

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7679487号  
(P7679487)

(45)発行日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(24)登録日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 7 K 14/78 (2006.01)	C 0 7 K 14/78	Z N A	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12		
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19		
請求項の数 22 (全24頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2023-557683(P2023-557683)	(73)特許権者	523356282
(86)(22)出願日	令和5年2月23日(2023.2.23)		山西 錦 波生物医 薬 股 フン 有 限公司
(65)公表番号	特表2024-526511(P2024-526511 A)		中華人民共和国山西省太原市山西 綜 改示范区太原唐槐 園 区 錦 波街1 8号
(43)公表日	令和6年7月19日(2024.7.19)	(74)代理人	100108453
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/077950		弁理士 村山 靖彦
(87)国際公開番号	WO2024/001242	(74)代理人	100188558
(87)国際公開日	令和6年1月4日(2024.1.4)		弁理士 飯田 雅人
審査請求日	令和5年9月19日(2023.9.19)	(74)代理人	100110364
(31)優先権主張番号	202210761804.8		弁理士 実広 信哉
(32)優先日	令和4年6月29日(2022.6.29)	(72)発明者	楊 霞
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		中華人民共和国山西省太原市山西 綜 改示范区太原唐槐 園 区 錦 波街1 最終頁に続く
早期審査対象出願 前置審査			

(54)【発明の名称】 ポリペプチド及びその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

N末端配列及びC末端配列から成り、N末端配列はSEQ ID NO. 1に示されるアミノ酸配列の繰り返し単位であり、かつC末端配列はSEQ ID NO. 2に示されるアミノ酸配列であり、N末端配列及びC末端配列は直接接続され、各繰り返し単位は直接接続され、2～8の温度で自ゲル化を完了し、繰り返し単位の数は4から20の間であるポリペプチド。

【請求項2】

SEQ ID NO. 3に示されるアミノ酸配列から成る、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

請求項1に記載のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項4】

SEQ ID NO. 4に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項3に記載のポリヌクレオチドを含み、精製タグをコードするヌクレオチドをさらに含み、及び/又はリーダー配列をコードするヌクレオチドをさらに含む、核酸。

【請求項6】

精製タグが、Hisタグ、GSTタグ、MBPタグ、SUMOタグ又はNusAタグであ

る、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 8】

発現ベクターである、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】

ポリヌクレオチド又は核酸に操作可能に接続された発現制御要素を含む、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

発現制御要素が、プロモーター、ターミネーター及び/又はエンハンサーである、請求項 9 に記載のベクター。

10

【請求項 11】

請求項 3 又は 4 に記載のポリヌクレオチド、請求項 5 又は 6 に記載の核酸又は請求項 7 から 10 のいずれか一項に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 12】

細菌、真菌又は動物細胞である、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】

細菌は大腸菌であり、又は、真菌は酵母である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

酵母は出芽酵母である、請求項 13 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 15】

請求項 1 に記載のポリペプチドを製造する方法であって、

- (1) 適切な培養条件で請求項 11 に記載の宿主細胞を培養するステップ、
  - (2) ポリペプチドを含む宿主細胞及び/又は培地を収穫するステップ、及び
  - (3) ポリペプチドを精製するステップ、
- を含む、方法。

【請求項 16】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 17】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを含む、ゲル。

30

【請求項 18】

架橋剤を含まない、請求項 17 に記載のゲル。

【請求項 19】

ゲルを製造する方法であって、

2 ~ 8 の条件下の温度で請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを貯蔵するステップを含む、方法。

【請求項 20】

ポリペプチドは塩化ナトリウム溶液中のポリペプチドである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 3 又は 4 に記載のポリヌクレオチド、請求項 5 又は 6 に記載の核酸、請求項 7 から 10 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 16 に記載の組成物、又は請求項 17 又は 18 に記載のゲルを含む、細胞接着を増加させるか又は組織充填及び/又は相溶化するためのキット。

40

【請求項 22】

豊胸、隆鼻術及び/又は顔充填に用いられる、請求項 21 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2022年6月29日に提出された発明の名称が「ポリペプチド及びその用途

50

」である中国発明特許出願第202210761804.8号の優先権の権利を要求し、それは引用により本願に組み込まれる。

本発明は、合成生物技術分野に属し、かつ具体的にはコラーゲンポリペプチドに関し、組織充填及び相溶化の人体構造的な材料に用いることができる。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

遺伝的要因、栄養状況、年齢要因等のため、一部の人は側頭部凹み、鼻基底凹み、顎の短さ及び収縮、鼻梁の低さなどの顔構造的欠陥が発生する。一部の女性は乳房の発育不良又は下垂萎縮等の問題が発生し、美感に深刻な影響を与える。人々の生活水準の継続的な向上及び思考コンセプトの開放に伴い、ますます多くの人は美容整形に注目し始める。現在充填手術により女性の容姿及び身材を改善することにより、優れた鼻形、平らで滑らかな顔及び飽満で滑らかな乳房を取得することができる。現在の段階の充填手術は、主に義体移植手術、自家組織移植手術、注射充填手術に分けることができる。

10

##### 【0003】

シリカゲルは良好な組織適合性を有し、発癌、突然変異誘発、催奇形などの問題がなく、抗引き裂き力、硬度、弾性収縮力などの各方面がいずれも満足できるため、早期の豊胸手術及び隆鼻術は常にシリカゲル義体をインプラントとして採用する。これは操作しやすく、外形が美しく、効果がすぐに現れるなどの利点を有する。しかしながら、シリカゲル義体は、表面に静電気が存在するため、いくつかの塵埃又は毛を吸着しやすく、傷口に感染が発生しやすい。手術後にいくつかの合併症が発生する可能性もある。例えば、豊胸の切痕が明らかであり、乳溝が広すぎ、持ち上げにくく、義体が破裂し、漏れ、包膜拘縮などの合併症が発生し、かつ義体が拘縮し、破裂する確率は義体の移植時間の延長に伴って増大する。隆鼻術は、義体が光を透過し、組織適合性が低く、材料が硬く、移植した後に触感が悪く、変位しやすいなどの問題が発生しやすく、かつ鼻部腫れ、鼻尖皮炎及び皮下張力が大きすぎるなどの合併症を引き起こし、鼻の背中を支持することができない。

20

##### 【0004】

整形技術の発展に伴い、自家組織移植は美容外科においてますます重要な役割を果たしている。ここで自家脂肪豊胸、隆鼻術、面中央部充填は自家脂肪の豊かな部位の脂肪顆粒を所望の部位に移植することである。自家脂肪移植は、一般的に注射方式を採用し、痛みが小さくかつ手術創傷が小さく、時間が短く、手術領域の傷跡が明らかではなく、手術後の回復が速い。その充填物は自家に由来し、生体適合性を有し、移植後に免疫拒絶反応がなく、かつ自家の乳房又は鼻部機能に影響を与えない。優れた融合性を有し、変位が発生しにくい。手術後の合併症が少ない。同時に痩せることができる。しかしながら、従来の脂肪採取技術及び注射技術に高吸収率、低生存率等の不足が存在し、一回の移植が過剰であれば乳房結節等の合併症を引き起こすため、所望の効果を達成するために常に複数回の脂肪移植を必要とする。自家脂肪以外に、自家軟骨は鼻と面の中央部に充填された原料とすることができ、自家脂肪と類似する利点を有するが、それは自家ねじれ変形を生成し、それにより後続の充填効果に大きな影響を与える。

30

##### 【0005】

注射充填とは、人工化学物質を乳房や顔欠陥部位に注射により充填する手術方式である。ここで人工脂肪は最も一般的に使用される注射充填材料であり、その化学成分は親水性ポリプロピレンアミンヒドロゲルであり、一般的に豊胸術に用いられるが、後続の長期応用においてそれが多くの合併症及び有害反応を有することが発見された。当該ヒドロゲルは製造過程において有毒重金属を有し、皮膚粘膜により人体に吸収され蓄積されやすく、それにより中毒を引き起こす。かつ細胞及び腎臓に対しても異なる程度の毒性や副作用を有する。注射後に乳房内の硬塊又は硬結、痛み、両側乳房の非対称、感染、哺乳期乳腺炎、無菌性炎症、乳房崩壊穿孔、注射物変位、上肢活動制限などの合併症を引き起こし、いくつかの患者の場合、数種の合併症が共存する。

40

##### 【0006】

現代の技術の発展に伴い、組換えコラーゲンは遺伝子工学技術により製造することがで

50

きるが、現在市販されているコラーゲンは主にヒト由来コラーゲンの配列を突然変異させて得られ、類コラーゲンに属し、依然として一定の免疫原性を有する。かつその生物学的性質を実現し、組織の相溶化及び充填を完了するために、依然として架橋剤と混合してゲル製品を製造する必要がある。しかし、架橋剤を用いると、免疫原性が低く、かつ毒性のないコラーゲンには、観察されていない副作用や異物反応が生じることが多い。したがって、本分野は、外来遺伝子配列を有さず、免疫原性がなく、生体適合性が高く、自主的に架橋可能なヒト化コラーゲンを発明する必要があり、かつ人体構造物材料として組織充填及び相溶化に用いられる。

【発明の概要】

【0007】

本発明者らはヒト化コラーゲンに対して長期の研究を行い、かつ中国特許出願CN201210482543.2及びCN201811438582.6において様々なIII型コラーゲンポリペプチドを発見した。本発明者らは、これらの発見されたコラーゲンポリペプチドをさらに研究し、これらのコラーゲンポリペプチドが低温で自家でゲルを形成することができないことを発見した。驚くべきことに、発明者らは従来の発明のコラーゲンポリペプチドに基づいて小さなペプチドセグメントを添加することにより、形成されたコラーゲンポリペプチドが低温でゲルを形成することができる。本発明のゲルは、架橋剤を含まなくてもよい。

【0008】

一態様において、本発明はポリペプチドを提供し、当該ポリペプチドはN末端配列及びC末端配列を含み、N末端配列は一つ又は複数の繰り返し単位を含み、当該繰り返し単位はSEQ ID NO. 1で示されるアミノ酸配列を含み、かつC末端配列はSEQ ID NO. 2で示されるアミノ酸配列である。SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列はgergapgrgpapngipgekgpagergapである。SEQ ID NO. 2のアミノ酸配列はgapgpccggである。

【0009】

一実施形態において、繰り返し単位は、SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列が一つ又は複数のアミノ酸残基の突然変異（置換、挿入、削除又は添加）を経た後に得られたアミノ酸配列であってもよい。

【0010】

一実施形態において、C末端配列は、SEQ ID NO. 2のアミノ酸配列が一つ又は複数のアミノ酸残基の突然変異（置換、挿入、削除又は添加）を経た後に得られたアミノ酸配列であってもよい。

【0011】

一実施形態において、繰り返し単位の数は1 - 20である。

【0012】

一実施形態において、繰り返し単位の数は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20である。

【0013】

一実施形態において、N末端配列及びC末端配列は、直接接続されるか又は一つ又は複数のアミノ酸残基を隔て接続される。

【0014】

一実施形態において、各繰り返し単位は、直接接続されるか又は一つ又は複数のアミノ酸残基を隔て接続される。

【0015】

一実施形態において、ポリペプチドは、SEQ ID NO. 3に示されるアミノ酸配列、又はSEQ ID NO. 3のアミノ酸配列が一つ又は複数のアミノ酸残基の突然変異（置換、挿入、削除又は添加）を経た後に得られたアミノ酸配列を含む。

【0016】

一実施形態において、ポリペプチド配列が突然変異した場合、得られたポリペプチドは

10

20

30

40

50

本発明の機能、例えば細胞接着、自身でゲルを形成する能力などを保持する。

【0017】

一態様において、本発明はポリヌクレオチドを提供し、当該ポリヌクレオチドは本願に記載のポリペプチドをコードする。

【0018】

一実施形態において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO. 4に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0019】

一態様において、本発明は核酸を提供し、当該核酸は本願のポリヌクレオチドを含む。

【0020】

一実施形態において、核酸はさらに精製タグ、例えばHisタグ、GSTタグ、MBPタグ、SUMOタグ又はNusAタグをコードするヌクレオチドを含む。

【0021】

一実施形態において、核酸はさらにリーダー配列をコードするヌクレオチドを含む。

【0022】

一態様において、本発明はベクターを提供し、当該ベクターは本願のポリヌクレオチド又は核酸を含む。

【0023】

一実施形態において、ベクターは発現ベクターである。

【0024】

一実施形態において、ベクターはポリヌクレオチド又は核酸に操作可能に接続された発現制御要素、例えばプロモーター、ターミネーター及び/又はエンハンサーを含む。

【0025】

一態様において、本発明は宿主細胞を提供し、当該宿主細胞は本願のポリヌクレオチド、核酸又はベクターを含む。

【0026】

一実施形態において、宿主細胞は細菌、真菌又は動物細胞である。

【0027】

一実施形態において、細菌は大腸菌である。

【0028】

一実施形態において、真菌は酵母であり、例えば出芽酵母である。

【0029】

一態様において、本発明はポリペプチドを製造する方法を提供し、当該方法は以下のステップを含む：

- (1) 適切な培養条件で本願の宿主細胞を培養するステップ、
- (2) ポリペプチドを含む宿主細胞及び/又は培地を収穫するステップ、
- (3) ポリペプチドを精製するステップ。

【0030】

一態様において、本発明は組成物を提供し、当該組成物は本願に記載のポリペプチドを含む。組成物は、組織充填及び/又は相溶化するための組成物であってもよい。

【0031】

一態様において、本発明はゲルを提供し、当該ゲルは本願に記載のポリペプチドを含むか又は当該ポリペプチドから製造される。

【0032】

一実施形態において、ゲルは架橋剤を含まない。

【0033】

一実施形態において、本願のゲルは人体構造的な材料であり、組織充填及び/又は相溶化に用いることができる。

【0034】

別の態様において、本発明はゲルを製造する方法を提供し、当該方法は低温で本願に記

10

20

30

40

50

載のポリペプチドを貯蔵するステップを含む。

【0035】

一実施形態において、低温は2～8の温度である。

【0036】

一実施形態において、低温は2、3、4、5、6、7又は8である。

【0037】

一実施形態において、本発明の方法はポリペプチド溶液を貯蔵するステップを含む。好ましく、ポリペプチド溶液はポリペプチドの塩化ナトリウム溶液である。溶液は50 - 500 mMのNaClであってもよく、例えば100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM又は450 mMである。

10

【0038】

一実施形態において、塩化ナトリウム溶液のpHは6以上であり、例えば6.5、7、7.5、8.0、8.5、9又は9.5である。

【0039】

別の態様において、本発明は本願のポリペプチド、ポリヌクレオチド、核酸、宿主細胞、組成物又はゲルの、細胞接着を増加させるか又は組織充填及び相溶化するための用途を提供する。例えば、本願のポリペプチド、ポリヌクレオチド、核酸、宿主細胞、組成物又はゲルは、豊胸、隆鼻術及びノ又は顔充填に用いられることができる。

【0040】

本発明は以下の利点を含む：

20

1. 本発明は組換えIII型ヒト化コラーゲン低温ゲルの合成を初めて成功して、そのアミノ酸配列は全て人体自身に由来し、外来アミノ酸配列がない。

2. 本発明により製造された組換えIII型ヒト化コラーゲンは、外因性架橋剤が関与しない場合においても架橋反応を発生させて低温ゲルを形成することができ、生物毒性がない。

3. 本発明により製造された組換えIII型ヒト化コラーゲン低温ゲルは、ヒト化コラーゲンに属し、良好な組織充填及び相溶化作用を有し、かつ人体に適用されたときに免疫反応がなく、組織適合性が高く、人体構造物材料として人体に直接注射することができる。

4. 本発明において組換えIII型ヒト化コラーゲン低温ゲルを生物合成する方法は、工業的に大規模で安定して製造することができる、

30

5. 本発明は組織充填及び相溶化に用いられる人体構造物材料の用途を提供し、それは人体から移植する必要がなく、人体組織充填の天然利点を有するため、豊胸、隆鼻術及び面中央部充填などの分野に広く応用されることが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】精製後の組換えIII型ヒト化コラーゲンAT16の電気泳動検出結果である。

【図2】精製後の組換えIII型ヒト化コラーゲンAT16の細胞接着活性の検出結果である。

【図3】プラスミド図である。

【図4】ヒト由来コラーゲンT16、TE16c及びAT16の動粘度測定過程における画像である。

40

【図5】精製された組換えIII型ヒト化コラーゲンAT4、AT8、AT12、AT16、AT20の電気泳動検出結果である。

【図6】試験サンプルAT4、AT8、AT12、AT16、AT20の生体接着活性。

【図7】組換えIII型ヒト化コラーゲンAT4、AT8、AT12、AT16、AT20によるゲル形成画像である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本発明の目的、技術的解決手段及び利点をより明確にするために、以下に本発明の実施例を結合し、本発明の実施例における技術構成を明確で完全に説明し、説明された実施例

50

は本発明の一部の実施例であり、全ての実施例ではない。本発明における実施例に基づいて、当業者が創造的な労力を要さずに想到し得る他の実施例は、いずれも本発明の保護範囲に属する。

【0043】

本発明者らは、ヒト化コラーゲンに対して長期の研究を行い、かつ中国特許出願CN 201210482543.2及びCN 201811438582.6において様々なIII型コラーゲンポリペプチドを発見した。本発明者らは、これらの発見されたコラーゲンポリペプチドをさらに研究し、これらのコラーゲンポリペプチドが低温で自家でゲルを形成することができないことを発見した。驚くべきことに、発明者らは従来の発明のコラーゲンポリペプチドに基づいて小さなペプチドセグメントを添加することにより、形成されたコラーゲンポリペプチドが低温でゲルを形成することができる。本発明のゲルは、架橋剤を含まなくてもよい。スクリーニングされた組換えIII型ヒト化コラーゲンAT16機能領域のアミノ酸配列は以下のとおりである：

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i  
p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e  
r g a p

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f  
r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p

g a p g p c c g g (SEQ ID NO. 3)。横線を引いたアミノ酸配列部分は、特許CN 201811438582.6のアミノ酸に基づいて行われた新たな機能領域の組み合わせである。

【0044】

本願に記載のように、「ポリペプチド」はペプチド結合により接続された複数のアミノ酸残基を指す。本願に記載のように、ポリペプチド又は特定のアミノ酸配列について、「C末端」及び「N末端」は当該ポリペプチド又は特定のアミノ酸配列に対する位置を指し、具体的にはポリペプチド又は特定のアミノ酸配列のカルボキシル末端又はアミノ末端に位置する方向を指す。

【0045】

本願において、N末端からC末端まで、ポリペプチドはN末端配列及びC末端配列を含むことができる。N末端配列は一つ又は複数の繰り返し単位を含むことができ、当該繰り返し単位は、SEQ ID NO. 1に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列が一つ又は複数のアミノ酸残基の突然変異（置換、添加、挿入又は欠失）を経たアミノ酸配列を含む。繰り返し単位の数は1 - 20であってもよい。例えば、繰り返し単位の数は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20である。特に、突然変異は置換であってもよく、例えば保存的アミノ酸置換である。SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列はg e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a pである。N末端配列において、各繰り返し単位は、直接接続されるか又は一つ又は複数のアミノ酸残基を隔て接続されることができる。

【0046】

10

20

30

40

50

C末端配列は、SEQ ID NO. 2に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列が一つ又は複数のアミノ酸残基の突然変異（置換、添加、挿入又は欠失）を経たアミノ酸配列であってもよい。特に、突然変異は置換であってもよく、例えば保存的アミノ酸置換である。SEQ ID NO. 2のアミノ酸配列はg a p g p c c g gである。N末端配列とC末端配列は、直接接続されるか又は一つ又は複数のアミノ酸残基、例えば2 - 10個のアミノ酸残基を隔て接続されることができる。例えば、N末端配列とC末端配列は3、4、5、6、7、8又は9個のアミノ酸残基を隔て接続されることができる。

#### 【0047】

ポリペプチド配列に突然変異が発生するか又は間隔配列が存在する場合、得られたポリペプチドは、本発明の機能、例えば細胞接着、自身でゲルを形成する能力などを保持する。

10

#### 【0048】

本発明のポリペプチドは、合成されたか又は組換えにより発現されてもよい。組換えにより発現された場合、本発明のポリペプチドは、ポリヌクレオチドによりコードすることができる。ポリヌクレオチドは、発現する宿主細胞に対してコドン最適化を行うことができる。ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、発現制御要素、例えばプロモーター、ターミネーター及び/又はエンハンサーと操作可能に接続されて核酸、又は発現カセットを構成することができる。当該核酸は、ポリペプチドの精製又は分泌を容易にするために、さらに精製タグ、例えばHisタグ、GSTタグ、MBPタグ、SUMOタグ又はNusAタグをコードするヌクレオチド、又はリーダー配列をコードするヌクレオチドを含むことができる。

20

#### 【0049】

本願に記載のように、用語「ベクター」は、ポリヌクレオチドをその中に挿入することができる核酸運搬ツールである。ベクターは、挿入されたポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質を発現させることができる場合、発現ベクターと呼ばれる。ベクターは形質転換、形質導入又はトランスフェクションにより宿主細胞に導入することができ、それに搬送された遺伝物質要素を宿主細胞において発現させる。ベクターは当業者に公知であり、以下を含むがこれらに限定されない：プラスミド；ファージ；コスミド；人工染色体、例えば酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）又はP1由来の人工染色体（PAC）；ファージ、例えばファージ又はM13ファージ、及び動物ウイルス等。ベクターは、様々な発現を制御する要素を含むことができ、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択要素及びレポーター遺伝子を含むがこれらに限定されない。また、ベクターはさらに複製開始部位を含むことができる。ベクターは、細胞に導入して発現させるために本発明の核酸を含むことができる。ベクターは、前記核酸に操作可能に接続された発現制御要素、例えばプロモーター、ターミネーター及び/又はエンハンサーを含むことができる。

30

#### 【0050】

本願に記載のように、用語「宿主細胞」は、分子生物学技術により核酸分子を導入した細胞である。これらの技術は、ウイルスベクターのトランスフェクション、プラスミドベクターでの形質転換、及びエレクトロポレーション、脂質トランスフェクション、及び粒子銃により加速して裸DNAに導入することを含む。宿主細胞は、真核細胞又は原核細胞であってもよい。例えば、真核細胞は、酵母細胞、動物細胞及び/又は昆虫細胞である。原核細胞は大腸菌細胞であってもよい。

40

#### 【0051】

本発明はさらにポリペプチドを製造する方法を提供し、それは以下のステップを含む：  
（1）適切な培養条件で本願の宿主細胞を培養するステップ、（2）ポリペプチドを含む宿主細胞及び/又は培地を収穫するステップ、及び（3）ポリペプチドを精製するステップ。本発明の方法は、タグを酵素切断するステップを含むことができる。

#### 【0052】

本発明のポリペプチドは、組成物又はキットに製造することができる。組成物又はキットは、組織充填及び/又は相溶化用の組成物又はキットであってもよい。組成物又はキッ

50



C G G T G A G C G C G G G G C A C C G G G T G A A C G T G G C G C G C C G G G C  
 T T T C G C G G A C C G G C G G G T C C G A A C G G C A T C C C G G G T G A G A  
 A G G G T C C G G C T G G C G A G C G T G G T G C G C C G G G T G A A C G T G G  
 T G C A C C G G G A T T C C G C G G C C C G G C G G G A C C G A A T G G T A T T  
 C C G G G T G A G A A G G G T C C G G C G G G C G A A C G C G G A G C A C C A G  
 G C G A A C G C G G C G C T C C G G G C T T T C G C G G T C C G G C G G G T C C  
 G A A T G G T A T C C C G G G C G A G A A G G G T C C T G C C G G T G A G C G T  
 G G T G C C C C G G G C G A A C G T G G C G C T C C G G G T T T T C G T G G T C  
 C G G C G G G T C C G A A C G G C A T T C C G G G T G A A A A G G G C C C A G C  
 G G G T G A G C G T G G C G C G C C A G G C G A G A G A G G T G C C C C G G G T  
 T T T C G T G G C C C G G C G G G T C C G A A C G G C A T C C C G G G T G A G A  
 A A G G C C C G G C G G G C G A A C G T G G T G C G C C A G G C G A G A G A G G  
 T G C T C C G G G T T T C C G T G G C C C G G C T G G T C C G A A C G G T A T T  
 C C G G G T G A A A A G G G C C C G G C G G G C G A G C G T G G C G C G C C G G  
 G T G A G C G T G G T G C C C C A G G C T T T C G T G G T C C A G C T G G T C C  
 G A A C G G T A T C C C G G G T G A A A A A G G T C C G G C G G G T G A G C G T  
 G G C G C G C C G G G T G A A C G T G G T G C C C C A G G C T T C C G C G G G C  
 C G G C A G G T C C C A A C G G T A T C C C G G G C G A G A A A G G T C C G G C  
 T G G C G A G C G A G G T G C C C C G G G C G A A C G T G G C G C G C C G G G C  
 T T C C G C G G T C C G G C A G G C C C G A A C G G T A T C C C G G G C G A G A  
 A A G G T C C G G C A G G T G A G C G T G G T G C G C C G G G T G A A C G C G G  
 C G C T C C G G G T T T T C G T G G C C C G G C A G G C C C A A A T G G C A T T  
 C C G G G C G A A A A A G G C C C A G C G G G T G A G C G T G G T G C C C C G G  
 G T G A G C G C G G T G C G C C G G G T T T C C G C G G T C C G G C G G G T C C  
 G A A T G G T A T T C C G G G C G A A A A A G G C C C G G C G G G C G A G C G T  
 G G C G C T C C G G G C G A A C G T G G A G C G C C A G G A T T C C G C G G C C  
 C G G C A G G A C C G A A C G G C A T C C C G G G A G A A A A G G G C C C G G C  
 G G G T G A A C G T G G T G C A C C G G G A G C G C C T G G T C C G T G T T G C  
 G G T G G T ( S E Q N O : 4 ) 。

10

20

【 0 0 5 6 】

30

2 . 合成された遺伝子断片を p E T - 2 8 a - T r x - H i s 発現ベクターに挿入して組換え発現プラスミドを得た。

【 0 0 5 7 】

3 . 構築に成功した発現プラスミドを大腸菌コンピテント細胞 B L 2 1 ( D E 3 ) に形質転換した。具体的な過程は以下のとおりである： ( 1 ) 超低温冷蔵庫で大腸菌コンピテント細胞 B L 2 1 ( D E 3 ) を取り出して氷上に置き、半融解する時に 2 μ l の形質転換対象のプラスミドを取って大腸菌コンピテント細胞 B L 2 1 ( D E 3 ) に添加し、2 - 3 回均一に混合した。( 2 ) 混合物を氷上に 3 0 m i n 氷浴し、その後 4 2 ° C の水浴で 4 5 - 9 0 s 熱ショックし、取り出した後に氷上に 2 m i n 氷浴する。( 3 ) 生物安全キャビネットに移し、かつ 7 0 0 μ l の液体 L B 培地に添加し、次に 3 7 ° C 、 2 2 0 r p m の条件で 6 0 m i n 培養した。( 4 ) 2 0 0 μ l の菌液を取って硫酸カナマイシンを含有する L B プレートに均一に塗布した。( 5 ) プレートを 3 7 ° C のインキュベーターで 1 5 - 1 7 h 培養し、大きさが均一なコロニーを生成する。

40

【 0 0 5 8 】

4 . 好ましい大腸菌遺伝子工学的単一コロニーを選び出し、カナマイシンを含有する L B 液体培地に置き、3 7 ° C で、2 2 0 r p m で 5 時間培養した後、1 6 ° C まで降温し、最終濃度が 0 . 5 m M の I P T G を添加して誘導した。1 6 時間培養した後、6 0 0 0 r p m 、 4 ° C で 1 2 m i n 遠心分離し、菌体を収集した。

【 0 0 5 9 】

5 . 組換えヒト化 I I I 型コラーゲンを精製し酵素切断し、具体的な過程は以下のとお

50

りである：(1) Tris 緩衝液 (25 mM Tris、200 mM NaCl、20 mM イミダゾール、pH = 8.0) で細菌を再懸濁し、均質に破碎し、17000 rpm で4で20分間遠心分離し、上清を収集した；(2) Ni6FFアフィニティークラムによりタンパク質を結合し、20 mM イミダゾールを含有する洗浄緩衝溶液 (20 mM イミダゾール、25 mM Tris、200 mM NaCl、pH 8.0) でヘテロタンパク質をすすぎ、350 mM イミダゾールを含有する溶液 (350 mM イミダゾール、25 mM Tris、200 mM NaCl、pH 8.0) で目的タンパク質を溶出した；(3) 溶出されたタンパク質サンプルに His タグを有する適量の TEV プロテアーゼを20で添加し、2h 酵素切断し、組換えヒト化 III 型コラーゲン AT16 を取得した；(4) 10 kDa 透析バッグを利用し、酵素切断された組換えヒト化 III 型コラーゲン AT16 の混合液を透析して塩化ナトリウム溶液に交換する；(5) 10 kDa 限外濾過濃縮チューブを利用し、交換された組換えヒト化 III 型コラーゲン AT16 をタンパク質濃度が 10 mg/mL 以上に濃縮した。

#### 【0060】

6. 組換え III 型ヒト化コラーゲンの形成であって、その具体的な過程は以下のとおりである：得られた組換えヒト化 III 型コラーゲン AT16 を冷蔵庫に入れて保存し、タンパク質を低温環境で架橋してゲルを形成した。

#### 【0061】

##### 7. 組換え III 型ヒト化コラーゲンの純度検出

得られた AT16 タンパク質は SDS-PAGE を利用して純度を検出した。具体的な過程は以下のとおりである：精製されたタンパク質溶液 20  $\mu$ L を取り、5  $\mu$ L の 5x のタンパク質ローディング緩衝液 (250 mM の Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、0.5% ブロモフェノールブルー、5% グリセリン、5%  $\beta$ -メルカプトエタノール) を添加し、100 の沸騰水に置いて 5 min 煮て、次に各ウェル 10  $\mu$ L を SDS-PAGE タンパク質ゲルに添加し、電圧 150 V で 1 h 電気泳動した後、クマシーブリリアントブルー染色液 (0.1% のクマシーブリリアントブルー R-250、25% エタノール、10% 氷酢酸) でタンパク質染色を 3 min 行い、さらにタンパク質脱色液 (10% 酢酸、5% エタノール) で脱色した。

#### 【0062】

図 1 は、精製された組換え III 型ヒト化コラーゲン AT16 の電気泳動検出結果を示し、AT16 の見かけ分子量は 45 kDa であり、分子量は AT16 ポリペプチドに対応し、ポリペプチド AT16 が正確に発現されることを示す。

#### 【0063】

##### 実施例 2：組換え III 型ヒト化コラーゲン AT16 の生物活性検出

コラーゲンの活性検出方法は、文献 Juming Yao, Satoshi Yanagisawa, Tetsuo Asakura, Design, Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens, J Biochem. 136, 643-649 (2004) を参照することができる。具体的な実施方法は下記の通りである。

#### 【0064】

(1) 紫外線吸収法を利用して測定されるタンパク質サンプルの濃度を検出し、ウシ III 型コラーゲン標準品 (Sigma、番号：380002)、本発明で提供する組換え III 型ヒト化コラーゲン AT16 を含む。

#### 【0065】

具体的にはそれぞれサンプルの 215 nm 及び 225 nm での紫外光吸収を測定し、経験式  $C (\mu\text{g/mL}) = 144 \times (A_{215} - A_{225})$  を利用してタンパク質濃度を計算し、 $A_{215} < 1.5$  の場合に検出する必要があることに注意した。当該方法の原理は以下のとおりである：ペプチド結合の遠紫外光での特徴吸収を測定し、発色団含有量の影

10

20

30

40

50

響を受けず、干渉物質が少なく、操作しやすく、クマシーブリリアントブルーが発色しないヒトコラーゲン及びその類似体を検出することに適する。(参考文献は、Walker J M . The Protein Protocols Handbook , second edition . Humana Press . 43 - 45 . である)。タンパク質濃度を検出した後、PBSで全ての測定されるタンパク質濃度を0.5 mg / mLに調整した。

【0066】

(2) 96ウェルプレートに100 μLの様々なタンパク質溶液及びブランクPBS溶液対照を添加して、室温で60 min 静置した。

【0067】

(3) 各ウェルに培養状態が良好な10<sup>5</sup>個の3T3細胞を添加し、37 °C で60 min インキュベートした。

10

【0068】

(4) 各ウェルをPBSで4回洗浄した。

【0069】

(5) LDH検出キット(Roche、04744926001)でOD492 nmの吸光度を検出した。ブランク対照の数値に基づいて、細胞の接着率を計算することができる。計算式は以下のとおりである：細胞接着率 = (測定ウェル - ブランクウェル) / (陽性ウェル - ブランクウェル) × 100%。細胞の接着率は、コラーゲンの活性を反応することができる。タンパク質の活性が高いほど、短時間で細胞に良質な外部環境を提供し、細胞の接着を助けることができる。

20

【0070】

結果は図2に示すとおりである(D - PBSはブランクPBS群を示す；B c o l I はウシI型コラーゲン標準品対照群を示す；0.25は0.25 mg / mL AT16群を示す；0.5は0.5 mg / mL AT16群を示す；1は1.0 mg / mL AT16群を示す)。比較から分かるように、商品化されたヒトコラーゲンに比べて、本発明の異なる濃度の組換えIII型ヒト化コラーゲンAT16はより優れた生体接着活性を有する。

【0071】

実施例3：組換えIII型ヒト化コラーゲンAT16のマスペクトル検出

実験方法

【表1】

30

機器名	マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析計MALDI-TOF / TOF Ultraflex extreme <sup>TM</sup> 、Brucker、Germany		
基質	CHCA	レーザーエネルギー	125
データ検索ソフトウェア	Mascot	検索物種	ALL entries
検索データベース	NCBI prot		

【0072】

タンパク質サンプルをDTT還元及びヨードアセトアミドアルキル化処理を行った後、トリプシンを添加して酵素分解して一晩放置した。酵素分解した後に得られたペプチド断片をさらにC18 Zip Tipで脱塩した後、基質 - cyano - 4 - hydroxy cinnamic acid (CHCA) と混合してパネルをスポットした。最後にマトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間質量分析計MALDI - TOF / TOF Ultraflex extreme<sup>TM</sup>、Brucker、Germanyを用いて分析した(ペプチドマスフィンガープリンティング(peptide mass fingerprinting ; PMF)の技術はProtein J . 2016 ; 35 : 212 - 7を参照することができる)。

40

【0073】

データ検索は、ローカルmac oウェブサイトからMS / MS Ion searchペ

50





GCTGGCGAGCGCGGGTGCACCGGGCGAACGTGGTGCCCCGG  
 GCTTCCGTGGCCCCAGCGGGTCCGAACGGTATTCCGGGCGA  
 GAAAGGTCCGGCAGGTGAACGTGGTGCGCCAGGCGAGCGT  
 GGTGCGCCTGGTTTCAGAGGCCCCAGCAGGCCCAAATGGCA  
 TCCCCGGTGAGAAAGGGCCCCAGCCGGTGAGCGCGGGGCAAC  
 GGGTGAACGTGGCGCGCCGGGCTTTTCGCGGACC GGCGGGT  
 CCGAACGGC ATCCGGGTGAGAAAGGGTCCGGCTGGCGAGC  
 GTGGTGCGCCGGGTGAACGTGGTGACCGGGATTCCGCGG  
 CCCGGCGGGACCGAATGGTATTCCGGGTGAGAAAGGGTCCG  
 GCGGGCGAACGCGGAGCACCAAGGCGAACGCGGCGCTCCGG  
 GCTTTCGCGGGTCCGGCGGGTCCGAATGGTATCCCGGGCGA  
 GAAGGGTCCCTGCGCGGTGAGCGTGGTGCCCCGGGCGAACGT  
 GGCGCTCCGGGTTTTCGTGGTCCGGCGGGTCCGAACGGCA  
 TTCCGGGTGAAAAGGGCCCCAGCGGGTGAGCGTGGCGCGCC  
 AGGAGCGCCTGGTCCGTGTTGCGGGTGGT (SEQ ID NO. 14)

10

【0082】

AT12のアミノ酸配列

gergapgfrgpagnngipgekpgagergapgergapgfr  
 gpagnngipgekpgagergapgergapgfrgpagnngipg  
 ekpgagergapgergapgfrgpagnngipgekpgagerga  
 pgergapgfrgpagnngipgekpgagergapgergapgfr  
 gpagnngipgekpgagergapgergapgfrgpagnngipg  
 ekpgagergapgergapgfrgpagnngipgekpgagerga  
 pgergapgfrgpagnngipgekpgagergapgergapgfr  
 gpagnngipgekpgagergapgergapgfrgpagnngipg  
 ekpgagergapgergapgfrgpagnngipgekpgagerga  
 pagapgpccgg (SEQ ID NO. 15)

20

【0083】

対応の最適化された塩基配列

GGAGAAAGGGGGGGCGCCTGGCTTTTCGTGGTCCGGCGGGT  
 CCGAATGGCATTCCGGGTGAAAAGGGTCTTGCCGGTGAGC  
 GTGGTGCTCCGGGTGAGCGCGCGCTCCGGGTTTCCGCGG  
 TCCCGCGGGTCCGAACGGCATCCGGGAGAAAAAGGCCCA  
 GCTGGCGAGCGCGGTGCACCGGGCGAACGTGGTGCCCCGG  
 GCTTCCGTGGCCCCAGCGGGTCCGAACGGTATTCCGGGCGA  
 GAAAGGTCCGGCAGGTGAACGTGGTGCGCCAGGCGAGCGT  
 GGTGCGCCTGGTTTCAGAGGCCCAAGCAGGCCCAAATGGCA  
 TCCCCGGTGAGAAAGGGCCCCAGCCGGTGAGCGCGGGGCAAC  
 GGGTGAACGTGGCGCGCCGGGCTTTTCGCGGACC GGCGGGT  
 CCGAACGGC ATCCGGGTGAGAAAGGGTCCGGCTGGCGAGC  
 GTGGTGCGCCGGGTGAACGTGGTGACCGGGATTCCGCGG  
 CCCGGCGGGACCGAATGGTATTCCGGGTGAGAAAGGGTCCG  
 GCGGGCGAACGCGGAGCACCAAGGCGAACGCGGCGCTCCGG  
 GCTTTCGCGGGTCCGGCGGGTCCGAATGGTATCCCGGGCGA  
 GAAGGGTCCCTGCGCGGTGAGCGTGGTGCCCCGGGCGAACGT  
 GGCGCTCCGGGTTTTCGTGGTCCGGCGGGTCCGAACGGCA  
 TTCCGGGTGAAAAGGGCCCCAGCGGGTGAGCGTGGCGCGCC  
 AGGCGAGAGAGGTGCCCCGGGTTTTCGTGGCCCCGGCGGGT  
 CCGAACGGC ATCCGGGTGAGAAAGGCCCGGCGGGCGAAC  
 GTGGTGCGCCAGGCGAGAGAGGTGCTCCGGGTTTCCGTGG

30

40

50

C C C G G C T G G T C C G A A C G G T A T T C C G G G T G A A A A G G G C C C G  
 G C G G G C G A G C G T G G C G C G C C G G G T G A G C G T G G T G C C C C A G  
 G C T T T C G T G G T C C A G C T G G T C C G A A C G G T A T C C C G G G T G A  
 A A A A G G T C C G G C G G G T G A G C G T G G C G C G C C G G G T G A A C G T  
 G G T G C C C C A G G C T T C C G C G G G C C G G C A G G T C C C A A C G G T A  
 T C C C G G G C G A G A A A G G T C C G G C T G G C G A G C G A G G T G C C C C  
 G G G A G C G C C T G G T C C G T G T T G C G G T G G T ( S E Q I D N O . 1 6 )

【0084】

AT16のアミノ酸配列

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g a p g p c c g g

10

20

【0085】

対応の最適化された塩基配列

G G A G A A A G G G G G G C G C C T G G C T T T C G T G G T C C G G C G G G T  
 C C G A A T G G C A T T C C G G G T G A A A A G G G T C C T G C C G G T G A G C  
 G T G G T G C T C C G G G T G A G C G C G G C G C T C C G G G T T T C C G C G G  
 T C C C G C G G G T C C G A A C G G C A T C C C G G G A G A A A A A G G C C C A  
 G C T G G C G A G C G C G G T G C A C C G G G C G A A C G T G G T G C C C C G G  
 G C T T C C G T G G C C C A G C G G G T C C G A A C G G T A T T C C G G G C G A  
 G A A A G G T C C G G C A G G T G A A C G T G G T G C G C C A G G C G A G C G T  
 G G T G C G C C T G G T T T C A G A G G C C C A G C A G G C C C A A A T G G C A  
 T C C C C G G T G A G A A G G G C C C A G C C G G T G A G C G C G G G G C A C C  
 G G G T G A A C G T G G C G C G C C G G G C T T T C G C G G A C C G G C G G G T  
 C C G A A C G G C A T C C C G G G T G A G A A G G G T C C G G C T G G C G A G C  
 G T G G T G C G C C G G G T G A A C G T G G T G C A C C G G G A T T C C G C G G  
 C C C G G C G G G A C C G A A T G G T A T T C C G G G T G A G A A G G G T C C G  
 G C G G G C G A A C G C G G A G C A C C A G G C G A A C G C G G C G C T C C G G  
 G C T T T C G C G G T C C G G C G G G T C C G A A T G G T A T C C C G G G C G A  
 G A A G G G T C C T G C C G G T G A G C G T G G T G C C C C G G G C G A A C G T  
 G G C G C T C C G G G T T T T C G T G G T C C G G C G G G T C C G A A C G G C A  
 T T C C G G G T G A A A A G G G C C C A G C G G G T G A G C G T G G C G C G C C  
 A G G C G A G A G A G G T G C C C C G G G T T T T C G T G G C C C G G C G G G T  
 C C G A A C G G C A T C C C G G G T G A G A A A G G C C C G G C G G G C G A A C  
 G T G G T G C G C C A G G C G A G A G A G G T G C T C C G G G T T T C C G T G G  
 C C C G G C T G G T C C G A A C G G T A T T C C G G G T G A A A A G G G C C C G  
 G C G G G C G A G C G T G G C G C G C C G G G T G A G C G T G G T G C C C A G  
 G C T T T C G T G G T C C A G C T G G T C C G A A C G G T A T C C C G G G T G A  
 A A A A G G T C C G G C G G G T G A G C G T G G C G C G C C G G G T G A A C G T  
 G G T G C C C C A G G C T T C C G C G G G C C G G C A G G T C C C A A C G G T A

30

40

50

T C C C G G G C G A G A A A G G T C C G G C T G G C G A G C G A G G T G C C C C  
 G G G C G A A C G T G G C G C G C C G G G C T T C C G C G G T C C G G C A G G C  
 C C G A A C G G T A T C C C G G G C G A G A A A G G T C C G G C A G G T G A G C  
 G T G G T G C G C C G G G T G A A C G C G G C G C T C C G G G T T T T C G T G G  
 C C C G G C A G G C C C A A A T G G C A T T C C G G G C G A A A A A G G C C C A  
 G C G G G T G A G C G T G G T G C C C C G G G T G A G C G C G G T G C G C C G G  
 G T T T C C G C G G T C C G G C G G G T C C G A A T G G T A T T C C G G G C G A  
 A A A A G G C C C G G C G G G C G A G C G T G G C G C T C C G G G C G A A C G T  
 G G A G C G C C A G G A T T C C G C G G C C C G G C A G G A C C G A A C G G C A  
 T C C C G G G A G A A A A G G G C C C G G C G G G T G A A C G T G G T G C A C C  
 G G G A G C G C C T G G T C C G T G T T G C G G T G G T

10

【0086】

AT20のアミノ酸配列

g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r  
 g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g  
 e k g p a g e r g a p g e r g a p g f r g p a g p n g i p g e k g p a g e r g a  
 p g a p g p c c g g

20

【0087】

対応の最適化された塩基配列

G G A G A A A G G G G G G C G C C T G G C T T T C G T G G T C C G G C G G G T  
 C C G A A T G G C A T T C C G G G T G A A A A G G G T C C T G C C G G T G A G C  
 G T G G T G C T C C G G G T G A G C G C G G C G C T C C G G G T T T C C G C G G  
 T C C C G C G G G T C C G A A C G G C A T C C C G G G A G A A A A A G G C C C A  
 G C T G G C G A G C G C G G T G C A C C G G G C G A A C G T G G T G C C C C G G  
 G C T T C C G T G G C C C A G C G G G T C C G A A C G G T A T T C C G G G C G A  
 G A A A G G T C C G G C A G G T G A A C G T G G T G C G C C A G G C G A G C G T  
 G G T G C G C C T G G T T T C A G A G G C C C A G C A G G C C C A A A T G G C A  
 T C C C C G G T G A G A A G G G C C C A G C C G G T G A G C G C G G G G C A C C  
 G G G T G A A C G T G G C G C G C C G G G C T T T C G C G G A C C G G C G G G T  
 C C G A A C G G C A T C C C G G G T G A G A A G G G T C C G G C T G G C G A G C  
 G T G G T G C G C C G G G T G A A C G T G G T G C A C C G G G A T T C C G C G G  
 C C C G G C G G G A C C G A A T G G T A T T C C G G G T G A G A A G G G T C C G  
 G C G G G C G A A C G C G G A G C A C C A G G C G A A C G C G G C G C T C C G G  
 G C T T T C G C G G T C C G G C G G G T C C G A A T G G T A T C C C G G G C G A  
 G A A G G G T C C T G C C G G T G A G C G T G G T G C C C C G G G C G A A C G T  
 G G C G C T C C G G G T T T T C G T G G T C C G G C G G G T C C G A A C G G C A  
 T T C C G G G T G A A A A G G G C C C A G C G G G T G A G C G T G G C G C G C C  
 A G G C G A G A G A G G T G C C C C G G G T T T T C G T G G C C C G G C G G G T

40

50

C C G A A C G G C A T C C C G G G T G A G A A A G G C C C G G C G G G C G A A C  
 G T G G T G C G C C A G G C G A G A G A G G T G C T C C G G G T T T C C G T G G  
 C C C G G C T G G T C C G A A C G G T A T T C C G G G T G A A A A G G G C C C G  
 G C G G G C G A G C G T G G C G C G C C G G G T G A G C G T G G T G C C C C A G  
 G C T T T C G T G G T C C A G C T G G T C C G A A C G G T A T C C C G G G T G A  
 A A A A G G T C C G G C G G G T G A G C G T G G C G C G C C G G G T G A A C G T  
 G G T G C C C C A G G C T T C C G C G G G C C G G C A G G T C C C A A C G G T A  
 T C C C G G G C G A G A A A G G T C C G G C T G G C G A G C G A G G T G C C C C  
 G G G C G A A C G T G G C G C G C C G G G C T T C C G C G G T C C G G C A G G C  
 C C G A A C G G T A T C C C G G G C G A G A A A G G T C C G G C A G G T G A G C  
 G T G G T G C G C C G G G T G A A C G C G G C G C T C C G G G T T T T C G T G G  
 C C C G G C A G G C C C A A A T G G C A T T C C G G G C G A A A A A G G C C C A  
 G C G G G T G A G C G T G G T G C C C C G G G T G A G C G C G G T G C G C C G G  
 G T T T C C G C G G T C C G G C G G G T C C G A A T G G T A T T C C G G G C G A  
 A A A A G G C C C G G C G G G C G A G C G T G G C G C T C C G G G C G A A C G T  
 G G A G C G C C A G G A T T C C G C G G C C C G G C A G G A C C G A A C G G C A  
 T C C C G G G A G A A A A G G G C C C G G C G G G T G A A C G T G G T G C A C C  
 G G G A G A A A G G G G G G C G C C T G G C T T T C G T G G T C C G G C G G G T  
 C C G A A T G G C A T T C C G G G T G A A A A G G G T C C T G C C G G T G A G C  
 G T G G T G C T C C G G G T G A G C G C G G C G C T C C G G G T T T C C G C G G  
 T C C C G C G G G T C C G A A C G G C A T C C C G G G A G A A A A A G G C C C A  
 G C T G G C G A G C G C G G T G C A C C G G G C G A A C G T G G T G C C C C G G  
 G C T T C C G T G G C C C A G C G G G T C C G A A C G G T A T T C C G G G C G A  
 G A A A G G T C C G G C A G G T G A A C G T G G T G C G C C A G G C G A G C G T  
 G G T G C G C C T G G T T T C A G A G G C C C A G C A G G C C C A A A T G G C A  
 T C C C C G G T G A G A A G G G C C C A G C C G G T G A G C G C G G G G C A C C  
 G G G A G C G C C T G G T C C G T G T T G C G G T G G T。

10

20

【0088】

実施例6：AT4、AT8、AT12、AT16、AT20のSDS-PAGE実験  
 実験過程：精製されたタンパク質溶液20μLを取り、5μlの5×のタンパク質ロー  
 ディング緩衝液(250mMのTris HCl(pH6.8)、10%SDS、0.5  
 %プロモフェノールブルー、50%グリセリン、5%メルカプトエタノール)を添加し  
 、100の沸騰水に置いて5min煮て、次に各ウェル10μlをSDS PAGEタ  
 ンパク質ゲルに添加し、電圧150Vで1h電気泳動した後、クマシーブリリアントブル  
 ー染色液(0.1%クマシーブリリアントブルーR250、25%エタノール、10%氷  
 酢酸)でタンパク質染色を3min行い、さらにタンパク質脱色液(10%酢酸、5%エ  
 タノール)で脱色した。

30

【0089】

実験結果：  
 図5は、精製された組換えIII型ヒト化コラーゲンAT4、AT8、AT12、AT  
 16、AT20の電気泳動検出結果を示し、AT4、AT8、AT12、AT16、AT  
 20の見かけ分子量はそれぞれ13kDa、26kDa、38kDa、45kDa、66  
 kDaであり、分子量はAT4、AT8、AT12、AT16、AT20ポリペプチドに  
 対応し、AT4、AT8、AT12、AT16、AT20ポリペプチドが正確に発現され  
 ることを示す。

40

【0090】

実施例7：AT4、AT8、AT12、AT16、AT20の生物活性検出  
 実験過程：  
 コラーゲンの活性検出方法は、文献Juming Yao, Satoshi Yanagisawa, Tetsuo Asakura, Design, Expressio

50

n and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens, J Biochem. 136, 643-649 (2004)を参照することができる。具体的な実施方法は下記の通りである。

【0091】

(1) 紫外線吸収法を利用して測定されるタンパク質サンプルの濃度を検出し、ウシI型コラーゲン標準品(Sigma、番号:380002)、本発明で提供する組換えIII型ヒト化コラーゲンAT4、AT8、AT12、AT16、AT20を含む。

【0092】

具体的にはそれぞれサンプルの215nm及び225nmでの紫外光吸収を測定し、経験式 $C(\mu\text{g}/\text{mL}) = 144 \times (A_{215} - A_{225})$ を利用してタンパク質濃度を計算し、 $A_{215} < 1.5$ の場合に検出する必要があることに注意した。当該方法の原理は以下のとおりである:ペプチド結合の遠紫外光での特徴吸収を測定し、発色団含有量の影響を受けず、干渉物質が少なく、操作しやすく、クマシーブリリアントブルーが発色しないヒトコラーゲン及びその類似体を検出することに適する。(参考文献はWalker JM. The Protein Protocols Handbook, second edition. Humana Press. 43-45.である)。タンパク質濃度を検出した後、PBSで全ての測定されるタンパク質濃度を0.5mg/mLに調整した。

【0093】

(2) 96ウェルプレートに100 $\mu\text{L}$ の様々なタンパク質溶液及びブランクPBS溶液対照を添加して、室温で60min静置した。

【0094】

(3) 各ウェルに培養状態が良好な $10^5$ 個の3T3細胞を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で60minインキュベートした。

【0095】

(4) 各ウェルをPBSで4回洗浄した。

【0096】

(5) LDH検出キット(Roche、04744926001)でOD492nmの吸光度を検出した。ブランク対照の数値に基づいて、細胞の接着率を計算することができる。計算式は以下のとおりである:細胞接着率=(測定ウェル-ブランクウェル)/(陽性ウェル-ブランクウェル) $\times 100\%$ 。細胞の接着率は、コラーゲンの活性を反応することができる。タンパク質の活性が高いほど、短時間で細胞に良質な外部環境を提供し、細胞の接着を助けることができる。

【0097】

実験結果

結果は図6に示すとおりである(D-PBSはブランクPBS群を示す;Bcol IはウシI型コラーゲン標準品対照群を示す;試験サンプルAT4、AT8、AT12、AT16、AT20の濃度はそれぞれ0.5mg/mLである)。比較から分かるように、商品化されたヒトコラーゲンに比べて、本発明の組換えIII型ヒト化コラーゲンAT4、AT8、AT12、AT16、AT20は0.5mg/mLの濃度でいずれも優れた生体接着活性を有する。

【0098】

実施例8:AT4、AT8、AT12、AT20のマスマスペクトル検出

実験方法

10

20

30

40

50

【表 3】

機器名	マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間質量分析計MALDI-TOF / TOF Ultraflex extreme™、Brucker、Germany		
基質	CHCA	レーザーエネルギー	125
データ検索ソフトウェア	Mascot	検索物種	ALL entries
検索データベース	NCBI prot		

## 【0099】

10

タンパク質サンプルをDTT還元及びヨードアセトアミドアルキル化処理を行った後、トリプシンを添加して酵素分解して一晩放置した。酵素分解した後に得られたペプチド断片をさらにC18 Zip Tipで脱塩した後、基質 - cyano - 4 - hydroxy cinnamic acid (CHCA) と混合してパネルをスポットした。最後にマトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間質量分析計MALDI - TOF / TOF Ultraflex extreme™、Brucker、Germanyを用いて分析した(ペプチドマスフィンガープリンティングの技術はProtein J. 2016; 35: 212 - 7を参照することができる)。

## 【0100】

データ検索は、ローカルmacoウェブサイトからMS / MS Ion searchページで処理される。タンパク質同定結果は、酵素分解後に生成されたペプチド断片の一次マススペクトルに基づいて得られた。検出パラメータ: Trypsin酵素分解、二つの切断漏れ部位を設定した。システインのアルキル化が固定修飾であるように設定した。メチオニンの酸化は可変修飾である。同定に用いられたデータベースはNCB protである。

20

## 【0101】

## 実験結果

AT4 マススペクトル検出分子量及び対応するポリペプチド

【表 4】

観測値	Mr (期待値)	ペプチド
839.8683	839.8528	GPAGERGA
1337.4579	1337.4432	GFRGPAGPNGIP
1765.8265	1765.8446	GERGAPGERGAPGFR
2413.5765	2413.5232	EKGPAGERGAPGERGAPGFRG

30

## 【0102】

AT8 マススペクトル検出分子量及び対応するポリペプチド

【表 5】

観測値	Mr (期待値)	ペプチド
1087.1974	1087.1434	GPNGIPGEKG
1497.5287	1497.5728	KGPAGERGAPGER
1602.6752	1602.6600	PAGPNGIPGEKGPAGE
2452.5278	2452.5542	AGPNGIPGEKGPAGERGAPGER

40

## 【0103】

AT12 マススペクトル検出分子量及び対応するポリペプチド

50

【表 6】

観測値	Mr (期待値)	ペプチド
913.9889	913.9748	ERGAPGFRGP
1442.5276	1442.5364	RGAPGERGAPGFR
1570.6602	1570.6612	GPAGPNGIPGEKGA
2527.6376	2527.6212	NGIPGEKGPAGERGAPGERGAPG

## 【0104】

AT20 マススペクトル検出分子量及び対応するポリペプチド

【表 7】

観測値	Mr (期待値)	ペプチド
1070.1833	1070.1130	PAGPNGIPGE
1559.6287	1559.6406	GFRGPAGPNGIPGE
2013.1492	2013.1382	RGAPGERGAPGFRGPAGP
2686.8492	2686.8516	PGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGP

## 【0105】

実施例 9 : AT4、AT8、AT12、AT16、AT20 の粘度試験

実験過程 :

本発明の組換え III 型ヒト化コラーゲン AT4、AT8、AT12、AT16、AT20 は同じ濃度及び対応溶液 (150 mM NaCl 溶液、ポリペプチド濃度 15 mg / mL) に、それぞれ 2 ~ 8 の環境に貯蔵して機器回転粘度計に入れ、その動粘度を測定して比較した。

## 【0106】

実験結果

組換え III 型ヒト由来コラーゲン T16 及び TE16c は、動粘度を測定することができず、本発明の組換え III 型ヒト化コラーゲン AT4、AT8、AT12、AT16、AT20 により測定された動粘度はそれぞれ 3225 mpa・s、3340 mpa・s、3475 mpa・s、3510 mpa・s、3650 mpa・s である。これは同じ条件で本発明の組換え III 型ヒト化コラーゲン AT4、AT8、AT12、AT16、AT20 がゲルをよりよく形成できることを示し、図 7 に示すとおりである。図 7 から分かるように、無色透明を呈する T16 及び TE16c に比べて、AT4、AT8、AT12、AT16、AT20 は乳白色を呈し、ゲルを形成することができる。

10

20

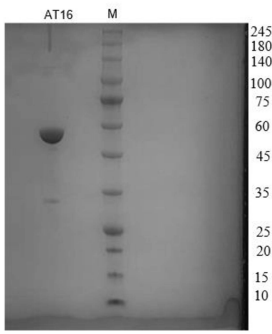
30

40

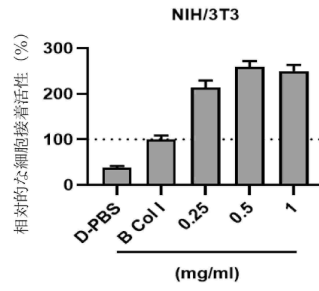
50

【図面】

【図 1】

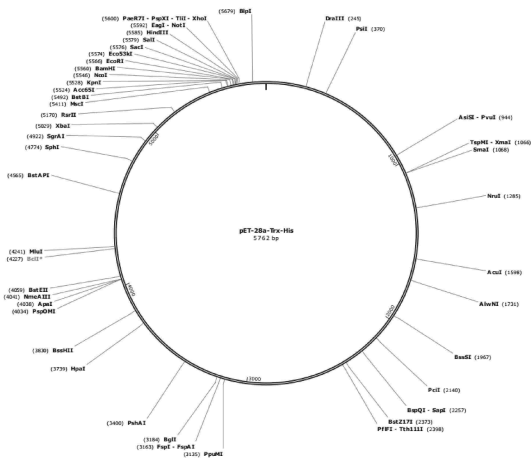


【図 2】



10

【図 3】

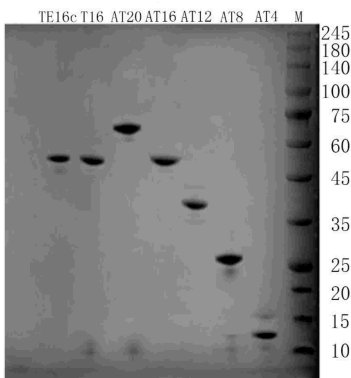


【図 4】

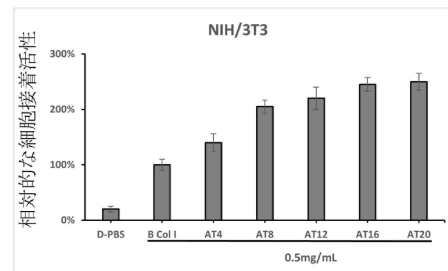


20

【図 5】




【図 6】



30

40

50

【 7】



【配列表】

0007679487000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>
<i>A 6 1 F</i>	<i>2/02 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 F</i>	<i>2/02</i>	
<i>A 6 1 F</i>	<i>2/12 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 F</i>	<i>2/12</i>	

8号

(72)発明者 何 振瑞

中華人民共和国山西省太原市山西 綜 改示范区太原唐槐 園 区 錦 波街18号

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 中国特許出願公開第113185612(CN, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

*C 1 2 N* 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

*C 0 7 K* 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

*C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )*

*P u b M e d*