

明 細 書

発明の名称： リンカー

技術分野

[0001] 本発明は、所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカー、当該リンカーの使用、当該リンカーを含む、遺伝情報物質－リンカー連結体、当該リンカーを含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体等に関する。

背景技術

[0002] 1. ディスプレイ法

進化分子工学のツールとして誕生した遺伝子型と表現型の対応付け技術は、ディスプレイ法とも称され、ファージディスプレイ法、リボソーム・ディスプレイ法、マイクロビーズドロップレット法、STABLE法（非共有結合DNAディスプレイ）、mRNAディスプレイ法（“In vitro virus”、Nemoto N, et al. FEBS Lett. 414, 405－408（1997）（非特許文献1）、WO98/016636（特許文献1）；または“RNA-peptide fusions”、Roberts, R. W. & Szostak, J. W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12297－12302（1997）（非特許文献2）、WO1998/31700（特許文献12））、cDNAディスプレイ法、光架橋型cDNAディスプレイ法（WO2016/159211（特許文献6））、TRAP（transcription-translation coupled with association of puromycin linker）ディスプレイ法（T. Ishizuka et al., TRAP display: a high-speed selection method for the generation of functional polypeptides., Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14, 5433

－5440（非特許文献3））、cDNA TRAPディスプレイ法（T. Kondo et al., cDNA TRAP display for rapid and stable in vitro selection of antibody-like proteins., Chem. Commun., 2021, 572416－572419（非特許文献4））などが知られている。

[0003] ディスプレイ法では、ライブラリーから機能のあるペプチドやタンパク質の分子を選択した際に、それに対応する遺伝子が連結しているのでその配列を容易に読み取ることができ、特定の機能を有するポリペプチドの遺伝情報を選択する際に有用である。無細胞翻訳系（in vitroタンパク質合成系）のディスプレイ法を、遺伝暗号のリプログラミングと組み合わせることにより、非天然アミノ酸残基を含むペプチド（非天然ペプチド）の合成が可能になる。

[0004] 2. ピューロマイシンを介したディスプレイ法

上記ディスプレイ法は、無細胞翻訳系（in vitroタンパク質合成系）を用いて、遺伝子型としてのmRNAと表現型としてのペプチド分子を連結させることにより、遺伝子型と表現型を一体化する技術である。代表的な手法として、チロシルtRNA 3'末端部分のアナログであるピューロマイシンを介して、合成されたペプチド分子とこれをコードするmRNAとを連結する方法がとられている。また、ピューロマイシン以外に、ピューロマイシン誘導体などの物質でも同様に、ペプチドとmRNAを連結可能であることが報告されている（WO2011/049157（特許文献2））。

[0005] このようなピューロマイシン様物質を介したディスプレイ法においては、ピューロマイシンを適当なリンカーを介してmRNAに連結させておき、これを無細胞翻訳系に導入してmRNAからペプチドを合成すると、ピューロマイシン様物質がリボソームにおけるペプチド転移反応の基質として伸長中のペプチド鎖のC末端に連結し、翻訳産物であるペプチド分子がピューロマイシン様物質を介してmRNAと連結する。ピューロマイシン様物質を介し

たディスプレイ法において、mRNAとピューロマイシン様物質は、RNAリガーゼを用いて共有結合により、もしくは核酸のハイブリダイズによって非共有結合的に、連結される。これらはmRNAディスプレイ法（*In vitro virus*法）、cDNAディスプレイ法、光架橋型cDNAディスプレイ法（WO2016/159211（特許文献6））、TRAP（*transcription-translation coupled with association of puromycin linker*）ディスプレイ法として、共有結合もしくは非共有結合的に様々な核酸物質をピューロマイシン様物質と連結可能である。

[0006] 上記手法において、ピューロマイシン様物質がリボソームにおけるペプチド転移反応の基質として作用するが、ピューロマイシン様物質を介した核酸とその翻訳産物の連結体について、1つの核酸に対して1つの翻訳産物が結合したものしか知られていない（例えば、WO1998/016636（特許文献1）、WO2011/049157（特許文献2）、WO2006/041194（特許文献3）、特表2011-528912（特許文献4）など）。ピューロマイシン様物質を介したディスプレイ法では、1つの核酸に対し、1価の翻訳産物（ペプチド）が結合したもののみが利用されていた。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：WO1998/016636
特許文献2：WO2011/049157
特許文献3：WO2006/041194
特許文献4：特表2011-528912
特許文献5：特開2008-125396
特許文献6：WO2016/159211
特許文献7：WO2012/026566
特許文献8：特開2008-125396

特許文献9: WO 2007/066627

特許文献10: WO 2019/077887

特許文献11: WO 2023/234425

特許文献12: WO 1998/31700

非特許文献

[0008] 非特許文献1: N Nemoto, et al., FEBS Lett., 1997, 414, 405-408

非特許文献2: Roberts, R. W, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1997, 94, 12297-12302

非特許文献3: T. Ishizuka et al., Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14, 5433-5440

非特許文献4: T. Kondo et al., Chem. Commun., 2021, 572416-572419

非特許文献5: Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012, 109 (2), 413-418

非特許文献6: Ko et al., J. Am. Chem. Soc. 2022, 144, 47, 21494-21501

非特許文献7: I. P. Korndorfer and A. Skerra, Protein Sci., 2002, 11, 4, 883-893

非特許文献8: K. A. McDonnell et al., J. Med. Chem., 2010, 53, 4, 1587-1596

非特許文献9: M. N. Pascha et al., ACS Chem. Biol., 2022, 17, 9, 2425-2436

非特許文献10: K. Muguruma et al., ACS Omega, 2019, 4, 11, 14390-14397

非特許文献11: N. Terasaka et al., Nat. Chem. Biol., 2014, 10, 7, 555-557

非特許文献12: H. Murakami et al., Nat. Metho

ds, 2006, 3, 5, 357–359

非特許文献13: T. Kawakami et al., Chem. Biol., 2008, 15, 1, 32–42

非特許文献14: M. Saito et al., Nat. Commun., 2021, 12, 1, 2654

非特許文献15: KATO T, et al. Nucleic Acids Res. 51, 8169–8180, 2023

非特許文献16: Y. Goto et al., J. Am. Chem. Soc. 131, 14, 5040–5041, 2009

非特許文献17: Zhenling Cui, et al., Front Bioeng Biotechnol. 8, 1031, 2020

非特許文献18: Mizusawa et al., Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 6, 2381–2387

非特許文献19: Hayashi et al., ACS Chem. Biol., 2012, 7, 3, 607–613

非特許文献20: Hadidi et al., Angew Chem Int Ed Engl., 2023, 62, 23, e202216784

非特許文献21: Starck et al., RNA., 2002, 8, 7, 890–903

非特許文献22: Bao T Le et al., Mol Ther Nucleic Acids., 2019, 1, 14, 142–157

非特許文献23: Irina Anosova et al., Nucleic Acids Res., 2016., Feb 18, 44, 3, 1007–1021

非特許文献24: Michiko Kimoto et al., Front Mol Biosci, 2022, May 24, 9, 851646

非特許文献25: Naho Akiyama et al., Nat Struct Mol Biol., 2024, Mar, 27

非特許文献26: Valerie de Crecy-Lagard et al., Trends Microbiol., 2021, Jan, 29, 1, 41-53

非特許文献27: M. H. Schreier et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 116, No. 4, 727-753

非特許文献28: H. Trachsel et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 116, No. 4, 755-767

非特許文献29: P. C. Jelenc et al., Proceedings of the National Academy Science of the United States of America Vol. 76, No. 7, 3174-3178

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の一態様は、所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカー、当該リンカーの使用、当該リンカーを含む、遺伝情報物質-リンカー連結体、当該リンカーを含む、遺伝情報物質-リンカー-ペプチド連結体等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、驚くべきことに、標的mRNAと、分岐した複数箇所の各々に結合したピューロマイシン様物質を含むリンカーが連結している、標的mRNA-リンカー連結体を、リボソームにおいて翻訳させることにより、1つのmRNAに対し複数の翻訳産物が結合した連結体を得られること、さらにはこのステップを繰り返すことにより、このような連結体を効率よく得られることを見出し、本発明を想到した。本発明のリンカーには、ピューロマイシン様物質が複数結合しているため、本発明のmRNA-リンカー連結

体は無細胞翻訳系に導入して、mRNAからペプチドを合成することで、核酸と翻訳産物の連結体を得ることができる。

[0011] 限定されるわけではないが、本発明は、以下の態様を含む。

[態様1]

所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および
少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質
を含むリンカーであって、

前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能
である、
前記リンカー。

[態様2]

前記所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部が、前記所望の
遺伝情報物質と結合可能な核酸を含む、
態様1に記載のリンカー。

[態様3]

前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結
させるための、態様1または2に記載のリンカー。

[態様4]

前記遺伝情報物質が、核酸である、態様1ないし3に記載のリンカー。

[態様5]

前記ピューロマイシン様物質が、ピューロマイシンである、態様1ないし
3に記載のリンカー。

[態様6]

所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および
少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質
を含むリンカーであって、

前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能
である、

前記リンカーの使用であって、

前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるための前記使用。

[態様 7]

(a) 態様 1 ないし 3 に記載のリンカー；および

(b) (a) のリンカーの結合部に結合した、前記遺伝情報物質を含む、遺伝情報物質－リンカー連結体。

[態様 8]

(a) 態様 1 ないし 3 に記載のリンカー；

(b) (a) のリンカーの結合部に結合した、前記遺伝情報物質；および

(c) (a) のリンカーの、少なくとも 2 つ以上のピューロマイシン様物質に結合した、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドを含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体。

[態様 9]

(1) 態様 7 に記載の遺伝情報物質－リンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を得られる、

を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法。

[態様 10]

(1) の工程の前に、(0) 態様 1 ないし 3 に記載のリンカーを、所望の遺伝情報物質と結合させ、遺伝情報物質－リンカー連結体を得る工程、を含む、態様 9 に記載の製造方法。

[態様 11]

(2) (1) の工程を 2 回以上繰り返す工程、を含む、態様 9 または 10 に記載の製造方法。

[態様 12]

態様 8 に記載の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を少なくとも 2

つ含む、ライブラリー。

[態様 1 3]

所望の標的物質に結合するペプチドのスクリーニング方法であって、
態様 8 に記載の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を少なくとも 2
つ含む、ライブラリーと、前記標的物質とを接触させる工程
を含む、前記スクリーニング方法。

[態様 1 4]

所望の標的物質とペプチドとの結合能の評価方法であって、
態様 8 に記載の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を、前記標的物
質と接触させる工程
を含む、前記評価方法。

[態様 1 5]

(1-i) 少なくとも 1 つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカー
と所望の遺伝情報物質とが結合した遺伝情報物質－リンカー連結体を、無細
胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー
中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物
質－リンカー－ペプチド連結体を得られる；

および

(2-i) (1-i) の工程を 2 回以上繰り返す工程
を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法。

[態様 1 6]

(1-ii) 少なくとも 2 つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカ
ーと所望の遺伝情報物質とが結合した遺伝情報物質－リンカー連結体を、無
細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカ
ー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報
物質－リンカー－ペプチド連結体を得られる、
を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法。

[態様 1 7]

所望の遺伝情報物質にコードされるペプチドを2つ以上、前記遺伝情報物質から提示する方法であって、

前記ペプチドはそれぞれ、前記ペプチドのC末端と共有結合可能な官能基を介して、前記遺伝情報物質と連結している、方法。

[態様18]

態様7に記載の遺伝情報物質ーリンカー連結体を無細胞翻訳系に供し、前記遺伝情報物質から前記ペプチドを翻訳する工程を含み、ここにおいて、前記ピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合する、工程を含む、態様17に記載の提示方法。

発明の効果

[0012] 前記「1つの遺伝情報物質に対しピューロマイシン様物質を介して複数の翻訳産物が結合した連結体」は、翻訳産物が標的結合能を有している場合に、複数の前記翻訳産物によって標的物質を認識することができる。これによって、標的に対する複数価相互作用（アビディティ効果）を前記翻訳産物に付与することが可能である。従って、このような本発明の連結体を、例えば、無細胞翻訳系のディスプレイ法（ピューロマイシン様物質を介したディスプレイ法等）およびアフィニティセクション（試験管内淘汰法）に使用することによって、標的物質に結合するペプチドー遺伝情報物質連結体を、より高効率に回収することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1-1]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」（配列番号1）、「c t c c c g c c c c c c g t c c」（配列番号60）のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下

付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-2]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-3]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-4]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し

構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-5]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgcccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-6]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgcccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-7]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgcccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-8]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-9]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図1-10]図1は、実施例で用いたリンカー1～15の各々の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgccccccgtcc」、「ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図2-1]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構

造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」（配列番号1）、「c t c c c g c c c c c c g t c c」（配列番号60）のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-2]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-3]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字につい

ては、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-4]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-5]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-6]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「ccccgcctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgcctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端

のリボース 3' 位の炭素原子がホスホジエステル結合を介して PEG またはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー 4～6、8、11～15 の合成に使用した。

[図2-7] 図2は、リンカー 2～15 の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「cccgccctcccgccccccgtcc」、「ctcccgccccccgtcc」の c、g および t は、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「cccgccctcccgccccccgtcc」、「ctcccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結した DNA を指す。前記 DNA は 3' 末端のリボース 3' 位の炭素原子がホスホジエステル結合を介して PEG またはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー 4～6、8、11～15 の合成に使用した。

[図2-8] 図2は、リンカー 2～15 の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「cccgccctcccgccccccgtcc」、「ctcccgccccccgtcc」の c、g および t は、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「cccgccctcccgccccccgtcc」、「ctcccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結した DNA を指す。前記 DNA は 3' 末端のリボース 3' 位の炭素原子がホスホジエステル結合を介して PEG またはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー 4～6、8、11～15 の合成に使用した。

[図2-9] 図2は、リンカー 2～15 の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「cccgccctcccgccccccgtcc」、「ctcccgccccccgtcc」の c、g および t は、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「cccgccct

ccccgccccccgtcc」、ctccccgccccccgtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-10]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中のccccgcctccccgccccccgtcc、ctccccgccccccgtccのc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、ccccgcctccccgccccccgtcc、ctccccgccccccgtccは、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-11]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中のccccgcctccccgccccccgtcc、ctccccgccccccgtccのc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、ccccgcctccccgccccccgtcc、ctccccgccccccgtccは、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-12]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中のccccgcctccccgccccccgtcc、

「c t c c c g c c c c c c g t c c」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-13]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-14]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」、「c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図2-15]図2は、リンカー2～15の各リンカーの合成に使用した前駆体の構造を示す。構造中の「ccccgccctccccgcccccccggtcc」、
「ctccccgcccccccggtcc」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「ccccgccctccccgcccccccggtcc」、「ctccccgcccccccggtcc」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEGまたはアルキル構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。アルキンピューロマイシンは、リンカー4～6、8、11～15の合成に使用した。

[図3]図3は、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによって、mRNAーリンカー連結体の形成を評価した結果である。図3a、bは、翻訳領域の一部がアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルを塩基とするデオキシヌクレオチドのいずれかでランダム化された、総塩基数の異なるいくつかのmRNAに対して、2価リンカー（リンカー4）が連結可能であることを解析した結果である。図3cは、翻訳領域の一部がアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルを塩基とするデオキシヌクレオチドのいずれかでランダム化されたmRNAに対して、分岐鎖構造またはリンカー中のピューロマイシン数に依らず、リンカーが連結可能であることを解析した結果である。図3dは、5'末端にリン酸基を有し、mRNAの3'末端とライゲーション反応により共有結合形成が可能な2価リンカー（リンカー8）が、翻訳領域の一部がアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルを塩基とするデオキシヌクレオチドのいずれかでランダム化された、塩基数の異なるいくつかのmRNAに対して連結可能であることを解析した結果である。

[図4]図4は、二つの分岐鎖構造の端部にアジド基をそれぞれ有するリンカー（リンカー4前駆体2）とmRNAとが結合した連結体に対して、CuAAC反応（AAC: Azide-Alkyne-cycloaddition）を介してアルキンピューロマイシンを導入することで、2つのピューロマ

イシンを端部に有するmRNAーリンカー連結体の作製が可能であることを解析した結果である。

[図5]図5は、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによってmRNAーリンカー連結体に対するペプチドの結合反応を評価した結果である。図5aはCy5、図5bはフルオロセインに由来する蛍光をそれぞれ検出した際に得られた画像である。これらは、2価リンカー（リンカー3）を用いて人工リサイクリング翻訳を行うことで、リンカー中のピューロマイシンを介して複数のペプチドを効率よく提示することが可能であることを解析した結果である。

[図6]図6aは、2価リンカー（リンカー3）を用いて人工リサイクリング翻訳を行うことで、リンカー中のピューロマイシンを介して複数のペプチド提示が可能であることを、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによって解析した結果である。図6bは、人工リサイクリング翻訳を行うことで、複数のペプチドが提示されたリンカー量が増大することを示す。図6c、図6dは、人工リサイクリング翻訳を行うことで、1価リンカー（リンカー2）のペプチド提示量が増大することを解析した結果である。

[図7]図7は、2価リンカー（リンカー3）をハイブリダイズさせたmRNAにおいても、逆転写反応の実施が可能であることを、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによって解析した結果である。

[図8]図8は、異なるリンカー長を有する2価リンカーにおいても、複数のペプチド提示が可能であることを、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによって解析した結果である。

[図9]図9aは、リンカー4に対して、5'末端へのビオチン修飾および、リンカー中の分岐部直前にグアニンを塩基とするデオキシヌクレオチドを修飾したリンカー12が、RNase T1によって特異的な切断が可能であることを、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによって解析した結果である。図9bは、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによってmRNAーリンカー12連結体に対するペプチドの結合反応を評価した結果である。これに

より、2価リンカー（リンカー12）を用いて人工リサイクリング翻訳を行うことで、リンカー中のピューロマイシンを介して複数のペプチドを効率良く提示することが可能であることが示された。

[図10]図10aは、Streptag IIおよびストレプトアビジンをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー（リンカー3）を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。また、人工リサイクリング翻訳を行うことで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（ $n=3$ ）。図10bは、Streptag IIおよびストレプトアビジンをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー（リンカー3～6）を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率増強が可能であり、分岐鎖長によってその増強率が変化することを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（ $n=3$ ）。

[図11]図11は、Human IgG Fc protein結合性ペプチドを用いた結合能評価において、2価リンカー（リンカー3）を用いて人工リサイクリング翻訳を行った場合に、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示した。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（ $n=3$ ）。

[図12]図12は、ヘマグルチニン（HA）結合性ペプチドを用いたリカバリー率評価において、2価リンカー（リンカー3）を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。また、人工リサイクリング翻訳を行うことで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（ $n=3$ ）。

[図13]図13は、neonatal Fc receptor (FcRn)

結合性ペプチドを用いたリカバリー率評価において、2価リンカー（リンカー3～6）を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率増強が可能であり、分岐鎖長が短くなるほど、その増強率が高くなることを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（ $n = 3$ ）。

[図14]図14は、ランダムペプチドライブラリーを用いたFc結合性ペプチドのセレクションにおける各ラウンドのリカバリー率評価において、2価リンカー（リンカー4）を用いた場合に、セレクションラウンドを重ねるごとに、（ネガティブセレクションで得られた）非特異結合に由来するDNAのリカバリー率に対して、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が顕著に高く得られることを示す。

[図15]図15は、Fc結合性ペプチドセレクションの遺伝子配列解析により得られた配列を用いたリカバリー率評価において、2価リンカー（リンカー4）を用いたセレクションから得られたペプチド配列が、非特異結合に由来するDNAのリカバリー率に対して、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が高く得られることを示す。

[図16]図16は、Streptag IIおよびストレプトアビジンをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、リンカーとmRNAとが共有結合した状態であっても、2価リンカー（リンカー8）を用いることで、1価リンカー（リンカー7）を用いた場合と比較して、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（ $n = 3$ ）。

[図17]図17aは、1価リンカー（リンカー9）および2価リンカー（リンカー10）の3'末端に対してアミノ酸がアシル化されたことを、ゲル電気泳動および蛍光イメージングによって解析した結果である。図17bは、リンカーの3'末端に対してアミノ酸がアシル化されたことによって作製された、ピューロマイシン様物質の構造を示す。図17cは、リンカーの3'末

端に対してアミノ酸がアシル化されたことによって作製された、2価リンカーの構造を示す。構造中の「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」のc、gおよびtは、シトシン、グアニン、チミンを塩基とするヌクレオチドをそれぞれ指し、「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」は、これらのヌクレオチドが連結したDNAを指す。前記DNAは3'末端のリボース3'位の炭素原子がホスホジエステル結合を介してPEG構造と連結されている。鍵括弧内の構造および下付きの数字については、繰り返し構造およびその繰り返し数をそれぞれ示す。

[図18]図18は、Streptag IIおよびストレプトアビジンをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー（リンカー10）の3'末端にあるリボースに対して、エステル結合を介してアミノ酸が共有結合し、ピューロマイシン様物質としての特性をなした状態であっても、2価リンカー（リンカー10）を用いることで、1価リンカー（リンカー9）を用いた場合と比較して、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（n=3）。

[図19]図19は、Streptag IIおよびストレプトアビジンをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、3価リンカー（リンカー11）を用いることで、1価リンカーを用いた場合と比較して、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上することを示す。また、人工リサイクリング翻訳を行うことで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が人工リサイクリング翻訳の回数依存的に向上することを示す。図中のグラフのリカバリー率（%）は平均値、エラーバーは標準偏差を示す（n=3）。

[図20]図20は、Streptag IIおよびストレプトアビジンをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、3価リンカー（リンカー15）を用いることで、1価リンカーを用いた場合と比較して、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が向上す

ることを示す。図中のグラフのリカバリー率（％）は平均値を示す（ $n = 2$ ）。

発明を実施するための形態

[0014] 非限定的に本発明は、以下の態様を含む。本明細書において他に断りが無い限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に開示された物質、材料および例は単なる例示であり、制限することを意図していない。本明細書において「一態様において」と言及する場合は、その態様に限定されない、即ち、非限定的であることを意味する。

[0015] 1. リンカー

一態様において、本発明はリンカーに関する。本発明のリンカーは、所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含み、

前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、前記リンカーである。前記共有結合は、好ましくはアミド結合である。

[0016] 「遺伝情報物質」は、リボソームにおいてペプチドに翻訳される（情報を含む）物質である。

[0017] 一態様において、「遺伝情報物質」は核酸である。遺伝情報物質としての核酸は、天然型であっても非天然型であってもよい。天然型核酸は天然に存在する修飾核酸を含み、非天然型核酸は非天然物質で修飾または一部構造が置換された核酸を含む。核酸の種類としては、RNA、RNA-DNAのハイブリッド、などを含む。限定されるものではないが、このような核酸としてRNAを好ましく使用することができる。前記遺伝情報物質の塩基配列は、既知のものであってもよいし、未知のものであってもよい。当該配列は、自然界に存在する配列に基づくものであってもよく、人為的に設計した配列であってもよい。例えば、有機合成によってランダムに合成された配列を有

してもよいし、PCR法を利用したランダム変異の挿入により配列未知のタンパク質をコードするようになったものでもよい。

[0018] 上記のとおり「遺伝情報物質」は、ペプチドをコードしているが、このペプチドのアミノ酸配列は、既知のものであってもよいし、未知のものであってもよい。また、このペプチドの長さに特に限定はない。一態様において、「遺伝情報物質」にコードされるペプチドの長さは、1個以上のアミノ酸から構成されるものであってよく、好ましくは2個以上であり、上限には特に限定はないが、1000個以下、500個以下、100個以下、50個以下、30個以下、20個以下であってよい。

[0019] 従って、「遺伝情報物質」の長さは、一態様において、3塩基以上であってよく、好ましくは6塩基以上であってよく、上限に特に限定はないが、3000塩基以下、1500塩基以下、300塩基以下、150塩基以下、90塩基以下、60塩基以下であってよい。

[0020] また、「遺伝情報物質」がコードするペプチドの種類は、特に限定されない。前記ペプチドは、tRNAが連結可能であり、リボソームによって縮合可能な分子を含むものであってよい。リボソームは、一般的なアミノ酸と構造が異なる様々な分子を翻訳可能であることが知られている (“Translation initiation with exotic amino acids using EF-P-responsive artificial initiator tRNA”, KATO T, et al. Nucleic Acids Res. 51, 8169–8180, 2023 (非特許文献15) 及び、“Translation Initiation with Initiator tRNA Charged with Exotic Peptides”, Goto Y, et al. J. Am. Chem. Soc. 131, 14, 5040–5041, 2009 (非特許文献16)、“Cell-Free Approach for Non-canonical Amino Acids Incorporation Into Polypeptides”, Zh

enling Cui, et al. Front Bioeng Biotechnol. 8, 1031, 2020 (非特許文献17))。従って、アミノ酸と異なる構造であってもリボソームによって翻訳可能であれば、本発明に適用可能である。すなわち、本明細書において、リボソームによって翻訳されるペプチドは、tRNAに連結可能であり、リボソームによって翻訳可能な分子であればよい。

[0021] 前記ペプチドは、天然のアミノ酸残基、非天然のアミノ酸残基、又はその他のtRNAに連結可能でありリボソームによって翻訳可能な構造、を含む分子であってもよい。ここで、非天然のアミノ酸は、tRNAが連結可能であり、リボソームによって縮合可能である化合物であればよく、その非限定な例として、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、L-アミノ酸、D-アミノ酸（D型アミノ酸とも言う）、N-メチルアミノ酸やN-エチルアミノ酸などのN-アルキルアミノ酸、ペプチド、 α 置換アミノ酸、 α - α -2置換アミノ酸、環状 α アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸などが挙げられる。また、前記ペプチドは、RNAが連結可能であり、リボソームによって縮合可能な、ヒドロキシ酸を含むものであってもよい。また、リボソームで「遺伝情報物質」から翻訳されたペプチドは、その形状に限定はなく、翻訳の後、一本鎖ペプチド、環状ペプチド（その一部が環状であるペプチドを含む）、特定の二次構造を有する形状、といったいずれの形状をとってもよい。一態様において、翻訳されたペプチドは環状である。

[0022] また、一態様において、前記ペプチドは標的物質に結合するペプチドである。一態様において、前記ペプチドはタンパク質のフラグメント又は全長である。一態様において、前記ペプチドは標的物質のアンタゴニスト又はアゴニストである。一態様において、前記ペプチドは抗原または当該抗原に対する抗体である。非限定的に、前記ペプチドは、リボソームにおいて、ペプチド転移反応の基質として伸長中のペプチドであってもよい。本明細書における「遺伝情報物質にコードされるペプチド」は、遺伝情報物質からの翻訳が

完全に完了したもの他、翻訳中で伸長中のものも含む。

[0023] 「所望の遺伝情報物質と結合可能な構造」は、所望の遺伝情報物質と直接的に、または、間接的に結合可能な構造をいう。

[0024] 「所望の遺伝情報物質と間接的に結合可能な構造」の一態様は、所望の遺伝情報物質と、適切なリンカーを介して結合することが可能な構造をいう。前記適切なリンカーは、所望の遺伝情報物質と本発明のリンカーとを接続可能なリンカーである。前記適切なリンカーは、所望の遺伝情報物質と直接的に結合可能な物質と、本発明のリンカーに直接的に結合可能な物質とを含む。前記所望の遺伝情報物質と直接的に結合可能な物質として、前記所望の遺伝情報物質と結合可能な核酸を使用することができる。

[0025] また、前記本発明のリンカーに間接的に結合可能な物質の一態様は、互いに結合可能な一組の官能基の一方である。互いに結合可能な一組の官能基を選択し、その一方の官能基を前記適切なリンカーに、他方の官能基を本発明のリンカーに使用することで、前記適切なリンカーと本発明のリンカーを結合することができる。この場合、前記「互いに結合可能な一組の官能基」は、当業者の技術常識に基づき適宜選択できる。このような官能基の組を用いた結合のための反応の非限定的な例として、アジド-アルキンのペアを代表とするクリックケミストリーまたはバイオコンジュゲーション反応を介した反応、求核性官能基-求電子性官能基のペアを用いた求核置換または求核付加反応などが挙げられる。これらの具体的な例として、アジドと非環状歪みアルキンのペア、アジドと環状歪みアルキンのペア、チオールとマレイミドのペア、チオールとハロアセチルのペアが挙げられる。また、前記適切なリンカーの構造は、前記の目的を達成できる構造であれば、特に限定されない。前記の目的に鑑み、当業者の技術常識に基づき、適切な構造を選択することができる。

[0026] 以上、本発明のリンカーの「所望の遺伝情報物質と間接的に結合可能な構造を有する結合部」の一態様は、所望の遺伝情報物質と、適切なリンカーを介して結合する場合において、前記適切なリンカーが有する「互いに結合可

能な一組の官能基の一方」と結合できる、他方の官能基を有する構造を有する結合部である。

[0027] また「所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部」の異なる一態様は、前記所望の遺伝情報物質と結合可能な核酸を含む結合部である。「所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部」が、前記所望の遺伝情報物質と結合可能な核酸を含む場合、本発明のリンカーは、リンカー中の核酸部分が所望の遺伝情報物質と直接結合することができる。

[0028] 「遺伝情報物質と結合可能な核酸」の核酸も、天然型であっても非天然型であってもよく、天然型の核酸と非天然型の核酸が混在していてもよい。限定されるものではないが、このような核酸としてDNAを使用することができる。また本明細書において、前記「遺伝情報物質と結合可能な核酸」の核酸を構成しうる「非天然型の核酸」には、ペプチド核酸も含まれる。ペプチド核酸は、主鎖にペプチド構造を保持したDNA若しくはRNAに類似した構造を有する分子であり、PNAと呼称される場合もある。ペプチド核酸は、糖（デオキシリボース若しくはリボース）の代わりに、N-（2-アミノエチル）グリシンがアミド結合したものが主鎖となっている。そして、核酸塩基に相当するプリン環やピリミジン環が、メチレン基とカルボニル基を介して主鎖に結合している。ペプチド核酸も、所望の遺伝情報物質と結合可能である限り、天然型の核酸と同様に、前記リンカーの構成要素となりうる。

[0029] 前記核酸は、前記リンカーの目的を踏まえ、技術常識に基づき、「所望の遺伝情報物質と結合可能な」適切な構造を選択できる。好ましくは、共有結合または非共有結合可能な構造である。前記核酸の塩基配列は特に限定されない。前記核酸の塩基配列の長さも特に限定されず、所望の遺伝情報物質と結合可能な長さであればよく、所望の遺伝情報物質の長さに合わせて適宜決定してもよい。一態様において、前記核酸の塩基配列の長さは、所望の遺伝情報物質と特異的にハイブリダイズ可能な長さである。一態様において、核酸の塩基配列の長さは、2塩基以上、3塩基以上、5塩基以上、10塩基以上、11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上、14塩基以上、15塩基

以上、16塩基以上、17塩基以上、18塩基以上、19塩基以上、20塩基以上、22塩基以上である。核酸と所望の遺伝情報物質との結合を維持する観点から、ハイブリダイズさせる核酸の塩基配列の長さが9塩基以下の場合には、ハイブリダイズに加え、前記核酸を所望の遺伝情報物質と、後述の方法等で共有結合させることが好ましい。また、一態様において、前記核酸の塩基配列の長さは、200塩基以下、150塩基以下、100塩基以下、80塩基以下、70塩基以下、60塩基以下、55塩基以下、50塩基以下、45塩基以下、40塩基以下、35塩基以下、30塩基以下、25塩基以下である。一態様において、前記核酸の塩基配列の長さは、上述した長さ以上と上述した長さ以下の任意の組合せの範囲内である。前記核酸の塩基配列の全部または一部が前記遺伝情報物質と結合可能である。

[0030] 前記核酸と遺伝情報物質は、非共有結合及び／又は共有結合によって連結可能である。前記核酸と遺伝情報物質との結合の具体的な態様として、限定されるものではないが、好ましくは、標的RNA（好ましくは、標的mRNA）と特異的にハイブリダイズすることが可能な一本鎖DNAにより非共有結合させる態様である。また、特異的部位で標的RNAとハイブリダイゼーションした、光架橋性非天然核酸を含む一本鎖DNAにUV照射して、標的RNAと前記一本鎖DNAを光架橋させる態様、RNAリガーゼまたはDNAリガーゼを使用して標的RNAと一本鎖DNAの末端同士を酵素的に共有結合させる態様、なども含まれる。

[0031] 一態様において、「遺伝情報物質と結合可能な核酸」は、標的RNAと特異的にハイブリダイズすることが可能な一本鎖DNAである。限定するものではないが、このようなDNAは非天然型の核酸を含んでもよい。

[0032] 前記リンカーは、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含む。本明細書において、2つのピューロマイシン様物質を含む前記リンカーを「2価リンカー」、またn個のピューロマイシン様物質を含む前記リンカーを「n価リンカー」ともいう。

[0033] 本明細書において、「ピューロマイシン様物質」とは、リンカーを構成す

る物質と連結可能な部位を持ち、リボソーム上でペプチドのC末端と共有結合可能である物質を意味する。このような物質は、後述のピューロマイシンやその誘導体に限定されるものではなく、例えば、特許文献1に記載されているピューロマイシンとサプレッサー tRNA とが結合し、一体となってリボソームに認識されるような分子であってもよい。「ピューロマイシン様物質」は、一態様において、リボソームのPサイトに結合しているペプチジル tRNA と反応して伸長ペプチドとの複合体を形成する機能を有する物質であり、このような物質であれば、特に限定はない。ここで「ペプチジル tRNA」は、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドの翻訳工程で生じるペプチジル tRNA であってよい。一態様において、ピューロマイシン様物質は、このようなペプチジル tRNA と、リボソームにおいて共有結合、好ましくはアミド結合することができる。

[0034] また「ピューロマイシン様物質」の一態様は、ヌクレオシドもしくは核酸またはこれらに類似した化学構造骨格を有する物質あるいはその連続体と、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質が化学的に結合した構造を有し、リボソームのPサイトに結合しているペプチジル tRNA と反応して伸長ペプチドとの複合体を形成する機能を有する物質である。

[0035] 一態様において、ピューロマイシン様物質は、ピューロマイシンである。

[0036] また、一態様として、ピューロマイシン様物質は、ピューロマイシン誘導体である。ピューロマイシン誘導体は、ピューロマイシン構造を完全に有しているものに限られず、ピューロマイシン構造の一部が欠落しているもの、または一部が別の構造に置換されているものも包含する。ピューロマイシン誘導体の非限定な例として、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド (PANS-アミノ酸) や、3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合して形成されるアミド結合で連結した3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (AANS-アミノ酸) が挙げられる。PANS-アミノ酸の例として、アミノ酸部がグ

リシンのPANS-Gly、バリンのPANS-Val、アラニンのPANS-Ala、又はアミノ酸部が全ての各アミノ酸に対応するPANS-アミノ酸混合物を挙げることができる。また、AANS-アミノ酸の例として、アミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、バリンのAANS-Val、アラニンのAANS-Ala、またはアミノ酸部が全アミノ酸の各アミノ酸に対応するAANS-アミノ酸混合物を挙げることができる。また、ヌクレオシドまたはヌクレオシドとアミノ酸がエステル結合したものなども使用できる(WO2011/049157(特許文献2))。さらには、ピューロマイシン誘導体の非限定な例として、ピューロマイシンのアルキンアナログ(“Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin” Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012, 109(2), 413-418(非特許文献5))や、翻訳を光で制御できるPuroswitch(“Optical Control of Translation with a Puromycin Photoswitch” Ko et al., J. Am. Chem. Soc. 2022, 144, 47, 21494-21501(非特許文献6))を挙げることができる。

[0037] また、一態様において、ピューロマイシン様物質は、ピューロマイシンもしくはその誘導体と1残基もしくは2残基のデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドからなる物質であってもよい。このような物質の非限定な例として、リボシチジルピューロマイシン(rCpPur)、デオキシジルピューロマイシン(dCpPur)、デオキシウリジルピューロマイシン(dUpPur)などが挙げられる。

[0038] また、一態様において、ピューロマイシン様物質は、ピューロマイシン中の糖骨格の1位に結合しているアデニン様構造が、異なる化学構造骨格を有する物質で置換されているものであっても良い。非限定的な例として、ピューロマイシン中の糖骨格の1位に結合しているアデニン様構造が、アデニン

、チエノ [3、4-d] ピリミジン骨格とアゼチジン構造、または、チエノ [3、4-d] ピリミジン骨格と3、3-ジフルオロアゼチジン構造に置換されているものが挙げられる (“Inherently Emissive Puromycin Analogues for Live Cell Labelling” Hadidi et al., Angew Chem Int Ed Engl., 2023, 62, 23, e202216784、非特許文献20)。

[0039] また、一態様において、プューロマイシン様物質は、プューロマイシン中の糖骨格の3位に結合しているアミノ酸様構造が、天然のアミノ酸残基、非天然のアミノ酸残基、ヒドロキシ酸やヒドロキシ酸誘導体のようなヒドロキシ基を有する残基に置換され、リボソーム上でペプチドのC末端とアミド結合またはエステル結合を形成するようなものであっても良い。非限定的な例として、プューロマイシン中の糖骨格の3位に結合しているアミノ酸様構造が、βアラニン、または、(2r)-3-ヒドロキシー-2-メチルプロパノイック酸に置換されているものが挙げられる (“Synthesis of puromycin derivatives with backbone-elongated substrates and associated translation inhibitory activities” Mizusawa et al., Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 6, 2381-2387、非特許文献18)。

[0040] また、一態様において、プューロマイシン様物質は、プューロマイシン中の糖骨格の5位に対して、一つの核酸、複数の核酸、低分子化合物またはPEGなど多様な分子が結合したものであっても良い。非限定的な例として、プューロマイシン中の糖骨格の5位に対して、核酸が1〜30個連結されたもの、ビオチンが連結されたもの、フルオレセインが連結されたものが挙げられる (“Puromycin oligonucleotides reveal steric restrictions for ribosome entry and multiple modes of tr

anslation inhibition” Starck et al., RNA, 2002, 8, 7, 890-903、非特許文献21)。

[0041] また、ピューロマイシンは、チロシルtRNAの3'末端に対する類縁物質であり、下記に記述するような核酸構造の代替が適用し得る。公知の知見として、RNAまたはDNAの糖骨格またはリン酸部は、様々な非天然糖骨格またはアミド結合骨格によって、代替可能であることが知られている(Bao T Le et al., Antisense Oligonucleotides Targeting Angiogenic Factors as Potential Cancer Therapeutics., Mol Ther Nucleic Acids., 2019, 1, 14, 142-157, 非特許文献22及び、Irina Anosova et al., The structural diversity of artificial genetic polymers., Nucleic Acids Res., 2016, Feb 18, 44, 3, 1007-1021, 非特許文献23)。このような非天然骨格の非限定的な例として、PNA、LNA、PS、2'-F、2'-OMe、2'-O-OMe、PMO、NP、UNA、4'-Thio、FANA、CeNA、HNA、tcDNA、ENA、ANA、hDNA、FRNA、GNA、TNA、XyNA、dXyNA、等があげられる。代替可能な非天然糖骨格またはリン酸骨格を利用して、ピューロマイシンまたはピューロマイシン類縁体の糖骨格部分またはリン酸部分を代替した物質も、ピューロマイシン様物質の一態様である。

また、非天然型の塩基をもつRNAまたはDNA分子は、DNAまたはRNAのハイブリダイズ機能を有していることが知られている(Michiko Kimoto et al., Genetic Code Engineering by Natural and Unnatural Base Pair Systems for the Site-Specific Incorporation of Non-Standard A

mino Acids Into Proteins., Front Mol Biosci, 2022, May 24, 9, 851646. 非特許文献24)。このような非天然骨格の非限定的な例として、isoG、isoC、P、Z、s、y、Ds、Pa、Ds、Px、5SICS、NaM、TPT3、NaM、CNMO、TAT1、NaM、5FM等があげられる。非天然塩基骨格を利用して、ピューロマイシンまたはピューロマイシン類縁体の塩基部分を代替した物質も、ピューロマイシン様物質の一態様である。

[0042] また、天然に存在する修飾型RNA分子も、天然型RNAの機能を保持または、一部の機能を有していることが広く知られている(Naho Akiyama et al., Structural insights into the decoding capability of isoleucine tRNAs with lysidine and agmatidine., Nat Struct Mol Biol., 2024, Mar, 27 (非特許文献25) 及び、Valerie de Crecy-Lagard., Functions of bacterial tRNA modifications: from ubiquity to diversity., Trends Microbiol., 2021, Jan, 29, 1, 41-53 (非特許文献26))。天然に存在する修飾型RNA骨格を用いてピューロマイシンまたはピューロマイシン類縁体の糖骨格、リン酸骨格または塩基部分を代替した物質も、ピューロマイシン様物質の一態様である。

[0043] 前記リンカーに含まれるピューロマイシン様物質の数は、少なくとも2つ以上で、上限は特に限定されない。非限定的に、好ましくは、2つ〜8つ、2つ〜7つ、2つ〜6つ、2つ〜5つ、2つ〜4つ、2つ〜3つである。一態様において、リンカーに含まれるピューロマイシン様物質の数は2つ、3つ、4つ、5つまたは6つである。

[0044] 所望の遺伝情報物質と結合可能な核酸は、リンカーの端部、または中間部のいずれに存在してもよい。仮に、前記リンカーを、2種類以上のモノマー

化合物を連結して作製された共重合体と解釈し、共重合体を構成する各モノマーの詳細な構造を省略し、リンカーの構造を単純に、隣り合う各モノマーの連結部を線で結んで記述した場合に得られる線によって表現する。本明細書において、前記線で表現されたリンカーの線の端をリンカーの端部、線中の連結部を両端に持つ部分をリンカーの中間部とする。

[0045] 少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質は、リンカーの端部、または中間部のいずれに存在してもよい。一態様において、リンカーは分岐しており（分岐リンカー）、分岐鎖の各々にピューロマイシン様物質が結合していてもよい。なお、本明細書において、分岐とは、前記のようにリンカーを線で記述した際に、枝分かれした線が得られる状態をいう。また、分岐リンカーの各分岐鎖の長さは同じであっても異なってもよい。一態様として、分岐リンカーの各分岐鎖の長さは同じである。

[0046] 前記リンカーの構造は、翻訳工程において伸長中のペプチドのC末端に対して連結可能な構造であれば、特に限定されない。当業者は、前記リンカーの目的を踏まえ、技術常識に基づき、適切な構造を選択できる。

[0047] 限定するものではないが、前記リンカーは全体として、適度に柔軟性があり、側鎖の少ない単純な直鎖構造を基本とし、少なくとも1つの分岐部を含み、前記分岐部において少なくとも3つに分岐する、側鎖の少ない直鎖構造（以下、分岐部において結合している各々の鎖状構造部を「分岐鎖」という。）を有するものであってよい。なお、本明細書において、前記分岐部において3つに分岐するとは、分岐部において、3つの鎖状構造物が、各々の端部で結合している状態をいう。例えば、実施例記載のリンカー1は分岐部を有さず、リンカー3は1つの分岐部と3つの分岐鎖を有している。前記分岐鎖は、さらに分岐部を含んでもよい。また、限定するものではないが、リンカーは全体として、親水性であってよい。また、限定するものではないが、前記リンカーを構成するために、例えば、一本鎖や二本鎖DNAやRNA等のオリゴヌクレオチド、ポリエチレンなどのポリアルキレン、ポリエチレングリコール（PEG）などのポリアルキレングリコール、ポリスチレン、直

鎖状の多糖類、直鎖状のペプチド等の直鎖状物質又はこれらの組合せを適宜選択して用いることができる。これらの直鎖状物質を組み合わせる際には、適宜、それらを適当な連結基（ $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NHCO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHNH}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}_2\text{H}-\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ [nは例えば1～10、好ましくは1～3]、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}-$ など）で化学的に連結することができる。

[0048] 非限定的な一態様において、前記リンカーは、以下の（１）～（４）の構造を含む。

[0049] （１）ホスホジエステル結合を介した遺伝情報物質との連結部、および、ホスホジエステル結合を介したピューロマイシンとの連結部；

（２）３つの分岐鎖が結合している分岐部；

（３）PEGから構成される、遺伝情報物質に連結される直鎖部、PEG単体、アルキレン単体、またはPEGとアルキレンの組み合わせから構成される直鎖部；

ならびに、

（４）前記直鎖部におけるホスホジエステル結合および／またはアミド結合による連結部、および／またはCuAAC反応（AAC: Azide-Alkyne-cycloaddition）、もしくはSPAAC反応（strain-promoted Azide-Alkyne-cycloaddition）アジド-アルキン付加環化反応）を介して結合している連結部。

[0050] もしくは、非限定的な一態様において、前記リンカーは、以下の（１）～（４）の構造を含む。

[0051] （１）ホスホジエステル結合を介した遺伝情報物質との連結部、および、ホスホジエステル結合を介したピューロマイシンとの連結部；

（２）４つの分岐鎖が結合している分岐部；

（３）PEGから構成される、遺伝情報物質に連結される直鎖部、PEG単体、アルキレン単体、またはPEGとアルキレンの組み合わせから構成さ

れる直鎖部；

ならびに、

(4) 前記直鎖部におけるホスホジエステル結合および／またはアミド結合による連結部、および／またはCuAAC反応(AAC: Azide-Alkyne-cycloaddition)、もしくはSPAAC反応(strain-promoted Azide-Alkyne-cycloaddition)アジド-アルキン付加環化反応)を介して結合している連結部。

[0052] 前記リンカーの長さは、翻訳工程において伸長中のペプチドのC末端に対して連結可能な構造であれば特に限定されない。リンカーの全体としての長さは、リンカーの提示効率に大きな影響を与えないことが知られている(“cdNA TRAP display for rapid and stable in vitro selection of antibody-like proteins” T. Kondo et al., Chem. Commun., 2021, 572416-572419 (非特許文献4))。当業者は本願リンカーの目的を踏まえ、技術常識に基づき適切な長さを適宜選択できる。

[0053] 前記リンカーの合成は、公知の方法を用いて行うことが可能である。非限定的に、例えば、核酸に結合している分岐した直鎖状物質に、CuAAC反応(AAC: Azide-Alkyne-cycloaddition)、またはSPAAC反応(strain-promoted Azide-Alkyne-cycloaddition)アジド-アルキン付加環化反応)を用いて、ピューロマイシン様物質を導入することができる。

[0054] 前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能であるとは、前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能な状態でリンカー中(の端部または中間部)に存在していることを意味する。このような状態にあるピューロマイシン様物質は、リボソームにおいて、ペプチド転移反応の基質として伸長中のペプチドのC末端と、共

有結合可能であると考えられる。前記共有結合の好ましい一態様は、アミド結合である。当業者であれば、従来技術に基づき、このような状態になるように、リンカーを適宜設計することができる。その一態様は、前記ピューロマイシン様物質が有するヌクレオシド（ヌクレオシドに類似した化学構造骨格を含む。）が、所望のペプチドのC末端に位置するアミノ酸（アミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質を含む。）と共有結合し得る状態である。一態様として、前記ピューロマイシン様物質の少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは全部、は、リンカーを構成する分岐鎖の両端部のうち、分岐部に結合していない方の端部に結合している。また、一態様において、前記ピューロマイシン様物質は、リンカーの中間部に存在する分岐鎖の側鎖に結合している。

[0055] よって、ピューロマイシン様物質が結合可能なペプチドの種類、大きさ（長さ）は、特に限定されない。所望のペプチドの一態様は、直鎖状ペプチドであり、好ましくは、そのC末端が直鎖状であるペプチドである。前記ペプチドは、天然のアミノ酸残基のみならず、非天然のアミノ酸残基を含むものであってもよい。このようなペプチドの非限定な例として、実施例に記載した蛍光性モデルペプチド（アミノ酸配列：配列番号19）、ストレプトアビジン結合ペプチド（アミノ酸配列：配列番号21）、ヒト新生児Fc受容体（FcRn）結合ペプチド（アミノ酸配列：配列番号23）、ヘマグルチニン（HA）結合ペプチド（アミノ酸配列；配列番号25）、ヒトIgGFcタンパク質（Fc）結合ペプチド（アミノ酸配列；配列番号27）が挙げられ、前記ペプチドは、この中から選択される、少なくとも1つ以上のペプチドであってよい。

[0056] また、非限定的に、前記ペプチドは、リボソームにおいて、ペプチド転移反応の基質として伸長中のペプチドであってもよい。本明細書における「ペプチド」は、遺伝情報物質からの翻訳が完全に完了したものの他、翻訳中で伸長中のものも含む。

[0057] 一態様において、前記リンカーは前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質

にコードされるペプチドとを連結させるために使用される。

[0058] 前記リンカーは、その使用目的に応じて適宜修飾してもよい。限定されるものではないが、公知の修飾法を用いることができる。例えば、ビオチン、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグなどに代表されるなどの結合用物質、蛍光分子、蛍光性タンパク質、化学発光タンパク質、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの発色用タンパク質などで修飾することにより、下記4. に記載の遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を、下記「8. 結合能の評価方法」に好適に使用することができる。また、前記リンカーに対する修飾物質の数に特に限定はなく、単数であっても複数であってもよい。

[0059] 2. リンカーの使用

一態様において、本発明は前記リンカーの、遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるための使用に関する。

[0060] 一態様において、本発明は、

所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および
少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質
を含むリンカーであって、

前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、

前記リンカーの使用であって、

前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるための前記使用、に関する。

[0061] 「リンカー」およびリンカーの構成要素等については、「1. リンカー」で説明した通りである。リンカー中の「所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部」は、前記遺伝情報物質に結合する。前記ピューロマイシン様物質は、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である。そのため、前記リンカーを介することにより、前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させることが可能である。前記ピューロマイ

シン様物質は前記リンカー中に少なくとも2つ以上存在するため、2つ以上の前記ペプチドを、前記遺伝情報物質と連結させることが可能である。

[0062] 本発明は、前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるために使用されるリンカーに関する。

[0063] 本発明は、前記リンカーを含むキットまたは組成物（例えば、実験用組成物）に関する。前記キットまたは組成物は、例えば、遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるために使用される。または、前記キットまたは組成物は、下記「7. スクリーニング方法」、「8. 結合能の評価方法」、「10. ペプチドの提示方法」等に使用される。

[0064] 3. 遺伝情報物質－リンカー連結体

一態様において、本発明は、遺伝情報物質－リンカー連結体に関する。本発明の遺伝情報物質－リンカー連結体は、

(a) 前記リンカー；および

(b) (a) のリンカーの結合部に結合した、前記遺伝情報物質を含む。

[0065] 「リンカー」およびリンカーの構成要素、「遺伝情報物質」等は、「1. リンカー」または「2. リンカーの使用」に説明した通りである。

[0066] 前記連結体は、前記リンカー中の「所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部」に、前記遺伝情報物質が連結した態様である。

[0067] 「1. リンカー」において説明した通り、前記リンカーの一態様は、所望の遺伝情報物質と間接的に結合可能な構造を有する結合部を含むリンカーである。この態様において、前記連結体は、さらに前記適切なリンカーを含んでよく、遺伝情報物質－前記適切なリンカー－本発明のリンカーの連結体であってよい。前記適切なリンカーは、所望の遺伝情報物質と本発明のリンカーとを接続可能なリンカーである。前記適切なリンカーは、所望の遺伝情報物質と直接的に結合可能な物質と、本発明のリンカーに直接的に結合可能な物質とを含む。

[0068] また、前記連結体は、その構成要素として、前記(a)および(b)を含

んでいればよく、連結体の製造工程において、必ずしも前記リンカーを使用する必要はなく、「リンカー前駆体」を用いてもよい。「リンカー前駆体」とは、前記リンカーを作製するための中間体であり、例えば、前記リンカーにピューロマイシン様物質を結合する前の中間体が挙げられる。このようなリンカー前駆体の一態様は、ピューロマイシン様物質を結合するための反応基を2つ以上有しており、それぞれにピューロマイシン様物質を結合することによって、前記リンカーとなる特徴を有したものである。このようなリンカー前駆体も、本発明の一態様である。

[0069] 例えば、実施例3-2に記載されているように、所望の遺伝情報物質とリンカー前駆体とを結合させた後に、ピューロマイシン様物質を結合して得られる遺伝情報物質-リンカー連結体も、その構成要素として前記(a)および(b)を含んでいることから、前記「遺伝情報物質-リンカー連結体」の一態様である。

[0070] また、一態様において、本発明は、
所望の遺伝情報物質と、
少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含み、
前記所望の遺伝情報物質と、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質が連結されており、

前記ピューロマイシン様物質のうち、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、
所望の遺伝情報物質とピューロマイシン様物質の連結体、を含む。前記リンカーは、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含み、前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である。本明細書において、「遺伝情報物質とピューロマイシン様物質の連結体」は、特に技術的に不都合がない限り、前記「遺伝情報物質-リンカー連結体」を含みうる。

[0071] 前記遺伝情報物質-リンカー連結体は、連結体を構成する前記リンカーを介して、前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドと

を連結させることが可能である。本発明は一態様において、前記連結体の、前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるための使用に関する。

[0072] 前記連結体は、また、「6. ライブラリー」の調製、「7. スクリーニング方法」、「8. 結合能の評価方法」、「10. ペプチドの提示方法」等に、好適に使用することができる。本発明は、一態様において、前記リンカーと前記遺伝情報物質との連結体の、ライブラリー調製、スクリーニング方法、または、結合能の評価方法の使用に関する。

[0073] 本発明はまた、一態様において、前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるために使用される、前記リンカーと前記遺伝情報物質との連結体に関する。本発明はまた、一態様において、ライブラリー調製、スクリーニング方法、または、結合能の評価方法に使用される、前記リンカーと前記遺伝情報物質との連結体に関する。

[0074] 本発明は、前記リンカーと前記遺伝情報物質との連結体を含むキットまたは組成物（例えば、実験用組成物）に関する。前記キットまたは組成物は、例えば、遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるために使用される。または、前記キットまたは組成物は、下記「6. ライブラリー」の調製、「7. スクリーニング方法」、「8. 結合能の評価方法」、「10. ペプチドの提示方法」等に使用される。

[0075] 4. 遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体
一態様において、本発明は、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体に関する。前記遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体は、

- (a) 前記リンカー；
 - (b) (a) のリンカーの結合部に結合した、前記遺伝情報物質；および
 - (c) (a) のリンカーのピュロマイシン様物質の少なくとも1つに結合した、前記遺伝情報物質にコードされるペプチド
- を含む。

[0076] 「リンカー」およびリンカーの構成要素、「遺伝情報物質」、「ペプチド

」等は、「1. リンカー」、「2. リンカーの使用」、または、「3. 遺伝情報物質－リンカー連結体」に説明した通りである。

[0077] (c) のペプチドは、リンカーの少なくとも1つ、好ましくは2つ以上のピューロマイシン様物質に連結している。好ましくは(c)のペプチドは、リンカーのピューロマイシン様物質の全部または一部(2つ以上)に連結している。一態様において、(c)のペプチドは、リンカーのピューロマイシン様物質の全部に連結している。すなわち、(c)のペプチドの数の上限は、リンカーの有するピューロマイシン様物質の数である。一態様において、(c)のペプチドは、リンカーのピューロマイシン様物質の全部に連結している。非限定的に、2つ以上であり、好ましくは、2つ～8つ、2つ～7つ、2つ～6つ、2つ～5つ、2つ～4つ、2つ～3つのペプチドが連結している。一態様において、2つのペプチドが連結している。

[0078] 前記「遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体」は、例えば、「6. ライブラリー」の調製、「7. スクリーニング方法」、「8. 結合能の評価方法」、「10. ペプチドの提示方法」等に、好適に使用することができる。本発明は一態様において、前記遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の、ライブラリー調製、スクリーニング方法、または、結合能の評価方法の使用に関する。本発明は一態様において、ライブラリー調製、スクリーニング方法、または、結合能の評価方法に使用される、前記遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体に関する。

[0079] また、一態様において、本発明は、

(d) 所望の遺伝情報物質とピューロマイシン様物質の連結体；

(e) (d)の連結体が有するピューロマイシン様物質に結合した、前記所望の遺伝情報物質にコードされるペプチドを含む、遺伝情報物質－ピューロマイシン様物質－ペプチド連結体、を含む。

[0080] 「所望の遺伝情報物質とピューロマイシン様物質の連結体」、「ペプチド」等は、3. 遺伝情報物質－リンカー連結体、または上記に説明した通りで

ある。

[0081] 本発明は、前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を含むキットまたは組成物（例えば、実験用組成物）に関する。本発明は、前記遺伝情報物質ーピューロマイシン様物質ーペプチド連結体を含むキットまたは組成物（例えば、実験用組成物）に関する。前記キットまたは組成物は、例えば、下記「６．ライブラリー」の調製、「７．スクリーニング方法」「８．結合能の評価方法」、「１０．ペプチドの提示方法」等に使用される。

[0082] ５．遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体の製造方法（１）

一態様において、本発明は、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体の製造方法に関する。前記製造方法は、

（１）本発明の遺伝情報物質ーリンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を得られる、を含む。

[0083] 非限定的に、（１）の工程の前に、（０）前記リンカーを、所望の遺伝情報物質と結合させ、遺伝情報物質ーリンカー連結体を得る工程、を含む。

[0084] 「リンカー」およびリンカーの構成要素、「遺伝情報物質」、「ペプチド」等は、「１．リンカー」、「２．リンカーの使用」、「３．遺伝情報物質ーリンカー連結体」、または、「４．遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体」に説明した通りである。

[0085] 工程（０）において、リンカーと遺伝情報物質とを結合する手法は特に限定されず、結合様式に応じて任意の公知の手法によって行うことが可能である。「ハイブリダイゼーション」は、リンカーと遺伝情報物質を、核酸のハイブリダイゼーションに適した条件下（温度、塩濃度等）に供することによって行うことができる。さらに特異的部位で標的mRNAとハイブリダイゼーションした一本鎖DNAにUV照射して光架橋により結合させる態様、RNAリガーゼまたはDNAリガーゼを使用して標的mRNAと一本鎖DNA

の末端同士を酵素的に共有結合させる態様、なども、公知の材料、公知の条件を用いて行うことができる。

[0086] 工程（１）において、工程（０）で得られた遺伝情報物質－リンカー連結体に基づき、リボソームにおいて遺伝情報物質の翻訳を行う。前記リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を得られる。

[0087] 遺伝情報物質を翻訳する手法は、特に限定されず、翻訳のための公知の方法を用いて行うことができる。ペプチドは、前記ピューロマイシン様物質に結合する翻訳工程が終了したペプチドであっても、あるいは、リボソームにおいて、ペプチド転移反応の基質として伸長中のペプチドであってもよい。

[0088] 非限定的に、前記製造方法（特に（１）の翻訳工程）は、無細胞翻訳系を用いる。非限定的に、無細胞翻訳系は、細胞より抽出したリボソームの他、翻訳に関与するタンパク因子群、tRNA、アミノ酸、ATPなどのエネルギー源、その再生系を組み合わせたもので、mRNAをタンパク質に翻訳することができるものであれば特に限定されない。非限定的に、無細胞翻訳系は、開始因子、伸長因子、解離因子、アミノアシルtRNA合成酵素などを含むことができる。これらの因子は、種々の細胞の抽出液から精製することによって得ることができる。因子を精製するための細胞は、例えば原核細胞、または真核細胞を挙げることができる。原核細胞としては、大腸菌細胞、高度好熱菌細胞、または枯草菌細胞を挙げることができる。真核細胞としては、酵母細胞、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、植物細胞、昆虫細胞、または動物細胞を材料にしたものが知られている。またtRNAやアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）は天然に存在するものに加え、人工tRNAや非天然アミノ酸を認識する人工アミノアシルtRNA合成酵素を用いることもできる。また、化学的に合成されたtRNAやRNAリガーゼなどによって連結されたtRNAも用いることができる。

[0089] また、非限定的に、無細胞翻訳系は、再構成型の無細胞翻訳系である。再構成型の無細胞翻訳系の例としては、主に大腸菌抽出液を細分化し、各因子

を再構成することにより、翻訳と関係のない成分が除かれた系である。再構成型の無細胞翻訳系には精製したリボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、mRNA、アミノアシルtRNA、基質としてATPやGTP等が必要である (M. H. Schreier, B. Erni and T. Staehelin (1977) "Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors." *Journal of Molecular Biology*, Vol. 116, No. 4, 727-753 (非特許文献27) ; H. Trachsel, B. Erni, M. H. Schreier and T. Staehelin (1977) "Initiation of mammalian protein synthesis. II. The assembly of the initiation complex with purified initiation factors." *Journal of Molecular Biology*, Vol. 116, No. 4, 755-767 (非特許文献28))。これらのうち、アミノアシルtRNAは同一反応液中にtRNAとアミノアシル-tRNA合成酵素およびその基質を加えることで代替が可能である。また、一般の無細胞翻訳系において行われているように、翻訳反応の効率や忠実性を上げるため、翻訳終止因子、リボソーム再生因子、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、ヌクレオチド二リン酸キナーゼ、ピロフォスファターゼなどのタンパク質や酵素およびその基質を添加することも可能である (P. C. Jelenc and C. G. Kurland (1979) "Nucleoside triphosphate regeneration decreases the frequency of translation errors" *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* Vol. 76, No. 7,

3174-3178（非特許文献29））。

[0090] 再構成型の無細胞翻訳系は、従来の細胞抽出液を使用する無細胞翻訳系よりもヌクレアーゼやプロテアーゼなどの阻害物質の混入を容易に防ぐことができる。

[0091] また、特殊アミノ酸を含むペプチドを合成する場合には、非限定的に、F I T system（WO2012/026566（特許文献7））を使用することができる。

[0092] 実施例5の図5（b）や実施例6の図6（a）、（b）に示されたとおり、翻訳反応が1回の場合であっても、人工リサイクリング翻訳を行った場合と比べるとその量は少ないものの、前記リンカー中の各ピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合した、遺伝情報物質-リンカー-ペプチド連結体を得られた。理論に縛られるものではないが、その理由として、翻訳反応の後、リボソームが自然にペプチドから解離し、2個目またはそれ以降のペプチドの翻訳を開始し、翻訳合成されたペプチドがリンカーの各ピューロマイシン様物質に結合することが考えられる。あるいは、翻訳される遺伝情報物質に複数のリボソームが結合してポリソームを形成し、それぞれのリボソームで翻訳されたペプチドが、リンカーの各ピューロマイシン様物質に結合することも想定される。

[0093] 前記遺伝情報物質-リンカー-ペプチド連結体は、製造された後に、即ち、ペプチドの合成が終了した後に（ペプチドの合成が途中の場合も含む）、リボソームから解離することが望ましい。連結体とリボソームの解離、即ち、ペプチドのリボソームからの解離は、公知の方法によって行うことができる。リボソームがその機能を発揮するためには、適切な立体構造を維持することが必要となるが、そのためにはMgイオンが必要である。よって、Mgイオンと結合可能な物質、例えばEDTAを添加することにより、Mgイオンが奪われ、リボソームが変性しその機能が失われる。従って、非限定的に、例えばEDTAを添加してリボソームを変性させることにより、効率よくリボソームから解離した状態の連結体を得ることができる。また、EDTA

に代えて、リボゾームを変性し得る物質を添加してもよい。

- [0094] 一態様において、前記製造方法は、(1)の工程を2回以上繰り返すことを含む(工程(2))。(1)の工程を2回以上繰り返すことを含む前記製造方法を、本明細書において「人工リサイクリング翻訳(法)」ということがある。(1)の工程を繰り返す回数は特に限定されない。一態様において、2回～8回、2回～7回、2回～6回、2回～5回、2回～4回、2回～3回繰り返す。一態様において、(1)の工程を2回繰り返す。また、一態様において、(1)の工程を3回繰り返す。
- [0095] なお、リンカーとしてn価リンカーを使用する場合、人工リサイクリング翻訳は、2回以上であってよいが、ペプチドのピューロマイシン様物質への結合効率の観点からは、繰り返す回数が多い方が好ましく、n回以上がより好ましい。遺伝情報物質の翻訳を2回以上繰り返すためには、翻訳が完了した、または、翻訳途中のペプチドから、リボソームをいったん解離させることが望ましい。すなわち、遺伝情報物質の翻訳工程の後に、リボソームの解離工程を行うことが望ましい。リボソームの解離方法は、上述した通りである。人為的にリボソームの解離を行わなくても、リボソームが自然にペプチドから解離し、2個目またはそれ以降のペプチドの翻訳を開始する場合もある。
- [0096] 上記したMgイオンと結合可能な物質を添加する方法によりリボソームの解離を行った場合、次の翻訳工程を行うに際し、リボソーム非変性条件とした後、未変性のリボソームを追加して添加することが好ましい。
- [0097] 例えば、 $Mg(OAc)_2$ (例えば、濃度9～20mM程度)を加えることにより、Mgイオンを加え、リボソームを翻訳可能な状態にすることができる。
- [0098] また、前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を磁性ビーズなどの固層上に固定化し、リボソーム変性条件にある液相部分を除いた後、リボソーム非変性条件の溶液を加えることにより、リボソームを翻訳可能な状態にすることができる。

- [0099] 一態様において、前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体は、製造された後に、mRNAーリンカーーペプチド連結体のmRNA部分の安定性を向上させるための処理を行ってもよい。安定化のための処理として、例えば、連結体を鋳型に逆転写反応を行うことにより、RNAーDNAハイブリッド鎖を形成させてもよい。非限定的に、翻訳反応により得られた遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を含む反応液に、逆転写反応溶液を加えて、逆転写反応を行う。
- [0100] 非限定的に、前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体は、ピューロマイシン様物質を1つしか含まないリンカーを用いた場合よりも、ペプチド結合物質を用いた回収によるリカバリー率が高い。一態様において、前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を用いることにより、ピューロマイシン様物質を1つしか含まないリンカーを用いた場合よりも、ペプチド結合物質を用いた回収によるリカバリー率が、1.5倍、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、100倍以上、600倍以上のペプチド結合物質（標的物質）を取得することが可能である。
- [0101] ペプチド結合物質（標的物質）はペプチドと結合しうる物質であれば、種類は特に限定されない。非限定的な、前記標的物質の例として、タンパク質、核酸、糖鎖、低分子化合物、細胞などが挙げられる。一態様において、標的物質はタンパク質である。
- [0102] 一態様において、本発明は、
- (1) 前記リンカーを、所望の遺伝情報物質と結合させ、遺伝情報物質ーリンカー連結体を得る工程；および
 - (2) 工程(1)で得られた遺伝情報物質ーリンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を得られる、
- を含む方法によって製造された、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体に関する。

[0103] このような「遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体」も、例えば、「6. ライブラリー」の調製、「7. スクリーニング方法」、「8. 結合能の評価方法」、「10. ペプチドの提示方法」等に、好適に使用することができる。

[0104] 6. ライブラリー

一態様において、本発明は、本発明の遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を少なくとも2つ含む、ライブラリーに関する。

[0105] 「リンカー」およびリンカーの構成要素、「遺伝情報物質」、「ペプチド」等は、「1. リンカー」、「2. リンカーの使用」、「3. 遺伝情報物質ーリンカー連結体」、または、「4. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体」に説明した通りである。

[0106] 前記ライブラリーは、前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を少なくとも2つ含む、ことを特徴し、その他の点においては公知の方法において調製することが可能である。例えば、実施例10、11、12、13、15、16にあるように、前記リンカーは、異なるディスプレイ法のいずれにおいても高い回収率を示したことから、ピューロマイシン様物質を用いた公知のディスプレイ法及びそのライブラリーに対して用いることができる。

[0107] 非限定的に、前記ライブラリーは、無細胞翻訳系において前記リンカーが遺伝情報物質と共有結合的もしくは非共有結合的に連結されたディスプレイ法を組み合わせで作製したライブラリーである。また、非限定的に、ライブラリーは、mRNAディスプレイ法、TRAPディスプレイ法、またはRAPIDディスプレイ法のライブラリーである。

[0108] また、非限定的に、前記ライブラリーは、ランダムペプチドライブラリーである。例えば、遺伝情報物質としてランダム化された核酸を使用することで、それらにコードされる多様なペプチドを含む、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体のライブラリーを得ることができる。

[0109] 前記遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体は、所望のペプチドを少なくとも2つ以上含み、各ペプチドは、リンカー中のピューロマイシン様物質

に1つずつ結合しており、2つ以上のペプチドが（リンカーの長さ等に応じて）作用しあう可能性のある近距離に存在しうる。そのため前記ペプチドに対して、より弱い結合能を有するペプチド結合物質のスクリーニングが可能となる。また、本発明のライブラリーを用いることによって、標的物質に結合する遺伝情報物質－ペプチド連結体を、より高効率に回収することが可能となる。

[0110] 7. スクリーニング方法

一態様において、本発明は、所望の標的物質に結合するペプチドのスクリーニング方法に関する。前記方法は、前記遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を少なくとも2つ含む、ライブラリーと、前記標的物質とを接触させる工程、を含む。

[0111] 「リンカー」およびリンカーの構成要素、「遺伝情報物質」、「ペプチド」、「ライブラリー」等は、「1. リンカー」、「2. リンカーの使用」、「3. 遺伝情報物質－リンカー連結体」、「4. 遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体」、または、「6. ライブラリー」に説明した通りである。

[0112] 非限定的な、前記標的物質の例として、タンパク質、核酸、糖鎖、低分子化合物、細胞等が挙げられる。一態様において、標的物質はタンパク質である。

[0113] 前記スクリーニング方法は、前記遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を少なくとも2つ含む、言い換えると、前記ライブラリーを使用する、ことを特徴とし、その他の点においては公知のスクリーニング方法を用いることができる。前記スクリーニング方法では、前記ペプチドに対して、より弱い結合能を有するペプチド結合物質のスクリーニングが可能となる。また、本発明のスクリーニング方法によって、標的物質に結合する遺伝情報物質－ペプチド連結体を、より高効率に回収することができる。

[0114] 8. 結合能の評価方法

一態様において、本発明は、所望の標的物質とペプチドとの結合能の評価方法に関する。前記方法は、発明の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結

体を、前記標的物質と接触させる工程、を含む。

[0115] 「リンカー」およびリンカーの構成要素、「遺伝情報物質」、「ペプチド」等は、「1. リンカー」、「2. リンカーの使用」、「3. 遺伝情報物質ーリンカー連結体」、または、「4. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体」に説明した通りである。

[0116] 前記評価方法は、本発明の遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を、前記標的物質と接触させる、ことを特徴とし、その他の点においては特に限定されない。一態様において、前記評価方法は、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を、前記標的物質と接触させる工程、および、連結体中のペプチドと標的物質の結合能を測定する工程を含む。結合能の評価方法は特に限定されず、公知の結合能の評価方法を用いることができる。前記標的物質は、溶液中に存在する態様であってもよく、ビーズ、チップ、プレートなどの担体上に固定されていてもよく、また、細胞、ウイルスなどに発現していてもよい。また、本発明の遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を、ビーズまたはセンサーチップなどへ固定化し、標的物質との相互作用を評価することが可能である。前記標的物質に対する結合能は、公知の手法によって評価することができる。このような結合能の評価のための手法の非限定的な例として、表面プラズモン共鳴法やバイオレイヤー干渉法に代表される質量差を基にした検出方法、ELISA法、qPCR定量法、フローサイトメーター、色素染色法、化学発色検出法、化学発光検出法、蛍光発光検出法などの検出方法が挙げられる。

[0117] 本発明の遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体は、公知のアフィニティタグ及び修飾物質、例えば、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグなどに代表される結合用物質、蛍光分子、蛍光性タンパク質、化学発光タンパク質、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの発色用タンパク質によって修飾することができる。また、実施例に記載されているように、ビオチンによって標識することも可能である。このようにして修飾された遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体は、固定化、精製、結合能の評価などに

適宜使用することができる。

[0118] また、前記修飾された遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を、ビーズ、チップ、プレート上に固定化されている標的物質や、細胞、ウイルスなどに発現している標的物質と反応させ、公知の標識検出手法によってその結合性を同定することも可能である。

[0119] 前記修飾された遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体に対する結合能は、公知の手法によって評価することができる。その非限定な例として、表面プラズモン共鳴法やバイオレイヤー干渉法に代表される質量差を基にした検出法、ELISA法、qPCR定量法、フローサイトメーター、色素染色法、化学発色検出法、化学発光検出法、蛍光発光検出法などの検出手法によって、その結合能を評価可能である。

[0120] 実施例にも示される通り、前記評価方法は、本発明の遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を用いるため、標的物質に対する結合能が向上し、ペプチドに対して、より弱い結合能を有するペプチド結合物質であっても、その結合能をより正確に評価することが可能となる。

[0121] 9. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体の製造方法（2）

一態様において、本発明は、

（1-i）少なくとも1つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーと所望の遺伝情報物質とが結合した遺伝情報物質ーリンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体を得られる；

および

（2-i）（1-i）の工程を2回以上繰り返す工程を含む。

[0122] 一態様において、本発明は、工程（1-i）の前に、（0-i）所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部、および、少なくとも1つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーであって、前記ピューロマイシン

様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、前記リンカーを、所望の遺伝情報物質と結合させ、遺伝情報物質－リンカー連結体を得る工程、を含む。

を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法に関する。

[0123] 一態様において、本発明は、

(1-i i) 少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーと所望の遺伝情報物質とが結合した遺伝情報物質－リンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を得られる、

を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法に関する。

[0124] 一態様において、本発明は、工程(1-i i)の前に、(0-i i) 所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部、および、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーであって、前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、前記リンカーを、所望の遺伝情報物質と結合させ、遺伝情報物質－リンカー連結体を得る工程、を含む。ここで、リンカーの構成要素、「遺伝情報物質」、「ペプチド」等は、「1. リンカー」、「2. リンカーの使用」、「3. 遺伝情報物質－リンカー連結体」、または、「4. 遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体」に説明した通りである。また、工程(1) および(2)については、上記で説明した通りである。

[0125] 「5. 遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法(1)」に記載した製造方法は、人工リサイクリング翻訳の工程を含む。本発明者らは、人工リサイクリング翻訳の工程を含む方法は、前記「2つ以上のピューロマイシン様物質を含む」リンカーに限らず、「1つのピューロマイシン様物質を含む」リンカー(本明細書において「1価リンカー」ともいう。)を供した場合でも有効であることを見出した。このことは、例えば、実施例10の図10、実施例11の図11、および実施例12の図12に示されている。

これらいずれの実施例においても、1価リンカーを使用した場合、翻訳工程1回のものと2回のものとを比較すると、後者のリカバリー率が大幅に向上していた。理論に縛られるものではないが、これは、1つのピューロマイシン様物質を有するリンカーを翻訳工程に供する場合、1回の翻訳工程では、ペプチドが結合していないリンカーが反応液中に多く残るところ、翻訳工程を2回以上繰り返すことにより、反応液中の、ペプチドが結合したリンカーが増加するためと考えられる。

[0126] 前記製造方法により得られる遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体は、所望の標的物質に結合するペプチドのスクリーニング方法や、所望の標的物質とペプチドとの結合能の評価方法に、好適に使用することができる。前記スクリーニング方法や、前記結合能の評価方法には、特に限定はなく、それぞれ公知の方法を用いることができる。

[0127] 「5. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体の製造方法(1)」に記載した事項は、技術的に矛盾がない限り、「9. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体の製造方法(2)」にも適用される。

[0128] 10. ペプチドの提示方法

一態様において、本発明は、

所望の遺伝情報物質にコードされるペプチドを2つ以上、前記遺伝情報物質から提示する方法であって、

前記ペプチドはそれぞれ、前記ペプチドのC末端と共有結合可能な官能基を介して、前記遺伝情報物質と連結させる、方法に関する。

[0129] 「遺伝情報物質」、「ペプチド」等は、「1. リンカー」、「2. リンカーの使用」、「3. 遺伝情報物質ーリンカー連結体」、または、「4. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体」に説明した通りである。

[0130] 一態様において、前記提示方法は、

前記遺伝情報物質ーリンカー連結体を無細胞翻訳系に供し、前記遺伝情報物質から前記ペプチドを翻訳する工程を含み、ここにおいて、前記ピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合する、工程を含む。

[0131] 「リンカーを遺伝情報物質と結合させる工程」、「無細胞翻訳系」、「ペプチドを翻訳する工程」等は、「5. 遺伝情報物質ーリンカーーペプチド連結体の製造方法（1）」に説明した通りである。

[0132] 本発明の提示方法は、所望の遺伝情報物質から、これをコードするペプチドを複数提示することができるため、アビディティが向上し、標的物質に結合する遺伝情報物質ーペプチド連結体を、より高効率に回収することができる。

実施例

[0133] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0134] [実施例1：各種リンカーの合成]

リンカーは、mRNAハイブリダイズ領域として「c c c g c c t c c c g c c c c c c g t c c」（配列番号1）または「c t c c c g c c c c c c g t c c」（配列番号60）を含むように設計した。また、リンカー1、2、7、9は所望のペプチドのC末端とアミド結合可能なピューロマイシンを1つ、リンカー3～6、8、10、12は2つ、リンカー11、15は3つ、リンカー13は4つ、リンカー14は6つ含むように設計した（図1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10）。前記リンカーの合成方法については、以下のように設計を行った。

[0135] リンカー1、7、9、10：下記に対応する非特許文献を参照し、リンカー1（非特許文献3）、リンカー7（“In Vitro Selection of Anti-Akt2 Thioether-Macrocyclic Peptides Leading to Isoform-Selective Inhibitors” Hayashi et al., ACS Chem. Biol., 2012, 7, 3, 607-613、非特

許文献 19)、リンカー 9, 10 (特許文献 2)、一般的なホスホロアミダイト法による合成および高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による精製

。

[0136] リンカー 2 : 一般的なホスホロアミダイト法によって 3' 末端にチオールを有するリンカー 2 前駆体 (図 2-1) を合成し、前記チオールのマレイミドへのマイケル付加反応による Cy 5 修飾を行った後、HPLC による精製

。

[0137] リンカー 3 : 一般的なホスホロアミダイト法によって 5' 末端に 2 個の 1 級アミンを有するリンカー 3 前駆体 1 (図 2-1) を合成し、一端にアミン反応性 N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルを有する 4-アジド-ブタン-1-オイック酸 NHS エステルと反応させリンカー 3 前駆体 2 (図 2-2) を合成した後、HPLC 精製。続けて、一般的なホスホロアミダイト法によってリンカー 3 前駆体 3 (図 2-2) を合成し、SPAAC 反応を介してリンカー 3 前駆体 2 と結合させリンカー 3 を合成した後、HPLC による精製。

[0138] リンカー 4~6、8、11~15 : 一般的なホスホロアミダイト法によって 5' 末端に複数個の 1 級アミンを有するリンカー 4~6、8、11~15 前駆体 1 (図 2-3、2-4、2-5、2-7、2-8、2-10、2-11、2-13、2-15) を合成し、一端にアミン反応性 NHS エステルを有する 4-アジド-ブタン-1-オイック酸 NHS エステルと反応させ、リンカー 4~6、8、11~15 前駆体 2 (図 2-3、2-4、2-5、2-7、2-9、2-10、2-12、2-14、2-15) を合成した後、HPLC 精製。続けて、一般的なホスホロアミダイト法によってアルキンピュロマイシン (図 2-6) を合成し、CuAAC 反応を介してリンカー 4~6、8、11~15 前駆体 2 と結合させリンカー 4~6、8、11~15 を合成した後、HPLC による精製。

[0139] 上記で設計した合成方法に基づいて、リンカー 1、3 については BEX 社 (日本)、リンカー 2、4~15 についてはジーンデザイン社 (日本)、に

合成を委託した。リンカー12については、ジーンデザイン社（日本）に合成委託したリンカー12前駆体2とアルキンピューロマシンを用いて合成を行った。リンカー4～12、15、リンカー12前駆体2については、ジーンデザイン社によってHPLC（BioAccord（商標）SYSTEM, Waters社）を用いた解析（使用カラム：XBridge C18 Column 130Å 2.5μm 4.6mm x 75mm、カラム温度：60℃、溶媒A：100mM ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）8mM トリエチルアミン、溶媒B：メタノール、溶媒Bのグラジエント：5－40%（リンカー4、9、10、リンカー12前駆体2は5－30%、リンカー8は5－50%、リンカー11、13～15は5－60%）、20分、流速：1mL／分）が実施されており、前記解析により得られたリンカーの純度は以下の通りであった。

- [0140] リンカー4：96.3%
リンカー5：95.6%
リンカー6：91.6%
リンカー7：97.6%
リンカー8：95.54%
リンカー9：98.75%
リンカー10：98.18%
リンカー11：90.3%
リンカー12前駆体2：97.68%
リンカー13：92.65%
リンカー14：89.38%
リンカー15：96.17%

- [0141] また、ジーンデザイン社が実施したエレクトロスプレーイオン化飛行時間形質量分析計（ESI-TOF-MS, BioAccord™ SYSTEM, Waters社）による質量分析の結果は下記の通りであった。

- [0142] リンカー4：ESI-TOF-MS, [M - H]⁻ 計算値1080

8.12 ; 測定値10807.00 (デコンボリューション後) .
リンカー5 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値1149
6.72 ; 測定値11496.00 (デコンボリューション後) .
リンカー6 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値1218
5.32 ; 測定値12184.00 (デコンボリューション後) .
リンカー7 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値7587
.33 ; 測定値7588.0 (デコンボリューション後) .
リンカー8 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値9398
.84 ; 測定値9400.30 (デコンボリューション後) .
リンカー9 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値9150
.22 ; 測定値9150.90 (デコンボリューション後) .
リンカー10 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値111
5.62 ; 測定値11115.00 (デコンボリューション後) .
リンカー11 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値136
59.18 ; 測定値13662.00 (デコンボリューション後) .
リンカー12前駆体 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値
9303.66 ; 測定値9302.00 (デコンボリューション後) .
リンカー13 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値164
93.59 ; 測定値16493.00 (デコンボリューション後) .
リンカー14 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値228
80.98 ; 測定値22880.60 (デコンボリューション後) .
リンカー15 : ESI-TOF-MS, [M - H] - 計算値122
81.98 ; 測定値12284.80 (デコンボリューション後) .

[0143] 合成委託したリンカー1~12 (終濃度: 20 μ M) に対してそれぞれ、
3-ヒドロキシピコリン酸 (終濃度: 50% (v/v)、飽和溶液、50%
アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸、10mg/mLクエン酸水素
二アンモニウム) を加え、MTP 384 TARGET PLATE P
OLISHED STEEL BC (Bruker社) 上で結晶化させた (

RT)。結晶化させたサンプルについて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間形質量分析計 (MALDI-TOF-MS、autoflex (登録商標) max、Bruker社) を用いた質量分析 (リニアモード、ポジティブイオンモード) により解析した結果、以下のとおりであった。

[0144] リンカー1: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値8995.34; 測定値8994.27.

リンカー2: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値9956.42; 測定値9956.17.

リンカー3: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値13782.77; 測定値13782.73.

リンカー4: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値10810.13; 測定値10808.55.

リンカー5: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値11498.73; 測定値11496.18.

リンカー6: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値12187.33; 測定値12185.45.

リンカー7: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値7589.35; 測定値7589.90.

リンカー8: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値9400.86; 測定値9400.68.

リンカー9: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値9152.24; 測定値9152.58.

リンカー10: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値11117.64; 測定値11117.02.

リンカー11: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計算値13661.20; 測定値13661.66.

リンカー12: MALDI-TOF-MS (m/z)、 $[M+H]^+$ 計

算値 1 1 7 2 5 . 6 6 ; 測定値 1 1 7 2 4 . 2 3 .

[0145] これらの結果より、上記で得られた物質が目的のリンカーであることが確認された。

[0146] [実施例 2 : 実施例で使用する DNA の合成]

リンカーに結合させる mRNA を作製するための鋳型 DNA を合成した。

[0147] 鋳型 DNA は、合成一本鎖 DNA とプライマーとをポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) により連結することによって調製した。表 1-1、表 1-2 に、鋳型 DNA を調製するための PCR に使用した合成一本鎖 DNA の塩基配列を示す。また、表 1-3 は、本明細書に記載の実施例において使用したプライマーの配列を示す。表 2 に、本実施例の各鋳型 DNA の合成において使用した、合成一本鎖 DNA とプライマーの組み合わせを示す。

[0148]

[表1-3]

配列一覧、小文字はDNAを指す。

名称	配列	配列番号
PD-T7g10M-F52	ctagtaaacgacacactatagggttaacttaagaaggagataacataag	7
TGG-ssG4S2-R44	ccgcctccgcgccccgcgtctagctactccaccaccctcccca	8
TGG-ssG4S2-R23RT	tagctactccaccaccctcccca	9
RV_Strep-tag II	ccgcctccgcgccccgcgtctactactccaccaccctcttttc	10
RV_FcRn binder	ccgcctccgcgccccgcgtctactactccaccaccctccggg	11
RV_HA binder	ccgcctccgcgccccgcgtctagctactccaccaccctccgcc	12
RV_Fc binder	ccgcctccgcgccccgcgtctagctactccaccaccctccggt	13
RT_Strep-tag II	taactactccaccaccctctttt	14
RT_FcRn binder	laactactccaccaccctccggg	15
RT_HA binder	tagctactccaccaccctccgcc	16
RT_Fc binder	tagctactccaccaccctccggt	17
RV_R39_mRNA display	tttcgccccgcgtctagctactccaccaccctcccca	44
RV_mRNA display_Strep-tag II	tttcgccccgcgtctactactactccaccaccctcttttc	45
F70-ID12-07-4	cacgacgctctccgatactgctgcgcggtttccactatagggttaactttaagaaggagataacataag	46
F70-ID12-07-5	cacgacgctctccgatactgcagctgagggaalcaclatactagggttaactttaagaaggagataacataag	47
R38-3UTR-SBS-R	agaogtgcctcttccgatacttccgcccccgctccta	48
F63-P5-SBS-F	aatgalacggcgacaccacgagatctacacacactcttccclacacgacgctctccgactct	49
R58-SBSR-P7	caagcagaagacggcatacagagatgtagctggagttcagacgtgctctctccgactct	50

[表2]

PCR による鑄型DNAの合成に使用した核酸の組み合わせ					
作製される鑄型 DNA の名称	合成ー本鎖 DNA	フォワードプライマー	リバースプライマー		
モデル配列の鑄型 DNA	モデル配列用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	TGG-ssG4S2.R44		
Strep-tag II の鑄型 DNA	Strep-tag II 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	RV_Strep-tag II		
FcRn binder の鑄型 DNA	FcRn binder 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	RV_FcRn binder		
HA binder の鑄型 DNA	HA binder 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	RV_HA binder		
Fc binder の鑄型 DNA	Fc binder 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	RV_Fc binder		
ランダム領域を含む mRNA A-H の鑄型 DNA	ランダム領域を含む mRNA A-H 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	TGG-ssG4S2.R44		
ランダム領域を含む mRNA I-L の鑄型 DNA	ランダム領域を含む mRNA I-L 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	RV_R39_mRNA display		
mRNA display format Strep-tag II の鑄型 DNA	Strep-tag II 用の合成ー本鎖 DNA	PD-T7g10M.F52	RV_mRNA display_Strep-tag II		

[0152] 表3に、上記のPCRにより得られる各鑄型DNA、および、以下の各実施例における翻訳反応において前記鑄型DNAの翻訳領域によりコードされるペプチドのアミノ酸配列を示す。前記鑄型DNAは、T7プロモーター配列、リボソーム結合配列、開始コドン、ペプチド配列、スパーサーペプチド

配列、アンバーコドンおよびリンカーハイブリダイゼーション配列より構成される。

[0153] [表3-1]

PCRにより作製した鑄型DNA配列および、各実施例において鑄型DNAの翻訳領域がコードされることで得られるペプチドのアミノ酸配列

名称	配列	配列番号
モデル配列の鑄型 DNA	ctagtaatacgcactcactatagggttaacctttaagaagagatatatcacatagcgttggttatatttttagtgatggttctact ccgctcttccatattatttggggaaggtagtggaatagcttaaggacagggggacgggaagggcggg	18
配列番号18の翻訳領域によりコードされる フルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチド	Fph-R-MeA-VNFSDGSTPALHIYWGGGSS	19
Srep-tag II の鑄型 DNA	ctagtaatacgcactcactatagggttaacctttaagaagagatatatcacatagcgttggttatatttttagtgatggttctact gtgggaaggtagttagaacagggggggcgggggggcgggg	20
配列番号20の翻訳領域によりコードされる ストレプトアビジン結合ペプチド	WSHPQFEKGGGGSS	21
FcRn binder の鑄型 DNA	ctagtaatacgcactcactatagggttaacctttaagaagagatatatcacatagcgttggttatatttttagtgatggttctact ctctaacccctgcaacggggccggggagggttgtagaattagttaggacggggggcggggaagggcggg	22
配列番号22の翻訳領域によりコードされる FcRn結合ペプチド	MRFCGTFGGLYPCNGPGGGGSS	23

[0154]

ノ酸の略称、FphはN-(3', 6'-ジヒドロキシ-3-オキソ-3-
H-スピロ[イソベンゼンフラン-1, 9'-キサンテン]-5-カルボキ
シル)-L-フェニルアラニン、MeAはN-メチル-L-アラニン、CI
AcYはN-2-クロロアセチル-L-チロシンを指す。下線は鋳型DNA
中の翻訳領域を指す。

- [0156] なお、表の「モデル配列用の合成一本鎖DNA」によって作製された鋳型DNA（配列番号18）はフルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチド（配列番号19）をコードするオリゴヌクレオチドを、「Streptag II用の合成一本鎖DNA」によって作製された鋳型DNA（配列番号20）はストレプトアビジン結合ペプチド（配列番号21, “Improved affinity of engineered streptavidin for the Streptag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site” I. P. Korndorfer and A. Skerra, Protein Sci., 2002, 11, 4, 883-893（非特許文献7））をコードするオリゴヌクレオチドを、「FcRn binder用の合成一本鎖DNA」によって作製された鋳型DNA（配列番号22）はヒト新生児Fc受容体（FcRn）結合ペプチド（配列番号23, “Synthesis and Structure-Activity Relationships of Dimeric Peptide Antagonists of the Human Immunoglobulin G-Human Neonatal Fc Receptor (IgG-FcRn) Interaction” K. A. McDonnell et al., J. Med. Chem., 2010, 53, 4, 1587-1596（非特許文献8））をコードするオリゴヌクレオチドを、「HA binder用の合成一本鎖DNA」によって作製された鋳型DNA（配列番号24）はヘマグルチニン（HA）結合ペプチド（配列番号25, “

Inhibition of H1 and H5 Influenza A Virus Entry by Diverse Macrocyclic Peptides Targeting the Hemagglutinin Stem Region” M. N. Pascha et al., ACS Chem. Biol., 2022, 17, 9, 2425–2436 (非特許文献9)) をコードするオリゴヌクレオチドを、「Fc binder用の合成一本鎖DNA」によって作製された鋳型DNA (配列番号26) はヒトIgG Fcタンパク質 (Fc) 結合ペプチド (配列番号27, “Kinetics-Based Structural Requirements of Human Immunoglobulin G Binding Peptides” K. Muguruma et al., ACS Omega, 2019, 4, 11, 14390–14397 (非特許文献10)) をコードするオリゴヌクレオチドを、それぞれ含む。

[0157] 表2に従い、ランダム領域を含むmRNA A～L用の合成一本鎖DNA以外の合成一本鎖DNA (終濃度: 2 nM) と、対応するプライマー (終濃度: 500 nM) とを含むPCR反応液 (終濃度: 1×Phusion HFバッファー、200 μM dNTPs、3% ジメチルスルホキシド (DMSO)、2ユニット Phusion DNAポリメラーゼ) 100 μLを調製し、サーマルサイクラー (T100サーマルサイクラー、BioRad社) を用いて、98℃ 60秒、(98℃ 10秒、61℃ 30秒、72℃ 30秒) 25サイクルによる反応を行った。反応産物は、AMPure XP (Beckman Coulter社) を用いて精製を行った。

[0158] また、表2に従い、ランダム領域を含むmRNA A～L用の合成一本鎖DNA (終濃度: 1 μM、各々配列番号32～43) を含むExtension PCR反応液 (終濃度: 1 μM 対応するリバースプライマー、1×buffer for KOD-Plus-ver. 2 (東洋紡社)、200 μM dNTPs、1.5 mM MgSO₄、0.02 U/μL KO

D plus (東洋紡社)) を調製し、サーマルサイクラー (T100サーマルサイクラー、BioRad社) を用いて、94℃ 2分、(60℃、40秒、68℃ 60秒) 5サイクル、68℃、60秒、による反応を行った。続けて、上記で作製した反応後溶液をPCR反応液 (終濃度: 10mM Tris-HCl (pH8.5)、50mM KCl、0.1% (v/v) Triton X-100、2mM MgCl₂、250μM dNTPs、250nM 対応するフォワードプライマー、250nM 対応するリバースプライマー、Taq DNA Polymerase (NEB社) 0.02U/μL) で40倍希釈し、サーマルサイクラー (T100サーマルサイクラー、BioRad社) を用いて、95℃ 40秒、{95℃ 40秒、50℃ 40秒、72℃ 60秒} 4サイクル、72℃ 60秒、による反応を行った。反応後フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による精製を行い、得られたペレットを超純水で再溶解した。

[0159] [実施例3: mRNA-リンカー連結体の作製]

実施例3-1 mRNAの調製およびmRNA-リンカー連結体の作製

実施例2で作製した鋳型DNA (ランダム領域を含むmRNA A~Lの鋳型DNAを除く) を元に、T7RNAポリメラーゼによる転写反応によりmRNAを合成し、得られた反応産物は、RNAClean XP (Beckman Coulter社) を用いて精製を行った。精製後、mRNAの濃度を、260nmにおけるUV吸収から求め、20μMになるように希釈した。

[0160] また、ランダム領域を含むmRNA A~Lの鋳型DNAを、Transcription mix (終濃度: 40mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM Spermidine、0.01% (v/v) Triton X-100、10mM DTT、20mM MgCl₂、25mM KOH、3.75mM NTPs、0.24μM T7 RNA polymerase) で5倍希釈し、37℃、6時間、反応を行った。反応後、DNase反応溶液 (終濃度: 40mM Tris-HCl (pH8.0)、

10 mM MgSO_4 、1 mM CaCl_2 、0.025 U/ μL RQ1 RNase-Free DNase（プロメガ社）を加え、37℃、1時間、反応を行った。最後に、前述の反応後溶液をフェノール・クロロホルム抽出により精製し、mRNAの濃度を、260 nmにおけるUV吸収から求め、20 μM になるように希釈した。

[0161] このようにして調製した各mRNA（ランダム領域を含むmRNA I～Lの鋳型DNAを元に作製されたmRNAを除く）（終濃度：5 μM ）と、実施例1で作製した各リンカー（終濃度：5.5 μM ）を4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸（HEPES）-KOH（終濃度：62.5 mM、pH 7.6）、KOAc（終濃度：375 mM、pH 7.6）中で加熱（95℃、3分）した後、室温で静置しハイブリダイゼーションをさせることで、5 μM mRNA-リンカー連結体を作製した。このように作製したmRNA-リンカー連結体のうち、ランダム領域を含むmRNA A～Hを用いた連結体については、5倍量のローディングバッファー（終濃度：7 M尿素、10 mM EDTA、1 mM Tris-HCl（pH 7.6））に溶解し1分間、95℃で加熱した後、8%変性尿素ポリアクリルアミド電気泳動およびSYBR Green II染色後に、PharosFX（Biorad社）を用いて蛍光イメージングした。

[0162] ランダム領域を含むmRNA I～Lの鋳型DNAを元に作製されたmRNAについては、それぞれのmRNA（終濃度：1 μM ）とリンカー8（終濃度：1.5 μM ）、1x Ligation buffer（Takara）、DMSO（終濃度：10%（v/v））、T4 RNA ligase（Takara、終濃度：5 U/ μL ）とを混合し、37℃で1時間ライゲーション反応を行った。作製したmRNA-リンカー連結体の一部については、5倍量のローディングバッファー（終濃度：7 M尿素、10 mM EDTA、1 mM Tris-HCl（pH 7.6））に溶解し1分間、95℃で加熱した後、8%変性尿素ポリアクリルアミド電気泳動およびSYBR Green II染色後に、PharosFX（Biorad社）を用いて

蛍光イメージングした。

[0163] 図3にmRNA-リンカー連結体の分析結果を示す。いずれのmRNA-リンカー連結体でも、mRNAに対して高分子量側の位置に、mRNA-リンカー連結体由来する蛍光バンドが見られた。このことから、各種リンカーが多様な遺伝情報物質に対して適用可能であることが示された。

[0164] 実施例3-2 mRNA-リンカー4前駆体2連結体へのピューロマイシン様物質の結合

実施例3-1でモデル配列の鋳型DNAより作製したmRNA（終濃度：5 μ M）と、リンカー4前駆体2（終濃度：10 μ M）をHEPES-KOH（終濃度：62.5 mM, pH 7.6）、KOAc（終濃度：375 mM、pH 7.6）中で加熱（95℃、3分）した後、室温で静置しハイブリダイゼーションをさせることで、5 μ M mRNA-リンカー4前駆体2連結体を作製した。次に、上記連結体（終濃度：3.3 μ M）にアルキンピューロマイシン（終濃度：53.4 μ M）、DMSO（終濃度：10%（v/v））、トリス（3-ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル）アミン（THPTA）／硫酸銅（II）溶液（終濃度：THPTA=10 mM、硫酸銅（II）=5 mM）、アスコルビン酸ナトリウム（終濃度：10 mM）を加え、室温で2時間CuAAC（AAC: Azide-Alkyne-cycloaddition）反応を行った。CuAAC反応後、エタノール沈殿により精製を行った後、5倍量のローディングバッファー（終濃度：7 M尿素、10 mM EDTA、1 mM Tris-HCl（pH 7.6））に溶解し1分間、95℃で加熱した後、8%変性尿素ポリアクリルアミド電気泳動およびSYBR Green I染色後に、PharosFX（BioRad社）を用いて蛍光イメージングした。

[0165] 図4に、蛍光イメージングの結果を示す。mRNA-リンカー4前駆体2連結体由来する蛍光バンドが、CuAAC反応後に完全に高分子量側にシフトしており、これは同リンカーに含まれる二つのアジド基に対して、それぞれアルキンピューロマイシンが反応したことに由来すると考えられる。こ

のことから、mRNAに対して、アジドアルキンのような互いに結合可能な一組の官能基の一方を導入し、他方のペアとなる官能基を含むピューロマイシンを反応させることで、間接的にピューロマイシンを二つ有するmRNA-リンカー連結体の作製が可能であることが示された。

[0166] [実施例4：アミノアシルtRNAの調製]

無細胞翻訳系において翻訳反応に供するアミノアシルtRNAについて、以下のように調製した。

[0167] アシル化触媒RNA (ARSリボザイム) によるtRNAのアミノアシル化に使用するアミノ酸活性化エステルとして、(3', 6'-ジヒドロキシ-3-オキソ-3-H-スピロ [イソベンゼンフラン-1, 9'-キサンテン]-5-カルボキシル)-L-フェニルアラニンシアノメチルエステル (Fph-CME、“An orthogonal ribosome-tRNA pair via engineering of the peptidyl transferase center” N. Terasaka et al., Nat. Chem. Biol., 2014, 10, 7, 555-557)、L-トリプトファンシアノメチルエステル (W-CME、“A highly flexible tRNA acylation method for non-natural polypeptide synthesis” H. Murakami et al., Nat. Methods, 2006, 3, 5, 357-359 (非特許文献12))、N-メチル-L-アラニンジニトロベンジルエステル (MeA-DBE、“Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides” T. Kawakami et al., Chem. Biol., 2008, 15, 1, 32-42 (非特許文献13))、N-2-クロロアセチル-L-チロシンシアノメチルエステル (ClAcY-CME、“Macrocyclic peptides exhibit antivira

l effects against influenza virus HA and prevent pneumonia in animal models” M. Saito et al., Nat. Commun., 2021, 12, 1, 2654 (非特許文献14))を調製した(特開2008-125396で開示の方法で調製(特許文献8))。

- [0168] Fph-CME、W-CME、またはCIAcY-CMEとtRNAとを連結するために、ARSリボザイムとしてエンハンスドフレキシザイム(表4、eFx、WO2007/066627(特許文献9))を用いた。MeA-DBEに対しては、ジニトロベンジルフレキシザイム(表4、dFx、WO2007/066627(特許文献9))を用いた。
- [0169] その際、Fph、W、およびCIAcYをAUGのコドンに、MeAをUGCのコドンに割り当てるため、アンチコドン部分にCAUを有するInit-tRNA(表4、WO2012/026566(特許文献7))、GCAを有するtRNA_{GCA}(表4、WO2019/077887(特許文献10))をそれぞれ使用した。
- [0170] Fph-CME、W-CMEおよびCIAcY-CME(終濃度: 5 mM)については、eFx(終濃度: 25 μM)、Init-tRNA(終濃度: 25 μM)、HEPES-KOH(終濃度: 100 mM、pH 7.5)、MgCl₂(終濃度: 50 mM)、DMSO(終濃度: 20%)を加え、0℃、オーバーナイト、でアミノアシル化反応を行った。MeA-DBE(終濃度: 5 mM)については、dFx(終濃度: 25 μM)、tRNA_{GCA}(終濃度: 25 μM)、HEPES-KOH(終濃度: 100 mM、pH 7.5)、MgCl₂(終濃度: 50 mM)、DMSO(終濃度: 20%)を加え、0℃、オーバーナイト、でアミノアシル化反応を行った。前記アミノアシル化後サンプルに対して等量の3M NaOAc(pH 5.2)を加えた後、エタノール沈殿を行った。
- [0171] 次に、ペレットを0.3M NaOAc(pH 5.2)を用いて再溶解した後、再度エタノール沈殿を行った。最後に、ペレットを0.1M NaO

A c (p H 5 . 2) を含む 7 0 %エタノールおよび 7 0 %エタノールを用いて、それぞれ一回ずつ洗浄を行った。得られたアミノアシル t R N A のペレットは、0 . 2 %酢酸に溶解した。

[0172] [表4]

実施例で使用したARSリボザイムおよびtRNAの配列一覧
大文字は一般的に使用される各RNAの省略形を指す。

名称	配列	配列番号
dFx	GGAUCGAAAGAUUUCGCAUCCCGAAAGGGUACAUGGGGUUAGGU	28
eFx	GGAUCGAAAGAUUUCGCGGCGCCCGGAAAGGGGAUUAAGGUUAGGU	29
Ini-tRNA	GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGGCUUGGCGGCUCAUAACCGGAAGAUUCGCGGUCAAUUCGGCCCGCGCAACCA	30
tRNA ^{ACA}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGCAACGGAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	31
tRNA ^{ACC}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	53
tRNA ^{ADA}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	54
tRNA ^{AGA}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	55
tRNA ^{AGG}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	56
tRNA ^{AAA}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	57
tRNA ^{AAU}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	58
tRNA ^{AAU}	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGGCACUUCGCGUGGCAAGGGGUCAGGGGUUUGGAUCCCUAUCACCCGCCA	59

[0173] 表4に、実施例で使用したARSリボザイムおよびtRNAの配列一覧を示す（配列番号28-31）。大文字は一般的に使用される各RNAの省略系を指す。

[0174] [実施例5：mRNA-リンカー連結体を使用した翻訳反応（1）]

実施例3で作製したmRNA-リンカー連結体を使用して、翻訳反応を行った。

[0175] 翻訳に使用する無細胞翻訳系を、以下のとおり構成した。

[0176] 50mM HEPES-KOH [pH 7.6]、100mM KOAc、20mM クレアチンリン酸、12.5mM Mg(OAc)₂、2mM グアノシン三リン酸（GTP）、2mM アデノシン三リン酸（ATP）、1mM シチジン三リン酸（CTP）、1mM ウリジン三リン酸（UTP）、2mM スペルミジン、1mM ジチオトレイトール（DTT）、1.5mg/mL E. coli全tRNA（Roche社）、1.2μM リボソーム、2.7μM 開始因子1（IF1）、0.4μM 開始因子2（IF2）、1.5μM 開始因子3（IF3）、0.25μM 終結因子2（RF2）、0.17μM 終結因子3（RF3）、0.5μM リボソーム終結因子（RRF）、10μM 伸長因子 熱非安定性（EF-Tu）、10μM 伸長因子 熱安定性（EF-Ts）、0.26μM 伸長因子G（EF-G）、5μM 伸長因子P（EF-P）、0.6μM メチオニントランスフォーミラーゼ、4μg/mL クレアチンキナーゼ（Roche社）、3μg/mL ミオキナーゼ（Sigma社）、0.1μM ピロホスファターゼ、0.1μM ヌクレオチドージホスファターゼキナーゼ。

[0177] これらに、実施例3で作製したフルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチドをコードするモデル配列mRNAとリンカー2または3の連結体（終濃度：1μM）、2種類のアミノアシルtRNA（終濃度：10μM Fp h-Ini tRNA、10μM MeA-tRNA_{GCA}）、15種類のアミノ酸（終濃度：2mM Ala、Arg、Asn、Gly、His、Ile、Leu、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Val、Asp、T

y r) および15種類のアミノアシルtRNA合成酵素(終濃度: 0.73 μ M AlaRS、0.03 μ M ArgRS、0.38 μ M AsnRS、0.09 μ M GlyRS、0.02 μ M HisRS、0.4 μ M IleRS、0.04 μ M LeuRS、0.68 μ M PheRS、0.16 μ M ProRS、0.04 μ M SerRS、0.09 μ M ThrRS、0.03 μ M TrpRS、0.02 μ M ValRS、0.13 μ M AspRS、0.02 μ M TyrRS)を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(1回目の翻訳反応)。反応後、エチレンジアミン四酢酸(EDTA、終濃度: 12.5 mM)を加え氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0178] 次に、人工リサイクリング翻訳を行うため、2回目の翻訳反応を実施した。Mg(OAc)₂(終濃度: 12.5 mM)、翻訳関連溶液(終濃度: 23.5 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli全tRNA (Roche社)、0.47 mM DTT、アミノアシルtRNA(終濃度: 10 μ M Fph-Ini tRNA、10 μ M MeA-tRNA_{GCA})およびリボソーム(終濃度: 1.2 μ M)を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(2回目の翻訳反応)。反応後、EDTA(終濃度: 16.7 mM)を加え翻訳反応を停止させた。

[0179] 翻訳後の反応液に等量のNovex(商標) Tricin SDS Sample Buffer (2x、Thermo社)を加え、16%のトリシン変性ポリアクリルアミド電気泳動 1xNovex(商標) Tricin SDS Running buffer)で分離し、電気泳動後のゲルを、PharosFX (Biorad社)を用いて蛍光イメージングした(励起: フルオロセインまたはCy5モード、フィルター: フルオロセインまたはCy5)。

- [0180] 得られた結果を図5に示す。図5 aはCy5、図5 bはフルオロセインに由来する蛍光をそれぞれ検出した際に得られた画像である。リンカー2は5'末端をCy5で標識したリンカーであり、フルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチドと結合した場合に、Cy5とフルオロセインに由来する蛍光バンドが重なって得られる。翻訳に必要なアミノ酸を含む条件でmRNAとリンカー2の連結体を翻訳した場合に、同連結体に対して高分子量側の位置にCy5とフルオロセインとが重なり合う蛍光バンドが得られた。上記の結果から、フルオロセイン標識されたペプチドを用いることにより、ペプチドとリンカーの結合を分子量シフトにより確認可能であることが示された。
- [0181] mRNAとリンカー3の連結体を翻訳した場合では、翻訳に必要なアミノ酸を含む条件でのみ蛍光バンドが得られていることに加えて、得られているフルオロセイン由来の蛍光バンドがリンカー2に対して高分子量側に位置していることから、同蛍光バンドがmRNA-リンカー3-ペプチド連結体由来のものであると考えられる。また、mRNAとリンカー3の連結体を用いて翻訳を行った場合に、ペプチドに由来する蛍光バンドが2つ得られており、これはリンカー3の末端に結合したペプチド数の違いによって生じる分子量差によるものであると考えられる。
- [0182] また、2価リンカー（リンカー3）を用いることで、人工リサイクリング翻訳を行わない場合でも、2つの蛍光バンドが得られているが、人工リサイクリング翻訳を行うことで、2つの蛍光バンドの内、高分子量側の蛍光バンド強度が増強しており、これは1回目の翻訳で1つのペプチドが結合したリンカーに対して、さらにペプチドが付加することで、同蛍光バンドの蛍光強度増加が起きていると考えられる。
- [0183] 以上の結果から、mRNA-リンカー連結体を無細胞翻訳系で翻訳することにより、複数のペプチドが結合したmRNA-リンカー-ペプチド連結体を得られたこと、さらに人工リサイクリング翻訳を行うことにより、mRNA-リンカー-ペプチド連結体を効率よく提示できることが示された。
- [0184] [実施例6：mRNA-リンカー連結体を使用した翻訳反応（2）]

mRNA-リンカー連結体として、フルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチドをコードするモデル配列mRNAに対して、リンカー2、3をそれぞれハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、実施例5と同条件にて人工リサイクリング翻訳を行い、最後に、EDTA（終濃度：5 mM）を加え翻訳反応を停止させた。

[0185] 本実施例では、電気泳動における分解能を向上させるため、実施例5の操作に加えて、ヌクレアーゼ処理を行った。具体的には、翻訳溶液に対してRNase H（NEB社、2.5ユニット）およびRNase T1（Thermo社、200ユニット）を加え、37℃、2時間、ヌクレアーゼ処理を行った。ヌクレアーゼ処理後、実施例5と同条件にてトリシン変性ポリアクリルアミド電気泳動および蛍光イメージングを行った。

[0186] 得られた結果を図6に示す。図6a、cはフルオロセインに由来する蛍光を検出した際に得られた画像である。2価リンカー（リンカー3）を使用し、人工リサイクリング翻訳を行ったmRNA-リンカー連結体において、ヌクレアーゼ処理をすることで、処理前と比べて大きく2つに分離した蛍光バンドが得られている（図6a）。一方で、1価リンカー（リンカー2）を使用し、人工リサイクリング翻訳を行ったmRNA-リンカー連結体では、ヌクレアーゼ処理により分画能を向上させた場合でも、ペプチドに由来する蛍光バンドは1つであった（図6c）。このことから、2価リンカー（リンカー3）を使用し、人工リサイクリング翻訳を行ったmRNA-リンカー連結体において複数のペプチドが連結されていることが示された。

[0187] さらに、人工リサイクリング翻訳を行うことで、ペプチドに由来する蛍光バンド強度が増強されており（図6b、d）、翻訳反応を繰り返すことで、ペプチドと共有結合を形成したmRNA-リンカー連結体の割合の増大が可能であることが示された。

[0188] [実施例7：mRNA-リンカー連結体を使用した翻訳反応（3）]

mRNA-リンカー連結体として、フルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチドをコードするモデル配列mRNAに対して、リンカー2、3をそ

れぞれハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、実施例5と同条件にて人工リサイクリング翻訳を行った。本実施例では、実施例5の操作に加えて、翻訳産物を含む反応液において逆転写処理を行った。

[0189] 具体的には、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液（終濃度：49.5mM Tris-HCl、74.2mM KCl、18.4mM MgCl₂、1mM DTT、0.3mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP)s、20ユニット/μL MLV逆転写酵素、12μM TGG-ssG4S2、R23RT（配列番号9））を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。逆転写後、実施例5と同条件にてトリシン変性ポリアクリルアミド電気泳動および蛍光イメージングを行った。

[0190] 得られた結果を図7に示す。図7は、フルオロセインに由来する蛍光を検出した際に得られた画像である。mRNA-リンカー2-ペプチド連結体に対して、TGG-ssG4S2、R23RTがハイブリダイズすることで、同連結体由来する蛍光バンドが高分子量側にシフトした。また、TGG-ssG4S2、R23RTがハイブリダイズしたmRNA-リンカー-ペプチド連結体は、逆転写反応後、さらに高分子量側にシフトした。

[0191] mRNA-リンカー3-ペプチド連結体においては、リンカー2とは異なり複数の蛍光バンドが確認された。このことから2価リンカーにおいては複数のペプチドが連結され、逆転写反応の実施が可能であることが示された。

[0192] [実施例8：mRNA-リンカー連結体を使用した翻訳反応（4）]

mRNA-リンカー連結体として、フルオロセイン構造を含む蛍光性モデルペプチドをコードするモデル配列mRNAに対して、リンカー2、3、4、5、6をそれぞれハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、実施例6と同様条件において人工リサイクリング翻訳を行った。

[0193] 得られた結果を図8に示す。図8はCy5およびフルオロセインに由来す

る蛍光をそれぞれ検出した際に得られた画像をマージさせたものである。1価リンカー（リンカー2）を使用したmRNA-リンカー連結体では、ペプチドに由来する蛍光バンドは1つであった。これに対して、ピューロマイシンを2つ有するリンカー3、4、5、6を使用したmRNA-リンカー連結体はいずれも、ペプチドに由来する2つの蛍光バンドが得られた。

以上から、2価リンカーは、それぞれのピューロマイシンの間のリンカー長が様々に異なっているにもかかわらず、複数のペプチドが連結したmRNA-リンカー-ペプチド連結体を得られることが示された。

[0194] [実施例9：mRNA-リンカー連結体を使用した翻訳反応（5）]

実施例9-1 RNase T1によるリンカー12の特異的な切断

リンカー4とリンカー12について、それぞれRNase T1溶液中（200U RNase T1（Thermo社）、50mM Tris-HCl（pH7.5）、2mM EDTA）で、37℃、オーバーナイト、で酵素処理を行った。酵素処理後のサンプルについて、変性尿素ポリアクリルアミド電気泳動およびSYBR Green II染色後に、Pharos FX（Bio-rad社）を用いて蛍光イメージングした。

[0195] 得られた結果を図9aに示す。グアニンを塩基とするデオキシヌクレオチドを有さないリンカー4は、酵素処理を行っても蛍光バンド位置に変化がない一方で、グアニンを塩基とするデオキシヌクレオチドを分岐部直前に修飾したリンカー12は、酵素処理を行った場合に、低分子量側に蛍光バンドがシフトしており、このような修飾を行うことで、特異的な切断が可能であることが示された。

[0196] 実施例9-2 Tricine PAGEによるディスプレイペプチドの解析

mRNA-リンカー連結体として、フルオレセイン構造を含む蛍光性モデルペプチドをコードするモデル配列mRNAに対して、リンカー12をハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、実施例5と同条件にて人工リサイクリング翻訳を行い、最後に、EDTA（終濃度：

5 mM) を加え翻訳反応を停止させた。

[0197] 本実施例では、電気泳動における分解能を向上させるため、実施例5の操作に加えて、ヌクレアーゼ処理を行った。具体的には、翻訳溶液に対して RNase T1 (Thermo社、200ユニット) を加え、37℃、2時間、ヌクレアーゼ処理を行った。ヌクレアーゼ処理後、実施例5と同条件にてトリシン変性ポリアクリルアミド電気泳動および蛍光イメージングを行った。

[0198] 得られた結果を図9bに示す。図9bはCy5およびフルオロセインに由来する蛍光を検出し、重ね合わせた際に得られた画像である。2価リンカー（リンカー12）を使用し、人工リサイクリング翻訳を行ったmRNAーリンカー連結体において、ヌクレアーゼ処理をすることで、処理前と比べて大きく2つに分離した蛍光バンドが得られている（図9b）。一方で、1価リンカー（リンカー2）を使用し、人工リサイクリング翻訳を行ったmRNAーリンカー連結体では、ヌクレアーゼ処理により分画能を向上させた場合でも、ペプチドに由来する蛍光バンドは1つであった（図9b）。このことから、2価リンカー（リンカー12）を使用し、人工リサイクリング翻訳を行ったmRNAーリンカー連結体において複数のペプチドが連結されていることが示された。

[0199] [実施例10：Streptag IIをモデルペプチドとしたmRNAーリンカーーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ]

Streptag IIをモデルペプチドとしたmRNAーリンカーーペプチド連結体を使用して、ストレプトアビジンとの結合に伴うリカバリー率を評価するディスプレイアッセイを行った。

[0200] 実施例3で作製した、Streptag IIをコードするmRNAに対して、リンカー1又はリンカー3～6をハイブリダイゼーションさせたmRNAーリンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0201] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、前記mRNAーリンカー連結体（終濃度：1 μM）、1種類のアミノアシルtRNA（終濃度：10 μM

W l n i - t R N A)、9種類のアミノ酸(終濃度: 2 mM、G l y、H i s、P h e、P r o、S e r、G l n、G l u、L y s、T r p) および9種類のアミノアシル t R N A 合成酵素(終濃度: 0. 09 μ M G l y R S、0. 02 μ M H i s R S、0. 68 μ M P h e R S、0. 16 μ M P r o R S、0. 04 μ M S e r R S、0. 06 μ M G l n R S、0. 23 μ M G l u R S、0. 11 μ M L y s R S、0. 03 μ M T r p R S) を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(1回目の翻訳反応)。反応後、人工リサイクリング翻訳を行わないサンプルについては終濃度: 16. 7 mMになるようにE D T Aを加え、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについては終濃度12. 5 mMになるようにE D T Aを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0202] さらに、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについて、2回目の翻訳反応を実施した。

[0203] 上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、M g (O A c) ₂ (終濃度: 12. 5 mM)、翻訳関連溶液(終濃度: 23. 5 mM H E P E S - K O H (p H 7. 6)、0. 94 mM A T P、0. 94 mM G T P、0. 47 mM C T P、0. 47 mM U T P、9. 4 mM クレアチンリン酸、47. 0 mM 酢酸カリウム、0. 94 mM スペルミジン、0. 7 m g / m L E . c o l i 全 t R N A (R o c h e 社)、0. 47 mM D T T、アミノアシル t R N A (終濃度: 10 μ M W l n i - t R N A) およびリボソーム(終濃度: 1. 2 μ M) を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(2回目の翻訳反応)。翻訳反応後、E D T A (終濃度: 16. 7 mM) を加え翻訳反応を停止させた。

[0204] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液(終濃度: 49. 5 mM T r i s - H C l、74. 2 mM K C l、18. 4 mM M g C l ₂、1 mM D T T、0. 30 mM d N T P s、20ユニット/ μ L M L V 逆転写酵素、12 μ M R T _ S t r e p - t a g I I (配列番号14))を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。

[0205] 逆転写反応後、EDTA（終濃度：16.7 mM）およびHEPES（終濃度：53.4 mM）を加えた後、HBS-T（0.05%（v/v）Tween 20、25 mM HEPES-NaOH（pH 7.4）、150 mM NaCl）で置換をしたBio-Gel P30 Gel（Biorad社）脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0206] 脱塩後、標的タンパク質としてストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズ（終濃度：1 mg/mL、Dynabeads（商標）M-280 ストレプトアビジン、Thermo社）を加え、4℃、1時間、結合反応を行った。この時、ネガティブコントロールとして、Protein Gを固定化した磁性ビーズ（終濃度：1 mg/mL、Dynabeads（商標）Protein G for Immunoprecipitation、Thermo社）に対して、脱塩後のサンプルを加え、4℃、1時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-Tを用いて磁性ビーズを再懸濁し（0.5 mg/mL）、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、5分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁・4℃での5分間の混合、を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR溶液（10 mM Tris-HCl（pH 8.5）、50 mM KCl、0.1% Triton X-100）を用いて再懸濁し（2 mg/mL）、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0207] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96（Roche Applied Science社）を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I（100,000倍希釈、Invitrogen社）、dNTP（終濃度：0.25 mM）、MgCl₂（終濃度：2 mM）、T7g10M、F52（0.25 μM）、RV_Strep-tag II（配列番号10）（0.25 μM）および測定サンプル溶液を添加

した反応液を測定に供した。

[0208] 前記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図10に示す。ここで、リカバリー率(%)は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Streptag II、ストレプトアビジンを、それぞれモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー(リンカー3)を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が1価リンカー(リンカー1)と比較して大きく増強した。さらに、人工リサイクリング翻訳においても、前記リカバリー率の増強が確認された(図10a)。また、分岐鎖長の異なる2価リンカー(リンカー3~6)で比較した場合において、前記リカバリー率はリンカーの分岐鎖長の種類によって異なる増強率を示した(図10b)。これらの結果から、前記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられた。

[0209] [実施例11:Fc binderをモデルペプチドとしたmRNA-リンカーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ]

実施例11-1 Fcのビオチン化

組換えヒトIgG1 Fcタンパク質(終濃度:29 μ M、110-HG、R&D Systems社)とEZ-Link NHS-PEG4-Biotin(終濃度:290 μ M、Thermo社)を1x phosphate buffer saline(PBS)中で、4℃、終夜、反応させた。反応後、1x PBSで置換をしたBio-Gel P30 Gel(Biorad社)を用いて精製を行った。

[0210] 実施例11-2 ビオチン化したFcの磁性ビーズ上への固定化

前記で作製したビオチン化Fc(2.8 μ M)と磁性ビーズ(終濃度:31mg/mL、Dynabeads(商標) M-280 ストレプトアビジン、Thermo社)とを、4℃、20分間、混合した。混合後の磁性ビーズを磁気分離し上清除去後、HBS-Tによる再懸濁を行った。さらに、

前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、HBS-Tを用いて再懸濁した（終濃度：10mg/mL）。

[0211] 実施例11-3 Fc binderをモデルペプチドとしたmRNA-リンカー-ペプチド連結体によるディスプレイアッセイ

実施例3で作製した、Fc binderをコードするmRNAに対してリンカー1又はリンカー3をハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0212] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、前記mRNA-リンカー連結体（終濃度：1μM）、15種類のアミノ酸（2mM Leu、Met、Val、Ser、Pro、Thr、Ala、Tyr、His、Lys、Asp、Glu、Cys、Trp、Gly）および15種類のアミノアシルtRNA合成酵素（0.04μM LeuRS、0.03μM MetRS、0.02μM ValRS、0.04μM SerRS、0.16μM ProRS、0.09μM ThrRS、0.73μM AlaRS、0.02μM TyrRS、0.02μM HisRS、0.11μM LysRS、0.13μM AspRS、0.23μM GluRS、0.02μM CysRS、0.03μM TrpRS、0.09μM GlyRS）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、人工リサイクリング翻訳を行わないサンプルについては終濃度16.7mMになるようにEDTAを加え、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについては終濃度12.5mMになるようにEDTAを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0213] さらに、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについて、2回目の翻訳反応を実施した。

[0214] 上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg(OAc)₂（終濃度：12.5mM）、翻訳関連溶液（終濃度：23.5mM HEPES-KOH（pH7.6）、0.94mM ATP、0.94mM GTP、0

、47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli 全 tRNA (Roche 社)、0.47 mM DTT)、およびリボソーム (終濃度: 1.2 μ M) を加え、37°C、30 分間、翻訳反応を行った。反応後、EDTA (終濃度: 16.7 mM) を加え翻訳反応を停止させた。

[0215] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液 (終濃度: 49.5 mM Tris-HCl、74.2 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、20 ユニット/ μ L MLV 逆転写酵素、12 μ M RT_Fc binder (配列番号 17)) を加え、42°C、30 分、逆転写反応を行った。

[0216] 逆転写反応後、EDTA (終濃度: 16.7 mM) および酸化型グルタチオン (終濃度 1 mM、Nacalai 社) を加え、37°C、1 時間、反応を行った。

[0217] 上記サンプルについて、HEPES (終濃度: 53.4 mM) を加えた後、HBS-T (0.05% (v/v) Tween 20、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl) で置換をした Bio-Gel P30 Gel (Biorad 社) 脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0218] 脱塩後のサンプルを、前記 Fc 固定化磁性ビーズ (終濃度: 6.2 mg/mL)、または Fc 非固定化磁性ビーズ (終濃度: 6.2 mg/mL、Dynabeads (商標) M-280 ストレプトアビジン、Thermo 社) と混合し、4°C、1 時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-T を用いて磁性ビーズを再懸濁し (1.5 mg/mL)、新しいサンプルチューブに移した後、4°C、5 分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-T による再懸濁・4°C での 5 分間の混合、を計 2 回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 8

、5)、50mM KCl、0.1% Triton X-100)を用いて再懸濁し(12.4mg/mL)、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0219] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96 (Roche Applied Science社)を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I (100、000倍希釈、Invitrogen社)、dNTP (終濃度: 0.25mM)、MgCl₂ (終濃度: 2mM)、T7g10M, F52 (0.25μM)、RV_Fc binder (配列番号13) (0.25μM) および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。

[0220] 前記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図11に示す。ここで、リカバリー率(%)は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Fc binderおよびFcをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質としたリカバリー率評価において、2価リンカー(リンカー3)を用いた場合のみ、高収率でDNAが回収されており、対象の2価リンカーを用いることで高いリカバリー率を得ることができた。また、人工リサイクリング翻訳を行った場合においては、行っていない場合と比べて高いリカバリー率が得られており、標的に結合した連結体を高収率に回収するには、人工リサイクリング翻訳を行うことが有効であった。これらの結果から、前記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられた。

[0221] [実施例12: HA binderをモデルペプチドとしたmRNA-リンカーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ]

実施例12-1 HAの磁性ビーズへの固定化

インフルエンザA H5N1 (A/Indonesia/5/2005)

ヘマグルチニン／HAタンパク質-HIS-tag（終濃度：4.5 μ M、11060-V08B、Shino Biological社）と磁性ビーズ（終濃度：4 mg/mL、Dynabeads（商標） His-tag Isolation and Pulldown、Thermo社）とを、4℃、20分間混合した。混合後の磁性ビーズを磁気分離し上清除去後、HBS-Tによる再懸濁を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、HBS-Tを用いて再懸濁した（終濃度：10 mg/mL）。

[0222] 実施例12-2 HA binderをモデルペプチドとしたmRNA-リンカーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ

実施例3で作製した、HA binderをコードするmRNAに対してリンカー1またはリンカー3をそれぞれ別々にハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0223] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、前記mRNA-リンカー連結体（終濃度：1 μ M）、1つのアミノアシルtRNA（10 μ M C I A c Y I n i - t R N A）、13種類のアミノ酸（2 mM P h e、L e u、V a l、S e r、T h r、A l a、T y r、H i s、A s n、L y s、C y s、T r p、G l y）および12種類のアミノアシルtRNA合成酵素（0.68 μ M P h e R S、0.04 μ M L e u R S、0.02 μ M V a l R S、0.04 μ M S e r R S、0.09 μ M T h r R S、0.73 μ M A l a R S、0.02 μ M T y r R S、0.02 μ M H i s R S、0.38 μ M A s n R S、0.11 μ M L y s R S、0.02 μ M C y s R S、0.03 μ M T r p R S、0.09 μ M G l y R S）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、人工リサイクリング翻訳を行わないサンプルについては終濃度16.7 mMになるようにEDTAを加え、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについては終濃度12.5 mMになるようにEDTAを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

- [0224] さらに、上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg (OAc)₂ (終濃度: 12.5 mM)、翻訳関連溶液 (終濃度: 23.5 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli 全 tRNA (Roche 社)、0.47 mM DTT)、アミノアシル tRNA (終濃度: 10 μM C I A c Y I n i - t R N A) およびリボソーム (終濃度: 1.2 μM) を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、EDTA (終濃度: 16.7 mM) を加え翻訳反応を停止させた。
- [0225] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液 (終濃度: 49.5 mM Tris-HCl、74.2 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、20 ユニット/μL MLV 逆転写酵素、12 μM RT_HA binder (配列番号 16)) を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。
- [0226] 逆転写反応後、EDTA (終濃度: 16.7 mM) および HEPES (終濃度: 53.4 mM) を加えた後、HBS-T (0.05% (v/v) Tween 20、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl) で置換をした Bio-Gel P30 Gel (Biorad 社) 脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。
- [0227] 脱塩後のサンプルを、前記 HA 固定化磁性ビーズ (終濃度: 4 mg/mL)、または HA 非固定化磁性ビーズ (終濃度: 4 mg/mL、Dynabeads (商標) His-tag Isolation and Pull down、Thermo 社) と混合し、4℃、1時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-T を用いて磁性ビーズを再懸濁し (2 mg/mL)、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、5分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-T による再懸濁・4℃での5分間の混合、を計2回

行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR溶液（10mM Tris-HCl（pH8.5）、50mM KCl、0.1% Triton X-100）を用いて再懸濁し（8mg/mL）、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0228] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNA量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定装置はLightCycler 96（Roche Applied Science社）を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I（100,000倍希釈、Invitrogen社）、dNTP（終濃度：0.25mM）、MgCl₂（終濃度：2mM）、T7g10M、F52（0.25μM）、RV_HA binder（配列番号12）（0.25μM）および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。

[0229] 前記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図12に示す。ここで、リカバリー（%）は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。HA binderおよびHAをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー（リンカー3）を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が1価リンカー（リンカー1）と比較して増強して得られており、対象リンカーを使用することで、標的タンパク質へ結合したmRNA-リンカー-ペプチド連結体が高収率に回収された。さらに、人工リサイクリング翻訳を行うことで、前記リカバリー率が増強して得られており、人工リサイクリング翻訳を行うことで、標的に結合したmRNA-リンカー-ペプチド連結体を高効率に回収可能であることが示された。これらの結果から、前記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられた。

[0230] [実施例13：FcRn binderをモデルペプチドとしたmRNA-

リンカーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ]

実施例 13-1 FcRn 固定化ビーズの作製

磁性ビーズ（終濃度：9.3 mg/mL、Dynabeads（商標）M-280 ストレプトアビジン、Thermo社）とビオチン化したFcRn（0.7 μM、FCM-H82W7、ACROBiosystems社）とを、4℃、20分間混合した。混合後の磁性ビーズを磁気分離・上清除去後、HBS-Tによる再懸濁を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、HBS-Tを用いて再懸濁した（終濃度：10 mg/mL）。

[0231] 実施例 13-2 FcRn binder をモデルペプチドとした mRNA-リンカーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ

実施例 3 で作製した、FcRn binder をコードする mRNA に対してリンカー 1 またはリンカー 3～6 をそれぞれ別々にハイブリダイゼーションさせた mRNA-リンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0232] 実施例 5 で構成した無細胞翻訳系に対して、前記 mRNA-リンカー連結体（終濃度：1 μM）、12 種類のアミノ酸（2 mM Phe、Leu、Met、Ser、Pro、Thr、Tyr、His、Asn、Cys、Arg、Gly）および 12 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素（0.68 μM PheRS、0.04 μM LeuRS、0.03 μM MetRS、0.04 μM SerRS、0.16 μM ProRS、0.09 μM ThrRS、0.02 μM TyrRS、0.02 μM HisRS、0.38 μM AsnRS、0.02 μM CysRS、0.03 μM ArgRS、0.09 μM GlyRS）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、終濃度 12.5 mM になるように EDTA を加え、氷浴上で 10分間静置し、リボソームの変性を行った。

さらに、上記の 1 回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg(OAc)₂（終濃度：12.5 mM）、翻訳関連溶液（終濃度：23.5 mM HEPES-KOH（pH 7.6）、0.94 mM ATP、0.94 mM GT

P、0.47mM CTP、0.47mM UTP、9.4mM クレアチンリン酸、47.0mM 酢酸カリウム、0.94mM スペルミジン、0.7mg/mL E. coli 全tRNA (Roche社)、0.47mM DTT)、およびリボソーム (終濃度: 1.2 μ M) を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、EDTA (終濃度: 16.7mM) を加え翻訳反応を停止させた。

[0233] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液 (終濃度: 49.5mM Tris-HCl、74.2mM KCl、18.4mM MgCl₂、1mM DTT、0.30mM dNTPs、20ユニット/ μ L MLV逆転写酵素、12 μ M RT_FcRn binder (配列番号15)) を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。

[0234] 逆転写反応後、EDTA (終濃度: 16.7mM) および酸化型グルタチオン (終濃度1mM、Nacalai社) を加え、37℃、1時間、反応を行った。

[0235] 上記サンプルについて、HEPES (終濃度: 53.4mM) を加えた後、HBS-T (0.05% (v/v) Tween20、25mM HEPES-NaOH (pH7.4)、150mM NaCl) で置換をしたBio-Gel P30 Gel (Biorad社) 脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0236] 脱塩後のサンプルを、前記FcRn固定化磁性ビーズ (終濃度: 3.2mg/mL) と混合し、4℃、1時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-Tを用いて磁性ビーズを再懸濁し (1.6mg/mL)、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、5分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁・4℃での5分間の混合、を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR溶液 (10mM Tris-HCl (pH8.5)、50mM KCl、0.1% Triton X-100) を用いて再懸濁し (3.2mg/mL)、95℃、5分間加熱を行った。加

熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0237] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96 (Roche Applied Science社)を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I (100,000倍希釈、Invitrogen社)、dNTP (終濃度: 0.25 mM)、MgCl₂ (終濃度: 2 mM)、T7g10M, F52 (0.25 μM)、RV_FcRn binder (配列番号11) (0.25 μM) および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。

[0238] 前記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図13に示す。ここで、リカバリー (%) は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。FcRn binderおよびFcRnをモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が1価リンカー (リンカー1) と比較してすべての2価リンカー (リンカー3~6) で増強して得られており、対象のリンカーを用いることで、標的タンパク質へ結合したmRNA-リンカー-ペプチド連結体のリカバリー率が向上した。また、前記リカバリー率はリンカーの分岐鎖長が短くなるほど高く得られており、適切なリンカーの分岐鎖長を選択することで、標的タンパク質へ結合したmRNA-リンカー-ペプチド連結体のリカバリー率が向上することが示された。これは、前記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられた。

[0239] [実施例14: ランダム化されたペプチドライブラリーを用いた標的結合性ペプチドのスクリーニング]

実施例14-1 アミノアシルtRNAの調製

無細胞翻訳系において翻訳反応に供するアミノアシルtRNAについて、

以下のように調製した。

- [0240] アシル化触媒RNA (ARSリボザイム) によるtRNAのアミノアシル化に使用するアミノ酸活性化エステルとして、(2, 6-ジクロロピリジン-4-イル)メチル メチル-L-アラニネート塩酸塩 (MeA-DCPE)、(2, 6-ジクロロピリジン-4-イル)メチル-L-システイネート塩酸塩 (Cys-DCPE)、2, 2, 2-トリフルオロエチル メチル-L-フェニルアラニネート塩酸塩 (MeF-TEE)、(2, 6-ジクロロピリジン-4-イル)メチルN-メチルグリシネート塩酸塩 (MeG-DCPE)、2, 2, 2-トリフルオロエチル (2-クロロアセチル)-L-フェニルアラニネート (CIAc-F-TEE)、(2, 6-ジクロロピリジン-4-イル)メチル (S)-2-(メチルアミノ)ヘキサノエート塩酸塩 (MeNie-DCPE)、2, 2, 2-トリフルオロエチル L-トリプトファネート塩酸塩 (Trp-TEE)、を調製した (WO2023/234425 (特許文献11) に開示の方法で調製)。
- [0241] MeF-TEE、CIAc-F-TEE、Trp-TEEとtRNAとを連結するために、ARSリボザイムとしてエンハンスドフレキシザイム (表4、eFx、WO2007/066627 (特許文献9)) を用いた。MeA-DCPE、Cys-DCPE、MeG-DCPE、MeNie-DCPEに対しては、ジニトロベンジルフレキシザイム (表4、dFx、WO2007/066627 (特許文献9)) を用いた。
- [0242] その際、CIAc-FをAUGのコドンに、MeAをGCCのコドンに、CysをTGGコドンに、MeFをUUCコドンに、MeGをAUCコドンに、MeNieをACCコドンに、TrpをTGCコドンに、それぞれ割り当てるため、アンチコドン部分にCAUを有するInitRNA (表4、WO2012/026566 (特許文献7))、GGCを有するtRNA_{GGC}、CCAを有するtRNA_{CCA}、GAAを有するtRNA_{GAA}、GAUを有するtRNA_{GAU}、GGUを有するtRNA_{GGU}、GCAを有するtRNA_{GCA} (表4、WO2019/077887 (特許文献10)) をそれぞれ使用し

た。

[0243] C I A c - F - T E E (終濃度: 5 mM) については、対応する A R S リボザイム (終濃度: 25 μ M)、I n i - t R N A (終濃度: 25 μ M)、b i c i n e (終濃度: 50 mM、pH 9.0)、M g C l ₂ (終濃度: 50 mM)、D M S O (終濃度: 20%) を加え、0℃、オーバーナイト、でアミノアシル化反応を行った。C y s - D C P E (終濃度: 5 mM) については、対応する A R S リボザイム (終濃度: 25 μ M)、対応する t R N A (終濃度: 25 μ M)、H E P E S - K O H (終濃度: 50 mM、pH 7.5)、M g C l ₂ (終濃度: 20 mM)、D M S O (終濃度: 20%)、D T T (終濃度: 5 mM) を加え、0℃、オーバーナイト、でアミノアシル化反応を行った。その他のアミノ酸活性化エステル (終濃度: 5 mM) については、対応する A R S リボザイム (終濃度: 25 μ M)、対応する t R N A (終濃度: 25 μ M)、H E P E S - K O H (終濃度: 50 mM、pH 7.5)、M g C l ₂ (終濃度: 50 mM)、D M S O (終濃度: 20%) を加え、0℃、オーバーナイト、でアミノアシル化反応を行った。前記アミノアシル化後サンプルに対して等量の 3 M N a O A c (pH 5.2) を加えた後、エタノール沈殿を行った。

[0244] 次に、ペレットを 0.3 M N a O A c (pH 5.2) を用いて再溶解した後、再度エタノール沈殿を行った。最後に、ペレットを 0.1 M N a O A c (pH 5.2) を含む 70%エタノールおよび 70%エタノールを用いて、それぞれ一回ずつ洗浄を行った。得られたアミノアシル t R N A のペレットは、0.2%酢酸に溶解した。

[0245] 表 4 に、実施例で使用した A R S リボザイムおよび t R N A の配列一覧を示す (配列番号 28-31、53-59)。大文字は一般的に使用される各 R N A の省略系を指す。

[0246] 実施例 14-2 m R N A - リンカー - ペプチド連結体ライブラリーの構築

実施例 3 で作製した、ランダム領域を含む m R N A G に対してリンカー

1 またはリンカー4をそれぞれ別々にハイブリダイゼーションさせたmRNAーリンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0247] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、前記mRNAーリンカー連結体（終濃度：1 μ M）、7つのアミノアシルtRNA（終濃度10 μ M C I A c - F I n i - t R N A、Me F t R N A_{GAA}、Me G t R N A_{GAU}、Me N I e t R N A_{GGU}、Me A t R N A_{GGC}、W t R N A_{GCA}、C t R N A_{CCA}）、10種類のアミノ酸（終濃度0.2 mM L e u、V a l、S e r、P r o、T y r、H i s、A s n、A s p、A r g、G l y）および10種類のアミノアシルtRNA合成酵素（終濃度0.04 μ M L e u R S、0.02 μ M V a l R S、0.04 μ M S e r R S、0.16 μ M P r o R S、0.02 μ M T y r R S、0.02 μ M H i s R S、0.38 μ M A s n R S、0.13 μ M A s p R S、0.03 μ M A r g R S、0.09 μ M G l y R S）、Mg (O A c)₂（終濃度：1 mM）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、終濃度12.5 mMになるようにE D T Aを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0248] さらに、上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg (O A c)₂（終濃度：13.5 mM）、翻訳関連溶液（終濃度：23.5 mM H E P E S - K O H (pH 7.6)、0.94 mM A T P、0.94 mM G T P、0.47 mM C T P、0.47 mM U T P、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. c o l i 全tRNA (R o c h e 社)、0.47 mM D T T）、アミノアシルtRNA（終濃度10 μ M C I A c - F I n i - t R N A、Me F t R N A_{GAA}、Me G t R N A_{GAU}、Me N I e t R N A_{GGU}、Me A t R N A_{GGC}、W t R N A_{GCA}、C t R N A_{CCA}）およびリボソーム（終濃度：1.2 μ M）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、E D T A（終濃度：16.7 mM）を加え翻訳反応を停止させた。

- [0249] 次に、上記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液（終濃度：50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、5 ユニット/μL MLV 逆転写酵素、3 μM TGG-ssG4S2.R23RT（配列番号9））を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。
- [0250] 逆転写反応後、EDTA（終濃度：16.7 mM）を加えた後、HBS-T（0.05%（v/v）Tween20、25 mM HEPES-NaOH（pH7.4）、150 mM NaCl）で置換をしたBio-Gel P30 Gel（Bio-rad社）脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。
- [0251] 実施例14-3 mRNA-リンカー-ペプチド連結体のライブラリーを用いた標的結合性ペプチドのセレクション
- 上記2で得られた脱塩後のサンプルを、組換えヒトIgG1 Fcタンパク質（終濃度：250 nM、110-HG、R&D Systems社）および磁性ビーズ（終濃度：3 mg/mL、Dynabeads Protein G、Thermo社）と混合し、4℃、60分間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-Tを用いて磁性ビーズを再懸濁し（1.5 mg/mL）、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、1分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁・4℃での1分間の混合、を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR mix溶液（10 mM Tris-HCl（pH8.5）、50 mM KCl、0.1% Triton X-100、dNTP（終濃度：0.25 mM）、MgCl₂（終濃度：2 mM）、T7g10M.F52（0.25 μM）、TGG-ssG4S2.R44（配列番号8）（0.25 μM））を用いて再懸濁し（3.0 mg/mL）、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。以降、上記工程をポジティブセレクションとする。
- [0252] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁性ビーズより回収（ポジティブセレクション）後のDNA量をリアルタイムPCR

法により定量した。リアルタイムPCR測定装置はLight Cycler 96 (Roche Applied Science社)を使用し、前述のPCR mix溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I (100、000倍希釈、Invitrogen社)、および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。また、上記磁気ビーズより回収後のDNAについて、リアルタイムPCR法から得られたThreshold Cycle (Cq値)をもとに、PCR (T100サーマルサイクラー、BioRad社、94℃ 60秒、{94℃ 40秒、61℃ 40秒、72℃ 40秒})を行いDNAの増幅を行った。反応産物は、AMPure XP (Beckman Coulter社)を用いて精製を行った。精製後のDNAを元に、T7 RNAポリメラーゼによる転写反応によりmRNAを合成し、得られた反応産物は、RNAClean XP (Beckman Coulter社)を用いて精製を行った。精製後、mRNAの濃度を、260nmにおけるUV吸収から求め、20μMになるように希釈した。

[0253] 上記で得られたmRNAを用いて、実施例13-2と同様の手法にてペプチドライブラリーを構築し、脱塩後のサンプルを、磁性ビーズ(終濃度: 3mg/mL、Dynabeads Protein G、Thermo社)と混合し、4℃、10分間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離により除いた。上記の磁性ビーズとの混合、磁気分離による磁性ビーズの除去、を計2回行った。この工程をネガティブセクションとする。磁気分離後の磁性ビーズについて、HBS-Tを用いて再懸濁し(3.0mg/mL)、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収し、リアルタイムPCR法におけるネガティブセクションのサンプルとした。磁気分離後の上清については、さらに上記ポジティブセクションを行い、得られたサンプルのDNA量について上記リアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR法から得られたThreshold Cycle (Cq値)をもとに、ポジティブセクション後のサンプルについてのみ、上記と同様にPCR法によるDNAの増幅およびmRNA

の作製を行った。さらに、上記ネガティブセクション、ポジティブセクション、リアルタイムPCR、PCRによるDNAの増幅およびmRNAの作製、を計3回行った。

[0254] 上記セクション過程の結果を図14に示す。ここで、リカバリー(%)は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Fcをモデル標的タンパク質とした標的結合性ペプチドのセクションにおいて、1価リンカー(リンカー1)を用いてセクションを行った場合では、標的タンパク質への結合に由来する(ポジティブセクションにおいて得られた)DNAのリカバリー率と、非特異的な結合に由来する(ネガティブセクションにおいて得られた)DNAのリカバリー率とで有意な差が得られなかった。一方で、2価リンカー(リンカー4)を用いてセクションを行った場合では、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が、非特異的な結合に由来するDNAのリカバリー率と比較して顕著に高く得られた。これは、1価リンカー(リンカー1)においては、セクション工程中の洗浄操作において、標的結合性ペプチドとFcタンパク質との結合が、その結合能の弱さから保持されなかったが、2価リンカー(リンカー4)においては、同リンカーに連結した複数のペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上し、洗浄操作において、標的結合性ペプチドとFcタンパク質との結合が保持されたものと考えられる。

[0255] 実施例14-4 次世代シーケンシング(NGS)による遺伝子配列解析
各ラウンドのDNAについて、PCR法により所望の配列付加を行った後、NGS解析を行った。具体的な試験方法を以下に示す。

[0256] 最終ラウンドのPCR後のサンプルについて、NGS解析においてシーケンシングを開始するフォワード・リバースプライマーのハイブリダイズ領域とインデックス領域を付加するために、PCR後のサンプル(終濃度: 2%(v/v))と、1st PCR反応液(終濃度: 1×Phusion HFバッファ、200 μM dNTPs、250 nM フォワードプライマ

ー（1価リンカーを用いたセクションサンプルはF70-ID12-07-4（配列番号46）、2価リンカーを用いたセクションサンプルはF70-ID12-07-5（配列番号47））、250nM R38-3UTR-SBS-R（配列番号48）、20U/mL Phusion DNAポリメラーゼ）を50μL調製し、サーマルサイクラー（T100サーマルサイクラー、BioRad社）を用いて、95℃ 120秒、{95℃ 20秒、61℃ 30秒、72℃ 30秒} 6サイクルによる反応を行った。次に、PCR後のサンプルに対してNGS解析におけるフローセル上に固定化されている核酸配列へのハイブリダイズ領域を付加するために、前記PCR後のサンプル（終濃度：2%（v/v））と、2nd PCR反応液（終濃度：1×Phusion HFバッファー、200μM dNTPs、250nM F63-P5-SBS-F（配列番号49）、250nM R58-SBSR-P7（配列番号50）、20U/mL Phusion DNAポリメラーゼ）を50μL調製し、サーマルサイクラー（T100サーマルサイクラー、BioRad社）を用いて、95℃ 120秒、{95℃ 20秒、61℃ 30秒、72℃ 30秒} 6サイクルによる反応を行った。反応産物は、AMPure XP（Beckman Coulter社）を用いて精製を行った。精製後のサンプルについて、Miseq（登録商標）SystemおよびMiseq Regent Micro Kit v2を用いて遺伝子配列解析を行った。

[0257] 実施例14-5 ディスプレイアッセイによる結合能評価

前記1価リンカーおよび2価リンカーを用いたセクションのそれぞれのNGS解析において、読み取られた遺伝子情報から翻訳されたペプチド配列を解析し、遺伝子情報を介して設計したペプチドの固定配列およびランダム化されたペプチド数が保たれている配列のみを抽出した。さらに、抽出されたペプチド配列から、出現頻度上位15配列を選択し、実施例2に従ってmRNAの調製を行った。調製後、1価リンカーおよび2価リンカーを用いたセクションからそれぞれ選択された出現頻度上位15配列のmRNAにつ

いて、リンカー1またはリンカー4をそれぞれ別々にハイブリダイゼーションさせ、mRNA-リンカー連結体を作製した。

[0258] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、前記mRNA-リンカー連結体（終濃度：1 μ M）、7つのアミノアシルtRNA（終濃度10 μ M C I A c - F I n i - t R N A、Me F t R N A_{GAA}、Me G t R N A_{GAU}、Me N I e t R N A_{GGU}、Me A t R N A_{GGC}、W t R N A_{GCA}、C t R N A_{CCA}）、10種類のアミノ酸（終濃度0.2 mM L e u、V a l、S e r、P r o、T y r、H i s、A s n、A s p、A r g、G l y）および10種類のアミノアシルtRNA合成酵素（終濃度0.04 μ M L e u R S、0.02 μ M V a l R S、0.04 μ M S e r R S、0.16 μ M P r o R S、0.02 μ M T y r R S、0.02 μ M H i s R S、0.38 μ M A s n R S、0.13 μ M A s p R S、0.03 μ M A r g R S、0.09 μ M G l y R S）、Mg (O A c)₂（終濃度：1 mM）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、終濃度12.5 mMになるようにE D T Aを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0259] さらに、上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg (O A c)₂（終濃度：13.5 mM）、翻訳関連溶液（終濃度：23.5 mM H E P E S - K O H (pH 7.6)、0.94 mM A T P、0.94 mM G T P、0.47 mM C T P、0.47 mM U T P、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. c o l i 全tRNA (R o c h e 社)、0.47 mM D T T）、アミノアシルtRNA（終濃度10 μ M C I A c - F I n i - t R N A、Me F t R N A_{GAA}、Me G t R N A_{GAU}、Me N I e t R N A_{GGU}、Me A t R N A_{GGC}、W t R N A_{GCA}、C t R N A_{CCA}）およびリボソーム（終濃度：1.2 μ M）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った。反応後、E D T A（終濃度：16.7 mM）を加え翻訳反応を停止させた。

- [0260] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液（終濃度：50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、5 ユニット/μL MLV逆転写酵素、3 μM TGG-s sG4S2. R23RT（配列番号9））を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。
- [0261] 逆転写反応後、EDTA（終濃度：16.7 mM）を加えた後、HBS-T（0.05%（v/v）Tween20、25 mM HEPES-NaOH（pH7.4）、150 mM NaCl）で置換をしたBio-Gel P30 Gel（Bio-rad社）脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。脱塩後のサンプルを、組換えヒトIgG1 Fcタンパク質（終濃度：250 nM、110-HG、R&D Systems社）および磁性ビーズ（終濃度：3 mg/mL、Dynabeads Protein G、Thermo社）または磁性ビーズ（終濃度：3 mg/mL、Dynabeads Protein G、Thermo社）のみ、と混合し、4℃、30分間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-Tを用いて磁性ビーズを再懸濁し（1.5 mg/mL）、新しいサンプルチューブに移した。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁、を計3回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、HBS-Tを用いて再懸濁し（3.0 mg/mL）、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。
- [0262] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁性ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96（Roche Applied Science社）を使用し、前述のPCR mix溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I（100,000倍希釈、Invitrogen社）、および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。
- [0263] 上記ディスプレイアッセイの結果を図15に示す。ここで、リカバリー（

%) は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Fcをモデル標的タンパク質とした標的結合性ペプチドのセクションにおいて、1価リンカー（リンカー1）を用いたセクションから選択された出現頻度上位15配列については、ディスプレイアッセイにおける1価リンカーおよび2価リンカーの使用に関わらず、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率と、非特異的な結合に由来するDNAのリカバリー率とで有意な差が得られなかった。一方で、2価リンカー（リンカー4）を用いたセクションから選択された出現頻度上位15配列については、2価リンカーを使用したディスプレイアッセイにおいて、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が、非特異的な結合に由来するDNAのリカバリー率と比較して顕著に高くなる配列が多く得られた。これは、ランダム化されたペプチドライブラリーを用いたセクションにおいて、2価リンカー（リンカー4）を用いた場合に、同リンカーに連結した複数のペプチドに由来するアビディティ効果によって、Fcへの結合が保たれ、標的結合能を有する配列が出現頻度上位配列として選択されたものと考えられる。

[0264] [実施例15：mRNA-リンカー連結体（共有結合体）によるディスプレイアッセイ]

実施例15-1 ライゲーションによるmRNA-リンカー連結体（共有結合体）の作製

実施例2で、mRNA display format Streptag IIの鋳型DNAより調製した各mRNA（終濃度：1.0 μ M）と、実施例1で作製したリンカー7またはリンカー8（終濃度：1.5 μ M）をライゲーション溶液（10% DMSO（v/v）、1x ligation buffer（TAKARA）、5 U/ μ L T4 RNA ligase）中で、37℃、1時間、反応を行った。反応後、NaCl（終濃度：0.3 M）およびEDTA（5 mM）を加え反応を停止させた後、フェノール／クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿し、乾燥後、超純水で溶解

し、5 μ M mRNA-リンカー連結体（共有結合体）を作製した。

[0265] 実施例15-2 Strep-tag11をモデルペプチドとしたmRNA-リンカーペプチド連結体によるディスプレイアッセイ

上記1においてライゲーション反応により得られたmRNA-リンカーペプチド連結体（共有結合体）を使用して、ストレプトアビジンとの結合に伴うリカバリー率を評価する、以下に記載のディスプレイアッセイを行った。

[0266] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、上記mRNA-リンカー連結体（終濃度：1 μ M）、1種類のアミノアシルtRNA（終濃度：10 μ M W Init tRNA）、9種類のアミノ酸（終濃度：0.2 mM、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Gln、Glu、Lys、Trp）および9種類のアミノアシルtRNA合成酵素（終濃度：0.09 μ M GlyRS、0.02 μ M HisRS、0.68 μ M PheRS、0.16 μ M ProRS、0.04 μ M SerRS、0.06 μ M GlnRS、0.23 μ M GluRS、0.11 μ M LysRS、0.03 μ M TrpRS）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った（1回目の翻訳反応）。反応後、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについては終濃度12.5 mMになるようにEDTAを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0267] 上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg(OAc)₂（終濃度：12.5 mM）、翻訳関連溶液（終濃度：23.5 mM HEPES-KOH（pH7.6）、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli全tRNA（Roche社）、0.47 mM DTT、アミノアシルtRNA（終濃度：10 μ M W Init tRNA）およびリボソーム（終濃度：1.2 μ M）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った（2回目の翻訳反応）。翻訳反応後、EDTA（終濃度：16.

7 mM) を加え翻訳反応を停止させた。

[0268] 次に、上記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液（終濃度：50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、5 ユニット/μL MLV 逆転写酵素、3 μM RT-Strep-tag II（配列番号 14））を加え、42℃、30 分、逆転写反応を行った。

[0269] 逆転写反応後、EDTA（終濃度：16.7 mM）を加えた後、HBS-T（0.05% (v/v) Tween 20、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl）で置換をした Bio-Gel P30 Gel（Biorad 社）脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0270] 脱塩後、標的タンパク質としてストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズ（終濃度：1 mg/mL、Dynabeads（商標） M-280 ストレプトアビジン、Thermo 社）を加え、4℃、1 時間、結合反応を行った。この時、ネガティブコントロールとして、Protein G を固定化した磁性ビーズ（終濃度：1 mg/mL、Dynabeads（商標） Protein G for Immunoprecipitation、Thermo 社）に対して、脱塩後のサンプルを加え、4℃、1 時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-T を用いて磁性ビーズを再懸濁し（0.5 mg/mL）、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、5 分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-T による再懸濁・4℃での 5 分間の混合、を計 2 回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR 溶液（10 mM Tris-HCl (pH 8.5)、50 mM KCl、0.1% Triton X-100）を用いて再懸濁し（2 mg/mL）、95℃、5 分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0271] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中の DNA 量、および磁気ビーズより回収後の DNA の量をリアルタイム PCR 法により定量した。リアルタイム PCR 測定措置は LightCycler 96 (Roche App

l i e d S c i e n c e 社) を使用し、前述の P C R 溶液に T a q ポリメラーゼ、S Y B R G r e e n I (100、000倍希釈、I n v i t r o g e n 社)、d N T P (終濃度: 0.25 mM)、M g C l₂ (終濃度: 2 mM)、T7 g10M、F52 (0.25 μM)、R V_mRNA d i s p l a y__S t r e p - t a g I I (配列番号45) (0.25 μM) および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。

[0272] 前記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図16に示す。ここで、リカバリー率(%)は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。S t r e p - t a g I I、ストレプトアビジンを、それぞれモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー(リンカー8)を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が1価リンカー(リンカー7)と比較して大きく増強した。さらに、人工リサイクリング翻訳においても、上記リカバリー率の増強が確認された。これらの結果から、実施例10と同様に、上記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられた。

[0273] 以上の実施例10と15-2の結果から、mRNAとリンカーの連結方法に依らず、2価リンカーを用いることで複数ペプチドの提示が可能であり、アビディティ効果によって標的タンパク質への結合能が向上することが示された。

[0274] [実施例16: 3'末端リボースにエステル結合を介してアミノ酸が共有結合したリンカー(RAPIDリンカー)の構築と、これを用いたディスプレイアッセイ]

実施例16-1 ARSリボザイムによるリンカー9と10の3'末端のアシル化

ARSリボザイムによるリンカー9、10の3'末端のアミノアシル化に使用するアミノ酸活性化エステルとして、2, 2, 2-トリフルオロエチル

メチル-L-フェニルアラニネート塩酸塩 (NMe-Phe-TEE) を調製した (WO 2023/234425 (特許文献 11)) で開示の方法で調製)。リンカー 9、10 の 3' 末端と各アミノ酸活性化エステルとをそれぞれ別々に連結するために、ARS リボザイムとして eFx を用いた。NMe-Phe-TEE (終濃度: 5 mM) について、eFx (終濃度: 25 μ M)、リンカー 9 または リンカー 10 (終濃度: 25 μ M)、HEPES-KOH (終濃度: 50 mM、pH 7.5)、MgCl₂ (終濃度: 50 mM)、DMSO (終濃度: 20%) を加え、0℃、オーバーナイト、でアミノアシル化反応を行った。前記アミノアシル化後サンプルに対して等量の 3M NaOAc (pH 5.2) を加えた後、エタノール沈殿を行った。

[0275] 次に、ペレットを 0.3M NaOAc (pH 5.2) を用いて再溶解した後、再度エタノール沈殿を行った。最後に、ペレットを 0.1M NaOAc (pH 5.2) を含む 70%エタノールおよび 70%エタノールを用いて、それぞれ一回ずつ洗浄を行った。得られた前記アミノアシル化後サンプルのペレットは、0.2%酢酸に溶解した。前記アミノアシル化後サンプルを 2.64 倍量のローディングバッファー (終濃度: 41 mM 酢酸ナトリウム、23% ホルムアミド、2.7 mM EDTA) に溶解した後、酸性条件下、20%の変性ポリアクリルアミドゲル (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、6M尿素) 電気泳動 (電気泳動溶液: 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2)) で分離し、泳動後のゲルを SYBR Green I (Invitrogen, SYBRhaMolecular Probes Inc.) を用いた蛍光染色により解析した。

[0276] 得られた結果を図 17a に示す。図 17a は、SYBR Green I (Invitrogen, SYBRhaMolecular Probes Inc.) に由来する蛍光を検出した際に得られた画像である。1 価リンカー (リンカー 9) を用いてアシル化を行った場合、アシル化前のバンド位置と比較して高分子量側にシフトしたバンドが 1 本現れており、リンカーに対してアミノ酸が一つアシル化されることによって分子量が増加し、このよ

うなバンドシフトが得られていると考えられる。2価リンカー（リンカー10）を用いた場合においては、アシル化前のバンド位置と比較して高分子量側にシフトしたバンドが2本現れた。これはARSリボザイムの核酸認識部位であるCCAを末端に二つ有する2価リンカー（リンカー10）に対して、アミノ酸が一つまたは二つアシル化されることによって分子量が増加し、このようなバンドシフトがそれぞれ得られていると考えられる。

[0277] 実施例16-2 Strep-tag11をモデルペプチドとしたmRNA-リンカー-ペプチド連結体によるディスプレイアッセイ

Strep-tag11をモデルペプチドとしたmRNA-リンカー-ペプチド連結体を使用して、ストレプトアビジンとの結合に伴うリカバリー率を評価するディスプレイアッセイを行った。

[0278] 実施例3で作製した、Strep-tag11をコードするmRNAに対して、実施例16-1でMePheをアシル化したリンカー9又はリンカー10を1mM酢酸ナトリウム溶液中でハイブリダイゼーションさせて、以下の実験を行った。

[0279] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、上記mRNA-リンカー連結体（終濃度：1 μ M）、1種類のアミノアシルtRNA（終濃度：10 μ M W InitRNA）、9種類のアミノ酸（終濃度：0.2mM、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Gln、Glu、Lys、Trp）および9種類のアミノアシルtRNA合成酵素（終濃度：0.09 μ M GlyRS、0.02 μ M HisRS、0.68 μ M PheRS、0.16 μ M ProRS、0.04 μ M SerRS、0.06 μ M GlnRS、0.23 μ M GluRS、0.11 μ M LysRS、0.03 μ M TrpRS）を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った（1回目の翻訳反応）。反応後、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについては終濃度12.5mMになるようにEDTAを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0280] 上記の1回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg(OAc)₂（終濃

度：12.5 mM)、翻訳関連溶液(終濃度：23.5 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli 全 tRNA (Roche 社)、0.47 mM DTT、アミノアシル tRNA (終濃度：10 μ M W-initRNA) およびリボソーム(終濃度：1.2 μ M)を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(2回目の翻訳反応)。翻訳反応後、EDTA(終濃度：16.7 mM)を加え翻訳反応を停止させた。

[0281] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液(終濃度：50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、5ユニット/ μ L MLV逆転写酵素、3 μ M RT-Strep-tag II (配列番号14))を加え、42℃、15分、逆転写反応を行った。

[0282] 逆転写反応後、EDTA(終濃度：16.7 mM)を加えた後、HBS-T (0.05% (v/v) Tween 20、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl)で置換をしたBio-Gel P30 Gel (Biorad 社)脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0283] 脱塩後、標的タンパク質としてストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズ(終濃度：1 mg/mL、Dynabeads (商標) M-280 ストレプトアビジン、Thermo 社)を加え、4℃、1時間、結合反応を行った。この時、ネガティブコントロールとして、Protein Gを固定化した磁性ビーズ(終濃度：1 mg/mL、Dynabeads (商標) Protein G for Immunoprecipitation、Thermo 社)に対して、脱塩後のサンプルを加え、4℃、1時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-Tを用いて磁性ビーズを再懸濁し(0.5 mg/mL)、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、5分間、混合を行った。さ

らに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁・4℃での5分間の混合、を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR溶液（10mM Tris-HCl（pH8.5）、50mM KCl、0.1% Triton X-100）を用いて再懸濁し（2mg/mL）、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0284] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96（Roche Applied Science社）を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I（100,000倍希釈、Invitrogen社）、dNTP（終濃度：0.25mM）、MgCl₂（終濃度：2mM）、T7g10M, F52（0.25μM）、RV_Streptag II（配列番号10）（0.25μM）および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。

[0285] 上記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図18に示す。ここで、リカバリー率（%）は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Streptag II、ストレプトアビジンを、それぞれモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、2価リンカー（リンカー10）を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が1価リンカー（リンカー9）と比較して大きく増強した。さらに、人工リサイクリング翻訳においても、上記リカバリー率の増強が確認された。これらの結果から、実施例10と同様に、上記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられた。

[0286] 上記実施例10、実施例16-1、2の結果から、リンカーの3'末端にあるリボースに対して、エステル結合を介してアミノ酸が共有結合し、ピューロマイシン様物質としての特性をなした場合についても、2価リンカーを

用いることで複数ペプチドの提示が可能であり、アビディティ効果によって標的タンパク質への結合能が向上するものと考えられた。

[0287] [実施例 17 : 3 価リンカーを用いたディスプレイアッセイ]

実施例 17-1 Strep-tag II をモデルペプチドとした mRNA-リンカー-ペプチド連結体によるディスプレイアッセイ 1

Strep-tag II をモデルペプチドとした mRNA-リンカー-ペプチド連結体を使用して、ストレプトアビジンとの結合に伴うリカバリー率を評価するディスプレイアッセイを行った。

[0288] 実施例 3 で作製した、Strep-tag II をコードする mRNA に対して、リンカー 1、リンカー 11 をハイブリダイゼーションさせた mRNA-リンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0289] 実施例 5 で構成した無細胞翻訳系に対して、前記 mRNA-リンカー連結体（終濃度：1 μ M）、1 種類のアミノアシル tRNA（終濃度：10 μ M W Init RNA）、9 種類のアミノ酸（終濃度：0.2 mM、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Gln、Glu、Lys、Trp）および 9 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素（終濃度：0.09 μ M GlyRS、0.02 μ M HisRS、0.68 μ M PheRS、0.16 μ M ProRS、0.04 μ M SerRS、0.06 μ M GlnRS、0.23 μ M GluRS、0.11 μ M LysRS、0.03 μ M TrpRS）を加え、37°C、30 分間、翻訳反応を行った（1 回目の翻訳反応）。反応後、人工リサイクリング翻訳を行わないサンプルについては終濃度：16.7 mM になるように EDTA を加え、人工リサイクリング翻訳により 2 回目の翻訳を行うサンプルについては終濃度 12.5 mM になるように EDTA を加え、氷浴上で 10 分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0290] さらに、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについて、2 回目の翻訳反応を実施した。

[0291] 上記の 1 回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg(OAc)₂（終濃

度：12.5 mM)、翻訳関連溶液(終濃度：23.5 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli 全 tRNA (Roche 社)、0.47 mM DTT、アミノアシル tRNA (終濃度：10 μ M W-initRNA) およびリボソーム(終濃度：1.2 μ M)を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(2回目の翻訳反応)。反応後、人工リサイクリング翻訳により3回目の翻訳を行わないサンプルについては終濃度：16.7 mMになるようにEDTAを加え、人工リサイクリング翻訳により3回目の翻訳を行うサンプルについては終濃度12.5 mMになるようにEDTAを加え、氷浴上で10分間静置し、リボソームの変性を行った。

さらに、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについて、3回目の翻訳反応を実施した。

[0292] 上記の2回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg(OAc)₂(終濃度：12.5 mM)、翻訳関連溶液(終濃度：23.5 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli 全 tRNA (Roche 社)、0.47 mM DTT、アミノアシル tRNA (終濃度：10 μ M W-initRNA) およびリボソーム(終濃度：1.2 μ M)を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(3回目の翻訳反応)。翻訳反応後、EDTA(終濃度：16.7 mM)を加え翻訳反応を停止させた。

[0293] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液(終濃度：50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、5ユニット/ μ L MLV逆転写酵素、3 μ M RT-Strep-tag II (配列番号14))

)を加え、42℃、30分、逆転写反応を行った。

[0294] 逆転写反応後、EDTA（終濃度：16.7mM）を加えた後、HBST（0.05%（v/v）Tween20、25mM HEPES-NaOH（pH7.4）、150mM NaCl）で置換をしたBio-Gel P30 Gel（Biorad社）脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0295] 脱塩後、標的タンパク質としてストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズ（終濃度：1mg/mL、Dynabeads（商標）M-280 ストレプトアビジン、Thermo社）を加え、4℃、1時間、結合反応を行った。この時、ネガティブコントロールとして、Protein Gを固定化した磁性ビーズ（終濃度：1mg/mL、Dynabeads（商標）Protein G for Immunoprecipitation、Thermo社）に対して、脱塩後のサンプルを加え、4℃、1時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBSTを用いて磁性ビーズを再懸濁し（0.5mg/mL）、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、30分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBSTによる再懸濁・4℃での30分間の混合、を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR溶液（10mM Tris-HCl（pH8.5）、50mM KCl、0.1% Triton X-100）を用いて再懸濁し（2mg/mL）、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0296] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96（Roche Applied Science社）を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I（100,000倍希釈、Invitrogen社）、dNTP（終濃度：0.25mM）、MgCl₂（終濃度：2mM）、T7g10M、F52（0.25μM）、RV_Strep-tag II（配列番号10）（0.25μM）および測定サンプル溶液を添加

した反応液を測定に供した。

[0297] 前記ディスプレイアッセイを3回試行した結果を図19に示す。ここで、リカバリー率(%)は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Strep-tag II、ストレプトアビジンを、それぞれモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、3価リンカー(リンカー11)を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が、人工リサイクリング翻訳の回数依存的に、1価リンカー(リンカー1)と比較して大きく増強した。これは、前記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられる。

[0298] 実施例17-2 Strep-tag IIをモデルペプチドとしたmRNA-リンカー-ペプチド連結体によるディスプレイアッセイ2

Strep-tag IIをモデルペプチドとしたmRNA-リンカー-ペプチド連結体を使用して、ストレプトアビジンとの結合に伴うリカバリー率を評価するディスプレイアッセイを行った。

[0299] 実施例3で作製した、Strep-tag IIをコードするmRNAに対して、リンカー1、リンカー15をハイブリダイゼーションさせたmRNA-リンカー連結体を使用して、以下の実験を行った。

[0300] 実施例5で構成した無細胞翻訳系に対して、前記mRNA-リンカー連結体(終濃度: 1 μ M)、1種類のアミノアシルtRNA(終濃度: 10 μ M W Init tRNA)、9種類のアミノ酸(終濃度: 0.2 mM、Gly、His、Phe、Pro、Ser、Gln、Glu、Lys、Trp)および9種類のアミノアシルtRNA合成酵素(終濃度: 0.09 μ M GlyRS、0.02 μ M HisRS、0.68 μ M PheRS、0.16 μ M ProRS、0.04 μ M SerRS、0.06 μ M GlnRS、0.23 μ M GluRS、0.11 μ M LysRS、0.03 μ M TrpRS)を加え、37℃、30分間、翻訳反応を行った(1回目の翻

訳反応)。反応後、人工リサイクリング翻訳を行うサンプルについては終濃度 12.5 mM になるように EDTA を加え、氷浴上で 10 分間静置し、リボソームの変性を行った。

[0301] 上記の 1 回目の翻訳反応を行った反応液に対して、Mg (OAc)₂ (終濃度：12.5 mM)、翻訳関連溶液 (終濃度：23.5 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、0.94 mM ATP、0.94 mM GTP、0.47 mM CTP、0.47 mM UTP、9.4 mM クレアチンリン酸、47.0 mM 酢酸カリウム、0.94 mM スペルミジン、0.7 mg/mL E. coli 全 tRNA (Roche 社)、0.47 mM DTT、アミノアシル tRNA (終濃度：10 μM W-init tRNA) およびリボソーム (終濃度：1.2 μM) を加え、37℃、30 分間、翻訳反応を行った (2 回目の翻訳反応)。翻訳反応後、EDTA (終濃度：16.7 mM) を加え翻訳反応を停止させた。

[0302] 次に、前記で得られた翻訳産物を含む反応液に、逆転写反応溶液 (終濃度：50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、18.4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.30 mM dNTPs、5 ユニット/μL MLV 逆転写酵素、3 μM RT-Strep-tag II (配列番号 14)) を加え、42℃、30 分、逆転写反応を行った。

[0303] 逆転写反応後、EDTA (終濃度：16.7 mM) を加えた後、HBS-T (0.05% (v/v) Tween 20、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl) で置換をした Bio-Gel P30 Gel (Biorad 社) 脱塩カラムを用いて、脱塩を行った。

[0304] 脱塩後、標的タンパク質としてストレプトアビジンを固定化した磁性ビーズ (終濃度：1 mg/mL、Dynabeads (商標) M-280 ストレプトアビジン、Thermo 社) を加え、4℃、1 時間、結合反応を行った。この時、ネガティブコントロールとして、Protein G を固定化した磁性ビーズ (終濃度：1 mg/mL、Dynabeads (商標) Protein G for Immunoprecipitation、

Thermo社) に対して、脱塩後のサンプルを加え、4℃、1時間、混合し結合反応を行った。結合反応後、磁性ビーズを磁気分離し、上清を取り除いた。次に、HBS-Tを用いて磁性ビーズを再懸濁し(0.5mg/mL)、新しいサンプルチューブに移した後、4℃、30分間、混合を行った。さらに、前記の磁気分離・上清除去・HBS-Tによる再懸濁・4℃での30分間の混合、を計2回行った。最後に、磁気分離・上清除去後に、PCR溶液(10mM Tris-HCl (pH8.5)、50mM KCl、0.1% Triton X-100)を用いて再懸濁し(2mg/mL)、95℃、5分間加熱を行った。加熱後、磁気分離を行い、上清を回収した。

[0305] 上記脱塩後の標的タンパク質添加前の液中のDNA量、および磁気ビーズより回収後のDNAの量をリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCR測定措置はLightCycler 96 (Roche Applied Science社)を使用し、前述のPCR溶液にTaqポリメラーゼ、SYBR Green I (100,000倍希釈、Invitrogen社)、dNTP (終濃度: 0.25mM)、MgCl₂ (終濃度: 2mM)、T7g10M, F52 (0.25μM)、RV_Streptag II (配列番号10) (0.25μM) および測定サンプル溶液を添加した反応液を測定に供した。

[0306] 前記ディスプレイアッセイを2回試行した結果を図20に示す。ここで、リカバリー率(%)は、標的タンパク質添加前の液中のDNA量に対する、磁性ビーズから回収後のDNA量の割合を示す。Streptag II、ストレプトアビジンを、それぞれモデルペプチドおよびモデル標的タンパク質とした結合能評価において、3価リンカー(リンカー15)を用いることで、標的タンパク質への結合に由来するDNAのリカバリー率が、1価リンカー(リンカー1)と比較して大きく増強した。これは、前記リンカーに連結した複数ペプチドに由来するアビディティ効果によって、標的タンパク質への結合能が向上したものと考えられる。

産業上の利用可能性

[0307] 本発明の「1つの遺伝情報物質に対しピューロマイシン様物質を介して複数の翻訳産物が結合した連結体」は、複数の翻訳産物によってターゲットタンパク質を認識することができる。そのため、例えば、無細胞翻訳系のディスプレイ（mRNAディスプレイ等）に使用することによって、ターゲットタンパク質に結合するペプチド-核酸連結体のリカバリー率の大幅な向上、および、前記ペプチドに対して、より弱い結合能を有するペプチド結合物質の取得が可能になる。このような新規なディスプレイの提供により、例えば、優れたペプチド医薬の開発等が期待される。

請求の範囲

- [請求項1] 所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーであって、
前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、
前記リンカー。
- [請求項2] 前記所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部が、前記所望の遺伝情報物質と結合可能な核酸を含む、
請求項1に記載のリンカー。
- [請求項3] 前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるための、請求項1または2に記載のリンカー。
- [請求項4] 前記遺伝情報物質が、核酸である、請求項1ないし3に記載のリンカー。
- [請求項5] 前記ピューロマイシン様物質が、ピューロマイシンである、請求項1ないし3に記載のリンカー。
- [請求項6] 所望の遺伝情報物質と結合可能な構造を有する結合部；および少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーであって、
前記ピューロマイシン様物質が、所望のペプチドのC末端と共有結合可能である、
前記リンカーの使用であって、
前記遺伝情報物質と、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドとを連結させるための前記使用。
- [請求項7] (a) 請求項1ないし3に記載のリンカー；および
(b) (a)のリンカーの結合部に結合した、前記遺伝情報物質を含む、遺伝情報物質－リンカー連結体。
- [請求項8] (a) 請求項1ないし3に記載のリンカー；

(b) (a) のリンカーの結合部に結合した、前記遺伝情報物質；
および

(c) (a) のリンカーの、少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質に結合した、前記遺伝情報物質にコードされるペプチドを含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体。

[請求項9] (1) 請求項7に記載の遺伝情報物質－リンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を得られる、を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法。

[請求項10] (1) の工程の前に、(0) 請求項1ないし3に記載のリンカーを、所望の遺伝情報物質と結合させ、遺伝情報物質－リンカー連結体を得る工程、を含む、請求項9に記載の製造方法。

[請求項11] (2) (1) の工程を2回以上繰り返す工程、を含む、請求項9または10に記載の製造方法。

[請求項12] 請求項8に記載の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を少なくとも2つ含む、ライブラリー。

[請求項13] 所望の標的物質に結合するペプチドのスクリーニング方法であって、
請求項8に記載の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を少なくとも2つ含む、ライブラリーと、前記標的物質とを接触させる工程を含む、前記スクリーニング方法。

[請求項14] 所望の標的物質とペプチドとの結合能の評価方法であって、
請求項8に記載の遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体を、前記標的物質と接触させる工程を含む、前記評価方法。

[請求項15] (1-i) 少なくとも1つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーと所望の遺伝情報物質とが結合した遺伝情報物質－リンカー連

結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体が得られる；

および

(2-i) (1-i) の工程を2回以上繰り返す工程

を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法。

[請求項16] (1-ii) 少なくとも2つ以上のピューロマイシン様物質を含むリンカーと所望の遺伝情報物質とが結合した遺伝情報物質－リンカー連結体を、無細胞翻訳系に供し、遺伝情報物質の翻訳を行う工程、ここにおいて、リンカー中のピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合し、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体が得られる、

を含む、遺伝情報物質－リンカー－ペプチド連結体の製造方法。

[請求項17] 所望の遺伝情報物質にコードされるペプチドを2つ以上、前記遺伝情報物質から提示する方法であって、

前記ペプチドはそれぞれ、前記ペプチドのC末端と共有結合可能な官能基を介して、前記遺伝情報物質と連結している、方法。

[請求項18] 請求項7に記載の遺伝情報物質－リンカー連結体を無細胞翻訳系に供し、前記遺伝情報物質から前記ペプチドを翻訳する工程を含み、ここにおいて、前記ピューロマイシン様物質と翻訳されたペプチドとが結合する、工程を含む、請求項17に記載の提示方法。