

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-525187

(P2011-525187A)

(43) 公表日 平成23年9月15日(2011.9.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00 Z N A	4 C O 8 4
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/531 Z	4 H O 4 5
<b>C4OB 30/04 (2006.01)</b>	C 4 O B 30/04	
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/06	
<b>C07K 7/08 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-514807 (P2011-514807)  
 (86) (22) 出願日 平成21年6月18日 (2009. 6. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年2月15日 (2011. 2. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/047799  
 (87) 国際公開番号 W02009/155420  
 (87) 国際公開日 平成21年12月23日 (2009. 12. 23)  
 (31) 優先権主張番号 61/132, 416  
 (32) 優先日 平成20年6月18日 (2008. 6. 18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/155, 890  
 (32) 優先日 平成21年2月26日 (2009. 2. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

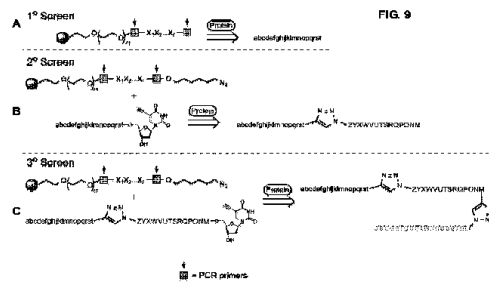
(71) 出願人 508032284  
 カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91125, パサデナ, イースト・カリフォルニア・ブールヴァード 1200, エム/シー 201-85  
 (74) 代理人 100070150  
 弁理士 伊東 忠彦  
 (74) 代理人 100091214  
 弁理士 大貫 進介  
 (74) 代理人 100107766  
 弁理士 伊東 忠重

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系

(57) 【要約】

2つ以上のリガンドを含む多リガンド捕捉剤、ならびに関連組成物、方法および系を記載する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

そのそれぞれが標的と特異的に結合し、かつ他方と結合的に識別可能であり、  
多リガンド捕捉剤が標的と結合した際に2つ以上のリガンドのそれぞれが標的と特異的に結合するように、多リガンド捕捉剤中で配置されている  
互いに共有結合した2つ以上のリガンドを含む、標的に対する多リガンド捕捉剤。

**【請求項 2】**

2つ以上のリガンドのうち少なくとも1つが少なくとも1つの他のリガンドに非関連および/または標的に非関連である、請求項1に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 3】**

2つ以上のリガンドが同一または異なる化学性質のものである、請求項1または2に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 4】**

2つ以上のリガンドが、ペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および小分子からなる群から独立して選択される、請求項1から3のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 5】**

2つ以上のリガンドのうち1つまたは複数が、それぞれ3～100個の単量体を含むペプチドである、請求項4に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 6】**

10個までのリガンドを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 7】**

2つ以上のリガンドが直鎖状多リガンド捕捉剤を提供するように配置されている、請求項1から6のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 8】**

2つ以上のリガンドが分枝状多リガンド捕捉剤を提供するように配置されている、請求項1から6のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 9】**

捕捉剤に所望の化学活性または生物活性を提供する追加の分子または官能基をさらに含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 10】**

所望の化学活性または生物活性が溶解度、安定性、生体利用度、免疫原性、検出性、および反応性である、請求項9に記載の多リガンド。

**【請求項 11】**

追加の分子または官能基が親水性化合物、疎水性化合物、担体または標識である、請求項9または10に記載の多リガンド捕捉剤。

**【請求項 12】**

共有結合しており、  
単離されている場合に第1のリガンドが標的と結合することができ、  
単離されている場合に第2のリガンドが標的と結合することができ、  
標的とのその結合において結合的に識別可能である  
第1のリガンドおよび第2のリガンドを含む、  
標的と特異的に結合することができ、  
標的と結合する場合は第1のリガンドおよび第2のリガンドがどちらも標的と接触する多リガンド捕捉剤。

**【請求項 13】**

第3のリガンドをさらに含み、第3のリガンドは第1および第2のリガンドと共有結合しており、多リガンド捕捉剤が標的と結合する場合は第3のリガンドは標的と接触する、請求項12に記載の多リガンド捕捉剤。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

第4のリガンドをさらに含み、第4のリガンドは第1、第2、および第3のリガンドと共有結合しており、多リガンド捕捉剤が標的と結合する場合は第4のリガンドは標的と接触する、請求項13に記載の多リガンド捕捉剤。

## 【請求項 15】

複数の候補リガンドから、対応する結合部位で標的と特異的に結合することができる候補リガンドを選択するステップを含み、

結合部位が、それぞれの部位上に結合したそれぞれの、リガンドの互いの間での共有結合を可能にするように配置されている

、標的に対する多リガンド捕捉剤の2つ以上のリガンドを多リガンドで提供する方法。

10

## 【請求項 16】

複数の候補リガンドが、別のリガンドに非関連および/または標的に非関連である少なくとも1つの候補リガンドを含む、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

選択を、標的と結合した候補リガンド間の共有結合の形成を可能にする時間かつ条件下で複数の候補リガンドを標的と接触させることによって行ない、共有結合の形成が標的によって触媒される、請求項15または16に記載の方法。

## 【請求項 18】

候補リガンドが、標的またはその一部分と結合できることが当初は知られていない化合物を含む、請求項17に記載の方法。

20

## 【請求項 19】

標的と接触させる前または後に所望の特長が導入されるように候補リガンドを修飾する、請求項17または18に記載の方法。

## 【請求項 20】

リガンド上に提示される官能基によってリガンド間の共有結合が行なわれて、2つの個別のリガンドと標的が結合した際に、官能基が反応して共有結合が形成される、請求項17から19のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 21】

複数の候補リガンドが、第1の複数の候補リガンドおよび第2の複数の候補リガンドを含み、

30

選択を、

標的を第1の複数の候補リガンドと接触させて、標的と特異的に結合し、標的によって触媒される反応において対応する第2の官能基と特異的に結合することができる第1の官能基を提示するアンカーリガンドを選択するステップと、

アンカーリガンドを標的と接触させ、それによりアンカーリガンド標的複合体を提供するステップと、

アンカーリガンド標的複合体を第2の複数の候補リガンドと接触させるステップと、

アンカーリガンド標的複合体と特異的に結合し、アンカーリガンドと共有結合する第2の複数の候補リガンドの候補リガンドを選択し、それにより多リガンドを提供するステップと

40

によって行なう、請求項17から20のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 22】

アンカーリガンドの選択を、

標的と特異的に結合する候補リガンドを選択するステップと、

標的によって触媒される反応において対応する第2の官能基と特異的に結合することができる第1の官能基が導入されるように選択した候補リガンドを修飾し、それにより前記第1の官能基を提示するアンカーリガンドを提供するステップと

によって行なう、請求項21に記載の方法。

## 【請求項 23】

第1および第2の複数の候補リガンドが全体でまたは部分的に同一または異なる、請求

50

項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

追加のリガンドを多リガンドに付加するために多リガンドをアンカーリガンドとして用いて選択を繰り返す、請求項 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

標的に対する高次多リガンド捕捉剤の結合親和性がアンカーリガンドの結合親和性よりも少なくとも  $10^2$  高くなるまで選択を繰り返す、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

標的に対する高次多リガンド捕捉剤の結合親和性がアンカーリガンドの結合親和性よりも少なくとも  $10^{10}$  高くなるまで選択を繰り返す、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

多リガンド捕捉剤と標的の結合の解離定数が  $10^{-5}$  M 以下となるまで選択を繰り返す、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

多リガンド捕捉剤と標的の結合の解離定数が  $10^{-16}$  M 以下となるまで選択を繰り返す、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

選択を繰り返し、1 回または複数回の選択の反復において同一または異なる複数の候補リガンドを第 2 の複数の候補リガンドとして用いる、請求項 2 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

選択を繰り返し、1 回または複数回の選択の反復において同一または異なる官能基を第 1 のおよび / または第 2 の官能基として用いる、請求項 2 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

2 つ以上のリガンドがペプチドまたはポリペプチドである、請求項 2 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

多リガンド捕捉剤がポリペプチドによって形成されるタンパク質捕捉剤であり、ポリペプチドを合成するために行なう、請求項 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

修飾したアンカーリガンドを第 1 の複数の候補リガンドおよび標的と接触させるステップであって、修飾したアンカーリガンドが、標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの 1 つまたは複数と共有結合しており、それにより 1 つまたは複数の多リガンド捕捉剤が形成され、多リガンド捕捉剤のそれぞれが、修飾したアンカーリガンドおよび候補リガンドのうちの 1 つを含むステップを含み、

アンカーリガンドが標的と結合することができ、修飾したアンカーリガンドが第 1 の官能基を含、第 1 の官能基が対応する第 2 の官能基と特異的に反応することができ、候補リガンドのそれぞれが第 2 の官能基を含む、多リガンド捕捉剤を作製する方法。

40

【請求項 3 4】

( i ) 対応する第 4 の官能基と特異的に反応することができる第 3 の官能基を含むように多リガンド捕捉剤のうちの 1 つを修飾するステップと、

( i i ) 修飾された多リガンド捕捉剤を第 2 の複数の候補リガンドおよび標的と接触させるステップであって、修飾された多リガンド捕捉剤が標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの 1 つまたは複数と共有結合し、それにより 1 つまたは複数の高次多リガンド捕捉剤が形成されるステップと

をさらに含み、

50

高次多リガンド捕捉剤のそれぞれが、修飾された多リガンド捕捉剤および候補リガンドのうちの一つを含み、

第2の複数の捕捉リガンド中の候補リガンドのそれぞれが第4の官能基を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

接触前にはどの候補リガンドが標的と結合できるかが知られていない、請求項33または34に記載の方法。

【請求項36】

第1の複数および/または第2の複数の候補リガンドが化合物のコンビナトリアルライブラリを含む、請求項33から35のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項37】

化合物のコンビナトリアルライブラリが鎖中で連結されたサブユニットの群の順列を含む化合物を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

鎖が直鎖状、分枝状、環状、または組合せである、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

サブユニットの群がアミノ酸、修飾アミノ酸、または組合せを含む、請求項37または38に記載の方法。

【請求項40】

サブユニットの群が1つまたは複数の有機小分子をさらに含む、請求項39に記載の方法。

20

【請求項41】

サブユニットの群中のアミノ酸がアミノ酸の部分組から本質的になる、請求項39または40に記載の方法。

【請求項42】

サブユニットの群中の修飾アミノ酸が修飾アミノ酸の部分組から本質的になる、請求項39または40に記載の方法。

【請求項43】

請求項1から14のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤とビヒクルとを含む組成物。

30

【請求項44】

ビヒクルが製薬上許容されるビヒクルである、薬剤組成物である請求項43に記載の組成物。

【請求項45】

多リガンド捕捉剤と標的の結合を可能にして多リガンド捕捉剤標的複合体を形成させる時間かつ条件下で、標的を請求項1から14のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤と接触させるステップと、

多リガンド捕捉剤標的複合体を検出するステップとを含む、標的を検出する方法。

【請求項46】

標的と多リガンド捕捉剤との接触および多リガンド捕捉剤標的複合体の検出を単パラメータアッセイまたは複数パラメータアッセイに従って行なう、請求項45に記載の方法。

40

【請求項47】

多リガンド捕捉剤がタンパク質捕捉剤であり、単パラメータアッセイまたは複数パラメータアッセイが標準のタンパク質アッセイである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

標的が事前に決定した条件に関連するバイオマーカーである、請求項45から47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

請求項1から14のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤および多リガンド捕捉剤標

50

的複合体の検出を行なうために必要な少なくとも1つの試薬を含む、標的を検出する系。

【請求項50】

少なくとも1つの試薬が標識した分子である、請求項49に記載の系。

【請求項51】

多リガンド捕捉剤と標的の特異的結合を可能にして多リガンド捕捉剤標的複合体を形成させるための時間かつ条件下で、請求項1から14のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤を混合物と接触させるステップと、

タンパク質捕捉剤標的複合体を混合物から分離するステップとを含む、標的を混合物中の分析物から分離する方法。

【請求項52】

標的とタンパク質捕捉剤との接触およびタンパク質捕捉剤標的複合体の分離を単パラメータアッセイまたは複数パラメータアッセイに従って行なう、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

請求項1から14のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤および混合物から多リガンド捕捉剤標的複合体を分離するために必要な少なくとも1つの試薬を含む、標的を混合物中の分析物から分離する系。

【請求項54】

少なくとも1つの複数の候補リガンド、および

1つまたは複数の官能基を前記候補リガンド上に導入するための試薬を含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の多リガンド捕捉剤を提供する系。

【請求項55】

標識をさらに含む、請求項54に記載の系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が全体で本明細書中に参考として組み込まれている、題名「多リガンドタンパク質捕捉剤のタンパク質触媒形成 (Protein-Catalyzed Formation of Multi-ligand Protein Capture Agents)」、第61/132,416号、2008年6月18日提出、整理番号CIT-5164P号の米国仮出願、および題名「捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系 (Capture Agents and Related Compositions Methods and Systems)」、第61/155,890号、2009年2月26日提出、整理番号P367-USP号の米国仮出願の優先権を主張するものである。

【0002】

政府補助金の記述

「国立衛生研究所によって授与された補助金番号CA119347号に準じて、米国政府は本発明の特定の権利を有する」。

【0003】

技術分野

本開示は、試料中の1つまたは複数の標的を検出および/または分離するための捕捉剤に関する。

【背景技術】

【0004】

標的および特にバイオマーカーの高感度検出は、生体分子分析の分野において、特に複数の標的の検出および/または特定の寸法もしくは低濃度で試料中に存在する標的の検出を目的とする場合の課題であった。病理学的検査のためであれ、基礎的な生物学的研究のためであれ、いくつかの方法が、様々なクラスの生体材料および生体分子を検出するために一般的に使用されている。

10

20

30

40

50

## 【0005】

単一の生物学的標的を検出するために実験室で最も一般的に使用されている技術の一部には、ゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、ウエスタンブロット、蛍光insituハイブリダイゼーション(FISH)、蛍光活性化細胞分取(FACS)、ポリマーゼ連鎖反応(PCR)、および酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)が含まれる。これらの方法により、血清および組織などの生体試料中の1つまたは複数のバイオマーカーを検出する能力が提供され、また、診断目的にも適切である。

## 【0006】

続くポリヌクレオチドエンコード手法により以前の技術を超える改善が提供され、特に、標的の感度および選択性の高い多重検出を行なうことが可能となった。

10

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本明細書中では、いくつかの実施形態では1つまたは複数の標的を高い親和性および特異性で効率的に検出および/または分離するために使用することができる、捕捉剤を提供する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

第1の態様によれば、標的に対する多リガンド捕捉剤を記載する。多リガンド捕捉剤は互いに共有結合した2つ以上のリガンドを含み、2つ以上のリガンドのそれぞれは標的と特異的に結合し、かつ他方と結合的に識別可能であり、2つ以上のリガンドは、多リガンド捕捉剤が標的と結合した際に2つ以上のリガンドのそれぞれが標的と特異的に結合するように、多リガンド捕捉剤中で配置されている。

20

## 【0009】

第2の態様によれば、組成物を記載する。組成物は、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤と適合性のあるビヒクルとを含む。

## 【0010】

第3の態様によれば、多リガンド捕捉剤と標的の結合を可能にして多リガンド捕捉剤標的複合体を形成させるための時間かつ条件下で、標的を本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤と接触させることと、多リガンド捕捉剤標的複合体を検出することとを含む、標的を検出する方法を記載する。

30

## 【0011】

第4の態様によれば、標的を混合物中の別の分析物から分離する方法を記載する。この方法は、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を混合物中で、多リガンド捕捉剤と標的の特異的結合を可能にして多リガンド捕捉剤標的複合体を形成させるための時間かつ条件下で加えることと、多リガンド捕捉剤標的複合体を混合物から分離することとを含む。

## 【0012】

第5の態様によれば、標的を検出するための系を記載する。この系は、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤と、多リガンド捕捉剤標的複合体の検出を行なうために必要な試薬のうち少なくとも1つとを含む。

40

## 【0013】

第6の態様によれば、標的を混合物中の別の分析物から分離するための系を記載する。この系は、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤と、混合物から多リガンド捕捉剤標的複合体を分離するために必要な試薬のうち少なくとも1つとを含む。

## 【0014】

第7の態様によれば、多リガンド捕捉剤の2つ以上のリガンドを、多リガンドで提供する方法を提供する。この方法は、標的を提供することと、複数の候補リガンドを提供することと、対応する結合部位で標的と特異的に結合することができる候補リガンドを選択することとを含み、結合部位は、それぞれの部位上に結合したそれぞれのリガンドの、互いの間での共有結合が可能となるように配置されている。

50

## 【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系により、標的に対する親和性剤の必要な事前の知識なしに、事前に決定した標的に特異的な捕捉剤の生成が可能となる。

## 【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系により、熱ショック、脱水、pH変動、多くの化学プロセス、および特定の天然に存在する酵素による分解に対して増加した安定性を有する一方で、抗体の感度および選択性に少なくとも匹敵する感度および選択性で標的を検出することが可能となる。

## 【 0 0 1 7 】

さらに、いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系により、当分野の特定の抗体に基づいた溶液と比較して、捕捉剤の迅速および/または対費用効果の高い開発が可能となる。

## 【 0 0 1 8 】

さらに、いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系により、多様な化学性質のリガンドを有する捕捉剤の形成が可能となる。

## 【 0 0 1 9 】

また、いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系により、事前に決定した標的分子内の部位特異的な標的化が可能となる。

## 【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤ならびに関連組成物、方法および系により、単パラメータまたは複数パラメータのアッセイにおける、基質または表面に対する多リガンド捕捉剤の高度に配向された付着が可能となる。

## 【 0 0 2 1 】

本明細書中に組み込まれており、その一部を構成する添付の図面は、本開示の1つまたは複数の実施形態を例示し、詳細な説明および実施例と共に、本開示の原理および実行を説明する役割を果たす。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 2 】

【 図 1 】 図 1 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による共有結合を示す模式図である。

【 図 2 】 図 2 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による共有結合を示す模式図である。

【 図 3 】 図 3 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による共有結合を示す模式図である。

【 図 4 】 図 4 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による共有結合を示す模式図である。

【 図 5 】 図 5 は、本明細書中に記載の実施形態による二重リガンド捕捉剤を示す図である。特に、14個の非天然および人工アミノ酸からなる二重リガンド捕捉剤を高純度で合成することができる(単一の親質量を示す)。アンカーリガンドは1°として示し、二次リガンドは2°として示し、1, 2, 3-トリアゾールリンカー(1°および2°を接続)はTz1として示す。

【 図 6 】 図 6 は、本明細書中に記載の実施形態による三重リガンド捕捉剤を示す図である。特に、アンカーリガンドは濃い灰色の書体によって示し、二次リガンドは中程度の灰色の書体によって示し、三次リガンドは薄い灰色の書体によって示す。リガンド間の接続は1, 2, 3-トリアゾール(Tz1およびTz2)によって形成される。

【 図 7 】 図 7 は、本明細書中に記載のいくつかの実施形態による多リガンド捕捉剤を調製する方法を示す模式図である。パネルAは、ライブラリ中の複数の候補分子を標識した標

10

20

30

40

50

的と接触させて、一次リガンドまたはアンカーリガンドを同定する、第1のステップを示す。パネルBは、第1のステップからの一次リガンドを、今ではリンカーが付加されている同じライブラリと接触させて二次リガンドを同定し、第1のステップの一次リガンドおよび二次リガンドによって形成される二重リガンドを得る、第2のステップを示す。パネルCは、第2のステップから形成された二重リガンドを新しい一次リガンドとして用いることの繰返しにより高次多リガンドの同定を可能にする、第3のステップを示す。

【図8】図8は、本明細書中に記載のいくつかの実施形態による分枝状多リガンド捕捉剤を調製する方法を示す模式図である。パネルAは、ライブラリを、標識した標的および第1の官能基(図7Aの方法によって同定)を提示するアンカーリガンドと接触させて、二次リガンドを同定する、第1のステップを示す。この二次リガンドのライブラリは、複数の第2の官能基による置換部位を含有する。そのようなスクリーニングの結果は、内部の分枝点によって接続された二次リガンドからなる二重リガンドである。この分枝状二重リガンドは、官能基でさらに修飾し、分枝状三重リガンドのスクリーニングにおいてアンカーとして利用し得る。パネルBは、この分枝状二重リガンドアンカーを、今ではリンカーが付加されている包括的なライブラリと接触させて、1つの分枝点を有する多リガンド捕捉剤中の三次リガンドを同定する、第2のステップを示す。パネルCは、2つの分枝点を有する多リガンド捕捉剤中の三次リガンドを同定するために行なう、同じステップを示す。パネルA、パネルBおよび/またはパネルCの方法を任意選択で繰り返して、n個の分枝点を有する多リガンド捕捉剤中のn個のリガンドが得られ得る。

【図9】図9は、本明細書中に記載の実施形態によるポリヌクレオチド多リガンド捕捉剤を連続してアセンブルする方法を示す模式図である。パネルAは、複数のポリヌクレオチドを標識した標的と接触させて、一次リガンドまたはアンカーリガンドを同定する、第1のステップを示す。パネルBは、第1のステップからの一次リガンドを、今ではリンカーが付加されている同じ複数のポリヌクレオチドと接触させて二次リガンドを同定し、第1のステップの一次リガンドおよび二次リガンドによって形成される二重リガンドを得る、第2のステップを示す。パネルCは、第2のステップから形成された二重リガンドを新しい一次リガンドとして用いることの繰返しにより高次多リガンドの同定を可能にする、第3のステップを示す。

【図10】図10は、本明細書中に記載の実施形態による小分子多リガンド捕捉剤を連続してアセンブルする方法を示す模式図である。パネルAは、複数の小分子を標識した標的と接触させて、一次リガンドまたはアンカーリガンドを同定する、第1のステップを示す。パネルBは、第1のステップからの一次リガンドを、今ではリンカーが付加されている同じライブラリと接触させて二次リガンドを同定し、第1のステップの一次リガンドおよび二次リガンドによって形成される二重リガンドを得る、第2のステップを示す。パネルCは、第2のステップから形成された二重リガンドを新しい一次リガンドとして用いることの繰返しにより高次多リガンドの同定を可能にする、第3のステップを示す。

【図11】図11は、様々な化学性質のリガンドを連続してアセンブルすることによってキメラ多リガンド捕捉剤を合成する方法を示す模式図である。パネルAは、ポリヌクレオチドのライブラリを標識した標的と接触させて、一次リガンドまたはアンカーリガンドを同定する、第1のステップを示す。パネルBは、第1のステップからの一次リガンドを、今ではリンカーが付加されているペプチドライブラリと接触させて二次リガンドを同定し、第1のステップの一次リガンドおよび二次リガンドによって形成される二重リガンドを得る、第2のステップを示す。パネルCは、パネルBの同じまたは別のペプチドライブラリを接触させることによって、第2のステップから形成された二重リガンドを新しい一次リガンドとして用いることの繰返しにより高次多リガンドの同定を可能にする、第3のステップを示す。

【図12】図12は、本明細書中に記載の実施形態による脱保護した二重リガンドアンカーの構造式を示す図である。特に、図12の脱保護した二重リガンドアンカーは二重リガンド捕捉剤の元の配列からなり、三重リガンド捕捉剤を構築するための付着部位として役割を果たす1つの追加の官能基を有する。また、図12の脱保護した二重リガンドアンカ

10

20

30

40

50

ーは15個の非天然および人工アミノ酸も含有し、単一の親質量を示す。

【図13】図13は、本明細書中に記載の実施形態による完全に保護した二重リガンドアンカーの構造式を示す図である。図13の完全に保護した二重リガンドアンカーは二重リガンドアンカー中のアミノ酸側鎖の保護を維持しており、バルク量での多リガンド捕捉剤の合成に使用することができる。また、図13の完全に保護した二重リガンドアンカーは、15量体の配列として高純度で合成することもできる。

【図14】図14は、本明細書中に記載の実施形態によるビオチン標識した二重リガンドアンカーの構造式を示す図である。特に、示したビオチン標識した二重リガンドアンカーは、図12に示した脱保護した二重リガンドアンカーの伸長であり、ビオチンにより、生じる修飾された多リガンド捕捉剤に検出性が与えられる。図14のビオチン標識した二重リガンドアンカーは、ドットプロット実験(図21を参照)および図29に模式的に示すアッセイ(実施例13を参照)の適切な試薬として使用することができる。

【図15】図15は、本明細書中に記載の実施形態によるビオチン標識した三重リガンド捕捉剤の構造式を示す図である。特に、図15のビオチン標識した三重リガンド捕捉剤は、図6に示した三重リガンド捕捉剤の伸長であり、ビオチンにより、生じる修飾された多リガンド捕捉剤に検出性が与えられる。図14のビオチン標識した二重リガンドアンカーは、実施例16、20および21によって例示されるドットプロット、ウエスタンプロット、およびELISA型のアッセイの適切な試薬として使用することができる。

【図16】図16は、本明細書中に記載の実施形態による分枝状多リガンド捕捉剤の構造および標的親和性を示す図である。パネルAは、b(h)CAIIの分枝状二重リガンド捕捉剤vkw(Tz1)fw-kfwlk1の化学構造を示す。パネルBは、漸増する濃度の二重リガンド(0から1656nM)を用いて得られたSPR応答センサーグラムにより、bCAII標的に対して500nMの結合親和性が実証されることを示す。図5の同様に開発した直鎖状二重リガンド捕捉剤の結合親和性と比較した場合、この分枝状構造の親和性は5倍向上していた。

【図17】図17は、本明細書中に記載の実施形態による分枝状多リガンド捕捉剤を示す模式図である。パネルAは直鎖状三重リガンド捕捉剤を示す。パネルBおよびCは分枝状三重リガンド捕捉剤を示し、そのような構造中の制限された回転を有する結合をハイライトする。パネルBおよびCの制限された回転を有する結合は、同様に開発したが直鎖状である多リガンド捕捉剤(パネルA)と比較して、結合力を増加させる潜在性を有する。

【図18】図18は、本明細書中に記載のいくつかの実施形態による分枝状三重リガンド捕捉剤の構造を示す図である。アンカーリガンドは1°として示し、二次リガンドは2°として示し、三次リガンドは3°として示し、2つの1, 2, 3-トリアゾールリンカー(1°および2°ならびに2°および3°を接続)はそれぞれTz1およびTz2として示す。

【図19】図19は、本明細書中に記載の一部の実施形態によるアンカーリガンドを同定する方法を示す模式図である。

【図20】図20は、本明細書中に記載の一部の実施形態による二次リガンドを同定する方法を示す模式図である。

【図21】図21は、本明細書中に記載の実施形態による図14の二重リガンドおよび図15の三重リガンドを用いて行なった標的検出の感度を模式的に示す図である。パネルAは、10%のブタ血清におけるb(h)CAIIの検出について図15の三重リガンドを用いて行なったドットプロット(下部)および関連する図(上部)を示す。パネルBは、0.1%のブタ血清中で、図14の二重リガンドを用いて行なったドットプロットを示す。

【図22】図22は、本明細書中に記載の一部の実施形態による多リガンド捕捉剤を用いて行なったネイティブウエスタンプロットの結果を示す図である。パネルAは、全タンパク質含有物を詳しく示す、クマシー染色したネイティブゲルを示す。パネルBは、一次抗体による特異的タンパク質結合を例示するネイティブウエスタンプロットを示す。パネルCは、三重リガンド捕捉剤による特異的タンパク質結合を例示するネイティブウエスタン

10

20

30

40

50

プロットを示す。

【図 2 3】図 2 3 は、本明細書中に記載の実施形態による多リガンド捕捉剤を用いて行なった、標的分子の検出を示す模式図である。パネル A は、b C A I I タンパク質を検出するために三重リガンド捕捉剤を用いた、完全にアSEMBLした E L I S A 様サンドイッチ吸光度アッセイの構造の模式図を示す。パネル B は、96 ウェルプレートのウェルで行なった、様々な濃度の b C A I I での E L I S A アッセイの実験データを示す。漸増する b C A I I 濃度は濃くなっていく灰色として検出される。パネル C および D は、様々なアッセイ条件を例示する図を示す。パネル C では標的が緩衝溶液中で提示される一方で、パネル D では、標的が 10% のブタ血清中で提示され、三重リガンド捕捉剤または検出抗体のどちらによっても特異的結合が損なわれなかった。

10

【図 2 4】図 2 4 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による 2 種類の二重リガンドのスクリーニングを例示する模式図である。パネル A には、最初に図 2 0 に詳述した二次 (2°) リガンドの *in situ* スクリーニングを、比較のために再度示す。パネル B には、パネル A のスクリーニングが効いていたことを確認するために利用した、二次 (2°) リガンドのビーズ上スクリーニングを示す。

【図 2 5】図 2 5 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による多リガンド捕捉剤の一次またはアンカーリガンドを選択する方法の結果を例示する図である。パネル A は、スクリーニングライブラリ A (第一世代アンカーリガンドスクリーニング) から単離された 51 個のヒット配列の、頻度対 D - アミノ酸をプロットした図を示す。パネル B は、2 つのアンカーリガンドの選択をもたらす、ライブラリ A および B (第二世代アンカーリガンド) のスクリーニングのヒット率を示す。

20

【図 2 6】図 2 6 は、本明細書中に記載の一部の実施形態によるリガンドまたは多リガンド捕捉剤の親和性の検出を例示する図である。特に、図 2 6 の図は、漸増する濃度の標的 (0.2  $\mu$ M から 800  $\mu$ M) で滴定したフルオレセイン化アンカーリガンドの蛍光偏光実験の結果を例示しており、この結合相互作用について 500  $\mu$ M の親和性を示唆している。

【図 2 7】図 2 7 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による多リガンド捕捉剤の二次リガンドの同定を示す図である。パネル A は、アンカーリガンドおよび標的の存在下でスクリーニングライブラリから単離した二重リガンド捕捉剤の二次リガンド候補の、D - アミノ酸 (x 軸) の頻度 (y 軸) を例示する図を示す。パネル B は、パネル A のスクリーニングライブラリから単離した正確な二次リガンド配列の略記のリストを示す。

30

【図 2 8】図 2 8 は、漸増する濃度の本明細書中に記載の実施形態による多リガンド捕捉剤を用いた、多リガンド捕捉剤の検出された結合親和性の変動を例示する図である。特に、図 2 8 の図は、2 つの二重リガンド捕捉剤のそれぞれとセンサー表面上に固定した標的との相互作用の、表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験の結果を例示している。パネル A は、漸増する濃度の二重リガンド *l k l w f k - T z 1 - k i w i G* (2 nM ~ 5  $\mu$ M) を用いて得られた SPR 応答センサーグラムを示す。パネル B は、漸増する濃度の二重リガンド *k w l w G l - T z 1 - k f w l k l* (2 nM ~ 5  $\mu$ M) を用いて得られた SPR 応答センサーグラムを示す。

【図 2 9】図 2 9 は、本明細書中に記載の一部の実施形態による多リガンド捕捉剤のリガンド間の連結を検出する方法を示す図である。特に、パネル A は、ビオチン標識した二重リガンドアンカーを用いたビーズ上トリアゾール形成の、*in situ* クリックアッセイの模式図を示し、パネル B は、紫色ビーズ (濃い灰色で示す) をトリアゾール形成の陽性指示薬として示す。

40

【図 3 0】図 3 0 は、本明細書中に記載の実施形態による多リガンド捕捉剤を検出する方法を示す模式図である。パネル A は、三重リガンドの検出を例示的な事例として用いた、QPCR によるビーズ上多リガンド検出を検出する方法の模式図を示す。パネル B は、QPCR によって行なった、図 2 9 のビオチン標識した三重リガンドの形成の定量の模式図を例示する。パネル C は、パネル B の定量に関するデータを例示する図を示し、約 10 : 1 の対照を超える選択性を示す。

50

【図3 1】図3 1は、本明細書中に記載の一部の実施形態による第二世代リガンドのスクリーニングを例示する図である。特に、図3 1の図は、37個の二重リガンドのヒットしたビーズの分析に基づいて位置1～6に見つかるD-アミノ酸の分布を示す。それぞれの位置のアミノ酸残基の頻度は、コンセンサスの指標である。

【図3 2】図3 2は、本明細書中に記載の一部の実施形態による多リガンド捕捉剤の形成を検証する方法を示す模式図である。特に、アジド含有アミノ酸を有する(パネルA)および有さない(パネルC)ペプチドの、第一世代三次リガンドスクリーニングを行なって三重リガンドを作製するための、位置依存性のヒストグラムを、(パネルB)第一および第二世代のCuAACライブラリのスクリーニングと共に例示する。最終コンセンサス三重リガンド配列を灰色の書体によって示す。

【図3 3】図3 3は、漸増する濃度の本明細書中に記載の実施形態による多リガンド捕捉剤を用いた、多リガンド捕捉剤の検出された結合親和性の変動を例示する図である。特に、パネルAおよびBは、それぞれヒト(A)およびウシ(B)CAII標的について測定した、漸増するペプチド濃度(0.1nMから162nM)を用いて得られた図15の三重リガンド捕捉剤(rfviln-Tz2-kwlwGl-Tz1-kfwlkl)のSPR応答センサーグラムを示す。

【図3 4】図3 4は、本明細書中に記載の実施形態による多リガンド捕捉剤との複合体中の、標的分子の酵素活性を例示する図である。特に、図3 4の図は、三重リガンド捕捉剤の存在下(灰色)および非存在下(黒色)、ならびに対照としてbCAIIの非存在下(濃い灰色)における、基質4-酢酸ニトロフェニル(4-NPA)に対するbCAIIの酵素活性を示す。三重リガンド捕捉剤がアッセイ中に存在する場合は、経時的な活性には変化がない。

【図3 5】図3 5は、本明細書中に記載の実施形態による多リガンド捕捉剤のリガンドを接続する適切なリンカーを同定する方法を示す模式図である。パネルAは、b(h)CAIIに対する三重リガンド捕捉剤中の1,2,3-トリアゾールリンカー(Tz1およびTz2)を置き換える代替リンカーをスクリーニングするために利用するライブラリを形成する模式図を示す。パネルBは代表的なヒットを示し、Tz1またはTz2の適切な置換えであるD-アミノ酸を示す。パネルCは、元の1,2,3-トリアゾールのよりコンパクトな型を表す代替アミドリリンカーの適合性の例示を示す。

【図3 6】図3 6は、1,2,3-トリアゾールリンカー(Tz1およびTz2)の代わりにアミドリリンカーを提示する3つの三重リガンド捕捉剤の分子構造を示す図である。パネルAはTzR1と示し、Tz2=Gfであり、Tz1=nkであり、パネルBはTzR3と示し、Tz2=alであり、Tz1=dkであり、パネルCはTzR2と示し、Tz2=psであり、Tz1=vvである。

【図3 7】図3 7は、リガンド間の接続リンカーが1つまたは複数のアミド結合によって置き換えられている三重リガンド捕捉剤の特性を記載する図である。パネルAは円二色性(CD)実験の結果を示し、どちらもランダムコイルであるという点において、三重リガンド捕捉剤TzR1が元の三重リガンド配列(rfviln-Tz2-kwlwGl-Tz1-kfwlkl、図6)と類似構造を共有することを例示している。パネルBは、SPRによるTzR1(0~1500nMの分析物)とb(h)CAIIとの間の結合相互作用の結果を示し、平衡解離定数は高いnMとして推定された。パネルCは、1,2,3-トリアゾールの原子配置および電子特性をアミド結合によって模倣し得ることを例示している。

【図3 8】図3 8は、図6の三重リガンド捕捉剤中のTz2リンカーを置き換えるアミノ酸3個のリンカーを同定するためのスクリーニング手法の例を示す図である。このスクリーニング手法は図23のELISA様サンドイッチアッセイに類似しているが、基質はマイクロウェルではなくビーズであることに注意されたい。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本明細書中では、いくつかの実施形態では1つまたは複数の標的を高い親和性および特

10

20

30

40

50

異性で効率的に検出および/または分離するために使用できる、捕捉剤を提供する。

【0024】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載する多リガンド捕捉剤を、それだけには限定されないが、本開示を読むことによって当業者が同定可能な標的を検出および/または分離するためのアッセイを含めた、いくつかのアッセイを行なうための他の捕捉剤の代わりに使用することができる。

【0025】

本明細書中で使用する用語「捕捉剤」とは、標的と特異的に結合することができる化合物を示す。たとえば、開示した捕捉剤は、標的と特異的に結合するように構成することができる。開示した捕捉剤には、それだけには限定されないが、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび当業者が同定可能な他の非ポリマー分子などの有機分子が含まれることができる。本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤は捕捉剤の例である。

10

【0026】

第1の分子と第2の分子の結合に関して本明細書中で使用する表現「特異的」、「特異的に」または「特異性」とは、第1の分子と第2の分子との間の認識、接触および安定な複合体の形成ことをいい、それと共に、第1の分子および第2の分子のそれぞれと存在し得る他の分子との間の認識、接触および安定な複合体の形成が実質的により低いまたは存在しないことをいう。例示的な特異的結合は、抗体-抗原の相互作用、細胞受容体-リガンドの相互作用、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション、酵素基質相互作用などである。複合体の分子構成成分に関して本明細書中で使用する用語「特異的」とは、その構成成分と、その構成成分が一部である特定の複合体との固有の会合をいう。ポリヌクレオチドの配列に関して本明細書中で使用する用語「特異的」とは、配列と相補的配列である単一のポリヌクレオチドとの固有の会合をいう。「安定な複合体」とは、検出可能であり、任意の安定性レベルを全く必要としない複合体を意味するが、より高い安定性が一般に好ましい。

20

【0027】

本明細書中で使用する用語「標的」とは、目的の分析物を示す。用語「分析物」とは、試料中のその存在または非存在を検出する、物質、化合物、部分、または構成成分をいう。分析物には、それだけには限定されないが、生体分子、特にバイオマーカーが含まれる。本明細書中で使用する用語「生体分子」とは、それだけには限定されないが、糖、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、有機分子、ハプテン、エピトープ、生体細胞、生体細胞の部分、ビタミン、ホルモンなどを含めた、生物学的環境に関連する物質、化合物または構成成分を示す。用語「バイオマーカー」とは、それだけには限定されないが、細胞サイクルの期、健康および病状を含めた、生物学的環境の具体的な状態に関連する生体分子を示す。バイオマーカーの存在、非存在、低下、アップレギュレーションは、特定の状態に関連しており、その指標である。「生物学的環境」とは、たとえば、生態系、目、科、属、種、亜種、生物、組織、細胞、ウイルス、オルガネラ、細胞下部構造、プリオン、および生体由来の試料を含めた、任意の生物学的設定をいう。

30

【0028】

当分野で既に知られている例示的な捕捉剤には、抗体、ポリヌクレオチドおよびアプタマーが含まれる。

40

【0029】

本明細書中で使用する用語「抗体」とは、抗原による刺激後に活性B細胞によって産生され、抗原と特異的に結合して生物系において免疫応答を促進することができる種類のタンパク質をいう。完全抗体は、典型的には、2本の重鎖および2本の軽鎖が含まれる4つのサブユニットからなる。用語抗体には、それだけには限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはその断片を含めた、天然および合成の抗体が含まれる。例示的な抗体には、IgA、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgMなどが含まれる。例示的な断片には、Fab、Fv、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>などが含まれる。モ

50

ノクローナル抗体とは、「エピトープ」と呼ばれる、別の生体分子の単一の特定の空間的かつ極性の組織と特異的に結合し、したがってそれに相補的であると定義される抗体である。一部の形態では、モノクローナル抗体は同じ構造を有することもできる。ポリクローナル抗体とは、様々なモノクローナル抗体の混合物をいう。一部の形態では、ポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体のうち少なくとも2つが異なる抗原性エピトープと結合する、モノクローナル抗体の混合物であることができる。異なる抗原性エピトープは、同じ標的上、異なる標的上、またはその組合せであることができる。抗体は、宿主の免疫化および血清の収集などの当分野で周知の技術によって（ポリクローナル）、または連続ハイブリドーマ細胞系を調製し、分泌されたタンパク質を収集することによって（モノクローナル）調製することができる。

10

**【0030】**

本明細書中で使用する用語「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチド、ヌクレオシドまたはその類似体を含めた2つ以上の単量体からなる有機ポリマーを示す。用語「ヌクレオチド」とは、プリンまたはピリミジン塩基およびリン酸基と結合したりボースまたはデオキシリボース糖からなり、核酸の基本構造単位であるいくつかの化合物のうちの任意のものをいう。用語「ヌクレオシド」とは、デオキシリボースまたはリボースと合わせたプリンまたはピリミジン塩基からなり、特に核酸中に見つかる化合物（グアノシンまたはアデノシンなど）をいう。用語「ヌクレオチド類似体」または「ヌクレオシド類似体」とは、それぞれ、1つまたは複数の個々の原子が異なる原子または異なる官能基で置き換えられた、ヌクレオチドまたはヌクレオシドをいう。したがって、用語「ポリヌクレオチド」には、任意の長さの核酸、特に、DNA、RNA、類似体およびその断片が含まれる。また、3個以上のヌクレオチドのポリヌクレオチドは、「ヌクレオチドオリゴマー」または「オリゴヌクレオチド」とも呼ばれる。

20

**【0031】**

本明細書中で使用する用語「アプタマー」とは、特定の標的と結合するオリゴ核酸またはペプチド分子を示す。特に、核酸アプタマーは、たとえば、*in vitro* 選択の繰返し、または同等にSELEX（指数関数的富化によるリガンドの系統的な進化）を介して、小分子、タンパク質、核酸などの様々な分子標的、ならびにさらには細胞、組織および生物と結合するように操作された核酸種を含むことができる。アプタマーは抗体に匹敵する分子認識特性を提供するため、生物工学的および治療的用途において有用である。ペプチドアプタマーとは、細胞内のタンパク質-タンパク質の相互作用と特異的に結合してそれを妨害するように設計されたペプチドである。特に、ペプチドアプタマーは、たとえば、酵母二重ハイブリッド（Y2H）系に由来する選択戦略に従って誘導することができる。特に、この戦略によれば、転写因子結合ドメインと付着した可変ペプチドアプタマーを、転写因子活性化ドメインと付着した標的タンパク質に対してスクリーニングする。この選択戦略を介したペプチドアプタマーとその標的との*in vivo* 結合は、下流の酵母マーカー遺伝子の発現として検出される。

30

**【0032】**

本明細書中で使用する用語「多リガンド捕捉剤」とは、薬剤中に含まれる複数のリガンドの特異的結合を介して標的と特異的に結合することができる薬剤を示す。たとえば、多リガンド捕捉剤は、捕捉剤中に含まれる複数のリガンドの特異的結合を介して標的と特異的に結合するように構成された捕捉剤であることができる。多リガンド捕捉剤には、様々な化学性質の分子（たとえば、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または小分子）が含まれることができ、リガンドによって形成される捕捉剤およびリガンドのうち少なくとも1つと付着する捕捉剤がどちらも含まれる。

40

**【0033】**

特に、本明細書中に記載する多リガンド捕捉剤は、それぞれ標的と結合することができる2つ以上のリガンドを含むことができる。本明細書中で使用する用語「リガンド」とは、標的と結合する親和性を有する化合物を示す。この親和性は任意の形態をとることができる。たとえば、そのような親和性は、非共有的相互作用、たとえば、特定の基質に特異

50

的かつ検出可能な、酵素中で起こる結合の種類に関連して説明することができる。典型的には、これらの相互作用には、典型的には同時に起こる、疎水性、ファンデルワールス、および水素結合などのいくつかの弱い相互作用が含まれる。例示的なリガンドには、それぞれが特定の標的（たとえばタンパク質標的）に対して測定可能な親和性を有する、アミノ酸、非天然アミノ酸、および人工アミノ酸、ならびに有機分子の群から採用される複数のサブユニットからなる分子が含まれる。より詳細には、例示的なリガンドには、ポリペプチドおよびペプチド、1つもしくは複数の官能基が含まれるように修飾できる可能性がある他の分子が含まれる。たとえば、開示したリガンドは、標的に対する親和性を有することができる、標的と結合することができる、標的と特異的に結合することができる、および/または標的との結合において1つもしくは複数の他のリガンドとは結合的に識別可能であることができる。一般に、開示した多リガンド捕捉剤は標的と特異的に結合する。このためには、多リガンド捕捉剤中に含まれる個々のリガンドが個々に標的と特異的に結合することは必要ではないが、これも企図される。

10

20

30

40

#### 【0034】

本明細書中で使用する用語「ポリペプチド」とは、2つ以上のアミノ酸単量体および/またはその類似体からなる、有機の直鎖状、環状、または分枝状のポリマーを示す。用語「ポリペプチド」には、完全長のタンパク質およびペプチドを含めた任意の長さのアミノ酸ポリマー、ならびにその類似体および断片が含まれる。また、3個以上のアミノ酸のポリペプチドは、タンパク質オリゴマー、ペプチドまたはオリゴペプチドとも呼ばれる。特に、用語「ペプチド」および「オリゴペプチド」は、通常は50個未満のアミノ酸単量体を有するポリペプチドを示す。本明細書中で使用する用語「アミノ酸」、「アミノ酸単量体」、または「アミノ酸残基」とは、20種の天然に存在するアミノ酸のうちの任意のもの、非天然アミノ酸、および人工アミノ酸をいい、DおよびL光学異性体がどちらも含まれる。特に、非天然アミノ酸には、天然に存在するアミノ酸のD-立体異性体が含まれる（これらは酵素分解に感受性がないため、これらには有用なリガンド構成単位が含まれる）。用語「人工アミノ酸」とは、標準のアミノ酸カップリング化学を用いて容易に一緒にカップリングすることができるが、天然に存在するアミノ酸とは似ていない分子構造を有する分子を示す。用語「アミノ酸類似体」とは、1つまたは複数の個々の原子が異なる原子、同位体、または異なる官能基のいずれかで置き換えられているが、それ以外は類似体が由来する元のアミノ酸と同一であるアミノ酸をいう。これらのアミノ酸はすべて、標準のアミノ酸カップリング化学を用いてペプチドまたはポリペプチド内に合成によって取り込ませることができる(Lam, K. S.ら、1997)。本明細書中で使用する用語「ポリペプチド」には、1つまたは複数の単量体またはアミノ酸単量体以外の構成単位を含むポリマーが含まれる。用語、単量体、サブユニット、または構成単位とは、適切な条件下で同一または異なる化学性質の別の単量体と化学結合されてポリマーを形成することができる化学物質を示す。用語「ポリペプチド」とは、構成単位のうちの1つまたは複数がアミドまたはペプチド結合以外の化学結合によって互いに共有結合しているポリマーを含むことをさらに意図する。いくつかの実施形態では、2つ以上のリガンドのうちの少なくとも1つのリガンドは1つまたは複数のアミノ酸残基を含み、特に、ポリペプチドによって形成されることができる。特に、いくつかの実施形態では、少なくとも2つのリガンドのうちの少なくとも1つは、3~100個の単量体、特に5~80個の単量体を含むペプチドである。一部の実施形態では、ペプチドは、3~10個の単量体、特に5~7個の単量体を含むことができる。一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤はタンパク質からなることができる。

#### 【0035】

本明細書中で使用する用語「タンパク質」とは、別の分析物、特に、他のタンパク質、DNA、RNA、脂質、代謝物、ホルモン、ケモカイン、および小分子を含めた他の生体分子と相互作用することができる、特定の二次および三次構造を有するポリペプチドを示す。

#### 【0036】

50

特に、本明細書中に記載の捕捉剤に含まれるタンパク質は、天然に存在しないタンパク質、すなわち、それ自体で天然に存在せず、人工的な補助なしに存在しないタンパク質であることができる。天然に存在しないタンパク質には、天然に存在するタンパク質の修飾によって誘導することができるタンパク質が含まれる。

【0037】

より詳細には、いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤はペプチドリガンドから構築することができ、そのそれぞれは、その一部が天然に存在しない、および/または特定の任務のために固有の化学的機能を有するように設計されている固有のアミノ酸の組から構築する。これらの実施形態の一部では、ペプチドは、事前に決定した実験設計に従って、人工アミノ酸を用いて、および/または天然に存在するペプチドと構造および/もしくは機能は類似もしくは異なる天然に存在しないペプチドがもたらされるように合成する。1つまたは複数のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質リガンドを含む多リガンド捕捉剤は、タンパク質性質の多リガンド捕捉剤と呼ぶことができる。

10

【0038】

多リガンド捕捉剤がアミノ酸リガンドを含むいくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、アミノ酸構成単位は容易に入手可能であるか、または比較的大量に化学合成することが困難でないため、複数グラム量を低コストで生成することができる。アミノ酸およびペプチドを合成する手順は当業者に知られており、実施例1に例示した手順に例示されている。

【0039】

他の実施形態では、多リガンド捕捉剤は、アミノ酸以外の化学性質を有するリガンドを含む。特に、一部の例示的な実施形態では、多リガンド捕捉剤は、ポリヌクレオチド（特にオリゴヌクレオチド）、小分子、および生物活性を有する可能性がある様々な他のリガンドによって形成することができる。

20

【0040】

本明細書中で使用する用語「小分子」とは、合成または生物学的起源であり、単量体および/または一次代謝物が含まれ得るがポリマーではない有機化合物を示す。特に、小分子は、タンパク質または核酸でなく、内在性（たとえば、標的の阻害もしくは活性化）または外因性（たとえば細胞シグナル伝達）の生物学的役割を果たし、分子生物学のツールとして使用する、または医学における薬物として適切な分子を含むことができる。また、小分子は、天然の生体分子と関係性を有さない場合もある。典型的には、小分子は  $1 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  未満のモル質量を有する。例示的な小分子には、二次代謝物（アクチノマイシン (actinomycin) - D など）、特定の抗ウイルス薬（アマンタジンおよびリマンタジンなど）、催奇形物質および発癌物質（ホルボール12-ミリスレート13-アセテートなど）、天然物（ペニシリン、モルヒネおよびパクリタキセルなど）ならびに本開示を読んだ際に当業者によって同定可能な追加の分子が含まれる。

30

【0041】

また、リガンドが非アミノ酸性質の化合物によって形成される実施形態では、リガンドは人工化合物（ヌクレオチドまたはヌクレオシド類似体など）を用いて合成することができ、天然に存在する対応する分子を模倣できる可能性がある非天然リガンドがもたらされる場合がある。リガンドとして適切な非アミノ酸分子を合成する手順は当分野で知られている。たとえば、非ペプチド捕捉剤を含む単量体をアセンブルする手順は、その特定のリガンドのクラスに特異的な反応、たとえば、ポリヌクレオチド捕捉剤の2つのヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合の形成、または小分子捕捉剤の有機合成に一般的な多数の反応のうち任意のもの（たとえば、アミド結合の形成、C-C結合の形成、 $S_N1$ 、 $S_N2$ 、 $E1$ 、 $E2$ ）を含む。分子の合成に適切なさらなる手順は当業者によって同定可能であり、さらに詳述しない。

40

【0042】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は同じ化学性質のリガンドによって形成することができる。他の実施形態では、本開示を読んだ際に当業者によって理解されるように、

50

多リガンド捕捉剤は異なる化学性質のリガンドによって形成することができる。

【0043】

特に、いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤の1つまたは複数のリガンドは、同じ捕捉剤中に含まれる他のリガンドのいずれとも化学性質が異なり得る。生じる多リガンド捕捉剤には、異なる化学性質を有する少なくとも2つの化合物が含まれることができ、本明細書中でキメラ捕捉剤またはキメラ多リガンド捕捉剤としても同定される。例示的なキメラ多リガンド捕捉剤には、それだけには限定されないが、小分子/ペプチド、小分子/ポリヌクレオチド、およびポリヌクレオチド/ペプチドが含まれる。本開示中にさらに例示するように、リガンドの逐次付加はリガンドの組成物自体によってではなく、リガンドが付随する官能基によって達成されるため、当業者には、多リガンド捕捉剤を構成するリガンドの化学性質は限定されないことが理解されよう。

10

【0044】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤の1つまたは複数のリガンドは、同じ多リガンド捕捉剤中に含まれる少なくとも1つの他のリガンドに非関連および/または標的に非関連である。2つの項目間において本明細書中で使用する用語「非関連」とは、以前に確立された関係性の理由、特に共通祖先による接続または会合を欠くことを示す。

【0045】

本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤中では、2つ以上の含まれるリガンドのそれぞれは、多リガンド捕捉剤の標的と特異的に結合することができ、かつ他方と結合的に識別可能であることができる。

20

【0046】

分子、特にリガンドに関して本明細書中で使用する表現「結合的に識別可能」とは、特定の分子またはその一部分と結合するその能力に基づいて識別可能な分子を示す。したがって、たとえば、第1の分子は、第1の分子が第3の分子と特異的に結合し、第2の分子が第4の分子と特異的に結合し、第4の分子が第3の分子とは明確に異なる場合に、第2の分子とは結合的に識別可能である。第1および第2の分子が同じ第3の分子と特異的に結合する場合は、第1の分子は、第1の分子が第3の分子の第1の部分と特異的に結合し、第2の分子が第3の分子の第2の部分と特異的に結合し、第3の分子の第1の部分が第3の分子の第2の部分とは明確に異なる場合に、第2の分子とは結合的に識別可能である。したがって、たとえば、同じ標的と結合する第1のリガンドおよび第2のリガンドは、第1のリガンドが標的の第1の部分 ( p o r t i o n または m o i e t y ) (たとえば標的タンパク質の第1の結合部位) と特異的に結合し、第2のリガンドが標的の第2の部分 (たとえば標的タンパク質の第2の結合部位) と特異的に結合し、標的の第1の部分が標的の第2の部分とは明確に異なる場合に、結合的に識別可能である。別の例として、同じ標的と結合する第1のリガンドおよび第2のリガンドは、第1のリガンドが標的の第1の部分 (たとえば標的タンパク質の第1の結合部位) と結合し、第2のリガンドが標的の第2の部分 (たとえば標的タンパク質の第2の結合部位) と結合し、標的の第1の部分が標的の第2の部分とは明確に異なり、かつ第1のリガンドが第2の部分と結合しない、第2のリガンドが第1の部分と結合しない、またはその両方の場合に、結合的に識別可能である。

30

40

【0047】

特に、たとえば、2つ以上のリガンドは、捕捉剤と標的が結合する際に2つ以上のリガンドのそれぞれが標的と特異的に結合することなどによって標的と結合するように、多リガンド捕捉剤中で配置することができる。特に、たとえば、2つ以上のリガンドは、標的上の隣接する結合部位と結合することができる。これらの実施形態では、2つ以上のリガンドは共有結合によって互いに結合している。

【0048】

用語「共有結合 ( c o v a l e n t b o n d または c o v a l e n t l i n k または c o v a l e n t l i n k a g e ) 」とは、原子間、または原子と他の共有結合との間で電子対を共有することによって特徴づけられる化学結合の形態を示す。少なくとも2

50

つのリガンドを連結する例示的な共有結合には、それだけには限定されないが、アミドまたはペプチド結合、アジドとトリアリールホスフィンとの間の改変シタウディングライゲーション（図1およびその全体が本明細書中に参考として組み込まれているE. Saxonら、Science (2000)、第287巻、2007-2010を参照）、アジドとアセチレンとを共有結合する1, 2, 3-トリアゾール（図2およびその全体が本明細書中に参考として組み込まれているV. D. Bockら、Eur. J. Org. Chem. (2006)、51-68を参照）、スルホニルアジドとチオ酸とを共有結合するアシルスルホンアミド（図3およびその全体が本明細書中に参考として組み込まれているX. Huら、J. Am. Chem. Soc. (2008)、第130巻、13820-13821を参照）、ならびにアルデヒドと第一級アミンとをカップリングさせて過渡的なヘミアミナルまたはイミンを形成し、これを還元して第二級または第三級アミンを得ること（図4およびその全体が本明細書中に参考として組み込まれているM. Hochguertelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002)、第99巻、3382-3387, 130, 13820-13821を参照）が含まれる。

#### 【0049】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は複数のリガンドを含み、特に、本開示を読んだ際に当業者によって同定可能な基準による実験設計に応じて、2~5個のリガンド、またはそれよりも多くのリガンドが含まれる場合がある。長さが増加した多リガンド捕捉剤（たとえば3個以上のリガンド）の特性には、標的と結合した際のエンタルピーの安定性の増強（親和性の増強をもたらす）およびこの結合相互作用における特異性の増加が含まれることができる。たとえば、ペプチドに基づく多リガンド捕捉剤を含む長いポリペプチド鎖は、三次元の折り畳まれた構造をとることができ、それにより、標的との可能な三次相互作用の数が増加する。長さが低下した多リガンド捕捉剤（たとえば3個以下のリガンド）の特性には、標的との結合におけるエントロピー消費の低下および合成負荷の低下が含まれる場合がある。

#### 【0050】

多リガンド捕捉剤が複数のリガンドを含む実施形態では、使用するリガンドの正確な数は、標的の性質、リガンドの化学性質、および所望する標的との最終的な結合親和性のいずれにも依存する場合がある。

#### 【0051】

本明細書中で使用する用語「結合親和性」または「親和性」とは、第1の分子と第2の分子の結合に関連する親和性を示す。特に、たとえば、結合親和性は、結合の強度の測度をいう場合がある。たとえば、会合定数、解離定数、会合速度、解離速度、ならびに他の動力学および結合の測度が、結合親和性の測度および/または構成成分となることができる。結合親和性は、水素結合、静電的相互作用、疎水性相互作用、およびファンデルワールス力などの、2つの分子間の非共有の分子間相互作用によって影響を受ける。会合および解離定数は、典型的にはリガンド（すなわち、他の分子と結合しているとみなされる分子）の濃度に関して表す。内容によって別段に指定しない限りは、親和性および結合親和性への定量的および相対的な言及は、第1の分子と第2の分子の結合の解離定数として表す。解離定数が小さいほど、リガンドがより密に結合している、または2つの分子間の結合親和性がより良好である。

#### 【0052】

いくつかの実施形態では、6または7量体ペプチドなどのリガンドには、 $10^{-4} \sim 10^{-6}$  Mの標的に対するリガンドの結合の解離定数が典型的には達成可能である。 $10^{-6} \sim 10^{-7}$  Mおよび $10^{-7} \sim 10^{-8}$  Mおよび $10^{-8} \sim 10^{-9}$  Mの解離定数が、14量体ペプチドなどの二重リガンド捕捉剤（図5を参照）および22量体ペプチドなどの三重リガンド捕捉剤（図6を参照）においてそれぞれ典型的には達成可能である。例示的な一事例では、2つの小分子リガンドが標的と特異的に接触し、互いに共有的に反応して、 $10^{-15}$  Mの解離定数を有する阻害剤を形成することが示されている（Lewis, W. G.ら、2002、Manetsch, R.ら、2004、Bourne, Y.ら

10

20

30

40

50

、2004、Krasinski, A.ら、2005)。

【0053】

本明細書中に記載の多様な化学性質のリガンドからなる多リガンド捕捉剤は、長さおよび達成可能な親和性に関して制限を示さない。唯一の要件は、図7～11)に例示されており、本開示中にさらに記載されているように、多リガンド捕捉剤のそれぞれのリガンドの化学性質がいくつかの官能基(たとえば、アジドもしくはアセチレン、スルホニルアジドもしくはチオ酸、トリアリールホスフィンもしくはアジド、またはアルデヒドもしくはアミン)のうちの1つの提示を許容し、したがって、n個のリガンドを含む多リガンド捕捉剤の連続的なアセンブルを許容することである。

【0054】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は直鎖状捕捉剤である、すなわち、2つ以上のリガンドが鎖様の構造で互いに連結されている捕捉剤である。本開示の例示的な直鎖状多リガンド捕捉剤は実施例7～21に記載されており、2つの7量体D-ペプチドリガンド(1°および2°)からなる二重リガンド捕捉剤(図5、図12、図13および図14を参照)、ならびに3つのD-ペプチドリガンド(1°、2°、および3°)からなる三重リガンド捕捉剤(図6および図15を参照)が含まれる。

【0055】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤は分枝状捕捉剤である、すなわち、少なくとも2つのリガンドのうち少なくとも1つが、捕捉剤の主部分に位置するまたはそれから伸長する捕捉剤である。特に、分枝状捕捉剤には、2つ以上のリガンドのうち少なくとも1つを分子の分枝状部分中で提示するように構成された、分枝状ポリペプチドなどの分枝状分子が含まれる。例示的な分枝状多リガンド捕捉剤は実施例17に記載されており、2つの7量体D-ペプチドリガンド(1°および2°)からなる分枝状二重リガンド捕捉剤[ただし、1°リガンドは2°リガンド内の非末端残基で2°リガンドと接続しており、同様に対応する直鎖状二重リガンド捕捉剤を超える5倍の親和性の増強を示す](図16Aを図5と比較して参照)、ならびに3つの7量体D-ペプチドリガンド(1°、2°、および3°)からなる分枝状三重リガンド捕捉剤[ただし、3°リガンドは末端残基で分枝状二重リガンドアンカーと接続している](図17Bに模式図を示す)(図18を図6と比較して参照)が含まれる。

【0056】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、天然で共有結合していない少なくとも2つのリガンドを含む。

【0057】

特に、一部の実施形態では、同じ天然に存在する分子の一部ではない、特に標的の同じ基質の一部ではない、少なくとも2つのリガンドを含む多リガンド捕捉剤である。

【0058】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は、標的と結合することが知られている化合物から独立して選択された、特に設計された、少なくとも1つのリガンドを含む。特に、一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤の少なくとも1つのリガンドは、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしていないおよび/またはそれに由来しない。

【0059】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は、単離された標的と結合することができる少なくとも1つのリガンドを含む。これらの実施形態の一部では、1つまたは複数の追加のリガンドが多リガンド捕捉剤中に含まれることができ、1つまたは複数の追加のリガンドは、捕捉剤と標的が特異的結合する際に標的と接触する。

【0060】

本明細書中に記載するいくつかの多リガンド捕捉剤では、捕捉剤の構造ならびにリガンドの数、化学性質および可能な修飾は、選択した標的の所望の結合親和性および結合特異性の観点から決定することができる。本明細書中で使用する用語「結合特異性」とは、多リガンド捕捉剤と標的の結合親和性および多リガンド捕捉剤と参照分子の結合親和性の間

10

20

30

40

50

の際の倍数を示す。

【0061】

一部の実施形態では、参照分子と比較した多リガンド捕捉剤の結合特異性は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、または少なくとも100である。参照分子とは、多リガンド捕捉剤の結合親和性を多リガンド捕捉剤と標的との結合親和性と比較する、任意の分子である。一部の実施形態では、リガンドまたは多リガンドといくつかの異なる標的との結合を説明する場合、参照分子は、標的のうちのいずれとも異なる分子によって提供することができる。たとえば、標的が血清タンパク質である場合、参照分子は、別の血清タンパク質、細胞質タンパク質、または標的と共通祖先のタンパク質であることができる。これらの実施形態では、参照分子により、たとえば、リガンドまたは多リガンドと標的および標的でない参照分子との間の結合親和性の差異の測定および監視が可能となる。一部の実施形態では、いくつかのリガンドまたは多リガンドと標的との示差的結合を説明する場合、参照分子は標的によって形成されることができる。これらの実施形態では、リガンドまたは多リガンドと単一の標的との相対的結合親和性は、参照分子を使用することによって測定および監視することができる。これらの実施形態では、参照分子により、たとえば、多リガンド捕捉剤を生産および/または同定する開示した方法などにおいて、様々な形態のリガンドまたは多リガンドによる結合親和性の差異の増加を測定および監視することが可能となる。上述のように、標的および参照分子に対する多リガンド捕捉剤の結合親和性の差異は、多リガンド捕捉剤の結合特異性と呼ぶことができる。

10

【0062】

一部の実施形態では、標的に対する多リガンド捕捉剤の結合特異性は、標的に関連する参照分子に対する多リガンド捕捉剤の結合特異性に基づくことができる。特に、これらの実施形態の一部では、標的に関連する参照分子は、標的の対立型、標的の相同体および/または標的の修飾型である。

20

【0063】

一部の実施形態では、標的に対する多リガンド捕捉剤の結合親和性は、アンカーリガンドの結合親和性よりも、たとえば、少なくとも $10^6$ 、少なくとも $10^7$ 、少なくとも $10^8$ 、少なくとも $10^9$ 、少なくとも $10^{10}$ 、少なくとも $10^{11}$ 、少なくとも $10^{12}$ 、または少なくとも $10^{13}$ 高い場合がある。

【0064】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤と標的の結合の解離定数は、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  M、 $10^{-15}$  M、または $10^{-16}$  M以下である。

30

【0065】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、捕捉剤中に所望の特長が導入されるように合成または修飾することができる。例示的な所望の特長は、多リガンド捕捉剤中の化学活性または生物活性を可能にするまたは向上させるものである。例示的な化学活性または生物活性には、溶解度、特に水溶性、検出性（特異的環境における検出性が含まれる）、生体利用度（特に、捕捉剤を投与する個体の全身循環を達成する能力）、免疫原性（特に、捕捉剤を投与する個体において液性または細胞媒介性の免疫応答を誘発する、捕捉剤の能力）、ならびに反応性（化合物または物質と反応または結合する、特に、別の目的の化合物もしくは分子および/または表面と結合する能力が含まれる）が含まれる。所望の特長は、典型的には、多リガンド捕捉剤の合成中またはその後、別の分子または官能基を付加することによって導入することができる。所望の化学活性または生物活性を可能にするまたは向上させる例示的な分子または官能基は、親水性または疎水性の分子または官能基（たとえば、ポリエーテルまたはポリヌクレオチド）、担体（たとえばワクチン担体）、および標識（たとえば、コード分子、たとえばコードポリヌクレオチド、蛍光色素または金ナノ粒子などの捕捉剤の検出を可能にする分子または官能基）を含む。

40

【0066】

例示的な修飾された多リガンド捕捉剤には、2つの7量体D-ペプチドリガンドからな

50

り、N末端で修飾されて三次リガンドと結合するためのアセチレン官能基を提示する二重リガンド捕捉剤（図12を参照）、中性および塩基性pHで実行する有機反応のために捕捉剤を安定化させる鎖保護基を有するアミノ酸側の残基で修飾された捕捉剤（図13の構造を参照）、ドットプロット、ウエスタンプロット、およびELISA様アッセイにおける捕捉剤の検出性を可能にするビオチン分子が含まれるようにNまたはC末端が修飾された捕捉剤（図14および15を参照）、ならびに、蛍光偏光（実施例6を参照）、免疫細胞化学、および免疫組織化学を含めた生物学的アッセイにおける捕捉剤の検出性を提供する蛍光色素分子が含まれるようにN末端が修飾された捕捉剤が含まれる。

#### 【0067】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤、特にペプチドリガンドを含む多リガンド捕捉剤は、1つまたは複数の保護基（たとえば、アルコール保護基、アミン保護基、カルボニル保護基など）が含まれるように合成または修飾することができる。たとえば、一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤を固相樹脂上で合成し、標準の側鎖保護基を無処置のままにする条件下で放出させることができる。他の例示的な実施形態では、そのような結合が所望される用途において、1つまたは複数の残基の側鎖保護を用いて、多リガンド捕捉剤と他の化合物、特に他のリガンドとの結合を可能にすることができる（たとえばCuAAC、実施例12を参照）。これらの用途の例には、断片縮合による捕捉剤のバルク合成が含まれる。他の実施形態では、側鎖保護を用いて多リガンドの環化を得ることができる。特に、多リガンド捕捉剤は、捕捉剤の一方の末端を第1の官能基（たとえば-SH）で官能化し、他方の末端を第2の官能基（たとえば-SH）で官能化することができる。その後、第1および第2の官能基を互いに反応させて、単一の閉ループ構造（たとえばジスルフィド結合）を生じさせる。この閉ループ構造は、低下したコンホメーションエントロピーを示し、これは、多リガンド捕捉剤と標的の結合相互作用をさらに安定化させることができる。他の実施形態では、側鎖保護を用いて、単パラメータまたは複数パラメータのアッセイにおいて多リガンド捕捉剤と基質または表面との高度に配向された共有結合を達成することができる。これらの実施形態のうちの任意のものにおいて、これら3つのうちの任意のものを利用して記載した化学変換が完了した後、側鎖保護を（たとえば酸処理によって）除去することができる。

#### 【0068】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤に水溶性を提供することができる化合物が付加されるように多リガンド捕捉剤を合成または修飾することができる。例示的な化合物には、それだけには限定されないが、ポリエーテル（たとえば、ポリエチレングリコール（PEG）またはオリゴヌクレオチド）などの親水性分子ならびに非イオン性、無毒性、生体適合性、および高度に親水性の他のポリマーが含まれる。たとえば、PEG化捕捉剤は、その増加した水溶性および生体利用度により増強した治療特性を有することができる。

#### 【0069】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、捕捉剤の存在下における標的の活性の特徴づけおよび/または標的に対する捕捉剤の結合親和性を含めた定量的アッセイを可能にする、安定な非放射性（たとえば、 $^2\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、もしくは $^{13}\text{C}$ ）または放射性同位元素（たとえば、 $^3\text{T}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、もしくは $^{32}\text{P}$ ）が含まれるように合成または修飾することができる。

#### 【0070】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、生化学的または免疫局在性研究のための、捕捉剤に対するポリクローナル抗体を産生させるために、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、BSA、または卵白アルブミンなどの担体とコンジュゲートするように修飾することができる。多リガンド捕捉剤と担体の間のコンジュゲーションは、多リガンド捕捉剤のシステイン残基を担体タンパク質にカップリングさせるマレイミド方法によって達成することができる。

#### 【0071】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、検出性を可能または増強するために、ビオチン分子とコンジュゲートしているように修飾することができる。ビオチンで標識した多リガンド捕捉剤は、捕捉剤とその標的との相互作用の増幅を可能にする、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどのストレプトアビジンと連結したタンパク質でさらに標識することができる。別の実施形態では、ストレプトアビジン - Cy 5 などのアダプタータンパク質によってビオチン標識をフルオロフォア標識へと変換することができる。

#### 【0072】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、暗視野および電子顕微鏡観察を含めた方法によって複合体試料（たとえば組織切片）中の捕捉剤と標的の結合の可視化を可能にする、金ナノ粒子標識とコンジュゲートしているように修飾することができる。このコンジュゲーションは、多リガンド捕捉剤の遊離チオール（たとえば -SH）を金ナノ粒子とカップリングさせるマレイミド方法によって達成することができる。また、このコンジュゲーションは、緩和な条件下（pH 7.5 ~ 8.2）で金ナノ粒子を多リガンド捕捉剤中の第一級アミンと反応させるスルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル（スルホ - NHS）方法によっても達成することができる。遊離チオールおよび第一級アミンは、捕捉剤の既存の構成成分であるか、または当業者によって同定可能な化学によって達成されるルーチンの設置される修飾のいずれかの官能基の例である。

#### 【0073】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は、多リガンド捕捉剤の標的以外の標的に対して事前に決定した親和性を有する、別のペプチド、小分子、またはタンパク質などの別の目的分子を付加することによって修飾することができる。2つの標的がどちらもタンパク質である実施形態では、修飾された多リガンド捕捉剤を用いてタンパク質間の相互作用を分析することができる。

#### 【0074】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載する多リガンド捕捉剤は多リガンドタンパク質捕捉剤である、すなわち、特定のタンパク質に対して結合親和性を有する少なくとも一部分を含む捕捉剤である。例示的な多リガンドタンパク質捕捉剤には、それだけには限定されないが、タンパク質性質の標的を特異的に認識し、それと接触し、安定な複合体を形成することができる、任意の化学性質の捕捉剤が含まれる。特に、多リガンドタンパク質捕捉剤と標的タンパク質の結合は、タンパク質捕捉剤の1つまたは複数の部分と標的タンパク質の1つまたは複数の結合部位との特異的結合によって行なうことができる。多リガンド捕捉剤が多リガンドタンパク質捕捉剤である実施形態では、2つ以上のリガンドは、標的タンパク質の隣接する結合部位と隣接して結合することができる。

#### 【0075】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は生物学的であるが非タンパク質性質である追加の標的を認識することができる。例示的な多リガンド捕捉剤には、それだけには限定されないが、核酸、炭水化物、ペプチド、小分子、および/または細菌孢子標的を含めた非タンパク質性質の生物学的標的を特異的に認識し、それと接触し、安定な複合体を形成することができる、任意の化学性質の捕捉剤が含まれる。特に、多リガンド捕捉剤と非タンパク質標的の結合は、捕捉剤の1つまたは複数の部分と標的の1つまたは複数の隣接する結合部位との結合によって行なうことができる。特に、DNA標的上のポリアミドの二量体化が実証されている（Poulin - Kerstien, A. T. および P. B. Der van, 2003）。一部の実施形態では、2つ以上の天然物を含む多リガンドは核酸標的と特異的に結合することができる（Tse, W. C. および D. L. Boger, 2004）。さらに、2つ以上のペプチドを含む多リガンドは、炭水化物（Landon, L. A. ら、2004）、蛍光色素（Marks, K. M. ら、2004）、および細菌孢子標的（Lusvarghi, S. ら、2009）と特異的に結合することができる。さらに、2つ以上のポリヌクレオチドを含む多リガンドはペプチド標的と特異的に結合することができる（Williams, K. P. ら、1997）。

10

20

30

40

50

## 【0076】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は非生物学的性質の標的を認識することもできる。例示的な多リガンド捕捉剤には、それだけには限定されないが、金属および金属イオン、半導体、および伝導性ポリマーを含めた非生物学的標的を特異的に認識し、それと接触し、安定な複合体を形成することができる、任意の化学性質の捕捉剤が含まれる。特に、多リガンド捕捉剤と非生物学的標的との結合は、捕捉剤の1つまたは複数の部分と標的の1つまたは複数の部位との結合、特に特異的結合によって行なうことができる。一部の実施形態では、2つ以上のペプチドを含む多リガンドは、AuもしくはCr (Brown, S., 1997)、ガリウムヒ素 (Whaley, S.R., 2000)、酸化ケイ素 (Eteshola, E., 2005)、またはポリピロールポリマー (Sanghvi, A.B., 2005) と特異的に結合することができる。

10

## 【0077】

いくつかの実施形態では、標的に特異的な多リガンド捕捉剤のリガンドは、生じる多リガンド捕捉剤と同じ標的を用いて同定する。特に、一部の実施形態によれば、多リガンド捕捉剤のリガンドの同定は、それぞれの結合したリガンドと別のリガンドとの間の共有結合が可能となるように配置した標的上の対応する部位で選択標的と非共有付着することができるリガンドを選択することによって、行なうことができる。

## 【0078】

いくつかの実施形態では、リガンドの選択は、候補リガンドから、たとえば、標的によって触媒される、標的と結合した候補リガンド間の共有結合の形成が可能となる時間かつ条件下で候補リガンドを標的と接触させることによって、行なうことができる。

20

## 【0079】

いくつかの実施形態では、候補リガンドのうちの少なくとも1つは、少なくとも1つの他の候補リガンドに非関連および/または標的に非関連である。一部の実施形態では、提供するすべての候補リガンドは、互いにおよび/または標的と非関連である。特に、一部の実施形態では、候補リガンドは、当初は標的と結合できることが知られていない化合物を含む。

## 【0080】

一部の実施形態では、候補リガンドは、標的またはその一部分と結合できることが当初から知られている化合物を含む。

30

## 【0081】

一部の実施形態では、リガンドの選択は、標的と、ならびにこれらの実施形態の一部では標的上の目的の特異的部位(たとえば、抗体の結合部位および対応するエピトープ)と結合する、候補リガンドの知られている能力に基づいて行なうことができる。また、標的と結合するリガンドの能力に関連する、リガンドのさらなる特長(たとえば、結合親和性および/または特異性)も、選択を行なう際に考慮することができる。

## 【0082】

いずれにせよ、一部の実施形態では、リガンドの選択は、リガンド上の所望の特長を選択または導入するためにリガンドおよび/または候補リガンドを設計することによって行なうことができる。

40

## 【0083】

例示的な所望の特長は、リガンドと選択した標的および/または選択した標的内の特異的部位との結合を可能にするまたは向上させるものである。たとえば、一部の実施形態では、2つ以上のリガンドのうちの少なくとも1つは、標的上の特異的部位での結合が得られるように修飾することができる(たとえば、標的上の部位に対するリガンドの親和性および特異性に基づいて)。また、一部の実施形態では、リガンドは、標的、より詳細には標的上の目的の特異的部位によって特異的に認識される分子構造(ヌクレオチド配列など)を模倣するように設計することができる。一部の実施形態では、リガンドは、目的の標的と特異的に結合する能力を得るために、候補リガンド上に1つまたは複数の官能基を挿入することによって修飾することができる。一部の実施形態では、リガンドは、目的の標

50

的またはそれ上の特異的部位と特異的に結合する能力に基づいて候補リガンドの中から事前に選択して、プレスクリーニング手順をもたらすことができる。これらの実施形態すべての一部において、リガンドの選択は、事前に決定した親和性または選択性で標的上の目的部位と結合する能力に基づくこともできる。

**【0084】**

他の例示的な所望の特長は実験設計に依存する。たとえば、一部の実施形態では、リガンドまたは候補リガンドは、生じる多リガンド捕捉剤が水溶性を有することが確実にできるように設計することができる。特に、これらの実施形態の一部では、リガンドは、ポリ(エチレン)グリコール、アミン、カルボン酸、ヒドロキシル、またはアジド官能基を含有する単量体などの親水性性質のリガンド構成単位が含まれるように設計することができる。他の例示的な実施形態では、リガンドまたは候補リガンドは、プロテアーゼなどの生体分子酵素に対して安定性を示すように設計することができる。これらの実施形態の一部では、生体分子酵素は立体化学、配列、および官能基に対する選択性が高いため、そのような束縛に従って生物学的に耐性のある候補リガンドを設計する。非天然アミノ酸には天然に存在するアミノ酸の任意のD光学異性体が含まれ、実施例2のライブラリに例示されている。人工アミノ酸とは、標準のアミノ酸カップリング化学を使用して容易に一緒にカップリングすることができるが、天然に存在するアミノ酸とは似ていない分子構造を有する分子を示す。実施例1のFmoc-Az4-OH、Fmoc-Az8-OH、およびFmoc-D-Pra-OHが例示的な人工アミノ酸である。

10

**【0085】**

リガンドまたは候補リガンド上に選択または導入するさらなる所望の特長は、多リガンド捕捉剤中の他のリガンドと連結するリガンドまたは候補リガンドの能力を可能にするまたは向上させるものである。

20

**【0086】**

特に、本明細書中に記載する多リガンド捕捉剤では、リガンド上に提示される官能基によってリガンド対間の共有結合が行なわれて、2つの個別のリガンドと標的が結合した際にこれらの官能基が反応して共有結合を形成する。

**【0087】**

本明細書中で使用する用語「官能基」とは、その構造の特徴的な化学反応を司る、分子構造内の特定の原子群を示す。例示的な官能基には、すべて当業者によって同定可能な、炭化水素、ハロゲン含有基、酸素含有基、窒素含有基ならびにリンおよび硫黄含有基が含まれる。特に、本開示の意義での官能基には、カルボン酸、アミン、トリアリールホスフィン、アジド、アセチレン、スルホニルアジド、チオ酸およびアルデヒドが含まれる。特に、たとえば、第1の官能基および第2の官能基は、以下の結合パートナーを含むように選択することができる：カルボン酸基およびアミン基、アジドおよびアセチレン基、アジドおよびトリアリールホスフィン基、スルホニルアジドおよびチオ酸、ならびにアルデヒドおよび第一級アミン。さらなる官能基は本開示を読んだ際に当業者が同定することができる。本明細書中で使用する用語「対応する官能基」とは、別の官能基と反応することができる官能基をいう。したがって、互いに反応することができる官能基を対応する官能基と呼ぶことができる。

30

40

**【0088】**

化合物または官能基に関して本明細書中で使用する用語「提示する」とは、付着したままで化合物または官能基の化学反応性が維持されるように行なわれる付着を示す。したがって、リガンド上に提示された官能基は、適切な条件下で、官能基を化学的に特徴づける1つまたは複数の化学反応を行なうことができる。

**【0089】**

特に、2つ以上のリガンドが改変シュタウディンガーライゲーションによって共有結合している実施形態では、官能基はアジドおよびトリアリールホスフィンによって形成され、反応は、水性環境中でもアジドおよびトリアリールホスフィン基の間でアミド結合を形成することによって安定な共有付加物を生じる化学選択的ライゲーションである(図1

50

)。2つ以上のリガンドが生体直交型のアミド化反応によって共有結合している実施形態では、官能基はスルホニルアジドおよびチオ酸によって形成され、これらを反応させてアシルスルホンアミドが形成される(図3)。2つ以上のリガンドが過渡的なヘミアミナルおよびイミンの還元によって共有結合している実施形態では、官能基はアルデヒドおよび第一級アミンの間の相互作用によって形成される(図4)。

【0090】

2つ以上のリガンドが生体直交型の1,3-双極ヒュスゲン付加環化反応によって共有結合している実施形態では、官能基はアジドおよびアセチレンによって形成され、これらを反応させて1,2,3-トリアゾール基が形成される(図2)。

【0091】

一部の実施形態では、官能基は選択したリガンドまたは候補リガンド中に元々提示されている。一部の実施形態では、リガンドと別のリガンドとを連結させるための官能基の提示は、リガンドまたは候補リガンド中に導入される所望の特長である。特に、これらの実施形態の一部では、候補リガンドと別のリガンドとの間の共有結合を特異的に可能にする官能基が導入されるようにリガンドまたは候補リガンドを修飾することが可能である。

【0092】

一部の実施形態では、別のリガンドと連結するためにリガンドおよび/または候補リガンド上に提示される官能基は、目的の標的およびそれ上に提示される官能基(たとえば、標的が生物学的標的である場合は、改変シュタウディングーライゲーションにおいて連結させるアジドおよびトリアリールホスフィンに対して非反応性である(その全体が本明細書中に参考として組み込まれているE. Saxonら、Science(2000)、第287巻、2007-2010)。

【0093】

いくつかの実施形態では、選択されたリガンドは少なくともアンカーまたは一次リガンドおよび少なくとも1つの二次リガンドを含み、これらは、本明細書中に記載の方法を用いて標的に対するその親和性について選択することができる。

【0094】

特に、候補リガンドを標的と接触させ、標的と特異的に結合して候補リガンド標的複合体を形成する候補一次リガンドを選択することによって、複数の候補一次リガンドから一次リガンドを選択することができる。

【0095】

その後、二次リガンド一次リガンド標的複合体の形成を可能にする時間かつ条件下で、複数の候補二次リガンドを一次リガンド標的複合体と接触させ、一次リガンド標的複合体と特異的に結合し、かつ一次リガンドと共有結合する二次リガンドを選択することによって、二次リガンドを選択することができる。

【0096】

特に、一次リガンドを任意選択で修飾して、標的によって触媒される反応において対応する第2の官能基と特異的に結合することができる第1の官能基を導入することができる。その後、修飾された一次リガンドを標的と接触させて、二次リガンドを選択するために使用する修飾された一次リガンド標的複合体を形成することができる。

【0097】

三次リガンド、四次リガンドなど、実験設計によって所望されるだけの数のリガンドの同定に向けられた同様の手法を用いて、追加のリガンドをさらに選択することができる。

【0098】

いくつかの実施形態では、様々な複数の候補リガンド(たとえば、候補一次リガンド、候補二次リガンド、候補三次リガンドなど)のうちの少なくとも2つは、互いに異なる場合がある。特に、複数の候補リガンドを、候補リガンドの以前の選択に由来する情報を用いて選択することができる。たとえば、複数の候補二次リガンドを、複数の第1の候補リガンドに由来する情報を用いて選択して、複数の候補二次リガンドから候補リガンドの親和性を増加させることができる。

10

20

30

40

50

## 【0099】

いくつかの実施形態では、複数の候補リガンドのうち少なくとも1つは基質に付着している。本明細書中で使用する用語「付着」または「付着した」とは、2つ以上の構成成分と一緒に保つための、結合、連結、力または繋がりによる接続または一体化をいい、たとえば、第1の分子が第2の分子もしくは物質と直接結合している、または1つもしくは複数の中間体分子が第1の分子および第2の分子もしくは物質の間に配置されている、直接または間接的な付着のいずれかが包含される。本明細書中で使用する用語「基質」とは、根底にある支持体または基層を示す。例示的な基質には、ガラスプレート、マイクロタイターウェルプレート、磁気ビーズ、ケイ素ウエファーおよび本開示を読んだ際に当業者によって同定可能なさらなる基質または表面などの固体基質が含まれる。

10

## 【0100】

特に、一部の実施形態では、それぞれの複数の候補リガンドは、それぞれの候補リガンドが含まれる複合体を互いに別々に検出することができるように、異なる基質または基質の一部分に付着している。これらの実施形態の一部では、候補リガンドはビーズに付着しており、候補リガンドのそれぞれは、1リガンド - 1ビーズの配置で単一のビーズに特異的に付着している。別の実施形態では、候補リガンドは表面上の特定の位置に付着しており、候補リガンドのそれぞれは、1リガンド - 1位置の配置で事前に決定された位置に特異的に付着している。

## 【0101】

特に、いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤のリガンドの選択はライブラリの支援を用いて行なうことができる。たとえば、一次および二次候補リガンドをライブラリ中に提供し、その後、これを標的分子および/または標的分子と選択した一次リガンドとの複合体でスクリーニングすることができる。

20

## 【0102】

多リガンド捕捉剤中に含めるリガンドがポリペプチド、特にペプチドを含む実施形態では、スクリーニング用に提示された3~10単量体ペプチドなどの候補ポリペプチドが含まれるタンパク質ライブラリを用いてリガンドを同定することができる。特に、一部の実施形態では、候補リガンドは、たとえば、それぞれその全体が本明細書中に参考として組み込まれている、Lam, K. S.ら、1997、Furka, A.ら、1991、Geyesen, H. M.およびT. J. Mason、1993に記載の手法を用いて、1ビーズ - 1化合物(OBOC)ペプチドライブラリ上に提示することができる。本開示を読んだ際に当業者によって同定可能なさらなるライブラリを使用することができる。目的標的との接触後のヒットの検出は、実施例セクションにさらに例示する方法が含まれる、当業者が同定可能なくつがの方法に従って行なうことができる。

30

## 【0103】

多リガンド捕捉剤中に含めるリガンドがポリヌクレオチド、特にオリゴヌクレオチドを含む実施形態では(図9を参照)、たとえば、ポリスチレンビーズ上の標準のホスホルアミダイトおよびチオホスホルアミダイト化学を用いた1ビーズ1オリゴヌクレオチド(S-ODNまたはS<sub>2</sub>-ODN)方法を使用して、オリゴヌクレオチドリガンドのライブラリを合成してリガンドを同定することができる(Yang, X.ら、2002)。特に、これらの実施形態では、ポリヌクレオチド捕捉剤のそれぞれのリガンドは、典型的には20~30個のヌクレオチドの長さを含むことができる。標的との接触後のヒットの検出は、それだけには限定されないが、配列決定前の下流PCR増幅を可能にする、オリゴヌクレオチドリガンドのコンビナトリアルライブラリセグメントに隣接する5'および3'固定プライマー配列の取り込みによって可能となるヒットの配列決定が含まれる、配列を用いて行なうことができる。ビーズに基づいたS-ODNライブラリの多様性要素は、標準の単量体(たとえば、A、T、G、C、U)から増加させて1つまたは複数の官能基を提示する非天然単量体を含めることができ、これには、アセチレン保有ピリミジン三リン酸(Gramlich, P. M. E.ら、2008)および5'-プロモヘキシルホスホルアミダイト(これらはアジ化ナトリウムで処理することによってビーズ上で5'-アジド

40

50

ヘキシル修飾単量体に迅速に変換される)が含まれることができる。非天然修飾はこれらの捕捉剤のヌクレアーゼ安定性を増加させ、また、個々の一次リガンドから多リガンドを構築するための官能基も提供する。二次リガンドは、複数の候補リガンド(第2の官能基で修飾)を一次リガンド/標的の複合体と接触させて、2つのリガンド間の特異的結合および共有的反応を可能にすることによって選択される。これらの官能基はアジドおよびアセチレンであることができるが(図9に示す)、図1または図3に示すものなどの官能基も含まれることができる。三次、四次などのリガンドは同様の方法によって同定される。

#### 【0104】

多リガンド捕捉剤中に含めるリガンドが小分子を含む実施形態では、標準の固相有機合成(SPOS)および1ピース1分子方法によって小分子のライブラリを調製することができる。小分子捕捉剤のそれぞれのリガンドは、1つ(図10に示す)または複数の分子構成単位を含むことができる。ライブラリは、典型的には数十個の構成単位を含有して $10^2 \sim 10^3$ 個のリガンドをもたす。ヒットの解読は、単一ピースの内容物を光切断可能(たとえば2-ニトロフェニル)またはCNBr切断可能(たとえばメチオニン)なリンカーによって放出させ、続いて質量分析を行なうことによって可能となる。代替的に、それぞれのコンビナトリアルステップ後に分子タグによってエンコードすることで、間接的手段によるヒット解読が可能となる(Baldwin, J. J.ら、1995)。小分子捕捉剤のそれぞれの一次リガンドは、官能基を提示するように合成される。二次リガンドは、複数の候補リガンド(第2の官能基で修飾)を一次リガンド/標的の複合体と接触させて、2つのリガンド間の特異的結合および共有的反応を可能にすることによって選択される。これらの官能基はアジドおよびアセチレンであることができるが(図10に示す)、図1または図3または図4に示すものなどの官能基も含まれることができる。三次、四次などのリガンドは同様の方法によって同定される。一部の事例では、官能基は、標的と特異的に結合し、捕捉剤の複合的な部分となることができる。小分子捕捉剤は薬物としての有効性を有することができる。

#### 【0105】

多リガンド捕捉剤が小分子/ペプチド、小分子/ポリヌクレオチド、およびポリヌクレオチド/ペプチドなどのキメラ捕捉剤によって形成される実施形態では(1つのスキームにはたとえば図11を参照)、関連するリガンドは、上述のものなどの所望の化学性質のリガンドの同定に関連する特定のステップを組み合わせる方法によって同定する(また、ポリヌクレオチドには図9、小分子には図10、ならびにペプチドには図7および8を参照)。これらの実施形態では、リガンドを同定し、場合によっては捕捉剤を生成するための全体的な方法は、多リガンドの連続アセンブルが、標的を、相補的官能基を表示するように合成した2つの個別のリガンドと接触させ、それらの間の反応を促進することによって起こるという点で、他の捕捉剤で使用するものと類似である。オリゴヌクレオチドへの効率的なペプチドカップリングは以前に示されており(Halpin, D. R.ら、2004)、これはバルク量でのキメラ多リガンド捕捉剤の合成が実行可能であることを実証している。官能基が1つまたは複数のリガンドの内部部位で提示される場合は、キメラ多リガンド捕捉剤のうちの任意のものが分枝状組成物を有することができる。キメラ捕捉剤は、2つの結合ポケットを含有するタンパク質(たとえば、DNA結合のために1つのポケットおよび他のタンパク質と結合するための第2のポケット)などの、多様な化学性質の複数のエピトープを有するタンパク質と効率的に相互作用することができる。

#### 【0106】

多リガンド捕捉剤が分枝状捕捉剤である実施形態では、分枝状構造は、捕捉剤を構成する1つまたは複数のリガンドの内部部位で、リガンドの化学性質に依存せずに官能基を提示することによって得ることができる。多リガンド捕捉剤が直鎖状捕捉剤である実施形態では、その代わりに官能基をリガンドの末端のうち的一方で提示することができる。

#### 【0107】

リガンドがアジドとアセチレンの間の生体直交型の1,3-双極ヒュスゲン付加環化反応で連結されている実施形態では、大きなライブラリ(図7に例示するものなど)を、標

10

20

30

40

50

的との特異的相互作用についてスクリーニングする。最良結合リガンドをアセチレン官能基で修飾し、「アンカーリガンド」とする。第2のスクリーニングでは、アセチレンで修飾したアンカーリガンドを、アジド官能基を付随させた二次リガンドの包括的なビーズライブラリの存在下でインキュベーションする。このスクリーニングの結果は、標的と接触する2つのリガンド間の共有結合1, 2, 3-トリアゾール結合によって形成される「二重リガンド」である。この二重リガンドが(アセチレン修飾して)新しいアンカーリガンドとして役割を果たすことができ、同じビーズライブラリを用いて三重リガンド捕捉剤の三次リガンドを同定し、以降も同様である。逆に、アンカーリガンドがアジド官能基を含有する場合は、二次、三次などのリガンド候補はアセチレン官能基を含有することができる。本明細書中で使用する用語「アンカーリガンド」とは、第2のリガンドをカップリングさせるリガンドをいう。一般に、開示した方法のコンテキストでは、第2のリガンドは、標的に触媒される反応においてアンカーリガンドと共有結合する。

10

**【0108】**

リガンドが改変シュタウディンガーライゲーションで連結されている実施形態では、多リガンド捕捉剤を合成するためのライブラリは、図7に例示するものに類似の手法に従って構築することができるが、例外として、1°および2°スクリーニングのアンカーリガンドは、アセチレン基ではなくトリアリールホスフィンで官能化する。

**【0109】**

リガンドがアミド化反応で連結されている実施形態では、多リガンド捕捉剤を合成するためのライブラリは、図7に例示するものに類似の手法に従って構築することができるが、例外として、1°および2°スクリーニングのアンカーリガンドはアセチレン基ではなくチオ酸で官能化し、ビーズライブラリはスルホニルアジド官能基で修飾する。代替的に、極性を逆転させ、アンカーリガンドをスルホニルアジド官能基に付着させ、ビーズライブラリをチオ酸に付着させることができる。

20

**【0110】**

リガンドが還元性アミノ化によって連結されている実施形態では、多リガンド捕捉剤を合成するためのライブラリは、図7に例示するものに類似の手法に従って構築することができるが、例外として、1°および2°スクリーニングのアンカーリガンドはアセチレン基ではなくアルデヒドで官能化し、ビーズライブラリはアミン官能基で修飾する(たとえばペプチドリガンドのN末端)。代替的に、極性を逆転させ、アンカーリガンドをアミン官能基に付着させ、ビーズライブラリをアルデヒドに付着させることができる。

30

**【0111】**

一部の実施形態では、標的に対する多リガンド捕捉剤の2つ以上のリガンドは、対応する結合部位で標的と特異的に結合することができる候補リガンドを選択することを含むことができる。本明細書中に記載の方法を用いて、多リガンドで提供することができる結合部位は、それぞれの部位上に結合しているそれぞれのリガンド間の互いの共有結合が可能となるように標的上に配置されている。いくつかの実施形態では、候補リガンドのうち少なくとも1つは、少なくとも1つの他の候補リガンドに非関連および/または標的に非関連である。本明細書中で使用する用語「対応する結合部位」とは、別の分子上の分子結合部位をいう。したがって、所定のリガンドが結合する標的上の部位は、リガンドの対応する結合部位であると言える。

40

**【0112】**

特に、一部の実施形態では、候補リガンドは第1の複数の候補リガンドおよび第2の複数の候補リガンドを含み、そのそれぞれには、複数の候補リガンドのうち少なくとも1つの他のリガンドに非関連および/または標的に非関連である少なくとも1つのリガンドが、場合によっては含まれる。これらの実施形態では、リガンドの選択は、標的を第1の複数の候補リガンドと接触させて、標的と特異的に結合し、かつ標的によって触媒される反応において対応する第2の官能基と特異的に結合することができる第1の官能基を提示するアンカーリガンドを選択することによって行なうことができる。その後、そのようにして提供されたアンカーリガンドを標的と接触させてアンカーリガンド標的複合体を提供

50

し、その後、これを第2の複数の候補リガンドと接触させて第2の官能基を提示する。その後、アンカーリガンド標的複合体と特異的に結合し、アンカーリガンドと共有結合し、したがって多リガンドを提供する、第2の複数の候補リガンドの候補リガンドを選択する。追加のリガンドを多リガンドに付加するためのアンカーリガンドとして多リガンドを使用して、候補リガンドの選択を任意選択で繰り返すことができる。

【0113】

特に、一部の実施形態では、アンカーリガンドの選択は、標的と特異的に結合する候補リガンドを選択することと、標的によって触媒される反応において対応する第2の官能基と特異的に結合することができる第1の官能基を導入する選択した候補リガンドを修飾し、したがって第1の官能基を提示するアンカーリガンドを提供することによって行なうことができる。

10

【0114】

一部の実施形態では、多リガンドをアンカーとして用いて候補リガンドの選択を2回以上、3回以上、4回以上、5回以上、6回以上、または7回以上繰り返して、追加のリガンドを多リガンドに付加する。

【0115】

一部の実施形態では、標的に対する高次多リガンド捕捉剤の結合親和性が、アンカーリガンドの結合親和性よりも少なくとも $10^2$ 、少なくとも $10^3$ 、少なくとも $10^4$ 、少なくとも $10^5$ 、少なくとも $10^6$ 、少なくとも $10^7$ 、少なくとも $10^8$ 、少なくとも $10^9$ 、少なくとも $10^{10}$ 、少なくとも $10^{11}$ 、少なくとも $10^{12}$ 、または少なくとも $10^{13}$ 高くなるまで、多リガンドをアンカーとして用いて候補リガンドの選択を繰り返す。本明細書中で使用する、高次多リガンド捕捉剤とは、3個以上のリガンドを有する多リガンド捕捉剤をいう。多リガンド捕捉剤を同定および生成する開示した方法の一部の実施形態では、第3、第4、第5、第6、第7などのリガンドを二重リガンド捕捉剤に付加することができる。これは、たとえば、多リガンド捕捉剤をアンカーリガンドとして用いた標的に触媒される付加ステップを繰り返すことによって達成することができる。生じる多リガンド捕捉剤は高次多リガンド捕捉剤である。2、3、4、5、6、および7個のリガンドを有する多リガンド捕捉剤は、それぞれ二重リガンド、三重リガンド、四重リガンド、五重リガンド、六重リガンド、および七重リガンドと呼ぶことができる。

20

【0116】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤と標的の結合の解離定数が $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  M、 $10^{-15}$  M、または $10^{-16}$  M以下となるまで候補リガンドの選択を繰り返す。

30

【0117】

一部の実施形態では、第1および第2の複数の候補リガンドは、全体としてまたは部分的に同一または異なる。

【0118】

一部の実施形態では、候補リガンドの選択の反復うちの1回または複数回、場合によっては毎回において、同一または異なる複数の候補リガンドを第2の複数の候補リガンドとして使用し、アンカーリガンドの選択は、標的と特異的に結合する候補リガンドを選択することと、第1の官能基を導入するために選択した候補リガンドを修飾することによって行なう。

40

【0119】

一部の実施形態では、候補リガンドの選択の反復のうちの1回または複数回、場合によっては毎回において、同一または異なる官能基を第1のおよび/または第2の官能基として使用し、アンカーリガンドの選択は、標的と特異的に結合する候補リガンドを選択することと、第1の官能基を導入するために選択した候補リガンドを修飾することによって行なう。

【0120】

50

2つ以上のリガンドがペプチドまたはポリペプチドによって形成される一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤はタンパク質性質の多リガンド捕捉剤を形成することができ、上記方法を用いてタンパク質性質の多リガンド捕捉剤を合成することができる。

【0121】

一部の実施形態では、ペプチドリガンド、タンパク質標的およびトリアゾール結合を参照して実施例セクションに例示されている手順を行なうことができる。このプロセスは必要な変更を加えて他のリガンド、標的分子および共有結合で行なうことができることが、当業者には理解されよう。

【0122】

この手順によれば、ペプチドアンカーリガンドは、当業者に知られている手順に従って合成したペプチドを用いて調製できる第1の大きなペプチドライブラリを用いて同定することができる。特に、スクリーニング方法を用いて、ペプチドアンカーリガンドを、第1のライブラリのペプチドから、目的タンパク質に対する事前に決定した親和性を有することについて選択する。特に、ペプチドアンカーリガンドの選択手順には、ペプチドアンカーリガンドの所望の親和性および/または選択性を達成するための配列選択が含まれることができる。

10

【0123】

その後、第1のライブラリと同じ（または異なるものでもよい）種類のアミノ酸構成単位から調製できる第2の大きなペプチドライブラリを用いることによって、二次リガンド同定することができる。ペプチドアンカーリガンドが1つまたは複数のアジドで官能化されたアミノ酸を有する場合は、第2のライブラリからのペプチドは、少なくとも1つまたは複数のアセチレンで官能化された人工アミノ酸を含有する。同じタンパク質に対する第2のペプチドライブラリを含む第2のスクリーニングを実施するが、ただし、過剰量のペプチドアンカーリガンドの存在下で実施する。正しい配向でタンパク質表面およびペプチドアンカーリガンドと接触させることができる二次リガンドのみが反応して1, 2, 3-トリアゾール結合を形成する。したがって、タンパク質表面は、アンカーリガンドおよび二次リガンドを互いに対しておよびタンパク質表面に対して正しく配向することによって、このプロセスの触媒を提供する。

20

【0124】

本明細書中に記載の一部の実施形態によるペプチドアンカーリガンドを同定する方法を図19に模式的に例示する。特に、図19の図中では、蛍光標識した目的タンパク質(11)をペプチドのライブラリ(12)に対してスクリーニングする。

30

【0125】

そのライブラリは、1ビーズ1化合物(OBOC)手法を用いてビーズ上に構築することができる(Lam, K. S.ら、1997、Furka, A.ら、1991、Geysen, H. M.およびT. J. Mason、1993)。このようにして、それぞれのビーズは固有のペプチド(13)を含有し、そのペプチドは、天然に存在するアミノ酸、非天然アミノ酸(D-立体異性体)、または人工アミノ酸(アジドもしくはアセチレン官能基を含有することができる)であるアミノ酸からなる。

【0126】

ライブラリ自体は標準のカップリング化学を用いてアSEMBLする(Carpino, L. A.ら、1994)。タンパク質(11)およびライブラリ(12)を一定時間、特定のタンパク質濃度でインキュベーションし、「ヒット」したビーズ(14)をその蛍光によって同定する。典型的には、ビーズのうちの0.1%以下がヒットしたビーズとして同定され、ヒットしなかったビーズ(15)から分離する。標準の化学を用いてタンパク質をビーズから除去し、エドマン分解(Laurson, R. A.、1971)または質量分析(Wang, X.ら、2005、Lewis, J. K.ら、2000)などの方法を用いてビーズ上のペプチドを配列決定する。

40

【0127】

ペプチド配列(16)が同定された後、アミノ酸頻度対アミノ酸同一性を相関させるヒ

50

ストグラム(17)を調製する。その後、最も共通して同定されたアミノ酸を使用する第2のより集中したライブラリ(18)を調製し、タンパク質(11)に対して再度スクリーニングし、ヒットしたピーズをそのペプチド配列(16)によって再度同定することができる。この第2のライブラリはわずかに長いペプチドを含有する場合があります。スクリーニングプロセスはより低濃度のタンパク質(11)を含む場合がある。所望の親和性の1つまたは複数のペプチドアンカーリガンド(19)が達成されるまでこのプロセスを繰り返すことができる。その後、これらのペプチドを、二重リガンド捕捉剤を同定するスクリーニングプロセスの第2の段階のためにバルク量で調製する。それぞれ利点および不利点を有する、アンカーリガンドを同定する他の方法を使用することができる。たとえば、ファージディスプレイ方法を用いてペプチドを同定することができ(Smith, G. P. および V. A. Petrenko, 1997)、その後、そのペプチドをアジドまたはアセチレン含有人工アミノ酸で修飾して、集中したライブラリを生成することができ、その後、これを目的タンパク質に対してスクリーニングする。他の手法を同等に適用可能である。ペプチドアンカーリガンドの親和性は、他の要因の中でとりわけ、ペプチド中のアミノ酸の数、およびそれに対してスクリーニングするタンパク質に依存する。いくつかの実施形態では、6または7量体ペプチドなどの捕捉剤では、 $10^{-4} \sim 10^{-6}$  Mの桁の親和性が典型的には達成可能であり、これは、当分野の特定の捕捉剤と少なくとも見合っている。

10

20

30

40

50

**【0128】**

その後、二次リガンドの同定および二重リガンド捕捉剤の形成を、本明細書中に記載の一部の実施形態による手法を例示する図20に模式的に例示する方法に従って行なうことができる。上述のスクリーニング手順からのペプチドアンカーリガンド(19)のうちの1つを、目的タンパク質(11)をペプチドアンカー分子の結合親和性に依存する濃度で含有する溶液に加える。典型的には、 $10^{-6}$  Mの結合親和性には、数~10マイクロモラーの濃度が十分である。

**【0129】**

その後、ペプチドアンカーリガンド/タンパク質の溶液を候補二次リガンド(21)のライブラリに対してスクリーニングする。このライブラリは、ペプチドアンカーリガンド(12)の候補ライブラリと同様に構築されているが、例外として、アジドで官能化されたペプチドアンカーリガンドの事例では人工アミノ酸構成成分(22)の一部がアセチレン官能基を含有する。逆に、ペプチドアンカーリガンドがアセチレンで官能化されたアミノ酸構成成分を含有する場合は、二次リガンド候補はアジドで官能化されたアミノ酸構成成分を含有する。以前に記載したスクリーニングと同様に、ヒットしたピーズ(23)をその蛍光によって同定し、ヒットしなかったピーズ(15)から分離する。ヒットしたピーズは、ピーズと結合したペプチドとペプチドアンカーリガンドとのタンパク質に触媒されるカップリングによって形成される二重リガンド捕捉剤を特定の量で含有することができるが、ヒットしたピーズ(23)上のペプチドの大多数は反応しなかった二次リガンドである可能性が高い。標準の化学手順を用いてタンパク質および任意の反応しなかったペプチドアンカーリガンドをピーズから除去し、標準の方法を用いてピーズ上のペプチド(24)を配列決定し、アミノ酸頻度対アミノ酸同一性を相関させるヒストグラム(25)を調製する。その後、最も共通して同定されたアミノ酸を使用する第2のより集中したライブラリ(26)を調製し、タンパク質(11)に対して再度スクリーニングし、ヒットしたピーズをそのペプチド配列(24)によって再度同定する。この二次リガンドの第2のライブラリはわずかに長いペプチドを含有する場合があります。スクリーニングプロセスはより低濃度のタンパク質(11)を含む場合がある。

**【0130】**

二次リガンドのスクリーニングから二重リガンドが形成されたかどうかを決定することは、いくつかの方法に従って行なうことができる。1つの可能性のある方法は、二次リガンドペプチド配列に由来する情報の検出に基づく。配列相同性、特にペプチド内の人工アミノ酸の同定および位置に関する配列相同性が手掛かりを提供する場合がある。別の可能

性のある方法は、二次リガンドのバルク合成、続いてペプチドアンカーリガンドおよびタンパク質と合わせた *in situ* クリック実験に基づく。さらに、図 19 に記載したものと類似であるが、二重リガンド全体をビーズ上で合成するさらなるスクリーニングを、場合によっては一部の配列変動、対照の追加などを伴って行なうことができる。最後に、同定した候補二重リガンド捕捉剤 (27) をバルク量で合成することができ、タンパク質に対するその測定した結合親和性をペプチドアンカーリガンド (19) に対して比較する。10 ~ 100 (すなわち、 $10^{-6}$  M ~  $10^{-7}$  M または  $10^{-8}$  M 以下の親和性の増加) 以上の結合親和性の増加を、二重リガンド捕捉剤対ペプチドアンカーリガンドについて得ることができる。

#### 【0131】

所望の親和性および/または選択性が達成されない場合、および/または実験設計に従ってより長い捕捉剤が所望される場合、二重リガンド自体をアンカーリガンドとして利用することができ、必要に応じて図 20 に記載のプロセスを繰り返して三重リガンドを調製することができる。

#### 【0132】

三重リガンドを提供する方法の模式図を示す図 7 を参照されたい。一次 (1°) スクリーニングでは、包括的な OBOC ライブラリを標識した標的と共にインキュベーションする。実施例 3 ~ 5、7、および 11 に詳述するように、ヒットは標識の直接または間接検出のどちらかによって同定する。1°スクリーニングからのヒットを第 1 の官能基で修飾し、その後、標識した標的および第 2 の官能基で修飾した二次 (2°) リガンドからなる第 2 の OBOC ライブラリに対するスクリーニングにおいてアンカーリガンドとして用いる。特定の条件下では、アンカーリガンドおよび二次リガンドは、互いに共有結合した標的および官能基と同時に結合する。実施例 7 に詳述するように、生じる捕捉剤は二重リガンドである。三次 (3°) スクリーニングでは、プロセスを繰り返すが、ここでは 2°スクリーニング (図 12 を参照) からの二重リガンドを新しいアンカー単位として用い、三重リガンド捕捉剤の迅速な同定が可能となる (実施例 11 も参照)。

#### 【0133】

追加のリガンドは、選択された一次リガンドを選択された二次リガンドと共有結合させることによって得られた  $n$  重リガンドを使用し、その後、さらなる  $n$  次リガンドを選択するためにこの構築体をアンカーリガンドとして用いることによって、付加することができる。3 個のリガンドからなる三重リガンド捕捉剤を同定した例示的な事例を実施例 11 に示す。この三重リガンドを 1 つの官能基でさらに修飾し、第 2 の官能基で修飾した四次 (4°) リガンドからなる OBOC ライブラリに対してスクリーニングできることに注意されたい。(  $n - 1$  ) 重捕捉剤を 1 つの官能基で修飾し、この構築体を第 2 の官能基で修飾した  $n$  重リガンドからなる OBOC ライブラリに対してスクリーニングするプロセスは、所望の物理的、化学的、および/または生物学的特性が達成されるだけの回数まで繰り返すことができる。たとえば、10 個までのリガンド、特に 7 個までのリガンドまたは 2 ~ 5 個のリガンドを付加することができるが、これは限定することを意図しない。

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤を構成するリガンドの数が増加するにつれて、目的の標的分子に対するその捕捉剤の親和性が劇的に増加する。これらの実施形態の一部では、この効果は、タンパク質に対して  $10^{-6}$  M の親和性を示す 2 つのリガンドが、二重リガンドとして形成される場合に  $10^{-12}$  M の親和性を示すことができるという程度まで、非常に大きい。特に、 $n$  重リガンドの親和性は、個々のリガンド構成成分の親和性の積ほどに高い場合がある。いくつかの実施形態では、追加のリガンドあたり  $10^2$  ~  $10^3$  の親和性の積の増加が達成される (実施例 10、14、および 17 を参照)。

#### 【0135】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤を構成するリガンドの数が増加するにつれて、目的タンパク質に対するその捕捉剤の選択性も増加する。限定することを意図せず、指導目的としてのみ本明細書中に提供する可能性のある説明は、捕捉剤を構成するリガンドが

10

20

30

40

50

タンパク質表面のより大きな領域をサンプリングしており、タンパク質表面がタンパク質の固有のフィンガープリントであることである。多リガンド捕捉剤中に含まれるリガンドの数が増加するにつれて、そのようなりガンドと標的の間の接触の数が一般に増加する。これらの接触には、ファンデルワールス、水素結合、静電気、および疎水性相互作用が含まれる場合がある。特異的接触の数の増加は、一般に、標的に対する捕捉剤の選択性の増加を促進する。

#### 【0136】

ペプチドの二次リガンド内の非末端アミノ酸から分枝するように多リガンド捕捉剤のリガンドのうちの任意のものが別のものと連結している一部の実施形態では、分枝状多リガンド捕捉剤を生成することができる。分枝状三重リガンド捕捉剤を提供する方法の模式図を示す図8を参照されたい。分枝状二重リガンドを選択する方法（図8の2°スクリーニングによる）は図7とほぼ同一である。図8に示すように、図7によって同定し、第1の官能基を提示する同じアンカーリガンドを、標識した標的および第2の官能基で修飾した二次（2°）リガンドからなる第2のO B O Cライブラリに対するスクリーニングにおけるアンカーリガンドとして使用するが、この第2の官能基を提示する人工アミノ酸は、二次（2°）リガンドのライブラリの非末端位置に位置することに注意されたい。特定の条件下では、アンカーリガンドおよび二次リガンドは、互いに共有結合した標的および官能基と同時に結合する。

10

#### 【0137】

実施例17および図16Aに詳述するように、生じる捕捉剤は分枝状二重リガンドである。三次（3°）スクリーニングでは、プロセスを繰り返すが、ここでは2°スクリーニングからの分枝状二重リガンドを新しいアンカー単位として用い、三重リガンド捕捉剤の迅速な同定が可能となる（図18を参照）。この図8の3°スクリーニングでは、三次（3°）リガンドのO B O Cライブラリは、官能基を末端位置で提示して単一の分枝点を有する三重リガンド捕捉剤をもたらすか（図18を参照）、または非末端位置で提示して2つの分枝点を有する三重リガンド捕捉剤をもたらすことができる。n個のリガンドの多リガンドおよびn個の分枝点が得られるまでこのプロセスを繰り返すことができる。この多リガンド捕捉剤のクラスは、比較的低い分子量を維持する一方で、折り畳まれた免疫グロブリン（抗体）内の可変領域の効果に匹敵する場合がある。図17B（1つの分枝点）および図17C（2つの分枝点）は、分枝状三重リガンド捕捉剤の代表的な構造を示す。分枝状多リガンド中の分枝点は、直鎖状多リガンドと比較しておよび分枝状捕捉剤のクラス内で異なるコンホメーション動力学を与えることができる。一部の実施形態では、分枝状多リガンド構造中の結合の制限された回転は、同様に開発したが直鎖状である多リガンド捕捉剤と比較して結合力を増加させることができる。

20

30

#### 【0138】

大きなペプチドライブラリを合成およびスクリーニングするための代替手法は、本開示を読んだ際に当業者が同定することができる。特に、O B O C手法以外のさらなる手法は、ペプチドマイクロアレイを使用することによって提供することができる（R. C. Panickerら、コンビナトリアル化学および高スループットスクリーニング（Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening）（2004）、第7巻、547-556を参照）。特に、一部の実施形態では、非共有吸着（「スポッティング」）または共有固定によってペプチドをガラス基質上に付着させることができる。非共有吸着方法では、ペプチドを静電的相互作用によって表面に接着させ、ランダムに配向させる。共有固定方法では、ペプチドおよび基質を化学結合によって一緒にし、この付着は、典型的には部位特異的な様式で達成される（たとえば、マレイミドで官能化された基質とチオール化ペプチドとの間のマイケル付加）。ペプチドマイクロアレイは、スライドガラス上の空間的なエンコードの内因性の利点を唯一持っており、個々のペプチドまたはペプチド組成物はその位置によって同定される。ペプチドライブラリを慣用の固相ペプチド合成によって作製し、その後、アレイに固定することができる（非共有または共有的に）。しかし、これらの実施形態では、ペ

40

50

プチドのライブラリを最初に作製し(たとえばビーズ上で)、構成成分を精製した後にアレイを作製する。また、ペプチドを基質自体の上で *in situ* 方法によって合成することもできる(フォトリソグラフィーなど、S. Liら、Chem. Commun. (2005)、581-583およびS. Liら、J. Am. Chem. Soc. (2004)、第126巻、4088-4089を参照)。

#### 【0139】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤の組成は、その親和性および選択性は折り畳まれた構造に依存しないため、標的の結合能力が変性によって影響を受けないものである。1つの例示的な事例は、3つのリガンドからなる構造化されていない直鎖状捕捉剤である図15の多リガンド捕捉剤であり、ドットプロット(実施例16)、ネイティブウエスタンプロット(実施例20)、およびELISA様アッセイ(実施例21)において有効であることが示された。特に、いくつかの実施形態では、多リガンド捕捉剤は、短い長さのリガンドならびに非天然および人工単量体からなり、これは典型的には高い度合の折り畳まれた三次構造をとらない。これらの実施形態は、配列が約30倍長く、天然単量体からなり、高い度合の折り畳まれた三次構造(変性に対して潜在的に不安定な場合があるジスルフィド結合が含まれる)を促進する、抗体などの当分野の特定の捕捉剤とは異なる。

10

#### 【0140】

いくつかの実施形態では、所望の特性は、リガンド選択プロセスの前、その間またはその後捕捉剤内に構築することができる。例示的な特性は、水溶性、または多リガンド捕捉剤を特異的な所望の配向で表面に付着させる能力、および当業者によって同定可能なさらなる特性を含む。一部の実施形態では、所望の特性に関連する特定の反応に活用することができる官能基などの関連する所望の特長を導入することによって、所望の特性を多リガンド捕捉剤上に導入することができる。

20

#### 【0141】

たとえば、多リガンド捕捉剤のリガンド選択の前、その間またはその後、単パラメータまたは複数パラメータのアッセイにおいて多リガンド捕捉剤と基質または表面との特異的な高度に配向された付着を可能にする捕捉剤を、官能基および他の分子タグ内に構築することができる。特に、これらの実施形態の一部では、基質上に提示される第2の官能基と結合することができる官能基を導入することができる。結合パートナーとして使用することができる例示的な官能基には、カルボン酸基およびアミン基、アジドおよびアセチレン、ならびにアルデヒドおよびアミンが含まれる。たとえば、アミノ化表面は、ガラスまたはケイ素をシラン処理剤で処理することによって調製することができ、この表面を、カルボン酸を提示する捕捉剤とさらに共有的カップリングさせることができる(McAlpine, M. C.ら、2008)。第2の例では、アセチレン(Rohde, R. D.ら、2006)またはアジド(Cao, P.ら、2008)で修飾したケイ素表面を調製し、銅(I)触媒性アジド-アルキン付加環化(CuAAC)によって、それぞれアジドまたはアセチレンのどちらかで修飾された捕捉剤と共有的にカップリングさせることができる。また、多リガンド捕捉剤を修飾してそれを表面上への配向に特異的な固定のために調製することには、捕捉剤が、その相補鎖とのハイブリダイゼーションによって核酸アレイ上に固定されることを可能にする、短いポリヌクレオチド配列などの共有タグも含まれる場合がある(たとえば、Fan, R.ら、2008の方法による)。これらすべての例において、表面の配向に特異的な固定は容易に達成され、これは標的と表面との特異的結合を測定するアッセイ間の均一性を促進する。

30

40

#### 【0142】

2つ以上のリガンドを同定した後、リガンドの化学性質に依存する当業者によって同定可能な方法を用いて多リガンド捕捉剤を合成することができる。特に、2つ以上のリガンドがペプチドである実施形態では、ペプチドを同定した後、当業者によって同定可能なアミノ酸単量体を重合させる方法を用いてタンパク質多リガンド捕捉剤を合成することができる。

#### 【0143】

50

合成した多リガンド捕捉剤のさらなる修飾を行なうことができる。たとえば、一部の実施形態では、細胞透過ペプチド配列が導入されるように多リガンド捕捉剤を修飾することができ、これにより、捕捉剤が *in vivo* 標的化またはイメージングに特化したものとなる。また、多リガンド捕捉剤を脂質分子で修飾することもでき、これにより、細胞膜との会合が促進され、その後、細胞 - 細胞の認識のプロープとして使用することができる。

【0144】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤は、修飾したアンカーリガンドを第1の複数の候補リガンドおよび標的と接触させるステップであって、修飾したアンカーリガンドが、標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの一つまたは複数と共有結合しており、それにより一つまたは複数の多リガンド捕捉剤が形成されるステップを含む、多リガンド捕捉剤を作製する方法によって提供することができる。多リガンド捕捉剤のそれぞれは、修飾したアンカーリガンドおよび候補リガンドのうちの一つを含み、アンカーリガンドは標的と結合することができ、修飾したアンカーリガンドは第1の官能基を含み、第1の官能基は対応する第2の官能基と特異的に反応することができ、候補リガンドのそれぞれは第2の官能基を含む。

10

【0145】

この方法は、(i) 対応する第4の官能基と特異的に反応することができる第3の官能基を含むように多リガンド捕捉剤のうちの一つを修飾するステップと、(ii) 修飾された多リガンド捕捉剤を第2の複数の候補リガンドおよび標的と接触させるステップであって、修飾された多リガンド捕捉剤が標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの一つまたは複数と共有結合し、それにより一つまたは複数の高次多リガンド捕捉剤が形成されるステップとをさらに含むことができる。高次多リガンド捕捉剤のそれぞれは、修飾された多リガンド捕捉剤および候補リガンドのうちの一つを含むことができ、第2の複数の捕捉リガンド中の候補リガンドのそれぞれは第4の官能基を含むことができる。

20

【0146】

この方法は、ステップ(i)および(ii)を1回または複数回繰り返すことをさらに含むことができ、ステップ(i)および(ii)のそれぞれの繰り返しについて、ステップ(ii)の最後の反復で形成される高次多リガンド捕捉剤のうちの一つを、ステップ(i)の次の反復で修飾する多リガンド捕捉剤として使用する。ステップ(i)および(ii)を2回以上、3回以上、4回以上、5回以上、6回以上、または7回以上繰り返すことができる。標的に対する高次多リガンド捕捉剤の結合親和性がアンカーリガンドの結合親和性よりも少なくとも  $10^7$ 、少なくとも  $10^8$ 、少なくとも  $10^9$ 、少なくとも  $10^{10}$ 、少なくとも  $10^{11}$ 、少なくとも  $10^{12}$ 、または少なくとも  $10^{13}$  高くなるまで、ステップ(i)および(ii)を繰り返すことができる。標的に対する多リガンド捕捉剤の結合親和性が、多リガンドと標的との結合の解離定数が  $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  M、 $10^{-15}$  M、または  $10^{-16}$  M 以下となるまで、ステップ(i)および(ii)を繰り返すことができる。

30

【0147】

第2の複数の候補リガンドは、第1の複数の候補リガンドと同一であることができる。第2の複数の候補リガンドは、第1の複数の候補リガンドとは異なることができる。第2の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部は、第1の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部と同一であることができる。第2の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部は、第1の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部とは異なることができる。第2の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部は、第1の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部と同一であることができ、第2の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部は、第1の複数の候補リガンド中の候補リガンドの一部とは異なることができる。

40

【0148】

異なる複数の候補リガンドを、ステップ(i)および(ii)の反復のうちの一つまた

50

は複数において第2の複数の候補リガンドとして使用することができる。異なる複数の候補リガンドを、ステップ(i)および(ii)のすべての反復において第2の複数の候補リガンドとして使用することができる。同じ複数の候補リガンドを、ステップ(i)および(ii)の反復のうちの一つまたは複数において第2の複数の候補リガンドとして使用することができる。同じ複数の候補リガンドを、ステップ(i)および(ii)のすべての反復において第2の複数の候補リガンドとして使用することができる。複数の異なる複数の候補リガンドを、ステップ(i)および(ii)の反復において第2の複数の候補リガンドとして使用することができる。

【0149】

第3の官能基は、第1の官能基と同一であることができる。第4の官能基は、第2の官能基と同一であることができる。第3の官能基は、第2の官能基と同一であることができる。第4の官能基は、第1の官能基と同一であることができる。第3の官能基は、第1の官能基とは異なることができる。第3の官能基は、第2の官能基とは異なることができる。第4の官能基は、第1の官能基とは異なることができる。第4の官能基は、第2の官能基とは異なることができる。

10

【0150】

この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)のそれぞれの繰り返しについて、同一の第3の官能基を使用することができる。この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)のそれぞれの繰り返しについて、同一の第4の官能基を使用することができる。この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)のそれぞれの繰り返しについて、異なる第3の官能基を使用することができる。この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)の一部の繰り返しについて、異なる第4の官能基を使用することができる。この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)の一部の繰り返しについて、同一の第3の官能基を使用することができる。この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)の一部の繰り返しについて、同一の第4の官能基を使用することができる。この方法の一部の形態では、ステップ(i)および(ii)の一部の繰り返しについて、異なる第4の官能基を使用することができる。

20

【0151】

本方法は、修飾したアンカーリガンドを第1の複数の候補リガンドおよび標的と接触させるステップの前に、標的を第3の複数の候補リガンドと接触させ、標的と結合する候補リガンドを同定し、同定される候補リガンドのうちの一つをアンカーリガンドとして使用することをさらに含むことができる。

30

【0152】

本方法は、修飾したアンカーリガンドを第1の複数の候補リガンドおよび標的と接触させるステップの前に、修飾したアンカーリガンドを調製することをさらに含むことができる。

【0153】

修飾したアンカーリガンドは、第1の官能基を含むアンカーリガンドの形態を合成することによって調製することができる。修飾したアンカーリガンドは、部分的に合成したアンカーリガンドの合成を完了することによって調製することができる。第1の官能基は、合成の完了中にアンカーリガンドに付加する。修飾したアンカーリガンドは、第1の官能基をアンカーリガンドに付加することによって調製することができる。高次多リガンド捕捉剤は本方法によって作製した多リガンド捕捉剤であることができる。ステップ(ii)の最後の反復で形成される高次多リガンド捕捉剤は、本方法によって作製した多リガンド捕捉剤であることができる。修飾したアンカーリガンドは、第1の官能基および第2の官能基の間の反応によって候補リガンドのうちの一つまたは複数と共有結合させることができる。多リガンド捕捉剤は標的と結合することができる。

40

【0154】

この方法の一部の形態では、接触前にはどの候補リガンドが標的と結合できるかは知られていない。

50

## 【0155】

複数の候補リガンドは化合物のコンビナトリアルライブラリを含むことができる。化合物のコンビナトリアルライブラリは、鎖中で連結されたサブユニットの群の順列を含む化合物を含むことができる。鎖は、直鎖状、分枝状、環状、または組合せであることができる。サブユニットの群は、アミノ酸、修飾アミノ酸、または組合せを含むことができる。サブユニットの群は、1つまたは複数の有機小分子をさらに含むことができる。サブユニットの群中のアミノ酸は、アミノ酸の部分組から本質的になることができる。サブユニットの群中の修飾アミノ酸は、修飾アミノ酸の部分組から本質的になることができる。サブユニットの群は、アミノ酸から本質的になることができる。サブユニットの群は、アミノ酸の部分組から本質的になることができる。

10

## 【0156】

参照分子と比較した多リガンド捕捉剤の結合特異性は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、または少なくとも100であることができる。多リガンド捕捉剤と参照分子との結合は、参照アッセイで検出不可能な場合がある。参照分子は標的に関連する分子であることができる。参照分子は標的であることができる。参照標的は標的の対立型であることができる。参照標的は標的の相同体であることができる。参照分子は参照試料であることができる。参照試料は、標的を検出する試料と同じ種類の標的を欠く試料であることができる。参照試料は、標的を検出する試料と同じ供給源の標的を欠く試料であることができる。

20

## 【0157】

標的に対する多リガンド捕捉剤の結合親和性は、アンカーリガンドの結合親和性よりも少なくとも $10^6$ 、少なくとも $10^7$ 、少なくとも $10^8$ 、少なくとも $10^9$ 、少なくとも $10^{10}$ 、少なくとも $10^{11}$ 、少なくとも $10^{12}$ 、または少なくとも $10^{13}$ 高い場合がある。多リガンド捕捉剤と標的の結合の解離定数は、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  M、 $10^{-15}$  M、または $10^{-16}$  M以下であることができる。

30

## 【0158】

一部の形態では、修飾したアンカーリガンドは標的の天然基質ではない。一部の形態では、修飾したアンカーリガンドは標的の基質ではない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは標的の天然基質を含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは標的の基質を含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしている化合物を含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、標的と結合することが知られている化合物に由来する化合物を含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、標的と結合することが知られている化合物をどれも含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、標的と結合すると同定された化合物をどれも含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、修飾したアンカーリガンド、第1の複数の候補リガンド、および標的を接触させるステップの前に、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしている化合物を含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、修飾したアンカーリガンド、第1の複数の候補リガンド、および標的を接触させるステップの前に、標的と結合することが知られている化合物に由来する化合物を含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、修飾したアンカーリガンド、第1の複数の候補リガンド、および標的を接触させるステップの前に、標的と結合することが知られている化合物をどれも含まない。一部の形態では、第1の複数の候補リガンドは、修飾したアンカーリガンド、第1の複数の候補リガンド、および標的を接触させるステップの前に、標的と結合すると同定された化合物をどれも含まない。

40

## 【0159】

また、開示した方法のうちの任意のものによって作製した多リガンド捕捉剤も記載する。また、開示した方法のうちの任意のものによって作製した多リガンド捕捉剤の修飾型を含む多リガンド捕捉剤も記載する。多リガンド捕捉剤の1つまたは複数の官能基部分を修

50

飾することができる。多リガンド捕捉剤の官能基部分は、官能基部分をリンカーで置き換えることによって修飾することができる。多リガンド捕捉剤の官能基部分は、官能基部分をサブユニットで置き換えることによって修飾することができる。サブユニットは、アミノ酸または修飾アミノ酸を含むことができる。サブユニットは、有機小分子を含むことができる。多リガンド捕捉剤は、鎖中で連結された2つ以上のサブユニットを含むことができ、サブユニットのうちの1つまたは複数は修飾されている。サブユニットは、サブユニットを異なるサブユニットで置き換えることによって修飾することができる。サブユニットは、アミノ酸または修飾アミノ酸を含むことができる。サブユニットは、有機小分子を含むことができる。

**【0160】**

また、第1のリガンドおよび第2のリガンドを含む多リガンド捕捉剤も開示されており、第1のリガンドおよび第2のリガンドは共有結合しており、第1のリガンドは単離されている場合に標的と結合することができ、第2のリガンドは単離されている場合に標的と結合することができ、第1のリガンドおよび第2のリガンドは、標的とのその結合において結合的に識別可能であり、多リガンド捕捉剤は標的と特異的に結合することができ、多リガンド捕捉剤が標的と結合する場合は第1のリガンドおよび第2のリガンドはどちらも標的と接触する。一部の形態では、第1のリガンドおよび第2のリガンドは天然で共有結合していない。一部の形態では、第1のリガンドおよび第2のリガンドは同じ天然分子の一部ではない。一部の形態では、第1のリガンドおよび第2のリガンドは標的の同じ基質の一部ではない。一部の形態では、第1のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしていない。一部の形態では、第1のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物に由来しない。一部の形態では、第2のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしていない。一部の形態では、第2のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物に由来しない。

**【0161】**

一部の形態では、第2のリガンドは、修飾したアンカーリガンドを複数の候補リガンドおよび標的と接触させることによって同定することができ、修飾したアンカーリガンドは、標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの1つと共有結合し、第2のリガンドは、修飾したアンカーリガンドと共有結合した候補リガンドであり、修飾したアンカーリガンドは第1の官能基を含んでおり、第1の官能基は対応する第2の官能基と特異的に反応することができ、候補リガンドのそれぞれは第2の官能基を含んでいた。アンカーリガンドは第1のリガンドを含んでいた可能性がある。

**【0162】**

多リガンド捕捉剤は第3のリガンドを含むことができ、第3のリガンドは第1および第2のリガンドと共有結合しており、多リガンド捕捉剤が標的と結合する場合は第3のリガンドは標的と接触する。一部の形態では、単離されている場合に第3のリガンドは標的と結合することができる。第1のリガンドおよび第3のリガンドは、標的とのその結合において結合的に識別可能であることができる。第2のリガンドおよび第3のリガンドは、標的とのその結合において結合的に識別可能であることができる。第3のリガンドは第1のリガンドと直接連結することができる。第3のリガンドは第2のリガンドと直接連結することができる。第3のリガンドは、第1のリガンドを介して第2のリガンドと連結することができる。第3のリガンドは、第2のリガンドを介して第1のリガンドと連結することができる。一部の形態では、第1のリガンドおよび第3のリガンドは天然で共有結合していない。一部の形態では、第1のリガンドおよび第3のリガンドは同じ天然分子の一部ではない。一部の形態では、第1のリガンドおよび第3のリガンドは標的の同じ基質の一部ではない。一部の形態では、第2のリガンドおよび第3のリガンドは天然で共有結合していない。一部の形態では、第2のリガンドおよび第3のリガンドは同じ天然分子の一部ではない。一部の形態では、第2のリガンドおよび第3のリガンドは標的の同じ基質の一部ではない。一部の形態では、第3のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしていない。一部の形態では、第3のリガンドは、標的と結合する

10

20

30

40

50

ことが知られている化合物に由来しない。

【0163】

第3のリガンドは、修飾したアンカーリガンドを複数の候補リガンドおよび標的と接触させることによって同定することができ、修飾したアンカーリガンドは、標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの一つと共有結合し、第3のリガンドは、修飾したアンカーリガンドと共有結合した候補リガンドであり、修飾したアンカーリガンドは第1の官能基を含んでおり、第1の官能基は対応する第2の官能基と特異的に反応することができ、候補リガンドのそれぞれは第2の官能基を含んでいた。アンカーリガンドは第1のリガンドを含んでいた可能性がある。アンカーリガンドは第2のリガンドを含んでいた可能性がある。

10

【0164】

多リガンド捕捉剤は第4のリガンドを含むことができ、第4のリガンドは第1、第2、および第3のリガンドと共有結合しており、多リガンド捕捉剤が標的と結合する場合は第4のリガンドは標的と接触する。一部の形態では、単離されている場合に第4のリガンドは標的と結合することができる。第1のリガンドおよび第4のリガンドは、標的とのその結合において結合的に識別可能であることができる。第2のリガンドおよび第4のリガンドは、標的とのその結合において結合的に識別可能であることができる。第3のリガンドおよび第4のリガンドは、標的とのその結合において結合的に識別可能であることができる。第4のリガンドは第1のリガンドと直接連結することができる。第4のリガンドは第2のリガンドと直接連結することができる。第4のリガンドは第3のリガンドと直接連結することができる。第4のリガンドは、第1のリガンドを介して第2のリガンドと連結することができる。第4のリガンドは、第3のリガンドを介して第2のリガンドと連結することができる。第4のリガンドは、第2のリガンドを介して第1のリガンドと連結することができる。第4のリガンドは、第3のリガンドを介して第1のリガンドと連結することができる。第4のリガンドは、第1のリガンドを介して第3のリガンドと連結することができる。第4のリガンドは、第2のリガンドを介して第3のリガンドと連結することができる。一部の形態では、第1のリガンドおよび第4のリガンドは天然で共有結合していない。一部の形態では、第1のリガンドおよび第4のリガンドは同じ天然分子の一部ではない。一部の形態では、第1のリガンドおよび第4のリガンドは標的の同じ基質の一部ではない。一部の形態では、第2のリガンドおよび第4のリガンドは天然で共有結合していない。一部の形態では、第2のリガンドおよび第4のリガンドは同じ天然分子の一部ではない。一部の形態では、第2のリガンドおよび第4のリガンドは標的の同じ基質の一部ではない。一部の形態では、第3のリガンドおよび第4のリガンドは天然で共有結合していない。一部の形態では、第3のリガンドおよび第4のリガンドは同じ天然分子の一部ではない。一部の形態では、第3のリガンドおよび第4のリガンドは標的の同じ基質の一部ではない。一部の形態では、第4のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物をモデルとしていない。一部の形態では、第4のリガンドは、標的と結合することが知られている化合物に由来しない。

20

30

【0165】

第4のリガンドは、修飾したアンカーリガンドを複数の候補リガンドおよび標的と接触させることによって同定することができ、修飾したアンカーリガンドは、標的によって触媒される反応において候補リガンドのうちの一つと共有結合し、第4のリガンドは、修飾したアンカーリガンドと共有結合した候補リガンドであり、修飾したアンカーリガンドは第1の官能基を含んでおり、第1の官能基は対応する第2の官能基と特異的に反応することができ、候補リガンドのそれぞれは第2の官能基を含んでいた。アンカーリガンドは第1のリガンドを含んでいた可能性がある。アンカーリガンドは第2のリガンドを含んでいた可能性がある。アンカーリガンドは第3のリガンドを含んでいた可能性がある。

40

【0166】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤は、適切なビヒクルと一緒に組成物中に含まれる。本明細書中で使用する用語「ビヒクル」とは、組成物中に活性成

50

分として含まれる多リガンド捕捉剤の、通常は溶媒、担体、結合剤または希釈剤として作用する様々な媒体のうちの任意のものを示す。特に、多リガンド捕捉剤が含まれる組成物は、本明細書中に記載の方法または系のうちの1つで使用することができる。

【0167】

本明細書中に記載する多リガンド捕捉剤は、試料中の1つまたは複数の標的を検出および/または分離するための方法および系で使用することができる。

【0168】

本明細書中で使用する用語「検出する」または「検出」とは、それだけには限定されないが、試料、反応混合物、分子複合体および基質を含めた、限定された空間部分における標的の存在 (existence、presence) または事実の決定を示す。本明細書中で使用する「検出する」または「検出」は、それだけには限定されないが、他の化合物と相互作用する、特に結合する能力、別の化合物を活性化する能力、および本開示を読んだ際に当業者によって同定可能なさらなる特性を含めた、標的の化学的および/または生物学的特性の決定を含むことができる。検出は定量的または定性的であることができる。検出は、標的またはシグナルの量 (quantity もしくは amount) の測定をいう、それに関連する、またはそれを含む場合に「定量的」であり (定量化とも呼ぶ)、それだけには限定されないが、標的またはシグナルの量または割合を決定するために設計された任意の分析が含まれる。検出は、定量しない別の標的またはシグナルの相対的存在量に関して標的またはシグナルの品質または種類の同定をいう、それに関する、またはそれを含む場合に「定性的」である。

10

20

【0169】

本明細書中で使用する用語「分離する」とは、1つの項目と別の項目の間、特に標的と目的でない別の分析物との間を設定、離して保つまたは区別することを示し、複数の目的の標的を分別することが含まれる。本明細書中で使用する用語「分別する」とは、任意の共通特長に基づいて設定された群を設定することを示す。特に、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を用いて、標的を分離するおよび/または試料中の複数の標的を分別することができる。

【0170】

本明細書中で使用する用語「試料」とは、それだけには限定されないが、生物学的環境由来の流体、検体、培養物、組織、市販の組換えタンパク質、合成化合物またはその一部を含めた、限定された量のある物を示し、これは、より大量のその物の指標となる。

30

【0171】

特に、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤は、すべて多重アッセイとして行なうことができる単パラメータアッセイおよび複数パラメータアッセイを含めた、標的を検出するアッセイを行なうための方法および系において使用することができる。

【0172】

本明細書中で使用する用語「単パラメータアッセイ」とは、1つの標的の存在、非存在、または量を決定するために行なう分析をいう。用語「複数パラメータアッセイ」とは、複数の標的の存在、非存在、または量を決定するために行なう分析をいう。用語「多重」または「多重」アッセイとは、複数のアッセイ反応、たとえば複数の分析物の同時アッセイを、単一の反応チャンバ内で実施する、および/または単一の分離および検出様式で分析するアッセイをいう。

40

【0173】

本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を用いて行なうことができる単パラメータアッセイには、それだけには限定されないが、血清中の単一のマーカーを検出するための任意のアッセイ、生体試料中の単一のタンパク質の検出、1つの表面マーカーに従った細胞分取、および、本開示を読んだ際に当業者によって同定可能な、捕捉剤を用いて行なうことができるさらなるアッセイが含まれる。検出に有用な多くの分析物および標的が当業者に知られており、開示した多リガンド捕捉剤および方法を用いて検出および/または捕捉することができる。多くの様々なアッセイ様式を含めた多くのアッセイおよび検出方法が当業

50

者に知られており、開示した多リガンド捕捉剤において使用に適応させることができる。特に、抗体を利用する任意のアッセイまたは検出方法を、開示した多リガンド捕捉剤のうちの1つまたは複数を、アッセイまたは方法中で使用する任意の抗体に加えて、またはその代わりとして、使用に適応させることができる。

【0174】

本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を用いて行なうことができる複数パラメータアッセイには、それだけには限定されないが、任意のプロテオミクス分析、組織分析、血清診断学、バイオマーカー、血清プロファイリング、複数パラメータ細胞分取、単一細胞研究、および本開示を読んだ際に当業者によって同定可能なさらなるアッセイが含まれる。

【0175】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を有利に用いて診断的アッセイを行なうことができ、検出する標的は、事前に決定した条件に関連する事前に決定したバイオマーカーである。2つの項目に関して本明細書中で使用する表現「関連する」とは、第1の項目の発生が第2の項目の発生によって伴われるような、2つの項目間の関係性を示し、それだけには限定されないが、因果関係および兆候/症状-疾患の関係性が含まれる。例示的なバイオマーカーには、臨床的に情報価値のあるバイオマーカーおよび診断的バイオマーカーが含まれる。

【0176】

これらの実施形態は、様々なクラスの生体材料および生体分子を、典型的には異種の組織試料の異なる領域からそれぞれ測定することで定量が困難な不可避なノイズ源が導入される、診断的手法において特に有利である。

【0177】

本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を用いて行なうことができる例示的なアッセイには、それだけには限定されないが、血清診断学、免疫組織化学、細胞分取、単一細胞研究、ドットプロット、ウエスタンプロット、親和性精製および他の分離、ならびに実施例16、20、および21の図21、図22、および図23に例示する酵素結合免疫吸着アッセイが含まれる。

【0178】

さらなる実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤を用いて、マイクロフルイディクスに基づいたアッセイを行なうことができる。本明細書中で使用する用語「マイクロフルイディクス」とは、マイクロフルイディクスの特長、たとえば、一般にミクロンまたはサブミクロンのスケールで製作されるチャンネルおよび/またはチャンバを有する構成成分または系をいう。たとえば、典型的なチャンネルまたはチャンバは、約0.1ミクロン~約1500ミクロンの範囲、より典型的には約0.2ミクロン~約1000ミクロンの範囲、さらにより典型的には約0.4ミクロン~約500ミクロンの範囲の、少なくとも1つの横断寸法を有する。個々のマイクロフルイディクスの特長は、典型的にはたとえば約10ナノリットル~約5ミリリットル、より典型的には約100ナノリットル~約2ミリリットル、さらにより典型的には約200ナノリットル~約500マイクロリットル、またはさらにより典型的には約500ナノリットル~約200マイクロリットルの、非常に少量の流体を保有する。

【0179】

本明細書中に記載の方法および系により、多重複数パラメータの検出、目的バイオマーカーの分別および関連する診断的分析が可能となる。

【0180】

本明細書中に開示するように、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤は、本明細書中に記載のアッセイのうちの任意のものを含めた任意のアッセイを行なうための系の一部として提供することができる。系は、有用なアレイまたはキットの形態で提供することができる。場合によっては「マイクロアレイ」とも呼ばれるアレイには、その領域に関連する特定の分子を保有する、任意の一次元、二次元または三次元のアドレス可能な領域配置が含まれることができる。通常は、特徴的な特長の大きさはマイクロメートルである。

10

20

30

40

50

## 【0181】

有用なキットでは、アッセイ行なうための多リガンド捕捉剤および他の試薬が独立してキットに含まれることができる。多リガンド捕捉剤を1つまたは複数の組成物中に含めることができ、それぞれ捕捉剤は適切なピヒクルと共に組成物中に一緒に存在することができる。

## 【0182】

追加の構成成分には、標識した分子、特に、標識したポリヌクレオチド、標識した抗体、標識、マイクロフルイディクスチップ、参照標準、および本開示を読んだ際に当業者によって同定可能な追加の構成成分が含まれることができる。複合体または分子の構成成分として本明細書中で使用する用語「標識」および「標識した分子」とは、それだけには限定されないが、放射性同位元素、フルオロフォア、化学発光色素、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、色素、金属イオン、ナノ粒子、金属ゾル、リガンド（ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンまたはハプテン等）などを含めた、検出が可能な分子をいう。用語「フルオロフォア」とは、検出可能な画像において蛍光を示すことができる物質またはその一部分をいう。その結果、本明細書中で使用する表現「標識シグナル」とは、それだけには限定されないが、放射活性、蛍光、化学発光、酵素反応の結果としての化合物の産生などを含めた、標識の検出を可能にする、標識から放出されるシグナルを示す。

10

## 【0183】

一部の実施形態では、多リガンド捕捉剤の検出は、標識した抗体を、網羅的ではないが小分子色素、タンパク質発色団、量子ドット、および金ナノ粒子が含まれるフルオロフォアで標識する、蛍光に基づいた読取りによって実施することができる。さらなる技術は本開示を読んだ際に当業者によって同定可能であり、さらに詳述しない。

20

## 【0184】

特に、キットの構成成分は、本明細書中に記載の方法を行なうために、適切な指示および他の必要な試薬と共に提供することができる。キットは通常、組成物を別々の容器内に含有する。アッセイを実施するための指示、たとえば、紙またはテープもしくはCD-ROMなどの電子支持体上の書面または音声の指示が通常キット内に含まれる。また、使用する特定の方法に応じて、キットは他の梱包試薬および物質（すなわち洗浄バッファなど）も含有することができる。

30

## 【0185】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の多リガンド捕捉剤は、賦形剤または希釈剤と一緒に薬剤組成物中に含めることができる。特に、一部の実施形態では、本明細書中に記載の少なくとも1つの多リガンド捕捉剤を、1つまたは複数の適合性のあるかつ製薬上許容されるピヒクル、特に製薬上許容される希釈剤または賦形剤と組み合わせて含有する薬剤組成物が開示されている。これらの薬剤組成物では、多リガンド捕捉剤は、個体において状態を処置または予防するための活性成分として投与することができる。

## 【0186】

本明細書中で使用する用語「治療」とは、状態の医療の一部であるまたはそれに医学的にもしくは外科的に対処する、任意の活動を示す。

40

## 【0187】

本明細書中で使用する用語「予防」とは、個体における状態から死亡率または罹患率の負荷を低下させる任意の活動を示す。これは一次、二次および三次の予防レベルで起こり、a) 一次予防は疾患の発生を回避し、b) 二次予防活動は初期疾患処置を目的としており、したがって、疾患の進行および症状の出現を予防するための介入機会を増加させ、c) 三次予防は、機能を回復し、疾患関連の合併症を低下させることによって、既に確立された疾患の悪影響を低下させる。

## 【0188】

本明細書中で使用する用語「状態」とは、個体の完全な物理的、精神的および社会的な健全性の状態に関連する標準の身体状態とは一致しない、個体の身体（全体としてまたは

50

その部分の1つもしくは複数として)の身体状態を示す。本明細書中に記載の状態には、それだけには限定されないが、障害および疾患が含まれ、用語「障害」とは、身体またはその任意の部分の機能異常に関連する生きた個体の状態を示し、用語「疾患」とは、身体またはその任意の部分の正常機能を損なう生きた個体の状態を示し、典型的には識別可能な兆候および症状によって明らかとなる。

【0189】

処置のコンテキストにおいて本明細書中で使用する用語「個体」には、それだけには限定されないが、動物、特に高等動物、特に脊椎動物、たとえば哺乳動物、特に人間を含めた、単一の生物が含まれる。

【0190】

本明細書中で使用する用語「賦形剤」とは、医薬品の活性成分の担体として使用する不活性物質を示す。本明細書中に記載の薬剤組成物の適切な賦形剤には、個体の身体が多リガンド捕捉剤またはその組合せを吸収する能力を増強させる任意の物質が含まれる。また、適切な賦形剤には、好都合かつ正確な用量を可能にするために、ペプチドまたはその組合せを有する配合物を増大させるために使用できる任意の物質も含まれる。単一用量でのその使用に加えて、賦形剤は、関係するペプチドまたはその組合せの取扱いを支援するために、製造プロセス中に使用することができる。投与経路および医薬品の形態に応じて、様々な賦形剤を使用することができる。例示的な賦形剤には、それだけには限定されないが、抗接着剤、結合剤、コーティング、崩壊剤、充填剤、香料(甘味料など)および着色料、流動促進剤、潤滑剤、保存料、吸着剤が含まれる。

【0191】

本明細書中で使用する用語「希釈剤」とは、組成物の活性成分を希釈または運ぶための希釈用剤を示す。適切な希釈剤には、医薬調製物の粘度を減少させることができる任意の物質が含まれる。

【0192】

以降、本開示のさらなる利点および特徴は、実験セクションを参照することで、例示目的のみとして以下の詳細な開示からより明らかになる。

【実施例】

【0193】

本明細書中に記載の捕捉剤、方法および系を、例示目的として提供し、限定することを意図しない以下の実施例にさらに例示する。特に、以下の実施例では、リガンドがポリペプチドによって形成されるタンパク質性質の多リガンド捕捉剤を参照して、本開示の多リガンド捕捉剤ならびに関連する方法および系のさらなる説明を提供する。当業者には、アミノ酸化学性質のリガンドによって形成された捕捉剤について詳述した特長の、別の化学性質のリガンドによって全体または一部が形成された捕捉剤への適用性が理解されよう。特に、本開示を読んだ当業者は、ペプチド性化学性質の多リガンド捕捉剤は捕捉剤の1つの例のみであり、多リガンド捕捉剤にはオリゴおよびポリヌクレオチド、小分子、ならびに他の生物活性のあるリガンドが含まれることを理解されよう。

【0194】

特に、現在の標準である抗体を置き換えることができる、多リガンド捕捉タンパク質剤およびタンパク質性質の多リガンド捕捉剤を含めた多リガンド捕捉剤を開発する方法を記載し、リガンドがペプチド様分子によって提供される例示的な実施形態を参照して実証した。特に、それぞれのリガンドは、天然、人工、または非天然のアミノ酸および他の有機分子構成単位からなるペプチド様分子である。それぞれの多リガンドは2つ以上のリガンドからなり、それぞれのリガンドは複数の構成単位(アミノ酸など)からなる。多リガンドを構成するリガンドの数が増加するにつれて、目的タンパク質に対する多リガンドの選択性および親和性が迅速に増加する。標的タンパク質自体を、それ自体の多リガンド捕捉剤をアセンブルするための触媒として利用する。個々のリガンド自体(およびその構成成分のアミノ酸)は、この触媒プロセスのために特異的に設計されている。化学的および生化学的な安定性、水溶性、熱安定性、ならびに他の所望の特徴を多リガンド中に設計する

10

20

30

40

50

ことができる。さらに、多リガンドは、慣用の化学方法を用いてグラムのスケールの量で生成することができる。

【0195】

また、以下の実施例では、標準のタンパク質アッセイにおける、タンパク質に触媒される多リガンド捕捉剤の使用も例示する。実験室または臨床設定のいずれかにおいて使用されているいくつかの標準のタンパク質アッセイが存在する。標準のアッセイは、試料分析物の直接標識によって行なうアッセイおよび無標識アッセイの2つのクラスに分類される。これらの標準のアッセイには、最も一般的なタンパク質捕捉剤は抗体である。

【0196】

無標識アッセイとは、少なくとも1つの抗体を利用してその同族タンパク質を検出するものである。これらには、ウエスタンブロットおよびドットブロット、ならびに酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 等のサンドイッチアッセイなどのアッセイが含まれる。

【0197】

実施例1：官能化した人工アミノ酸の合成および特徴づけ

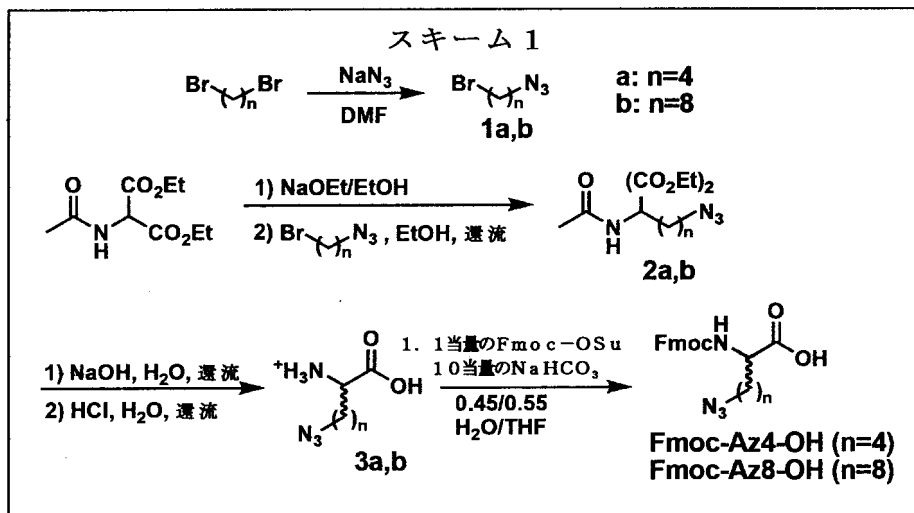
アジド含有人工アミノ酸の合成には、すべての化学薬品はSigma-Aldrich (モンタナ州St. Louis) から購入し、受け取ったままの状態で使用した。Fmoc-D-プロパルギルグリシン (Fmoc-D-Pra-OH) は商業販売業者 (Chem-Impex International、イリノイ州Wood Dale) から獲得し、アンカーリガンドおよび二重リガンドを構築するためのアセチレンハンドルとして使用した。

【0198】

スキーム1は、1ピース1化合物のペプチドライブラリに取り込ませた、アジド含有人工アミノ酸Fmoc-Az4-OHおよびFmoc-Az8-OHの合成を記載する。Fmoc-Az4-OHの詳細な合成プロトコルおよび分光学的な特徴づけを提供する。Fmoc-Az8-OHでは、分光学的な特徴づけのみを提供する。

【0199】

【化1】



【0200】

アジドブチルプロマイド (1a)。1,4-ジブromoブタン (1.23 mmol) の溶液に、アジ化ナトリウム (61.5 mmol) を加え、終夜、N,N'-ジメチルホルムアミド (DMF) 中、50 で攪拌した。反応を酢酸エチルで希釈し、有機層を水、その後ブラインで洗浄し、その後、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (100%のヘキサン) によって精製して、生成物 (80%) が透明な油状物として得られた。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>): 3.44 (2H、t、J = 6.3 Hz)、3.34

(2H, t, J = 6.6 Hz)、1.93-1.98 (2H, m)、1.74-1.79 (2H, m)。

【0201】

アジドオクチルプロマイド(1b)。1,8-ジブロモブタンを出発物質として使用した以外は、上述のように合成を実施した。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.41 (2H, t, J = 6.9 Hz)、3.26 (2H, t, J = 6.6 Hz)、1.86 (2H, p, J = 6.9 Hz)、1.60 (2H, p, J=8.7 Hz)、1.34-1.55 (4H, m)。

【0202】

ジエチル2-アセトアミド-2-(4-アジドブチル)マロネート(2a)。以前に公開されている手順に従って、25mlの無水EtOH中の0.598g(0.026mol)の金属ナトリウムの溶液に、5.65gのジエチルアセトアミドマロネート(0.026mol)を加えた(Chenault, H. K.ら、1989)。混合物を30分間、室温で撹拌した。滴下によってアジドブチルプロマイド1a(4.82g、0.027mol)を撹拌しながら加えた。反応混合物を2時間、室温で撹拌し、6時間80で還流した。終夜冷却した後、反応混合物を濃縮乾固し、残渣をジエチルエーテルで抽出した。合わせたエーテル抽出物を水、飽和NaHCO<sub>3</sub>、水、およびブラインで洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、その後、濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィー(Hex:EtOAc = 1:1)により、生成物(63%)が透明な粘稠油状物として得られた。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.77 (1H, s)、4.24 (4H, q, J=6.9 Hz)、3.26 (2H, t, J=6.9 Hz)、2.31-2.37 (2H, m)、2.04 (3H, s)、1.59 (2H, p, J=7.5 Hz)、1.26 (6H, t, J=6 Hz)、1.16-1.27 (2H, m)。ESI-MS m/e 315。

10

20

【0203】

ジエチル2-アセトアミド-2-(4-アジドオクチル)マロネート(2b)。アジドオクチルプロマイド1bが出発物質として役割を果たした以外は、2aと同様の合成プロトコルを採用した。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.76 (1H, s)、4.24 (4H, q, J=7.2 Hz)、3.24 (2H, t, J=6.9 Hz)、2.27-2.33 (2H, m)、2.04 (3H, s)、1.56 (2H, p, J=7.5 Hz)、1.25 (6H, t, J=7.2 Hz)、1.06-1.16、1.2-1.4 (10H, m)。ESI-MS m/e 371。

【0204】

2-アジドブチルアミノ酸(3a)。標準の方法に従って、25mlの10%のNaOH溶液中のジエステル2a(2.8mmol)を4時間加熱還流した(van Hest, J. C. M.ら、2000)。その後、溶液を濃HClで中和し、蒸発させた。残渣を25mlの1MのHClに溶かし、3時間加熱還流した。溶媒を還元し、MeOHで抽出して、アミノ酸3aが塩酸塩として得られた(85%)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.98 (1H, t, J=6.3 Hz)、3.35 (2H, t, J=7.8 Hz)、1.45-1.7、1.85-2.05 (6H, m)。MALDI-MS m/e 173。

30

【0205】

2-アジドオクチルアミノ酸(3b)。ジエステル2bを出発物質として使用して、上述のように合成を実施した。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.94 (1H, t, J=6.3 Hz)、3.27 (2H, t, J=6.9 Hz)、1.3-1.52、1.52-1.62、1.8-1.98 (14H, m)。ESI-MS m/e 229。

40

【0206】

Fmoc-2-アジドブチルアミノ酸(Fmoc-Az4-OH)。公開されている方法に従って、アミノ酸3a(26.3mmol)を0.45:0.55のH<sub>2</sub>O:THF(150ml)に溶かし、NaHCO<sub>3</sub>(22.1g、263mmol)を加えた(Lee, H. - S.ら、2003)。混合物を0まで冷却した後、Fmoc-OSu(9.7g、28.9mmol)を5分間かけて滴下した。反応混合物を室温にし、終夜撹拌した。THFの蒸発を真空下で完了し、水性残渣をジエチルエーテルで洗浄した(2x200ml)。その後、水層を収集し、濃HClでpH2まで酸性化した後、酢酸エチル(4x100ml)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、濃縮した。有機残渣をカラムクロマトグラフィー(DCM中に2%のMeOH

50

)によって精製して、白色粉末が得られた(48%の収率)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>): 7.76 (2H、d、J=7.5 Hz)、7.59 (2H、d、J=6.9 Hz)、7.40 (2H、t、J=7.5 Hz)、7.31 (2H、t、J=7.5 Hz)、5.34 (1H、d、J=7.8 Hz)、4.49-4.59 (1H、m)、4.43 (2H、d、J=6.6 Hz)、4.22 (1H、t、J=6.6 Hz)、3.27 (2H、t、J=6.6 Hz)、1.3-2.0 (6H、m)。ESI-MS m/e 395。

#### 【0207】

Fmoc-2-アジドオクチルアミノ酸(Fmoc-Az8-OH)。上述のようにアミノ酸3bをFmoc保護で処理した。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>): 7.75 (2H、d、J=7.5 Hz)、7.57-7.61 (2H、m)、7.39 (2H、t、J=7.5 Hz)、7.30 (2H、t、J=7.2 Hz)、5.40 (1H、d、J=8.1 Hz)、4.42-4.52 (1H、m)、4.40 (2H、d、J=7.2 Hz)、4.21 (1H、t、J=7.2 Hz)、3.23 (2H、t、J=6.9 Hz)、1.18-1.98 (14H、m)。ESI-MS m/e 450。

10

#### 【0208】

##### 実施例2: 1ピース-1化合物のペプチドライブラリの構築

材料。Fmoc-D-Ala-OH (Fmoc、フルオレン-9-イルメトキシカルボニル)、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH (Pbf、ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル)、Fmoc-D-Asn(Trt)-OH (Trt、トリチル)、Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH (tBu、tert-ブチル)、Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-D-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-D-His(Trt)-OH、Fmoc-D-Ile-OH、Fmoc-D-Leu-OH、Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (Boc、tert-ブチルオキシカルボニル)、Fmoc-D-Met-OH、Fmoc-D-Phe-OH、Fmoc-D-Pro-OH、Fmoc-D-Ser(tBu)-OH、Fmoc-D-Thr(tBu)-OH、Fmoc-D-Trp(Boc)-OH、Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH、およびFmoc-D-Val-OHをAnaspec(カリフォルニア州San Jose)から購入し、受け取ったままの状態で使用した。TentaGel S-NH<sub>2</sub>樹脂(90 μm、0.31 mmol/g)をAnaspec(カリフォルニア州San Jose)から得て、OBOCライブラリの構築に利用した。Fmoc-RinkアミドMBHA樹脂(50 μm、0.67 mmol/g)をAnaspec(カリフォルニア州San Jose)から得て、ヒットしたペプチド配列のバルク合成に利用した。アミノ酸カップリング反応を、1-メチル-2-ピロリジノン(NMP、99%)中で、HATU(2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアンモニウムヘキサフルオロホスフェート、ChemPeP、フロリダ州Miami)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(99%、Sigma-Aldrich、モンタナ州St. Louis)を用いて行なった。N-Fmoc保護基の除去には、NMP中の20%のピペリジンの溶液を使用した。ペプチドライブラリの最終脱保護には、トリフルオロ酢酸(98%の最小滴定)およびトリエチルシラン(TEES)を使用した(Sigma-Aldrich、モンタナ州St. Louis)。

20

30

#### 【0209】

40

ペプチドライブラリの構築。1ピース-1化合物(OBOC)のコンビナトリアルライブラリ方法を用いて、5~7個のペプチドのランダム化されたライブラリを合成し、ペプチドライブラリは、以前の報告されている分割混合手法によって合成した(Lam, K. S.ら、1997、Furka, A.ら、1991、Geysen, H. M.およびT. J. Mason、1993)。

#### 【0210】

特に、5~7個のペプチドのランダム化されたOBOCライブラリを、90 μMのポリエチレングリコール移植ポリスチレンピース(TentaGel S-NH<sub>2</sub>、0.31 mmol/g、2.86 × 10<sup>6</sup>個のピース/g)上の標準の分割混合固相ペプチド合成方法によって、手動で合成した(Lam, K. S.ら、1997、Furka, A.ら、

50

1991、Geysen, H. M. および T. J. Mason、1993)。非天然 D - 立体異性体 (小文字の一文字のアミノ酸コードで示す) をペプチド配列中の可能なすべての位置で使用した。それぞれのライブラリ要素の十分な表示を保証するために、少なくとも 5 倍過剰のビーズをそれぞれのライブラリ合成で利用した。Fmoc 化学を用いた標準の固相ペプチド合成方法を使用した (Coin, I. ら、2007)。すべての洗浄、脱保護、およびカップリングのステップは、樹脂の 180 度振盪によって促進した。プラスチックフリット反応器内で樹脂を NMP で事前に膨潤させ、複数のアリコートに分けた。それぞれのアリコートを 2 倍モル濃度過剰量 (樹脂に対して) の単一の N - Fmoc - アミノ酸と反応させた。アミドカップリングは、2 倍モル濃度過剰量の HATU および 6 倍モル濃度過剰量の DIEA を加えることによって開始した (Carpino, L. A. ら、1994)。カップリング反応は 15 分間実行した。別の 2 当量の N - Fmoc - アミノ酸、2 当量の HATU、および 6 当量の DIEA を加え、15 分間反応させた (「二重カップリング」)。一部の事例では、第 3 の組のカップリング試薬および N - Fmoc - アミノ酸を用いた「三重カップリング」を行なった (表 1、ライブラリ D、E、F、および G)。カップリング後、アリコートを十分に洗浄し (5 x NMP)、単一の容器内で一緒に混合し、NMP 中の 20% のピペリジンで脱保護した (30 分間)。樹脂を十分に洗浄し (5 x NMP)、乾燥させ (5 x DCM)、次のカップリングサイクルのために複数の等質量のアリコートへと再度分割した。所望の長さのペプチドが得られるまで手順を繰り返した。

10

**【0211】**

20

その後、トリフルオロ酢酸 (95%)、水 (5%)、およびトリエチルシラン (保護した側鎖あたり 2 倍モル濃度過剰量) 中、2 時間、25 でインキュベーションすることによってアミノ酸側鎖保護基を除去した。その後、ライブラリ樹脂を DMF で中和し、DMF (5 x)、水 (5 x)、メタノール (MeOH、5 x)、および塩化メチレン (DCM、5 x) で十分に洗浄し (Dixon, S. M. ら、2006)、その後、真空下で乾燥させ、リン酸緩衝生理食塩水 [PBS (pH 7.4)] + 0.05% の NaN<sub>3</sub> 中、25 で保管した。

**【0212】**

表 1 に、直鎖状および分枝状の二重リガンドならびに三重リガンド捕捉剤の開発に利用したライブラリを記載する。

30

**【0213】**

【表 1】

表 1. 合成およびスクリーニングしたライブラリ。\*

ライブラリ 式	構成成分	固有配列の数	
A	$x_1x_2x_3x_4x_5$	$x_i = 19$ 個の D-アミノ酸 (D-Cys なし)	2, 476, 099
B	$x_1x_2x_3x_4x_5x_6$	$x_i = r, k, l, w, f, h, y$	117, 649
C	$Az_n - x_2x_3x_4x_5x_6 - Az_n$	$x_i = 19$ 個の D-アミノ酸 (D-Cys なし) $Az_n = 1/3$ の Az4、 $1/3$ の Az8、 $1/3$ のアミノ酸なし	22, 284, 891
D	$x_1x_2x_3x_4x_5x_6 - Tz1 - kfwlkl$	$x_i = k, l, w, f, i, g, v$	117, 649
Tz1 = Az4 (末端 k 上) および D-Pra ( $x_6$ 上) の間に形成された トリアゾール			
E	$x_7x_6x_5x_4x_3x_2 - Tz2 - kwlwGl - Tz1 - kfwlkl$	$x_i = d, r, s, w, G, f, l$	117, 649
Tz1 = Az4 (末端 k 上) および D-Pra (l 上) の間に形成された トリアゾール Tz2 = Az4 (末端 $x_2$ 上) および D-Pra (k 上) の間に形成された トリアゾール			
F	$Az4 - x_2x_3x_4x_5x_6x_7$	$x_2 = r, n, l, i$ ; $x_3 = w, f, l, i$ ; $x_4 = r, w, f, l, i$ ;	3200
G	$x_7x_6x_5x_4x_3x_2 - Tz2 - kwlwGl - Tz1 - kfwlkl$	$x_5 = w, f, v, l$ ; $x_6 = r, w, f, l, k$ ; $x_7 = f, r$	3200
H	$x_1x_2x_3x_4x_5x_6$	$x_i = k, w, f, i, g, l, v, Az4$	262, 144
I	$x_1x_2x_3 - Az4 - x_5x_6$	$x_i = k, w, i, g, v, l, f$	16, 807
J	$x_0x_1 - k - x_3 - Az4 - x_5 - w$	$x_0 = a, G, l, i, v, y, w, f, s, t, e, d, h, p, r, n, q, k$ $x_1 = k$ (N <sup>ε</sup> -Aloc), w, v $x_3 = v, w, r, n, q, d, k, s, t, h, G, a$ . $x_5 = f, l, r, n, q, d, k, s, t, h, G, a$	7776

10

20

30

\* ランダム化された位置は、 $x$  (D-アミノ酸) および  $Az_n$  (アジド含有人工アミノ酸) で示す。

## 【0214】

## 実施例 3：一般スクリーニング手順

タンパク質標的の提供。炭酸脱水酵素 II (bCAII) が多リガンドタンパク質捕捉剤の概念証明開発の標的として役割を果たした。bCAII (C2522)、ウシ赤血球由来、凍結乾燥粉末、3,000 の W-A 単位 / mg のタンパク質を Sigma-Aldrich (モンタナ州 St. Louis) から得て、受け取ったままの状態で使用した。Alexa Fluor 647 マイクロスケールタンパク質標識キット (Invitrogen、カリフォルニア州 Carlsbad) を用いて製造者の低度標識 (DOL) のプロトコルに従ってタンパク質を色素標識した。手短に述べると、100  $\mu$ g のタンパク質を、6 mol 当量の Alexa Fluor 647 NHS エステルと共に 15 分間、25 でインキュベーションした。BioGel P-6 サイズ排除樹脂によって過剰の色素を除去した。標識したタンパク質 (bCAII-Alexa647) を UV-Vis および質量分析によって特徴づけた。

40

## 【0215】

リガンドのスクリーニングに適切なスクリーニング手順は以下のように要約される。典型的なペプチドアンカーリガンドのスクリーニングは、非特異的なタンパク質結合を遮断するために、PBS (pH 7.4) + 0.1% の Tween 20 + 0.1% のウシ血清ア

50

ルブミン (BSA) + 0.05% の  $\text{NaN}_3$  (PBSTB $\text{NaN}_3$ ) 中、1時間、振盪しながらライブラリをインキュベーションすることに始まる (Lehman, A.ら、2006)。その後、ライブラリを3×5 mLのPBSTB $\text{NaN}_3$ で洗浄した。ビーズ上多リガンドスクリーニングは適切なbCAII-Alexa Fluor 647の希釈率で実行し (表2および図24のスキームを参照)、その後、3×5 mLのPBSTB $\text{NaN}_3$ 、3×5 mLのPBS (pH 7.4) + 0.1%のTween 20、最後に6×5 mLのPBS (pH 7.4)で洗浄した。すべての*in situ*多リガンドスクリーニングは、bCAII-Alexa Fluor 647とペプチドアンカーリガンド (典型的にはタンパク質に対して2000当量)とのさらに2時間のプレインキュベーションを含有し、その後、ビーズライブラリをこの混合物に加え、スクリーニングを続けた (表2および図24のスキームを参照)。In situの多リガンドのスクリーニング後、ビーズを3×5 mLのPBSTB $\text{NaN}_3$ 、3×5 mLのPBS (pH 7.4) + 0.1%のTween 20、その後6×5 mLのPBS (pH 7.4)で洗浄した。

【0216】

実施例2のライブラリA~Jに使用するスクリーニング条件の要約を以下の表2に報告する。

【0217】

【表 2】

表 2. スクリーニングの要約。別段に指定しない限りは、すべてのスクリーニングは pH = 7.4 および T = 25 °C で実行した。

スクリーニング	ライブラリ	[bCAII-AF647]	時間 (時間)	ヒットしたビーズの%	緩衝液	他の構成成分
An1	A	100 nM	1 時間	0.02%	PBS	
An2a	B	50 nM	1 時間	0.09%	PBS	
An2b	B	8 nM	2 4 時間	2 個のヒット	PBS	
Bi1	C	50 nM	2 時間、37° (ビーズなし) + 4 8 時間、 37°	0.007%	PBS + 1% の DMSO (v/v)	100 μM の klwfk- (D-Pra)
Bi2a	D	50 nM	1 7 時間	0.07%	PBSTBNaN <sub>3</sub>	
Bi2b	D	10 nM	1 7 時間	0.008%	PBSTBNaN <sub>3</sub>	
Tri1	C	50 nM	2 時間 (ビーズなし) + 1 5 時間	0.007%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	100 μM の (D- Pra)-klwGf- Tz1-kfwkI
Tri2	E	10 nM	1 7 時間	0.008%	PBSTBNaN <sub>3</sub>	
TriX	A	10 nM	1 7 時間	0.007%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	100 μM の (D- Pra)-klwGf- Tz1-kfwkI
Tri3	F	0.5 nM	2 時間 (ビーズなし) + 1 8 時間	0.005-0.01%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	100 μM の (D- Pra)-klwGf- Tz1-kfwkI
Tri4	G	0.25 nM	1 8 時間	0.005-0.01%	PBSTBNaN <sub>3</sub>	
BrBi1	H	50 nM	2 時間、37° (ビーズなし) + 1 8 時間、 37°	0.01%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	100 μM の klwfk- (D-Pra)
BrBi2	I	10 nM to 500 pM	2 時間 (ビーズなし) + 1 5 時間	0.06%- 0.006%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	40 μM の klwfk- (D-Pra)
BrBi3	J	10 nM	2 時間 (ビーズ なし) + 6 時間、37°	0.07%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	40 μM の klwfk- (D-Pra)
BrTri1	C	50 nM	2 時間 (ビーズなし) + 1 6 時間	0.003%	PBSTBNaN <sub>3</sub> + 1% の DMSO (v/v)	100 μM の分枝状二重 リガンドアンカー

## 【0218】

スクリーニングしたビーズをガラス製顕微鏡スライド上に移し、GenePix 4200 アレイスキャナ ( $\lambda_{ex} = 635 \text{ nm}$ ) を用いて蛍光についてすぐにイメージングした。ヒットしたビーズをガラスマイクロピペットによって手動で選択した。結合したタンパク質を除去するために、それぞれのヒットしたビーズを 7.5 M の塩酸グアニジン (pH 2.0) 中で 1 時間インキュベーションし、続いて水で 10 回すすいだ。

## 【0219】

単一のヒットしたビーズをエドマン分解によって配列決定した。特に、エドマン配列決定は、モデル 494 Procise cLC 配列決定システム (Applied Biosystems、カリフォルニア州 Foster City) で実施した。反復 N 末端化学分解サイクルにより、直接の位置的なアミノ酸情報が得られる。それぞれの分解サイクルにより 1 個の PTH-アミノ酸 (PTH = フェニルチオヒダントイン) 産物が生じ、これを HPLC によって分析し、PTH-アミノ酸標準と比較した保持時間によって同定した。この方法による人工アジド含有アミノ酸の分割を可能にするために習慣のエドマン分解方法を利用し、これには延長した勾配およびフラスコサイクルが含まれる。

## 【0220】

Az2、Az4、Az6およびAz8の溶出に対応するエドマン追跡により、アジドアルキル側鎖に2個のメチレン単位が付加されるごとに6分の保持時間の増加が実証された。Fmoc-Az2-OHは文献プロトコルに従って合成し(Roicé, Mら、2004)、一方で、Fmoc-Az6-OHは上記実施例1のスキーム1に従って合成した。

## 【0221】

実施例4：スクリーニング手法：第一世代アンカーリガンド

アンカーリガンドのスクリーニング。特に、第一世代スクリーニングは、上記実施例2に記載し、図19に例示したように調製した五量体のライブラリA(4g、約2,500,000個のビーズ)を用いて実行した。特に、ライブラリAをポリプロピレンフリット管へ10mg部分で分けた。その後、1mLのPBS[20mMのリン酸ナトリウム、150mMのNaCl(pH7.4)]中に100nMの希釈率のbCAII-Alexa647を、それぞれのライブラリ部分と共に1時間、25℃で振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを3×5mLのPBS(pH7.4)および7×5mLの水で洗浄した。ビーズを必要最低限量の水中でガラス製顕微鏡スライド上に移し、GenePix4200アレイスキャナを用いて蛍光についてすぐにイメージングした。ヒットをガラスマイクロピペットによって手動で選択した。結合したタンパク質を除去するために、それぞれのヒットしたビーズを7.5Mの塩酸グアニジン(pH2.0)中で1時間インキュベーションし、続いて水で10回すすいだ。

10

20

## 【0222】

その後、ヒット配列をエドマン分解によって解読した。ヒストグラム分析を用いて、アミノ酸頻度のヒット配列および試料間の位置的な配列相同性について分析した。第一世代アンカーリガンド分析の例を図25に提示する。

## 【0223】

特に、図25の図では、スクリーニングAn1から単離した51個のヒット配列の頻度対D-アミノ酸をパネルAに示す。スクリーニングAn2aおよびAn3bのヒット率を図25のパネルBに示し、これにより2つのペプチドアンカーリガンドの選択がもたらされる。

30

## 【0224】

これから、塩基性/帯電残基(k、r)および芳香族残基(y、f、w)がbCAIIのアンカーリガンド中の重要なアミノ酸であることが決定され、これらのアミノ酸を用いて、以下の実施例5に例示した手順に従って集中したライブラリBを構築した。

## 【0225】

実施例5：スクリーニング手法：第二世代アンカーリガンド

実施例2に例示した手順に従って集中したライブラリBを構築して、実施例4に例示した手順に従って同定した発生頻度の高いアミノ酸を反映した。

## 【0226】

具体的には、アミノ酸k、r、y、f、w、h、およびlを含ませて、ペプチドの長さを六量体まで増加した。構成成分のアミノ酸のより密な分布および増加したペプチドの長さは、第二世代スクリーニングを濃縮して、さらにより特異的なアンカーリガンドが選択されることが示された。

40

## 【0227】

その後、上記実施例3に例示したスクリーニングAn1と同様のプロトコルに従って、1個のコピーのライブラリB(40mg、約120,000個のビーズ)を使用して第二世代アンカーリガンドスクリーニングを実行した。ここでは、4mLのPBS(pH7.4)中の8~50nMのbCAII-Alexa647の希釈率をライブラリと共に、1~24時間、25℃で振盪しながらインキュベーションした。

## 【0228】

第二世代スクリーニングAn2aおよびAn2bの結果を例示する図25Bを参照され

50

たい(図19も参照)。ここでは、ヒットはさらに低いタンパク質濃度およびより低い頻度で単離された。

【0229】

最もストリンジェントなスクリーニングにより、2つのヒット、hlyflrおよびklwfkが得られ、これらは2つの選択されたアンカーリガンドを表す。

【0230】

実施例6：アンカーリガンドの合成および親和性測定。

【0231】

ペプチド合成。スクリーニングAn2bからのヒットを、その末端に適切な人工アミノ酸(アジド/アセチレン)リンカーを含有するように再合成して、これらをクリックケミストリーに適切なものとした。ヒットしたペプチド配列のバルク合成は、Fmoc-RinkアミドMBHA(50 $\mu$ m、0.67mmol/g)または塩化2-クロロトリチル(1.5mmol/g)樹脂(Anaspec、カリフォルニア州San Jose)のいずれか上で、0.3g/配列の典型的な樹脂スケールで行なった。粗ペプチドをエーテルで沈殿させ、その後、HPLC(Beckman Coulter System Gold 126溶媒モジュールおよび168検出器、カリフォルニア州Fullerton)によって、C<sub>18</sub>逆相半調製用カラム(Phenomenex Luna 10 $\mu$ m、250 $\times$ 10mm)上で>98%まで精製した。純粋なペプチドを親和性測定、スクリーニング、および結合アッセイに使用した。ヒットしたペプチド配列を同様の樹脂スケールでTentaGel S-NH<sub>2</sub>上でも再合成し、ビーズ上結合アッセイに使用した。

10

20

【0232】

蛍光偏光によるK<sub>D</sub>の決定。公開されているプロトコルに従って、アンカーリガンドのN末端をフルオレseinイソチオシアネート(FITC)で標識した(Yin, H.ら、2006)。樹脂の切断後、粗フルオレsein化アンカーリガンドをエーテルで沈殿させ、その後、C<sub>18</sub>逆相HPLCによって>98%まで精製した。

【0233】

発光スペクトルは、Beckman Instituteレーザー資源センター(Laser Resource Center)(カリフォルニア州Pasadena)のFluorolog 2分光蛍光光度計(Jobin Yvon、フランスLongjumeau)によって記録した。すべての試料は、6 $\mu$ Mのフルオレsein化アンカーリガンドおよび様々な濃度のbCAII(0.2 $\mu$ Mから800 $\mu$ M)をPBS(pH7.4)+3%(v/v)のDMSO中に含有していた。ストックタンパク質およびアンカーリガンドの濃度は、UV-Visによって、フルオレsein化アンカーリガンドには $\epsilon_{280}(bCAII) = 57,000 M^{-1} cm^{-1}$ または $\epsilon_{494}(FITC, 0.1 NのNaOH) = 68,000 M^{-1} cm^{-1}$ を用いて検証した。試料を488nm(2nmの帯域通過)で励起し、発光スペクトルを500nm~700nm(4nmの帯域通過)で得た。すべての測定値は2nm間隔、0.5秒の積分時間、25で採った。すべての発光スペクトルはバックグラウンド減算に供した。

30

【0234】

系の垂直および水平の平面偏光の感受性(G)の比は、ペプチドのみの試料から得られたI<sub>HH</sub>およびI<sub>HV</sub>発光スペクトルを用いて、方程式G = I<sub>HH</sub> / I<sub>HV</sub>によって計算した。発光スペクトルI<sub>VV</sub>およびI<sub>VH</sub>を積分し、蛍光偏光値(P)は方程式1を適用することによって得られた。

40

【0235】

【数1】

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad (1)$$

50

## 【0236】

Origin 6.1 (マサチューセッツ州 Northampton) を用いて分極値を S 字型用量応答曲線に当てはめた。

## 【0237】

この方法によって、bCAII に対する  $500 \mu\text{M}$  の親和性がフルオレセイン化アンカーリガンド *lklwfk* - (D - Pra) で測定された。フルオレセイン化アンカーリガンドを漸増する濃度の標的 ( $0.2 \mu\text{M}$  から  $800 \mu\text{M}$ ) で滴定し、この結合相互作用について  $500 \mu\text{M}$  の親和性が示唆された (図 26)。

## 【0238】

実施例 7 : 二次リガンドの同定 : 二重リガンドのスクリーニング

二次リガンドを 2 つの相補的な手法、1) *in situ* 二重リガンドスクリーニング、2) ビーズ上二重リガンドスクリーニングによって同定した。(図 24 を参照)

## 【0239】

*In situ* 二重リガンドスクリーニング : 第 1 の手法では (図 20 および図 24 A を参照)、ペプチドアンカーリガンドおよびタンパク質は溶液中にあり、二次リガンドの同族ライブラリはビーズ上にある。タンパク質は、ビーズ上での二重リガンドの *in situ* アセンブリの触媒として作用する。

## 【0240】

スクリーニング Bi1 では、 $50 \text{ nM}$  の bCAII - Alexa647 の溶液を、ペプチドアンカーリガンド (*lklwfk* - (D - Pra)、タンパク質に対して  $2000 \times$ ) と、2 時間、 $37^\circ\text{C}$  でプレインキュベーションした。ポリプロピレンフリット管あたり  $60 \text{ mg}$  部分に分けたアジド七量体ライブラリ C ( $4 \text{ g}$ 、約  $2,250,000$  個のビーズ) を用いてスクリーニングを実行した。アンカーリガンド/タンパク質の溶液をビーズライブラリに加え、 $48$  時間、 $37^\circ\text{C}$  で振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを  $3 \times 5 \text{ mL}$  の PBS ( $\text{pH } 7.4$ ) および  $7 \times 5 \text{ mL}$  の水で洗浄した。実施例 3 に概要を示したプロトコルを用いてビーズを蛍光についてイメージングした。*In situ* 二重リガンドを表すヒットをマイクロピペットによって手動で選択した。その後、選択されたビーズを加工して、結合したタンパク質を除去し [ $7.5 \text{ M}$  の塩酸グアニジン ( $\text{pH } 2.0$ )]、二次リガンドの配列がエドマン分解によって得られた。

## 【0241】

図 27 は、この第一世代 *in situ* 二重リガンドスクリーニング Bi1 の結果を例示する。この第一世代 *in situ* 二重リガンドスクリーニング Bi1 におけるヒットした二次リガンドのヒストグラム分析および生分析から、そのモチーフがいくつかのヒットした試料にわたって繰り返されていた二次リガンド候補が出現した (Az4 - kiwiG)。特に、図 8 A 27 A は、 $100 \mu\text{M}$  のアンカーリガンド (*lklwfk* - (D - Pra)) の存在下でスクリーニングライブラリ C から単離した二次リガンド候補の頻度対 D - アミノ酸のヒストグラムを示す。図 27 B は、 $50 \text{ nM}$  の bCAII - Alexa647 に対するスクリーニングライブラリ C から単離したヒット配列の略記のリストを示す。

## 【0242】

*In situ* 二重リガンドアセンブリによって二次リガンドをスクリーニングする方法は、対でのスクリーニングによって妥当性確認することができる。特に、アンカーリガンドおよび二次リガンドの対を、タンパク質標的の存在下で、溶液中で合わせる。タンパク質に触媒される二重リガンド捕捉剤のアセンブリを Manetsch、Krasinski ら、2004 および Krasinski、Radics ら、2005 によって記載されているものなどの分析方法によって監視する。

## 【0243】

対でのスクリーニング。二次リガンド (アジド、Az4 - kiwiG、 $13.1 \text{ mM}$ ) およびアンカーリガンド (アセチレン、*lklwfk* - (D - Pra)、 $2.1 \text{ mM}$ ) のストック溶液を DMSO 中で調製した。bCAII およびウシ血清アルブミン (BSA)

10

20

30

40

50

のストック溶液をPBS (pH 7.4) 中で調製した。それぞれの反応は、100  $\mu$ LのPBS (pH 7.4) + 6%のDMSO (v/v) 中に394  $\mu$ Mのアジド、65  $\mu$ Mのアルキン、および36  $\mu$ Mのタンパク質を含有していた。反応を48時間、37 °Cで、続いて5日間、25 °Cで進行させた。反応を100  $\mu$ Lの7.5 Mの塩酸グアニジン (pH 2.0) で反応停止させ、続いて遠心濾過 (Microcon YM-3, Millipore、マサチューセッツ州Billerica) によってタンパク質を除去した。

#### 【0244】

In situ二重リガンドの形成はMALDI-TOF質量分析によって同定した。対照実験は、アジドおよびアルキンの間のクリック反応がbCAIIタンパク質標的に特異的であることを検証するために、(1) bCAIIの非存在下で、および(2) bCAIIをBSAで置き換えて実行した。タンパク質の非存在下で行なった第3の対照は、アジドおよびアルキンの溶液の間の、ゆっくりの熱駆動される反応を表す。

10

#### 【0245】

MALDI-MSでは、タンパク質bCAIIがin situ二重リガンドの代謝回転を触媒した、対でのスクリーニングの結果を図28に例示する。BSAによって触媒されるバックグラウンド反応または熱クリック反応は低く、二重リガンドの代謝回転のほとんどがbCAIIに起因する可能性があることを提供している。特定の実施形態では、対でのスクリーニングの生成物の増幅は、実施例13の図29および図30に例示するように行なうことができる。

20

#### 【0246】

ビーズ上二重リガンドスクリーニング：二次リガンドを同定する第2の手法では(図24Bを参照)、銅(I)に触媒されるアジド-アルキン付加環化(CuAAC)によってペプチドアンカーリガンドを二次リガンドのビーズ上ライブラリに共有的カップリングさせる。特に、この事前にアSEMBLした二重リガンドのライブラリをタンパク質標的に対してスクリーニングして、二次リガンド候補が得られる。この手法ではタンパク質標的は触媒ではなく、このスクリーニングは、in situ捕捉剤スクリーニングに対する比較の妥当性確認ツールとして用いた。

#### 【0247】

上記実施例3に従って、ライブラリD (40 mg、約120,000個のビーズ) を用いてポリプロピレンフリット管中でスクリーニングBi2aおよびBi2bを実行した。非特異的なタンパク質結合を遮断するために、ライブラリを最初にPBS (pH 7.4) + 0.1%のTween 20 + 0.1%のウシ血清アルブミン (BSA) + 0.05%のNaN<sub>3</sub> (PBSTBNaNa<sub>3</sub>) 中で1時間、振盪しながらインキュベーションした (Lehman, A.ら、2006)。この事前遮断ステップの後、ライブラリを3 x 5 mLのPBSTBNaNa<sub>3</sub>で洗浄した。4 mLのPBSTBNaNa<sub>3</sub>中に10~50 nMの希釈率のbCAII-Alexa647を、ライブラリと共に17時間、25 °Cで振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを3 x 5 mLのPBSTBNaNa<sub>3</sub>、その後、3 x 5 mLのPBS (pH 7.4) + 0.1%のTween 20で洗浄し、最後に6 x 5 mLのPBS、pH 7.4で洗浄した。ビーズを蛍光についてイメージングし、マイクロピペットによってヒットを選択した。ヒットを洗浄して結合したタンパク質を除去した後 [7.5 Mの塩酸グアニジン (pH 2.0)]、上記実施例3に従ってその配列をエドマン分解によって決定した。

30

40

#### 【0248】

スクリーニングBi2aおよびBi2bによって得られたすべての二次リガンド配列は、特筆すべき配列相同性を示す。kwlwglおよびkwiwgwを含めたいくつかの配列は複数回繰り返されていた。

#### 【0249】

すべての二次リガンドヒットの残基ごとのヒストグラム分析 (図31) は、二重リガンド捕捉剤の二次リガンド構成成分中でそれぞれの残基1 (k)、2 (w)、4 (w)、および5 (G) で、1個のみのアミノ酸の強力な優先性が見つかることを例示している。特

50

に、37個の二重リガンドヒットしたビーズの分析に基づいて位置1~6に見つかった、図31に例示されているD-アミノ酸の分布により、コンセンサス配列k-w-x<sub>3</sub>-w-g(式中、x<sub>3</sub>=疎水性アミノ酸)が示唆されている。

【0250】

実施例8:より長い多リガンド捕捉剤のアンカーリガンドとしての二重リガンドの利用

二重リガンドを同定した後、その二重リガンドは図7のアンカーリガンドとして役割を果たすことができ、同じOBOCライブラリを用いて三重リガンドを同定し、以降も同様である。

【0251】

図7の図に示すように、多リガンド捕捉剤を調製するための逐次のin situクリックケミストリースクリーニングの表示。1°)TentaGel(TG)ビーズ上の包括的なOBOPeptidライブラリ(x<sub>i</sub>=可変領域)を、蛍光標識したタンパク質標的と共にインキュベーションする。実施例4および5に詳述するように、ヒットをその蛍光強度によって同定する。2°)1°スクリーニングからのヒットしたペプチドをアンカーリガンドとして用い、今ではアジドリンカー(n=4、8)が付随しているOBOPeptidライブラリの存在下でインキュベーションする。実施例7に詳述するように二重リガンドを選択する。3°)プロセスを繰り返すが、ここでは2°スクリーニングからの二重リガンドを新しいアンカー単位として用い、高次多リガンドの迅速な同定が可能となる。

10

【0252】

リガンドを捕捉剤に付加するごとに、その捕捉剤の、その同族タンパク質に対する親和性および選択性が迅速に増加する。実施例2~7に例示した手順に従って、図7のスクリーニングを用いてlkllwfk-(D-PrA)をアンカーリガンドとして同定し、(D-PrA)-kwllwGl-Tz1-kfwllklを二重リガンドとして同定し、最終的には(D-PrA)-kwllwGl-Tz1-kfwllklを、bCAIIに対する三重リガンドを同定するためのアンカーリガンドとして示唆した。

20

【0253】

以下の実施例9に例示するように、bCAIIに対する二重リガンドkwllwGl-Tz1-kfwllklは、表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定して、bCAIIに対して3μMの結合親和性を示した(SPR手順には実施例10も参照)。この二重リガンドの測定された解離定数は、標的と相互作用するアンカーリガンドlkllwfk-(D-PrA)で測定されたものよりも150倍良好である。

30

【0254】

実施例9:ビーズ上クリック反応を用いた二重リガンドの合成。

【0255】

bCAIIに対する特異的な二重リガンドの同定および親和性測定を、以下に記載するように行なった。

【0256】

材料。ペプチド二重リガンド合成には、アセチル化試薬(無水酢酸、2,6-ルチジン、およびN,N-ジメチルホルムアミド(DMF))をSigma-Aldrich(モンタナ州St.Louis)から購入した。ビーズ上のCu(I)に触媒されるクリック反応には、ヨウ化銅(I)、L-アスコルビン酸、およびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物をSigma-Aldrich(モンタナ州St.Louis)から購入した。

40

【0257】

ビーズ上での二重リガンド合成。二重リガンドの合成は4つのステップ、すなわち、以前の実施例中に例示した手順に従った(1)アンカーリガンドの合成、(2)アセチル化、(3)クリック反応、および(4)二次リガンド配列の付加で完了した。スキーム2はアセチル化およびクリック反応を例示する。アセチル化には、完全に保護したTentaGel-S-NH<sub>2</sub>ビーズと結合した配列(0.420g、0.13mmol)を、触媒量の2,6-ルチジンを含むDMF中の無水酢酸(1mmol)の溶液によってキャ

50

ップした。

【0258】

アセチル化したペプチドを、Fmoc-D-Pra-OH (0.218 g、0.65 mmol) と、ヨウ化銅 (I) (0.124 g、0.65 mmol)、L-アスコルビン酸 (0.114 g、0.65 mmol)、および DMF / ピペリジン (8 / 2) の存在下、25 で 6 時間反応させた (Zhang, Z. および E. Fan, 2006)。反応溶液を樹脂から排出し、樹脂を、DMF 中の 1% の DIEA (v/v) を含有する 5 x 5 mL のジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物 (Et<sub>2</sub>NCSSNa · 3H<sub>2</sub>O、1% w/v) で洗浄して、クリック反応後の過剰の配位した銅を除去した (Weterings, J. J. ら、2006)。

10

【0259】

特に、スキーム 2 を用いて、二重リガンドアンカー (D-Pra) - kwlwGl - Tz1 - kfwlkl を塩化 2 - クロロトリチル (1.6 mmol / g) 樹脂 (Anasp ec、カリフォルニア州 San Jose) 上で合成した。二重リガンドアンカーは、95 : 5 の TFA : 水 (側鎖保護基あたり + 2 mol 当量のトリエチルシラン捕捉剤) を用いた切断によって完全に脱保護されたペプチドとして、または 99 : 1 の DCM : TFA を用いた切断によって完全に保護されたペプチドとして放出された (Garcia - Martin, F. ら、2007)。ビーズ上クリック反応を容易にするために、1° リガンドをここでは Az4 - kfwlkl (N 末端 Az<sub>n</sub> 修飾を示す) として合成し、この配列に D-Pra および 2° リガンドをカップリングさせて直鎖状二重リガンドを生成したことに注意されたい。

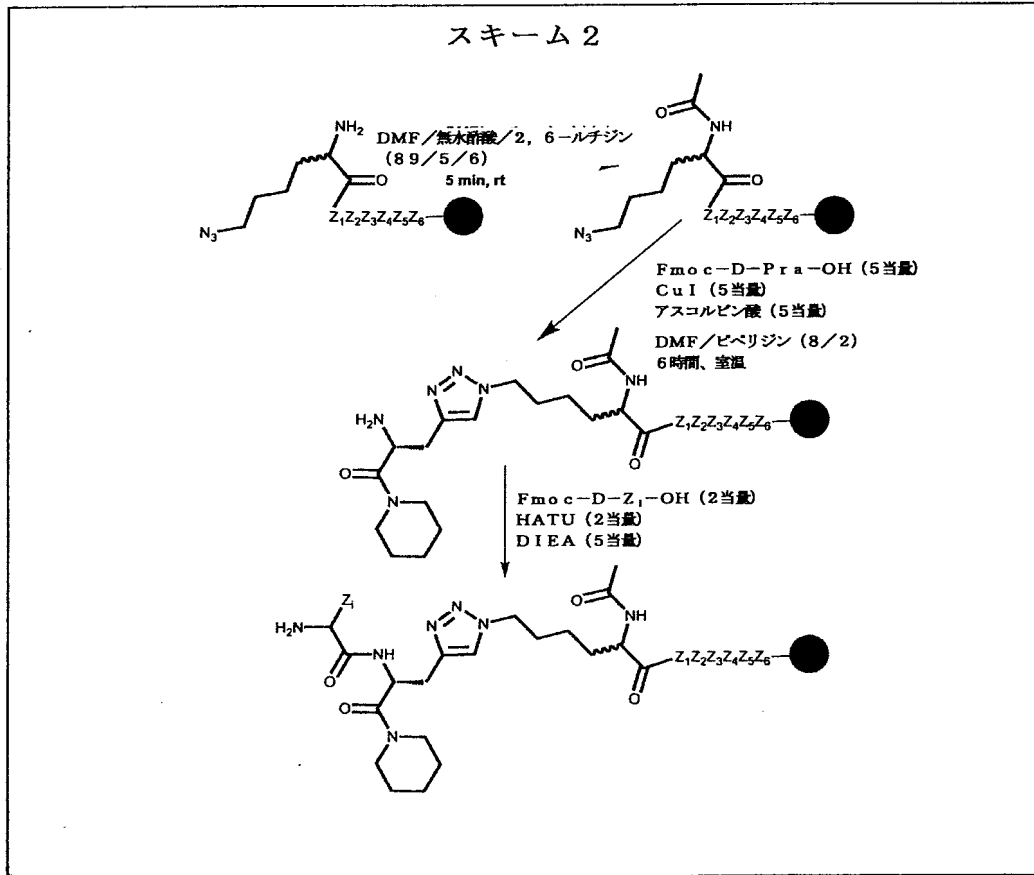
20

【0260】

スキーム 2 は、アンカーリガンドを二重リガンドまたはより長い多リガンドの二次リガンドと結合させるために 1, 2, 3 - トリアゾールを設置する方法を例示する。

【0261】

## 【化2】



10

20

## 【0262】

## 実施例10：二重リガンドの親和性測定

表面プラズモン共鳴 (SPR) による  $K_D$  の決定。固定および二重リガンド感受性実験を Biacore T100 SPR (カリフォルニア大学タンパク質発現センター (California Institute of Technology Protein Expression Center)、カリフォルニア州 Pasadena) によって行なった。標準の手順に従って、10 mM の酢酸ナトリウム (pH 5.0) 緩衝液中で調製した 0.25 mg/mL の bCAI I ならびに 0.1 mM の NHS および 0.4 mM の EDC の 1:1 溶液を使用して、バイオセンサー表面 (Biacore CM5) の1つのフローセルに bCAI I を固定した (Papalia, G. A. ら、2006)。同様に、標準の手順に従って、10 mM の酢酸ナトリウム (pH 5.5) 緩衝液中で調製した 0.25 mg/mL の hCAI I を使用して、第2のフローセルに hCAI I を固定した (Svedhem, S. ら、2001)。100  $\mu$ L/分の流速を用いて420秒間かけて約4000 RUの固定レベルが達成された。バルク屈折率の変化を補正し、非特異的結合を評価するために、残りの2つのフローセルは誘導体化しないままにした。ランニング緩衝液は10 mMのHEPES + 150 mMのNaCl + 0.05%のTween 20 + 3%のDMSOを含有するように調製し、この緩衝液をすべての実験で使用した。ペプチド分析物の実験の前に、ベースラインの安定化を確立するために8回の緩衝液単独でのサイクルを完了した。二重リガンド試料を、4つのフローセルにわたって100  $\mu$ L/分の流速で、120 ~ 180秒間、一連の濃度 (5  $\mu$ M から 2 nM) で注入した。バックグラウンド減算の後、BiaEvaluationソフトウェアを用いて分析物の応答データを1:1の結合親和性に当てはめた。

30

40

## 【0263】

50

結合応答(図28)により、bCAIIに対する2つの二重リガンドが $10^{-6}$ Mの親和性であることが明らかとなった。これは、選択された二重リガンドを図28Aに示す*in situ*二重リガンドスクリーニング、および選択された二重リガンドを図28Bに示すビーズ上二重リガンドライブラリのスクリーニングが、同様の親和性を有する同様の二重リガンド配列に収束することを証明している。

【0264】

特に、図28Aは、*in situ*スクリーニングBi1から選択された二重リガンドのSPRデータ組を示し、ライブラリCが $K_D = 11 \mu\text{M}$ を示すことを示唆している。図28Bは、ビーズ上スクリーニングBi2bから選択された二重リガンドのSPRデータ組を示し、ライブラリDが $K_D = 3 \mu\text{M}$ を示すことを示唆している。これらの平衡解離定数は、アンカーリガンドと標的の間の相互作用と比較して150倍の親和性の増強を表している(図26)。

【0265】

上記に鑑みて、二重リガンドアンカー(D-Pr a) - k w l w G l - T z 1 - k f w l k lを合成した(分子量: 1993.49)。

【0266】

実施例11: 三重リガンド捕捉剤の同定

二重リガンド(D-Pr a) - k w l w G l - T z 1 - k f w l k lが新しいアンカー単位として役割を果たし、図7のスクリーニングをライブラリCで繰り返して(実施例2、3、および7を参照)、SPRによってbCAIIおよびhCAIIに対してそれぞれ60nMおよび45nMの結合親和性を示した、三重リガンドr f v i l n - T z 2 - k w l w G l - T z 1 - k f w l k lを同定した(図6)。

【0267】

*In situ*三重リガンドスクリーニングのそれぞれの事例において、図7を用いて、ヒットしたビーズ中で観察されたアミノ酸の位置依存性の頻度の示すヒストグラムを作成した(図32)。コンセンサス三次リガンドはA z 4 - n l i v f rであった。

【0268】

図32は、三重リガンドを作製するためのアジド含有アミノ酸を(a)有するおよび(c)有さないペプチドの第一世代*in situ*クリックスクリーニングの位置依存性のヒストグラムを示す。(a) *In situ*スクリーニング(Tr i 1)には、ビーズの1/3が $x_1$ または $x_7$ の位置にアジドを有さなかったが、すべてのヒットしたビーズはアジドを含有していた。(b) CuAAC(Tz2、図32)を介して3°リガンドの可変領域を二重リガンドとカップリングさせた、第一および第二世代のCuAACライブラリスクリーニング(Tr i 2およびTr i 4)により、*in situ*結果の独立した妥当性確認が得られた。最終的なコンセンサス三重リガンド配列を灰色の書体によって示す。このビーズ上の三重リガンドのスクリーニングおよび*in situ*スクリーニングのどちらでも同じコンセンサス配列が得られ、2種類のスクリーニングが等価であることが確認された。(c) アジドの非存在下では、三重リガンド捕捉剤の形成が禁止されたため、*in situ*三重リガンドスクリーニングにより、完全に異なり、はるかに相同性の低いヒット配列が得られた(対照スクリーニングTr i Xを実施)。この結果は、標的の表面上で相互作用して多リガンド捕捉剤を形成するアジドおよびアセチレンなどの官能基の重要性を例示している。試料の大きさ: *in situ* = 25個のヒット、*in situ*のアジドなし = 24個のヒット、CuAACライブラリ = 21個のヒット。

【0269】

第二世代*in situ*スクリーニングTr i 3によって得られたコンセンサス三次リガンドは、第一世代スクリーニング(Tr i 1)によって単離された三次リガンドとほとんど正確に似ている。そのような配列相同性は、標的に導かれた選択を示す*in situ*スクリーニングに固有である。

【0270】

実施例12: ビーズ上クリック反応を用いた三重リガンドの合成

個々の6量体からなる三重リガンドは、バルク量で標準の固相合成によって調製し、その後、個々のセグメントをCu(I)に触媒されるアジド-アルキン付加環化(CuAAC)によってライゲーションすることができる[TornoeおよびMeldal、「ペプチドトリアゾール：固相上の銅(I)に触媒される1,3-双極環付加(Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase)」、ペプチド：未来の波(Peptides: The Wave of the Future)(LebelおよびHoughten編、2001)、263ページ、Tornoeら、J. Org. Chem.、67(9): 3057-3064(2002)、Rostovtsev, V. V.ら、2002]。

#### 【0271】

あるいは、三重リガンド合成をビーズ上で行なうことができる。Cu(I)に触媒されるクリック化学反応は、4つの一般的なステップ、すなわち、以前の実施例9に例示した手順に従った(1)アンカーリガンドの合成、(2)アセチル化、(3)クリック反応、および(4)2°リガンド配列の付加を用いて、ビーズ上で実施した。特に、三重リガンドは、完全に保護した二重リガンドアンカー(D-PrakwlwGl-Tz1-kfwlkl(0.274g、0.1mmol、>98%のHPLC)およびビーズと結合した3°リガンドAz4-nlivfr(0.1g、0.03mmol)の間のクリック反応によって、DMF/ピペリジン(8/2)中のヨウ化銅(0.021g、0.1mmol)およびL-アスコルビン酸(0.020g、0.1mmol)を使用して、25

#### 【0272】

上記手順は、ライブラリD、E、およびGの調製(実施例2の表1を参照)、ならびに三重リガンド候補のバルク合成のために使用した。

#### 【0273】

実施例13：タンパク質に触媒される*in situ*多リガンド形成の妥当性確認

タンパク質に触媒される多リガンド捕捉剤を、三重リガンド捕捉剤の生成を例示する図7のスキームに従って調製する。

#### 【0274】

特に、図7の図では、タンパク質に触媒される多リガンド捕捉剤を開発するスキームを示す。多リガンドを含む個々のペプチドリガンドの間を架橋するトリアゾール結合の2つの潜在的な構造が可能であることに注意されたい。2つの可能な構造のうちの一つのみを示す。

#### 【0275】

*In situ*多リガンドスクリーニングを図7に従って実施する場合、ビーズ上n次リガンドの非常に小さな画分のみがタンパク質によって溶液相のアンカーリガンドと共有のカップリングしている。標準の方法を用いたビーズ上のn次リガンドの分析により、大部分はn次リガンド自体の配列に関する情報が得られ、これは、これらが含む分子の>99%がビーズと結合しており、完全な多リガンドではないためである。以前に公開されている*in situ*クリックケミストリースクリーニングでは、クロマトグラフィー分離、続いて質量分析を用いてトリアゾール生成物を同定した[Lewis, W. G.ら、2002、Manetsch, R.ら、2004、Bourne, Y.ら、2004、Mocharla, V. P.ら、2005、Whiting, M.ら、2006]。*In situ*の図7を用いた二重リガンドスクリーニングの事例では、実施例7の対でのスクリーニングを適用した。これは幅広く適用可能な方法ではなかったが、1つの例示的な事例において有効性を示した(図28)。したがって、代替戦略はタンパク質に触媒される多リガンド捕捉剤の化学が成功であったことを実証するために有用である。

#### 【0276】

2つの代替戦略には、配列相同性分析、および1つまたは複数の標識したリガンドの増幅を含むアッセイが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0277】

配列相同性：第一世代の二重リガンドおよび三重リガンドのスクリーニングのどちらでも、特筆すべき結果は、ヒットしたビーズで観察された非常に高い配列相同性であった。たとえば、スクリーニング *Bi 1* から配列決定した最初の17個のヒットしたビーズでは2個のペプチドが同一であり、第3のペプチドは単一のアミノ酸のみが変化していた。スクリーニング *Tri 1* (同じライブラリに対する) では、位置によって最も共通して観察されるアミノ酸 (図32) は、第二世代 (集中) スクリーニング *Tri 3* で同定したコンセンサス配列をほぼ正確に反映している。そのような配列相同性は *in situ* スクリーニングに固有であり、これらのスクリーニングが選択的に高いヒットを生じることがわかった。

10

## 【0278】

*in situ* の図7を用いた三重リガンドスクリーニングの事例では、ヒットしたビーズで観察されたアミノ酸の位置依存性頻度を示すヒストグラムを作成した (図32A)。そのヒストグラムに基づいて2つの集中した *OBOC* ライブラリを構築した。第1のライブラリは3°リガンド可変領域のみを含有しており、*in situ* スクリーニング *Tri 3* に使用した。第2のライブラリ (ライブラリG) は同じ3°リガンド可変領域を含有しており、CuAACを介して (Tz2、図6) 二重リガンドとカップリングしていた。このビーズ上の三重リガンドのスクリーニング *Tri 4* および *in situ* スクリーニング *Tri 3* のどちらでも同じコンセンサス配列が得られた。この2種類のスクリーニングが等価であることが確認された。さらに、第3の *in situ* スクリーニング *Tri X* を実施したが、 $Az_n$  (アジド含有) アミノ酸は *OBOC* ライブラリに含めず、したがってトリアゾール結合の形成が禁止された。そのスクリーニングにより、非常に異なり、はるかに相同性の低いヒット配列の組が作製された (図32)。この結果により、多リガンドの提供におけるトリアゾール結合の重要性が確認された。

20

## 【0279】

標識したリガンドを用いたアッセイ：ビーズ上のタンパク質鑄型の多リガンドを検出するために酵素連結の比色アッセイを開発した (図29)。この手法は、ビオチンなどの小分子を、スクリーニングで使用する溶液相アンカーリガンドに付随させることに依存する。スクリーニングが完了した後、タンパク質に触媒される多リガンドを含有するビーズのみがその小分子も含有する。その後、その分子は、ある程度の検出可能なシグナルを生じることができる化学構築体を構築するためのハンドルを提供する。最も成功する手法は増幅できるシグナルに依存する。たとえば、酵素を小分子に付随させ、その後、その酵素を利用して何らかの化学的プロセスを触媒する場合は、化学プロセス自体がビーズ上のタンパク質に触媒される多リガンドの増幅したサインを表す。酵素反応によって生成された生成分子は、固有の色、蛍光であるか、または検出することができる何らかの他の珍しい化学的もしくは物理的特性を有することができ、立ち代ってこれはビーズ上多リガンド生成物の形成の証拠を提供する。図7の3°リガンドスクリーニングの生成物として示す、三重リガンドのビーズ上形成を検出するために利用するそのようなアッセイの結果を図29に表す。

30

## 【0280】

特に、図29Aの図は、ビオチン標識した二重リガンドアンカー [ビオチン - (EG)<sub>5</sub> - (D-PrA) - kWlWG1 - Tz1 - kfwlkl] を用いた、ビーズ上トリアゾール形成の *in situ* クリックアッセイの模式図を示す。標的の解離後、図29Bは、アルカリホスファターゼ - ストレプトアビジン (AP-SA)、その後、BCIP (5-プロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート、Liu, G. および K. S. Lam, 2000 に従う) で処理することで、紫色ビーズ (濃い灰色で示す) が多リガンド形成の陽性指示薬として得られることを示す。*In situ* 三重リガンドは b(h)CAII タンパク質の存在下のみで形成され、タンパク質がヒトトランスフェリン (Tf)、BSA、または非存在の場合は形成されなかった。また、二重リガンドアンカー配列が不正確な場合も三重リガンドは観察されなかった。

40

50

## 【0281】

ビーズ上のタンパク質に触媒される多リグンドタンパク質捕捉剤の形成を検出および定量するためのPCRアッセイ。このアッセイは図21に示す。PCRに基づくアッセイは酵素アッセイの変形であり、AP-SAを小鋳型オリゴヌクレオチド(5'・・・NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GGGACAACTTACTATTTACAATTACAATGCTCACTGTGGTACGAGTTCGTCTCCCAAGG・・・3'-配列番号1)とコンジュゲートしたストレプトアビジンで置き換えた。この試薬とビオチン標識した三重リグンドとの結合により鋳型オリゴヌクレオチドがビーズ表面に動員され、ここでPCRによって増幅することができる。増幅の程度はビーズ表面でのオリゴヌクレオチドの量に正比例し、アSEMBLされた三重リグンドの定量的な読取値が提供される。

10

## 【0282】

ストレプトアビジンオリゴ試薬を以下に記載のように調製した。SACの発現は以前に公開されているプロトコルに従って行なった(Sano, T.およびC.R. Cantor, 1990)。

## 【0283】

使用前に、脱塩カラム(Pierce)を用いて、ストックSAC(ストレプトアビジン-システイン)を、5mMのトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TEP)を含有するトリス緩衝生理食塩水(TBS)に緩衝液交換した。DMF中のMHPH(塩酸3-N-マレイミド-6-ヒドラジニウムピリジン、Solulink)をSACに300:1のモル濃度過剰量で加えた。平行して、DMF中のSFB(スクシンイミジル4-ホルミルベンゾエート、Solulink)を40:1モル濃度過剰量で5'アミノ化オリゴに加えた。混合物を室温で3~4時間反応させた。過剰のMHPHおよびSFBを除去し、試料を、zeba脱塩スピンカラム(Pierce)を用いて、クエン酸緩衝液(50mMのクエン酸ナトリウム、150mMのNaCl、pH6.0)に緩衝液交換した。その後、SFBで標識したオリゴを20:1モル濃度過剰量で誘導体化したSACと合わせ、2~3時間、室温で反応させた後、終夜、4でのインキュベーションに移した。0.5ml/分のPBSの均一濃度流のPharmacia Superdex 200ゲル濾過カラムを用いて反応していないオリゴを除去した。10K mwc濃縮フィルター(Millipore)を用いてSAC-オリゴコンジュゲートを含有する画分を濃縮した。SAC-オリゴ構築体の合成は、非還元8%のトリス-HCl SDS-PAGEによって検証した。

20

30

## 【0284】

三重リグンド含有ビーズを上述のように調製した(図29Aを参照)。標的の解離後、0.5mgのビーズを水で10回洗浄し、遮断緩衝液(0.15%のBSA(w/v)、0.1%のTween-20、150μg/mLの剪断サケ精子DNA、PBS中、pH7.4)に再懸濁させた。ビーズを100μLの遮断緩衝液で3回洗浄し、1時間、25で、100μLの遮断緩衝液中でインキュベーションした。その後、ビーズを濾過し、100μLの遮断緩衝液でさらに2回洗浄した。100μLのストレプトアビジン-オリゴ(遮断緩衝液中に170ng/mL)を加え、ビーズを1時間、25でインキュベーションした。ビーズを250μLの遮断緩衝液で5回洗浄し、続いて250μLのPBSで3回洗浄した。ビーズをdH<sub>2</sub>Oに再懸濁させ、スライドガラス上にスポットした。蒸発後、ビーズを手動で選び取り、薄壁PCR管内に入れた。

40

## 【0285】

定量的PCR(QPCR)をBio-RadリアルタイムPCRシステム上で実施した。1~5個の個別のビーズを含有するそれぞれの管に、12.5μLのiQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad)、11.5μLのdH<sub>2</sub>O、100nMの順方向プライマー(5'・・・TAATACGACTCACTATAGGGACAACTTACTATTTACAATTACA・・・3'-配列番号2)、および100nMの逆方向プライマー(5'・・・ACCGCTGCCAGACCCTGATTTGGCCTGGGAGACGAACCTCG・・・3'、配列番号3)を加えた。リアルタイムPCR

50

は、以下の熱プロフィールを用いて30サイクル実施した：94、30秒間、50、45秒間、72、60秒間。0.01 nM ~ 0.01 pMの範囲の既知の鑄型濃度を用いて検量線を作成した。既知の濃度のそれぞれの計数値を鑄型濃度の対数に対してプロットして直線検量線を作成し、その後、これを使用してそれぞれの試料管中のオリゴの濃度を決定した。これを、SDS-PAGEによって決定したストレプトアビジン四量体あたりの存在するオリゴヌクレオチド鑄型の数に基づいて調節した。

【0286】

実施例14：三重リガンドの親和性測定

実施例10に例示した方法を用いて、三重リガンド捕捉剤およびb(h)CAIIの間の特異的相互作用を説明する結合親和性測定を行なった。その後、4つのフローセルにわたって100 μL/分の流速、120~180秒間の接触時間、および300秒間の解離相で、様々な濃度にわたって三重リガンド(図33)分析物の応答データを収集した。バックグラウンド減算の後、BiaEvaluationソフトウェアを用いて分析物の応答データを1:1の結合親和性に当てはめた。図33に代表的な結果を示す(図33Aおよび図33B)。

10

【0287】

特に、図33Aの図は、漸増する濃度の三重リガンドrfvln-Tz2-kwlwGl-Tz1-kfwlkl(0.1 nMから162 nM)を用いて得られたSPR応答センサーグラムを示し、ヒト(図33A)およびウシ(図33B)のCAIIでそれぞれ45 nMおよび64 nMの親和性が実証された。これらの平衡解離定数は、二重リガンドと標的の間の相互作用と比較して50倍の親和性の増強を表している(図28も参照)。

20

【0288】

実施例15：三重リガンドの存在下における酵素活性アッセイ

基質4-酢酸ニトロフェニルに対するbCAIIの酵素活性(4-NPA、Pocker, Y.およびJ. T. Stone, 1967)を、三重リガンド捕捉剤の存在および非存在下、ならびに対照としてbCAIIの非存在下で測定した。三重リガンド捕捉剤がアッセイ中に存在する場合は経時的なエステラーゼ活性に変化がなかった。

【0289】

実験結果を図34に表す。三重リガンドはbCAIIの酵素活性を妨害しないことが観察され、活性部位の正常な触媒作用から離れて結合する、または少なくともそれを妨害しないように見えた。そのような、オフサイトであるが高度に選択的な結合は、タンパク質に対して産生した天然抗体に一般的であり、現在の技術の範囲を良好に予示している。

30

【0290】

実施例16：血清中のドットプロット選択性/感度アッセイ

ドットプロットは、タンパク質を検出する一般的な方法である。複合体環境における多リガンド(二重リガンドおよび三重リガンド)捕捉剤のb(h)CAIIに対する感度および選択性を、10%のブタ血清中のドットプロット実験を使用することによって実証した。ドットプロットには、目的タンパク質を含有する溶液を単純に吸収膜材料(典型的にはニトロセルロース)上にドットする。捕捉剤(典型的には抗体)をビオチン分子で標識し、同じスポットに施用する。スポットをすすぎ、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識したストレプトアビジンを加え、タンパク質と結合したビオチンと結合させる。典型的には光学的方法を利用してこの結合を検出する。

40

【0291】

これらの試験では、ビオチン-PEG-Novatag樹脂(0.48 mmol/g、Novabiochem)をC末端ビオチン標識多リガンドのバルク合成に利用する。樹脂の切断後、粗ビオチン標識した多リガンドをエーテルで沈殿させ、その後、C<sub>18</sub>逆相HPLCによって>98%まで精製した。

【0292】

ドットプロットアッセイでは、手順は以下のとおりであった：b(h)CAII抗原を

50

PBS (pH 7.4) 中の 1 mg/mL のストックとして調製した。抗原の希釈系列を、典型的には 2 µg ~ 0.5 ng / スポットの範囲でニトロセルロース膜に施用した。膜を 4 時間、終夜、トリス - 緩衝生理食塩水 (TBS) [ 25 mM のトリス、150 mM の NaCl、2 mM の KCl (pH 8.0) ] 中の 5% の乳で遮断した。その後、膜を TBS で洗浄した。ビオチン標識した多リガンドを 1 µM の TBS + 0.1% の DMSO 中の 10% のブタ血清で調製し、膜上で終夜、4 時間インキュベーションした。TBS で 1 時間洗浄した後、0.5% の乳 / TBS 中で調製した 1 : 3000 のストレプトアビジン - HRP (Abcam、マサチューセッツ州 Cambridge) を膜に加え、1 時間インキュベーションした。TBS で 1 時間洗浄した後、膜を化学発光試薬で処理し (SuperSignal West Pico 化学発光エンハンサーおよび基質溶液、Pierce、イリノイ州 Rockford)、その後、すぐにフィルム上で現像した。

10

## 【0293】

hCAII および bCAII をブタ血清から検出するために二重リガンド (図 14) および三重リガンド (図 15) を使用するドットプロットアッセイの結果を図 21 に示す。bCAII および hCAII は、配列が > 80% 同一であることに注意されたい (PDB ID: 1CA2、1V9E)。

## 【0294】

特に、図 21 A は、10% のブタ血清における三重リガンドによる b(h)CAII の検出限界を例示するドットプロットを示す。この検出限界は 20 ng のタンパク質である。図 21 B は、0.1% の血清中で二重リガンドアンカー (D-PrA) - kwlwgl - Tz1 - kfwlk1 を捕捉剤として使用する場合、感度が > 10 倍低下することを示している。

20

## 【0295】

実施例 17 : 分枝状多リガンド捕捉剤

直鎖状ポリペプチド鎖は、折り畳まれた構造を採用することによって潜在的なタンパク質標的といくつかの可能な三次相互作用を示す場合がある。分枝状オリゴペプチドはそのような折り畳まれた構造を真似ることができるが、はるかに小さなフットプリントを有する (したがって作製はるかに安価である) という主要な利点を持つ。また、図 8 に例示した方法によって調製した分枝状多リガンド捕捉剤も、多数の所望の化学的、物理的、および生化学的な特性、すなわち、抗体および天然のポリペプチドが安定でない様々な環境における安定性を示すことができる。

30

## 【0296】

低分子量ペプチドとの捕捉剤の結合力の向上には、分枝状および直鎖状の多リガンド捕捉剤の比較結合動力学および熱力学が関係している。図 17 はこの効果を模式的に例示している。

## 【0297】

特に、図 17 の図は、直鎖状と分枝状の三重リガンド捕捉剤を模式的に比較する。図 17 A は、単一のペプチド鎖である直鎖状三重リガンド捕捉剤を示す。図 17 B (1 つの分枝点) および図 17 C (2 つの分枝点) は、分枝状三重リガンド捕捉剤の代表的な構造を示す。分枝状多リガンド中の分枝点は、直鎖状多リガンドと比較しておよび分枝状捕捉剤のクラス内で異なるコンホメーション動力学を与える。分枝状多リガンド構造におけるこれらの結合の周りの制限された回転は、同様に開発したが直鎖状である多リガンド捕捉剤と比較して結合力を増加させる潜在性を有する。

40

## 【0298】

図 8 に例示した方法を用いて、b(h)CAII タンパク質に対する分枝状多リガンド捕捉剤が開発されている。直鎖状の事例 (図 7) と同様、アンカーリガンド lklwfk - (D-PrA) を 2 世代の in situ 二重リガンドスクリーニングで利用した。第一世代スクリーニング BrBi1 により、分枝を許容する二次 (2°) リガンドのライブラリ (ライブラリ H) 内の位置を同定した。スクリーニング BrBi1 では、50 nM の bCAII - Alexa647 の溶液を、ペプチドアンカーリガンド (lklwfk - (

50

D - P r a )、タンパク質に対して2000x)と共に、2時間、37 ° で、PBS ( pH 7 . 4 ) + 0 . 1 % の T w e e n 2 0 + 0 . 1 % の B S A + 0 . 0 5 % の N a N <sub>3</sub> + 1 % の D M S O ( v / v ) 中でプレインキュベーションした。アンカーリガンド/タンパク質の溶液をライブラリHに加え、18時間、37 ° で振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを6 x 5 mLのPBS ( pH 7 . 4 ) + 0 . 1 % の T w e e n 2 0 + 0 . 1 % の B S A + 0 . 0 5 % の N a N <sub>3</sub>、2 x 5 mLのPBS ( pH 7 . 4 ) + 0 . 1 % の T w e e n 2 0、および4 x 5 mLのPBSで洗浄した。実施例3に概要を示したプロトコルを用いてビーズを蛍光についてイメージングした。ヒット ( i n s i t u二重リガンドを表す)をマイクロピペットによって選び取り、7 . 5 Mの塩酸グアニジン ( pH 2 . 0 )で加工して、結合したタンパク質を除去し、その後、エドマン分解によって分析して二次リガンド配列を解読した。

10

【0299】

スクリーニングBrBi1の結果を表3に示す。選択した二次リガンド中の4個目の残基としてのAz4の高度な保存は、本発明者らの図8の方法が分枝点の選択に成功したことを示している。

【0300】

【表3】

表3

x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	x <sub>5</sub>	x <sub>6</sub>
i	k	f	Az4	v	w
i	k	v	Az4	i	w
f	k	w	Az4	i	w
f	k	w	Az4	i	w
v	k	v	Az4	i	w
w	k	v	Az4	i	w
w	k	i	Az4	i	w
f	k	l	f	i	k
f	k	l	w	i	k
i	f	i	k	i	k
i	v	k	w	k	k
f	k	f	Az4	f	f
Az4	k	w	G	G	l
Az4	k	f	Az4	i	w

20

30

【0301】

二次 ( 2 ° ) リガンドの集中したライブラリ ( ライブラリI ) を用いた第二世代スクリーニングBrBi2により、vkw ( Az4 ) fwおよびwkv ( Az4 ) lwが2つの最適化された二次リガンド候補として同定された。スクリーニングBrBi2では、10 nM ~ 500 pMの範囲のbCAII - Alexa647の溶液を、ペプチドアンカーリガンド ( lk1wfk - ( D - P r a )、40 μM)と共に、2時間、25 ° で、PBS ( pH 7 . 4 ) + 0 . 1 % の T w e e n 2 0 + 0 . 1 % の B S A + 0 . 0 5 % の N a N <sub>3</sub> + 1 % の D M S O ( v / v ) 中でプレインキュベーションした。アンカーリガンド/タンパク質の溶液をライブラリIに加え、15時間、25 ° で振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを洗浄し、蛍光についてイメージングし、実施例3に概要を示したプロトコルを用いて選び取った。7 . 5 Mの塩酸グアニジン ( pH 2 . 0 )で処理して、結合したタンパク質を除去した後、エドマン分解による分析により最適化された二次リガンド配列のリストが得られ、これを実施例7に記載のヒストグラム分析に供した。ヒストグラム分析により、スクリーニングBrBi2からのすべてのヒットが単一のコンセンサス配列、x<sub>1</sub> - k - x<sub>3</sub> - Az4 - x<sub>5</sub> - wを含有していることが例示され

40

50

た。2つの分枝状二重リガンド捕捉剤候補、vkw(Tz1)fw-kfwlk1およびwkv(Tz1)lw-kfwlk1(前者は図16Aの分子構造によって示される)は、同じスクリーニング中に2回観察され、試験した最低タンパク質濃度(すなわち1nMの標的)での唯一のヒットとして単離されたことから、優勢であると考えられた。

【0302】

ビーズ上クリック反応を用いた分枝状二重リガンドの合成。分枝状二重リガンドの合成を、直鎖状二重リガンドの合成(実施例9のスキーム2)の改変によって、スキーム4に示すように行なった。最初に、N-Fmoc保護戦略を用いて二次(2°)リガンドをFmoc-RinkアミドMBHA樹脂(0.67mmol/g)上に合成した。末端アミノ酸(たとえば、スキーム4に示すD-Val)をN-Bocの保護された型として設置し、これはこのセグメント上にさらなる合成をかぶせた。次に、25℃、終夜のDMF/ピペリジン(8/2)中のヨウ化銅(0.15mmol)およびL-アスコルビン酸(0.15mmol)を用いたCuAACによって、Fmoc-D-Pra-OH(0.15mmol)を、ビーズと結合した二次リガンド(0.03mmol)と共有結合させた。さらなるペプチド合成のための末端アミンを現すこの分枝点に、アンカーリガンド配列(lk1wfk)の残りの部分を、標準のN-Fmoc保護戦略によってカップリングさせた。95:5のTFA:トリエチルシラン(TEES)捕捉剤で処理した後、この分枝状二重リガンドをHPLCによって>95%まで精製した。

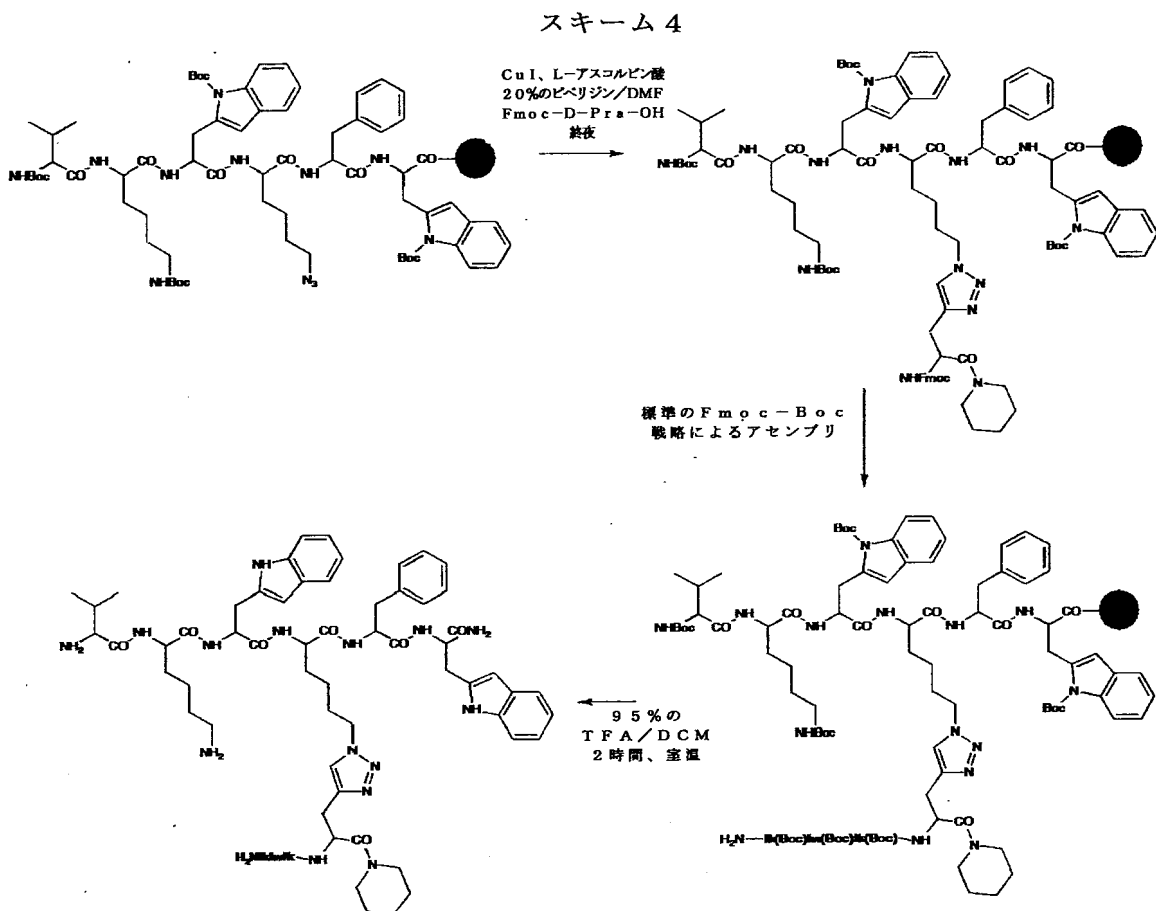
10

20

30

40

50



【0304】

図16Aは、bCAIIに対する分枝状二重リガンド捕捉剤vkw(Tz1)fw-kfwlk1の化学構造を示す。分枝状二重リガンド捕捉剤とbCAIIの特異的相互作用を説明する結合親和性測定を、実施例10に詳述したSPR方法を用いて行なった。図16Bは、漸増する濃度の二重リガンド(0から1656nM)を用いて得られたSP

R 応答センサーグラムを示し、b C A I I に対する 5 0 0 n M の二重リガンド親和性が実証された。同様に開発した直鎖状二重リガンド捕捉剤の結合親和性と比較した場合（図 2 8 も参照）、この分枝状の実態の親和性は 5 倍良好であった。したがって、分枝状三重リガンドはこの同じ親和性増強を順守することができ、p M の親和性を示すはずである。

【 0 3 0 5 】

より長い分枝状多リガンド捕捉剤のアンカーリガンドとしての分枝状二重リガンドの利用。

【 0 3 0 6 】

分枝状二重リガンドが同定された後、その分枝状二重リガンドが図 8 のアンカーリガンドとして役割を果たすことができ、分枝状三重リガンドを三次（3°）スクリーニングで選択することができる。さらにより集中した二次（2°）リガンドのライブラリ（ライブラリ J）を用いた第三世代スクリーニング B r B i 3 により、D - L y s が位置 x<sub>0</sub> に新しい分枝点を設置するための適切なアミノ酸であることが同定された。スクリーニング B r B i 3 では、1 0 n M の b C A I I - A l e x a 6 4 7 の溶液を、ペプチドアンカーリガンド（l k l w f k - （D - P r a）、4 0 μ M）と共に、2 時間、2 5 で、P B S （p H 7 . 4）+ 0 . 1 % の T w e e n 2 0 + 0 . 1 % の B S A + 0 . 0 5 % の N a N<sub>3</sub> + 1 % の D M S O （v / v）中でプレインキュベーションした。アンカーリガンド/タンパク質の溶液をライブラリ J に加え、1 5 時間、2 5 で振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを洗浄し、蛍光についてイメージングし、実施例 3 に概要を示したプロトコルを用いて選び取った。7 . 5 M の塩酸グアニジン（p H 2 . 0）で処理して、結合したタンパク質を除去した後、エドマン分解による分析により、表 4 に示す配列が得られた。表 4 の分析により、第 2 の分枝点が x<sub>0</sub> に設置された k w k v （A z 4）l w が、分枝状二重リガンドアンカーの構築に適切であるという判断がもたらされた。

【 0 3 0 7 】

【表 4】

表 4

x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	x <sub>5</sub>	x <sub>6</sub>
k	w	K	w	A z 4	l	w
r	v	K	w	A z 4	i	w
v	w	K	v	A z 4	i	w
k	w	K	v	A z 4	l	w
a	v	K	v	A z 4	l	w
i	v	K	w	A z 4	l	w
i	w	K	v	A z 4	f	w

【 0 3 0 8 】

n 次分枝状多リガンド捕捉剤を選択するための n 次アンカー中の新しい分枝点位置を同定するために、三重リガンド、四重リガンドなどを用いて B r B i 3 スクリーニングの方法を繰り返すことができる。

【 0 3 0 9 】

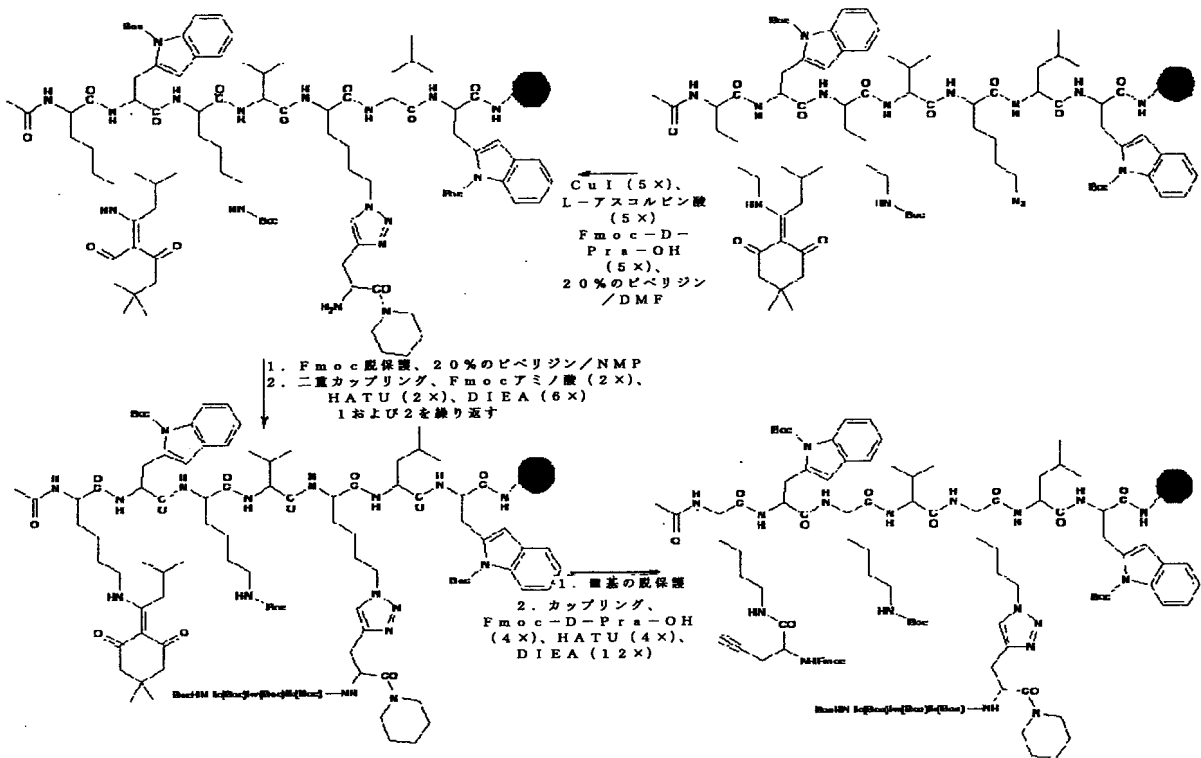
分枝状二重リガンドアンカーの合成を、スキーム 4 の軽微な改変によってスキーム 5 に示すように行なった。最初に、標準の N - F m o c 保護戦略を用いて二次（2°）リガンドを F m o c - R i n k アミド M B H A 樹脂（0 . 6 7 m m o l / g）上に合成した。この二次（2°）リガンドの N 末端位置は、D - L y s （i v D d e）（i v D d e = 1 - （4, 4 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン） - 3 - メチルブチル）の取り込みによって第 2 の分枝点を提示するように合成し、これにより、後の段階での選択的脱保護および D - L y s 側鎖との反応が可能となった。D - L y s はスクリー

ニング BrBi3 によって選択された x<sub>0</sub> 残基であることに注意されたい。この D-Lys(ivDde) カップリングおよび無水酢酸を用いたカップリング後 (実施例 9 を参照)、修飾された二次リガンド Ac-k(ivDde)wkv(Az4)lw が生じた。次に、25、終夜の DMF/ピペリジン (8/2) 中のヨウ化銅 (0.15 mmol) および L-アスコルビン酸 (0.15 mmol) を用いた CuAAC によって、Fmoc-D-Pra-OH (0.15 mmol) を、ビーズと結合した修飾した二次リガンド (0.03 mmol) と共有結合させた。さらなるペプチド合成のための末端アミンを現すこの分枝点に、アンカーリガンド配列 (lk1wfk) の残りの部分を、標準の N-Fmoc 保護戦略によってカップリングさせた。最後に、DMF 中の 2% のヒドラジンを用いた処理による ivDde 保護基の選択的除去により第一級アミンが現れ、これに Fmoc-D-Pra-OH を標準のアミドカップリング化学によってカップリングさせる。

【0310】  
【化4】

10

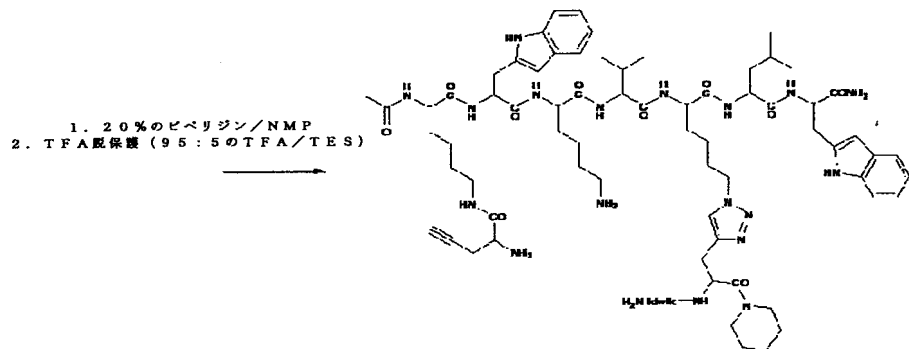
スキーム 5



20

30

分枝状二重リガンドアンカー



40

50

## 【0311】

分枝状三重リガンド捕捉剤の同定。分枝状三重リガンド捕捉剤を同定するために、スクリーン5の分枝状二重リガンドアンカー(D - P r a) - k w k v ( T z 1) l w - k f w l k lを用いて、図8に示した方法に従ってb C A I IおよびライブラリCに対する三次(3°)スクリーニングを行なった。スクリーニングB r T r i 1では、50 n Mのb C A I I - A l e x a 6 4 7の溶液を、100 μ Mの分枝状二重リガンドアンカーと共に、2時間、25 で、P B S ( p H 7 . 4 ) + 0 . 1 %のT w e e n 2 0 + 0 . 1 %のB S A + 0 . 0 5 %のN a N <sub>3</sub> + 1 %のD M S O ( v / v )中でプレインキュベーションした。アンカーリガンド/タンパク質の溶液をライブラリCに加え、16時間、25 で振盪しながらインキュベーションした。スクリーニングしたビーズを洗浄し、蛍光についてイメージングした、実施例3のプロトコルを用いて選び取った。7 . 5 Mの塩酸グアニジン(p H 2 . 0)で処理して、結合したタンパク質を除去した後、エドマン分解による分析により三次(3°)リガンド配列が得られた。実施例11の方法に従った三次リガンド配列のヒストグラム分析により、図17Bの模式図および図18の分子構造によって示されるものなどの、分枝状三重リガンド捕捉剤が得られた。

10

## 【0312】

## 実施例18：多リガンド捕捉剤の合成方法

アジドおよびアセチレンなどの官能基は(図2)、実施例5および実施例17に例示したように、多リガンド捕捉剤のタンパク質に触媒されるアセンブリを可能にする。官能基は単なるスクリーニングツールであり、診断学アッセイ、分離などに実装する捕捉剤中に必ずしも所望されるものではない。そのようなアッセイのために多リガンド捕捉剤をバルク量で合成する手順は、アジド-アルキン1, 2, 3-トリアゾールリンカーを2-アミノ酸リンカーによって置き換えることを含む(図35を参照)。この代替リンカーは、現在の自動ペプチド合成装置を改変することなしに、捕捉剤の高スループット生産を可能にする。図35Aは、b C A I Iに対する三重リガンド捕捉剤中の1, 2, 3-トリアゾールリンカー(T z 1およびT z 2)を置き換える代替リンカーをスクリーニングするために利用する1つのO B O Cライブラリの形成を示す。上記実施例3に従ってこのライブラリを用いてスクリーニングを実行した。

20

## 【0313】

図35Bは代表的なヒットを示し、どのD-アミノ酸がT z 1およびT z 2の適切な置換えとなるかを示す。これらのヒットのいくつかの分子構造を図36に示す。図36AはT z R 1と示し、T z 2 = G fであり、T z 1 = n kであり、図36BはT z R 3と示し、T z 2 = a lであり、T z 1 = d kであり、図36CはT z R 2と示し、T z 2 = p sであり、T z 1 = v vである。

30

## 【0314】

1, 2, 3-トリアゾール自体の新しい代理は、図37Cに示すように1つの主鎖アミド結合であることに注意されたい(B o c k, V . D . ら、2006から再現)。アミド結合は、1, 2, 3-トリアゾールの原子配置および電子特性を模倣することができる強固な連結単位として機能する(K o l b, H . C . およびK . B . S h a r p l e s s、2003、B o c k, V . D . ら、2006)。しかし、T z 1およびT z 2リンカーはアジドブチルおよびプロパルギルの側鎖基間の1, 2, 3-トリアゾールの共有的合成を表し(図6を参照)、したがって、理想的には2~5個のアミド結合がリンカー全体の原子配置および電子特性を模倣することができる。図35Cは、選択したアミドリンカーが元のT z 1およびT z 2リンカーよりもコンパクトであることができることを示す図である。アミドリンカーの模倣体を、本実施例16、20、および21に記載のタンパク質アッセイ(たとえば、ウエスタンプロット、ドットプロット、およびE L I S A様アッセイ)における捕捉剤の特性を変化させる手段として活用することができる。

40

## 【0315】

代理アミド結合を有する三重リガンド捕捉剤の特性を図37に例示する。円二色性(C D)実験によって、三重リガンド捕捉剤T z R 1は元の三重リガンド配列(r f v i l n

50

- T z 2 - k w l w G l - T z 1 - k f w l k l、図 6 ) と類似構造を共有することが見いだされ、これらはどちらもランダムコイルである ( 図 3 7 A ) 。対照的に、T z R 2 および T z R 3 は、図 6 の三重リガンドとは異なるその強力な  $\alpha$ -ヘリックス特徴に基づいて、適切な候補から除外された。T z R 1 と b ( h ) C A I I の間の結合相互作用を S P R によって測定した際、平衡解離定数は高い n M として推定された ( 図 3 3 B ) 。ランダムコイル構造およびより長い 3 ~ 5 個のアミノ酸リンカーの長さに集中する、代理アミド結合を有する三重リガンドの第二世代スクリーニングにより、 $K_D$  が 4 5 ~ 6 4 n M または元の三重リガンドよりも良好な代理三重リガンドを得ることができる。

#### 【 0 3 1 6 】

T z 2 リンカーを置き換えるアミノ酸 3 個のリンカーを同定するスクリーニング手法の例を図 3 8 に示す。このスクリーニング手法は E L I S A 様サンドイッチアッセイであるが ( 実施例 2 1 を参照 ) 、基質がマイクロウェルではなくビーズであることに注意されたい。この手法では、最初に、合計 5 8 3 2 個の配列の、アミノ酸 3 個のリンカーの包括的なライブラリ (  $X_1 = D - M e t$  および  $D - C y s$  以外の任意の D - 立体異性体 ) を、終夜、2 5 分で、遮断緩衝液 ( 2 5 m M の T r i s - C l 、 1 0 m M の  $M g C l_2$  、 1 5 0 m M の  $N a C l$  、 1 4 m M の 2 - メルカプトエタノール、0 . 1 % ( w / v ) の B S A 、 0 . 1 % ( v / v ) の T w e e n 2 0 、 p H 7 . 5 ) ) 中で遮断する。遮断後、包括的なライブラリを標的 ( たとえば 1 0 n M ~ 1  $\mu$  M の b C A I I ) と接触させる。1 時間、2 5 分で接触させた後、ライブラリ / 標的の複合体を 5  $\times$  1 m L の遮断緩衝液で洗浄して過剰の標的を除去し、その後、一次抗体 ( たとえば、ウサギポリクローナル抗 b C A I I 、 1 : 5 0 0 0 の希釈率 ) と共に 1 時間インキュベーションした。ビーズを遮断緩衝液で洗浄して過剰の一次抗体を除去し、その後、遮断緩衝液中の二次抗体 ( たとえば、抗ウサギ I g G 、アルカリホスファターゼ ( A P ) コンジュゲート、1 : 2 0 0 0 の希釈率 ) と共に、3 0 分間、振盪しながらインキュベーションした。5  $\times$  1 m L の洗浄 1 緩衝液 ( 2 5 m M の T r i s - C l 、 1 0 m M の  $M g C l_2$  、 7 0 0 m M の  $N a C l$  、 1 4 m M の 2 - メルカプトエタノール、p H 7 . 5 ) 、続いて 5  $\times$  1 m L の洗浄 2 緩衝液 ( 2 5 m M の T r i s - C l 、 1 4 m M の 2 - メルカプトエタノール、p H 7 . 5 ) でビーズを洗浄することによって、過剰の二次抗体を除去した。ビーズを発色基質 B C I P 中で 2 0 分間展開させた。最も濃い紫色ビーズをヒットとして選択し、塩酸グアニジン ( p H 2 . 0 ) で洗浄して結合したタンパク質を除去し、その後、実施例 3 に記載のようにエドマン分解によって配列決定して  $X_1$  、  $X_2$  、 および  $X_3$  を同定した。

#### 【 0 3 1 7 】

実施例 1 9 : 二重リガンドおよび三重リガンド捕捉剤 - 構造的な考察。

#### 【 0 3 1 8 】

タンパク質に触媒される二重リガンド捕捉剤およびタンパク質に触媒される三重リガンド捕捉剤の構造をそれぞれ図 5 および図 6 に示す。これらの捕捉剤は、実施例 4 ~ 1 2 の方法に従って作製した。

#### 【 0 3 1 9 】

非天然アミノ酸 ( D - 立体異性体 ) および人工アミノ酸からなる 1  $^\circ$  ペプチドリガンドから開始して、図 5 および図 6 に示す捕捉剤を逐次的にアSEMBL した。1  $^\circ$  ペプチドリガンド、タンパク質 b C A I I 、 および大きな 1 ビーズ - 1 化合物のライブラリからなる、タンパク質に触媒されるスクリーニングを利用して二重リガンド ( 1  $^\circ$  + 2  $^\circ$  ) を同定した。三重リガンド ( 1  $^\circ$  + 2  $^\circ$  + 3  $^\circ$  ) を同様に調製したが、ただし、二重リガンドおよびタンパク質 b C A I I を大きな 1 ビーズ 1 化合物のライブラリに対してスクリーニングした。

#### 【 0 3 2 0 】

図 1 4 および図 1 5 に示すように、これらの捕捉剤は、ビオチン分子をリガンド構成成分のうちの 1 つの末端に付加することによって修飾することができる。アンカーリガンド ( 図 2 6 ) および二重リガンドは、フルオレセインイソチオシアネート ( F I T C ) 、 他 のフルオロフォア、他の小分子標識、オリゴヌクレオチド、および捕捉剤と部位特異的に

10

20

30

40

50

カップリングさせることができるタンパク質で修飾することができる。

【0321】

実施例20：多リガンド捕捉剤を用いて行なうウエスタンブロット。

【0322】

ウエスタンブロットは、タンパク質を検出するための2番目に一般的な方法である。ネイティブウエスタンブロットおよびウエスタンブロット手順の違いは、標準のウエスタンブロットでは検出するタンパク質が変性していることである。

【0323】

タンパク質を検出するためのネイティブウエスタンブロット方法では、試料中のタンパク質を非変性ゲル電気泳動に供し、吸収膜に移す。それだけには限定されないが抗体または多リガンドが含まれる捕捉剤を用いて膜上のタンパク質を調べる。捕捉剤と標的との特異的結合の後、捕捉剤と特異的に結合させるために二次検出剤を加える。二次検出剤（たとえばストレプトアビジン - HRP）は、多くの場合、結果の可視化を可能にする化学発光を示す。

【0324】

三重リガンドおよび市販の抗体の間の直接比較を伴う、10%の血清からのbCAI Iを検出するためのネイティブウエスタンブロットの例示を図22に示す。

【0325】

図22Aは、全タンパク質含有物を詳しく示す、クマシー染色したネイティブゲルを示す。一次抗体（図22B）または三重リガンド捕捉剤（図22C）でプローブするネイティブウエスタンブロットは、血清の存在下でもbCAI Iに対する強力な選択性を例示し、三重リガンドが市販の抗体とほぼ同等に感受性があることを示している。

【0326】

実施例21：多リガンド捕捉剤を用いて実行するELISA様サンドイッチアッセイ。

【0327】

サンドイッチアッセイは、タンパク質を検出するための3番目に一般的な方法である。サンドイッチアッセイは、目的の標的（タンパク質）を検出するために2つの抗体、すなわち一次捕捉抗体（1°）および標識した検出抗体（2°抗体）に依存する。1°抗体は、典型的には、96ウェルプレート内のウェルの表面などの表面上にコーティングする。タンパク質を含有する血清などの溶液をウェルに加え、タンパク質を表面まで拡散させ、ここでこれが1°抗体によって捕捉される。その後、2°抗体を同じウェルに加える。この抗体は、検出するタンパク質の異なる結合部位またはエピトープと結合するように設計されており、この2°抗体は、タンパク質 + 抗体の複合体全体が光学的手段または何らかの他の手段によって検出されることを可能にするように、標識することができる。光学検出には、標識は、多くの場合、光学吸収性の色素分子または蛍光色素分子であり、その標識は、多くの場合、最初にビオチンを2°抗体にコンジュゲートさせ、その後、標識したタンパク質（たとえばストレプトアビジン）をビオチンと結合させることを用いることによって、2°抗体に付着させる。他の方法、たとえば、蛍光標識を2°抗体に直接付着させること、または蛍光もしくは光学吸収性の色素分子の代わりに金ナノ粒子を標識として利用すること、または放射性分子を標識として使用することなどが可能であり、この場合、最終検出はシンチレーションカウンターまたは適切に感光性にしたフィルムを用いて行なう。

【0328】

典型的なELISAサンドイッチアッセイでは、一次捕捉抗体（1°）を表面（たとえば96ウェルプレート内のウェル）上にコーティングし、その後、標的分子を含有する溶液を表面まで拡散させて特異的に結合させる。標識した（たとえばビオチン）検出抗体（2°）が、標的分子上の直交性部位と特異的に結合することによって「サンドイッチ」を完成する。その後、標識を蛍光または何らかの他の光学的方法によって検出し、シグナル強度はアッセイにおいて捕捉された標的分子の量に比例する。

【0329】

10

20

30

40

50

市販の抗体（2°捕捉剤）および三重リガンド（1°捕捉剤として）の組合せを使用した、b C A I Iを検出するためのストレプトアビジンで官能化されたマイクロタイタープレート上におけるサンドイッチ型 E L I S A アッセイの例示を図 2 3 に示す。

【0330】

図 2 3 2 4 は、b C A I I タンパク質を検出するために三重リガンドを用いた E L I S A 様サンドイッチ吸光度アッセイを示す。特に、図 2 3 A は、完全にアSEMBLしたアッセイの構造を示す。図 2 3 B は、9 6 ウェルプレートのウェルで行なった、様々な濃度の b C A I I での E L I S A アッセイの実験データを示す。漸増する b C A I I 濃度は濃くなっていく灰色として検出される。図 2 3 C ~ 2 3 D は 2 つの典型的なアッセイ条件を示す。図 2 3 C は、b C A I I を緩衝溶液中に提示して行なったアッセイであり、一方、図 2 3 D は 1 0 % のブタ血清中で行なったアッセイであり、三重リガンド捕捉剤または検出抗体のどちらによっても特異的結合は損なわれなかった。

10

【0331】

要約すると、いくつかの実施形態では、2 つ以上のリガンドを含む多リガンド捕捉剤、ならびに関連組成物、方法および系が記載されている。

【0332】

上述の実施例は、本開示の装置、系および方法の実施形態をどのように作製および使用するかの完全な開示および説明を当業者に与えるために提供し、本発明者らがその開示とみなす範囲を限定することを意図しない。本開示中に言及するすべての特許および出版物は、本開示が関連する分野の技術者の技術レベルの指標である。本開示中に引用したすべての参考文献は、それぞれの参考文献を個別にその全体で参考として組み込んだ場合と同じ程度に、参考として組み込まれている。

20

【0333】

引用したそれぞれの文書（特許、特許出願、雑誌論文、要旨、実験室の手引き、本、または他の開示が含まれる）の開示は、その全体が本明細書中に参考として組み込まれている。

【0334】

さらに、本出願と共に提出した配列表の印刷物および対応するコンピュータ読取可能な形態は、どちらもその全体で本明細書中に参考として組み込まれている。

【0335】

本開示は特定の組成物または生物系に限定されず、これらはもちろん変動することができることを理解されたい。また、本明細書中で使用する用語は特定の実施形態を説明する目的のためのみであり、限定することを意図しないことも理解されたい。本明細書および付随する特許請求の範囲中で使用する単数形「a」、「an」、および「the」には、内容により明らかにそうでないと指示される場合以外は、複数形の指示対象が含まれる。用語「複数 (multiple および plurality)」には、内容により明らかにそうでないと指示される場合以外は、2 つ以上の指示対象が含まれる。別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての技術用語および科学用語は、本開示が関連する分野の技術者に一般的に理解されるものと同じ意味をもつ。

30

【0336】

本開示のいくつかの実施形態を記載した。とはいえ、本開示の精神および範囲から逸脱せずに様々な改変を行ない得ることを理解されたい。特に、当業者に明らかな上述の発明を実施するための形態の改変は、本開示の範囲内にあることを意図する。したがって、他の実施形態が以下の特許請求の範囲内にある。

40

参考文献

- Atherton, E. and R. C. Sheppard, in *Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach*, Oxford University Press, USA, 1989, p. 136.  
Baldwin, J. J., J. J. Burbaum, I. Henderson, and M. H. J. Ohlmeyer (1995). "Synthesis of a Small Molecule Combinatorial Library Encoded w

50

- ith Molecular Tags." J. Am. Chem. Soc. 117(20): 5588-5589.
- Bock, V. D., H. Hiemstra, and J. H. van Maarseveen, (2006). "Cu<sup>I</sup>-Catalyzed Azide-Alkyne "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective." Eur. J. Org. Chem.: 51-68.
- Bourne, Y., H. C. Kolb, Z. Radic, K. B. Sharpless, P. Taylor, and P. Marchot (2004). "Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(6): 1449-1454.
- Brown, S. (1997). "Metal-recognition by repeating polypeptides." Nat. Biotechnol. 15: 269-272. 10
- Cao, P., K. Xu, and J. R. Heath (2008). "Azidation of Silicon(111) Surfaces." J. Am. Chem. Soc. 130(45): 14910-14911.
- Carpino, L. A., A. El-Faham, C. A. Minor, and F. Albericio (1994). "Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis." J. Chem. Soc., Chem. Commun. 2: 201-203.
- Chenault, H. K., J. Dahmer, and G. M. Whitesides (1989). "Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids: Enantioselective hydrolysis of N-acyl amino acids catalyzed by acylase I." J. Am. Chem. Soc. 111(16): 6354-6364. 20
- Coin, I., M. Beyermann, and M. Bienert (2007). "Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences." Nat. Protocols 2(12): 3247-3256.
- Dixon, S. M.; P. Li, R. Liu, H. Wolosker, K. S. Lam, M. J. Kurth, and M. D. Toney (2006). "Slow-binding human serine racemase inhibitors from high-throughput screening of combinatorial libraries." J. Med. Chem. 49(8): 2388-2397.
- Eteshola, E., L. J. Brillson, and S. C. Lee (2005). "Selection and characteristics of peptides that bind thermally grown silicon dioxide films." Biomol. Eng. 22: 201-204. 30
- Fan, R., O. Vermesh, A. Srivastava, B. K. H. Yen, L. Qin, H. Ahmad, G. A. Kwong, C.-C. Liu, J. Gould, L. Hood, and J. R. Heath (2008). "Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood." Nat. Biotechnol. 26: 1373-1378.
- Furka, A., F. Sebestyen, M. Asgedom, and G. Dibo, (1991). "General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures." Int. J. Pept. Protein Res. 37: 487-493.
- Garcia-Martin, F., N. Bayo-Puxan, L. J. Cruz, J. C. Bohling, and F. Albericio (2007). "Chlorotriethyl Chloride (CTC) Resin as a Reusable Carboxyl Protecting Group." QSAR Comb. Sci. 26(10), 1027-1035. 40
- Geysen, H. M. and T. J. Mason (1993). "Screening chemically synthesized peptide libraries for biologically-relevant molecules." Bioorg. Med. Chem. Lett. 3(3): 397-404.
- Gramlich, P. M. E., C. T. Wirges, J. Gierlich, and T. Carell (2008). "Synthesis of Modified DNA by PCR with Alkyne-Bearing Purines Followed by a Click Reaction." Org. Lett. 10(2): 249-251.
- Halpin, D. R., J. A. Lee, S. J. Wrenn, and P. B. Harbury (2004). "DNA Display III. Solid-Phase Organic Synthesis on Unprotected DNA." PLoS Biology 2(7): 1031-1038.
- Hochgurtel, M., H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. K 50

- rause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, and A. V. Eliseev (2002). "Target-induced formation of neuraminidase inhibitors from in vitro virtual combinatorial libraries." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(6): 3382-3387.
- Hu, X., J. Sun, H.-G. Wang, and R. Manetsch (2008). "Bcl-X<sub>L</sub>-Templated Assembly of Its Own Protein-Protein Interaction Modulator from Fragments Decorated with Thio Acids and Sulfonyl Azides." J. Am. Chem. Soc. 130(42): 13820-13821.
- Kolb, H. C. and K. B. Sharpless (2003). "The growing impact of click chemistry on drug discovery." Drug Disc. Today 8(24): 1128-1137.
- Krasinski, A., Z. Radic, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and H. C. Kolb (2005). "In situ selection of lead compounds by click chemistry: Target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors." J. Am. Chem. Soc. 127(18): 6686-6692. 10
- Lam, K. S., M. Lebl, and V. Krchnak (1997). "The 'one-bead-one-compound' combinatorial library method." Chem. Rev. 97(2): 411-448.
- Landon, L. A., J. Zou, and S. L. Deutscher (2004). "Effective combinatorial strategy carbohydrate to increase affinity of carbohydrate binding by peptides." Mol. Diversity 8: 35-50.
- Laursen, R. A. (1971). "Solid-phase Edman degradation: An automatic peptide sequencer." Eur. J. Biochem. 20: 89-102. 20
- Lee, H.-S., J.-S. Park, B. M. Kim, and S. H. Gellman (2003). "Efficient synthesis of enantiomerically pure <sup>2</sup>-amino acids via chiral isoxazolidinones." J. Org. Chem. 68(4): 1575-1578.
- Lehman, A., S. Gholami, M. Hahn, and K. S. Lam (2006). "Image subtraction approach to screening one-bead-one-compound combinatorial libraries with complex protein mixtures." J. Comb. Chem. 8(4): 562-570.
- Lewis, W. G., L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, and K. B. Sharpless (2002). "Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks." Angew. Chem. 114(6): 1095-1099; Angew. Chem. Int. Ed. 41(6): 1053-1057. 30
- Lewis, J. K., J. Wei, and G. Siuzdak (2000). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis." In Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers (ed.), 5880-5894.
- Li, S., D. Bowerman, N. Marthandan, S. Klyza, K. J. Luebke, H. R. Garner, and T. Kodadek (2004). "Photolithographic Synthesis of Peptoids." J. Am. Chem. Soc. 126(13): 4088-4089.
- Li, S., N. Marthandan, D. Bowerman, H. R. Garner, and T. Kodadek (2005). "Photolithographic synthesis of cyclic peptide arrays using a differential deprotection strategy." Chem. Commun. 581-583. 40
- Liu, G. and K. S. Lam, in Combinatorial Chemistry-A Practical Approach, Ed. H. Fenniri, Oxford University Press, USA, 2000, pp. 43-44.
- Lusvarghi, S., J. M. Kim, Y. Creeger, and B. A. Armitage (2009). "Refined multivalent display of bacterial spore-binding peptides." Org. Biomol. Chem. 7: 1815-1820.
- Manetsch, R., A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and H. C. Kolb (2004). "In situ click chemistry: Enzyme inhibitors made to their own specifications." J. Am. Chem. Soc. 126(40) 50

: 12809-12818.

- Marks, K. M., M. Rosinov, and G. P. Nolan (2004). "In Vivo Targeting of Organic Calcium Sensors via Genetically Selected Peptides." Chem. Biol. 11: 347-356.
- McAlpine, M. C., H. D. Agnew, R. D. Rohde, M. Blanco, H. Ahmad, A. D. Stuparu, W. A. Goddard, and J. R. Heath (2008). "Peptide-Nanowire Hybrid Materials for Selective Sensing of Small Molecules." J. Am. Chem. Soc. 130(29): 9583-9589.
- Mocharla V. P., B. Colasson, L. V. Lee, S. Roper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, and H. C. Kolb (2005). "In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II." Angew. Chem. 117(1): 118-122; Angew. Chem. Int. Ed. 44(1): 116-120. 10
- Panicker, R. C., X. Huang, and S. Q. Yao (2004). "Recent Advances in Peptide-Based Microarray Technologies." Comb. Chem. High Throughput Screen. 7(6): 547-556.
- Papalia, G. A., S. Leavitt, M. A. Bynum, P. S. Katsamba, R. Wilton, H. Qiu, M. Steukers, S. Wang, L. Bindu, S. Phogat, A. M. Giannetti, T. E. Ryan, V. A. Pudlak, K. Matusiewicz, K. M. Michelson, A. Nowakowski, A. Pham-Baginski, J. Brooks, B. C. Tieman, B. D. Bruce, M. Vaughn, M. Baksh, Y. H. Cho, M. De Wit, A. Smets, J. Vandersmissen, L. Michiels, and D. G. Myszka (2006). "Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology." Anal. Biochem. 359: 94-105. 20
- Pocker, Y. and J. T. Stone (1967). "The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase. III. Kinetic Studies of the Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate." Biochemistry 6(3): 668-678.
- Poulin-Kerstien, A. T. and P. B. Dervan (2003). "DNA-Templated Dimerization of Hairpin Polyamides." J. Am. Chem. Soc. 125(51): 15811-15821.
- Roice, M., I. Johannsen, and M. Meldal (2004). "High Capacity Poly(ethylene glycol) Based Amino Polymers for Peptide and Organic Synthesis." QSAR Comb. Sci. 23(8): 662-673. 30
- Rohde, R. D., H. D. Agnew, W.-S. Yeo, R. C. Bailey, and J. R. Heath (2006). "A Non-Oxidative Approach toward Chemically and Electrochemically Functionalizing Si(111)." J. Am. Chem. Soc. 128(29): 9518-9525.
- Rostovtsev V. V., L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless (2002). "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes." Angew. Chem. 114(14): 2708-2711; Angew. Chem. Int. Ed. 41(14): 2596-2599.
- Sanghvi, A. B., K. P-H Miller, A. M. Belcher, and C. E. Schmidt (2005). "Biomaterials functionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer." Nat. Mater. 4: 496-502. 40
- Sano, T. and C. R. Cantor (1990). "Expression of a Cloned Streptavidin Gene in Escherichia coli." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(1): 142-146.
- Saxon, E. and Bertozzi, C. R. (2000). "Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction." Science 287(5460): 2007-2010.
- Smith, G. P. and V. A. Petrenko (1997). "Phage display." Chem. Rev. 97(2): 391-410.
- Svedhem, S., K. Enander, M. Karlsson, H. Sjobom, B. Liedberg, S. Lofas, L.-G. Martensson, S. E. Sjostrand, S. Svensson, U. Carlsson, and I 50

- . Lundstrom (2001). "Subtle Differences in Dissociation Rates of Interactions between Destabilized Human Carbonic Anhydrase II Mutants and Immobilized Benzenesulfonamide Inhibitors Probed by a Surface Plasmon Resonance Biosensor." Anal. Biochem. 296(2): 188-196.
- Tornøe and Meldal, "Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase" in *Peptides: The Wave of the Future* (Lebel and Houghten, eds., 2001), p. 263;
- Tornøe et al., *J. Org. Chem.* 67(9):3057-3064 (2002); Rostovtsev, V. V. et al., 2002].
- Tse, W. C. and D. L. Boger (2004). "Sequence-Selective DNA Recognition: Natural Products and Nature's Lessons." Chem. Biol. 11: 1607-1617. 10
- van Hest, J. C. M., K. L. Kiick, and D. A. Tirrell (2000). "Efficient incorporation of unsaturated methionine analogues into proteins in vivo." J. Am. Chem. Soc. 122(7): 1282-1288.
- Wang, X., L. Peng, R. Liu, S. S. Gill, and Kit S. Lam (2005). "Partial Alloc-deprotection approach for ladder synthesis of 'one-bead one-compound' combinatorial libraries." J. Comb. Chem. 7(2): 197-209.
- Weterings, J. J., S. Khan, G. J. van der Heden, J. W. Drijfhout, C. J. M. Melief, H. S. Overkleeft, S. H. van der Burg, F. Ossendorp, G. A. van der Marel, and D. V. Filippov (2006). "Synthesis of 2-alkoxy-8-hydroxyadenylpeptides: Towards synthetic epitope-based vaccines." 20  
Bioorg. Med. Chem. Lett. 16(12): 3258-3261.
- Whaley, S. R., D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, and A. M. Belcher (2000). "Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly." Nature 405: 665-668.
- Whiting M., J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, and V. V. Fokin (2006). "Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry." Angew. Chem. 118(9): 1463-1467; Angew. Chem. Int. Ed. 45(9): 1435-1439. 30
- Williams, K. P., X.-H. Liu, T. N. M. Schumacher, H. Y. Lin, D. A. Ausiello, P. S. Kim, and D. P. Bartel (1997). "Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11285-11290.
- Yang, X., S. E. Bassett, X. Li, B. A. Luxon, N. K. Herzog, R. E. Shope, J. Aronson, T. W. Prow, J. F. Leary, R. Kirby, A. D. Ellington, and D. G. Gorenstein (2002). "Construction and selection of bead-bound combinatorial oligonucleoside phosphorothioate and phosphorodithioate aptamer libraries designed for rapid PCR-based sequencing." Nucleic Acids Res. 30(23): e132. 40
- Yin, H., R. I. Litvinov, G. Vilaire, H. Zhu, W. Li, G. A. Caputo, D. T. Moore, J. D. Lear, J. W. Weisel, W. F. DeGrado, J. S. Bennett (2006). "Activation of platelet IIb/3 by an exogenous peptide corresponding to the transmembrane domain of IIb." J. Biol. Chem. 281(48): 36732-36741.
- Zhang, Z. and E. Fan (2006). "Solid phase synthesis of peptidotriazoles with multiple cycles of triazole formation." Tetrahedron Lett. 47(5): 665-669.

アジド+トリアリールホスフィン

【 図 1 】

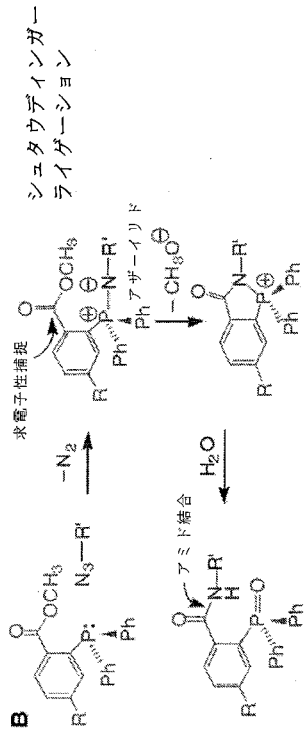


図 1

【 図 2 】

アジド+アセチレン



図 2

スルホニルアジド+チオ酸

【 図 3 】

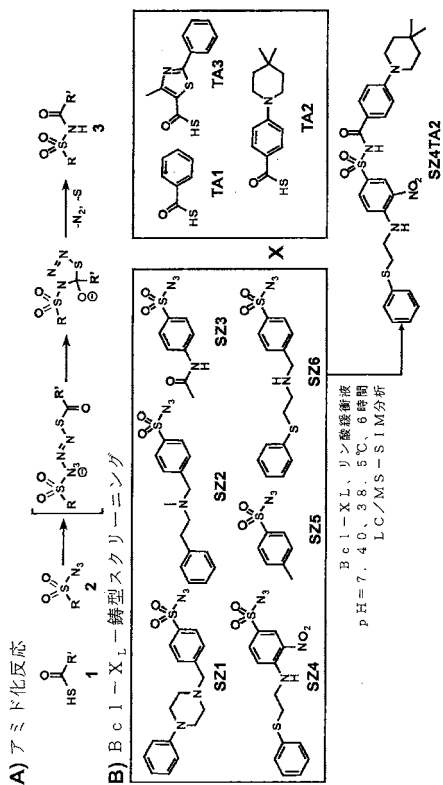


図 3

【 図 4 】

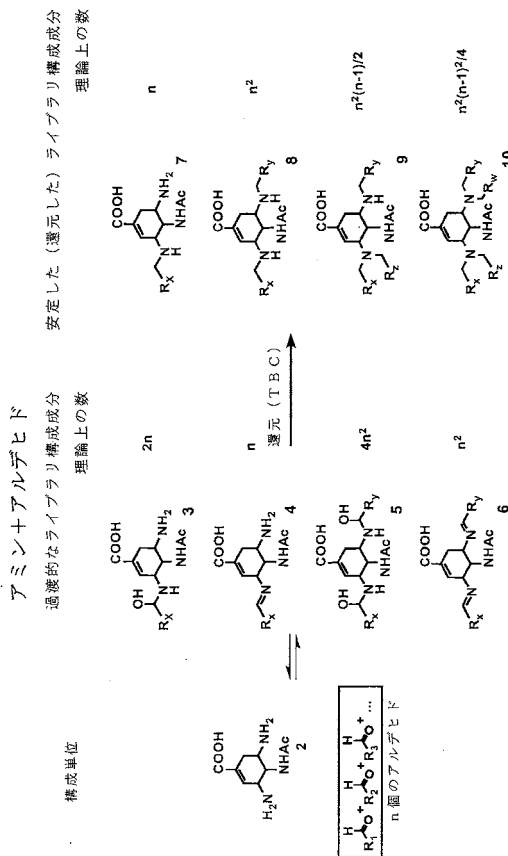


図 4

【 図 5 】

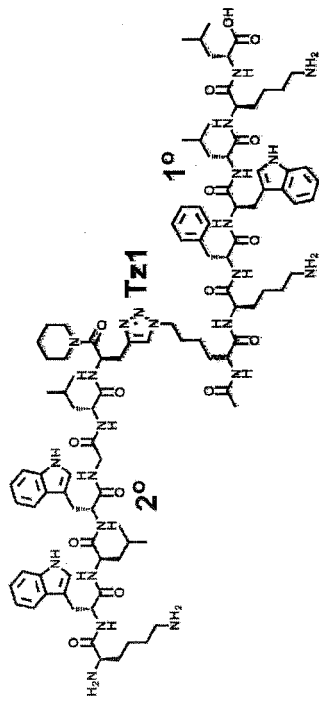


図 5

【 図 6 】

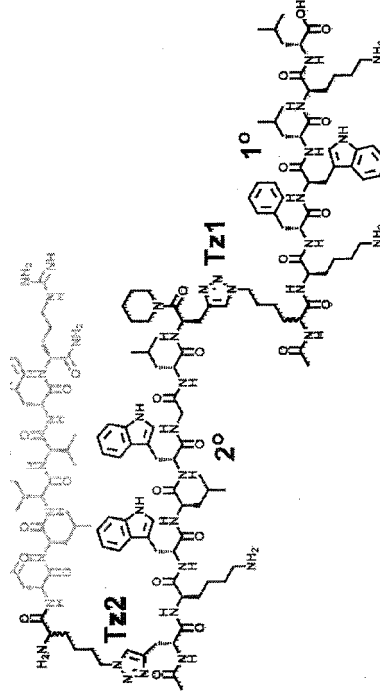


図 6

【 図 7 】

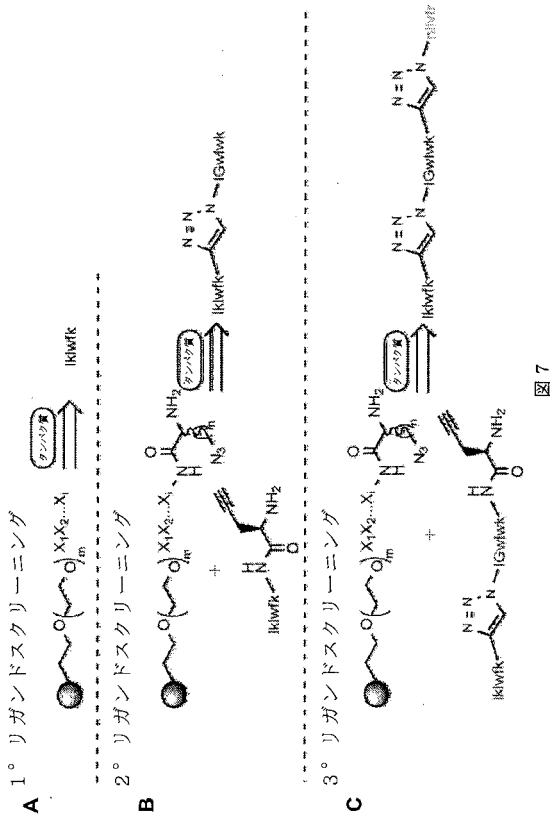


図 7

【 図 8 】

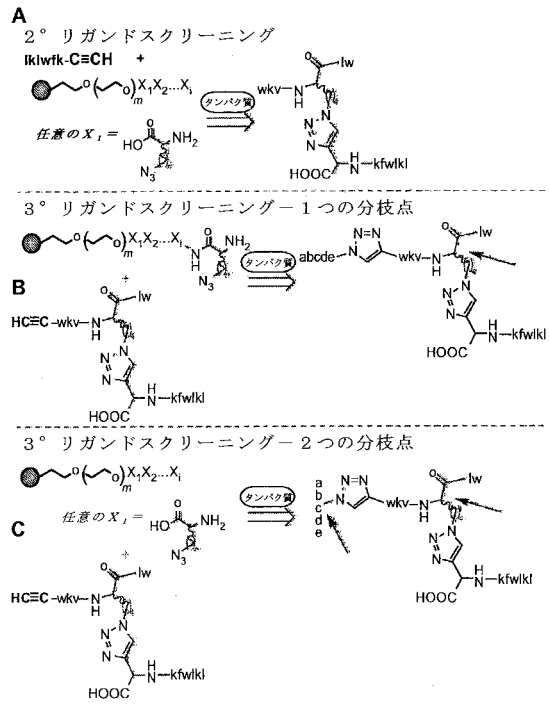


図 8

【 図 9 】

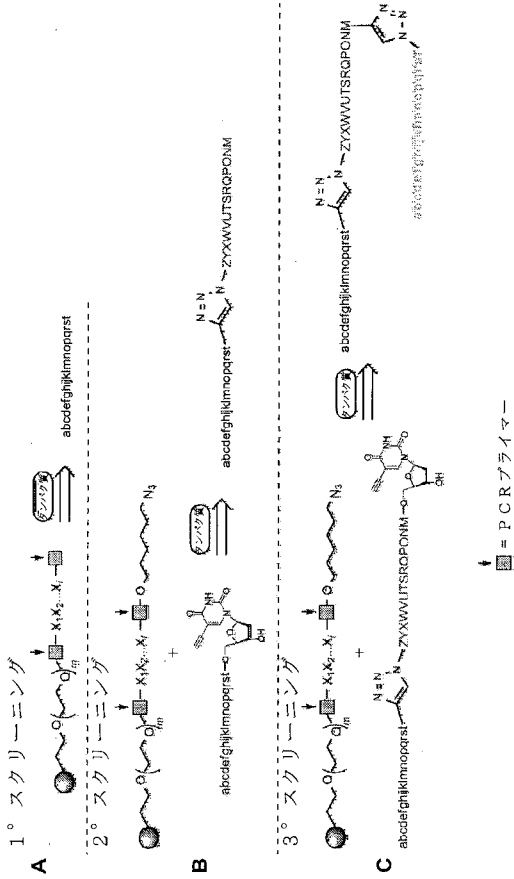


図 9

【 図 10 】

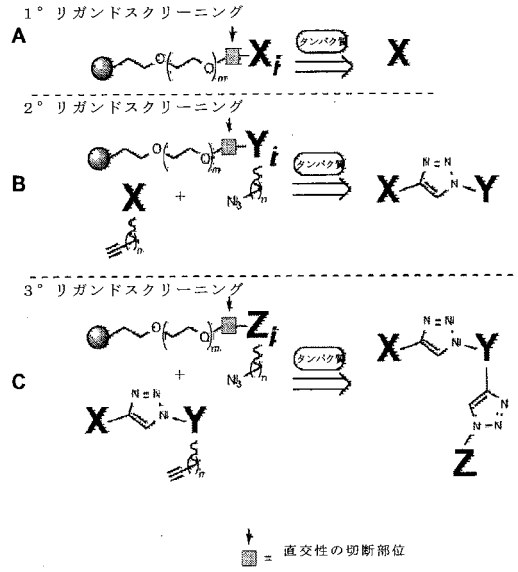


図 10

【 図 11 】

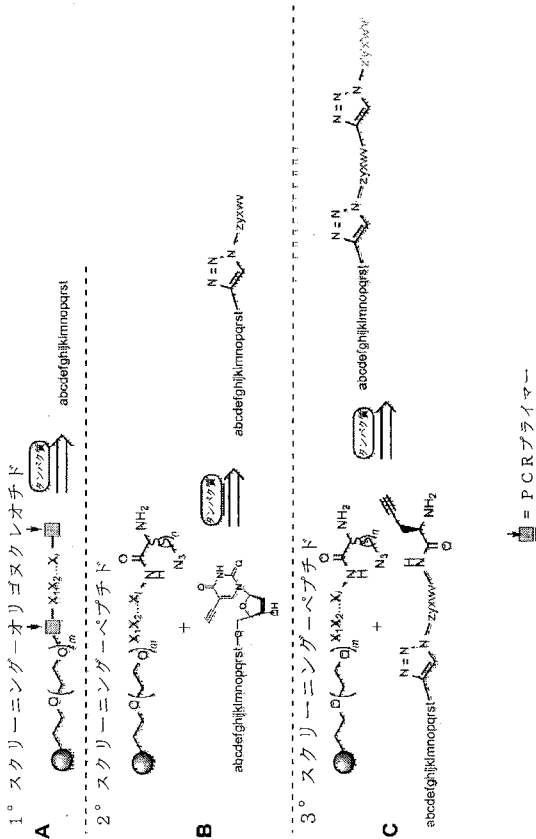


図 11

【 図 12 】

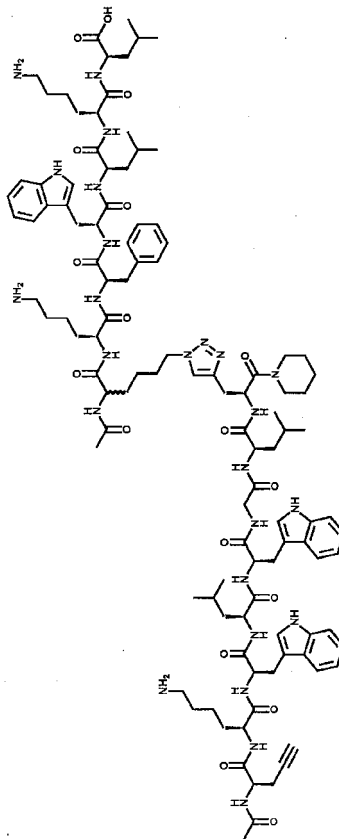


図 12

【 図 1 3 】

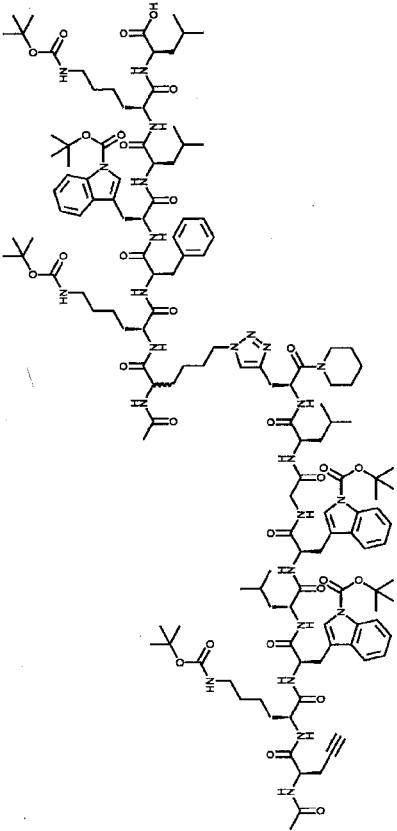


図 1 3

【 図 1 4 】

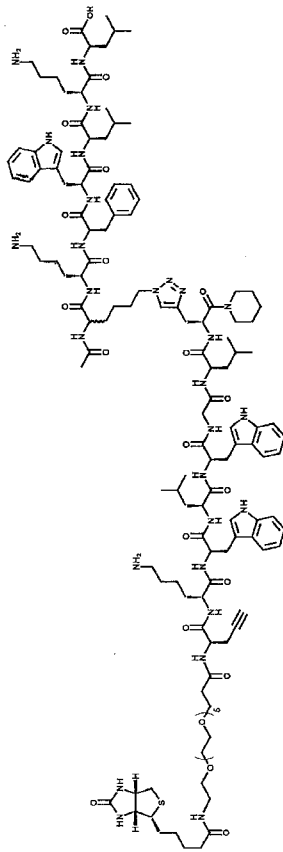


図 1 4

【 図 1 5 】

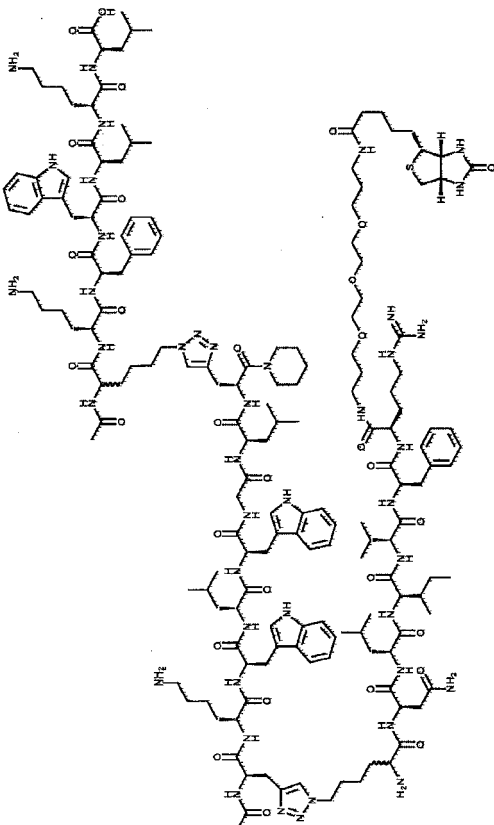


図 1 5

【 図 1 6 】

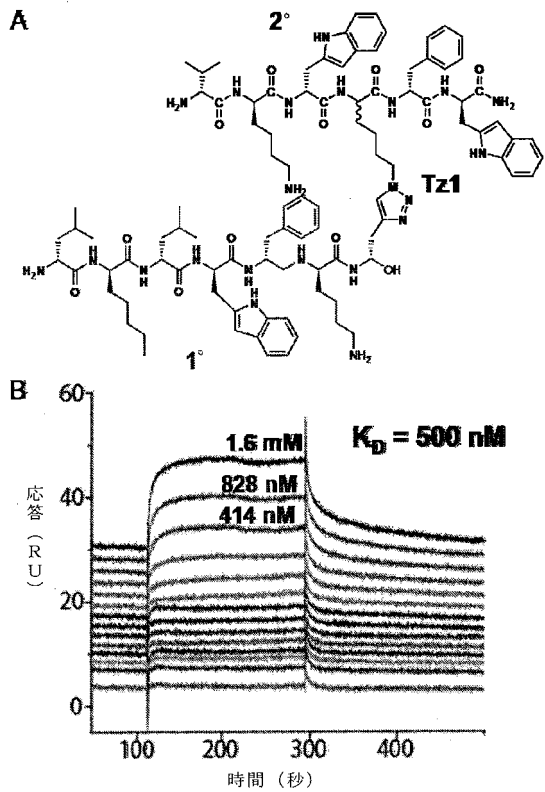


図 1 6

【 図 17 】

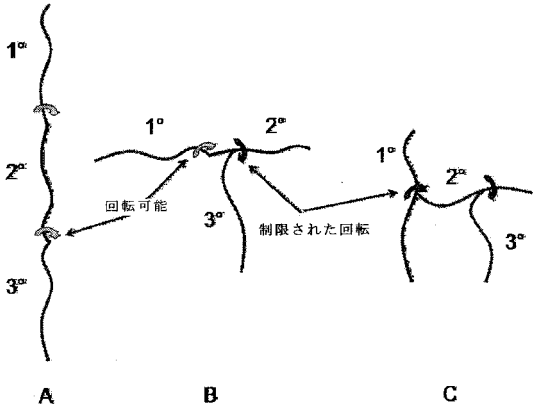


図 17

【 図 18 】

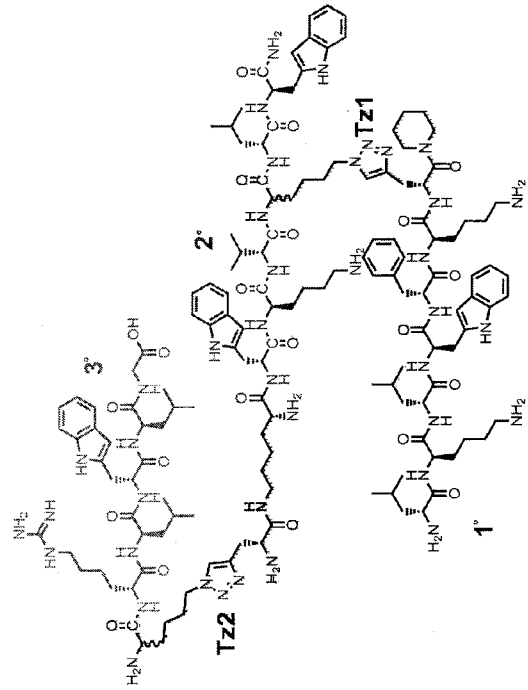


図 18

【 図 19 】

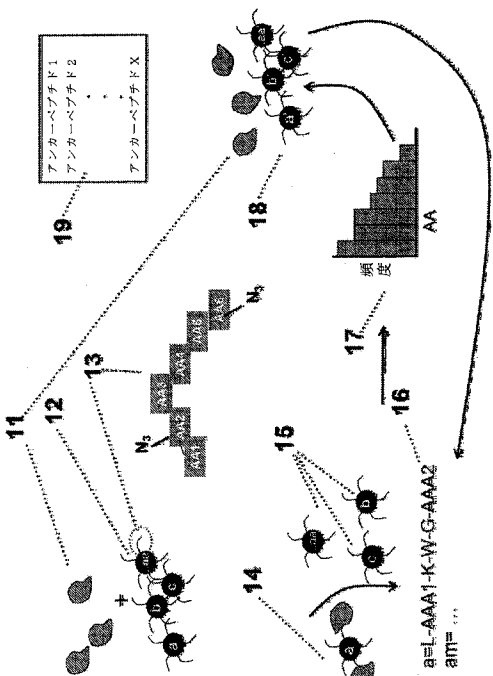


図 19

【 図 20 】

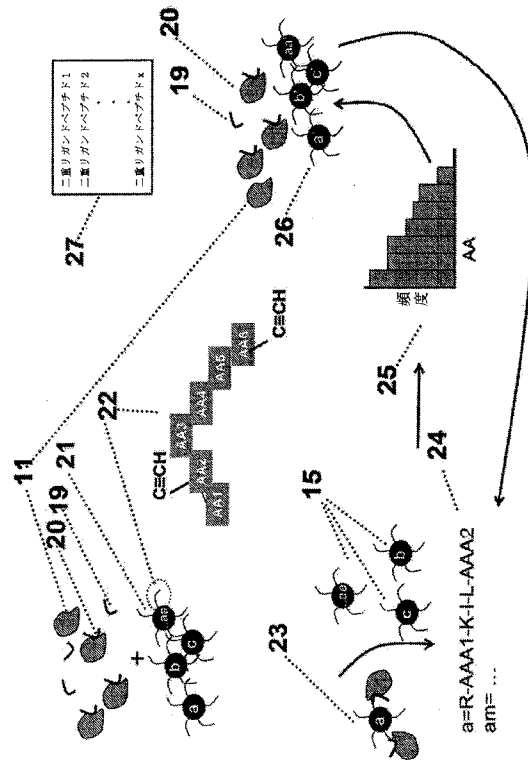


図 20

【 図 2 1 】

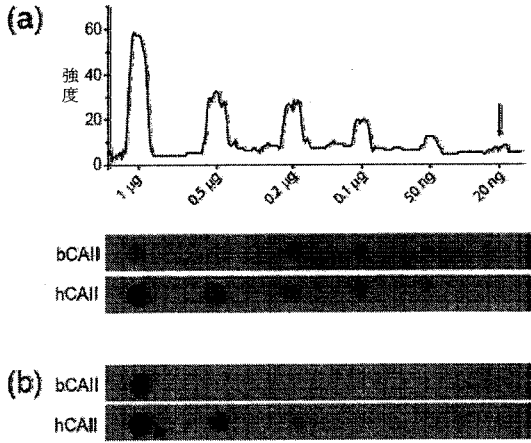


図 2 1

【 図 2 2 】

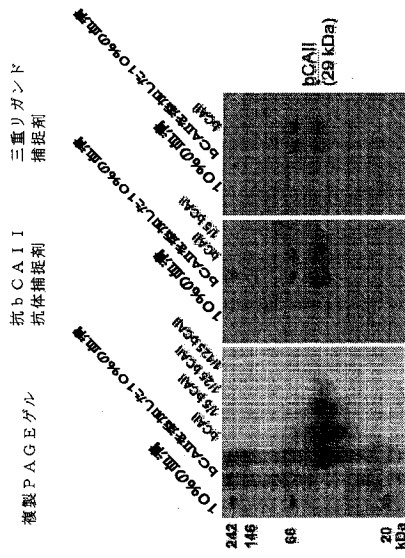


図 2 2

【 図 2 3 】

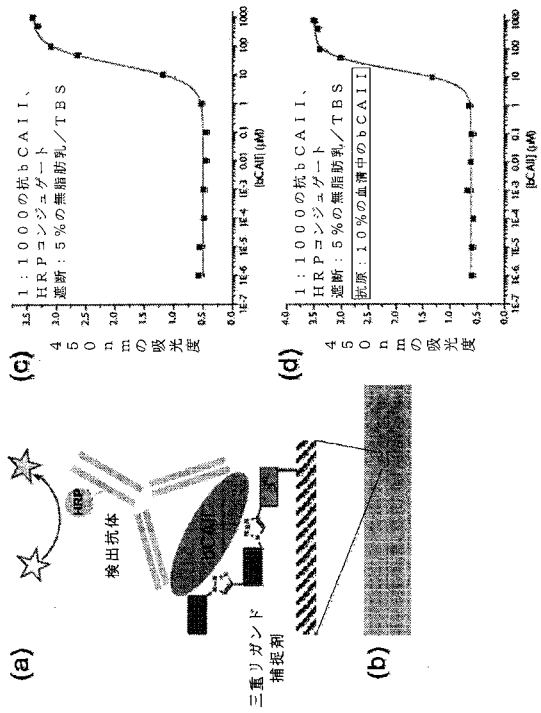


図 2 3

【 図 2 4 】

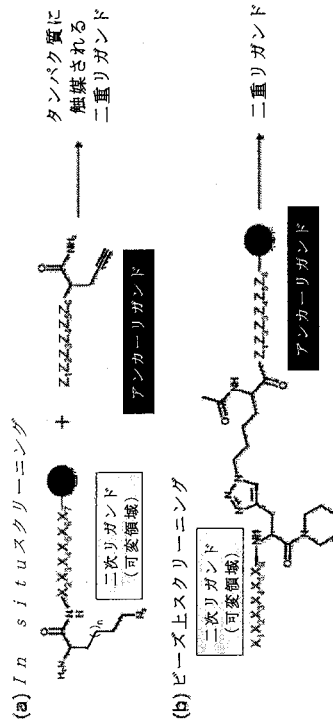


図 2 4

【 図 2 5 】

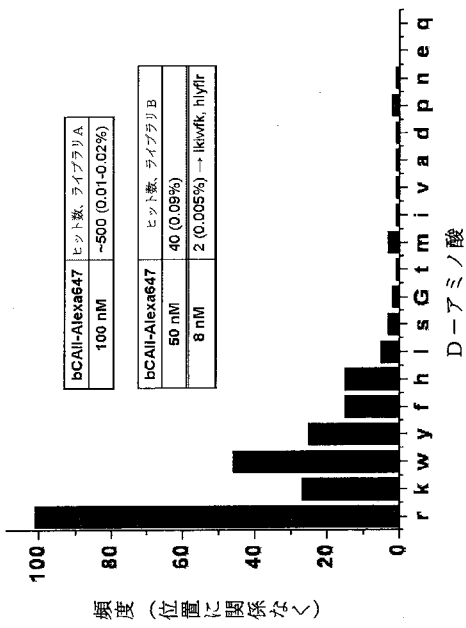


図 2 5

【 図 2 6 】

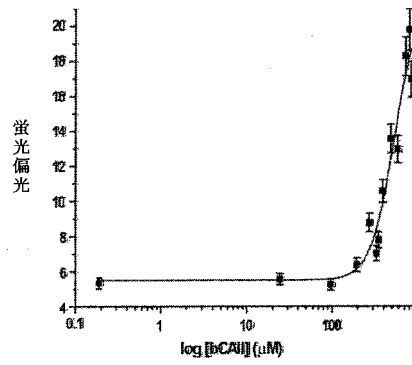
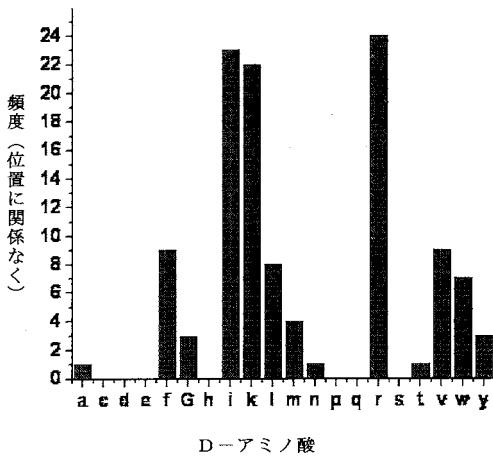


図 2 6

【 図 2 7 A 】



D-アミノ酸

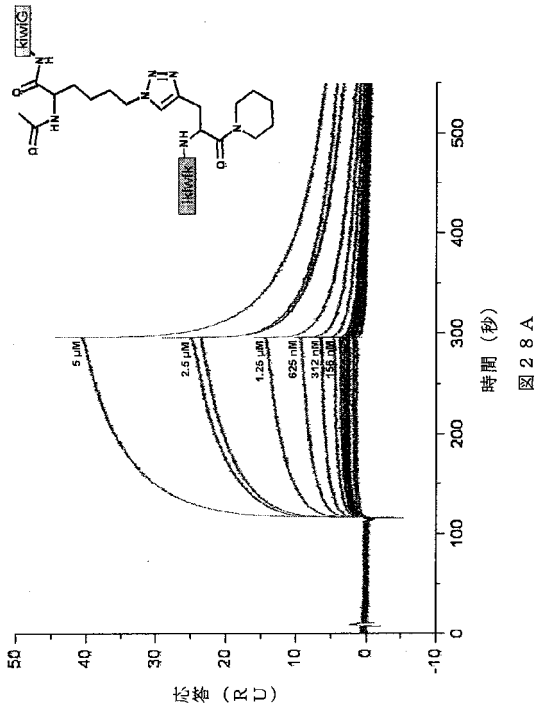
図 2 7 A

【 図 2 7 B 】

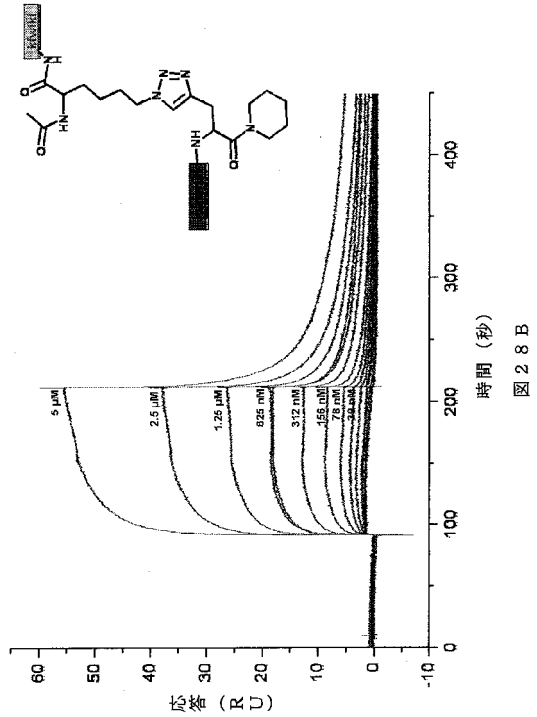
	Az <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	Az <sub>n</sub>
ヒット2	Az8	r	l	w	v	G	Az4
ヒット3	Az8	r	r	r	k	r	Az8
ヒット4	Az4	l	l	v	i	k	Az4
ヒット5	Az4	m	i	l	i	k	
ヒット6	Az8	i	i	i	m	r	Az4
ヒット7	Az8	i	i	i	w	r	Az8
ヒット8	Az4	n	v	i	i	f	
ヒット9	Az4	i	f	l	v	k	Az8
							Az8
ヒット11	Az4	r	r	k	f	r	Az8
ヒット12	Az4	r	v	w	l	r	Az8
ヒット13	Az8	k	y	r	r	r	Az4
ヒット14	Az8	r	r	k	v	w	Az4
ヒット15	Az4	i	f	l	v	k	Az8
ヒット16		k	r	k	r	f	Az4

図 2 7 B

【 図 2 8 A 】



【 図 2 8 B 】



【 図 2 9 】

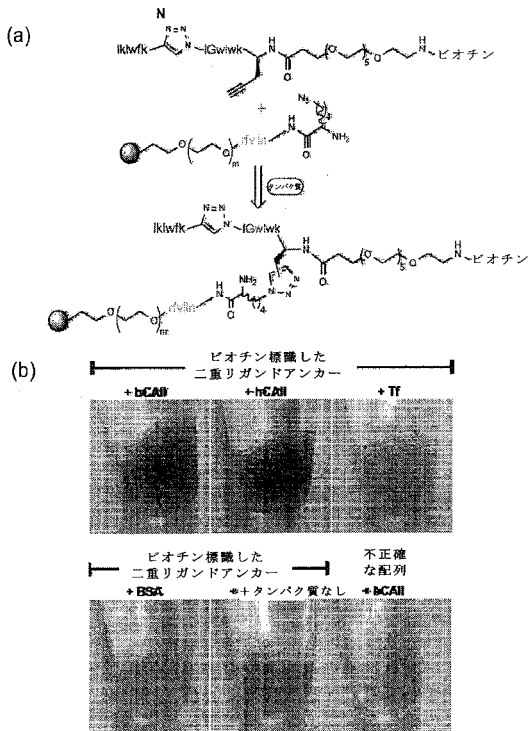


図 2 9

【 図 3 0 】

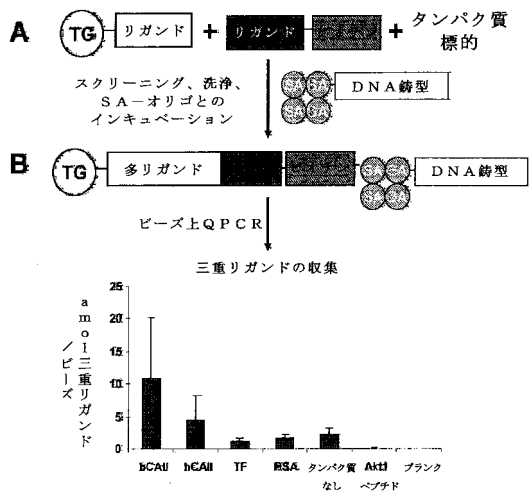


図 3 0

【 図 3 1 】

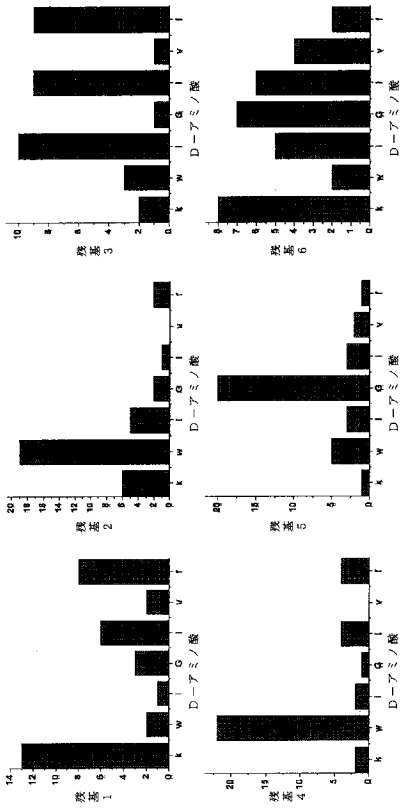


図 3 1

【 図 3 2 】

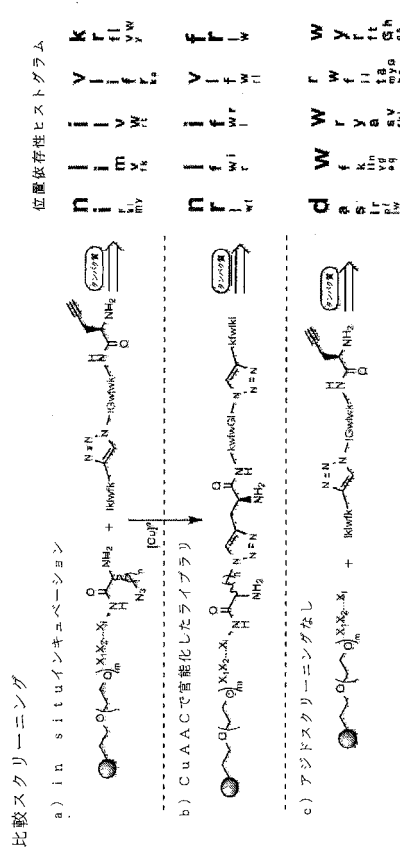


図 3 2

【 図 3 3 】

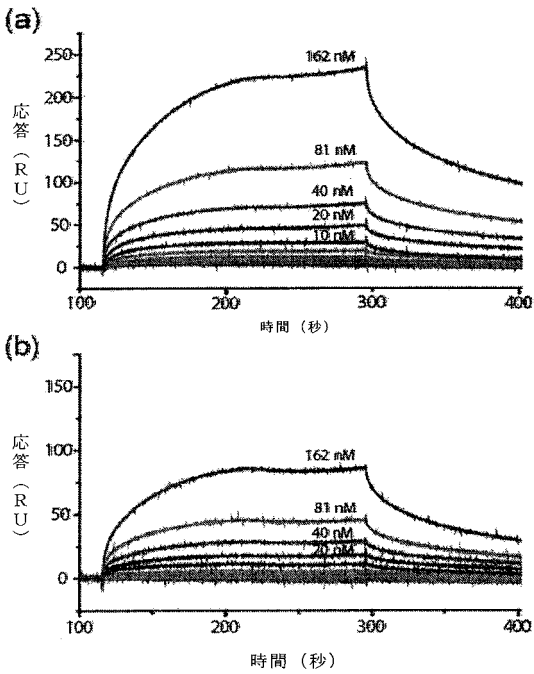


図 3 3

【 図 3 4 】

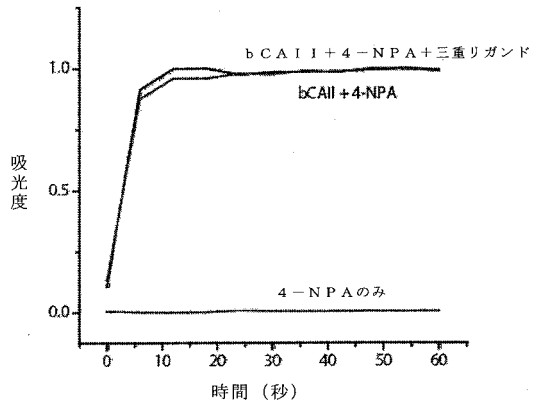


図 3 4



【配列表】

2011525187000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2009/047799
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/531 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARDIMAN G: "MICROARRAY PLATFORMS - COMPARISONS AND CONTRASTS" PHARMACOGENOMICS, ASHLEY PUBLICATIONS, GB, vol. 5, no. 5, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 487-502, XP009079995 ISSN: 1462-2416 the whole document	1-55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 October 2009		20/11/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Chrétien, Eva Maria

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2009/047799
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHWEITZER B ET AL: "MICROARRAYS TO CHARACTERIZE PROTEIN INTERACTIONS ON A WHOLE-PROTEOME SCALE" PROTEOMICS, WILEY - VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 3, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 2190-2199, XP009053823 ISSN: 1615-9853 the whole document	1-55
X	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LTD [GB]; WINTER GREG [GB]; TOMLINSON IAN [GB]; IGNATOVICH OL) 8 January 2004 (2004-01-08)  page 5, line 23 - page 6, line 9 page 8, line 9 - line 21 page 10, line 16 - line 21 page 11, line 11 - line 14 page 12, line 23 - page 13, line 6 page 16, line 15 - line 31 page 17, line 20 - line 24 page 19, line 12 - line 22 page 19, line 32 - page 20, line 8 page 23, line 1 - line 3 page 25, line 19 - page 28, line 4 page 29, line 18 - page 31, line 26 page 42, line 19 - line 25 page 43, line 10 - line 24 page 44, line 7 - line 28 page 48, line 5 - line 11 page 53, line 18 - page 54, line 17 page 72, line 22 - line 29 page 78, line 22 - line 29	1-28, 31-44, 49,50, 54,55
X	WO 2006/116736 A (SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS [US]; KOLB HARTMUTH C [US]; MOCHARLA VANI P) 2 November 2006 (2006-11-02) page 1, line 4 - line 5 page 3, line 2 - line 11 page 4, line 14 - page 5, line 21 page 6, line 18 page 6, line 23 - page 7, line 13 page 7, line 28 - page 9, line 6 page 9, line 18 - line 25 page 10, line 17 - page 12, line 25 page 13, line 22 - page 18, line 18 page 18, line 28 - page 20, line 24 page 22, line 12 - page 23, line 4	1-12, 15-33, 35-50, 54,55
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/047799

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEWIS W G ET AL: "Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, vol. 41, no. 6, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 1053-1057, XP002967538 ISSN: 1433-7851 the whole document	1-8,12, 15-23, 25,27, 29,30, 33, 35-38, 43, 45-47,54
X	MOCHARLA VANI P ET AL: "IN SITU CLICK CHEMISTRY: ENZYME-GENERATED INHIBITORS OF CARBONIC ANHYDRASE II" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 44, no. 1, 17 December 2004 (2004-12-17), pages 116-120, XP009072498 ISSN: 0570-0833 the whole document	1-8,12, 15-23, 25,27, 29,30, 33, 35-38, 43, 45-47,54
A	BUCK SUZANNE B ET AL: "Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies" BIOTECHNIQUES,, vol. 44, no. 7, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 927-929, XP001537196 the whole document	1-55
A	GB 2 433 506 A (SHARP KK [JP]) 27 June 2007 (2007-06-27) the whole document	1-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No  
PCT/US2009/047799

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003019 A	08-01-2004	AT 328906 T	15-06-2006
		CA 2492092 A1	08-01-2004
		CN 1678634 A	05-10-2005
		DE 60305919 T2	18-01-2007
		DK 1517921 T3	09-10-2006
		EP 1517921 A2	30-03-2005
		ES 2263984 T3	16-12-2006
		JP 2006512895 T	20-04-2006
		PT 1517921 E	29-09-2006
WO 2006116736 A	02-11-2006	CA 2606477 A1	02-11-2006
		EP 1875239 A2	09-01-2008
		JP 2008541014 T	20-11-2008
		KR 20080003441 A	07-01-2008
GB 2433506 A	27-06-2007	CN 101331400 A	24-12-2008
		EP 1969371 A1	17-09-2008
		WO 2007072976 A1	28-06-2007
		JP 2009519433 T	14-05-2009
		US 2009192048 A1	30-07-2009

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	14/00		
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	37/02		
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	37/02		

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

(72) 発明者 アグニュー, ヒーサー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 0 1, パサデナ, エス・マディソン・アヴェニュー  
 2 6 7 2 0 9 号

(72) 発明者 ロード, ローズマリー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 0 6, パサデナ, エス・メンター・アヴェニュー 2  
 3 6 アパートメント 2 号

(72) 発明者 ミルワード, スティーヴン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 6, モンロヴィア, ダブリュ・フットヒル・ブル  
 ヴァード 8 3 6 アパートメント イー

(72) 発明者 ナグ, アルンドハティ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 0 6, パサデナ, エス・カタリナ・アヴェニュー 1  
 8 8 9 号

(72) 発明者 ヒース, ジェイムズ, アール  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 3 0, パサデナ, オルタ・ヴィスタ・アヴェニュー  
 3 3 0

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 BA41 NA14 ZB072  
 4H045 AA10 BA01 BA05 BA09 BA16 BA17 BA41 BA50 EA20 EA50  
 FA33

专利名称(译)	多配体捕获剂和相关的组合物，方法和系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011525187A</a>	公开(公告)日	2011-09-15
申请号	JP2011514807	申请日	2009-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	加州理工学院		
申请(专利权)人(译)	加州理工学院		
[标]发明人	アグニューヒューサー ロードローズマリー ミルワードスティーヴン ナグアルンドハティ ヒースジェームズアール		
发明人	アグニュー,ヒューサー ロード,ローズマリー ミルワード,スティーヴン ナグ,アルンドハティ ヒース,ジェームズ,アール		
IPC分类号	C07K19/00 G01N33/531 C40B30/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 A61P37/02 A61K38/00		
CPC分类号	G01N33/54306 A61K38/02 C07D249/04 C07K1/00 C12Q2523/109 C40B30/04 G01N33/531		
FI分类号	C07K19/00.ZNA G01N33/531.Z C40B30/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 A61P37/02 A61K37/02		
F-TERM分类号	4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA41 4C084/NA14 4C084/ZB072 4H045/AA10 4H045/BA01 4H045/BA05 4H045/BA09 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA33		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	61/132416 2008-06-18 US 61/155890 2009-02-26 US		
其他公开文献	JP5647113B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

描述了包含两种或更多种配体的多配位体捕获剂，以及相关的组合物，方法和系统。

