

明 細 書

発明の名称：ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド、当該ペプチドを含む組成物、及び当該ペプチドの利用に関する。

背景技術

[0002] TGF- β （形質転換増殖因子：transforming growth factor β ）は、TGF- β ファミリーに属するサイトカインで、多くの機能を有する。TGF- β ファミリーにはTGF- β の3つのアイソフォーム（TGF- β 1、 β 2及び β 3）やその他の多くのシグナル伝達タンパク質が含まれる。TGF- β は、細胞の増殖や分化の制御、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質の産生及び沈着促進に影響するなど、多くの機能を有することが知られている。TGF- β を介したシグナル伝達経路は、例えばがん細胞の増殖、転移や血管新生、免疫応答制御などに関係することが知られている（特表2021-100972）。そのため、TGF- β の機能に作用する物質、特にTGF- β シグナル伝達を阻害する又は弱めるような化合物、例えばTGF- β アンタゴニストの医薬品への適用について研究開発が求められている。また、TGF- β シグナル経路は細胞の増殖・生存・分化に大きな影響を有することから、培地への添加剤としても検討されている。

[0003] TGF- β アンタゴニスト活性を有する物質としては、例えば抗体（WO 01/066140、WO2012/030394）や低分子（WO2015/103355）等が知られており、それらを用いた腎機能不全、心筋梗塞の治療薬などが研究されている。また近年TGF- β のもつ腫瘍免疫抑制作用に注目し免疫チェックポイント阻害剤とTGF- β 中和抗体との併用も研究されている。

[0004] しかしながら、TGF- β 結合活性、TGF- β アンタゴニスト活性を有

するペプチドについては、報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2021-100972

特許文献2：WO01/066140

特許文献3：WO2012/030394

特許文献4：WO2015/103355

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Massague, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2012; 13 (10).

非特許文献2：Zhang et al., Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017; 9 (4).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明者らは、TGF- β 結合活性、好ましくは、TGF- β アンタゴニスト活性を有するペプチドを創出することを目的として鋭意研究に努めた結果、本発明を想到した。本発明は、ペプチド、当該ペプチドを含む組成物、及び当該ペプチドの利用を提供する。

課題を解決するための手段

[0008] 非限定的に、本出願は以下の発明を含む。

[1]

以下のアミノ酸配列：

F-NaI1-V-V-N-V-Y-D-D-PeG-V-NaI1-Y
-H-V-C-G（配列番号2）；

あるいは、

上記のアミノ酸配列の2番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目、12番目、13番目、14番目、15番目及び17番目のアミノ酸残基

からなるグループから選択される、1-11個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列を含む、ペプチド。

[2]

以下のアミノ酸配列：

F-X1-V-X2-N-V-X3-X4-X5-X6-V-X7-X8
-X9-X10-C（配列番号1）

ここにおいて、

X1は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

X2は、任意のアミノ酸であり；

X3は、任意のアミノ酸であり；

X4は、任意のアミノ酸であり；

X5は、任意のアミノ酸であり；

X6は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸であり；

X7は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

X8は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

X9は、任意のアミノ酸であり；

X10は、任意のアミノ酸である、

を含む、ペプチド。

[3]

X1が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である、[2]に記載のペプチド。

[4]

X1が、NaI1、W6N、W7N又はWである、[2]に記載のペプチド。

[5]

X2が、V、K、KCOpipzaa、KCOMeglumine又はQ

である、[2] – [4] のいずれか1項に記載のペプチド。

[6]

X2が、V、K、KCOpipzaa、又はKCOMeglumineである、[2] – [4] のいずれか1項に記載のペプチド。

[7]

X3が、Y、4Py、A、E、F4G、Q、K、F3G、又は3Pyである、[2] – [6] のいずれか1項に記載のペプチド。

[8]

X3が、Y又は4Pyである、[2] – [6] のいずれか1項に記載のペプチド。

[9]

X4が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、[2] – [8] のいずれか1項に記載のペプチド。

[10]

X4が、D、A、Q、K又はEである、[2] – [8] のいずれか1項に記載のペプチド。

[11]

X5が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、[2] – [10] のいずれか1項に記載のペプチド。

[12]

X5が、D、E、KCOpipzaa、KCOMeglumine、A、Q、又はKである、[2] – [10] のいずれか1項に記載のペプチド。

[13]

X6が、PeG、K又はMeGである、[2] – [12] のいずれか1項に記載のペプチド。

[14]

X7が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である、[2] – [13] のいずれか1項に記載のペプチド。

[1 5]

X 7 が、N a l 1、W 6 N、又はWである、[2] – [1 3] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[1 6]

X 8 が、Y、4 P y、3 P y又はEである、[2] – [1 5] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[1 7]

X 8 が、Y又は4 P yである、[2] – [1 5] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[1 8]

X 9 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、[2] – [1 7] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[1 9]

X 9 が、H、A、Q又はEである、[2] – [1 7] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[2 0]

X 1 0 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、[2] – [1 9] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[2 1]

X 1 0 が、V、E、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e、Q、K、又はAである、[2] – [1 9] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[2 2]

配列番号 2 – 3 3、あるいは、

配列番号 2、4 – 1 3、1 5 – 3 3 のうち C 末端のグリシン (G) を有しないアミノ酸配列

のいずれかに 1 つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、[1] – [2 1] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[2 3]

前記ペプチドが、環状ペプチドである、[1] – [22] のいずれか1項に記載のペプチド。

[24]

クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する、[23]に記載の環状ペプチド。

[25]

さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、[1] – [24] のいずれか1項に記載のペプチド。

[26]

そのC末端にリンカーを含む、[1] – [21]、[23] – [25] のいずれか1項に記載のペプチド。

[27]

TGF- β 結合活性を有する、[1] – [26] いずれか1項に記載のペプチド。

[28]

TGF- β アンタゴニスト活性を有する、[1] – [27] いずれか1項に記載のペプチド。

[29]

[1] – [28] のいずれか1項に記載のペプチドを含む、医療用、診断用組成物。

[30]

[1] – [28] のいずれか1項に記載のペプチドを含む、研究用組成物であって、ただし、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く、前記研究用組成物。

発明の効果

[0009] 本発明のペプチドは、TGF- β 結合活性、そして、好ましくは、TGF- β アンタゴニスト活性を有する。がんや肝疾患等の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等として有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 図1は、TGF- β 1、TGF- β 2に対する、TGF β 1__012（配列番号13）のSBEレポーターアッセイによる阻害活性測定の結果を示す。図1中、黒丸はTGF- β 1を示し、黒四角はTGF- β 2を示す。横軸はTGF- β 1__012（配列番号13）の濃度（nM）を、縦軸は阻害活性を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 1. 略語

本明細書において、特に明記しない限り、以下の略語は下記の意味で使用される。

[0012] 略語（一般）

Å：オングストローム（単位）；

ClAc：クロロアセチル；

DCM：ジクロロメタン；

DMSO：ジメチルスルホキシド；

DMF：ジメチルホルムアミド；

DEA又はDEA：N，N-ジイソプロピルエチルアミン；

DICI：N，N'-ジイソプロピルカルボジイミド；

DODT：6-ジオキサ-1，8-オクタン-ジチオール；

Fmoc：9-フルオレニルメチルオキシカルボニル；

NHS：N-ヒドロキシコハク酸イミド；

g：グラム（単位）；

HATU：O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N，N，N'，N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩；

HOSu：N-ヒドロキシスクシンイミド；

HPLC：高速液体クロマトグラフィー；

LC-MSもしくはLC/MS：液体クロマトグラフィー質量分析計；

mL：ミリリットル（単位）；

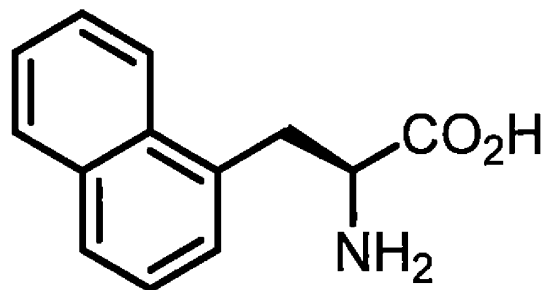
M : モーラー (単位) ;
 μ L : マイクロリットル (単位) ;
m M : ミリモーラー (単位) ;
 μ M : マイクロモーラー (単位) ;
m g : ミリグラム (単位) ;
M e C N : アセトニトリル ;
m m : ミリメートル (単位) ;
 μ m : マイクロメートル (単位)
n M : ナノモーラー (単位) ;
O S u : スクシンイミド ;
P E G : ポリエチレングリコール ;
r p m : 回転毎分 (単位) ;
t B u : ターシャリーブチル ;
M p e : メチルペンタン-3-イル ;
B o c : t e r t -ブトキシカルボニル ;
T F A : トリフルオロ酢酸 ;
T I S : トリイソプロピルシラン ;
T r t 又は T r : トリチル基 ;
T I P S : トリイソプロピルシリル基。

[0013] 略語 (非天然アミノ酸)

N a l 1 : 1-ナフチル-L-アラニン (C A S N o. 5 5 5 1 6 - 5
4 - 6) ;

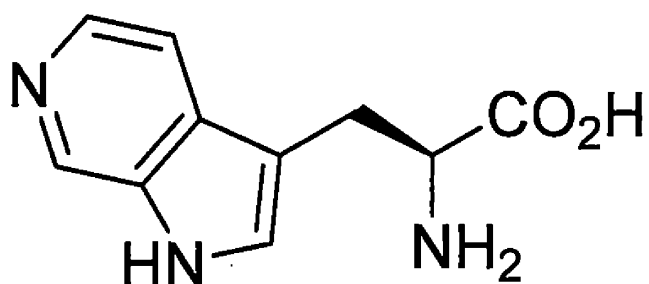
[0014]

[化1]



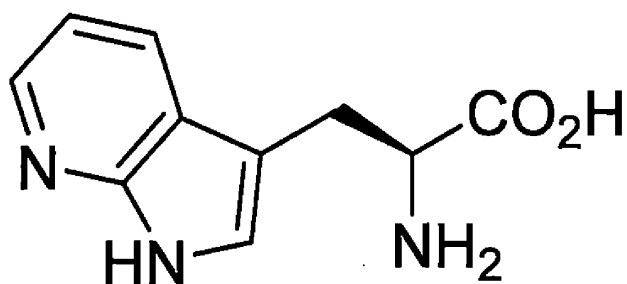
[0015] W6N : 6-アザー-トリプトファン (CAS No. 149704-63-2) ;

[0016] [化2]



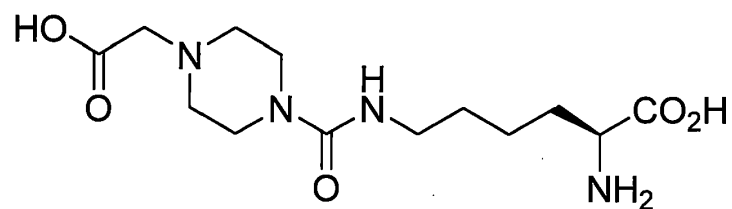
[0017] W7N : L-7-アザトリプトファン (CAS No. 49758-35-2) ;

[0018] [化3]



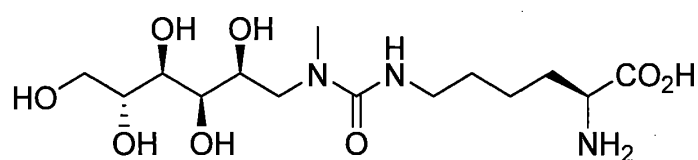
[0019] KCOpipzaa : N6-(4-(カルボキシメチル) ピペラジン-1-カルボニル)-L-リシン (CAS No. N/A) ;

[0020] [化4]



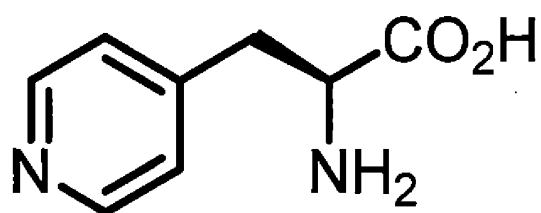
[0021] KCOmeglumine: N6-(メチル((2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル)カルバモイル)-L-リシン;

[0022] [化5]



[0023] 4Py: 4-ピリジル-L-アラニン (CAS No. 37535-49-2);

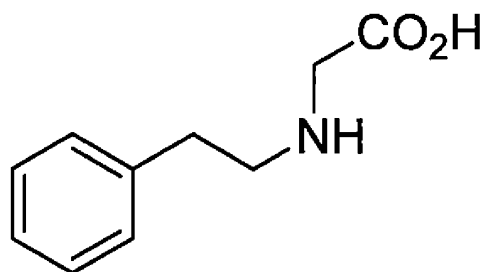
[0024] [化6]



[0025] PeG: フェネチルグリシン (CAS No. 7738-38-7);

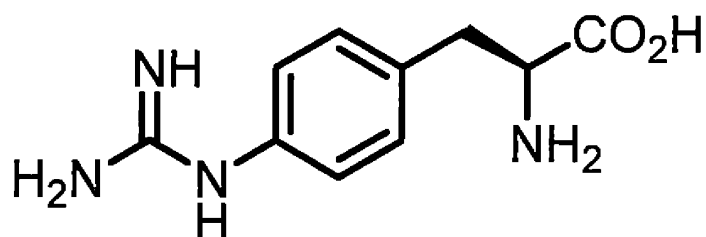
[0026]

[化7]



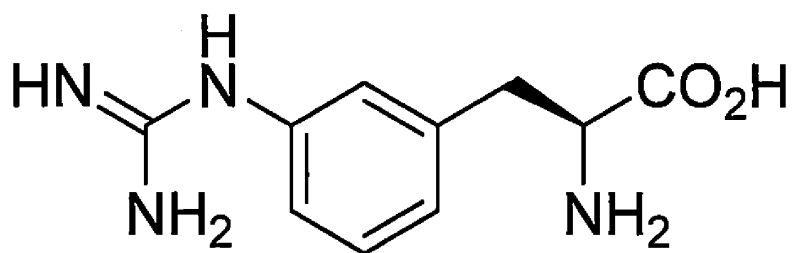
[0027] F4G : p-グアニジノーL-フェニルアラニン (CAS No. 59574-11-7) ;

[0028] [化8]



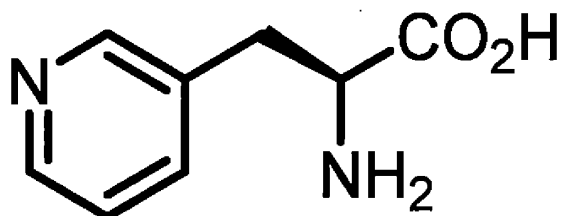
[0029] F3G : 3-[(アミノイミノメチル)アミノ]-L-フェニルアラニン (CAS No. 1019057-42-1) ;

[0030] [化9]



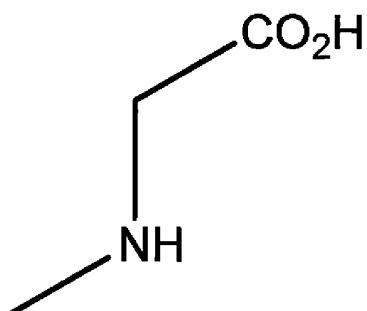
[0031] 3Py : 3-(3-ピリジル)-L-アラニン (CAS No. 64090-98-8) ;

[0032] [化10]



[0033] MeG : メチルグリシン (CAS No. 107-97-1) ;

[0034] [化11]



[0035] PEG10c : 1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24、27、30-デカオキサトリリアコンタン-33-オイック酸 ;

MePEG8c : 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサヘキサコサン-26-オイック酸 ;

OCOmPEG10000 : メトキシポリエチレングリコールカーボネート (平均分子量10, 000)。

[0036] 2. ペプチド (A)

本発明は、ペプチドに関する。

[0037] 一態様において、本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列 :

F-NaI1-V-V-N-V-Y-D-D-PeG-V-NaI1-Y
-H-V-C-G (配列番号2) ;

あるいは、

上記のアミノ酸配列の2番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目、12番目、13番目、14番目、15番目及び17番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-11個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列を含む、ペプチド。

[0038] 配列番号2は、本願明細書の実施例において、TGF- β 結合活性、及び、TGF- β アンタゴニスト活性を有することが確認されたペプチドである。

[0039] 配列番号2のアミノ酸配列の2番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目、12番目、13番目、14番目、15番目及び17番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-11個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有していてもよい。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸の数は、1個以上10個以下であればよく、その下限は1個である。その上限は10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個であり、最小1個である。好ましくは、アミノ酸の「置換」である。かかるアミノ酸の置換は、好適には保存的アミノ酸置換である。

[0040] 「保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価又は類似のアミノ酸との置換を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つ又は二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造及び機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の(チオール)フォームと比較してより極性の低い、酸化

型の（ジスルフィド）フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的及び機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖（トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）はイオン？芳香族相互作用又は陽イオン？ π 相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性又は非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的及び機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン（ジスルフィド・フォーム）等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

[0041] 保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換（例えば、レーニンジャ、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁：L. Lehninger、Biochemistry、2nd edition、pp73?75、Worth Publisher、New York（1975）に記載の置換）及び典型的置換を含む。

[0042] また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のように天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けたグループにおいて、あるアミノ酸が属するグループと同じグループに属するアミノ酸への置換が好ましい。

[0043] 疎水性（非極性とも言う）アミノ酸：疎水性（非極性）を示すアミノ酸であって、アラニン（「Ala」又は単に「A」とも記す）、グリシン（「Gly」又は単に「G」とも記す）、バリン（「Val」又は単に「V」とも記す）、ロイシン（「Leu」又は単に「L」とも記す）、イソロイシン（「Ile」又は単に「I」とも記す）、プロリン（「Pro」又は単に「P」とも記す）、フェニルアラニン（「Phe」又は単に「F」とも記す）、トリプトファン（「Trp」又は単に「W」とも記す）、チロシン（「Tyr」又は単に「Y」とも記す）、メチオニン（「Met」又は単に「M」とも記す）を含む。

[0044] なお、疎水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

[0045] 脂肪族アミノ酸：側鎖に脂肪酸又は水素を有するアミノ酸であって、Al

a、G l y、V a l、l l e、L e uを含む。

[0046] 脂肪族・分岐鎖アミノ酸：側鎖に分岐型脂肪酸を有するアミノ酸であって、V a l、l l e、L e uを含む。

[0047] 芳香族アミノ酸：側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、T r p、T y r、P h eを含む。

[0048] 親水性（極性とも言う）アミノ酸：親水性（極性）を示すアミノ酸であって、セリン（「S e r」又は単に「S」とも記す）、スレオニン（「T h r」又は単に「T」とも記す）、システイン（「C y s」又は単に「C」とも記す）、アスパラギン（「A s n」又は単に「N」とも記す）、グルタミン（「G l n」又は単に「Q」とも記す）、アスパラギン酸（「A s p」又は単に「D」とも記す）、グルタミン酸（「G l u」又は単に「E」とも記す）、リジン（リシンとも記す。「L y s」又は単に「K」とも記す）、アルギニン（「A r g」又は単に「R」とも記す）、ヒスチジン（「H i s」又は単に「H」とも記す）を含む。

[0049] なお、親水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

[0050] 酸性アミノ酸：側鎖が酸性を示すアミノ酸であって、A s p、G l uを含む、

塩基性アミノ酸：側鎖が塩基性を示すアミノ酸であって、L y s、A r g、H i sを含む。

[0051] 中性アミノ酸：側鎖が中性を示すアミノ酸であって、S e r、T h r、A s n、G l n、C y sを含む。

[0052] また、G l y及びP r oについては、「主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸」に分けることもでき、側鎖に硫黄分子を含むアミノ酸、C y s及びM e tは、「含硫アミノ酸」に分けることもできる。

[0053] また、側鎖に芳香族を有するグループとして、T r p、T y r、P h eが含まれる。

[0054] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のア

ミノ酸がN-アルキル化されたN-アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級（例えば、C1-C5の、好ましくは、C1-C3、より好ましくはC1）のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。N-アルキルアミノ酸においては、好ましくはN-エチルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸又はN-メチルアミノ酸であり、さらに好ましくはN-メチルアミノ酸である。また、非天然のアミノ酸には、D型アミノ酸（D-アミノ酸とも記する）、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸（例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基やアルキル基のC数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換された構造を有するアミノ酸誘導体等複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

[0055] なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加又は置換等されることで、天然のアミノ酸とは異なる性質を付与することができる。すなわち、天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けた、前述のグループに、同様の側鎖の性質を有する非天然アミノ酸を含めることが出来る。このように、あるアミノ酸と同様の側鎖の性質を示す非天然アミノ酸についても、保存的アミノ酸置換の対象として含むことができる。

[0056] 非限定的に、非天然のアミノ酸には、N-メチルアミノ酸、4Py、NaI1、W6N、W7N、KCOpipzaa、KCOmeglumine、PeG等を含む。

例えば、NaI1、PeGは疎水性アミノ酸に、4Py、W7N、W6Nは親水性アミノ酸に分けることができ、さらに、4Py、W7N、W6Nは塩基性アミノ酸、4Py、NaI1、PeG、W6N、W7Nは芳香族アミノ

酸に分けることもできる。なお、N-メチルアミノ酸については、N-アルキルアミノ酸として分類することもでき、N-メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0057] D-アミノ酸は、D-アミノ酸として分類することもできるが、その側鎖の性質に従い分類することもでき、N-メチルアミノ酸については、N-アルキルアミノ酸として分類することもでき、N-メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0058] 前記ペプチドは、非限定的に、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」については、「3. ペプチド (B)」で詳述する。本明細書において、「非限定的に」、「一態様において」は、同義に用いられ得る。

[0059] 前記ペプチドは、一態様において、配列番号2に加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。「付加的なアミノ酸残基」については、「3. ペプチド (B)」で詳述する。

[0060] 前記ペプチドは、一態様において、リンカーを好ましくはC末端に含んでもよい。「リンカー」については、「3. ペプチド (B)」で詳述する。配列番号2のC末端(17番目のアミノ酸残基)の「G」は、リンカーである。一態様において、前記ペプチドは、G以外のリンカー、例えばPEGリンカーを有しても良い。あるいは、C末端のGに加えて、さらに別のリンカーを有しても良い。例えば、グリシン-リッチペプチド等の態様も含まれる。

[0061] 前記ペプチドは、好ましくは、TGF- β 結合活性、さらに好ましくは、TGF- β 1結合活性を有する。前記ペプチドは、好ましくは、TGF- β アンタゴニスト活性を有する。「TGF- β 1結合活性を有する」、「TGF- β アンタゴニスト活性を有する」については、「3. ペプチド (B)」で詳述する。

[0062] 本明細書における「ペプチド」は、特に言及しない限り、ペプチド (A) 及びペプチド (B) の双方を含む。

[0063] 3. ペプチド (B)

本発明はペプチドに関する。

[0064] 本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

F-X1-V-X2-N-V-X3-X4-X5-X6-V-X7-X8
-X9-X10-C（配列番号1）

ここにおいて、

X1は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

X2は、任意のアミノ酸であり；

X3は、任意のアミノ酸であり；

X4は、任意のアミノ酸であり；

X5は、任意のアミノ酸であり；

X6は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸であり；

X7は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

X8は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

X9は、任意のアミノ酸であり；

X10は、任意のアミノ酸である、

を含む。

[0065] 「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」とは、側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、例えば芳香環としてフェニル基やインドール環を有し、その一部のCなどがNなど他の分子への置換があってもよい。芳香族環は複素環であってもよい。また、例えば、チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されているようなアミノ酸であってもよい。「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、一態様において、好ましくは側鎖に縮合環を有するアミノ酸である。例えば、インドール環やナフタレン構造を有するアミノ酸であってよく、さらにその一部のCなどがNなど他の分子への置換があってもよい。置換基は特に限定されず、アルキル基、シクロアルキル基、水酸基、ハロゲン等に任意に選択される。「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等を含む。非天然型アミノ

酸、例えば、N a l 1、W 6 N、W 7 N又はWであってもよい。

[0066] 「側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸、例えば、リシン、アラニン、プロリン、グリシン、ロイシン等であって、これらのアミノ酸の側鎖が、置換されていても、置換されていなくてもよいアミノ酸である。アルキル基は、鎖状でも環状でもよい。「置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸」とは、二級アミノ酸であって、環状又は鎖状構造を有する、任意の天然又は非天然のアミノ酸を含む。

[0067] 一態様において、「側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸」、「置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸」の側鎖が置換されている場合、置換基は特に限定されない。側鎖のアルキル基の末端に官能基を有しても良い。末端に結合する官能基としては、例えば、非限定的に、アミノ基や、ベンジル基などが挙げられる。

[0068] X 1 - X 1 0 の上記選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。

[0069] 一態様において、X 1 が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である。一態様において、X 1 が、N a l 1、W 6 N、W 7 N又はWである。

[0070] 一態様において、X 2 が、V、K、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e又はQである。一態様において、X 2 が、V、K、K C O p i p z a a、又はK C O m e g l u m i n eである。一態様において、X 2 はEではない。

[0071] 一態様において、X 3 が、Y、4 P y、A、E、F 4 G、Q、K、F 3 G、又は3 P yである。一態様において、X 3 が、Y又は4 P yである。

[0072] 一態様において、X 4 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。「芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等である。「含硫アミノ酸」は、例えば、メチオニン、システイン等である。一態様において、X 4 が、D、A、Q、K又はEである。一態様において、X 4 が、

Dである。

[0073] 一態様において、X 5 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。一態様において、X 5 が、D、E、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e、A、Q、又はKである。一態様において、X 5 が、D、E、K C O p i p z a a又はK C O m e g l u m i n eである。

[0074] 一態様において、X 6 が、P e G、K又はM e Gである。一態様において、X 6 が、P e gである。一態様において、X 6 は、A、N、Q、S（D体）、P（D体）ではない。

[0075] 一態様において、X 7 が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である。一態様において、X 7 が、N a l 1、W 6 N、又はWである。一態様において、X 7 が、N a l 1である。一態様において、X 7 は、A、Q、K、Eではない。

[0076] 一態様において、X 8 が、Y、4 P y、3 P y又はEである。一態様において、X 8 が、Y又は4 P yである。一態様において、X 8 は、A、Q、K、F 3 G、F 4 Gではない。

[0077] 一態様において、X 9 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。「芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン等である。「含硫アミノ酸」は、例えば、メチオニン、システイン等である。一態様において、X 9 が、H、A、Q又はEである。一態様において、X 9 が、Hである。

[0078] 一態様において、X 1 0 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。「芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等である。「含硫アミノ酸」は、例えば、メチオニン、システイン等である。一態様において、X 1 0 が、V、E、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e、Q、K、又はAである。一態様において、X 1 0 が、V、E、K C O p i p z a a又はK C O m e g l u m i n eである。

- [0079] X1-X10の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。
- [0080] 前記ペプチドは、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」は、ペプチド中の2つのアミノ酸が結合し、その全部又は一部が環状になっているものをいう。当該2つのアミノ酸同士の結合型に特に限定されない。一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基との間のアミド結合、一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のチオール基との間のチオエステル結合、一方のアミノ酸のチオール基と他方のアミノ酸のチオール基との間のジスルフィド結合、ラクタム環形成又はマクロ環化反応により環状構造を形成したものや、ラッセペプチド状構造を有するもの等も環状ペプチドに包含される。ただし、当該2つのアミノ酸同士がアミド結合により結合している場合、当該アミド結合は一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基が結合することにより形成されたものに限られず、合成反応の結果としてアミド結合により結合しておればよい。他の結合型についても同様である。好ましくは、後述のクロロアセチル化アミノ酸とシステイン残基の結合による環状化である。
- [0081] 前記環状ペプチドは、その一部が環状構造を形成するものであればよく、直鎖部を有していてもよい。
- [0082] ペプチドは、一般的に生体内において代謝安定性が悪く、またサイズが大きいため細胞膜を透過しづらいという問題がある。そのような課題に対し、ペプチドを環状化させるという方法がとられてきた。ペプチドを環状化すると、プロテアーゼ耐性が向上し代謝安定性が向上し、またコンフォメーション変化にも制限が加わるため、剛直性が増して膜透過性や標的タンパク質との親和性が向上することが示唆されてきた。
- [0083] 一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸

残基)と、前記ペプチドに含まれる16番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したN末端アミノ酸(1番目のアミノ酸残基)と、前記ペプチドに含まれる16番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。「クロロアセチル化」は、他のハロゲンによる「ハロゲンアセチル化」でもよい。また、「アセチル化」は、アセチル基以外のアシル基による「アシル化」でもよい。

[0084] 本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も包含する。例えば、上述したように、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合がある、このような、クロロアセチル基が付加された各種(天然/非天然)アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。一態様において、前記ペプチドは、

配列番号2-33、あるいは、

配列番号2、4-13、15-33のうちC末端のグリシン(G)を有しないアミノ酸配列

のいずれかに1つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる。

[0085] 一態様において、前記ペプチドは、

配列番号2-33、あるいは、

配列番号2、4-13、15-33のうちC末端のグリシン(G)を有しないアミノ酸配列

のいずれかに1つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、環状ペプチドである。

[0086] 一態様において、前記ペプチドは、配列番号34-69、あるいは、配列番号34-69のうちC末端のグリシン(G)を有しないアミノ酸配列のいずれかに1つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる。

[0087] 一態様において、前記ペプチドは、配列番号34-69、あるいは、配列番号34-69のうちC末端のグリシン(G)を有しないアミノ酸配列のい

ずれかに1つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、環状ペプチドである。

[0088] 前記ペプチドは、配列番号2-33、あるいは、配列番号2、4-13、15-33のうちC末端のグリシン（G）を有しないアミノ酸配列、のいずれかに加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。前記ペプチドは、配列番号34-69、あるいは、配列番号34-69のうちC末端のグリシン（G）を有しないアミノ酸配列のいずれかに1つのアミノ酸配列のいずれかに加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。

[0089] 付加的なアミノ酸残基は、環状構造を成すペプチドに含まれてもよいし、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されていてもよい。ペプチド、ペプチド部位のアミド結合の数（アミノ酸の数・長さ）は特に限定されない。総アミノ酸残基（環状構造を成すペプチドに含まれるアミノ酸残基数をいい、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されている場合は、それらのアミノ酸は含めない）が22残基以内が好ましい。好ましくはアミノ酸が6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上であり、好ましくはアミノ酸が20以下、19以下、18以下である。更に好ましくはアミノ酸が15以上18以下であり、最も好ましくはアミノ酸が16又は17である。

[0090] また、環状ペプチドからさらにリンカーが付加されていてもよい。リンカーとしては、例えば、前述のアミノ酸リンカー（ペプチドリンカー）、化学リンカー、脂肪酸リンカー、核酸リンカー、糖鎖リンカーなどが挙げられ、また、例えば化学リンカーとペプチドリンカーなどの複合体であってもよい。化学リンカーとしては、例えば、PEG（Polyethylene glycol）リンカーである。例えば、1～24個のエチレングリコール単位からなるPEGリンカーであってよい。また、リンカーは、脂肪酸から誘導される二価化学部分を含む脂肪酸リンカーでもよい。アミノ酸（ペプチド）リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸を含むリンカーであり、例えば、米国特許第7,271,149号に記載のような、配列[Gly-Gly-G

l y - G l y - S e r] n (式中、nは1、2、3、4、5又は6である)を有するペプチドなどのグリシン-リッチペプチドや、米国特許第5, 525, 491号に記載のセリン-リッチペプチドリンカーを用いることができる。非限定的に、リンカーの付加によりペプチドの物性(例えば溶解度)が変化する場合がある。

[0091] リンカーの付加位置については、どこに付加されていても良い。例えば、C末端側に位置するC y sに結合していてもよく、環状ペプチドに含まれるアミノ酸に結合していても良い。好ましくはC末端側に位置するC y sに結合しているか、環状ペプチドに含まれるアミノ酸の側鎖に結合しているものである。一態様において、リンカーはC末端に含まれる。

[0092] リンカーの付加は単独でもよく、あるいは、リンカーは同種のもの又は異なるものを複数個付加されていてもよい。例えば、アミノ酸リンカーとしてG l y - L y sが結合し、さらに当該L y sの側鎖末端にP E Gリンカーが結合したかたちであってよい。

[0093] さらに、前記ペプチドは、リンカーなどを介して多量体を形成していてもよい。この場合において、前記ペプチドは、同じ配列を有するペプチドからなるホモマーであってもよく、別の配列を有するペプチドからなるヘテロマーであってもよい。

[0094] 配列番号2、4-13、15-33のC末端のグリシン(G)は、リンカーである。配列番号2のペプチドについて上述したのと同様に、一態様において、前記ペプチドは、G以外のリンカーを有しても良い。あるいは、C末端のGに加えて、さらに別のリンカーを有しても良い。

[0095] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、T G F - β 結合活性、さらに好ましくは、T G F - β 1 結合活性又はT G F - β 2 結合活性を有する。

[0096] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、T G F - β 1 結合活性及びT G F - β 2 結合活性を有する。

[0097] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、T G F - β アンタゴニス

ト活性、さらに好ましくは、 $TGF-\beta 1$ アンタゴニスト活性又は $TGF-\beta 2$ アンタゴニスト活性を有する。さらに一態様において、好ましくは、 $TGF-\beta$ アンタゴニスト活性を有するペプチドは、 $TGF-\beta 1$ 結合活性を有する。なお、「 $TGF-\beta 1$ 結合活性を有する」とは、 $TGF-\beta 1$ のみに対する結合活性に限られるものではなく、 $TGF-\beta 2$ に対して結合を有していてもよい。

[0098] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、 $TGF-\beta 1$ アンタゴニスト活性及び $TGF-\beta 2$ アンタゴニスト活性を有する。また、好ましくは、 $TGF-\beta 1$ アンタゴニスト活性及び $TGF-\beta 2$ アンタゴニスト活性を有するペプチドは、 $TGF-\beta 1$ 結合活性及び $TGF-\beta 2$ 結合活性を有する。

[0099] $TGF-\beta$ (形質転換増殖因子: *transforming growth factor* β) は、 $TGF-\beta$ ファミリーに属するサイトカインで、哺乳動物で3種類のアイソフォーム ($TGF-\beta 1$, $-\beta 2$, $-\beta 3$) が存在する。さらに、構造的に類似した $TGF-\beta$ スーパーファミリーには、アクチビンや BMP (骨形成誘導因子) などが含まれる。

[0100] 本発明の態様となる「 $TGF-\beta$ 」は、 $TGF-\beta 1$ 及び／又は $TGF-\beta 2$ であり、好ましくは $TGF-\beta 1$ である。本明細書において、「 $TGF-\beta$ 」とは、特に明記しない場合は、 $TGF-\beta 1$ のことを指す。

[0101] $TGF-\beta$ は、I 型と II 型の受容体サブユニットから構成されるセリン／スレオニンキナーゼ型受容体に結合し、Smad のリン酸化を介してシグナルを伝達することで生体において様々な反応を引き起こす。例えば、細胞の増殖や分化の制御、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質の産生及び沈着促進に影響するなど、多くの機能を有することが知られている (Massague, 2012; Zhang et al., 2017)。

[0102] $TGF-\beta$ は、非限定的に、哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジー等の霊長類、ラット、マウス、及びウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒ

ツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物の TGF- β 、好ましくはヒトの TGF- β 、さらに好ましくはヒト TGF- β 1 (NCBI GENE ID: 7040)、ヒト TGF- β 2 (NCBI GENE ID: 7042) を含む。

[0103] 「TGF- β 1 結合活性」とは、TGF- β 1 に特異的に結合する活性、又は TGF- β 1 及び TGF- β 2 の両方に特異的に結合する活性、を意味する。

[0104] 非限定的に、TGF- β 1 に対する本発明のペプチドの結合状態は、親和性定数 K_a 、解離定数 K_d (KD とも記す)、結合速度定数 k_{on} 、及び解離速度定数 k_{off} などを指標として表すことができる。

[0105] 親和性定数 K_a 及び解離定数 K_d は、平衡状態にある 2 分子間の結合親和性、すなわち結合の強さを示す指標であり、解離定数 K_d は親和性定数 K_a の逆数である。そして解離定数 K_d の値が小さいほど、結合が強いことを意味する。一方、平衡状態にある 2 分子間の結合・解離反応の速さは、反応速度論的解析によって求められる結合速度定数 k_{on} 及び解離速度定数 k_{off} によって示され、 $K_d = k_{off} / k_{on}$ である。従って同等の解離定数 K_d を示す場合でも、ゆっくり会合するがゆっくり解離する場合 (k_{on} と k_{off} の値が共に小さい) と、速やかに会合し速やかに解離する場合 (k_{on} と k_{off} の値が共に大きい) とがあり、それぞれの結合保持状態は全く異なる。

[0106] 前記ペプチドの TGF- β に対する結合状態を示すこれらの親和性定数 K_a 、解離定数 K_d (KD とも記す)、結合速度定数 k_{on} 、及び解離速度定数 k_{off} などは、当業者に周知の任意の分子間相互作用測定法を用いて決定することができる。

[0107] TGF- β に対する前記ペプチドの結合状態は、公知の方法によって測定することができる。例えば、表面プラズモン共鳴スペクトル解析 (SPR) によって測定することができる。非限定的に、表面プラズモン共鳴スペクトル解析は、例えば、バイオセンサー (生体分子間相互解析装置) である B I

ACOREシステム（BIACORE社）を用いて行うことができる。

- [0108] 前記ペプチドのTGF- β 結合活性の指標の1つとしてK_d解離定数がある。解離定数K_dが低いほど結合活性（親和性）が高い。表面プラズモン共鳴スペクトル解析によれば、前記ペプチドと例えばヒトTGF- β との結合に関する解離定数K_dは、非限定的に、50 nM以下、30 nM以下、20 nM以下、15 nM以下、10 nM以下、8 nM以下、6 nM以下、5 nM以下である。前記ペプチドとヒトTGF- β との結合の解離定数K_dの下限は特に限定されない。非限定的に、前記ペプチド解離定数K_dは、0.01 nM以上、0.05 nM以上、0.1 nM以上、0.2 nM以上、0.3 nM以上、0.4 nM以上、0.5 nM以上である。非限定的に、前記ペプチドの解離定数K_dは、0.01-50 nM、好ましくは0.05-30 nM、さらに好ましくは0.2-15 nM、特に好ましくは0.3-10 nM、最も好ましくは0.4-6 nMである。
- [0109] TGF- β に対する前記ペプチドの結合は、例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着法）によって調べることも可能である。ELISAは、例えば、TGF- β 1 ビーズとC末端にHAタグ配列を付加したペプチドを用い、結合活性を調べることによって、行ってもよい。
- [0110] 非限定的に、前記ペプチドとTGF- β との結合は、好ましくは非共有結合である。
- [0111] 一態様において、前記ペプチドは実施例1-6の化学式に示した環状の構造を有する。
- [0112] 「TGF- β アンタゴニスト活性」は、TGF- β がTGF- β 受容体に結合し作用することを阻害又は減弱させる活性をいう。本発明においては、特に、TGF- β に結合することでアンタゴニスト作用を及ぼすものが好ましい。
- [0113] 「TGF- β アンタゴニスト活性」は、例えば、SBEレポーター-HEK293細胞系（BP Bioscience）を用いたSBEレポーターアッセイによって、評価してもよい。非限定的に、TGF- β で誘導される

シグナルの最大値を0%阻害、無刺激を100%阻害としてペプチドの阻害活性を算出することができる。非限定的に、適切な濃度、例えば、最適濃度のペプチドを使用した場合、阻害活性が、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上阻害される。

[0114] 4・ペプチドの製造

本発明のペプチドは、例えば以下のような、ペプチド製造のための任意の公知の方法によって、製造することができる。

[0115] 液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法；

遺伝子組み換え法、等

固相法は、例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 α -アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール（MSNT）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。

[0116] 次に、第一アミノ酸の α -アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第一及び第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸の α -アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第二及び第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドが合成されたら、すべての官能基を脱保護する。

[0117] 固相合成のレジンとしては、例えば、Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HM

FS resin、Amino-PEGA resin (メルク社)、HMPA-PEGA resin (メルク社) 等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤 (ジメチルホルムアミド (DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等) で洗浄してから用いることができる。

[0118] α -アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル (Cbz 又は Z) 基、tert-ブトキシカルボニル (Boc) 基、フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル (Alloc) 基等が挙げられる。Cbz 基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Boc 基はトリフルオロ酢酸 (TFA) により脱保護でき、Fmoc 基はピペリジン又はピロリジンによる処理で脱保護できる。

[0119] α -カルボキシ基の保護は、例えば、メチルエステル、エチルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いることができる。

[0120] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC あるいはWSC)、(1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (BOP)、1-[ビス (ジメチルアミノ) メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU) 等が挙げられる。

[0121] レジンからのペプチド鎖の切断は、TFA、フッ化水素 (HF) 等の酸で処理することによって行うことができる。

[0122] 遺伝子組み換え法 (翻訳合成系) によるペプチドの製造は、前記ペプチドをコードする核酸を用いて行うことができる。前記ペプチドをコードする核酸は、DNA であっても RNA であってもよい。

[0123] 前記ペプチドをコードする核酸は、公知の方法又はそれに準ずる方法で調

製することができる。例えば、自動合成装置によって合成することができる。得られたDNAをベクターに挿入するために制限酵素認識部位を加えてもよい。あるいは、できたペプチド鎖を酵素などで切り出すためのアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んでよい。

[0124] 上述のとおり、前記ペプチドを膜透過性ペプチド等と融合させる場合、前記核酸は、膜透過性ペプチドをコードする核酸も含む。

[0125] 宿主由来のプロテアーゼによる分解を抑制するため、目的のペプチドを他のペプチドとのキメラペプチドとして発現させるキメラタンパク質発現法を用いることもできる。この場合、前記核酸としては、目的とするペプチドと、これに結合するペプチドとをコードする核酸が用いられる。

[0126] 続いて、当該ペプチドをコードする核酸を用いて発現ベクターを調製する。核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加する等して、発現ベクターのプロモータの下流に挿入することができる。ベクターとしては、例えば、大腸菌由来プラスミド（pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pBlue script II等）、枯草菌由来プラスミド（pUB110、pTP5、pC1912、pTP4、pE194、pC194等）、酵母由来プラスミド（pSH19、pSH15、YEp、YRp、Ylp、YAC等）、バクテリオファージ（φファージ、M13ファージ等）、ウイルス（レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、バキュロウイルス等）、コスミド等が挙げられる。

[0127] プロモータは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、SV40（simian virus 40）由来プロモータ、CMV（cytomegalovirus）由来プロモータを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、trpプロモータ、T7プロモータ、lacプロモータ等を用いることができる。

[0128] 発現ベクターには、例えば、DNA複製開始点（ori）、選択マーカー

(抗生物質抵抗性、栄養要求性等)、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、タグ(FLAG、HA、GST、GFPなど)をコードする核酸等を組み込むこともできる。

[0129] 次に、前記発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換する。宿主は、ベクターとの関係で適宜選択することができる。宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌、バチルス属菌)、酵母、昆虫又は昆虫細胞、動物細胞等が用いられる。動物細胞として、例えば、HEK293T細胞、CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、HeLa細胞、Vero細胞を用いることができる。形質転換は、宿主の種類に応じ、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等、公知の方法に従って行うことができる。形質転換体を常法に従って培養することにより、目的とするペプチドが発現する。

[0130] 形質転換体の培養物からのペプチドの精製は、培養細胞を回収し、適当な緩衝液に懸濁してから超音波処理、凍結融解などの方法により細胞を破壊し、遠心分離やろ過によって粗抽出液を得る。培養液中にペプチドが分泌される場合には、上清を回収する。

[0131] 粗抽出液又は培養上清からの精製も公知の方法又はそれに準ずる方法(例えば、塩析、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、SDS-PAGE法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー等)で行うことができる。

[0132] 得られたペプチドは、公知の方法又はそれに準ずる方法で遊離体から塩に、又は塩から遊離体に変換してもよい。

[0133] 一態様において、翻訳合成系は、無細胞翻訳系としてもよい。無細胞翻訳系によれば、一般に、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる。無細胞翻訳系は、例えば、リボソームタンパク質、アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)、リボソームRNA、アミノ酸、rRNA、GTP、ATP、翻訳開始因子(IF)、伸長因子(EF)、終結因子(RF)、及びリボソーム再生因子(RRF)、並びに翻訳に必要なその他の因子

を含む。発現効率を高くするために大腸菌抽出液や小麦胚芽抽出液加えてもよい。他に、ウサギ赤血球抽出液や昆虫細胞抽出液を加えてもよい。

[0134] これらを含む系に、透析を用いて連続的にエネルギーを供給することで、非限定的に、数100 μ gから数mg/mLのタンパク質を生産することができる。遺伝子DNAからの転写を併せて行うためにRNAポリメラーゼを含む系としてもよい。市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系としてはロシュ・ダイアグノスティックス社のRTS-100（登録商標）ジーンフロンティア社のPURESYSTEMやNEW ENGLAND Biolabs社のPURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit等、小麦胚芽抽出液を用いた系としてはゾイジーン社やセルフリーサイエンス社のもの等を使用できる。

[0135] 細胞翻訳系においては、天然のアミノアシルtRNA合成酵素に合成されるアミノアシルtRNAに代えて、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸をtRNAに連結（アシル化）した人工のアミノアシルtRNAを用いてもよい。かかるアミノアシルtRNAは、人工のリボザイムを用いて合成することができる。

[0136] かかるリボザイムとしては、フレキシザイム（flexizyme）（H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; 及びWO2007/066627等）が挙げられる。フレキシザイムは、原型のフレキシザイム（Fx）、及び、これから改変されたジニトロベンジルフレキシザイム（dFx）、エンハンスドフレキシザイム（eFx）、アミノフレキシザイム（aFx）等の呼称でも知られる。

[0137] フレキシザイムによって生成された、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸が連結されたtRNAを用いることにより、所望のコドン、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸と関連付けて翻訳することができる。所望のアミノ酸としては、特殊アミノ酸を用いてもよい。例えば、上述した環状化に必要な非天然アミノ酸もこの方法により、結合ペプチドに導入することができる。

[0138] 前記ペプチドの化学合成は、例えば、段階的固相合成、配座的に支援される再ライゲーションを経るペプチドフラグメントの半合成、化学ライゲーションを含めた様々な当該技術分野において汎用される方法を使用して合成できる。前記ペプチドの合成は、例えば、K. J. Jensen、P. T. Shelton、S. L. Pedersen、Peptide Synthesis and Applications、2nd Edition、Springer、2013などに記載されるような種々の固相技術を使用する化学合成である。好ましい戦略として、 α -アミノ基を一時的に保護及び塩基による選択的除去を可能とするFmoc基と、側鎖官能基を一時的に保護しかつ脱Fmoc条件に安定な保護基の組み合わせに基づく。そのような一般的なペプチド側鎖の選択は前述のPeptide Synthesis and Applications、第2版やG. B. Fields、R. L. Noble、Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids、Int. J. Peptide Protein Res. 35、1990、161-214などで知られているが、好ましいペプチド側鎖保護基としては、例えば、セリンやトレオニンのヒドロキシ基に対するベンジル基やtert-ブチル基及びトリチル(Trt)基、チロシンのヒドロキシ基に対する2-ブロモベンジルオキシカルボニル基やtert-ブチル基、リジン側鎖のアミノ基に対するBoc基、メチルテトラゾールチオール(Mtt)基、Alloc基、及びivDde基、ヒスチジンのイミダゾール基に対するTrt基やBoc基、アルギニンのグアニジル基に対する2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホン基(Pbf)基、グルタミン酸やアスパラギン酸をはじめとするカルボキシ基に対するtert-ブチル基、アリル基、及び3-メチルペンタン(Mpe)基、グルタミンやアスパラギンのカルボキサミド基に対するTrt基、また、システインのチオール基に対するTrt基及びモノメトキシトリチル(Mmt)基がある。

- [0139] 前記ペプチドは、前述した固相樹脂上で段階的方法において合成できる。使用するC末端アミノ酸及び合成に使用するすべてのアミノ酸やペプチドは、 α -アミノ保護基が合成過程において、選択的に除去されなければならない。好ましくは前述の固相樹脂を用い、N末端がFmoc等適切に保護されたペプチドのC末端カルボキシ基又はFmocで保護されたアミノ酸のC末端カルボキシ基を適切な試薬により活性化エステルとしたのち固相樹脂上のアミノ基に付加することにより開始する。引き続くペプチド鎖の伸長は、目的とするペプチドのアミノ酸配列に従って、N末端保護基（Fmoc基）の除去、次いで保護アミノ酸誘導体の縮合を順次繰り返すことにより達成することが可能である。なお、これらは目的のペプチドを最終段階で遊離させることができる。たとえば遊離させる条件として、Teixeira, W. E., Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. P. M. Valentijn, J. W. Drijfhout, Protein Pept. Lett., 2002, 9, 379-385などに挙げられる、TFA中に捕捉剤として、水／シリルヒドリド／チオールを含むTFA溶液で遊離させることができる。典型的な例として、TFA／Water／TIS／DODT（体積比92.5：2.5：2.5：2.5）が挙げられる。
- [0140] 本明細書に記載するペプチドの合成は、単又は多チャネルペプチド合成機、たとえばCEM社のLiberty Blue合成機又はBiotage社のSyro 1合成機やそれらの後継機などを使用することで実施できる。
- [0141] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDCあるいはWSC）、（1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスファート（BOP）、1-[ビス（ジメチルアミノ）メチル

] - 1 H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU) 等が挙げられる。

[0142] ペプチドの環化については、公知の方法に従って行うことができる。非限定的に、例えば、ペプチドに2個以上のシステイン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Gotoらの方法 (Y. Goto, et al. ACS Chem. Biol. 3 120-129 (2008)) に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、N末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中に硫黄分子を含むシステイン残基を配置しておくことによっても環状化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環状化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環状化してもよい (本願の環化方法、C I A c - C y s)。あるいは、ペプチド中にL-2-アミノアジピン酸残基を配置し、N末端の主鎖アミノ基との間で結合することによって、環状化してもよい。このように、公知の環状化方法であれば、特に制限されず用いることができる。

[0143] 5. 複合体

一態様において、本発明は、複合体に関する。この複合体は、上記のいずれかのペプチドと、前記ペプチドと結合したリンカーと、このリンカーに結合した物質とを含む複合体である。前記ペプチドは、TGF- β に結合することができるため、前記複合体は、前記物質をTGF- β に運搬することが可能である。

[0144] ペプチドに物質 (特に、薬剤等) が結合した態様を、PDC (p e p t i d e d r u g c o n j u g a t e) と呼称する場合がある。

[0145] 物質はTGF- β に送達することを希望する物質であれば、当業者の希望する何らの物質であってよい。前記物質の例としては、限られないが、以下が挙げられる：

化合物：低分子化合物，中分子化合物を含み、例えば公知の低分子薬剤が挙げられる。

[0146] ペプチド：体内の標的に結合して何らかの効果を示すペプチドであってよく、例えば、本発明のペプチドとは別の環状ペプチドであってよい。

[0147] R I：放射性同位元素でラベルした低分子、中分子化合物や抗体等、放射性同位元素でラベルできる化合物であれば何でもよい。例えば、PET検査用の化合物が挙げられる。

[0148] タンパク質：抗体，酵素等の、体内にて有用な機能を示すタンパク質であれば何でもよい。例えば、酵素補充療法に用いられる酵素が挙げられる。

[0149] 核酸：DNA，RNA等、塩基配列を含むものであれば何でもよい。例えば、核酸医薬品が挙げられる。

[0150] ドラッグデリバリーシステム（DDS）に用いる分子：リポソームやミセルなどのDDSに使われる公知の分子であってよい。当該DDS分子には内部にさらに薬剤などの化合物が含まれていてもよい。

[0151] 上記挙げた物質が、複数結合した複合体であってよい。複数結合する物質は、同種であっても、異なる種であってもよい。

[0152] ペプチドに物質（特に、薬剤等）が結合した態様を、PDC（peptide drug conjugate）と呼称する場合がある。本明細書において、「ペプチド」と述べた場合、特に限定しない限り、物質が結合した複合体の態様も含みうる。

[0153] 6. 組成物等

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、組成物に関する。本項において、「ペプチド」は、「5. 複合体」の複合体も含みうる。

[0154] 前記組成物は、非限定的に、医療用組成物、診断用組成物、又は研究用組成物である。

[0155] 医薬組成物

前記医薬組成物は、前記ペプチドそのものを含んでもよいが、前記ペプチドの薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含んでもよい。本明細書にお

いて「ペプチド」は、特に明記しない限り、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含みうる。前記医薬組成物は、前記ペプチドを有効成分として有効量含むものが好ましい。

[0156] 前記「医薬組成物」の対象となる疾患は、上述したペプチドそのものが効果を奏する疾患、及び、ペプチドを修飾する薬剤が効果を奏する疾患の双方を含む。前記医薬組成物の対象となる疾患としては、限定するものではないが、例えば、TGF- β シグナル伝達経路が関連する疾病が挙げられ、例えば腫瘍、がん、細胞の異常線維化などの細胞増殖に関連する疾病がある。また、糸球体硬化などを含む腎機能不全や、肝硬変、心筋梗塞などの治療用医薬組成物の有効成分としても有用である。あるいは、ペプチドを修飾する薬剤が効果を奏する疾患を対象としてもよい。

[0157] 本明細書において、医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膣、経直腸）投与等が上げられる。

[0158] 前記医薬組成物は、ポリペプチドが代謝及び排泄されやすい性質に鑑みて、各種の修飾を行うことができる。例えば、ポリペプチドにポリエチレングリコール（PEG）や糖鎖を付加して血中滞留時間を長くし、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸・グリコール（PLGA）などの生体内分解性の高分子化合物、多孔性ヒドロキシアパタイト、リポソーム、表面修飾リポソーム、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これにポリペプチドを内包させてもよい。経皮投与する場合、弱い電流を皮膚表面に流して角質層を透過させることもできる（イオントフォoresis法）。

[0159] 前記医薬組成物は、有効成分をそのまま用いてもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、

軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤などを適宜使用し、常法により行うことができる。

[0160] 製剤化に用いられる成分の例としては、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアarylアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0161] 前記医薬組成物は、ペプチドが一般には経粘膜吸収されにくいことに鑑みて、難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤を含むことができる。かかる吸収促進剤としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、サポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸等の胆汁酸塩；EDTA、サリチル酸類等のキレート剤；カプロン酸、カプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体、N-アシルコラーゲンペプチド、N-アシルアミノ酸、シクロデキストリン類、キトサン類、一酸化窒素供与体等を用いることができる。

[0162] 前記医薬組成物が丸剤又は錠剤の場合、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆

してもよい。

[0163] 前記医薬組成物が注射剤の場合、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含んでもよい。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えもよい。

[0164] また、前記医薬組成物は、ヒトだけではなく、非ヒト哺乳動物又は鳥類を対象としていてもよい。非ヒト哺乳動物の例は、ヒト以外の霊長類（サル、チンパンジー、ゴリラ等）、家畜動物（ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジなど）、あるいは、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、ウサギ等が含まれる。

[0165] 特にヒトに投与する場合の投与量は、症状、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、非限定的に、例えば、 $30\mu\text{g}\sim 100\text{g}$ 、 $100\mu\text{g}\sim 500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ を1回又は数回に分けて投与することができる。注射投与の場合、患者の体重により、 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3\mu\text{g}/\text{kg}\sim 1000\mu\text{g}/\text{kg}$ を1回又は数回に分けて投与してもよい。

[0166] 本発明は、本発明のペプチドを投与することによる、疾患の予防又は治療する方法に関する。

[0167] 本発明は、本発明のペプチドの疾患の予防又は治療のための使用、に関する。

[0168] 本発明は、本発明のペプチドの、疾患の予防又は治療のための医薬組成物の製造のための使用、に関する。

[0169] 本発明は、疾患を予防又は治療する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0170] 診断用組成物及び研究用組成物

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、診断用組成物に関する。

[0171] 前記ペプチドは、好ましくは、 $\text{TGF}-\beta$ 結合活性、さらに好ましくは $\text{TGF}-\beta 1$ 結合活性を有する。「 $\text{TGF}-\beta 1$ 結合活性を有する」とは、「

3. ペプチド (B)」で詳述した通りである。本発明のペプチドは、 $\text{TGF}-\beta$ に結合するため、 $\text{TGF}-\beta$ を検出する診断薬としても使用しうる。診断薬としては、 $\text{TGF}-\beta$ 量の検出薬であってよく、検出薬として用いる場合は、本発明のペプチドは、検出可能に標識してもよい。標識物質により標識されている場合、前記ペプチドが $\text{TGF}-\beta$ と複合体を形成することで、該標識物質を介して $\text{TGF}-\beta$ の検出又は定量を行うことが可能となる。

[0172] 標識物質の種類は、特に、限定されない。非限定的に、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、化学発光色素、放射性物質（例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性同位元素、又は、放射性同位体金属イオンのキレート錯体、例えば DOTA 又はデスフェリオキサミンのキレート錯体）、並びにビオチン及び GFP （緑色蛍光たんぱく質）等の蛍光たんぱく質、発光たんぱく質、並びにペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素を含む。好ましい標識物質の例は、フルオレセイン及び FITC 等のフルオレセイン誘導体、ローダミン及びテトラメチルローダミン等のローダミン誘導体、並びにテキサスレッド等の蛍光色素である。

[0173] 診断用組成物で診断し得る疾患は、特に限定されない。例えば、 $\text{TGF}-\beta$ シグナル伝達経路に関連する疾病が挙げられ、例えば腫瘍、がん、細胞の異常線維化などの細胞増殖に関連する疾病がある。また、糸球体硬化などを含む腎機能不全や、肝硬変、心筋梗塞などの診断用組成物としても有用である。

[0174] 本発明は、本発明のペプチドを用いることによる、疾患を診断する方法に関する。「診断する方法」は、*in vivo*又は*in vitro*の診断方法を含む。好ましくは、*in vitro*の診断方法である。本発明はまた、本発明のペプチドを用いることによる、疾患の検出方法に関する。疾患の検出は、例えば、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業等において、医師以外の、検査技師、研究者等によって行うこともできる。一態様にお

いて、疾患の検出方法は医療行為を含まない。

[0175] 本発明は、本発明のペプチドの疾患の診断又は検出のための使用、に関する。

[0176] 本発明は、本発明のペプチドの、疾患の診断又は検出のための組成物の製造のための使用、に関する。

[0177] 本発明は、疾患の診断又は検出する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0178] 本発明はまた、本発明のペプチドを含む、研究用組成物に関する。ただし、本発明の研究用組成物は、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く。「研究用組成物」は、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業、病院等において、研究者、技師、学生、医師等によって使用されるものを含む。

[0179] 前記研究用組成物は、例えば、 $TGF-\beta$ の精製又は検出、疾患の検出のために使用することができる。

[0180] 一態様において、本発明のペプチドは $TGF-\beta$ アンタゴニスト活性を有するため、細胞や臓器の培養のための培地への添加剤としても使用しうる。また、移植用の臓器を保護するための保護溶液への添加剤としても使用しうる。非限定的に、肝臓や脳幹、などの臓器又はその断片を培養するための培地であってよく、幹細胞など全能性を有する細胞を培養するための培地であってよい。さらに、例えば再生医療における細胞療法のための細胞培養などに使用することも可能である。本発明の「研究用組成物」は、このような培養培地へ使用される組成物を含む。

[0181] ただし、本発明の研究用組成物は、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く。「オルガノイド」は、ヒト幹細胞に由来しその自己凝集能力、自己再生能力及び分化能力により三次元的に培養され、自己組織化により形成されたインビトロ培養物である。「オルガノイド」は、「臓器のミニチュア版」とも考えられている。

[0182] 前記ペプチドは、 $TGF-\beta$ 、特に $TGF-\beta 1$ に対する結合活性（親和

性)、特に高い結合活性を有するため、例えば、ヒト血清等からTGF- β を選択的に分離することが可能である。従って、前記ペプチドは、TGF- β の精製方法に使用しうる。TGF- β の精製方法は、例えば、前記ペプチド又は固定化された前記ペプチドをTGF- β と結合させること、並びに、結合したTGF- β を遊離させてTGF- β を回収することを含む。さらに、前記ペプチドは、TGF- β の検出方法に使用しうる。TGF- β の検出方法は、例えば、前記ペプチド又は固定化された前記ペプチドにサンプル中のTGF- β を結合させ、結合したTGF- β を検出することを含む。ここで、検出には、定性又は定量のいずれかの分析を含むものとする。

[0183] 本明細書において、ペプチドを固定化するための担体は特に限定されない、例えば、ラス製、金属性、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられる。

[0184] 本発明は、本発明のペプチドを用いた、TGF- β の精製又は検出方法を含む。

[0185] 本発明はまた、本発明のペプチドのTGF- β の精製又は検出のための使用、を含む。

[0186] 本発明は、本発明のペプチドを含む、診断用又は検出用のキットに関する。前記診断用又は検出用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（非限定的に、本発明のペプチド、抗体、固相担体、緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー等のいずれか又は全てを含む）を含む。

[0187] 本発明は、本発明のペプチドを含む診断用又は検出用のテスターに関する。

実施例

[0188] 以下、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限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0189] 化学合成

以下の実施例における化学合成において使用された全ての原料、ビルディングブロック、試薬、酸、塩基、固相樹脂、溶媒は、市販品をそのまま用いたか、もしくは当業者にて有機化学的手法を用いて合成できるものである。なお、保護基を含むアミノ酸は特記が無い限り市販品をそのまま用いた。

[0190] 固相樹脂におけるペプチド鎖の伸長は、それぞれの実施例に記載された樹脂を出発原料とし、通常用いられるペプチドカップリング反応条件と Fmoc 除去反応条件を用いて行った。反応はペプチド自動合成機である CEM 社の Liberty Blue、もしくは Biotage 社の Siro l を使用し、製造元のマニュアルに従い行った。

[0191] 例として、使用される一般的なアミノ酸の一部を下記に列挙し、側鎖保護基はカッコ内に示した。

[0192] Fmoc-Trp(Boc)-OH;
Fmoc-Gly-OH;
Fmoc-Asp(OMpe)-OH;
Fmoc-Phe-OH;
Fmoc-His(Boc)-OH;
Fmoc-Tyr(tBu)-OH;
Fmoc-Val-OH;
Fmoc-Cys(Trt)-OH;
Fmoc-Asn(Trt)-OH。

[0193] 得られた粗精製ペプチドの精製方法として、Waters 社 Auto Purification System-SQD2 single quadrupole mass spectrometer で逆相分取 HPLC を使用し、目的物由来の m/z イオンをモニタリングしながら溶出した。ESI-positive のスキャンモードで得られるマススペクトルと目的物の分子式より計算される多価イオンを含むマススペクトルが使用した質量分析器の誤差範囲で一致しているのを確認した。なお、使用したカラムを含む精

mmol/g、0.213g)を用い、前述の一般的な化学合成方法にてFmoc基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blue HTを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0198] 各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure (5.25当量/10当量/5当量)を用い、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、9残基目は90℃下、10分間2回反応を行った。14残基目、16残基目は50℃下15分間1回反応を行った。

[0199] また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と75℃下、3分間反応させることを基本条件とした。ただし、1残基目、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、6残基目、7残基目、及び8残基目のFmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下5分間2回反応を行った。

[0200] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法でα-アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.2M クロロ酢酸(約5当量)のDMF溶液、0.5M HATU(約5当量)のDMF溶液、1M DIEA(約10当量)のDMF溶液を固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。

[0201] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA(5mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、室温で60分振盪した。

[0202] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000rpm、1分)、溶液をデカンテーションした。得られた固体

を再度0℃に冷やした15 mLのジエチルエーテルにて3回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0203] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSOに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約5時間振盪した。得られた反応溶液をGenevac社のEZ-2を用いて減圧濃縮した(40℃未満、減圧時間14時間)。

[0204] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム: Waters XBridge (登録商標) C18 5 μ m 30 $\times$ 150 mm; 移動相: A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 40℃; グラジエント(%B): 3分間かけて13–38%、その後8分間かけて38–43%、その後1分かけて43–60%; 流量: 45 mL/分。

[0205] 目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し96.0%であった。

[0206] 分析条件: 保持時間=15.01分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å; 移動相: A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN中); 温度: 60℃; グラジエント(% B conc): 20分間かけて20–60%、その後1分間かけて60–95%、その後5分かけて95–95%; 流量: 0.25 mL/分

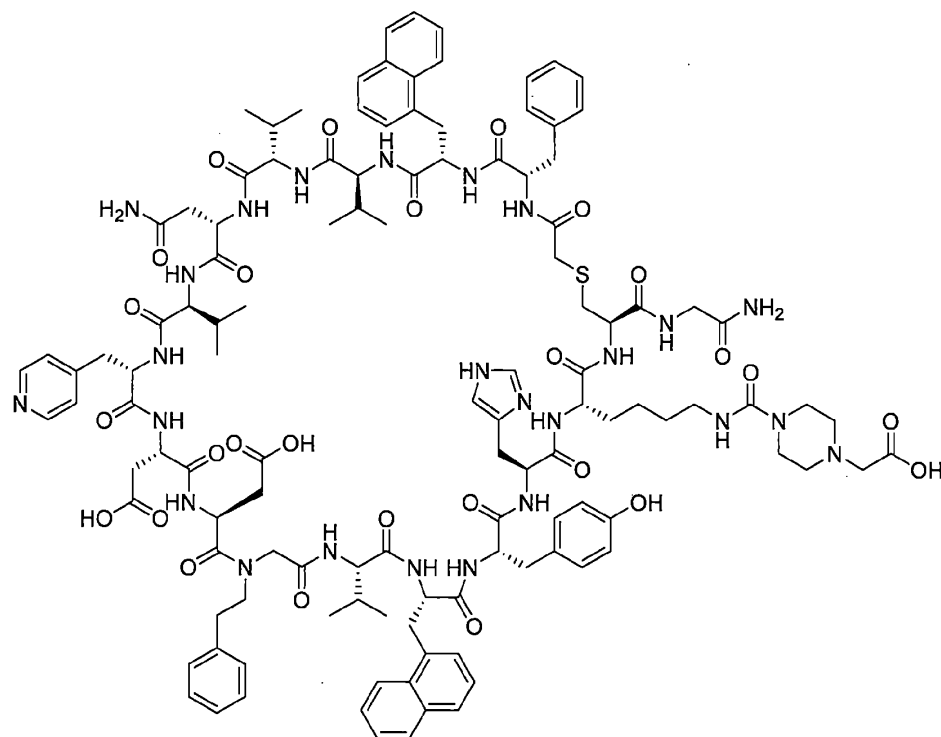
ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1112.53$ ($M+2H$)²⁺

実施例2 TGFb1__012 (配列番号13) の合成

本実施例では、以下の構造を有するTGFb1__012 (配列番号13) を合成した。

[0207]

[化13]



[0208] Fmoc-Sieber amide resin (渡辺化学、0.65 mmol/g、0.115 g) を用い、前述の一般的な化学合成方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Siro I を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0209] 各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2 当量/4 当量/8 当量) を用い、DMF 中 75℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。ただし、11 残基目、12 残基目、13 残基目は 75℃ 下、20 分間 1 回反応を行った。14 残基目は室温下 60 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 75℃ 下、20 分間 1 回反応を行った。17 残基目は 75℃ 下、10 分間 1 回反応を行った。16 残基目は室温下 20 分間 1 回反応を行った。

[0210] また、Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と室温下、5 分間、

及び15分間反応させることを基本条件とした。

- [0211] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.2M クロロ酢酸（約5当量）のDMF溶液、0.2M DIPI（約5当量）のDMF溶液、0.2M HOSu（約5当量）のDMF溶液を固相樹脂に加え室温にて90分振盪することにより行った。
- [0212] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（3mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物）を加え、室温で60分振盪した。
- [0213] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル溶媒に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000rpm、3分）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした10mLのジエチルエーテルにて3回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。
- [0214] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5mMとなるようにDMSO/水（9/1）の混合溶液に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約18.5時間振盪した。反応液に、20当量の酢酸を添加後、得られた反応溶液をGenevac社のEZ-2を用いて減圧濃縮した（40℃未満、減圧時間16時間）。
- [0215] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Waters XBridge（登録商標）C18 5 μ m 19×150mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（%B）：3分間かけて5-30%、その後8分間かけて30-35%、その後1分かけて35-60%；流量：17

mL／分。

[0216] 目的物の純度は分析条件のLC／MS（UV波長225nm）クロマトグラムの面積比から算出し90.5％であった。

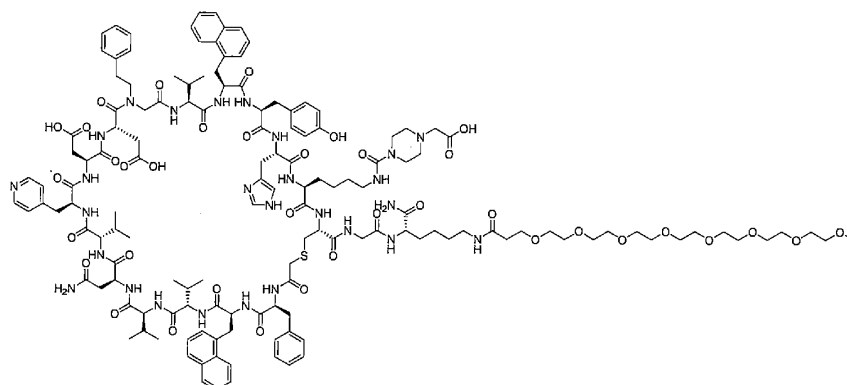
[0217] 分析条件：保持時間＝3.62分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6μm 2.1×150mm、100Å；移動相：A＝0.025％TFA（水中）、B＝0.025％TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（％B conc）：7.15分間かけて20－60％、その後0.3分間かけて60－95％、その後1.55分かけて95－95％；流量：0.5mL／分

ESI－MS（＋） 観測値m／z＝1204.64（M＋2H）²⁺

実施例3 TGFb1__031（配列番号32）の合成

本実施例では、以下の構造を有するTGFb1__031（配列番号32）を合成した。

[0218] [化14]



[0219] Fmoc－Sieber amide resin（渡辺化学、0.48mmol／g、0.521g）を用い、前述の一般的な化学合成方法にてFmoc基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blue HTを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0220] 各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc－AA／DIPCI／Ox

y m a p u r e (4.2当量/8当量/4当量)を用い、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、3残基目、4残基目、6残基目、7残基目、11残基目、15残基目は75℃下、20分間1回反応を行った。9残基目は90℃下3分間2回反応を行った。10残基目は75℃下20分間2回反応を行った。14残基目は50℃下15分間1回反応を行った。

[0221] また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と75℃下、3分間反応させることを基本条件とした。ただし、1残基目、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、6残基目、7残基目、8残基目、11残基目、12残基目、13残基目、15残基目、17残基目、及び18残基目のFmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下5分間2回反応を行った。

[0222] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、0.1M クロロ酢酸(約5当量)のDMF溶液、0.1M HATU(約5当量)のDMF溶液、0.2M DIEA(約10当量)のDMF溶液を固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。

[0223] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA(5mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、室温で60分振盪した。

[0224] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000rpm、2分)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした15mLのジエチルエーテルにて3回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0225] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5mM

となるようにDMSOに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約16時間振盪した。得られた反応溶液をThermo Scientific社のSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した（40℃未満、減圧時間3時間）。

[0226] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Waters XBridge（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて5–28%、その後8分間かけて28–33%、その後1分かけて33–60%；流量：120 mL／分。

[0227] 目的物の純度は分析条件のLC／MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し99.2%であった。ここで得られるペプチドを、ペプチドAとする。

[0228] 分析条件：保持時間=1.20分；カラム：CSH Ph-hexyl 1.7 μ m 2.1 $\times$ 30 mm；移動相：A=0.025% TFA（水中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：1.14分間かけて5–95%、その後0.86分間かけて95–95%；流量：0.72 mL／分

ESI-MS（+） 観測値 m/z = 1269.3 （M+4H）⁴⁺

上記で得られたペプチドA（16.5 μ mol）をペプチドの終濃度が25 mMとなるようにDMSO／水（9／1）の混合溶液に溶解後、1.2当量のMePEG8c、1.1当量のHATU、3当量のDIPEAを加えて、室温で約1時間振盪した。

[0229] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Waters XBridge（登録商標） C18 5 μ m 19 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：3分間かけて7–32%、その後8分間かけて32–37%、その後1分かけて37–60%；流量：17

mL／分。

[0230] 目的物の純度は分析条件のLC／MS（UV波長225nm）クロマトグラムの面積比から算出し98.2％であった。

[0231] 分析条件：保持時間＝4.09分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6μm 2.1×150mm、100Å；移動相：A＝0.025％TFA（水中）、B＝0.025％TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（％B conc）：7.15分間かけて20－60％、その後0.3分間かけて60－95％、その後1.55分かけて95－95％；流量：0.5mL／分

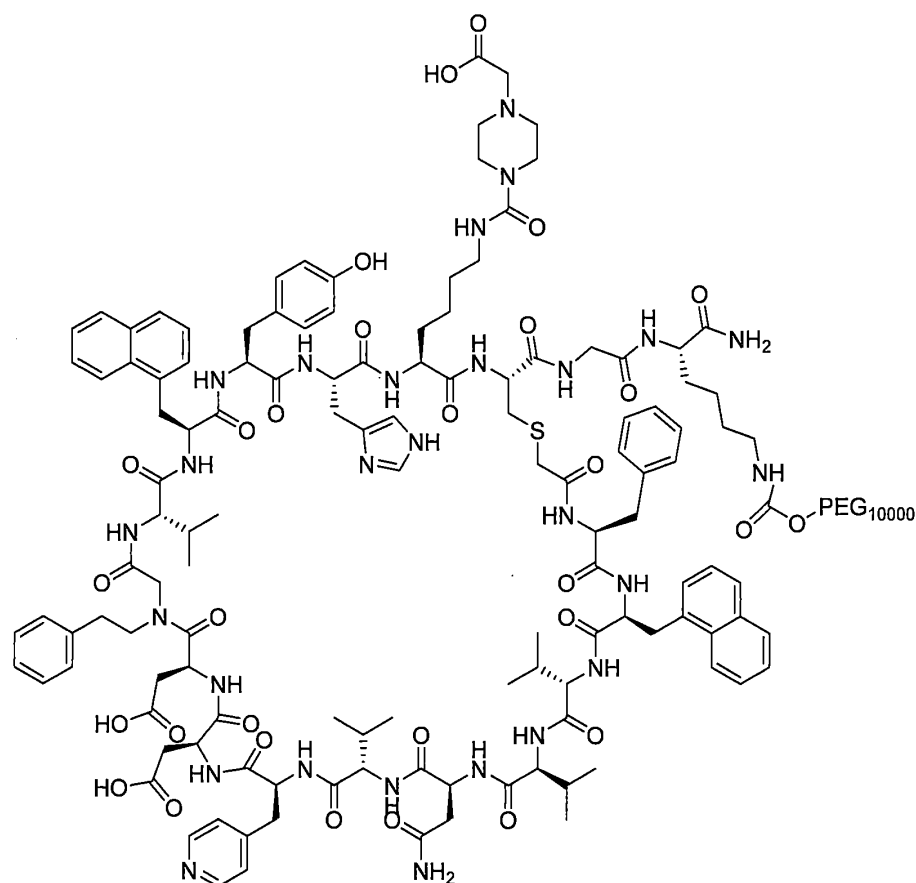
ESI－MS（＋） 観測値m／z＝977.70（M＋3H）³⁺

実施例4 TGFb1__032（配列番号33）の合成

本実施例では、以下の構造を有するTGFb1__032（配列番号33）を合成した。

[0232]

[化15]



[0233] TGF β 1__031 (配列番号32) の合成で得られたペプチドA (4.5 μ mol) をペプチドの終濃度が25 mMとなるようにアセトニトリル／水 (1／1) の混合溶液に溶解後、0.67当量のNHS-OCOMPEG10000、5当量のDIPEAを加えて、室温で約1時間振盪した。

[0234] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Waters XBridge (登録商標) C18 5 μ m 30 $\times$ 150mm；移動相：A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中)；温度：50 $^{\circ}$ C；グラジエント (%B)：0.5分間かけて35–35%、その後11.5分間かけて35–60%；流量：45 mL／分。

[0235] 目的物の純度は分析条件のLC／MS (UV波長225 nm) クロマトグ

ラムの面積比から算出し99.3%であった。

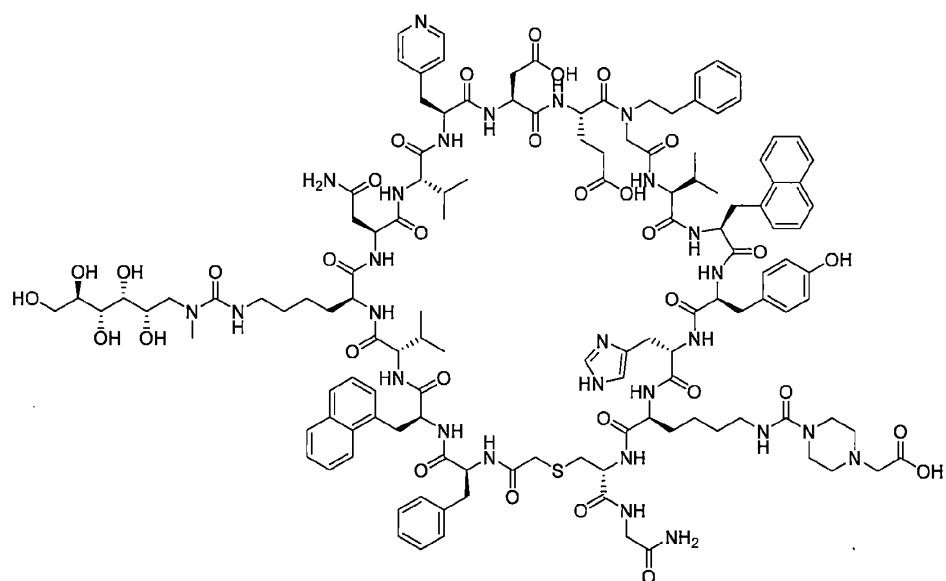
[0236] 分析条件：保持時間＝3.16分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A＝0.025% TFA（水中）、B＝0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて40－80%、その後0.3分間かけて80－95%、その後1.55分かけて95－95%；流量：0.5 mL／分

ESI－MS（+） 観測値 $m/z = 1331.06$ （中央値）

実施例5 TGFb1__024（配列番号25）の合成

本実施例では、以下の構造を有するTGFb1__024（配列番号25）を合成した。

[0237] [化16]



[0238] Fmoc－Sieber amide resin（渡辺化学、0.48 mmol／g、0.156 g）を用い、前述の一般的な化学合成方法にてFmoc基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage社のSiro Iを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

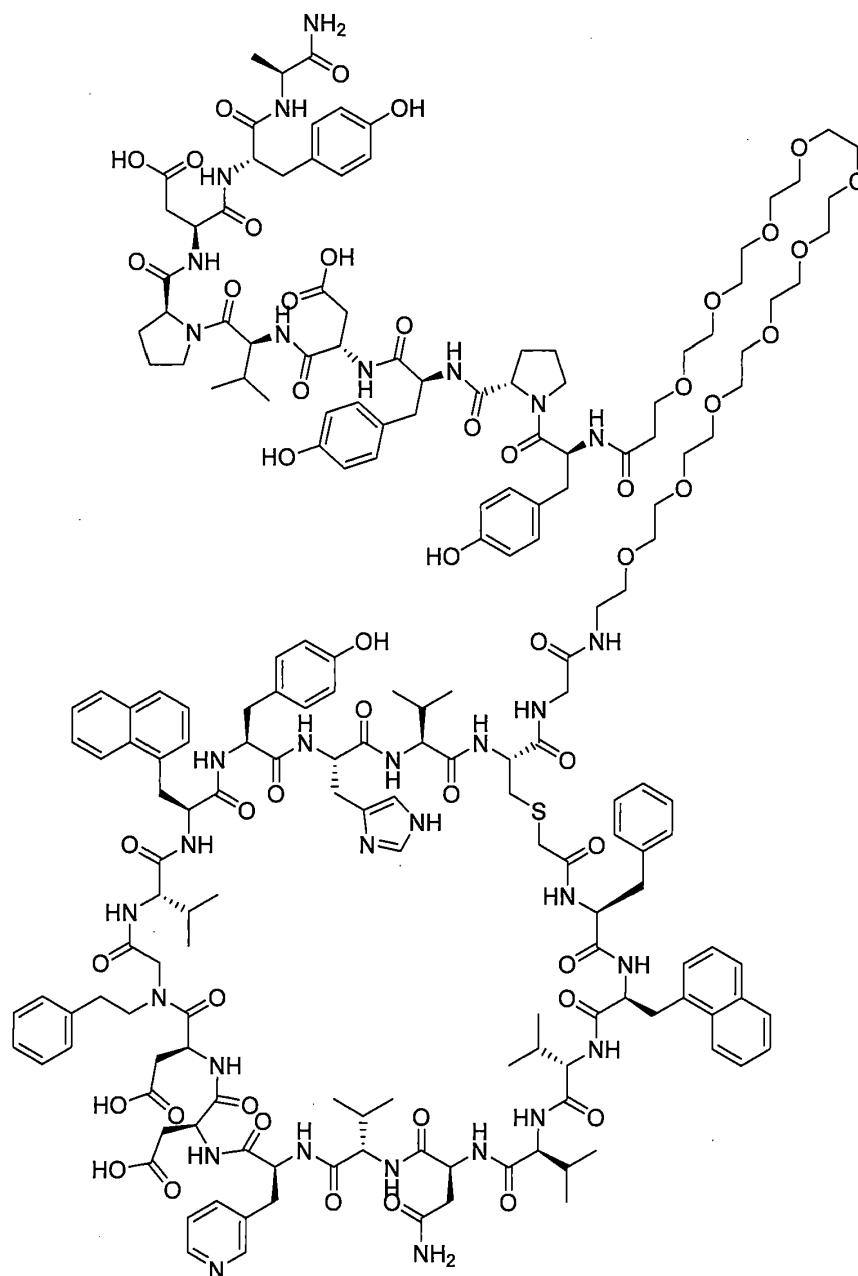
- [0239] 各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIPEA (4.2 当量/4 当量/8 当量) を用い、DMF 中 75℃下、20 分間 2 回反応を行った。ただし、4 残基目、9 残基目は 75℃下、30 分間 2 回反応を行った。14 残基目は室温下 30 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 75℃下、20 分間 1 回反応を行った。16 残基目は室温下 20 分間 1 回反応を行った。17 残基目は 75℃下、10 分間 1 回反応を行った。
- [0240] また、Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と室温下、5 分間、及び 15 分間反応させることを基本条件とした。
- [0241] クロロアセチル基の導入、側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出し、並びにペプチドの沈殿下は、TGfb1__012 (配列番号 13) の合成の方法に準じて行った。
- [0242] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 2.5 mM となるようにアセトニトリル/水 (1/1) の混合溶液に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約 3 時間振盪した。反応液に、20 当量の酢酸を添加後、得られた反応溶液を Genevac 社の EZ-2 を用いて減圧濃縮した (40℃未満、減圧時間 16 時間)。
- [0243] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム: Waters XBridge (登録商標) C18 5µm 50×150mm; 移動相: A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN 中); 温度: 40℃; グラジエント (%B): 3 分間かけて 5-26%、その後 8 分間かけて 26-31%、その後 1 分かけて 31-60%; 流量: 17 mL/分。
- [0244] 目的物の純度は分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 79.9% であった。
- [0245] 分析条件: 保持時間=3.01 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6µm 2.1×150mm、100Å; 移動相: A=0.025% TFA (水中)、B=0.025% TFA (MeCN 中); 温度: 60℃; グラジエント (% B conc): 7.15 分間かけて 20-6

0%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分かけて95-95%；流量：0.5 mL/分

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1336.96$ ($M + 2H$)²⁺

実施例6 TGFb1__068 (配列番号69) の合成

[0246] [化17]



- [0247] HA tag resin (0.65 mmol/g, 0.004 mg, 2.5 μ mol scale) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Siro II を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。
- [0248] 固相樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA / HATU / DIPEA (4.2 当量 / 3.9 当量 / 8.4 当量) を用い、DMF 中 75℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。ただし、5 残基目、7 残基目、8 残基目、9 残基目、10 残基目、12 残基目、13 残基目、17 残基目は 75℃ 下、10 分間 2 回反応を行った。14 残基目、16 残基目は 50℃ 下、30 分間 2 回反応を行った。18 残基目は室温下、60 分間 1 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と室温下、5 分間反応させた後、15 分間反応させることを基本条件とした。
- [0249] クロロアセチル基の導入は、前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち、0.3 M クロロ酢酸の DMF 溶液 (4.2 当量)、0.28 M HATU の DMF 溶液 (3.9 当量)、1.05 M DIPEA の DMF 溶液 (8.4 当量) を固相樹脂に加え、室温下、30 分間振盪を 2 回繰り返すことにより行った。
- [0250] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (TFA / H₂O / TIS / DODT の体積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物) を加え、室温で 60 分間振盪した。
- [0251] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やしたジイソプロピルエーテル (1.5 mL) に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (8500 rpm、

30秒間)、溶液をデカンテーションにより除去した。得られた固体を再度0℃に冷やしたジエチルエーテル／ヘキサン(1:1、1mL)にて2回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0252] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に25mM(2.5μmol/0.1mL)となるようにイソプロピルアルコール／水／DMSO(1:1:18)に溶解後、20当量のトリエチルアミンを加えて、室温下で63時間振盪した。得られた反応溶液に40当量の酢酸を加えた。

[0253] 得られた上記反応溶液はギルソン社のカラムを用い固相抽出した(カラム: Gilson ASPEC C18 500mg 3mL)。

[0254] (i) カラムを抽出液A(0.1% TFA in 95% MeCN／水、3mL)で洗浄した。

[0255] (ii) 抽出液B(0.1% TFA in 5% MeCN／水、3mL)でカラムを平衡化した。

[0256] (iii) 上記反応溶液0.1mLをカラムにローディングした。

[0257] (iv) 抽出液B(4mL)でカラムを洗浄した。

[0258] (v) 抽出液A(4mL)で抽出した。得られた抽出液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0259] 目的物は主たるピークの一つの純度は以下の分析条件のLC/MS(UV波長220nm)クロマトグラムの面積比から算出し21.8%であった。

[0260] 分析条件: 保持時間=1.74分; カラム: Kinetex EVO C18 1.7μm 2.1×50mm、100Å; 移動相: A=0.025% TFA(水中)、B=0.025% TFA(MeCN中); 温度: 60℃; グラジエント(% B conc): 2.10分間かけて5-95%、その後0.75分間かけて95-95%; 流量: 0.6mL/分

ESI-MS(+) 観測値m/z = 1903.5 (M+2H)²⁺

実施例7 各種ペプチド合成

本実施例では、実施例 1 - 6 と同様に、各種環状ペプチドを化学合成した。合成したペプチドの配列を、表 1 及び表 4 に示す。表 1 において、配列番号 2、4 - 13、15 - 33 は、アミノ酸配列が環化構造をとる環状ペプチドの C 末端にグリシン (G) リンカーが付加されている。配列番号 32 は、G リンカーの先にさらに、K (MePEG8c) が、そして、配列番号 33 は、G リンカーの先にさらに、K (OCOmPEG10000) が付加されている。なお、配列番号 3 は、配列番号 2 と同じアミノ酸配列だが、C 末端のグリシン (G) リンカー付加がない。なお、配列番号 14 は、配列番号 13 と同じアミノ酸配列だが、C 末端のグリシン (G) リンカー付加がない。

[0261] 配列番号 34 - 69 のアミノ酸配列からなるペプチドも、環化構造をとる環状ペプチドの C 末端にリンカーとして G が結合している。なお、表 4 において、配列番号 34 - 69 のアミノ酸配列からなるペプチドの C 末端リンカーの G の先に HA-tag が結合している。これは、ELISA により TGF- β 阻害ペプチドと TGF- β 1 との結合を評価する際に必要なアミノ酸配列で、活性に影響を及ぼすものでない。

[0262] 合成したペプチドは実施例 1 - 6 に記載する分析条件で分析し、質量スペクトル分析法における ESI-MS (+) により構造を確認した。得られた ESI-MS (+) 観測値と、その場合における価数を表 1、表 4 に示す。

[0263] 実施例 8 表面プラズモン共鳴 (SPR) による TGF- β とペプチドとの分子間相互作用評価試験

本実施例では、(1) 実施例 1 - 5 及び実施例 7 で合成した配列番号 2 - 33 のアミノ酸配列からなる各種ペプチドについての TGF- β への結合活性を評価するため、また、(2) 実施例 2 で合成した配列番号 13 のアミノ酸配列からなるペプチドの TGF- β の 2 種類のアイソフォーム (TGF- β 1、 β 2) に対する結合活性及び選択性を確認するため、TGF- β に対するペプチドの表面プラズモン共鳴 (SPR) による分子間相互作用を、以下に示す方法によって試験を実施した。具体的な試験方法を以下に示す。

[SPR 測定]

Biacore T200 (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) に CM3 センサーチップ (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) を挿入し、ランニング緩衝液: HBS-EP+ (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) でプライム操作を3回実施し、流速 $30 \mu\text{L}/\text{分}$ で平衡化した。

[0264] 60 mM EDC 溶液 (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社)、 650 mM NHS 溶液 (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) を各々 $50 \mu\text{L}$ ずつ混合させた後、流速 $10 \mu\text{L}/\text{分}$ で 420 秒反応させた。 10 mM 酢酸溶液 ($\text{pH} 5.0$) で希釈した $0.2 \mu\text{M}$ TGF- β 溶液 $150 \mu\text{L}$ 調製し、流速 $10 \mu\text{L}/\text{分}$ で 420 秒反応させ CM3 センサーチップに TGF- β を固定化した。TGF- β は、ヒト由来の TGF- $\beta 1$ 又は $\beta 2$ (組換えヒト TGF- $\beta 1$ 、 2) であり、R&D systems より入手した。固定化後、 1.0 M エタノールアミン水溶液 (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) を流速 $10 \mu\text{L}/\text{分}$ で 420 秒反応させキャッピングを行った。

[0265] DMSO 溶液中で 10 mM に調製されたペプチド溶解液を、終濃度が $10 \mu\text{M}$ のペプチド溶解液になるようにランニング緩衝液で希釈した後、 50 nM 、 25 nM 、 12.5 nM 、 5 nM 、 2.5 nM のペプチド溶液を作製した。上述のサンプルを用い、TGF- β に対するペプチドのカイネティクスを SPR 測定により取得した。

[0266] カイネティクス評価モデルは、Single Cycle Kinetics とし、Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0 (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) を使用してカーブフィッティングを行った。得られたセンサーグラムに対して、最小二乗法によるカーブフィッティングを実施し、その KD 値を求めることで各種ペプチドの TGF- β に対する結合を評価した。

[0267] (1) 配列番号 2-33 のアミノ酸配列からなるペプチドの KD 値を表 2

、表3に示す。表2、表3に示されたとおり、配列番号2-33のペプチドはTGF- β 1に対する結合能を有することが示された。なお、配列番号3及び配列番号14のペプチドについては、各々配列番号2及び配列番号13と環状ペプチド構造を成すアミノ配列が同じでリンカー部位のグリシン付加の有無だけの差異である。それらペプチドのTGF- β 1に対する結合能は、配列番号3のペプチドのKDが0.46 nM、配列番号14のペプチドのKDが0.82 nMであり、グリシンが付加されている配列番号2及び配列番号13のKDとほぼ変わらなかった。これより、本発明のペプチドにリンカーを付加してもTGF- β 1に結合可能であることが示唆された。

[0268] (2) 配列番号13のアミノ酸配列からなるペプチドのTGF- β の2種類のアイソフォーム(TGF- β 1、 β 2)に対するKD値は、TGF- β 1については表2に記載の通り0.86 nMであった。TGF- β 2については2.0 nMであった。以上の結果より、本発明のペプチドは、TGF- β 1、2に対し特異的に結合することが示された。

[0269] 実施例9 TGF- β 阻害活性を評価

本実施例では、実施例1-5及び実施例7で合成した配列番号2-33のアミノ酸配列からなるペプチドのTGF- β 1阻害活性を、SBEレポーター-HEK293細胞系(BP Bioscience)を用いたSBEレポーターアッセイによって、下記の通り評価した。

[0270] また、本発明のペプチドのTGF- β のアイソフォーム(TGF- β 1、 β 2)に対する選択性を確認する為、実施例2で合成した配列番号13のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて、TGF- β 1及びTGF- β 2に対する阻害活性を評価した。

[0271] SBEレポーター-HEK293細胞を10%FBS(Sigma)含むE-MEM(Wako)で培養した。アクターゼ(Accutase)(Innovative cell technologies)を用いて細胞を剥離後、0.5%FBSを含むE-MEMに懸濁し1ウェルあたり45,000細胞となるように96穴プレートに播種し、一晚培養した。翌日ペプ

チドを加え20分静置後、組換えヒトTGF- β 1 (R&D systems)、組換えヒトTGF- β 2 (R&D systems)を0.13nMになるように添加し18時間培養を行った。

[0272] その後、各ウェルにルシフェラーゼアッセイ ONE-Glo試薬を加え5分間振とうした。シグナルの検出にはSpectraMax Paradigm multimode microplate reader (Molecular Devices)を使用した。得られたシグナルをGraphPad Prismで解析し、TGF- β で誘導されるシグナルの最大値を0%阻害、無刺激を100%阻害としてペプチドの阻害活性を算出した。

[0273] 実施例1-5及び実施例7で合成した配列番号2-33のアミノ酸配列からなるペプチドのTGF- β 1阻害活評価結果を表2、表3に示す。表2、表3に示されたとおり、合成した各種ペプチドはTGF- β 1アンタゴニスト活性を有することが示された。なお、配列番号3及び配列番号14のペプチドについては、前述のとおり各々配列番号2及び配列番号13と環状ペプチド構造を成すアミノ配列が同じでリンカー部位のグリシンの有無だけの差異であり、実施例8より結合活性も変わらないため、SBEレポーターの結果は省略する。

[0274] また、TGF- β のアイソフォーム(TGF- β 1、 β 2)に対する選択性評価の結果を図1に示す。図1に示されたとおり、実施例2で合成した配列番号13のアミノ酸配列からなるペプチドはTGF- β 1及びTGF- β 2に対する阻害活性を示した。このことから、本発明の配列番号13のアミノ酸配列からなるペプチドは、TGF- β 1だけではなく、TGF- β 2をも阻害することが示された。

[0275] 実施例10 ELISAによるTGF- β とペプチドとの結合評価

本実施例では、実施例6及び実施例7で合成した配列番号34-69のアミノ酸配列からなる各種ペプチドについて、TGF- β 1との結合を、ELISAを用いて評価した。配列番号34-69のアミノ酸配列からなるペプ

チドのC末端リンカーのGの先にH A - t a g を結合させた。本明細書中、「H A - t a g」とは、P E G 1 0 c - Y - P - Y - D - V - P - D - Y - A（配列番号70）のアミノ酸配列を意味する。これは、E L I S AによりT G F - β 阻害ペプチドとT G F - β 1との結合を評価する際に必要なアミノ酸配列である。T G F - β 1との結合活性に影響を及ぼすものでない。

[0276] H A - t a g を結合させた配列番号34-69のアミノ酸配列からなるペプチドと、T G F - β 1ビーズを用いたE L I S Aにより、ペプチドとT G F - β 1との結合活性を調べた。

[0277] <T G F - β 1ビーズの作製>

組換えヒトT G F - β 1（R & D S y s t e m s）を、D y n a b e a d M - 2 7 0 C a r b o x y l i c A c i d（T h e r m o f i s h e r s c i e n t i f i c）に固定化しT G F - β 1ビーズを作製した。固定化反応はA m i n e C o u p l i n g k i t（同仁化学研究所）を用いた。

[0278] <E L I S A>

T G F - β 1ビーズとC末端にH A タグ配列を付加したペプチドを0.1% T w e e n 2 0（ナカライテスク）を含むP B S（P B S - T）中で1時間反応させた後P B S - Tにより洗浄した。T G F - β 1ビーズに結合したペプチドを検出する為、1% B S Aを含むP B S - T中でA n t i - H A - t a g m A b - H R P - D i r e c T（M B L）と前述のT G F - β 1ビーズを30分反応させた。P B S Tで洗浄後S u r e B l u e T M B M i c r o w e l l P e r o x i d a s e S u b s t r a t e（K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s）により10分間発色後T M B s t o p s o l u t i o n（K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s）を添加し発色反応を停止させた。吸光度測定にはE n S p i r e（P e r k i n E l m e r）を使用した。

[0279] なお、結合活性はT G F b 1 __ 0 6 1（配列番号62）のペプチドのT G

F- β 1 に対する結合能を 100%としたときの相対値として示した。結果を表 4 に示す。表 4 に示されたとおり、配列番号 34-69 のアミノ酸配列からなるペプチドは TGF- β 1 に対する結合能を有することが示された。

[0280] 表 1 アンタゴニスト活性を示したペプチド配列と MS 値 (配列番号 2-33)

[0281]

[表1]

配列番号	変換後の名称	SEQ																リンカー	m/z	価数
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			
2	TGFb1_001	F	Nat1	V	V	N	V	Y	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1112.53	2	
3	TGFb1_002	F	Nat1	V	V	N	V	Y	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1084.03	2	
4	TGFb1_003	F	W	V	V	N	V	Y	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1107.06	2	
5	TGFb1_004	F	W6N	V	V	N	V	Y	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1107.5	2	
6	TGFb1_005	F	W7N	V	V	N	V	Y	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1107.56	2	
7	TGFb1_006	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1105.06	2	
8	TGFb1_007	F	Nat1	V	K	N	V	4Py	D	D	PxG	Nat1	Y	H	V	V	C	1119.59	2	
9	TGFb1_008	F	W7N	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1100.07	2	
10	TGFb1_009	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	4Py	H	V	C	1097.53	2	
11	TGFb1_010	F	Nat1	V	KCOppzaa	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1204.67	2	
12	TGFb1_011	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	KCOppzaa	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1196.69	2	
13	TGFb1_012	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1204.64	2	
14	TGFb1_013	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1176.22	2	
15	TGFb1_014	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1230.14	2	
16	TGFb1_015	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	KCOmeglun	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1222.15	2	
17	TGFb1_016	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOmeglun	C	1230.17	2	
18	TGFb1_017	F	W7N	V	V	N	V	4Py	D	KCOppzaa	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1191.65	2	
19	TGFb1_018	F	W7N	V	V	N	V	4Py	D	KCOmeglun	PxG	V	Nat1	Y	H	V	C	1217.21	2	
20	TGFb1_019	F	Nat1	V	KCOppzaa	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1304.39	2	
21	TGFb1_020	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1329.93	2	
22	TGFb1_021	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	E	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1211.78	2	
23	TGFb1_022	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	KCOppzaa	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1286.44	2	
24	TGFb1_023	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	KCOmeglun	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1321.87	2	
25	TGFb1_024	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	E	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1336.96	2	
26	TGFb1_025	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	KCOppzaa	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1421.52	2	
27	TGFb1_026	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	KCOmeglun	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1447.12	2	
28	TGFb1_027	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	E	C	1120.19	2	
29	TGFb1_028	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	E	C	1245.24	2	
30	TGFb1_029	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	E	PxG	V	Nat1	Y	H	E	C	1252.23	2	
31	TGFb1_030	F	Nat1	V	KCOmeglun	N	V	4Py	D	KCOmeglun	PxG	V	Nat1	Y	H	E	C	1362.59	2	
32	TGFb1_031	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1269.3	2	
33	TGFb1_032	F	Nat1	V	V	N	V	4Py	D	D	PxG	V	Nat1	Y	H	KCOppzaa	C	1269.3	2	

[0282] 表1の配列番号32及び33のm/zは、各々リンカーであるK (MeP

EG8c)、K(OCOMPEG10000)のうち、MePEG8c、OCOMPEG10000構造の付加前の値である。

[0283] 表2 配列番号2～19のペプチド配列のSPR測定結果とアンタゴニスト活性測定結果

[0284] [表2]

配列番号	実施例の名称	KD (nM)	SBE reporter %inhibition				
			(nM)	0.075	0.75	7.5	75.0
2	TGFb1_001	0.55	19.7	69.7	98.1	100.6	
4	TGFb1_003	0.72	1.6	65.2	97.3	98.8	
5	TGFb1_004	1.49	0.0	0.9	70.1	94.9	
6	TGFb1_005	1.15	0.4	47.0	90.8	98.9	
7	TGFb1_006	1.03	2.8	69.3	97.1	99.7	
8	TGFb1_007	2.70	0.1	37.5	83.5	96.7	
9	TGFb1_008	4.64	3.8	56.8	94.6	98.4	
10	TGFb1_009	0.58	2.7	53.0	94.8	99.6	
11	TGFb1_010	0.90	2.0	63.8	97.9	99.9	
12	TGFb1_011	0.62	6.1	76.3	97.9	100.0	
13	TGFb1_012	0.86	10.1	65.2	96.0	99.5	
15	TGFb1_014	0.66	0.0	64.8	97.2	98.8	
16	TGFb1_015	0.59	0.0	76.9	98.7	98.4	
17	TGFb1_016	0.97	6.1	61.0	97.6	100.2	
18	TGFb1_017	1.07	21.7	60.2	97.2	100.0	
19	TGFb1_018	1.42	22.2	61.0	97.6	99.9	

[0285] 表3 配列番号20～33のペプチド配列のSPR測定結果とアンタゴニスト活性測定結果

[0286] [表3]

配列番号	実施例の名称	KD (nM)	SBE reporter %inhibition						
			(nM)	0.062	0.185	0.56	1.7	5.0	15.0
13	TGFb1_012	0.86	4.18	19.75	48.37	80.93	94.42	98.68	
20	TGFb1_019	1.41	5.21	11.33	30.18	61.64	87.75	96.36	
21	TGFb1_020	1.26	8.50	15.76	36.31	70.43	89.30	96.94	
22	TGFb1_021	1.37	10.20	26.85	58.89	87.77	97.12	98.85	
23	TGFb1_022	0.91	6.49	20.84	53.76	85.23	97.14	99.48	
24	TGFb1_023	1.04	8.58	24.45	49.71	82.35	95.98	99.52	
25	TGFb1_024	1.04	5.79	16.65	45.05	80.24	95.55	98.87	
26	TGFb1_025	0.83	4.81	18.38	43.34	77.51	94.70	99.42	
27	TGFb1_026	1.03	6.85	17.80	41.38	74.29	93.39	98.04	
28	TGFb1_027	1.11	2.53	9.14	28.41	59.38	84.91	95.51	
29	TGFb1_028	1.31	0.94	6.17	20.36	47.63	73.91	91.72	
30	TGFb1_029	0.94	11.97	16.91	32.43	63.66	85.78	96.75	
31	TGFb1_030	1.13	10.88	14.30	29.95	52.55	80.82	95.25	
32	TGFb1_031	0.91	9.29	20.14	51.88	84.94	96.73	99.09	
33	TGFb1_032	3.08	2.67	7.18	1.11	4.77	53.99	91.32	

[0287] 表2及び表3のSBE reporterの欄の下の濃度(nM)は、実

際の測定に使用したペプチドの濃度を記載している。

[0288] 表4 アンタゴニスト活性は測定していないが、 $\text{TGF-}\beta$ への結合活性を示したペプチド配列、MS値、 $\text{TGF-}\beta$ への結合活性測定結果（配列番号34～69）

[0289]

[表4]

配列番号	変異例の名称	SEQ																リンク	HA tag	m/z	価数	TGF-βへの結合活性
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16					
34	TGFb1_033	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	W	Y	H	V	C	G	HA-tag	1805.4	2	43%
35	TGFb1_034	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	E	H	V	C	G	HA-tag	1803.5	2	43%
36	TGFb1_035	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	W/N	Y	H	V	C	G	HA-tag	1805.6	2	45%
37	TGFb1_036	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	E	V	C	G	HA-tag	1805.6	2	46%
38	TGFb1_037	F	NatI	V	V	N	V	Y	A	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1889.3	2	51%
39	TGFb1_038	F	NatI	V	Q	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1906	2	61%
40	TGFb1_039	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	A	C	G	HA-tag	1896.7	2	62%
41	TGFb1_040	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	MeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1889.4	2	62%
42	TGFb1_041	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	A	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1889.4	2	63%
43	TGFb1_042	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	A	V	C	G	HA-tag	1877.6	2	67%
44	TGFb1_043	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	K	C	G	HA-tag	1825.4	2	71%
45	TGFb1_044	F	NatI	V	V	N	V	Y	Q	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.3	2	74%
46	TGFb1_045	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1864.8	2	75%
47	TGFb1_046	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	Q	V	C	G	HA-tag	1906.5	2	78%
48	TGFb1_047	F	NatI	V	V	N	V	E	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1883.5	2	80%
49	TGFb1_048	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	4Py	H	V	C	G	HA-tag	1903.6	2	80%
50	TGFb1_049	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	Q	C	G	HA-tag	1926	2	81%
51	TGFb1_050	F	NatI	V	K	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1925.5	2	81%
52	TGFb1_051	F	W/N	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1906	2	85%
53	TGFb1_052	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	K	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1894.7	2	86%
54	TGFb1_053	F	NatI	V	V	N	V	F4G	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1931.2	2	87%
55	TGFb1_054	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	E	C	G	HA-tag	1925.9	2	89%
56	TGFb1_055	F	W	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1905.6	2	90%
57	TGFb1_056	F	NatI	V	V	N	V	Q	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1883.4	2	99%
58	TGFb1_057	F	NatI	V	V	N	V	Y	E	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1918.1	2	93%
59	TGFb1_058	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	3Py	H	V	C	G	HA-tag	1903.6	2	95%
60	TGFb1_059	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	Q	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.6	2	95%
61	TGFb1_060	F	NatI	V	V	N	V	Y	K	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.3	2	95%
62	TGFb1_061	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1910.9	2	100%
63	TGFb1_062	F	NatI	V	V	N	V	K	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1893.5	2	100%
64	TGFb1_063	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	K	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.4	2	102%
65	TGFb1_064	F	NatI	V	V	N	V	F3G	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1931.4	2	104%
66	TGFb1_065	F	W/N	V	V	N	V	Y	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1906.1	2	106%
67	TGFb1_066	F	NatI	V	V	N	V	Y	D	E	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1918.1	2	116%
68	TGFb1_067	F	NatI	V	V	N	V	4Py	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1903.3	2	117%
69	TGFb1_068	F	NatI	V	V	N	V	3Py	D	D	PeG	V	NatI	Y	H	V	C	G	HA-tag	1903.5	2	140%

[0290] 表4のTGF-βへの結合活性は、TGFb1_061（配列番号62）のペプチドのTGF-β1に対する結合能を100%とした時の相対値として

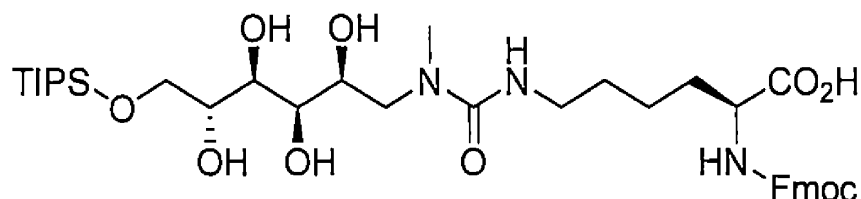
示した。

参考例 新規非天然アミノ酸の合成

本参考例は、本発明のペプチドに含まれる非天然アミノ酸の合成を示す。

[0291] KCOmeglumineの合成

[0292] [化18]



[0293] N2- { [(9H-フルオレン-9-イル) メトキシ] カルボニル} -L-リジン-2-プロペン-1-イルエステル塩酸塩 (8.00 g、17.98 mmol) のジクロロメタン (80 mL) 溶液に、トリホスゲン (2.67 g、8.99 mmol) を氷冷下で加えた後、DIEA (10.1 mL、57.5 mmol) を滴下し、氷冷下で30分攪拌した。反応液にジオキサン (80 mL) を加えた後、メグルミン (14.0 g、71.9 mmol) 含有0.5 mol/L炭酸水素ナトリウム水溶液 (80 mL) を加えた。反応液を終夜氷冷下で攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、有機層を水、0.5 mol/Lクエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。その溶液を濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し (ジクロロメタン/メタノール=100/0-60/40)、所望の生成物 (8.70 g、13.82 mmol) を白色アモルファスとして得た。

[0294] 得られた生成物 (8.70 g、13.82 mmol) をジクロロメタン (100 mL) に溶かし、氷冷下でイミダゾール (2.35 g、34.5 mmol)、トリイソプロピルクロロシラン (3.33 g、17.27 mmol) を加え、室温で5日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水で3回洗浄した。抽出層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮

した。

[0295] 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（酢酸エチル／ヘキサン＝0／100－60／40 その後ジクロロメタン／メタノール＝100／0－90／10）、所望の生成物（9.30g、11.83mmol）を白色アモルファスとして得た。

[0296] 得られた生成物（10.4g、13.23mmol）をジクロロメタン（50mL）に溶かし、フェニルシラン（3.3mL、26.5mmol）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（0.38g、0.331mmol）を加え室温で2時間攪拌した。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（酢酸エチル／ヘキサン＝0／100－60／40 その後ジクロロメタン／メタノール＝100／0－90／10）、表記物質（7.7g、10.3mmol）を得た。

[0297] ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 746.6$ (M+H)⁺

産業上の利用可能性

[0298] 本発明に係るペプチドは、TGF- β に対し結合活性を有し、そして、好ましくは、TGF- β アンタゴニスト活性を有する。がんや肝疾患等の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等としての利用可能である。

請求の範囲

[請求項1]

以下のアミノ酸配列：

F-N a l 1-V-V-N-V-Y-D-D-P e G-V-N a l
1-Y-H-V-C-G（配列番号2）；

あるいは、

上記のアミノ酸配列の2番目、4番目、7番目、8番目、9番目、
10番目、12番目、13番目、14番目、15番目及び17番目の
アミノ酸残基からなるグループから選択される、1-11個のアミノ
酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列
を含む、ペプチド。

[請求項2]

以下のアミノ酸配列：

F-X 1-V-X 2-N-V-X 3-X 4-X 5-X 6-V-X 7
-X 8-X 9-X 10-C（配列番号1）

ここにおいて、

X 1は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸で
あり；

X 2は、任意のアミノ酸であり；

X 3は、任意のアミノ酸であり；

X 4は、任意のアミノ酸であり；

X 5は、任意のアミノ酸であり；

X 6は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸
、又は置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸であり
；

X 7は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸で
あり；

X 8は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸で
あり；

X 9は、任意のアミノ酸であり；

X 1 0 は、任意のアミノ酸である、
を含む、ペプチド。

- [請求項3] X 1 が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である、請求項 2 に記載のペプチド。
- [請求項4] X 1 が、N a l 1、W 6 N、W 7 N 又は W である、請求項 2 に記載のペプチド。
- [請求項5] X 2 が、V、K、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e 又は Q である、請求項 2－4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項6] X 2 が、V、K、K C O p i p z a a、又は K C O m e g l u m i n e である、請求項 2－4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項7] X 3 が、Y、4 P y、A、E、F 4 G、Q、K、F 3 G、又は 3 P y である、請求項 2－6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項8] X 3 が、Y 又は 4 P y である、請求項 2－6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項9] X 4 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項 2－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項10] X 4 が、D、A、Q、K 又は E である、請求項 2－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項11] X 5 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項 2－10 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項12] X 5 が、D、E、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e、A、Q、又は K である、請求項 2－10 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項13] X 6 が、P e G、K 又は M e G である、請求項 2－12 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項14] X 7 が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸であ

る、請求項 2-13 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項15] X7 が、N a l 1、W6 N、又は W である、請求項 2-13 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項16] X8 が、Y、4 P y、3 P y 又は E である、請求項 2-15 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項17] X8 が、Y 又は 4 P y である、請求項 2-15 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項18] X9 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項 2-17 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項19] X9 が、H、A、Q 又は E である、請求項 2-17 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項20] X10 が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項 2-19 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項21] X10 が、V、E、K C O p i p z a a、K C O m e g l u m i n e、Q、K、又は A である、請求項 2-19 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項22] 配列番号 2-33、あるいは、
配列番号 2、4-13、15-33 のうち C 末端のグリシン (G) を有しないアミノ酸配列
のいずれかに 1 つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、請求項 1-21 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項23] 前記ペプチドが、環状ペプチドである、請求項 1-22 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項24] クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する、請求項 23 に記載の環状ペプチド。

- [請求項25] さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、請求項 1－24 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項26] そのC末端にリンカーを含む、請求項 1－21、23－25 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項27] TGF- β 結合活性を有する、請求項 1－26 いずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項28] TGF- β アンタゴニスト活性を有する、請求項 1－27 いずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項29] 請求項 1－28 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、医療用、診断用組成物。
- [請求項30] 請求項 1－28 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、研究用組成物であって、ただし、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く、前記研究用組成物。