

明 細 書

発明の名称：

生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法、及びポリペプチドの生理活性を評価する方法

技術分野

[0001] 本開示は、生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法、及びポリペプチドの生理活性を評価する方法に関する。

背景技術

[0002] 低分子化合物が有する安価な製造原価及び高い安定性と、抗体等の高分子化合物が有する標的タンパク質への結合性を併せ持つ化合物として、ポリペプチドをはじめとする中分子化合物が注目されており、治療薬及び診断薬をはじめとした広範囲のバイオ関連産業で使用され始めている。なかでも、天然に存在しない非天然アミノ酸を組み込むことで高い標的タンパク質結合性と安定性を実現可能な特殊ポリペプチドが盛んに開発されている。

[0003] 近年、単にタンパク質に結合するだけでなく、タンパク質への結合を介して細胞増殖性等の生理活性を発現する特殊ポリペプチドが従来にない高機能な化合物として注目され始めている。しかしながら、特殊ポリペプチドの化学合成はコストと期間を要するうえ、生理活性を発現する特殊ポリペプチドはタンパク質結合性を有する特殊ポリペプチドの中のごく一部であり、探索が極めて困難であった。

[0004] 細胞に対する生理活性を発現するポリペプチドを探索する方法として、特許文献1では迅速かつ低コストである無細胞発現法を用いて合成したポリペプチドを、希釈後に細胞に作用させることにより、迅速かつ簡便に細胞に対する生理活性を探索する方法が報告されている。

[0005] 無細胞発現法を用いて合成したポリペプチドを精製して目的の用途に供する方法も知られている。非特許文献1では無細胞発現したポリペプチドのアフニティー精製が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2022/158554号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Hisタグ付きタンパク質の精製方法、[online]、2021年、ジーンフロンティア株式会社、[令和5年3月20日検索]、インターネット<URL：<https://www.genefrontier.com/cases/purefrefx/applications-09/>>)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 非天然アミノ酸を組み込んだ特殊ポリペプチドを無細胞発現法により合成する場合、合成されるポリペプチドの濃度が極めて低いため、特許文献1に記載されるように無細胞発現後に希釈を行うと、活性評価のために十分な濃度を確保し難い。一方、希釈を行わずに無細胞発現後のポリペプチド溶液を細胞に対する生理活性評価に供する場合、無細胞発現後のポリペプチド溶液に含まれる成分の細胞毒性により細胞が死滅するなどして、生理活性の評価が困難である。そのため、非天然アミノ酸を組み込んだ特殊ポリペプチドには特許文献1の手法は適用し難い。

[0009] 無細胞発現後のポリペプチド溶液の毒性成分を除去するために、非特許文献1に記載されるようにアフィニティー精製を行うことも考えられる。しかしながら、汎用されるアフィニティー精製では、高濃度のイミダゾールの夾雑、高濃度の溶出用ポリペプチドの夾雑、低いpHなどに起因して、溶出液が細胞毒性を有するため、そのまま細胞に対する生理活性評価に供することができない。夾雑物を除去するための工程を別途行う場合には、ポリペプチドの損失を伴い、かつコストもかかる。

[0010] かかる状況に鑑み、本開示は、無細胞発現により合成されたポリペプチドの生理活性を簡便かつ高いポリペプチド濃度で評価できる、生理活性評価用

のポリペプチド溶液を調製する方法、及びポリペプチドの生理活性を評価する方法に関する。

課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するための手段は、以下の態様を含む。

<1> (A) 無細胞発現後のポリペプチド粗溶液を担体に接触させて、pH 応答性のアフィニティータグを有するポリペプチドを担体に付着させることと、

(B) 担体に付着させたポリペプチドを、50 mM未満の酸性水溶液又は塩基性水溶液で溶出して、溶出液を得ることと、

(C) 溶出液中に含まれる酸又は塩基を中和するために、溶出液に塩基性水溶液又は酸性水溶液を添加し、中和反応で形成される塩の濃度が50 mM未満となるように中和して、ポリペプチド溶液を得ることと、

を含む、生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法。

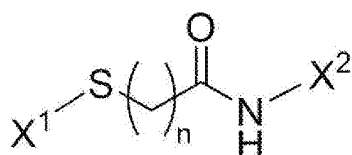
<2> <1>に記載の方法によりポリペプチド溶液を調製することと、ポリペプチド溶液を細胞に接触させて、ポリペプチドの生理活性を評価することと、を含む、ポリペプチドの生理活性を評価する方法。

<3> ポリペプチドが非天然アミノ酸残基を含む、<1>又は<2>に記載の方法。

<4> ポリペプチドが1個以上の環構造を含む、<1>～<3>のいずれか1項に記載の方法。

<5> 環構造が下記構造を含む、<4>に記載の方法。

[化1]



式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に任意の連結基であり、 n は1～10の整数を表す。

<6> ポリペプチドが1～4個の環構造を含む、<4>又は<5>に記載

の方法。

<7> 工程（B）では50mM未満の酸性水溶液を用い、工程（C）では塩基性水溶液を用いる、<1>～<6>のいずれか1項に記載の方法。

<8> 酸性水溶液が塩酸水溶液である、<7>に記載の方法。

<9> 塩基性水溶液が炭酸水素ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、又は炭酸水素ナトリウムと炭酸ナトリウムの混合水溶液である、<7>又は<8>に記載の方法。

<10> 担体が磁気ビーズである、<1>～<9>のいずれか1項に記載の方法。

<11> アフィニティータグが、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグ、c-Mycタグ、V5タグ、Streptタグ、又はPATagである、<1>～<10>のいずれか1項に記載の方法。

<12> （A）の前に、ポリペプチドを無細胞発現させることをさらに含む、<1>～<11>のいずれか1項に記載の方法。

<13> （A）の後、（B）の前に、担体を水で洗浄する工程をさらに含む、<1>～<12>のいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

[0012] 本開示によれば、無細胞発現により合成されたポリペプチドの生理活性を簡便かつ高いポリペプチド濃度で評価できる、生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法、及びポリペプチドの生理活性を評価する方法が提供される。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に、本開示の実施形態を説明する。これらの説明及び実施例は実施形態を例示するものであり、実施形態の範囲を制限するものではない。本開示において述べる作用機序は推定を含んでおり、その正否は実施形態の範囲を制限するものではない。

[0014] 本開示において「工程」又は工程を表す語には、他の工程から独立した工程に加え、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の目的が

達成されれば、当該工程も含まれる。

本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

本開示において各成分は該当する物質を複数種含んでいてもよい。本開示において組成物中の各成分の量について言及する場合、組成物中に各成分に該当する物質が複数種存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する複数種の物質の合計量を意味する。

本開示において、アミノ酸の表記に、IUPAC-IUBMB-JCBN (IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) が定める3文字表記及び1文字表記を使用する。本開示において言及されるアミノ酸は、特に断らない限り、L-アミノ酸である。

本開示において、単位「M」はモル濃度の単位であり、mol/Lと同義である。

本開示において要素が単数形で表記されている場合であっても、特に明示されているときを除き、技術的な矛盾が生じない限りは複数の存在を排除しない。

[0015] <生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法、及びポリペプチドの生理活性を評価する方法>

本開示の一実施形態における、生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法は、(A) 無細胞発現後のポリペプチド粗溶液を担体に接触させて、pH応答性のアフィニティータグを有するポリペプチドを担体に付着させることと、

(B) 担体に付着させたポリペプチドを、50 mM未満の酸性水溶液又は塩

基性水溶液で溶出して、溶出液を得ることと、

(C) 溶出液中に含まれる酸又は塩基を中和するために、溶出液に塩基性水溶液又は酸性水溶液を添加し、中和反応で形成される塩の濃度が50 mM未満となるように中和して、ポリペプチド溶液を得ることと、を含む。

[0016] 本開示の一実施形態における、ポリペプチドの生理活性を評価する方法は、上記の生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法によりポリペプチド溶液を調製することと、(D) ポリペプチド溶液を細胞に接触させて、ポリペプチドの生理活性を評価することと、を含む。

[0017] 本開示のポリペプチド溶液を調製する方法及び生理活性を評価する方法（以下、両者を包括的に「本開示の方法」とも記す。）では、アフィニティー精製を利用して無細胞発現後のポリペプチドを精製する。アフィニティー精製とは、精製したい分子を担体に対して特異的に非共有結合で付着させた後に、単体から溶出する精製方法を指す。本開示の方法によれば、簡便かつ高いポリペプチド濃度でポリペプチドの生理活性を評価することが可能となる。本開示の方法では、担体に付着させたポリペプチドを50 mM未満の酸性水溶液又は塩基性水溶液で溶出し、続いて溶出液を塩濃度が50 mM未満となるように中和する。得られるポリペプチド溶液は、塩濃度が十分に低いいため浸透圧の影響が少ない条件下で生理活性を評価可能であり、また塩以外の成分をほとんど含まない。加えて、無細胞発現後のポリペプチド溶液に含まれる細胞毒性成分が十分に低減されているため、そのまま細胞に対する生理活性評価を行っても、細胞毒性の影響を低減しつつ評価を行うことができる。これにより、迅速かつ低コストにポリペプチド溶液を調製し、生理活性を評価することも可能となる。

[0018] 以下、上記の(A)～(D)の工程をそれぞれ工程(A)～(D)とも称する。また、工程(A)を「付着工程」、工程(B)を「溶出工程」、工程(C)を「中和工程」、工程(D)を「評価工程」とも称することがある。

本開示の方法は、工程(A)～(D)に加えて、他の工程をさらに含んでもよい。例えば、本開示の方法は、工程(A)の後、工程(B)の前に、担

体を水で洗浄する工程をさらに含んでもよい。また、本開示の方法は、工程（A）の前に、ポリペプチドを無細胞発現させることをさらに含んでもよい。

以下、本開示の方法における各工程を説明する。

[0019] 〔無細胞発現〕

本開示の方法は、（A）の前に、ポリペプチドを無細胞発現させることを含んでもよい。「無細胞発現」とは、細胞（大腸菌等）を用いるのではなく、生細胞由来又は遺伝子工学的手法で得られた成分（リボソーム、転写・翻訳因子等）を利用して、鋳型核酸からインビトロでポリペプチドの発現を行う手法である。

[0020] 無細胞発現は大腸菌等の細胞を用いる発現に比べ、下記の利点がある。第一に、生細胞を維持する必要がないため操作性が良好で系の自由度も高い。したがって目的のポリペプチドの性質に応じてさまざまな修正を施した合成系を設計することが可能である。第二に、細胞を用いる発現系では使用する細胞に毒性のあるポリペプチドの合成は基本的にはできないが、無細胞発現系では細胞毒性を有するポリペプチドも合成可能である。第三に、多種類のポリペプチドを同時かつ迅速に合成できること、並びに産生されたポリペプチドの分離及び精製が容易であることから、ハイスループット化が容易である。第四に、非天然アミノ酸を含む特殊ポリペプチドを合成可能である。

[0021] ーポリペプチドー

無細胞発現させるポリペプチドは、生理活性の評価対象となるポリペプチド（以下、「評価対象ポリペプチド」とも記す。）にpH応答性のアフィニティータグを連結させたポリペプチドである。本開示において、ポリペプチドとは、アミノ酸がペプチド結合により繋がった分子を指す。ポリペプチドのアミノ酸残基数に制限はなく、ポリペプチドはタンパク質を包含する用語である。

[0022] 評価対象ポリペプチドは、細胞に対する生理活性を評価したい任意のポリペプチドである。本開示において、ポリペプチドの「生理活性」とは、生細

胞に対する生理活性を意味する。生理活性としては、細胞の増殖性、細胞の分化状態、細胞生存率、細胞内各種タンパク質のシグナル、各種レポーターの応答等に対する活性が挙げられる。評価工程において細胞に評価対象ポリペプチドを接触させ、細胞における状態の変化を観察することにより、評価対象ポリペプチドの生理活性の評価が可能となる。

[0023] 評価対象ポリペプチドのアミノ酸残基数は、ポリペプチドの活性発現の観点からは、6 残基以上であることが好ましい。評価対象ポリペプチドのアミノ酸残基数は、発現効率の観点からは、600 残基未満であることが好ましく、300 残基未満であることがより好ましく、150 残基未満であることがさらに好ましい。かかる観点からは、評価対象ポリペプチドのアミノ酸残基数は、6 残基以上600 残基未満であることが好ましく、6 残基以上300 残基未満であることがより好ましく、6 残基以上150 残基未満であることがさらに好ましい。

[0024] pH 応答性のアフィニティータグとは、精製したい分子が特定の pH では担体に付着し、特定の pH では担体から解離する性質を示すタグを指す。ポリペプチドの安定性の観点からは、アフィニティータグとしては、中性（例えば pH 6～8）で担体に付着し、酸性（例えば pH 4 以下）で担体から解離するアフィニティータグが好ましい。

アフィニティータグは pH 応答性を示すものであれば使用できるが、評価対象ポリペプチドの生理活性に影響を与えにくい観点から、少ないアミノ酸で構成されるタグが好ましい。アミノ酸数が少ないタグの例としては、FLAG タグ、HA タグ、His タグ、c-Myc タグ、V5 タグ、Strep タグ、及び PA タグが挙げられる。なかでも精製収率の観点から、HA タグ、His タグ、c-Myc タグ、及び PA タグがより好ましい。

[0025] ポリペプチドを無細胞発現する際、ポリペプチド配列の N 末端、C 末端、及び／又は配列内にスペーサー配列を入れてもよく、入れなくてもよい。精製収率の観点からは、アフィニティータグの前後にはスペーサー配列を入れることが好ましい。また評価対象ポリペプチドの生理活性に影響を与えにく

い観点から、評価対象ポリペプチドとアフィニティータグの間にスペーサー配列を入れることが好ましい。スペーサー配列としてはGGSリンカーが挙げられる。

[0026] 一態様において、発現させるポリペプチドは、N末端翻訳領域に翻訳促進配列を含むことが好ましい。ポリペプチドに翻訳促進配列を含めることにより、ポリペプチドをコードする塩基配列の無細胞発現量が向上する。翻訳促進配列としては、以下のアミノ酸配列(1)をコードする塩基配列が好ましい。以下、アミノ酸配列(1)を有するポリペプチドを「VKKXタグ」とも記す。

[0027] アミノ酸配列(1) : Val-Lys-Lys-(Xaa)_n

アミノ酸配列(1)において、(Xaa)_nは任意のアミノ酸n個の連なりであり、nは1~8の整数であり、(Xaa)_nを構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0028] (Xaa)_nを構成するアミノ酸としては、Ile、Lys、Arg、His、Ser、Thr、Asp、Cys、Asn、Tyr、Gln、Trp及びPheからなる群より選択されるn個のアミノ酸が好ましく、Ile、Lys、Arg、His、Ser、Thr及びAspからなる群より選択されるn個のアミノ酸がより好ましい。

アミノ酸配列(1)において、nは1~7の整数が好ましく、2~7の整数がより好ましい。

[0029] VKKXタグとしては、アミノ酸配列(2)のアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましく、アミノ酸配列(3)のアミノ酸配列を有するポリペプチドがより好ましく、アミノ酸配列(4)のアミノ酸配列を有するポリペプチドがさらに好ましい。

[0030] アミノ酸配列(2) : Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m

アミノ酸配列(2)において、N末端から4番目のXaaはIle、Lys、Arg、His、Ser及びThrからなる群より選択される1種のアミノ酸であり、(Xaa)_mは任意のアミノ酸m個の連なりであり、mは0~

7の整数であり、 $(Xaa)_m$ を構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0031] アミノ酸配列(2)において、N末端から4番目の Xaa としては、 Ile 、 Lys 及び Thr からなる群より選択される1種のアミノ酸が好ましく、 Thr がより好ましい。

アミノ酸配列(2)において、 $(Xaa)_m$ を構成するアミノ酸としては、 Ile 、 Lys 、 Arg 、 His 、 Ser 、 Thr 、 Asp 、 Cys 、 Asn 、 Tyr 、 Gln 、 Trp 及び Phe からなる群より選択される m 個のアミノ酸が好ましく、 Ile 、 Lys 、 Arg 、 His 、 Ser 、 Thr 及び Asp からなる群より選択される m 個のアミノ酸がより好ましい。

アミノ酸配列(2)において、 m は0～6の整数が好ましく、1～6の整数がより好ましい。

[0032] アミノ酸配列(3)： $Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k$

アミノ酸配列(3)において、N末端から4番目の Xaa は Ile 、 Lys 及び Thr からなる群より選択される1種のアミノ酸であり、 $(Xaa)_k$ は Lys 、 Thr 及び Asp からなる群より選択される k 個のアミノ酸の連なりであり、 k は0～6の整数であり、 $(Xaa)_k$ を構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0033] アミノ酸配列(3)において、N末端から4番目の Xaa としては、 Thr が好ましい。

アミノ酸配列(3)において、 k は1～6の整数が好ましい。

[0034] アミノ酸配列(4)： $Val-Lys-Lys-Thr-Lys-Thr-(Xaa)_j$ (配列番号40)

アミノ酸配列(4)において、 $(Xaa)_j$ は Lys 、 Thr 及び Asp からなる群より選択される j 個のアミノ酸の連なりであり、 j は0～4の整数であり、 $(Xaa)_j$ を構成するアミノ酸は1種でもよく2種以上でもよい。

[0035] $VKKX$ タグをコードする塩基配列に制限はない。タグ付加ポリペプチドの発現に使用する生合成システム(例えば、無細胞発現系)のコドン表に従

ってVKKXタグの塩基配列を設計する。

[0036] VKKXタグ及びVKKXタグをコードする塩基配列の例を下表に示す。
なお、それぞれのVKKXタグをコードする塩基配列は下表の配列に限定されない。

[0037] [表1]

VKKX タグ		VKKX タグをコードする塩基配列 (例)	
配列番号	アミノ酸配列	配列番号	塩基配列
41	VKKI	87	GTTAAAAAATA
42	VKKK	88	GTTAAAAAATAA
43	VKKT	89	GTTAAAAAACA
44	VKKR	90	GTTAAAAACGG
45	VKKS	91	GTTAAAAATCA
46	VKKH	92	GTTAAAAACAT
47	VKKM	93	GTTAAAAAATG
48	VKKP	94	GTTAAAAACCT
49	VKKG	95	GTTAAAAAGGC
50	VKKL	96	GTTAAAAACTA
51	VKKV	97	GTTAAAAAGTT
52	VKKE	98	GTTAAAAAGAA
53	VKKA	99	GTTAAAAAGCA
54	VKKD	100	GTTAAAAAGAT
55	VKKC	101	GTTAAAAATGT
56	VKKN	102	GTTAAAAAAT
57	VKKY	103	GTTAAAAATAT
58	VKKQ	104	GTTAAAAACAA
59	VKKW	105	GTTAAAAATGG
60	VKKF	106	GTTAAAAATTT
61	VKTKT	107	GTTAAAAAACAAAAACA
62	VKTKTT	108	GTTAAAAAACAAAAACAACA
63	VKTKTD	109	GTTAAAAAACAAAAACAGAT
64	VKTKTKK	110	GTTAAAAAACAAAAACAAAAAA
65	VKTKTKT	111	GTTAAAAAACAAAAACAAAAACA
66	VKTKTKD	112	GTTAAAAAACAAAAACAAAAGAT
67	VKTKTKK	113	GTTAAAAAACAAAAACAACAAAA
68	VKTKTKTT	114	GTTAAAAAACAAAAACAACAACA
69	VKTKTKDD	115	GTTAAAAAACAAAAACAGATGAT
70	VKTKTKKT	116	GTTAAAAAACAAAAACAAAAAAACA
71	VKTKTKKD	117	GTTAAAAAACAAAAACAAAAAAGAT
72	VKTKTKTK	118	GTTAAAAAACAAAAACAAAAACAAA
73	VKTKTKTT	119	GTTAAAAAACAAAAACAAAAACAACA
74	VKTKTKDK	120	GTTAAAAAACAAAAACAAAAGATAAA
75	VKTKTKDT	121	GTTAAAAAACAAAAACAAAAGATACA
76	VKTKTKDD	122	GTTAAAAAACAAAAACAAAAGATGAT
77	VKTKTKKK	123	GTTAAAAAACAAAAACAACAAAAAA
78	VKTKTKTK	124	GTTAAAAAACAAAAACAACAAAAACA
79	VKTKTKTD	125	GTTAAAAAACAAAAACAACAAAAGAT
80	VKTKTKKTK	126	GTTAAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAA
81	VKTKTKKDK	127	GTTAAAAAACAAAAACAAAAAAGATAAA
82	VKTKTKTKK	128	GTTAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAAA
83	VKTKTKTKK	129	GTTAAAAAACAAAAACAAAAACAACAAAA
84	VKTKTKDKK	130	GTTAAAAAACAAAAACAAAAGATAAAAA
85	VKTKTKTTK	131	GTTAAAAAACAAAAACAACAACAAAAAA
86	VKTKTKTDTT	132	GTTAAAAAACAAAAACAAAAACAGATACAACA

[0038] 翻訳促進配列の詳細としては、国際公開第2023/048290号に記

載の詳細を適用することができる。

- [0039] 発現させるポリペプチドの立体構造、アミノ酸配列、アミノ酸残基数、アミノ酸の種類、及びポリペプチドをコードする塩基配列等に制限はない。ポリペプチドには、アミノ酸が翻訳後修飾されたポリペプチドが含まれる。アミノ酸の翻訳後修飾としては、リン酸化、メチル化、アセチル化、糖鎖付加、脂質付加などが挙げられる。

本開示において、アミノ酸は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、修飾化アミノ酸及びそれらの誘導体を含む。

- [0040] 本開示において天然アミノ酸とは、一般的なタンパク質を構成するアミノ酸を指し、アラニン (A l a, A)、アルギニン (A r g, R)、アスパラギン (A s n, N)、アスパラギン酸 (A s p, D)、システイン (C y s, C)、グルタミン (G l n, Q)、グルタミン酸 (G l u, E)、グリシン (G l y, G)、ヒスチジン (H i s, H)、イソロイシン (I l e, I)、ロイシン (L e u, L)、リジン (L y s, K)、メチオニン (M e t, M)、フェニルアラニン (P h e, F)、プロリン (P r o, P)、セリン (S e r, S)、トレオニン (T h r, T)、トリプトファン (T r p, W)、チロシン (T y r, Y) 及びバリン (V a l, V) を指す。天然アミノ酸は、天然物でもよく人工物でもよい。

- [0041] 本開示において非天然アミノ酸とは、上記の20種類のアミノ酸以外のアミノ酸を指し、天然物も人工物も含む。非天然アミノ酸としては、ハロアセチル基を有するアミノ酸（例えば、クロロアセチル化リジン、クロロアセチルジアミノ酪酸等のクロロアセチル化アミノ酸）、N-メチルアミノ酸（例えば、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン）等が挙げられる。

- [0042] 修飾化アミノ酸としては、標識化合物と結合したアミノ酸である標識化アミノ酸等が挙げられる。標識化合物は、生化学的、化学的、免疫化学的、又は電磁的な検出方法で検出可能な物質である。標識化合物としては、色素化合物、蛍光物質、化学発光物質、生物発光物質、酵素基質、補酵素、抗原性

物質、特定のタンパク質に結合する物質、磁性物質等が挙げられる。標識化アミノ酸としては、機能で分類すると、蛍光標識アミノ酸、光応答性アミノ酸、光スイッチアミノ酸、蛍光プローブアミノ酸等が挙げられる。

[0043] 標識化アミノ酸におけるアミノ酸と標識化合物とは、直接結合していてもよく、スペーサーを介して結合していてもよい。スペーサーとしては、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン；ポリオキシエチレン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等のポリエーテル；ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、ポリカーボネートなどが挙げられる。

[0044] 天然アミノ酸、非天然アミノ酸又は修飾化アミノ酸の誘導体としては、例えば、ヒドロキシ酸、メルカプト酸及びカルボン酸が挙げられる。

[0045] 一態様において、ポリペプチドは、非天然アミノ酸残基を含むポリペプチドであってもよい。非天然アミノ酸残基を含むポリペプチドとしては、先に例示した非天然アミノ酸を含むポリペプチドが挙げられる。本開示の方法によれば、非天然アミノ酸を含むポリペプチドであっても簡便かつ高いポリペプチド濃度で生理活性評価が可能である。

[0046] ポリペプチドは直鎖ポリペプチドであってもよく、環構造を含むポリペプチド（以下、「環状ポリペプチド」とも記す。）であってもよい。環構造を含むポリペプチドは直鎖ポリペプチドに比べ、一般に高い生理活性を示すため、発現させるポリペプチドのうち、評価対象ポリペプチドの部分が環状であるポリペプチドが好ましい。

[0047] 環状ポリペプチドとしては、間に4つ以上のアミノ酸残基が挟まっている第1のアミノ酸残基及び第2のアミノ酸残基が、主鎖又は側鎖を介して共有結合している構造を含むポリペプチドが好ましい。第1のアミノ酸残基及び第2のアミノ酸残基の間に挟まれるアミノ酸残基の数は、例えば4～20であってもよい。共有結合は、第1のアミノ酸残基が有する第1の官能基と第2のアミノ酸残基が有する第2の官能基との反応により形成され得る。

第1の官能基と第2の官能基とは、共有結合する限り、同じ種類の官能基

でもよく、異なる種類の官能基でもよい。第1の官能基と第2の官能基の組み合わせとしては、例えば、チオール基とクロロアセチル基、チオール基とチオール基、側鎖中のカルボキシ基と側鎖中のアミノ基が挙げられる。

チオール基を有するアミノ酸としては、例えば、システインが挙げられる。

クロロアセチル基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチルジアミノ酪酸及びクロロアセチル化リジンが挙げられる。

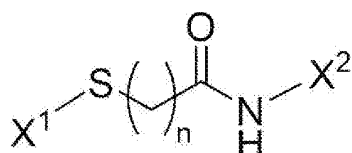
側鎖中にカルボキシ基を有するアミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。

側鎖中にアミノ基を有するアミノ酸としては、例えば、リジン、アスパラギン、及びグルタミンが挙げられる。

[0048] ポリペプチドは環構造を1つ有していてもよく複数有していてもよい。ポリペプチドに含まれる環構造の数は、細胞に対する生理活性の発現の観点からは多いことが好ましく、無細胞発現の収量の観点からは少ない方が好ましい。かかる観点から、ポリペプチドに含まれる環構造の数は、1～4が好ましく、1～3がより好ましく、1～2がさらに好ましい。

[0049] 一態様において、環構造は下記構造を含んでもよい。

[0050] [化2]



[0051] 式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に任意の連結基であり、 n は1～10の整数を表す。

[0052] 上記式は、環構造における2つのアミノ酸残基の結合部であり得る。この場合、 X^1 及び X^2 はそれぞれアミノ酸残基と連結されており、 X^1 に連結されるアミノ酸残基と X^2 に連結されるアミノ酸残基とは、他の1又は複数のアミノ酸残基を介して連結されて、全体として環構造を形成している。

X^1 としては、単結合及び2価の有機基が挙げられる。2価の有機基として

は、炭素数 1 ～ 10 の直鎖状又は分岐鎖状のアルキレン基が挙げられる。前記炭素数 1 ～ 10 のアルキレン基における炭素数は 1 ～ 5 であってもよく、1 ～ 3 であってもよい。

X^2 としては、単結合及び 2 価の有機基が挙げられる。2 価の有機基としては、炭素数 1 ～ 10 の直鎖状又は分岐鎖状のアルキレン基が挙げられる。前記炭素数 1 ～ 10 のアルキレン基における炭素数は 1 ～ 5 であってもよい。

n は、1 ～ 10 であり、1 ～ 5 が好ましく、1 ～ 3 がより好ましく、1 がさらに好ましい。

一例として、チオール基を有するアミノ酸残基とクロロアセチルアミノ基を有するアミノ酸残基との反応により上記式の構造が形成される。この場合、 n は 1 である。チオール基を有するアミノ酸残基がシステイン残基である場合 X^1 は炭素数 1 の直鎖状アルキレン基であり、チオール基を有するアミノ酸残基がホモシステイン残基である場合、 X^1 は炭素数 2 の直鎖状アルキレン基である。クロロアセチル基がリジン残基の側鎖に結合している場合 X^2 は炭素数 4 の直鎖状アルキレン基であり、クロロアセチル基がリジン残基の主鎖に結合している場合 X^2 は単結合である。

[0053] 一態様において、ポリペプチドは非天然アミノ酸残基を含む環状ポリペプチドであってもよい。非天然アミノ酸残基を含む環状ポリペプチドとしては、チオール基を有するアミノ酸（例えば、システイン）と、クロロアセチル基を有するアミノ酸（例えば、クロロアセチルジアミノ酪酸、クロロアセチル化リジン）とを一分子に含むポリペプチドが挙げられる。かかるポリペプチドでは、チオール基とクロロアセチル基とが反応して環化し、環状ポリペプチドとなる。

[0054] 発現させるポリペプチドのアミノ酸残基数は、ポリペプチドの活性発現の観点からは、6 残基以上であることが好ましい。ポリペプチドのアミノ酸残基数は、発現効率の観点からは、600 残基以下であることが好ましく、300 残基以下であることがより好ましく、150 残基以下であることがさらに好ましい。かかる観点からは、発現させるポリペプチドのアミノ酸残基数

は、6 残基～600 残基であることが好ましく、6 残基～300 残基であることがより好ましく、6 残基～150 残基であることがさらに好ましい。

[0055] ー無細胞発現の手法ー

ポリペプチドの無細胞発現は、鋳型核酸の翻訳を行う方法、又は鋳型核酸の転写及び翻訳を行う方法により実行できる。無細胞発現には、細胞破碎液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液を使用してもよく、遺伝子工学的に調製されたりボソーム又は他の各種因子を混合した再構成液を使用してもよい。各因子の濃度制御が可能であるために非天然アミノ酸の導入効率が高い条件を設定可能なこと、及びロット間の性能差が少ないことから、再構成液を使用することが好ましい。

[0056] 細胞抽出液としては、大腸菌抽出液、コムギ胚芽抽出液、ウサギ赤血球抽出液、又は昆虫細胞抽出液が挙げられる。細胞抽出液には一般的に、ペプチドの合成に用いられるリボソーム、開始因子等の各種因子、tRNA等の各種酵素群が含まれる。細胞抽出液を用いて発現を行う際には、一般的に、抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTP等のエネルギー源、クレアチンリン酸など、無細胞発現に用いられるその他の物質を添加する。また、別途用意したりボソーム又は各種因子、各種酵素群等を必要に応じて添加してもよい。

[0057] 再構成液は、それぞれ精製したりボソームタンパク質、アミノアシルtRNA合成酵素（ARS；aminoacyl-tRNA synthetase）、リボソームRNA、アミノ酸、GTP、ATP、翻訳開始因子（IF；initiation factor）、伸長因子（EF；elongation factor）、終結因子（RF；release factor）、リボソーム再生因子、その他の無細胞ペプチド合成に必要な因子等で構築することができる。

[0058] 鋳型核酸は、DNAでもよくmRNAでもよい。鋳型核酸は、一本鎖の核酸でもよく、二本鎖の核酸でもよい。鋳型核酸は、線状の核酸でもよく、環状の核酸でもよい。鋳型核酸は、ポリペプチド合成に必要な塩基配列がベクター（プラスミドベクター、コスミドベクター等）に組み込まれた核酸でもよい。

プライマーエクステンション法を用いて、迅速かつ低コストに調製可能である観点からは、鋳型核酸としては、直鎖状のDNAが好ましい。

[0059] 鋳型核酸は、無細胞発現によってポリペプチドを合成するのに必要な塩基配列を有する。鋳型核酸は、プロモーター配列、リボソーム結合部位をコードする配列、開始コドン、アフィニティータグをコードする配列、評価対象ポリペプチドをコードする配列等を含む。

例えば、大腸菌の因子を用いた無細胞発現の場合、大腸菌での目的ポリペプチドの発現が可能となるように、大腸菌で機能するプロモーター、例えばT7プロモーター、lacプロモーター等を用いることができる。また、各種プロモーターはリボソーム結合部位をコードする配列の上流に配置することができる。リボソーム結合部位は開始コドンの上流に位置し、リボソームが結合する配列（SD配列）を含む。SD配列はアデニン及びグアニンに富んだ配列であり、例えば、AGGAGGの配列からなる。

[0060] 一態様において、鋳型核酸は、開始コドンの直後に翻訳促進配列をコードする核酸配列を含むことが好ましい。翻訳促進配列及び翻訳促進配列をコードする塩基配列の詳細は上述の通りである。

[0061] ポリペプチドを無細胞発現する際、生理活性評価に用いるポリペプチド濃度を高める観点から、鋳型DNA配列に用いるコドンの種類は、無細胞発現の宿主に合わせて最適化されていることが好ましい。

[0062] 非天然アミノ酸を含むポリペプチドを無細胞発現する場合、非天然アミノ酸の導入に用いるtRNAに制約はなく、導入効率を高くするべく改良が施されたtRNAが好ましい。非天然アミノ酸導入用のアミノアシルtRNAは加水分解により失活しやすいため、生理活性評価に用いるポリペプチド濃度を高める観点から、アミノアシルtRNAの添加濃度は高いことが好ましく、複数回に分けて繰り返し添加することが好ましい。また生理活性評価に用いるポリペプチド濃度を高める観点から、加水分解したアミノアシルtRNAを再生するべく、無細胞発現に用いる溶液中にアミノアシル化酵素又は同様の機能を有する人工酵素を添加することが好ましい。

[0063] 無細胞発現には、公知のあらゆる無細胞発現システムが採用できる。無細胞発現システムの市販品の例として、PUREfrex（ジーンフロンティア）、PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit（New England BioLabs）、S30 T7 High-Yield Protein Expression System（Promega）、Human Cell-Free Protein Expression System（タカラバイオ株式会社）、Rapid Translation System（ロシュ）、Expressway Cell-Free Expression System（インビトロジェン）等が挙げられる。

[0064] 〔工程（A）：付着工程〕

工程（A）では、無細胞発現後のポリペプチド粗溶液を担体に接触させて、pH応答性のアフィニティータグを有するポリペプチドを担体に付着させる。無細胞発現後のポリペプチド粗溶液とは、無細胞発現後、何ら分離又は精製を経ないか、一部分離及び／又は精製を行っても、発現させたポリペプチド以外の成分が混在しているポリペプチド溶液である。

[0065] 担体は、アフィニティータグを特異的に付着させる担体であれば特に制約はなく、アフィニティータグを特異的に付着させる官能基を有する、又はアフィニティータグを特異的に付着させる分子を固定化した、磁気ビーズ、アガロースビーズ、及び樹脂（例えばポリスチレン）製のビーズ又はプレートが挙げられる。

担体の形態は特に制限されず、ビーズであっても、カラムの形態であってもよい。微量の溶液を扱えるほど低コストに評価可能なため、微量の溶液のハンドリングの観点からは、磁気ビーズが好ましい。

アフィニティータグを特異的に付着させる分子としては、低分子有機化合物、金属化合物（例えば、Ni-NTA）、疎水性分子、タンパク質（例えば、Strept-Tactin（登録商標））、抗体（例えば、抗PAタグ抗体、抗FLAGタグ抗体、抗HAタグ抗体、抗c-Myc抗体）が挙げられる。

[0066] 〔工程（B）：溶出工程〕

工程（B）では、担体に付着させたポリペプチドを、50mM未満の酸性

水溶液又は塩基性水溶液で溶出して、溶出液を得る。溶出に用いる酸性水溶液又は塩基性水溶液の濃度は、50 mM未満であり、中和後の塩に起因する細胞毒性を低減する観点から、30 mM未満がより好ましく、20 mM未満が特に好ましい。溶出効率の観点、及び生理活性評価に用いるポリペプチド濃度を高める観点からは、溶出に用いる酸性水溶液又は塩基性水溶液の濃度は0.1 mM以上であることが好ましく、1 mM以上であることがより好ましく、10 mMであることが特に好ましい。かかる観点から、溶出に用いる酸性水溶液又は塩基性水溶液の濃度は、0.1 mM以上50 mM未満であることが好ましく、1 mM以上30 mM未満であることがより好ましく、10 mM以上20 mM未満であることがさらに好ましい。

[0067] 酸性水溶液の種類に特に制約はなく、中和後に細胞毒性を示さない塩を形成する酸性水溶液が好ましく、中和後に通常培地に含まれる塩を形成する酸性溶液がより好ましい。通常培地に含まれる塩としては、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、塩化カリウム等が挙げられる。中和後に通常培地に最も多量含まれる塩である塩化ナトリウムを形成する酸性溶液が特に好ましい。中和後に塩化ナトリウムを形成する酸性水溶液としては塩酸水溶液が挙げられる。その他の酸性水溶液としては、酢酸水溶液、炭酸水溶液、クエン酸水溶液、グリシン水溶液、硝酸水溶液、硫酸水溶液等が挙げられる。

[0068] 塩基性水溶液の種類に特に制約はなく、中和後に細胞毒性を示さない塩を形成する塩基性水溶液が好ましく、中和後に通常培地に含まれる塩を形成する塩基性水溶液がより好ましい。通常培地に含まれる塩の種類の例は上記記載と同一である。中でも中和後に通常培地に最も多量含まれる塩である塩化ナトリウムを形成する塩基性水溶液が特に好ましい。中和後に塩化ナトリウムを形成する塩基性水溶液としては、水酸化ナトリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、及び炭酸ナトリウム水溶液が挙げられる。その他の塩基性水溶液としては、水酸化カルシウム水溶液、アンモニア水溶液等が挙げられる。

[0069] 溶出に用いる酸性水溶液又は塩基性水溶液には、他の夾雑物（緩衝成分等）が含まれていてもよく、含まれていなくてもよい。生理活性評価に与える影響を低減する観点から、他の夾雑物が含まれていないことが好ましい。

[0070] 工程（B）では溶出に酸性水溶液を用いても塩基性水溶液を用いてもよく、評価対象ポリペプチドの分解を抑制する観点からは、酸性水溶液を用いることが好ましい。

[0071] 無細胞発現後のポリペプチド粗溶液由来の細胞毒性成分の除去効率の観点からは、工程（A）の後、工程（B）の前に、担体を洗浄することが好ましい。

細胞毒性成分の除去効率及びペプチドの収率の観点からは、洗浄回数は2回～7回が好ましく、3回～5回がより好ましい。

細胞毒性成分の除去効率の観点からは、洗浄に用いる溶液には界面活性剤を添加することが好ましい。一方、洗浄に用いる溶液に界面活性剤を添加する場合、界面活性剤の細胞毒性を軽減するべく、溶出の直前に純水による洗浄を行うことが好ましい。界面活性剤の種類に制約はなく、細胞毒性を軽減する観点から非イオン系の界面活性剤が好ましく、T w e e n 2 0、P l u r o n i c（登録商標）F-68、P l u r o n i c（登録商標）F-127、又はNP-40がより好ましく、T w e e n 2 0がさらに好ましい。界面活性剤の濃度に制約はなく、細胞毒性及び細胞毒性成分の除去効率の観点から0.1質量%～0.0001質量%が好ましく、0.01質量%～0.001質量%がより好ましい。

[0072] [工程（C）：中和工程]

工程（C）では、工程（B）で得られた溶出液中に含まれる酸又は塩基を中和するために、溶出液に塩基性水溶液又は酸性水溶液を添加し、中和反応で形成される塩の濃度が50mM未満となるように中和して、ポリペプチド溶液を得る。工程（B）において溶出に酸性水溶液を用いた場合には、塩基性水溶液で中和し、工程（B）において溶出に塩基性水溶液を用いた場合には、酸性水溶液で中和する。本開示において、「中和」とは、酸と塩基との

反応により塩を生じさせることをいい、典型的には、同じ当量数の酸及び塩基により中和させることをいう。ただし、細胞毒性により生理活性評価に影響を及ぼさない範囲において（例えば、生細胞数の80%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは10%以上を死滅させない範囲において）、酸又は塩基を過剰量混合する場合も除外されない。

中和後の溶液のpH制御の観点からは、中和に用いる水溶液は強塩基より弱塩基が好ましく、強酸より弱酸の方が好ましい。混合比が意図した比から乖離した際のpH変動がより小さいためである。弱塩基水溶液としては中和後に通常培地に最も多量含まれる塩である塩化ナトリウムを形成する、炭酸水素ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、又は炭酸水素ナトリウムと炭酸ナトリウムの混合水溶液がより好ましい。弱酸水溶液としては、炭酸水溶液がより好ましい。

[0073] 中和に用いる酸性水溶液又は塩基性水溶液の濃度は、形成される塩の濃度が50mM未満となる限り特に制限されず、工程（B）における溶出液中の酸濃度又は塩基濃度、溶出液の液量、中和に用いる水溶液の液量等に応じて決定すればよい。例えば、中和に用いる酸性水溶液又は塩基性水溶液の濃度は、1mM～10Mであってもよく、10mM～1Mであってもよい。

[0074] 中和後のポリペプチド溶液の塩濃度は50mM未満であり、30mM未満が好ましく、20mM未満がより好ましい。ポリペプチド溶液の塩濃度は低いほど好ましいが、1mM以上であってもよく、2mM以上であってもよく、5mM以上であってもよい。かかる観点から、中和後のポリペプチド溶液の塩濃度は、1mM以上50mM未満であってもよく、2mM以上30mM未満であってもよく、5mM以上20mM未満であってもよい。

[0075] 中和後のポリペプチド溶液のpHは、細胞毒性を低減する観点からは、6～9が好ましく、7～8がより好ましい。

[0076] [工程（D）：評価工程]

工程（D）では、工程（C）を経たポリペプチド溶液を細胞に接触させて、ポリペプチドの生理活性を評価する。

生理活性の評価に用いる細胞の種類に制約はなく、評価の感度、特異性、及び精度の観点からは、評価用に改良された株化細胞を用いることが好ましい。評価用に改良された株化細胞としては、特定の受容体を強制発現させた細胞、レポーター遺伝子を導入した細胞等が挙げられる。

[0077] ポリペプチドの評価濃度を高める方策として、多量の精製ポリペプチド溶液と少量の濃縮培地を混合して培地を調製する方法が考えられる。市販で入手可能な濃縮培地は、一般的に、培地を構成する成分が等しく濃縮されているため、精製ポリペプチド溶液と濃縮培地を希釈して培地を調製するに際し、精製ポリペプチド溶液に含まれる塩濃度は可能な限り低いことが好ましい。精製ポリペプチド溶液に塩が含まれている場合には、調製後の培地組成は、適正な組成よりも高濃度の塩を含むことになり、細胞毒性の原因となる可能性があるためである。

[0078] 生理活性評価に用いる培地の種類に制約はなく、生理活性評価の種類や用いる細胞の種類に合わせて適切な培地を選択することが好ましい。生理活性評価に用いるポリペプチド濃度を高める観点からは、濃縮培地を中和後のポリペプチド溶液で希釈して使用することがより好ましい。

[0079] [他の工程]

本開示の方法は、無細胞発現、工程（A）～（D）、及び工程（B）の前の洗浄工程の他、追加の工程を含んでもよい。追加の工程としては、無細胞発現に用いるDNAの調整工程、無細胞発現後又は工程（C）後のポリペプチド濃度を定量する工程等が挙げられる。本開示の方法は、ポリペプチドの高い収率を得る観点からは、工程（C）の後、生理活性評価の前に、他の精製工程（サイズ排除カラム精製等）を含まないことが好ましい。

実施例

[0080] 次に本開示の実施形態を実施例により具体的に説明するが、本開示の実施形態はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0081] <実施例 1：細胞毒性評価>

本実施例では、無細胞発現法で合成したポリペプチドを生理活性評価する

にあたり、無細胞発現後のポリペプチド粗溶液、アフィニティー精製の溶出液、及びアフィニティー精製の溶出液を中和した溶液の細胞毒性を評価した。本実施例では、無細胞発現に用いる反応系の細胞毒性の評価を行うため、鋳型DNAを添加せずに無細胞発現反応を行うことにより、ポリペプチドを含まない無細胞発現液を用意し、本液に対してアフィニティー精製作業を行った。

[0082] 非天然アミノ酸としてクロロアセチル化リジンを選択し、クロロアセチル化リジンをポリペプチドに導入するために、アンチコドンがCUAであり、mRNAのUAGコドンに対合するtRNAを、配列番号1のDNAを転写することにより用意した。tRNAをN-クロロアセチル化リジンp d C p A (5'-phospho-2'-deoxyribocytidylylriboadenosine) エステル体でアミノアシル化した。作製したアミノアシルtRNAを、アミノアシルtRNA (1) と呼ぶ。

[0083] 配列番号1 : G T T G T A A A A C G A C G G C C A G T G C C A A G C
T T G G G C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A G T A G T
T C A A T G G T A G A A C G T C G G T C T C T A A A A C C G A G C G
T T G A G G G T T C G A T T C C T T T C T C T C C C A C

[0084] 無細胞発現液として、PUREfrex2.0 (ジーンフロンティア株式会社、PF201-0.25-5)、PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit (NEW ENGLAND Biolabs、E6800S)、及びS30T7 High-Yield Protein Expression System (Promega、L1110) の3種を用い、それぞれ下記組成で反応液を調製し、37℃で1時間反応させることで、ポリペプチドを含まない無細胞発現液を調製した。

[0085] ・PUREfrex2.0 : S o l u t i o n I 5.0 μ L、S o l u t i o n I I 0.5 μ L、S o l u t i o n I I I 1.0 μ L、アミノアシルtRNA (1) の乾燥体 (終濃度0.5 μ g / μ L)、及び水3.5 μ Lを混合。
・PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit : S o l u t i o n A 4.0 μ L、S o l u t i o n B 3.0 μ L、アミノアシルtRNA (1) の乾燥体 (終濃度0.5 μ g / μ L)、及び水3.0 μ Lを混合。

・ S30 T7 High-Yield Protein Expression System : S30 Premix Plus 4.0 μ L、T7 S30 Extract 3.6 μ L、アミノアシル tRNA (1) の乾燥体 (終濃度 0.5 μ g/ μ L)、及び水 2.4 μ L を混合。

[0086] 無細胞発現液を表 2 に記載の条件に沿ってアフィニティー精製及び中和処理した。

なお、アフィニティー精製を実施しない条件については、アフィニティー精製を実施した条件と無細胞発現液の希釈度を統一するべく、無細胞発現液を 6.5 μ L 分取し、水 17.5 μ L と混合した。

[0087] アフィニティー精製を実施する条件については、下記作業を行った。

アフィニティー精製に用いるアフィニティー担体として、下記の磁気ビーズを使用した。

・ P A タグ : MagCapture HP 抗 P A タグ抗体磁気ビーズ (富士フイルム和光純薬株式会社、137-18751)

・ F L A G (登録商標) タグ : 抗 D Y K D D D D K タグ抗体磁気ビーズ (富士フイルム和光純薬株式会社、011-25154)

・ H A タグ : Pierce Anti-HA Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific、88836)

・ H i s タグ : HisPur Ni-NTA Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific、88831)

・ c - M y c タグ : Pierce Anti-c-Myc Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific、88842)

・ S t r e p タグ (登録商標) : MagStrep "type3" Strep-Tactin (登録商標) beads (IBA Lifesciences、2-1613-002)

[0088] まずアフィニティー精製に用いるビーズを必要量分取し、PBS-T で 3 度洗浄した。

次に、無細胞発現液 8.0 μ L と洗浄済ビーズ 10 μ L 及び PBS-T 2.0 μ L とを混合し、室温 (約 25℃) で 2 時間、振盪混合することで、付

着工程を行った。その後、混合物をマグネットスタンド上に設置して上清を除き、 $100\mu\text{L}$ の洗浄液で計3度、洗浄を行った。使用した洗浄液の種類は表2に記載の通りである。

次いで、洗浄後のビーズをマグネットスタンド上に設置して上清を除いた後、 $25\mu\text{L}$ の液Aを添加し、室温で15分振盪混合することにより、溶出工程を行った。

溶出液をマグネットスタンド上に設置して溶出上清を $21.6\mu\text{L}$ 回収し、 $2.4\mu\text{L}$ の液Bと混合することで中和工程を行った。使用した液A及び液Bの種類は表2に記載の通りであり、具体的に使用した液は下記の通りである。

[0089] ・塩酸： 0.1mol/L 塩酸（富士フイルム和光純薬株式会社、081-0111）を水で表2に記載の濃度に調製して使用。

・PAペプチド：PAタグペプチド（富士フイルム和光純薬株式会社、161-28681）を水で表2に記載の濃度に調製して使用。

・NaOH： 0.1mol/L 水酸化ナトリウム（富士フイルム和光純薬株式会社、194-02191）を水で表2に記載の濃度に調製して使用。

・炭酸水素ナトリウム：炭酸水素ナトリウム（関東化学株式会社、37116-23）を水で表2に記載の濃度に調製して使用。

溶出工程後に夾雑物を除去する比較例として、溶出液をサイズ排除カラム精製する条件については、Pierce™ Polyacrylamide Desalting Columns (Thermo Fisher Scientific、43426) を $75\mu\text{L}$ スピンカラムに充填し、メーカー推奨のプロトコルに沿ってサイズ排除カラム精製を行った。

[0090] 各液の細胞毒性を、FGFR (fibroblast growth factor receptor ; 線維芽細胞増殖因子受容体) を安定発現したBaF3細胞増殖性を用いて評価した。本細胞は各種FGF (fibroblast growth factor ; 線維芽細胞増殖因子) 及びその類似活性分子の存在下で増殖し、非存在下では死滅する性質を有する。FGFRを安定発現したBaF3細胞は、FGFR遺伝子が組み込まれたベクター (Gene Copoeia、EX-Y2820-M67) を、Nucleofector (Lonza) を

用いてB a F 3細胞に導入し、F G F R 遺伝子が導入された細胞を、ハイグロマイシンを用いて薬剤選択することで樹立した。

- [0091] 無細胞発現液をより低い希釈度で細胞に作用させるべく、通常組成より3倍濃いR P M I 培地（以降、「濃縮培地」と記載）を、RPMI-1640(10×) (Sigma-Aldrich、R1145) 750 μ L、Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific、10270-106) 750 μ L、Penicillin Streptomycin (Thermo Fisher Scientific、15140-122) 75 μ L、GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific、35050-061) 75 μ L、Sodium Bicarbonate 7.5% solution (Thermo Fisher Scientific、25080094) 200 μ L、葉酸（富士フイルム和光純薬株式会社、060-01802、1% DMSO水溶液で100 μ g/mLになるよう溶解）75 μ L、Heparin Solution (2 mg/mL) (STEM CELL、07980) 10 μ L、b F G F (F G F の一種、R&D Systems、3718-GMP、PBSで0.25 μ Mになるよう溶解) 40 μ L、及び水 525 μ Lを混合することで調製した。
- [0092] F G F R を安定発現したB a F 3細胞をPBSで2回洗浄した後、R P M I - 1 6 4 0 (L - グルタミン、フェノールレッド含有) (富士フイルム和光純薬株式会社、189-02025) とFetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific、10270-106) を10 : 1で混合した培地を用いて 4×10^5 cells/mLに調製した。
- [0093] 各液（無細胞発現後のポリペプチド粗溶液、アフィニティー精製の溶出液、又はアフィニティー精製の溶出液を中和した溶液）24 μ Lと濃縮培地12 μ Lを混合した液を、384ウェルプレート (Perkin Elmer、6057300) に15 μ Lずつ分注後、各ウェルに上記の細胞懸濁液を5 μ L添加し、振盪混合後、37°C (5% CO₂) で2晩培養した。この際、細胞毒性を有さない陽性対照として、各液の代わりに水24 μ Lを濃縮培地12 μ Lと混合した液を15 μ Lずつ分注したウェルを用意した。
- [0094] 2晩培養後、Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10mg/mL Solution in Water (Thermo Fisher Scientific、H3570)、-Cellstain (登録

商標) - Calcein - AM solution (1 mg/mL DMSO 溶液) (DOJINDO、C396)、及び Cellstain (登録商標) - PI solution (DOJINDO、P378) を R P M I (10% FBS) 培地にそれぞれ終濃度で 1 / 1000 体積量ずつ添加し、室温で 1 時間静置することで生死染色し、共焦点顕微鏡 (横河電機株式会社、CQ1) にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、各ウェル内の細胞数を陽性対照のウェル内に存在した生細胞数を 100 として規格化した。結果を表 2 に示す。

[0095] 細胞毒性の評価基準は以下の通りである。陽性対照のウェル内に存在した生細胞数を 100 として規格化した際の各ウェル内の細胞数が以下の個数である場合に、それぞれ評価 A ~ D と判定した。評価は A、B 又は C であることが好ましい。

A . . . 90 以上

B . . . 50 以上、90 未満

C . . . 20 以上、50 未満

D . . . 20 未満

[0096]

[表2]

無細胞発現液のアフィニティー精製及び中和処理条件と細胞毒性評価結果									
No.	無細胞発現液	菌液有無	アフィニティー	洗浄工程	源 A	液 B	評価区分	備考	
1	PUREflex	無	---	---	---	---	D		
2	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
3	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	20mM 塩酸	200mM 炭酸水素ナトリウム	B		
4	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	30mM 塩酸	300mM 炭酸水素ナトリウム	C		
5	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	40mM 塩酸	400mM 炭酸水素ナトリウム	C		
6	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	50mM 塩酸	500mM 炭酸水素ナトリウム	D		
7	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	60mM 塩酸	600mM 炭酸水素ナトリウム	D		
8	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	80mM 塩酸	800mM 炭酸水素ナトリウム	D		
9	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	100mM 塩酸	1000mM 炭酸水素ナトリウム	D		
10	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	30mM 塩酸	水	D		
11	PUREflex	有	PA	PBS-T3 固	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	B		
12	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	0.5mg/mL PA ヘフド	水	B		
13	PUREflex	有	FLAG	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
14	PUREflex	有	HA	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
15	PUREflex	有	His	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
22	PUREflex	有	Strep	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
23	PUREflex	有	c-Myc	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
24	PUREflex	有	HA	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 水酸化ナトリウム	90mM 塩酸	A		
25	PUREflex	有	c-Myc	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 水酸化ナトリウム	90mM 塩酸	A		
26	PUREflex	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	100mM 塩酸	1000mM 炭酸水素ナトリウム	A	中和後に脱塩処理	
27	PURExpress	無	---	---	---	---	D		
28	PURExpress	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A		
29	S30	無	---	---	---	---	D		
30	S30	有	PA	PBS-T2 固→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	C		

[0097] アフィニティー精製を行っていない条件（No. 1、27、及び29）で

は、無細胞発現液の毒性に起因して細胞が完全に死滅しており、本条件では生理活性を評価することは不可能である。

アフィニティー精製を行った条件においても、液A又は液Bの溶解物濃度が高い条件（No. 6～9）では液A及び液Bの混合溶液の細胞毒性に起因して、生細胞数が大幅に減少している。

また、液Bにより中和が行われていない条件（No. 10）では、液AのpHに起因して、生細胞数が大幅に減少している。このように細胞が瀕死の条件下で生理活性評価を行うことは極めて困難である。

液AがPAペプチド溶液である条件（No. 12）では生細胞数の減少が観察されている。このような条件下では、生理活性評価を実施することは不可能ではないが、実施例2にて後述するように、このようにペプチドを用いて目的物を競合的に溶出する方法は、溶出効率が低く、評価濃度が著しく低下してしまうため、生理活性評価に使用し難い。溶出効率を向上するべくPAペプチドの濃度を高めると、PAペプチドが高濃度に存在することに起因する毒性も強くなるため、高い溶出効率と低い毒性の両立は困難である。このため、競合的溶出を用いた生理活性評価は極めて困難である。

溶出後に夾雑成分を除去するべくサイズ排除カラム精製工程を行った条件（No. 26）では生細胞数は維持されているが、実施例2にて後述する通り、夾雑成分を除去する工程でのペプチドロスが多く、高い評価濃度と低い毒性の両立は困難である。

液A及び液Bが低濃度の酸又は塩基である条件（No. 2～5、11、13～25、28、及び30）では、生細胞数は維持されており、本条件下で生理活性評価は実施可能であることを示している。

溶出直前の洗浄工程が水であるNo. 2と、PBS-TであるNo. 11とを比較すると、No. 2の方が生細胞数が多く、このことから、溶出直前に水で洗浄することにより、わずかに混入するPBS-Tの毒性を除去でき、生細胞数の減少をより抑えられることが示されている。本結果より溶出直前に水で洗浄することにより、生理活性評価の精度と感度をより向上させる

ことができる。

[0098] <実施例2：アフィニティー精製したポリペプチドの生理活性評価>

本実施例では、bFGF様の生理活性を有する配列番号2のポリペプチドについて、無細胞発現を行った後にアフィニティー精製及び中和処理を行い、アフィニティー精製及び中和処理における収率、及びアフィニティー精製及び中和処理を行って得られたポリペプチド溶液を用いた生理活性評価を実施した。アフィニティー精製及び中和処理における収率は、高いポリペプチド濃度で生理活性評価を実現するための重要な性能指標である。

[0099] 配列番号2：H-C-SYERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQFHGHEAPFRV-X-V

(Xは非天然アミノ酸残基であるクロロアセチル化リジン残基を示す。本ポリペプチドは、N末端から一つ目のシステインと一つ目のクロロアセチル化リジンの側鎖間でチオエーテル結合を形成するとともに、N末端から二つ目のシステインと二つ目のクロロアセチル化リジンの側鎖間でもチオエーテル結合を形成している、環を二つ有するポリペプチドである。)

[0100] ポリペプチドの無細胞発現を下記の手順で実施した。

まず翻訳促進配列(配列番号3)、配列番号2のポリペプチド、濃度定量用のHiBiTag(配列番号4)、及びアフィニティー精製用のアフィニティータグ(配列番号5～10のいずれか1種)を、GGSリンカーを介して順に連結した融合ペプチド(配列番号11～16)を設計した。

[0101] 配列番号3：VKKTKT

配列番号4：VSGWRLFKKIS

配列番号5(PAタグ)：GVAMPGAEDDVV

配列番号6(FLAGタグ)：DYKDDDDK

配列番号7(HAタグ)：YPYDVPDYA

配列番号8(Hisタグ)：HHHHHH

配列番号9(c-Mycタグ)：EQKLISEEDL

配列番号10(Streptタグ)：WSHPQFEK

配列番号 11 (PA タグ付き融合ペプチド) : MVKKTKTH-C-S
YERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQFHGH
EAPFRV-X-VGSGVSGWRLFKKISSGSGVAMPGA
EDDVV

配列番号 12 (FLAG タグ付き融合ペプチド) : MVKKTKTH-C-
-SYERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQFH
GHEAPFRV-X-VGSGVSGWRLFKKISSGSDYKDD
DDK

配列番号 13 (HA タグ付き融合ペプチド) : MVKKTKTH-C-S
YERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQFHGH
EAPFRV-X-VGSGVSGWRLFKKISSGSYPYDVPD
YA

配列番号 14 (His タグ付き融合ペプチド) : MVKKTKTH-C-
SYERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQFHG
HEAPFRV-X-VGSGVSGWRLFKKISSGSHHHHHH

配列番号 15 (c-Myc タグ付き融合ペプチド) : MVKKTKTH-
C-SYERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQF
HGHEAPFRV-X-VGSGVSGWRLFKKISSGSEQKL
ISEEDL

配列番号 16 (Strep タグ付き融合ペプチド) : MVKKTKTH-
C-SYERLQFHGHEAPFRV-X-VSH-C-SYERLQF
HGHEAPFRV-X-VGSGVSGWRLFKKISSGWSHP
QFEK

[0102] 次いで、上記融合ペプチド（配列番号 11～16）をコードする DNA 配列に対し、5' 末端側に T7 プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列、開始コドン（ATG）等の転写及び翻訳開始に必要な配列、3' 末端側に終止コドン群を付与した鋳型 DNA 配列（配列番号 17～22）を設計した。本鋳型 DNA 配列中にトリプレット TAG コドンが含まれる場合は、上記コ

ドンをクロロアセチル化リジンのコドンに当てているため、上記DNA配列がコードするペプチドは、システインのチオール基とクロロアセチル化リジンのクロロアセチル基とが自発的にチオエーテル結合を形成し、環を二つ有するポリペプチドとなる。

[0103] 配列番号17 (PAタグ付き融合ペプチド用鋳型DNA) : g a a a t t
a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a g a c c a c a a c g g t t t
c c c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g a a g
g a g a t a t a c c a A T G G T T A A A A A A C A A A A A C A C A
T T G C T C T T A C G A A C G T C T G C A G T T C C A T G G T C A T
G A A G C T C C G T T C C G T G T T T A G G T T T C G C A C T G T A
G C T A T G A G C G C T T G C A A T T T C A C G G C C A C G A G G C
A C C C T T T C G C G T A T A G G T A G G A A G T G G T G T A A G T
G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C A G C G G C A
G T G G A G T T G C A A T G C C T G G T G C A G A A G A T G A T G T
A G T A t a a t g a

[0104] 配列番号18 (FLAGタグ付き融合ペプチド用鋳型DNA) : g a a a
t t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a g a c c a c a a c g g t
t t c c c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g a
a g g a g a t a t a c c a A T G G T T A A A A A A C A A A A A C A
C A T T G C T C T T A C G A A C G T C T G C A G T T C C A T G G T C
A T G A A G C T C C G T T C C G T G T T T A G G T T T C G C A C T G
T A G C T A T G A G C G C T T G C A A T T T C A C G G C C A C G A G
G C A C C C T T T C G C G T A T A G G T A G G A A G T G G T G T A A
G T G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C A G C G G
C A G T G A C T A C A A A G A C G A C G A C G A C A A A t a a t g a

[0105] 配列番号19 (HAタグ付き融合ペプチド用鋳型DNA) : g a a a t t
a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a g a c c a c a a c g g t t t
c c c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g a a g

g a g a t a t a c c a A T G G T T A A A A A A C A A A A C A C A
T T G C T C T T A C G A A C G T C T G C A G T T C C A T G G T C A T
G A A G C T C C G T T C C G T G T T T A G G T T T C G C A C T G T A
G C T A T G A G C G C T T G C A A T T T C A C G G C C A C G A G G C
A C C C T T T C G C G T A T A G G T A G G A A G T G G T G T A A G T
G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C A G C G G C A
G T T A C C C G T A C G A C G T T C C G G A C T A C G C T t a a t g
a

[0106] 配列番号20 (Hisタグ付き融合ペプチド用鋳型DNA) : g a a a t
t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a g a c c a c a a c g g t t
t c c c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g a a
g g a g a t a t a c c a A T G G T T A A A A A A C A A A A C A C
A T T G C T C T T A C G A A C G T C T G C A G T T C C A T G G T C A
T G A A G C T C C G T T C C G T G T T T A G G T T T C G C A C T G T
A G C T A T G A G C G C T T G C A A T T T C A C G G C C A C G A G G
C A C C C T T T C G C G T A T A G G T A G G A A G T G G T G T A A G
T G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C A G C G G C
A G T C A T C A T C A T C A T C A T C A T t a a t g a

[0107] 配列番号21 (c-Mycタグ付き融合ペプチド用鋳型DNA) : g a a
a t t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a g a c c a c a a c g g
t t t c c c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g
a a g g a g a t a t a c c a A T G G T T A A A A A A C A A A A C
A C A T T G C T C T T A C G A A C G T C T G C A G T T C C A T G G T
C A T G A A G C T C C G T T C C G T G T T T A G G T T T C G C A C T
G T A G C T A T G A G C G C T T G C A A T T T C A C G G C C A C G A
G G C A C C C T T T C G C G T A T A G G T A G G A A G T G G T G T A
A G T G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C A G C G
G C A G T G A A C A G A A A C T G A T C T C T G A A G A A G A C C T

Gt a a t g a

[0108] 配列番号22 (Streptタグ付き融合ペプチド用鋳型DNA) : g a a
a t t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g a g a c c a c a a c g g
t t t c c c t c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g
a a g g a g a t a t a c c a A T G G T T A A A A A A C A A A A A C
A C A T T G C T C T T A C G A A C G T C T G C A G T T C C A T G G T
C A T G A A G C T C C G T T C C G T G T T T A G G T T T C G C A C T
G T A G C T A T G A G C G C T T G C A A T T T C A C G G C C A C G A
G G C A C C C T T T C G C G T A T A G G T A G G A A G T G G T G T A
A G T G G A T G G C G A T T A T T C A A G A A G A T T A G C A G C G
G C A G T T G G T C T C A T C C G C A G T T C G A A A A A t a a t g
a

[0109] 上記配列において、融合ペプチドをコードするDNA配列を大文字で記載し、5'末端及び3'末端に付与した配列を小文字で記載している。また、精製用アフィニティータグをコードするDNA配列に下線を記載している。

[0110] 鋳型DNAは、2段階のオーバーラップエクステンションPCRにより作製した。

1段階目のPCRは、配列番号23のDNA、配列番号24のDNA、配列番号25のDNA、及び配列番号26のDNA、の4種のDNAを、それぞれ0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ となるように混合し、PrimeSTAR Max (Takara, R045B) 存在下、98°C/10秒、39°C/5秒、72°C/5秒、の後、98°C/10秒、58°C/5秒、72°C/5秒の3ステップを27サイクル繰り返すことで、配列番号25のDNAと配列番号26のDNAを連結した。連結したDNAを精製し、50 ng/ μL に希釈した。

[0111] 配列番号23 : G A A A T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G
配列番号24 : C G A A A C C T A A A C A C G G A A
配列番号25 : G A A A T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A

GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
TTAACTTTTAAGAAGGAGATATACCAATGGTTAAA
AAAACAAAAAC

配列番号26 : CGAAACCTAAACACGGAACGGAGCTT
CATGACCATGGAACTGCAGACGTTTCGTAAGAGCA
ATGTGTTTTTTGTTTTTTTAAAC

[0112] 2段階目のPCRは、配列番号23のDNA、配列番号27～32のDNAのいずれか1種、配列番号33～38のDNAのいずれか1種、及び1段階目の精製産物、の4種のDNAを、それぞれ0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0025 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 ng/ μL となるように混合し、PrimeSTAR Max (TaKaRa、R045B) 存在下、98℃/10秒、58℃/5秒、72℃/5秒の3ステップを30サイクル繰り返すことで、配列番号33～38のDNAと1段階目の精製産物を連結し、鋳型DNA (配列番号17～22) を得た。この際、配列番号27～32のDNAと配列番号33～38のDNAについては、同一タグ種を組み合わせることで連結反応を行った。得られた鋳型DNAを精製し、50 ng/ μL に希釈した。

[0113] 配列番号27 (PAタグ) : TCATTATACTACATCATCTTCTGCACCAG

配列番号28 (FLAGタグ) : TCATTATTTGTCGTCGTCG

配列番号29 (HAタグ) : TCATTAAGCGTAGTCCGGAAAC

配列番号30 (Hisタグ) : TCATTAATGATGATGATGATGATGA

配列番号31 (c-Mycタグ) : TCATTACAGGTCTTCTTCAGAGATCAG

配列番号32 (Strepタグ) : TCATTATTTTTTCGAACT

GCG

配列番号33 (PAタグ) : CATCATCTTCTGCACCAGGC
ATTGCAACTCCACTGCCGCTGCTAATCTTCTTGA
ATAATCGCCATCCACTTACACCACTTCCTACCTA
TACGCGAAAGGGTGCCCTCGTGGCCGTGAAATTGC
AAGCGCTCATAGCTACAGTGCGAAACCTAAACAC
GGAA

配列番号34 (FLAGタグ) : TCATTATTTGTGTCGTCGTC
GTCTTTGTAGTCACTGCCGCTGCTAATCTTCTTG
ATAATCGCCATCCACTTACACCACTTCCTACCT
ATACGCGAAAGGGTGCCCTCGTGGCCGTGAAATTG
CAAGCGCTCATAGCTACAGTGCGAAACCTAAACA
CGGAA

配列番号35 (HAタグ) : ATTAAGCGTAGTCCGGAACG
TCGTACGGGTA ACTGCCGCTGCTAATCTTCTTGA
ATAATCGCCATCCACTTACACCACTTCCTACCTA
TACGCGAAAGGGTGCCCTCGTGGCCGTGAAATTGC
AAGCGCTCATAGCTACAGTGCGAAACCTAAACAC
GGAA

配列番号36 (Hisタグ) : TCATTAATGATGATGATGA
TGATGACTGCCGCTGCTAATCTTCTTGAATAATC
GCCATCCACTTACACCACTTCCTACCTATACGCG
AAAGGGTGCCCTCGTGGCCGTGAAATTGCAAGCGC
TCATAGCTACAGTGCGAAACCTAAACACGGAA

配列番号37 (c-My cタグ) : ACAGGTCTTCTTCAGAG
ATCAGTTTCTGTTCACTGCCGCTGCTAATCTTCT
TGAATAATCGCCATCCACTTACACCACTTCCTAC
CTATACGCGAAAGGGTGCCCTCGTGGCCGTGAAAT

TGCAAGCGCTCATAGCTACAGTGCGAAACCTAAA
CACGGAA

配列番号38 (Streptag) : TCATTATTTTTTCGAACT
GCGGATGAGACCAACTGCCGCTGCTAATCTTCTT
GAATAATCGCCATCCACTTACACCACTTCCTACC
TATACGCGAAAGGGTGCCCTCGTGGCCGTGAAATT
GCAAGCGCTCATAGCTACAGTGCGAAACCTAAAC
ACGGAA

- [0114] 作製した鋳型DNAを、表3に記載の条件に沿って、無細胞発現、アフィニティー精製、及び中和処理した。
- [0115] ポリペプチドの無細胞発現は、実施例1と同様、PUREfrex2.0 (ジーンフロンティア株式会社、PF201-0.25-5)、PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit (NEW ENGLAND BioLabs、E6800S)、及びS30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega、L1110)の3種を用いて行った。それぞれ下記組成で反応液を調製し、37℃で1時間反応させることで、ポリペプチドを無細胞発現した。
- [0116] ・PUREfrex2.0 : Solution I 5.0 μ L、Solution II 0.5 μ L、Solution III 1.0 μ L、アミノアシルtRNA (1)の乾燥体 (終濃度0.5 μ g/ μ L)、鋳型DNA 2.0 μ L、及び水1.5 μ Lを混合。
- ・PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit : Solution A 4.0 μ L、Solution B 3.0 μ L、アミノアシルtRNA (1)の乾燥体 (終濃度0.5 μ g/ μ L)、鋳型DNA 2.0 μ L、及び水1.0 μ Lを混合。
- ・S30 T7 High-Yield Protein Expression System : S30 Premix Plus 4.0 μ L、T7 S30 Extract 3.6 μ L、アミノアシルtRNA (1)の乾燥体 (終濃度0.5 μ g/ μ L)、鋳型DNA 2.0 μ L、及び水0.4 μ Lを混合。

[0117] 無細胞発現したポリペプチドを実施例 1 と同様の手順でアフィニティー精製及び中和処理した。アフィニティー精製を実施しない条件については、実施例 1 と同様、アフィニティー精製を実施した条件と無細胞発現液の希釈度を統一するべく、無細胞発現液を 6.5 μ L 分取し、水 17.5 μ L と混合した。

[0118] アフィニティー精製及び中和処理後のポリペプチド濃度は、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I (T0Y0B0、NKB-101) にて 100 倍希釈したアフィニティー精製及び中和処理産物を、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega、N3040) と、濃度既知のペプチド（配列番号 39）を用い、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System の標準プロトコルに則り測定した。得られたポリペプチド濃度を有効数字 2 桁で表 3 に記載した。配列番号 39 のペプチドは、化学合成により作製した後に、500 μ M になるよう PBS（-）に溶解し、溶解液を適宜希釈して用いた。

[0119] 配列番号 39 : E Q K L I S E E D L G G S V S G W R L F K K I S

[0120] アフィニティー精製を実施しない条件におけるポリペプチド濃度を基にアフィニティー精製及び中和処理におけるポリペプチド収率を算出し、表 3 に記載した。

アフィニティー精製及び中和処理におけるポリペプチド収率の評価基準は以下の通りである。アフィニティー精製及び中和処理におけるポリペプチドの収率が以下の割合である場合に、それぞれ評価 A ～ D と判定した。評価は A、B 又は C であることが好ましい。

A . . . 50% 以上

B . . . 10% 以上、50% 未満

C . . . 5% 以上、10% 未満

D . . . 5% 未満

[0121]

[表3]

アブアイニテアー精製及び中和処理におけるポリペプチド収率

No.	無細胞発現液	精製有無	アブアイニテアー	洗浄工程	液 A	液 B	評価区分	備考
2	PUREflex	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	
3	PUREflex	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	20mM 塩酸	200mM 炭酸水素ナトリウム	A	
4	PUREflex	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	30mM 塩酸	300mM 炭酸水素ナトリウム	A	
5	PUREflex	有	PA	PBS-T3 回→水 1 回	40mM 塩酸	400mM 炭酸水素ナトリウム	A	
11	PUREflex	有	PA	PBS-T3 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	
12	PUREflex	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	0.5mg/ml PA ペプチド	水	D	
13	PUREflex	有	FLAG	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	B	
14	PUREflex	有	HA	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	
15	PUREflex	有	His	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	
22	PUREflex	有	Strep	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	C	
23	PUREflex	有	c-Myc	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	
24	PUREflex	有	HA	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 水酸化ナトリウム	90mM 塩酸	A	
25	PUREflex	有	c-Myc	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 水酸化ナトリウム	90mM 塩酸	A	
26	PUREflex	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	100mM 塩酸	1000mM 炭酸水素ナトリウム	D	中和後に廃液処理
28	PURExpress	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	
30	S30	有	PA	PBS-T2 回→水 1 回	10mM 塩酸	100mM 炭酸水素ナトリウム	A	

[0122] タグ種によりポリペプチドの収率は多少異なるが、液A及び液Bが低濃度の酸又は塩基である条件（No. 2～5、11、13～15、22～25、28、及び30）では、評価に十分な収率を実現している。

液AがPAペプチド溶液である条件（No. 12）では溶出効率が低く、評価濃度が著しく低下してしまうため、生理活性評価に使用し難い。

溶出後に夾雑成分を除去するべくサイズ排除カラム精製工程を行った条件（No. 26）では夾雑成分を除去する工程でのペプチドロスが多く、評価濃度が著しく低下してしまうため、生理活性評価に使用し難い。

[0123] 各条件でアフィニティー精製及び中和処理したポリペプチドの生理活性を、実施例1と同様、FGFR（線維芽細胞増殖因子受容体）を安定発現したBaF3細胞増殖性を用いて評価した。本細胞は各種FGF（線維芽細胞増殖因子）及びその類似活性分子の存在下で増殖し、非存在下では死滅する性質を有するため、bFGF様の生理活性を有するポリペプチド存在下では増殖活性を示す。

無細胞発現液をより少ない希釈度で細胞に作用させるべく、通常組成より3倍濃いRPMI培地（以降、「濃縮培地」と記載）を、RPMI-1640（10×）（Sigma-Aldrich、R1145）750 μ L、Fetal Bovine Serum（Thermo Fisher Scientific、10270-106）750 μ L、Penicillin Streptomycin（Thermo Fisher Scientific、15140-122）75 μ L、GlutaMAX（Thermo Fisher Scientific、35050-061）75 μ L、Sodium Bicarbonate 7.5% solution（Thermo Fisher Scientific、25080094）200 μ L、葉酸（富士フイルム和光純薬株式会社、060-01802、1%DMSO水溶液で100 μ g/mLになるよう溶解）75 μ L、Heparin Solution（2mg/mL）（STEM CELL、07980）10 μ L、及び水 565 μ Lを混合することで調製した。ポリペプチドのbFGF様の生理活性を評価するべく、実施例1の濃縮培地と異なり、本濃縮培地にはbFGFは含まれていない。

[0124] FGF Rを安定発現したBaF3細胞をPBSで2回洗浄した後、RPMI-1640（L-グルタミン、フェノールレッド含有）（富士フイルム和光純薬株式

会社、189-02025) とFetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific、10270-106) を10 : 1で混合した培地を用いて 4×10^5 cells/mLに調製した。

- [0125] 各条件でアフィニティー精製及び中和処理したポリペプチド24 μ Lと濃縮培地12 μ Lを混合した液を、384ウェルプレート (Perkin Elmer、6057300) に15 μ Lずつ分注後、各ウェルに上記の細胞懸濁液を5 μ L添加し、振盪混合後、37℃ (5%CO₂) で2晩培養した。この際、生理活性を有さない陰性対照として、ポリペプチドの代わりに水24 μ Lを濃縮培地12 μ Lと混合した液を15 μ Lずつ分注したウェルを用意した。
- [0126] 2晩培養後、Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10mg/mL Solution in Water(Thermo Fisher Scientific、H3570)、-Cellstain (登録商標) - Calcein-AM solution (1 mg/mL DMSO溶液) (DOJINDO、C396)、及び-Cellstain (登録商標) - PI solution (DOJINDO、P378) をRPMI (10%FBS) 培地にそれぞれ終濃度で1 / 1000体積量ずつ添加し、室温で1時間静置することで生死染色し、共焦点顕微鏡 (横河電機株式会社、CQ1) にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、表4に記載した。

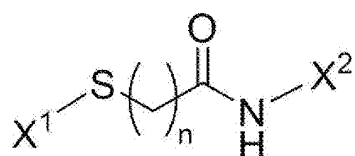
[0127]

- [0128] 各例において、生細胞は陰性対照より10倍以上増加しており、本発明の手法によって無細胞発現したポリペプチドの生理活性を評価可能であることを示している。
- [0129] 2023年4月11日出願された日本国特許出願第2023-064440号の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] (A) 無細胞発現後のポリペプチド粗溶液を担体に接触させて、pH 応答性のアフィニティータグを有するポリペプチドを担体に付着させることと、
- (B) 前記担体に付着させた前記ポリペプチドを、50 mM未満の酸性水溶液又は塩基性水溶液で溶出して、溶出液を得ることと、
- (C) 前記溶出液中に含まれる酸又は塩基を中和するために、前記溶出液に塩基性水溶液又は酸性水溶液を添加し、中和反応で形成される塩の濃度が50 mM未満となるように中和して、ポリペプチド溶液を得ることと、
- を含む、生理活性評価用のポリペプチド溶液を調製する方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の方法によりポリペプチド溶液を調製することと、
- 前記ポリペプチド溶液を細胞に接触させて、前記ポリペプチドの生理活性を評価することと、
- を含む、ポリペプチドの生理活性を評価する方法。
- [請求項3] 前記ポリペプチドが非天然アミノ酸残基を含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記ポリペプチドが1個以上の環構造を含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。
- [請求項5] 前記環構造が下記構造を含む、請求項4に記載の方法。

[化1]



式中、X¹及びX²はそれぞれ独立に任意の連結基であり、nは1～10の整数を表す。

- [請求項6] 前記ポリペプチドが1～4個の環構造を含む、請求項4に記載の方法。

- [請求項7] 前記（B）では50 mM未満の酸性水溶液を用い、前記（C）では塩基性水溶液を用いる、請求項1又は請求項2に記載の方法。
- [請求項8] 前記酸性水溶液が塩酸水溶液である、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記塩基性水溶液が炭酸水素ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、又は炭酸水素ナトリウムと炭酸ナトリウムの混合水溶液である、請求項7に記載の方法。
- [請求項10] 前記担体が磁気ビーズである、請求項1又は請求項2に記載の方法。
- [請求項11] 前記アフィニティータグが、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグ、c-Mycタグ、V5タグ、Streptタグ、又はPAタグである、請求項1又は請求項2に記載の方法。
- [請求項12] 前記（A）の前に、前記ポリペプチドを無細胞発現させることをさらに含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。
- [請求項13] 前記（A）の後、前記（B）の前に、前記担体を水で洗浄する工程をさらに含む、請求項1又は請求項2に記載の方法。