

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-109931

(P2017-109931A)

(43) 公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/00 (2006.01)	C07K 7/00 ZNA	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
C12N 7/01 (2006.01)	C12N 7/01	4H045
C4OB 40/10 (2006.01)	C4OB 40/10	
C12Q 1/70 (2006.01)	C12Q 1/70	

審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2015-243334 (P2015-243334)
 (22) 出願日 平成27年12月14日 (2015.12.14)

(71) 出願人 504133110
 国立大学法人電気通信大学
 東京都調布市調布ヶ丘一丁目5番地1
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (74) 代理人 100101247
 弁理士 高橋 俊一
 (72) 発明者 瀧 真清
 東京都調布市調布ヶ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内
 Fターム(参考) 4B063 QA05 QA18 QQ10 QQ79 QR48
 QS36
 4B065 AA98X AB01 BA01 BD50 CA24
 CA44

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マクロ環分子およびそのスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】新規マクロ環分子を提供することを課題とする。特に、タンパク質に対して結合することができるマクロ環分子を提供することを課題とする。特に、H s p 9 0 に結合することができるマクロ環分子を提供することを課題とする。また、標的分子に結合することができるマクロ環分子の同定・単離を可能にするライブラリーおよびスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】クラウンエーテル誘導体によって提示ペプチドが修飾されたT7ファージのライブラリー、およびそのライブラリーを用いて標的分子に対する結合分子をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニングから得られたH s p 9 0 結合性分子は、疎水性アミノ酸が配置されたペプチドがクラウンエーテル誘導体に結合した構造を有する。

【選択図】なし

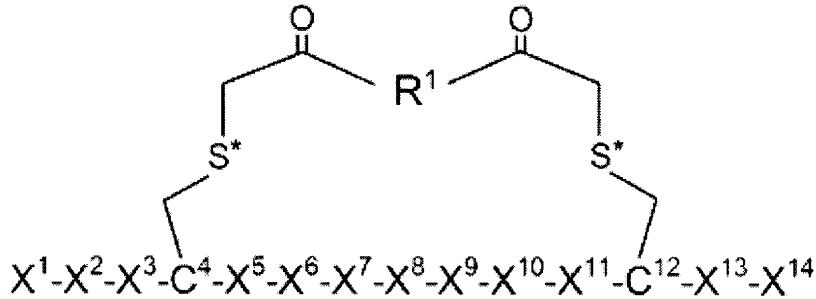
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の式 (I) で表される構造を有する分子であって、

【化 1】

(I)



10

式中、

X¹ ~ X¹⁴ (C⁴ および C¹² を含む) は、ペプチド結合で連結されたアミノ酸を表し、C⁴ および C¹² はそれぞれシステインを表し、S* は C⁴ および C¹² のシステインに由来する硫黄原子を表し、

X¹ は任意のアミノ酸であり、

20

X² は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X³ は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X⁵ は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X⁶ は任意のアミノ酸であり、

X⁷ は任意のアミノ酸であり、

X⁸ は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

30

X⁹ は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X¹⁰ は任意のアミノ酸であり、

X¹¹ は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

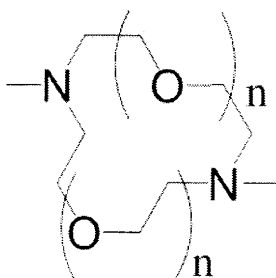
X¹³ は任意のアミノ酸であり、

X¹⁴ は任意のアミノ酸であるか、または存在せず、

R¹ は、下記の式 (II) ~ (V) のいずれかで表される構造を有する基であり、

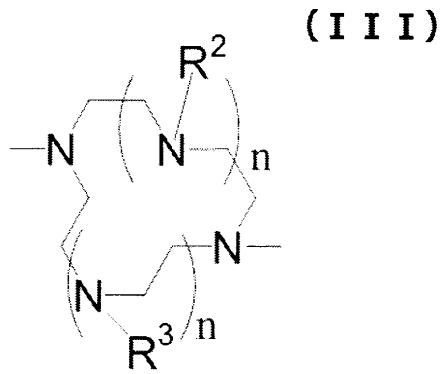
【化 2】

(II)



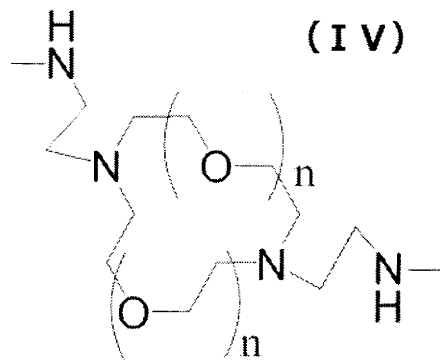
40

【化 3】



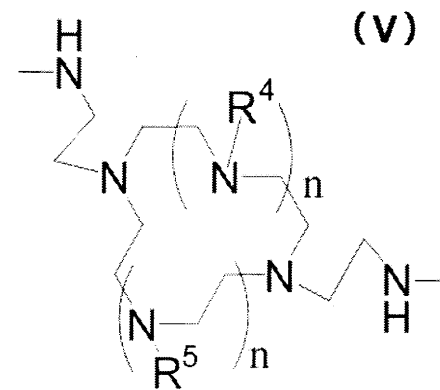
10

【化 4】



20

【化 5】



30

式中、

n は 1 ~ 4 の整数であり、

R² ~ R⁵ は、それぞれ独立して、水素またはメチル基である、分子。

40

【請求項 2】

X² はトリプトファンであり、X³ はバリンであり、X⁵ はロイシンであり、X⁸ はトリプトファンであり、X⁹ はロイシンであり、X¹¹ はイソロイシンである、

請求項 1 に記載の分子。

【請求項 3】

X⁷ はプロリンである、請求項 1 または 2 に記載の分子。

50

【請求項 4】

X^1 、 X^6 、 X^{10} 、および X^{13} は、それぞれ独立して、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群から選択される親水性アミノ酸である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の分子。

【請求項 5】

X^1 はグルタミンまたはアスパラギンであり、
 X^6 はグルタミンまたはアスパラギンであり、
 X^{10} はセリンまたはトレオニンであり、
 X^{13} はアルギニンまたはリジンである、
 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の分子。

10

【請求項 6】

$X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を含む) で示されるペプチド鎖部分が、
 QWVCLNPWLSICRA
 というアミノ酸配列を有する、
 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の分子。

【請求項 7】

R^1 において、 $n = 2$ である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の分子。

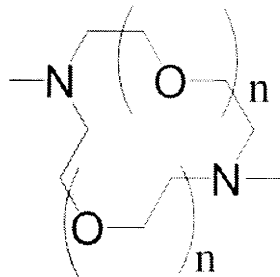
【請求項 8】

R^1 は、下記の式 (II) で表される構造を有する基であり、

20

【化 6】

(II)



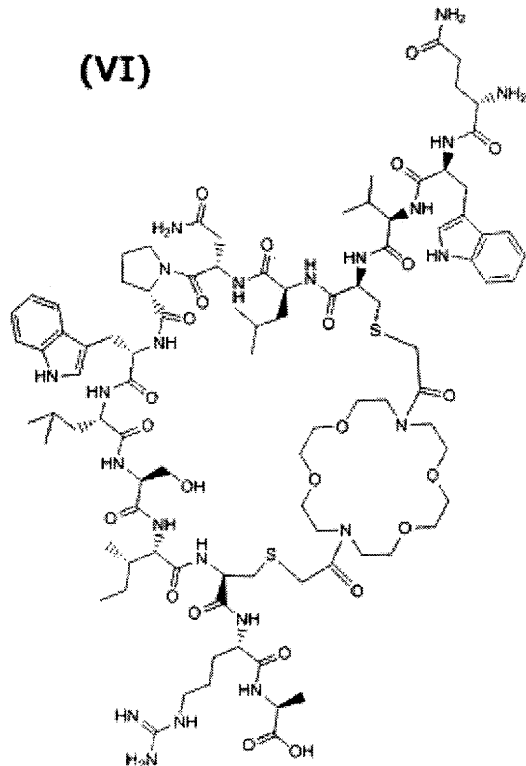
30

式中、 $n = 2$ である、
 請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の分子。

【請求項 9】

下記式 (VI) で表される構造を有する分子。

【化 7】



10

20

【請求項 10】

下記の配列

$$X^1 - X^2 - X^3 - C^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - C^{12} - X^{13} - X^{14}$$

を有するペプチドを含む、h s p 9 0 結合剤製造用組成物であって、

$X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を含む) は、ペプチド結合で連結されたアミノ酸を表し、 C^4 および C^{12} はそれぞれシステインを表し、

X^1 は任意のアミノ酸であり、

X^2 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^3 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^5 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^6 は任意のアミノ酸であり、

X^7 は任意のアミノ酸であり、

X^8 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^9 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^{10} は任意のアミノ酸であり、

X^{11} は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^{13} は任意のアミノ酸であり、

X^{14} は任意のアミノ酸であるか、または存在せず、

前記ペプチドは、 C^4 および C^{12} のシステインの側鎖を介してアザクラウンエーテルの 2 つの窒素原子に連結されて h s p 9 0 結合剤を生じる、組成物。

30

40

50

【請求項 11】

X² はトリプトファンであり、
 X³ はバリンであり、
 X⁵ はロイシンであり、
 X⁸ はトリプトファンであり、
 X⁹ はロイシンであり、
 X¹¹ はイソロイシンである、
 請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

X⁷ はプロリンである、請求項 10 または 11 に記載の組成物。

10

【請求項 13】

X¹、X⁶、X¹⁰、および X¹³ は、それぞれ独立して、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群から選択される親水性アミノ酸である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

X¹ はグルタミンまたはアスパラギンであり、
 X⁶ はグルタミンまたはアスパラギンであり、
 X¹⁰ はセリンまたはトレオニンであり、
 X¹³ はアルギニンまたはリジンである、
 請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 15】

X¹ ~ X¹⁴ (C⁴ および C¹² を含む) で示されるペプチド鎖部分が、
 QWVCLNPWLSICRA
 というアミノ酸配列を有する、
 請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

gp10 タンパク質の C 末端に、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の分子のペプチド部分が融合している、T7 ファージ。

【請求項 17】

標的分子に結合することができる分子をスクリーニングする方法であって、
 (a) 4 ~ 10 個のランダムアミノ酸で隔てられた 2 つのシステインを含むペプチドが gp10 タンパク質の C 末端に融合されるように遺伝子操作されており、かつ、アザクラウンエーテルの周上の相対する 2 つの窒素原子に連結された -CO-CH₂- 基が、前記 2 つのシステインの側鎖の硫黄原子にそれぞれ結合している構造を含む修飾 T7 ファージのライブラリーを、
 前記標的分子と混合する工程、
 (b) 前記標的分子に結合した修飾 T7 ファージを分離する工程、
 (c) 前記分離された修飾 T7 ファージを、宿主細菌細胞に感染させ、対応する T7 ファージを増殖させる工程、
 (d) 前記工程 (c) において増殖された T7 ファージと、前記アザクラウンエーテルの前記 2 つの窒素原子にハロアセチル基またはハロアセトアミド基が連結された構造を有するジハロゲン化合物とを反応させて、修飾 T7 ファージを新たに得る工程、
 (e) 前記工程 (d) で新たに得られた修飾 T7 ファージを、前記標的分子と混合する工程、および
 (f) 前記標的分子に結合した修飾 T7 ファージを分離する工程、
 を含む、方法。

30

40

【請求項 18】

前記工程 (f) の後に、
 (g) 前記工程 (c) ~ (f) を繰り返す工程

50

をさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記工程 (g) において、前記工程 (c) ~ (f) が少なくとも 4 回繰り返される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記工程 (a) の前に、前記修飾 T7 フェージのライブラリーを作製する初期工程をさらに含み、この初期工程は、

4 ~ 10 個のランダムアミノ酸で隔てられた 2 つのシステインを含むペプチドが gp10 タンパク質の C 末端に融合されるように遺伝子操作された T7 フェージのライブラリーを、

前記アザクラウンエーテルの前記 2 つの窒素原子にハロアセチル基またはハロアセトアミド基が連結された構造を有するジハロゲン化合物と反応させること

を含む、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

4 ~ 10 個のランダムアミノ酸で隔てられた 2 つのシステインを含むペプチドが gp10 タンパク質の C 末端に融合されるように遺伝子操作されており、かつ、

アザクラウンエーテルの周上の相対する 2 つの窒素原子に連結された -CO-CH₂- 基が、前記 2 つのシステインの側鎖の硫黄原子にそれぞれ結合している構造を含む修飾 T7 フェージのライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチド部分およびクラウンエーテル部分を含んでクリプタンド構造をなすマクロ環分子、およびその同定方法に関する。本発明は特に、標的タンパク質のような標的分子に結合するマクロ環分子、およびそのようなマクロ環分子をスクリーニングにより同定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

人工マクロ環分子は、例えば電気化学的材料および光物理学的材料など、幅広い応用可能性を有するために注目を集めている。人工マクロ環分子の中でも、クラウンエーテルおよびその類似体（クラウン類縁体）は、その親水性オリゴエチレン構造が水溶性を高めて凝集を防ぐため、生体適合性が優れている。

【0003】

クラウンの潜在的有用性に関わらず、その生物学的アプリケーションに関する包括的な研究は最近になるまで報告されていなかった。本発明者らは、T7 フェージを利用して、10 の 9 乗という非常に大きな分子多様性を提供するクラウンエーテル様分子ライブラリー（クラウンライブラリー）の構築を初めて報告し、そのライブラリーから、癌関連タンパク質（ヒートショックタンパク質 90 ; Hsp90）に特異的に結合する分子の同定・単離に成功した（特許文献 1、非特許文献 1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2014 - 128211 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Chem. Comm. (2014) Vol. 50, No. 30, pp. 3887-4012

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

10

20

30

40

50

しかしながら、さらに多様な構造の人工マクロ環分子を得ることに対するニーズが存在する。特に、先行技術のクラウンライブラリーから得られたクラウンエーテル様分子では、標的タンパク質に対する結合親和性（解離定数 K_D ）が $1.7 \mu\text{M}$ 程度であったところ、それと同等あるいはそれより強い結合力を示す分子を得ることに対するニーズが存在する。

【0007】

本発明は、新規マクロ環分子を提供することを課題とする。特に、タンパク質に対して結合することができるマクロ環分子を提供することを課題とする。本発明は特に、Hsp90に結合することができるマクロ環分子、およびそのようなマクロ環分子の製造用のペプチド組成物を提供することを課題とする。また、標的分子に結合することができるマクロ環分子の同定・単離を可能にするライブラリーおよびスクリーニング方法を提供することを課題とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

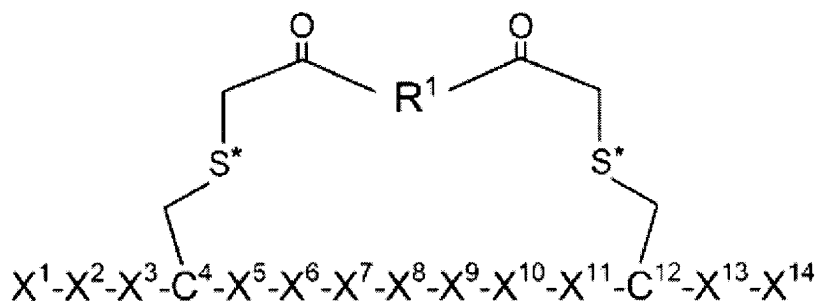
本発明は以下の側面を含む。

[1]

下記の式(I)で表される構造を有する分子であって、

【化1】

(I)



20

式中、

30

$X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を含む) は、ペプチド結合で連結されたアミノ酸を表し、 C^4 および C^{12} はそれぞれシステインを表し、 S^* は C^4 および C^{12} のシステインに由来する硫黄原子を表し、

X^1 は任意のアミノ酸であり、

X^2 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^3 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^5 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

40

X^6 は任意のアミノ酸であり、

X^7 は任意のアミノ酸であり、

X^8 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^9 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^{10} は任意のアミノ酸であり、

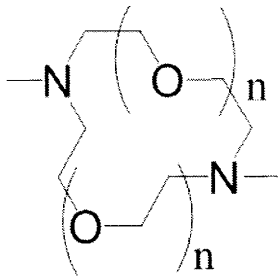
X^{11} は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^{13} は任意のアミノ酸であり、

50

X¹⁻⁴ は任意のアミノ酸であるか、または存在せず、
 R¹ は、下記の式 (I I) ~ (V) のいずれかで表される構造を有する基であり、
 【化 2】

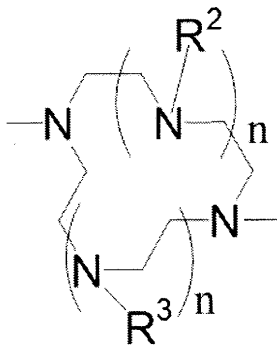
(I I)



10

【化 3】

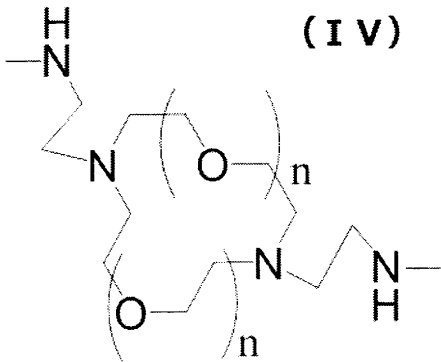
(I I I)



20

【化 4】

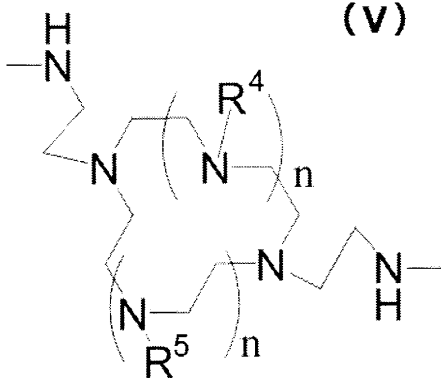
(I V)



30

【化 5】

(V)



40

式中、

50

n は 1 ~ 4 の整数であり、
 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、水素またはメチル基である、
 分子。

[2]

X^2 はトリプトファンであり、
 X^3 はバリンであり、
 X^5 はロイシンであり、
 X^8 はトリプトファンであり、
 X^9 はロイシンであり、
 X^{11} はイソロイシンである、
 [1] に記載の分子。

10

[3]

X^7 はプロリンである、[1] または [2] に記載の分子。

[4]

X^1 、 X^6 、 X^{10} 、および X^{13} は、それぞれ独立して、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群から選択される親水性アミノ酸である、[1] ~ [3] のいずれかに記載の分子。

[5]

X^1 はグルタミンまたはアスパラギンであり、
 X^6 はグルタミンまたはアスパラギンであり、
 X^{10} はセリンまたはトレオニンであり、
 X^{13} はアルギニンまたはリジンである、
 [1] ~ [4] のいずれかに記載の分子。

20

[6]

$X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を含む) で示されるペプチド鎖部分が、
 QWVCLNPWLSICRA
 というアミノ酸配列を有する、
 [1] ~ [5] のいずれかに記載の分子。

[7]

R^1 において、 $n = 2$ である、[1] ~ [6] のいずれかに記載の分子。

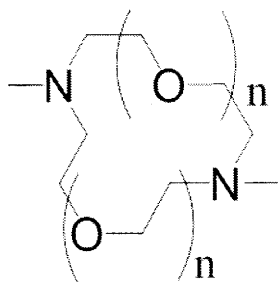
30

[8]

R^1 は、下記の式 (I I) で表される構造を有する基であり、

【化 6】

(I I)



40

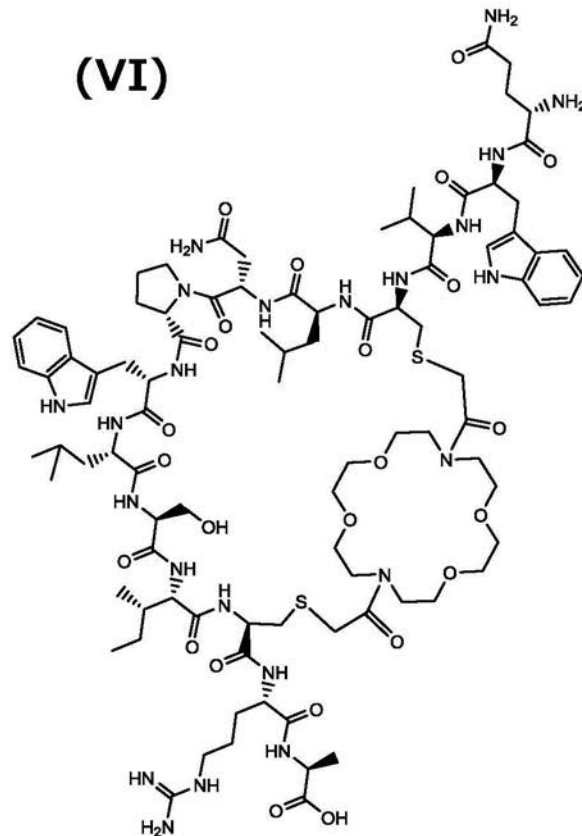
式中、 $n = 2$ である、

[1] ~ [7] のいずれかに記載の分子。

[9]

下記式 (V I) で表される構造を有する分子。

【化 7】



10

20

[1 0]

下記の配列

$$X^1 - X^2 - X^3 - C^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - C^{12} - X^{13} - X^{14}$$

30

を有するペプチドを含む、h s p 9 0 結合剤製造用組成物であって、

$X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を含む) は、ペプチド結合で連結されたアミノ酸を表し、 C^4 および C^{12} はそれぞれシステインを表し、

X^1 は任意のアミノ酸であり、

X^2 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^3 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^5 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

40

X^6 は任意のアミノ酸であり、

X^7 は任意のアミノ酸であり、

X^8 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^9 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^{10} は任意のアミノ酸であり、

X^{11} は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、

X^{13} は任意のアミノ酸であり、

50

X^{1 4} は任意のアミノ酸であるか、または存在せず、
前記ペプチドは、C⁴ および C^{1 2} のシステインの側鎖を介してアザクラウンエーテル
の 2 つの窒素原子に連結されて h s p 9 0 結合剤を生じる、
組成物。

[1 1]

X² はトリプトファンであり、
X³ はバリンであり、
X⁵ はロイシンであり、
X⁸ はトリプトファンであり、
X⁹ はロイシンであり、
X^{1 1} はイソロイシンである、
[1 0] に記載の組成物。

10

[1 2]

X⁷ はプロリンである、[1 0] または [1 1] に記載の組成物。

[1 3]

X¹、X⁶、X^{1 0}、および X^{1 3} は、それぞれ独立して、グルタミン、アスパラギン
、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、アスパラギン酸、
およびグルタミン酸からなる群から選択される親水性アミノ酸である、[1 0] ~ [1 2
] のいずれかに記載の組成物。

20

[1 4]

X¹ はグルタミンまたはアスパラギンであり、
X⁶ はグルタミンまたはアスパラギンであり、
X^{1 0} はセリンまたはトレオニンであり、
X^{1 3} はアルギニンまたはリジンである、
[1 0] ~ [1 3] のいずれかに記載の組成物。

[1 5]

X¹ ~ X^{1 4} (C⁴ および C^{1 2} を含む) で示されるペプチド鎖部分が、
Q W V C L N P W L S I C R A
というアミノ酸配列を有する、
[1 0] ~ [1 4] のいずれかに記載の組成物。

30

[1 6]

g p 1 0 タンパク質の C 末端に、[1] ~ [9] のいずれかに記載の分子のペプチド部
分が融合している、T 7 フェージ。

[1 7]

標的分子に結合することができる分子をスクリーニングする方法であって、
(a) 4 ~ 1 0 個のランダムアミノ酸で隔てられた 2 つのシステインを含むペプチドが
g p 1 0 タンパク質の C 末端に融合されるように遺伝子操作されており、かつ、
アザクラウンエーテルの周上の相対する 2 つの窒素原子に連結された - C O - C H₂ -
基が、前記 2 つのシステインの側鎖の硫黄原子にそれぞれ結合している構造を含む
修飾 T 7 フェージのライブラリーを、
前記標的分子と混合する工程、

40

(b) 前記標的分子に結合した修飾 T 7 フェージを分離する工程、

(c) 前記分離された修飾 T 7 フェージを、宿主細菌細胞に感染させ、対応する T 7
フェージを増殖させる工程、

(d) 前記工程 (c) において増殖された T 7 フェージと、前記アザクラウンエーテル
の前記 2 つの窒素原子にハロアセチル基またはハロアセトアミド基が連結された構造を有
するジハロゲン化合物とを反応させて、修飾 T 7 フェージを新たに得る工程、

(e) 前記工程 (d) で新たに得られた修飾 T 7 フェージを、前記標的分子と混合する
工程、および

(f) 前記標的分子に結合した修飾 T 7 フェージを分離する工程、

50

を含む、方法。

[1 8]

前記工程 (f) の後に、

(g) 前記工程 (c) ~ (f) を繰り返す工程

をさらに含む、[1 7] に記載の方法。

[1 9]

前記工程 (g) において、前記工程 (c) ~ (f) が少なくとも 4 回繰り返される、[1 8] に記載の方法。

[2 0]

前記工程 (a) の前に、前記修飾 T 7 フェージのライブラリーを作製する初期工程をさらに含み、この初期工程は、

4 ~ 1 0 個のランダムアミノ酸で隔てられた 2 つのシステインを含むペプチドが g p 1 0 タンパク質の C 末端に融合されるように遺伝子操作された T 7 フェージのライブラリーを、

前記アザクラウンエーテルの前記 2 つの窒素原子にハロアセチル基またはハロアセトアミド基が連結された構造を有するジハロゲン化合物と反応させること

を含む、[1 7] ~ [1 9] のいずれかに記載の方法。

[2 1]

4 ~ 1 0 個のランダムアミノ酸で隔てられた 2 つのシステインを含むペプチドが g p 1 0 タンパク質の C 末端に融合されるように遺伝子操作されており、かつ、

アザクラウンエーテルの周上の相対する 2 つの窒素原子に連結された - C O - C H ₂ - 基が、前記 2 つのシステインの側鎖の硫黄原子にそれぞれ結合している構造を含む修飾 T 7 フェージのライブラリー。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、標的分子に対して様々な結合力を有するマクロ環分子を効率よく得ることができる。特に、抗体の代替物となり得るような、n M 域の K_D を有する強い結合分子を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】図 1 は、スキーム 1 により合成された 1,1'-(1,4,10,13-テトラオキサ-7,16-ジアザシクロオクタデカン-7,16-ジイル)ビス(2-プロモエタノン)の (A) L C - M S スペクトル (実測 m / z 値 = 5 0 3 . 3、5 0 5 . 2、5 0 7 . 2 ; 理論 m / z 値 = 5 0 3 . 0、5 0 5 . 0、5 0 7 . 0) および (B) ¹H N M R スペクトル (5 0 0 M H z、C D C l ₃) を示す。

【図 2】図 2 は、クラウンエーテル修飾化したモデルペプチドを L C - M S / M S によって解析した結果を示す。

【図 3】図 3 は、(A) モデルペプチドを異なる濃度のクラウンエーテルで修飾した後にさらに F L - I A (フルオレセインヨードアセトアミド) で修飾した場合に観察された蛍光の強さ、および (B) A における蛍光強度を定量化したグラフを示す。

【図 4】図 4 は、本発明の一実施態様によるスクリーニングの概略を示す。

【図 5】図 5 は、ポジティブセレクションの各ラウンド後のフェージ群 (ポリクローン) について、標的タンパク質または対照タンパク質 (B S A) に対する結合を E L I S A によって定量化した結果を示す。

【図 6】図 6 は、スクリーニング後に単離した 2 2 個のフェージクローンについて、標的タンパク質または対照タンパク質 (B S A) に対する結合を E L I S A によって定量化した結果を示す。

【図 7】図 7 は、合成ペプチドを用いて製造した本発明の一実施態様によるクリプタン分子の L C - M S / M S スペクトルを示す。

【図 8】図 8 は、合成ペプチドリinker (上) および対応するクリプタン分子 (下) の

10

20

30

40

50

C D スペクトルを示す。

【図 9】図 9 は、本発明の一実施態様によるクリプタンド分子に G S T - H s p 9 0 N T D (左) または G S T (右) を滴下した I T C 実験の結果を示す。N : 結合部位数、 K_D : 解離定数、 H : エンタルピー変化、 S : エントロピー変化、 G : 自由エネルギー変化。

【図 10】図 10 は、本発明の一実施態様によるクリプタンド分子の ^1H NMR スペクトル (上) および標的タンパク質と結合させた際の STD - NMR 測定結果 (下) を示す。左上に、このクリプタンド分子の構造および疎水性アミノ酸の配置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の第 1 の側面は、H s p 9 0 タンパク質に結合することができる分子を提供する。H s p 9 0 は、当業者に知られているように、細胞においてタンパク質の品質管理を行ういわゆる分子シャペロンとして機能する、進化的に保存されたタンパク質である。H s p 9 0 は、タンパク質のホメオスタシス、細胞シグナル伝達、ストレス応答等の様々な生体機能において重要な役割を果たす。H s p 9 0 はまた、癌の病理に関与することが知られており、薬剤療法における重要なターゲットであると考えられている (J. Med. Chem., 2010, 53, 3-17 ; Nat. Rev. Cancer, 2010, 10, 537-549)。従って、H s p 9 0 に結合する分子は、H s p 9 0 結合剤の成分として、例えば医薬成分として、あるいは結合に基づいた阻害、検出、精製等を行うための研究ツール等として有用となり得る。

【0012】

本発明者らは先に、T 7 フェージの g p 1 0 タンパク質の C 末端に融合されたシステイン含有ペプチドに選択的に化合物をチオエーテル結合させる方法 (10BASE₀-T) を開発した (特許文献 1、非特許文献 1)。

【0013】

本発明において、発明者らは、この 10BASE₀-T 法を利用して、ランダムペプチド (すなわち、2 つのシステイン以外はランダムなアミノ酸を含むペプチド) にクラウンエーテルを連結させた構造を有するクリプタンド分子のライブラリーを構築し、H s p 9 0 に結合する分子のスクリーニングを行ったところ、強い親和性をもって H s p 9 0 に結合するクリプタンド分子を同定し取得することに成功した。

【0014】

本明細書における「クリプタンド」という用語は、一般的に、3 つ以上の弧が結合したかたちをとるクラウンエーテル様環状分子を包含する。本発明の一実施態様による分子は、クラウンエーテルの環を二分するようにしてペプチド性の弧が結合して、結果として 3 つの弧を含む環状分子となっているため、クリプタンドである。

【0015】

本明細書において「クラウンエーテル」という場合、エーテルの酸素の代わりに窒素が配置されたアザクラウンエーテルも包含される。事実、本発明の実施態様のクリプタンドを構成するのは、クラウンの周上の第 1 の酸素原子と、クラウンの周上で第 1 の酸素原子から最も離れた (すなわち、第 1 の酸素原子と相対する) 第 2 の酸素原子とがそれぞれ窒素原子に置き換わったアザクラウンエーテル (ジアザクラウンエーテル)、または、クラウンの周上のその他の酸素も窒素になっているアザクラウンエーテルである。クラウンの周上で相対するこれら 2 つの窒素原子が、 $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 基等を含むリンカー (例えば $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 等) を介して、上記ペプチドの 2 つのシステインの側鎖硫黄原子にそれぞれ連結される (例えば下記式 (I) ~ (V) 参照)。

【0016】

上記分子は、抗体に匹敵するほどの高い親和性によって H s p 9 0 タンパク質に結合し得ることが見出された。これは、先行技術のクラウン類縁体 (非特許文献 1) をはるかに上回る強い結合力である。

【0017】

10

20

30

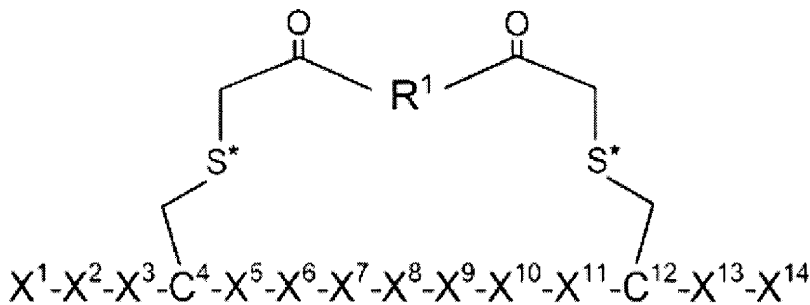
40

50

本発明の一実施態様による分子は、下記一般式 (I) で表される構造に属する。

【化 8】

(I)



10

この式中、 $X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を含む) は、ペプチド結合で連結されたアミノ酸を表し、 C^4 および C^{12} はそれぞれシステインを表し、 S^* は C^4 および C^{12} のシステインの側鎖に由来する硫黄原子を表し、 R^1 はクラウンエーテル構造を含む基を表す。上記ペプチド結合で連結された複数のアミノ酸からなる部分、すなわちペプチドの部分、 X^1 が N 末端側、 X^{14} が C 末端側である。

【0018】

本発明の実施態様による分子の物理化学的解析により、クリプタンド中のペプチド部分は Hsp90 との結合において主要な役割を果たすとみられる疎水性アミノ酸の配置を提供し、またクラウンエーテル部分は、水溶性向上に貢献し水素結合に寄与することに加えて、分子全体に適度な剛直性を与え、これらの特徴の結果として上述した強い結合力が得られることが示唆された。

20

【0019】

すなわち、本発明の一実施態様による分子は、上記一般式 (I) で表される構造を含み、式中、

X^1 は任意のアミノ酸であり、

X^2 は疎水性アミノ酸であり、

X^3 は疎水性アミノ酸であり、

X^5 は疎水性アミノ酸であり、

X^6 は任意のアミノ酸であり、

X^7 は任意のアミノ酸であり、

X^8 は疎水性アミノ酸であり、

X^9 は疎水性アミノ酸であり、

X^{10} は任意のアミノ酸であり、

X^{11} は疎水性アミノ酸であり、

X^{13} は任意のアミノ酸であり、

X^{14} は任意のアミノ酸であるか、または X^{14} は存在せずに X^{13} が末端アミノ酸である。

30

40

【0020】

上記 $X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を除く) は、システインではないことが好ましい。

【0021】

上記疎水性アミノ酸は、好ましくは、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択され、より好ましくは、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、およびフェニルアラニンからなる群から選択され、さらに好ましくは、ロイシン、イソロイシン、バリン、およびトリプトファンからなる群から選択される。これらの疎水性アミノ酸は、ペプチド間の疎水性結合に関与するものであり、進化の過程でこれらの疎水性アミノ酸がこれらのうちの別の疎水性ア

50

ミノ酸にしばしば置き換わることは当業者に知られている。すなわち、これらの疎水性アミノ酸は一定の互換性を有することが理解される。

【0022】

上記一般式(I)中、 X^2 はトリプトファン、 X^3 はバリン、 X^5 はロイシン、 X^8 はトリプトファン、 X^9 はロイシン、 X^{11} はイソロイシンであることが特に好ましい。

【0023】

一般式(I)中、 X^7 は任意のアミノ酸であるが、プロリンであることが好ましい。

【0024】

一般式(I)中、 X^1 、 X^6 、 X^{10} 、および X^{13} は任意のアミノ酸であるが、それぞれ親水性アミノ酸であることが好ましい。これら親水性アミノ酸の存在は、クラウンエーテル部分の酸素原子または窒素原子により提供される水溶性および/または水素結合をさらに補完すると考えられるからである。

【0025】

上記親水性アミノ酸は、好ましくは、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群から選択され、より好ましくは、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、およびヒスチジンからなる群から選択され、さらに好ましくは、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、およびリジンからなる群から選択される。

【0026】

一般式(I)中、 X^1 はグルタミンまたはアスパラギン、 X^6 はグルタミンまたはアスパラギン、 X^{10} はセリンまたはトレオニン、 X^{13} はアルギニンまたはリジンであることがより好ましい。 X^1 はグルタミン、 X^6 はアスパラギン、 X^{10} はセリン、 X^{13} はアルギニンであることが特に好ましい。

【0027】

本発明の実施態様による分子において、ペプチド鎖部分は、QWVCLNPWLSICRAというアミノ酸配列を有することが特に好ましい。これらのアルファベットは、当業者が通常用いる一文字略記法によりアミノ酸を表したものである。

【0028】

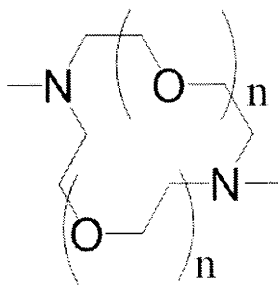
上記一般式(I)において R^1 として示される部分は、アザクラウンエーテル構造を含む基であり、このアザクラウンエーテルは、クラウンの周上の1つの窒素と、クラウンの周上の相対する位置にあるもう1つの窒素とを介して、一般式(I)の構造の残りの部分に連結される。クラウンの周上のこれら2つの窒素以外の非炭素原子は、酸素であってもよいし、窒素であってもよい。クラウンの大きさは、12-クラウン-4から30-クラウン-10までであり得、18-クラウン-6が特に好ましい。

【0029】

好ましくは、 R^1 は、下記式(II)~(V)のいずれかで表される構造を有する。

【化9】

(II)



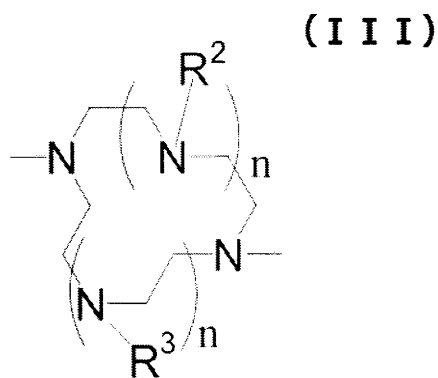
10

20

30

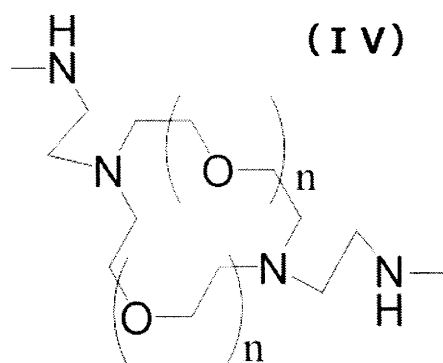
40

【化 1 0】



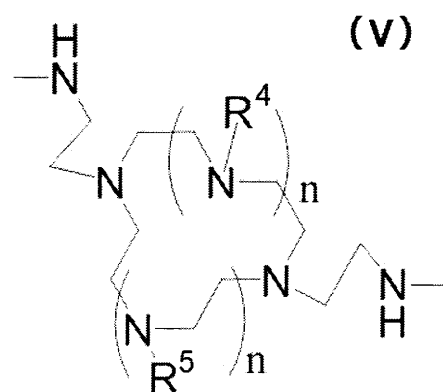
10

【化 1 1】



20

【化 1 2】



30

【0030】

式 (I I) ~ (V) の各々において、左右両端に示されている窒素原子は、上記一般式 (I) に示されているカルボニル炭素に共有結合している。

40

【0031】

式 (I I) ~ (V) において、 n は 1 ~ 4 の整数であり、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、水素または炭素数 12 以下の炭化水素基もしくは炭素数 6 以下の炭化水素基であり得る。 $R^2 \sim R^5$ が炭化水素基である場合の例としては、置換または非置換の直鎖状、分岐鎖状、もしくは環状のアルキル基もしくはアリール基またはこれらの複合基が挙げられ、より具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、*sec*-ブチル、シクロヘキシル、フェニル等が挙げられ、メチルが特に好ましい。

【0032】

上記一般式 (I) において、 R^1 基は、上記式 (I I) で表される基であることが好ま

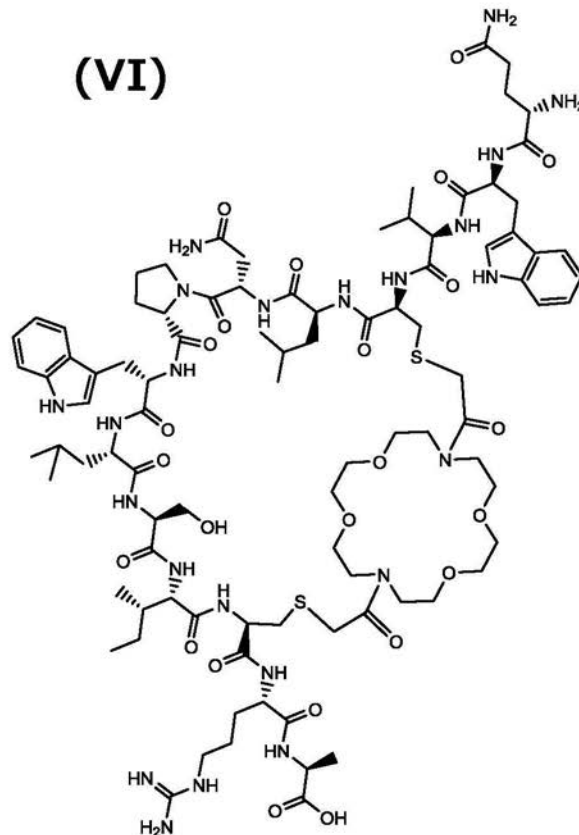
50

しい。式 (I I) ~ (V) のそれぞれにおいて、 $n = 2$ であることが好ましい。

【 0 0 3 3 】

本発明の分子の好ましい一例は、下記式 (V I) によって表される構造を有するものである。

【 化 1 3 】



10

20

30

【 0 0 3 4 】

一般式 (I) で表される化合物が、より大きな分子の一部をなす場合もある。例えば、ペプチド部分は、N末端側および/またはC末端側においてさらなるアミノ酸と連結してもよい。特に、一般式 (I) に示されるペプチドのN末端は、T7ファージのgp10タンパク質のC末端に融合している場合もある。すなわち、本発明の一実施態様による分子は、一般式 (I) で表される構造およびgp10ポリペプチド部分からなるものであり得る。本発明の実施態様による分子は、gp10の代わりに、あるいはgp10に加えて、検出用/精製用タグその他のオリゴペプチドまたはポリペプチドを含んでいてもよい。

【 0 0 3 5 】

クラウンエーテルおよびクリプタンドは、その環の中に金属イオンを捕える性質を有することが知られる。本発明の実施態様によるクリプタンド分子は、金属イオンと混合することにより、環中にその金属イオンを1つ取り込んだ錯体の形態で提供され得る。この場合において好ましい金属イオンの例としては、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、および Zn^{2+} が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 6 】

本発明の実施態様によるクリプタンド分子は、下記において詳しく説明するように、T7ファージの提示ペプチドをクラウンエーテルで修飾する工程を経て取得することができる。あるいは、ペプチド部分を合成し、または細菌細胞や真核生物細胞に発現させて精製し、クラウンエーテル部分を連結させることによって取得することもできる。これらの実

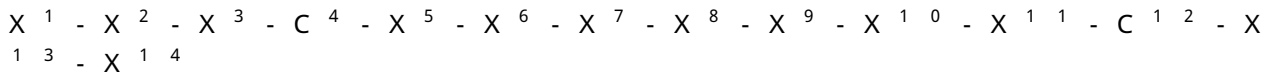
40

50

験手法そのものは当業者の通常の技量の範囲内である。

【0037】

本発明の別の側面では、



で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを含有する、hsp90結合剤製造用の組成物が提供される。この組成物中のこのペプチドは、 C^4 および C^{12} のシステインの側鎖を介して、アザクラウンエーテルのクラウン周上で相対する2つの窒素原子に連結されて、hsp90結合剤を生じさせるという用途を有する。 $X^1 \sim X^{14}$ の各アミノ酸の種類は、上記において特定のクリプタンド分子との関連で説明したものと同様である。

10

【0038】

すなわち、本発明の実施態様による上記のペプチド含有組成物において、 X^1 は任意のアミノ酸であり、 X^2 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、 X^3 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、 X^5 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、 X^6 は任意のアミノ酸であり、 X^7 は任意のアミノ酸であり、 X^8 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、 X^9 は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、 X^{10} は任意のアミノ酸であり、 X^{11} は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンからなる群から選択される疎水性アミノ酸であり、 X^{13} は任意のアミノ酸であり、 X^{14} は任意のアミノ酸であるか、または X^{14} は存在しない。 $X^1 \sim X^{14}$ (C^4 および C^{12} を除く) は、システインではないことが好ましい。

20

【0039】

本発明の実施態様によるペプチド含有組成物において、 X^2 はトリプトファンであり、 X^3 はバリンであり、 X^5 はロイシンであり、 X^8 はトリプトファンであり、 X^9 はロイシンであり、 X^{11} はイソロイシンであることが好ましい。また、 X^7 はプロリンであることが好ましい。

30

【0040】

本発明の実施態様によるペプチド含有組成物において、 X^1 、 X^6 、 X^{10} 、および X^{13} は、それぞれ独立して、グルタミン、アスパラギン、セリン、トレオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、チロシン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群から選択される親水性アミノ酸であることが好ましい。より好ましくは、 X^1 はグルタミンまたはアスパラギンであり、 X^6 はグルタミンまたはアスパラギンであり、 X^{10} はセリンまたはトレオニンであり、 X^{13} はアルギニンまたはリジンである。 X^1 はグルタミン、 X^6 はアスパラギン、 X^{10} はセリン、 X^{13} はアルギニンであることが特に好ましい。

40

【0041】

本発明の実施態様によるペプチド含有組成物中のペプチドは、

QWVCLNPWLSICRA

というアミノ酸配列を有することが最も好ましい。

【0042】

上記組成物中には、ペプチド以外の成分が含有され得るが、そのような成分の例としては、水、還元剤(特に、10BASE_d-Tにおいて使用するもの)、緩衝剤、塩(例えば塩化ナトリウムや塩化カリウム等)、防腐剤、およびこれらのいずれかの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

50

本発明の別の側面は、上述した本発明の実施態様によるクリプタン分子のペプチド部分が融合した gp10 タンパク質を含有する、T7ファージに関する。本明細書において「融合」とは、2つまたはそれ以上のペプチドがペプチド結合により連結されて1つのペプチドを形成することを意味する。本明細書における「ペプチド」はオリゴペプチドおよびポリペプチドを包含する。

【0044】

gp10のC末端と式(I)の分子のペプチド部分のN末端とが、直接ペプチド結合することにより融合していてもよいし、あるいは、リンカーアミノ酸を介して融合していてもよい。リンカーアミノ酸とは、gp10の配列と式(I)に示されるペプチドの配列との間に挿入される1つ以上のアミノ酸である。リンカーアミノ酸は、当業者に知られる切断酵素による切断を可能にするための酵素認識配列や、検出もしくは精製の用に供するタグ配列などを含み得る。切断酵素による切断を行えば、修飾されたペプチド部分が切り出されるため、本発明の第1の側面による、gp10部分を含まないクリプタン分子を得ることができる。

10

【0045】

本発明の実施態様によるT7ファージは、通常のT7ファージと同様、宿主細菌細胞に感染して増殖することができる。ただし、増殖の際に生じるのは、クラウンエーテル修飾が除去された裸(未修飾)のペプチド鎖を有するファージである。このように増殖されたファージに対して、10BASE_J-T法を使用してクラウンエーテル構造をあらためて連結させることにより、増殖前のクラウンエーテル修飾T7ファージと同一構造のものを多量に得ることができる。

20

【0046】

クラウンエーテル部分により提供される利点(あるいは、クリプタン構造であることに基づく利点)を生かしながら、ペプチド部分のアミノ酸配列を変動することにより、Hsp90以外の標的タンパク質その他の標的分子に結合する新規分子を探索し取得し得ることが理解される。また、異なる結合力を示すさらなるHsp90結合性分子も探索し得る。従って、本発明の別の側面は、標的分子に結合することができるクリプタン分子をスクリーニングする方法に関する。

【0047】

本発明の一実施態様によるスクリーニング方法では、2つのシステインが1個以上のランダムアミノ酸で隔てられた配列を含むペプチドが、gp10タンパク質のC末端に融合されるように遺伝子操作された、T7ファージのライブラリーを利用する。gp10タンパク質のC末端に融合されたこのペプチドは、T7ファージ粒子の外表面に提示されるため(特許文献1参照)、本明細書において「提示ランダムペプチド」と呼ぶ。本明細書において、「ライブラリー」とは、構造が異なる多数のファージまたは分子の群を意味する。ライブラリーの中から特定の性質(例えば標的タンパク質への結合能)を有するファージまたは分子を選択する過程を「スクリーニング」という。

30

【0048】

ランダムアミノ酸とは、当業者に理解されるように、20種類のアミノ酸のうち無作為に選ばれるいずれかを意味する。同じく当業者に理解されるように、提示ランダムペプチドにおけるランダムアミノ酸は、アミノ酸をコードするDNAの配列をランダム化してそのランダム化DNA配列をgp10遺伝子の一部としてT7ファージに組み入れることにより生じさせることができる。1つ1つのT7ファージ個体はそれぞれ1種類のgp10遺伝子DNA配列を取り込み1種類の提示ペプチド配列を発現するが、T7ファージ群全体としてみるとランダムな提示ペプチド配列のライブラリーが得られることとなる。T7ファージの遺伝子の配列を改変する遺伝子操作法、および改変された遺伝子を組み入れたT7ファージを生成する方法は、当業者に知られている。

40

【0049】

2つのシステインの間に挿入されるランダムアミノ酸の数は、例えば3~12個、あるいは4~10個、好ましくは5~9個であり、7個が特に好ましい。2つのシステインの

50

外側、すなわち、N末端側のシステインのさらにN末端側、もしくはC末端側のシステインのさらにC末端側、またはその両方に、さらにランダムアミノ酸を加えてもよい。これら外側のアミノ酸の数は、N末端、C末端それぞれについて例えば0～12個であり得、1～10個が好ましく、2～5個がより好ましく、3個がより好ましい。N末端側とC末端側のランダムアミノ酸の数が異なってもよい。一例として、提示ランダムペプチドは、 $X^1 - X^2 - X^3 - C^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - C^{12} - X^{13} - X^{14}$ というアミノ酸配列を有することが好ましく、ここで、 $X^1 \sim X^3$ 、 $X^5 \sim X^{11}$ 、 $X^{13} \sim X^{14}$ はそれぞれランダムアミノ酸であり、 C^4 および C^{12} はそれぞれシステインである、

【0050】

10

提示ランダムペプチドを提示したT7ファージのライブラリーとクラウンエーテルリンカー化合物とを反応させて、提示ランダムペプチドをクラウンエーテルで修飾することにより、クリプタンド構造が提示されたT7ファージのライブラリーを得ることができる。この反応は、例えば10BASE₉-T法を使用して、提示ランダムペプチドを提示したT7ファージのライブラリーとクラウンエーテルリンカー化合物とを、TCEP等の還元剤の存在下で混合することにより達成することができる（特許文献1、非特許文献1）。このようにして得られたクリプタンドライブラリーは、任意の標的分子に結合するクリプタンド分子のスクリーニングのために有用である。

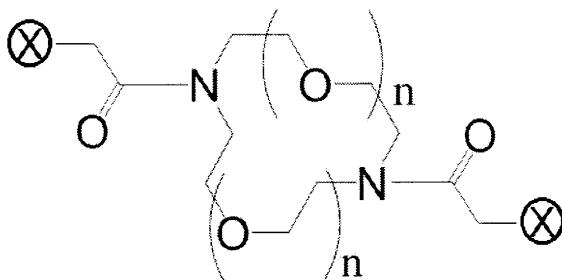
【0051】

20

クラウンエーテルリンカー化合物としては、アザクラウンエーテルのクラウン周上で相対する2つの窒素原子に、ハロアセチル基またはハロアセトアミド基が連結された構造を有するジハロゲン化合物を好ましく使用することができる。クラウンの周上のこれら2つの窒素以外の非炭素原子は、酸素であってもよいし、窒素であってもよい。クラウンの大きさは、12-クラウン-4から30-クラウン-10までであり得、18-クラウン-6が特に好ましい。より具体的には、下記の式(VII)～(X)のいずれかで表される構造を有するジハロゲン化合物を使用することができ、

【化14】

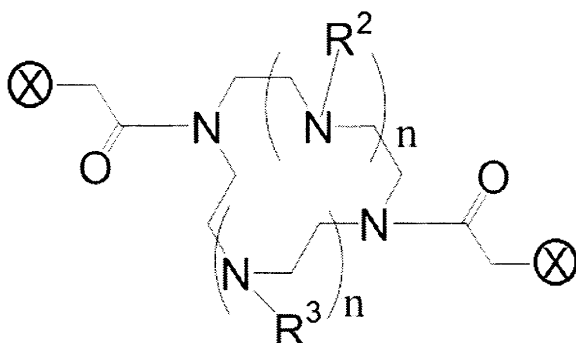
(VII)



30

【化15】

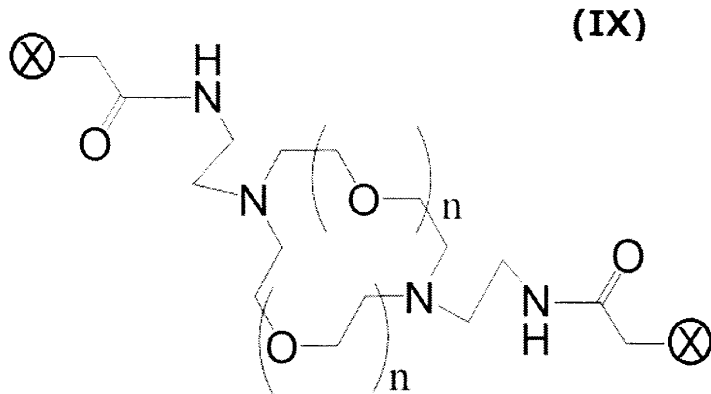
(VIII)



40

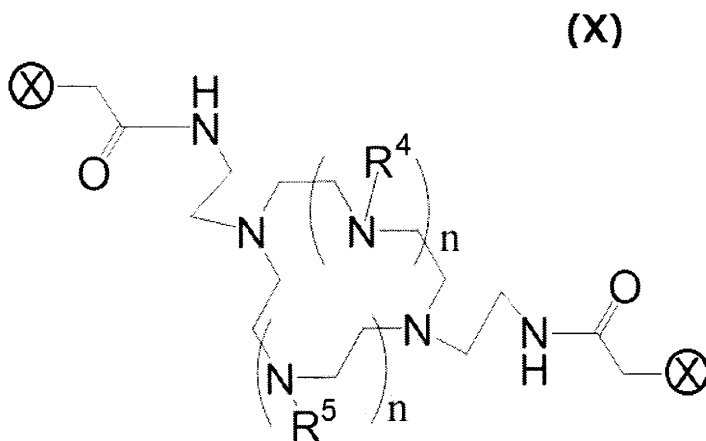
50

【化 1 6】



10

【化 1 7】



20

各式中、 n は1～4の整数であり、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、水素または炭素数12以下の炭化水素基もしくは炭素数6以下の炭化水素基であり、丸で囲まれた X はハロゲンを示す。 $R^2 \sim R^5$ が炭化水素基である場合の例としては、置換または非置換の直鎖状、分岐鎖状、もしくは環状のアルキル基もしくはアリール基またはこれらの複合基が挙げられ、より具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、*sec*-ブチル、シクロヘキシル、フェニル等が挙げられる。ハロゲンは、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、または At であり得、 Cl 、 Br または I であることが好ましく、 Br であることが特に好ましい。前記ペプチドとの反応後には、このハロゲンが、ペプチドのシステインの側鎖に由来する硫黄原子に置き換わることとなる。これらのリンカー化合物は、容易に入手できる材料化合物を使用して、当業者に知られる有機化学的手法により合成することができる。

30

【0052】

上記反応で使用され得る還元剤の例としては、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)、ジチオスレイトール(DTT)、および β -メルカプトエタノール等が挙げられるが、TCEPが特に好ましい。例えばTCEPのようなトリアルキルホスフィン、ハロ酢酸やそのアミド誘導体と反応してしまうことが報告されている。このため、一般的には、システイン残基の還元およびアルキル化は、二段階の独立した反応により行われる。しかしながら、10BASE₉-T法では、TCEPによる還元の後には精製を行うことなく、一段階で、すなわち、「ワンポット」で、還元およびアルキル化の反応ができる(特許文献1参照)。

40

【0053】

上記ワンポット反応における還元剤の濃度は、当業者が適宜決定することができ、特に限定されないが、好ましくは10～2000 μ M、より好ましくは100～1000 μ M

50

、さらに好ましくは200～800 μM、最も好ましくは400～600 μMである。

【0054】

なお、ここでは、クリプタンド構造を含んだ修飾T7ファージのライブラリーを作成するための反応について説明したが、本発明の実施態様による特定のクリプタンド分子または特定のクラウンエーテル修飾T7ファージを取得するために同様の反応を使用することもできる。その場合、提示ランダムペプチドの代わりに特定のアミノ酸配列の提示ペプチドを使用すればよい。

【0055】

上記のようにして得られる、クリプタンド構造を含んだ修飾T7ファージのライブラリーを、標的分子と混合し、溶液中で両者を接触させる。その結果、ライブラリーに含まれるファージのうち、標的分子に対する親和性を有するクリプタンド構造を提示しているファージが、標的分子に選択的に結合する。これらの混合・結合およびそれに続く洗浄の具体的手順は、当業者が標準的技術に基づいて適宜設計することができ、特許文献1等にも例示されている。

10

【0056】

修飾T7ファージは、金属イオンを添加することにより、クリプタンドの環中にその金属イオンを1つ取り込んだ錯体の状態として標的分子と混合してもよい。この場合において好ましい金属イオンの例としては、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、および Zn^{2+} が挙げられるが、これらに限定されない。

【0057】

「標的分子」とは、スクリーニングにより得られる分子の結合標的となることが意図される分子を意味する。標的分子は、ユーザーによって任意に選ばれる分子であり、典型的にはタンパク質（標的タンパク質）であるが、核酸、糖、脂質、その他のマクロ分子、あるいはそれらの複合体等でもあり得る。標的タンパク質は、全長タンパク質であってもよいし、タンパク質の断片であってもよい。一例において、標的タンパク質は、Hsp90のN末端ドメイン断片である。標的タンパク質はまた、他のペプチド（オリゴペプチドおよびポリペプチドを含む）のタグに融合された形態でスクリーニングに用いられてもよい。そのようなペプチドタグの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質（MBP）、Hisタグ、FLAGタグ等が挙げられるが、これらに限定されない。標的タンパク質はまた、ビオチン化などの修飾がなされたものであってもよい。これらの付随的構造は、標的タンパク質の精製やカラムにおける結合・溶出の操作を促進し得る。

20

30

【0058】

次に、標的分子の種類に応じた適切な手段を用いて、標的分子およびそれに結合した修飾T7ファージ群を、標的分子に結合していない修飾T7ファージ群から分離する。例えば、標的タンパク質がGST融合タンパク質の形態のものであるならば、グルタチオンに対する親和性クロマトグラフィーにより、標的タンパク質およびそれに結合した修飾T7ファージ群を分離・回収し、未結合の修飾T7ファージ群を除去することができる。ファージを標的分子と混合し、結合したファージを未結合のファージから分離して回収することを含むこれら一連の操作を、「ポジティブセレクション」という。ポジティブセレクション後に得られたファージ群は、もとのライブラリーに含まれていた全ファージ群の一部（亜群）である。

40

【0059】

なお、標的タンパク質がタグに融合した形態である場合には、ポジティブセレクションに先立って、タグ部分そのものに結合するファージを除去しておく「ネガティブセレクション」を行うことが好ましい。ネガティブセレクションにおいては、ポジティブセレクションとは逆に、結合した画分を捨て、結合しなかった画分を回収して以降の実験に使用する。同様に、結合・洗浄の操作の際にビーズ等の担体を使用する場合には、それら担体に結合するファージを除去するためのネガティブセレクションを行うことが好ましい。

【0060】

50

ポジティブセレクションによって分離されたファージ群は、そのまま宿主細菌に感染させることができる。例えば、ビーズへの結合を利用して標的タンパク質およびそれに結合したファージをまとめて分離した場合は、これらのものの複合体を含むビーズをそのまま感染反応に用いることができる。もちろん、ビーズからの分離あるいは標的タンパク質からの分離が可能であれば、分離したファージ単体を感染に用いてもよい。T7ファージが感染可能なあらゆる宿主細菌を使用し得るが、通常は大腸菌（例えばBLT5403株）が宿主細菌として使用される。感染方法としては当業者に知られる標準的な方法を使用することができる。

【0061】

当業者には理解されるように、宿主細菌への感染により、標的分子に結合していたクリプタンド構造に対応するペプチド配列を提示するT7ファージを増殖させることができる。しかしながら、上述したように、増殖により得られた新たなファージ粒子は、提示ペプチドにおいてクラウンエーテル修飾を有していない。そこで、増殖されたT7ファージを、上記においてファージライブラリーに対して行ったのと同様にしてクラウンエーテルリンカー化合物と反応させ（10BASE_q-T反応）、クリプタンド構造を含んだ修飾T7ファージ群を再取得する。このようにして再取得された修飾T7ファージ群は、もとの修飾ファージライブラリーと比較して、標的分子結合能を有するファージが濃縮されている。

10

【0062】

ポジティブセレクションを繰り返せば繰り返すほど、標的分子に対する結合能を有するファージがより濃縮されていくことが理解される。従って、本スクリーニング方法では、上記において再取得された修飾T7ファージ群を、標的分子と再び混合し、標的分子に結合する修飾T7ファージを再び分離する。すなわち、2度目のポジティブセレクションを行う。このようにして、標的分子に結合することができるクリプタンド分子を含むファージを取得し得る。

20

【0063】

その後、分離されたファージの感染・増殖、クラウンエーテルリンカー化合物による修飾、標的分子への結合、結合したファージの分離というサイクルを、少なくともさらに1回繰り返すことが好ましく（合計3ラウンド）、少なくとも4回繰り返すことがより好ましい（合計6ラウンド）。これらの反復により、標的分子に対する結合能を有するファージが著しく濃縮され、より高い結合力を有する分子が含まれる率が高くなる。所望の分子を単離するために何ラウンドの繰り返しが必要であるかは、標的分子の種類によって異なり得る。

30

【0064】

このように、標的に結合するファージのポジティブセレクションと増殖とを繰り返して、結合能を有するファージ（ペプチド）を濃縮していく手法は一般に「バイオパニング」とも呼ばれる。

【0065】

最後のポジティブセレクション後に、分離されたファージを感染・増殖させ、任意の数のクローンを単離して、結合能力の確認を行うことができる。結合能力の確認のためには、ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）等、当業者に知られた手法を適宜使用すればよい。また、これらクローンにおけるgp10遺伝子のコーディング領域末端部分のDNA配列を決定することにより、結合能力を提供したクリプタンドのペプチド部分のアミノ酸配列を決定することができる。

40

【実施例】

【0066】

以下、実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0067】

[概要]

ランダム化されたペプチド配列 $X_3CX_7CX_3$ （ここで、 X_3 は3つのランダムな

50

アミノ酸を表し、 X_7 は7つのランダムなアミノ酸を表し、Cはシステインを表す)を提示するT7ファージのライブラリーに対して、10BASE₀-T法を用いてクラウンエーテル修飾を行い、クリプタンド構造を有するファージのライブラリー(クリプタンドライブラリー)を作製した。

【0068】

上記の修飾したファージを用いて、標的タンパク質GST-Hsp90NTD(Hsp90のN末端ドメイン(NTD)をGSTタグに融合させたもの)に対するポジティブセクションおよびGSTに対するネガティブセクションを行い、Hsp90NTD(PDB ID: 1YER)に対する結合を持ったクリプタンドを有するT7ファージの濃縮を6回行った。

10

【0069】

ポジティブセクション(0~6ラウンド目)にて得られたファージを増殖させて、その懸濁液に対し10BASE₀-Tによるクラウンエーテル修飾反応を行い、その後ELISAにてGST-Hsp90NTDに対する結合能の評価を行ったところ、無修飾ペプチド(mock)およびクリプタンド(クラウンエーテル修飾ペプチド)の双方から、GST-Hsp90NTDに結合するペプチドの存在が観察された。

【0070】

クリプタンドライブラリー中からGST-Hsp90NTDに結合する新規の分子を単離して獲得するために、ポジティブセクションの6ラウンド目終了後に無作為に選出したクローン22個に対し、それぞれ10BASE₀-Tにて無修飾ペプチドおよびクリプタンド(クラウンエーテル修飾ペプチド)を作製し、再度ELISAにてGST-Hsp90NTDに対する結合能の評価を行った。

20

【0071】

その結果、22個のクローンの中から、GST-Hsp90NTDに強く結合するクリプタンド構造を持つクローンが1つ見出された。このクリプタンド構造のペプチド部分のアミノ酸配列を、DNAシーケンス解析を介して決定し、既知のHsp90結合ペプチドの配列と比較したが、両者の配列に共通性は見られなかった。

【0072】

[T7ファージライブラリーの作製]

T7Select10-3bシステム(メルクミリポア社)を用い、マニュアルに従いながら、gp10のC末端に提示ペプチドが融合されたT7ファージライブラリーを作製した。その際、検出および解析を容易にするために、gp10と提示ペプチドの間には、エンテロキナーゼ切断部位の配列(DDDDK)を有するFLAGタグを挿入した。提示ペプチドは、2つのシステイン残基およびそれらを囲むランダムな配列を有するようにデザインした。手短に述べると、まず、以下の塩基配列: 5'-GGTGGAGGTGGCGACTACAAGGATGACGATGACAAGGGATCA(NNK)₃TGC(NNK)₇TGT(NNK)₃TGAAAGCTTGA-3'(配列番号1)を有するオリゴヌクレオチドを合成した(Nはランダム化したヌクレオチド(すなわち「A、C、G、またはT」)を意味し、Kは「GまたはT」を意味する)。制限酵素EcoRIおよびHindIIIの認識配列をそれぞれ含む適切な2つのプライマーを用いたPCRによって、上記オリゴヌクレオチドから二本鎖DNAを増幅した。PCR産物を精製し、EcoRIおよびHindIIIで切断した。DNA断片をさらに精製し、T7Select10-3bベクターにライゲーションした。このライゲーション産物およびT7パッケージングエキストラクトを用いてパッケージングを行った後、大腸菌BLT5403細胞に感染させた。無作為に選んだクローンのDNA配列をチェックすることにより、T7ライブラリーの品質を確認した。

30

40

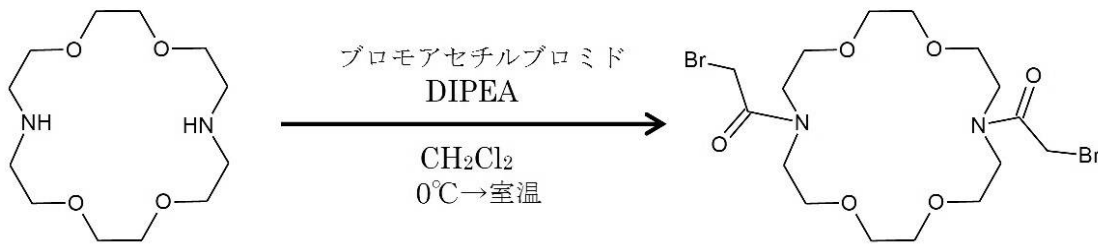
【0073】

[クラウンエーテル誘導体の有機合成]

下記のスキーム1に従って、市販の化合物からクリプタンド前駆体としてのアザクラウンエーテル誘導体を合成した。

【化18】

スキーム1：アザクラウンエーテル誘導体の合成



【0074】

10

0.30 g (1.1 mmol) の1,4,10,13-テトラオキサ-7,16-ジアザシクロオクタデカンを2.0 mLの CH_2Cl_2 中に溶解し、0℃氷水中にて0.60 mLのN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)を加え、15分間攪拌した。その後、シリンジを用いて0.30 mL(2.3 mmol)のブロモアセチルブロミドを徐々に滴下したのち混合物を徐々に室温に戻し、そのまま5.5時間攪拌した。TLC(MeOH)にて反応溶液を確認したところ、原料のRf値0.4に対し、生成物はRf値0.7を示した。原料が消失したことが確認されたため、反応溶液を減圧濃縮した。得られた粗生成物は、逆相中圧液体クロマトグラフィー(reverse-phase middle pressure liquid chromatography)(山善ODSカラム 26×300 mm、流速20 mL/分、40分間にわたる純水中5~100% MeOH の勾配、 $\lambda = 260$ nm)にて精製を行い、目的のジプロモ体を収率30%にて得た(0.15 g)。図1参照。このジプロモ体は、クラウンエーテルリンカー化合物として以下の実験に用いることができる。

20

【0075】

[クラウンエーテル誘導体によるT7ファージの化学修飾(クリプタンド化)]

(1) モデルファージに対するクラウンエーテル修飾

ライブラリーを用いたセレクション(分子進化)実験に先立ち、ファージ上の提示ペプチドに対してクラウンエーテルによる修飾化が可能であるか否かを調べた。すなわち、モデルファージ(gp10-FLAGタグ-GSRVSCGGRRDRPGCLSV)に対して10BASE_d-T法を用いてクラウンエーテルによる修飾を行った後、LC-MS/MSによる質量測定を行った。具体的手順を以下に示す。

30

【0076】

(2) 10BASE_d-Tによるクラウンエーテル修飾化の具体的手順

1.5 mL サンプルチューブにファージ量: 2.4×10^{11} pfu分のモデルファージのモノクローン懸濁液を入れる。(1サンプルあたり 1.2×10^{11} pfu分使用する。後にクラウンエーテル修飾用とmock修飾用に二等分するため、あらかじめ2サンプル分のファージを調製した。)

ファージ懸濁液の体積の1/5倍量の20% PEG-6000/2.5M NaClを加える。

ピペティング、ボルテックス

40

遠心分離(4,150 rpm、10分間)

上清除去

1M NaClを180 μL 加える。

超音波処理(5分間)

PBS(リン酸緩衝生理食塩水)を520 μL 加える。

超音波処理(1分間)

卓上遠心分離(室温、12,000 rpm、5分間)

新たな1.5 mL サンプルチューブに、上清690 μL を入れる。

以下、4℃の氷水を使って、温度を上げないようにして実験を行った。

10 mM TCEP-NaOH(pH 7)を40 μL 加える。

50

365 μ L ずつ 2 等分する。一方はクラウンエーテル修飾用 (イ) であり、他方は T M R I A (ハロアセトアミド類の蛍光物質であるテトラメチルローダミン - 5 - ヨードアセトアミド) 修飾用 (ロ) である。

各ファージ懸濁液 365 μ L に対し、

(イ) 10 mM のクラウンエーテルリンカー化合物水溶液 6.5 μ L を加える (最終濃度: 174 μ M)。

(ロ) 1 mM の T M R I A を 65 μ L 加える (最終濃度: 151 μ M)。

ロータリーミキサー (日伸理化) で攪拌 (4、3 時間)

100 mM のベータ・メルカプトエタノールを 22 μ L 加える。

ロータリーミキサー (日伸理化) で攪拌 (4、1 時間)

ファージ懸濁液の体積の 1/5 倍量の 20% P E G - 6 0 0 0 / 2 . 5 M N a C l を加える。

ピペティング、ボルテックス

遠心分離 (4、15,000 rpm、15 分間)

上清除去

40 μ L の標準的な 1 x S D S サンプルバッファーを加える。

超音波処理 (5 分間)

95 で保温 (5 分間)

電気泳動用の (イ) クラウンエーテル修飾ファージライブラリー溶液、および (ロ) T M R I A 修飾ファージライブラリー溶液が完成

完成した溶液を全量用いて S D S - P A G E (15% アクリルアミドゲル、25 mA、60 分間) を行う。

ゲルの C B B (クーマシーブリリアントブルー) 染色 (30 分間)

ゲルの洗浄 (10 分間)

バイオ・ラッド社製 ChemiDoc XRS PLUS を用いたゲルの撮影

【0077】

(3) 修飾された目的物の溶出

目的物であると考えられる 45 k D a 付近のバンドをゲルから切り出し、ゲル片を約 1 m m 四方の大きさに切り分けた後、1.5 mL サンプルチューブに取り分けた。

100 μ L の脱色液を入れて振とう (37、800 rpm、10 分間) x 2 回
脱色液を除去

30 μ L の還元液を加える (60、10 分間)

還元液を除去

30 μ L の修飾液を加える (室温、1 時間、暗所)

修飾液を除去

200 μ L の脱色液を入れて振とう (37、800 rpm、10 分間)

脱色液を除去

50 μ L のアセトニトリルを加える (室温、5 分間)

アセトニトリルを除去

エバポレーターを用いてゲル片を乾燥 (10 分間)

10 μ L の活性化トリプシン液を加える (室温、15 分間)

25 μ L の消化液を加える (37、12 時間)

消化液混合物 (A) を新しい 1.5 mL チューブに移し、その (A) に 5 μ L の 1% ギ酸を加える

残ったゲル片 (B) にも 20 μ L の 1% ギ酸を加え、超音波処理する (10 分間)

(B) の溶液画分だけを (A) に移し取る

(A)、(B) の混合溶液が酸性であることを確認

10

20

30

40

50

LC - MS / MS による解析

【 0 0 7 8 】

上記溶出に用いた試薬を表 1 にまとめた。

【表 1】

ゲルからの溶出に用いた試薬の組成

作製試薬	組成	使用量
脱色液	アセトニトリル (ACN)	5 mL
	超純水	5 mL
	NH ₄ HCO ₃	20 mg
消化液	超純水	5 mL
	NH ₄ HCO ₃	10 mg
還元液	1M DTT	3 μL
	消化液	297 μL
修飾液	ヨードアセトアミド	7 mg
	消化液	350 μL
活性化トリプシン液	0.5 μg / μL トリプシン液	2 μL
	消化液	98 μL

10

20

【 0 0 7 9 】

(4) モデルファージに対するクラウンエーテル修飾化の結果

30

モデルファージ上の提示ペプチドに対してクラウンエーテル修飾を施した試料の、LC - MS / MS による解析結果を図 2 に示す。図 2 に示されているように、クラウンエーテル修飾されたペプチドに相当するフラグメントが検出された。この結果から、モデルファージ上の提示ペプチドに対して 10BASE₀-T 法を用いて行ったクラウンエーテル修飾化が成功していることがわかる。

【 0 0 8 0 】

[10BASE₀-T 反応におけるクラウンエーテル濃度の最適化]

(1) 最適化実験の具体的手順

200 μM のフルオレセインヨードアセトアミド (FL - IA) を用いて 10BASE₀-T を行った場合、ほぼ全ての T7 ファージ提示ペプチドが FL - IA によって化学修飾されていた (> 95%)。これを利用して、10BASE₀-T 反応におけるクラウンエーテルリンカー化合物の最適濃度を決定した。この手法は Tokunaga et al., *Molecules*, 19, 2481-2496 (2014) に記述されており、ここでは、同文献の図 2 に示された手順と同様の実験を行った。なお、上述のものと同じモデルファージを用いた。具体的な手順を以下に示す。

40

【 0 0 8 1 】

1.5 mL サンプルチューブにファージ量 : 1.0 × 10¹² pfu 分のモデルファージのモノクローン懸濁液を入れる。

ファージ懸濁液の体積の 1 / 5 倍量の 20% PEG - 6000 / 2.5 M NaCl を加える。

50

ピペティング、ボルテックス

遠心分離 (4、15, 000 rpm、10分間)

上清除去

180 μ L の 1 M NaCl を加える。

超音波 (5分間)

520 μ L の PBS を加える。

超音波処理 (1分間)

卓上遠心分離 (室温、12, 000 rpm、5分間)

新たな 1.5 mL サンプルチューブに、上清 690 μ L を入れる (以下においてこれをファージ液という)。

10

以下、4 の氷水を使って、温度を上げないようにして実験を行った。

1.5 mL チューブに、下記の組成の混合液を 8 サンプル分調製する。

ファージ液 ... 80 μ L

10 mM TCEP - NaOH ... 5 μ L

10 mM クラウンエーテルリンカー化合物水溶液 ... X μ L

PBS ... 残部

合計 ... 100 μ L

20

クラウンエーテルの濃度を 0 μ M ~ 1 mM の間で変動させるために、X = 0, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 とした。(後に、FL - IA で修飾しない陰性対照が必要になるため、X = 0 μ L のサンプルを 2 つ調製した。)

ロータリーミキサー (日伸理化) で攪拌 (4、3時間)

2 mM の FL - IA 水溶液 / DMSO = 1 : 1 の液を 10 μ L 加える。

ロータリーミキサー (日伸理化) で攪拌 (4、3時間)

5 μ L の 100 mM ベータ・メルカプトエタノールを加える。

ロータリーミキサー (日伸理化) で攪拌 (4、30分間)

ファージ懸濁液の体積の 1 / 5 倍量の 20% PEG - 6000 / 2.5 M NaCl を加える。

30

ピペティング、ボルテックス

遠心分離 (4、15, 000 rpm、15分)

上清除去

40 μ L の 1 x SDS サンプルバッファーを加える

超音波処理 (5分間)

95 で保温 (5分間)

遠心分離 (室温、12, 000 rpm、5分間)

完成した溶液を 15 μ L 用いて SDS - PAGE (10% アクリルアミドゲル、25 mA、60分間)

40

バイオ・ラッド社製 ChemiDoc XRS PLUS および日立ソリューションズ製 FMBIO (登録商標) III を用いたゲルの撮影

【0082】

(2) 最適化実験の結果

上記のように、まず異なる量のクラウンエーテルで修飾し続いて FL - IA で修飾した gp10 融合ペプチドを電気泳動して、FL - IA 由来の蛍光を検出した結果 (ChemiDoc XRS PLUS により撮影したゲル) を図 3 A に示す。また、FL - IA の蛍光強度をグラフ化したものを図 3 B に示す (FMBIO III によりゲルをスキャンした後、定量化した)。

【0083】

図 3 A、B より、クラウンエーテルの濃度を上げるにつれて蛍光強度が落ちている (す

50

なわち、濃度依存的にクラウンエーテル修飾が増加し、後から加えられたFL-IAが修飾できる余地が減少している)ことがわかる。更に、クラウンエーテル濃度を400 μMまで上昇させた場合には蛍光強度がほとんど無くなっている(すなわち、ほとんど全ての提示ペプチドがクラウンエーテルによって修飾されきっている)ことがわかる。以上の結果から、10BASE_q-Tにおけるクラウンエーテルリンカー化合物の最適濃度は(やや余裕を持たせて)500 μMと決定した。後述するスクリーニングにおいては、10BASE_q-T反応の際のクラウンエーテルリンカー化合物の濃度は500 μMとした。

【0084】

[クリプタンド化したT7ファージのライブラリーを用いた、Hsp90結合性クリプタンドのスクリーニング]

上述したT7ファージライブラリーに対して10BASE_q-T法によるクラウンエーテル修飾を行うことで、クリプタンドライブラリーを作製した。このクリプタンドライブラリーを初期ライブラリーとして用いて、GST-Hsp90 NTDに対するポジティブセレクションを経たファージ群の増殖・再修飾を繰り返してバイオニングを行うことにより、標的タンパク質Hsp90に特異的に結合するクリプタンド構造が提示されたファージを順次濃縮し、スクリーニングを行った(なお、GSTおよびグルタチオンビーズに対するネガティブセレクションを行うことによって、これらの部分に結合するファージは事前に排除した)。この例では、合計6ラウンドのポジティブセレクションを行った。最終的にELISAアッセイで結合が確認できたファージクローンのDNA配列を決定することにより、ファージ上の提示ペプチドの配列を解析した。これら一連の手順の概略を図4に示す。

【0085】

[ELISAによる結合能評価の結果]

0~6ラウンド(R0~R6)のポジティブセレクション終了後に感染・増殖させた試料に対し、再度10BASE_q-Tを用いてクラウンエーテル修飾反応を行い(この際、陰性対照として未修飾の試料も用意した)、ELISAにて標的タンパク質GST-Hsp90 NTDまたは対照タンパク質BSA(ウシ血清アルブミン)に対する結合能の評価を行った。このアッセイにおいて結合量を表す発色強度の測定結果を図5に示す。

【0086】

図5によれば、5ラウンド(R5)目から、未修飾のファージ群においてGST-Hsp90 NTDに結合するファージが急激に濃縮されていることがわかる。クラウンエーテル修飾のファージ群の方は6ラウンド(R6)目から顕著に濃縮されているが、未修飾のファージ群と比べると、ポリクロナルでの結合力はより弱い(すなわち、個々のファージではなくファージ群全体としての結合量は、より低い)と見られる。

【0087】

しかしながら、クラウンエーテル修飾のファージ群中には、個々のモノクローンとして強い結合力を持つクリプタンド分子が含まれていることが期待できる。従って、6ラウンド目直後のタイターチェックにて得られたファージブランクの中から、無作為に22個のモノクローンを選んで番号を振り、10BASE_q-Tによる再修飾を行い、個々のクローンについて再度ELISAにて結合能の評価を行った。このELISAで測定される発色強度はモノクローンとしての結合力の強さを表す。測定結果を図6に示す。

【0088】

図6より、クラウンエーテル修飾された18番のモノクローンは、GST-Hsp90 NTDに対して強い結合力を持つことが確認できた。

【0089】

[DNA配列決定を介したペプチド配列の解析]

クラウンエーテル修飾をすることでGST-Hsp90 NTDに結合することが確認された上記18番のモノクローンを用いて、PCRによってgp10遺伝子のDNA増幅を行い、PCR産物を精製した。そして提示ペプチドのDNA配列を決定した。その結果、このクローンの提示ペプチドは下記のアミノ酸配列を有することが明らかになった。

10

20

30

40

50

18番クローンの提示ペプチド配列：

Q W V C L N P W L S I C R A

下線で示したシステインは初期ライブラリーにおいてランダム化されていなかったアミノ酸であり、このシステインの側鎖がクラウンエーテルと連結する。

【0090】

一方、今日までの研究により、H s p 9 0 N T D に結合するペプチドとして下記の配列のものが知られている（非特許文献1参照）。なお、 は任意のアミノ酸を示す。上記同様、下線で示したシステインはランダム化されていないアミノ酸であり、実際にはこれら2つのシステインがジスルフィド結合を形成している。

先行技術のH s p 9 0 結合性ペプチドの配列：

R T C Y C W

【0091】

そして、特許文献1および非特許文献1で記述されたH s p 9 0 N T D 結合性環状分子（非クリプタンド）のペプチド部分の配列は下記のとおりであった。

先行技術のH s p 9 0 結合性環状分子のペプチド部分の配列：

R S W C R K S R K N S G G G L V W C F

【0092】

上記3つのアミノ酸配列を比べると、システイン以外の共通性は全くと言っていいほど見出されない。このことから、既知のH s p 9 0 N T D 結合性ペプチドの場合とは異なり、本発明においては、クラウンエーテルとペプチドとが合わさって形成する独特の固いクリプタンド様の構造が、H s p 9 0 に結合する上で有利に働き、全く目新しい配列の同定につながったと考えられる。

【0093】

[H s p 9 0 結合性クリプタンドの化学合成、および各種物性の測定]

上記18番クローンと同じ配列（H₂N - Q W V C L N P W L S I C R A - O H）を有するペプチドを、GenScript社（米国ニュージャージー州）に委託して合成・分析した。合成ペプチドの純度は90%超と推定された。上記スキーム1において示したアザクラウンエーテル誘導体（ジプロミド化合物）をこのペプチドとともに環状化するために、ペプチド（12mg、7.1μmol）を70mLのリン酸バッファー（10mMリン酸Na、pH7.4）に溶解して最終濃度0.10mMの水溶液とし、その後、少量の水に溶解したジプロミド化合物（17mg、0.48mM）と中和したTCPEP（0.50mM）とを5分間かけて徐々に加えた。この混合物を、室温の暗所において揺らしながら3時間インキュベートして反応を行った。残ったジプロミドを不活性化するために、2-メルカプトエタノール原液（5.0μL、1.0mM）をさらに反応混合物に加え、室温の暗所において揺らしながらさらに30分間インキュベートした。その後、混合物を凍結乾燥した。凍結乾燥物を1%ギ酸/25%DMSOの水溶液中に溶解し、XTerra Prep MS C18カラム（10×50mm、ウォーターズ社）を備えた逆相HPLC（島津製作所）を用いて、上記反応の産物であるクリプタンド分子を精製した。クリプタンド分子は、0.1%ギ酸を含む0~100%の直線的アセトニトリル勾配を50分間にわたって使用して流速4mL/分にて分離した。得られたクリプタンド分子（5.0mg、収率35%）を凍結乾燥し、LC-MS/MSおよびNMRで分析した。

【0094】

図7は、0.1%ギ酸を含み50分間にわたる0~100%の直線的メタノール勾配を使用して分析したクリプタンド分子のLC-MS/MSスペクトルを示す。（A）は全イオンクロマトグラフィー、（B）は29.6分付近のMSスペクトル、（C）は1016.8のm/zを有するフラグメントのMS/MSスペクトルを示す。環状化の前は、直鎖ペプチド（H₂N - Q W V C L N P W L S I C R A - O H）のほとんどのbおよびy MS/MSフラグメントが同定可能であったが（データは示していない）、環状化後は、限られた数のMS/MSフラグメントしか見出されない。

【0095】

10

20

30

40

50

[H s p 9 0 N T D 結合性クリプタンドの C D スペクトル]

直鎖状リンカーペプチド（すなわちクラウンエーテル修飾前のペプチド）とクリプタンドとの両方について、C D (circular dichroism) スペクトルを測定した。手短に述べると、それぞれの化合物をリン酸バッファー（20 mM リン酸、p H 7 . 4）に溶解して最終濃度 20 μ M とし、25 $^{\circ}$ にて円二色性分散計（J-720W、JASCO社製）および 1 c m 光路長の石英セルを用いてスペクトルを測定した。

【 0 0 9 6 】

直鎖状ペプチドおよびクリプタンドの両方において、互いに類似した特徴的なかたちのピークが観察された（図 8）。この結果は、ペプチドの二次構造が、クラウンエーテルの結合によって壊されるどころかむしろ剛直な環状構造の一部として堅持されていることを示唆している。これは、構造の柔軟性の高さを示していた先行技術の非クリプタンド型クラウン類縁体とは対照をなすものであり（非特許文献 1）、本発明のクリプタンド分子が強い結合力を示す一因となっていると考えられる。

10

【 0 0 9 7 】

[等温滴定型カロリメトリー (I T C)]

I T C 実験は、MicroCal iTC₂₀₀（G Eヘルスケア社製）を使用して行った。限外濾過カラム（vivaspin column 500、分子量カットオフ 10 k D a、G Eヘルスケア社製）を使用して G S T タグ化 H s p 9 0 N T D を濃縮し、バッファーをリン酸バッファー（20 mM リン酸 - K O H、p H 7 . 2、50 mM N a C l、1 mM T C E P）に置き換えた。ブラッドフォードアッセイによりタンパク質濃度を決定した。滴定実験のために、G S T - H s p 9 0 N T D または G S T とクリプタンドとをそれぞれ 5 μ M と 50 μ M とに希釈した。滴定は 25 $^{\circ}$ で行った。インジェクションパラメータは以下のようにした：体積 2 μ L、持続時間 4 秒間、間隔 60 秒間、およびフィルター時間 5 秒間。リファレンスパワーは 5 μ c a l / s に設定した。オリジンソフトウェア 7 . 0（MicroCal）を使用してデータを分析した。1 : 1 相互作用モデルを使用してカーブフィッティングを行った。

20

【 0 0 9 8 】

I T C 実験の結果（図 9）は、このクリプタンド分子が H s p 9 0 N T D に特異的に結合し、G S T には結合しないことを明確に示している。G S T への結合に関して得られたデータは特異的相互作用の欠如を示す無秩序なものである。H s p 9 0 N T D への結合に関して得られた解離定数 K_D は 62 n M であったが、これは、先行技術の非クリプタンド環状分子（非特許文献 1）をはるかに上回り、抗体に匹敵するほどの強い結合力を表す数値である。また、エンタルピー変化 ΔH は、上記先行技術の環状分子で得られた値（- 13 . 7 k c a l / m o l）より大きな変化となっている（- 16 . 9 k c a l / m o l）。このことは、本発明の実施態様によるこのクリプタンド分子が、相対的に標的タンパク質と水素結合しやすいことを示唆している。なお、 $\Delta T \Delta S = 7 . 0$ であり、測定温度は 25 $^{\circ}$ であることから、エントロピー変化 ΔS は $- 7000 / (273 + 25) = - 23 . 5$ c a l / m o l / d e g と計算される。これは、非特許文献 1 のものの - 19 . 6 c a l / m o l / d e g と比べると類似しており、あるいはむしろエントロピー的にはごくわずかに不利であることを示す値である。非特許文献 1 のクラウン様分子に比べて環構造が小さく、かつ、より剛直である 2 環構造である本クリプタンドにおいて、結合に伴うエントロピーロスが微増している（すなわちエントロピー的にはごくわずかに不利である）のは、標的分子との結合に伴う水素結合の数が増えてエントロピーロス（不利さ）が生じる一方で、適度な剛直性を有していることによるエントロピーロスの低減（有利さ）がそれを相殺し、結果的に ΔS が殆ど同じ値となったものと推測される。

30

40

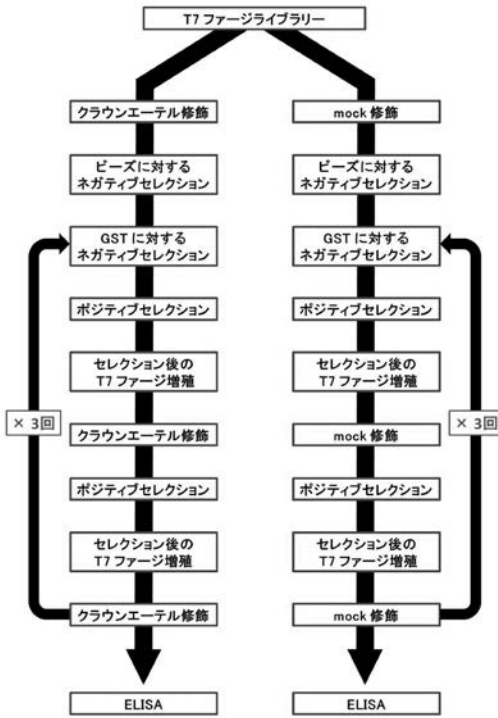
【 0 0 9 9 】

[核磁気共鳴 (N M R) 測定]

500 M H z 分光計（JNM-ECA500、Jeol Resonance社製）を使用して、30 $^{\circ}$ にて、 1 H - 1 H C O S Y および S T D (Saturation Transfer Difference) 測定を含む N M R 実験を行った。クリプタンドの通常の 1 次元プロトン N M R (1 H N M R) スペクトル

50

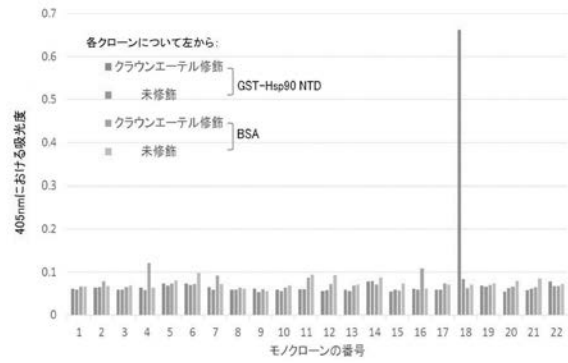
【 図 4 】



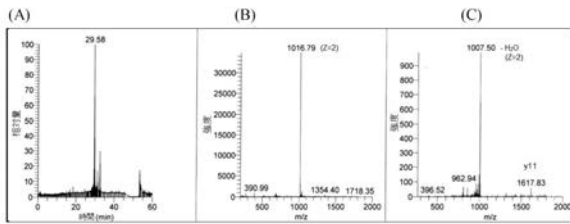
【 図 5 】



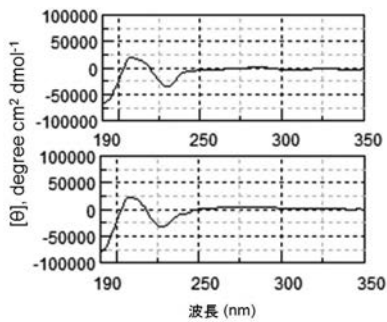
【 図 6 】



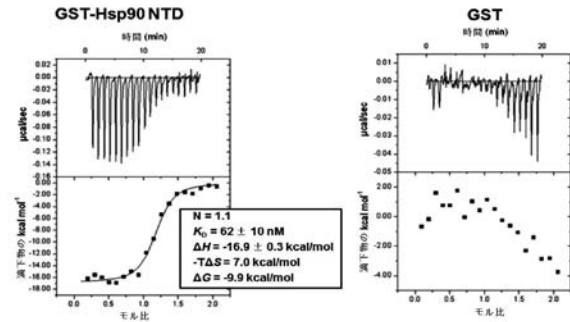
【 図 7 】



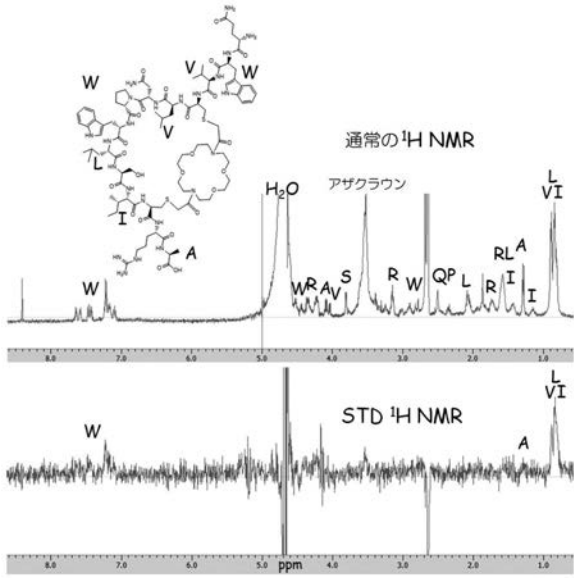
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

2017109931000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り (1) Pacificchem 2015 Online Program 内のWebサイト <https://ep70.eventpilotadmin.com/web/page.php?page=IntHtml&project=Pachem15&id=2254602> 「(7) Biological:419-Cryptand library construction via the 10BASEd-T for specific binding toward a cancer-related protein」平成27年7月20日掲載 (2) NPO法人北関東官学研究会 第101回複合材料懇話会の講演配布資料「人工分子の進化によるものづくり(創薬システム工学を中心に)」平成27年9月4日掲載

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA51 EA28 FA52 FA74