(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-513092
(P2022-513092A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/10 (2006.01)		C12N	15/10	ZZNA　4H045
C12N 15/11 (2006.01)		C12N	15/11	Z
C12N 15/115 (2010.01)		C12N	15/115	Z
C07K 16/00 (2006.01)		C07K	16/00	

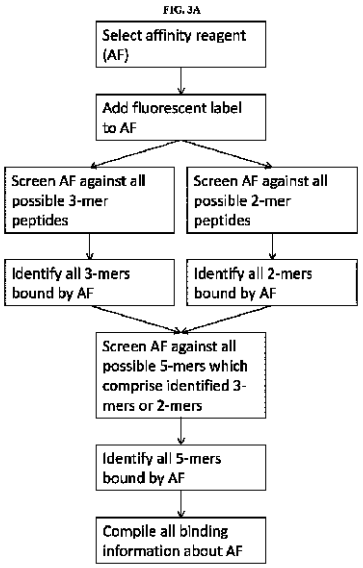
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全99頁）

(21)出願番号　特願2021-527883(P2021-527883)
(86)(22)出願日　令和1年11月20日(2019.11.20)
(85)翻訳文提出日　令和3年7月14日(2021.7.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/062482
(87)国際公開番号　WO2020/106889
(87)国際公開日　令和2年5月28日(2020.5.28)
(31)優先権主張番号　62/770,136
(32)優先日　平成30年11月20日(2018.11.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　521214746
ノーティラス・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(74)代理人　100114188
弁理士　小野 誠
(74)代理人　100119253
弁理士　金山 賢教
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉 道明
(74)代理人　100129713
弁理士　重森 一輝
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　親和性試薬の設計および選択

(57)【要約】
複数の配列構成において所望のペプチドエピトープに結合する親和性試薬を選択するための方法およびシステムを本明細書において提供する。該方法は、各ペプチドが配列αXβを有するペプチドライブラリーを得、該ペプチドライブラリーを用いて親和性試薬を選択することに依存し、このとき、Xは所望のペプチドエピトープであり、αおよびβは各々、アミノ酸を含む。
【選択図】図３Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
各ペプチドが式αＸβの配列を含む第１の複数のペプチドを含む第１のペプチドライブラリーを得ること、式中、Ｘは所望のエピトープであり、αおよびβは、既知のアミノ酸配列を含むフランキングドメインである；
前記第１のペプチドライブラリーを複数の親和性試薬に曝露し、それにより前記複数の親和性試薬の少なくとも１つの親和性試薬を前記第１のペプチドライブラリーに結合させること；
前記第１の複数のペプチドに結合された前記少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それにより縮小された親和性試薬プールを形成すること；
各ペプチドが式γＸδの配列を含む第２の複数のペプチドを含む第２のペプチドライブラリーを得ること、式中、Ｘは所望のエピトープであり、γおよびδは、既知のアミノ酸配列を含むフランキングドメインである；
前記第２のペプチドライブラリーを前記縮小された親和性試薬プールに曝露し、それにより前記縮小された親和性試薬プールの少なくとも１つの親和性試薬を前記第２のペプチドライブラリーに結合させること；ならびに
前記縮小された親和性試薬プールのうち前記第２のペプチドライブラリーに結合された少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それにより前記エピトープＸに対する親和性試薬を同定すること
を含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法。
【請求項２】
αおよびβが同じアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
αおよびβが異なるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
αおよびβがγおよびδと異なるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
αおよびβが、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
αおよびβが、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
γおよびδが、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
γおよびδが、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１２】
前記不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記複数の親和性試薬のうち前記第１のペプチドライブラリーに結合された前記少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記縮小された親和性試薬プールのうち前記第２のペプチドライブラリーに結合された前記少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
前記第１または第２のペプチドライブラリー内の前記ペプチドがネイティブ状態である、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記ペプチドの第１または第２のライブラリー内の前記ペプチドが非ネイティブ状態である、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
前記非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態である、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記少なくともオンの親和性試薬が１つより多くのエピトープと結合する、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
前記異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、前記化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、請求項１９、２０または２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、前記化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、請求項１９、２０または２１に記載の方法。
【請求項２４】
前記第１のペプチドライブラリーを前記複数の親和性試薬に曝露する工程および前記少なくとも１つの親和性試薬の前記（１つまたは複数の）配列を決定する工程を１回またはそれより多くの回数繰り返すことを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
前記第２のペプチドライブラリーを前記縮小された親和性試薬プールに曝露する工程および前記少なくとも１つの親和性試薬の前記（１つまたは複数の）配列を決定する工程を１回またはそれより多くの回数繰り返すことを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
前記複数の親和性試薬の親和性試薬が、オリゴヌクレオチド、ペプチマー、ミニタンパク質バインダー、抗体、抗体断片またはその組合せを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
前記複数の親和性試薬の親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項２８】
第１の媒体中のペプチドライブラリー内の複数のペプチドを第２の媒体中の親和性試薬プール内の複数の親和性試薬と接触させ、ペプチド－親和性試薬複合体を形成すること、前記ペプチド－親和性試薬複合体の各々はペプチドおよび少なくとも１つの結合している親和性試薬を含み、前記ペプチドの各々はエピトープＸを含む；
前記ペプチド－親和性試薬複合体を収集すること；
未結合の親和性試薬を分離すること；ならびに
前記ペプチド－親和性試薬複合体の前記親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それによりエピトープＸに対する少なくとも１つの親和性試薬を同定すること
を含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法。
【請求項２９】
前記ペプチドライブラリー内の前記ペプチドがネイティブ状態である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記ペプチドライブラリー内の前記ペプチドが非ネイティブ状態である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
前記非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
すべての工程をネイティブ状態の前記複数のペプチドで繰り返すことをさらに含む、請求項３０または３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ネイティブ状態のエピトープＸに対する前記少なくとも１つの親和性試薬が前記非ネイティブ状態のエピトープＸに対する前記少なくとも１つの親和性試薬と異なる、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記ネイティブ状態のエピトープＸに対する前記少なくとも１つの親和性試薬が前記非ネイティブ状態のエピトープＸに対する前記少なくとも１つの親和性試薬と同じである、請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
前記エピトープＸが１つより多くの親和性試薬と結合する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３６】
前記少なくとも１つの親和性試薬が１つより多くのエピトープと結合する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３７】
前記１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、前記化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、請求項３７、３８または３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、前記化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、請求項３７、３８または３９に記載の方法。
【請求項４２】

前記複数の親和性試薬の親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項４３】
前記複数のペプチドに結合された前記少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定することが：
前記少なくとも１つの親和性試薬を前記複数のペプチドから分離すること；および
前記少なくとも１つの親和性試薬をシーケンシングし、それにより前記少なくとも１つの親和性試薬の前記（１つまたは複数の）配列を決定すること
を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項４４】
$S_1S_2S_3$の構造を含む親和性試薬であって、S_1およびS_3は、相補的なアダプターに結合することができるアダプタードメインであり、S_2はエピトープ結合ドメインであり、前記エピトープ結合ドメインは１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する親和性試薬。
【請求項４５】
前記親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項４６】
前記アダプタードメインが次世代シーケンシングアダプターである、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項４７】
S_1またはS_3がバーコードを含む、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項４８】
S_2が約９０個以下のヌクレオチドを含む、請求項４５に記載の親和性試薬。
【請求項４９】
S_2が約６０個以下のヌクレオチドを含む、請求項４８に記載の親和性試薬。
【請求項５０】
S_2が約３０個以下のヌクレオチドを含む、請求項４９に記載の親和性試薬。
【請求項５１】
前記親和性試薬が１つより多くのエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項５２】
前記親和性試薬が１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-9}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、請求項５１に記載の親和性試薬。
【請求項５３】
前記親和性試薬が１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-12}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、請求項５２に記載の親和性試薬。
【請求項５４】
前記少なくとも１つの親和性試薬が１つより多くのエピトープと結合する、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項５５】
前記１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、請求項５４に記載の親和性試薬。
【請求項５６】
前記縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、請求項５５に記載の親和性試薬。
【請求項５７】
前記縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、請求項５５に記載の親和性試薬。
【請求項５８】
前記異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、前記化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、請求項

５５、５６または５７に記載の親和性試薬。
【請求項５９】
前記異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、前記化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、請求項５５、５６または５７に記載の親和性試薬。
【請求項６０】
前記親和性試薬が１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに結合するのは前記ペプチドがネイティブ状態である場合である、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項６１】
前記親和性試薬が１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに結合するのは前記ペプチドが非ネイティブ状態である場合である、請求項４４に記載の親和性試薬。
【請求項６２】
前記非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態を含む、請求項６１に記載の親和性試薬。
【請求項６３】
複数の親和性試薬を含む親和性試薬プールであって；
前記複数の親和性のうちの２つまたはそれより多くの親和性試薬が構造$S_1S_2S_3$を含み、ここで、S_1およびS_3は共通のアダプタードメインを含み、S_2はエピトープ結合ドメインを含む；ならびに
前記２つまたはそれより多くの親和性試薬のうちの第１の親和性試薬は、ペプチドエピトープX_1に対する特性評価済みの特異性を有する第１のドメインS_2を含み、前記２つまたはそれより多くの親和性試薬のうちの第２の親和性試薬は、ペプチドエピトープX_2に対する特性評価済みの特異性を有する第２のドメインS_2を含み、前記第１のドメインS_2は前記第２のドメインS_2と異なる、
親和性試薬プール。
【請求項６４】
複数のペプチドを含むペプチドライブラリーを得ること、前記複数のペプチドのペプチドはその配列内に１つより多くのエピトープＸを含む；
前記ペプチドライブラリーを複数の親和性試薬を含む親和性試薬プールに曝露し、それにより少なくとも１つの親和性試薬を、その配列内に１つより多くのエピトープＸを含む前記ペプチドに結合させること；および
その配列内に１つより多くのエピトープＸを含む前記ペプチドに結合された前記少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それによりエピトープＸに対する親和性試薬を同定すること
を含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１８年１１月２０日に出願された米国特許仮出願第６２／７７０，１３６号の恩典を主張するものであり、この仮出願は引用により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
結合試薬の作成のための選択方法は典型的には、単一のエピトープまたはタンパク質に対して高い親和性と特異性を有する結合試薬が選択されるように設計される。一部の用途では、多種類のエピトープに結合する結合試薬を選択すること、または単一のタンパク質もしくはエピトープに特異的なものでない結合試薬の結合パターンを特性評価することが有用な場合があり得る。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】

【０００３】
本開示により、親和性試薬を選択および特性評価するための方法およびシステムを提供する。一部の実施形態において、本開示により、さまざまな配列構成のエピトープに結合する親和性試薬が選択されるアプローチを提供する。本明細書に記載の方法およびシステムはまた、親和性試薬の結合パターンおよびエピトープに対する親和性試薬の結合に対する配列構成の効果を性評価するためにも使用され得る。さらに、本明細書に記載の方法およびシステムは、多種類のエピトープに結合する、例えば同じ長さを有する多種類のエピトープに結合する親和性試薬を特性評価および選択するために使用され得る。同じ長さの多種類のエピトープにおける寛容性（ｐｒｏｍｉｓｃｕｉｔｙ）を実証することにより、特定の１つの親和性試薬の使用で、配列が、該特定の１つの親和性試薬が結合する多種類のエピトープのうちの少なくとも１種類のエピトープを含むと同定され得る。

【０００４】
一態様において、各ペプチドが式αＸβの配列を含む第１の複数のペプチドを含む第１のペプチドライブラリーを得ること（式中、Ｘは所望のエピトープであり、αおよびβは、既知のアミノ酸配列を含むフランキングドメインである）、第１のペプチドライブラリーを複数の親和性試薬に曝露し、それにより該複数の親和性試薬の少なくとも１つの親和性試薬を第１のペプチドライブラリーに結合させること、第１の複数のペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それにより縮小された親和性試薬プールを形成すること、各ペプチドが式γＸδの配列を含む第２の複数のペプチドを含む第２のペプチドライブラリーを得ること（式中、Ｘは所望のエピトープであり、γおよびδは、既知のアミノ酸配列を含むフランキングドメインである）、第２のペプチドライブラリーを該縮小された親和性試薬プールに曝露し、それにより該縮小された親和性試薬プールの少なくとも１つの親和性試薬を第２のペプチドライブラリーに結合させること、ならびに該縮小された親和性試薬プールのうち第２のペプチドライブラリーに結合された少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それにより該エピトープＸに対する親和性試薬を同定することを含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法を提供する。

【０００５】
一部の場合において、αおよびβは同じアミノ酸配列を含む。一部の場合において、αおよびβは異なるアミノ酸配列を含む。一部の場合において、αおよびβはγおよびδと異なるアミノ酸配列を含む。一部の場合において、αおよびβは、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合において、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列は、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む。一部の場合において、αおよびβは、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合において、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列は、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む。

【０００６】
一部の場合において、γおよびδは、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合において、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列は、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む。一部の場合において、γおよびδは、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合において、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列は、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む。

【０００７】
一部の場合において、該方法は、該複数の親和性試薬のうち第１のペプチドライブラリーに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む。一部の場合に

おいて、該方法は、該縮小された親和性試薬プールのうち第２のペプチドライブラリーに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む。

【０００８】

一部の場合において、第１または第２のペプチドライブラリー内のペプチドはネイティブ状態である。一部の場合において、該ペプチドの第１または第２のライブラリー内のペプチドは非ネイティブ状態である。一部の場合において、非ネイティブ状態は変性状態または部分的にフォールディングされた状態である。

【０００９】

一部の場合において、該少なくともオンの親和性試薬は１つより多くのエピトープと結合する。一部の場合において、該１つより多くのエピトープは縮重アミノ酸配列を含む。一部の場合において、縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる。縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、請求項２０に記載の方法。一部の場合において、該異なるアミノ酸は類似の化学的特性を含み、該化学的特性は、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される。一部の場合において、該異なるアミノ酸は非類似の化学的特性を含み、該化学的特性は、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される。

【００１０】

一部の場合において、該方法は、第１のペプチドライブラリーを該複数の親和性試薬に曝露する工程および該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定する工程を１回またはそれより多くの回数繰り返すことを含む。一部の場合において、該方法は、第２のペプチドライブラリーを該縮小された親和性試薬プールに曝露する工程および該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定する工程を１回またはそれより多くの回数繰り返すことを含む。

【００１１】

一部の場合において、該複数の親和性試薬の親和性試薬は、オリゴヌクレオチド、ペプチマー（ｐｅｐｔｉｍｅｒ）、ミニタンパク質バインダー、抗体、抗体断片またはその組合せを含む。一部の場合において、該複数の親和性試薬の親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む。

【００１２】

別の態様において、第１の媒体中のペプチドライブラリー内の複数のペプチドを第２の媒体中の親和性試薬プール内の複数の親和性試薬と接触させ、ペプチド－親和性試薬複合体を形成すること（該ペプチド－親和性試薬複合体の各々はペプチドおよび少なくとも１つの結合している親和性試薬を含み、該ペプチドの各々はエピトープＸを含む）、該ペプチド－親和性試薬複合体を収集すること、未結合の親和性試薬を分離すること、ならびに該ペプチド－親和性試薬複合体の該親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それによりエピトープＸに対する少なくとも１つの親和性試薬を同定することを含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法を提供する。

【００１３】

一部の場合において、該ペプチドライブラリー内のペプチドはネイティブ状態である。一部の場合において、該ペプチドライブラリー内のペプチドは非ネイティブ状態である。一部の場合において、非ネイティブ状態は変性状態または部分的にフォールディングされた状態である。一部の場合において、該方法は、すべての工程をネイティブ状態の該複数のペプチドで繰り返すことをさらに含む。一部の場合において、ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬は非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と異なる。一部の場合において、ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬は非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と同じである。一部の場合において、該エピトープＸは１つより多くの親和性試薬と結合する。

【００１４】

一部の場合において、該少なくとも１つの親和性試薬は１つより多くのエピトープと結合

する。一部の場合において、該１つより多くのエピトープは縮重アミノ酸配列を含む。一部の場合において、縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる。一部の場合において、縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる。一部の場合において、該異なるアミノ酸は類似の化学的特性を含み、該化学的特性は、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される。一部の場合において、該異なるアミノ酸は非類似の化学的特性を含み、該化学的特性は、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される。

【００１５】

一部の場合において、該複数の親和性試薬の親和性試薬はオリゴヌクレオチドを含む。

【００１６】

一部の場合において、該複数のペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定することは、該少なくとも１つの親和性試薬を該複数のペプチドから分離すること、および該少なくとも１つの親和性試薬をシーケンシングすること、それにより該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定することを含む。

【００１７】

別の態様において、$S_1S_2S_3$の構造を含む親和性試薬であって、S_1およびS_3は、相補的なアダプターに結合することができるアダプタードメインであり、S_2はエピトープ結合ドメインであり、該エピトープ結合ドメインは１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する親和性試薬を提供する。

【００１８】

一部の場合において、親和性試薬はオリゴヌクレオチドを含む。一部の場合において、アダプタードメインは次世代シーケンシングアダプターである。一部の場合において、S_1またはS_3はバーコードを含む。一部の場合において、S_2は約９０個以下のヌクレオチドを含む。一部の場合において、S_2は約６０個以下のヌクレオチドを含む。一部の場合において、S_2は約３０個以下のヌクレオチドを含む。

【００１９】

一部の場合において、親和性試薬は１つより多くのエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する。一部の場合において、親和性試薬は１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-9}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する。一部の場合において、親和性試薬は１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-12}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する。

【００２０】

一部の場合において、該少なくとも１つの親和性試薬は１つより多くのエピトープと結合する。一部の場合において、該１つより多くのエピトープは縮重アミノ酸配列を含む。一部の場合において、縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる。一部の場合において、縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる。一部の場合において、該異なるアミノ酸は類似の化学的特性を含み、該化学的特性は、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される。一部の場合において、該異なるアミノ酸は非類似の化学的特性を含み、該化学的特性は、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される。

【００２１】

一部の場合において、親和性試薬は１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに結合するのは該ペプチドがネイティブ状態である場合である。一部の場合において、親和性試薬は１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに結合するのは該ペプチドが非ネイティブ状態の場合である。一部の場合において、非ネイティブ状態は変性状態または部分的にフォールディングされた状態を含む。

【００２２】

別の態様において、複数の親和性試薬を含む親和性試薬プールであって、該複数の親和性のうちの２つまたはそれより多くの親和性試薬が構造$S_1S_2S_3$を含み、ここで、S_1

およびＳ３は共通のアダプタードメインを含み、Ｓ２はエピトープ結合ドメインを含む、ならびに該２つまたはそれより多くの親和性試薬のうちの第１の親和性試薬は、ペプチドエピトープＸ１に対する特性評価済みの特異性を有する第１のドメインＳ２を含み、該２つまたはそれより多くの親和性試薬のうちの第２の親和性試薬は、ペプチドエピトープＸ２に対する特性評価済みの特異性を有する第２のドメインＳ２を含み、第１のドメインＳ２は第２のドメインＳ２と異なる親和性試薬プールを提供する。

【００２３】

別の態様において、複数のペプチドを含むペプチドライブラリーを得ること（該複数のペプチドのペプチドはその配列内に１つより多くのエピトープＸを含む）、該ペプチドライブラリーを複数の親和性試薬を含む親和性試薬プールに曝露し、それにより少なくとも１つの親和性試薬を、その配列内に１つより多くのエピトープＸを含む該ペプチドに結合させること、およびその配列内に１つより多くのエピトープＸを含む該ペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それによりエピトープＸに対する親和性試薬を同定することを含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法を提供する。

【００２４】

参照による組み込み

本明細書において挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、引用により、あたかも個々の各刊行物、特許または特許出願が具体的に個々に示されて引用により組み込まれているのと同程度に本明細書に組み込まれる。

【００２５】

本発明の新規な特徴を添付の特許請求の範囲における詳述とともに示す。本発明の原理を使用している例示的な実施形態を示す以下の詳細説明および添付の図面を参照することにより本発明の特徴および利点のよりよい理解が得られよう。図面のうち：

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】図１は、一部の実施形態による、親和性試薬の選択のための固定化された標的を、該標的を含むペプチドの例示的な一覧とともに示す。

【図２】図２は、一部の実施形態による親和性試薬の選択プロセスのフローチャートを示す。

【図３Ａ】図３Ａは、一部の実施形態による、親和性試薬の特性評価のプロセスにおけるスクリーニング工程の例示的なフローチャートを示す。

【図３Ｂ】図３Ｂは、一部の実施形態による、エピトープＡＡＡに対する親和性試薬の結合におけるフランキング配列の効果を調べるためのスクリーニング工程を行うための５量体αＸβペプチドのアレイを示す。

【図４】図４は、本明細書において提供する方法を実行するためにプログラミングまたは別の様式で構成されたコンピュータ制御システムを示す。

【図５】図５は、異なる二次構造を有する長鎖配列内に組み込まれた標的の例を示す。図５Ａは、一部の実施形態による、アルファヘリックスペプチドの異なる領域内に標的が組み込まれた（チェック柄の四角で示す）アルファヘリックスを形成しているペプチドの例を示す。図５Ｂは、一部の実施形態による、ペプチドを形成しているベータシートの異なる領域内に標的が組み込まれた（黒四角で示す）ベータシートを形成しているペプチドの例を示す。

【図６】図６は、一部の実施形態による、アプタマー選択スクリーニングにおいて同定されたいくつかのアプタマーの標的結合を示す。

【図７】図７は、一部の実施形態による、同定されたアプタマーの予備特性評価を示す。

【図８】図８は、一部の実施形態による、同定されたアプタマーの予備特性評価を示す。

【図９】図９は、一部の実施形態による、合成されたペプチドの質量分析検証を示す。

【図１０】図１０は、一部の実施形態による、クラスター増幅の一例を示す。

【図１１】図１１は、一部の実施形態による、フローセル上でのアプタマークラスターに

対する蛍光標識したペプチド標的の結合を示す。
【図１２】図１２は、一部の実施形態による、ペプチド標的に対するいくつかのアプタマーの結合親和性を示す。
【図１３Ａ】図１３Ａは、アミノ酸配列ＬＲＤの反復を含むペプチドに対して試験した親和性試薬の無溶液ＳＥＬＥＸ濃縮データを示す。
【図１３Ｂ】図１３Ｂは、アミノ酸配列ＴＱＡの反復を含むペプチドに対して試験した親和性試薬の無溶液ＳＥＬＥＸ濃縮データを示す。
【図１４Ａ】図１４Ａは、アミノ酸配列ＹＳＬの反復を含むペプチドに対して試験した親和性試薬の磁性ビーズＳＥＬＥＸ濃縮データを示す。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、アミノ酸配列ＥＶＴを含むペプチドに対して試験した親和性試薬の磁性ビーズＳＥＬＥＸ濃縮データを示す。
【図１５Ａ】図１５Ａは、５００種類のペプチドに対してスクリーニングされた第１の親和性試薬の予測される三量体結合確率対真の結合確率の対数プロットを示す。
【図１５Ｂ】図１５Ｂは、図１５Ａのデータの非対数スケールでのプロットを示す。
【図１６Ａ】図１６Ａは、５００種類のペプチドに対してスクリーニングされた第２の親和性試薬の予測される三量体結合確率対真の結合確率の対数プロットを示す。
【図１６Ｂ】図１６Ｂは、図１６Ａのデータの非対数スケールでのプロットを示す。
【図１７Ａ】図１７Ａは、５００種類のペプチドに対してスクリーニングされた第３の親和性試薬の予測される三量体結合確率対真の結合確率の対数プロットを示す。
【図１７Ｂ】図１７Ｂは、図１７Ａのデータの非対数スケールでのプロットを示す。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
生命科学全体にわたって、特異的なタンパク質、代謝産物、細胞または細胞境界部結合できる親和性試薬の開発には相当な関心がみられる。最近になって、親和性試薬の選択手法は非天然のヌクレオチドおよびアミノ酸を包含するように拡張されている。このようなアプローチの目的は、所与のエピトープに排他的に結合する試薬を開発することである。
【００２８】
結合の排他性は、親和性試薬における望ましい特質であると考えられる。親和性試薬がたった１つのタンパク質に結合し、他のタンパク質に対する結合は最小限であることを確実にするために相当な取り組みがなされている。これに対する例外は、機能的に重要な残基、例えばホスホ－チロシンに対して生じる抗体である。
【００２９】
親和性試薬が直面している具体的な課題の１つは状況依存性であり得る。例えば、親和性試薬は１つのコアエピトープに完璧に結合し得るが、フランキング残基に依存して良好に結合するか、または全く結合しないかにバイアスがかかることがあり得る。例えば、ペプチドｎ－Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ｉｌｅ－Ｓｅｒ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｌｅｕに対する親和性試薬を作成する場合、該試薬は、ｎ－末端残基がＧｌｙである場合の方がＳｅｒである場合より良好に結合し得る。
【００３０】
任意の単一のタンパク質に特異的でない親和性試薬を作成することは一般的には望ましくないことであり得るが、多くのタンパク質に存在するかもしれない１つまたはそれより多くのペプチドに特異的である親和性試薬を有することが最適であり得る特別使用の場合がある。
【００３１】
用語「エピトープ」は、本明細書で用いる場合、巨大分子、例えばタンパク質またはペプチドの一部であって、親和性試薬によって認識されるものを示し得る。一部の場合において、エピトープは、抗体によって認識されるタンパク質またはペプチドの一部であり得る。一部の場合において、エピトープは、抗体断片によって認識されるタンパク質またはペプチドの一部であり得る。一部の場合において、エピトープは、アプタマーによって認識されるタンパク質またはペプチドの一部であり得る。一部の場合において、エピトープは

、ペプチドによって認識されるタンパク質またはペプチドの一部であり得る。
【００３２】
用語「抗原性」は、本明細書で用いる場合、化学構造体（抗原、ハプテン、エピトープまたはアミノ酸配列のいずれか）が適応免疫を有するある特定の産物群またはあるクラスの親和性試薬に特異的に結合する能力を示し得る。用語「抗原性」は、用語「アプタ原性（ａｐｔａｇｅｎｉｃｉｔｙ）」－化学構造体がアプタマーによって認識される能力と互換的に使用され得る。また、用語「抗原性」は、化学構造体が親和性試薬一般によって認識される能力を示す用語「親和性試薬原性」とも互換的に使用され得る。
【００３３】
本明細書に記載の方法は、所望の特性を有する親和性試薬を作成するために使用され得る。例えば、本明細書に記載の方法は、アプタマーを粒子上に固定化させた場合、バッファー洗浄後もペプチド標的がアプタマーに結合されたままであり、およそ１５分後またはそれ以降におけるシグナルの減損が１０％未満であるようなアプタマーを作成するために使用され得る。別の一例において、本明細書に記載の方法は、アプタマーを粒子上に固定化させた場合、バッファー洗浄後、結合しているペプチド標的由来の結合シグナルが溶出バッファーの存在下でおよそ１５秒後またはそれ以内に検出不能なレベルまで低減されるようなアプタマーを作成するために使用され得る。別の一例において、本明細書に記載の方法は、アプタマー結合特性が、フランキングアミノ酸残基具体物の混合物を含む標的ペプチドの存在下で保存されるようなアプタマーを作成するために使用され得る。一部の場合において、固定化した場合に結合特性が保存されるアプタマーが所望され得る。
【００３４】
親和性試薬の選択
新規な親和性試薬は当該技術分野で知られた任意の方法によって作成され得る。親和性試薬を開発する方法としては、試験管内進化法（Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）（ＳＥＬＥＸ）、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、昆虫細胞ディスプレイ、リボソームディスプレイ、粒子ディスプレイ、ペプチマー進化、ペプチマー設計および播種が挙げられる。例示的な親和性試薬としては、オリゴマー、アプタマー、ペプチマー、抗体、抗体断片、ミニタンパク質バインダー、合成分子および／またはその組合せが挙げられ得る。一部の例では、親和性試薬が構造に基づく薬物設計法を用いて設計され得る。構造に基づく薬物設計（または直接薬物設計）には対象エピトープおよび親和性試薬の結合部位の三次元構造の知識が利用される。
【００３５】
一部の場合において、本開示の親和性試薬は配列構成に関係なく所望のエピトープに結合する能力で選出され得る。一部の実施形態において、親和性試薬は、タンパク質が部分的または完全に変性した構成である場合に所望のエピトープ結合するように設計され得る。一部の実施形態において、本開示の親和性試薬は、フォールディング構成またはアンフォールディング構成のタンパク質内の所望のエピトープに結合する能力で選出され得る。一部の実施形態において、変性しているタンパク質には、そのタンパク質内に微小なフォールディングが含まれ得るか、あるいは生じ得る。一部の実施形態において、所望のエピトープＡＡＡを認識するために選出される親和性試薬は等しく良好に、またはほぼ等しく良好に、配列ＡＡＡを含むすべてのペプチドに結合し得る。一部の場合において、本開示の親和性試薬は、エピトープの配列構成または構造構成に従って異なる親和性を有する所望のエピトープであり得る。一部の場合において、本開示の親和性試薬は配列構成に関係なくいくつかの異なるエピトープに結合し得る。一部の場合において、本開示の親和性試薬は、配列構成に依存する異なる親和性でいくつかの異なるエピトープに結合し得る。一部の場合において、本開示の親和性試薬はタンパク質エピトープに、該エピトープのアミノ酸配列に基づいてではなく該エピトープの化学的または物理的特性に基づいて結合するように設計され得る。例えば、親和性試薬はエピトープに局在電荷、局在立体相互作用、疎水性、親水性、酸性度、塩基性度および任意の他の化学的または物理的特性に基づいて結

合する場合もあり、これらに基づいて結合しない場合もあり得る。

【００３６】

本開示の親和性試薬（例えば、アプタマー、ペプチマー、ミニタンパク質バインダーなど）は、所望のレベルの結合寛容性を有することで選出され得る。結合寛容性は、親和性試薬が１つより多くの特異的エピトープに結合する能力を示し得る。非寛容性の親和性試薬は、単一のエピトープに対する結合特異性しか有しない任意の親和性試薬であり得る。寛容性の親和性試薬は、１つより多くのエピトープに対する結合特異性を有する任意の親和性試薬であり得る。親和性試薬の寛容性は、エピトープが一群の（ｆａｍｉｌｙ）エピトープに結合する能力を示し得る。一部の場合において、一群のエピトープは、共通するアミノ酸構造が関連しているものであり得る。例えば、一群のエピトープは、構造ＧλＧを有するものであり得、このとき、λは任意のアミノ酸であり得る（例えば、ＧＲＧ、ＧＨＧ、ＧＫＧ、ＧＤＧなど）。一部の場合において、一群のエピトープは、共通する化学的特性が関連しているものであり得る。例えば、一群のエピトープは、すべてが疎水性側鎖を有する３個のアミノ酸のエピトープ（例えば、ＡＡＶ、ＡＩＭ、ＷＬＶなど）を含むものであり得る。一部の場合において、寛容性の親和性試薬は、識別可能な配列または構造モチーフを有しないランダムな一組のエピトープに結合するものであり得る。一部の場合において、特性評価されていない寛容性の親和性試薬は、既知の一組または特性評価されている一組のペプチドまたはタンパク質内の未知の一組のエピトープに結合するものであり得る。

【００３７】

親和性試薬は、約２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００または１０００より多くのエピトープに結合するならば寛容性であり得る。親和性試薬は、少なくとも約２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００または１０００より多くのエピトープに結合するならば寛容性であり得る。親和性試薬は、約１０００以下、９００、８００、７００、６００、５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、９つ、８つ、７つ、６つ、５つ、４つ、３つまたは３つ未満のエピトープに結合するならば寛容性であり得る。

【００３８】

親和性試薬の結合寛容性は二項様式または確率的様式で特性評価され得る。結合寛容性の二項式特性評価は、親和性試薬が既知のすべてのエピトープに対して結合するか、または結合しないかを評価することを含み得る（例えば、ＡＲＡ－結合する；ＡＨＡ－結合する；ＡＫＡ－結合しない；ＡＤＡ－結合するなど）。結合寛容性の確率的特性評価は、特定の結合条件下または一連の結合条件下で既知のエピトープに対する親和性試薬の結合が検出される尤度を評価することを含み得る（例えば、ＡＲＡ－７５％の結合変化；ＡＨＡ－８１％の結合見込み；ＡＫＡ－０．０５％の結合見込み；ＡＤＡ－６１％の結合見込みなど）。親和性試薬は、エピトープ結合の閾値尤度を有することが測定されれば、エピトープに結合するとみなされ得る。親和性試薬は、所与の条件でエピトープとの約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％または９９．９％より高い結合見込みを有することが測定されれば、エピトープに結合するとみなされ得る。親和性試薬は、所与の条件でエピトープとの少なくとも約４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％または９９．９％より高い結合見込みを有することが測定されれば、エピトープに結合するとみなされ得る。親和性試薬は、所与の条

件でエピトープとの約９９．９％以下、９９．５％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％または４０％より低い結合見込みを有することが測定されれば、エピトープに結合するとみなされ得る。

【００３９】

一部の場合において、かかる親和性試薬の同定は、３工程スクリーニングプロセス：１）エピトープを含む標的に対する結合に関する初期スクリーニング、２）該エピトープおよび／または該エピトープのバリアントに対する親和性試薬の結合を特性評価するためのペプチドレベルでの適格性スクリーニング、ならびに３）工程２の結合特性評価スクリーニングを確認するためのタンパク質レベルでのスクリーニングにより行われ得る。一部の場合において、工程３は、工程２の前または一部が工程２の前に行われ得る。一部の場合において、工程２は省かれ得、工程３で充分に親和性試薬の結合が特性評価され得る。一部の場合において、親和性試薬を判定するための工程３を省いてもよい。

【００４０】

一部の場合において、所望のエピトープはペプチドであり得る。一部の場合において、いくつかの異なるエピトープが所望され得、この場合、該所望のエピトープに結合する親和性試薬が選択され得る。一部の場合において、所望のエピトープまたは標的エピトープは一群のエピトープを含むものであり得る。一部の場合において、該一群のエピトープは、縮重配列を有するエピトープを含むものであり得る。例えば、一群のエピトープは、ＥＸＥを含むアミノ酸配列を有するエピトープを含むものであり得、このとき、Ｘは任意のアミノ酸である。また、縮重配列を含む一群のエピトープを化学的特性に基づいて特性評価してもよい。一部の場合において、一群のエピトープは一部または全部が、全体として非中性電荷を有するエピトープ（例えば、ＲＲＤ、ＤＧＥ）、いくつかの立体的障害性アミノ酸側鎖基を有するエピトープ（例えば、ＷＹＡ、ＦＦＬ）、極性側鎖基を有するエピトープ、疎水性側鎖基を有するエピトープ、親水性側鎖基を有するエピトープなどを含むものであり得る。一部の場合において、縮重配列を有する一群のエピトープは、特定の秩序の化学的特性を有するアミノ酸配列を含み得る。例えば、一群のエピトープは、連続的に極性側鎖基があるアミノ酸／正電荷を有する側鎖基があるアミノ酸／非極性側鎖基があるアミノ酸を有するアミノ酸配列（例えば、ＴＫＧ）を含む任意のエピトープを含むものであり得る。一部の場合において、所望の１つのエピトープもしくは１つの標的エピトープまたは所望の一群のエピトープもしくは一群の標的エピトープはＸと示され得る。一部の場合において、該エピトープは不連続エピトープである。例えば、エピトープは、ペプチドまたはタンパク質の一次構造において順次的アミノ酸配列または近位アミノ酸配列を含むものであり得る。別の一例において、エピトープは２つ目ごとにアミノ酸残基を含むものであり得る。別の一例において、エピトープは、残基がタンパク質配列または一次構造内の近位には存在しないにもかかわらずペプチドまたはタンパク質の二次構造、三次構造または四次構造において互いに近位に位置するいくつかのアミノ酸残基を含むものであり得る。一部の場合において、該エピトープは隣接しているエピトープである。一部の場合において、所望のエピトープＸは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個または２０個より多くのアミノ酸の短いアミノ酸配列である。一部の場合において、所望のエピトープＸは、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個または２０個より多くのアミノ酸の短いアミノ酸配列である。一部の場合において、所望のエピトープＸは、２０個以下、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３個または３個未満のアミノ酸の短いアミノ酸配列である。一部の場合において、Ｘはいくつかの異なる短いアミノ酸配列を含む。一部の場合において、Ｘは、１つまたはそれより多くの隣接していない短いアミノ酸配列を含む。例えばＸは例えばＣ－ＫＹＷを含むものであり得、このとき、システイン残基はペプチドの二次構造または三次構造においてリシン、トリプトファンまたはチロシンのいずれかに近位である。一部の実施形態において、所望のエピトープＸは３個のア

ミノ酸配列Ｘ１Ｘ２Ｘ３である。さまざまな配列構成のこの所望のエピトープに結合する親和性試薬は、該所望のエピトープを含む標的に結合する親和性試薬に関してスクリーニングすることにより同定され得る。

【００４１】

標的は、所望の配列Ｘを含むペプチドを含み得る。一部の場合において、標的は、すべてが配列Ｘであるペプチドプールである。一部の実施形態において、標的は配列αＸβのペプチドプールを含み得、ここで、Ｘは所望のエピトープであり、フランキングドメインαおよびβは、０、１、２、３、４または４個より多くのアミノ酸の任意の配列であり得る。例えば、所望のエピトープＸがＡＡＡである場合、標的ペプチド内にみられ得る配列の例としては：ＡＡＡＡＡ、ＡＡＡＡＣ、ＣＡＡＡＡ、ＣＡＡＡＣおよびＣＡＡＡＤが挙げられ得る。一部の場合において、αおよびβは各々、任意の単一のアミノ酸であり得る。一部の場合において、フランキングドメインαおよびβのうち少なくとも一方は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個または１０個より多くのアミノ酸であり得る。一部の場合において、αおよびβのうち少なくとも一方はリンカーまたはスペーサーを含み得る。リンカーまたはスペーサーは当該技術分野で知られた任意のリンカーまたはスペーサーであり得る。一部の場合において、リンカーはアミノ酸リンカーである。一部の場合において、リンカーはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはＰＥＧポリマー鎖である。ＰＥＧ鎖は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０個または５０個より多くのＰＥＧ部分からなるものであり得る。一部の場合において、リンカーは炭素鎖であり得る。一部の場合において、リンカーまたはスペーサーはＨｉｓタグなどの末端タグを含み得る。また、該ペプチドは、Ｎ末端修飾またはＣ末端修飾、例えばキャッピングを含んでいてもよい。一部の場合において、該ペプチドは電荷が消去されるように修飾され得、例えば末端のアミド化（Ｃ末端）またはアセチル化（Ｎ末端）が行われ得る。一部の場合において、αＸβペプチドは天然に存在しないアミノ酸を含み得る。一部の場合において、αＸβペプチドはリンカーおよび官能基を有するように修飾され得る。例えば、該分子は構造Ｆ－Ｌ－αＸβのものであり得、このとき、Ｆは官能基であり、Ｌはリンカーである。他の場合において、該分子は構造αＸβ－Ｌ－Ｆのものであり得、このとき、Ｆは官能基であり、Ｌはリンカーである。一部の場合において、αおよびβは各々、同じアミノ酸、例えばグリシンであり得るか、または各々、１個またはそれより多くの同じアミノ酸、例えば多重グリシン残基であり得る。一部の実施形態において、残基は、そのアプタ原性が改変されるように修飾され得る。例えば、残基は、正電荷を付与すること；負電荷を付与すること；疎水性基を付加すること；糖鎖が付加されるような修飾；または化学的多様性が増大するような他の修飾によって改変され得る。

【００４２】

一部の場合において、標的は、エピトープの連続反復、例えばＸＸ、ＸＸＸ、ＸＸＸＸなどを含むペプチドを含み得、このとき、ＸはＮ量体エピトープ（例えば、３量体）である。例えば、配列ＫＹＷを有するＸでは、ペプチドは、ＫＹＷ、ＫＹＷＫＹＷ、ＫＹＷＫＹＷＫＹＷなどの配列を含み得る。一部の場合において、標的は、フランキング配列αおよびβを有するエピトープＸの連続反復、例えばαＸＸβ、αＸＸＸβ、αＸＸＸＸβなどを含み得る。一部の場合において、αおよびβは単一のアミノ酸であり得る。一部の場合において、反復エピトープＸを含むペプチドは、親和性試薬プールからのエピトープＸに特異的な親和性試薬の初期濃縮のための標的として使用され得る。Ｘに特異的な親和性試薬の初期濃縮後、親和性試薬プールの残部は、エピトープＸの反復配列を含まない標的で試験され得る。所与のＮ量体の反復配列を含むペプチドは、該配列が約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０回または２０回より多く繰り返されたものであり得る。所与のＮ量体の反復配列を含むペプチドは、該配列が少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０回または２０回より多く繰り返されたものであり得る。所与のＮ量体の反復配列を含むペプチドは、該配列が約２０回以下、１

９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３回または３回未満繰り返されたものであり得る。

【００４３】

一部の場合において、標的は、ペプチド配列内のいくつかの箇所にエピトープＸを含むペプチドを含み得る。例えば、標的は配列αＸβＸγＸδを含むものであり得、ここで、α、β、γおよびδは各々、独立して、スペーサー、スペーシング配列、リンカーまたは連結配列である。スペーサー、スペーシング配列、リンカーおよび／または連結配列は異なる長さであり得る。スペーシング配列または連結配列は１個またはそれより多くのアミノ酸残基を含み得る。連結配列のスペーシング配列は、フォールディングもしくは微小構造をほとんどもしくは全く有しないように、および／またはエピトープＸとの相互作用のための親和性をほとんど有しないように選出され得る。スペーサーまたはリンカーはＰＥＧ鎖または他の官能基を含み得る。スペーサーまたはリンカーは、フォールディングもしくは微小構造をほとんどもしくは全く有しないように、および／またはエピトープＸとの相互作用のための親和性をほとんど有しないように選出され得る。エピトープＸを含むペプチドは、ペプチド鎖内の約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０箇所または２０箇所より多くにエピトープＸを含み得る。エピトープＸを含むペプチドは、ペプチド鎖内の少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０箇所または２０箇所より多くにエピトープＸを含み得る。エピトープＸを含むペプチドは、ペプチド鎖内の約２０箇所以下１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３箇所または３箇所箇所にエピトープＸを含み得る。

【００４４】

ペプチドは、当該技術分野で知られた任意の方法を用いて合成され得る。ペプチド合成のための市販のプラットフォームいくつか存在しており、例えばＭｕｌｔｉＰｅｐ　ＲＳｉ合成装置（Ｉｎｔａｖｉｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）がある。ペプチドは、液相法または固相法を用いて合成され得る。合成されたペプチドは、ペプチド解析のための既知の任意の方法を用いて検証され得る。例えば、ペプチドは、質量分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法、ＡＭＳ（加速器質量分析）、ガスクロマトグラフィー－ＭＳ、液体クロマトグラフィー－ＭＳ、誘導結合プラズマ－質量分析（ＩＣＰ－ＭＳ）、同位体比質量分析（ＩＲＭＳ）、イオンモビリティ分光分析－ＭＳ、タンデムＭＳ、熱イオン化質量分析（ＴＩＭＳ）またはスパークソース質量分析（ＳＳＭＳ）を用いて検証され得る。また、合成されたペプチドの濃度を分光法によって評価してもよい。ペプチド合成反応および検証の一例を実施例５に示す。

【００４５】

図１は、一部の実施形態による、親和性試薬の選択のための固定化された標的を該標的を含むペプチドの例示的な一覧とともに示す。図１の例において、所望のエピトープＸはアミノ酸配列ＡＡＡを有し、標的のペプチドは配列αＡＡＡβを含み、ここで、フランキングドメインαおよびβは各々、単一のアミノ酸である。この例では、標的は、αＡＡＡβの考えられ得る各配列を表す４００種類の異なるペプチドを含み、ここで、αおよびβは各々、単一のアミノ酸である。図１の例を、考えられ得る実施形態を限定するものであると理解すべきでない。例えば、記載の１つまたは複数の標的は、３個より多いアミノ酸または３個より少ないアミノ酸のエピトープ、例えばαＡＡＡＡβを有するように容易に構成することができよう、あるいは標的を１個より多くのアミノ酸、例えばγαＡＡＡＡβδで構成することができよう、ここで、α、β、γおよびδは各々、単一のタンパク質である。

【００４６】

このように、フランキングアミノ酸配列αおよびβを有する任意の所与のＮ量体エピトープでは、プールを構成する標的配列の総数は、

【数１】

$$20^{(L\alpha+L\beta)},$$

【００４７】
と計算され得、このとき、ＬαおよびＬβは、それぞれαおよびβを構成するアミノ酸の数である長さの整数値である。例えば、３量体エピトープでは、５量体プールを含む標的は、４００種類の異なる配列（αについて２０種類の可能性とβについて２０種類の可能性、このとき、αおよびβは各々、単一のタンパク質である）を含み得る。一部の場合において、標的は、αおよびβの各々または両方が２個またはそれより多くのアミノ酸を含み得る５アミノ酸より長いペプチドプールを含み得る。一部の場合において、αおよびβのうち一方はゼロ個のアミノ酸を含み得、αまたはβの他方は１個またはそれより多くのアミノ酸を含み得る。一部の場合において、標的は、さらなるアミノ酸なしの配列Ｘのペプチドを含み得る。一部の場合において、２０個より多くのアミノ酸残基、例えば非天然アミノ酸または修飾アミノ酸がα、Ｘまたはβにおいて可能であり得る。

【００４８】
一部の場合において、多数回の選択が、すべての配列がαＸβの形態のプールから選択された異なる標的で実施され得、ここで、αおよびβは各々、アミノ酸配列または単一のタンパク質であり、Ｘは、少なくとも１個のアミノ酸を含むアミノ酸配列を含むペプチドエピトープである。一部の場合において、αＸβは、既知の度合いの化学的複雑性または化学的多様性を有する標的エピトープを含み得る。化学的複雑性または化学的多様性としては、均一系または不均一系の化学的複雑性または化学的多様性が挙げられ得る。化学的複雑性または化学的多様性は、特定の化学的特性、例えば電荷、立体的サイズ、疎水性、親水性、求核性、求電子性、極性、酸性度または塩基性度をもたらす部分、官能基、側鎖、側鎖基、介在基、介在要素または他の化学的実体を有することと定義され得る。フランキングドメインαまたはβは、αまたはβのアミノ酸配列が類似の化学的特性を有するアミノ酸を含むならば、均一系の化学的複雑性または化学的多様性を含み得る。例えば、ＧＡＧまたはＶＩＬなどのアミノ酸配列は、アミノ酸側鎖基の類似の化学的特性のため均一系の化学的複雑性または化学的多様性を有するフランキングドメイン配列を含み得る。フランキングドメインαまたはβは、αまたはβのアミノ酸配列が非類似の化学的特性を有するアミノ酸を含むならば不均一系の化学的複雑性または化学的多様性を含み得る。例えば、ＧＥＷまたはＦＲＥなどのアミノ酸配列は、アミノ酸側鎖基の非類似の化学的特性のため不均一系の化学的複雑性または化学的多様性を有するフランキングドメイン配列を含み得る。一部の場合において、標的エピトープαＸβは、フランキングドメインαまたはβの化学的複雑性または化学的多様性がＸのアミノ酸配列の化学的複雑性または化学的多様性と類似しているならば、均一系の化学的複雑性または化学的多様性を含み得る。一部の場合において、化学的複雑性または化学的多様性は親和性試薬の結合の尤度を改変し得る。

【００４９】
一部の場合において、標的配列Ｘは長鎖配列内に組み込まれ得る。例えば、標的配列Ｘは１５量体内に組み込まれ得る。標的配列Ｘは１５量体内の任意の位置に組み込まれ得る、例えば３個のアミノ酸の標的配列Ｘの場合、標的配列Ｘは１５量体の１位、２位、３位、４位、５位、６位、７位、８位、９位、１０位、１１位、１２位または１３位に存在し得る。組み込まれる標的配列を含むペプチドは溶液中で合成され得るか、または例えばＰＥＰｐｅｒＰＲＩＮＴチップなどのチップ上もしくは他のペプチドアレイ上に合成され得る。一部の実施形態において、組み込まれる標的配列を含むペプチドは単一分子タンパク質アレイ上に結合または合成され得る。長鎖配列は二次構造を形成するため、または二次構

造を欠如させるために選択され得る。かかる二次構造の例としては、アルファヘリックス、ベータシート、プロリンベンド、ターン、ループおよびシステイン架橋が挙げられる。一部の場合において、長鎖配列は天然に存在しないアミノ酸または他の基を含み得る。

【００５０】

一部の場合において、所望のエピトープまたは標的エピトープＸは、大型分子または結合基材、例えばタンパク質またはペプチド上に装飾され得る。例えば、所望のエピトープまたは標的エピトープＸは大型分子または結合基材に、共有結合性リンカーまたは非共有結合性リンカー（例えば、ＮＨＳ－マレイミドリンカー）を介して結合され得る。エピトープＸはタンパク質またはペプチドに、アミノ酸側鎖とのリンカーの結合によって連結され得る。エピトープＸはタンパク質またはペプチドに、該タンパク質またはペプチド配列の末端部分への該エピトープの付加によって付加され得る。該タンパク質またはペプチドは、多コピーのエピトープＸを含むテイルを含み得る。所望のエピトープまたは標的エピトープＸで装飾された大型分子または結合基材は、表面または基材（例えば、磁性ビーズ、フローセルなど）に、エピトープＸでの装飾の前または後に固着され得る。

【００５１】

初期選択工程は、所望のエピトープを含む標的に対する親和性試薬のライブラリーのスクリーニングを含み得る。親和性試薬ライブラリーは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはランダムな配列を有するか、もしくは既知タンパク質結合アプタマーのものと類似の配列を有するペプチドアプタマーを含むものであり得る。一部の場合において、親和性試薬ライブラリーは、非古典的ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチド（例えば、ウラシル、ＬＮＡ、ＢＮＡ、ＰＮＡ）を含む。一部の場合において、アプタマーライブラリーは市販のライブラリーであり得る。一部の場合において、アプタマーライブラリーは、施設、大学、大学病院（ａｃａｄｅｍｉｃ　ｃｅｎｔｅｒ）または研究センターから入手可能であり得る。一部の場合において、ライブラリーはビーズライブラリーを含み得る。一部の場合において、アプタマーライブラリーは既知配列のライブラリーから、またはランダムな配列から作成され得る。一部の場合において、アプタマーライブラリーは、関連しているか、または無関連の所望の１つのエピトープもしくは１つの標的エピトープまたは所望の一群のエピトープもしくは一群の標的エピトープに対する以前の選択の結果に基づいて設計され得る。一部の場合において、アプタマーライブラリーは、特定の構造を有するアプタマーを含み得る、例えばステムループライブラリーなどを含む。一部の場合において、アプタマーライブラリーは、２つのコンホメーション間の切り替えが可能である切り替え可能なアプタマー－アプタマーを含み得る。例えば、アプタマーは、第１のコンホメーションを形成するための金属イオン補因子、キレート剤、例えばＥＤＴＡまたはＥＧＴＡの添加を必要とする場合があり得、金属イオンを封鎖し、該アプタマーが異なるコンホメーションに適応することを引き起こす。アプタマーの切り替えを誘導するために使用され得る他の要素としては光、ｐＨ、温度、溶液のイオン強度、磁場および電流が挙げられる。

【００５２】

一部の場合において、アプタマーはオリゴヌクレオチドを含み得る。一部の場合において、アプタマーは１個より多くのオリゴヌクレオチドを含み得る。アプタマーは、約５、１０、１５、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００個または１００個より多くのヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アプタマーは、少なくとも約５、１０、１５、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６

３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００個または１００個より多くのヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アプタマーは、約１００個以下、９９、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、９１、９０、８９、８８、８７、８６、８５、８４、８３、８２、８１、８０、７９、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、７１、７０、６９、６８、６７、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９、５８、５７、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、５個または５個未満のヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。

【００５３】

アプタマーは、種々の領域、部分または成分、例えば結合領域、非結合領域、アダプター、バーコードおよび標識された領域を含み得る。アプタマーの該領域、部分または成分は、約５、１０、１５、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００個または１００個より多くのヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アプタマーの該領域、部分または成分は、少なくとも約５、１０、１５、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００個または１００個より多くのヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アプタマーの該領域、部分または成分は、約１００個以下、９９、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、９１、９０、８９、８８、８７、８６、８５、８４、８３、８２、８１、８０、７９、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、７１、７０、６９、６８、６７、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９、５８、５７、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、５個または５個未満のヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。

【００５４】

一部の場合において、アプタマーライブラリーはランダムな配列を含み得る。一部の場合において、アプタマーライブラリーは合理的設計ライブラリーを含み得る。一部の場合において、アプタマーライブラリーは、ランダムな配列または合理的設計配列、ならびにライブラリーのすべてのアプタマーに存在する定常領域を含み得る。一部の場合において、ライブラリーのアプタマーは、配列$S_1S_2S_3$を含むものであり得、ここで、S_1およびS_3は、ライブラリー内のすべてのアプタマーに共通する定常配列を含み、S_2は、各アプタマーに固有であり得る可変配列である。一部の場合において、アプタマーライブラリーは、すべてのアプタマーが配列$S_1S_2S_3$を含むように設計され得、ここで、S_1およびS_3は次世代シーケンシング反応に適したアダプターを構成する。例えば、S_1およびS_3は、ライブラリーのアプタマーが、さらなる修飾なしで直接Ｉｌｌｕｍｉｎａ

シーケンシング反応に使用され得るようなＩｌｌｕｍｉｎａアダプターを構成し得る。例えば、Ｓ１が配列５’－ＣＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＣＧＧＣＡＴＡＣＧＡＧＡＴ－３’を含み得るか、またはＳ３が配列５’－ＧＴＧＴＡＧＡＴＣＴＣＧＧＴＧＧＴＣＧＣＣＧＴＡＴＣＡＴＴ－３’を含み得る。一部の場合において、S3はアプタマーの３’末端に存在し得、Ｓ３はシーケンシングのためのアダプターを構成しないものであり得る。かかる場合では、Ｓ３は、アダプターが付加されるのを可能にするために最小限の長さのものであり得るが、アダプターが付加したらＳ３－アダプター配列は、該アダプターが除去されてＳ３配列が残り得るような制限部位を含み得る。

【００５５】

また、一部の場合において、Ｓ１とＳ３のうち少なくとも一方はバーコードを構成し得る。バーコードは、選択標的、選択条件、実験日時、起源のライブラリーまたはマルチウェルプレートのウェルに固有であり得る。一部の場合において、バーコードはマルチウェルプレートのウェルに固有であり得、そのため、多くの異なる選択実験が１つのマルチウェルプレート内で実施され得、ウェル間の夾雑は、各ウェル内のアプタマーのバーコードのシーケンシングによって評価され得る。

【００５６】

標的に対するアプタマーライブラリーのスクリーニングは、当該技術分野で知られた任意の方法によって行われ得る。一態様において、標的は固相支持体上に固定化され得、アプタマーは、低特異性を有するアプタマーの結合を可能にする条件下で添加され得る。未結合アプタマーは標的から、漸増ストリンジェンシーの一連の洗浄により洗い流され得る。スクリーニング方法は、１回の濃縮サイクルあたり約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０工程または１０工程より多くの洗浄工程を含み得る。スクリーニング方法は、１回の濃縮サイクルあたり少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０工程または１０工程より多くの洗浄工程を含み得る。スクリーニング方法は、１回の濃縮サイクルあたり約１０回以下、９、８、７、６、５、４、３、２回または２回より少ない洗浄を含み得る。洗浄工程を経て標的に結合されたままであるアプタマーは、さらなる選択ラウンドのためにシーケンシングされ、増幅され得るか、または高い配列類似性を有するさらなるアプタマーの設計のために使用され得る。数ラウンドの標的結合、洗浄、シーケンシングおよび増幅、または新たなアプタマーの設計が、所望の特異性および結合親和性のアプタマーが作成されるまで繰り返され得る。また、アプタマーライブラリーは、各々が多コピーのアプタマーを含むビーズを使用するビーズベースのアプローチを用いてスクリーニングされ得る。また、アプタマーライブラリーは、アレイベースのアプローチを用いて、例えばライブラリーの多コピーの各アプタマーをアレイ上にスポットし、次いで、標的が結合しているスポットを評価することによりスクリーニングされ得る。また、アプタマーライブラリーは、粒子ディスプレイアプローチを用いてスクリーニングされ得る。一部の実施形態において、アプタマーライブラリーは、単一分子タンパク質アレイを用いてスクリーニングされ得る。

【００５７】

親和性試薬は、想定され得る任意の形状の標的プールに曝露され得る。第１の場合では、標的プールが基材に固定化され得、この場合、続いて親和性試薬が該標的プールに曝露され、結合が測定され得る。第２の場合では、親和性試薬プールが基材に固定化され得、この場合、続いてタンパク質標的が該親和性試薬プールに曝露され、結合が測定され得る。第３の場合では、標的と親和性試薬が遊離状態のときに溶液中で接触させられ、次いで基材に固定化され、結合が測定され得る。第３の場合の第１の実施形態では、親和性試薬とペプチドが溶液中で、ある期間、接触させられ、次いで標的に、該ペプチドが該基材に連結または結合されるように固定化され得る。タンパク質の固定化後、溶出工程により親和性試薬はペプチドから未結合状態となり、続いてシーケンシングおよび／または増幅のために捕捉され得る。第３の場合の第２の実施形態では、親和性試薬とペプチドが溶液中で、ある期間、接触させられ、次いで標的に、該親和性試薬が該基材に連結または結合されるように固定化され得る。親和性試薬の固定化後、溶出工程によりタンパク質は親和性試

薬から未結合状態となり得る。固定化された親和性試薬は、続いてシーケンシングおよび／または増幅のために基材から解離され得る。親和性試薬を標的プールと接触させる方法は、未結合または弱く結合している親和性試薬またはペプチド（あれば）を、結合を測定する前に除去するために１回またはそれより多くのすすぎ、洗浄または分離の工程を伴い得る。一部の場合において、基材に結合されているペプチドは、基材からの親和性試薬の溶出の前に該基材から解離または溶出され得る。

【００５８】

一部の場合において、標的プールのうち同定される親和性試薬が結合するパーセンテージは、例えば、結合した親和性試薬のコピー数を結合に利用可能な標的ペプチドの数と比較することにより測定され得る。一部の実施形態において、親和性試薬は、標的含有ペプチドの約０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％または８０％より多くに結合し得る。一部の実施形態において、親和性試薬は、標的含有ペプチドの少なくとも約０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％または８０％より多くに結合し得る。一部の実施形態において、親和性試薬は、標的含有ペプチドの約８０％以下、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、１％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％または０．０００００１％未満に結合し得る。さらに、具体的な親和性試薬が同定され、選択されたら、該親和性試薬が確認され得る。一部の実施形態において、選択された親和性試薬は、該親和性試薬が結合すると特性評価されるエピトープを含む複数の配列に対して確認され得る。一部の実施形態において、選択された親和性試薬は、単一分子アレイ上の複数のペプチドまたはタンパク質配列に対する選択された該親和性試薬を評価することにより確認され得る。

【００５９】

一部の場合において、親和性試薬プールのうち所望のエピトープまたは標的エピトープに結合するパーセンテージは、例えば、既知配列プールに対する検出された固有の親和性試薬配列の数を比較することにより測定され得る。一部の実施形態において、１つのエピトープまたは一群のエピトープは、親和性試薬プールの約０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％または８０％より多くに結合し得る。一部の実施形態において、１つのエピトープまたは一群のエピトープは、親和性試薬プールの少なくとも約０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％，０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％または８０％より多くに結合し得る。一部の実施形態において、１つのエピトープまたは一群のエピトープは、親和性試薬プールの約８０％以下、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、１％、０．１％、０．０１％、０．００１％、０．０００１％、０．００００１％、０．０００００１％または０．０００００１％未満に結合し得る。

【００６０】

図２は、一部の実施形態による親和性試薬の選択プロセスのフローチャートを示す。まず、標的を入手し、固相支持体上に固定化させる。次いで標的を親和性試薬のライブラリーに曝露する。この例では、親和性試薬がアプタマーである。未結合アプタマーを標的から洗い流し、残りのアプタマーを溶出させる。一部の場合において、溶出されたアプタマーはＰＣＲを用いて増幅され得、次いでアンチセンス鎖が除去され、ｓｓＤＮＡアプタマーが再生され得る。一部の場合において、溶出されたアプタマーはビオチン標識リバースプライマーを用いて、アンチセンス鎖がストレプトアビジン標識ビーズを用いて除去され得るように増幅され得る。一部の場合において、溶出されたアプタマーはリン酸化リバース

プライマーを用いて、アンチセンス鎖がラムダエキソヌクレアーゼを用いて除去され得るように増幅され得る。一部の場合において、溶出されたアプタマーのアリコートまたは増幅および再生されたアプタマーのアリコートのいずれかが、プール方式アッセイにて、全体標的結合を測定するために使用され得る。選択ラウンドが進行して最適化プールに向かうにつれて、溶出されたアプタマープールまたは増幅および再生されたアプタマープールの標的結合は初期選択ラウンドより増大するはずである。一部の場合において、過度な選択ラウンドは結合の低減をもたらし得る。標的に対するアプタマーの結合は、当該技術分野で知られた任意の方法を用いて測定され得る。例えば、標的に対するアプタマーの結合は、ＥＬＩＳＡアッセイ、ＥＬＯＮＡアッセイ、ドットブロットアッセイ、表面プラズモン共鳴、生体層干渉法またはマイクロスケール熱泳動によって測定され得る。一部の場合において、溶出されたアプタマーは、該アプタマーが保存される様式でシーケンシングされ得るか、あるいは溶出されたアプタマーのアリコートがシーケンシングされ得る。該プロセスの一部の実施形態において、シーケンシングの結果は、単一のアプタマーまたは少数群のアプタマーが高度に濃縮され（強い結合を示す）、さらなるスクリーニングのために選択されるべきであるかどうか、あるいは多くの異なるアプタマーが示す濃縮が軽度であるかどうか（この場合、溶出されたアプタマーは増幅され、再度、標的に適用され得る）を予測するために使用され得る。これらの工程は、所望の結合親和性を有するアプタマーがもたらされるまで繰り返され得る。洗浄工程のストリンジェンシーは後続の洗浄工程では増大され得る。洗浄工程の長さは、低オフレートを有する親和性試薬が得られるように選択され得る。溶出工程に使用される溶液の組成は、標的から速やかに解離するアプタマーが選択されるように最適化され得、例えば、溶出工程に使用される溶液は、遊離イオンのｐＨまたは濃度の変化をもたらすものであり得る。

【００６１】

本開示の方法では、標的に対する親和性試薬の結合強度および／または結合特異性を特性評価するために１種類またはそれより多くのバッファー、溶液または混合物が使用され得る。バッファー、溶液または混合物は、保存、ペプチドまたはタンパク質標的の状態調節のため（例えば、変性バッファー）、未結合または弱く結合している親和性試薬の洗浄のため、標的との親和性試薬の結合のため、結合しているタンパク質を基材から溶出させるため、あるいは結合している親和性試薬をペプチドから溶出させるために使用され得る。一部の場合において、バッファー、溶液または混合物は水性または非水性であり得る。バッファー、溶液または混合物は、共通する試薬、例えばＴｒｉｓ、リン酸バッファーまたは生理食塩液を含み得る。バッファーまたは溶液は、他の試薬、例えば塩類（例えば、ＮａＣｌ、ＫＣｌ、$MgCl_2$）、デタージェント、カオトロピック剤、キレート剤または界面活性剤を含み得る。例示的なバッファー添加剤としては、Ｔｗｅｅｎ－２０、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、ドデシル硫酸ナトリウム、アセトニトリル、コレート、デオキシコレート、ジギトニン、ＣＨＡＰＳ、尿素、塩化グアニジニウム、ＥＤＴＡおよびＥＧＴＡが挙げられ得る。バッファーまたは溶液は、標的の物理的または化学的特性が改変されるように選出され得る。例えば、バッファーまたは溶液は、アミノ酸側鎖のアミン基（例えば、ヒスチジン、アルギニン、リシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、トリプトファン）がプロトン化されるように、またはアミノ酸側鎖のカルボン酸基（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）が脱プロトン化されるように充分な酸強度または塩基強度を有するものが選出され得る。バッファーまたは溶液は、標的の二次構造または三次構造を、タンパク質を変性させることなく改変するものであってもよい。例えば、バッファーまたは溶液は、以前は該バッファーまたは溶液に曝露されなかったエピトープを露出させるコンホメーション変化を引き起こすものであり得る。バッファーまたは溶液は、タンパク質の一部分を酸化または還元するものであってもよい（例えば、ジスルフィド架橋）。

【００６２】

一部の場合において、バッファーは、親和性薬剤のスクリーニング方法のための選択用薬剤として選出してもよい。親和性試薬のスクリーニング方法におけるバッファーの特性は

、親和性試薬の結合の尤度が上がるように、または下がるように選出され得る。例えば、バッファーは、特定のイオン強度を有するもの、またはデタージェントもしくはカオトロピック剤の存在を有するものが選出され得る。バッファーを、親和性試薬が使用されるであろう下流のアッセイにおける使用のため選択用薬剤として選出してもよい。例えば、本開示の親和性試薬を使用するタンパク質の特性評価または同定の方法では結合バッファー、洗浄バッファーまたは検出バッファーが必要とされ得る。親和性試薬は、タンパク質の特性評価アッセイで使用されるのものと類似または同一の組成を有するバッファーの存在下で閾値レベルの結合を有するため、上記の方法および後述する方法によって選択され得る。

【００６３】

バッファーまたは溶液は具体的なイオン強度または塩強度によって特性評価され得る。バッファーまたは溶液は、少なくとも約１０μＭ、５０μＭ、１００μＭ、２５０μＭ、５００μＭ、７５０μＭ、１ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、２５ｍＭ、５０ｍＭ、１００ｍＭ、２５０ｍＭ、５００ｍＭ、１Ｍ、２Ｍ、５Ｍまたは５Ｍより高いイオン強度または塩強度を有するものであり得る。バッファーまたは溶液は、約５Ｍ以下、２Ｍ、１Ｍ、５００ｍＭ、２００ｍＭ、１００ｍＭ、５０ｍＭ、２５ｍＭ、１０ｍＭ、５ｍＭ、１ｍＭ、７５０μＭ、５００μＭ、２５０μＭ、１００μＭ、５０μＭ、１０μＭまたは１０μＭ未満のイオン強度または塩強度を有するものであり得る。バッファーまたは溶液は具体的なｐＨで特性評価され得る。バッファーまたは溶液は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２または１３のｐＨを有するものであり得る。バッファーまたは溶液は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３または１３より高いｐＨを有するものであり得る。バッファーまたは溶液は、約１３以下、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１または１未満のｐＨを有するものであり得る。バッファーは、塩、デタージェント、カオトロピック剤または界面活性剤などの成分を、少なくとも約０．０１ｗｔ％、０．０５ｗｔ％、０．１ｗｔ％、０．５ｗｔ％、１ｗｔ％、２ｗｔ％、５ｗｔ％、１０ｗｔ％または１０ｗｔ％より多くの量で含み得る。バッファーは、塩、デタージェント、カオトロピック剤または界面活性剤などの成分を、約１０ｗｔ％以下、５ｗｔ％、２ｗｔ％、１ｗｔ％、０．５ｗｔ％、０．１ｗｔ％、０．０５ｗｔ％、０．０１ｗｔ％または０．０１ｗｔ％未満の量で含み得る。

【００６４】

本開示のバッファー、溶液または混合物は、アッセイまたはプロセス中、特定の温度で提供され得るか、あるいは特定の温度まで加熱および／または冷却され得る。バッファー、溶液または混合物の温度は、特定のプロセス、例えば親和性試薬の結合、洗浄または親和性試薬の溶出が最適化されるように変更され得る。バッファー、溶液または混合物は、約－８０℃、－７０℃、－６０℃、－５０℃、－４０℃、－３０℃、－２０℃、－１０℃、０℃、４℃、１０℃、１５℃、２０℃、２５℃、３０℃、３５℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、７０℃、７５℃、８０℃、８５℃、９０℃、９５℃または９５℃より高い温度を有するものであり得る。バッファー、溶液または混合物は、少なくとも約－８０℃、－７０℃、－６０℃、－５０℃、－４０℃、－３０℃、－２０℃、－１０℃、０℃、４℃、１０℃、１５℃、２０℃、２５℃、３０℃、３５℃、４０℃、４５℃、５０℃、５５℃、６０℃、６５℃、７０℃、７５℃、８０℃、８５℃、９０℃、９５℃または９５℃より高い温度を有するものであり得る。バッファー、溶液または混合物は、約９５℃以下、９０℃、８５℃、８０℃、７５℃、７０℃、６５℃、６０℃、５５℃、５０℃、４５℃、４０℃、３５℃、３０℃、２５℃、２０℃、１５℃、１０℃、４℃、０℃、－１０℃、－２０℃、－３０℃、－４０℃、－５０℃、－６０℃、－７０℃、－８０℃または－８０℃より低い温度を有するものであり得る。

【００６５】

標的は、親和性試薬の結合が試験され得る対象のタンパク質のタンパク質断片であるペプチドを含み得る。標的は天然のタンパク質であってもタンパク質断片であってもよい。標的は、合成されたペプチド、タンパク質またはタンパク質断片であってもよい。標的が入

手され、次いで基材上に結合または固定化され得る。標的を直接、基材上で合成してもよい。

【００６６】

一部の場合において、標的はビーズ上に固定化され得る。一部の場合において、標的は、異なる配列のプールを含むものであり得、ビーズ上に、各ビーズが２つまたはそれより多くの異なる配列を含むように、あるいは各ビーズが単一の標的配列を含むように固定化され得る。一部の場合において、標的はビーズ上に、各ビーズが、考えられ得るすべての配列の相違するサブセットに由来する標的配列を含むように固定化され得る。例えば、第１のビーズは配列Ｇ－Ｘ－Ｇの標的を含み得、このとき、Ｘは、結合対象となることが所望される最終配列であり、Ｇはグリシンであり、第２のビーズは、αＸβを含む配列から選択される１つまたはそれより多くの標的を含み得、ここで、αおよびβは各々、単一のアミノ酸であり、αおよびβのうち少なくとも一方はグリシンでない。別の一例において、第１のビーズは配列Ｇ－Ｘ－Ｇの標的を含み得、このとき、Ｘは、結合対象となることが所望される最終配列であり、Ｇはグリシンであり、第２のビーズは、αＸβを含む配列から選択される１つまたはそれより多くの標的を含み得、ここで、αおよびβは各々、任意の単一のアミノ酸である。一部の場合において、前記ビーズは磁性ビーズであり得る。

【００６７】

一部の場合において、標的は、固相支持体、例えばビーズにリンカーを用いて固定化され得る。リンカーの例としては、短いアミノ酸配列、例えばＧＧＧ、ＡＧＡ、または標的の配列組成に使用される左旋性アミノ酸とは対照的な右旋性アミノ酸の短鎖配列が挙げられる。一部の場合において、使用されるリンカーはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーであり得る。ＰＥＧの構造は一般的にＨ－（Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$）$_n$－ＯＨと示される。一部の場合において、ＰＥＧリンカーは、該ＰＥＧリンカーが、固定化された標的がスクリーニングまたは選択対象の親和性試薬に到達可能であるのに充分長いように選択され得る。一部の場合において、ＰＥＧリンカーは、該ＰＥＧリンカーが、ＰＥＧリンカー自体のフォールディングが回避されてスクリーニングまたは選択対象の親和性試薬への標的の到達可能性が低減されるのに充分短いように選択され得る。一部の場合において、ＰＥＧリンカーは２～３２、４～１２、４～１０または４～８のポリマー鎖長を含み得る。一部の場合において、使用されるＰＥＧリンカーは、ＰＥＧ－２、ＰＥＧ－３、ＰＥＧ－４、ＰＥＧ－５、ＰＥＧ－６、ＰＥＧ－７、ＰＥＧ－８、ＰＥＧ－９、ＰＥＧ－１０、ＰＥＧ－１１、ＰＥＧ－１２、ＰＥＧ－１３、ＰＥＧ－１４、ＰＥＧ－１５、ＰＥＧ－１６、ＰＥＧ－１７またはＰＥＧ－１８であり得る。一部の場合において、ＰＥＧリンカーはＰＥＧ－４またはＰＥＧ－８であり得る。

【００６８】

一部の場合において、固相支持体上の標的の密度は、選択される親和性試薬の結合に影響を及ぼし得る。例えば、高い標的密度は協調的結合をもたらし得る。一部の場合において、固相支持体上の標的の密度または支持体上の標的の濃度は、所望の特性を有する親和性試薬の選択が促進されるように最適化され得る。一部の場合において、固相支持体上の標的の密度または支持体上の標的の濃度は、標的の特性－例えば標的の電荷に応じてさまざまであり得る。一部の場合において、正電荷を有する標的が固相支持体に、無電荷の標的または負電荷を有する標的より低濃度で適用され得る。一部の場合では、正電荷を有する標的が固相支持体に、無電荷の標的または負電荷を有する標的より高濃度で適用され得る。

【００６９】

他の態様において、初期選択工程は、ライブラリーの親和性試薬を固相支持体上に固定化すること、および標識された標的を添加することを含み得る。固相支持体は、スライド、ビーズ、磁性ビーズ、フローセル内の表面であり得る。ライブラリーの親和性試薬は単一コピーとして固定化され得るか、またはプール状態で固定化され得る。例えば、多コピーの単一の親和性試薬が固相支持体の一領域に固定化され得、一方、多コピーの他の親和性試薬は前記固相支持体の他の領域に固定化される。一部の場合において、ライブラリーの

親和性試薬はアダプターで修飾され、オリゴコート固相支持体にハイブリダイズされ得る。オリゴベースの親和性試薬では、次いでクラスター増幅が使用され、各アプタマーが固相支持体上で局所増幅され得る。一部の場合において、固相支持体はガラススライドである。一部の場合において、固相支持体はフローセルである。一部の場合において、固相支持体は、蛍光イメージングに適したフローセルである。一部の場合において、固相支持体は１個の磁性ビーズまたは複数の磁性ビーズである。複数の磁性ビーズの各磁性ビーズは多コピーの相違する単一の親和性試薬で、各ビーズがビーズ同士相互に異なる親和性試薬でコートされるようにコートされ得る。

【００７０】

他の態様において、親和性試薬の初期選択工程は、標的を、該標的に対する抗体を産生することができる宿主動物に注射することを含み得る。宿主動物は、抗体を産生することができる任意の動物、例えばウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ウマ、ウシ、ヒツジ、ラクダまたはロバであり得る抗体は宿主動物の血清から回収され得る。宿主動物由来の血清をそのまま使用してもよく、血清から抗体を精製してもよい。抗体を精製する方法としては、物理化学的分別、クラス特異的アフィニティまたは抗原特異的アフィニティが挙げられる。クラス特異的アフィニティは、免疫グロブリンに対する特異的親和性を有する固定化された生物学的リガンドとの抗体の結合を伴い得る。抗原特異的アフィニティは、標的に結合する抗体をプルダウンさせるための固定化された標的の使用を伴い得る。精製された抗体は、血清由来の該抗体を同定するためにシーケンシングされ得、次いで、同定された抗体はインビボまたはインビトロで合成され得る。

【００７１】

一部の場合において、免疫処置した宿主動物の血清から抗体を抽出するのではなく、脾臓が摘出され得、脾臓細胞が不死化され得る。脾臓細胞を不死化させるための方法の一例は、該細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを形成することであり得る。個々のクローンがハイブリドーマから単離され得、各々は単一のモノクローナル抗体を産生する。いろいろなモノクローナル抗体が、標的に対して上記のものと類似の方法を用いてスクリーニングされ得る。簡単には、標的が固相支持体上に固定化され得、抗体が漸増ストリンジェント条件下で添加され、所望の親和性で結合する抗体が決定され得る。選択されたモノクローナル抗体の配列は、そのタンパク質をシーケンシングすることによって、または該タンパク質を産生する細胞株由来のコード配列をシーケンシングすることによって得られ得る。

【００７２】

一部の場合において、抗体、抗体の断片、ペプチドまたは可変領域を有する別の好適なタンパク質足場（ｓｃａｆｆｏｌｄ）はファージディスプレイを用いて選択され得る。各ファージがその表面上に抗体、抗体の断片、ペプチドまたは別のタンパク質足場を発現し、該タンパク質またはペプチドを生成するための配列をコードしているファージライブラリーを入手するのがよい。ファージライブラリーはペプチド標的に適用され得る、標的に結合しないタンパク質またはペプチドを発現およびコードするファージは洗い流され得る。標的に結合するタンパク質またはペプチドを発現およびコードするファージは該標的から溶出され得る。溶出されたファージは、細胞を該ファージに感染させることにより増幅され得、増幅されたファージを用いて選択工程が所望の反復回数、繰り返され得る。後続の反復では、ストリンジェンシーの漸増または洗浄時間の漸増を伴う洗浄バッファーが使用され得る。所望の反復回数が終了したら、選択されたファージが、例えば該ファージを溶解させ、発現されたタンパク質またはペプチドをコードしているＤＮＡをシーケンシングすることにより解析され得る。この配列は、選択された該タンパク質またはペプチドを発現する細胞株を構築するために使用され得る。

【００７３】

一部の場合において、抗体または他の親和性試薬は、細菌ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイ、昆虫細胞ディスプレイまたは酵母ディスプレイを用いて選択され得る。これらの方法は上記のファージディスプレイと類似しているが、細菌、哺乳動物細胞、昆虫細

胞または酵母細胞の各々がその表面上にタンパク質またはペプチドを発現し、該タンパク質またはペプチドを生成するための配列をコードしている細菌ライブラリー、哺乳動物細胞ライブラリー、昆虫細胞ライブラリーまたは酵母ライブラリーが入手される。選択方法は、ファージディスプレイについて記載のものと同じである。

【００７４】

本開示の親和性試薬の選択方法は、合成成分または非天然成分（例えば、非天然のヌクレオチドまたはアミノ酸）を含む想定され得る任意の親和性試薬、例えば、オリゴマー、ペプチマー、ミニタンパク質バインダー、抗体、抗体断片、親和性試薬およびその組合せに対して使用され得る。

【００７５】

一部の実施形態において、親和性試薬は、多くの異なる標的に対してパラレルで選択され得る。例えば、アプタマー親和性試薬では、多くの異なる標的がアレイ上の異なるロケーションに固定され、ＳＥＬＥＸ選択法で使用され得る。別の一例では、多くの異なる標的が磁性ビーズに結合され、ＳＥＬＥＸ選択法で使用され得る。一部の実施形態において、親和性試薬は、単一分子タンパク質アレイ上の標的に対して選択され得る。

【００７６】

一実施形態において、次世代シーケンシングプラットフォーム（例えば、Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｎａｎｏｐｏｒｅ）がハイスループットアプタマースクリーニングのために適合され得る。一部の場合では、Ｉｌｌｕｍｉｎａ様式の次世代シーケンシングプラットフォームがハイスループットＤＮＡアプタマースクリーニングのために適合され得る。一部の場合において、ＲＮＡベースのアプタマーがスクリーニングされ、逆転写法によってシーケンシングされ得る。ペプチドアプタマーは、任意のタンパク質シーケンシング方法によってシーケンシングされ得る。一部の場合において、本開示の親和性試薬は、構造Ｓ１Ｓ２Ｓ３を有するものであり得、ここで、Ｓ１およびＳ３は、親和性試薬の捕捉、検出および／または同定に適したアダプターを含む。例えば、上記のようなＳＥＬＥＸ選択により溶出されたアプタマープール（この場合、プール中のすべてのアプタマーは配列Ｓ１Ｓ２Ｓ３を含み、ここで、Ｓ１およびＳ３は次世代シーケンシング反応に適したアダプターを構成する）は、フローセル内のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ得る。固相増幅は、アプタマーライブラリーの各出発アプタマーからアプタマークラスターを作出するために使用され得る。アンチセンス鎖はフローセルからいくつかの方法によって、例えば固相支持体からアンチセンス鎖を特異的に切断する酵素を使用することにより除去され得る。ＳＥＬＥＸ段階の際にアダプターが組み込まれるアプタマーライブラリーの使用では、アダプターを添加するときのアプタマーのフォールディングの破壊が抑制され、フローセル内に存在するアプタマーが、ＳＥＬＥＸの際に作成される出力プールと同じ長さと配列になることが確実になる。これにより、フローセル内のアプタマーが、ＳＥＬＥＸ段階の場合と同じ様式でフォールディングする見込みが最大限となり、したがって比較が可能になる。アプタマーが、アダプター配列には含まれていないがアダプターに結合した場合に代わりに制限部位を形成するＳ３配列を含む場合、増幅された鎖は適当な制限酵素で処理され、選択工程で使用されるアプタマー配列が再生され得る。フローセルの表面は、このとき複数の核酸クラスターで覆われ得、各クラスターは、アプタマーライブラリー由来の単一のアプタマーの多コピーを含む。シーケンシング反応はフローセル上で、核酸ポリメラーゼ、プライマーおよび４種類の異なる蛍光標識された可逆的ターミネーター（Ａ、Ｔ、ＣおよびＧ）を用いて実行され得る。これにより、フローセル内の各ロケーションのアプタマーの配列が得られ得る。各アプタマークラスターの具体物がわかったら、検出可能に標識された１つまたはそれより多くのペプチド標的がフローセルに添加され、アプタマークラスターとともにインキュベートされ得る。インキュベーション期間後、未結合の標的は洗い流され、フローセルがイメージングされ、標的が結合しているロケーションが決定される。多数相のインキュベーションおよび洗浄工程を行う際、ｋａ値、ｋｄ値およびＫＤ値が得られ得る。特に、未結合の標的を除去するための初期洗浄工程後、どの結合標的まだ存在しているのかを特定するために初期画像が撮影され得る。初期画像を撮影した後、

経過時間中に未結合となった標的を除去するための第２の洗浄工程が行われ得、次いで第２の画像が撮影され得る。このプロセスは、未結合となった時間に基づいていくつかの標的における結合特性を計算するために複数の段階にわたって反復され得る。一部の例では、初期洗浄工程の直後に第２の洗浄工程が行われ得る。また、結合特性の測定は、例えば表面プラズモン共鳴または生体層干渉法（ＢＬＩ）手法などの手法を用いて行われ得る。

【００７７】

一部の場合において、分割可能な異なる標識を有する多くの異なる標的がフローセルに添加され、多重パラレル選択が行われ得る。この方法の一例を実施例４に示す。

【００７８】

一部の場合において、上記のようなＩｌｌｕｍｉｎａ様式のフローセルを用いるハイスループットアプタマースクリーニングにより、所望の結合特性を有するアプタマーを同定するために必要とされるＳＥＬＥＸ選択ラウンドの回数が少なくなり得る。一部の場合において、所望の結合特性を有するアプタマーは、たった１ラウンド、２、３、４、５、６または７ラウンドのＳＥＬＥＸ選択後に同定され得る。一部の場合において、合理的設計ライブラリー全体がＩｌｌｕｍｉｎａ様式のフローセルを用いてスクリーニングされ得るため、ＳＥＬＥＸラウンドは必要とされない。

【００７９】

一部の実施形態において、親和性試薬の選択の容易性はエピトープの配列／構造に影響され得る。高い「免疫原性」、「抗原性」、「アプタマー原性」または「親和性試薬原性」を有するエピトープの方が対象の親和性試薬を設計するのが容易であり得る。例えば、非常に異なる化学的特性または多様な化学的特性（例えば、側鎖基の電荷、側鎖基の立体的サイズ、側鎖基の疎水性、側鎖基のｐＫａ、側鎖基の極性）を有するアミノ酸残基を含むエピトープの方が対象の親和性試薬を選択するのが容易であり得る。ＧＧＧまたはＡＡＡなどのエピトープの方がＫＷＫまたはＤＣＹなどのエピトープより対象の親和性試薬を選択するのが困難であり得る。一部の実施形態において、エピトープは、例えば修飾型のエピトープと相互作用する親和性試薬が同定されるように化学的バイオコンジュゲーションを用いて修飾され得る。アミノ酸Ｋ、Ｒ、Ｄ、Ｅ、Ｙ、ＷおよびＣは特に、容易に修飾される。一部の実施形態において、その所望のエピトープに結合する親和性試薬を同定する場合、ＤＹＷを、親和性試薬を用いて同定することがより容易になる成分を付加する化学反応で修飾することが有益であり得る。特に、ＤＹＷは、正電荷または核酸が付加されるように修飾され得、その結果、これが、該成分に対して個別調整された親和性試薬を有することになり得る。このように、ＤＹＷエピトープは目立たせる（ｓｔａｎｄ　ｏｕｔ）ことがより容易であり得る。さらに、修飾されている所望のエピトープを同定するためのプラットフォームを実行する場合、タンパク質試料（例えば、血液試料）は、ＤＹＷエピトープが予測される特定の様式で修飾される化学反応に曝露され得、これにより、次いで該タンパク質が特定の親和性試薬に対して評価され、正電荷または核酸成分を有する修飾型ＤＹＷエピトープに対応する未修飾ＤＹＷエピトープが元のタンパク質試料中に存在したかどうかを判定すること可能となり得る。一部の実施形態において、ＤＹＷエピトープに対する化学反応は可逆的であり得る。一部の実施形態では、ＤＹＷエピトープに対する化学反応が不可逆的であり得る。このように、個別調整型のアッセイが、修飾型ＤＹＷエピトープを同定するために実行され得る。

【００８０】

一部の場合において、潜在的標的の集合体が、標的エピトープの予測される「抗原性」または「親和性試薬原性」に基づいて異なる群に層別化され得る。例えば、一部の場合において、高抗原性標的と低抗原性標的の両方を単一のパラレル選択工程に合わせることにより、低抗原性標的に対する親和性試薬からのシグナルから抜け出た高抗原性標的に対する親和性試薬がもたらされ得る。予測される抗原性は標的内のアミノ酸残基の化学的特性に基づいたものであり得、電荷を有するアミノ酸および大型のアミノ酸の方が高い抗原性を有することが予測される。２つまたはそれより多くの同じアミノ酸残基または化学的に類似のアミノ酸残基を含む標的は、非常に異なる化学的特性を有するアミノ酸残基を含む標

的より低い抗原性を有し得る。一部の場合において、異なる標的の抗原性は実験により、最初の親和性試薬の選択スクリーニングの結果に基づいて測定され得る。

【００８１】

一部の場合において、親和性試薬のライブラリーまたは１つの親和性試薬に負の選択スクリーニング法が行われ得る。負の選択スクリーニング法の目的は、所望されないエピトープ、表面、物質またはその組合せに対して閾値の結合度合いを示さない親和性試薬を同定することであり得る。一部の場合において、負の選択スクリーニングにより、基材物質（例えば、ガラス、ポリマービーズ、流路チュービング）に結合しない親和性試薬が同定され得る。一部の場合において、負の選択スクリーニングにより、ペプチドまたはタンパク質に非特異的に結合しない親和性試薬が同定され得る。例えば、親和性試薬は、ランダムライブラリー（例えば、生物学的試料由来のネイティブタンパク質を含むライブラリー）内のすべてのペプチドまたはタンパク質のうちの少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％またはそれより多くに結合することがわかったならば選択され得ない。一部の場合において、親和性試薬は、そのエピトープの特異性が特性評価される前に負の選択スクリーニングにおいて同定され得る。他の場合では、親和性試薬は、そのエピトープの特異性について特性評価され、次いで負の選択スクリーニングによって検証され得る。

【００８２】

負の選択スクリーニングは、ａ）媒体中の親和性試薬を１つまたはそれより多くの物質または基材と接触させる工程、ｂ）接触後、媒体から未結合の親和性試薬を収集する工程、ｃ）未結合の親和性試薬をシーケンシングする工程、ｄ）該１つまたはそれより多くの物質または基材から結合している親和性試薬を収集する工程、ｅ）結合している親和性試薬をシーケンシングする工程、およびｆ）結合している親和性試薬の配列と未結合の親和性試薬の配列を比較し、どの親和性試薬が、試験した物質または基材に対する親和性を有していなかったか、または有する親和性が最小限であったかを決定する工程を伴い得る。該物質または基材からの結合している親和性試薬の収集は、１回またはそれより多くの溶出洗浄またはすすぎを伴い得る。

【００８３】

親和性試薬の特性評価スクリーニング

ペプチドの特性評価または適格性スクリーニングは、標的に結合すると認定された任意の親和性試薬において行われ得る。親和性試薬は、上記のようなスクリーニングにおいて同定されたものであってもよく、当該技術分野で知られた任意の方法によって得たものであってもよい。一部の実施形態において、他の考えられ得る配列における所望のエピトープに対する親和性試薬の結合親和性または特異性を測定するために二次特性評価スクリーニングが使用され得る。この二次スクリーニングでは、親和性試薬が他の配列を認識するかどうかを調べるために、考えられ得るＮ量体配列のライブラリーが使用され得る。一部の場合において、ライブラリーは、考えられ得るすべてのＮ量体配列のうちの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．９％または９９．９％より多くを含む。一部の場合において、ライブラリーは考えられ得るすべてのＮ量体配列を含む。親和性試薬が３量体に結合すると思われるならば、その他の配列は、考えられ得るすべての３量体（$20^3 = 8000$）であるように選択され得る。一部の実施形態において、考えられ得る対象の該エピトープであるように選択される配列を、フランキング配列などの他の配列内に組み込んでもよい。一部の実施形態において、所望のエピトープであるように選択される配列は、親和性試薬が所望のエピトープに到達することが可能となるように所望のエピトープが固相基材から充分遠い位置に存在するように、固相基材に結合する所望のエピトープの側部に付加されるフランキング配列または化学的リンカーを有していてもよい。親和性試薬が４量体に結合すると思われるならば、その他の配列は、考えられ得るすべての４量体（$20^4 = 160,000$）であるように選択され得る。一実施形態において、異なるＮ量体のプールはマルチウェルプレートの異なるウェル内または固相支持体の異なる領域上に固定化され得る。次いで親和性試薬がライブラリー

とともにインキュベートされ得、未結合の親和性試薬は穏やかに洗い流される。親和性試薬がライブラリーに結合されている領域は、親和性試薬を可視化するのに適した任意の方法によって検出され得る。一部の例では、親和性試薬は、タンパク質および／または核酸に結合する色素または試薬によって可視化され得る、あるいは親和性試薬は、ライブラリーへの添加前に検出可能な部分で標識され得る。一部の場合において、標的に対する親和性試薬の結合は、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）顕微鏡法、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）、生物発光共鳴エネルギー移動（ＢＲＥＴ）、ＮａｎｏＢＲＥＴまたは生体層干渉法（ＢＬＩ）によって検出され得る。

【００８４】

一部の場合において、親和性試薬の有無は、いくつかの異なる条件下－例えば異なるストリンジェンシー洗浄下（これは、例えば、異なる洗浄バッファー、異なる洗浄時間、異なる洗浄温度または異なるアジテーションレベルを使用することにより行われ得る）で調べられ得る。一部の場合において、親和性試薬の結合は、結合の時間的推移を得るために反復して経時的に測定され得る。一部の場合において、異なる条件下および／または異なる時点で親和性試薬の結合を測定することにより、標的に対する親和性試薬のＫＤ、ｋａまたはｋｄの推定が可能となり得る。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合は、約１秒（ｓ）、３０秒、１分間（ｍｉｎ）、２分、３分、５分、１０分、１５分、２０分、３０分、４５分、１時間（ｈｒ）、２時間、３時間、６時間、１２時間または１２時間より長い期間測定され得る。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合は、少なくとも約１秒、３０秒、１分、２分、３分、５分、１０分、１５分、２０分、３０分、４５分、１時間（ｈｒ）、２時間、３時間、６時間、１２時間または１２時間より長い期間測定され得る。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合は、約１２時間以下、６時間、３時間、２時間、１時間、４５分、３０分、２０分、１５分、１０分、５分、３分、２分、１分、３０秒、１秒または１秒未満の期間測定され得る。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合を、ある期間にわたって間隔を空けて測定してもよい。時間間隔は規則的であっても、パターン化しても、ランダムであってもよい。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合は、約１秒、５秒、１０秒、１５秒、３０秒、１分、５分、１０分、１５分、３０分、１時間、２時間、３時間、６時間または６時間より長い間隔で測定され得る。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合は、少なくとも約１秒、５秒、１０秒、１５秒、３０秒、１分、５分、１０分、１５分、３０分、１時間、２時間、３時間、６時間または６時間より長い間隔で測定され得る。１つの親和性試薬または親和性試薬プールの結合は、約６時間以下、３時間、２時間、１時間、３０ｉｎｓ、１５分、１０分、５分、１分、３０秒、１５秒、１０秒、５秒、１秒または１秒未満の間隔で測定され得る。

【００８５】

一部の実施形態において、所望の特性、例えば所望のオンレートおよびオフレートあるいは平衡結合定数（ｋａ）および解離定数（ｋｄ）などを有する親和性試薬を同定するために異なる洗浄条件および検出条件が使用され得る。一部の場合において、所望の親和性試薬は低オフレートを有するものであり得る。親和性試薬とエピトープ結合反応は：

［親和性試薬］・［エピトープ］・ｋａ＝［親和性試薬－エピトープ］・ｋｄ

の場合に平衡に達する。

【００８６】

一部の場合において、好ましい親和性試薬は、約１ｓ－１未満、１０－１ｓ－１、１０－２ｓ－１、１０－３ｓ－１、１０－４ｓ－１、１０－５ｓ－１、１０－６ｓ－１、１０－７ｓ－１、１０－８ｓ－１、１０－９ｓ－１または１０－１０ｓ－１であるｋｄ値を有するものであり得る。一部の場合において、不充分なオンレートは反応に加える親和性試薬の量を増やすことによって、または洗浄前のインキュベーション時間を長くすることによって代償され得るため、オフレートがオンレートより重要であり得る。一部の場合において、親和性試薬は、オフレートが、１回またはそれより多くの洗浄工程を経てイメージング工程の終了後まで親和性試薬が結合されたままであることが可能であるのに充分である

ように選択される。一部の場合において、親和性試薬は、少なくとも約１分間、２分間、３分間、４分間、５分間、６分間、７分間、８分間、９分間、１０分間、１１分間、１２分間、１３分間、１４分間、１５分間、１６分間、１７分間、１８分間、１９分間、２０分間、２５分間、３０分間、３５分間、４０分間、４５分間、５０分間、５５分間、６０分間または約６０分間より長くエピトープに結合されたままであり得る。

【００８７】

一部の場合において、好ましい親和性試薬は、ライブラリー内の１種類のＮ量体（例えば、３量体）のみに結合する。他の場合において、好ましい親和性試薬は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００種類または１００種類より多くの異なるＮ量体に結合し得る。一部の実施形態において、親和性試薬を洗い流す工程は漸増ストリンジェンシーで繰り返され得、結合されたままである親和性試薬が各洗浄工程後に検出され得る。一部の場合において、該好ましい親和性試薬は、任意のアミノ酸残基にフランキングされたＮ量体に結合する。一部の場合において、該好ましい親和性試薬は、考えられ得るすべてのアミノ酸残基のサブセットにフランキングされたＮ量体（例えば、３量体）に結合する。一部の場合において、特定の１つの標的エピトープまたは一群のエピトープに対して選択された親和性薬剤が、該１つの標的エピトープまたは一群のエピトープと異なるエピトープにも結合すると特性評価される場合があり得る。例えば、親和性試薬は、配列ＡＸＡを有する標的エピトープに対するものであると認定され得、このとき、Ｘは任意のアミノ酸を含み得る。ＡＸＡに対する該親和性試薬はまた、後続の特性評価でエピトープＲＳＲ、ＦＦＷおよびＹＩＣに結合すると認定されるかもしれない。一部の場合において、標的エピトープ群以外のエピトープに対する結合を有する寛容性の親和性試薬は、該寛容性の特異的エピトープが既知であるならば、依然としてペプチドエピトープの同定に有用な親和性試薬であり得る。

【００８８】

別の方法において、所望の１つのエピトープもしくは１つの標的エピトープまたは所望の一群のエピトープもしくは一群の標的エピトープに対して同定された親和性試薬は、新たな標的ライブラリーを作成するために修飾または成熟され得る。一部の場合において、親和性試薬の修飾または成熟は、同定された親和性試薬の結合領域の配列内の単一ヌクレオチド置換体または多ヌクレオチド置換体のライブラリーの作出を含み得る。他の場合において、親和性試薬の修飾または成熟は、同じエピトープに対する修飾型親和性試薬のライブラリーを作出するための１つもしくはそれより多くの非天然ヌクレオチドの代用または他の化学的修飾を含み得る。修飾または成熟された親和性試薬ライブラリーは、所望の１つのエピトープもしくは１つの標的エピトープまたは所望の一群のエピトープもしくは一群の標的エピトープに対して試験され、違う結合親和性、例えばより強い結合または標的エピトープ群以外のエピトープに対して違う寛容性を有する親和性試薬が同定され得る。

【００８９】

別の方法では、親和性試薬が固相支持体上に固定化され得、考えられ得るすべてのＮ量体のプールが親和性試薬に添加され得、未結合のＮ量体が洗浄によって除去され得、残りのＮ量体が解析され、親和性試薬によって結合される配列が見出され得る。反復スクリーニング工程が、違うストリンジェンシーの洗浄工程を伴って行われ得る。結合されたＮ量体は、任意の適当な方法、例えば質量分析または高速液体クロマトグラフィー質量分析を用いて同定され得る。一部の場合において、考えられ得るすべてのＮ量体のプールではなくランダムなＮ量体のプールが使用され得る。ランダムなＮ量体のプールが特性評価スクリーニングに使用される場合は、結合されたＮ量体と未結合のＮ量体の両方が同定され得る。結合されたＮ量体のプールまたは未結合のＮ量体のプールのいずれでもなかった配列は、後続の特性評価スクリーニングでの追跡のために記録され得る。一部の場合において、ランダムなＮ量体のプールは、該プールが、考えられ得るＮ量体配列の少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または９

９％より多くを含むことを確実にするために、親和性試薬に適用する前に特性評価され得る。一部の場合において、ランダムなＮ量体を用いて予備特性評価スクリーニングが行われ得、約３０種類未満、２５、２０、１５、１０または５種類のＮ量体に結合する親和性試薬が、考えられ得るすべてのＮ量体のプールを用いるさらなる特性評価に選択され得る。

【００９０】

親和性試薬所望のエピトープに特異的に結合するかどうか、または親和性試薬が該エピトープの下位区分に結合しているかどうかを調べるために、さらなるペプチド適格性スクリーニングが行われ得る。例えば、３量体配列ＡＫＤに特異的であると思われる親和性試薬は実際には二量体配列ＡＫに特異的であり得る。したがって、各Ｎ量体用親和性試薬について、その一組のすべての（Ｎ－１）量体に対するスクリーニング工程が行われ得る。一部の場合において、特性評価スクリーニングが行われており、親和性試薬によって結合されるその一組のすべてのＮ量体がわかっている場合、スクリーニングは、親和性試薬によって結合されるＮ量体に含まれている（Ｎ－１）量体のみに限定され得る。例えば、親和性試薬によって結合される唯一の４量体がＡＡＫＤならば、スクリーニングは、考えられ得るすべての３量体ではなくＡＡＫおよびＡＫＤに対して行われ得る。親和性試薬が（Ｎ－１）量体に結合するならば、（Ｎ－２）量体に対するさらなるスクリーニングが行われ、親和性試薬の特異性がさらに規定され得る。一部の場合では、（Ｎ－１）量体に結合する親和性試薬は、さらなるスクリーニングのために選択され得ない。他の場合では、（Ｎ－１）量体のうちの１種類以下に結合する親和性試薬が選択され得る。他の場合では、１種類より多くの（Ｎ－１）量体に結合する親和性試薬が、さらなるスクリーニングのために保持され得る。

【００９１】

さらなるペプチド適格性スクリーニングは、親和性試薬のその１つのエピトープまたは複数のエピトープに対する親和性におけるフランキング配列の効果を調べるために行ってもよい。この工程のため、配列αＸβ（ここで、Ｘは親和性試薬の１つエピトープまたは複数のエピトープであり、αおよびβは任意の１個またはそれより多くのアミノ酸であり得る）のペプチドのライブラリーが作出され得る。単一のエピトープに結合する親和性試薬の例において、αおよびβは各々単一のタンパク質である場合とし、結合されるエピトープの配列がセットであると仮定すると、所望のエピトープ長さに関係なく、考えられ得るαＸβ配列は４００種類ある。親和性試薬が２つまたはそれより多くの異なるエピトープに結合する場合、またはαおよびβが各々、アミノ酸なし、１個または１個より多くのアミノ酸であり得る場合では、考えられ得るαＸβの配列は多くなり得る。一部の場合において、このスクリーニング工程に使用されるαＸβペプチドセットは、親和性試薬の選択に使用した標的を構成したものと同じαＸβペプチドセットであり得る。親和性試薬は、αＸβ配列セットに対して標準的なスクリーニング方法を用いてスクリーニングされ得る。親和性試薬が結合するαＸβ配列の一覧ならびに相対結合親和性を精査することにより、親和性試薬の結合親和性に対するフランキング配列の効果を調べることが可能になり得る。強い効果がみられたならば、さらなるスクリーニングが、より長鎖のフランキング配列で行われ得、例えば、第１のライブラリーの配列がペプチドαＸβ（ここで、αおよびβは各々、単一のタンパク質である（ｗｈｅｒｅ））からなるならば、後続のスクリーニングは、γＸδ（ここで、γおよびδは各々、２個のアミノ酸を含む）からなるペプチドのライブラリーで行われ得る。

【００９２】

図３Ａは、一部の実施形態による、親和性試薬の特性評価のプロセスにおけるスクリーニング工程の例示的なフローチャートを示す。親和性試薬は該親和性試薬の検出を容易にするために蛍光標識で標識される。次いで親和性試薬は、考えられ得るすべてのＮ量体（例えば、３量体）配列を含むペプチドのプールに適用される。考えられ得るすべてのＮ量体配列を含むペプチドのプールが、アレイとして固相支持体上に固定化され得る。一部の実施形態において、考えられ得るすべてのＮ量体配列を含むペプチドプールは１つまたはそ

れより多くの単一分子タンパク質アレイ上に固定化され得る。一部の実施形態において、複数のＮ量体配列は固相基材上に固定化され得る。一部の実施形態において、複数のＮ量体配列は単一分子タンパク質アレイ上に固定化され得る。次いで、パラレルで行われ得る別の工程において、親和性試薬は、考えられ得るすべての（Ｎ－１）量体配列を含むペプチドのプールに適用される。親和性試薬によって結合されるすべてのＮ量体ペプチドおよび（Ｎ－１）量体ペプチドが同定される。同定された結合Ｎ量体および結合（Ｎ－１）量体の配列を含む考えられ得るすべての（Ｎ＋２）量体ペプチドを含む（Ｎ＋２）量体ペプチドプールが得られる。一例として、親和性試薬がエピトープＡＡＡのみに結合することがわかっているならば、考えられ得るすべての（Ｎ＋２）量体ペプチドのプールは図３Ｂに示すようにペプチドαＡＡＡβからなる。次いで親和性試薬は（Ｎ＋２）量体ペプチドプールに適用され、全３回のスクリーニング工程のデータが編集され、親和性試薬の結合特性評価が得られる。他の例において、工程が省かれてもよく、異なる順序で行われてもよい。タンパク質の適格性スクリーニングは、親和性試薬が、ペプチドではなくタンパク質の構成において所望の１つまたは複数のエピトープに結合することを確認するために行われ得る。具体物および配列が既知のタンパク質が固相支持体上に固定化され、親和性試薬に曝露され得る。タンパク質は、精製タンパク質ストック液を固相支持体に適用してもよく、固相支持体上で核酸プログラム型タンパク質アレイ（ＮＡＰＰＡ）などのプロセスにより合成してもよい。一部の場合において、このスクリーニングに使用されるタンパク質は、親和性試薬の予測される１つもしくは複数のエピトープまたは既知の１つもしくは複数のエピトープを含むタンパク質からなるものであり得る。一部の場合において、このスクリーニングに使用されるタンパク質は、親和性試薬の予測される１つもしくは複数のエピトープまたは既知の１つもしくは複数のエピトープを含まないタンパク質からなるものであり得る。一部の場合において、このスクリーニングに使用されるタンパク質は、親和性試薬の予測される１つもしくは複数のエピトープまたは既知の１つもしくは複数のエピトープを含むタンパク質とこのようなエピトープを含まないタンパク質の両方からなるものであり得る。いろいろなタンパク質に対する親和性試薬の結合は、当該技術分野で知られた任意の方法によって評価され得る。例えば、結合している親和性試薬は、親和性試薬特異的抗体によって、タンパク質もしくは核酸に結合する色素によって、またはスクリーニング前に親和性試薬を検出可能な部分で標識することによって同定され得る。結合タンパク質と未結合タンパク質が決定されたら、その配列が比較され、どのくらい頻繁に親和性試薬がその１つまたは複数のエピトープに結合するか、および結合が周囲のタンパク質配列によって影響されるのかどうかが調べられ得る。また、結合結果およびタンパク質配列を機械学習アルゴリズムにフィードし、最も見込みのある結合部位を検証するしてもよい。また、オフターゲット効果もこの方法によって調べられ得る。一部の場合において、エピトープに対する親和性試薬は、これが該エピトープを含むタンパク質の少なくとも約１％、２％、３％、５％、７％、１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９５％より多くに結合する場合に選択され得る。一部の場合において、エピトープに対する親和性試薬は、これが該エピトープを含んでいないタンパク質の約５０％未満、４０％、３０％、２０％、１０％、５％または５％未満に結合する場合に選択され得る。一部の場合において、同じエピトープに対して多種類の親和性試薬が選択され得る。前記多種類の親和性試薬は一緒にプールされ、親和性試薬プールとして使用され得る。

【００９３】

親和性試薬は、絶対的様式または確率的様式で特性評価され得る。絶対的特性評価は、既知エピトープ、エピトープ群、タンパク質特性、または親和性試薬が親和性を有する対象の他の特性評価パラメータのセットを構築することを含み得る。親和性試薬の確率的特性評価は、１つのエピトープまたは一群のエピトープに対する結合の尤度の構成依存的測定または構成非依存的測定を含み得る。構成依存的な親和性薬剤の特性評価では、例えば、親和性試薬は、ペプチドまたはタンパク質がネイティブ状態である場合では２５％の尤度のエピトープＸ結合、およびペプチドまたはタンパク質が変性している場合では７５％の

尤度のエピトープＸ結合を有することになり得よう。構成非依存的特性評価では、例えば、親和性試薬は３５％の尤度のエピトープＸ結合を有することになり得よう。親和性試薬の特性評価は多くの結合条件下で、例えば温度範囲、緩衝条件（例えば、ｐＨ、モル濃度）、結合競合体の存在、ペプチドまたはタンパク質のフォールディング状態（例えば、ネイティブ、非ネイティブ）および親和性試薬の結合に影響し得る任意の他の条件下で行われ得る。

【００９４】

既知タンパク質との相互作用の結合データを用いた親和性試薬の特性評価

プロテオーム（例えば、ヒトプロテオーム、酵母プロテオーム、大腸菌プロテオーム）を構成するタンパク質において特定の親和性試薬の結合親和性を特性評価する様式を見出すことは有用である。Ｕｎｉｐｒｏｔ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｐｒｏｔｅｏｍｅｓ／ＵＰ０００００５６４０）の参照プロテオームデータベースに規定された約７０，０００の古典的タンパク質配列を調べたとしても、ヒトプロテオーム内のタンパク質セット全体において特定の親和性試薬セットの結合親和性を特性評価するためには多大な労力がかかるであろう。さらに、プロテオフォームを考慮する場合、ヒトプロテオーム内において同定され得る相違するプロテオフォームの数は数十万または数百万の数となり得よう。そのため、親和性試薬の結合親和性を、いくつかの未知タンパク質において適用できる様式で効率的に特性評価することが有益である。一部の実施形態において、親和性試薬の結合親和性は、既知タンパク質との親和性試薬の相互作用を評価することによりにより得られる。一部の実施形態において、親和性試薬の結合親和性は、配列データベース、例えばＮＣＢＩまたはＵｎｉｐｒｏｔの参照プロテオームに由来する配列を有するタンパク質との親和性試薬の相互作用を評価することによりにより得られる。一部の実施形態において、本明細書において提供する方法に使用されるタンパク質配列は既知の天然起源を有しないもの、例えばランダムな配列を有するタンパク質であり得る。一部の実施形態において、非天然配列を有するタンパク質の合成は、モデル、例えば本明細書に論考しているものへのさらなる入力を提供するのに有用であり得る。一部の実施形態において、既知タンパク質内の特定の標的に対する親和性試薬の結合親和性が、該既知タンパク質内の該標的の存在に基づいて、および該既知タンパク質内の該標的のコピー数に基づいて評価され得る。

【００９５】

したがって、一部の場合において、親和性試薬、例えば本明細書に開示した親和性試薬は、既知タンパク質のアレイに対する親和性試薬のスクリーニングによって特性評価され得る。既知タンパク質に対する親和性試薬のスクリーニングにより得られた結合データは、親和性試薬が結合する１つのエピトープまたは多種類のエピトープが未知タンパク質内に存在するかどうか評価するために使用され得る結合親和性情報を得るために使用され得る。特に、各親和性試薬は、１つまたはそれより多くのエピトープに結合し得る。さらに、各タンパク質は、各々が特定の親和性試薬に結合し得る多種類のエピトープを含み得る。特定の親和性試薬に結合する多種類のエピトープを含むタンパク質では、該タンパク質は、多コピーの特定のエピトープを有するものであり得る、および／または多コピーの相違するエピトープを有するものであり得る。そのため、一部の場合において、特定の１つのタンパク質が多数の親和性試薬分子に結合し得、該多数の親和性試薬分子の各々がタンパク質内に存在する複数のエピトープのうちの１つに結合している可能性がある。したがって、親和性試薬を特性評価し、タンパク質に対する結合を予測することを補助となる情報は、未知タンパク質を同定する方法に適用可能であり得る。一部の実施形態において、得られた結合データは、その配列がタンパク質データベース内に示される未知タンパク質を同定するために使用され得る。一部の実施形態において、該結合データは、未知タンパク質を特性評価するために使用され得る特定のプロフィールを得るために、該未知タンパク質と関連している配列が同定されるまで使用され得る。特に、既知タンパク質のアレイ内のタンパク質との親和性試薬の相互作用で得られた結合データは、該既知タンパク質内の１つまたはそれより多くのエピトープに対する親和性試薬の結合親和性を測定するために

使用され得る。これは、さらには、１コピーまたはそれより多くの該１つまたはそれより多くのエピトープを有するタンパク質に対するスクリーニングされた親和性試薬の結合親和性の評価において使用され得る。付加的または択一的に、１つまたはそれより多くのエピトープに対する親和性試薬の結合親和性は、特性評価済みの１つまたはそれより多くのエピトープと類似しているか、または同じである他のエピトープを有するタンパク質に対するスクリーニングされた親和性試薬の結合親和性の評価に使用され得る。一部の実施形態において、既知タンパク質のアレイ内のタンパク質に対してスクリーニングされた親和性試薬の相互作用での結合データは、特定の型のエピトープ、例えば、特定の長さの考えられ得る各エピトープ、完全タンパク質配列の特定のサブセット内のエピトープ、フォールディングしたタンパク質構造の特定のロケーションのエピトープ、フォールディングしたタンパク質構造内に高度に到達可能であることが予測もしくは観察される各エピトープ、または経験的結合スクリーニングもしくはインシリコ結合スクリーニングにより既知タンパク質のアレイ内の１つもしくはそれより多くのタンパク質内に同定された各エピトープの親和性特性を調べるために使用され得る。一部の実施形態において、既知タンパク質のアレイ内のタンパク質に対してスクリーニングされた親和性試薬の相互作用での結合データは、既知タンパク質の該アレイ内の１つまたはそれより多くのタンパク質内の多種類のエピトープとの親和性試薬の結合親和性を測定するために使用され得る。一部の実施形態において、既知タンパク質のアレイ内のタンパク質に対してスクリーニングされた親和性試薬の相互作用での結合データは、多コピーの特定のエピトープを有するタンパク質との親和性試薬の結合親和性を測定するために使用され得る。

【００９６】

既知タンパク質のアレイに対する親和性試薬のスクリーニングを実施するための方法を後述する。後述するように、該方法により、試験した親和性試薬は、少なくとも１つのＮ個のアミノ酸のエピトープ（例えば、三量体）またはＮ量体の組合せに結合することが示され得る。該方法の諸実施形態は、三量体以外の異なる長さの１つまたはそれより多くのエピトープ、例えば二量体４量体、５量体、６量体、７量体、より長鎖のエピトープおよび不連続エピトープを含み得る。一部の実施形態において、該方法により、試験した親和性試薬は、少なくとも１つの二量体または二量体の組合せに結合することが示され得る。一部の実施形態において、該方法により、試験した親和性試薬は、少なくとも１つの二量体もしくは三量体または二量体もしくは三量体の組合せに結合することが示され得る。一部の実施形態において、該方法により、試験した親和性試薬は、二量体、三量体、４量体、５量体、６量体、７量体、７量体より長鎖のＮ量体からなる群より選択される２つまたはそれより多くのＮ量体および不連続エピトープに結合することが示され得る。一部の実施形態において、該方法により、試験した親和性試薬は、二量体、三量体、４量体、５量体、６量体、７量体、７量体より長鎖のＮ量体からなる群より選択される３つまたはそれより多くのＮ量体および不連続エピトープに結合することが示され得る。一部の実施形態において、該方法により、試験した親和性試薬は、二量体、三量体、４量体、５量体、６量体、７量体、７量体より長鎖のＮ量体からなる群より選択される３つより多くのＮ量体および不連続エピトープに結合することが示され得る。

【００９７】

本明細書において提供する方法を使用し、タンパク質の推論が計算され得る。一部の実施形態において、タンパク質の推論は、１つまたはそれより多くの考慮事項、例えば、該タンパク質に対する特定の親和性試薬の結合測定値；該タンパク質の考えられ得る候補タンパク質のタンパク質配列に関する情報；および各候補タンパク質に対する各親和性試薬について予測される結合度合いにおいて特定の信頼度を有する予測が誘導され得る結合親和性情報などの情報に基づいて計算され得る。本明細書に記載のような一部の方法は、タンパク質に対する親和性試薬の結合の確率が、該タンパク質が一次配列であるものとしてコンピューティングされ得る親和性試薬の統計モデルを得るために提供される。

【００９８】

一部の実施形態において、統計モデルは、複数の既知タンパク質の各々に対する複数の特

定の親和性試薬の一連の結合測定値を用いてトレーニングされ得る。このアプローチは、直接的な経験的測定が利用可能でない場合の親和性試薬－タンパク質間結合を予測するために使用され得る。該方法をヒトプロテオーム内のタンパク質に提供する状況では、候補ヒトタンパク質の最小限のリストはおよそ２０，０００種類のタンパク質を含み得る。さらに、スプライシングバリアント、多型、部分分解物およびさらなる非ヒトゲノムを許容すると候補タンパク質は数十万または数百万の数に急速に拡大し得る。

【００９９】

一部の場合において、本開示は、ランダムな配列を有するペプチドパネルまたはサブセットのみが標的化対象エピトープを含むペプチドパネルに対する選択された親和性試薬のスクリーニングによる、選択された親和性試薬を特性評価する方法を含み得る。一部の場合において、スクリーニング対象のペプチドセットまたはタンパク質セットに存在しないエピトープ（例えば、非天然アミノ酸を含むエピトープ）に対する選択された親和性試薬の結合が補完モデルを用いて補完され得る。一部の場合において、補完モデルは、複数のペプチドまたはタンパク質に対して選択された親和性試薬の結合測定値によりトレーニングされ得る。一部の場合において、補完モデルは、複数のタンパク質またはペプチドに対する他の親和性試薬の結合測定値によりトレーニングされ得る。一部の場合において、補完モデルは、例えばアミノ酸置換行列（例えば、ＰＡＭ、ＢＬＯＳＵＭ）、アミノ酸特性（例えば、電荷、疎水性、極性表面積）、生理化学ベースのアミノ酸距離（例えば、グランサム（Ｇｒａｎｔｈａｍ）距離）またはその組合せから計算されるエピトープ類似性メトリクス（ｍｅｔｒｉｃｓ）によって補われ得る。

【０１００】

方法

一部の実施形態において、既知タンパク質配列のアレイを得る。一部の実施形態において、この既知タンパク質のアレイは、純粋なタンパク質試料をチップ上にスポットすることにより作成され得る。一部の実施形態において、この既知タンパク質のアレイは、例えば核酸プログラム型タンパク質アレイ（ＮＡＰＰＡ）の使用によってタンパク質の翻訳を直接チップ上で行うことにより作成され得る。１つまたはそれより多くの特定のアレイにおいて解析され得る既知タンパク質の数は、５０未満の異なるタンパク質配列を含み得る、５０の異なるタンパク質配列を含み得る、５０より多くのタンパク質配列を含み得る、およそ１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、２，０００、３，０００、５，０００、１０，０００、１５，０００、２０，０００または２０，０００より多くのタンパク質配列を含み得る。一般的概念として、解析されるタンパク質が多くなるほど、開発されるモデルの精度は高くなり得る。一部の実施形態において、解析され得る既知タンパク質の数は、とりわけ一例として約３００～約３０００の異なるタンパク質配列；約５００～約２０００の異なるタンパク質配列；約６００～約１５００の異なるタンパク質配列；約６００～約１０００の異なるタンパク質配列；または約１０００～３０００の異なるタンパク質配列であり得る。一部の実施形態において、各既知タンパク質は、アレイ上の単一のロケーションに多コピーで存在し得る。一部の実施形態において、各タンパク質は、アレイ内の数多くのロケーションに多コピーで存在し得る。一部の実施形態において、各タンパク質は、アレイにおいて２つのロケーション、３つのロケーション、４つのロケーション、５つのロケーション、６つのロケーション、７つのロケーション、８つのロケーション、８つより多くのロケーション、または異なる数の組合せのロケーションに存在し得る。一部の実施形態において、各タンパク質は、アレイにおいて１、２、３、４、５、６、７、８つまたは８つより多くの各ロケーションに約１０００コピーより多く、２０００コピー、３０００コピー、５０００コピー、１０，０００コピー、２０，０００コピー、５０，０００コピー、１００，０００コピー、５００，０００コピー、１，０００，０００コピー、２，０００，０００コピー、５，０００，０００コピー、１０，０００，０００コピー、１００，０００，０００コピー、１０億コピー、１００億コピー、１０００億コピーまたは１０００億コピーより多くで存在し得る。さらに、一部の実施形態において、親和性試薬はま

た、特定のロケーションのタンパク質の数が少ないと評価されること、例えば１コピー／ロケーション、２コピー／ロケーション、３コピー／ロケーション、４コピー／ロケーション　５コピー／ロケーション、１０コピー／ロケーション、または１０コピー超／ロケーションによっても特性評価され得る。一部の実施形態において、ロケーションは、各特定のロケーションが別のロケーションと光学検出または他の検出センサーに基づいて分割可能に相違する場合、互いに区別され得る。

【０１０１】

一部の実施形態において、アレイ内の既知タンパク質に対する１つまたはそれより多くの親和性試薬の結合は、蛍光標識した親和性試薬をアレイにハイブリダイズさせ、該アレイ上の各スポットで観察された蛍光を測定することにより評価され得る。一部の実施形態において、各スポットの各タンパク質の具体物は、蛍光（結合の代用物としての）がタンパク質の具体物にマッピングされ得るように既知のものにしてもよい。

【０１０２】

一部の実施形態において、Ｎ量体（例えば、三量体）エピトープは、任意のペプチド内の所望のエピトープまたは標的エピトープ（例えば、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、部分分解タンパク質）より長鎖の特定のエピトープに対する親和性試薬の結合の評価に使用され得る。一部の実施形態において、本明細書において論考される方法は、三量体エピトープを用いて適用され得る。一部の実施形態において、タンパク質レベルでの蛍光測定値が、個々のエピトープ、例えば個々の各エピトープの蛍光測定値に対する分数的（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ）寄与を導き出すために使用され得る。一部の実施形態において、タンパク質結合は、タンパク質配列における考えられ得るＮ量体の各々、例えばタンパク質配列における考えられ得る８０００種類の三量体のカウント数と該Ｎ量体による蛍光分数の線形結合としてモデル化され得る。三量体では、これは：

【数２】

$$F_{pr} = \sum_{t=1}^{t=8000} c_{t,pr}\beta_t$$

【０１０３】

と示され得、

式中：

Ｆｐｒ＝タンパク質ｐｒの測定値（例えば、蛍光）

Ｃｔ，ｐｒ＝タンパク質ｐｒ内三量体ｔのカウント数

βｔ＝三量体ｔに対する親和性試薬の結合による蛍光分数

一部の実施形態において、

多種類のタンパク質に対する三量体エピトープに対する親和性試薬の測定値は、方程式：

【数３】

$$\vec{F} = C\vec{\beta} + \epsilon$$

【０１０４】

の線形システムを構成し得、

式中：

【数４】

$$\vec{F}$$

【０１０５】
は、各タンパク質の実測値（例えば、蛍光）を含む長さＮの列ベクトルである
Ｃは、三量体のカウント数と各測定対象タンパク質内の特定の三量体のカウント数である各列とのＮ×８０００行列である
【数５】

$$\vec{\beta}$$

【０１０６】
は、考えられ得る各三量体に対する該試薬の結合による蛍光分数である長さ８０００の列ベクトルである
εは、バックグラウンド結合またはノイズフロアを補正するためのスカラー定数である
一部の実施形態において、本明細書において提供する方法は、非標準アミノ酸および／または異なる長さおモデルＮ量体を含み得る。既知のＮＡＰＰＡまたは同様の結合測定値の場合、
【数６】

$$\vec{F}$$

【０１０７】
およびＣは既知変数であり、
【数７】

$$\vec{\beta}$$

【０１０８】
および
εの値は線形回帰または関連アプローチによって得られ得る。特に、非負最小二乗法およびラッソ（ｎｏｎ－ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｌｅａｓｔ　ａｂｓｏｌｕｔｅ　ｓｈｒｉｎｋａｇｅ　ａｎｄ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｐｅｒａｔｏｒ）（ＬＡＳＳＯ）回帰は、本明細書に記載の方法の考慮事項に非常に適したものであり得る。非負最小二乗法では解
【数８】

$$\vec{\beta}$$

【０１０９】
が非負に制限され、非負ＬＡＳＳＯ回帰ではさらに、スパース制約が課される。ＬＡＳＳＯ回帰は、システムが未定である場合、すなわち、測定される固有タンパク質の数が固有三量体の数（この例では８，０００）より少ない場合に特に有効である。一部の実施形態において、各エピトープに由来する蛍光分数は、個々のエピトープに対する特定の親和性試薬の結合特性、例えば結合速度論を推定するために使用され得る。一部の実施形態において、相対蛍光分数は、各エピトープに対する親和性試薬の相対結合親和性に比例するとみなされ得る。一部の実施形態において、蛍光分数は、フルオロフォア１個あたりの蛍光カウント数で割り算し、次いでアレイ上のスポット１箇所あたりの期待タンパク質分子数で割り算することによって被結合部位の割合の計算値に変換され得る。この方法のシミュ

レーションを実施例２に示す。実施例２では、理論的親和性試薬の一組の結合親和性を７２０種類のヒトタンパク質に対する該親和性試薬の結合の予測に使用し、次いで、予測される結合データの解を求め、考えられ得る各三量体エピトープに対する親和性試薬の親和性を調べる。

【０１１０】

親和性試薬の結合に対するタンパク質のモデリングの実施形態から収集されたデータは、タンパク質の結合親和性をタンパク質の一次配列から予測する他のモデルをトレーニングするのを補助するために使用され得る。一部の実施形態において、親和性試薬の結合に対するタンパク質のモデリングの実施形態から収集されたデータは、タンパク質の結合親和性を、その一次配列（例えば、アミノ酸組成、三量体カウント数、予測される三次元構造）の誘導体から予測する他のモデルをトレーニングするのを補助するために使用され得る。一部の実施形態において、該モデルは、異なる長さを有するエピトープ（例えば、１量体、２量体、４量体など）または異なる長さを有するエピトープの混合物について論考したものと類似のパラメータを含み得る。一部の実施形態において、該モデルでは、例えば、三量体への親和性を観察された蛍光と関連付ける指数関数または三量体レベルでの親和性が乗算され、タンパク質レベルでの親和性を得る乗法モデルを用いる非線形モデルが使用され得る。一部の実施形態において、ニューラルネットワークが、タンパク質配列または三量体組成からタンパク質結合親和性を予測するために使用され得る。さらに、サポートベクトル回帰モデルが、タンパク質配列または三量体組成からタンパク質結合親和性を予測するために使用され得る。

【０１１１】

さらなる方法の一例では、タンパク質レベルの結合測定値しか入手可能でない場合、タンパク質レベルの結合を推進するＮ量体の同定が可能となり得る。この方法は、結合される分子（例えば、ペプチド）が、エピトープより長いタンパク質くらいの（ｕｐ　ｔｏ　ａｎｄ　ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）配列を有する任意の状況において機能し得る（例えば、１５量体がコンジュゲートされたＰＥＰｐｅｒＰｒｉｎｔチップの三量体エピトープの学習）。一部の場合において、親和性試薬は、単一のタンパク質に対して親和性を有することが示される。追跡実験なしでは、該タンパク質のどの部分配列が該タンパク質に対する親和性試薬の親和性を推進するのかを調べることは、コンピュータ計算による解決は困難であり得る。しかしながら、数百のタンパク質に対する該親和性試薬の結合測定値が取得され、該親和性試薬がタンパク質の多くに結合される場合、パターンが出現し始めることがあるかもしれない。一部の場合において、親和性試薬は、例えば特定のＮ量体（例えば、三量体）を内部に有するタンパク質に有利であり得る。本明細書に記載のアルゴリズムは、収集されたタンパク質結合の測定値から親和性試薬の三量体への結合確率（親和性試薬が、このタンパク質に関して調べた場合に考えられ得る８０００種類の三量体の各々に結合する確率）を求めることに対するアプローチである。より具体的には、タンパク質結合の測定値はタンパク質に対するプローブの結合分数である。例えば、１，０００コピーの単一のタンパク質をアレイ上に堆積させ、ハイブリダイゼーション後、親和性試薬が２５０のタンパク質に結合した場合、結合分数は０．２５となり得よう。記載の方法は、他の特性または配列長さを含むエピトープに拡張され得る。

【０１１２】

該アプローチでは、三量体への結合確率にビルド（ｂｕｉｌｔ）親和性試薬のタンパク質結合の確率モデルが使用され得る。このモデルにより、タンパク質が一次配列であると仮定すると、単一コピーの任意のタンパク質に対する単一分子の親和性試薬の結合の確率が推定され得る。

【０１１３】

タンパク質に対する親和性試薬の結合確率ｐは：

【数９】

$$p = 1 - \prod_{j=1}^{8000} \theta_j^{x_j}$$

【０１１４】
とモデル化され、
ここで：
Ｘ：基剤タンパク質内の各三量体ｊのカウント数
【数１０】

$$X = \{x_1, x_2, x_3 \ldots x_{8000}\} \text{ここで} x_j \in \mathbb{Z}^*$$

【０１１５】
θ：結合モデルパラメータ．各三量体に結合しないプローブ確率ベクトル
θ＝｛θ１、θ２、θ３…θ８０００｝ここで０≦θｊ≦１
親和性試薬がタンパク質に結合しない確率は１－ｐである。
【０１１６】
親和性試薬が任意の特定の三量体ｊに結合する確率は１－θｊである。
【０１１７】
観察される結合結果が単一の基剤タンパク質に対するものであると仮定すると、特定の親和性試薬の結合モデルの尤度は：
【数１１】

$$L(\theta|y,X) = \left(\prod_{j=1}^{8000} \theta_j^{x_j}\right)^{1-y} \left(1 - \prod_{j=1}^{8000} \theta_j^{x_j}\right)^{y}$$

【０１１８】
であり、
ここで：
ｙ：結合結果
【数１２】

$$y = \begin{cases} \text{結合する場合は}1 \\ \text{結合しない場合は}0 \end{cases}$$

【０１１９】
ｌｏｇ－尤度は：
【数１３】

$$log\big(L(\theta|y,X)\big) = (1-y)\sum_{j=1}^{8000} x_j \log\theta_j + y\log\left(1 - \prod_{j=1}^{8000} \theta_j^{x_j}\right)$$

【０１２０】
である。

【０１２１】
また、多数の結合結果のｌｏｇ尤度も計算され得る。
【０１２２】
Ｎ個の単一コピーの基剤タンパク質のＮ個の結合結果が観察された場合：
ＹはＮ個の結合結果のベクトルである
Ｘは、Ｎ個の基材の各々での三量体のカウント数のＮ×８０００行列であり、ここで、任意の行Ｘｉは８０００種類のうちのｉ番目の基材の各三量体のカウント数である。
【０１２３】
この観察結果をセットと仮定すると、結合モデルθのｌｏｇ尤度は：
【数１４】

$$log\big(L(\theta|Y,X)\big) = \sum_{i=1}^{N}\left((1-y_i)\sum_{j=1}^{8000} x_{ij}\log\theta_j + y_i log\left(1-\prod_{j=1}^{8000}\theta_j^{x_{ij}}\right)\right)$$

【０１２４】
である。
【０１２５】
上記の尤度関数の最大化は、親和性試薬の結合モデルのパラメータθの推定値
【数１５】

$$\hat{\theta}$$

【０１２６】
を得るために使用され得る。現状のこの公式では、複数コピーの同じタンパク質に対する多数の結合結果が行列Ｘにおいてベクトルの個々の成分および行として表され得、これは、ｌｏｇ尤度をコンピュータ計算するためにソフトウェアを使用する場合、これは大きなメモリーフットプリントになり得る。必要とされる計算資源を減らすため、同じ計算が、よりコンパクトな結合データ表現を用いて行われ得、この場合、結合結果は、結果収集時に各固有基剤タンパク質での結合事象および非結合事象の数にコラプス（ｃｏｌｌａｐｓｅ）される。この再公式では、コンピュータ計算に使用される行列およびベクトルの次元が、観察された結合結果の数ではなくデータセット内の固有タンパク質の数のスケールになる。
【０１２７】
この択一的な公式では：
【数１６】

$$log\big(L(\theta|U,B,T)\big) = \sum_{i=1}^{M}\left(u_i\sum_{j=1}^{8000} t_{ij}\log\theta_j + b_i log\left(1-\prod_{j=1}^{8000}\theta_j^{t_{ij}}\right)\right)$$

【０１２８】
ここで：
結合の観察結果はＭ個の固有タンパク質からなる
Ｂは各固有タンパク質に対する結合のカウント数のベクトルであり、Ｕは非結合のカウント数のベクトルである。どちらも長さはＭ
Ｔは、各固有タンパク質での三量体のカウント数のＭ個の行と８０００個の列の行列であ

る。
【０１２９】
このアプローチにより結合モデル
【数１７】

$$\hat{\theta}$$

【０１３０】
が、関数
【数１８】

$$f(\hat{\theta}) = -log\left(L(\hat{\theta}|U,B,T)\right)$$

【０１３１】
を、Ｌ－ＢＦＧＳ－Ｂアルゴリズムを用いて最小化することにより推定され、
【数１９】

$$\hat{\theta}$$

【０１３２】
の各パラメータはゼロより大きく１より小さくなるように制約される。
【０１３３】
最大尤度の推定速度は、関数
【数２０】

$$J = j(\hat{\theta})$$

【０１３４】
を与え、パラメータ推定値を
【数２１】

$$\hat{\theta}.$$

【０１３５】
と仮定すると、ｆの解析勾配ベクトルＪを直接コンピュータ計算することにより改善される。解析勾配は：
【数２２】

$$J = \boldsymbol{j}(\hat{\theta}) = \left[\frac{\partial f}{\partial \widehat{\theta_1}} \quad \frac{\partial f}{\partial \widehat{\theta_2}} \quad \cdots \quad \frac{\partial f}{\partial \widehat{\theta_{8000}}}\right]$$

【数２３】

$$\frac{\partial \mathbf{f}}{\partial \widehat{\theta_q}} = -\sum_{i=1}^{M}\left(\frac{u_i t_{iq}}{\widehat{\theta_q}} - \frac{b_i t_{iq}\prod_{j=1}^{8000}\hat{\theta}_j{}^{t_{ij}}}{\hat{\theta}_q\left(1-\prod_{j=1}^{8000}\hat{\theta}_j{}^{t_{ij}}\right)}\right)$$

【０１３６】
である。
【０１３７】
示したように、該アプローチは、実験観察結果のセット内の各固有タンパク質での結合事象および非結合事象の個々のカウント数で機能し得る。しかしながら、結合分数しか測定または推定され得ない場合、ベクトルＢは、データセット内のＭ個の固有タンパク質の各々に対する結合分数を含む長さＭのベクトルＦで置き換えられ得、ベクトルＵはベクトルＤ＝１－Ｆで置き換えられ得る。例えば、核酸プログラム型タンパク質アレイ（ＮＡＰＰＡ）に対する蛍光標識親和性試薬候補のハイブリダイゼーション後、蛍光強度を測定するためにイメージングを行う場合、Ｆの値は、１（全結タンパク質）の結合分数で観察されるであろう蛍光強度の推定値で割り算した所与のタンパク質の蛍光強度として推定され得る。
【０１３８】
特定の三量体が結合データセット内に全く観察されず、単一の固有タンパク質配列内にのみ観察されるか、またはタンパク質配列構成の各々の別の特異的三量体で常に観察される場合、三量体の結合確率の学習は困難であり得る。かかる三量体では、結合確率は、例えば、該三量体の確率を、配列または生化学的特性に基づいて類似している別の三量体のものと同等となるように設定することにより補完され得る。一部の場合において、補完は、該三量体の確率を、補完しなかった他のすべての三量体の平均結合確率に設定することにより行われ得る。
【０１３９】
上記のアプローチは、二量体、三量体、４量体、５量体などからビルドされる結合モデルの学習に適用され得る。さらに、これは、前述のＮ量体のサブセットまたは混合物を含むモデルにも適用され得る。そのためには、行列Ｍにおいて、各三量体での各タンパク質におけるカウント数（１～８０００）である列が、各タンパク質における各Ｎ量体のカウント数である列で置き換えられ得る。さらに、パラメータベクトルθは、該モデルで使用されるＮ量体の各々に対する結合確率となろう。
【０１４０】
親和性試薬の特性評価に対する改善
上記のコンピュータ実装アルゴリズムにより親和性試薬の結合特異性の特性評価が改善され、特性評価されていない親和性試薬の結合親和性を予測するための迅速なスクリーニング方法が可能となり得る。例えば、結合を、数百万のペプチドまたはタンパク質を含むタンパク質プールまたはペプチドライブラリーに対して、特性評価済みの親和性試薬の既知プールを用いて測定することができよう。そのため、後続の特性評価されていない親和性試薬の結合を、同じタンパク質プールまたはライブラリーに対して測定することができるかもしれない。上記のアルゴリズムにより、特性評価されていない親和性試薬に対する結合親和性の迅速な特性評価が可能となり得る。上記の方法の利用により、結合親和性が不明の親和性薬剤のスクリーニングおよび特性評価が改善され、それによりタンパク質の特性評価または同定方法における使用のための親和性試薬プールに追加される１つまたはそれより多くの親和性試薬がもたらされ得る
上記のコンピュータ実装アルゴリズムは単一分子測定データを用いて動作（ｏｐｅｒａｔｅ）し得る。上記のコンピュータ実装アルゴリズムは、完全タンパク質配列を用いて動か（ｗｏｒｋ）すことが可能であり得る。上記のコンピュータ実装アルゴリズムは、親和性試薬を特性評価する場合に数億または数十億のデータポイントを用いて動かすことが可能

であり得る。
【０１４１】
上記のコンピュータ実装アルゴリズムは、長鎖配列から信頼性のあるＮ量体レベルの結合測定値をプルすることが可能であり得、それにより、かかるアプローチなしでは実現可能にはなり得ない数多くの新しい潜在的親和性試薬特性評価方法を可能となり得る。上記のアルゴリズムは結合親和性を、多様なペプチド供給源またはエピトープ結合データ、例えば：質量分析、スポット式ペプチドアレイ、スポット式タンパク質アレイ、ファージディスプレイ、ＮＡＰＰＡおよびプリント式ペプチドアレイ（例えば、ＰＥＰｐｅｒＰｒｉｎｔ）を伴うペプチドプルダウンに基づいて評価することが可能であり得る。上記のコンピュータ実装型により、これまでに特性評価されていない親和性試薬の結合親和性を、厳密測定または絶対的測定なしでタンパク質の同定に使用することが可能となり得る。
【０１４２】
親和性試薬のタンパク質結合に対する二次構造の影響の評価
タンパク質に対する親和性試薬の結合は、二次構造要素、例えば、ヘリックス、ターン、ループおよびシートの存在に影響され得る。一部の実施形態において、ペプチドアレイおよびタンパク質構造のデータベースを活用するアプローチが、エピトープに対する親和性試薬の結合が二次構造の存在によってどのくらい改変されるかを評価するために使用され得る。一部の実施形態において、既知タンパク質構造に関する情報が、異なる二次構造、例えばアルファヘリックスおよびベータシートを形成するタンパク質領域、および対象エピトープも含むタンパク質領域を同定するために使用され得る。一部の実施形態において、対象エピトープは同定された二次構造内に存在し得る。一部の実施形態において、対象エピトープは同定された二次構造付近に存在し得る。一部の実施形態において、既知の二次構造を有するタンパク質領域が合成され、親和性試薬の結合を、二次構造を有することが観察されなかった異なるタンパク質領域と比較して評価するために使用され得る。一部の実施形態において、既知の二次構造を有するタンパク質領域が合成され、親和性試薬の結合を、対象エピトープおよび該構造を有する領域と同じアミノ酸組成だが異なるアミノ酸配列を含むスクランブル配列と比較して評価するために使用され得る。
【０１４３】
一部の実施形態において、異なる二次構造に対する親和性試薬の結合親和性を測定するための方法は、プリント式ペプチドアレイ上の数百または数千のペプチド、例えばＰＥＰｐｅｒＰＲＩＮＴから入手可能なものの使用を伴い得る。例えば、１１，０００個のペプチドを含み、各ペプチドが１０～３０残基の長さを有するアレイがプリントされ、次いで蛍光標識した親和性試薬とハイブリダイズされ得る。アレイ上の各スポットで測定された蛍光の量は、該スポットに位置する対応ペプチドに対する親和性試薬の結合親和性に比例するとみなされ得る。一部の実施形態において、該方法は、構造の影響について試験するために提供され得る。例えば、「構造」ペプチド－例えば、対象エピトープも含む特定の二次構造を有することが期待され得る１５量体などのペプチドを含むアレイがプリントされ得る。さらに、択一的または付加的にアレイを、二次構造を有することが観察されなかったが同じ対象エピトープも含む「非構造化」ペプチドを含むようにプリントしてもよい。「非構造化」ペプチドは、二次構造と関連している１つまたはそれより多くの配列部分が修飾され、それにより、元のペプチドより少ない二次構造を有することが観察されるか、またはなんら二次構造を有しないことが観察されるかのいずれかである修飾型配列がもたらされるように、特定の配列の一部分を修飾することにより構築され得る。結合親和性の異なる指標（例えば蛍光の量、または親和性試薬とペプチド間の別の結合指標）を測定することにより、二次構造成分の存在が１つまたはそれより多くの対象エピトープに対する具体的な親和性試薬の具体的な結合親和性にどのくらい影響を及ぼし得るかに関する測定が行われ得る。
【０１４４】
構造化ペプチドの発見
一部の実施形態において、構造化ペプチドの配列は、構造化していることがわかっている

内因性タンパク質の領域に由来し得る。一部の実施形態において、このようなペプチドは、対象の種のアノテーション付きタンパク質配列内のエピトープのすべての存在を見出すための参照プロテオーム（例えば、Ｕｎｉｐｒｏｔヒト参照プロテオーム）を最初に検索することによって見出され得る。対象の種のアノテーション付きタンパク質配列内のエピトープの存在が同定されたら、エピトープを含む配列ロケーションがタンパク質データベース、例えばＰｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）の構造データと相互参照され得る。付加的または択一的に、エピトープを含む配列ロケーションが対象の構造モチーフ（例えば、二次構造）と関連しているかどうかを調べるために、二次構造を予測するソフトウェアを使用してもよい。二次構造を予測するために使用され得るソフトウェアプログラムとしては、限定されないが、とりわけ一例として．Ｒｏｓｅｔｔａ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｒｏｓｅｔｔａｃｏｍｍｏｎｓ．ｏｒｇ／ｓｏｆｔｗａｒｅ）、Ｉ－ＴＡＳＳＥＲ（ｈｔｔｐｓ：／／ｚｈａｎｇｌａｂ．ｃｃｍｂ．ｍｅｄ．ｕｍｉｃｈ．ｅｄｕ／Ｉ－ＴＡＳＳＥＲ／）およびＰＥＰ－ＦＯＬＤ（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｓｅｒｖ．ｒｐｂｓ．ｕｎｉｖ－ｐａｒｉｓ－ｄｉｄｅｒｏｔ．ｆｒ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＰＥＰ－ＦＯＬＤ／）が挙げられる。

【０１４５】

構造データと関連している配列ロケーション／配列部分が同定されたら、対象の構造モチーフ（例えば、ベータシート、アルファヘリックス、ターン）と関連している配列部分内に存在するものでないエピトープは除去され得る。さらに、構造要素内に存在する各場合のエピトープについて、エピトープと構造化フランキング配列が該エピトープの一方側から抽出され得る。各エピトープについて数回の異なる抽出、例えばエピトープがペプチドの先端部に存在する抽出、エピトープがペプチドの中央付近に存在する抽出、およびエピトープがペプチドの末端部に存在する抽出が行われ得る。一部の場合において、ペプチド長さが選択され得、例えばペプチド長さは、１０個未満、１０個、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０個または４０個より多くの残基であり得る。一部の実施形態において、エピトープの考えられ得る断片とフランキング配列が選択され得る。例えば、エピトープ長さが３個でペプチド長さが１５個の場合、エピトープが該ペプチドの１番目～１３番目のどの位置から始まるかに応じて選択され得る１３種類の異なる配列が存在する。一部の場合において、多種類のペプチド長さが選択され得る。さらに、抽出された各ペプチド配列（エピトープ＋構造化フランキング配列）について、「非構造化」ペプチド、これは、二次構造と関連している配列部分が、二次構造特性が改変または除去されるように修飾されている。一部の実施形態において、「非構造化」ペプチドは、１つまたはそれより多くのフランキング配列をシャッフルするがエピトープは同じ位置にしておくことにより作成され得る。配列のシャッフルは、配列内の残基の組成を維持したまま順序を変更することを含み得る。さらに、組成は配列各残基のカウント数とみなし得る。一部の実施形態において、配列のシャッフルは、配列内の残基の組成を維持したまま順序をランダムに改変することを含み得る。一部の実施形態において、「非構造化」ペプチドは、配列組成を維持したまま配列内の残基の順序を非ランダムに改変することにより作成され得る。一部の実施形態において、「非構造化」ペプチドは、非天然アミノ酸残基または修飾アミノ酸残基を配列内に組み込むことにより作成され得る。一部の実施形態において、「非構造化」ペプチドは、これらの方法の１つまたはそれより多くを組合せで適用して、順番に適用して、またはエピトープと関連している１つもしくはそれより多くのフランキング配列のサブセットに適用して作成され得る。一部の実施形態において、「非構造化」ペプチドの二次構造は、該ペプチドを合成し、円偏光二色性分光法などの方法を使用することにより評価され得る。

【０１４６】

構造化ペプチドの評価

構造化エピトープ含有ペプチドおよび非構造化エピトープ含有ペプチドが上記のようにして同定されたら、該構造化ペプチドおよび非構造化ペプチドの各々の多くの複製を有する

アレイがプリントされ得る。次いでアレイは、蛍光標識した親和性試薬とハイブリダイズされ得る。アレイ上の各スポットで測定された蛍光の量が測定され得、構造化ペプチドおよび非構造化ペプチドとの蛍光測定値を比較する対応のあるｔ検定が行われ、例えば二次構造による結合の有意な増大または減少がみられるかどうかを調べられ得る。構造化ペプチドの蛍光が非構造化ペプチドと比べて少ない場合、これは、二次構造要素によるいくらかの度合いの親和性試薬結合の破壊を示し得る。タンパク質のフォールディングの課題のため、アレイ上にプリントされたときにすべての「構造化化」ペプチドが予測される「ネイティブ」コンホメーションにフォールディングするとは限らないことが考えられ得る。多種類の異なる構造化ペプチド配列の使用および各エピトープの冗長断片は、この課題に対処する一助となり得る。同じエピトープ内の他のペプチドと比べて結合親和性に有意な変化を示すペプチドはいずれもさらなる試験に選択され得る。例えば、該ペプチドは、期待される二次構造が採用されているかどうかを調べるために円偏光二色性分光法（ＣＤ分光法）によって評価され得る。一部の場合では、親和性試薬とのハイブリダイゼーション前の二次構造を調べるために、すべてのペプチドがＣＤ分光法によって評価され得る。

【０１４７】

親和性試薬の結合に対する二次構造の効果を評価するための択一的な方法の１つは、無細胞発現によるものまたは細胞ライセート由来のいずれかに由来する完全長タンパク質の使用であり得る。一部の場合において、高度構造化タンパク質、例えばプリオンタンパク質、アミロイド斑またはタウ線維が組織試料から単離され得る。例えば、二次構造が既知の異なる組換えタンパク質の試料を得、該構造化タンパク質に対する親和性試薬の結合を非構造化タンパク質、スクランブルタンパク質または変性タンパク質と比較して評価するために使用され得る。上記のような方法は、選択された構造化タンパク質の構造化領域内に位置する任意のエピトープに対して使用され得る。該タンパク質を、結合の評価を容易にするために固相支持体に結合させてもよく、溶液中に維持し、結合の評価のために親和性プルダウン法などの方法を使用してもよい。

【０１４８】

一部の場合において、ペプチド適格性スクリーニングおよびタンパク質の適格性スクリーニングが、所望の特性を有する親和性試薬を選択するために行われ得る。他の場合において、親和性試薬はいずれかのスクリーニングを行う前に選択され得、スクリーニングは親和性試薬に関する結合データを収集するために行われ得る。

【０１４９】

スクリーニング工程および選択工程は所与のＮ量体の考えられ得るすべてのエピトープに対して、例えば考えられ得る８０００種類すべての３量体に対して行われ得る。一部の場合において、スクリーニング工程は考えられ得るＮ量体のサブセットに対してのみ行われ得る。例えば、８０００種類すべての３量体に対する親和性試薬のスクリーニングするのではなく、８００種類の３量体が所望のエピトープとして選択され得、その他の７２００種類の３量体はスクリーニング対象にしなくてもよい。

【０１５０】

一部の場合において、本明細書に記載の方法を用いて選択される親和性試薬は、プロテオームにおいて考えられ得るすべてのタンパク質の約０．１％、０．５％、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％または５０％に結合し得る。一部の場合において、本明細書に記載の方法を用いて選択される親和性試薬は、プロテオームにおいて考えられ得るすべてのタンパク質の少なくとも約０．１％、０．５％、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％ ５０％または５０％より多くに結合し得る。一部の場合において、本明細書に記載の方法を用いて選択される親和性試薬は、プロテオームにおいて考えられ得るすべてのタンパク質の約５０％以下（ｎｏｒ ｍｏｒｅ ｔｈａｎ）、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％、０．５％、０．１％または０．１％以下に結合し得る。一部の場合において、異なる結合特性を有する複数の親和性試薬が選択され、親和性試薬プールがプロテオーム内のすべてのタンパク質の約半数に結合するように一

緒にプールされ得る。一部の場合において、親和性試薬プールは単一の親和性試薬の代わりに使用され得る。

【０１５１】

親和性試薬は、再現性のある特異性を有するタンパク質またはペプチドに結合する任意の試薬であり得る。例えば、親和性試薬は、抗体、抗体断片、アプタマーまたはペプチドであり得る。一部の例では、モノクローナル抗体が好ましいかもしれない。一部の例では、抗体断片、例えばＦａｂ断片が好ましいかもしれない。一部の例では、アプタマーが好ましいかもしれない。一部の場合において、親和性試薬は、市販の親和性試薬、例えば市販の抗体であり得る。一部の場合において、所望の親和性試薬は、市販の親和性試薬をスクリーニングし、有用な特性を有するものを同定すること選択され得る。一部の場合において、親和性試薬は、単一のタンパク質に結合する能力についてスクリーニングされ得る。一部の場合において、親和性試薬は、エピトープまたはアミノ酸の配列に結合する能力についてスクリーニングされ得る。一部の場合において、親和性試薬のグループが、類似のタンパク質（例えば、高度に類似した配列を有するもの）を結合性の差によって集合的に分割する能力についてスクリーニングされ得る。一部の場合において、親和性試薬は、特定のタンパク質に対する結合特異性を高める結合特性の重複についてスクリーニングされ得る。親和性試薬のスクリーニングは、さまざまな異なる様式で行われ得る。一例は、ＮＡＰＰＡまたはエピトープタイリングアレイに対して親和性試薬をスクリーニングすることであろう。一部の場合において、タンパク質標的に結合するように設計されたタンパク質特異的親和性試薬が使用され得る（例えば、市販の抗体またはアプタマー）。一部の場合において、多種類のタンパク質特異的親和性試薬またはエピトープ特異的親和性試薬が、結合測定を行う前に混合され得る。例えば、結合測定を通過するたびに、完全セットからランダムに選択された利用可能な親和性試薬のサブセットを含む新たなタンパク質特異的親和性試薬混合物が選択され得る。例えば、後続の各混合物は、親和性試薬の多くが１つより多くの混合物中に存在することを期待して同じランダム様式で作成され得る。一部の場合において、同定タンパク質は、タンパク質特異的親和性試薬混合物を用いてより速やかに得られ得る。一部の場合において、かかるタンパク質特異的親和性試薬混合物により、個々の任意の通過時において、親和性試薬は結合する未知タンパク質のパーセンテージが高まり得る。親和性試薬混合物は、利用可能なすべての親和性試薬のうちの１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％または９０％より多くからなるものであり得る。親和性試薬混合物は、利用可能なすべての親和性試薬のうちの少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％または９０％より多くからなるものであり得る。親和性試薬混合物は、利用可能なすべての親和性試薬のうちの９０％以下、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、１％または１％未満からなるものであり得る。親和性試薬混合物は、２、３、５、１０、２０、３０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１２００、１５００、２０００、３０００、４０００、５０００、７０００、８０００、１００００種類または１００００より多くの種類の親和性試薬からなるものであり得る。親和性試薬混合物は、少なくとも２、３、５、１０、２０、３０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１２００、１５００、２０００、３０００、４０００、５０００、７０００、８０００、１００００種類または１００００より多くの種類の親和性試薬からなるものであり得る。親和性試薬混合物は、１００００種類以下、８０００、７０００、５０００、４０００、３０００、２０００、１５００、１２００、１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２５０、２００、１５０、１００、５０、３０、２０、１０、５、３種類または３種類未満の親和性試薬からなるものであり得る。

【０１５２】

親和性試薬は高特異性、中特異性または低特異性を有するものであり得る。一部の例では、親和性試薬がいくつかの異なるエピトープを認識し得る。一部の例では、親和性試薬が

、２種類またはそれより多くの異なるタンパク質に存在するエピトープを認識し得る。一部の例では、親和性試薬が、多くの異なるタンパク質に存在するエピトープを認識し得る。一部の場合において、本開示の方法に使用される親和性試薬は単一のエピトープに高度に特異的であり得る。一部の場合において、本開示の方法に使用される親和性試薬は、翻訳後修飾を含む単一のエピトープに高度に特異的であり得る。

【０１５３】

一部の実施形態において、標的アミノ酸配列の同定に関する親和性試薬は実際には、本明細書に記載の方法で使用される際に、互いに識別されないか、または区別可能でない異なる成分グループを含んでいる場合があり得る。特に、同じ標的アミノ酸配列を同定するために使用され得る該異なる成分には、同じ標的アミノ酸配列を同定するための同じ検出部分が使用さえ得る。例えば、フランキング配列に関係なく三量体アミノ酸配列（ＡＡＡ）に結合する親和性試薬は、なんらフランキング配列による効果を伴うことなく三量体ＡＡＡ配列に結合する単一のプローブまたは各々がαＡＡＡＡβの形態の５個のアミノ酸の異なるエピトープに結合する４００個のプローブグループのいずれかを含み得、このとき、αおよびβは任意のアミノ酸であり得る。第２の場合の一部の場合において、該４００個のプローブは、各々が等量で存在するように合わされ得る。第２の場合の一部の場合において、該４００個のプローブは、５個のアミノ酸の任意の所与のエピトープが結合される確率が等しくなるように各プローブの量が各プローブの特徴的な結合親和性によって加重され得るように合わされ得る。

【０１５４】

新規な親和性試薬は当該技術分野で知られた任意の方法によって作成され得る。親和性試薬を開発する方法としては、ＳＥＬＥＸ、ファージディスプレイおよび播種が挙げられる。一部の例では、親和性試薬が、構造に基づく薬物設計法を用いて設計され得る。構造に基づく薬物設計（または直接薬物設計）には対象エピトープおよび親和性試薬の結合部位の三次元構造の知識が利用される。

【０１５５】

一部の場合において、親和性試薬は核酸バーコードで標識され得る。一部の例では、核酸バーコードは、使用後の親和性試薬を精製するために使用され得る。一部の例では、核酸バーコードは、親和性試薬を反復使用のために分取するために使用され得る。一部の場合において、親和性試薬は、使用後の親和性試薬を分取するために使用され得るフルオロフォアで標識され得る。

【０１５６】

一部の場合において、核酸バーコードで標識された多種類の親和性試薬がマルチプレックス化され、次いで相補的核酸プローブを用いて検出され得る。マルチプレックス化親和性試薬グループは単一サイクルで、相違する検出部分を有する多種類の相補的核酸を用いて検出され得る。一部の場合において、マルチプレックス化親和性試薬グループは多サイクルで、検出部分にコンジュゲートされた単一の相補的核酸を用いて検出され得る。一部の場合において、マルチプレックス化親和性試薬グループは多サイクルで、各々が相違する検出部分にコンジュゲートされている多種類の相補的核酸を用いて検出され得る。一部の場合において、マルチプレックス化親和性試薬グループは多サイクルで、各々が相違する検出部分グループにコンジュゲートされている多種類の相補的核酸を用いて検出され得る。

【０１５７】

一部の場合において、核酸バーコードで標識された１つまたはそれより多くの親和性試薬は、結合しているタンパク質に架橋され得る。該１つまたはそれより多くの親和性試薬が該タンパク質に架橋されたら、バーコードがシーケンシングされ、架橋している親和性試薬の具体物が調べられ得る。一部の場合において、多種類の結合しているタンパク質が該１つまたはそれより多くの親和性試薬に曝露され得る。一部の場合において、多種類の結合しているタンパク質が１つまたはそれより多くの親和性試薬と架橋している場合、該結合している親和性試薬と関連しているバーコードがシーケンシングされ、該多種類の結合

しているタンパク質の各々と関連している架橋している親和性試薬の具体物が調べられ得る。

【０１５８】

該一群の親和性試薬は、１つまたはそれより多くの型の親和性試薬を含み得る。例えば、本開示の方法には、抗体、抗体断片、Ｆａｂ断片、アプタマー、ペプチドおよびタンパク質のうちの１種類またはそれより多くを含む一群の親和性試薬が使用され得る。

【０１５９】

親和性試薬を修飾してもよい。修飾としては、限定されないが、検出部分の結合が挙げられる。検出部分は直接または間接的に結合され得る。例えば、検出部分は親和性試薬に直接共有結合され得るか、またはリンカーを介して結合され得るか、または相補的核酸タグもしくはビオチンストレプトアビジンペアなどの親和性反応により結合され得る。穏やかな洗浄および親和性試薬の溶出に耐えることができる結合方法が好ましい場合もあり得る。１つより多くの検出部分を各親和性試薬に結合してもよい。検出部分は、親和性試薬の任意の位置、例えば週末端に結合され得る。検出部分は、親和性試薬またはエピトープのエピトープ結合領域の確認を改変しないロケーションに結合され得る。

【０１６０】

検出部分としては、限定されないが、フルオロフォア、生物発光タンパク質（ＧＦＰ）、酵素タンパク質（例えば、ＨＲＰ）、ナノ粒子（例えば、量子ドット）、核酸セグメント例えば定常領域およびバーコード領域、またはナノ粒子、例えば磁性粒子との連結のための化学的テザリング部が挙げられる。検出部分には、異なるパターンの励起または発光を有するいくつかの異なるフルオロフォアも包含され得る。

【０１６１】

検出部分は親和性試薬から切断可能であり得る。これにより、もはや対象でない親和性試薬から検出部分を除去し、シグナル夾雑を低減させる工程が可能となり得る。

【０１６２】

一部の場合において、親和性試薬は非修飾である。例えば親和性試薬が抗体ならば、該抗体の存在は原子間力顕微鏡法によって検出され得る。親和性試薬は非修飾であり得、例えば該親和性試薬のうちの１つまたはそれより多くに特異的な抗体を有することにより検出され得る。例えば、親和性試薬がマウス抗体ならば、該マウス抗体は抗マウス二次抗体用いることによって検出され得る。あるいはまた、親和性試薬はアプタマーであってもよく、これは該アプタマーに特異的な抗体によって検出される。二次抗体を上記のような検出部分で修飾してもよい。一部の場合において、二次抗体の存在は原子間力顕微鏡法によって検出され得る。

【０１６３】

一部の例では、親和性試薬は、同じ修飾、例えばコンジュゲートされた緑色蛍光タンパク質を含み得るか、または２つもしくはそれより多くの異なる型の修飾を含み得る。例えば、各親和性試薬は、各々が異なる励起波長または発光波長を有するいくつかの異なる蛍光の部分のうちの１つにコンジュゲートされ得る。これにより、いくつかの異なる親和性試薬が合わされ得る、および／または区別され得る際の親和性試薬のマルチプレックス化が可能となり得る。一例において、第１の親和性試薬は緑色蛍光タンパク質にコンジュゲートされ得、第２の親和性試薬は黄色蛍光タンパク質にコンジュゲートされ得、第３の親和性試薬は赤色蛍光タンパク質にコンジュゲートされ得、したがって、この３種類の親和性試薬がマルチプレックス化され、その蛍光によって同定され得る。さらなる一例では、第１、第４および第７の親和性試薬が緑色蛍光タンパク質にコンジュゲートされ得、第２、第５および第８の親和性試薬が黄色蛍光タンパク質にコンジュゲートされ得、第３、第６および第９の親和性試薬が赤色蛍光タンパク質にコンジュゲートされ得る；この場合、第１、第２および第３の親和性試薬は一緒にマルチプレックス化され得るが、第２、第４および第７ならびに第３、第６および第９の親和性試薬は２つのさらなるマルチプレックス化反応を構成する。一緒にマルチプレックス化され得る親和性試薬の数は識別に使用される検出部分に依存し得る。例えば、フルオロフォアで標識された親和性試薬のマルチプレ

ックス化は、利用可能な固有のフルオロフォアの数によって制限され得る。さらに例えば、核酸タグで標識された親和性試薬のマルチプレックス化は、核酸バーコードの長さによって決定され得る。

【０１６４】

各親和性試薬の特異性はアッセイでの使用前に測定され得る。親和性試薬の結合特異性は対照実験において既知タンパク質を用いて測定され得る。親和性試薬の特異性を測定するために任意の適切な実験方法が使用され得る。一例において、固相支持体に既知タンパク質標準が既知のロケーションにロードされ、複数の親和性試薬の特異性を評価するために使用され得る。別の一例において、固相支持体は、各親和性試薬の特異性が対照および標準に対する結合から計算され、次いで実験試料を同定するために使用され得るように実験試料と対照および標準のパネルの両方を含み得る。一部の場合において、特異性が未知の親和性試薬が、特異性が既知の親和性試薬とともに含められ得、特異性既知の親和性試薬のデータがタンパク質を同定するために使用され得、同定されたタンパク質に対する特異性未知の親和性試薬の結合パターンが、その結合特異性を調べるために使用され得る。また、他の親和性試薬の既知の結合データを使用し、どのタンパク質に個々の親和性試薬が結合されるかを評価することにより、任意の個々の親和性試薬の特異性を再確認することが考えられ得る。したがって、親和性試薬パネルの多重使用により、親和性試薬の特異性が反復ごとに漸増的に精緻化され得る。特定のタンパク質に対して固有に特異的な親和性試薬が使用され得るが、本明細書に記載の方法はそれを必要としない場合もあり得る。さらに、該方法は、ある範囲の特異性において有効であり得る。一部の例では、本明細書に記載の方法は、親和性試薬が任意の特定のタンパク質には特異的でないが代わりにアミノ酸モチーフ（例えば、トリペプチドＡＡＡ）に特異的である場合に特に効率的であり得る。

【０１６５】

一部の例では、１つまたはそれより多くの親和性試薬が、所与の長さ、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個または１０個より多くのアミノ酸のアミノ酸モチーフに結合させるために選出され得る。一部の例では、１つまたはそれより多くの親和性試薬が、２個のアミノ酸～４０個のアミノ酸のいろいろな長さ範囲のアミノ酸モチーフに結合させるために選出され得る。

【０１６６】

一部の例では、親和性試薬が、高結合親和性、中結合親和性または低結合親和性を有するように選出され得る。一部の場合において、低結合親和性または中結合親和性を有する親和性試薬が好ましいかもしれない。一部の場合において、親和性試薬は約10^{-3}Ｍ、10^{-4}Ｍ、10^{-5}Ｍ、10^{-6}Ｍ、10^{-7}Ｍ、10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍまたはそれより小さい解離定数を有するものであり得る。一部の場合において、親和性試薬は約10^{-10}Ｍより大きい、10^{-9}Ｍ、10^{-8}Ｍ、10^{-7}Ｍ、10^{-6}Ｍ、10^{-5}Ｍ、10^{-4}Ｍ、10^{-3}Ｍ、10^{-2}Ｍまたはそれより高い解離定数を有するものであり得る。

【０１６７】

一部の親和性試薬は、修飾アミノ酸配列、例えばリン酸化またはユビキチン化されたアミノ酸配列に結合するように選出され得る。一部の例では、１つまたはそれより多くの親和性試薬は、１つまたはそれより多くのタンパク質に含まれ得る一群のエピトープに広く特異的であるように選出され得る。一部の例では、１つまたはそれより多くの親和性試薬は２種類またはそれより多くの異なるタンパク質に結合し得る。一部の例では、１つまたはそれより多くの親和性試薬はその１つまたは複数の標的に弱く結合し得る。例えば、親和性試薬は、その１つまたは複数の標的に１０％未満、１０％未満、１５％未満、２０％未満、２５％未満、３０％未満、３５％未満または３５％未満で結合し得る。一部の例では、１つまたはそれより多くの親和性試薬は、その１つまたは複数の標的に中程度で、または強く結合し得る。例えば、親和性試薬は、その１つまたは複数の標的に３５％超、４０％超、４５％超、６０％超、６５％超、７０％超、７５％超、８０％超、８５％超、９０

％超、９１％超、９２％超、９３％超、９４％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超または９９％超で結合し得る。

【０１６８】

弱い結合を代償するため、過剰の親和性試薬が固相支持体に適用され得る。親和性試薬は、試料タンパク質に対して約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１または１０：１過剰で適用され得る。親和性試薬は、試料タンパク質内のエピトープの期待される出現数に対して約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１または１０：１過剰で適用され得る。

【０１６９】

また、親和性試薬に磁性成分を含めてもよい。磁性成分は、結合している親和性試薬の一部または全部を同じイメージング平面またはｚスタックにて操作するのに有用であり得る。一部または全部の親和性試薬を同じイメージング平面にて操作することにより、イメージングデータの品質が改善され、システムのノイズが低減され得る。

【０１７０】

基材／固相支持体

一部の実施形態において、ペプチドは、親和性試薬の選択またはスクリーニング工程を容易にするために、官能基化された基材、例えば固相支持体に適用され得る。図３Ｂは、エピトープＡＡＡに対する親和性試薬の結合におけるフランキング配列の効果を調べるための親和性試薬の特性評価スクリーニングにおける使用のための、アレイ式ペプチドがコンジュゲートされた固相支持体の一例を示す。一部の場合において、標的ペプチドは直接、固相支持体に適用され得る。一部の場合において、標的ペプチドは固相支持体上で合成されるか、または増やされ得る。一部の場合において、ペプチドは、固相支持体、例えばアレイまたはビーズ上で合成され得る。例えば、ペプチドアレイは、多コピーの単一のペプチド配列をアレイ上の各ロケーションに含むように製造され得る。また、市販のカスタムペプチドマイクロアレイ、例えばＰＥＰｐｅｒＰＲＩＮＴを購入してもよい。

【０１７１】

基材は、固相支持体を構成することができる任意の基材であり得る。基材、例えば固相支持体は、本明細書で用いる場合、ペプチドが共有結合または非共有結合され得る任意の固相表面を示し得る。固相支持体の非限定的な例としては、粒子、ビーズ、スライド、デバイスの構成要素の表面、膜、フローセル、ウェル、チャンバ、マクロ流路（ｍａｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ）チャンバ、マイクロ流路チャンバ、チャネル、マイクロ流路チャネルまたは任意の他の表面が挙げられる。固相支持体表面は平坦であっても湾曲していてもよく、他の形状を有するものであり得、滑らかであってもざらざらしていてもよい。固相支持体表面はマイクロウェルを含んでいてもよい。一部の実施形態において、固相支持体は、ガラス、糖質、例えばデキストラン、プラスチック、例えばポリスチレンもしくはポリプロピレン、ポリアクリルアミド、ラテックス、シリコン、金属もしくは金属酸化物、例えば金もしくは酸化ジルコニウムまたはセルロースで構成されたものであり得、オリゴヌクレオチドの共有結合性または非共有結合性の結合を可能にするため、または増強するためにさらに修飾されていてもよい。例えば、固相支持体表面は、特定の官能基、例えばマレイン酸部分またはコハク酸部分での修飾によって官能基化され得るか、あるいは、化学反応性基、例えばアミノ基、チオール基またはアクリレート基での修飾によって、例えばシラン処理またはリン酸基を含む化合物の結合によって誘導体化され得る。好適なシラン試薬としては、アミノプロピルトリメトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシランおよび４－アミノブチルトリエトキシシランが挙げられ得る。固相支持体は、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）官能基で官能基化され得る。また、ガラス表面は、アクリレートまたはエポキシなどの他の反応性基で、例えばエポキシシラン、アクリレートシランまたはアクリルアミドシランを用いて誘導体化され得る。固相支持体およびオリゴヌクレオチド結合のプロセスは好ましくは、繰り返される結合、洗浄、イメージングおよび溶出の工程に対して安定である。一部の例では、固相支持体はスライドまたはフローセルであり得る。Ａ

固相支持体上の官能基の間隔は規則的であってもランダムであってもよい。官能基の規則的なアレイはフォトリソグラフィによって作出され得る。規則的なアレイ内の官能基は、各官能基が任意の他の官能基から少なくとも約１０ｎｍ、約２５ｎｍ、約５０ｎｍ、約１００ｎｍ、２００ｎｍ、約２５０ｎｍ、約３００ｎｍ、約３５０ｎｍ、約４００ｎｍ、約４５０ｎｍ、約５００ｎｍ、約５５０ｎｍ、約６００ｎｍ、約６５０ｎｍ、約７００ｎｍ、約７５０ｎｍ、約８００ｎｍ、約８５０ｎｍ、約９００ｎｍ、約９５０ｎｍ、約１０００ｎｍまたは約１０００ｎｍ超であるように位置し得る。ランダム間隔の官能基は、官能基が任意の他の官能基から平均して少なくとも約１０ｎｍ、約２５ｎｍ、約５０ｎｍ、約１００ｎｍ、２００ｎｍ、約２５０ｎｍ、約３００ｎｍ、約３５０ｎｍ、約４００ｎｍ、約４５０ｎｍ、約５００ｎｍ、約５５０ｎｍ、約６００ｎｍ、約６５０ｎｍ、約７００ｎｍ、約７５０ｎｍ、約８００ｎｍ、約８５０ｎｍ、約９００ｎｍ、約９５０ｎｍ、約１０００ｎｍまたは約１０００ｎｍ超であるような濃度で提供され得る。

【０１７２】

基材、例えば固相支持体を間接的に官能基化してもよい。例えば、固相支持体がＰＥＧ化され得、官能基がＰＥＧ分子のすべてに、またはサブセットに適用され得る。

【０１７３】

基材は、任意の材質、例えば金属、ガラス、プラスチック、セラミックまたはその組合せで構成されたものであり得る。基材は、種々の目的で、さらなる層または物質、例えば反射性コーティング、反射防止コーティング、保護（ｐａｓｓｉｖａｔｉｎｇ）基またはブロック基を含み得る。一部の好ましい実施形態では、固相支持体はフローセルであり得る。フローセルは、単一の層で構成されたものであっても多層で構成されたものであってもよい。例えば、フローセルは、基層（例えば、ホウケイ酸ガラスの）、基層上に重層されたチャネル層（例えば、エッチングされたシリコンの）およびカバーまたは最上層を含むものであり得る。層が一体に構成される場合、いずれかの端部にカバーを通り抜ける供給口／排出口を有する閉鎖型のチャネルが形成され得る。各層の厚さはさまざまであり得るが、好ましくは約１７００μｉｎ未満である。層は、当該技術分野で知られた任意の適当な材質、例えば限定されないが感光性ガラス、ホウケイ酸ガラス、溶融シリケート、ＰＤＭＳまたはシリコンで構成されたものであり得る。異なる層が、同じ材質で構成されていても異なる材質で構成されていてもよい。基材を構成する材質は、有する自己蛍光が低レベルとなるように選出され得る。

【０１７４】

一部の実施形態において、フローセルは、フローセルの底部にチャネル用の開口部を含み得る。フローセルは、個別に可視化され得るロケーションに、標的が結合している数百万のコンジュゲーション部位を含み得る。一部の実施形態において、本発明の実施形態で有用な種々のフローセルは、いろいろな数のチャネル（例えば、１個のチャネル、２個またはそれより多くのチャネル、３個またはそれより多くのチャネル、４個またはそれより多くのチャネル、６個またはそれより多くのチャネル、８個またはそれより多くのチャネル、１０個またはそれより多くのチャネル、１２個またはそれより多くのチャネル、１６個またはそれより多くのチャネルまたは１６個より多くのチャネル）を含むものであり得る。種々のフローセルはいろいろな深さまたは幅のチャネルを含むものであり得、これは、単一のフローセル内のチャネル間で異なっていてもよく、異なるフローセルのチャネル間で異なっていてもよい。また、単一のチャネルも深さおよび／または幅がさまざまであり得る。例えば、チャネルは、チャネル内の１つまたはそれより多くのポイントにおいて約５０μｉｎ未満の深さ、約５０μｉｎの深さ、約１００μｉｎ未満の深さ、約１００μｉｎの深さ、約１００μｉ　ｉｏ　約５００μｉｎの深さ、約５００μｉｎの深さまたは約５００μｉｎを超える深さであり得る。チャネルは、任意の断面形状、例えば限定されないが円形、半円形、長方形、台形、三角形または楕円形の断面を有するものであり得る。

【０１７５】

ペプチドは固相支持体に、スポット、滴下、ピペッティング、流動、洗浄または別の様式で適用され得る。ＮＨＳエステルなどの部分で官能基化されている固相支持体の場合、ペ

プチドの修飾は必要とされない。択一的な部分（例えば、スルフヒドリル、アミンまたはリンカーＤＮＡ）で官能基化されている固相支持体の場合、架橋試薬（例えば、ジスクシンイミジルスベレート、ＮＨＳ、スルホンアミド）が使用され得る。リンカーＤＮＡで官能基化されている固相支持体の場合、標的のペプチドは相補的ＤＮＡタグで修飾され得る。

【０１７６】

光活性化型クロスリンカーは、固相支持体上の特定の領域への試料の直接架橋のために使用され得る。光活性化型クロスリンカーは、各試料を固相支持体の既知領域に結合させることによるペプチド試料のマルチプレックス化を可能にするために使用され得る。光活性化型クロスリンカーにより、例えばペプチドの架橋前に蛍光性タグを検出することによって、成功裡にタグ化されているペプチドの特異的結合が可能となり得る。光活性化型クロスリンカーの例としては、限定されないが、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド、スルホスクシンイミジル６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート、スクシンイミジル４，４’－アジペンタノエート、スルホスクシンイミジル４，４’－アジペンタノエート、スクシンイミジル６－（４，４’－アジペンタンアミド）ヘキサノエート、スルホスクシンイミジル６－（４，４’－アジペンタンアミド）ヘキサノエート、スクシンイミジル２－（（４，４’－アジペンタンアミド）エチル）－１，３’－ジチオプロピオネート、およびスルホスクシンイミジル２－（（４，４’－アジペンタンアミド）エチル）－１，３’－ジチオプロピオネートが挙げられる。

【０１７７】

ペプチドは基材に、１個またはそれより多くの残基によって結合され得る。一部の例では、ペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、両末端によって、または内部残基によって結合され得る。

【０１７８】

一部の実施形態において、各ペプチド配列は固有の空間アドレスと関連し得る。例えば、ペプチドが固相支持体内の空間的に隔てられたロケーションに結合したら、各ペプチド配列には、例えば座標によってインデックス付きアドレスが割り当てられ得る。一部の例では、事前に割り当てられた固有の空間アドレスのグリッドが事前決定され得る。一部の実施形態において、固相支持体は、各ペプチドの配置が固相支持体の固定マークを基準にして決定され得るように、容易に識別可能な固定マークを含み得る。一部の例では、固相支持体は、表面上に永続的に標示されたグリッドラインおよび／または「起点」もしくは他の基準を有するものであり得る。一部の例では、固相支持体の表面の標示は、架橋されたペプチドの位置を示すための基準を示すために永続的または半永続的であり得る。また、そのパターン形成の形状、例えばコンジュゲートされたペプチドの外側縁も、各スポットの固有のロケーションの決定基準として使用され得る。

【０１７９】

［実施例］

［実施例１］

選択アプローチ

工程１：ＳＥＬＥＸを用いた予備濃縮

目的：一組の予備濃縮アプローチを、（１）ペプチド標的に対する入力ライブラリーの多様性を穏やかに低減できる可能性および（２）目標アプタマープロフィールと整合する特性を示す低複雑性アプタマープールを得ることができる可能性について比較すること

主要措置：各ペプチド標的に対する最終アプタマープールを絞り込むため、多様なおよそ１０１５のランダムライブラリー配列を含む入力ライブラリーを使用し、予備濃縮を、典型的なビーズベースのＳＥＬＥＸを用いて行う。試験対象のライブラリー設計には構造化ライブラリーおよびナイーブライブラリーが含められ得る。

【０１８０】

低オフレートを有する標的の予備濃縮を促進させるため、結合バッファー中でアプタマープールとペプチド－ビーズプール間のＳＥＬＥＸインキュベーションを一晩行い、低オフ

レートバインダーを高オフレートバインダーとビーズ占有について競合させる。さらに、低オフレート結合の濃縮にバイアスをかけるためのインキュベーション後のビーズ－ペプチド複合体に対する時間漸増の一連の洗浄を検討する。一晩のインキュベーション条件を１時間のインキュベーションと比較し、２つ：短時間インキュベーションと長時間インキュベーションのＳＥＬＥＸトラックを得る。

【０１８１】

標的の予備濃縮を促進させるため、特定の溶出液中に存在する未結合を速やかに、結合しているアプタマーを１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（または規定される他の溶出液）中に溶出させ、溶出液を用いて、次のラウンドのＳＥＬＥＸ用のアプタマープールを得る。残りのビーズの材料を熱によって溶出させ、択一的な溶出条件を検討する選択肢とするために保存する。

【０１８２】

フランキングアミノ酸残基の組成に関係なく短時間インキュベーションおよび長時間インキュベーションの両方のＳＥＬＥＸトラックに結合する標的の予備濃縮を最良に促進させるストラテジーを特定するため、濃縮の４つのアプローチを比較し、合計８つのＳＥＬＥＸトラックを得る：

予備濃縮アプローチ１：予備濃縮ＳＥＬＥＸを「低ストリンジェンシー」グリシンフランキング（’’Ｇ－ｆｌａｎｋ’’，ＧＸＧ）ペプチド標的に対して行う。

【０１８３】

予備濃縮アプローチ２：予備濃縮ＳＥＬＥＸを第１セットのＳＥＬＥＸラウンドでＧ－ｆｌａｎｋペプチド標的に対して、次いで後続のＳＥＬＥＸラウンドで特定のセットのアミノ酸残基にフランキングされた「高ストリンジェンシー」ペプチド標的（’’αＸβ’’）に対して行う。

【０１８４】

予備濃縮アプローチ３：予備濃縮ＳＥＬＥＸを第１セットのＳＥＬＥＸラウンドでαＸβペプチド標的に対して、次いで後続のＳＥＬＥＸラウンドでＧＸＧペプチド標的に対して行う。高ストリンジェンシーから低ストリンジェンシーへの移行ラウンドを決定する。

【０１８５】

予備濃縮アプローチ４：予備濃縮ＳＥＬＥＸをαＸβ標的ペプチドのみに対して行う。

【０１８６】

予備濃縮後、進行を、粒子ディスプレイを用いて測定する。このデータを使用し、どの予備濃縮アプタマープールを工程２に進めるかを決定する。得られたｑＰＣＲ、フローサイトメトリーおよび他のデータは、どのアプタマープールを選択するかの指定の手引きのために使用され得る。

【０１８７】

予備濃縮プロセスの一部として、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）が、すべてのＳＥＬＥＸラウンドまたはＳＥＬＥＸラウンドのサブセットに対して行われ得る。ライブラリーの調製はマルチプレックス化を含み得る。予備濃縮プロセス全体を通して、各ＳＥＬＥＸラウンドの増幅後の材料は保存し、粒子ディスプレイでの潜在的アプタマープールとして使用する。

【０１８８】

工程２：粒子ディスプレイ

目的：目標アプタマープロフィールを示す配列群を同定すること。

【０１８９】

主要措置：必要な回数の粒子ディスプレイ分取ラウンド（通常、３～５ラウンド）を、指定された予備濃縮アプタマープールに対して行い、目標アプタマープロフィールを示すアプタマーのプールを単離する。粒子ディスプレイの実行中の実験計画は、相応に分取のストリンジェンシーを調整するために精緻化する。

【０１９０】

目標アプタマープロフィールを示すアプタマーの分取を促進させるため、各粒子ディスプ

レイラウンドは２つの分取工程からなり、各入力プールに対して２つのアプタマー候補出力プールが得られる。この工程では、αＸβ標的ペプチドのみを使用する。

【０１９１】

第１の分取工程は、プロパティ１を示すアプタマーの濃縮が促進されるように設計する。アプタマープールを、フルオロフォア１で標識した標的ペプチドおよびビオチン標識陰性対照ペプチドと混合する。結合している過剰の標的および陰性対照ペプチドをアプタマービーズから１５分間解離させた後、蛍光性ストレプトアビジンで標識し、分取を、高標的ペプチドシグナル、低陰性対照ペプチドシグナルおよび高アプタマーシグナルに対してゲーティングする。この出力プールを増幅し、該プールの一部をＮＧＳ用に保存する。

【０１９２】

第２の分取工程は、プロパティ２を示すアプタマーの濃縮が促進されるように設計する。第１の分取工程の出力プールの残部を、陰性対照ペプチドは除外し、プールを溶出バッファー中に移して１５秒間インキュベートした後分取すること以外は、第１の分取工程で使用した入力プールと同じ様式で調製する。このプールを、低ペプチドシグナルおよび高アプタマーシグナルに対してゲーティングする。出力を増幅し、該プールの一部をＮＧＳ用に保存し、該プールの残部を次のラウンドの粒子ディスプレイに使用する。

【０１９３】

工程３：シーケンシングおよびアプタマーの特性評価

目的：特異的配列および特異的配列群を同定し、その結合特性が目標アプタマープロフィールを満たすことを確認すること。

【０１９４】

主要措置：ＮＧＳによる鑑定対象の粒子ディスプレイ出力プールを上記の結果に基づいて同定する。ライブラリーをシーケンシングのために調製し、ＮＧＳ出力を得るために使用する。

【０１９５】

候補配列（「ヒットアプタマー」）を合成する、および／またはビーズにコンジュゲートさせ、目標アプタマープロフィールについて以下のとおりにスクリーニングする：

プロパティ１についてヒットアプタマーをスコアリングするため、アプタマービーズを１ｕＭの蛍光標識標的ペプチドと３分間混合し、洗浄し、フローサイトメトリー解析に適した濃度に希釈する。次いで、混合物を１時間の時間的推移でサンプリングすることにより解離速度を求める。

【０１９６】

プロパティ２についてヒットアプタマーをスコアリングするため、アプタマービーズを、希釈剤を溶出バッファーで構成し、混合物を、希釈剤添加の１５秒以内または技術的に実現可能な限りすぐにサンプリングすること以外は上記のとおりに調製する。

【０１９７】

プロパティ３についてヒットアプタマーをスコアリングするため、アプタマー候補をプロパティ１およびプロパティ２について、Ｇ－ｆｌａｎｋペプチド標的およびＸ－ｆｌａｎｋペプチド標的を用いて別々にスコアリングする。

【０１９８】

［実施例２］

実装例

この実施例では、７２０種類の固有タンパク質を含む核酸プログラム型タンパク質アレイ（ＮＡＰＰＡ）に対する親和性試薬の結合測定値を、各々、アレイ上に含まれる３～５つの複製を用いて考慮する。一部の実施形態において、このような複製はアレイにおいて散乱していてもよい。結合は、蛍光標識した親和性試薬をアレイにハイブリダイズさせ、アレイ上の各スポットで観察される蛍光を測定することにより評価する。この例では、各スポットの各タンパク質の具体物がわかっている。したがって、蛍光はタンパク質の具体物にマッピングされ得る。

【０１９９】

この例では、タンパク質結合の測定値（蛍光）を、タンパク質配列における考えられ得る８０００種類の三量体の各々のカウント数と該三量体に対する親和性試薬の結合に帰属する蛍光測定値に対する分数的寄与の線形結合としてモデル化する。すなわち：
【数２４】

$$F_{pr} = \sum_{t=1}^{t=8000} c_{t,pr}\beta_t$$

【０２００】
式中：
Ｆｐｒ＝タンパク質ｐｒの測定値（例えば、蛍光）
Ｃｔ，ｐｒ＝タンパク質ｐｒ内三量体ｔのカウント数
βｔ＝三量体ｔに対する親和性試薬の結合による蛍光分数
多種類のタンパク質に対する親和性試薬の測定値は、方程式：
【数２５】

$$\vec{F} = C\vec{\beta} + \epsilon$$

【０２０１】
の線形システムを構成し得、
式中：
【数２６】

$\vec{F}$

【０２０２】
は、各タンパク質の蛍光実測値を含む長さＮの列ベクトルである
Ｃは、三量体のカウント数と各測定対象タンパク質内の特定の三量体のカウント数である各列とのＮ×８０００行列である
【数２７】

$\vec{\beta}$

【０２０３】
は、考えられ得る各三量体に対する蛍光分数である長さ８０００の列ベクトルである
εは、バックグラウンド結合またはノイズフロアを補正するためのスカラー定数である
本明細書に記載のモデルは、非標準アミノ酸または異なる長さのモデルｎ量体を含むように拡張され得る。既知のＮＡＰＰＡまたは同様の結合測定値の場合、
【数２８】

$\vec{F}$

【０２０４】

およびＣは既知変数であり、
【数２９】

$$\vec{\beta}$$

【０２０５】
およびεの値は線形回帰または関連アプローチによって得られ得る。特に、非負最小二乗法およびラッソ（ＬＡＳＳＯ）回帰は、この問題に非常に適したものであり得る。非負最小二乗法では解
【数３０】

$$\vec{\beta}$$

【０２０６】
が非負に制限され、非負ＬＡＳＳＯ回帰ではさらに、スパース制約が課される。ＬＡＳＳＯ回帰は、システムが未定である場合、すなわち、測定される固有タンパク質の数が固有三量体の数（この例では８，０００）より少ない場合に特に有効である。
【０２０７】
前述のＮＡＰＰＡアレイに対する結合を、以下の相対親和性を有する親和性試薬でシミュレーションした：
ＬＡＳ：０．７５
ＧＥＬ：０．０５
ＹＩＣ：０．００１
ＳＴＫ：０．００１
他のすべての三量体に対する結合には親和性０．０００００１を割り当てた。
【０２０８】
ＮＡＰＰＡアレイ上の各タンパク質に対する結合を、記載の統計モデルおよび前述の結合親和性を用いて、適用されるガウスノイズが結合親和性の期待値が５％の標準偏差を有するようにして結合の期待値を計算することによりシミュレーションした。
【０２０９】
このようなシミュレーションデータから、ＬＡＳＳＯを用いて（ＬＡＳＳＯスパース（ｓｐａｒｓｉｔｙ）パラメータαを１ｅ－３に設定）試薬の結合親和性をタンパク質結合の測定値から学習させた。学習された親和性は：

ＬＡＳ	０．７５００３４
ＧＥＬ	０．０４０７９６
ＡＳＷ	０．０１２１２０
ＳＧＤ	０．００５００１
ＱＰＨ	０．００３９７５
ＬＧＣ	０．００３７８８
ＫＧＲ	０．００２４７５
ＶＰＳ	０．００２４１６
ＥＩＫ	０．００２３０５
ＳＥＳ	０．００２１４９
ＲＩＳ	０．００１２３５
ＳＳＥ	０．００１０６７
ＳＴＳ	０．０００９５３
ＡＰＰ	０．０００８８９
ＨＳＤ	０．０００７８５

ＫＳＱ　０．０００７３５
ＶＱＫ　０．０００６３７
ＰＰＴ　０．０００５３８
ＧＣＳ　０．０００４１７
ＲＰＲ　０．０００１０６
ＱＰＱ　０．０００００５１
ＡＣＳ　０．０００００２６
であった。
【０２１０】
他のすべての三量体は親和性ゼロを有した。
【０２１１】
この実施例は、このアプローチにより、ノイズ量が許容範囲であるにもかかわらず、親和性試薬の結合の妥当な推定値をビルドできることを示す。
【０２１２】
［実施例３］
ＫＷ親和性試薬の選択
親和性試薬の選択スクリーニングを実施し、４種類の異なる標的エピトープ－ＫＷ、ＬＦＱ、ＩＲＮおよびＥＧＥのいずれかに結合するアプタマーを選択した。アレイベースの表面プラズモン共鳴イメージング選択を使用し、アプタマーライブラリー由来の標的に結合するアプタマーを選択した。予備検証を標的ＫＷに結合するアプタマーに対して実施した。図６は、表面プラズモン共鳴による測定時のＫＷ標的に対する上位５つのヒットの結合を示す。図７は、陰性対照ペプチドと比較したときの最良の抗ＫＷアプタマーの結合を示す。
【０２１３】
図６の最上位の抗ＫＷアプタマーのエピトープの特異性を調べるため、アプタマーを蛍光標識し、ペプチドアレイに適用した。ペプチドアレイに対するこの標識アプタマーの結合に基づき、該アプタマーによって認識されるエピトープをｂｅ　ＫＷおよびＫＲであると判断し、両者は比較的類似した親和性を有した。結合データおよび予備モチーフ解析を図８に示す。
【０２１４】
［実施例４］
ハイスループットシーケンシング蛍光リガンド相互作用プロファイリング
ハイスループットシーケンシング蛍光リガンド相互作用プロファイリングアッセイを、アプタマーライブラリーを得、このライブラリーのアプタマーの両端にアダプター配列組み込むことにより実施した。アダプターを有するアプタマーのライブラリーを、固定化オリゴプライマーを含むフローセルに適用し、クラスター増幅を図１０に示すとおりに実施した。クラスター増幅後、クラスター（各々はアプタマーライブラリー由来の単一のアプタマーである）を、可逆的色素ターミネーターを用いてシーケンシングした。次いで、クラスターを変性させてシーケンシング試薬を除去し、洗浄し、そのネイティブアプタマーコンホメーションにフォールディングさせた。蛍光標識したペプチド標的をクラスターに４つの異なる濃度で適用し、蛍光標識したペプチド標的に結合するクラスターを示すためにイメージングした。図１１は、蛍光標識したペプチド標的が結合している２つの異なる濃度のフローセルの代表的な画像を示す。蛍光データをシーケンシングデータと合わせ、フローセル上に提示されたアプタマーライブラリーの各アプタマーの親和性測定値を得た。図１２は、蛍光標識したペプチド標的（ＬＦＱ）に対するいくつかの異なるアプタマーの配列および結合親和性を示す。
【０２１５】
［実施例５］
ペプチドの合成および検証
材料：

試薬および溶媒はすべて、ペプチド合成等級またはそれより高い利用可能な純度のものであった。アミノ酸誘導体はＡａｐｐｔｅｃｈ（Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ，ＫＹ　ＵＳＡ）から入手し、ペプチド合成、ＳＰＥおよびＲＰ±ＨＰＬＣ用の溶媒はすべて、Ａｃｒｏｓ Ｏｒｇａｎｉｃｓ，ＵＳＡから入手した。

【０２１６】

ペプチドの合成：

ペプチドは、ＭｕｌｔｉＰｅｐ　ＲＳｉ合成装置（Ｉｎｔａｖｉｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で、標準的なＦｍｏｃ／ｔＢｕケミストリーを用いて合成した。アミノ酸誘導体は、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（１Ｈ－ベンソトリアゾル－１－イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）（０．５Ｍ）によって活性化させた。標準的な合成プロトコルを９６槽マイクロ反応ブロックにおいて使用し、ペプチドを合成した。Ｒｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ　Ｒｅｓｉｎ（Ｉｎｔａｖｉｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を０．５３ｍｍｏｌ／ｇのアミン含有量で２マイクロモル／槽をロードした。以下の添加シーケンスを用いてペプチドを合成した：

【表１】

レジンの調製		
1	メモ	合成スケール:2μmol
1	ニードルすすぎ	1500/2000ul(DMF)
2	ピペット	1500μl/1500μlのキャップ混合物(無水酢酸)→排出
3	ニードルすすぎ	1500/2000ul(DMF)
4	ピペット	1500μl/1500μlのN-メチルピペリジン溶液→排出
5	ニードルすすぎ	1000/2000ul(DMF)
6	マニホールドプライミング	10000μl、DMF
7	レジン洗浄	1200μl、DMF、4×
8	抽出	60秒
サイクル		1.→N.(カウント数=N)(N-カップリング回数)
9	脱保護	50μl、N-メチルピペリジン
10	脱保護	50μl、N-メチルピペリジン
11	ニードルすすぎ	1000/2000ul
12	レジン洗浄	1800μl、DMF、2×
13	レジン洗浄	1200μl、DMF、8×
14	抽出	30秒
15	カップリング	20μlのHBTU+5μlのNMM+2μlのNMP+21μlのアミノ酸誘導体
16	カップリング	20μlのHBTU+5μlのNMM+2μlのNMP+21μlのアミノ酸誘導体
17	キャッピング	50μl、キャップ混合物(無水酢酸)
18	ニードルすすぎ	1000/2000ul(DMF)
19	レジン洗浄	1200μl、DMF、6×
20	抽出	60秒
最終措置		
21	脱保護	80μl、N-メチルピペリジン
22	脱保護	80μl、N-メチルピペリジン
23	脱保護	80μl、N-メチルピペリジン
24	ニードルすすぎ	500/2500ul(DMF)
25	レジン洗浄	1800μl、DMF、2×
26	レジン洗浄	1200μl、DMF、8×
27	マニホールドプライミング	10000μl、エタノール
28	レジン洗浄	1200μl、エタノール、2×
29	抽出	300秒
30	ニードルすすぎ	1000/3000ul(DMF)

【０２１７】

アミノ酸誘導体はすべて、Ｆｍｏｃ－リシン（Ｂｉｏｔｉｎ）（０．３Ｍ）以外は、ＤＭＦ中０．５Ｍの溶液として使用した。Ｎ－メチルピペリジンはＤＭＦ中２Ｍの溶液として使用し、無水酢酸はＤＭＦ中５％（０．５２９Ｍ）の溶液として使用した。カップリングは各サイクルで３０分間継続し、各構築ブロックで２回繰り返した。アミン酸は、完全なカップリングを確実にするためにアミンに対して１０倍過剰で使用した。ペプチドは、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）中５％の水、２．５％のトリイソプロピルシランの溶液を用いて室温で２時間切断し、ｔｒｅｔ－ブチルメチルエーテルを用いて－２０Ｃで沈殿させ、冷ｔｒｅｔ－ブチルメチルエーテル（２００ｕｌ）で３回洗浄した。乾燥させたペプチド

を１ｍＬの０．１％水性ＴＦＡ（５００マイクロリットル）に溶解させ、－２０Ｃで保存した。

【０２１８】

固相抽出

粗製ペプチドを、各ウェル内に４０ｍｇのＣ１８吸着剤を含むＳｅｐ－Ｐａｋ　Ｃ１８　Ｍｕｌｔｉ　９６ウェルプレート（ＷＡＴ０５４９５５）で、Ｍｕｌｔｉ　９６真空マニホールド（Ｗａｔｅｒｓ，ＵＳＡ）を用いて精製した。溶出液を２ｍＬ容積収集ラック（ＷＡＴ０５８９５６）に収集した。典型的なプロトコルで、カートリッジまたはプレートを１ｍｌのＭｅＯＨで洗浄し、０．１％水性ＴＦＡでコンディショニングした後、ペプチド試料をロードした。ペプチドは、溶液を、真空なしで固定相中をゆっくり通過させ、ほぼ定量的ペプチド結合を行わせることによりロードした。固相を０．１％水性ＴＦＡで洗浄し、塩および他の極性不純物を除去した後、結合しているペプチドを１ｍＬの７０％水性アセトニトリルで溶出させた。溶媒をＣｅｎｔｒｉｖａｐを用いて一晩蒸発させ、ペレットを５００マイクロリットルのＤＩ水に再溶解させた。ブランクとして水を用いてＴｅｃａｎ　Ｓｐａｒｋプレートリーダーを使用し、２００～１０００ｎｍの範囲の吸収スペクトルを収集して濃度を測定した。２１４ｎｍにおける吸光係数および消光係数を使用し、ペプチド濃度を算出した。ＵＶ透過９６ウェルプレート（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　８４０４）を使用してペプチド濃度を測定した。

【０２１９】

質量分析：

マトリックス溶液はＡｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入した（Ｃａｔ＃Ｇ２０３７Ａ）。１マイクロリットルのペプチドストック溶液および１マイクロリットルのマトリックスをＭＡＬＤＩ試料プレート上に同時スポッティングし、試料を周囲条件下で乾燥させることにより試料を調製した。質量スペクトルをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析計ＡＢ　ＳＣＩＥＸ　５８００　ＴＯＦ／ＴＯＦで記録した。代表的な質量スペクトルを図９に示す。

【０２２０】

［実施例６］

磁性ビーズペプチドライブラリーを用いた親和性試薬のＳＥＬＥＸ選択

アルキン磁性ビーズ上でのペプチドコンジュゲーション

アルキン磁性ビーズ用のコンジュゲーション溶液を調製した。０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０（５ｍＬの水＋０．５μＬのＴｗｅｅｎ２０）の第１の溶液を調製した。１００ｍＭ　ＣｕＳＯ４・５Ｈ２Ｏ（ＭＷ：２４９．６９ｇ／ｍｏｌ）の第２の溶液を、１ｍＬの水に溶解させた２５ｍｇのＣｕＳＯ４・５Ｈ２Ｏから調製した。５００ｍＭアスコルビン酸ナトリウム（ＭＷ：１９８．１１ｇ／ｍｏｌ）を、１００ｍｇのアスコルビン酸ナトリウムを１ｍＬの水に溶解させることにより調製した。

【０２２１】

ストックアルキン磁性ビーズを洗浄した。各試料には、５μＬの供給されたままのビーズを使用した。ビーズをストックバイアル内に＞３０秒間のボルテックスまたは５分間の傾斜回転によって再懸濁させた。ビーズをストックバイアルから除去し、磁性チューブラックを用いてプルダウンし、上清みを除去した。１ｍＬの０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０をビーズに添加し、次いでビーズを再懸濁させ、磁性チューブラックを用いてプルダウンした後、上清みを除去した。Ｔｗｅｅｎ　２０中でのすすぎをさらに４回繰り返した。洗浄したビーズを０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０中に再懸濁させた。

【０２２２】

ペプチドをアルキン磁性ビーズに以下のとおりにコンジュゲートさせた。磁性ビーズの各アリコート（２００μＬのビーズ）を、調製した１００ｎｍｏｌのペプチド、２０μＬの１００ｍＭ　ＣｕＳＯ４・５Ｈ２Ｏ（アルキン基の数の２０倍）、２０μＬの５００ｍＭアスコルビン酸ナトリウム（アルキン基の数の１００倍）および充分な０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０と合わせ、反応容量を１０００μＬにした。合わせたペプチド－ビーズ混合物を

Ｔｈｅｒｍｏｍｉｘｅｒ内で１６時間振盪した。混合後、コンジュゲートされたビーズをプルダウンした。上清みを除去し、確保してペプチド濃度をタンパク質解析装置で測定した。ビーズを０．０１％　ｔｗｅｅｎ２０で２回洗浄し、次いで０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０中に再懸濁させた。

【０２２３】

親和性試薬のＳＥＬＥＸ選択

ライブラリーを、ＳＥＬＥＸの前にペプチド標的に対して３ラウンド予備濃縮した。予備濃縮ラウンド（ＰＥ　Ｒ）１では、親和性試薬ライブラリーを、加熱を伴って水中に溶出させた。ＰＥ　Ｒ２およびＲ３の前に、別の１２５ｐｍｏｌのナイーブライブラリーを加熱溶出生成物に添加する。

【０２２４】

パート１：ＳＥＬＥＸ用バッファーの調製：

ＳＥＬＥＸ選択用のバッファーを調製した。ＮＶＴ［２００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２．４ＭＮａＣｌ、１００ｍＭ　ＭｇＣｌ２、１００ｍＭ　ＫＣｌ、２％Ｔｗｅｅｎ２０　ｐＨ７．４］の１Ｌの２０倍ストックを、４７．６６ｇのＨＥＰＥＳ（ＭＷ　２３８．３０ｇ／ｍｏｌ）、１４０．２５６ｇのＮａＣｌ（ＭＷ　５８．４４ｇ／ｍｏｌ）、９．５２１１ｇのＭｇＣｌ２（ＭＷ　９５．２１１ｇ／ｍｏｌ）および７．４５５ｇのＫＣｌ（ＭＷ　７４．５５ｇ／ｍｏｌ）を７５０ｍＬの水に溶解させることにより調製した。ｐＨをＨＣｌ／ＮａＯＨを用いて７．４に調整した。２０ｍＬのＴｗｅｅｎ２０をこの溶液に添加し、次いで最終容量を１Ｌにした。結合バッファーを、３００ｕＭ硫酸デキストランおよび０．１ｍｇ／ｍｌの断片化処理済みのサケ精子ＤＮＡを有する１×ＮＶＴを用いて調製した。ＳＥＬＥＸ用の洗浄バッファーは１×ＮＶＴであった。

【０２２５】

パート２：ＳＥＬＥＸ用ライブラリーの調製：

中間ライブラリーストックを１×ＮＶＴで調製した。このライブラリーを９５℃まで５分間加熱し、次いで１０分間冷却した

パート３：ペプチドのビーズ洗浄およびライブラリー結合：

２００μＬの１×ＮＶＴを有するマルチウェル洗浄プレートを５つ作成した。マルチウェルビーズプレートのうちの１つに４０μＬのビーズ／ウェルを、ビーズペプチドストックマイクロ遠心チューブ（最初のストックプレートの５μＬのビーズ）からロードし、次いでｔ０　１６０μＬの１×ＮＶＴ／ウェルと合わせた。コームをこのプレートに添加した。２００μＬの１×結合バッファー中１００ｐｍｏｌの加熱ナイーブライブラリー／ウェルを有するマルチウェルライブラリープレートを１つ作成した。５０μＬの水／ウェルを有する標準プレートを１つ作成した。

【０２２６】

ビーズをビーズプレートから２０秒間／収集で３回収集した。ビーズを洗浄プレート１内で、１０秒間のビーズの解離、３０秒間の混合および各収集３０秒間で５回のビーズ収集によって洗浄した。この洗浄方法を洗浄プレート２で繰り返した。ビーズをライブラリープレートにライブラリー結合のために、１０秒間のビーズ解離、６ラウンドの高速混合で９分３０秒間＋低速混合で３０秒間の結合、次いで、５ラウンドの３０秒間のビーズ収集によって移動させた。次いでビーズを３回（洗浄プレート３、４および５）、１０秒間のビーズ解離、４分３０秒間の中速混合＋３０秒間の低速混合による２回の洗浄、次いで２ラウンドの３０秒間のビーズ収集によって洗浄した。ビーズを水中に、１４秒間のビーズの解離、中速度で３０秒間の混合および３０秒間の低速混合、次いで２ラウンドで２１秒間のビーズ収集によって溶出させた。ビーズをビーズプレートに移して戻した。加熱溶出プレートを収集し、その内容物を、次のラウンドの前に保存のためにＰＣＲプレートに移した。

【０２２７】

ＳＥＬＥＸ（６ラウンド）

ＳＥＬＥＸを長鎖ペプチドおよび短鎖ペプチドに対して、ナイーブ親和性試薬ライブラリ

ーおよび予備濃縮親和性試薬ライブラリーを用いて行った。最初の２ラウンドの溶出液を２つのグループ：ＥＤＴＡ溶出とペプチド競合溶出に分けた。ラウンド３以降の試料はすべて、ＥＤＴＡで溶出させた。すべてのラウンドは第２の加熱溶出を含む。

【０２２８】

パート１：ＳＥＬＥＸ用ライブラリーの調製：

中間ライブラリーストックを１×ＮＶＴで調製した。このライブラリーを９５℃まで５分間加熱し、次いで１０分間冷却した。

【０２２９】

パート２：ペプチドのビーズ洗浄およびライブラリー結合：

ビーズ洗浄をＭａｇＭａｘで行った。２００μＬの１×ＮＶＴ／ウェルを有する５つのマルチウェル洗浄プレートを作成した。ビーズペプチドストックマイクロ遠心チューブ（最初のストックプレートの５μＬのビーズ）から１６μＬのビーズを有するマルチウェルビーズプレートを１つ作成し、ｔ０　１６０μＬの１×ＮＶＴを充填した。コームをこのプレートに添加した。１３４μＬの１×結合バッファー中１００ｐｍｏｌの５０μＬの加熱ナイーブ親和性試薬ライブラリーまたは５０μＬの予備濃縮親和性試薬ライブラリーを有するマルチウェルライブラリープレートを１つ作成した。１６μＬのビーズを適切なウェルに添加した。適切なウェル内に５０μＬのＥＤＴＡを有する標準プレートを１つ作成した。残りのウェルに水を充填した。適切なウェル内の１×ＮＶＴ中に５０μＬのペプチド（５００ｐｍｏｌ）を有する標準プレートを１つ作成し、残りのウェルに１×ＮＶＴを充填した。５０μＬの水を有する標準プレートを１つ作成した。

【０２３０】

ビーズをビーズプレートから３回２０秒間収集した。ビーズを洗浄プレート１内で、１０秒間のビーズ解離、３０秒間の中速混合、次いで５回で３０秒間のビーズ収集によって洗浄した。この洗浄を洗浄プレート２で繰り返した。ビーズをライブラリープレートにライブラリー結合のために、６×（９分３０秒間の中速混合＋３０秒間の低速混合）の結合、５回で３０秒間のビーズ収集によって移動させた。ビーズを３回（洗浄プレート３、４および５）、１０秒間のビーズ解離、２×（４分３０秒間の中速混合＋３０秒間の底混合）の洗浄、次いで２回で３０秒間のビーズ収集によって洗浄した。ＥＤＴＡ中への溶出では、ビーズを１４秒間解離させた後、３０秒間の中速混合および３０秒間の低速混合で混合し、２回で２１秒間ビーズ収集した。ペプチド中への溶出では、ビーズを１４秒間解離させた後、３回で４分３０秒間の中速混合および３０秒間の低速混合を行い、次いで２回で２１秒間ビーズ収集を行った。水中への溶出では、ビーズを１４秒間解離させた後、３０秒間の中速混合および３０秒間の低速混合を行い、次いで２回で２１秒間のビーズ収集を行った。ビーズをライブラリー結合プレートに移して戻した。すべての溶出プレートから液体を収集し、内容物を保存のためにＰＣＲプレートに移した。ＥＤＴＡ溶出生成物とペプチド溶出生成物をＰＣＲ増幅のために単一のプレートに合わせた。

【０２３１】

パート３：ＳＥＬＥＸ出力の増幅

内容物をＰｅｐｔｉｄｅ／ＥＤＴＡプレートからｑＰＣＲプレートに移した。２種類の異なるマスターミックス（１種類はＥＤＴＡ溶出用および１種類はペプチド溶出用）を調製した。ＥＤＴＡ溶出用マスターミックスは１００μＬの総容量で、２×Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　１００×１／２＝５０μＬ、フォワードプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、リバースプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、ＳｙＢｒ　ｇｒｅｅｎ　１００×１／１００＝１μＬ、ＭｇＣｌ２　１００×４．５／５００＝０．９μＬ、ＥＤＴＡ溶出＝４５μＬ（ラウンド１用）および２．７μの水を合わせることにより調製した。ペプチド溶出用マスターミックスは、２×Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　１００×１／２＝５０μＬ、フォワードプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、リバースプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、ＳｙＢｒ　ｇｒｅｅｎ　１００×１／１００＝１μＬ、ＥＤＴＡ１００ｘ２．５／１００＝２．５μＬ、ペプチド溶出＝４５μＬ（ラウンド１用）および水１．１μＬの水を合わせることにより作成した。プレートの混合にＴｉｓｓｕｅＬｙｓ

ｅｒを３回使用した。プレートを２０００×ｇで１分間、遠心分離した。ｑＰＣＲプログラムを、９８Ｃで３分のサーマルサイクル、９８Ｃで１５秒、６５Ｃで３０秒および７２Ｃで３０秒を１０サイクルで実行した。

【０２３２】

両方の溶出用の１つのマスターミックスを作出し、さらに１００μＬを各試料に添加した。全ＰＣＲ容量は２００μＬであった。このマスターミックスは、２×Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　１００×１／２＝５０μＬ、フォワードプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、リバースプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、ＳｙＢｒ　ｇｒｅｅｎ　１００×１／１００＝１μＬおよび４８．６μＬの水を合わせることにより作出した。各試料が１０００００～１２５００００ＦＬＵに達するのに必要とされるＰＣＲサイクルの回数を記録した。陽性対照試料のピークがどこで平坦になるかに応じて、バイオアナライザで実施するためのＮＴＣを含む２４種類の試料を選択し、後続ラウンド用の充分な材料が作成されていることを確実にするためにアンプリコンのサイズならびに濃度を確認した。検出されるアンプリコンが不充分な場合、試料をさらなるラウンドのＰＣＲで再増幅し、気泡形成の除去ならびにより多くの材料の生成を行った。

【０２３３】

パート４：ライブラリーの再生

２×結合バッファー／洗浄バッファー（Ｂ＆Ｗバッファー）を、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび２Ｍ　ＮａＣｌを合わせ、溶液をｐＨ７．５にすることにより作成した。必要とされるビーズの量は、７５μｌのビーズが３００μｌのＰＣＲ反応液に必要とされると計算された。必要とされるＮａＯＨの量は、７５μｌのビーズに対して８０μｌの２０ｍＭ　ＮａＯＨが必要とされると計算された。ビーズを１×Ｂ＆Ｗバッファー中で手作業にて洗浄した。２００μＬの１×Ｂ＆Ｗ／ウェルを有するマルチウェル洗浄プレートを２つ作出した。７５μＬのビーズを有するマルチウェルビーズプレートを１つ作成し、１２５μＬの１×Ｂ＆Ｗに添加した。コームをこのプレートに添加する。３００μＬのＰＣＲ反応液および３００μＬの２×Ｂ＆Ｗバッファーを有するマルチウェルライブラリープレートを１つ作出した。適切なウェル内に８０μＬのＮａＯＨを有する標準プレートを１つ作出した。残りのウェルに水を充填した。２０μＬの４０ｍＭ　ＨＣＬおよび５μＬの２０×ＮＶＴを有するＰＣＲ収集プレートを１つ作成した。コームをビーズプレートから取り出した。ビーズをライブラリープレート内の親和性試薬ライブラリーとライブラリー結合のために以下のとおり、結合：４×（４分５５秒間の中速混合＋５秒間の低速混合）および５回で３０秒間のビーズ収集によって混合した。ビーズを２回（洗浄プレート１および２）、１０秒間のビーズ解離、１０秒間のビーズ洗浄および５回で３０秒間のビーズ収集によって洗浄した。ペプチドをＮａＯＨ中で、１０秒間の解離、中速度で１０分間の混合および５秒間の低速混合、次いで５回で３０秒間のビーズ収集によって変性させた。ビーズプレート内のコームを取り替えた。

【０２３４】

すべての試料を、Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイを用いて定量した。Ｏｌｉｇｒｅｅｎ標準液を１×ＮＶＴ中で２ｎｇ／μＬに希釈した。標準液の２倍希釈を９６ウェル黒色プレート内で行った（最終容量は１００μＬであった）。２μＬのｓｓＤＮＡをプレートに添加した（最終容量は１００μＬであった）。２００×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬を１×に希釈した。１００μＬの１×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬をプレート上の各ウェルに添加した。読み値をＴｅｃａｎＦ２００で４８５（２０）ｎｍ／５３５（２５）ｎｍにて得た後、次の選択ラウンドに進めた。

【０２３５】

［実施例７］

コバルトＳＥＬＥＸ親和性試薬選択

コバルトアガロースビーズ用バッファーの調製

アガロースビーズベースのＳＥＬＥＸ用のバッファーを調製した。ＮＶＴ［２００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２．４Ｍ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　ＭｇＣｌ２、１００ｍＭ　ＫＣｌ、２％

Ｔｗｅｅｎ２０　ｐＨ７．４］の１Ｌの２０倍ストックを、４７．６６ｇのＨＥＰＥＳ（ＭＷ　２３８．３０ｇ／ｍｏｌ）、１４０．２５６ｇのＮａＣｌ（ＭＷ　５８．４４ｇ／ｍｏｌ）、９．５２１１ｇのＭｇＣｌ２（ＭＷ　９５．２１１ｇ／ｍｏｌ）および７．４５５ｇのＫＣｌ（ＭＷ　７４．５５ｇ／ｍｏｌ）を７５０ｍＬの水に溶解させ、ＨＣｌ／ＮａＯＨを用いてｐＨを７．４に調整することにより調製した。２０ｍＬのＴｗｅｅｎ２０を添加し、最終容量を１Ｌにした。結合バッファーを、１×ＮＶＴを３００μＭ硫酸デキストランおよび０．１ｍｇ／ｍｌの断片化処理済みのサケ精子ＤＮＡと混合することにより調製した。

【０２３６】

ライブラリーの調製

中間ライブラリーストックを１×ＮＶＴで調製した。このライブラリーを９５℃まで５分間加熱し、次いで１０分間冷却した。

【０２３７】

予備濃縮（３ラウンド）

ライブラリーを、ＳＥＬＥＸラウンド１の前にペプチド標的に対して３ラウンド予備濃縮した。予備濃縮ラウンド（ＰＥ　Ｒ）１では、ライブラリーを、加熱を伴って水中に溶出させた。ＰＥ　Ｒ２およびＲ３の前に、別の１２５ｐｍｏｌのナイーブライブラリーをこの加熱溶出液に添加した。

【０２３８】

ストックコバルトアガロースビーズの初期洗浄

必要とされるビーズの数は、１０ｍｇ／ｍｌのビーズ濃度で１０μＬのビーズ／試料と計算された。ビーズをバイアル内に、＞３０秒間のボルテックスまたは５分間の傾斜回転によって再懸濁させた。ビーズをストックバイアルから取り出し、１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブに添加した。１０μＬのビーズを９６ウェルフィルタープレートのウェルに添加した。この１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブを次の添加との間にボルテックスし、アガロースビーズが適正に懸濁されるのを確実にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間スピンした。これを２回繰り返し、収集プレートを空にした。

【０２３９】

ペプチドの固定化

２００μＬの１μＭペプチドをウェルに添加した。プレートを１時間振盪した。次いでプレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した。固定化手順をさらに２回繰り返し、収集プレートを空にした。

【０２４０】

ビーズに対する正の選択

１２５ｐｍｏｌの親和性試薬ライブラリーをＮＶＴ結合バッファー中で調製した。ＮＶＴ結合バッファー中の２００μＬのライブラリーを各ウェル内に添加した。プレートを１時間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。添加する２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、次いで１０分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。この手順をさらに２回繰り返した。収集プレートをきれいな収集プレートに取り替えた。５０μＬの９５℃の水を各ウェルに添加した。プレートを７０℃で３分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した。

【０２４１】

ＳＥＬＥＸ（６ラウンド）

ＳＥＬＥＸを長鎖ペプチドおよび短鎖ペプチドに対して、ナイーブライブラリーおよび予備濃縮ライブラリーを用いて行った。最初の２ラウンドの溶出液を２つのグループ：無塩溶出およびペプチド競合溶出に分けた。ラウンド３以降、試料はすべて、加熱を伴って溶出させた。

【０２４２】
パート１：ＳＥＬＥＸ用ビーズの初期洗浄
必要とされるビーズの数は、１０ｍｇ／ｍｌのビーズ濃度で１０μＬのビーズ／試料と計算された。ビーズをバイアル内に、＞３０秒間のボルテックスまたは５分間の傾斜回転によって再懸濁させた。ビーズをストックバイアルから取り出し、１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブに添加した。１０μＬのビーズを９６ウェルフィルタープレートのウェルに添加した。この１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブを次の添加との間にボルテックスし、アガロースビーズが適正に懸濁されるのを確実にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間スピンした。これを２回繰り返し、収集プレートを空にした。

【０２４３】
パート２：ペプチドの固定化
２００μＬの１μＭペプチドをウェルに添加した。プレートを１時間振盪した。次いでプレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した。固定化手順をさらに２回繰り返し、収集プレートを空にした。

【０２４４】
パート３：ビーズに対する正の選択
１９０μＬのＮＶＴ結合バッファーをプレートの各ウェル内に添加した。１０μＬのライブラリーを各ウェル内に添加し、プレートを１時間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加し、プレートを１０分間振盪した。これをさらに２回繰り返した。５０μＬの５μＭペプチドをペプチド溶出ウェルに添加した。プレートを１４分間振盪した。５０μＬの溶出バッファーをウェルに添加し、プレートを１分間振盪した。収集プレートをきれいな収集プレートに取り替え、１０００×ｇで２分間、遠心分離した。収集プレートをきれいな収集プレートに取り替え、５０μＬの９５℃の水を各ウェルに添加した。プレートを７０℃で３分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した。

【０２４５】
パート４：ＳＥＬＥＸ出力の増幅
内容物をペプチド／無塩プレートからｑＰＣＲプレートに移した。２種類の異なるマスターミックスを調製した（１種類はＥＤＴＡ溶出用および１種類はペプチド溶出用）。溶出用マスターミックスは、Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　Ｍａｓｔｅｒｍｉｘ（最終１×）、Ｆ－プライマー／Ｒ－バイオプライマー（最終１ｕＭ）、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（最終１×）、ＥＤＴＡ（最終４ｍＭ）、４０ｕｌのＳＥＬＥＸ溶出液および最終容量までの水を合わせることにより調製した。各試料の混合のためにＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒを３回使用した。プレートを２０００×ｇで１分間、遠心分離した。各試料を１０サイクルで増幅した。１００μＬのマスターミックスを各試料に添加した。各試料が１０００００００～１２５００００ＦＬＵに達するのに要するＰＣＲサイクルの回数を記録した。陽性対照試料のピークがどこで平坦になるかに応じて、バイオアナライザで実施するためのＮＴＣを含む１２種類の試料を選出し、後続ラウンドのＳＥＬＥＸ用の充分な材料が作成されていることを確実にするためにアンプリコンのサイズならびに濃度を確認した。

【０２４６】
パート５：ライブラリーの再生
２×結合バッファー／洗浄バッファー（Ｂ＆Ｗバッファー）を、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび２Ｍ　ＮａＣｌを合わせ、溶液のｐＨを７．５に調整することにより調製した。必要とされる磁性ビーズの量は、７５μｌのビーズが３００μｌのＰＣＲ反応液に必要とされると計算された。必要とされるＮａＯＨの量は、７５μｌのビーズに対して８０μｌの２０ｍＭ　ＮａＯＨが必要とされると計算された。

【０２４７】
磁性ビーズ（５０μＬのビーズ×１００μＬのＰＣＲ反応液の数）を１ｍＬの１×Ｂ＆Ｗ

バッファー中で洗浄した。ビーズを、磁性チューブラックを用いてプルダウンし、バッファーを除去した。ビーズを同容量のビーズ中で洗浄した。バッファーを除去し、洗浄を繰り返した。等容量の２×Ｂ＆Ｗバッファーをビーズに添加した
試料に対してＭａｇＭＡＸプロトコルを実行した。２００μｌのＢ＆Ｗ中に置かれたコームを、ディープウェルプレート内の０μｌ容量レベルにあるコームから取り上げた。コームは、ビーズとライブラリーを室温で２０分間を混合するために使用した。１００μＬのＰＣＲ反応液を１００μＬのビーズと、ディープウェルプレート内の総容量２００μｌの２×Ｂ＆Ｗバッファー中で合わせた。各ウェルで中速混合を１０秒間、次いで中速混合を４分間５０秒間、次いで低速混合を１０秒間行った。この手順を２回繰り返した。

【０２４８】

ライブラリーが結合しているダイナビーズを収集し、洗浄１に移行した。各ウェルはディープウェルプレート内に２００μｌの容量を有し、１０秒間、中速混合した。ライブラリーが結合しているダイナビーズを収集し、洗浄２に移行した。各ウェルはディープウェルプレート内に２００μｌの容量を有し、１０秒間、中速混合した。ライブラリーが結合しているダイナビーズを収集し、２０ｍＭ　ＮａＯＨ中での溶出のためのＮａＯＨプレートに移した。各ウェルはディープウェルプレート内に８０μｌの容量を有し、１０分間、中速混合した。ライブラリーがないダイナビーズを収集し、解離のためにコームプレートに移した。ＮａＯＨ溶出の内容物をＰＣＲプレートに移し、５μｌの２０×ＮＶバッファーおよび２０μｌの４０ｍＭ　ＨＣｌを添加した。ｐＨを、ｐＨ紙を用いて確認した（ｐＨ７．２～７．４）。少量の試料を選択し、そのサイズをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　２％ＥＸゲルで確認した。すべての試料を、Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイを用いて定量した。Ｏｌｉｇｒｅｅｎ標準液を１×ＮＶＴ中で２ｎｇ／μＬに希釈した。標準液の２倍希釈を９６ウェル黒色プレート内で行った（最終容量は１００μＬであった）。２μＬのｓｓＤＮＡをプレートに添加した（最終容量は１００μＬであった）。２００×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬を１×に希釈した。１００μＬの１×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬をプレート上の各ウェルに添加した。読み値をＴｅｃａｎＦ２００で４８５（２０）ｎｍ／５３５（２５）ｎｍにて得た後、次の選択ラウンドに進めた。

【０２４９】

［実施例８］

無溶液ＳＥＬＥＸプロトコル

予備濃縮（３ラウンド）

ライブラリーを、ＳＥＬＥＸラウンド１の前にペプチド標的に対して３ラウンド予備濃縮した。予備濃縮ラウンド（ＰＥ　Ｒ）１では、ライブラリーを加熱を伴って水中に溶出させた。ＰＥ　Ｒ２およびＲ３の前に、別の１２５ｐｍｏｌのナイーブライブラリーをこの加熱溶出液に添加した。

【０２５０】

パート１：ＳＥＬＥＸ用バッファーの調製

アガロースビーズベースのＳＥＬＥＸ用のバッファーを調製した。ＮＶＴ［２００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２．４Ｍ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　ＭｇＣｌ２、１００ｍＭ　ＫＣｌ、２％　Ｔｗｅｅｎ２０　ｐＨ７．４］の１Ｌの２０倍ストックを、４７．６６ｇのＨＥＰＥＳ（ＭＷ　２３８．３０ｇ／ｍｏｌ）、１４０．２５６ｇのＮａＣｌ（ＭＷ　５８．４４ｇ／ｍｏｌ）、９．５２１１ｇのＭｇＣｌ２（ＭＷ　９５．２１１ｇ／ｍｏｌ）および７．４５５ｇのＫＣｌ（ＭＷ　７４．５５ｇ／ｍｏｌ）を７５０ｍＬの水に溶解させ、ＨＣｌ／ＮａＯＨを用いてｐＨを７．４に調整することにより調製した。２０ｍＬのＴｗｅｅｎ２０を添加し、最終容量を１Ｌにした。結合バッファーを、１×ＮＶＴを３００μＭ硫酸デキストランおよび０．１ｍｇ／ｍｌの断片化処理済みのサケ精子ＤＮＡと混合することにより調製した。

【０２５１】

パート２：ライブラリーの調製

中間ライブラリーストックを１×ＮＶＴで調製した。このライブラリーを９５℃まで５分

間加熱し、次いで１０分間冷却した。
【０２５２】
パート３：溶液中でのペプチド標的に対するライブラリー結合
１００ｐｍｏｌのペプチドを、ＭａｇＭＡＸディープウェルプレート内の２５０μＬの結合バッファー中で調製した。１２５ｐｍｏｌのバーコード含有ライブラリーをプレートマップに従って添加し、プレートを室温で１時間振盪した。インキュベーション中、ウェル１つあたり１０μＬのアガロースストレプトアビジンビーズを取り出した（ピペットチップの先端を切断）。試料をマイクロ遠心チューブ内で５００×ｇにて１分間スピンした。上清みを除去し、容量を記録した。試料を１ｍｌの１×ＮＶＴで２回洗浄した。ビーズを元の上清みと同じ容量の１×ＮＶＴ中に再懸濁させ、総容量がウェルの数の１０倍となるようにした。洗浄した１０μＬのビーズを空の９６ウェルマイクロスピンカラムの各ウェルに添加し、膜およびビーズを４０μＬの結合バッファーで洗浄した。プレートを１０００×ｇで２分間、遠心分離した。ペプチドライブラリーミックスをビーズと合わせ、振盪しながら１０分間インキュベートした。プレートを１０００×ｇで２分間、遠心分離し、ウェルを２５０μＬの１×ＮＶＴで室温にて１０分間洗浄した。プレートを１０００×ｇで２分間、遠心分離し、洗浄をさらに２回繰り返した。洗浄中、チューブ用サーモミキサーを９５ｃに、プレート用サーモミキサーを７０ｃに設定した。４ｍｌの水をチューブ用サーモミキサー内で加熱し、次いで、５０μＬの加熱された水を各ウェルに添加した。ウェルを混合下で３分間、プレート用サーモミキサー上で７０ｃにてインキュベートした。フィルタープレートに新たな収集プレートを取り付け、遠心分離し、フロースルー画分を収集した。内容物を保存のためにＰＣＲプレートに移した
ＳＥＬＥＸ（６ラウンド）
ＳＥＬＥＸを長鎖ペプチドおよび短鎖ペプチドに対して、ナイーブライブラリーおよび予備濃縮ライブラリーを用いて行った。最初の２ラウンドの溶出液を２つのグループ：ＥＤＴＡ溶出とペプチド競合溶出に分けた。ラウンド３以降の試料はすべて、ＥＤＴＡで溶出させた。すべてのラウンドに第２の加熱溶出を含めた。
【０２５３】
パート１：ＳＥＬＥＸ用ライブラリーの調製
このライブラリーを９５℃まで５分間加熱し、次いで１０分間冷却した。
【０２５４】
パート２：溶液中でのペプチド標的に対するライブラリー結合
１００ｐｍｏｌのペプチドを、ＭａｇＭＡＸディープウェルプレート内の２５０μＬの結合バッファー中で調製した。１２５ｐｍｏｌのバーコード含有ライブラリーをプレートマップに従って添加し、プレートを室温で１時間振盪した。インキュベーション中、ウェル１つあたり１０μＬのアガロースストレプトアビジンビーズを取り出した（ピペットチップの先端を切断）。試料をマイクロ遠心チューブ内で５００×ｇにて１分間スピンした。上清みを除去し、容量を記録した。試料を１ｍｌの１×ＮＶＴで２回洗浄した。ビーズを元の上清みと同じ容量の１×ＮＶＴ中に再懸濁させ、総容量がウェルの数の１０倍となるようにした。洗浄した１０μＬのビーズを空の９６ウェルマイクロスピンカラムの各ウェルに添加し、膜およびビーズを４０μＬの結合バッファーで洗浄した。プレートを１０００×ｇで２分間、遠心分離した。ペプチドライブラリーミックスをビーズと合わせ、振盪しながら１０分間インキュベートした。プレートを１０００×ｇで２分間、遠心分離し、ウェルを２５０μＬの１×ＮＶＴで室温にて１０分間洗浄した。プレートを１０００×ｇで２分間、遠心分離し、洗浄をさらに２回繰り返した。洗浄中、チューブ用サーモミキサーを９５ｃに、プレート用サーモミキサーを７０ｃに設定した。４ｍｌの水をチューブ用サーモミキサー内で加熱し、次いで、５０μＬの加熱された水を各ウェルに添加した。ウェルを混合下で３分間、プレート用サーモミキサー上で７０ｃにてインキュベートした。フィルタープレートに新たな収集プレートを取り付け、遠心分離し、フロースルー画分を収集した。内容物を保存のためにＰＣＲプレートに移した
パート３：ＳＥＬＥＸ出力の増幅

内容物をＰｅｐｔｉｄｅ／ＥＤＴＡプレートからｑＰＣＲプレートに移した。２種類の異なるマスターミックス（１種類はＥＤＴＡ溶出用および１種類はペプチド溶出用）を調製した。ＥＤＴＡ溶出用マスターミックスは１００μＬの総容量で、２×Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　１００×１／２＝５０μＬ、フォワードプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、リバースプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、ＳｙＢｒ　ｇｒｅｅｎ　１００×１／１００＝１μＬ、ＭｇＣｌ２　１００×４．５／５００＝０．９μＬ、ＥＤＴＡ溶出＝４５μＬ（ラウンド１用）および２．７μの水を合わせることにより調製した。ペプチド溶出用マスターミックスは、２×Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　１００×１／２＝５０μＬ、フォワードプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、リバースプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、ＳｙＢｒ　ｇｒｅｅｎ　１００×１／１００＝１μＬ、ＥＤＴＡ１００ｘ２．５／１００＝２．５μＬ、ペプチド溶出＝４５μＬ（ラウンド１用）および水１．１μＬの水を合わせることにより作成した。プレートの混合にＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒを３回使用した。プレートを２０００×ｇで１分間、遠心分離した。ｑＰＣＲプログラムを、９８Ｃで３分のサーマルサイクル、９８Ｃで１５秒、６５Ｃで３０秒および７２Ｃで３０秒を１０サイクルで実行した。各試料を１０サイクルで増幅した。

【０２５５】

両方の溶出用の１つのマスターミックスを作出し、さらに１００μＬを各試料に添加した。全ＰＣＲ容量は２００μＬであった。このマスターミックスは、２×Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　１００×１／２＝５０μＬ、フォワードプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、リバースプライマー１００×１／５００＝０．２μＬ、ＳｙＢｒ　ｇｒｅｅｎ　１００×１／１００＝１μＬおよび４８．６μＬの水を合わせることにより作出した。各試料が１０００００～１２５００００ＦＬＵに達するのに必要とされるＰＣＲサイクルの回数を記録した。陽性対照試料のピークがどこで平坦になるかに応じて、バイオアナライザで実施するためのＮＴＣを含む２４種類の試料を選択し、後続ラウンド用の充分な材料が作成されていることを確実にするためにアンプリコンのサイズならびに濃度を確認した。検出されるアンプリコンが不充分な場合、試料をさらなるラウンドのＰＣＲで再増幅し、気泡形成の除去ならびにより多くの材料の生成を行った。

【０２５６】

パート４：ライブラリーの再生

２×結合バッファー／洗浄バッファー（Ｂ＆Ｗバッファー）を、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび２Ｍ　ＮａＣｌを合わせ、溶液をｐＨ７．５にすることにより作成した。必要とされるビーズの量は、７５μｌのビーズが３００μｌのＰＣＲ反応液に必要とされると計算された。必要とされるＮａＯＨの量は、７５μｌのビーズに対して８０μｌの２０ｍＭ　ＮａＯＨが必要とされると計算された。ビーズを１×Ｂ＆Ｗバッファー中で手作業にて洗浄した。２００μＬの１×Ｂ＆Ｗ／ウェルを有するマルチウェル洗浄プレートを２つ作出した。７５μＬのビーズを有するマルチウェルビーズプレートを１つ作成し、１２５μＬの１×Ｂ＆Ｗに添加した。コームをこのプレートに添加する。３００μＬのＰＣＲ反応液および３００μＬの２×Ｂ＆Ｗバッファーを有するマルチウェルライブラリープレートを１つ作出した。適切なウェル内に８０μＬのＮａＯＨを有する標準プレートを１つ作出した。残りのウェルに水を充填した。２０μＬの４０ｍＭ　ＨＣＬおよび５μＬの２０×ＮＶＴを有するＰＣＲ収集プレートを１つ作成した。コームをビーズプレートから取り出した。ビーズをライブラリープレート内の親和性試薬ライブラリーとライブラリー結合のために以下のとおり、結合：４×（４分５５秒間の中速混合＋５秒間の低速混合）および５回で３０秒間のビーズ収集によって混合した。ビーズを２回（洗浄プレート１および２）、１０秒間のビーズ解離、１０秒間のビーズ洗浄および５回で３０秒間のビーズ収集によって洗浄した。ペプチドをＮａＯＨ中で、１０秒間の解離、中速度で１０分間の混合および５秒間の低速混合、次いで５回で３０秒間のビーズ収集によって変性させた。ビーズプレート内のコームを取り替えた。

【０２５７】

すべての試料を、Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイを用いて定量した。Ｏｌｉｇｒｅｅｎ標準液

を１×ＮＶＴ中で２ｎｇ／μＬに希釈した。標準液の２倍希釈を９６ウェル黒色プレート内で行った（最終容量は１００μＬであった）。２μＬのｓｓＤＮＡをプレートに添加した（最終容量は１００μＬであった）。２００×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬を１×に希釈した。１００μＬの１×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬をプレート上の各ウェルに添加した。読み値をＴｅｃａｎＦ２００で４８５（２０）ｎｍ／５３５（２５）ｎｍにて得た後、次の選択ラウンドに進めた。

【０２５８】

［実施例９］

ストレプトアビジンアガロースＳＥＬＥＸプロトコル

予備濃縮（３ラウンド）

ライブラリーを、ＳＥＬＥＸラウンド１の前にペプチド標的に対して３ラウンド予備濃縮した。予備濃縮ラウンド（ＰＥ　Ｒ）１では、ライブラリーを、加熱を伴って水中に溶出させた。ＰＥ　Ｒ２およびＲ３の前に、別の１２５ｐｍｏｌのナイーブライブラリーをこの加熱溶出液に添加した。

【０２５９】

パート１：ＳＥＬＥＸ用バッファーの調製

アガロースビーズベースのＳＥＬＥＸ用のバッファーを調製した。ＮＶＴ［２００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２．４Ｍ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　ＭｇＣｌ２、１００ｍＭ　ＫＣｌ、２％　Ｔｗｅｅｎ２０　ｐＨ７．４］の１Ｌの２０倍ストックを、４７．６６ｇのＨＥＰＥＳ（ＭＷ　２３８．３０ｇ／ｍｏｌ）、１４０．２５６ｇのＮａＣｌ（ＭＷ　５８．４４ｇ／ｍｏｌ）、９．５２１１ｇのＭｇＣｌ２（ＭＷ　９５．２１１ｇ／ｍｏｌ）および７．４５５ｇのＫＣｌ（ＭＷ　７４．５５ｇ／ｍｏｌ）を７５０ｍＬの水に溶解させ、ＨＣｌ／ＮａＯＨを用いてｐＨを７．４に調整することにより調製した。２０ｍＬのＴｗｅｅｎ２０を添加し、最終容量を１Ｌにした。結合バッファーを、１×ＮＶＴを３００μＭ硫酸デキストランおよび０．１ｍｇ／ｍｌの断片化処理済みのサケ精子ＤＮＡと混合することにより調製した。洗浄バッファーを１×ＮＶＴとして調製した。

【０２６０】

パート２：ＳＥＬＥＸ用ライブラリーの調製

中間ライブラリーストックを１×ＮＶＴで調製した。このライブラリーを９５℃まで５分間加熱し、次いで１０分間冷却した。

【０２６１】

パート３：予備濃縮ラウンド

ストックストレプトアビジンアガロースビーズの初期洗浄

必要とされるストレプトアビジン－アガロースビーズの数は、１０ｍｇ／ｍｌのビーズ濃度で試料１つあたり１０μＬのビーズが使用されると計算された。ビーズをバイアル内に、＞３０秒間のボルテックスまたは５分間の傾斜回転）によって再懸濁させた。ビーズをストックバイアルから取り出し、１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブに添加した。１０μＬのビーズを９６ウェルフィルタープレートのウェルに添加した。この１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブを次の添加との間にボルテックスし、アガロースビーズが適正に懸濁されるのを確実にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間スピンした。これを２回繰り返し、収集プレートを空にした。

【０２６２】

ペプチドの固定化

２００μＬの１μＭペプチドをウェルに添加した。プレートを１時間振盪した。次いでプレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した。固定化手順をさらに２回繰り返し、収集プレートを空にした。２００μＬの１μＭビオチン－ＰＥＧ４をウェルに添加した。プレートを１０分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間スピンし、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加し、プレートを１０００×ｇで２分間スピンした。洗浄をさらに２回繰り返し、次いで収集プレ

ートを空にした。
【０２６３】
ビーズに対する正の選択
１２５ｐｍｏｌの親和性試薬ライブラリーをＮＶＴ結合バッファー中で調製した。ＮＶＴ結合バッファー中の２００μＬのライブラリーを各ウェル内に添加した。プレートを１０分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。添加する２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、次いで１０分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。この手順をさらに２回繰り返した。収集プレートをきれいな収集プレートに取り替えた。５０μＬの９５℃の水を各ウェルに添加した。プレートを７０℃で３分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した
ＳＥＬＥＸ６ラウンド
ＳＥＬＥＸを長鎖ペプチドおよび短鎖ペプチドに対して、ナイーブライブラリーおよび予備濃縮ライブラリーを用いて行った。最初の２ラウンドの溶出液を２つのグループ：ＥＤＴＡ溶出とペプチド競合溶出に分けた。ラウンド３以降の試料はすべて、ＥＤＴＡで溶出させた。すべてのラウンドに第２の加熱溶出を含めた。
【０２６４】
パート１：ＳＥＬＥＸ用ビーズの初期洗浄
必要とされるストレプトアビジン－アガロースビーズの数は、１０ｍｇ／ｍｌのビーズ濃度で試料１つあたり１０μＬのビーズが使用されると計算された。ビーズをバイアル内に、＞３０秒間のボルテックスまたは５分間の傾斜回転）によって再懸濁させた。ビーズをストックバイアルから取り出し、１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブに添加した。１０μＬのビーズを９６ウェルフィルタープレートのウェルに添加した。この１．５ｍＬ容マイクロ遠心チューブを次の添加との間にボルテックスし、アガロースビーズが適正に懸濁されるのを確実にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間スピンした。これを２回繰り返し、収集プレートを空にした。
【０２６５】
パート２：ペプチドの固定化
２００μＬの１μＭペプチドをウェルに添加した。プレートを１時間振盪した。次いでプレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した。固定化手順をさらに２回繰り返し、収集プレートを空にした。２００μＬの１μＭビオチン－ＰＥＧ４をウェルに添加した。プレートを１０分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間スピンし、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加し、プレートを１０００×ｇで２分間スピンした。洗浄をさらに２回繰り返し、次いで収集プレートを空にした。
【０２６６】
パート３：ビーズに対する正の選択
１２５ｐｍｏｌの親和性試薬ライブラリーをＮＶＴ結合バッファー中で調製した。ＮＶＴ結合バッファー中の２００μＬのライブラリーを各ウェル内に添加した。プレートを１時間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。２００μＬの１×ＮＶＴを各ウェルに添加した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、次いで１０分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離し、収集プレートを空にした。この手順をさらに２回繰り返した。５０μＬの０．５μＭペプチドをペプチド溶出ウェルに添加し、プレートを１４分間振盪した。５０μＬの１０ｍＭ　ＥＤＴＡをＥＤＴＡ溶出ウェルに添加し、プレートを１分間振盪した。収集プレートをきれいな収集プレートに取り替えた。５０μＬの９５℃の水を各ウェルに添加した。プレートを７０℃で３分間振盪した。プレートを１０００×ｇで２分間遠心分離した
パート４：ＳＥＬＥＸ出力の増幅
内容物をペプチド／無塩プレートからｑＰＣＲプレートに移した。２種類の異なるマスタ

ーミックスを調製した（１種類はＥＤＴＡ溶出用および１種類はペプチド溶出用）。溶出用マスターミックスは、Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　Ｍａｓｔｅｒｍｉｘ（最終１×）、Ｆ－プライマー／Ｒ－バイオプライマー（最終１ｕＭ）、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（最終１×）、ＥＤＴＡ（最終４ｍＭ）、４０ｕｌのＳＥＬＥＸ溶出液および最終容量までの水を合わせることにより調製した。各試料の混合のためにＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒを３回使用した。プレートを２０００×ｇで１分間、遠心分離した。各試料を１０サイクルで増幅した。１００μＬのマスターミックスを各試料に添加した。各試料が１０００００００～１２５００００ＦＬＵに達するのに要するＰＣＲサイクルの回数を記録した。陽性対照試料のピークがどこで平坦になるかに応じて、バイオアナライザで実施するためのＮＴＣを含む１２種類の試料を選出し、後続ラウンドのＳＥＬＥＸ用の充分な材料が作成されていることを確実にするためにアンプリコンのサイズならびに濃度を確認した。

【０２６７】

パート５：ライブラリーの再生

内容物をペプチド／無塩プレートからｑＰＣＲプレートに移した。２種類の異なるマスターミックスを調製した（１種類はＥＤＴＡ溶出用および１種類はペプチド溶出用）。溶出用マスターミックスは、Ｋａｐａ　ＨｉＦｉ　Ｍａｓｔｅｒｍｉｘ（最終１×）、Ｆ－プライマー／Ｒ－バイオプライマー（最終１ｕＭ）、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（最終１×）、ＥＤＴＡ（最終４ｍＭ）、４０ｕｌのＳＥＬＥＸ溶出液および最終容量までの水を合わせることにより調製した。各試料の混合のためにＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒを３回使用した。プレートを２０００×ｇで１分間、遠心分離した。各試料を１０サイクルで増幅した。１００μＬのマスターミックスを各試料に添加した。各試料が１０００００００～１２５００００ＦＬＵに達するのに要するＰＣＲサイクルの回数を記録した。陽性対照試料のピークがどこで平坦になるかに応じて、バイオアナライザで実施するためのＮＴＣを含む１２種類の試料を選出し、後続ラウンドのＳＥＬＥＸ用の充分な材料が作成されていることを確実にするためにアンプリコンのサイズならびに濃度を確認した。

【０２６８】

２×結合バッファー／洗浄バッファー（Ｂ＆Ｗバッファー）を、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび２Ｍ　ＮａＣｌを合わせ、溶液のｐＨを７．５に調整することにより調製した。必要とされる磁性ビーズの量は、７５μｌのビーズが３００μｌのＰＣＲ反応液に必要とされると計算された。必要とされるＮａＯＨの量は、７５μｌのビーズに対して８０μｌの２０ｍＭ　ＮａＯＨが必要とされると計算された。

【０２６９】

磁性ビーズ（５０μＬのビーズ×１００μＬのＰＣＲ反応液の数）を１ｍＬの１×Ｂ＆Ｗバッファー中で洗浄した。ビーズを、磁性チューブラックを用いてプルダウンし、バッファーを除去した。ビーズを同容量のビーズ中で洗浄した。バッファーを除去し、洗浄を繰り返した。等容量の２×Ｂ＆Ｗバッファーをビーズに添加した

試料に対してＭａｇＭＡＸプロトコルを実行した。２００μｌのＢ＆Ｗ中に置かれたコームを、ディープウェルプレート内の０μｌ容量レベルにあるコームから取り上げた。コームは、ビーズとライブラリーを室温で２０分間を混合するために使用した。１００μＬのＰＣＲ反応液を１００μＬのビーズと、ディープウェルプレート内の総容量２００μｌの２×Ｂ＆Ｗバッファー中で合わせた。各ウェルで中速混合を１０秒間、次いで中速混合を４分間５０秒間、次いで低速混合を１０秒間行った。この手順を２回繰り返した。

【０２７０】

ライブラリーが結合しているダイナビーズを収集し、洗浄１に移行した。各ウェルはディープウェルプレート内に２００μｌの容量を有し、１０秒間、中速混合した。ライブラリーが結合しているダイナビーズを収集し、洗浄２に移行した。各ウェルはディープウェルプレート内に２００μｌの容量を有し、１０秒間、中速混合した。ライブラリーが結合しているダイナビーズを収集し、２０ｍＭ　ＮａＯＨ中での溶出のためのＮａＯＨプレートに移した。各ウェルはディープウェルプレート内に８０μｌの容量を有し、１０分間、中速混合した。ライブラリーがないダイナビーズを収集し、解離のためにコームプレートに

移した。ＮａＯＨ溶出の内容物をＰＣＲプレートに移し、５μｌの２０×ＮＶバッファーおよび２０μｌの４０ｍＭ　ＨＣｌを添加した。ｐＨを、ｐＨ紙を用いて確認した（ｐＨ７．２～７．４）。少量の試料を選択し、そのサイズをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　２％ＥＸゲルで確認した。すべての試料を、Ｏｌｉｇｒｅｅｎアッセイを用いて定量した。Ｏｌｉｇｒｅｅｎ標準液を１×ＮＶＴ中で２ｎｇ／μＬに希釈した。標準液の２倍希釈を９６ウェル黒色プレート内で行った（最終容量は１００μＬであった）。２μＬのｓｓＤＮＡをプレートに添加した（最終容量は１００μＬであった）。２００×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬を１×に希釈した。１００μＬの１×Ｏｌｉｇｒｅｅｎ試薬をプレート上の各ウェルに添加した。読み値をＴｅｃａｎＦ２００で４８５（２０）ｎｍ／５３５（２５）ｎｍにて得た後、次の選択ラウンドに進めた。

【０２７１】

［実施例１０］

プールＥＬＯＮＡアッセイ

少なくとも１５μｌの１００μＭの親和性試薬プールならびに個々のビオチン化オリゴを作出した。親和性試薬プールを、２×ＮＶＴバッファー（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１２０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＭｇＣｌ２、５ｍＭ　ＫＣｌ、ｐＨ７．４、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０を含む）を用いて５０μＭに希釈した。このライブラリーを９５℃まで５分間加熱し、次いで１０分間冷却した。

【０２７２】

ＥＬＯＮＡプロトコル

ＥＬＯＮＡプレート（Ｐｉｅｒｃｅ（商標）　Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ　Ｃｏａｔｅｄ　Ｈｉｇｈ　Ｃａｐａｃｉｔｙ　Ｐｌａｔｅｓ，Ｃｌｅａｒ，３８４ウェル）を１００μｌの１×ＮＶバッファー＋０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０で２回洗浄した。プレートを、２５μＬのペプチド結合バッファー（０．１ｍｇ／ｍｌのｓｓｓＤＮＡ（断片化処理済みのサケ精子ＤＮＡ）を有する１×ＮＶバッファー）中１μＭビオチン化ペプチドとともにインキュベートし、約５００ＲＰＭで３０分間振盪した。ストレプトアビジンプレートのウェル１つあたり合計１００ｐｍｏｌのペプチドを添加した。ペプチドではなくビオチンを入れたウェルでは、１．６μＭのビオチンを添加した。プレートを１００μｌの１×ＮＶバッファー＋０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０で６回洗浄した。各ウェルを１００μｌのＳｕｐｅｒＧブロッキングバッファー＋１００μＭのＤ－Ｂｉｏｔｉｎでブロックし、約５００ＲＰＭで室温にて３０分間振盪した。ブロックインキュベーション中、リフォールディングしたアプタマーを希釈し、滴定した。ブロック後、プレートを１００μｌの１×ＮＶバッファー＋０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０で６回洗浄した。フォールディングしたアプタマーを、２５μＬのアプタマー結合バッファー（０．１ｍｇ／ｍｌのｓｓＤＮＡおよび３００μＭ硫酸デキストランを有する１×ＮＶバッファー）中に１００ｕＭ　Ｄ－Ｂｉｏｔｉｎとともにウェルに添加し、約５００ＲＰＭで１時間振盪した。

【０２７３】

検出溶液（アプタマー結合バッファー中０．５ｕｇ／ｍｌ（ストックの１：１０００希釈）のストレプトアビジンＨＲＰコンジュゲート）を、インキュベーション期間の５分前と終了時に調製した。プレートを１００μｌの１×ＮＶ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０で６回洗浄した。２５μｌの検出溶液を試料ウェルに添加し、約５００ＲＰＭで３０分間振盪した。プレートを１００μｌの１×ＮＶ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ　２０で６回洗浄した。２５μｌの室温のＴＭＢ基質を各ウェル内に添加し、１分３０秒間インキュベートした。２５μｌの１Ｎ　ＨＣｌを各ウェル内に添加することにより発色を停止した。色は黄色に変化し、４５０ｎｍで最大吸光度であった。各ウェルの４５０ｎｍにおける吸光度をＴｅｃａｎ　Ｓｐａｒｋで測定した。

【０２７４】

［実施例１１］

無溶液ＳＥＬＥＸ親和性試薬濃縮

ビオチン化ペプチドとアプタマーライブラリーの結合を溶液中で１時間、実施例８に記載

のとおりに行った。結合後、ペプチドを結合しているアプタマーとともにストレプトアビジンアガロースビーズ上に固定化させた。３回の１０分間の洗浄後、結合しているアプタマーをＥＤＴＡ中に溶出させ、ＰＣＲ増幅し、単一の標準的なライブラリーに再生させた。このプロセスを６ラウンド繰り返した後、濃縮を次世代シーケンシングによって評価した。親和性試薬ライブラリーは、エピトープＬＲＤＬＲＤＬＲＤＬＲＤまたはＴＱＡＴＱＡＴＱＡＴＱＡを含むペプチドを有するペプチドライブラリーに対して試験した。

【０２７５】

図１３Ａは、配列ＬＲＤＬＲＤＬＲＤＬＲＤに対して試験した親和性試薬濃縮のデータを示す。このエピトープに結合する配列の検出可能な濃縮が観察される。図１３Ｂは、配列ＴＱＡＴＱＡＴＱＡＴＱＡに対して試験した親和性試薬濃縮のデータを示す。このエピトープに結合する配列の検出可能な濃縮が観察されるが、６ラウンドのＳＥＬＥＸ後に観察される濃縮はエピトープＬＲＤＬＲＤＬＲＤＬＲＤに対して観察されたものより少ない。

【０２７６】

［実施例１２］

磁性ビーズを用いたＳＥＬＥＸ親和性試薬濃縮

アジド修飾ペプチドを磁性アルキンビーズ上に、実施例６に記載のとおりにコンジュゲートさせた。コンジュゲーション後、ペプチド結合ビーズをアプタマーライブラリーとともに１時間インキュベートし、３回の１０分間の洗浄後、結合しているアプタマーをＥＤＴＡ中に溶出させ、ＰＣＲ増幅し、単一の標準的なライブラリーに再生させた。このプロセスを６ラウンド繰り返した後、濃縮を次世代シーケンシングによって評価した。親和性試薬ライブラリーは、エピトープＹＳＬＹＳＬＹＳＬＹＳＬまたはＥＶＴを含むペプチドを有するペプチドライブラリーに対して試験した。

【０２７７】

図１４Ａは、配列ＹＳＬＹＳＬＹＳＬＹＳＬに対して試験した親和性試薬濃縮のデータを示す。このエピトープに結合する配列の検出可能な濃縮が観察される。図１４Ｂは、配列ＥＶＴに対して試験した親和性試薬濃縮のデータを示す。このエピトープに結合する配列の検出可能な濃縮が観察されるが、６ラウンドのＳＥＬＥＸ後に観察される濃縮はエピトープＹＳＬＹＳＬＹＳＬＹＳＬに対して観察されたものより少ない。

【０２７８】

［実施例１３］

確率的親和性結合モデル

確率的親和性結合モデルを使用し、５００種類のランダムに選択された固有の酵母タンパク質に対する各親和性試薬の結合を含む結合データセットから３種類の親和性試薬の三量体への結合確率を学習させた。結合測定（結合または非結合）を、各親和性試薬について５００種類の該タンパク質の各々の１０，０００コピーについて蓄積した。各親和性試薬は５種類の三量体に０．２５の確率で結合するとともに、他の三量体にはより低い確率で結合する。３種類の親和性試薬の各々について、このアプローチと用いて予測された三量体への結合確率（ｙ軸）を、親和性試薬の真の結合確率（ｘ軸）と比較してプロットする。点線は、予測確率と真の確率（対比）間の完全一致のラインを示すためにプロットしている。図１５Ａ、１６Ａおよび１７Ａは、対数変換した確率を示し、三量体のカウント数をプロットの４つのビジー（ｂｕｓｙ）領域に明瞭性のために示す。さらに、５００種類のタンパク質セット内に存在しない６８種類の三量体を、異なる陰影を用いてプロットしているが、これらは、プロットのうちの他の点によってわかりにくくなっているかもしれない。図１５Ｂ、１６Ｂおよび１７Ｂは確率の対数変換なしの同じデータを示す。

【０２７９】

本発明の好ましい実施形態を本明細書において図示および記載したが、当業者には、かかる実施形態は一例として示しているにすぎないことが明白であろう。本発明が本明細書に示した具体的な実施例に限定されることは意図していない。本発明を前述の明細書を参照して説明したが、本明細書における実施形態の説明および例示は限定の意味で解釈されることを意図しない。ここに数多くの変形、変更および置き換えが本発明を逸脱することな

く当業者に想起されよう。さらに、本発明のあらゆる態様は、さまざまな条件および可変量に依存する本明細書に示す具体的な描写、構成または相対割合に限定されないことは理解されよう。本発明の実施において、本明細書に記載の本発明の実施形態の種々の択一物が使用され得ることを理解されたい。したがって、本発明は、任意のかかる択一物、修正、変形または均等物も包含しているものとすることが想定される。以下の特許請求の範囲によって本発明の範囲が規定されること、ならびにこの特許請求の範囲の範囲に含まれる方法および構造とその均等物が特許請求の範囲に包含されることを意図する。

【０２８０】

添付の特許請求の範囲に関係なく、本明細書に示す開示内容はまた、以下の項目によっても規定される：

１．各ペプチドが式αＸβの配列を含む第１の複数のペプチドを含む第１のペプチドライブラリーを得ること、式中、Ｘは所望のエピトープであり、αおよびβは、既知のアミノ酸配列を含むフランキングドメインである；

第１のペプチドライブラリーを複数の親和性試薬に曝露し、それにより該複数の親和性試薬の少なくとも１つの親和性試薬を第１のペプチドライブラリーに結合させること；

第１の複数のペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それにより縮小された親和性試薬プールを形成すること；

各ペプチドが式γＸδの配列を含む第２の複数のペプチドを含む第２のペプチドライブラリーを得ること、式中、Ｘは所望のエピトープであり、γおよびδは、既知のアミノ酸配列を含むフランキングドメインである；

第２のペプチドライブラリーを該縮小された親和性試薬プールに曝露し、それにより該縮小された親和性試薬プールの少なくとも１つの親和性試薬を第２のペプチドライブラリーに結合させること；ならびに

該縮小された親和性試薬プールのうち第２のペプチドライブラリーに結合された少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それにより該エピトープＸに対する親和性試薬を同定すること

を含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法。

【０２８１】

２．αおよびβが同じアミノ酸配列を含む、項目１の方法。

【０２８２】

３．αおよびβが単一のアミノ酸を含む、項目２の方法。

【０２８３】

４．αおよびβが同じ単一のアミノ酸である、項目３の方法。

【０２８４】

５．αおよびβがアラニンまたはグリシンである、項目４の方法。

【０２８５】

６．αおよびβが異なるアミノ酸配列を含む、項目１の方法。

【０２８６】

７．γおよびδが同じアミノ酸配列を含む、項目１の方法。

【０２８７】

８．γおよびδが単一のアミノ酸を含む、項目７の方法。

【０２８８】

９．γおよびδが同じ単一のアミノ酸である、項目８の方法。

【０２８９】

１０．γおよびδがアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン、プロリンまたはトリプトファンである、項目９の方法。

【０２９０】

１１．γおよびδが異なるアミノ酸配列を含む、項目１の方法。

【０２９１】

１２．αまたはβがγおよびδと異なるアミノ酸配列を含む、項目１の方法。

【０２９２】
１３．αおよびβがγおよびδと異なるアミノ酸配列を含む、項目１２の方法。
【０２９３】
１４．αおよびβが同じ第１のアミノ酸配列を含み、γおよびδが同じ第２のアミノ酸配列を含む、項目１３の方法。
【０２９４】
１５．Ｘが長さｍのアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０２９５】
１６．ｍが２～７個のアミノ酸の範囲である、項目１５の方法。
【０２９６】
１７．ｍが３個のアミノ酸である、項目１６の方法。
【０２９７】
１８．Ｘが、該複数のペプチドの一次構造において近位に存在するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０２９８】
１９．Ｘが、該複数のペプチドの二次構造、三次構造または四次構造において近位に存在するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０２９９】
２０．該複数の親和性試薬のうち少なくとも０．００１％が第１のペプチドライブラリーに結合される、項目１の方法。
【０３００】
２１．該複数の親和性試薬のうち少なくとも１％が第１のペプチドライブラリーに結合される、項目２０の方法。
【０３０１】
２２．該縮小された親和性試薬プール中の０．００１％以下が第２のペプチドライブラリーに結合する、項目１の方法。
【０３０２】
２３．該縮小された親和性試薬プール中の０．０００００１％以下が第２のペプチドライブラリーに結合する、項目１の方法。
【０３０３】
２４．該複数の親和性試薬の親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、項目１の方法。
【０３０４】
２５．オリゴヌクレオチドがバーコードを含む、項目２４の方法。
【０３０５】
２６．オリゴヌクレオチドがシーケンシング反応のためのアダプターを含む、項目２４の方法。
【０３０６】
２７．オリゴヌクレオチドが検出可能な標識またはタグを含む、項目２４の方法。
【０３０７】
２８．検出可能な標識またはタグが、フルオロフォア、生物発光標識、放射性標識または酵素タグを含む、項目２７の方法。
【０３０８】
２９．第１の複数のペプチドに結合している親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定することが：
該親和性試薬を第１のペプチドライブラリーから分離すること；および
該分離後、該親和性試薬のシーケンシングを行い、それにより該親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定すること
を含む、項目１の方法。
【０３０９】
３０．該縮小された親和性試薬プールのうち第２のペプチドライブラリーに結合された少

なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定することが：
該少なくとも１つの親和性試薬を第２のペプチドライブラリーから分離すること；および
該分離後、該少なくとも１つの親和性試薬のシーケンシングを行い、それにより該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定すること
を含む、項目１の方法。
【０３１０】
３１．シーケンシングが次世代シーケンシング反応を行うことを含む、項目２９または３０の方法。
【０３１１】
３２．該分離が、該少なくとも１つの親和性試薬を該ペプチドから溶出させることを含む、項目２９または３０の方法。
【０３１２】
３３．該少なくとも１つの親和性試薬を溶出させることが溶出バッファーの使用を含む、項目３２の方法。
【０３１３】
３４．溶出バッファーがカオトロピック剤を含む、項目３２の方法。
【０３１４】
３５．該少なくとも１つの親和性試薬を溶出させることが該少なくとも１つの親和性試薬を水と接触させることを含み、該水が少なくとも５０℃の温度である、項目３２の方法。
【０３１５】
３６．αおよびβが中性電荷を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３１６】
３７．αまたはβが非中性電荷を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３１７】
３８．αまたはβが、エピトープＸの少なくとも一部分を立体的に妨害しないアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３１８】
３９．αおよびβが、エピトープＸの少なくとも一部分を立体的に妨害するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３１９】
４０．αおよびβが、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２０】
４１．均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、項目４０の方法。
【０３２１】
４２．αおよびβが、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２２】
４３．不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、項目４２の方法。
【０３２３】
４４．γおよびδが中性電荷を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２４】
４５．γおよびδが非中性電荷を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２５】
４６．γおよびδが、エピトープＸの少なくとも一部分を立体的に妨害しないアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２６】

４７．γおよびδが、エピトープＸの少なくとも一部分を立体的に妨害するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２７】
４８．γおよびδが、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３２８】
４９．均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、項目４８の方法。
【０３２９】
５０．γおよびδが、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、項目１の方法。
【０３３０】
５１．不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、項目４８の方法
５２．親和性試薬プールが液状媒体をさらに含む、項目１の方法。
【０３３１】
５３．液状媒体が水溶液である、項目５２の方法。
【０３３２】
５４．水溶液が緩衝溶液である、項目５３の方法。
【０３３３】
５５．該複数の親和性試薬のうち第１のペプチドライブラリーに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、項目１の方法。
【０３３４】
５６．該縮小された親和性試薬プールのうち第２のペプチドライブラリーに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、項目１の方法。
【０３３５】
５７．該洗浄が洗浄バッファーの使用を含む、項目５５または５６の方法。
【０３３６】
５８．洗浄バッファーがデタージェント、界面活性剤またはカオトロピック剤を含む、項目５７の方法。
【０３３７】
５９．第１または第２のペプチドライブラリー内のペプチドがネイティブ状態である、項目１の方法。
【０３３８】
６０．該ペプチドの第１または第２のライブラリー内のペプチドが非ネイティブ状態である、項目１の方法。
【０３３９】
６１．非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態である、項目１の方法。
【０３４０】
６２．すべての工程をネイティブ状態の該複数のペプチドで繰り返すことをさらに含む、項目６０または６１の方法。
【０３４１】
６３．ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも親和性試薬が非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と異なる、項目６２の方法。
【０３４２】
６４．ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも親和性試薬が非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と同じである、項目６２の方法。

【０３４３】
６５．エピトープＸが１つより多くの親和性試薬と結合する、項目１の方法。
【０３４４】
６６．該少なくとも１つの親和性試薬が１つより多くのエピトープと結合する、項目１の方法。
【０３４５】
６７．該１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、項目６６の方法。
【０３４６】
６８．該縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、項目６７の方法。
【０３４７】
６９．該縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、項目６７の方法。
【０３４８】
７０．該異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目６７、６８または６９の方法。
【０３４９】
７１．該異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目６７、６８または６９の方法。
【０３５０】
７２．第１のペプチドライブラリーの該複数のペプチドまたは第２のペプチドライブラリーの該複数のペプチドが基材に結合されている、項目１の方法。
【０３５１】
７３．第１のペプチドライブラリーの該複数のペプチドまたは第２のペプチドライブラリーの該複数のペプチドが基材に結合されていない、項目１の方法。
【０３５２】
７４．基材がフローセルを含む、項目７２の方法。
【０３５３】
７５．第１のペプチドライブラリーを該複数の親和性試薬に曝露する工程および該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定する工程を１回またはそれより多くの回数繰り返すことを含む、項目１の方法。
【０３５４】
７６．第２のペプチドライブラリーを該縮小された親和性試薬プールに曝露する工程および該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定する工程を１回またはそれより多くの回数繰り返すことを含む、項目１の方法。
【０３５５】
７７．該複数の親和性試薬の親和性試薬が、オリゴヌクレオチド、ペプチマー、ミニタンパク質バインダー、抗体、抗体断片またはその組合せを含む、項目１の方法。
【０３５６】
７８．複数のペプチドを含むペプチドライブラリーを得ること、該複数のペプチドのペプチドはその配列内に１つより多くのエピトープＸを含む；
該ペプチドライブラリーを複数の親和性試薬を含む親和性試薬プールに曝露し、それにより少なくとも１つの親和性試薬を、その配列内に１つより多くのエピトープＸを含む該ペプチドに結合させること；および
その配列内に１つより多くのエピトープＸを含む該ペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それによりエピトープＸに対する親和性試薬を同定すること
を含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法。
【０３５７】
７９．該１つより多くのエピトープＸが隣接している、項目７８の方法。

【０３５８】
８０．該１つより多くのエピトープＸが隣接していない、項目７８の方法。
【０３５９】
８１．該１つより多くのエピトープＸが介在アミノ酸配列を含む、項目８０の方法。
【０３６０】
８２．該複数のペプチドのペプチドが、同じ介在配列を含むアミノ酸配列によって隔てられた少なくとも３つのエピトープＸの実体を含む、項目８１の方法。
【０３６１】
８３．該複数のペプチドのペプチドが、異なる介在配列を含むアミノ酸配列によって隔てられた少なくとも３つのエピトープＸの実体を含む、項目８１の方法。
【０３６２】
８４．該複数のペプチドのペプチドがエピトープＹをさらに含む、項目７８の方法。
【０３６３】
８５．エピトープＹがエピトープＸに隣接している、項目８４の方法。
【０３６４】
８６．エピトープＹが各エピトープＸに隣接している、項目８５の方法。
【０３６５】
８７．エピトープＹが各エピトープＸに隣接していない、項目８４の方法。
【０３６６】
８８．各エピトープＹが、ペプチドのアミノ酸配列内でエピトープＸに対して規則的に間が空いている、項目８７の方法。
【０３６７】
８９．少なくとも２つのエピトープＹがペプチドのアミノ酸配列内でエピトープＸに対してランダムに間が空いている、項目８７の方法。
【０３６８】
９０．Ｘが長さｍのアミノ酸配列を含む、項目７８の方法。
【０３６９】
９１．ｍが２～７個のアミノ酸の範囲である、項目９０の方法。
【０３７０】
９２．ｍが３個のアミノ酸である、項目９１の方法。
【０３７１】
９３．該１つより多くの隣接しているエピトープＸがフランキングドメインαおよびβをさらに含む、項目７９の方法。
【０３７２】
９４．αおよびβが同じアミノ酸配列を含む、項目９３の方法。
【０３７３】
９５．αおよびβが単一のアミノ酸を含む、項目９４の方法。
【０３７４】
９６．αおよびβが同じ単一のアミノ酸である、項目９５の方法。
【０３７５】
９７．αおよびβがアラニンまたはグリシンである、項目９６の方法。
【０３７６】
９８．αおよびβが異なるアミノ酸配列を含む、項目９３の方法。
【０３７７】
９９．該複数の親和性試薬の親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、項目７８の方法。
【０３７８】
１００．オリゴヌクレオチドがバーコードを含む、項目９９の方法。
【０３７９】
１０１．オリゴヌクレオチドがシーケンシング反応のためのアダプターを含む、項目９９の方法。

【０３８０】
１０２．オリゴヌクレオチドが検出可能な標識またはタグを含む、項目９９の方法。
【０３８１】
１０３．検出可能な標識またはタグが、フルオロフォア、生物発光標識、放射性標識または酵素タグを含む、項目１０２の方法。
【０３８２】
１０４．該ペプチドライブラリーに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定することが：
少なくとも１つの親和性試薬をペプチドライブラリーから分離すること；および
該少なくとも１つの親和性試薬をシーケンシングし、それにより該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定すること
を含む、項目７８の方法。
【０３８３】
１０５．シーケンシングが次世代シーケンシング反応を行うことを含む、項目１０４の方法。
【０３８４】
１０６．該分離が、該少なくとも１つの親和性試薬を該ペプチドから溶出させることを含む、項目１０４の方法。
【０３８５】
１０７．該少なくとも１つの親和性試薬を溶出させることが溶出バッファーの使用を含む、項目１０６の方法。
【０３８６】
１０８．溶出バッファーがカオトロピック剤を含む、項目１０６の方法。
【０３８７】
１０９．該少なくとも１つの親和性試薬を溶出させることが該少なくとも１つの親和性試薬を水と接触させることを含み、該水が少なくとも５０℃の温度である、項目１０６の方法。
【０３８８】
１１０．αおよびβが、均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、項目９３の方法。
【０３８９】
１１１．均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、同等の電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、項目１１０の方法。
【０３９０】
１１２．αおよびβが、不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列を含む、項目９３の方法。
【０３９１】
１１３．不均一系化学的多様性を有するアミノ酸配列が、違う電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せを有する２つまたはそれより多くのアミノ酸側鎖基を含むアミノ酸配列を含む、項目１１２の方法。
【０３９２】
１１４．親和性試薬プールが液状媒体をさらに含む、項目７８の方法。
【０３９３】
１１５．液状媒体が水溶液である、項目１１４の方法。
【０３９４】
１１６．水溶液が緩衝溶液である、項目１１５の方法。
【０３９５】
１１７．該複数の親和性試薬のうち第１のペプチドライブラリーに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、項目７８の方法。

【０３９６】
１１８．親和性試薬プールのうち該ペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、項目７８の方法。
【０３９７】
１１９．該洗浄が洗浄バッファーの使用を含む、項目１１７または１１８の方法。
【０３９８】
１２０．洗浄バッファーがデタージェント、界面活性剤またはカオトロピック剤を含む、項目１１９の方法。
【０３９９】
１２１．該ペプチドライブラリー内のペプチドがネイティブ状態である、項目７８の方法。
【０４００】
１２２．該ペプチドライブラリー内のペプチドが非ネイティブ状態である、項目７８の方法。
【０４０１】
１２３．非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態である、項目７８の方法。
【０４０２】
１２４．すべての工程をネイティブ状態の該複数のペプチドで繰り返すことをさらに含む、項目１２２または１２３の方法。
【０４０３】
１２５．ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも親和性試薬が非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と異なる、項目１２４の方法。
【０４０４】
１２６．ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも親和性試薬が非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と同じである、項目１２４の方法。
【０４０５】
１２７．エピトープＸが１つより多くの親和性試薬と結合する、項目７８の方法。
【０４０６】
１２８．該少なくとも１つの親和性試薬が１つより多くのエピトープと結合する、項目７８の方法。
【０４０７】
１２９．該１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、項目１２８の方法。
【０４０８】
１３０．該縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、項目１２９の方法。
【０４０９】
１３１．該縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、項目１２９の方法。
【０４１０】
１３２．該異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目１２９、１３０または１３１の方法。
【０４１１】
１３３．該異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目１２９、１３０または１３１の方法。
【０４１２】
１３４．該ペプチドライブラリーの該複数のペプチドが基材に結合されている、項目７８の方法。

【０４１３】
１３５．該ペプチドライブラリーの該複数のペプチドが基材に結合されていない、項目７８の方法。
【０４１４】
１３６．基材がフローセルを含む、項目１３４の方法。
【０４１５】
１３７．第１の媒体中のペプチドライブラリー内の複数のペプチドを第２の媒体中の親和性試薬プール内の複数の親和性試薬と接触させ、ペプチド－親和性試薬複合体を形成すること、該ペプチド－親和性試薬複合体の各々はペプチドおよび少なくとも１つの結合している親和性試薬を含み、該ペプチドの各々はエピトープＸを含む；
該ペプチド－親和性試薬複合体を収集すること；
未結合の親和性試薬を分離すること；ならびに
該ペプチド－親和性試薬複合体の該親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定し、それによりエピトープＸに対する少なくとも１つの親和性試薬を同定すること
を含む、エピトープに対する親和性試薬の同定方法。
【０４１６】
１３８．第１の媒体または第２の媒体が水溶液を含む、項目１３７の方法。
【０４１７】
１３９．水溶液が緩衝溶液を含む、項目１３８の方法。
【０４１８】
１４０．第１の媒体および第２の媒体が緩衝水溶液を含む、項目１３８の方法。
【０４１９】
１４１．該ペプチドライブラリー内のペプチドがネイティブ状態である、項目１３７の方法。
【０４２０】
１４２．該ペプチドライブラリー内のペプチドが非ネイティブ状態である、項目１３７の方法。
【０４２１】
１４３．非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態である、項目１３７の方法。
【０４２２】
１４４．すべての工程をネイティブ状態の該複数のペプチドで繰り返すことをさらに含む、項目１４２または１４３の方法。
【０４２３】
１４５．ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬が非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と異なる、項目１４４の方法。
【０４２４】
１４６．ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬が非ネイティブ状態のエピトープＸに対する該少なくとも１つの親和性試薬と同じである、項目１４５の方法。
【０４２５】
１４７．エピトープＸが１つより多くの親和性試薬と結合する、項目１３７の方法。
【０４２６】
１４８．該少なくとも１つの親和性試薬が１つより多くのエピトープと結合する、項目１３７の方法。
【０４２７】
１４９．該１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、項目１４８の方法。
【０４２８】
１５０．該縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、項目１４９の方法。

【０４２９】
１５１．該縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、項目１４９の方法。
【０４３０】
１５２．該異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目１４９、１５０または１５１の方法。
【０４３１】
１５３．該異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目１４９、１５０または１５１の方法。
【０４３２】
１５４．ペプチド－親和性試薬複合体を収集することが該ペプチド－親和性試薬複合体を基材に結合させることを含む、項目１３７の方法。
【０４３３】
１５５．ペプチド親和性試薬複合体を収集することが該ペプチド親和性試薬複合体を第１または第２の媒体から分離することを含む、項目１３７の方法。
【０４３４】
１５６．Ｘが長さｍのアミノ酸配列を含む、項目１３７の方法。
【０４３５】
１５７．ｍが２～７個のアミノ酸の範囲である、項目１５６の方法。
【０４３６】
１５８．ｍが３個のアミノ酸である、項目１５７の方法。
【０４３７】
１５９．Ｘが、該複数のペプチドの一次構造において近位に存在するアミノ酸配列を含む、項目１３７の方法。
【０４３８】
１６０．Ｘが、該複数のペプチドの二次構造、三次構造または四次構造において近位に存在するアミノ酸配列を含む、項目１３７の方法。
【０４３９】
１６１．該複数の親和性試薬の親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、項目１３７の方法。
【０４４０】
１６２．オリゴヌクレオチドがバーコードを含む、項目１６１の方法。
【０４４１】
１６３．オリゴヌクレオチドがシーケンシング反応のためのアダプターを含む、項目１６１の方法。
【０４４２】
１６４．オリゴヌクレオチドが検出可能な標識またはタグを含む、項目１６１の方法。
【０４４３】
１６５．検出可能な標識またはタグが、フルオロフォア、生物発光標識、放射性標識または酵素タグを含む、項目１６１の方法。
【０４４４】
１６６．該複数のペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬の（１つまたは複数の）配列を決定することが：
該少なくとも１つの親和性試薬を該複数のペプチドから分離すること；および
該少なくとも１つの親和性試薬をシーケンシングし、それにより該少なくとも１つの親和性試薬の該（１つまたは複数の）配列を決定すること
を含む、項目１３７の方法。
【０４４５】
１６７．シーケンシングが次世代シーケンシング反応を行うことを含む、項目１６６の方

法。
【０４４６】
１６８．該分離が、該少なくとも１つの親和性試薬を該ペプチドから溶出させることを含む、項目１６６の方法。
【０４４７】
１６９．該少なくとも１つの親和性試薬を溶出させることが溶出バッファーの使用を含む、項目１６８の方法。
【０４４８】
１７０．溶出バッファーがカオトロピック剤を含む、項目１６９の方法。
【０４４９】
１７１．該少なくとも１つの親和性試薬を溶出させることが該少なくとも１つの親和性試薬を水と接触させることを含み、該水が少なくとも５０℃の温度である、項目１６８の方法。
【０４５０】
１７２．該複数の親和性試薬のうち該複数のペプチドに結合された該少なくとも１つの親和性試薬を洗浄することをさらに含む、項目１３７の方法。
【０４５１】
１７３．該洗浄が洗浄バッファーの使用を含む、項目１７２の方法。
【０４５２】
１７４．洗浄バッファーがデタージェント、界面活性剤またはカオトロピック剤を含む、項目１７３の方法。
【０４５３】
１７５．$S_1S_2S_3$の構造を含む親和性試薬であって、S_1およびS_3は、相補的なアダプターに結合することができるアダプタードメインであり、S_2はエピトープ結合ドメインであり、該エピトープ結合ドメインは１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数Ｋｄで結合する親和性試薬。
【０４５４】
１７６．オリゴヌクレオチドを含む、項目１７５の親和性試薬。
【０４５５】
１７７．アダプタードメインが次世代シーケンシングアダプターである、項目１７５の親和性試薬。
【０４５６】
１７８．S_1またはS_3がバーコードを含む、項目１７５の親和性試薬。
【０４５７】
１７９．S_1またはS_3がストレプトアビジンタグを含む、項目１７５の親和性試薬。
【０４５８】
１８０．オリゴヌクレオチドが検出可能な標識またはタグを含む、項目１７６の方法。
【０４５９】
１８１．検出可能な標識またはタグが、フルオロフォア、生物発光標識、放射性標識または酵素タグを含む、項目１８０の親和性試薬。
【０４６０】
１８２．S_2が約９０個以下のヌクレオチドを含む、項目１７６の親和性試薬。
【０４６１】
１８３．S_2が約８０個以下のヌクレオチドを含む、項目１８２の親和性試薬。
【０４６２】
１８４．S_2が約７０個以下のヌクレオチドを含む、項目１８３の親和性試薬。
【０４６３】
１８５．S_2が約６０個以下のヌクレオチドを含む、項目１８４の親和性試薬。
【０４６４】
１８６．S_2が約５０個以下のヌクレオチドを含む、項目１８５の親和性試薬。

【０４６５】
１８７．S_2が約４０個以下のヌクレオチドを含む、項目１８６の親和性試薬。
【０４６６】
１８８．S_2が約３０個以下のヌクレオチドを含む、項目１８７の親和性試薬。
【０４６７】
１８９．１つより多くのエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１７５の親和性試薬。
【０４６８】
１９０．該１つより多くのエピトープが縮重アミノ酸配列を含む、項目１８９の親和性試薬。
【０４６９】
１９１．縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、項目１９０の親和性試薬。
【０４７０】
１９２．縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、項目１９０の親和性試薬。
【０４７１】
１９３．該異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目１９０、１９１または１９２の親和性試薬。
【０４７２】
１９４．該異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目１９０、１９１または１９２の親和性試薬。
【０４７３】
１９５．１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-7}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１８９の親和性試薬。
【０４７４】
１９６．１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-8}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１９５の親和性試薬。
【０４７５】
１９７．１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-9}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１９６の親和性試薬。
【０４７６】
１９８．１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-10}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１９７の親和性試薬。
【０４７７】
１９９．１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-11}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１９８の親和性試薬。
【０４７８】
２００．１つまたはそれより多くのエピトープに10^{-12}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目１９９の親和性試薬。
【０４７９】
２０１．１つまたはそれより多くのエピトープに少なくとも１分の期間結合する、項目１７５の親和性試薬。
【０４８０】
２０２．１つまたはそれより多くのエピトープに少なくとも１５分の期間結合する、項目１７５の親和性試薬。
【０４８１】
２０３．１つまたはそれより多くのエピトープに少なくとも１時間の期間結合する、項目２０２の親和性試薬。

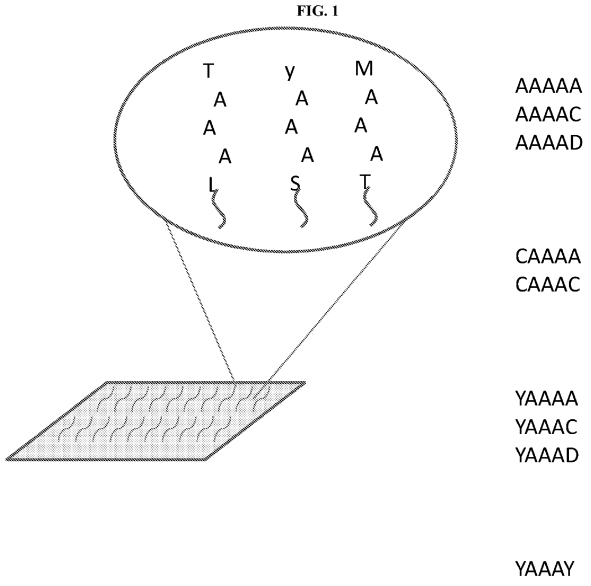
【０４８２】
２０４．１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに結合するのは該ペプチドがネイティブ状態である場合である、項目１７５の親和性試薬。
【０４８３】
２０５．１つまたはそれより多くのペプチドエピトープに結合するのは該ペプチドが非ネイティブ状態である場合である、項目１７５の親和性試薬。
【０４８４】
２０６．非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態を含む、項目２０５の親和性試薬。
【０４８５】
２０７．液状媒体をさらに含む、項目１７５の親和性試薬。
【０４８６】
２０８．液状媒体が水性媒体を含む、項目２０７の親和性試薬。
【０４８７】
２０９．複数の親和性試薬を含む親和性試薬プールであって；
該複数の親和性のうちの２つまたはそれより多くの親和性試薬が構造$S_1S_2S_3$を含み、ここで、S_1およびS_3は共通のアダプタードメインを含み、S_2はエピトープ結合ドメインを含む；ならびに
該２つまたはそれより多くの親和性試薬のうちの第１の親和性試薬は、ペプチドエピトープX_1に対する特性評価済みの特異性を有する第１のドメインS_2を含み、該２つまたはそれより多くの親和性試薬のうちの第２の親和性試薬は、ペプチドエピトープX_2に対する特性評価済みの特異性を有する第２のドメインS_2を含み、第１のドメインS_2は第２のドメインS_2と異なる
親和性試薬プール。
【０４８８】
２１０．X_1がX_2と異なるアミノ酸配列を含む、項目２０９の親和性試薬プール。
【０４８９】
２１１．X_1がX_2と同じアミノ酸配列を含む、項目２０９の親和性試薬プール。
【０４９０】
２１２．ペプチドエピトープX_3に対する特性評価済みの特異性を有する第３のドメインS_2を含む第３の親和性試薬をさらに含み、第３のドメインS_2は第１のドメインS_2および第２のドメインS_2と異なる、項目２０９の親和性試薬プール。
【０４９１】
２１３．X_3がX_1またはX_2と異なるアミノ酸配列を含む、項目２１２の親和性試薬プール。
【０４９２】
２１４．X_3がX_1およびX_2と異なるアミノ酸配列を含む、項目２１３の親和性試薬プール。
【０４９３】
２１５．X_3がX_1およびX_2と同じアミノ酸配列を含む、項目２１４の親和性試薬プール。
【０４９４】
２１６．X_3がX_1およびX_2と同じアミノ酸配列を含む、項目２０１５の親和性試薬プール。
【０４９５】
２１７．該２つまたはそれより多くの親和性試薬がオリゴヌクレオチドを含む、項目２０９の親和性試薬プール。
【０４９６】
２１８．共通のアダプタードメインが次世代シーケンシングアダプターである、項目２０９の親和性試薬プール。

【０４９７】
２１９．S_1またはS_3がバーコードを含む、項目２０９の親和性試薬プール。
【０４９８】
２２０．S_1またはS_3がストレプトアビジンタグを含む、項目２０９の親和性試薬プール。
【０４９９】
２２１．オリゴヌクレオチドが検出可能な標識またはタグを含む、項目２１７の親和性試薬プール。
【０５００】
２２２．検出可能な標識またはタグが、フルオロフォア、生物発光標識、放射性標識または酵素タグを含む、項目２２１の親和性試薬プール。
【０５０１】
２２３．S_2が約９０個以下のヌクレオチドを含む、項目２１７の親和性試薬プール。
【０５０２】
２２４．S_2が約８０個以下のヌクレオチドを含む、項目２２３の親和性試薬プール。
【０５０３】
２２５．S_2が約７０個以下のヌクレオチドを含む、項目２２４の親和性試薬プール。
【０５０４】
２２６．S_2が約６０個以下のヌクレオチドを含む、項目２２５の親和性試薬プール。
【０５０５】
２２７．S_2が約５０個以下のヌクレオチドを含む、項目２２６の親和性試薬プール。
【０５０６】
２２８．S_2が約４０個以下のヌクレオチドを含む、項目２２７の親和性試薬プール。
【０５０７】
２２９．S_2が約３０個以下のヌクレオチドを含む、項目２２８の親和性試薬プール。
【０５０８】
２３０．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに10^{-6}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５０９】
２３１．X_1およびX_2が縮重アミノ酸配列を含む、項目２３０の親和性試薬プール。
【０５１０】
２３２．縮重アミノ酸配列は１個のアミノ酸が異なる、項目２３１の親和性試薬プール。
【０５１１】
２３３．縮重アミノ酸配列は１個より多くのアミノ酸が異なる、項目２３１の親和性試薬プール。
【０５１２】
２３４．該異なるアミノ酸が類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目２３１、２３２または２３３の親和性試薬プール。
【０５１３】
２３５．該異なるアミノ酸が非類似の化学的特性を含み、該化学的特性が、電荷、疎水性、親水性、立体的サイズ、極性、分子構造またはその組合せからなる群より選択される、項目２３１、２３２または２３３の親和性試薬プール。
【０５１４】
２３６．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに10^{-7}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目２３０の親和性試薬プール。
【０５１５】
２３７．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに10^{-8}Ｍ未満の平衡結合定数K_dで結合する、項目２３６の親和性試薬プール。
【０５１６】

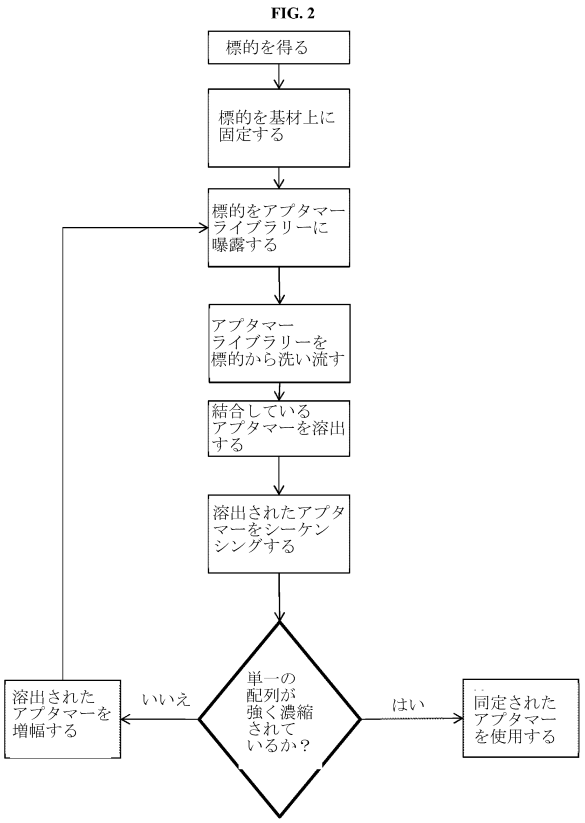
２３８．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに１０－９Ｍ未満の平衡結合定数Ｋｄで結合する、項目２３７の親和性試薬プール。
【０５１７】
２３９．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに１０－１０Ｍ未満の平衡結合定数Ｋｄで結合する、項目２３８の親和性試薬プール。
【０５１８】
２４０．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに１０－１１Ｍ未満の平衡結合定数Ｋｄで結合する、項目２３９の親和性試薬プール。
【０５１９】
２４１．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに１０－１２Ｍ未満の平衡結合定数Ｋｄで結合する、項目２４０の親和性試薬プール。
【０５２０】
２４２．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに少なくとも１分の期間結合する、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５２１】
２４３．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに少なくとも１５分の期間結合する、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５２２】
２４４．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬はそのペプチドエピトープに少なくとも１時間の期間結合する、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５２３】
２４５．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬がそのペプチドエピトープに結合するのは該ペプチドがネイティブ状態である場合である、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５２４】
２４６．第１の親和性試薬および第２の親和性試薬がそのペプチドエピトープに結合するのは該ペプチドが非ネイティブ状態である場合である、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５２５】
２４７．非ネイティブ状態が変性状態または部分的にフォールディングされた状態を含む、項目２４６の親和性試薬プール。
【０５２６】
２４８．親和性試薬プールが液状媒体をさらに含む、項目２０９の親和性試薬プール。
【０５２７】
２４９．液状媒体が水性媒体を含む、項目２４８の親和性試薬プール。

【図面】

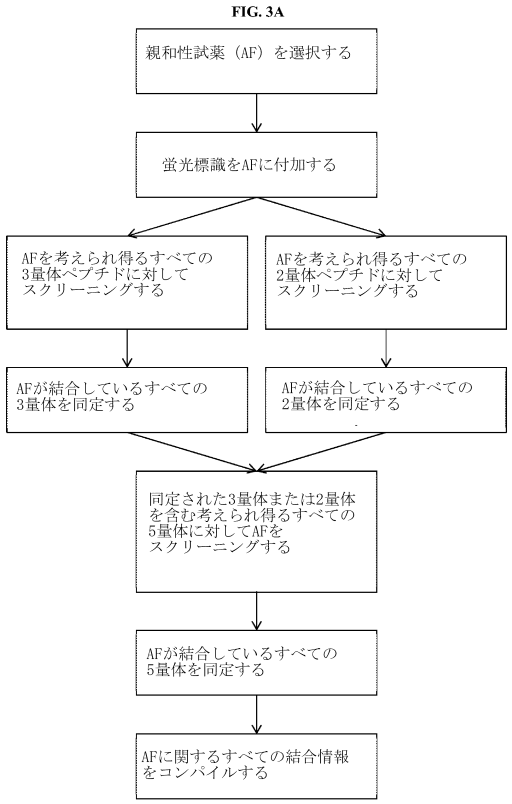
【図１】



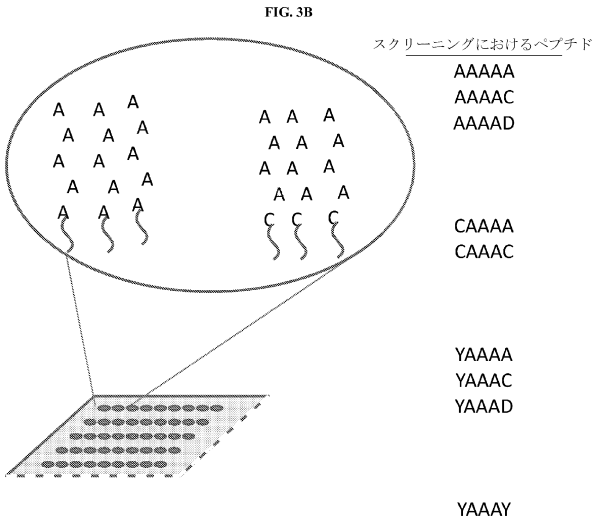
【図２】



【図３Ａ】

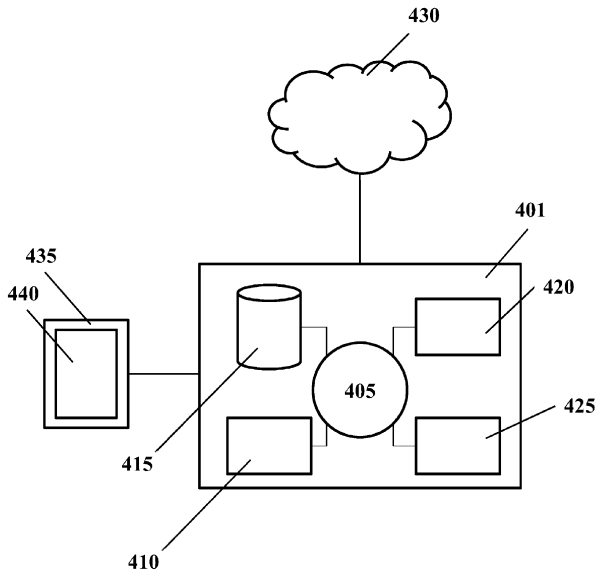


【図３Ｂ】



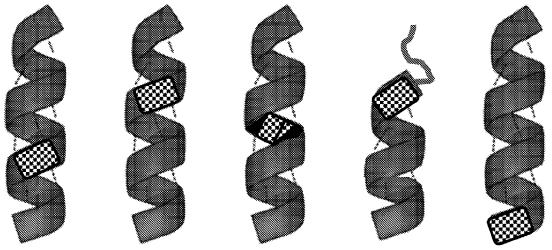
【図４】

FIG. 4



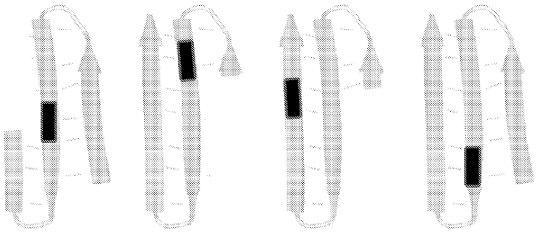
【図５Ａ】

FIG. 5A



【図５Ｂ】

FIG. 5B



【図６】

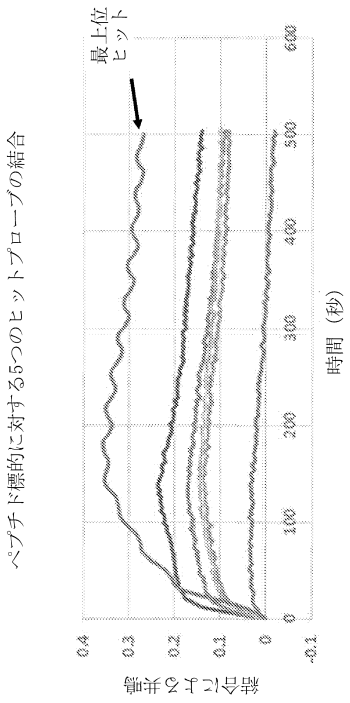


FIG. 6

【図７】

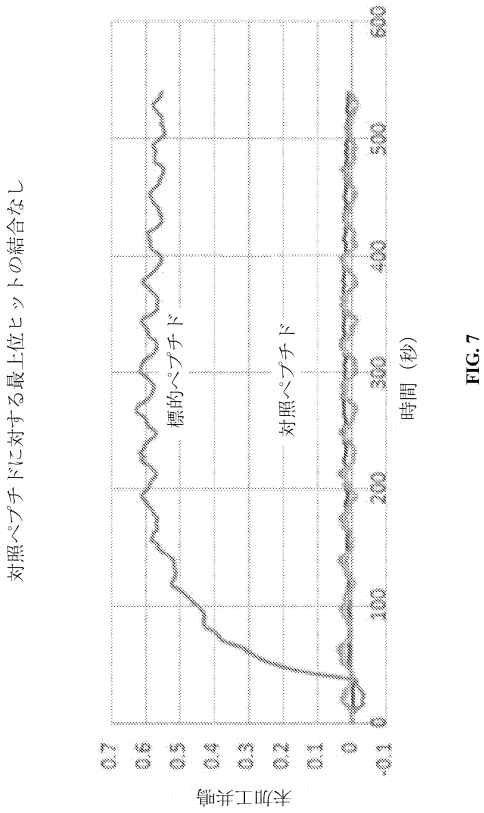
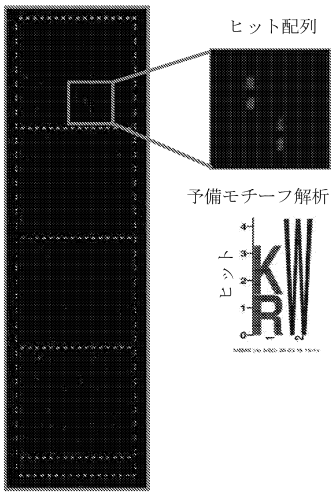


FIG. 7

【図８】

FIG. 8



【図９】

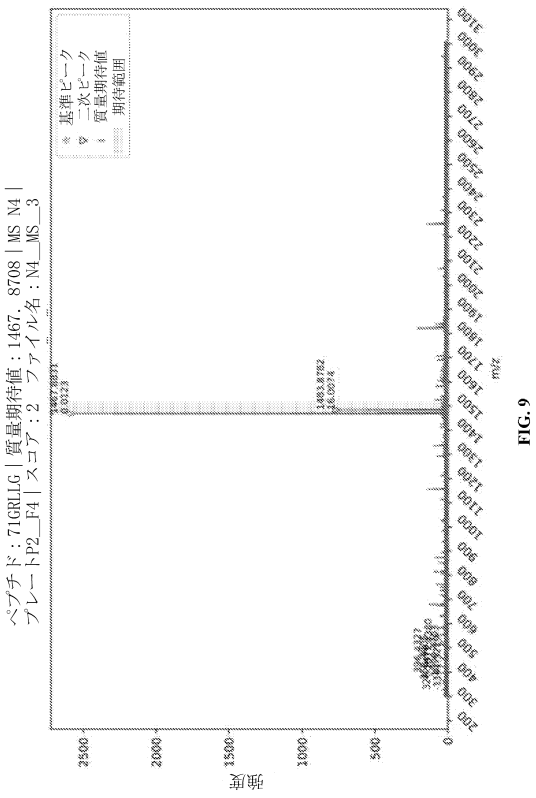
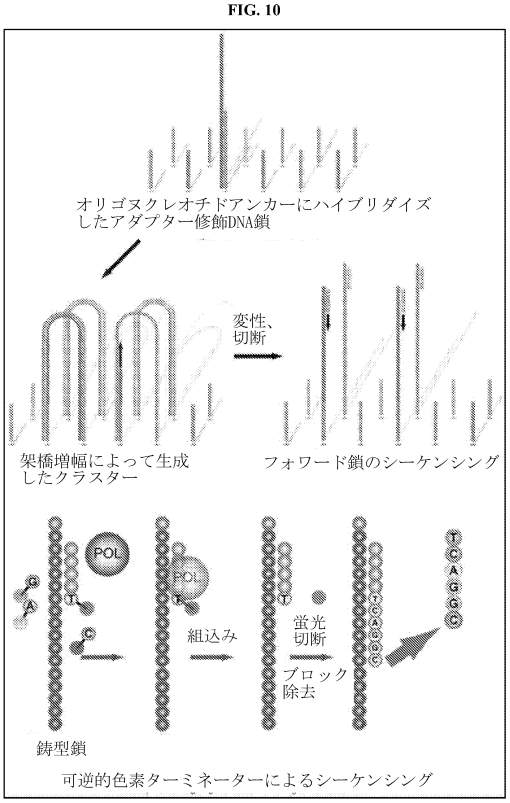


FIG. 9

【図１０】

FIG. 10



【図１１】

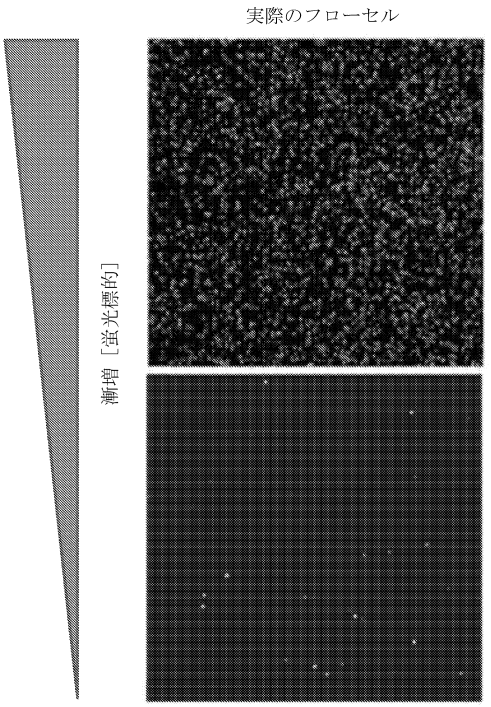


FIG. 11

【図１２】

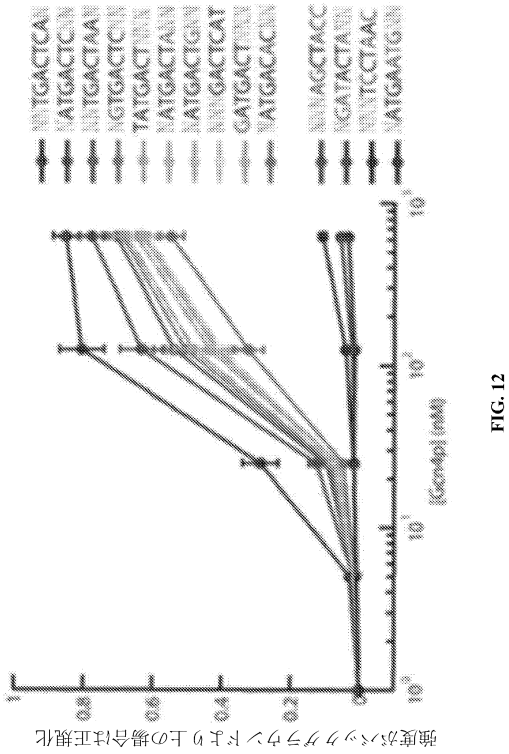


FIG. 12

【図１３Ａ】

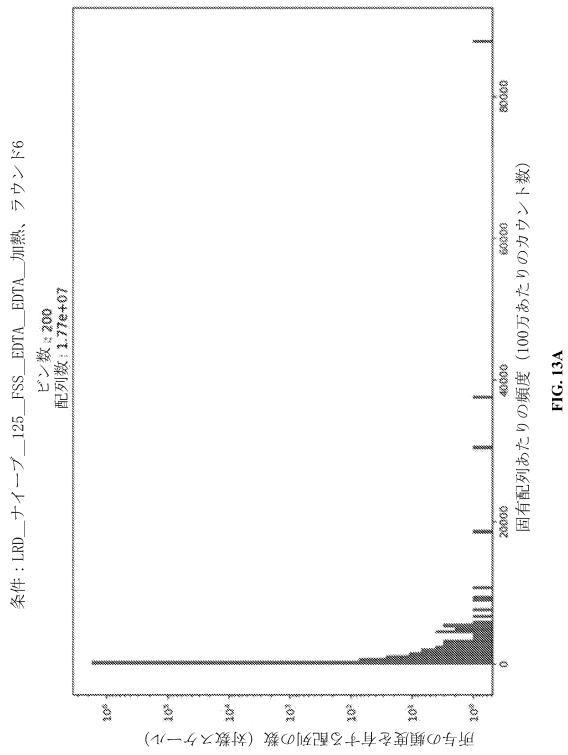


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

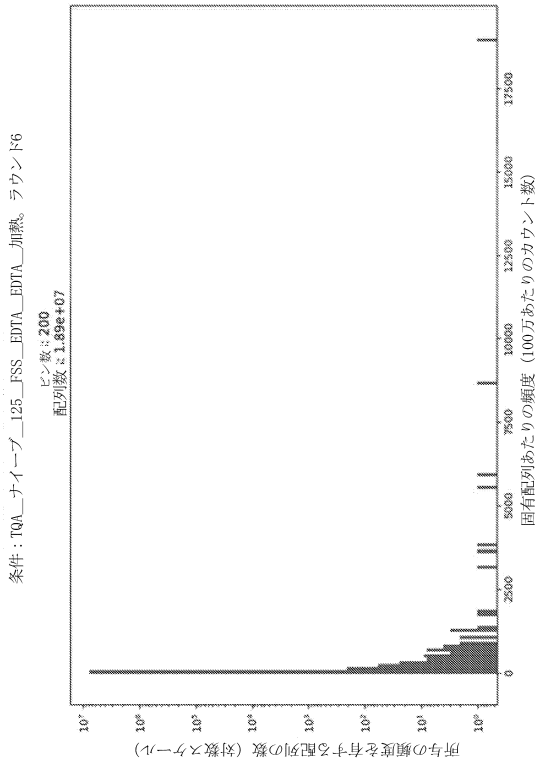


FIG. 13B

【図１４Ａ】

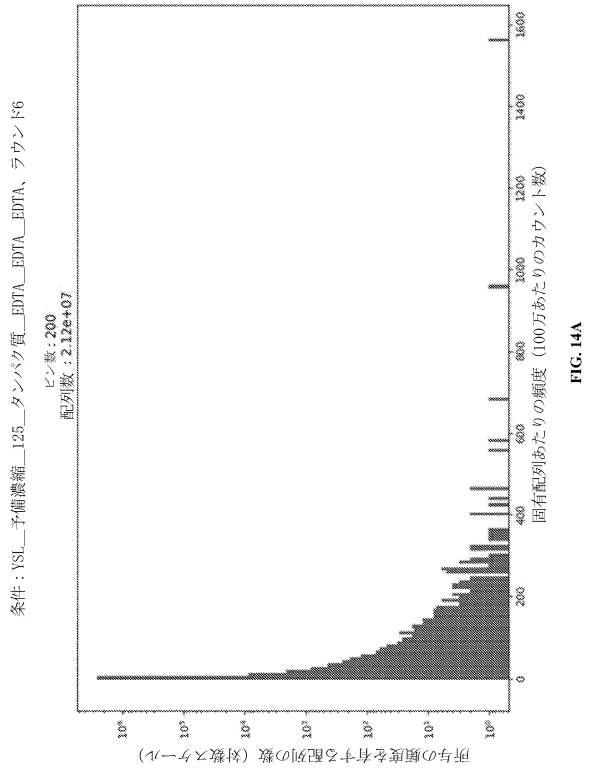


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

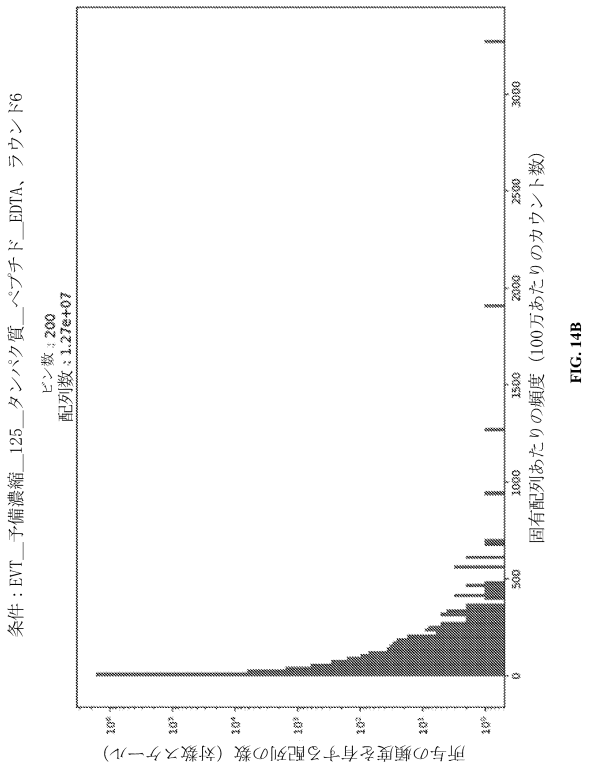
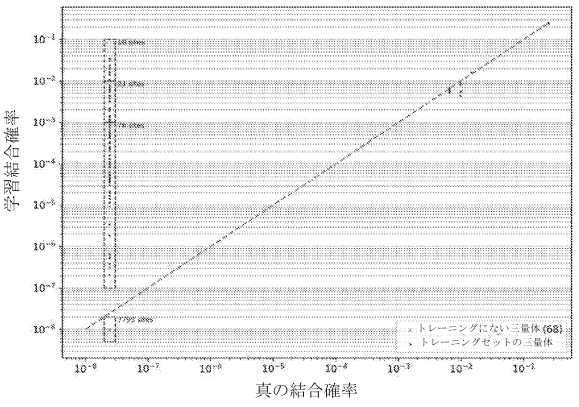


FIG. 14B

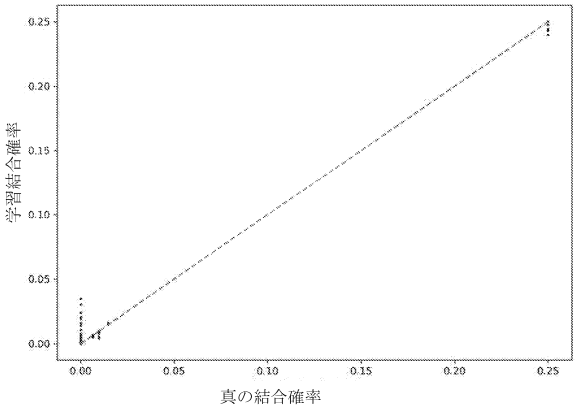
【図１５Ａ】

FIG. 15A



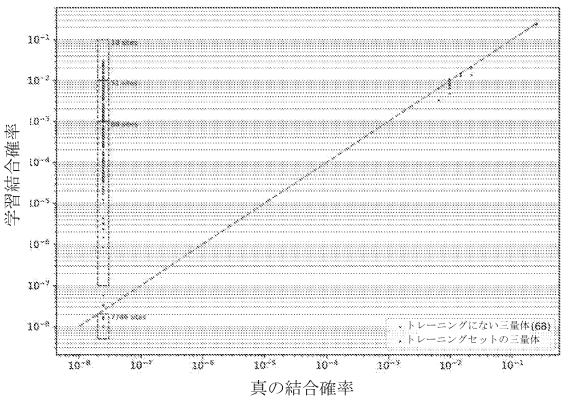
【図１５Ｂ】

FIG. 15B



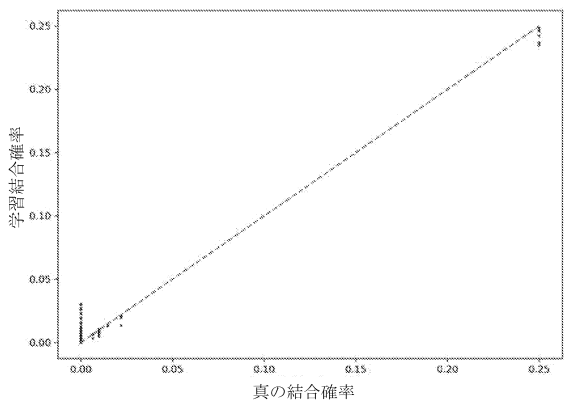
【図１６Ａ】

FIG. 16A



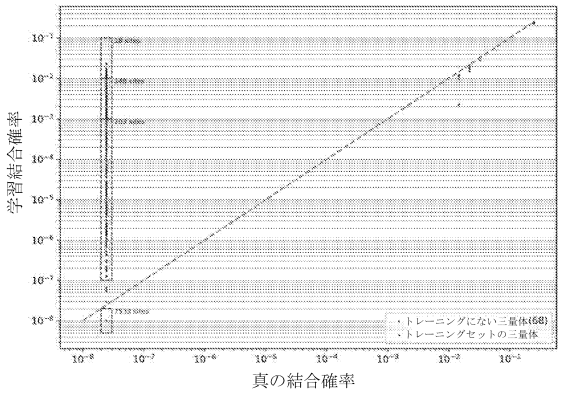
【図１６Ｂ】

FIG. 16B



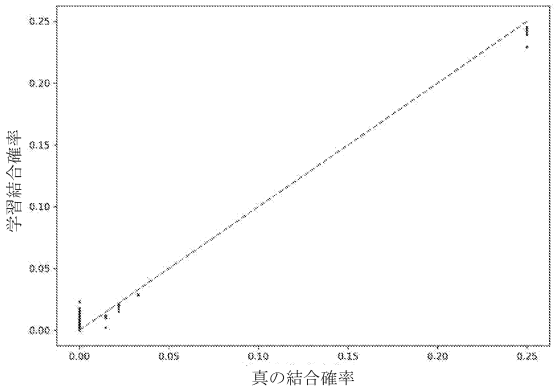
【図１７Ａ】

FIG. 17A



【図１７Ｂ】

FIG. 17B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/062482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 15/10; C12N 15/115; C40B 30/04; C40B 40/06; G01N 33/53 (2020.01)
CPC - C07K 2317/34; C12N 15/10; C12N 15/115; C12Q 1/6811; C40B 30/04; C40B 40/06; G01N 33/53; G01N 33/68 (2020.02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/6.11; 436/501; 506/9 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	WO 2017/127762 A1 (VITRISA THERAPEUTICS, INC.) 27 July 2017 (27.07.2017) entire document	28-30, 32, 35, 36, 42, 43 --- 1-27, 31, 33, 34, 37-41, 44-62
X – Y	WO 2006/135527 A2 (SAINT LOUIS UNIVERSITY et al) 21 December 2006 (21.12.2006) entire document	63, 64 --- 44-62
Y	PATRONOV et al. "Peptide binding prediction for the human class II MHC allele HLA-DP2: a molecular docking approach," BMC Struct Biol, 14 July 2011 (14.07.2011), Vol. 11, No. 32, Pgs. 1-10. entire document	1-27, 40, 41, 58, 59
Y	BUNKA et al. "Production and characterization of RNA aptamers specific for amyloid fibril epitopes," J Biol Chem, 18 September 2007 (18.09.2007), Vol. 282, No. 47, Pgs. 34500-34509. entire document	17, 31, 33, 34, 62
Y	FORD et al. "Degenerate recognition of T cell epitopes: impact of T cell receptor reserve and stability of peptide:MHC complexes," Mol Immunol, 01 February 2004 (01.02.2004), Vol. 40, No.14-15, Pgs. 1019-1025. entire document	19-23, 37-41, 55-59
A	REYES et al. "Critical role of HLA-DRβ* binding peptides' peripheral flanking residues in fully-protective malaria vaccine development," Biochem Biophys Res Commun, 23 May 2017 (23.05.2017), Vol. 489, No. 3, Pgs. 339-345. entire document	1-64

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 February 2020	03 MAR 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/062482

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

ISA/225 was mailed on 05 December 2019. No approved electronic sequence listing was submitted in response to the ISA/225.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/062482

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANT'ANGELO et al. "Recognition of core and flanking amino acids of MHC class II-bound peptides by the T cell receptor," Eur J Immunol, 01 September 2002 (01.09.2002), Vol. 32, No. 9, Pgs. 2510-2520. entire document	1-64
A	ARNOLD et al. "The majority of immunogenic epitopes generate CD4+ T cells that are dependent on MHC class II-bound peptide-flanking residues," J Immunol, 15 July 2002 (15.07.2002), Vol. 169, No. 2, Pgs. 739-749. entire document	1-64

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ
２．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人　100137213
弁理士　安藤 健司
(74)代理人　100143823
弁理士　市川 英彦
(74)代理人　100183519
弁理士　櫻田 芳恵
(74)代理人　100196483
弁理士　川嵜 洋祐
(74)代理人　100160749
弁理士　飯野 陽一
(74)代理人　100160255
弁理士　市川 祐輔
(74)代理人　100202267
弁理士　森山 正浩
(74)代理人　100182132
弁理士　河野 隆
(74)代理人　100146318
弁理士　岩瀬 吉和
(74)代理人　100127812
弁理士　城山 康文
(72)発明者　クライン，ジョシュ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　エガートン，ジャレット
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　チャン，トレイシー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　トナピ，ソナル
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　マリック，パラグ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　チョン，ミニョン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　オーザー，アブドゥッラー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　ソレラ，エリオット
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０
(72)発明者　スターン，デイビッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０７０、サン・カルロス、インダストリアル・ロード・２０１、スイート・３１０

Ｆターム（参考）　4H045　AA10 AA11 AA30 BA10 DA75 DA76 EA65