

明 細 書

発明の名称：

複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子のスクリーニング方法、及び当該スクリーニング方法を含む目的分子の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子のスクリーニング方法及び当該スクリーニング方法を含む目的分子の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、薬物標的の探索が進んでおり、従来のように単一の標的分子と結合する能力を有する分子だけではなく、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る分子も望まれるようになってきた。

[0003] そのような分子を取得する方法として、例えば、非特許文献2ではラパマイシンによるFRB及びFKBP12の結合をSplit-EGFPによる蛍光又はSplit-ルシフェラーゼによる発光により確認する方法が提案されている。さらに、非特許文献3及び4では用いる標的分子の種類や固相担体への固定の有無を変更した複数の条件下においてスクリーニングを行う方法を開示している。また、抗体分野においては、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を得るための様々な方法も提案されてきた。例えば、特許文献1では、PD-1とPD-L1のフュージョンタンパクを動物に免疫することにより、両タンパク質の界面を認識する抗体を取得する方法、非特許文献1では、IL6とgp80(IL6R)のフュージョンタンパクを動物に免疫することにより、両タンパク質の界面を認識する抗体を取得する方法を開示している。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2021/235509号

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Scientific Reports, 7:37716
非特許文献2: Cancer Res., 2005 August, 15; 65(16):7413-7420
非特許文献3: ACS Chem. Biol., 2023, 18, 1, 25-33
非特許文献4: <https://doi.org/10.1101/2022.10.13.512184>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 前記特許文献1及び非特許文献1はフュージョンタンパクを利用した免疫反応により目的とする抗体を取得する方法を開示しているに過ぎず、フュージョンタンパクを用いたスクリーニングに応用することについて開示も示唆もしていない。
- [0007] また、前記非特許文献2はFRB及びFKBP12の結合をルシフェラーゼによる発光又はEGFPの蛍光により確認する方法を開示しているに過ぎず、多様性が高いライブラリに適用することが困難である上、FRB及びFKBP12のような標的分子を結合し得る分子ではなく、それらに結合した標識分子であるSplit-ルシフェラーゼ又はSplit-EGFP自体を会合させることで発光又は蛍光が発生し、Split-ルシフェラーゼ又はSplit-EGFP自体を会合させ得る分子が取得されてしまう可能性も払拭しきれない。
- [0008] さらに、前記非特許文献3及び4は、近接した複数種類の標的分子にディスプレイライブラリを接触させることについては開示も示唆もしていない。
- [0009] ここで、複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子を取得しようとした場合、(i)それぞれの標的分子ごとにスクリーニングして得た候補分子を連結させる方法や、(ii)片方の標的分子と複合体を形成する候補分子を取得したあとにその標的分子と候補分子の複合体を別の標的分子に接

触させる方法が知られている。

例えば、経口吸収性を高めること、又は細胞内標的を狙う場合、目的分子の分子量をある程度小さくすることが一つの有力な方法である。そのため、このような目的で目的分子を取得しようとした場合、各標的分子それぞれと複合体を形成し得る候補分子を取得した後にこれらを連結する（i）の方法では、個々の候補分子の分子量の上限に大きな制限がかかる。一方、候補分子の分子量を小さくしすぎると、結合に使用できる候補分子側の構造や標的分子側の結合部位に制限が生じるため、適用可能な標的分子が限られてしまう。他方、（i i）の方法は、2つの候補分子を連結させることなく、ライブラリから複数種類の標的分子と複合体を形成し得る目的分子をスクリーニングするものであるが、単独の標的分子への単一特異性による選別が第一工程となる。この工程において、該標的（第1の標的）分子に対して優位な結合様式を有する候補分子が濃縮されるため、次の工程では、第1の標的分子に対する結合様式に偏りのある候補分子集団から、目的分子を選別しなければならない。第1の標的分子に対する優位な結合様式が、複数種類の標的分子と共に複合体を形成するための結合様式と一致するとは限らないため、スクリーニングされる候補分子の多様性に制限が生じる。各標的分子との多様な結合様式を生じうるライブラリから、目的分子を直接選別することができるスクリーニング方法が求められる。

[0010] また、単一の標的分子への結合活性のみならず、目的分子に多様な性質を求めるほど、多様な候補分子が含まれるライブラリからスクリーニングを行う必要性が高まる。加えて、複数の標的分子と共に複合体を形成するためには、目的分子が複雑な結合・反応様式をもたらすことが必要であるところ、そのために最適な分子構造は予測が難しいため、できる限り多様性のあるライブラリに適用可能で、目的分子の選択と同定が簡便な、スループット性の高いスクリーニング方法が求められる。

[0011] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を効率的に取得できるスクリーニング方

法を提供することを課題とする。本発明はまた、当該スクリーニング方法を含む目的分子の効率的な製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、候補分子－核酸結合体ライブラリに、互いに近接した複数種類の標的分子を接触させ、前記ライブラリから、前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る候補分子－核酸結合体を回収し、回収された候補分子－核酸結合体から、前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子である目的分子を同定することで、目的分子を取得できることを見出した。
- [0013] 本発明者らはまた、スクリーニングにおいて用いられる構成要素の内、少なくとも2つを連結する（複数種類の標的分子同士を連結するか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結する）工程を含む本願開示の方法により、前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る目的分子を効率的に取得できることを見出した。
- [0014] 本発明者らはまた、（1）複数種類の標的分子同士を連結するか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び（2）前記複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は前記1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結工程において用いられなかった標的分子を接触させる工程（接触工程）を含むスクリーニングによって、目的分子を取得できることを見出した。
- [0015] 本発明者らはまた、複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、該連結体に含まれない標的分子を接触させる工程（接触工程）を含む、スクリーニングによって目的分子を取得できることを見出した。
- [0016] 本発明により提供されるスクリーニング方法は、前記複数種類（例えば、2種類以上）の標的分子と共に複合体を形成し得る目的分子を、ライブラリ

に含まれる候補分子から効率的に選定することを可能とする。特定の理論に拘束されることを意図しないが、これは、本発明により提供されるスクリーニング方法においては、目的分子及び前記複数種類の標的分子により形成される複合体が、前記複数種類の標的分子が近接している場合に、より安定化するためであると考えられる。

また、本発明により提供されるスクリーニング方法における（i）互いに近接した複数種類の標的分子、及び（i i）候補分子－核酸結合体を含むディスプレイライブラリの使用も、目的分子の効率的な取得に貢献している。

[0017] 当初、候補分子－核酸結合体ライブラリに、互いに近接した複数種類の標的分子を接触させたとしても、前記複数種類の標的分子を構成している一種の標的分子のみと複合体を形成し得る分子が優位に取得されることが予測されたが、驚くべきことに、前記複数種類の標的分子との複合体を形成し得る分子が優位に取得されることが見いだされた。

[0018] 本発明では、互いに近接した複数種類の標的分子を接触させることで、前記複数種類の標的分子との複合体を形成し得る分子が優位に取得される性質を、パニングのみならず、目的分子の同定にも応用することで、前記複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を取得することを可能としている。

[0019] また、実施例でも示されているとおり、前記複数種類の標的分子が近接するためには、前記複数種類の標的分子同士が必ずしも互いに結合する性質を有している必要は無く（例えば、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が $10\text{ }\mu\text{M}$ を超えていてもよく）、例えば、融合部や固相担体等により望ましい距離（例えば、 60 nm 以下）で近接させることができる。

[0020] 特定の理論に拘束されることを意図しないが、本発明の方法により得られた目的分子は、（i）複数種類の標的分子が互いに近接した場合にのみ形成される結合部位に結合する、（i i）複数種類の標的分子それぞれに結合する2以上の異なる部位を有している、（i i i）1種類以上の標的分子に結合し、他の種類の標的分子への結合を促す等により、複数種類の標的分子と

の複合体を形成しているものと考えられる。

[0021] 本発明は、このような知見に基づくものであり、例えば、以下を包含する。

[1]

(1) 複数種類の標的分子同士を連結するか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 前記複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は前記1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結工程において用いられなかった標的分子を接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[2]

(1) 複数種類の標的分子同士を連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 候補分子－核酸結合体を、前記連結工程において用意された連結体に接触させる工程（接触工程）を含む、[1]に記載の方法。

[3]

(1) 1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 前記連結工程において用いられなかった標的分子を、前記連結工程において用意された連結体に接触させる工程（接触工程）を含む、[1]に記載の方法。

[4]

(1) 複数種類の標的分子同士を連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 候補分子－核酸結合体を、前記連結工程において用意された連結体に接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[5]

(1) 1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで

、連結体を用意する工程（連結工程）、及び（２）前記連結工程において用いられなかった標的分子を、前記連結工程において用意された連結体に接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[6]

複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は１種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、該連結体に含まれない標的分子を接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[7]

複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させる工程を含む、[6] に記載の方法。

[8]

１種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結体に含まれない標的分子を接触させる工程を含む、[6] に記載の方法。

[9]

複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させる工程を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[1 0]

１種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結体に含まれない標的分子を接触させる工程を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[1 1]

候補分子－核酸結合体と連結される前記１種類以上の標的分子が、１種類である、[1]、[3]、[5]、[6]、[8] 又は [1 0] に記載の方法。

[1 2]

互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを

接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[1 3]

前記複数種類の標的分子同士が互いに融合して標的融合分子を形成している、[1]、[2]、[4]、[6]、[7]、[9] 又は [1 2] に記載の方法。

[1 4]

複数種類の標的分子同士が互いに融合した標的融合分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[1 5]

前記複数種類の標的分子同士が融合部を介して標的融合分子を形成している、[1]、[2]、[4]、[6]、[7]、[9]、[1 2]、[1 3] 又は [1 4] に記載の方法。

[1 6]

前記融合部が、150アミノ酸残基以下から成るペプチドである、[1 5] に記載の方法。

[1 7]

前記複数種類の標的分子のN末端同士が前記融合部を介して結合している、[1 5] 又は [1 6] に記載の方法。

[1 8]

前記複数種類の標的分子のC末端同士が前記融合部を介して結合している、[1 5] 又は [1 6] に記載の方法。

[1 9]

前記複数種類の標的分子における第一の標的分子のN末端及び前記複数種類の標的分子における第二の標的分子のC末端が、前記融合部を介して結合している、[1 5] 又は [1 6] に記載の方法。

[2 0]

前記標的融合分子が固相担体上に固定化されている、[1 3] ～ [1 9]

のいずれかに記載の方法。

[2 1]

前記候補分子－核酸結合体が固相担体上に固定化されている、[1] ～ [2 0] のいずれかに記載の方法。

[2 2]

前記固相担体が、アビジン、ニュートラアビジン及びストレプトアビジンからなる群より選ばれる1つ以上をその表面に有する、[2 0] 又は [2 1] に記載の方法。

[2 3]

前記互いに近接した複数種類の標的分子が固相担体上に固定化されている、[1 2] に記載の方法。

[2 4]

前記複数種類の標的分子が同一の固相担体上に固定化されている、[1] ～ [2 3] に記載の方法。

[2 5]

同一の固相担体上に固定化されている複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[2 6]

前記固相担体の表面 1 m^2 あたり、 1×10^{13} 以上の標的分子が固定化されている、[2 4] 又は [2 5] に記載の方法。

[2 7]

前記固相担体の表面 1 m^2 あたり、 1×10^{13} 以上の標的分子を前記固相担体に対して接触させる工程を含む、[2 6] に記載の方法。

[2 8]

前記固相担体が、アビジン、ニュートラアビジン及びストレプトアビジンからなる群より選ばれる1つ以上をその表面に有する、[2 3] ～ [2 7] のいずれかに記載の方法。

[2 9]

前記接触工程が、前記候補分子－核酸結合体ライブラリと前記標的分子、又は前記標的融合分子とを混合する工程を含む、[1] ～ [2 8] のいずれかに記載の方法。

[3 0]

前記接触工程が、複数種類の標的分子から選択される1種類である第一の標的分子に、候補分子－核酸結合体それぞれと第一の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接触させる工程である、[1]、[3]、[5]、[6]、[8]、[1 0]、[1 1] 又は [1 2] に記載の方法。

[3 1]

複数種類の標的分子から選択される1種類である第一の標的分子に、候補分子－核酸結合体それぞれと前記第一の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接触させる工程を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[3 2]

前記候補分子－核酸結合体それぞれと前記第一の標的分子とは異なる標的分子とが連結部を介して連結体を形成している、[3 0] 又は [3 1] に記載の方法。

[3 3]

前記連結部が、Hisタグ及びNi－NTAを含む、[3 2] に記載の方法。

[3 4]

前記Ni－NTAが、mono－Ni－NTA、di－Ni－NTA、tetraakis－Ni－NTA及びTris－Ni－NTAからなる群より選ばれる1つ以上である、[3 3] に記載の方法。

[3 5]

前記標的分子がHisタグを含む、[3 0] ～ [3 4] のいずれかに記載

の方法。

[36]

前記候補分子-核酸結合体がN i -NTAを含む、[30]～[35]のいずれかに記載の方法。

[37]

前記連結体が固相担体上に固定化されている、[30]～[36]のいずれかに記載の方法。

[38]

前記第一の標的分子が固相担体上に固定化されている、[30]～[36]のいずれかに記載の方法。

[39]

前記固相担体が、アビジン、ニュートラアビジン及びストレプトアビジンからなる群より選ばれる1つ以上をその表面に有する、[37]又は[38]に記載の方法。

[40]

前記接触工程が、前記連結体ライブラリと前記第一の標的分子とを混合する工程を含む、[30]～[39]のいずれかに記載の方法。

[41]

前記接触工程において、前記連結体以外の標的分子及び前記連結体に前記候補分子-核酸結合体を接触させる、[1]～[40]に記載の方法。

[42]

前記連結体以外の標的分子が、前記連結体に含まれる標的分子の内の1つと同じ種類の標的分子である、[41]に記載の方法。

[43]

前記連結体以外の標的分子が1種類である、[41]又は[42]に記載の方法。

[44]

前記連結体以外の標的分子が固相担体に固定されていない、[41]から

[43] のいずれかに記載の方法。

[45]

前記接触工程において、前記連結体の濃度に対する、前記連結体以外の標的分子の濃度の比率が1以上である、[41] から [44] のいずれかに記載の方法。

[45-1]

前記接触工程を、候補分子-核酸結合体ライブラリに含まれておらず、かつ、近接した前記複数種類の標的分子に対して選択的に複合体を形成し得る分子が存在しない条件下で行う、[41] から [45] のいずれかに記載の方法。

[46]

前記複数種類の標的分子から選択される少なくとも1種類の標的分子と候補分子-核酸結合体との複合体を回収する工程（回収工程）をさらに含む、[1] ～ [45-1] のいずれかに記載の方法。

[47]

前記回収工程における回収がアフィニティーを利用した方法により行われる、[46] に記載の方法。

[48]

前記アフィニティーを利用した方法が、プルダウン法である、[47] に記載の方法。

[49]

前記アフィニティーを利用した方法が、ビオチンとビオチン結合タンパク質との間のアフィニティー、His タグとNi-NTAとの間のアフィニティー、又は抗原と抗体との間のアフィニティーを利用した方法である、[47] 又は [48] に記載の方法。

[50]

前記アフィニティーを利用した方法が、ビオチンとビオチン結合タンパク質との間のアフィニティーを利用した方法である、[47] ～ [49] のい

ずれかに記載の方法。

[5 1]

前記回収工程により回収された前記候補分子－核酸結合体中の核酸を溶出する工程（溶出工程）をさらに含む、[4 6] ～ [5 0] のいずれかに記載の方法。

[5 2]

前記溶出工程における溶出が、酵素を使用する方法、光を使用する方法、又は熱を使用する方法からなる群より選ばれる1つ以上により行われる、[5 1] に記載の方法。

[5 3]

前記溶出工程における溶出が、酵素を使用する方法により行われる、[5 1] 又は [5 2] に記載の方法。

[5 4]

前記酵素がT E V プロテアーゼである、[5 2] 又は [5 3] に記載の方法。

[5 5]

前記溶出工程において、固相担体と標的分子との結合が切断される、[5 1] ～ [5 4] のいずれかに記載の方法。

[5 6]

前記溶出工程において、標的分子と候補分子－核酸結合体との結合が切断される、[5 1] ～ [5 5] のいずれかに記載の方法。

[5 7]

前記溶出工程において、候補分子と核酸との結合が切断される、[5 1] ～ [5 6] のいずれかに記載の方法。

[5 8]

前記複合体を形成した候補分子－核酸結合体中の核酸を増幅する工程（増幅工程）をさらに含む、[4 6] ～ [5 7] のいずれかに記載の方法。

[5 9]

前記増幅工程が、前記溶出工程の後に行われる、〔５８〕に記載の方法。

〔６０〕

前記増幅工程で増幅した核酸から新たに候補分子－核酸結合体ライブラリを生成し、当該候補分子－核酸結合体ライブラリを使用して接触工程、回収工程、及び増幅工程を複数回繰り返す、〔５８〕又は〔５９〕に記載の方法。

〔６１〕

前記増幅工程で増幅した核酸から新たに候補分子－核酸結合体ライブラリを生成し、当該候補分子－核酸結合体ライブラリを使用して接触工程、回収工程、溶出工程及び増幅工程を複数回繰り返す、〔５９〕に記載の方法。

〔６２〕

前記複合体を形成した候補分子－核酸結合体から目的分子を同定する工程（同定工程）をさらに含む、〔４６〕～〔６１〕のいずれかに記載の方法。

〔６３〕

前記同定工程が、前記溶出工程及び／又は前記増幅工程の後に行われる、〔６２〕に記載の方法。

〔６４〕

前記同定工程は、前記溶出工程で溶出された前記核酸又は前記増幅工程で増幅された前記核酸の配列を決定することが含まれる、〔６２〕又は〔６３〕に記載の方法。

〔６５〕

前記同定工程は、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率（回収率Ａ）と、前記複数種類の標的分子から選択される１種類の標的分子のみに前記候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率（回収率Ｂ）とを比較することを含む、〔６２〕～〔６４〕のいずれかに記載の方法。

〔６６〕

前記回収率 B に、前記複数種類の標的分子から選択される 1 種類の標的分子である第一の標的分子のみに標的分子として候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における回収率 B 1 及び、前記第一の標的分子とは異なる第二の標的分子のみに候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における回収率 B 2 が含まれ、回収率 A と回収率 B 1 の比較及び回収率 A と回収率 B 2 の比較を行うことを含む、[6 5] に記載の方法。

[6 7]

前記回収率 B と比較した前記回収率 A が 5 倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、[6 5] に記載の方法。

[6 8]

前記回収率 B 1 及び前記回収率 B 2 の両方と比較した回収率 A が 5 倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、[6 6] に記載の方法。

[6 9]

前記同定工程は、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率（回収率 A）と、標的分子非存在下の場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率（回収率 C）とを比較することを含む、[6 2] ～ [6 8] のいずれかに記載の方法。

[7 0]

前記回収率 C と比較した、前記回収率 A が 5 倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、[6 9] に記載の方法。

[7 1]

前記同定工程は、（１）互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率（回収率（A）と、（２）前記複数種類の標的分子から選択される 1 種類の標的分子であり固相担体上に固定化されている第一の標的分子及び固相担体上に固定化されていない前記第一の標的分子とは異なる標的分子に

前記候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率（回収率D）とを比較することを含む、〔62〕～〔70〕のいずれかに記載の方法。

〔72〕

前記回収率Dに、前記複数種類の標的分子から選択される1種類の標的分子であり固相担体上に固定化されている第一の標的分子及び固相担体上に固定化されていない前記第一の標的分子とは異なる標的分子に前記候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における前記候補分子－核酸結合体の回収率D1及び、前記第一の標的分子及び第二標的分子を入れ替えた際の回収率D2が含まれ、回収率Aと回収率D1の比較及び回収率Aと回収率D2の比較を行うことを含む、〔71〕に記載の方法。

〔73〕

前記回収率Dと比較した、前記回収率Aが5倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、〔71〕に記載の方法。

〔74〕

前記回収率D1及び前記回収率D2の両方と比較した回収率Aが5倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、〔72〕に記載の方法。

〔75〕

前記同定工程は、前記回収率A、前記回収率B、前記回収率C及び前記回収率Dを相互に比較することの全てを含む、〔62〕～〔74〕のいずれかに記載の方法。

〔76〕

前記同定工程は、前記回収率Aに対して、前記回収率B、前記回収率C及び前記回収率Dを比較することの全てを含む、〔62〕～〔75〕のいずれかに記載の方法。

〔77〕

前記回収率B、前記回収率C、前記回収率Dのいずれと比較しても前記回

収率Aが5倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、
[76]に記載の方法。

[78]

前記同定工程は、前記回収率Bに対して、前記回収率Dを比較することを
含む、[62]～[77]のいずれかに記載の方法。

[79]

前記回収率Bと比較して、前記回収率Dが5倍以上である場合に、前記候補分子を目的分子として同定する、[78]に記載の方法。

[80]

*in vitro*で行われる、[1]～[79]のいずれかに記載の方法
。

[81]

GFPによる蛍光又はルシフェラーゼによる発光を用いない、[1]～[80]のいずれかに記載の方法。

[82]

前記ライブラリが、ディスプレイライブラリである、[1]～[81]の
いずれかに記載の方法。

[83]

前記ライブラリが、mRNAディスプレイライブラリである、[1]～[82]のいずれかに記載の方法。

[84]

前記ライブラリが、DNAエンコードライブラリである、[1]～[81]
]のいずれかに記載の方法。

[85]

前記ライブラリに含まれる候補分子が、 1×10^3 以上の多様性を有する、
[1]～[84]のいずれかに記載の方法。

[86]

前記ライブラリに含まれる候補分子が、 1×10^5 以上の多様性を有する、

[1] ~ [85] のいずれかに記載の方法。

[87]

前記ライブラリに含まれる候補分子が、 1×10^7 以上の多様性を有する、

[1] ~ [86] のいずれかに記載の方法。

[88]

前記ライブラリに含まれる候補分子が、 1×10^9 以上の多様性を有する、

[1] ~ [87] のいずれかに記載の方法。

[89]

前記核酸が、当該核酸と前記候補分子-核酸結合体を形成している候補分子をエンコードする核酸である、[1] ~ [88] のいずれかに記載の方法

。

[90]

前記核酸がDNAである、[1] ~ [89] のいずれかに記載の方法。

[91]

前記核酸がmRNAである、[1] ~ [90] のいずれかに記載の方法。

[92]

前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記候補分子の分子量が 300 g/mol 以上 $5,000 \text{ g/mol}$ 以下である、[1] ~ [91] のいずれかに記載の方法。

[93]

前記候補分子がペプチドである、[1] ~ [92] のいずれかに記載の方法。

[94]

前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記候補分子に含まれるアミノ酸残基数が5以上30以下である、[93]に記載の方法。

[95]

前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記候補分子に含まれる非天然アミノ酸残基数が1以上である、[93]又は[94]に記載の方法。

[96]

前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記候補分子に含まれるN置換アミノ酸残基数が1以上である、[93]～[95]のいずれかに記載の方法。

[97]

前記N置換アミノ酸残基の窒素原子上の置換基が C_1-C_6 アルキル基である、[96]に記載の方法。

[98]

前記候補分子が環状部を有する、[93]～[97]のいずれかに記載の方法。

[99]

前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記環状部を構成するアミノ酸残基数が5以上15以下である、[98]に記載の方法。

[100]

前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記候補分子の $ClogP$ が4以上25以下である、[93]～[99]のいずれかに記載の方法。

[101]

前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、前記候補分子の $ClogP$ /アミノ酸残基数が1.0以上である、[93]～[100]のいずれかに記載の方法。

[102]

前記複数種類の標的分子が2種類以上5種類以下である、[1]～[101]のいずれかに記載の方法。

[1 0 3]

前記複数種類の標的分子が2種類である、[1] ~ [1 0 2] のいずれかに記載の方法。

[1 0 4]

前記複数種類の標的分子から選択される少なくとも2つの標的分子同士の解離定数が10 μ Mを超える、[1] ~ [1 0 3] のいずれかに記載の方法。

。

[1 0 5]

前記複数種類の標的分子同士の解離定数が、いずれも10 μ Mを超える、[1] ~ [1 0 4] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6]

前記標的分子がタンパク質である、[1] ~ [1 0 5] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6 - 1]

前記標的分子がヒトの生体内に存在する分子である、[1] ~ [1 0 6] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6 - 2]

前記標的分子がスプリットタンパクを含まない分子である、[1] ~ [1 0 6 - 1] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6 - 3]

前記標的分子がGFP及びその断片のいずれも含まない分子である、[1] ~ [1 0 6 - 2] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6 - 4]

前記標的分子がルシフェラーゼ及びその断片のいずれも含まない分子である、[1] ~ [1 0 6 - 3] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6 - 5]

前記標的分子がSNAPタグ及びその断片のいずれも含まない分子である、[1] ~ [1 0 6 - 4] のいずれかに記載の方法。

[1 0 6 – 6]

前記標的分子がユビキチン及びその断片のいずれも含まない分子である、
[1] ～ [1 0 6 – 5] のいずれかに記載の方法。

[1 0 7]

前記標的分子が F K 5 0 6 結合タンパク質 (F K B P) 、 F K B P – ラパ
マイシン結合タンパク質 (F R B) 、 シクロフィリン A (C y A) 及びカル
シニューリン (C n) からなる群より選ばれる 1 つ以上を含む、 [1] ～ [1 0 6 – 5] のいずれかに記載の方法。

[1 0 8]

前記標的分子として F K B P を含む、 [1] ～ [1 0 7] のいずれかに記
載の方法。

[1 0 9]

前記標的分子として C y A を含む、 [1] ～ [1 0 7] のいずれかに記載
の方法。

[1 1 0]

前記標的分子として F K B P 及び F R B を含む、 [1] ～ [1 0 7] のい
ずれかに記載の方法。

[1 1 1]

前記標的分子として C y A 及び C n を含む、 [1] ～ [1 0 7] のいずれ
かに記載の方法。

[1 1 2]

前記標的分子が F K B P 及び F R B である、 [1] ～ [1 0 7] のいずれ
かに記載の方法。

[1 1 3]

前記標的分子が C y A 及び C n である、 [1] ～ [1 0 7] のいずれかに
記載の方法。

[1 1 4]

前記標的分子が F K B P 及び C n である、 [1] ～ [1 0 7] のいずれか

に記載の方法。

[1 1 5]

前記候補分子と前記核酸とが結合部を介して結合体を形成している、[1] ~ [1 1 4] のいずれかに記載の方法。

[1 1 6]

前記結合部がピューロマイシンを含む、[1 1 5] に記載の方法。

[1 1 7]

前記目的分子 1 0 μ M 存在下における、前記複数種類の標的分子から選択される少なくとも 2 つの標的分子同士の解離定数が 1 0 μ M 以下である、[1] ~ [1 1 6] のいずれかに記載の方法。

[1 1 8]

前記目的分子 1 0 μ M 存在下における、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が、いずれも 1 0 μ M 以下である、[1] ~ [1 1 7] のいずれかに記載の方法。

[1 1 9]

前記目的分子は、前記回収率 B と比較した前記回収率 A が 5 倍以上であるときの候補分子である、[1] ~ [1 1 8] のいずれかに記載の方法。

[1 2 0]

前記目的分子は、前記回収率 C と比較した前記回収率 A が 5 倍以上であるときの候補分子である、[1] ~ [1 1 9] のいずれかに記載の方法。

[1 2 1]

前記目的分子は、前記回収率 D と比較した前記回収率 A が 5 倍以上であるときの候補分子である、[1] ~ [1 2 0] のいずれかに記載の方法。

[1 2 2]

前記目的分子が、前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子である、[1] ~ [1 2 1] のいずれかに記載の方法。

[1 2 3]

前記目的分子 1 0 μ M 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離

定数の値が、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して小さくなる、[1]～[122]に記載の方法。

[124]

前記目的分子10 μ M存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満である、[1]～[123]に記載の方法。

[125]

前記目的分子10 μ M存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、30 μ M以下である、[1]～[124]に記載の方法。

[126]

前記目的分子10 μ M存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、30 μ M以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満である、[1]～[125]に記載の方法。

[127]

[1]～[126]のいずれかに記載の方法を含む、ペプチドの製造方法。

[128]

以下の工程を含む、ペプチドの製造方法：

(i) [1]～[127]のいずれかに記載の方法により前記目的分子をスクリーニングする工程；及び

(ii) (i)で選択された目的分子のアミノ酸配列に基づき、ペプチドを製造する工程。

[0022] 本発明はまた、例えば、以下を包含する。

[2-1]

標的分子及び候補分子が連結部を介して連結した、標的分子－候補分子連結体。

[2 - 2]

標的分子及び候補分子が連結部を介して連結し、かつ、候補分子及び核酸が結合部を介して結合した、標的分子－候補分子－核酸連結体。

[2 - 3]

前記連結部が、H i s タグ及びN i - N T Aを含む、[2 - 1] 又は [2 - 2] に記載の連結体。

[2 - 4]

前記N i - N T Aが、m o n o - N i - N T A、d i - N i - N T A、t e t r a k i s - N i - N T A及びT r i s - N i - N T Aからなる群より選ばれる1つ以上である、[2 - 3] に記載の連結体。

[2 - 5]

前記標的分子がH i s タグを含む、[2 - 3] 又は [2 - 4] に記載の連結体。

[2 - 6]

前記候補分子－核酸結合体がN i - N T Aを含む、[2 - 3] ～ [2 - 5] のいずれかに記載の連結体。

[2 - 7]

前記結合部が、ピューロマイシンを含む、[2 - 1] ～ [2 - 6] のいずれかに記載の連結体。

[2 - 8]

標的分子及び候補分子を連結部を介して連結させる、標的分子－候補分子連結体の製造方法。

[2 - 9]

標的分子及び候補分子を連結部を介して連結させ、かつ、候補分子及び核酸を結合部を介して結合させる、標的分子－候補分子－核酸連結体の製造方法。

[2 - 1 0]

前記連結部が、H i s タグ及びN i - N T Aを含む、[2 - 8] 又は [2

－ 9］に記載の製造方法。

[2－ 1 1]

前記Ni－NTAが、mono－Ni－NTA、di－Ni－NTA、tetrakis－Ni－NTA及びTris－Ni－NTAからなる群より選ばれる1つ以上である、[2－ 1 0]に記載の製造方法。

[2－ 1 2]

前記標的分子がHisタグを含む、[2－ 1 0] 又は [2－ 1 1] に記載の製造方法。

[2－ 1 3]

前記候補分子－核酸結合体がNi－NTAを含む、[2－ 1 0] ～ [2－ 1 2] のいずれかに記載の製造方法。

[2－ 1 4]

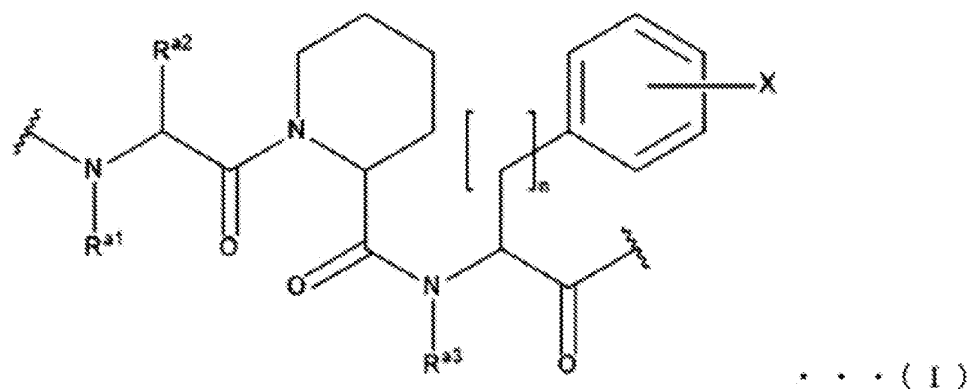
前記結合部が、ピューロマイシンを含む、[2－ 8] ～ [2－ 1 3] のいずれかに記載の製造方法。

[0023] 本発明は更に、例えば、以下を包含する。

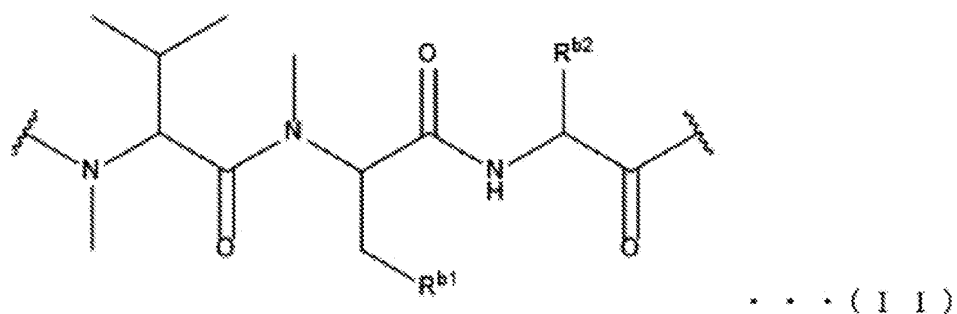
[3－ 1]

下記式 (I) 又は (I I) で表される構造を有するペプチド：

[化1]



[化2]



(式中、

[化3]



は結合手を表し、

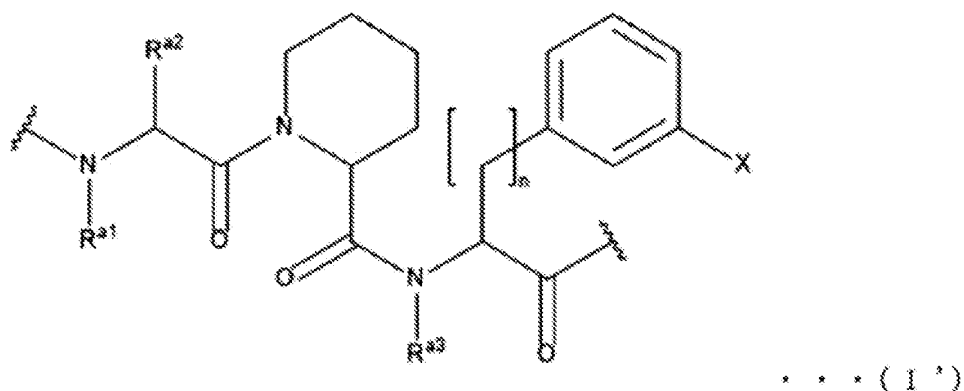
式 (I) 中、 R^{a1} は水素原子又は C_1-C_6 アルキルであり、 R^{a2} はヒドロキシにより置換されていてよい C_1-C_3 アルキル又は水素原子であり、 R^{a3} は水素原子又はメチルであり、 X はハロゲンであり、 n は 1 又は 2 であり、

式 (I I) 中、 R^{b1} はハロゲン及びアリールからなる群より選ばれるいずれか 1 つで置換されていてよい C_1-C_6 アルキル、又は $-O-R^{b3}$ であり、 R^{b3} は C_1-C_3 アルキルであり、 R^{b2} はヒドロキシで置換されていてよい C_1-C_4 アルキルである。))

[3 - 2]

式 (I ') で表される構造を有する、[3 - 1] に記載のペプチド：

[化4]



(式中、 R^{a1} 、 R^{a2} 、 R^{a3} 、 n 及び X は式(1)における R^{a1} 、 R^{a2} 、 R^{a3} 、 n 及び X と同義である)。

[3-3]

式(1)又は式(1')で表される構造を有する、[3-1]又は[3-2]に記載のペプチド。

[3-4]

R^{a1} が水素原子又は C_1-C_4 アルキルである、[3-1]～[3-3]のいずれかに記載のペプチド。

[3-5]

R^{a1} が C_1-C_4 アルキルである、[3-1]～[3-4]のいずれかに記載のペプチド。

[3-6]

R^{a1} がメチル又は n -ブチルである、[3-1]～[3-5]のいずれかに記載のペプチド。

[3-7]

R^{a2} が水素原子又はヒドロキシメチルである、[3-1]～[3-6]のいずれかに記載のペプチド。

[3-8]

R^{a3} が水素原子である、[3-1]～[3-7]のいずれかに記載のペプ

チド。

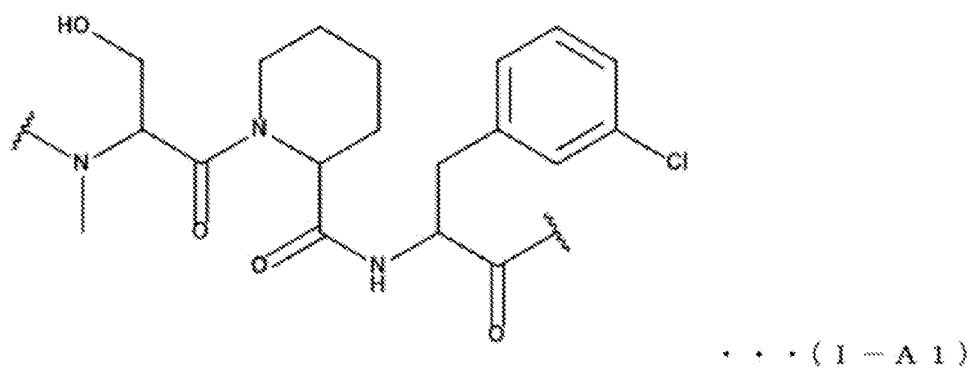
[3-9]

Xが塩素原子である、[3-1]～[3-8]のいずれかに記載のペプチド。

[3-10]

下記式(1-A1)で表される構造を有する、[3-1]～[3-9]のいずれかに記載のペプチド。

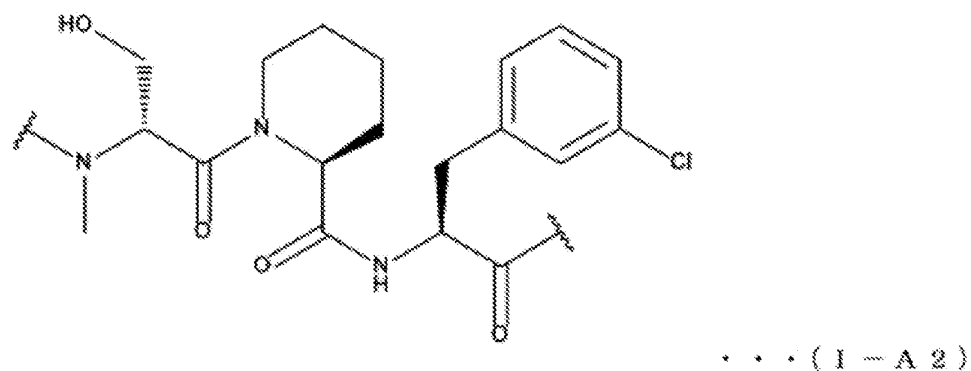
[化5]



[3-11]

下記式(1-A2)で表される構造を有する、[3-1]～[3-10]のいずれかに記載のペプチド。

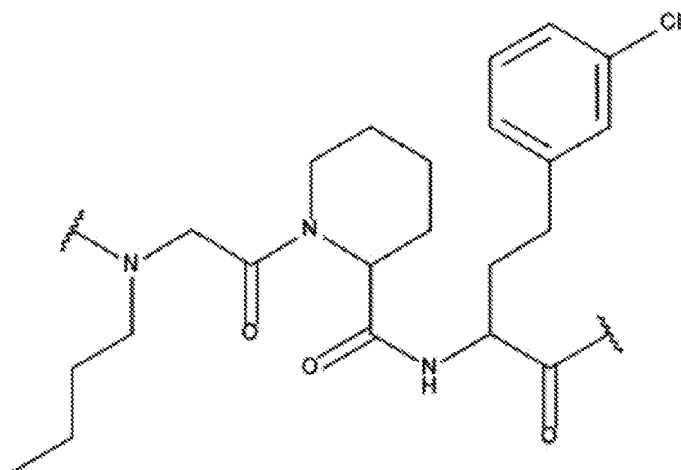
[化6]



[3-12]

下記式（I-B1）で表される構造を有する、[3-1]～[3-9]のいずれかに記載のペプチド。

[化7]

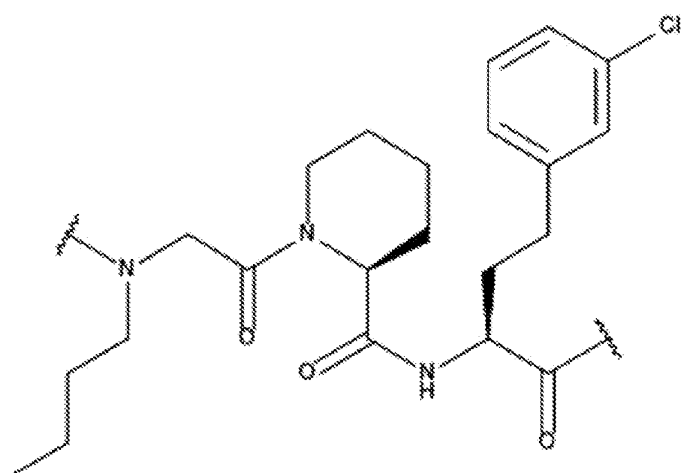


・・・(I-B1)

[3-13]

下記式（I-B2）で表される構造を有する、[3-1]～[3-9]及び[3-12]のいずれかに記載のペプチド。

[化8]



・・・(I-B2)

[3-14]

式 (11) で表される構造を有する、[3-1] に記載のペプチド。

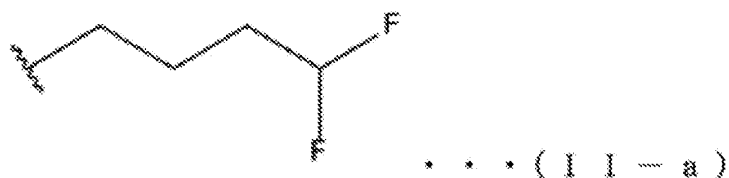
[3-15]

R^{b1} がハロゲン及びアリールからなる群より選ばれるいずれか 1 つで置換されていてよい C_1-C_5 アルキル、又は $-O-R^{b3}$ であり、 R^{b3} が n -プロピルである、[3-1] 又は [3-14] に記載のペプチド。

[3-16]

R^{b1} が下記式 (11-a), (11-b) 又は (11-c) のいずれか 1 つである、[3-1] 及び [3-14] ~ [3-15] のいずれかに記載のペプチド。

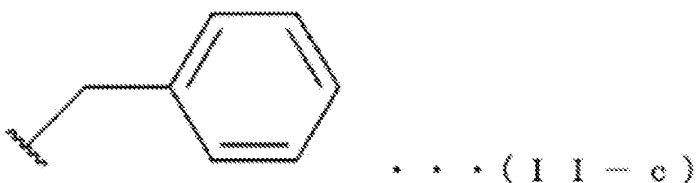
[化9]



[化10]



[化11]



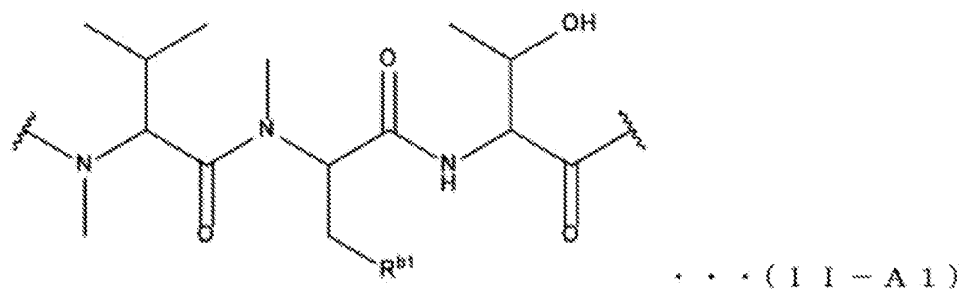
[3-17]

R^{b2} が 1-ヒドロキシエチル又は 1-メチルプロピルである、[3-1] 及び [3-14] ~ [3-16] のいずれかに記載のペプチド。

[3-18]

式(11)で表される構造が、下記式(11-A1)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-17]のいずれかに記載のペプチド。

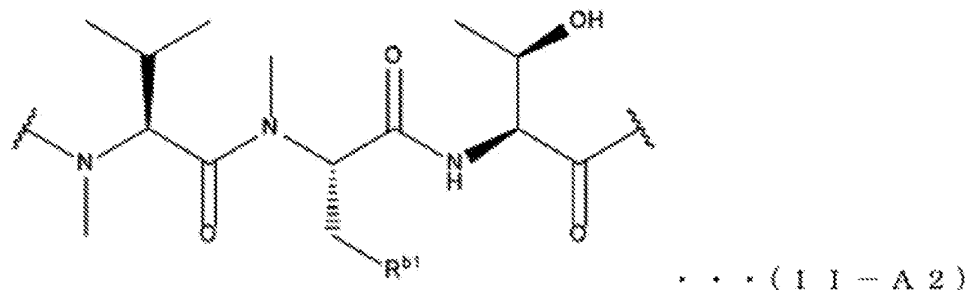
[化12]



[3-19]

式(11)で表される構造が、下記式(11-A2)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-18]のいずれかに記載のペプチド。

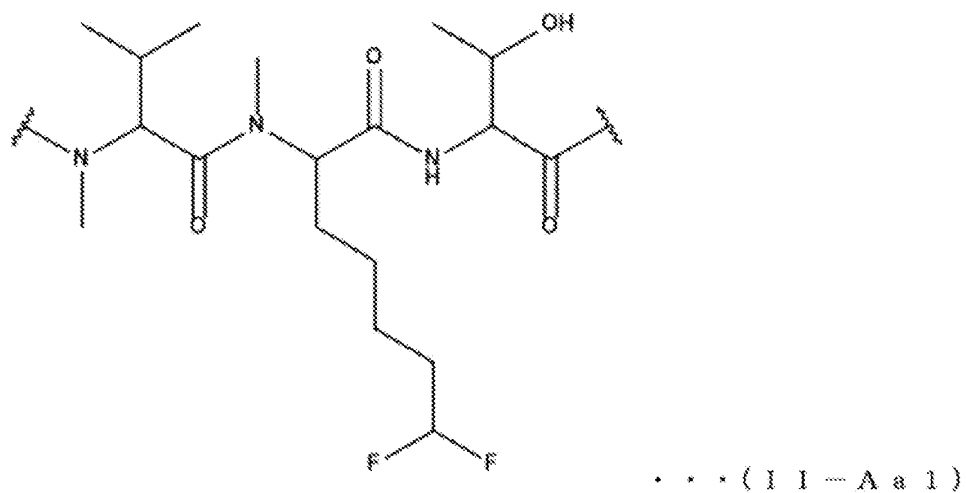
[化13]



[3-20]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Aa1)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-18]のいずれかに記載のペプチド。

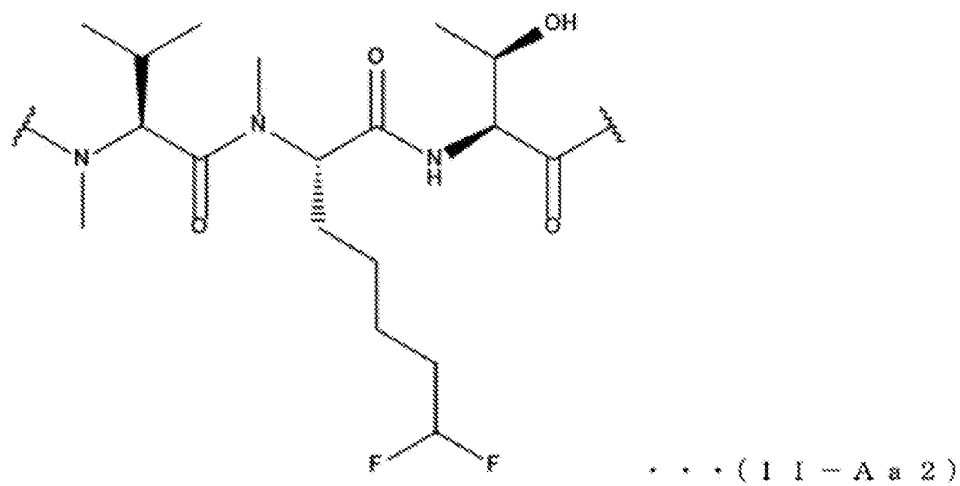
[化14]



[3-21]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Aa2)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-20]のいずれかに記載のペプチド。

[化15]

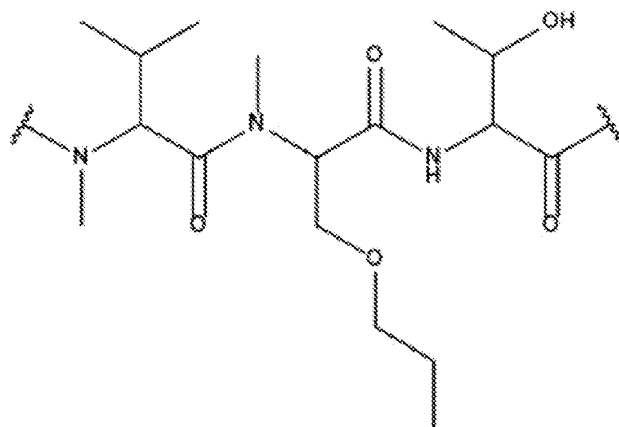


[3-22]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Ab1)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-18]のいずれかに記載のペプチド。

チド。

[化16]

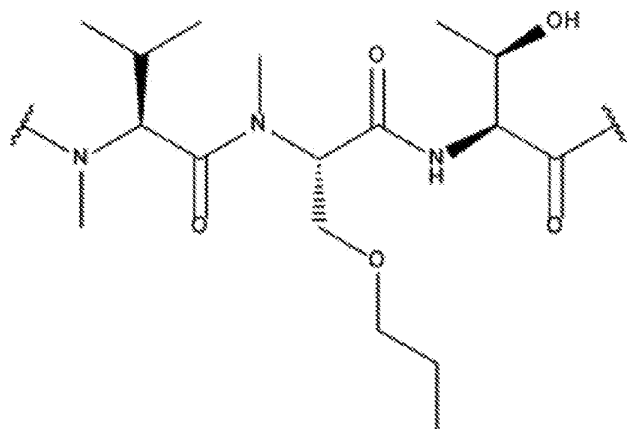


・・・(11-Ab1)

[3-23]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Ab2)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-19]及び[3-22]のいずれかに記載のペプチド。

[化17]



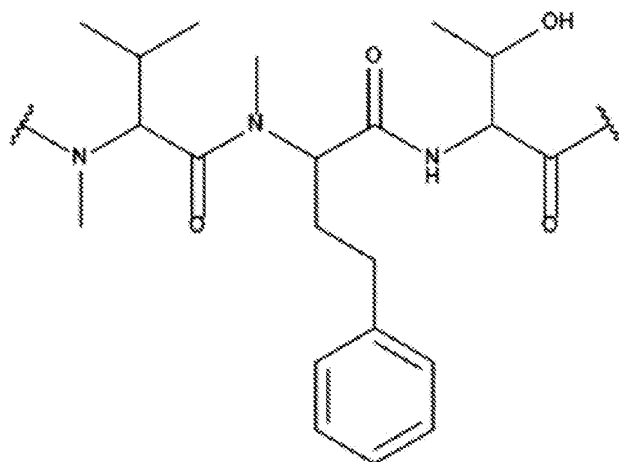
・・・(11-Ab2)

[3-24]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Ac1)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-18]のいずれかに記載のペプ

チド。

[化18]

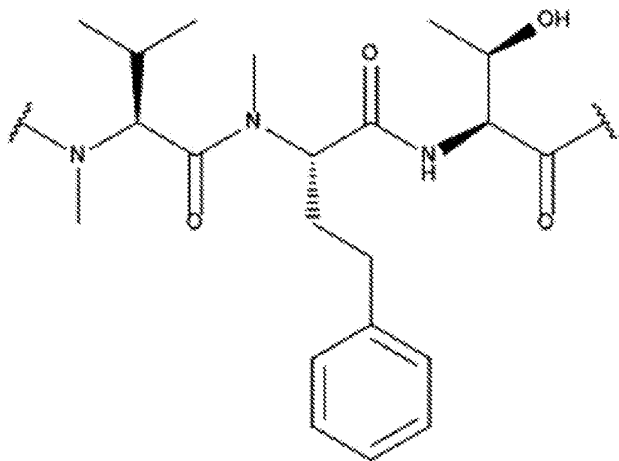


・・・(11-Ac1)

[3-25]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Ac2)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-19]及び[3-24]のいずれかに記載のペプチド。

[化19]



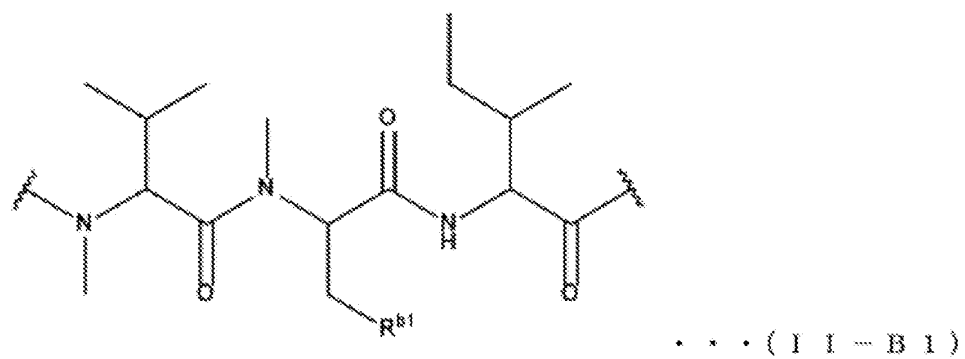
・・・(11-Ac2)

[3-26]

式(11)で表される構造が、下記式(11-B1)で表される構造である、[3-1]及び[3-14]～[3-17]のいずれかに記載のペプチド。

ド。

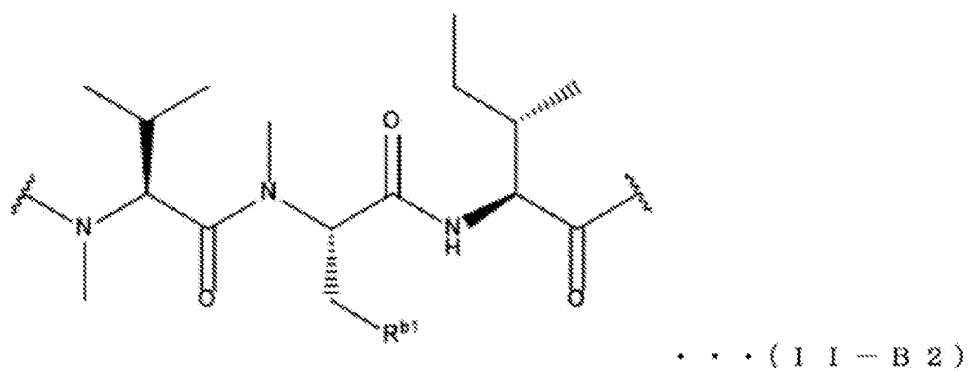
[化20]



[3 - 2 7]

式 (I I) で表される構造が、下記式 (I I - B 2) で表される構造である、[3 - 1]、[3 - 1 4] ~ [3 - 1 7] 及び [3 - 2 6] のいずれかに記載のペプチド。

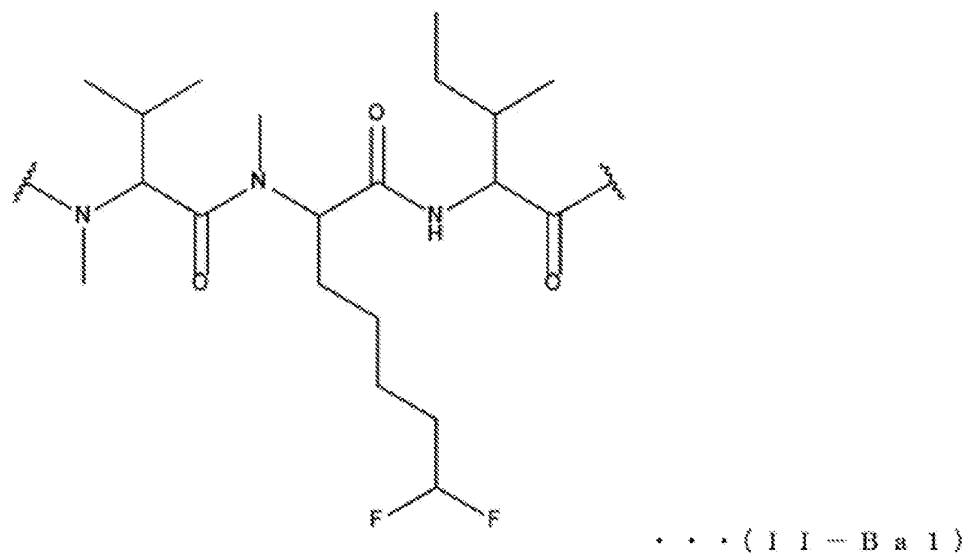
[化21]



[3 - 2 8]

式 (I I) で表される構造が、下記式 (I I - B a 1) で表される構造である、[3 - 1]、[3 - 1 4] ~ [3 - 1 7] 及び [3 - 2 6] のいずれかに記載のペプチド。

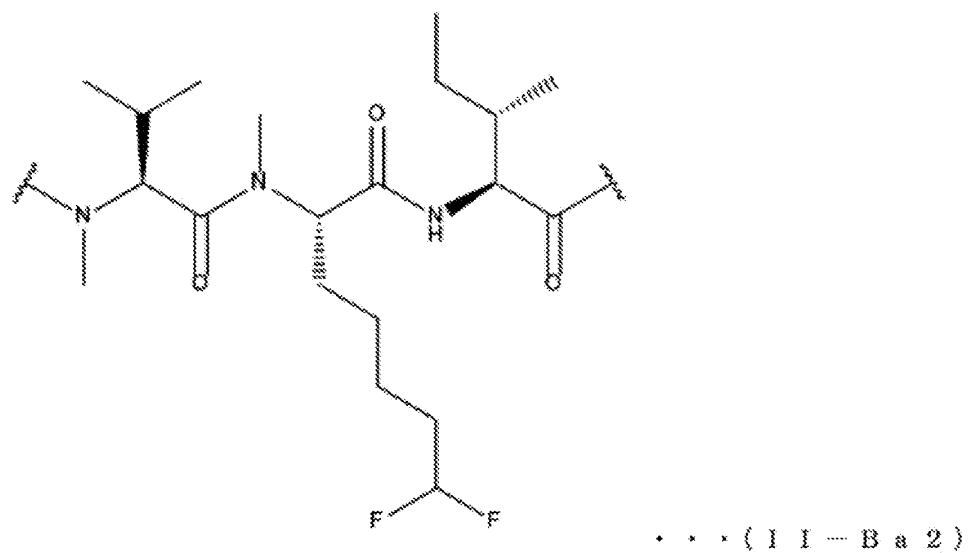
[化22]



[3-29]

式(II)で表される構造が、下記式(II-Ba2)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-17]及び[3-26]～[3-27]のいずれかに記載のペプチド。

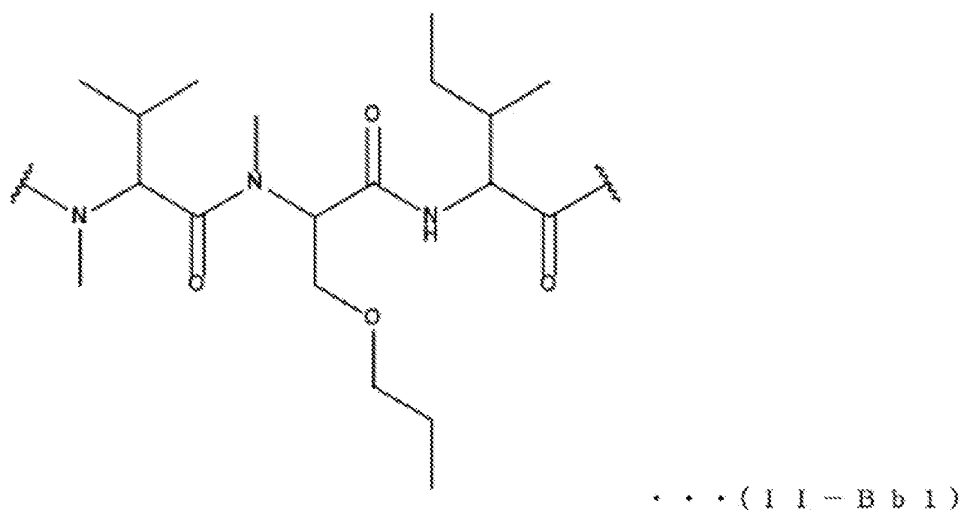
[化23]



[3-30]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Bb1)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-17]及び[3-26]のいずれかに記載のペプチド。

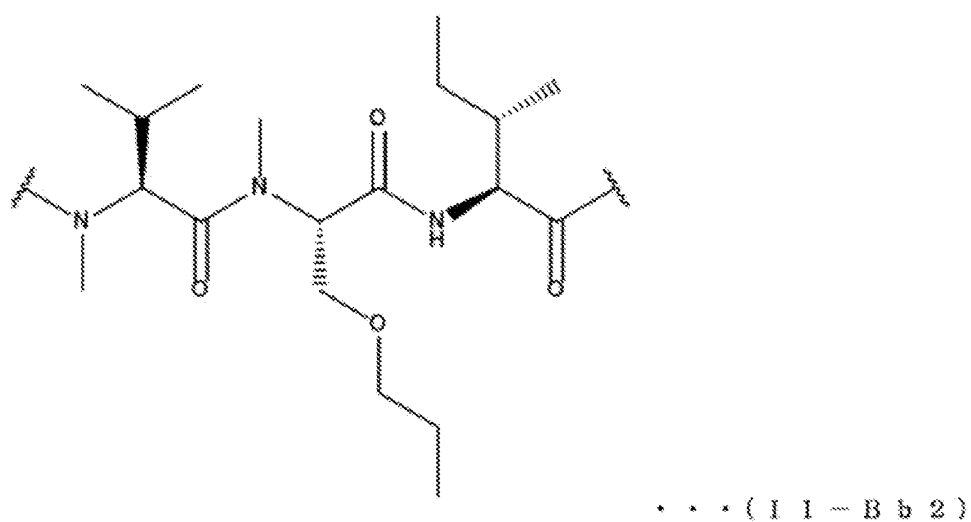
[化24]



[3-31]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Bb2)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-17]及び[3-26]～[3-27]のいずれかに記載のペプチド。

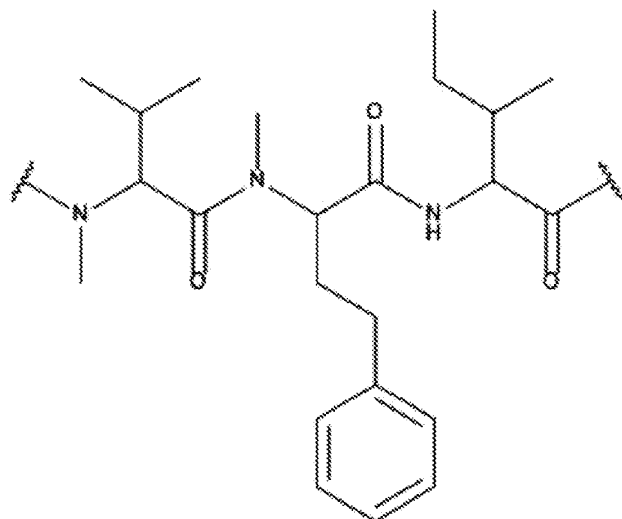
[化25]



[3-32]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Bc1)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-17]及び[3-26]のいずれかに記載のペプチド。

[化26]

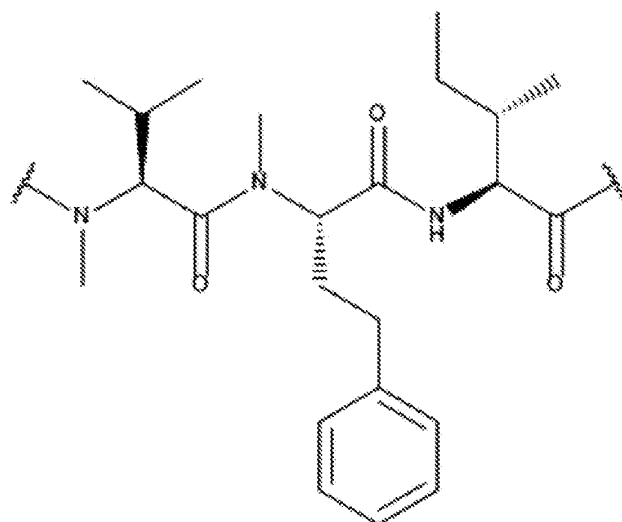


・・・(11-Bc1)

[3-33]

式(11)で表される構造が、下記式(11-Bc2)で表される構造である、[3-1]、[3-14]～[3-17]及び[3-26]～[3-27]のいずれかに記載のペプチド。

[化27]



・・・(11-B c 2)

発明の効果

[0024] 本発明によれば、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を効率的に取得できるスクリーニング方法を提供することができる。本発明によればまた、当該スクリーニング方法を含む目的分子の効率的な製造方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0026] 本明細書において「1つ又は複数の」とは、1つ又は2つ以上の数を意味する。「1つ又は複数の」が、ある基の置換基に関連する文脈で用いられる場合、この用語は、1つからその基が許容する置換基の最大数までの数を意味する。「1つ又は複数の」として具体的には、たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、及び／又はそれより大きい数が挙げられる。

[0027] 本明細書において、範囲を示す「～」とはその両端の値を含み、例えば、「A～B」は、A以上であり、かつB以下である範囲を意味する。

[0028] 本明細書において、「約」という用語は、数値と組み合わせて使用される

場合、その数値の+10%及び-10%の値範囲を意味する。

[0029] 本発明において、「及び／又は」との用語の意義は、「及び」と「又は」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば、「A、B及び／又はC」には、以下の7通りのバリエーションが含まれる；(i) A、(ii) B、(iii) C、(iv) A及びB、(v) A及びC、(vi) B及びC、(vii) A、B及びC。

[0030] [スクリーニング方法]

本発明に係るスクリーニング方法は、目的分子をスクリーニングする方法に関するものである。目的分子は、複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子であってよい。

[0031] 前記スクリーニング方法は、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子-核酸結合体ライブラリを接触させる工程（接触工程）を含む。

[0032] 接触工程は以下に限定されるものではないが、その具体的な態様として、以下に示す態様を例示できる。

第一の態様として、接触工程は、(i) 複数種類の標的分子同士が互いに融合した標的融合分子に(ii) 候補分子-核酸結合体ライブラリを接触させる工程であってよい。

第二の態様として、接触工程は、(i) 同一の固相担体上に固定化されている複数種類の標的分子に(ii) 候補分子-核酸結合体ライブラリを接触させる工程であってよい。

第三の態様として、接触工程は、(i) 複数種類の標的分子から選択される1種類である第一の標的分子に、(ii) 候補分子-核酸結合体それぞれと前記第一の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接触させる工程であってよい。

第四の態様として、接触工程は、(i) 複数種類の標的分子同士を連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）を経て用意された連結体に、(ii) 候補分子-核酸結合体を接触させる工程、又は(i) 1種類以上の標的分子と候補分子-核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工

程（連結工程）を経て用意された連結体に、（i i）前記連結工程において用いられなかった標的分子を接触させる工程であってよい。

第五の態様として、接触工程は、（i）複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、（i i）候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は（i）1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、（i i）前記連結体に含まれない標的分子を接触させる工程であってよい。

[0033] 前記スクリーニング方法は、接触工程に加えて、更に回収工程、溶出工程、増幅工程、及び／又は同定工程を含むものであってよい。

[0034] 回収工程は、複数種類の標的分子から選択される少なくとも1種類の標的分子と候補分子－核酸結合体との複合体を回収する工程である。

[0035] 溶出工程は、前記回収工程により回収された前記候補分子－核酸結合体中の核酸を溶出する工程である。

[0036] 増幅工程は、複合体を形成した候補分子－核酸結合体中の核酸を増幅する工程である。

[0037] 同定工程は、複合体を形成した候補分子－核酸結合体から目的分子を同定する工程である。

[0038] [接触工程]

接触工程では、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる。

[0039] 複数種類の標的分子を互いに近接させた状態で候補分子－核酸結合体ライブラリと接触させる手段は特に限定されないが、例えば、（1）（i）複数種類（例えば、2種類以上）の標的分子同士が（例えば、融合部により）互いに融合した標的融合分子に（i i）候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させてもよく、（2）（i）同一の固相担体上に固定化されている複数種類の標的分子に（i i）候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させてもよく、（3）（i）複数種類の標的分子から選択される1種類である第一の標的分子に、（i i）候補分子－核酸結合体それぞれと前記第一の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接

触させてもよく、(4) (i) リポソームやナノディスクに代表される脂質二重層に各標的分子を埋め込むことで互いに近接させた複数種類の標的分子に (i i) 候補分子-核酸結合体ライブラリを接触させてもよく、(5) ライブラリ中に含まれる全ての候補分子-核酸結合体を標的融合分子に対して結合させておき、(i) 標的融合分子中の融合部及び／又は (i i) 候補分子-核酸結合体と標的融合分子との結合部を切断してもよい。なお、(5) の場合、(i) 標的融合分子中の融合部及び／又は (i i) 候補分子-核酸結合体と標的融合分子との結合部を切断した後も標的融合分子に含まれる複数種類の標的分子及び候補分子-核酸結合体の複合体が維持されるか確認することで、複数種類の標的分子との複合体を形成しない候補分子を除くことができる。特に、この中では、(1) の方法が最も好ましい。(1) の方法を採用することで、複数種類の標的分子同士の距離の制御がより容易になる。言い換えると、ここで説明されている及び／又は従来技術に見られる、複数種類の標的分子を（例えば、融合部を介して）融合させる方法を用いることで、前記複数種類の標的分子同士の距離（近接程度）を直接制御することができる。

また、前記接触工程は、候補分子-核酸結合体ライブラリに含まれておらず、かつ、近接した前記複数種類の標的分子に対して選択的に複合体を形成し得る分子が存在しない条件下で行うことが好ましい。

[0040] (標的分子)

一態様において、前記複数種類の標的分子は、複数種類であればよく、その数や素性について限定されないが、例えば、2種類以上、3種類以上、4種類以上、5種類以上、6種類以上、7種類以上、8種類以上、9種類以上、又は10種類以上であってよく、10種類以下、9種類以下、8種類以下、7種類以下、6種類以下、5種類以下、4種類以下、3種類以下、又は2種類以下であってよい。前記複数種類の標的分子は、例えば、2種類以上5種類以下であってよく、好ましくは2種類以上4種類以下、より好ましくは2種類以上3種類以下、最も好ましくは2種類である。標的分子の種類が上記範囲にあることで、目的分子を取

得することがより容易になる。

[0041] 一態様において、複数種類の標的分子から選択される少なくとも2つ（2種類）の標的分子同士の解離定数が $10\ \mu\text{M}$ を超えるものであってよく、好ましくは複数種類の標的分子同士の解離定数が、いずれも $10\ \mu\text{M}$ を超える。本発明に係るスクリーニング方法は、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる工程を含んでいるため、このように解離定数が高い複数種類の標的分子に対しても複合体を形成し得る目的分子を選抜することができる。

[0042] 前記複数種類の標的分子から選択される少なくとも2つ（2種類）の標的分子同士の解離定数は、例えば、 $10\ \mu\text{M}$ 超、 $15\ \mu\text{M}$ 以上、 $20\ \mu\text{M}$ 以上、 $25\ \mu\text{M}$ 以上、 $30\ \mu\text{M}$ 以上、 $35\ \mu\text{M}$ 以上、 $40\ \mu\text{M}$ 以上、 $45\ \mu\text{M}$ 以上、又は $50\ \mu\text{M}$ 以上であってもよい。前記複数種類の標的分子から選択される少なくとも2つ（2種類）の標的分子同士の解離定数は、例えば $10\ \mu\text{M}$ 超であってよく、好ましくは $20\ \mu\text{M}$ 以上、より好ましくは $30\ \mu\text{M}$ 以上、最も好ましくは $50\ \mu\text{M}$ 以上である。本発明技術を用いることで、解離定数が上記範囲にある複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子をより効率的に取得することができる。

[0043] 標的分子は、特に制限されないが、例えば、タンパク質、糖（オリゴ糖、多糖類等）、脂質、核酸（DNA、RNA等）が挙げられる。標的分子としては、好ましくは、タンパク質である。

[0044] また、前記標的分子は、ヒトの生体内に存在する分子であることが好ましい。

また、前記標的分子は、スプリットタンパクを含まない分子であることが好ましい。

また、前記標的分子は、GFP及びその断片のいずれも含まない分子であることが好ましい。

また、前記標的分子は、ルシフェラーゼ及びその断片のいずれも含まない分子であることが好ましい。

また、前記標的分子は、S N A P タグ及びその断片のいずれも含まない分子であることが好ましい。

また、前記標的分子は、ユビキチン及びその断片のいずれも含まない分子であることが好ましい。

[0045] 前記標的分子は、F K 5 0 6 結合タンパク質 (F K B P)、F K B P ーラパマイシン結合タンパク質 (F R B)、シクロフィリン及びカルシニューリン (C n) からなる群より選ばれる1つ以上を含んでいてもよい。

[0046] 前記標的分子は、F K B Pを含んでいてもよい。F K B Pとしては、好ましくは、F K B P 1 2、F K B P 1 2. 6、F K B P 1 3、F K B P 1 9、F K B P 2 2、F K B P 2 3、F K B P 2 5、F K B P 3 6、F K B P 3 8、F K B P 5 1、F K B P 5 2、F K B P 6 0、F K B P 6 5が挙げられる。

[0047] 前記標的分子は、シクロフィリンを含んでいてもよい。シクロフィリンとしては、好ましくは、シクロフィリンA (C y A)、シクロフィリンB、シクロフィリンC、シクロフィリンD、シクロフィリンE、シクロフィリンF、シクロフィリンG、シクロフィリンH、シクロフィリンI、シクロフィリンJ、シクロフィリン40、N K T R、P P W D 1、P P I L 1、P P I L 2、P P I L 4、P P I L 5、R A N B P 2、S D C C A G ー 1 0が挙げられる。

[0048] 前記標的分子は、例えば、F K B P及びF R Bを含んでいてもよく、F K B P及びF R Bであってもよい。

[0049] 前記標的分子は、例えば、シクロフィリン及びC nを含んでいてもよく、シクロフィリン及びC nであってもよい。

[0050] 前記標的分子は、例えば、F K P B及びC nを含んでいてもよく、F K B P及びC nであってもよい。

[0051] 前記シクロフィリンは、例えば、C y Aであってもよい。

[0052] (ライブラリ)

候補分子ー核酸結合体ライブラリは、候補分子とタグとしての核酸とが対応付けられた結合体 (候補分子ー核酸結合体) の集合 (ライブラリ) である

。候補分子－核酸結合体ライブラリに含まれる結合体（候補分子－核酸結合体）は、結合体（候補分子－核酸結合体）そのものであってもよく、結合体（候補分子－核酸結合体）と標的分子が連結された連結体であってもよい。当該連結体の集合を特に連結体ライブラリとも呼ぶ。

[0053] 候補分子－核酸結合体において、候補分子と核酸は、候補分子の種類と核酸の種類との間で1対1の対応付けがなされていればよく、候補分子と核酸が直接又は結合部を介して結合することで結合体を形成していてもよく、候補分子と核酸とが直接又は結合部を介して結合することなく結合体を形成していてもよい。非限定の一態様として、好ましくは、候補分子と核酸とが結合部を介して結合体を形成している。

[0054] 結合部は、候補分子と核酸とを連結できるものであれば限定されないが、例えば、アミノアシル tRNA のアナログである抗生物質ピューロマイシンを含んでいてもよい。結合部はさらに、当業者に周知のスペーサーを含むことができる。

[0055] 前記核酸は、当該核酸と候補分子－核酸結合体を形成している候補分子をエンコードする核酸であってもよい。これにより、回収した候補分子－核酸結合体から核酸を増幅した後、増幅した核酸からタンパク質を合成（翻訳）することで容易に候補分子－核酸結合体を再生産することができる。

[0056] 前記核酸は、DNA であってもよく、mRNA であってもよい。また、核酸は、結合体に含まれる候補分子を識別するためのタグ配列の他、増幅に使用するための配列（プライマー結合配列等）を有していてもよい。増幅に使用するための配列は、全核酸で共通の配列であってもよい。

[0057] ライブラリは、ファージディスプレイライブラリ、リボソームディスプレイライブラリ、バクテリアディスプレイライブラリ、酵母ディスプレイライブラリ、mRNAディスプレイライブラリ、及びDNAディスプレイライブラリ等のディスプレイライブラリ、又はDNAエンコードライブラリ（DNA encoded library）であってもよい。ライブラリは、好ましくは、mRNAディスプレイライブラリ、DNAエンコードライブラリで

あり、より好ましくは、mRNAディスプレイライブラリである。

- [0058] ライブラリに含まれる候補分子は、 1×10^3 以上の多様性を有してよい。これにより目的分子のスクリーニング効率を向上させることができる。ライブラリに含まれる候補分子の多様性は、 5×10^3 以上、 1×10^4 以上、 5×10^4 以上、 1×10^5 以上、 5×10^5 以上、 1×10^6 以上、 5×10^6 以上、 1×10^7 以上、 5×10^7 以上、 1×10^8 以上、 5×10^8 以上、 1×10^9 以上、 5×10^9 以上、 1×10^{10} 以上、 5×10^{10} 以上、又は 1×10^{11} 以上であってよい。ライブラリに含まれる候補分子の多様性は、例えば 1×10^3 以上であってよく、好ましくは 1×10^5 以上、より好ましくは 1×10^7 以上、最も好ましくは 1×10^9 以上である。候補分子の多様性とは、候補分子の種類の数と同義である。ライブラリに含まれる候補分子の多様性が上記範囲にあることで、目的分子を取得する効率がより高まる。
- [0059] ライブラリは、当業者に周知の方法で調製することができる。例えば、mRNAディスプレイライブラリは、これに限定されるものではないが、以下のように作製することができる。まずプロモーターの下流に所望の塩基配列を配置したDNAのライブラリを化学合成し、これを鋳型にプライマー伸長反応にて二本鎖DNAにする。次いで、これを鋳型にしてRNAポリメラーゼを用いてmRNAに転写する。このmRNAの3'末端にアミノアシルtRNAのアナログである抗生物質ピューロマイシン等がつながったリンカー（スペーサー）を結合させる。これを公知の無細胞翻訳系に加え、保温することによってmRNAが翻訳され、mRNAとこれにコードされるペプチドがピューロマイシン等を含むリンカーを介して連結される。このようにしてmRNAとその産物が対応付けられたmRNAとその産物の複合体からなるmRNAディスプレイライブラリを構築することができる。また、所望の固定した標的分子に当該mRNAディスプレイライブラリを接触させ、標的分子に結合しない複合体を洗い流すことで標的分子に結合する複合体を濃縮することができる（パニング）。このように選択された複合体に含まれるmRNAからcDNAを合成し、PCR増幅し、塩基配列を解析することで、結

合したペプチドのアミノ酸配列を明らかにすることができる。

- [0060] 候補分子は、候補分子-核酸結合体において核酸及び結合部を除いた部分に相当する。例えば、本願実施例においては、候補分子はペプチドであり、候補分子-核酸結合体中における候補分子は、ペプチドリンカーであるアミノ酸配列（PTGTGTGKK：配列番号45）及びピューロマイシンを含む結合部並びに核酸部分を除いた上で、ペプチドリンカーが結合していたカルボキシの結合部にピロリジンを結合させた部分である。非限定の一態様においては、このように候補分子-核酸結合体から核酸及び結合部を除いた際に生じたカルボキシ基をキャッピングしたものを候補分子とすることができる。候補分子は特に制限されず、任意の化合物（低分子化合物、中分子化合物、高分子化合物）を使用することができる。候補分子としては、好ましくはペプチド等の中分子化合物であり、より好ましくは環状ペプチドである。
- [0061] 前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、候補分子の分子量は、例えば、 300 g/mol 以上、 350 g/mol 以上、 400 g/mol 以上、 450 g/mol 以上、又は 500 g/mol 以上であってよく、 $5,000 \text{ g/mol}$ 以下、 $4,500 \text{ g/mol}$ 以下、 $4,000 \text{ g/mol}$ 以下、 $3,500 \text{ g/mol}$ 以下、 $3,000 \text{ g/mol}$ 以下、 $2,500 \text{ g/mol}$ 以下、又は $2,000 \text{ g/mol}$ 以下であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子において、候補分子の分子量は、例えば、 300 g/mol 以上 $5,000 \text{ g/mol}$ 以下であってよく、好ましくは 350 g/mol 以上 $4,500 \text{ g/mol}$ 以下、より好ましくは 400 g/mol 以上 $4,000 \text{ g/mol}$ 以下、最も好ましくは 450 g/mol 以上 $3,500 \text{ g/mol}$ 以下である。本明細書における分子量は、化合物分子を構成する原子の原子量の総和（単位：「 g/mol 」）を意味し、分子構造式に含まれる原子の原子量の総和を算出することで得られる（単位「 g/mol 」）。候補分子の分子量が上記範囲にあることで、目的分子を取得する効率がより高まる。

[0062] 本明細書において、ペプチドは、アミノ酸残基がアミド結合又はエステル結合によって連結されるペプチドであれば特に限定されない。ペプチドとしては、2以上のアミノ酸残基がアミド結合によって連結したものが好ましい。この場合、デプシペプチドのように主鎖の一部にエステル結合を有していてもよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドのアミノ酸残基数は、特に制限はないが、例えば5以上であってよく、7以上、8以上又は9以上であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドのアミノ酸残基数はまた、例えば30以下であってよく、25以下、15以下、13以下であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドのアミノ酸残基数は、例えば、5以上30以下であってよく、好ましくは7以上25以下、より好ましくは8以上15以下、最も好ましくは及び9以上13以下である。ペプチドのアミノ酸残基数が上記範囲にあることで、膜透過性や代謝安定性が高い目的分子を取得する効率がより高まる。ペプチドは、分岐構造を有していてもよい。

[0063] 本明細書において、「アミノ酸」には、天然アミノ酸、及び非天然アミノ酸が含まれる。また、本明細書において、「アミノ酸残基」には、天然アミノ酸残基、及び非天然アミノ酸残基が含まれる。

[0064] 天然アミノ酸とは、グリシン (G l y)、L-アラニン (A l a)、L-セリン (S e r)、L-トレオニン (T h r)、L-バリン (V a l)、L-ロイシン (L e u)、L-イソロイシン (I l e)、L-フェニルアラニン (P h e)、L-チロシン (T y r)、L-トリプトファン (T r p)、L-ヒスチジン (H i s)、L-グルタミン酸 (G l u)、L-アスパラギン酸 (A s p)、L-グルタミン (G l n)、L-アスパラギン (A s n)、L-システイン (C y s)、L-メチオニン (M e t)、L-リシン (L y s)、L-アルギニン (A r g)、及びL-プロリン (P r o) を指す。

- [0065] 非天然アミノ酸は、天然アミノ酸以外のアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸としては、例えば、 β -アミノ酸、D型アミノ酸、N置換アミノ酸（P r oを除く。）、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、側鎖が天然アミノ酸と異なるアミノ酸、ヒドロキシカルボン酸等が例示される。本明細書において、非天然のN置換アミノ酸は、P r o以外のN置換アミノ酸を意味する。
- [0066] 本明細書におけるアミノ酸としては、任意の立体配置が許容される。アミノ酸の側鎖の選択は特に制限を設けなが、水素原子の他にも例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アララルキル基、ヘテロアララルキル基、シクロアルキル基、スピロ結合したシクロアルキル基から自由に選択される。それぞれには置換基が付与されていてもよく、それら置換基も制限されず、例えば、ハロゲン原子、O原子、S原子、N原子、B原子、S i原子、又はP原子を含む任意の置換基の中から独立して1つ又は2つ以上自由に選択されてよい。すなわち、置換されていてもよいアルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アララルキル基、シクロアルキル基等、又はオキソ、アミノカルボニル、ハロゲン原子等が例示される。一実施形態に係るアミノ酸は、同一分子内にカルボキシ基とアミノ基を有する化合物であってよい（この場合であっても、アミノ基の窒素原子と側鎖の任意の原子がと一緒になって環を形成したプロリン、ヒドロキシプロリン、アゼチジン-2-カルボン酸などもアミノ酸に含まれる。）。
- [0067] ハロゲン由来の置換基としては、フルオロ（-F）、クロロ（-C l）、ブロモ（-B r）、ヨウド（-I）等が挙げられる。
- [0068] O原子由来の置換基としては、ヒドロキシ（-O H）、オキシ（-O R）、カルボニル（-C（=O）-R）、カルボキシ（-C O₂H）、オキシカルボニル（-C（=O）-O R）、カルボニルオキシ（-O-C（=O）-R）、チオカルボニル（-C（=O）-S R）、カルボニルチオ基（-S-C（=O）-R）、アミノカルボニル（-C（=O）-N H R）、カルボニルアミノ（-N H-C（=O）-R）、オキシカルボニルアミノ（-N H-C

(=O) - OR)、スルホニルアミノ (-NH-SO₂-R)、アミノスルホニル (-SO₂-NHR)、スルファモイルアミノ (-NH-SO₂-NHR)、チオカルボキシ (-C(=O)-SH)、カルボキシカルボニル (-C(=O)-CO₂H) が挙げられる。

[0069] オキシ (-OR) の例としては、アルコキシ、シクロアルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アラルキルオキシ等が挙げられる。

[0070] カルボニル (-C(=O)-R) の例としては、ホルミル (-C(=O)-H)、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アラルキルカルボニル等が挙げられる。

[0071] オキシカルボニル (-C(=O)-OR) の例としては、アルキルオキシカルボニル、シクロアルキルオキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシカルボニル、アラルキルオキシカルボニル等が挙げられる。

[0072] カルボニルオキシ (-O-C(=O)-R) の例としては、アルキルカルボニルオキシ、シクロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ、アルキニルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、ヘテロアリールカルボニルオキシ、アラルキルカルボニルオキシ等が挙げられる。

[0073] チオカルボニル (-C(=O)-SR) の例としては、アルキルチオカルボニル、シクロアルキルチオカルボニル、アルケニルチオカルボニル、アルキニルチオカルボニル、アリールチオカルボニル、ヘテロアリールチオカルボニル、アラルキルチオカルボニル等が挙げられる。

[0074] カルボニルチオ (-S-C(=O)-R) の例としては、アルキルカルボニルチオ、シクロアルキルカルボニルチオ、アルケニルカルボニルチオ、アルキニルカルボニルチオ、アリールカルボニルチオ、ヘテロアリールカルボニルチオ、アラルキルカルボニルチオ等が挙げられる。

[0075] アミノカルボニル (-C(=O)-NHR) の例としては、アルキルアミ

ノカルボニル、シクロアルキルアミノカルボニル、アルケニルアミノカルボニル、アルキニルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、ヘテロアリールアミノカルボニル、アラルキルアミノカルボニル等が挙げられる。これらに加えて、 $-C(=O)-NHR$ 中のN原子と結合したH原子が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0076] カルボニルアミノ ($-NH-C(=O)-R$) の例としては、アルキルカルボニルアミノ、シクロアルキルカルボニルアミノ、アルケニルカルボニルアミノ、アルキニルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、ヘテロアリールカルボニルアミノ、アラルキルカルボニルアミノ等が挙げられる。これらに加えて $-NH-C(=O)-R$ 中のN原子と結合したH原子が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0077] オキシカルボニルアミノ ($-NH-C(=O)-OR$) の例としては、アルコキシカルボニルアミノ、シクロアルコキシカルボニルアミノ、アルケニルオキシカルボニルアミノ、アルキニルオキシカルボニルアミノ、アリールオキシカルボニルアミノ、ヘテロアリールオキシカルボニルアミノ、アラルキルオキシカルボニルアミノ等が挙げられる。これらに加えて、 $-NH-C(=O)-OR$ 中のN原子と結合したH原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

[0078] スルホニルアミノ ($-NH-SO_2-R$) の例としては、アルキルスルホニルアミノ、シクロアルキルスルホニルアミノ、アルケニルスルホニルアミノ、アルキニルスルホニルアミノ、アリールスルホニルアミノ、ヘテロアリールスルホニルアミノ、アラルキルスルホニルアミノ等が挙げられる。これらに加えて、 $-NH-SO_2-R$ 中のN原子と結合したH原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。

- [0079] アミノスルホニル ($-\text{SO}_2-\text{NHR}$) の例としては、アルキルアミノスルホニル、シクロアルキルアミノスルホニル、アルケニルアミノスルホニル、アルキニルアミノスルホニル、アリールアミノスルホニル、ヘテロアリールアミノスルホニル、アラルキルアミノスルホニル等が挙げられる。これらに加えて、 $-\text{SO}_2-\text{NHR}$ 中の N 原子と結合した H 原子がアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルでさらに置換された化合物が挙げられる。
- [0080] スルファモイルアミノ ($-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$) の例としては、アルキルスルファモイルアミノ、シクロアルキルスルファモイルアミノ、アルケニルスルファモイルアミノ、アルキニルスルファモイルアミノ、アリールスルファモイルアミノ、ヘテロアリールスルファモイルアミノ、アラルキルスルファモイルアミノ等が挙げられる。さらに、 $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$ 中の N 原子と結合した 2 つの H 原子はアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、及びアラルキルからなる群より独立して選択される置換基で置換されていてもよく、またこれらの 2 つの置換基は環を形成してもよい。
- [0081] S 原子由来の置換基として、チオール ($-\text{SH}$)、チオ ($-\text{S}-\text{R}$)、スルフィニル ($-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$)、スルホニル ($-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$)、スルホ ($-\text{SO}_3\text{H}$)、ペンタフルオロスルファニル ($-\text{SF}_5$) 等が挙げられる。
- [0082] チオ ($-\text{S}-\text{R}$) の例としては、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルケニルチオ、アルキニルチオ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、アラルキルチオ等が挙げられる。
- [0083] スルフィニル ($-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$) の例としては、アルキルスルフィニル、シクロアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、アラルキルスルフィニル等が挙げられる。
- [0084] スルホニル ($-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$) の例としては、アルキルスルホニル、シクロアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、ア

リールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、アラルキルスルホニル等が挙げられる。

[0085] N原子由来の置換基として、アジド ($-\text{N}_3$ 、「アジド基」ともいう)、シアノ ($-\text{CN}$)、1級アミノ ($-\text{NH}_2$)、2級アミノ ($-\text{NH}-\text{R}$)、3級アミノ ($-\text{NR}(\text{R}')$)、アミジノ ($-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$)、置換アミジノ ($-\text{C}(=\text{NR})-\text{NR}'\text{R}''$)、グアニジノ ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$)、置換グアニジノ ($-\text{NR}-\text{C}(=\text{NR}''')-\text{NR}'\text{R}''$)、アミノカルボニルアミノ ($-\text{NR}-\text{CO}-\text{NR}'\text{R}''$)等が挙げられる。

[0086] 2級アミノ ($-\text{NH}-\text{R}$) の例としては、アルキルアミノ、シクロアルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、アラルキルアミノ等が挙げられる。

[0087] 3級アミノ ($-\text{NR}(\text{R}')$) の例としては、例えばアルキル（アラルキル）アミノなど、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル等の中からそれぞれ独立して選択される、任意の2つの置換基を有するアミノ基が挙げられ、これらの任意の2つの置換基は環を形成してもよい。

[0088] 置換アミジノ ($-\text{C}(=\text{NR})-\text{NR}'\text{R}''$) の例としては、N原子上の3つの置換基R、R'、及びR''が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、例えばアルキル（アラルキル）（アリール）アミジノ等が挙げられる。

[0089] 置換グアニジノ ($-\text{NR}-\text{C}(=\text{NR}''')-\text{NR}'\text{R}''$) の例としては、R、R'、R''、及びR'''が、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、及びこれらが環を形成した基等が挙げられる。

[0090] アミノカルボニルアミノ ($-\text{NR}-\text{CO}-\text{NR}'\text{R}''$) の例としては、

R、R'、及びR''が、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルの中からそれぞれ独立して選択された基、及びこれらが環を形成した基等が挙げられる。

[0091] B原子由来の置換基として、ボリル(−BR(R'))、及びジオキシボリル(−B(OR)(OR'))等が挙げられる。これらの2つの置換基R及びR'は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキルなどの中からそれぞれ独立して選択された基、又はこれらが環を形成した基であってもよい。具体的には、環状ボリル基が挙げられ、さらに具体的には、ピナコラートボリル基、ネオペンタンジオラートボリル基、カテコラートボリル基等が挙げられる。

[0092] アミノ酸の主鎖アミノ基は、非置換(−NH₂)でも、置換されていてもよい(すなわち、−NHR。Rは、例えば、置換基を有していてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基等を示し、またプロリンのようにN原子に結合した炭素鎖とα位の炭素原子とが環を形成していてもよい。))。

[0093] 本明細書において、主鎖アミノ基が置換されているアミノ酸残基を「N置換アミノ酸残基」と称する。本明細書における「N置換アミノ酸残基」としては、例えば、N−アルキルアミノ酸残基、N−C₁−C₆アルキルアミノ酸残基、N−C₁−C₅アルキルアミノ酸残基、N−C₁−C₄アルキルアミノ酸残基、N−C₁−C₃アルキルアミノ酸残基、N−エチルアミノ酸残基、N−メチルアミノ酸残基、N−C₇−C₁₄アラルキルアミノ酸残基、N−ベンジルアミノ酸残基、N−フェネチルアミノ酸残基であってよい。

[0094] 本明細書におけるN置換アミノ酸残基の窒素原子上の置換基(上述した−NHRのR)として具体的には、アルキル基(好ましくはC₁−C₆アルキル基、より好ましくはC₁−C₄アルキル基、より好ましくはC₁−C₃アルキル基、更に好ましくはエチル基又はメチル基)、C₇−C₁₄アラルキル基、ベンジル基、フェネチル基等が例示される。N置換アミノ酸の窒素原子上の置換基は、例えばC₁−C₆アルキル基であってよく、好ましくはC₁−C₃アルキ

ル基であり、より好ましくはエチル基又はメチル基であり、最も好ましくはメチル基である。（すなわち、N置換アミノ酸として、Nメチルアミノ酸が最も好ましい）。

- [0095] 本明細書における「アミノ酸」にはそれぞれに対応する全ての同位体を含む。「アミノ酸」の同位体は、少なくとも1つの原子が、原子番号（陽子数）が同じで、質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる原子で置換されたものである。本明細書の「アミノ酸」に含まれる同位体の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれ、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 等が含まれる。
- [0096] 前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれる非天然アミノ酸残基数は、例えば、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上又は10以上であってよい。また、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれる非天然アミノ酸残基数は、例えば、30以下、25以下、20以下、15以下、14以下、13以下又は12以下であってよい。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれる非天然アミノ酸残基数の範囲としては、例えば、1以上30以下、2以上25以下、3以上20以下、4以上15以下、5以上14以下、6以上13以下、7以上12以下、又は11を例示できる。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれる非天然アミノ酸残基数の範囲は、例えば1以上13以下であり、好ましくは3以上12以下、より好ましくは4以上11以下、最も好ましくは5以上10以下である。
- [0097] 前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれるN置換アミノ酸残基数

は、例えば、1以上、2以上、3以上、4以上、又は5以上であってよい。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれるN置換アミノ酸残基数は、例えば、10以下、9以下、好ましくは8以下、より好ましくは7以下、最も好ましくは6以下である。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれるN置換アミノ酸残基数の範囲としては、例えば、1以上10以下、1以上8以下、1以上7以下、2以上6以下を例示できる。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドに含まれるN置換アミノ酸残基数は、例えば1以上13以下であり、好ましくは3以上12以下、より好ましくは4以上11以下、最も好ましくは5以上10以下である。

[0098] ペプチドは、環状ペプチドであってもよい。本明細書において「環状ペプチド」とは、5以上のアミノ酸残基により構成される環状部を有するペプチドであれば特に限定されない。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、環状ペプチドの環状部を構成するアミノ酸残基数は、例えば、5以上15以下、6以上15以下、6以上14以下、7以上14以下、8以上14以下、7以上13以下、7以上12以下、8以上12以下、8以上11以下、9以上11以下、10又は11であってよい。前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、環状部を構成するアミノ酸残基数は、例えば5以上15以下であってよく、好ましくは9以上15以下、より好ましくは10以上14以下、最も好ましくは11以上13以下である。環状部を構成するアミノ酸残基数が上記範囲にあることで、膜透過性や代謝安定性が高い目的分子を取得する効率がより高まる。環状部は、アミド結合、炭素－炭素結合形成反応、S－S結合、チオエーテル結合、トリアゾール結合等の共有結合を介して形成されることが好ましい。環化は、アミド結合のような炭素－窒素結合による環化、エステル結合及びエー

テル結合のような炭素－酸素結合による環化、チオエーテル結合のような炭素－硫黄結合による環化、炭素－炭素結合による環化、又は複素環構築による環化など、どのような形態であってもよい。これらのうちでは、アミド結合及び炭素－炭素結合などの共有結合を介した環化が好ましく、側鎖のカルボキシ基と主鎖のアミノ基によるアミド結合を介した環化がより好ましい。環化に用いられるカルボキシ基及びアミノ基等の位置は、主鎖上のものでも、側鎖上のものでもよく、環化可能な位置にあれば、特に制限されない。

[0099] 環状ペプチドは、環状部に加えて、直鎖部を有していてもよい。環状ペプチドのアミノ酸残基数の具体的態様は、上述したペプチドのアミノ酸残基数の具体的態様と同様である。環状ペプチドが直鎖部を有する場合、環状部と直鎖部を合わせたアミノ酸残基数が同範囲に入ることが好ましい。また、環状ペプチドが直鎖部を有する場合、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、環状部を構成するアミノ酸残基数は、例えば、5以上15以下、6以上15以下、6以上14以下、7以上14以下、8以上14以下、7以上13以下、7以上12以下、8以上11以下、9以上11以下、10又は11であってよく、直鎖部を構成するアミノ酸残基数は、例えば、1以上8以下、1以上7以下、1以上6以下、1以上5以下、1以上4以下、1以上3以下であってよい。環状ペプチドが直鎖部を有する場合、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、環状部を構成するアミノ酸残基数は、例えば5以上15以下であってよく、好ましくは9以上15以下、より好ましくは10以上14以下、最も好ましくは11以上13以下であり、直鎖部を構成するアミノ酸残基数は、例えば1以上8以下、好ましくは1以上6以下、より好ましくは1以上4以下、最も好ましくは1以上3以下である。直鎖部を構成するアミノ酸残基数が上記範囲にあることで、膜透過性や代謝安定性が高い目的分子を取得する効率がより高まる。

[0100] 前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、1

$\times 10^3$ 以上のペプチドにおいて、ペプチドのClogPは例えば4以上25以下であってよい。ClogPは、コンピューターで計算した分配係数であり、「CLOGP Reference Manual Daylight Version 4.9 (リリース日: 2011年8月1日、<https://www.daylight.com/dayhtml/doc/clogp/>)」に記載の原則に則って求めることができる。ClogPを計算する方法の一例として、Daylight Chemical Information Systems, Inc. のDaylight Version 4.95 (リリース日: 2011年8月1日、ClogPアルゴリズムversion 5.4、データベースversion 28、https://www.daylight.com/dayhtml/doc/release_notes/index.html) を用いて計算することが挙げられる。

[0101] なお、CLOGP Reference Manual Daylight Version 4.9 (リリース日: 2011年8月1日、<https://www.daylight.com/dayhtml/doc/clogp/>)」に記載の原則は以下のとおりである。

1. Introduction

The CLOGP Reference Manual will help the user understand why the CLOGP program calculates logP(ow) the way it does. Although the procedure cannot be derived from first principles, we have tried to make the rules consistent with solvation theory, if for no other reason than they are more easily remembered. The method simply adds together values for structural parts of a solute molecule and correction factors dependent upon the particular way the parts are put together.

The CLOGP EXAMPLES section contains example CLOGP calculations for a variety of chemicals and is designed as a companion to the CLOGP Reference Manual. An asterisk (*) appears in the CLOGP Reference Manual w

When one or more examples are provided in CLOGP Example Calculations to illustrate aspects of the CLOGP computation. Examples also demonstrate DEPICT (chemical depiction).

Funding for the development of CLOGP was provided by the U.S. Environmental Protection Agency through Cooperative Agreement No. 809295, and we wish to acknowledge the encouragement and support of the project officer, Dr. Gilman Veith of ERL-Duluth.

1.1 Measurement and Past Uses of Partition Coefficients

The partition coefficient is the equilibrium concentration of solute in a non-polar solvent divided by the concentration of the same species in a polar solvent. In this and most other applications, the polar solvent is water. The logarithm of the partition coefficient, $\log P$, has been successfully used as a hydrophobic parameter in 'extrathermodynamic' Hammett methodology. 1-octanol has much to recommend it as the choice for the non-polar phase (1) and $\log P_{ow}$ has been used successfully in Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) in the following special fields: drug and pesticide design (2,3); pharmacokinetics (4); anaesthesiology (5); environmental transport and soil binding (6,7); toxicology (8); bioaccumulation (9); protein folding (10); enzyme binding (11,12); enzymic reactions in non-aqueous solvents (13); and host-guest complexation (14a,b).

In principle, the measurement of the equilibrium concentration of solute in the octanol and water phases, after shaking in a separatory funnel, is very simple, and since good measured values are always to be preferred over calculated ones, it would seem that there should be little need for a procedure to calculate them. As it turns out, reliable shake-flask measurements are time-consuming and often difficult to

make. The criteria for high reliability are: measurements over a 10-fold concentration range (with upper concentration no more than 75% of solubility or CMC, or no more than 5% of the aqueous phase, whichever is lower) and standard deviation of 0.03 or less in log terms. This often requires working at sub-micromolar concentrations, and so, with either UV spectrophotometry or gas chromatography, it means that the standard curves must be established with utmost care. Radiotracer methods seem well-suited for analyses at these low concentrations, but impurities as well as adsorption at phase boundaries (including container walls) can introduce significant errors.

HPLC procedures provide a way around this bottleneck(15,16) and can save time if there is a limited variety of structural types, and the log P values fall in the range of 0.5 to 4.0. Most HPLC procedures which are used to develop log P(ow) values do not use octanol and thus have to be referred to that system by standard curves which can be different depending on whether the solutes do or do not contain certain basic fragments, such as pyridine nitrogen. If the solutes do not absorb well in the UV, difficulties in detecting the elution time eliminates any advantage HPLC may have over the shake-flask method.

Procedures which employ filter probes (17) or solubility columns(18) speed up partition coefficient measurements by eliminating centrifugation as the means of phase separation. However, each has its own set of disadvantages and limit its acceptance as a method for establishing the standard values for a calculation procedure.

More efficient methods of measurement of octanol/water partition coefficients are certain to be developed in the future, but no conceivable 'breakthrough' is likely to eliminate the need for logP calculation. To put the problem in proper perspective, one need only imagine some

e dedicated synthetic chemist making all possible tri-substituted benzoic acids with the methods commonly available today. When finished, there would be five million analogs for which partition coefficients could be determined. And of course only by calculation is one going to have an estimate of hydrophobicity before synthesis.

The Pomona MedChem Project saw these and other arguments as reason enough to develop a method to calculate log P(ow) from structure by an additive-constitutive procedure. As it turns out, the 'constitutive' portion of the procedure was, by the very nature of the two competing solvation equilibria, very complex, and the manual method required considerable effort before it could be applied with confidence. It is the aim of the second-generation program, CLOGP, to take most of the routine calculation burden from the user but still encourage him to study the interplay of hydrophobic and polar solvation forces which can be so crucial to the design of bioactive chemicals.

1.2 How to Understand CLOGP Calculations

The first published method for calculating log P(ow) from structure (19) was based on a 'substitution' procedure and was developed with substituent pi constants for aromatic rings in mind. Of course this method was limited to deriving a new log P from a 'parent' structure whose log P was already known. Rekker(20) was the first to publish a procedure which was more general in that it assigned 'fragmental constants' to a variety of structural pieces, and the calculated log P was the sum of the values appropriate for the molecule in question. The original pi system can be expressed as:

[数1]

$$\pi_x = \log P_{C_6H_5X} - \log P_{C_6H_6}$$

while the expression for Rekker's fragment system is:

[数2]

$$\text{LogP} = \sum_{i=1}^N a_i f_i + \sum_{j=1}^M b_j F_j$$

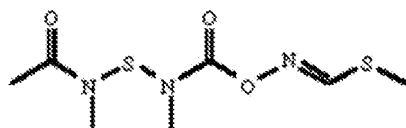
The method developed by Pomona MedChem (21) follows Rekker's general formulation, but there are some important differences in the approach used to derive the actual working constants. Rekker used a 'reductionist' approach - deriving the constants for carbon and hydrogen as well as those for polar fragments from a statistical treatment of a large body of log P data which contained numerous interaction factors. Both the fragment values (f) and interaction factors (F) had to be identified and evaluated concurrently. Also, Rekker neglected to clearly define just what constitutes a fragment. Instead he provides a table in which the known constants can be found (see footnote). Rekker also treats all correction factors as some multiple of a 'Magic Number' (+0.28), but the selection of multiples was not made clear in his published work. Although his method gained some acceptance for manual calculation, we considered it too seriously flawed to serve as the basis for a computer method.

In order to construct a dependable, verifiable algorithm suitable for log P calculations used in developing QSAR at Pomona College, we first elected to clearly define what constitutes a fragment. Next we chose a 'constructionist' approach to evaluate them; that is, we accepted as axiomatic that the hydrophobic portions of solutes were those most 'hydrocarbon-like', and defined these carbons and hydrogen fragment values as being truly constant. We gave very heavy emphasis to the carefully-measured values for three solutes; molecular hydrogen, methane and ethane, because from these we could derive fragment constants

for carbon and hydrogen, which would be free of obscuring interactions. For all hydrocarbon structures more complex than these, whose measured values were NOT the sum of fragment values, we attempted to define the difference in terms of universally-applicable correction factors. It appears that this approach has led not only to a workable algorithm, but has highlighted the importance of certain types of polar solvation forces which have received insufficient attention in the past.

The first attempt to reduce the 'Pomona Method' of log P calculation to computer algorithm was made in collaboration with Dr. Jack Chou and Dr. Peter Jurs of Pennsylvania State University (22). It was called CLOGP. A great deal was learned in the process of developing this first version, and it certainly established the real need for a 'stand-alone' program to make these calculations. Nevertheless, CLOGP was difficult to install and modify, and many well-known correction factors could not be implemented due to programming difficulties. In light of this experience, we deemed it essential to incorporate, in the second generation program, design features which would encourage its continuing evolution. To achieve that objective, the program had to be conceived as a 'modeling system' which could operate from one or more easily-revised 'value files'. As an example of the ease of updating, the largest fragment encountered to date is:

[化28]



It took less than two minutes to enter it into the database and begin

to use it in calculations.

A number of significant improvements have been made to CLOGP over the past few years. The most significant improvement is the ability to estimate a polar fragment value which has not appeared in a solute having a measure log P (oct). This type of estimation is designated as 'calculated'. If the fragment in question has appeared in a measured solute, but in a different bonding environment (e.g., aromatic attached when aliphatic attached is needed), the new 4.0 version allows for all extrapolations and designates the value as 'derived'. The methodology for the 'No Missing Fragments' algorithm is explained in more detail in ref. 23.

Earlier versions of CLOGP were able to assign corrections to polar fragments interacting over two Isolating Carbons (see Section 2. following). In the latest version, this distance has been extended to three I.C.s. A significant improvement in steroid calculations recognizes the unique contribution of polar groups at the 11 position as well as some long-range intramolecular hydrogen bonds. These and a few other minor improvements will be noted in the changed values in the CLOGP Example Calculations, 6.3.

2. Fundamental Fragments

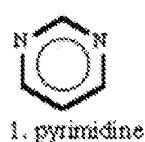
In view of the decision to make alkane carbons and hydrogens the most fundamental fragments in the system, it is necessary to define these very carefully before defining the polar, more hydrophilic fragments.

2.1. Isolating Carbons

An 'Isolating Carbon' (I.C.) atom is carbon which is NOT doubly- or t

riply- bonded to a hetero atom. An I.C. may be bonded to a hetero atom by a single or an aromatic bond. This definition can be made clearer from the following two examples:

[化29]



In an earlier version of the manual calculation procedure (Ref. 21 p. 34) the Kekule structures for pyrimidine was considered; the earlier rule is now superceded. In coumarin, both rings are designated as aromatic, and the only carbon which is not isolating is the one in the carbonyl group, because it is doubly bonded to a hetero outside the ring.

Although the hydrophobic value of an I.C. is constant, several types must still be identified; the degree to which they delocalize electrons in any polar fragments attached to them has a great influence on overall log P. The types of I.C.s presently identified are listed below with appropriate symbols:

[表1]

Symbol	Type
A	Aliphatic
Z	Benzyl
V	Vinyl
Y	Styryl
a	Aromatic

To be completely characterized, a polar fragment must have each of its 'valence bonds' designated with one of the above symbols (see section "Fragment Valence Types"). The numerical value of the fragment will increase roughly in the order 'A' to 'a', but must be experimentally determined for high reliability.

All hydrogens bonded to I.C.s are fragments. These two kinds of fundamental fragments are the most important members of the non-polar class. A comparison of their relative values ($C = 0.2$; $H = 0.225$) is a reminder that the measure of effective cavity size may not be as simple as using van der Waals radii or CPK models.

2.2. Polar Fragments

A fragment is any atom or group of atoms bounded by Isolating Carbon atoms, and all except hydrogen are considered polar. A fragment may have many internal bonds but those connecting it to I.C.s are called 'valence bonds'. Valence bonds are most often single, but can be aromatic, as in the case of the N fragments in pyrimidine shown above. Each hydrogen in methane is a fragment, but the hydrogens in formaldehyde are not because the carbon to which they are bonded is not isolating. This is very important to remember, for one frequently sees published calculations in which one fragment value is obtained from another by the replacement of a fragment hydrogen with another fragment of known value. At the present time a good rule to follow is: "Never break up a Fragment; estimations can be made from values measured for different bond environments (see below) but a Fragment cannot be constructed from parts." Examples of fragments which cannot be "broken down" further are:

[表2]

Monovalent:	-Cl;-CN
Divalent	-OC(=O)NH-
Trivalent:	-OC(=O)N<
Tetravalent:	>NC(=O)N<

As will become evident in the following sections, polar fragments can interact in various ways. To quantitate this interaction it is necessary to define several types of polar fragments:

(A) X = any halogen, but for one type of interaction fluorine must be assigned to a special subclass, 'F'. (B) Y = all non-X fragments; these are further subdivided according to: sensitivity to halogen interaction as 'Y-1', 'Y-2', and 'Y-3' containing '-OH' or not.

2.3. Intrinsic Values

Here the term, 'intrinsic' fragment values, means those which would, if summed, yield the correct log P without any correction factors. It is worthwhile to examine some of the accepted hypotheses as to what solvation forces or other phenomena determine these intrinsic values. It takes more energy to form a cavity in water than in octanol. One would predict, therefore, that increasing the size of a solute would increase its log P. Other factors being equal, this appears to be the case. However, other features of the solute can partly or completely override the effect of its size.

Water is much more capable than is octanol of accommodating localized dipoles, and it contains, on a molar basis, more hydrogen bond accep

ting and donating groups. So it is these three factors –size, localized dipole strength, and H-bonding ability – which largely determine the sign and magnitude of any fragment value.

2.3.1 Halogens

Halogens form an intense localized dipole when bonded to an aliphatic carbon atom.* This intensity is somewhat lessened if the I.C. is benzyl and greatly lessened if it is vinyl, styryl or aromatic.* Fluorine has a negative fragment value when attached to an aliphatic carbon, because the dipole effect outweighs the effect of size. Size is of greater importance with chlorine and bromine, but even bromine is less hydrophobic than a hydrogen in an aliphatic setting. As will become evident in the following section, much of this hydrophilic polar effect can be lost through 'shielding' by other halogens, or by electronic interaction with 'Y' type polar groups.

2.3.2 H-Polar Fragments

H-Polar Fragments ('Y') almost universally form some sort of hydrogen bonds with the donor (H) or acceptor (O) of the aqueous phase. This is thought to interrupt the peculiar 'ice-like' water shell which forms around the non-polar, hydrocarbon-like portions of each solute molecule, and thereby effectively reduces cavity size. As noted above, this should reduce log P.

2.3.3 Ions

Octanol can accept some larger solutes containing a full formal charge in sufficient concentration for measurement. However, one must be careful that the species measured is the same, because water easily su

ports complete ionization while ion-pairing is the usual condition in octanol except at the very lowest concentrations. Consistent values can be obtained if 'standard conditions' are adhered to: 0.1 M small counter-ion (Na^+ or Cl^-) and extrapolation to infinite dilution. Measured in this way a carboxylate ion is about 4.1 log units lower than the undissociated acid. No single value can be given to the positive charge on a protonated amine or quaternary ammonium, because the charge is delocalized along the hydrocarbon chain and thus the effect is dependent on chain-length. It should be emphasized at this point that, except for zwitterions, CLOGP calculates values for the neutral solute only.*

2.3.4 Unsaturation

Double bonds in isolation have a slightly negative effect on log P.* This effect may arise from the polarity of the pi electrons or else it may be due to the shorter bond length reducing cavity size. At any rate, it disappears if the double bonds are conjugated.* Triple bonds are decidedly hydrophilic and require a large negative correction factor.

3. Correction Factors

3.1 Structural Factors

3.1.1 Bonds

To properly perform its calculations, CLOGP needs to know the number and types of certain bonds in the solute structure. There is some reason to believe that, for the bonds in question, factors other than bond length affect the size of the solvent cavity needed to contain the hydrophobic portions of the solute molecule.

The effect of all bonds within any fragment is taken care of by the fragment value, and so it is NOT necessary to keep track of them, NOR of any bonds to hydrogen. And, as explained below, it is convenient to allow for the bond effect in aromatic rings by including it in a special aromatic I.C. type, 'aromatic carbon'; therefore, aromatic bonds also are NOT given special attention.

Bonds which DO need to be identified are the following:

3.1.1.1 Chain bonds

Chain bonds are non-ring bonds between I.C.s plus any valence bonds to fragments*.

3.1.1.2 Ring Bonds

Ring bonds are non-aromatic ring bonds between I.C.s plus any valence bonds to fragments*.

3.1.1.3 Branch Bonds

Branch bonds are chain bonds emanating from 'Branched Fragments' (a fragment type presently limited to phosphate esters) and counted to the last I.C. preceding any polar fragment.*

A separate count of each of these bonds types must be made, and a negative correction applied. For chain bonds only, this correction applies to bonds AFTER the first in each chain. For example, there is no net bond correction for ethane but there is one for propane. This suggests that the correction accounts for flexing of the chain which is not possible in methane or ethane. 1,2-diethylbenzene gets only a net of two bond corrections, because each chain is counted separately. Also compatible with a 'flexing' hypothesis is the fact that the correc

tion is greater for chains than for aliphatic rings.

As noted above, an isolated double bond is assigned a negative correction factor (-0.09). This factor actually becomes slightly positive if the double bonds are conjugated in a ring such as benzene. Since it is much more convenient to assign all bonds in large fused ring systems as aromatic type, rather than using the Kekule system of alternating doubles and singles, it is worthwhile to assign a special fragment value to an aromatic carbon and include all the necessary bonding effects therein. The value of aliphatic carbon is $+0.20$; the value for aromatic carbon which includes all bond effects associated with the aromatic ring system is $+0.13$.

3.1.2 Branching at Isolating Carbons

3.1.2.1 Chain Branch

It is well-known that iso-alkanes are more water-soluble than their n-isomers. This branching evidently does not produce a corresponding solubility increase in the octanol phase in the partitioning process, because the correction required in CLOGP is negative in sign.

In CLOGP, the concept of branching was expanded, and now replaces the earlier use of the 'ring' cluster' correction(21). Fusion carbons in non-aromatic rings are considered as branched and given the same correction factor as chains; i.e., -0.13 . They are designated cluster branches.

3.1.2.2 Group Branch

If an H-Polar group branches from an I.C. the increase in water solubility, compared to the n-isomer, is even greater than with chain branching. Again this carries over to partitioning equilibrium; H-Polar g

group branching requires a larger correction than does chain branching. For this reason isopropyl alcohol is given one group branch correction and no chain branch is considered.* Tertiary butyl alcohol gets one of each type.*

If a fragment has more than two external(valence) bonds, it could be considered a branching point. However, in all cases except the 'Branched Fragments' noted above (t-amines and phosphate esters), the entire negative branching effect is included in the fragment value itself.

Only in the case of the 'Branched Fragments' is the effect chain-length dependent.

3.2 Interaction Factors

3.2.1 Aliphatic Proximity (Measured Topologically)

3.2.1.1 Halogen vs. Halogen (X vs. X)

The positive correction to log P for this interaction is thought to result from dipole shielding and is limited to halogens on the same (geminal) or adjacent (vicinal) I.C.s. The geminal interaction is designated 'X-C-X', and the corrections can be thought to arise as follows: adding a second halogen to an I.C. which already has one creates the first X-C-X pair, and the correction required is +0.60.* Adding the third halogen to the same I.C. creates two more such pairings, each of which requires a correction of +0.5.* If the fourth halogen is added, the dipole is almost completely shielded, and the three additional pairings require corrections of +0.40 each.* For carbon tetrachloride the total geminal halogen correction would be:

EQ on pg. 12

For the vicinal halogen correction, X-C-C-X, the bond between carbons must not be double.* The correction is evaluated by subtracting one

from the number of halogens meeting the structural requirement and multiplying by the factor 0.28. (Again Rekker's Magic Constant pops up!)

3.2.1.2 H-Polar vs. H-Polar (Y vs. Y)

As noted in the section on 'Intrinsic Values', the negative sign on the 'Y' fragments is thought to result from their 'structure-breaking' (and thus cavity-reducing) ability in the water phase. 'Y' fragments appear to eliminate the cavity requirement for two or more I.C.s to which they are attached. Obviously if two 'Y' fragments are located on the same or adjacent I.C.s to which they are attached. Obviously if two 'Y' fragments are located on the same or adjacent I.C.s some of this cavity reduction is going to be counted twice. Thus a positive correction factor is called for when the topological separation is less than three I.C.s. The CLOGP algorithm is an improvement over the original Rekker procedure(20) in that, in place of the same correction for every Y-C-Y or Y-C-C-Y, it makes the correction proportional to how much hydrophilic character (negative fragment value) is involved. This proportionality appears to apply even if one of the fragments is charged and has a highly negative value, but as previously noted, the CLOGP algorithm currently does not treat ions.

If one of the 'Y' fragments in a Y-C-Y interaction contains an -OH moiety (e.g. -NHOH, -COOH, or -OH itself), a greater proportion of the hydrophilic character of the pair is lost. The coefficient by which the fragment sum is multiplied increases from 0.32 to 0.42.*

If both the 'Y' fragments and the carbons of Y-C-C-Y are in a ring, the hydrophilicity loss is not as great as if they are all in a chain (coefficient 0.26 vs. 0.20).* If one 'Y' is a substituent on the ring

while the other is in the ring, the correction coefficients are averaged (0.23).* If one of the carbons has two 'Y' fragments, the geminal correction is applied first; then, for the (Y-C-C,Y'Y'') correction, both pairings are calculated and averaged.* If both I.C.s have geminal 'Y' fragments, then the vicinal correction is not applicable.* (See penicillin in EXAMPLES).

3.2.1.3 Halogen vs. H-Polar (X vs. Y)

The interaction being considered at this point is limited to that which takes place across single bonds. It is therefore, probably due to an inductive or field effect. (The electronic interaction between fragments on or in aromatic rings is discussed in the following section.) In evaluating the X-C-Y correction factor, all halogens can be treated alike. However, there are at least three levels of sensitivity shown by 'Y' type fragments. In CLOGP the most sensitive class, 'Y-3', is restricted to the structural type: -SO₂-R.* 'Y-2' consists of the types: -CONH-R, -O-R, -S-R, and -NH-R; and 'Y-1' of all other, H-polar fragments.* The correction factor for the first alpha-halogen (i.e. X-C-Y) is the same for all three Y-types (+0.9). For 'Y-3' fragments, this correction factor is doubled when there are two alpha halogens (X₂-C-Y₃) and tripled when there are three (X₃-C-Y₃). For 'Y-2' fragments, the second and third alpha-halogens need much less correction, and for 'Y-1', virtually none. In the case of multiple halogenation, the X-C-X and the X-C-Y corrections are additive. The CLOGP algorithm makes no separation of 'Y' types to make the X-C-C-Y correction, but needs to distinguish fluorine from the other 'X' halogens.*

3.2.2 Electronic (through Pi-bonds)

3.2.2.1 Fragment Valence Type

As previously noted, all fragments (X or Y type) are assigned the most negative values when bonded to aliphatic I.C.s (designated as 'A').

This can be considered as the 'base' or 'intrinsic' level. If the fragment value when attached to a vinyl I.C. (V) has not been measured it can be estimated as the average of the base and aromatic-bonded (a) values.* Likewise the value for the styryl-attached fragment can be estimated as two-thirds the way from the base to the aromatic value.

* CLOGP will only make these estimations when measured values have not been entered in the database.

3.2.2.2 Extension of Aromaticity

The extension of the aromatic ring system through fusion (as in naphthalene or direct substitution (as in biphenyl)) appears to increase log P, especially if the heteroaromatic atom is next to the juncture.*

If the ringjoining carbons are attached only to other aromatic carbons, electron delocalization is minimal and so is the correction: +0.10 for each I.C. If the I.C.s are also attached to a polar (fused-in) fragment, such as in quinoline or 2-phenylpyrimidine, the correction is greater, +0.31.*

3.2.2.3 Sigma/Rho Fragment Interaction

When two or more X and/or Y type fragments are attached to an aromatic ring system, the correction factors can be calculated by a method very similar to that used by Hammett(23) to calculate the electronic effects in other equilibria, such as acid ionization.* This requires the assignment of a measure of electronic 'strength' (sigma) and 'susc

eptibility' (ρ). In dealing with electronic effects on partitioning equilibria, a few fragments appear to act 'bidirectionally' and require both σ and ρ values, although they cannot, of course, act upon themselves. Most of the details of σ and ρ assignment to X and Y type fragments can be found elsewhere (24), but it should be pointed out that the latest version of the program (CLOGP) follows a newer procedure for 'fused-in' fragments. Fragments fused in aromatic rings (e.g. -N= or >C=O) may also be assigned both ρ and σ constants and treated together with 'on-ring' fragments instead of requiring a separate treatment.*

Fragments on different rings in an aromatic ring system interact with one another but the effect is attenuated.* If the two rings in the system are fused, as in 5-acetyl-1-naphthylamine, the 'intrinsic' effect is only half the $\sigma\rho$ product just as it is in the biphenyl system such as in 4-(m-chlorophenyl)aniline.

One frequently encounters aromatic ring systems containing several fragments with ρ and σ values assigned, and the potential correction from all cross products of σ/ρ could be very large. Since these multiple effects are NOT additive, some scaling down procedure was indicated. The one chosen for CLOGP takes the following steps:

- a) The full potential $\sigma\rho$ product for each possible interaction is calculated and placed in descending value order, AFTER considering if the fragment pair are on the same or separate rings.
- b) Except for the σ for a pyridine type nitrogen, each use of σ or ρ causes it to 'age'. The first interaction at the top of the list is entered at full potential because the current age of its σ and ρ components is 'zero' for each. Each use reduces the effective σ or ρ value to 1/2 its previous value, and so if each were

at 'age 1', the increment to the correction would only be 1/4 as much as a 'fresh' interaction. The mechanics of this computation are best understood by looking at the detailed output of some complex structures. Two such examples are provided in the example section.*

3.2.3 Special Ortho

As noted in the previous section, aromatic substituent (fragment) pairs, if they have sigma and rho values assigned to them, are given the same correction factor regardless of their relative position on the ring. It is important to keep in mind that if the fragment pair are on adjacent positions (i.e. ortho), an additional correction may be required.

3.2.3.1 Crowding

'Crowding' of certain fragment types can effectively lower their aromatic-attached values. This is most apparent in the case of fragments attached to the aromatic ring through a hetero atom which possesses an electron pair, such as -NHCOCH3.* A reasonable explanation of this observation is that the lone pair can no longer remain in the plane of the ring, making the fragment attachment resemble aliphatic (A) rather than true aromatic (a). The magnitude of the correction appears to depend on both steric and electronic (field) effects(25).

If this explanation is valid, one would expect the correction to vary continuously up to a maximum characteristic of each fragment type. It was surprising, therefore, to find that the rather large data set used in the original evaluation of the 'negative ortho' effect (24) seemed to fit multiples of Rekker's Magic Constant(20). This is handled in CLOGP by assigning integers to a matrix which has generalized fra

gment types for coordinates.

More recent data provides many examples which do not support this 'quantized' correction. Nevertheless, it is being retained for the present because of simplicity and because its maximum is only 0.14.

3.2.3.2 Intra-Molecular Hydrogen Bonding

Hydrogen bonding is known to occur intramolecularly between two ortho substituents if one is a donor and the other an acceptor. A classical example of such an H-bond is that in o-nitrophenol. As might be expected, an intramolecular H-bond reduces water's ability to accommodate that solute, and the log P of o-nitrophenol is over two log units higher than the m- and p-isomers in the heptane and carbon tetrachloride solvent systems. One must always keep in mind, however, that the octanol phase possesses both H-donor and H-acceptor capability, not only because it is an alcohol, but because of the 2M water present at saturation. In actuality, the presence of the intramolecular H-bond in o-nitrophenol penalizes solvation in octanol slightly more than it does solvation in water, and its log P is 0.09 log units lower than the m- and p-isomers.

In terms of intramolecular H-bonding between aromatic ortho substituents, the octanol/water system appears to be sensitive to a very restricted class. The only clear-cut cases seem to result from a carbonyl group directly attached to the ring acting as acceptor, and a directly-attached -OH or -NH- acting as donor.* In all of the cases observed so far, the correction is very close to +0.63, and is stored in the same matrix used for the 'negative ortho' corrections. Thus the 'crowding' and H-bonding ortho effects never are applied simultaneously, but a sigma/rho correction cannot be added to either.

4. Summary

The fragment method of calculating $\log P(ow)$ has been proved valuable in many fields, including drug design and hazard assessment. However, manual calculations require a great deal of instructions and become very lengthy for complex structures and thus are error-prone. The computer program, CLOGP, enables the method to be applied by non-experts and includes an estimate of error, which is not possible in the future. Regular users can avail themselves of an annual update which will bring them current with all newly measured fragment values and improved correction factors. Versions with the Unified Driver compare the calculation from structure with a measured value from $\log P(ow)$ for neutral solutes. Starlist is also included in the annual updating service. We plan to make available in the near future a searching program, GENIE, which will extend the search of Starlist to close analogs. The current literature contains many examples of QSAR accompanied by calculations of hydrophobicity which have not been made according to a consistent application of the rules they purport to follow. This has caused some confusion and cast doubt upon the entire approach. Perhaps, if the use of CLOGP becomes more widespread, published calculations will become more comparable, especially if reference is made to the program version.

Any prediction of the future is risky, but, judging from the recent past, we can expect an increasing demand for $\log P(ow)$ values. It is conceivable that CLOGP will be perfected to such an extent that it supplants partition coefficient measurement. The two methods should remain as they are now: mutually complementary.

With the STARLIST module in CLOGP, the user will be able to check the

calculated value against an acceptable measured value if the solute structure entered is one of over 4,000 contained in that special file which is limited to non-tautomeric structures measured at a pH where the neutral form predominates.

5. Bibliography

- 1) Smith, R., Hansch, C. Ames, M., J. Pharm. Sci., 64, 599 (1975).
- 2) Martin, Y., Quantitative Drug Design, Medicinal Research Series No . 8, Marcel Dekker, New York, 1978.
- 3) Magee, P., Chemtech, 11, 378 (1981).
- 4) Smyth, R., Pfeffer, M., Van Harken, D., Cohen, A. and Hottendorf, G. Antimicrob. Agents Chemother., 10, 1004, (1981).
- 5) Koblin, D., Eger II, E., Johnson, B., Collins, P., Terrell, R., and Spears, L., Anesth. Analg., 60, 464 (1981).
- 6) Brown, D. and Flagg, E., J. Environ. Qual., 10, 382 (1981).
- 7) Ellinghausen, H., Guth, J. and Eser, H., Ecotox. Environ. Safety, 4, 26 (1980).
- 8) Levitan, H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 2914 (1977).
- 9) Neeley, W., Branson, D. and Blau, G., Environ. Sci. Technol., 8, 113 (1974).
- 10) Tanford, C., The Hydrophobic Effect, Wiley, New York, 1980, 2nd E d., Ch. 13.
- 11) Coats, E., Genther, G., Dietrich, S., Guo, Z., and Hansch, C., J. Med. Chem., 24, 1422 (1981).
- 12) Smith, R., Hansch, C. and Langridge, R., Arch. Biochem. Biophys., 215, 319 (1982).
- 13) Martinek, K., and Semenov, A., J. Appl. Biochem., 3, 93 (1981).
- 14a) Newcomb, M., Moore, S. and Cram, D., J. Am. Chem. Soc., 99, 6405

(1977).

14b) Hansch, C., J. Org. Chem., 43, 4889 (1978).

15) Unger, S. and Feuerman, T., J. Chromatog., 176, 426 (1979).

16) Mirrlees, R. and Taylor, P., J. Med. Chem., 19, 615 (1976).

17) Tomlinson, E., Proceedings of A.Ph.A., Symposium on Partition Coefficients, San Diego, CA, (1982).

18) Tewari, Y., Miller, M., Wasik, S. and Martire, D., J. Chem. Eng. Data, 27, 451 (1982).

19) Fujita, T., Iwasa, J. and Hansch, C., J. Am. Chem. Soc., 86, 5157 (1964).

20) Rekker, R., The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam (1977).

21) Hansch, C. and Leo, A., Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, Wiley Interscience New York (1979).

21) Leo, A. and Hoekman, D., Perspect. in Drug Discov. & Design, 18, 19 (2000).

22) Chou, J. and Jurs, P., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 19, 172 (1979).

23) Hammett, L., Physical Organic Chemistry: Reaction Rates, Equilibria and Mechanism, McGrawHill, New York, 1970, 2nd Ed.

24) Leo, A., J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 825 (1983).

25) Ogino, A., Matsumura, S. and Fujita, T., J. Med. Chem., 23, 437 (1980).

26) Leo, A. and Hansch, C., J. Org. Chem., 36, 1539, (1971).

[0102] 前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドの ClogP は、例えば、2.4以下、2.3以下、2.2以下、2.1以下、又は2.0以下であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上

のペプチドにおいて、ペプチドの C l o g P の下限は、例えば、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、又は 10 以上であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドの C l o g P の範囲として、例えば、5 以上 24 以下、6 以上 23 以下、7 以上 22 以下、8 以上 21 以下、9 以上 20 以下、及び 10 以上 20 以下、11 以上 18 以下であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドの C l o g P の範囲は、例えば 4 以上 25 以下であってよく、好ましくは 6 以上 23 以下であり、より好ましくは 8 以上 21 以下であり、最も好ましくは 9 以上 20 以下である。

[0103] 前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドは、 $\text{C l o g P} / \text{アミノ酸残基数}$ が例えば 1.0 以上であってよい。「アミノ酸残基数」は、ペプチドを構成するアミノ酸残基の総数を意味する。例えば、環状部が 10 個のアミノ酸残基からなり、直鎖部が 1 アミノ酸残基からなる環状ペプチドのアミノ酸残基数は 11 である。 $\text{C l o g P} / \text{アミノ酸残基数}$ は、ペプチドの C l o g P を該ペプチドに含まれるアミノ酸残基数で除すことにより算出される値である。例えば、ペプチドの C l o g P が 14.0 で、該ペプチドに含まれるアミノ酸残基数が 7 のとき、該ペプチドの $\text{C l o g P} / \text{アミノ酸残基数}$ は 2.0 と計算される。

[0104] 前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドの $\text{C l o g P} / \text{アミノ酸残基数}$ は、例えば、1.1 以上、1.2 以上であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドの $\text{C l o g P} / \text{アミノ酸残基数}$ の上限は、例えば、1.8 以下、1.7 以下、1.6 以下、1.5 以下であってよい。前記候補分子-核酸結合体ライブラリ中に含まれる全ペプチドのうち、 1×10^3 以上のペプチドにおいて、ペプチドの $\text{C l o g P} / \text{アミノ酸残基数}$ の範囲は、例えば 1.

0以上1.8以下であり、好ましくは1.0以上1.7以下、より好ましくは1.1以上1.6以下、最も好ましくは1.1以上1.5以下である。

[0105] 本明細書中において、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子が特定の値の範囲に含まれるか否かは、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に実際に含まれている全候補分子それぞれが有する値を求め、その数が 1×10^3 以上となるか否かを確認することで判断できる。

但し、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子の数が 1×10^3 以上である場合、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に理論上含まれ得る全種類の候補分子を想定し、そのうち、 1×10^3 種類以上の前記候補分子－核酸結合体が特定の値の範囲に含まれる場合に、前記候補分子－核酸結合体ライブラリ中に含まれる全候補分子のうち、 1×10^3 以上の候補分子が特定の値の範囲に含まれているものとする。

[0106] (接触工程の実施方法)

接触工程では、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる。複数種類の標的分子が近接していることで、複数種類の標的分子と複合体を形成し得る目的分子の取得を効率よく行うことができる。

[0107] 非限定の一態様として、複数種類の標的分子が「互いに近接」しているとは、標的分子間の距離が60nm以下であることを意味する。標的分子間の距離は、例えば、55nm以下、50nm以下、45nm以下、40nm以下、35nm以下、又は30nm以下であってよい。標的分子間の距離は、好ましくは50nm以下、より好ましくは40nm以下、最も好ましくは30nm以下である。また、標的分子間の距離は、例えば、1nm以上、好ましくは5nm以上、より好ましくは10nm以上、最も好ましくは15nm以上である。また、標的分子間の距離は、例えば、1nm以上60nm以下、好ましくは5nm以上50nm以下、より好ましくは10nm以上40nm以下、最も好ましくは15nm以上30nm以下である。標的分子の距離

が上記範囲にあることで、目的分子を取得する効率がより高まる。標的分子間の距離とは、標的分子間の間隙のうち、最も直線距離が短い部分の距離である。なお、標的分子間の距離は0 nm（すなわち、標的分子同士が接触又は融合している状態）であってもよい。標的分子間の距離は、標的分子を互いに近接させる手段に応じて制御することができ、例えば、標的分子同士をリンカーで繋ぐ場合はその長さを調整することで、複数種類の標的分子同士を固相担体上に近接した状態で配置する場合はその密度を調整することで制御することができる。例えば、複数種類の標的分子が融合部を介して標的融合分子を形成している場合、標的分子間の距離の最大値は当該融合部の長さにより定まる。当該融合部が15の α -アミノ酸が結合したペプチドである場合、その長さは約5.7 nmであることが知られており（Advanced Drug Delivery Reviews, 2013年, vol. 65, pp. 1357-1369）、この場合における標的分子の距離は、当該ペプチドが直線状に伸びきったと仮定した場合の長さである5.7 nmが最大となる。そのため、当該標的融合分子を形成する複数種類の標的分子同士は近接していることとなる。

[0108] 非限定の第一の態様として、複数種類の標的分子同士が互いに融合して標的融合分子を形成していてもよい。標的融合分子を形成することにより、複数種類の標的分子を互いに近接させることができる。

[0109] すなわち、前記第一の態様として、接触工程は、複数種類の標的分子同士が互いに融合した標的融合分子に候補分子-核酸結合体ライブラリを接触させる工程であってよい。標的融合分子は、例えば、融合タンパク質（本明細書において、フュージョンタンパク質ともいう。）である。

[0110] 標的融合分子は、複数種類の標的分子同士が融合部を介して標的融合分子を形成しているものであってよい。融合部は、例えば、150アミノ酸残基以下から成るペプチド、125アミノ酸残基以下から成るペプチド、100アミノ酸残基以下から成るペプチド、75アミノ酸残基以下から成るペプチド、55アミノ酸残基以下から成るペプチド、35アミノ酸残基以下から成るペプチド、

るペプチド、25アミノ酸残基以下から成るペプチド、又は15アミノ酸残基以下から成るペプチドであってよい。また、例えば150アミノ酸残基以下から成るペプチド、好ましくは125アミノ酸残基以下から成るペプチド、より好ましくは100アミノ酸残基以下から成るペプチド、最も好ましくは75アミノ酸残基以下から成るペプチドであってよい。これにより、複数種類の標的分子が互いに近接する頻度がより高くなる。融合部はまた、例えば、ペプチド以外の共有結合によるリンカーを含んでいてもよく、光化学分解を生じる化合物（ペプチド等）を含んでいてもよく、抗体であってもよく、コイルドコイルペプチドタグ（PNAS, 2018年, vol. 115, no. 51, pp. 12961-12966）であってもよく、核酸であってもよく、N-NTAとHisタグのような非共有結合によるリンカーであってもよい。

[0111] 前記複数種類の標的分子同士が融合部を介して標的融合分子を形成している場合、前記複数種類の標的分子のN末端同士が前記融合部を介して結合していてもよく、前記複数種類の標的分子のC末端同士が前記融合部を介して結合していてもよく、前記複数種類の標的分子における第一の標的分子のN末端及び前記複数種類の標的分子における第二の標的分子のC末端が、前記融合部を介して結合していてもよい。

[0112] 非限定の第二の態様として、複数種類の標的分子が同一の固相担体上に固定化されていてもよい。同一の固相担体上に固定化されていることにより、複数種類の標的分子が互いに近接する頻度を上昇させることができる。

[0113] すなわち、第二の態様として、接触工程は、（1）同一の固相担体上に固定化されている複数種類の標的分子に（2）候補分子-核酸結合体ライブラリを接触させる工程であってよい。

[0114] 固相担体の形状に特に制限はないが、例えば、ビーズ、プレート、チップ等の形状であってよい。固相担体は、アフィニティー結合に利用しうる分子を表面に有するものであってよい。具体的には例えば、固相担体は、アビジン、ニュートラアビジン及びストレプトアビジンからなる群より選ばれる1

つ以上をその表面に有するものであってよい。

[0115] 固相担体の表面 1 m^2 あたりには、例えば、 1×10^{13} 以上、 5×10^{13} 以上、 1×10^{14} 以上、又は 5×10^{14} 以上の標的分子が固定化されていてもよい。また、例えば 1×10^{13} 以上、好ましくは 5×10^{13} 以上、より好ましくは 1×10^{14} 以上、最も好ましくは 5×10^{14} 以上の標的分子が固定化されていてもよい。これにより、複数種類の標的分子が互いに近接する頻度がより高くなる。

[0116] 固相担体の表面 1 m^2 あたりには、例えば、 1×10^{13} 以上、 5×10^{13} 以上、 1×10^{14} 以上、又は 5×10^{14} 以上の標的分子を、前記固相担体に対して接触させる工程を含んでいてよい。また、例えば 1×10^{13} 以上、好ましくは 5×10^{13} 以上、より好ましくは 1×10^{14} 以上、最も好ましくは 5×10^{14} 以上の標的分子を、前記固相担体に対して接触させる工程を含んでいてよい。これにより、複数種類の標的分子が互いに近接する頻度がより高くなる。

[0117] 前記第二の態様において、標的融合分子、候補分子－核酸結合体、及び／又は互いに近接した複数種類の標的分子のそれぞれは、固相担体上に固定化されていてもよい。固相担体の具体的な態様は、上述のとおりである。

[0118] 接触工程は、候補分子－核酸結合体ライブラリと標的分子、又は標的融合分子とを混合する工程を含むものであってよい。

[0119] 接触工程の具体例として、例えば、複数種類の標的分子又は標的融合分子を含む液体に、候補分子－核酸結合体ライブラリを加えて混合し、その後インキュベートする方法が挙げられる。複数種類の標的分子又は標的融合分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる際の条件（インキュベートの時間、インキュベート時の温度等）は、標的分子又は標的融合分子の種類、候補分子－核酸結合体ライブラリの種類等に応じて、適宜選択することができる。

[0120] 非限定の第三の態様として、接触工程は、複数種類の標的分子から選択される1種類である第一の標的分子に、候補分子－核酸結合体それぞれと第一

の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接触させる工程であってよい。

[0121] 前記第三の態様では、候補分子－核酸結合体と第一の標的分子とは異なる標的分子とが結合しているため、候補分子－核酸結合体と第一の標的分子が接近した際に、第一の標的分子と候補分子－核酸結合体に結合した標的分子（第一の標的分子とは異なる標的分子である）とが近接する頻度を上昇させることができる。

[0122] 前記第三の態様として、候補分子－核酸結合体それぞれと第一の標的分子とは異なる標的分子とは、連結部を介して連結体を形成しているものであってよい。

[0123] 連結部としては、候補分子－核酸結合体及び標的分子を連結できる限り特に制限はないが、例えば、Hisタグ及びNi－NTAを含むものであってよい。Ni－NTAとしては、例えば、mono－Ni－NTA、di－Ni－NTA、tetraakis－Ni－NTA及びTris－Ni－NTAからなる群より選ばれる1つ以上が挙げられる（J. Am. Chem. Soc., 2005年, vol. 127, pp. 10205－10215）。具体的には、例えば、候補分子にNi－NTAを付加し、標的分子にHisタグを付加した上で、両者を混合することで連結体を得ることができる。

[0124] 前記第三の態様において、連結体、及び／又は第一の標的分子は、固相担体上に固定化されていてもよい。固相担体の具体的な態様は、上述のとおりである。

[0125] 接触工程は、連結体ライブラリと第一の標的分子とを混合する工程を含むものであってよい。

[0126] 接触工程の具体例として、例えば、第一の標的分子を含む液体に、連結体ライブラリを加えて混合し、その後インキュベートする方法が挙げられる。第一の標的分子に連結体ライブラリを接触させる際の条件（インキュベートの時間、インキュベート時の温度等）は、第一の標的分子の種類、連結体ライブラリの種類等に応じて、適宜選択することができる。

[0127] 第三の態様の変形例として、標的分子及び候補分子が連結部を介して連結した標的分子－候補分子連結体、並びに標的分子及び候補分子を連結部を介して連結させる、標的分子－候補分子連結体の製造方法が提供される。第三の態様の更なる変形例として、標的分子及び候補分子が連結部を介して連結し、かつ、候補分子及び核酸が結合部を介して結合した、標的分子－候補分子－核酸連結体、並びに標的分子及び候補分子を連結部を介して連結させ、かつ、候補分子及び核酸を結合部を介して結合させる、標的分子－候補分子－核酸連結体の製造方法が提供される。連結部及び結合部の具体的態様は既述のとおりである。

[0128] 第四の態様として、接触工程は、複数種類の標的分子同士を連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）を経て用意された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させる工程、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）を経て用意された連結体に、前記連結工程において用いられなかった標的分子を接触させる工程であってよい。

[0129] 非限定の一態様において、前記接触工程において、前記連結体以外の標的分子及び前記連結体に前記候補分子－核酸結合体を接触させてもよい。

また、前記連結体以外の標的分子が、前記連結体に含まれる標的分子の内の1つと同じ種類の標的分子であってよい。

また、前記連結体以外の標的分子は1種類であってよい。

また、前記連結体以外の標的分子は固相担体に固定されていなくてよい。

また、前記接触工程において、前記連結体の濃度に対する、前記連結体以外の標的分子の濃度の比率は、例えば1以上であり、好ましくは3以上であり、より好ましくは5以上であり、最も好ましくは10以上である。

また、前記接触工程において、前記連結体の濃度に対する、前記連結体以外の標的分子の濃度の比率は、例えば1,000以下であり、好ましくは500以下であり、より好ましくは300以下であり、最も好ましくは100以下である。

また、前記接触工程において、前記連結体の濃度に対する、前記連結体以外の標的分子の濃度の比率は、例えば1以上1,000以下であり、好ましくは3以上500以下であり、より好ましくは5以上300以下であり、最も好ましくは10以上100以下である。

[0130] (連結工程)

連結工程では、複数種類の標的分子同士を連結するか、又は複数種類の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結する。連結工程により、標的分子と標的分子が連結された連結体、又は標的分子と候補分子－核酸結合体との連結体が得られる。標的分子と標的分子が連結された連結体に含まれる標的分子は、互いに同一であってもよく、異なってもよいが、互いに異なっていることが好ましい。

[0131] 第五の態様として、接触工程は、複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結体に含まれない標的分子を接触させる工程であってよい。

[0132] 第四の態様及び第五の態様において、標的分子と標的分子が連結された連結体を用意する手段は、複数種類の標的分子を近接させた状態で候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる手段で説明した態様と同じ態様を例示できる。すなわち、標的分子と標的分子が連結された連結体を用意する手段は特に限定されないが、(1)複数種類の標的分子同士が互いに融合した標的融合分子としてもよく、(2)同一の固相担体上に複数種類の標的分子を固定化してもよく、(3)リポソームやナノディスクに代表される脂質二重層に各標的分子を埋め込むことで連結させてもよい。特にこの中では(1)の方法が最も好ましい。また、(1)については、標的分子同士が融合部を介して連結した連結体(標的融合分子)であってよい。標的分子と候補分子－核酸結合体との連結体は、標的分子と候補分子－核酸結合体が融合部を介して連結した連結体であってよい。融合部は、標的融合分子で説明した態様と同じ態様を例示できる。すなわち、融合部は、例えば、150アミノ酸残基

以下から成るペプチド、125アミノ酸残基以下から成るペプチド、100アミノ酸残基以下から成るペプチド、又は75アミノ酸残基以下から成るペプチドであってよい。また、例えば150アミノ酸残基以下から成るペプチド、好ましくは125アミノ酸残基以下から成るペプチド、より好ましくは100アミノ酸残基以下から成るペプチド、最も好ましくは75アミノ酸残基以下から成るペプチドであってよい。これにより、複数種類の標的分子が互いに近接する頻度がより高くなる。融合部はまた、例えば、ペプチド以外の共有結合によるリンカーを含んでいてもよく、光化学分解を生じる化合物（ペプチド等）を含んでいてもよく、抗体であってもよく、コイルドコイルペプチドタグ（PNAS, 2018年, vol. 115, no. 51, pp. 12961-12966）であってもよく、核酸であってもよく、Ni-NTAとHisタグのような非共有結合によるリンカーであってもよい。

標的分子同士の融合部は、例えば、ペプチド以外の共有結合によるリンカーを含んでいてもよく、光化学分解を生じる化合物（ペプチド等）を含んでいてもよく、抗体であってもよく、コイルドコイルペプチドタグ（PNAS, 2018年, vol. 115, no. 51, pp. 12961-12966）であってもよく、核酸であってもよく、Ni-NTAとHisタグのような非共有結合によるリンカーであってもよい。

標的分子と候補分子-核酸結合体の融合部は、例えば、ペプチド以外の共有結合によるリンカーを含んでいてもよく、光化学分解を生じる化合物（ペプチド等）を含んでいてもよく、抗体であってもよく、コイルドコイルペプチドタグ（PNAS, 2018年, vol. 115, no. 51, pp. 12961-12966）であってもよく、核酸であってもよく、Ni-NTAとHisタグのような非共有結合によるリンカーであってもよい。

[0133] [回収工程]

回収工程では、複数種類の標的分子から選択される少なくとも1種類の標的分子と候補分子-核酸結合体との複合体を回収する。

[0134] 複合体の回収は、当業者に周知の方法により実施することができる。例え

ば、プルダウン法等のアフィニティーを利用した方法により、複合体を回収することができる。

[0135] アフィニティーを利用した方法としては、例えば、ビオチンとビオチン結合タンパク質との間のアフィニティー、HisタグとNi-NTAとの間のアフィニティー、又は抗原と抗体との間のアフィニティーを利用した方法が挙げられ、好ましくはビオチンとビオチン結合タンパク質との間のアフィニティーを利用した方法である。

[0136] 非限定の一態様として、例えば、標的分子をビオチン修飾し、ビオチン結合タンパク質を表面に結合した固相担体（例えば、ビーズ）と混合することでビオチンとビオチン結合タンパク質とをアフィニティー結合させ、ビーズを遠心分離等で回収することにより、標的分子と共に標的分子と複合体を形成した候補分子-核酸結合体を回収することができる。

[0137] 本明細書におけるビオチン結合タンパク質としては、アビジン、ニュートラアビジン及びストレプトアビジンが例示される。

[0138] [溶出工程]

溶出工程では、前記回収工程により回収された前記候補分子-核酸結合体中の核酸を溶出する。

[0139] 核酸は、核酸そのもの、候補分子-核酸結合体、又は標的分子と候補分子-核酸結合体との複合体の形態で溶出してもよい。

[0140] すなわち、溶出工程では、候補分子と核酸との結合が切断されてもよく、標的分子と候補分子-核酸結合体との結合が切断されてもよく、及び／又は固相担体と標的分子との結合が切断されてもよい。候補分子と核酸との結合が切断されることにより、核酸そのものの形態で核酸を溶出することができる。標的分子と候補分子-核酸結合体との結合が切断されることにより、候補分子-核酸結合体の形態で核酸を溶出することができる。固相担体と標的分子との結合が切断されることにより、標的分子と候補分子-核酸結合体との複合体の形態で核酸を溶出することができる。

[0141] 結合の切断は、例えば、酵素を使用する方法、光を使用する方法、又は熱

を使用する方法からなる群より選ばれる1つ以上により行うことができる。
結合の切断は、好ましくは、酵素を使用する方法により行われる。

[0142] 酵素を使用する方法による結合の切断は、例えば、候補分子と核酸との結合部、標的分子と候補分子-核酸結合体との結合部、又は固相担体と標的分子との結合部に酵素により特異的に認識及び切断される基質を含ませることにより行うことができる。当該基質を含む複合体に酵素を作用させることで、結合が切断され、核酸が溶出される。酵素と基質との組み合わせの具体例として、例えば、TEVプロテアーゼ、3Cプロテアーゼ等のタンパク質分解酵素と、当該タンパク質分解酵素により特異的に認識及び切断されるアミノ酸配列を含むペプチドとの組み合わせ、制限酵素等のDNA分解酵素と、当該DNA分解酵素により特異的に認識及び切断される塩基配列を含むDNAとの組み合わせを挙げることができる。

[0143] 光を使用する方法による結合の切断は、例えば、候補分子と核酸との結合部、標的分子と候補分子-核酸結合体との結合部、又は固相担体と標的分子との結合部に光化学分解を生じる構造を含ませることにより行うことができる。当該構造を含む複合体に適切な波長の光照射を行うことで、結合が切断され、核酸が溶出される。光化学分解を生じる構造の具体例として、例えば、6-ニトロベラトリルオキシカルボニル(NVOC)構造、クマリン構造が挙げられる。

[0144] 熱を使用する方法による結合の切断は、例えば、候補分子と核酸との結合、標的分子と候補分子-核酸結合体との結合、又は固相担体と標的分子との結合をアフィニティーを利用した結合（例えば、ビオチンとビオチン結合タンパク質との結合）とすることで行うことができる。当該結合を有する複合体に熱（例えば、95℃10分間）をかけることによって、結合が切断され、核酸が溶出される。

[0145] [増幅工程]

増幅工程では、複合体を形成した候補分子-核酸結合体中の核酸を増幅する。増幅工程は、回収工程の後に行われればよいが、好ましくは溶出工程の

後に行われ、より好ましくは溶出工程の後かつ同定工程の前に行われる。

[0146] 核酸の増幅は、例えば、回収された複合体、又は溶出された核酸を鋳型とし、核酸中の増幅に使用するための配列に結合するプライマーを使用したPCR法等により実施することができる。

[0147] 〔繰り返しによる方法〕

本実施形態に係るスクリーニング方法は、増幅工程で増幅した核酸から新たに候補分子-核酸結合体ライブラリを生成し、当該候補分子-核酸結合体ライブラリを使用して接触工程、回収工程、及び増幅工程を複数回繰り返すものであってもよい。

[0148] 接触工程、回収工程、及び増幅工程を繰り返すことによって、目的分子が濃縮されたライブラリを得ることができる。繰り返し数は、1回以上、2回以上、3回以上、4回以上、又は5回以上であってよく、具体的には例えば、1回、2回、3回、4回、又は5回であってよい。非限定の一態様において、繰り返し数が4回以上であると、通常、目的分子が高度に濃縮されるため、同定工程を実施することなく目的分子を得ることもできる。

[0149] 他の実施形態に係るスクリーニング方法は、増幅工程で増幅した核酸から新たに候補分子-核酸結合体ライブラリを生成し、当該候補分子-核酸結合体ライブラリを使用して接触工程、回収工程、溶出工程及び増幅工程を複数回繰り返すものであってもよい。

[0150] 接触工程、回収工程、溶出工程及び増幅工程を繰り返すことによって、目的分子が濃縮されたライブラリを得ることができる。繰り返し数は、2回以上、3回以上、4回以上、又は5回以上であってよく、具体的には例えば、2回、3回、4回、又は5回であってよい。非限定の一態様において、繰り返し数が4回以上であると、通常、目的分子が高度に濃縮されるため、同定工程を実施することなく目的分子を得ることもできる。

[0151] 〔同定工程〕

同定工程では、複合体を形成した候補分子-核酸結合体から目的分子を同定する。同定工程は、回収工程の後に行われればよいが、好ましくは溶出工

程の後、又は増幅工程の後に行われ、より好ましくは溶出工程の後かつ増幅工程の後に行われる。

[0152] 前記同定工程には、溶出工程で溶出された核酸、又は増幅工程で増幅された核酸の配列を決定することが含まれていてよい。核酸の配列を決定することにより、当該核酸と結合体を形成している候補分子の種類を特定することができる。

[0153] 前記同定工程は、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における候補分子－核酸結合体の回収率（回収率A）と、複数種類の標的分子から選択される1種類の標的分子のみに候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における候補分子－核酸結合体の回収率（回収率B）とを比較することを含んでいてよい。

[0154] この場合、回収率Aが、回収率Bと比較して、5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは20倍以上、最も好ましくは30倍以上である場合に、候補分子を目的分子として同定することができる。回収率Bと比較した回収率Aの倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

[0155] ここで「回収率」は、標的分子に接触させたライブラリ中の候補分子－核酸結合体の分子数（インプット分子数）に対する標的分子と複合体を形成して回収された候補分子－核酸結合体の分子数（アウトプット分子数）の割合（百分率：%）である。

また、回収率Bには、複数種類の標的分子それぞれのみに候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における回収率が含まれる。例えば、標的分子が2種類である場合、回収率Bには、第一の標的分子のみに候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における回収率B1、及び第二の標的分子のみに候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における回収率B2が含まれる。この場合、回収率Aが、回収率B1及び回収率B2の両方と比較して5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは20倍以上、最も好ましくは30倍以上である場合に、候補分子を目的分子として

同定することができる。回収率B 1 及び回収率B 2 の両方と比較した回収率A の倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

[0156] 前記同定工程は、互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における候補分子－核酸結合体の回収率（回収率A）と、標的分子非存在下の場合における候補分子－核酸結合体の回収率（回収率C）とを比較することを含んでよい。

[0157] この場合、回収率A が、回収率C と比較して、5 倍以上、好ましくは10 倍以上、より好ましくは20 倍以上、最も好ましくは30 倍以上である場合に、候補分子を目的分子として同定することができる。回収率C と比較した回収率A の倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

[0158] 前記同定工程は、（1）互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における候補分子－核酸結合体の回収率（回収率A）と、（2）複数種類の標的分子から選択される1 種類の標的分子であり固相担体上に固定化されている第一の標的分子及び固相担体上に固定化されていない第一の標的分子とは異なる標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させた場合における候補分子－核酸結合体の回収率（回収率D）とを比較することを含んでよい。

[0159] この場合、回収率A が、回収率D と比較して、5 倍以上、好ましくは10 倍以上、より好ましくは20 倍以上、最も好ましくは30 倍以上である場合に、候補分子を目的分子として同定することができる。回収率D と比較した回収率A の倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。また、回収率D には、前記第一の標的分子として、複数種類の標的分子の内いずれかの標的分子を選んだ場合それぞれにおける回収率が含まれる。例えば、標的分子が標的分子X 及び標的分子Y の2 種類である場合、回収率D には、第一の標的分子として標的分子X を選んだ場合における回収率D 1 及び、第一

の標的分子として標的分子Yを選んだ場合における回収率D₂が含まれる。
この場合、回収率Aが、回収率D₁及び回収率D₂の両方と比較して5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは20倍以上、最も好ましくは30倍以上である場合に、候補分子を目的分子として同定することができる。
回収率D₁及び回収率D₂の両方と比較した回収率Aの倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

[0160] 前記同定工程は、上述した回収率A～Dを相互に比較することの全てを含むものであってよい。

また、前記同定工程は、上述した回収率Aに対して、前記回収率B、前記回収率C及び前記回収率Dを比較することの全てを含むものであってよい。

この場合、前記回収率Aが、前記回収率B、前記回収率C及び前記回収率Dのいずれと比較しても5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは20倍以上、最も好ましくは30倍以上である場合に、候補分子を目的分子として同定することができる。回収率B、回収率C及び回収率Dのいずれとも比較した回収率Aの倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

また、前記同定工程は、上述した回収率Bに対して、前記回収率Dを比較することを含むものであってよい。

この場合、前記回収率Dが、前記回収率Bと比較して5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは20倍以上、最も好ましくは30倍以上である場合に、候補分子を目的分子として同定することができる。回収率Bと比較した回収率Dの倍率が上記範囲にある場合、当該同定された目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

[0161] 前記スクリーニング方法は、*in vitro*で行われるものであってよい。

[0162] 前記スクリーニング方法は、Split-GFPによる蛍光又はルシフェ

ラーゼによる発光を用いないものであってよい。

[0163] 本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子である。

目的分子が複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子である場合、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値は、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して小さくなる。つまり、本発明において、目的分子が複数種類の標的分子と共に複合体を形成している状態とは、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して小さくなっている状態をいう。

前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して小さいほど、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成する性質がより強く、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に形成した複合体がより安定した状態にあると言える。

ここで、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値は、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して、例えば、5分の1未満であってよく、好ましくは10分の1未満、より好ましくは20分の1未満、最も好ましくは30分の1未満である。前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して上記範囲である場合、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成する性質がより強く、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に形成した複合体がより安定した状態にあると言える。

また、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値は、例えば $30\ \mu\text{M}$ 以下であってよく、好ましくは $20\ \mu\text{M}$

以下、より好ましくは $10\ \mu\text{M}$ 以下、最も好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下である。前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が上記範囲にある場合、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成する性質がより強く、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に形成した複合体がより安定した状態にあると言える。

さらに、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値は、例えば $30\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満であってよく、好ましくは $20\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満であり、より好ましくは $10\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満であり、最も好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満である。前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が上記範囲にある場合、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成する性質がより強く、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に形成した複合体がより安定した状態にあると言える。

さらに、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値は、例えば $30\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5分の1未満であってよく、好ましくは $20\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して10分の1未満であり、より好ましくは $10\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して20分の1未満であり、最も好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して30分の1未満である。前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離

定数の値が上記範囲にある場合、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成する性質がより強く、前記目的分子が前記複数種類の標的分子と共に形成した複合体がより安定した状態にあると言える。

本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における、複数種類の標的分子から選択される少なくとも2つの標的分子同士の解離定数が $10\ \mu\text{M}$ 以下となるものであってよく、好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下となるもの、より好ましくは $3\ \mu\text{M}$ 以下となるもの、最も好ましくは $1\ \mu\text{M}$ 以下となるものである。当該解離定数が小さいほど、当該目的分子における、複数種類の標的分子から選択される少なくとも2つの標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

また、本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における、複数種類の標的分子同士の解離定数が、いずれも $10\ \mu\text{M}$ 以下となるものであってよく、好ましくは $5\ \mu\text{M}$ 以下となるもの、より好ましくは $3\ \mu\text{M}$ 以下となるもの、最も好ましくは $1\ \mu\text{M}$ 以下となるものである。

また、本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、目的分子非存在下における複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5倍以上となるものであってよく、好ましくは7倍以上となるもの、より好ましくは10倍以上となるもの、最も好ましくは20倍以上となるものである。当該解離定数が小さいほど、当該目的分子における、複数種類の標的分子との複合体を形成する性質がより強いと言える。

本発明において、複数種類の標的分子との複合体を目的分子が形成している状態とは、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下において、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が $10\ \mu\text{M}$ 以下であり、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5倍以上である状態をいう。

本発明における別の態様として、複数種類の標的分子との複合体を目的分子が形成している状態とは、例えば、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下において、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が $30\ \mu\text{M}$ 以下であり、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5倍以上である状態をいう。

本発明における別の態様として、複数種類の標的分子との複合体を目的分子が形成している状態とは、好ましくは、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下において、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が $20\ \mu\text{M}$ 以下であり、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5倍以上である状態をいう。

本発明における別の態様として、複数種類の標的分子との複合体を目的分子が形成している状態とは、より好ましくは、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下において、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が $15\ \mu\text{M}$ 以下であり、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5倍以上である状態をいう。

本発明における別の態様として、複数種類の標的分子との複合体を目的分子が形成している状態とは、最も好ましくは、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下において、前記複数種類の標的分子同士の解離定数が最も好ましくは $10\ \mu\text{M}$ 以下であり、かつ、前記目的分子非存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値が、前記目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における前記複数種類の標的分子同士の解離定数の値と比較して5倍以上である状態をいう。

なお、前記複数種類の標的分子同士の解離定数は Surface plasmon resonance (SPR) によって測定することが可能である。例えば、目的分子 $10\ \mu\text{M}$ 存在下における、2種類の標的分子同士の解離定数は、下記の方法により求めることができる。まず、センサーチップ上

の全てのフローセルに Biotin CAPture reagent を固定化後、一部のフローセルに 1 種類目の標的分子を固定化する。次に、アナライトとして、最高濃度を $10\ \mu\text{M}$ 又は $20\ \mu\text{M}$ とした希釈系列の 2 種類目の標的分子と $10\ \mu\text{M}$ の目的分子の混合溶液を調製し、全フローセルに添加して結合のセンサーグラムを取得する。

なお、Running buffer として HBS、 1mM Dithiothreitol、 0.01% Tween20、 4% Dimethylsulfoxide (DMSO) を用いることができる。前記 Running buffer には 5mM CaCl_2 を追加で添加することもできる。

また、得られたセンサーグラムの解析は、例えば T200 evaluation software (Cytiva) を用いて行うことができる。1 種類目の標的分子が固定化されていないフローセルで得られたセンサーグラム、及び Running buffer 添加時に得られたセンサーグラムをダブルリファレンスとして差し引き、DMSO 溶媒補正を施し、上記処理を行ったセンサーグラムに対する 1 : 1 結合モデルを用いたカーブフィッティングから、目的分子 $10\ \mu\text{M}$ をアナライトに共存させた場合の見かけの標的分子間相互作用パラメータとして、結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、及び解離定数 K_D を決定することができる。

[0164] 非限定の一態様において、本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、前記回収率 B と比較した前記回収率 A が 5 倍以上であるときの候補分子であってよい。

[0165] 非限定の一態様において、本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、前記回収率 C と比較した前記回収率 A が 5 倍以上であるときの候補分子であってよい。

[0166] 非限定の一態様において、本発明に係るスクリーニング方法により選抜される目的分子は、前記回収率 D と比較した前記回収率 A が 5 倍以上であるときの候補分子であってよい。

[0167] [ペプチドの製造方法]

本発明に係るペプチドの製造方法は、上述した本発明に係るスクリーニング方法を実施することを含む。これにより、複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得るペプチドを製造することができる。

[0168] 前記ペプチドの製造方法は、接触工程、回収工程、必要に応じて溶出工程、増幅工程、及び必要に応じて同定工程をこの順で含み、更に増幅工程で増幅した核酸を鋳型として転写及び翻訳を行い、目的とするペプチドを得る工程（翻訳工程）を含むものであってよい。翻訳工程は、当業者に周知の方法（例えば、無細胞翻訳系を使用する方法）により実施することができる。

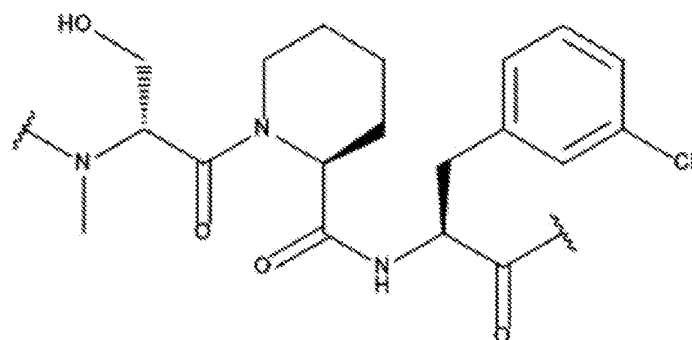
[0169] 更に、前記ペプチドの製造方法は、接触工程、回収工程、必要に応じて溶出工程、増幅工程、及び必要に応じて同定工程をこの順で含み、更に増幅工程で増幅した核酸の塩基配列を解読して目的とするペプチドのアミノ酸配列を特定する工程（解読工程）、及び特定したアミノ酸配列に基づき目的とするペプチドを合成する工程（合成工程）を含むものであってもよい。解読工程及び合成工程は、当業者に周知の方法により実施することができる。

[0170] [特定のモチーフを有するペプチド]

本発明者らは、本発明に係るスクリーニング方法により選抜された目的分子（ペプチド）のアミノ酸配列を解析した結果、特定の複数種類の標的分子（C y A及びC n、又はF K B P及びF R P）と複合体を形成し得る目的分子（ペプチド）には、特定のアミノ酸配列構造（モチーフ）があることを見出した。具体的には、下記（a）～（h）の知見を得た。

[0171] （a）式（1-A2）で表される構造（アミノ酸配列：*-(D-MeSer)-(Pic(2))-(Phe(3-Cl))-*。*は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。）を有するペプチドが、F K B P及びF R Pと複合体を形成する。

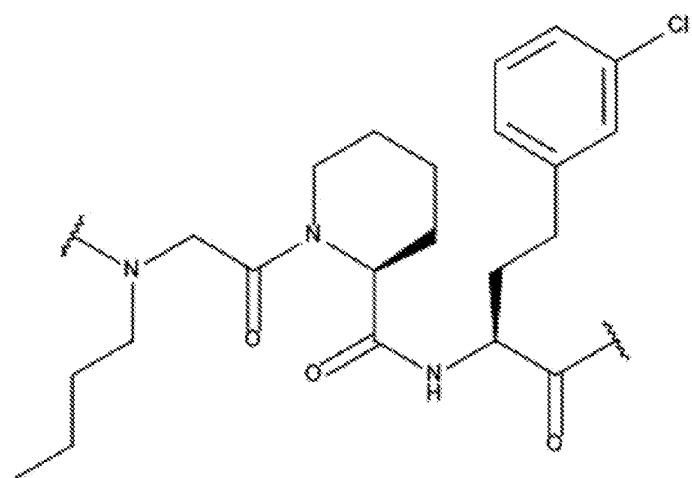
[化30]



... (I - A 2)

[0172] (b) 式 (I - B 2) で表される構造 (アミノ酸配列 : * - (n B u G l y) - (P i c (2)) - (H p h (3 - C l)) - * 。 * は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。) を有するペプチドが、 F K B P 及び F R P と複合体を形成する。

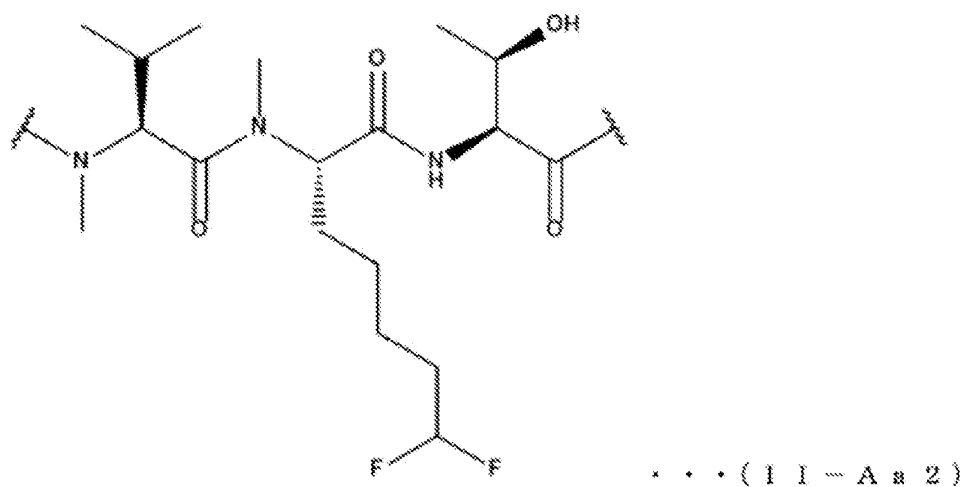
[化31]



... (I - B 2)

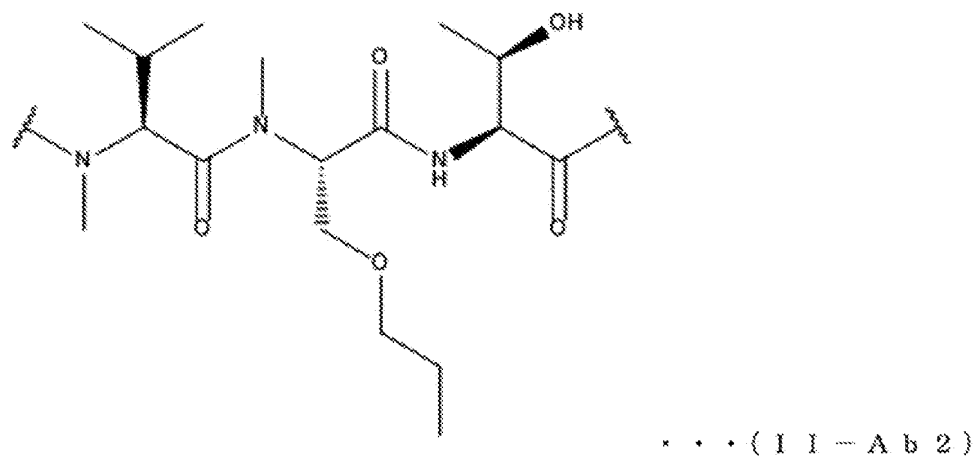
[0173] (c) 式 (I I - A a 2) で表される構造 (アミノ酸配列 : * - (M e V) - (M e H n l (7 - F 2)) - (T h r) - * 。 * は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。) を有するペプチドは、 C y - A 及び C n と複合体を形成する。

[化32]



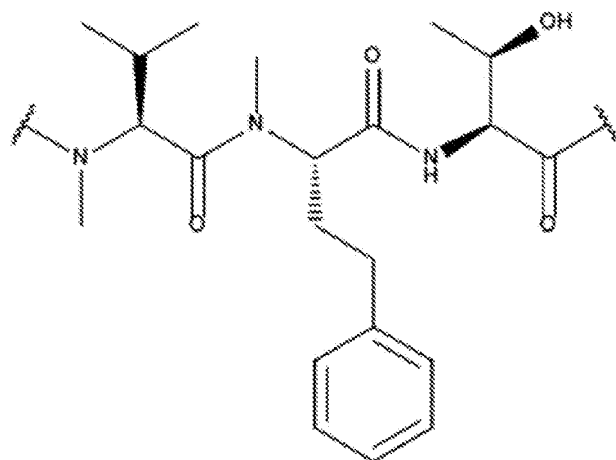
[0174] (d) 式 (11-Ab2) で表される構造 (アミノ酸配列: *-(MeV)-(MeSer(nPr))-(Thr)-*)。*は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。) を有するペプチドは、Cy-A 及び Cn と複合体を形成する。

[化33]



[0175] (e) 式 (11-Ac2) で表される構造 (アミノ酸配列: *-(MeV)-(MeHph)-(Thr)-*)。*は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。) を有するペプチドは、Cy-A 及び Cn と複合体を形成する。

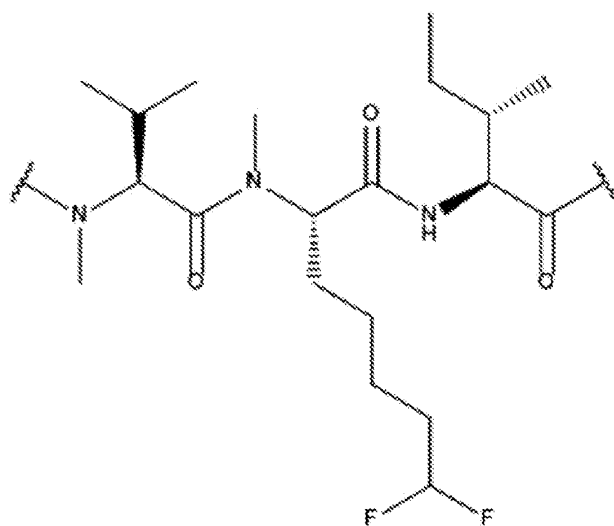
[化34]



... (11-Ac2)

[0176] (f) 式 (11-Ba2) で表される構造 (アミノ酸配列: *-(MeV)-(MeHnI(7-F2))-(Ile)-*。*は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。) を有するペプチドは、Cy-A 及び Cn と複合体を形成する。

[化35]

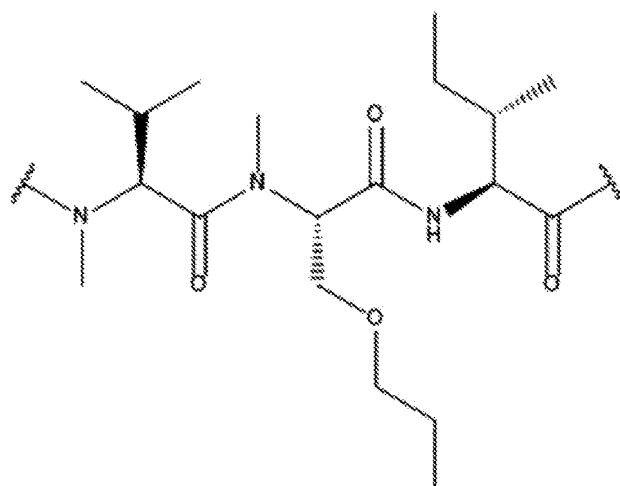


... (11-Ba2)

[0177] (g) 式 (11-Bb2) で表される構造 (アミノ酸配列: *-(MeV)-(MeSer(nPr))-(Ile)-*。*は、他のアミノ酸残基

との結合手を示す。)を有するペプチドは、C_y-A及びC_nと複合体を形成する。

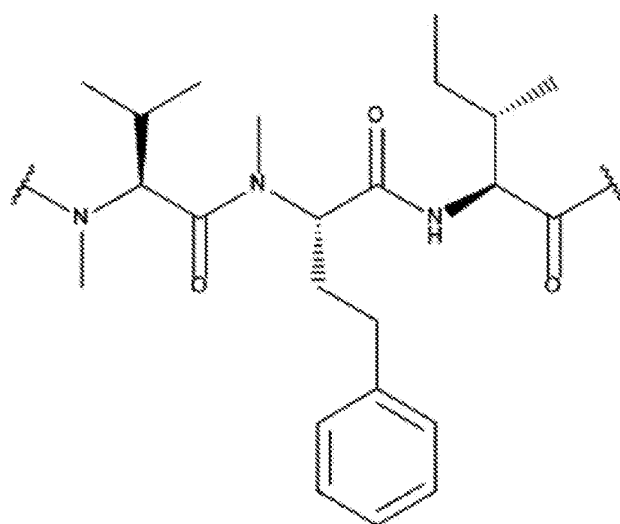
[化36]



・・・(I I-B b 2)

[0178] (h) 式 (I I-B c 2) で表される構造 (アミノ酸配列: *-(MeV)-(MeHph)-(I I e)-*)。*は、他のアミノ酸残基との結合手を示す。)を有するペプチドは、C_y-A及びC_nと複合体を形成する。

[化37]

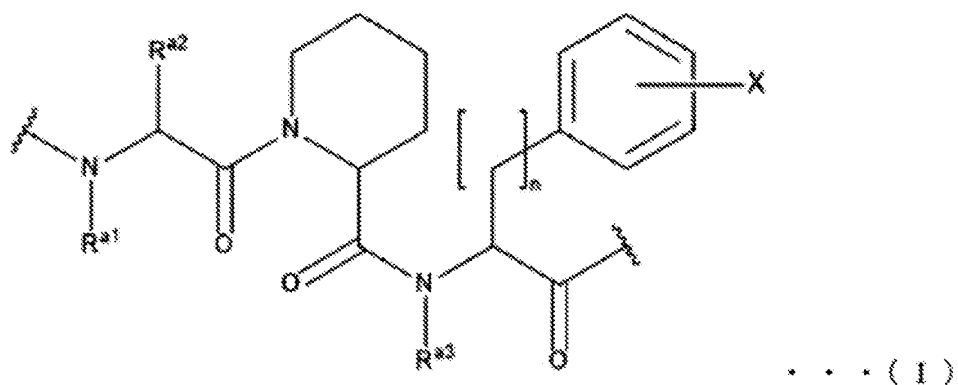


・・・(I I-B c 2)

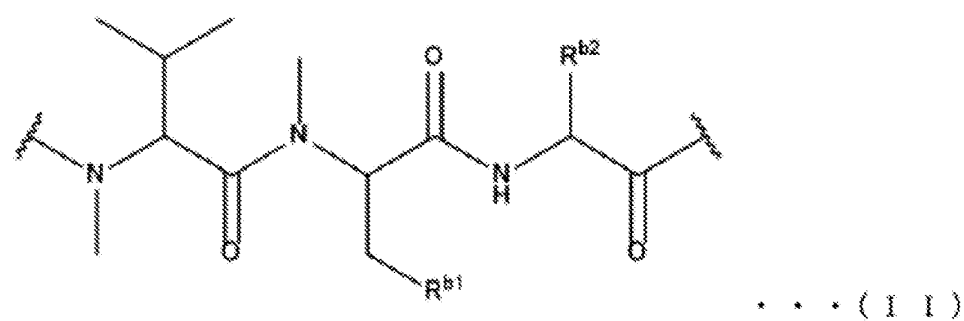
[0179] これら (a) ~ (h) の知見に基づき、本発明は、式 (I) 又は (I I)

で表される構造を有するペプチドを包含する。

[化38]



[化39]



[0180] 式 (I) 及び (II) 中、

[化40]



は結合手を表し、

式 (I) 中、 R^{a1} は水素原子又は C_1-C_6 アルキルであり、 R^{a2} はヒドロキシにより置換されていてよい C_1-C_3 アルキル又は水素原子であり、 R^{a3} は水素原子又はメチルであり、 X はハロゲンであり、 n は1又は2であり、

式 (II) 中、 R^{b1} はハロゲン及びアリールからなる群より選ばれるいずれか1つで置換されていてよい C_1-C_6 アルキル、又は $-O-R^{b3}$ であり、

R^{b3} は C_1-C_3 アルキルであり、 R^{b2} はヒドロキシで置換されていてよい C_1-C_4 アルキルである。

[0181] 式(1)で表される構造を有するペプチドは、FKBP及びFRPと複合体を形成することが期待できる。式(11)で表される構造を有するペプチドは、 C_y-A 及び C_n と複合体を形成することが期待できる。

[0182] 式(1)において、 R^{a1} は水素原子又は C_1-C_6 アルキルである。

[0183] 本明細書において「アルキル」とは、脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される1価の基であり、骨格中にヘテロ原子（炭素及び水素原子以外の原子をいう。）又は不飽和の炭素-炭素結合を含有せず、水素及び炭素原子を含有するヒドロカルビル又は炭化水素基構造の部分集合を有する。アルキルは直鎖状のものだけでなく、分枝鎖状のものも含む。アルキルとして具体的には、炭素原子数1~20（ C_1-C_{20} 、以下「 C_p-C_q 」とは炭素原子数が $p\sim q$ 個であることを意味する）のアルキルであり、好ましくは C_1-C_{10} アルキル、より好ましくは C_1-C_6 アルキルが挙げられる。アルキルとして、具体的には、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 s -ブチル、 t -ブチル、イソブチル（2-メチルプロピル）、 n -ペンチル、 s -ペンチル（1-メチルブチル）、 t -ペンチル（1, 1-ジメチルプロピル）、ネオペンチル（2, 2-ジメチルプロピル）、イソペンチル（3-メチルブチル）、3-ペンチル（1-エチルプロピル）、1, 2-ジメチルプロピル、2-メチルブチル、 n -ヘキシル、1, 1, 2-トリメチルプロピル、1, 2, 2-トリメチルプロピル、1, 1, 2, 2-テトラメチルプロピル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル等が挙げられる。

[0184] R^{a1} として好ましくは、水素原子、 $C_1\sim C_4$ アルキルであり、より好ましくは $C_1\sim C_4$ アルキルであり、更に好ましくはメチル、 n -ブチルである。

[0185] 式(1)において、 R^{a2} はヒドロキシにより置換されていてよい C_1-C_3

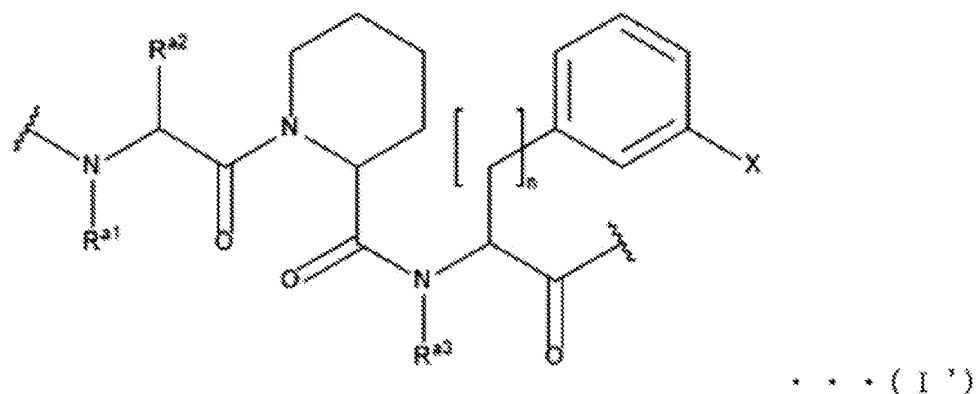
アルキル又は水素原子である。R^{a2}として好ましくは、ヒドロキシにより置換されているC₁－C₃アルキル、水素原子であり、より好ましくは水素原子、ヒドロキシメチルである。

[0186] 式(1)において、R^{a3}は水素原子又はメチルである。R^{a3}として好ましくは、水素原子である。

[0187] 式(1)において、Xはハロゲンである。Xとして具体的には、F、Cl、Br、Iが例示される。Xとして好ましくは、Clである。

[0188] 式(1)で表される構造を有するペプチドとして好ましくは、式(1')で表される構造を有するペプチドであり、

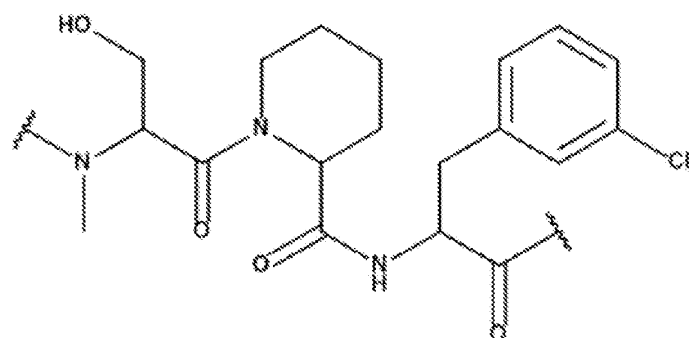
[化41]



(式(1')中、R^{a1}、R^{a2}、R^{a3}、n及びXは式(1)におけるR^{a1}、R^{a2}、R^{a3}、n及びXと同義である)、

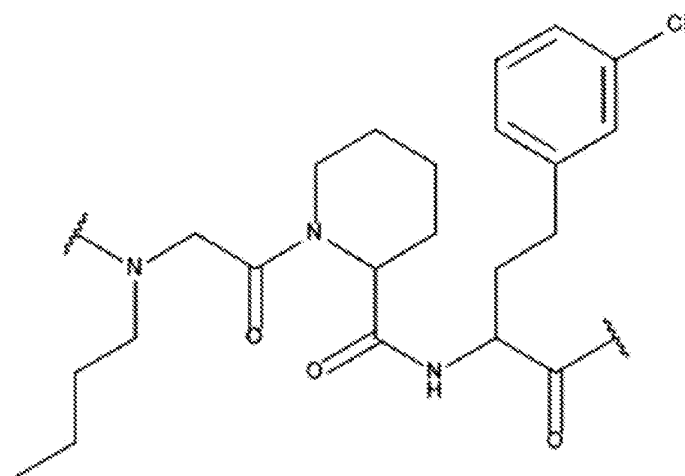
より好ましくは式(1-A1)で表される構造を有するペプチド、式(1-B1)で表される構造を有するペプチドであり、

[化42]



... (1-A1)

[化43]



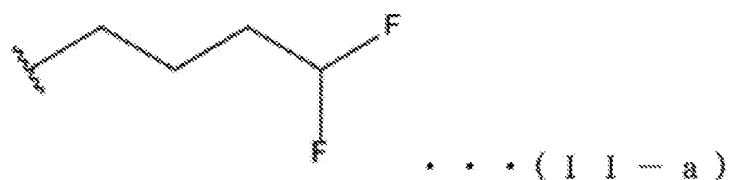
... (1-B1)

更に好ましくは式 (1-A2) で表される構造を有するペプチド、式 (1-B2) で表される構造を有するペプチドである。

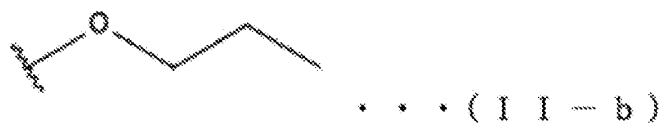
又は飽和複素環である縮環構造のアリールを含む。具体的には、インダニル、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチル、2, 3-ジヒドロベンゾフランなどが挙げられる。

[0191] R^{b1} として好ましくは、ハロゲン及びアリールからなる群より選ばれるいずれか1つで置換されていてよい C_1-C_5 アルキル、 $-O-R^{b3}$ であり、より好ましくは下記式(II-a)、(II-b)又は(II-c)のいずれか1つである。

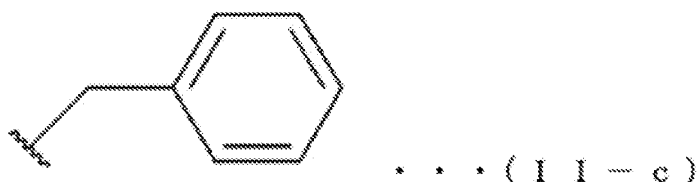
[化46]



[化47]



[化48]



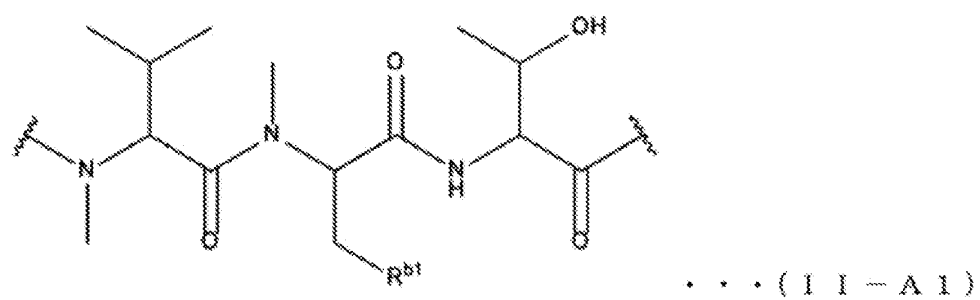
[0192] R^{b3} として好ましくは C_3 アルキルであり、より好ましくはn-プロピルである。

[0193] 式(II)において、 R^{b2} はヒドロキシで置換されていてよい C_1-C_4 アルキルである。 R^{b2} として好ましくは、1-ヒドロキシエチル、1-メチルプロピルである。

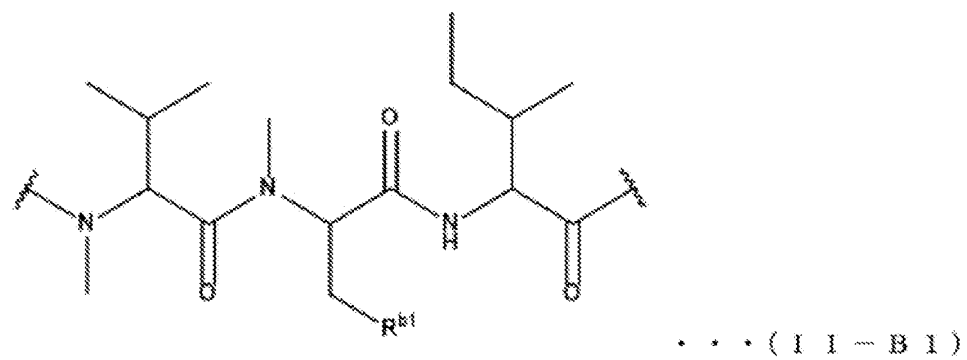
[0194] 式(II)で表される構造を有するペプチドとして好ましくは、式(II-A1)で表される構造を有するペプチド、式(II-B1)で表される構

造を有するペプチドであり、より好ましくは式（ⅠⅠ－A 2）で表される構造を有するペプチド、式（ⅠⅠ－B 2）で表される構造を有するペプチドである。

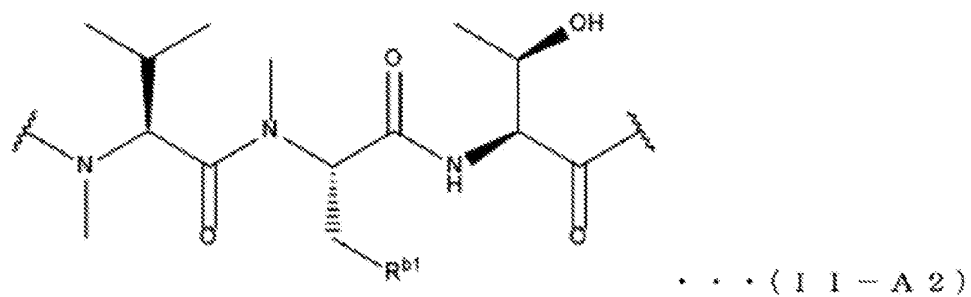
[化49]



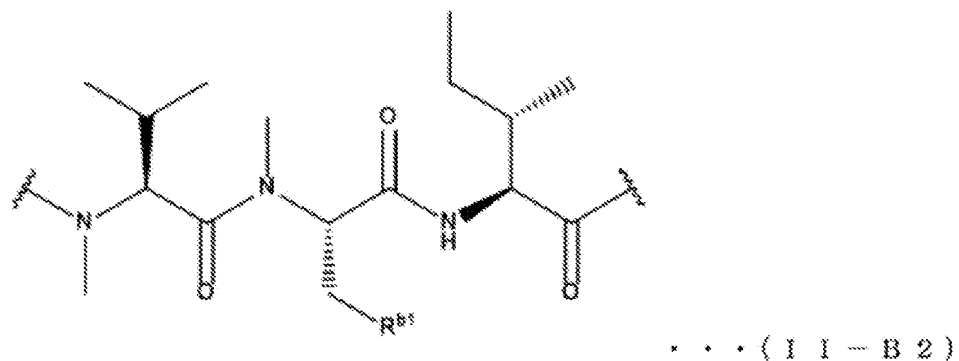
[化50]



[化51]



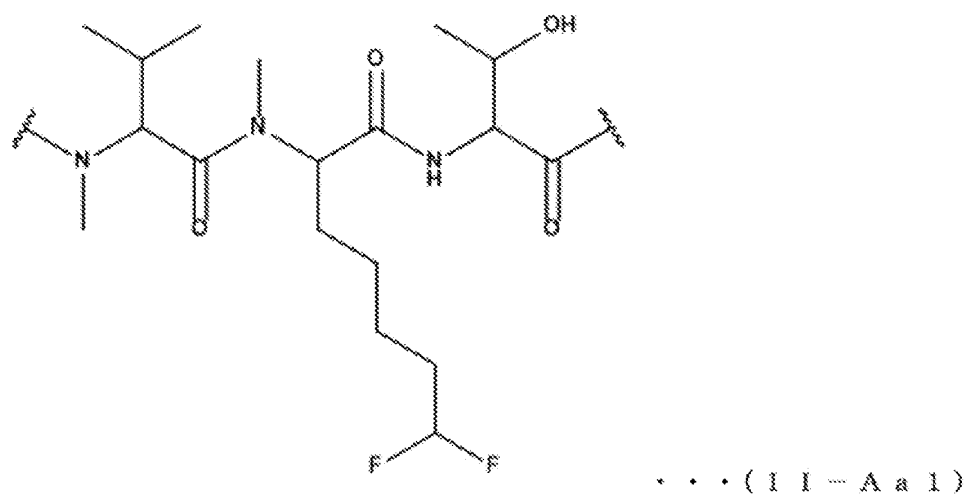
[化52]



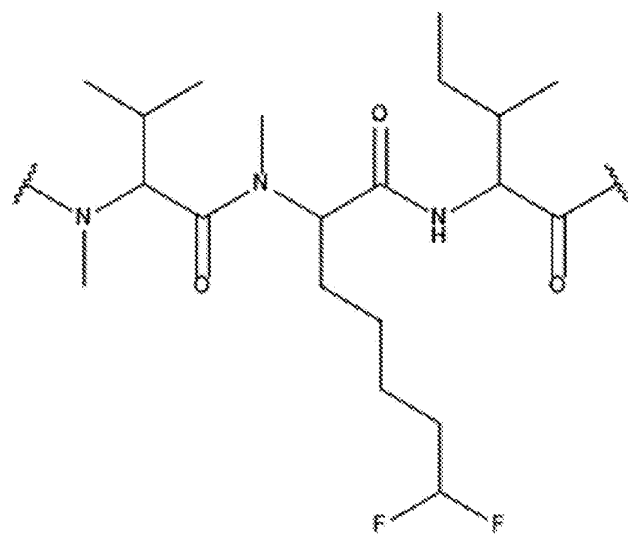
式 (II-A1)、式 (II-B1)、式 (II-A2) 及び式 (II-B2) 中、R^{b1}は、式 (I) 中のR^{b1}と同義である。

[0195] 式 (II-A1) で表される構造を有するペプチドとして好ましくは、式 (II-Aa1) で表される構造を有するペプチド、式 (II-Ab1) で表される構造を有するペプチド、式 (II-Ac1) で表される構造を有するペプチドである。

[化53]

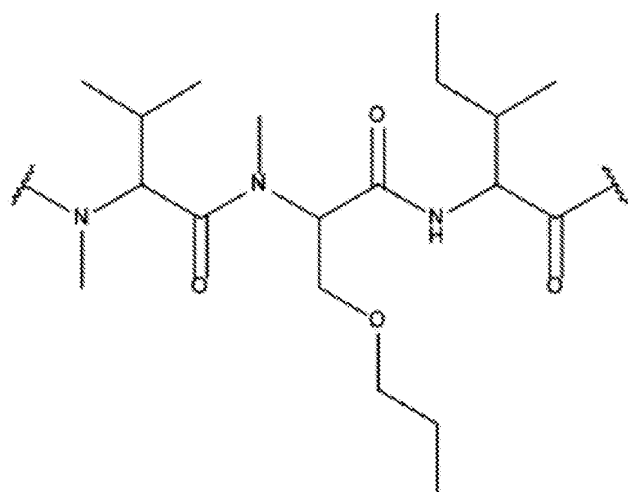


[化56]



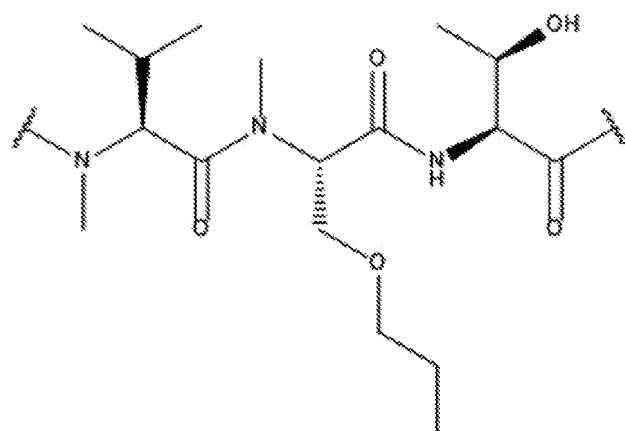
* * * (1 1 - B a 1)

[化57]



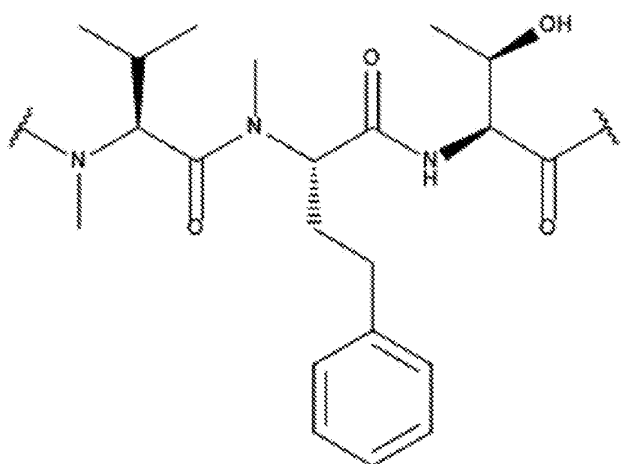
* * * (1 1 - B b 1)

[化60]



... (11-A b 2)

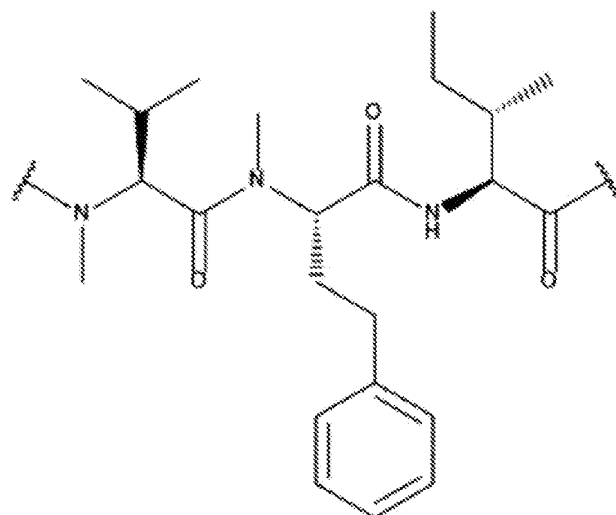
[化61]



... (11-A c 2)

[0198] 式 (11-B 2) で表される構造を有するペプチドとして好ましくは、式 (11-B a 2) で表される構造を有するペプチド、式 (11-B b 2) で表される構造を有するペプチド、式 (11-B c 2) で表される構造を有するペプチドである。

[化64]



* * * (I I - B c 2)

[0199] 上述した各式中、

[化65]



は結合手を表す。

[0200] 本実施形態に係るペプチドは、上述した特定の構造（モチーフ）を有する他は、候補分子及び目的分子として既に説明したペプチドの態様を制限なく適用できる。例えば、非限定の一態様において、本実施形態に係るペプチドは、環状ペプチドであってよい。

実施例

[0201] 以下、本発明の好適な具体的態様を実施例として説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、実施例中では以下の略号を使用した。

D I P E A : N, N-ジイソプロピルエチルアミン

D M F : N, N-ジメチルホルムアミド

D M S O : ジメチルスルホキシド

F A : ギ酸

HATU: 1- [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] -1H-1, 2, 3-
トリアゾロ [4, 5-b] ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフ
アート

[0202] [実験例1: フュージョンタンパク質を用いたパニングによる複数種類の標
的タンパク質との複合体を形成するペプチドの取得]

[調製例1: FKBP12, FRB及びそのフュージョンタンパク質の調製
]

<調製例1-1: FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したFKBP
12 (FKBP) を用いた。C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タ
グ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、FKBP-FLAG-TEV-A
vi-bioを調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している
。

[0203] FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioのアミノ酸配列 (配列番号
1)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDG
KKFDSSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMS
VGQRAKL TISPDYAYGATGHPGII PP HATLVFDV
ELLKLEGGGSSDYKDDDDKSSGENLYFQSSGGGL
NDIFEAQK*IEWHE

[0204] 具体的には、pCDFDuet-1にFKBP-FLAG-TEV-Av
i-bio及びビオチンライゲース (BirA) の遺伝子をクローニングし
て調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して
発現株を作成した。OD₆₀₀が0.4から0.6程度になるまでLB培地で培
養し、終濃度1mMのIPTG及び100μMのビオチンとなるように加え
て誘導をかけ、37℃で3時間培養した後、サンプルを遠心して培養菌体を
回収した。

[0205] 回収した培養菌体にDisruption buffer (50mM T

ris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000 (v/v) Benzonase, Protease inhibitor cocktail) を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収後、さらにその上清を15000×g、15分、4℃で遠心したのち0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0206] ライセートサンプルを、Streptactin XT Superflow HC (IBA, #2-4030-010) 5mLレジンとEcono-Pac Chromatography Columns (bio-rad, #7321010) を用いて精製した。精製にはBinding buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP) 及びElution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP, 50mM biotin) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した。

[0207] 濃縮したサンプルをHiLoad 26/600 Superdex 75pg (Cytiva, #28-9893-34) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した後、0.22μmフィルターで濾過し、目的タンパク質FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioを得た。サンプルは-80℃にて保存した。

[0208] <調製例1-2: FRB-FLAG-TEV-Avi-bioの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したFRBを用いた。C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素

認識タグを付加した、FRB-FLAG-TEV-Avi-bioを調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0209] FRB-FLAG-TEV-Avi-bioのアミノ酸配列（配列番号2）

MELIRVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGM
FEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEA
QEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQG
GGSSDYKDDDDKSSGENLYFQSSGGGLNDIFEAQ
K*IEWHE

[0210] 具体的には、pCDFDuet-1にFRB-FLAG-TEV-Avi-bio及びビオチンライゲース（BirA）の遺伝子をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21（DE3）を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.4から0.6程度になるまでLB培地で培養し、終濃度1mMのIPTG及び100μMのビオチンとなるように加えて誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを遠心して培養菌体を回収した。

[0211] 回収した培養菌体にDisruption buffer（50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000（v/v）Benzonase, Protease inhibitor cocktail）を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収した。さらにその上清を0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0212] ライセートサンプルを、Streptactin XT Superflow HC（IBA, #2-4030-010）5mLレジンとEcono-Pac Chromatography Columns（bio-rad, #7321010）を用いて精製した。精製にはBinding bu

ffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP) 及び Elution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP, 50mM biotin) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した。

[0213] 濃縮したサンプルを HiLoad 26/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-34) を用いてゲル濾過精製した。精製には Running buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した後、0.22 μ m フィルターで濾過し、目的タンパク質 FRB-FLAG-TEV-Avi-bio を得た。サンプルは -80°C にて保存した。

[0214] <調製例 1-3: FKBP-FLAG-Sor-His の調製>

検討に使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製した FKBP を用いた。C末端に精製タグ及びソルターゼ認識配列を付加した、FKBP-FLAG-Sor-His を調製した。

[0215] FKBP-FLAG-Sor-His のアミノ酸配列 (配列番号 3)

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDG
KKFDSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMS
VGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDV
ELLKLEGGGSSDYKDDDDKGGSSLPMTGGGGSSH
HHHHH

[0216] 具体的には、pET11a に FKBP-FLAG-Sor-His の遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀ が 0.5 程度になるまで LB 培地で培養し、終濃度 1mM の IPTG となるように加えて誘導をかけ

、18℃で18時間培養した後、サンプルを遠心して培養菌体を回収した。

[0217] 回収した培養菌体にDisruption buffer (50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000 (v/v) Benzonase, Protease inhibitor cocktail) を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収した。さらにその上清を15000×g、15分、4℃で遠心したのち0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0218] ライセートサンプルを、His Trap FF (Cytiva, 17531901) を用いて精製した。精製にはBinding buffer (100mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 10% Glycerol) 及びElution buffer (100mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 500mM imidazole) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した。

[0219] 濃縮したサンプルをHiLoad 26/600 Superdex 75pg (Cytiva, #28-9893-34) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した後、0.22μmフィルターで濾過し、目的タンパク質FKBP-FLAG-Sor-Hisを得た。サンプルは-80℃にて保存した。

[0220] <調製例1-4: FRB-FLAG-Sor-Hisの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したFRBを用いた。C末端に精製タグ及びソルターゼ認識配列を付加した、FRB-F

LAG-Sor-Hisを調製した。

[0221] FRB-FLAG-Sor-Hisのアミノ酸配列（配列番号4）

MELIRVA ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGM
FEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEA
QEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQG
GGSSDYKDDDDKGGSSLPMTGGGGSSHHHHHH

[0222] 具体的には、pET11aにFRB-FLAG-Sor-Hisの遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21（DE3）を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.6になるまでLB培地で培養し、終濃度0.1mMのIPTGとなるように加えて誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを遠心して培養菌体を回収した。

[0223] 回収した培養菌体にDisruption buffer（50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000（v/v）Benzonase, Protease inhibitor cocktail）を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収した。さらにその上清を15000×g、15分、4℃で遠心したのち0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0224] ライセートサンプルを、His Trap FF（Cytiva, 17531901）を用いて精製した。精製にはBinding buffer（100mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 10% Glycerol）及びElution buffer（100mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 500mM imidazole）を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K（MERCK、#UFC901024）で濃縮した。

[0225] 濃縮したサンプルをHiLoad 26/600 Superdex 7

5 pg (Cytiva, #28-9893-34) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した後、0.22 μm フィルターで濾過し、目的タンパク質FRB-FLAG-Sor-Hisを得た。サンプルは-80℃にて保存した。

[0226] <調製例1-5: bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-Hisの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、FKBPとFRBをリンカーで連結したフュージョンタンパク質を大腸菌で発現・精製し、パニングに使用する標的タンパク質として用いた。N末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを、C末端に精製タグを付加した、bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-Hisを調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0227] bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-Hisのアミノ酸配列（配列番号5）

MGLNDIFEAQK*IEWHESSGENLYFQSGGGSSDYK
DDDDKSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT
GMLEDGKKFDSSRDRNKPFFKFMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHA
TLVFDVELLKLEGGSSGLEVLFGGPSSGSSGTE
LIRVAI LWHMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFE
VLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQE
WCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQGGG
SSHHHHHH

[0228] 具体的には、pCDFDuet-1にbio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His及びビオチンライゲース(BirA)の遺伝子

配列をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.4から0.6程度になるまでLB培地で培養し、終濃度1 mMのIPTG及び100 μMのビオチンを加えて誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを遠心して培養菌体を回収した。

[0229] 回収した培養菌体にDisruption buffer (50 mM Tris-HCl pH7.0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1 mg/mL lysozyme, 1/1000 (v/v) Benzonase, Protease inhibitor cocktail) を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収する。さらにその上清を15000×g、15分、4℃で遠心したのち0.22 μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0230] ライセートサンプルを、Streptactin XT Superflow HC (IBA, #2-4030-010) 5 mLレジンとEcono-Pac Chromatography Columns (bio-rad, #7321010) を用いて精製した。精製にはBinding buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP) 及びElution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 50 mM biotin) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した。

[0231] 濃縮したサンプルをHiLoad 26/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-34) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 1 mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15

10K (MERCK、#UFC901024)で濃縮した後、0.22 μ m フィルターで濾過し、目的タンパク質 bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His を得た。サンプルは-80℃にて保存した。

[0232] 〔調製例2：シクロフィリンA (CyA)，カルシニューリン (Cn) 及びそのフュージョンタンパク質の調製〕

＜調製例2-1：CyA-FLAG-TEV-Avi-bioの調製＞

検討に使用する標的タンパク質として、哺乳細胞で発現・精製したシクロフィリンAを用いた。C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、CyA-FLAG-TEV-Avi-bioを調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0233] CyA-FLAG-TEV-Avi-bioのアミノ酸配列（配列番号6）

GPMVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKT
AENFRALSTGEKGFYKGSCHFRIIPGFMCQGGD
FTRHNGTGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSM
ANAGPNTNGSQFFICTAKTEWLDGKHVVFGKVKE
GMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLEGSS
DYKDDDDKSSGENLYFQSSGGGLNDIFEAQK*IEW
HE

[0234] 具体的には、哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへ、N末端にHistag及び3Cプロテアーゼ切断サイトを付与したCyA-FLAG-TEV-Avi-bioの遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを、Expi293F細胞にExpiFectamine293 Transfection Kit (Thermo Fisher, #A14525)を用いて製品添付の基本プロトコルに従いトランスフェクションして発現させた。Expi293 Expression medium (Thermo Fisher, #A1435102)にて37℃で3日培養した。

[0235] 培養液を遠心分離し、上清を除いて細胞を回収し、精製を行うまで-80

℃で冷凍保存した。得られた細胞を、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むLysis buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5) を用いて懸濁し、超音波ホモジナイザーにより細胞を破碎した。破碎後の細胞溶液に1mM MgCl₂、1/5000 (v/v) Benzonaseとなるように加えて20分氷上でインキュベートした。これを遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は0.45 μmのフィルターで濾過し、サンプルとした。

[0236] 回収した上清をANTI-FLAG (R) M2 Affinity Gel (sigma) を用いて、Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5), Wash buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM ATP, 5mM MgCl₂, pH7.5), Elution buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1mg/mL FLAG peptide, pH7.5) により精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従った。得られた産物をBiotin存在下でBirAにより処理しビオチン化を行った。ビオチン化タンパク質とストレプトアビジン間の相互作用を利用したゲルシフトアッセイにより、目的タンパク質がビオチン化されていることを確認した。

[0237] Turbo3C Protease (Accelagen) にてTag切断を行い、Strep-Tactin XT Superflow high capacity (IBA Lifesciences) を用いて、Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM DTT, pH7.5), Elution buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM DTT, 50mM biotin, pH7.5) により精製した。精製及びTag切断はそれぞれ製品添付の基本プロトコルに従って行った。

[0238] 調製したサンプルをSuperdex 200 Increase 10/300 GL (GE) を用いて、Running buffer (20m

M Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM DTT, pH7.

5) によりサイズ分画クロマトグラフィーを行い、目的タンパク質CyA-FLAG-TEV-Avi-bioを得た。サンプルは-80℃で保存した。

[0239] <調製例2-2: CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、哺乳細胞で発現・精製したカルシニューリンBサブユニット(CnB)とカルシニューリンAサブユニット(CnA)をリンカーで連結させたフュージョンタンパク質を用いた。C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioを調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0240] CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioのアミノ酸配列(配列番号7)

GPMGNEASYPLEMCSHFDADEIKRLGKRFKKLDL
DNSGSLSVEEFMSLPQLQQNPLVQRVIDIFD TDG
NGEVDFKEFIEGV SQFSVKGDKEQKLRF AFRIYD
MDK DGYISNGELFQVLKMMVGNNLKDTQLQQIVD
KTIINADKDGDGRISFEEFC AVVGGLDIHKKMVV
DVGGGGGGMSEPKAIDPKLSTTDRVVKAVPFPPS
HRLTAKEVFDNDGKPRVDILKAHLMKEGRLEESV
ALRIITEGASILRQEKNLLDIDAPVTVC GD IHGQ
FFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIE
CVLYLWALKILYPKTLFLLRGNHECRHLTEYFTF
KQECKIKYSERVYDACMDAFDCLPLAALMNQQFL
CVHGGLSPEINTLDDIRKLDRFKEPPAYGPMCDI
LWSDPLEDFGNEKTQEHFTHNTVRGCSYFYSPYA
VCEFLQHNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTG

F P S L I T I F S A P N Y L D V Y N N K A A V L K Y E N N V M N I R
Q F N C S P H P Y W L P N F M D V F T W S L P F V G E K V T E M L V
N V L N I C S D D E L G S E E D G F D G A T A A A R K E V I R N K I
R A I G K M A R V F S V L R E E S E S V L T L K G L T P T G M L P S
G V L S G G K Q T L Q S A T V E A I E A D E A I K G F S P Q H K I T
S F E E A K G L D R I N E R M P P R R D A M P S D A N L N S I N K A
L T S E T N G T D S N G S N S S N I Q G S S D Y K D D D D K S S G E
N L Y F Q S S G G G L N D I F E A Q K * I E W H E

- [0241] 具体的には、哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへN末端にHis tag及び3Cプロテアーゼ切断サイトを付与したCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioの遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクター、及び哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへビオチンライゲース (BirA) の遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを、Expi293F細胞にExpiFectamine293 Transfection Kit (Thermo Fisher, #A14525) を用いて製品添付の基本プロトコルに従いトランスフェクションして発現させた。終濃度0.1mMになるようにBiotinを添加したExpi293 Expression medium (Thermo Fisher, #A1435102) にて37℃で3日培養した。
- [0242] 培養液を遠心分離し、上清を除いて細胞を回収し、精製を行うまで-80℃で冷凍保存した。得られた細胞を、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むLysis buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.5) を用いて懸濁し、超音波ホモジナイザーにより細胞を破碎した。破碎後の細胞溶液に1mM MgCl₂、12.5U/mL Benzonaseとなるように加えて20分氷上でインキュベートした。これを遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は0.45μmのフィルターで濾過し、サンプルとした。
- [0243] 回収した上清をANTI-FLAG (R) M2 Affinity G

el (sigma) を用いて、Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.5), Wash buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 2mM ATP, 5mM MgCl₂, pH7.5), Elution buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.1mg/mL FLAG peptide, pH7.5) により精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従った。

[0244] 精製したサンプルをTurbo3C Protease (Accelagen) にてTag切断を行った。これにより得られたサンプルを、Strept-Tactin XT Superflow high capacity (IBA Lifesciences) を用いて、Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.5), Elution buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 50mM biotin, pH7.5) 精製した。精製及びTag切断はそれぞれ製品添付の基本プロトコルを行った。

[0245] 調製したサンプルをHiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE) を用いて、Running buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM DTT, 5mM CaCl₂, pH7.5) によりサイズ分画クロマトグラフィーを実施した。目的画分を含むサンプルをAmicon Ultra-4 10K (Merck) により濃縮し、目的タンパク質CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioを得た。サンプルは-80℃で保存した。

[0246] <調製例2-3: CyA-FLAG-Sor-Hisの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、哺乳細胞で発現・精製したシクロフィリンAを用いた。C末端に精製タグ及びソルターゼ認識配列を付加した、CyA-FLAG-Sor-Hisを調製した。

[0247] CyA-FLAG-Sor-Hisのアミノ酸配列（配列番号8）

MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAE
NFRALSTGEKGFYKGSFCFHRIPGFMCQGGDFT
RHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMAN
AGPNTNGSQFFICTAKTEWLDGKHVVFGKVKEGM
NIVEAMERFGSRNGKTSKKITIA DCGQLEGSSDY
KDDDDKGGSSLPMTGGGGSSHHHHHH

[0248] 具体的には、哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへCyA-FLAG-Sor-Hisの遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを、製品添付の基本プロトコルに従いExpiFectamine293 Transfection Kit (Thermo Fisher, #A14525) を用いてExpi293F細胞にトランスフェクションして発現させた。Expi293 Expression medium (Thermo Fisher, #A1435102) にて37℃で3日培養した。

[0249] 培養液を遠心分離し、上清を除いて細胞を回収し、精製を行うまで-80℃で冷凍保存した。得られた細胞を、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むLysis buffer (50mM Na-Phosphate, 500mM NaCl, pH7.5) を用いて懸濁し、超音波ホモジナイザーにより細胞を破碎した。破碎後の細胞溶液に1mM MgCl₂、12.5U/mL Benzonaseとなるように加えて20分氷上でインキュベートした。これを遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は0.45μmのフィルターで濾過し、サンプルとした。

[0250] 回収した上清をTALON Metal Affinity Resin (Clontech) を用いて、Wash buffer (50mM Na-Phosphate, 500mM NaCl, 5mM Imidazole, pH7.5), Elution buffer (50mM Na-Phosphate, 500mM NaCl, 150mM Imidazole, pH7.5) により精製した。調製したサンプルをさらにDDDDK-_t

agged Protein PURIFICATION GEL (MBL, #3329R) を用いて、Equilibration buffer (50mM Na-Phosphate, 500mM NaCl, pH7.5), Elution buffer (50mM Na-Phosphate, 500mM NaCl, 0.1mg/mL FLAG peptide, pH7.5) 精製した。精製はそれぞれ製品添付の基本プロトコルに従った。

[0251] 調製したサンプルをSuperdex 200 Increase 10/300 GL (GE) を用いて、Running buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM DTT, pH7.5) によりサイズ分画クロマトグラフィーを行った。目的画分を含むサンプルを回収し、目的タンパク質CyA-FLAG-Sor-Hisを得た。サンプルは-80℃で保存した。

[0252] <調製例2-4: CnB-CnA-FLAG-Sor-Hisの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、哺乳細胞で発現・精製したカルシニューリンBサブユニットとAサブユニットをリンカーで連結させたフュージョンタンパク質を用いた。C末端に精製及びソルターゼ認識配列タグを付加した、CnB-CnA-FLAG-Sor-Hisを調製した。

[0253] CnB-CnA-FLAG-Sor-Hisのアミノ酸配列（配列番号9）

MGNEASYPLEMCSHFDAD E I K R L G K R F K K L D L D N
S G S L S V E E F M S L P E L Q Q N P L V Q R V I D I F D T D G N G
E V D F K E F I E G V S Q F S V K G D K E Q K L R F A F R I Y D M D
K D G Y I S N G E L F Q V L K M M V G N N L K D T Q L Q Q I V D K T
I I N A D K D G D G R I S F E E F C A V V G G L D I H K K M V V D V
G G G G G G M S E P K A I D P K L S T T D R V V K A V P F P P S H R
L T A K E V F D N D G K P R V D I L K A H L M K E G R L E E S V A L
R I I T E G A S I L R Q E K N L L D I D A P V T V C G D I H G Q F F

DLMKLF EVGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIECV
LYLWALKILYPKTLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQ
ECKIKYSERVYDACMDAFDCLPLAALMNQQFLCV
HGGLSPEINTLDDIRKLDRFKEPPAYGPMCDILW
SDPLEDFGNEKTQEHFTHNTVRGCSYFYSPAVC
EFLQHNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTFGP
SLITIF SAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVMNIRQF
NCSPHPYWL PNFMDVFTWSLPFVGEKVTEMLVNV
LNICSDDEL GSEEDGFDGATAAARKEVIRNKIRA
IGKMARVFSVLREESESVLTLKGLTPTGMLPSGV
LSGGKQTLQSATVEAIEADEA IKGFSPQHKITSF
EEAKGLDRINERMPPRRDAMP SDANLNSINKALT
SETNGTDSNGSNSSNIQGSSDYKDDDDKGGSSLP
MTGGGGSSSHHHHHH

[0254] 具体的には、哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへCnB-CnA-F
LAG-Sor-Hisの遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベ
クターを、製品添付の基本プロトコルに従いExpiFectamine29
3 Transfection Kit (Thermo Fisher, #
A14525)を用いてExpi293F細胞にトランスフェクションして
発現させた。Expi293 Expression medium (Th
ermo Fisher, #A1435102)にて37℃で3日培養した
。

[0255] 培養液を遠心分離し、上清を除いて細胞を回収し、精製を行うまで-80
℃で冷凍保存した。得られた細胞を、プロテアーゼインヒビターカクテルを
含むLysis buffer (20mM Tris-HCl, 150mM
NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.5)を用いて懸濁し、超音波ホモ
ジナイザーにより細胞を破碎した。破碎後の細胞溶液に1mM MgCl₂、
12.5U/mL Benzonaseとなるように加えて20分氷上でイ

ンキュベートした。これを遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は0.45 μmのフィルターで濾過し、サンプルとした。

[0256] 回収した上清をANTI-FLAG (R) M2 Affinity Gel (sigma) を用いて、Equilibration buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.5), Wash buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 2mM ATP, 5mM MgCl₂, pH7.5), Elution buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.1mg/mL FLAG peptide, pH7.5) により精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。

[0257] 調製したサンプルをHiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE) を用いて、Running buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 5mM CaCl₂) によりサイズ分画クロマトグラフィーを行った。目的画分を含むサンプルをAmicon Ultra-4 10K (Merck) により濃縮し、目的タンパク質CnB-CnA-FLAG-Sor-Hisを得た。サンプルは-80℃で保存した。

[0258] <調製例2-5: His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bioの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、哺乳細胞で発現・精製したカルシニューリンBサブユニット、Aサブユニット及びシクロフィリンAをリンカーで連結させたフュージョンタンパク質を用いた。N末端に精製タグ、C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bioを調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0259] His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bioのアミノ酸配列 (配列番号10)

MHHHHHHGNEASYPLEMCSHFDADEIKRLGKRFK
KLDLDNSGSLSVEEFMSLPQLQQNPLVQRVIDIF
DTDGNGEVDFKEFIEGVVSQFSVKGDKEQKLRFAF
RIYDMDKDGYSNGELFQVLKMMVGNNLKDTQLQ
QIVDKTIINADKDGDGRISFEEFCVVGGGLDIHK
KMVVDVGGGGGGSEPKAIDPKLSTTDRVVKAVPF
PPSHRLTAKEVFDNDGKPRVDILKAHLMKEGRLE
ESVALRIITEGASILRQEKNLLDIDAPVTVCGDI
HGQFFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDYVDRGYF
SIECVLYLWALKILYPKTLFLLRGNHECRHLTEY
FTFKQECKIKYSERVYDACMDAFDCLPLAALMNQ
QFLCVHGGLSPEINTLDDIRKLDRFKEPPAYGPM
CDILWSDPLEDFGNEKTQEHFTHNTVRGCSYFYS
YPAVCEFLQHNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQ
TTGFPSLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVM
NIRQFNCSPPHYWLPNFMVDVFTWSLPFVGEKVTE
MLVNVNLNICSDDDELGSEEDGFDGATAARAIGKMA
RVFSVLREESESVLTLKGLTPTGMLPSGVLSGGK
QTLQSATVEAIEADEAIKGFSPQHKITSEEAKGL
DRINERMPPRRDAMPDANLNSINKALTSETNGT
DSNGSNSSNIDGGGGSGLEVLFQGPGGGSGGGGS
GGGSTVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVP
KTAENFRALSTGEKGFYKGSFCFHRIPGFMCQG
GDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGIL
SMANAGPNTNGSQFFICTAKTEWLDGKHVVFGKV
KEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLED
YKDDDDKGSGGENLYFQSSGGGLNDIFEAQK*IEW
HE

- [0260] 具体的には、哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへHis-CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioの遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクター、及び哺乳細胞用のタンパク質発現ベクターへピオチンライゲース(BirA)の遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを、Expi293F細胞にExpiFectamine293 Transfection Kit(Thermo Fisher, #A14525)を用いて製品添付の基本プロトコルに従いトランスフェクションして発現させた。終濃度0.1mMになるようにBiotinを添加したExpi293 Expression medium(Thermo Fisher, #A1435102)にて37℃で3日培養した。
- [0261] 培養液を遠心分離し、上清を除いて細胞を回収し、精製を行うまで-80℃で冷凍保存した。得られた細胞を、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むLysis buffer(20mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH6.0)を用いて懸濁し、超音波ホモジナイザーにより細胞を破碎した。破碎後の細胞溶液に1mM MgCl₂、12.5U/mL Benzonaseとなるように加えて20分氷上でインキュベートした。これを遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は0.22μmのフィルターで濾過し、サンプルとした。
- [0262] 回収した上清をStrep-Tactin XT 4 Flow(IBA Lifesciences)を用いて、Equilibration buffer(20mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 1mM DTT, pH6.0), Wash buffer(20mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 1mM DTT, 2mM ATP, 5mM MgCl₂, pH6.0), Elution buffer(20mM Bis-Tris, 100mM NaCl, 1mM DTT, 50mM Biotin, pH6.0)により精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。
- [0263] 得られたサンプルをHiTrapQ HP(Cytiva)を用いて、E

qu il i b r a t i o n b u f f e r (20mM B i s - T r i s ,
1mM D T T , p H 6 . 0) , E l u t i o n b u f f e r (20mM
B i s - T r i s , 1M N a C l , 1mM D T T , p H 6 . 0) により
精製した。

[0264] 得られたサンプルをH i L o a d 16 / 600 S u p e r d e x 2
00 p g (G E) を用いて、R u n n i n g b u f f e r (20mM
B i s - T r i s , 50mM N a C l , 1mM D T T , 0.1% C H
A P S , p H 7 . 5) によりサイズ分画クロマトグラフィーを行い精製した
。

[0265] 得られたサンプルをさらにS t r e p - T a c t i n X T 4 F l o
w h i g h c a p a c i t y r e s i n (I B A L i f e s c i e
n c e s) を用いて、E q u i l i b r a t i o n b u f f e r (20
mM B i s - T r i s , 100mM N a C l , 1mM D T T , p H 6
. 0) , E l u t i o n b u f f e r (20mM B i s - T r i s ,
100mM N a C l , 1mM D T T , 50mM B i o t i n , p H 6
. 0) により精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。

[0266] 最後に、得られたサンプルをH i L o a d 16 / 600 S u p e r d
e x 200 p g (G E) を用いて、R u n n i n g b u f f e r (2
0mM T r i s - H C l p H 7 . 5 , 50mM N a C l , 1mM D
T T , 0.1% C H A P S) によりサイズ分画クロマトグラフィーを行い
精製した。目的画分を含むサンプルをA m i c o n U l t r a - 4 30
K (M e r c k) により濃縮し、目的タンパク質H i s - C n B - C n A -
C y A - F L A G - T E V - A v i - b i o を得た。サンプルは-80℃で
保存した。

[0267] [調製例3 : カルシニューリン-F K B P フュージョンタンパク質の調製]
<調製例3-1 : G L - F K B P - F L A G - T E V - A v i - b i o の調
製>

検討に使用する標的タンパク質として、N末端にO a A E P 1 認識配列、

C末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加したFKBPである、GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioを大腸菌で発現・精製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0268] GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioのアミノ酸配列（配列番号46）

GLGGGGSGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRGQTC
VVHYTGMLLEDGKKFDSSRDNRNKPFFKFMLGKQEV
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGI
IPPHATLVFDVELLKLEGGGSSDYKDDDDKSSGE
NL YFQSSGGGLNDIFEAK*IEWHE

[0269] 具体的には、pCDFDuet-1にHis-WELQ-GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio及びビオチンライゲース（BirA）の遺伝子をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21（DE3）を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.5になるまでLB培地で培養し、終濃度1mMのIPTG及び100μMのビオチンとなるように加えて誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを8000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。

[0270] 回収した培養菌体にDisruption buffer（50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 20mM Imidazole, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000（v/v）Benzonase, Protease inhibitor cocktail）を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収後、さらにその上清を15000×g、10分、4℃で遠心したのち0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0271] ライセートサンプルを、Strep Tactin XT 4flow

HC (IBA, #2-5030-010) 5 mL レジンを用いて精製した。精製には Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP) 及び Elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 50 mM D-biotin) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した。

[0272] 濃縮したサンプルの一部を、Dialysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM TCEP) で透析した。その後、WELQut プロテアーゼ認識配列 (WEQL) を認識し切断する WELQut プロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#E00861) を 20 U / 100 μ g サンプルの割合で添加し、4 °C で終夜処理をすることにより、原料タンパク質の N 末端の精製タグを除去した。

[0273] WELQut プロテアーゼ処理をしたサンプルを His Trap FF 5 mL (GE, #17525501) を用いて精製した。精製には Buffer A (50 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM TCEP) 及び Buffer B (50 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 400 mM imidazole, 1 mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

[0274] 回収したサンプルを、Strep Tactin XT 4 flow HC (IBA, #2-5030-010) 3 mL レジンを用いて精製した。精製には Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP) 及び Elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 50 mM D-biotin) を

用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

[0275] 回収したサンプルをHiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-33) を用いてゲル濾過精製した。精製にはEquilibration buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した後、目的タンパク質GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioを得た。サンプルは-80℃にて保存した。

[0276] <調製例3-2: OaAEP1__C247Aの調製>

フュージオンタンパク質の*in vitro*での調製のため、非特許文献(J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 5351-5358.)の方法に準じ、ペプチドの連結反応を触媒するアスパラギニルエンドペプチダーゼの一つ(植物由来)であるOaAEP1を大腸菌で発現させ、精製した。なお、ここで合成したOaAEP1は野生型ではなく、より高活性のC247A変異体(OaAEP1__C247A)である。

[0277] OaAEP1__C247Aのアミノ酸配列(配列番号47)

ARDGDYLHLPSEVSRFFRPQETNDDHGEDSVGTR
WAVLIAGSKGYANYRHQAGVCHAYQILKRGGLKD
ENIVVFMYYDDIAYNESNPRPGV I INSPHGSDVYA
GVPKDYTGEEVNAKNFLAA I LGNKSAITGGSGKV
VDSGPNDHIF I YYTDHGAAGV I GMPSKPYLYADE
LNDALKKKHASGTYKSLVFYLEACESGSMFEGIL
PEDLNIYALTSTNTTESSWAYYCPAQENPPPPEY
NVCLGDLFSVAWLEDSDVQNSWYETLNQQYHHVD
KRISHASHATQYGNLKLGEGLFVYMGSNPANDN
YTSLDGNALTPSSIVVNQRDAD

[0278] 具体的には、pET-28b(+)にOaAEP1__C247Aの遺伝子

配列をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して発現株を作成し、グリセロールストックを作成した。

LBK培地にグリセロールストックを懸濁し、OD₆₀₀が6.7から6.8程度になるまで、37℃で18時間、220 rpm、振盪培養した。その後、新しいLBK培地に、OD₆₀₀が0.1となるように培養液を添加し、37℃で140分、120 rpmで振盪培養をした。OD₆₀₀が0.5よりも大きくなったことを確認し、培養温度を16℃へと下げて30分冷却した。さらに、1 mMのIPTGを加えて誘導をかけ、16℃、120 rpmで20時間誘導培養した後、サンプルを4000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。回収した菌体をD-PBS (-) (ナカライテスク, #14249-95) に再度懸濁し、再び4000×g、30分、4℃で遠心して上清を除き、菌体サンプルとした。

[0279] 回収した菌体サンプルにDisruption buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% (w/v) CHAPS, 10% (v/v) Glycerol, 1/10000 (25U/mL) Benzonase, 1 tablet/50mL Protease inhibitor cocktail) を用いて懸濁し、氷上で超音波破碎した。このサンプルを、100000×g、30分、4℃で遠心し沈殿を除き、上清をライセートサンプルとした。

[0280] ライセートサンプルを、cOmplete His-tag Purification Column (5mL) (Roche, 06781535001) を用いて精製した。精製にはEquilibration buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% (w/v) CHAPS, 10% (v/v) Glycerol) 及びElution buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% (w/v) CHAPS, 10% (v/v) Glycerol, 1M imidazole) を用いた。サンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質を含むフラクション

を回収した。

[0281] 回収サンプルを、buffer A (20mM Bis-Tris propane pH7.0) を用いて終夜透析した。ただし、2時間で一度外液を交換した。その後、サンプルを、HiTrap Q HP 5mL (Cytiva, #1-7115-401) を用いて精製した。精製には、buffer A及びbuffer B (20mM Bis-Tris propane pH7.0, 2M NaCl) を用いた。なお、buffer A及びbuffer Bの調製には、1M Bis-Tris propane pH6.5 (Molecular Dimensions, MD2-005-pH) を用いた。SDS-PAGE分析により目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-4 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した。

[0282] 濃縮したサンプルをSuperdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, #28-9909-44) を用いてゲル濾過精製した。Running bufferとして、D-PBS (-) (ナカライテスク, #14249-95) を用いた。SDS-PAGE分析により目的タンパク質を含むフラクションを回収し、目的タンパク質OaAEP1__C247Aを得た。

[0283] ゲル濾過精製サンプルをActivation buffer (50mM sodium acetate pH 4.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM TCEP) で1.5μMまで希釈した後、希釈サンプルを同じbufferで3時間透析した。さらにその後、Dialysis buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl) を用いて終夜透析した。ただし、2時間で一度外液を交換した。これにより、目的タンパク質OaAEP1__C247Aを活性化した。サンプルは-80℃にて保存した。

[0284] <調製例3-3: Sortase A pentamutant (eSrtA) の調製>

フュージョンタンパク質の *in vitro* での調製のため、非特許文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011 Jul 12 ; 108 (28) : 11399-11404. の方法に準じ、ペプチドの連結反応を触媒するリガーゼの一つである *eSrtA* を大腸菌で発現させ、精製した。なお、ここで合成したソルターゼ A は野生型ではなく、より高活性の P94R/D160N/D165A/K190E/K196T 五重変異体 (Sortase A pentamutant (*eSrtA*)) である。

[0285] ソルターゼ A のアミノ酸配列 (配列番号 48)

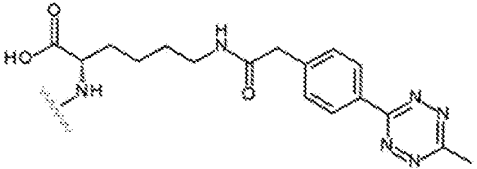
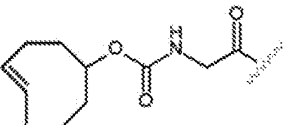
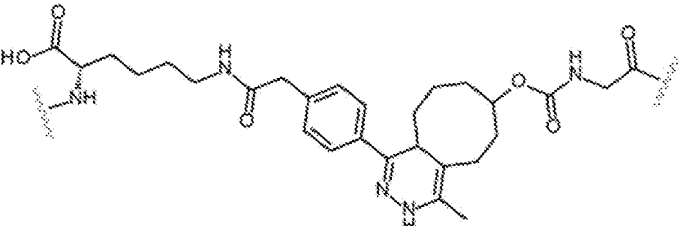
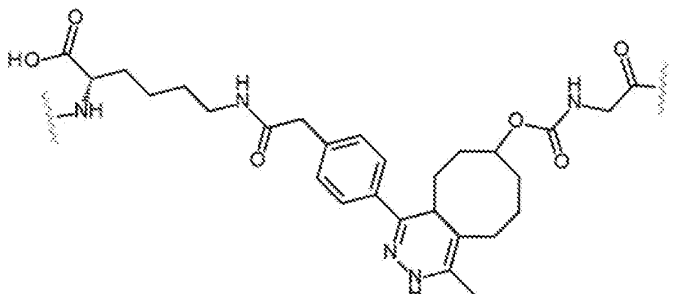
MQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPA
TREQLNRGVSF AEENESLDDQNISIAGHTFIDRP
NYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRN
VKPTAVEVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEETGVW
ETRKIFVATEVKLEHHHHHH

[0286] <調製例 3-4 : C_nB-C_nA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio の調製>

検討に使用する標的タンパク質として、カルシニューリンと FKBP をクリック反応により連結したフュージョンタンパク質である C_nB-C_nA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio を用いた。具体的には、調製例 3-1 で調製した N 末端に OaAEP1 認識配列を含む GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio に、調製例 3-2 で調製した OaAEP1 を用いてトランスシクロオクテン (TCO) 官能基を持つリンカーを付加した。同時に、調製例 2-4 で調製した C 末端にソルターゼ認識配列を含む C_nB-C_nA-FLAG-Sor-His に対し、調製例 3-3 で調製したソルターゼを用いて、C 末端にメチルテトラジン (MeTz) 官能基を持ったリンカーをそれぞれ付加した。その後、TCO が付加された FKBP と MeTz が付加された C_nB-C_nA をクリック反応により連結させることにより、カルシニューリンの C 末端と FKBP の N 末端をペプチドリンカーで連結させたフュージョンタンパク質を調製した。「K*」はビオ

チン化されたL y s、「K（＊１）」は側鎖にメチルテトラジン官能基が付加されたL y s、「（＊２）G」はN末端にトランスシクロオクテン官能基が付加されたG l yをそれぞれ表しており、「K（＊１）」と「（＊２）G」はクリック反応により「（＊３）」又は「（＊４）」のように連結される。「K（＊１）」、「（＊２）G」、「（＊３）」及び「（＊４）」の構造式を表３に示す。

[0287] [表3]

名称	構造式
※（＊１）	
（＊２）G	
（＊３）	
（＊４）	

[0288] C n B－C n A－F L A G－F K B P－F L A G－T E V－A v i－b i
 o のアミノ酸配列（配列番号４９及び配列番号５０）
M G N E A S Y P L E M C S H F D A D E I K R L G K R F K K L D L D N
S G S L S V E E F M S L P E L Q Q N P L V Q R V I D I F D T D G N G

EVDFKEFIEGV SQFSVKGDKEQKLRF AFRIYDMD
K DGYISNGELFQVLKMMVGNNLKDTQLQQIVDKT
IINADKDGDGRISFEEFC AVVGGLDIHKKMVVDV
GGGGGGMSEPKAIDPKLSTTDRVVKAVPFPPSHR
LTAKEVFDNDGKPRVDILKAHLMKEGRLEESVAL
RIITEGASILRQEKNLLDIDAPVTVC GDIHGQFF
DLMKLF EVGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIECV
LYLWALKILYPKTLFLLRGNHECRHLTEYFTFKQ
ECKIKYSERVYDACMDAFDCLPLAALMNQQFLCV
HGGLSPEINTLDDIRKLD RFKEPPAYGPMCDILW
SDPLEDFGNEKTQE HFTHTNTVRGCSYFYSPAVC
EFLQHNNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTTGFP
SLITIF SAPNYLDVYNNKAAVLKYENNV MNIRQF
NCSPHPYWL PNFMDVFTWSLPFVGEKVTEMLVNV
LNICSDDELGSEEDGFDGATAAARKEVIRNKIRA
IGKMARVFSVLREESESVLTLKGLTPTGMLPSGV
LSGGKQTLQSATVEAIEADEA IKGFSPQHKITSF
EEAKGLDRINERMPPRRDAMP SDANLNSINKALT
SETNGTDSNGSNSSNIQGSSDYKDDDDKGGSSLP
MTGGGGSGGGGSK (*1) (*2) GGS GGGGSGGGGS
NGLGGGGSGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRGQT
CVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEV
IRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPG
IIPPHATLVFDVELLKLEGGGSSDYKDDDDKSSG
ENLYFQSSGGGLNDIFEAQK*IEWHE

[0289] <合成例 3-1 : TCO-GGS-(G4S)2-NGLH の合成>

[0290] グリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-L-アスパラギニルグリシル-L-ロイシル-L-ヒスチジン (40.6 mg、0.032 mmol) と (E)-シクロオクト-4-エン-1-イル (2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) カーボネートをジメチルスルホキシド (1.3 mL) に溶解させ、N-エチルジイソプロピルアミン (28.3 μ L、0.16 mmol) を滴下した。反応液を 25℃ にて 60 分攪拌した。反応液をクロマトグラフィーによって精製し、((E)-シクロオクト-4-エン-1-イル) オキシカルボニル) グリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-L-アスパラギニルグリシル-L-ロイシル-L-ヒスチジン (40 mg、収率 88%) を得た。

保持時間：0.42 分

m/z：1422 (M-H) -

[0291] (調製例 3-4-1：OaAEP1 反応による FKBP へのペプチドリンカーの付加)

具体的には、46 μ M GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio、1 mM TCO-GGS-(G4S)2-NGLH、400 μ M NiCl₂、0.6 μ M OaAEP1 を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

OaAEP1 反応の前後のサンプルを SDS-PAGE 分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0292] 反応後のクルードサンプルを、Strep-Tactin XT Sepharose chromatography resin (Cytiva, 29401324)、Wash buffer (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP)、及び Elution buffer (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 50 mM biotin) を用いて精

製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK、#UFC501096) で濃縮することで、FKBPのN末端にTCOが付加したTCO-GGS-(G4S)2-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioを得た。

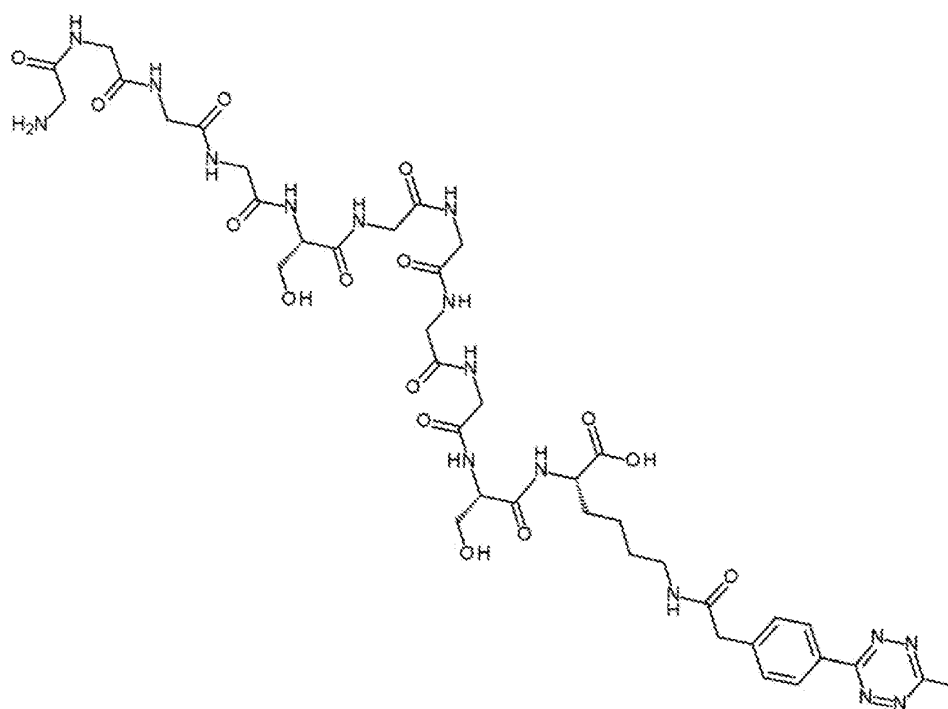
[0293] (調製例3-4-2: ソルターゼ反応によるCnB-CnAへのペプチドリ
ンカーの付加)

Reaction Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 10mM CaCl₂) 中、40μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His、1mM (G4S)2-K (MeTz) (スクラム社にて合成)、1μM eSrtAを氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

ソルターゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0294] 上記反応に利用した(G4S)2-K (MeTz)の構造式は下記の通りである。

[化67]



[0295] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag 1 isolation and Pulldown (Invitrogen, 10103D) と混合して4℃で10分間転倒混和し、上清を回収することで粗精製サンプルを得た。その後、ANTI-FLAG (R) M2 Affinity Gel (Sigma, #A2220)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及びElution buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 500μg/mL FLAG peptide) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK, #UFC501096) で濃縮することで、カルシニューリンのC末端にMeTzが付加したCnB-CnA-FLAG-(G4S)-2-K (MeTz) を得た。

[0296] (調製例3-4-3: クリック反応によるカルシニューリン-FKBPフュ

ージョントタンパク質の合成)

F K B P の N 末端に T C O が付加した T C O - G G S - (G 4 S) 2 - F K B P - F L A G - T E V - A v i - b i o と C n B - C n A の C 末端に M e T z が付加した C n B - C n A - F L A G - (G 4 S) 2 - K (M e T z) を混合し、4℃で2時間インキュベートした。混合前後のサンプルを S D S - P A G E 分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0297] 濃縮したサンプルを Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, #29148721) を用いてゲル濾過精製した。精製には Running buffer (50mM HEPES pH7.5, 300mM NaCl, 1mM DTT) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、カルシニューリンのC末端とFKBPのN末端をペプチドリンカーで連結させた目的タンパク質 C n B - C n A - F L A G - F K B P - F L A G - T E V - A v i - b i o を得た。

[0298] [調製例4：mRNAディスプレイライブラリの調製]

<調製例4-1：アシル化tRNAの合成>

WO2018/143145及びWO2018/225864に記載の手法に準じて翻訳に使用するアシル化tRNAを調製した。Pro(4-pip-4-F2), Asp(SMe), Hph(3-Cl), cisPro(4-pip-4-F2), MeHnl(7-F2), Ser(3-F-5-Me-Pyr), MeSer(nPr), MeAla(3-Pyr), Phe(3-Cl), Pic(2), MeGly, Nle, MeSer(tBuOH), Ser(NtBu-Aca), Ser(iPen), nBuGly, MeHph, Ser(Ph-2-Cl), D-MeSerからなる19種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物を調製した。それぞれのアシル化tRNAの翻訳液中の最終濃度は10μM～20μMであった。F-Pnaz保護のpCpAアミノ酸は、脱保護を実施せずにフェノール抽出以降の作業を行った。Initiatorアミノア

シル化 tRNA は WO 2017/150732 に記載の化合物 A A t R - 3 (A c b z - M e C y s (S t B u) - t R N A f M e t C A U) と同一化合物であり、最終濃度が 25 μ M になるように翻訳液中に添加して用いた。

[0299] <調製例 4-2: ランダム化された 2 本鎖 DNA ライブラリの調製>

WO 2013/100132 に記載の手法に準じて、DNA ライブラリを構築した。TTT、TTG、CTT、CTG、ATT、ATG、GTT、GTG、TCT、TCG、CCG、ACT、GCT、TAC、CAT、CAG、AAC、GAT、GAG、TGC、TGG、CGT、CGG、AGT、AGG、GGT の 26 種類のトリプレットがランダムに 8 回又は 9 回繰り返して出現するものを用意した (配列番号 11、配列番号 12)。

[0300] DNA ライブラリの塩基配列 (配列番号 11)

G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G T T A A C T T T A A T A A
G G A G A T A T A A A T A T G (R a n d o m _ t r i p l e t) _ 9 T A G
C C G A C C G G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A A

[0301] DNA ライブラリの塩基配列 (配列番号 12)

G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G T T A A C T T T A A T A A
G G A G A T A T A A A T A T G (R a n d o m _ t r i p l e t) _ 8 T A G
C C G A C C G G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A A

[0302] <調製例 4-3: mRNA ディスプレイライブラリの翻訳>

翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系である PURE system を用いた。

[0303] 後述する実施例 1-1 及び 1-2 のパニングにおいては、1 mM の GTP, 1 mM の ATP, 20 mM のクレアチンリン酸, 50 mM の HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM の酢酸カリウム, 4 mM の酢酸マグネシウム, 2 mM のスペルミジン, 1 mM のジチオスレイトール, 1 mg/mL E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社) (非特許文献: Yokogawa T et al. 2010 に記載の方法に準じて、一部の tRNA を除去している), 3 μ M の in v

*in vitro*転写大腸菌 tRNA Ala1B, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクレアチンキナーゼ, 6.72 U/ mL のミオキナーゼ, 2 unit/ mL の無機ピロフォスファターゼ, 1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 0.4 Unit/ μL の RNase in (登録商標) Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega), 0.26 μM の EF-G, 2.7 μM の IF1, 0.4 μM の IF2, 1.5 μM の IF3, 40 μM の EF-Tu, 59 μM の EF-Ts, 1 μM の EF-P-Lys, 1.2 μM の改変体リボソーム (WO2021/117848), 1.37 μM の AlaRS, 1 μM の GlyRS, 0.04 μM の IleRS, 0.11 μM の LysRS, 0.16 μM の ProRS, 0.09 μM の ThrRS, 0.5 μM の変異体 PheRS (WO2016/148044), 1 μM の変異体 SerRS (WO2016/148044), 1 μM の変異体 ValRS (WO2016/148044), 250 μM のグリシン、10 μM のイソロイシン、250 μM のリジン、250 μM のプロリン、250 μM のスレオニン、2.5 mM の N-メチルアラニン、5 mM の N-メチルバリン、5 mM の N-メチルセリン、5 mM の N-メチルフェニルアラニン、調製例 4-1 で調製した Elongator アミノアシル化 tRNA 混合物、調製例 4-1 で調製した 25 μM Initiator アミノアシル化 tRNA (WO2017/150732)、0.5 μM Penicillin G Amidase (PGA)、調製例 4-2 で調製した二本鎖 DNA ライブラリから WO2013/100132 に準じて調製した mRNA-ピューロマイシン連結体を 1 μM になるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで翻訳を行った。なお、ピューロマイシンリンカーとしては、非特許文献 (J. Am. Chem. Soc., 2023年, 145, pp. 24035-24051) に記載の axPM-27 を用いた。

[0304] 後述する実施例 1-3 のパニングにおいては、酢酸マグネシウムの濃度を 6 mM、EF-Ts の濃度を 60 μM とし、その他は実施例 1-1 及び 1-

2 のパニングと同様に翻訳を行った。

[0305] 〔実施例 1 : パニングの実施〕

翻訳した mRNA ディスプレイライブラリを使用し、フュージョンタンパク質及び比較のために単体のタンパク質に対して WO 2013/100132 に準じてパニングを 4 ラウンド実施した。ただし、ペプチドの環化反応及び脱硫反応に関しては WO 2017/150732 に倣って実施した。

[0306] <実施例 1-1 : FKBP、FRB 及びそれらのフュージョンタンパク質を標的として用いたパニング>

ラウンド 1 では、 $1\times$ TBS、 2 mg/mL BSA (Invitrogen)、 2 mM DTT を含むバッファーに、ディスプレイライブラリが $0.4\text{ }\mu\text{M}$ 、標的タンパク質として bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His、FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio 又は FRB-FLAG-TEV-Avi-bio が $0.4\text{ }\mu\text{M}$ となるように加えて 4°C で 1 時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して 10 分間 4°C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 $0.03\text{--}0.04\text{ mM}$ となるようにビオチンを加え、さらに 10 分間 4°C で転倒混和した。

[0307] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これを Wash buffer ($1\times$ TBS, 2 mM DTT, 0.1% Tween 20 (Sigma Aldrich), 500 mM アルギニン) で数回洗浄後、TEV プロテアーゼ認識配列を認識し切断する TEV プロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的な TEV 溶出液として、 $1\times$ TEV buffer、 1 mM DTT、 $0.1\text{ U}/\mu\text{L}$ AcTEV プロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエントフィック社、#12575015) を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー (Fw-primer 及び Rv-primer) で P

CRして、次のラウンドへ供した。

また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、ラウンド1のライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（Fw-primer及びRv-primer）を使用した。qPCRの反応液は、 $1\times$ Ex taq buffer、 0.2 mM dNTP、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ Fw-primer、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ Rv-primer、 5000 倍希釈 SYBR Green I（Lonza, #50513）、 $0.025\text{ U}/\mu\text{L}$ Ex Taq polymerase（TAKARA）を混合し、 95°C で2分加熱後、 95°C 10秒、 57°C 20秒、 72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0308] Fw-primerの塩基配列（配列番号13）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAG

[0309] Rv-primerの塩基配列（配列番号14）

TTTTTTTGGCCGGTGCCGGTGCCGGTCGGCTA

[0310] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピュロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、 $1\text{ E}+8/\mu\text{L}$ 、 $1\text{ E}+6/\mu\text{L}$ 、 $1\text{ E}+4/\mu\text{L}$ になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0311] ラウンド2から4では、 $1\times$ TBS、 $2\text{ mg}/\text{mL}$ BSA（Invitrogen）、 2 mM DTTを含むバッファーに、ディスプレイライブラリが $0.2-0.3\text{ }\mu\text{M}$ 、標的タンパク質としてbio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His、FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio又はFRB-FLAG-TEV-Avi-bioが $0.4\text{ }\mu\text{M}$ となるように加えて 4°C で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ又はニュートラアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間 4°C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 $0.04-0.05\text{ mM}$ となるようにビオチンを加えさらに10分間 4°C で転倒

混和した。以降はラウンド1と同様の作業を行った。

[0312] 2ラウンド目以降は、インプットライブラリを2つにわけ、片方は標的タンパク質存在下、もう片方は標的タンパク質非存在下でセクションを行い、双方の核酸回収率を、qPCRの結果から評価した。パニングの各ラウンドの回収率(%)を以下の式により算出した。結果を下表に示す。

[0313] ライブラリの回収率(%) = ライブラリのアウトプット核酸量(分子数) / (ライブラリのインプット核酸量(分子数)) × 100

[0314] [表4]

標的タンパク質としてbio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His(配列番号5)を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸量(分子)	標的有り		標的無し		標的の 有無による 回収率の比
		アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	2.93E+13	1.37E+08	4.67E-04	-	-	-
2	8.26E+11	3.88E+06	4.69E-04	8.70E+05	1.05E-04	4.5
3	3.03E+11	1.51E+08	4.98E-02	2.47E+04	8.16E-06	6108.4
4	1.63E+11	4.67E+08	2.86E-01	1.13E+05	6.88E-05	4153.8

[0315] [表5]

標的タンパク質としてFKBP-FLAG-TEV-Avi-bio(配列番号1)を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸量(分子)	標的有り		標的無し		標的の 有無による 回収率の比
		アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	3.09E+13	3.40E+06	1.10E-05	-	-	-
2	7.83E+11	7.87E+06	1.00E-03	4.78E+05	6.10E-05	16.5
3	5.82E+11	2.17E+09	3.72E-01	1.32E+04	2.27E-06	163794.4
4	4.54E+11	2.71E+09	5.96E-01	1.09E+05	2.39E-05	24908.1
5	5.52E+11	3.31E+08	5.98E-02	8.01E+03	1.45E-06	41268.3

[0316]

[表6]

標的タンパク質としてFRB-FLAG-TEV-Avi-bio（配列番号2）を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸塩(分子)	標的有り		標的無し		標的の有無による 回収率の比
		アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	2.49E+13	1.01E+07	4.04E-05	-	-	-
2	6.62E+11	3.11E+05	4.69E-05	4.53E+05	6.84E-05	0.7
3	4.34E+11	9.19E+06	2.11E-03	3.36E+04	7.73E-06	273.8
4	3.63E+11	4.60E+08	1.27E-01	7.07E+05	1.95E-04	651.1

[0317] 結果、表4～6に示すように後半ラウンドにおいて、前記標的タンパク質存在下と前記標的タンパク質非存在下のセレクション間で回収率に差がついていることから、前記標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されていることが示唆された。特にフュージョンタンパク質のみならず単体タンパク質に対するパニングにおいてもこの現象が見られることから、ライブラリ中にFKBP及びFRBとの三者複合体を形成し得るバインダーのみならず、FKBPやFRBに対して単独で結合するバインダーも存在することが強く示唆される。

[0318] パニングで得られた各ラウンドのDNAプールは、当業者公知の方法により次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析を実施した。

[0319] <実施例1-2：カルシニューリン、シクロフィリンA及びそれらのフュージョンタンパク質を標的として用いたパニング>

ラウンド1では、1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーに、ディスプレイライブラリが0.4μM、標的タンパク質としてHis-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio、CyA-FLAG-TEV-Avi-bio又はCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioが0.4μMとなるように加えた。なお、標的タンパク質がHis-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio又はCnB-Cn

A-FLAG-TEV-Avi-bioの場合は、さらにCalmodulin（富士フイルム和光純薬）を $2\mu\text{M}$ となるように加えて 4°C で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間 4°C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後、 $0.03-0.04\text{mM}$ となるようにビオチンを加え、さらに10分間 4°C で転倒混和した。

[0320] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これをWash buffer（ $1\times\text{TBS}$ 、 2mM DTT 、 0.1% Tween 20（Sigma Aldrich）、 500mM アルギニン）で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、 $1\times\text{TEV buffer}$ 、 1mM DTT 、 $0.1\text{U}/\mu\text{L}$ AcTEVプロテアーゼ（サーモフィッシュャーサイエントフィック社、#12575015）を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー（Fw-primer及びRv-primer）でPCRして、次のラウンドへ供した。

また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、ラウンド1のライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（Fw-primer及びRv-primer）を使用した。qPCRの反応液は、 $1\times\text{Ex taq buffer}$ 、 0.2mM dNTP 、 $0.5\mu\text{M Fw-primer}$ 、 $0.5\mu\text{M Rv-primer}$ 、 5000 倍希釈 SYBR Green I（Lonza、#50513）、 $0.025\text{U}/\mu\text{L}$ Ex Taq polymerase（TAKARA）を混合し、 95°C で2分加熱後、 95°C 10秒、 57°C 20秒、 72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0321] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4

ー3で調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、 $1 \text{ E} + 8 / \mu\text{L}$ 、 $1 \text{ E} + 6 / \mu\text{L}$ 、 $1 \text{ E} + 4 / \mu\text{L}$ 、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0322] ラウンド2-4では、 $1 \times \text{TBS}$ 、 $2 \text{ mg} / \text{mL}$ BSA (Invitrogen)、 2 mM DTT、 5 mM CaCl_2 を含むバッファーに、ディスプレイライブラリが $0.2 - 0.3 \mu\text{M}$ 、標的タンパク質としてHis-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio、CyA-FLAG-TEV-Avi-bio又はCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioが $0.4 \mu\text{M}$ となるように加えた。なお、標的タンパク質がHis-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio又はCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioの場合は、さらにCalmodulin (富士フイルム和光純薬)を $2 \mu\text{M}$ となるように加えて 4°C で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ又はニュートラアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間 4°C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 $0.04 - 0.05 \text{ mM}$ となるようにビオチンを加えさらに10分間 4°C で転倒混和した。これ以降はラウンド1と同様の作業を行った。

[0323] 2ラウンド目以降は、インプットライブラリを2つにわけ、片方は標的タンパク質存在下、もう片方は標的タンパク質非存在下でセレクションを行い、双方の核酸回収率を、qPCRの結果から評価した。パニングの各ラウンドの回収率(%)を以下の式により算出した。結果を下表に示す。

[0324] ライブラリの回収率(%) = ライブラリのアウトプット核酸量(分子数) / (ライブラリのインプット核酸量(分子数)) $\times 100$

[0325]

[表7]

標的タンパク質としてHis-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio（配列番号10）を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸量(分子)	標的有り		標的無し		標的の 有無による 回収率の比
		アプトブット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アプトブット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	3.25E+13	1.62E+08	4.98E-04	-	-	-
2	6.62E+11	4.59E+07	6.94E-03	4.81E+05	7.27E-05	95.4
3	2.40E+11	8.94E+06	3.72E-03	5.47E+04	2.28E-05	163.4
4	2.92E+11	9.89E+08	3.38E-01	2.70E+05	9.25E-05	3660.9
5	5.79E+11	4.15E+08	7.16E-02	3.01E+04	5.20E-06	13761.6

[0326] [表8]

標的タンパク質としてCyA-FLAG-TEV-Avi-bio（配列番号6）を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸量(分子)	標的有り		標的無し		標的の 有無による 回収率の比
		アプトブット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アプトブット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	3.22E+13	2.50E+07	7.76E-05	-	-	-
2	1.15E+12	4.15E+07	3.61E-03	8.88E+05	7.73E-05	46.7
3	4.00E+11	7.97E+07	1.99E-02	5.18E+04	1.29E-05	1538.3
4	3.88E+11	1.70E+09	4.38E-01	1.88E+05	4.85E-05	9031.9
5	6.97E+11	1.04E+09	1.49E-01	2.43E+04	3.49E-06	42645.9

[0327] [表9]

標的タンパク質としてCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio（配列番号7）を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸量(分子)	標的有り		標的無し		標的の 有無による 回収率の比
		アプトブット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アプトブット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	3.30E+13	7.25E+08	2.20E-03	-	-	-
2	8.90E+11	1.98E+08	2.22E-02	6.34E+05	7.13E-05	311.9
3	4.68E+11	8.95E+07	1.91E-02	7.90E+04	1.69E-05	1133.1
4	1.02E+11	8.45E+07	8.29E-02	9.52E+04	9.35E-05	887.1
5	2.38E+11	1.25E+08	5.26E-02	8.67E+04	3.64E-05	1444.7

[0328] 結果、表7～9に示すように後半ラウンドにおいて、前記標的タンパク質存在下と前記標的タンパク質非存在下のセレクション間で回収率に差がついていることから、前記標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が

、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されていることが示唆された。特にフュージョンタンパク質のみならず単体タンパク質に対するパニングにおいてもこの現象が見られることから、ライブラリ中にシクロフィリンA及びカルシニューリンとの三者複合体を形成し得るバインダーのみならず、シクロフィリンAやカルシニューリンに対して単独で結合するバインダーが存在することも強く示唆される。

[0329] パニングで得られた各ラウンドのDNAプールは、当業者公知の方法により次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析を実施した。

[0330] <実施例1-3：カルシニューリン-FKBPのフュージョンタンパク質を標的として用いたパニング>

ラウンド1では、 $1\times$ TBS、 2 mg/mL BSA (Invitrogen)、 2 mM DTT、 5 mM CaCl_2 を含むバッファーに、標的タンパク質としてCnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioが $0.4\text{ }\mu\text{M}$ となるように加えて、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間 4°C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後、 0.5 mM となるようにビオチンを加え、さらに10分間 4°C で転倒混和した。さらにその後、標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除き、一度Wash buffer ($1\times$ TBS、 2 mM DTT、 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich)、 500 mM アルギニン)で洗浄後、ディスプレイライブラリが $0.6\text{ }\mu\text{M}$ 、Calmodulin (富士フイルム和光純薬)が $2\text{ }\mu\text{M}$ となるように加えて 4°C で1時間転倒混和した。

[0331] ディスプレイライブラリと混合したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これを前述のWash bufferで数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、 $1\times\text{TEV buffer}$ 、 1 mM DTT 、 $0.1\text{ U}/\mu\text{L AcTEV}$ プロテアーゼ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015）を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー（ Fw-primer 及び Rv-primer ）でPCRして、次のラウンドへ供した。

また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、ラウンド1のライブラリの回収率（%）を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（ Fw-primer 及び Rv-primer ）を使用した。qPCRの反応液は、 $1\times\text{Ex taq buffer}$ 、 0.2 mM dNTP 、 $0.5\text{ }\mu\text{M Fw-primer}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{M Rv-primer}$ 、 50000 倍希釈 SYBR Green I （Lonza, #50513）、 $0.025\text{ U}/\mu\text{L Ex Taq polymerase}$ （TAKARA）を混合し、 95°C で2分加熱後、 95°C 10秒、 57°C 20秒、 72°C 30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0332] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピュアロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、 $1\text{ E}+8/\mu\text{L}$ 、 $1\text{ E}+6/\mu\text{L}$ 、 $1\text{ E}+4/\mu\text{L}$ 、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0333] ラウンド2-4では、 $1\times\text{TBS}$ 、 $2\text{ mg}/\text{mL BSA}$ （Invitrogen）、 2 mM DTT 、 5 mM CaCl_2 を含むバッファーに、標的タンパク質として $\text{CnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio}$ が $0.4\text{ }\mu\text{M}$ となるように加えて、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ又はニュートラアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間 4°C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後、 0.5 mM となるようにビオチンを加え、さらに10分間 4°C で転倒混和した。さらにその後、標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ又はニュートラアビジンコーティング磁気ビーズをマグネ

ットで集めて上清を除き、一度前述のWash bufferで洗浄後、ディスプレイライブラリが0.2-0.3 μM、Calmodulin（富士フイルム和光純薬）が2 μMとなるように加えて4℃で1時間転倒混和した。これ以降はラウンド1と同様の作業を行った。

[0334] 2ラウンド目以降は、インプットライブラリを2つにわけ、片方は標的タンパク質存在下、もう片方は標的タンパク質非存在下でセレクションを行い、双方の核酸回収率を、qPCRの結果から評価した。パニングの各ラウンドの回収率（%）を以下の式により算出した。結果を下表に示す。

[0335] ライブラリの回収率（%）＝ライブラリのアウトプット核酸量（分子数）／（ライブラリのインプット核酸量（分子数））×100

[0336] [表10]

標的タンパク質としてCnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio（配列番号49及び配列番号50）を使用した場合の回収率の推移

ラウンド	ライブラリの インプット 核酸量(分子)	標的有り		標的無し		標的の有無による 回収率の比
		アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	アウトプット核酸 分子(分子)	回収率(%)	
1	1.68E+13	4.31E+08	2.57E-03	-	-	-
2	6.22E+11	1.83E+08	2.94E-02	3.82E+06	5.82E-04	50.6
3	4.11E+11	2.95E+07	7.18E-03	1.37E+05	3.34E-05	215.0
4	3.16E+11	2.85E+09	9.02E-01	3.42E+06	1.08E-03	833.3

[0337] 結果、表10に示すように後半ラウンドにおいて、前記標的タンパク質存在下と前記標的タンパク質非存在下のセレクション間で回収率に差がついていることから、前記標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されていることが示唆された。

[0338] パニングで得られた各ラウンドのDNAプールは、当業者公知の方法により次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析を実施した。

[0339] [実施例2：カウンターアッセイによる複数種類の標的との複合体を形成し得るペプチド候補の同定]

上述の通り、フュージョン体を用いたパニングを実施した場合、濃縮して

きた配列は複数種類の標的との複合体を形成し得るペプチドのみならず、単独標的とのみ結合するようなペプチドも含まれると予想される。この中から複数種類の標的との複合体を形成し得るペプチドである目的分子を同定するために、カウンターアッセイを実施した。

[0340] <実施例 2-1 : F K B P 及び F R B との三者複合体を形成し得るペプチドの同定>

(実施例 2-1-1 : パニングにおいて濃縮した配列から成る m R N A ディスプレイライブラリの調製)

F K B P と F R B のフュージョンタンパク質を用いたパニングにて 3 ラウンドを経た後の D N A プールから、W O 2 0 1 3 / 1 0 0 1 3 2 の方法に準じて m R N A - ピューロマイシン連結体を調製した。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述の a x P M - 2 7 を用いた。これを実験例 1 の調製例 4-3 で調製した翻訳系で翻訳し、W O 2 0 1 7 / 1 5 0 7 3 2 に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことで、フュージョンタンパク質を用いたパニングで濃縮したペプチド配列から成る m R N A - ディスプレイライブラリを調製した。

[0341] (実施例 2-1-2 : m R N A ディスプレイライブラリのアフィニティセレクション)

1 × T B S 、 2 m g / m L B S A (I n v i t r o g e n) 、 2 m M D T T を含むバッファーに、実施例 2-1-1 で調製したディスプレイライブラリが 0 . 2 - 0 . 3 μ M 、標的タンパク質が表 1 1 となるように添加して 4 ° C で 1 時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して 1 0 分間 4 ° C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 0 . 0 4 - 0 . 0 5 m M となるようにビオチンを加えさらに 1 0 分間 4 ° C で転倒混和した。標的タンパク質は調製例 1-1 ~ 1-5 で調製したタンパク質を用いた。

[0342]

[表11]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μ M bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His
2	0.4 μ M FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
3	0.4 μ M FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μ M FRB-FLAG-Sor-His
4	0.4 μ M FRB-FLAG-TEV-Avi-bio
5	0.4 μ M FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μ M FKBP-FLAG-Sor-His
6	標的タンパク質無し

[0343] 条件1はフュージョンタンパク質を用いた場合であり、2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2及び4はFKBPのみ、又はFRBのみが系中に存在している条件である。条件3及び5はFKBPとFRBが存在している条件であるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされる標的タンパク質がそれぞれFKBP又はFRBとなる条件であり、2種類の標的タンパク質は近接していない条件である。条件6は標的タンパク非存在下の条件である。

[0344] 実験例1の実施例1-1と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収した。一部はqPCRにて定量を行い、算出されたインプットの分子数、各条件で回収された分子数及び回収率を算出し表12にまとめた。

[0345] [表12]

インプット分子数 (分子)	条件	回収された分子数(分子)	回収率 (%)
1.86E+11	1	1.01E+09	5.43E-01
	2	5.06E+08	2.71E-01
	3	3.99E+08	2.14E-01
	4	4.77E+05	2.56E-04
	5	1.99E+05	1.07E-04
	6	8.88E+04	4.76E-05

[0346] qPCRに供さなかった残りの溶出液に対し、qPCRと同様のプライマーを用いてPCRを実施し、プルダウンによって回収されたDNAを増幅させた。これらとインプットのライブラリの塩基配列を当業者公知の方法で次世代シーケンサーによって解析した。この結果を基に、各配列がDNAプー

ル全体に占める割合を算出した。

[0347] また、下記式（１）に従い、各々のセレクション条件における各ペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子それぞれの回収率（％）を算出した。

[0348] [数3]

$$\text{回収率}(\%) = \frac{\text{アウトプット分子数} X_a \times \text{特定ディスプレイ分子割合} R_a}{\text{インプット分子数} X_i \times \text{特定ディスプレイ分子割合} R_i} \times 100 \quad \text{・・・式（１）}$$

（上記式（１）において、アウトプット分子数 X_a はプルダウン操作により回収された全てのmRNAディスプレイ分子の数を表し、特定ディスプレイ分子割合 R_a は前記アウトプット分子数 X_a において特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子が占める数割合を表し、インプット分子数 X_i はプルダウン操作を行う前のライブラリに含まれていた全てのmRNAディスプレイ分子の数を表し、特定ディスプレイ分子割合 R_i は前記インプット分子数 X_i において前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子が占める数割合を表す。）

[0349] ここで、FKBP及びFRBと三者複合体を形成し得るペプチドである目的分子は、上記条件１において最も回収されやすいであろうと仮定し、下記の条件を満たすmRNAディスプレイ分子によりコードされるペプチドを目的分子として同定した。

[0350] （特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件１における回収率）／（前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件２における回収率） ≥ 5 かつ（前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件１における回収率）／前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件４における回収率 ≥ 5

[0351] これらの条件を満たすペプチドの中から一部を選定し、合成例１で合成した。

[0352] ＜実施例２－２：シクロフィリンA及びカルシニューリンとの三者複合体を形成し得るペプチドの同定＞

(実施例 2-2-1：パニングにおいて濃縮した配列から成る mRNA ディスプレイライブラリの調製)

シクロフィリン A とカルシニューリンのフュージョンタンパク質を用いたパニングにて 3 ラウンドを経た後の DNA プールから、WO 2013/100132 の方法に準じて mRNA-ピューロマイシン連結体を調製した。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述の a x P M-27 を用いた。これを実験例 1 の調製例 4-3 で調製した翻訳系で翻訳し、WO 2017/150732 に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことで、フュージョンタンパク質を用いたパニングで濃縮したペプチド配列から成る mRNA ディスプレイライブラリを調製した。

[0353] (実施例 2-2-2：mRNA ディスプレイライブラリのアフィニティセレクション)

1 x TBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen)、2 mM DTT、5 mM CaCl₂ を含むバッファーに、実験例 1 の実施例 2-2-1 で調製したディスプレイライブラリが 0.2-0.3 μM、Calmodulin (富士フイルム和光純薬) が 2 μM、標的タンパク質が表 13 のようになるように添加して 4℃ で 1 時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して 10 分間 4℃ で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 0.04-0.05 mM となるようにビオチンを加えさらに 10 分間 4℃ で転倒混和した。標的タンパク質は調製例 2-1 ~ 2-5 で調製したタンパク質を用いた。

[0354] [表13]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio
2	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio
3	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio
5	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His
6	標的タンパク質無し

[0355] 条件1はフュージョントタンパク質を用いた場合であり、2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2及び4はシクロフィリンAのみ、又はカルシニューリンのみが系中に存在している条件である。条件3及び5はシクロフィリンAとカルシニューリンが存在している条件であるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされる標的タンパク質がそれぞれシクロフィリンA又はカルシニューリンとなる条件であり、2種類の標的タンパク質は近接していない条件である。条件6は標的タンパク非存在下の条件である。

[0356] 実験例1の実施例1－2と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収した。一部はqPCRにて定量を行い、算出されたインプットの分子数、各条件で回収された分子数及び回収率を算出し表14にまとめた。

[0357] [表14]

インプット分子数 (分子)	条件	回収された分子数(分子)	回収率 (%)
6.84E+11	1	8.13E+09	1.19E+00
	2	1.19E+09	1.74E-01
	3	1.36E+09	1.98E-01
	4	3.01E+09	4.40E-01
	5	2.99E+09	4.37E-01
	6	3.50E+05	5.12E-05

[0358] qPCRに供さなかった残りの溶出液に対し、qPCRと同様のプライマーを用いてPCRを実施し、プルダウンによって回収されたDNAを増幅させた。これらとインプットのライブラリの塩基配列を当業者公知の方法で次世代シーケンサーによって解析した。この結果を基に、各配列がDNAプール全体に占める割合を算出した。

[0359] また、上記式(1)に従い、各々のセレクション条件における各ペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の回収率を算出した。

[0360] ここで、シクロフィリンA及びカルシニューリンと三者複合体を形成し得るペプチドである目的分子は、上記条件1において最も回収されやすいであろうと仮定し、下記の条件を満たすmRNAディスプレイ分子によりコード

されるペプチドを目的分子として同定した。

[0361] (特定のペプチドをコードするmRNA-ディスプレイ分子の条件1における回収率) / (前記特定のペプチドをコードするmRNA-ディスプレイ分子の条件2における回収率) ≥ 5 かつ (前記特定のペプチドをコードするmRNA-ディスプレイ分子の条件1における回収率) / (前記特定のペプチドをコードするmRNA-ディスプレイ分子の条件4における回収率) ≥ 5

[0362] これらの条件を満たすペプチドの中から一部を選定し、合成例1で合成した。

[0363] <実施例2-3: FKBP及びカルシニューリンとの三者複合体を形成し得るペプチドの同定>

(実施例2-3-1: パニングにおいて濃縮した配列から成るmRNAディスプレイライブラリの調製)

FKBPとカルシニューリンのフュージョンタンパク質を用いたパニングにて3ラウンドを経た後のDNAプールから、WO2013/100132の方法に準じてmRNA-ピュロマイシン連結体を調製した。なお、ピュロマイシンリンカーとしては前述のaxPM-27を用いた。これを実験例1の調製例4-3で調製した翻訳系で翻訳し、WO2017/150732に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことで、フュージョンタンパク質を用いたパニングで濃縮したペプチド配列から成るmRNA-ディスプレイライブラリを調製した。翻訳に必要な翻訳系及びアミノアシル化tRNAは実験例1の実施例1-3で使用了したものを用いた。

[0364] (実施例2-3-2: mRNAディスプレイライブラリのアフィニティセクション)

1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーに、ビオチン化標的タンパク質が表15のようになるように添加し、ニュートラアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した

。その後0.5 mMとなるようにビオチンを加え、さらに10分間4℃で転倒混和した。さらにその後、標的タンパク質を固定化したニュートラアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除き、一度Wash buffer (1×TBS, 2 mM DTT, 0.1% Tween 20 (Sigma Aldrich), 500 mM アルギニン) で洗浄後、実験例1の実施例2-3-1で調製したディスプレイライブラリが0.2-0.3 μM、Calmodulin (富士フイルム和光純薬) が2 μM、非ビオチン化タンパク質を加える場合は表15に記載の濃度となるように加えて4℃で1時間転倒混和した。標的タンパク質は調製例1-1, 1-3, 2-2, 2-4, 3-4で調製したタンパク質を用いた。

[0365] [表15]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
3	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio
5	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His
6	標的タンパク無し

[0366] 条件1はフュージョンタンパク質を用いた場合であり、2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2及び4はFKBPのみ、又はカルシニューリンのみが系中に存在している条件である。条件3及び5はFKBPとカルシニューリンが存在している条件であるが、ニュートラアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされる標的タンパク質がそれぞれFKBP又はカルシニューリンとなる条件であり、2種類の標的タンパク質は近接していない条件である。条件6は標的タンパク非存在下の条件である。

[0367] 実験例1の実施例1-3と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収した。一部はqPCRにて定量を行い、算出されたインプットの分子数、各条件で回収された分子数及び回収率を算出し表16にまとめた。

[0368]

[表16]

インプット分子数 (分子)	条件	回収された分子数(分子)	回収率 (%)
1.99E+11	1	3.25E+09	1.63E+00
	2	1.76E+09	8.84E-01
	3	1.68E+09	8.44E-01
	4	2.73E+09	1.37E+00
	5	2.23E+09	1.12E+00
	6	2.97E+06	1.49E-03

[0369] qPCRに供さなかった残りの溶出液に対し、qPCRと同様のプライマーを用いてPCRを実施し、プルダウンによって回収されたDNAを増幅させた。これらとインプットのライブラリの塩基配列を当業者公知の方法で次世代シーケンサーによって解析した。この結果を基に、各配列がDNAプール全体に占める割合を算出した。

[0370] また、上記式(1)に従い、各々のセレクション条件における各ペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の回収率を算出した。

[0371] ここで、FKBP及びカルシニューリンと三者複合体を形成し得るペプチドである目的分子は、上記条件1において最も回収されやすいであろうと仮定し、下記の条件を満たすmRNAディスプレイ分子によりコードされるペプチドを目的分子として同定した。

[0372] (特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件1における回収率) / (前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件2における回収率) $\geq$ 5 かつ (前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件1における回収率) / (前記特定のペプチドをコードするmRNAディスプレイ分子の条件4における回収率) $\geq$ 5

[0373] これらの条件を満たすペプチドの中から一部を選定し、合成例1で合成した。

[0374] [合成例1：パニング及びそれに続くカウンターアッセイにより取得したペプチドの合成]

[0375] LC-MSの分析条件は下記のとおりである。

[表17]

分取条件	装置	カラム(内径×長さ(mm))	移動相	勾配(A/B)	流速 (ml/分)	カラム温度 (℃)	波長
SQD FADS	Acquity UPLC/SQD2	Aldrich Ascendis Express C16 (2.1×50)	A) 0.1% FA in H ₂ O B) 0.1% FA in CH ₃ CN	95:5 => 0:100 (1.0分間)<=> 0:100(0.4分間)	0.9	35	210-400nm PDA total
SQD AAS	Acquity UPLC/SQD2	Aldrich Ascendis Express C16 (2.1×50)	A) 10mM AcONH ₄ , H ₂ O B) methanol	95:5 => 0:100 (1.0分間)<=> 0:100(0.4分間)	0.9	35	210-400nm PDA total

[0376] 全ての出発物質及び試薬は商業的供給業者から入手、又は公知の方法を用いて合成した。

[0377] [合成例 1 : ペプチドの固相合成]

WO 2 0 1 3 / 1 0 0 1 3 2、WO 2 0 1 8 / 2 2 5 8 6 4、WO 2 0 2 2 / 2 3 4 8 5 2 に記載の F m o c 法を用いた合成法に従い、ペプチドを伸長し化合物を合成した。

- 1) A s p 側鎖のカルボン酸を 2-クロロトリチルレジンに担持させたものを用いて、アミノ酸の N 末からの F m o c 法によるペプチド伸長反応、
- 2) 2-クロロトリチルレジンからのペプチドの切り出し過程、
- 3) 2-クロロトリチルレジンから外れて生じた A s p 側鎖のカルボン酸と、ペプチド鎖 N 末端のアミノ基との縮合によるアミド環化、
- 4) 必要に応じたペプチド鎖に含まれる側鎖官能基の保護基の脱保護、
- 5) 分取 H P L C による化合物の精製、の 5 段階の工程である。本実施例において、特に記述がない限り、この合成法をもとにペプチドの合成を行った。

[0378] 上記の合成条件に従い環状ペプチドを合成した。表 1 8 及び 1 9 では、1 ～ 1 1 のカラムで N 末端から順にアミノ酸の配列を示し、各化合物の精密質量 (e x a c t m a s s)、L C - M S 分析条件、観測されたマスペクトル (o b s . m a s s ; m / z)、イオン形 (i o n f o r m)、及び保持時間 (m i n) を記載した。全てのペプチドは N 末端アミノ基と C 末端 A s p の側鎖カルボキシル基とのアミド結合を形成した環状ペプチドである。L C - M S の分析条件は表 1 7 に記載した。

[0379]

[表18]

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Exact mass	分析条件	obs. Mass (m/z)	ion form	保持時間 (min)
FF-01	MeAla	Hph(3-Cl)	MeGly	Gly	D-MeSer	Pic(2)	Hph(3-Cl)	Thr	MeSer	Ser(NIBu-Aca)	Asp2-pyrro	1365.6	FA05	1364.9	[M-H] ⁻	0.74
FF-02	MeAla	MePhe	MeGly	D-MeSer	Pic(2)	Thr	Nle	MeSer(B uOH)	Pro	Ser(Ph-2-Cl)	Asp2-pyrro	1378.7	FA05	1369.0	[M-H] ⁺	0.66
FF-03	MeAla	Ser(NIBu-Aca)	Gly	MeAla(3-Pyr)	Hph(3-Cl)	nBuGly	Pic(2)	Hph(3-Cl)	Ile	Ser(3-F-5-Me-Pyr)	Asp2-pyrro	1595.8	FA05	1595.0	[M-H] ⁻	0.82
FF-04	MeAla	Phe(3-Cl)	MeVal	Ser(Ph-2-Cl)	nBuGly	Pic(2)	Ser(NIBu-Aca)	Thr	Gly	Gly	Asp2-pyrro	1383.6	FA05	1382.9	[M-H] ⁻	0.92
FF-05	MeAla	MeVal	Pic(2)	Ser(NIBu-Aca)	Ser(NIBu-Aca)	Ser(3-F-5-Me-Pyr)	Ser(NIBu-Aca)	nBuGly	Nle	MeSer(nP r)	Asp2-pyrro	1643.0	FA05	1642.3	[M-H] ⁻	0.94
FF-06	MeAla	Thr	nBuGly	Nle	D-MeSer	Pic(2)	Gly	Hph(3-Cl)	Pic(2)	Hph(3-Cl)	Asp2-pyrro	1350.7	FA05	1351.8	[M-H] ⁺	0.84
FF-07	MeAla	MeSer(B uOH)	Ser(Ph-2-Cl)	D-MeSer	Phe(3-Cl)	MePhe	MeVal	Phe(3-Cl)	Pro	Thr	Asp2-pyrro	1558.6	FA05	1559.9	[M-H] ⁺	0.93
CC-01	MeAla	MeAla(3-Pyr)	MeSer(B uOH)	nBuGly	Ile	MeSer(nP r)	Phe(3-Cl)	MeVal	MeHn(7-F2)	Thr	Asp2-pyrro	1529.8	FA05	1529.2	[M-H] ⁻	0.82
CC-02	MeAla	Phe(3-Cl)	MePhe	MePro(4-pip-4-F2)	Nle	MeGly	Nle	MeHn(7-F2)	MeHn(7-F2)	Thr	Asp2-pyrro	1563.8	FA05	1563.2	[M-H] ⁻	0.83
CC-03	MeAla	Ser((Pen)	Pro	Ser(3-F-5-Me-Pyr)	Nle	MeVal	MeHph	Thr	Thr	MeSer(B uOH)	Asp2-pyrro	1479.8	FA05	1479.2	[M-H] ⁻	0.81
CC-04	MeAla	MePhe	MeSer	Gly	Ile	Pro	Phe(3-Cl)	MeVal	MeHn(7-F2)	Ile	Asp2-pyrro	1366.7	FA05	1366.1	[M-H] ⁻	0.93
CC-05	MeAla	Ser(NIBu-Aca)	Thr	MeAla	MeHn(7-F2)	Thr	Ser(3-F-5-Me-Pyr)	Ser(Ph-2-Cl)	Nle	MeSer	Asp2-pyrro	1524.7	FA05	1525.0	[M-H] ⁺	0.72
CC-06	MeAla	MePro(4-pip-4-F2)	Phe(3-Cl)	Pro	Gly	Ser(Ph-2-Cl)	MeSer(nP r)	Thr	Ile	Gly	Asp2-pyrro	1415.6	AA05	1416.6	[M-H] ⁺	1.10
CC-07	MeAla	Ile	Phe(3-Cl)	MeVal	MeHph	Thr	Nle	Thr	MeVal	MeVal	Asp2-pyrro	1376.8	FA05	1377.9	[M-H] ⁺	0.88

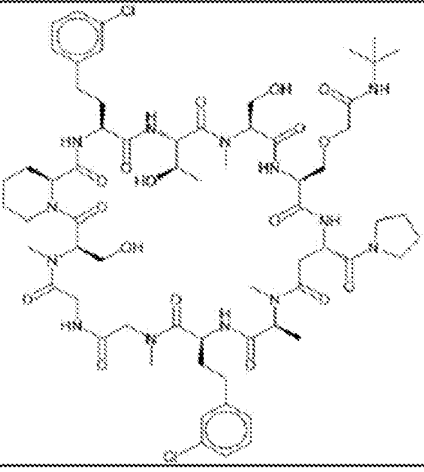
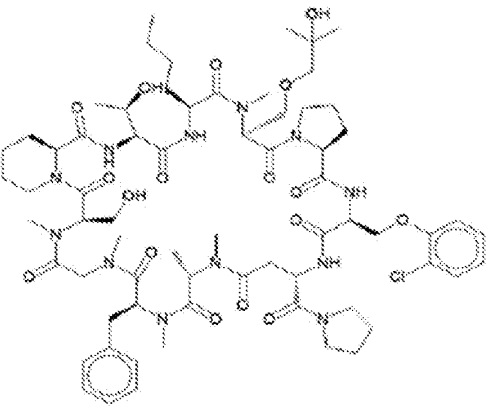
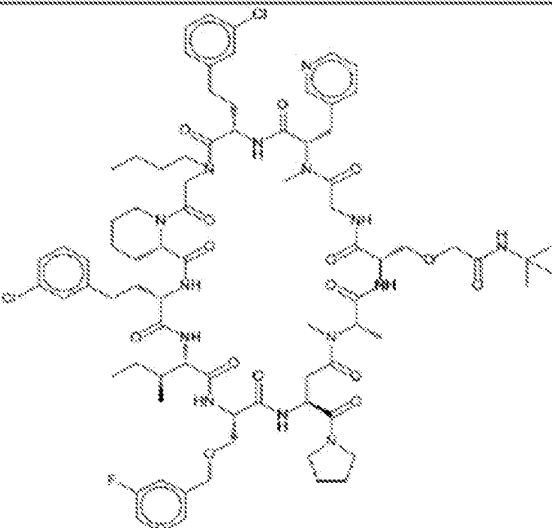
[0380] [表19]

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Exact mass	分析条件	obs. Mass (m/z)	ion form	保持時間 (min)
CF-01	MeAla	Pic(2)	Thr	Ser(NHB u-Aca)	Thr	Gly	Pro(4- pip-4-	Phe(3- Cl)	MeHph	Hph(3- Cl)	Asp2- pyro	1590.7	FA05	1590.0	[M-H]-	0.51
CF-02	MeAla	Ile	Nle	MeHtl(7-F2)	MePhe	MeCly	Gly	Pic(2)	Pro(4- pip-4-	Pro	Asp2- pyro	1369.8	FA05	1369.0	[M-H]-	0.70

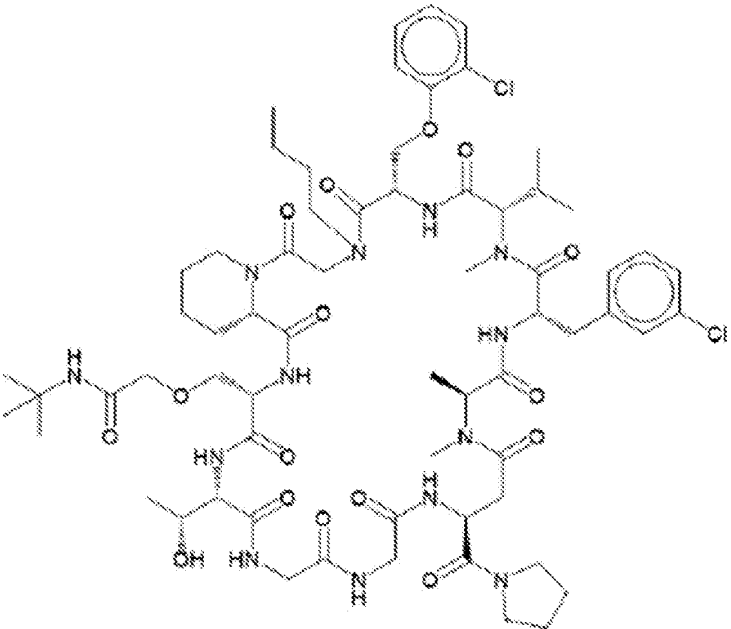
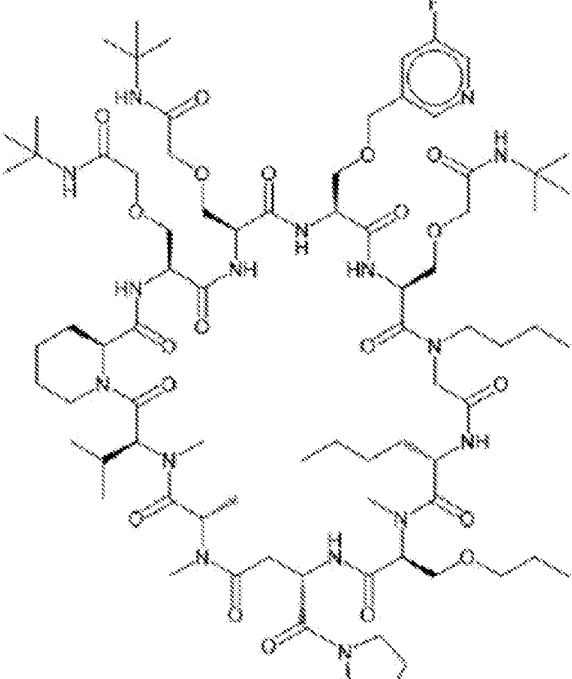
[0381] 合成した化合物 F F - 0 1 ~ F F - 0 7、C C - 0 1 ~ C C - 0 7、及び
C F - 0 1 ~ C F - 0 2 の構造式を表 2 0 ~ 2 6 に示す。

[0382]

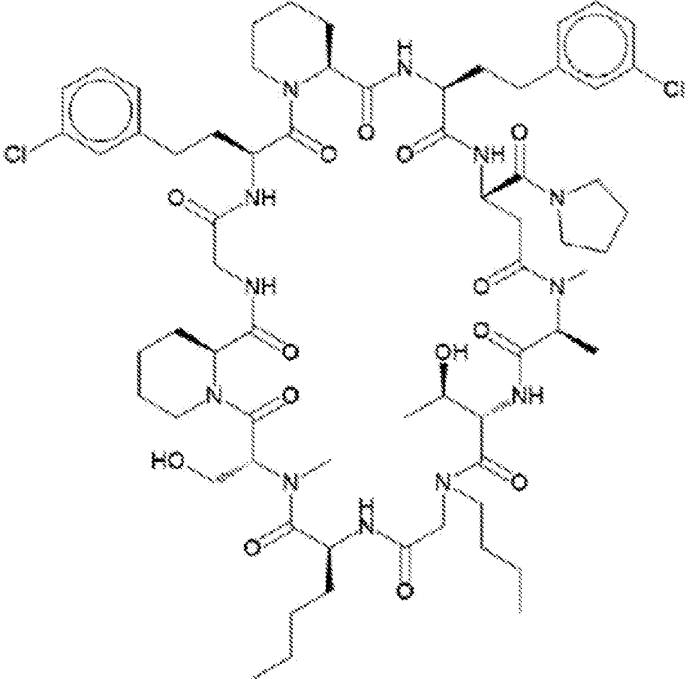
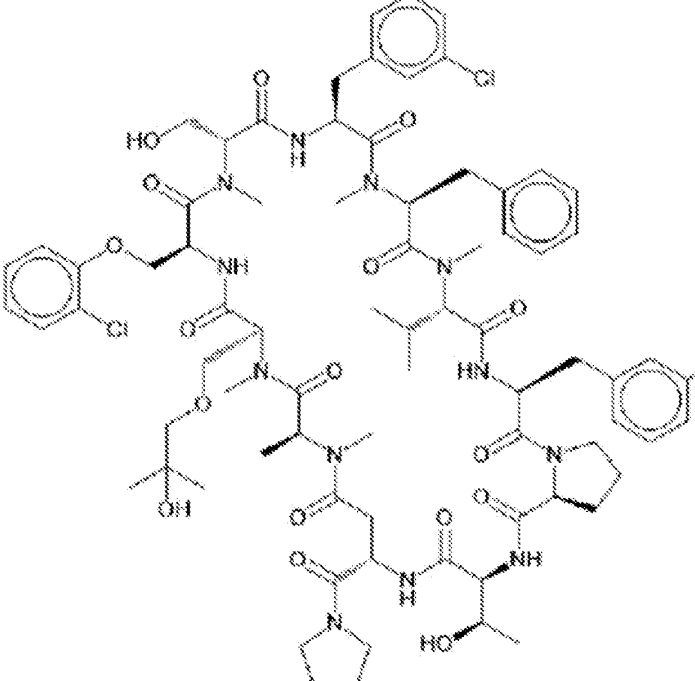
[表20]

化合物名	構造式
FF-01	
FF-02	
FF-03	

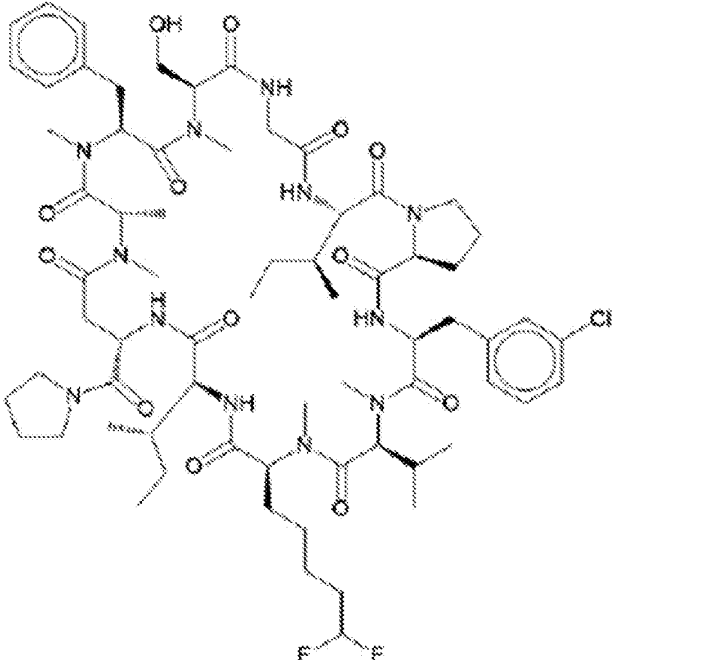
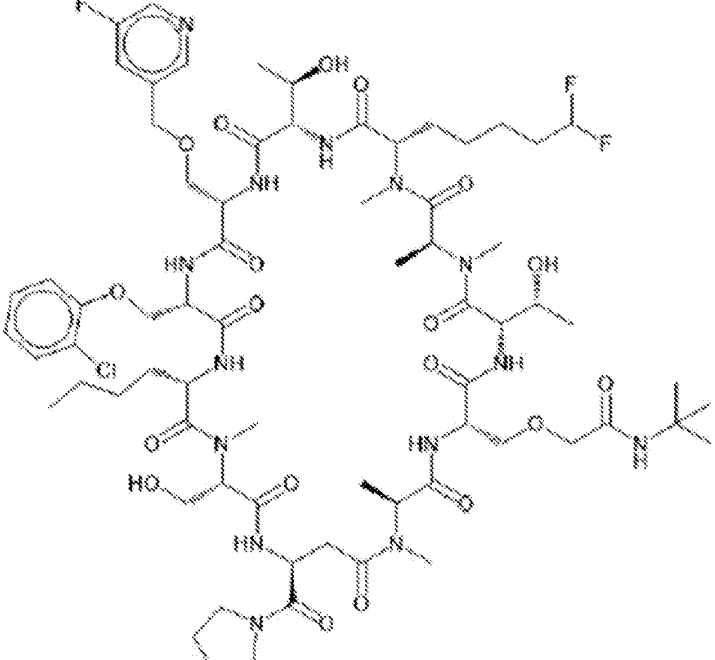
[0383] [表21]

化合物名	構造式
FF-04	 The chemical structure of FF-04 is a complex molecule featuring a central core with multiple amide and ester linkages. It includes a p-chlorophenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The structure also contains a piperidine ring, a pyrrolidine ring, and a hydroxyl group. The molecule is highly branched and contains several chiral centers.
FF-05	 The chemical structure of FF-05 is a complex molecule featuring a central core with multiple amide and ester linkages. It includes a 4-fluorophenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-chlorophenyl group. The structure also contains a piperidine ring, a pyrrolidine ring, and a hydroxyl group. The molecule is highly branched and contains several chiral centers.

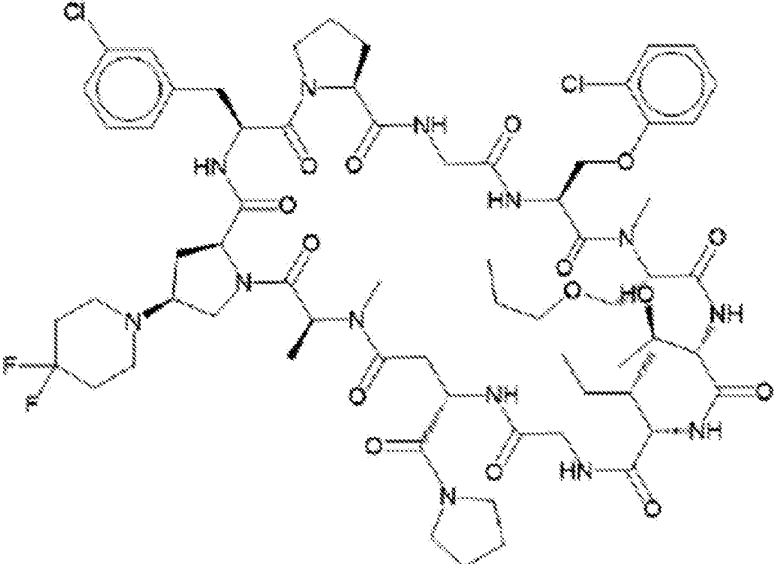
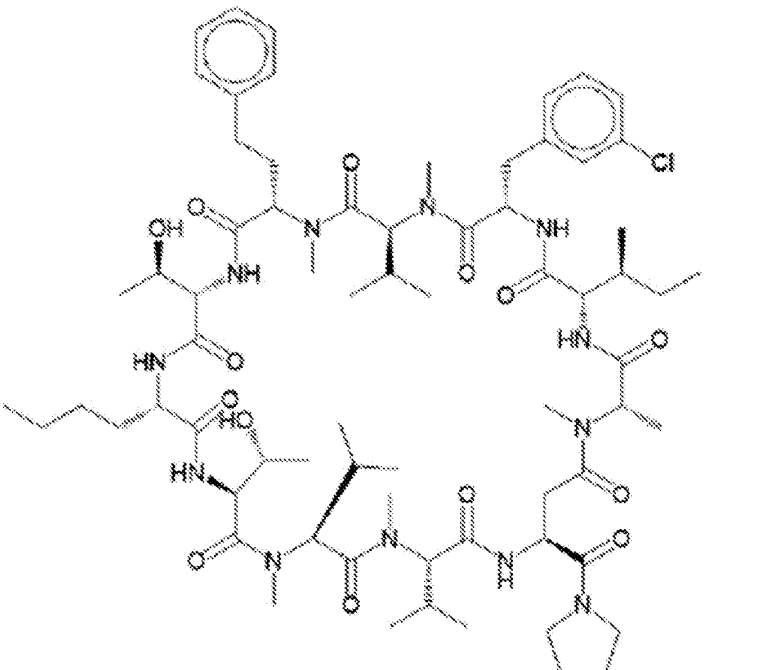
[0384] [表22]

化合物名	構造式
FF-06	 Chemical structure of compound FF-06, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a piperidine ring, a pyrrolidine ring, and a 4-chlorophenyl group. The structure includes a central amide linkage connecting a piperidine-containing side chain to a pyrrolidine-containing side chain, which is further substituted with a 4-chlorophenyl group and a hydroxyl group.
FF-07	 Chemical structure of compound FF-07, a complex molecule featuring multiple amide bonds, a piperidine ring, a pyrrolidine ring, and a 4-chlorophenyl group. The structure includes a central amide linkage connecting a piperidine-containing side chain to a pyrrolidine-containing side chain, which is further substituted with a 4-chlorophenyl group and a hydroxyl group.

[0386] [表24]

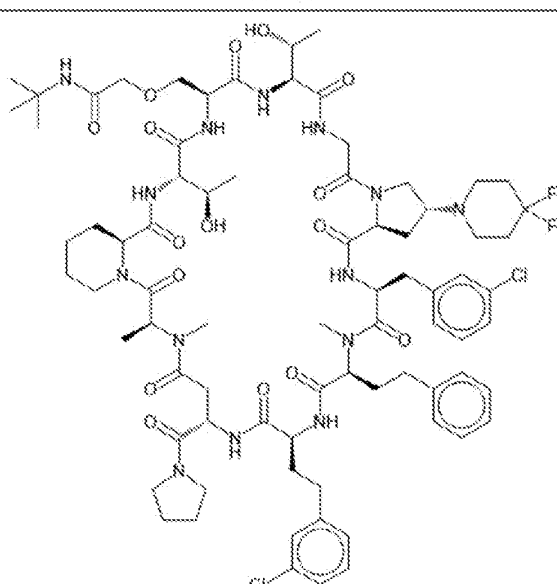
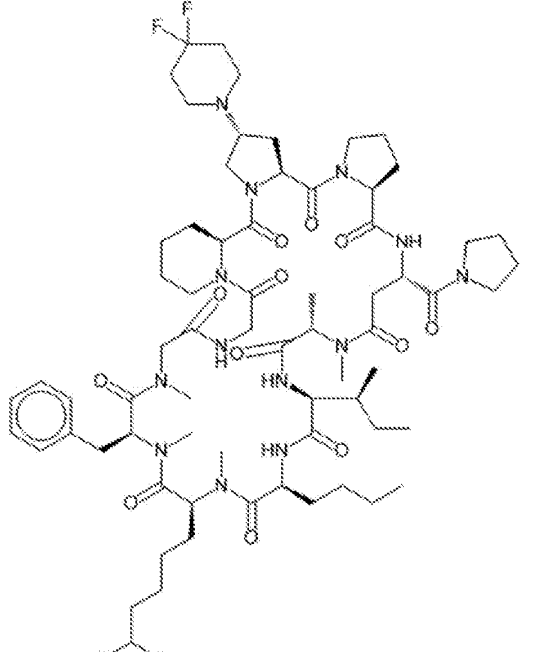
化合物名	構造式
CC-04	 The chemical structure of CC-04 is a complex molecule featuring a central core with multiple amide and ester linkages. It includes a phenyl ring, a hydroxyl group, a chlorine atom, and a fluorinated alkyl chain. The structure is highly branched and contains several chiral centers.
CC-05	 The chemical structure of CC-05 is a complex molecule featuring a central core with multiple amide and ester linkages. It includes a fluorinated phenyl ring, a chlorine atom, a hydroxyl group, and a fluorinated alkyl chain. The structure is highly branched and contains several chiral centers.

[0387] [表25]

化合物名	構造式
CC-06	 The chemical structure of CC-06 is a complex molecule featuring multiple amide and ester linkages. It includes a 4-chlorophenyl group, a 4-chlorophenyl ether, a 4-fluorophenyl group, and a 4-chlorophenyl group. The structure also contains a 4-chlorophenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-chlorophenyl group. The molecule is highly branched and contains several chiral centers.
CC-07	 The chemical structure of CC-07 is a complex molecule featuring multiple amide and ester linkages. It includes a 4-chlorophenyl group, a 4-chlorophenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-chlorophenyl group. The structure also contains a 4-chlorophenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-chlorophenyl group. The molecule is highly branched and contains several chiral centers.

[0388]

[表26]

化合物名	構造式
CF-01	
CF-02	

[0389] [実験例2：複数種類の標的タンパク質を融合させたフュージョンタンパク質をパニングに用いる手法の効果検証]

複数種類のタンパク質と複合体を形成するペプチドの取得効率向上させる

目的において、当該複数種類の標的タンパク質を融合させたフュージョンタンパク質を形成し、当該複数種類の標的タンパク質を近接させることの効果を検証した。

[0390] 具体的には、2種類の標的タンパク質を融合させたフュージョンタンパク質の利用により、両標的タンパク質を近接させた場合に、当該両標的タンパク質との複合体を形成するペプチドの回収率向上効果が得られるかを検証した。

[0391] [評価例1: Surface plasmon resonance (SPR) を利用した合成ペプチドの評価]

<評価例1-1: FKBP及びFRBと複合体を形成するペプチドの評価>
パニングにより取得したペプチドがFKBP及びFRBと複合体を形成しうるか否かをSPRにより評価した。測定はBiacore T200 (Cytiva) を用いて20℃で測定を実施した。

[0392] 具体的には、ピアコア用センサーチップSeries S sensor chip CAP (Cytiva) 上の全てのフローセルにBiotin CAPture reagentを固定化後、一部のフローセルにはFRB-FLAG-TEV-Avi-Bioを固定化した。アナライトとして、最高濃度を10 μMとした希釈系列のFKBP-FLAG-Sor-Hisと10 μMの合成ペプチドの混合溶液を調製し、全フローセルに添加して結合のセンサーグラムを取得した。Running bufferとしてはHBS (Nacal Tesque)、1mM Dithiothreitol、0.01% Tween 20に、Dimethylsulfoxide (DMSO) を終濃度4%になるよう添加した溶液を用いた。

[0393] 得られたセンサーグラムの解析は、T200 evaluation software (Cytiva) を用いて行った。FRB-FLAG-TEV-Avi-Bioが固定化されていないフローセルで得られたセンサーグラム、及びRunning buffer添加時に得られたセンサーグラムをダブルリファレンスとして差し引き、DMSO溶媒補正を施した。上記処

理を行ったセンサーグラムに対する 1 : 1 結合モデルを用いたカーブフィッティングから、結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、及び解離定数 K_D を決定した。一部のペプチドにおいては、平衡値解析により K_D を決定した。以上によって得られる K_D を、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のペプチド存在下での FRB と FKBP の結合の見かけの解離定数として、ペプチドが二つのタンパク質と複合体形成を誘起する指標と考えた。なお $10\text{ }\mu\text{M}$ FKBP-FLAG-S o r -H i s 溶液をアナライトとして添加した場合には結合レスポンスは観測されなかった。

[0394] 得られた K_D を以下に示す。

[表27]

化合物名	K_D [mol/L]
FF-01	1.3E-06
FF-02	5.5E-07
FF-03	5.2E-07
FF-04	7.1E-07
FF-05	3.0E-06
FF-06	1.2E-06
FF-07	6.1E-06

[0395] 上記の結果、FKBP 及び FRB の複合体形成を誘起するペプチドをパニングにより複数取得したことを確認した。

[0396] <評価例 1 - 2 : シクロフィリン A 及びカルシニューリンと複合体を形成するペプチドの評価>

パニングにより取得したペプチドがシクロフィリン A 及びカルシニューリンと複合体を形成しうるか否かを SPR により評価した。測定は B i a c o r e T 2 0 0 (C y t i v a) を用いて 20°C で測定を実施した。

[0397] 具体的には、ピアコア用センサーチップ S e r i e s S e n s o r c h i p C A P (C y t i v a) 上の全てのフローセルに B i o t i n C A P t u r e r e a g e n t を固定化後、一部のフローセルには C n

B-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioを固定化した。アナライトとして、最高濃度を $10\mu\text{M}$ とした希釈系列のCyA-FLAG-Sor-Hisと $10\mu\text{M}$ の合成ペプチドの混合溶液を調製し、 $1\mu\text{M}$ Calmodulin添加後のフローセルに添加して結合のセンサーグラムを取得した。Running bufferとしてはHBS (Nacalai tesque)、 1mM Dithiothreitol、 5mM CaCl_2 、 0.01% Tween 20に、DMSOを終濃度 4% になるよう添加した溶液を用いた。

[0398] 得られたセンサーグラムの解析は、T200 evaluation software (Cytiva) を用いて行った。CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioが固定化されていないフローセルで得られたセンサーグラム、及びRunning buffer添加時に得られたセンサーグラムをダブルリファレンスとして差し引き、DMSO溶媒補正を施した。上記処理を行ったセンサーグラムに対する $1:1$ 結合モデルを用いたカーブフィッティングから、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、及び解離定数 K_D を決定した。一部のペプチドにおいては、平衡値解析により K_D を決定した。以上によって得られる K_D を、 $10\mu\text{M}$ のペプチド存在下でのシクロフィリンAとカルシニューリンの結合の見かけの解離定数として、ペプチドが二つのタンパク質と複合体形成を誘起する指標と考えた。なお $10\mu\text{M}$ のペプチド存在下でのシクロフィリンAとカルシニューリンの結合は、 $1\mu\text{M}$ Calmodulinを添加しない条件でも確認できた。一方で、 $10\mu\text{M}$ CyA-FLAG-Sor-His溶液をアナライトとして添加した場合には結合レスポンスは観測されなかった。

[0399] 得られた K_D を以下に示す。

[表28]

化合物名	K_D [mol/L]
CC-01	3.7E-07
CC-02	5.7E-07
CC-03	4.0E-06
CC-04	2.1E-06
CC-05	6.4E-07
CC-06	5.4E-06
CC-07	1.9E-06

[0400] 上記の結果、シクロフィリンA及びカルシニューリンの複合体形成を誘起するペプチドをパニングにより複数取得したことを確認した。

[0401] <評価例1-3：FKBP及びカルシニューリンと複合体を形成するペプチドの評価>

パニングにより取得したペプチドがFKBP及びカルシニューリンと複合体を形成しうるか否かをSPRにより評価した。測定はBiacore T200 (Cytiva) を用いて20℃で実施した。

[0402] 具体的には、ピアコア用センサーチップSeries S sensor chip SA (Cytiva) 上の一部のフローセルにCnB-FLAG-TEV-Avi-bioを固定化後、10μMのビオチン溶液をすべてのフローセルに流した。アナライトとして、10μMの合成ペプチドを一定濃度で含む、最高濃度を20μMとしたFKBP-FLAG-Sor-Hisの希釈系列を調製し、1μM Calmodulin添加後のフローセルに添加して結合のセンサーグラムを取得した。Running bufferとしてはHBS (Nacalaitesque)、1mM Dithiothreitol、5mM CaCl₂、0.01% Tween 20にDMSOを終濃度4%になるよう添加した溶液を用いた。

[0403] 得られたセンサーグラムの解析は、Biacore T200 evaluation software (Cytiva) を用いて行った。CnB

－C n A－F L A G－T E V－A v i－b i oが固定化されていないフローセルで得られたセンサーグラム、及びR u n n i n g b u f f e r添加時に得られたセンサーグラムをダブルリファレンスとして差し引き、DMSO溶媒補正を施した。上記処理を行ったセンサーグラムに対する1：1結合モデルを用いたカーブフィッティングから、結合速度定数（ k_a ）、解離速度定数（ k_d ）、及び解離定数 K_D を決定した。以上によって得られる K_D を、10 μ Mのペプチド存在下でのF K B Pとカルシニューリンの見かけの解離定数として、ペプチドが二つのタンパク質と複合体形成を誘起する指標と考えた。なお、10 μ Mのペプチド存在下でのF K B Pとカルシニューリンの結合は、1 μ M C a l m o d u l i nを添加しない条件でも確認できた。一方で、20 μ M F K B P－F L A G－S o r－H i s溶液をアナライトとして添加した場合には結合レスポンスは観測されなかった。

[0404] 得られた K_D を以下に示す。

[表29]

化合物名	K_D [m o l / L]
C F－0 1	1 . 2 E－0 6
C F－0 2	1 . 8 E－0 6

[0405] [評価例2：フュージョンタンパク質を用いた検証]

＜評価例2－1：F K B P及びF R Bを標的タンパク質とするペプチドでの検証＞

実施例1－1のパニング実験によって得られたF K B P、F R Bと三者複合体を形成するペプチドが、フュージョンタンパク質の利用により取得できたのか否かを考察するため、合成例1で合成した各ペプチドのmRNAディスプレイ分子のプルダウン効率を比較することにより検証した。具体的には、ペプチドF F－0 1，F F－0 2，F F－0 3，F F－0 4を用いてmRNAとペプチドが連結されたディスプレイ分子を調製し、各種条件でプルダウンした際の各ペプチドのディスプレイ分子の回収率を検証した。

[0406] (調製例2-1-1: mRNAの調製 (FF-01~04))

鋳型DNA ((D-1) ~ (D-4)) から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro転写反応によりmRNA ((mR-1) ~ (mR-4)) を合成し、RNAClean XP (BECKMAN COULTER社) により精製した。

[0407] 鋳型DNA (D-1) の塩基配列 (配列番号15) (DNA配列: FF-01)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGCATTCGGGTGAGTGCC
ATACTAGTTCTTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0408] 鋳型DNA (D-2) の塩基配列 (配列番号16) (DNA配列: FF-02)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGTTTTTCGGAGTGCACTA
ACCAGCCGTTGTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0409] 鋳型DNA (D-3) の塩基配列 (配列番号17) (DNA配列: FF-03)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGTCTGGTCGTCATCTGT
GCCATATTAGGTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0410] 鋳型DNA (D-4) の塩基配列 (配列番号18) (DNA配列: FF-04)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGTGGGTTTTTGCTGTGCT
CTACTGGTGGTTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG

C A A A A A A A

[0411] mRNA (mR-1) の塩基配列 (配列番号 19) (RNA 配列: FF-01)

GGGUU AACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCAU
UCGGGUGAGUGCCAUACUAGUUCUUAGCCGACCG
GCACCGGCACCGGC A A A A A A A

[0412] mRNA (mR-2) の塩基配列 (配列番号 20) (RNA 配列: FF-02)

GGGUU AACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGUUU
UCGGAGUGCACUAACCAGCCGUUGUAGCCGACCG
GCACCGGCACCGGC A A A A A A A

[0413] mRNA (mR-3) の塩基配列 (配列番号 21) (RNA 配列: FF-03)

GGGUU AACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGUCU
GGUCGUCAUCUGUGCCAUAUUAGGUAGCCGACCG
GCACCGGCACCGGC A A A A A A A

[0414] mRNA (mR-4) の塩基配列 (配列番号 22) (RNA 配列: FF-04)

GGGUU AACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGUGG
GUUUUGCUGUGCUCUACUGGUGGUUAGCCGACCG
GCACCGGCACCGGC A A A A A A A

[0415] (調製例 2-1-2: mRNA-ペプチドディスプレイ分子の調製 (FF-01~04))

WO 2013/100132 に記載の方法に準じて、調製例 2-1-1 で精製した mRNA の 3' 末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結した。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述の a x PM-27 を用いた。これを翻訳し、WO 2017/150732 に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことにより mRNA-ペプチドのディスプレイ

レイ分子を調製した。

[0416] 〈調製例 2-1-2-1 : アミノアシル化 tRNA の調製 (FF-01~04)〉

翻訳に使用するアミノアシル化 tRNA に関しては実験例 1 の調製例 4-1 と同様に調製した。

[0417] 〈調製例 2-1-2-2 : mRNA-ペプチドディスプレイ分子の翻訳 (FF-01~04)〉

翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系である PURE system を用いた。具体的には、1 mM の GTP, 1 mM の ATP, 20 mM のクレアチンリン酸, 50 mM の HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM の酢酸カリウム, 5 mM の酢酸マグネシウム, 2 mM のスペルミジン, 1 mM のジチオスレイトール, 1 mg/mL E. coli MR E600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社) (非特許文献: Yokogawa T et al. 2010 に記載の方法に準じて、一部の tRNA を除去している), 3 μ M の in vitro 転写大腸菌 tRNA Ala1B, 4 μ g/mL のクレアチンキナーゼ, 6.72 U/mL のミオキナーゼ, 2 unit/mL の無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/mL のヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 0.4 Unit/ μ L の RNase in (登録商標) Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega), 0.26 μ M の EF-G, 2.7 μ M の IF1, 0.4 μ M の IF2, 1.5 μ M の IF3, 40 μ M の EF-Tu, 60 μ M の EF-Ts, 1 μ M の EF-P-Lys, 1.2 μ M の改変体 リボソーム (WO2021/117848), 1.37 μ M の AlaRS, 1 μ M の GlyRS, 0.04 μ M の IleRS, 0.11 μ M の LysRS, 0.16 μ M の ProRS, 0.09 μ M の ThrRS, 0.5 μ M の変異体 PheRS (WO2016/148044), 1 μ M の変異体 SerRS (WO2016/148044), 1 μ M の変異体 ValRS (WO2016/148044), 250 μ M のグリシン、10 μ M のイソロイシン

、250 μMのリジン、250 μMのプロリン、250 μMのスレオニン、2.5 mMのN-メチルアラニン、5 mMのN-メチルバリン、5 mMのN-メチルセリン、5 mMのN-メチルフェニルアラニン、調製例2-1-2-1で調製したElongatorアミノアシル化tRNA混合物、調製例2-1-2で調製した25 μM Initiatorアミノアシル化tRNA (WO2017/150732)、0.5 μM Penicillin G Amidase (PGA)、及び調製例2-1-2で調製したmRNA-ピユーロマイシン連結体を1 μMになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで翻訳を行った。

[0418] (評価例2-1-1：mRNA-ペプチドディスプレイ分子のプルダウンアッセイ (FF-01~04))

1×TBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen)、2 mM DTTを含むバッファーに、調製例2-1-2で調製したディスプレイ分子が0.3 μM、標的タンパク質が表30となるように添加して4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.08 mMとなるようにビオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。標的タンパク質は調製例1-1~1-5で調製したタンパク質を用い、下記の表で示す6条件を比較した。

[0419] [表30]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
3	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FRB-FLAG-Sor-His
4	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio
5	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His
6	標的タンパク質無し

[0420] 条件1はフュージョンタンパク質を用いた場合であり、2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2及び4はFKBPのみ、又はFRBの

みが系中に存在している条件である。条件3及び5はFKBPとFRBが存在している条件であるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされる標的タンパク質がそれぞれFKBP又はFRBとなる条件であり、2種類の標的タンパク質は近接していない条件である。条件6は標的タンパク非存在下の条件である。

[0421] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これをWash buffer (1×TBS, 2mM DTT, 0.1% Tween 20 (Sigma Aldrich), 500mM アルギニン) で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1×TEV buffer、1mM DTT、0.1U/μL AcTEVプロテアーゼ(サーモフィッシュサイエンティフィック社、#12575015)を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収してqPCRを実施した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー(Fw-primer及びRv-primer)を使用した。qPCRの反応液は、1×Ex taq buffer、0.2mM dNTP、0.5μM Fw-primer、0.5μM Rv-primer、50000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.025U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃10秒、57℃20秒、72℃30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。この際、標的タンパク質と混合する前の各ディスプレイ分子も同様にqPCRを行った。

[0422] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピュアロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0423] 標的タンパク質との結合により回収された各ディスプレイ分子の核酸量を、標的タンパク質と混合する前に存在していた各ディスプレイ分子の核酸量（インプットの値）で割ることで回収率を算出した。

[0424] 回収率（％）＝回収された核酸量（分子数）／インプットの核酸量（分子数）×１００

[0425] FF－０１、FF－０２、FF－０３、FF－０４の各ディスプレイ分子の回収率及び、条件１の回収率を条件２～６における各々の回収率で除して求めた比をそれぞれ表３１、表３２、表３３及び表３４にまとめた。

[0426] [表31]

ペプチド：FF－０１

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	1.15E+01	—
2	1.19E-02	963
3	1.02E-02	1120
4	4.46E-04	25691
5	3.77E-04	30450
6	7.11E-05	161292

[0427] [表32]

ペプチド：FF－０２

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	1.79E+00	—
2	1.06E-04	16961
3	4.87E-05	36771
4	6.51E-05	27532
5	9.80E-05	18290
6	3.96E-05	45250

[0428]

[表33]

ペプチド：FF－03

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	9.32E+00	—
2	1.49E-04	62390
3	2.68E-04	34754
4	7.71E-04	12078
5	7.06E-04	13191
6	8.16E-05	114154

[0429] [表34]

ペプチド：FF－04

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	7.11E+00	—
2	1.23E-04	57854
3	1.38E-04	51333
4	2.89E-04	24591
5	4.75E-04	14961
6	4.38E-05	162319

[0430] その結果、これら4種類のペプチド（FF－01～04）において調製例1－5で調製したフュージョントタンパク質により2種類の標的タンパク質であるFKBP及びFRBを近接させた条件1における回収率が、前記2種類の標的タンパクをそれぞれ個別に添加した条件3及び5の回収率と比較して少なくとも1100倍以上高いことが明らかとなった。これは前記2種類の標的タンパク質を近接させることで効率的にFKBP及びFRBと三者複合体を形成するペプチドをプルダウンできることを示唆しており、これらのペプチドが前記フュージョントタンパク質を用いたパニングにより取得できたことを強く示唆するものである。

[0431] 加えてこの結果は、実施例2で示したカウンターアッセイの手法により、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を同定できることを示している。すなわち、2種類の標的タンパク質が近接した状態で系中に存在する場合と、1種類の標的タンパク質のみが系中に存在する場合とのプルダウン効率の差異を指標に、複数種類の標的タンパク質と複合体を形成し得るペプチドをスクリーニングすることができることを示している。例えば本実施例においては、複数種類の標的分子を近接させた条件である条件1におけるディスプレイ分子の回収率と、単独の標的分子のみが存在する条件である条件2及び条件4におけるディスプレイ分子の回収率とを比較する手法が、条件3におけるディスプレイ分子の回収率と条件2におけるディスプレイ分子の回収率、又は条件5におけるディスプレイ分子の回収率と条件4におけるディスプレイ分子の回収率とを比較する既存の手法と比較して、目的分子であるペプチドを同定する感度に優れることが示されている。

なお、本実施例では、多様性の高いライブラリから目的分子を効率的に同定するためにパニングによる濃縮を行った上で調製されたディスプレイライブラリに対してカウンターアッセイを実施したが、当該カウンターアッセイにおいては、それぞれの条件下における各ディスプレイ分子の回収率を個別に確認・比較するため、より多様性の低いライブラリを用いる場合であればパニングを実施せずにディスプレイライブラリにカウンターアッセイを実施することでも目的分子を同定することが可能である。

[0432] <評価例2-2：シクロフィリンA及びカルシニューリンを標的タンパク質とするペプチドでの検証>

実施例1-2のパニング実験によって得られたシクロフィリンA、カルシニューリンと三者複合体を形成するペプチドが、フュージョンタンパク質の利用により取得できたのか否かを考察するため合成例1で合成した各ペプチドのmRNAディスプレイ分子のプルダウン効率（以降、これを回収率と呼ぶ）を比較することにより検証した。具体的には、ペプチドCC-01, CC-02, CC-03, CC-04を用いてmRNAとペプチドが連結され

たディスプレイ分子を調製し、各種条件における各ペプチドの回収率を検証した。

[0433] (調製例2-2-1: mRNAの調製(CC-01~04))

鋳型DNA((D-5)~(D-8))から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro転写反応によりmRNA((mR-5)~(mR-8))を合成し、RNAClean XP(BECKMAN COULTER社)により精製した。

[0434] 鋳型DNA(D-5)の塩基配列(配列番号23)(DNA配列: CC-01)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGCGTCAGCTGATTCGGT
GGGTTGTGACTTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0435] 鋳型DNA(D-6)の塩基配列(配列番号24)(DNA配列: CC-02)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGTGGTTTGTATAACTCGA
ACGTGGTGACTTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0436] 鋳型DNA(D-7)の塩基配列(配列番号25)(DNA配列: CC-03)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGATGCCGAGGAACGTTC
TTACTACTCAGTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0437] 鋳型DNA(D-8)の塩基配列(配列番号26)(DNA配列: CC-04)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA

T A A G G A G A T A T A A A T A T G T T T A G T G G T A T T C C G T
G G G T T G T G A T T T A G C C G A C C G G C A C C G G C A C C G G
C A A A A A A A

[0438] mRNA (mR-5) の塩基配列 (配列番号 27) (RNA 配列 : CC-01)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G C G U
C A G C U G A U U C G G U G G G U U G U G A C U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0439] mRNA (mR-6) の塩基配列 (配列番号 28) (RNA 配列 : CC-02)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G U G G
U U U G A U A A C U C G A A C G U G G U G A C U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0440] mRNA (mR-7) の塩基配列 (配列番号 29) (RNA 配列 : CC-03)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G A U G
C C G A G G A A C G U U C U U A C U A C U C A G U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0441] mRNA (mR-8) の塩基配列 (配列番号 30) (RNA 配列 : CC-04)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G U U U
A G U G G U A U U C C G U G G G U U G U G A U U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0442] (調製例 2-2-2 : mRNA-ペプチドディスプレイ分子の調製 (CC-01~04))

WO 2013/100132 に記載の方法に準じて、調製例 2-2-1 で精製した mRNA の 3' 末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結した。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述の a x PM-27 を用い

た。これを翻訳し、WO 2017/150732に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことによりmRNAーペプチドのディスプレイ分子を調製した。また、翻訳に必要な翻訳系及びアミノアシル化tRNAは実験例2の調製例2-1-2で使用したものを使用した。

[0443] (評価例2-2-1：mRNAディスプレイ分子のプルダウンアッセイ (C-C01~04))

1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーに、調製例2-2-2で調製したディスプレイ分子が0.3μM、Calmodulin (富士フイルム和光純薬) が2μM、標的タンパク質が表35のようになるように添加して4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.08mMとなるようにビオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。標的タンパク質は調製例2-1~2-5で調製した標的タンパク質を用い、下記の表で示す6条件を比較した。

[0444] [表35]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio
2	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio
3	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio
5	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His
6	標的タンパク質無し

[0445] 条件1はフュージョンタンパク質を用いた場合であり、2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2及び4はシクロフィリンAのみ、又はカルシニューリンのみが系中に存在している条件である。条件3及び5はシクロフィリンAとカルシニューリンが存在している条件であるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされる標的タンパク質がそれぞれシクロフィリンA又はカルシニューリンとなる条件であり、2種類の

標的タンパク質は近接していない条件である。条件6は標的タンパク非存在下の条件である。

[0446] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これをWash buffer (1×TBS, 2mM DTT, 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich), 500mM アルギニン) で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1×TEV buffer、1mM DTT、0.1U/μL AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエントフィック社、#12575015) を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収してqPCRを実施した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー (Forward primer及びReverse primer) を使用した。qPCRの反応液は、1×Ex taq buffer、0.2mM dNTP、0.5μM Forward primer、0.5μM Reverse primer、50000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.025U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA) を混合し、95℃で2分加熱後、95℃10秒、57℃20秒、72℃30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。この際、標的タンパク質と混合する前の各ディスプレイ分子も同様にqPCRを行った。

[0447] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μLになるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0448] 標的タンパク質との結合により回収された各ディスプレイ分子の核酸量を、標的タンパク質と混合する前に存在していた各ディスプレイ分子の核酸量 (インプットの値) で割ることで回収率を算出した。

[0449] 回収率 (%) = 回収された核酸量 (分子数) / インプットの核酸量 (分子数) × 100

[0450] CC-01、CC-02、CC-03、CC-04の各ディスプレイ分子の回収率及び、条件1の回収率を条件2～6における各々の回収率で除して求めた比をそれぞれ表36、表37、表38及び表39にまとめた。

[0451] [表36]

ペプチド : CC-01

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	1.09E+00	—
2	2.91E-04	3745
3	1.99E-02	55
4	8.14E-04	1338
5	2.26E-02	48
6	5.72E-05	19031

[0452] [表37]

ペプチド : CC-02

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	2.73E+00	—
2	5.53E-04	4944
3	1.07E-02	255
4	2.16E-03	1267
5	1.61E-02	170
6	3.54E-04	7730

[0453]

[表38]

ペプチド：CC-03

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	1.22E+00	—
2	3.47E-04	3525
3	1.36E-03	897
4	1.07E-03	1145
5	1.28E-03	954
6	2.61E-05	46858

[0454] [表39]

ペプチド：CC-04

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	1.92E+00	—
2	2.40E-03	800
3	2.06E-03	935
4	1.11E-03	1731
5	1.02E-03	1890
6	3.49E-04	5510

[0455] その結果、これら4種類のペプチド（CC-01～04）において調製例2～5で調製したフュージョントンパク質により2種類の標的タンパク質であるシクロフィリンA及びカルシニューリンを近接させた条件1における回収率が、前記2種類の標的タンパクをそれぞれ個別に添加した条件3及び5の回収率と比較して少なくとも40倍以上高いことが明らかとなった。これは前記2種類の標的タンパク質を近接させることで効率的にシクロフィリンA及びカルシニューリンと三者複合体を形成するペプチドをプルダウンできることを示唆しており、これらのペプチドが前記フュージョントンパク質を用いたパニングにより初めて取得できたことを強く示唆するものである。

[0456] 加えてこの結果は、実施例2で示したカウンターアッセイの手法により、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を同定できることを示

している。すなわち、2種類の標的タンパク質が近接した状態で系中に存在する場合と、1種類の標的タンパク質のみが系中に存在する場合とのプルダウン効率の差異を指標に、複数種類の標的タンパク質と複合体を形成し得るペプチドをスクリーニングすることができることを示している。例えば本実施例においては、複数種類の標的分子を近接させた条件である条件1におけるディスプレイ分子の回収率と、単独の標的分子のみが存在する条件である条件2及び条件4におけるディスプレイ分子の回収率とを比較する手法が、条件3におけるディスプレイ分子の回収率と条件2におけるディスプレイ分子の回収率、又は条件5におけるディスプレイ分子の回収率と条件4におけるディスプレイ分子の回収率とを比較する既存の手法と比較して、目的分子であるペプチドを同定する感度に優れることが示されている。

なお、本実施例では、多様性の高いライブラリから目的分子を効率的に同定するためにパニングによる濃縮を行った上で調製されたディスプレイライブラリに対してカウンターアッセイを実施したが、当該カウンターアッセイにおいては、それぞれの条件下における各ディスプレイ分子の回収率を個別に確認・比較するため、より多様性の低いライブラリを用いる場合であればパニングを実施せずにディスプレイライブラリにカウンターアッセイを実施することでも目的分子を同定することが可能である。

[0457] <評価例2-3：FKBP及びカルシニューリンを標的タンパク質とするペプチドでの検証>

実施例1-3のパニング実験によって得られたFKBP、カルシニューリンと三者複合体を形成するペプチドが、フュージョンタンパク質の利用により取得できたのか否かを考察するため、合成例1で合成した各ペプチドのmRNAディスプレイ分子のプルダウン効率を比較することにより検証した。具体的には、ペプチドCF-01、CF-02を用いてmRNAとペプチドが連結されたディスプレイ分子を調製し、各種条件でプルダウンした際の各ペプチドのディスプレイ分子の回収率を検証した。

[0458] (調製例2-3-1：mRNAの調製(CF-01, 02))

鋳型DNA ((D-9), (D-10)) から、T7 RNA polymeraseを用いた *in vitro* 転写反応により mRNA ((mR-9), (mR-10)) を合成し、RNAClean XP (BECKMAN COULTER社) により精製した。

[0459] 鋳型DNA (D-9) の塩基配列 (配列番号51) (DNA配列: CF-01)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAA
GGAGATATAAATATGTGCACTTCTACTGGTTACT
GGCTTCATTAGCCGACCGGCACCGGCACCGGCAA
AAAAA

[0460] 鋳型DNA (D-10) の塩基配列 (配列番号52) (DNA配列: CF-02)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAA
GGAGATATAAATATGATTAAACGTGTTTTTCGGGTT
GCTACCCGTAGCCGACCGGCACCGGCACCGGCAA
AAAAA

[0461] mRNA (mR-9) の塩基配列 (配列番号53) (RNA配列: CF-01)

GGGUUAAACUUUAAUAAGGAGAUUAUAAUAUGUGC
ACUUCUACUGGUUACUGGCUUCAUUAGCCGACCG
GCACCGGCACCGGCACCAAAAAA

[0462] mRNA (mR-10) の塩基配列 (配列番号54) (RNA配列: CF-02)

GGGUUAAACUUUAAUAAGGAGAUUAUAAUAUGAUU
AACGUGUUUUUCGGGUUGCUACCCGUAGCCGACCG
GCACCGGCACCGGCACCAAAAAA

[0463] (調製例2-3-2: mRNA-ペプチドディスプレイ分子の調製 (CF-01, 02))

WO 2 0 1 3 / 1 0 0 1 3 2 に記載の方法に準じて、調製例 2 - 3 - 1 で精製した mRNA の 3' 末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結した。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述の a x P M - 2 7 を用いた。これを翻訳し、WO 2 0 1 7 / 1 5 0 7 3 2 に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことにより mRNA - ペプチドのディスプレイ分子を調製した。また、翻訳に必要な翻訳系及びアミノアシル化 t R N A は実験例 1 の実施例 1 - 3 で使用したものを用いた。

[0464] (評価例 2 - 3 - 1 : mRNAディスプレイ分子のプルダウンアッセイ (C F - 0 1 , 0 2))

1 x T B S 、 2 m g / m L B S A (I n v i t r o g e n) 、 2 m M D T T 、 5 m M C a C l ₂ を含むバッファーに、ビオチン化標的タンパク質が表 4 0 のようになるように添加し、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して 1 0 分間 4 ° C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後、0 . 5 m M となるようにビオチンを加え、さらに 1 0 分間 4 ° C で転倒混和した。標的タンパク質は調製例 1 - 1 , 1 - 3 , 2 - 2 , 2 - 4 , 3 - 4 で調製した標的タンパク質を用い、下記の表で示す 6 条件を比較した。

[0465] [表40]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
3	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio
5	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His
6	標的タンパク無し

[0466] 条件 1 はフュージョンタンパク質を用いた場合であり、2 種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件 2 及び 4 は F K B P のみ、又はカルシニューリンのみが系中に存在している条件である。条件 3 及び 5 は F K B P とカルシニューリンが存在している条件であるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされる標的タンパク質がそれぞれ F K B P 又

はカルシニューリンとなる条件であり、2種類の標的タンパク質は近接していない条件である。条件6は標的タンパク非存在下の条件である。

[0467] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除き、一度Wash buffer (1×TBS, 2mM DTT, 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich), 500mM アルギニン) で洗浄後、調製例2-3-2で調製したディスプレイライブラリが0.2-0.3 μM、Calmodulin (富士フイルム和光純薬) が2 μM、非ビオチン化タンパク質を加える場合は表40に記載の濃度となるように加えて4℃で1時間転倒混和した。

[0468] ディスプレイライブラリと混合したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除き、これを前述のWash bufferで数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1×TEV buffer、1mM DTT、0.1 U/μL AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015) を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収してqPCRを実施した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー (Fw-primer及びRv-primer) を使用した。qPCRの反応液は、1×Ex taq buffer、0.2mM dNTP、0.5 μM Fw-primer、0.5 μM Rv-primer、50000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.025 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA) を混合し、95℃で2分加熱後、95℃10秒、57℃20秒、72℃30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。この際、標的タンパク質と混合する前の各ディスプレイ分子も同様にqPCRを行った。

[0469] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4

－3で調製したmRNA－ピューロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、 $1 \text{ E} + 8 / \mu\text{L}$ 、 $1 \text{ E} + 6 / \mu\text{L}$ 、 $1 \text{ E} + 4 / \mu\text{L}$ になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0470] 標的タンパク質との結合により回収された各ディスプレイ分子の核酸量を、標的タンパク質と混合する前に存在していた各ディスプレイ分子の核酸量（インプットの値）で割ることで回収率を算出した。

[0471] 回収率（%）＝回収された核酸量（分子数）／インプットの核酸量（分子数）×100

[0472] CF－01，CF－02の各ディスプレイ分子の回収率及び、条件1の回収率を、条件2～6における各々の回収率で除して求めた比をそれぞれ表41及び表42にまとめた。

[0473] [表41]

ペプチド：CF－01

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	4.58E-01	-
2	2.95E-06	155142
3	4.17E-03	110
4	1.11E-02	41
5	1.51E-02	30
6	1.14E-05	40313

[0474] [表42]

ペプチド：CF－02

条件	回収率 (%)	条件1の回収率 / 回収率
1	1.09E+00	-
2	1.27E-05	85434
3	7.83E-03	139
4	4.25E-03	256
5	2.14E-02	51
6	2.23E-06	488308

[0475] その結果、これら2種類のペプチド（CF－01，02）において調製例3－4で調製したフュージョンタンパク質により2種類の標的タンパク質で

あるFKBP及びカルシニューリンを近接させた条件1における回収率が、前記2種類の標的タンパクをそれぞれ個別に添加した条件3及び5の回収率と比較して少なくとも30倍以上高いことが明らかとなった。これは前記2種類の標的タンパク質を近接させることで効率的にFKBP及びカルシニューリンと三者複合体を形成するペプチドをプルダウンできることを示唆しており、これらのペプチドが前記フュージョンタンパク質を用いたパニングにより初めて取得できたことを強く示唆するものである。

[0476] 加えてこの結果は、実施例2で示したカウンターアッセイの手法により、複数種類の標的分子との複合体を形成し得る目的分子を同定できることを示している。すなわち、2種類の標的タンパク質が近接した状態で系中に存在する場合と、1種類の標的タンパク質のみが系中に存在する場合とのプルダウン効率の差異を指標に、複数種類の標的タンパク質と複合体を形成し得るペプチドをスクリーニングすることができることを示している。例えば本実施例においては、複数種類の標的分子を近接させた条件である条件1におけるディスプレイ分子の回収率と、単独の標的分子のみが存在する条件である条件2及び条件4におけるディスプレイ分子の回収率とを比較する手法が、条件3におけるディスプレイ分子の回収率と条件2におけるディスプレイ分子の回収率、又は条件5におけるディスプレイ分子の回収率と条件4におけるディスプレイ分子の回収率とを比較する既存の手法と比較して、目的分子であるペプチドを同定する感度に優れることが示されている。

なお、本実施例では、多様性の高いライブラリから目的分子を効率的に同定するためにパニングによる濃縮を行った上で調製されたディスプレイライブラリに対してカウンターアッセイを実施したが、当該カウンターアッセイにおいては、それぞれの条件下における各ディスプレイ分子の回収率を個別に確認・比較するため、より多様性の低いライブラリを用いる場合であればパニングを実施せずにディスプレイライブラリにカウンターアッセイを実施することでも目的分子を同定することが可能である。

[0477] [評価例2-4：フュージョンタンパク質を用いたパニングで得られたDN

A プールの解析]

評価例 2-1、2-2 及び 2-3 は、2 種類の標的タンパク質が近接した条件におけるディスプレイ分子の回収率と、それぞれの標的タンパク質が単独で系中に存在する条件における回収率との差異が、複数種類の標的タンパク質と複合体を形成し得るペプチドである目的分子を同定するために極めて有用な一つの指標であることを示しており、実験例 1 の実施例 2 で実施した目的分子としての条件を満たすペプチドを選定するための手法としての妥当性を示すものである。

[0478] これを踏まえ、フュージョンタンパク質を用いたパニングにより濃縮した各ラウンドの DNA プールの中で頻度の高い上位 100 配列において、実施例 2 のカウンターアッセイにて定義される目的分子としての条件を満たすペプチドがどの程度の割合を占めるか解析し、表 4-3 及び表 4-4 にまとめた。

[0479] [表43]

F K B P 及び F R B のフュージョンタンパク質を用いたパニングで取得された DNA プールの解析

パニングを実施したラウンド数	頻度上位100配列中に含まれる当該分子候補の数
3	80
4	82

[0480] [表44]

シクロフィリン A 及びカルシニューリンのフュージョンタンパク質を用いたパニングで取得された DNA プールの解析

パニングを実施したラウンド数	頻度上位100配列中に含まれる当該分子候補の数
3	89
4	87

[0481] その結果驚くべきことに、実験例 1 の実施例 1 で示されるように、本実施例で用いたライブラリ中には各標的タンパク質に単独で結合するようなペプチドが存在することが強く示唆されるにも関わらず、複数種類の標的タンパ

ク質と複合体を形成し得るペプチドである目的分子が頻度上位 100 配列のうち 8 割以上を占め、優先的に取得されることが明らかになった。このことはフュージョントタンパク質を用いてパニングを実施することが、複数種類の標的分子と複合体を形成し得るペプチドである目的分子の取得に極めて有用であることを強く示唆するものである。

[0482] 評価例 1 及び 2 により構成される実験例 2 の結果より、複数種類の標的タンパク質（標的分子）からなる標的フュージョントタンパク質（標的融合分子）を用いたパニングを行うことで、当該複数種類の標的タンパク質との複合体を形成するペプチド（目的分子）をライブラリ中に存在するその他のペプチド（候補分子）の中から効率良く取得可能であることが示された。

特定の理論に拘束されることを意図しないが、このようなことが可能となるのは、複数種類の標的タンパク質をフュージョントタンパク質とすることで、当該複数種類の標的タンパク質同士が近接し、当該複数種類の標的タンパク質とペプチドの複合体がより安定となるためであると考えられる。

[0483] [評価例 2-5：フュージョントタンパク質のリンカー長についての検証]

評価例 2-1, 2-2 及び 2-3 により、フュージョントタンパク質を利用することで複数標的と複合体を形成するペプチドを効率的にプルダウンできることが示されている。そこで次に、このプルダウン効率へのフュージョントタンパク質のリンカー長の影響を FKBP と FRB のタンパク質のペアを用いて検証した。

[0484] [調製例 2-5-1：リンカー長の異なる FKBP-FRB フュージョントタンパク質群の調製]

<調製例 2-5-1-1：His-FKBP-(54)-FRB-FLAG-TEV-Avi-bio の調製>

検討に使用する標的タンパク質として、FKBP と FRB をリンカーで連結し、N 末端に精製タグ、C 末端に精製タグ、TEV プロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加したフュージョントタンパク質である、His-FKBP-(54)-FRB-FLAG-TEV-Avi-bio を大

腸菌で発現・精製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0485] His-FKBP-(54)-FRB-FLAG-TEV-Avi-bio
oのアミノ酸配列(配列番号55)
MH H H H H H S G G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H
Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W
E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P
H A T L V F D V E L L K L E G S G G G S G G G G S G G G G S G G G G
S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G T
E L I R V A I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F
E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q
E W C R K Y M K S G N V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K Q G G
G S S D Y K D D D D K S S G E N L Y F Q S S G G G L N D I F E A Q K *
I E W H E

[0486] 具体的には、pCDFDuet-1にHis-FKBP-(54)-FRB-FLAG-TEV-Avi-bio及びビオチンライゲース(BirA)の遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21(DE3)を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.4から0.6程度になるまでLB培地で培養し、1mMのIPTG及び100μMのビオチンにより誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを8000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。

[0487] 回収した培養菌体にDisruption buffer(50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, Protease inhibitor cocktail)を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、10分、4℃で遠心し上清を回収したのち0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0488] ライセートサンプルを、Streptactin XT 4flow H

C (I B A , # 2 - 5 0 3 0 - 0 1 0) 5 m L レジンを用いて精製した。精製には E q u i l i b r a t i o n b u f f e r (5 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 5 , 3 0 0 m M N a C l , 1 m M T C E P) 及び E l u t i o n b u f f e r (5 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 5 , 3 0 0 m M N a C l , 1 m M T C E P , 5 0 m M D - b i o t i n) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、A m i c o n U l t r a - 1 5 1 0 K (M E R C K , # U F C 9 0 1 0 2 4) で濃縮した。

[0489] 濃縮したサンプルを H i L o a d 1 6 / 6 0 0 S u p e r d e x 7 5 p g (C y t i v a , # 2 8 - 9 8 9 3 - 3 3) を用いてゲル濾過精製した。精製には R u n n i n g b u f f e r (5 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 5 , 3 0 0 m M N a C l , 1 m M T C E P) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収した後、A m i c o n U l t r a - 1 5 1 0 K (M E R C K , # U F C 9 0 1 0 2 4) で濃縮し、目的タンパク質 H i s - F K B P - (5 4) - F R B - F L A G - T E V - A v i - b i o を得た。サンプルは - 8 0 ° C にて保存した。

[0490] <調製例 2 - 5 - 1 - 2 : b i o - A v i - T E V - F L A G - F K B P - (2 3) - F R B - H i s の調製>

検討に使用する標的タンパク質として、F K B P と F R B をリンカーで連結し、N 末端に精製タグ、T E V プロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを、C 末端に精製タグを付加したフュージョンタンパク質である、b i o - A v i - T E V - F L A G - F K B P - (2 3) - F R B - H i s を、大腸菌で発現・精製した。「K*」は、ビオチン化された L y s を表している。

[0491] b i o - A v i - T E V - F L A G - F K B P - (2 3) - F R B - H i s のアミノ酸配列 (配列番号 5 6)

M G L N D I F E A Q K * I E W H E S S G E N L Y F Q S G G G S S D Y K
D D D D K S G G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T
G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E

GVAQMSVGQRAKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHA
TLVFDVELLKLEGGSSSGSSGLEVL FQGPSSGSS
GSSSGSSGTELRVA I L WHEMWHEGLEEASRLYFG
ERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAY
GRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVF
RRISKQGGGSSHHHHHH

- [0492] 具体的には、pCDFDuet-1にbio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-(23)-FRB-His及びビオチンライゲース(BirA)の遺伝子配列をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21(DE3)を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.4から0.6程度になるまでLB培地で培養し、1mMのIPTG及び100μMのビオチンにより誘導をかけ、23℃で18時間培養した後、サンプルを8000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。
- [0493] 回収した培養菌体にDisruption buffer (50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000 (v/v) Benzonase, Protease inhibitor cocktail)を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心し上清を回収した。さらにその上清を15000×g、4℃で10分以上遠心したのち0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。
- [0494] ライセートサンプルを、Streptactin XT Superflow HC (IBA, #2-4030-010) 5mLレジンをを用いて精製した。精製にはBinding buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP) 及びElution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP, 50mM D-biotin)を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultr

a-15 10K (MERCK、#UFC901024) で濃縮した。

[0495] 濃縮したサンプルをHiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-343) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Running buffer で希釈した後、0.22 μ m フィルターで濾過し、目的タンパク質 bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-(23)-FRB-His を得た。サンプルは-80°C にて保存した。

[0496] <調製例 2-5-1-3: FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His の調製>

検討に使用する標的タンパク質として、N末端に精製タグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグ、C末端に精製タグ及びソルターゼ認識配列を付加したFKBPである、FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His を大腸菌で発現・精製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0497] FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His のアミノ酸配列 (配列番号 57)

MDYKDDDDKGGSSGLNDIFEAQK*IEWHESSGENLY
YFQGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY
TGMLEDGKKFDSSRDRNKPFFKFM LGKQEVIRGWE
EGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPH
ATLVFDVELLKLEGGGSSLPMTGGGGSSHHHHHH

[0498] 具体的には、pCDFDuet-1 に FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His 及びビオチンライゲース (BirA) の遺伝子をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀ が 0.6 になるまで LB 培地で培養し、終濃度 0.1 mM の IPTG 及び 100 μ M のビオチンとなるよう

に加えて誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを8000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。

- [0499] 回収した培養菌体にDisruption buffer (50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000 (v/v) Benzonase, Protease inhibitor cocktail) を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、ホモジナイズした。このサンプルを、30000×g、60分、4℃で遠心したのち、上清を0.22μmフィルターに通し、ライセートサンプルとした。
- [0500] ライセートサンプルを、Strep Tactin XT 4flow HC (IBA, #2-5030-010) 5mLレジンを用いて精製した。精製にはEquilibration buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP) 及びElution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP, 50mM D-biotin) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した。
- [0501] 濃縮したサンプルをHiLoad 16/600 Superdex 75pg (Cytiva, #28-9893-33) を用いてゲル濾過精製した。精製にはEquilibration buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した後、目的タンパク質FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-Hisを得た。サンプルは-80℃にて保存した。
- [0502] <調製例2-5-1-4: bio-Avi-TEV-FRB-FLAGの調製>
- 検討に使用する標的タンパク質として、N末端にTEVプロテアーゼ切断

タグ、ビオチン化酵素認識タグ、C末端に精製タグを付加したFRBである、bio-Avi-TEV-FRB-FLAGを大腸菌で発現・精製した。

「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0503] bio-Avi-TEV-FRB-FLAGのアミノ酸配列（配列番号58）

MGLNDIFEAQK*IEWHESSGENLYFQGGGGSELIR
VAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLE
PLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCR
KYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQGGGSSD
YKDDDDK

[0504] 具体的には、pCDFDuet-1にbio-Avi-TEV-FRB-FLAG及びビオチンライゲース（BirA）の遺伝子をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21（DE3）を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.4から0.6程度になるまでLB培地で培養し、終濃度1mMのIPTG及び100μMのビオチンとなるように加えて誘導をかけ、18℃で16時間培養した後、サンプルを8000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。

[0505] 回収した培養菌体にDisruption buffer（50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000（v/v）Benzonase, Protease inhibitor cocktail）を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、超音波破碎した。このサンプルを、15000×g、30分、4℃で遠心したのち、上清を0.22μmフィルターに通し、ライセートサンプルとした。

[0506] ライセートサンプルを、Strep Tactin XT 4flow HC（IBA, #2-5030-010）5mLレジンをを用いて精製した。精製にはEquilibration buffer（50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP）及びE

lution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM TCEP, 50mM D-biotin) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

[0507] 回収したサンプルの一部をHiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-33) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、bio-Avi-TEV-FRB-FLAGを得た。サンプルは-80℃にて保存した。

[0508] <調製例2-5-1-5: FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-(14)-FRB-FLAGの調製>

検討に使用する標的タンパク質として、調製例2-5-1-3で調製したC末端にソルターゼ認識配列を含むFLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His、及び、調製例2-5-1-4で調製したbio-Avi-TEV-FRB-FLAGをTEVプロテアーゼ処理することでN末端にソルターゼ認識配列を露出させたGGG-FRB-FLAGの2種類のタンパク質に対し、調製例3-3で調製したソルターゼを用いたペプチド連結反応を行うことにより、FRBのN末端とFKBPのC末端をペプチドリンカーで連結させたフュージョンタンパク質を調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0509] FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-(14)-FRB-FLAGのアミノ酸配列 (配列番号59)

MDYKDDDDKGGSSGLNDIFEAQK*IEWHESSGENLYFQGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWE
EGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH
ATLVFDVELLKLEGGGSSLPMTGGGGSELIRVAI
LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLH

AMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYM
KSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQGGGSSDYKD
DDDK

[0510] (調製例2-5-1-5-1: TEVプロテアーゼ反応によるFRBのN末端タグの除去)

調製例2-5-1-4で調製したbio-Avi-TEV-FRB-FLAGについて、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、N末端のタグ配列を切断した。

具体的には、42.5 μ Lのbio-Avi-TEV-FRB-FLAGに対して、TEV溶出液として、1×TEV buffer、1mM DTT、0.1 U/ μ L AcTEVプロテアーゼ(サーモフィッシャーサイエントフィック社、#12575015)を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

TEVプロテアーゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0511] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen, 10103D)と混合して4℃で30分間、ついで、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して4℃で30分間転倒混和することにより、精製サンプルとした。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK、#UFC501096)で濃縮した後、Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWC0, 0.5 mL (サーモフィッシャーサイエントフィック社、#89883)を用いて、製品添付の基本プロトコルに従いbuffer交換(50mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl, 1mM DTT)を実施し、N末端のタグ配列が切断され、ソルターゼ認識配列が露出したGGG-FRB-FLAGを得た。

[0512] (調製例 2-5-1-5-2: ソルターゼ反応による FKBP への FRB の付加)

Reaction Buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂) 中、40μM FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His、40μM GG-FRB-FLAG、1μM eSrtA を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

ソルターゼ反応の前後のサンプルを SDS-PAGE 分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0513] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen, 10103D) と混合して 4℃で 10 分間転倒混和し、上清を回収した。その後、Strep-Tactin XT Sepharose chromatography resin (Cytiva, 29401324)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及び Elution buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 50mM biotin) を用いて粗精製をした。粗精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。

[0514] 粗精製後のサンプルを、Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, #29148721) を用いてゲル濾過精製した。精製には Running buffer (50mM HEPES pH7.5, 300mM NaCl, 1mM DTT) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収後濃縮し、FRB の N 末端と FKBP の C 末端をペプチドリンカーで連結させた目的タンパク質 FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-(14)-FRB-FLAG を得た。

[0515] <評価例 2-5-1: Linker 長の異なるフュージョンタンパク質に対

する mRNA-ペプチドディスプレイ分子（FF-01～04）のプルダウンアッセイ>

1×TBS、2mg/mL BSA（Invitrogen）、2mM DTTを含むバッファーに、調製例2-1-2に準ずる方法で調製したディスプレイ分子が0.2～0.3μM、標的タンパク質が表45となるように添加して4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.04mMとなるようにビオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。標的タンパク質は調製例2-5-1-1，2-5-1-2，2-5-1-5で調製したタンパク質を用い、下記の表で示す4条件を比較した。

[0516] [表45]

条件	標的タンパク質	リンカー長 (AA)
1	0.4 μM His-FKBP-(54)-FRB-FLAG-TEV-Avi-bio	54
2	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-(23)-FRB-His	23
3	0.4 μM FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-(14)-FRB-FLAG	14
4	標的タンパク無し	-

[0517] 条件1～3はFKBPとFRBのフュージョンタンパク質を用いた場合であり、それぞれフュージョンタンパク質の融合部であるペプチドリンカーの長さが、54アミノ酸残基、23アミノ酸残基、14アミノ酸残基となっているものである。条件4は標的タンパク非存在下の条件である。

[0518] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これをWash buffer（1×TBS，2mM DTT，0.1% Tween20（Sigma Aldrich），500mM アルギニン）で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1×TEV buffer、1mM DTT、0.1U/μL AcTEVプロテアーゼ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、#12575015）を、洗浄後のストレプトアビジン

コーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収してqPCRを実施した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（Fw-primer及びRv-primer）を使用した。qPCRの反応液は、1×Ex taq buffer、0.2mM dNTP、0.5μM Fw-primer、0.5μM Rv-primer、50000倍希釈 SYBR Green I（Lonza, #50513）、0.025U/μL Ex Taq polymerase（TAKARA）を混合し、95℃で2分加熱後、95℃10秒、57℃20秒、72℃30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。この際、標的タンパク質と混合する前の各ディスプレイ分子も同様にqPCRを行った。

[0519] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピュロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0520] 標的タンパク質との結合により回収された各ディスプレイ分子の核酸量を、標的タンパク質と混合する前に存在していた各ディスプレイ分子の核酸量（インプットの値）で割ることで回収率を算出した。

[0521] 回収率（%）＝回収された核酸量（分子数）／インプットの核酸量（分子数）×100

[0522] 条件1～4における、FF-01、FF-02、FF-03、FF-04の各ディスプレイ分子の回収率を表46にまとめた。

[0523] [表46]

条件	回収率 (%)			
	FF-01	FF-02	FF-03	FF-04
1	8.09E+00	1.88E+00	1.38E+01	6.87E+00
2	8.81E+00	2.09E+00	1.31E+01	6.65E+00
3	6.36E+00	1.26E+00	8.14E+00	5.30E+00
4	4.11E-05	4.11E-05	2.25E-04	3.12E-04

[0524] その結果、これら4種類のペプチド（FF-01～04）において、調製例2-5-1-1、2-5-1-2、2-5-1-5で調製したフュージョ

ンタンパク質により2種類の標的タンパク質であるFKBP及びFRBを近接させた条件1～3における回収率が、標的タンパク質非存在下の条件4の回収率と比較して少なくとも16000倍以上高いことが明らかとなった。

これら条件1～3における回収率及び評価例2-1-1におけるFKBPとFRBが近接していない条件での回収率を踏まえると、フュージョンタンパク質の融合部であるペプチドリンカーの長さがそれぞれ54アミノ酸残基、23アミノ酸残基、14アミノ酸残基のいずれの長さであっても、本系においては発明の効果を得られることを強く示唆するものであった。

[0525] 〔評価例2-6：フュージョンタンパク質における各タンパク質のN末端及びC末端の繋ぎ方に関する検証〕

評価例2-1、2-2及び2-3により、フュージョンタンパク質を利用することで複数標的と複合体を形成するペプチドを効率的にプルダウンできることが示されている。そこで次に、このプルダウン効率へのフュージョンタンパク質における2種類のタンパクの末端同士の繋ぎ方の影響を、FKBPとFRBのタンパク質のペアを用いて検証した。

[0526] 〔調製例2-6-1：FKBPとFRBのN末端及びC末端の繋ぎ方が異なるFKBP-FRBフュージョンタンパク質群の調製〕

＜調製例2-6-1-1：GL-FRB-FLAGの調製＞

検討に使用する標的タンパク質として、N末端にOaAEP1認識配列、C末端に精製タグを付加したFRBである、GL-FRB-FLAGを大腸菌で発現・精製した。

[0527] GL-FRB-FLAGのアミノ酸配列（配列番号60）

GLGGGGSGGGGSELIRVAILWHEMWHEGLEEASR
LYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSF
NQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDL
YHVFRRISKQGGGSSDYKDDDDK

[0528] 具体的には、pET11aにHis-TEV-FRB-FLAGの遺伝子をクローニングして調製した発現ベクターを用い、大腸菌BL21（DE3

）を形質転換して発現株を作成した。OD₆₀₀が0.6になるまでLB培地で培養し、終濃度1mMのIPTGとなるように加えて誘導をかけ、18℃で18時間培養した後、サンプルを8000×g、15分、4℃で遠心して培養菌体を回収した。

[0529] 回収した培養菌体にDisruption buffer (50mM Tris-HCl pH7.0, 200mM NaCl, 1mM TCEP, 0.1% CHAPS, 0.1mg/mL lysozyme, 1/1000 (v/v) Benzonase) を用いて懸濁し、室温で20分攪拌した後、ホモジナイズした。このサンプルを、40000rpm、60分、4℃で遠心したのち、上清を回収し、さらに0.22μmフィルターを通し、ライセートサンプルとした。

[0530] ライセートサンプルを、His Trap HP 5mL (Cytiva, 17524801) を用いて精製した。精製にはEquilibration buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 20mM imidazole, 1mM TCEP) 及びElution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 250mM imidazole, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収した。

[0531] 回収したサンプルについて、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼを目的タンパク質100μgに対して5μgとなるように加え、4℃で終夜処理をすることにより、原料タンパク質のN末端の精製タグを除去した。同時に、Dialysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 20mM imidazole, 1mM TCEP) で透析した。

[0532] TEVプロテアーゼ処理をしたサンプルをHis Trap HP 5mL (Cytiva, 17524801) を用いて精製した。精製にはEquilibration buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 20mM imidazole, 1mM

TCEP) 及び Elution buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 250mM imidazole, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した。

[0533] 濃縮したサンプルを HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-33) を用いてゲル濾過精製した。精製には Equilibration buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM TCEP) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、Amicon Ultra-15 10K (MERCK, #UFC901024) で濃縮した後、目的タンパク質 GL-FRB-FLAG を得た。サンプルは -80℃ にて保存した。

[0534] <調製例 2-6-1-2: 酵素的なペプチド連結反応を利用した FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FRB-FLAG (N-to-C) の調製>

調製例 2-5-1-3 で調製した C 末端にソルターゼ認識配列を含む FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His、及び、調製例 2-6-1-1 で調製した N 末端に OaAEP1 ライゲース認識配列を含む GL-FRB-FLAG に対し、調製例 3-3 で調製したソルターゼ、及び、調製例 3-2 で調製した OaAEP1 を用いた 2 段階のペプチド連結反応により、FRB の N 末端と FKBP の C 末端をペプチドリンカーで連結させたフュージョンタンパク質を調製した。「K*」は、ビオチン化された Lys を表している。

[0535] FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FRB-FLAG (N-to-C) のアミノ酸配列 (配列番号 61)

MDYKDDDDKGGSSGLNDIFEAQK*IEWHESSGENLYFQGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY

T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E
E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H
A T L V F D V E L L K L E G G G S S L P M T G G G G G G G S G G G G
S G G G G S G G G G S N G L G G G G S G G G G S E L I R V A I L W H
E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M
E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S G
N V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K Q G G G S S D Y K D D D D
K

[0536] ペプチドリンカーGGG-(G4S)-4-NGLHのアミノ酸配列（配列番号62）

GGGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSSNGLH

[0537] （調製例2-6-1-2-1：ソルターゼ反応によるFKBPへのペプチドリンカーの付加）

Reaction Buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂) 中、100μM FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His、1mM GGG-(G4S)-4-NGLH（スクラム社にて合成）、1μM eSrtAを氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

ソルターゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0538] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen, 10103D) と混合して4℃で10分間転倒混和し、上清を回収することで粗精製サンプルを得た。その後、Strep-Tactin XT Sepharose chromatography resin (Cytiva, 29401324)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及びElu

tion buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 50mM biotin) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従って行った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK、#UFC501096) で濃縮することで、FKBPのC末端にLinkerが付加した複合体FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-GGG-(G4S)4-NGLHを得た。

[0539] (調製例2-6-1-2-2: OaAEP1反応によるFKBP-ペプチドリンカー複合体へのFRBの付加)

具体的には、29.3 μ M FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-GGG-(G4S)4-NGLH、29.3 μ M FRB-FLAG、293 μ M NiCl₂、0.44 μ M OaAEP1を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

OaAEP1反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0540] 濃縮したサンプルをSuperdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, #29148721) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM HEPES pH7.5, 300mM NaCl, 1mM DTT) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、FRBのN末端とFKBPのC末端をペプチドリンカーで連結させた目的タンパク質FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FRB-FLAG (N-to-C) を得た。

[0541] <調製例2-6-1-3: 酵素的なペプチド連結反応を利用したFRB-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio (C-to-N) の調製>

調製例1-4で調製したC末端にソルターゼ認識配列を含むFRB-FLAG-Sor-His、及び、調製例3-1で調製したN末端にOaAEP

1 認識配列を含むGL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioに対し、調製例3-3で調製したソルターゼ、及び、調製例3-2で調製したOaAEP1を用いた2段階のペプチド連結反応によりリンカーを付加し、FRBのC末端とFKBPのN末端をペプチドリナーで連結させたフュージョンタンパク質を調製した。「K*」は、ビオチン化されたLysを表している。

[0542] FRB-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio (C-to-N) のアミノ酸配列 (配列番号63)

MELIRVA ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGM
FEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEA
QEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SKQG
GGSSDYKDDDDKGGSSLPMTGGGGGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGNGLGGGGSGGGGSGVQVETISPGDG
RTFPKRGGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPF
KFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY
AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGSSDY
KDDDDKSSGENLYFQSSGGGLNDIFEAQK*IEWHE

[0543] (調製例2-6-1-3-1:ソルターゼ反応によるFRBへのペプチドリナーの付加)

Reaction Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 10mM CaCl₂) 中、100μM FRB-FLAG-Sor-His、1mM GGG-(G4S)₄-NGLH (スクラム社にて合成)、1μM eSrtAを氷上にて混合し、4℃で5時間インキュベートした。

ソルターゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0544] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag I

s o l a t i o n a n d P u l l d o w n (I n v i t r o g e n , 1 0 1 0 3 D) と混合して4℃で10分間転倒混和し、上清を回収することで粗精製サンプルを得た。その後、A N T I - F L A G (R) M 2 A f f i n i t y G e l (S i g m a , # A 2 2 2 0) 、 W a s h b u f f e r (5 0 m M H E P E S p H 7 . 5 , 1 5 0 m M N a C l , 0 . 5 m M T C E P) 、 及び E l u t i o n b u f f e r (5 0 m M H E P E S p H 7 . 5 , 1 5 0 m M N a C l , 0 . 5 m M T C E P , 5 0 0 μ g / m L F L A G p e p t i d e) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。精製後のサンプルを回収し、A m i c o n U l t r a - 0 . 5 1 0 K (M E R C K , # U F C 5 0 1 0 9 6) で濃縮することで、FRBのC末端にL i n k e r が付加した複合体FRB-F L A G - G G G - (G 4 S) 4 - N G L H を得た。

[0545] (調製例2-6-1-3-2: O a A E P 1 反応によるFRB-ペプチドリンカー複合体へのFKBPの付加)

具体的には、30 μM F R B - F L A G - G G G - (G 4 S) 4 - N G L H 、 3 0 μM G L - F K B P - F L A G - T E V - A v i - b i o 、 3 0 0 μM N i C l 2 、 0 . 4 5 μM O a A E P 1 を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

O a A E P 1 反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

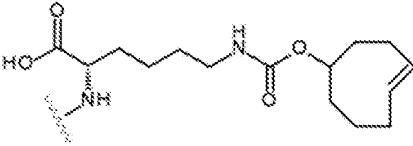
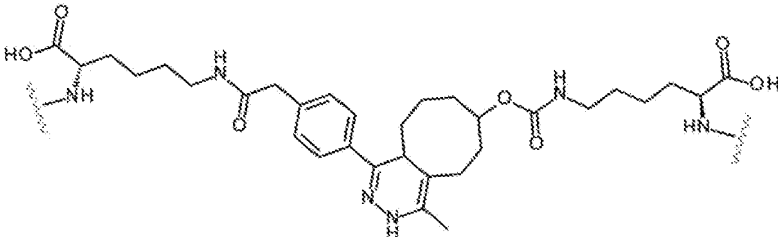
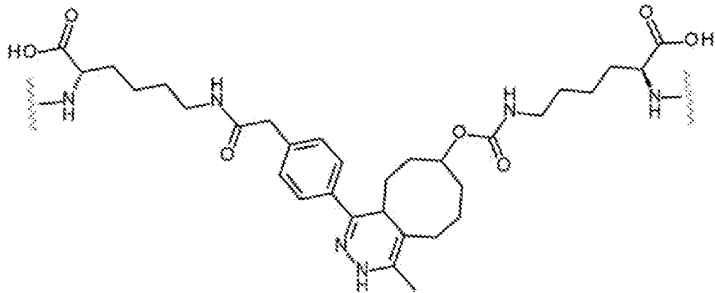
[0546] 濃縮したサンプルをS u p e r d e x 7 5 I n c r e a s e 1 0 / 3 0 0 G L (C y t i v a , # 2 9 1 4 8 7 2 1) を用いてゲル濾過精製した。精製にはR u n n i n g b u f f e r (5 0 m M H E P E S p H 7 . 5 , 3 0 0 m M N a C l , 1 m M D T T) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、FRBのC末端とFKBPのN末端をペプチドリンカーで連結させた目的タンパク質FRB-F L A G - F K B P - F L A G - T E V - A v i - b i o (C - t o - N) を得た。

[0547] <調製例 2-6-1-4 : FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FLAG-FRB (C-to-C) の調製>

調製例 2-5-1-3 で調製した C 末端にソルターゼ認識配列を含む FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His、及び、調製例 1-4 で調製した C 末端にソルターゼ認識配列を含む FRB-FLAG-Sor-His に対し、調製例 3-3 で調製したソルターゼを用いて C 末端にメチルテトラジン (MeTz) 官能基とトランスシクロオクテン (TCO) 官能基を持ったリンカーをそれぞれ付加し、得られた各タンパク質をクリック反応により連結させることにより、FRB の C 末端と FKBP の C 末端をペプチドリッカーで連結させたフュージョンタンパク質を調製した。「K*」はビオチン化された Lys、「K(*1)」は側鎖にメチルテトラジン官能基が付加された Lys、「K(*5)」は側鎖にトランスシクロオクテン官能基が付加された Lys をそれぞれ表しており、「K(*1)」と「K(*5)」はクリック反応により「(*6)」又は「(*7)」のように連結される。「K(*5)」、「(*6)」及び「(*7)」の構造式を表 47 に示す。

[0548]

[表47]

名称	構造式
K (*5)	
(*6)	
(*7)	

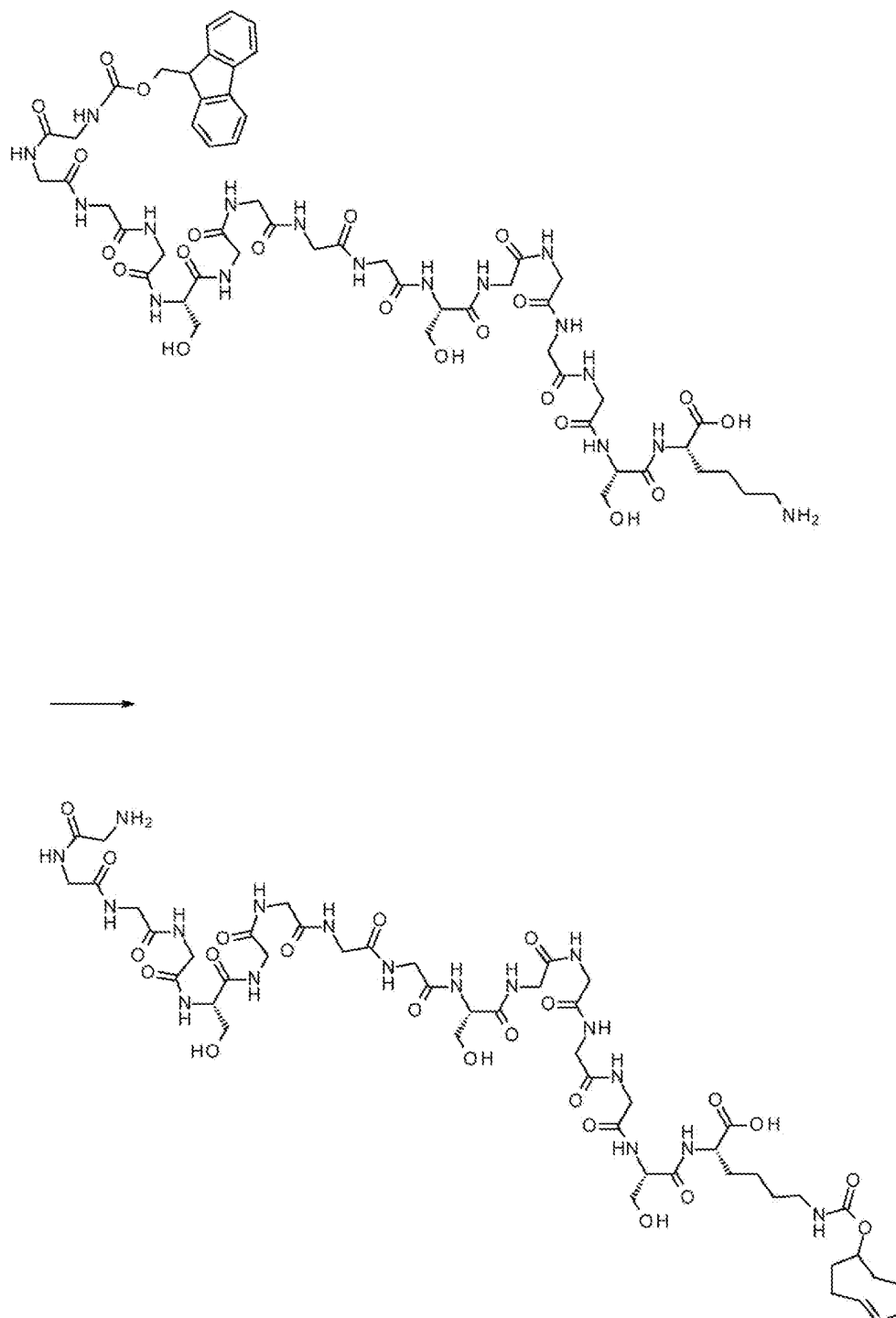
[0549] FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FLAG-FRB (C-
t o - C) のアミノ酸配列 (配列番号 64 及び配列番号 65)

MDYKDDDDKGGSSGLNDIFEAQK*IEWHESSGENL
YFQGGGGSGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY
TGMLEDGKKFDSSRDRNKPFFKFMLGKQEVIRGWE
EGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH
ATLVFDVELLKLEGGGSSLPMTGGGGSGGGGSK (* 1)

MELIRVAI LWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGM
FEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEA
QEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRI SKQG
GGSSDYKDDDDKGGSSLPMTGGGGSGGGGSGGGG
SK (*5)

[0550] <合成例 2-6-1 : (G4S) 3-K (TCO) の合成>

[化68]



[0551] (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) グリシルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-L-リジン (50.5 mg, 0.038 mmol) と (E)-シクロオクト-4-エン-1-イル (2-ジオキソピロリジン-1-イル) カルボネートをジメチルスルホキシド (1281 μ L) に溶解させ、N-エチルジイソプロピルアミン (34.0 μ L, 0.16 mmol) を滴下した。反応液を25度にて60分攪拌した。反応液を逆相カラムによって濾過し、N²- (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) グリシルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-N⁶- (((E)-シクロオクト-4-エン-1-イル) オキシ) カルボニル) -L-リジンの粗生成物 (90 mg) を得た。

[0552] N²- (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) グリシルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-N⁶- (((E)-シクロオクト-4-エン-1-イル) オキシ) カルボニル) -L-リジン (90 mg, 0.061 mmol) をジメチルスルホキシド (3.1 mL) に溶解させ、1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-ウンデセン (93 mg, 0.614 mmol) を滴下した。反応液を25度にて25分攪拌した。反応液をクロマトグラフィーによって精製し、N⁶- (((E)-シクロオクト-4-エン-1-イル) オキシ) カルボニル) -N²-グリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシルグリシル-L-セリルリジン (14 mg) を得た。

保持時間 : 0.43分

m/z 1243 (M-H) -

[0553] (調製例2-6-1-4-1 : ソルターゼ反応によるFKBPへのペプチドリンカーの付加)

Reaction Buffer (50mM Tris-HCl (pH7

. 5), 150mM NaCl, 10mM CaCl₂) 中、100μM FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-Sor-His、1mM (G4S) 2-K (MeTz) (スクラム社にて合成)、1μM eSrtA を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

ソルターゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0554] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag isolation and Pulldown (Invitrogen, 10103D) と混合して4℃で10分間転倒混和し、上清を回収することで粗精製サンプルを得た。その後、Strep-Tactin XT Sepharose chromatography resin (Cytiva, 29401324)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及びElution buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 50mM biotin) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK、#UFC501096) で濃縮することで、FKBPのC末端にLinkerが付加したFLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-(G4S) 2-K (MeTz) を得た。

[0555] (調製例2-6-1-4-2: ソルターゼ反応によるFRBへのペプチドリンカーの付加)

Reaction Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 10mM CaCl₂) 中、100μM FRB-FLAG-Sor-His、1mM (G4S) 3-K (TCO)、1μM eSrtA を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

ソルターゼ反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパ

ク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0556] 反応後のクルードサンプルを、Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen, 10103D) と混合して4℃で10分間転倒混和し、上清を回収することで粗精製サンプルを得た。その後、ANTI-FLAG (R) M2 Affinity Gel (Sigma, #A2220)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及びElution buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 500μg/mL FLAG peptide) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従い行った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK, #UFC501096) で濃縮することで、FRBのC末端にLinkerが付加したFRB-FLAG-(G4S)-3-K(TCO)を得た。

[0557] (調製例2-6-1-4-3: クリック反応によるFKBP-FRBフュージョンタンパク質の合成)

FKBPのC末端にLinkerが付加した複合体FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-(G4S)-2-K(Metz) とFRBのC末端にLinkerが付加した複合体FRB-FLAG-(G4S)-3-K(TCO) を混合し、4℃で2時間インキュベートした。混合前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0558] 濃縮したサンプルをSuperdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, #29148721) を用いてゲル濾過精製した。精製にはRunning buffer (50mM HEPES pH7.5, 300mM NaCl, 1mM DTT) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、FRBのC末端とFKBPのC末端をペ

プチドリinkerで連結させた目的タンパク質FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FLAG-FRB (C-to-C) を得た。

[0559] <調製例 2-6-1-5: bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-FLAG (N-to-N) の調製>

調製例 3-1 で調製したN末端にOaAEP1 認識配列を含むGL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio、及び、調製例 2-6-1-1 で調製したN末端にOaAEP1 認識配列を含むGL-FRB-FLAGに対し、調製例 3-2 で調製したOaAEP1 を用いてN末端にメチルテトラジン (MeTz) 官能基とトランスシクロオクテン (TCO) 官能基を持ったリンカーをそれぞれ付加した。得られたタンパク質をクリック反応により連結させることにより、FRBのN末端とFKBPのN末端をペプチドリinkerで連結させたフュージョンタンパク質を調製した。「K*」はビオチン化されたLys、「(*8) G」はN末端にメチルテトラジン官能基が付加されたGly、「(*2) G」はN末端にトランスシクロオクテン官能基が付加されたGlyをそれぞれ表しており、「(*8) G」と「(*2) G」はクリック反応により「(*9)」又は「(*10)」のように連結される。「(*8) G」、「(*9)」及び「(*10)」の構造式を表48に示す。

[0560]

[表48]

[illegible]

[0561] b i o - A v i - T E V - F L A G - F K B P - F R B - F L A G (N -
t o o - N) のアミノ酸配列 (配列番号 6 6 及び配列番号 6 7)

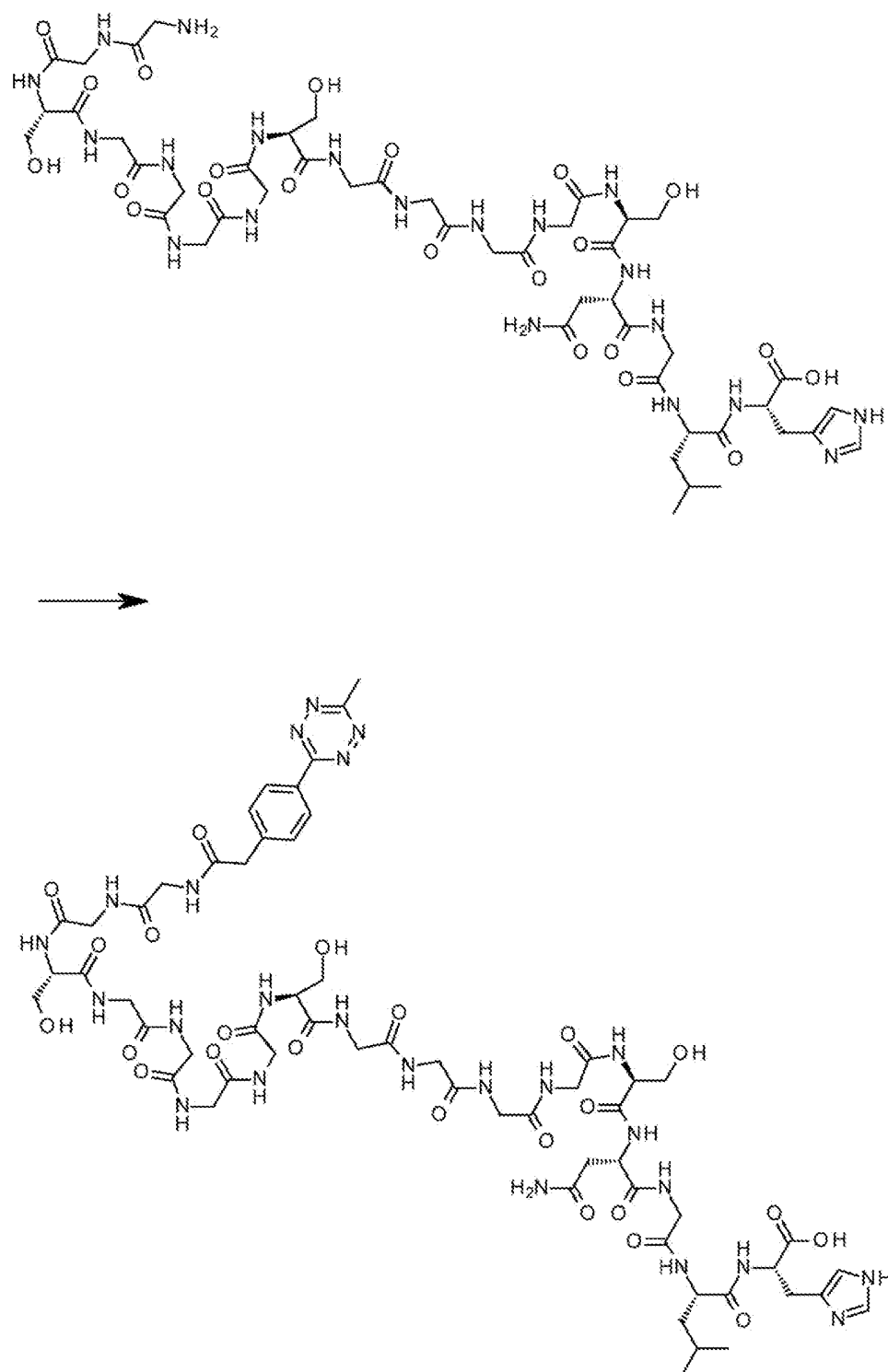
(*8) GGS GGGGSGGGGSSNGLGGGGSGGGGSGVQV
ETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDS
SRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRA
KLTISPDYAYGATGHPGIIIPPHATLVFDVELLKL
EGGGSSDYKDDDDKSSGENLYFQSSGGGLNDIFE
AQK*IEWHE

(* 2) G G S G G G G S G G G G S N G L G G G G S G G G G S E L I R
V A I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E
P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R

K Y M K S G N V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K Q G G G S S D
Y K D D D D K

[0562] <合成例 2-6-2 : (MeTz) - GGS - (G4S) 2 - NGLHの合
成>

[化69]



[0563] セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-L-アスパラギングリシル-L-ロイシル-L-ヒスチジン (31.4 mg, 0.025 mmol) と 2, 5-ジオキソ-1-ピロリジニル-4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル) ベンゼン-アセテート (24.25 mg, 0.074 mmol) をジメチルスルホキシド (494 μ L) に溶解させ、N-エチルジイソプロピルアミン (21.9 μ L, 0.124 mmol) を滴下した。反応液を25度にて60分攪拌した。反応液をクロマトグラフィーによって精製し、(2-(4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル) フェニル) アセチル) グリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリルグリシルグリシルグリシル-L-セリル-L-アスパラギングリシル-L-ロイシル-L-ヒスチジン (26 mg, 収率71%) を得た。

保持時間: 0.37分

m/z: 1482 (M-H) -

[0564] (調製例2-6-1-5-1: OaAEP1反応によるFKBPへのペプチドリンカーの付加)

具体的には、48 μ M GL-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio、1mM (MeTz)-GGS-(G4S)2-NGLH、400 μ M NiCl₂、0.6 μ M OaAEP1を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

OaAEP1反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0565] 反応後のクルードサンプルを、Strep-Tactin XT Sepharose chromatography resin (Cytiva, 29401324)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及びElution buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM

NaCl, 0.5mM TCEP, 50mM biotin) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK、#UFC501096) で濃縮することで、FKBPのN末端にLinkerが付加した(Metz)-GGG-(G4S)2-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioを得た。

[0566] (調製例2-6-1-5-2: OaAEP1反応によるFRBへのペプチドリンカーの付加)

76 μ M GL-FRB-FLAG、1mM (TCO)-GGG-(G4S)2-NGLH、400 μ M NiCl₂、0.6 μ M OaAEP1を氷上にて混合し、4℃で一晩インキュベートした。

OaAEP1反応の前後のサンプルをSDS-PAGE分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0567] 反応後のクルードサンプルを、ANTI-FLAG (R) M2 Affinity Gel (Sigma, #A2220)、Wash buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP)、及びElution buffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 500 μ g/mL FLAG peptide) を用いて精製した。精製は製品添付の基本プロトコルに従った。精製後のサンプルを回収し、Amicon Ultra-0.5 10K (MERCK、#UFC501096) で濃縮することで、FRBのN末端にLinkerが付加した(TCO)-GGG-(G4S)2-FRB-FLAGを得た。

[0568] (調製例2-6-1-5-3: クリック反応によるFKBP-FRBフュージョンタンパク質の合成)

FKBPのN末端にLinkerが付加した(Metz)-GGG-(G4S)2-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bioとFRBのN末端

に L i n k e r が付加した (T C O) − G G S − (G 4 S) 2 − F R B − F L A G を混合し、4℃で2時間インキュベートした。混合前後のサンプルを S D S − P A G E 分析し、目的タンパク質の理論分子量に対応するゲルシフトを確認することで、反応が正常に進んだことを確認した。

[0569] 濃縮したサンプルを S u p e r d e x 7 5 I n c r e a s e 1 0 / 3 0 0 G L (C y t i v a , # 2 9 1 4 8 7 2 1) を用いてゲル濾過精製した。精製には R u n n i n g b u f f e r (5 0 m M H E P E S p H 7 . 5 , 3 0 0 m M N a C l , 1 m M D T T) を用いた。目的タンパク質を含むフラクションを回収し、F R B の N 末端と F K B P の N 末端をペプチドリinkerで連結させた目的タンパク質 b i o − A v i − T E V − F L A G − F K B P − F R B − F L A G (N − t o − N) を得た。

[0570] (評価例 2 − 6 − 1 : タンパク質同士の N 末端及び C 末端の繋ぎ方が異なるフュージョンタンパク質に対する m R N A − ペプチドディスプレイ分子 (F F − 0 1 ∼ 0 4) のプルダウンアッセイ)

1 × T B S 、 2 m g / m L B S A (I n v i t r o g e n) 、 2 m M D T T を含むバッファーに、調製例 2 − 1 − 2 に準ずる方法で調製したディスプレイ分子が 0 . 2 − 0 . 3 μ M 、標的タンパク質が表 4 9 となるように添加して 4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して 1 0 分間 4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 0 . 0 4 m M となるようにビオチンを加えさらに 1 0 分間 4℃で転倒混和した。標的タンパク質は調製例 2 − 6 − 1 − 2 ∼ 2 − 6 − 1 − 5 で調製したタンパク質を用い、下記の表で示す 5 条件を比較した。

[0571] [表49]

条件	標的タンパク質	繋ぎ方
1	0.4 μM FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FRB-FLAG (N-to-C)	N-to-C
2	0.4 μM FRB-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio (C-to-N)	C-to-N
3	0.4 μM FLAG-Avi-bio-TEV-FKBP-FLAG-FRB (C-to-C)	C-to-C
4	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-FLAG (N-to-N)	N-to-N
5	標的タンパク無し	-

[0572] 条件 1 ∼ 4 は F K B P と F R B のフュージョンタンパク質を用いた場合で

ある。それぞれ、FRBのN末端とFKBPのC末端（N－t o－C）、FRBのC末端とFKBPのN末端（C－t o－N）、FRBとFKBPのC末端同士（C－t o－C）、FRBとFKBPのN末端同士（N－t o－N）をそれぞれ連結させた状態であり、2種類の標的タンパク質の末端同士の繋ぎ方が異なって近接した状態である。条件5は標的タンパク非存在下の条件である。

[0573] 評価例2－5－1に準じた方法で、条件1～5におけるFF－01～04のディスプレイ分子の回収率を算出し、表50にまとめた。

[0574] [表50]

条件	回収率 (%)			
	FF-01	FF-02	FF-03	FF-04
1	2.08E+00	7.11E-01	4.62E+00	3.45E+00
2	7.86E+00	1.06E+00	7.47E+00	4.68E+00
3	7.00E+00	7.44E-01	5.87E+00	2.78E+00
4	5.33E+00	1.27E+00	9.68E+00	5.39E+00
5	1.25E-06	2.48E-06	1.01E-05	4.83E-06

[0575] その結果、FF－01～04において、調製例2－6－1－2～2－6－1－5で調製したフュージョンタンパク質により2種類の標的タンパク質FKBP及びFRBが近接した条件1～4における回収率が、標的タンパク質非存在下の条件5の回収率と比較して少なくとも287000倍以上高いことが明らかとなった。

したがって、本系においては2つの標的タンパク質を近接させるにあたり、N末端とC末端、C末端とN末端、C末端同士又はN末端同士、というタンパク質の末端同士の繋ぎ方のいずれを採用しても発明の効果を得られることが分かった。このことは、本系において、発明の効果が上記4種類のつなぎ方全てにおいて得られるということを示唆するものであったといえる。

[0576] [評価例2－7：フュージョンタンパク質と非ビオチン化単体タンパク質を共存させる条件についての検証]

評価例2－1，2－2及び2－3により、フュージョンタンパク質を利用することで複数標的と複合体を形成するペプチドを効率的にプルダウンでき

ることが示されている。ここで発明者らは、複数標的と複合体を形成するペプチドの濃縮をさらに効率化するべく、ビオチン化されたフュージョンタンパク質に対してビオチン化されていない単体タンパク質を共存させた状態でパニングを行い、複数標的と複合体を形成できない分子の濃縮を抑制しながら、複数標的と複合体を形成する分子をさらに効率的に濃縮させることが可能か否かを検討した。

[0577] <評価例 2-7-1 : F K B P 及び F R B を標的タンパク質とするペプチドでの検証>

ビオチン化されたフュージョンタンパク質に対してビオチン化されていない単体タンパク質を共存させた状態でセクションを実施することで、複数標的と複合体を形成するペプチドをより選択的にプルダウンできるか否かを評価した。具体的には、評価例 1-1 によって得られた F K B P、F R B と三者複合体を形成するペプチド (F F-01, F F-02, F F-03, F F-04) の mRNA ディスプレイ分子のプルダウン効率を、非ビオチン化単体タンパク質の有無によって比較することにより検証した。

[0578] (調製例 2-7-1-1 : mRNA-ペプチドディスプレイ分子の調製 (F F-01~04))

WO 2013/100132 に記載の方法に準じて、調製例 2-1-1 で精製した mRNA の 3' 末端にリンカーを介してピュロマイシンを連結した。なお、ピュロマイシンリンカーとしては前述の a x P M-27 を用いた。これを翻訳し、WO 2017/150732 に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことにより mRNA-ペプチドのディスプレイ分子を調製した。また、翻訳反応に使用するアミノアシル化 tRNA 及び翻訳系は、翻訳系中の酢酸マグネシウム濃度が 6 mMであることを除いて調製例 2-1-2 に準ずるものを使用した。

[0579] (評価例 2-7-1-2 : mRNA-ペプチドディスプレイ分子のプルダウンアッセイ (F F-01~04))

1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM

D T Tを含むバッファーに、調製例 2－7－1－1で調製したディスプレイ分子が0. 2 μM、標的タンパク質が表 5 1 となるように添加して4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して1 0分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0. 0 8 m Mとなるようにビオチンを加えさらに1 0分間4℃で転倒混和した。標的タンパク質は実験例 1 の調製例 1－3 及び1－5で調製したタンパク質を用い、下記の表で示す2条件を比較した。

[0580] [表51]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His
2	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His および 4 μM FKBP-FLAG-Sor-His

[0581] 条件 1 はビオチン化されたフュージョンタンパク質のみが存在する場合であり、条件 2 はビオチン化されたフュージョンタンパク質とビオチン化されていない F K B P が共存する条件である。

[0582] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これをWash buffer (1×TBS, 2 mM DTT, 0. 1% Tween 20 (Sigma Aldrich), 5 0 0 m M アルギニン) で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド－核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1×TEV buffer、1 mM DTT、0. 1 U／μL AcTEVプロテアーゼ（サーモフィッシャーサイエントフィック社、# 1 2 5 7 5 0 1 5）を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収してqPCRを実施した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（Fw-primer及びRv-primer）を使用した。qPCRの反応液は、1×Ex taq buffer、0. 2 mM dNTP、0. 5 μM Fw-primer、0. 5 μM Rv-primer、5 0 0 0 0倍希釈 S

YBR Green I (Lonza, #50513)、0.025 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃10秒、57℃20秒、72℃30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。この際、標的タンパク質と混合する前の各ディスプレイ分子も同様にqPCRを行った。

[0583] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0584] 標的タンパク質との結合により回収された各ディスプレイ分子の核酸量を、標的タンパク質と混合する前に存在していた各ディスプレイ分子の核酸量（インプットの値）で割ることで回収率を算出した。

[0585] 回収率（%）＝回収された核酸量（分子数）／インプットの核酸量（分子数）×100

[0586] FF-01～04の各ディスプレイ分子の回収率及び、条件1の回収率を条件2における回収率で除して求めた比をそれぞれ表52にまとめた。

[0587] [表52]

ペプチド	条件1の回収率 (%) : (1)	条件2の回収率 (%) : (2)	回収率の比 : (1) / (2)
FF-01	8.52E+00	8.86E+00	1.0
FF-02	3.30E+00	2.56E+00	1.3
FF-03	1.14E+01	1.22E+01	0.9
FF-04	9.97E+00	1.02E+01	1.0

[0588] その結果、FKBP及びFRBと共に複合体を形成できる4種類のペプチド（FF-01～04）は非ビオチン化FKBPが存在してもその回収率の変化は最大でも1.3倍しか低下しないことが明らかとなった。これは4種類のペプチドが、非ビオチン化FKBPと比してフュージョンタンパク質に対して優先的に結合しているためであると考えられる。一方、FKBP及びFRBと共に複合体を形成できないが、FKBPには結合できるペプチドの場合は、非ビオチン化FKBPが存在することにより、ビオチン化されたフ

ュージョンタンパク質に含まれるFKBPだけでなく、当該非ビオチン化FKBPにも同等程度結合するはずであるため、その回収効率が低下することが予想される。故にフュージョンタンパク質を用いてパニングを実施する際に、非ビオチン化単体タンパク質を共存させることで、複数種類の標的分子と複合体を形成するペプチドをより選択的に濃縮させることが可能であることが予想される。

[0589] <評価例2-7-2：シクロフィリンA及びカルシニューリンを標的タンパク質とするペプチドでの検証>

ビオチン化されたフュージョンタンパク質に対してビオチン化されていない単体タンパク質を共存させた状態でセレクションを実施することで、複数標的と複合体を形成するペプチドをより選択的にプルダウンできるか否かを評価した。具体的には、評価例1-2によって得られたシクロフィリンA、カルシニューリンと三者複合体を形成するペプチド(CC-01, CC-02, CC-03, CC-04)のmRNAディスプレイ分子のプルダウン効率を、非ビオチン化単体タンパク質の有無によって比較することにより検証した。

[0590] (調製例2-7-2-1：mRNA-ペプチドディスプレイ分子の調製(CC-01~04))

WO2013/100132に記載の方法に準じて、調製例2-2-2で精製したmRNAの3'末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結した。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述のaxPM-27を用いた。これを翻訳し、WO2017/150732に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことによりmRNA-ペプチドのディスプレイ分子を調製した。また、翻訳反応に使用するアミノアシル化tRNA及び翻訳系は、翻訳系中の酢酸マグネシウム濃度が6mMであることを除いて調製例2-1-2に準ずるものを使用した。

[0591] (評価例2-7-2-2：mRNA-ペプチドディスプレイ分子のプルダウンアッセイ(CC-01~04))

1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーに、調製例2-7-2-1で調製したディスプレイ分子が0.2μM、Calmodulin (富士フィルム和光純薬)が2μM、標的タンパク質が表53となるように添加して4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.08mMとなるようにビオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。標的タンパク質は実験例1の調製例2-3及び2-5で調製したタンパク質を用い、下記の表で示す2条件を比較した。

[0592] [表53]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio
2	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 4 μM CyA-FLAG-Sor-His

[0593] 条件1はビオチン化されたフュージョンタンパク質のみが存在する場合であり、条件2はビオチン化されたフュージョンタンパク質とビオチン化されていないシクロフィリンAが共存する条件である。

[0594] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これをWash buffer (1×TBS, 2mM DTT, 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich), 500mM アルギニン) で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

具体的なTEV溶出液として、1×TEV buffer、1mM DTT、0.1U/μL AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシュサイエントフィック社、#12575015) を、洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収してqPCRを実施した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー (Fw-primer及びRv-primer) を使用した。qPCRの反応液は、1×Ex taq buffer、0.2mM dNTP、0.5μM Fw

- primer、0.5 μM Rv-primer、50000倍希釈 SYBR Green I (Lonza, #50513)、0.025 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA) を混合し、95℃で2分加熱後、95℃10秒、57℃20秒、72℃30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。この際、標的タンパク質と混合する前の各ディスプレイ分子も同様にqPCRを行った。

[0595] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、実験例1の調製例4-3で調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を逆転写して調製したサンプルを、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0596] 標的タンパク質との結合により回収された各ディスプレイ分子の核酸量を、標的タンパク質と混合する前に存在していた各ディスプレイ分子の核酸量（インプットの値）で割ることで回収率を算出した。

[0597] 回収率（%）＝回収された核酸量（分子数）／インプットの核酸量（分子数）×100

[0598] CC-01～04の各ディスプレイ分子の回収率及び、条件1の回収率を条件2における回収率で除して求めた比を表54にまとめた。

[0599] [表54]

ペプチド	条件1の回収率 (%) : (1)	条件2の回収率 (%) : (2)	回収率の比 : (1) / (2)
CC-01	9.29E-01	8.04E-01	1.2
CC-02	5.27E+00	4.21E+00	1.3
CC-03	2.10E+00	2.04E+00	1.0
CC-04	3.22E+00	1.43E+00	2.2

[0600] その結果、シクロフィリンA及びカルシニューリンと共に複合体を形成できる4種類のペプチド（CC-01～04）は非ビオチン化シクロフィリンAが存在してもその回収率の変化は最大でも2.2倍しか低下しないことが明らかとなった。これは4種類のペプチドが、非ビオチン化シクロフィリンAと比してフュージョンタンパク質に対して優先的に結合しているためであると考えられる。一方、シクロフィリンA及びカルシニューリンと共に複合

体を形成できないが、シクロフィリンAには結合できるペプチドの場合は、非ビオチン化シクロフィリンAが存在することにより、ビオチン化されたフュージョントタンパク質に含まれるシクロフィリンAだけでなく、当該非ビオチン化シクロフィリンAにも同等程度結合するはずであるため、その回収効率が低下することが予想される。故にフュージョントタンパク質を用いてパニングを実施する際に、非ビオチン化単体タンパク質を共存させることで、複数種類の標的分子と複合体を形成するペプチドをより選択的に濃縮させることが可能であることが予想される。

[0601] 評価例2-7-1及び2-7-2の結果より、標的フュージョントタンパク質（標的融合分子）に対して非ビオチン化単体タンパク質を共存させた状態でパニングを行うことで、当該複数種類の標的タンパク質との複合体を形成するペプチド（目的分子）をライブラリ中に存在するその他のペプチド（候補分子）の中からさらに効率良く取得可能であることが予想される。

[0602] [実験例3：ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で固定した複数種類の標的タンパク質をパニングに用いる手法の効果検証]

複数種類のタンパク質と複合体を形成するペプチドの取得効率向上させる目的において、当該複数種類の標的タンパク質をフュージョントタンパク質の形成以外の手法で近接させることによっても同様の効果が得られるか否かを検証した。

[0603] 具体的には、ビオチン化した2種類の標的タンパク質をストレプトアビジンコーティング磁気ビーズに固定化することで、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で両標的タンパク質を近接させた場合に、当該両標的タンパク質との複合体を形成するペプチドの回収率向上効果が得られるかを検証した。

[0604] [評価例3：ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定した標的タンパク質を用いた検証]

<評価例3-1：ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定したFKBP及びFRBを標的として用いた検証>

標的タンパク質としてFKBP及びFRB、これら2種類の標的タンパク質と三者複合体を形成するペプチドとして合成例1で合成したFF-01, FF-02, FF-03, FF-04を選択し、当該各ペプチドのmRNAディスプレイ分子の回収率を測定した。mRNA-ペプチドのディスプレイ分子の調製は調製例2-1-2と同様の方法で行った。

[0605] 1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTTを含むバッファーに、調製例2-1-2で調製したディスプレイ分子が0.3 μM、標的タンパク質として調製例1-1で調製したFKBP-FLAG-TEV-Avi-bio及び調製例1-2で調製したFRB-FLAG-TEV-Avi-bioをそれぞれ0.4 μMとなるように添加して4℃で1時間静置した。この反応液は計5 μLとなるように調製した。その後、前記2種類の標的タンパク質が一部において近接した状態となるよう、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.08 mMとなるようにピオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。なお、本実験ではストレプトアビジンコーティング磁気ビーズとしてDynabeads M-270 Streptavidin (サーモフィッシャー、<https://www.veritastk.co.jp/products/PGN-DB0115.html>)を3 μL用いた。

ここで、Dynabeads M-270 Streptavidinのビーズ粒径は2.8 μmであることから、その表面積は1個あたり $2.46 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ である計算となる。また、Dynabeads M-270 Streptavidinの濃度は10 mg/mL ($6 \times 10^8 \sim 7 \times 10^8$ ビーズ/mL)であることから、本実験において使用されたビーズは $1.80 \times 10^6 \sim 2.10 \times 10^6$ 個である計算となる。従って、本実験において使用されたビーズの合計表面積は $4.43 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \sim 5.17 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ である計算となる。

また、本実験において使用された、調製例1-1で調製したFKBP-F

LAG-TEV-Avi-bio及び調製例1-2で調製したFRB-FLAG-TEV-Avi-bioの量はそれぞれ2 pmolであり、それらの合計分子数は 2.41×10^{12} である計算となる。

以上より、本実験においては、前記ビーズの表面1 m²あたり、 $4.66 \times 10^{16} \sim 5.43 \times 10^{16}$ の標的分子が固定されている計算となる。

[0606] 実験例2の評価例2-1と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収、qPCRにて定量を行い、回収率を算出した。

[0607] 本手法にて得られた回収率と実験例2の評価例2-1で得られた各条件における回収率を比較し、下記の表にまとめた。

[0608] 条件1はフュージョントンパク質を用いた場合であり、前記2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2は、FKBPとFRBが存在している条件ではあるがストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定されているのはFKBPのみであり、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされるタンパク質もFKBPとなる条件である。条件3でもFKBPとFRBが存在しているが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定されているのはFRBのみであり、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされるタンパク質もFRBとなる条件である。条件2及び3において、前記2種類の標的タンパク質は近接していない。条件4はFKBP及びFRB共にビオチン化されており、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で2種類のタンパク質が近接していると推測される条件である。

[0609] [表55]

ペプチド：FF-01

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM Bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His	1.15E+01	0.8
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-Bio 及び 0.4 μM FRB-FLAG-Sor-His	1.02E-02	693
3	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio 及び 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His	3.77E-04	24278
4	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio 及び 0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	9.14E+00	~

[0610]

[表56]

ペプチド：FF-02

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His	1.79E+00	0.3
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FRB-FLAG-Sor-His	4.87E-05	12860
3	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His	9.80E-05	5397
4	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	6.27E-01	—

[0611] [表57]

ペプチド：FF-03

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His	9.32E+00	0.6
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FRB-FLAG-Sor-His	2.68E-04	21137
3	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His	7.06E-04	8023
4	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	5.67E+00	—

[0612] [表58]

ペプチド：FF-04

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM bio-Avi-TEV-FLAG-FKBP-FRB-His	7.11E+00	0.4
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FRB-FLAG-Sor-His	1.38E-04	18760
3	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His	4.75E-04	5468
4	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	2.60E+00	—

[0613] 表55～58の結果より、これら4種類のペプチド（FF-01～04）においてストレプトアビジンコーティング磁気ビーズを介して2種類の標的タンパク質が近接していると推測される条件4における回収率が、2種類の標的タンパクをそれぞれ個別に添加した条件2及び3の回収率と比較して少なくとも800倍以上高いことが明らかとなった。また、その回収率はフュージョンタンパク質により2種類の標的タンパク質を近接させた条件1における回収率と同等であることが明らかとなった。このことは、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で2種類の標的タンパク質が近接していると推測される状態とすることによっても効率的にFKBP、FRBと三者複合体を形成するペプチドをプルダウンできることを強く示唆するものである。

[0614] <評価例3-2：ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定した

シクロフィリンA及びカルシニューリンを標的として用いた検証>

標的タンパク質としてシクロフィリンA及びカルシニューリンを、これら2種類の標的タンパク質と三者複合体を形成するペプチドとして合成例1で合成したCC-01, CC-02, CC-03, CC-04を選択し、当該各ペプチドのmRNAディスプレイ分子の回収率を測定した。mRNA-ペプチドのディスプレイ分子の調製は調製例2-2-1と同様の方法で行った。

[0615] 1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーに、調製例2-2-2で調製したディスプレイ分子が0.3 μM、標的タンパク質として調製例2-1で調製したCyA-FLAG-TEV-Avi-bio及び調製例2-2で調製したCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioをそれぞれ0.4 μM、Calmodulin (富士フイルム和光純薬) が2 μMとなるように添加して4℃で1時間静置した。この反応液は計5 μLとなるように調製した。その後、前記2種類の標的タンパク質が一部において近接した状態となるよう、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.08 mMとなるようにビオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。なお、本実験ではストレプトアビジンコーティング磁気ビーズとしてDynabeads M-270 Streptavidin (サーモフィッシャー) を3 μL用いた。

ここで、本実験における前記ビーズの表面1 m²あたりに固定されている標的分子数は、評価例3-1と同様の計算により、 $4.66 \times 10^{16} \sim 5.43 \times 10^{16}$ となる。

[0616] 実験例2の評価例2-2と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収、qPCRにて定量を行い、回収率を算出した。

[0617] 本手法にて得られた回収率と実験例2の評価例2-2で得られた各条件における回収率を比較し、下記の表にまとめた。

[0618] 条件1はフュージョントンパク質を用いた場合であり、前記2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2は、シクロフィリンAとカルシニューリンが存在している条件ではあるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定されているのはシクロフィリンAのみであり、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされるタンパク質もシクロフィリンAとなる条件である。条件3でもシクロフィリンAとカルシニューリンが存在しているが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定されているのはカルシニューリンのみであり、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされるタンパク質もカルシニューリンとなる条件である。条件2及び3において、前記2種類の標的タンパク質は近接していない。条件4はシクロフィリンA及びカルシニューリン共にビオチン化されており、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で2種類のタンパク質が近接していると推測される条件である。

[0619] [表59]

ペプチド：C C－0 1

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio	1.09E+00	0.8
2	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His	1.99E-02	41.5
3	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His	2.26E-02	36.5
4	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio	8.25E-01	-

[0620] [表60]

ペプチド：C C－0 2

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio	2.73E+00	0.9
2	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His	1.07E-02	219.4
3	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His	1.61E-02	146.1
4	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio	2.36E+00	-

[0621]

[表61]

ペプチド：C C－0 3

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio	1.22E+00	2.0
2	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His	1.36E-03	1801.7
3	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His	1.28E-03	1915.1
4	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio	2.45E+00	-

[0622] [表62]

ペプチド：C C－0 4

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM His-CnB-CnA-CyA-FLAG-TEV-Avi-bio	1.92E+00	0.7
2	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His	2.06E-03	689.1
3	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His	1.02E-03	1393.5
4	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio	1.42E+00	-

[0623] 表5 9～6 2の結果より、これら4種類のペプチド（C C－0 1～0 4）においてストレプトアビジンコーティング磁気ビーズを介して2種類の標的タンパク質が近接していると推測される条件4における回収率が、2種類の標的タンパクをそれぞれ個別に添加した条件2及び3の回収率と比較して少なくとも3 5倍以上高いことが明らかとなった。また、その回収率はフュージョンタンパク質により2種類の標的タンパク質を近接させた条件1における回収率と同等であることが明らかとなった。このことは、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で2種類の標的タンパク質を近接させることによって効率的にシクロフィリンA及びカルシニューリンと三者複合体を形成するペプチドをプルダウンできることを強く示唆するものである。

[0624] <評価例3－3：ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定したF K B P及びカルシニューリンを標的として用いた検証>

標的タンパク質としてF K B P及びカルシニューリンを、これら2種類の標的タンパク質と三者複合体を形成するペプチドとして合成例1で合成したC F－0 1，C F－0 2を選択し、当該各ペプチドのm R N Aディスプレイ分子の回収率を測定した。m R N A－ペプチドのディスプレイ分子の調製は調製例2－3－1と同様の方法で行った。

[0625] 1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl_2 を含むバッファーに、調製例1-1で調製したFKBP-FLAG-TEV-Avi-bio及び調製例2-2で調製したCnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bioをそれぞれ0.4 μM とようになるように添加し、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、前記2種類の標的タンパク質が一部において近接した状態となるよう、標的タンパク質を固定化した。この反応液は計5 μL となるように調製した。その後、0.5mMとなるようにビオチンを加え、さらに10分間4℃で転倒混和した。なお、本実験ではストレプトアビジンコーティング磁気ビーズとしてDynabeads M-270 Streptavidin (サーモフィッシャー)を3 μL 用いた。

ここで、本実験における前記ビーズの表面1 m^2 あたりに固定されている標的分子数は、評価例3-1と同様の計算により、 $4.66 \times 10^{16} \sim 5.43 \times 10^{16}$ となる。

[0626] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除き、一度Wash buffer (1×TBS、2mM DTT、0.1% Tween20 (Sigma Aldrich)、500mM アルギニン)で洗浄後、mRNA-ペプチドのディスプレイ分子が0.2-0.3 μM 、Calmodulin (富士フイルム和光純薬)が2 μM となるように加えて4℃で1時間転倒混和した。

[0627] 実験例2の評価例2-3と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収、qPCRにて定量を行い、回収率を算出した。

[0628] 本手法にて得られた回収率と実験例2の評価例2-3で得られた各条件における回収率を比較し、下記の表にまとめた。

[0629] 条件1はフュージョンタンパク質を用いた場合であり、前記2種類の標的タンパク質が近接した状態である。条件2は、FKBPとカルシニューリンが存在している条件ではあるが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定されているのはFKBPのみであり、ストレプトアビジンコーテ

ィング磁気ビーズでプルダウンされるタンパク質も F K B P となる条件である。条件 3 でも F K B P とカルシニューリンが存在しているが、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上に固定されているのはカルシニューリンのみであり、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズでプルダウンされるタンパク質もカルシニューリンとなる条件である。条件 2 及び 3 において、前記 2 種類の標的タンパク質は近接していない。条件 4 は F K B P 及びカルシニューリン共にビオチン化されており、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で 2 種類のタンパク質が近接していると推測される条件である。

[0630] [表63]

ペプチド：CF-01

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	4.58E-01	4.3
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His	4.17E-03	476.7
3	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His	1.91E-02	131.6
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	1.99E+00	-

[0631] [表64]

ペプチド：CF-02

条件	標的タンパク質	回収率 (%)	条件4の回収率 / 回収率
1	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	1.09E+00	3.4
2	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His	7.83E-03	477.0
3	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His	2.14E-02	174.5
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio	3.73E+00	-

[0632] 表 6 3 ～ 6 4 の結果より、これら 2 種類のペプチド (CF-01, 02) においてストレプトアビジンコーティング磁気ビーズを介して 2 種類の標的タンパク質が近接していると推測される条件 4 における回収率が、2 種類の標的タンパクをそれぞれ個別に添加した条件 2 及び 3 の回収率と比較して少なくとも 1 3 0 倍以上高いことが明らかとなった。また、その回収率はフュージョンタンパク質により 2 種類の標的タンパク質を近接させた条件 1 における回収率と同等であることが明らかとなった。このことは、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ上で 2 種類の標的タンパク質を近接させることによって効率的に F K B P 及びカルシニューリンと三者複合体を形成す

るペプチドをプルダウンできることを強く示唆するものである。

[0633] 評価例3により構成される実験例3の結果は、フュージョンタンパク質を用いたパニングで見られた発明の効果が、同一のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ（固相担体）上に固定した標的タンパク質を用いたパニングでも達成されることを示している。

特定の理論に拘束されることを意図しないが、このようなことが可能となるのは、複数種類の標的タンパク質をストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ（固相担体）に固定化することで、一部において当該複数種類の標的タンパク質同士が近接し、当該複数種類の標的タンパク質とペプチドの複合体がより安定となるためであると考えられる。

[0634] 実験例2及び実験例3の結果は、複数種類の標的タンパク質との複合体を形成するペプチドをA f f i n i t yによるセレクションによって取得する際に、当該複数種類のタンパク質を近接させることが極めて効果的であることを示すものである。

[0635] 加えて、実験例2及び実験例3の結果は、複数種類の標的タンパク質との複合体を形成し得るペプチドである目的分子をスクリーニングする目的において、当該複数種類のタンパク質を近接させた条件でのプルダウン効率、すなわちディスプレイ分子の回収率を指標とすることが極めて有用であることも示すものである。

[0636] [実験例4：ディスプレイ分子と標的タンパク質の連結体をパニングに用いる手法の効果検証]

複数種類のタンパク質と複合体を形成するペプチドの取得効率を向上させる目的において、複合体を形成する要素としてmRNAーディスプレイ分子と標的タンパク質に着目し、これらを近接させる効果について検証した。

[0637] 具体的には、T r i s - N i - N T Aとポリヒスチジンタグ（以下、H i s t a gともいう。）の相互作用を利用し、mRNAーディスプレイ分子とビオチン化されていない一つの標的タンパク質が連結した連結体を形成することにより、当該mRNAーディスプレイ分子と当該一つの標的タンパク

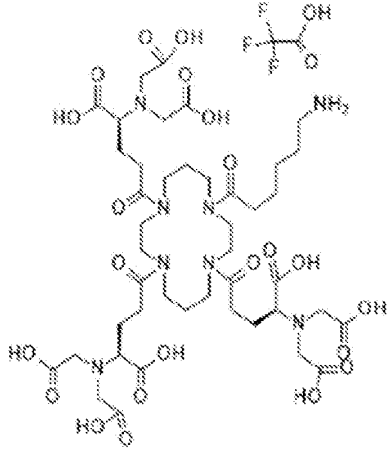
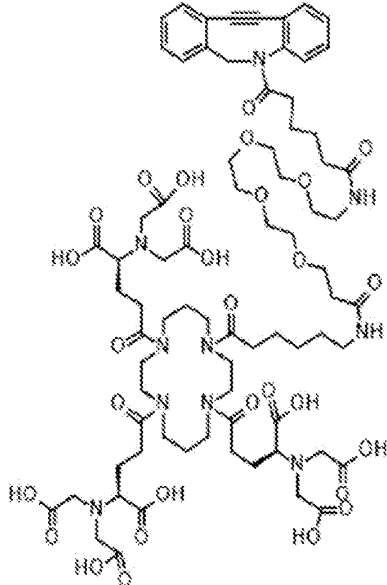
質を近接させた状態とし、当該一つの標的タンパク質及びそれ以外の一つの標的タンパクとの複合体を形成するペプチドの回収率が上昇するか否かを検証した。T r i s - N i - N T A とポリヒスチジンタグの解離定数 K_D は $0.1 - 4.0 \text{ nM}$ 程度であることが報告されている。(J. Am. Chem. Soc., 2005年, 127, pp. 10205-10215)

[0638] 〔調製例4：N i - N T Aを有する逆転写プライマーの調製〕

＜合成例4-1：D B C O - P E G (4) - N T Aの合成＞

合成した化合物の略称と構造は以下の表65のとおりである。

[表65]

略称	構造	和名
NTA		(2S)-5-[11-(6-アミノヘキサノイル)-4,8-ビス[(4S)-4-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]-4-カルボキシブタノイル]-1,4,8,11-テトラザシクロテトラデクー1-イル]-2-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]-5-オキソペンタン酸; 2,2,2-トリフルオロ酢酸
DBCO-PEG(4)-NTA		(2S)-5-[11-[6-[3-[2-[2-[2-[2-[[[6-(2-アザトリシクロ[10,4,0,04,9]ヘキサデカ-1(12),4,6,8,13,15-ヘキサエン-10-イン-2-イル]-6-オキソヘキサノイル]アミノ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]プロパノイルアミノ]ヘキサノイル]-4,8-ビス[(4S)-4-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]-4-カルボキシブタノイル]-1,4,8,11-テトラザシクロテトラデクー1-イル]-2-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]-5-オキソペンタン酸

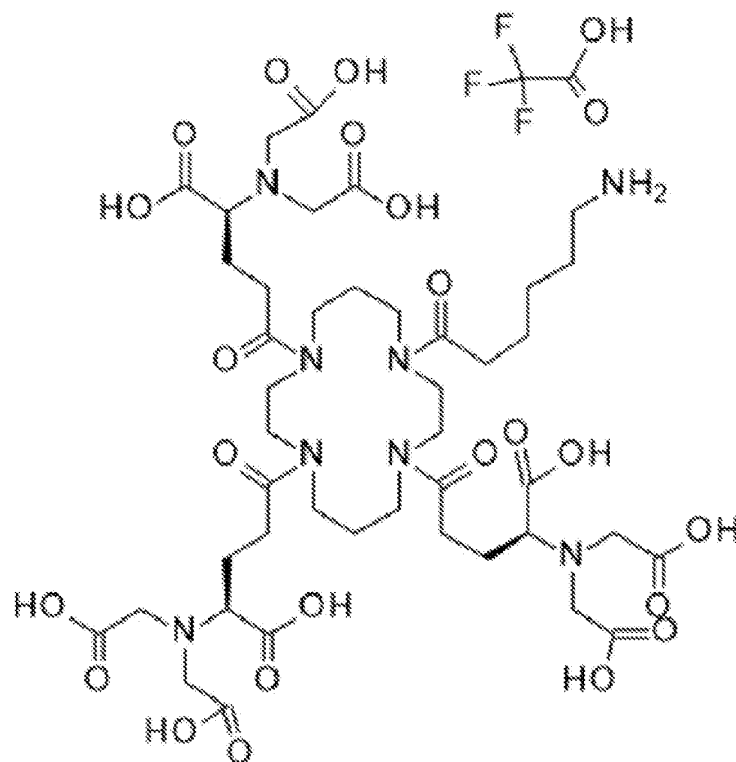
[0639] LC-MSの分析条件は下記のとおりである。

[表66]

分析条件	装置	カラム (I.D. × 長さ(mm))	移動相	割合(A/B)	流速(ml/分)	カラム温度(°C)	波長
SOD FA05	Acquity UPLC-SOD2	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 × 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA, CH ₃ CN	95/5 ⇒ 0/100 (1.0 分間) ⇒ 0/100 (0.4 分間)	0.9	35	210-400nm POA total

[0640] NTA (ST01) の合成

[化70]



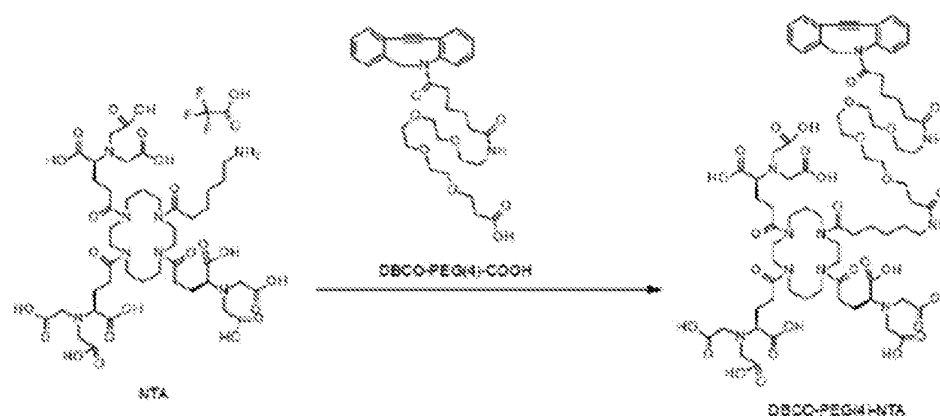
非特許文献 (J. Am. Chem. Soc., 2006年, 128巻, 7号, pp. 2365-2372) に記載の方法に従って合成した。

LCMS (ESI) $m/z = 1049.9$ (M+H)⁺

保持時間: 0.26分 (分析条件SQD FA05)

[0641] DBCO-PEG (4) - NTA (ST02) の合成

[化71]



窒素雰囲気下、 DBCO-PEG(4)-COOH (5.8 mg、0.01 mmol) 及び HATU (34.9 mg、0.03 mmol、1.1 eq) を DMF (50 μL) に溶解したのち、 DIEPA (3.8 μL 、0.02 mmol、2.0 eq) を加え室温で30分撹拌した。そこへ NTA (35 mg、3.0 eq) 及び DIEPA (22.8 μL 、0.12 mmol、6.0 eq) を溶解させた DMF 溶液 (100 μL) を加え室温でさらに30分撹拌した。

反応溶液を直接、逆相シリカゲルクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル) にて精製し、表題化合物 (DBCO-PEG(4)-NTA 、6.7 mg、42%) を得た。

LCMS (ESI) $m/z = 1612.3$ ($\text{M} + \text{H}$) +
保持時間: 0.57分 (分析条件 SQD FA05)

[0642] <調製例4-1: Tris-NTA 付加逆転写プライマーの調製>

0.7 mMの5'側にアジド基を有する逆転写プライマー (ファスマック社にて合成) と3.3 mMの DBCO-PEG(4)-NTA を3.3 mMの酢酸ナトリウム水溶液を含む67%の DMSO 溶液中で37℃24時間反応させた。反応液をエタノール沈殿で精製し、 Tris-NTA が5'末端に修飾された逆転写プライマーを調製した。調製した Tris-NTA 逆転写プライマー (終濃度90 μM) と塩化ニッケル水溶液 (終濃度100 mM

）を混合して1時間室温にて反応させた。反応液をエタノール沈殿にて精製し、T r i s－N i－N T A付加逆転写プライマーを調製した。

[0643] 5' 側にアジド基を有する逆転写プライマーの塩基配列（配列番号31）
[化72]



[0644] 〔評価例4：ディスプレイ分子と標的タンパク質の連結体を用いた検証〕

＜評価例4－1：ディスプレイ分子－F K B P連結体又はディスプレイ分子－F R B連結体を用いた検証＞

標的タンパク質としてF K B P及びF R B、これら2種類の標的タンパク質と三者複合体を形成するペプチドとして、合成例1で合成したF F－05、F F－06、F F－07を選択し、当該各ペプチドのmRNA－ディスプレイ分子の回収率を測定した。

[0645] （調製例4－1－1：mRNAの合成（F F－05～07））

鋳型DNA（（D－9）～（D－11））から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro転写反応によりmRNA（（mR－9）～（mR－11））を合成し、RNAClean XP（BECKMAN COULTER社）又はRNeasy MinElute Cleanup Kit（QIAGEN）により精製した。

[0646] 鋳型DNA（D－9）の塩基配列（配列番号32）（DNA配列：F F－05）

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGGTTTGCTCTTCTAGGT
CTCTGAACCGGTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0647] 鋳型DNA（D－10）の塩基配列（配列番号33）（DNA配列：F F－06）

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA

T A A G G A G A T A T A A A T A T G A C T C T G A A C G A G T G C G
G T C A T T G C C A T T A G C C G A C C G G C A C C G G C A C C G G
C A A A A A A A

[0648] 鋳型DNA (D-11) の塩基配列 (配列番号34) (DNA配列: FF-07)

G G C G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G T T A A C T T T A A
T A A G G A G A T A T A A A T A T G C A G T T G G A G T G G T T T G
T T T G G C C G A C T T A G C C G A C C G G C A C C G G C A C C G G
C A A A A A A A

[0649] mRNA (mR-9) の塩基配列 (配列番号35) (RNA配列: FF-05)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G G U U
U G C U C U U C U A G G U C U C U G A A C C G G U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0650] mRNA (mR-10) の塩基配列 (配列番号36) (RNA配列: FF-06)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G A C U
C U G A A C G A G U G C G G U C A U U G C C A U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0651] mRNA (mR-11) の塩基配列 (配列番号37) (RNA配列: FF-07)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G C A G
U U G G A G U G G U U U G U U U G G C C G A C U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0652] (調製例4-1-2: mRNA-ペプチドディスプレイ分子の調製 (FF-05~07))

WO2013/100132に記載の方法に準じて、調製例4-1-1で精製したmRNAの3'末端にリンカーを介してピューロマイシンを連結し

た。なお、ピューロマイシンリンカーとしては前述の a x P M - 2 7 を用いた。これを翻訳し、W O 2 0 1 7 / 1 5 0 7 3 2 に記載の方法に準じて環化反応、脱硫反応及び逆転写を行うことにより m R N A - ペプチドのディスプレイ分子を調製した。翻訳に必要な翻訳系及びアミノアシル化 t R N A は実験例 2 の調製例 2 - 1 - 2 と同様のものを使用した。

ただし、逆転写反応においては、調製したサンプルに下記逆転写プライマー (T r i s - N i - N T A を持たない逆転写プライマー)、又は調製例 4 - 1 で調製した T r i s - N i - N T A 付加逆転写プライマーを 1 . 1 等量加えて 7 0 ° C で 5 分インキュベーションした後、氷上で 5 分間静置した。その後 1 × M - M L V R T R e a c t i o n b u f f e r (P r o m e g a)、0 . 5 m M d N T P 混合物、8 U / μ L M - M L V R T (H -) (P r o m e g a) となるように試薬を加え、4 2 ° C で 1 時間反応させることによって行った。

[0653] 逆転写プライマーの塩基配列 (配列番号 3 8)

T T T T T T T G C C G G T G C C G G T G C C G G T C G G

[0654] (評価例 4 - 1 - 1 : m R N A ディスプレイ分子のプルダウンアッセイ (F F - 0 5 ~ 0 7))

1 × T B S、2 m g / m L B S A (I n v i t r o g e n)、2 m M D T T を含むバッファーに、調製例 4 - 1 - 2 で調製したディスプレイライブラリが 0 . 3 μ M、標的タンパク質を表 6 7 となるように添加して 4 ° C で 1 時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して 1 0 分間 4 ° C で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後 0 . 0 8 m M となるようにビオチンを加えさらに 1 0 分間 4 ° C で転倒混和した。標的タンパク質は調製例 1 - 1 ~ 1 - 4 で調製したタンパク質を用いた。

[0655]

[表67]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FRB-FLAG-Sor-His
2	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM FKBP-FLAG-Sor-His
3	0.4 μM FKBP-FLAG-TEV-Avi-bio
4	0.4 μM FRB-FLAG-TEV-Avi-bio

[0656] 条件1はFKBPがビオチン化されている一方で、FRBにのみHis tagが付与されている。条件2はFRBがビオチン化されている一方でFKBPにのみHis tagが付与されている。したがって、Tris-Ni-NTA付加逆転写プライマーで逆転写したmRNA-ディスプレイ分子は系中で非ビオチン化タンパク質と近接した状態でインキュベーションされる状態となっている。条件3、4はそれぞれ、ビオチン化はされているがHis tagを持たないFKBP及びFRBのみが存在している条件である。

[0657] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットを集めて上清を除いた。これを、Tris-Ni-NTAを持たない逆転写プライマーを用いた場合は1×TBS、2mg/mL BSA、2mM DTTを含むバッファーで、Tris-Ni-NTA付加逆転写プライマーを用いた場合は1×TBS、2mg/mL BSA、2mM DTT、500mM イミダゾールを含むバッファーでそれぞれ1回洗浄した。洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをWash buffer (1×TBS, 2mM DTT, 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich), 500mM アルギニン) で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

[0658] 実験例2の評価例2-1と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収、qPCRにて定量を行い、回収率を算出し、下記の表にまとめた。また、条件1から4におけるTris-Ni-NTAの有無の比較も実施した。

[0659] [表68]

ペプチド：FF－05

条件	Tris-Ni-NTA	
	(-)	(+)
	回収率 (%)	回収率 (%)
1	6.58E-04	7.31E-02
2	7.76E-04	2.76E-02
3	2.22E-05	2.61E-05
4	2.29E-05	4.14E-05

[0660] [表69]

ペプチド：FF－06

条件	Tris-Ni-NTA	
	(-)	(+)
	回収率 (%)	回収率 (%)
1	1.00E-02	1.86E-01
2	6.84E-03	1.49E-01
3	2.87E-05	2.03E-05
4	4.88E-05	4.17E-05

[0661] [表70]

ペプチド：FF－07

条件	Tris-Ni-NTA	
	(-)	(+)
	回収率 (%)	回収率 (%)
1	1.04E-04	3.21E-03
2	1.75E-04	6.57E-03
3	1.16E-05	1.29E-05
4	2.08E-05	2.56E-05

[0662] その結果、これら3種類のペプチド（FF－05～07）においてT r i

s-Ni-NTA逆転写プライマーによりmRNA-ディスプレイ分子と非ビオチン化タンパク質を近接させた条件においては、mRNA-ディスプレイ分子と非ビオチン化タンパク質が近接していない条件と比較して、FKBP及びFRBと三者複合体を形成するペプチドの回収率が最大で100倍以上上昇することが明らかとなった。

[0663] 〔評価例4-2：ディスプレイ分子-シクロフィリンA連結体又はディスプレイ分子-カルシニューリン連結体を用いた検証〕

標的タンパク質としてシクロフィリンA及びカルシニューリン、これら2種類の標的タンパク質と三者複合体を形成するペプチドとして、合成例1で合成したCC-05、CC-06、CC-07を選択し、当該ペプチドのmRNA-ディスプレイ分子の回収率を測定した。

[0664] (調製例4-2-1：mRNAの合成(CC-05~07))

鋳型DNA((D-12)~(D-14))から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro転写反応によりmRNA((mR-12)~(mR-14))を合成し、RNAClean XP(BECKMAN COULTER社)又はRNeasy MinElute Cleanup Kit(QIAGEN)により精製した。

[0665] 鋳型DNA(D-12)の塩基配列(配列番号39)(DNA配列:CC-05)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGTCTACTGCTGTGACTA
GGTTGAACAGTTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG
CAAAAAAA

[0666] 鋳型DNA(D-13)の塩基配列(配列番号40)(DNA配列:CC-06)

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTTAA
TAAGGAGATATAAATATGGATTGGCCGGGTTTGC
GGACTATTGGTTAGCCGACCGGCACCGGCACCGG

C A A A A A A A

[0667] 鋳型DNA (D-14) の塩基配列 (配列番号41) (DNA配列: CC-07)

G G C G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G T T A A C T T T A A
T A A G G A G A T A T A A A T A T G A T T T G G G T T C T T A C T A
A C A C T G T T G T T T A G C C G A C C G G C A C C G G C A C C G G
C A A A A A A A

[0668] mRNA (mR-12) の塩基配列 (配列番号42) (RNA配列: CC-05)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G U C U
A C U G C U G U G A C U A G G U U G A A C A G U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0669] mRNA (mR-13) の塩基配列 (配列番号43) (RNA配列: CC-06)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G G A U
U G G C C G G G U U U G C G G A C U A U U G G U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0670] mRNA (mR-14) の塩基配列 (配列番号44) (RNA配列: CC-07)

G G G U U A A C U U U A A U A A G G A G A U A U A A A U A U G A U U
U G G G U U C U U A C U A A C A C U G U U G U U U A G C C G A C C G
G C A C C G G C A C C G G C A A A A A A

[0671] (調製例4-2-2: mRNAディスプレイ分子の調製 (CC-05~07))

mRNAディスプレイ分子の調製は、実験例4の調製例4-1-2と同様の手法で実施した。

[0672] (評価例4-2-1: mRNAディスプレイ分子のプルダウンアッセイ (CC-05~07))

1×TBS、2mg/mL BSA (Invitrogen)、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーに、調製例4-2-2で調製したディスプレイライブラリが0.3μM、Calmodulin (富士フイルム和光純薬)を2μM、標的タンパク質を表71となるように添加して4℃で1時間静置した。その後、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと混合して10分間4℃で転倒混和し、標的タンパク質を固定化した。その後0.08mMとなるようにビオチンを加えさらに10分間4℃で転倒混和した。標的タンパク質は調製例2-1～2-4で調製したタンパク質を用いた。

[0673] [表71]

条件	標的タンパク質
1	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CnB-CnA-FLAG-Sor-His
2	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio および 0.4 μM CyA-FLAG-Sor-His
3	0.4 μM CyA-FLAG-TEV-Avi-bio
4	0.4 μM CnB-CnA-FLAG-TEV-Avi-bio

[0674] 条件1はシクロフィリンAがビオチン化されている一方で、カルシニューリンにのみHis tagが付与されている。条件2はカルシニューリンがビオチン化されている一方でシクロフィリンAにのみHis tagが付与されている。したがって、Tris-Ni-NTA付加逆転写プライマーで逆転写したmRNA-ディスプレイ分子は系中で非ビオチン化タンパク質と近接した状態でインキュベーションされる状態となっている。条件3、4はそれぞれ、ビオチン化はされているがHis tagを持たないシクロフィリンA及びカルシニューリンのみが存在している条件である。

[0675] 標的タンパク質を固定化したストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをマグネットで集めて上清を除いた。これを、Tris-Ni-NTAを持たない逆転写プライマーを用いた場合は1×TBS、2mg/mL BSA、2mM DTT、5mM CaCl₂を含むバッファーで、Tris-Ni-NTA付加逆転写プライマーを用いた場合は1×TBS、2mg/mL BSA、2mM DTT、5mM CaCl₂、500mM イミダゾールを

含むバッファーでそれぞれ1回洗浄した。洗浄後のストレプトアビジンコーティング磁気ビーズをWash buffer (1×TBS, 2mM DTT, 0.1% Tween20 (Sigma Aldrich), 500mM アルギニン) で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し、標的タンパク質及びそれに結合するペプチド-核酸結合体の溶出を行った。

[0676] 実験例2の評価例2-2-1と同様の方法でプルダウンしたディスプレイ分子を回収、qPCRにて定量を行い、回収率を算出し、下記の表にまとめた。また、条件1から4におけるTris-Ni-NTAの有無の比較も実施した。

[0677] [表72]

ペプチド：CC-05

条件	Tris-Ni-NTA	
	(-)	(+)
	回収率 (%)	回収率 (%)
1	1.63E-02	4.71E-02
2	1.41E-02	5.22E-01
3	1.80E-04	4.05E-04
4	1.58E-03	5.42E-03

[0678] [表73]

ペプチド：CC-06

条件	Tris-Ni-NTA	
	(-)	(+)
	回収率 (%)	回収率 (%)
1	4.38E-02	2.64E-01
2	1.61E-01	8.07E-01
3	1.40E-04	7.82E-04
4	3.95E-03	1.13E-02

[0679] [表74]

ペプチド：CC-07

条件	Tris-Ni-NTA	
	(-)	(+)
	回収率 (%)	回収率 (%)
1	3.13E-02	1.10E-01
2	5.46E-02	4.00E-01
3	7.66E-04	9.75E-04
4	2.55E-02	3.68E-02

[0680] その結果、これら3種類のペプチド（FF-05～07）においてTris-Ni-NTA逆転写プライマーによりmRNA-ディスプレイ分子と非ビオチン化タンパク質を近接させた条件においては、mRNA-ディスプレイ分子と非ビオチン化タンパク質が近接していない条件と比較して、シクロフィリンA及びカルシニューリンと三者複合体を形成するペプチドの回収率が最大で30倍以上上昇することが明らかとなった。

[0681] 調製例4及び評価例4により構成される実験例4の結果は、複数種類のタンパク質と複合体を形成するペプチドの取得効率を向上させる目的において、ディスプレイ分子と標的タンパク質をTris-Ni-NTA逆転写プライマーなどのリンカー（連結部）で連結した連結体でも達成されることを示している。

 特定の理論に拘束されることを意図しないが、このようなことが可能となるのは、ディスプレイ分子を一つの標的タンパク質と連結した連結体を用いることで、複数種類のタンパク質とペプチドの複合体がより安定となるためであると考えられる。

[0682] 実験例4の結果は、複数種類の標的タンパク質との複合体を形成するペプチドをAffinityによるセレクションによって取得する際に、ディスプレイ分子と一つの標的タンパク質を近接させることが極めて効果的であることを示すものである。

請求の範囲

- [請求項1] (1) 複数種類の標的分子同士を連結するか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 前記複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は前記1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結工程において用いられなかった標的分子を接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。
- [請求項2] (1) 複数種類の標的分子同士を連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 候補分子－核酸結合体を、前記連結工程において用意された連結体に接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。
- [請求項3] (1) 1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とを連結することで、連結体を用意する工程（連結工程）、及び(2) 前記連結工程において用いられなかった標的分子を、前記連結工程において用意された連結体に接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。
- [請求項4] 複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させるか、又は1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、該連結体に含まれない標的分子を接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。
- [請求項5] 複数種類の標的分子同士が連結された連結体に、候補分子－核酸結合体を接触させる工程を含む、目的分子をスクリーニングする方法。
- [請求項6] 1種類以上の標的分子と候補分子－核酸結合体とが連結された連結体に、前記連結体に含まれない標的分子を接触させる工程を含む、目的分子をスクリーニングする方法。
- [請求項7] 候補分子－核酸結合体と連結される前記1種類以上の標的分子が、

1 種類である、請求項 1、3、4 又は 6 に記載の方法。

[請求項8] 互いに近接した複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[請求項9] 前記複数種類の標的分子同士が互いに融合して標的融合分子を形成している、請求項 1、2、4、5 又は 8 に記載の方法。

[請求項10] 複数種類の標的分子同士が互いに融合した標的融合分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[請求項11] 前記互いに近接した複数種類の標的分子が固相担体上に固定化されている、請求項 8 に記載の方法。

[請求項12] 同一の固相担体上に固定化されている複数種類の標的分子に候補分子－核酸結合体ライブラリを接触させる工程（接触工程）を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[請求項13] 前記接触工程が、複数種類の標的分子から選択される 1 種類である第一の標的分子に、候補分子－核酸結合体それぞれと第一の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接触させる工程である、請求項 8 に記載の方法。

[請求項14] 複数種類の標的分子から選択される 1 種類である第一の標的分子に、候補分子－核酸結合体それぞれと前記第一の標的分子とは異なる標的分子が連結した複数種類の連結体を含む連結体ライブラリを接触させる工程を含む、目的分子をスクリーニングする方法。

[請求項15] 前記複数種類の標的分子から選択される少なくとも 1 種類の標的分子と候補分子－核酸結合体との複合体を回収する工程（回収工程）をさらに含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 前記回収工程により回収された前記候補分子－核酸結合体中の核酸を溶出する工程（溶出工程）をさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

- [請求項17] 前記複合体を形成した候補分子－核酸結合体中の核酸を増幅する工程（増幅工程）をさらに含む、請求項15又は16に記載の方法。
- [請求項18] 前記増幅工程で増幅した核酸から新たに候補分子－核酸結合体ライブラリを生成し、当該候補分子－核酸結合体ライブラリを使用して接触工程、回収工程、及び増幅工程を複数回繰り返す、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記複合体を形成した候補分子－核酸結合体から目的分子を同定する工程（同定工程）をさらに含む、請求項15～18に記載の方法。
- [請求項20] 前記候補分子がペプチドである、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項21] 前記複数種類の標的分子が2種類以上5種類以下である、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項22] 前記目的分子が、前記複数種類の標的分子と共に複合体を形成し得る分子である、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項23] 請求項1～22のいずれか一項に記載の方法を含む、ペプチドの製造方法。