

明 細 書

発明の名称：

複数のライブラリを用いたペプチドのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、複数のライブラリを用いたペプチドのスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 大腸菌の再構成無細胞翻訳系を用いる mRNA ディスプレイ技術が、非天然アミノ酸を含むペプチドライブラリの合成、及びそれを用いた高結合能を持つペプチドのスクリーニングに利用されている（特許文献 1）。

[0003] スクリーニングで有益なペプチドを効率よく見出すためには、ライブラリの多様性は非常に重要である。そのためには、ライブラリに含まれるペプチドの構成単位（アミノ酸）の多様性を増やすことが重要であるが、ペプチドを翻訳により合成する場合、1つのコドンテーブルに組み込めるアミノ酸の種類には限界があることから、利用可能なアミノ酸の数にも限界がある。そこで、異なる無細胞翻訳系を使用して多様性の高いライブラリの作製が検討されている（非特許文献 1、2）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献 1：国際公開第 2013/100132 号

非特許文献

[0005] 非特許文献 1：D.E. Hacker et al. ACS Chem. Biol., 2017, 12, 795-804.

非特許文献 2：M.E. Brousseau et al. Cell Chem. Biol., 2022, 29, 249-258.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 複数の無細胞翻訳系を用いて、表現型と遺伝子型が対応付けられたペプチド-核酸複合体ライブラリを別々に作製すれば、理論上、全体として表現型であるペプチドの多様性を高めることはできる。しかしこの場合、使用される遺伝子型がライブラリ間で共通するため、使用した無細胞翻訳系ごとにそれぞれ独立したライブラリとして取り扱う必要があり、ライブラリの数に応じてパニングに必要な時間と労力が増加するという問題があった。そこで、より簡便に標的分子に結合し得る候補ペプチドを選別するために、各ライブラリを混合してパニングを行う方法が考えられる。しかしながら、各ライブラリを混合して標的分子に対してパニングした場合、遺伝子型（核酸）と表現型（ペプチド）の対応付けができなくなり、濃縮したペプチド（正確には、濃縮した核酸に対応する表現型であるペプチド）がどのライブラリに由来するのか同定することが困難となる。また、各ライブラリを混合してパニングを行うときに、特定のライブラリ中に標的分子と結合しやすいペプチドが多く存在するなどの偏りがあると、そのライブラリに由来するペプチドが濃縮されやすく、他のライブラリに由来するペプチドが相対的に濃縮されにくく（低濃縮率となり）、多様な構造を有するヒットペプチドを取得することが難しくなる可能性があった。

[0007] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、複数のペプチド-核酸複合体ライブラリを効率的にスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、ライブラリ中に含まれるペプチド-核酸複合体に核酸バーコードを付与（バーコード化）することにより、複数のライブラリを混合しても、標的分子に結合したペプチドが、どのライブラリに由来するか同定することを可能とする手法を見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] 本発明は、以下の〔A 1〕～〔A 6 7〕、〔B 1〕～〔B 3〕、〔C 1〕～〔C 5〕、又は〔D 1〕～〔D 9〕を提供する。

〔A 1〕 次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法：

（１）バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

（２）前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

（３）前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

（４）バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程。

〔A 2〕 前記工程（１）が、無細胞翻訳系を用いて、複数の核酸ライブラリをそれぞれ別々に翻訳し、複数のペプチド-核酸複合体を調製することを含む、〔A 1〕に記載の方法。

〔A 3〕 前記工程（１）が、ペプチドをコードする核酸を翻訳してペプチドを調製し、該ペプチドと前記核酸を連結させて、ペプチド-核酸複合体を調製することを含む、〔A 1〕または〔A 2〕に記載の方法。

〔A 4〕 前記工程（１）が、前記ペプチド-核酸複合体をバーコード化し、バーコード化されたペプチド-核酸複合体を調製することを含む、〔A 1〕～〔A 3〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5〕 前記バーコード化が、前記ペプチド-核酸複合体の核酸部分を逆転写することである、〔A 1〕～〔A 4〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6〕 前記バーコード化が、前記ペプチド-核酸複合体の核酸部分を、バーコード配列を含む第一のプライマーで逆転写することである、〔A 1〕～〔A 5〕のいずれかに記載の方法。

〔A 7〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリが、核酸ディスプレイラ

イブラリごとに異なるバーコード配列を有する、〔A 1〕～〔A 6〕のいずれかに記載の方法。

〔A 8〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリに含まれるバーコード化されたペプチド-核酸複合体が、核酸ディスプレイライブラリごとに異なるバーコード配列を有する、〔A 1〕～〔A 7〕のいずれかに記載の方法。

〔A 9〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリが、互いに異なる無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、〔A 1〕～〔A 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 10〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリが、互いに異なる遺伝暗号表に基づいて翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、〔A 1〕～〔A 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、少なくとも一つのコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11. 1〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、2以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11. 2〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、3以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11. 3〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、4以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11. 4〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、5以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11. 5〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、10以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 10〕

のいずれかに記載の方法。

〔A 1 1. 6〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、15以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 1 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 1. 7〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、1以上48以下のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 1 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 1. 8〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、1以上30以下のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 1 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 1. 9〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、2以上30以下のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる、〔A 1〕～〔A 1 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2〕 前記工程（2）において、2以上の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 1〕 前記工程（2）において、3以上の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 2〕 前記工程（2）において、4以上の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 3〕 前記工程（2）において、2以上400以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 4〕 前記工程（2）において、2以上200以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 5〕 前記工程（2）において、2以上100以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 6〕 前記工程（２）において、２以上５０以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 7〕 前記工程（２）において、２以上１５以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 8〕 前記工程（２）において、２以上１０以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 0 9〕 前記工程（２）において、３以上５０以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 2. 1 0〕 前記工程（２）において、４以上５０以下の核酸ディスプレイライブラリを混合する、〔A 1〕～〔A 1 1. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 3〕 前記バーコード化されたペプチドー核酸複合体が、ライブラリの由来を識別可能なようにバーコード化されている、〔A 1〕～〔A 1 2. 1〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 4〕 前記「ライブラリの由来」は、複数の核酸ディスプレイライブラリのいずれかである、〔A 1 3〕に記載の方法。

〔A 1 5〕 前記バーコード配列は、当該バーコード配列を含むバーコード化されたペプチドー核酸複合体が、前記核酸ディスプレイライブラリのいずれに由来するかを識別可能なように、核酸ディスプレイライブラリごとにそれぞれ異なっている、〔A 1 3〕または〔A 1 4〕に記載の方法。

〔A 1 6〕 前記ペプチドー核酸複合体は、核酸部分及びペプチド部分を含み、前記核酸部分が、前記ペプチド部分をコードする核酸配列を含む、〔A 1〕～〔A 1 5〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 7〕 前記ペプチド部分をコードする核酸の核酸配列が、ランダム配

列を含む、〔A 1〕～〔A 1 6〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 8〕 前記ランダム配列中に少なくとも1つの非天然アミノ酸を指定するコドンを含む、〔A 1 7〕に記載の方法。

〔A 1 9〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを少なくとも2個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 1 9. 1〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～1 0 0 0個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 2〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～5 0 0個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 3〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～1 0 0個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 4〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～2 0個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 5〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを3～1 8個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 6〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを4～1 8個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 7〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを4～1 5個含む、〔A 1 7〕または〔A 1 8〕に記載の方法。

〔A 1 9. 8〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択さ

れる1又は複数種類のトリプレットを5～15個含む、〔A17〕または〔A18〕に記載の方法。

〔A19.9〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを5～12個含む、〔A17〕または〔A18〕に記載の方法。

〔A20〕 前記複数種類のトリプレットが、64種類以下のトリプレットである、〔A19〕～〔A19.9〕のいずれかに記載の方法。

〔A21〕 前記1又は複数種類のトリプレットが、前記複数種類のトリプレットからランダムに選択される、〔A19〕～〔A19.9〕のいずれかに記載の方法。

〔A22〕 前記ペプチドー核酸複合体が、環状ペプチドー核酸複合体である、〔A1〕～〔A21〕のいずれかに記載の方法。

〔A23〕 前記ペプチドー核酸複合体が、ペプチドーDNA複合体およびペプチドーmRNA複合体からなる群より選択される、〔A1〕～〔A22〕のいずれかに記載の方法。

〔A24〕 前記ペプチドー核酸複合体が、ペプチドーmRNA複合体である、〔A1〕～〔A23〕のいずれかに記載の方法。

〔A25〕 前記ペプチドー核酸複合体が、環状ペプチドーmRNA複合体である、〔A1〕～〔A24〕のいずれかに記載の方法。

〔A26〕 前記ペプチドー核酸複合体の核酸部分を逆転写して、前記バーコード化されたペプチドー核酸複合体を得ることをさらに含む、〔A1〕～〔A25〕のいずれかに記載の方法。

〔A27〕 バーコード配列を含む第一のプライマーを用いて逆転写して、前記バーコード化されたペプチドー核酸複合体を得ることを含む、〔A1〕～〔A26〕のいずれかに記載の方法。

〔A28〕 バーコード配列を含む第一のプライマーを用いて、前記ペプチドー核酸複合体の核酸部分を逆転写して、前記バーコード化されたペプチドー核酸複合体を得ることを含む、〔A1〕～〔A27〕のいずれかに記載の

方法。

〔A 2 9〕 前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体が、バーコード化された環状ペプチド-核酸複合体である、〔A 1〕～〔A 2 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 0〕 前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分が、バーコード配列および前記ペプチドをコードする核酸配列を含む、〔A 1〕～〔A 2 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 1〕 前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分が、DNA/mRNAデュプレックス及びDNA/DNAデュプレックスからなる群より選択される、〔A 1〕～〔A 3 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 2〕 前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分が、DNA/mRNAデュプレックスである、〔A 1〕～〔A 3 1〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 3〕 前記DNA/mRNAデュプレックスがcDNA/mRNAデュプレックスである、〔A 3 2〕に記載の方法。

〔A 3 4〕 前記第一のプライマーが、識別用バーコード配列を含む、〔A 6〕または〔A 2 7〕に記載の方法。

〔A 3 4. 1〕 前記第一のプライマーが、共通バーコード配列を含む、〔A 6〕または〔A 2 7〕に記載の方法。

〔A 3 4. 2〕 前記第一のプライマーが、識別用バーコード配列および共通バーコード配列を含む、〔A 6〕または〔A 2 7〕に記載の方法。

〔A 3 4. 3〕 前記第一のプライマーは、塩基数が15～30である識別用バーコード配列を含む、〔A 6〕、〔A 2 7〕、〔A 3 4〕、または〔A 3 4. 2〕に記載の方法。

〔A 3 4. 4〕 前記第一のプライマーは、塩基数が15～30である共通バーコード配列を含む、〔A 6〕、〔A 2 7〕、〔A 3 4. 1〕、または〔A 3 4. 2〕に記載の方法。

〔A 3 4. 5〕 前記第一のプライマーは、塩基数が25～150であるバ

ーコード配列を含む、〔A 6〕または〔A 2 7〕に記載の方法。

〔A 3 5〕 前記無細胞翻訳系が、再構成無細胞翻訳系である、〔A 1〕～〔A 3 4. 5〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 6〕 前記無細胞翻訳系が、複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、互いに異なるアミノ酸の組み合わせを含む、〔A 1〕～〔A 3 5〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 7〕 核酸ライブラリに含まれる核酸の核酸配列が、ランダム配列を含む、〔A 1〕～〔A 3 6〕のいずれかに記載の方法。

〔A 3 8〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを少なくとも2個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 1〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～1 0 0 0個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 2〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～5 0 0個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 3〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～1 0 0個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 4〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを2～2 0個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 5〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを3～1 8個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 6〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを4～1 8個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

方法。

〔A 3 8. 7〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを4～15個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 8〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを5～15個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 8. 9〕 前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを5～12個含む、〔A 3 7〕に記載の方法。

〔A 3 9〕 前記複数種類のトリプレットが、64種類以下のトリプレットである、〔A 3 8〕～〔A 3 8. 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 0〕 前記1又は複数種類のトリプレットが、前記複数種類のトリプレットからランダムに選択される、〔A 3 8〕～〔A 3 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 1〕 核酸ライブラリが、mRNAライブラリである、〔A 1〕～〔A 4 0〕のいずれかに記載の方法。

〔4 1-1〕 前記核酸ライブラリが、繰り返し数が異なる核酸を含む、〔A 1〕～〔A 4 0〕のいずれかに記載の方法。

〔4 1-2〕 前記核酸ライブラリが、繰り返し数が同じ核酸を含む、〔A 1〕～〔A 4 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 2〕 前記ペプチド-核酸複合体のペプチド部分が、所定のアミノ酸を含み、かつ核酸部分が該アミノ酸をコードするトリプレットを含む、〔A 1〕～〔A 4 1〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 3〕 工程（3）と工程（4）の間に、前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から、前記核酸部分を溶出する工程（3A）を含む、〔A 1〕～〔A 4 2〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 4〕 工程（3A）における溶出が、酵素処理、加熱、化学的な刺激

または光の照射により行われる、〔A 4 3〕に記載の方法。

〔A 4 5〕 前記酵素がT E Vプロテアーゼである、〔A 4 4〕に記載の方法。

〔A 4 6〕 照射する前記光が、3 0 0 n m以上5 0 0 n m以下の波長の光である、〔A 4 4〕に記載の方法。

〔A 4 7〕 化学的な刺激が、酸または塩基である、〔A 4 4〕に記載の方法。

〔A 4 8〕 工程（3）と工程（4）の間に、前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程（3 B）をさらに含む、〔A 1〕～〔A 4 7〕のいずれかに記載の方法。

〔A 4 9〕 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分の核酸配列に基づいて、前記アミノ酸配列を同定する、〔A 4 8〕に記載の方法。

〔A 5 0〕 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分の核酸配列およびバーコード配列に基づいて、前記アミノ酸配列を同定する、〔A 4 8〕または〔A 4 9〕に記載の方法。

〔A 5 1〕 工程（4）において、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のうち、同じバーコード配列を有するバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を選択的に増幅する、〔A 1〕～〔A 5 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5 2〕 前記バーコードプライマーが、バーコード配列を含む第二のプライマーである、〔A 1〕～〔A 5 1〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5 3〕 前記バーコードプライマーが、前記バーコード配列からなる第二のプライマーである、〔A 1〕～〔A 5 2〕に記載の方法。

〔A 5 4〕 前記バーコード配列の塩基数が、1 5～3 0である、〔A 5 3〕に記載の方法。

〔A 5 5〕 工程（4）において、前記バーコードプライマーのバーコード

配列と同じバーコード配列を有するバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸を選択的に増幅する、〔A 1〕～〔A 5 4〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5 6〕 工程（4）において、PCR法により核酸を増幅する、〔A 1〕～〔A 5 5〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5 7〕 増幅された前記核酸が、バーコード化されたペプチド-核酸複合体に含まれるDNAと同一の塩基を有する、〔A 1〕～〔A 5 6〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5 8〕 工程（1）～工程（4）を1サイクルとして、複数サイクルを繰り返す、〔A 1〕～〔A 5 7〕のいずれかに記載の方法。

〔A 5 9〕 工程（4）の後または次のサイクルを始める前に、（5）バーコード配列を含まないプライマーを用いて、工程（4）で増幅した前記核酸をさらに増幅させる工程をさらに含む、〔A 1〕～〔A 5 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 0〕 工程（4）の後または次のサイクルを始める前に、（5）バーコード配列を含まないプライマーを用いて、工程（4）で増幅した前記核酸をさらに増幅させる工程であって、バーコード配列を含まない核酸が増幅される工程を含む、〔A 1〕～〔A 5 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 1〕 バーコード配列を含まないプライマーが、核酸ライブラリの3'領域にアニールするプライマーである、〔A 1〕～〔A 6 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 2〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^4 以上の多様性を有するライブラリである、〔A 1〕～〔A 6 1〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 3〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^{10} 以上の多様性を有するライブラリである、〔A 1〕～〔A 6 0〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 4〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^4 種類以上のペプチド-核酸複合体を含むライブラリである、〔A 1〕～〔A 6 3〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 5〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^{10} 種類以上のペプチドー核酸複合体を含むライブラリである、〔A 1〕～〔A 6 4〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 6〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、mRNAディスプレイライブラリである、〔A 1〕～〔A 6 5〕のいずれかに記載の方法。

〔A 6 7〕 前記標的分子がタンパク質である、〔A 1〕～〔A 6 6〕のいずれかに記載の方法。

[0010] 〔B 1〕 次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法：

(1) 無細胞翻訳系を用いて複数の核酸ライブラリをそれぞれ別々に翻訳し、ペプチド部分と核酸部分を含むペプチドー核酸複合体を調製する工程、

(1-1) 前記ペプチドー核酸複合体をバーコード化して、バーコード化されたペプチドー核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチドー核酸複体の核酸部分に含まれる核酸を増幅する工程。

〔B 2〕 前記バーコード化されたペプチドー核酸複合体は、該核酸部分にバーコード化された核酸配列（バーコード配列）を含む、〔B 1〕に記載の方法。

〔B 3〕 〔A 2〕～〔A 6 7〕のいずれかに記載の特徴を備える、〔B 1〕または〔B 2〕に記載の方法。

[0011] 「〔A 2〕～〔A 6 7〕のいずれかに記載の特徴」とは、上記〔A 2〕～〔A 6 7〕のそれぞれに記載した発明特定事項を意味し、〔B 1〕および〔B 2〕の記載と共通して使用される用語については互換的に適用して理解される。

[0012] [C 1] 次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法：

(1) 単一の無細胞翻訳系を用いて複数の核酸ライブラリをそれぞれ別々に翻訳し、ペプチド-核酸複合体を調製する工程、

(1-1) 前記ペプチド-核酸複合体をバーコード化して、バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる核酸を増幅する工程。

[C 2] 核酸ライブラリに含まれる核酸の核酸配列がランダム配列を含み、前記ランダム配列が、複数種類のトリプレットから選択される1又は複数種類のトリプレットを少なくとも2個含む、[C 1]に記載の方法。

[C 3] 前記核酸ライブラリが、他の核酸ライブラリと互いに異なる繰返し数を有する、[C 1]または[C 2]に記載の方法。

[C 4] 前記ペプチド-核酸複合体のペプチド部分が、所定のアミノ酸を含み、かつ核酸部分が該アミノ酸をコードするトリプレットを含む、[C 1]～[C 3]のいずれかに記載の方法。

[C 5] 複数の核酸ディスプレイライブラリは、互いに同じ遺伝暗号表に基づいて翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、[C 1]～[C 4]のいずれかに記載の方法。

[C 6] [A 1]～[A 67]のいずれかに記載の特徴を備える、[C 1]～[C 5]のいずれかに記載の方法。

[0013] [D 1] 核酸ディスプレイライブラリの製造方法であって、以下(a)及び(b)の工程を含む、方法：

(a) 記述子を用いた主成分分析の解析結果を指標としてペプチド-核酸複

合体を含む核酸ディスプレイライブラリを設計する工程；

（b）無細胞翻訳系を用いて核酸ライブラリを翻訳し、ペプチド-核酸複合体を調製する工程；

〔D2〕 工程（b）の後に、前記ペプチド-核酸複合体をバーコード化し、バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む前記核酸ディスプレイライブラリを調製する工程（c）をさらに含む、〔D1〕に記載の方法。

〔D3〕 核酸ディスプレイライブラリをそれぞれ別々に調製し、複数の核酸ディスプレイライブラリを用意する工程（d）をさらに含む、〔D1〕又は〔D2〕に記載の方法。

〔D4〕 前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、前記複数の核酸ディスプレイライブラリ間で前記ペプチド-核酸複合体の構造上の重なりが少ないライブラリである、〔D1〕～〔D3〕のいずれかに記載の方法。

〔D5〕 前記記述子が、'NumValenceElectrons'、'PEOE_VSA3'、'fr_Al_0H'、'fr_Al_OH_noTert'、'fr_Ar_N'、'fr_C_0_noC00'、'fr_C_S'、'fr_HOCCN'、'fr_NH1'、'fr_Ndealkylation2'、'fr_Nhpyrrole'、'fr_SH'、'fr_alkyl_halide'、'fr_allylic_oxid'、'fr_aryl_methyl'、'fr_azide'、'fr_azo'、'fr_bicyclic'、'fr_diazo'、'fr_dihydropyridine'、'fr_epoxide'、'fr_ether'、'fr_furan'、'fr_halogen'、'fr_hdrzine'、'fr_hdrzone'、'fr_imidazole'、'fr_imide'、'fr_isocyan'、'fr_isothiocyan'、'fr_ketone'、'fr_ketone_Topliss'、'fr_lactam'、'fr_lactone'、'fr_methoxy'、'fr_morpholine'、'fr_nitrile'、'fr_nitro'、'fr_nitro_aryl'、'fr_nitro_aryl_nonortho'、'fr_nitroso'、'fr_oxazole'、'fr_phenol'、'fr_phenol_noOrthoHbond'、'fr_phos_acid'、'fr_phos_ester'、'fr_piperidine'、'fr_piperzine'、'fr_priamide'、'fr_prisulfonamide'、'fr_pyridine'、'fr_quatN'、'fr_sulfide'、'fr_sulfonamide'、'fr_sulfone'、'fr_term_acetylene'、'fr_tetrazole'、'fr_thiazole'、'fr_thiocyan'、および'fr_thiophene'を含む記述子である、〔D1〕～〔D4〕のいずれかに記載の方法。

〔D 6〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^4 以上の多様性を有するライブラリである、〔D 1〕～〔D 5〕のいずれかに記載の方法。

〔D 7〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^4 種類以上のペプチド-核酸複合体を含むライブラリである、〔D 1〕～〔D 5〕のいずれかに記載の方法。

〔D 8〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、mRNAディスプレイライブラリである、〔D 1〕～〔D 7〕のいずれかに記載の方法。

〔D 9〕 〔D 1〕～〔D 8〕のいずれかに記載の方法によって得られる核酸ディスプレイライブラリ。

〔D 10〕 前記核酸ディスプレイライブラリが、〔D 9〕に記載のライブラリである、〔A 1〕～〔A 67〕のいずれかに記載の方法。

- [0014] 「〔A 1〕～〔A 67〕のいずれかに記載の特徴」とは、上記〔A 1〕～〔A 67〕のそれぞれに記載した発明特定事項を意味し、〔C 1〕～〔C 4〕の記載と共通して使用される用語については互換的に適用して理解される。また、上記番号付けにおいて、従属項が引用する番号は、特に言及がない限りその番号の枝番を含む。例えば、従属項において引用する〔A 1〕は、〔A 1〕とともに、その枝番である〔A 1. 1〕等も含むことを示す。他の番号付けにおいても同様である。

発明の効果

- [0015] 本発明に係るスクリーニング方法により、複数のライブラリを同時にスクリーニングすることが可能となり、より効率的に標的分子に結合するペプチドを見出すことができる。また、本発明に係るスクリーニング方法であれば、複数のライブラリを混合して構成された混合核酸ディスプレイライブラリを使用することにより、ライブラリ規模を拡大することができるだけでなく、各ペプチドに結合したバーコード配列に基づいて各ペプチドがどのライブラリに由来するかを容易に識別できる。そして、各バーコード配列に対応するプライマーを利用してペプチドをコードする核酸部分を選択的に増幅することによって、標的分子に結合し得るペプチドをライブラリごとに濃縮する

ことができるため、低濃縮率のペプチドを見落としにくく、標的分子に結合し得るペプチドを効率的に見出すことができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]各コドン表のランダム配列 (Random 1 : PURE 1、Random 2 : PURE 2、Random 3 : PURE 3、Random 4 : PURE 4) の各主成分の値をプロットしたものである。

[図2]各コドン表の濃縮配列の各主成分の値をプロットしたものである。

[図3]濃縮配列 (黒色で示す) と全てのランダム配列 (灰色で示す。で示す。各形状は、以下の無細胞翻訳系に対応する。○ : PURE 1、△ : PURE 2、□ : PURE 3、× : PURE 4) の各主成分の値をプロットしたものである。

発明を実施するための形態

[0017] 以下に、本発明の一実施形態について、詳述する。

[0018] 本明細書において、ペプチドを構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」を、それぞれ、「アミノ酸残基」、「アミノ酸類縁体残基」ということがある。

[0019] 本明細書において、「アミノ酸」とは、 α -、 β -および γ -アミノ酸であり、天然アミノ酸 (本願では天然アミノ酸とはタンパク質に含まれる20種類のアミノ酸を指す。具体的にはGly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、His、Glu、Asp、Gln、Asn、Cys、Met、Lys、Arg、およびProを指す。) に限定されず、非天然アミノ酸であってもよい。 α -アミノ酸の場合、L型アミノ酸でもD型アミノ酸でもよく、 α , α -ジアルキルアミノ酸でもよい。アミノ酸側鎖は特に制限されないが、水素原子の他にも例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基などから自由に選択される。側鎖のそれぞれには置換基が付与されていてもよく、それら置換基も例えば、N原子、O原子、S原子、B原子、Si原子、P原子を含む任意の官能基の中から自由に選択

される（すなわち、置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基など）。

[0020] 置換基として、例えば、ハロゲン由来の置換基として、フルオロ（ $-F$ ）、クロロ（ $-Cl$ ）、ブロモ（ $-Br$ ）、ヨウド（ $-I$ ）などが挙げられる。これらで1つ以上置換された、ハロゲンを置換基に有していてもよいアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などが挙げられる。

[0021] O原子由来の置換基としてエーテルを形成させるための置換基として、アルコキシ基（ $-OR$ ）が挙げられ、アルコキシ基はアルキルアルコキシ基、シクロアルキルアルコキシ基、アルケニルアルコキシ基、アルキニルアルコキシ基、アリールアルコキシ基、ヘテロアリールアルコキシ基、アラルキルアルコキシ基、などの中から選択される。アルコール部位を形成させる置換基として、ヒドロキシ基（ $-OH$ ）が挙げられ、カルボニル基を形成させる置換基として、カルボニル基（ $-C(=O)-R$ ）が挙げられ、カルボニル基は、ヒドロカルボニル基（ $-C(=O)-H$ ，化合物としてはアルデヒドが得られる）、アルキルカルボニル基（化合物としてはケトンが得られる）、シクロアルキルカルボニル基、アルケニルカルボニル基、アルキニルカルボニル基、アリールカルボニル基、ヘテロアリールカルボニル基、アラルキルカルボニル基などの中から選択される。カルボン酸を形成させる置換基（ $-CO_2H$ ）としてカルボキシ基が挙げられ、エステル基を形成させる置換基として、オキシカルボニル基（ $-O-C(=O)-R$ ）およびカルボニルアルコキシ基（ $-C(=O)-OR$ ）が挙げられ、カルボニルアルコキシ基は、アルキルオキシカルボニル基、シクロアルキルオキシカルボニル基、アルケニルオキシカルボニル基、アルキニルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、ヘテロアリールオキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基などの中から選択され、オキシカルボニル基は、アルキルカルボニルオキシ基、シクロアルキルカルボニルオキシ基、アルケニルカルボニル

オキシ基、アルキニルカルボニルオキシ基、アリールカルボニルオキシ基、ヘテロアリールカルボニルオキシ基、アラルキルカルボニルオキシ基などの中から選択される。

[0022] チオエステルを形成させる置換基としてメルカプトカルボニル基 ($-S-C(=O)-R$) およびカルボニルアルキルメルカプト基 ($-C(=O)-SR$) などが挙げられ、メルカプトアルキルカルボニル基、メルカプトシクロアルキルカルボニル基、メルカプトアルケニルカルボニル基、メルカプトアルキニルカルボニル基、メルカプトアリールカルボニル基、メルカプトヘテロアリールカルボニル基、メルカプトアラルキルカルボニル基などの中から選択され、あるいは、カルボニルアルキルメルカプト基、カルボニルシクロアルキルメルカプト基、カルボニルアルケニルメルカプト基、カルボニルアルキニルメルカプト基、カルボニルアリールメルカプト基、カルボニルヘテロアリールメルカプト基、カルボニルアラルキルメルカプト基が挙げられる。

[0023] アミド基を形成する置換基としては、アミノアルキルカルボニル基 ($-NH-C(=O)-R$)、アミノシクロアルキルカルボニル基、アミノアルケニルカルボニル基、アミノアルキニルカルボニル基、アミノシクロアルキルカルボニル基、アミノアリールカルボニル基、アミノヘテロアリールカルボニル基、アミノアラルキルカルボニル基などが挙げられ、もしくはカルボニルアルキルアミノ基 ($-C(=O)-NHR$)、カルボニルシクロアルキルアミノ基、カルボニルアルケニルアミノ基、カルボニルアルキニルアミノ基、カルボニルアリールアミノ基、カルボニルヘテロアリールアミノ基、カルボニルアラルキルアミノ基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0024] カルバメート基を形成する置換基としては、アミノアルキルカルバメート基 ($-NH-C(=O)-OR$)、アミノシクロアルキルカルバメート基、

アミノアルケニルカルバメート基、アミノアルキニルカルバメート基、アミノシクロアルキルカルバメート基、アミノアリールカルバメート基、アミノヘテロアリールカルバメート基、アミノアラルキルカルバメート基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0025] スルホンアミド基を形成する置換基としては、アミノアルキルスルホニル基 ($-NH-SO_2-R$)、アミノシクロアルキルスルホニル基、アミノアルケニルスルホニル基、アミノアルキニルスルホニル基、アミノシクロアルキルスルホニル基、アミノアリールスルホニル基、アミノヘテロアリールスルホニル基、アミノアラルキルスルホニル基などが挙げられ、もしくはスルホニルアルキルアミノ基 ($-SO_2-NHR$)、スルホニルシクロアルキルアミノ基、スルホニルアルケニルアミノ基、スルホニルアルキニルアミノ基、スルホニルアリールアミノ基、スルホニルヘテロアリールアミノ基、スルホニルアラルキルアミノ基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0026] スルファミド基を形成する置換基としては、アミノアルキルスルファモイル基 ($-NH-SO_2-NHR$)、アミノシクロアルキルスルファモイル基、アミノアルケニルスルファモイル基、アミノアルキニルスルファモイル基、アミノシクロアルキルスルファモイル基、アミノアリールスルファモイル基、アミノヘテロアリールスルファモイル基、アミノアラルキルスルファモイル基などが挙げられる。さらに、N原子と結合したH原子がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から同一あるいは別物の任意の2つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基に置き換わった化合物も挙げられる。

[0027] チオカルボン酸を形成させる置換基としては、チオカルボン酸基 ($-C$ (

$=O) - SH$) が挙げられ、ケト酸を形成させる官能基としてケト酸基 ($-C(=O) - CO_2H$) が挙げられる。

[0028] さらに、S原子由来の置換基としてチオール基を形成する置換基としては、チオール基 ($-SH$) が挙げられ、アルキルチオール、シクロアルキルチオール、アルケニルチオール、アルキニルチオール、アリールチオール、ヘテロアリールチオール、アラルキルチオールが形成される。チオエーテル ($-S-R$) を形成する置換基としては、アルキルメルカプト基、シクロアルキルメルカプト基、アルケニルメルカプト基、アルキニルメルカプト基、アリールメルカプト基、ヘテロアリールメルカプト基、アラルキルメルカプト基などの中から選択され、スルホキシド基 ($-S(=O) - R$) を形成させる置換基としては、アルキルスルホキシド基、シクロアルキルスルホキシド基、アルケニルスルホキシド基、アルキニルスルホキシド基、アリールスルホキシド基、ヘテロアリールスルホキシド基、アラルキルスルホキシド基などの中から選択され、スルホン基 ($-SO_2 - R$) を形成させる置換基としては、アルキルスルホン基、シクロアルキルスルホン基、アルケニルスルホン基、アルキニルスルホン基、アリールスルホン基、ヘテロアリールスルホン基、アラルキルスルホン基などの中から選択され、スルホン酸を形成させる置換基としてスルホン酸基 ($-SO_3H$) が挙げられる。

[0029] N原子由来の置換基として、例えばアジド基 ($-N_3$) が挙げられ、ニトリル基 ($-CN$) が挙げられ、1級アミンを形成させる置換基としてアミノ基 ($-NH_2$) が挙げられ、2級アミン ($-NH-R$) を形成させる置換基として、アルキルアミノ基、シクロアルキルアミノ基、アルケニルアミノ基、アルキニルアミノ基、アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、アラルキルアミノ基などが挙げられ、3級アミン ($-NR(R')$) を形成させる置換基として、アルキル (アラルキル) アミノ基など、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などの中から、任意の2つあるいは同一の置換基を2つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられ、ア

ミジノ基 ($-\text{C}(=\text{NR})-\text{NR}'\text{R}''$) を形成させる置換基として、アミジノ基 ($-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$)、あるいはN原子上の置換基3点が、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の同一あるいは別々の任意の3つで置換された、例えばアルキル（アラルキル）（アリール）アミジノ基などが挙げられ、グアニジノ基 ($-\text{NR}-\text{C}(=\text{NR}')-\text{NR}''$) を形成させる置換基として、グアニジン基 ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$) あるいは、R、R'、R''、R''' がアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から同一あるいは別物の任意の4つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられる。

[0030] ウレア基を形成する置換基としては、アミノカルバモイル基 ($-\text{NR}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}'\text{R}''$) が挙げられる。R、R'、R'' はそれぞれ水素原子、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基の中から同一あるいは別物の任意の3つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられる。

[0031] またB原子由来の官能基として、アルキルボラン ($-\text{BR}(\text{R}')$) やアルコキシボラン ($-\text{B}(\text{OR})(\text{OR}')$) などが挙げられる。これらの2つの置換基はアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基などの中から、任意の2つあるいは同一の置換基を2つ、あるいはこれらが環を形成しても良い置換基から選択された置換基などが挙げられる。

[0032] このように、ハロゲン基等通常低分子化合物にて利用されるO原子、N原子、S原子、B原子、P原子、Si原子、ハロゲン原子が含まれる様々官能基が1つあるいは2つ以上付与されていてもよい。つまり、これら置換基の1つに示されるアルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基にさらに別の置換基が1つ以上付与されていてもよい。これら全てを満たす官能基の条件を、自由に置換基を選択することと定義する。 β や γ -アミノ酸の場合にも任意の立体

配置が、 α -アミノ酸の場合と同様に許容され、その側鎖の選択も特に制限なく α -アミノ酸の場合と同様である。

[0033] アミノ酸の主鎖アミノ基部位は無置換 (NH_2 基) でもよく、置換されていてもよい (即ち、 NHR 基: R は任意に置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基を示し、またプロリンのように N 原子に結合した炭素原子とカルボニル α 位から伸びた側鎖上の炭素原子が結合して環を形成していてもよい。置換基としては、自由に選択することが可能であり、たとえばハロゲン基、エーテル基、ヒドロキシ基などが挙げられる)。このような主鎖アミノ基が置換されているアミノ酸を、本明細書において「 N 置換アミノ酸」と称する。本明細書における「 N 置換アミノ酸」としては、 N -アルキルアミノ酸が好ましく、 $\text{N}-\text{C}_1-\text{C}_6$ アルキルアミノ酸、 $\text{N}-\text{C}_1-\text{C}_4$ アルキルアミノ酸であってもよい。より好ましい N 置換アミノ酸は、 N -メチルアミノ酸または N -エチルアミノ酸であってよく、特に好ましくは N -メチルアミノ酸であってよい。

[0034] 本明細書において、「アミノ酸類縁体」とは、 α -ヒドロキシカルボン酸を意味する。 α -ヒドロキシカルボン酸は、ヒドロキシ基の α 位に側鎖として、アミノ酸と同様、様々な置換基を有していてもよい。 α -ヒドロキシカルボン酸が上記側鎖を有する場合、側鎖が結合する炭素原子は不斉中心となり得る。 α -ヒドロキシカルボン酸の立体構造はアミノ酸の L 型でも D 型に対応するものでもよく、側鎖の選択には特に制限を設けないが、例えば自由に置換されていてもよいアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、アラルキル基、シクロアルキル基などの中から自由に選択される。置換基の数は 1 つに限定されず、2 つ以上有していてもよい。例えば、 S 原子を有し、さらにアミノ基やハロゲン基などの官能基を有していてもよい。

[0035] ペプチドを構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」には、それぞれの原子に対応する同位体の全ての組み合わせを含む。「アミノ酸」、「アミノ

酸類縁体」の同位体は、少なくとも1つの原子が、原子番号（陽子数）が同じで、質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる原子で置換されたものである。ペプチドを構成する「アミノ酸」、「アミノ酸類縁体」に含まれる原子の例としては、水素原子、炭素原子、窒素原子、酸素原子、リン原子、硫黄原子、フッ素原子、塩素原子などがあり、それぞれの同位体には、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 等が含まれる。

[0036] 本明細書における「ペプチド」は、2以上の天然アミノ酸及び／又は非天然アミノ酸がアミド結合によって連結したものであればよく、デプシペプチドのように主鎖の一部にエステル結合を有していてもよい。ペプチドとして、好ましくは5～30残基、より好ましくは7～20残基のアミノ酸を含むペプチドである。ペプチドは、直鎖ペプチド、環状ペプチド、またはこれらが結合した構造のペプチドでもよい。

[0037] 本明細書において、「核酸」とは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、人工塩基を有するヌクレオチド誘導体、及びペプチド核酸（PNA）を包含し、目的とする遺伝情報が保持される限り、これらの任意の混成であってもよい。すなわち、本発明における核酸には、DNA-RNAのハイブリッドヌクレオチドやDNAとRNAのような異なる核酸が1本鎖に連結されたキメラ核酸も含まれる。

[0038] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

（1）バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

（2）前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイ

レイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程。

[0039] 工程 (1)

工程 (1) は、バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程である。

[0040] 本明細書において、「核酸ディスプレイライブラリ」は、ペプチドと、そのペプチドをコードするRNAもしくはDNAが対応付けられているライブラリを意味する。所望の標的にライブラリを接触させ、標的に結合しない分子を洗い流すことで結合するペプチドの濃縮が可能である（パニング法）。このような過程を経て選択されたペプチドに対応付けられている遺伝子情報を解析することで標的に結合したタンパク質の配列を明らかにすることが出来る。例えば、アミノアシル tRNA のアナログである抗生物質ピューロマイシンがリボソームによる mRNA 翻訳伸長中の蛋白質に非特異的に連結されることを利用する方法が mRNA display (Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:12297-302. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Roberts RW, Szostak JW.) ないしは in vitro virus (FEBS Lett. 1997;414:405-8. In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H.) として報告されている。

[0041] ペプチド-核酸複合体は、核酸部分とペプチド部分を含み、核酸部分は、当該ペプチド部分に含まれるペプチドをコードする核酸の核酸配列を含む。ペプチド-核酸複合体のペプチド部分が所定のアミノ酸を含み、かつ核酸部分が該アミノ酸をコードするトリプレットを含む。

[0042] 本明細書において、「トリプレット」とは、核酸配列中における3つの連続する核酸塩基の順列のことを意味し、通常、5'末端側から順に表記する

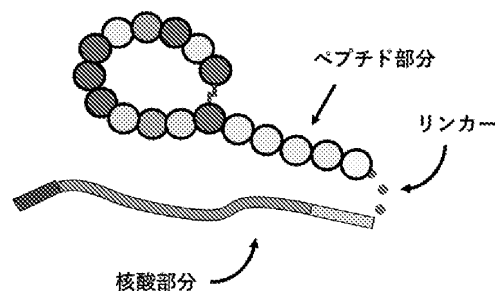
。核酸がDNAである場合、トリプレットとしては、例えば、TTT、TTG、CTT、CTG、ATT、ATG、GTT、GTG、TCT、TCG、CCG、ACT、GCT、TAC、CAT、CAG、AAC、GAT、GAG、TGC、TGG、CGT、CGG、AGT、AGG、及びGGTが挙げられる。これらは、コドンに対応する。無細胞翻訳系を用いて翻訳すると、同一のトリプレットは同一のアミノ酸に翻訳されるため、同一のトリプレットを複数含むmRNAから翻訳されたペプチドは、同一のアミノ酸を複数含むこととなる。

[0043] ペプチド部分に含まれるペプチドをコードする核酸の核酸配列は、ランダム配列を含む。ここでランダム配列とは、核酸配列ごとに異なる配列（共通していない配列）であり、任意に選択されたアミノ酸及び／又はアミノ酸類縁体からなる配列である。ランダム配列中には、少なくとも1つの非天然アミノ酸を指定するトリプレット（コドン）を含んでいてもよい。ランダム配列は、複数種類のトリプレットから選択されるトリプレットを少なくとも1個、2～1000個、2～750個、2～500個、2～250個、2～100個、2～50個、2～20個、2～18個、2～15個、2～12個、少なくとも3個、3～1000個、3～750個、3～500個、3～250個、3～100個、3～50個、3～18個、3～15個、3～12個、少なくとも4個、4～1000個、4～750個、4～500個、4～250個、4～100個、4～50個、4～18個、4～15個、4～12個、少なくとも5個、5～1000個、5～750個、5～500個、5～250個、5～100個、5～50個、5～18個、5～15個、又は5～12個含むことが好ましい。本明細書では、上記トリプレットの数を「繰り返し数」と表現する。トリプレットの種類は、64種類以下、60種類以下、55種類以下、50種類以下、45種類以下、40種類以下、35種類以下、30種類以下、25種類以下、20種類以下、15種類以下、10種類以下、又は5種類以下であってよく、64種類以下が好ましく、50種類以下がより好ましく、40種類以下が特に好ましい。各トリプレットは、互いに同

一であっても異なってもよく、ランダムに選択したものであってもよい。ペプチド-核酸複合体のペプチド部分が、所定のアミノ酸を含み、かつ核酸部分が該アミノ酸をコードするトリプレットを含むものであることが好ましい。

[0044] ペプチド-核酸複合体は、ペプチド部位のC末端側で核酸と結合していてもよい。ペプチド-核酸複合体の核酸部分とペプチド部分の間に、リンカーが存在してもよい。リンカーとして、ピュロマイシン、またはその誘導体、もしくはRNA、DNA、ヘキサエチレングリコール (s p c 1 8 : 18-0-Dimethoxytritylhexaethyleneglycol, 1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite) のポリマーなどで形成されるリンカーを含むことが好ましい。具体的には、例えば、核酸部分の3'末端とペプチド部分のC末端とが、ピュロマイシンなどを含むリンカーを介して連結されている。ペプチド-核酸複合体は、ペプチド-DNA複合体又はペプチド-mRNA複合体であることが好ましく、ペプチド-mRNA複合体であることがより好ましく、環状ペプチド-mRNA複合体であることが特に好ましい。ペプチド-核酸複合体の一例を示す模式図を以下に示す。

[化1]



無細胞翻訳系を使用する場合、目的の核酸の下流にスペーサー（ペプチド部分に含まれる直鎖部分であって、核酸と連結している部分）をコードする核酸配列を含むことが好ましい。スペーサーとしては、グリシンやセリンを含む配列が挙げられるがこれに限定しない。

[0045] ペプチド-核酸複合体は、例えば、国際公開2013/100132号に記載の方法により製造することができる。具体的には、ペプチド-核酸複合

体は、以下の工程を含む方法で製造することができる。

A) ジヌクレオチド p d C p A または p C p A を所望のアミノ酸又はアミノ酸類縁体でアシル化し、アミノアシル p d C p A またはアミノアシル p C p A を提供する工程、

B) 3' 末端の C A を欠損した t R N A を提供する工程、

C) 工程 A) のアミノアシル p d C p A またはアミノアシル p C p A と、工程 B) の C A 欠損 t R N A を連結させ、所望のアミノ酸又はアミノ酸類縁体でアシル化された開始 t R N A を提供する工程、

D) 工程 C) の開始 t R N A を含み、メチオニン、メチオニル t R N A 合成酵素 (M e t R S)、メチオニン用翻訳開始 t R N A、フォルミルドナー、及びメチオニル t R N A トランスフェラーゼのうちの少なくとも 1 つを含まない無細胞翻訳系を提供する工程、

E) プロモーターの下流に、翻訳開始 A T G に続いてシステインコドン U G U もしくは U G C を、その下流に工程 C) の t R N A のアンチコドンに対応するコドンを含むペプチド配列をコードした鋳型 D N A を提供する工程、

F) 工程 E) の鋳型 D N A から m R N A を提供する工程、

G) 工程 F) の m R N A の 3' 末端にリンカーを結合させる工程、

H) 工程 D) の無細胞翻訳系に工程 G) のリンカーを結合した m R N A を加え、翻訳することで、環化前ペプチド-m R N A 複合体を提供する工程。

[0046] ペプチドが環状ペプチドである場合には、工程 H) の環化前ペプチド-m R N A 複合体をさらに環化する工程を設けてもよい。工程 H) では、必要に応じて脱硫反応を行うことができる。また、工程 G) の後、m R N A の 3' 領域にアニールするプライマーを用いて c D N A を合成する工程を含むことができる。

[0047] 工程 A ~ C では、所望の t R N A 配列をコードし、上流に T7, T3 もしくは S P6 プロモーターを配置した鋳型 D N A を用意し、T7 RNA polymerase や T3, S P6 RNA polymerase などプロモーターに適応した R N A ポリメラーゼを利用して転写によって R N A を合成することができる。細胞から t R N A を抽出精

製し、tRNAの配列の相補配列のプロープを用いて目的の生成tRNAを抽出することも出来る。この際目的のtRNAの発現ベクターで形質転換した細胞をソースにすることもできる。化学合成によって目的の配列のRNAを合成することもできる。例えば、このようにして得られた3'末端のCCA配列からCAを除いたtRNAと別途調製したアミノアシル化したpdcppAとをRNAリガーゼで結合させることでアミノアシルtRNAを得ることができる(pdcppA法)。全長tRNAを用意し、種々の非天然アミノ酸の活性エステルをtRNAに担持させるリボザイムであるフレキシザイムによるアミノアシル化も可能である。この他にも後述の方法を用いることによってアシル化tRNAを得ることができる。

[0048] 工程E～Hでは、まずT7プロモーターなどのプロモーターの下流に所望の配列を配置したDNAを化学合成し、これを鋳型にプライマー伸長反応にて二本鎖DNAにする。得られた二本鎖DNAを鋳型にT7 RNA polymeraseなどのRNAポリメラーゼを用いてmRNAに転写する。転写で得られたmRNAの3'末端にピューロマイシンなどを含むリンカーを結合させ、PURE systemなど公知の無細胞翻訳系を用いてmRNAをタンパク質に翻訳させると、ピューロマイシンがタンパク質に取り込まれ、mRNAとこれにコードされるタンパク質がピューロマイシンを介して連結される。このようにして、mRNAとそれにコードされる産物(ペプチド)が対応付けられたペプチド-mRNA複合体を構築することができる。

[0049] 転移RNA(tRNA)は、分子量25000から30000で、3'末端のCCA配列を含む鎖長73～93塩基からなるRNAで、3'末端を介してアミノ酸のカルボキシ末端とエステル結合したアミノアシル化tRNAとしてポリペプチド伸長因子(EF-Tu)、GTPと三重複合体を形成し、リボソームに運ばれ、リボソームによるmRNAの核酸配列情報のアミノ酸配列への翻訳において、tRNAの配列中のアンチコドンとmRNAのコドンとの塩基対形成によってコドンの識別に関与するRNAである。細胞内で生合成されるtRNAには共有結合的に修飾された塩基が含まれており、tR

N Aのコンフォメーションやアンチコドンの塩基対形成に影響し、t R N Aのコドン識別を助けていることがある。一般的な試験管内転写にて合成したt R N Aは所謂核酸塩基であるアデニン、ウラシル、グアニン、シトシンから成るが、細胞内から調製したものや化学的に合成したものにはその他のメチル化体、含硫誘導体、脱アミノ誘導体、イソペンテニル基やトレオニンを含むアデノシン誘導体などの修飾塩基を含むものもあり、p d C p A法などを利用した場合にデオキシ塩基を含む場合もある。

[0050] 一般的な遺伝暗号表（「コドンテーブル」ともいう。）によれば、翻訳開始アミノ酸としてメチオニンを翻訳するが、所望のアミノ酸又はアミノ酸類縁体が結合したアシルt R N Aを用いて翻訳することにより、N末端を所望のアミノ酸として翻訳させる方法を使用することができる。非天然アミノ酸のN末端導入ではアミノ酸の許容度が伸長時よりも高く、天然アミノ酸と大きく構造の異なるアミノ酸、アミノ酸類縁体を利用できることが知られている（非特許文献：J Am Chem Soc. 2009 Apr 15;131(14):5040-1. Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides. Goto Y, Suga H.）。例えば、本発明において、メチオニン以外の所望のアミノ酸又はアミノ酸類縁体をN末端に導入する方法としては、以下の方法がある。翻訳開始t R N Aとして、所望のアミノ酸又はアミノ酸類縁体をアシル化したt R N Aを、メチオニン、フォルミルドナーもしくはメチオニルトランスフェラーゼを抜いた翻訳系に添加し、翻訳開始コドン（例えばA T G）に前記アミノ酸又はアミノ酸類縁体をコードさせ翻訳させることによって末端を前記アミノ酸又はアミノ酸類縁体とする環化前のペプチドを構築する。アンチコドンがC A Uでない翻訳開始t R N Aと当該アンチコドンに対応するコドンの様々な組み合わせを翻訳開始t R N A及び開始コドンの組み合わせとして利用するとN末端に多様性をもたせることが可能である。つまり、アンチコドンの異なる複数種類の翻訳開始t R N Aに所望のアミノ酸、アミノ酸類縁体又はN末端カルボン酸類縁体をそれぞれアミノアシル化し、これに対応するコドンを開始コドンとしたm R N A又はm R N Aライブラリを翻訳させる

ことによってN末端残基が一種類に限定されない環化前のペプチド又はペプチドのライブラリを作製することができる。具体的には、例えば、Mayer C, et al. Anticodon sequence mutants of Escherichia coli initiator tRNA: effects of overproduction of aminoacyl-tRNA synthetases, methionyl-tRNA formyltransferase, and initiation factor 2 on activity in initiation. *Biochemistry*. 2003, 42, 4787-99. (C A U以外のアンチコドンを持つ開始 tRNA の変異大腸菌による f - M e t 以外のアミノ酸からの翻訳開始と同コドンを含む蛋白の発現。)に記載の方法を用いて環化前のペプチド又はペプチドライブラリを作製することができる。

- [0051] 大腸菌の翻訳に必要な蛋白因子類(メチオニル tRNA トランスフォルミラーゼ、EF-G、RF1、RF2、RF3、RRF、IF1、IF2、IF3、EF-Tu、EF-Ts、ARS (AlaRS、ArgRS、AsnRS、AspRS、CysRS、GlnRS、GluRS、GlyRS、HisRS、IleRS、LeuRS、LysRS、MetRS、PheRS、ProRS、SerRS、ThrRS、TrpRS、TyrRS、ValRSから必要なものを選ぶ))、リボソーム、アミノ酸、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、無機ピロフォスファターゼ、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、E. coli 由来tRNA、クレアチンリン酸、グルタミン酸カリウム、HEPES-KOH pH7.6、酢酸マグネシウム、スペルミジン、ジチオスレイトール、GTP、ATP、CTP、UTPなどを混合したPURE systemにmRNAを加えることによってペプチドに翻訳することができる。また、T7 RNA polymeraseを加えておけばT7プロモーターを含む鋳型DNAからの転写、翻訳を共役して行なうこともできる。このとき所望のアシル化tRNA群やARSが許容する非天然アミノ酸群(例えばF-Tyr)を系に添加することによって非天然アミノ酸群を含むペプチドを翻訳合成することができる(Kawakami T, et al. Ribosomal synthesis of polypeptides and peptoid-peptide hybrids. *J Am Chem Soc*. 2008, 130, 16861-3., Kawakami T, et al. Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming. *Nat Chem Biol*. 2009, 5, 888-90.)。あるいは、ribosomeやEF-Tuなどの変異体を利用することによって非天然アミノ酸の翻訳導入の効率を高めることもできる(Dedkova LM, et al. Construction of modified ribosome

s for incorporation of D-amino acids into proteins. *Biochemistry*. 2006, 45, 15541-51., Doi Y, et al. Elongation factor Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system. *J Am Chem Soc*. 2007, 129, 14458-62., Park HS, et al. Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphoserine. *Science*. 2011, 333, 1151-4.).

[0052] 無細胞翻訳系とは、材料の細胞から抽出した翻訳に関与する因子に、tRNA、アミノ酸、ATPなどを混合したものである。無細胞翻訳系は、生細胞を含まない。材料の細胞としては、例えば、大腸菌 (*Methods Enzymol*. 1983;101:674-90. Prokaryotic coupled transcription-translation. Chen HZ, Zubay G.)、酵母 (*J. Biol. Chem*. 1979 254: 3965-3969. The preparation and characterization of a cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae* that translates natural messenger ribonucleic acid. E Gasior, F Herrera, I Sadnik, C S McLaughlin, and K Moldave)、小麦胚芽 (*Methods Enzymol*. 1983;96:38-50. Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system. Erickson AH, Blobel G.)、ウサギ網状赤血球 (*Methods Enzymol*. 1983;96:50-74. Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. Jackson RJ, Hunt T.)、HeLa細胞 (*Methods Enzymol*. 1996;275:35-57. Assays for poliovirus polymerase, 3D(Pol), and authentic RNA replication in HeLa S10 extracts. Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB.)、昆虫細胞 (*Comp Biochem Physiol B*. 1989;93:803-6. Cell-free translation in lysates from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) cells. Swerdel MR, Fallon AM.) が挙げられる。T7 RNA polymeraseなどのRNAポリメラーゼを材料の細胞に加えることでDNAからの転写、翻訳を共役させることができる。一方、PURE systemは、大腸菌の翻訳に必要な蛋白因子類、エネルギー再生系酵素、リボソームそれぞれを抽出、精製し、tRNA、アミノ酸、ATP、GTPなどと混合した再構成無細胞翻訳系である。PURE systemは、不純物の含有量が少ないだけでなく、再構成系であるため排除した

い蛋白因子、アミノ酸を含まない系を容易に作製することができる ((i) Nat Biotechnol. 2001;19:751-5. Cell-free translation reconstituted with purified components. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. (ii) Methods Mol Biol. 2010;607:11-21. PURE technology. Shimizu Y, Ueda T.)。再構成無細胞翻訳系の作成にあたり、適宜、公知の方法を使用することができる。

- [0053] リボソーム、tRNA等、無細胞翻訳系に含まれる種々の因子は大腸菌細胞や酵母細胞から当業者に周知の方法によって精製することができる。またtRNAやアミノアシルtRNA合成酵素（本明細書において「ARS」とも表記する。）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。人工tRNAや人工アミノアシルtRNA合成酵素を用いることにより部位特異的に非天然アミノ酸を導入したペプチドを合成することができる。
- [0054] 非天然アミノ酸のペプチドへの翻訳導入には、直交性を有し効率よくリボソームに取り込まれるtRNA ((i) Biochemistry. 2003;42:9598-608. Adaptation of an orthogonal archaeal leucyl-tRNA and synthetase pair for four-base, amber, and opal suppression. Anderson JC, Schultz PG., (ii) Chem Biol. 2003;10:1077-84. Using a solid-phase ribozyme aminoacylation system to reprogram the genetic code. Murakami H, Kourouklis D, Suga H.) のアミノアシル化が必要である。tRNAをアミノアシル化する方法として、例えば以下の方法を用いることができる。
- [0055] 細胞内ではtRNAをアミノ酸でアシル化するアミノアシルtRNA合成酵素がアミノ酸別に用意されている。ある種のアミノアシルtRNA合成酵素がN-Me-Hisなど非天然アミノ酸を許容することを利用する方法、非天然アミノ酸を許容する変異アミノアシルtRNA合成酵素を用意し、これを利用する方法である ((i) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002;99:9715-20. An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in e

ukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system. Kiga D, Sakamoto K, Kodama K, Kigawa T, Matsuda T, Yabuki T, Shirouzu M, Harada Y, Nakayama H, Takio K, Hasegawa Y, Endo Y, Hirao I, Yokoyama S.; (ii) Science 2003;301:964-7. An expanded eukaryotic genetic code. Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, Mukherji M, Zhang Z, Schultz PG. Chin, JW.; (iii) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006;103:4356-61. Enzymatic aminoacylation of tRNA with unnatural amino acids. Hartman MC, Josephson K, Szostak JW.)。試験管内で tRNA をアミノアシル化しその後アミノ酸を化学修飾する方法も用いることができる (J Am Chem Soc. 2008;130:6131-6. Ribosomal synthesis of N-methyl peptides. Subtelny AO, Hartman MC, Szostak JW.)。tRNA の 3' 末端の CCA 配列から CA を除いたものと別途調製したアミノアシル化した p d C p A とを RNA リガーゼで結合させることでアミノアシル tRNA を得ることが出来る (Biochemistry. 1984;23:1468-73. T4 RNA ligase mediated preparation of novel "chemically misacylated" tRNA^{Phe}S. Heckler TG, Chang LH, Zama Y, Nakatani T, Chorghade MS, Hecht SM.)。種々の非天然アミノ酸の活性エステルを tRNA に担持させるリボザイムであるフレキシザイムによるアミノアシル化もある (J Am Chem Soc. 2002;124:6834-5. Aminoacyl-tRNA synthesis by a resin-immobilized ribozyme. Murakami H, Bonzaghi NJ, Suga H.)。tRNA とアミノ酸活性エステルとをカチオン性ミセル中で超音波混合する方法も用いることができる (Chem Commun (Camb). 2005;(34):4321-3. Simple and quick chemical aminoacylation of tRNA in cationic micellar solution under ultrasonic agitation. Hashimoto N, Ninomiya K, Endo T, Sisido M.)。tRNA の 3' 末端付近に相補的な PNA にアミノ酸活性エステルを結合したものを tRNA に加えることによってもアミノアシル化が可能である (J. Am. Chem. Soc. 2004;126:15984-9. In situ chemical aminoacylation with amino acid thioesters linked to a peptide nucleic acid. Ninomiya K, Minohata T, Nishimura M, Sisido M.)。

- [0056] 非天然アミノ酸を導入するコドンとして終止コドンを利用する方法が多く報告されているが、前述のPURE systemを用いることで天然アミノ酸、A R Sを除いた合成系を構築できるため、アミノ酸をコードするコドンについて除外した天然アミノ酸の代わりに非天然アミノ酸を導入することができる (J. Am. Chem. Soc. 2005;127:11727-35. Ribosomal synthesis of unnatural peptides. Josephson K, Hartman MC, Szostak JW.)。さらにコドンの縮重を解くことにより天然アミノ酸を除外することなく非天然アミノ酸を加えることが出来る (Kwon I, et al. Breaking the degeneracy of the genetic code. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 7512-3.)。N-メチルアミノ酸を含むペプチドがPURE systemなどの無細胞翻訳系の活用によりリボソームにて合成できる。
- [0057] 無細胞翻訳系を利用したディスプレイライブラリには、mRNAディスプレイの他に、ペプチド及びピューロマイシンの複合体と当該ペプチドをコードするcDNAが結合しているcDNAディスプレイライブラリ (Nucleic Acids Res. 2009;37(16):e108. cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions. Yamaguchi J, Naimuddin M, Biyani M, Sasaki T, Machida M, Kubo T, Funatsu T, Husimi Y, Nemoto N.)、mRNA翻訳中にribosomeと翻訳産物が比較的安定な複合体であることを利用したリボソームライブラリ (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1994;91:9022-6. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ.)、bacteriophage endonuclease P2AがDNAと共有結合を形成することを利用したcovalent display(Nucleic Acids Res. 2005;33:e10. Covalent antibody display--an in vitro antibody-DNA library selection system. Reiersen H, Loberli I, Loset GA, Hvattum E, Simonsen B, Stacy JE, McGregor D, Fitzgerald K, Welschof M, Brekke OH, Marvik OJ.)、微生物のプラスミドの複製開始蛋白RepAが複製開始点oriに結合することを利用したCIS display(Proc

. Natl. Acad. Sci. U S A. 2004;101:2806-10. CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. Odegrip R, Coomber D, Eldridge B, Hederer R, Kuhlman PA, Ullman C, FitzGerald K, McGregor D.) が知られている。また、DNAライブラリを構成するDNAの1分子毎に転写翻訳系をwater-in-oilエマルジョンやリポソームに封入し、翻訳反応を行うin vitro compartmentalization(Nat. Biotechnol. 1998;16:652-6. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. Tawfik DS, Griffiths AD.) も知られている。ディスプレイライブラリの作成にあたり、適宜、公知の方法を使用することができる。

[0058] 本明細書において、「バーコード配列」(バーコードともいう。)とは、検出および識別することができる核酸配列を意味する。バーコード配列は、例えば、10から100の間のヌクレオチドを有し得、様々な核酸に組み込むことができる。その結果、ライブラリ中で、バーコード配列を組み込んだ核酸は、バーコードによって識別またはグループ化され得る。

[0059] 本明細書において、「バーコード化された」とは、バーコード配列を含むことを意味する。ペプチド-核酸複合体をバーコード化することにより、特定のライブラリとバーコード配列の対応関係を利用して、バーコード配列を特定することにより、スクリーニングでヒットしたペプチドが含まれるライブラリを特定することができる。そして、ライブラリが特定されれば、標的に結合しやすいペプチドをコードする核酸配列を容易に認識しやすくなる。バーコード配列は識別用バーコード配列および／または共通バーコード配列を含んでいてよく、バーコード配列は、共通バーコード配列と識別用バーコード配列の2種類が結合したものであってよい。識別用バーコード配列は、当該バーコード配列を含むバーコード化されたペプチド-核酸複合体が、いずれの核酸ディスプレイライブラリに由来するかを識別可能なように、核酸ディスプレイライブラリごとにそれぞれ異なっている。共通バーコード配列は、いずれの核酸ディスプレイライブラリにも共通に有するバーコード配列であり、核酸ディスプレイライブラリの混合物全体をPCRで増幅したい場合に

、共通バーコード配列にアニールするプライマーを用いることで核酸全体を増幅することができる。

[0060] バーコード化する方法としては、特に限定されないが、バーコード配列を含むプライマー（第一のバーコードプライマー又は第一のプライマーともいう。）及び逆転写酵素を用いて核酸配列を逆転写することにより、ペプチド－核酸複合体の核酸部分のヌクレオチド鎖とプライマーが伸長されたヌクレオチド鎖（相補的DNA（cDNA））との二本鎖となり、バーコード化されたペプチド－核酸複合体を得ることができる。バーコード配列は、cDNAの5'末端側に結合している。得られる二本鎖は、DNA／mRNAデュプレックス又は及びDNA／DNAデュプレックスであり、好ましくはcDNA／mRNAデュプレックスである。ペプチド－核酸複合体の核酸部分が二本鎖となっていることにより、ペプチド－核酸複合体の安定性が向上し、増幅、複製、転写、逆転写、精製等の種々の条件においても安定に取り扱いやすくなる。また、その他のバーコード化する方法として、核酸（DNA）ライブラリ調製時に導入しておくことやピューロマイシンとの連結（ライゲーション）時においても導入することができる。例えば、DNAライブラリについて、バーコード配列を含むプライマーでPCRを行い、その後転写によってバーコード配列を含むmRNAを調製する。そして当該mRNAを「Douthwaite J. A. et al. “Ribosome Display and Related Technologies: Methods and Protocols” (Published from Humana, 2011, pages 113-135)の図1に示すようなピューロマイシンリンカーでペプチドに連結させる、またはピューロマイシンリンカーの核酸部分にバーコード配列を含むmRNAを導入しておき、それをペプチドと連結させる。その後mRNAを翻訳することでバーコード化されたペプチド－核酸複合体を得ることができる。当該核酸は、DNA、DNA／mRNAデュプレックス又はDNA／DNAデュプレックスであり、好ましくはcDNA、cDNA／mRNAデュプレックス又はcDNA／cDNAデュプレックスである。

[0061] 第一のバーコードプライマーは、識別用バーコード配列と共通バーコード

配列を含むプライマーであることが好ましく、共通バーコード配列が識別用バーコード配列の5'末端側に存在することが好ましい。

[0062] 第一のバーコードプライマーの塩基数は、プライマーの機能を発揮できる数であれば制限はなく、例えば、15～150、15～140、15～130、15～120、15～110、15～100、15～90、15～80、15～70、15～60、15～50、15～40、15～30、25～150、25～140、25～130、25～120、25～110、25～100、25～90、25～80、25～70、25～60、25～50、25～40、又は25～30であってよい。第一のバーコードプライマーの塩基数は、好ましくは25～150であり、より好ましくは25～100であり、特に好ましくは25～60である。

[0063] 識別用バーコード配列の塩基数は、バーコード配列の機能を発揮できる数であれば制限はなく、例えば、15～30、15～27、15～25、15～22、15～20、15～17、17～30、17～27、17～25、17～22、17～20、20～30、20～27、20～25、20～22、22～30、22～27、22～25、又は25～30であってよい。好ましくは15～30であり、より好ましくは17～25であり、特に好ましくは17～22である。

[0064] 共通バーコード配列の塩基数は、バーコード配列の機能を発揮できる数であれば制限はなく、例えば、15～30、15～27、15～25、15～22、15～20、15～17、17～30、17～27、17～25、17～22、17～20、20～30、20～27、20～25、20～22、22～30、22～27、22～25、又は25～30であってよい。好ましくは15～30であり、より好ましくは17～25であり、特に好ましくは17～22である。

[0065] 本実施形態では、無細胞翻訳系を用いて、鋳型となるmRNAを別々に翻訳することにより、対応する複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する。翻訳を行う際に使用する無細胞翻訳系によって、同一の鋳型mRNAであ

っても異なるペプチドが調製され得る。複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する際に使用する無細胞翻訳系は、複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、互いに異なるアミノ酸の組み合わせを含む。また、本実施形態では、翻訳を行う際に使用する無細胞翻訳系が同じでも、異なる鋳型 mRNA（例えば、ランダム配列の繰り返し数が異なる）であれば、異なるペプチドが調製され得る。

[0066] ある態様では、複数の核酸ディスプレイライブラリは、互いに異なる遺伝暗号表に基づいて翻訳された核酸ディスプレイライブラリである。ある態様では、複数の核酸ディスプレイライブラリは、互いに同じ遺伝暗号表に基づいて翻訳された核酸ディスプレイライブラリである。鋳型 mRNA の核酸配列と翻訳産物であるペプチドのアミノ酸配列は、使用する無細胞翻訳系におけるコドンテーブルに依存する。ある態様では、複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、少なくとも 1 つ、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、11 以上、12 以上、13 以上、14 以上、又は 15 以上のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる。ある態様では、複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、48 以下、45 以下、40 以下、35 以下、30 以下、25 以下、20 以下、又は 15 以下のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる。複数の核酸ディスプレイライブラリ間において、1 以上 48 以下、1 以上 45 以下、1 以上 40 以下、1 以上 35 以下、1 以上 30 以下、1 以上 25 以下、1 以上 20 以下、2 以上 48 以下、2 以上 40 以下、2 以上 35 以下、2 以上 30 以下、2 以上 25 以下、2 以上 20 以下のコドンとアミノ酸の対応関係が互いに異なる。好ましくは 1 以上、48 以下、または 1 以上 48 以下であり、より好ましくは 1 以上、40 以下、または 1 以上 40 以下、特に好ましくは 2 以上、30 以下、または 2 以上 30 以下である。

[0067] 工程（1）で用意する核酸ディスプレイライブラリのは数は、少なくとも 2、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、20 以上、30 以上、40 以上、50 以上、60 以上、70 以上、80 以上

、90以上、100以上、110以上、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上、180以上、190以上、200以上、210以上、220以上、230以上、240以上、250以上、260以上、270以上、280以上、290以上、300以上、310以上、320以上、330以上、340以上、又は350以上である。工程（1）で用意する核酸ディスプレイライブラリのは数は、400以下、390以下、380以下、370以下、360以下、350以下、340以下、330以下、320以下、310以下、300以下、290以下、280以下、270以下、260以下、250以下、240以下、230以下、220以下、210以下、200以下、190以下、180以下、170以下、160以下、150以下、140以下、130以下、120以下、110以下、100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、30以下、20以下、又は10以下である。工程（1）で用意する核酸ディスプレイライブラリのは数は、2以上400以下、2以上200以下、2以上100以下、2以上50以下、2以上30以下、2以上15以下、2以上10以下、3以上400以下、3以上200以下、3以上100以下、3以上50以下、3以上30以下、3以上15以下、3以上10以下、4以上400以下、4以上200以下、4以上100以下、4以上50以下、4以上30以下、4以上15以下、又は4以上10以下である。好ましくは2以上、400以下、または2以上400以下であり、より好ましくは2以上、100以下、または2以上100以下であり、特に好ましくは2以上、50以下、または2以上50以下であり、最も好ましくは2以上、10以下、または2以上10以下である。

[0068] 核酸ディスプレイライブラリは、 10^3 以上、 10^4 以上、 10^5 以上、 10^6 以上、 10^7 以上、 10^8 以上、 10^9 以上、又は 10^{10} 以上、 10^{11} 以上、 10^{12} 以上の多様性を有するライブラリである。これら多様性は、実測値に限定されるものではなく、理論値である。本明細書において、「多様性」とは、核酸ディスプレイライブラリに含まれるペプチド-核酸複合体の種類を

意味し、理論上、上限は、使用した鋳型DNA中のランダム配列の種類に依存する。

[0069] 本開示における核酸ディスプレイライブラリに含まれるペプチド-核酸複合体の「バリエーションの理論上の（総）数」を求める際、実際にペプチド-核酸複合体として製造され得ないものは、理論上の（総）数には算入しない。例えば、以下（１）及び（２）のような場合には、該当するアミノ酸は翻訳合成されないことから、このようなアミノ酸を含むペプチド-核酸複合体理論上の（総）数に算入しない：（１）ペプチドの材料として翻訳液中にアミノ酸が添加されていても、同アミノ酸をコードする核酸を鋳型として含まない場合；（２）ペプチドの鋳型となる核酸には塩基配列を含むが、これに対応するアミノ酸を含まない翻訳液を使用する場合。また、環状ペプチド化合物を製造する過程での副反応物や未反応物が存在する場合には、これらは前記理論上の（総）数には算入しない。

[0070] 例えば、計20種類の天然アミノ酸を用いて、1種のアミノ酸に対して1組のコドンユニットを対応させたコドン表により、前記コドンユニットがランダムに配置された塩基配列から、11残基のペプチドを翻訳合成する場合において、翻訳開始アミノ酸がメチオニンに固定されていたとすると、バリエーションの理論上の数は、 20^{10} となり、これが上限となる。

[0071] また、核酸ディスプレイライブラリは、 10^3 種類以上、 10^4 種類以上、 10^5 種類以上、 10^6 種類以上、 10^7 種類以上、 10^8 種類以上、 10^9 種類以上、又は 10^{10} 種類以上、 10^{11} 種類以上、 10^{12} 種類以上のペプチド-核酸複合体を含むライブラリである。

[0072] 工程（２）

工程（２）は、工程（１）で得られた複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程である。

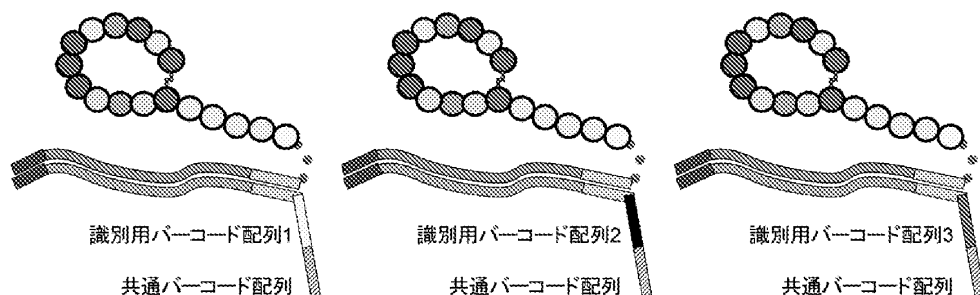
[0073] 工程（２）において、少なくとも2、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上、100以上、110以上

、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上、180以上、190以上、200以上、210以上、220以上、230以上、240以上、250以上、260以上、270以上、280以上、290以上、300以上、310以上、320以上、330以上、340以上、又は350以上の核酸ディスプレイライブラリを混合して、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する。工程（2）において、400以下、390以下、380以下、370以下、360以下、350以下、340以下、330以下、320以下、310以下、300以下、290以下、280以下、270以下、260以下、250以下、240以下、230以下、220以下、210以下、200以下、190以下、180以下、170以下、160以下、150以下、140以下、130以下、120以下、110以下、100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、30以下、20以下、又は10以下の核酸ディスプレイライブラリを混合して、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する。工程（2）において、2以上400以下、2以上200以下、2以上100以下、2以上50以下、2以上20以下、2以上15以下、2以上10以下、3以上400以下、3以上200以下、3以上100以下、3以上50以下、3以上20以下、3以上15以下、3以上10以下、4以上400以下、4以上200以下、4以上100以下、4以上50以下、4以上20以下、4以上15以下、又は4以上10以下の核酸ディスプレイライブラリを混合して、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する。好ましくは2以上、400以下、または2以上400以下であり、より好ましくは2以上、100以下、または2以上100以下であり、特に好ましくは2以上10以下である。

[0074] 工程（2）において、複数の核酸ディスプレイライブラリを混合して、混合核酸ディスプレイライブラリを調製することにより、単一の鋳型RNAからより多様性の高いライブラリを調製することができる。例えば、単一の鋳型RNA及び10種類の無細胞翻訳系を用いて、10種類の核酸ディスプレイライブラリ（各核酸ディスプレイライブラリの多様性は 10^3 と仮定する。

）を調製し、これらを混合して混合核酸ディスプレイライブラリを調製する場合、混合核酸ディスプレイライブラリの多様性は 10^4 となる。すなわち、この混合核酸ディスプレイライブラリを用いてスクリーニング操作を1回行えば、10種類の核酸ディスプレイライブラリを用いてそれぞれスクリーニング操作を行った場合と同等の結果を得ることができ、極めて効率的にスクリーニングを行うことができる。また、ライブラリ（又はその調製時に使用した無細胞翻訳系）ごとに異なるバーコード配列を選択することにより、バーコード配列によって、ペプチド-核酸複合体の由来となるライブラリ（又はその調製時に使用した無細胞翻訳系）を識別可能とする目印として使用できる。例えば、混合核酸ディスプレイライブラリは、以下に示すように、異なる識別用バーコード配列と共通バーコード配列を有するペプチド-核酸複合体を含んでおり、各識別用バーコード配列は、その由来となる核酸ディスプレイライブラリに対応する。

[化2]



[0075] 工程（3）

工程（3）は、工程（2）で得られた混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程である。ライブラリと標的分子を接触させることにより、ライブラリ中に含まれる一部のバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分が標的分子と結合する。標的分子は、当業者に周知な方法で固定してもよい。標的分子に混合核酸ディスプレイライブラリを接触させ、標的分子に結合しないペプチド-核酸複合体を洗い流すことで標的分子に結合するペプチド-核酸複合体（標的分子と親和性の高いペプチド-核

酸複合体)を選択できる(パニング法)。工程(3)を複数回繰り返してもよく、例えば2～5回繰り返すことが例示される。工程(3)を繰り返すことで、選択の精度を上げることができる。

- [0076] このように選択されたバーコード化されたペプチド-核酸複合体から、核酸部分に含まれる核酸(例えばcDNA)を溶出する。核酸は、第一のバーコードプライマーに由来するバーコード配列を含む。溶出した核酸からPCRにより核酸部分に対応する核酸(cDNA)を増幅してもよい。得られた核酸をPCR法で増幅し、核酸配列を解析することで、標的分子に結合したペプチドの配列を同定できる。本実施形態に係る方法は、工程(3)と工程(4)の間に、工程(3A)及び/又は工程(3B)をさらに含んでもよい。

[0077] 工程(3A)

工程(3A)は、工程(3)と工程(4)の間に実施する工程であり、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸(例えばcDNA)を溶出する工程である。バーコード化されたペプチド-核酸複合体を、特定の酵素で処理したり、加熱したり、化学的な刺激を加えたり、特定の光を照射することにより、核酸を溶出させることができる。溶出に使用できる酵素としては、TEVプロテアーゼが挙げられる。光を照射して溶出させる場合には、300nm以上500nm以下の波長の光を照射することが好ましい。化学的な刺激としては、酸または塩基で処理することが挙げられる。溶出された核酸は、5'末端側に第一のバーコードプライマーに由来するバーコード配列を含む。溶出された核酸を、フォワードプライマーを用いてプライマーの伸長を行い、二本鎖の核酸(例えば二本鎖cDNA)に変換してもよい。

[0078] 工程(3B)

工程(3B)は、工程(3)と工程(4)の間(例えば、工程(3A)の後)に実施する工程であり、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程である。標的

分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分の核酸配列及び／又はバーコード配列に基づいて、ペプチド部分のアミノ酸配列を同定する。また、工程（3A）で溶出した核酸（例えばcDNA）のバーコード配列によって、ペプチド-核酸複合体の由来となるライブラリ（又はその調製時に使用した無細胞翻訳系）を識別可能となる目印として使用できる。例えば、2種類の鋳型mRNAを2種類の無細胞翻訳系を用いて翻訳し、合計4つの核酸ディスプレイライブラリを調製する場合、使用した無細胞翻訳系に対応するバーコード配列に相補的な配列を含むプライマーを用いて、逆転写し、ペプチド-核酸複合体の核酸部位の核酸配列とバーコード配列を同定することにより、理論上、その組み合わせからペプチド部位の化学構造を把握できる。

同定されたアミノ酸配列情報に基づき、任意の方法によりペプチドを合成することができる。このペプチドを用いて、標的分子に対する結合活性や阻害活性の評価、又は細胞や動物を用いた評価を行い、所望のペプチドを得ることができる。

[0079] 本開示におけるスクリーニング方法に用いられる標的分子は特に限定されず、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、脂質などが例示されるが、中でもタンパク質を標的とすることが好ましい。ある態様において、本開示におけるスクリーニング方法によれば、タンパク質-タンパク質間の相互作用（PPI）を阻害するペプチドを得ることができる。特にPPIに関与する両タンパク質の表面には、ホットスポットと呼ばれる部位が存在し、PPIの結合力を高めていると考えられている。PPIとしては、例えば、疎水性相互作用、静電的相互作用、ファンデルワールス力、水素結合、光架橋、塩橋などが挙げられる。このようなPPIにより、タンパク質のリン酸化、コンフォメーション変化または局在化、タンパク質同士の複合体形成（例えば、マルチサブユニット化）などが生じ、タンパク質の修飾、輸送、フォールディング変化、シグナル伝達などに関与し得る。特定の理論に拘束されることを意図しないが、本開示におけるライブラリに含まれるペプチドを構成するアミ

ノ酸の側鎖がこの部位に入り込むことによりPPIを阻害することができると考えられる。すなわち、本開示におけるライブラリやスクリーニング方法によれば、標的分子の種類によらず、PPIを阻害するペプチドが得られると考えられる。

[0080] 非限定の一態様において、本開示におけるスクリーニング方法に用いられる標的分子は、担体に固定して使用される。担体としては、標的分子を固定することができれば特に限定されないが、ビーズ又は樹脂が例示される。標的分子は公知の方法により担体に固定することができる。

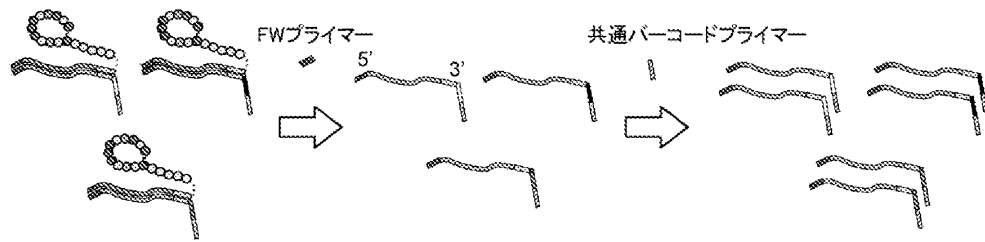
[0081] 本開示におけるスクリーニング方法の標的分子は、特に限定されない。本開示におけるライブラリは、様々な標的分子に対し特異的に結合できるペプチド化合物を含むため、ある態様において、これまで創薬が困難とされてきたtough targetへの創薬を可能にし得る。

[0082] 工程（４）

工程（４）は、バーコード配列に相補的な配列を含むプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸又はそのcDNAを増幅する工程である。増幅された核酸は、バーコード化されたペプチド-核酸複合体に含まれる核酸と同一の核酸配列を有する。

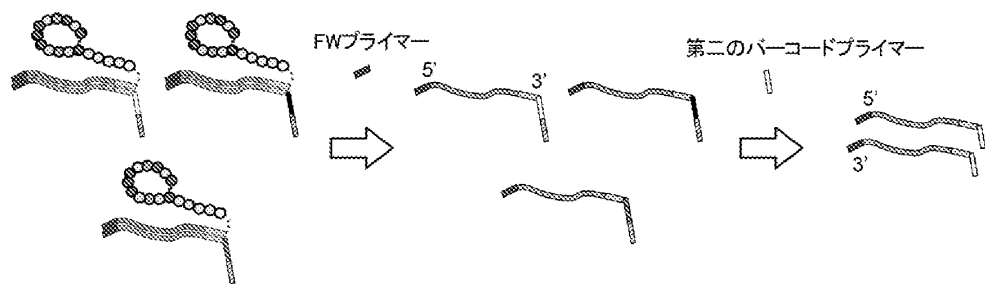
[0083] 工程（４）では、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸をPCR法により増幅する。まず、フォワードプライマー（Fwプライマー）を用いてPCR法により増幅することにより、核酸部分に対応する核酸が増幅する。Fwプライマーは、核酸部分の5'領域の核酸配列に相補的な配列を有する。得られた核酸を、共通バーコード配列と相補的な配列を含むプライマー（共通バーコードプライマー）を用いたPCR法により増幅する場合、その由来となる核酸ディスプレイライブラリの違いを考慮せずにcDNAを増幅することができる。この一連の反応は、Fwプライマーと共通バーコードプライマーを同時に加えておき、PCR法により繰り返し増幅させることで達成することができる。

[化3]



[0084] 一方、核酸部分に対応する核酸を、識別用バーコード配列と相補的な配列を含むプライマー（第二のバーコードプライマー又は第二のプライマーともいう）を用いてPCR法により増幅する場合、以下に示すように、その由来となる核酸ディスプレイライブラリごとを選択的にcDNAを増幅することができる。一般的に、パニング法では、より濃縮されにくい核酸とより濃縮されやすい核酸が見られる。パニング法で濃縮すると、より濃縮されにくい核酸は相対的に少なくなっていくため、標的分子に結合したペプチド-核酸複合体であったとしても見逃される可能性がある。そのため、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の識別用バーコード配列ごとを選択的にPCR法で増幅させることで、より濃縮されにくい核酸を増幅させることができるようになり、有望なペプチドの見逃しを回避することができる。

[化4]



[0085] 第二のバーコードプライマーは、識別用バーコード配列に相補的な配列を含むプライマーであることが好ましく、識別用バーコード配列に相補的な配列からなるプライマーであってもよい。第二のバーコードプライマーに含まれる識別用バーコード配列に相補的な配列は、選択的に増幅しようとする核

酸ディスプレイライブラリに対応するものを選択する。第二のバーコードプライマーは、塩基数が10～150、10～140、10～130、10～120、10～110、10～100、10～90、10～80、10～70、10～60、10～50、10～40、10～30、10～20、15～150、15～140、15～130、15～120、15～110、15～100、15～90、15～80、15～70、15～60、15～50、15～40、15～30、25～150、25～140、25～130、25～120、25～110、25～100、25～90、25～80、25～70、25～60、25～50、25～40、又は25～30であるプライマーであってよい。好ましくは10～150であり、より好ましくは10～50であり、特に好ましくは15～30である。

[0086] 本実施形態では、工程（1）～（4）の一連の工程を1サイクル（「1ラウンド」ともいう。）として、複数サイクルを繰り返すことが好ましい。繰り返し回数は、例えば、2サイクル以上、3サイクル以上、4サイクル以上、5サイクル以上、6サイクル以上、7サイクル以上、8サイクル以上、9サイクル以上、又は10サイクル以上であってもよい。サイクルを繰り返すことによって、標的に結合するペプチド-核酸複合体の核酸が濃縮され得る。

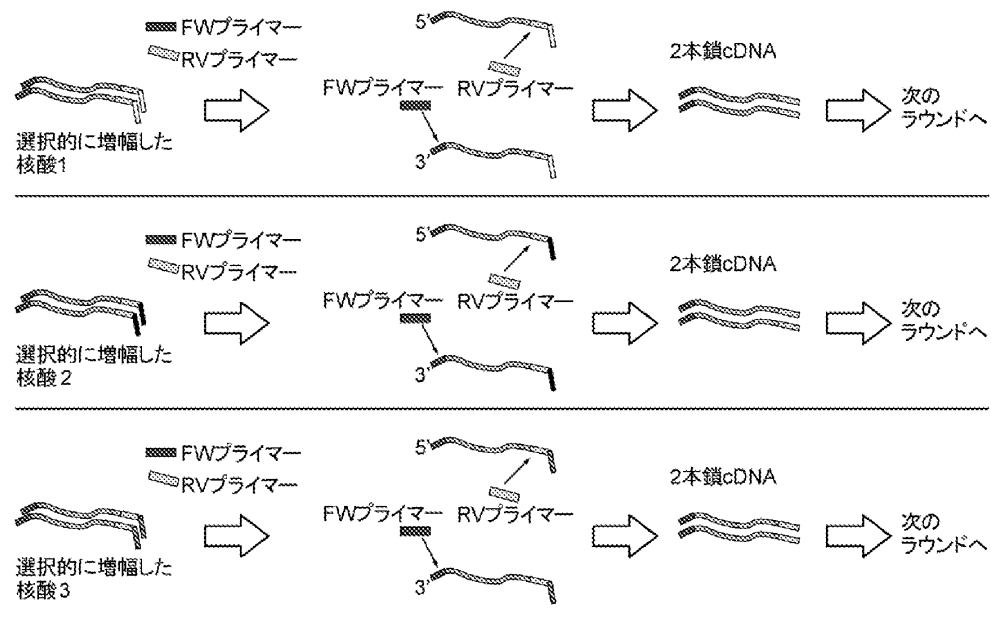
[0087] 工程（5）

本実施形態に係る方法は、工程（4）の後に工程（5）をさらに含んでもよい。例えば、工程（5）は、工程（4）の後、次のサイクルを始めずに実施することができる。工程（5）は、フォワードプライマー（Fwプライマー）とリバースプライマー（Rvプライマー）を用いて、工程（4）で増幅した核酸をさらに増幅する工程である。工程（5）で増幅された核酸は、識別用バーコード配列を含まない。FwプライマーとRvプライマーを用いてPCR法により増幅することにより、識別用バーコード配列を除去し、ペプチド部分に対応する核酸のみを増幅することができる。

[0088] Fwプライマーは、核酸部分の5'領域の核酸配列に相補的な配列を有し

、R v プライマーは、核酸部分の3' 領域の核酸配列に相補的な配列を有する。すなわち、F w プライマー及びR v プライマーは、はそれぞれ、ペプチド-核酸複合体の核酸部分の5' 領域及び3' 領域にアニールできるプライマーであり、バーコード配列に相補的な配列を含まない。工程（5）により、ペプチド部分に対応する核酸を、識別用バーコード配列を含まない状態で得ることができ、次のラウンド（工程（1）～（4）の一連の工程）を実施することができる。ペプチド部分に対応する核酸の核酸配列を同定することができれば、その核酸配列を、識別用バーコード配列の種類に対応する無細胞翻訳系を用いて、翻訳することにより、所望のペプチドを合成することができる。

[化5]



[0089] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

（1）バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイ

プレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(6) 工程(1)～(4)の工程を複数回(サイクル)繰り返す工程。

[0090] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(5) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる識別用バーコード配列を除去する工程。

[0091] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコー

ド配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(5) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる識別用バーコード配列を除去する工程、

(6) 工程(1)～(4)の工程を複数回(サイクル)繰り返す工程。

[0092] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程。

[0093] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(6) 工程(1)～(4)の工程を複数回(サイクル)繰り返す工程。

[0094] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化さ

れたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(5) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる識別用バーコード配列を除去する工程。

[0095] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(5) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる識別用バーコード配列を除去する工程、

(6) 工程(1)～(4)の工程を複数回(サイクル)繰り返す工程。

[0096] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核

酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3 A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(3 B) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程。

[0097] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3 A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(3 B) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程。

(6) 工程(1)～(4)の工程を複数回(サイクル)繰り返す工程。

[0098] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(3B) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(5) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複体の核酸部分に含まれる識別用バーコード配列を除去する工程。

[0099] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイ

レイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(3A) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から核酸を溶出する工程、

(3B) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程、

(5) 前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる識別用バーコード配列を除去する工程、

(6) 工程(1)～(4)の工程を複数回(サイクル)繰り返す工程。

[0100] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) 無細胞翻訳系を用いて複数の核酸ライブラリをそれぞれ別々に翻訳し、ペプチド部分と核酸部分を含むペプチド-核酸複合体を調製する工程、

(1-1) 前記ペプチド-核酸複合体をバーコード化して、バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に含まれる核酸を増幅する工程。

[0101] 本実施形態に係る各用語の定義、及び各工程の説明は、上述の実施形態における記載を参照できる。

[0102] 本明細書における「核酸ライブラリ」とは、核酸ディスプレイライブラリを調製するための鋳型となる核酸の集合体である。核酸ライブラリに含まれる核酸は、DNA、mRNA、cDNA又はこれらの任意の組み合わせであ

ってよい。好ましい核酸ライブラリは、mRNAライブラリである。

[0103] 本実施形態では、無細胞翻訳系を用いて、複数の核酸ライブラリを翻訳することにより、ペプチド部分と核酸部分を含むペプチド-核酸複合体を調製することができる。得られたペプチド-核酸複合体の核酸部分に、プライマーを用いる逆転写によりcDNAとのデュプレックス状態に変換してもよい。バーコード配列を含むプライマーを用いて逆転写することにより、バーコード化されたペプチド-核酸複合体に変換することもできる。ペプチド-核酸複合体を調製する際、複数の無細胞翻訳系と複数の核酸ライブラリを組み合わせることにより、多様なパターンのペプチド-核酸複合体のディスプレイライブラリを調製することが可能となる。使用する無細胞翻訳系に関連づけて特定のバーコード配列を含むプライマー（第一のバーコードプライマー）を用いて逆転写することにより、バーコード配列に基づく識別が可能となる。得られた複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製したとしても、バーコード配列に基づき、由来となるライブラリ（又は無細胞翻訳系）の特定が可能となる。ある態様では、核酸ライブラリは、他の核酸ライブラリと互いに異なる繰り返し数を有する。ある態様では、核酸ライブラリは、1つの核酸ライブラリ中に互いに異なる繰り返し数を有する核酸を少なくとも2つ以上含んでいてよい。ある態様では、核酸ライブラリは、1つの核酸ライブラリ中に同じ繰り返し数を有する核酸からなるライブラリであってもよい。

[0104] 核酸ライブラリに含まれる核酸の核酸配列は、ランダム配列を含む。ここでランダム配列とは、核酸配列ごとに異なる配列（共通していない配列）であり、任意に選択されたアミノ酸及び／又はアミノ酸類縁体からなる配列である。ランダム配列中には、少なくとも1つの非天然アミノ酸を指定するトリプレット（コドン）を含んでいてもよい。ランダム配列は、複数種類のトリプレットから選択されるトリプレットを少なくとも1個、2～1000個、2～750個、2～500個、2～250個、2～100個、2～50個、2～20個、2～18個、2～15個、2～12個、少なくとも3個、3

～1000個、3～750個、3～500個、3～250個、3～100個、3～50個、3～18個、3～15個、3～12個、少なくとも4個、4～1000個、4～750個、4～500個、4～250個、4～100個、4～50個、4～18個、4～15個、4～12個、少なくとも5個、5～1000個、5～750個、5～500個、5～250個、5～100個、5～50個、5～18個、5～15個、5～12個含むことが好ましい。トリプレットの種類は、64種類以下、60種類以下、55種類以下、50種類以下、45種類以下、40種類以下、35種類以下、30種類以下、25種類以下、20種類以下、15種類以下、10種類以下、又は5種類以下であることが好ましい。各トリプレットは、互いに同一であっても異なってもよく、ランダムに選択したものであってもよい。ペプチドー核酸複合体のペプチド部分が、所定のアミノ酸を含み、かつ核酸部分が該アミノ酸をコードするトリプレットを含むものであることが好ましい。

[0105] また、本発明の一実施形態は、次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法である。

(1) 単一の無細胞翻訳系を用いて複数の核酸ライブラリをそれぞれ別々に翻訳し、ペプチドー核酸複合体を調製する工程、

(1-1) 前記ペプチドー核酸複合体をバーコード化して、バーコード化されたペプチドー核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、

(3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、

(4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチドー核酸複合体の核酸部分に含まれる核酸を増幅する工程。

[0106] 本実施形態に係る各用語の定義、及び各工程の説明は、上述の実施形態における記載を参照できる。

[0107] 本発明の一実施形態は、次の工程を含む、核酸ディスプレイライブラリの

製造方法である。

(a) 記述子を用いた主成分分析の解析結果を指標としてペプチド-核酸複合体を含む核酸ディスプレイライブラリを設計する工程；

(b) 無細胞翻訳系を用いて核酸ライブラリを翻訳し、ペプチド-核酸複合体を調製する工程。

[0108] 本実施形態では、記述子を指標としてペプチド-核酸複合体を含む核酸ディスプレイライブラリを設計することができる。複数の記述子から主成分分析を実施し、第1主成分、第2主成分としてベクトル空間に図1～3のように2次元マッピング（第一主成分の値をX軸に、第二主成分の値をY軸にプロット）することで、多様性の高いライブラリを設計することができる。記述子の算出には、オープンソースのライブラリであるRDKit (<https://www.rdkit.org/>) の化合物情報を用いることができる。記述子は、例えば、RDKitのウェブサイト (<http://rdkit.org/docs/source/rdkit.Chem.html>) で提供される記述子から適宜採用できる。記述子としては、'NumValenceElectrons' (Number of valence electrons)、'PEOE_VSA3' (MOE Charge VSA Descriptor 3 ($-0.25 \leq x < -0.20$))、'fr_Al_OH' (Number of aliphatic hydroxyl groups)、'fr_Al_OH_noTert' (Number of aliphatic hydroxyl groups excluding tert-OH)、'fr_Ar_N' (Number of aromatic nitrogens)、'fr_C_O_noCOO' (Number of carbonyl O, excluding COOH)、'fr_C_S' (Number of thiocarbonyl)、'fr_HOCCN' (Number of C(OH)CCN-Ctert-alkyl or C(OH)CCNcyclic)、'fr_NH1' (Number of Secondary amines)、'fr_Ndealkylation2' (Number of tert-alicyclic amines (no heteroatoms, not quinine-like bridged N))、'fr_Nhpyrrole' (Number of H-pyrrole nitrogens)、'fr_SH' (Number of thiol groups)、'fr_alkyl_halide' (Number of alkyl halides)、'fr_allylic_oxid' (Number of allylic oxidation sites excluding steroid dienone)、'fr_aryl_methyl' (Number of aryl methyl sites for hydroxylation)、'fr_azide' (Number of azide groups)、'fr_azo' (Number of azo groups)、'fr_bicyclic' (Bicyclic)、'fr

_diaz' (Number of diazo groups) 、 'fr_dihydropyridine' (Number of dihydropyridines) 、 'fr_epoxide' (Number of epoxide rings) 、 'fr_ether' (Number of ether oxygens (including phenoxy)) 、 'fr_furan' (Number of furan rings) 、 'fr_halogen' (Number of halogens) 、 'fr_hdrzine' (Number of hydrazine groups) 、 'fr_hdrzone' (Number of hydrazone groups) 、 'fr_imidazole' (Number of imidazole rings) 、 'fr_imide' (Number of imide groups) 、 'fr_isocyan' (Number of isocyanates) 、 'fr_isothiocyan' (Number of isothiocyanates) 、 'fr_ketone' (Number of ketones) 、 'fr_ketone_Topliiss' (Number of ketones excluding diaryl, a,b-unsat. dienones, heteroatom on C α) 、 'fr_lactam' (Number of beta lactams) 、 'fr_lactone' (Number of cyclic esters (lactones)) 、 'fr_methoxy' (Number of methoxy groups -OCH₃) 、 'fr_morpholine' (Number of morpholine rings) 、 'fr_nitrile' (Number of nitriles) 、 'fr_nitro' (Number of nitro groups) 、 'fr_nitro_arom' (Number of nitro benzene ring substituents) 、 'fr_nitro_arom_nonortho' (Number of non-ortho nitro benzene ring substituents) 、 'fr_nitroso' (Number of nitroso groups, excluding NO₂) 、 'fr_oxazole' (Number of oxazole rings) 、 'fr_phenol' (Number of phenols) 、 'fr_phenol_noOrthoHbond' (Number of phenolic OH excluding ortho intramolecular Hbond substituents) 、 'fr_phos_acid' (Number of phosphoric acid groups) 、 'fr_phos_ester' (Number of phosphoric ester groups) 、 'fr_piperdine' (Number of piperdine rings) 、 'fr_piperzine' (Number of piperzine rings) 、 'fr_priamide' (Number of primary amides) 、 'fr_prisulfonamd' (Number of primary sulfonamides) 、 'fr_pyridine' (Number of pyridine rings) 、 'fr_quatN' (Number of quaternary nitrogens) 、 'fr_sulfide' (Number of thioether) 、 'fr_sulfonamd' (Number of sulfonamides) 、 'fr_sulfone' (Number of sulfone groups) 、 'fr_term_acetylene' (Number of terminal acetylenes) 、 'fr_tetrazole' (Number of tetrazole rings) 、 '

fr_thiazole' (Number of thiazole rings)、'fr_thiocyan' (Number of thiocyanates)、および 'fr_thiophene' (Number of thiophene rings) を含む記述子が例示されるが、これらに限定されない。この手法により、複数の核酸ディスプレイライブラリ間で、核酸ディスプレイライブラリに含まれるペプチド-核酸複合体の構造上の重なりが少ないライブラリの設計が可能となる。

- [0109] 本実施形態に係る各用語の定義、及び各工程の説明は、上述の実施形態における記載を参照できる。

実施例

[0110] 実施例 1 Split & Pool技術を使用した複数PURE systemによるパニング

複数の原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE system (以後、PUREともいう。) で翻訳したペプチドディスプレイライブラリを用いて、本手法で、標的タンパク質に結合する多様なペプチド配列群を取得可能か、mRNAディスプレイパニングを行い検証した。

- [0111] パニングの1ラウンド目では、4種類のPUREで翻訳したペプチドディスプレイライブラリをそれぞれ独立してセレクションを行い、PCR反応でセレクションライブラリを増幅した。

- [0112] 2ラウンド目以降は前ラウンド目で得られた4種類のセレクションライブラリを各PUREで翻訳し、それぞれ使用したPUREに対応した4種類の逆転写プライマーを用いてペプチドディスプレイを調製した。そしてこれらのライブラリを混合したライブラリでセレクションを行い、その後4種類のプライマーを用いたPCRで各PUREに対応するセレクションライブラリをそれぞれ増幅し、これを繰り返した。

[0113] 実施例 1-1 パニング標的タンパク質の調製

パニングに使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を用いた。WO 2022/138892に記載の手法に準じてC末端にHisタグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、GST-HisTEVAviからGST-HisT

EV-Bioを調製した。

[0114] 実施例 1－2 ペプチドディスプレイライブラリの調製

実施例 1－2－1 翻訳に使用するアシル化 tRNA の合成

本パニングで使用したPUREをPURE 1、PURE 2、PURE 3、PURE 4と定義する。WO2018/143145およびWO2018/225864に記載の手法に準じてこれらで使用するアシル化 tRNA を調製した。

[0115] PURE 1では、Asp (SMe)、Phe (3-Cl)、Hph (3-Cl)、MeAla (3-Pyr)、MeGly、MeHnl (7-F2)、MeHph、MeSer (nPr)、MeSer (tBuOH)、Nle、Pro (4-pip-4-F2)、Pic (2)、Ser (3-F-5-Me-Pyr)、Ser (NtBu-Aca)、Ser (Ph-2-Cl)、Ser (iPen)、cisPro (4-pip-4-F2)、D-MeSer、nBuGlyの19種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化 tRNA 混合物を調製した。

[0116] PURE 2では、Asp (SMe)、MeAla、MeGly、MeHnl (7-F2)、MeSer (nPr)、MeSer (tBuOH)、MeVal、Nle、Pro (4-pip-4-F2)、Pic (2)、Ser (NtBu-Aca)、D-MeSerを含む23種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化 tRNA 混合物を調製した。

[0117] PURE 3では、Asp (SMe)、MeAla (3-Pyr)、MeGly、MeHnl (7-F2)、MeSer (nPr)、MeSer (tBuOH)、Nle、Pic (2)、cisPro (4-pip-4-F2)、nBuGlyを含む21種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化 tRNA 混合物を調製した。

[0118] PURE 4では、Asp (SMe)、MeAla、MeGly、MeHnl (7-F2)、MeSer (nPr)、MeSer (tBuOH)、MeVal、Nle、Pro (4-pip-4-F2)、Pic (2)、cis

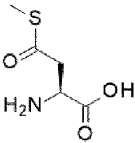
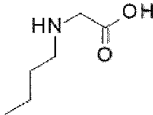
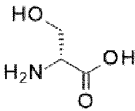
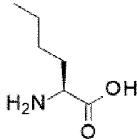
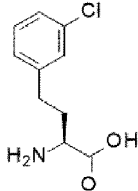
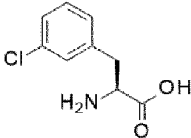
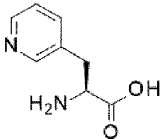
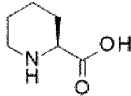
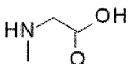
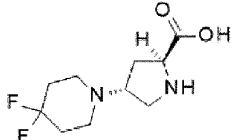
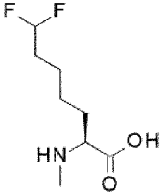
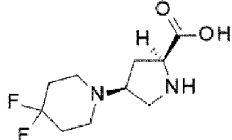
Pro (4-pip-4-F2)、nBuGlyを含む23種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物を調製した。

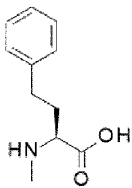
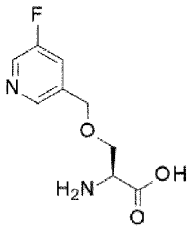
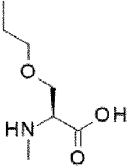
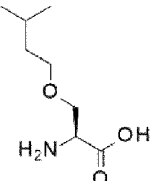
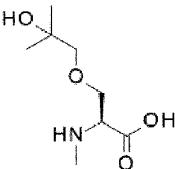
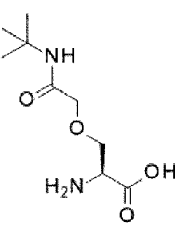
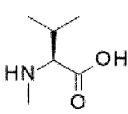
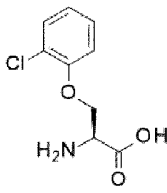
[0119] それぞれのアシル化tRNAの翻訳液中の最終濃度は10 μ M～20 μ Mであった。PnaZ保護のpCpAアミノ酸は、脱保護を実施せずにフェノール抽出以降の作業を行った。Initiatorアミノアシル化tRNAはWO 2018/225864に記載のAcbs-MeCys(StBu)-tRNA^{fMet}CAUと同一化合物であり、最終濃度が25 μ Mになるように翻訳液中に添加して用いた。

[0120] 本明細書において例示されるアミノ酸の略称とその構造との関係を以下の表1に示す。

[0121]

[表1]

略称	アミノ酸構造	略称	アミノ酸構造
Asp(SMe)		nBuGly	
D-MeSer		Nle	
Hph(3-Cl)		Phe(3-Cl)	
MeAla(3-Pyr)		Pic(2)	
MeGly		Pro(4-pip-4-F2)	
MeHnl(7-F2)		cisPro(4-pip-4-F2)	

MeHph		Ser(3-F-5-Me-Pyr)	
MeSer(nPr)		Ser(iPen)	
MeSer(tBuOH)		Ser(NtBu-Aca)	
MeVal		Ser(Ph-2-Cl)	

[0122] 実施例 1-2-2 ペプチドライブラリをコードするランダム化された 2 本鎖 DNA ライブラリ

WO 2013/100132 に記載の方法に準じて、DNA ライブラリを構築した。TTT、TTG、CTT、CTG、ATT、ATG、GTT、GTG、TCT、TCG、CCG、ACT、GCT、TAC、CAT、CAG、AAC、GAT、GAG、TGC、TGG、CGT、CGG、AGT、AGG、GGT の 26 種類のトリプレットがランダムに 8 回ないし 9 回繰り返して出現するものを用意した（配列番号 1, 2）。そしてこれらを用いて mRNA-ピューロマイシンリンカーライゲーション産物を調製し、使用した。下記配列中の各「N」は、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンのいずれか 1 つを意味し、「NNN」で表されるトリプレットを 8 または 9 個

含む。

DNAライブラリ（配列番号1）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(NNN)₈TAGCCGACCGGCACC
GGCACC GGCAAAAAA

DNAライブラリ（配列番号2）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(NNN)₉TAGCCGACCGGCACC
GGCACC GGCAAAAAA

[0123] 実施例1-2-3 ペプチドディスプレイライブラリの翻訳・環化

翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いた。具体的には、PURE 1～4の4種類のPURE全てにおいて1 mMのGTP、1 mMのATP、20 mMのクレアチンリン酸、50 mMのHEPES-KOH pH 7.6、100 mMの酢酸カリウム、2～4 mMの酢酸マグネシウム、2 mMのスペルミジン、1 mMのジチオスレイトール、1 mg/mL E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社製) (Nucleic Acids Research, 2010, Vol. 38, No. 6 e89に記載の方法で、一部のtRNAを除去している)、4 μg/mLのクレアチンキナーゼ、6.72 U/mLのミオキナーゼ、2 unit/mLの無機ピロフォスファターゼ、1.1 μg/mLのヌクレオシドニリン酸キナーゼ、0.26 μMのEF-G、2.7 μMのIF1、0.4 μMのIF2、1.5 μMのIF3、40 μMのEF-Tu、59 μMのEF-Ts、1.2 μMのリボソーム、1 μMのGlyRS、0.04～0.4 μMのIleRS、0.16 μMのProRS、0.09 μMのThrRS、0.11 μMのLysRS、3 μMのin vitro転写大腸菌tRNA Ala1B、250 μMのグリシン、10～100 μMのイソロイシン、250 μMのプロリン、250 μMのスレオニン、250 μMのリジン、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物、25 μM Initiatorアミノアシル化tRNA (WO2020/138336A1)、0.5 μM Penicillin G Amidase (PGA)、1 μMのEF-P-Lys、0.4 unit/μLのRNasin（登

録商標) Ribonuclease Inhibitor (PROMEGA社)、前述の二本鎖DNAライブラリからWO2013/100132に従って調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を1 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加した。

- [0124] PURE1では上記に加えて、0.5 μ Mの変異体PheRS (WO2016/148044)、1.37 μ MのAlaRS、1 μ Mの変異体ValRS (WO2016/148044)、1 μ Mの変異体SerRS (WO2016/148044)、5 mMのN-メチルフェニルアラニン、5 mMのN-メチルバリン、5 mMのN-メチルセリン、2.5 mMのN-メチルアラニンを添加した。PURE3では上記に加えて、2.73 μ MのAlaRS、1 μ Mの変異体ValRS (WO2016/148044)、5 mMのN-メチルバリン、5 mMのN-メチルアラニンを添加した。上記因子を混合後、37℃で1時間静置することで翻訳を行った。

[0125] 実施例1-3 パニング

翻訳したディスプレイライブラリを使用しWO2013/100132に従ってパニングを5ラウンド実施した。

実施例1-3-1 ディスプレイライブラリの逆転写

1ラウンド目では環化・脱硫・精製した100 μ Lの計4種類のディスプレイライブラリ溶液に対して、3 μ M Rvプライマー1-1 (配列番号3)、50 mM TrisHCl (pH8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、0.5 mM dGTP、0.5 mM dATP、0.5 mM dCTP、0.5 mM dTTP、8U/ μ L M-MLV Reverse transcriptase(H-) (Promega社、M368B)を加えNuclease free waterでメスアップし、125 μ L溶液で42℃、60分間保温し、逆転写反応を行った。この逆転写液に対して1xTBS、2 mg/mL BSA (invitrogen社)のバッファーを加えて0.6 μ M ディスプレイライブラリとした。

- [0126] 2ラウンド目以降ではPURE1で翻訳・環化・脱硫・精製したディスプレイライブラリにはRTプライマー1 (配列番号4)、PURE2翻訳物にはRTプライマー2 (配列番号5)、PURE3翻訳物にはRTプライマー

3（配列番号6）、PURE 4 翻訳物にはRTプライマー4（配列番号7）を逆転写プライマーとして使用した。具体的には翻訳・環化・脱硫・精製した24 μ Lディスプレイライブラリ溶液にPUREの種類に対応する3 μ M 逆転写プライマー、50 mM Tris HCl（pH 8.3）、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、0.5 mM dGTP、0.5 mM dATP、0.5 mM dCTP、0.5 mM dTTP、8U/ μ L M-MLV Reverse transcriptase(H-)（Promega社、M368B）になるように加えNuclease free waterでメスアップし、30 μ L溶液で42℃、60分間保温し、逆転写反応を行った。この逆転写液に対して1×TBS、2 mg/ml BSA（invitrogen社）のバッファーを加えて0.25 μ M ディスプレイライブラリとした。その後各4種類のPUREから翻訳されたディスプレイライブラリを混合し1つのディスプレイライブラリ溶液とした。

Rvプライマー1-1（配列番号3）

TTTTTTTgccggtgccggtgccggtCGG

RTプライマー1（配列番号4）

AAACACGTGGCAAACATTCCAAGAATTACTGACCCCTCGGTTTTTTTgccggtgccggtg

RTプライマー2（配列番号5）

AAACACGTGGCAAACATTCCAAGCACTCTTAGGCCTCTGTTTTTTTgccggtgccggtg

RTプライマー3（配列番号6）

AAACACGTGGCAAACATTCCAAGGACTGCATACCAGGTTGTTTTTTTgccggtgccggtg

RTプライマー4（配列番号7）

AAACACGTGGCAAACATTCCAAGGCCAGAGGATACAACTTTTTTTTgccggtgccggtg

[0127] 実施例1-3-2 4種類のPUREライブラリを用いたパニング

ラウンド1では、Streptavidinコーティング磁気ビーズに、GST-HisTev-Bioが0.4 μ Mになるように固定した後、それぞれ4種類のディスプレイライブラリに加えて、4℃で1時間反応させた。反応後に、マグネットで集めて上清を除いたビーズを、tTBS（ナカライテスク社製）で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理

し核酸の溶出を行った。

[0128] 具体的なTEV溶出液として、1xTEV buffer、10 mM DTT、0.1 U/μL AcTEVプロテアーゼ（サーモフィッシュャーサイエンティフィック社、#12575015）を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー（Fwプライマー（配列番号8）、Rvプライマー1-2（配列番号9））でPCRして、次のラウンドのインプットライブラリとした。

[0129] また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、各ラウンドのライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（Fwプライマー（配列番号8）、Rvプライマー1-3（配列番号10））を使用した。qPCRの反応液は、1xEx taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μM Fwプライマー、0.5 μM Rvプライマー1-2又は1-3、20000倍希釈SYBR Green I（Lonza社製、カタログ#50513）、0.02 U/μL Ex Taq polymerase（TAKARA社製）を混合し、95℃で2分加熱後、95℃で10秒、57℃で20秒、72℃で30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

Fwプライマー（配列番号8）

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAG

Rvプライマー1-2（配列番号9）

TTTTTTTgccggtgccggtgccggtCGGCTA

Rvプライマー1-3（配列番号10）

TTTGTGGTgccggtgccggtgccggtCGG

[0130] ラウンド2～ラウンド4ではStreptavidinコーティング磁気ビーズに、GST-HisTeV-Bioが0.4 μMになるように固定した後、4種類のディスプレイライブラリ混合溶液に加えて、4℃で1時間反応させた。反応後に、ラウンド1と同じようにマグネットで集めて上清を除いたビーズを、tTBS（ナカライテスク）で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し核酸の溶出を行った。反

応後、上清を回収し、ライブラリ認識プライマー（Fwプライマー（配列番号8）、Rvプライマー2（配列番号11）でPCRした。

Rvプライマー2（配列番号11）

AAACACGTGGCAAACATTCC

- [0131] PCR産物とFwプライマー（配列番号8）とRvプライマー3（配列番号12）またはRvプライマー4（配列番号13）またはRvプライマー5（配列番号：14）またはRvプライマー6（配列番号15）を用いてPCRを行い各PURE由来のPCR産物を4種類得た。

Rvプライマー3（配列番号12）

AAGAATTACTGACCCCTCGG

Rvプライマー4（配列番号13）

AAAGCACTCTTAGGCCTCTG

Rvプライマー5（配列番号14）

AAGGACTGCATACCAGGTTG

Rvプライマー6（配列番号15）

AAGGCCCGAGAAGGATACAAC

- [0132] その後各4種類のPCR産物それぞれとFwプライマー（配列番号8）、Rvプライマー1-2（配列番号9）でPCRをして次のラウンドのインプットライブラリとした。Rvプライマー3由来のものはPURE1、Rvプライマー4由来のものはPURE2、Rvプライマー5由来のものはPURE3、Rvプライマー6由来のものはPURE4を用いて次のラウンドの翻訳を行った。

- [0133] また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、各ラウンドの各ライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー（Fwプライマー（配列番号8）、Rvプライマー3（配列番号12）またはRvプライマー4（配列番号13）またはRvプライマー5（配列番号14）またはRvプライマー6（配列番号15））を使用した。qPCRの反応液は、1x Ex taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μM Fw

プライマー、0.5 μM Rvプライマー、200000倍希釈SYBR Green I (Lonza社製、カタログ#50513)、0.02 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA社製)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃で10秒、57℃で20秒、72℃で30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0134] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、インプットライブラリを、1E+8/μL、1E+6/μL、1E+4/μL、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0135] 2ラウンド目以降は、インプットライブラリを2つにわけ、片方は標的タンパク質存在下、もう片方は標的タンパク質非存在下でセレクションを行い、双方の核酸回収率を、qPCRの結果から評価した。パニングの各ラウンドの回収率(%)を以下の式により算出した。結果を表2に示す。

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

[表2]

Round	翻訳 PURE	ライブラリのイン プット核酸量 (分子)	標的タンパク質存在下		標的タンパク質非存在下	
			アウトプット 核酸量(分子)	回収率(%)	アウトプット 核酸量(分子)	回収率(%)
1	PURE1	1.11.E+14	2.34.E+08	2.11.E-04	—	—
2		3.35.E+11	3.59.E+06	1.07.E-03	3.04.E+05	9.07.E-05
3		3.66.E+11	2.82.E+08	7.72.E-02	5.90.E+06	1.61.E-03
4		4.16.E+11	3.41.E+09	8.19.E-01	1.37.E+06	3.30.E-04
1	PURE2	1.08.E+14	3.37.E+08	3.10.E-04	—	—
2		4.22.E+11	1.75.E+06	4.14.E-04	4.32.E+05	1.02.E-04
3		3.90.E+11	7.92.E+07	2.03.E-02	2.64.E+06	6.79.E-04
4		7.74.E+11	4.47.E+09	5.78.E-01	1.20.E+06	1.55.E-04
1	PURE3	9.87.E+13	1.75.E+08	1.77.E-04	—	—
2		2.58.E+11	5.40.E+05	2.09.E-04	4.54.E+04	1.76.E-05
3		3.45.E+11	2.43.E+08	7.06.E-02	3.37.E+06	9.77.E-04
4		7.37.E+11	4.88.E+09	6.61.E-01	1.17.E+06	1.59.E-04
1	PURE4	1.08.E+14	3.69.E+08	3.41.E-04	—	—
2		2.28.E+11	9.10.E+05	3.99.E-04	3.47.E+04	1.52.E-05
3		2.42.E+11	5.75.E+07	2.37.E-02	1.64.E+06	6.76.E-04
4		5.51.E+11	3.18.E+09	5.76.E-01	1.15.E+06	2.09.E-04

[0136] 結果、表2に示すように後半ラウンドにおいて標的タンパク質存在下と標的タンパク質非存在下のセクション間で回収率に差がついていることから、標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されている可能性が考えられる。

[0137] 実施例 1－3－3 濃縮配列の解析

パニングの各ラウンドのDNAプールの塩基配列解析を行い、濃縮配列の解析を行った。

[0138] 標的タンパク質存在下でセクションしたDNAプールにおいて翻訳されるペプチドの11残基目がAsp (SMe)である配列であり、最低1ラウンド以上で出現頻度が0.05%を上回り、直前のラウンドのプールを分割し標的を添加せずにパニングした場合に比べ、標的を添加した場合に出現頻度が10倍以上増加する配列を標的タンパク質下でのみ濃縮する配列として抽出した。

[0139] 本解析では主成分分析を用いて濃縮配列の特徴を評価した。主成分分析では、各配列から60の記述子(以下に示す)を算出し、各値の標準化を行ったのち、横軸は第1主成分、縦軸は第2主成分としてベクトル空間にマッピングした。ここで、記述子の算出には、化合物情報を扱うオープンソースのライブラリであるRDKit (<https://www.rdkit.org/>)を用いた。

[0140] 60の記述子の名前

'NumValenceElectrons', 'PEOE_VSA3', 'fr_Al_OH', 'fr_Al_OH_noTert', 'fr_Ar_N', 'fr_C_O_noCOO', 'fr_C_S', 'fr_HOCCN', 'fr_NH1', 'fr_Ndealkylation2', 'fr_Nhpyrrole', 'fr_SH', 'fr_alkyl_halide', 'fr_allylic_oxid', 'fr_aryl_methyl', 'fr_azide', 'fr_azo', 'fr_bicyclic', 'fr_diazo', 'fr_dihydropyridine', 'fr_epoxide', 'fr_ether', 'fr_furan', 'fr_halogen', 'fr_hdrzine', 'fr_hdrzone', 'fr_imidazole', 'fr_imide', 'fr_isocyan', 'fr_isothiocyan', 'fr_ketone', 'fr_ketone_Topliss', 'fr_lactam', 'fr_lactone', 'fr_methoxy', 'fr_morpholine', 'fr_nitrile', 'fr_nit

ro', 'fr_nitro_arom', 'fr_nitro_arom_nonortho', 'fr_nitroso', 'fr_oxazole', 'fr_phenol', 'fr_phenol_noOrthoHbond', 'fr_phos_acid', 'fr_phos_ester', 'fr_piperdine', 'fr_piperzine', 'fr_priamide', 'fr_prisulfonamd', 'fr_pyridine', 'fr_quatN', 'fr_sulfide', 'fr_sulfonamd', 'fr_sulfone', 'fr_term_acetylene', 'fr_tetrazole', 'fr_thiazole', 'fr_thiocyan', 'fr_thiophene'

[0141] 標的タンパク質下でのみ濃縮した配列との比較群として、PURE 1、PURE 2、PURE 3、及びPURE 4の4種類のコドン表の組み合わせからそれぞれ合成されうる11残基ペプチドランダム配列を1000配列生成させた。図1は、各コドン表のランダム配列(Random 1: PURE 1、Random 2: PURE 2、Random 3: PURE 3、Random 4: PURE 4)、図2は各コドン表の濃縮配列、図3はそれら濃縮配列(黒色で示す。)と全てのランダム配列(灰色で示す。各形状は、以下の無細胞翻訳系に対応する。○: PURE 1、△: PURE 2、□: PURE 3、×: PURE 4)を各主成分の値をプロットしたものである。

[0142] 図1～3において、数値ベクトルは実在するアミノ酸配列の特徴を示したベクトルであるため、近しいアミノ酸配列は似たベクトルとして表現される。

[0143] 図1において、4種類のランダム配列ではほとんどの各配列の値が近い値となったが、一部では一つのコドン表から生成された配列のみが有する値となった。つまり、おおむね4種類のコドン表から生成されるランダム配列は相互のアミノ酸配列と近しいが、1つのコドン表からでしか生成されないアミノ酸配列も同時に存在することが確認できる。

[0144] 図2、3において濃縮配列がランダム配列と各配列の値が近い値となり、また一部の濃縮配列は特定のコドン表でのみ分布する値と近い値となった。すなわち、濃縮配列は、4種類のコドン表から生成されるアミノ酸配列と近しく、また4種類のコドン表から生成される配列の特徴を反映しており、一部のペプチドは複数のPUREを用いたことで得られた特徴の異なる配

列であることが確認できる。このことから、Split&Pool技術を使用した複数PURE systemによるパニングにより、1つのコドン表からだけでは得られない多様なアミノ酸配列を有するペプチドが濃縮されることが確認された。

[0145] 実施例2 Split&Pool技術を使用した複数ライブラリによるパニング

ランダム配列の長さが違うペプチドディスプレイライブラリを用いて、本手法で、標的タンパク質に結合する多様なペプチド配列群を取得可能か、mRNAディスプレイパニングを行い検証した。また本手法を用いず、予めランダム配列の長さが異なるライブラリを混ぜたものをライブラリとして用いて、mRNAディスプレイパニングを行い、この結果を比較対象とした。

[0146] Split&Pool技術を用いたパニングでは、4種類の長さのライブラリを用いて1種類のPUREで翻訳し、それぞれライブラリの長さに対応した4種類の逆転写プライマーを用いてペプチドディスプレイライブラリを調製した。そしてこれらのライブラリを混合したライブラリでセクションを行い、その後4種類のプライマーを用いたPCRで各PUREに対応するセクションライブラリをそれぞれ増幅し、これを繰り返した。

[0147] 比較条件のパニングでは4種類のライブラリを混ぜた後1種類のPUREで翻訳し、1種類の逆転写プライマーを用いてペプチドディスプレイライブラリを調製した。そしてセクション、PCRを行い、これを繰り返した。

[0148] 実施例2-1 パニング標的タンパク質の調製

パニングに使用する標的タンパク質として、大腸菌で発現・精製したグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を用いた。WO2022/138892に記載の手法に準じてC末端にHisタグ、TEVプロテアーゼ切断タグ、ビオチン化酵素認識タグを付加した、GST-HisTEVAviからGST-HisTEV-Bioを調製した。

[0149] 実施例2-2 ペプチドディスプレイライブラリの調製

実施例2-2-1 翻訳に使用するアシル化tRNAの合成

WO2018/143145およびWO2018/225864に記載の手法に準じてこれらで使用するアシル化tRNAを調製した。Asp (SM

e)、Phe (3-Cl)、Hph (3-Cl)、MeAla (3-Pyr)、MeGly、MeHnl (7-F2)、MeHph、MeSer (nPyr)、MeSer (tBuOH)、Nle、Pro (4-pip-4-F2)、Pic (2)、Ser (3-F-5-Me-Pyr)、Ser (NtBu-Aca)、Ser (Ph-2-Cl)、Ser (iPen)、cisPro (4-pip-4-F2)、D-MeSer、nBuGlyを含む19種類のアミノ酸を用いて、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物を調製した。それぞれのアシル化tRNAの翻訳液中の最終濃度は10 μ M~20 μ Mであった。Pnaz保護のpCpAアミノ酸は、脱保護を実施せずにフェノール抽出以降の作業を行った。Initiatorアミノアシル化tRNAはWO 2018/225864に記載のAcbz-MeCys(StBu)-tRNA^{fMet}CAUと同一化合物であり、最終濃度が25 μ Mになるように翻訳液中に添加して用いた。

[0150] 実施例2-2-2 ペプチドライブラリをコードするランダム化された2本鎖DNAライブラリ

鋳型DNAとして、NNBのトリプレットがランダムに5回、7回、9回または11回繰り返して出現する合成DNAオリゴを用意した (IDT社) (配列番号: 16、17、18、19)。下記配列中、「N」は、A、T、G、Cの4種類のDNA塩基のうちいずれか1つを意味し、各「N」は互いに同一であっても異なってもよい。「B」は、T、G、Cの3種類のDNA塩基のうちいずれか1つを意味し、各「B」は互いに同一であっても異なってもよい。これらのそれぞれの0.01 μ M合成オリゴと1 μ M合成オリゴDNA1 (配列番号20)、Rvプライマー1-2 (配列番号: 9)、1x PrimeSTAR Buffer、0.2 mM dNTP、0.025 U/ μ L PrimeSTAR HS DNA polymerase (TAKARA) を混合し、95℃で2分加熱後、95℃で10秒、57℃で20秒、72℃で30秒のサイクルを10サイクル繰り返し、4種類の2本鎖DNAライブラリ (配列番号21~24) を調製した。そしてWO 2013/100132に記載の方法に準じてこれらを用いてmRNA-ピューロマイシンリンカーライゲーション産物を調製し、使

用した。

7 残基 D N A オリゴ (配列番号 1 6)

GAGATATAAATATG(NNB)₅TAGCCGACCGGCACCGGC

9 残基 D N A オリゴ (配列番号 1 7)

GAGATATAAATATG(NNB)₇TAGCCGACCGGCACCGGC

1 1 残基 D N A ライブラリ (配列番号 1 8)

GAGATATAAATATG(NNB)₉TAGCCGACCGGCACCGGC

1 3 残基 D N A ライブラリ (配列番号 1 9)

GAGATATAAATATG(NNB)₁₁TAGCCGACCGGCACCGGC

合成 D N A オリゴ 1 (配列番号 2 0)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG

7 残基 D N A ライブラリ (配列番号 2 1)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(NNB)₅TAGCCGACCGGCACCGGCACCGGCAAAAAAA

9 残基 D N A ライブラリ (配列番号 2 2)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(NNB)₇TAGCCGACCGGCACCGGCACCGGCAAAAAAA

1 1 残基 D N A ライブラリ (配列番号 2 3)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(NNB)₉TAGCCGACCGGCACCGGCACCGGCAAAAAAA

1 3 残基 D N A ライブラリ (配列番号 2 4)

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATG(NNB)₁₁TAGCCGACCGGCACCGGCACCGGCAAAAAAA

[0151] 実施例 2-2-3 ペプチドディスプレイライブラリの翻訳・環化

翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いた。具体的には、1 mMのGTP、1 mMのATP、20 mMのクレアチンリン酸、50 mMのHEPES-KOH pH 7.6、100 mMの酢酸カリウム、4 mMの酢酸マグネシウム、2 mMのスペルミジン、1 m

Mのジチオスレイトール、1 mg/mL E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社) (Nucleic Acids Research, 2010, Vol. 38, No. 6 e89に記載の方法で、一部のtRNAを除去している)、4 μ g/mLのクレアチンキナーゼ、6.72 U/mLのミオキナーゼ、2 unit/mLの無機ピロフォスファターゼ、1.1 μ g/mLのヌクレオシドニリン酸キナーゼ、0.26 μ MのEF-G、2.7 μ MのIF1、0.4 μ MのIF2、1.5 μ MのIF3、40 μ MのEF-Tu、59 μ MのEF-Ts、1.2 μ Mのリボソーム、1 μ MのGlyRS、0.04 μ MのIleRS、0.16 μ MのProRS、0.09 μ MのThrRS、0.11 μ MのLysRS、0.5 μ Mの変異体PheRS (WO2016/148044)、1.37 μ MのAlaRS、1 μ Mの変異体ValRS (WO2016/148044)、1 μ Mの変異体SerRS (WO2016/148044)、3 μ Mのin vitro転写大腸菌tRNA Ala1B、250 μ Mのグリシン、10 μ Mのイソロイシン、250 μ Mのプロリン、250 μ Mのスレオニン、250 μ Mのリジン、5 mMのN-メチルフェニルアラニン、5 mMのN-メチルバリン、5 mMのN-メチルセリン、2.5 mMのN-メチルアラニン、Elongatorアミノアシル化tRNA混合物、25 μ M Initiatorアミノアシル化tRNA (WO2020/138336A1)、0.5 μ M Penicillin G Amidase (PGA)、1 μ MのEF-P-Lys、0.4 unit/ μ LのRNasin (登録商標) Ribonuclease Inhibitor (PROMEGA社)、前述の二本鎖DNAライブラリからWO2013/100132に従って調製したmRNA-ピューロマイシン連結体を1 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37°Cで1時間静置することで翻訳を行った。

[0152] 実施例2-3 パニング

翻訳したディスプレイライブラリを使用しWO2013/100132に倣ってパニングを5ラウンド実施した。

[0153] 実施例2-3-1 ディスプレイライブラリの逆転写

Split&Pool技術を用いたパニングではイニシャルライブラリがNNBを7残基もので翻訳・環化・脱硫・精製したディスプレイライブラリにはRTプライマー5（配列番号25）、NNBを9残基ものではRTプライマー2（配列番号5）、NNBを11残基ものではRTプライマー6（配列番号26）、NNBを13残基ものではRTプライマー7（配列番号27）を逆転写プライマーとして使用した。具体的には翻訳、環化、脱硫、及び精製した24 μ L ディスプレイライブラリ溶液にPUREの種類に対応する3 μ M 逆転写プライマー、50 mM TrisHCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、0.5 mM dGTP、0.5 mM dATP、0.5 mM dCTP、0.5 mM dTTP、8 U/ μ L M-MLV Reverse transcriptase(H-) (Promega社、カタログ#M368B)になるよう加えNuclease free waterでメスアップし、30 μ L溶液で42°C、60分間保温し、逆転写反応を行った。この逆転写液に対して1 x TBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社)のバッファーを加えて0.25 μ M ディスプレイライブラリとした。その後ラウンド1では各4種類のディスプレイライブラリを7残基：9残基：11残基：13残基=1：1：10：10の比率で混合し1つのディスプレイライブラリ溶液とした。ラウンド2以降では等量混合して使用した。

RTプライマー5（配列番号25）

AAACACGTGGCAAACATTCCAAACCGGAGCCATACAGTACTTTTTTTgccggtgccggtg

RTプライマー6（配列番号26）

AAACACGTGGCAAACATTCCAACGATGATGCTCACTCTCGTTTTTTTgccggtgccggtg

RTプライマー7（配列番号27）

AAACACGTGGCAAACATTCCAAGACGATCCGAGCCATTACTTTTTTTgccggtgccggtg

[0154] 比較条件の混合ライブラリによるパニングではイニシャルライブラリとして7残基：9残基：11残基：13残基=1：1：10：10の比率で混合したものを準備し、これを用いて翻訳、環化、脱硫、及び精製した24 μ Lのディスプレイライブラリ溶液に対して3 μ M Rvプライマー1-1（配

列番号3)、50 mM TrisHCl (pH8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、0.5 mM dGTP、0.5 mM dATP、0.5 mM dCTP、0.5 mM dTTP、8 U/μL M-MLV Reverse transcriptase (H-) (Promega社、カタログ#M368B)を加えNuclease free waterでメスアップし、30 μL溶液で42℃、60分間保温し、逆転写反応を行った。この逆転写液に対して1×TBS、2 mg/mL BSA (Invitrogen社)のバッファーを加えて0.25 μM ディスプレイライブラリとした。

[0155] 実施例2-3-2 パニング

ラウンド1～4では、Streptavidinコーティング磁気ビーズに、GST-HisTev-Bioが0.4 μMになるように固定した後、それぞれ4種類のディスプレイライブラリに加えて、4℃で1時間反応させた。反応後に、マグネットで集めて上清を除いたビーズを、tTBS (ナカライテスク社製)で数回洗浄後、TEVプロテアーゼ認識配列を認識し切断するTEVプロテアーゼにより処理し核酸の溶出を行った。

[0156] 具体的なTEV溶出液として、1xTEV buffer、10 mM DTT、0.1 U/μL AcTEVプロテアーゼ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、#12575015)を、洗浄後のビーズに添加し反応させた。反応後、上清を回収した。

[0157] Split&Pool技術を用いたパニングではライブラリ認識プライマー (Fwプライマー (配列番号8)、Rvプライマー2 (配列番号11))でPCRした。

[0158] PCR産物とFwプライマー (配列番号8)とRvプライマー7 (配列番号28)またはRvプライマー4 (配列番号13)またはRvプライマー8 (配列番号29)またはRvプライマー9 (配列番号30)を用いてPCRを行い各ライブラリ由来のPCR産物を4種類得た。

Rvプライマー7 (配列番号28)

AAACCGGAGCCATACAGTAC

R v プライマー 8 (配列番号 29)

AACGATGATGCTCACTCTCG

R v プライマー 9 (配列番号 30)

AAGACGATCCGAGCCATTAC

- [0159] その後各4種類のPCR産物それぞれとFwプライマー(配列番号8)、Rvプライマー1-2(配列番号9)でPCRをして次のラウンドのインプットライブラリとした。Rvプライマー7由来のものは7残基、Rvプライマー4由来のものは9残基、Rvプライマー8由来のものは11残基、Rvプライマー9由来のものは13残基イニシャルDNAライブラリ由来のものとして次のラウンド以降の操作を繰り返した。
- [0160] また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、各ラウンドの各ライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー(Fwプライマー(配列番号8)、Rvプライマー7(配列番号28)またはRvプライマー4(配列番号13)またはRvプライマー8(配列番号29)またはRvプライマー9(配列番号30))を使用した。qPCRの反応液は、1x Ex taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μM Fwプライマー、0.5 μM Rvプライマー、200000倍希釈SYBR Green I (Lonza社製、カタログ#50513)、0.02 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA社製)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃で10秒、57℃で20秒、72℃で30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。
- [0161] 混合ライブラリによるパニングではライブラリ認識プライマー(Fwプライマー(配列番号8)、Rvプライマー1-2(配列番号9))でPCRして、次のラウンドのインプットライブラリとした。
- [0162] また、TEV溶出産物の一部を使用してqPCRを行い、各ラウンドのライブラリの回収率を評価した。qPCRのプライマーには、前述のプライマー(Fwプライマー(配列番号8)、Rvプライマー1-1(配列番号3))を使用した。qPCRの反応液は、1x Ex taq buffer、0.2 mM dNTP、0.5 μM Fwプライマー、0.5 μM Rvプライマー、200

000倍希釈SYBR Green I (Lonza社製、カタログ#50513)、0.02 U/μL Ex Taq polymerase (TAKARA社製)を混合し、95℃で2分加熱後、95℃で10秒、57℃で20秒、72℃で30秒のサイクルを40サイクル繰り返した。

[0163] ライブラリの回収率を見積もる検量線を引くために、インプットライブラリを、 $1 \text{ E} + 8 / \mu \text{L}$ 、 $1 \text{ E} + 6 / \mu \text{L}$ 、 $1 \text{ E} + 4 / \mu \text{L}$ 、になるように希釈し、同様の条件のqPCRにかけた。

[0164] 2ラウンド目以降は、インプットライブラリを2つにわけ、片方は標的タンパク質存在下、もう片方は標的タンパク質非存在下でセレクションを行い、双方の核酸回収率を、qPCRの結果から評価した。パニングの各ラウンドの回収率(%)を以下の式により算出した。結果を表3に示す。

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

[表3]

Round	Panning initial library	ライブラリのイ ンพุット核酸量 (分子)	標的タンパク質存在下		標的タンパク質非存在下	
			アウトプット 核酸量 (分子)	回収率(%)	アウトプット 核酸量 (分子)	回収率(%)
1	7 残基	3.33.E+10	1.08.E+04	3.23.E-05	-	-
2		1.06.E+11	1.55.E+06	1.46.E-03	3.29.E+05	3.10.E-04
3		1.59.E+11	2.03.E+07	1.28.E-02	1.89.E+06	1.19.E-03
4		7.17.E+10	1.68.E+08	2.35.E-01	6.40.E+05	8.93.E-04
1	9 残基	4.62.E+10	2.17.E+04	4.70.E-05	-	-
2		1.25.E+11	1.38.E+06	1.10.E-03	8.28.E+05	6.62.E-04
3		3.10.E+11	6.00.E+07	1.94.E-02	5.04.E+06	1.63.E-03
4		7.85.E+10	1.91.E+08	2.44.E-01	3.62.E+05	4.61.E-04
1	11 残基	4.13.E+11	1.55.E+05	3.76.E-05	-	-
2		9.86.E+10	1.15.E+06	1.16.E-03	3.52.E+05	3.57.E-04
3		1.30.E+11	3.86.E+08	2.97.E-01	2.58.E+06	1.98.E-03
4		8.43.E+10	1.36.E+09	1.62.E+00	3.97.E+05	4.71.E-04
1	13 残基	4.52.E+11	1.06.E+05	2.34.E-05	-	-
2		1.23.E+11	1.41.E+06	1.14.E-03	5.04.E+05	4.10.E-04
3		2.31.E+11	1.76.E+07	7.64.E-03	4.12.E+06	1.78.E-03
4		6.73.E+10	1.86.E+08	2.77.E-01	4.60.E+05	6.84.E-04
1	7,9,11,13 残基混合	4.29.E+12	3.19.E+07	7.45.E-04	-	-
2		8.27.E+11	3.90.E+06	4.71.E-04	1.21.E+06	1.47.E-04
3		1.06.E+12	9.08.E+08	8.57.E-02	2.23.E+07	2.11.E-03
4		7.47.E+11	1.58.E+10	2.12.E+00	2.32.E+06	3.11.E-04

[0165] 結果、表3に示すように後半ラウンドにおいて標的タンパク質存在下と標的タンパク質非存在下のセレクション間で回収率に差がついていることから、標的タンパク質存在下においてのみ回収される分子が、各ラウンドのライブラリに存在し、それらがラウンドを重ねる毎に濃縮されている可能性が考えられる。

[0166] 実施例2-3-3 濃縮配列の解析

パニングの各ラウンドのDNAプールの塩基配列解析を行った。1アミノ酸残基のみ違う配列を同一クラスタとし、同一クラスタ内で一番リード数が大きい配列の最大NGSリード数で各配列の最大NGSリード数で割った時

の値が0.01より大きく、直前のラウンドのプール中を分割し標的を添加せずにパニングした場合に比べ、最低1ラウンドにおいて標的を添加した場合の出現頻度が0.05%以上かつその出現頻度が10倍以上増加する配列をNGS、PCRエラーにより出現した配列を除く標的タンパク質下でのみ濃縮する配列として抽出した。

[0167] 抽出した配列の数を、パニング結果ごとに表4に示す。表4中、「AA」はアミノ酸残基を示し、「7AA」、「9AA」、「11AA」及び「13AA」はそれぞれ、7残基イニシャルライブラリに出現する配列、9残基イニシャルライブラリに出現する配列、11残基イニシャルライブラリに出現する配列、13残基イニシャルライブラリに出現する配列を示す。

[表4]

Panning initial library	標的タンパク質下における濃縮配列数			
	7AA	9AA	11AA	13AA
7 残基	15	—	2	—
9 残基	—	17	2	—
11 残基	—	—	12	—
13 残基	—	—	2	5
7,9,11,13 残基混合	2	5	12	1

[0168] 結果、表4に示すように混合ライブラリによるパニングでは11残基のイニシャルライブラリ由来の配列が顕著に濃縮しており、それ以外のイニシャルライブラリ由来の配列が少ない一方、Split&Poolを用いたパニングにおいては混合ライブラリでは濃縮しにくい7、9、13残基のイニシャルライブラリ由来の配列も多く見出すことができしており、Split&Poolパニングにより多様なバインダー候補配列を見出すことができている。

請求の範囲

- [請求項1] 次の工程を含む、標的分子に結合し得る候補ペプチドをスクリーニングする方法。
- (1) バーコード化されたペプチド-核酸複合体を含む、複数の核酸ディスプレイライブラリを調製する工程であって、前記バーコード化されたペプチド-核酸複合体は核酸部分及びペプチド部分を含み、該核酸部分はバーコード配列と前記ペプチドをコードする核酸配列を含み、前記複数の核酸ディスプレイライブラリは、無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、工程、
- (2) 前記複数の核酸ディスプレイライブラリを混合し、混合核酸ディスプレイライブラリを調製する工程、
- (3) 前記混合核酸ディスプレイライブラリを標的分子に接触させる工程、
- (4) バーコードプライマーを用いて、標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸部分に対応する核酸を増幅する工程。
- [請求項2] 前記工程(1)が、ペプチドをコードする核酸を翻訳してペプチドを調製し、該ペプチドと前記核酸を連結させて、ペプチド-核酸複合体を調製することを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程(1)が、前記ペプチド-核酸複合体をバーコード化し、バーコード化されたペプチド-核酸複合体を調製することを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記バーコード化が、前記ペプチド-核酸複合体の核酸部分を逆転写することである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記バーコード化が、前記ペプチド-核酸複合体の核酸部分を、バーコード配列を含む第一のプライマーで逆転写することである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項6] 前記複数の核酸ディスプレイライブラリが、核酸ディスプレイライブラリごとに異なるバーコード配列を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記複数の核酸ディスプレイライブラリが、互いに異なる無細胞翻訳系を用いて、それぞれ別々に翻訳された核酸ディスプレイライブラリである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 前記工程（2）において、2以上の核酸ディスプレイライブラリを混合する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 工程（3）と工程（4）の間に、前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体から、前記核酸部分を溶出する工程（3A）を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 工程（3）と工程（4）の間に、前記標的分子に結合したバーコード化されたペプチド-核酸複合体のペプチド部分のアミノ酸配列を同定する工程（3B）をさらに含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 工程（4）において、前記バーコードプライマーのバーコード配列と同じバーコード配列を有するバーコード化されたペプチド-核酸複合体の核酸を選択的に増幅する、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 前記バーコードプライマーが、バーコード配列を含む第二のプライマーである、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項13] 工程（1）～工程（4）を1サイクルとして、複数サイクルを繰り返す、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] 工程（4）の後または次のサイクルを始める前に、（5）バーコード配列を含まないプライマーを用いて、工程（4）で増幅した前記核酸をさらに増幅する工程をさらに含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 前記核酸ディスプレイライブラリが、 10^4 以上の多様性を有する

ライブラリである、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。