および/または獣医師による患者における多くの状態もしくは欠乏症の予防または処置のために用いられうることは明らかであると思われる。従って、本発明は、もう一つの局面において、薬学的に許容される担体および/または希釈剤と共に、本発明のより高次の凝集体を含む薬学的組成物を企図する。様々な状態の処置に用いられる凝集体の量は、もちろん、処置されることになっている状態の重症度、選択された投与の経路、およびより高次の凝集体の特定の活性または純度に依存するものであり、かつ所属医師または獣医師により決定されるものである。投与に適した薬学的組成物は、有効量でのより高次の凝集体および薬学的に許容される担体を含む。
【０１８４】
本発明の組成物は、限定されるものではないが、非経口(例えば、限定されるものではないが、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下を含む注射；限定されるものではないが、気管支内、鼻腔内または口での吸入、鼻腔内滴下を含む吸入；局所)および非経口ではない(例えば、限定されるものではないが、食事を含め口を用いる；直腸)を含む様々な経路により投与されうる。
【０１８５】
担体は、用いられる投与量および濃度においてレシピエントに対して非毒性である。用いられる製剤は、選択された投与の経路により異なるものである(例えば、溶液、乳濁液、カプセル)。溶液または乳濁液について、適する担体は、例えば、食塩水および緩衝媒体を含む、水性もしくはアルコール性/水性溶液、乳濁液または懸濁液を含む。非経口媒体は、塩化ナトリウム溶液、リンガーのブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸化リンガー溶液、または固定油を含みうる。静脈内媒体は、様々な添加剤、保存剤、または流動性の栄養分もしくは電解質補充液を含みうる。一般的には、Remington's Pharmaceutical Science、第16版、Mack編(1980)を参照されたい。吸入については、化合物は可溶化されて、投与に適したディスペンサー(例えば、アトマイザー、ネブライザーまたは加圧エアゾールディスペンサー)へ充填されうる。融合タンパク質は、個々に、共に、また

は他の薬物もしくは薬剤(例えば、他の化学療法剤、免疫系増強剤)と組み合わせて、投与されうる。

【０１８６】

本発明はまた、本発明のより高次の凝集体および選択的にアジュバントを含む免疫増強組成物を企図する。効果的でありうるアジュバントの例は、限定されるものではないが、以下のものを含む：水酸化アルミニウム、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thur-MDP)、N-アセチル-ノル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP 11637、ノル-MDPと呼ばれる)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリロキシ)-エチルアミン(CGP 1983A、MTP-PEと呼ばれる)、ならびに、2 % スクアレン/ツイーン80乳濁液における細菌から抽出された3つの成分、モノホスホリルリピドA、トレハロースジミコレートおよび細胞壁骨格(MPL+TDM+CWS)を含むRIBI。例えば、アジュバントの有効性は、組成物の投与に起因する抗体の量を測定することにより決定されうり、それらの抗体は、組成物の処理された細胞により提示された1つまたは複数の抗原に対して産生される。さらに、望ましい場合には、免疫増強組成物は、組成物の有効性を増強する、湿潤剤もしくは乳化剤および/またはpH緩衝剤のような微量の補助物質を含みうる。

【０１８７】

望ましい場合には、持続性もしくは間欠性放出に適した免疫増強組成物を含む装置または組成物は、実際において、身体に移植されうる、または身体へのそのような物質の比較的ゆっくりした放出のためにそれへ局所的に投与されうる。

【０１８８】

免疫増強組成物は、通常には、例えば、皮下または筋肉内のいずれかへの注射により、非経口的に投与される。投与の他の様式に適している追加の製剤は、坐剤および、いくつかの場合には、経口製剤を含む。坐剤について、伝統的な結合剤および担体は、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含みうる；そのような坐剤は、0.5 %～10 %、好ましくは1 %～2 %の範囲で活性成分を含む混合物から形成されうる。経口製剤は、例えば、薬学的等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、炭酸マグネシウムなどのような通常用いられる賦形剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤または粉末の形をとり、10 %～95 %、好ましくは25 %～70 %の活性成分を含む。

【０１８９】

疾患もしくは状態の処置および/または予防のための方法もまた、本発明により含まれ、そのような処置を必要とする患者へ、上で大まかに記載されているような組成物の有効量を投与することを含む。疾患または状態は、病原性生物体もしくは例えば上で記載されているような癌により引き起こされうる、またはそれは、自己免疫疾患またはアレルギーでありうる。

【０１９０】

いくつかの態様において、本発明の免疫増強組成物は、癌の処置または予防に適している。本発明の実施に従って適切に処置されうる癌は、肺、乳房、卵巣、子宮頸、大腸、頭および首、膵臓、前立腺、胃、膀胱、腎臓、骨、肝臓、食道、脳、精巣、子宮の癌、黒色腫ならびに様々な白血病およびリンパ腫を含む。

【０１９１】

他の態様において、免疫増強組成物は、ウイルス、細菌もしくは寄生虫の感染に対する処置または予防に適する。本発明により企図されるウイルス感染は、限定されるものではないが、HIV、肝炎、インフルエンザ、日本脳炎ウイルス、エプスタイン-バーウイルスおよびRS(respiratory syncytial)ウイルスにより引き起こされる感染を含む。細菌感染は、限定されるものではないが、ナイセリア(Neisseria)種、髄膜炎菌の(Menigococcal)種、ヘモフィルス(Haemophilus)種、サルモネラ(Salmonella)種、連鎖球菌の(Streptococcal)種、レジオネラ(Legionella)種およびマイコバクテリウム(Mycobacterium)種により引き起こされるものを含む。本発明により含まれる寄生虫感染は、限定されるものではない

が、プラスモジウム(Plasmodium)種、住血吸虫(Schistosoma)種、リーシュマニア(Leishmania)種、トリパノソーマ(Trypanosoma)種、トキソプラズマ(Toxoplasma)種およびジアルジア(Giardia)種により引き起こされるものを含む。

【０１９２】

上の組成物またはワクチンは、投与製剤と適合性のある様式において、疾患もしくは状態から患者を楽にするのに治療的有効であるような、または患者において疾患または状態の発生を防ぐのに予防的有効であるような量において、投与されうる。本発明の関係において、患者へ投与される用量は、失血の低下または停止のような、時間が経って患者に有益な応答をもたらすのに十分であるべきである。投与される組成物またはワクチンの量は、年齢、性別、体重および一般的な健康状態を含めて処置される対象に依存しうる。このことについては、投与のための組成物またはワクチンの正確な量は、医師の判断に依存するものである。疾患もしくは状態の処置において投与される組成物またはワクチンの有効量を決定することにおいて、医師は、時間の経過に伴う疾患または状態の進行を評価する場合がある。とにかく、当業者は、本発明の組成物またはワクチンの適する投与量を容易に決定しうる。

【０１９３】

本発明が容易に理解されかつ実際的効果へ至らせうるために、特定の好ましい態様が、今、以下の非限定的実施例として記載されている。

【０１９４】

実施例

実施例1

移動可能なOmpAシグナルペプチド構築物

生理活性ポリペプチドを含む対象となる分子は、シグナルペプチドおよび柔軟なリンカーを含む移動可能な構築物の、個々の生理活性ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端への共有結合的付着によりより高次の凝集体へと集合させうる。この実施例において、シグナルペプチドリンカーは、配列：

MKKTA

IAIAVALAGFATVAQAGGGGSGGGGSGGGGS***

[配列番号：133]または配列：

***GSSGSGGGGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：134]を含む。配列番号：133の最初の21個のアミノ酸残基および配列番号：134の最後の21個のアミノ酸残基は、OmpAシグナルペプチドに由来する。これらの配列の残りのアミノ酸残基は、例えば、単鎖抗体産生において日常的に用いられる柔軟な親水性リンカーの短縮型を表す。他の柔軟な親水性リンカーは報告されており、それらの代わりに用いられることができた。記号***は、ペプチドリンカーの生理活性ポリペプチドへの結合のために必要とされる反応性基(例えば、ヨードアセトアミドのようなα-ハロカルボン酸またはエステル、マレイミド、ビニルスルホンまたはジスルフィドのようなイミド)を表す。

【０１９５】

実施例2

組換えまたは合成SCEキメラ構築物の組み立て

例証目的として、組換えまたは合成キメラ構築物は、SCEをコードする第一ヌクレオチド配列、対象となるペプチドまたはポリペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列、および構築物の精製を容易にするタグペプチドをコードする第三ヌクレオチド配列を同じ読み枠においていっしょに連結することにより構築させる。選択的には、翻訳された場合、SCE配列が対象となるポリペプチドの本来の折り畳みに実質的に干渉しないために対象となるポリペプチドをSCEから間隔をあけるスペーサーをコードするオリゴヌクレオチドが、第一と第二のヌクレオチド配列の間、および第二と第三のヌクレオチド配列の間に挿入

される。SCEは、対象となるポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかに連結されうる。構築物は、融合タンパク質をコードし、以下の一般式により要約される：

1. N-SCE—スペーサー1—対象となるポリペプチド—スペーサー2—タグ (XII); および

2. Tag—スペーサー2—対象となるポリペプチド—スペーサー3—SCE-C (XIII),

N-SCEは、

MKKTAIAIAVALAGFATVAQA

[配列番号：136]である；

SCE-Cは、

TAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：138]である；

対象となるポリペプチドは、マウスもしくはヒトGM-CSF[それぞれ、配列番号：140および142]、マウスもしくはヒトIFN-β[それぞれ、配列番号：144および146]、マウスもしくはヒトIL-1Ra[それぞれ、配列番号：148および150]、マウスもしくはヒトIL-2[それぞれ、配列番号：152および154]、マウスもしくはヒトのFasリガンド[それぞれ、配列番号：156および158]、またはHEL[配列番号：160]、マウスもしくはヒトMCP-1[それぞれ、配列番号：208および210]から選択される；

タグは、Flag(ＤＹＫＤＤＤＤＫ[配列番号：162])、His(ＨＨＨＨＨＨ[配列番号：164])またはStrep(ＡＷＲＨＰＱＦＧＧ[配列番号：166])から選択される；

スペーサー1は選択的であり、存在する場合、ＧＳ(ＧＧＧＧＳ)nＧＳＳ[配列番号：167]、n=0～10、である；

スペーサー2は選択的であり、存在する場合、ＧＳＳ[配列番号：168]である；および

スペーサー3は選択的であり、存在する場合、ＧＳＳＧＳ(ＧＧＧＧＳ)n[配列番号：169]、n=0～10、である。

【０１９６】

組換え発現について、本発明のキメラ分子をコードする核酸構築物は、適切な翻訳開始(例えば、ATG)および終結(例えば、TAA)シグナルを含むように設計される(そのようなシグナルが構築物の末端エレメントによりすでには供給されていない場合)。これらの構築物は、構築物の組換え発現のために適切な発現ベクター(例えば、pET-28a(+)ベクター、Novagenから商業的に入手可能である)へと挿入されうる。

【０１９７】

実施例3

自己合体マウスGM-CSF構築物

自己合体マウスGM-CSFは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGTGGTGGTGGATCCGGCTCGAGTTGGCTGCAGAATTTACT
TTTCCTGGGCATTGTGGTCTACAGCCTCTCAGCACCCACCCGCTCACCCATCACTGTCA
CCCGGCCTTGGAAGCATGTAGAGGCCATCAAAGAAGCCCTGAACCTCCTGGATGACAT
GCCTGTCACATTGAATGAAGAGGTAGAAGTCGTCTCTAACGAGTTCTCCTTCAAGAAG
CTAACATGTGTGCAGACCCGCCTGAAGATATTCGAGCAGGGTCTACGGGGCAATTTCA
CCAAACTCAAGGGCGCCTTGAACATGACAGCCAGCTACTACCAGACATACTGCCCCCC
AACTCCGGAAACGGACTGTGAAACACAAGTTACCACCTATGCGGATTTCATAGACAGC
CTTAAAACCTTTCTGACTGATATCCCCTTTGAATGCAAAAAACCAGTCCAAAAAGGCT
CGAGT*GACTACAAGGACGATGACGACAAG***TAATAA**

[配列番号：185]
四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=1であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはマウスGM-CSFをコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのFLAGタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンの直列型ペアである。

【０１９８】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSWLQNLLFLGIVVYSLSAPTRSPIT
VTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFT
KLKGALNMTASYYQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPVQKGSSDY
KDDDDK

[配列番号：186]

【０１９９】

実施例4

自己合体ヒトGM-CSF構築物

自己合体ヒトGM-CSFは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATG*GACTACAAGGACGATGACGACAAG*GGCTCGAGTTGGCTGCAGAGCCTGCT
GCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAGC
ACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGA
GTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGA
CCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGG
GGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGC
ACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTC
AAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCC
AGGAGGGCTCGAGTGGATCCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGATCCACCGCTA
TCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACAAAGAAATA
ATAA

[配列番号：187]
太型字体のヌクレオチドは翻訳開始コドンであり、イタリック体のヌクレオチドは、精製

を容易にするためのFlagタグをコードし、二重の下線の引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、標準型字体のヌクレオチドはヒトGM-CSFをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=2であるスペーサー3をコードし、四角で囲われたヌクレオチドはSCE-Cをコードする。

【０２００】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MDYKDDDDKGSSWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLL
NLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQ
HCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGSSGSGGGGSGGGGSTAIAIAV
ALAGFATVAQATKK

[配列番号：188]

【０２０１】

実施例5

自己合体マウスIFN-β構築物

自己合体マウスIFN-βは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATG*CATCATCATCATCATCAT*GGCTCGAGTAACAACAGGTGGATCCTCCACGCT
GCGTTCCTGCTGTGCTTCTCCACCACAGCCCTCTCCATCAACTATAAGCAGCTCCAGCT
CCAAGAAAGGACGAACATTCGGAAATGTCAGGAGCTCCTGGAGCAGCTGAATGGAAA
GATCAACCTCACCTACAGGGCGGACTTCAAGATCCCTATGGAGATGACGGAGAAGAT
GCAGAAGAGTTACACTGCCTTTGCCATCCAAGAGATGCTCCAGAATGTCTTTCTTGTCT
TCAGAAACAATTTCTCCAGCACTGGGTGGAATGAGACTATTGTTGTACGTCTCCTGGA
TGAACTCCACCAGCAGACAGTGTTTCTGAAGACAGTACTAGAGGAAAAGCAAGAGGA
AAGATTGACGTGGGAGATGTCCTCAACTGCTCTCCACTTGAAGAGCTATTACTGGAGG
GTGCAAAGGTACCTTAAACTCATGAAGTACAACAGCTACGCCTGGATGGTGGTCCGAG
CAGAGATCTTCAGGAACTTTCTCATCATTCGAAGACTTACCAGAAACTTCCAAAACGG
CTCGAGTGGATCCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGC
GGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGATCCACCGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGG
CTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACAAAGAAATAATAA

[配列番号：189]

太型字体のヌクレオチドは翻訳開始コドンであり、イタリック体のヌクレオチドは、精製を容易にするためのHisタグをコードし、二重の下線の引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、標準型字体のヌクレオチドはマウスIFN-βをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=5であるスペーサー3をコードし、四角で囲われたヌクレオチドはSCE-Cをコードする。

【０２０２】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MHHHHHHGSSNNRWILHAAFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKCQELLEQLN
GKINLTYRADFKIPMEMTEKMQKSYTAFAIQEMLQNVFLVFRNNFSSTGWNETIVVRLLD
ELHQQTVFLKTVLEEKQEERLTWEMSSTALHLKSYYWRVQRYLKLMKYNSYAWMVVR
AEIFRNFLIIRRLTRNFQNGSSGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSTAIAIAVALAGF
ATVAQATKK

[配列番号：190]

【０２０３】

実施例6

自己合体ヒトIFN-β構築物

自己合体ヒトIFN-βは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGATCCGGCTCGAGTA
CCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCTCTTTCCA
TGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGCT
CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATATTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGAC
ATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCATTGACC
ATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCATCTAGCACTGG
CTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAACCAT
CTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAAACTGGAGAAAGAAGATTTTACCAGGGGAAAACTC
ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCA
AGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTA
CTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAACGGCTCGAGT*GCTTGGCGTCACCCGC*
*AGTTCGGTGGT*TAATAA

[配列番号：191]

四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=2であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはヒトIFN-βをコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのStrepタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンの直列型ペアである。

【０２０４】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGGGGSGSSTNKCLLQIALLLCFSTTAL
SMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTI
YEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL
HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNGSSAWRHPQFGG

[配列番号：192]

【０２０５】

実施例7

自己合体マウスIL-1Ra構築物

自己合体マウスIL-1Raは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTG
GTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGATCCGGCTCGAGTGAAATCTGCTGGGG
ACCCTACAGTCACCTAATCTCTCTCCTTCTCATCCTTCTGTTTCATTCAGAGGCAGCCTG
CCGCCCTTCTGGGAAAAGACCCTGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATACTAAC
CAGAAGACCTTTTACCTGAGAAACAACCAGCTCATTGCTGGGTACTTACAAGGACCAA
ATATCAAACTAGAAGAAAAGATAGACATGGTGCCTATTGACCTTCATAGTGTGTTCTT
GGGCATCCACGGGGGCAAGCTGTGCCTGTCTTGTGCCAAGTCTGGAGATGATATCAAG
CTCCAGCTGGAGGAAGTTAACATCACTGATCTGAGCAAGAACAAAGAAGAAGACAAG
CGCTTTACCTTCATCCGCTCTGAGAAAGGCCCCACCACCAGCTTTGAGTCAGCTGCCTG
TCCAGGATGGTTCCTCTGCACAACACTAGAGGCTGACCGTCCTGTGAGCCTCACCAAC
ACACCGGAAGAGCCCCTTATAGTCACGAAGTTCTACTTCCAGGAAGACCAAGGCTCGA
GT*GACTACAAGGACGATGACGACAAG*TAATAA

[配列番号：193]

四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=5であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはマウスIL-1Raをコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのFlagタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンの直列型ペアである。

【０２０６】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSSEIC
WGPYSHLISLLLILLFHSEAACRPSGKRPCKMQAFRIWDTNQKTFYLRNNQLIAGYLQGPN
IKLEEKIDMVPIDLHSVFLGIHGGKLCLSCAKSGDDIKLQLEEVNITDLSKNKEEDKRFTFIR
SEKGPTTSFESAACPGWFLCTTLEADRPVSLTNTPEEPLIVTKFYFQEDQGSSDYKDDDDK

[配列番号：194]

【０２０７】

実施例8

自己合体ヒトIL-1Ra構築物

自己合体ヒトIL-1Raは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATG*CATCATCATCATCATCAT*GGCTCGAGTGAAATCTGCAGAGGCCTCCGCAGT
CACCTAATCACTCTCCTCCTCTTCCTGTTCCATTCAGAGACGATCTGCCGACCCTCTGG
GAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTT
CTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAATTTA
GAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCATG
GAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGA
GGCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCCTT
CATCCGCTCAGACAGCGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTGG
TTCCTCTGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACG
AAGGCGTCATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGAGGACGAGGGCTCGAGTGGATCCAC
CGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACAAAG
AAATAATAA

[配列番号：195]
太型字体のヌクレオチドは翻訳開始コドンであり、イタリック体のヌクレオチドは、精製を容易にするためのHisタグをコードし、二重の下線の引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、標準型字体のヌクレオチドはヒトIL-1Raをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=0であるスペーサー3をコードし、四角で囲われたヌクレオチドはSCE-Cをコードする。

【０２０８】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MHHHHHHGSSEICRGLRSHLITLLLFLFHSETICRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKT
FYLRNNQLVAGYLQGPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEA
VNITDLSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVM
VTKFYFQEDEGSSGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：196]

【０２０９】

実施例9

自己合体マウスIL-2構築物

自己合体マウスIL-2は、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATG*GCTTGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGT*GGCTCGAGTTACAGCATGCAGCT
CGCATCCTGTGTCACATTGACACTTGTGCTCCTTGTCAACAGCGCACCCACTTCAAGCT
CCACTTCAAGCTCTACAGCGGAAGCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCACCTGGAGCAGCTGTTGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAGCAGGATGGAGA
ATTACAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCTCACCTTCAAATTTTACTTGCCCAAGCA
GGCCACAGAATTGAAAGATCTTCAGTGCCTAGAAGATGAACTTGGACCTCTGCGGCAT
GTTCTGGATTTGACTCAAAGCAAAAGCTTTCAATTGGAAGATGCTGAGAATTTCATCA
GCAATATCAGAGTAACTGTTGTAAAACTAAAGGGCTCTGACAACACATTTGAGTGCCA
ATTCGATGATGAGTCAGCAACTGTGGTGGACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCTTCTGT
CAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAAGGCTCGAGTGGATCCGGTGGTGGTGGATCCA
CCGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACAAA
GAAATAATAA

[配列番号：197]
太型字体のヌクレオチドは翻訳開始コドンであり、イタリック体のヌクレオチドは、精製を容易にするためのStrepタグをコードし、二重の下線の引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、標準型字体のヌクレオチドはマウスIL-2をコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=1であるスペーサー3をコードし、四角で囲われたヌクレオチドはSCE-Cをコードする。

【０２１０】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MAWRHPQFGGGSSYSMQLASCVTLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQ
QQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLR
HVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSI
ISTSPQGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：198]

【０２１１】

実施例10

自己合体ヒトIL-2構築物

自己合体ヒトIL-2は、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGCTCGAGTCCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCT
ACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTAC
AAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCA
CAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGAAGGAAGTGCT
AAATTTAGCTCAAAGCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATC
AACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTG
ATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTCTCAAAGCAT
CATCTCAACACTGACTGGCTCGAGT*GACTACAAGGACGATGACGACAAG*TAATAA

[配列番号：199]

四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=0であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはヒトIL-2をコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのFlagタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンの直列型ペアである。

【０２１２】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN
YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLKEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV
IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGSSDYKDDDDK

[配列番号：200]

【０２１３】

実施例11

自己合体マウスFas-L構築物

自己合体マウスFas-リガンドは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGTGGTGGTGGATCCGGCTCGAGTCAGCAGCCCATGAATTA
CCCATGTCCCCAGATCTTCTGGGTAGACAGCAGTGCCACTTCATCTTGGGCTCCTCCAG
GGTCAGTTTTTCCCTGTCCATCTTGTGGGCCTAGAGGGCCGGACCAAAGGAGACCGCC
ACCTCCACCACCACCTGTGTCACCACTACCACCGCCATCACAACCACTCCCACTGCCG
CCACTGACCCCTCTAAAGAAGAAGGACCACAACACAAATCTGTGGCTACCGGTGGTAT
TTTTCATGGTTCTGGTGGCTCTGGTTGGAATGGGATTAGGAATGTATCAGCTCTTCCAC
CTGCAGAAGGAACTGGCAGAACTCCGTGAGTTCACCAACCAAAGCCTTAAAGTATCAT
CTTTTGAAAAGCAAATAGCCAACCCCAGTACACCCTCTGAAAAAAAAGAGCCGAGGA
GTGTGGCCCATTTAACAGGGAACCCCCACTCAAGGTCCATCCCTCTGGAATGGGAAGA
CACATATGGAACCGCTCTGATCTCTGGAGTGAAGTATAAGAAAGGTGGCCTTGTGATC
AACGAAACTGGGTTGTACTTCGTGTATTCCAAAGTATACTTCCGGGGTCAGTCTTGCA
ACAACCAGCCCCTAAACCACAAGGTCTATATGAGGAACTCTAAGTATCCTGAGGATCT
GGTGCTAATGGAGGAGAAGAGGTTGAACTACTGCACTACTGGACAGATATGGGCCCA
CAGCAGCTACCTGGGGGCAGTATTCAATCTTACCAGTGCTGACCATTTATATGTCAAC
ATATCTCAACTCTCTCTGATCAATTTTGAGGAATCTAAGACCTTTTTCGGCTTGTATAA
GCTTGGCTCGAGT*CATCATCATCATCATCAT*TAATAA

[配列番号：201]

四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=1であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはマウスFas-Lをコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのHisタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンの直列型ペアである。

【０２１４】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSQQPMNYPCPQIFWVDSSATSSWA
PPGSVFPCPSCGPRGPDQRRPPPPPPPVSPLPPPSQPLPLPPLTPLKKKDHNTNLWLPVVFFM
VLVALVGMGLGMYQLFHLQKELAELREFTNQSLKVSSFEKQIANPSTPSEKKEPRSVAHLT
GNPHSRSIPLEWEDTYGTALISGVKYKKGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNQPLNHK
VYMRNSKYPEDLVLMEEKRLNYCTTGQIWAHSSYLGAVFNLTSADHLYVNISQLSLINFE
ESKTFFGLYKLGSSHHHHHH

[配列番号：202]

【０２１５】

実施例12

自己合体ヒトFas-L構築物

自己合体ヒトFas-リガンドは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATG*GCTTGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGT*GGCTCGAGTCAGCAGCCCTTCAA
TTACCCATATCCCCAGATCTACTGGGTGGACAGCAGTGCCAGCTCTCCCTGGGCCCCTC
CAGGCACAGTTCTTCCCTGTCCAACCTCTGTGCCCAGAAGGCCTGGTCAAAGGAGGCC
ACCACCACCACCGCCACCGCCACCACTACCACCTCCGCCGCCGCCGCCACCACTGCCT
CCACTACCGCTGCCACCCCTGAAGAAGAGAGGGAACCACAGCACAGGCCTGTGTCTCC
TTGTGATGTTTTTCATGGTTCTGGTTGCCTTGGTAGGATTGGGCCTGGGGATGTTTCAG
CTCTTCCACCTACAGAAGGAGCTGGCAGAACTCCGAGAGTCTACCAGCCAGATGCACA
CAGCATCATCTTTGGAGAAGCAAATAGGCCACCCCAGTCCACCCCCTGAAAAAAAGG
AGCTGAGGAAAGTGGCCCATTTAACAGGCAAGTCCAACTCAAGGTCCATGCCTCTGGA
ATGGGAAGACACCTATGGAATTGTCCTGCTTTCTGGAGTGAAGTATAAGAAGGGTGGC
CTTGTGATCAATGAAACTGGGCTGTACTTTGTATATTCCAAAGTATACTTCCGGGGTCA
ATCTTGCAACAACCTGCCCCTGAGCCACAAGGTCTACATGAGGAACTCTAAGTATCCC
CAGGATCTGGTGATGATGGAGGGGAAGATGATGAGCTACTGCACTACTGGGCAGATG
TGGGCCCGCAGCAGCTACCTGGGGGCAGTGTTCAATCTTACCAGTGCTGATCATTTAT
ATGTCAACGTATCTGAGCTCTCTCTGGTCAATTTTGAGGAATCTCAGACGTTTTTCGGC
TTATATAAGCTCGGCTCGAGTGGATCCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGATCCA
CCGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACAAA
GAAATAATAA

[配列番号：203]

太型字体のヌクレオチドは翻訳開始コドンであり、イタリック体のヌクレオチドは、精製を容易にするためのStrepタグをコードし、二重の下線の引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、標準型字体のヌクレオチドはヒトFas-Lをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=2であるスペーサー3をコードし、四角で囲われたヌクレオチドはSCE-Cをコードする。

【０２１６】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MAWRHPQFGGGSSQQPFNYPYPQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCPTSVPRRPGQ
RRPPPPPPPPPLPPPPPPPPLPPLPLPPLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLGMFQLF
HLQKELAELRESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNSRSMPLEWEDTY
GIVLLSGVKYKKGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHKVYMRNSKYPQDLVMM
EGKMMSYCTTGQMWARSSYLGAVFNLTSADHLYVNVSELSLVNFEESQTFFGLYKLGSS
GSGGGGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：204]

【０２１７】

実施例13

ヘテロ凝集体を形成するためのN-SCEを含むマウスFasLおよびSCE-Cを含むマウスIL-2

自己合体マウスFas-リガンド/IL-2ヘテロ凝集体は、実施例9および11に記載されている核酸構築物を含む発現ベクターの細胞(例えば、大腸菌、CHO細胞など)への共トランスフェクション、ならびにストレプトアビジンカラムおよび結果的にヘテロ凝集体のみの精製を保証しうるNi-キレートカラムを通しての発現されたポリペプチド産物の精製により作製される。

【０２１８】

両方の組換えタンパク質は、大腸菌において産生される。精製後、N-SCE-マウスFas-LおよびマウスIL-2-SCE-Cのいずれのすでに形成された凝集体も超音波処理/ツイーン20処理により解体され、共凝集を可能にするようにいっしょに混合される。

【０２１９】

実施例14

自己合体HEL構築物

自己合体HELは、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATG*GACTACAAGGACGATGACGACAAG*GGCTCGAGTAGGTCTTTGCTAATCTTG
GTGCTTTGCTTCCTGCCCCTGGCTGCTCTGGGGAAAGTCTTTGGACGATGTGAGCTGGC
AGCGGCTATGAAGCGTCACGGACTTGATAACTATCGGGGATACAGCCTGGGAAACTG
GGTGTGTGTTGCAAAATTCGAGAGTAACTTCAACACCCAGGCTACAAACCGTAACACC
GATGGGAGTACCGACTACGGAATCCTACAGATCAACAGCCGCTGGTGGTGCAACGAT
GGCAGGACCCCAGGCTCCAGGAACCTGTGCAACATCCCGTGCTCAGCCCTGCTGAGCT
CAGACATAACAGCGAGCGTGAACTGCGCGAAGAAGATCGTCAGCGATGGAAACGGCA
TGAGCGCGTGGGTCGCCTGGCGCAACCGCTGCAAGGGTACCGACGTCCAGGCGTGGA
TCAGAGGCTGCCGGCTGGGCTCGAGTGGATCCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGG
TAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGATCCACCGCTATC
GCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCACAAAGAAATAAT
AA

[配列番号：205]

太型字体のヌクレオチドは翻訳開始コドンであり、イタリック体のヌクレオチドは、精製を容易にするためのFlagタグをコードし、二重の下線の引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、標準型字体のヌクレオチドはHELをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=5であるスペーサー3をコードし、四角で囲われたヌクレオチドはSCE-Cをコードする。

【０２２０】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MDYKDDDDKGSSRSLLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYS
LGNWVCVAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALL
SSDITASVNCAKKIVSDGNGMSAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCRLGSSGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：206]

【０２２１】

実施例15

自己合体マウスMCP-1構築物

自己合体マウスMCP-1は、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGCTCGAGTAAGATTTCCACACTTCTATGCCTCCTGCTCATA
GCTACCACCATCAGTCCTCAGGTATTGGCTGGACCAGATGCGGTGAGCACCCCAGTCA
CGTGCTGTTATAATGTTGTTAAGCAGAAGATTCACGTCCGGAAGCTGAAGAGCTACAG
GAGAATCACAAGCAGCCAGTGTCCCCGGGAAGCTGTGATCTTCAGGACCATACTGGAT
AAGGAGATCTGTGCTGACCCCAAGGAGAAGTGGGTTAAGAATTCCATAAACCACTTG
GATAAGACGTCTCGAACGGGCTCGAGTGCTTGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGTTAAT
AA

[配列番号：211]

四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=0であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはマウスMCP-1をコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのStrepタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンの直列型ペアである。

【０２２２】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSKISTLLCLLLIATTISPQVLAGPDAVSTPV
TCCYNVVKQKIHVRKLKSYRRITSSQCPREAVIFRTILDKEICADPKEKWVKNSINHLDKTS
RTGSSAWRHPQFGG

[配列番号：212]

【０２２３】

実施例16

自己合体ヒトMCP-1構築物

自己合体ヒトMCP-1は、以下の核酸配列を発現させる適する発現系を用いて産生可能である：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCG
TAGCGCAGGCCGGATCCGGCTCGAGTAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTGCT
CATAGCAGCCACCTTCATTCCCCAAGGGCTCGCTCAGCCAGATGCAATCAATGCCCCA
GTCACCTGCTGTTATAACTTCACCAATAGGAAGATCTCAGTGCAGAGGCTCGCGAGCT
ATAGAAGAATCACCAGCAGCAAGTGTCCCAAAGAAGCTGTGATCTTCAAGACCATTGT
GGCCAAGGAGATCTGTGCTGACCCCAAGCAGAAGTGGGTTCAGGATTCCATGGACCA
CCTGGACAAGCAAACCCAAACTCCGAAGACTGGCTCGAGT*CATCATCATCATCATCAT*T
AATAA

[配列番号：213]
四角で囲われたヌクレオチドはN-SCEをコードし、下線の引かれたヌクレオチドは、n=0であるスペーサー1をコードし、標準型字体のヌクレオチドはヒトMCP-1をコードし、二重の下線を引かれたヌクレオチドはスペーサー2をコードし、イタリック体のヌクレオチドは精製を容易にするためのHisタグをコードし、太型字体のヌクレオチドは、翻訳終結コドンである。

【０２２４】

上の構築物の、例えば、大腸菌における発現は、以下の配列を有するポリペプチドを産生する：

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSKVSAALLCLLLIAATFIPQGLAQPDAINAP
VTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDK
QTQTPKTGSSHHHHHH

[配列番号：214]

【０２２５】

実施例17

化学合成されたキメラペプチド構築物

化学合成されたキメラペプチド構築物は、以下の一般式に従って構築されうる：

1. N-SCE2－スペーサー1－対象となるペプチド (XIV); および
2. 対象となるペプチド－スペーサー3－SCE-C (XV)

N-SCE2はKKTAIAIAVALAGFATVAQA

[配列番号：215]；
SCE-Cは実施例2に定義されているとおりである；
スペーサー1および3は、実施例2に定義されているとおりである；ならびに
対象となるペプチドは、例えば、代謝性ペプチド、サイトカインペプチド、サイトカイン受容体由来ペプチド、エフェクターペプチドおよび抗原性ペプチドから選択可能である。

【０２２６】

実施例18

合成自己合体ヒトACTHキメラペプチド

自己合体ヒトACTHペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSSYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVY
PNGAEDESAEAFPLEF

[配列番号：216]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であ

り、標準型字体の残基はヒトACTHペプチドである。

【０２２７】

実施例19

合成自己合体マウスACTHキメラペプチド

自己合体マウスACTHペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYPNVAENESAEAFPLEFGSSGSTAIAIAVALA GFATVAQATKK

[配列番号：217]

標準型字体の残基はマウスACTHペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２２８】

実施例20

合成自己合体α-MSHキメラペプチド

自己合体α-MSHペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

SYSMEHFRWGKPVGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：218]

標準型字体の残基はα-MSHペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２２９】

実施例21

合成自己合体ヒトβ-MSHキメラペプチド

自己合体β-MSHペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSAEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD

[配列番号：219]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトβ-MSHペプチドである。

【０２３０】

実施例22

合成自己合体マウスβ-MSHキメラペプチド

自己合体β-MSHペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

AEKDDGPYRVEHFRWSNPPKDGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：220]

標準型字体の残基はマウスβ-MSHペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２３１】

実施例23

合成自己合体γ-MSHキメラペプチド

自己合体γ-MSHペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSYVMGHFRWDRFG

[配列番号：221]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトγ-MSHペプチドである。

【０２３２】
実施例24
合成自己合体アンジオテンシンIキメラペプチド
自己合体アンジオテンシンIペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSDRVYIHPFHL

[配列番号：222]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はアンジオテンシンIペプチドである。
【０２３３】
実施例25
合成自己合体アンジオテンシンIIキメラペプチド
自己合体アンジオテンシンIIペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

DRVYIHPFGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：223]
標準型字体の残基はアンジオテンシンIIペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。
【０２３４】
実施例25
合成自己合体アンジオテンシンIIIキメラペプチド
自己合体アンジオテンシンIIIペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSRVYIHPF

[配列番号：224]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はアンジオテンシンIIIペプチドである。
【０２３５】
実施例26
合成自己合体ヒト成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)キメラペプチドI
自己合体ヒト成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

YFDAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRGSSGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：225]
標準型字体の残基はヒトGHRHペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである、かつGHRHペプチドの1位でのTyrはアセチル化され、2位でのPheはD-異性体型であり、20位でのArgはアミド化されている。
【０２３６】
実施例27
合成自己合体ヒトGHRHキメラペプチドII
自己合体ヒト成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARLGSSGSTAIAIA
VALAGFATVAQATKK

[配列番号：226]
標準型字体の残基はヒトGHRHペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペー

サー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２３７】

実施例28

合成自己合体マウスGHRHキメラペプチド

自己合体マウス成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSHVDAIFTTNYRKLLSQLYARKVIQDIMNKQ GERIQEQRARLS

[配列番号：227]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はマウスGHRHペプチドである。

【０２３８】

実施例29

合成自己合体ヒトIL-1βキメラペプチドI

自己合体ヒトIL-1βペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

VQGEESNDKGSSGSTAIAIAVALA GFATVAQATKK

[配列番号：228]

標準型字体の残基はヒトIL-1β(アミノ酸163位～171位)ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２３９】

実施例30

合成自己合体ヒトIL-1βキメラペプチドII

自己合体ヒトIL-1βペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESV DPKNYP

[配列番号：229]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトIL-1β(アミノ酸178位～207位)ペプチドである。

【０２４０】

実施例31

合成自己合体ヒトIL-2キメラペプチドI

自己合体ヒトIL-2ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSEYADETATIVEFL

[配列番号：230]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトIL-2(126位～138位)由来ペプチドである。

【０２４１】

実施例32

合成自己合体ヒトIL-2キメラペプチドII

自己合体ヒトIL-2ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

ILNGINNYKNPKLGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：231]

標準型字体の残基はヒトIL-2(44位～56位)由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２４２】
実施例33
合成自己合体ヒトIL-2キメラペプチドIII
自己合体ヒトIL-2ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSLTFKFYMPKKA

[配列番号：232]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトIL-2(60位～70位)由来ペプチドである。
【０２４３】
実施例34
合成自己合体ヒトTNF-αキメラペプチドI
自己合体ヒトTNF-αペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

SPLAQAVRSSSRGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：233]
標準型字体の残基はヒトTNF-α(アミノ酸71位～82位)由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。
【０２４４】
実施例35
合成自己合体ヒトTNF-αキメラペプチドII
自己合体ヒトTNF-αペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANAL

[配列番号：234]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はTNF-α(10位～36位)由来ペプチドである。
【０２４５】
実施例36
合成自己合体ヒトTNF-αキメラペプチドIII
自己合体ヒトTNF-αペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

RRANALLANGVELRDGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：235]
標準型字体の残基はTNF-α(31位～45位)由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。
【０２４６】
実施例37
合成自己合体ヒトCys-BAFF-Rキメラペプチド I
自己合体ヒトCys-BAFF受容体ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

CLRGASSAEAPDGDKDAPEPLDKGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：236]
標準型字体の残基はヒトCys-BAFF-R(アミノ酸108位～129位)由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。
【０２４７】
実施例38

合成自己合体ヒトCys-BAFF-RキメラペプチドII

自己合体ヒトCys-BAFF受容体ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSCHSVPVPATELGSTELVTTKTAGPE

Q

[配列番号：237]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトCys-BAFF-R(アミノ酸159位～183位)由来ペプチドである。

【０２４８】

実施例39

合成自己合体ヒトP55-TNF-Rキメラペプチド

自己合体ヒトP55-TNF受容体ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSLPQIENVKGTED

[配列番号：238]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトP55-TNF-R由来ペプチドである。

【０２４９】

実施例40

合成自己合体ヒトP75-TNF-Rキメラペプチド

自己合体ヒトP75-TNF受容体ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

SMAPGAVHLPQPDRVYIHPFGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：239]

標準型字体の残基はヒトP75-TNF-R由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２５０】

実施例41

合成自己合体IL-6-Rキメラペプチド

自己合体ヒトIL-6受容体ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

TSLPVQDSSSVPGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：240]

標準型字体の残基はヒトIL-6-R由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。

【０２５１】

実施例42

合成自己合体L-セレクチンキメラペプチド

自己合体ヒトL-セレクチンペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGGGGSGSSCQKLDKSFSMIK

[配列番号：241]

四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=2であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトL-セレクチン由来ペプチドである。

【０２５２】

実施例43

合成自己合体MUC-1キメラペプチド

腫瘍抗原ワクチンの調製に有用である自己合体ヒトMUC-1(ムチン-1)ペプチドは、以下

のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH

[配列番号：242]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はヒトMUC-1ペプチドである。
【０２５３】
実施例44
合成自己合体卵白アルブミンキメラペプチドI
免疫増強組成物の調製に有用である自己合体卵白アルブミン(OVA)ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

ISQAVHAAHAEINEAGRGSSGSGGGGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：243]
標準型字体の残基はOVA(アミノ酸323位～339位)由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。
【０２５４】
実施例45
合成自己合体卵白アルブミンキメラペプチドII
免疫増強組成物の調製に有用である自己合体卵白アルブミン(OVA)ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSSIINFEKL

[配列番号：244]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はOVA(アミノ酸257位～264位)由来ペプチドである。
【０２５５】
実施例46
合成自己合体HIV gp120キメラペプチドI
免疫増強組成物の調製に有用である自己合体HIV gp120ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

YNAKRKRIHIQRGPGRAFYTTKNIIGSSGSTAIAIAVALAGFATVAQATKK

[配列番号：245]
標準型字体の残基はHIV gp120由来ペプチドであり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、四角で囲まれた残基はSCE-Cである。
【０２５６】
実施例47
合成自己合体HIV gp120キメラペプチドII
免疫増強組成物の調製に有用である自己合体HIV gp120ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGSSNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIG

[配列番号：246]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=0であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はHIV gp120(アミノ酸307位～331位)由来ペプチドである。

【０２５７】
実施例48
合成自己合体HIV gp120キメラペプチドIII
免疫増強組成物の調製に有用である自己合体HIV gp120ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

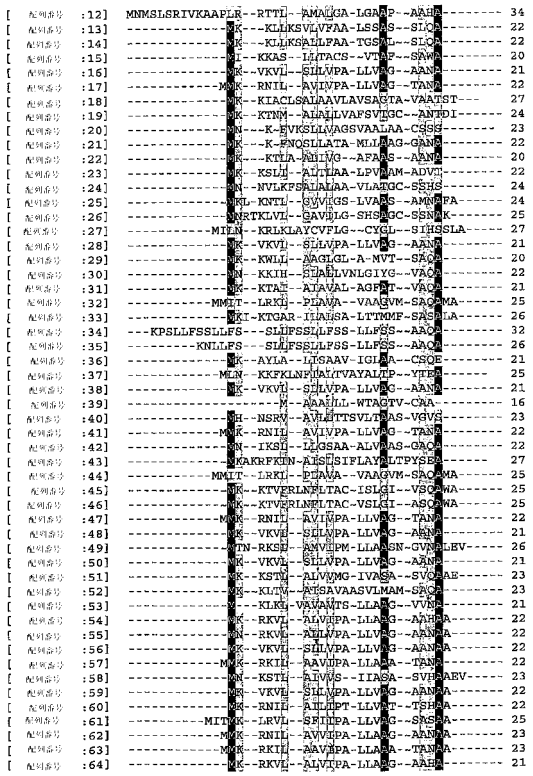
KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSCGKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKR

[配列番号：247]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はHIV gp120由来ペプチドである。
【０２５８】
実施例49
合成自己合体HIV gp41キメラペプチド
免疫増強組成物の調製に有用である自己合体HIV gp41ペプチドは、以下のアミノ酸配列で以て化学合成される：

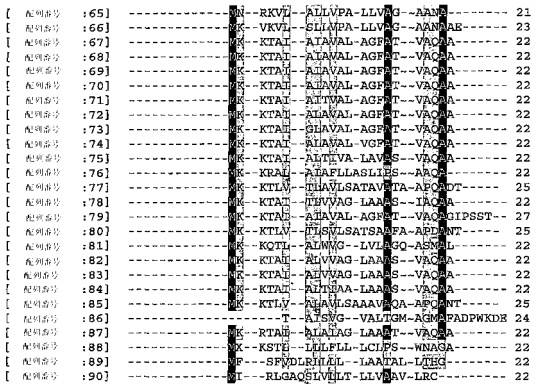
KKTAIAIAVALAGFATVAQAGSGGGGSGSSRVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQ
VCHTTVPWVNDS-NH2

[配列番号：248]
四角で囲まれた残基はN-SCE2であり、下線の引かれた残基は、n=1であるスペーサー1であり、標準型字体の残基はHIV gp41由来ペプチドである。
【０２５９】
本明細書に引用されているあらゆる特許、特許出願および刊行物の開示は、これにより、完全に参照として本明細書に組み入れられている。
【０２６０】
本明細書でのいずれの参照文献の引用も、そのような参照文献が本出願に対する「先行技術」として有効であるという承認として解釈されるべきではない。
【０２６１】
明細書を通じて、目的は、本発明をいずれの一つの態様または特徴の特定の収集にも限定することなく、本発明の好ましい態様を記載することである。それゆえに、当業者は、本開示に鑑みて、様々な改変および変化が、本発明の範囲から逸脱することなく、例示された特定の態様になされうることを認識しているものと思われる。すべてのそのような改変および変化は、添付された特許請求の範囲内に含まれるものである。
【図面の簡単な説明】
【０２６２】
【図１】種の多様な選択由来の膜転位置アミノ酸配列のアラインメントを示す図式表示である。
【図２】細菌の外膜タンパク質のアラインメントを示す図式表示である。

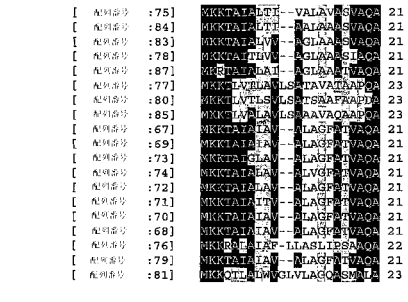
【図１－１】



【図１－２】



【図２】



【配列表】

2005528107000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年2月2日(2005.2.2)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

単離または精製されたより高次の凝集体ならびに担体もしくはアジュバンドを含む組成物であって、該凝集体は、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる、および対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、かつ個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：融合タンパク質の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外である、組成物。

【請求項２】

自己合体エレメントが長さが約8個から約35個のアミノ酸残基である、請求項1記載の組成物。

【請求項３】

自己合体エレメントのアミノ酸配列が約60 %から約95 %の小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはそれらの修飾型を有する、請求項1記載の組成物。
【請求項４】
自己合体エレメントが膜転位置配列である、請求項1記載の組成物。
【請求項５】
膜転位置配列が、生理的条件下でより高次の凝集体へ凝集する能力をもつ、天然に存在するシグナル配列またはその変異体である、請求項4記載の組成物。
【請求項６】
膜転位置配列が細菌、放線菌、ウイルス、原生動物、酵母、植物および動物からなる群より選択される生物体から得られる、請求項4記載の組成物。
【請求項７】
膜転位置配列が昆虫、鳥、爬虫類、魚および哺乳動物からなる群より選択される動物から得られる、請求項4記載の組成物。
【請求項８】
膜転位置配列が細菌から得られる、請求項4記載の組成物。
【請求項９】
膜転位置配列が配列番号：12～90およびそれらの生物学的活性断片からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の組成物。
【請求項１０】
膜転位置配列が配列番号：67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、83、84、85および87ならびにそれらの生物学的活性断片からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の組成物。
【請求項１１】
膜転位置配列が配列番号：91～132からなる群より選択される配列に少なくとも低ストリンジェント性条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の組成物。
【請求項１２】
膜転位置配列が配列番号：126～132からなる群より選択される配列に少なくとも低ストリンジェント性条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項8記載の組成物。
【請求項１３】
対象となる分子が薬物、代謝産物、殺虫剤および除草剤からなる群より選択される有機化合物である、請求項1記載の組成物。
【請求項１４】
対象となる分子が有機ポリマーである、請求項1記載の組成物。
【請求項１５】
有機ポリマーがポリペプチドおよびポリヌクレオチドからなる群より選択される、請求項14記載の組成物。
【請求項１６】
対象となる分子が酵素、受容体、抗原結合分子、リガンド結合ポリペプチド、金属結合ポリペプチド、集光性ポリペプチド、光スペクトル改変ポリペプチド、制御ポリペプチド、ケモカイン、サイトカイン、インターロイキン、成長因子、インターフェロン、代謝性ポリペプチド、免疫増強ポリペプチド、免疫抑制ポリペプチド、血管形成性ポリペプチド、抗血管形成性ポリペプチド、抗原性ポリペプチドおよびそれらの生物学的活性断片からなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1記載の組成物。
【請求項１７】
対象となる分子がサイトカイン、成長因子およびホルモンからなる群より選択されるポリペプチドである、請求項1記載の組成物。
【請求項１８】
ポリペプチドがインターフェロン-α、インターフェロン-β、インターフェロン-γ、

インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターロイキン-12、インターロイキン-13、インターロイキン-14、インターロイキン-15、インターロイキン-16、エリスロポエチン、コロニー刺激因子-1、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、白血病抑制因子、腫瘍壊死因子、リンホトキシン、血小板由来成長因子、線維芽細胞成長因子、血管内皮細胞成長因子、上皮細胞成長因子、トランスフォーミング成長因子-β、トランスフォーミング成長因子-α、トロンボポエチン、幹細胞因子、オンコスタチンM、アンフィレギュリン、ミュラー管阻害物質、B細胞成長因子、マクロファージ遊走阻止因子、単球化学誘引物質タンパク質、エンドスタチンおよびアンジオスタチン、ならびにそれらの生物学的活性断片からなる群より選択される、請求項17記載の組成物。

【請求項１９】

対象となる分子がポリペプチド抗原である、請求項1記載の組成物。

【請求項２０】

ポリペプチド抗原がウイルス抗原、細菌抗原、原生動物抗原、微生物抗原、腫瘍抗原および自己抗原からなる群より選択される、請求項19記載の組成物。

【請求項２１】

ポリペプチド抗原がヒト免疫不全ウイルス(HIV)、パピローマウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルス、ラウス肉腫ウイルス、脳炎を引き起こすウイルス、ヘルペスウイルスおよび肝炎ウイルスからなる群より選択されるウイルス由来である、請求項19記載の組成物。

【請求項２２】

ポリペプチド抗原がナイセリア(Neisseria)種、髄膜炎菌の(Meningococcal)種、ヘモフィルス(Haemophilus)種、サルモネラ(Salmonella)種、連鎖球菌の(Streptococcal)種、レジオネラ(Legionella)種およびマイコバクテリウム(Mycobacterium)種からなる群より選択される細菌由来である、請求項19記載の組成物。

【請求項２３】

ポリペプチド抗原がプラスモディウム(Plasmodium)種、住血吸虫(Schistosoma)種、リーシュマニア(Leishmania)種、トリパノソーマ(Trypanosoma)種、トキソプラズマ(Toxoplasma)種およびジアルジア(Giardia)種からなる群より選択される原生動物由来である、請求項19記載の組成物。

【請求項２４】

ポリペプチド抗原が黒色腫、肺癌、乳癌、子宮頚癌、前立腺癌、大腸癌、膵癌、胃癌、膀胱癌、腎臓癌、移植後リンパ球増殖性疾患(PTLD)およびホジキンリンパ腫からなる群より選択される癌または腫瘍由来である、請求項19記載の組成物。

【請求項２５】

対象となる分子が化合物吸収ポリペプチド、化合物結合ポリペプチド、化合物取り込みポリペプチド、化合物排出ポリペプチド、化合物分配ポリペプチド、化合物輸送ポリペプチド、化合物処理ポリペプチド、化合物転化ポリペプチドおよび化合物分解ポリペプチドからなる群より選択される代謝性ポリペプチドである、請求項1記載の組成物。

【請求項２６】

代謝性ポリペプチドが薬物代謝ポリペプチド、薬物結合ポリペプチド、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸シンセターゼ、グルタミンシンセターゼ、グリコーゲンシンセターゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ、グルコキナーゼ、インスリン、ピルビン酸キナーゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、脂肪酸シンセターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フェリチン、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、P450酵素およびアルコールデヒドロゲナーゼからなる群より選択される、請求項25記載の組成物。

【請求項２７】

対象となる分子がT細胞エピトープ、B細胞エピトープ、サイトカインペプチド、ケモカインペプチド、神経ペプチド、抗炎症性ペプチドおよび受容体リガンドペプチドからなる群より選択されるペプチドである、請求項1記載の組成物。
【請求項２８】
対象となる分子がホルモンである、請求項1記載の組成物。
【請求項２９】
ホルモンが成長ホルモン、性ホルモン、甲状腺ホルモン、下垂体ホルモンおよびメラニン細胞刺激ホルモンからなる群より選択される、請求項28記載の組成物。
【請求項３０】
ホルモンがエストロゲン、抗エストロゲン、プロゲスチン、抗プロゲスチン、アンドロゲンおよび抗アンドロゲンからなる群より選択される、請求項28記載の組成物。
【請求項３１】
ホルモンがトリヨードサイロニン、サイロキシン、プロピルチオウラシル、メチマゾールおよびヨージキソドからなる群より選択される甲状腺ホルモンである、請求項28記載の組成物。
【請求項３２】
ホルモンがガストリン、グルカゴン、セクレチン、コレシストキニン、胃抑制ペプチド、血管作動性腸ペプチド、サブスタンスP、グルカゴン様免疫反応性ペプチド、ソマトスタチン、ボンベシンおよびニューロテンシンからなる群より選択される胃腸ホルモンである、請求項28記載の組成物。
【請求項３３】
ホルモンがコルチコトロピン、スムトトロピン、オキシトシンおよびバソプレシンからなる群より選択される下垂体ホルモンである、請求項28記載の組成物。
【請求項３４】
ホルモンが副腎皮質刺激ホルモン、アルドステロン、コルチゾール、コルチコステロン、デオキシコルチコステロンおよびデヒドロエピアンドロステロンからなる群より選択される副腎皮質ホルモンである、請求項28記載の組成物。
【請求項３５】
ホルモンがプレドニゾン、ベータメタゾン、ベタメタゾン、コルチゾン、デキサメタゾン、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、酢酸パラメタゾン、プレドニゾロンおよびトリアムシノロン　フルドロコルチゾンからなる群より選択される、請求項28記載の組成物。
【請求項３６】
同一のまたは実質的に類似した、対象となる分子を含む、請求項1記載の組成物。
【請求項３７】
対象となる異なる分子を含む、請求項1記載の組成物。
【請求項３８】
キメラ分子が化学合成により形成される、請求項1記載の組成物。
【請求項３９】
自己合体エレメントが化学的架橋により対象となる分子に共有結合的に付着している、請求項1記載の組成物。
【請求項４０】
自己合体エレメントが化学的架橋剤を用いて対象となる分子に化学的架橋される、請求項39記載の組成物。
【請求項４１】
自己合体エレメントがホモ二官能性架橋剤を用いて対象となる分子に化学的架橋される、請求項39記載の組成物。
【請求項４２】
自己合体エレメントがヘテロ二官能性架橋剤を用いて対象となる分子に化学的架橋される、請求項39記載の組成物。

【請求項４３】
キメラ分子が組換え手段により形成される、請求項1記載の組成物。
【請求項４４】
キメラ分子のより高次の凝集体への自己集合において、対象となる分子が凝集体の外部に露出されるように、自己合体エレメントが対象となる分子に付着している、請求項1記載の組成物。
【請求項４５】
自己合体エレメントがリンカーまたはスペーサー分子により対象となる分子から間隔をあけられている、請求項1記載の組成物。
【請求項４６】
対象となる分子の本来の折り畳みが促進するように、リンカーまたはスペーサー分子が対象となる分子を自己合体エレメントから間隔を十分にあける、請求項45記載の組成物。
【請求項４７】
キメラ分子が他のキメラ分子と凝集体を形成する場合、対象となる分子が所望の活性を保持するように、リンカーまたはスペーサー分子が対象となる分子を自己合体エレメントから十分に間隔をあける、請求項45記載の組成物。
【請求項４８】
リンカーまたはスペーサー分子が長さが約1個から約100個の原子である、請求項45記載の組成物。
【請求項４９】
リンカーまたはスペーサー分子が長さが約1個から約50個のアミノ酸残基である、請求項45記載の組成物。
【請求項５０】
リンカーまたはスペーサー分子が配列番号：167、169、171、173、175、179、181および183からなる群より選択されるアミノ酸配列である、請求項45記載の組成物。
【請求項５１】
単離または精製されたより高次の凝集体ならびに担体もしくはアジュバンドを含む組成物であって、該凝集体は、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる、および対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、かつ個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：融合タンパク質の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外であり、かつ該自己合体エレメントが以下の式により表される、組成物：

$$B_1\text{–}X_1\,[X_j]_n\,X_2\,X_3\,X_4\,X_5\,[X_k]_n\,X_6\,[X_l]_n\,X_7\,X_8\,X_9\text{–}Z_1 \qquad (I)$$

[配列番号：1]
式中：
B_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約50個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_1は、疎水性、小型、中性もしくは塩基性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_j]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは0個から2個のアミノ酸残基であり、配列X_jは、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_2は、疎水性、小型もしくは極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_3は、疎水性、小型もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_4は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；

X_5は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_k]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは4個から6個のアミノ酸残基であり、配列X_kは、疎水性、小型、極性もしくは中性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_6は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
$[X_l]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは2個から4個のアミノ酸残基であり、配列X_lは、疎水性、小型もしくは極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_7は、疎水性、小型、荷電もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_8は、中性/極性、荷電、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_9は、選択的であり、存在する場合、小型もしくは荷電のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
Z_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約50個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【請求項５２】
B_1が存在する場合、それが約1個から約20個のアミノ酸残基の配列である、請求項51記載の組成物。

【請求項５３】
B_1が存在する場合、それが以下の式により表される、請求項51記載の組成物：
$B_2J_1[X_i]_n$ (II) [配列番号：2]
式中：
B_2は、存在しない、または、J_1もまた存在する条件下で、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約15個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
J_1は、存在しない、または、$[X_i]_n$もまた存在する条件下で、疎水性、荷電、中性/極性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；および
$[X_i]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは2個から5個のアミノ酸残基であり、配列X_iは、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。

【請求項５４】
J_1がPheもしくはIleから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項53記載の組成物。

【請求項５５】
J_1がHis、Lysもしくは Argから選択される塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項53記載の組成物。

【請求項５６】
J_1がAsnまたはその修飾型である、請求項53記載の組成物。

【請求項５７】
J_1がSerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項53記載の組成物。

【請求項５８】
$[X_i]_n$が以下の式により表される、請求項53記載の組成物：
$O_1O_2O_3O_4O_5$ (III) [配列番号：3]
式中：
O_1～O_5の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：
O_1は、疎水性、荷電、中性/極性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_2は、小型もしくは塩基性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_3は、荷電、中性/極性、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；

O_4は、荷電、中性/極性、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
O_5は、荷電、中性/極性、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項５９】
$[X_i]_n$が以下の式により表される、請求項53記載の組成物または使用：
$O_1O_2O_3O_4O_5$ (III) [配列番号：3]
式中：
O_1～O_5の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：
O_1は、Leu、Ile、Arg、AsnもしくはAlaまたはその修飾型から選択される；
O_2は、ThrもしくはLysまたはその修飾型から選択される；
O_3は、Arg、Lys、Asn、Ile、Val、LeuもしくはAlaまたはその修飾型から選択される；
O_4は、Arg、Lys、Gln、Asn、Phe、Ile、Val、Leu、Ala、Gly、Ser、Thrまたはその修飾型から選択される；および
O_5は、Arg、Lys、Asn、Phe、Ile、Val、Leu、Ala、Gly、Ser、Thrまたはその修飾型から選択される。
【請求項６０】
X_1がLeu、Met、Phe、IleもしくはValから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項６１】
X_1がGly、Ala、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項６２】
X_1がCys、LysもしくはHisまたはその修飾型から選択される、請求項51記載の組成物。
【請求項６３】
$[X_j]_n$がAla、Arg、AsnもしくはValまたはその修飾型から選択される単一のアミノ酸残基である、請求項51記載の組成物。
【請求項６４】
$[X_j]_n$が2個のアミノ酸残基の配列であり、第一アミノ酸残基がLys、Asp、Leu、Asn、Ala、ValもしくはPheまたはその修飾型から選択され、かつ第二アミノ酸残基がSer、Ala、Lys、Gln、AsnもしくはLeuまたはその修飾型から選択される、請求項51記載の組成物。
【請求項６５】
X_2がVal、Leu、Tyr、IleもしくはPheから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項６６】
X_2がPro、Ala、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項６７】
X_2がAsnもしくはArgまたはその修飾型から選択される、請求項51記載の組成物。
【請求項６８】
X_3がAlaまたはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項６９】
X_3がMet、Leu、Val、IleもしくはPheから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項７０】
X_3がCysまたはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項７１】
X_4がVal、Leu、IleもしくはTrpから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項７２】

X_4がAla、Gly、Serもしくは Thrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項７３】
X_5がAla、Gly、Serもしくは Thrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項７４】
X_5がLeu、Phe、Val、Ileから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項７５】
$[X_k]_n$が以下の式により表される、請求項51記載の組成物：
$B_3O_6O_7O_8O_9B_4$ (IV) [配列番号：4]
式中：
B_3は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_6～O_9の少なくとも2個は存在し、ここにおいて：
O_6は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_7は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_8は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
O_9は、小型、疎水性、塩基性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；ならびに
B_4は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項７６】
B_3がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、Val、Leuもしくは Cysまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の組成物。
【請求項７７】
O_6がAla、Gly、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Metもしくは Cysまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の組成物。
【請求項７８】
O_7がAla、Ser、Pheもしくは Asnまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の組成物。
【請求項７９】
O_8がThr、Ala、Ser、Ile、Leu、Val、Met、Phe、Tyrもしくは Trpまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の組成物。
【請求項８０】
O_9がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、Ile、Leu、Val、Phe、Hisもしくは Cysまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の組成物。
【請求項８１】
B_4がAla、Ser、Thr、Ile、Val、Leu、Met、Tyrもしくは Pheまたはその修飾型から選択される、請求項75記載の組成物。
【請求項８２】
X_6がLeu、Val、Metもしくは Tyrから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項８３】
X_6がPro、Ala、Gly、Serもしくは Thrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項８４】
$[X_l]_n$が以下の式により表される、請求項51記載の組成物：
$B_5O_{10}O_{11}O_{12}$ (V) [配列番号：5]

式中：
B_5は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_{10}～O_{12}の少なくとも1個は存在し、ここにおいて：
O_{10}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
O_{11}は、小型アミノ酸残基である；および
O_{12}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項８５】
B_5がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、Ile、Leu、Val、Phe、MetもしくはGlnまたはその修飾型から選択される、請求項84記載の組成物。
【請求項８６】
O_{10}がGly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Met、Phe、Cys、AsnもしくはGlnまたはその修飾型から選択される、請求項84記載の組成物。
【請求項８７】
O_{11}がProまたはその修飾型である、請求項84記載の組成物。
【請求項８８】
O_{12}がAla、Gly、Ser、Thr、Ile、Leu、Val、Tyr、TrpもしくはCysまたはその修飾型から選択される、請求項84記載の組成物。
【請求項８９】
X_7がLeu、Ile、ValもしくはMetから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９０】
X_7がPro、Ala、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９１】
X_7が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９２】
X_7がAspもしくはArgから選択される塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項91記載の組成物。
【請求項９３】
X_7がAsnまたはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９４】
X_8がGln、AsnもしくはCysから選択される中性/極性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９５】
X_8が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９６】
X_8がHisもしくはGluから選択される塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項95記載の組成物。
【請求項９７】
X_8がVal、MetもしくはTrpから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９８】
X_8がAlaもしくはSerから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項９９】
X_9がAla、Gly、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。

【請求項１００】
X_9が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項51記載の組成物。
【請求項１０１】
X_9が酸性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項100記載の組成物。
【請求項１０２】
X_9がGluまたはその修飾型である、請求項100記載の組成物。
【請求項１０３】
Z_1が以下の式により表される、請求項51記載の組成物：
$J_2J_3J_4Z_2$ (VI) [配列番号：6]
式中：
J_2は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
J_3は、存在しない、または、J_2も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_4は、存在しない、または、J_3も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；および
Z_2は、存在しない、または、J_4も存在する条件下で、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約15個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。
【請求項１０４】
J_2がThrまたはその修飾型である、請求項103記載の組成物。
【請求項１０５】
J_3が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項103記載の組成物。
【請求項１０６】
J_3がLysまたはその修飾型である、請求項103記載の組成物。
【請求項１０７】
J_4が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項103記載の組成物。
【請求項１０８】
J_4がLysまたはその修飾型である、請求項103記載の組成物。
【請求項１０９】
Z_1が少なくとも1個の荷電アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項51記載の組成物。
【請求項１１０】
Z_1が少なくとも1個の塩基性アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項51記載の組成物。
【請求項１１１】
Z_2が少なくとも1個の荷電アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項103記載の凝集体。
【請求項１１２】
Z_2が少なくとも1個の塩基性アミノ酸残基またはその修飾型を含む、請求項103記載の凝集体。
【請求項１１３】
単離または精製されたより高次の凝集体ならびに担体もしくはアジュバンドを含む組成物であって、該凝集体は、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せ、かつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：融合タンパク質の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパ

ク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外であって、かつ該自己合体エレメントが以下の式により表される、組成物：

$$B_2 J_1 [X_i]_n X_1 [X_j]_n X_2 X_3 X_4 X_5 [X_k]_n X_6 [X_l]_n X_7 X_8 X_9 Z_1 \quad (VII)$$

[配列番号：7]
式中：
B_2、J_1および$[X_i]_n$は、請求項53に定義されているとおりである；ならびに$[X_j]_n$、$[X_k]_n$、$[X_l]_n$、X_{1-9}およびZ_1は、請求項51に定義されているとおりである。
【請求項１１４】
単離または精製されたより高次の凝集体ならびに担体もしくはアジュバンドを含む組成物であって、該凝集体は、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せ、かつ対象となる分子と融合、連結または異なる方法で会合している少なくとも1つの自己合体エレメントを各キメラ分子が含み、個々のキメラ分子が凝集に好都合な条件下で該または各自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、複数のキメラ分子を含む単離または精製されたより高次の凝集体であって、該凝集体の少なくとも1つのキメラ分子は：融合タンパク質の触媒性産物がB細胞有糸分裂生起を誘発することができる、B細胞表面免疫グロブリン結合ドメインおよびシグナルペプチドを含むB細胞活性化融合タンパク質；ならびにプロテインLおよびompAを含む融合タンパク質、からなる群より選択されるキメラ分子以外であって、かつ該自己合体エレメントが以下の式により表される、組成物：

$$B_1\text{–}X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 [X_m]_n X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16}\text{–}Z_1 \quad (VIII)$$

[配列番号：8]
式中：
B_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約5個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸を含む；
X_1は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_2は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_3は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_4は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；
X_5は、疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である；および
$[X_m]_n$は、n個のアミノ酸残基の配列であり、nは約0個から約2個のアミノ酸残基であり、配列X_mは、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される、同じまたは異なるアミノ酸残基を含む；
X_6は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_7は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_8は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_9は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{10}は、疎水性、小型もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{11}は、小型、疎水性もしくは中性/極性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{12}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{13}は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{14}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{15}は、中性/極性、酸性もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型である；
X_{16}は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；および
Z_1は、存在しない、またはn個のアミノ酸残基の配列であり、nは約1個から約20個のアミノ酸残基であり、配列は、任意のアミノ酸残基から選択される同じまたは異なるアミノ酸残基を含む。
【請求項１１５】

B_1が存在する場合、それが以下の式により表される、請求項114記載の組成物：
$J_1J_2J_3J_4J_5$ (IX) [配列番号：9]
式中：
J_1は、存在しない、または、J_2も存在する条件下で、疎水性アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_2は、存在しない、または、J_3も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_3は、存在しない、または、J_4も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；
J_4は、存在しない、または、J_5も存在する条件下で、小型、荷電もしくは中性/極性のアミノ酸残基、もしくはその修飾型から選択される；および
J_5は、存在しない、または、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基、もしくはその修飾型から選択される。

【請求項１１６】
J_1がMetまたはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１１７】
J_2が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１１８】
J_2がLysまたはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１１９】
J_3が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２０】
J_3がLysもしくはArgまたはその修飾型から選択される、請求項115記載の組成物。

【請求項１２１】
J_4がThrまたはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２２】
J_4が荷電アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２３】
J_4が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２４】
J_4がLysもしくはArgまたはその修飾型から選択される、請求項115記載の組成物。

【請求項１２５】
J_4がGlnまたはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２６】
J_5がAlaもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２７】
J_5がLeuまたはその修飾型である、請求項115記載の組成物。

【請求項１２８】
X_1がIle、Valもしくはまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の組成物。

【請求項１２９】
X_2がThr、Glyもしくはまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の組成物。

【請求項１３０】
X_3がIleもしくはまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の組成物。

【請求項１３１】
X_4がValもしくはTrpから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。

【請求項１３２】
X_4がAla、Serもしくはまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。

【請求項１３３】
X_5がIle、PheもしくはValまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の組成物。
【請求項１３４】
$[X_1]_n$が以下の式により表される、請求項114記載の組成物：
J_6J_7 (X) [配列番号：10]
式中：
J_6およびJ_7の少なくとも1個は存在し、
J_6は、疎水性もしくは小型のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される；および
J_7は、小型もしくは疎水性のアミノ酸残基またはその修飾型から選択される。
【請求項１３５】
J_6がLeuもしくはGlyまたはその修飾型である、請求項134記載の組成物。
【請求項１３６】
J_7がSerもしくはLeuまたはその修飾型である、請求項134記載の組成物。
【請求項１３７】
X_6がAlaまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１３８】
X_6がValもしくはLeuから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１３９】
X_7がAla、GlyもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４０】
X_7がLeuまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４１】
X_8がLeuもしくはValから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４２】
X_8がAlaもしくはSerから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４３】
X_9がValもしくはLeuから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４４】
X_9がAlaもしくはGlyから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４５】
X_{10}がGlnまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４６】
X_{10}がIle、ValもしくはPheから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４７】
X_{11}がPro、AlaもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４８】
X_{11}がPheまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１４９】
X_{11}がGlnまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５０】
X_{12}がAla、SerもしくはThrから選択される小型アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。

【請求項１５１】
X_{13}がVal、IleもしくはMetから選択される疎水性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５２】
X_{13}がAlaまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５３】
X_{14}がProもしくはAlaまたはその修飾型から選択される、請求項114記載の組成物。
【請求項１５４】
X_{15}がGlnまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５５】
X_{15}がAspまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５６】
X_{15}がLeuまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５７】
X_{16}がAlaまたはその修飾型である、請求項114記載の組成物。
【請求項１５８】
Z_1が以下の式により表される、請求項114記載の組成物：
$J_8J_9J_{10}$ (XI) [配列番号：11]
式中：
J_8は、小型アミノ酸残基またはその修飾型である；
J_9は、存在しない、または、J_8も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である；および
J_{10}は、存在しない、または、J_9も存在する条件下で、荷電アミノ酸残基もしくはその修飾型である。
【請求項１５９】
J_8がThrまたはその修飾型である、請求項158記載の組成物。
【請求項１６０】
J_9が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項158記載の組成物。
【請求項１６１】
J_9がLysまたはその修飾型である、請求項158記載の組成物。
【請求項１６２】
J_{10}が塩基性アミノ酸残基またはその修飾型である、請求項158記載の組成物。
【請求項１６３】
J_{10}がLysまたはその修飾型である、請求項158記載の組成物。
【請求項１６４】
制御エレメントに作動可能に連結されたキメラ分子をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む細胞を有する非ヒトの遺伝子改変の動物であって、該キメラ分子は、膜転位置配列もしくはその変異体から得られるまたは導き出せる、および対象となる分子と融合、付着または異なる方法で会合している自己合体エレメントを含み、かつ凝集に好都合な条件下で該自己合体エレメントが他のキメラ分子と合体してより高次の凝集体となることができる、非ヒトの遺伝子改変の動物。
【請求項１６５】
請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の単離もしくは精製されたより高次な凝集体の有効量を投与することを含む、患者における疾患もしくは状態を処置または予防する方法。
【請求項１６６】
随意で担体を用いて調剤される、状態を処置または予防するための薬の製造における、請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の単離もしくは精製されたより高次な凝集体の使用。
【請求項１６７】

随意で担体を用いて調剤される、状態を処置または予防するための免疫増強組成物の製造における、請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の単離もしくは精製されたより高次な凝集体の使用。

【請求項１６８】

化学工程を実施するための組成物の製造における、請求項1、51、113および114のいずれか一項記載の単離もしくは精製されたより高次な凝集体の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU03/00667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. [7]: C12N 15/12, C07K 14/53

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)
AS BELOW

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
AS BELOW

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Chemical Abstracts, Medline, WPIDS : Keywords, translocat?, aggregat?, coalesc?, multimer, oligomer, signal, secretory, transit, export, protein, membrane, OmpA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BOWDEN, G. A., et. al. Folding and Aggregation of β-Lactamase in the Periplasmic Space of *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry. 265(28):16760-6. 5 October 1990. (See abstract, p. 16765, col. 1 line 49 - col. 2 line 22)	1 - 173 174 - 178
X A	TAKAHARA, M., et. al. The *ompA* Signal Peptide Directed Secretion of Staphylococcal Nuclease A by *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 260(5):2670-4. 10 March 1985. (See abstract, p. 2673 Discussion)	1 - 173 174 - 178
X A	SHIBUI, T., et. al. High-level secretion of human apolipoprotein E produced in Escherichia coli: use of a secretion plasmid containing tandemly polymerised ompF-hybrid gene. Journal of Biotechnology 17:109-20 (1991) (See Summary, p. 117 - 119 Discussion)	1 - 173 174 - 178

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 July 2003	- 6 AUG 2003
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer **ALISTAIR BESTOW** Telephone No : (02) 6283 2450

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU03/00667

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HALFMANN, G., et. al. Targeting of interleukin-2 to the periplasm of *Escherichia coli*. Journal of General Microbiology 139:2465-73 (1993) (see abstract, p. 2470-71, Discussion)	1 - 173 174 - 178
X A	GÖTT, P., et. al. Antigenicity of hantavirus nucleocapsid proteins expressed in E. coli Virus Research 19:1-16 (1991) (see Summary, Fig. 1, p. 9 Immunological identification, and p. 12 Discussion)	1 - 178 174 - 178
X A	WO, A1, 97/35887 (AMRAD OPERATIONS PTY. LTD.) 2 October 1997. (see p. 6 line 27 - p. 7 line 14, and Examples 2, 3, 14, 25 and 30)	1 - 173 174 - 178
X A	US, A, 5348867 (GEORGIOU, G., ET.AL.) 20 September 1994 (see claims and col. 4 line 58 - col. 5 line 2, Example 5)	1 - 173 174 - 178

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU03/00667

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
WO	9735887	AU	21434/97	CA	2249455	EP	935612
		GB	2326643	US	6043069	US	6326179
		US	6521741	ZA	9702620		
US	5348867	EP	746621	WO	9310214	AU	71710/98
		US	5866344AU	WO	9849286		END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/48	Ａ６１Ｐ 31/18		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 31/18	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/02		
Ａ６１Ｐ 35/02	Ａ６１Ｐ 37/00		
Ａ６１Ｐ 37/00	Ａ６１Ｐ 37/04		
Ａ６１Ｐ 37/04	Ａ６１Ｐ 43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ 43/00	Ｃ０７Ｋ 14/475		
Ｃ０７Ｋ 14/475	Ｃ０７Ｋ 14/52		
Ｃ０７Ｋ 14/52	Ｃ０７Ｋ 14/575		
Ｃ０７Ｋ 14/575	Ｃ０７Ｋ 14/705		
Ｃ０７Ｋ 14/705	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ａ６１Ｋ 37/02		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
ＷＩＮＤＯＷＳ

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA02 HA17
4B065 AB01 BA02 CA44
4C076 AA95 CC07 CC27 CC41 EE41A EE57A EE59
4C084 AA02 AA03 AA07 AA27 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA31
BA41 CA18 DA01 DB01 DB52 DC50 NA10 NA14 ZB021 ZB022
ZB071 ZB091 ZB092 ZB211 ZB261 ZB271 ZC031 ZC412 ZC551
4C085 AA02 AA05 AA21 BA01 BB01 BB06 BB17 CC02 CC07 CC08
DD51 DD71 EE01 EE06
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA11 CA40 DA01 DA30 DA86 EA22
EA28