

(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2005-515754  
(P2005-515754A)

(43) 公表日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00 A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/275	A 6 1 K 39/275	4 B O 6 3
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 B O 6 4
C O 7 K 17/00	C O 7 K 17/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-500220 (P2003-500220)  
 (86) (22) 出願日 平成14年5月29日 (2002. 5. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月30日 (2004. 1. 30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/017005  
 (87) 国際公開番号 W02002/097051  
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002. 12. 5)  
 (31) 優先権主張番号 60/294, 739  
 (32) 優先日 平成13年5月30日 (2001. 5. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

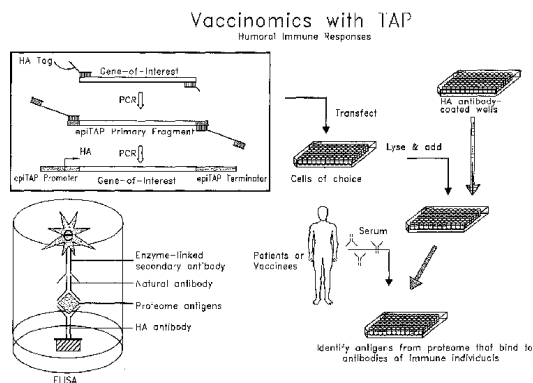
(71) 出願人 500126235  
 ジーン セラピー システムズ インコー  
 ポレーテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921  
 21 サンディエゴ テレシス コート  
 10190  
 (71) 出願人 503440967  
 アメリカ合衆国  
 アメリカ合衆国 ヴァージニア 2221  
 7 アーリントン ノース クインシー  
 ストリート 800  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100090516  
 弁理士 松倉 秀実

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質アレイ、ならびにそれらを生産する方法およびシステム

(57) 【要約】

複数のポリペプチドを迅速に生成および分析する方法が開示される。より具体的には、個々の免疫原性効果を測定するために、ポリペプチドのライブラリーおよびアレイをアッセイする。ポリペプチドの免疫原性効果に基づいて、特定のサブユニットワクチンを開発することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法であって、以下の：

(a) 転写的に活性でない増幅コード配列を提供する為に、前記標的生物由来の所望のポリヌクレオチド配列を増幅することが可能な第1のプライマー対を用いて第1のPCR反応を実施する工程、

(b) 前記増幅コード配列に転写活性を付与する少なくとも1つのヌクレオチド配列を付加することが可能な第2のPCRヌクレオチドプライマー対を提供する工程、

(c) 転写的に活性なコード配列の増幅をもたらす為に、前記第2のプライマー対および前記増幅コード配列を用いて第2のPCR反応を実施する工程、

(d) 前記転写的に活性なコード配列のポリペプチドを発現させる工程、

(e) 前記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なる第1のプライマー対を用いて、工程(a)～工程(d)を少なくとも10回繰り返す工程、  
を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

10

## 【請求項 2】

前記工程(a)～工程(d)は少なくとも20回繰り返される、請求項1に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 3】

前記工程(a)～工程(d)は少なくとも100回繰り返される、請求項1に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

20

## 【請求項 4】

前記工程(a)～工程(d)は約266回繰り返される、請求項1に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 5】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項1に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 6】

リンカー分子を操作可能にコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を、前記増幅コード配列または前記転写的に活性なコード配列に付加することをさらに含む方法であって、前記リンカー分子は前記ポリヌクレオチドを固体支持体に固定化する、請求項1

30

## 【請求項 7】

前記転写的に活性なコード配列およびリンカー分子を操作可能にコードするポリヌクレオチド配列を発現させることにより、リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドを生じさせる、請求項6に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 8】

前記リンカー分子はエピトープである、請求項7に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 9】

前記リンカー分子は、6x、7x、8x、9xおよび10x his-タグ、GSTタグ、蛍光タンパク質タグ、Flagタグ、ならびにHAタグからなる群から選択される、請求項7に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

40

## 【請求項 10】

前記転写活性を付与する少なくとも1つの配列はプロモーター配列である、請求項1に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 11】

前記転写活性を付与する少なくとも1つの配列はターミネーター配列である、請求項1に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 12】

自動化システムを用いて前記第1のプライマー対を設計することをさらに含む、請求項

50

1 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 の PCR 反応は自動化システムを用いて実施される、請求項 1 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 1 4】

前記第 2 の PCR 反応は自動化システムを用いて実施される、請求項 1 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 1 5】

前記転写的に活性なコード配列は自動化システムを用いて発現される、請求項 1 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

10

【請求項 1 6】

体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法であって、以下の：

請求項 7 に記載の方法により調製されるリンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供する工程、

少なくとも 10 個の前記標的生物ポリペプチドを固体支持体に固定化する工程、および  
体液性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定する為に、前記標的生物由来の 1 つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも 1 つの抗体を用いて前記ポリペプチドをアッセイする工程、

を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

20

【請求項 1 7】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 1 6 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

【請求項 1 8】

細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法であって、以下の：

請求項 1 に記載の方法により標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供する工程、

少なくとも 10 個の前記標的生物ポリペプチドを複数の抗原提示細胞に供給する工程、  
および

細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定する為に、前記標的生物由来の 1 つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも 1 つの T 細胞を用いて前記抗原提示細胞をアッセイする工程、

30

を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

【請求項 1 9】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 1 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

【請求項 2 0】

前記抗原提示細胞は B 細胞である、請求項 1 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

【請求項 2 1】

前記抗原提示細胞はマクロファージである、請求項 1 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

40

【請求項 2 2】

前記抗原提示細胞は樹状細胞である、請求項 1 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

【請求項 2 3】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項 1 6 に記載の方法により同定される、免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を提供する工程、

前記抗原を、単独であるいは免疫応答を誘発することが可能である少なくとも 1 つの他

50

の標的生物抗原と組み合わせて被験体に投与する工程、および

前記被験体における前記抗原または該抗原の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、

を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項 24】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 23 に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項 25】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項 18 に記載の方法により同定される免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を提供する工程、 10

前記抗原を、単独であるいは免疫応答を誘発することが可能である少なくとも 1 つの他の標的生物抗原と組み合わせて被験体に投与する工程、および

前記被験体における前記抗原または該抗原の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、

を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項 26】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 25 に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項 27】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項 16 に記載の方法により免疫応答を誘発することが可能であると同定された標的生物抗原を操作可能にコードする核酸配列を提供する工程、 20

前記核酸配列を、単独であるいは標的生物抗原を発現することが可能である少なくとも 1 つの他の核酸と組み合わせて被験体に導入する工程、および

前記被験体における前記核酸または該核酸の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、

を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項 28】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 27 に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。 30

【請求項 29】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項 18 に記載の方法により免疫応答を誘発することが可能であると同定された標的生物抗原を操作可能にコードする核酸配列を提供する工程、

前記核酸配列を、単独であるいは標的生物抗原を発現することが可能である少なくとも 1 つの他の核酸と組み合わせて被験体に導入する工程、および

前記被験体における前記核酸または核酸の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、

を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。 40

【請求項 30】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 29 に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項 31】

請求項 1 により調製される少なくとも 20 個の標的生物ポリペプチドのアレイ。

【請求項 32】

細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法であって、以下の：

請求項 31 に記載の標的生物ポリペプチドの前記アレイを提供する工程、

少なくとも 10 個の前記標的生物ポリペプチドを複数の抗原提示細胞に供給する工程、 50

## および

細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定する為に、前記標的生物由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも1つのT細胞を用いて前記抗原提示細胞をアッセイする工程、  
を含む標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。

## 【請求項33】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項32に記載の標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。

## 【請求項34】

前記抗原提示細胞はB細胞である、請求項32に記載の標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。 10

## 【請求項35】

前記抗原提示細胞はマクロファージである、請求項32に記載の標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。

## 【請求項36】

前記抗原提示細胞は樹状細胞である、請求項32に記載の標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。

## 【請求項37】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項32に記載の方法により同定される、免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を提供する工程、 20

前記抗原を、単独であるいは免疫応答を誘発することが可能である少なくとも1つの他の標的生物抗原と組み合わせて被験体に投与する工程、および

前記被験体における前記抗原または前記抗原の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、  
を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

## 【請求項38】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項37に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

## 【請求項39】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項32に記載の方法により免疫応答を誘発することが可能であると同定された標的生物抗原を操作可能にコードする核酸配列を提供する工程、

前記核酸配列を、単独であるいは標的生物抗原を発現することが可能である少なくとも1つの他の核酸と組み合わせて被験体に導入する工程、および

前記被験体における前記核酸または前記核酸の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、  
を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

## 【請求項40】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項39に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。 40

## 【請求項41】

請求項7により調製されるリンカー分子に結合された少なくとも20個の標的生物ポリペプチドのアレイ。

## 【請求項42】

体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法であって、以下の：

請求項41に記載の方法により調製されるリンカー分子に結合された標的生物ウイルスポリペプチドのアレイを提供する工程、

少なくとも10個の前記標的生物ポリペプチドを固体支持体に固定化する工程、および 50

体液性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定する為に、前記標的生物由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも1つの抗体を用いて前記ポリペプチドをアッセイする工程、  
を含む標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。

【請求項43】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項42に記載の標的生物ポリペプチドのアレイをスクリーニングする方法。

【請求項44】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項42に記載の方法により同定される、免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を提供する工程、

前記抗原を、単独であるいは免疫応答を誘発することが可能である少なくとも1つの他の標的生物抗原と組み合わせて被験体に投与する工程、および

前記被験体における前記抗原または前記抗原の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、

を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項45】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項44に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項46】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法であって、以下の：

請求項42に記載の方法により免疫応答を誘発することが可能であると同定された標的生物抗原を操作可能にコードする核酸配列を提供する工程、

前記核酸配列を、単独であるいは標的生物抗原を発現することが可能である少なくとも1つの他の核酸と組み合わせて被験体に導入する工程、および

前記被験体における前記核酸または前記核酸の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングする工程、

を含む標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項47】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項46に記載の標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法。

【請求項48】

請求項1に記載の方法を実施することが可能な自動化システム。

【請求項49】

複数の別個の位置を含むアレイであって、標的生物由来の異なるポリペプチドが各位置に配置され、前記標的生物由来の発現ポリペプチド全体の少なくとも約50%が前記アレイ上に配置されるアレイ。

【請求項50】

前記標的生物由来の発現ポリペプチド全体の少なくとも約75%が前記アレイ上に配置される、請求項49に記載のアレイ。

【請求項51】

前記標的生物由来の発現ポリペプチド全体の約100%が前記アレイ上に配置される、請求項49に記載のアレイ。

【請求項52】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項49に記載のアレイ。

【請求項53】

前記配置されるポリペプチドは、6x、7x、8x、9xまたは10xヒスチジンタグ、GSTタグ、蛍光タンパク質タグ、ならびにFlagタグからなる群から選択されるリンカー分子に結合される、請求項49に記載のアレイ。

【請求項54】

10

20

30

40

50

前記配置されるポリペプチドは前記別個の位置に結合される、請求項 5 3 に記載のアレイ。

【請求項 5 5】

前記アレイは複数のサブアレイを含む、請求項 4 9 に記載のアレイ。

【請求項 5 6】

前記サブアレイはマイクロタイタープレートである、請求項 5 5 に記載のアレイ。

【請求項 5 7】

前記マイクロタイタープレートは 9 6 ウェルプレートである、請求項 5 6 に記載のアレイ。

【請求項 5 8】

標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法であって、以下の：

( a ) 前記標的生物由来の所望の核酸コード配列を、該コード配列を第 1 のアダプター配列および第 2 のアダプター配列と隣接させることによりベクターに P C R クローニングする工程であって、前記第 1 のアダプター配列および前記第 2 のアダプター配列は P C R により付加されることを特徴とし、

( b ) 宿主細胞において *i n v i v o* での組換えにより、前記コード配列が、前記ベクターに組み込まれるような条件下で、前記宿主細胞内の前記第 1 のアダプター配列および前記第 2 のアダプター配列に相同的な配列を有する前記ベクターと前記コード配列とを接触させる工程と、

( c ) 前記コード配列によりコードされる前記ポリペプチドを発現させる工程と、

( d ) 前記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なるコード配列を用いて、工程 ( a ) ~ 工程 ( c ) を少なくとも 1 0 回繰り返す工程と、  
を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 5 9】

工程 ( a ) ~ 工程 ( d ) は約 2 6 6 回繰り返される、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 0】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 1】

前記標的生物は炭疽菌 (*B. anthracis*) である、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 2】

前記標的生物は野兎病菌 (*Francisella tularensis*) である、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 3】

前記標的生物は熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) である、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 4】

前記標的生物は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) である、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 5】

リンカー分子を操作可能にコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列を、前記標的生物由来の前記核酸コード配列に付加することをさらに含む方法であって、前記リンカー分子は前記発現されるポリヌクレオチドを固体支持体に固定化する、請求項 5 8 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

【請求項 6 6】

前記所望の核酸コード配列およびリンカー分子を操作可能にコードするポリヌクレオチド配列を発現させることにより、リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドを生じさせる、請求項 6 5 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 67】

体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法であって、以下の：

請求項 66 に記載の方法により調製されるリンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供する工程、

少なくとも 10 個の前記標的生物ポリペプチドを固体支持体に固定化する工程、および  
 体液性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定する為に、前記標的生物由来の 1 つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも 1 つの抗体を用いて前記ポリペプチドをアッセイする工程、

を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

10

## 【請求項 68】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 67 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 69】

前記標的生物は炭疽菌 (*B. anthracis*) である、請求項 67 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 70】

前記標的生物は野兎病菌 (*Francisella tularensis*) である、請求項 67 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 71】

前記標的生物は熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) である、請求項 67 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

20

## 【請求項 72】

前記標的生物は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) である、請求項 67 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 73】

細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法であって、以下の：

請求項 58 に記載の方法により標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供する工程、

少なくとも 10 個の前記標的生物ポリペプチドを複数の抗原提示細胞に供給する工程、  
 および

30

細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定する為に、前記標的生物由来の 1 つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも 1 つの T 細胞を用いて前記抗原提示細胞をアッセイする工程、

を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 74】

前記標的生物はワクシニアウイルスである、請求項 73 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 75】

前記標的生物は炭疽菌 (*B. anthracis*) である、請求項 73 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

40

## 【請求項 76】

前記標的生物は野兎病菌 (*Francisella tularensis*) である、請求項 73 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 77】

前記標的生物は熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) である、請求項 73 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

## 【請求項 78】

前記標的生物はマイコバクテリウム属である、請求項 73 に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法。

50

## 【請求項 79】

標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法であって、以下の：

(a) 所望のポリヌクレオチドコード配列を増幅することが可能な第1のプライマー対を用いてPCRを実施することにより、前記標的生物由来の前記所望のポリヌクレオチドコード配列を増幅する工程、

(b) 前記増幅ポリヌクレオチドコード配列を発現させる工程、

(c) 前記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なる第1のプライマー対を用いて、工程(a)～工程(b)を少なくとも10回繰り返す工程、を含む標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【請求項 80】

前記PCR反応は、以下の：

(a) 転写的に活性でない増幅コード配列を提供する為に、前記標的生物由来の所望のポリヌクレオチド配列を増幅することが可能な第1のプライマー対を用いて第1のPCR反応を実施する工程、

(b) 前記増幅コード配列に転写活性を付与する少なくとも1つのヌクレオチド配列を付加することが可能な第2のPCRヌクレオチドプライマー対を提供する工程、

(c) 転写的に活性なコード配列の増幅をもたらす為に、前記第2のプライマー対および前記増幅コード配列を用いて第2のPCR反応を実施する工程、を含む、請求項79に記載の標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## [省益の主張]

米国政府は、Naval Medical Research CenterによりCRADA NCRADA - NMR-01-1037の条件により提供されるように政府により、または政府の利益になるように世界中で本発明を実施するか、あるいは実施された本発明を有する非独占的取消不能払込済みライセンスを有する。

## 【0002】

本発明は、複数のポリペプチドを迅速に生成および分析する方法に関する。より具体的には、個々の免疫原性効果を測定するために、ポリペプチドをアッセイすることができる。ポリペプチドの免疫原性効果をモニタリングすることにより、当業者は特定のサブユニットワクチンを開発することが可能である。

## 【背景技術】

## 【0003】

伝統的なワクチン技術は、それが種々の宿主において様々な度合いの反応原性(reactogenicity)を生じることが多いという問題に悩まされている。全体的な健康に対する懸念およびバイオテロリズムの高まる脅威を考慮すると、多数のかつ遺伝的に多様な宿主に適切な免疫応答を誘発することが可能なサブユニットワクチンを開発する必要がある。このアプローチは、多数の特定の抗原性ポリペプチドの同定を必要とする。ワクチンまたは任意の組換え型サブユニットワクチンを開発する際の最も困難な作業の1つが、特に病原体のゲノムが大きい場合に、特定の病原体に対して最も有効な免疫応答を促すことができる抗原を同定することである。

## 【0004】

例として、天然痘は、その高い致死率および伝染性のために、今では最も深刻なバイオテロリストの脅威の1つである。何世紀にもわたって、天然に存在する天然痘は、その30%以上の致死率およびその任意の気候および季節で蔓延する能力で、すべての感染疾患のうちで最も壊滅的なものの1つとして全世界的に恐れられてきた。ワクチンとしてワクシニアウイルスを使用することにより、天然に存在する天然痘の世界的な根絶が可能となった。天然痘の最後の天然に存在した事例は、1977年にソマリアで見られた。1980年5月に、この世界から天然に存在する天然痘がなくなったことを世界保健総会は認証し

10

20

30

40

50

た。米国での日常的なワクチン接種は1971年に終了し、いくらかの軍人および研究室労働者を除いて、1983年以来ワクチン接種したものはいない。しかしながら、テロリズムの兵器として使用される天然痘の現在の脅威により、大量のワクチン接種が再度最前線に現れる可能性がある。

#### 【0005】

不運にも、天然痘ワクチンとしてのワクシニアウイルスの使用は、天然痘根絶キャンペーン全体にわたって、1980年代の一般市民におけるワクチン接種の中止まで、25年前の技術を用いて製造されてきた。この技術は、生ワクチン付与体(vaccinifer)からウイルス含有物質を収集することを含む。この製造方法の安全性の記録が証明されているにもかかわらず、様々な度合いの反応原性がワクチン受容体で報告されている。現代では、大衆のワクチン接種が重要な目的であり得るが、おそらく免疫抑制疾患がより一層流行する場合、生ウイルスの感染特性のないワクチンがより一層重要である。病原体の免疫活性化ポリペプチドの完全な領域の理解が、より有効なワクチンを開発する重要な第一歩となる。

10

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明の実施の形態は、標的生物のポリペプチドのライブラリーを作製する方法である。本方法は以下の：(a)該標的生物由来の所望のポリヌクレオチド配列を増幅することが可能な第1のプライマー対を用いて第1のPCR反応を実施する工程であって、それにより転写的に活性でない増幅コード配列を提供する、実施する工程と、(b)該増幅コード配列に転写活性を付与する少なくとも1つのヌクレオチド配列を付加することが可能な第2のPCRヌクレオチドプライマー対を提供する工程と、(c)該第2のプライマー対および該増幅コード配列を用いて第2のPCR反応を実施する工程であって、それにより転写的に活性なコード配列の増幅をもたらす、実施する工程と、(d)該転写的に活性なコード配列のポリペプチドを発現させる工程と、(e)上記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なる第1のプライマー対を用いて、工程(a)~工程(d)を少なくとも10回繰り返す工程とを含む。他の実施形態では、工程(a)~工程(d)は、上記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なる第1のプライマー対を用いて、少なくとも約10回、約20回、約30回、約40回、約50回、約60回、約70回、約80回、約90回、約100回、約110回、約120回、約130回、約140回、約150回、約160回、約170回、約180回、約190回、約200回、約210回、約220回、約230回、約240回、約250回、約260回、約266回、約300回、約350回、約400回、約450回、約500回、約550回、約600回、約650回、約700回、約750回、約800回、約850回、約900回、約950回、約1,000回、約1,050回、約1,100回、約1,150回、約1,200回、約1,250回、約1,300回、約1,350回、約1,400回、約1,450回、約1,500回、約1,600回、約1,700回、約1,800回、約1,900回、約2,000回、約2,500回、約3,000回、約3,500回、約4,000回、約4,500回、約5,000回、約6,000回、約7,000回、約8,000回、約9,000回、約10,000回、約15,000回、約20,000回、約25,000回、約30,000回またはそれ以上繰り返され得る。

20

30

40

#### 【0007】

標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法は、リンカー分子を操作可能にコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を、上記増幅コード配列または上記転写的に活性なコード配列に付加することをさらに含むことができ、ここで上記リンカー分子は上記ポリヌクレオチドを固体支持体に固定化する。他の実施形態では、上記転写的に活性なコード配列および上記リンカー分子を操作可能にコードするポリヌクレオチド配列を発現させることで、リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドを生じる。一実施形態では、上記リンカー分子は、エピトープ、例えばHAエピトープであり得る。他のリン

50

カー分子としては、例えば 6 x、7 x、8 x、9 x または 10 x ヒスチジンタグ、GST タグ、蛍光タンパク質タグ、Flag タグ等であり得る。

【0008】

他の実施形態では、上記転写活性を付与する少なくとも 1 つの配列は、プロモーター配列、ターミネーター配列等である。

【0009】

他の実施形態は、本明細書中で議論する方法を実施することが可能である自動化システムに関する。例えば、自動化システムは、上記第 1 のプライマー対を設計すること、上記第 1 の PCR 反応を実施すること、上記第 2 の PCR 反応を実施すること、上記転写的に活性なコード配列を発現すること等に使用することができる。

10

【0010】

本発明のさらなる実施形態は、体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法に関する。上記方法は、リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供すること、少なくとも約 10 個、約 20 個、約 30 個、約 40 個、約 50 個、約 60 個、約 70 個、約 80 個、約 90 個、約 100 個、約 110 個、約 120 個、約 130 個、約 140 個、約 150 個、約 160 個、約 170 個、約 180 個、約 190 個、約 200 個、約 210 個、約 220 個、約 230 個、約 240 個、約 250 個、約 260 個、約 266 個、約 300 個、約 350 個、約 400 個、約 450 個、約 500 個、約 550 個、約 600 個、約 650 個、約 700 個、約 750 個、約 800 個、約 850 個、約 900 個、約 950 個、約 1,000 個、約 1,050 個、約 1,100 個、約 1,150 個、約 1,200 個、約 1,250 個、約 1,300 個、約 1,350 個、約 1,400 個、約 1,450 個、約 1,500 個、約 1,600 個、約 1,700 個、約 1,800 個、約 1,900 個、約 2,000 個、約 2,500 個、約 3,000 個、約 3,500 個、約 4,000 個、約 4,500 個、約 5,000 個、約 6,000 個、約 7,000 個、約 8,000 個、約 9,000 個、約 10,000 個、約 15,000 個、約 20,000 個、約 25,000 個、約 30,000 個またはそれ以上のポリペプチドを固体支持体に固定化すること、および上記標的生物由来の 1 つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも 1 つの抗体を用いて上記ポリペプチドをアッセイすることであって、それにより体液性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定することを含むことができる。

20

30

【0011】

さらなる実施形態は、細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法に関する。上記方法は、例えば、標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供すること、少なくとも約 10 個、約 20 個、約 30 個、約 40 個、約 50 個、約 60 個、約 70 個、約 80 個、約 90 個、約 100 個、約 110 個、約 120 個、約 130 個、約 140 個、約 150 個、約 160 個、約 170 個、約 180 個、約 190 個、約 200 個、約 210 個、約 220 個、約 230 個、約 240 個、約 250 個、約 260 個、約 266 個、約 300 個、約 350 個、約 400 個、約 450 個、約 500 個、約 550 個、約 600 個、約 650 個、約 700 個、約 750 個、約 800 個、約 850 個、約 900 個、約 950 個、約 1,000 個、約 1,050 個、約 1,100 個、約 1,150 個、約 1,200 個、約 1,250 個、約 1,300 個、約 1,350 個、約 1,400 個、約 1,450 個、約 1,500 個、約 1,600 個、約 1,700 個、約 1,800 個、約 1,900 個、約 2,000 個、約 2,500 個、約 3,000 個、約 3,500 個、約 4,000 個、約 4,500 個、約 5,000 個、約 6,000 個、約 7,000 個、約 8,000 個、約 9,000 個、約 10,000 個、約 15,000 個、約 20,000 個、約 25,000 個、約 30,000 個またはそれ以上の標的生物ポリペプチドを複数の抗原提示細胞に供給すること、および上記標的生物由来の 1 つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも 1 つの T 細胞を用いて上記抗原提示細胞をアッセイすることであって、それによ

40

50

り細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定することを含むことができる。ある特定の実施形態では、上記抗原提示細胞は、B細胞、マクロファージ、樹状細胞等であり得る。

【0012】

他の実施形態は、標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法に関する。本方法は、体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を提供すること、該抗原を、単独であるいは免疫応答を誘発することが可能である少なくとも1つの他の標的生物抗原と組み合わせて被験体に投与すること、および該被験体における該抗原または該抗原の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングすることを含む。

【0013】

別の実施形態において、細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を提供することにより標的生物に対するサブユニットワクチン開発される。本方法は、該抗原を、単独であるいは免疫応答を誘発することが可能である少なくとも1つの他の標的生物抗原と組み合わせて被験体に投与すること、および該被験体における該抗原または該抗原の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングすることを含む。

【0014】

さらなる実施形態は、標的生物に対するサブユニットワクチンを開発する方法に関する。本方法は、体液性免疫応答を誘発することが可能であると同定された標的生物抗原を操作可能にコードする核酸配列を提供すること、該核酸配列を、単独であるいは標的生物抗原を発現することが可能である少なくとも1つの他の核酸と組み合わせて被験体に導入すること、および該被験体における該核酸または核酸の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングすることを含む。

【0015】

標的生物に対するサブユニットワクチンを開発するさらなる方法は、細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能であると同定された標的生物抗原を操作可能にコードする核酸配列を提供すること、該核酸配列を、単独であるいは標的生物抗原を発現することが可能である少なくとも1つの他の核酸と組み合わせて被験体に導入すること、および該被験体における該核酸または核酸の組合せに対する免疫応答の発生をモニタリングすることを含む。

【0016】

本発明の他の実施形態は、少なくとも約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、約150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個、約300個、約350個、約400個、約450個、約500個、約550個、約600個、約650個、約700個、約750個、約800個、約850個、約900個、約950個、約1,000個、約1,050個、約1,100個、約1,150個、約1,200個、約1,250個、約1,300個、約1,350個、約1,400個、約1,450個、約1,500個、約1,600個、約1,700個、約1,800個、約1,900個、約2,000個、約2,500個、約3,000個、約3,500個、約4,000個、約4,500個、約5,000個、約6,000個、約7,000個、約8,000個、約9,000個、約10,000個、約15,000個、約20,000個、約25,000個、約30,000個またはそれ以上の標的生物ポリペプチドのアレイに関する。上記アレイは、細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドをスクリーニングするのに使用することができる。上記方法は、標的生物ポリペプチドのアレイを提供すること、少なくとも約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、約150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個、約300個

10

20

30

40

50

、約350個、約400個、約450個、約500個、約550個、約600個、約650個、約700個、約750個、約800個、約850個、約900個、約950個、約1,000個、約1,050個、約1,100個、約1,150個、約1,200個、約1,250個、約1,300個、約1,350個、約1,400個、約1,450個、約1,500個、約1,600個、約1,700個、約1,800個、約1,900個、約2,000個、約2,500個、約3,000個、約3,500個、約4,000個、約4,500個、約5,000個、約6,000個、約7,000個、約8,000個、約9,000個、約10,000個、約15,000個、約20,000個、約25,000個、約30,000個またはそれ以上の標的生物ポリペプチドを複数の抗原提示細胞に供給すること、および上記標的生物由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも1つのT細胞を用いて上記抗原提示細胞をアッセイすることによって、それにより細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定することができる。上記抗原提示細胞は、B細胞、マクロファージ、樹状細胞等であり得る。

#### 【0017】

さらなる実施形態はまた、リンカー分子に結合された少なくとも約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、約150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個、約300個、約350個、約400個、約450個、約500個、約550個、約600個、約650個、約700個、約750個、約800個、約850個、約900個、約950個、約1,000個、約1,050個、約1,100個、約1,150個、約1,200個、約1,250個、約1,300個、約1,350個、約1,400個、約1,450個、約1,500個、約1,600個、約1,700個、約1,800個、約1,900個、約2,000個、約2,500個、約3,000個、約3,500個、約4,000個、約4,500個、約5,000個、約6,000個、約7,000個、約8,000個、約9,000個、約10,000個、約15,000個、約20,000個、約25,000個、約30,000個またはそれ以上の標的生物ポリペプチドのアレイに関する。上記アレイは、体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために、標的生物ポリペプチドをスクリーニングするのに使用することができる。上記方法は、リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドのアレイを提供すること、少なくとも10個の標的生物ポリペプチドを固体支持体に固定化すること、および上記標的生物由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも1つの抗体を用いて上記ポリペプチドをアッセイすることによって、それにより体液性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定することができる。

#### 【0018】

さらなる実施形態は、複数の別個の位置を含むアレイに関し、ここで標的生物由来の異なるポリペプチドが各位置に配置され、上記標的生物由来の発現ポリペプチドすべての少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%が上記アレイ上に配置される。アレイは、任意の標的生物由来の異なる発現ポリペプチドを含むことができる。本発明のある特定の実施形態では、ワクシニアウイルスが標的生物である。他の実施形態では、例えば、炭疽菌(*B. anthracis*)、ボツリヌス菌(*Clostridium botulism*)、ペスト菌(*Yersinia pestis*)、大痘瘡(*Variola major*)、野兔病菌(*Francoisella tularensis*)、熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)、連鎖球菌属(*Streptococcus*)、ライム病菌(*Borrelia burgdorferi*)、トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*)、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、ウイルス性出血熱の原因となる病原体、エボラ(*Ebola*)、マールブルグ(*Marburg*)、ポックスウイルス(*pox viruses*)、アレナウイルス(*Arenaviruses*)、LCM、フニンウイルス(*Junin virus*)、マチュポウイルス(*Machupo virus*)、グアナリトウイルス(*Guanarito virus*)、ブンヤウイルス(*Bunyaviruses*)、ハンタウイルス(*Hantaviruses*)、フラビウイ

ス(Flaviviruses)、デング熱ウイルス(Dengue virus)、フィロウイルス(Filoviruses)、Q熱リケッチア(*Coxiella burnetti*)、ブルセラ(*Brucella*)種、鼻疽菌(*Burkholderia mallei*)、トウゴマ(*Ricinus communis*)、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)、発疹チフスリケッチア(*Rickettsia prowazekii*)および他のリケッチア属(*Rickettsias*)、食物および水媒介性病原体、下痢原性大腸菌(*Diarrheagenic E. coli*)、病原性ビブリオ属(*Pathogenic Vibrios*)、赤痢菌属(*Shigella*)種、サルモネラ属(*Salmonella*)、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、エルシニア・エンテロコリティカ(*Yersinia enterocolitica*)、カリチウイルス(Caliciviruses)、A型肝炎原生動物(Hepatitis A Protozoa)、クリプトスポリジウム・パルバム(*Cryptosporidium parvum*)、シクロスポラ・カヤタネンシス(*Cyclospora cayatanesis*)、ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、トキソプラズマ属(*Toxoplasma*)、微孢子虫類(Microsporidia)、ウイルス性脳炎(Viral encephalitides)、西ナイルウイルス(West Nile Virus)、ラクロセウイルス(LaCrosse virus)、V E E、E E E、W E E、日本脳炎ウイルス(Japanese Encephalitis Virus)、キャサヌール森林ウイルス(Kyasanur Forest Virus)、ニパウイルス(Nipah virus)、ダニ媒介出血熱ウイルス(Tickborne hemorrhagic fever viruses)、クリミア-コンゴ出血熱ウイルス(Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus)、ダニ媒介脳炎ウイルス(Tickborne encephalitis viruses)、多剤耐性T B、狂犬病ウイルス(Rabies virus)、リフトバレー熱ウイルス(Rift Valley Fever virus)、ラッサ熱ウイルス(Lassa Fever virus)、インフルエンザウイルス(Influenza virus)、ならびに黄熱病ウイルス(Yellow fever virus)等を含む病原体であり得る。アレイ中のポリペプチドは、無数の様式(例えば、溶液中に懸濁されているか、またはアレイに結合されている)で配置させることができる。さらに、配置されるポリペプチドは、例えば6x、7x、8x、9xまたは10xヒスチジンタグ、GSTタグ、蛍光タンパク質タグ、またはFlagタグからなる群から選択されるリンカー分子に結合され得る。リンカー分子を伴い配置されたポリペプチドは、アレイに結合され得る。

#### 【0019】

さらなる実施形態は、標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法であって、以下の：(a)該標的生物由来の所望の核酸コード配列を、該コード配列を第1のアダプター配列および第2のアダプター配列と隣接させることによりベクターにPCRクローニングする工程であって、該第1のアダプター配列および第2のアダプター配列はPCRにより付加されることを特徴とし、(b)宿主細胞において*in vivo*での組換えにより、該コード配列が、前記ベクターに組み込まれるような条件下で、宿主細胞内の該第1のアダプター配列および第2のアダプター配列に相同的な配列を有する前記ベクターと該コード配列とを接触させる工程と、(c)該コード配列によりコードされるポリペプチドを発現させる工程と、(d)上記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なるコード配列を用いて、工程(a)~工程(c)を少なくとも10回繰り返す工程とを含む標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製する方法に関する。

#### 【0020】

他の実施形態では、工程(a)~工程(c)は、上記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なるコード配列を用いて、少なくとも約10回、約20回、約30回、約40回、約50回、約60回、約70回、約80回、約90回、約100回、約110回、約120回、約130回、約140回、150回、約160回、約170回、約180回、約190回、約200回、約210回、約220回、約230回、約240回、約250回、約260回、約266回、約300回、約350回、約400回、約450回、約500回、約550回、約600回、約650回、約700回、約750回、約800回、約850回、約900回、約950回、約1,000回、約1,050回、約1,100回、約1,150回、約1,200回、約1,250回、約1,300回、約1,350回、約1,400回、約1,450回、約1,500回、約1,600回、約1,700回、約1,800回、約1,900回、約2,000回、約2,500回、約3,

000回、約3, 500回、約4, 000回、約4, 500回、約5, 000回、約6, 000回、約7, 000回、約8, 000回、約9, 000回、約10, 000回、約15, 000回、約20, 000回、約25, 000回、約30, 000回またはそれ以上繰り返され得る。

【0021】

標的生物は、例えば、炭疽菌、ボツリヌス菌、ペスト菌、大痘瘡、野兔病菌、熱帯熱マラリア原虫、連鎖球菌属、ライム病菌、トラコーマクラミジア、ヘリコバクター・ピロリ、結核菌、ウイルス性出血熱の原因となる病原体、エボラ、マールブルグ、ポックスウイルス、アレナウイルス、LCM、フニンウイルス、マチュポウイルス、グアナリトウイルス、ブンヤウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス、デング熱ウイルス、フィロウイルス、Q熱リケッチア、ブルセラ種、鼻疽菌、トウゴマ、ウェルシュ菌、ブドウ球菌属、発疹チフスリケッチアおよび他のリケッチア属、食物および水媒介性病原体、下痢原性大腸菌、病原性ビブリオ属、赤痢菌属種、サルモネラ属、リステリア菌、カンピロバクター・ジェジュニ、エルシニア・エンテロコリティカ、カリチウイルス、A型肝炎原生動物、クリプトスポリジウム・パルバム、シクロスポラ・カヤタネンシス、ランブル鞭毛虫、赤痢アメーバ、トキソプラズマ属、微孢子虫類、ウイルス性脳炎、西ナイルウイルス、ラクロセウイルス、VEE、EEE、WEE、日本脳炎ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、ニパウイルス、ダニ媒介出血熱ウイルス、クリミア-コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、多剤耐性TB、狂犬病ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、インフルエンザウイルス、ならびに黄熱病ウイルス等を含む病原体であり得る。

10

20

【0022】

さらなる方法は、リンカー分子を操作可能にコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を、上記標的生物由来の上記核酸コード配列に付加することに関し、ここで上記リンカー分子は、上記発現されるポリペプチドを固体支持体に固定化する。さらに、上記所望の核酸コード配列および上記リンカー分子を操作可能にコードするポリヌクレオチド配列を発現させる方法は、リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドを生じる。

【0023】

さらなる方法は、体液性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングすることに関し、以下の：リンカー分子に結合された標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供すること、少なくとも10個の該標的生物ポリペプチドを固体支持体に固定化すること、および該標的生物由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも1つの抗体を用いて該ポリペプチドをアッセイすることであって、それにより体液性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定することを含み得る。

30

【0024】

さらなる実施形態は、細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能である標的生物抗原を同定するために標的生物ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングする方法であって、以下の：標的生物ポリペプチドのライブラリーを提供すること、少なくとも10個の該標的生物ポリペプチドを複数の抗原提示細胞に供給すること、および該標的生物由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物からの少なくとも1つのT細胞を用いて該抗原提示細胞をアッセイすることであって、それにより細胞媒介性免疫応答を誘発することが可能な標的生物抗原を同定することを含む方法に関する。

40

【0025】

さらなる方法は、標的生物ポリペプチドのライブラリーを作製することであって、以下の：(a) 所望のポリヌクレオチドコード配列を増幅することが可能な第1のプライマー対を用いてPCRを実施することにより、該標的生物由来の該所望のポリヌクレオチドコード配列を増幅する工程と、(b) 該増幅ポリヌクレオチドコード配列を発現させる工程と、上記標的生物の異なるポリペプチドを発現するための異なる第1のプライマー対を用いて、工程(a)~工程(b)を少なくとも10回繰り返す工程とに関する。

【0026】

50

上記PCR反応は、以下の：(a)転写的に活性でない増幅コード配列を提供する為に、上記標的生物由来の所望のポリヌクレオチド配列を増幅することが可能な第1のプライマー対を用いて第1のPCR反応を実施すること、(b)該増幅コード配列に転写活性を付与する少なくとも1つのヌクレオチド配列を付加することが可能な第2のPCRヌクレオチドプライマー対を提供すること、(c)転写的に活性なコード配列の増幅をもたらす為に、該第2のプライマー対および該増幅コード配列を用いて第2のPCR反応を実施すること、を含み得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明は概して、標的生物のポリペプチドライブラリーを作製する方法、これらのポリペプチドの免疫原性効果をモニタリングする方法、抗原性ポリペプチドの同定に基づいて標的生物に対するサブユニットワクチン、薬学的組成物、および免疫原性組成物を開発する方法、ならびにこれらに関連したシステムに関する。さらに、本発明は、特定の標的生物に由来するポリペプチドのアレイに関する。さらに、本発明は、標的生物によりコードされるポリペプチドを発見し、上記ポリペプチドの免疫原性効果を測定することが可能な自動化システムに関する。

【0028】

ポリペプチドライブラリー

標的生物

「標的生物」という用語は広く解釈されるべきであり、ヒトおよび他の霊長類または家畜のような哺乳類、細菌、真菌、原生動物、ウイルス等を含む任意の原核もしくは真核生物または細胞を包含する。ある特定の形態では、標的生物は、比較的大きなゲノムを有する病原体であり得る。標的生物の例としては、ワクシニアウイルス、炭疽菌、ボツリヌス菌、ペスト菌、大痘瘡、野兎病菌、熱帯熱マラリア原虫、連鎖球菌属、ライム病菌、トラコーマクラミジア、ヘリコバクター・ピロリ、結核菌、ウイルス性出血熱の原因となる病原体、エボラ、マールブルグ、ポックスウイルス、アレナウイルス、LCM、フニンウイルス、マチュポウイルス、グアナリトウイルス、ブンヤウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス、デング熱ウイルス、フィロウイルス、Q熱リケッチア、ブルセラ種、鼻疽菌、トウゴマ、ウェルシュ菌、ブドウ球菌属、発疹チフスリケッチアおよび他のリケッチア属、食物および水媒介性病原体、下痢原性大腸菌、病原性ビブリオ属、赤痢菌属種、サルモネラ属、リステリア菌、カンピロバクター・ジェジュニ、エルシニア・エンテロコリチカ、カリチウイルス、A型肝炎原生動物、クリプトスポリジウム・パルバム、シクロスポラ・カヤタネンシス、ランブル鞭毛虫、赤痢アメーバ、トキソプラズマ属、微孢子虫類、ウイルス性脳炎、西ナイルウイルス、ラクロセウイルス、VEE、EEE、WEE、日本脳炎ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、ニパウイルス、ダニ媒介出血熱ウイルス、クリミア-コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、多剤耐性TB、狂犬病ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、インフルエンザウイルス、ならびに黄熱病ウイルス等が挙げられる。

【0029】

本発明はまた、自己免疫疾患により生み出される細胞を分析するのに使用することができる。自己免疫疾患により生み出される細胞によりコードされるポリペプチドを理解することにより、より効果的な治療を開発することができる。本発明で分析することができる自己免疫疾患の非排他的リストとしては、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アディソン病、糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、またはグレーブズ病が挙げられる。したがって、幾つかの実形態では、「標的生物」は、特定の自己免疫疾患により生み出される細胞型を包含することができる。さらに、「標的生物」は、例えば癌細胞、腫瘍細胞、および病変細胞を含む異常細胞型を包含することができる。

【0030】

「ポリペプチド」という用語もまた広く解釈されるべきであり、コードされた産物にお

10

20

30

40

50

ける特定数のアミノ酸に限定されない。幾つかの実施形態では、「ポリペプチド」は、少なくとも約3個、4個、5個、6個、7個、8個またはそれ以上のアミノ酸長であり得る。本発明による「ポリペプチド」は、例えば、天然に存在するポリペプチド、組換えポリペプチド、ペプチド、オリゴペプチド、天然に存在するタンパク質、組換えタンパク質、断片、およびポリペプチド配列の変異体または類縁体等を包含する。

#### 【0031】

「アレイ」という用語は広く解釈されるべきであり、複数の異なるポリペプチドが保持、提示、配置、位置または支持される任意の配置を包含する。アレイとしては、マイクロタイタープレート（例えば、48ウェル、96ウェル、144ウェル、192ウェル、240ウェル、288ウェル、336ウェル、384ウェル、432ウェル、480ウェル、576ウェル、672ウェル、768ウェル、864ウェル、960ウェル、1056ウェル、1152ウェル、1248ウェル、1344ウェル、1440ウェル、または1536ウェルプレート）、チューブ、スライド、チップ、フラスコ、または任意の他の適切な実験室装置を挙げることができる。さらに、アレイはまた、複数のサブアレイを包含することができる。複数のサブアレイは、標的生物のポリペプチドを配置するのに2つ以上の配置が使用されるアレイを包含する。例えば、多重96ウェルプレートは、複数のサブアレイおよび単一アレイを構成することができる。

10

#### 【0032】

同様に「ライブラリー」という用語は広く解釈されるべきであり、配列されようとしてであろうと、ポリペプチドの任意の非天然収集物を包含する。したがって、ライブラリーはアレイを包含するが、2つの用語は必ずしも同義ではない。

20

#### 【0033】

本発明の実施形態は、特定の標的生物からポリペプチドライブラリーを作製する方法を包含する。本発明は、任意の特定サイズのゲノムを有する任意の所定の標的生物から複数のポリペプチドを生成するのに使用することができる。本発明の他の実施形態では、標的生物は、そのゲノム中に50個以上のヌクレオチドコード配列を有することができる。さらなる実施形態では、標的生物は、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個、約400個、約450個、約500個、約550個、約600個、約650個、約700個、約750個、約800個、約850個、約900個、約950個、約1,000個、約1,050個、約1,100個、約1,150個、約1,200個、約1,250個、約1,300個、約1,350個、約1,400個、約1,450個、約1,500個、約1,600個、約1,700個、約1,800個、約1,900個、約2,000個、約2,500個、約3,000個、約3,500個、約4,000個、約4,500個、約5,000個、約6,000個、約7,000個、約8,000個、約9,000個、約10,000個、約15,000個、約20,000個、約25,000個、約30,000個またはそれ以上のヌクレオチドコード配列を有するゲノムを有することができる。

30

#### 【0034】

##### TAP技術

本発明のある特定の方法は、転写的に活性なポリメラーゼ連鎖反応（「TAP」）の使用によりポリペプチドライブラリーを迅速に作製するのに有用である。TAP技術を用いると、例えば1日未満で所定の特定の遺伝子を転写的に活性にさせ、発現の準備を完了させることができる。TAP断片は、転写的に活性なコード配列を包含し、2つの用語は交換可能に使用することができる。TAP断片は発現ベクターへのサブクロニングおよび細菌由来のプラスミドDNAの精製を必要とせずに、任意の核酸トランスフェクション技法により動物細胞または組織に容易にトランスフェクトすることができるポリヌクレオチド断片を包含する。転写的に活性なDNA断片は、ネスト化したオリゴヌクレオチドプライマーおよび2つのDNA断片を用いて、任意の所定の遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅により合成することができ、2つのDNA断片のうち1つは、活性な転写プロモーター配列を含み、もう1つは基本的な転写ターミネーター要素を含む。

40

50

## 【0035】

TAP断片およびそれらを作製する方法は、「転写的に活性なDNA断片を生成する方法(Method for generating transcriptionally active DNA fragments)」という表題の米国特許第6,280,977号に詳述されている。一実施形態では、TAP断片を創出する方法は、i)オリゴヌクレオチド設計工程、ii)TAP一次断片増幅工程、およびiii)TAP発現断片増幅工程を組み込むことができる。図1は、TAP断片を生成する方法の1つを示す。

## 【0036】

TAP断片の創出は、カスタムオリゴヌクレオチド配列の設計を包含する。所定の遺伝子の5'および3'末端に相補的なプライマーを合成することができる。「所定の遺伝子」という用語は、任意の「所望のポリヌクレオチド配列」または「コード配列」を包含し、所定の遺伝子の増幅を可能にするための任意の適切数のヌクレオチドを含むことができる。例えば、5'-カスタムオリゴヌクレオチドは、約41個、42個、43個、44個、45個および46個のヌクレオチドを包含することができ、これらのうち、約26個のヌクレオチドが5'-TAP末端普遍配列を含み、約15~20個のヌクレオチドが該遺伝子特異的配列を構成する。したがって、遺伝子特異的配列は、例えば、約15個、16個、17個、18個、19個、または20個のヌクレオチドであり得る。5'オリゴヌクレオチドはまた、mRNAのより効率的な翻訳のために、開始コドン周辺にコザックコンセンサス配列(A/GCC AUGG)を組み込んでよい。一実施形態では、開始コドンATGが、カスタム5'-オリゴヌクレオチドに含まれ得る。別の実施形態では、所定のペプチドをコードする配列はその5'末端に開始メチオニンコドンを欠如する場合、開始コドンATGがカスタム5'-オリゴヌクレオチドに包含され得る。

## 【0037】

3'-カスタムオリゴヌクレオチドは、所定の遺伝子の増幅を可能にするための任意の適切数のヌクレオチドを含むことができる。例えば、3'-カスタムオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、および45個のヌクレオチドを含有することができ、これらのうち、約20個のヌクレオチドが好ましくは3'-TAP末端普遍配列を含み、約20個のヌクレオチドが好ましくはポリヌクレオチドまたは所定の遺伝子に特異的である。さらに別の実施形態では、相補的終止コドン配列(例えば、TCA、TTA、またはCTA)を遺伝子配列の末端に付加して、発現される遺伝子の適正な翻訳終結を達成することができる。

## 【0038】

TAP断片を生成する別の工程は、TAP一次断片を増幅することである。「TAP一次断片」という用語は「増幅コード配列」を包含し、一実施形態において、増幅されたが、転写的に活性でないポリヌクレオチド配列に関する。この工程は、付加された5'および3'-TAP普遍末端配列を有する所定の遺伝子を含有するポリヌクレオチド断片を生成するPCRを実施することを包含する。これらの5'および3'-TAP普遍末端配列は、転写活性を付与する1つまたは複数のヌクレオチド配列を付加するのに有用である。一実施形態では、これらの配列は、TAP Express<sup>TM</sup>プロモーターおよびターミネーター断片を包含することができる。当業者は、必要性が生じた場合には、上述の特定のPCR反応を最適化するために上記方法を調節することができる。

## 【0039】

さらなる工程は、TAP一次断片上に転写活性を付与する少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を付加することを包含する。TAP発現断片と称される第2のPCR反応の最終産物は、in vivoまたはin vitro(例えば、無細胞)発現研究で直接使用することができる転写的に活性なDNAである。ある特定の実施形態では、TAP発現断片を培養細胞にトランスフェクトするか、または動物に注入することができる。「TAP発現断片」という用語は、「転写的に活性なコード配列」という用語を包含する。

## 【0040】

TAP断片の生成は、転写的に活性な多数のポリヌクレオチドコード配列を作製する迅

速かつ効率的な方法である。したがって、実施形態では、標的生物由来の複数の異なる遺伝子を、TAP技術を用いて転写的に活性にさせることができる。一実施形態では、約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、約150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個、約300個、約350個、約400個、約450個、約500個、約550個、約600個、約650個、約700個、約750個、約800個、約850個、約900個、約950個、約1,000個、約1,050個、約1,100個、約1,150個、約1,200個、約1,250個、約1,300個、約1,350個、約1,400個、約1,450個、約1,500個、約1,600個、約1,700個、約1,800個、約1,900個、約2,000個、約2,500個、約3,000個、約3,500個、約4,000個、約4,500個、約5,000個、約6,000個、約7,000個、約8,000個、約9,000個、約10,000個またはそれ以上の遺伝子が、TAP技術を用いて転写的に活性になり得る。当業者は、適切数の回数で開示した方法を繰り返すことにより、多数の異なる遺伝子を転写的に活性にさせることができることを理解できる。

10

#### 【0041】

転写活性を付与するポリヌクレオチド配列の例は、プロモーター配列、ターミネーター配列、転写因子用の結合部位、TATAボックス配列、およびエンハンサーである。一実施形態では、1つのプロモーターおよび1つのターミネーター配列がTAP断片上に付加される。これらのプロモーターおよびターミネーター配列は、数多くの方法で得ることができる。例えば、市販のプラスミドおよびcDNA分子の制限酵素消化を用いて、あるいは当業者に既知の方法を用いて自動化DNA合成機を使用して、上記配列を合成することができる。

20

#### 【0042】

本明細書中で使用する場合、「プロモーター」という用語は、転写開始部位から上流に伸長し、かつRNAポリメラーゼの結合に関与するDNA配列である。プロモーターは、概して200個を超える塩基対にわたって散在される、転写因子を結合する幾つかの短い(10塩基対未満)配列要素を含有し得る。一般的なかつ上流の因子により認識される唯一の要素を含有するプロモーターは通常、任意の細胞型で転写される。かかるプロモーターは、構成的に発現される細胞遺伝子(ときには、ハウスキーピング遺伝子と呼ばれる)の発現を担い得る。また、重金属イオンおよびグルココルチコイドによりアップレギュレートされるヒトメタロチオネイン(MT)プロモーターのような特定の細胞型に限定される組織特異的プロモーターも存在する。プロモーターは、核酸断片に関する所望の使用を考慮することに基づいて選択することができる。当業者は、核酸断片の使用に応じて適切なプロモーターを容易に選択することができる。例えば、核酸配列がヒト細胞において潜在的有用性を有する遺伝子をコードする場合、哺乳類細胞で転写を促進することが可能なプロモーターが選択され得る。プロモーターの他の例としては、植物または植物病原体(例えば、カリフラワーモザイクウイルス等)由来のプロモーターが挙げられる。プロモーターは、CMV、SV40、RSV、MMV、HIV等のような哺乳類または哺乳類病原体由来であり得る。他の例では、プロモーターは、酵母(Gal4プロモーター)等のような真菌由来であり得る一方で、他の例では、プロモーターは、細菌または細菌ファージ、例えば、T3、T7、SP6等由来であり得る。プロモーターはまた、レトロウイルスの長い末端反復配列(LTR)、筋クレアチンキナーゼプロモーター、アクチンプロモーター、伸長因子プロモーター、合成プロモーター、組織特異的プロモーター等であり得る。

30

40

#### 【0043】

本明細書中で使用する場合、「ターミネーター」という用語は、RNAポリメラーゼに転写を終結させる、転写の終わりを表わすDNA配列を包含する。さらに、「ターミネー

50

ター」という用語は、転写されたRNAを翻訳前にプロセシングさせる（例えば、ポリアダデニル化）シグナル配列を包含する。これは成熟3'末端の下流の別個の部位に見られ、切断およびポリアダデニル化により生成される。任意のタイプのターミネーターがこれらの方法に使用され得る。例えば、ターミネーター配列は、原核生物または真核生物（例えば、植物供給源）に由来し得る。一実施形態では、人工的な哺乳類転写ターミネーター要素を使用することができる。ターミネーター配列の非排他的リストとしては、SV40転写ターミネーター、ウシ成長ホルモン（BGH）ターミネーター、合成ターミネーター、ウサギ-グロビンターミネーター等が挙げられる。ターミネーターはまた、TAP断片の3'末端にあるアデニンヌクレオチドの連続伸長物であり得る。

#### 【0044】

10

#### T a p リンカー分子

上述するように、TAP技術を用いて、プロモーター配列、ターミネーター配列、転写因子用の結合部位、TATAボックス配列、およびエンハンサー等の追加要素を有した形で、遺伝子を増幅することができる。さらに、遺伝子がコードするポリペプチドのより迅速なスクリーニング、特性化、精製および研究を可能にすることができる追加の要素を有した形をで、遺伝子を増幅することができる。これらの追加要素としては、例えば、レポーター遺伝子、親和性タグ、抗体タグ、PNA結合部位、ヒスチジンタグ、分泌シグナル、レポーター遺伝子等が挙げられる。TAP一次断片またはTAP発現断片に付加することができる他のかかる追加要素の1つは、リンカー分子をコードするポリヌクレオチドである。「リンカー分子」という用語は、ポリペプチドを固体支持体に固定化することが可能である任意の分子を包含する。

20

#### 【0045】

一実施形態では、リンカー分子はエピトープタグであり得る。近代分子実験室では、ウェスタンブロット、免疫沈降、および蛍光タグ付け抗体を用いた免疫細胞化学のような様々な抗体ベースの実験方法で、発現されたポリペプチドを検出する作業に頻繁に直面する。これらの様々な研究を遂行するために、各ポリペプチドに特異的な抗体の入手可能性が最も貴重である。しかしながら、特定の実験室で研究中の組換えポリペプチドすべてに特異的な抗体の開発は、高価で時間がかかり、一般に非現実的な計画であろう。このことは、世界的シーケンシングの努力の結果として発見されている未知の機能を有する新規遺伝子数の急速な増大を考慮するときには、特に手ごわい問題である。

30

#### 【0046】

TAP断片のエピトープタグ付けは、TAP断片の発現産物の細胞内分布を迅速かつ利便性よく測定すること、ポリペプチドの精製を容易にすること、関連ポリペプチドを同定すること、および免疫沈降により新規ポリペプチドを特性化することに有用である。エピトープタグ付けの使用により、組換えポリペプチドは、標的生物の天然遺伝子によりコードされるポリペプチドに付加された短オリゴペプチドエピトープを保有する融合ポリペプチドとして発現される。次に、付加エピトープに対する抗体を、所望の融合ポリペプチドのウェスタンブロット、免疫細胞化学、DNAバンドスーパーシフト実験、蛍光標示式細胞分取（FACS）およびアフィニティ精製におけるポリペプチドの検出用のツールとして使用することができる。

40

#### 【0047】

したがって、本発明の一実施形態は、基本的なTAP系を修飾して、所定の遺伝子および赤血球凝集素（HA）エピトープタグをコードするポリヌクレオチド配列の融合を創出することである。HAエピトープタグは、十分に特性化されており、非常に免疫反応性が高い。このエピトープタグ付けTAP断片を細胞にトランスフェクトした後、生じたHAタグ付けポリペプチドを、市販の抗HA抗体で同定することができる。したがって、HAエピトープコード配列を有する所定の遺伝子を増幅することにより、発現産物は、遺伝子産物およびHAエピトープ部位を包含することができる。したがって、この発現産物は、HAエピトープに特異的な抗体を用いて、素早く捕捉および/または精製することができる。

50

## 【0048】

同様に、ヒスチジンタグをコードするポリヌクレオチド配列を、TAP断片に組み込むことができ、発現遺伝子産物を利便性よく精製することが可能である。組換えポリペプチドの発現、精製、検出、およびアッセイは、HAおよびヒスチジンタグのような小さな親和性タグを使用することによりかなり簡素かつ強力となり得る。例えば、十分に確立されたQIAexpressタンパク質発現および精製系は、QIAGEN(Seattle, Washington)から入手可能な6個の連続ヒスチジン残基(6×Hisタグ)でタグ付けしたポリペプチドに対して特許化されたニッケル-ニトリロ三酢酸(Ni-NTA)金属-アフィニティークロマトグラフィマトリックスの顕著な選択性および親和性に基づいている。

## 【0049】

QIAexpress系は、6個の連続ヒスチジン残基の親和性タグ、すなわち6×Hisタグを有するポリペプチドに対するNi-NTA(ニッケル-ニトリロ三酢酸)の顕著な選択性に基づいている。この技術は、任意の発現系から、ほとんどの任意の6×Hisタグ付けポリペプチドの精製、検出、およびアッセイを可能とする。6×Hisタグを有するポリペプチドは、ニッケルニトリロ三酢酸(Ni-NTA)樹脂により精製することができる。

## 【0050】

TAP断片は、検出および精製を簡素化するように設計されたタグを含むことができる。組換えポリペプチド精製に関する最も強力な技術の1つは、6個の連続ヒスチジン残基の親和性タグの付加である。6×Hisタグを有するポリペプチドは、ニッケルニトリロ三酢酸(Ni-NTA)樹脂により精製することができる。6×Hisタグは、ほとんどの他の親和性タグよりもかなり小さく、生理学的pHで荷電されない。6×Hisタグは、ポリペプチド免疫原性を変化させるか、または免疫原性に寄与することはほとんどなく、ポリペプチド構造または機能を妨害することはほとんどなく、分泌を妨害せず、プロテアーゼ切断による除去を必要とせず、変性用緩衝液系と適合性である。したがって、このタグは、従来のプラスミドベースのクローニングアプローチを用いてクローニングすることが極めて困難であるプロテインキナーゼのような真核生物遺伝子の発現、アッセイおよび精製用の強力なツールである。

## 【0051】

オリゴヌクレオチドは、例えばpCMVmおよびpTP-SV40由来のTAPプロモーターおよびターミネーター断片と一緒に6×Hisエピトープタグをコードするヌクレオチド配列を含むように設計することができる。コード配列の5'末端に6×Hisエピトープを付加するために、ヒスチジン残基をコードする配列をプロモーターと一緒に包含することができる。コード配列の3'末端に6×Hisエピトープを付加するために、ヒスチジン残基をコードする配列をターミネーターと一緒に包含することができる。

## 【0052】

HAおよび6×Hisエピトープの実施形態は、限定するものと解釈されるべきではなく、説明の目的で提供される。例えば、7×、8×、9×、または10×ヒスチジンタグ、GSTタグ、蛍光タンパク質タグ、Flagタグ等のような任意のタイプのリンカー分子を発現産物に結合させることができることが当業者には理解されよう。

## 【0053】

分泌シグナルを伴うTAP断片

多くの遺伝子療法およびDNAワクチン適用に関して、遺伝子産物がトランスフェクト細胞から分泌されることが有益である。この理由により、TAP系および方法の1つのバージョンは、遺伝子産物が分泌シグナルを含有するように設計され得る。一般に使用されるシグナルペプチドは、以下に示す：ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC(配列番号1)のようなコード配列を有するヒト組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)由来の最初の23個のアミノ酸である。この配列は、TAPプロモーター断片に組み込まれることができ、上述の

10

20

30

40

50

タグ付けポリペプチドの構築と同様の様式で新規 T A P 断片を創出することができる。

【0054】

プラスミドベクターへの T A P 断片の組み込み

遺伝子の機能または免疫原性が T A P e x p r e s s を用いることでいったん同定されれば、遺伝子をプラスミドベクターにクローニングすることに関心がもたれ得る。T A P e x p r e s s は、Gene Therapy Systems, San Diego, Californiaから入手可能である。T A P クローニングは、これを達成する迅速かつ利便性のよい方法である。

【0055】

指定機能を有する遺伝子が T A P e x p r e s s によりいったん同定されれば、さらなる遺伝子の特性化および操作を容易とするためには、遺伝子をプラスミドベクターにクローニングすることが望ましくなり得る。標準的なクローニング技法は、プラスミドおよび挿入されるべき遺伝子断片を消化するための制限酵素の使用を包含し得る。適合性末端のアニーリングおよびライゲーションにより、ベクターへの遺伝子の挿入を導くことができる。制限末端指向性クローニングの代替的な方法は、二重鎖 D N A 上の 3' 末端上に T オーバーハングを有する線状化プラスミドを調製して、P C R により特定のポリメラーゼを用いて増幅された D N A 断片を収容することである。この方法は、「T / A クローニング」と呼ばれることがある。

【0056】

ある特定の実施形態では、T A P クローニング系、方法およびキットは、第 1 または第 2 の P C R 工程後に T A P E x p r e s s 断片上に存在する普遍 5' および 3' 配列を利用することにより、クローニングプロセスをさらに簡素化することができる。これらの領域は、本発明者等の線状化 T A P E x p r e s s クローニングベクターの末端配列と重複する。T A P 断片および線状化プラスミドと一緒に混合し、T A P E x p r e s s E l e c t r o - C o m p 細胞に直接エレクトロポレートすると、内因性細菌リコンビナーゼ活性が 2 つの D N A 断片を組換えて、挿入 T A P E x p r e s s 断片を有するプラスミドを生じる。このプロセスは、従来のクローニングを 2 つの簡素な P C R 工程で置き換えることができる。幾つかの実施形態では、上記プロセスは、D N A 断片の切断、ペースティングおよび連結を必要としない。さらに、このプロセスは、制限酵素、D N A リガーゼ、トポイソメラーゼ、または他の D N A 修飾酵素に頼ることなく、T A P P C R 断片の迅速かつ利便性のよいクローニングに非常に適し得る。すべての「T A P」系、ベクターおよび細胞は、Gene Therapy Systems, San Diego, Californiaから容易に入手可能である。

【0057】

G e n e G r i p P N A 適合性 T A P 系もまた、P N A 依存性遺伝子化学により D N A 上にポリペプチドを連結させるのに使用することができ、これは上述の方法論を限定しない。G e n e G r i p は、Gene Therapy Systems, San Diego, Californiaから入手可能である。このアプローチは、配列特異的かつ非常に高度な親和性様式で、二本鎖 D N A とハイブリダイズさせるためにペプチド核酸 ( P N A ) の特性を利用する。P N A 結合部位は、例えば、トランスフェクトプラスミドを標的とし、かつ導入遺伝子の発現を改善するために、D N A 上に一連のポリペプチドを結合させるのに使用することができる。これにより、科学者等は、核の取り込みを増加するか、エンドソーム逃避を促進するか、あるいは細胞表面または細胞内受容体への遺伝子供給を標的とするように意図される要素を付加することにより、遺伝子供給の効率および有効性を改善するための合理的アプローチを追従することが可能となる。

【0058】

G e n e G r i p 部位を T A P に組み込むことにより、ペプチド核酸 ( P N A ) を T A P 遺伝子とハイブリダイズさせることが可能となる。続いて、遺伝子のバイオアベイラビリティおよび D N A ワクチン効力を改善するために、リガンドを P N A に結合させることができる。

【0059】

10

20

30

40

50

## TAP方法を実施するための自動化システム

本発明の実施形態では、標的生物由来のTAP断片の生成に関与したあらゆる工程を実施するためのシステムを使用することができる。さらに、各個々の工程は、システムにより制御され得る。例えば、システムは、カスタマイズされたPCRプライマーを設計し、上記プライマーを獲得し、TAP技術を利用してPCR反応を実施し、プロモーターおよびターミネーターを結合し、リンカー分子をコードする配列を一次断片または発現断片に結合することができる。上記システムは、自動化され得るか、または自動化され得ない。

### 【0060】

#### TAP断片の発現

転写的に活性な状態で増幅されたDNA断片は、ゲノムで各遺伝子に関して相当するポリペプチドを獲得するために、各種発現系で直接使用することができる。本発明は、任意の核酸トランスフェクション技法により、動物細胞または組織に容易にトランスフェクトされ得る転写的に活性なDNA断片を生成する簡素で効率的な方法を提供する。上記方法は、発現ベクターへのサブクロニングおよび細菌からのプラスミドDNAの精製の必要性を回避することができる。当業者が理解できることであるが、TAP断片は、*in vivo*または*in vitro*（例えば、無細胞）発現系を用いて迅速に発現させることができる。例えば、増幅断片は、発現用の真核細胞または原核細胞に直接トランスフェクトすることができる。発現に使用され得る真核細胞の例としては、哺乳類、昆虫（例えば、バキュロウイルス発現系）、酵母（例えば、ピキア・パストリス）等が挙げられる。原核細胞発現系の例としては、大腸菌が挙げられる。

10

20

### 【0061】

あるいは、発現は、無細胞系、例えばT7プロモーター系で達成され得る。無細胞翻訳系としては、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽および大腸菌からの抽出物を挙げるができる。これらの系は、外因性RNAの翻訳に必要とされる巨大分子構成成分（70Sまたは80Sリボソーム、tRNA、アミノアシルtRNAシンテターゼ、開始因子、伸長因子および終結因子等）を含有する粗製抽出物として調製され得る。効率的な翻訳を促進するために、各抽出物を、アミノ酸、エネルギー源（ATP、GTP）、エネルギー再生系（真核生物系に関してはリン酸クレアチンおよびクレアチンホスホキナーゼ、および大腸菌溶解産物に関してはホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼ）、および他の補因子（ $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 等）で補充することができる。

30

### 【0062】

TAP技術の使用により、当業者は、複数の遺伝子を迅速に発現させることが可能である。特定の所定の遺伝子が転写的に活性になった後、他の異なる遺伝子もまた、本発明の方法により転写的に活性にさせることができる。したがって、本発明の一実施形態では、ポリペプチドライブラリーを作製するために、標的生物由来の複数の遺伝子を増幅および発現する。本発明の一実施形態では、複数のTAP断片を発現することによりポリペプチドのライブラリーを作製することができる。本発明の他の実施形態では、少なくとも約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個またはそれ以上の異なる遺伝子が、TAP技術により転写的に活性となった後に発現される。

40

### 【0063】

本発明の他の実施形態は、リンカー分子をコードするポリヌクレオチドの産物を発現することに関する。リンカー分子をコードするポリヌクレオチドは、TAP一次断片またはTAP発現断片に付加させることができる。したがって、リンカー分子は、所定の遺伝子とともに発現させることができる。上述のように、一実施形態では、リンカー分子はエピトープタグであり得る。エピトープタグは、発現産物の精製を容易にすること、関連ポリペプチドを同定すること、免疫沈降により新規ポリペプチドを特性化すること、細胞下局在化を確定すること等に有用である。特定のリンカー分子の一例は、HAエピトープタグ

50

である。したがって、H A エピトープを含有する発現産物は、H A エピトープに特異的な抗体を用いて迅速に捕捉および/または精製され得る。他のリンカー分子としては、例えば6 x、7 x、8 x、9 x、または10 x ヒスチジンタグ、G S T タグ、蛍光タンパク質タグ、F l a g タグ等が挙げられる。

#### 【0064】

本発明の方法によるポリペプチドライブラリーの作製により、当業者は、続く探索および研究でポリペプチドライブラリーを容易に使用することが可能である。例えば、発現ポリペプチドを、さらなる分析用のアレイへと構築することが可能である。例えば、微生物疾患、新生物性疾患等に対する新規ワクチンおよび薬物標的を同定するために、発現ポリペプチドアレイをスクリーニングすることができる。発現ポリペプチドを用いて、抗体ライブラリーをスクリーニングすること、試薬を開発すること、機能的プロテオミクス研究を実施すること等のために使用することができる。これらはすべて、従来の方法をはるかに超える速度で迅速に達成することができる。

10

#### 【0065】

本発明の方法により作製されるアレイは、約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、約150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個、約300個、約350個、約400個、約450個、約500個、約550個、約600個、約650個、約700個、約750個、約800個、約850個、約900個、約950個、約1,000個、約1,050個、約1,100個、約1,150個、約1,200個、約1,250個、約1,300個、約1,350個、約1,400個、約1,450個、約1,500個、約1,600個、約1,700個、約1,800個、約1,900個、約2,000個、約2,500個、約3,000個、約3,500個、約4,000個、約4,500個、約5,000個、約6,000個、約7,000個、約8,000個、約9,000個、約10,000個、約15,000個、約20,000個、約25,000個、約30,000個またはそれ以上の異なるポリペプチドを包含してもよい。さらに、本発明は、ポリペプチドの少なくとも1つが少なくとも1つのリンカー分子に結合されたアレイを包含する。

20

#### 【0066】

##### T A P によるヒトプロテオーム

一実施形態では、完全ヒトプロテオームまたは複数のヒトポリペプチドは、例えば抗体ライブラリーをスクリーニングのために迅速に獲得および利用され得る。完全ヒトプロテオームは、非常に短期間で生成することができる。この企画は、4工程に分けることができる。例えば、ヒトゲノムの配列は、公的遺伝子データベースから当業者により容易に獲得され得る。配列情報に基づいて、ヒトゲノム中の各遺伝子または複数のヒト遺伝子をコードする、およそ27,000個の転写的に活性なP C R ( T A P ) 一次断片が生成され得る。これらのおよそ27,000個の断片が必ずしも選択的スプライシングにより産生された追加的な産物の原因となるとは限らないことに留意すべきである。これらの産物用のヌクレオチドコード配列もまた、増幅および発現され得る。

30

40

#### 【0067】

およそ27,000個の断片の生成は、およそ54,000個の遺伝子特異的プライマーを必要とし得て、それらは、当業者に既知の手段および会社(例えば、Genset)により獲得および迅速に生成することができる。いったんプライマーが獲得されれば、一次T A P 断片は、P C R マシンを用いて迅速に増幅させることができる。ある特定の実施形態では、多数回の反応、例えば768回の反応/マシンが可能なマシンを使用することで、時間を大いに減少させることができる。

#### 【0068】

続いて、一次T A P 断片は続くP C R を経て、およそ27,000個の転写的に活性なP C R ( A T P ) 断片を生成することができる。一実施形態では、T A P 断片はT7プロ

50

モーターを含有し、*in vitro*での転写/翻訳反応に使用することができる。TAP断片は、TAP一次断片とまさに同程度に迅速に生成および分析され得る。TAP断片を生成するのに使用されるプライマーは遺伝子すべてについて同じであり、それらは大量に獲得および購入することができる。生成される各TAP Express断片の量は、96ウェルプレート中での少なくとも10回、15回、20回、100回またはそれ以上の転写/翻訳反応に十分であり得る。代替的实施形態では、TAP断片は、上述するように、例えば「核酸断片の迅速かつ無酵素クローニング(Fast and Enzymeless Cloning Nucleic Acid Fragments)」という表題の米国特許第09/836,436号に記載されるような「TAPクローニング」を用いて、発現ベクターに利便性よく移入させることができる。クローニングされた断片は、さらなるおよび今後の研究のために確保および使用され得る。 10

#### 【0069】

およそ27,000個のTAP断片を用いて、非常に短期間で全ヒトプロテオームを合成することができる。例えばP7プロモーター系を有するTAP断片を使用して、各TAP断片は、96ウェルプレート中で適切な転写/翻訳試薬とともに*in vitro*で使用することができる。かかる系を用いた幾つかの実施形態では、例えば、10~50マイクログラムの各タンパク質が生成され得る。生成されるポリペプチド調製物は概して、例えば抗体スクリーニングアッセイで使用するためのさらなる精製を必要としない。プロテオームはマイクロチップ上に表示され、組換え抗体ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。プロテオームは、例えば細胞スクリーニングアッセイで使用され得る。 20  
続いて、抗体は、例えば試薬を開発するのに使用され得る。あるいは、抗体を用いて、どのポリペプチドがそこで発現されるかを確認するために各種細胞および組織(例えば、ヒト腫瘍組織のような)におけるポリペプチド発現を確認することができる。このアプローチは、任意の組織でポリペプチドを局在化させるのに使用することができる。ポリペプチドは、例えば免疫疾患のようなヒト疾患に関与したポリペプチドに関してスクリーニングすることができる。

#### 【0070】

上述のように、TAP断片は、自動化システムにより生成され得る。さらに、TAP断片によりコードされるポリペプチドは、*in vivo*または*in vitro*(例えば、無細胞)発現系を用いて発現され得る。発現産物は、自動化システムを用いて精製され得る。 30

#### 【0071】

##### アダプター技術

TAP技術を用いて所定の遺伝子を増幅する以外に、本発明はまた、「アダプター技術」を用いて遺伝子を増幅することを包含する。幾つかの実施形態では、アダプター技術は、1工程のPCR反応を利用することができる。本明細書中に記載する場合、「アダプター技術」という用語は、所望の核酸配列、例えば所定の遺伝子を、第1および第2のアダプター配列と隣接させることにより、所望の核酸断片をベクターにクローニングする方法に関する。得られた断片は、宿主細胞における核酸断片が*in vivo*での相同組換えによりベクターに組み込まれるような条件下で第1および第2のアダプター配列に相同的な配列を有するベクターと接触させることができる。したがって、アダプター技術は、ベクターへの核酸断片の迅速かつ無酵素クローニングを可能とし、首尾よい形質転換用の強制クローニング選択に使用することもできる。アダプター技術は、「核酸断片の迅速かつ無酵素クローニング(Fast and Enzymeless Cloning of Nucleic Acid Fragments)」という表題の米国特許出願第09/836,436号、「核酸断片の迅速かつ無酵素クローニング(Rapid and Enzymeless Cloning of Nucleic Acid Fragments)」という表題の米国特許出願第10/125789号、およびPCT出願第PCTUS 02/12334号にさらに詳述されている。 40

#### 【0072】

核酸断片は、任意のベクターに組み込まれ得る。幾つかの実施形態では、断片が組み込 50

まれるベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、細菌人工染色体 ( B A C ) 等であり得る。プラスミドは、C o E 1、P R 1 0 0、R 2、p A C Y C 等であり得る。ベクターはまた、機能的選択マーカーを含むことができる。機能的選択マーカーは、例えば、カナマイシン、アンピシリン、ブラストサイジン、カルボニシリン ( carbonicillin )、テトラサイクリン、クロラムフェニコール等に関する耐性遺伝子であり得る。ベクターはさらに、重要な要素を欠如し、かつ重要な要素が首尾よい相同組換え時に上記核酸断片により供給される機能障害性選択マーカーを含むことができる。機能障害性選択マーカーは、例えば、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、カルボニシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等であり得る。さらに、機能障害性選択マーカーは、例えば、l a c Z 遺伝子のようなレポーター遺伝子等であり得る。 10

#### 【 0 0 7 3 】

ベクターは、宿主細胞成長にとって有害なネガティブ選択要素を含むことができる。ネガティブ選択要素は、首尾よい相同組換え時に上記核酸断片により無能にされ得る。ネガティブ選択要素は誘導性であり得る。ネガティブ選択要素は、例えば、マウス G A T A - 1 遺伝子であり得る。ベクターは、機能障害性選択マーカーおよびネガティブ選択要素を含むことができる。

#### 【 0 0 7 4 】

アダプター技術で使用される宿主細胞は細菌であり得る。細菌は、i n v i v o での組換えが可能であり得る。細菌の例としては、J C 8 6 7 9、T B 1、D H、D H %、H B 1 0 1、J M 1 0 1、J M 1 0 9、L E 3 9 2 等が挙げられる。プラスミドは、機能的選択マーカーに対して選択する選択条件下で宿主細胞において維持され得る。 20

#### 【 0 0 7 5 】

第 1 および第 2 のアダプターは、所望の核酸配列がベクターに組み込まれるようにベクターの相同配列に結合するのに十分な任意の長さであり得る。第 1 および第 2 のアダプター配列は、例えば、少なくとも 1 1 b p、1 2 b p、1 3 b p、1 4 b p、1 5 b p、1 6 b p、1 7 b p、1 8 b p、1 9 b p、2 0 b p、2 1 b p、2 2 b p、2 3 b p、2 4 b p、2 5 b p、2 6 b p、2 7 b p、2 8 b p、2 9 b p、3 0 b p、3 1 b p、3 2 b p、3 3 b p、3 4 b p、3 5 b p、3 6 b p、3 7 b p、3 8 b p、4 0 b p、5 0 b p、6 0 b p 等であり得る。さらに、第 1 および第 2 のアダプター配列は、6 0 b p 30 以上であり得る。

#### 【 0 0 7 6 】

第 1 および第 2 のアダプター配列はさらに、機能的要素を含むことができる。機能的要素としては、プロモーター、ターミネーター、選択マーカー遺伝子をコードする核酸断片、リンカー分子をコードする核酸、既知のタンパク質をコードする核酸断片、融合タグ、選択マーカー遺伝子の一部をコードする核酸断片、成長促進タンパク質をコードする核酸断片、転写因子をコードする核酸断片、自己蛍光タンパク質 ( 例えば G F P ) をコードする核酸断片等を挙げることができる。

#### 【 0 0 7 7 】

核酸断片の 5 ' 末端および 3 ' 末端の両方上の共通の配列が線状化空ベクターにおける末端配列と相補的であり、断片および線状化ベクターが例えばエレクトロポレーションにより宿主細胞と一緒に導入される場合、それらは組換わり、定方向的に挿入される断片を有する新規発現ベクターを生じる。代替的实施形態では、宿主細胞は、核酸断片のみが宿主細胞に導入されるように線状化空ベクターを含むことができる。本発明の代替的实施形態では、ベクターは環状化され得て、本明細書中で使用する場合、ベクターは線状化され得るか、または環状化され得ることに留意すべきである。宿主細胞は、相同組換えにより発現ベクターに変換される。原則的に、このアプローチは、概して従来 of クローニング方法に対する代替法として適用され得る。 40

#### 【 0 0 7 8 】

第 1 および第 2 のアダプター配列を有する核酸断片は、当業者に既知の方法により生成 50

することができる。例えば、既知の5'および3'配列を有する所定の遺伝子は、重複する5'および3'プライミングオリゴヌクレオチドと一緒にPCRを受ける。プライミングオリゴヌクレオチドは、商業的供給業者による製造を含む当該技術分野で既知の方法により得ることができる。アダプター配列を有する一次断片を生成することができる。所定の遺伝子と隣接するアダプター配列は、ベクター上の配列、または続くPCRで使用されるべき他の5'もしくは3'断片由来の配列に相同的であり得る。

#### 【0079】

本発明の幾つかの実施形態では、標的生物由来の特定の所定の遺伝子は、3'末端および5'末端の両方上のアダプター配列とともに増幅させることができる。他の実施形態では、アダプターは、標的生物のゲノム内の複数の遺伝子、例えばあらゆる遺伝子に結合させることができる。ある特定の実施形態では、アダプターは、所望の遺伝子を転写的に活性にすることができる。いったん所望のベクターに組み込まれれば、所望の遺伝子は迅速に複製させて、発現させることができ、その結果複数の標的生物の遺伝子、例えばあらゆる遺伝子が発現される。

10

#### 【0080】

複数の発現産物をライブラリーまたはアレイ中に保管することができ、以下に記載するようにそれらの免疫原性特性に関してアッセイすることができる。アッセイ方法論に関するほとんどの実施形態がTAP技術に関して議論されるが、以下のアッセイはすべて、同様にアダプター技術発現産物で実施されれば、ワクチンを開発する方法が利用され得る。以下に記載するワクチンを開発することに関する実施形態のほとんどがTAP技術に係るが、ワクチン実施形態のすべてはまた、アダプター技術から生じるポリペプチドライブラリーおよびアレイとともに使用することができる。

20

#### 【0081】

ポリペプチドの免疫原性効果の同定

TAPまたはアダプター技術、および続く発現により調製されるポリペプチドのライブラリーおよびアレイは、ポリペプチドまたは核酸サブユニットワクチンの開発に有用であり得る。DNAワクチンは、製造するのに安価な有効ワクチンであり、広く分布させることができる。DNAワクチン（または任意の組換えサブユニットワクチン）を開発する際の最も困難な作業の1つは、特に生物のゲノムが大きい場合に、病原体に対して最も有効な免疫応答を刺激することができる抗原の同定である。

30

#### 【0082】

これを達成する包括的な方法は、ライブラリーまたはアレイの様式で特定の病原体から複数のポリペプチドを得ることである。これらのポリペプチドは、体液性および/または細胞媒介性免疫応答を誘起するそれらの能力を測定するために試験され得る。免疫原性応答を誘起するポリペプチドは、サブユニットワクチンとしての有効性に関して、個々にまたは他の抗原とともに試験され得る。さらに、同定された抗原性ポリペプチドをコードする核酸もまた、特定の病原体用のサブユニットワクチンを開発するために、単独であるいは抗原をコードする他の核酸とともに使用することができる。

#### 【0083】

以下に記載する実施形態の多くがワクシニアポリペプチドの免疫原性効果を同定することに関するが、本発明の方法は任意の標的生物を取り扱うことができる。特定の実施形態では、標的生物は、例えば、ワクシニアウイルス、炭疽菌、ボツリヌス菌、ペスト菌、大痘瘡、野兔病菌、マラリア(Malaria)、トラコーマクラミジア、連鎖球菌属、ライム病菌、ヘリコバクター・ピロリ、結核菌、ウイルス性出血熱の原因となる病原体、エボラ、マールブルグ、ポックスウイルス、アレナウイルス、LCM、フニンウイルス、マチュポウイルス、グアナリトウイルス、ブンヤウイルス、ハンタウイルス、フラビウイルス、デング熱ウイルス、フィロウイルス、Q熱リケッチア、ブルセラ種、鼻疽菌、トウゴマ、ウェルシュ菌、ブドウ球菌属、発疹チフスリケッチアおよび他のリケッチア属、食物および水媒介性病原体、下痢原性大腸菌、病原性ビブリオ属、赤痢菌属種、サルモネラ属、リステ

40

50

リア菌、カンピロバクター・ジェジュニ、エルシニア・エンテロコリティカ、カリチウイルス、A型肝炎原生動物、クリプトスポリジウム・パルバム、シクロスポラ・カヤタネンシス、ランブル鞭毛虫、赤痢アメーバ、トキソプラズマ属、微孢子虫類、ウイルス性脳炎、西ナイルウイルス、ラクロセウイルス、V E E、E E E、W E E、日本脳炎ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、ニパウイルス、ダニ媒介出血熱ウイルス、クリミア - コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、多剤耐性TB、狂犬病ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、インフルエンザウイルス、ならびに黄熱病ウイルス等のような病原体であり得る。この病原体リストは、単なる例示の目的で提供しており、当業者は、本発明の方法により使用することができる無数の標的生物を認識することができる。

10

#### 【0084】

##### ワクシニアウイルス実施形態

本発明の一実施形態は、体液性および細胞媒介性免疫応答を引き起こすワクシニアウイルスにおける抗原すべてを系統的にスクリーニングおよび同定することが可能であるTAP Expressを用いた迅速なハイスループットワクチン抗原スクリーニングアプローチを取り入れる。上記ワクシニア抗原の同定により、高特異的サブユニットワクチンの開発が可能となる。図2は、TAP技術を用いて多数の遺伝子を増幅し、上記遺伝子産物を発現させ、得られたポリペプチドを精製および定量化する方法を示す。図2はさらに、細胞媒介性または体液性免疫応答を誘起するポリペプチドの能力を同定するためにアッセイされ得るポリペプチドを調製する方法を示す。

20

#### 【0085】

天然痘ワクチンを開発するある特定の方法では、複数のワクシニア遺伝子を転写的に活性とすることができる。一実施形態では、ワクシニアウイルスゲノム由来の266個のオープンリーディングフレームそれぞれをコードするおよそ266個の発現ベクターを、TAP技術を用いて転写的に活性にすることができる。得られたTAP断片は、当該技術分野で既知の任意の方法に従って、*in vitro*または*in vivo*で精製および発現され得る。ポリペプチドを包含する発現産物は、体液性および/または細胞媒介性免疫原性応答を誘起するそれらの能力を測定するためにアッセイされ得る。免疫応答を誘起することが可能であると同定されたポリペプチドは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドサブユニットワクチンを開発するのに使用され得る。完全な方法は以下にさらに詳述する。

30

#### 【0086】

一実施形態によれば、遺伝子特異的PCRプライマーは、ワクシニアウイルスから複数の転写的に活性な遺伝子を生成するように設計される。ある特定の実施形態では、プライマーは、ワクシニアウイルスゲノム中のあらゆる遺伝子に関して設計される。他の実施形態では、プライマーの設計により、当業者は、TAP技術を用いて任意の所定の遺伝子を転写的に活性にすることが可能である。

#### 【0087】

上述のように、これらのPCRプライマーは、自動化システムを用いて設計することができる。例えば、TAPプロセスで使用するためのカスタムプライマーを設計するために、ロボットワークステーションを、Linuxオペレーティングシステムを実行するデュアルペンティアムIII CPU (1.4 GHz) コンピュータとインターフェースで接続することができる。さらに、カスタマイズドMySQLデータベースは、ジーンバンクおよび他の供給源からの入力配列データすべてを管理することができる。このデータベースは、操作、試料およびロボットにより作製される解析データすべてを探知することができる。別の実施形態では、PCRプライマー、PCR産物およびポリペプチドは、データベースにより探知され得る。例えば、PCRプライマー、PCR産物およびポリペプチドは、バーコード付き96ウェルプレートを使用することにより探知され得る。以下の実施形態はある特定の実施形態において96ウェルプレートを使用することについて議論しているが、任意のサイズのウェルプレートを使用することができることを当業者は理解する

40

50

ことができる。例えば、ウェルプレートは、約48個、約96個、約144個、約192個、約240個、約288個、約336個、約384個、約432個、約480個、約576個、約672個、約768個、約864個、約960個、約1,056個、約1,152個、約1,248個、約1,344個、約1,440個、約1,536個またはそれ以上のウェルから構成され得る。ウェルプレートのほかに、PCR産物およびポリペプチドは、任意の適切な容器、例えば試験管を用いて探知され得る。

#### 【0088】

PCR反応に必要とされるカスタムオリゴヌクレオチドは、TAP技術を実施するために生成または獲得され得る。一実施形態では、ワクシニアウイルスゲノム配列データおよびプライマー設計ソフトウェア(プライマー3)を、ワクシニアウイルスゲノムにおける遺伝子すべてに関して遺伝子特異的プライマーを生成するためにデータベースで使うことができる。プライマーは、遺伝子サイズおよびGC含有量に従って、約48個、約96個、約144個、約192個、約240個、約288個、約336個、約384個、約432個、約480個、約576個、約672個、約768個、約864個、約960個、約1,056個、約1,152個、約1,248個、約1,344個、約1,440個、約1,536個の5'プライマーおよび3'プライマーを有するアレイへと構築させることができ、その結果、最適PCR反応条件はすべて、各プレートにとって同じであり得る。さらに、遺伝子特異的プライマー配列を、オリゴヌクレオチド合成供給者(例えば、MWG Biotech, Inc, High Point, NC.)に送ることができ、そこでプライマーが合成され得る。合成プライマーは、100 pmole/ $\mu$ lの濃度でバーコード付きプレートに構築および分取され、凍結され、実施者へと輸送され得る。一実施形態では、266個のワクシニアウイルス遺伝子それぞれを増幅することが可能である524個の遺伝子特異的PCRプライマーが設計され、生成され、注文され、構築される。

#### 【0089】

遺伝子特異的PCRプライマーを獲得または生成した後、遺伝子は増幅され得る。一実施形態では、プライマーは、遺伝子サイズに従って、アレイの96個の5'プライマー、および96個の3'プライマーへと構築され、ロボットワークステーション上へ配置され得る。ロボットは、適切な5'および3'プライマーをTaqポリメラーゼおよびワクシニアウイルスゲノムDNAと混合することにより、約48回、約96回、約144回、約192回、約240回、約288回、約336回、約384回、約432回、約480回、約576回、約672回、約768回、約864回、約960回、約1,056回、約1,152回、約1,248回、約1,344回、約1,440回、約1,536回のPCR反応のプレートを生成するようにプログラムされ得る。Taqのほかに、任意の熱的に安定なポリメラーゼをPCR反応に使うことができる。例えば、Vent、Pfu、Tfl、Tth、およびTgoポリメラーゼが使用され得る。ロボットワークステーションは、混合試薬を含有するPCR反応プレートを、増幅用PCRマシンに移行させることができる。一実施形態では、ロボットワークステーションは、PCR反応プレートをPCRマシンへ移行させるためのロボットアームを使うことができる。

#### 【0090】

第1のPCR手順は、任意のサイクル数で実行することができる。一実施形態では、PCRマシンは、例えば、約20回、21回、22回、23回、24回、25回、26回、27回、28回、29回、30回、31回、32回、33回、34回、35回、36回、37回、38回、39回、40回またはそれ以上のサイクルで実行される。第1のPCR反応は、必要であれば、例えばMillipore Montage 96ウェルクリーンアップキットにロボットにより移行させることができる。しかしながら、任意の方法、キットまたはシステムがこれらの反応を清浄化することができる。一実施形態によれば、ロボットプラットフォームの真空ステーションが精製工程を実施し得る。幾つかの実施形態では、得られた産物の分取量が、dsDNA産物のみと反応するPico-Green蛍光プローブ(Molecular Probes, Eugene, OR)を含有する分析プレートへロボットにより移行させることができる。ウェルの数に応じて、プレートは、約48個、約96個、約14

10

20

30

40

50

4個、約192個、約240個、約288個、約336個、約384個、約432個、約480個、約576個、約672個、約768個、約864個、約960個、約1,056個、約1,152個、約1,248個、約1,344個、約1,440個、約1,536個またはそれ以上のウェル蛍光プレート読取り機へ移行させることができる。蛍光シグナルを標準曲線と比較して、この第1のPCR工程で生成される二重鎖PCR産物の量を確定することができる。当業者は、必要性が生じた場合には、それらの特定のPCR反応を最適化するために上記方法を調節することができる。

#### 【0091】

第1のPCR手順に加えて、一次転写物に転写活性を付与する少なくとも1つの配列を付加するために、第2のPCR反応を実施することができる。一実施形態では、ロボットは、先の工程からの各PCR反応の分取量を、プロモーターおよびターミネーター配列を含有するPCR反応に移行させるようにプログラムされ得る。特定の実施形態では、プロモーターはT7-ヒスチジンプロモーター断片であり得て、ターミネーターはT7-ヒスチジントーミネーター断片であり得る。任意のプロモーターまたはターミネーター配列が一次転写物に付加され得ることを当業者は理解することができる。さらに、発現ポリペプチドを検出または精製することを可能とする分子をコードする任意のポリヌクレオチド配列もまた予期されうる。

10

#### 【0092】

第1のPCR反応と同様に、第2のPCR反応は、任意のサイクル数で実行することができる。一実施形態では、第2のPCR反応は、約20回、21回、22回、23回、24回、25回、26回、27回、28回、29回、30回、31回、32回、33回、34回、35回、36回、37回、38回、39回、40回またはそれ以上のサイクルで実行される。さらに、任意のタイプの熱安定性ポリメラーゼを第2のPCR反応に使用することができる。特定の実施形態では、ポリメラーゼはTaqであり得る。幾つかの実施形態では、Vent、Pfu、Tfl、Tth、およびTgoポリメラーゼが使用され得る。第2のPCR反応から生じたPCR断片は、任意のキット、方法またはシステムにより清浄化され得る。生じたTAP断片を清浄化するのに使用することができる特定のキットは、Millipore Montage 96 ウェルクリーンアップキットである。さらに、上述するように、回収されたPCR産物レベルは、任意の検出剤、例えばPico-Greenを用いて測定され得る。

20

30

#### 【0093】

生じたTAP断片は、任意の遺伝子発現方法を用いて発現させることができる。一実施形態では、TAP断片は、*in vivo*または*in vitro*（例えば、無細胞）系を用いて発現させることができる。例えば、断片は、発現用の任意の真核細胞または原核細胞に直接トランスフェクトすることができる。発現に使用され得る真核細胞の例としては、哺乳類、昆虫、酵母等が挙げられる。原核細胞発現系の例としては、大腸菌が挙げられる。TAP断片はまた、無細胞系により発現させることができる。本発明の一実施形態によれば、生じたTAP断片は、例えばRoche RTS（迅速翻訳システム）100のようなハイスループット無細胞発現マシンで発現させることができる。さらなる実施形態では、TAP断片は、Roche RTS 100システムで、30分で5時間インキュベートされ得る。特定の無細胞翻訳マシンの説明書に従うことの有用性を当業者は容易に理解することができる。T7-ヒスチジンプロモーターまたはターミネーター断片が一次転写物に付加される場合、TAP断片の翻訳は、ヒスチジntag付けポリペプチドを生じることができ、これは以下で議論するように精製することができる。本明細書中に記載するように、任意のタグが使用され得る。

40

#### 【0094】

発現されるワクシニアポリペプチドは、発現ポリペプチドを精製する任意の精製方法を用いて精製され得る。一実施形態では、ヒスチジntag付けポリペプチドは、Ni-NTA Superflow 96 BiorobotキットのようなQiagenニッケルカラムを用いて精製され得る。特定のポリペプチド精製系の説明書に従うことの有用性を

50

当業者は容易に理解することができる。ポリペプチドを精製するのに使用することができる他の方法としては、限外濾過、抽出、およびクロマトグラフィが挙げられる。

【0095】

精製されたワクシニアポリペプチドの同定、量および純度は、SDSゲル電気泳動により確認され得る。一実施形態では、MALDI-TOF MS (マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間型質量分析法)を用いて、精製されたポリペプチドの身元を確認することができる。この実施形態によれば、各ポリペプチドの分取量(1~2 μg)を約48個、約96個、約144個、約192個、約240個、約288個、約336個、約384個、約432個、約480個、約576個、約672個、約768個、約864個、約960個、約1,056個、約1,152個、約1,248個、約1,344個、約1,440個、約1,536個またはそれ以上のウェルプレートに分取し、修飾トリプシンで消化させることができる。生じた物質をマトリックス(α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA))と混合して、適切なスポット数、例えば、48個、約96個、約144個、約192個、約240個、約288個、約336個、約384個、約432個、約480個、約576個、約672個、約768個、約864個、約960個、約1,056個、約1,152個、約1,248個、約1,344個、約1,440個、約1,536個またはそれ以上のスポットで、任意の標的プレート上へスポットさせることができる。一実施形態では、384スポットの「アンカーチップ」標的プレート(Bruker Daltonics, Billerica, MA)が使用され得る。プレートは、Brucker Autoflex MALDI-TOF質量分析計の試料段へと移行させることができる。分析計は、自動的にプレートをスキャンし、インターネットを介してMascootポリペプチドデータベースを検索するように設定することができる。したがって、非常に迅速な確認システムは、ポリペプチドの量に応じて、例えば1日未満で純度、同定および量を確認することができる。精製ポリペプチドは、ライブラリーに配置され得るか、または続く試験および分析用のアレイへと構築され得る。

【0096】

体液性免疫応答

例えば上記方法に従って(例えば、TAPまたはアダプター技術を用いて)調製されるワクシニアウイルスポリペプチドライブラリーおよびアレイの使用は、ワクシニアでワクチン接種した動物における体液性免疫性の抗原性標的を同定するのに使用され得る。体液性免疫応答は、抗体の生成および特定の抗原に結合する抗体の能力に関する。概して、体液性免疫系は白血球細胞を使用し、これは抗原を認識する能力を有し、抗原に結合することが可能である抗体を生成する。

【0097】

一実施形態では、ワクシニアポリペプチドは、上述の方法に従って生成される。より特定の実施形態では、リンカー分子をコードするさらなるポリヌクレオチド配列がTAP一次断片またはTAP発現断片に付加され、その結果発現産物は、リンカー分子に結合された遺伝子産物を包含することができる。上述のように、「リンカー分子」という用語は、ポリペプチドを固体支持体に固定化することが可能である分子を包含する。

【0098】

特定の実施形態では、ワクシニアの所定の遺伝子は、HAエピトープコード配列と組み合わせられ、その結果、発現産物は、ワクシニア遺伝子産物およびHAエピトープ部位を包含することができる。別の実施形態では、ワクシニアの所定の遺伝子は、ヒスチジンコード配列と組み合わせられ、その結果、発現産物は、ワクシニア遺伝子産物および6x、7x、8x、9x、または10xヒスチジntagを包含することができる。他の実施形態では、ワクシニア遺伝子は、GSTタグ、蛍光タンパク質タグ、またはFlagタグをコードする配列と組み合わせられる。これらの方法を使用して、そのゲノムによりコードされるあらゆるワクシニアウイルスポリペプチドを発現およびタグ付けすることが可能である。別の実施形態では、タグ付けしたワクシニアウイルスポリペプチドは、96ウェルプレートのような固体支持体に結合され得る。結合されたポリペプチドは、ワクシニアウイ

10

20

30

40

50

ルス由来の1つまたは複数の抗原で免疫化された動物由来のBリンパ球を含有する血清または他の液体と接触させられ得る。一実施形態では、典型的なELISAアッセイを実施して、抗原特異的抗体の存在を検出することができる。

#### 【0099】

ELISAアッセイの例として、タグ付けしたワクシニアポリペプチドは、96ウェルプレートのような固体支持体に結合され得る。結合されたワクシニアポリペプチドは、ワクシニアウイルス由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物由来の血清とともにインキュベートされ得る。反応混合物を洗浄して、任意の未結合の血清抗体を除去することができる。血清抗体の結合ワクシニアポリペプチドへ結合する能力は、無数の方法を用いて検出することができる。例えば、酵素結合二次抗体を添加して、抗原特異的抗体の存在を検出することができる。血清の供給源に応じて、任意の酵素結合二次抗体が本発明で使用され得る。例えば、一次抗体を提供するのにワクチン接種されたマウス血清を使用する場合、酵素結合抗マウス抗体を二次抗体として使用することができる。同様に、一次抗体を提供するのにヒト血清を使用する場合、酵素結合抗ヒト血清を二次酵素として使用することができる。

10

#### 【0100】

任意の適切なアッセイを使用して、結合されるポリペプチド特異的抗体の量を測定することができる。また、当業者は、結合されているポリペプチド特異的抗体の量を測定するための酵素アッセイを開発することができる。一実施形態では、アッセイからの読み出しは、96ウェルそれぞれにおける異なるレベルの抗体の存在を示すことができる。例えば、いかなる血清抗体をも生成することができないワクシニアウイルスポリペプチドがある一方で、中間レベルの抗体を生成することができるポリペプチドもあれば、高抗体レベルを生成することができるものもある。一実施形態では、高抗体力価を生成するポリペプチドは、どのポリペプチドがウイルスの表面上に存在するかを測定するためにさらに研究され得る。特定の実施形態では、高抗体力価を生成し、ウイルスの表面に位置するポリペプチドは、サブユニット天然痘ワクチンの開発で使用するための良好な候補物であり得る。

20

#### 【0101】

図3は、ポリペプチドのアレイにより生成される体液性免疫応答を測定する一実施形態を示す。当業者は、図3に示すものからある特定の細部で逸脱させてもよい。例えば、HAタグは、エピトープがプレートへの結合に起因して隠されないことを保証するために、ポリペプチドのC末端またはN末端のいずれかに配置させてもよい。HAタグ付けポリペプチドの代わりに、ヒスチジntagを使用することができ、ポリペプチドをニッケルでコーティングしたプレートに結合させることができる。例えば、6x、7x、8x、9x、または10xヒスチジntagが使用され得る。あるいは、ヒスチジntag付けポリペプチドは、トランスフェクト細胞または*in vitro*転写翻訳系から精製され得る。精製されたポリペプチドは、例えばImmulonプレートのようなポリペプチド吸収プレートに非特異的に結合させることができる。

30

#### 【0102】

##### 細胞媒介性免疫応答

上記方法に従って（例えば、TAPまたはアダプター技術を用いて）調製されるワクシニアウイルスポリペプチドライブラリーおよびアレイの使用はまた、ワクシニアでワクチン接種した動物における細胞媒介性免疫性の抗原性標的を同定するのに使用され得る。抗体が抗原への結合を直接結合する体液性免疫応答と対比して、細胞媒介性免疫応答は、抗原を表示する他の細胞の表面上へのT細胞結合に関する。ある特定のT細胞が提示抗原と接触すると、T細胞はインターフェロン-（IFN-）または腫瘍壊死因子-（TNF-）のようなサイトカインを産生および放出する。サイトカインは、別の細胞の挙動または特性を変更させることができる細胞性シグナルである。例えば、サイトカインは、ウイルス複製を阻害し得るか、感染細胞におけるMHCクラスIおよびペプチド輸送体分子の発現の増加を誘導し得るか、またはマクロファージを活性化し得る。したがって、抗原への結合に関連したT細胞より放出されるサイトカインは、T細胞/抗原相互作用を

40

50

同定および検出するのに使用することができる。

【0103】

細胞によっては、その膜上にMHC分子を有して、T細胞に抗原を提示するものもある。効率的なT細胞機能は、MHC抗原複合体の適正な認識に依存する。2つのタイプのMHC分子：クラスIおよびクラスIIが存在する。2つの異なる種類のMHC分子は、細胞表面上での提示のための細胞内部の異なる供給源からのペプチドを、異なる種類のT細胞に結合する。任意のT細胞を本発明で使用することができ、例えばCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>のT細胞の両方を包含する。CD8<sup>+</sup>細胞(細胞障害性T細胞)は、クラスI MHC分子の一部であるエピトープを結合する。炎症性CD4<sup>+</sup>T細胞およびヘルパーCD4<sup>+</sup>T細胞を包含するCD4<sup>+</sup>T細胞は、クラスII MHC分子の一部であるエピトープを結合する。特殊抗原提示細胞のみが、クラスII分子を発現する。

10

【0104】

3つの主要なタイプの抗原提示細胞：B細胞、マクロファージおよび樹状細胞が存在する。これらの細胞型はそれぞれ、異なる供給源からの抗原をプロセッシングして、T細胞に提示するように特殊化されており、これらのうちの2つであるマクロファージおよびB細胞はまた、防御エフェクターT細胞の続く作用の標的でもある。これらの3つの細胞型は、それらがナイーブT細胞を活性化することを可能にする特殊同時刺激分子を発現することができるが、マクロファージおよびB細胞は、感染により適切に活性化される場合のみ、それらの分子を発現する。

【0105】

本発明の実施形態は、サブユニットワクチンまたは他の薬学的組成物で使用するための潜在的候補物を同定するために、細胞媒介性免疫応答を誘起することが可能なワクシニアポリペプチドを検出することに関する。細胞媒介性免疫応答を検出する一方法によれば、ポリペプチドは抗原提示細胞へ供給され、そこでポリペプチドは、抗原特異的T細胞により認識される様式で提示され得る。本発明の別の実施形態では、転写的に活性な遺伝子を抗原提示細胞へ供給することができ、そこで抗原特異的T細胞により認識され得る様式で発現および提示される。抗原特異的T細胞は、多数の供給源から獲得され得る。例えば、ワクシニアウイルス由来の1つまたは複数の抗原で免疫化した動物は、抗原特異的T細胞の良好な供給源である。例えば、ワクシニアで免疫化したヒトボランティアは、抗原特異的T細胞の供給源であり得る。

20

30

【0106】

ワクシニアポリペプチドの細胞媒介性応答を誘発する能力を試験するために、TAP技術を用いて、複数のワクシニア遺伝子を増幅して、転写的に活性にすることができる。一実施形態では、約10個、約20個、約30個、約40個、約50個、約60個、約70個、約80個、約90個、約100個、約110個、約120個、約130個、約140個、約150個、約160個、約170個、約180個、約190個、約200個、約210個、約220個、約230個、約240個、約250個、約260個、約266個のワクシニアウイルス遺伝子を、TAP技術を用いて転写的に活性とさせる。

【0107】

転写的に活性な遺伝子は、抗原提示細胞へトランスフェクトされ、細胞内で発現され得る。別の実施形態では、遺伝子を抗原提示細胞にトランスフェクトする代わりに、遺伝子は*in vivo*または*in vitro*(無細胞)発現系で発現させることができ、発現されたポリペプチドが抗原提示細胞に供給され得る。ポリペプチドは、任意の方法に従って抗原提示細胞に供給され得る。一実施形態では、ポリペプチドは、「細胞内タンパク質供給試薬(Intracellular Protein Delivery Reagent)」という表題の米国特許出願第09/738046号、および「細胞内タンパク質供給組成物および使用方法(Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use)」という表題の米国特許出願第10/141535号に記載される技術を用いて供給され得る。そこに記載される試薬は、任意のタイプのポリペプチドを任意の細胞型に供給することが可能である。さらに、図5の結果は、抗原性ポリペプチドが上述の出願からの試薬を用いて樹状細胞に供給された

40

50

後に、樹状細胞が、免疫化された宿主から供給されるT細胞に抗原を提示することができることを示す。

【0108】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドを培養細胞へ供給するのに使用される試薬は、カチオン脂質配合物であり得る。一実施形態では、これらの試薬は、蛍光標識した抗体、高および低分子量デキストラン、フェコエリトリン-B SA、カスパーゼ3、カスパーゼ8、グランザイムB、および - ガラクトシダーゼを、各種接着細胞および懸濁細胞の細胞質に供給することができる。カスパーゼは細胞をアポトーシスさせることが示され得るため、ともに細胞へ供給されるカスパーゼは機能的である。一実施形態では、ワクシニアポリペプチドは、これらの試薬を用いて樹状細胞へ供給される。

10

【0109】

抗原提示細胞が特定のポリペプチドをプロセッシングした後に、抗原提示細胞に結合するT細胞の能力を検出することは、特定のポリペプチドは細胞媒介性免疫応答を誘起するかどうかを確定するのに有用である。特定のポリペプチドは、いったん抗原提示細胞に供給されるか、または抗原提示細胞で発現されれば、アッセイを実施して、MHC抗原複合体とのT細胞相互作用を同定することができる。一実施形態では、ワクシニアで免疫化した動物から得られるT細胞が、抗原提示細胞により提示される特定の抗原に結合することができるかどうかを測定され得る。例えば、EliSpotアッセイを実施して、抗原特異的T細胞を同定することができる。同様の免疫アッセイを実施して、ワクシニアで免疫化した個体由来のT細胞を刺激するワクシニア抗原（抗原提示細胞により提示される）を同定することができる。

20

【0110】

T細胞/抗原相互作用を検出する方法の1つは、T細胞がMHC抗原複合体と相互作用する場合に、T細胞により放出される特定のサイトカインの量を測定することである。細胞媒介性免疫応答を示すために、他の細胞性シグナルを使用することができることを当業者は理解することができる。一実施形態では、T細胞により放出されるIFN- $\gamma$ レベルは、特定のペプチドが細胞媒介性免疫応答を誘起することが可能であるかどうかを示すことができる。特定の実施形態では、IFN- $\gamma$ に特異的な抗体は、固体支持体上へコーティングされ得る。未結合の抗体を洗い流し、T細胞+抗原提示細胞または抗原形質導入抗原提示細胞を含有する上清から得られるIFN- $\gamma$ がウェルに添加され得る。IFN- $\gamma$ に特異的なビオチン化二次抗体が添加され得る。過剰の二次抗体を除去することができ、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを混合物に添加することができる。ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼは、4つのメンバーからなる免疫アッセイ「サンドイッチ」を完全なものにするために、ビオチン化抗体への結合が可能である。過剰または未結合のストレプトアビジン-ペルオキシダーゼは、混合物から容易に除去される。結合ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼの量を検出するために、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼと反応して発色する基質溶液が添加され得る。着色産物の強度は、T細胞/抗原提示細胞上清中に存在するIFN- $\gamma$ の濃度に正比例する。これらのタイプの免疫アッセイを実施するためのキットは、多くの商業的供給業者から容易に入手可能であるか、またはかかるキットを構成する必要な試薬は別個に購入され得るか、または内部で生産され得る。一実施形態では、T細胞を誘起して、高レベルのIFN- $\gamma$ を産生する、プロセッシングおよび提示されたワクシニアポリペプチドは、サブユニットワクチンを開発する際に使用される強力な候補物であるとみなすことができる。

30

40

【0111】

他の方法を使用して、T細胞/抗原相互作用を検出することができることが当業者には理解されよう。これらの方法としては、ビーズベースのアッセイ、流動ベースのアッセイ、RT-PCRベースのアッセイ、サイトカインELISA、リンパ球増殖アッセイ、細胞障害性T細胞アッセイ、またはT細胞とレスポンド細胞（例えば、マクロファージ）との相互作用を検出することができる任意の他のアッセイが挙げられる。

【0112】

50

### 熱帯熱マラリア原虫の実施形態

ワクシニアの実施形態と同様に、以下の熱帯熱マラリア原虫の実施形態に開示される方法および装置は、任意の所定の標的生物または細胞に適用可能である。したがって、この実施形態は、本発明の限定として提供されるのではなく、特定の標的生物の実用的な例として提供されるものである。

#### 【0113】

マラリアは、人間の最も重大な寄生虫疾患である。化学的予防剤および化学療法剤に対するその耐性が増大しており、有効なマラリアワクチンの開発は、国際的公衆衛生の優先事項として認識されている。マラリアワクチンの開発に向けての進展は、寄生虫の複雑なライフサイクルにより幾分妨害されてきた。寄生虫は無数の細胞内および細胞外環境で発達し、寄生虫は、5,000個以上の遺伝子を含む大きな26メガベースのゲノムを有する。これらの遺伝子の多くはライフサイクルの種々の段階で発現され、寄生虫は株間を広範囲に変化する。

10

#### 【0114】

マラリアの原因である寄生虫である熱帯熱マラリア原虫のゲノムは5,000個を上回るポリペプチドをコードすると予測され、それらのそれぞれが、DNAまたはポリペプチドワクチンに有用な潜在的抗原である。あらゆる熱帯熱マラリア原虫ポリペプチドを発現およびスクリーニングする時間および費用は、本発明の方法を使用して大いに低減される。今やDNAまたはポリペプチドワクチンに関して最も有効な抗原を同定し、ならびにこれらの抗原の段階特異的発現ならびに細胞下局在化および機能的活性を確立するための基盤を提供することが可能である。

20

#### 【0115】

2つのタイプの免疫化が、動物およびヒトにおけるマラリア感染に対する防御を達成するのに効果的であることが見出されている。寄生虫全体または放射線弱毒性スポロゾイトによる免疫化が、前赤血球段階で免疫性を誘発する。マラリアに対する自然に獲得された免疫性は、赤血球段階に対して発生する。これらの観察により、マラリアワクチンの開発は実現可能であるが、サブユニットワクチンの現在の生成は、最適な防御も遺伝的に多様なバックグラウンドに対する防御も提供しないという確信が提供される。

#### 【0116】

本発明のシステム、方法、キットおよびアレイは、マラリアに暴露された人々からのマラリアゲノム中の個々の抗原それぞれに対する体液性および細胞性免疫応答を定量化するために系統的にアッセイするのに使用され得る。この情報を用いて、マラリアDNAワクチンの次の生成のための新規標的抗原を同定することができる。

30

#### 【0117】

したがって、システム、方法、キット、およびポリペプチドアレイは、生物全体のワクチン接種により誘発される防御を再現することが生物全体自体と同程度複雑なワクチンを必要とし得るという仮定に基づく効果的なマラリアワクチンの開発のための代替的アプローチとして使用され得る。本発明による新規ワクチンは、十分数の抗原性エピトープを取り入れ、多様な宿主遺伝的特徴の状況で適切な免疫応答を誘発する。これは、生物全体誘発性の防御的免疫性の寛容性および多重性を再現するために、前例のない数の寄生虫由来のポリペプチド抗原の同定、およびこれらの抗原に基づいたワクチン供給系の開発を伴う。したがって、本発明は、2つの異なる経路の効果的な免疫化において発現される抗原性標的を同定するために、マラリアゲノムプロジェクトから得られるゲノム配列データを利用することができる。

40

#### 【0118】

本明細書中に記載する方法、システム、およびキットは、2つの連続したPCR反応において任意の所定の遺伝子から転写的に活性なPCR(TAP)断片を生成するのに使用され得る。TAP断片は、培養細胞にトランスフェクトされ得るか、または動物に注入されて、同じポリペプチドをコードするスーパーコイルプラスミドに匹敵する発現レベルをもたらす。さらに、免疫原性抗原をコードするTAP断片が動物に注入される場合、スー

50

パーコイルプラスミドにより誘発される力価に匹敵する抗体力価が生成される。

【0119】

照射スポロゾイトで免疫化したヒトボランティアは、宿主肝細胞内のマラリア寄生虫により発現される何百または何千もの抗原に対して体液性および細胞性免疫応答のレパートリーを発生する。主に肝臓段階抗原に対して誘導され生じた免疫応答は、感染性熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトによる続く攻撃から免疫化個体を防御するのに十分である。他方で、マラリアへの自然暴露により個体で誘発される防御は、主に寄生虫のライフサイクルの赤血球段階中に発現される寄生虫ポリペプチドに対して誘導される抗体により媒介される。個体の第3の関連群は、慢性的に寄生虫血症であるが、臨床的に無症候性である、マラリアに自然に暴露された個体の亜群である。不明瞭な理由で、これらの患者は通常無症候性であるが、彼らは臨床的症状を定期的に発症する場合がある。ある特定の抗原に対する免疫応答の変動は、この回復と臨床疾患のサイクルを説明できるかもしれない。

10

【0120】

中心的な仮定は、マラリアに対する免疫性を誘発する生物全体の2つのヒトモデル（照射スポロゾイトモデルおよび自然に獲得された免疫性モデル）に基づいて、5,000個以上のマラリア抗原のうち、肝臓段階生物により発現されるポリペプチドに対して誘導される防御的T細胞応答の標的の1つのサブセット、および赤血球段階中に発現されるポリペプチドに対して誘導される防御的抗体の標的である別のサブセットが存在することである。本発明の目標は、人における防御的細胞性および体液性免疫応答を生成することを担うマラリアポリペプチドすべてを同定およびカタログ作製し、また照射スポロゾイト免疫化により誘発される応答をマラリアへの自然暴露により誘発される応答と比較するための迅速なハイスループットアプローチを開発することである。

20

【0121】

この迅速なワクチン抗原スキャンシステムは、穏やかな疾患、重症の疾患、大脳マラリア、母子感染（妊娠）、および無症候性寄生虫血症を伴う患者を含むマラリアに暴露された個体の種々の集団における免疫応答を特性化するのに使用することができる。臨床的疾患および後天性免疫性はまた、個体の年齢により影響を受けるため、幼児、児童、および成人における免疫応答はモニタリングされ得る。臨床的症状を示す患者および臨床的に無症候性の患者における免疫応答を比較して、臨床的疾患を調べることが可能である特定の抗原に対する免疫応答を同定する。これらの抗原は、予防用ワクチン開発にとって特に適した候補物であり、臨床的に症状を示すエピソードの頻度を減少するために、無症候性寄生虫血症集団を治療するための治療用ワクチンの状況でも有用であり得る。

30

【0122】

本発明の迅速なワクチン抗原スキャンアプローチを図6および図7に示す。上述するように、これらのアプローチは、任意のタイプの生物または細胞に適用させることができる。例として、マラリアゲノムをスキャンするためのアプローチが示される。例示的手順を以下に詳述する。体液性抗原スキャン（図6）に関して、マラリア抗原それぞれをコードするHA-エピトープTAP断片は個々に増幅される。各断片1マイクログラムが、GenePORTER試薬(Gene Therapy Systems, San Diego, CA)のようなトランスフェクション試薬2マイクログラムと混合され、混合物は、CHO-K1またはUM449細胞を含有する96ウェルプレートに移行される。トランスフェクションは、48時間続けて、細胞を溶解し、上清および溶解産物を、抗HA抗体でコーティングした別の96ウェルプレートセットに移行させる。HA-EpiTAP断片それぞれがHAエピトープを含有するため、溶解産物中のHAエピトープタグ付けポリペプチドの幾つかがHA抗体でコーティングしたプレートに結合する。

40

【0123】

別の実施形態では、細胞は、発現産物を捕捉するために溶解されない。より具体的には、発現産物が細胞から分泌され、かつ/または細胞表面上で発現される場合、細胞の溶解産物に対して細胞自体が、適切なアッセイを用いて発現産物を捕捉するのに使用され得る。溶解が行われないこの実施形態では、捕捉アッセイは、トランスフェクションが行われ

50

た同じプレート（単数または複数）で行われ得る。

【0124】

細胞系を使用するほかに、当業者は、無細胞転写および翻訳系、例えばT7プロモーター系を使用してTAP発現産物を得ることができる。無細胞翻訳系としては、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽および大腸菌からの抽出物を挙げるができる。これらの系は、外因性RNAの翻訳に必要とされる巨大分子構成成分（70Sまたは80Sリボソーム、tRNA、アミノアシルtRNAシンターゼ、開始因子、伸長因子および終結因子等）を含有する粗製抽出物として調製され得る。効率的な翻訳を促進するために、各抽出物を、アミノ酸、エネルギー源（ATP、GTP）、エネルギー再生系（真核生物系に関してはリン酸クレアチンおよびクレアチンホスホキナーゼ、および大腸菌溶解産物に関してはホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼ）、および他の補因子（ $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 等）で補充することができる。

10

【0125】

ある特定のマラリアエピトープが、HA抗体へのポリペプチドの結合により阻止されないことを確実にするために、2つの型のHAエピトープタグアプローチが使用され得る。一方の型は、マラリアポリペプチドのC末端に融合されたHAエピトープを有し、他方は、N末端に融合されたHAエピトープを有する。この方法では、プラスモディウム属(Plasmodium)プロテオームは、96ウェルマイクロタイタープレートの表面上に表示され得る。HisTAP方法、システム、およびキットは、HA-EpiTAPアプローチの代わりに使用され得る。また、*in vitro*転写/翻訳アプローチにおけるT7は、細胞ベースのシステム、あるいはそれらと連動したものよりむしろ、遺伝子を発現するためのシステムおよび方法の一例である。

20

【0126】

照射スポロゾイトまたはマラリアへの自然暴露のいずれかにより免疫化した個体由来の血清をプレートに塗布することができ、抗原結合抗体は、アルカリホスファターゼ結合抗ヒト抗体で検出され得る。アルカリホスファターゼシグナルの強度レベルが、血清中に存在する所定の抗原に対する抗体量に比例するように、アッセイを設定することができることが当業者には理解されよう。

【0127】

細胞性ワクチン抗原スキャン（図7）に関して、マラリア抗原それぞれをコードするTAP断片（HAタグなし）は個々に増幅される。再び、マラリアおよび熱帯熱マラリア原虫ゲノムを用いて、シナリオの1つに対する適用を説明する。しかしながら、システム、方法およびキットを任意の生物または細胞に適用させることが可能であることが当業者には理解されよう。

30

【0128】

変形体ゲノムをスキャンする例となるプロトコルについて記載する。各断片1マイクログラムは、GenePORTERトランスフェクション試薬2マイクログラムと混合され得て、混合物は、ハプロタイプ特異的抗原提示細胞を含有する96ウェルプレートに移行される。トランスフェクションを48時間続ける。これらのTAPトランスフェクト細胞は、細胞性免疫アッセイに関する標的細胞として作用することができ、抗IFN- $\gamma$ （Th1型応答）または抗IL-4（Th2型応答）mAbでプレコーティングした標準的なELISPOTプレートに移行され得る。スポロゾイト免疫化個体または自然に暴露された個体由来のT細胞（エフェクター細胞）は、トランスフェクト抗原提示細胞を含有する各ウェルに移行され、24時間培養され、続いて従来ELISPOTアッセイにより処理される。スポット形成細胞（SFC）を、コンピュータによるELISPOT計数マシンを用いて数え上げる。サイトカイン産生細胞数は、個々のウェルに関して抗原提示細胞においてトランスフェクトされたTAP断片に対して誘導されるT細胞を個体が有することを示す。さらに、培養物からの上清は、必要であれば、従来サイトカインELISAアッセイによるアッセイのために-70℃で保管され得る。

40

【0129】

50

体液性ワクチン抗原スキャン用の E p i T A P 断片を生成するのに使用される遺伝子特異的プライマーはすべて、細胞性ワクチン抗原スキャンに必要とされる T A P 断片の生成に適用可能であり得て、したがって、いかなる新規プライマーを生成する必要はない。完全ゲノムが、伝統的な技法では不可能な期間でスキャンされ得る。さらに、ほとんどの人種および民族集団で高頻度で表される種々の H L A 対立遺伝子（例えば、H L A - A 2、A 1、A 3、B 7）を発現する多数の個体をスクリーニングすることができる。

#### 【0130】

候補ワクチン抗原に関してスクリーニングするためのゲノムデータを利用する方法の開発は、適切な想起免疫応答が同定標的に対して誘発され得ることを実証する能力により制限され得る。本発明は、T細胞および抗体応答をモニタリングするためのシステムを包含し、適切な免疫想起を確実にするために、マラリア暴露された個体からの細胞性および体液性免疫応答の測定を可能にする。標的抗原の段階特異的発現の特定は重要であり得る。照射スポロゾイトによる免疫化により誘発される前赤血球段階マラリアに対する防御的免疫性が I F N -  $\gamma$  により媒介されることから、I F N -  $\gamma$  は細胞免疫原性の主要マーカーとして使用され得る。プロフェッショナル抗原提示細胞、具体的には H L A - トランスフェクト B 細胞系もまた利用され得る。防御的 T 細胞特異性の全レパートリーがこれらの個体で表されるため、スクリーニングアッセイは、放射線弱毒性熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトで免疫化した免疫ポランティアまたはマラリアに自然に暴露された半免疫個体からの試料の使用に依存し得る。混合培養中の I F N -  $\gamma$  レベルは、ワクシニアウイルスに関して実施例 3 に開示するアッセイと同様の E l i s p o t アッセイを用いることで測定され得る。

10

20

#### 【0131】

本発明の実施形態は、照射熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトで実験的に免疫化した免疫個体またはマラリアに自然に暴露された半免疫個体由来の P B M C および血清による認識のために熱帯熱マラリア原虫ゲノム由来の遺伝子に対する体液性および細胞性免疫応答をスキャンするための方法およびシステムを包含する。このスキャンの結果の 1 つは、ハプロサイトにおいて照射スポロゾイトにより発現される抗原（防御的 T 細胞免疫応答の標的）および血液段階寄生虫により発現される抗原（防御的抗体応答の標的）の同定である。

#### 【0132】

サブユニットワクチン、薬学的組成物または免疫原性組成物の開発

体液性または細胞媒介性免疫応答のいずれかを誘発すると同定された特定のポリペプチドは、サブユニットワクチン、薬学的組成物または免疫原性組成物で使用されるその能力を確定するためにさらに調査され得る。「サブユニットワクチン」、「薬学的組成物」および「免疫原性組成物」という用語は、ポリペプチド、核酸、またはその両方の組合せから構成されるワクチンを包含する。ポリペプチド候補物のさらなる調査には、高率の患者におけるポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸の試験が含まれる。特定の実施形態では、表面抗原は、それらがウイルス感染性を抑制し得る見込みのために綿密に研究され得る。一実施形態では、ワクシニアゲノムによりコードされるあらゆるポリペプチドは、その免疫原性効果を測定するためにアッセイされる。細胞媒介性であろうと体液性であろうと、免疫応答を誘発するポリペプチドは、サブユニットワクチン、薬学的組成物、または免疫原性組成物として、単独での、あるいは他のポリペプチドおよび遺伝子と併用した潜在的な使用を測定するために綿密に研究され得る。免疫応答を選択および研究するための適切な方法論は、当該技術分野で十分に確立されている。

30

40

#### 【0133】

他の標的生物

上記実施形態は、ワクシニアポリペプチドの免疫原性応答を検出し、その結果に基づいてサブユニットワクチンを開発するための詳細な説明を提供するが、任意の特定の標的生物に関して同様の方法が利用され得ることを当業者は理解することができる。

#### 【実施例 1】

50

## 【0134】

ヒスチジンタグ付けTAP express断片の生成手順

タグ付けT7-TAP Express断片を生産するのに使用された詳細な手順は、以下の通りである：96個の異なる遺伝子をプラスミド鋳型の混合物から増幅した。第1のPCR反応は、カスタマイズされた5'および3'プライマーを用いて実行した。5'プライマーは、43~48塩基を含有していた。特に、T7-His TAP末端は28塩基を含有していた一方で、遺伝子特異的構成成分は15~20塩基を含有していた。3'プライマーは45~50塩基を含有していた。具体的には、T7-ターミネーターTAP末端は30塩基を含有していた一方で、遺伝子特異的構成成分は15~20塩基を含有していた。第1のPCR反応に関する反応温度および時間は、94 で2分間、続いて94 で20秒間、58 で35秒間、および70 で2分間(2kb以上を含有する遺伝子に関しては、各kbについて1分を追加)を28サイクルであった。

10

## 【0135】

第1のPCR反応を実施した後、先の工程からの各PCR反応の分取物を、T7-ヒスチジンプロモーター断片およびT7ターミネーター断片を含有するPCR反応に移行させた。T7プロモーターは25塩基を含有していた一方で、T7-プロモーターHisタグ断片は104塩基のEcoRV/BglII断片を含有していた。T7-ターミネーター断片は74塩基オリゴヌクレオチドであった。第2のPCR反応に関する反応時間および温度は、94 で2分間、続いて94 で20秒間、60 で35秒間、および70 で2分間(2kb以上を含有する遺伝子に関しては、各kbについて1分を追加)を30サイクルであった。

20

## 【実施例2】

## 【0136】

ワクシニアでワクチン接種したマウスおよびヒトにおける体液性免疫性の抗原性標的を同定するためのワクシニアウイルスプロテオームの使用

防御的体液性免疫応答を引き起こすワクシニアウイルスにおける抗原すべてを系統的にスクリーニングおよび同定するのに使用される方法は以下の通りである。TAP技術の使用により、ワクシニアゲノムのあらゆる遺伝子が増幅される。PCR反応は、HAエピトープをコードするヌクレオチド配列がこれらの増幅された転写的に活性な遺伝子に結合されるように実施される。生じたHAタグ付けTAP断片を、HAエピトープタグを含有する266個のワクシニアウイルスポリペプチドすべてを産生するように発現させる。266個のHAタグ付けポリペプチドを、96ウェルプレート中の異なるHA抗体でコーティングしたウェルに入れる。ワクシニアで免疫化したヒト由来の血清を266個の異なるウェルそれぞれに添加する。反応をインキュベートして、洗浄して、未結合の血清ポリペプチドを除去する。プレートに結合したポリペプチドに特異的な抗体は、依然としてプレートに結合したままである。酵素結合抗ヒト抗体(ヒト血清由来のポリペプチド特異的抗体の検出用)を各ウェルに添加する。ウェルをインキュベートして、洗浄して、未結合の抗体を除去する。基質を添加して、プレートに結合しているポリペプチド特異的抗体を定量化する。

30

## 【実施例3】

## 【0137】

ワクシニアでワクチン接種したマウスおよびヒトにおける細胞媒介性免疫性の抗原性標的を同定するためのワクシニアウイルスプロテオームの使用

防御的細胞媒介性免疫応答を引き起こすワクシニアウイルスにおける抗原すべてを系統的にスクリーニングおよび同定するのに使用される方法は以下の通りである。TAP技術の使用により、ワクシニアゲノムのあらゆる遺伝子が増幅される。PCR反応は、あらゆる遺伝子が転写的に活性となるように実施される。生じたTAP断片を、266個のワクシニアウイルスポリペプチドすべてを産生するように発現させる。ポリペプチドそれぞれを、ポリペプチド供給試薬を用いて96ウェルプレート中に配置される樹状細胞へと供給する。ワクシニアで免疫化したヒト由来の血清を266個の異なるウェルそれぞれに添加

40

50

する。

【0138】

IFN - ELISPOTアッセイは、以下の材料および方法を用いて実行される：

【0139】

材料：

Millipore 96 ウェルマルチスクリーンフィルトレーションプレート (Millipore #MAIP S45-10) (Millipore, Bedford, MA)

抗IFN-g 精製MAb (クローン1-D1K) (MABTECH #3420-3) (Mabtech, Naka, Sweden)

抗IFN-g ビオチン化MAb (クローン7-B6-1) (MABTECH #3420-6) (Mabtech, Naka, Sweden) 10

ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ (MABTECH #3310-8) (Mabtech, Naka, Sweden)

アルカリホスファターゼ基質キット (BIO-RAD #170-6432) (Bio-Rad, Hercules, CA)

カーボネート緩衝液 pH 9.6 (0.2 μM 滅菌濾過)

PRMI-1640 培地 (GIBCO #22400-089) (Gibco, Grand Island, N.Y.)

ウシ胎児血清 (Sigma #F4135-500mL) (Sigma, St. Louis, MO)

1 × PBS (10 × PBS DIGENE #3400-1010 から調製) (DIGENE, Gaithersburg, MD) 20

Tween (R) 20 (J.T. Baker #X251-07) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)

【0140】

方法：

96 ウェルプレートは、10 ~ 15 μg / mL (100 μL / ウェル) でコーティング抗体 (抗IFN-g クローン1-D1K) でコーティングし、4 で一晩インキュベートする。無菌技法を用いて、プレートを軽くはじいてコーティング抗体を除去して、RPMI-1640 で6回洗浄する。プレートを、RPMI-1640 + 10% FBS (またはヒトAB血清) 100 μL / ウェルで室温にて1 ~ 2時間ブロックする。プレートを軽くはじいてブロッキング緩衝液を除去して、抗原特異的ペプチドまたは対照ペプチド100 μL / ウェルを、最終濃度10 μg / ウェルで添加する。末梢血リンパ球 (PBL) を  $4 \times 10^5$  / ウェルおよび  $1 \times 10^5$  / ウェルで添加する。プレートを37 / 5% CO<sub>2</sub> で36時間インキュベートする。プレートを軽くはじいて細胞を除去して、200 ~ 250 μL / ウェルでPBS + 0.05% Tween (R) 20を用いて6回洗浄する。プレートをペーパータオル上でプロット乾燥する。 30

【0141】

1 × PBS で1 : 1, 000で希釈したビオチン化抗体 (抗IFN-g クローン7-B6-1) を100 μL / ウェルで添加する。得られた溶液を室温で3時間インキュベートする。プレートを軽くはじいてビオチン化抗体を除去して、200 ~ 250 μL / ウェルでPBS + 0.05% Tween (R) 20を用いて6回洗浄する。プレートをペーパータオル上でプロット乾燥する。ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼを、1 × PBS で1 : 1, 000に希釈して100 μL / ウェルで添加する。プレートを室温で1時間インキュベートする。プレートを軽くはじいてストレプトアビジン - アルカリホスファターゼを除去して、200 ~ 250 μL / ウェルで0.05% Tween (R) 20で6回洗浄する。プレートを、200 ~ 250 μL / ウェルで1 × PBSを用いてさらに3回洗浄する。プレートをペーパータオル上でプロット乾燥する。 40

【0142】

基質を、100 μL / ウェルで室温にて10 ~ 15分間添加する。基質は、製造業者のプロトコルに従って調製される。25 × 基質緩衝液を、dH2O中に1 × 濃度へと希釈す 50

る。試薬 A & B それぞれを、1 × 基質緩衝液中に 1 : 100 で希釈する。多量の水道水でプレートをしずくこと（プレートに多量の水を注ぎ、数回軽くたたくこと）により、比色基質を停止させる。プレートを暗所で室温にて一晩乾燥させる。実体顕微鏡 (Zeiss KS EL lspot) を用いて、IFN - 産生細胞に相当するスポットを視覚的に測定する。結果は、 $10^6$  個の脾臓細胞当たりの IFN - 分泌細胞数として表され得る。ワクシニアペプチドエピトープを試験するための応答がペプチドなしに対する応答と比較した場合に有意差がある ( $p < 0.05$ ) 場合、および刺激指数 ( $SI = \text{試験ペプチドによる応答} / \text{対照ペプチドによる応答}$ ) が 2.0 を超える場合には、応答は陽性であるとみなされる。

#### 【実施例 4】

##### 【0143】

#### 細胞性ワクチン抗原選別

ヒトボランティアを、マラリアの原因である感染性作用物質である熱帯熱マラリア原虫由来の照射スポロゾイトで免疫化した。ボランティア由来の樹状細胞を単離および培養する。熱帯熱マラリア原虫由来の組換え CSP ポリペプチドを、「細胞内タンパク質供給試薬 (Intracellular Protein Delivery reagents)」という表題の米国特許出願第 09 / 738046 号に記載されるポリペプチド供給試薬を用いてまたは用いずに、樹状細胞へ供給した。免疫化ボランティアから単離した T 細胞を培養物に添加した。EliSpot アッセイにより、CSP が上記供給試薬と一緒に培養物に添加された場合に培養物に添加された 250,000 個の T 細胞から 120 個の CSP 抗原特異的 T 細胞が同定された。CSP が上記供給試薬なしで添加された場合、シグナルはかろうじてバックグラウンドを超えた。

#### 【実施例 5】

##### 【0144】

#### マウスの DNA 免疫化

1 つの実験当たり 40 匹の動物を平均とし、4 週齢の BALB / c 雌マウスから構成される 1 群当たり 5 匹の動物で実験を設定する。これらのマウスを、選択したワクシニアウイルス抗原をコードするプラスミド DNA または転写的に活性な PCR 断片 50  $\mu$ g で、各前脛骨筋に、3 週間隔で 3 回筋内に免疫化する。

##### 【0145】

抗体研究のために、各免疫化の 10 日後に血清を収集する。血液試料 (約 50  $\mu$ l) を、滅菌パスチュラピペットを用いて眼窩出血によりマウスから収集する。マウスは、およそ 50  $\mu$ l の容量で約一週間に一度出血させる。

##### 【0146】

3 回目の免疫化の 14 日後に脾臓細胞を収集し、IFN - EliSpot アッセイのような T 細胞観察に供する。実験の最後に CO<sub>2</sub> (SOP 98.19) により安楽死させた動物で組織収集を行う。実験は、5 匹の動物 / 群であり得て、40 匹の動物 / 実験 × 4 回の実験を平均として、総数 160 匹のマウスである。

#### 【実施例 6】

##### 【0147】

#### PCR 鋳型として使用されるべきワクシニアウイルスゲノム DNA の調製

ワクシニアビリオン DNA を PCR 鋳型として使用する。粗製ストックワクシニアを用いて、HeLa 細胞攪拌培養物 10 リットルを感染させる。感染の 2 ~ 3 日後に、遠心分離により細胞を収集し、氷上で 10 mM トリス HCl (pH 9.0) 中で少しずつ破壊する。核をペレット化して、洗浄して、再ペレット化して、その後上清を組み合わせ、トリプシン処理して、36% スクロースクッション上に置いた。遠心分離後、ペレット化したウイルスを分散させて、トリプシン処理して、5 ~ 40% スクロース勾配上へ載せる。バンドを収集し、希釈して、ウイルスを洗浄する。精製ビリオンのデオキシコレート抽出物を遠心分離して、細片を除去して、ペレットを再抽出し、組み合わせた上清を DEAE セルロースカラムにかけて、0.1 M KCl、トリス HCl (pH 8.4) で平衡化する。250 mM KCl でカラムを洗浄した後、ワクシニア DNA を 0.7 M KCl

10

20

30

40

50

で溶出させ、エタノール沈殿し、TE緩衝液に再溶解させる。

【実施例7】

【0148】

ヒト樹状細胞の調製

樹状細胞を、Allcells: カタログ番号PB002 (NPB-単核細胞) から注文した。細胞は50 mL 緩衝液中に存在していた。細胞をすぐに計数し、総数は $312.5 \times 10^6$  個であった。細胞をペレット化して、DNアーゼを含有する25 mL RPMI-1640中に再懸濁させた。この溶液(30  $\mu$ g/mL)を室温で5分間インキュベートした。完全培地で細胞を二度洗浄した。細胞を $10 \times 10^6$  個の細胞/3 mLで再懸濁させた。皿それぞれに完全培地10 mLを含有する12個の10 mm皿を使用した。細胞を37

で3時間インキュベートした。プレートを穏やかに振とうし、上清を吸引することにより、非接着細胞を除去した。その後、接着細胞を含有する皿を、2%ヒト血清を含有するRPMI-1640 10 mLで3回洗浄した。50 ng/mLのGM-CSFおよび500 ng/mL IL-4を含有する培養培地10 mLを、プレートそれぞれに添加した。この培養培地は4日目まで添加した。4日後、GM-CSFおよびIL-4の入っていない培養培地を添加した。トランスフェクションは5日目に行われた。完全培地は、RPMI-1640 (455 mL)、5%ヒトAB血清(25 mL)、非必須アミノ酸(5 mL)、ピルビン酸ナトリウム(5 mL)、L-グルタミン(5 mL)、およびペニシリン-ストレプトマイシン(5 mL)から構成されていた。

10

【実施例8】

【0149】

マウス骨髄からの樹状細胞の生成

1匹のマウスの骨(マクロファージを除去していない大腿骨2つおよび脛骨2つ)から細胞を採取した。骨髄から赤血球を獲得して、溶解した。細胞を計数し( $51 \times 10^6$  個の細胞、総数)、トランスフェクション前に、成長培地中で8日間培養した( $2.5 \times 10^6$  個の細胞/プレート、10 mL/プレート)。4日目に、成長培地をもう10 mL添加した。6日目に、古い培地10 mLを各プレートから採取して、細胞をペレット化した。10 ng/mLのGM-CSFおよび2.5 ng/mL IL-4を有する培地10 mL中に細胞を再懸濁させた。細胞を培養に戻した。8日目にトランスフェクトするまで細胞を培養した。トランスフェクションの日に、 $2.5 \times 10^6$  個の細胞を各皿から収集した。mbmDC用の成長培地は、DMEM/Iscove、10% FCS、50  $\mu$ M

-メルカプトエタノール、1xペニシリン/ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、10 mM ヘペス、1x非必須アミノ酸、20 ng/mL rmGM-CSF、および5 ng/mL rmIL-4を含有していた。

20

30

【実施例9】

【0150】

HAエピトープタグの付加

オリゴは、それぞれpCMVおよびpTP-SV40からのTAPプロモーターおよびターミネーター断片を用いて、HAエピトープタグをコードするヌクレオチド配列を付加して設計される。コード配列の5'末端へのHAエピトープの付加に関して、以下の配列を使用する:

40

プロモーター5' : CCGCCATGTTGACATTTG (配列番号2)

プロモーター3' : GGCAGATCTGGGAGGCTAGCGTAATCCGGA  
ACATCGTATGGGTACATTTGTTAAGTCGACGGTGC (配列番号3)

コード配列の3'末端へのHAエピトープの付加に関して、以下の配列を使用する:

ターミネーター5' : GATCCCGGGTACCCATACGATGTTCCGGAT  
TTACGCTTAGGGGAGATCTCAGACATG (配列番号4)

ターミネーター3' : CAGGATATCATGCTTGCAGGACGACTCTA  
GAG (配列番号5)

50

## 【0151】

上記方法は以下を包含する：

PCRを用いて、鋳型としてpCMVmを利用して新規HAプロモータを、および鋳型としてpTP-SV40を利用して新規HAターミネータを増幅する。得られたPCR産物を、QIAGEN QIAquickゲル抽出キット(Qiagen, Seattle, WA)を用いてゲル精製する。PCR産物および両方のプラスミド(pCMVmおよびpTP-SV40)をEcoRVおよびBglII制限酵素で消化する。消化産物すべてを、QIAquickゲル抽出キットを用いてゲル精製する。HAプロモーターおよびHAターミネータを、消化pCMVmおよびpTP-SV40プラスミドに個々に連結する。これらのプラスミドをDH5に形質転換して、カナマイシンを含有するLBプレート上で一晩成長させ、コロニーを選択して、カナマイシンを含有するLB培地中で成長させる。QIAGEN QIAprepスピンミニプレップキットを用いて、プラスミドを単離する。EcoRVおよびBglIIを用いてプラスミドを消化する。消化物をゲル上に流して、正しいサイズの挿入物を有するプラスミドを含有するコロニーを同定する。プラスミドをシーケンシングして、挿入物が正しいことを確認する。プレップ培養を成長させ、プラスミドを単離して、プラスミドをEcoRVおよびBglIIで消化して、プロモーターおよびターミネータ断片をゲル精製する。Epi-TAP-5' HAおよびEpi-TAP-3' HAキットを使用する。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0152】

20

【図1】TAP発現断片を生成するのに使用される方法の1つを示す図である。

【図2】TAP技術を用いて多数の遺伝子を増幅し、上記遺伝子産物を発現させ、得られたポリペプチドを精製および定量化する方法を示す図である。

【図3】各ポリペプチドの、体液性免疫応答を誘発する能力を測定するために、標的生物由来の複数のポリペプチドをアッセイし得る方法を示す図である。

【図4】各ポリペプチドの、細胞媒介性免疫応答を誘発する能力を測定するために、標的生物由来の複数のポリペプチドをアッセイし得る方法を示す図である。

【図5】蛍光タンパク質(ヤギIgG抗体)は、タンパク質供給試薬なし(A&C)に対して、タンパク質供給試薬(B&D)を有するNIH-3T3細胞(A&B)およびヒト樹状細胞(C&D)により効果的に供給することができることを示す図である。

30

【図6】体液性ワクチン抗原スキャンを示す図である。熱帯熱マラリア原虫由来の424個の異なる抗原をコードするHA-EpiTAP断片を増幅し、UM449細胞を含有する5個の96ウェルプレートの別個のウェルに個々にトランスフェクトすることができる。細胞を溶解して、上清および溶解産物を、プレートの表面に結合されたHA抗体を含有する別の96ウェルプレートセットに移行する。HA抗体は、細胞溶解産物中に存在するHAエピトープタグ付け抗体を捕捉することができる。感染個体由来の血清を各ウェルに添加して、ウェルの底部の抗原は、血清中に存在する抗マラリア抗体を捕捉することができる。結合抗マラリア抗原抗体は、抗ヒト検出用抗体を用いて定量化される。自然に免疫化された個体は一般に、血液段階生物に対する抗原を示し得るのに対して、スポロゾイト免疫化した個体は一般に、肝臓段階生物に対する抗体を有する。

40

【図7】細胞性ワクチン抗原スキャンを示す図である。熱帯熱マラリア原虫由来の424個の異なる抗原をコードするTAP断片を増幅し、96ウェルプレート中のハプロタイプ適合性抗原提示細胞に個々にトランスフェクトする。免疫化個体の血液から単離したT細胞をトランスフェクト細胞と混合し、インターフェロン- $\gamma$ 産生をElispotアッセイによりモニタリングする。スポロゾイト個体における防御的応答に寄与する多数の潜在的抗原がこのアプローチにより発見される。

【図8】プロモーターおよびターミネータを隣接する5'および3'プライマー(P1およびP2)を用いて、CMVベースのプラスミド鋳型から生成されるPCR増幅産物を示す図である。これにより、完全長プロモーターおよびターミネータ配列が隣接するレポーター遺伝子をコードするPCR断片が産生される。

50

【図9】触媒量の遺伝子特異的プライマー（P3およびP4）と混合した触媒量のプロモーターおよびターミネーター断片（F1およびF2）を示す図である。プライマーP3およびP4はまた、プロモーターおよびターミネーターに相補的な約20個のヌクレオチド配列を有する。プロモーターおよびターミネーターの5'末端および3'末端に相補的な過剰量のプライマーP1およびP2は、プロモーターおよびターミネーター配列を隣接して有する遺伝子断片に導く産物を増幅するのに使用される。

【図10】TAPターミネーターおよびTAPプロモーター断片用の供給源として使用することができるプラスミドを示す図である。

【図11】TAPクローニングスキームを示す図である。TAP断片を、相補的末端を含有する線状化プラスミドと混合することができ、混合物を、高リコンビナーゼ活性を含有する宿主細菌細胞にエレクトロポレートすることができる。生じた安定なコロニーのほとんどが、定方向的に挿入された所定の遺伝子を有するプラスミドを含有する。

【図12】共通の5'および3'TAP末端を有する各遺伝子に特異的なカスタムオリゴを用いて増幅したマラリア寄生虫由来の3つの抗原をコードするDNA鋳型を示す図である。第2のPCR反応を実施して、各一次TAP産物にTAPプロモーターおよびTAPターミネーターを付加して、さらなる1050bpのサイズを付加して、最終的な活性TAP発現断片を生産した。相当する一次および最終PCR産物を互いに隣接して流して、試料を0.8%アガロースゲル上の電気泳動により分離した。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> GENE THERAPY SYSTEMS, INC.  
 FELGNER, Philip, L.  
 DOOLAN, Denise, L.

<120> PROTEIN ARRAYS AND METHODS AND SYSTEMS  
 FOR PRODUCING THE SAME

<130> GTSYS.008VPC

<150> US 60/294,739  
 <151> 2001-05-30 10

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens

<400> 1  
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgetgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60  
 tcgcccagc 69

<210> 2  
 <211> 17 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> HA epitope encoding sequence added to a pCMV $\alpha$  5'  
 promoter sequence

<400> 2  
 ccgccatggt gacattg 17

<210> 3  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> 30  
 <223> HA epitope encoding sequence attached to a pCMV $\alpha$   
 3' promoter sequence

<400> 3  
 ggcagatctg ggaggctagc gtaatccgga acatcgtatg ggtacattgt taagtcgacg 60  
 gtgc 64

<210> 4  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> HA epitope encoding sequence added to a pTP-SV40 40

5' terminator sequence

<400> 4  
gatccccgggt acccatacga tgttccggat tacgcttagg ggagatctca gacatg 56

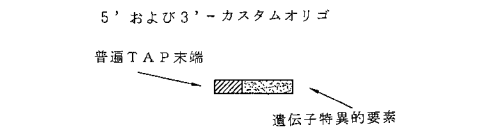
<210> 5  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> HA epitope encoding sequence added to a pTP-SV40  
3' terminator sequence

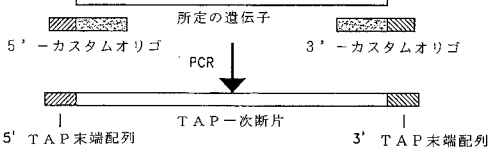
<400> 5  
caggatatca tgcctgcagg acgactctag ag 32

【 図 1 】

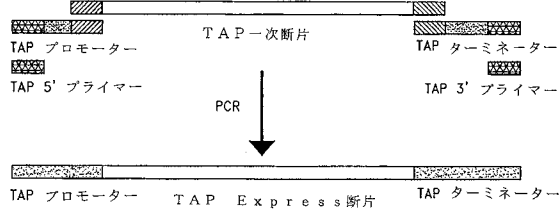
工程 1 普通TAP末端を含有する遺伝子特異的カスタムプライマーの合成



工程 2 TAP一次断片を創出するためのカスタムプライマーによる所定の遺伝子の増幅

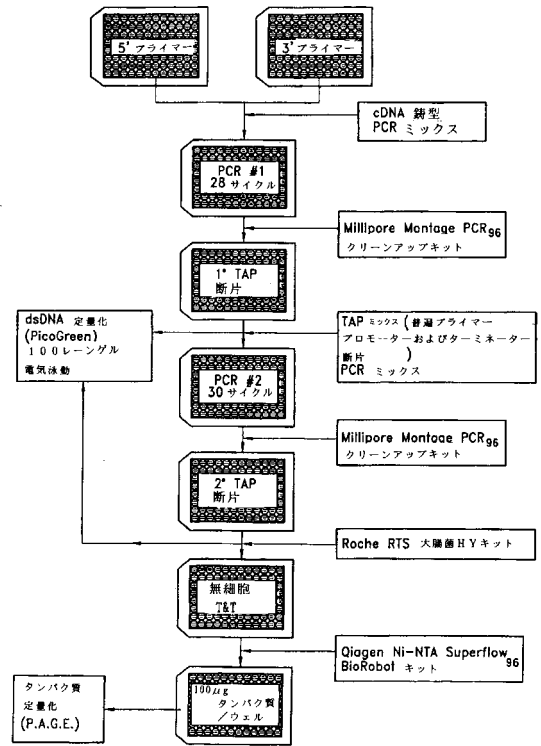


工程 3



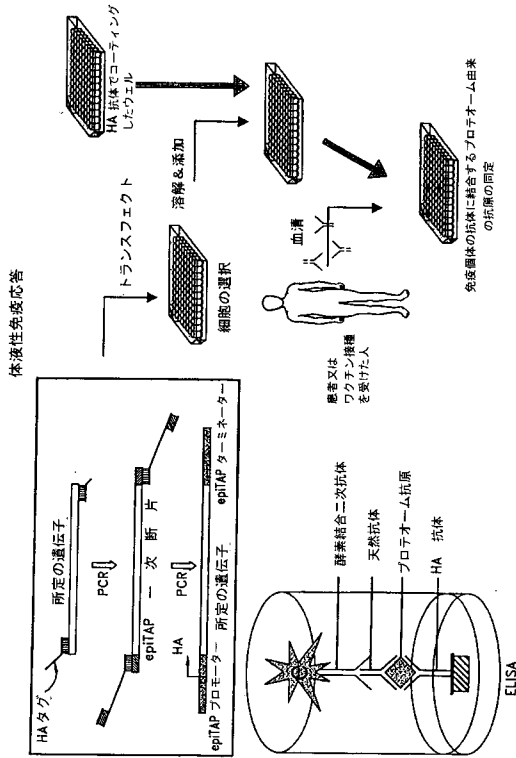
この断片は転写的に活性であり、培養細胞へのトランスフェクションまたは動物への注入の準備が完了している。

【 図 2 】



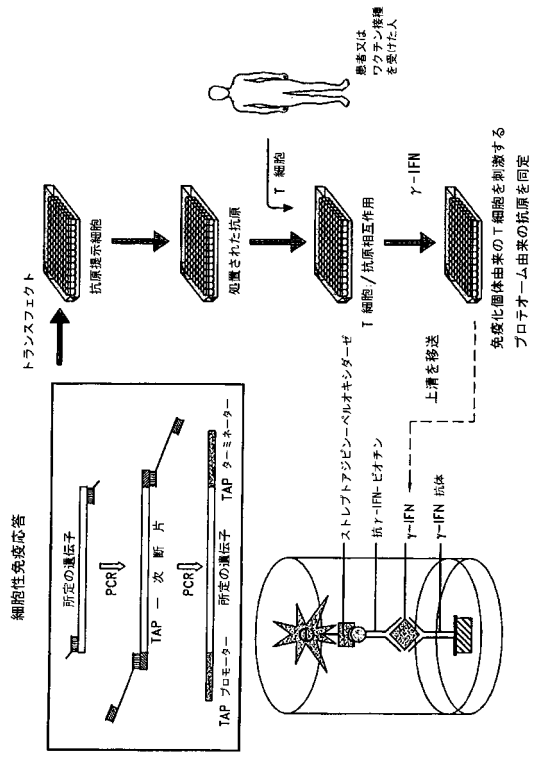
【 図 3 】

TAPによるワクチノミクス

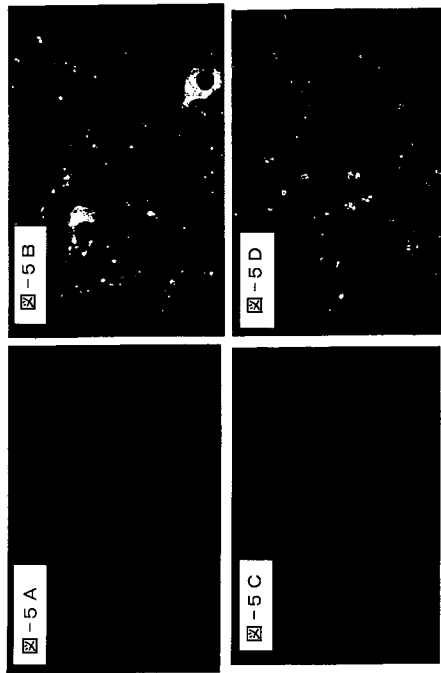


【 図 4 】

TAPによるワクチノミクス



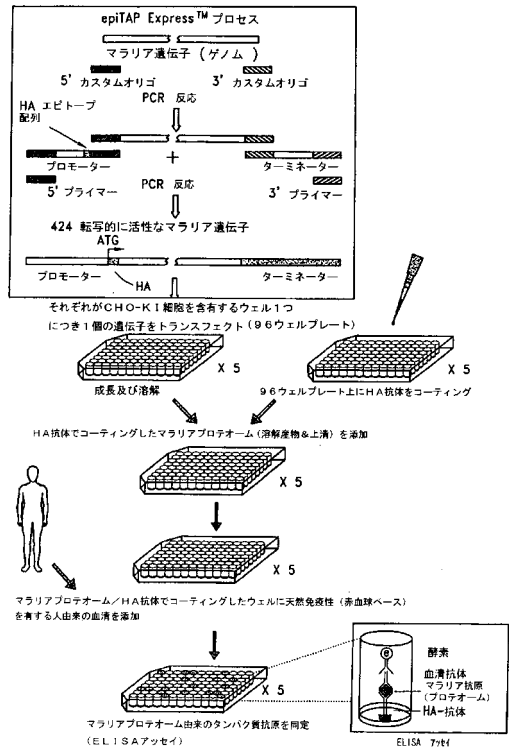
【 図 5 】



【 図 6 】

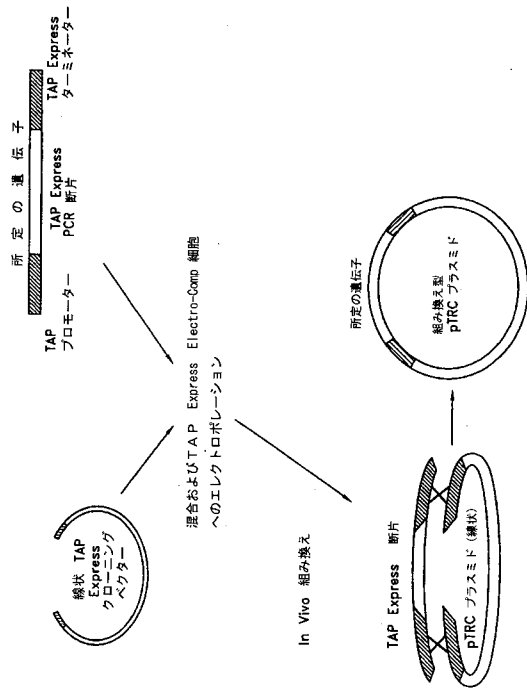
TAP迅速ワクチン抗原スキャンシステム

TAP抗体スキャン方法を用いたマラリア抗原の迅速な同定方法





【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

マラリア 抗原



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/17005		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : C12Q 1/68, 1/70 US CL : 435/5, 6, 7.2, 7.32 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 6, 7.2, 7.32				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) west, ca, hacaplus, biosis, medline				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
P, Y	US 6,291,665 B1 (GAFFNEY et al) 18 September 2001 (18.09.2001), column 15, lines 20 up to column 19, line 21.	1, 10, 11		
Y	US 6,083,695 A (HARDIN et al) 04 July 2000 (04.07.2000), column 10, line 33 up to column 11, line 30.	1, 10, 11		
A	US 5,888,736 A (LACROIX et al) 30 March 1999 (30.03.1999), entire document.	1-5, 10, 11		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * 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 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         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           "I" 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            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* 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 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	"I" 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
* 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 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	"I" 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 18 December 2002 (18.12.2002)		Date of mailing of the international search report 10 APR 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer T. Wessendorf Telephone No. 703-308-0196		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/17005

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

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

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5, 10, 11

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US02/17005

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

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

- Group I, claim(s) 1-5, 10 and 11 drawn to a method of generating a library of target organism polypeptides, without a linker.
- Group II, claim(s) 6 and 7-9 drawn to a method of generating a library of target organism polypeptides, with a linker.
- Group III, claim(s) 16-17, drawn to a method of screening a library of target organism polypeptides to identify a target antigen capable of eliciting a humoral immune response.
- Group IV, claim(s) 18-22, drawn to a method of screening a library of target organism polypeptides to identify a target antigen capable of eliciting a cellular mediated immune response.
- Group V, claim(s) 23-24, drawn to a method for developing a subunit vaccine against a target organism.
- Group VI, claim(s) 25-26, drawn to a method of making a subunit vaccine that elicits an immune response.
- Group VII, claim(s) 27-28, drawn to a method of developing a subunit vaccine against a target organism comprising a nucleic acid sequence.
- Group VIII, claim(s) 29-30, drawn to a method of developing a subunit vaccine against a target organism capable of eliciting a cell-mediated immune response.
- Group IX, claim(s) 31-36, drawn to an array and method of screening the array.
- Group X, claim(s) 37-38, drawn to a method of developing subunit vaccine.
- Group XI, claim(s) 39-40, drawn to a method of developing a vaccine using nucleic acid.
- Group XII, claim(s) 41-43, drawn to an array with peptide-linker and method of screening the array.
- Group XIII, claim(s) 44-45, drawn to a method of developing a vaccine using an array.
- Group XIV, claim(s) 46-47, drawn to method of developing a subunit vaccine using nucleic acid.
- Group XV, claim(s) 48-57, drawn to an automated system.
- Group XVI, claim(s) 49-57, drawn to an array.
- Group XVII, claim(s) 58-66, drawn to a method of generating a library of target organism polypeptides comprising the step of using a nucleic acid with adapter sequences.
- Group XVIII, claim(s) 67-72, drawn to a method of screening a library of target organism polypeptide capable of eliciting humoral immune response.
- Group XIX, claim(s) 73-78, drawn to a method of screening a library for cell-mediated response including delivering a least 10 target organism polypeptides into a plurality of antigen presenting cells.
- Group XX, claim(s) 79-80, drawn to a method of generating organism peptides by amplifying a nucleic acid from the target organism by PCR.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/17005

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

A). Linker molecule as recited in claims 6- 9 or claim 53:

1. His-tag
2. GST tag
3. Fluorescent protein tag
4. Flag tag
5. HA tag

B). Antigen presenting cells (claims 20-22) (Group III) or Group VIII (claims 34-36).

1. B cells
2. Macrophages
3. Dendritic cells

C). Organism as recited in claims 60-64 (Group XVI) or claims 67-72(Group XVII) or claims 74-78 (Group XVIII)

1. Vaccinia Virus
2. B. anthracis
3. Francisella tularensis
4. P. falciparum
5. M. tuberculosis

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

See above.

The following claim(s) are generic: 1, 16, 18, 23, 25, 27, 29, 31, 37, 39, 41, 44, 46, 58, 67, 73.

The inventions listed as Groups I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XIV, XIII, XVII, XVIII, XIX do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the methods lack a corresponding special technical features since each of the methods employ different steps, conditions and/or components in the methods.

The inventions listed as Groups IX, XII, XV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the array lack a corresponding special technical features since each of the arrays comprises different components and each array defines a contribution over the prior art. For example, the array of Group VIII does not need a linker i.e., a non-covalent attachment for the components in the array.

The inventions listed as Groups I, II, III and XV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the methods and computer system lack a corresponding special technical features since the method can be generated without a computer.

The inventions listed as Groups (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XIV, XIII, XVII, XVIII, XIX) and Groups IX, XII and XVI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the methods lack a corresponding special technical features with the array as the method generates a library of organism target polypeptide not a multiple positioned polypeptide at different locations as in an array.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

L i n u x

ペンティアム

(74) 代理人 100098268

弁理士 永田 豊

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(72) 発明者 フェルグナー, フィリップ エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 7 ランチョ サンタ フェ ラス パロマス 5 4  
1 2

(72) 発明者 ドーラン, デニス エル.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 3 ロックビル ノルベック ロード 4 7 0 8

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BA11 BB50 DA12 DA36 FB02

4B024 AA01 AA11 BA31 BA32 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 DA02  
DA06 EA02 EA04 FA02 FA07 GA11 GA18 GA19 HA03 HA08  
HA14

4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ08 QQ10 QQ79 QR41 QR48 QR77 QR82  
QS12 QS24 QS28 QS36 QX01

4B064 AG01 AG31 AG32 CA02 CA10 CA19 CA50 CC24 CC30 CD01  
CD07 DA01 DA13

4C085 AA03 BA01 BA85 EE01

4H045 AA10 BA10 BA60 CA01 CA11 DA86 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005515754A5</a>	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003500220	申请日	2002-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	基因治疗系统公司 美国政府		
申请(专利权)人(译)	基因治疗系统公司 美国		
[标]发明人	フェルグナーフィリップエル ドゥーランデニスエル		
发明人	フェルグナー,フィリップ エル. ドゥーラン,デニス エル.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/275 A61P31/12 C07K17/00 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/1086 C07K2319/21 C07K2319/23 C07K2319/42 C07K2319/43 C07K2319/60 C12N15/10 C12N15/1093 C12N15/66 C40B30/04 G01N33/6845 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.A A61K39/275 A61P31/12 C07K17/00 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG31 4B064/AG32 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA50 4B064/CC24 4B064/CC30 4B064/CD01 4B064/CD07 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/BA01 4C085/BA85 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/CA01 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	川口义行 永田豊 远山 勉		
优先权	60/294739 2001-05-30 US		
其他公开文献	JP2005515754A		

#### 摘要(译)

公开了用于快速产生和分析多种多肽的方法。更具体地，测定文库和多肽阵列以测量个体免疫原性作用。基于多肽的免疫原性作用，可以开发特定的亚单位疫苗。

