

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年10月3日(03.10.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/203784 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 1/04 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/011171

(22) 国際出願日: 2024年3月21日(21.03.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-049791 2023年3月27日(27.03.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東海国立大学機構 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 大石 俊輔(OISHI, Shunsuke); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 鳴瀧 彩絵(NARUTAKI, Ayae); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: ポリペプチドの製造方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for producing an elastin-like polypeptide without relying on genetic recombination technologies. Provided is a method for producing a polypeptide that contains an elastin-like block peptide sequence containing a G sequence block comprising (SEQ ID NO: 1: X^1GGX^2G)_n (wherein: X^1 's are the same as or different from each other and each independently represent V or L; X^2 's are the same as or different from each other and each independently represent V or L; and n is an integer of 2 or greater) and a P sequence block comprising (SEQ ID NO: 2: $VPGX^3G$)_m (wherein: X^3 's are the same as or different from each other and each independently represent an arbitrary amino acid; and m is an integer of 5 or greater), the method comprising: (a) a step for solid-phase synthesizing the polypeptide and/or divided fragments of the polypeptide; and/or (b) a step for linking the terminal regions of the plurality of divided fragments of the polypeptide by a chemical reaction.

(57) 要約: 遺伝子組み換え技術に依拠せずともエラスチン類似ポリペプチドを製造する方法を提供すること。(配列番号1: X^1GGX^2G)_nからなるG配列ブロック(式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、nは2以上の整数を示す。)と(配列番号2: $VPGX^3G$)_mからなるP配列ブロック(式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、mは5以上の整数を示す。)を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含むポリペプチドの製造方法であって、(a) 前記ポリペプチド及び/又は前記ポリペプチドの分割断片を固相合成する工程、及び/又は(b) 複数の前記ポリペプチドの分割断片の末端領域間を化学反応で連結する工程、を含む、製造方法。

[続葉有]

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類：

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

明 細 書

発明の名称：ポリペプチドの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ポリペプチドの製造方法等に関する。

背景技術

[0002] エラスチンは生体組織に弾性・伸縮性を付与する重要な機能性タンパク質であるが、その高い疎水性に由来するハンドリングの難しさから、材料利用が大幅に遅れている。本発明者は、水中で自己集合性ナノファイバーを形成する二重疎水性エラスチン類似ポリペプチド（GPG）を開発している（非特許文献1）。得られるファイバーは物理ゲルを形成することができ、例えば人工血管等の生体材料、細胞培養基材、機能性化粧品等への応用が期待できる。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Biomacromolecules, 14 (2013) 1028-1034, <https://doi.org/10.1021/bm301887m>.

非特許文献2：Journal of Peptide Science, 2016 May;22(5):334-42.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 非特許文献1では、GPGを遺伝子組み換え技術を利用して細胞内で生産している。しかし、生体由来の不純物、品質管理の難しさ、組換え技術に対する消費者の抵抗感から、上記生産技術は望ましくない。

[0005] 一方で、エラスチン類似ポリペプチドは、数十アミノ酸残基以上であるので、化学合成は困難であると考えられていた（非特許文献2）。また、化学反応を用いて複数の断片を連結する場合、得られたエラスチン類似ポリペプチド内の上記化学反応による連結部位が、エラスチン類似ポリペプチドのファイバー形成を阻害すると考えられていた。

[0006] 本発明は、遺伝子組み換え技術に依拠せずともエラスチン類似ポリペプチドを製造する方法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] 本発明者は、上記課題に鑑みて鋭意研究を進めた結果、（配列番号1： X^1GGX^2G ）_nからなるG配列ブロック（式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、 n は2以上の整数を示す。）と（配列番号2： $VPGX^3G$ ）_mからなるP配列ブロック（式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、 m は5以上の整数を示す。）を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含むポリペプチドの製造方法であって、（a）前記ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの分割断片を固相合成する工程、及び／又は（b）複数の前記ポリペプチドの分割断片の末端領域間を化学反応で連結する工程、を含む、製造方法、であれば、上記課題を解決できることを見出した。本発明者はこの知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本発明を完成させた。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

[0008] 項1. （配列番号1： X^1GGX^2G ）_nからなるG配列ブロック（式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、 n は2以上の整数を示す。）と（配列番号2： $VPGX^3G$ ）_mからなるP配列ブロック（式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、 m は5以上の整数を示す。）を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含むポリペプチドの製造方法であって、

（a）前記ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの分割断片を固相合成する工程、及び／又は

（b）複数の前記ポリペプチドの分割断片の末端領域間を化学反応で連結する工程、

を含む、製造方法。

[0009] 項2. 前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側から、G配列ブロック－P配列ブロック－G配列ブロック、G配列ブロック－P配列ブロック－P配列ブロック－G配列ブロック、P配列ブロック－G配列ブロック

、又はG配列ブロックーP配列ブロックである、項1に記載の製造方法。

[0010] 項3. 前記工程(a)を含み、且つ前記ポリペプチドの分割断片のアミノ酸残基数が30以上である、項1又は2に記載の製造方法。

[0011] 項4. 前記ポリペプチドの分割断片のアミノ酸残基数が50以上である、項3に記載の製造方法。

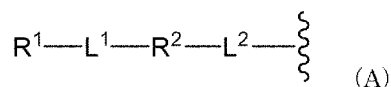
[0012] 項5. 前記工程(a)を含み、且つ前記工程(a)において前記分割断片が前記P配列ブロックの全部又は一部を含む、項1～4のいずれかに記載の製造方法。

[0013] 項6. 前記工程(a)を含み、且つ前記ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの分割断片が親水性アミノ酸リッチ配列を含む、項1～5のいずれかに記載の製造方法。

[0014] 項7. 前記工程(b)を含み、且つ前記工程(b)における前記化学反応が、一方の分割断片aの末端領域のアミノ酸残基aが有するチオール基と、他方の分割断片bの末端領域のアミノ酸残基bに付加されたビニル基又はマレイミド基との反応である、項1～6のいずれかに記載の製造方法。

[0015] 項8. 前記分割断片bの末端領域に一般式(A)：

[0016] [化1]



[0017] [式中：R¹はビニル基又はマレイミド基を示す。L¹はアミド結合又はエステル結合を含むリンカーを示す。R²は芳香環を示す。L²はリンカーを示す。]で表される基が付加されている、項7に記載の製造方法。

[0018] 項9. 前記ポリペプチドのアミノ酸残基数が80以上である、項1～8のいずれかに記載の製造方法。

[0019] 項10. 前記ポリペプチドが、

(配列番号1：X¹GGX²G)_nからなるG配列ブロック（式中、X¹は同一又は異なってV又はLを示し、X²は同一又は異なってV又はLを示し、nは2以上の整数を示す。）と（配列番号2：VPGX³G)_mからなるP配列ブロック（式中、X³は同一又は異

なって任意のアミノ酸を示し、 m は5以上の整数を示す。)を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含み、且つ

(c) 前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側からG配列ブロック-P配列ブロックである、且つ/或いは

(d) m が5~22の整数である、

項1~8のいずれかに記載の製造方法。

[0020] 項1 1. (配列番号1: X^1GGX^2G) $_n$ からなるG配列ブロック(式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、 n は4以上の整数を示す。)と(配列番号2: $VPGX^3G$) $_m$ からなるP配列ブロック(式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、 m は5以上の整数を示す。)を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含み、且つ

(c) 前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側からG配列ブロック-P配列ブロックである、且つ/或いは

(d) m が5~22の整数である、

ポリペプチド。

[0021] 項1 2. m が13~22である、項1 1に記載のポリペプチド。

[0022] 項1 3. 項1 1又は1 2に記載のポリペプチドを含有する、ゲル状組成物。

発明の効果

[0023] 本発明によれば、遺伝子組み換え技術に依拠せずともエラスチン類似ポリペプチドを製造する方法を提供することができる。また、本発明によれば、当該方法による製造に適した、新規構造のエラスチン類似ポリペプチドを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]試験例1で合成したポリペプチド(MG5PPPPP)のMALDI-TOF MSデータ及びHPLCデータを示す。

[図2]試験例2で合成したポリペプチド(MG5P)のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図3]試験例2で合成したポリペプチド (MG5PP) のMALDI-TOF MSデータを示す。
。

[図4]試験例2で合成したポリペプチド (PHis) のMALDI-TOF MSデータを示す。
。

[図5]試験例2で合成したポリペプチド (PPHis) のMALDI-TOF MSデータを示す。
。

[図6]試験例2で合成したポリペプチド (PPPHis) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図7]試験例3で合成したポリペプチド (MG5P-PHis) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図8]試験例3で合成したポリペプチド (MG5P-PPHis) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図9]試験例3で合成したポリペプチド (MG5P-PPPHis) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図10]試験例3で合成したポリペプチド (MG5PP-PPPHis) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図11]試験例4のMG5P-PPPHisゲルの原子間力顕微鏡による観察像を示す。

[図12]試験例5の周波数分散での貯蔵弾性率 (G') の測定結果を示す。GP2はMG5P-PHisゲルの測定結果を示し、GP3はMG5P-PPHisゲルの測定結果を示し、GP4はMG5P-PPPHisゲルの測定結果を示し、GP5はMG5PP-PPPHisゲルの測定結果を示す。

[図13]試験例5の周波数分散での損失正接 ($\tan \delta$) の測定結果を示す。GP2はMG5P-PHisゲルの測定結果を示し、GP3はMG5P-PPHisゲルの測定結果を示し、GP4はMG5P-PPPHisゲルの測定結果を示し、GP5はMG5PP-PPPHisゲルの測定結果を示す。

[図14]試験例5の歪み分散での損失正接 ($\tan \delta$) の測定結果を示す。GP2はMG5P-PHisゲルの測定結果を示し、GP3はMG5P-PPHisゲルの測定結果を示し、GP4はMG5P-PPPHisゲルの測定結果を示し、GP5はMG5PP-PPPHisゲルの測定結果を示す。

示す。

[図15]試験例6で合成したポリペプチド (MPP) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図16]試験例6で合成したポリペプチド (MPPP) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図17]試験例6で合成したポリペプチド (MG4PP) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図18]試験例6で合成したポリペプチド (PG5His) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図19]試験例6で合成したポリペプチド (PPG4His) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図20]試験例6で合成したポリペプチド (PPG5His) のMALDI-TOF MSデータを示す。

[図21]試験例7で合成したポリペプチド (MPP-PG5His) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図22]試験例7で合成したポリペプチド (MPP-PPG5His) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図23]試験例7で合成したポリペプチド (MPPP-PPG5His) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図24]試験例7で合成したポリペプチド (MPP-PPG4His) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

[図25]試験例7で合成したポリペプチド (MG4PP-PPHis) のHPLCデータ及びMALDI-TOF MSデータを示す。

発明を実施するための形態

[0025] 本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

[0026] 本明細書中において、アミノ酸配列中のアミノ酸残基を、単にアミノ酸ま

たは具体的なアミノ酸名称（バリン、ロイシン）等で示すこともある。また、アミノ酸配列中のアミノ酸残基をアミノ酸の一文字表記で示すこともある。

[0027] 本発明は、その一態様において、（配列番号1： X^1GGX^2G ）_nからなるG配列ブロック（式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、 n は2以上の整数を示す。）と（配列番号2： $VPGX^3G$ ）_mからなるP配列ブロック（式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、 m は5以上の整数を示す。）を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含むポリペプチド（本明細書において、「本発明のポリペプチド」と示すこともある。）の製造方法であって、（a）前記ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの分割断片を固相合成する工程、及び／又は（b）複数の前記ポリペプチドの分割断片の末端領域間を化学反応で連結する工程、を含む、製造方法（本明細書において、「本発明の製造方法」と示すこともある。）、に関する。以下にこれについて説明する。

[0028] 製造対象である本発明のポリペプチドについて説明する。

[0029] G配列ブロックは、配列番号1に示されるアミノ酸配列（ X^1GGX^2G ）のリピート配列（ X^1GGX^2G ）_nからなるブロックである限り、特に制限されない。G配列ブロックは、通常、 β -シート構造を採り得るブロックである。G配列ブロックにより、ポリペプチドに自己集合による繊維形成能を付与することができる。

[0030] X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示す。 X^1 及び X^2 は好ましくはVである。

[0031] n は2以上の整数を示す。 n を2以上とすることにより、本発明のポリペプチドは、繊維状自己集合体を形成することができる。 n は、好ましくは3以上、より好ましくは4以上、さらに好ましくは4~20、よりさらに好ましくは4~12、とりわけさらに好ましくは4~8、とりわけよりさらに好ましくは4~6である。

[0032] P配列ブロックは、配列番号2に示されるアミノ酸配列（ $VPGX^3G$ ）のリピート

配列 (VPGX³G)_n からなるブロックである限り、特に制限されない。P配列ブロックは、通常、 β -ターン構造をとり得るブロックである。P配列ブロックにより、ポリペプチドが下限臨界共溶温度 (LCST) を持つようになり、LCST以上で自己集合して水溶液から相分離するようになる。P配列ブロックの存在により、或いはP配列ブロックと本発明のポリペプチドの他の配列構造も相まって、固相合成の効率がより向上する。

[0033] 本発明のポリペプチドのLCST (溶媒：水、濃度：0.03 wt%の場合) は、例えば10～30℃、好ましくは15～25℃である。

[0034] X³は同一又は異なって任意のアミノ酸を示す。X³で示されるアミノ酸としては、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン等の塩基性側鎖を有するアミノ酸； アスパラギン酸、グルタミン酸といった酸性側鎖を有するアミノ酸； グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインといった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸； アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンといった非極性側鎖を有するアミノ酸； スレオニン、バリン、イソロイシンといった β -分枝側鎖を有するアミノ酸； チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンといった芳香族側鎖を有するアミノ酸等が挙げられる。X³で示されるアミノ酸は、プロリン以外のアミノ酸であることが好ましい。

[0035] X³で示されるアミノ酸により、LCSTを調整することができる。X³で示されるアミノ酸が親水性アミノ酸である場合、LCSTが高くなり過ぎる傾向にあるので、好ましくない。LCSTを適切な (生理的に許容可能な) 温度 (例えば30～40℃) に調整し易いという観点から、P配列ブロック中のX³で示されるアミノ酸の一部はバリン、ロイシン等の非芳香族性疎水性アミノ酸 (好ましくはバリン) であり、他のアミノ酸としては、フェニルアラニン、トリプトファン等の芳香族性疎水性アミノ酸 (好ましくはフェニルアラニン) であることが好ましい。この場合、P配列ブロック中のX³の総数に対するX³で示される非芳香族性疎水性アミノ酸の数の割合は、例えば60～95%、好ましくは70～90%、

より好ましくは75～85%であり、P配列ブロック中のX³の総数に対するX³で示される芳香族性疎水性アミノ酸の数の割合は、例えば5～40%、好ましくは10～30%、より好ましくは15～25%である。さらに、この場合、P配列ブロック中、X³で示される芳香族性疎水性アミノ酸はできるだけ分散して出現することが好ましく、例えば1～10個、好ましくは2～8個、より好ましくは3～7個、さらに好ましくは4～6個、特に好ましくは5個のリピート単位（VPGX³G）の繰返しに対して1つの割合で、X³が芳香族性疎水性アミノ酸であるリピート単位が出現することが好ましい。

[0036] mは5以上の整数を示す。mは、本発明のポリペプチドから得られるゲルの貯蔵弾性率の高さの観点、損失正接の低さの観点、また歪みに対してより固体的性質を保つことができるという観点から、好ましくは5～25であり、より好ましくは8～25であり、さらに好ましくは13～25であり、よりさらに好ましくは13～22であり、とりわけさらに好ましくは13～20であり、特に好ましくは14～17である。また、本発明の一態様において、mは5～22、13～22であることができる。

[0037] エラスチン様ブロックペプチド配列は、G配列ブロック及びP配列ブロックを含むものである限り、特に制限されない。エラスチン様ブロックペプチド配列中のG配列ブロックの数は、特に制限されないが、例えば1～5、好ましくは1～4、より好ましくは1～3、さらに好ましくは1～2、特に好ましくは1である。エラスチン様ブロックペプチド配列中のP配列ブロックの数は、特に制限されないが、例えば1～5、好ましくは1～4、より好ましくは1～3、さらに好ましくは1～2、特に好ましくは1である。

[0038] ブロック間（G配列ブロックとP配列ブロックとの間、G配列ブロックとG配列ブロックとの間、P配列ブロックとP配列ブロックとの間）は、直接連結されていてもよいし、リンカー配列が介在していてもよい。

[0039] リンカー配列としては、エラスチン様ブロックペプチド配列の自己集合性による繊維形成能を著しく低減させない限りにおいて特に制限されず、通常は、大きな制限なく任意のアミノ酸またはアミノ酸配列を採用することがで

きる。リンカー配列のアミノ酸長は、例えば1~20、好ましくは1~15、より好ましくは1~10、さらに好ましくは1~8、よりさらに好ましくは2~8である。リンカー配列の具体例としては、配列番号9：LWLGSGで示されるアミノ酸配列、KLで示されるアミノ酸配列等が挙げられ、さらにこれらのアミノ酸配列に対して1または複数個（例えば1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1~2個、さらに好ましくは1個）のアミノ酸が変異（例えば置換、欠失、挿入、付加、好ましくは置換、より好ましくは保存的置換）されてなるアミノ酸配列を採用することができる。

[0040] 本明細書中において、「保存的置換」とは、アミノ酸が類似の側鎖を有するアミノ酸に置換されることを意味する。例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンといった塩基性側鎖を有するアミノ酸同士で置換されることが、保存的な置換にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸といった酸性側鎖を有するアミノ酸；グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインといった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンといった非極性側鎖を有するアミノ酸；スレオニン、バリン、イソロイシンといった β -分枝側鎖を有するアミノ酸；チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンといった芳香族側鎖を有するアミノ酸同士での置換も同様に、保存的な置換にあたる。

[0041] エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造は、自己集合による繊維形成の観点から、N末端側から、G配列ブロック-P配列ブロック-G配列ブロック、G配列ブロック-P配列ブロック-P配列ブロック-G配列ブロック、P配列ブロック-G配列ブロック、又はG配列ブロック-P配列ブロックであることが好ましい。該配列構造は、特に、G配列ブロック-P配列ブロックであることが好ましい。これらの構造中、「-」は（ブロック間の）直接連結又は他の配列（例えばリンカー配列等）を示す。

[0042] 本発明のポリペプチドは、親水性アミノ酸リッチ配列を含むことが好ましい。親水性アミノ酸リッチ配列により、固相合成の効率、ポリペプチドの溶

解性向上に伴う精製の容易性、ゲル形成性等をより向上させることができる。親水性アミノ酸リッチ配列は、親水性アミノ酸（塩基性側鎖を有するアミノ酸、酸性側鎖を有するアミノ酸、非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸）の割合が高い配列である限り特に制限されず、例えば50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上の割合で親水性アミノ酸を含む、例えば3～15、5～10アミノ酸長のアミノ酸配列が挙げられる。親水性アミノ酸リッチ配列としては、ヒスチジン連続配列（Hisタグ配列）が好ましい。他のアミノ酸配列内には、架橋反応に使用できる官能基を有するアミノ酸（例えばリシン、システイン等）が含まれることが好ましい。

[0043] 本発明のポリペプチドが親水性アミノ酸リッチ配列を含む場合、細胞接着配列は、本発明のポリペプチドの末端（N末端及び／又はC末端）に配置され、好ましくはC末端に配置される。親水性アミノ酸リッチ配列は、N末端及びC末端のどちらか一方にのみ配置されていてもよいし、両方に配置されていてもよい。

[0044] 本発明のポリペプチドは、末端に細胞接着性配列を有することができる。細胞接着性配列としては、特に制限されず、各種配列を採用することができる。細胞接着性配列としては、RGDS（配列番号10）等の細胞選択性を有しないものであることもでき、また細胞選択性を有するもの（例えば、REDV（配列番号22））であることができる。細胞選択性を有する配列としては、例えばHHH、VVV、TTT、TGA、NNN、KKK、AAA、RRR、YYY、TTT、GAT、GGG、PGH、GQA、QGD、GIG、EKG、KGK、QGF、GMK、GLS、CAG、CNG、KGT、PLG、NRG、CSG、LGL、AVG、GHP、GLI、GVG、GPS、SPG、GPP、GIS、GYL、GEK、QGE、CNY、FPG、GAP、APG、GEC、LPG、GPR、PCG、GDV、IGG、CDG、AVA、FLM、GFD、GTP、GPY、VSG、DGR、GIT、GFL、ASG、GCP、NQG、SGL、GGA、PDG、QAL、GLK、GSP、GEP、GNS、AKG、DGY、TGP、VGP、SLW、AAG、AGA、ARG、GRD、EGF、GSC、PGQ、HSQ、EAP、RGP、PGD、CNI、GFG、GPT、GDQ、KGE、PFI、QGP、SYW、LPGFPGLK（配列番号11）、LPGFPGTP（配列番号12）、GPPGLSGPP（配列番号13）、FPGPPGPP（配列番号14）、LPGLPGPP（配列番号15）、FPGLPGPP（配列番号16）、GPP

GPPGSPG（配列番号17）、LPGPPGPP（配列番号18）、FPGSPGFPG（配列番号19）、GSPGLPGTP（配列番号20）及びIGLSGEKG（配列番号21）等が挙げられる。

[0045] 本発明のポリペプチドが細胞接着性配列を含む場合、細胞接着配列は、本発明のポリペプチドの末端（N末端及び／又はC末端）に配置され、好ましくはC末端に配置される。細胞接着配列は、N末端及びC末端のどちらか一方にのみ配置されていてもよいし、両方に配置されていてもよい。本発明の好ましい態様においては、細胞接着配列は、一方の末端にのみ配置される。

[0046] エラスチン様ブロックペプチド配列のアミノ酸残基数は、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基数100%に対して、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、よりさらに好ましくは80%以上、とりわけ好ましくは90%以上である。

[0047] 本発明のポリペプチドのアミノ酸残基数は、例えば80以上、好ましくは80～250、より好ましくは90～200、さらに好ましくは100～180である。

[0048] 本発明のポリペプチドは、アミノ酸がアミド結合により連結してなるポリマーのみからなるもの（典型的なポリペプチド）であることができ、また当該典型的なポリペプチドの末端のアミノ酸残基同士が化学反応によって連結してなるもの（連結ポリペプチド）であることができる。後者の場合、複数個（例えば2～5、2～4、2～3、2）の典型的なポリペプチドの間に化学反応による結合を含むリンカー（主鎖原子数が、例えば2～25、5～20、7～15）が配置される。なお、主鎖とは、典型的なポリペプチドの末端のアミノ酸残基の間を繋ぐ鎖であり、環が介在する場合は鎖長が最も短くなるように当該環内の原子を辿った場合の鎖である。

[0049] 本発明のポリペプチドはゲルを形成する性質が著しく損なわれない限りにおいて、化学修飾されたものであってもよい。ゲルを形成する性質の有無は、後述の試験例4及び試験例5に従って評価することができる。

[0050] 本発明のポリペプチドは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

- [0051] ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基；例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基； α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。
- [0052] 本発明のポリペプチドは、C末端以外のカルボキシル基（またはカルボキシレート）が、アミド化またはエステル化されていてもよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。
- [0053] さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども包含される。
- [0054] 本発明のポリペプチドは、酸または塩基との薬学的に許容される塩の形態であってもよい。塩は、薬学的に許容される塩である限り特に限定されず、酸性塩、塩基性塩のいずれも採用することができる。例えば酸性塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等の有機酸塩；アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等のアミノ酸塩等が挙げられる。また、塩基性塩の例として、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

- [0055] 本発明のポリペプチドは、溶媒和物の形態であってもよい。溶媒は、薬学的に許容されるものであれば特に限定されず、例えば水、エタノール、グリセロール、酢酸等が挙げられる。
- [0056] 工程 (a) では、本発明のポリペプチド及び／又は本発明のポリペプチドの分割断片を固相合成する。
- [0057] 本発明のポリペプチドの分割断片は、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドであり、その限りにおいて特に制限されない。
- [0058] 分割断片のアミノ酸残基数は、例えば30以上、好ましくは40以上、より好ましくは50以上である。本発明のポリペプチドの分割断片であれば、このような長鎖のポリペプチドであっても、固相合成が可能である。
- [0059] 分割断片は、本発明のポリペプチドのP配列ブロックの全部又は一部を含むことが好ましい。これにより、固相合成の効率をより向上させることができる。分割断片内のP配列ブロックの（配列番号2：VPGX³G）リピート数は、好ましくは3以上、より好ましくは5以上であることができ、その上限は特に制限されず本発明のポリペプチドにおけるP配列ブロックのリピート数の上限であることができる。P配列ブロックのアミノ酸残基数は、分割断片内のアミノ酸残基数100%に対して、好ましくは25%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは35%以上、よりさらに好ましくは40%以上、とりわけ好ましくは50%以上、とりわけさらに好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上である。
- [0060] 本発明の一態様において、分割断片は、本発明のポリペプチドのG配列ブロックを含まないことが好ましい。これにより、固相合成の効率をより向上させることができる。
- [0061] 本発明の一態様において、分割断片は、本発明のポリペプチドの親水性アミノ酸リッチ配列を含むことが好ましい。これにより、固相合成の効率、ポリペプチドの溶解性向上に伴う精製の容易性、ゲル形成性等をより向上させることができる。

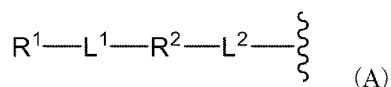
[0062] 本発明の一態様において、後述の工程（b）における化学反応による連結に使用するために、分割断片の末端領域のアミノ酸残基は、当該化学反応に使用することができる側鎖を有するアミノ酸残基である、或いは当該化学反応に使用することができる基が付加されたアミノ酸残基であることができる。

[0063] 末端領域のアミノ酸残基とは、例えば、末端の1～5アミノ酸領域のアミノ酸残基、好ましくは1～3アミノ酸領域のアミノ酸残基、より好ましくは1～2アミノ酸領域のアミノ酸残基、特に好ましくは末端アミノ酸残基のアミノ酸残基である。

[0064] 化学反応に使用することができる側鎖を有するアミノ酸残基は、好ましくはシステイン残基である。システイン残基側鎖のチオール基は、チオールエン反応やマイケル付加反応による連結に使用することができる。

[0065] 化学反応に使用することができる基としては、好ましくはビニル基、マレイミド基が挙げられ、特に好ましくはビニル基が挙げられる。ビニル基は、チオール基とのチオールエン反応に、マレイミド基は、チオール基とのマイケル付加反応に使用することができる。後述の工程（b）の反応効率の観点から、分割断片の末端領域に一般式（A）：

[0066] [化2]



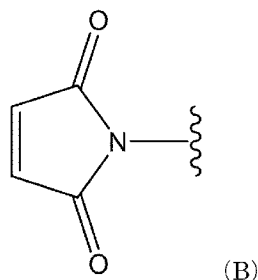
[0067] [式中：R¹はビニル基又はマレイミド基を示す。L¹はアミド結合（-C（=O）-NH-）又はエステル結合（-C（=O）-O-）を含むリンカーを示す。R²は芳香環を示す。L²はリンカーを示す。]

で表される基が付加されていることが好ましい。

[0068] R¹で示されるマレイミド基は、式（B）：

[0069]

[化3]



[0070] で表される基である。

[0071] L^1 で示されるリンカーの主鎖構成原子数は、好ましくは2～5、より好ましくは2～4、さらに好ましくは2～3、特に好ましくは2である。 L^1 で示されるリンカーは環構造を含まない鎖状構造である。 L^1 で示されるリンカーは特に好ましくはアミド結合 ($-C(=O)-NH-$) である。

[0072] R^2 で示される芳香環は、例えば炭素原子数5～20、好ましくは5～12、より好ましくは5～7の芳香環であることができる。当該芳香環としては、特に好ましくはベンゼン環が挙げられる。

[0073] L^2 で示されるリンカーの主鎖構成原子数は、好ましくは1～5、より好ましくは1～3、さらに好ましくは2である。 L^2 で示されるリンカーは環構造を含まない鎖状構造である。 L^2 で示されるリンカーは特に好ましくは $-CH_2-C(=O)-$ である。

[0074] 固相合成は、特に制限されず、公知の方法に従って又は準じて行うことができる。

[0075] 固相合成方法の一般的な工程は次のとおりである。保護基（代表的にはFmoc、Boc）でN末端の保護されたアミノ酸（保護アミノ酸）を、固体の不溶性担体（代表的にはポリスチレン樹脂製ビーズ）に、該保護アミノ酸のC末端で、必要に応じてリンカーを介して結合させる。次に、未反応の保護アミノ酸、すなわち担体に結合していない保護アミノ酸を除去する。次いで、担体に結合された保護アミノ酸が担体から遊離しない条件で、保護アミノ酸の保護基を除去する。別途、担体に結合されたアミノ酸と結合させるアミノ酸のN末端を保護基で保護した第2の保護アミノ酸を調製しておく。第2の保護アミノ酸

を担体に結合したアミノ酸に添加し、担体に結合したアミノ酸のN末端と第2の保護アミノ酸のC末端を縮合する。次に、未反応の第2の保護アミノ酸を除去し、次いで、第2の保護アミノ酸の保護基を除去する。保護基でN末端の保護された第3のアミノ酸を添加して、第2のアミノ酸のN末端と第3の保護アミノ酸のC末端を縮合する。この操作を繰り返し、担体と結合した所望のアミノ酸配列を有するペプチドを合成する。このペプチドを担体から分離することによって所望のペプチドが得られる。

[0076] 主鎖上のアミノ基の保護基としては、例えば9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、ターシャリーブトキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシカルボニル (Z)、ターシャリーアミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロロベンジルオキシカルボニル (Cl-Z)、2-ブromoベンジルオキシカルボニル (Br-Z)、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル等が挙げられる。これらの中でも、ペプチド合成効率等の観点から、好ましくはFmoc、Bocが挙げられ、特に好ましくはFmocが挙げられる。

[0077] アミノ酸において、縮合反応条件下で反応することが望まれないその他の基（反応性側鎖）が存在する場合、この反応性側鎖が適当な保護基で保護された保護アミノ酸を用いることができる。カルボキシル基の保護基としては、例えばアルキルエステル（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチル等のエステル基）、ベンジルエステル、2-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル、フェナシルエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジド等が挙げられる。セリンの水酸基は、例えばエステル化又はエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基等の低級アルカノイル基（好ましくは炭素数1~3のアル

ルカノイル基)、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が挙げられる。またエーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基等である。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、ベンジル (Bzl)、2,6-ジクロロベンジル ($\text{Cl}_2\text{-Bzl}$)、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチル (tBu) 等が挙げられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、パラトルエンスルホニル (Tos)、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、ジニトロフェニル (DNP)、ベンジルオキシメチル、ターシャリーブトキシメチル (Bum)、Boc、トリチル (Trt)、Fmoc等が挙げられる。

[0078] 担体の例としては、スチレン樹脂、アクリルアミド樹脂、ポリエチレングリコール-アクリルアミド複合樹脂、ポリオキシエチレングラフテッドスチレン樹脂などが挙げられるがこれらに限定されない。これらはジビニルベンゼンで架橋されていても良く、また、1種単独又は2種以上組み合わせてもよい。リンカーは既知のリンカーを広く使用できる。リンカーの例としては、クロロメチル、ヒドロキシメチル、ベンズヒドリルアミン、アミノメチル、4-ベンジルオキシベンジルアルコール、4-メチルベンズヒドリルアミン、フェニルアセトアミドメチル、4-ヒドロキシメチルフェニルアセトアミドメチル、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ、2-クロロトリチルクロライド樹脂、4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸 (HMPA)、4-ヒドロキシメチル安息香酸 (HMBA)、2,4-ジメトキシ-4-ヒドロキシベンゾフェノンなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0079] 保護基除去剤としては、使用している保護基、固相担体、リンカー等を考慮し、適宜選択すればよい。例えば、Fmocの除去には、ピペリジンを20%v/vで含有するN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液等を使用することができる。なお、環境負荷軽減の観点から、本工程における有機溶媒使用量を低減する場合には、水系の保護基除去剤、例えば水酸化ナトリウム含有含水エタノール (例; 0.1M NaOH含有90%含水エタノール) 等を使用することができる。

その他の保護基除去剤としては、25%v/v臭化水素酢酸溶液、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸（TFA）などが挙げられる。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。また、縮合反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化、反応条件などもまた公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

[0080] 分離されたペプチドは必要に応じて、常法、例えば、抽出、分配、再沈澱、再結晶、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより精製される。

[0081] 工程（b）では、複数の本発明ポリペプチドの分割断片の末端領域間を化学反応で連結する。

[0082] 工程（b）で連結する分割断片の数は、特に制限されないが、例えば2～5、2～4、2～3、2であることができる。分割断片の数が3以上である場合は、3以上の分割断片を同時に連結させてもよく、3以上の分割断片を逐次連結する（2つの分割断片を連結し、得られた断片を他の分割断片と連結する）ことでもよい。

[0083] 工程（b）における化学反応は、2分子を共有結合により連結することができる反応である限り特に制限されないが、反応効率、位置選択性等の観点から、好ましくはクリック反応であることが好ましい。クリック反応の中でも、反応に使用する成分の生体に対する安全性の観点から、例えばチオールエン反応、マイケル付加反応、ヒュスゲン環化付加反応、好ましくはチオールエン反応、マイケル付加反応、特に好ましくはチオールエン反応である。

[0084] 工程（b）における化学反応は、特に好ましくは、一方の分割断片aの末端領域のアミノ酸残基aが有するチオール基と、他方の分割断片bの末端領域の

アミノ酸残基bに付加されたビニル基又はマレイミド基との反応であることが好ましい。この態様において、工程（b）の反応効率の観点から、分割断片bの末端領域に上述の一般式（A）で表される基が付加されていることが好ましい。また、アミノ酸残基aはC末端領域のアミノ酸残基であり、アミノ酸残基bはN末端領域のアミノ酸残基であることが好ましい。

[0085] 工程（b）において、連結させる一方の分割断片1モルに対する、他方の分割断片の使用量は、例えば0.5～3モル、好ましくは0.8～2モルである。

[0086] 工程（b）の溶媒は、ポリペプチドが溶解する溶媒である限り特に制限されないが、特に好ましくは水である。

[0087] 工程（b）の反応液は、炭酸ナトリウム緩衝剤等の緩衝剤を含有することが好ましい。反応液のpHは、好ましくは8～12、より好ましくは9～11、特に好ましくは9.5～10.5である。

[0088] 反応液は、必要に応じて、また化学反応の種類に応じて、適宜、触媒、重合開始剤等の添加剤を含有することができる。また、反応の際には、光照射、加熱により、ラジカル生成させ、反応を進行させることができる。

[0089] 反応温度は、加熱下、常温下及び冷却下のいずれでも行うことができ、好ましくは30～80℃、より好ましくは40～60℃で行うことが好ましい。反応時間は特に制限されず、通常、30分間～30時間とすることができる。

[0090] 反応終了後、溶媒を留去し、生成物は必要に応じて、常法、例えば、抽出、分配、再沈澱、再結晶、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより精製される。

[0091] 工程（b）は、収束的な合成ルートであるので効率的であり、好ましい。また、合成中間体である上記分割断片を精製しておくことによって、目的物である本発明のポリペプチドの精製操作をより容易なものとすることができる。

[0092] 工程（b）は、コンビナトリアル合成に利用することができる。すなわち、予め複数種の分割断片を準備しておくことにより、それらの分割断片を任意に組み合わせて工程（b）に供して多種の本発明のポリペプチドを簡便に製造

することができる。このようにして得られた本発明のポリペプチドのライブラリを用いることによって、任意の目的にとって最適な本発明のポリペプチドをより簡便且つ効率的にスクリーニングすることが可能となる。

[0093] 工程 (a) 及び／又は工程 (b) により（製造効率、生体に対する安全性等の観点から、特に好ましくは工程 (a) 及び工程 (b) により）、遺伝子組み換え技術に依拠せずともエラスチン類似ポリペプチドを製造することができる。本発明の製造方法により得られた本発明のポリペプチドは、当該ポリペプチドのゲル化性能を維持及び／又は発揮することができる。

[0094] 本発明の製造方法は、新規構造のエラスチン類似ポリペプチド（新規ポリペプチド）：（配列番号1： X^1GGX^2G ）_nからなるG配列ブロック（式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、 n は4以上の整数を示す。）と（配列番号2： $VPGX^3G$ ）_mからなるP配列ブロック（式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、 m は5以上の整数を示す。）を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含み、且つ

（c）前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側からG配列ブロックーP配列ブロックである、且つ／或いは

（d） m が5～22の整数である、
ポリペプチドの製造に適している。

[0095] 新規ポリペプチドは、得られるゲルの貯蔵弾性率の高さ、損失正接の低さの観点、また歪みに対してより固体的性質を保つことができるという観点で、従来のエラスチン類似ポリペプチドに比べて優れている。この観点から、上記（d）の要件を満たすことが好ましく、上記（c）及び（d）の両方の要件を満たすことが特に好ましい。また、同様の観点から、 m は、より好ましくは8～22であり、さらに好ましくは13～22であり、よりさらに好ましくは13～17であり、特に好ましくは14～16である。

[0096] 本発明のポリペプチドをLCST未満の温度（例えば0～15℃、2～10℃）で溶媒中に溶解させた後、得られた溶液をLCST以上（例えば30～50℃、30～45℃、30～40℃）に加温して一定時間（例えば1～300時間、好ましくは8～120時

間、より好ましくは12～80時間) 静置することにより、本発明のポリペプチドを含有するゲル状組成物を得ることができる。溶媒としては水が使用されるが、水と有機溶媒の混合溶媒も使用することができる。

[0097] 本発明のゲル状組成物における本発明のポリペプチドの濃度は、ゲル形成性の観点から、例えば0.2 w/v%以上、好ましくは0.3 w/v%以上、より好ましくは0.35 w/v%以上である。当該濃度は、本発明のゲル状組成物への他の成分（例えば細胞培養に必要又は好適な成分）を浸透させやすいという観点から、例えば3.0 w/v%以下、好ましくは2.0 w/v%以下、より好ましくは1.5 w/v%以下、さらに好ましくは1.0 w/v%以下、よりさらに好ましくは0.8 w/v%以下である。

実施例

[0098] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0099] 試験例1. ポリペプチドの合成1（固相合成法）

以下のアミノ酸配列及び構造であるポリペプチドを固相合成法で合成した。アミノ酸残基は1文字表記で表す。

[0100] [化4]

MG5PPPPP（配列番号3）

MKSG(VGGVG)₅KL[(VPGVG)₂(VPGFG)(VPGVG)₂]₃LWLEHHHHHH

[0101] 合成方法の詳細は以下のとおりである。

[0102] <1-1. 略語>

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

HATU: O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HCTU: O-(1H-6-chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HPLC: 高速液体クロマトグラフィー。

[0103] <1-2. 合成試薬と溶媒>

Fmoc-アミノ酸、HCTU、HATUはMerck社（ドイツ）から購入した。分析や精製に使用したHPLCグレードのアセトニトリルは、関東化学株式会社（日本、東京）と富士フイルム和光純薬株式会社（日本、大阪）から購入した。固相ペプチド合成には富士フイルム和光純薬のDMFをそのまま使用した。その他の市販の試薬は、Merck社（ドイツ）、関東化学株式会社（日本、東京）、富士フイルム和光純薬株式会社（日本、大阪）、東京化成工業株式会社（日本、東京）から購入し、精製を行うことなく使用した。

[0104] <1-3. ペプチド固相合成>

ペプチドの固相合成は、Fmoc法により自動合成装置または手動での操作により行った。アミノ酸試薬として、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His(1-Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Val-OHを使用した。固相としては2-クロロトリルチルポリスチレン樹脂を用い、最初のアミノ酸残基は樹脂に手動で担持した。その後、以下の標準プロトコルに従ってペプチドの伸長を行った。Fmoc-脱保護はピペリジン20%DMF溶液で行った（8分×2）。カップリングは、DMF中、Fmoc-アミノ酸（樹脂のアミノ酸担持量に対して4モル当量）、HCTUまたはHATU（4モル当量）、N-メチルモルホリン（8モル当量）を用いて60分間行った。必要に応じてダブルカップリング（カップリング工程の繰り返し）を行った。カップリング後、DMF中20%の無水酢酸と10%のN-メチルモルホリンで10分間処理し、未反応の遊離アミノ基をキャッピングした。エピメリ化しやすいアミノ酸残基は、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミドを用いて事前に調製した1-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステルを用いてカップリングした。

[0105] <1-4. ペプチド自動合成装置>

ペプチド自動合成装置として、CS Bio 136X（CSBio）、またはSyro I（Biotage）を用いた。

[0106] <1-5. 手動でのペプチド合成>

それぞれのモノマー（1モル当量）を最小限のDMFに溶解し、HATU（1モル当

量)とN-メチルモルホリン(2モル当量)を加え、反応溶液を調製した。2分間予備活性化した後、この溶液を、フィルターを備えた反应用カラム(国産化学、東京)中で樹脂に加え、室温で2時間反応を行った。必要に応じて、反応を完結させるため、カップリングを繰り返した。

[0107] <1-6. 樹脂からの切り出しと脱保護>

得られた樹脂にクリベージ溶液(トリイソプロピルシラン:水:TFA = 1:2:98 v/v溶液)を添加して室温で2時間震盪した。反応後、樹脂をろ過して除き、ろ液を減圧濃縮した。得られた固体に氷冷したジエチルエーテルを加えボルテックスをした後、遠心し、上清を除去した。このジエチルエーテルによる洗浄を2回繰り返し、粗生成物を得た。粗生成物を0.1 v/v%のTFAを添加したアセトニトリル水溶液に溶解し、0.45 μ mのメンブレンフィルターを用いて濾過した後、分取HPLCによって精製した。得られた分画を凍結乾燥して目的のペプチドを得た。

[0108] <1-7. HPLCによる分析と精製>

ペプチドやタンパク質のセグメントの分析と精製は、デュアルポンプ、ミキサー、インライン脱気装置、波長可変UV検出器を備えた日本分光株式会社(日本、東京)のHPLC装置またはGilson社(米国)のHPLC装置を用いて行った。移動相は220 nm、254 nm、301 nmの波長での吸収を観測した。必要に応じて、カラムヒーターまたは水浴を用いてカラムを加熱した。移動相はTFA 0.1 v/v%を添加したアセトニトリル水溶液を用いた。

[0109] 試料注入前にカラムを通常10分間、開始溶媒組成で予備平衡化した。試料注入後、開始溶媒組成のまま10分間運転した後、最終溶媒組成(例えば50%アセトニトリル)までグラジエント運転した。最終溶媒組成に到達後、1分以内に溶媒組成を95%アセトニトリルに変更し、10分間カラムを洗浄し、さらに1分以内に溶媒組成を10%アセトニトリルに変更し、終了した。

[0110] <1-8. 分析HPLC>

分析HPLCはCapcell Pak MG-II(資生堂、5 μ m、孔径120 Å、内径4.6 mm x 250 mm)、Jupiter C18(Phenomenex、5 μ m、孔径300 Å、内径4.6 mm x 2

50 mm) または、Jupiter C4 (Phenomenex、5 μm 、300 Å、内径4.6 mm x 250 mm) を流量1 mL/minで行った。

[0111] <1-9. 分取HPLC>

分取HPLCはCapcell pak C18 UG80 (資生堂、5 μm 、孔径 80 Å、内径 50 mm x 250 mm)、Jupiter C18 (Phenomenex、5 μm 、孔径 300 Å、内径 30 mm x 250 mm)、Jupiter C18 (Phenomenex、5 μm 、孔径 300 Å、内径 21.2 mm x 250 mm)、Jupiter C4 (Phenomenex、5 μm 、孔径300 Å、内径 30 mm x 250 mm)、またはJupiter C4 (Phenomenex、5 μm 、孔径 300 Å、内径 21.2 mm x 250 mm) を用いて行った。

[0112] <1-10. 質量分析>

化合物の質量分析は、マトリクスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を使用し、Microflex MALDI-TOF spectrometer (Bruker、ドイツ) を用いて測定した。

[0113] <結果>

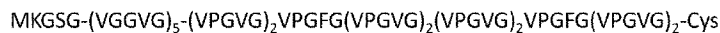
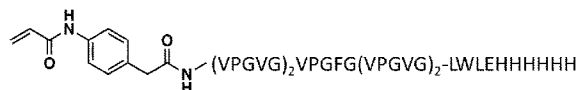
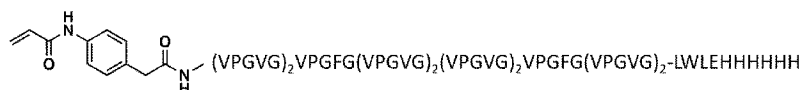
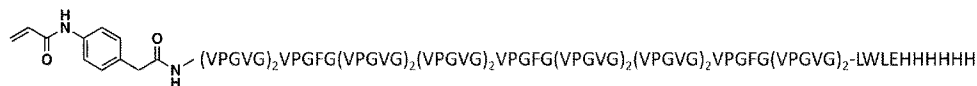
質量分析により、目的のポリペプチド (MG5PPPPP) を合成できたことが確認された (図1)。収率は1.2%であった。

[0114] 試験例2. ポリペプチドの合成2 (固相合成法)

以下のアミノ酸配列及び構造であるポリペプチドを、試験例1と同様にして固相合成法で合成した。MG5P及びMG5PPにおけるC末端のシステイン残基のみ3文字表記で表し、他のアミノ酸残基は1文字表記で表す。Phis、PPHis、及びPPPHisにおけるN末端のV (バリン残基) の左隣の-NH-は当該バリン残基由来の基である。

[0115]

[化5]

MG5P (配列番号 4)MG5PP (配列番号 5)PHis (配列番号 6)PPHis (配列番号 7)PPPHis (配列番号 8)

[0116] 質量分析により、目的のポリペプチド (MG5P、MG5PP、PHis、PPHis、及び PPHis) を合成できたことが確認された (図 2～6)。収率は以下のとおりであった。

MG5P : 収率19%。

MG5PP : 収率16%。

PHis : 収率27%。

PPHis : 収率15%。

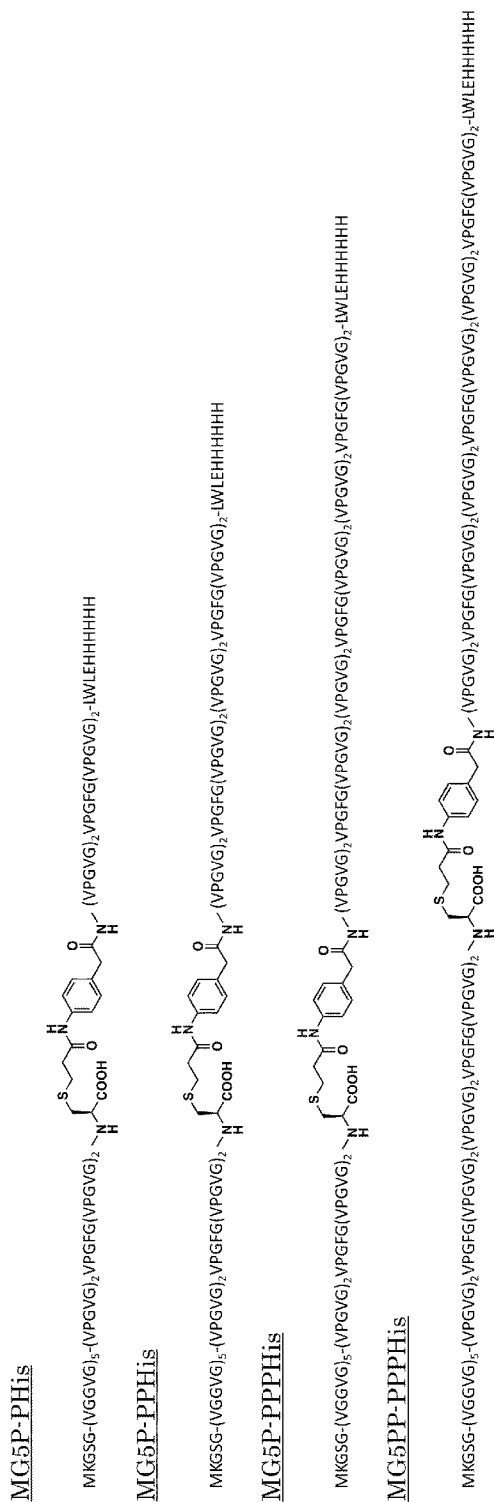
PPPHis : 収率6%。

[0117] 試験例3. ポリペプチドの合成3 (化学反応による連結)

以下のアミノ酸配列及び構造であるポリペプチドを合成した。

[0118]

[化6]



- [0119] MG5P-PHisは、MG5PとPHisとをチオールエン反応により連結して合成した。
- MG5P-PPHisは、MG5PとPPHisとをチオールエン反応により連結して合成した。
- MG5P-PPPHisは、MG5PとPPPHisとをチオールエン反応により連結して合成した。

。MG5PP-PPPHisは、MG5PPとPPPHisとをチオールエン反応により連結して合成した。

[0120] チオール-エン反応は次のようにして行った。1.5モル当量のペプチドセグメント1 (MG5PまたはMG5PP) と1.0モル当量のペプチドセグメント2 (PHis、PPHisまたはPPPHis) をバイアル瓶に量りとり、炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10) を加え、ペプチドセグメント2の濃度を10 mMとした。緩衝液は事前に窒素ガスのバブリングにより溶存酸素を除去した。反応溶液を攪拌しながら50℃で加熱し18時間反応させた。反応は分析HPLCにより追跡した。その後、TFA 0.1 v/v%を添加した50%アセトニトリル水溶液で希釈し、分取HPLCにより精製した。

[0121] 質量分析により、目的のポリペプチド (MG5P、MG5PP、PHis、PPHis、及びPPPHis) を合成できたことが確認された (図7～10)。収率は以下のとおりであった。

MG5P-PHis : 収率24%。

MG5P-PPHis : 収率24%。

MG5P-PPPHis : 収率21%。

MG5PP-PPPHis : 収率15%。

[0122] 試験例4. ポリペプチド溶液のゲル化

MG5P-PHis、MG5P-PPHis、MG5P-PPPHis、及びMG5PP-PPPHisそれぞれを、終濃度0.5重量%になるように、10w/v%スクロース水溶液に溶解させた。得られたポリペプチド溶液を加温して37℃に維持し、放置した。7日経過後、ポリペプチド溶液は透明ゲル化していた。

[0123] また、終濃度0.1重量%になるように10w/v%スクロース水溶液に溶解し、37℃で7日日保持したMG5P-PPHis分散液をマイカ基板に滴下し、37℃で乾燥させた試料を原子間力顕微鏡 (AFM) 観察したところ、ナノファイバーが絡み合った形態が観察された (図11)。

[0124] 試験例5. 動的粘弾性測定

試験例4で得られたポリペプチドゲルについて、37℃に調整したレオメータ

—MCR302にセットし、動的粘弾性測定を行った。測定した動的粘弾性は周波数分散で、貯蔵弾性率 (G') と損失正接 ($\tan \delta$) を計測した。周波数分散測定は0.1 %の一定歪みで、100-0.1 rad/sの角周波数の範囲で行った。

[0125] 貯蔵弾性率の測定結果を図12に示し、損失正接の測定結果を図13に示す。図12より、MG5PP-PPHisに比べて、MG5P-PHis、MG5P-PPHis、及びMG5P-PPPHisは貯蔵弾性率が高いことが分かった。図13より、全ての試料で角周波数 ω によらず $\tan \delta \leq 1$ であることが分かった。また、図12及び図13より、MG5P-PPHisが G' が最大かつ $\tan \delta$ 最小である、すなわち最も硬く固体的なゲルを形成することが分かった。

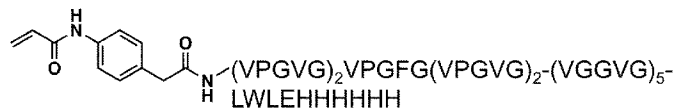
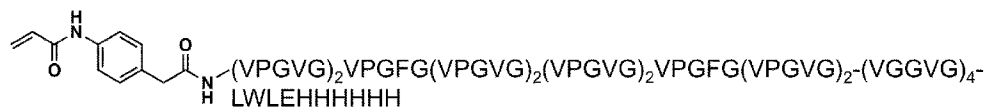
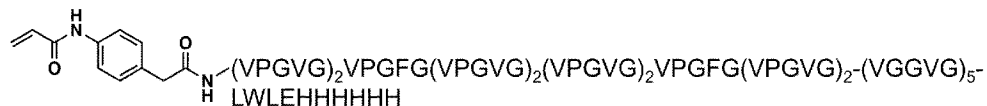
[0126] また、歪み分散で損失正接 ($\tan \delta$) を測定したところ、MG5P-PPHisは100 %の歪み下においても固体的性質があること、及び歪みを大きくすると、MG5P-PPPHis、MG5P-PHis、MG5P-PPPHis、MG5P-PPHisの順に液体的であることが分かった (図14)。

[0127] 試験例6. ポリペプチドの合成4 (固相合成法)

以下のアミノ酸配列及び構造であるポリペプチドを、試験例1と同様にして固相合成法で合成した。MPP、MPPP、及びMG4PPにおけるC末端のシステイン残基のみ3文字表記で表し、他のアミノ酸残基は1文字表記で表す。Phis、PPHis、及びPPPHisにおけるN末端のV (バリン残基) の左隣の—NH—は当該バリン残基由来の基である。

[0128]

[化7]

MPP (配列番号23)MKGSG-(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂-Cys**MPPP (配列番号24)**MKGSG-(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂-Cys**MG4PP (配列番号25)**MKGSG-(VGGVG)₄-(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂(VPGVG)₂VPGFG(VPGVG)₂-Cys**PG5His (配列番号26)****PPG4His (配列番号27)****PPG5His (配列番号28)**

[0129] 質量分析により、目的のポリペプチド（MPP、MPPP、MG4PP、PG5His、PPG4His、及びPPG5His）を合成できたことが確認された（図15～20）。収率は以下のとおりであった。

MPP：収率52%。

MPPP：収率29%。

MG4PP：収率20%。

PG5His：収率17%。

PPG4His：収率10%。

PPG5His：収率6%。

[0130] 試験例7. ポリペプチドの合成5（化学反応による連結）

以下のアミノ酸配列及び構造であるポリペプチドを合成した。

[0131]

。MPPP-PPG5Hisは、MPPPとPPG5Hisとをチオールエン反応により連結して合成した。MPP-PPG4Hisは、MPPとPPG4Hisとをチオールエン反応により連結して合成した。MG4PP-PPHisは、MG4PPとPPHisとをチオールエン反応により連結して合成した。

[0133] チオール-エン反応は次のようにして行った。1.5モル当量のペプチドセグメント1（MPP、MPPP、またはMG4PP）と1.0モル当量のペプチドセグメント2（PG5His、PPG4His、及びPPG5His、またはPPHis）をバイアル瓶に量りとり、炭酸ナトリウム緩衝液（pH 10）を加え、ペプチドセグメント2の濃度を10 mMとした。緩衝液は事前に窒素ガスのバブリングにより溶存酸素を除去した。反応溶液を攪拌しながら50℃で加熱し18時間反応させた。反応は分析HPLCにより追跡した。その後、TFA 0.1 v/v%を添加した50%アセトニトリル水溶液で希釈し、分取HPLCにより精製した。

[0134] 質量分析により、目的のポリペプチド（MPP-PG5His、MPP-PPG5His、MPPP-PG5His、MPP-PPG4His、及びMG4PP-PPHis）を合成できたことが確認された（図21～25）。収率は以下のとおりであった。

MPP-PG5His：収率30%。

MPP-PPG5His：収率23%。

MPPP-PPG5His：収率20%。

MPP-PPG4His：収率20%。

MG4PP-PPHis：収率20%。

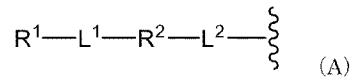
請求の範囲

- [請求項1] (配列番号1 : X^1GGX^2G)_nからなるG配列ブロック (式中、 X^1 は同一又は異なってV又はLを示し、 X^2 は同一又は異なってV又はLを示し、nは2以上の整数を示す。) と (配列番号2 : $VPGX^3G$)_mからなるP配列ブロック (式中、 X^3 は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、mは5以上の整数を示す。) を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含むポリペプチドの製造方法であって、
- (a) 前記ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの分割断片を固相合成する工程、及び／又は
- (b) 複数の前記ポリペプチドの分割断片の末端領域間を化学反応で連結する工程、を含む、製造方法。
- [請求項2] 前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側から、G配列ブロック－P配列ブロック－G配列ブロック、G配列ブロック－P配列ブロック－P配列ブロック－G配列ブロック、P配列ブロック－G配列ブロック、又はG配列ブロック－P配列ブロックである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記工程 (a) を含み、且つ前記ポリペプチドの分割断片のアミノ酸残基数が30以上である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記ポリペプチドの分割断片のアミノ酸残基数が50以上である、請求項3に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記工程 (a) を含み、且つ前記工程 (a) において前記分割断片が前記P配列ブロックの全部又は一部を含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記工程 (a) を含み、且つ前記ポリペプチド及び／又は前記ポリペプチドの分割断片が親水性アミノ酸リッチ配列を含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記工程 (b) を含み、且つ前記工程 (b) における前記化学反応が、

一方の分割断片aの末端領域のアミノ酸残基aが有するチオール基と、他方の分割断片bの末端領域のアミノ酸残基bに付加されたビニル基又はマレイミド基との反応である、請求項1に記載の製造方法。

[請求項8] 前記分割断片bの末端領域に一般式 (A) :

[化1]



[式中：R¹はビニル基又はマレイミド基を示す。L¹はアミド結合又はエステル結合を含むリンカーを示す。R²は芳香環を示す。L²はリンカーを示す。]

で表される基が付加されている、請求項7に記載の製造方法。

[請求項9] 前記ポリペプチドのアミノ酸残基数が80以上である、請求項1～8のいずれかに記載の製造方法。

[請求項10] 前記ポリペプチドが、

(配列番号1：X¹GGX²G)_nからなるG配列ブロック（式中、X¹は同一又は異なってV又はLを示し、X²は同一又は異なってV又はLを示し、nは2以上の整数を示す。）と（配列番号2：VPGX³G)_mからなるP配列ブロック（式中、X³は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、mは5以上の整数を示す。）を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含み、且つ

(c) 前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側からG配列ブロックーP配列ブロックである、且つ／或いは

(d) mが5～22の整数である、

請求項1～8のいずれかに記載の製造方法。

[請求項11] (配列番号1：X¹GGX²G)_nからなるG配列ブロック（式中、X¹は同一又は異なってV又はLを示し、X²は同一又は異なってV又はLを示し、nは4以上の整数を示す。）と（配列番号2：VPGX³G)_mからなるP配列ブロック（式中、X³は同一又は異なって任意のアミノ酸を示し、mは5以上の

整数を示す。)を含むエラスチン様ブロックペプチド配列を含み、且つ

(c) 前記エラスチン様ブロックペプチド配列の配列構造が、N末端側からG配列ブロック-P配列ブロックである、且つ／或いは

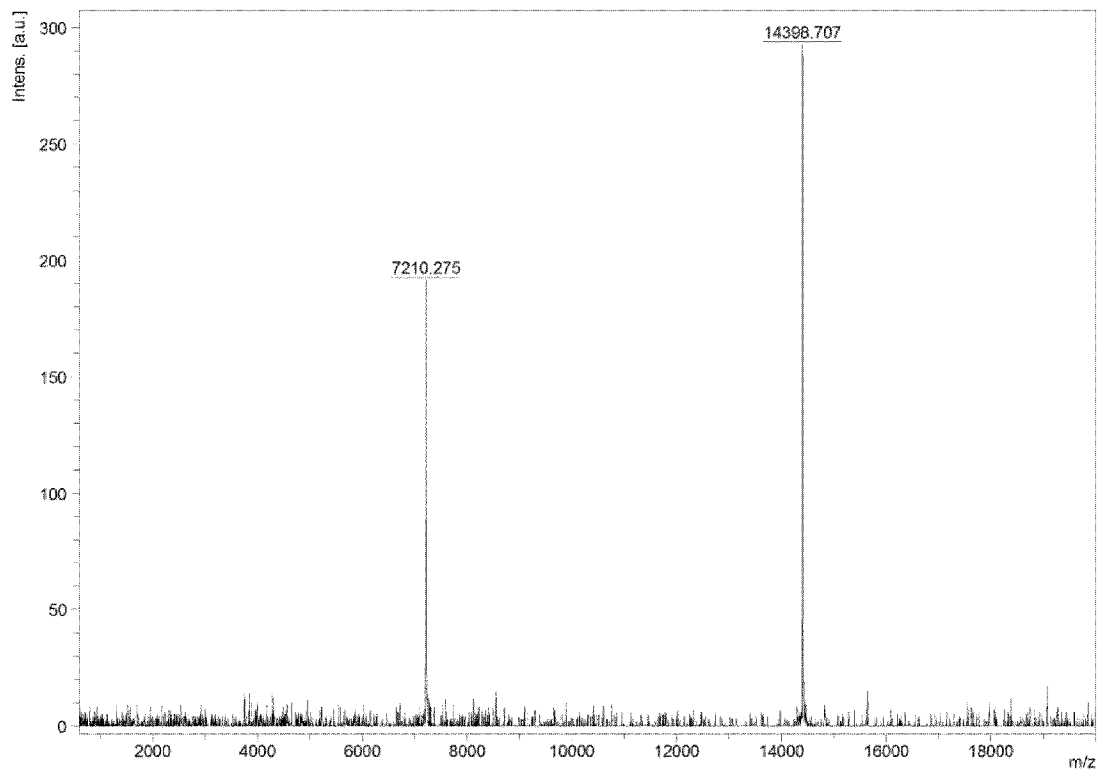
(d) mが5～22の整数である、
ポリペプチド。

[請求項12] mが13～22である、請求項11に記載のポリペプチド。

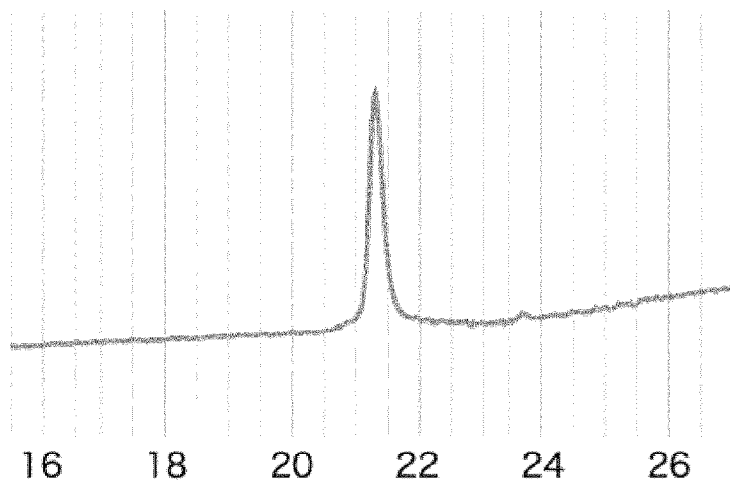
[請求項13] 請求項11又は12に記載のポリペプチドを含有する、ゲル状組成物。
。

[図1]

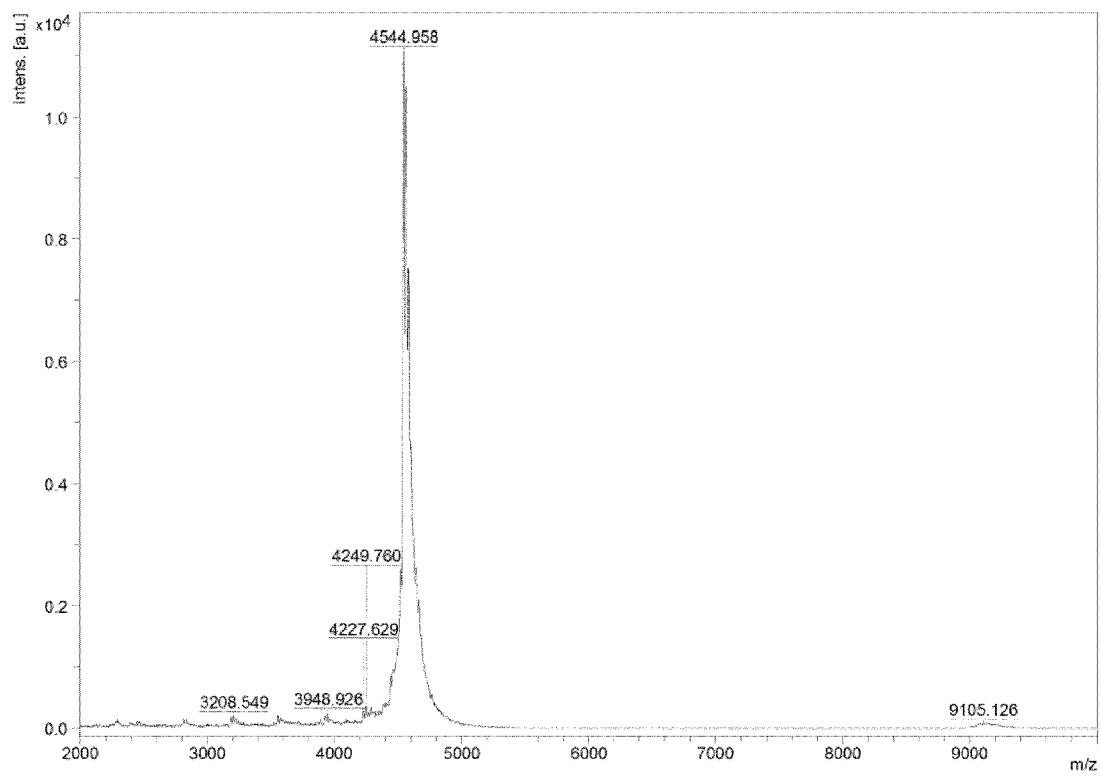
MALDI-TOF MS



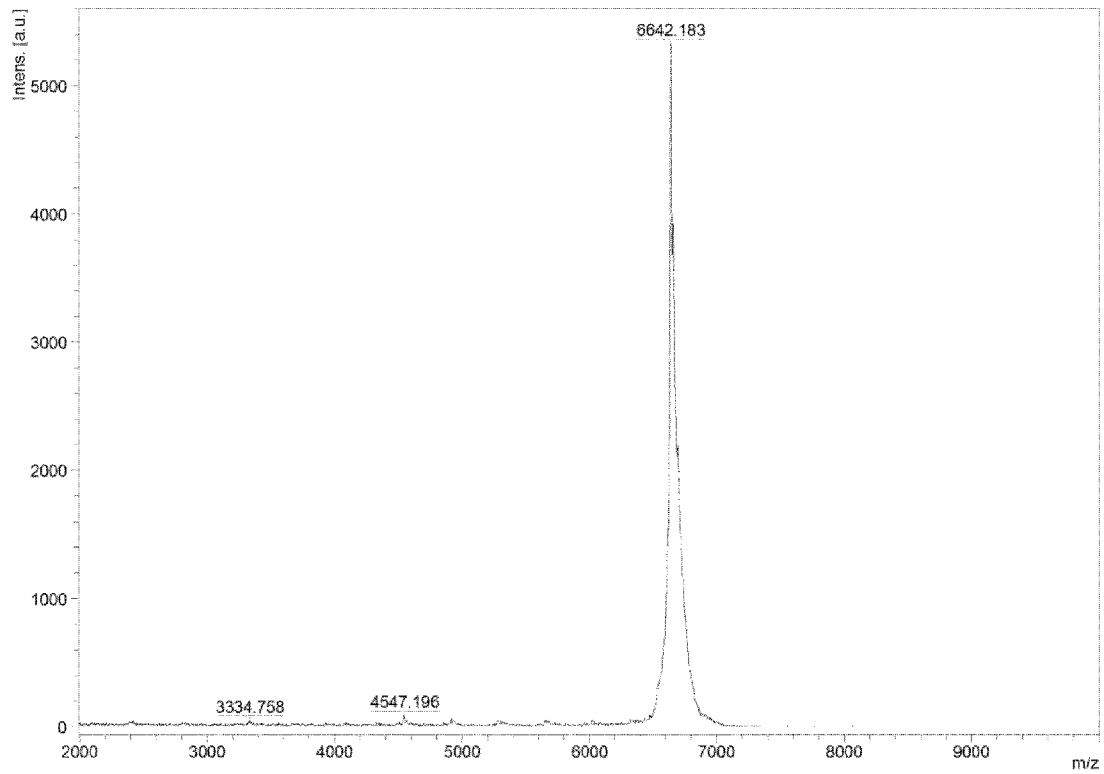
分析 HPLC



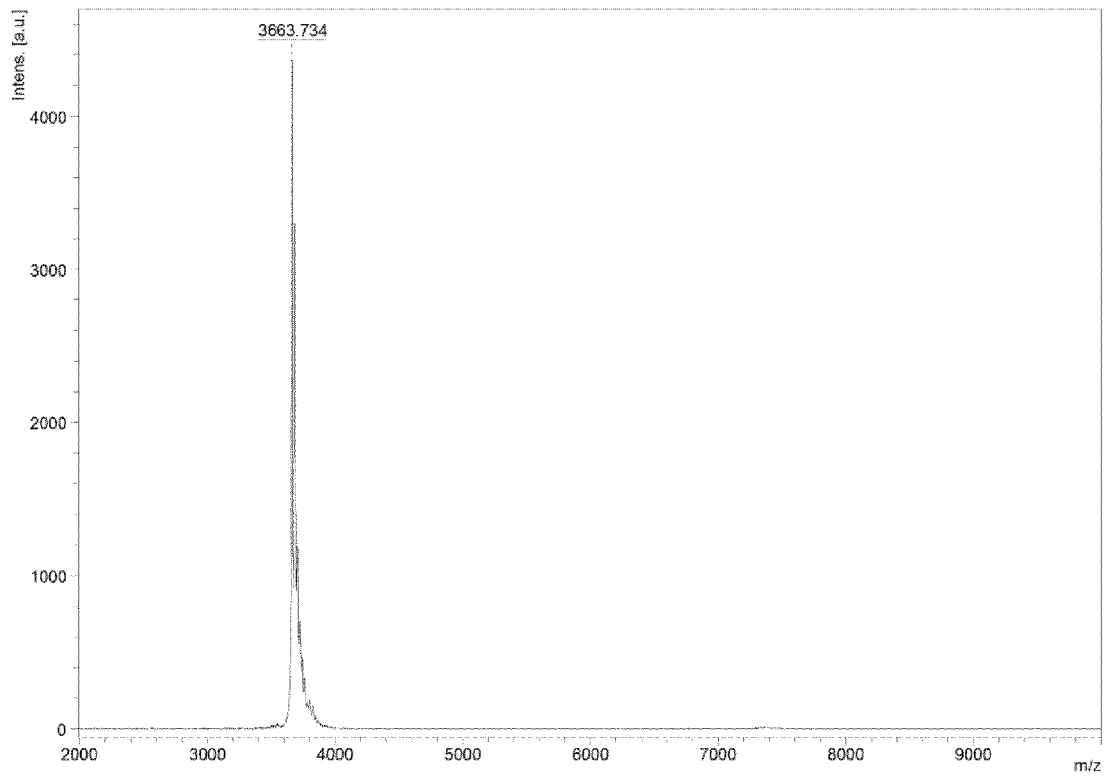
[図2]



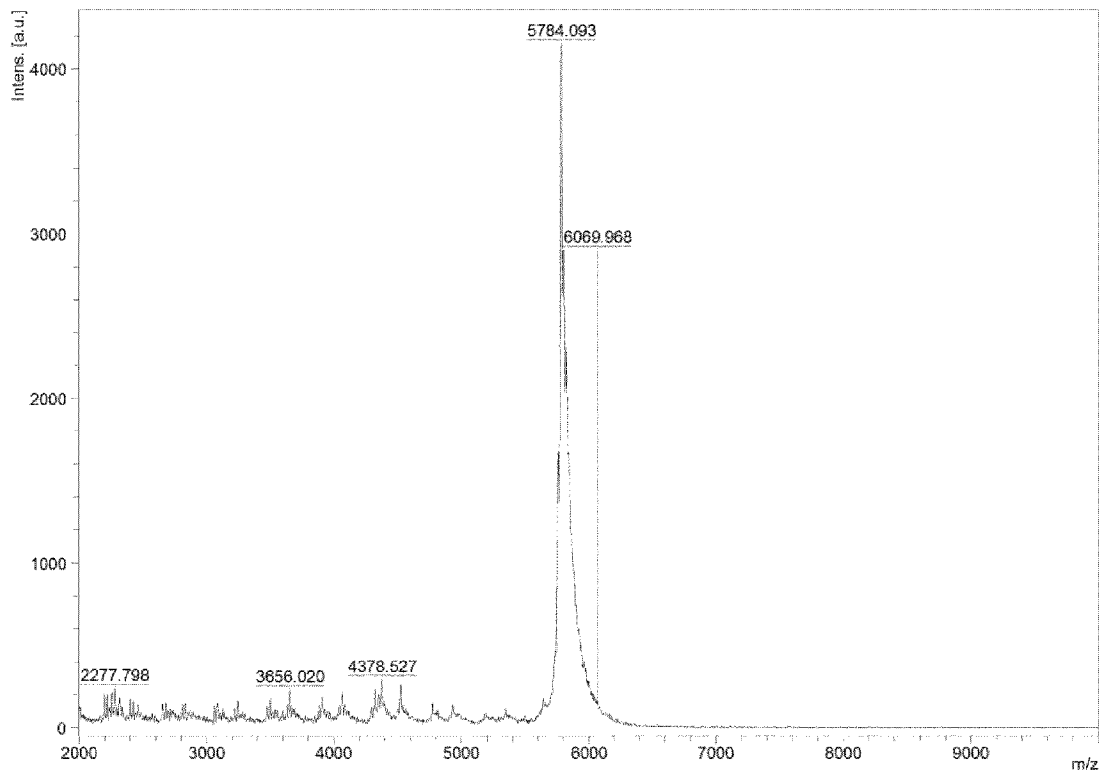
[図3]



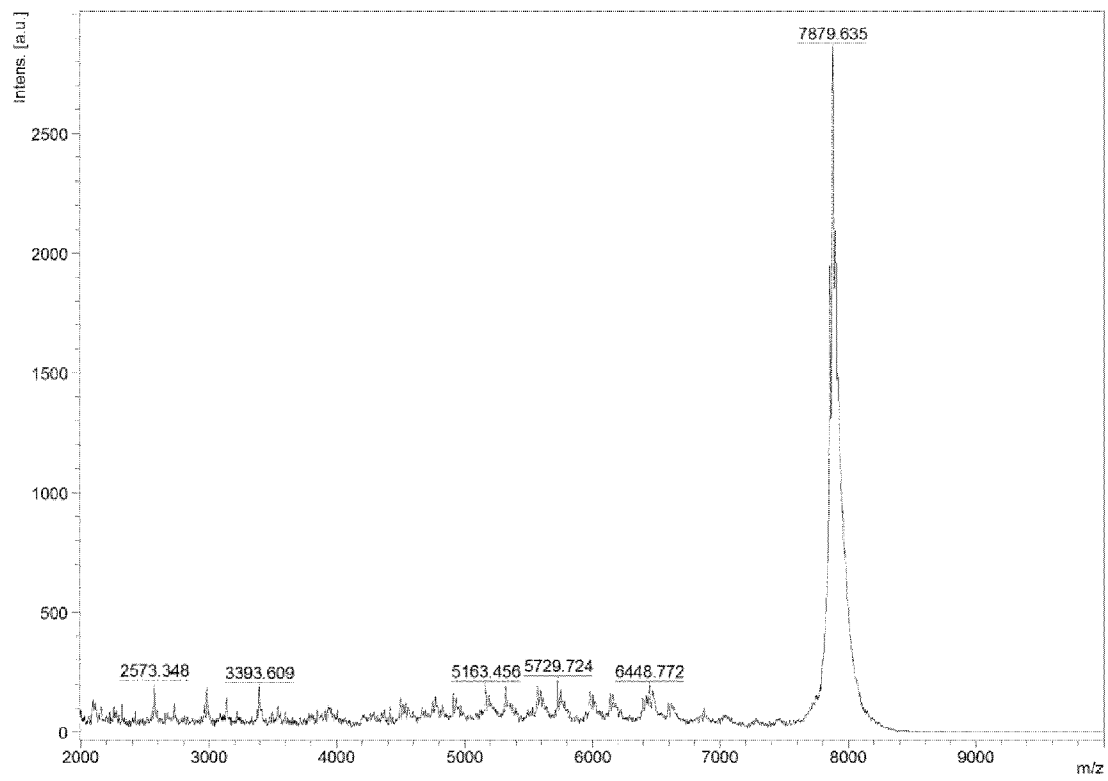
[図4]



[図5]

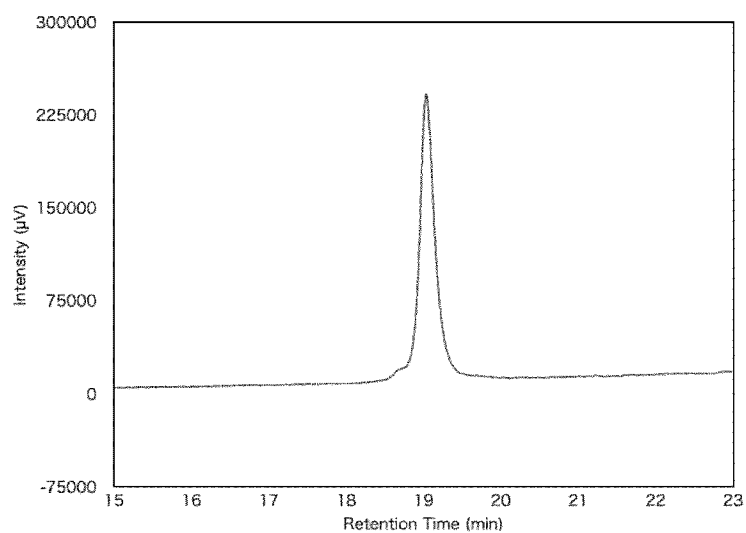


[図6]

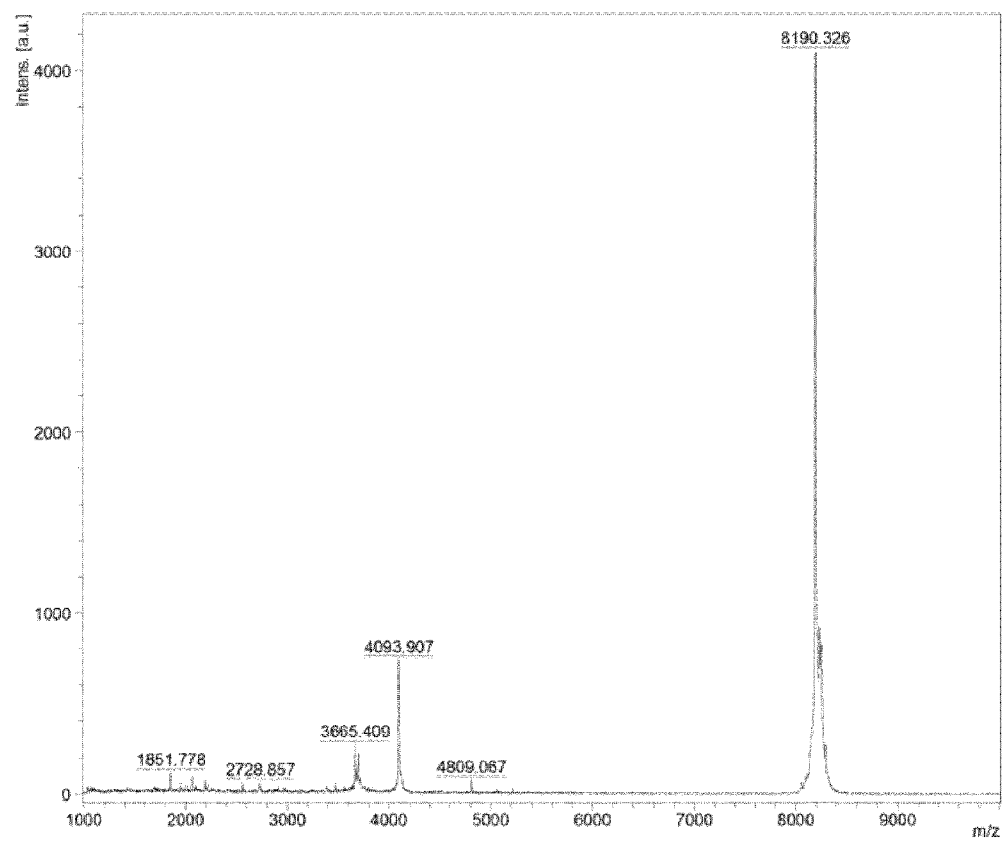


[図7]

分析 HPLC



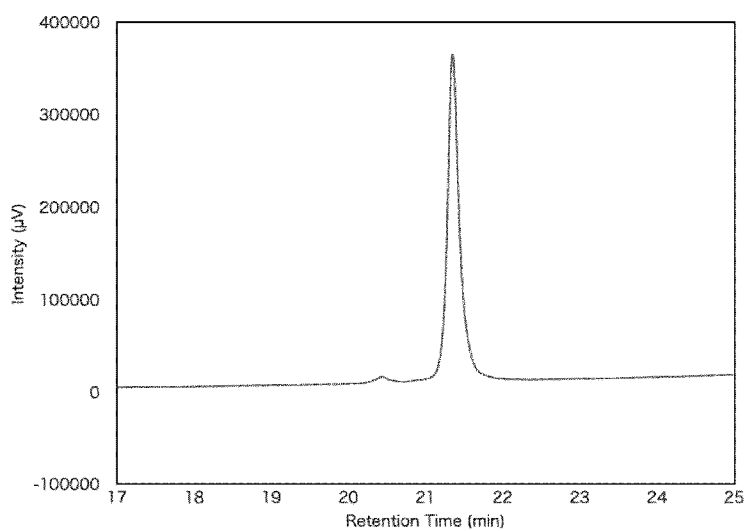
MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 8190.49

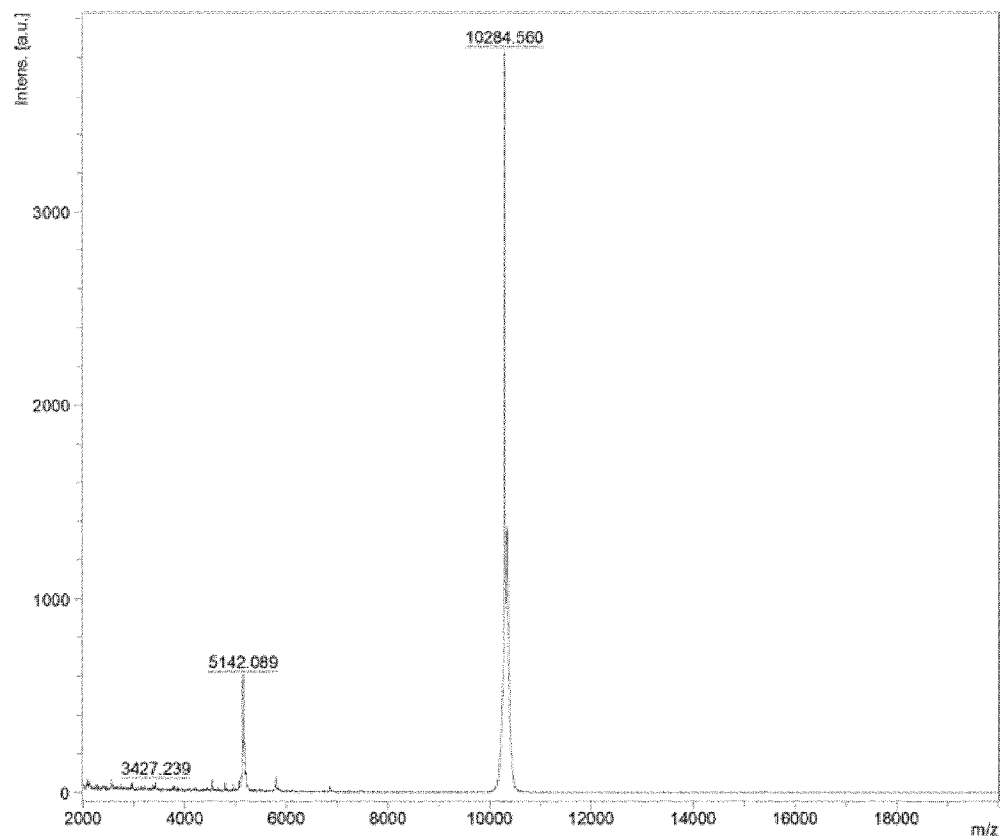
Found: 8190.326

[図8]

分析 HPLC



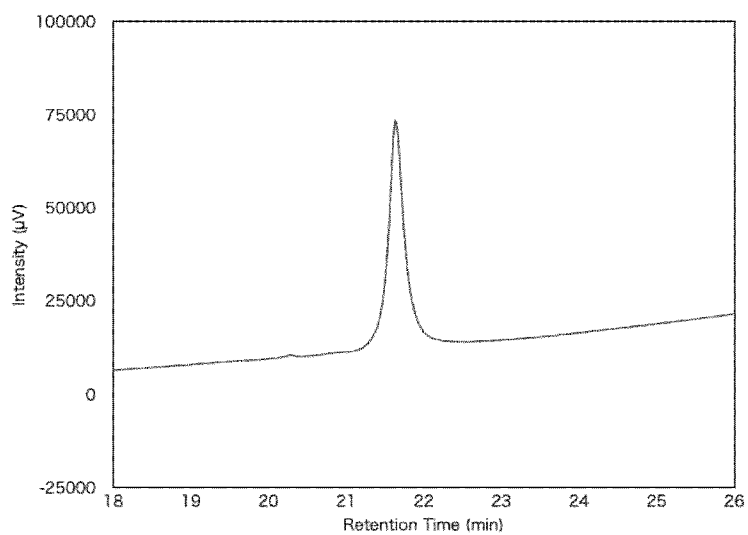
MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 10284.47

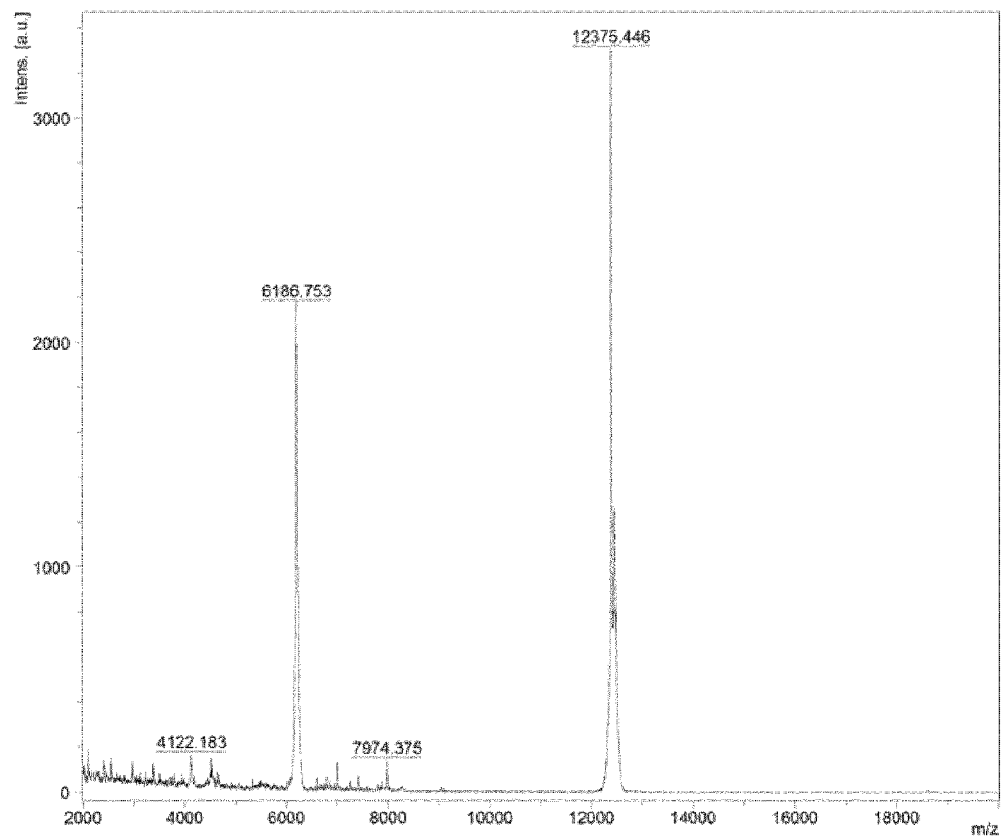
Found: 10284.560

[図9]

分析 HPLC



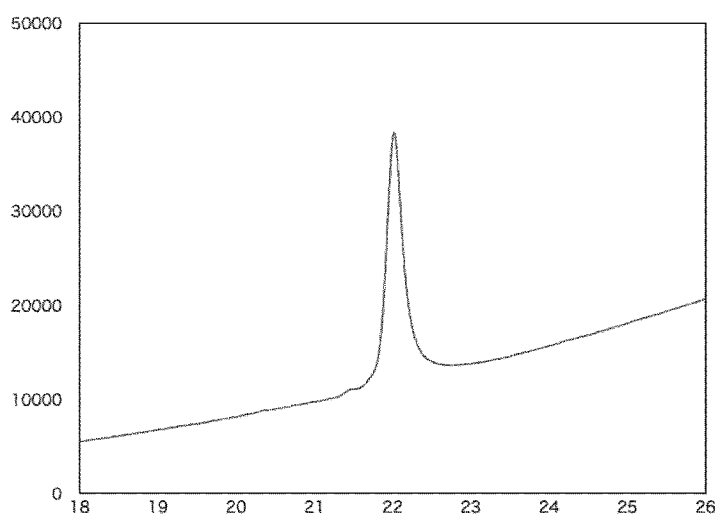
MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 12378.63

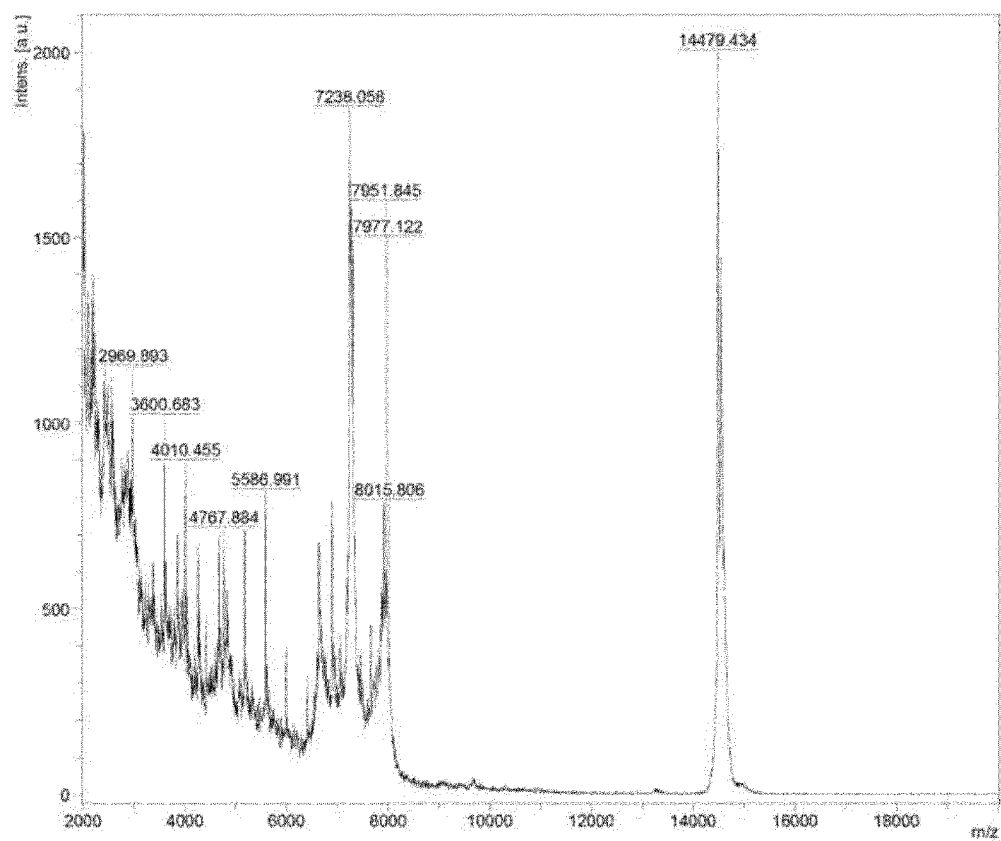
Found: 12375.446

[図10]

分析 HPLC

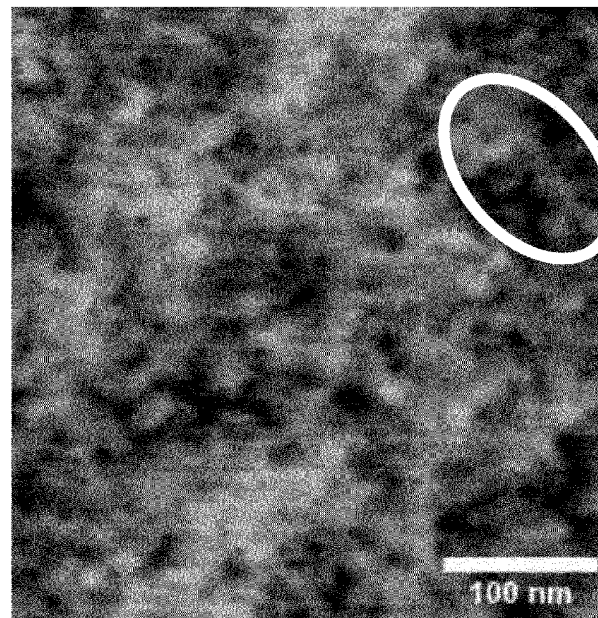


MALDI-TOF MS

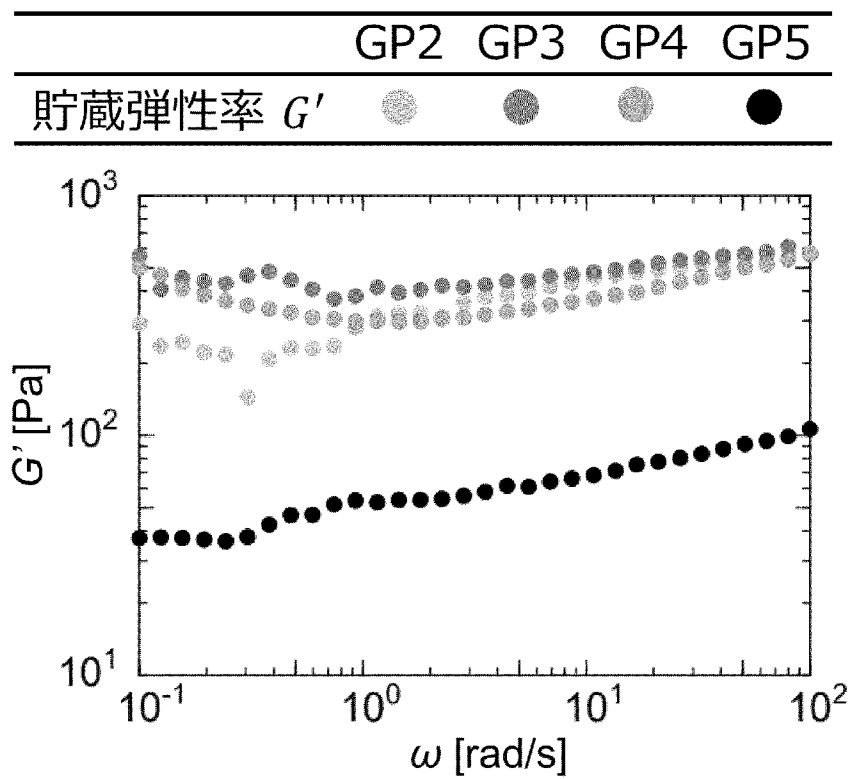
calculated for $[M+H]^+$: 14476.93

Found: 14479.434

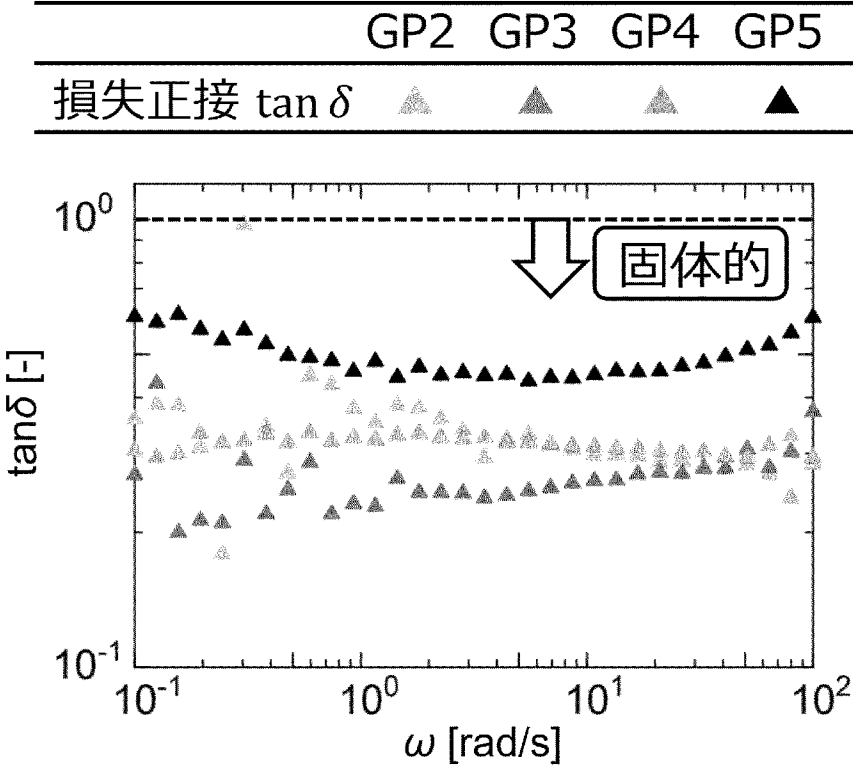
[図11]



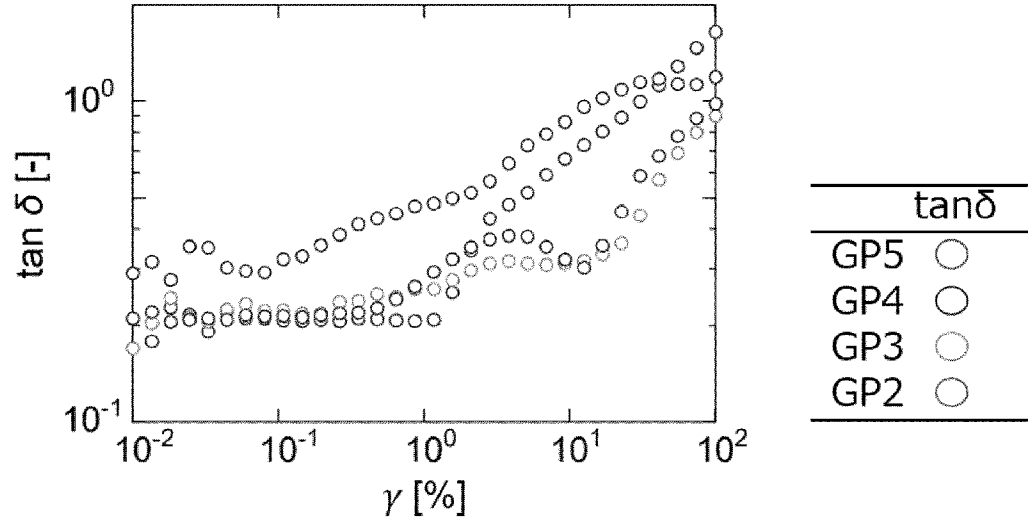
[図12]

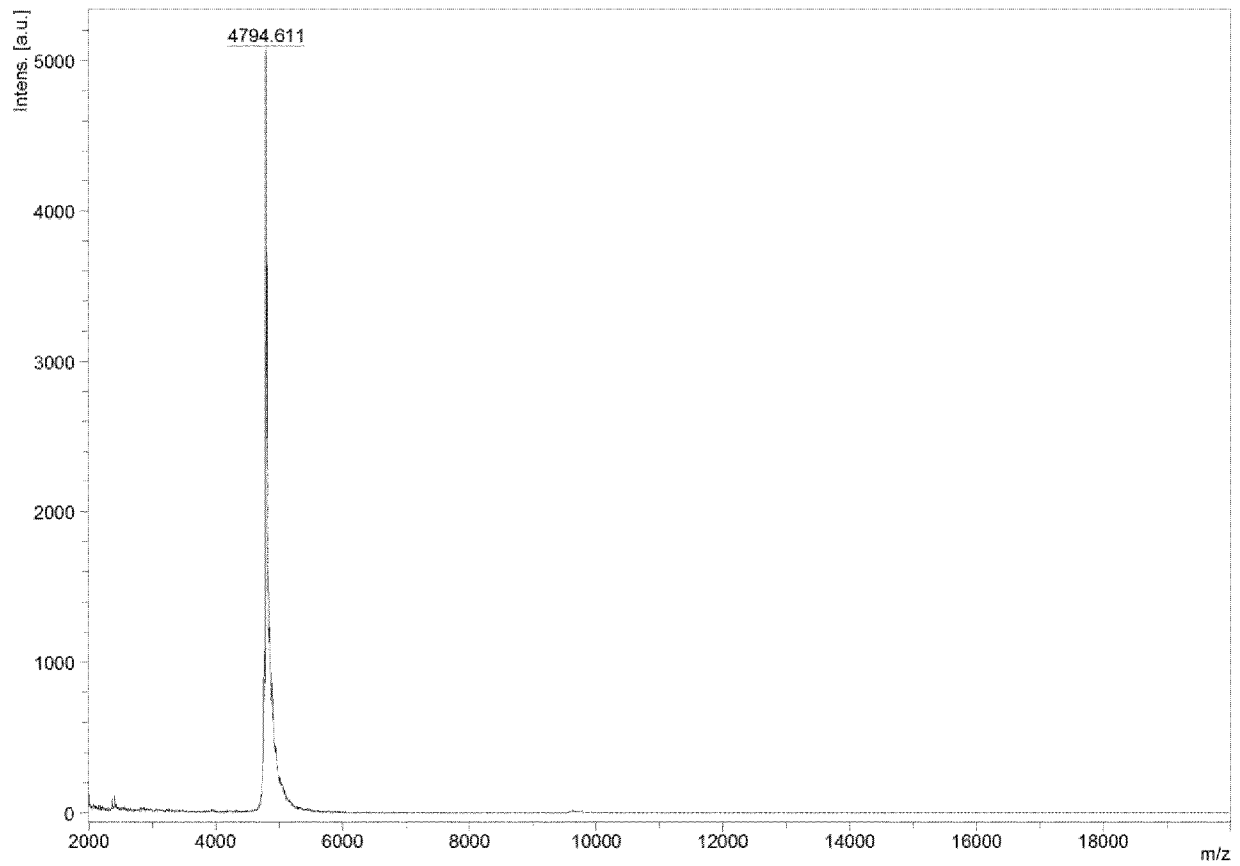
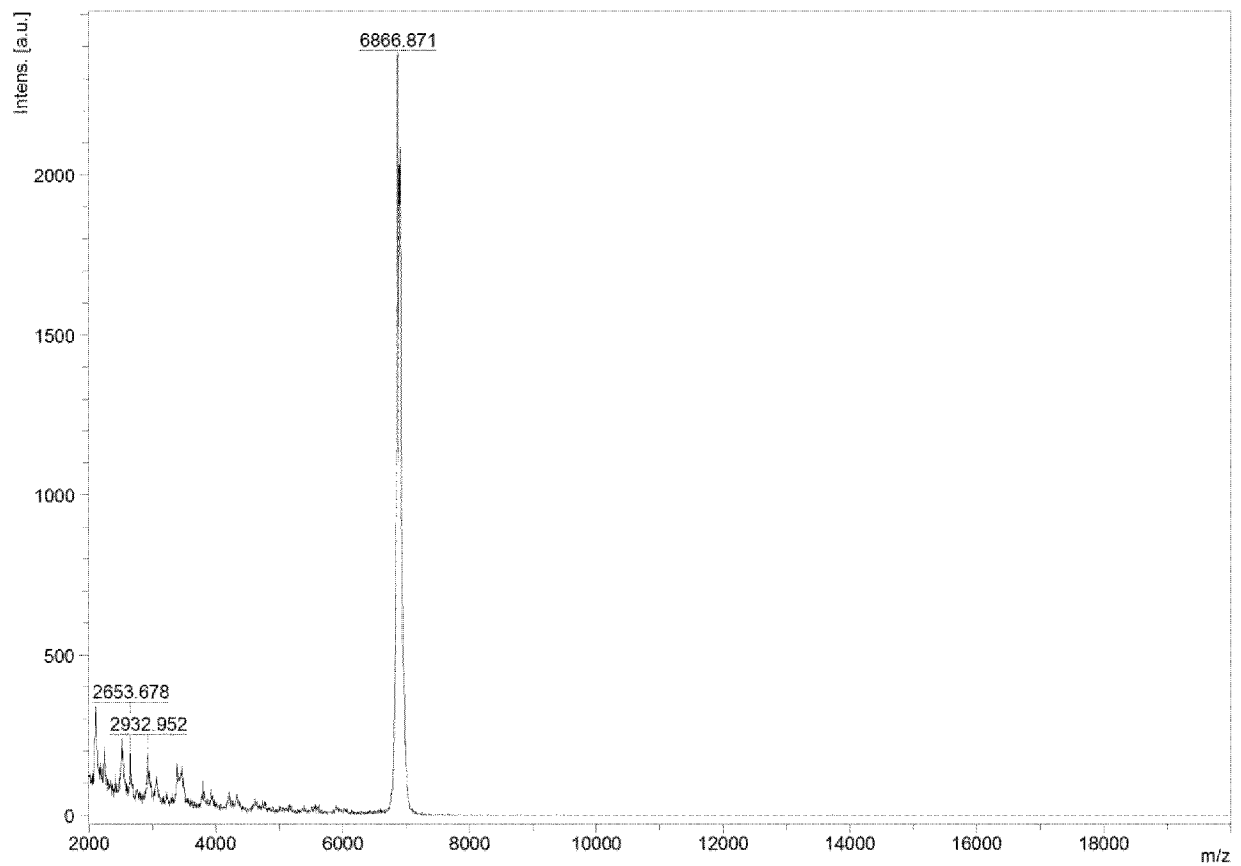


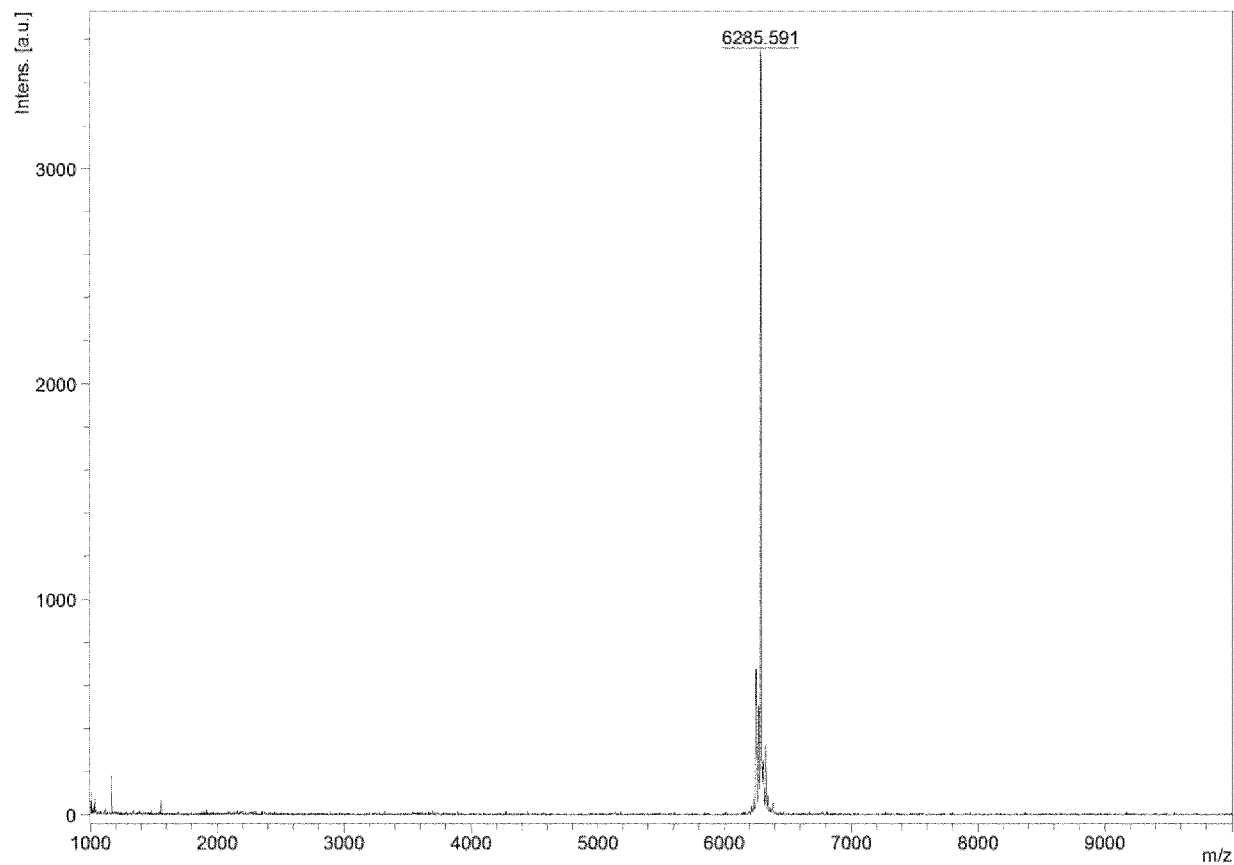
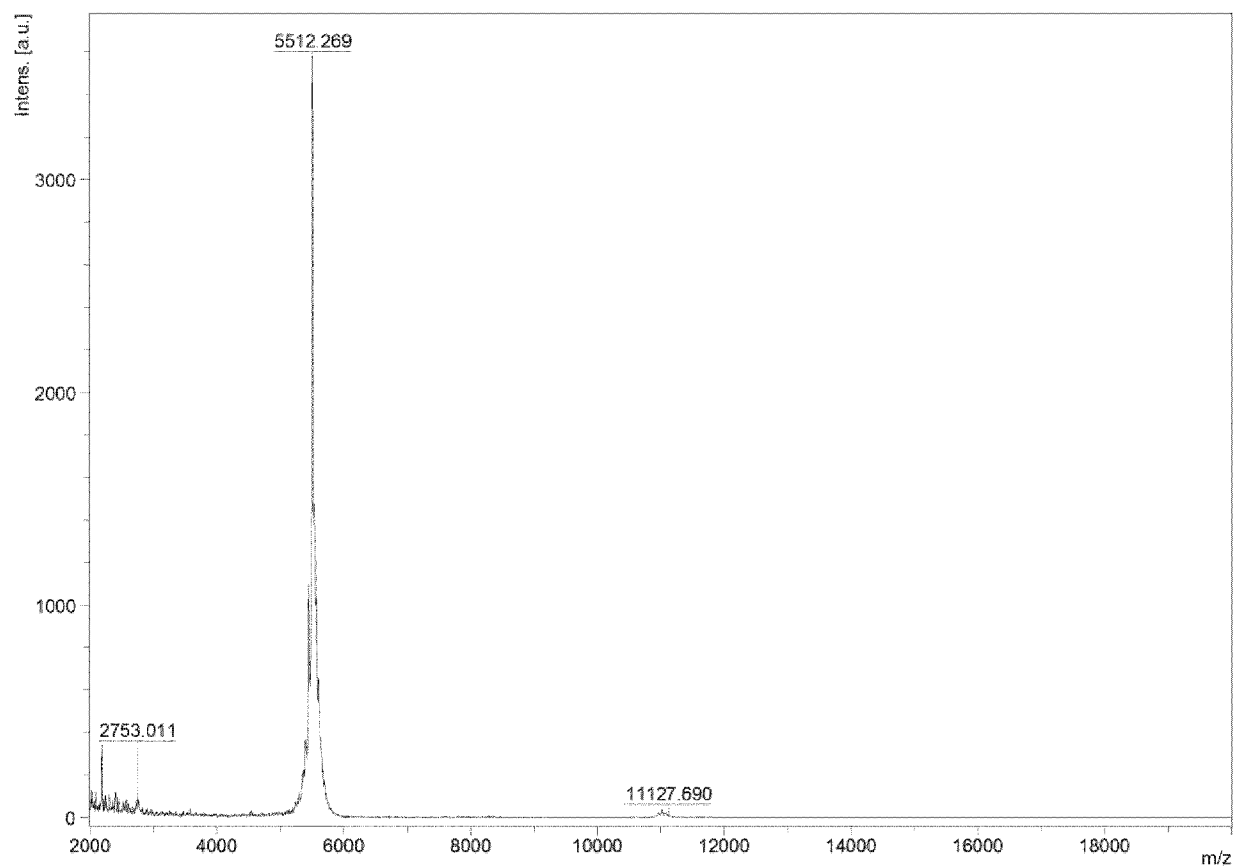
[図13]



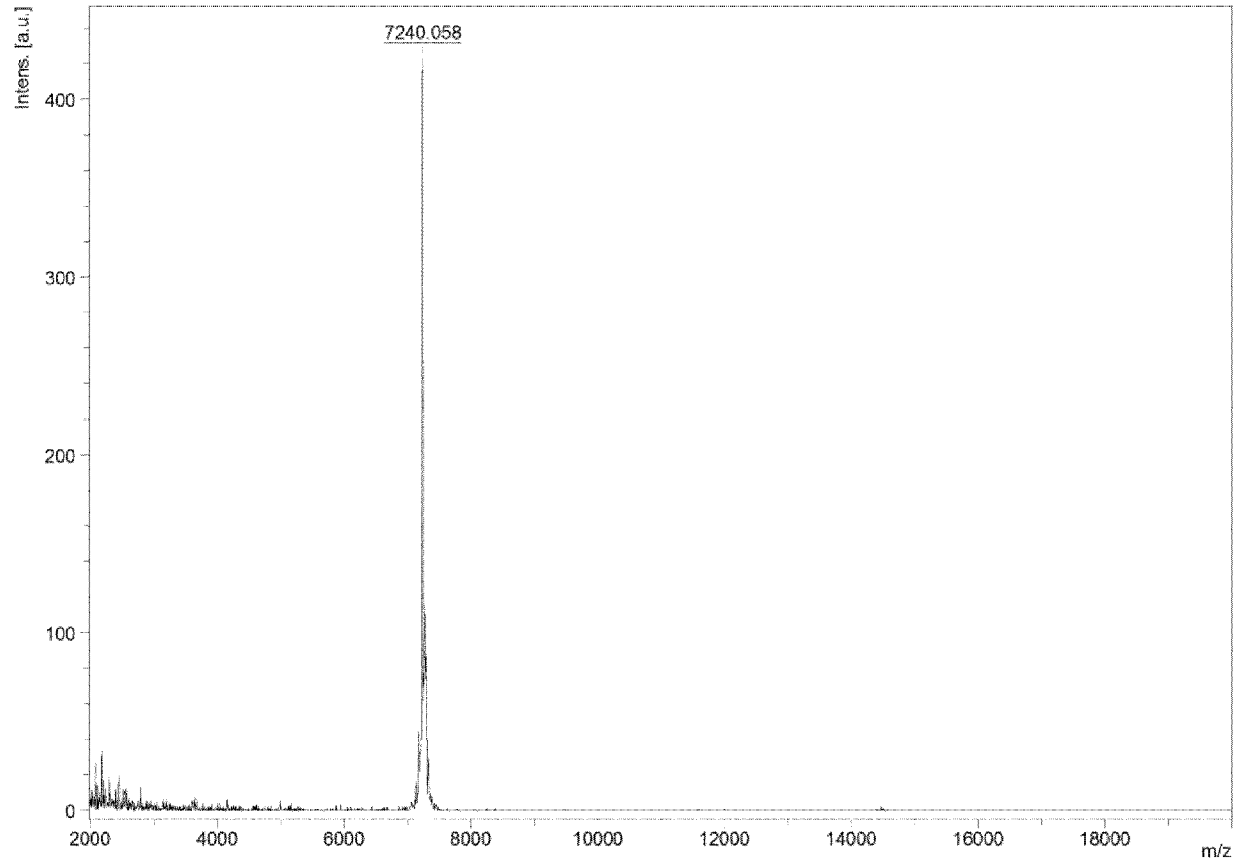
[図14]



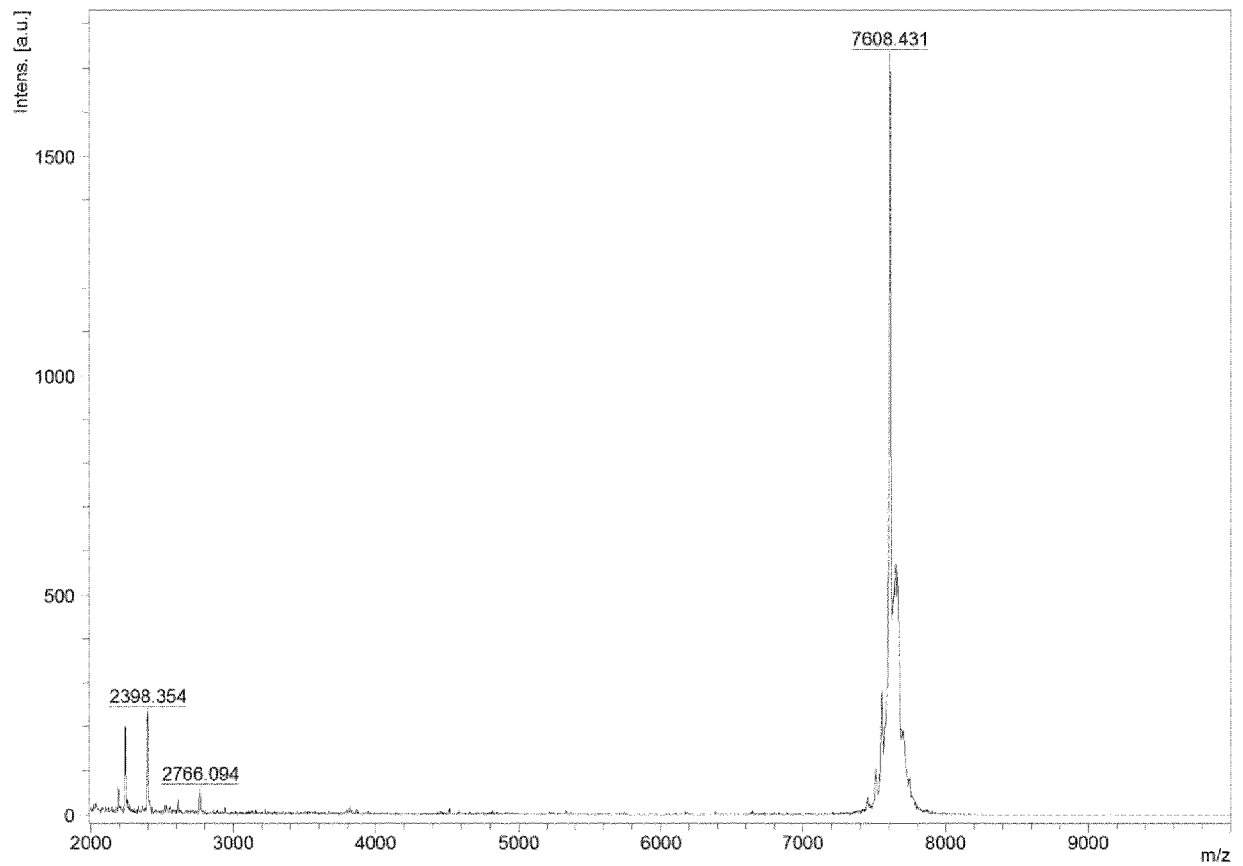
[15][16]

[17][18]

[図19]

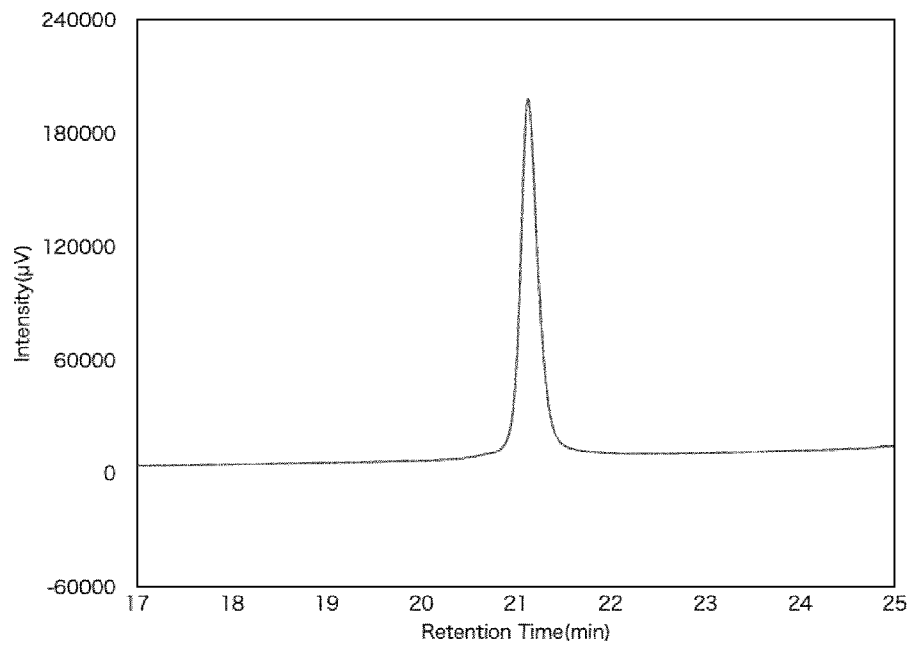


[図20]

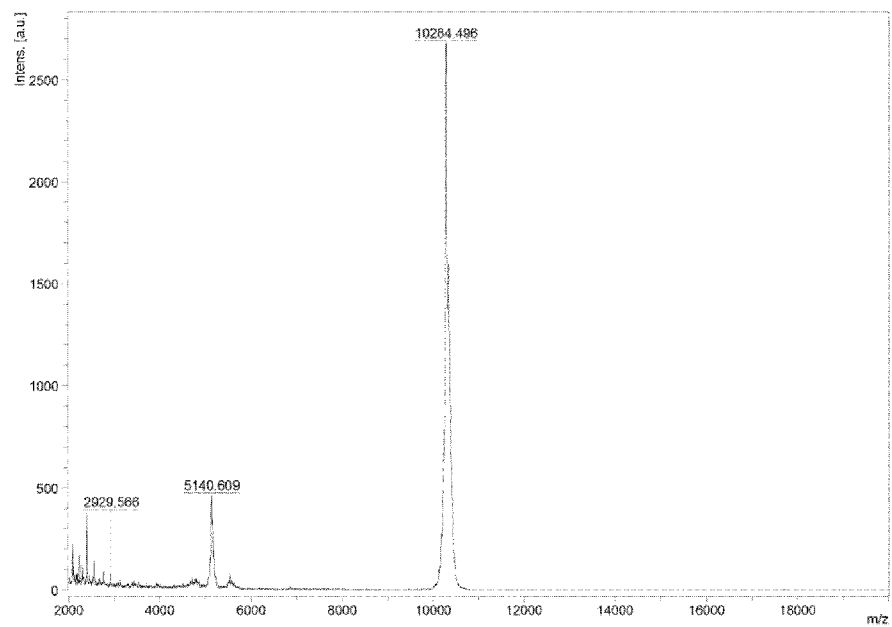


[図21]

分析HPLC



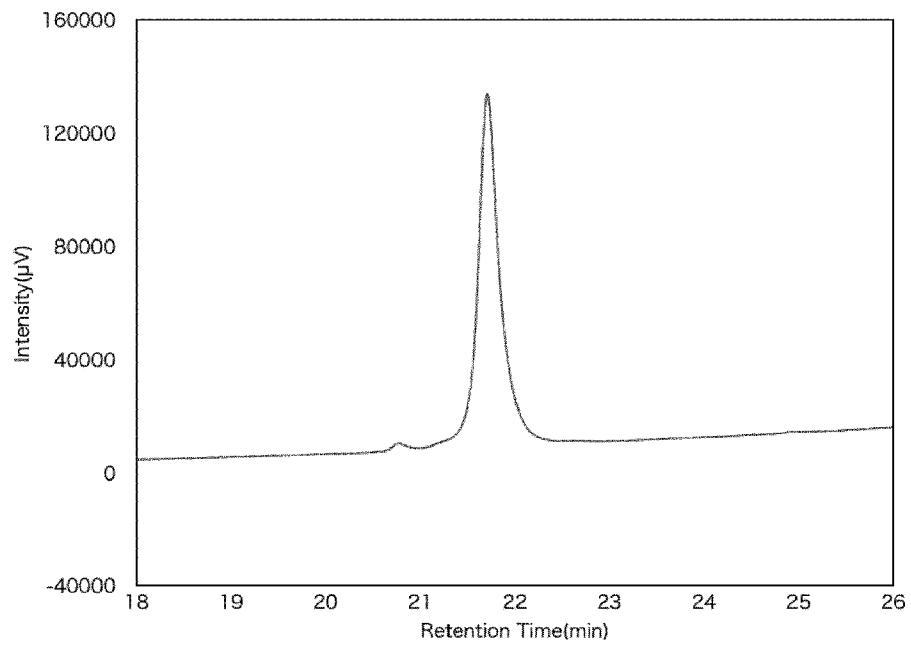
MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 10284.47

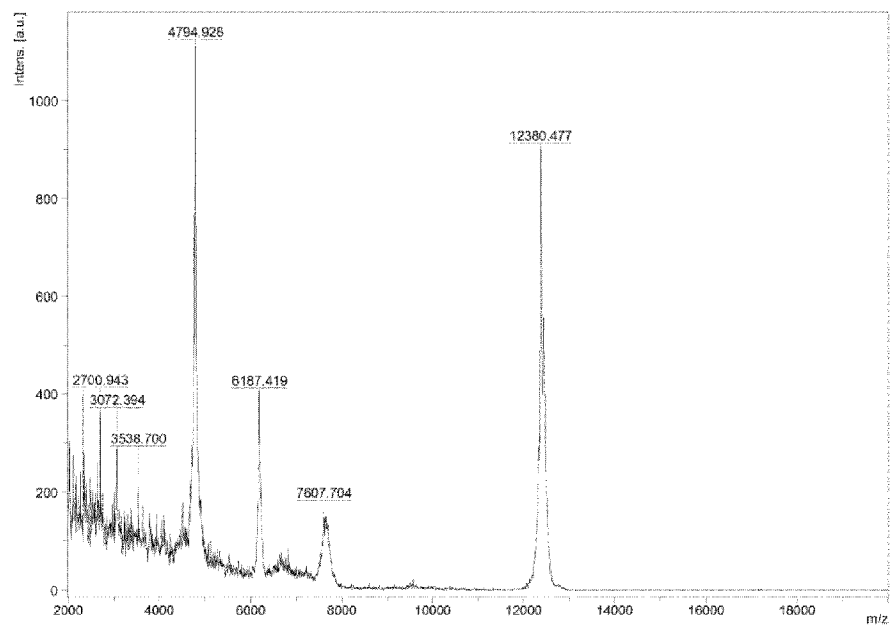
Found : 10284.496

[図22]

分析HPLC



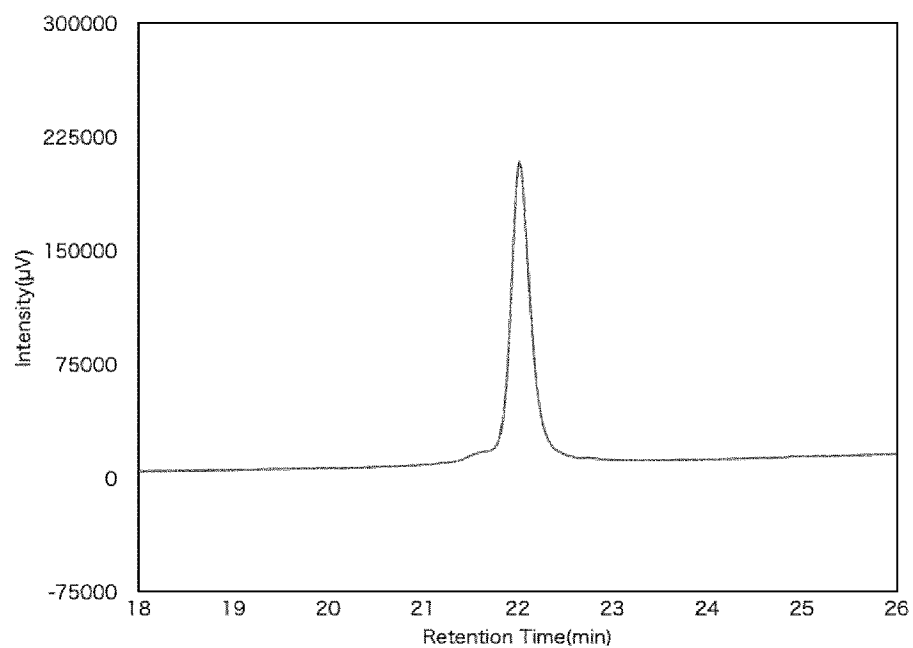
MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 12378.63

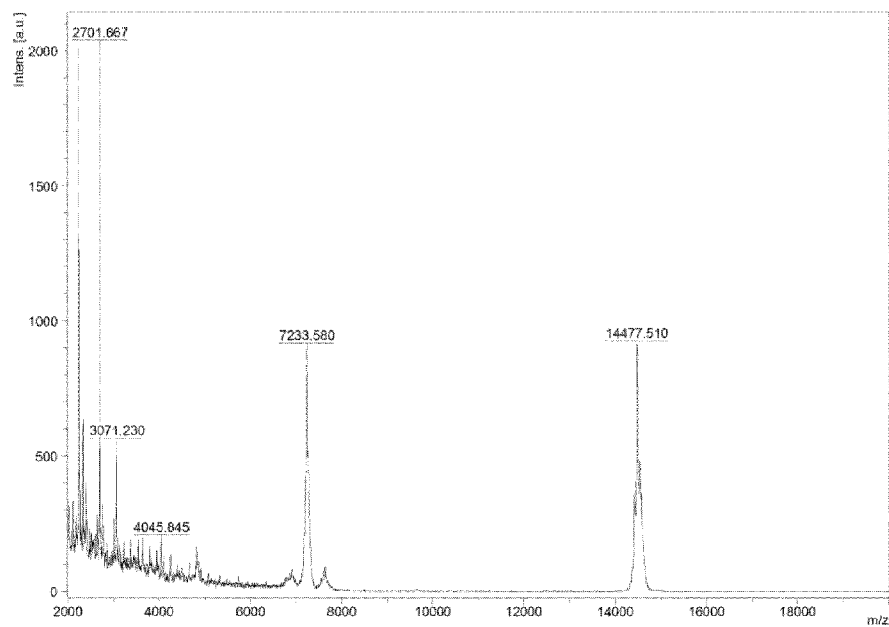
Found : 12380.477

[図23]

分析HPLC



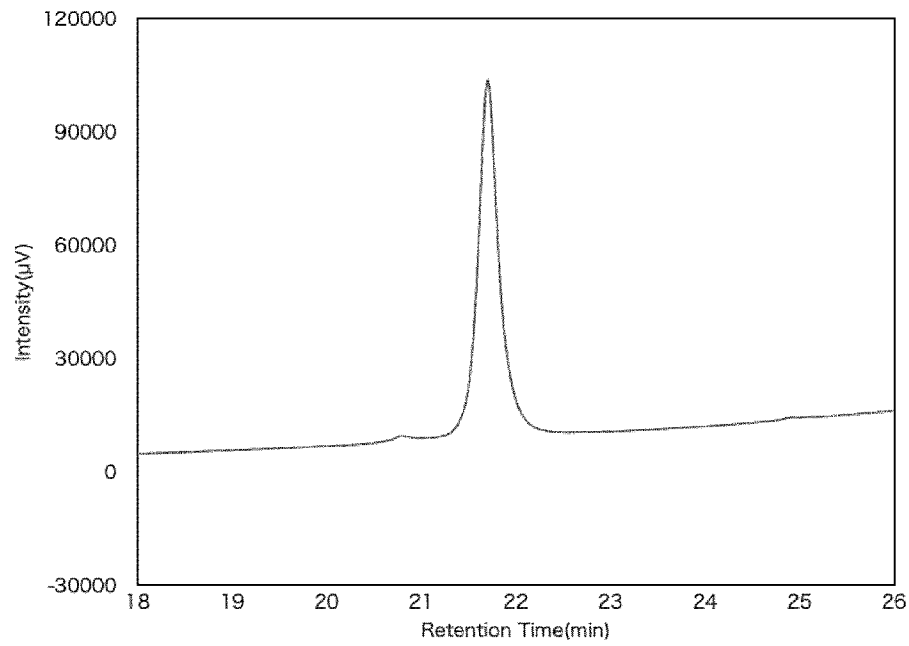
MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 14472.79

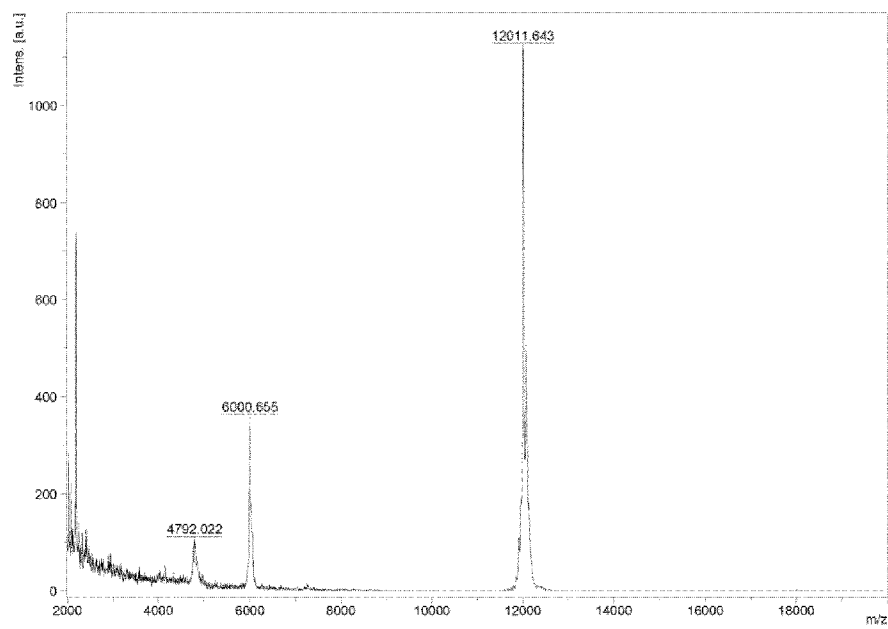
Found : 14477.510

[図24]

分析HPLC



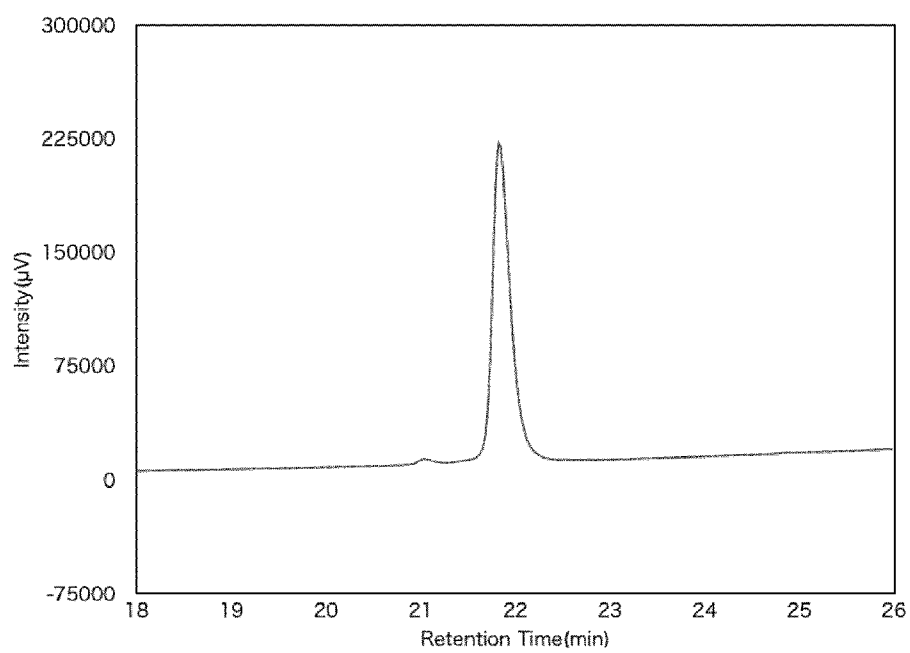
MALDI-TOF MS



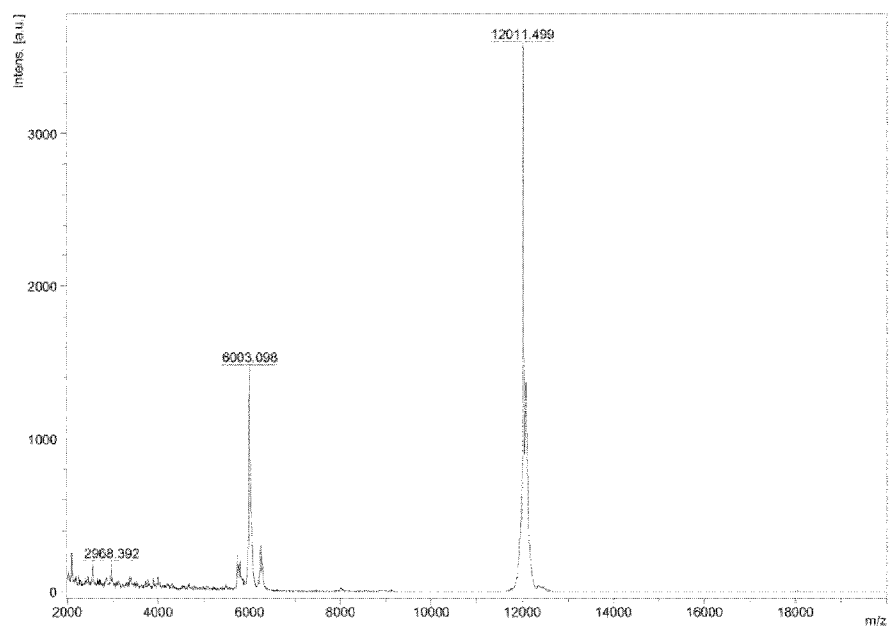
calculated for $[M+H]^+$: 12009.43
Found : 12011.643

[図25]

分析HPLC



MALDI-TOF MS

calculated for $[M+H]^+$: 12009.43

Found : 12011.499

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/011171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/04(2006.01)i; **C07K 14/00**(2006.01)i; **C07K 14/78**(2006.01)i; **C07K 19/00**(2006.01)i
FI: C07K1/04 ZNA; C07K14/00; C07K19/00; C07K14/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K1/00-19/00;

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/090787 A1 (NATIONAL UNIV CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM) 14 May 2021 (2021-05-14) claims, paragraphs [0033], [0042], [0068]	11-13
Y		1-6, 9-10
A		7-8
Y	野瀬 健, 温度依存的に凝集するエラスチンペプチドによる新食品基材の開発, 浦上財団研究報告書, 2015, vol. 22, pp. 10-15, (NOSE, Takeru. Development of the novel food materials based on elastin-derived peptides possessing temperature-dependent coacervation property. Urakami Foundation Memoirs.) p. 11, left column, lines 12-28, right column, line 25 to p. 12, right column, line 11	1-6, 9-10
Y	JP 2012-232961 A (OSAKA PREFECTURE UNIVERSITY) 29 November 2012 (2012-11-29) claims, paragraph [0041]	1-6, 9-10
A	JP 2018-507908 A (MOSAIC BIOSCIENCES, INC.) 22 March 2018 (2018-03-22) claims	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 April 2024

Date of mailing of the international search report

23 April 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/011171

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/011171

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/090787	A1	14 May 2021	(Family: none)	
JP	2012-232961	A	29 November 2012	(Family: none)	
JP	2018-507908	A	22 March 2018	US 2018/0043030 A1	
				claims	
				EP 3256167 A4	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 1/04(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; C07K 14/78(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i

FI: C07K1/04 ZNA; C07K14/00; C07K19/00; C07K14/78

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C07K1/00-19/00;

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922-1996年

日本国公開実用新案公報

1971-2024年

日本国実用新案登録公報

1996-2024年

日本国登録実用新案公報

1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN);JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2021/090787 A1（国立大学法人東海国立大学機構）14.05.2021（2021-05-14） 特許請求の範囲、[0033]、[0042]、[0068]	11-13
Y		1-6,9-10
A		7-8
Y	野瀬 健，温度依存的に凝集するエラスチンペプチドによる新食品基材の開発，浦上 財団研究報告書，2015，Vol.22，pp.10-15 第11頁左欄第12行～第28行、右欄第25行～第12頁右欄第11行	1-6,9-10
Y	JP 2012-232961 A（公立大学法人大阪府立大学）29.11.2012（2012-11-29） 特許請求の範囲、[0041]	1-6,9-10
A	JP 2018-507908 A（モザイク バイオサイエンス、インコーポレイティド） 22.03.2018（2018-03-22） 特許請求の範囲	1-13

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.04.2024

国際調査報告の発送日

23.04.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

松本 淳 4I 4675

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
- ☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/011171

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2021/090787	A1	14.05.2021	(ファミリーなし)	
JP	2012-232961	A	29.11.2012	(ファミリーなし)	
JP	2018-507908	A	22.03.2018	US 2018/0043030 A1	
				Claims	
				EP 3256167 A4	