



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0042497
(43) 공개일자 2024년04월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/67 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 5/103 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/50 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/67 (2013.01)
C07K 19/00 (2023.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7007512
- (22) 출원일자(국제) 2022년09월26일
심사청구일자 2024년03월05일
- (85) 번역문제출일자 2024년03월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2022/035787
- (87) 국제공개번호 WO 2023/048290
국제공개일자 2023년03월30일
- (30) 우선권주장
JP-P-2021-157186 2021년09월27일 일본(JP)

- (71) 출원인
후지필름 가부시킴가이샤
일본 도쿄도 미나토쿠 니시 아자부 2초메 26방 30고
- (72) 발명자
마츠이 겐
일본 가나가와켄 아시가라카미군 가이세이마치 우시지마 577번지 후지필름 가부시킴가이샤 나이도미나가 조
일본 가나가와켄 아시가라카미군 가이세이마치 우시지마 577번지 후지필름 가부시킴가이샤 나이(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 23 항

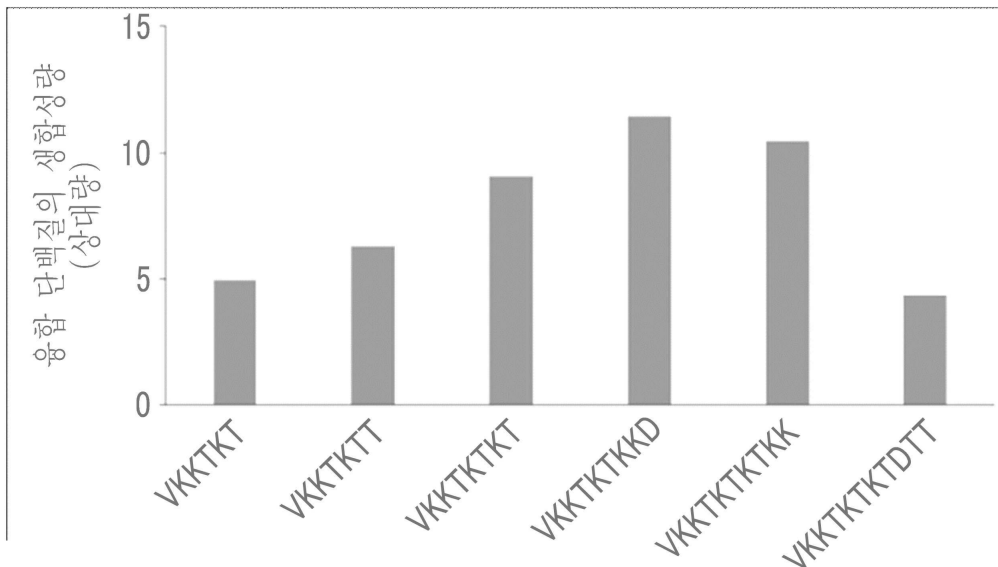
(54) 발명의 명칭 폴리펩타이드의 제작 방법, 태그, 발현 벡터, 폴리펩타이드의 평가 방법, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법 및 스크리닝 방법

(57) 요약

폴리펩타이드를 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현시키는 것을 포함하는 폴리펩타이드의 제작 방법으로서, 개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코드하는 염기 배열과, 상기 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시키는 것을 포함하는, 폴리펩타이드의 제작 방법.

배열 번호 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n은 임의의 아미노산 n개의 연결이고, n은 1-8의 정수이며, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 5/1005 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
C07K 7/50 (2013.01)
C12N 15/1065 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
C12P 21/02 (2013.01)
C40B 40/08 (2013.01)
C40B 40/10 (2013.01)

(72) 발명자

기하라 시오리

일본 가나가와켄 아시가라카미군 가이세이마치 우
시지마 577번지 후지필름 가부시키키가이샤 나이

호사카 다카히로

일본 이시카와켄 노미시 아사히다이 1-1 고쿠리츠
다이가쿠호진 호쿠리쿠 쉐단 가가쿠 기쥬츠 다이가
쿠인 다이가쿠 나이

와타나베 다카요시

일본 이시카와켄 노미시 아사히다이 1-1 고쿠리츠
다이가쿠호진 호쿠리쿠 쉐단 가가쿠 기쥬츠 다이가
쿠인 다이가쿠 나이

명세서

청구범위

청구항 1

폴리펩타이드를 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현시키는 것을 포함하는 폴리펩타이드의 제작 방법으로서, 개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코드하는 염기 배열과,

상기 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시키는 것을 포함하는, 폴리펩타이드의 제작 방법.

배열 번호 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n은 임의의 아미노산 n개의 연결이고, n은 1-8의 정수이며, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 태그가 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, 폴리펩타이드의 제작 방법.

배열 번호 2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys, Arg, His, Ser 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_m은 임의의 아미노산 m개의 연결이고, m은 0-7의 정수이며, (Xaa)_m을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 태그가 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, 폴리펩타이드의 제작 방법.

배열 번호 3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_k는 Lys, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 k개의 아미노산의 연결이고, k는 0-6의 정수이며, (Xaa)_k를 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

무세포 펩타이드 합성 시스템 또는 대장균에 의하여 상기 핵산으로부터 상기 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시키는, 폴리펩타이드의 제작 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 비천연 아미노산을 포함하는, 폴리펩타이드의 제작 방법.

청구항 6

배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그.

배열 번호 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n은 임의의 아미노산 n개의 연결이고, n은 1-8의 정수이며, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 7

배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그.

배열 번호 2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys, Arg, His, Ser 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_m은 임의의 아미노산 m개의 연결이고, m은 0-7의 정수이

며, (Xaa)_m을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 8

배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그.

배열 번호 3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_k는 Lys, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 k개의 아미노산의 연결이고, k는 0~6의 정수이며, (Xaa)_k를 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 9

청구항 6 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

무세포 펩타이드 합성 시스템 또는 대장균에 의하여 폴리펩타이드를 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현시키기 위하여 이용하는, 태그.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 비천연 아미노산을 포함하는, 태그.

청구항 11

개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코드하는 염기 배열과,

상기 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는, 발현 벡터.

배열 번호 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n은 임의의 아미노산 n개의 연결이고, n은 1~8의 정수이며, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 태그가 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, 발현 벡터.

배열 번호 2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys, Arg, His, Ser 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_m은 임의의 아미노산 m개의 연결이고, m은 0~7의 정수이며, (Xaa)_m을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 태그가 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, 발현 벡터.

배열 번호 3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_k는 Lys, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 k개의 아미노산의 연결이고, k는 0~6의 정수이며, (Xaa)_k를 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 14

청구항 11 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

무세포 펩타이드 합성 시스템 또는 대장균에 있어서 발현하도록 설계된, 발현 벡터.

청구항 15

청구항 1에 기재된 폴리펩타이드의 제작 방법에 의하여 폴리펩타이드를 제작하는 것과, 표적 물질에 대한 상기 폴리펩타이드의 결합성을 평가하는 것을 포함하는, 폴리펩타이드의 평가 방법.

청구항 16

개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코딩하는 염기 배열과, 상기 태그를 코딩하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 배열을 갖는 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시켜, 핵산-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것을 포함하는, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

배열 번호 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n은 임의의 아미노산 n개의 연결이고, n은 1~8의 정수이며, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 태그가 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

배열 번호 2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys, Arg, His, Ser 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_m은 임의의 아미노산 m개의 연결이고, m은 0~7의 정수이며, (Xaa)_m을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 18

청구항 16에 있어서,

상기 태그가 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

배열 번호 3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_k는 Lys, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 k개의 아미노산의 연결이고, k는 0~6의 정수이며, (Xaa)_k를 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.

청구항 19

청구항 16에 있어서,

상기 핵산-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것이, mRNA-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것, 및, 상기 mRNA-폴리펩타이드 연결체의 mRNA를 역전사하여 cDNA-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것을 포함하는, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

청구항 20

청구항 16에 있어서,

상기 핵산-폴리펩타이드 연결체에 있어서 핵산과 폴리펩타이드가 퓨로마이신 링커에 의하여 연결되어 있는, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

청구항 21

청구항 16에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 비천연 아미노산을 포함하는, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

청구항 22

청구항 16에 있어서,

상기 폴리펩타이드가, 제1 관능기를 갖는 아미노산과, 상기 제1 관능기와 공유 결합하는 제2 관능기를 갖는 아미노산을 포함하고, 상기 제1 관능기를 갖는 아미노산과 상기 제2 관능기를 갖는 아미노산의 사이에 2개~28개의 아미노산이 개재되는 폴리펩타이드이며,

상기 핵산-폴리펩타이드 연결체의 폴리펩타이드가 상기 제1 관능기와 상기 제2 관능기의 공유 결합에 의하여 환화되는 것을 더 포함하는, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.

청구항 23

청구항 16에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법에 의하여 핵산 디스플레이 라이브러리를 제작하는 것과, 상기 핵산 디스플레이 라이브러리로부터 목적의 활성을 갖는 핵산-폴리펩타이드 연결체를 선택하고, 선택한 핵산-폴리펩타이드 연결체의 핵산의 염기 배열을 동정하는 것을 포함하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는, 폴리펩타이드의 제작 방법, 태그, 발현 벡터, 폴리펩타이드의 평가 방법, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전자 공학에 의하여 목적 단백질을 발현시킬 때에, 태그라고 불리는 비교적 저분자량의 폴리펩타이드를 목적 단백질의 말단에 붙이는 기술이 있다. 태그는, 목적 단백질의 검출, 단리(單離), 고정화 등에 이용된다.

[0003] 태그를 목적 단백질의 발현량 증대에 이용하는 것이 검토되고 있다.

[0004] 국제 공개공보 제2016/204198호에는, 목적 단백질의 발현량을 증대시키는 태그로서, SKIK의 아미노산 배열로 이루어지는 태그(배열 번호 107)와, 목적 단백질의 N 말단에 태그를 부가하여 발현시키는 방법이 개시되어 있다.

[0005] Protein Expression and Purification 2010; 74: 248-256에는, 개시 코돈의 직후에 Ala 또는 Ser을 도입함으로써 단백질의 발현량을 높이는 것이 기재되어 있다.

[0006] 단백질의 발현량 증대를 위하여, 유전자의 염기 배열의 최적화도 검토되고 있다.

[0007] Science 2013; 342:475-479는, 단백질의 N 말단에 회소 코돈을 사용하면, 대장균에 있어서 발현량이 증가하는 것이 기재되어 있다.

[0008] Protein Expression and Purification 2010; 70:224-230은, 인간 펩타이드 디포밀레이즈(hPDF)에 대하여, hPDF 유전자의 GC 함량의 저감 및 회소 코돈의 제거에 의하여 대장균에 있어서의 발현량이 증가하는 것이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 개시에 관한 실시형태는, 생산성이 높은 폴리펩타이드의 제작 방법과, 폴리펩타이드의 발현량을 증대시키는 태그 및 발현 벡터와, 효율이 양호한 폴리펩타이드의 평가 방법과, 발현량이 많고 또한 발현량의 편차가 적은 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법과, 신뢰도가 높은 스크리닝 방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 과제를 해결하기 위한 구체적 수단에는, 이하의 양태가 포함된다.

[0011] <1> 폴리펩타이드를 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현시키는 것을 포함하는 폴리펩타이드의 제작 방법으로서,

[0012] 개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코드하는 염기 배열과,

[0013] 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시키는 것을 포함하는, 폴리펩타이드의 제작 방법.

[0014] <2> 태그가 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, <1>에 기재된 폴리펩타이드의 제작 방법.

[0015] <3> 태그가 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, <1>에 기재된 폴리펩타이드의 제작 방법.

[0016] <4> 무세포 펩타이드 합성 시스템 또는 대장균에 의하여 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시키는, <1> 내지 <3> 중 어느 하나에 기재된 폴리펩타이드의 제작 방법.

[0017] <5> 폴리펩타이드가 비천연 아미노산을 포함하는, <1> 내지 <4> 중 어느 하나에 기재된 폴리펩타이드의 제작 방

법.

- [0018] <6> 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그.
- [0019] <7> 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그.
- [0020] <8> 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그.
- [0021] <9> 무세포 펩타이드 합성 시스템 또는 대장균에 의하여 폴리펩타이드를 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현시키기 위하여 이용하는, <6> 내지 <8> 중 어느 하나에 기재된 태그.
- [0022] <10> 폴리펩타이드가 비천연 아미노산을 포함하는, <9>에 기재된 태그.
- [0023] <11> 개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코드하는 염기 배열과, 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는, 발현 벡터.
- [0024] <12> 태그가 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, <11>에 기재된 발현 벡터.
- [0025] <13> 태그가 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, <11>에 기재된 발현 벡터.
- [0026] <14> 무세포 펩타이드 합성 시스템 또는 대장균에 있어서 발현하도록 설계된, <11> 내지 <13> 중 어느 하나에 기재된 발현 벡터.
- [0027] <15> <1> 내지 <5> 중 어느 하나에 기재된 폴리펩타이드의 제작 방법에 의하여 폴리펩타이드를 제작하는 것과, 표적 물질에 대한 폴리펩타이드의 결합성을 평가하는 것을 포함하는, 폴리펩타이드의 평가 방법.
- [0028] <16> 개시 코돈의 직후에 배치된, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 코드하는 염기 배열과, 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시켜, 핵산-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것을 포함하는, 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0029] <17> 태그가 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, <16>에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0030] <18> 태그가 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그인, <16>에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0031] <19> 핵산-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것이, mRNA-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것, 및, mRNA-폴리펩타이드 연결체의 mRNA를 역전사하여 cDNA-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것을 포함하는, <16> 내지 <18> 중 어느 하나에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0032] <20> 핵산-폴리펩타이드 연결체에 있어서 핵산과 폴리펩타이드가 퓨로마이신 링커에 의하여 연결되어 있는, <16> 내지 <19> 중 어느 하나에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0033] <21> 폴리펩타이드가 비천연 아미노산을 포함하는, <16> 내지 <20> 중 어느 하나에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0034] <22> 폴리펩타이드가, 제1 관능기를 갖는 아미노산과, 제1 관능기와 공유 결합하는 제2 관능기를 갖는 아미노산을 포함하고, 제1 관능기를 갖는 아미노산과 제2 관능기를 갖는 아미노산의 사이에 2개~28개의 아미노산이 개재되는 폴리펩타이드이며,
- [0035] 핵산-폴리펩타이드 연결체의 폴리펩타이드가 제1 관능기와 제2 관능기의 공유 결합에 의하여 환화되는 것을 더 포함하는, <16> 내지 <21> 중 어느 하나에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법.
- [0036] <23> <16> 내지 <22> 중 어느 하나에 기재된 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법에 의하여 핵산 디스플레이 라이브러리를 제작하는 것과,
- [0037] 핵산 디스플레이 라이브러리로부터 목적의 활성을 갖는 핵산-폴리펩타이드 연결체를 선택하고, 선택한 핵산-폴리펩타이드 연결체의 핵산의 염기 배열을 동정(同定)하는 것을 포함하는, 스크리닝 방법.

발명의 효과

[0038] 본 개시에 관한 실시형태에 의하면, 생산성이 높은 폴리펩타이드의 제작 방법과, 폴리펩타이드의 발현량을 증대시키는 태그 및 발현 벡터와, 효율이 양호한 폴리펩타이드의 평가 방법과, 발현량이 많고 또한 발현량의 편차가 적은 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법과, 신뢰도가 높은 스크리닝 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 배열 번호 7~26의 태그에 대하여 융합 단백질의 생합성량을 나타내는 그래프이며, 태그를 융합 단백질의 생합성량의 순서로 나열한 그래프이다.

도 2는 배열 번호 27, 28, 31, 37, 48 및 52의 태그에 대하여 융합 단백질의 생합성량을 나타내는 그래프이다.

도 3은 배열 번호 27의 태그를 부가한 인테그린 결합 펩타이드의 결합 성능을 나타낸 그래프이다.

도 4는 배열 번호 133~136에 도입한 화합물의 구조를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하에, 본 개시의 실시형태를 설명한다. 이들 설명 및 실시예는 일 실시형태를 예시하는 것이며, 본 개시의 실시형태의 범위를 제한하는 것은 아니다. 본 개시에 있어서 설명하는 작용 메커니즘은 추정을 포함하고 있으며, 그 정부(正否)는 본 개시의 실시형태의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0041] 본 개시에 있어서 "~"를 이용하여 나타난 수치 범위는, "~"의 전후에 기재되는 수치를 각각 최솟값 및 최댓값으로서 포함하는 범위를 나타낸다.

[0042] 본 개시 중에 단계적으로 기재되어 있는 수치 범위에 있어서, 하나의 수치 범위로 기재된 상한값 또는 하한값은, 다른 단계적인 기재의 수치 범위의 상한값 또는 하한값으로 치환해도 된다. 또, 본 개시 중에 기재되어 있는 수치 범위에 있어서, 그 수치 범위의 상한값 또는 하한값은, 실시예에 나타나 있는 값으로 치환해도 된다.

[0043] 본 개시에 있어서 각 성분은 해당하는 물질을 복수 중 포함하고 있어도 된다. 본 개시에 있어서 조성물 중의 각 성분의 양에 대하여 언급하는 경우, 조성물 중에 각 성분에 해당하는 물질이 복수 중 존재하는 경우에는, 특별히 설명하지 않는 한, 조성물 중에 존재하는 복수 중의 물질의 합계량을 의미한다.

[0044] 본 개시에 있어서 폴리펩타이드는, 아미노산이 펩타이드 결합에 의하여 연결된 분자를 가리킨다. 폴리펩타이드의 아미노산 잔기수에 제한은 없고, 폴리펩타이드는 단백질을 포함하는 용어이다. 본 개시에 있어서의 폴리펩타이드는 아미노산 잔기수가 6잔기 이상인 것이 바람직하다. 폴리펩타이드에는, 아미노산이 번역 후 수식(修飾)된 폴리펩타이드가 포함된다. 아미노산의 번역 후 수식으로서, 인산화, 메틸화, 아세틸화 등을 들 수 있다.

[0045] 본 개시에 있어서 핵산은, 폴리펩타이드를 합성하는 정보를 담당하는 분자를 가리킨다. 핵산은, 모든 핵산(예를 들면, DNA, RNA, 이들의 유사체, 천연물, 인공물)과, 모든 핵산에 저분자 화합물, 기, 핵산 이외의 분자, 구조물 등이 연결되어 있는 핵산을 포함하는 용어이다. 핵산은, 1개체의 핵산이어도 되고, 2개체의 핵산이어도 된다.

[0046] 본 개시에 있어서, 아미노산의 표기에, IUPAC-IUBMB JCBN(IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature)이 정하는 3문자 표기 및 1문자 표기를 사용한다.

[0047] 본 개시에 있어서 언급되는 아미노산은, 특별히 설명하지 않는 한, L-아미노산이다.

[0048] <폴리펩타이드의 제작 방법, 태그, 발현 벡터>

[0049] 본 개시는, 생산성이 높은 폴리펩타이드의 제작 방법을 제공한다. 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법은, 폴리펩타이드를 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현시키는 것을 포함한다.

[0050] 본 개시는, 생산성이 높은 폴리펩타이드의 제작 방법을 위하여, 폴리펩타이드의 발현량을 증대시키는 태그 및 발현 벡터를 제공한다. 본 개시에 관한 실시형태에 의하여 제공되는 태그를 VKKX 태그로 총칭한다.

[0051] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법은, 개시 코돈의 직후에 배치된 VKKX 태그를 코드하는 염기 배열과, VKKX 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시키는 것을 포함한다. VKKX 태그를 코드하는 염기 배열과 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열은, 핵산 1분자에 있어서 인프레임으로 배치되어 있다. 즉, VKKX 태그를 코드하는 염

기 배열의 직전의 개시 코돈을 기점으로 하는 관독 프레임에, VKKX 태그와 폴리펩타이드가 들어간다. VKKX 태그를 코드하는 염기 배열과 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열은, 직접 연결되어 있어도 되고, 다른 염기 배열을 개재하여 연결되어 있어도 된다.

- [0052] 개시 코돈의 직후에 배치된 VKKX 태그는, 개시 코돈 이후의 염기 배열의 번역 효율을 높이는 것이라고 추측된다. 따라서, 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법은, 생산성이 높은 폴리펩타이드의 제작 방법이다.
- [0053] VKKX 태그는, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그이다. VKKX 태그는, 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 바람직하고, 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 보다 바람직하며, 배열 번호 4의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 더 바람직하다.
- [0054] 배열 번호 1: Val-Lys-Lys-(Xaa)_n. (Xaa)_n은 임의의 아미노산 n개의 연결이고, n은 1~8의 정수이며, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.
- [0055] 배열 번호 1에 있어서, (Xaa)_n을 구성하는 아미노산으로서는, Ile, Lys, Arg, His, Ser, Thr, Asp, Cys, Asn, Tyr, Gln, Trp 및 Phe로 이루어지는 군으로부터 선택되는 n개의 아미노산이 바람직하고, Ile, Lys, Arg, His, Ser, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 n개의 아미노산이 보다 바람직하다.
- [0056] 배열 번호 1에 있어서, n은 1~7의 정수가 바람직하고, 2~7의 정수가 보다 바람직하다.
- [0057] 배열 번호 2: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_m. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys, Arg, His, Ser 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_m은 임의의 아미노산 m개의 연결이고, m은 0~7의 정수이며, (Xaa)_m을 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.
- [0058] 배열 번호 2에 있어서, N 말단으로부터 4번째의 Xaa로서는, Ile, Lys 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이 바람직하고, Thr이 보다 바람직하다.
- [0059] 배열 번호 2에 있어서, (Xaa)_m을 구성하는 아미노산으로서는, Ile, Lys, Arg, His, Ser, Thr, Asp, Cys, Asn, Tyr, Gln, Trp 및 Phe로 이루어지는 군으로부터 선택되는 m개의 아미노산이 바람직하고, Ile, Lys, Arg, His, Ser, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 m개의 아미노산이 보다 바람직하다.
- [0060] 배열 번호 2에 있어서, m은 0~6의 정수가 바람직하고, 1~6의 정수가 보다 바람직하다.
- [0061] 배열 번호 3: Val-Lys-Lys-Xaa-(Xaa)_k. N 말단으로부터 4번째의 Xaa는 Ile, Lys 및 Thr로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 아미노산이며, (Xaa)_k는 Lys, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 k개의 아미노산의 연결이고, k는 0~6의 정수이며, (Xaa)_k를 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.
- [0062] 배열 번호 3에 있어서, N 말단으로부터 4번째의 Xaa로서는, Thr이 바람직하다.
- [0063] 배열 번호 3에 있어서, k는 1~6의 정수가 바람직하다.
- [0064] 배열 번호 4: Val-Lys-Lys-Thr-Lys-Thr-(Xaa)_j. (Xaa)_j는 Lys, Thr 및 Asp로 이루어지는 군으로부터 선택되는 j개의 아미노산의 연결이고, j는 0~4의 정수이며, (Xaa)_j를 구성하는 아미노산은 1종이어도 되고 2종 이상이어도 된다.
- [0065] VKKX 태그의 구체예로서, 배열 번호 7~52 중 어느 하나의 아미노산 배열로 이루어지는 태그를 들 수 있다.
- [0066] VKKX 태그를 코드하는 염기 배열에 제한은 없다. 예를 들면, 태그 부가 폴리펩타이드의 발현에 사용하는 생합성 시스템(예를 들면, 무세포 펩타이드 합성 시스템, 대장균)의 코돈표에 따라 VKKX 태그의 염기 배열을 설계할 수 있다.
- [0067] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법의 목적물인 폴리펩타이드는, 입체 구조, 아미노산 배열, 아미노산 잔기수, 아미노산의 종류, 및 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열에 제한은 없다. 아미노산은, 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 수식화 아미노산 및 그들의 유도체를 포함한다.
- [0068] 본 개시에 있어서 천연 아미노산이란, 일반적인 단백질을 구성하는 아미노산을 가리키고, 알라닌(Ala, A), 아르지닌(Arg, R), 아스파라진(Asn, N), 아스파라진산(Asp, D), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 글루탐산(Glu, E), 글라이신(Gly, G), 히스티딘(His, H), 아이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메싸이오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W), 타이로신(Tyr, Y) 및 발린(Val, V)을 가리킨다. 천연 아미노산은, 천연물이어도 되고 인공물이어도 된다.

- [0069] 본 개시에 있어서 비천연 아미노산이란, 상기의 20종류의 아미노산 이외의 아미노산을 가리키며, 천연물도 인공물도 포함한다.
- [0070] 비천연 아미노산의 일례로서, 클로로아세틸기를 갖는 아미노산(예를 들면, 클로로아세틸라이신(chloroacetyl lysine) 등의 클로로아세틸화 아미노산, 클로로아세틸다이아미노뷰티르산)을 들 수 있다.
- [0071] 비천연 아미노산의 일례로서, N-메틸아미노산(예를 들면, N-메틸알라닌, N-메틸페닐알라닌)을 들 수 있다.
- [0072] 수식화 아미노산의 일례로서, 표지 화합물과 결합된 아미노산인 표지화 아미노산을 들 수 있다. 표지 화합물은, 생화학적, 화학적, 면역 화학적 또는 전자적인 검출 방법으로 검출 가능한 물질이다. 표지 화합물로서는, 색소 화합물, 형광 물질, 화학 발광 물질, 생물 발광 물질, 효소 기질, 보조소, 항원성 물질, 특정 단백질에 결합하는 물질, 자성 물질 등을 들 수 있다. 표지화 아미노산으로서는, 기능으로 분류하면, 예를 들면, 형광 표지 아미노산, 방사성 동위체 표지 아미노산, 광응답성 아미노산, 광스위치 아미노산, 형광 프로브 아미노산 등을 들 수 있다.
- [0073] 표지화 아미노산은, 아미노산과 표지 화합물이 직접 결합되어 있어도 되고, 아미노산과 표지 화합물이 스페이서를 개재하여 결합되어 있어도 된다. 스페이서로서는, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등의 폴리올레핀; 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸렌글라이콜, 폴리바이닐알코올 등의 폴리에터; 폴리스타이렌, 폴리 염화 바이닐, 폴리에스터, 폴리 아마이드, 폴리이미드, 폴리우레테인, 폴리카보네이트 등을 들 수 있다.
- [0074] 천연 아미노산, 비천연 아미노산 또는 수식화 아미노산의 유도체로서는, 예를 들면, 하이드록시산, 머캅토산 및 카복실산을 들 수 있다.
- [0075] 폴리펩타이드의 실시형태예로서, 비천연 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드를 들 수 있다. 구체예로서, N-메틸 아미노산(예를 들면, N-메틸알라닌, N-메틸페닐알라닌)을 포함하는 폴리펩타이드를 들 수 있다. 비천연 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드의 아미노산 잔기수는, 예를 들면 3개~20개이다.
- [0076] 폴리펩타이드의 실시형태예로서, 비천연 아미노산을 포함하는 환상 폴리펩타이드를 들 수 있다. 구체예로서, 싸이올기를 갖는 아미노산(예를 들면, 시스테인)과, 클로로아세틸기를 갖는 아미노산(예를 들면, 클로로아세틸다이아미노뷰티르산, 클로로아세틸라이신)과, N-메틸아미노산(예를 들면, N-메틸알라닌, N-메틸페닐알라닌)을 1분자에 포함하는 폴리펩타이드를 들 수 있다. 이 폴리펩타이드는, 싸이올기와 클로로아세틸기가 반응하여 환화되어, 환상 폴리펩타이드가 된다. 비천연 아미노산을 포함하는 환상 폴리펩타이드의 아미노산 잔기수는, 예를 들면 3개~20개이다.
- [0077] VKKX 태그와 폴리펩타이드는, 직접 연결되어 있어도 되고, 다른 아미노산 배열을 개재하여 연결되어 있어도 된다. 다른 아미노산 배열로서는, 프로테아제 인식 배열(예를 들면, 솔타제 인식 배열, HRV3C 인식 배열, TEV 프로테아제 인식 배열), 스페이서 배열(예를 들면, 글라이신 및 세린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1개의 아미노산), VKKX 태그 이외의 다른 태그(예를 들면, His 태그, HA 태그, FLAG 태그, Myc 태그, HiBiT 태그)를 들 수 있다.
- [0078] 프로테아제 인식 배열에 의하여, VKKX 태그와 폴리펩타이드의 분리가 가능해진다. 스페이서 배열에 의하여, 태그 부가 폴리펩타이드의 유연성이 향상된다. 다른 태그에 의하여, 태그 부가 폴리펩타이드의 정제 또는 검출이 용이해진다. 다른 태그는, VKKX 태그와 폴리펩타이드의 사이가 아닌, 폴리펩타이드의 C 말단 측에 있어도 된다.
- [0079] 이들 아미노산 배열과 같은 기능 배열이 아닌, 특정 기능을 갖지 않는 아미노산 배열을, VKKX 태그와 폴리펩타이드의 사이에 개재시켜도 되고, 폴리펩타이드의 C 말단 측에 부가해도 된다.
- [0080] 본 개시에 관한 발현 벡터는, 개시 코돈의 직후에 배치된 VKKX 태그를 코드하는 염기 배열과, VKKX 태그를 코드하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열을 갖는다. VKKX 태그는, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그이다. VKKX 태그는, 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 바람직하고, 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 보다 바람직하며, 배열 번호 4의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 더 바람직하다.
- [0081] 본 개시에 관한 발현 벡터는, 생합성 시스템에 의하여 폴리펩타이드를 합성하는 데 필요한 염기 배열을 갖고 있어도 된다. 폴리펩타이드 합성에 필요한 염기 배열이란, 개시 코돈, VKKX 태그를 코드하는 염기 배열 및 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열은 물론, 그 이외에 예를 들면, 프로모터 배열, 및/또는 리보솜 결합 배열을 포함하고 있어도 된다. VKKX 태그와 폴리펩타이드의 사이 또는 폴리펩타이드의 C 말단 측에 다른 아미노산 배열을

삽입하는 경우, 발현 벡터는 다른 아미노산 배열을 코드하는 염기 배열도 갖고 있어도 된다.

- [0082] 프로모터 배열, 리보솜 결합 배열, 개시 코돈 등은, 발현 벡터를 발현시키는 생합성 시스템(예를 들면, 무세포 펩타이드 합성 시스템, 대장균)의 요구에 맞추어 발현 벡터에 배치해도 된다.
- [0083] 본 개시에 관한 발현 벡터는, 프로모터 배열, 리보솜 결합 배열, 개시 코돈, VKKX 태그를 코드하는 염기 배열, 폴리펩타이드를 코드하는 염기 배열 등을 포함하는 DNA 단편을, 오버랩 익스텐션 PCR 등의 방법에 의하여 연결함으로써 제작해도 된다.
- [0084] 본 개시에 관한 발현 벡터의 구축에 이용되는 벡터로서는, 플라스미드 DNA, 코스미드 DNA, 파지 DNA, 동물 바이러스 벡터, 곤충 바이러스 벡터 등을 들 수 있다. 발현 벡터는 직쇄상이어도 되고, 환상이어도 된다.
- [0085] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법의 실시형태의 일례는, 발현 벡터를 포함하는 형질 전환체를 배양하고, 배양물로부터 태그 부가 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드를 회수함으로써 실현된다. 형질 전환체는, 본 개시에 관한 발현 벡터로 숙주를 형질 전환하여 제작해도 된다. 형질 전환체의 제작에 이용되는 숙주는, 대장균, 효모, 진균 세포, 곤충 세포, 동물 세포 및 식물 세포 중 어느 것이어도 된다.
- [0086] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법의 실시형태의 일례는, 무세포 펩타이드 합성 시스템에 의하여 실현된다. 무세포 펩타이드 합성 시스템은, 폴리펩타이드 합성을 위한 반응 시스템이며, 세포 자체를 사용하지 않고, (1) 핵산의 번역을 행하는 시스템, 또는, (2) 핵산의 전사 및 번역을 행하는 시스템이다. 무세포 펩타이드 합성 시스템은, 주형(鑄型) 핵산, 리보솜, 전사 및/또는 번역을 위한 인자 및 효소, 이들 이외에 시스템의 구성에 필요한 효소류, 각종 기질, 에너지원, 완충액 및 염류로 구성된다. 전사 및/또는 번역을 위한 인자 및 효소로서는, 대장균 등의 원핵 세포에서 유래하는 물질; 밀 배아, 동물 세포, 곤충 세포 등의 진핵 세포에서 유래하는 물질을 들 수 있다.
- [0087] 무세포 펩타이드 합성 시스템에 있어서 주형 핵산은, DNA여도 되고 RNA여도 된다. 주형 핵산은, 1개체의 핵산이어도 되고, 2개체의 핵산이어도 된다. 주형 핵산은, 선상의 핵산이어도 되고, 환상의 핵산이어도 된다. 주형 핵산은, 폴리펩타이드 합성에 필요한 염기 배열이 벡터(플라스미드 벡터, 코스미드 벡터 등)에 도입된 핵산이어도 된다.
- [0088] 주형 핵산은, 무세포 펩타이드 합성 시스템에 의하여 폴리펩타이드를 합성하는 데 필요한 염기 배열을 갖는다. 폴리펩타이드 합성에 필요한 염기 배열이란, 코딩 영역은 물론, 그 이외에 예를 들면, 프로모터 배열, 리보솜 결합 배열이다. 주형 핵산의 염기 배열은, 중지 코돈을 포함해도 되고 중지 코돈을 포함하지 않아도 된다. 여기에서 중지 코돈이란, 대합하는 tRNA가 없는 코돈을 의미한다. 주형 핵산의 염기 배열이 중지 코돈을 포함하지 않는 경우, mRNA-리보솜-폴리펩타이드 연결체가 형성될 수 있다.
- [0089] (1) 핵산(예를 들면 RNA)의 번역을 행하는 무세포 펩타이드 합성 시스템은, 리보솜, 번역 개시 인자, 번역 신장 인자, 번역 종결 인자, 아미노아실 tRNA 합성 효소 및 아미노아실 tRNA 합성 효소에 의하여 아미노아실화되는 tRNA를 포함하고, 대장균 유래의 시스템인 경우는 메싸이오닐 tRNA 트랜스포르밀라아제를 더 포함한다.
- [0090] (2) 핵산(예를 들면 DNA)의 전사 및 번역을 행하는 무세포 펩타이드 합성 시스템은, (1)의 구성 물질에 더하여, RNA 폴리메라아제(예를 들면 T7 RNA 폴리메라아제), 및 RNA 폴리메라아제의 기질인 뉴클레오사이드 삼인산을 포함한다.
- [0091] (1) 및 (2) 중 어느 것에 있어서도, 구성 물질로부터 번역 종결 인자를 제거함으로써, mRNA-리보솜-폴리펩타이드 연결체를 형성할 수 있다.
- [0092] 전사 및/또는 번역을 위한 인자 및 효소 이외의 효소류로서는, 예를 들면, 크레아틴키나아제, 미오키나아제, 뉴클레오사이드 이인산 키나아제(nucleoside diphosphate kinase; NDPK) 등의 에너지의 재생을 위한 효소; 무기 파이로포스파타제 등의 전사 및/또는 번역에서 발생하는 무기 파이로인산의 분해를 위한 효소 등을 들 수 있다.
- [0093] 각종 기질로서는, 천연 아미노산 및/또는 비천연 아미노산, 에너지원으로서의 뉴클레오타이드 삼인산, 크레아틴 포스페이트, 폼일 엽산 등을 들 수 있다. 뉴클레오타이드 삼인산으로서, ATP, GTP, CTP, UTP를 들 수 있으며, (1)에 있어서는 ATP 및 GTP가 이용되고, (2)에 있어서는 ATP, GTP, CTP 및 UTP가 이용된다.
- [0094] 완충액으로서, 인산 칼륨 완충액(pH7.3)이 통상 사용된다. 염류로서는, 글루타민산 칼륨, 염화 암모늄, 아세트산 마그네슘, 염화 칼슘, 푸트레신(putrescine), 스페르미딘(spermidine), 다이싸이오트레이톨(dithiothreitol; DTT) 등이 통상 사용된다.

- [0095] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법에는, 공지의 모든 무세포 펩타이드 합성 시스템을 채용할 수 있다. 무세포 펩타이드 합성 시스템의 시판품의 예로서, PUREfrex(진 프론티어, "PUREfrex"는 등록 상표), PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit(New England BioLabs), Human Cell-Free Protein Expression System(다카라 바이오), Rapid Translation System(로슈), Expressway Cell-Free Expression System(인비트로젠) 등을 들 수 있다.
- [0096] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법은, 또한, 태그 부가 폴리펩타이드를 정제하는 것, 태그 부가 폴리펩타이드를 농축하는 것, 태그 부가 폴리펩타이드의 VKKX 태그를 절단하는 것, 목적의 폴리펩타이드를 수식하는 것 등을 포함해도 된다.
- [0097] <폴리펩타이드의 평가 방법>
- [0098] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 평가 방법은, 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 제작 방법에 의하여 폴리펩타이드를 제작하는 것과, 표적 물질에 대한 폴리펩타이드의 결합성을 평가하는 것을 포함한다. 평가의 공정에 있어서 폴리펩타이드는, VKKX 태그가 붙은 태그 부가 폴리펩타이드여도 되고, 태그 부가 폴리펩타이드로부터 VKKX 태그를 제거한 폴리펩타이드여도 된다.
- [0099] 표적 물질에 대한 폴리펩타이드의 결합능을 평가하는 방법으로서 표면 플라즈몬 공명법이 알려져 있지만, 최근, 무세포 펩타이드 합성 시스템을 이용하여 폴리펩타이드를 취득하고, ELISA에 의하여 결합능을 평가하는 방법이 보고되고 있다(Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan, 2017년, 75권, 11호, 1171~1178). 그러나, 무세포 펩타이드 합성 시스템에서는 폴리펩타이드의 아미노산 배열에 따라 발현량에 편차가 발생하는 경우가 있기 때문에, 발현량이 적은 폴리펩타이드의 결합 평가는 곤란하다. 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 평가 방법에 의하면, 폴리펩타이드의 발현량을 많게, 또한, 복수 종류의 폴리펩타이드 사이에서 발현량의 편차를 적게 취득하는 것이 가능하고, 따라서, 보다 다종의 폴리펩타이드의 결합능 등을 평가할 수 있다.
- [0100] 표적 물질은, 생리 활성을 나타내는 모든 화학 물질을 포함하는 용어이며, 화합물, 기, 분자, 단백질, 핵산, 지질, 당질, 이들의 복합체 등을 포함하는 용어이다. 표적 물질은, 예를 들면, 금속 이온, 지질 분자 집합체, 펩타이드, 수용체, 전자 인자, 효소, 보조효소, 조절 인자, 항체, 항원, DNA, RNA, 막소포, 세포외소포, 세포 소기관, 세포, 이들의 단편, 이들의 복합체, 이들의 수식기이다.
- [0101] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 평가 방법의 실시형태의 일례는, 폴리펩타이드와 표적 물질(예를 들면, 표적 단백질을) 접촉시켜 인큐베이트하는 것을 포함한다. 예를 들면, 폴리펩타이드와 표적 물질을 완충액 중에서 접촉시키고, 완충액의 pH 및 온도 및 접촉 시간을 조절하여 인큐베이트한다. 이때, 표적 물질을 고상 담체에 고정해 두고, 고정된 표적 물질에 폴리펩타이드를 접촉시켜도 된다. 혹은, 폴리펩타이드를 고상 담체에 고정해 두고, 고정된 폴리펩타이드에 표적 물질을 접촉시켜도 된다. 고상 담체는, 표적 물질 혹은 폴리펩타이드를 고정할 수 있는 담체이면 제한은 없고, 마이크로타이터 플레이트, 기판, 비즈, 자성 비즈, 나이트로셀룰로스 멤브레인, 나일론 멤브레인, PVDF 멤브레인 등을 들 수 있다. 표적 물질 혹은 폴리펩타이드는, 이들의 고상 담체에 공지의 기술에 의하여 고정된다.
- [0102] 상기의 접촉 후, 표적 물질(예를 들면, 표적 단백질)에 결합된 폴리펩타이드를 정량한다. 폴리펩타이드의 정량에는, 공지의 모든 단백질 정량 기술을 채용할 수 있다. 예를 들면, 젤 전기 영동법, 흡광 광도법, 형광법, ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), 크로마토그래피, 표면 플라즈몬 공명법 등으로 정량한다.
- [0103] 본 개시에 관한 폴리펩타이드의 평가 방법의 실시형태의 일례는, 평가 대상인 폴리펩타이드에 VKKX 태그 이외의 다른 태그(예를 들면, His 태그, HA 태그, FLAG 태그, Myc 태그, HiBiT 태그)도 부가하여 발현시키고, 다른 태그의 기능(예를 들면 발광)을 이용하여, 표적 물질에 결합된 폴리펩타이드를 정량한다.
- [0104] <핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법>
- [0105] 핵산 디스플레이 라이브러리는, 핵산-폴리펩타이드 연결체를 구성 단위로 하여, 복수 개의 핵산-폴리펩타이드 연결체의 집합을 가리킨다. 핵산 디스플레이 라이브러리를 구성하는 핵산-폴리펩타이드 연결체의 클론수 및 카피수에 제한은 없다.
- [0106] 핵산-폴리펩타이드 연결체의 실시형태예로서, mRNA-폴리펩타이드 연결체 또는 cDNA-폴리펩타이드 연결체를 들 수 있다. cDNA-폴리펩타이드 연결체는, mRNA-폴리펩타이드 연결체의 역전사 산물이다.
- [0107] 핵산-폴리펩타이드 연결체에 있어서 핵산과 폴리펩타이드는, 예를 들면 퓨로마이신 링커 또는 리보솜을 개재하

여 연결되어 있다.

- [0108] 핵산-폴리펩타이드 연결체의 폴리펩타이드는, 입체 구조, 아미노산 배열, 아미노산 잔기수, 아미노산의 종류, 및 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 배열에 제한은 없다. 아미노산은, 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 수식화 아미노산 및 그들의 유도체를 포함한다.
- [0109] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법에 의하여 제작되는 핵산 디스플레이 라이브러리에 있어서, 핵산-폴리펩타이드 연결체의 폴리펩타이드는, VKKX 태그가 부가된 태그 부가 폴리펩타이드로서 발현되어 있다.
- [0110] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법은, 핵산으로부터 태그 부가 폴리펩타이드를 발현시켜, 핵산-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것을 포함한다. 핵산은, 개시 코돈의 직후에 배치된 VKKX 태그를 코딩하는 염기 배열과, VKKX 태그를 코딩하는 염기 배열의 하류에 인프레임으로 배치된 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 배열을 갖는다. VKKX 태그는, 배열 번호 1의 아미노산 배열로 이루어지는 태그이다. VKKX 태그는, 배열 번호 2의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 바람직하고, 배열 번호 3의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 보다 바람직하며, 배열 번호 4의 아미노산 배열로 이루어지는 태그가 더 바람직하다.
- [0111] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법은, 주형 핵산의 개시 코돈의 직후에 VKKX 태그를 코딩하는 염기 배열이 배치되어 있음으로써, 발현량이 많고 또한 발현량의 편차가 적은 핵산 디스플레이 라이브러리를 제작할 수 있다.
- [0112] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법의 실시형태의 일례는, mRNA-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것, 및, mRNA-폴리펩타이드 연결체의 mRNA를 역전사하여 cDNA-폴리펩타이드 연결체를 제작하는 것을 포함한다. 본 실시형태에 의하면, 핵산-폴리펩타이드 연결체의 핵산이 DNA이므로, 화학적으로 보다 안정된 핵산 디스플레이 라이브러리가 얻어진다.
- [0113] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법의 실시형태의 일례는, 무세포 펩타이드 합성 시스템에 의하여 실시된다. 무세포 펩타이드 합성 시스템은, (1) 핵산의 번역을 행하는 시스템, 또는, (2) 핵산의 전사 및 번역을 행하는 시스템 중 어느 것이어도 된다. 무세포 펩타이드 합성 시스템의 상세는 상술한 바와 같다. 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법에는, 공지의 모든 무세포 펩타이드 합성 시스템과, 공지의 모든 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 기술을 채용할 수 있다.
- [0114] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법에 있어서, 번역되는 핵산(통상은 mRNA)과 번역 산물의 연결은, 퓨로마이신 링커를 개재한 연결, 리보솜을 개재한 연결 등 중 어느 것이어도 된다. 번역 산물이 적절한 고차 구조를 형성하기 쉬운 관점 및 번역 산물의 기능을 평가하기 쉬운 관점에서, 번역되는 핵산과 번역 산물의 연결은 퓨로마이신 링커를 개재한 연결인 것이 바람직하다.
- [0115] 따라서, 무세포 펩타이드 합성 시스템에 있어서 번역되는 핵산은, 3' 말단에 퓨로마이신 링커가 부가된 핵산인 것이 바람직하다. 핵산에 퓨로마이신을 부가하기 위한 링커로서는, 핵산과 퓨로마이신의 해리를 억제하는 관점에서, 2'-O-메틸화한 핵산 링커 또는 5' 말단에 자외선 가교성 화합물을 갖는 핵산 링커가 바람직하다.
- [0116] 무세포 펩타이드 합성 시스템에 있어서 주형 핵산은, DNA여도 되고 RNA여도 된다. 주형 핵산은, 예를 들면, 랜덤 배열을 포함하는 랜덤 프라이머 세트를 이용하여 오버랩 익스텐션 PCR을 행함으로써 제작된, 2개체 DNA 단편의 집단이다. 랜덤 배열은, 예를 들면, 트리플렛의 반복 배열 [NNK]_m이다(여기에서, m은 양의 정수, N은 각각 독립적으로 A, T, G 또는 C, K는 각각 독립적으로 T 또는 G). 트리플렛[NNK]의 반복수를 임의의 수로 설정하여, 임의의 길이의 펩타이드를 제작할 수 있다. 랜덤 배열은, 종지 코돈의 출현 억제의 관점에서는, 1종류의 아미노산에 대하여 1종류의 코돈을 할당한 트리머올리고뉴클레오타이드인 것이 바람직하다.
- [0117] 주형 핵산은, VKKX 태그 및 목적의 폴리펩타이드 이외의 다른 아미노산 배열을 코딩하는 염기 배열을 포함하고 있어도 된다. 다른 아미노산 배열로서는, 프로테아제 인식 배열, 스페이서 배열, VKKX 태그 이외의 다른 태그를 들 수 있다. 다른 아미노산 배열을 코딩하는 염기 배열은, VKKX 태그를 코딩하는 염기 배열과 목적의 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 배열의 사이에, 또는, 목적의 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 배열의 하류에, 인프레임으로 배치된다.
- [0118] 주형 핵산의 3' 말단 측에는, 폴리펩타이드의 유연성을 높이는 관점에서, 스페이서를 코딩하는 염기 배열이 있는 것이 바람직하다. 스페이서는 예를 들면, 글라이신 및 세린으로부터 선택되는 적어도 1개의 아미노산이다.
- [0119] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법의 실시형태의 일례는, 발현시키는 폴리펩타이드가 비

천연 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드이다. 비천연 아미노산은, 비천연 아미노산; 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산의 수식화 아미노산; 천연 아미노산, 비천연 아미노산 또는 수식화 아미노산의 유도체를 포함한다. 이들 아미노산의 상세는 상술한 바와 같다.

- [0120] 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법의 실시형태의 일례는, 발현시키는 폴리펩타이드가, 제1 관능기를 갖는 아미노산과, 제1 관능기와 공유 결합하는 제2 관능기를 갖는 아미노산을 포함하고, 제1 관능기를 갖는 아미노산과 제2 관능기를 갖는 아미노산의 사이에 2개~28개의 아미노산이 개재되는 폴리펩타이드이다. 발현시키는 폴리펩타이드는, 제1 관능기를 갖는 아미노산과 제2 관능기를 갖는 아미노산의 사이에 6개~16개의 아미노산이 개재되는 폴리펩타이드여도 된다. 이 폴리펩타이드는, 제1 관능기와 제2 관능기가 반응하여 환화할 수 있어, 환상 폴리펩타이드가 될 수 있다. 이 환상 폴리펩타이드 전체의 아미노산 잔기수는, 예를 들면 4개~32개이다.
- [0121] 발현시키는 폴리펩타이드가 상기의 형태일 때, 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법은, 핵산-폴리펩타이드 연결체의 폴리펩타이드가 제1 관능기와 제2 관능기의 공유 결합에 의하여 환화되는 것을 포함한다. 환화는, mRNA-폴리펩타이드 연결체에 있어서 형성되어도 되고, cDNA-폴리펩타이드 연결체에 있어서 형성되어도 된다.
- [0122] 제1 관능기와 제2 관능기는, 공유 결합하는 한, 동일한 종류의 관능기여도 되고, 상이한 종류의 관능기여도 된다. 제1 관능기와 제2 관능기의 조합으로서는, 예를 들면, 싸이올기와 클로로아세틸기, 싸이올기와 싸이올기, 측쇄 중의 카복시기와 측쇄 중의 아미노기를 들 수 있다.
- [0123] 싸이올기를 갖는 아미노산으로서는, 예를 들면, 시스테인을 들 수 있다.
- [0124] 클로로아세틸기를 갖는 아미노산으로서는, 예를 들면, 클로로아세틸다이아미노뷰티르산, 클로로아세틸라이신을 들 수 있다.
- [0125] 측쇄 중에 카복시기를 갖는 아미노산으로서는, 예를 들면, 아스파라긴산, 글루탐산을 들 수 있다.
- [0126] 측쇄 중에 아미노기를 갖는 아미노산으로서는, 예를 들면, 라이신, 아스파라진, 글루타민을 들 수 있다.
- [0127] <스크리닝 방법>
- [0128] 본 개시에 관한 스크리닝 방법은, 본 개시에 관한 핵산 디스플레이 라이브러리의 제작 방법에 의하여 핵산 디스플레이 라이브러리를 제작하는 것과, 핵산 디스플레이 라이브러리로부터 목적의 활성을 갖는 핵산-폴리펩타이드 연결체를 선택하고, 선택한 핵산-폴리펩타이드 연결체의 핵산의 염기 배열을 동정하는 것을 포함한다.
- [0129] "목적의 활성"이란, 예를 들면, 표적 물질에 대한 결합이다. 표적 물질은, 생리 활성을 나타내는 모든 화학 물질을 포함하는 용어이며, 화합물, 기, 분자, 단백질, 핵산, 지질, 당질, 이들의 복합체 등을 포함하는 용어이다. 표적 물질은, 예를 들면, 금속 이온, 지질 분자 집합체, 펩타이드, 수용체, 전사 인자, 효소, 보호소, 조절 인자, 항체, 항원, DNA, RNA, 막소포, 세포외소포, 세포 소기관, 세포, 이들의 단편, 이들의 복합체, 이들의 수식기이다.
- [0130] 본 개시에 관한 스크리닝 방법의 실시형태의 일례는, 핵산 디스플레이 라이브러리와 표적 물질을 접촉시켜 인큐베이트하는 것을 포함한다. 예를 들면, 핵산 디스플레이 라이브러리와 표적 물질을 완충액 중에서 접촉시키고, 완충액의 pH 및 온도 및 접촉 시간을 조절하여 인큐베이트한다. 이때, 표적 물질을 고상 담체에 고정해 두고, 고정된 표적 물질에 핵산 디스플레이 라이브러리를 접촉시켜도 된다. 고상 담체는, 표적 물질을 고정할 수 있는 담체인면 제한은 없고, 마이크로타이터 플레이트, 기관, 비즈, 자성 비즈, 나이트로셀룰로스 멤브레인, 나일론 멤브레인, PVDF 멤브레인 등을 들 수 있다. 표적 물질은, 이들 고상 담체에 공지의 기술에 의하여 고정된다.
- [0131] 상기의 접촉 후, 표적 물질에 결합되어 있는 핵산-폴리펩타이드 연결체를 추출하고, 추출한 핵산-폴리펩타이드 연결체의 핵산의 염기 배열을 동정한다. 염기 배열의 동정은, 핵산 증폭 시스템 및 시퀀서를 이용하여 실시 가능하다.
- [0132] 핵산 증폭 시스템은, 핵산을 주형으로 하여 핵산을 증폭하는 시스템을 가리킨다. 핵산 증폭 시스템의 핵산 증폭 반응은, 폴리머라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), TMA(transcription mediated amplification), NASBA(nucleic acid sequence-based amplification) 등 중 어느 것이어도 된다.
- [0133] 본 개시에 있어서 "시퀀서"는, 제1 세대 시퀀서(캐필러리 시퀀서), 제2 세대 시퀀서(차세대 시퀀서), 제3 세대

시퀀서, 제4 세대 시퀀서, 및 이후 개발되는 시퀀서를 포함하는 용어이다. 시퀀서는, 캐필러리 시퀀서여도 되고, 차세대 시퀀서여도 되며, 그 외의 시퀀서여도 된다. 시퀀서로서는, 해석의 속도, 1회에 처리 가능한 시료 수의 많음 등의 관점에서, 차세대 시퀀서가 바람직하다. 차세대 시퀀서(next generation sequencer, NGS)란, 생어법을 이용한 캐필러리 시퀀서(제1 세대 시퀀서라고 불린다.)에 대비하여 분류되는 시퀀서를 가리킨다. 현재 시점에서 가장 보급되어 있는 차세대 시퀀서는, DNA 폴리메라아제에 의한 상보쇄 합성 또는 DNA 리가제에 의한 상보쇄 결합에 연동된 형광 또는 발광을 포착하여 염기 배열을 결정하는 원리의 시퀀서이다. 구체적으로는, MiSeq(Illumina사, MiSeq는 등록 상표), HiSeq2000(Illumina사, HiSeq는 등록 상표), Roche454(Roche사) 등을 들 수 있다.

[0134] 본 개시에 관한 스크리닝 방법은, 발현량이 많고 또한 발현량의 편차가 적은 핵산 디스플레이 라이브러리를 모집단으로 하므로, 신뢰도가 높은 스크리닝 방법이다.

[0135] 실시예

[0136] 이하에 구체예를 들어, 본 개시에 관한 태그 등을 보다 구체적으로 설명한다. 이하의 구체예에 나타내는 재료, 처리 수순 등은, 본 개시의 취지를 벗어나지 않는 한 적절히 변경할 수 있다. 본 개시에 관한 태그 등의 범위는, 이하에 나타내는 구체예에 의하여 한정적으로 해석되어서는 안 된다.

[0137] 이하의 설명에 있어서, 합성, 처리, 제조 등은, 특별히 설명이 없는 한, 실온(25℃±3℃)에서 행했다. 물질 농도에 관한 백분율은 질량 기준이다.

[0138] <실시예 1: 태그의 아미노산 배열의 검토>

[0139] 대장균에서 유래하는 무세포 펩타이드 합성 시스템에 있어서, 폴리펩타이드의 생합성량에 대한 VKXX 태그의 효과를 조사했다. 생합성하는 폴리펩타이드로서, 시스테인 및 클로로아세틸라이신을 포함하는 인테그린 결합 펩타이드를 선택했다. 이 폴리펩타이드는, 시스테인의 싸이올기와 클로로아세틸라이신의 클로로아세틸기가 자발적으로 싸이오에터 결합을 형성하여, 환상 폴리펩타이드가 된다.

[0140] 인테그린 결합 펩타이드, Myc 태그 및 HiBiT 태그를 이 순서로 연결한 융합 단백질을 설계했다. 인테그린 결합 펩타이드와 Myc 태그의 사이 및 Myc 태그와 HiBiT 태그의 사이에는, 스페이서로서 Gly-Gly-Ser을 각각 삽입했다. 이 융합 단백질의 아미노산 배열이 배열 번호 5이며, 이 융합 단백질을 코드하는 염기 배열이 배열 번호 6이다. 배열 번호 5에 있어서, N 말단으로부터 12번째의 아미노산(즉 알라닌)까지가 인테그린 결합 펩타이드이며, N 말단으로부터 11번째의 아미노산이 클로로아세틸라이신이다. 배열 번호 6의 염기 배열의 5' 말단부터 31~33번째의 트리플렛 TAG를 클로로아세틸라이신의 코돈에 할당한다. 배열 번호 6의 염기 배열의 말미가 종지 코돈 TAA이다.

[0141] 배열 번호 5: ACIPRGDSFAXAGGSEQKLISEEDLGGSVSGWRFLFKKIS(X는 클로로아세틸라이신)

[0142] 배열 번호 6:
GCGTGCATCCGCGCGGCGATTCTTTTGCATAGGCAGGCGGTTCTGAACAGAAACTGATCAGCGAAGAAGATCTGGGTGGCTCTGTAAGTGGATGGCGATTATCAAGAAGATTAGCTAA

[0143] VKXX 태그로서 배열 번호 7~52의 배열과, 이들을 코드하는 염기 배열로서 배열 번호 53~98의 배열을 설계했다. 표 1-1 및 표 1-2에 VKXX 태그의 아미노산 배열 및 염기 배열을 나타낸다. 배열 번호 53~98의 배열은 각각 배열 번호 7~52를 코드하는 염기 배열의 실시형태에이러, 배열 번호 7~52의 배열을 코드하는 염기 배열은 배열 번호 53~98의 배열에 한정되는 것은 아니다.

[0144] [표 1-1]

VKKX 태그		VKKX 태그를 코드하는 염기 배열	
배열 번호	아미노산 배열	배열 번호	염기 배열
7	VKKI	53	GTТАААААААТА
8	VKKK	54	GTТААААААААА
9	VKKT	55	GTТАААААААСА
10	VKKR	56	GTТАААААААСGG
11	VKKS	57	GTТАААААААТСА
12	VKKH	58	GTТАААААААСАТ
13	VKKM	59	GTТААААААААТG
14	VKKP	60	GTТАААААААССТ
15	VKKG	61	GTТАААААААGGC
16	VKKL	62	GTТАААААААСТА
17	VKKV	63	GTТАААААААGTT
18	VKKE	64	GTТАААААААGAA
19	VKKA	65	GTТАААААААGCA
20	VKKD	66	GTТАААААААGAT
21	VKKC	67	GTТАААААААТGT
22	VKKN	68	GTТАААААААААТ
23	VKKY	69	GTТААААААААТАТ
24	VKKQ	70	GTТАААААААСАА
25	VKKW	71	GTТАААААААТGG
26	VKKF	72	GTТАААААААТТТ

[0145]

[0146] [표 1-2]

VKKX 태그		VKKX 태그를 코드하는 염기 배열	
배열 번호	아미노산 배열	배열 번호	염기 배열
27	VKKTKT	73	GTТАААААААСААААСА
28	VKKTKTТ	74	GTТАААААААСААААСАСА
29	VKKTKTД	75	GTТАААААААСААААСАGAT
30	VKKTKTKK	76	GTТАААААААСААААСАААААА
31	VKKTKTKT	77	GTТАААААААСААААСААААСА
32	VKKTKTKD	78	GTТАААААААСААААСАААAGAT
33	VKKTKTТK	79	GTТАААААААСААААСААСАААА
34	VKKTKTТT	80	GTТАААААААСААААСААСАСА
35	VKKTKTDD	81	GTТАААААААСААААСАGATGAT
36	VKKTKTKKT	82	GTТАААААААСААААСААААААСА
37	VKKTKTKKD	83	GTТАААААААСААААСАААААAGAT
38	VKKTKTKTК	84	GTТАААААААСААААСААААСАААА
39	VKKTKTKTТ	85	GTТАААААААСААААСААААСАСА
40	VKKTKTKDК	86	GTТАААААААСААААСАААAGATAA
41	VKKTKTKDT	87	GTТАААААААСААААСАААAGATACA
42	VKKTKTKDD	88	GTТАААААААСААААСАААAGATGAT
43	VKKTKTTKK	89	GTТАААААААСААААСААСАААААА
44	VKKTKTTKT	90	GTТАААААААСААААСААСААААСА
45	VKKTKTTKD	91	GTТАААААААСААААСААСАААAGAT
46	VKKTKTTKTK	92	GTТАААААААСААААСААААААСАААА
47	VKKTKTTKDK	93	GTТАААААААСААААСАААААAGATAA
48	VKKTKTTKKK	94	GTТАААААААСААААСАААААСАААААА
49	VKKTKTTKTTK	95	GTТАААААААСААААСААААСААСАААА
50	VKKTKTTKDKK	96	GTТАААААААСААААСАААAGATAAАААА
51	VKKTKTTKTKK	97	GTТАААААААСААААСААСААСАААААА
52	VKKTKTTKDТT	98	GTТАААААААСААААСААААСАGATACA

[0147]

[0148] 메싸이오닌, VKKX 태그(배열 번호 7~52 중 어느 하나) 및 융합 단백질(배열 번호 5)이 이 순서로 연결된 태그

부가 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열을 설계했다. 이 염기 배열에 있어서는, 개시 코돈 ATG의 직후에 VKKX 태그를 코딩하는 염기 배열(배열 번호 53-98 중 어느 하나)이 배치되고, VKKX 태그를 코딩하는 염기 배열의 직후에 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열(배열 번호 6)이 배치되어 있다.

- [0149] VKKX 태그의 효과를 평가하기 위한 대조예로서, 개시 코돈 ATG의 직후에 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열(배열 번호 6)이 배치되어 있는 염기 배열을 설계했다.
- [0150] 융합 단백질을 발현시키기 위한 주형 DNA로서, 5' 말단으로부터 T7 프로모터 배열, 샤인·달가노 배열 및 태그 부가 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열을 연결한 주형 DNA를 제작했다. 주형 DNA의 제작은, 2단계의 PCR에 의하여 행했다.
- [0151] 1단계째의 PCR에서는, 배열 번호 99의 DNA(GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA)와, VKKX 태그마다의 연결용 DNA를 각각 1nmol/L가 되도록 혼합하고, KOD-Plus-Ver.2(TOYOBO, KOD-211)를 이용하여, 94℃/2분, 98℃/10초, 43℃/30초, 68℃/15초의 4스텝을 행하여 2개의 DNA를 연결했다.
- [0152] VKKX 태그마다의 연결용 DNA의 실시형태예가, 배열 번호 100의 염기 배열을 갖는 DNA이다. 배열 번호 100의 염기 배열을 갖는 DNA는, 배열 번호 27의 VKKX 태그(VKKTKT)를 위한 연결용 DNA이다.
- [0153] 배열 번호 100: CGCGCGGGATGCACGC[TGTTTTGTTTTTTTAAAC]CATTGGTATATCTCCTT
- [0154] 배열 번호 100에 있어서 [] 내의 염기 배열이, 배열 번호 73의 염기 배열(GTTAAAAAACAACAAACA, 배열 번호 27을 코딩하는 염기 배열)에 상보적인 배열이다. VKKX 태그마다의 연결용 DNA에 있어서 [] 내의 염기 배열이, 배열 번호 53~98 중 어느 하나의 배열에 상보적인 배열이다.
- [0155] 이어서, 연결한 DNA에, 배열 번호 101의 포워드 프라이머(GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACC) 및 배열 번호 102의 리버스 프라이머(CCTGCCTATGCAAAGAATCGCCGCGGGATGCAC)를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존 재하, 98℃/10초, 61℃/30초, 68℃/15초의 3스텝을 35사이클 행하여, T7 프로모터 배열로부터 인테그린 결합 펩타이드를 코딩하는 염기 배열의 일부까지를 갖는 DNA 단편을 제작했다. 이 DNA 단편을 정제하고, 50ng/μL로 희석하여, 2단계째의 PCR에 제공했다.
- [0156] 2단계째의 PCR에서는, 1단계째에서 제작한 DNA 단편 및 배열 번호 103의 DNA(GGATTAGTTATTCATTACAGATCTTCTTCGCTGATCAGTTTCTGTTTCAGAACCCTGCTATGCAAAGAATC)를 각각 20pg/μL, 0.2nmol/L가 되도록 혼합하고, KOD-Plus-Ver.2를 이용하여, 94℃/2분, 98℃/10초, 62℃/30초, 68℃/15초의 4스텝을 행하여 2개의 DNA를 연결했다. 이어서, 배열 번호 104의 포워드 프라이머(GAAATTAATACGACTCACTATAG) 및 배열 번호 105의 리버스 프라이머(GGATTAGTTATTCATTACAGATC)를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존 재하, 98℃/10초, 57℃/30초, 68℃/15초의 3스텝을 35사이클 행하여, 목적의 주형 DNA를 얻었다. 제작한 주형 DNA를 정제하여, 50ng/μL로 희석했다.
- [0157] 주형 DNA의 실시형태예가, 배열 번호 106의 염기 배열을 갖는 DNA이다. 배열 번호 106의 염기 배열을 갖는 주형 DNA는, 배열 번호 27의 태그가 부가된 태그 부가 융합 단백질의 주형 DNA이다. 배열 번호 106의 염기 배열에 있어서는, 개시 코돈 ATG의 직후에 배열 번호 73의 염기 배열(배열 번호 27을 코딩하는 염기 배열)이 배치되고, 배열 번호 73의 직후에 배열 번호 6의 염기 배열(융합 단백질을 코딩하는 염기 배열)이 배치되어 있다.
- [0158] 배열 번호 106: GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCAATG[GTTAAAAAACAACAAACA]GCGTGCATCCCGCGCGGATCTTTTGCATAGGCAGGCGTTCTGAACAGAACTGATCAGCGAAGAAGATCTGGTGGCTCTGTAAGTGGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGCTAATGAATAACTAATCC
- [0159] 배열 번호 106에 있어서 [] 내의 염기 배열이, 배열 번호 73의 배열이다. VKKX 태그마다의 주형 DNA에 있어서 [] 내의 염기 배열이, 배열 번호 53~98의 배열 중 어느 하나이다.
- [0160] 비천연 아미노산인 클로로아세틸라이신을 번역하기 위하여, 안티코돈이 CUA이며, mRNA의 UAG 코돈에 대합하는 tRNA를 준비했다. 이 tRNA를 N-클로로아세틸라이신 pdCpA(phospho 2'-deoxyribocytidylylriboadenosine)에스터체로 아미노아실화했다. 이 아미노아실 tRNA를, 아미노아실 tRNA (1)이라고 한다.
- [0161] 폴리펩타이드의 무세포 생합성은, 주형 DNA, PUREfrefx2.0(진 프론티어, PF201-0.25-5) 및 아미노아실 tRNA(1)을 포함하는 번역액 중에서 실시했다. 50ng/μL로 조제한 주형 DNA 1.25 μL(62.5ng), PUREfrefx 2.0 Solution I

2.5 μL, Solution II 0.25 μL, Solution III 0.5 μL, 아미노아실 tRNA (1) 0.5 μL를 혼합하여, 37°C에서 1시간 반응시켰다.

[0162] 생합성한 폴리펩타이드의 양은, ELISA에 의하여 측정했다. 96웰 플레이트의 각 웰에 50ng의 Recombinant Human Integrin αVβ3(R&D systems, 3050-AV-050)을 고정화하고, Blocker Casein in PBS(Thermo, 37528)로 블로킹한 후, 5mmol/L MgCl₂를 포함하는 Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I(TOYOBO, NKB-101)로 희석한 무세포 생합성액을 첨가하여, 실온에서 3시간 반응시켰다. 5mmol/L MgCl₂/0.05% Tween20 함유 PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 세정 후, Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution II(TOYOBO, NKB-101)로 희석한 항Myc 항체(Cell Signaling, 14038S)를 첨가하고, 실온에서 2시간 반응시켰다. 5mmol/L MgCl₂/0.05% Tween20 함유 PBS를 이용하여 세정 후, SuperSignal ELISA Femo Substrate(Thermo, 37075)를 첨가하여, 발광을 측정했다. 농도 기존의 융합 단백질로부터 작성한 검량선을 기초로, 무세포 생합성액 중의 융합 단백질량을 산출했다. 발광 측정을 2회 행하여, 융합 단백질량의 평균값을 산출했다. 대조예의 융합 단백질량을 기준값 1로 한 각 융합 단백질의 생합성량의 상대값을 표 2-1 및 표 2-2에 나타낸다.

[0163] [표 2-1]

VKKX 태그		융합 단백질의 생합성량
배열 번호	아미노산 배열	
-	-	1
7	VKKI	4.40
8	VKKK	6.15
9	VKKT	5.66
10	VKKR	5.75
11	VKKS	6.05
12	VKKH	5.82
13	VKKM	1.94
14	VKKP	2.23
15	VKKG	2.39
16	VKKL	2.71
17	VKKV	2.90
18	VKKE	2.94
19	VKKA	3.01
20	VKKD	3.05
21	VKKC	3.14
22	VKKN	3.17
23	VKKY	3.30
24	VKKQ	3.52
25	VKKW	3.52
26	VKKF	3.69

[0164]

[0165] [표 2-2]

VKKX 태그		융합 단백질의 생합성량
배열 번호	아미노산 배열	
27	VKKTKT	4.94
28	VKKTKTT	6.28
29	VKKTKTD	6.09
30	VKKTKTCK	9.01
31	VKKTKTCT	9.08
32	VKKTKTCKD	8.04
33	VKKTKTCTK	6.54
34	VKKTKTCTT	6.69
35	VKKTKTCTD	5.75
36	VKKTKTCKKT	10.50
37	VKKTKTCKKD	11.45
38	VKKTKTCKTK	8.42
39	VKKTKTCKTT	7.22
40	VKKTKTCKDK	8.49
41	VKKTKTCKDT	6.27
42	VKKTKTCKDD	5.35
43	VKKTKTCTCK	9.45
44	VKKTKTCTCT	7.83
45	VKKTKTCTCKD	7.83
46	VKKTKTCKKTK	9.94
47	VKKTKTCKKDK	8.90
48	VKKTKTCKTKK	10.47
49	VKKTKTCTTK	7.44
50	VKKTKTCKDKK	7.78
51	VKKTKTCTTKK	6.29
52	VKKTKTCTDTT	4.33

[0166]

[0167]

4아미노산으로 이루어지는 배열 번호 7~26의 태그에 의하여, 융합 단백질의 생합성량이 1.9배~6.2배 증가하고 있었다. 도 1은, 배열 번호 7~26의 태그에 대하여 융합 단백질의 생합성량을 나타내는 그래프이며, 태그를 융합 단백질의 생합성량의 순서로 나열한 그래프이다. VKKI, VKKT, VKKR, VKKH, VKKS 및 VKKK의 각 태그에 의하여, 융합 단백질의 생합성량이 4.4배~6.2배로 증가했다. 즉, 4아미노산으로 이루어지는 태그로서는, VKK의 직후에 I(Ile), T(Thr), R(Arg), H(His), S(Ser) 또는 K(Lys)를 배치한 태그가 우위이다.

[0168]

VKKTKT로 이루어지는 태그(배열 번호 27)에 의하여, 융합 단백질의 생합성량이 4.9배로 증가하고 있었다.

[0169]

VKKTKT에 계속해서 T, K 및 D를 1잔기 이상 배치하고, 태그 전체 길이를 10아미노산까지 신장시킴으로써(즉 배열 번호 28~51), 융합 단백질의 생합성량이 5.4배~11.5배로 증가했다. 태그 전체 길이를 11아미노산으로 한 예(즉 배열 번호 52)는, 융합 단백질의 생합성량의 증가가 4.3배였다. 도 2는, 배열 번호 27, 28, 31, 37, 48 및 52의 태그에 대하여 융합 단백질의 생합성량을 나타내는 그래프이다.

[0170]

즉, VKKTKT에 계속해서 T(Thr), K(Lys) 및 D(Asp)를 0~4잔기 배치한 태그(즉 태그 전체 길이 10아미노산 이하)의 우위성이 나타났다.

[0171]

<실시예 2: 태그를 코드하는 염기 배열의 검토>

[0172]

배열 번호 27의 태그(이하, VKKTKT 태그라고 한다.)에 의한 폴리펩타이드의 생합성량의 증가 효과에 대하여, 태그를 코드하는 염기 배열의 GC 함량에 의한 영향을 조사했다. 비교 대조로서, 폴리펩타이드의 생합성량의 증가 효과가 알려져 있는 SKIK 태그를 선택했다(배열 번호 107. SKIK 태그는, 국제 공개공보 2016/204198호에 개시되어 있다.). 생합성하는 폴리펩타이드는, 실시예 1과 동일하게, 인테그린 결합 펩타이드를 포함하는 융합 단백질이다.

[0173]

VKKTKT 태그를 코드하는 염기 배열과 SKIK 태그를 코드하는 염기 배열을 각각 3종류 설계했다. 표 3에 태그의

아미노산 배열 및 염기 배열을 나타낸다.

[표 3]

태그		태그를 코딩하는 염기 배열		
배열 번호	아미노산 배열	배열 번호	염기 배열	GC 함량[%]
107	SKIK	108	AGTAAAATTAAA	8
		109	AGTAAGATTAAG	25
		110	TCGAAGATCAAG	42
27	VKKTKT	73	GTAAAAAAACAAAACA	17
		111	GTAAAGAAAACCAAGACA	33
		112	GTGAAGAAGACCAAGACC	50

메싸이오닌, 태그(배열 번호 107 또는 배열 번호 27) 및 융합 단백질(배열 번호 5)이 이 순서로 연결된 태그 부가 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열을 설계했다. 이 염기 배열에 있어서는, 개시 코돈 ATG의 직후에 태그를 코딩하는 염기 배열(배열 번호 108~112 및 73 중 어느 하나)이 배치되고, 태그를 코딩하는 염기 배열의 직후에 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열(배열 번호 6)이 배치되어 있다.

실시에 1과 동일하게 2단계의 PCR에 의하여 주형 DNA를 제작했다. 1단계의 PCR에서는, 배열 번호 99의 DNA와, 태그마다 설계한 연결용 DNA(실시형태예가 배열 번호 100)를 각각 1nmol/L가 되도록 혼합하고, KOD-Plus-Ver.2(TOYOBO, KOD-211)를 이용하여, 94°C/2분, 98°C/10초, 43°C/30초, 68°C/15초의 4스텝을 행하여 2개의 DNA를 연결했다. 이어서, 배열 번호 101의 포워드 프라이머 및 배열 번호 102의 리버스 프라이머를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존재하, 98°C/10초, 61°C/30초, 68°C/15초의 3스텝을 35사이클 행하여, T7 프로모터 배열로부터 인테그린 결합 펩타이드를 코딩하는 배열의 일부까지를 갖는 DNA 단편을 제작했다. 이 DNA 단편을 정제하고, 50ng/μL로 희석하여, 2단계의 PCR에 제공했다. 2단계의 PCR에서는, 1단계에서 제작한 DNA 단편 및 배열 번호 103의 DNA를 각각 20pg/μL, 0.2nmol/L가 되도록 혼합하고, KOD-Plus-Ver. 2를 이용하여, 94°C/2분, 98°C/10초, 62°C/30초, 68°C/15초의 4스텝을 행하여 2개의 DNA를 연결했다. 이어서, 배열 번호 104의 포워드 프라이머 및 배열 번호 105의 리버스 프라이머를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존재하, 98°C/10초, 57°C/30초, 68°C/15초의 3스텝을 35사이클 행하여, 목적의 주형 DNA(실시형태예가 배열 번호 106)를 얻었다. 제작한 주형 DNA를 정제하여, 50ng/μL로 희석했다.

실시에 1과 동일하게, 무세포 펩타이드 합성 시스템에 의하여 융합 단백질을 발현시키고, ELISA에 의하여 정량했다. 측정을 2회 행하여, 융합 단백질량의 평균값을 산출했다. 대조예의 융합 단백질량을 기준값 1로 한 각 융합 단백질량의 상대값을 표 4에 나타낸다. 기준값 1의 대조예는, 실시에 1과 동일하게, 개시 코돈 ATG의 직후에 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열(배열 번호 6)을 배치한 형태이다.

[표 4]

태그		태그를 코딩하는 염기 배열		융합 단백질의 생합성량
배열 번호	아미노산 배열	배열 번호	GC 함량[%]	
-	-	-	-	1
107	SKIK	108	8	3.79
		109	25	4.18
		110	42	1.46
27	VKKTKT	73	17	4.94
		111	33	3.83
		112	50	3.77

SKIK 태그에 의하여 융합 단백질의 발현량은 증가하고, 증가율은 1.5배~4.2배였다. 발현량 증가의 정도에는, SKIK 태그를 코딩하는 염기 배열의 GC 함량에 의한 영향이 확인되었다.

VKKTKT 태그에 의하여 융합 단백질의 발현량은 증가하고, 증가율은 3.8배~4.9배였다. 발현량 증가의 정도에는, VKKTKT 태그를 코딩하는 염기 배열의 GC 함량에 의한 영향이 거의 없었다. 즉, VKKTKT 태그는, 코딩하는 염기

배열에 관계없이, 융합 단백질의 발현량을 증가시켰다.

[0183] <실시예 3: 번역 조건의 검토>

[0184] 배열 번호 27~52의 VKKX 태그에 의한 폴리펩타이드의 생합성량의 증가 효과에 대하여, 생합성의 인큐베이션 시간을 짧게 해도 그 효과를 발휘할 수 있는지 조사했다. 비교 대조로서, 배열 번호 107의 SKIK 태그를 선택했다. 생합성하는 폴리펩타이드는, 실시예 1과 동일하게, 인테그린 결합 펩타이드를 포함하는 융합 단백질이다.

[0185] 실시예 1에서 제작한 배열 번호 27~52의 VKKX 태그를 코드하는 DNA 배열(배열 번호 73~98)을 포함하는 주형 DNA 및 실시예 2에서 제작한 배열 번호 107의 SKIK 태그를 코드하는 DNA 배열(배열 번호 110)을 포함하는 주형 DNA를 이용하여, 반응 시간을 10분으로 하여 실시예 1과 동일하게 생합성 반응을 행했다. 실시예 1과 동일하게 무세포 펩타이드 합성 시스템에 의하여 융합 단백질을 발현시키고, ELISA에 의하여 정량했다. 측정을 2회 행하여, 융합 단백질량의 평균값을 산출했다. 대조예의 융합 단백질량을 기준값 1로 한 각 융합 단백질량의 상대값을 표 5에 나타낸다. 기준값 1의 대조예는, 실시예 1에서 이용한 대조예와 동일하게, 개시 코돈 ATG의 직후에 융합 단백질을 코드하는 염기 배열(배열 번호 6)을 배치한 형태이다.

[0186] [표 5]

VKKX 태그		융합 단백질의 생합성량
배열 번호	아미노산 배열	
27	VKKTKT	12.81
28	VKKTKT	16.65
29	VKKTKTD	15.90
30	VKKTKTKK	24.42
31	VKKTKTKT	15.48
32	VKKTKTKD	20.56
33	VKKTKTTK	8.17
34	VKKTKT	8.59
35	VKKTKTDD	8.49
36	VKKTKT	13.13
37	VKKTKT	19.84
38	VKKTKT	16.95
39	VKKTKT	7.57
40	VKKTKT	10.77
41	VKKTKT	28.80
42	VKKTKT	14.95
43	VKKTKT	23.35
44	VKKTKT	7.18
45	VKKTKT	10.61
46	VKKTKT	23.47
47	VKKTKT	15.53
48	VKKTKT	36.08
49	VKKTKT	8.75
50	VKKTKT	35.42
51	VKKTKT	15.28
52	VKKTKT	9.15
107	SKIK	1.27

[0187]

[0188] 생합성 반응의 인큐베이션 시간을 10분으로 한 경우에서도, VKKX 태그에 의하여 융합 단백질의 발현량은 증가하고, 증가율은 7.2배~36배였다. 한편, SKIK 태그에 의해서도 융합 단백질의 발현량은 증가했지만, 증가율은 1.3배였다. 즉, VKKX 태그는, 보다 짧은 생합성 반응 시간에서도 발현량 증가 효과를 나타냈다.

[0189] <실시예 4: 펩타이드 길이의 검토>

[0190] 배열 번호 27의 태그(VKKTKT 태그)에 의한 폴리펩타이드의 생합성량의 증가 효과에 대하여, 합성 대상이 되는 폴리펩타이드의 길이에 의한 영향을 조사했다. 생합성하는 폴리펩타이드는, dihydrofolate reductase(DHFR)의

일부 배열 및 발광(HiBiT) 태그를 포함하는 융합 단백질이다.

[0191] DHFR의 일부 배열, 및 HiBiT 태그를 이 순서로 연결한 융합 단백질을 설계했다. DHFR의 일부 배열과 HiBiT 태그의 사이에는, 스페이서로서 Gly-Gly-Ser을 삽입했다. 이들 융합 단백질의 아미노산 배열이 배열 번호 113, 114이며, 각각, DHFR의 N 말단부터 66번째 아미노산까지의 아미노산과 HiBiT 태그의 융합 단백질(80아미노산 길이), DHFR의 N 말단부터 86번째 아미노산까지의 아미노산과 HiBiT 태그의 융합 단백질(100아미노산 길이)이다. 이들 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열이 배열 번호 115, 116이다.

[0192] 배열 번호 113: VGLNLCIVAVSQNMGIKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPGGSVSGWRLFKKIS

[0193] 배열 번호 114: VGLNLCIVAVSQNMGIKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLRELKEPPQAGGSVSGWRLFKKIS

[0194] 배열 번호 115: GTTGGATCCTTGAAGTGCATCGTAGCTGTGAGCCAAAACATGGGAATTGGGAAGAACGGCGATTTACCCTGGCCACCGTTGCGGAATGAATTCGCTATTTT CAGCGTATGACCACCACAAGTTCGGTGAAGGGAACAGAAATCTGGTATCATGGGCAAGAAAACGTGGTTAGCATTCGGAGAAGAATCGTCTCTGGTGGC TCTGTAAGTGGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGC

[0195] 배열 번호 116: GTTGGATCCTTGAAGTGCATCGTAGCTGTGAGCCAAAACATGGGAATTGGGAAGAACGGCGATTTACCCTGGCCACCGTTGCGGAATGAATTCGCTATTTT CAGCGTATGACCACCACAAGTTCGGTGAAGGGAACAGAAATCTGGTATCATGGGCAAGAAAACGTGGTTAGCATTCGGAGAAGAATCGTCTCTGAAAGGC CGTATCAACCTCGTTCTGTACGCGAACTGAAAGAGCCTCCACAAGGTGCAGGTGGCTCTGTAAGTGGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGC

[0196] 메싸이오닌, VKKTKT 태그(배열 번호 27) 또는 SKIK 태그(배열 번호 107) 및 융합 단백질(배열 번호 113 또는 114 중 어느 하나)이 이 순서로 연결된 태그 부가 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열을 설계했다. 이 염기 배열에 있어서는, 개시 코돈 ATG의 직후에 VKKTKT 태그 또는 SKIK 태그를 코딩하는 염기 배열(배열 번호 73 또는 110)이 배치되고, VKKTKT 태그 또는 SKIK 태그를 코딩하는 염기 배열의 직후에 각 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열(배열 번호 115 또는 116 중 어느 하나)이 배치되어 있다.

[0197] VKKTKT 태그 또는 SKIK 태그의 효과를 평가하기 위한 대조예로서, 개시 코돈 ATG의 직후에 각 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열(배열 번호 115 또는 116 중 어느 하나)이 배치되어 있는 염기 배열을 설계했다.

[0198] 융합 단백질을 발현시키기 위한 주형 DNA로서, 5' 말단으로부터 T7 프로모터 배열, 샤인·달가노 배열 및 태그 부가 융합 단백질을 코딩하는 염기 배열을 연결한 주형 DNA를 제작했다. 배열 번호 115, 116의 배열을 포함하는 주형 DNA의 제작은, 3단계의 PCR에 의하여 행했다.

[0199] 1단계째의 PCR에서는, 배열 번호 117에 나타내는 DHFR을 코딩하는 DNA와, 배열 번호 118의 VKKTKT 태그 부가용의 포워드 프라이머 또는 배열 번호 119의 SKIK 태그 부가용의 포워드 프라이머와, 배열 번호 120의 리버스 프라이머를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존재하, 98°C/10초, 61°C/30초, 68°C/15초의 3스텝을 35 사이클 행하여, VKKTKT 태그 또는 SKIK 태그를 부가한 DHFR을 코딩하는 염기 배열의 전체 길이를 갖는 DNA 단편을 제작했다. 이 DNA 단편을 정제하고, 50ng/μL로 희석하여, 2단계째의 PCR에 제공했다.

[0200] 배열 번호 117: GTTGGATCCTTGAAGTGCATCGTAGCTGTGAGCCAAAACATGGGAATTGGGAAGAACGGCGATTTACCCTGGCCACCGTTGCGGAATGAATTCGCTATTTT CAGCGTATGACCACCACAAGTTCGGTGAAGGGAACAGAAATCTGGTATCATGGGCAAGAAAACGTGGTTAGCATTCGGAGAAGAATCGTCTCTGAAA GGCCGTATCAACCTCGTTCTGTACGCGAACTGAAAGAGCCTCCACAAGGTGCACACTTCTTAGCCGAGTCTTGATGATGCCCTGAAACTGACTGAACAG CCCGAATTAGCGAACAAAGTCGATATGGTCTGGATTGTAGGTGGCTCTCCGTGTACAAAGAAGCGATGAATCATCCGGGTCATCTGAAACTGTTTGTACG CGATTATGCAGGACTTTGAATCGGATACCTTCTTCCGGAAATTGACCTCGAGAAATACAAACTGTTACCGGAATATCCGGGTGTTCTGTCTGATGTGCAG GAAGAGAAAGGCATCAAATACAAATTCGAAGTCTATGAGAAGAACGAC

[0201] 배열 번호 118: AAGGAGATATACCAATGGTTAAAAAACAACAAACAGTTGGATCCTTGAAGTGCAT

[0202] 배열 번호 119: AAGGAGATATACCAATGTGCAAGATCAAGGTTGGATCCTTGAAGTGCAT

[0203] 배열 번호 120: TTAGTCGTTCTTCTCATAGA

[0204] 2단계째의 PCR에서는, 1단계째에서 제작한 DNA 단편 및 배열 번호 99의 DNA를 각각 1nmol/L가 되도록 혼합하고, KOD-Plus-Ver.2(TOYOB0, KOD-211)를 이용하여, 94°C/2분, 98°C/10초, 43°C/30초, 68°C/15초의 4스텝을 행하여 2개의 DNA를 연결했다.

[0205] 이어서, 연결한 DNA에, 배열 번호 101의 포워드 프라이머와, 배열 번호 121 또는 122의 리버스 프라이머 중 어느 하나를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존재하, 98℃/10초, 61℃/30초, 68℃/15초의 3스텝을 35 사이클 행하여, T7 프로모터 배열로부터 DHFR을 코드하는 염기 배열의 일부를 갖는 DNA 단편을 제작했다. 이 DNA 단편을 정제하고, 50ng/μL로 희석하여, 3단계제의 PCR에 제공했다.

[0206] 배열 번호 121: AGGACGATTCTTCTCCGAAT

[0207] 배열 번호 122: TGCACCTGTGGAGGCTCTTT

[0208] 3단계제의 PCR에서는, 2단계제에서 제작한 DNA 단편과, 배열 번호 123 또는 124의 DNA를 각각 1nmol/L가 되도록 혼합하고, KOD-Plus-Ver.2(TOYOBO, KOD-211)를 이용하여, 94℃/2분, 98℃/10초, 43℃/30초, 68℃/15초의 4스텝을 행하여 2개의 DNA를 연결했다.

[0209] 배열 번호 123: GGATTAGTTATTCATTAGCTAATCTTCTTGAATAATCGCCATCCACTTACAGAGCCACCAGGACGATTCTTCTCCGAAT

[0210] 배열 번호 124: GGATTAGTTATTCATTAGCTAATCTTCTTGAATAATCGCCATCCACTTACAGAGCCACTGCACCTTGTGGAGGCTCTTT

[0211] 이어서, 연결한 DNA에, 배열 번호 101의 포워드 프라이머 및 배열 번호 105의 리버스 프라이머를 각각 0.3 μmol/L 첨가하고, KOD-Plus-Ver.2 존재하, 98℃/10초, 61℃/30초, 68℃/15초의 3스텝을 35사이클 행하여, T7 프로모터 배열로부터 융합 단백질을 코드하는 염기 배열을 갖는 DNA 단편을 제작했다. 이 DNA 단편을 정제하여, 50ng/μL로 희석했다.

[0212] 실시예 1에서 이용한 무세포 펩타이드 합성 시스템과 동일한 무세포 펩타이드 합성 시스템을 이용하고, 생합성의 인큐베이션 시간을 10분으로 하여 융합 단백질을 발현시켰다. 얻어진 융합 단백질은, Nano Glo HiBiT Lytic Detection System(프로메가, N3040)을 이용하여 정량했다. 측정을 2회 행하여, 융합 단백질량의 평균값을 산출했다. 대조예의 융합 단백질량을 기준값 1로 한 각 융합 단백질량의 상대값을 표 6에 나타낸다. 기준값 1의 대조예는, 개시 코돈 ATG의 직후에 융합 단백질을 코드하는 염기 배열(배열 번호 115 또는 116)을 배치한 형태이다.

[0213] [표 6]

태그		융합 단백질		융합 단백질의 생합성량
배열 번호	아미노산 배열	배열 번호	아미노산 길이	
-	-	113	80	1
27	VKKTKT	113	80	1.67
107	SKIK	113	80	1.13
-	-	114	100	1
27	VKKTKT	114	100	1.24
107	SKIK	114	100	0.73

[0214]

[0215] 통상, 아미노산의 길이가 길어짐에 따라 번역 촉진 효과는 작아지지만, VKKTKT 태그는, 80~100아미노산 길이의 융합 단백질에 대해서도 번역 촉진 효과를 나타내고, 촉진 효과는 1.2배~1.7배였다. 이 효과는, SKIK 태그보다 우수한 효과였다.

[0216] <실시예 5: 태그 부가 펩타이드의 결합능 평가>

[0217] 본 개시에 관한 태그 배열의 부가에 의하여 폴리펩타이드를 고수량(收量)으로 취득 가능한 점에서, 고농도 폴리펩타이드의 결합 평가에 의하여 결합능의 중요 지표인 Emax값 및 EC50값을 정확하게 측정 가능하게 된다고 생각된다. 즉, 본 개시에 관한 태그 배열을 활용한 폴리펩타이드의 생합성 방법 및 제작한 폴리펩타이드는, 결합능의 평가에 활용할 수 있다고 생각된다. 따라서, 배열 번호 27의 VKKTKT 태그를 부가한 폴리펩타이드를 이용하여 결합 평가를 실시 가능한지를 조사했다.

[0218] 대장균에서 유래하는 무세포 펩타이드 합성 시스템과, 배열 번호 27의 태그 배열, 인테그린 결합 펩타이드부터 HiBiT 태그까지를 코드하는 주형 DNA 배열(배열 번호 106)을 이용하여, 인테그린 결합 펩타이드를 고수량으로 생합성하고, 얻어진 펩타이드의 인테그린 결합능을, 각 펩타이드 농도에 있어서의 인테그린에 대한 펩타이드 결합량을 ELISA 평가함으로써 측정했다. 주형 DNA의 제작 방법, 펩타이드의 무세포 생합성 방법, ELISA 작업의 상세는 실시예 1과 동일하다. 펩타이드 농도의 측정은 5mmol/L MgCl₂를 포함하는 Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I(TOYOBO)에서 5000배 희석한 펩타이드를, Nano Glo HiBiT Lytic Detection System(Promega)과 이미 알려진 농도의 검량선용 화학 합성 펩타이드(배열 번호 125)를 이용하여, Nano Glo HiBiT Lytic Detection System의 표준 프로토콜에 따라 측정했다.

[0219] 배열 번호 125: EQKLISEEDLGGSVSGWRLFKKIS

[0220] 또, 비교 대조로서, 인테그린 결합 펩타이드의 결합능(Kd값)을 SPR법으로 측정했다. 인테그린 결합 펩타이드(배열 번호 126)를 화학 합성하고, CM5 칩(Cytiva, BR100530)에 아민 커플링법으로 고상화했다. Biacore T-100(Cytiva)을 이용하여, 고상화한 인테그린 결합 펩타이드의, Recombinant Human Integrin $\alpha V\beta 3$ (R&D systems, 3050-AV-050)에 대한 결합능을 측정했다. 측정 버퍼에는, HBS-N 버퍼(Cytiva, BR100670)에 종농도 5mmol/L가 되도록 $MgCl_2$ 를 첨가하여 사용하고, 인테그린은 10, 30, 100, 300nmol/L의 농도로 10분간 첨가했다. CM5 칩은 500mmol/L EDTA의 10분간 첨가를 2회 반복함으로써 재생, 사용했다.

[0221] 배열 번호 126: CEPRGDNYRXGGSKKK(X는 클로로아세틸라이신)

[0222] ELISA의 발광 측정 결과와, Nano Glo HiBiT Lytic Detection System을 이용하여 측정한 인테그린 결합 펩타이드량으로부터, 본 인테그린 결합 펩타이드의 EC50값을 구한 결과, 7.7nM가 되고(도 3), SPR법으로 측정한 Kd값(EC50값과 대략 동일한 의미) 7.6nM과 합치했다. 본 결과는, 태그 배열을 이용한 생합성에 의하여 펩타이드를 고수량으로 취득 가능, 고농도 펩타이드의 결합 평가를 행할 수 있기 때문에, Emax값 및 결합능의 중요 지표인 EC50값을 정확하게 측정 가능한 것을 나타내고 있다.

[0223] <실시예 6: VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리로부터의 인테그린 결합 펩타이드 스크리닝>

[0224] VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리로부터, 표적 물질에 결합하는 폴리펩타이드를 취득 가능한 것을 조사했다. 구체적으로는 표적 물질로서 인테그린을 이용하여, 추출한 폴리펩타이드군에 공지의 결합 모티프(아미노산 배열 RGD)를 갖는 폴리펩타이드가 포함되는지 어떤지를 조사했다.

[0225] VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리로서 배열 번호 127~128의 배열을 이용했다. 이들 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리는, 5' 말단부터 86~88번째의 개시 코돈(ATG)으로부터 번역이 시작되고, 89~106번째의 염기(GTTAAGAAAACAAAACA)가 VKKX 태그, 107~142번째의 염기(NNNTGT(NNN)₈TAGNNN(NNN은 트리머올리고뉴클레오타이드, 여기에서, N은 각각 독립적으로 A, T, G 또는 C를 나타낸다))가 랜덤 배열, 143번째 이후의 염기가 퓨로마이신 링커의 결합부 및 중지 코돈이다. 본 랜덤 배열 중의 트리플렛 TAG는 클로로아세틸라이신의 코돈에 할당되어 있기 때문에, 본 랜덤 배열이 코드하는 폴리펩타이드는 실시예 1과 동일하게, 시스테인의 싸이올기와 클로로아세틸라이신의 클로로아세틸기가 자발적으로 싸이올에터 결합을 형성하여, 환상 폴리펩타이드가 된다. 배열 번호 127~128의 배열을 갖는 핵산에 있어서, NNN으로 나타나는 트리머올리고뉴클레오타이드는, 1종류의 아미노산에 대하여 1종류의 코돈을 할당한, 표 7에 나타내는 18종류의 코돈에 대응하는 트리머올리고뉴클레오타이드의 등량 혼합물이다.

[0226] [표 7]

아미노산(1문자 표기)	할당 코돈	아미노산(1문자 표기)	할당 코돈
A	GCT	N	ACC
I	ATC	Q	CAG
L	CTG	R	CGT
V	GTT	H	CAT
F	TTC	K	AAA
W	TGG	D	GAC
Y	TAC	E	GAA
S	TCT	G	GGT
T	ACT	P	CCG

[0227]

[0228] 배열 번호 127: GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAGAAAACAAA AACANNNTGT(NNN)₈TAGNNNGTGGCTCTGGCGGTAGCAGGACGGGGGGCGGGGGTAAATAAATAAGCTTGAGTAT(NNN은 트리머올리고뉴클레오타이드, 여기에서, N은 각각 독립적으로 A, T, G 또는 C를 나타낸다)

[0229]

배열 번호 128: GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAGAAAACAAA AACANNNTGT(NNN)₈TAGNNNGTGGCTCTGGCGGTAGCAGGACGGGGGGCGGGAGCGGGAATAAATAAGCTTGAGTAT(NNN은 트리머올리고뉴클레오타이드, 여기에서, N은 각각 독립적으로 A, T, G 또는 C를 나타낸다)

[0230] [표 8]

조건	라이브러리 배열 번호	라이브러리 제작용 DNA 배열 번호	퓨로마이신 링커 배열 번호	UV 조사 유무	증폭용 DNA 배열 번호	RGD 모티프 함유 펩타이드의 존재율
1	127	131	133	유	131	93%
2	127	131	134	유	131	96%
3	127	131	135	무	131	93%
4	128	132	135	무	132	87%

[0231]

[0232]

배열 번호 127~128의 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리는, 오버랩 익스텐션 PCR을 행함으로써 제작했다. 구체적으로는, 배열 번호 127~128의 라이브러리에 대하여, 배열 번호 129의 DNA, 배열 번호 130의 DNA, 및 표 8에 기재되는 배열 번호 131~132 중 어느 하나의 DNA의 3종의 DNA를 표 8의 조합으로, 각각 3 μmol/L, 1 μmol/L, 1 μmol/L가 되도록 혼합하고, Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase(Thermo, 12361010) 존재하, 98℃/30초 후, 98℃/10초, 60℃/10초, 72℃/10초의 3스텝을 7사이클 반복하며, 마지막에 72℃/5분의 처리를 행함으로써, 3개의 DNA를 연결하여, 목적의 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리를 제작했다. 제작한 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리를 정제하고, 2ng/μL로 희석했다. 배열 번호 130의 DNA에 있어서, NNN으로 나타나는 트리머올리고뉴클레오타이드는, 1종류의 아미노산에 대하여 1종류의 코돈을 할당한, 표 7에 나타내는 18종류의 코돈에 대응하는 트리머올리고뉴클레오타이드의 등량 혼합물이다.

[0233]

배열 번호 129: GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAAACAA AAC

[0234]

배열 번호 130: AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAAACAAAAACANNNTGT(NNN)₈TAGNNNGCGGTTCTGGCGGTAGC(NNN은 트리머 올리고뉴클레오타이드, 여기에서, N은 각각 독립적으로 A, T, G 또는 C를 나타낸다)

[0235]

배열 번호 131: ATACTCAAGCTTATTTATTATTACCCCGCCGCCCGCTCCTGCTACCGCCAGAACCACC

[0236]

배열 번호 132: ATACTCAAGCTTATTTATTATCCCGCTCCCGCCCGCTCCGCTACCGCCAGAACCACC

[0237]

표적 물질(인테그린)로서 Recombinant Human Integrin αVβ3(R&D systems, 3050-AV-050)을 이용하고, 자성 비즈(NHS Mag Sepharose, Cytiva, 28951380)에 메이커(Cytiva) 지정 프로토콜로 고상화(고상화 시 인테그린 농도: 1 μg/μL)했다.

[0238]

VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리와 표적 물질(자성 비즈 고상화 인테그린)을 접촉시켜 인큐베이트하는 공정을 함께 4라운드 반복한 후, 시퀀서를 이용하여 핵산-폴리펩타이드 연결체의 핵산의 염기 배열을 동정했다.

[0239]

각 라운드의 구체적 수순은 하기와 같다. 먼저, 제작한 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리(배열 번호 127~128)를 T7 RNA Polymerase(TaKaRa, 2540A) 존재하, 37℃에서 30분간 반응시킴으로써 라이브러리 전사물을 제작했다. 이 DNA 단편을 정제하고, 10 μM로 희석했다.

[0240]

다음으로 TBS 버퍼(1.25mM Tris, 25mM NaCl, pH7.5) 중에서, 라이브러리 전사물(중농도 5 μM), 표 9의 배열 번호 133~136의 란에 나타난 퓨로마이신 링커(중농도 10 μM)를 표 8의 조합으로 혼합한 후, 95℃에서 5분간 반응시키고, 자외선 가교성 화합물(PsoralenC6)을 갖는 퓨로마이신 링커를 포함하는 혼합액에는 10J의 UV(365nm)를 빙상에서 조사함으로써, 라이브러리 전사물과 퓨로마이신 링커의 복합체를 제작했다.

[0241] [표 9]

배열 번호	핵산 배열
133	5'-(PsoralenC6)-TACCCCGCGCCCGCTCCT-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'
134	5'-(PsoralenC6)-UACCCCGCGCCCGGUCCU-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'
135	5'-UACCCCGCGCCCGGUCCU-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'
136	5'-CCCGCCUCCCGCCCGGUCC-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-(Sp18)-CC-(Puro)-3'

[0242]

[0243]

*PsoralenC6, Sp18, Puro의 구조는 도 4 참조.

[0244]

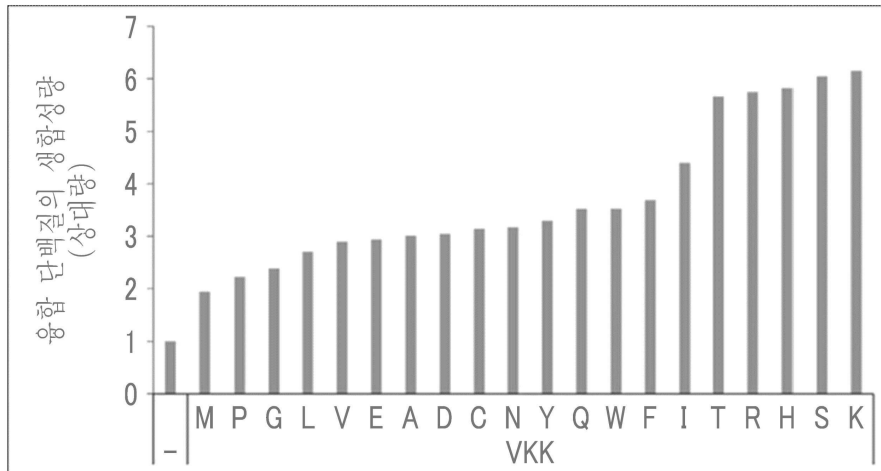
*밑줄 표기의 뉴클레오타이드는 RNA의 2'OH가 2'OMe체가 된 것이며, 밑줄이 그어져 있지 않은 뉴클레오타이드는 미수식의 DNA를 나타낸다.

- [0245] 배열 목록에 있어서는, 배열 번호 133~136은 본체부(즉, 링커 및 CC는 포함하지 않는 부분)의 배열만을 나타낸다.
- [0246] 라이브러리 전사물과 퓨로마이신 링커의 복합체를, PUREfrefx2.0(진 프론티어, PF201-0.25-5) 및 아미노아실 tRNA(실시에 1과 동일)를 포함하는 번역액 중에서 번역했다. 복합체 10 μ L, PUREfrefx2.0 Solution I 4.5 μ L, Solution II 0.75 μ L, Solution III 0.75 μ L, 아미노아실 tRNA(1) 3 μ L을 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응시킴으로써 mRNA-폴리펩타이드 연결체를 제작했다.
- [0247] 번역 산물 15 μ L와 배열 번호 137의 DNA(중농도 10 μ M)를 ReverTra Ace(TOYOBO, TRT-101) 존재하에서 혼합하고(반응 체적 37.5 μ L), 37°C에서 30분간 반응시킴으로써 역전사를 행하여, cDNA-mRNA-폴리펩타이드 연결체를 제작한다.
- [0248] 배열 번호 137: GCTACCGCCAGAACCACC
- [0249] 이어서 역전사 산물 22.5 μ L를 자성 비즈 고상화 인테그린 10 μ L와, HBS 버퍼(10mM Hepes, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH7.5) 중에서 혼합하고(반응 체적 37.5 μ L), 실온에서 45분간 반응 후, 자성 비즈를 HBS 버퍼 100 μ L로 3회 세정함으로써, 인테그린에 결합하는 cDNA-mRNA-폴리펩타이드 연결체를 추출했다. 추출한 cDNA-mRNA-폴리펩타이드 연결체를 하기 2단계의 PCR로 증폭했다.
- [0250] 1단계의 PCR에서는, cDNA-mRNA-폴리펩타이드 연결체 25 μ L를, 배열 번호 138의 DNA(중농도 0.5 μ M), 배열 번호 139의 DNA(중농도 0.5 μ M)와 혼합하고(반응 체적 50 μ L), Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase(Thermo, 12361010) 존재하, 98°C/30초 후, 98°C/10초, 60°C/10초, 72°C/10초의 3스텝을 6~15사이클 반복하며, 마지막에 72°C/5분의 처리를 행함으로써, 증폭 산물을 얻었다. 증폭 산물을 정제하고, 20nM로 희석했다.
- [0251] 배열 번호 138: GGAGATATACATATGGTTAAGAAAACAAAAC
- [0252] 배열 번호 139: CTGCTACCGCCAGAACCACC
- [0253] 2단계의 PCR에서는, 1단계의 PCR 증폭 산물(중농도 10nM)을, 배열 번호 129의 DNA(중농도 0.5 μ M), 표 8에 기재되는 배열 번호 131~132 중 어느 하나의 DNA(중농도 0.5 μ M)와 혼합하고, Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase(Thermo, 12361010) 존재하, 98°C/30초 후, 98°C/10초, 60°C/10초, 72°C/10초의 3스텝을 6사이클 반복하며, 마지막에 72°C/5분의 처리를 행함으로써, 원래의 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리와 랜덤 배열을 제외하고 동일한 배열의 DNA를 얻었다. 제작한 VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리를 정제하고, 2ng/ μ L로 희석하여, 후속 라운드에 이용했다.
- [0254] 4라운드째의 1단계의 PCR 산물의 염기 배열을, MiSeq(Illumina사제)와 MiSeq Reagent Kit V2(300cycle)(illumina, MS-102-2022)를 이용하여, Illumina사 표준 프로토콜로 동정했다. 동정한 폴리펩타이드군 내에 있어서는, 공지된 인테그린 결합 모티프(아미노산 배열 RGD)를 갖는 폴리펩타이드의 비율을 표 8에 나타낸다.
- [0255] 본 결과는, VKKX 태그 함유 핵산 디스플레이 라이브러리로부터, 표적 물질에 결합하는 폴리펩타이드를 취득 가능하다는 것을 나타내고 있다.
- [0256] 2021년 9월 27일에 출원된 일본 특허출원 2021-157186호의 개시는, 그 전체가 참조에 의하여 본 명세서에 인용된다.
- [0257] 본 명세서에 기재된 모든 문헌, 특허출원, 및 기술 규격은, 개개의 문헌, 특허출원, 및 기술 규격이 참조에 의하여 인용되는 것이 구체적이고 또한 개개에 기록된 경우와 동일한 정도로, 본 명세서 중에 참조에 의하여 인용된다.
- [0258] [배열표]

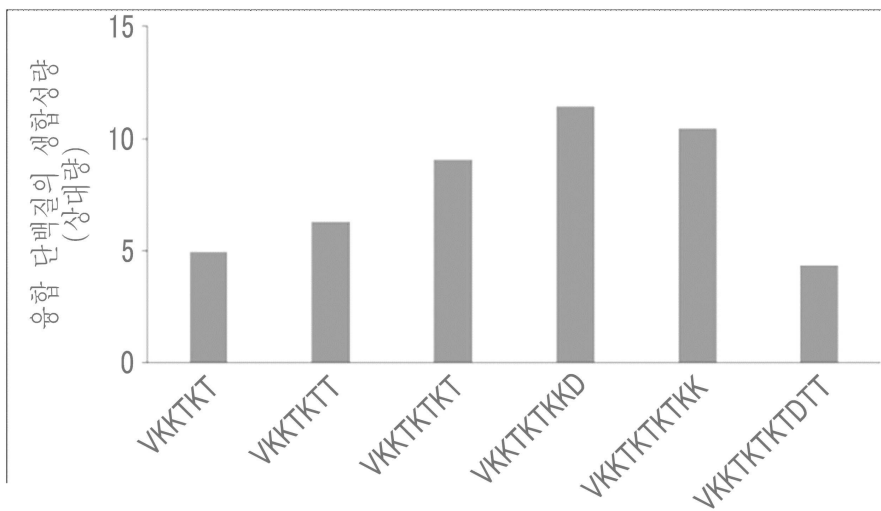
[0259] [국제특허협력조약에 근거하는 국제출원원 21F00801W1JP22035787_11.xml](#)

도면

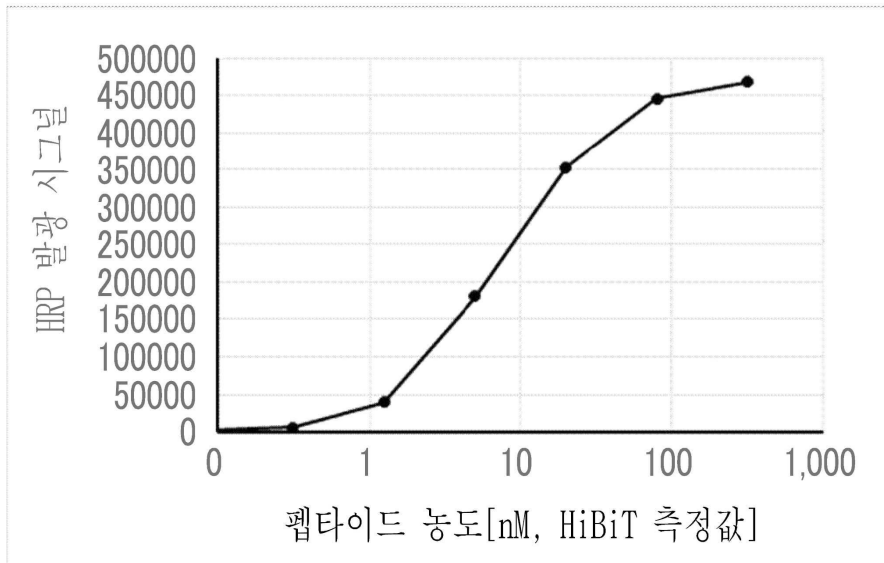
도면1



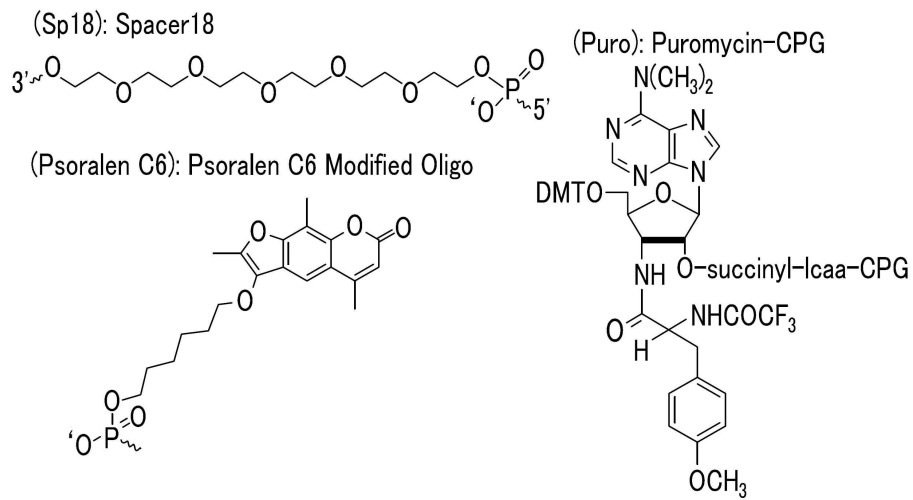
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.