

明 細 書

発明の名称：

ペプチド、細胞増殖促進剤、タンパク質産生促進剤、培地、該ペプチドを用いた細胞増殖方法、及び、該ペプチドを用いたタンパク質産生方法

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチドに関する。特に、動物細胞培養用に適した新規なトリペプチド、該ペプチドを含む細胞増殖促進剤、タンパク質産生促進剤、培地、該ペプチドを用いた細胞増殖方法、及び、該ペプチドを用いたタンパク質産生方法に関する。

背景技術

[0002] 動物細胞を培養して該動物細胞の産生する天然型タンパク質を得ようとする場合、あるいは所望のタンパク質をコードする遺伝子を導入した動物細胞を培養して所望のタンパク質等を製造する場合、ビタミン類、アミノ酸類、塩類、糖類等の栄養成分の他に、動物細胞の増殖の目的で、牛胎児血清等の哺乳動物由来の抽出物や、魚肉関連成分が添加される（特許文献１、２）。

[0003] しかしながら、牛胎児血清等の哺乳動物由来の抽出物は、培地に対し５％～２０％程度で添加され、培地のコストの７５％～９５％を占めることや、動物由来のために品質にロット差があるという問題があった。さらに、狂牛病、ウシ海綿状脳症、感染性海綿状脳症、クロイツフェルト・ヤコブ病等との相関が懸念されるため、牛胎児血清等の哺乳動物由来の抽出物を含有しない培地も試みられたが、培養の早期に細胞生存率の著しい低下を生じ、長期培養や大量培養を行うことが困難であるという別の課題が発生した。

[0004] また、魚肉抽出物や魚肉の酵素分解物である魚肉関連成分が添加されることにより、コスト面や、培養早期での細胞生存率低下の面の課題は解決された。しかしながら、動物由来に伴う品質にロット差があることには変わりはないという問題が残った。さらには、該魚肉関連成分の成分詳細が不明であり、また対象となる魚の種類、部位、酵素分解条件によって成分が変動する

ため、培地として使用する際にさまざまな未知のリスクを伴い、安全に使用しづらいという問題があった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開WO 99／63058号公報

特許文献2：特開2003-334068号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、動物由来の成分を含まない、合成培地を提供することを課題とする。特に、動物由来の成分が含まれなくとも、細胞増殖を促進し、又、タンパク質産生の促進に寄与するペプチドを含む培地を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記事情に鑑みて鋭意検討した結果、細胞増殖を促進し、又、タンパク質産生の促進に寄与するペプチドを見出し、該ペプチドを含む細胞増殖促進剤、該ペプチドを含むタンパク質産生促進剤、該ペプチドを含む培地を見出した。

[0008] すなわち、本発明のペプチドは、G l y - G l u - L y s (G E K) 、 A s p - G l y - P r o (D G P) 、 A l a - G l y - L y s (A G K) 、 G l y - P r o - P r o (G P P) 、 G l y - G l y - P r o (G G P) 、 A l a - G l u - L y s (A E K) 、 A l a - G l y - G l y (A G G) 、 A l a - S e r - A s n (A S N) 、及び、G l u - G l y - L y s (E G K) からなる群より選択されることを特徴とする。

[0009] 本発明の細胞増殖促進剤は、上記ペプチドを1種以上含むことを特徴とする。

[0010] 本発明のタンパク質産生促進剤は、上記ペプチドを1種以上含むことを特徴とする。

[0011] 本発明の培地は、上記細胞増殖促進剤、又は、上記タンパク質産生促進剤を含むことを特徴とする。

[0012] 本発明の細胞増殖方法は、上記ペプチドを1種以上用いることを特徴とする。

[0013] 本発明のタンパク質産生方法は、上記ペプチドを1種以上用いることを特徴とする。

発明の効果

[0014] 本発明のペプチドにより、動物由来成分を含まず、化学的に合成した物質を配合した、細胞増殖促進剤、タンパク質産生促進剤、培地、細胞増殖方法、及び、タンパク質産生方法を提供することができる。すなわち、狂牛病等との相関の懸念もなく、コストも抑えられ、かつ、成分詳細が明確となることにより品質の安定した細胞増殖促進剤、タンパク質産生促進剤、培地を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]細胞増殖試験における、G E Kの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図2]細胞増殖試験における、D G Pの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図3]細胞増殖試験における、A G Kの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図4]細胞増殖試験における、G P Pの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図5]細胞増殖試験における、G G Pの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図6]細胞増殖試験における、A E Kの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図7]細胞増殖試験における、A G Gの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図8]細胞増殖試験における、ASNの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図9]細胞増殖試験における、EGKの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図10]細胞増殖試験における、GGGの濃度と生細胞数（吸光度）との関係を示す。

[図11]細胞増殖試験における、各トリペプチドの生細胞数（吸光度）を示す。

[図12]細胞増殖試験における、各トリペプチドの生細胞数（吸光度）の経時変化を示す。

[図13]3日間の細胞増殖試験における、各トリペプチドの生細胞数を示す。

[図14]3日間の細胞増殖試験における、各トリペプチドの細胞生存率を示す。

[図15]5日間の細胞増殖試験における、各トリペプチドの生細胞数を示す。

[図16]5日間の細胞増殖試験における、各トリペプチドの細胞生存率を示す。

[図17]トリペプチド1種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの生細胞数を示す。

[図18]トリペプチド1種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの細胞生存率を示す。

[図19]トリペプチド1種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの産生タンパク質量を示す。

[図20]トリペプチド2種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの組み合わせの生細胞数を示す。

[図21]トリペプチド2種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの組み合わせの細胞生存率を示す。

[図22]トリペプチド2種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの組み合わせの産生タンパク質量を示す。

[図23]トリペプチド3種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの組み合わせの生細胞数を示す。

[図24]トリペプチド3種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの組み合わせの細胞生存率を示す。

[図25]トリペプチド3種の細胞増殖試験における、各トリペプチドの組み合わせの産生タンパク質量を示す。

[図26]ビタミン及び核酸を添加した細胞増殖試験における、A G Kの生細胞数、及び、産生タンパク質量を示す。

[図27]完全合成培地を用いた細胞増殖試験における、G E Kの濃度と生細胞数との関係を示す。

[図28]完全合成培地を用いた細胞増殖試験における、G E Kの濃度と細胞生存率との関係を示す。

[図29]完全合成培地を用いた細胞増殖試験における、G E Kの濃度と産生タンパク質量との関係を示す。

[図30]ビタミン等補強培地を用いた細胞増殖試験における、各トリペプチドの生細胞数を示す。

[図31]ビタミン等補強培地を用いた細胞増殖試験における、各トリペプチドの細胞生存率を示す。

[図32]ビタミン等補強培地を用いたタンパク質産生試験における、各トリペプチドの産生タンパク質量を示す。

[図33]ビタミン等補強培地を用いたタンパク質産生試験における、各トリペプチドの産生タンパク質量を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明の実施形態について、以下に具体的に説明する。

[0017] (ペプチド)

本発明のペプチドは、G l y - G l u - L y s (G E K)、A s p - G l y - P r o (D G P)、A l a - G l y - L y s (A G K)、G l y - P r o - P r o (G P P)、G l y - G l y - P r o (G G P)、A l a - G l

u-Lys (AEK)、Ala-Gly-Gly (AGG)、Ala-Ser-Asn (ASN)、及び、Glu-Gly-Lys (EGK) からなる群より選択される。また、上記ペプチドは薬学上許容される塩とすることができ、さらにはペプチドの活性の変わらないアミノ酸を化学修飾することができる。なかでも、Gly-Glu-Lys (GEK)、Asp-Gly-Pro (DGP)、Ala-Gly-Lys (AGK)、Gly-Pro-Pro (GPP)、及び、Gly-Gly-Pro (GGP) が好ましい。

「薬学上許容される塩」としては、塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩等の無機酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の無機塩基塩、スルホン酸塩、コハク酸塩、シュウ酸塩等の有機酸塩、アルキルアンモニウム塩等の有機塩基塩等が例示される。

「ペプチドの活性の変わらないアミノ酸を化学修飾する」とは、アミノ酸が化学修飾されても大きくペプチドの活性が変わらないもので化学修飾することであり、アミド、エステル、アシル基等によるC-末端の修飾、アセチル基によるN-末端の修飾等が例示される。

なお、上記プロリン (Pro (P)) は、ヒドロキシル基が導入されたヒドロキシプロリン (Hyp) となってもよい。

[0018] 上記トリペプチドは、主に魚肉の抽出物やその酵素分解物に含まれる数百種類のさまざまな長さのペプチドを中心に、動物細胞増殖を促進するもの及びタンパク質産生を促進するものをさまざまな条件で分画して同定し、その効果をペプチドごとに確認することにより、鋭意探索されたものである。

[0019] 上記ペプチドは、魚肉の抽出物やその酵素分解物から分画する方法や、ペプチド合成法を含む化学合成法、あるいは、組換えDNA法による発現のような手段によって、得ることができる。

魚肉の抽出物やその酵素分解物等から分画する方法では、ゲルろ過クロマトグラフィー、順相／逆相HPLCの各種条件を調整して分画、単離する。化学合成法では、合成されたアミノ酸もしくは化学修飾されたアミノ酸を化学反応により合成し、特定の配列を有するペプチドを得ることができる。組

換えDNA法では、ペプチド配列を複数含む組換えタンパク質を組換え体により生成させ、それらのタンパク質を精製後、酵素処理、あるいは化学処理等により分解することにより、目的とするペプチドを得ることができる。

[0020] (細胞増殖促進剤)

本発明の細胞増殖促進剤は、G l y - G l u - L y s (G E K)、A s p - G l y - P r o (D G P)、A l a - G l y - L y s (A G K)、G l y - P r o - P r o (G P P)、G l y - G l y - P r o (G G P)、A l a - G l u - L y s (A E K)、A l a - G l y - G l y (A G G)、A l a - S e r - A s n (A S N)、及び、G l u - G l y - L y s (E G K) かなる群より選択される、1種以上のペプチドを含む。また、該1種以上のペプチドを含まない場合に比べ、細胞増殖を促進するものである。

[0021] 上記ペプチドは薬学上許容される塩とすることができ、さらにはペプチドの活性の変わらないアミノ酸を化学修飾することができる。上記プロリン (P r o (P)) は、ヒドロキシル基が導入されたヒドロキシプロリン (H y p) となってもよい。

[0022] ペプチドの選択は、上記ペプチドから1種以上から適宜組み合わせることにより行われる。

なかでも、1種の場合は、G l y - G l u - L y s (G E K)、A s p - G l y - P r o (D G P)、A l a - G l y - L y s (A G K)、G l y - P r o - P r o (G P P)、G l y - G l y - P r o (G G P) がより好ましい。

2種の場合は、A s p - G l y - P r o (D G P) 及びA l a - G l y - L y s (A G K)、G l y - G l u - L y s (G E K) 及びA l a - G l y - L y s (A G K)、A s p - G l y - P r o (D G P) 及びG l y - G l u - L y s (G E K)、G l y - P r o - P r o (G P P) 及びA l a - G l y - L y s (A G K)、G l y - P r o - P r o (G P P) 及びG l y - G l u - L y s (G E K) 等が好ましい組み合わせとして例示される。

3種の場合は、G l y - P r o - P r o (G P P) + A s p - G l y - P

ro (DGP) + Gly-Glu-Lys (GEK) の組み合わせ、Gly-Pro-Pro (GPP) + Asp-Gly-Pro (DGP) + Ala-Gly-Lys (AGK) の組み合わせ、Gly-Pro-Pro (GPP) + Gly-Glu-Lys (GEK) + Ala-Gly-Lys (AGK) の組み合わせ等が、好ましい組み合わせとして例示される。

[0023] (タンパク質産生促進剤)

本発明のタンパク質産生促進剤は、Gly-Glu-Lys (GEK)、Asp-Gly-Pro (DGP)、Ala-Gly-Lys (AGK)、Gly-Pro-Pro (GPP)、Gly-Gly-Pro (GGP)、Ala-Glu-Lys (AEK)、Ala-Gly-Gly (AGG)、Ala-Ser-Asn (ASN)、及び、Glu-Gly-Lys (EGK) からなる群より選択される、1種以上のペプチドを含む。また、該1種以上のペプチドを含まない場合に比べ、タンパク質産生を促進するものである。

[0024] 上記ペプチドは薬学上許容される塩とすることができ、さらにはペプチドの活性の変わらないアミノ酸を化学修飾することができる。上記プロリン (Pro (P)) は、ヒドロキシル基が導入されたヒドロキシプロリン (Hyp) となってもよい。

[0025] ペプチドの選択は、上記ペプチドから1種以上から適宜組み合わせることにより行われる。

なかでも、1種の場合は、Gly-Glu-Lys (GEK)、Asp-Gly-Pro (DGP)、Ala-Gly-Lys (AGK)、Gly-Pro-Pro (GPP)、Gly-Gly-Pro (GGP) が好ましいペプチドとして例示される。

2種の場合は、Asp-Gly-Pro (DGP) 及びAla-Gly-Lys (AGK)、Gly-Glu-Lys (GEK) 及びAla-Gly-Lys (AGK)、Asp-Gly-Pro (DGP) 及びGly-Glu-Lys (GEK)、Gly-Pro-Pro (GPP) 及びAla-G

Gly-Lys (AGK)、Gly-Pro-Pro (GPP) 及び Gly-Glu-Lys (GEK) 等が好ましい組み合わせとして例示される。

3 種の場合は、Gly-Pro-Pro (GPP) + Asp-Gly-Pro (DGP) + Gly-Glu-Lys (GEK) の組み合わせ、Gly-Pro-Pro (GPP) + Asp-Gly-Pro (DGP) + Ala-Gly-Lys (AGK) の組み合わせ、Gly-Pro-Pro (GPP) + Gly-Glu-Lys (GEK) + Ala-Gly-Lys (AGK) の組み合わせ等が、好ましい組み合わせとして例示される。

[0026] (培地)

本発明の培地は、上記ペプチドを含む上記細胞増殖促進剤、又は、上記ペプチドを含む上記タンパク質産生促進剤を含む。

[0027] 培地中のペプチドの濃度は、細胞や培養条件により適宜設定される。すなわち、培地中のペプチドの量は、細胞が生存維持できる濃度が下限濃度であり、細胞増殖促進剤やタンパク質産生促進剤が添加されていない培地に比べて細胞増殖の量やタンパク質産生量が最大となる濃度が好適濃度であり、培地の組成として有害とならない最大濃度が上限濃度である。ペプチド 1 種あたりの濃度の一例は、培地に対し 0.1 mM~50 mM、好ましくは 0.2 mM~10 mM、より好ましくは 0.5 mM~5 mM である。

[0028] 培地には、動物細胞培養用培地で使用される他の成分を適宜配合することができる。ビタミン類、核酸、アミノ酸、無機塩、糖、ポリアミン、炭水化物、タンパク質、脂肪酸、脂質、pH 調整剤、亜鉛、銅、セレン等が例示される。

ビタミン類としては、塩化コリン、ナイアシンアミド、D-パントテン酸ヘミカルシウム塩、葉酸、シアノコバラミン、ピリドキサル塩酸塩、リボフラビン、ビオチン、ミオイノシトール、アスコルビン酸、塩酸チアミン、ビタミン B12 等が例示される。

核酸としては、キサンチン、ヒポキサンチン、ウリジン、グアニン塩酸塩、イノシン、グアノシン、シチジン、チミジン、アデニン等が例示される。

アミノ酸としては、グリシン、L-アラニン、L-アルギニン塩酸塩、L-アスパラギン-水和物、L-アスパラギン酸、L-システイン酸塩酸塩-水和物、L-シスチン二塩酸塩、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-ヒスチジン塩酸塩-水和物、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リシン塩酸塩、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン二ナトリウム塩、L-バリン、アルギニン等が例示される。

無機塩としては、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム-水和物等が例示される。

その他の成分として、D-グルコース、 α -リボ酸、フェノールスルホンフタレイン（フェノールレッド）、ピルビン酸ナトリウム、Albumax（登録商標）II、ヒトトランスフェリン（ホロ）、メタバナジン酸アンモニウム、硫酸銅、塩化マンガン、セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、グルタチオン、メトトレキサート、インスリン等があげられる。さらには、目的に応じ、ウシ胎児血清等の血清成分が含まれてもよいが、培地から動物由来の成分を除く意図がある場合は含有させない。

[0029] （細胞増殖方法及びタンパク質産生方法）

本発明の細胞増殖方法及びタンパク質産生方法は、上記培地に本発明のペプチドを配合し、様々な動物細胞を培養することによって行うものである。

細胞増殖方法及びタンパク質産生方法は、以下に例示するが、これに限定されるものではない。

[0030] 基礎培地を用いて、動物細胞を無血清浮遊化に馴化させる。

Gly-Gly-Lys (GEK)、Asp-Gly-Pro (DGP)、Ala-Gly-Lys (AGK)、Gly-Pro-Pro (GPP)、Gly-Gly-Pro (GGP)、Ala-Gly-Lys (AEK)、Ala-Gly-Gly (AGG)、Ala-Ser-Asn (ASN)、及び、Gly-Gly-Lys (EGK) からなる群より選択される、1

種以上のペプチドを基礎培地に添加する。このとき、基礎培地を補強する成分である、ビタミン、核酸、糖、ポリアミン、アミノ酸を添加してもよい。

バイオリアクターを用いて、ペプチドが添加された基礎培地に、基礎培地で馴化した動物細胞を播種し、細胞増殖及びタンパク質産生を行う。

実施例

[0031] 次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

[0032] (各ペプチド溶液の濃度と生細胞数の関係の測定)

G l y - G l u - L y s (G E K)、A s p - G l y - P r o (D G P)、A l a - G l y - L y s (A G K)、G l y - P r o - P r o (G P P)、G l y - G l y - P r o (G G P)、A l a - G l u - L y s (A E K)、A l a - G l y - G l y (A G G)、A l a - S e r - A s n (A S N)、G l u - G l y - L y s (E G K)、及び、G l y - G l y - G l y (G G G) の配列を有するペプチドを合成し、表1～表10に記載の10倍濃度となるように、ペプチド溶液をそれぞれ調製した。

C H O - K 1 (理化学研究所バイオリソース研究センター、型番R C B 2 3 3 0) を、 3×10^4 c e l l s / m L に調製した細胞懸濁液を96 w e l l プレートへ100 μ L / w e l l となるように播種し、37℃、CO₂5%のインキュベーターで24時間培養した。培地は、10% F B S を含有させた、MEM α 培地 (g i b c o 社) を用いた。

各w e l l の培地を除去し、MEM α 培地 (100 μ L) で洗い出した後、さらに新しいMEM α 培地を90 μ L ずつ分注し、各ペプチド溶液 (10 μ L) をそれぞれ添加して (合計100 μ L / w e l l)、0 mM ~ 5 mM の範囲内の表1～表10に記載の終濃度とし、5日間培養した。なお、比較試料としてペプチドもF B S も含有しない系にて、同様な培養試験を行った。5日間の培養後、生細胞数測定試薬S F (n a c a l a i t e s q u e 社) を10 μ L / w e l l 添加し、37℃、CO₂5%のインキュベーターで2時間呈色反応させ、プレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。

参照波長は630nmとした。なお、450nmの吸光度は細胞数と相関することが確認されている。

[0033] 以上の調製、培養、測定をn=3で行い、各ペプチド溶液の濃度における吸光度を表1～表10、図1～図10に示した。

[0034] [表1]

試験区 GEK(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.128	-0.0903	0.0933
0.257	0.0657	0.1054
0.512	0.3020	0.1473
1.02	0.6377	0.1016
2.05	1.0050	0.1205
4.10	0.5757	0.0055

n=3、平均値

[0035] [表2]

試験区 DGP(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.138	0.0957	0.0779
0.278	0.2464	0.0453
0.555	0.4127	0.0450
1.11	0.5617	0.0947
2.22	0.7657	0.0716
4.44	0.4004	0.0580

n=3、平均値

[0036] [表3]

試験区 AGK(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.123	0.0180	0.0823
0.247	0.1440	0.0613
0.494	0.3360	0.1299
0.99	0.5380	0.0297
1.97	0.6613	0.0490
3.95	0.4693	0.0550

n=3、平均値

[0037]

[表4]

試験区 GPP(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.137	0.1163	0.1072
0.276	0.2303	0.1138
0.550	0.4117	0.1168
1.10	0.6443	0.1129
2.20	0.5700	0.1032
4.40	0.3620	0.0721

n=3、平均値

[0038] [表5]

試験区 GPP(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.135	0.0420	0.0851
0.270	0.0966	0.0863
0.539	0.2946	0.1217
1.08	0.4653	0.0707
2.16	0.5483	0.1205
4.31	0.3286	0.0545

n=3、平均値

[0039] [表6]

試験区 AEK(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.129	0.0350	0.0250
0.259	0.1143	0.0840
0.516	0.1927	0.0850
1.03	0.2337	0.0570
2.06	0.5013	0.1066
4.13	0.4857	0.0873

n=3、平均値

[0040]

[表7]

試験区 AGG(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.156	0.0277	0.0831
0.313	0.0274	0.0458
0.625	0.0367	0.0975
1.25	0.2064	0.1312
2.5	0.3357	0.1854
5	0.2080	0.0951

n=3、平均値

[0041] [表8]

試験区 ASN(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.138	-0.0527	0.0550
0.276	-0.0250	0.0273
0.552	-0.0214	0.0506
1.10	-0.0224	0.0129
2.21	0.1170	0.1066
4.42	0.3320	0.0070

n=3、平均値

[0042] [表9]

試験区 EGK(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.128	0.0383	0.0922
0.257	0.1123	0.0985
0.512	0.0893	0.0710
1.02	0.1503	0.0951
2.05	0.1876	0.0861
4.10	0.2373	0.0824

n=3、平均値

[0043]

[表10]

試験区 GGG(mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
0	0.0000	0.0000
0.156	0.0067	0.0080
0.313	0.0037	0.0056
0.625	0.0027	0.0066
1.25	-0.0013	0.0036
2.5	0.0013	0.0031
5	0.0083	0.0006

n=3、平均値

[0044] 表1～表10、図1～図10より、試験したペプチドにおいては、GGGを除き、ペプチド溶液を添加することにより、添加しない場合に比べ、細胞数が増えることが分かった。また、ペプチドの種類により、細胞数が最も増えるペプチド溶液の濃度は異なることが分かった。

[0045] さらに、ペプチド溶液の濃度を最適化した場合の細胞増殖促進の程度を比較して示すため、試験した各ペプチドについて、細胞数が最も増えるペプチド溶液の濃度における吸光度について、表11及び図11にまとめた。

[0046] [表11]

Peptides (concentration)	濃度 (mM)	吸光度 (450nm)	標準偏差 SD
GGG (5mM)	5.0000	0.0083	0.0006
EGK (4.1mM)	4.0997	0.2373	0.0824
ASN (4.4mM)	4.4166	0.3320	0.0070
AGG (2.5mM)	2.5000	0.3357	0.1854
AEK (2.1mM)	2.0649	0.5013	0.1066
GGP (2.2mM)	2.1566	0.5483	0.1205
GPP (1.1mM)	1.1008	0.6443	0.1129
AGK (2.0mM)	1.9745	0.6613	0.0490
DGP (2.2mM)	2.2182	0.7657	0.0716
GEK (2.1mM)	2.0498	1.0050	0.1205

[0047] 上記試験条件においては、ペプチドの配列が、G l y - G l u - L y s (GEK)、A s p - G l y - P r o (DGP)、A l a - G l y - L y s (AGK)、G l y - P r o - P r o (GPP)、G l y - G l y - P r o (GGP)、A l a - G l u - L y s (AEK)、A l a - G l y - G l y (AGG)、A l a - S e r - A s n (ASN)、G l u - G l y - L y s (

E G K) の順に細胞増殖が促進されることが分かった。

[0048] (各ペプチドの細胞増殖日数と細胞数の関係の測定)

G l y - P r o - P r o (G P P)、A s p - G l y - P r o (D G P)、G l y - G l u - L y s (G E K)、A l a - G l y - L y s (A G K) の配列を有するペプチドを合成し、0 m M ~ 5 m M の範囲内で最も細胞数が増える濃度となるようにペプチド溶液をそれぞれ調製した。すなわち、G l y - P r o - P r o (G P P) は 1 1 m M、A s p - G l y - P r o (D G P) は 2 2 m M、G l y - G l u - L y s (G E K) は 2 1 m M、A l a - G l y - L y s (A G K) は 2 0 m M にそれぞれ調製し、細胞培養試験直前に各 w e l l の総培地容量の 1 / 1 0 量を添加し、それぞれ終濃度を 1 . 1 m M、2 . 2 m M、2 . 1 m M、2 . 0 m M とした。

C H O - K 1 (理化学研究所バイオリソース研究センター、型番 R C B 2 3 3 0) を、 3×10^4 c e l l s / m L に調製した細胞懸濁液を 9 6 w e l l プレートへ $100 \mu L / w e l l$ となるように播種し、 37°C 、 CO_2 5 % のインキュベーターで 24 時間培養した。培地は、1 0 % F B S を含有させた、MEM α 培地 (g i b c o 社) を用いた。

各 w e l l の培地を除去し、MEM α 培地 ($100 \mu L$) で洗い出した後、さらに新しい MEM α 培地を $90 \mu L$ ずつ分注し、各ペプチド溶液 ($10 \mu L$) をそれぞれ添加して (合計 $100 \mu L / w e l l$)、0 ~ 5 日間培養した。1 日毎に、生細胞数測定試薬 S F (n a c a l a i t e s q u e 社) を $10 \mu L / w e l l$ 添加し、 37°C 、 CO_2 5 % のインキュベーターで 2 時間呈色反応させ、プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。参照波長は 630 nm とした。なお、 450 nm の吸光度は細胞数と相関することが確認されている。比較試料としてペプチドも F B S も含有しない系にて、同様な培養試験を行った。

[0049] 以上の調製、培養、測定を $n = 3$ で行い、1 日毎の各ペプチド溶液の吸光度及び標準偏差を表 1 2、図 1 2 に示した。

[0050]

[表12]

OD450 (平均値 n=3)	Day					
	0	1	2	3	4	5
1.1mM GPP	0.2023	0.5267	0.7083	0.8350	1.0227	0.9003
2.2mM DGP	0.1607	0.4507	0.6840	0.7700	0.9313	0.9363
2.1mM GEK	0.1613	0.4280	0.6043	0.7300	0.9023	0.9107
2.0mM AGK	0.1757	0.4577	0.7440	0.7997	1.0263	1.0620
0%FBS	0.1970	0.3873	0.4227	0.2927	0.3200	0.2313

標準偏差 (SD, n=3)	Day					
	0	1	2	3	4	5
1.1mM GPP	0.0169	0.0410	0.0421	0.0190	0.1292	0.0613
2.2mM DGP	0.0183	0.0462	0.0541	0.0507	0.1180	0.1310
2.1mM GEK	0.0046	0.0269	0.0172	0.0599	0.1270	0.1182
2.0mM AGK	0.0081	0.0229	0.0471	0.0318	0.1376	0.1074
0%FBS	0.0010	0.0104	0.0150	0.0153	0.0140	0.0320

[0051] 表 1 2 及び図 1 2 より、上記試験条件においては、ペプチド溶液を添加することにより、添加しない系に比べ、日数が経過するに従い細胞数が増えることが分かった。

[0052] (各ペプチドのコート剤上での細胞増殖試験－3日間－)

G l y－G l u－L y s (G E K)、及び、A s p－G l y－P r o (D G P) の配列を有するペプチドを合成し、0 m M～5 m Mの範囲内で最も細胞数が増える濃度となるようにペプチド溶液をそれぞれ調製した。すなわち、G l y－G l u－L y s (G E K) は 2 1 m M、A s p－G l y－P r o (D G P) は 2 2 m Mにそれぞれ調製し、細胞培養試験直前に各 w e l l の総培地容量の 1 / 1 0 量を添加し、それぞれ終濃度を 2 . 1 m M、2 . 2 m Mとした。

ポリ－Ｌ－リシン（ペプチド研究所、ポリ－Ｌ－リシン塩酸塩、型番 3 0 7 5）を 0 . 1 m g / m L に調製し、2 4 w e l l プレートの各 w e l l に 2 0 0 μ L ずつ分注し、3 7 °C のインキュベーターで 2 時間静置した。アスピレーターで残液を除去後、蒸留水でリンスし、蓋をせずにクリーンベンチ

内でUVランプを照射し、一晚乾燥、滅菌した。

CHO-K1（理化学研究所バイオリソース研究センター、型番RCB2330）を、 4×10^4 cells/mLに調製した細胞懸濁液を24 wellプレートへ500 μ L/wellとなるように播種し、37℃、CO₂5%のインキュベーターで24時間培養した。培地は、10%FBSを含有させた、MEM α 培地（gibco社）を用いた。

各wellの培地を除去し、MEM α 培地（500 μ L）で洗い出した後、さらに新しいMEM α 培地を450 μ Lずつ分注し、各ペプチド溶液（50 μ L）をそれぞれ添加して（合計500 μ L/well）、3日間培養した。細胞を回収し細胞数をカウントした。なお、比較試料としてペプチドもFBSも含有しない系にて、同様な培養試験を行った。

[0053] 各well中の培地を1.5 mLチューブに回収し、MEM α 200 μ Lでリンスし、リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。その後、トリプシン100 μ Lを添加して3分間インキュベートを行った。10%FBS含有MEM α 300 μ Lでリンスし、該リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。再度、10%FBS含有MEM α 200 μ Lでリンスし、該リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。

[0054] 1.5 mLチューブに回収した細胞に対し、遠心操作を行った。遠心条件は、1000 rpm、10分間、4℃とした。

上清を取り除き、Cold PBS（リン酸緩衝生理食塩水）300 μ Lを添加し、同じ条件で遠心操作を行った。本操作を2回繰り返した。

Binding Buffer 100 μ Lで懸濁させ、PI（ヨウ化プロピジウム）2 μ Lを添加してチューブを攪拌し、室温・遮光で15分間反応させた。その後、フローサイトメーターで生細胞数及び生存率を測定した。

[0055] 以上の調製、培養、測定をn=3で行い、各ペプチド溶液における生細胞数を表13、図13に示し、各ペプチド溶液における細胞生存率を表14、図14に示した。

[0056]

[表13]

Cells

cell count ($\times 10^4$)	1	2	3	Average	SD
0%FBS	0.59	0.88	0.64	0.71	0.16
2.2mM Asp-Gly-Pro	11.69	10.47	13.82	11.99	1.70
2.1mM Gly-Glu-Lys	17.94	19.72	20.39	19.35	1.26

[0057] [表14]

Viability

	1	2	3	Average	SD
0%FBS	13.1	15.3	15.3	14.6	1.3
2.2mM Asp-Gly-Pro	77.9	75.6	82.0	78.5	3.2
2.1mM Gly-Glu-Lys	94.7	95.1	93.8	94.5	0.7

[0058] 表13、表14、図13、図14より、上記試験条件のコート剤上での3日間のペプチド培養において、ペプチドを添加しない系に比べ、生細胞数も増加し、細胞生存率も高いことが分かった。

[0059] (各ペプチドのコート剤上での細胞増殖試験－5日間－)

Asp-Gly-Pro (DGP)、Ala-Gly-Lys (AGK)、Gly-Glu-Lys (GEK)、及び、Gly-Gly-Gly (GGG) の配列を有するペプチドを合成し、0 mM～5 mMの範囲内で最も細胞数が増える濃度となるようにペプチド溶液をそれぞれ調製した。すなわち、Asp-Gly-Pro (DGP) は2.2 mM、Ala-Gly-Lys (AGK) は2.0 mM、Gly-Glu-Lys (GEK) は2.1 mM、及び、Gly-Gly-Gly (GGG) は2.5 mMにそれぞれ調製し、細胞培養試験直前に各wellの総培地容量の1/10量を添加し、それぞれ終濃度を2.2 mM、2.0 mM、2.1 mM、2.5 mMとした。

ポリ－L－リシン（ペプチド研究所、ポリ－L－リシン塩酸塩、型番3075）を0.1 mg/mLに調製し、24wellプレートの各wellに200 μ Lずつ分注し、37℃のインキュベーターで2時間静置した。アスピレーターで残液を除去後、蒸留水でリンスし、蓋をせずにクリーンベンチ

内でUVランプを照射し、一晚乾燥、滅菌した。

CHO-K1（理化学研究所バイオリソース研究センター、型番RCB2330）を、 4×10^4 cells/mLに調製した細胞懸濁液を24 wellプレート各wellへ500 μ L/wellとなるように播種し、37℃、CO₂ 5%のインキュベーターで24時間培養した。培地は、10% FBSを含有させた、MEM α 培地（gibco社）を用いた。

各wellの培地を除去し、MEM α 培地（500 μ L）で洗い出した後、さらに新しいMEM α 培地を450 μ Lずつ分注し、各ペプチド溶液（50 μ L）をそれぞれ添加して（合計500 μ L/well）、5日間培養した。細胞を回収し細胞数をカウントした。なお、比較試料としてペプチドもFBSも含有しない系にて、同様な培養試験を行った。

[0060] 各well中の培地を1.5 mLチューブに回収し、MEM α 200 μ Lでリンスし、リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。その後、トリプシン100 μ Lを添加して3分間インキュベートを行った。10% FBS含有MEM α 300 μ Lでリンスし、該リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。再度、10% FBS含有MEM α 200 μ Lでリンスし、該リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。

[0061] 1.5 mLチューブに回収した細胞に対し、遠心操作を行った。遠心条件は、1000 rpm、10分間、4℃とした。

上清を取り除き、Cold PBS（リン酸緩衝生理食塩水）300 μ Lを添加し、同じ条件で遠心操作を行った。本操作を2回繰り返した。

Binding Buffer 100 μ Lで懸濁させ、PI（ヨウ化プロピジウム）2 μ Lを添加してチューブを攪拌し、室温・遮光で15分間反応させた。その後、フローサイトメーターで生細胞数及び細胞生存率を測定した。

[0062] 以上の調製、培養、測定をn = 3で行い、各ペプチド溶液における生細胞数を表15、図15に示し、各ペプチド溶液における細胞生存率を表16、図16に示した。

[0063] [表15]

Cells

cell count ($\times 10^4$)	1	2	3	Mean	SD
0%FBS	0.0070	0.0100	0.0030	0.0067	0.0035
2.2mM Asp-Gly-Pro	15.8220	14.8590	14.1250	14.9353	0.8511
2.0mM Ala-Gly-Lys	2.6860	3.0605	2.1185	2.6217	0.4743
2.1mM Gly-Glu-Lys	15.7190	16.9875	17.0425	16.5830	0.7488
2.5mM Gly-Gly-Gly	0.1360	0.0080	0.0065	0.0502	0.0743

[0064] [表16]

Viability

	1	2	3	Mean	SD
0%FBS	0.4	0.4	0.3	0.4	0.1
2.2mM Asp-Gly-Pro	91.5	91.2	86.0	89.6	3.1
2.0mM Ala-Gly-Lys	26.4	26.4	22.1	25.0	2.5
2.1mM Gly-Glu-Lys	90.2	90.3	90.5	90.3	0.2
2.5mM Gly-Gly-Gly	4.45	0.31	0.21	1.7	2.4

[0065] 表15、表16、図15、図16より、上記試験条件のコート剤上での5日間のペプチド培養において、GGGを除き、ペプチドを添加しない系に比べ、細胞数も増加し、細胞生存率も高いことが分かった。

[0066] (各ペプチド及びペプチドを組み合わせた、コート剤上での細胞増殖試験及びタンパク質産生試験)

Gly-Pro-Pro (GPP)、Asp-Gly-Pro (DGP)、Gly-Glu-Lys (GEK)、Ala-Gly-Lys (AGK)の配列を有するペプチドを合成し、0mM～5mMの範囲内で最も細胞数が増える濃度となるようにペプチド溶液をそれぞれ調製した。すなわち、Gly-Pro-Pro (GPP)は11mM、Asp-Gly-Pro (DGP)は22mM、Gly-Glu-Lys (GEK)は21mM、Ala-Gly-Lys (AGK)は20mMにそれぞれ調製し、細胞培養試験直前に各wellの総培地容量の1/10量を添加し、それぞれ終濃度を1.1

mM、2.2 mM、2.1 mM、2.0 mMとした。

ポリ-L-リシン（ペプチド研究所、ポリ-L-リシン塩酸塩、型番3075）を0.1 mg/mLに調製し、24 wellプレートに200 μ Lずつ分注し、37°Cのインキュベーターで2時間静置した。アスピレーターで残液を除去後、蒸留水でリンスし、蓋をせずにクリーンベンチ内でUVランプを照射し、一晩乾燥、滅菌した。

CHO DP-12（ATCC、型番CRL-12445）を、 2×10^4 cells/well・500 μ Lとなるように調製した細胞懸濁液を24 wellプレートに播種し、37°C、CO₂5%のインキュベーターで24時間培養した。培地は、10%FBSを含有させたDMEM培地（gibco社）に200 nMメトトレキサート、2 μ g/mLインスリンを配合したDMEM基礎培地を用いた。

各wellの培地を除去、DMEM基礎培地（500 μ L）で洗い出した後、さらに新しいDMEM基礎培地を450 μ Lずつ分注し、各ペプチド溶液（50 μ L）をそれぞれ添加して（合計500 μ L/well）、5日間培養した。

ペプチドはGPP、DGP、GEK、AGKの単体の他、GPP+GEK、GPP+AGK、DGP+GEK、GEK+AGK、DGP+AGK、GPP+GEK+AGK、GPP+DGP+AGK、GPP+DGP+GEKの組み合わせを用いた。なお、比較試料としてペプチドもFBSも含有しない系にて、同様な培養試験を行った。

[0067] 産生タンパク質量を測定するために、培地上清100 μ Lを1.5 mLチューブに回収し、希釈し、ELISA法により産生タンパク質量を定量した。

[0068] 細胞を回収するため、各well中の培地を1.5 mLチューブに回収し、DMEM基礎培地200 μ Lでリンスし、リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。その後、トリプシン100 μ Lを添加して3分間インキュベートを行った。10%FBS含有DMEM基礎培地300 μ Lでリ

ンスし、該リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。再度、10% FBS含有DMEM基礎培地200 μ Lでリンスし、該リンス済みの液も同じ1.5 mLチューブに回収した。

[0069] 1.5 mLチューブに回収した細胞に対し、遠心操作を行った。遠心条件は、1000 rpm、10分間、4℃とした。

上清を取り除き、Cold PBS（リン酸緩衝生理食塩水）300 μ Lを添加し、同じ条件で遠心操作を行った。本操作を2回繰り返した。

Binding Buffer 100 μ Lで懸濁させ、PI（ヨウ化プロピジウム）2 μ Lを添加してチューブを攪拌し、室温・遮光で15分間反応させた。その後、フローサイトメーターで生細胞数及び細胞生存率を測定した。

[0070] 以上の調製、培養、測定をn=3で行い、各ペプチド溶液における生細胞数を表17、図17、表20、図20、表23、図23に示し、各ペプチド溶液における細胞生存率を表18、図18、表21、図21、表24、図24に示し、各ペプチド溶液における産生タンパク質量を表19、図19、表22、図22、表25、図25に示した。

[0071] [表17]

Cells		
cell count ($\times 10^4$)	Average	SD
GPP	15.5502	0.8225
DGP	14.6333	0.9364
GEK	15.9345	0.4884
AGK	19.0887	0.9484
0%FBS	4.0250	0.4633

[0072]

[表18]

Viability

	1	2	3	Average	SD
GPP	88.9	87.9	87.9	88.2	0.6
DGP	86.3	87.3	87.2	86.9	0.6
GEK	86.5	87.4	86.7	86.9	0.5
AGK	89.0	88.5	88.1	88.5	0.5
0%FBS	57.8	59.5	57.9	58.4	1.0

[0073] [表19]

産生タンパク質量(mg/L)

	1	2	3	Average	SD
GPP	5.78	5.31	6.50	5.86	0.60
DGP	5.37	4.90	5.44	5.24	0.29
GEK	6.13	4.59	6.06	5.59	0.87
AGK	7.36	6.61	6.78	6.92	0.39
0%FBS	3.95	4.47	4.63	4.35	0.36

[0074] [表20]

Cells

cell count ($\times 10^4$)	Average	SD
GPP+GEK	9.1175	0.5391
GPP+AGK	9.4750	0.1945
DGP+GEK	8.9357	0.6300
GEK+AGK	9.1192	0.1442
DGP+AGK	9.8113	0.6386
0%FBS	1.0642	0.1651

[0075]

[表21]

Viability

	1	2	3	Average	SD
GPP+GEK	86.3	85.7	85.1	85.7	0.6
GPP+AGK	86.0	86.2	85.1	85.8	0.6
DGP+GEK	84.1	85.0	86.2	85.1	1.1
GEK+AGK	86.0	85.4	87.3	86.2	1.0
DGP+AGK	84.6	85.5	86.0	85.4	0.7
0%FBS	37.5	40.9	41.0	39.8	2.0

[0076] [表22]

産生タンパク質量(mg/L)

	1	2	3	Average	SD
GPP+GEK	3.70	3.95	3.06	3.57	0.46
GPP+AGK	5.54	4.29	4.63	4.82	0.65
DGP+GEK	4.03	2.90	3.30	3.41	0.57
GEK+AGK	3.32	3.44	3.72	3.49	0.21
DGP+AGK	3.98	3.48	3.03	3.50	0.48
0%FBS	2.55	2.69	2.84	2.69	0.15

[0077] [表23]

Cells

cell count ($\times 10^4$)	Average	SD
GPP+GEK+AGK	10.5085	0.9625
GPP+DGP+AGK	9.6858	1.0850
GPP+DGP+GEK	9.4232	1.3146
0%FBS	1.8085	0.4705

[0078]

[表24]

Viability

	1	2	3	Average	SD
GPP+GEK+AGK	86.2	86.2	86.4	86.3	0.1
GPP+DGP+AGK	86.4	87.5	86.9	86.9	0.6
GPP+DGP+GEK	84.4	85.4	84.8	84.9	0.5
0%FBS	40.7	44.8	45.6	43.7	2.6

[0079] [表25]

産生タンパク質量(mg/L)

	1	2	3	Average	SD
GPP+GEK+AGK	4.23	3.90	4.17	4.10	0.18
GPP+DGP+AGK	4.12	4.21	4.07	4.13	0.07
GPP+DGP+GEK	3.06	3.30	3.98	3.45	0.48
0%FBS	2.87	3.16	3.41	3.15	0.27

[0080] 表17～表25、図17～図25より、上記試験条件において、ペプチド単体及びペプチド2種以上を組み合わせることで添加することにより、細胞増殖を促進させ、タンパク質産生を促進させることが分かった。

[0081] (各ペプチドの細胞増殖試験及びタンパク質産生試験ービタミン及び核酸の添加効果ー)

A l a - G l y - L y s (AGK) の配列を有するペプチドを合成し、1.0 mM及び2.0 mMのペプチド溶液を調製した。

CHO DP-12 (ATCC、型番CRL-12445) を、 2×10^4 cells/mLに調製した細胞懸濁液を、 1×10^4 cells/well (500 μ L) となるように24wellプレートに播種し、37℃、CO₂ 5%のインキュベーターで24時間培養した。培地は、10%FBSを含有させたDMEM培地 (gibco社) に200 nMメトトレキサート、2 μ g/mLインスリンを配合したDMEM基礎培地を用いた。

各wellの培地を除去し、DMEM基礎培地 (500 μ L) で洗い出した後、各ペプチド溶液 (500 μ L) をそれぞれのwellに分注して (合

計500 μ L/well)、5日間培養した。

[0082] 以下の試験区の評価培地にそれぞれ培地交換した後、37℃、CO₂5%のインキュベーターで5日間培養した。

<評価培地>

- ・DMEM基礎培地
- ・AGK(1mM)+DMEM基礎培地
- ・AGK(2mM)+DMEM基礎培地
- ・ビタミン及び核酸補強培地(DMEM基礎培地+ビタミン+核酸)
- ・AGK(1mM)+ビタミン及び核酸補強培地
- ・AGK(2mM)+ビタミン及び核酸補強培地

[0083] 培養5日後、24wellプレートの各wellの培地を全量回収し、遠心操作(5000rpm、5分間)を行い、上清を別途回収して産生タンパク質量をELISA法により測定した。

[0084] 上記ビタミン及び核酸の組成は、表26に示した。

[0085] [表26]

ビタミン	(各成分の終濃度)	核酸	(各成分の終濃度)
塩化コリン	4.155mg/L	キサンチン	0.9mg/L
ナイアシンアミド	0.276mg/L	ヒポキサンチン	1.8mg/L
D-パントテン酸ヘミカルシウム塩	45.8 μ g/L	ウリジン	3.6mg/L
葉酸	3.6 μ g/L	グアニン塩酸塩	2.4mg/L
シアノコバラミン	0.8 μ g/L	イノシン	4.9mg/L
ピリドキサル塩酸塩	12.2 μ g/L	グアノシン	3.8mg/L
リボフラビン	13.8 μ g/L	シチジン	0.4mg/L
ビオチン	0.8 μ g/L	チミジン	0.5mg/L
ミオ-イノシトール	0.73mg/L	アデニン	0.8mg/L

[0086] 培地回収後のwellに接着している細胞は、トリプシン処理により剥離し、再度10%FBSを含有したDMEM基礎培地に懸濁させ、セルカウンターにてトリパンブルー染色法により生細胞数及び生存率を測定した。

[0087] 以上の調製、培養、測定をn=3で行い、各評価培地における生細胞数、細胞生存率、産生タンパク質量を表27に示し、生細胞数と産生タンパク質量を図26に示した。

[0088] [表27]

試験区	生細胞数 ($\times 10^4$ cells/well)	標準偏差 ($\times 10^4$ cells/well)	生存率 (%)	標準偏差 (%)	産生タンパク質量 (mg/L)	標準偏差 (mg/L)
基礎培地	2.61	0.43	33	10	4.68	0.4
1mM AGK	11.97	2.00	65	8	7.5	0.6
2mM AGK	11.73	1.53	65	2	7.4	0.4
基礎培地 (ビタミン+核酸)	1.17	0.43	17	2	4.36	0.3
1mM AGK (ビタミン+核酸)	34.65	6.10	88	2	15.74	3.6
2mM AGK (ビタミン+核酸)	47.07	8.50	89	2	14.34	2.4

[0089] 表 27、図 26 より、上記試験条件においては、基礎培地に対し、ペプチドを添加すると、生細胞数、産生タンパク質量ともに多くなるが、さらにビタミンと核酸を添加すると細胞増殖もタンパク質産生もより促進されることが分かった。

[0090] (完全合成培地にペプチドを添加した場合の細胞増殖試験及びタンパク質産生試験)

[0091] Gly-Glu-Lys (G E K) の配列を有するペプチドを合成し、0 mM、2.6 mM、5.1 mM、10 mM、20.5 mM、41 mM の濃度のペプチド溶液を調製し、細胞培養試験直前に各 well の総培地容量の 1/10 量を添加して、それぞれ終濃度を 0 mM、0.26 mM、0.51 mM、1.0 mM、2.05 mM、4.1 mM とした。本試験には、CHO 用の完全合成培地である ASF104 培地 (味の素) に、200 nM メトトレキサート、2 μ g/mL インスリンを配合した ASF104 基礎培地に馴化させた CHO DP-12 (ATCC、型番 CRL-12445) を使用した。細胞濃度が 4×10^4 cells/mL に調製した細胞懸濁液を 24 well プレートへ 450 μ L/well となるように播種し、37℃、CO₂5% のインキュベーターで 24 時間培養した。培地は、CHO 用の完全合成培地である ASF104 培地 (味の素) に、200 nM メトトレキサート、2 μ g/mL インスリンを配合した ASF104 基礎培地を用いた。

[0092] 24 時間後、調製したペプチド溶液を 50 μ L ずつ添加し、5 日間培養した。培養後に細胞を回収して生細胞数をカウントした。

<評価培地>

- ・ A S F 1 0 4 基礎培地
- ・ G E K (0 . 2 6 m M) + A S F 1 0 4 基礎培地
- ・ G E K (0 . 5 1 m M) + A S F 1 0 4 基礎培地
- ・ G E K (1 . 0 m M) + A S F 1 0 4 基礎培地
- ・ G E K (2 . 0 5 m M) + A S F 1 0 4 基礎培地
- ・ G E K (4 . 1 m M) + A S F 1 0 4 基礎培地

[0093] 産生タンパク質量を定量するために、培地上清 100 μ L を 1.5 mL チューブに採取した。該上清を希釈し、E L I S A 法により産生タンパク質量を測定した。

[0094] 細胞を解析するために、各 w e l l 中の培地を 1.5 mL チューブに回収し、P B S 2 0 0 μ L でリンスし、リンス済みの液も同じ 1.5 mL チューブに回収した。その後、0.25%トリプシン／E D T A 1 0 0 μ L を添加して 1 分間インキュベートを行った。トリプシンインヒビター 1 0 0 μ L を添加して同じ 1.5 mL チューブに回収した。

P B S 2 0 0 μ L でリンスし、該リンス済みの液も同じ 1.5 mL チューブに回収した後、遠心操作を行った。P B S 1 0 0 μ L で懸濁させ、セルカウンターにてトリパンブルー染色法により生細胞数及び細胞生存率を測定した。

[0095] 以上の調製、培養、測定を $n = 3$ で行い、各ペプチド溶液における生細胞数を表 2 8、図 2 7 に示し、各ペプチド溶液における細胞生存率を表 2 9、図 2 8 に示し、産生タンパク質量を表 3 0、図 2 9 に示した。

[0096]

[表28]

生細胞数($\times 10^5$ cells/well)

	1	2	3	Average	SD
Vehicle	1.4	1.5	1.2	1.3	0.2
0.26mM GEK	1.6	1.5	1.6	1.6	0.0
0.51mM GEK	1.5	1.7	1.6	1.6	0.1
1.0mM GEK	1.3	1.8	1.4	1.5	0.3
2.05mM GEK	1.9	2.2	1.4	1.9	0.4
4.1mM GEK	1.8	1.8	1.5	1.7	0.1

[0097] [表29]

生存率 (%)

	1	2	3	Average	SD
Vehicle	95	96	97	96.0	1.0
0.26mM GEK	96	99	96	97.0	1.7
0.51mM GEK	95	98	97	96.7	1.5
1.0mM GEK	97	97	96	96.7	0.6
2.05mM GEK	96	96	98	96.7	1.2
4.1mM GEK	97	98	96	97.0	1.0

[0098] [表30]

産生タンパク質量 (mg/L)

	1	2	3	Average	SD
Vehicle	11.4	11.9	12.8	12.0	0.7
0.26mM GEK	12.2	12.6	12.7	12.5	0.2
0.51mM GEK	12.8	13.2	12.6	12.9	0.3
1.0mM GEK	12.4	12.8	14.1	13.1	0.9
2.05mM GEK	17.5	17.7	15.6	17.0	1.1
4.1mM GEK	13.9	13.2	12.8	13.3	0.6

[0099] 表28～表30、図27～図29より、上記試験条件において、市販の完全合成培地を用いた基礎培地に比べ、GEKのペプチドを添加した場合、生細胞数は増加し、細胞生存率は同等に高く、産生タンパク質量も増加傾向が

みられ、細胞増殖を促進し、タンパク質産生を促進することが分かった。

[0100] (浮遊細胞系におけるG E K及びD G Pの細胞増殖試験及びタンパク質産生試験)

G l y - G l u - L y s (G E K) 及びA s p - G l y - P r o (D G P) の配列を有するペプチドを合成し、2. 87 mMのG l y - G l u - L y s (G E K)、及び、1. 55 mMのA s p - G l y - P r o (D G P) のペプチド溶液を調製した。

[0101] M i c r o - 2 4 バイオリアクターシステム (日本ポール社製) の24 w e l l (D e e p w e l l) カセットの各w e l l にDMEM/F12基礎培地やビタミン等補強培地 (DMEM/F12基礎培地+ビタミン等補強成分)、各ペプチド溶液を5 mLずつ加え、37℃、pH7、攪拌速度650 r p mの条件で一晩培養した。翌日にpHキャリブレーションを行い、その後、 3.5×10^5 c e l l s / m L に調製した細胞懸濁液を24 w e l l (D e e p w e l l) カセットの各w e l l に2 mLずつ加え、浮遊細胞の細胞密度が 1×10^5 c e l l s / m L (7 mL / w e l l) となるように播種し、37℃、pH7、攪拌速度650 r p m、溶存酸素30%の培養条件、以下の評価培地で培養した。

<評価培地>

- ・ DMEM/F12基礎培地
- ・ ビタミン等補強培地 (基礎培地+ビタミン等補強成分)
- ・ G E K (2. 05 mM) + ビタミン等補強培地
- ・ D G P (1. 11 mM) + ビタミン等補強培地

なお、培地は、DMEM/F12培地 (g i b c o 社) に200 nMメトトレキサート、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ インスリン、 $5.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ トランスフェリン、 $6.7 \text{ ng} / \text{mL}$ 亜セレン酸ナトリウム、 $10 \mu\text{L} / \text{mL}$ のA n t i - C l u m p i n g A g e n t、 $10 \mu\text{L} / \text{mL}$ の10% P l u r o n i c F 6 8 を配合したDMEM/F12基礎培地を用いた。

[0102] 使用する浮遊細胞には、C H O D P - 1 2 (A T C C、型番C R L - 1

2445) を無血清浮遊化に馴化し、振とう型培養装置 (Custom Bio Shaker CO₂-BR-43FL、タイテック社) で、100 mL 容三角フラスコを用いて、37℃、CO₂5%、攪拌速度125 rpmの培養条件で継代培養をしている無血清浮遊化CHO DP-12を用いた。

[0103] 上記ビタミン等補強成分を、表31に示す。

[0104]

[表31]

	成分	各成分の終濃度
ビタミン	塩化コリン	20.775mg/L
	ナイアシンアミド	1.38mg/L
	D-パントテン酸ヘミカルシウム塩	229µg/L
	葉酸	18µg/L
	シアノコバラミン	4µg/L
	ピリドキサール塩酸塩	61µg/L
	リボフラビン	69µg/L
	ビオチン	4µg/L
	ミオ-イノシトール	3.65mg/L
核酸	キサンチン	4.5mg/L
	ヒポキサンチン	9mg/L
	ウリジン	18mg/L
	グアニン塩酸塩	12mg/L
	イノシン	24.5mg/L
	グアノシン	19mg/L
	シチジン	2mg/L
	チミジン	2.5mg/L
	アデニン	4mg/L
糖	グルコース	220mg/L
ポリアミン	スベルミジン	1.75mg/L
	スベルミン	0.5mg/L
	プトレシン	0.375mg/L
アミノ酸	シスチン	2.4mg/L
	アスパラギン	32.3mg/L
	アスパラギン酸	192.5mg/L
	セリン	126.35mg/L
	グリシン	85.35mg/L
	グルタミン	2.45mg/L
	システイン	22.55mg/L
	スレオニン	128mg/L
	グルタミン酸	213.35mg/L
	アラニン	185.15mg/L
	プロリン	30.5mg/L
	リジン・HCl	277.85mg/L
	ヒスチジン	120.65mg/L
	アルギニン	216.15mg/L
	バリン	167.15mg/L
	メチオニン	90.65mg/L
	チロシン	18.35mg/L
	イソロイシン	138.65mg/L
	ロイシン	246.85mg/L
	フェニルアラニン	120.15mg/L
	トリプトファン	38mg/L

[0105] 培養3日目以降、24well (Deep well) カセットの各wellから培地200 μ Lを1.5mLのチューブに回収した。うち、50 μ Lを別の1.5mLのチューブに取り、トリパンブルー50 μ Lを加えて十分に懸濁させた後、セルカウンター (Countess II、Life Technologies社製) により生細胞数及び生存率を測定した。

[0106] 以上の調製、培養、測定をn=2又は3で行い、各評価培地における生細胞数を表32、図30に示した。また、各評価培地における生存率を表33、図31に示した。

[0107] [表32]

細胞数($\times 10^5$ cells/ml)	Day							
	0	1	2	3	4	5	6	7
基礎培地	0.10			1.07	1.39	1.55	1.55	1.29
ビタミン等補強培地	0.10			1.23	1.67	2.18	2.35	2.11
GEK 2.05mM	0.10			1.73	2.40	2.65	2.64	3.05
DGP 1.11mM	0.10			1.15	2.52	2.58	3.50	3.01

標準偏差	Day							
	0	1	2	3	4	5	6	7
基礎培地	0.00			0.15	0.33	0.48	0.81	0.33
ビタミン等補強培地	0.00			0.06	0.00	0.18	0.16	0.39
GEK 2.05mM	0.00			0.36	0.41	0.29	0.27	0.10
DGP 1.11mM	0.00			0.16	0.14	0.21	1.07	0.07

[0108] [表33]

生存率(%)	Day							
	0	1	2	3	4	5	6	7
基礎培地	98.0			94.00	88.33	83.67	74.67	68.33
ビタミン等補強培地	98.0			97.00	95.00	93.50	91.50	86.50
GEK 2.05mM	98.0			97.00	97.00	95.33	84.33	79.00
DGP 1.11mM	98.0			97.50	97.50	94.50	87.00	81.50

標準偏差	Day							
	0	1	2	3	4	5	6	7
基礎培地	0.0			3.00	8.08	9.02	12.58	9.29
ビタミン等補強培地	0.0			0.00	2.83	2.12	4.95	0.71
GEK 2.05mM	0.0			1.00	1.00	3.79	12.66	8.19
DGP 1.11mM	0.0			0.71	2.12	0.71	0.00	0.71

[0109] 表32、図30、表33、図31より、上記試験条件において、基礎培地、あるいは、ビタミン等補強培地に対し、ペプチドを添加すると、生細胞数及び生存率ともに多くなることが分かった。

[0110] 培養3日目以降、24well (Deep well) カセットの各wellから回収した培地200 μ Lのうち、150 μ Lを1.5mLのチューブで遠心操作(5000rpm、5分間)を行い、上清を別途回収して産生タンパク質量をELISA法により測定した。

表34、図32に、測定された産生タンパク質量を示した。

[0111] [表34]

産生タンパク質量(mg/L)	Day				
	3	4	5	6	7
基礎培地	18.64	27.76	30.61	35.40	35.89
ビタミン等補強培地	16.34	38.33	60.83	64.83	89.44
GEK 2.05mM	26.32	54.96	75.54	98.46	127.08
DGP 1.11mM	19.86	43.99	63.65	82.54	104.75

標準偏差	Day				
	3	4	5	6	7
基礎培地	4.59	5.86	8.45	8.86	12.55
ビタミン等補強培地	1.14	2.61	5.64	9.90	15.29
GEK 2.05mM	6.02	8.53	11.17	7.64	5.38
DGP 1.11mM	5.64	10.12	10.01	5.74	7.60

[0112] 表34、図32より、基礎培地、あるいは、ビタミン等強化培地に対し、ペプチドを添加すると、産生タンパク質量は多くなることが分かった。

[0113] (浮遊細胞系におけるAGK及びGPPのタンパク質産生試験)

Ala-Gly-Lys (AGK) 及びGly-Pro-Pro (GPP) の配列を有するペプチドを合成し、5.53mMのAla-Gly-Lys (AGK)、及び、6.16mMのGly-Pro-Pro (GPP) のペプチド溶液を調製した。

[0114] Micro-24バイオリアクターシステム(日本ポール社製)の24well (Deep well) カセットの各wellに基礎培地やビタミン等補強培地(基礎培地+ビタミン等補強成分)、各ペプチド溶液を5mLずつ加え、37℃、pH7、650rpmの条件で一晩培養した。翌日にpHキャリブレーションを行い、その後、 3.5×10^5 cells/mLに調製

した細胞懸濁液を24well (Deep well) カセットの各wellに2 mLずつ加え、浮遊細胞の細胞密度が $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ (7 mL/well) となるように播種し、 37°C 、 $\text{pH} 7$ 、 650 rpm 、溶存酸素30%の培養条件、以下の評価培地で培養した。

<評価培地>

- ・基礎培地
- ・ビタミン等補強培地 (基礎培地+ビタミン等補強成分)
- ・AGK (3.95 mM) + ビタミン等補強培地
- ・GPP (4.40 mM) + ビタミン等補強培地

なお、培地は、DMEM/F12培地 (gibco社) に 200 nM メトトレキサート、 $10 \mu\text{g/mL}$ インスリン、 $5.5 \mu\text{g/mL}$ トランスフェリン、 6.7 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、 $10 \mu\text{L/mL}$ のAnti-Clumping Agent、 $10 \mu\text{L/mL}$ の10%Pluronic F68を配合した基礎培地を用いた。

[0115] 使用する浮遊細胞には、CHO DP-12 (ATCC、型番CRL-12445) を無血清浮遊化に馴化し、振とう型培養装置 (Custom Bio Shaker CO2-BR-43FL、タイテック社) で、 100 mL 容三角フラスコを用いて、 37°C 、 $\text{CO}_2 5\%$ 、攪拌速度 125 rpm の培養条件で継代培養をしている無血清浮遊化CHO DP-12を用いた。

[0116] 上記ビタミン等補強成分は表31に示したものである。

[0117] 培養3日目以降、24well (Deep well) カセットの各wellから培地 $150 \mu\text{L}$ を 1.5 mL のチューブに回収し、遠心操作 (500 rpm 、5分間) を行い、上清を回収して産生タンパク質量をELISA法により測定した。

表35、図33に、測定された産生タンパク質量を示した。

[0118]

[表35]

産生タンパク質量(mg/L)	Day				
	3	4	5	6	7
基礎培地	13.11	19.59	26.73	28.57	27.65
ビタミン等補強培地	13.96	28.00	43.26	51.30	63.31
AGK 3.95mM	17.74	31.36	49.43	65.58	73.46
GPP 4.40mM	14.95	32.30	52.53	67.01	80.86

標準偏差	Day				
	3	4	5	6	7
基礎培地	2.60	6.39	7.17	11.01	10.42
ビタミン等補強培地	1.93	6.75	11.09	16.74	15.34
AGK 3.95mM	1.73	0.99	2.67	5.86	6.88
GPP 4.40mM	0.94	1.34	5.68	13.16	11.46

[0119] 表35、図33より、上記試験条件において、基礎培地、あるいは、ビタミン等補強培地に対し、ペプチドを添加すると、産生タンパク質量は多くなることが分かった。

[0120] なお、上記浮遊細胞系でのタンパク質産生において、CHO細胞を無血清浮遊化したが、まず血清培地のみを用いて細胞培養を行い、その後、血清培地と無血清培地を半々にして細胞培養を行い、最後に無血清培地のみを用いて細胞培養を行うことにより、馴化させてもよい。

[0121] また、上記浮遊細胞系におけるタンパク質産生試験において、CHO細胞を用いたが、本発明のペプチドを含む培地は、その他の物質産生に利用されるハイブリドーマ、HEK293、COS、Sf9等の細胞株にも適用可能である。

[0122] 本発明のペプチドによるタンパク質産生方法は、上記バッチ培養の他、産生中に培地を継ぎ足すフェドバッチ培養の工程を含んでもよい。

請求の範囲

- [請求項1] Gly-Glu-Lys (GEK)、Asp-Gly-Pro (DGP)、Ala-Gly-Lys (AGK)、Gly-Pro-Pro (GPP)、Gly-Gly-Pro (GGP)、Ala-Glu-Lys (AEK)、Ala-Gly-Gly (AGG)、Ala-Ser-Asn (ASN)、及び、Glu-Gly-Lys (EGK) からなる群より選択される、ペプチド。
- [請求項2] 請求項1記載のペプチドを1種以上含む、細胞増殖促進剤。
- [請求項3] 請求項1記載のペプチドを1種以上含む、タンパク質産生促進剤。
- [請求項4] 請求項2記載の細胞増殖促進剤、又は、請求項3記載のタンパク質産生促進剤を含む、培地。
- [請求項5] 請求項1記載のペプチド1種以上を用いた、細胞増殖方法。
- [請求項6] 請求項1記載のペプチド1種以上を用いた、タンパク質産生方法。
- [請求項7] バッチ培養又はフェドバッチ培養を含む、請求項6に記載のタンパク質産生方法。