

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年7月28日(28.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/158554 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 7/64 (2006.01) *C40B 50/06* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/002117

(22) 国際出願日: 2022年1月21日(21.01.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2021-008420 2021年1月22日(22.01.2021) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 伊藤 健一郎 (ITO Kenichiro); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 宮入 匡平 (MIYAIRI Kyohei); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 田中 伸一郎, 外 (TANAKA Shinichiro et al.); 〒1008355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル 中村合同特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING DIMERIZED CYCLIC PEPTIDES

(54) 発明の名称: 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法

(57) Abstract: Provided is a quick and simple method for screening dimerized cyclic peptides, a library therefor, and molecules including cyclic peptides that can be used in the method and the library. For example, the method for screening dimerized cyclic peptides includes (1) a step in which, in a cell-free expression system, a cyclic peptide, a dimerization domain including a cysteine residue and a leucine zipper region, and at least one polypeptide including a peptide linker existing between the cyclic peptide and the dimerization domain are synthesized, and a dimer of the polypeptide is prepared, and (2) a step in which activity based on binding between the dimer and a target molecule is measured.

(57) 要約: 迅速で簡便な、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法、及びそのためのライブラリ、並びにこれらに利用できる環状ペプチドを含む分子等を提供する方法。例えば、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、(1) 無細胞発現系で、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含む少なくとも1種のポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程、及び(2) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む。



WO 2022/158554 A1

明 細 書

発明の名称：

二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法

技術分野

[0001] 本発明は、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法、及びそのためのライブラリ、並びにこれらに利用できる環状ペプチドを含む分子等に関する。

背景技術

[0002] 近年、医薬のモダリティとして、抗体医薬等のバイオ医薬品、再生医療、核酸医薬等が研究され、実際に用いられるようになってきた。また、新しい医薬のモダリティとして、中分子、特にペプチドが着目されている。中でも、環状ペプチド等の特殊な形状のペプチド（特殊ペプチド）が複数開発されており、医薬への応用が期待されるところである。

環状ペプチドは、直鎖ペプチドと比べて優れた結合親和性、標的選択性、分解耐性等を有し得る。そのため、医薬等の分野での環状ペプチドの利用が有望視されている。

ペプチドの中には、二量体となって生物活性を発揮するもの、又は生物活性が増強されるものが存在する。例えば、細胞分化に重要な生体分子である成長因子はその一例である。このような二量体となって生物活性を発揮する分子の生産コストや保存安定性等を向上させた代替分子の開発が近年行われており、環状ペプチドの利用も検討されているところである。そのため、二量体化した環状ペプチドのスクリーニングのための迅速で簡便な方法が切望されている。

[0003] 従来、環状ペプチドを二量体化したペプチドダイマーを得る手法としては、2つの環状ペプチドをリンカーで結合させた分子を合成することが行われていた。しかしながら、このような分子フォーマットの合成を生合成系で実施する場合、その鋳型となる遺伝子の、環状ペプチドに対応する2箇所の配

列を変える必要があり、複数箇所の遺伝子組み換えのような煩雑な操作や遺伝子全合成が必要となる。そのため、迅速で簡便な合成は達成できず、迅速で簡便な、二量体化した環状ペプチドのスクリーニングにも応用できない。

[0004] 一方で、大腸菌を用いて、ペプチドとロイシンジッパー領域を連結させた分子を発現させ、ロイシンジッパーにおける非共有結合性相互作用によりペプチドダイマーを得た例が知られている（国際公開第2000/018921号）。しかしながら、国際公開第2000/018921号は、bFGFの代替分子を提供することを目的としたものであり、ペプチドダイマーのスクリーニングを目的としたものではなく、ペプチドダイマーのスクリーニングについては何ら記載がない。

発明の概要

[0005] 上述のとおり、二量体化した環状ペプチドのスクリーニングのための迅速で簡便な方法が望まれている。

本発明の一態様では、迅速で簡便な、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法、又はそのためのライブラリを提供することを目的とする。

また、本発明の別の態様では、迅速で簡便な、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法、又はそのためのライブラリに利用できる、環状ペプチドを含む分子を提供することを目的とする。

[0006] 本発明は、例えば、以下の態様を含み得る。

〔1〕二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法であって、

（1）無細胞発現系で、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリinker

を含む少なくとも1種のポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程、及び

(2) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記方法。

〔2〕二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法であって、

(1) 無細胞発現系で、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含む少なくとも1種のポリペプチドを合成することにより得られた前記ポリペプチドの二量体を用意する工程、及び

(2) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記方法。

〔3〕工程(1)において、前記少なくとも1種のポリペプチドが、前記標的分子との結合親和性を有すると見込まれる複数の異なるポリペプチドを含み、かつ工程(2)において、前記複数の異なるポリペプチドの二量体について、前記標的分子との結合に基づく活性を測定することを含む、前記〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔4〕工程(1)が、前記少なくとも1種のポリペプチド又は前記二量体を複数含むライブラリを作製することを含み、又は工程(1)が、前記少なくとも1種のポリペプチド又は前記二量体を複数含むライブラリを用意することを含み、

複数の前記ポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の方法。

〔5〕無細胞発現系で複数のポリペプチドを合成することを含む、前記複数のポリペプチド又は前記複数のポリペプチドの二量体を含むライブラリを作製する方法であって、前記複数のポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリッカー

を含み、前記複数のポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記方法。

〔6〕二量体化した環状ペプチドをスクリーニングするためのライブラリであって、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体、又は前記複数のポリペプチドをコードする複数の核酸を含み、前記複数のポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリッカー

を含み、前記複数のポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記ライブラリ。

〔7〕8種以上のポリペプチド若しくは前記8種以上のポリペプチドの二量体、又は前記8種以上のポリペプチドをコードする8種以上の核酸を含む、前記〔6〕に記載のライブラリ。

〔8〕複数のポリペプチドの二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記〔6〕又は〔7〕に記載のライブラリを用いて二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法。

〔9〕二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法であって、

（1）複数のディスプレイされたポリペプチドを含むライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得する工程であって、前記複数のディスプレイされたポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、該取得工程、及び

(2) 工程(1)において取得した前記ポリペプチドと関連付けられた核酸を回収する工程、

(3) 工程(2)において回収した前記核酸を増幅する工程、

(4) 工程(3)において増幅した前記核酸を用いて、無細胞発現系で、環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含むポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程、及び

(5) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記方法。

〔10〕工程(1)が、取得した複数の前記ポリペプチドに基づき、複数のディスプレイされたポリペプチドを含む更なるライブラリを作製すること、及び前記更なるライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得することを繰り返すことを含む、前記〔9〕に記載の方法。

〔11〕二量体化した環状ペプチドをスクリーニングするためのライブラリであって、複数のディスプレイされたポリペプチド又は前記複数のディスプレイされたポリペプチドを発現させるための複数の核酸を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリッカー

を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記ライブラリ。

〔12〕 10^5 種以上のディスプレイされたポリペプチド又は前記 10^5 種以上のディスプレイされたポリペプチドを発現させるための 10^5 種以上の核酸を含む、前記〔11〕に記載のライブラリ。

〔13〕 前記〔1〕～〔4〕及び〔8〕～〔10〕のいずれか1項に記載の方法によって標的分子との結合に基づく活性を測定して、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドを得る方法。

〔14〕 二量体化した環状ペプチドを調製する方法であって、

無細胞発現系で、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリッカー

を含むポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製することを含む、前記方法。

〔15〕 環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリッカー

を含むポリペプチド。

〔16〕前記二量体化ドメインにおいて、システイン残基の数が1つである、前記〔15〕に記載のポリペプチド。

〔17〕前記ペプチドリンカーが、アラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基からなる、前記〔15〕又は〔16〕に記載のポリペプチド。

〔18〕前記〔15〕～〔17〕のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

[0007] 本発明の一実施態様によれば、従来の手法と比較して、迅速で簡便に、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドをスクリーニングすることができる。

本発明の一実施態様によれば、従来の手法と比較して、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドについて、高効率なスクリーニング（ハイスループットスクリーニング）を提供することができる。

本発明の一実施態様によれば、従来の手法と比較して、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドについて、低コストなスクリーニングを提供することができる。

本発明の一実施態様によれば、従来の手法にはない、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドについて、ディスプレイされた候補ポリペプチドの取得からシームレスに評価可能なスクリーニングを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]二量体化した環状ペプチドを表す模式図である。「環状ペプチド」－「ペプチドリンカー」－「システイン残基」－「ロイシンジッパー」という構造が示される。

[図2]二量体化した環状ペプチドを表す模式図である。「環状ペプチド」－「ペプチドリンカー」－「ロイシンジッパー」－「システイン残基」という構造が示される。

[図3]二量体化した環状ペプチドを表す模式図である。「システイン残基」－

「ロイシンジッパー」－「ペプチドリinker」－「環状ペプチド」という構造が示される。

[図4]二量体化した環状ペプチドを表す模式図である。「ロイシンジッパー」－「システイン残基」－「ペプチドリinker」－「環状ペプチド」という構造が示される。

[図5]二量体化した環状ペプチドを表す模式図である。「タグ配列」－「システイン残基」－「ロイシンジッパー」－「ペプチドリinker」－「環状ペプチド」という構造が示される。

[図6]二量体化した環状ペプチドを表す模式図である。「タグ配列」－「ロイシンジッパー」－「システイン残基」－「ペプチドリinker」－「環状ペプチド」という構造が示される。

[図7]無細胞発現系による二量体化した環状ペプチドの合成を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。Ladderはマーカーであり、レーン1はネガティブコントロール（発現用cDNAを添加していない無細胞翻訳液）であり、レーン2はネガティブコントロールからDynabeads His-Tag Isolation & Pulldown (Thermo Fisher Scientific)を用いて精製を行った画分であり、レーン3はN11-Cys-Jun-PA8-aMD4dYの無細胞翻訳液であり、レーン4はN11-Cys-Jun-PA8-aMD4dYの無細胞翻訳液からDynabeads His-Tag Isolation & Pulldownを用いて精製を行った画分であり、レーン5はその残渣画分であり、レーン6はN11-Cys-GCN4-PA8-aMD4dYであり、レーン7はN11-Cys-GCN4-PA8-aMD4dYの無細胞翻訳液からDynabeads His-Tag Isolation & Pulldownを用いて精製を行った画分であり、レーン8はその残渣画分である。Monomerは、環状ペプチド（aMD4dY）-ロイシンジッパー融合体と推定されるタンパク質バンドを指し、Dimerは、そのジスルフィド二量体と推定されるタンパク質バンドを指す。

[図8]HGFと合成した二量体化した環状ペプチド（aMD4dY-PA8-cys-Jun及びaMD4dY-PA8-Jun）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的SRE受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、合成した二量体化した環状ペ

チドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図9]HGFと合成した二量体化した環状ペプチド (aMD4dY-PA8-cys-Jun Δ hep) の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的SRE受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、合成した二量体化した環状ペプチドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図10]HGFと合成した二量体化した環状ペプチド (aMD4dY-PA8-GCN4-cys) の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的SRE受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、合成した二量体化した環状ペプチドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図11]HGFと合成した二量体化した環状ペプチド (aMD4dY-PA8-cys-CEBP α) の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的SRE受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、合成した二量体化した環状ペプチドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図12]HGFと合成した二量体化した環状ペプチド (cys-Jun-PA8-aMD4dY及びJun-cys-PA8-aMD4dY) の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的SRE受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、合成した二量体化した環状ペプチドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図13]HGFと合成した二量体化した環状ペプチド (cys-Jun-PA8-aMD4dY、N11-Jun-cys-PA8-aMD4dY、N11-cys-Jun-PA8-aMD4dY、N11-GCN4-cys-PA8-aMD4dY、及びN11-cys-GCN4-PA8-aMD4dY) の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的SRE受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、合成した二量体化した環状ペプチドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図14]合成した二量体化した環状ペプチド (EMP-cys-PA8-Jun) の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の濃度を表す。陰対照として、無細

胞発現系にEMP-cys-PA8-Jun合成用遺伝子を添加していないものを用いた（No DNA）。

[図15]DNAライブラリ構築に使用したaMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP'-Jun-cys-N11-SecM-GS3と、リボソームディスプレイ実施前後のDNAライブラリとのDNA長分析の結果である。レーン1はaMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3の鋳型DNAであり、レーン2はTP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3の鋳型DNAであり、レーン3はEMP'-Jun-cys-N11-SecM-GS3の鋳型DNAであり、レーン4はDNA mixであり、レーン5はDNA mix2である。

[図16]HGFとDNA mixの無細胞翻訳産物、DNA mix2の無細胞翻訳産物、無細胞翻訳したaMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、無細胞翻訳したTP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、無細胞翻訳したEMP'-Jun-cys-N11-SecM-GS3の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、無細胞翻訳した環状ペプチドに関しては、活性評価に供した培地に対する無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。

[図17]DNAライブラリ構築に使用したEMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3と、リボソームディスプレイ実施前後のDNAライブラリとのDNA長分析の結果である。レーン1はEMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3の鋳型DNAであり、レーン2はaMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3の鋳型DNAであり、レーン3はTP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3の鋳型DNAであり、レーン4はDNA mixであり、レーン5はDNA mix2である。

[図18]無細胞翻訳したEMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、無細胞翻訳したaMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、無細胞翻訳したTP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、DNA mixの無細胞翻訳産物、DNA mix2の無細胞翻訳産物、DNA不含無添加群、及びrecombinant human EP0 (rhEP0)の活性評価を示すグラフである。無細胞翻訳した環状ペプチド及びDNA不含無添加群に関しては、活性評価に供した培地中の無細胞発現系の反応液の濃度について5段階希釈したものを示す（1/110、1/330、1/990、1/2970及び1/8910）。rhEP0に関しては、rhEP0 50 μ g/mLを、活性評価に供した培地中に1/110となる濃度で添加したものである。縦軸は化学発

光強度（LU）を表す。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明の一実施態様は、環状ペプチドを含む分子に関する。このような環状ペプチドを含む分子は、具体的には、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチドである。このポリペプチドは、本明細書に記載の、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法や、そのためのライブラリにおいて利用することができる。なお、ポリペプチドにおいて、各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよく、天然型であっても非天然型であってもよいし、各アミノ酸は、好ましくは α -、 β -又は γ -アミノ酸であり、より好ましくは α -アミノ酸である。

一実施態様において、このようなポリペプチドは、例えば、N末端側から「環状ペプチド」－「ペプチドリンカー」－「システイン残基」－「ロイシンジッパー領域」を含む構造、N末端側から「環状ペプチド」－「ペプチドリンカー」－「ロイシンジッパー領域」－「システイン残基」を含む構造、N末端側から「システイン残基」－「ロイシンジッパー領域」－「ペプチドリンカー」－「環状ペプチド」を含む構造、又はN末端側から「ロイシンジッパー領域」－「システイン残基」－「ペプチドリンカー」－「環状ペプチド」を含む構造を有し得る。更に、当該ポリペプチドは、N末端側もしくはC末端側において、又は「環状ペプチド」と「ペプチドリンカー」の間、「ペプチドリンカー」と「システイン残基」の間、「ペプチドリンカー」と「ロイシンジッパー領域」の間、もしくは「システイン残基」と「ロイシンジッパー領域」の間において、少なくとも1つのアミノ酸残基からなる任意のアミノ酸配列を含んでもよい。このような任意のアミノ酸配列は、特に限定されないが、タグ配列、酵素認識配列、又はポリペプチドの発現を高めるのに有用な配列を含むものであってもよい。タグ配列としては、例えば、N11タグ、FLAGタグ、PAタグ、ヒスチジンタグ等が挙げられ、タグ配列は、上記ポ

リペプチドのN末端側に存在することが好ましい。酵素認識配列としては、例えば、プロテアーゼ切断配列、糖鎖修飾配列等が挙げられる。「環状ペプチド」と「ペプチドリンカー」の間、「ペプチドリンカー」と「システイン残基」の間、「ペプチドリンカー」と「ロイシンジッパー領域」の間、もしくは「システイン残基」と「ロイシンジッパー領域」の間に含まれ得るアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、1つ以上のグリシンからなるものが挙げられ、好ましくは1～5個のグリシンからなる。

[0010] 環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチドにおいて、当該環状ペプチドは、特に限定されないが、例えば、分子量250以上、500以上、800以上、又は1000以上であり得、10000以下、9000以下、8000以下、又は7000以下であり得る。また、当該環状ペプチドは、特に限定されないが、例えば、3個以上、6個以上、10個以上、又は12個以上のアミノ酸残基からなるものであり得、50個以下、45個以下、40個以下、又は35個以下のアミノ酸残基からなるものであり得る。

当該環状ペプチドは、どのような結合様式で環状構造となっているかは特に限定されないが、例えば2つのシステイン残基間でジスルフィド結合により環状構造を形成し得る。

当該環状ペプチドとしては、例えば、FGFR結合ペプチド、c-Met (HGFR) 結合ペプチド、エリスロポエチン受容体結合ペプチド、トロンボポエチン受容体結合ペプチド、アルブミン結合ペプチド、EGFR結合ペプチド、VEGFR結合ペプチド、PDGFR結合ペプチド、Axl結合ペプチド、PDGFR結合ペプチド、SCFR結合ペプチド、Flt-3結合ペプチド、c-Ret結合ペプチド、ROR結合ペプチド、Tie結合ペプチド、NGFR結合ペプチド、Insulin受容体結合ペプチド、EphR結合ペプチド、Alk結合ペプチド、DDR結合ペプチド、TGFB β 結合ペプチド、Activin受容体結合ペプチド、BMP受容体結合ペプチド、インターロイキン受容体結合ペプチド、T細胞受容体結合ペプチド、トランスフェリン受容体結合ペプチド

ド、リポタンパク質受容体結合ペプチド、ユビキチンリガーゼ結合ペプチド、抗体結合ペプチド、補体結合ペプチド、GPCR結合ペプチド、イオンチャネル結合ペプチド、ウイルス結合ペプチド、或いはこれらのペプチドとして作用すると見込まれるペプチド等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0011] 環状ペプチドの具体例として、c-Met（単にMetとも言う。）に結合する環状ペプチドを以下に挙げるが、これに限定されるものではない。

以下の（a）～（i）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチド。

（a）CYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：1）

（b）CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：2）（本明細書において、amd4dYとも称される。）

（c）CYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：3）

（d）CWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：4）

（e）CYISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：5）

（f）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：6）

（g）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の1又は2個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。

（h）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有し、但し両端のシステイン残基を有しているアミノ酸配列からなり、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92%以上、95%以上、又は98%以上であってもよい。本明細書において、アミノ酸配列相同性は、公知の解析ツールを用いて算出することができ、例えば、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の相同性アルゴリズムBLAST（Basic local alignment search tool）を用いることにより算出することができる。また、アミノ酸配列相同性の算出には、解析ツールにおけるデフォルト（初期設定）のパラメータを用いればよい。

(i) (a) ~ (h) のいずれかのアミノ酸配列において、両端のシステイン残基以外の少なくとも1つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

なお、MetはHGF受容体で、チロシンキナーゼ型受容体であり、このようなMet (HGFR) に結合する環状ペプチドは、ダイマー化することでMet (HGFR) アゴニストとして機能することが知られている。

[0012] 本明細書において、「置換、欠失又は付加」との表現において、置換とは、公知のアミノ酸への置換を意味し、好ましくは保存的アミノ酸置換である。「保存的アミノ酸置換」は、類似した化学的性質（例えば、電荷又は疎水性）を伴う側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によって、アミノ酸残基が置換された置換である。類似した化学的性質を伴う側鎖を有するアミノ酸基の例には、脂肪族側鎖を有するグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するセリン及びスレオニン、アミド含有側鎖を有するアスパラギン及びグルタミン、芳香族側鎖を有するフェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、塩基性側鎖を有するリシン、アルギニン、及びヒスチジン、並びに酸性側鎖を有するアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。置換により導入される各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよく、天然型アミノ酸であっても非天然型であってもよいが、好ましくは、ヒトや動物においてタンパク質を構成するアミノ酸である。

本明細書において、「置換、欠失又は付加」との表現において、付加とは、公知のアミノ酸がアミノ酸配列の末端に付加されること、又は公知のアミノ酸がアミノ酸配列のアミノ酸残基間に挿入されることを意味する。付加により導入される各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよく、天然型アミノ酸であっても非天然型であってもよいが、好ましくは、ヒトや動物においてタンパク質を構成するアミノ酸である。

[0013] また、環状ペプチドの具体例として、エリスロポエチン受容体に結合する

環状ペプチドを以下に挙げるが、これに限定されるものではない。

以下の (j) ~ (n) から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチド。

(j) GGLYACHMGPMTWVCQPLRG (配列番号 : 7)

(k) CISWNEFNSPNWRFITC (配列番号 : 8)

(l) (j) 又は (k) のアミノ酸配列において、システイン残基以外の 1 又は 2 個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド。

(m) (j) 又は (k) のいずれかのアミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有し、但しシステイン残基を (j) 又は (k) におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92% 以上、95% 以上、又は 98% 以上であってもよい。

(n) (j) ~ (m) のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも 1 つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADP リボシル化又は糖鎖付加である。

[0014] 環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチドにおいて、当該ペプチドリンカーは、特に限定されないが、分子量 10,000 以下であり、かつ 50 個以下のアミノ酸残基からなり得る。

また、一実施態様において、当該ペプチドリンカーは、分子量 10,000 以下であり、かつ 50 個以下のアミノ酸残基からなり得て、そのアミノ酸配列の少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は 100% がアラニン (A)、プロリン (P) 及びセリン (S) から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列において、4% 超かつ 40% 未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、当該ペプチド

リンカーのアミノ酸配列において、約４％超、約５％超、約６％超、約８％超、約１０％超、約１５％超、又は約２０％超を構成してもよく、約４０％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基及びセリン残基は、それぞれ独立に、約４％超、約１０％超、又は約２０％超を構成してもよく、約５０％未満を構成してもよい。

本明細書において、用語「約Ｘ％」とは、そのＸという数に制限されるのではなく、さらなる１０％～２０％多い値、又は１０％～２０％少ない値も含む。例えば、用語「約１０％」はまた、それぞれ、１１％又は１２％、及び９％又は８％にも関する。

当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr及びValからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Val、Ile、Leu、Met、Phe、TyrもしくはTrpのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はLys、Arg、AspもしくはGluのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0015] 一実施態様において、当該ペプチドリンカーは、分子量10,000以下であり、かつ50個以下のアミノ酸残基からなり得て、そのアミノ酸配列の少なくとも90％、少なくとも95％、又は100％がアラニン（A）及びプロリン（P）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列において、10％超かつ75％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列において、約10％超、約12％超、約14％超、約18％超、約20％超、約22％超、約23％超、約24％超、又は約25％超を構成してもよく、約75％未満、約70％未満、約65％未満、約60％未満、約55％未満、約50％未満、約48％未満、約46％未満、約44％未満、約42％未満、約41％未満、約40％未満、約39％未満、約38％未満、約

37%未満、約36%未満、又は約35%未満を構成してもよい。また、アラニン残基は、約25%超、約30%超、約35%超、約40%超、約45%超、約50%超、約52%超、約54%超、約56%超、約58%超、約59%超、約60%超、約61%超、約62%超、約63%超、約64%超、又は約65%超を構成してもよく、約90%未満、約88%未満、約86%未満、約84%未満、約82%未満、約80%未満、約79%未満、約78%未満、約77%未満、約76%未満、又は約75%未満を構成してもよい。

当該ペプチドリッカーのアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr及びValからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Val、Ile、Leu、Met、Phe、TyrもしくはTrpのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はLys、Arg、AspもしくはGluのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0016] 一実施態様において、当該ペプチドリッカーは、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が6残基以下、5残基以下、4残基以下、又は3残基以下であり得る。

一実施態様において、当該ペプチドリッカーは、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）及びプロリン（P）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が6残基以下、5残基以下、4残基以下、又は3残基以下であり得る。

一実施態様において、当該ペプチドリッカーは、AP又はAAPで表される配列を2つ以上繰り返して含むものであり得る。

一実施態様において、当該ペプチドリッカーは、グリシン（G）とセリン（S）から構成される配列を含むものであり得る。この場合、当該ペプチドリ

カーは、GGGGS、GGGS、GGS、及びGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を繰り返し含み得る。

一実施態様において、当該ペプチドリンカーは、グリシンを連続して含むものであり得、また、グリシンのみからなるものであり得る。

一実施態様において、当該ペプチドリンカーは、EAAAKで示されるアミノ酸配列を繰り返し含み得る。

一実施態様において、当該ペプチドリンカーのアミノ酸配列としては、A、P及びSからなるもの、A及びPからなるもの、又はGGGGSで示される配列の繰り返しからなるものが好ましいが、これらに限定されるものではない。

一実施態様において、当該ペプチドリンカーの長さは、50個以下のアミノ酸残基からなり得るが、例えば、当該ペプチドリンカーは、49個以下、40個以下、35個以下、30個以下、又は25個以下のアミノ酸残基からなることができる。

一実施態様において、当該ペプチドリンカーの長さは、1個以上のアミノ酸残基からなり得るが、例えば、当該ペプチドリンカーは、4個以上、8個以上、12個以上、又は16個以上のアミノ酸残基からなることができる。

[0017] 一実施態様において、当該ペプチドリンカーの具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものや、以下のアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。AAPAAPAPAAPAAPAAPAA（配列番号：9）、AAPAAPAPAAPAAPAAPAP（配列番号：10）、AAPAAPAPAAPAP（配列番号：11）、AAPAAPAPAAPAAPAPAP（配列番号12）、AAPAAPAPAAPAAPAPAP（配列番号13）、AAPAAPAPAAPAAPAAPAPAP（配列番号14）、APAAPAPAAPAAPAPAAPAP（配列番号15）、AAPAAPAPAAPAAPAPAPAP（配列番号16）、及びAPAPAPAPAPAPAPAPAP（配列番号17）、ASPAAPAPASPAAPAPSAP（配列番号18）、AAPASPAPAPAPSAPAPAPS（配列番号19）、APSSPSPSAPSSPSPASPSS（配列番号20）、SAPSSPSPSAPSSPSPASPS（配列番号21）、SSPSAPSPSSPSPSPSPA（配列番号22）、AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA（配列番号23）、ASAAAPAAASAAASAPSAAA（配列番号24）、AAPAAPAPAAPAAPAP（配列番号

号：２５）、AAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAPA（配列番号：２６）、及びSAPSPSSAPASAPASAPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASS（配列番号：２７）、並びにこれらの円順列変異配列から選択されるアミノ酸配列。

円順列変異配列は、AAPAAPAPAAPAAPAPAA（配列番号：９）を例にして説明すれば、例えば、上記の配列の第１のアラニンを除くこと及び上記の配列の末端に別のアラニンを付加することによって容易に作製され得る。配列番号：９のこのような円順列変異配列は、APAAPAPAAPAPAAPAA（配列番号：２８）となる。さらに、配列番号７の環状にアミノ酸残基の順序を変えられた円順列変異配列の限定されない例として、以下のものが挙げられる。P AAPAPAAPAPAAPAAA（配列番号：２９）、AAPAPAAPAPAAPAAAP（配列番号：３０）、APAPAAPAPAPAPAAA（配列番号：３１）、PAPAPAAPAPAPAAAA（配列番号：３２）、APAPAPAPAPAPAAAP（配列番号：３３）、PAPAPAPAPAPAAAA（配列番号：３４）、AAPAPAPAPAPAAAPAP（配列番号：３５）、APAPAPAPAPAAAAAPAP（配列番号：３６）、及びPAPAPAPAPAAAAAPAPAA（配列番号：３７）。

一実施態様において、当該ペプチドリンカーの具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものや、以下のアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。AAPAAPAPAA（配列番号：３８）、AAPAAP（配列番号：３９）、及びAAPAAPAPA（配列番号：４０）、並びにこれらの円順列変異配列から選択されるアミノ酸配列。

[0018] 環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチドにおいて、当該二量体化ドメイン中のシステイン残基は、1つのみであってもよいし、2個以上であってもよい。好ましくは、当該二量体化ドメイン中のシステイン残基は、1つのみである。

当該二量体化ドメイン中のロイシンジッパー領域とは、 α ヘリックスを形

成し、7残基ごとにロイシン残基を有する領域のことである。当該ロイシンジッパー領域は、特に限定されないが、例えば、60個以下、45個以下、35個以下、又は25個以下のアミノ酸残基からなることができる。

当該二量体化ドメイン中のロイシンジッパー領域としては、ダイマーを形成するものであれば特に限定されないが、例えば、c-Junタンパク質、GCN4タンパク質又はCEBP α タンパク質のロイシンジッパードメイン、及びc-Junロイシンジッパードメインの正電荷アミノ酸をグルタミンに置換することでヘパリン結合能を欠損させたJun Δ hep (M. D. Ballinger et al., Nat. Biotechnol. 17, 1199-1204 (1999)、ここに本明細書の一部を構成するものとして当該文献の内容を参照により引用する。)等が挙げられる。当該ロイシンジッパー領域の具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものや、以下のアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。RIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN (配列番号: 41)、QIAQLEEKVQTLQAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN (配列番号: 42)、RMKQLEDKVEELLSKNYHLEN EVARLKKLVGER (配列番号: 43)、RNVETQQKVLELTSDNDRLRKRVEQLSRELDTLRGIF RQ (配列番号: 44)。

一実施態様において、当該二量体化ドメイン中のロイシンジッパー領域は、ヘパリン結合能を除去したものであってもよい。

[0019] 環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリinkerを含む、本明細書に記載のポリペプチドは、特に限定されないが、例えば、分子量3000以上、4000以上、5000以上、又は6000以上であり得、20000以下、18000以下、16000以下、又は14000以下であり得る。また、当該ポリペプチドは、特に限定されないが、例えば、30個以上、40個以上、50個以上、又は60個以上のアミノ酸残基からなるものであり得、200個以下、180個以下、160個以下、又は140個以下のアミノ酸残基からなるものであり得る。

[0020] 環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化

ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリinkerを含む、本明細書に記載のポリペプチドは、当該ポリペプチドをコードする核酸に基づき、周知技術を用いて調製し得る。また、当該ポリペプチドは、二量体化ドメイン中のロイシンジッパー領域における非共有結合性相互作用と、二量体化ドメイン中のシステイン残基間でのジスルフィド結合により、二量体化し得る。システイン残基間でのジスルフィド結合は、強固な二量体化に寄与し、二量体化した環状ペプチドの活性に大きな影響を与え得る。

当該ポリペプチドをコードする核酸は、DNAでもRNA (mRNA) でもあり得る。このような核酸の合成は、目的とするポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、従来の合成技術を用いて当業者が適宜行い得る。

一実施態様において、当該ポリペプチドをコードする核酸は、5'側に無細胞発現に必要なプロモーター配列（例えばT7プロモーター配列）及びリボソーム結合配列を有し得る。また、当該核酸は、3'側に終止コドン及び非翻訳領域を有し得る。

従来、環状ペプチドを二量体化したペプチドダイマーを生合成系を用いてワンポットに得る手法としては、2つの環状ペプチドをリンカーで結合させた分子フォーマットについて遺伝子から発現する方法が用いられていたが、このような合成における鋳型遺伝子の調製には、2箇所の配列を環状ペプチドをコードするものへと変える必要があり、遺伝子全合成が必要となる。一方、本明細書に記載のポリペプチドは、ポリペプチドの合成後に二量化するものであり、そのようなポリペプチドの合成に用いられる核酸は、環状ペプチドをコードする配列を1ヶ所のみ有する。そのため、本明細書に記載の発明においては、核酸の合成、及びポリペプチドの合成を迅速で簡便に行うことができる。

[0021] 本発明の一実施態様は、二量体化した環状ペプチドを調製する方法に関する。このような二量体化した環状ペプチドを調製する方法は、例えば、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイ

ン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリinkerを含むポリペプチドを無細胞発現系で合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製することを含み、前記二量体はホモダイマーであってもヘテロダイマーであってもよい。ここで、環状ペプチド、二量体化ドメイン（システイン残基及びロイシンジッパー領域）、ペプチドリinkerについては本明細書に上述されているとおりである。

無細胞発現系でのタンパク質の合成は、当業者に周知の技術であり、細胞の抽出液を用いてもよいし、市販の無細胞発現用試薬を用いてもよい。無細胞発現系に含まれる成分としては、テンプレートである所望のポリペプチドをコードする核酸（DNA又はmRNA）、転写・翻訳・エネルギー再生・翻訳後修飾に必要なタンパク質（RNAポリメラーゼ、リボソーム、アミノアシルtRNA合成酵素、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、翻訳終結因子、リボソーム再生因子、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、アデノシンキナーゼ、クレアチンキナーゼ、プロリルイソメラーゼ、ジスルフィド結合イソメラーゼ、シャペロンなど）、tRNA、アミノアシルtRNA、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、NTP、バッファー等が挙げられる。

市販の無細胞発現用試薬としては、例えば、PUREfrex2.0（ジーンフロンティア社）、PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit（New England Biolabs社）等が挙げられる。

[0022] 本発明の一実施態様は、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法に関する。このような二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、例えば、以下の工程（1 A）又は（1 B）、及び工程（2）を含む。

（1 A）無細胞発現系で、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリinker

カー

を含む少なくとも 1 種のポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程、又は

(1 B) 無細胞発現系で、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含む少なくとも 1 種のポリペプチドを合成することにより得られた前記ポリペプチドの二量体を用意する工程、

及び

(2) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程。

二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、更に、工程 (2) で測定された活性に基づいて前記二量体 (二量体化した環状ペプチド) をスクリーニングする又は選別する工程を含み得る。

また、本発明の一実施態様は、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法によって標的分子との結合に基づく活性を測定して、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドを得る方法に関する。

[0023] 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法において、工程 (1 A) は、二量体化した環状ペプチドを調製する方法に関して本明細書に上述されているとおりであり、工程 (1 B) は、本明細書に上述されているとおりの方法で得られた二量体化した環状ペプチド (ポリペプチドの二量体) を用意するというものである。工程 (1 A) 及び (1 B) における、「環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含む少なくとも 1 種のポリペプチド」については、本明細書に

上述されている「環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチド」の内容をそのまま適用し得る。なお、工程（１Ａ）及び（１Ｂ）における少なくとも１種のポリペプチドは、標的分子との結合親和性を有すると見込まれる複数の異なるポリペプチドを含み得る。

また、本明細書において、「ポリペプチドの二量体」は、本明細書に上述されている「二量体化した環状ペプチド」と同義である。

[0024] 工程（２）において、「標的分子」とは、本明細書に記載の環状ペプチドもしくは二量体化した環状ペプチドが結合する又は結合することが見込まれる分子を意味する。標的分子は、好ましくは受容体であり、より好ましくは二量化により活性化する受容体、例えば、増殖因子受容体、成長因子受容体、サイトカイン受容体等である。標的分子の具体例としては、例えば、FGFR、c-Met（HGFR）、エリスロポエチン受容体、トロンプオエチン受容体、アルブミン、EGFR、VEGFR、PDGFR、Axl、PDGFR、SCFR、Flt-3、c-Ret、ROR、Tie、NGFR、Insulin受容体、EphR、Alk、DDR、TGFR、Activin受容体、BMP受容体、インターロイキン受容体、T細胞受容体、トランスフェリン受容体、リポタンパク質受容体、ユビキチンリガーゼ、抗体、補体、GPCR、イオンチャネル、ウイルス等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

工程（２）において、「二量体の標的分子との結合に基づく活性」とは、二量体が標的分子と結合することによりもたらされる作用及び／又はその強さを意味し、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性のいずれの意味をも含み得る。例えば、活性には、受容体活性、シグナル伝達活性、アポトーシス活性等が含まれ得る。

工程（２）における測定は、周知の手法を用いて行うことができ、ルシフェラーゼレポーターアッセイ等のバイオルミネセンスアッセイにより、PathHunter（登録商標） Receptor Dimerization アッセイ等の受容体二量体化アッセイにより、又は蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の測定により、または

ケミカルリンカーによるクロスリンクおよびSDS-PAGEによる二量化分析等により行うことができる。

工程（２）における測定には、工程（１）で得られた無細胞発現の反応液をそのまま用いてもよいし、適宜希釈して用いてもよい。

[0025] 一実施態様において、二量化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、工程（１）で、少なくとも１種のポリペプチドが、標的分子との結合親和性を有すると見込まれる複数の異なるポリペプチドを含み、かつ工程（２）で、前記複数の異なるポリペプチドの二量体について、前記標的分子との結合に基づく活性を測定することを含む。

一実施態様において、二量化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、工程（１）が、少なくとも１種のポリペプチド又はその二量体を複数含むライブラリを作製することを含み、複数の前記ポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている。ここで、少なくとも１種のポリペプチド又はその二量体を複数含むライブラリは、当該ポリペプチド又はその二量体を、例えば、２種以上、８種以上、１６種以上、３２種以上、４８種以上、９６種以上、２００種以上、１０００種以上、１００００種以上、 10^5 種以上、又は 10^6 種以上含み得る。また、少なくとも１種のポリペプチド又はその二量体を複数含むライブラリは、当該ポリペプチド又はその二量体を、例えば、 10^{15} 種以下、 10^{14} 種以下、又は 10^{13} 種以下含み得る。

本明細書において、「ライブラリ」とは、複数の異なる物質（例えば、異なるポリペプチド又は異なる核酸）を含む集合体を意味するものである。

[0026] 本発明の一実施態様は、ライブラリを作製する方法に関する。このようなライブラリを作製する方法は、例えば、無細胞発現系で複数のポリペプチドを合成することを含む、前記複数のポリペプチド又は前記複数のポリペプチドの二量体を含むライブラリを作製する方法であって、前記複数のポリペプチドが、各々、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含み、前記複数のポリペプチド間で異なる

る環状ペプチドが含まれている方法であり得る。

このライブラリを作製する方法において、「無細胞発現系で複数のポリペプチドを合成する」という工程は、二量体化した環状ペプチドを調製する方法に関して本明細書に上述されているとおりである。また、「前記複数のポリペプチドが、各々、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含み」というポリペプチドに関する内容は、本明細書に上述されている「環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチド」の内容をそのまま適用し得る。

[0027] 本発明の一実施態様は、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングするためのライブラリに関する。このようなライブラリは、例えば、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体、又は前記複数のポリペプチドをコードする複数の核酸を含み、前記複数のポリペプチドが、各々、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むものであり、前記複数のポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている。

このライブラリにおいて、「前記複数のポリペプチドが、各々、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むものであり」というポリペプチドに関する内容は、本明細書に上述されている「環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチド」の内容をそのまま適用し得る。

[0028] このようなライブラリは、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペ

プチドの二量体を、例えば、2種以上、8種以上、16種以上、32種以上、48種以上、96種以上、200種以上、1000種以上、10000種以上、 10^5 種以上、又は 10^6 種以上含み得る。また、このようなライブラリは、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体を、例えば、 10^{15} 種以下、 10^{14} 種以下、又は 10^{13} 種以下含み得る。

或いは、このようなライブラリは、複数のポリペプチドをコードする複数の核酸を、例えば、2種以上、8種以上、16種以上、32種以上、48種以上、96種以上、200種以上、1000種以上、10000種以上、 10^5 種以上、又は 10^6 種以上含み得る。また、このようなライブラリは、複数のポリペプチドをコードする複数の核酸を、例えば、 10^{15} 種以下、 10^{14} 種以下、又は 10^{13} 種以下含み得る。なお、「ポリペプチドをコードする核酸」は、本明細書に上述されているとおりである。

[0029] 本発明の一実施態様は、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法に関する。このような二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、前述の方法とは別の方法として、例えば、以下の工程（1'）～（5'）を含む。

（1'）複数のディスプレイされたポリペプチドを含むライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得する工程であって、前記複数のディスプレイされたポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリッカー

を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、該取得工程、及び

（2'）工程（1'）において取得した前記ポリペプチドと関連付けられた核酸を回収する工程、

(3') 工程 (2') において回収した前記核酸を増幅する工程、
(4') 工程 (3') において増幅した前記核酸を用いて、無細胞発現系で、
環状ペプチド、
システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並び
に
前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリン
カー
を含むポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程、
及び
(5') 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程。

[0030] このような工程 (1') ~ (5') を含む二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法によれば、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドについて、ディスプレイされた候補ポリペプチドの取得からシームレスに評価可能なスクリーニングを提供することができる。

このような工程 (1') ~ (5') を含む二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、更に、工程 (5') で測定された活性に基づいて前記二量体 (二量体化した環状ペプチド) をスクリーニングする又は選別する工程を含み得る。

また、本発明の一実施態様は、このような工程 (1') ~ (5') を含む二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法によって標的分子との結合に基づく活性を測定して、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドを得る方法に関する。

[0031] 工程 (1') は、複数のディスプレイされたポリペプチドを含むライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得する工程である。ここで、「複数のディスプレイされたポリペプチドを含むライブラリ」は、周知のディスプレイ技術を用いて作製し得るものである。このようなディスプレイ技術としては、例えば、リボソームディスプレイ

、mRNAディスプレイ、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ等が挙げられる。具体的には、鋳型DNA配列にSecM配列を導入することで、リボソームーポリペプチド（融合タンパク質）－mRNA複合体の作製が容易になり、簡便に複数のディスプレイされたポリペプチドを含むライブラリを作製可能であるが、用いる配列およびディスプレイ方法はこれに限定されるものではない。

工程（1'）において、ライブラリは、複数のディスプレイされたポリペプチドを、例えば、2種以上、8種以上、16種以上、32種以上、48種以上、96種以上、200種以上、1000種以上、10000種以上、 10^5 種以上、 10^6 種以上、 10^7 種以上、 10^8 種以上、 10^9 種以上、又は 10^{10} 種以上含み得る。また、このようなライブラリは、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体を、例えば、 10^{15} 種以下、 10^{14} 種以下、又は 10^{13} 種以下含み得る。

また、工程（1'）における、「標的分子」、並びに「複数のディスプレイされたポリペプチド」の「環状ペプチド」、「システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン」、及び「前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリinker」は、本明細書に上述されているとおりである。

工程（1'）において、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得することは、周知の手法で行われ得るが、例えば、リコンビナントの標的分子や標的分子を発現する細胞に対するアフィニティセクションにより行われ得る。

[0032] 工程（2'）は、工程（1'）において取得したポリペプチドと関連付けられた核酸を回収する工程である。これは、周知の手法で行われ得るが、例えば、磁気ビーズを用いた回収法、ELISAプレートを用いた回収法、細胞のペレットを用いた回収法、ナノドロップレットを用いた回収法、マイクロ流路を用いた手法等により行われ得る。

工程（3'）は、工程（2'）において回収した核酸を増幅する工程であ

る。これは、周知の手法で行われ得るが、例えば、PCRにより行われ得る。PCRにおいて、回収した核酸がDNAであればそのまま使用でき、回収した核酸がmRNAであれば、RT-PCRによりcDNAを作製し、核酸を増幅すればよい。

工程（4'）は、工程（3'）において増幅した核酸を用いて、無細胞発現系で、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程である。これは、二量体化した環状ペプチドを調製する方法に関して本明細書に上述されているとおりである。「環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチド」については、本明細書に上述されているとおりである。

[0033] 工程（5'）は、二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程である。

工程（5'）において、「二量体の標的分子との結合に基づく活性」とは、二量体が標的分子と結合することによりもたらされる作用及び／又はその強さを意味し、アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性のいずれの意味をも含み得る。例えば、活性には、受容体活性、シグナル伝達活性、アポトーシス活性等が含まれ得る。なお、工程（5'）における「標的分子」は、本明細書に上述されているとおりである。

工程（5'）における測定は、周知の手法を用いて行うことができ、ルシフェラーゼレポーターアッセイ等のバイオルミネセンスアッセイにより、PathHunter（登録商標） Receptor Dimerization アッセイ等の受容体二量体化アッセイにより、又は蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の測定により、またはケミカルリンカーによるクロスリンクおよびSDS-PAGEによる二量化分析等により行うことができる。

[0034] 一実施態様において、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方

法は、工程（1'）が、取得した複数のポリペプチドに基づき、複数のディスプレイされたポリペプチドを含む更なるライブラリを作製すること、及び前記更なるライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得することを繰り返すことを含む。

ここで、取得した複数のポリペプチドに基づき、複数のディスプレイされたポリペプチドを含む更なるライブラリの作製は、以下のような工程により行われ得る。

工程（1' - 1）：工程（1'）において取得したポリペプチドと関連付けられた核酸を回収する工程、及び

工程（1' - 2）：工程（1' - 1）において回収した核酸を増幅する工程。

工程（1' - 1）は、工程（2'）として記載の方法と同じように実施することができる。工程（1' - 2）は、工程（3'）として記載の方法と同じように実施することができる。このように作製された更なるライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得することは、工程（1'）と同じように実施することができる。

一実施態様において、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法は、工程（1'）において、取得した複数のポリペプチドに基づき、複数のディスプレイされたポリペプチドを含む更なるライブラリを作製すること、及び前記更なるライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得することを、2回、3回、4回、5回、6回、又は7回以上繰り返してもよい。

[0035] 本発明の一実施態様は、二量体化した環状ペプチドをスクリーニングするためのライブラリに関する。このようなライブラリは、前述のライブラリとは別のものとして、例えば、複数のディスプレイされたポリペプチド又は前記複数のディスプレイされたポリペプチドを発現させるための複数の核酸を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチドが、各々、環状ペプチド、システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並び

に前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むものであり、前記複数のディスプレイされたポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている。

このライブラリにおいて、「複数のディスプレイされたポリペプチド」の「環状ペプチド」、「システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン」、及び「前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー」は、本明細書に上述されているとおりである。

[0036] このようなライブラリは、複数のディスプレイされたポリペプチドを、例えば、2種以上、8種以上、16種以上、32種以上、48種以上、96種以上、200種以上、1000種以上、10000種以上、 10^5 種以上、 10^6 種以上、 10^7 種以上、 10^8 種以上、 10^9 種以上、又は 10^{10} 種以上含み得る。また、このようなライブラリは、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体を、例えば、 10^{15} 種以下、 10^{14} 種以下、又は 10^{13} 種以下含み得る。

或いは、このようなライブラリは、複数のディスプレイされたポリペプチドを発現させるための複数の核酸を、例えば、2種以上、8種以上、16種以上、32種以上、48種以上、96種以上、200種以上、1000種以上、10000種以上、 10^5 種以上、 10^6 種以上、 10^7 種以上、 10^8 種以上、 10^9 種以上、又は 10^{10} 種以上含み得る。また、このようなライブラリは、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体を、例えば、 10^{15} 種以下、 10^{14} 種以下、又は 10^{13} 種以下含み得る。

実施例

[0037] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

なお、実施例において用いたHGFは、全てリコンビナントヒトHGF（rhHGF, R&D Systems）であり、本明細書及び図面において、リコンビナントヒトHGFを単にHGFと表記する。

[0038] 実施例1：環状ペプチドーロイシンジッパー融合体の設計及び無細胞発現系

による発現

(1-1) aMD4dY-ロイシンジッパー融合体の設計の概要

環状ペプチドであるaMD4dY（配列番号：2）はダイマーにすることでHGF様の活性を発揮する、すなわちMetのアゴニストとして作用することが報告されている。そこで、aMD4dYを自己二量化するロイシンジッパー領域との融合体として発現するためにペプチド配列の設計を行った。

また、ロイシンジッパー領域は非共有結合により二量化をもたらすため、結合は可逆的である。そのため、システイン残基を付加し、分子間でジスルフィド結合を形成することでより強固に二量化をするようなペプチド配列を設計した。

具体的には、以下のようなペプチド配列を設計した（図1～4）。

- ・「aMD4dY」-「ペプチドリンカー」-「システイン残基」-「ロイシンジッパー領域」
- ・「aMD4dY」-「ペプチドリンカー」-「ロイシンジッパー領域」-「システイン残基」
- ・「ロイシンジッパー領域」-「システイン残基」-「ペプチドリンカー」-「aMD4dY」
- ・「システイン残基」-「ロイシンジッパー領域」-「ペプチドリンカー」-「aMD4dY」

このように、ロイシンジッパー領域のN末端側もしくはC末端側でジスルフィド結合を形成し、共有結合で二量化化することが可能である。

[0039] また、アフィニティータグであるN11タグをN末端に付加したコンストラクトについても同様に設計を行った。具体的には、以下のようなペプチド配列を設計した（図5及び6）。

- ・「タグ配列」-「ロイシンジッパー領域」-「システイン残基」-「ペプチドリンカー」-「aMD4dY」
- ・「タグ配列」-「システイン残基」-「ロイシンジッパー領域」-「ペプチドリンカー」-「aMD4dY」

ロイシンジッパー領域としては、ホモ二量体を形成することが知られているc-Jun、GCN4及びCEBP α タンパク質のロイシンジッパードメイン、並びにc-Junロイシンジッパードメインの正電荷アミノ酸をグルタミンに置換することでヘパリン結合能を欠損させたJun Δ hep (M. D. Ballinger et al., Nat. Biotechnol. 17, 1199-1204 (1999)) を用いた。なお、これらのロイシンジッパードメインを、以下、それぞれJun、GCN4、CEBP α 及びJun Δ hepと表す。

[0040] (1-2) aMD4dY-ロイシンジッパー融合体の設計

設計したaMD4dY-ロイシンジッパー融合体の配列を以下に示す。aMD4dY、Jun、GCN4、CEBP α 及びJun Δ hepは上記(1-1)のとおりであり、PA8はペプチドリンカーを表し、cysはシステイン残基を表す。

(a) aMD4dY-PA8-cys-Jun

MAETCRQFNRRTHEVWNLD CGAAPAAPAPAAGCGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN (配列番号：45)

(b) aMD4dY-PA8-Jun

MAETCRQFNRRTHEVWNLD CGAAPAAPAPAAGGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN (配列番号：46)

(c) aMD4dY-PA8-cys-Jun Δ hep

MAETCRQFNRRTHEVWNLD CGAAPAAPAPAAGCGGQIAQLEEKVQTLQAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN (配列番号：47)

(d) aMD4dY-PA8-GCN4-cys

MAETCRQFNRRTHEVWNLD CGAAPAAPAPGRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERGGCGG (配列番号：48)

(e) aMD4dY-PA8-cys-CEBP α

MAETCRQFNRRTHEVWNLD CGAAPAAPAPAAGCGGRNVETQQKVLELTSDNDR LKRVEQLSRELDTLRGIFRQ (配列番号：49)

(f) cys-Jun-PA8-aMD4dY

MGGCGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNAAPAAPACRQFNRRTHEVWNLD C (配列番号：50)

(g) Jun-cys-PA8-aMD4dY

MGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNGGCGGAAPAAPAPACRQFNRRTHEVWNL
DC (配列番号 : 5 1)

(h) N11-Jun-cys-PA8-aMD4dY

MKDHLIHNHHKHEHAHAHLGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNGGCGGAAP
AAPAPACRQFNRRTHEVWNLDC (配列番号 : 5 2)

(i) N11-cys-Jun-PA8-aMD4dY

MKDHLIHNHHKHEHAHAHLGGCGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNAAPAA
PAPACRQFNRRTHEVWNLDC (配列番号 : 5 3)

(j) N11-GCN4-cys-PA8-aMD4dY

MKDHLIHNHHKHEHAHAHLGGRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERGGCGGAAPAAPAPA
CRQFNRRTHEVWNLDC (配列番号 : 5 4)

(k) N11-cys-GCN4-PA8-aMD4dY

MKDHLIHNHHKHEHAHAHLGGCGGRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERAAPAAPAPACR
QFNRRTHEVWNLDC (配列番号 : 5 5)

[0041] (1 - 3) aMD4dYーロイシンジッパー融合体の発現

無細胞発現系を用いてaMD4dYーロイシンジッパー融合体の発現検討を行った。以下、発現検討の実施例を記載する。

[0042] (1 - 4) 無細胞発現用aMD4dYーロイシンジッパー融合体の遺伝子コンストラクトの構築

aMD4dYーロイシンジッパー融合体を発現させる核酸として、上記 (a) - (k) のアミノ酸配列をコードする塩基配列をそれぞれ設計した。さらに、これらの5'側には無細胞発現に必要なT7プロモーター配列及びリボソーム結合配列を付加し、3'側には終止コドンと非翻訳領域を付加した。上記 (a) - (k) に対応する無細胞発現用塩基配列をそれぞれ (l) - (v) に示す。

(l) aMD4dY-PA8-cys-Junを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT

GGACTGTGGCGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCTGCGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGA
AGAAAAAGTTAAACCCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACA
GGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 5 6)

(m) aMD4dY-PA8-Junを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTCGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT
GGACTGTGGCGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGA
AAAAGTTAAACCCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGT
TGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 5 7)

(n) aMD4dY-PA8-cys-Jun Δ hepを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTCGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT
GGACTGTGGCGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCTGCGGTGGTCAGATTGCCAACTGGA
AGAGAAAGTGCAGACGTTACAAGCGCAAAACAGCGAACTGGCTTCGACCGCGAACATGTTGCGCGAACA
GGTTGCACAGCTGAAACAGAAGGTCATGAATTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 5 8)

(o) aMD4dY-PA8-GCN4-cysを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTCGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT
GGACTGTGGCGCAGCACC CGCAGCTCCAGCACCAGGCCGCATGAAACAGTTGGAGGATAAAGTCGAAGA
GCTTCTGAGCAAGAACTATCACCTCGAAAACGAAGTTGCTCGTCTGAAGAACTCGTTGGAGAACGTGG
TGGTTGTGGCGGGTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 5 9)

(p) aMD4dY-PA8-cys-CEBP α を発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTCGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT
GGACTGTGGCGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCTGCGGTGGTCGCAATGTGGAGACTCA
GCAGAAGGTCCTGGAAGTACGTCTGACAACGATCGGTTACGCAAACGGGTTGAACAGCTGTCTCGTGA
ACTCGACACTCTTCGTGGCATCTTCGCCAATAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 6 0)

(q) cys-Jun-PA8-aMD4dYを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGGTGGTTGCGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAAAACCCT
GAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTGAAACA
GAAAGTTATGAACGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCATGTCGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGA
AGTTTGAATCTGGACTGTTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 6 1)

(r) Jun-cys-PA8-aMD4dYを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAAAACCCTGAAAGCTCAGAA
CTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAA
CGGTGGTTGCGGTGGTGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCATGTCGTCAGTTTAACCGTCGTACGCA
CGAAGTTTGAATCTGGACTGTTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 6 2)

(s) N11-Jun-cys-PA8-aMD4dYを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAAACATGAGCACGCTCATGCCGA
ACACCTGGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAAAACCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACT
GGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACGGTGGTTG
CGGTGGTGCAGCACCAGCAGCTCCGGCCCCTGCTTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTG
GAATCTGGACTGTTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 6 3)

(t) N11-cys-Jun-PA8-aMD4dYを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAAACATGAGCACGCTCATGCCGA
ACACCTGGGTGGTTGCGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAAAACCCTGAAAGCTCAGAA
CTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAA
CGCAGCACCAGCAGCTCCGGCCCCTGCTTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT
GGACTGTTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 6 4)

(u) N11-GCN4-cys-PA8-aMD4dYを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAAACATGAGCACGCTCATGCCGA

ACACCTGGGTGGTCGCATGAAACAGTTGGAGGATAAAGTCGAAGAGCTTCTGAGCAAGAACTATCACCT
CGAAAACGAAGTTGCTCGTCTGAAGAACTCGTTGGAGAACGTGGTGGTTGCGGTGGTGCAGCACCAGC
AGCTCCGGCCCCCTGCTTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCTGGACTGTTAGTG
AATAACTAATCC (配列番号：65)

(v) N11-cys-GCN4-PA8-aMD4dYを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAAACATGAGCACGCTCATGCCGA
ACACCTGGGTGGTTGCGGTGGTCGCATGAAACAGTTGGAGGATAAAGTCGAAGAGCTTCTGAGCAAGAA
CTATCACCTCGAAAACGAAGTTGCTCGTCTGAAGAACTCGTTGGAGAACGTGCAGCACCAGCAGCTCC
GGCCCCCTGCTTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCTGGACTGTTAGTGAATAAC
TAATCC (配列番号：66)

(l) - (v) に示すDNA配列は、ユーロフィンジェノミクス株式会社にて全合成およびpEX-K4J2プラスミドベクターへのクローニングを行った。

[0043] (1-5) EMP-ロイシンジッパー融合体の設計の概要

Johnson, D. L. et al. Chem. Biol. 1997, 4, 939-950に記載の環状ペプチドであるEMPは、二量体化することで強力なエリスロポエチン (EP0) 様の活性を発揮することが報告されている。そこで、EMPを自己二量化するロイシンジッパー領域との融合体として発現するためにペプチド配列の設計を行った。また、上記(1-1)と同様にシステイン残基を付加し、「EMP」-「ペプチドリンカー」-「システイン残基」-「ロイシンジッパー領域」となるようペプチド配列を設計した。

[0044] (1-6) EMP-ロイシンジッパー融合体の設計

設計したaMD4dY-ロイシンジッパー融合体の配列を以下に示す。

(w) EMP-PA8-cys-Jun

MGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAGCGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLK
QKVMN (配列番号：67)

EMPは上記(1-5)のとおりであり、PA8はペプチドリンカーを表し、cysはシステイン残基を表し、Junはc-Junタンパク質のロイシンジッパードメイン

ンを表す。

[0045] (1-7) EMP-ロイシンジッパー融合体の発現

無細胞発現系を用いてEMP-ロイシンジッパー融合体の発現検討を行った。
以下、発現検討の実施例を記載する。

[0046] (1-8) 無細胞発現用EMP-ロイシンジッパー融合体の遺伝子コンストラクトの構築

EMP-ロイシンジッパー融合体を発現させる核酸として、上記 (w) のアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計した。さらに、その5'側には無細胞発現に必要なT7プロモーター配列及びリボソーム結合配列を付加し、3'側には終止コドンと非翻訳領域を付加した。上記 (w) に対応する無細胞発現用塩基配列を (x) に示す。

(x) EMP-PA8-cys-Junを発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGGTGGCCTGTATGCGTGCCATATGGGGCCAATGACCTGGGTGTGTCAGCC
GTTACGCGGCGCAGCCCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCTGCGGTGGTCGTATCGCTCGTCTGGA
AGAAAAAGTTAAAACCCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACA
GGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACTAGTGAATAACTAATCC (配列番号：68)

(x) に示すDNA配列は、ユーロフィンジェノミクス株式会社にて全合成およびpEX-K4J2プラスミドベクターへのクローニングを行った。

[0047] (1-9) 環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の無細胞発現

上記で構築した環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の遺伝子をPCRにより増幅した。PCRは以下の (y) 及び (z) に示す配列のプライマーと、PCR酵素としてKOD -Plus- Ver.2 (東洋紡) を用いて行った。

(y) Cell-free primer Fwd :

GAAATTAATACGACTCACTATAGGG (配列番号：69)

(z) Cell-free primer Rev :

CACTGACTGGATTAGTTATTCAC (配列番号：70)

次に、PCRにより増幅した遺伝子断片を基に、環状ペプチド-ロイシンジッ

パー融合体を無細胞発現系によって発現した。無細胞発現にはPUREfrex2.0（ジーンフロンティア）又はPURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit（New England BioLabs）を用いた。

PUREfrex2.0で無細胞発現を行う場合、（l）－（v）のうちのいずれかまたは（x）のDNA配列断片4 ng、もしくは（l）－（v）のうちのいずれかまたは（x）のDNA配列を含む各プラスミドベクター90 ngに対し、10 μ LのSolution I、1 μ LのSolution II、2 μ LのSolution III、7 μ Lの水を添加し、37 $^{\circ}$ Cで6時間インキュベーションすることで翻訳反応を行った。

PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kitで無細胞発現を行う場合、（l）－（v）のうちのいずれかまたは（x）のDNA配列を含む各プラスミドベクター90 ngに対し、8 μ LのSolution A、6 μ LのSolution B、6 μ Lの水を添加し、37 $^{\circ}$ Cで6時間インキュベーションすることで翻訳反応を行った。

[0048] （1－10）SDS-PAGEによる環状ペプチドローイシンジッパー融合体の発現確認

上記（1－9）で無細胞発現した各環状ペプチドローイシンジッパー融合体を含む反応液3 μ LをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いてSDS-PAGEに供してから、Quick-CBB（Wako）にて染色を行った。PUREfrex2.0を用いて無細胞発現した、（i）N11-cys-Jun-PA8-aMD4dY、（k）N11-cys-GCN4-PA8-aMD4dYの各反応液を用いた場合、また各反応液をDynabeads His-Tag Isolation & Pulldownで精製実施後PAGEに供した場合について、結果を図7に示す。N11タグ精製を実施したレーンについて、それぞれのaMD4dY-ロイシンジッパー融合体（Monomer）、またそのジスルフィド二量体（Dimer）と推定されるタンパク質バンドが検出された。

[0049] 実施例2：aMD4dY-ロイシンジッパー融合体の活性評価

各aMD4dY-ロイシンジッパー融合体の二量体をルシフェラーゼアッセイによって評価した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μ Lに対し、0.6 μ LのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μ Lと1

μLのSRE reporter vector (QIAGEN社) の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 °C、5% CO₂インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS (Thermo Fisher Scientific社)、1% 非必須アミノ酸溶液 (Thermo Fisher Scientific社) 及びペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライテスク社) を含むOpti-MEM培地 (評価基礎培地) を100 μL添加し、37 °Cで4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0~100 ng/mLのHGFを加えるか、又は無細胞発現の反応液を当該培地に対して25~625倍希釈されるように加え、その評価基礎培地を細胞に100 μL添加した。37 °C、5% CO₂インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社) を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性 (Relative reporter activity) とした。

[0050] 図8に示されるとおり、aMD4dY-PA8-cys-Junを発現させた場合にはHGFと同程度の活性を示した一方で、aMD4dY-PA8-Junを発現させた場合には活性を示さなかった。このことから、システインが形成するジスルフィド結合による強固な二量体化が環状ペプチドの活性 (成長因子様の活性) を発揮するのに必要であることが明らかになった。

図9に示されるとおり、ヘパリン結合能を除去したaMD4dY-PA8-cys-JunΔh

epを発現させた場合も活性を示した。このことから、環状ペプチドの活性（成長因子様の活性）にロイシンジッパー領域のヘパリン結合能は必要ないことが明らかになった。

図10及び11に示されるとおり、aMD4dY-PA8-GCN4-cys及びaMD4dY-PA8-cys-CEBP α を発現させた場合、それぞれの二量体はシグナル活性化能を有することが明らかになった。このことから、二量体化ドメインにおいては、ホモダイマーを形成するロイシンジッパー領域を広く用いることが可能であると理解できた。

図12に示されるとおり、cys-Jun-PA8-aMD4dY及びJun-cys-PA8-aMD4dYを発現させた場合、それぞれの二量体はシグナル活性化能を有することが明らかになった。このことから、環状ペプチド、ペプチドリinker、システイン残基、ロイシンジッパー領域の順序を入れ替えても環状ペプチドの活性（成長因子様の活性）が得られることが理解できた。

図13に示されるとおり、N11タグをN末端に付加したコンストラクトを用いた場合でもシグナル活性化能を示すことが明らかになった。このことから、発現ポリペプチドのN末端にタグ配列を付加することも可能であると理解できた。

[0051] 実施例3：EMP-ロイシンジッパー融合体の活性評価

EMP-ロイシンジッパー融合体の二量体のEpoR活性化能をPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kit（DiscoverX社）を用いて評価した。

96-wellプレートにPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kitに含まれるEPO活性評価用細胞を播種し、24時間、37℃、5% CO₂下で培養を行った。細胞に対し、EMP-ロイシンジッパー融合体を含む無細胞発現の反応液を希釈して添加した。陰対照としては、この反応液と同じ倍率で希釈した、無細胞発現系に（x）で示される塩基配列の遺伝子を含まないこと以外は上記（1-9）に記載のとおり無細胞発現の処理を行った未反応液を添加した。3時間室温で刺激した細胞に対し、調製したSubstrate Reagent

を添加し、60分インキュベートした。化学発光強度をNivoプレートリーダー(Perkin Elmer社)で定量した。

結果を図14に示す。この結果より、EMP-PA8-cys-Junの二量体はEpoRを活性化することが明らかになった。

[0052] 実施例4：c-Met分子との結合に基づき、環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体ライブラリからHGF様活性分子を濃縮するスクリーニング

各々が環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体分子をコードする複数のDNAから無細胞翻訳により当該融合体を発現し、c-Metに結合する融合体分子および当該分子をコードするDNAを濃縮し、濃縮した融合体分子がHGF様活性を有することを確認した。当該実施例ではリボソームディスプレイ法と環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体を組み合わせることにより、磁気ビーズに固定化したc-Metに結合する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体とリボソーム、mRNA複合体との複合体を単離した。一連の操作により、c-Metに結合する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の鋳型DNAがライブラリより濃縮されること、および濃縮されたDNAの無細胞翻訳産物がc-Metを活性化するHGF様活性を有することを確認した。

[0053] (4-1) リボソームディスプレイ法に供する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の設計

設計した環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の配列を以下に示す。各融合体は「標的受容体結合環状ペプチド」-「ペプチドリinker」-「ロイシンジッパー」-「システイン」-「N11タグ」-「SecM配列」となるよう設計した。標的受容体結合環状ペプチドはc-Met結合環状ペプチド(aMD4dY)またはトロンボポエチン受容体結合環状ペプチド(TP0)またはエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド(EMP')を選択した。SecM配列(下記においてSecMと表記される。)は、FSTPVWISQAQGIRAG(配列番号:86)のアミノ酸配列で表される配列であり、リボソームの伸長反応を阻害することで、リボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体を形成させることを目的とするものである。下記においてGS3と表記される配列は、「グリシン」

－「セリン」の3回繰り返しからなる配列で、スペーサー配列である。

(A) aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3

MAETCRQFNRRTHEVWNLDCAAPAAPAPAAGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQK
VMNGCGGKDHLIHNHHKHEHAHAHLFSTPVWISQAQGIRAGGSGSGS (配列番号：71)

(B) TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3

MAETCADGPTLREWISFCGAAPAAPAPAAGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVM
NGCGGKDHLIHNHHKHEHAHAHLFSTPVWISQAQGIRAGGSGSGS (配列番号：72)

(C) EMP'-Jun-cys-N11-SecM-GS3

MAETCHMGPMTWVCGAAPAAPAPAAGGRIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNGCG
GKDHLIHNHHKHEHAHAHLFSTPVWISQAQGIRAGGSGSGS (配列番号：73)

[0054] (4-2) 環状ペプチドローロイシンジッパー融合体の鋳型DNAの構築

環状ペプチドローロイシンジッパー融合体を発現させる鋳型DNAとして、上記

(A) - (C) のアミノ酸配列をコードする塩基配列をそれぞれ設計した。さらに、これらの5'側には無細胞発現に必要なT7プロモーター配列及びリボソーム結合配列を付加し、3'側には終止コドンと非翻訳領域を付加した (D) - (F) を設計した。また、これらの鋳型DNAをPCRによって作成すべく、一重鎖DNA (G) - (O) を設計した。

(G) - (O) に示す一重鎖DNA配列は、ユーロフィンジェノミクス株式会社にて全合成を行った。

(D) aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3を発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCT
GGACTGTGGCGCAGCTCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAA
AGTTAAAACCTGAAAGCTCAGAACTCCGAAGTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGC
TCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACGGCTGCGGTGGCAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAACA
TGAGCAGCTCATGCCGAACACCTGTTTTCTACTCCTGTTTGGATTTCTCAAGCTCAAGGTATTCGTGC
TGGTGGTAGCGGTAGCGGTAGCTAGTGAATAACTAATCC (配列番号：74)

(E) TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3を発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTGCGGACGGTCCGACGTTACGCGAATGGATCAGCTTTTG
TGGCGCAGCTCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAA
AACCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCT
GAAACAGAAAGTTATGAACGGCTGCGGTGGCAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAAACATGAGCA
CGCTCATGCCGAACACCTGTTTTCTACTCCTGTTTGGATTTCTCAAGCTCAAGGTATTCGTGCTGGTGG
TAGCGGTAGCGGTAGCTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 7 5)

(F) EMP' -Jun-cys-N11-SecM-GS3を発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGTCATATGGGGCCAATGACCTGGGTGTGTGGCGCAGCTCC
CGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAAACCCTGAAAGC
TCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGT
TATGAACGGCTGCGGTGGCAAAGATCATCTCATCCACAATCATCACAAACATGAGCACGCTCATGCCGA
ACACCTGTTTTCTACTCCTGTTTGGATTTCTCAAGCTCAAGGTATTCGTGCTGGTGGTAGCGGTAGCGG
TAGCTAGTGAATAACTAATCC (配列番号 : 7 6)

(G) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 1

CAATGGCAGAGACCTGTGTCAGTTTAACCGTCGTACGCACGAAGTTTGAATCTGGACTGTGGCGCAG
CTCCCGC (配列番号 : 7 7)

(H) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 2

CAATGGCAGAGACCTGTGCGGACGGTCCGACGTTACGCGAATGGATCAGCTTTTGTGGCGCAGCTCCCG
C (配列番号 : 7 8)

(I) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 3

CAATGGCAGAGACCTGTCATATGGGGCCAATGACCTGGGTGTGTGGCGCAGCTCCCGC (配列番号
: 7 9)

(J) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 4

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCTGT (配列番号 : 8 0)

(K) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 5

TGTGGCGCAGCTCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTT
AAAACCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAG
CTGAAACAGAAAGTTATGAAC (配列番号 : 8 1)

(L) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 6
ACCAGCACGAATACCTTGAGCTTGAGAAATCCAAACAGGAGTAGAAAAACAGGTGTTCCGGCATGAGCGTG
CTCATGTTTGTGATGATTGTGGATGAGATGATCTTTGCCACCGCAGCCGTTCACTTTCTGTTTCAG
C (配列番号 : 8 2)

(M) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 7
GGATTAGTTATTTACTAGCTACCGCTACCGCTACCAACAGCAGCAATACCTTG (配列番号 : 8 3
)

(N) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 8 (selec_PCR_F1.F
39)
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTT (配列番号 : 8 4)

(O) (D) - (F) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 9 (selec_PCR_R2.R
24)
GGATTAGTTATTTACTAGCTACCG (配列番号 : 8 5)

[0055] (4 - 3) ライブラリの作製

PCRによりaMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP'
'-Jun-cys-N11-SecM-GS3の3種類のDNA配列を作製した。aMD4dY-Jun-cys-N11
-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP'-Jun-cys-N11-SecM-GS3のDNA
を1:50:50の割合で混合したDNA mixを作製した。

[0056] (4 - 4) 転写反応によるmRNAライブラリの作製

T7 RNA polymeraseを使用してDNAの転写を実施した。転写には、T7 RNA po
lymerase (タカラバイオ、2540A) とrNTPs (プロメガ、E6000) を使用した。
11 μ Lの超純水、2 μ Lの10x T7 RNA polymerase buffer、2 μ Lの50 mM DTT
、2 μ Lの25 mM rNTPs、1 μ LのT7 RNA polymeraseと1 μ LのDNA mixを混ぜ
て、37°Cの恒温槽で6時間反応させた。その後、50 mM EDTA溶液を加えた。RN
A Clean & Concentrator 5 (ZYMO RESEARCH、R1015) で精製し、2 μ MのmRNA

mixとした。

[0057] (4-5) mRNAライブラリの翻訳およびリボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体の形成

調製したライブラリの翻訳発現にはPURExpress Δ RF1,2,3 kitを用いた。2 μ Lのsolution A、1.5 μ Lのsolution B、1 μ LのmRNA mixと0.5 μ Lの超純水を混ぜて、37 °C恒温槽で2時間培養した。反応後、反応容器を氷上に静置し、形成したリボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体に氷冷した1x TBSM-T buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、50 mM MgCl₂、0.05% Tween 20) を20 μ L加えた。この複合体反応溶液を下記(4-7)で用いた。

[0058] (4-6) 標的分子の固定化

磁気ビーズへの標的分子の固定化を実施した。5 μ Lの2 pM Recombinant Human HGFR/c-MET Fc Chimera Protein (R&D systems、8614-MT-100)、5 μ L slurryのDynabeads (invitrogen、DB10003) と10 μ L の1x TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) を混ぜ合わせ、4°Cで30分転倒混和した。磁気ビーズを1x TBS-T buffer 100 μ Lで3回洗浄し、その後10 μ Lの1x TBS-T bufferで再懸濁して氷上に静置した。

[0059] (4-7) リボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体と標的分子との混合、単離

磁気ビーズ懸濁液から1x TBS-T bufferを除去し、そこへ上記(4-5)の複合体反応溶液を全量入れた。ゆっくりと再懸濁後、4°Cで30分転倒混和した。磁気ビーズ懸濁液を氷冷した1x TBSM-T buffer 200 μ Lで3回洗浄した。ネオジム磁石を用いて単離した磁気ビーズに20 μ L の1x TBS-T buffer、5 μ L 500 mM EDTA水溶液を加え、よく混ぜた後室温に5分静置し、リボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体からmRNAを遊離させた。

[0060] (4-8) mRNAの精製

回収した溶液からRNA Clean & Concentrator 5を用いてmRNAを精製した。

[0061] (4-9) 精製したmRNAの逆転写

精製したmRNAをSuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen、18064022) によって逆転写した。精製したmRNA溶液 1 μ Lと、100 μ Mのselec_PCR_R2.R24 0.5 μ L、dNTPs 2.5 μ L、超純水 2 μ Lとを混ぜ合わせ、70°Cで5分加熱した。室温でゆっくりと冷却し、卓上遠心装置で遠心を行った。5x First-strand buffer 2 μ L、0.1 M DTT溶液 1 μ L、超純水0.5 μ LとSuperScript II Reverse Transcriptase 0.5 μ Lを順番に添加し、42°Cの条件で50分反応させてmRNA-cDNA複合体を得た。

[0062] (4-10) cDNAのPCR増幅

回収したcDNAをPCRによって増幅した。PCRには、KOD -Plus- Ver.2 (東洋紡、KOD-211) を使用した。逆転写反応の完了した溶液4 μ Lに、10x PCR buffer 10 μ L、250 mM MgSO₄ 4 μ L、2mM dNTPs 10 μ L、100 μ M selec_PCR_F1.F39 1 μ L、100 μ M selec_PCR_R2.R24 1 μ L、超純水 63 μ L、KOD -Plus- 2 μ Lを混ぜ、94°C 30秒→55°C 40秒→68°C 60 秒の条件でサイクルを作成し、20-25サイクル繰り返した。回収したDNAをDNA mix2とした。

[0063] (4-11) cDNAのDNA長分析

aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP' -Jun-cys-N11-SecM-GS3の3種類のDNAとDNA mix、DNA mix2を2100 Bioanalyzer (Agilent technologies) で評価した。結果を図15に示す。レーン1-5はそれぞれ順番に、aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP' -Jun-cys-N11-SecM-GS3、DNA mix、DNA mix2に対応する。リボソームディスプレイ法を実施した後に得られたDNA mix2のバンドをDNA mixのバンドと比較したところ、DNA長が長くなる方向へのシフトが確認され、DNA mix2において、aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3をコードするDNAと同一のDNA長を示すバンドが最も高い強度を示した。

[0064] (4-12) 増幅したcDNAから無細胞翻訳した産物の活性評価

aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP' -Jun-cys-N11-SecM-GS3の3種類のDNAとDNA mix、DNA mix2を用い、PUREfrex2.0によって無細胞翻訳を行い、それぞれの無細胞翻訳産物をルシフェラーゼアッセ

イ活性により評価した。無細胞翻訳は各DNA20 ngに対し、2.5 μ LのSolution I、0.25 μ LのSolution II、0.5 μ LのSolution III、1.75 μ Lの水を添加し、37 $^{\circ}$ Cで6時間インキュベーションすることで翻訳反応を行った。

レポーターアッセイは以下の通り実施した。Opti-MEM培地 (Thermo Fisher Scientific社) 25 μ Lに対し、0.6 μ LのAttractene Transfection Reagent (QIAGEN社) を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μ Lと1 μ LのSRE reporter vector (QIAGEN社) の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS (Thermo Fisher Scientific社)、1% 非必須アミノ酸溶液 (Thermo Fisher Scientific社) 及びペニシリンーストレプトマイシン (ナカライテスク社) を含むOpti-MEM培地 (評価基礎培地) を100 μ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0~100 ng/mL HGFを加えるか、又は上記無細胞発現の反応液を当該培地に対して25~625倍希釈されるように加え、その評価基礎培地を細胞に100 μ L添加した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社) を使用した。100 μ Lの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μ L添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μ LのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性 (Relative SRE reporter activity) とした。

結果を図 16 に示す。DNA mix は相対的受容体活性を示さないのに対し、DNA mix2 では HGF と同様の活性を持つことが明らかとなった。また、aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、EMP'-Jun-cys-N11-SecM-GS3 それぞれの無細胞翻訳産物の中では aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3 しか活性を示さないことから、DNA mix2 は aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3 が濃縮されたものであることがわかった。以上の結果より、当該手法により複数のディスプレイされた環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体を含むライブラリから、標的分子との結合親和性を持ちかつ結合に起因する活性を有する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体を取得できることが明らかとなった。

[0065] 実施例 5 : EP0 受容体分子との結合に基づいた環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体ライブラリから活性分子の濃縮をするスクリーニング方法

実施例 4 にて実施したスクリーニング方法が標的分子に関わらず可能であることを示すため、複数の環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体分子から EP0 受容体に結合するペプチドを濃縮し、濃縮した DNA の EP0 受容体に対する結合に基づいた活性の有無を確認した。当該実施例ではリボソームディスプレイ法と環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体を組み合わせて、磁気ビーズに固定化した EP0 受容体に結合する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体とリボソーム、mRNA 複合体との複合体を回収した。一連の操作により、EP0 受容体に結合する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の鋳型 DNA がライブラリより濃縮されることを確認した。

[0066] (5-1) リボソームディスプレイ法に供する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の設計

実施例 4 に加えて新たに設計した環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体の配列を以下に示す。

(i) EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3

MAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAGGRIARLEEKVKTLLKAQNSELASTANMLREQVAQL
KQKVMNGCGGKDHLIHNHHKHEHAHAHLFSTPVWISQAQGIRAGGSGSGS (配列番号 : 87)

(5-2) EMP-ロイシンジッパー融合体の鋳型 DNA の構築

EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3を発現させる鋳型DNAとして、上記 (i) のアミノ酸配列をコードする塩基配列をそれぞれ設計した。さらに、これらの5'側には無細胞発現に必要なT7プロモーター配列及びリボソーム結合配列を付加し、3'側には終止コドンと非翻訳領域を付加した(ii)を設計した。また、これらの鋳型DNAをPCRによって作成すべく、一重鎖DNA(iii) - (ix)を設計した。

(iii) - (ix) に示す一重鎖DNA配列は、ユーロフィンジェノミクス株式会社にて全合成を行った。

(ii) EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3を発現するための塩基配列

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACCAATGGCAGAGACCGGTGGCCTGTATGCGTGCCATATGGGGCCAATGACCTGGGT
GTGTCAGCCGTTACGCGGCGCAGCTCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTCGTATCGCTCGTCT
GGAAGAAAAAGTTAAACCCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGA
ACAGGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACGGCTGCGGTGGCAAAGATCATCTCATCCACAATCA
TCACAAACATGAGCAGCTCATGCCGAACACCTGTTTTCTACTCCTGTTTGGATTTCTCAAGCTCAAGG
TATTCGTGCTGGTGGTAGCGGTAGCGGTAGCTAGTGAATAACTAATCC (配列番号：88)

(iii) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 1 (配列番号：77で示される)

(iv) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 2

ATACCAATGGCAGAGACCGGTGGCCTGTATGCGTGCCATATGGGGCCAATGACCTGGGTGTGTCAGCCG
TTACGCGGCGCAGCTCCCGCAG (配列番号：89)

(v) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 3

GGCGCAGCTCCCGCAGCACCAGCTCCAGCAGCAGGCGGTCGTATCGCTCGTCTGGAAGAAAAAGTTAAA
ACCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAACATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTG
AAACAGAAAGTTATGAAC (配列番号：90)

(vi) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 4 (配列番号：82で示される)

(vii) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 5 (配列番号：83で

示される)

(viii) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 6 (selec_PCR_F1.F39、配列番号：84で示される)

(ix) (ii) を作製するための一重鎖DNAの塩基配列 7 (selec_PCR_R2.R24、配列番号：85で示される)

[0067] (5-3) ライブラリの作製

PCRによりEMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3のDNA配列を作製した。amd4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3及びTP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3の2種類のDNA配列は実施例4にて作製したものを使用した。EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、amd4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3のDNAを1:50:50の割合で混合したDNA mixを作製した。

[0068] (5-4) 転写反応によるmRNAライブラリの作製

T7 RNA polymeraseを使用してDNAの転写を実施した。転写には、T7 RNA polymerase (タカラバイオ、2540A) とrNTPs (プロメガ、E6000) も使用した。11 μ Lの超純水、2 μ Lの10x T7 RNA polymerase buffer、2 μ Lの50 mM DTT、2 μ Lの25 mM rNTPs、1 μ LのT7 RNA polymeraseと1 μ LのDNA mixを混ぜて、37°Cの恒温槽で6時間反応させた。その後、50 mM EDTA溶液を加えた。RNA Clean & Concentrator 5 (ZYMO RESEARCH、R1015) で精製し、2 μ MのmRNA mixとした。

[0069] (5-5) mRNAライブラリの翻訳およびリボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体の形成

調製したライブラリの翻訳発現にはPURExpress Δ RF1,2,3 kitを用いた。2 μ Lのsolution A、1.5 μ Lのsolution B、1 μ LのmRNA mixと0.5 μ Lの超純水を混ぜて、37 °C恒温槽で2時間培養した。反応後、反応容器を氷上に静置し、形成したリボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体に氷冷した1x TBSM-T buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、50 mM MgCl₂、0.05% Tween 20) を20 μ L加えた。

[0070] (5-6) 標的分子の固定化

磁気ビーズへの標的分子の固定化を実施した。5 μ Lの2 pM Recombinant Human Erythropoietin R Fc Chimera Protein, CF (R&D systems、963-ER-50)、5 μ L slurryのDynabeads (invitrogen、DB10003) と10 μ L の1x TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) を混ぜ合わせ、4℃で30分転倒混和した。磁気ビーズを1x TBS-T buffer 100 μ Lで3回洗浄し、その後10 μ Lの1x TBS-T bufferで再懸濁して氷上に静置した。

[0071] (5-7) リボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体と標的分子との混合、回収

磁気ビーズ懸濁液から1x TBS-T bufferを除去し、そこへ上記(5-5)の複合体反応溶液を全量入れた。ゆっくりと再懸濁後、4℃で30分転倒混和した。磁気ビーズ懸濁液を氷冷した1x TBSM-T buffer 200 μ Lで3回洗浄した。ネオジム磁石を用いて単離した磁気ビーズに20 μ L の1x TBS-T buffer、5 μ L 500 mM EDTA水溶液を加え、よく混ぜた後室温に5分静置し、リボソーム-環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体-mRNA複合体からmRNAを遊離させた。

[0072] (5-8) mRNAの精製

回収した溶液からRNA Clean & Concentrator 5を用いてmRNAを精製した。

[0073] (5-9) 精製したmRNAの逆転写

精製したmRNAをSuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen、18064022) によって逆転写した。精製したmRNA溶液 1 μ Lと、100 μ Mのselec_PCR_R2.R24 0.5 μ L、dNTPs 2.5 μ L、超純水 2 μ Lとを混ぜ合わせ、70℃で5分加熱した。室温でゆっくりと冷却し、卓上遠心装置にかけた。5x First-strand buffer 2 μ L、0.1 M DTT溶液 1 μ L、超純水0.5 μ LとSuperScript II Reverse Transcriptase 0.5 μ Lを順番に添加し、42℃の条件で50分反応させてmRNA-cDNA複合体を得た。

[0074] (5-10) cDNAのPCR増幅

回収したcDNAをPCRによって増幅した。PCRには、KOD -Plus- Ver.2 (東洋紡、KOD-211) を使用した。逆転写反応の完了した溶液4 μ Lに、10x PCR buffer 10 μ L、250 mM MgSO₄ 4 μ L、2mM dNTPs 10 μ L、100 μ M selec_PCR_F1

.F39 1 μ L、100 μ M selec_PCR_R2.R24 1 μ L、超純水 63 μ L、KOD -Plus-2 μ Lを混ぜ、94°C 30秒→55°C 40秒→68°C 60 秒の条件でサイクルを作成し、20-25サイクル繰り返した。回収したDNAをDNA mix2とした。

[0075] (5-11) cDNAのDNA長分析

EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、amd4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3の3種類のDNAとDNA mix、DNA mix2を2100 Bioanalyzer (Agilent technologies) で評価した。結果を図17に示す。レーン1-5はそれぞれ順番に、EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、amd4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3、DNA mix、DNA mix2に対応する。リボソームディスプレイ法を実施した後に得られたDNA mix2のバンドをDNA mixのバンドと比較したところ、DNA長が長くなる方向へのシフトが確認され、DNA mix2において、EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3をコードするDNAと同一のDNA長を示すバンドが最も高い強度を示した。

[0076] (5-12) 増幅したcDNAから無細胞翻訳した産物の活性評価

EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、amd4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3の3種類のDNAとDNA mix、DNA mix2、更には無添加群に相当するDNA不含の蒸留水を用い、それぞれPUREfrex2.0 (ジーンフロンティア) によって無細胞翻訳を行った。各DNA20 ngに対し、2.5 μ LのSolution I、0.25 μ LのSolution II、0.5 μ LのSolution III、1.75 μ Lの水を添加し、37 °Cで6時間インキュベーションすることで翻訳反応を行った。

これらの無細胞翻訳産物をPathHunter (登録商標) eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kit (DiscoverRx社) により評価した。96-wellプレートにPathHunter (登録商標) eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kitに含まれるEPO活性評価用細胞を播種し、24時間、37 °C、5% CO₂下で培養を行った。細胞に対し、培地中に上記無細胞発現系の反応液の濃度が5段階希釈 (1/110、1/330、1/990、1/2970及び1/8910) となるように、またはrecombinant human EPO 50 μ g/mLが培地中に1/110の濃度となるように添加した。3時間室温で刺激した細胞に対し、調製したSubstrate Reagentを添加し、60分インキュベ

トした。化学発光強度をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で定量した。

結果を図18に示す。化学発光強度から算出される相対的受容体活性についてDNA mixとDNA mix2とを比較して、DNA mix2のみ活性を持つことが明らかとなった。また、EMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3、aMD4dY-Jun-cys-N11-SecM-GS3、TP0-Jun-cys-N11-SecM-GS3それぞれの無細胞翻訳産物の活性から、DNA mix 2はEMP-Jun-cys-N11-SecM-GS3が濃縮されたものであることがわかった。

以上の結果より、当該手法により複数のディスプレイされたポリペプチド（環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体）を含むライブラリから、標的分子との結合親和性を持ちかつ結合に基づいた活性を有する環状ペプチド-ロイシンジッパー融合体を取得できることが明らかとなった。また、実施例4の結果と合わせて、標的分子も限定されないことが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法であって、
- (1) 無細胞発現系で、
- 環状ペプチド、
- システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに
- 前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー
- を含む少なくとも1種のポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する工程、及び
- (2) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記方法。
- [請求項2] 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法であって、
- (1) 無細胞発現系で、
- 環状ペプチド、
- システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに
- 前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー
- を含む少なくとも1種のポリペプチドを合成することにより得られた前記ポリペプチドの二量体を用意する工程、及び
- (2) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記方法。
- [請求項3] 工程(1)において、前記少なくとも1種のポリペプチドが、前記標的分子との結合親和性を有すると見込まれる複数の異なるポリペプチドを含み、かつ工程(2)において、前記複数の異なるポリペプチドの二量体について、前記標的分子との結合に基づく活性を測定することを含む、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項4] 工程（１）が、前記少なくとも１種のポリペプチド又は前記二量体を複数含むライブラリを作製することを含み、又は工程（１）が、前記少なくとも１種のポリペプチド又は前記二量体を複数含むライブラリを用意することを含み、

複数の前記ポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 無細胞発現系で複数のポリペプチドを合成することを含む、前記複数のポリペプチド又は前記複数のポリペプチドの二量体を含むライブラリを作製する方法であって、前記複数のポリペプチドが、各々、環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含み、前記複数のポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記方法。

[請求項6] 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングするためのライブラリであって、複数のポリペプチド若しくは前記複数のポリペプチドの二量体、又は前記複数のポリペプチドをコードする複数の核酸を含み、前記複数のポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含み、前記複数のポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記ライブラリ。

[請求項7] ８種以上のポリペプチド若しくは前記８種以上のポリペプチドの二

量体、又は前記 8 種以上のポリペプチドをコードする 8 種以上の核酸を含む、請求項 6 に記載のライブラリ。

[請求項 8] 複数のポリペプチドの二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、請求項 6 又は 7 に記載のライブラリを用いて二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法。

[請求項 9] 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングする方法であって、

(1) 複数のディスプレイされたポリペプチドを含むライブラリから、標的分子との結合親和性を有する 1 つ又は複数のポリペプチドを取得する工程であって、前記複数のディスプレイされたポリペプチドが、各々、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、該取得工程、及び

(2) 工程 (1) において取得した前記ポリペプチドと関連付けられた核酸を回収する工程、

(3) 工程 (2) において回収した前記核酸を増幅する工程、

(4) 工程 (3) において増幅した前記核酸を用いて、無細胞発現系で、

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー

を含むポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製する

工程、及び

(5) 前記二量体の標的分子との結合に基づく活性を測定する工程を含む、前記方法。

[請求項10] 工程(1)が、取得した複数の前記ポリペプチドに基づき、複数のディスプレイされたポリペプチドを含む更なるライブラリを作製すること、及び前記更なるライブラリから、標的分子との結合親和性を有する1つ又は複数のポリペプチドを取得することを繰り返すことを含む、請求項9に記載の方法。

[請求項11] 二量体化した環状ペプチドをスクリーニングするためのライブラリであって、複数のディスプレイされたポリペプチド又は前記複数のディスプレイされたポリペプチドを発現させるための複数の核酸を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチドが、各々、
環状ペプチド、
システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに
前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカー
を含み、前記複数のディスプレイされたポリペプチド間で異なる環状ペプチドが含まれている、前記ライブラリ。

[請求項12] 10⁵種以上のディスプレイされたポリペプチド又は前記10⁵種以上のディスプレイされたポリペプチドを発現させるための10⁵種以上の核酸を含む、請求項11に記載のライブラリ。

[請求項13] 請求項1～4及び8～10のいずれか1項に記載の方法によって標的分子との結合に基づく活性を測定して、標的分子との結合に基づく活性を有する二量体化した環状ペプチドを得る方法。

[請求項14] 二量体化した環状ペプチドを調製する方法であって、
無細胞発現系で、
環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチドを合成し、前記ポリペプチドの二量体を調製することを含む、前記方法。

[請求項15]

環状ペプチド、

システイン残基及びロイシンジッパー領域を含む二量体化ドメイン、並びに

前記環状ペプチドと前記二量体化ドメインとの間に存在するペプチドリンカーを含むポリペプチド。

[請求項16]

前記二量体化ドメインにおいて、システイン残基の数が1つである、請求項15に記載のポリペプチド。

[請求項17]

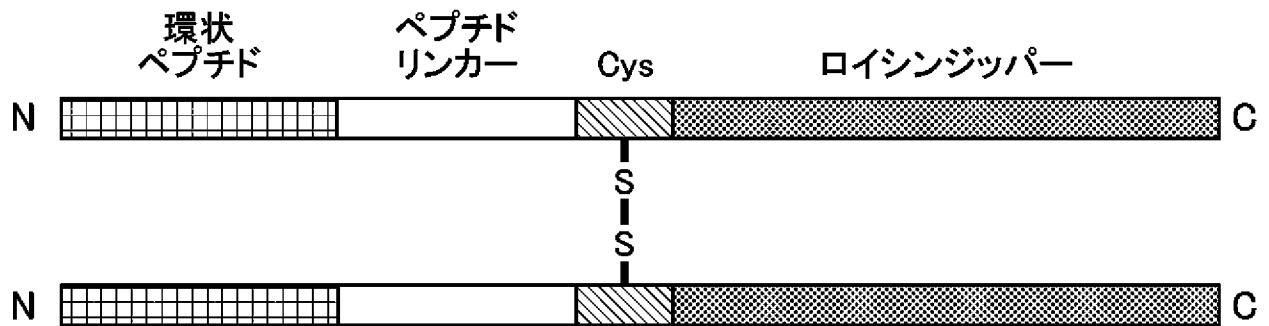
前記ペプチドリンカーが、アラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択される1つ又は複数のアミノ酸残基からなる、請求項15又は16に記載のポリペプチド。

[請求項18]

請求項15～17のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする核酸。

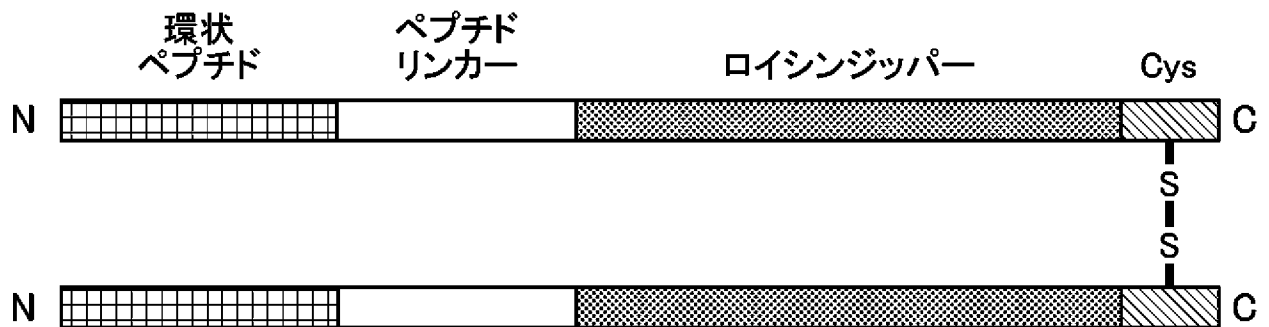
[図1]

FIG.1



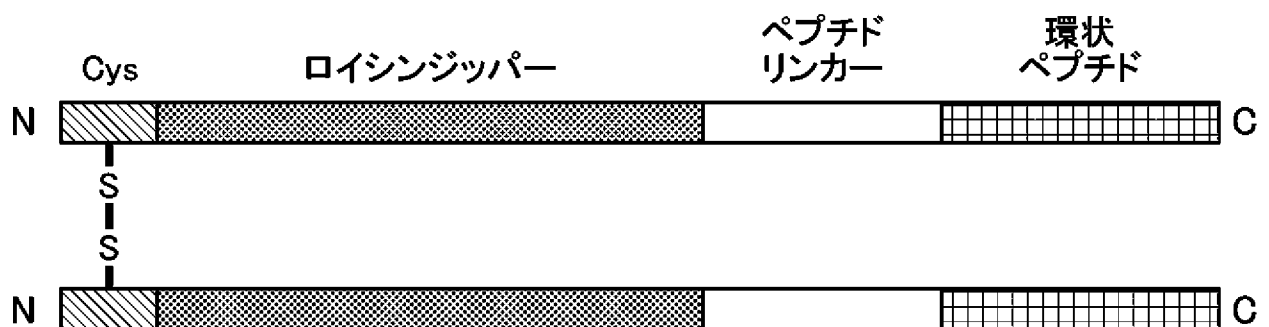
[図2]

FIG.2



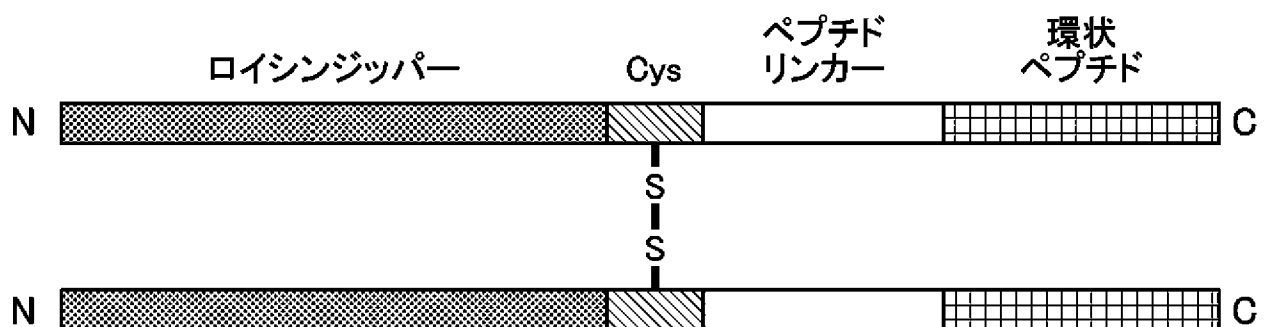
[図3]

FIG.3



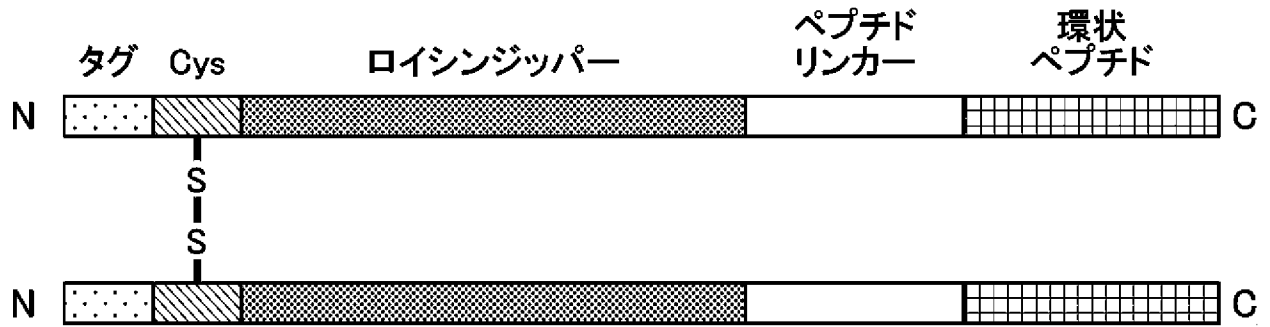
[図4]

FIG.4



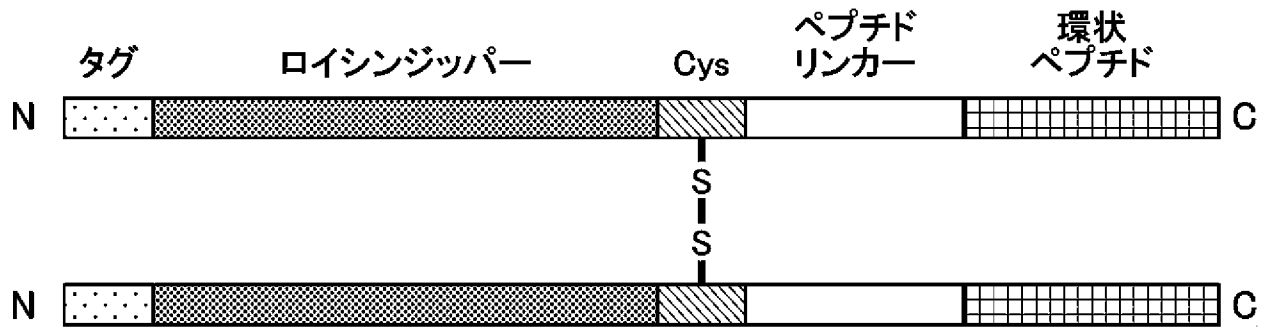
[図5]

FIG.5



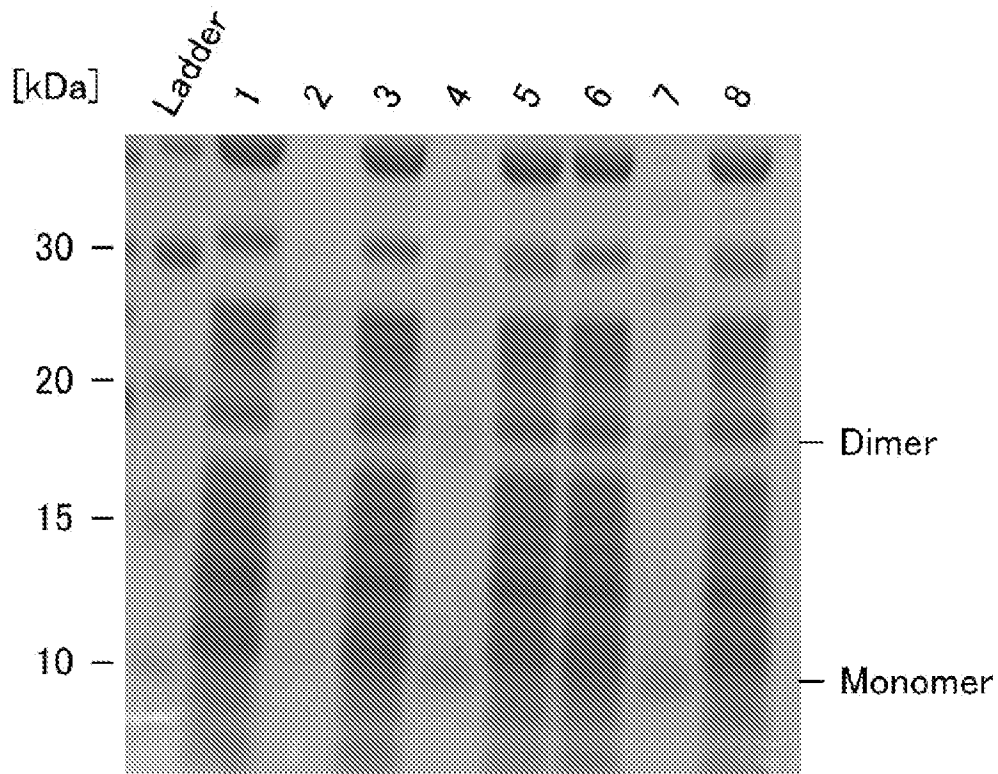
[図6]

FIG.6



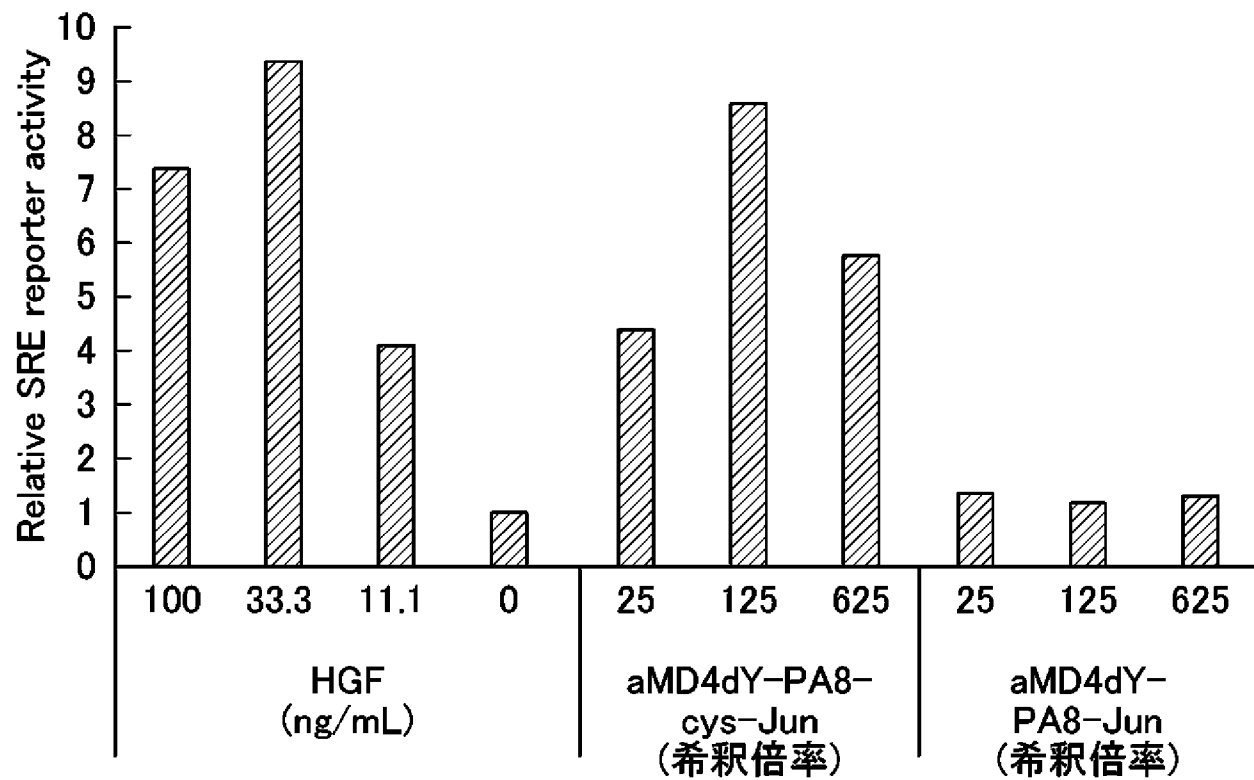
[図7]

FIG.7



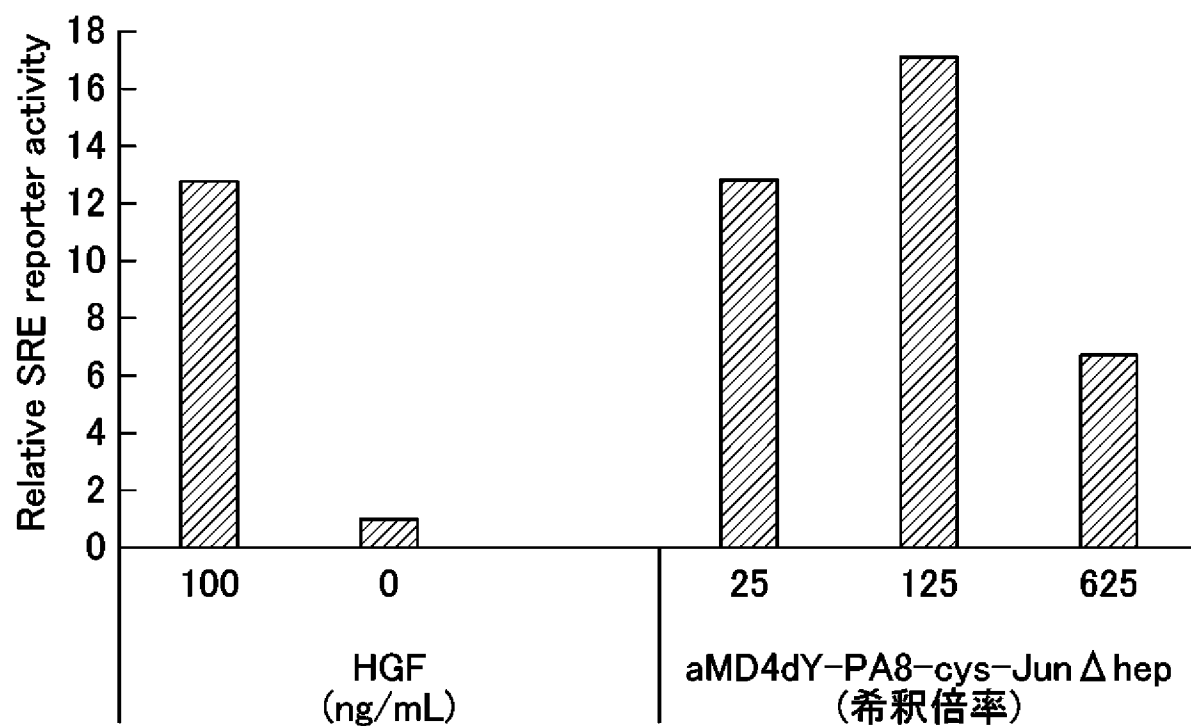
[図8]

FIG.8



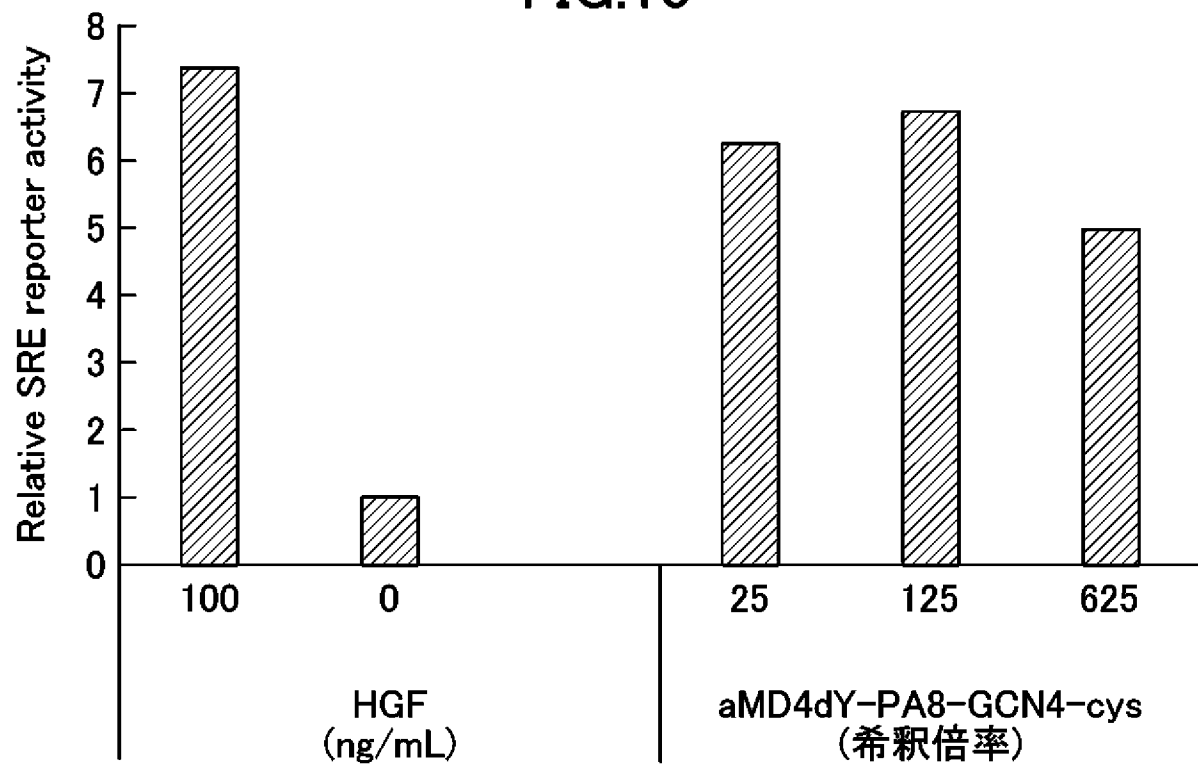
[図9]

FIG.9



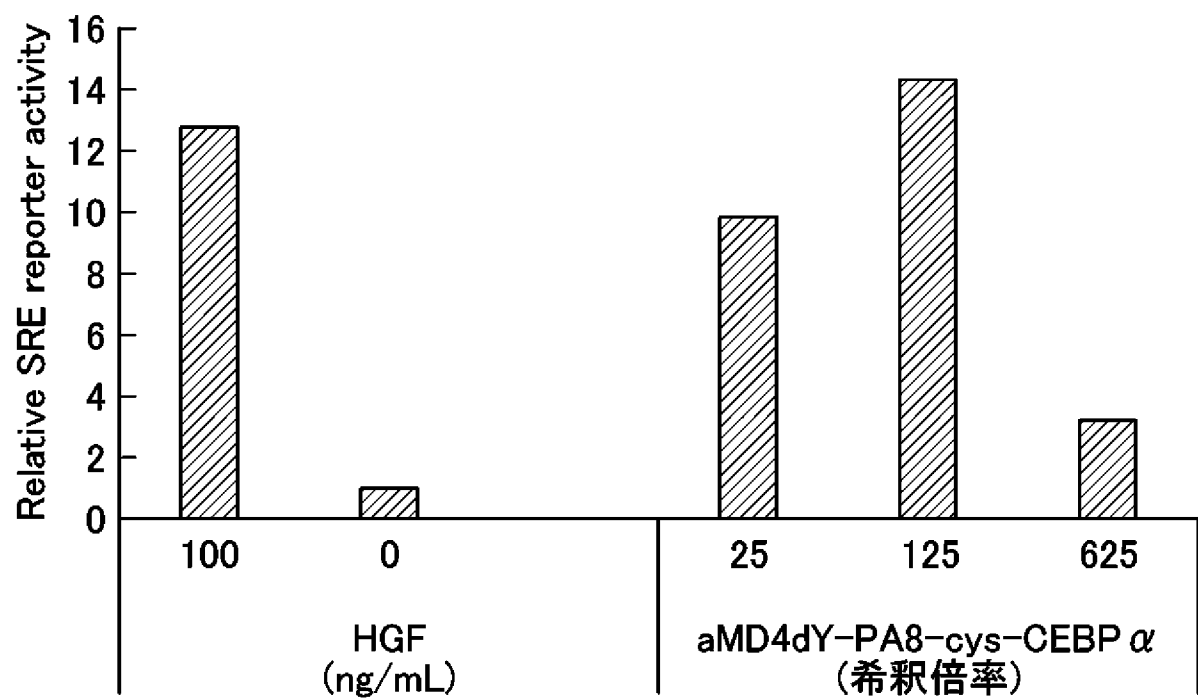
[図10]

FIG.10



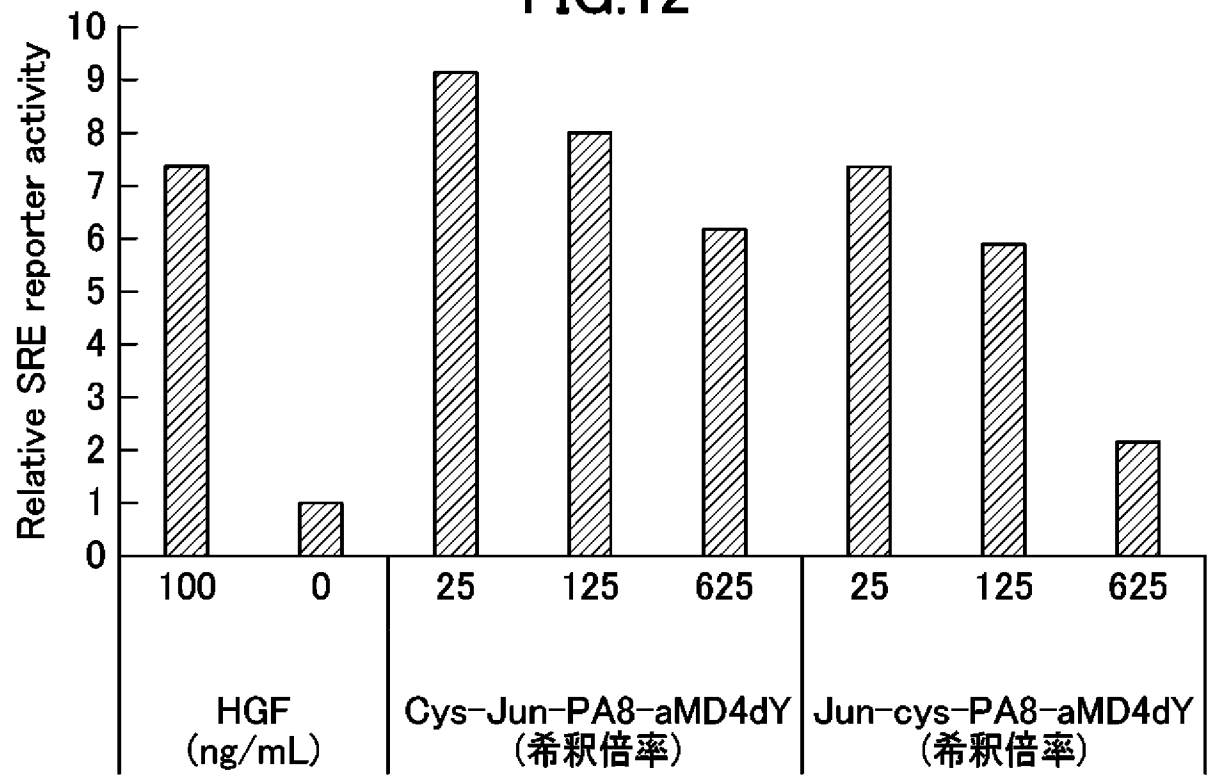
[図11]

FIG.11



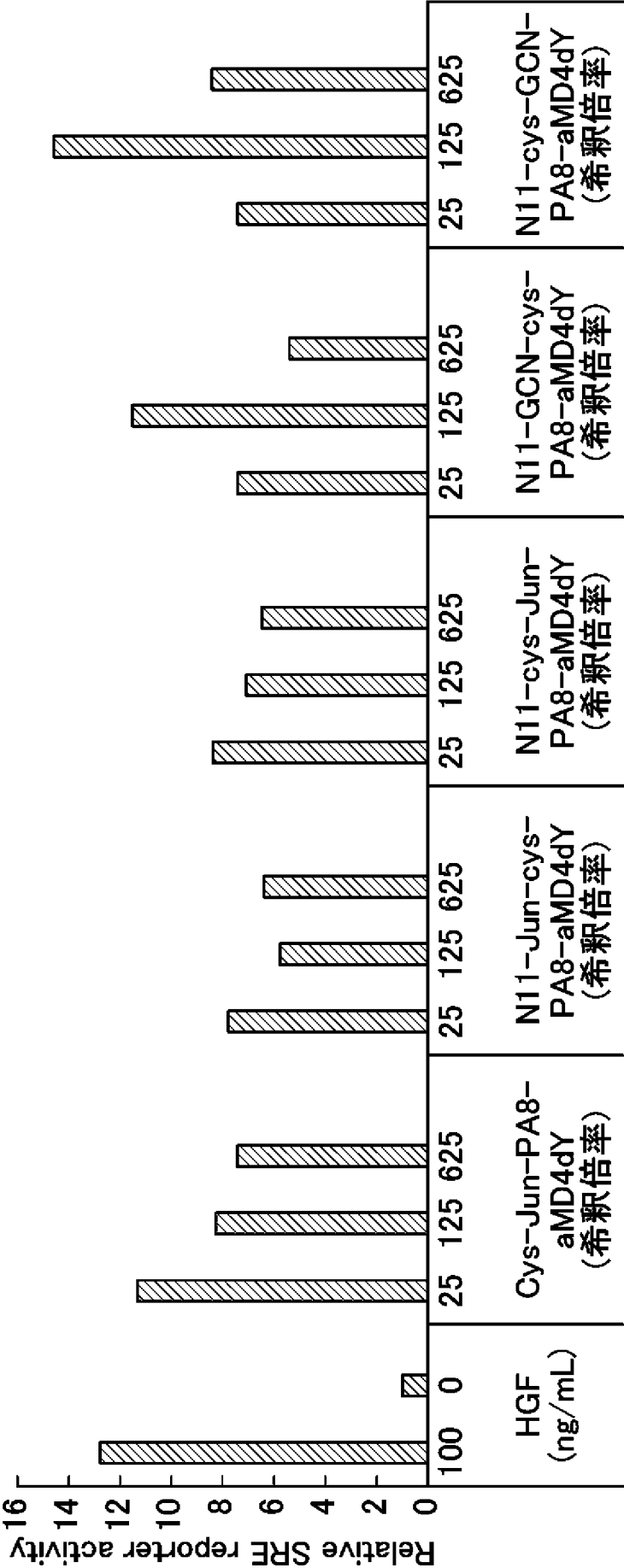
[図12]

FIG.12



[図13]

FIG.13



[図14]

FIG.14

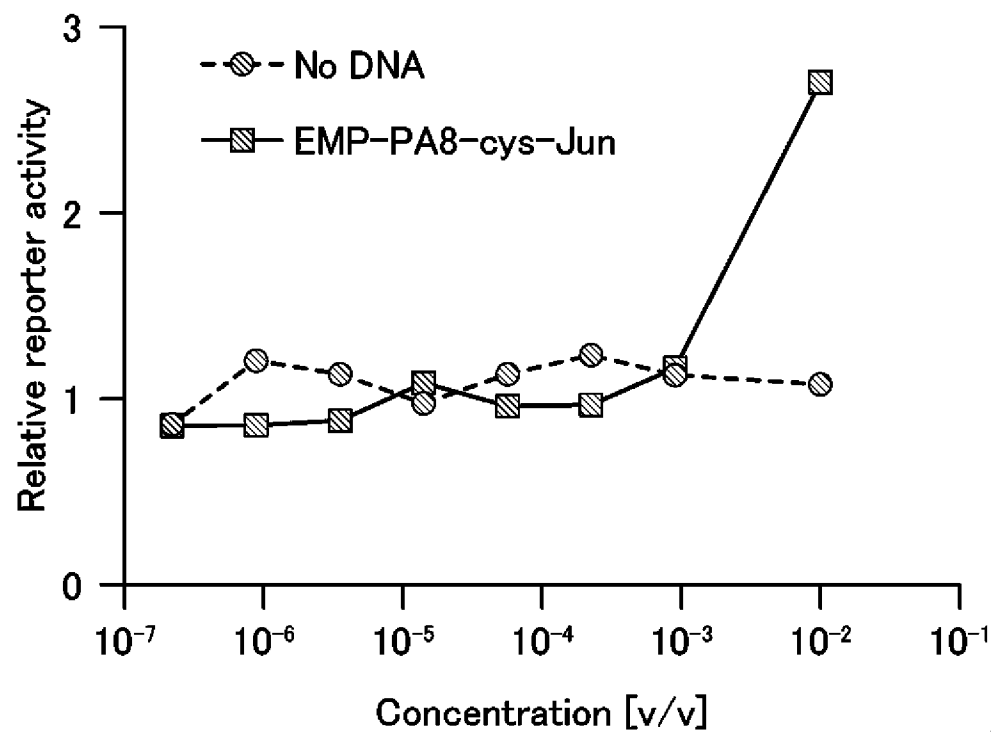
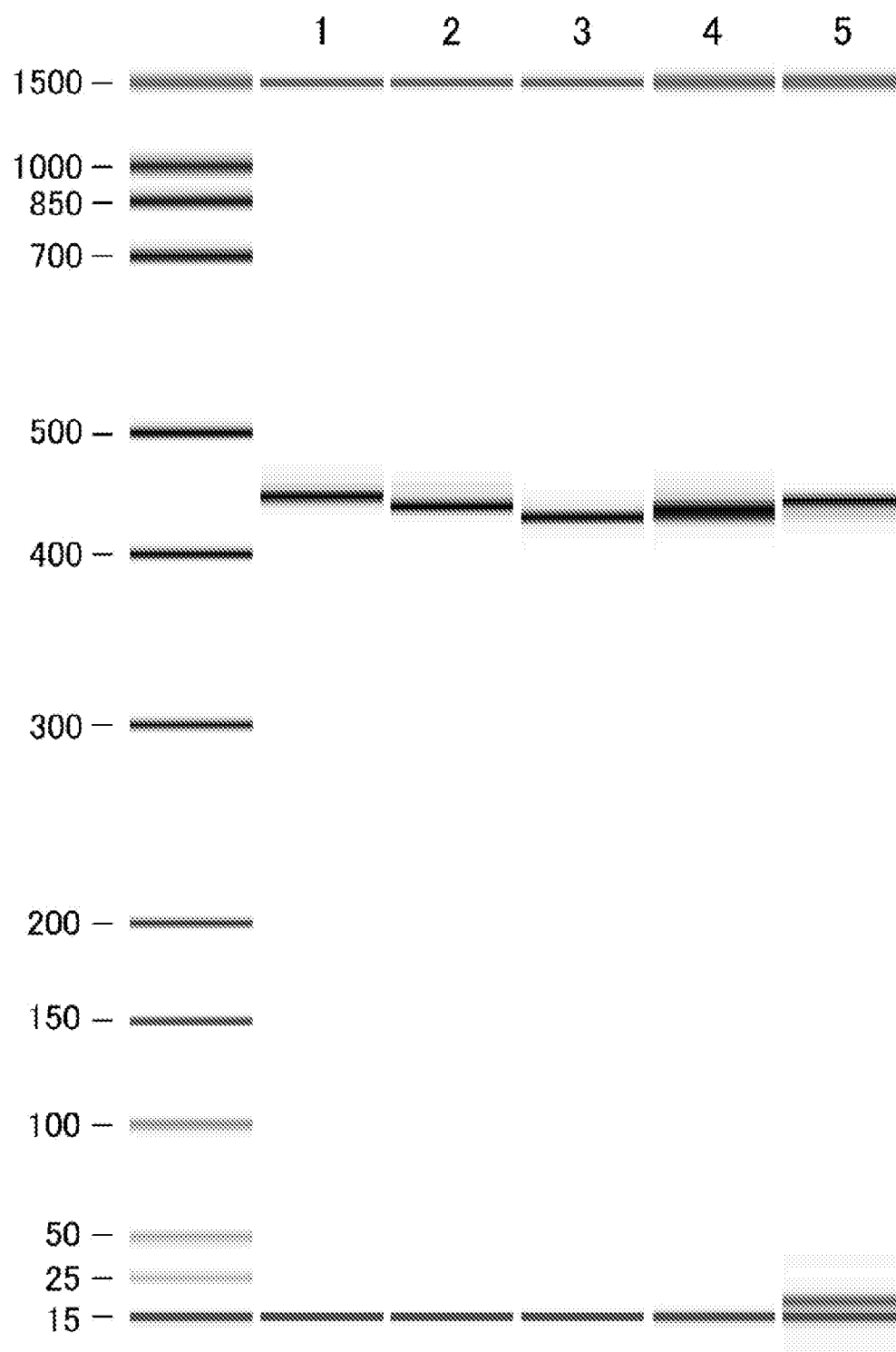
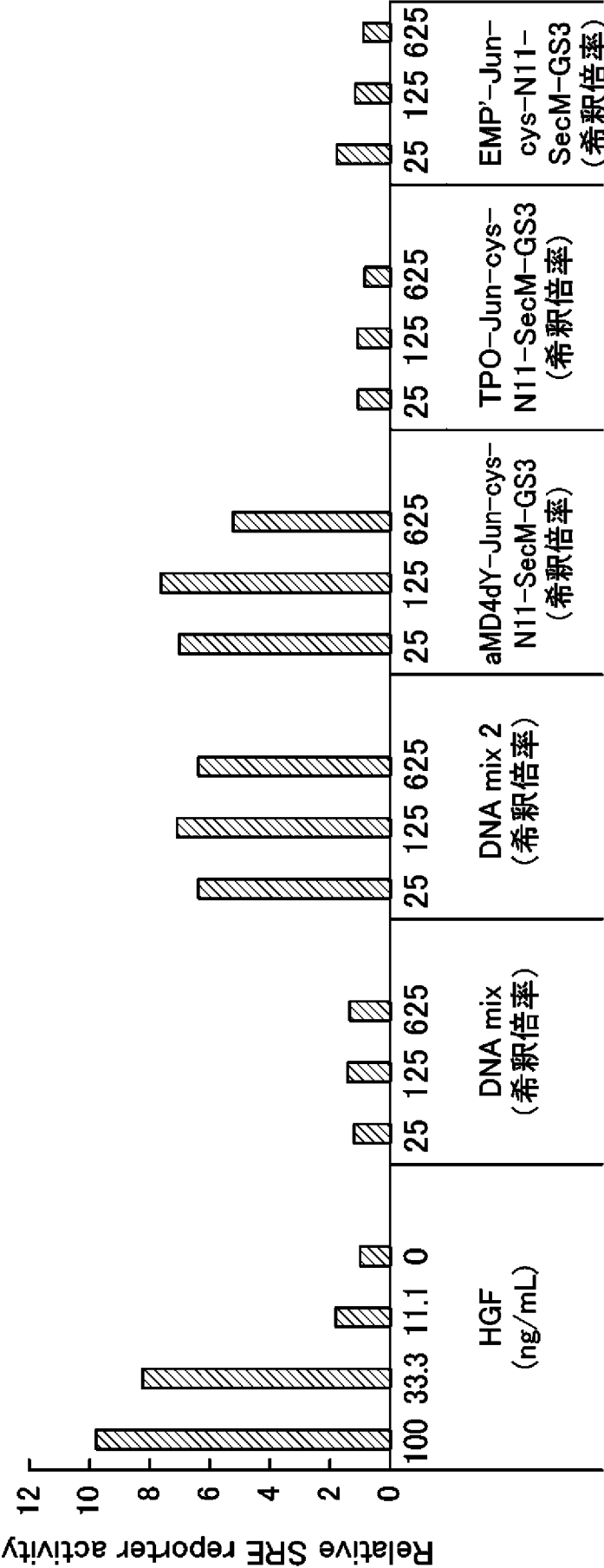


FIG. 15



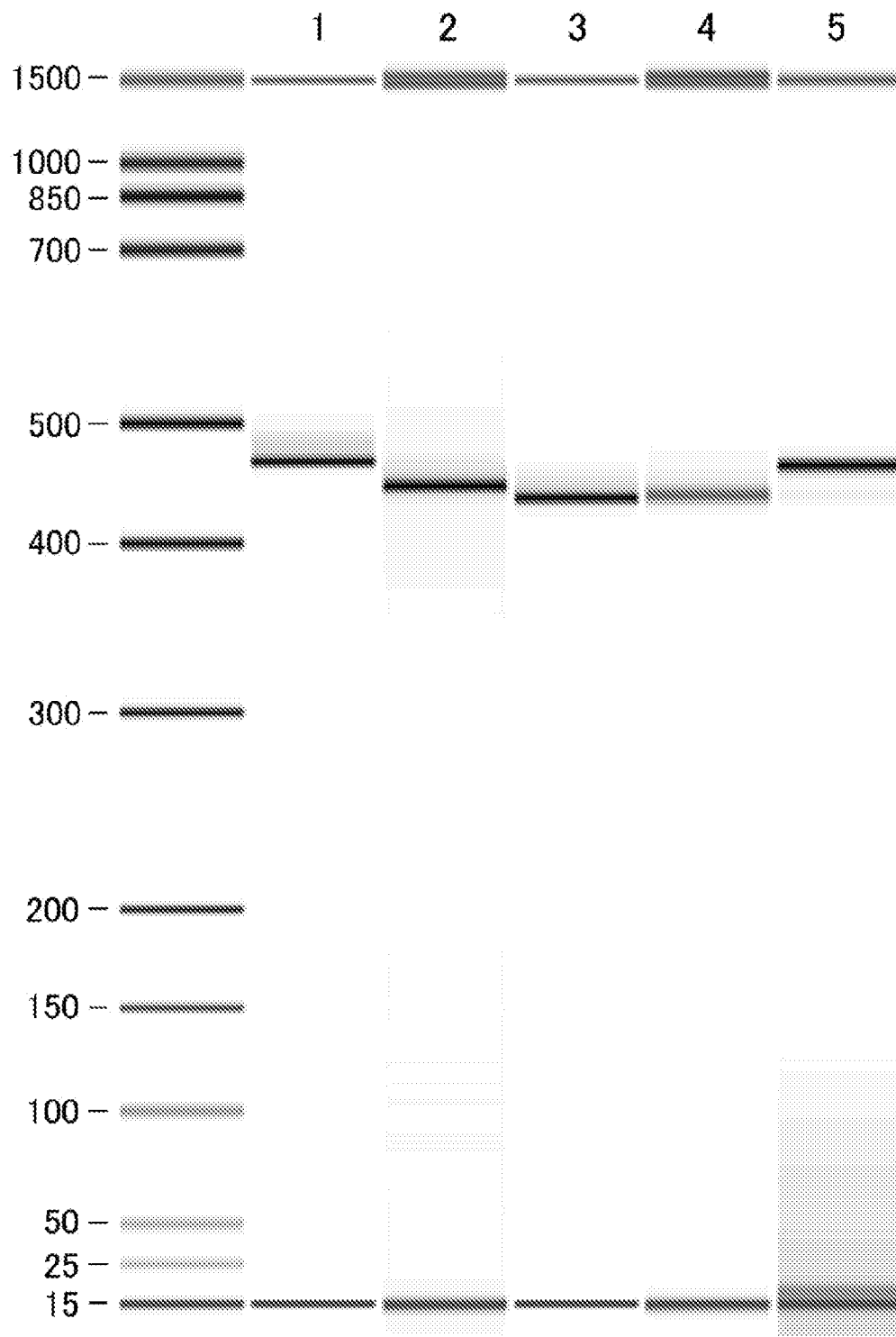
[図16]

FIG.16



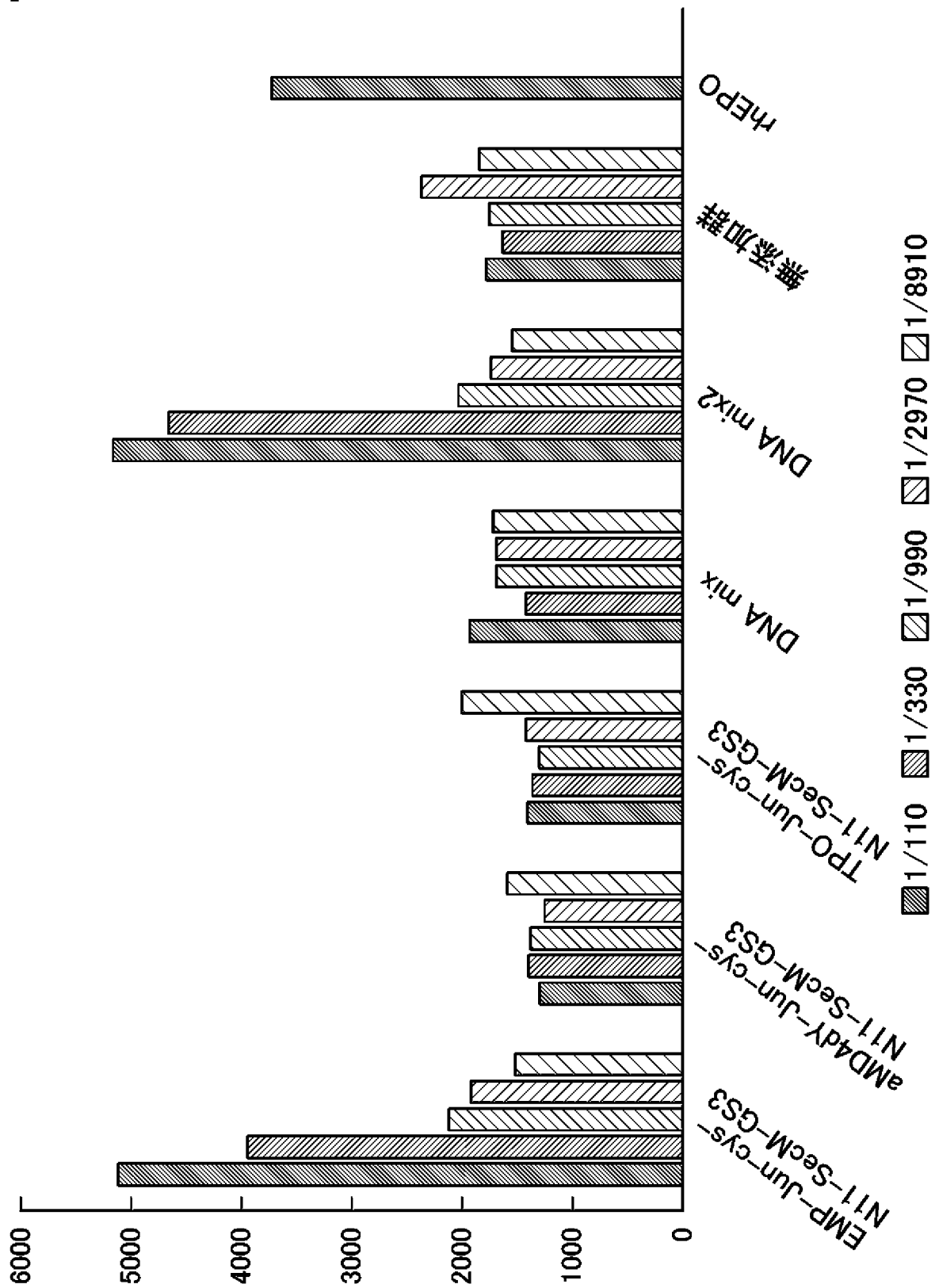
[図17]

FIG.17



[図18]

FIG.18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C07K 7/64**(2006.01)i; **C12N 15/11**(2006.01)i; **C40B 50/06**(2006.01)i

FI: C12N15/11 Z; C40B50/06; C07K7/64 ZNA

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)

C07K7/64; C12N15/11; C40B50/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022

Registered utility model specifications of Japan 1996-2022

Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2020-40886 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 19 March 2020 (2020-03-19) paragraphs [0020], [0036]	1-18
Y	WO 2000/18921 A2 (CHIRON CORP.) 06 April 2000 (2000-04-06) claims, examples	1-18
Y	WU X.-Q. et al. Dimerization of the testis brain RNA-binding protein(translin) is mediated through its C-terminus and is required for DNA- and RNA-binding. Nucleic Acids Research, 1998, vol. 26, pp. 1675-1680 abstract	1-18
Y	JP 2019-509054 A (MEDITOPE BIOSCIENCES, INC.) 04 April 2019 (2019-04-04) paragraph [0129]	1-18
Y	JP 2018-172415 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 08 November 2018 (2018-11-08) paragraph [0190]	1-18
Y	JP 2014-199261 A (BG MEDICINE, INC.) 23 October 2014 (2014-10-23) paragraph [0060]	1-18

☐ 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

01 April 2022

Date of mailing of the international search report

12 April 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/002117

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/002117

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-40886	A	19 March 2020	WO 2020/050419 A1 paragraphs [0020], [0036]	
WO	2000/18921	A2	06 April 2000	US 2004/0054131 A1 claims, examples	
JP	2019-509054	A	04 April 2019	WO 2017/120599 A1 paragraph [0129]	
JP	2018-172415	A	08 November 2018	WO 2013/185032 A1 paragraph [0202]	
JP	2014-199261	A	23 October 2014	WO 2010/096126 A1 paragraph [0047]	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 7/64(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C40B 50/06(2006.01)i FI: C12N15/11 Z; C40B50/06; C07K7/64 ZNA		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K7/64; C12N15/11; C40B50/06		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2020-40886 A (国立大学法人 東京大学) 19.03.2020 (2020-03-19) [0020], [0036]	1-18
Y	WO 2000/18921 A2 (CHIRON CORPORATION) 06.04.2000 (2000-04-06) claims, examples	1-18
Y	WU X.-Q. et al., Dimerization of the testis brain RNA-binding protein(translin) is mediated through its C-terminus and is required for DNA- and RNA-binding, Nucleic Acids Research, 1998, Vol.26, p.1675-1680 abstract	1-18
Y	JP 2019-509054 A (メディトープ バイオサイエンス インク) 04.04.2019 (2019-04-04) [0129]	1-18
Y	JP 2018-172415 A (プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ) 08.11.2018 (2018-11-08) [0190]	1-18
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.04.2022		国際調査報告の発送日 12.04.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 松原 寛子 4B 4154 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2014-199261 A (ビージー メディシン, インコーポレイテッド) 23.10.2014 (2014 - 10 - 23) [0060]	1-18

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/002117

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2020-40886	A	19.03.2020	WO	2020/050419	A1	
				[0020], [0036]			
WO	2000/18921	A2	06.04.2000	US	2004/0054131	A1	
				claims, examples			
JP	2019-509054	A	04.04.2019	WO	2017/120599	A1	
				[0129]			
JP	2018-172415	A	08.11.2018	WO	2013/185032	A1	
				[0202]			
JP	2014-199261	A	23.10.2014	WO	2010/096126	A1	
				[0047]			