

明 細 書

発明の名称：環状ペプチド又はその塩及びそれらの利用

技術分野

[0001] 本発明は、FGFR (F i b r o b l a s t G r o w t h F a c t o r R e c e p t o r、線維芽細胞増殖因子受容体) タンパク質への結合性に優れ、かつ安定性に優れた環状ペプチド又はその塩に関する。本発明はさらに、2分子以上の上記環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している環状ペプチド複合体又はその塩に関する。本発明はさらに、上記環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩の利用に関する。

背景技術

[0002] 従来の低分子医薬品及び抗体医薬品では治療できなかった疾患に対する治療法として、治癒機能を有する細胞を体内に投与する細胞治療品の開発が進められている。更に近年では、食糧難や温室効果ガスへの対策として期待されている培養肉（細胞農業）や創薬支援用細胞等の細胞製品の実用化に向けた研究開発が進められている。これらの細胞治療品、細胞製品の研究及び製造では、細胞を未分化能等の品質を維持したまま効率的に増殖させることが重要である。細胞の増殖に用いる培地の成分の中で、増殖因子（成長因子、サイトカインとも言う）と呼ばれるタンパク質群が、品質及び細胞増殖速度に大きく影響する重要成分である。しかし増殖因子は一般的に非常に高価かつ安定性が低く、細胞治療品、細胞製品の製造原価が高い原因となっている。特に培養肉の生産はコストがかかり、商業生産が難しく、非常に重要なコスト要因は、大量の特殊な細胞培養培地の必要性にあり、特に細胞培養培地の最も高価な成分となる傾向がある適切な増殖因子である。現在、生産コストの大部分（最大96%以上）は増殖因子のコストによって左右されており、生産は経済的に実行不可能である。

[0003] 増殖因子のうち、線維芽細胞増殖因子 (F i b r o b l a s t G r o w t h F a c t o r、FGF) は、広範囲の細胞の未分化能維持及び細胞増

殖促進において重要な役割を果たすことが知られている。中でも塩基性線維芽細胞増殖因子（basic FGF、略称：bFGF）は、細胞治療品の多数を占める間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell）の増殖に広く使用され、また人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cell、iPSC）や体性幹細胞の未分化能維持及び増殖促進に極めて重要な成分として広く使用されている。

[0004] bFGFの増殖促進は、例えば、bFGFのFGFRタンパク質の細胞外領域への結合を起点として発現される。そのため、bFGFの価格低減及び安定性向上を目指し、古くからFGFRタンパク質の細胞外領域に結合する物質が研究されてきた。

[0005] 特許文献1には、FGFRタンパク質に結合するジスルフィド型環状ペプチドが記載されている。特許文献2には、FGFR以外のタンパク質において結合性と安定性を両立する物質として、チオエーテル型環状ペプチドが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開WO2000/003245号公報

特許文献2：特開2017-95443号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1に記載のペプチドはFGFRタンパク質への結合性が著しく低く、実用性がない。加えて、ジスルフィド型環状ペプチドに含まれるジスルフィド結合は不安定であり、細胞培養環境下等で容易に分解されてしまうことが知られている。また、特許文献1のFGFRに結合するアミノ配列と、特許文献2の安定なチオエーテル結合を組み合わせた場合、FGFRタンパク質への結合性が著しく低く、実用性がない。

[0008] 本発明は、FGFRタンパク質への結合性に優れ、かつ安定性に優れた、

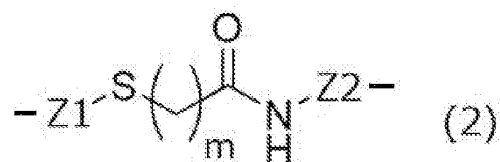
環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩を利用した、培地組成物、培地添加剤、精製用材料、標識用材料、細胞制御用材料、並びに集積用材料を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、アミノ酸配列において特定の位置に特定のアミノ酸残基を有する環状ペプチドが、F G F R タンパク質への結合性に優れ、かつ安定性に優れていることを見出した。本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。本発明によれば、以下の発明が提供される。

[0010] < 1 > X 1 - X 2 - X 3 - X 4 で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、共有結合にて環状化された環化部を含み、上記環化部が、式 (2) :

[化1]



で示される構造を含む、環状ペプチド又はその塩：

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

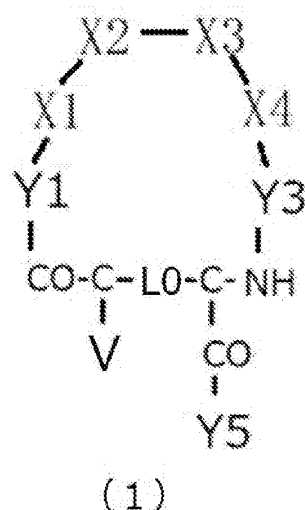
X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Z 1 及び Z 2 はそれぞれ独立に、連結基を示し、

mは、1～10の整数を示す。

<2> 式(1)で示される、<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

[化2]



式中、

Vは、 $-NH-Y4$ 、又はRを示し、

Vが $-NH-Y4$ である場合、L0はLを示し、VがRを示す場合、L0はL1を示す。

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Y1は、単結合、又は1から13個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y3は、1から14個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y4は、水素原子を示すか、あるいは1から7個の任意のアミノ酸残基を含

む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 5 は、OH を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、

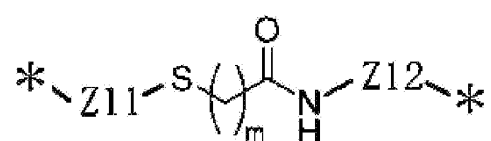
アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

X 1 のアミノ末端が Y 1 のカルボキシル末端と結合し、X 1 のカルボキシル

末端が X 2 のアミノ末端と結合し、

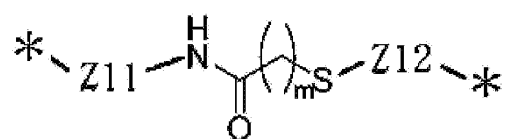
L は、

[化3]



又は

[化4]



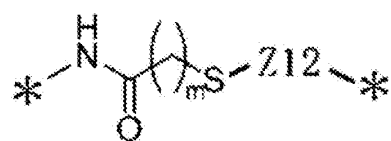
で示される環化部を示し、Z 1 1 及び Z 1 2 はそれぞれ独立に、連結基を示

し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を

示し、

L 1 は、

[化5]



で示される環化部を示し、Z 1 2 は連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を

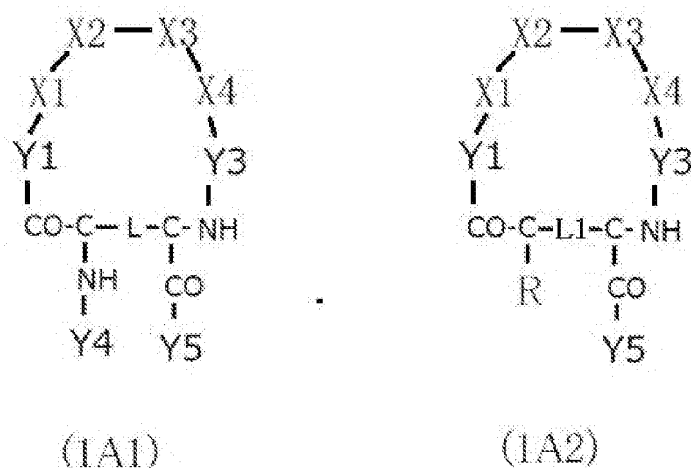
示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

R は、アミノ酸の側鎖構造を示す。

< 3 > 式 (1 A 1) 又は式 (1 A 2) で示される、< 1 > に記載の環状ペ

プチド又はその塩。

[化6]



式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Y 1 は、単結合、又は 1 から 13 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 3 は、1 から 14 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

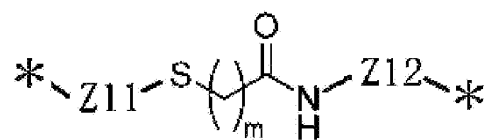
Y 4 は、水素原子を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 5 は、OH を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

X 1 のアミノ末端が Y 1 のカルボキシル末端と結合し、X 1 のカルボキシル末端が X 2 のアミノ末端と結合し、

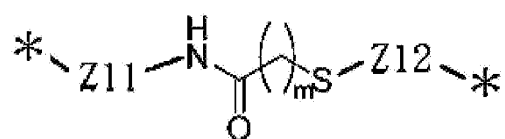
L は、

[化7]



又は

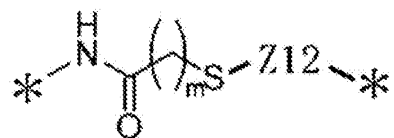
[化8]



で示される環化部を示し、Z 1 1 及び Z 1 2 はそれぞれ独立に、連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

L 1 は、

[化9]



で示される環化部を示し、Z 1 2 は連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

R は、アミノ酸の側鎖構造を示す。

< 4 > X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 で示されるアミノ酸配列を含む、< 1 > に記載の環状ペプチド又はその塩。

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。

<5> X1-X2-X3-X4-X5で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の環状ペプチド又はその塩。

式中、

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

<6> X1-X2-X3-X4-X5-Xn-X6で示されるアミノ酸配列を含む、<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示し、

Xnは、1～3個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

X6は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。

<7> X1-X2-X3-X4-X5-Xn-X6で示されるアミノ酸配列を含む、<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

式中、

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Xnは、1～3個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

X6は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

<8> 環を構成するアミノ酸残基の数が10～22個である、<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

<9> 環化部にホモシステイン残基を含む、<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

<10> 表4～表6に記載されている配列番号38～335及び配列番号337～342のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は表4～表6に記載されている配列番号38～335及び配列番号337～342のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、

<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

<11> 表4～表6に記載されている配列番号38～54、配列番号56～57、配列番号63～64、配列番号69～70、配列番号76～77、配列番号87、配列番号89～90、配列番号97～98、配列番号100～105、配列番号108～109、配列番号111～117、配列番号124、配列番号131～136、配列番号140～147、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号171～172、配列番号175～181、配列番号183、配列番号185～192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～225、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号242、配列番号244～245、配列番号250、配列番号252～253、配列番号256、配列番号258、配列番号265～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号283、配列番号290

～335及び配列番号340のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は表4～表6に記載されている配列番号38～54、配列番号56～57、配列番号63～64、配列番号69～70、配列番号76～77、配列番号87、配列番号89～90、配列番号97～98、配列番号100～105、配列番号108～109、配列番号111～117、配列番号124、配列番号131～136、配列番号140～147、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号171～172、配列番号175～181、配列番号183、配列番号185～192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～225、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号242、配列番号244～245、配列番号250、配列番号252～253、配列番号256、配列番号258、配列番号265～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号283、配列番号290～335及び配列番号340のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、

<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

<12> 表4～表6に記載されている配列番号38～45、配列番号47～54、配列番号57、配列番号63、配列番号70、配列番号87、配列番号97～98、配列番号100～101、配列番号103～105、配列番号111～117、配列番号131～134、配列番号136、配列番号140～146、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号176～178、配列番号185～190、配列番号192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～224、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号244～245、配列番号252、配列番号256、配列番号258、配列番号266～267、

配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号290～325、配列番号327～328、配列番号330及び配列番号332～335のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は表4～表6に記載されている配列番号38～45、配列番号47～54、配列番号57、配列番号63、配列番号70、配列番号87、配列番号97～98、配列番号100～101、配列番号103～105、配列番号111～117、配列番号131～134、配列番号136、配列番号140～146、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号176～178、配列番号185～190、配列番号192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～224、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号244～245、配列番号252、配列番号256、配列番号258、配列番号266～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号290～325、配列番号327～328、配列番号330及び配列番号332～335のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、

<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

<13> 他の物質で修飾されている、<1>に記載の環状ペプチド又はその塩。

<14> 2分子以上の<1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。

<15> 2分子の<1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。

<16> 他の物質で修飾されている、<14>に記載の環状ペプチド複合

体又はその塩。

<17> <1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。

<18> <1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、精製用材料。

<19> <1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、標識用材料。

<20> <1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、細胞制御用材料。

<21> <1>～<13>のいずれか1に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、集積用材料。

<22> <14>に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。

<23> <14>に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、精製用材料。

<24> <14>に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、標識用材料。

<25> <14>に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、細胞制御用材料。

<26> <14>に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、集積用材料。

発明の効果

[0011] 本発明の環状ペプチド又はその塩は、FGFRタンパク質への結合性に優れ、かつ安定性に優れている。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、実施例で使用した化合物の構造を示す。

[図2]図2は、環状ペプチド複合体（配列番号345）の細胞増殖促進作用を示す。

[図3]図3は、環状ペプチド複合体（配列番号346）及びbFGF（塩基性線維芽細胞増殖因子）の幹細胞増殖促進作用を示す。

[図4]図4は、環状ペプチド複合体（配列番号346）及びbFGF（塩基性線維芽細胞増殖因子）の幹細胞未分化能の維持作用を示す。

[図5]図5は、環状ペプチド複合体（配列番号346）のウシ細胞増殖作用を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明について詳細に説明する。これらの説明及び実施例は実施形態を例示するものであり、実施形態の範囲を制限するものではない。本開示において述べる作用機序は推定を含んでおり、その正否は実施形態の範囲を制限するものではない。

本開示において「工程」又は工程を表す語には、他の工程から独立した工程に加え、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の目的が達成されれば、当該工程も含まれる。

本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

[0014] <アミノ酸、アミノ酸残基及びペプチド>

アミノ酸は、原則として、国際純正・応用化学連合と国際生化学・分子生物学連合による共同命名委員会（INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY and INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical N

omenclature (JCBN)) で採用された名称、略号等を用いて表す。また、アミノ酸残基は、そのアミノ酸残基が由来するアミノ酸の略号を用いて表す。なお、アミノ酸残基は、N末端アミノ酸 (N末端残基) 又はC末端アミノ酸 (C末端残基) でもよい。

[0015] 特に明示しない限り、ペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列 (「1次構造」ともいう。) は、左端から右端にかけてN末端からC末端となるようにアミノ酸残基を1列に並べて表す。

[0016] アミノ酸としては、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、及びアミノ基又はカルボキシル基が同様に反応性の基により置換されたアミノ酸 (例えば、第一級アミンの第二級もしくは第三級アミンによる置換、又はカルボキシル基のエステルによる置換) が挙げられるが、特に限定されない。 α -アミノ酸は、 α -炭素として指定される炭素に結合したアミノ基及びカルボキシル基を含有する分子を意味する。 β -アミノ酸は、アミノ基及びカルボキシル基両方を β 配置で含有する分子を意味する。 γ -アミノ酸は、アミノ基及びカルボキシル基両方を γ 配置で含有する分子を意味する。アミノ酸としては、 α -アミノ酸が好ましい。

[0017] アミノ酸としては、天然アミノ酸又は非天然アミノ酸のいずれでもよく、D-及びL-異性体のいずれでもよい。ただし、アミノ酸をその名称を用いて表した場合であって、エナンチオマーの関係にある異性体、すなわち、L体及びD体が存在するときは、L体及びD体の別を明示的に示した場合を除いて、原則としてL体を表すものとする。例えば、「イソロイシン」は「L-イソロイシン」を表すものとし、「イソロイシン」のエナンチオマーは「D-イソロイシン」と表すものとする。アミノ酸残基についても同様である。

[0018] 一文字略号及び三文字略号が公式に認められたアミノ酸の名称及び略号 (一文字略号、三文字略号) を表1に示す。

[0019]

[表1]

表 1					
一文字 略号	三文字 略号	名称	一文字 略号	三文字 略号	名称
A	Ala	L-アラニン	O	Pyl	L-ピロリシン
B	Asx	L-アスパラギン酸又はL-アスパラギン	P	Pro	L-プロリン
C	Cys	L-システイン	Q	Gln	L-グルタミン
D	Asp	L-アスパラギン酸	R	Arg	L-アルギニン
E	Glu	L-グルタミン酸	S	Ser	L-セリン
F	Phe	L-フェニルアラニン	T	Thr	L-トレオニン
G	Gly	グリシン	U	Sec	L-セレノシステイン
H	His	L-ヒスチジン	V	Val	L-バリン
I	Ile	L-イソロイシン	W	Trp	L-トリプトファン
K	Lys	L-リジン	X	Xaa	任意のアミノ酸
L	Leu	L-ロイシン	Y	Tyr	L-チロシン
M	Met	L-メチオニン	Z	Glx	L-グルタミン酸又はL-グルタミン
N	Asn	L-アスパラギン			

[0020] アミノ酸は、表 1 に挙げるものに限定されず、非天然アミノ酸と称されるアミノ酸を使用することもできる。非天然アミノ酸の例は以下の表 2 に挙げられるが、これらに限定されるものではない。またアミノ酸は N 末端のアミノ基上の水素原子がアルキル基（メチル基、プロキル基など）で置換された N-アルキルアミノ酸であってもよい。N-アルキルアミノ酸の例としては N-メチルロイシン（以降、^{me}L と表記）が挙げられる。

[0021]

[表2]

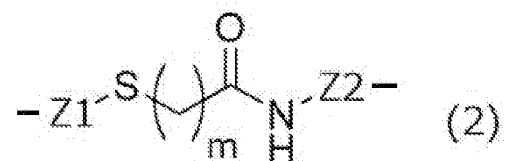
表 2			
三文字 略号	名称	三文字 略号	名称
Aad	ホモグルタミン酸	Gla	4-カルボキシグルタミン酸
β Aad	3-アミノアジピン酸	Gl p	5-オキソプロリン
Abu	2-アミノブタン酸	Hcy	ホモシステイン
Dab	2,4-ジアミノブタン酸	Hse	ホモセリン
Ahx	2-アミノヘキサン酸	Hsl	ホモセリンラクトン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	5Hyl	5-ヒドロキシリジン (Hyl)
Aib	2-アミノイソ酪酸	aHyl	アローヒドロキシリジン
ϵ Ahx	6-アミノヘキサン酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
β Ala	β -アラニン	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Ape	2-アミノペンタン酸	Hph	ホモフェニルアラニン
A ₂ pr	2,3-ジアミノプロパン酸	Hle	ホモロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	Hty	ホモチロシン
A ₂ pm	2,6-ジアミノピメリン酸	alle	アローイソロイシン
Cit	シトルリン	Nle	ノルロイシン
Cys	システイン酸	Nva	ノルバリン
Dbu	2,4-ジアミノブタン酸	Om	オルニチン
Dpm	2,6-ジアミノピメリン酸	Sar	サルコジン
Dap	2,3-ジアミノプロパン酸	aThr	アロートレオニン
Pen	ペニシラミン	Thx	チロキシン

- [0022] 芳香族残基を含むアミノ酸としては、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、及びヒスチジン、及びベンゼン環、イミダゾール環、又はピリジン環を側鎖構造に含む非天然アミノ酸が挙げられ、好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、及びヒスチジンである。
- [0023] アミノ酸としては、メチオニン、システイン、リジンを使用してもよいが、酸化耐性の観点からメチオニン及びシステインは使用しない方が好ましく、ペプチド化学合成コストの観点からシステイン及びリジンは含まない方が好ましい。
- [0024] ペプチドとは、一般にアミノ酸が3～100個連なった構造を指すが、その末端及び／又は内部に、アミノ酸以外の構造が含まれていてもよい。3～100個のアミノ酸が内包されている物質は全てペプチドである。
- 環状ペプチドとは、3つ以上のアミノ酸残基からなる閉じた環構造を内包するペプチドを指す。

[0025] <環状ペプチド>

本発明の環状ペプチドは、 $X1-X2-X3-X4$ で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、共有結合にて環状化された環化部を含み、上記環化部が、式(2)：

[化10]



で示される構造を含む、環状ペプチドである。

式中、

$X1$ は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

$X2$ は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

$X3$ は、任意のアミノ酸残基を示し、

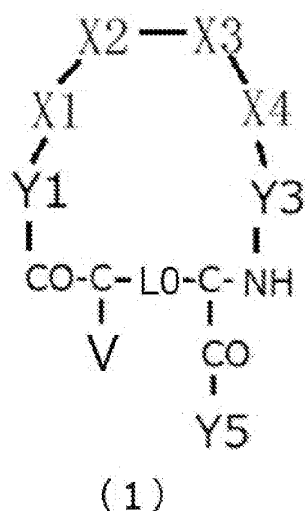
$X4$ は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

$Z1$ 及び $Z2$ はそれぞれ独立に、連結基を示し、

m は、1～10の整数を示す。

[0026] 好ましくは、本発明の環状ペプチドは、式(1)で示される。

[化11]



式中、

Vは、 $-\text{NH}-\text{Y4}$ 、又はRを示し、Vが $-\text{NH}-\text{Y4}$ である場合、LOはLを示し、VがRを示す場合、LOはL1を示す。

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Y1は、単結合、又は1から13個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y3は、1から14個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y4は、水素原子を示すか、あるいは1から7個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y5は、OHを示すか、あるいは1から7個の任意のアミノ酸残基を含む、

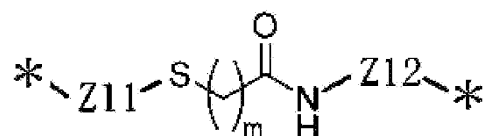
アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

X 1 のアミノ末端が Y 1 のカルボキシル末端と結合し、X 1 のカルボキシル

末端が X 2 のアミノ末端と結合し、

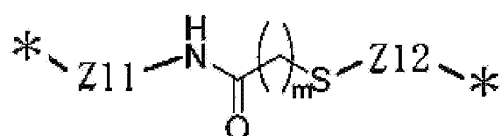
L は、

[化12]



又は

[化13]



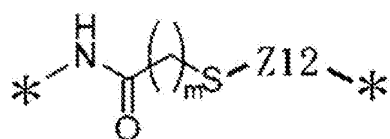
で示される環化部を示し、Z 1 1 及び Z 1 2 はそれぞれ独立に、連結基を示

し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を

示し、

L 1 は、

[化14]



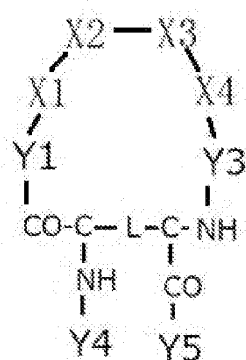
で示される環化部を示し、Z 1 2 は連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を

示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

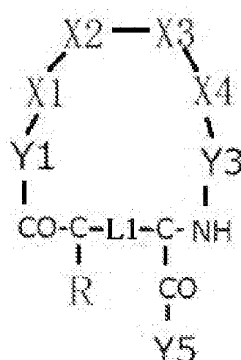
R は、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[0027] 好ましくは、本発明の環状ペプチドは、式 (1 A 1) 又は式 (1 A 2) で示される。

[化15]



(1A1)



(1A2)

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Y 1 は、単結合、又は 1 から 13 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 3 は、1 から 14 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

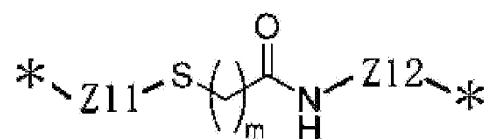
Y 4 は、水素原子を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 5 は、OH を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

X 1 のアミノ末端が Y 1 のカルボキシル末端と結合し、X 1 のカルボキシル末端が X 2 のアミノ末端と結合し、

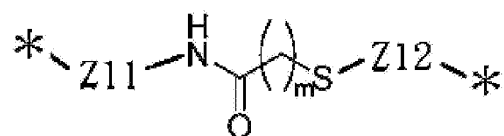
L は、

[化16]



又は

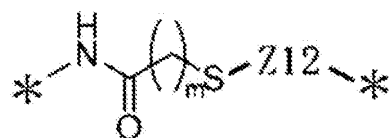
[化17]



で示される環化部を示し、Z 1 1 及び Z 1 2 はそれぞれ独立に、連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

L 1 は、

[化18]



で示される環化部を示し、Z 1 2 は連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

R は、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[0028] より好ましい態様においては、環状ペプチドは、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 で示されるアミノ酸配列を含む。

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。

より好ましい態様においては、環状ペプチドは、X1-X2-X3-X4-X5で示されるアミノ酸配列を含む。

式中、

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0029] さらに好ましい態様においては、環状ペプチドは、X1-X2-X3-X4-X5-Xn-X6で示されるアミノ酸配列を含む。

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残

基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、
X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示し、

Xnは、1～3個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

X6は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。

さらに好ましい態様においては、環状ペプチドは、X1-X2-X3-X4-X5-Xn-X6で示されるアミノ酸配列を含む。

式中、

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X5は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Xnは、1～3個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

X6は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、

バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0030] X 1 は、好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示す。X 1 は、より好ましくは、イソロイシン残基、又はバリン残基を示す。

[0031] X 2 は、好ましくは、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、又はヒスチジン残基を示す。X 2 は、より好ましくは、チロシン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0032] X 3 は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。X 3 は、より好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、グルタミン残基、セリン残基、又はトレオニン残基を示す。X 3 は、より好ましくは、ロイシン残基、グルタミン残基、セリン残基、又はトレオニン残基を示す。X 3 は、特に好ましくは、セリン残基、又はトレオニン残基を示す。

[0033] X 4 は、好ましくは、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、又はヒスチジン残基を示す。X 4 は、より好ましくは、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトリプトファン残基を示す。X 4 は、特に好ましくは、フェニルアラニン残基を示す。

[0034] X 5 は、好ましくは、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。X 5 は、より好ましくは、グリシン残基、イソロイシン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。X 5 は、特に好ましくは、アスパラギン残基、又はアスパラギン酸残基を示す。

[0035] X n は、好ましくは、X n 1 で示されるアミノ酸残基、又は X n 1 - X n

2で示される2個のアミノ酸残基からなるペプチド残基を示す。X_nは、より好ましくは、X_{n1}－X_{n2}で示される2個のアミノ酸残基からなるペプチド残基を示す。

[0036] X_{n1}は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、環化部を形成するチオール基含有アミノ酸残基、又は環化部を形成するハロカルボキシル基含有アミノ酸残基を示す。X_{n1}は、より好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、イソロイシン残基、バリン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、セリン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、環化部を形成するチオール基含有アミノ酸残基、又は環化部を形成するハロカルボキシル基含有アミノ酸残基を示す。X_{n1}は、さらに好ましくは、アラニン残基、プロリン残基、バリン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、セリン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基を示す。X_{n1}は、特に好ましくは、アラニン残基、グルタミン残基、セリン残基、グルタミン酸残基、又はアルギニン残基を示す。

[0037] X_{n2}は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、環化部を形成するチオール基含有アミノ酸残基、又は環化部を形成するハロカルボキシル基含有アミノ酸残基を示す。X_{n2}は、より好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒス

チジン残基、環化部を形成するチオール基含有アミノ酸残基、又は環化部を形成するハロカルボキシル基含有アミノ酸残基を示す。X_{n2}は、さらに好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、環化部を形成するチオール基含有アミノ酸残基、又は環化部を形成するハロカルボキシル基含有アミノ酸残基を示す。X_{n2}は、特に好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0038] X₆は、好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はリジン残基を示す。X₆は、より好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、又はリジン残基を示す。X₆は、特に好ましくは、アラニン残基を示す。

[0039] Y₁は、好ましくは、単結合を示す。

[0040] Y₃は、好ましくは、Y₃₁－Y₃₂－Y₃₃－Y₃₄－Y₃₅－Y₃₆－Y₃₇－Y₃₈で示される8個のアミノ酸残基からなるペプチド残基を示す。

[0041] Y₃₁は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y₃₁は、より好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、

バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 1 は、特に好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0042] Y 3 2 は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 2 は、より好ましくは、アラニン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、又はグルタミン酸残基を示す。Y 3 2 は、特に好ましくは、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、又はグルタミン酸残基を示す。

[0043] Y 3 3 は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 3 は、より好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、セリン残基、トレオニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 3 は、特に好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、又はチロシン残基を示す。

[0044] Y 3 4 は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギ

ニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 4 は、より好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、チロシン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 4 は、特に好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0045] Y 3 5 は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 5 は、より好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0046] Y 3 6 は、好ましくは、アラニン残基、イソロイシン残基、バリン残基、又はセリン残基を示す。Y 3 6 は、より好ましくは、アラニン残基を示す。

[0047] Y 3 7 は、好ましくは、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、又はトレオニン残基を示す。Y 3 7 は、より好ましくは、ロイシン残基を示す。

[0048] Y 3 8 は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。Y 3 8 は、より好ましくは、アスパラギン残基、グルタミン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0049] Y 4 は、好ましくは、水素原子を示すか、あるいは1個の任意のアミノ酸残基を示す。

- [0050] Y5は、好ましくは、OHを示すか、あるいは1個の任意のアミノ酸残基を示す。Y5はより好ましくは1つの任意のアミノ酸残基を示す。
- [0051] Z1及びZ2はそれぞれ独立に、連結基を示し、好ましくは炭素数1～10のアルキレン基を示し、より好ましくは炭素数1～5のアルキレン基を示し、特に好ましくは2～4のアルキレン基を示す。
- [0052] mは、好ましくは1～5の整数を示し、より好ましくは1～3の整数を示し、特に好ましくは1の整数を示す。
- [0053] Z11及びZ12はそれぞれ独立に、連結基を示し、好ましくは炭素数1～10のアルキレン基を示し、より好ましくは炭素数1～5のアルキレン基を示し、特に好ましくは2～4のアルキレン基を示す。
- [0054] 環状ペプチドは、ポリペプチド鎖に含まれる複数のアミノ酸残基が、主鎖ペプチド結合以外の共有結合により相互に結合することにより、閉じた環構造を形成する。環状ペプチドにおいて、上記の相互に結合した複数のアミノ酸残基からなる部分構造を環化部と呼ぶ。
- 環状ペプチドの環化部は、安定性の観点から、ジスルフィド結合を含まない必要がある。ジスルフィド結合を含まない環化部の例としては、チオエーテル結合を含む構造が挙げられる。
- [0055] チオエーテル結合を形成する場合は、例えば、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基の側鎖チオール基と、側鎖にクロロアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基の側鎖クロロアセチル基とを反応させてチオール結合を形成することができる。具体的には、例えば、L-ホモシステイン残基の側鎖チオール基とN-ε-クロロアセチル-L-リジン残基の側鎖クロロアセチル基との間でチオール結合を形成させることにより、直鎖状のポリペプチドを環化することができる。
- [0056] なお、側鎖にクロロアセチル基等のハロアセチル基を有するアミノ酸の代わりに、側鎖にクロロプロピオニル基等の、ハロアセチル基よりもメチレン単位の数が多いハロカルボニル基を有するアミノ酸を用いることも可能であるが、メチレン単位の数が少ないものほど環化効率が高いため好ましい。例

えば、ハロプロピオニル基 ($-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{X}$; X はハロゲン原子、メチレン単位の数 2) よりもアセチル基 ($-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{X}$; X はハロゲン原子、メチレン単位の数 1) の方が、環化効率が高いため、好ましい。

[0057] チオエーテルの形成において、主鎖にハロカルボニル基を有するアミノ酸を用いるよりも、側鎖にハロカルボニル基を有するアミノ酸を用いる方が、F G F R 結合性の観点より好ましい。

[0058] チオエーテル結合の形成において、チオール基を有するアミノ酸は、安定性、及びペプチド化学合成工程におけるラセミ化体の生成抑制の両観点から、システインよりホモシステインが好ましい。即ち、環状ペプチドの環化部はホモシステイン残基を含むことが好ましい。

[0059] 環状ペプチドの環を構成するアミノ酸残基の数は、F G F R タンパク質結合性の観点から、10～22 個であることが好ましく、13～20 個がより好ましく、17 個又は 18 個がさらに好ましく、18 個が特に好ましい。

[0060] 環状ペプチドに使用するアミノ酸は、F G F R タンパク質結合性の観点から、類似構造（一般的に類似と見なされるもの）であってもよい。類似構造には非天然アミノ酸を含む。非天然アミノ酸には炭素鎖を伸長したもの（ホモセリンなど）、メチル基を付与したもの（N-メチルアラニンなど）、及び単独又は複数の修飾を施したもの（リン酸化チロシンなど）でもよい。

環状ペプチドにおいて、特に規定されていない部位のアミノ酸は、天然アミノ酸であってもよく、非天然アミノ酸であってもよく、アミノ酸類似体（ペプチド）でもよい。

[0061] 環状ペプチドの具体例としては、

表 4～表 6 に記載されている配列番号 38～335 及び配列番号 337～342 のアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むか、又は

表 4～表 6 に記載されている配列番号 38～335 及び配列番号 337～342 のアミノ酸配列のいずれか 1 つにおいて 1～4 個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつ F G F R タンパク質へ

の結合能を有する、
環状ペプチドを挙げることができる。

[0062] 環状ペプチドの好ましい具体例としては、

表4～表6に記載されている配列番号38～54、配列番号56～57、配列番号63～64、配列番号69～70、配列番号76～77、配列番号87、配列番号89～90、配列番号97～98、配列番号100～105、配列番号108～109、配列番号111～117、配列番号124、配列番号131～136、配列番号140～147、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号171～172、配列番号175～181、配列番号183、配列番号185～192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～225、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号242、配列番号244～245、配列番号250、配列番号252～253、配列番号256、配列番号258、配列番号265～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号283、配列番号290～335及び配列番号340のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は

表4～表6に記載されている配列番号38～54、配列番号56～57、配列番号63～64、配列番号69～70、配列番号76～77、配列番号87、配列番号89～90、配列番号97～98、配列番号100～105、配列番号108～109、配列番号111～117、配列番号124、配列番号131～136、配列番号140～147、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号171～172、配列番号175～181、配列番号183、配列番号185～192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～225、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号242、配列番号244～245、配列番号250、配列番号252～253、配列番号256、配列番号258、

配列番号265～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号283、配列番号290～335及び配列番号340のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、
環状ペプチドを挙げることができる。

[0063] 環状ペプチドのより好ましい具体例としては、

表4～表6に記載されている配列番号38～45、配列番号47～54、配列番号57、配列番号63、配列番号70、配列番号87、配列番号97～98、配列番号100～101、配列番号103～105、配列番号111～117、配列番号131～134、配列番号136、配列番号140～146、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号176～178、配列番号185～190、配列番号192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～224、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号244～245、配列番号252、配列番号256、配列番号258、配列番号266～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号290～325、配列番号327～328、配列番号330及び配列番号332～335のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は

表4～表6に記載されている配列番号38～45、配列番号47～54、配列番号57、配列番号63、配列番号70、配列番号87、配列番号97～98、配列番号100～101、配列番号103～105、配列番号111～117、配列番号131～134、配列番号136、配列番号140～146、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号176～178、配列番号185～190、配列番号192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～224、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～2

37、配列番号239～240、配列番号244～245、配列番号252、配列番号256、配列番号258、配列番号266～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号290～325、配列番号327～328、配列番号330及び配列番号332～335のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、
環状ペプチドを挙げることができる。

[0064] 置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸の個数は、1～4個であればよいが、好ましくは1個、2個又は3個であり、より好ましくは1個また2個である。

[0065] FGFRタンパク質への結合性は、一定量のFGFRタンパク質に対し、環状ペプチドを特定濃度で作用させた際に、FGFRタンパク質に結合した環状ペプチドの量で示される。本開示ではELISA法及びSPR法を用いて測定しているが、他の手法（ITC、*alpha* screenなど）でも同様に測定可能である。FGFRタンパク質は全長体であってもよく、一部ドメインであってもよく、変異が導入されていてもよい。

[0066] 環状ペプチドの分子安定性について、本開示では還元耐性及びアルカリ耐性を指標にして測定しているが、他の刺激に対する耐性（例えば、X線耐性、 γ 線耐性、紫外線耐性、耐熱性、耐薬品性）においても同様に発揮される。分子安定性は、基本的には、分子が自由エネルギーの点からより安定であることを表しているためである。

[0067] 環状ペプチドは、以下に例示するような他の物質で修飾されていてもよい。

環状ペプチドには1～20個のアミノ酸及び／又は修飾構造が付与されていてもよい。ペプチド化学合成コストの観点から、アミノ酸は付与されていない方が好ましい。安定性の観点から、修飾構造は付与されている方が好ましい。修飾構造の例としてはN末端ではアセチル化及びその類縁構造、C末

端ではアミド化及びその類縁構造があげられる。

環状ペプチドには、用途に合わせてリン酸化、メチル化、アデニル化、ADP（アデノシン二リン酸）リボシル化、糖鎖付加などの修飾を加えてもよい。

また、環状ペプチドにおいて、水溶性、安定性、分離容易性及び／又は追跡容易性の観点から、環状ペプチドに機能構造を付与してもよい。機能構造の例としては、ポリエチレングリコール（PEG）などの水溶性ポリマー、IgG及びその他タンパク質、各種アフィニティタグ（例えば、ヒスチジン（His）タグ、FLAGタグ）、固相化担体（例えば、セファロースビーズ、磁気ビーズ、各種ゲル）、蛍光色素、放射性同位体が挙げられる。

[0068] 環状ペプチドからアミノ酸及び／又は修飾構造が欠損していてもよい。FGFRタンパク質結合性の観点からアミノ酸の欠損は4個以下である必要があり、欠損が2個以下の方が好ましく、欠損がない状態が特に好ましい。

[0069] 本発明の環状ペプチドは、塩であってもよい。塩は、好ましくは、生理学的に許容される無機及び有機の酸及び塩基との塩である。適切な酸塩の例には下記のものが含まれる：酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パモ酸塩（palmoate）、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロ酢酸塩及びウンデカン酸塩。適切な塩基から誘導される塩類には、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、アンモニウム塩、及びN-（アルキル）4⁺塩が含まれる。

[0070] <環状ペプチドの製造方法>

環状ペプチドの製造方法は特に限定されず、化学合成、遺伝子工学的合成

、又は無細胞翻訳系による酵素合成により製造することができる。純度の観点から、化学合成がより好ましい。

[0071] 化学合成によるペプチド合成としては、固相合成法でも液相合成法でもよい。少量の合成においては固相合成法が好ましく、自動ペプチド合成装置を用いた固相合成法が簡便であり好ましい。多量の合成においては液相合成が作業性の観点で好ましい。多量の目安として1 g以上が挙げられるが、この限りではない。

[0072] ペプチドの固相合成は、当業者には公知であり、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）のカルボキシル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 (DIPCDI) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。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、主鎖のカルボキシル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、上記カルボキシル基を活性化させて、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、主鎖のカルボキシル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、上記カルボキシル基を活性化させて、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。固相合成のレジンとしては、Merri field resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin (Merck)、HMPA-PEGA resin (Merck) 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てもよい。 α -アミノ基の保護基としては、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基はピペリジンによる処理で脱保護できる。 α -カルボキシル基の保護は、メチルエステル、エチルエステル、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て行うことができる。アミノ酸のその他の官能基として、セリンやトレオニンの水酸基はベンジル基やtert-ブチル基で保護することができ、チロシンの水酸基は2-ブロモベンジルオキシカルボニル基やtert-ブチル基で保護する。リジン側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシル基は、 α -アミノ基、 α -カルボキシル基と同様に保護することができる。カルボキシル基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCあるいはWSC)、(1Hベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート(BOP)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチル]-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。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。

[0073] 遺伝子工学的合成とは、細胞に遺伝子を導入し、ペプチドを合成する方法である。細胞としては、細菌、酵母、線虫細胞、昆虫細胞、動物細胞(哺乳類細胞など)等が用いられる。

例えば、4塩基コドン法を用いて、非天然アミノ酸を導入して合成することが可能である。また、鎖状ペプチドを合成し、環状部に導入されたアミノ酸残基の側鎖の架橋性官能基を反応させることにより環化し、合成できる。

[0074] 無細胞翻訳系は、無細胞タンパク質合成系とも呼ばれ、大腸菌等の細胞を

そのまま使用せず、大腸菌などの細胞内に存在する成分を利用する翻訳系であり、細胞抽出液を用いるものと、細胞抽出液の各成分を精製したもので再構成した反応液（再構成型無細胞翻訳系）を用いるものがある。

細胞抽出液を用いるものとしては、例えば、大腸菌抽出液、コムギ胚芽抽出液、ウサギ赤血球抽出液、昆虫細胞抽出液を用いるものが挙げられる。

[0075] 再構成型無細胞翻訳系は、それぞれ精製した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、GTP、ATP、翻訳開始因子（IF）、伸長因子（EF）、終結因子（RF）、リボソーム再生因子、その他の翻訳に必要な因子等で構築することができる。

翻訳系には、透析を用いて連続的にエネルギーを供給してもよい。DNA からの転写を行うために、RNA ポリメラーゼを加えてもよい。

[0076] 市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系では、ロシュ・ダイアグノスティックス社の RTS-100（登録商標）、コムギ胚芽抽出液の系では、ゾイジーン社やセルフリーサイエンス社の製品、再構成型翻訳系では、PGI 社の PURE SYSTEM（登録商標）、ジーンフロンティア社の Pureflex（登録商標）、New England BioLabs 社の PURExpress（登録商標）In Vitro Protein Synthesis Kit 等が挙げられる。

[0077] <環状ペプチド複合体>

本発明によれば、2 分子以上の本発明の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩が提供される。リンカーによって連結している環状ペプチド又はその塩の分子数は 2 分子以上であれば特に限定されないが、例えば 2～10 分子であり、好ましくは 2～5 分子であり、より好ましくは 2～4 分子であり、さらに好ましくは 2 分子又は 3 分子あり、特に好ましくは 2 分子である。

[0078] FGF R は一回膜貫通型の受容体チロシンキナーゼであり、FGF の結合を起点として FGF R が二量体化し、FGF R の細胞内キナーゼ領域が近接

することにより、相互リン酸化を起こし、細胞の増殖誘起及び／又は分化状態制御を促す。そのため、FGFRタンパク質結合性を有する環状ペプチドを、リンカー構造を介して多量体化し（多量体化した環状ペプチドを以降、環状ペプチド複合体と称する）、FGFRを発現する細胞に作用させることで、環状ペプチド複合体を介したFGFR多量体化を起こし、FGFRをリン酸化することが可能だと考えられる。この際、リン酸化がFGFRの細胞内キナーゼ領域間の近接を介することを鑑みると、FGFRを適切な距離と配向で多量体化することが好ましいと考えられる。

[0079] また、FGFRを発現する細胞などの増殖又は分化状態の維持を意図したFGFRリン酸化には、環状ペプチドを複数含むことが必要となる場合がある。環状ペプチド複合体に含まれる複数の環状ペプチドは共有結合で複合化されていてもよく、非共有結合（例えば、錯体形成、アフィニティー結合、核酸ハイブリダイゼーション）で結合していてもよい。上記結合は、合成コストの観点からは非共有結合であってもよいが、複合体安定性の観点から共有結合（例えば、アミド結合、各種クリックケミストリー）が好ましい。

[0080] 複数の環状ペプチドは環状ペプチド間の直接的な結合により複合化していてもよく、他の分子を介して複合化してもよい。環状ペプチド複合体に含まれる複数の環状ペプチドは、同一の構造を有していても良く、異なる構造を有していてもよい。細胞増殖促進作用及び／又は細胞分化状態制御の観点からは、異なる構造を有していてもよいが、合成コストの観点からは、同一の構造を有する方が好ましい。

[0081] リンカーの長さは、特に限定されないが、FGFR 2リン酸化の観点から、好ましくは10～200 Åであり、より好ましくは20～100 Åである。

リンカーの長さを算出するにあたり、分子鎖の折れ曲がりを加味し、単結合一つあたり1.33 Å（1アミノ酸残基あたり4 Å）という単位距離を算出した。本単位距離を用いることにより、リンカーの長さを、分子構造を基に算出可能である。

- [0082] 環状ペプチド複合体において、F G F Rリン酸化の観点から、リンカーは環状ペプチドのN末端とC末端のどちらに結合していても使用できるが、N末端に結合しているほうがより好ましい。
- [0083] 環状ペプチド複合体において、F G F Rリン酸化の観点から、リンカー構造はP E G（ポリエチレングリコール）、アルキル鎖（ポリエチレン）、ポリペプチド、ポリエステル、ポリアクリルアミド、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリスチレン及び／又はポリウレタンであってもよい。また、リンカー構造が塩を形成してもよい。リンカー構造が塩を形成する場合の塩は、上述の塩であることが好ましい。環状ペプチド複合体の水溶解性の観点から、P E G（ポリエチレングリコール）、アルキル鎖（ポリエチレン）、ポリペプチド、ポリエステル及び／又はポリアクリルアミドがより好ましい。
- [0084] 環状ペプチド複合体の製造は、例えばアミノ基を一つ有する二つの環状ペプチドを、N H S活性化されたカルボキシル基を2つ有するリンカー分子（以降、B i s－N H Sリンカーと記載）を用いて連結することで実施可能である。多様なリンカー長を有するB i s－N H Sリンカーが各社から販売されているが、例としてB S（P E G）5（P E G y l a t e d b i s（s u l f o s u c c i n i m i d y l）s u b e r a t e）（T h e r m o、2 1 5 8 1）やB i s（N H S）P E G 9（東京化成工業、B 4 6 8 8）が挙げられる。B i s－N H Sリンカーを用いた環状ペプチドの連結は、p H 7 付近の水中で環状ペプチドとリンカーを混合することにより実施可能である。
- [0085] またペプチド固相合成及び液相合成において複数のアミノ基を有する分岐型のアミノ酸を用いることにより環状ペプチド複合体を製造することが可能である。分岐型アミノ酸の例としてはリジンや2，4－ジアミノブタン酸などが挙げられる。この場合、分岐型アミノ酸を固相樹脂や液相合成用タグに連結させたのちに、複数のアミノ基を脱保護し、両方に対してペプチド鎖の伸長を行うことで環状ペプチド複合体を固相樹脂上、又は液相合成用タグ上

で合成することが可能である。ペプチド鎖の伸長は全てのアミノ基上で同時に進めてもよく、一つずつ進めてもよい。

[0086] 本発明の環状ペプチド複合体は、他の物質で修飾されていてもよい。他の物質としては、環状ペプチドの修飾について上記したものと同様である。

[0087] <環状ペプチド及び環状ペプチド複合体の利用>

本発明の環状ペプチド又はその塩及び本発明の環状ペプチド複合体又はその塩は、F G F Rタンパク質などを含む生体物質（タンパク質・細胞・組織など）の機能解析、機能制御、標識、増殖促進、分化状態制御又は精製などに利用可能である。中でも本発明の環状ペプチド複合体又はその塩の増殖促進作用は、各種細胞治療品、及び培養肉の製造コスト低減に寄与するため、産業上の価値が高い。特に培養肉においては生産コストの大部分（最大96%以上）である増殖因子を本発明の環状ペプチド複合体又はその塩で代替することで、商用生産が実行可能となる。

[0088] 環状ペプチド又はその塩、又は環状ペプチド複合体又はその塩を作用させる対象は、結合性、機能制御性、標識効率、精製増殖促進及び／又は分化状態制御の観点から、F G F Rタンパク質であってもよいし、他のタンパク質、化合物及び／又は細胞であってもよいが、F G F Rタンパク質及び／又はF G F Rを発現する細胞、細胞分泌物及び／又は細胞破砕液、b F G Fによる増殖や未分化維持効果が知られている細胞が好ましい。F G F R 1、F G F R 3、又はF G F R 4タンパク質及び／又はF G F R 1、F G F R 3、又はF G F R 4を発現する細胞、細胞分泌物及び／又は細胞破砕液がより好ましい。F G F R 1、又はF G F R 4タンパク質及び／又はF G F R 1、又はF G F R 4を発現する細胞、細胞分泌物及び／又は細胞破砕液が特に好ましい。

[0089] 環状ペプチド又はその塩、又は環状ペプチド複合体又はその塩を作用させる対象は、ヒトに由来する物質であってもマウス、ウシ又は他の動物に由来する物質でもよい。結合性、機能制御性、標識効率、精製増殖促進及び／又は分化状態制御の観点からは、ヒトとF G F Rを構成するアミノ酸配列の相

同性が高い動物に由来する物質が好ましい。ヒトとFGFRを構成するアミノ酸の相同性が高い動物の例としてはウシ、ブタ、トリ、マグロが挙げられる。

[0090] 環状ペプチド又はその塩、又は環状ペプチド複合体又はその塩は、水溶液又は有機溶剤に溶解して使用してもよく、固相化担体（例えば、プレート、ビーズ）に結合させて使用してもよい。固相化担体に結合させて使用する場合は、結合効率及び／又は目的性能発現の観点から、環状ペプチド及び／又は環状ペプチド複合体に結合用の反応基（例えば、アミノ基、チオール基、ビオチン）を導入する方が好ましい。

[0091] 具体的には、本発明の環状ペプチド又はその塩及び本発明の環状ペプチド複合体又はその塩は、培地組成物、培地添加剤、精製用材料、標識用材料、細胞制御用材料、又は集積用材料として使用することができる。

[0092] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物として使用する場合、常法によって構成成分を配合することで調製することができ、その形態は細胞増殖促進作用及び／又は細胞制御等の所望の効果が得られる限り特に限定されず、例えば、液体培地、半流動培地、及び固形培地の形態として調製することができる。また、本発明の培地組成物を、粉末状の形態において調製してもよい。粉末状の形態に調製することにより、輸送や保存が極めて容易となり得る。また、使用時に滅菌水及び／又は寒天等を添加することにより、容易に液体状、半液体状、又は固形状の培地を調製することができる。液体状、半液体状、又は固形状の培地を調製する場合、環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩の調製濃度は、FGFRリン酸化の観点から、 $0.001 \sim 100 \text{ nmol/L}$ であることが好ましく、 $0.01 \sim 10 \text{ nmol/L}$ がより好ましく、 $0.1 \sim 3 \text{ nmol/L}$ が特に好ましい。

また本発明の培地組成物は、接着培養、浮遊培養、包埋培養、組織培養等のいずれの培養方法にも用いることができる。

[0093] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物

として使用する場合、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩に加えて、一般的に細胞培養に使用される成分、例えば、アミノ酸類、ビタミン類、緩衝材、無機塩類、炭素源、血清及び血清代替物等を適宜採用しうる。

[0094] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物として使用する場合、培地に溶解して使用することができる。培地に溶解して使用する場合、FGFRリン酸化の観点から、溶解濃度は $0.001 \sim 100 \text{ nmol/L}$ であることが好ましく、 $0.01 \sim 10 \text{ nmol/L}$ がより好ましく、 $0.1 \sim 3 \text{ nmol/L}$ が特に好ましい。

環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地に溶解して使用する場合、培地は一般的に細胞培養に用いられるものであればよいが、細胞増殖促進作用及び／又は細胞制御の観点から、使用する細胞に適するように成分が調製された培地がより好ましい。

培地は血清を含んでもよいが、細胞治療品や培養肉等の細胞製品の製造に用いる場合、安全性の観点から無血清培地であることが好ましい。無血清培地は血清を含まないが、血清由来の精製された成分を含んでもよいし、血清由来成分の組換えタンパク質を含んでもよい。無血清培地は血清代替物を含有してもよく、例えば、血清アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール又は3'-チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものを挙げることができる。かかる血清代替物は、例えば、WO 98/30679に記載の方法により調製することができる。本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩も血清代替物として挙げられる。血清代替物としては市販品を利用してもよい。かかる市販の血清代替物としては、例えば、Knockout TMSerum Replacement (Life Technologies社)、Chemically-defined Lipid concentrated (Life Tech

n o l o g i e s 社)、G l u t a m a x T M (L i f e T e c h n o l o g i e s 社)、B 2 7 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社)、N 2 (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

- [0095] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地添加剤として使用する場合、環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地に添加する際に用いることができる。本発明の培地添加剤は、細胞増殖促進作用及び／又は細胞制御等の所望の効果を損なわない限り、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩に加えて、さらに、任意の添加剤、例えば、安定化剤、等張化剤、pH調整剤等を適量含有していてもよい。
- [0096] 本発明の培地添加剤は、所望の効果が得られる限り、いかなる剤形であってもよく、例えば、溶液、固形、粉末状等が挙げられる。輸送コスト削減の観点からは、固形又は粉末状が好ましい。固形又は粉末状である場合は、適切な緩衝液や溶媒等を使用して所望の濃度になるように溶解し、使用してもよいし、固形又は粉末状のまま、使用してもよい。培地添加剤が溶液である場合、該溶液はメンブレンフィルター等を用いた濾過滅菌などの滅菌処理を行うことが好ましい。
- [0097] 本発明の培地添加剤を培地に添加する回数及びタイミングは特に限定されず、細胞培養前に行ってもよく、細胞培養中に行ってもよく、細胞培養後に行ってもよいが、増殖促進及び／又は分化状態制御の観点から、細胞培養前及び／又は細胞培養中が好ましい。
- [0098] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物又は培地添加剤として使用する場合、培地組成物又は培地添加剤は細胞治療品又は培養肉の製造のために用いることができる。細胞治療品又は培養肉の製造方法は、例えば環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地を使用して、細胞を培養する工程を含むことができる。

[0099] 培養肉は、細胞培養を介して製造される食肉のことをいう。家畜を飼育する従来の方法の代わりに、細胞工学を使用して培養組織から動物の肉を生産する、革新的な技術である。生産工程には、筋肉組織や脂肪に成長するように作られた動物細胞の培養が含まれる。この技術により、従来の肉や魚をベースにした食品と物質的、栄養的に同等のタンパク質が豊富な食品が得られる。家畜の飼育は、明らかな動物福祉上の懸念に加えて、飼料作物の栽培のための水と土地の利用が増え続けており、非常に資源を必要とする。また、温室効果ガスの排出、森林破壊、汚染と抗生物質耐性、食肉生産の生態学的影響に対する意識の高まりと動物福祉への関心の高まりにより、従来の肉の消費を「実験室培養肉」に置き換えるために、「カルチャードミート」「クリーンミート」又は「培養肉」が提案されている。

[0100] 一般に食肉とは、筋繊維、結合組織、及び脂肪の集合体をいう。培養肉は食肉の構造を模倣することが好ましいが、いわゆる食肉の構成を全て含まなくてもよく、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞から群から選ばれる培養細胞を含むものであればよい。複数種の細胞の培養物を含むことがより好ましい。

培養肉は、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる培養細胞に加え、細胞外マトリクスを含んでもよい。培養肉の製造方法は、例えば以下の線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる培養細胞を培養する工程、培養された細胞を回収し、集積する工程を含む。培養肉の製造方法は、さらに、分化誘導工程や集積後の培養工程を含んでもよい。

[0101] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物又は培地添加剤として使用する場合、細胞の培養は、環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地に、細胞を播種することで行うことができる。培養は、本技術分野において周知の条件、例えば37℃ CO₂インキュベータ内で培養される。培養は平板培養であってもよいし、浮遊培養であってもよい。増殖した細胞は、トリプシン処理などにより細胞を

培養物として回収することができ、回収後さらに継代培養を行ってもよい。細胞の培養は、剥離可能な構築物に細胞を播種して培養することもできる。増殖した細胞が付着された構築物を培養物として回収することができる。かかる構築物は、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチンなどの細胞外マトリクスで構築することができ、細胞が付着した構築物を集積して培養肉を成型してもよい。

[0102] 集積工程は、回収された1又は複数種の細胞の培養物を成型することを含む。集積工程で成型された培養物は、ステーキなどのように1枚肉であってもよいし、枝肉であってもよいし、ミンチ状であってもよい。集積工程は、細胞の培養物を、他の細胞、血液及び組織からなる群から選ばれる少なくとも1の物質と合わせて集積することを含む。他の細胞としては、培養細胞であってもよいし、動物から採取された細胞であってもよい。より具体的には、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地で培養された他の細胞と合わせて成型することができる。一例として、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地で培養された筋組織由来細胞を、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地で培養された脂肪組織由来細胞及び/又は線維芽細胞と集積することができる。集積後にさらに共培養を行うこともできる。一例として、回収された1又は複数種の細胞の培養物を混合し、細胞外マトリクスに播種して共培養することができる。細胞外マトリクスとしては、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチンなどが使用しうる。この際の培地についても、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地を用いることができる。

[0103] 集積工程は、回収された1又は複数種の細胞の培養物を、血液及び/又は組織と集積してもよい。組織としては、動物から取得されたものであっても、培養されたものであってもよい。一例として、食肉の処理過程で分離された血液、脂肪組織や筋組織などを培養物と集積して培養肉を製造してもよい。

[0104] 分化誘導工程は、細胞培養後に行われてもよいし、集積工程の前、集積工程中、集積工程後に行われてもよい。分化誘導工程により、単核の筋衛星細胞及び筋芽細胞を多核の筋管細胞へと分化させ、さらに筋線維として成熟させることができる。分化誘導は、本技術分野に既知の方法により行われてよいが、一例として高い二酸化炭素濃度下で培養する手法が知られており、一例として5～10% (v/v) のCO₂雰囲気下で培養することにより、筋管細胞への分化を促進することができる。

[0105] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地は、任意の動物細胞を培養することができる。培養肉を製造する観点からは、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリ、ダチョウ、カモなどの家畜由来の細胞を使用する。特にウシの細胞を置く場合、ホルスタイン種、ジャージー種、黒毛和種、褐毛和種、短角種、無角和種、それらの交配種の中の任意の種の細胞であってもよいが、特に食肉製造の観点から肉用種である黒毛和種、褐毛和種、短角種、無角和種の細胞が好ましい。

環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地は、細胞が集合した組織を培養することもできる。動物の細胞は、動物から取得された初代細胞、及び初代細胞から継代された継代細胞であってもよいし、株化された細胞や遺伝子を欠損あるいは挿入された遺伝子改変細胞であってもよい。初代細胞は、動物組織を培地中で行うことにより取得することができる。幹細胞などの幹細胞から分化された細胞であってもよい。細胞治療品を製造する観点からは、間葉系幹細胞を含む体性幹細胞又は人工多能性幹細胞を培養することが好ましい。培養肉を製造する観点から、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる細胞を培養することが好ましい。

[0106] 線維芽細胞は、結合組織を構成する細胞であり、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリクスを生成する。筋肉に存在する線維芽細胞を特に筋線維芽細胞と呼ぶ。筋線維芽細胞は、骨格筋において筋線維の束を取り囲む結合組織を形成する。筋線維芽細胞は、 α -SMAを発現し、細胞外マトリク

スを産生するとともに、脂肪を蓄積することができ、歯ごたえ及び食味に寄与する。

[0107] 脂肪組織由来細胞とは、脂肪組織を構成する細胞であり、脂肪組織から分離されて培養された細胞である。脂肪組織由来細胞としては、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞である。脂肪幹細胞は、様々な細胞への分化能を有する間葉系幹細胞であり、筋細胞、脂肪細胞、結合組織の細胞へと分化することができる。多胞性脂肪細胞は、褐色脂肪細胞としても知られており、生体では脂肪の燃焼に寄与する。単胞性脂肪細胞は、白色脂肪細胞としても知られており、細胞内に脂肪滴をため込むことができる。脂肪組織由来細胞は、脂肪を含有することから食肉の食味に寄与する。

[0108] 筋組織由来細胞とは、筋組織を構成する細胞であり、筋組織から分離されて培養された細胞である。筋組織由来細胞としては、筋芽細胞、筋衛星細胞、筋管細胞が挙げられるが、筋管細胞は増殖性を有さないため、増殖させる観点からは、筋芽細胞及び/又は筋衛星細胞が好ましい。筋衛星細胞は、筋肉中に含まれる体性幹細胞であり、増殖し、筋芽細胞に分化することができる。筋芽細胞とは、筋線維の由来となる細胞であり、増殖性を有する単核の細胞である。筋芽細胞が分化すると、筋芽細胞同士が融合し、多核の筋管細胞を形成し、さらに成熟して筋線維となる。筋線維は、筋肉を構成するタンパク質であるアクチン線維及びミオシン線維から構成される筋原線維を構成単位としており、ミオシンのアイソフォームにより、赤色筋線維（Ⅰ型、ⅠⅠA型）と白色筋線維（ⅠⅠB）に分類され、食肉の食味の違いに寄与する。

[0109] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を精製用材料として使用する場合、環状ペプチドを固相担体に結合させて使用してもよく、結合させずに使用してもよい。結合させずに使用する方法としては、環状ペプチドに分離用の構造（例えば、ビオチンタグ、抗体エピトープ、静電分離のための極性残基）を付与する方法、又は、環状ペプチドに毒素を付与し目的外の細胞を死滅させる方法が存在する。

- [0110] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を標識用材料として使用する場合、標識基として蛍光色素、放射性同位体、核偏極分子、アフィニティータグ（例えば、ビオチン、FLAGタグ）、又は酵素類（例えば、ルシフェラーゼ）を使用してもよい。
- [0111] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を細胞制御用材料として使用する場合、環状ペプチドを固相担体（例えば、フラスコ、プレート）に結合させて使用してもよく、結合させずに使用してもよい。細胞制御の例としては、FGFRリン酸化促進、FGFRリン酸阻害、細胞増殖促進、細胞増殖阻害、細胞分化促進、及び細胞分化抑制が挙げられる。また環状ペプチドと他の細胞刺激剤とを連結することにより、FGFRを有する細胞選択的に連結した細胞刺激剤の効果を発現することが可能である。
- [0112] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を、特定の分子をFGFR近傍に集積させるための材料として使用する場合、集積させたい分子と環状ペプチドを連結する必要がある。連結は1分子対1分子でも、1分子対多分子でもよく、連結は可逆的な結合でも不可逆的な結合でもよい。

実施例

- [0113] 以下に具体例を挙げて、本開示に係る環状ペプチド等をより具体的に説明する。以下の具体例に示す材料、処理手順等は、本開示の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。本開示に係る環状ペプチド等の範囲は、以下に示す具体例によって限定的に解釈されるべきではない。以下の説明において、合成、処理、製造などは、特に断りのない限り、室温（25℃±3℃）で行った。物質濃度に係る百分率は質量基準である。
- [0114] <実施例1：mRNAディスプレイ法を用いたFGFR結合候補ペプチド取得>

FGFRに結合する環状ペプチドの候補配列を、mRNAディスプレイ法を用いて取得した。

mRNAディスプレイ法のライブラリとして配列番号1の配列を用いた。

このライブラリは、5'末端から86～88番目の開始コドン（ATG）より翻訳が始まり、107番目以降の塩基群（NNNTGT（NNN）_{6～18}TAGNNN（NNNはトリマーオリゴヌクレオチド、ここで、Nはそれぞれ独立にA、T、G又はCを表す））がランダム配列、ランダム配列の3'末端側に位置する塩基群がピューロマイシンリンカーの結合部及び終止コドンである。5'末端から85番目以前の塩基群は、T7プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列等の転写及び翻訳開始に必要な配列である。本ランダム配列中のトリプレットTAGはクロロアセチル化リジンのコドンに当てているため、本ランダム配列がコードするペプチドはシステインのチオール基とクロロアセチル化リジンのクロロアセチル基とが自発的にチオエーテル結合を形成し、環状ペプチドとなる。配列番号1の配列を有する核酸において、NNNで表されるトリマーオリゴヌクレオチドは、1種類のアミノ酸に対して1種類のコドンを割り当てた、表3に示す18種類のコドンに対応するトリマーオリゴヌクレオチドの等量混合物である。（NNN）_{6～18}部に関しては、繰り返し数が6～18で異なるライブラリを13種、個別に調製し、それぞれでmRNAディスプレイを実施した。

[0115] [表3]

アミノ酸(一文字表記)	割り当てコドン	アミノ酸(一文字表記)	割り当てコドン
A	GCT	N	AAC
I	ATC	Q	CAG
L	CTG	R	CGT
V	GTT	H	CAT
F	TTC	K	AAA
W	TGG	D	GAC
Y	TAC	E	GAA
S	TCT	G	GGT
T	ACT	P	CCG

[0116] 配列番号1：GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAGAA

AACAAAAACANNNTGT (NNN)_{6~18}TAGNNNGGTGG
CTCTGGCGGTAGCAGGACGGGGGGCGGCGGGGGG
TAAATAAATAAGCTTGAGTAT

(NNNはトリマーオリゴヌクレオチド、ここで、Nはそれぞれ独立にA、
T、G又はCを表す)

[0117] 配列番号1のライブラリは、オーバーラップエクステンションPCRを行うことで作製した。具体的には、配列番号2のDNA、配列番号3のDNA、及び配列番号4~16のいずれかのDNA、の3種のDNAを、それぞれ3 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ となるように混合し、Platinumtm SuperFi^{II} DNA Polymerase (Thermo、12361010) 存在下、98℃/30秒の後、98℃/10秒、60℃/10秒、72℃/10秒の3ステップを7サイクル繰り返し、最後に72℃/5分の処理を行うことで、3つのDNAを連結し、目的のライブラリを作製した。作製したライブラリを精製し、10 ng/ μL に希釈した。配列番号4~17のDNAにおいて、NNNで表されるトリマーオリゴヌクレオチドは、1種類のアミノ酸に対して1種類のコドン割り当てた、表1に示す18種類のコドンに対応するトリマーオリゴヌクレオチドの等量混合物である。

[0118] 配列番号2 : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAC
CCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTT
AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAAC

配列番号3 : ATACTCAAGCTTATTTATTTATTACCC
CCGCCGCCCGCTCCTGCTACCGCCAGAACCA
C

配列番号4 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAACANNNTGT (NNN)₆TAGNNNGGCGGTT
CTGGCGGTAGC

配列番号5 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAACANNNTGT (NNN)₇TAGNNNGGCGGTT
CTGGCGGTAGC

配列番号6 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAACANNNTGT (NNN)₈TAGNNNGGCGGTT
CTGGCGGTAGC

配列番号7 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAACANNNTGT (NNN)₉TAGNNNGGCGGTT
CTGGCGGTAGC

配列番号8 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₀TAGNNNGGCGGT
TCTGGCGGTAGC

配列番号9 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₁TAGNNNGGCGGT
TCTGGCGGTAGC

配列番号10 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₂TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

配列番号11 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₃TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

配列番号12 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₄TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

配列番号13 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA
AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₅TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

配列番号14 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAAA

AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₆TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

配列番号15 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAA
AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₇TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

配列番号16 : AAGAAGGAGATATACATATGGTTAAAA
AAACAAAAACANNNTGT (NNN)₁₈TAGNNNGGCGG
TTCTGGCGGTAGC

[0119] FGFRとしてRecombinant Human FGFR1 alpha (Il1c) Fc Chimera Protein, CF (R&D systems、658-FR-050) を用い、磁性ビーズ (NH S Mag Sepharose、Cytiva、28951380) にメーカー (Cytiva) 指定プロトコルにて固相化 (固相化時FGFR濃度 : $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) した。また磁性ビーズに結合する環状ペプチドを除くために、IgG1 Fc, Human, recombinant (富士フィルム和光純薬、098-07141) を上記同様に、磁性ビーズに固相化した。

[0120] ライブラリと磁性ビーズ固相化FGFRとを接触させてインキュベートする工程を計8ラウンド繰り返した後、シーケンサーを用いてFGFRに結合するペプチドの塩基を同定した。

各ラウンドの具体的手順は下記の通りである。

[0121] まず、作製したライブラリ (配列番号1) をT7 RNA Polymerase (TaKaRa、2540A) 存在下、 37°C で30分間反応させることでライブラリ転写物を作製した。このDNA断片を精製し、 $10\mu\text{mol}/\text{L}$ に希釈した。

次にTBSバッファー ($1.25\text{mmol}/\text{L}$ Tris、 $25\text{mmol}/\text{L}$ NaCl、pH7.5) 中で、ライブラリ転写物 (終濃度 $5\mu\text{mol}/\text{L}$)、配列番号17のピューロマイシンリンカー (終濃度 $10\mu\text{mol}/\text{L}$)

L)を混合した後、95℃で5分間加熱し、その後、UV(365nm)を氷上にて照射することで、ライブラリ転写物とピューロマイシンリンカーの複合体を作製した。

配列番号17: (P s o r a l e n C 6) - U A C C C C C C G C C G C C
C C C C G U C C U - (S p 1 8) - (S p 1 8) - (S p 1 8) - (S p
1 8) - C C - (P u r o)

(P s o r a l e n C 6、S p 1 8、P u r oの構造は図1参照。下線表記のヌクレオチドはRNAの2' OHが2' OMe体となったものであり、下線が付されていないヌクレオチドは未修飾のDNAを表す。)

- [0122] 非天然アミノ酸であるクロロアセチル化リジンを翻訳するために、アンチコドンがCUAであり、mRNAのUAGコドンに対合するtRNAを配列番号18のDNAを転写することで用意した。このtRNAをN-クロロアセチル化リジンp d C p A (phospho 2' deoxyribocytidylylriboadenosine) エステル体でアミノアシル化した。このアミノアシルtRNAを、アミノアシルtRNA(1)という。

配列番号18: G T T G T A A A A C G A C G G C C A G T G C C A A G C
T T G G G C T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A G T A G T
T C A A T G G T A G A A C G T C G G T C T C T A A A A C C G A G C G
T T G A G G G T T C G A T T C C T T T C T C T C C C A C

- [0123] ライブラリ転写物とピューロマイシンリンカーの複合体を、PUREfrex 2.0 (ジーンフロンティア、PF201-0.25-5) 及びアミノアシルtRNAを含む翻訳液中にて翻訳した。複合体5.25μL、PUREfrex 2.0 Solution I 7.5μL、Solution II 0.75μL、Solution III 1.5μL、アミノアシルtRNA(1)の乾燥体(終濃度0.5μg/μL)を混合し、37℃で60分間反応させることでmRNA-環状ペプチド連結体を作製した。

- [0124] 翻訳産物15μLと配列番号19のDNA(終濃度10μmol/L)とをReverTra Ace (TOYOBO、TRT-101) 存在下で混

合し（反応体積 $37.5\mu\text{L}$ ）、 37°C で30分間反応させることで逆転写を行い、cDNA-mRNA-環状ペプチド連結体を作製した。

配列番号19：GCTACCGCCAGAACCAACC

[0125] 次いで逆転写産物 $22.5\mu\text{L}$ を磁性ビーズ固相化IgG1Fc $10\mu\text{L}$ と、TBSバッファ（ 20mmol/L Tris、 150mmol/L NaCl、 0.1% BSA、 0.05% Tween20、 $\text{pH}7.4$ ）中で混合し（反応体積 $100\mu\text{L}$ ）、室温で45分間反応後、上清を回収することで、磁性ビーズに結合するcDNA-mRNA-環状ペプチド連結体を除去した。

[0126] 次いで上清を、磁性ビーズ固相化FGFR $10\mu\text{L}$ と混合し（反応体積 $50\mu\text{L}$ ）、室温で45分間反応後、磁性ビーズをTBSバッファ $100\mu\text{L}$ で3度洗浄することで、FGFRに結合するcDNA-mRNA-環状ペプチド連結体を抽出した。抽出したcDNA-mRNA-環状ペプチド連結体を下記2段階のPCRにて増幅した。

[0127] 1段階目のPCRでは、cDNA-mRNA-ポリペプチド連結体 $25\mu\text{L}$ を、配列番号20のDNA（終濃度 $0.5\mu\text{mol/L}$ ）、及び配列番号21のDNA（終濃度 $0.5\mu\text{mol/L}$ ）と混合し（反応体積 $50\mu\text{L}$ ）、Platinumtm SuperFi^{II} DNA Polymerase（Thermo、12361010）存在下、 $98^{\circ}\text{C}/30$ 秒の後、 $98^{\circ}\text{C}/10$ 秒、 $60^{\circ}\text{C}/10$ 秒、 $72^{\circ}\text{C}/10$ 秒の3ステップを6～15サイクル繰り返し、最後に $72^{\circ}\text{C}/5$ 分の処理を行うことで、増幅産物を得た。増幅産物を精製し、 20nmol/L に希釈した。

配列番号20：GGAGATATACATATGGTTAAGAAAACA
AAAC

配列番号21：CTGCTACCGCCAGAACCAACC

[0128] 2段階目のPCRでは、1段階目PCR増幅産物（終濃度 10nmol/L ）を、配列番号2のDNA（終濃度 $0.5\mu\text{mol/L}$ ）、及び配列番号3のDNA（終濃度 $0.5\mu\text{mol/L}$ ）と混合し、Platinumtm

SuperFi II DNA Polymerase (Thermo、12361010) 存在下、98℃／30秒の後、98℃／10秒、60℃／10秒、72℃／10秒の3ステップを6サイクル繰り返し、最後に72℃／5分の処理を行うことで、元のライブラリとランダム配列を除き同じ配列のDNAを得た。作製したライブラリを精製し、2 ng／μLに希釈して、次ラウンドに用いた。

[0129] 8ラウンド目の1段階目PCR産物の塩基配列を、MiSeq (Illumina社製)とMiSeq Reagent kit v2 (300 cycle) (Illumina、MS-102-2022)を用い、Illumina社標準プロトコルにて同定した。同定した環状ペプチド群を分析したところ、下記のアミノ酸配列を含む環状ペプチドが多数見出された。

X1-X2-X3-X4

X1：アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基

X2：フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、又はヒスチジン残基

X3：任意のアミノ酸残基

X4：アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基

同定された環状ペプチド群に含まれる環状ペプチドの一部、及び同定された環状ペプチド群に含まれる環状ペプチドの一部アミノ酸残基を置換、欠損、又は挿入した環状ペプチドを、実施例2の結合性評価にて評価した。

[0130] <実施例2：ペプチド（酵素合成品）の結合性評価>

ペプチドのFGFR結合性を、ELISA法を用いて評価した。

評価に用いるペプチドは、以下の方法で酵素合成した。

まず翻訳促進配列（配列番号22）、ペプチド、Mycタグ（配列番号23）及びHiBiTタグ（配列番号24）をこの順に連結した融合ペプチド（配列番号25）を設計した。次いで、上記融合ペプチドをコードするDN

A配列に対し、5'末端側にT7プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列、開始コドン(ATG)等の転写及び翻訳開始に必要な配列、3'末端側に終止コドン群を付与した鋳型DNA配列(配列番号26)を設計した。本鋳型DNA配列中にトリプレットTAGコドンが含まれる場合は、上記コドンをクロロアセチル化リジンのコドンに当てているため、上記DNA配列がコードするペプチドはシステインのチオール基とクロロアセチル化リジンのクロロアセチル基とが自発的にチオエーテル結合を形成し、環状ペプチドとなる。

配列番号22: VKKTKT

配列番号23: EQKLISEEDL

配列番号24: VSGWRLFKKIS

配列番号25: MVKKTKT [HCSYERLQFHGHEAPFRVXV] GSGSGSEQKLISEEDLGGSVSGWRLFKKIS

(Xはクロロアセチル化リジン、[]内は評価したいペプチドのアミノ酸配列の例であり、[]内はペプチドごとに異なる。)

配列番号26: GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG
ACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
TAACTTTAAGAAGGAGATATACCAATGGTTAAAA
AAACA AAAACA [CAT TGCTCTTACGAACGTCTGC
AGTTCCATGGTCATGAAGCTCCGTTCCGTGTTTA
GGTT] GGTTCTGGCAGTGGTTCCGAACAGAACT
GATCAGCGAAGAAGATCTGGGTGGCTCTGTAAGT
GGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGCTAATGAA
TAACTAATCC

([]内は評価したいペプチドをコードするDNA配列の例であり、[]内はペプチドごとに異なる。)

[0131] 鋳型DNAは、2段階のオーバーラップエクステンションPCRにより作製した。

1段階目のPCRは、配列番号27のDNA、配列番号28のDNA、配列番号29のDNA、及び配列番号30のDNA、の4種のDNAを、それぞれ0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ となるように混合し、PrimeSTAR Max (Takara, R045B) 存在下、98°C/10秒、39°C/5秒、72°C/5秒、の後、98°C/10秒、58°C/5秒、72°C/5秒の3ステップを27サイクル繰り返すことで、配列番号28のDNAと配列番号29のDNAを連結した。連結したDNAを精製し、50 ng/ μL に希釈した。

配列番号27 : GAAATTAATACGACTCACTATAGG

配列番号28 : GAACCACTGCCAGAACC

配列番号29 : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG
ACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
TAACTTTAAGAAGGAGATATACCAATGGTTAAAA
AACAAAAAC

配列番号30 : GAACCACTGCCAGAACC [AACCTAAAC
ACGGAACGGAGCTTCATGACCATGGAACTGCAGA
CGTTTCGTAAGAGCAATG] TGTTTTTTGTTTTTTT
AAC

([] 内は評価したいペプチドをコードするDNA配列の例であり、 [] 内はペプチドごとに異なる。)

[0132] 2段階目のPCRは、配列番号27のDNA、配列番号31のDNA、配列番号32のDNA、及び1段階目の精製産物、の4種のDNAを、それぞれ0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0025 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 ng/ μL となるように混合し、PrimeSTAR Max (Takara, R045B) 存在下、98°C/10秒、58°C/5秒、72°C/5秒の3ステップを30サイクル繰り返すことで、配列番号32 DNAと1段階目の精製産物を連結し、鋳型DNA (配列番号25) を得た。鋳型DNAを精製し、50 ng/ μL に希釈した。

配列番号31: GGATTAGTTATTTCATTAGCTAATC

配列番号32: GGTTCTGGCAGTGGTTCCGAACAGAAA
CTGATCAGCGAAGAAGATCTGGGTGGCTCTGTAA
GTGGATGGCGATTATTCAAGAAGATTAGCTAATG
AATAACTAATCC

[0133] ポリペプチドの無細胞酵素合成は、鋳型DNA、PUREfrex2.0 (ジーンフロンティア、PF201-0.25-5) 及びアミノアシルtRNA (1) を含む翻訳液中にて実施した。50 ng/μL に調製した鋳型DNA 1.75 μL (62.5 ng)、PUREfrex2.0 Solution I 2.5 μL、Solution II 0.25 μL、Solution III 0.5 μL、アミノアシルtRNA (1) の乾燥体 (終濃度 0.5 μg/μL) を混合し、37℃で1時間反応させた。

[0134] 酵素合成したペプチドの濃度は、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution I (TOYOBO、NKB-101) にて希釈したペプチドを、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega、N3040) と濃度既知の検量線用化学合成ペプチド (配列番号33) を用い、Nano Glo HiBiT Lytic Detection System の標準プロトコルに則り測定した。

配列番号33: EQKLISEEDLGGSVSGWRLFKKIS

[0135] 酵素合成したペプチドのFGFR結合性を、FGFRへのペプチド結合量をELISA評価することで測定した。

まず96ウェルプレート of 各ウェルに5 ng of Recombinant Human FGFR1 alpha (Il1c) Fc Chimera Protein, CF (R&D systems、658-FR-050) を固定化し、Pierce Protein-Free (PBS) Blocking Buffer (Thermo、37572) にてブロッキングした後、Can Get Signal Immunoreacti

on Enhancer Solution I (TOYOBO、NKB-101) にて希釈したペプチドを添加し、室温で3時間反応させた。0.05% Tween20含有PBS (phosphate buffered saline) を用いて洗浄後、Can Get Signal Immuno reaction Enhancer Solution II (TOYOBO、NKB-101) にて希釈した抗Myc抗体 (Cell Signaling、14038S) を添加し、室温で2時間反応させた。0.05% Tween20含有PBSを用いて洗浄後、SuperSignal E LISA Femto Substrate (Thermo、37075) を添加し、発光量を測定した。FGFRを固定化したウェルの発光量と、FGFRを固定化していないウェルの発光量の差分、及び反応時のペプチド濃度から用量反応関係を算出し、下記の評価基準に従ってFGFR結合性について評価した。評価基準A、B又はCであることが好ましい。

[0136] (FGFR結合性の評価基準)

配列番号239の環状ペプチドが、反応濃度10nmol/Lにおいて発する発光シグナルの値を1として規格化した際の、上記ペプチドが反応濃度10nmol/Lで発する発光シグナル値が、

- A・・・0.7以上である。
- B・・・0.5以上、0.7未満である。
- C・・・0.1以上、0.5未満である。
- D・・・0.1未満である。

[0137] 環状ペプチドの評価結果を表4に示す。

括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばK (a c e t y l) はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基のハロゲン原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

配列番号34は国際公開WO2000/003245号公報 (特許文献1

）で報告されている環状ペプチドであり、配列番号 3 6 は配列番号 3 4 をチオエーテル型の環化構造に変換した環状ペプチドである。

配列番号 3 5 は特開 2 0 2 1 - 7 0 6 5 2 号公報で報告されているペプチドであり、配列番号 3 7 は配列番号 3 5 をチオエーテル型の環化構造に変換したペプチドである。

配列番号 3 8 以降が本発明の対象となる環状ペプチドである。

[0138]

[表4]

配列番号	配列	FGFR 結合性 評価結果
34	(C)-RALLRGAPFHAE-(C)	D
35	(C)-DRTLLEYRLS-(C)	D
36	(C)-RALLRGAPFHAE-(K(acetyl))	D
37	(C)-DRTLLEYRLS-(K(acetyl))	D
38	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
39	A-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
40	G-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
41	P-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
42	L-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
43	V-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
44	F-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
45	Y-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
46	W-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
47	N-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
48	Q-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
49	S-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
50	T-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
51	D-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
52	E-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
53	R-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
54	H-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
55	I-(C)-AYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
56	I-(C)-LYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
57	I-(C)-IYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
58	I-(C)-FYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
59	I-(C)-YYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
60	I-(C)-TYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
61	I-(C)-VFTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
62	I-(C)-VWTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
63	I-(C)-VHTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
64	I-(C)-VYAFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
65	I-(C)-VYGFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
66	I-(C)-VYLFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
67	I-(C)-VYIFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
68	I-(C)-VYVFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
69	I-(C)-VYQFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
70	I-(C)-VYSFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
71	I-(C)-VYEFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C

72	I-(C)-VYRFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
73	I-(C)-VYHFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
74	I-(C)-VYTADAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
75	I-(C)-VYTGDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
76	I-(C)-VYTYDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
77	I-(C)-VYTWDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
78	I-(C)-VYTSDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
79	I-(C)-VYTHDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
80	I-(C)-VYTFAAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
81	I-(C)-VYTFGAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
82	I-(C)-VYTFPAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
83	I-(C)-VYTFVAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
84	I-(C)-VYTFFAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
85	I-(C)-VYTFYAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
86	I-(C)-VYTFWAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
87	I-(C)-VYTFNAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
88	I-(C)-VYTFSAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
89	I-(C)-VYTFDGAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
90	I-(C)-VYTFDPAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
91	I-(C)-VYTFDLHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
92	I-(C)-VYTFDIHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
93	I-(C)-VYTFDVHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
94	I-(C)-VYTFDYHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
95	I-(C)-VYTFDWAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
96	I-(C)-VYTFDNHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
97	I-(C)-VYTFDQHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
98	I-(C)-VYTFDSHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
99	I-(C)-VYTFDTHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
100	I-(C)-VYTFDEHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
101	I-(C)-VYTFDRHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
102	I-(C)-VYTFDHHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
103	I-(C)-VYTFDAAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
104	I-(C)-VYTFDAGAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
105	I-(C)-VYTFDALAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
106	I-(C)-VYTFDAIAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
107	I-(C)-VYTFDAVAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
108	I-(C)-VYTFDAFAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
109	I-(C)-VYTFDAYAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
110	I-(C)-VYTFDAWAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
111	I-(C)-VYTFDANAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
112	I-(C)-VYTFDAQAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A

113	I-(C)-VYTFDASAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
114	I-(C)-VYTFDATAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
115	I-(C)-VYTFDADAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
116	I-(C)-VYTFDAEAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
117	I-(C)-VYTFDARAHSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
118	I-(C)-VYTFDAHGHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
119	I-(C)-VYTFDAHIHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
120	I-(C)-VYTFDAHVHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
121	I-(C)-VYTFDAHFSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
122	I-(C)-VYTFDAHYSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
123	I-(C)-VYTFDAHWSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
124	I-(C)-VYTFDAHQSLHAALT-(K(acetyl))-I	B
125	I-(C)-VYTFDAHSHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
126	I-(C)-VYTFDAHTHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
127	I-(C)-VYTFDAHDHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
128	I-(C)-VYTFDAHEHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
129	I-(C)-VYTFDAHRHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
130	I-(C)-VYTFDAHHHSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
131	I-(C)-VYTFDAHAASLHAALT-(K(acetyl))-I	A
132	I-(C)-VYTFDAHAGSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
133	I-(C)-VYTFDAHAPSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
134	I-(C)-VYTFDAHALSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
135	I-(C)-VYTFDAHAISLHAALT-(K(acetyl))-I	B
136	I-(C)-VYTFDAHAVSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
137	I-(C)-VYTFDAHAFSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
138	I-(C)-VYTFDAHAYSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
139	I-(C)-VYTFDAHAWSLHAALT-(K(acetyl))-I	C
140	I-(C)-VYTFDAHANSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
141	I-(C)-VYTFDAHAQSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
142	I-(C)-VYTFDAHASSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
143	I-(C)-VYTFDAHATSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
144	I-(C)-VYTFDAHADSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
145	I-(C)-VYTFDAHAESLHAALT-(K(acetyl))-I	A
146	I-(C)-VYTFDAHARSLHAALT-(K(acetyl))-I	A
147	I-(C)-VYTFDAHAHALHAALT-(K(acetyl))-I	B
148	I-(C)-VYTFDAHAHGLHAALT-(K(acetyl))-I	C
149	I-(C)-VYTFDAHAHLLHAALT-(K(acetyl))-I	C
150	I-(C)-VYTFDAHAHILHAALT-(K(acetyl))-I	C
151	I-(C)-VYTFDAHAHVLHAALT-(K(acetyl))-I	C
152	I-(C)-VYTFDAHAHFLHAALT-(K(acetyl))-I	C
153	I-(C)-VYTFDAHAHYLHAALT-(K(acetyl))-I	C

154	I-(C)-VYTFDAHAHWLHAALT-(K(acetyl))-I	C
155	I-(C)-VYTFDAHAHNLHAALT-(K(acetyl))-I	A
156	I-(C)-VYTFDAHAHQLHAALT-(K(acetyl))-I	A
157	I-(C)-VYTFDAHAHTLHAALT-(K(acetyl))-I	A
158	I-(C)-VYTFDAHAHDLHAALT-(K(acetyl))-I	A
159	I-(C)-VYTFDAHAHELHAALT-(K(acetyl))-I	A
160	I-(C)-VYTFDAHAHRLHAALT-(K(acetyl))-I	C
161	I-(C)-VYTFDAHAHHLHAALT-(K(acetyl))-I	C
162	I-(C)-VYTFDAHAHSAHAALT-(K(acetyl))-I	A
163	I-(C)-VYTFDAHAHSGHAALT-(K(acetyl))-I	C
164	I-(C)-VYTFDAHAHSPHAALT-(K(acetyl))-I	C
165	I-(C)-VYTFDAHAHSIHAALT-(K(acetyl))-I	A
166	I-(C)-VYTFDAHAHSVHAALT-(K(acetyl))-I	A
167	I-(C)-VYTFDAHAHSFHAALT-(K(acetyl))-I	A
168	I-(C)-VYTFDAHAHSYHAALT-(K(acetyl))-I	A
169	I-(C)-VYTFDAHAHSWHAALT-(K(acetyl))-I	C
170	I-(C)-VYTFDAHAHSQHAALT-(K(acetyl))-I	C
171	I-(C)-VYTFDAHAHSSHAALT-(K(acetyl))-I	B
172	I-(C)-VYTFDAHAHSTHAALT-(K(acetyl))-I	B
173	I-(C)-VYTFDAHAHSEHAALT-(K(acetyl))-I	C
174	I-(C)-VYTFDAHAHSRHAALT-(K(acetyl))-I	C
175	I-(C)-VYTFDAHAHSHHAALT-(K(acetyl))-I	B
176	I-(C)-VYTFDAHAHSLAAALT-(K(acetyl))-I	A
177	I-(C)-VYTFDAHAHSLGAALT-(K(acetyl))-I	A
178	I-(C)-VYTFDAHAHSLPAALT-(K(acetyl))-I	A
179	I-(C)-VYTFDAHAHSLLAALT-(K(acetyl))-I	B
180	I-(C)-VYTFDAHAHSLIAALT-(K(acetyl))-I	B
181	I-(C)-VYTFDAHAHSLVAALT-(K(acetyl))-I	B
182	I-(C)-VYTFDAHAHSLFAALT-(K(acetyl))-I	C
183	I-(C)-VYTFDAHAHSLYAALT-(K(acetyl))-I	B
184	I-(C)-VYTFDAHAHSLWAALT-(K(acetyl))-I	C
185	I-(C)-VYTFDAHAHSLNAALT-(K(acetyl))-I	A
186	I-(C)-VYTFDAHAHSLQAALT-(K(acetyl))-I	A
187	I-(C)-VYTFDAHAHSLSAALT-(K(acetyl))-I	A
188	I-(C)-VYTFDAHAHSLTAALT-(K(acetyl))-I	A
189	I-(C)-VYTFDAHAHSLDAALT-(K(acetyl))-I	A
190	I-(C)-VYTFDAHAHSLEAALT-(K(acetyl))-I	A
191	I-(C)-VYTFDAHAHSLRAALT-(K(acetyl))-I	B
192	I-(C)-VYTFDAHAHSLHGALT-(K(acetyl))-I	A
193	I-(C)-VYTFDAHAHSLHALT-(K(acetyl))-I	C
194	I-(C)-VYTFDAHAHSLHIALT-(K(acetyl))-I	C

195	I-(C)-VYTFDAHAHSLHVALT-(K(acetyl))-I	C
196	I-(C)-VYTFDAHAHSLHFALT-(K(acetyl))-I	C
197	I-(C)-VYTFDAHAHSLHYALT-(K(acetyl))-I	C
198	I-(C)-VYTFDAHAHSLHWALT-(K(acetyl))-I	C
199	I-(C)-VYTFDAHAHSLHNALT-(K(acetyl))-I	A
200	I-(C)-VYTFDAHAHSLHQALT-(K(acetyl))-I	A
201	I-(C)-VYTFDAHAHSLHSALT-(K(acetyl))-I	A
202	I-(C)-VYTFDAHAHSLHTALT-(K(acetyl))-I	A
203	I-(C)-VYTFDAHAHSLHDALT-(K(acetyl))-I	A
204	I-(C)-VYTFDAHAHSLHEALT-(K(acetyl))-I	A
205	I-(C)-VYTFDAHAHSLHRALT-(K(acetyl))-I	A
206	I-(C)-VYTFDAHAHSLHHAALT-(K(acetyl))-I	A
207	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAILT-(K(acetyl))-I	C
208	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAVLT-(K(acetyl))-I	C
209	I-(C)-VYTFDAHAHSLHASLT-(K(acetyl))-I	C
210	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAAIT-(K(acetyl))-I	C
211	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAAVT-(K(acetyl))-I	C
212	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAAFT-(K(acetyl))-I	C
213	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAAATT-(K(acetyl))-I	C
214	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALA-(K(acetyl))-I	C
215	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALG-(K(acetyl))-I	C
216	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALP-(K(acetyl))-I	C
217	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALV-(K(acetyl))-I	C
218	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALF-(K(acetyl))-I	C
219	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALN-(K(acetyl))-I	A
220	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALQ-(K(acetyl))-I	A
221	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALS-(K(acetyl))-I	C
222	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALE-(K(acetyl))-I	C
223	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALR-(K(acetyl))-I	A
224	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALH-(K(acetyl))-I	A
225	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-A	B
226	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-L	C
227	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-V	A
228	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-F	C
229	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-Y	C
230	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-W	A
231	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-N	C
232	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-Q	A
233	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-S	C
234	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-T	C
235	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-R	A

236	I-(C)-VYTFDAHAHSLHAALT-(K(acetyl))-H	A
237	V-(C)-IYTFNHLAQTYWQSLN-(K(acetyl))-V	A
238	V-(C)-IWVFNRFHAHTLKESLT-(K(acetyl))-V	C
239	A-(C)-VWTFDRHAQEISQALH-(K(acetyl))-V	A
240	A-(C)-VYLFNWRATSYGKSLI-(K(acetyl))-W	A
241	H-(C)-KLYSYPLWYWPKWVFQT-(K(acetyl))-E	C
242	A-(C)-GVHQWEIGEWFGYRYYY-(K(acetyl))-P	B
243	Q-(C)-YLPSWFYQKARLLFQYI-(K(acetyl))-S	C
244	D-(C)-TQGKILTYSQALFSFGV-(K(acetyl))-I	A
245	N-(C)-VYYAKPVFAHANRVWTYI-(K(acetyl))-I	A
246	P-(C)-IYTFDQSAIKYKIGFVLR-(K(acetyl))-V	C
247	P-(C)-QSYIWSHFIVVNRQWLHP-(K(acetyl))-W	C
248	Q-(C)-WLQGPYWSDIKIYIYQHD-(K(acetyl))-Y	C
249	V-(C)-VRPIFIFSFRAPFNAVDW-(K(acetyl))-I	C
250	Q-(C)-IWQYLYQIASLFHVVG-(K(acetyl))-A	B
251	T-(C)-WTAWQWFGHWVPFVA-(K(acetyl))-T	C
252	R-(C)-VYSFDPARYPYHLK-(K(acetyl))-V	A
253	T-(C)-FSPGQIWIWTHLVTAIRN-(K(acetyl))-T	B
254	L-(C)-VYTFNWQQKFGHHLT-(K(acetyl))-I	C
255	F-(C)-TLWQFGNLVWTHESPFI-(K(acetyl))-Q	C
256	D-(C)-VYQYDRNAHYWDTALV-(K(acetyl))-V	A
257	F-(C)-AWVVDYQELHQFWSIVQ-(K(acetyl))-I	C
258	V-(C)-VRPIFIFSFRAPFNAVDW-(K(acetyl))-N	A
259	T-(C)-NIWQFNPAARWGFHLVY-(K(acetyl))-Y	C
260	I-(C)-REVIVGSLYTWDGNRGFF-(K(acetyl))-V	C
261	L-(C)-YINLFTHT-(K(acetyl))-V	C
262	W-(C)-NFANVWTFN-(K(acetyl))-S	C
263	Q-(C)-YHIIVYTFV-(K(acetyl))-P	C
264	V-(C)-IFTWDRVHWPV-(K(acetyl))-V	C
265	V-(C)-IYTWDRQSWPV-(K(acetyl))-L	B
266	D-(C)-IWQWHPWSGYT-(K(acetyl))-L	A
267	D-(C)-IWQWTPTKSFQ-(K(acetyl))-L	A
268	S-(C)-IYQWDYVHWPI-(K(acetyl))-L	C
269	H-(C)-LWQWTPQTHFV-(K(acetyl))-L	A
270	Q-(C)-WWTLQVWSYPFH-(K(acetyl))-H	C
271	L-(C)-QLGVYTYVALFY-(K(acetyl))-F	C
272	Q-(C)-DWVIWQWDPPYI-(K(acetyl))-V	C
273	P-(C)-WWATQIWTPFY-(K(acetyl))-V	C
274	F-(C)-IYTFSRESGLLW-(K(acetyl))-Q	A
275	L-(C)-PLYAWQTLYQYGW-(K(acetyl))-V	A
276	E-(C)-IYTFDPQRHPVLV-(K(acetyl))-V	C

277	T-(C)-PVWAWHQAFQFGW-(K(acetyl))-I	C
278	I-(C)-PLYGDQGGAWQYGW-(K(acetyl))-L	A
279	Q-(C)-LQKVGYLLWQFGWS-(K(acetyl))-I	C
280	P-(C)-PVWGDYGAHVHQYGW-(K(acetyl))-V	A
281	Y-(C)-VYTFDAQDVWRPLR-(K(acetyl))-V	C
282	F-(C)-IYSWNWNNLVRPEFR-(K(acetyl))-V	C
283	W-(C)-WLIPTWPGVYQFSP-(K(acetyl))-A	B
284	Q-(C)-RITLLTIYQWKYAWH-(K(acetyl))-E	C
285	Q-(C)-SWWYVQVWTYPFHVL-(K(acetyl))-G	C
286	H-(C)-LWSLHSFYTFKAWA-(K(acetyl))-I	C
287	Y-(C)-PFEVYSWWVPKWH-(K(acetyl))-I	C
288	L-(C)-HLVFQFNPDGKLP-(K(acetyl))-Y	C
289	D-(C)-PWSVFSWYIPIYN-(K(acetyl))-I	C
290	F-(C)-VYTFDANAQSLDDALN-(K(acetyl))-Q	A
291	I-(C)-VYTFDAHAHSLDDALT-(K(acetyl))-I	A
292	I-(C)-VYTFDAHAHSLDAALN-(K(acetyl))-I	A
293	I-(C)-VYTFDAHAHSLDAALT-(K(acetyl))-V	A
294	I-(C)-VYTFDAHAHSLDAALT-(K(acetyl))-Q	A
295	I-(C)-VYTFDAHAHSLDAALN-(K(acetyl))-V	A
296	I-(C)-VYTFDAHAHSLDAALN-(K(acetyl))-Q	A
297	I-(C)-VYTFDAHAHSLHDALN-(K(acetyl))-I	A
298	I-(C)-VYTFDAHAHSLHDALT-(K(acetyl))-V	A
299	I-(C)-VYTFDAHAHSLHDALT-(K(acetyl))-Q	A
300	I-(C)-VYTFDAHAHSLHDALN-(K(acetyl))-V	A
301	I-(C)-VYTFDAHAHSLHDALN-(K(acetyl))-Q	A
302	I-(C)-VYTFDAHAHSLDDALN-(K(acetyl))-I	A
303	I-(C)-VYTFDAHAHSLDDALT-(K(acetyl))-V	A
304	I-(C)-VYTFDAHAHSLDDALT-(K(acetyl))-Q	A
305	I-(C)-VYTFDAHAHSLDDALN-(K(acetyl))-V	A
306	I-(C)-VYTFDAHAHSLDDALN-(K(acetyl))-Q	A
307	F-(C)-VYTFDAHAHSLDAALT-(K(acetyl))-I	A
308	F-(C)-VYTFDAHAHSLHDALT-(K(acetyl))-I	A
309	F-(C)-VYTFDAHAHSLDDALT-(K(acetyl))-I	A
310	I-(C)-VYTFDAHAQSLDAALT-(K(acetyl))-I	A
311	I-(C)-VYTFDAHAQSLHDALT-(K(acetyl))-I	A
312	I-(C)-VYTFDAHAQSLDDALT-(K(acetyl))-I	A
313	F-(C)-VYTFDAHAHSLDAALN-(K(acetyl))-I	A
314	F-(C)-VYTFDAHAHSLHDALN-(K(acetyl))-I	A
315	F-(C)-VYTFDAHAHSLDDALN-(K(acetyl))-I	A
316	F-(C)-VYTFDAHAHSLDAALT-(K(acetyl))-Q	A
317	F-(C)-VYTFDAHAHSLHDALT-(K(acetyl))-Q	A

318	F-(C)-VYTFDAHAHSLDDALT-(K(acetyl))-Q	A
319	F-(C)-VYTFDAHAHSLDAALN-(K(acetyl))-Q	A
320	F-(C)-VYTFDAHAHSLHDALN-(K(acetyl))-Q	A
321	F-(C)-VYTFDAHAHSLDDALN-(K(acetyl))-Q	A
322	(C)-VYTFDAHAHSLDAALT-(K(acetyl))-I	A
323	I-(C)-VYTFDANAHS LDAALT-(K(acetyl))-I	A
324	I-(C)-VYTFDANAHS LHDALT-(K(acetyl))-I	A
325	I-(C)-VYTFDANAHS LDDALT-(K(acetyl))-I	A
326	I-(K(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALT-(C)-I	B

[0139] <実施例3：環状ペプチド（化学合成品）の結合性評価>

環状ペプチドのFGFR結合性を、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)法を用いて評価した。

評価に用いる環状ペプチドは、株式会社東レリサーチセンターにてカスタム合成した。

[0140] 化学合成した環状ペプチドのFGFR結合性を以下の手順で評価した。

表面プラズモン共鳴装置であるBiacore-T200 (Cytiva社製)にCM5センサーチップ (Cytiva、29149603)をセットし、ランニングバッファーとしてHBS-EPバッファー (Cytiva、BR100826)を10 μ L/minの流速で添加し、流路を平衡化した。次いで0.2mol/LのEDC (1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド)と0.05mol/LのNHS (N-ヒドロキシコハク酸イミド)混合水溶液を70 μ L添加し、センサーチップを活性化した。その後、Acetate 4.5バッファー (Cytiva、BR100350)で50nmol/Lに調製したRecombinant Human FGFR1 alpha (Il1c) Fc Chimera Protein CF (R&D systems、658-FR-050)を添加し、約5000RU、固相化した。その後、エタノールアミン溶液によってブロッキング処理を施した。また、同センサーチップの別流路にはFGFRを固定化せずに、活性化後にすぐブロッキング処理を行った。

[0141] 上記で作製したFGFR固体化センサーチップの各流路に、25℃にて、

HBS-E Pを用いて10nmol/Lに希釈した環状ペプチドを10分間添加した後、HBS-E Pをランニングバッファーとして30分間流し、FGFRに対する環状ペプチドの結合を測定した。その後、Glycine 1.5 (Cytiva、BR100354)に終濃度0.15mol/Lになるように塩化ナトリウム粉末を溶解させた再生液を1分間各流路に流すことを2回繰り返すことにより、結合した環状ペプチドを除去する再生処理を行った。10nmol/Lの環状ペプチドを流した際におけるFGFR固定済みの流路におけるBiacore-T200による測定値と、FGFR未固定の流路におけるBiacore-T200による測定値の差分から、環状ペプチドの結合量を評価した。

[0142] 上記で評価した環状ペプチドの結合量を、環状ペプチドとFGFRの分子量を用いて、FGFR 1分子あたりの環状ペプチド分子結合量に規格化し、下記の評価基準に従ってFGFR結合性について評価した。評価基準A、B又はCであることが好ましい。

(FGFR結合性の評価基準)

A・・・結合量が環状ペプチド0.7分子/FGFR 1分子以上である。

B・・・結合量が環状ペプチド0.5分子/FGFR 1分子以上、0.7分子/FGFR 1分子未満である。

C・・・結合量が環状ペプチド0.1分子/FGFR 1分子以上、0.5分子/FGFR 1分子未満である。

D・・・結合量が環状ペプチド0.1分子/FGFR 1分子未満である。

[0143] 評価結果を表5に示す。括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばK (acetyl) はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基のハロゲン原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

[0144]

[表5]

配列番号	配列	FGFR 結合性 評価結果
327	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(K(acetyl))-VKKK	A
328	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(Orn(acetyl))-VKKK	A
329	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(Dab(acetyl))-VKKK	B
330	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(Dap(acetyl))-VKKK	A
331	A-(K(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	B
332	A-(Orn(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
333	A-(Dab(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
334	A-(Dap(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
335	A-(C)-VWTFDRHAQEISQALH-(K(acetyl))-VKKK	A
336	A-(C)-VWTFDRHAQEISQALH-(C)-VKKK	D
337	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-IKKK	C
338	F-(Orn(propyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-IKKK	C
339	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHS ^{me} LDAALN-(Hcy)-IKKK	C
340	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSHleDAALN-(Hcy)-IKKK	B
341	(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-IKKK	C
342	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-KKK	C

[0145] <実施例4：環状ペプチド（化学合成品）のFGFR汎用性評価>

環状ペプチドが多様な種類のFGFRに結合することを、表面プラズモン共鳴法(Surface Plasmon Resonance: SPR)法を用いて評価した。

評価に用いる環状ペプチドは、株式会社東レリサーチセンターにてカスタム合成した。

[0146] 化学合成した環状ペプチドのFGFR結合性を以下の手順で評価した。

表面プラズモン共鳴装置であるBiacore-T200(Cytiva社製)にCM5センサーチップ(Cytiva、29149603)をセットし、ランニングバッファーとしてHBS-EPバッファー(Cytiva、BR100826)を10μL/minの流速で添加し、流路を平衡化した。次いで0.2mol/LのEDC(1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド)と0.05mol/LのNHS(N-ヒドロキシコハク酸イミド)混合水溶液を70μL添加し、センサーチップを活

性化した。その後HBS-E Pバッファーで2 mg/mLに調製した環状ペプチドを添加し、約200 RU、固相化した。その後、エタノールアミン溶液によってブロッキング処理を施した。また、同センサーチップの別流路にはFGFRを固定化せずに、活性化後にすぐブロッキング処理を行った。

[0147] 上記で作製した環状ペプチド固体化センサーチップの各流路に、25℃にて、HBS-E Pを用いて1 $\mu\text{mol/L}$ に希釈した各種FGFR (FGFR1 Protein, Human, Recombinant (His Tag) (Sino Biological, 10616-H08H)、FGFR3 Protein, Human, Recombinant (ECD, His Tag) (Sino Biological, 16044-H08H)、FGFR4 Protein, Human, Recombinant (His Tag) (Sino Biological, 10538-H08H))を10分間添加した後、HBS-E Pをランニングバッファーとして30分間流し、環状ペプチドに対する各種FGFRの結合を測定した。その後、Glycine 1.5 (Cytiva, BR100354)に塩化ナトリウム(終濃度0.4 mol/L)とドデシル硫酸ナトリウム水溶液(混合濃度1%、終濃度0.2%)を溶解させた再生液を1分間各流路に流すことを2回繰り返すことにより、結合したFGFRを除去する再生処理を行った。1 $\mu\text{mol/L}$ のFGFRを流した際における環状ペプチド固定済みの流路におけるBiacore-T200による測定値と、環状ペプチド未固定の流路におけるBiacore-T200による測定値の差分から、環状ペプチドの結合量を評価した。

[0148] 上記で評価したFGFRの結合量を、環状ペプチドとFGFRの分子量を用いて、環状ペプチド1分子あたりのFGFR分子結合量に規格化し、下記の評価基準に従ってFGFR結合性について評価した。評価基準A、B又はCであることが好ましい。

(FGFR結合性の評価基準)

A・・・結合量がFGFR 0.05分子/環状ペプチド1分子以上である。

- B・・・結合量がFGFR0.01分子/環状ペプチド1分子以上、FGFR0.05分子/環状ペプチド1分子未満である。
- C・・・結合量がFGFR0.005分子/環状ペプチド1分子以上、FGFR0.01分子/環状ペプチド1分子未満である。
- D・・・結合量がFGFR0.005分子/環状ペプチド1分子未満である。

[0149] 評価結果を表6に示す。

[0150] [表6]

配列番号	配列	FGFR1 結合性評価結果	FGFR3 結合性評価結果	FGFR4 結合性評価結果
335	A-(C)-VWTFDRHAQEISQALH-(K{acetyl})-VKKK	A	B	A

[0151] 本結果より、本発明の環状ペプチドは多様な種類のFGFRに結合可能であることが示された。

[0152] <実施例5：環状ペプチドの安定性評価>

環状ペプチドの分子安定性を、還元剤処理した環状ペプチド水溶液をLC（液体クロマトグラフィー分析法）にて分析することにより評価した。

還元剤処理は細胞に含まれるグルタチオン濃度を基に、次の条件で行った。0.2mg/mLの環状ペプチド水溶液を25μL調製し、この水溶液に58.8μLの12.6mmol/L DTT水溶液を加え、室温にて1時間インキュベートすることで還元剤処理環状ペプチド水溶液を得た。DTT水溶液は1mol/L（+）-ジチオトレイトール（DTT）溶液（富士フイルム和光純薬、044-33871）を水で希釈して用いた。還元剤処理前の環状ペプチドのLC/MSにおける全ピークの総面積を100%とし、還元剤処理環状ペプチド水溶液のLC/MSにおける全ピークの総面積の割合を求めることにより、環状ペプチド残存率を算出し、以下の評価基準に従って分子安定性を評価した。評価基準A、B又はCであることが好ましい。

[0153] （環状ペプチドの残存率の評価基準）

- A . . . 環状ペプチドの残存率が90%以上である
- B . . . 環状ペプチドの残存率が70%以上、90%未満である
- C . . . 環状ペプチドの残存率が50%以上、70%未満である
- D . . . 環状ペプチドの残存率が50%未満である

[0154] なお、分子安定性の評価に用いたLCは以下の条件とした。

- ・ LC装置：Prominenceシリーズ（ポンプ、カラムオーブン、オートサンプラー、検出器）（（株）島津製作所製）
- ・ 検出器：フォトダイオードアレイ検出器（SPD-M20A）、測定波長280nm
- ・ カラム：TSKgel ODS-100V、内径4.6mm×長さ150mm、粒子径5μm（東ソー（株）製）
- ・ 溶離液A：0.1%トリフルオロ酢酸を溶質として含み、溶媒は水100%の溶液
- ・ 溶離液B：0.1%のトリフルオロ酢酸を溶質として含み、溶媒はアセトニトリル100%の溶液
- ・ 流速：1.0mL/min
- ・ 注入量：25μL
- ・ グラジエント：20-50%：溶離液B（0-15分）、100%：溶離液B（15分）
- ・ カラム温度：40℃

[0155] 評価結果を表7に示す。括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばK（a c e t y l）はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基のハロゲン原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

[0156]

[表7]

配列番号	配列	還元安定性 評価結果
327	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(K(acetyl))-VKKK	A
328	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(Orn(acetyl))-VKKK	A
329	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(Dab(acetyl))-VKKK	A
330	A-(Hcy)-VWTFDRHAQEISQALH-(Dap(acetyl))-VKKK	A
331	A-(K(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
332	A-(Orn(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
333	A-(Dab(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
334	A-(Dap(acetyl))-VWTFDRHAQEISQALH-(Hcy)-VKKK	A
335	A-(C)-VWTFDRHAQEISQALH-(K(acetyl))-VKKK	B
336	A-(C)-VWTFDRHAQEISQALH-(C)-VKKK	D
337	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-IKKK	B
338	F-(Orn(propyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-IKKK	A
339	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHS ^m eLDAALN-(Hcy)-IKKK	B
340	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSHleDAALN-(Hcy)-IKKK	B
341	(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-IKKK	B
342	F-(Orn(acetyl))-VYTFDAHAHSLDAALN-(Hcy)-KKK	B

[0157] 本結果より、チオエーテル結合により環化した環状ペプチドは、ジスルフィド結合により環化した環状ペプチドより安定であることが示された。

[0158] また環化部にシステイン残基を含む環状ペプチド（配列番号335）と、環化部にホモシステイン残基を含む環状ペプチド（配列番号327）の安定性を、より過酷な条件である下記アルカリ処理にて比較した。

アルカリ処理は次の方法で行った。0.2 mg/mLの環状ペプチド水溶液を25 μ L調製し、この水溶液に58.8 μ Lの0.5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温にて3時間インキュベートすることでアルカリ処理環状ペプチド水溶液を得た。アルカリ処理前の環状ペプチドのLC/MSにおける全ピークの総面積を100%とし、アルカリ処理環状ペプチド水溶液のLC/MSにおける全ピークの総面積の割合を求めることにより、環状ペプチド残存率を算出した。配列番号335の残存率は15%、配列番号327の残存率は28%であり、環化部にシステイン残基を含む環状ペプチドより、環化部にホモシステイン残基を含む環状ペプチドの方が安定性が

高いことが示された。

なお、分子安定性の評価に用いたLCの条件は、上記の還元剤処理環状ペプチドの測定時と同一である。

[0159] <実施例6：環状ペプチド複合体の細胞増殖促進作用評価>

環状ペプチド複合体のFGFRリン酸化能を、FGFRを安定発現したBaF3細胞増殖促進作用を用いて評価した。

FGFRを安定発現したBaF3細胞は、FGFR遺伝子が組み込まれたベクター（ヒト：Gene Copoeia、EX-Y2820-M67、ウシ：Accession番号A41FL5の配列をpcDNA3.1/Hygro(+) Mammalian Expression Vector (Thermo、V87020)に導入、ブタ：Accession番号A0A8D1E4H1の配列をpcDNA3.1/Hygro(+) Mammalian Expression Vector (Thermo、V87020)に導入、トリ：Accession番号P21804の配列をpcDNA3.1/Hygro(+) Mammalian Expression Vector (Thermo、V87020)に導入)を用いてBaF3細胞に導入し、FGFR遺伝子が導入された細胞を、ハイグロマイシンを用いて薬剤選択することで樹立した。

[0160] 評価に用いる環状ペプチド複合体は、株式会社東レリサーチセンターにてカスタム合成した。

[0161] FGFRを安定発現したBaF3細胞の増殖促進作用評価は、以下の方法で実施した。まずRPMI-1640 with L-Glutamine and Phenol Red（富士フイルム和光純薬、189-02025）と、Fetal Bovine Serum（Thermo、10270-106）を、体積比9：1で混合後、ヘパリン（STEM CELL、07980）を終濃度8 μ g/mLになるよう添加することで、評価用の培地（以下、RPMI（10%FBS）培地と記載）を調製した。次いでFGFRを安定発現したBaF3細胞をRPMI（10%FBS）培地で2回

洗浄後、環状ペプチド複合体を終濃度 $0.001\sim10\text{nmol/L}$ になるように溶解したRPMI（10%FBS）培地に懸濁し、384穴プレートに播種した。この際、陰性対照として環状ペプチド複合体を添加しない条件を用意した。 37°C （5% CO_2 ）で2晩培養後、Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10mg/mL Solution in Water (Thermo、H3570)、-Cellstain（登録商標）- Calcein-AM solution（ 1mg/mL DMSO溶液）（DOJINDO、C396）、及び-Cellstain（登録商標）- PI solution（DOJINDO、P378）をRPMI（10%FBS）培地にそれぞれ終濃度で $1/1000$ 体積量ずつ添加し、室温で1時間静置することで生死染色し、共焦点顕微鏡（横河電機、CQ1）にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、下記の評価基準に従って細胞増殖促進作用について評価した。陰性対照における生細胞数は約 20cells/well であった。評価基準A、B又はCであることが好ましい。

[0162]（細胞増殖促進作用の評価基準）

生細胞数が最も多い環状ペプチド複合体の添加濃度における、

A・・・生細胞数が 400cells/well 以上である。

B・・・生細胞数が 200cells/well 以上、 400cells/well 未満である。

C・・・生細胞数が 100cells/well 以上、 200cells/well 未満である。

D・・・生細胞数が 100cells/well 未満である。

[0163] 評価結果を表8及び図2に示す。括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばK（acetyl）はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基のハロゲン原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

[0164] [表8]

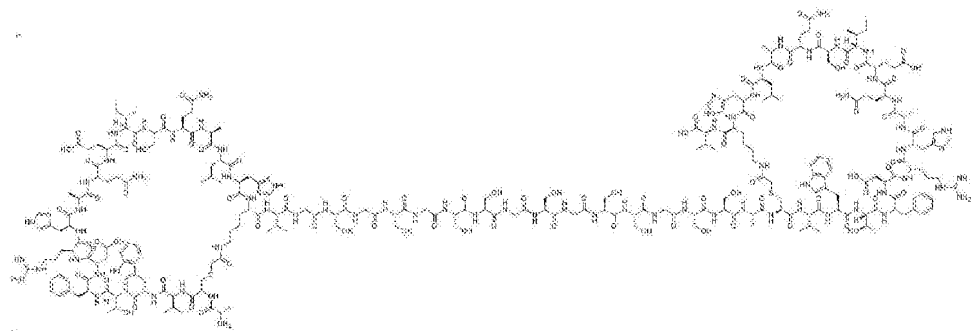
配列番号	配列	細胞増殖性評価結果				架橋
		ヒト	ウシ	ブタ	トリ	
343	A-(C ₁)- VWTFDRHAQEISQALH- (K(acetyl) ₁)- VGSGSGSSGSGSSGSSA- (C ₂)- VWTFDRHAQEISQALH- (K(acetyl) ₂)-V	C	A	B	B	C ₁ -K(acetyl) ₁ 間で環化形成、かつC ₂ -K(acetyl) ₂ 間で環化形成
344	A-(C)- VWTFDRHAQEISQALH- (K(acetyl))-V	B	A	B	B	C末端アミド化、N側鎖アミノ基間をBis-NHS-PEG13でアミド架橋
345	F-(Orn(acetyl))- VYTFDAHAHSLDAALN- (Hcy)-I	A	A	B	A	C末端アミド化、N側鎖アミノ基間をBis-NHS-PEG11でアミド架橋
346	F-(Orn(acetyl))- VYTFDAHAHSLDAALN- (Hcy)-I	A	A	B	A	C末端アミド化、N側鎖アミノ基間をBis-NHS-PEG13でアミド架橋

本結果より、本発明の環状ペプチドを連結した環状ペプチド複合体は、多様な動物由来のF G F Rをリン酸化可能であることが示された。

[0165] 上記配列番号343～346の環状ペプチド複合体の構造を以下に示す。

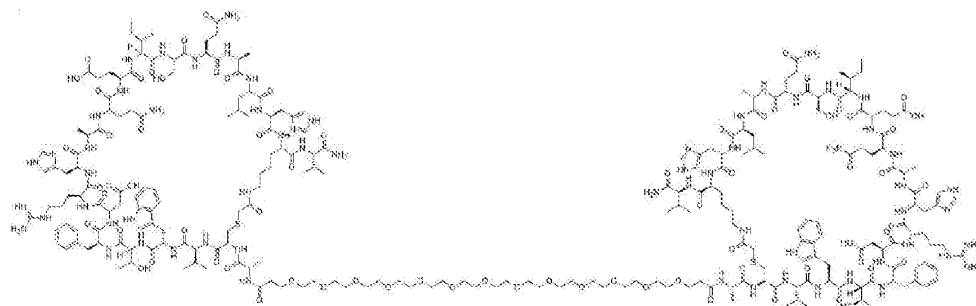
[化19]

配列番号343：



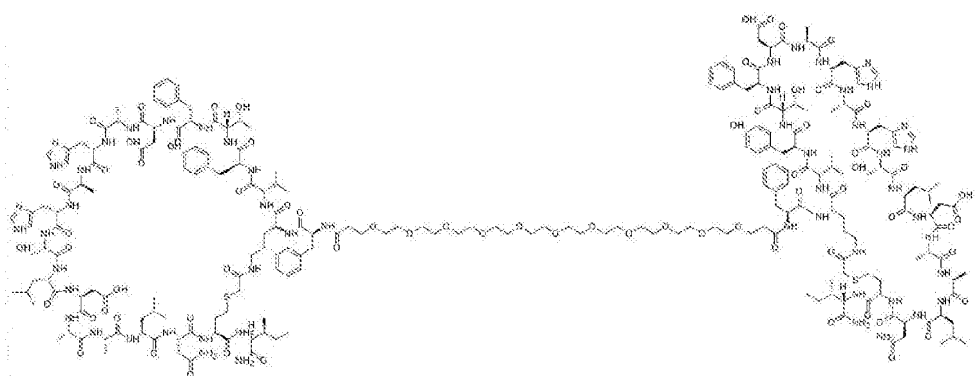
[化20]

配列番号 3 4 4 :



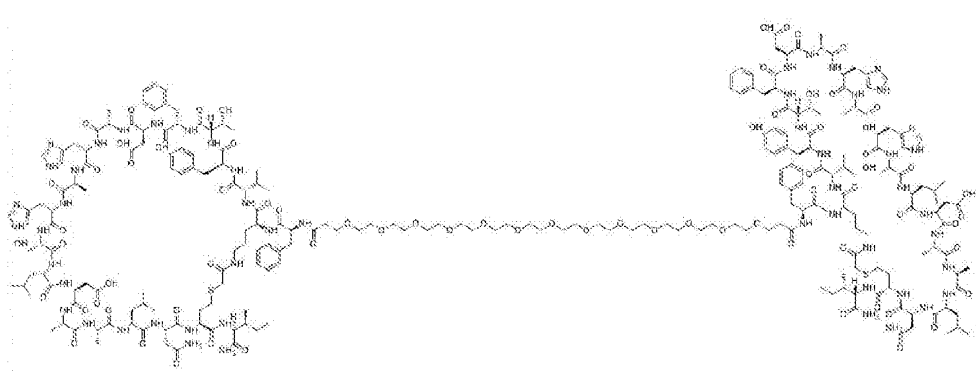
[化21]

配列番号 3 4 5 :



[化22]

配列番号 3 4 6 :



[0166] ＜実施例 7：環状ペプチド複合体の幹細胞増殖促進作用評価＞

環状ペプチド複合体の、MSC（間葉系幹細胞）増殖促進作用を評価した

。

MSCは、hMSC – Human Mesenchymal Stem Cells (Lonza、PT-2501) を用い、培地としてPRIME-XV MSC Expansion XSFM (FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.、91149) を用いて、FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. 推奨プロトコルに沿って起眠、継代した。1～4継代したMSCを評価に使用した。

[0167] MSCの増殖促進作用評価は、以下の方法で実施した。まずPRIME-XV MSC Expansion XSFM (FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.、91149) からbFGFを除いた培地（以下、カスタム培地と記載）を用意した。次いでPrime-XV Human Fibronectin (FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.、31002) をPBS（富士フイルム和光純薬、164-23551）に溶解し、評価に用いる96穴プレートに2 μ g/平方センチメートルずつ添加し、室温で3時間静置することで96穴プレートをFibronectinでコーティングした。その後、継代培養したMSCをTryple Express (Thermo、12604-013) を用いて剥離し、カスタム培地で1回洗浄後、環状ペプチド複合体又はbFGF (R&D Systems、3718-GMP) を終濃度0.001～3nmol/Lになるように希釈したカスタム培地に懸濁し、Fibronectinでコーティング済みの96穴プレートに播種した。この際、陰性対照として環状ペプチド複合体及びbFGFを添加しない条件を用意した。37℃（5%CO₂）で2晩培養後、培地上清を除き、除去したものと同一組成に調製した培地を同量添加することにより培地交換した。更に37℃（5%CO₂）で2晩培養後、培養上清を除いてHoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate – 10mg/mL Solution in Water (Thermo、H3570)、及びCellstain（登録商標）– Calcei

n-AM solution (1 mg/mL DMSO 溶液) (DOJINDO、C396) をそれぞれ終濃度で $1/10000$ 及び $1/4000$ 体積量ずつ添加したカスタム培地を添加し、 37°C ($5\%\text{CO}_2$) で30分静置することで全細胞及び生細胞を染色し、共焦点顕微鏡 (横河電機、CQ1) にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、 1 nmol/L bFGF を添加したウェルの生細胞数を100、陰性対照のウェルの生細胞数を0として、生細胞数を規格化した。評価結果を図3に示す。

[0168] 環状ペプチド複合体 (配列番号346) はbFGFと同モルで同程度のMSC増殖促進作用を示しており、本発明の環状ペプチド複合体でbFGFのMSC増殖促進作用を代替可能であることを示している。

[0169] <実施例8：環状ペプチド複合体の幹細胞未分化能の維持作用評価>

環状ペプチド複合体の、MSC (間葉系幹細胞) 未分化能の維持作用を評価した。

MSCは、実施例7と同様に調製した細胞を用いた。

MSC未分化能の維持作用評価は、以下の方法で実施した。まずPRIM E-XV MSC Expansion XSFM (FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.、91149) からbFGFを除いた培地 (以下、カスタム培地と記載) を用意した。次いでPrime-XV Human Fibronectin (FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.、31002) をPBS (富士フイルム和光純薬、164-23551) に溶解し、増殖に用いる12穴プレートに $2\mu\text{g}$ /平方センチメートルずつ添加し、室温で3時間静置することで12穴プレートをFibronectinでコーティングした。その後、継代培養したMSCをTryple Express (Thermo、12604-013) を用いて剥離し、カスタム培地で1回洗浄後、環状ペプチド複合体又はbFGF (R&D Systems、3718-GMP) をそれぞれ、終濃度 10 nmol/L 及び 1 nmol/L になるように希釈したカスタム培地に懸濁し、Fibronectinでコーティング済みの

12穴プレートに播種した。この際、陰性対照として環状ペプチド複合体及びbFGFを添加しない条件を用意した。37℃（5%CO₂）で2晩培養後、培地上清を除き、除去したものと同一組成に調製した培地を同量添加することにより培地交換した。更に37℃（5%CO₂）で2晩培養後、RNeasy Plus Mini Kit（Qiagen、74136）を用い、メーカー既定のプロトコルに沿ってRNAを抽出した。抽出したRNAをPrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）（Takara、RR047A）をメーカー既定のプロトコルに沿って使用することで逆転写し、TaqMan Gene Expression Assay（Thermo、4331182、GAPDH：Hs02758991 g1、Sox2、Hs04234836 s1、Oct4、Hs04260367 gH、Nanog、Hs02387400 g1）をメーカー既定のプロトコルで用いることで、未分化能維持を示す遺伝子の発現量を定量した。1nmol/L bFGFを添加したウェルの発現量を1として各遺伝子の発現量を規格化した。評価結果を図4に示す。

[0170] 未分化能維持を示す3遺伝子（Sox2、Oct4、Nanog）のうち、Sox2はbFGFがない条件（陰性対照）と1nmol/L bFGFを添加した条件で発現量が変化したため、bFGFのMSC未分化能維持作用を示す指標として使用可能であると判断した。一方、Oct4とNanogはbFGFがない条件（陰性対照）と1nmol/L bFGFを添加した条件で発現量がほぼ変化しなかったため、bFGFのMSC未分化能維持作用を示す指標として使用可能ではないと判断した。Sox2において環状ペプチド複合体（配列番号346）はbFGFと同程度の遺伝子発現量を示しており、本発明の環状ペプチド複合体でbFGFの未分化能維持作用を代替可能であることを示している。

[0171] <実施例9：環状ペプチド複合体のウシ細胞増殖促進作用評価>

環状ペプチド複合体の、ウシ細胞（筋芽細胞）増殖促進作用を評価した。

ウシ筋芽細胞は、以下の方法によりウシ筋組織より分離した。まずウシ黒毛和種の筋組織をHBSS（－）（フェノールレッド不含）（富士フイルム和光純薬、085-09355）中で細切した後、*pronase from Streptomyces Griseus*（Sigma-Aldrich、10165921001）を最終濃度1mg/mLになるように添加し、37℃で1時間静置した。静置後、10%FBSを含むHBSSを添加し、遠心分離により細胞を取得した。取得した細胞を最終濃度10%のウシ血清、30ng/mLのbFGFを含むD-MEM（高グルコース）（L-グルタミン、フェノールレッド含有）（富士フイルム和光純薬、044-29765）に懸濁した。懸濁した細胞を、0.55μg/平方センチメートルとなるようアイマトリックスー511溶液（富士フイルム和光純薬、381-07363）にてコーティングした培養フラスコ中で培養した。培養開始後2回以上継代したウシ筋芽細胞を評価に使用した。

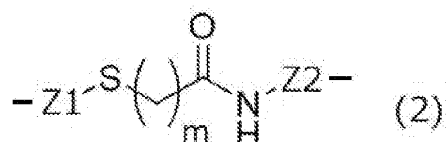
[0172] ウシ筋芽細胞の増殖促進作用評価は、以下の方法で実施した。継代培養したウシ筋芽細胞をTrypsin-EDTA（0.05%）、phenol red（Thermo、25300-054）を用いて剥離し、bFGFを終濃度30ng/mL又は環状ペプチド複合体を終濃度0.03~10nmol/Lになるように希釈した10%FBS含有D-MEM（高グルコース）（L-グルタミン、フェノールレッド含有）に懸濁し、アイマトリックスー511 0.55μg/平方センチメートルになるようにコーティングした96穴プレートに播種した。この際、陰性対照としてbFGF及び環状ペプチド複合体を添加しない条件を用意した。37℃（5%CO₂）で4日間培養後、培地上清を除き、Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10mg/mL Solution in Water（Thermo、H3570）、及びCell stain（登録商標）- Calcein-AM solution（1mg/mL DMSO溶液）（DOJINDO、C396）をそれぞれ終濃度で1/10000及び1/4000体積量ずつ添加した10%FBS含有D

ーMEM（高グルコース）（Lーグルタミン、フェノールレッド含有）を添加し、37℃（5%CO₂）で30分静置することで全細胞及び生細胞を染色し、共焦点顕微鏡（横河電機、CQ1）にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、30ng/mL bFGFを添加したウェルの生細胞数を100、陰性対照のウェルの生細胞数を0として、生細胞数を規格化した。評価結果を図5に示す。

[0173] 環状ペプチド複合体（配列番号346）はbFGFと同程度又はそれ以上のウシ筋芽細胞に対する増殖促進作用を示しており、本発明の環状ペプチド複合体でbFGFのウシ筋芽細胞増殖促進作用を代替可能であることを示している。

請求の範囲

- [請求項1] X1-X2-X3-X4で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、共有結合にて環状化された環化部を含み、前記環化部が、式(2)：
- [化1]



で示される構造を含む、環状ペプチド又はその塩：

式中、

X1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X3は、任意のアミノ酸残基を示し、

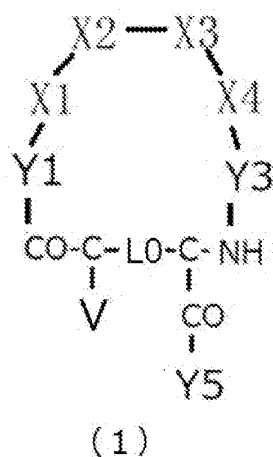
X4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Z1及びZ2はそれぞれ独立に、連結基を示し、

mは、1～10の整数を示す。

- [請求項2] 式(1)で示される、請求項1に記載の環状ペプチド又はその塩。

[化2]



式中、

Vは、 $-\text{NH}-\text{Y}4$ 、又はRを示し、

Vが $-\text{NH}-\text{Y}4$ である場合、L OはLを示し、VがRを示す場合、L OはL 1を示す。

X 1は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Y 1は、単結合、又は1から13個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 3は、1から14個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

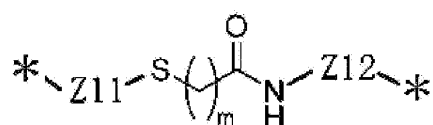
Y 4は、水素原子を示すか、あるいは1から7個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 5 は、OHを示すか、あるいは1から7個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

X 1 のアミノ末端がY 1 のカルボキシル末端と結合し、X 1 のカルボキシル末端がX 2 のアミノ末端と結合し、

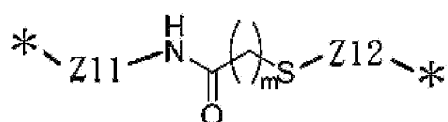
L は、

[化3]



又は

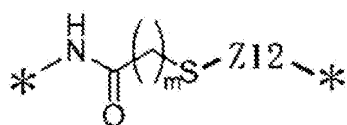
[化4]



で示される環化部を示し、Z 1 1 及びZ 1 2 はそれぞれ独立に、連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

L 1 は、

[化5]



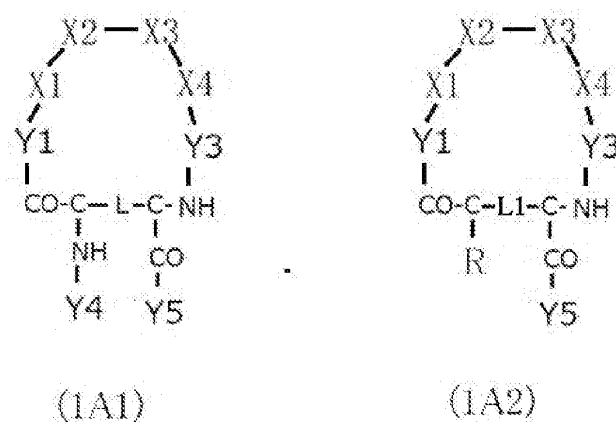
で示される環化部を示し、Z 1 2 は連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

R は、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[請求項3]

式(1 A 1) 又は式(1 A 2) で示される、請求項1 に記載の環状ペプチド又はその塩。

[化6]



式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

Y 1 は、単結合、又は 1 から 13 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 3 は、1 から 14 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

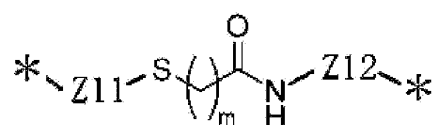
Y 4 は、水素原子を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Y 5 は、OH を示すか、あるいは 1 から 7 個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

X 1 のアミノ末端が Y 1 のカルボキシル末端と結合し、X 1 のカルボキシル末端が X 2 のアミノ末端と結合し、

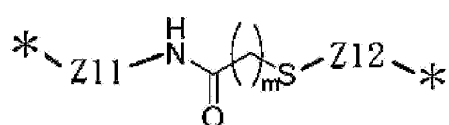
L は、

[化7]



又は

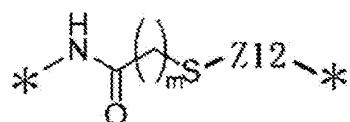
[化8]



で示される環化部を示し、Z 1 1 及び Z 1 2 はそれぞれ独立に、連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

L 1 は、

[化9]



で示される環化部を示し、Z 1 2 は連結基を示し、m は、1 ～ 1 0 の整数を示し、* はアミノ酸主鎖の α 炭素原子の位置を示し、

R は、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[請求項4]

X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の環状ペプチド又はその塩。

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X 5 は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。

[請求項5] X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の環状ペプチド又はその塩。

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X 5 は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[請求項6] X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X n - X 6 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の環状ペプチド又はその塩。

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残

基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X 5 は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示し、

X n は、1～3個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

X 6 は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。

[請求項7]

X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - X 5 - X n - X 6 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の環状ペプチド又はその塩。

式中、

X 1 は、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はトレオニン残基を示し、

X 2 は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

X 3 は、任意のアミノ酸残基を示し、

X 4 は、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、又はヒスチジン残基を

示し、

X 5 は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示し、

X n は、1～3個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

X 6 は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、又はヒスチジン残基を示す。

[請求項8] 環を構成するアミノ酸残基の数が10～22個である、請求項1に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項9] 環化部にホモシステイン残基を含む、請求項1に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項10] 表4～表6に記載されている配列番号38～335及び配列番号337～342のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は表4～表6に記載されている配列番号38～335及び配列番号337～342のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、請求項1に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項11] 表4～表6に記載されている配列番号38～54、配列番号56～57、配列番号63～64、配列番号69～70、配列番号76～77、配列番号87、配列番号89～90、配列番号97～98、配列番号100～105、配列番号108～109、配列番号111～117、配列番号124、配列番号131～136、配列番号140～1

47、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号171～172、配列番号175～181、配列番号183、配列番号185～192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～225、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号242、配列番号244～245、配列番号250、配列番号252～253、配列番号256、配列番号258、配列番号265～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号283、配列番号290～335及び配列番号340のアミノ酸配列のいずれか1つを含むか、又は

表4～表6に記載されている配列番号38～54、配列番号56～57、配列番号63～64、配列番号69～70、配列番号76～77、配列番号87、配列番号89～90、配列番号97～98、配列番号100～105、配列番号108～109、配列番号111～117、配列番号124、配列番号131～136、配列番号140～147、配列番号155～159、配列番号162、配列番号165～168、配列番号171～172、配列番号175～181、配列番号183、配列番号185～192、配列番号199～206、配列番号219～220、配列番号223～225、配列番号227、配列番号230、配列番号232、配列番号235～237、配列番号239～240、配列番号242、配列番号244～245、配列番号250、配列番号252～253、配列番号256、配列番号258、配列番号265～267、配列番号269、配列番号274～275、配列番号278、配列番号280、配列番号283、配列番号290～335及び配列番号340のアミノ酸配列のいずれか1つにおいて1～4個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつFGFRタンパク質への結合能を有する、

請求項 1 に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項12] 表 4 ～表 6 に記載されている配列番号 38 ～45、配列番号 47 ～54、配列番号 57、配列番号 63、配列番号 70、配列番号 87、配列番号 97 ～98、配列番号 100 ～101、配列番号 103 ～105、配列番号 111 ～117、配列番号 131 ～134、配列番号 136、配列番号 140 ～146、配列番号 155 ～159、配列番号 162、配列番号 165 ～168、配列番号 176 ～178、配列番号 185 ～190、配列番号 192、配列番号 199 ～206、配列番号 219 ～220、配列番号 223 ～224、配列番号 227、配列番号 230、配列番号 232、配列番号 235 ～237、配列番号 239 ～240、配列番号 244 ～245、配列番号 252、配列番号 256、配列番号 258、配列番号 266 ～267、配列番号 269、配列番号 274 ～275、配列番号 278、配列番号 280、配列番号 290 ～325、配列番号 327 ～328、配列番号 330 及び配列番号 332 ～335 のアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むか、又は

表 4 ～表 6 に記載されている配列番号 38 ～45、配列番号 47 ～54、配列番号 57、配列番号 63、配列番号 70、配列番号 87、配列番号 97 ～98、配列番号 100 ～101、配列番号 103 ～105、配列番号 111 ～117、配列番号 131 ～134、配列番号 136、配列番号 140 ～146、配列番号 155 ～159、配列番号 162、配列番号 165 ～168、配列番号 176 ～178、配列番号 185 ～190、配列番号 192、配列番号 199 ～206、配列番号 219 ～220、配列番号 223 ～224、配列番号 227、配列番号 230、配列番号 232、配列番号 235 ～237、配列番号 239 ～240、配列番号 244 ～245、配列番号 252、配列番号 256、配列番号 258、配列番号 266 ～267、配列番号 269、配列番号 274 ～275、配列番号 278、配列番号 280、配

列番号 290～325、配列番号 327～328、配列番号 330 及び配列番号 332～335 のアミノ酸配列のいずれか 1 つにおいて 1～4 個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつ FGF R タンパク質への結合能を有する、請求項 1 に記載の環状ペプチド又はその塩。

- [請求項13] 他の物質で修飾されている、請求項 1 に記載の環状ペプチド又はその塩。
- [請求項14] 2 分子以上の請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。
- [請求項15] 2 分子の請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。
- [請求項16] 他の物質で修飾されている、請求項 14 に記載の環状ペプチド複合体又はその塩。
- [請求項17] 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。
- [請求項18] 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、精製用材料。
- [請求項19] 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、標識用材料。
- [請求項20] 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、細胞制御用材料。
- [請求項21] 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、集積用材料。
- [請求項22] 請求項 14 に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。
- [請求項23] 請求項 14 に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、精製用材

料。

[請求項24] 請求項 1 4 に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、標識用材料。

[請求項25] 請求項 1 4 に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、細胞制御用材料。

[請求項26] 請求項 1 4 に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、集積用材料。