

明 細 書

発明の名称：

VEGFR－2 アゴニスト活性を有するペプチド複合体

技術分野

[0001] 本発明は、VEGFR－2 アゴニスト活性を有する新しいペプチド複合体やそのペプチド複合体を含む細胞培養用組成物に関する。また、本発明は、VEGFR－2 アゴニスト活性に由来する細胞増殖能を有する新しいペプチド複合体やそのペプチド複合体を含む細胞培養用組成物に関する。

背景技術

[0002] 血管新生は、胚発生、卵胞発育および創傷治療を含む通常の生理学的プロセスにおいて重要であり、血管新生の主要なメディエーターとして、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が挙げられる。VEGFの受容体であるVEGFRは、受容体型チロシンキナーゼの一種であり、VEGFR－1 からVEGFR－3 の3種のタンパク質が存在する。特に、VEGFのVEGFR－2 への結合は、受容体の2量体化及びチロシン残基の自己リン酸化を誘導し、この自己リン酸化は、幾つかのシグナル伝達カスケードの活性化を誘発し、内皮細胞の分化、増殖及び遊走、血管透過性、及び血管新生が誘導される。

VEGFR－2 アゴニストを利用した、創傷治療、肝機能障害や肝臓疾患の治療、肝臓障害からの保護、腎臓疾患の治療に関する研究が報告されているが（特許文献1、2、3、4）、当該研究で用いられているVEGFR－2 アゴニストは、天然のVEGF又はその変異体であり、化学合成可能なVEGFR－2 アゴニストペプチドは報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特表2008－546707

特許文献2：特開2010－159266

特許文献3：特許5 1 1 1 7 2 9

特許文献4：特表2 0 0 9－5 4 1 2 0 7

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Rom J Morphol Embryol 2018、
59、455.

非特許文献2：Biomolecules 2020、10、1673.

非特許文献3：Biology Methods and Protocols、
2023、8、bpac034.

非特許文献4：Scientific Reports 2020、10、
17937.

非特許文献5：Scientific Reports 4：6716 doi：
10.1038/srep06716.

非特許文献6：Developmental Cell 2020、54、
516.

非特許文献7：Cell Reports 2018、23、1620.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

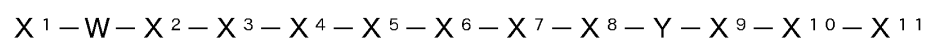
[0005] 本発明の一態様は、VEGFR－2アゴニスト活性を有する新しい化合物を提供する。また、本発明の一態様は、VEGFR－2アゴニスト活性に由来する細胞増殖能を有する新しい化合物をも提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 限定されるものではないが、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 第1のペプチドを含み、VEGFR－2アゴニスト活性を有するペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、



－C（配列番号1）で示されるアミノ酸配列を有するか、又は

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、

X¹は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり、

X²は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X³は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁵は、任意のアミノ酸であり、

X⁶は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は側鎖を有しないアミノ酸であり、

X⁷は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁹は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹¹は、任意のアミノ酸である、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[2] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X²は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X³は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環又は複素環で置換された鎖状アルキル基を有するアミノ酸である、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[3] [2] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X¹は、W、H c i t、4 P y 2 N H 2、3 P y 6 N H 2、F 4 a a o、又はW 7 Nであり、

X²は、V、T b g、C h g、又はH t yであり、

X³は、D、Q、又はM e t O 2であり、

X⁴は、V、T b g、a l T、又はC h gであり、

X⁵は、Q、A h p、W、H p h、C h a、F 4 C O O、又はKであり、

X⁶は、D、G、又はNであり、

X⁷は、D又はVであり、

X⁸は、L、N、又はA t bであり、

X⁹は、F、B p h、Y p h、F 4 G、又はF 4 Cであり、

X¹⁰は、V、H p h、H t y、C h g、又はH 4 P yであり、

X¹¹は、D、A、S、F、F 4 a a o、H a r、又はH y pである、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[4] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X²は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁶は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミ

ノ酸であり、

X⁷は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸である、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[5] [4] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X¹は、W又はW⁷Nであり、

X²は、V、T b g、又はC h gであり、

X³は、Dであり、

X⁴は、V又はa l Tであり、

X⁵は、A h p、C h a又はKであり、

X⁶は、D又はNであり、

X⁷は、Dであり、

X⁸は、L、N又はA t bであり、

X⁹は、F又はF⁴Gであり、

X¹⁰は、V、H t y又はC h gであり、

X¹¹は、D又はSである、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[6] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、

W-W-V-D-V-Q-D-D-L-Y-F-V-D-C（配列番号2）
）で示されるアミノ酸配列を有するか、又は
配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換

、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなる、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[7] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、C末端にグリシンが付加したアミノ酸配列を有する、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[8] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、配列番号3～51のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[9] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、環状ペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[10] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、N末端のアミノ酸残基がクロロアセチル化したアミノ酸残基であり、ペプチド内のシステイン残基を有し、前記N末端のアミノ酸残基と、前記システイン残基とが結合した環状ペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[11] [1] に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記ペプチド複合体は、前記第1のペプチドと第2のペプチドと、前記第1のペプチドと前記第2のペプチドを接続するリンカーとからなり、

前記第2のペプチドは、前記第1のペプチドと同一でも異なってもよく、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するか、又は

配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置

換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなる、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[12] [11]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記第1のペプチドと前記第2のペプチドの相同性が90%以上100%以下である、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[13] [11]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記第1のペプチドと前記第2のペプチドが同じ配列を有するペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[14] [11]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記第1のペプチドの6番目のアミノ酸と前記第2のペプチドの6番目のアミノ酸、又は前記第1のペプチドのC末端と前記第2のペプチドのC末端が前記リンカーを介して結合している、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[15] [11]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記リンカーがPEGリンカー、又はPEGリンカーに1～6個のアミノ酸が付加したリンカーである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[16] [1]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩と担体とを含む組成物。

[17] [1]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩と担体とを含み、細胞培養に用いられる細胞培養用組成物。

[18] [1]に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩と担体とを含み、医療用、診断用又は研究用に用いられる組成物。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、VEGFR-2アゴニスト活性を有する新しい化合物を提供できる。また、この発明は、さらに、VEGFR-2アゴニスト活性に由来する細胞増殖能を有する新しい化合物を提供できる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1A]図1は、本発明のペプチド複合体及びVEGF165aを用いた、Human Phospho-RTK Arrayアッセイ評価の結果を示す。図1Aは標的因子のアレイマップを示す。

[図1B]図1Bは、評価結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 非限定的に本発明は、以下の態様を含む。本明細書において他に断りがないう限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に開示された物質、材料および例は単なる例示であり、制限することを意図していない。本明細書において「一態様において」と言及する場合は、その態様に限定されない、即ち、非限定的であることを意味する。

[0010] この明細書の最初の発明は、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩に関する。このペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩は、第1のペプチドを含み、VEGFR-2アゴニスト活性を有する。また、このペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩は、VEGFR-2アゴニスト活性に由来する細胞増殖能を有する。その薬学的に許容される塩は、ペプチド複合体の薬学的に許容される塩を意味する。薬学的に許容される塩は、後述する通りである。以下、簡単のため、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩を単にペプチド複合体と表記する場合がある。

[0011] ペプチド複合体

一態様において、本発明のペプチド複合体は、第1のペプチドを含み、VEGFR-2アゴニスト活性を有する。また、一態様において、本発明のペプチド複合体は、VEGFR-2アゴニスト活性に由来する細胞増殖能を有する。

前記ペプチド複合体は、第1のペプチドとその他のペプチドや化合物を含むペプチド、ペプチド含有化合物、又はその薬学的に許容される塩である。前記ペプチド複合体は、第1のペプチドを1つ又は2つ以上（3つ以上又は4つ以上）含んでもよい。前記ペプチド複合体は、さらに第1のペプチドと

は異なる部分ペプチドを1又は2つ以上含んでもよい。前記ペプチド複合体は、第1のペプチドや部分ペプチドがリンカーを介して結合していることが好ましい。前記ペプチド複合体は、同一のアミノ酸配列を有するペプチドのみを含むホモマルチマーであってよい。前記ペプチド複合体は、異なるアミノ酸配列を有するペプチドを含むヘテロマルチマーであってよい。前記ペプチド複合体は、同じアミノ酸配列を有する第1のペプチドを2つ有し、2つの第1のペプチドがリンカーを介して結合するホモダイマーが好ましい。ホモダイマーにおいては、2つのペプチド部分が完全に同じアミノ酸配列を有していてもよいし、実質的に同じアミノ酸配列を有していてもよい。前記ペプチド複合体は、VEGFR-2アゴニスト活性を有するが、さらに、前記ペプチド複合体を構成する第1のペプチドや部分ペプチドが、VEGFR-2アゴニスト活性を有していてもよい。実施例に示された通り、第1のペプチドはリンカーを介したペプチド複合体構造をとることで、VEGFR-2アゴニスト活性を示す。

[0012] 一態様において、本発明のペプチド複合体は、第1のペプチドと、第2のペプチドと、第1のペプチドと第2のペプチドを接続するリンカーとからなるものであってもよい。この場合、第2のペプチドは、第1のペプチドと同一でも異なってもよく、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するか、又は配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなるものが好ましい。また、前記ペプチド複合体は、第1のペプチドと第2のペプチドの相同性が90%以上100%以下であるものが好ましく、第1のペプチドと第2のペプチドが実質的に同じなホモダイマーであるものがより好ましい。

[0013] 第1のペプチド

一態様において、前記第1のペプチドは、 $X^1-W-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-Y-X^9-X^{10}-X^{11}-C$ （配列番号1）で示されるアミノ酸配列を有するか、又は配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1～3個（1個、2個又は3個）のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入され

たアミノ酸配列からなる。置換されたアミノ酸には、アミノ酸の薬学的に許容される塩が含まれる。配列番号1で示されるアミノ酸配列において、アミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなる配列を有するペプチドの好ましい例は、保存的アミノ酸置換がなされたアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0014] 保存的アミノ酸置換

特定の配列から、1個、2個又は3個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加又は挿入される場合、保存的アミノ酸置換がなされることが好ましい。「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、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。

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（レーニンジャ、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁：L. Lehninger、Biochemistry、2nd edition、pp73～75、Worth Publisher、New York（1975））および典型的置換を含む。

[0015] 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。

疎水性（非極性ともいう）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。

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。

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、I l e、L e uを含む。

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、I l e、L e uを含む。

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。

親水性（極性ともいう）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。

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。

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。

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。

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。

[0016] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のアミノ酸がN-アルキル化されたN-アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級(例えば、C1-C5の、好ましくは、C1-C3、より好ましくはC1)のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。N-アルキルアミノ酸においては、好ましくはN-エチルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸又はN-メチルアミノ酸であり、さらに好ましくはN-メチルアミノ酸である。また、非天然のアミノ酸には、D型アミノ酸(D-アミノ酸とも記する)、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸(例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基や

アルキル基のC数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

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は側鎖にピペリジル基が付加されたアラニンであるが、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、塩基性という極性を示す。

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できる。例えば、塩基性アミノ酸に属するアルギニンのN-メチル化アミノ酸である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。

非限定的に、非天然のアミノ酸には、N-メチルアミノ酸、4 P y、a l T、C i t、P 4 S h、F 4 C O N、F 4 C O O、3 P y、H y P、S M e、A 4 p a a、A t p、H g l、K A c、N a l 1、W 6 N、W 7 N、P e G等を含む。なお、N-メチルアミノ酸については、N-アルキルアミノ酸として分類することもでき、N-メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0017] ペプチド長

一態様において、前記第1のペプチドは、例えば、配列番号2～51に記載されるアミノ酸配列、またはそれらアミノ酸配列の1～14番目のアミノ酸配列に加えて、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が、総アミノ酸残基（環状構造を成すペプチドに含まれるアミノ酸残基数をい

い、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されている場合は、それらのアミノ酸は含めない）が、20残基以内であることが好ましい。好ましいペプチド長は、アミノ酸残基が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残基が19以下、18以下、である。更に好ましいペプチド長は、アミノ酸残基が13以上16以下であり、最も好ましくはアミノ酸が14又は15である。

[0018] 前記第1のペプチドの好ましい例は、配列番号1 ($X^1-W-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-Y-X^9-X^{10}-X^{11}-C$) で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、

X^1 は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり、

X^2 は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X^3 は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^4 は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X^5 は、任意のアミノ酸であり、

X^6 は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は側鎖を有しないアミノ酸であり、

X^7 は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^8 は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^9 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり、

X^{10} は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X^{11} は、任意のアミノ酸である。

[0019] また、前記第1のペプチドの好ましい例は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、

X²は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X³は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環又は複素環で置換された鎖状アルキル基を有するアミノ酸である。

[0020] また、前記第1のペプチドの好ましい例は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、

X¹は、W、H c i t、4 P y 2 N H 2、3 P y 6 N H 2、F 4 a a o、又はW 7 Nであり、

X²は、V、T b g、C h g、又はH t yであり、

X³は、D、Q、又はM e t O 2であり、

X⁴は、V、T b g、a l T、又はC h gであり、

X⁵は、Q、A h p、W、H p h、C h a、F 4 C O O、又はKであり、

X⁶は、D、G、又はNであり、

X⁷は、D又はVであり、

X⁸は、L、N、又はA t bであり、

X⁹は、F、B p h、Y p h、F 4 G、又はF 4 Cであり、

X¹⁰は、V、H p h、H t y、C h g、又はH 4 P yであり、

X¹¹は、D、A、S、F、F 4 a a o、H a r、又はH y pである。

[0021] また、前記第1のペプチドの好ましい例は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、

X²は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁶は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸である。これらのペプチドを有する複合体は、実施例により VEGFR-2 アゴニスト活性を有するとともに、細胞増殖能を有することが示されている。

[0022] また、前記第1のペプチドの好ましい例は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、

X¹は、W又はW7Nであり、

X²は、V、Tbg、又はChgであり、

X³は、Dであり、

X⁴は、V又はaITであり、

X⁵は、Ahp、Cha又はKであり、

X⁶は、D又はNであり、

X⁷は、Dであり、

X⁸は、L、N又はAtbであり、

X⁹は、F又はF4Gであり、

X¹⁰は、V、Hty又はChgであり、

X¹¹は、D又はSである。

[0023] 本明細書において、「置換されていてもよい」とは、無置換であるか、又は任意の数の任意の置換基で置換されていることを意味する。

[0024] 側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸

「側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸、例えば、非限定的に、アラニン、プロリン、イソロイシン、ロイシン、バリン等であって、前記アルキル基は、鎖状でも環状でも良く、前記側鎖にアルキル基を有するアミノ酸の側鎖が、さらにアルキル基、芳香環、複素環、水酸基等の置換基で置換されているか、又は無置換であるアミノ酸を意味する。

[0025] 側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸

「側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸、例えば、非限定的に、アラニン、イソロイシン、ロイシン、バリン等であって前記側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸の側鎖が、さらにアルキル基、極性基等の置換基、例えば、非限定的に、カルボキシ基、アミド基、メタンスルホニル基等で置換されているか、又は無置換であるアミノ酸を意味する。

[0026] 側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸

「側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖に前記鎖状アルキル基を有するアミノ酸であって、前記鎖状アルキル基を有するアミノ酸の側鎖が、さらに極性基、例えば、非限定的に、ウレア基、アミノ基、カルボキシ基、アミド基、水酸基、メタンスルホニル基等で置換されているか、又は極性基で置換されていないアミノ酸を意味するが、好ましくは前者である。

[0027] 側鎖を有しないアミノ酸

「側鎖を有しないアミノ酸」とは、グリシン、又はグリシン誘導体を意味する。

[0028] 側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するアミノ酸

「側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するアミノ酸」は、側鎖に前記アルキル基を有するアミノ酸であって、前記アルキル基は、鎖状でも環状でもよい。

[0029] 側鎖に芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸
「側鎖に芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸」
とは、側鎖に前記鎖状アルキル基を有するアミノ酸であって、前記側鎖に鎖
状アルキル基を有するアミノ酸の側鎖が、さらに芳香環で置換されているか
、又は芳香環で置換されていないアミノ酸を意味するが、好ましくは前者で
ある。

[0030] 側鎖に分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸
「側鎖に分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸」は、側鎖に
前記鎖状アルキル基を有するアミノ酸であって、これらのアミノ酸の側鎖が
、さらに分岐していてもよい。前記側鎖に分岐していてもよい鎖状アルキル
基を有するアミノ酸は、好ましくは、分岐した鎖状アルキル基を有するアミ
ノ酸である。

[0031] 側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸
「側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸」とは、側鎖に芳香
環を有するアミノ酸であって、前記芳香環を構成する炭素原子や前記芳香環
に結合した官能基が置換されているか、又は置換されていないアミノ酸を意
味し、前者が好ましい。前記側鎖に置換されていてもよい芳香環は、例えば
ベンゼン環、インドール環やナフタレン環等の縮環構造を有し、その一部の
CなどがNなど他の分子へ置換されたものであってよい。前記芳香環は複素
環であってもよい。また、前記側鎖に置換されていてもよい芳香環を有する
アミノ酸は、例えば、チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されてい
るようなアミノ酸であってもよい。置換される官能基の種類や位置は特に限
定されず、アルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、水酸基、ハロゲン
等任意に選択できる。前記側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミ
ノ酸は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニ
ン等を含む。また、前記側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ
酸は、非天然型アミノ酸であってもよく、例えば、4 P y 2 N H 2、3 P y
6 N H 2、F 4 a a o、W 7 N、B p h、Y p h、F 4 G、F 4 C等であっ

てもよい。

[0032] 側鎖に芳香環又は複素環で置換された鎖状アルキル基を有するアミノ酸「側鎖に芳香環又は複素環で置換された鎖状アルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖に前記鎖状アルキル基を有するアミノ酸であって、これらのアミノ酸の側鎖が、さらに芳香環や複素環で置換されているアミノ酸を意味する。

[0033] また、前記第1のペプチドの好ましい例は、W-W-V-D-V-Q-D-D-L-Y-F-V-D-C（配列番号2）で示されるアミノ酸配列を有するか、又は配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなるペプチドである。アミノ酸が置換又は欠失される場合、そのアミノ酸の位置は、配列番号2における、アミノ酸配列の1番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、11番目、12番目及び13番目のいずれかであることが好ましい。

[0034] 前記第1のペプチドの好ましい例は、C末端にさらにグリシンが付加したアミノ酸配列を有するペプチドである。また、配列番号14～35および配列番号37～51のペプチドにおいて、15番目のグリシンのC末端のカルボン酸は、アミドに変換されていることが好ましい。

[0035] 前記第1のペプチドの好ましい例は、前記第1のペプチドが、配列番号2～51のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその薬学的に許容される塩である。薬学的に許容される塩の例は、無機酸塩、有機酸塩、無機塩基塩、有機塩基塩、酸性または塩基性アミノ酸塩である。無機酸塩の例は、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩である。有機酸塩の例は、酢酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、ステアリン酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、及びp-トルエンスルホン酸塩である。無機塩基塩の例は、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、及びアンモニウム塩である。有機塩基塩

の例は、ジエチルアミン塩、ジエタノールアミン塩、メグルミン塩、及びN、N'-ジベンジルエチレンジアミン塩である。酸性アミノ酸塩の例は、アスパラギン酸塩、及びグルタミン酸塩である。塩基性アミノ酸塩の例は、アルギニン塩、リジン塩、及びオルニチン塩である。前記第1のペプチド及び前記ペプチド複合体は、薬学的に許容される塩や溶媒和物であってもよい。溶媒和物の例は、水和物である。

[0036] 前記第1のペプチドの好ましい例は、環状ペプチドである。前記第1のペプチドの好ましい例は、N末端のアミノ酸残基がクロロアセチル化したアミノ酸残基であり、ペプチド内にシステイン残基を有し、前記N末端のアミノ酸残基と、前記システイン残基とが結合した環状ペプチドである。

[0037] 環状ペプチド

本明細書において、環状ペプチドとは、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。なお、本明細書においては、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や、ラッセペプチド状構造を有するもの等をも包含される。すなわち、本明細書において環状ペプチドは、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。

[0038] 本明細書において、ペプチドの環化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。本明細書におけるペプチドは、そのような一部の改変がなされたアミノ酸を含むペプチドも包含する。環化のための改変の例として、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環化するような場合がある。クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸を含むペプチドも本明細書におけるペプチドに包含される。

[0039] 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、ペプチドを環化させるという方法がとられてきた。ペプチドを環化すると、

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。

[0040] 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。これに限られるものではないが、例えば、ペプチドに2個以上のシステイン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Gotoらの方法(Y. Goto, et al., ACS Chem. Biol., 3, 120-129 (2008))に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、N末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中にシステイン残基を配置しておくことによっても環化できる。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、結合して環状構造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化してもよい。あるいは、N末端にシクロアミドを有するペプチドを合成し、ペプチド中にL-2-アミノアジピン酸残基を配置し、それらの間で結合することによって、環化してもよい。このように、公知の環化方法であれば、特に制限されず用いることができる。

[0041] リンカー

一態様において、前記第1のペプチドや前記部分ペプチドは、リンカーが付加されていてもよい。前記リンカーは、前記ペプチド複合体において複数のペプチドを互いにつなぐ構造体であってもよい。前記リンカーとしては、例えば、アミノ酸リンカー(ペプチドリンカー)、化学リンカー、脂肪酸リンカー、核酸リンカー、及び糖鎖リンカーが挙げられ、また、例えば化学リンカーとペプチドリンカーなどの複合体であってもよい。化学リンカーの例は、PEG(Polyethyleneglycol)リンカーである。PEGリンカーは、1~36個のエチレングリコール単位からなるリンカーであってよい。また、前記リンカーは、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 号に記載のセリンーリッチペプチドリンカーを用いることができる。非限定的に、リンカーの付加によりペプチドの物性（例えば溶解度）が変化する場合がある。さらに、前記リンカーは、上記のリンカーの組合せであってよい。例えば、アミノ酸リンカーとして $Gly-Lys$ が結合し、さらに当該 Lys の側鎖末端に PEG リンカーが結合した形であってよい。また、リンカーは、PEG-アミノ酸-PEG のように、アミノ酸と PEG が交互に結合する構造をとっていてもよい。ここで、PEG は PEG リンカーを意味する。リンカーの別の例は、PEG リンカー部分に 1～6 個のアミノ酸が付加したリンカーである。このリンカーは、PEG リンカー部分の片方の端部にアミノ酸が付加した構造を有するものでもよいし、PEG リンカー部分の両端にアミノ酸が付加した構造を有するものであってもよい。PEG 部分に付加するアミノ酸の好ましい例は、K (Lys) であるものの、K に限定されず、他のアミノ酸であってもよい。リンカーの好ましい例は、表 3 に示される構造を有するリンカーである。

リンカーの付加位置については、ペプチドのどこに付加されていてもよい。例えば、ペプチドの C 末端に位置しており、1 番目のアミノ酸と結合し環状構造を形成する Cys 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よい。限定するものではないが、前記リンカーは、C 末端に位置する Cys 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ことが好ましい。さらに好ましくは、前記リンカーは、C 末端に位置する Cys に結合しているか、環状ペプチドに含まれる 6 番目のアミノ酸の側鎖に結合している。

なお、例えば配列番号 2～51 に表されるアミノ酸配列において、15 番

目のGlyをリンカーとみなすこともできる。非限定的に、例えば、配列番号2～51に表されるアミノ酸配列の1番目のアミノ酸が14番目のアミノ酸であるCysと結合した環状ペプチドであって、14番目のCysにさらにグリシンが付加された環状ペプチド構造体が2つ、当該付加されたグリシンから表2に表される構造を介してダイマー構造を取っている場合においては、リンカー構造は、表2に表される構造ということもでき、またグリシンに表2に表される構造が結合した構造とみなすこともできる。ダイマーは、第1のペプチドの6番目のアミノ酸と第2のペプチドの6番目のアミノ酸がリンカーを介して結合しているものや、第1のペプチドのC末端と第2のペプチドのC末端がリンカーを介して結合しているものであってもよい。これらの中では、前者が好ましい。

[0042] VEGFR-2

VEGFR-2は、KDR (kinase insert domain receptor) 又は、Flk-1 (fetal liver kinase 1) とも称される、チロシンキナーゼレセプターファミリーの一種である。VEGFR-2は、血管内皮細胞やリンパ管に多く発現し、リガンドであるVEGFの中で、VEGF-AおよびVEGF-Eに対して、より高い親和性を有し、VEGF-CおよびVEGF-Dに対しては、低い親和性を有する。(非特許文献1)

VEGFR-2は、他のチロシンキナーゼレセプターと同様に細胞内にチロシンキナーゼドメインを有し、VEGFがVEGFR-2の細胞外領域に結合すると、チロシン残基の自己リン酸化が起こり、幾つかのシグナルの活性化およびメカニズムにより、脈管形成や非病理的または病理的な血管新生が誘導される。(非特許文献1)

一方、VEGF-Aは、血管新生に重要なリガンドであり、脈管形成や血管新生において、重要な役割を果たしている。VEGF-Aは、VEGFR-1およびVEGFR-2に結合する。VEGFR-2に対するVEGF-Aの結合親和性は、VEGFR-1に対するVEGF-Aの結合親和性より

も低いが、VEGFR-2のチロシンキナーゼ活性は、VEGFR-1のチロシンキナーゼ活性よりも高い。従って、総合的に考慮すると、VEGFR-2は、VEGF-Aの結合における主要なシグナル伝達因子受容体であると考えられている。（非特許文献1、2）

[0043] VEGFR-2 アゴニスト活性

一態様において、本発明のペプチド複合体は、好ましくは、VEGFR-2 アゴニスト活性を有する。

VEGFR-2 アゴニスト活性とは、天然に存在するVEGFR-2 アゴニストであるVEGFが、VEGFR-2 に及ぼす効果に類似する効果をもたらす能力をいう。また、具体的には、VEGFR-2 特異的にVEGFR-2 の2量体化およびシグナル伝達経路を活性化する能力をいう。

「VEGFR-2 アゴニスト活性」は、例えば、標的タンパク質としてVEGFR-2を用いたキナーゼアッセイ系等によって評価してもよい。例えば、非限定的に、VEGFR-2やERKのリン酸化を検出するAlphaLISAアッセイやNFATアッセイなどにより評価することができる。非限定的に、例えば、AlphaLISA（登録商標）SureFire（登録商標）Ultra VEGFR-2（p-Tyr1175）Assay Kit（PerkinElmer社）、AlphaLISA（登録商標）SureFire（登録商標）Ultra p-ERK1/2（T202/Y204）kit（PerkinElmer社）、VEGFR2/NFAT Reporter-HEK293 Recombinant Cell line（BPS Bioscience社）やVEGF Bioassayキット（Promega社）などを用いた評価が挙げられる。いずれの評価系であっても、標準の手順に従い、最適条件において最適濃度のペプチドまたはペプチド複合体を使用した場合にVEGFR-2 アゴニスト活性を検出できるときに、前記ペプチドまたはペプチド複合体はVEGFR-2 アゴニスト活性を有するという。非限定的に、EC50をもってペプチドのアゴニスト活性を示すことができる。

[0044] 核酸

この明細書は、第1のペプチドや、ペプチド複合体をコードする核酸をも記載する。本明細書において「核酸」は、天然であっても非天然であってもよく、DNA、RNA、及びこれらのキメラを含むが、これらに限定されない。この核酸は、前記第1のペプチドや、前記ペプチド複合体の配列を基に公知の方法で設計し、製造できる。

[0045] ペプチドドラッグコンジュゲート（PDC）

一態様において、本発明は、本発明のペプチド又はペプチド複合体と、VEGFR-2に送達したい所望の物質と、前記ペプチド又はペプチド複合体と前記物質を結合するためのリンカーとを含む複合体（ペプチドドラッグコンジュゲート）に関する。前記ペプチド複合体は、VEGFR-2アゴニスト活性を有することから、VEGFR-2に結合すると考えられる。従って、前記ペプチド又はペプチド複合体は、物質をVEGFR-2に送達することが可能である。

前記物質はVEGFR-2に送達することを希望する物質であれば、当業者の希望する何らの物質であってよい。前記物質の例としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：

化合物：低分子化合物、中分子化合物であってよく、例えば公知の低分子薬剤が挙げられる。

ペプチド：体内の標的に結合して何らかの効果を示すペプチドであってよく、例えば環状ペプチドであってよい。

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

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

核酸：DNA、RNA、これらのキメラであってよく、特に限定されない。例えば、核酸医薬品が挙げられる。

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

また、VEGFR-2に送達することを希望する物質は、上記に挙げた物質の複合体であってよい。

[0046] 組成物

一態様において、本発明は、前記ペプチド複合体と担体とを含む組成物に関する。前記担体の例は、滅菌水、純水、蒸留水などの水；生理食塩水；ブドウ糖溶液；エタノールなどのアルコール；グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのポリアルコール；滅菌有機溶媒；又は水性デンプン；PBSのいずれか1種又は2種以上の混合物である。

[0047] 細胞培養用組成物

一態様として、本発明は、細胞培養用組成物に関する。前記細胞培養用組成物は、細胞培養に用いられる組成物である。前記ペプチド複合体は、VEGFR-2アゴニスト活性を有するため、細胞培養のための培地用試薬、添加剤、好ましくは哺乳類細胞、さらに好ましくはヒト細胞の培養のための培地用試薬、添加剤としても利用されうる。前記細胞培養のための培地用試薬、添加剤は、細胞培養肉の生産のために細胞を培養するための培地用試薬、添加剤であってよい。

また、前記ペプチド複合体は、肝疾患の治療に用いる肝臓オルガノイドを作製するための培地への試薬又は添加剤としても使用し得る。前記肝臓オルガノイドは、非限定的に、多能性幹細胞から誘導された肝内胚葉細胞や血管内皮細胞、間葉系細胞の共培養によって創出される。前記ペプチド複合体は、血管内皮細胞への分化誘導系に使用し得るが（非特許文献3、4）、これに限定されるものではない。天然に存在するVEGFR-2アゴニストであるVEGFは、多能性幹細胞から血管内皮細胞や血管壁細胞へと分化誘導し、心筋細胞や腸管上皮細胞、膵島などと共培養することで、高次構造の形成やオルガノイドの樹立・維持に寄与する（非特許文献5、6、7）。

このように V E G F が組織創出における基盤的な役割を果たしている分子であることから、前記ペプチド複合体は、上記のような様々な細胞を作製するための試薬又は添加剤として利用され得る。

[0048] 前記培地は、細胞又は組織を培養するための培地であれば特に限定はされない。前記培地は、血清培地であってよく、好ましくは無血清培地や低血清培地である。

一態様において、前記培養用培地添加物は、溶液の形態であっても、乾燥した固体（例えば、固形状、粉末状等）の形態であってもよい。溶液の形態である場合には、そのまま培養用の培地として用いてもよいし、溶媒で希釈し、必要に応じて上述した添加剤を加えたものを、培養用の培地として用いてもよい。希釈する際に用いる溶媒としては、例えば、水、緩衝液、生理食塩水、各種細胞や組織培養に用いられる培地等が挙げられ、これらは単独で用いても、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

前記培養用培地添加物が乾燥した固体の形態である場合には、例えば、水、緩衝液、生理食塩水、各種細胞や組織培養に用いられる培地等の溶媒に溶解し、必要に応じて上述した添加剤を加えたものを、培養用の培地として用いてもよい。

前記細胞又は組織を培養するための培地中、又はこれから得られた細胞用の培地中の本発明のペプチド複合体の含有量は、例えば、組成物全量又は培地全量に対して、最終濃度として、約 0.01～約 10000 nmol/L、好ましくは約 0.1～約 1000 nmol/L、より好ましくは約 0.5～約 1000 nmol/L、更に好ましくは約 1～約 100 nmol/L であり得る。

[0049] 医療用組成物

一態様において、本発明は、医療用組成物に関する。前記医療用組成物は、一態様として、本発明のペプチド複合体、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物（簡単のため、以下ではこれらを単にペプチドとも表記する）を含む。前記医療用組成物は、前記ペプチド複合体を有効成分として有効量含む

ものが好ましい。

前記医療用組成物の対象となる疾患は、VEGFR-2の発現または活性の増加または減少によって引き起こされる、それによって悪化する、またはそれ以外でそれに関連するあらゆる疾患、又はVEGFシグナル伝達、若しくはVEGFR-2を介して活性化される他のあらゆる細胞内シグナル伝達カスケードの減少によって引き起こされる、それによって悪化する、若しくはそれ以外でそれに関連するあらゆる障害を指す。

創傷の例としては、慢性創傷、急性創傷、通常の創傷が挙げられる。慢性創傷は、治癒しない創傷を指し、例えば、動脈の潰瘍、糖尿病性潰瘍、褥瘡、静脈潰瘍などが含まれるが、これに限定されるものではない。急性創傷は慢性創傷に発達しうる。急性創傷には、例えば、熱障害、外傷、手術、広範囲な皮膚癌の切除、深在性真菌及び細菌の感染、血管炎、強皮症、ペンフィグス、中毒性上皮性表皮壊死症などによって生じる創傷が含まれるが、これに限定されるものではない。通常の創傷は、通常の創傷治癒修復を経る創傷を指す。

肝機能障害や肝臓疾患の病理状態は、構造上及び／又は機能的なあらゆる肝臓の異常に関係し、例えば、肝不全、肝炎、肝硬変、中毒性肝臓障害、薬物性肝臓障害、肝性脳症、肝性昏睡、肝性壊死が含まれるが、これに限定されるものではない。肝臓障害からの保護は、内的又は外的因子（例えば、化学薬剤や生物薬剤等）、あるいはその組み合わせから直接的又は間接的に生じる構造上又は機能的な肝臓損傷から保護することを指す。

腎臓疾患には、例えば、炎症性腎臓病、腎炎、糸球体硬化症、糸球体腎炎、巣状分節状糸球体硬化症などを含むが、これに限定されるものではない。また、腎臓疾患を引き起こす感染症も含む。

[0050] 前記医療用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。非経口的投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膣、経直腸）投与等が挙げられる。

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

[0051] 前記医療用組成物は、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。

前記製剤化は、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。

[0052] 前記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、トレハロース、ポリソルベート等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0053] 前記吸収促進剤は、難吸収性薬物の吸収を改善するために使用することができる。前記吸収促進剤として、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てもよい。

[0054] 前記丸剤又は錠剤は、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆することもできる。前記注射剤は、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むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えることができる。

[0055] 一態様として、本発明の医療用組成物は、前記疾患に有用な他の医薬や治療法と併用投与してもよい。

[0056] 本発明の医療用組成物を哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル、ブタ、ヒツジ等）、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、特に限定されないが、例えば、 $30\mu\text{g} \sim 1000\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ 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。

[0057] 診断用組成物

一態様として、本発明は、診断用組成物に関する。前記ペプチド複合体は、VEGFR-2 アゴニスト活性を有することから、VEGFR-2 に結合すると考えられる。従って、VEGFR-2 を検出する診断薬としても使用し得る。前記診断薬としては、VEGFR-2 の発現量を検出する検出薬であってよく、検出薬として用いる場合は、本発明のペプチド複合体は、検出可能に標識してもよい。このようにして、前記ペプチド複合体又はそれらを含む組成物は、VEGFR-2 を検出する診断薬として利用できる。

[0058] 研究用組成物

一態様として、本発明は、研究用組成物に関する。前記ペプチド複合体は、VEGFR-2 アゴニスト活性を有することから、VEGFR-2 に結合すると考えられる。従って、VEGFR-2 が関与する研究に好ましく用いることができる。

[0059] 一態様として、本発明は、ペプチド、及び／又はペプチドとリンカーの結合体にさらに結合した物質とを含む複合体について、

- a) 溶媒への溶解度、
- b) VEGFR-2 との結合能、
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、
- d) 実験動物への毒性、

の少なくとも1つを試験するペプチド及び／又は複合体の試験方法であって、

前記ペプチドは、本発明のペプチドが有するアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸残基を、欠失、置換、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列を有するペプチドである、前記方法を提供する。

[0060] 前記試験方法について、ペプチド及び／又は複合体の、溶媒への溶解度の試験は、溶解度の測定であってよい。溶解度の測定にあたっては、溶媒は限定されるものではなく、目的に応じて自由に選択してよい。また、溶解度の測定方法に関しては、溶媒の種類に応じて、公知の方法を適切に選択することができる。

VEGFR-2との結合能の試験は、VEGFR-2との結合能の測定であってよく、限定されるものではないが、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法など、公知の方法を好ましく使用することができる。

細胞及び／又は組織への毒性の試験は、細胞及び／又は組織を用いた公知の毒性評価試験であってよく、例えば、*in vitro*で実施する方法であってよい。細胞や組織は、医薬品について通常、毒性評価試験を行う細胞及び／又は組織であってよく、限定されるものではない。

実験動物の毒性の試験方法は、実験動物を使用した公知の毒性評価試験であってよい。実験動物について、通常使用されているものであれば特に限定されないが、例として、マウス、ラット、モルモット、スナネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウマ、ウシ、鳥類（例えば、ニワトリ、ウズラなど）、サル、ヒトを除く霊長類（例えば、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルなど）などが挙げられる。上記の毒性評価試験は、限定されるものではないが、医薬品の非臨床試験において通常行われる安全性に関する試験であってよく、例として、一般毒性試験（単回投与毒性試験／反復投与毒性試験）、遺伝毒性試験（Ames試験／染色体異常試験／*in vitro*小核試験）、がん原性試験、生殖発生毒性試験（ICH-I、II、III）、局所刺激性試験（眼刺激性試験、皮膚刺激性試験等）、その他の毒性試験（皮膚感作性試験、光毒性試験、抗原性試験）、化学分析・生体分析（TK／PK）などが挙げられる。

[0061] 略語（一般）

オングストローム（単位）としてÅ；

ウシ血清アルブミンとしてBSA；

tert-ブトキシカルボニル基としてBoc；

クロロアセチルとしてClAc；

（2，5-ジオキソピロリジン-1-イル）2-クロロアセテートとしてCl

AcOSu ;

ジクロロメタン又は塩化メチレンとしてDCM ;

N, N' -ジイソプロピルカルボジイミドとしてDIPCI ;

N, N-ジイソプロピルエチルアミンとしてDIEA又はDIEA ;

ジメチルスルホキシドとしてDMSO ;

N, N-ジメチルホルムアミドとしてDMF ;

3, 6-ジオキサー1, 8-オクタンジチオールとしてDODT ;

ダルベッコ改変イーグル培地としてDMEM ;

50%効果濃度としてEC50 ;

ウシ胎児血清としてFBS ;

9-フルオレニルメチルオキシカルボニルとしてFmoc ;

N², N⁶-ビス (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) -L-リシンとしてFmoc-Lys (Fmoc) -OH ;

グラム (単位) としてg ;

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としてHATU ;

高速液体クロマトグラフィーとしてHPLC ;

液体クロマトグラフィー質量分析計としてLC-MSもしくはLC/MS ;

モラー (単位) としてM ;

アセトニトリルとしてMeCN ;

ミリグラム (単位) としてmg ;

分 (単位) としてmin ;

ミリリットル (単位) としてmL ;

ミリモラー (単位) としてmM ;

ミリメートル (単位) としてmm ;

O-3-メチル-ペント-3-イル基としてMpe基

N-ヒドロキシコハク酸イミドとしてNHS ;

ナノメートル (単位) としてnm ;

マイクロリットル（単位）として μL ；
オキシスクシンイミドとして OSu ；
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
基として Pbf ；
ポリエチレングリコールとして PEG ；
回転毎分（単位）として rpm ；
ジベンゾスベリル基として Sub
 tert -ブチル基として tBu ；
酢酸トリエチルアミンとして TEAA ；
トリフルオロ酢酸として TFA ；
トリイソプロピルシランとして TIS ；
トリチル基として Trt または Tr ；

[0062] 略語（非天然アミノ酸）

Ahp (S)-2-アミノヘプタン酸（CAS番号：44902-02-5）
 aIT アロースレオニン（CAS番号：28954-12-3）
 Atb (S)-2-アミノ-4, 4-ジメチルペンタン酸（CAS番号：57224-50-7）
 Atp (2S)-2-アミノ-3-（オキサ-4-イル）プロパン酸（CAS番号：1344910-91-3）
 Bph (S)-3-（[1, 1'-ビフェニル]-4-イル）-2-アミノプロパン酸（CAS番号：155760-02-4）
 Cha (S)-2-アミノ-3-シクロヘキシルプロパン酸（CAS番号：27527-05-5）
 Chg (S)-2-アミノ-2-シクロヘキシル酢酸（CAS番号：14328-51-9）
 Cit L-シトルリン（CAS番号：372-75-8）
 cPEG9c 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28-ノナ

オキサヘントリアコンタンジオイック酸 (CAS 番号 : 1 2 6 8 4 8 8 - 7 0 - 5)

c P E G 1 3 c 4, 7, 1 0, 1 3, 1 6, 1 9, 2 2, 2 5, 2 8, 3 1, 3 4, 3 7, 4 0 - トリデカオキサトリテトラコンタンジオイック酸 (CAS 番号 : 2 2 2 5 9 0 3 - 6 6 - 0)

c P E G 1 7 c 4, 7, 1 0, 1 3, 1 6, 1 9, 2 2, 2 5, 2 8, 3 1, 3 4, 3 7, 4 0, 4 3, 4 6, 4 9, 5 2 - ヘプタデカオキサペンタペンタコンタンジオイック酸 (CAS 番号 : 2 2 2 6 8 9 7 - 7 4 - 9)

F 4 a a o (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - (カルボキシメトキシ) フェニル) プロパン酸 (CAS 番号 : 2 4 5 5 8 - 6 3 - 2)

F 4 c (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - クロロフェニル) プロパン酸 (CAS 番号 : 1 4 1 7 3 - 3 9 - 8)

F 4 C O O 4 - カルボキシル - L - フェニルアラニン (CAS 番号 : 1 2 6 1 0 9 - 4 2 - 0)

F 4 G (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - グアニジノフェニル) プロパン酸 (CAS 番号 : 5 9 5 7 4 - 1 1 - 7)

H 4 P y (S) - 2 - アミノ - 4 - (ピリジン - 4 - イル) ブタン酸 (CAS 番号 : 1 2 4 0 5 8 8 - 6 2 - 8)

H a r N 6 - カルバムイミドイル - L - リシン (CAS 番号 : 1 5 6 - 8 6 - 5)

H c i t N 6 - カルバモイル - L - リシン (CAS 番号 : 1 1 9 0 - 4 9 - 4)

H g l L - 2 - アミノアジピン酸 (CAS 番号 : 1 1 1 8 - 9 0 - 7)

H p h (S) - 2 - アミノ - 4 - フェニル b u t a n o i c a c i d (CAS 番号 : 9 4 3 - 7 3 - 7)

H t y ホモ - L - チロシン (CAS 番号 : 2 2 1 2 4 3 - 0 1 - 2)

H y p ヒドロキシプロリン (CAS 番号 : 5 1 - 3 5 - 4)

M e t O 2 (S) - 2 - アミノ - 4 - (メチルスルホニル) ブタン酸 (C

AS番号：7314-32-1)

NHS-cPEG9c-NHS ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)4,7,10,13,16,19,22,25,28-ノナオキサヘントリアコンタンジオエート(CAS番号:1008402-79-6)

NHS-cPEG13c-NHS ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-トリデカオキサトリテトラコンタンジオエート(Bis-PEG13-NHS ester CAS番号:2221949-00-2)

NHS-cPEG17c-NHS ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52-ヘプタデカオキサペンタペンタコンタンジオエート(Bis-PEG17-NHS ester CAS番号:2221948-93-0)

NHS-OCOPEG13OCO-NHS ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)(3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-ウンデカオキサペンタトリアコンタン-1,35-ジイル)ビスカーボネート(TS-L12-TS 日油株式会社)

NHS-OCOPEG17OCO-NHS ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)(3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-ペンタデカオキサヘプタテトラコンタン-1,47-ジイル)ビスカーボネート(TS-L16-TS 日油株式会社)

OCOPEG13OCO 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-ウンデカオキサペンタトリアコンタン-1,35-ジイル
ビス(ハイドロゲン カーボネート)(日油株式会社)

OCOPEG17OCO 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-ペンタデカオキサヘプタテトラコンタン-1,47-ジイル ビス(ハイドロゲン カーボネート)(日油株式会社)

株式会社)

PEG8c 1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサヘプタコサン-27-オイック酸 (CAS番号: 756526-04-2)

PEG12c 1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36-ドデカオキサノナトリアコンタン-39-オイック酸 (CAS番号: 1415408-69-3)

3Py6NH2 (S)-2-アミノ-3-(6-アミノピリジン-3-イル)プロパン酸 (CAS番号: 1269968-61-7)

4Py2NH2 (S)-2-アミノ-3-(2-アミノピリジン-4-イル)プロパン酸 (CAS番号: 1269969-46-1)

Tbg (S)-2-アミノ-3, 3-ジメチルブタン酸 (CAS番号: 20859-02-3)

W7N (S)-2-アミノ-3-(1H-ピロロ[2, 3-b]ピリジン-3-イル)プロパン酸 (CAS番号: 49758-35-2)

Yph (S)-2-アミノ-3-(4-フェノキシフェニル)プロパン酸 (CAS番号: 150351-64-7)

実施例

[0063] 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。

[0064] 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。

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Biotage社のSyro I、Biotage社のSyro II、CEM社のLiberty Blue、CEM社のLiberty Blue HT12、又はCEM社のLiberty Primeを使用し、製造元のマニュアルに従って行った。

使用した樹脂は、NovaPEG Rink Amide resin、又はSeiber Amide resinを用い、使用した量は各ペプチドに応じて5mg-2gの範囲であった。

側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しに用いる反応剤カクテルは、各ペプチドに応じて4mL-50mLであり、以下の組成の溶液を用いた。
A : TFA/H₂O/TIS/DODT (92.5/2.5/2.5/2.5)

B : TFA/H₂O/TIS/DODT (90/2.5/2.5/5)

使用した一般的なアミノ酸を下記に列挙し、側鎖保護基はカッコ内に示した。

表1. 実施例において使用した一般的なアミノ酸

[0065]

[表1-1]

Fmoc アミノ酸	CAS 番号
Fmoc-3Py6NH2(Boc)-OH	2699074-67-2
Fmoc-4Py2NH2(Boc)-OH	2640471-43-6
Fmoc-Ahp-OH	1197020-22-6
Fmoc-Ala-OH	35661-39-3
Fmoc-alT(tBu)-OH	201481-37-0
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	154445-77-9
Fmoc-Asn(Trt)-OH	132388-59-1
Fmoc-Asp(Mpe)-OH	180675-08-5
Fmoc-Atb-OH	139551-74-9
Fmoc-Atp-OH	368866-34-6
Fmoc-Bph-OH	199110-64-0
Fmoc-Cha-OH	135673-97-1
Fmoc-Chg-OH	161321-36-4
Fmoc-Cit-OH	133174-15-9
Fmoc-Cys(Trt)-OH	103213-32-7
Fmoc-F4aao(tBu)-OH	181951-92-8
Fmoc-F4C-OH	175453-08-4
Fmoc-F4COO(tBu)-OH	183070-44-2
Fmoc-F4G(Pbf,Sub)-OH	2803482-69-9
Fmoc-Gln(Trt)-OH	132327-80-1
Fmoc-Glu(tBu)-OH	71989-18-9
Fmoc-Gly-OH	29022-11-5
Fmoc-H4Py-OH	273222-04-1
Fmoc-Har(Pbf)-OH	1159680-21-3

[表1-2]

Fmoc アミノ酸	CAS 番号
Fmoc-Hcit-OH	201485-17-8
Fmoc-Hph-OH	132684-59-4
Fmoc-Hty(tBu)-OH	204384-69-0
Fmoc-Hyp(tBu)-OH	122996-47-8
Fmoc-Ile-OH	71989-23-6
Fmoc-Leu-OH	35661-60-0
Fmoc-Lys(Boc)-OH	71989-26-9
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	78081-87-5
Fmoc-MetO2-OH	163437-14-7
Fmoc-PEG12c-OH	1952360-91-6
Fmoc-PEG8c-OH	756526-02-0
Fmoc-Phe-OH	35661-40-6
Fmoc-Ser(Trt)-OH	111061-56-4
Fmoc-Tbg-OH	132684-60-7
Fmoc-Thr(Trt)-OH	133180-01-5
Fmoc-Trp(Boc)-OH	143824-78-6
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	71989-38-3
Fmoc-Val-OH	68858-20-8
Fmoc-W7N-OH	737007-45-3
Fmoc-Yph-OH	180414-93-1

[0066] 得られた粗精製ペプチドの精製方法としては、特に記載がない限り、以下

A) / B) / C) / D) のいずれかの逆相分取精製装置を用いた。

A) : Shimadzu prep-HPLC system (LC-20 AP, SPD-M20A, CTO-20AC, and CBM-20A) ;

B) : Waters AutoPurification System ;

C) : Waters AutoPurification System with SQD ;

D) : Waters Preparative HPLC System ;

使用したカラムは特に記載がない限り、以下a) ~ n) のいずれかを用いた。

a) Jeanius One-Column 20mml. D. x150 mmL

b) Kinetex EVO C18 5 μ m 21.2x150mm

c) Waters XBridge BEH Prep OBD Amide 5 μ m 19x150mm

d) Waters XBridge C18 19x150mm

e) Waters XBridge C18 5 μ m 19x150mm

f) Waters XBridge C18 5 μ m 30x150mm

g) Waters XBridge C18 5 μ m 50x150mm

h) Waters XSelect C18 19x150mm

i) Waters XSelect C18 30x150mm

j) Waters XSelect C18 50x150mm

k) Waters XSelect C18 5 μ m 19x150mm

l) Waters XSelect C18 5 μ m 30x150mm

m) Waters XSelect CSH Prep C18 5 μ m OBD 30x150mm

n) Waters XSelect CSH Prep C18 5 μ m

O B D 50 × 250 mm

[0067] 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、多価イオンとして高頻度で検出された。

[0068] 基本分析装置および基本条件

以下の実施例において合成されたペプチドの質量スペクトル分析には、特に記載がない限り、以下の基本分析装置および基本条件を用いた。勾配B (%)はx/yのいずれかの条件を用いて分析を行った。

[0069] 装置: Shimadzu LC/MS system (LC-20ADXR, CTO-20AC, SPD-M20A, SIL-20AXR, CBM-20A and LCMS-2020)

カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 × 150 mm、100 Å

カラム温度: 60 °C

移動相A: 0.025% TFA in H₂O

移動相B: 0.025% TFA in MeCN

流速: 0.5 mL/min

波長: 225 nm PDA

勾配B (%):

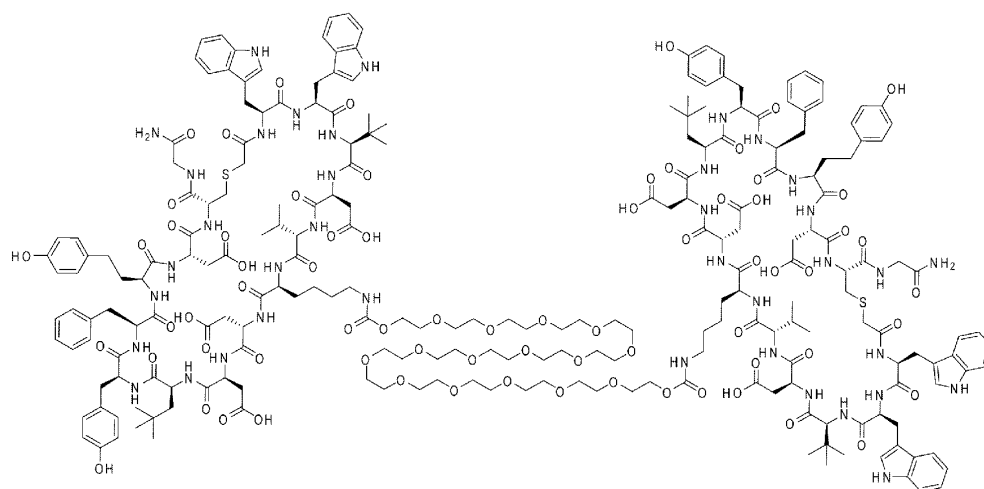
x: 20-60%/7.15 min、60-95%/0.3 min、95-95%/1.55 min;

y: 40-80%/7.15 min、80-95%/0.3 min、95-95%/1.55 min.

[0070] 実施例1 ペプチド複合体 (ダイマー構造番号52) の合成

本実施例では、以下の構造を有するペプチド複合体（ペプチド配列番号47とリンカー構造番号6の複合体であり、表4のダイマー構造番号52）を合成した。

[0071] [化1]



[0072] Sieber amide resin（渡辺化学、0.60mmol/g）を用い、前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、CEM社のLiberty Blue HT 12を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure（4.2当量/8当量/4当量）を用いDMF中90℃下、3分間1回反応を行った。ただし3残基目、9残基目は90℃下、10分間1回反応を行った。14残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。

Fmoc除去は、10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下、1分間反応させる条件、又は50℃下、90秒間反応させる条件を用いた。

クロロアセチル基の導入は、ClAcOSu（5当量）のDMF溶液を固相樹脂に加え室温にて60分間振盪することにより行った。

側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFに続いて塩化メチレン、さらにジエチルエーテルで洗浄した後、減圧下乾燥し、固相樹脂の入った反応容器に、反応剤

カクテル-A (TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5の混合物)を加え、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。この濾液を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、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冷やしたジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥した。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4.2 mMとなるようにDMSO/H₂O(9/1)に溶解後、トリエチルアミン(20当量)を加えて、室温で1時間振盪した後、酢酸を加えた。得られた反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。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 XSelect C18 5um 50x250mm;

移動相:A=20mM TEAA in H₂O、B=20mM TEAA in MeCN、C=0.2M TEAA in H₂O、D=MeCN ;

温度:50℃;

グラジエント(%A conc):5.0分間かけて0.1%、その後0.1分間かけて0.1-100%、5.1分以降(100%-B);(%B conc):5.1分間かけて0%、その後1.9分間かけて0-4.2%、その後3分間かけて4.2-20.5%、その後15.5分間かけて20.5-25.6%、その後1.5分間かけて25.6-60%、その後4分間かけて60%;(%C conc):5.0分間かけて99.9%、その後0.1分間かけて99.9-0%、5.1分以降0%;(%D conc):0%

流速:5.1分間かけて18mL/分、その後1.9分間かけて(18mL/分-118mL/分)、その後118mL/分

凍結乾燥後、0.1% TFA in H₂O-MeCN (1:1, 10

0 mL) を加え再度凍結乾燥し得られたペプチドAをペプチド複合体の合成に用いた。

ペプチド複合体の合成は、ペプチドAの終濃度が25 mMとなるようにDM SOに溶解後、NHS-OCOPEG17OCO-NHS (0.4 当量)、及びDIEA (10 当量) を加えて室温で1時間振盪した後、酢酸を加えた。

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 C18、19×150 mm; 移動相: A=0.1% TFA in H₂O、B=0.1% TFA in MeCN; 温度: 50 °C; グラジエント (%B conc): 3分間かけて15-40%、その後8分間かけて40-45%、その後1分間かけて45-60%; 流速: 17 mL/分。

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94.86%であった。

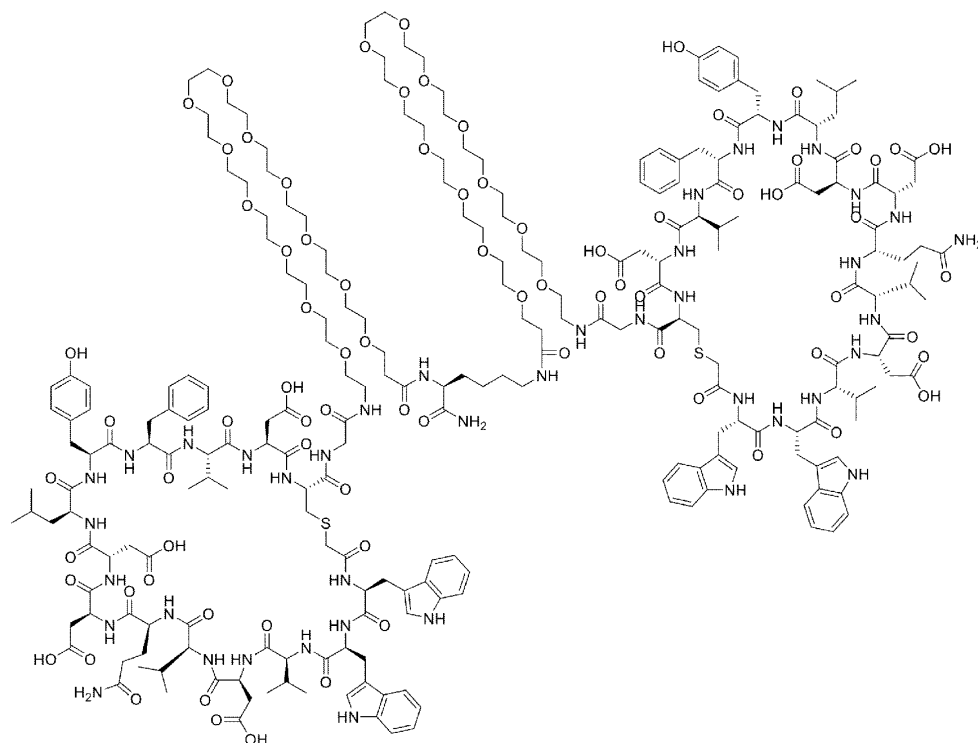
分析条件: 保持時間=5.7分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O、B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60 °C; グラジエント (%B conc): 7.15分間かけて20-60%、その後0.30分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%; 流速: 0.5 mL/分; ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1197 (M+4H)⁴⁺。

[0073] 実施例2 ペプチド複合体 (ダイマー構造番号1) の合成

本実施例では、以下の構造を有するペプチド複合体 (ペプチド配列番号3とリンカー構造番号1の複合体であり、表4のダイマー構造番号1) を合成した。

[0074]

[化2]



[0075] Sieber amide resin (渡辺化学、0.65 mmol/g) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH を導入後、リンカー部分 PEG や各 Fmoc アミノ酸を導入することによって目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Syro 1 を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (9.45 当量/9 当量/18.8 当量) を用い DMF 中 75℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。ただし 2 残基目は 75℃ 下、20 分間 3 回反応を行った。4 残基目は室温下、60 分間 2 回反応を行った。14 残基目は室温下、30 分間 2 回反応を行った。15 残基目、リンカー部分 Fmoc-PEG12c、および Fmoc-Lys(Fmoc)-OH の導入は 75℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。

Fmoc 除去は、室温下 20% ピペリジンの DMF 溶液と 5 分間反応させ

た後、溶液を除去後、再度室温下20%ピペリジンのDMF溶液と15分間反応させた。

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(0.5M DMF溶液、10当量)、HCTU(0.49M DMF溶液、9.8当量)とDIEA(0.5M 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。

側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、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)を加えよく振盪した後、室温で60分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。この濾液を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、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冷やしたジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒にて洗浄後、60分間減圧下乾燥した。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1mMとなるようにDMSO/MeCN/H₂O(18/1/1)に溶解後、トリエチルアミン(20当量)を加えて、室温で3時間攪拌した。得られた反応溶液をGenevac EZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

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、50x150mm; 移動相: A=0.1% TFA in H₂O、B=0.1% TFA in MeCN; 温度: 40℃; グラジエント(%B conc): 3分間かけて9-34%、その後8分間かけて34-39%、その後1分間かけて39-60%; 流速: 120mL/分。

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、86.83%であった。

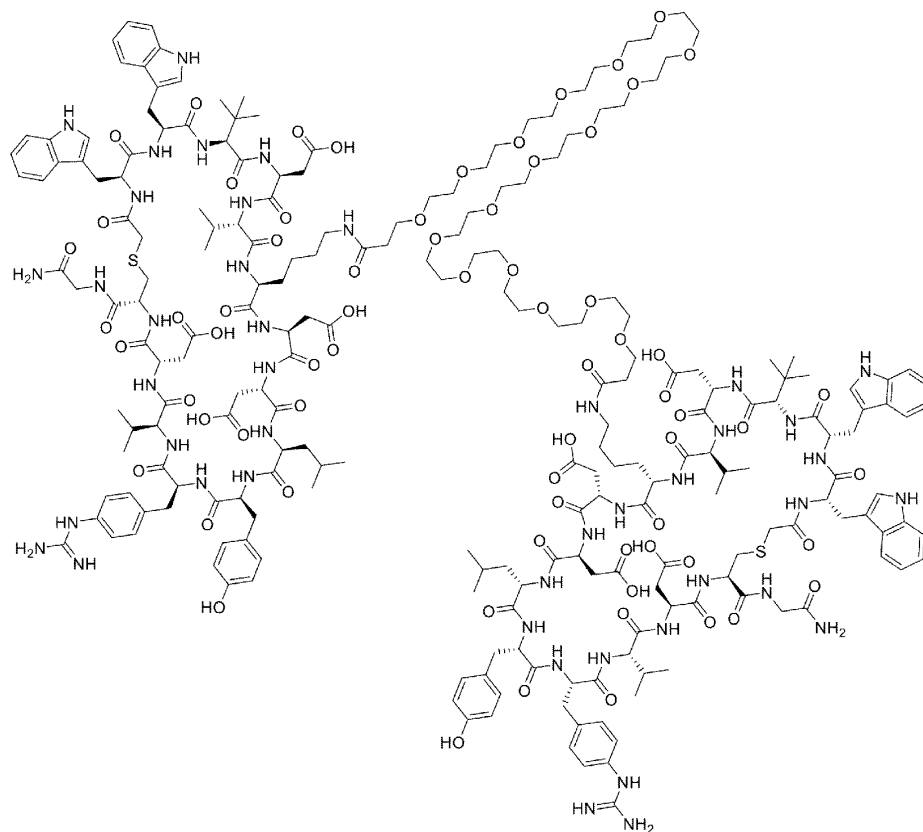
分析条件：保持時間＝5.3分；カラム：Kinetex EVO C18、2.6 μm 、2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相：A＝0.025% TFA in H_2O 、B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（%B conc）：7.15分間かけて20－60%、その後0.30分間かけて60－95%、その後1.55分間かけて95－95%；流速：0.5 mL／分；ESI－MS（+）観測値 m/z ＝1023（M+5H）⁵⁺。

[0076] 実施例3 ペプチド複合体（ダイマー構造番号43）の合成

本実施例では、以下の構造を有するペプチド複合体（ペプチド配列番号42とリンカー構造番号4の複合体であり、表4のダイマー構造番号43）を合成した。

[0077]

[化3]



[0078] Sieber amide resin (渡辺化学、0.57 mmol / g) を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Syro 1 を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA / HATU / DIPEA (4.2 当量 / 4 当量 / 8.4 当量) を用い DMF 中 75℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。ただし 13 残基目は 75℃ 下、30 分間 2 回反応を行った。14 残基目は室温下、30 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 75℃ 下、20 分間 1 回反応を行った。

Fmoc 除去は、室温下 20% ピペリジンの DMF 溶液と 5 分間反応させた後、溶液を除去後、再度室温下 20% ピペリジンの DMF 溶液と 15 分間

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、DIPCI (10 当量) と HOSu (10 当量)、クロロ酢酸 (10 当量) を DCM 中攪拌し DCM と同量の DMF を加え CIAcOSu の DCM/DMF 溶液を調整したものを固相樹脂に加え室温にて 60 分間振盪することにより行った。

側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物) を加え室温で 60 分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。この濾液を冷やした過剰のジイソプロピルエーテルに加えると白濁沈殿が生じ、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冷やしたジエチルエーテルにて洗浄後減圧下乾燥した。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/H₂O (9/1) に溶解後、トリエチルアミン (10 当量) を加えて、室温で 15 時間攪拌した。得られた反応溶液を Genevac EZ-2 Elite を用いて減圧濃縮し、未精製の環状ペプチド B を得た。

ペプチド複合体の合成は、上記で得られたペプチド B の濃度が 25 mM となるように DMSO に溶解後、10 当量のジイソプロピルエチルアミンを加えた後、0.4 当量の NHS-cPEG17c-NHS を加え、室温で 30 分間振盪した後、酢酸を加えた。

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: Kinetex EVO C18 5 μ m 21.2 x 150 mm; 移動相: A=0.1% TFA in H₂O、B=0.1% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (%B conc): 3 分間かけて 5-30%、その後 8 分間かけて 30-35%、その後 1 分間かけて 35-60%; 流速: 2

0 mL／分。

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87.55％であった。

分析条件：保持時間＝4.5分；カラム：Kinetex EVO C18、2.6 μm、2.1×150 mm、100 Å；移動相：A＝0.025％ TFA in H₂O、B＝0.025％ TFA in MeCN；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分間かけて95－95％；流速：0.5 mL／分；ESI－MS（＋）観測値m／z＝1194（M＋4H）⁴⁺。

[0079] 実施例4 各種ペプチド合成

本実施例では、実施例1－3と同様に、各種ペプチド複合体を化学合成した。合成した環状ペプチドの配列を表2、リンカーの構造を表3、環状ペプチドがリンカーを介してダイマー化したペプチド複合体を表4に示す。表4中のConjugation No.は、各ペプチド配列番号で示されるアミノ酸配列において、リンカーが付加しているアミノ酸の位置を示す。

なお、表2および表4中のペプチド配列番号14～35およびペプチド配列番号37～51において、15番目のGlyのC末端のカルボン酸は、アミドに変換されていることが好ましい。

合成したペプチド複合体は、上記の基本分析装置および基本条件に記載するいずれかの分析条件で分析し、質量スペクトル分析法におけるESI－MS（＋）により構造を確認した。得られたESI－MS（＋）観測値と保持時間、価数、分析に用いた移動相Bの濃度勾配（％）を表4に示す。

[0080] 表2. 合成した環状ペプチドの配列

[表2-1]

Seq	Peptide SEQ														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
3	W	W	V	D	V	Q	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
4	W	W	V	D	V	Ahp	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
5	W	W	V	D	V	W	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
6	W	W	V	D	V	Hph	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
7	W	W	V	D	V	Cha	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
8	W	W	V	D	V	F4COO	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
9	W	W	V	D	V	Q	G	D	L	Y	F	V	D	C	G
10	W	W	V	D	V	Q	D	D	L	Y	Bph	V	D	C	G
11	W	W	V	D	V	Q	D	D	L	Y	F	Hph	D	C	G
12	W	W	V	D	V	Q	D	D	L	Y	F	V	A	C	G
13	W	W	V	D	V	Q	D	D	L	Y	F	V	S	C	G
14	W	W	V	D	V	K	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
15	W	W	V	D	Tbg	K	D	D	L	Y	F	V	D	C	G
16	W	W	V	D	V	K	D	D	L	Y	Yph	V	D	C	G
17	W	W	V	D	V	K	D	D	L	Y	F4G	V	D	C	G
18	W	W	V	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
19	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	Yph	V	D	C	G
20	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	Yph	Hty	D	C	G
21	Hcit	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
22	4Py2NH2	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
23	3Py6NH2	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
24	F4aao	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
25	W	W	Chg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
26	W	W	Tbg	Q	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G

[表2-2]

27	W	W	Tbg	D	aiT	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
28	W	W	Tbg	D	Chg	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
29	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	N	Y	F	Hty	D	C	G
30	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F4C	Hty	D	C	G
31	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Chg	D	C	G
32	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	H4Py	D	C	G
33	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	S	C	G
34	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	F	C	G
35	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	F4aao	C	G
36	W	W	Tbg	D	V	Ahp	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
37	W	W	V	D	V	K	G	V	N	Y	F	Hty	D	C	G
38	W	W	V	MetO2	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
39	W	W	V	D	V	K	D	D	L	Y	Yph	V	Har	C	G
40	W	W	Hty	D	V	K	D	D	L	Y	F4G	V	D	C	G
41	W	W	V	D	V	K	D	D	L	Y	F4G	Hty	Hyp	C	G
42	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F4G	V	D	C	G
43	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
44	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F4G	Hty	D	C	G
45	W7N	W	Tbg	D	V	K	D	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
46	W	W	Tbg	D	V	K	N	D	L	Y	F	Hty	D	C	G
47	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	Atb	Y	F	Hty	D	C	G
48	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	Atb	Y	F4G	Hty	D	C	G
49	W	W	Tbg	D	V	K	D	D	Atb	Y	F4G	Hty	Hyp	C	G
50	W	W	Hty	D	V	K	D	D	Atb	Y	F4G	V	D	C	G
51	W	W	Hty	D	V	K	D	D	Atb	Y	F4G	Hty	D	C	G

[0081] 表3. リンカーの構造

[表3]

リンカー 構造番号	リンカー配列		
1	PEG12c	K	PEG12c
2	cPEG9c		
3	cPEG13c		
4	cPEG17c		
5	OCOPEG13OCO		
6	OCOPEG17OCO		
7	K	cPEG17c	K

[0082] 表4. ペプチド複合体

[表4-1]

ダイマー 構造番号	Seq	リンカー 構造番号	Conjugation No.	Ret time	ESI (m/z)	[M+XH] ⁺	QC condition	
							Concentration gradient of B	
1	3	1	15	5.3	1023	5	x	
2	4	1	15	3.4	1278	4	y	
3	5	1	15	3.0	1307	4	y	
4	6	1	15	3.4	1295	4	y	
5	7	1	15	3.8	1033	5	y	
6	8	1	15	5.7	1310	4	x	
7	9	1	15	5.0	1249	4	x	
8	10	1	15	6.2	1316	4	x	
9	11	1	15	6.0	1309	4	x	
10	12	1	15	5.4	1005	5	x	
11	13	1	15	5.3	1011	5	x	
12	3	7	15	5.1	1222	4	x	
13	14	2	6	5.5	1427	3	x	
14	14	3	6	5.6	1485	3	x	
15	15	4	6	5.4	1166	4	x	
16	16	4	6	6.4	1205	4	x	
17	17	4	6	4.4	1187	4	x	
18	18	4	6	5.5	1198	4	x	
19	19	4	6	6.3	1212	4	x	
20	20	4	6	6.5	1250	4	x	
21	21	4	6	4.6	1197	4	x	
22	22	4	6	3.9	1193	4	x	
23	23	4	6	3.9	1193	4	x	
24	24	4	6	4.9	1222	4	x	

[表4-2]

25	25	4	6	6.0	974	5	x
26	26	4	6	5.2	1211	4	x
27	27	4	6	5.4	1205	4	x
28	28	4	6	5.8	1224	4	x
29	29	4	6	5.5	1205	4	x
30	30	4	6	5.9	1221	4	x
31	31	4	6	5.8	1186	4	x
32	32	4	6	4.6	1197	4	x
33	33	4	6	5.5	1190	4	x
34	34	4	6	6.5	1220	4	x
35	35	4	6	5.8	1257	4	x
36	36	1	15	3.3	1324	4	y
37	37	5	6	5.2	1470	3	x
38	38	5	6	5.3	1163	4	x
39	39	5	6	5.0	1174	4	x
40	40	5	6	4.3	1168	4	x
41	41	5	6	3.9	1167	4	x
42	14	4	6	5.4	1166	4	x
43	42	4	6	4.5	1194	4	x
44	43	4	6	5.5	1204	4	x
45	44	4	6	4.2	1233	4	x
46	45	4	6	4.2	1205	4	x
47	46	4	6	5.1	1204	4	x
48	47	4	6	5.5	1211	4	x
49	47	5	6	5.2	1154	4	x
50	14	6	6	5.9	1144	4	x
51	42	6	6	4.8	1180	4	x
52	47	6	6	5.7	1197	4	x
53	48	6	6	4.1	1226	4	x
54	49	5	6	4.0	1181	4	x
55	48	5	6	4.2	1182	4	x
56	50	5	6	4.3	1175	4	x
57	51	5	6	4.2	1214	4	x

[0083] 実施例5 pVEGFR AlphaLISAアッセイによるVEGFR-2 アゴニスト活性評価

本発明のVEGFR-2 アゴニストペプチドのVEGFR-2の活性化能を評価する為に、VEGFR-2のリン酸化を検証した。HUVECをEGM™-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit (LONZA; CC-3162) で培養した。Tryple (ThermoFisher Scientific) を用いて細胞を剥離後、1ウェルあたり24000細胞となるように接着細胞用96 well PDL-coated plate (Corning: 354461) に播種し、2日間培養した。スタベーションの為、0.5% FBS (ThermoFisher Scientific)、0

． 1% Heparin（上記のLONZA；CC-3162に付属）、
0.1% Gentamicin（Nacalai）を含むEBM-2培地
（LONZA）に交換し18時間培養した。その後Recombinant
Human VEGF165a Protein（R&D systems）もしくはペプチドを加え、CO₂インキュベータ内で37°C、10分
刺激後、AlphaLISA SureFire Ultra VEGFR
-2（p-Tyr1175）Assay キット（PerkinElmer）に付属するLysis Bufferで細胞を溶解した。キットの
プロトコールに沿って実施し、シグナルの検出にはSpectraMax
Paradigm multimode microplate reader（Molecular Devices）を使用した。得られたシグ
ナルをGraphPad Prismで解析し、VEGF165aで誘導さ
れるシグナルの最大値を100%、無刺激を0%として% activity
を計算した。

VEGF165aの添加濃度は20 nMから1／4倍希釈で5点（0.08、0.31、1.25、5、20 nM）で評価し最大値（100%）を決
定した。ペプチドの添加濃度は、ダイマー構造番号1については3.2、16、80 nM、ダイマー構造番号2～41については、10、100 nM、
ダイマー構造番号42～57については、1.25、5、20 nMで試験を
実施した。

% activityについて、ペプチドを3.2 nM添加時に50%以上
活性があるものを1-A、ペプチドを16 nM添加時に50%以上活性があ
るものを1-B、ペプチドを80 nM添加時に50%以上活性があるものを
1-C、ペプチドを80 nM添加時に1%以上50%未満活性があるものを
1-Dとした。

ペプチドを10 nM添加時に50%以上活性があるものを2-A、ペプチ
ドを100 nM添加時に50%以上活性があるものを2-B、ペプチドを1
00 nM添加時に1%以上50%未満活性があるものを2-Cとした。

ペプチドを1.25 nM添加時に50%以上活性があるものを3-A、ペプチドを5 nM添加時に50%以上活性があるものを3-B、ペプチドを20 nM添加時に50%以上活性があるものを3-C、ペプチドを20 nM添加時に1%以上50%未満活性があるものを3-Dとした。

[0084] 結果を表5に示した。なお、上記分類の1-A～1-C、3-Aに該当するものはなかった。表5に示されたとおり、合成したペプチド複合体はVEGFR-2のリン酸化を誘導するVEGFR-2アゴニスト活性を有することが示された。

[0085] 表5. VEGFR-2アゴニスト活性評価

[表5-1]

ダイマー構造番号	pVEGFR2アッセイ結果	pERKアッセイ結果
1	1-D	1-D
2	2-C	2-B
3	2-C	2-A
4	2-C	2-A
5	2-C	2-A
6	2-C	2-B
7	2-C	2-B
8	2-C	2-C
9	2-C	2-C
10	2-C	2-C
11	2-C	2-C
12	2-C	2-C
13	2-C	2-A
14	2-C	2-A
15	2-B	2-B
16	2-B	2-B
17	2-C	2-B
18	2-C	2-B
19	2-C	2-B
20	2-A	2-A
21	2-A	2-A
22	2-C	2-A
23	2-C	2-A
24	2-B	2-A
25	2-C	2-A

[表5-2]

26	2-B	2-B
27	2-A	2-A
28	2-B	2-A
29	2-A	2-A
30	2-A	2-A
31	2-A	2-A
32	2-A	2-A
33	2-A	2-A
34	2-A	2-A
35	2-A	2-A
36	2-C	2-B
37	2-A	2-B
38	2-C	2-B
39	2-C	2-B
40	2-A	2-A
41	2-A	2-A
42	3-D	3-C
43	3-C	3-B
44	3-C	3-C
45	3-C	3-C
46	3-C	3-C
47	3-C	3-C
48	3-C	3-C
49	3-D	3-C
50	3-D	3-C
51	3-B	3-B
52	3-C	3-B
53	3-B	3-B
54	3-B	3-B
55	3-C	3-B
56	3-C	3-C
57	3-D	3-C

[0086] 実施例6 pERK AlphaLISAアッセイによるVEGFR-2
アゴニスト活性評価

本発明のVEGFR-2アゴニストペプチドの細胞内シグナル活性化能を
評価する為に、ERKのリン酸化を検証した。pVEGFRのAlphaL
ISAで使用したライセートを用いて、AlphaLISA SureFi

re Ultra p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) Assay キット (PerkinElmer) のプロトコルに沿って実施し、シグナルの検出には SpectraMax Paradigm multimode microplate reader (Molecular Devices) を使用した。得られたシグナルを GraphPad Prism で解析し、VEGF165a で誘導されるシグナルの最大値を 100%、無刺激を 0% として %activity を計算した。

VEGF165a の添加濃度は 20 nM から 1/4 倍希釈で 5 点 (0.08、0.31、1.25、5、20 nM) で評価し最大値 (100%) を決定した。ペプチドの添加濃度は、ダイマー構造番号 1 については 3.2、16、80 nM、ダイマー構造番号 2~41 については、10、100 nM、ダイマー構造番号 42~57 については、1.25、5、20 nM で試験を実施した。

%activity について、ペプチドを 3.2 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 1-A、ペプチドを 16 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 1-B、ペプチドを 80 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 1-C、ペプチドを 80 nM 添加時に 1% 以上 50% 未満活性があるものを 1-D とした。

ペプチドを 10 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 2-A、ペプチドを 100 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 2-B、ペプチドを 100 nM 添加時に 1% 以上 50% 未満活性があるものを 2-C とした。

ペプチドを 1.25 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 3-A、ペプチドを 5 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 3-B、ペプチドを 20 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを 3-C、ペプチドを 20 nM 添加時に 1% 以上 50% 未満活性があるものを 3-D とした。

[0087] 結果を表 5 に示した。なお、上記分類の 1-A~1-C、3-A、3-D に該当するものはなかった。表 5 に示されたとおり、合成したペプチド複合体は VEGFR-2 のリン酸化だけでなく細胞内シグナルである ERK のリ

ン酸化誘導能を有することが示された。

[0088] 実施例7 HUVECの増殖促進評価

本発明のVEGFR-2アゴニストペプチドの生物活性を評価する為に、HUVECの増殖促進評価を実施した。上記と同様に培養したHUVECをTryple (ThermoFisher Scientific)を用いて剥離後、1ウェルあたり10000細胞となるように接着細胞用、発光検出用Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunc lon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate (cat. #136101)に播種した。24時間後にスタベーションの為、0.5% FBS (ThermoFisher Scientific)、0.1% Heparin (上記のLONZA; CC-3162に付属)、0.1% Gentamicin (Nacalai)を含むEBM-2培地 (LONZA)に交換し18時間培養した。その後Recombinant Human VEGF165a Protein (R&D systems)もしくはペプチドを加え、CO2インキュベータ内で37°C、2日間培養した。CellTiter-Glo (Promega)キットのプロトコールに沿って実施し、シグナルの検出にはSpectraMax Paradigm multimode microplate reader (Molecular Devices)を使用した。得られたシグナルをGraphPad Prismで解析し、VEGF165aで誘導されるシグナルの最大値を100%、無刺激を0%として% activityを計算した。

VEGF165aの添加濃度は20 nMから1/5倍希釈で6点 (0.006、0.03、0.16、0.8、4、20 nM)で評価し最大値 (100%)を決定した。ペプチドの添加濃度は、ダイマー構造番号2、5、13、14、25、27、29、31、33については1、10、100 nM、ダイマー構造番号42~53については、20 nMから1/4倍希釈で4点 (0.31、1.25、5、20 nM)で試験を実施した。

%a c t i v i t yについて、ペプチドを1 nM添加時に50%以上活性があるものを4-A、ペプチドを10 nM添加時に50%以上活性があるものを4-B、ペプチドを100 nM添加時に50%以上活性があるものを4-C、ペプチドを100 nM添加時に1%以上50%未満活性があるものを4-Dとした。

ペプチドを0.31 nM添加時に50%以上活性があるものを5-A、ペプチドを1.25 nM添加時に50%以上活性があるものを5-B、ペプチドを5 nM添加時に50%以上活性があるものを5-C、ペプチドを20 nM添加時に50%以上活性があるものを5-D、ペプチドを20 nM添加時に1%以上50%未満活性があるものを5-Eとした。

[0089] 結果を表6に示した。なお、上記分類の4-A、4-C、5-Eに該当するものはなかった。表6に示されたとおり、合成したペプチド複合体はHUVECの増殖促進能を有することが示された。

[0090] 表6. HUVECの増殖促進評価

[表6]

ダイマー構造番号	proliferation
2	4-D
5	4-D
13	4-D
14	4-D
25	4-B
27	4-B
29	4-B
31	4-B
33	4-B
42	5-B
43	5-C
44	5-A
45	5-C
46	5-B
47	5-B
48	5-A
49	5-C
50	5-D
51	5-C
52	5-C
53	5-C

[0091] 実施例8 RTK arrayアッセイによるVEGFR特異的活性化能
の評価
本発明のVEGFR-2アゴニストペプチドのVEGFR特異的活性化能

を評価する為に、VEGFR-2を含む49種類のチロシンキナーゼ受容体のリン酸化を検証した。

上記と同様に培養したHUVECをTryple (ThermoFisher Scientific) を用いて剥離後、1ウェルあたり72000細胞となるように接着細胞用6穴プレートに播種し、2日間培養した。スタベーションの為、0.5%FBS (ThermoFisher Scientific)、0.1%Heparin (上記のLONZA; CC-3162に付属)、0.1%Gentamicin (Nacalai) を含むEBM-2培地 (LONZA) に交換し18時間培養した。その後Recombinant Human VEGF165a Protein (R&D systems) もしくはペプチドを加え、CO2インキュベータ内で37°C、10分刺激後、Human Phospho-RTK Arrayキット (R&D) に付属するLysis Bufferで細胞を溶解した。キットのプロトコールに沿って実施し、シグナルの検出にはC-Digit (Li-COR) を使用した。得られたシグナルは、キット付属のTransparency Overlay Templateの画像を用いて解析した。VEGF165aの添加濃度は5nM、ペプチドの添加濃度は20nMで評価した。

[0092] 結果を図1Bに示した。図1Bに示された通り、合成したペプチド複合体 (表4におけるダイマー構造番号48および52) はリコンビナントタンパク質のVEGFと同様にVEGFR-2特異的活性化能を示した。

産業上の利用可能性

[0093] この発明は、医薬産業や生物学産業において利用されうる。

請求の範囲

[請求項1] 第1のペプチドを含み、VEGFR-2アゴニスト活性を有するペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、

$X^1-W-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-Y-X^9-X^{10}-X^{11}-C$ (配列番号1) で示されるアミノ酸配列を有するか、又は

配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、

X^1 は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり、

X^2 は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X^3 は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^4 は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X^5 は、任意のアミノ酸であり、

X^6 は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は側鎖を有しないアミノ酸であり、

X^7 は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^8 は、側鎖に置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^9 は、側鎖に置換されていてもよい芳香環を有するアミノ酸であり、

X^{10} は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹¹は、任意のアミノ酸である、
ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項2] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X²は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X³は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環又は複素環で置換された鎖状アルキル基を有するアミノ酸である、
ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項3] 請求項2に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X¹は、W、Hc i t、4 P y 2 N H 2、3 P y 6 N H 2、F 4 a a o、又はW 7 Nであり、

X²は、V、T b g、C h g、又はH t yであり、

X³は、D、Q、又はM e t O 2であり、

X⁴は、V、T b g、a l T、又はC h gであり、

X⁵は、Q、A h p、W、H p h、C h a、F 4 C O O、又はKであり、

X⁶は、D、G、又はNであり、

X⁷は、D又はVであり、

X⁸は、L、N、又はA t bであり、

X⁹は、F、B p h、Y p h、F 4 G、又はF 4 Cであり、

X¹⁰は、V、H p h、H t y、C h g、又はH 4 P yであり、

X¹¹は、D、A、S、F、F 4 a a o、H a r、又はH y pである、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項4]

請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X²は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁴は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁶は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に極性基で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するか、又は分岐していてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に鎖状又は環状アルキル基を有するか、又は芳香環で置換されていてもよい鎖状アルキル基を有するアミノ酸である、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項5]

請求項4に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

X¹は、W又はW 7 Nであり、

X²は、V、T b g、又はC h gであり、

X³は、Dであり、
X⁴は、V又はa I Tであり、
X⁵は、A h p、C h a又はKであり、
X⁶は、D又はNであり、
X⁷は、Dであり、
X⁸は、L、N又はA t bであり、
X⁹は、F又はF 4 Gであり、
X¹⁰は、V、H t y又はC h gであり、
X¹¹は、D又はSである、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項6] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、

W-W-V-D-V-Q-D-D-L-Y-F-V-D-C（配列番号2）で示されるアミノ酸配列を有するか、又は
配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなる、
ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項7] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、C末端にグリシンが付加したアミノ酸配列を有する、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項8] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、配列番号3～51のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項9] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩で

あって、

前記第1のペプチドは、環状ペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項10] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記第1のペプチドは、N末端のアミノ酸残基がクロロアセチル化したアミノ酸残基であり、ペプチド内のシステイン残基を有し、前記N末端のアミノ酸残基と、前記システイン残基とが結合した環状ペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項11] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、

前記ペプチド複合体は、前記第1のペプチドと第2のペプチドと、前記第1のペプチドと前記第2のペプチドを接続するリンカーとからなり、

前記第2のペプチドは、前記第1のペプチドと同一でも異なってもよく、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するか、又は

配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸が、置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなる、

ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項12] 請求項11に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記第1のペプチドと前記第2のペプチドの相同性が90%以上100%以下である、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項13] 請求項11に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記第1のペプチドと前記第2のペプチドが同じ配列を有するペプチドである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項14] 請求項11に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩

であって、前記第1のペプチドの6番目のアミノ酸と前記第2のペプチドの6番目のアミノ酸、又は前記第1のペプチドのC末端と前記第2のペプチドのC末端が前記リンカーを介して結合している、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項15] 請求項11に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩であって、前記リンカーがPEGリンカー、又はPEGリンカーに1～6個のアミノ酸が付加したリンカーである、ペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩。

[請求項16] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩と担体とを含む組成物。

[請求項17] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩と担体とを含み、細胞培養に用いられる細胞培養用組成物。

[請求項18] 請求項1に記載のペプチド複合体又はその薬学的に許容される塩と担体とを含み、医療用、診断用又は研究用に用いられる組成物。