

明 細 書

発明の名称： ペプチド及びペプチドを含む組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド及び当該ペプチドを含む組成物に関する。

背景技術

[0002] 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、SARSコロナウィルス2（Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2；SARS-CoV-2）により引き起こされ2020年初頭に世界的な感染（パンデミック）に至った疾病である。2020年12月上旬における全世界の死者数は156万人を超えており、対策が世界的な急務となっている。

[0003] SARS-CoV-2は、SARSコロナウィルスやMERSコロナウィルス（MERS-CoV）と同様ベータコロナウィルス属に属する新種のウィルスであり、世界中で有効な治療薬や予防薬を見出すべく研究が急がれている。現在薬物療法に使用可能な薬剤として挙げられているのが、抗ウィルス薬（レムデシビルやファビピラビル）、抗炎症剤（デキサメタゾンやスタチン）、標的免疫調整薬療法（トシリズマブ、サリルマブなど）である（非特許文献1）。しかし、これらの薬剤は元来、他の疾病への治療に開発されたものであり、コロナウィルス感染症を主要な治療ターゲットとしていないものが多い。例えば、レムデシビルについてはフィロウィルスの一種であるエボラウィルスにより引き起こされるエボラ出血熱の治療薬として開発されたが、コロナウィルスを含む一本鎖RNAウィルスへ抗ウィルス活性を示すため、COVID-19への治療薬として特例承認を得たものである。そのため、患者によっては投与しても症状の改善が見られない場合や、副作用を引き起こす場合もあり、問題になっている。さらに最近、COVID-19の引き金となった武漢型SARS-CoV-2から変異した欧州型、ブラジル型、南アフリカ型などの変異ウィルス株が発見されており、それら従来の

薬剤が変異型ウイルスに対しても効果があるかどうかは研究が待たれているところである。

- [0004] また、SARS-CoV-2へのワクチンとしてはmRNAワクチンである「コミナティ」（コロナウイルス修飾ウリジンRNAワクチン）が2020年12月に日本においても承認を得られ、接種が急がれている。しかしながら、ワクチンであるため罹患してからの治療薬としての効果は期待できない。さらに、南アフリカ型変異ウイルスに対しては効果が低下するという指摘もあるため（非特許文献2）、依然としてコロナウイルスに対する予防又は治療薬の開発が求められている。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：新型コロナウイルス感染症 診療の手引き p. 37-44（2021年度 第4.2版）

非特許文献2：New England Journal of Medicine、Liu et al.、Neutralizing Activity of BNT162b2-Elicited Serum Preliminary Report (DOI: 10.1056/NEJMc2102017)

非特許文献3：Ujiike M., and Taguchi T., Viruses. 2015 Apr 3;7(4):1700-1725.

非特許文献4：Yuan H. et. al., Acta Pharmacol Sin. 2020 Sep; 41(9): 1141-1149.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明者らが、コロナウイルスに対する予防又は治療薬を提供するために鋭意・研究に努めた結果、本発明を想到した。本発明は、ペプチド及び当該ペプチドを含む組成物、特に、抗SARS-CoV-2ウイルス活性を有す

るペプチド、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための組成物、SARS-CoV-2ウイルス感染症を診断するための組成物を提供する。本発明はまた、本発明のペプチドと他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤を含む、組合せ剤を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 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：

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C（配列番号2）

あるいは、上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-10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：

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C（配列番号2）

あるいは、上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、5番目、6番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-8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。

[3]

以下のアミノ酸配列：

X1-X2-X3-Cha-X4-X5-Y-X6-X7-X8-Cha-C（配列番号1）

ここにおいて、

X 1 は、A、E、Me A、またはMe Eあり；

X 2 は、N－メチルアミノ酸であり；

X 3 は、S又はA i bであり；

X 4 は、非置換の若しくは置換された芳香環を側鎖に有するアミノ酸であり；

X 5 は、：任意のアミノ酸であり；

X 6 は、非置換の若しくは置換された芳香環を側鎖に有するアミノ酸であり；

X 7 は、任意のアミノ酸であり；

X 8 は、任意の塩基性アミノ酸である、
を含む、ペプチド。

[4]

X 1 が、Me A又はMe Eである、[3] に記載のペプチド。

[5]

X 2 が、Me F又はMe N l eである、[3] 又は[4] に記載のペプチド。

[6]

X 4 が、非置換の若しくは置換されたY、又は、非置換若しくは置換されたFである、[3]－[5] のいずれか1項に記載のペプチド。

[7]

X 4 が、Y又はF 4 Fである、[3]－[6] のいずれか1項に記載のペプチド。

[8]

X 5 が、任意の親水性アミノ酸又はA i b、あるいはN－メチル化された任意の親水性アミノ酸又はA i bである、[3]－[7] のいずれか1項に記載のペプチド。

[9]

X5が、Aib、E、K、S、dd、ddap、ds、MeEのいずれかである、[3] – [8] のいずれか1項に記載のペプチド。

[10]

X6が、非置換の若しくは置換されたY、又は、非置換若しくは置換されたFである、[3] – [9] のいずれか1項に記載のペプチド。

[11]

X6が、Y、Yae、3Py、NaI1のいずれかである、[3] – [10] のいずれか1項に記載のペプチド。

[12]

X7が、A、Ahp、Cit、Dab、E、F4COO、K、Rのいずれかである、[3] – [11] のいずれか1項に記載のペプチド。

[13]

X8が、K、R、A4pのいずれかである、[3] – [12] のいずれか1項に記載のペプチド。

[14]

C末端に、さらにD-グルタミン酸を含む、[1] – [13] のいずれか1項に記載のペプチド。

[15]

配列番号2-126、132-234のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、[1] – [14] のいずれか1項に記載のペプチド。

[16]

環状ペプチドである、[1] – [15] のいずれか1項に記載のペプチド。

[17]

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、[16] に記載のペプチド。

[18]

さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、〔１〕－〔１７〕のいずれか１項に記載のペプチド。

〔１９〕

〔１〕－〔１７〕のいずれか１項に記載のペプチドを含む、医薬組成物。

〔２０〕

抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス活性を有する、〔１９〕に記載の医薬組成物。

〔２１〕

コロナウイルス感染症の予防又は治療のための、〔１９〕又は〔２０〕に記載の医薬組成物。

〔２２〕

コロナウイルス感染症が、ＣＯＶＩＤ－１９である、〔１９〕－〔２１〕のいずれか１項に記載の医薬組成物。

〔２３〕

〔１〕－〔１７〕のいずれか１項に記載のペプチドの薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含む、〔１９〕－〔２２〕のいずれか１項に記載の医薬組成物。

〔２４〕

〔１〕－〔１７〕のいずれか１項に記載のペプチドを含む、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス感染症を診断するための診断用組成物。

〔２５〕

コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤と併用される、〔１９〕－〔２３〕のいずれか１項に記載の医薬組成物。

〔２６〕

コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤が、レムデシビル、カシリビマブとイムデビマブの併用剤、及び、モラヌピラビル若しくはその活性体からなる群から選択される、〔２５〕に記載の医薬組成物。

〔２７〕

コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤と同時投与される、[24]又は[26]に記載の医薬組成物。

[28]

[1]－[17]のいずれか1項に記載のペプチドと、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤を含む、組合せ剤。

[29]

[1]－[17]のいずれか1項に記載のペプチドを含む、医薬組成物と併用される、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤。

発明の効果

[0008] 本発明に係るペプチドによれば、抗SARS-CoV-2活性を有するため、COVID-19の予防又は治療用化合物として有用である。また、本発明のペプチドは、SARS-CoV-2に結合するため、診断薬としても有用である。さらに、本発明のペプチドは他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と併用することにより、コロナウイルス感染症の予防又は治療のより高い効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0009] [図1-1]図1-1は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性測定の結果を示すグラフである。

[図1-2]図1-2は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性測定の結果を示すグラフである。

[図1-3]図1-3は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性測定の結果を示すグラフである。

[図1-4]図1-4は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性測定の結果を示すグラフである。

[図2-1]図2-1は、マウスSARS-CoV-2感染致死モデルにおける555__p020および55555__p028の重症化阻止効果を示すグラフである。

[図2-2]図2-2は、マウスSARS-CoV-2感染致死モデルにおける555__p020および55555__p028の致死率改善効果を示すグラフである。

[図3]図3は、マウスSARS-CoV-2感染致死モデルの観察終了時の肺組織像を示す、図面に変わる写真である。写真のスケールバーは200 μ mを示す。写真中のA1は肺胞、Brは細気管支、Vは血管を示す。

[図4]図4は、SARS-CoV-2感染による肺炎に対する5555__p028の抑制作用を示す、図面に代わる写真（肺後葉の組織像）である。写真のスケールバーについて、a, c, e, gは2.0mm、b, d, f, hは100 μ mを示す。a, bは溶媒対照群、c, dは5555__p028の25mg/Kg群、e, fは5555__p028の5mg/Kg群、g, hは5555__p028の1mg/Kg群での結果を示す。

[図5-1]図5-1は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合の武漢株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-2]図5-2は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合の武漢株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-3]図5-3は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合の武漢株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-4]図5-4は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合のデルタ株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-5]図5-5は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペ

プチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合のデルタ株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-6]図5-6は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合のデルタ株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-7]図5-7は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合のオミクロン株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

[図5-8]図5-8は、細胞培養上清中のウイルスRNA量測定による、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物を組み合わせた場合のオミクロン株に対する抗ウイルス活性測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] 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。

[0011] 略語（一般）

Å：オングストローム（単位）；

AA：アミノ酸；

Allyl：アリルオキシカルボニル；

ClAc：クロロアセチル；

DCM：ジクロロメタン；

DIC：N，N'-ジイソプロピルカルボジイミド；

DMSO：ジメチルスルホキシド；

DMF：ジメチルホルムアミド；

DIPEAもしくはDIEA：N，N-ジイソプロピルエチルアミン；

DODT：6-ジオキサー-1，8-オクタン-ジチオール；

FAM：フルオレセイン；

Fmoc：9-フルオレニルメチルオキシカルボニル；

Fmoc-Lys (Fmoc)-OH : N²、N⁶-ビス ((9H-フル
オレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) -L-リジン ;

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 ;

MeCN : アセトニトリル ;

mL : ミリリットル (単位) ;

M : モーラー (単位) ;

μL : マイクロリットル (単位) ;

mM : ミリモーラー (単位) ;

μM : マイクロモーラー (単位) ;

mg : ミリグラム (単位) ;

MeCN : アセトニトリル ;

mm : ミリメートル (単位) ;

Mpe : 3- (3-メチル) ペンチル ;

nm : ナノメートル (単位) ;

nM : ナノモーラー (単位) ;

Oxyma pure : シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル ;

rpm : 回転毎分 (単位) ;

TAMRA : 5-カルボキシテトラメチルローダミン ;

tBu : ターシャリーブチル ;

TFA : トリフルオロ酢酸 ;

TIS : トリイソプロピルシラン ;

TrtまたはTr : トリチル基 ;

MOI (multiplicity of infection) : 感染

多重度；

RBD (receptor binding domain) : 受容体結合ドメイン；

(実施例に記載されている「抗SARS-CoV-2抗体カクテル製剤（カシリビマブ・イムデビマブ；REGN-COV2）」は、SARS-CoV-2スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（RBD）を標的とする2種のヒトIgG1中和抗体（カシリビマブとイムデビマブのカクテルである。）

RT-qPCR：リアルタイム定量PCR；

HE染色：ヘマトキシリン・エオジン染色；

EDTA：エチレンジアミン四酢酸；

PBS：リン酸緩衝生理食塩水；

Pd(OAc)₂：酢酸パラジウム(II)；

PPh₃：トリフェニルホスフィン；

PhSiH₃：フェニルシラン；

FBS：ウシ胎児血清；

CPE (cytopathic effect) : 細胞変性効果；

(ウイルスの侵入によって引き起こされる宿主細胞の形態変化)

IC₅₀ (half maximal (50%) inhibitory concentration) : 50%阻害濃度

CC₅₀ (half cytotoxic concentration) : 50%細胞毒性濃度

WRCEVA: The World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses

[0012] 略語（非天然アミノ酸）

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

A 4 p : (S) - 2 - アミノ - 3 - (ピペリジン - 4 - イル) プロパン酸
(CAS No. 342036-77-5) ;

A 4 p i p a a : 4 - アミノ - 1 - (カルボキシメチル) ピペリジン - 4
- カルボン酸 (キシダ化学) ;

A h p : (S) - 2 - アミノヘプタン酸 (CAS No. 44902-0
2-5) ;

A i b : α - メチルアラニン (CAS No. 62-57-7) ;

A i n d : (S) - 2 - アミノ - 3 - (2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデ
ン - 2 - イル) プロパン酸 (CAS No. : 736122-13-7) ;

a M e S : 2 - メチルセリン ;

C h a : β - シクロヘキシル - L - アラニン (CAS No. 27527-
05-5)

C i t : (S) - 2 - アミノ - 5 - ウレイドペンタン酸 (CAS No.
372-75-8) ;

D a b : L - α , γ - ジアミノブタン酸 (CAS No. 1758-80
- 1) ;

d d : D - アスパラギン酸 ;

d d a p : D - α , β - ジアミノプロピオン酸 (CAS No. 1915
- 96-4) ;

d e : D - グルタミン酸 ;

d k : D - リジン ;

d r : D - アルギニン

d s : D - セリン ;

F 4 C O O : 4 - カルボキシ - L - フェニルアラニン (CAS No. 1
26109-42-0) ;

F 4 F : 4 - フルオロ - L - フェニルアラニン (CAS No. 1132
- 68-9) ;

M e : N - メチル ;

Me A : N-メチルアラニン ;
Me d a : N-メチル-D-アラニン ;
Me d d : N-メチル-D-アスパラギン酸 ;
Me d e : N-メチル-D-グルタミン酸 ;
Me F : N-メチルフェニルアラニン ;
Me E : N-メチルグルタミン酸 ;
Me G : N-メチルグリシン ;
Me N l e : N-メチル-L-ノルロイシン (CAS No. 17343-27-0) ;
Na l 1 : β -(1-ナフチル)-L-アラニン (CAS No. 55516-54-6) ;
Y a e : (S)-2-アミノ-3-(4-(2-アミノエトキシ)フェニル)プロパン酸 (CAS No. 1909283-20-0)
Y 3 M e : (S)-2-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)プロパン酸 (CAS No. : 17028-03-4) ;
c C 1 0 C O O : 12-オキシドデカン酸 ;
c C 1 2 C O O : 14-オキソテトラデカン酸 ;
c C 1 4 C O O : 16-オキソヘキサデカン酸 ;
c C 8 C O O : 10-オキソデカン酸

[0013] 2. ペプチド (A)

本発明は、ペプチドに関する。

[0014] 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：

Me A-Me F-S-Ch a-Y-S-Y-Y-R-R-Ch a-C (配列番号2)

あるいは、上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-10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。

[0015] MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (配列番号2) は、本願明細書の実施例において、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質 (GENE Accession No. YP_009724390) に結合し、かつ、抗SARS-CoV-2活性が確認されたペプチドである。

[0016] 配列番号2のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-10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。好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、5番目、6番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-8個のアミノ酸残基における置換、欠失、付加および／又は挿入である。アミノ酸の置換、欠失、付加および／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。

[0017] 「保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価また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、当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また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およ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およ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-芳香族相互作用または陽イオン- 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、酸性または非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的およ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。

[0018] 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、73-75頁：L. Lehninger、Biochemistry、2nd edition、pp 73-75、Worth Publisher、New York（1975）に記載の置換）および典型的置換を含む。

[0019] 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。

[0020] 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（「A l a」または単に「A」とも記す）、グリシン（「G l y」または単に「G」とも記す）、バリン（「V a l」または単に「V」とも記す）、ロイシン（「L e u」または単に「L」とも記す）、イソロイシン（「I l e」または単に「I」とも記す）、プロリン（「P r o」または単に「P」とも記す）、フェニルアラニン（「P h e」または単に「F」とも記す）、トリプトファン（「T r p」または単に「W」とも記す）、チロシン（「T y r」または単に「Y」とも記す）、メチオニン（「M e t」または単に「M」とも記す）を含む。

[0021] 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。

[0022] 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、A l

a、G l y、V a l、l l e、L e uを含む。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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」または単に「S」とも記す）、スレオニン（「T h r」または単に「T」とも記す）、システイン（「C y s」または単に「C」とも記す）、アスパラギン（「A s n」または単に「N」とも記す）、グルタミン（「G l n」または単に「Q」とも記す）、アスパラギン酸（「A s p」または単に「D」とも記す）、グルタミン酸（「G l u」または単に「E」とも記す）、リジン（リシンとも記す。「L y s」または単に「K」とも記す）、アルギニン（「A r g」または単に「R」とも記す）、ヒスチジン（「H i s」または単に「H」とも記す）を含む。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 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、C 1 - C 5の、好ま

しくは、C 1－C 3、より好ましくはC 1) 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、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

[0031] なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加また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。例えば、A 4 pはアラニンの側鎖にピペリジル基を有するアミノ酸であるが、当該ピペリジル基が付加されたことで、非極性アミノ酸グループに属するアラニンとは異なり、塩基性を有する極性アミノ酸の性質を示す。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。例えば、塩基性アミノ酸に属するアルギニンの主鎖窒素原子がメチル化されたアミノ酸であるN－メチルアルギニン（Me R）は、非天然アミノ酸であるが、塩基性を示すため、塩基性アミノ酸に分類することができる。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。

[0032] 非限定的に、非天然のアミノ酸には、N－メチルアミノ酸、3 P y、A 4 p、A 4 p i p a a、A h p、A i b、A i n d、a M e S、C h a、C i t、D a b、d d、d d a p、d k、d r、d s、F 4 C O O、4 P y、F 4 F、M e N l e、M e d a、M e d d、M e d e、N a l 1、Y a e、Y

3Me等を含む。例えば、Ahp、Aib、Aind、Cha、MeNle、F4COO、F4F、Nal1、Yae、Y3Meは疎水性アミノ酸に、3Py、Cit、A4p、A4pipaa、Dab、ddap、dk、dr、dd、dsは親水性アミノ酸に分けることができ、さらに、Ahp、Aib、Cha、MeNleは脂肪族アミノ酸、Citは極性アミノ酸、3Py、A4p、A4pipaa、Dab、ddap、dk、drは塩基性アミノ酸、ddは酸性アミノ酸、dsは中性アミノ酸、4Py、F4COO、F4F、Nal1、Yae、Y3Meは芳香族アミノ酸に分けることもできる。なお、dd、dsなどの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。

[0033] 一態様において、本発明のペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、4番目のアミノ酸Chaが置換されているペプチドであってもよい。一態様において、4番目のアミノ酸Chaは、Aindに置換されていても良い。

[0034] 一態様において、本発明のペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、7番目のアミノ酸Yが置換されているペプチドであってもよい。一態様において、7番目のアミノ酸Yは、置換されたY、例えばY3Me、に置換されていても良い。

[0035] 前記ペプチドは、非限定的に、一態様において、C末端に、さらにD-グルタミン酸を含んでもよい。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。

[0036] 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」については、「3. ペプチド(B)」で詳述する。

[0037] 前記ペプチドは、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。

[0038] 前記ペプチドは、好ましくは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質に結合する。前記ペプチドは、抗SARS-CoV-2活性を有する。前記ペプチドは、好ましくは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質に結合し、そして、抗SARS-CoV-2活性を有する。「SARS-CoV-2のスパイクタンパク質に結合する」、「抗SARS-CoV-2活性を有する」について、「3. ペプチド(B)」で詳述する。

[0039] 3. ペプチド(B)

本発明はペプチドに関する。

[0040] 本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

X1-X2-X3-Cha-X4-X5-Y-X6-X7-X8-Cha
-C (配列番号1)

ここにおいて、

X1は、A、E、MeA、またはMeEであり；

X2は、N-メチルアミノ酸であり；

X3は、S又はAibであり；

X4は、非置換の若しくは置換された芳香環を側鎖に有するアミノ酸であり；

X5は、任意のアミノ酸であり；

X6は、非置換の若しくは置換された芳香環を側鎖に有するアミノ酸であり；

X7は、任意のアミノ酸であり；

X8は、任意の塩基性アミノ酸である、
を含む。

[0041] 非置換の芳香環を側鎖に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、芳香族アミノ酸に属する天然のアミノ酸、又はN-アセチル化された芳香族アミノ酸のような非天然アミノ酸や、天然のアミノ酸の側鎖に芳香環が付加又は置換されたアミノ酸を含む。また、置換された芳香環を側鎖に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、芳香

族アミノ酸に属する天然アミノ酸又はN-アセチル化された芳香族アミノ酸のような非天然アミノ酸が有する芳香環の一部の分子が、他の分子や官能基に置換された環や複素環化した環を有するアミノ酸や、縮合環化した環を有するアミノ酸を含む。例えば、Tyrの側鎖ヒドロキシ基に置換を有するアミノ酸、Pheのベンゼン環に置換基を有するアミノ酸や、Trpの側鎖インドール環にヘテロ原子を含む環を有するアミノ酸、置換基を有するアミノ酸、並びにそれらに官能基が付加されたアミノ酸をも含む。

- [0042] X1-X8の上記選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。
- [0043] 一態様において、X1が、MeA、MeE又は3Pyである。一態様において、X1が、MeA又はMeEである。一態様において、X1が、3Pyである。
- [0044] 一態様において、X2が、MeF又はMeNieである。
- [0045] 一態様において、X4が、非置換の若しくは置換されたY、又は、非置換若しくは置換されたFである。
- [0046] 一態様に置いて、X4が、Y又はF4Fである。
- [0047] 一態様において、X5が、任意の親水性アミノ酸又はAib、あるいはN-メチル化された任意の親水性アミノ酸又はAibである。一態様において、X5が、Aib、A4pipaa、E、K、S、P、dd、ddap、ds、de、MeE、MeG、aMeS、Meda、Medd、Medeのいずれかである。一態様において、X5が、Aib、E、K、S、dd、ddap、ds、MeEのいずれかである。一態様において、X5が、A4pipaa、P、de、MeG、aMeS、Meda、Medd、Medeのいずれかである。
- [0048] 一態様において、X6が、非置換の若しくは置換されたY、又は、非置換若しくは置換されたFである。
- [0049] 一態様において、X6が、Y、Yae、3Py、NaI1、Y3Meのいずれかである。一態様において、X6が、Y、Yae、3Py、NaI1のいずれかである。一態様において、X6が、Y3Meである。

- [0050] 一態様において、X 7 が、A、A h p、C i t、D a b、E、F 4 C O O、K、R のいずれかである。
- [0051] 一態様において、X 8 が、K、R、A 4 p、d k、d r のいずれかである。一態様において、X 8 が、K、R、A 4 p のいずれかである。一態様において、X 8 が、d k、d r のいずれかである。
- [0052] また、一態様において、本発明のペプチドは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、4 番目のアミノ酸 C h a が置換されているペプチドであってもよい。一態様において、4 番目のアミノ酸 C h a は、A i n d に置換されていても良い。
- [0053] また、一態様において、本発明のペプチドは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、7 番目のアミノ酸 Y が置換されているペプチドであってもよい。一態様において、7 番目のアミノ酸 Y は、置換された Y、例えば Y 3 M e、に置換されていても良い。
- [0054] なお、非置換の Y とは天然のアミノ酸であるチロシンであり、置換された Y とは、Y が側鎖に有するフェノールのヒドロキシル基が置換された Y の誘導体アミノ酸、複素環化した環を有する Y の誘導体アミノ酸、又は、縮合多環構造を有する Y の誘導体アミノ酸などが含まれる。
- [0055] また、非置換の F とは天然のアミノ酸であるフェニルアラニンであり、置換された F とは、フェニルアラニンが側鎖に有するベンゼン環に置換基を有するアミノ酸、複素環化した環を有する F の誘導体アミノ酸、又は、縮合多環構造を有する F の誘導体アミノ酸などが含まれる。
- [0056] X 1 - X 8 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。
- [0057] 前記ペプチドは、非限定的に、一態様において、C 末端に、さらに D - グルタミン酸を含んでもよい。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。
- [0058] 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、その全部または一部が環状になっているものをいう。前記ペプチドは、ペプチド中のアミノ酸が架橋構造

を形成したもの、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、ラッセペプチド状構造を有するもの等も含む。すなわち、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。

[0059] 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。

[0060] 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12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12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。

[0061] 前記ペプチドは、一態様において、配列番号2-126、132-234のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号2-126、132-234のいずれか1つに記載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。

[0062] 前記ペプチドは、配列番号1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機数をいい、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20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以上であり、好ましくはアミノ酸が19以下、18以下、17以下、16以下、15以下である。最も好ましくはアミノ酸が12以上13以下である。

[0063] 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（Polyethyleneglycol）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-Gly-Gly-Ser]_n（式中、*n*は1、2、3、4、5または6である）を有するペプチドなどのグリシンーリッチペプチドや、米国特許第5,525,491号に記載のセリナーリッチペプチドリリンカーを用いることができる。

[0064] 化学リンカーとペプチドリリンカーの複合体としては、例えば、アミノ酸とPEGリンカーの複合体や、アミノ酸と脂肪酸リンカーの複合体、またはアミノ酸、PEG及び脂肪酸リンカーの複合体であってもよい。例えば、配列番号219乃至234で表されるペプチドのうち、13番目以降の構造（例えば、配列番号219においては13番目のアミノ酸以降の構造；d e-d k

(c C 1 0 C O O) 構造であり、配列番号 2 2 5 においては 1 3 番目のアミノ酸以降の構造 ; d e - P E G 2 c - d k (c C 1 0 C O O) 構造である) であってよい。なお、ペプチドリンカーにおいては、アミノ酸－アミノ酸間またはアミノ酸－化学リンカー間の結合が、アミノ酸の側鎖を介して結合していても良い。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。

- [0065] 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、N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N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。
- [0066] 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。例えば、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質は 3 量体を形成することが知られているため、それにあわせて、前記ペプチドは 3 量体（トリマー）になっていてもよい。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。
- [0067] 前記ペプチドは、好ましくは、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に結合する。前記ペプチドは、抗 SARS-CoV-2 活性を有する。前記ペプチドは、好ましくは、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に結合し、そして、抗 SARS-CoV-2 活性を有する。
- [0068] 「SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に結合する」とは、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質 (GENE Accession No. YP_009724390) に結合することを示す。スパイクタンパク質への結合は、公知の分子間結合を測定する任意の方法によって測定することができる。非限定的に、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ、スキャチャード解析ならびに／または放射免疫アッセイ (RIA)、酵素免疫アッセイ (EIA) およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合結

合アッセイ、ならびに当技術分野でそれ自体公知であるその異なるバリエーションを含む、それ自体公知である任意の適切な様式で決定することが可能である。

[0069] 「抗コロナウイルス活性」とは、コロナウイルスの活性を阻害する活性（不活化ともいう）を示し、例えば、コロナウイルスの感染阻害、増殖阻害、成熟阻害、ウイルス数の低減、感染性の低下、細胞毒性の抑制、ウイルス性細胞変性の抑制、ウイルス感染の重症化阻止、致死率改善、肺炎症状の抑制・改善などが挙げられる。好ましくは感染阻害又は増殖阻害である。前記ペプチドが、コロナウイルスの活性を阻害する、例えば、30%阻害する、50%阻害する、70%阻害する、90%阻害する、場合に「抗コロナウイルス活性を有する」と判断する。あるいは、前記ペプチドが、既知の他のCOVID薬、例えば、レムデシビル、REGN-COV2（カシリピマブとイムデビマブの併用剤）、モラヌピラビルの活性体としてEIDD-1931等のいずれかと同等の、あるいはそれ以上に、コロナウイルスの活性を阻害する効果を示す場合に、「コロナウイルスの活性を有する」と判断する。

[0070] 例えば、非限定的に、コロナウイルスの細胞培養上清へのペプチドの添加により、当該上清からウイルスRNAが減少する場合、例えば、ウイルスRNAが30%減少する、50%減少する、70%減少する、90%減少する場合、当該ペプチドが抗コロナウイルス活性を有する、と判断する。「抗SARS-CoV-2活性」とは、SARS-CoV-2の活性を阻害する活性を意味する。ペプチドが、当該ペプチドが存在しない場合と比較して、SARS-CoV-2の活性を阻害する、例えば、30%阻害する、50%阻害する、70%阻害する、90%阻害する、場合に「抗SARS-CoV-2活性を有する」と判断する。例えば、本明細書の実施例1では、ペプチドを1 μ M添加時に、SARS-CoV-2（武漢株）の細胞培養上清に含まれるSARS-CoV-2のRNAの量が10%以下になった場合（90%減少した場合）に、抗SARS-CoV-2活性を有する、と判断した。ウイルスRNAの量は、公知の方法、好ましくは、RT-qPCRを用いた測

定法、で測定できる。実施例5では、前記ペプチドは武漢株だけでは無く、他のアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、オミクロンと言った変異型ウイルスに対しても、抗SARS-CoV-2活性を有する、即ち、ペプチドを1 μ M添加時に、SARS-CoV-2の細胞培養上清に含まれるSARS-CoV-2のRNAの量が10%以下まで減少させる（90%減少させる）ことが示された。

[0071] 実施例4及び実施例11では、SARS-CoV-2由来Sタンパク質遺伝子を挿入したSタンパク質発現ベクターとルシフェラーゼのサブユニットタンパク質遺伝子を挿入した発現ベクターを用いてSARS-CoV-2由来Sタンパク質（疑似的ウイルス）およびルシフェラーゼのサブユニットを発現させた細胞と、ヒトACE2タンパクを発現している細胞にルシフェラーゼのサブユニットタンパク遺伝子を挿入した発現ベクターを用いて発現させた細胞を混和したときに、SARS-CoV-2由来Sタンパク質とヒトACE2タンパク質の結合を介して細胞融合した際に細胞内でルシフェラーゼタンパク質が再構成された結果放出される蛍光強度を測定することにより、添加した前期ペプチドのSタンパク質阻害活性（%）及び IC_{50} 値を求めた。非限定的に、Sタンパク質阻害活性（%）が50%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは90%以上の場合に、抗SARS-CoV-2活性を有する、と判断する。あるいは、非限定的に、 IC_{50} 値が、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 以下、好ましくは $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 以下、さらに好ましくは $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 以下の場合に、抗SARS-CoV-2活性を有すると判断する。

[0072] 実施例6及び実施例11では、SARS-CoV-2ウイルスとヒトACE2を発現している細胞を用いて、ウイルスによる細胞傷害性（cytopathic effect; CPE）に対する抑制効果を調べた。細胞傷害性は感染後一定期間後の細胞の生存率を指標に、細胞培養系に添加した上記ペプチドの抗ウイルス効果を評価した。非限定的に、CPE減少値が、50%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは90%以上の場合に、抗

SARS-CoV-2 活性を有する、と判断する。あるいは、非限定的に、 IC_{50} 値が $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 以下、好ましくは $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 以下の場合に、抗 SARS-CoV-2 活性を有する、と判断する。

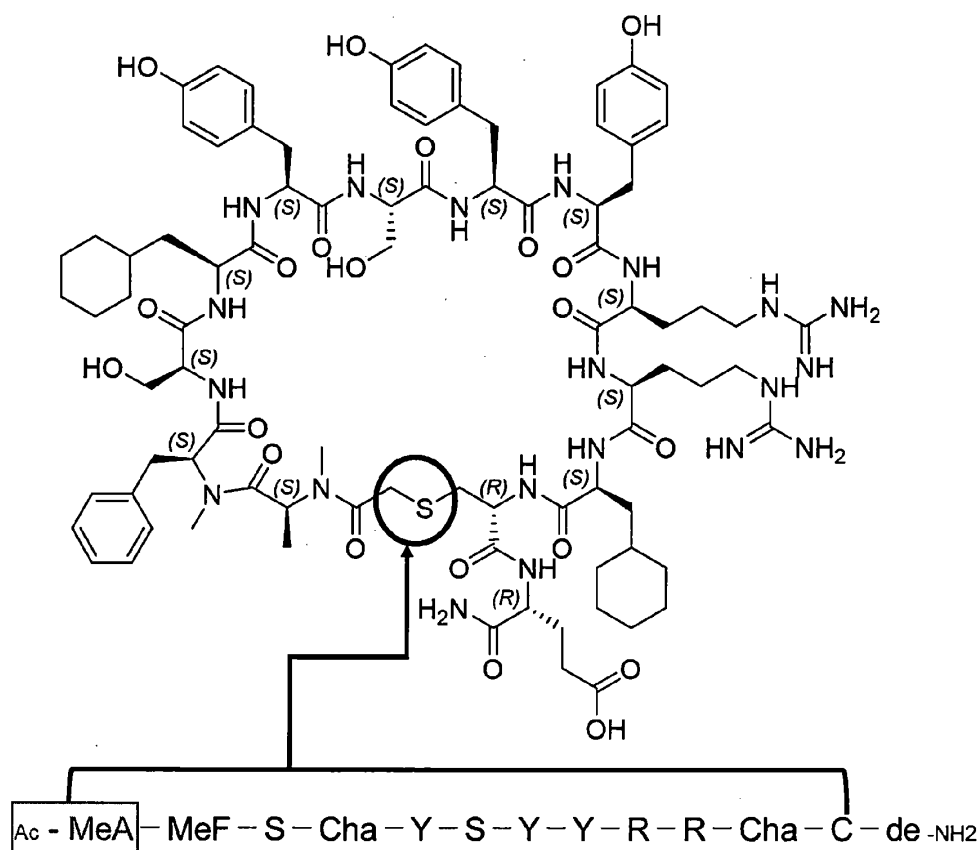
[0073] 実施例 7 では、マウス SARS-CoV-2 感染致死モデルを用いた、前記ペプチドによる、マウス SARS-CoV-2 感染の重症化阻止効果の評価、致死率改善効果の測定及び肺組織像評価を行った。前記ペプチドを投与した方が、投与しない場合と比較して、重症化が阻止される場合、例えば体重減少が阻止される場合、あるいは、致死率が改善される場合に、抗 SARS-CoV-2 活性を有する、と判断する。体重減少が阻止されるとは、例えば、SARS-CoV-2 感染 7 日後に、例えば、前記ペプチドを投与しないと体重が 10% 以上減少する場合に、前記ペプチドを投与すれば体重減少が 10% 未満、好ましくは 8% 未満、より好ましくは 5% 未満であることを意味する。

[0074] あるいは、前記ペプチドを投与した方が、投与しない場合と比較して、肺炎症状が抑制・改善される。肺炎の症状は、例えば、血管周囲に細胞の集簇、肺胞野において炎症性細胞浸潤と肺胞上皮の再生像が認められるなど、びまん性肺胞傷害における増殖期にあたる細胞像によって確認することができる。前記ペプチドを投与によりこれらの状況が減少しうる。さらに、実施例 8 では、ハムスター SARS-CoV-2 感染モデルを用いて、前記ペプチドの肺炎に対する有効性を調べた。前記ペプチドの投与によって、投与しない場合よりも、肺炎による症状、例えば、慢性活動性の間質性および胸膜の炎症が抑制・改善されうる。以上のような肺炎に対する効果が確認される場合、前記ペプチドが抗 SARS-CoV-2 活性を有する、と判断する。

[0075] 前記ペプチドは、上述したウイルス RNA の減少、抗ウイルス性細胞変性抑制、細胞毒性の抑制、ウイルス性細胞変性の抑制、ウイルス感染の重症化阻止、致死率改善、肺炎症状の抑制・改善等の効果のうち、少なくとも一つ、好ましくは複数の効果を奏する場合に、抗 SARS-CoV-2 活性を有する、と判断される。

[0076] 一態様において、前記ペプチドは以下の構造を有する。

[0077] [化1]



[0078] 本明細書において「ペプチド」は、特に言及しない限り、「2. ペプチド (A)」と、「3. ペプチド (B)」の双方を含む。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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、HMFS 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。

[0083] 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基はピペリジンまたはピロリジンによる処理で脱保護できる。

[0084] 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。

- [0085] 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。
- [0086] 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。
- [0087] 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。
- [0088] 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。
- [0089] 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。
- [0090] 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。
- [0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

- [0095] 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。
- [0096] 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。
- [0097] 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。
- [0098] 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。
- [0099] 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スサイエンス社のもの等を使用できる。
- [0100] 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。

- [0101] 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 WO 2007/066627 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。
- [0102] 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。
- [0103] 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およ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. Fiel

ds、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-ブチル基およびトリチル (T r t) 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 (M t t) 基、Alloc基、およびivDde基、ヒスチジンのイミダゾール基に対するT r t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-スルホニル基 (P b f) 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ル基に対するtert-ブチル基、アリル基、および3-メチルペンタン (M p e) 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T r t基、また、システインのチオール基に対するT r t基およびモノメトキシトリチル (M m t) 基がある。

[0104] 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末端アミノ酸およ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末端カルボキシル基またはFmocで保護されたアミノ酸のC末端カルボキシル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。

[0105] 本明細書に記載するペプチドの合成は、単または多チャネルペプチド合成機、たとえばCEM社のLiberty Blue合成機またはBiotage社のSyro I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。

[0106] 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。

[0107] 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)）の従い、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。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。

[0108] 5. 医薬組成物

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、医薬組成物に関する。医薬組成物の対象となる疾病としては、コロナウイルスにより引き起こされる感染症、好ましくはSARS-CoV-2により引き起こされる感染症であり、COVID-19である。本発明のペプチドは、コロナウイルスにより引き起こされる感染症の予防又は治療する医薬組成物の有効成分として有用である。

[0109] 非限定的に、前記医薬組成物は、抗SARS-CoV-2ウイルス活性を有する。「抗SARS-CoV-2ウイルス活性を有する。」は、「3. ペプチド(B)」で述べた通りである。

[0110] 一態様において、前記医薬組成物は、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための、医薬組成物である。一態様において、コロナウイルス感染症が、COVID-19である。

[0111] 「コロナウイルス」は、一本鎖RNAウイルスの一種である、脂質二重膜エンベロープを有するウイルスの一種である。ウイルス分類学上はニドウイルス目コルニドウイルス亜目のコロナウイルス科に分類されており、さらにレトウイルス亜科とオルトコロナウイルス亜科に分けられる。ウイルス粒子の内部にゲノムRNAとそれに結合するNタンパク質から成るヌクレオカプシドを有し、さらにエンベロープ表面にはスパイク(S)タンパク、エンベロープ(E)タンパク、メンブレン(M)タンパクと呼ばれるタンパク質構造を有する。特にスパイクタンパク質は、感染時に重要な役割を果たすことが知られている(非特許文献3)。

[0112] ヒトに感染するコロナウイルスとしては、ヒトに日常的に感染するコロナウイルス(Human Coronavirus: HCoV)と、中東呼吸

器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）及び重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）の大きく3種類に分けられる。また、動物に感染するコロナウイルス（豚流行性下痢ウイルス（PEDV）、豚伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）、鶏伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、マウス肝炎ウイルス（MHV）、猫伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）など）もあり、動物に感染するコロナウイルスは、別種の動物に感染することはほとんど無いことが知られている。本明細書における「コロナウイルス」とは、特に明記しない限り、前記ヒト感染型及び動物感染型コロナウイルス全てを示す。

[0113] 「SARS-CoV-2」は、重症急性呼吸器症候群を引き起こすコロナウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルスの姉妹種として発見された新型コロナウイルスであり、2019年末に中国の武漢で始めて報告され、世界中でパンデミックを引き起こしたウイルスを指す。SARS-CoV-2はその表面にスパイクタンパク質を有し、そのスパイクタンパク質を介して宿主に感染するものと考えられている（非特許文献4）。

[0114] SARS-CoV-2は、他のウイルスと同様に、増殖や感染を繰り返す中で突然変異し、多くの変異株が生み出される。SARS-CoV-2には何千もの変異株が存在し、系統や系統群により分類され、PANGO系統名などが用いられてきたが、近年WHO（世界保健機関）がギリシャアルファベットを使用する呼称を発表したことから、 α 株や β 株などの呼称が用いられている（非特許文献5）。感染力の増加やワクチン・治療法の有効性の低下などのリスクのある変異株は、「注目すべき変異株；VOI」とみなされ、それらのリスクが検証されると、各国の保健機関などにより、「懸念される変異株；VOC」と改称され、特に危険性が高く警戒が必要な変異株とみなされる。 α （アルファ）株、 β （ベータ）株、 γ （ガンマ）株、 δ （デルタ）株、 $\omicron$ （オミクロン）株は、いずれもVOCとみなされている、特に、デルタ株は、既存の変異株よりも感染力が強く、抗体に対する感受性も低いとされていることから、デルタ株にも効果のある治療剤が望まれている（非

特許文献 5、6)。

- [0115] なお、アルファ株・ベータ株・ガンマ株・デルタ株について、スパイクタンパク質の変異箇所は以下の表 1 の通りである。本明細書における、「SARS-CoV-2」は、武漢で報告された株（武漢株、野生株）のみでなく、当該ウイルスから変異した欧州系統変異株（アルファ株）、南アフリカ系統変異株（ベータ株）、ブラジル系統変異株（ガンマ株）、インド系統変異株（デルタ株）、米国系統変異株（イプシロン株）、米国系統株（イオタ株）、インド系統変異株（カッパ株）、フィリピン系統変異株（シータ株）、ペルー系統株（ラムダ株）、コロンビア系統株（ミュー株）、オミクロン株や、デルタ株にさらに別の変異が加わった A Y. 4. 2 系統やオミクロン株にさらに別の変異が加わった B A. 2 系統のような多重変異型ウイルス株、またその他の変異株が含まれる。

[0116] [表1]

SARS-CoV2 strain	Mutation
Wuhan	—
α	S1: H69del, V70del, Y144del, N501Y, A570D, P681H S2: T716I, S982A, D1118H
β	S1: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y S2: T1027I, V1176F
γ	S1: D80A, 242-245 del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G S2: A701V
δ	S1: T19R, G142D, 157-158 del, L452R, T478K, D614G, P681R S2: D950N

- [0117] 「COVID-19」は、SARS-CoV-2 によって引き起こされる感染症を指す。インフルエンザや感冒に似た初期症状を示す場合が多く、主な症状としては急性呼吸器疾患が多いが、無症状の場合もある。本明細書においては、SARS-CoV-2 により引き起こされる諸症状をいう。

- [0118] 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。

- [0119] 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、経膈、経直腸）投与等が上げられる。
- [0120] 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、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）。
- [0121] 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。
- [0122] 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、ステアリルアルコール、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。

- [0123] 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。
- [0124] 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。
- [0125] 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。
- [0126] 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。

- [0127] 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。
- [0128] 本発明は、本発明のペプチドを投与することによる、コロナウイルス感染症を予防又は治療する方法に関する。
- [0129] 本発明は、本発明のペプチドのコロナウイルス感染症の予防又は治療のための使用、に関する。
- [0130] 本発明は、本発明のペプチドの、コロナウイルス感染症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。
- [0131] 本発明は、本発明のペプチドの、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための医薬組成物としての使用、に関する。
- [0132] 本発明は、コロナウイルス感染症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。
- [0133] 本発明は、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための医薬組成物として使用されるための、本発明のペプチド、に関する。
- [0134] 6. 診断用組成物
- 本発明はまた、本発明のペプチドを含む、SARS-CoV-2ウイルス感染症を診断するための診断用組成物に関する。
- [0135] 本発明のペプチドは、SARS-CoV-2に結合するため、SARS-CoV-2を検出する診断用組成物としても使用しうる。診断薬としては、SARS-CoV-2に罹患しているか否かを診断するための検出薬であつてよく、検出薬として用いる場合は、前記ペプチドは、検出可能に標識してもよい。
- [0136] 前記ペプチドは、検出可能に標識してもよい。ペプチドの標識は、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、125I、131

I、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、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、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体が用いられる。その他、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子で標識した抗体を検出することもできる。例えば、SARS-CoV-2感染に関する特定の標的（例えばSARS-CoV-2のスパイクタンパク質）に結合する抗体と前記ペプチドとで複合体を作成し、当該抗体又は前記ペプチドに標識した複合体を作成し、それを投与、検出することで、SARS-CoV-2感染の有無、重篤度などを検出することができる。また、イムノアッセイでは、前記ペプチドをビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出することもできる。

[0137] イムノアッセイの中でも、酵素標識を用いるELISA法は、簡便且つ迅速に抗原を測定することができて好ましい。例えば、抗体を固相担体に固定し、サンプルを添加して反応させた後、標識した前記ペプチドを添加して反応させる。洗浄後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定することにより、SARS-CoV-2感染の有無、重篤度などを検出することができる。固相担体に固定した抗体と試料を反応させた後、標識していない前記ペプチドを添加し、前記ペプチドに対する抗体を酵素標識してさらに添加してもよい。抗体は固相担体の表面に固定されても、内部に固定されてもよい。

[0138] 酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB)、3, 3'、5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB)、o-フェニレンジアミン (OPD) 等を用いることができ、アルカリホスファターゼの場合、p-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) 等を用いることができる。

[0139] 本明細書において「固相担体」は、抗体を固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、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、標的物質は、これらの固相担体に公知の方法に従って固定することができる。

[0140] 本発明は、本発明のペプチドを含む、診断用のキットに関する。前記診断用キットは、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。

[0141] 本発明は、本発明のペプチドを含むテスターに関する。

[0142] 本発明は、本発明のペプチドを投与することによる、コロナウイルス感染症を診断する方法に関する。

[0143] 本発明は、本発明のペプチドのコロナウイルス感染症の診断のための使用、に関する。

[0144] 本発明は、本発明のペプチドの、コロナウイルス感染症の診断のための診断用組成物の製造のための使用、に関する。

[0145] 本発明は、本発明のペプチドの、コロナウイルス感染症の診断のための診断用組成物としての使用、に関する。

[0146] 本発明は、コロナウイルス感染症を診断する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0147] 本発明は、コロナウイルス感染症を診断するための診断用組成物として使用されるための、本発明のペプチド、に関する。

[0148] 7. 併用

本発明の、本発明のペプチドを含む、医薬組成物は、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と併用されてもよい。

[0149] 本発明は、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と併用される、本発明のペプチドを含む、医薬組成物に関する。「医薬組成物」について、「5. 医薬組成物」の項目で説明した通りである。

[0150] 他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤は、本発明のペプチド以外の、コロナウイルス感染症の予防又は治療に有効な薬剤であり、特に限定されない。例えば、レムデシビル、ファビピラビル、モラヌピラビル

のようなRNAポリメラーゼ阻害剤や、デキサメタゾン、シクレソニドのようなステロイド剤、バリシチニブのようなヤヌスキナーゼ阻害剤、ナファモスタットのようなポリメラーゼ阻害剤のような化合物であってもよく、また、トシリズマブ、サリルマブのような抗体や、複数の抗体のカクテル剤であってもよい。また、それらの混合剤であってもよい。非限定的に、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤は、レムデシビル、カシリピマブとイムデビマブの併用剤、及び、モルヌピラビル若しくはその活性体からなる群から選択される。

[0151] 「レムデシビル」は、新規ヌクレオチドアナログのプロドラッグで、抗ウイルス薬である。一本鎖RNAウイルス（RSウイルス、フニンウイルス、ラッサ熱ウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、MERSおよびSARSウイルスを含むコロナウイルス）に対して抗ウイルス活性を示すことが見出された。SARS-CoV-2を含む複数のコロナウイルス感染症での抗ウイルス活性も明らかにされている。

[0152] 「カシリピマブ・イムデビマブ」は、REGEN-COV（登録商標）の商品で販売されている。これは、SARS-CoV-2コロナウイルスに対する耐性を作り出すために設計された人工的な「抗体カクテル」である。これは、カシリピマブ（REGN10933）とイムデビマブ（REGN10987）の2つのモノクローナル抗体で構成され（併用）、好ましくは、混合して使用される。

[0153] 「モルヌピラビル」は、抗インフルエンザ薬として開発された経口活性がある抗ウイルス薬である。モルヌピラビルは、合成ヌクレオシド誘導体N4-ヒドロキシシチジン（「EIDD-1931」とも呼ばれる）のプロドラッグである。N4-ヒドロキシシチジンは、 β -D-N4-ヒドロキシシチジン 5'-3リン酸（「EIDD-1931 5'-3リン酸」、または「NHC-TP」とも呼ばれる）に代謝される。非限定的に、モルヌピラビル若しくはその活性体は、N4-ヒドロキシシチジン、 β -D-N4-ヒドロキシシチジン 5'-3リン酸を含む。

- [0154] 本発明のペプチドを含む、医薬組成物と、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤の投与されるタイミングは特に限定されない、本発明のペプチドを含む、医薬組成物の投与は、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤の投与の前に、投与と同時に、あるいは投与の後に行いうる。一態様において、本発明のペプチドを含む、医薬組成物を他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と同時投与する。
- [0155] 本発明のペプチドと、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤を同時投与するために、組合せ剤としてもよい。本発明は一態様において、本発明のペプチドと他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤を含む、組合せ剤に関する。
- [0156] 本発明はまた、本発明のペプチドを含む、医薬組成物と併用される、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤に関する。
- [0157] 本発明を、本発明のペプチドと、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤とを投与することによる、コロナウイルス感染症を予防又は治療する方法に関する。一態様において、本発明のペプチドは、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤の投与の前に、後に、又は同時に投与しうる。
- [0158] 本発明は、本発明のペプチドと他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤の、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための使用、に関する。
- [0159] 本発明は、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と併用される、本発明のペプチドを含む、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための医薬組成物の製造のための、本発明のペプチドの使用、に関する。
- [0160] 本発明は、本発明のペプチドの、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と併用される、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための医薬組成物としての使用、に関する。
- [0161] 本発明は、コロナウイルス感染症を予防又は治療する方法に使用するための、本発明のペプチドと他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための

薬剤、に関する。

[0162] 本発明は、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤と併用される、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための医薬組成物として使用されるための、本発明のペプチド、に関する。

[0163] 本発明は、本発明のペプチドを含む、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための医薬組成物と併用される、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤の、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための使用に関する。一態様において、他のコロナウイルス感染症の予防又は治療のための薬剤において、本発明のペプチドを含む医薬組成物と併用して、コロナウイルス感染症の予防又は治療することを示唆することを含む。

実施例

[0164] 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。

[0165] 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。

[0166] 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 を使用し、製造元のマニュアルに従って行った。

[0167] 使用した樹脂は、Sieber Amide resin を用い、使用した量は各ペプチドに応じて 5 mg – 2 g の範囲であった。

[0168] 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。

Fmoc-N-Me-Phe-OH;
Fmoc-Ala-OH;
Fmoc-N-Me-Ala-OH;
Fmoc-N-Me-Nle-OH;
Fmoc-Aib-OH;
Fmoc-Cha-OH;
Fmoc-Cit-OH;
Fmoc-Nal1-OH;
Fmoc-Tyr(tBu)-OH;
Fmoc-Cys(Trt)-OH;
Fmoc-Ser(Trt)-OH;
Fmoc-dd(Mpe)-OH。

[0169] 得られた粗精製ペプチドの精製方法として、Waters社AutoPurification 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のスキア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製条件はそれぞれの実施例に示した。

[0170] 化学合成されたペプチドの構造決定は、目的配列に従って用いたアミノ酸と必要に応じて用いたビルディングブロックを考慮し計算された分子量を、質量スペクトル分析法におけるESI-MS(+)により確認した。なお、“ESI-MS(+)”とは、正イオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は“ m/z ”単位表記によって報告された。なお、分子量がおおよそ1000より大きい化合物は、2価イオンまたは3価イオンとして高頻度で検出された。

[0171] 実施例1 抗SARS-CoV-2活性を有するペプチドの同定

本実施例では、抗SARS-CoV-2活性を有する複数の環状ペプチドを同定した。

- [0172] 先ず、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質 (GENE Accession No. YP_009724390) を標的とし、国際公開 WO2014/119600号、国際公開 WO2012/033154号、又は国際公開 WO2007/066627号に記載されているスクリーニング方法で、標的タンパク質に結合するペプチドを見出した。
- [0173] SARS-CoV-2感染実験系を用い、当該ペプチド及びそのアナログが実際に抗SARS-CoV-2活性を持つかどうかを調べた。具体的には、SARS-CoV-2を用いた感染実験を、BSL3実験区画内で行った。VeroE6/TMPRSS2細胞 (Transmembrane Serine Protease TMPRSS2発現VeroE6アフリカミドリザル細胞株、中東呼吸器症候群コロナウイルス高感受性である細胞) を96ウェルプレートに 3.0×10^4 cellsになるように播種し、一晚培養した。
- [0174] 感染性SARS-CoV-2 (JPN/TY/WK-521株) を含む培地をMOI (multiplicity of infection) = 0.003で細胞に1時間処理し、洗浄後に、後述する実施例2、実施例3で合成した環状ペプチド、又はコントロールとしてレムデシビルとともに化合物を含む新しい培地に交換した。なお、環状ペプチドは、最終濃度が $1 \mu\text{M}$ または 50 nM になるように添加した。レムデシビルは、最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように添加した。24時間後に培養上清を回収し、この中に含まれるウイルスRNAをMagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) により抽出した。
- [0175] 抽出物に含まれるウイルスRNAはone-step qRT-PCR kit (THUNDERBIRD (登録商標) Probe One-step qRT-PCR kit; 東洋紡社) を用いたリアルタイムRT-qP

CRによって定量した。

[0176] プライマー

5' - ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT - 3' (配列番号127)

5' - ATATTGCAGCAGTACGCACACA - 3' (配列番号128)

プローブ

5' - FAM - ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG - TAMRA - 3' (配列番号129)

[0177] 結果を表2に示す。表2の「配列」の1-13はペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸残基の番号を示す。表2のペプチドはいずれも1番目のアミノ酸残基と、12番目のシステイン残基(C)とが結合した環状ペプチドである。なお、実際の合成方法については後述するが、表2の「配列」に記載の12残基又は13残基から成るアミノ酸配列を合成後、1番目のアミノ酸残基にクロロアセチル基を導入し、当該クロロアセチル基に含まれるアセチル基とシステイン残基に含まれる硫黄分子Sとが結合することで環化が成される。また、13番目のアミノ酸残基に「de」と記載されているペプチドは、C末端(環状の外側)にD-グルタミン酸を有することを意味する。

[0178] 前記ペプチドの添加前と比べ、培養上清に含まれるウイルスRNAの量が10%以下になった場合、抗SARS-CoV-2活性を有する、と判断した。表2において、ペプチドを50nM添加時に抗SARS-CoV-2活性が認められたものは「2」、50nM添加時には活性が認められなかったが、1μM添加時には活性が認められたものは「1」として表した。表2におけるESI-MS(m/z)は、ESI-MS(+)観測値([M+2H]²⁺)を示す。表2に示した125の環状ペプチドにおいて、抗SARS-CoV-2活性があることが示された。

[0179] なお、レムデシビルは10μM添加時に抗SARS-CoV-2活性を示した。

[0180] 表2: ペプチド配列及び抗SARS-CoV-2活性

[0181] [表2-1]

配列番号	ペプチド名														ESI (m/z) [M+2H] ²⁺	抗SARS-CoV-2 活性	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
2	5555_p000	MeA	MeF	S	Cha	Y	S	Y	Y	R	R	Cha	C	de	-NH ₂	909.85	2
3	5555_p001	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	873.85	2
4	5555_p002	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	872.91	2
5	5555_p003	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	888.87	2
6	5555_p004	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	887.87	2
7	5555_p005	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	902.87	2
8	5555_p006	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	dr	Cha	C		-NH ₂	919.87	2
9	5555_p007	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	918.86	2
10	5555_p008	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	dr	Cha	C		-NH ₂	859.84	2
11	5555_p009	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	A4p	Cha	C		-NH ₂	858.79	2
12	5555_p010	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C		-NH ₂	901.88	2
13	5555_p011	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	dr	Cha	C		-NH ₂	842.85	2
14	5555_p012	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	A4p	Cha	C		-NH ₂	841.85	2
15	5555_p013	MeA	MeF	S	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH ₂	895.79	2
16	5555_p014	MeA	MeF	S	Cha	Y	ddap	Y	Y	E	R	Cha	C	de	-NH ₂	895.79	2
17	5555_p015	MeA	MeF	S	Cha	Y	K	Y	Y	Ahp	R	Cha	C	de	-NH ₂	915.86	2
18	5555_p016	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	880.85	2
19	5555_p017	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	940.87	2
20	5555_p018	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	923.88	2
21	5555_p019	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH ₂	938.40	2
22	5555_p020	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH ₂	937.43	2
23	5555_p021	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	953.92	2
24	5555_p022	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	939.93	2

[0182] [表2-2]

25	5555_p023	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	K	dr	Cha	C	de	-OH	939.46	2
26	5555_p024	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	K	dk	Cha	C	de	-OH	925.41	2
27	5555_p025	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	953.37	2
28	5555_p026	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	952.39	2
29	5555_p027	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	936.90	2
30	5555_p028	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	922.92	2
31	5555_p029	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	dr	Cha	C	de	-NH2	924.36	2
32	5555_p030	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	A4p	Cha	C	de	-NH2	923.37	2
33	5555_p031	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	984.42	2
34	5555_p032	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	983.42	2
35	5555_p033	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	K	dr	Cha	C	de	-OH	953.48	2
36	5555_p034	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	967.96	2
37	5555_p035	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	907.86	2
38	5555_p036	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	dr	Cha	C	de	-NH2	907.39	2
39	5555_p037	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	A4p	Cha	C	de	-NH2	906.44	2
40	5555_p038	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	967.90	2
41	5555_p039	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	967.41	2
42	5555_p040	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	966.43	2
43	5555_p041	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	950.88	2
44	5555_p042	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	950.89	2
45	5555_p043	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	936.89	2
46	5555_p044	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	K	dk	Cha	C	de	-OH	939.44	2
47	5555_p045	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	953.93	2
48	5555_p046	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	913.91	2
49	5555_p047	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	956.89	2
50	5555_p048	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	896.82	2

[0183] [表2-3]

51	5555_p049	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	956.90	2
52	5555_p050	MeE	MeF	S	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	939.92	2
53	5555_p051	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	935.88	2
54	5555_p052	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	978.93	2
55	5555_p053	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	918.85	2
56	5555_p054	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	978.90	2
57	5555_p055	MeE	MeF	S	Cha	F4F	E	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	961.87	2
58	5555_p056	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	3Py	Cit	R	Cha	C	de	-OH	933.37	1
59	5555_p057	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	3Py	A	R	Cha	C	de	-OH	890.29	1
60	5555_p058	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	914.89	2
61	5555_p059	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	957.93	2
62	5555_p060	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	897.80	2
63	5555_p061	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-NH2	897.32	2
64	5555_p062	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-OH	883.86	2
65	5555_p063	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-NH2	883.35	2
66	5555_p064	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	A	A4p	Cha	C	de	-OH	896.85	1
67	5555_p065	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	957.84	1
68	5555_p066	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-NH2	957.40	2
69	5555_p067	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	943.87	1
70	5555_p068	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-NH2	943.38	2
71	5555_p069	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	940.86	2
72	5555_p070	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	940.37	2
73	5555_p071	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	926.89	2
74	5555_p072	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-NH2	926.38	2
75	5555_p073	MeE	MeF	S	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	939.91	2
76	5555_p074	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	914.90	2

[0184] [表2-4]

77	5555_p075	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	957.87	2
78	5555_p076	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	897.87	2
79	5555_p077	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	957.86	1
80	5555_p078	MeE	MeF	S	Cha	F4F	ds	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	940.91	2
81	5555_p079	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	942.90	2
82	5555_p080	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	985.90	2
83	5555_p081	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	925.88	2
84	5555_p082	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-NH2	925.38	2
85	5555_p083	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-OH	911.84	2
86	5555_p084	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-NH2	911.37	2
87	5555_p085	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	985.90	2
88	5555_p086	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-NH2	985.42	2
89	5555_p087	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	971.88	2
90	5555_p088	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-NH2	971.42	2
91	5555_p089	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	968.88	2
92	5555_p090	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	968.38	2
93	5555_p091	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	954.88	2
94	5555_p092	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-NH2	954.39	2
95	5555_p093	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Yae	A	R	Cha	C	de	-NH2	916.80	2
96	5555_p094	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Yae	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	959.87	2
97	5555_p095	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	3Py	A	R	Cha	C	de	-NH2	887.78	2
98	5555_p096	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	3Py	Cit	R	Cha	C	de	-NH2	930.88	2
99	5555_p097	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	938.91	2
100	5555_p098	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	924.88	2
101	5555_p099	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	938.96	2
102	5555_p100	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	924.89	2

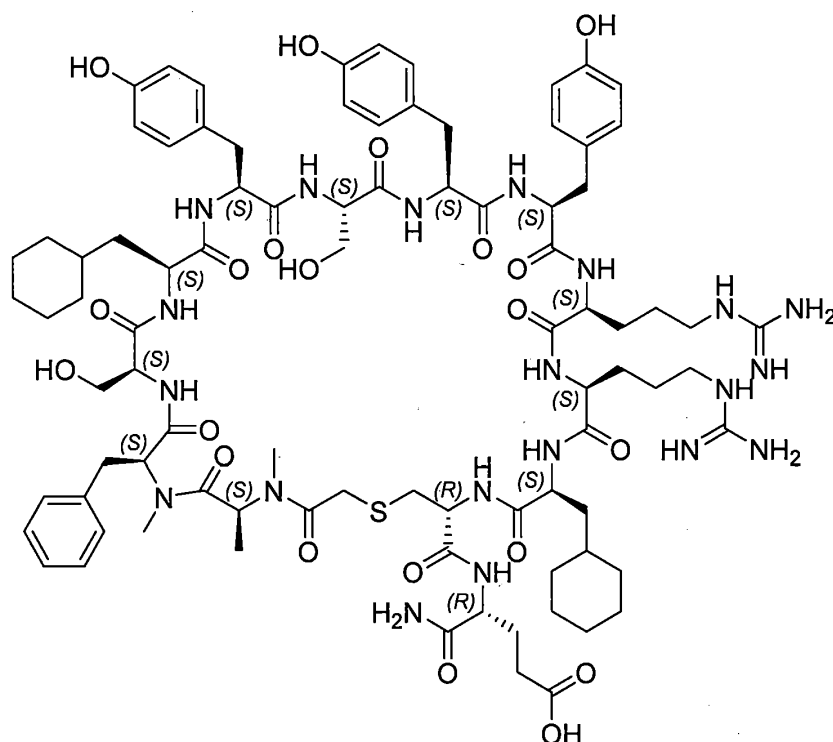
[0185] [表2-5]

103	5555_p101	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	970.93	2
104	5555_p102	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	K	Cha	C	de	-OH	956.89	2
105	5555_p103	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	970.92	2
106	5555_p104	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	956.93	2
107	5555_p105	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Nal1	A	R	Cha	C	de	-OH	913.93	2
108	5555_p106	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	956.97	2
109	5555_p107	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	896.88	2
110	5555_p108	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	956.90	2
111	5555_p109	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	S	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	939.88	2
112	5555_p110	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	R	Cha	C	de	-OH	984.92	2
113	5555_p111	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	K	Cha	C	de	-OH	970.97	2
114	5555_p112	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	984.92	2
115	5555_p113	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Nal1	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	970.92	2
116	5555_p114	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	R	Cha	C	de	-OH	924.88	2
117	5555_p115	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	K	Cha	C	de	-OH	910.86	2
118	5555_p116	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	A	A4p	Cha	C	de	-OH	923.92	2
119	5555_p117	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	984.89	2
120	5555_p118	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	970.90	2
121	5555_p119	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-OH	983.94	1
122	5555_p120	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	R	Cha	C	de	-OH	967.93	2
123	5555_p121	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	K	Cha	C	de	-OH	953.87	2
124	5555_p122	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dr	Cha	C	de	-OH	967.91	2
125	5555_p123	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	953.92	2
126	5555_p124	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	966.91	2

[0186] 実施例2 環状ペプチド5555_p000(配列番号2)の合成

本実施例は、環状ペプチド5555_p000(配列番号2)の合成を記載する。

[0187] [化2]



[0188] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.65 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/HATU/DIEA(4.2当量/4当量/8当量)を用いて、DMF中75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、10分間2回、9残基目、10残基目は30℃下、20分間2回、12残基目は30℃下、20分間1回反応を行った。

- [0189] 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残基目は25℃下、5分間反応させた後、10分間反応を行った。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 クロロ酢酸のDMF溶液（5当量）、0.5M HATUのDMF溶液（5当量）、0.5M DIPEAのDMF溶液（5当量）を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。
- [0190] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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、25℃で35分間振盪により実施した。
- [0191] 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エチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000rpm、1分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、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。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/水（9/1）に溶解後、6当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で18時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。
- [0192] 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（登録商標）30×150mm；移動相：A=0.1% TFA（H₂O中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて9→3

4%、その後8分間かけて34-39%、その後1分かけて39-60%；
流量：45 mL／分）。

[0193] 目的物の純度は以下の分析条件のLC／MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出して91.67%であった。

分析条件：保持時間=3.86分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm

100 Å；移動相：A=0.025% TFA（H₂O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0.30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=909.85、（M+2H）²⁺

[0194] 表1に記載の環状ペプチドについては、本明細書中に他に合成実施例が記載されていない場合、5555__p000と同様に合成した。

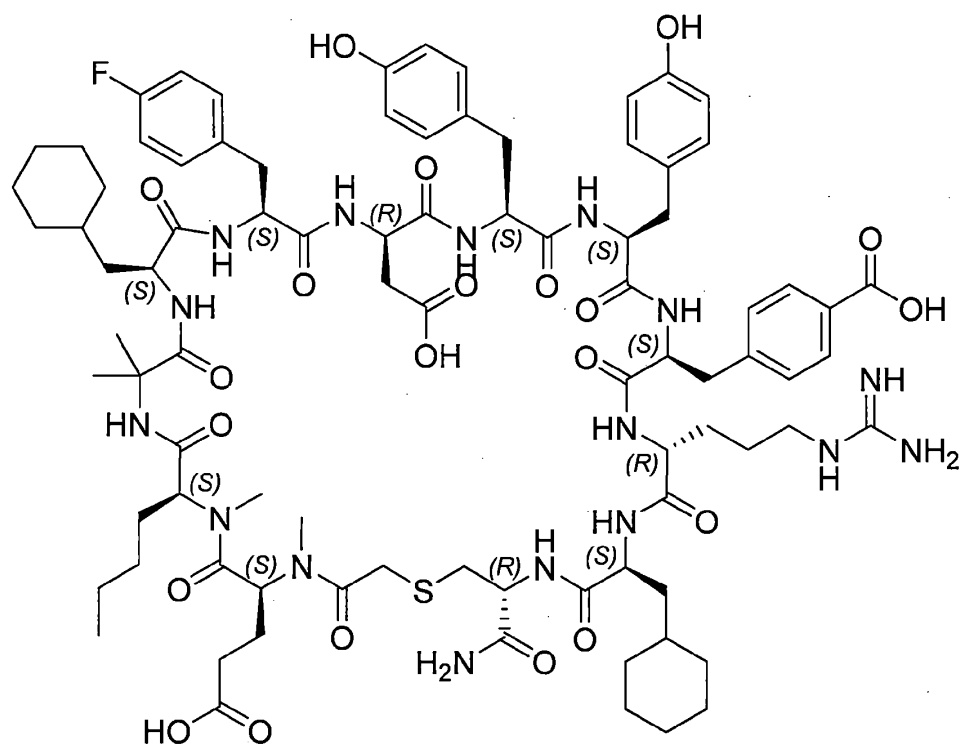
[0195] 実施例3 環状ペプチドの合成例

本実施例は、環状ペプチドの合成例を記載する。

[0196] （1）実施例3-1 環状ペプチド5555__p003（配列番号5）の合成

[0197]

[化3]



[0198] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.65 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて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て、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量) を用いて、DMF中105℃下、2分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間2回、2残基目、3残基目は105℃下、2分間2回、10残基目は50℃下、15分間2回、12残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。

[0199] また、Fmoc除去は83mM Oxyma pureの4%ピロリジンのDMF溶液と110℃下、1分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、及び6残基目は10%ピロ

リジンのDMF溶液と50℃下、90秒間反応させた。1残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下、1分間2回反応させた。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基を除去した後、0.2M クロロ酢酸のDMF溶液（5当量）、0.5M HATUのDMF溶液（5当量）、1M DIEAのDMF溶液（10当量）を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。

[0200] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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、25℃で30分間振盪により実施した。

[0201] 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エチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（10000rpm、1分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、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。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、5当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で16時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0202] 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（登録商標） 30×150mm；移動相：A=0.1% TFA（H₂O中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて18-43%、その後8分間かけて43-48%、その後1分かけて48-60%；流量：45mL/分）。

[0203] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出して94.80%であった。

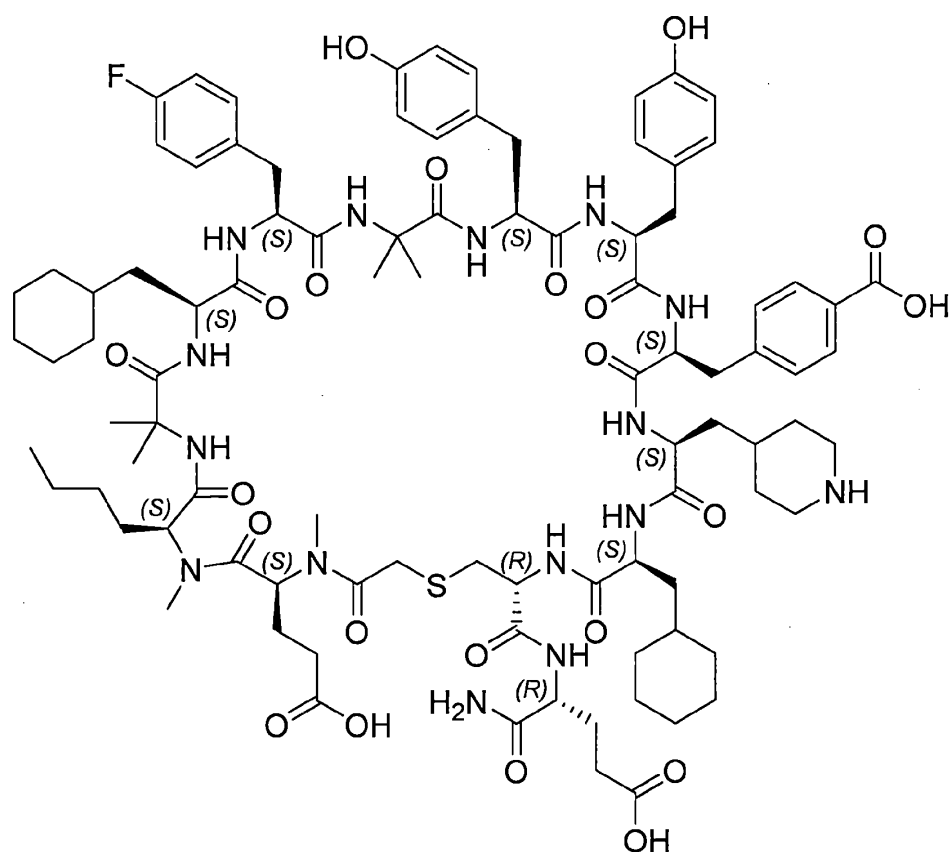
分析条件：保持時間=5.70分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm、100Å；移動相：A=0.025% TFA (H₂O中)、B=0.025% TFA (MeCN中)；温度：60℃；グラジエント (%B conc)：7.15分間かけて20-60%、その後0.30分間かけて60-95%、その後1.55分かけて95-95%；流量：0.5mL/分

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 888.87$ ($M+2H$)²⁺

[0204] (2) 実施例3-2 環状ペプチド5555__p020 (配列番号22)

の合成

[0205] [化4]



- [0206] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.65 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Primeを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量) を用いて、DMF中105℃下、2分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間2回反応、2残基目、3残基目、5残基目、及び6残基目は105℃下、2分間2回、12残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。
- [0207] また、Fmoc除去は83mM Oxyma pureの4%ピロリジンのDMF溶液と110℃下、1分間反応させることを基本条件とした。ただし、1残基目は25℃下、1分間2回反応させた。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基を除去した後、0.2M クロロ酢酸のDMF溶液 (5当量)、0.5M HATUのDMF溶液 (5当量)、0.5M DIEAのDMF溶液 (10当量) を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪することにより行った。
- [0208] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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、25℃で5分間振盪により実施した。
- [0209] 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エチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (9000 rpm、1分間)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、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。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、25℃で16時間振盪した。得られた反応溶液を20当量の酢酸を加えた後、EZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0210] 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（登録商標） 30 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（H₂O中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて20–45%、その後8分間かけて45–50%、その後1分かけて50–60%；流量：4.5 mL/分）。

[0211] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出して93.40%であった。

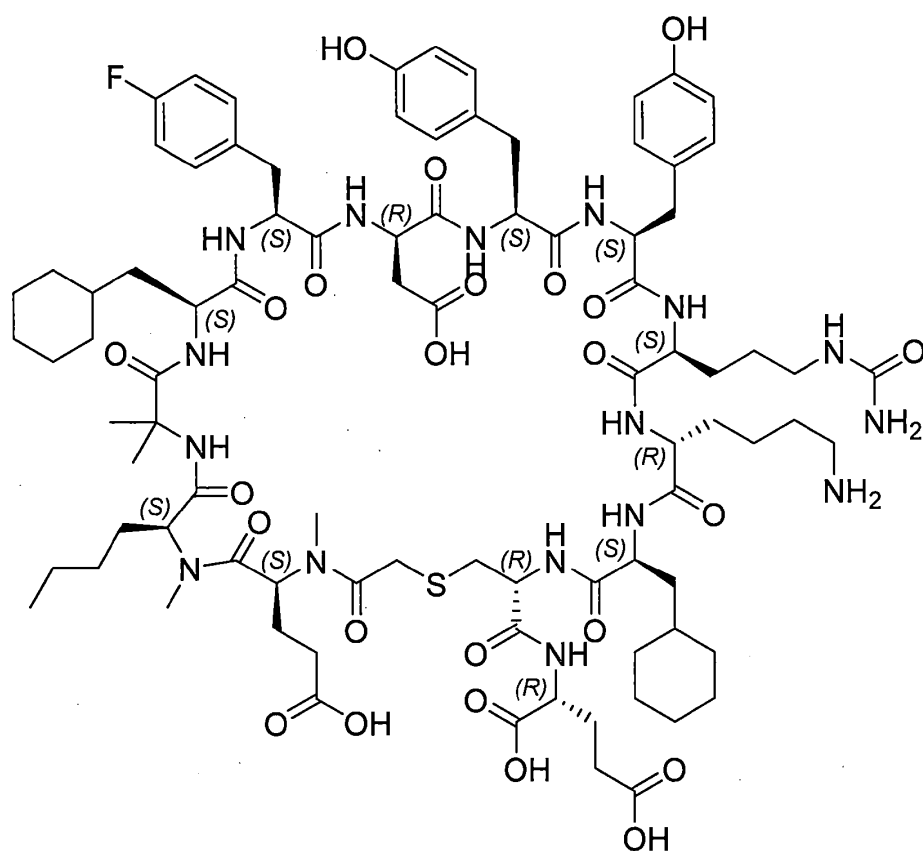
分析条件：保持時間=6.01分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A=0.025% TFA（H₂O中）、B=0.025% TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（%B conc）：7.15分間かけて20–60%、その後0.30分間かけて60–95%、その後1.55分かけて95–95%；流量：0.5 mL/分

ESI-MS（+） 観測値 m/z = 937.43（M+2H）²⁺

[0212] （3）実施例3-3 環状ペプチド5555__p028（配列番号30）の合成

[0213]

[化5]



[0214] HMPB-MBHA resin (Merck、0.85mmol/g)、及び樹脂1当量に対してFmoc-D-Glu(OtBu)-OH/DIC/DMAP(4当量/4当量/0.1~0.5当量)を、DMF/DCM(1/10)中、室温にて30分1回反応を行い合成したFmoc-de(OtBu)-HMPB-MBHA resinを用いて、一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure(4.2当量/8当量/4当量)を用いて、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間2回、2残基目は75℃下、20分間2回、12残基目は50℃下、20分間1回

反応を行った。

- [0215] 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、及び6残基目は25℃下、5分間2回反応させた。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基を除去した後、0.1M クロロ酢酸のDMF溶液（5当量）、0.1M HATUのDMF溶液（5当量）、0.2M DIEAのDMF溶液（10当量）を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。
- [0216] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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、25℃で30分間振盪により実施した。
- [0217] 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、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000rpm、1分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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/水（19/1）に溶解後、15当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で4時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。
- [0218] 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（登録商標） 50 $\times$ 250mm；移動相：A=0.1% TFA（H₂O中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：3分間かけて1

4. 4 – 38. 8 %、その後15分間かけて38. 8 – 43. 9 %、その後3分間かけて43. 9 – 60 %；流量：120 mL／分）。

[0219] 目的物の純度は以下の分析条件のLC／MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し81. 62 %であった。

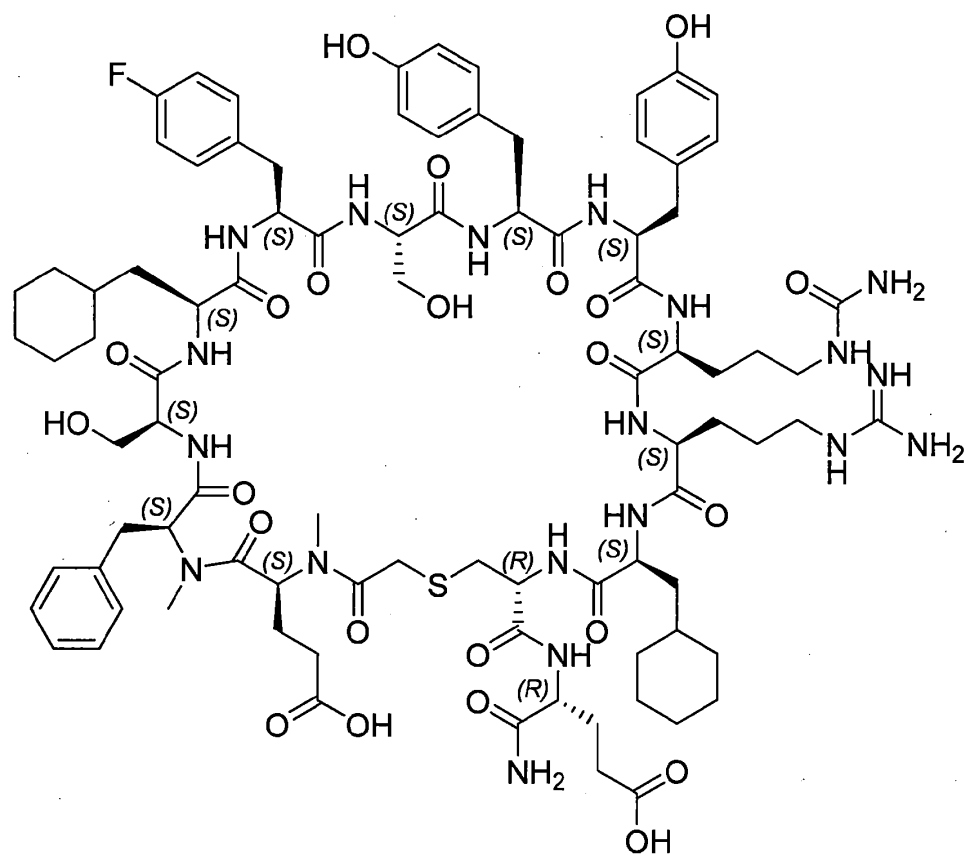
分析条件：保持時間＝5. 40分；カラム：K i n e t e x E V O C 18 2. 6 μ m 2. 1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A＝0. 025 % TFA（H₂O中）、B＝0. 025 % TFA（MeCN中）；温度：60℃；グラジエント（%B c o n c）：7. 15分間かけて20 – 60 %、その後0. 30分間かけて60 – 95 %、その後1. 55分かけて95 – 95 %；流量：0. 5 mL／分

ESI – MS（+） 観測値 $m/z = 922. 92$ （ $M + 2H$ ）²⁺

[0220] （4）実施例3 – 4 環状ペプチド5555__p070（配列番号72）の合成

[0221]

[化6]



[0222] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.65 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量) を用いて、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間2回、10残基目は50℃下、20分間2回、12残基目は50℃下、20分間1回反応を行った。

[0223] 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。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基を除去した後、0.2M クロロ酢酸のDMF溶液（4当量）、0.5M HATUのDMF溶液（4当量）、1M DIEAのDMF溶液（8当量）を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。

[0224] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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、25℃で45分間振盪により実施した。

[0225] 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エチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離（9000rpm、1分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテル/ヘキサンにて洗浄後、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。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/水（9/1）に溶解後、6当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で18時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[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（登録商標） 30x150mm；移動相：A=0.1% TFA（H₂O中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて14-39%、その後8分間かけて39-44%、その後1分かけて44-60%；流量：45mL/分）。

[0227] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225nm）クロ

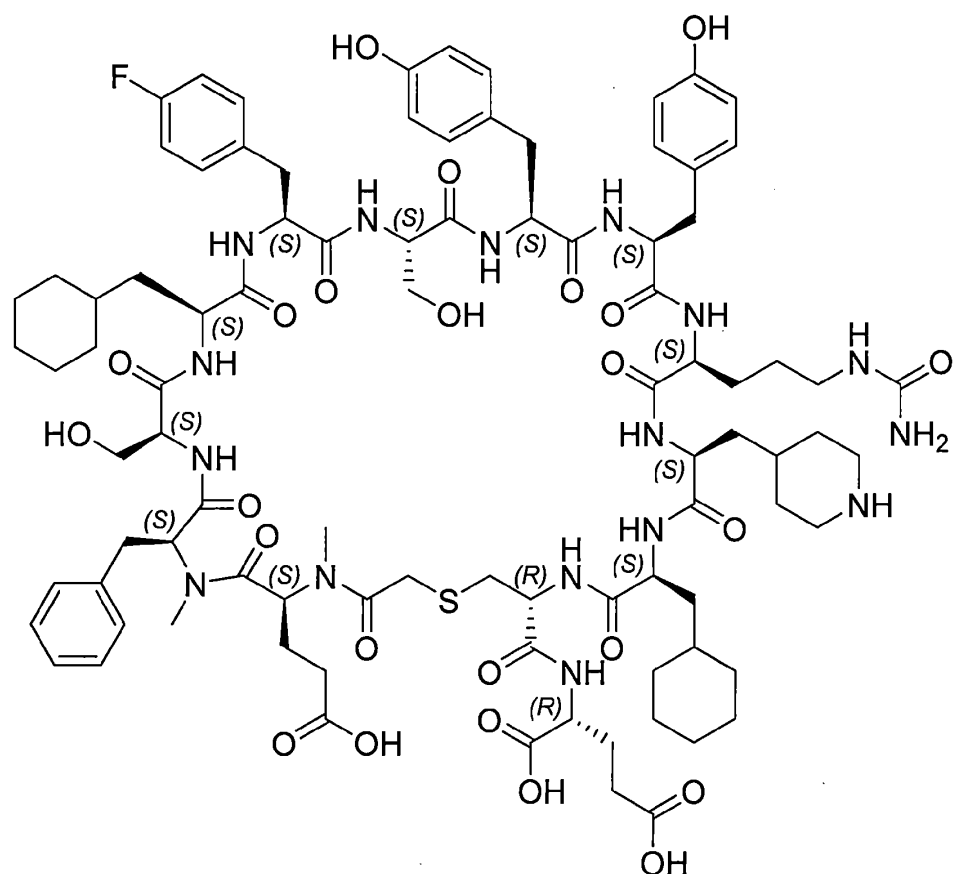
マトグラムの面積比から算出して93.35%であった。

分析条件：保持時間＝4.91分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A＝0.025% TFA (H₂O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0.30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 $m/z = 940.37$ ($M + 2H$)²⁺

[0228] (5) 実施例3－5 環状ペプチド5555__p073 (配列番号75) の合成

[0229] [化7]



[0230] HMPB-MBHA resin (Merck, 0.85 mmol/g)、及び樹脂1当量に対してFmoc-D-Glu(OtBu)-OH/DIC/DMAP (4当量/4当量/0.1~0.5当量)を、DMF/DCM (1/10)中、室温にて30分1回反応を行い合成したFmoc-de(OtBu)-HMPB-MBHA resinを用いて、一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Primeを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量)を用い、DMF中105℃下、2分間1回反応を行った。ただし、12残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。1残基目は樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2当量/8当量/4当量)を用い、DMF中75℃下、30分間2回反応を行った。

[0231] また、Fmoc除去は83 mM Oxyma pureの4%ピロリジンのDMF溶液と110℃下、1分間反応させることを基本条件とした。ただし、1残基目は20%ピペリジンのDMF溶液25℃下、5分間反応させた後、10分間反応を行った。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基を除去した後、0.1 M クロロ酢酸のDMF溶液 (4当量)、0.1 M HATUのDMF溶液 (4当量)、0.2 M DIEAのDMF溶液 (8当量)を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。

[0232] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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、25℃で10分間振盪により実施した。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エチルエーテル／ヘキサン（1／1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm、2 分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃ に冷やした少量のジエチルエーテル／ヘキサンにて洗浄後、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。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 MeCN／水（1／1）に溶解後、5 当量のトリエチルアミンを加えて、25℃ で 15 時間振盪した。得られた反応溶液を EZ-2 Elite を用いて減圧濃縮した。

[0233] 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 μm（登録商標） 30 × 150 mm；移動相：A = 0.1% TFA（H₂O 中）、B = 0.1% TFA（MeCN 中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3 分間かけて 14－39%、その後 8 分間かけて 39－44%、その後 1 分かけて 44－60%；流量：4.5 mL／分）。

[0234] 目的物の純度は以下の分析条件の LC／MS（UV 波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から算出して 95.07% であった。

分析条件：保持時間 = 5.01 分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 × 150 mm、100 Å；移動相：A = 0.025% TFA（H₂O 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 0.30 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 $m/z = 939.91$ ($M + 2H$)²⁺

[0235] 実施例 4 細胞融合法を用いた環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性測定

本実施例では、細胞融合法を用いて、環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性を測定した。

- [0236] *Ver*oE6/*h*TM*PRSS*2細胞株（JCRB細胞バンクのJCRB1819）に*HiBiT*を安定発現させた*Ver*oE6/*h*TM*PRSS*2/*HiBiT*細胞を作製するため、*pBiT*3.1-N[CMV/*HiBiT*/*Blast*]ベクター（プロメガ社のN2361）に*HaLoTag*遺伝子をクローニングした後、エレクトロポレーターNEPA21（ネッパジーン社）で当該ベクターを導入した。ベクターにブラストサイジン耐性遺伝子がコードされているので、ブラストサイジン（インビトロジェン社の）を10 μ g/mLの濃度で細胞に添加し、ベクター未導入のコントロール細胞が死滅するまで薬剤セレクションを行った。樹立した細胞は薬剤セレクションから3回継代後にアッセイに用いた。*Ver*oE6/*h*TM*PRSS*2/*HiBiT*細胞の培養には、10%非働化ウシ胎児血清（サーモフィッシャーサイエンティフィック社の10270-106）、50 μ g/mLゲンタマイシン（ナカライテスク社の11980-14）含有DMEM培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック社の10569010）を用いた。また、HEK293T細胞（ヨーロピアンコレクションオブオーセンティケイテッドセルカルチャーズ）の培養にも同じ培地を用いた。*Ver*oE6/*h*TM*PRSS*2/*HiBiT*細胞（1:10~1:5）、HEK293T細胞（1:10~1:5）とも週2回継代して維持し、試験に用いた。
- [0237] *pcDNA*3.1(+)哺乳類発現ベクター（サーモフィッシャーサイエンティフィック社のV79020）または*pcDNA*3.4ベクター（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）に、各種変異ウイルス株を誘導するSARS-CoV-2由来Sタンパク質遺伝子を挿入したSタンパク質発現ベクターを作製した。また、*pBiT*1.1-N[TK/*LgBiT*]ベクター（プロメガ社のN198A）に*HaLoTag*遺伝子をクローニングすることにより*LgBiT*発現ベクターを作製した。ここで、各種変異ウイルス株とは、野生株である武漢株から変異した、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株のことを示す。
- [0238] *Ver*oE6/*h*TM*PRSS*/*HiBiT*細胞（ 1.7×10^4 個/ウェ

ル)を96ウェルプレート(サーモフィッシャーサイエンティフィック社の136101)に播種し、37℃、5% CO₂存在下で48時間培養した。また、HEK293T細胞(2.0×10⁶個/ウェル)を6ウェルプレート(住友ベークライト社のMS-80060)に播種し、Lipofectamine(登録商標)3000試薬(サーモフィッシャーサイエンティフィック社のL3000-015)とOpti-MEM(登録商標)培地(サーモフィッシャーサイエンティフィック社の11058-021)を用いたりバーストランスフェクション法により、Sタンパク質発現ベクターまたはコントロールベクター(1.25 μg/ウェル)とLgB1T発現ベクター(1.25 μg/ウェル)をコトランスフェクションし、37℃、5% CO₂存在下で48時間培養した(Sタンパク質発現HEK293T細胞とコントロール細胞の調製)。

- [0239] アッセイ時の試験対象の環状ペプチドの2倍濃縮液の調製のため、ペプチドの100%DMSO溶液をアッセイ溶液(0.5%非働化ウシ胎児血清(サーモフィッシャーサイエンティフィック社の10270-106)、50 μg/mL ゲンタマイシン(ナカライテスク社の11980-14)含有DMEM培地)で希釈し、段階希釈で7段階の5倍希釈系列を調製し、さらに96ウェルプレート(住友ベークライト社のMS-3296U)に分注した。DMSOの最終濃度は0.1%以下とした。また、上記のトランスフェクション後に48時間培養したHEK293T細胞の培地を除去し、1ウェル当たり500 μLの0.5 mM EDTA/PBS(ナカライテスク社の13567-84)中、室温で10分間インキュベーションした。剥離したHEK293T細胞懸濁液に4倍量の10%非働化ウシ胎児血清含有DMEM培地を加え、200×gで3分間遠心した後に上清を除去し、前述のアッセイ溶液(0.5%非働化ウシ胎児血清含有DMEM培地)を加えて再懸濁した。Sタンパク質発現HEK293T細胞とコントロール細胞のそれぞれの細胞数と生存率をセルカウンター(バイオラッド社のTC20)とトリパンブルー(バイオラッド社の1450022)を用いて測定し、生細胞数が2

$\times 10^6$ 個/mLとなるようアッセイ溶液を加えて調整した。96ウェルプレートに播種後48時間培養した前述のVeroE6/hTMPRSS2/HiBiT細胞の培地を除去し、環状ペプチドの2倍濃縮液50 μ L/ウェルを添加した。直後に上記のSタンパク質発現HEK293T細胞またはコントロール細胞の懸濁液50 μ L/ウェルを添加し、ピペッティングした後に37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下で1時間、共培養した。細胞の培地を除去後、Nano-Glo (登録商標) Live Cell Assay System (プロメガ社のN2012)の基質溶液を0.5%非働化ウシ胎児血清含有Opti-MEM (登録商標)培地で5倍希釈した検出液75 μ L/ウェルを添加し、室温で5分間インキュベーションした後、SpectraMax (登録商標) Paradigm (登録商標) multimode microplate reader (モレキュラーデバイス社)を用いて発光強度を測定した。

[0240] 本実施例の系における化合物の濃度-阻害シグモイド曲線に基づき、4パラメーターロジスティック回帰でI_{max}とI_{C₅₀}値を算出した。具体的には、Sタンパク質阻害活性(%)は、発光強度測定値を基に以下の式により算出した。

[0241] [化8]

Sタンパク質阻害活性(%) = (試験ペプチド未処理のSタンパク質発現細胞平均値 - 試験ペプチド処理したSタンパク質発現細胞測定値) / (試験ペプチド未処理のSタンパク質発現細胞平均値 - 試験ペプチド未処理のコントロール細胞平均値) $\times$ 100

I_{C₅₀}値は、TIBCO Spotfire (登録商標)ソフトウェアを用いて、4パラメーターロジスティック回帰により以下の式から算出した。

[0242] [化9]

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

算出した各種変異ウイルス株に対する各ペプチドの抗ウイルス活性(I_{C₅₀}

o) を表3に示す。

[0243] [表3]

			5555_p000	5555_p020	5555_p028
変異ウイルス株	武漢株	Imax: % (at 500 nM)	100	99	91
		IC50: nM	2.0	1.9	2.0
	アルファ株	Imax: % (at 500 nM)	100	100	96
		IC50: nM	1.0	1.9	0.9
	ベータ株	Imax: % (at 500 nM)	100	100	93
		IC50: nM	2.0	1.8	2.0
	ガンマ株	Imax: % (at 500 nM)	100	100	95
		IC50: nM	2.0	1.2	2.0
	デルタ株	Imax: % (at 500 nM)	100	-	98
		IC50: nM	0.8	-	3.0

[0244] 表3において、各ペプチドの活性の強さは、Imax値（最大抑制効果）で表現されている。Imax100%はSタンパク質とACE2蛋白の結合の化合物による阻害によって細胞融合→発光が検出限界以下になったことを意味する。表3において、5種類のSARS-CoV-2変異株に対し、Imaxは100%近い値の最大効果を示しており、環状ペプチドが幅広いウイルスの変異に対する抗ウイルス抑制効果を有すると判断される。さらに、抗ウイルス抑制効果のIC₅₀が数nMという非常に低い濃度で検出されており、比活性が高いことを意味する。

[0245] 表3より、環状ペプチドは、SARS-CoV-2の各種変異ウイルス株に対しても抗ウイルス活性を有することが示された。

[0246] 実施例5 各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性測定

本実施例では、環状ペプチドの各種変異ウイルス株に対する抗ウイルス活性を測定した。

[0247] Ver o E 6 / T M P R S S 2細胞を96ウェルプレートに3.0×10⁴細胞を播種し、一晚培養した。感染性SARS-CoV-2（武漢株：WK-521株、アルファ株：QK002株、ガンマ株：TY7-501株、ベータ株：TY8-612株、デルタ株：TY11-927株、もしくはオミクロン株：TY38-873株）を含む培地をMOI=0.003で化合物とともに細胞に1時間処理した後、ウイルスを洗浄し、環状ペプチド555

5__p000、5555__p020、5555__p013)、又は5555__p028、あるいは、対照化合物として抗SARS-CoV-2抗体カクテル製剤(カシリビマブ・イムデビマブ; REGN-COV2)またはレムデシビルを含む新しい培地に交換した。24時間後に培養上清を回収し、この中に含まれるウイルスRNAをMagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)により抽出した。この時、細胞毒性を顕微鏡観察により評価した。

[0248] なお、抽出物に含まれるウイルスRNAは、one-step RT-qPCR kit (THUNDERBIRD (登録商標) Probe One-step RT-qPCR kit、東洋紡社)を用いたリアルタイムRT-qPCRによって定量した。

[0249] プライマーは以下の配列を用いた。

5' -ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' (配列番号127)

5' -ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' (配列番号128)

[0250] プローブとして以下の配列を用いた。

5' -FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-TAMRA-3' (配列番号129)

[0251] 結果を図1-1、図1-2、図1-3及び図1-4に示す。図1の縦軸は上清中に含まれるウイルスRNA量をペプチド又はREGN-COV2無添加の際の値を1とした比較値で示し、横軸は、添加したペプチド又はREGN-COV2の量を示す。

[0252] 図1-1における白三角はウイルス株として武漢株、黒四角はアルファ株に対する効果を示し、Aは5555__p000、BはREGN-COV2、Cは5555__p020、Dは5555__p013、それぞれを添加した試験区の結果を示す。図1-2における白三角はウイルス株として武漢株、黒

丸はベータ株、白四角はガンマ株に対する効果を示し、AはREGN-COV2、Bは5555__p020、Cは5555__p028、それぞれを添加した試験区の結果を示す。また、図1-3における白三角はウイルス株として武漢株、黒いひし形はデルタ株に対する効果を示し、AはREGN-COV2、Bは5555__p028、それぞれを添加した試験区の結果を示す。図1-4における白三角はウイルス株として武漢株、白丸はオミクロン株に対する効果を示し、AはREGN-COV2、Bはレムデシビル、Cは5555__p028、それぞれを添加した試験区の結果を示す。

[0253] 図1-1～1-4より、環状ペプチドは武漢株だけでは無く、他のアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、オミクロンと言った変異型ウイルスに対しても抗ウイルス活性を有することが示された。なお、どの試験区においても細胞毒性については確認されなかった。

[0254] 実施例6 抗ウイルス性細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) アッセイ

(1) 実施例6-1

Ver o E 6細胞株 (アメリカンタイプカルチャーコレクション; CRL-1586) のうち、ACE2発現量が高い細胞を選抜して試験に用いた。Ver o E 6細胞を10%非働化ウシ胎児血清 (HI-FBS, ギブコ社の14000) とアムホテリシンBを含有するMEM培地 (ギブコ社の11095) で培養した。これを希釈倍率1:2～1:5の比率で週2回継代し、生細胞比率が95%であることをLuna cell viability analyzer (ロゴスバイオシステム社) とトリパンブルー染色法で確認した。継代培養後の細胞を2% FBSおよび1% ペニシリン・ストレプトマイシン含有MEMに懸濁し、感染実験に用いた。

[0255] 環状ペプチドの調製は、100% DMSOペプチド溶液80 μ Lを空の384ウェル ECHOプレート (ラボサイト社のP-05525) に分注し、そのうち40 μ Lを隣のDMSO 40 μ Lを含むウェルに移し混和することを繰り返し、8段階の2倍希釈系列を作成することにより行った (濃

度範囲；原液濃度が10 mMの場合は30-0.06 μ M、3.3 mMでは1-0.002 μ M、33.3 μ Mでは100-0.2 nMにそれぞれ設定した)。アッセイでの最終DMSO濃度は0.3%とした。

[0256] 抗ウイルス性CPE抑制効果のアッセイは以下のように行った。上記の環状ペプチド希釈系列を、ECHO（登録商標）555アコースティック微量自動分注機（ベックマン・コールター社）を用いて各ウェルに5 μ Lを分注し、アッセイプレートを作成した。VeroE6細胞に、SARS-CoV-2（WRCEVAのUSA_WA1/2020株）を感染させ、72時間後の細胞生存率が5%となる感染力価（MOI~0.002）で感染させたバッチを作成した。作成したバッチをアッセイプレートに25 μ L（VeroE6細胞 4,000個/ウェル）を分注した。それを37℃、5%CO₂、湿度90%で72時間培養し、30 μ LのCell Titer-Glo（登録商標）（プロメガ社）を添加して、室温で10分インキュベーションした。インキュベーション後の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。

[0257] 環状ペプチドの細胞毒性は以下のように測定した。上述した方法で環状ペプチドを分注したアッセイプレートに25 μ LのVeroE6細胞（4000個/ウェル）を分注し、7℃、5%CO₂、湿度90%で72時間培養した。30 μ LのCell Titer-Glo（登録商標）（プロメガ社）を添加し、室温で10分インキュベーション後、蛍光強度をプレートリーダーで測定した。アッセイ高値と低値のコントロールとして、細胞のみのウェルとHyamine（登録商標）1622（シグマ社の1622）100 μ Mのウェルも設定した。

測定値を下記の式で%CPE reduction値に変換して算出した。

[0258] [化10]

% CPE reduction=

$$100 \times (\text{被験物質値} - \text{感染細胞対照平均値}) / (\text{非感染細胞平均値} - \text{感染細胞対照平均値})$$

[0259] IC₅₀値は、Activity Base (v. 9.3.; IDBS社)

のX1fit モジュールを用いて、4パラメーターロジスティック回帰によって算出した。具体的には、抗ウイルス性CPE抑制効果は、横軸を使用する環状ペプチドの濃度、縦軸を下記の算出した%CPE reduction値とするシグモイド曲線に基づいて判定した。縦軸の%CPE reduction値が高いほど、抗ウイルス効果が高いことを意味する。%CPE reduction値が50%となる場合の環状ペプチドの濃度をIC₅₀値とした。

[0260] 細胞毒性は、%細胞生存率を下記の式で算出した。

[0261] [化11]

$$\%細胞生存率 = 100 \times (\text{被験物質値} - \text{低値対照平均値}) / (\text{高値対照平均値} - \text{低値対照平均値})$$

[0262] CC₅₀値も、IC₅₀値と同様に、Activity Base (v. 9.3; IDBS社)のX1fit モジュールを用いて、4パラメーターロジスティック回帰によって算出した。

[0263] 結果を表4に示す。

[0264] [表4]

表4：SARS-CoV2 CPEアッセイにおける被験物質の抗ウイルス活性と細胞障害性

被験物質	Antiviral IC ₅₀ (nM)	Cytotoxicity CC ₅₀ (μM)
5555-p000	23.9	>100
5555-p003	4.5	>100
5555-p039	7.4	>100
5555-p119	18.2	>100
5555-p005	5.0	>100
5555-p088	11.4	>100
5555-p093	4.1	>100

[0265] 表4より、抗ウイルス抑制効果のIC₅₀が数nMという非常に低い濃度で検出されており、比活性が高いことを意味する。一方、化合物のオフターゲットの細胞毒性で細胞が死ぬ場合、ウイルスによる細胞死か、薬剤による非特異的細胞死か区別できず、化合物の活性を正しく評価することは困難である。表4に示したように、細胞の生存状況に影響がない(>1 μM以上の細胞傷害性CC₅₀)状態で化合物が奏効する場合は、細胞毒性が極めて低く、

安心して有効であると判定できる。

[0266] (2) 実施例 6-2

Ver o E 6 細胞株 (アメリカンタイプカルチャーコレクション ; CRL-1586) のうち、ACE 2 発現量が高い細胞を選抜して試験に用いた。Ver o E 6 細胞を 10% 非働化ウシ胎児血清 (H I - F B S、P E A K 社の P S - F B 4) と 1% ペニシリン・ストレプトマイシンを含有する M E M 培地 (G i b c o、# 11095) で培養した。これを、希釈倍率 1 : 2 ~ 1 : 5 の比率で週 2 回継代し、生細胞比率が 95%であることを L u n a c e l l v i a b i l i t y a n a l y z e r とトリパンブルー染色法で確認した。継代培養した細胞を、2% F B S、1% ペニシリン・ストレプトマイシン (コーニング社の 30-002-CL) および 1% H E P E S (コーニング社の 25-060-CL) 含有 MEM (アッセイメディア) に懸濁し、感染実験に用いた。

[0267] 環状ペプチドの調製は、100% DMSO ペプチド溶液 80 μ L を空の 384 ウェル E C H O プレート (ラボサイト社の P-05525) に分注し、そのうち 40 μ L を隣の DMSO 40 μ L を含むウェルに移し混和することを繰り返し、8 段階の 2 倍希釈系列を作成することにより行った (濃度範囲 ; 原液濃度が 333 μ M の場合は 100-2 nM、33.3 μ M では 100-0.2 nM にそれぞれ設定した)。アッセイでの最終 DMSO 濃度は 0.3% とした。

[0268] 抗ウイルス性 C P E 抑制効果のアッセイは以下のように行った。上記の環状ペプチド希釈系列を、E C H O (登録商標) 555 アコースティック微量自動分注機 (ベックマン・コールター社) を用いて各ウェルに 90 nL を分注し、5 μ L のアッセイメディアを添加したアッセイプレートを作成した。Ver o E 6 細胞に、S A R S - C o V 2 (W R C E V A、U S A _ W A 1 / 2020 株) を感染させ、72 時間後の細胞生存率が 5% となる感染力価 (M O I ~ 0.002) で感染させたバッチを作成した。作成したバッチをアッセイプレートに 25 μ L (Ver o E 6 細胞 4,000 個 / ウェル)

を分注した。それを37℃、5%CO₂、湿度90%で72時間培養し、30μLのCell Titer-Glo（プロメガ社）を添加して、室温で10分インキュベーションした。インキュベーション後の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。

[0269] 環状ペプチドの細胞毒性は以下のように測定した。上述した方法で環状ペプチドを分注したアッセイプレートに25μLのVeroE6細胞（4000個/ウェル）を分注し、7℃、5%CO₂、湿度90%で72時間培養した。30μLのCell Titer-Glo（プロメガ社）を添加し、室温で10分インキュベーション後、蛍光強度をプレートリーダーで測定した。アッセイ高値と低値のコントロールとして、細胞のみのウェルとHyamine（登録商標）1622（シグマ社の1622）100μMのウェルも設定した。

[0270] 実施例6-1と同様に、抗ウイルス性CPE抑制効果（CPE reduction値）、細胞毒性（%細胞生存率）、IC₅₀値及びCC₅₀値を算出した。結果を表5に示す。

[0271] [表5]

表5：SARS-CoV2 CPEアッセイにおける被験物質の抗ウイルス活性と細胞障害性

被験物質	Antiviral IC ₅₀ (nM)	Cytotoxicity CC ₅₀ (nM)
5555_p020	2.3	>1000
5555_p028	3.5	
5555_p026	8.1	

[0272] 表5より、本実施例で試験した環状ペプチドも、実施例6-1で試験した環状ペプチドと同様に、抗ウイルス抑制効果のIC₅₀が数nMという非常に低い濃度で検出されており、比活性が高いことを意味する。また、細胞の生存状況に影響がない（>1μM以上の細胞傷害性CC₅₀）状態で化合物が奏効しており、細胞毒性が極めて低く、安心して有効である。

[0273] 実施例7 マウスSARS-CoV-2感染致死モデルを用いた、環状ペプチドの重症化阻止効果、致死率改善効果の測定及び肺組織像評価

本実施例は、マウスSARS-CoV-2感染致死モデルを用いた、環状

ペプチドの重症化阻止効果、致死率改善効果の測定及び肺組織像評価の結果を示す。

- [0274] 37週令のBALB/cマウス24匹にSARS-CoV-2マウス継代株であるQHmu s X株を 3×10^3 TCID₅₀ (5 LD₅₀)量投与し、経鼻感染させた。マウスを8匹ずつ3群に分け、非治療群には溶媒対照（以下、PBS群）を、治療群には5555__p020、又は5555__p028の10または30mg/kgを（以下、ペプチド投与群）、感染後1、7、24、48、72および96時間で腹腔内投与した。治療対照群には、抗RBDカクテル抗体（以下、REGN-COV2群）の10mg/kgを、ウイルス接種1時間後に単回投与した。
- [0275] それぞれの群について、ウイルス感染後10日間の体重変化と人道的エンドポイントあるいは致死判定を行った。ウイルス接種10日目に観察期間を終了した。致死となった個体、人道的エンドポイントと判定された個体、あるいは観察終了時に動物を安楽死処置し、心臓採血後に肺を採取し10%中性緩衝ホルマリンに浸漬し、病理解析用の組織材料とした。
- [0276] ウイルス接種後10日間の各群における体重変化と生存率を図2-1及び図2-2に示す。
- [0277] 図2-1の縦軸は、マウスの体重を試験開始時を100とした変化率（%）を表したものであり、横軸は試験開始（ウイルス感染）後の日数である。XはPBS群、黒丸は5555__p020の10mg投与群、白丸は5555__p020の30mg投与群、黒四角は5555__p028の10mg投与群、白四角は5555__p028の30mg投与群、及び黒三角はREGN-COV2群を示す。
- [0278] また、図2-2の縦軸は、マウスの生存率を試験開始時を100とした%で表したものであり、横軸は試験開始後の日数である。XはPBS群、黒丸は5555__p020の10mg投与群、白丸は5555__p020の30mg投与群、黒四角は5555__p028の10mg投与群、白四角は5555__p028の30mg投与群、及び黒三角はREGN-COV2群を示す。

す。

[0279] P B S群では接種2日目以降、全個体で体重減少が観察され、接種3日目以降に、8匹中7匹が致死あるいは人道的エンドポイントとなった。8匹中1匹のみ接種7日目以降体重が増加し、回復傾向が認められた。R E G N - C O V 2群では2日目まで全頭で体重減少が認められたものの、8匹中7匹が3日以降、体重は増加し観察期間中に体重は回復した。8匹中1匹のみ5日目に致死となった。一方、ペプチド投与群では接種2日目に一部の個体が体重減少を示したものの、全個体が生残した。ペプチド投与群のうち、5 5 5 5 __ p 0 2 0 投与群においてはいずれの濃度においても、観察期間中に体重減少や呼吸器症状を示唆する所見は観察されなかった。5 5 5 5 __ p 0 2 8 では接種3日目に体重減少が観察されたものの、4日目以降、P B S 投与群に較べて体重減少率は有意 ($P < 0.05$) に改善した。なお、体重変化についてはDunnett's multiple comparison s t e s tにより統計学的処理を行い、生存率はLog-rank (Mantel-Cox) 試験t e s tを行った。この結果より、環状ペプチドを投与することで、SARS-CoV-2感染後の体重減少が抑制されることが示された。

[0280] 接種10日目の観察終了時の各群の代表的な肺組織像を図3（ヘマトキシリン・エオシン染色、倍率10倍で撮影）に示す。

[0281] P B S群で接種10日目まで生残した1個体における肺炎像を示す（A）では、血管周囲に細胞の集簇（*）、肺胞野において炎症性細胞浸潤と肺胞上皮の再生像（#）が認められるなど、びまん性肺胞傷害における増殖期にあたる組織像が認められた。R E G N - C O V 2 投与群の肺組織像を示す（B）では、一部の肺胞野に軽度の細胞の増加が認められたのみであった。5 5 5 5 __ p 0 2 0 の10mg投与群における肺組織像を示す（C）では、いくつかの肺葉において細気管支付近の血管周囲に軽度のリンパ球の集簇が認められた（*）。肺胞野の一部に細胞の増加がみられた。5 5 5 5 __ p 0 2 8 の30mg投与群における肺組織像を示す（D）では、殆どの肺葉におい

て血管周囲に軽度の細胞の集簇がみられた（＊）。以上の肺組織像より、環状ペプチドを投与することで、SARS-CoV-2感染による肺炎が抑制されることが示された。

[0282] 実施例8 ハムスターSARS-CoV-2感染モデルを用いた、環状ペプチドの一般状態および肺炎に対する有効性の評価

本実施例は、ハムスターSARS-CoV-2感染モデルを用いた、環状ペプチドの一般状態（体重）および肺炎に対する有効性の評価を示す。

[0283] 5555__p028のSARS-CoV-2感染による一般状態および肺炎に対するin vivo有効性を評価する目的で、ハムスターを用いた感染モデルを用いた試験を実施した。このモデルはSARS-CoV-2治療薬である抗SARS-CoV-2抗体カクテル製剤が奏効することが報告されており（参考文献7）、in vivo有効性を評価するモデルとして妥当と考え採用した。

[0284] 8-9週令の雌ゴールデンシリアンハムスター24匹にSARS-CoV-2（USA__WA1/2020株） 8×10^5 TCID₅₀を経鼻感染させた。ハムスターは6匹/用量で群分けし、溶媒対照または5555__p028の1、5、25mg/kgを感染後2、8、24、48および72時間で腹腔内投与し、感染後5日まで毎日体重を測定した。感染後5日にハムスターを安楽死処置し、肺の重量を測定した。その後、左葉は細切してRT-qPCR法でウイルスRNAを定量するために-70℃で凍結保存した。右前葉と後葉は10%中性緩衝ホルマリンで固定し、5μm厚のパラフィン切片を作成し、HE染色して病理組織学的検索に用いた。

[0285] ハムスターのようなげっ歯類は、成長し続ける動物である。健康であれば、体重が増加し続けるが、体調が悪いと、体重増加抑制や、重篤な場合は体重が減少する。そのため、体重は、げっ歯類の動物の体調を推し量るために重要な臨床パラメーターの一つである。体重の推移を表6に示した。溶媒対照群ではDay1から平均値が低下傾向を示したが、5555__p028投与群ではいずれの用量においても体重減少は同程度に抑制された。溶媒対照

群で体重が減少したことは、被験ハムスターの体調（一般状態）が悪いことを意味し、環状ペプチド投与群で体重減少が軽減したことは、体調（一般状態）が改善したことを意味する。

[0286] [表6]

表 6：体重の推移

用量		感染日 (Day 0) からの日数						
		-6	0	1	2	3	4	5
溶媒対照	平均	118.95	125.33	122.12	116.63	112.23	109.80	109.62
	SD	3.66	4.36	5.29	4.28	3.77	3.11	4.66
5555_p028 25 mg/	平均	118.95	129.63	126.85	126.68	126.22	124.45	121.62
	SD	3.84	5.71	4.37	5.24	4.63	4.19	5.86
5555_p028 5 mg/kg	平均	118.67	126.52	122.87	120.87	120.42	118.52	119.68
	SD	4.11	6.1	5.29	4.96	4.06	2.93	2.3
5555_p028 1mg/kg	平均	118.63	126.75	124.03	122.3	120.17	120.33	120.75
	SD	3.68	4.64	4.21	6.08	6.22	6.41	5.79

[0287] 左肺からおよそ 20 mg を採取・秤量後に 25 mg/mL となるようにバッファーを添加後ホモジナイズし、200 μ L（肺 5 mg 相当）から RNA を抽出し、SARS-CoV-2 の N2 タンパク質の mRNA 量を N-2 プライマーセット、Quant-iT Ribogreen RNA assay kit、TaqMan Fast Virus 4x Master Mix および QuantStudio 6（いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて、RT-qPCR 法で 3 回定量した。

[0288] N-2 プライマーセット

Forward: 5' -TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3' （配列番号 130）

Reverse: 5' -GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3' （配列番号 131）

[0289] その結果、5555_p028 1、5 mg/kg 群は統計学的に有意な SARS-CoV-2 ゲノムコピー数の低下が、25 mg/kg 群では低下傾向が認められた（表 7）。

[0290]

[表7]

表 7 : 肺でのSARS-CoV-2 ゲノムコピー数 (RT-qPCR)

群	Log ₁₀ of Geometric mean (copy number/gram)	SD of Log ₁₀	危険率 (vs. 溶媒対照、 Student t-test、両側)
溶媒対照	9.28	0.34	-
5555 p028 25 mg/kg	8.76	1.00	0.25
5555 p028 5 mg/kg	7.72	0.32	<0.01
5555 p028 1 mg/kg	8.15	0.9	0.017

[0291] 剖検時の肺の肉眼的所見は、斑状の退色が全ての群で認められ、5 5 5 5 __ p 0 2 8 の腹腔内投与に直接関係する群間の違いは見られなかった。このとき、5 5 5 5 __ p 0 2 8 の 2 5 m g / k g 群の 2 例で肺の退色が観察されなかった (表 8)。

[0292] [表8]

表 8 : 肺の肉眼的所見

群	変化なし(匹)	斑状退色 (匹)
溶媒対照	0	6
5555 p028 25 mg/kg	2	4
5555 p028 5 mg/kg	0	6
5555 p028 1 mg/kg	0	6

[0293] 病理組織学的には、すべての群において肺の慢性活動性炎症が認められた。間質性炎症は、多くのマクロファージ浸潤が生じており、それより顕著でない好中球、リンパ球、好酸球とまれに巨細胞を伴っていた。罹患部位においては、肺胞内に赤血球と好酸性線維状物質、炎症性細胞と細胞デブリが認められた。罹患部位の細気管支と肺胞の上皮細胞は増生しており、稀に肺胞上皮細胞は大型化し奇異な形態を示した (細胞異形)。さらに、中皮の増生を伴う胸膜の多発性炎症が認められた。

[0294] 肺の炎症の重篤度は 5 5 5 5 __ p 0 2 8 投与によって溶媒対照群より減じていた。肺の炎症は 5 5 5 5 __ p 0 2 8 の 5 m g / k g 群の 2 例で、後葉において軽微であった。それに対して、溶媒対照群の 6 例中 3 例の前葉と後葉

で炎症が高度であった（表9）。病理組織像を図4に示した。

[0295] [表9]

表9：病理組織学的所見

病理組織学的所見	溶媒対照 (n=6)	5555_p028 25 mg/kg (n=6)	5555_p028 5 mg/kg (n=6)	5555_p028 1 mg/kg (n=6)
慢性活動性炎症（後葉）				
軽微	0	0	2	0
軽度	1	6	3	5
中等度	2	0	1	1
高度	3	0	0	0
慢性活動性炎症（前葉）				
軽度	2	2	1	5
中等度	1	4	5	1
高度	3	0	0	0

[0296] これらの結果から、SARS-CoV-2に感染したゴールデンシリアンハムスターにおいては、慢性活動性の間質性および胸膜の炎症が生じ、5555_p028の投与によって改善する可能性が示された。

[0297] 実施例9 抗COVID薬との併存投与が環状ペプチドの抗ウイルス活性に与える影響の測定

本実施例では、抗COVID薬との併存投与が環状ペプチドの抗ウイルス活性に与える影響を調べるために、既知のCOVID薬剤としてレムデシビル、REGN-COV2（カシリピマブとイムデピマブの併用剤）、又はモラヌピラビルの活性体としてEIDD-1931、及び環状ペプチドを各濃度で混合し、ウイルス感染細胞に投与、上清のウイルスRNA量を測定した。詳細を以下に示す。

[0298] Ver o E6/TMPRSS2細胞を96ウェルプレートに 3.0×10^4 の細胞を播種し、一晚培養した。感染性SARS-CoV-2（武漢株：WK-521株、デルタ株：TY11-927株、もしくはオミクロン株：TY38-873株）を含む培地をMOI=0.003で、環状ペプチドと既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物の組合せ（EIDD-1931と5555_p028の組み合わせ、レムデシビルと5555_p028の組み合わせ、又はREGN-COV2と5555_p028の組み合わせ）

せ)とともに細胞に1時間処理した。その後、ウイルスを洗浄し、化合物を含む新しい培地に交換した。24時間後に培養上清を回収し、この中に含まれるウイルスRNAをMagMax Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation kit (サーモフィッシュサイエンティフィック社)により抽出した。この時、細胞毒性を顕微鏡観察により評価した。なお、抽出物に含まれるウイルスRNAは、実施例5と同様に定量した。

[0299] 結果を図5-1～図5-8に示す。図5の縦軸は上清中に含まれるウイルスRNA量をペプチドおよび各種既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物が無添加の際の値を1とした比較値で示し、横軸は各種既存の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物の量を示す。図5-1～図5-3は、武漢株に対する抗ウイルス活性測定結果を示し、図5-4～図5-6は、デルタ株に対する抗ウイルス活性測定結果を示し、図5-7～図5-8は、オミクロン株に対する抗ウイルス活性測定結果を示す。

[0300] 図5-1～図5-8より、環状ペプチドは単剤で抗ウイルス活性を有するだけでは無く、既知の抗SARS-CoV-2活性を有する化合物と併用することで、さらに優れた抗ウイルス活性を有することが示された。

[0301] なお、細胞毒性はいずれの試験区においても確認されなかった。

[0302] 実施例10 環状ペプチドの合成例

実施例2と同様に、環状ペプチドを合成した。合成したペプチドの配列及び構造を表10及び表11に示す。

[0303]

[表10-1]

配列番号	ペプチド名														ESI (m/z) [M+2H] ²⁺	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
132	5555_p125	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	A	dr	Cha	C	de	-OH	879.87
133	5555_p126	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	A	dk	Cha	C	de	-OH	865.87
134	5555_p127	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	A	dr	Cha	C	de	-NH2	879.38
135	5555_p128	MeE	MeNle	S	Cha	F4F	Aib	Y	Y	A	dk	Cha	C	de	-NH2	865.37
136	5555_p129	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	984.91
137	5555_p130	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	967.93
138	5555_p131	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	985.49
139	5555_p132	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-NH2	984.48
140	5555_p133	MeE	MeF	S	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	985.90
141	5555_p134	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	953.89
142	5555_p135	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	939.88
143	5555_p136	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	R	Cha	C	de	-OH	955.90
144	5555_p137	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	K	Cha	C	de	-OH	941.90
145	5555_p138	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dr	Cha	C	de	-OH	955.92
146	5555_p139	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	941.90
147	5555_p140	MeE	MeF	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	970.91
148	5555_p141	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	MeE	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	953.92
149	5555_p142	MeE	MeNle	S	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	907.87
150	5555_p143	MeE	MeNle	Aib	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	906.92
151	5555_p144	MeE	MeNle	S	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	907.87
152	5555_p145	MeE	MeNle	Aib	Cha	Y	dd	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	906.87
153	5555_p146	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-NH2	924.56
154	5555_p151	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Aib	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-NH2	920.68

[0304]

[表10-2]

155	5555_p152	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-OH	937.98
156	5555_p153	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-NH2	935.72
157	5555_p154	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-NH2	939.41
158	5555_p155	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-OH	952.99
159	5555_p156	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	907.38
160	5555_p157	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	921.01
161	5555_p158	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	F4COO	dk	Cha	C	de	-OH	925.00
162	5555_p159	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	922.55
163	5555_p160	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	A4p	Cha	C	de	-OH	936.01
164	5555_p161	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	907.92
165	5555_p162	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	893.23
166	5555_p163	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Dab	dk	Cha	C	de	-NH2	879.23
167	5555_p164	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	893.23
168	5555_p165	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Alb	Y	Y	Dab	A4p	Cha	C	de	-NH2	892.24
169	5555_p166	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Dab	R	Cha	C	de	-NH2	908.15
170	5555_p167	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Dab	dk	Cha	C	de	-NH2	894.21
171	5555_p168	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Dab	dr	Cha	C	de	-NH2	907.88
172	5555_p169	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Dab	A4p	Cha	C	de	-NH2	907.09
173	5555_p173	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	A4p1aa	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	986.93
174	5555_p174	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	MeG	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	930.40
175	5555_p175	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Mede	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	966.54
176	5555_p176	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	Medd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	959.55
177	5555_p177	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	924.92
178	5555_p178	3Py	MeNle	Alb	Alnd	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	941.87
179	5555_p179	3Py	MeNle	Alb	Alnd	F4F	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	927.28
180	5555_p180	3Py	MeNle	Alb	Alnd	F4F	Meda	Y _{3Me}	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	934.19

[0305]

[表10-3]

181	5555_p181	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	909.89
182	5555_p182	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	Meda	Y ^{3Me}	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	917.00
183	5555_p183	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	939.47
184	5555_p184	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	Meda	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	924.49
185	5555_p185	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	Meda	Y ^{3Me}	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	931.47
186	5555_p186	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	MeG	Y ^{3Me}	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	924.46
187	5555_p187	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y ^{3Me}	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	929.43
188	5555_p188	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	P	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	913.41
189	5555_p189	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	A4paa	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	989.47
190	5555_p190	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	947.96
191	5555_p191	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	MeG	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	932.89
192	5555_p192	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	Mede	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	968.98
193	5555_p193	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	Medd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	961.94
194	5555_p194	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	P	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	945.93
195	5555_p195	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	954.90
196	5555_p196	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	A4paa	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	1003.97
197	5555_p197	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	aMeS	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	962.43
198	5555_p198	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	MeG	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	947.47
199	5555_p199	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	Mede	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	983.48
200	5555_p200	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	Medd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	976.71
201	5555_p201	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	P	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	960.44
202	5555_p202	MeE	MeNle	Alb	Aind	F4F	dd	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	969.42
203	5555_p203	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	F4COO	A4p	Cha	C	de	-NH2	945.45
204	5555_p204	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	A4paa	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	959.42
205	5555_p205	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	917.89
206	5555_p206	3Py	MeNle	Alb	Cha	F4F	MeG	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	902.92

[0306]

[表10-4]

207	5555_p207	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	Mede	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	938.91
208	5555_p208	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	Medd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	931.80
209	5555_p209	3Py	MeNle	Aib	Cha	F4F	P	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	916.17
210	5555_p211	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	A4pipaa	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	974.00
211	5555_p212	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	aMeS	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	932.40
212	5555_p213	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	MeG	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	917.38
213	5555_p214	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	Mede	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	953.43
214	5555_p215	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	Medd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	946.41
215	5555_p216	MeE	MeNle	Aib	Aind	F4F	P	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	930.38
216	5555_p218	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	aMeS	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-NH2	915.38
217	5555_p219	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	Medd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	929.88
218	5555_p220	MeE	MeNle	Aib	Cha	F4F	de	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	-OH	929.93

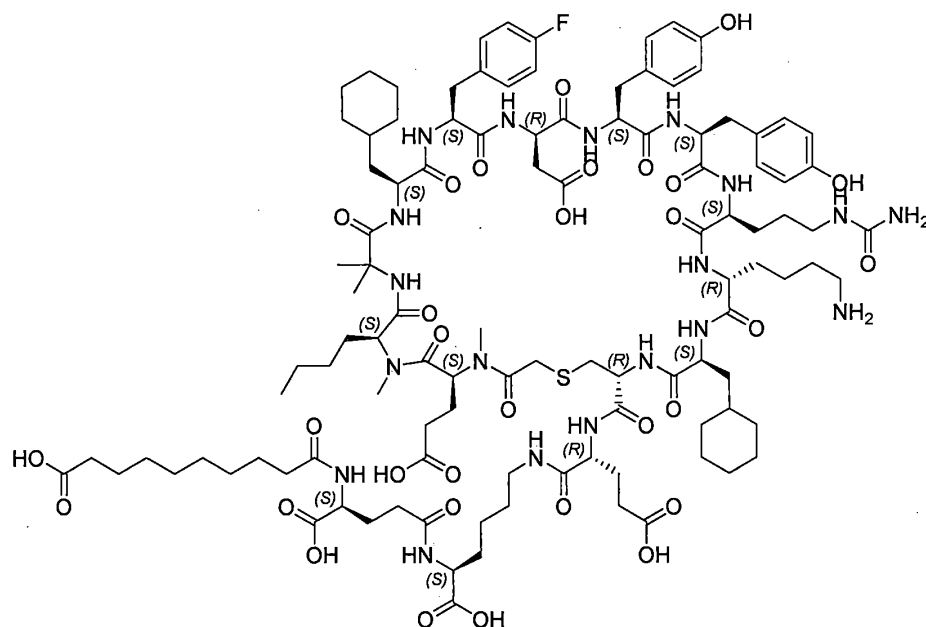
[0307] [表11]

配列番号	ペプチド名																	ESI (m/z) [M+2H] ²⁺
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
219	5555_p221	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC10COO)	-NH ₂		1092.86
220	5555_p222	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC12COO)	-NH ₂		1106.71
221	5555_p223	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC14COO)	-NH ₂		1120.74
222	5555_p224	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC9)	-NH ₂		1063.71
223	5555_p225	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC11)	-NH ₂		1077.72
224	5555_p226	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC13)	-NH ₂		1091.72
225	5555_p227	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cC10COO)	-NH ₂	1172.48
226	5555_p228	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cC12COO)	-NH ₂	1186.49
227	5555_p229	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cC14COO)	-NH ₂	1200.35
228	5555_p230	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cC8COO)	-OH	1158.66
229	5555_p231	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cC10COO)	-OH	1172.67
230	5555_p232	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	PEG2c	dk(cC12COO)	-OH	1187.11
231	5555_p233	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	K(@R1)	E(@R2)	cC8COO -OH	1143.57
232	5555_p234	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	K(@R1)	E(@R2)	cC10COO -OH	1157.61
233	5555_p235	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	K(@R1)	E(@R2)	cC12COO -OH	1171.63
234	5555_p236	MeE	MeNle	Alb	Cha	F4F	dd	Y	Y	Cit	dk	Cha	C	de	dk(cC10COO)	-OH		1093.08

[0308] 表 1 1 に記載のペプチドは、1 番目のアミノ酸と 1 2 番目のアミノ酸が環状構造を形成し、さらにリンカーとして 1 3 番目以降のアミノ酸または PEG、アルキル鎖構造を付加した構造をもつペプチドである。また、表中の @

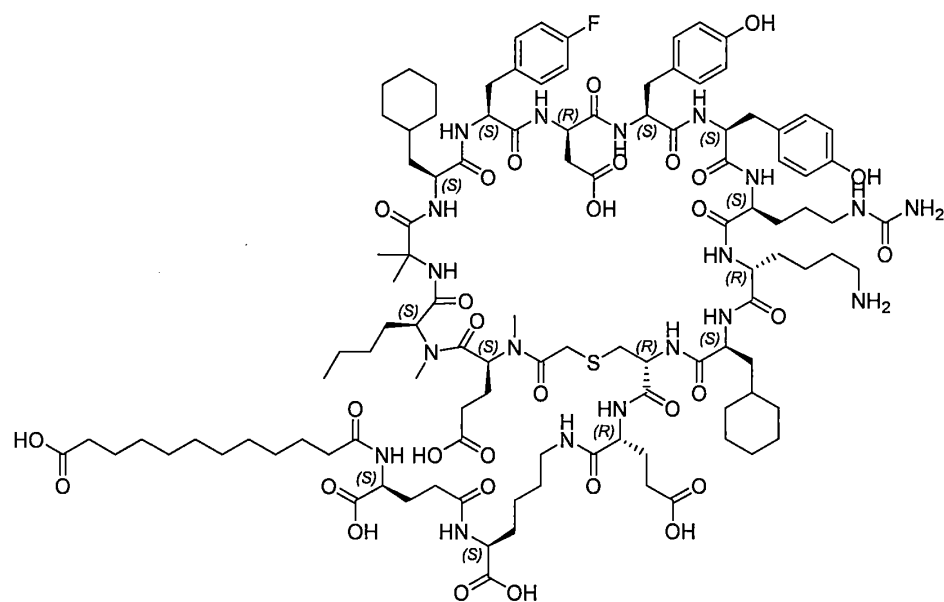
Rは、アミノ酸の側鎖に含まれる官能基を介して結合した構造を持つことを示す。K@R 1は、13番目のアミノ酸d eに側鎖アミノ基を介して、E@R 2は、前記K@R 1のリシンに側鎖のカルボキシ基を介して結合している。例えば環状ペプチド5555__p233（配列番号：229）は下記〔化12〕で示される構造、環状ペプチド5555__p234（配列番号：230）は下記〔化13〕で示される構造、環状ペプチド5555__p235（配列番号：231）は下記〔化14〕で示される構造である。

[0309] [化12]

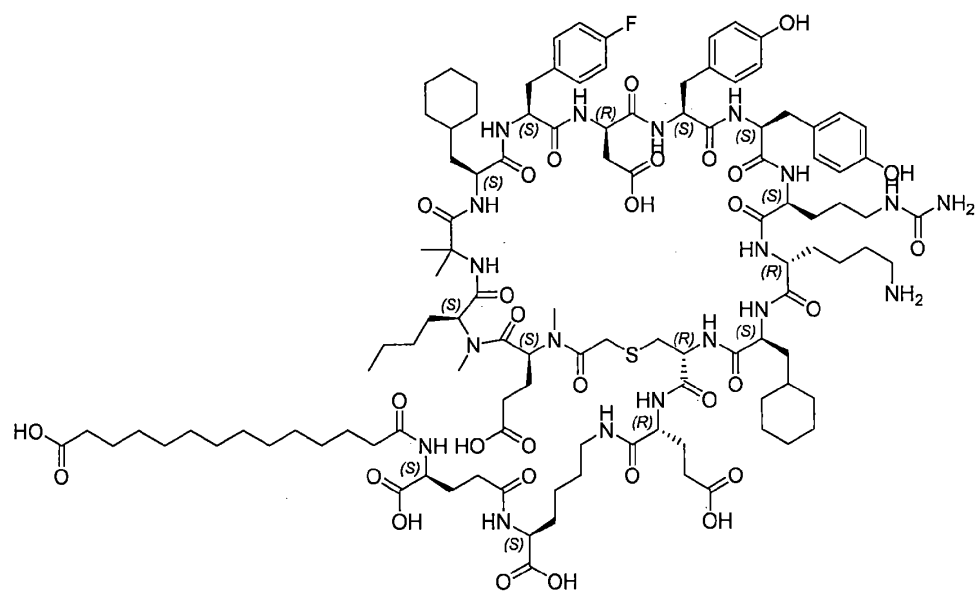


[0310]

[化13]



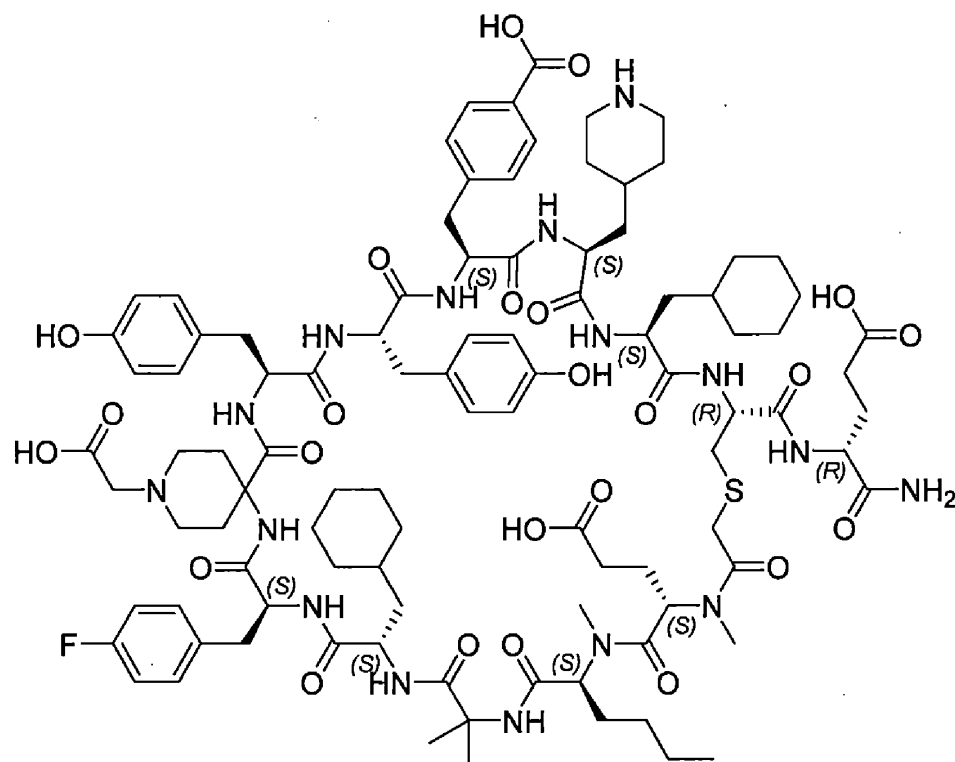
[0311] [化14]



[0312] 以下に、環状ペプチドの詳細な合成例を記載する。

(1) 実施例10-1 環状ペプチド5555__p173 (配列番号173) の合成

[0313] [化15]



[0314] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.48 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (5.25当量/10当量/5当量) を用いて、DMF中75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間3回、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、及び6残基目75℃下、20分間1回、12残基目は40℃下、30分間1回反応を行った。

[0315] また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と75℃下、3分間反応させることを基本条件とした。1残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と室温下、5分間反応させた後、10分間反応を行った。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基を除去した後、クロロ酢酸をDIC/HOSuで活性化したDMF/塩化メチレン（1/1）溶液（5当量）を固相樹脂に加え室温にて60分間振盪により行った。

[0316] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレン、ジエチルエーテルで洗浄して減圧下乾燥した後、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分間振盪により実施した。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、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000rpm、2分間）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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90%DMSO水溶液に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で15時間振盪した。得られた反応溶液をHT-12を用いて減圧濃縮した。

[0317] 得られた粗生成物は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（登録商標） 50×250mm；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10→36%，その後15分間かけて36→41%，その後3分かけて41→60%；流量：118mL/分）。

[0318] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225nm）クロマトグラムの面積比から算出して99.41%であった。

分析条件：保持時間=5.03分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm， 100Å；移動相：A=0.0

[0321] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.48 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量) を用いて、DMF中75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、1残基目、3残基目は75℃下、30分間2回、2残基目は

75℃下、10分間2回、5残基目は90℃下、10分間2回、12残基目は50℃下、20分間1回反応を行った。

[0322] 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。1残基目、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、及び6残基目は20% ピペリジンのDMF溶液と室温下、5分間反応させた後、10分間反応を行った。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基を除去した後、クロロ酢酸/HATU/DIPEA (5.2当量/5当量/5当量)を用いてDMF中室温で30分間振盪により行った。

[0323] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレン、ジエチルエーテルで洗浄して減圧下乾燥した後、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5分間振盪により実施した。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エチルエーテル/ヘキサン (1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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/MeCN/H₂O (1/1/1)に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で7時間振盪した。得られた反応溶液をHT-12を用いて減圧濃縮した。

[0324] 得られた粗生成物は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 (登録商標) 50x250mm; 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16-42%, その後15分間かけて42-47%, その後3分かけて47-60%; 流量 : 118 mL/分)。

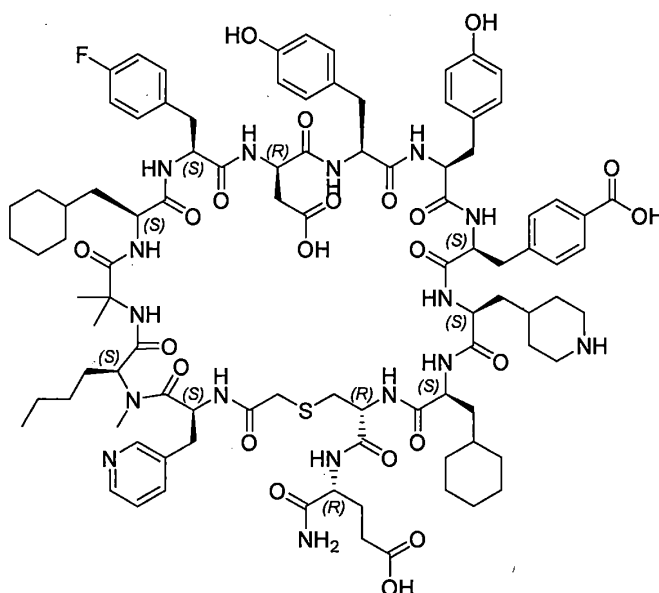
[0325] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出して99.01%であった。

分析条件 : 保持時間 = 5.82分 ; カラム : Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 × 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20-60%, その後0.30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 $m/z = 959.55$ ($M + 2H$)²⁺

[0326] (3) 実施例10-3 環状ペプチド5555__p195 (配列番号195) の合成

[0327] [化17]



[0328] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社, 0.4

8 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Primeを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量) を用いて、DMF中105℃下、2分間1回反応を行った。ただし、1残基目は90℃下、10分間2回、12残基目は50℃下、15分間1回、13残基目は105℃下、1分間1回反応を行った。

[0329] また、Fmoc除去は83mM Oxyma pureの4%ピロリジンのDMF溶液と110℃下、1分間反応させることを基本条件とした。2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、及び6残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と50℃下、90秒間反応させた。1残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と室温下、1分間2回反応させた。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基を除去した後、クロロ酢酸/HATU/DIPEA (5当量/5当量/10当量) を用いてDMF中室温で30分間振盪により行った。

[0330] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレン、ジエチルエーテルで洗浄して減圧下乾燥した後、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90分間振盪により実施した。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エチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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／イソプロピルアルコール／H₂O（90／5／5）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で15時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0331] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μm（登録商標） 50×150 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12-37%，その後8分間かけて37-42%，その後1分かけて42-60%；流量：120 mL／分）。

[0332] 目的物の純度は以下の分析条件のLC／MS（UV波長225 nm）クロマトグラム面積比から算出して95.15%であった。

分析条件：保持時間=4.51分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 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20-60%，その後0.30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 $m/z = 954.90$ $(M+2H)^{2+}$

[0333] （4）実施例10-4 環状ペプチド5555__p213（配列番号212）の合成

[0334]

と室温下、1分間2回反応させた。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基を除去した後、クロロ酢酸/HATU/DIPEA（5当量/5当量/10当量）を用いてDMF中室温で30分間振盪により行った。

[0337] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレン、ジエチルエーテルで洗浄して減圧下乾燥した後、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70分間振盪により実施した。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、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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6.3mMとなるように90%DMSO水溶液に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で18時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0338] 得られた粗生成物は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（登録商標） 50 $\times$ 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17-42%，その後8分間かけて42-47%，その後1分かけて47-60%；流量：120mL/分）。

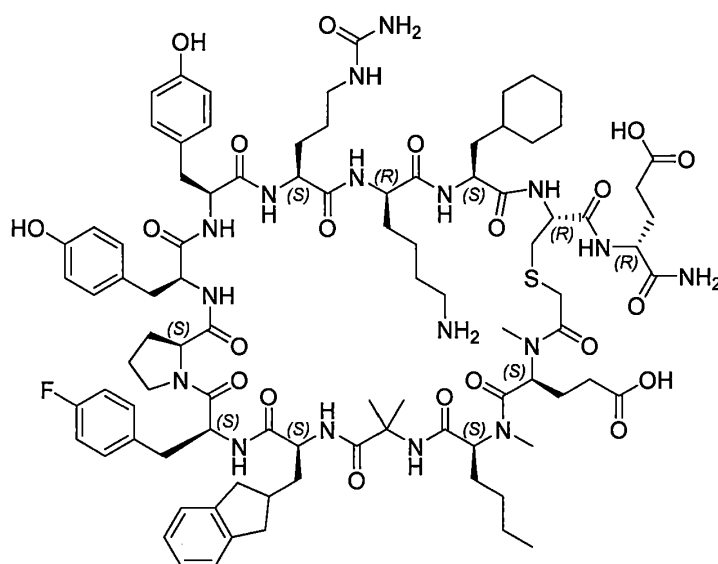
[0339] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225nm）クロマトグラムの面積比から算出して92.09%であった。

分析条件：保持時間＝5. 53分；カラム：K i n e t e x E V O C
18 2. 6 μ m 2. 1 x 150mm, 100 Å；移動相：A＝0. 0
25% 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. 30分間かけて60－95%，その後1. 55分かけて95
－95%；流量：0. 5 mL／分

ES I-MS (+) 観測値 $m/z = 917.38$ $(M+2H)^{2+}$

[0340] (5) 実施例 10-5 環状ペプチド 5555__p216 (配列番号 215) の合成

[0341] [化19]



[0342] Sieber amide resin (渡辺化学工業株式会社、0.48 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量) を用いて、DMF中90℃下、3分間1回反応を行っ

た。ただし、1 残基目は75℃下、30分間2回、2 残基目、3 残基目は90℃下、10分間2回、4 残基目はFmoc-AA/DIC/Oxyma pure (3当量/8当量/4当量)を用いて、75℃下、30分間1回、12 残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。

[0343] また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下、1分間反応させることを基本条件とした。1 残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と室温下、1分間2回反応させた。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基を除去した後、クロロ酢酸/HATU/DIPEA (5当量/5当量/10当量)を用いてDMF中室温で30分間振盪により行った。

[0344] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレン、ジエチルエーテルで洗浄して減圧下乾燥した後、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70分間振盪により実施した。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、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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6.3mMとなるように90%DMSO水溶液に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で18時間振盪した。得られた反応溶液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0345] 得られた粗生成物は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 (登録商標) 50x15

0 mm ; 移動相 : A = 0.1% TFA (水中) , B = 0.1% TFA (MeCN中) ; 温度 : 40°C ; グラジエント (%B) : 3分間かけて17-42% , その後8分間かけて42-47% , その後1分かけて47-60% ; 流量 : 120 mL / 分) 。

[0346] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出して89.40%であった。

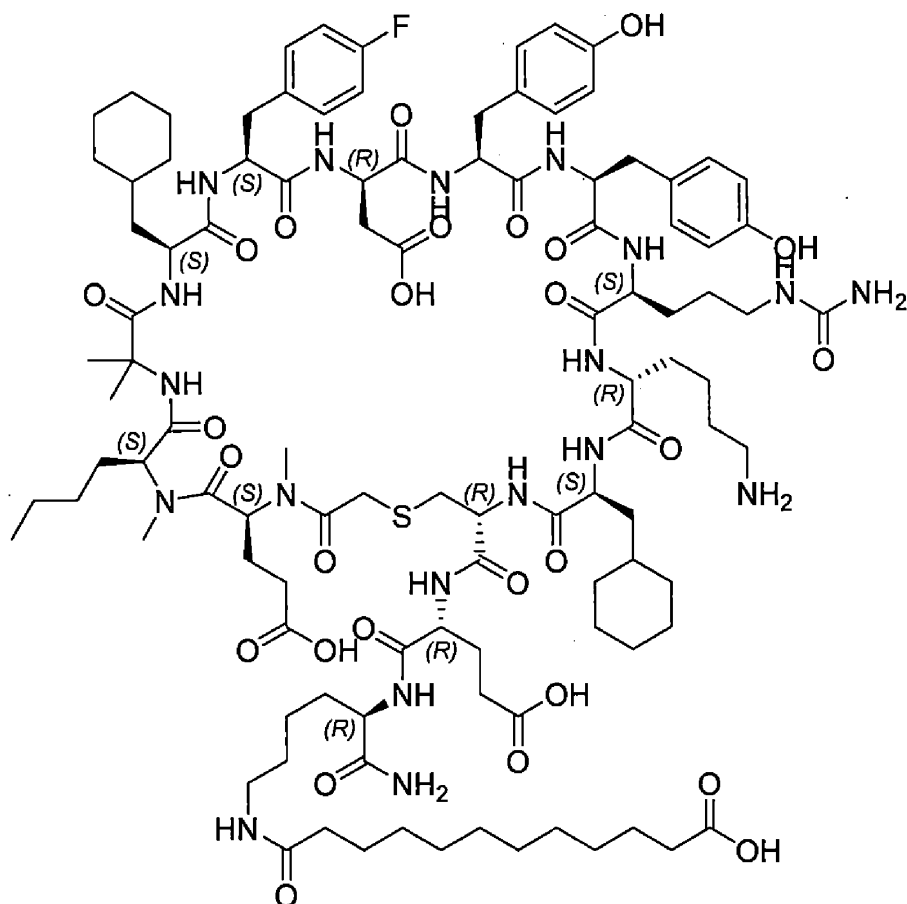
分析条件 : 保持時間 = 5.78分 ; カラム : Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å ; 移動相 : A = 0.025% TFA (水中) , B = 0.025% TFA (MeCN中) ; 温度 : 60°C ; グラジエント (%B conc) : 7.15分間かけて20-60% , その後0.30分間かけて60-95% , その後1.55分かけて95-95% ; 流量 : 0.5 mL / 分

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 930.38$ (M+2H)²⁺

[0347] (6) 実施例10-6 環状ペプチド5555__p221 (ペプチド部分の配列番号 : 30で表されるペプチドに、リンカー構造としてdk (cC10COO) が付加された構造、配列番号219) の合成

[0348]

[化20]



[0349] Fmoc-NH-sieber resin (渡辺化学工業株式会社、 0.48 mmol/g) を用いて、前述の一般的方法にて目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty blueを固相合成機として使用して、製造元のマニュアルに従って合成を行った。Fmoc除去を10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下、1分間反応を行った。樹脂1当量に対してAlloc-D-Lys(Fmoc)-OH/DIC/Oxymapure(4.2当量/8当量/4当量)を用いて、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。同条件でFmoc除去を行った後、12-(tert-ブトキシ)-12-オキソデカン酸を用いて、DMF中90℃下、1

0分間1回反応を行った。A l l o c 除去を樹脂1当量に対してP d (O A c)₂/P P h₃/P h S i H₃ (0.2当量/1当量/10当量)を用いて、塩化メチレン中室温下、60分間反応を行った。前工程で得られた固相樹脂に対し、各残基の導入には樹脂1当量に対して、F m o c - A A / D I C / O x y m a p u r e (4.2当量/8当量/4当量)を用いて、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間2回、3残基目は90℃下、10分間2回、5残基目は90℃下、10分間1回、12残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。

[0350] また、F m o c 除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下、1分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、及び6残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と50℃下、90秒間反応させた。1残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と室温下、1分間2回反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたF m o c 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F m o c 基を除去した後、0.1M クロロ酢酸のDMF溶液(5当量)、0.1M H A T UのDMF溶液(5当量)、0.2M D I E AのDMF溶液(10当量)を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。

[0351] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A (T F A / H₂O / T I S / D O D Tの体積比92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5の混合物)を加え、室温で5分間振盪により実施した。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エチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000rpm、2分間)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチ

ルエーテルにて洗浄後、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。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90% DMSO水溶液に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で6時間振盪した。得られた反応溶液を減圧濃縮した。

[0352] 得られた粗生成物は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（登録商標） 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21–46%，その後8分間かけて46–51%，その後1分かけて51–60%；流量：120 mL/分）。

[0353] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出して96.88%であった。

分析条件：保持時間=6.01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）：7.15分間かけて20–60%，その後0.30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 = 1092.86 ($M+2H$)²⁺

[0354] （7）実施例10–7 環状ペプチド5555__p227（ペプチドの配列番号：30で表されるペプチドに、リンカー構造としてPEG2c–dk（cC10COO）が付加された構造、配列番号225）の合成

[0355]

いて、塩化メチレン中室温下、60分間反応を行った。前工程で得られた固相樹脂に対し、各残基の導入には樹脂1当量に対して、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure (4.2当量/8当量/4当量)を用いて、DMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、1残基目は75℃下、30分間2回、3残基目は90℃下、10分間2回、5残基目は90℃下、10分間1回、12残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。

[0357] また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下、1分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、及び6残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と50℃下、90秒間反応させた。1残基目は10%ピロリジンのDMF溶液と室温下、1分間2回反応させた。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基を除去した後、0.1M クロロ酢酸のDMF溶液(5当量)、0.1M HATUのDMF溶液(5当量)、0.2M DIEAのDMF溶液(10当量)を固相樹脂に加え室温にて30分間振盪により行った。

[0358] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンで洗浄して減圧下乾燥した後、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5分間振盪により実施した。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エチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000rpm、2分間)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、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。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90% DMSO水溶液に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で6時間振盪した。得られた反応溶液を減圧濃縮した。

[0359] 得られた粗生成物は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（登録商標） 50 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中），B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40°C；グラジエント（%B）：3分間かけて19–44%，その後8分間かけて44–49%，その後1分かけて49–60%；流量：120 mL/分）。

[0360] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出して95.47%であった。

分析条件：保持時間=5.94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°C；グラジエント（%B conc）：7.15分間かけて20–60%，その後0.30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 $m/z = 1172.48$ ($M+2H$)²⁺

[0361] 実施例11 各抗ウイルス活性アッセイによる抗SARS-CoV-2活性の評価

本実施例では、実施例10にて合成したペプチドの一部について、実施例4と同様に抗ウイルス活性を測定及び評価した。本アッセイにおいてはウイルス株としてデルタ株を用いた。その結果を表12に示す。

[0362]

[表12]

配列番号	被験物質名	I _{max} : % (at 500nM)	IC ₅₀ : nM
173	5555_p173	100	0.6
176	5555_p176	100	0.6
177	5555_p177	97	2.8
178	5555_p178	100	1.9
183	5555_p183	101	1.0
187	5555_p187	101	1.1
188	5555_p188	101	0.4
192	5555_p192	102	2.5
193	5555_p193	102	1.5
195	5555_p195	101	2.3
196	5555_p196	101	0.8
197	5555_p197	101	0.4
201	5555_p201	101	0.7
202	5555_p202	100	1.2
203	5555_p203	101	0.5
210	5555_p211	101	0.5
211	5555_p212	101	0.3
212	5555_p213	101	0.6
213	5555_p214	102	1.6
214	5555_p215	101	0.8
215	5555_p216	102	0.4
216	5555_p218	101	0.3
219	5555_p221	97	2.6
225	5555_p227	100	1.9
228	5555_p230	101	3.0
229	5555_p231	100	4.2
230	5555_p232	99	7.0
231	5555_p233	99	4.2
232	5555_p234	99	5.9
233	5555_p235	99	7.0

[0363] また、実施例 10 にて合成したペプチドの一部について、実施例 6 と同様

に抗ウイルス活性を測定及び評価した。なお、本アッセイにおいてはウイルス株として武漢株及びデルタ株を用いた。その結果を表 1 3 に示す。

[0364] [表13]

配列番号	被験物質名	武漢株 IC50 :nM	デルタ株 IC50 :nM
173	5555_p173	6.8	no data
175	5555_p175	34.5	no data
176	5555_p176	13.6	13.7
219	5555_p221	17.7	18.6
225	5555_p227	11.5	8.0
229	5555_p231	no data	19.2
230	5555_p232	no data	44.5
232	5555_p234	no data	42
233	5555_p235	no data	57

[0365] 表 1 2 及び表 1 3 の結果より、本発明の環状ペプチドは、リンカーが付加されていても S A R S - C o V - 2 （各種変異ウイルス株を含む）に対して抗ウイルス活性を有することが示された。

[0366] 本明細書中の表と配列表に、万が一齟齬があった場合には、表の記載が正しいと解釈する。

請求の範囲

[請求項1]

以下のアミノ酸配列：

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (配列番号2)

あるいは、上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-10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：

MeA-MeF-S-Cha-Y-S-Y-Y-R-R-Cha-C (配列番号2)

あるいは、上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、5番目、6番目、8番目、9番目及び10番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-8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3]

以下のアミノ酸配列：

X1-X2-X3-Cha-X4-X5-Y-X6-X7-X8-Cha-C (配列番号1)

ここにおいて、

X1は、A、E、MeA、またはMeEであり；

X2は、N-メチルアミノ酸であり；

X3は、S又はAibであり；

X4は、非置換の若しくは置換された芳香環を側鎖に有するアミノ酸であり；

X5は、任意のアミノ酸であり；

X6は、非置換の若しくは置換された芳香環を側鎖に有するアミノ

酸であり；

X 7 は、任意のアミノ酸であり；

X 8 は、任意の塩基性アミノ酸である、
を含む、ペプチド。

[請求項4] X 1 が、Me A 又は Me E である、請求項 3 に記載のペプチド。

[請求項5] X 2 が、Me F 又は Me N l e である、請求項 3 又は請求項 4 に記載のペプチド。

[請求項6] X 4 が、非置換の若しくは置換された Y、又は、非置換若しくは置換された F である、請求項 3－5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項7] X 4 が、Y 又は F 4 F である、請求項 3－6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項8] X 5 が、任意の親水性アミノ酸又は A i b、あるいは N－メチル化された任意の親水性アミノ酸又は A i b である、請求項 3－7 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項9] X 5 が、A i b、E、K、S、d d、d d a p、d s、Me E のいずれかである、請求項 3－8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項10] X 6 が、非置換の若しくは置換された Y、又は、非置換若しくは置換された F である、請求項 3－9 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項11] X 6 が、Y、Y a e、3 P y、N a l l のいずれかである、請求項 3－10 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項12] X 7 が、A、A h p、C i t、D a b、E、F 4 C O O、K、R のいずれかである、請求項 3－11 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項13] X 8 が、K、R、A 4 p のいずれかである、請求項 3－12 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項14] C 末端に、さらに D－グルタミン酸を含む、請求項 1－13 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項15] 配列番号 2－126、132－234 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、請求項 1－14 のいずれか 1 項に記

載のペプチド。

- [請求項16] 環状ペプチドである、請求項 1－15 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項17] 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 16 に記載のペプチド。
- [請求項18] さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、請求項 1－17 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項19] 請求項 1－17 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、医薬組成物。
- [請求項20] 抗 S A R S－C o V－2 ウイルス活性を有する、請求項 19 に記載の医薬組成物。
- [請求項21] コロナウイルス感染症の予防又は治療のための、請求項 19 又は 20 に記載の医薬組成物。
- [請求項22] コロナウイルス感染症が、C O V I D－19 である、請求項 19－21 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項23] 請求項 1－17 のいずれか 1 項に記載のペプチド薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含む、請求項 19－22 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項24] 請求項 1－17 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、S A R S－C o V－2 ウイルス感染症を診断するための診断用組成物。
- [請求項25] コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤と併用される、請求項 19－23 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- [請求項26] コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤が、レムデシビル、カシリビマブとイムデビマブの併用剤、及び、モラヌピラビル若しくはその活性体からなる群から選択される、請求項 25 に記載の医薬組成物。
- [請求項27] コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤と同時投与

される、請求項 25 又は 26 に記載の医薬組成物。

[請求項28] 請求項 1－17 のいずれか 1 項に記載のペプチドとコロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤を含む、組合せ剤。

[請求項29] 請求項 1－17 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、医薬組成物と併用される、コロナウイルス感染症の予防又は治療のための他の薬剤。