

明 細 書

発明の名称： T r k B結合活性を有するペプチド複合体

技術分野

[0001] この出願は、T r k B結合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医薬品組成物に関する。また、この出願は、T r k B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医薬品組成物に関する。

背景技術

[0002] T r k B（トロポミオシン受容体キナーゼB）は、T r k A及びT r k Cを含む単一膜貫通型受容体チロシンキナーゼのファミリーに属する。これらの受容体キナーゼは、神経細胞の生存および発生に必要とされるニューロトロフィンの活性を仲介する。ニューロトロフィンには、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、およびニューロトロフィン-4/5（NT-4/5）の4種が知られており、これらの高親和性受容体であるT r k A、T r k B、及びT r k Cとそれぞれ特異的に結合する。T r k Bは、BDNFの高親和性受容体であり、NT-3やNT-4/5に結合することも知られている。二量体であるBDNFのT r k Bへの結合は、受容体であるT r k Bの二量化を引き起こし、受容体上の特定のチロシン残基の自己リン酸化、ならびにマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）、およびホスホリパーゼC- γ （PLC- γ ）を含むシグナル伝達経路の活性化をもたらす。T r k Bは、BDNFに結合した後、神経細胞の分化および生存を含む、ニューロトロフィンの複数の作用を仲介する。T r k Bは、神経細胞の生存、分化、および機能において主要な役割を果たすため、T r k Bアゴニストは、多数の神経変性障害および精神神経疾患の治療に用いられることが期待される。

天然に存在するT r k BアゴニストであるBDNFは、上記疾患の治療薬

として臨床試験が進められていたが、薬物動態などの問題があり、その後の研究開発に進展は見られない。近年、BDNFの代替として、TrkBアゴニスト抗体（特許文献2，5，非特許文献3，4），低分子化合物（特許文献8，非特許文献1，2）やペプチド（特許文献9）が報告されている。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：特表2010-513461
特許文献2：特表2011-510021
特許文献3：特表2018-522016
特許文献4：特表2019-517787
特許文献5：特表2020-513806
特許文献6：特表2021-507677
特許文献7：特表2021-527070
特許文献8：特許第5946454号
特許文献9：国際公開WO2022/009992号パンフレット

非特許文献

- [0004] 非特許文献1：PLOS ONE 2014, 9, e87923.
非特許文献2：Sci. Signal. 2017, 10, eaal1670.
非特許文献3：PNAS, 115, E7023.
非特許文献4：Neurobiology of Disease 2019, 132, 104590.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] TrkB結合活性を有する新しい化合物を提供する。また、TrkBアゴニスト活性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] この明細書の最初の発明は、ペプチド複合体に関する。

このペプチド複合体は、第1のペプチドを含み、T r k B結合活性を有する。

第1のペプチドは、

$X^1-X^2-X^3-X^4-3Py-W-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-V-X^{11}-C$ （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、1～4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。

X^1 は、側鎖に芳香族環を有するアミノ酸である。

X^2 は、任意のアミノ酸である。

X^3 は、2級アミノ酸である。

X^4 は、側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸である。

X^5 は、2級アミノ酸である。

X^6 は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸である。

X^7 は、側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸である。

X^8 は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸である。

X^9 は、任意のアミノ酸である。

X^{10} は、側鎖に芳香族環を有するアミノ酸である。

X^{11} は、任意のアミノ酸である。

発明の効果

[0007] この発明によれば、T r k B結合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、T r k Bアゴニスト活性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1]図1は、本発明のペプチド複合体及び脳由来神経栄養因子（BDNF）を用いた、pERK1/2 AlphaLISAアッセイによるT r k Bアゴニスト活性測定の結果を示す。図中、○は脳由来神経栄養因子を示し、黒丸はT r k Bアゴニスト活性ペプチド複合体（ペプチド（ペプチド配列番号

15) とリンカー (リンカー構造番号7) の複合体 (表3におけるダイマー構造番号48)) を示し、黒三角はTrkBアゴニスト活性ペプチド複合体 (ペプチド (ペプチド配列番号17) とリンカー (リンカー構造番号7) の複合体 (表3におけるダイマー構造番号56)) を示す。横軸はペプチド複合体又は脳由来神経栄養因子の濃度 (nM) を、縦軸は脳由来神経栄養因子で誘導される活性化シグナルの最大値を100としたときの活性化シグナルの相対値を示す。

[図2] 図2は、本発明のペプチド複合体及び脳由来神経栄養因子 (BDNF) を用いた、NFATアッセイによるTrkBアゴニスト活性測定の結果を示す。図中、○は脳由来神経栄養因子を示し、黒丸はTrkBアゴニスト活性ペプチド複合体 (ペプチド (ペプチド配列番号15) とリンカー (リンカー構造番号7) の複合体 (表3におけるダイマー構造番号48)) を示し、黒三角はTrkBアゴニスト活性ペプチド複合体 (ペプチド (ペプチド配列番号17) とリンカー (リンカー構造番号7) の複合体 (表3におけるダイマー構造番号56)) を示す。横軸はペプチド複合体又は脳由来神経栄養因子の濃度 (nM) を、縦軸は脳由来神経栄養因子で誘導される活性化シグナルの最大値を100としたときの活性化シグナルの相対値を示す。

[図3] 図3は、本発明のペプチド複合体及び脳由来神経栄養因子 (BDNF) を用いた、PathHunterアッセイによるTrkBアゴニスト活性測定の結果を示す。図中、○は脳由来神経栄養因子を示し、黒丸はTrkBアゴニスト活性ペプチド複合体 (ペプチド (ペプチド配列番号15) とリンカー (リンカー構造番号7) の複合体 (表3におけるダイマー構造番号48)) を示し、黒三角はTrkBアゴニスト活性ペプチド複合体 (ペプチド (ペプチド配列番号17) とリンカー (リンカー構造番号7) の複合体 (表3におけるダイマー構造番号56)) を示す。横軸はペプチド複合体又は脳由来神経栄養因子の濃度 (nM) を、縦軸は脳由来神経栄養因子で誘導される活性化シグナルの最大値を100としたときの活性化シグナルの相対値を示す。

[図4]図4は、T r k A、T r k B、T r k Cに対する、本発明のペプチド複合体の表面プラズモン共鳴（S P R）による分子間相互作用の測定結果を示す。なお、上段は表3におけるダイマー構造番号48のペプチド複合体を用いたときの結果を、下段は表3におけるダイマー構造番号56のペプチド複合体を用いたときの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、図面を用いて本発明を実施するための形態について説明する。本発明は、以下に説明する形態に限定されるものではなく、以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものも含む。

[0010] この明細書の最初の発明は、ペプチド複合体に関する。このペプチド複合体は、第1のペプチドを含み、T r k B結合活性を有する。また、このペプチド複合体は、T r k Bアゴニスト活性を有する。

[0011] ペプチド複合体

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。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。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。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。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。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。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。ペプチド複合体がT r k B結合活性を有すればよい。もっとも、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、T r k B結合活性を有するものも好ましい。実施例により示された通り、第1のペプチドはリンカーを介しペプチド複合体構造をとることで、T r k Bアゴニスト活性を示す。

[0012] 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、1～4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。第1のペプチドと第2のペプチドの相同性が80%以上100%以下であるものが好ましい。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好ましい。

[0013] 第1のペプチド

第1のペプチドは、 $X^1-X^2-X^3-X^4-3Py-W-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-V-X^{11}-C$ （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、1～4個（1個，2個，3個又は4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、配列番号1で示されるアミノ酸配列において、保存的アミノ酸置換がなされた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）、 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、A4p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、塩基性となり、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（MeR）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、4Py, aI, T, Cit, P4Sh, F4CON, F4COO, 3Py, HyP, SMe, A4paa, Atp, Hgl, KAc, NaI1, W6N, W7N, Peg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

第1のペプチドは、例えば、配列番号2～41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1～15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15以上17以下であり、最も好ましくはアミノ酸が16である。

[0018] 第1のペプチドの好ましい例は、

- X¹は、側鎖に芳香族環を有するアミノ酸であり、
- X²は、任意のアミノ酸であり、
- X³は、2級アミノ酸であり、
- X⁴は、側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸であり、
- X⁵は、2級アミノ酸であり、
- X⁶は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、
- X⁷は、側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X⁹は、任意のアミノ酸であり、

X¹⁰は、側鎖に芳香族環を有するアミノ酸であり、

X¹¹は、任意のアミノ酸である。

[0019] 第1のペプチドの好ましい例は、

X²は、側鎖に鎖状または環状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X³は、プロリン又はプロリン誘導体であり、

X⁴は、チロシン又はチロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されたアミノ酸であり、

X⁵は、プロリン又はプロリン誘導体であり、

X⁶は、側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、チロシン又はチロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されたアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸であり、

X⁹は、側鎖における官能基の炭素数が3以上のアミノ酸である。

[0020] 第1のペプチドの好ましい例は、

X²は、側鎖に極性基をさらに有するアミノ酸（側鎖に鎖状または環状アルキル基と極性基を有するアミノ酸）であり、

X⁶は、側鎖に鎖状アルキル基と水酸基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、チロシン又はチロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されたアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に鎖状アルキル基と置換されても良い水酸基を有するアミノ酸であり、

X⁹は、側鎖に鎖状または環状アルキル基を有するアミノ酸である。

[0021] 側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸

「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」とは、側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、例えば芳香環としてフェニル基やインドール環を有し、その一部のCなどがNなど他の分子への置換があってもよい。

芳香族環は複素環であってもよい。また、例えば、チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されているようなアミノ酸であってもよい。「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、一態様において、好ましくは側鎖に縮合環を有するアミノ酸である。例えば、インドール環やナフタレン構造を有するアミノ酸であってよく、さらにその一部のCなどがNなど他の分子への置換があってもよい。置換基は特に限定されず、アルキル基、シクロアルキル基、水酸基、ハロゲン等に任意に選択される。「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等を含む。非天然型アミノ酸、例えば、4 Py, F4CON, F4COO又は3 Pyであってもよい。

「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、「側鎖に芳香族環を有するアミノ酸」であってもよい。

[0022] 側鎖に鎖状または環状アルキル基を有するアミノ酸

「側鎖に鎖状または環状アルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸、例えば、リシン、アラニン、プロリン、グリシン、ロイシン等であって、これらのアミノ酸の側鎖が、置換されていても、置換されていなくてもよいアミノ酸であり、当該アルキル基は、鎖状でも環状でもよい。

「側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸」は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸である。

[0023] 側鎖に極性基を有するアミノ酸

「側鎖に極性基を有するアミノ酸」とは、側鎖に極性基を有するアミノ酸であって、例えばチロシン、リシン、アルギニン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、トレオニン等が挙げられる。結合する極性基としては、例えば、非限定的に、水酸基、ウレア基、カルボン酸、アミド基、エーテルなどが挙げられる。

[0024] チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されたアミノ酸

「チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されていてもよいアミノ酸

」とは、チロシンの水酸基が他の極性基、例えば、非限定的に、ウレア基、カルボン酸、アミド基、エーテルなどに置換されているアミノ酸であってよい。例えば、非限定的に、F 4 C O N, F 4 C O O, 及びYなどが挙げられる。

[0025] 2級アミノ酸

2級アミノ酸は、2級アミン（アミノ基に水素以外の基が2つ付いたアミノ酸）を有するアミノ酸を意味する。2級アミノ酸の例は、プロリン及びプロリン誘導体である。プロリン誘導体の例は、H y P及びP 4 S hである。

[0026] 側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸

側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸における鎖状アルキル基及び極性基は先に説明した通りである。極性基の例は水酸基である。側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸の例は、S, 及びS M eである。

[0027] 側鎖に鎖状または環状アルキル基と極性基を有するアミノ酸

側鎖に鎖状または環状アルキル基と極性基を有するアミノ酸における鎖状または環状アルキル基及び極性基は先に説明した通りである。側鎖に鎖状または環状アルキル基と極性基を有するアミノ酸の例は、a l T, C i t, D, E, L, Q, 及びSである。

[0028] 側鎖における官能基の炭素数が3以上のアミノ酸

側鎖における官能基の炭素数が3以上のアミノ酸とは、側鎖に1又は複数の官能基があり、官能基に含まれる炭素の数の合計が3以上であるアミノ酸を意味する。側鎖における官能基の炭素数が3以上のアミノ酸の例は、A 4 p a a, A t p, E, H g l, K A c, 及びLである。

[0029] 第1のペプチドの好ましい例は、

X¹は、3-(4-ピリジル)-L-アラニン(4 P y)又はFであり、
X²は、アロースレオニン(a l T), L-シトルリン(C i t), D, E, L, Q, 又はSであり、
X³は、P, 又はc i s-4-ヒドロキシーL-プロリン(P 4 S h)であり、

X⁴は、L-4-カルバモイルフェニルアラニン (F 4 C O N) , 4-カルボキシル-L-フェニルアラニン (F 4 C O O) , 又はYであり,

X⁵は、ヒドロキシプロリン (H y P) , P, 又はc i s-4-ヒドロキシ-L-プロリン (P 4 S h) であり,

X⁶は、S, 又はTであり,

X⁷は、L-4-カルバモイルフェニルアラニン (F 4 C O N) , 又はYであり,

X⁸は、S, 又は(S)-2-アミノ-3-メトキシプロパン酸 (S M e) であり,

X⁹は、(S)-2-アミノ-3-(1-(カルボキシメチル)ピペラジン-4-イル)プロパン酸 (A 4 p a a) , (2 S)-2-アミノ-3-(オキサン-4-イル)プロパン酸 (A t p) , E, L-2-アミノアジピン酸 (H g l) , N 6-アセチル-L-リシン (K A c) , 又はLであり,

X¹⁰は、3-(3-ピリジル)-L-アラニン (3 P y) 又は3-(4-ピリジル)-L-アラニン (4 P y) であり,

X¹¹は、A, E, N-メチルグルタミン酸 (M e E) , P, S, 又はWである。

[0030] 第1のペプチドの好ましい例は、F-L-P-Y-3 P y-W-P-T-Y-S-L-3 P y-V-W-C (配列番号2) で示されるアミノ酸配列を有するか (3 p yは3-(3-ピリジル)-L-アラニンを意味する) , 又は配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1~4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、2番目、3番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目、11番目、12番目及び14番目のいずれかであることが好ましい。

[0031] 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。

[0032] 第1のペプチドの好ましい例は、第1のペプチドが、配列番号2～41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。第1のペプチド及び複合体は、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。

[0033] 第1のペプチドの好ましい例は、環状ペプチドである。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、ペプチド内のシステイン残基を有し、N末端のアミノ酸残基と、システイン残基とが結合した環状ペプチドである。

[0034] 環状ペプチド

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、本願においては、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、本願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。

[0035] 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。ペプチドには、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願のペプチドに包含される。

[0036] 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。

[0037] 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環状化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環化してもよい。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。

[0038] リンカー

第1のペプチドや部分ペプチドは、リンカーが付加されていても良い。ま

た、リンカーは、ペプチドを含む複合体において複数のペプチドを含む化合物を互いにつなぐ構造であってもよい。リンカーとしては、例えば、アミノ酸リンカー（ペプチドリinker）、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inker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、1～24個、又は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、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inker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）が変化する可能性がある。さらに、上記のリンカーの組合せで合ってもよい。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もよい。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。リンカーの好ましい例は、表2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、どこに付加されていても良い。例えば、ペプチドのN末端側に位置しており、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良い。リンカーの好ましい例は、N末端側に位置する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ものである。

なお、例えば配列番号3～41に表されるアミノ酸配列において、16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3～41に表されるアミノ酸配列の1番目のアミノ酸が15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、15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。

[0039] TrkB

TrkBは、トロポミオシン受容体キナーゼBを指す。TrkBは、チロシン受容体キナーゼB、BDNF／NT-4受容体、及び高親和性ニューロトロフィン受容体としても知られている。ヒトのTrkBは、NTRK2遺伝子によってコードされるタンパク質である（Entrez Gene ID：4915）。TrkBは、細胞膜に配置されており、リガンドが受容体の細胞外ドメインに結合することによって活性化される。TrkBは、脳由来神経栄養因子（BDNF）のための受容体であり、リガンド特異的な方式でBDNFと結合する。二量体であるBDNFがTrkBに結合すると、TrkBが二量体化し、キナーゼドメインによってチロシン残基の自己リン酸化がおこり、その結果としてマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）およびホスホリパーゼC- γ 1（PLC- γ 1）を含む3つの主要なシグナル伝達経路の活性化が起こる。数種のニューロトロフィン、例えばBDNF、ニューロトロフィン-4（NT-4）およびニューロトロフィン-3（NT-3）が、TrkBを活性化し、それによってニューロンの分化、ニューロン修復、ニューロン可塑性、増殖および生存などの複数の作用を活性化することが報告されている。本明細書におけるTrkBは、非限定的に、ヒトTrkBまたは非ヒト動物TrkB、例えばマウスTrkB、ラットTrkB、ウサギTrkBであって、好ましくはヒトTrkBである。

[0040] TrkB結合活性

本発明のペプチド複合体は、TrkB結合活性を有する。この発明のペプ

チド複合体は、T r k Bに特異的に結合するものが好ましい。例えば、この発明のペプチド複合体は、T r k AやT r k Cには結合性を示さず、T r k Bには結合性を示すものが好ましい。T r k Aは、T r k Bと同じニューロトロフィンファミリーに属し、T r k Bと異なりB N D FではなくN G F（神経成長因子）が結合する。T r k Cは、T r k Bと同じニューロトロフィンファミリーに属し、ニューロトロフィン-3が結合する。また、非限定的に、T r k Bに対する本発明のペプチドの結合状態は、親和性定数 K_a 、解離定数 K_d 、結合速度定数 k_{on} 、及び解離速度定数 k_{off} などを指標として表すことができる。

[0041] 親和性定数 K_a 及び解離定数 K_d は、平衡状態にある2分子間の結合親和性、すなわち結合の強さを示す指標であり、解離定数 K_d は親和性定数 K_a の逆数である。そして解離定数 K_d の値が小さいほど、結合が強いことを意味する。前記ペプチドのT r k B（例えば、ヒトT r k B）に対する結合状態を示す親和性定数 K_a 、解離定数 K_d 、結合速度定数 k_{on} 、及び解離速度定数 k_{off} などは、当業者に周知の任意の分子間相互作用測定法を用いて決定することができる。T r k Bに対する前記ペプチドの結合状態は、例えば、表面プラズモン共鳴スペクトル解析（S P R）によって測定することができる。非限定的に、表面プラズモン共鳴スペクトル解析は、例えば、バイオセンサー（生体分子間相互解析装置）であるB I A C O R Eシステム（B I A C O R E社）を用いて行うことができる。

[0042] ペプチドのT r k B結合活性の指標の1つとして解離定数 K_d がある。解離定数 K_d が低いほど結合活性（親和性）が高い。非限定的に、前記ペプチドとヒトT r k Bとの結合の解離定数 K_d は、100 nM以下、75 nM以下、50 nM以下、30 nM以下、20 nM以下、15 nM以下、10 nM以下、5 nM以下、1 nM以下、100 pM以下である。前記ペプチドとヒトT r k Bとの結合の解離定数 k_{off} の下限は特に限定されない。

[0043] T r k Bアゴニスト活性

本発明のペプチド複合体は、好ましくは、T r k Bアゴニスト活性を有す

る。

TrkBアゴニスト活性とは、天然に存在するTrkBアゴニストであるBDNFおよびNT4によってもたらされる効果に類似する効果をもたらす能力をいう。また、特異的にTrkBに結合し、上述の受容体の2量体およびシグナル伝達経路を活性化する能力をいう。

「TrkBアゴニスト活性」は、例えば、標的タンパク質としてTrkBを用いたキナーゼアッセイ系等によって評価しても良い。例えば、非限定的に、ERKのリン酸化を検出するAlphaLISAアッセイやNFATアッセイ、 β -ガラクトシダーゼ活性による加水分解された基質の化学発光シグナルのレベルを測定することにより受容体型チロシンキナーゼに対する化合物の作用を同定するPathHunter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、HunterPathHunter（登録商標）eXpress TrkB Functional Assayキット（DiscoverRx社）、PathHunter（登録商標）TrkB Functional Assayキット（コスモバイオ社）、CellSensor（登録商標）TrkB-NFAT-bla CHO-K1 Cell Line（Invitrogen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TrkBアゴニスト活性を検出できるときに、TrkB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算出することができる。

[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提供する。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、第1のペプチドや、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）

ペプチド複合体の例は、上記のいずれかのペプチドと、これらのペプチドと結合したリンカーと、このリンカーに結合した物質とを含む複合体である。上記ペプチドは、T r k Bに結合することができるため、複合体は、物質をT r k Bに運搬することが可能である。

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

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

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。

R I：放射性同位元素でラベルした低分子、中分子化合物や抗体等、放射性同位元素でラベルされた化合物であれば何でもよい。例えば、P E T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：D N A，R N A等、核酸を含むものであれば何でもよい。例えば、核酸医薬品が挙げられる。

ドラッグデリバリーシステム（D D S）に用いる分子：リポソームやミセルなどのD D Sに使われる公知の分子であってよい。当該D D S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。

T r k B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

ペプチド複合体と担体とを含む組成物に関する。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] 医療用組成物

医療用組成物（本明細書において「医薬組成物」ともいう）としては、上記したペプチド、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。この医薬組成物は、上述のペプチドを有効成分として有効量含むものが好ましい。

医薬の対象となるTrkBに関連する疾患は、TrkB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、またはBDNFシグナル伝達、またはTrkB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、またはそれによって悪化する障害を指す。このような神経障害および精神障害の例としては、神経変性疾患（これらに限定されないが、アルツハイマー病とそれに関連する認知症、パーキンソン病、ハンチントン病、レヴィ小体病とそれに関連する運動障害、筋萎縮性側索硬化症、緑内障およびフリードライヒ運動失調症とそれに関連する脊髄小脳失調症など）、うつ病、不安、自閉症、統合失調症、および心的外傷後ストレス障害、CNS障害、卒中および外傷性脳傷害などが挙げられる。代謝性疾患の例としては、肥満症および多食症が挙げられる。がんまたはがん性疾患は、悪性細胞の成長または新生物、異常な増殖、浸潤または転位を特徴とするあらゆる医学的疾患を指し、そのようなものとしては、固形腫瘍がんおよび非固形がん（血液系腫瘍）の両方、例えば白血病が挙げられる。固形腫瘍としては、肉腫および癌腫が挙げられる。肉腫は、血管、骨、脂肪組織、靱帯、リンパ管、筋肉または腱における非上皮性腫瘍であり、それに対して癌腫は、皮膚、腺および臓器の内層における上皮性腫瘍である。腫瘍は、新生物および／または悪性細胞の個体塊を指す。

[0048] 上記医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口的投与としては、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（経鼻，経口腔，経眼，経肺，経膈，経直腸）投与等が挙げられる。

医薬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（イオントフォレシス法）。

[0049] 医薬組成物は，有効成分をそのまま用いてもよいし，薬学的に許容できる担体，賦形剤，添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては，例えば，液剤（例えば注射剤），分散剤，懸濁剤，錠剤，丸剤，粉末剤，坐剤，散剤，細粒剤，顆粒剤，カプセル剤，シロップ剤，トローチ剤，吸入剤，軟膏剤，点眼剤，点鼻剤，点耳剤，パップ剤等が挙げられる。

製剤化は，例えば，賦形剤，結合剤，崩壊剤，滑沢剤，溶解剤，溶解補助剤，着色剤，矯味矯臭剤，安定化剤，乳化剤，吸収促進剤，界面活性剤，pH調整剤，防腐剤，抗酸化剤などを適宜使用し，常法により行うことができる。

[0050] 製剤化に用いられる成分の例としては，精製水，食塩水，リン酸緩衝液，デキストロース，グリセロール，エタノール等薬学的に許容される有機溶剤，動植物油，乳糖，マンニトール，ブドウ糖，ソルビトール，結晶セルロース，ヒドロキシプロピルセルロース，デンプン，コーンスターチ，無水ケイ酸，ケイ酸アルミニウムマグネシウム，コラーゲン，ポリビニルアルコール，ポリビニルピロリドン，カルボキシビニルポリマー，カルボキシメチルセルロースナトリウム，ポリアクリル酸ナトリウム，アルギン酸ナトリウム，水溶性デキストラン，カルボキシメチルスターチナトリウム，ペクチン，メ

チルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。

- [0051] 難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤として、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。
- [0052] 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。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。
- [0053] 本発明の医薬組成物は，上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。
- [0054] 本発明の医薬組成物を哺乳類（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。

[0055] 診断用組成物

本発明のペプチドは、T r k Bに結合するため、T r k Bを検出する診断薬としても使用し得る。診断薬としては、T r k B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、本発明のペプチドは、検出可能に標識してもよい。このようにして、第1のペプチドやペプチド複合体又はそれらを含む組成物は、T r k Bを検出する診断薬として利用できる。

[0056] 研究用組成物

本発明のペプチドは、T r k Bに結合するため、T r k Bが関与する研究に好ましく用いることができる。

[0057] 細胞培養用組成物

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。本願のペプチドは、T r k Bアゴニスト活性を有するため、細胞培養のための培地、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、添加剤としても使用しうる。

また、本発明のペプチドは、神経変性疾患等の治療に用いる移植用神経細胞を作製するための培地への試薬・添加剤としても使用し得る。上記移植用神経細胞は、非限定的に、多能性幹細胞、複能性幹細胞、または前駆細胞を培養することによって作製される。天然に存在するT r k BアゴニストであるBDNFは、骨、軟骨、腎臓、歯胚などの非神経系の組織にも発現しており、細胞レベルでも、歯周靱帯細胞、骨芽細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞、上皮細胞が産生する。このようにBDNFが神経細胞だけでなく、種々の非神経系細胞において機能的な役割を果たしているシグナル分子であることから、本願のペプチドは、上記のような様々な細胞を作製するための試薬及び添加剤として利用されうる。

[0058] 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。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。

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。

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。

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10000nmol/L、好ましくは約0.1~約1000nmol/L、より好ましくは約0.5~約1000nmol/L、更に好ましくは約1~約100nmol/Lであり得る。

[0059] 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;

クロロアセチルとしてClAc;

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-リジンとして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；

ミリグラム（単位）としてmg；

ミリリットル（単位）としてmL；

ミリモラー（単位）としてmM；

アセトニトリルとしてMeCN；

分（単位）としてmin；

ミリメートル（単位）としてmm；

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；

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；

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；

[0060] 略語（非天然アミノ酸）

A h p (S) - 2 - アミノヘプタン酸 (CAS 番号 : 4 4 9 0 2 - 0 2 - 5)

A t p (2 S) - 2 - アミノ - 3 - (オキサン - 4 - イル) プロパン酸 (CAS 番号 : 1 3 4 4 9 1 0 - 9 1 - 3)

A 4 p a a (S) - 2 - アミノ - 3 - (1 - (カルボキシメチル) ピペラジン - 4 - イル) プロパン酸 (キシダ化学株式会社)

C i t L - シトルリン (CAS 番号 : 3 7 2 - 7 5 - 8)

c P E G 1 c 3, 3 ' - オキシジプロピオン酸

c P E G 5 c 4, 7, 1 0, 1 3, 1 6 - ペンタオキサノナデカンジオイック酸

c P E G 9 c 4, 7, 1 0, 1 3, 1 6, 1 9, 2 2, 2 5, 2 8 - ノナオキサヘントリアコンタンジオイック酸

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

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

d f D - フェニルアラニン

d c D - システイン

F 4 C O N L - 4 - カルバモイルフェニルアラニン (CAS 番号 : 2 2 3 5 9 3 - 0 4 - 2)

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)

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

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

K A c N 6 - アセチル - L - リシン (CAS 番号 : 9 2 - 0 4 - 6)

M e F N - メチル - L - フェニルアラニン

M e A N - メチル - L - アラニン

MeG N-メチルグリシン

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

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

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(炭酸水素塩)

PEG2c 3-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)プロパン酸

PEG4c 1-アミノ-3,6,9,12-テトラオキサペンタデカン-15-オイック酸

PEG6c 1-アミノ-3,6,9,12,15,18-ヘキサオキサヘンニコサン-21-オイック酸

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

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

P4Sh cis-4-ヒドロキシーL-プロリン(CAS番号:618-27-9)

SMe (S)-2-アミノ-3-メトキシプロパン酸(CAS番号:32620-11-4)

Tic L-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸
(CAS番号:74163-81-8)

3Py 3-(3-ピリジル)-L-アラニン(CAS番号:64090-

98-8)

4Py 3-(4-ピリジル)-L-アラニン(CAS番号: 37535-49-2)

aIT アロースレオニン

HyP ヒドロキシプロリン

MeE N-メチルグルタミン酸

実施例

[0061] 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。

[0062] 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 1, Biotage社のSyro 11, 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。

Fmoc-Ala-OH;
Fmoc-Arg (Pbf) -OH;
Fmoc-Asn (Trt) -OH;
Fmoc-Asp (OMpe) -OH;
Fmoc-Cys (Trt) -OH;
Fmoc-Gln (Trt) -OH;
Fmoc-Glu (OtBu) -OH;
Fmoc-Gly-OH;
Fmoc-Leu-OH;
Fmoc-Lys (Boc) -OH;
Fmoc-Lys (Fmoc) -OH;
Fmoc-Phe-OH;
Fmoc-Pro-OH;
Fmoc-Ser (tBu) -OH;
Fmoc-Ser (Trt) -OH;
Fmoc-Thr (tBu) -OH;
Fmoc-Trp (Boc) -OH;
Fmoc-Tyr (tBu) -OH;
Fmoc-Val-OH。

[0063] 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-20AP, SPD-M20A, CTO-20AC, and CBM-2

0 A) ;

b) : Waters AutoPurification System ;

c) : Waters AutoPurification System
with SQD ;

d) : Waters Preparative HPLC System ;

なお、使用したカラムを含む精製条件はそれぞれの実施例に示した。

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。

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1 または2 を用いた。勾配B (%) はX/Y/Z のいずれかの条件を用いて分析を行った。

[0064] 基本分析装置および基本条件1

装置 : Shimadzu LC/MS system (LC-20AD
XR, CTO-20AC, SPD-M20A, SIL-20AXR,
CBM-20A and LCMS-2020)

カラム : Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 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%/7.15min, 60-95%/0.3min, 95-95%/1.55min; Y : 5-45%/7.15min, 45-95%/0.3min, 95-95%/1.55min

[0065] 基本分析装置および基本条件2

装置: UPLC H-Class with SQD2 mass spectrometer (Waters)

カラム: Kinetex EVO C18 1.7 μ m 2.1 x 50mm, 100Å

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: 0.6mL/min

波長: 220nm

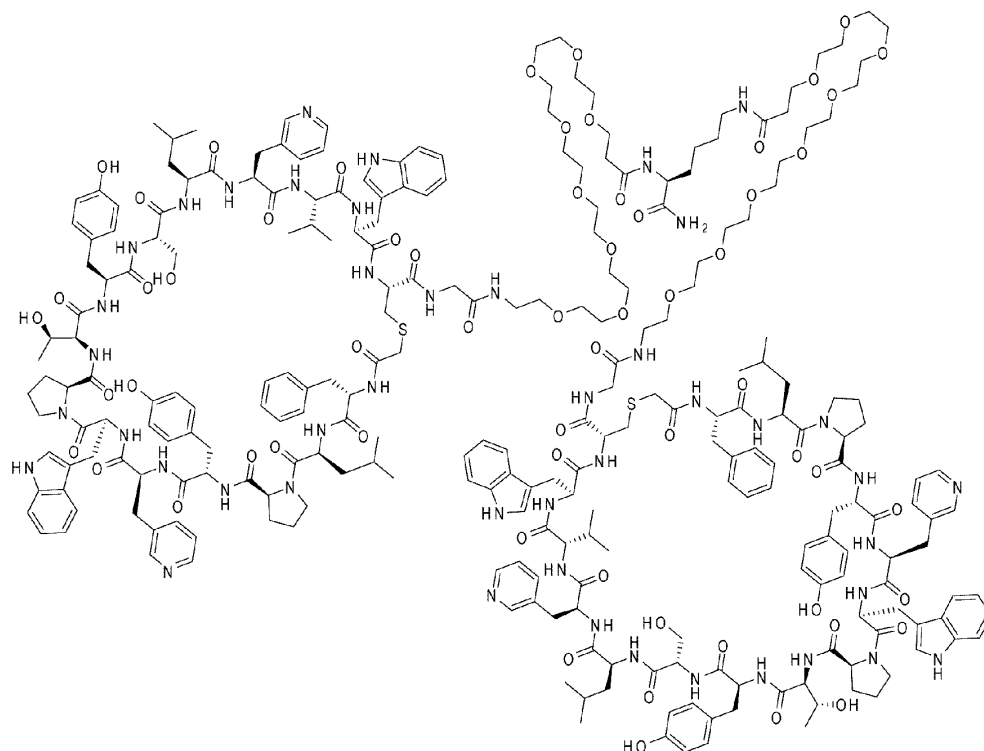
勾配B (%) : Z : 5-95%/2.10min, 95-95%/0.75min

[0066] 実施例1 ペプチド複合体（ダイマー構造番号2）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2の複合体であり、表3のダイマー構造番号2）を合成した。当該ペプチド複合体は、実施例1-1又は実施例1-2のいずれの方法を用いても合成することができる。

[0067]

[化1]



[0068] 实施例 1-1

NovaPEG Rink amide resin (Merck, 0.49mmol/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 IIを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (12.6当量/11.2当量/25.2当量)を用い25℃下、60分間2回反応を行った。ただしリンカー部分PEG8cの導入は25℃下、60分間1回反応を行った。

Fmoc 除去は、25℃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25℃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基を除去したのち、クロロ酢酸（12.6当量）のDMF溶液、HCTU（12当量）のDMF溶液、DIEA（25当量）のDMF溶液を固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。

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で5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A（TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物）を加え、室温で60分振盪した。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少量のジエチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒にて洗浄後、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2.5mMとなるようにDMSOに溶解後、トリエチルアミン（10当量）を加えて、室温で終夜振盪した。得られた反応溶液をGenevac EZ-2 Eliteを用いてペプチド濃度が25mMになるように減圧濃縮した。

得られた上記反応溶液はギルソン社のカラムを用い固相抽出した（カラム：Gilson ASPEC C18 50mg 1mL）：（1）カラムを抽出液A（0.1% TFA in 95% MeCN/H₂O, 0.3mL）で洗浄した。（2）抽出液B（0.1% TFA in 5% MeCN/H₂O, 0.3mL）でカラムを平衡化した。（3）上記反応溶液0.02mLをカラムにローディングした。（4）抽出液B（0.4mL）でカラムを洗浄した。（5）抽出液A（0.4mL）で抽出した。得られた抽出液をEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

目的物の主たるピークの一つの純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長220nm）クロマトグラムの面積比から算出し55.3%であった。

分析条件：保持時間＝1.52分；カラム：Kinetex EVO C18 1.7 μ m 2.1 x 50mm, 100Å；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）：2.10分間かけて5－95%，その後0.75分間かけて95－95%；流速：0.6 mL／分

ESI-MS（+） 観測値m/z＝1274.4（M+4H）⁴⁺.

[0069] 実施例1－2

NovaPEG Rink amide resin（Merck, 0.49 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Syrío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（8.4当量／8当量／16当量）を用いDMF中75℃下、20分間2回反応を行った。ただし15残基目は室温下、20分間1回反応を行った。16残基目、リンカー部分PEG8c、およびKの導入は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、クロロ酢酸（10.6当量）、DIPCI（10.5当量）とHOSu（10.6当量）をDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えClAcOSuのDCM／DMF溶液を調整したものを固相樹脂に加え室温にて150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で5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A (TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、室温で90分振盪した。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少量の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1 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3時間攪拌した。得られた反応溶液に酢酸を加えたのち、Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0070] 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, 50 x 150 mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40°C; グラジエント (%B conc): 3分間かけて12-37%, その後8分間かけて37-42%, その後1分間かけて42-60%; 流速: 120 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85.03%であった。

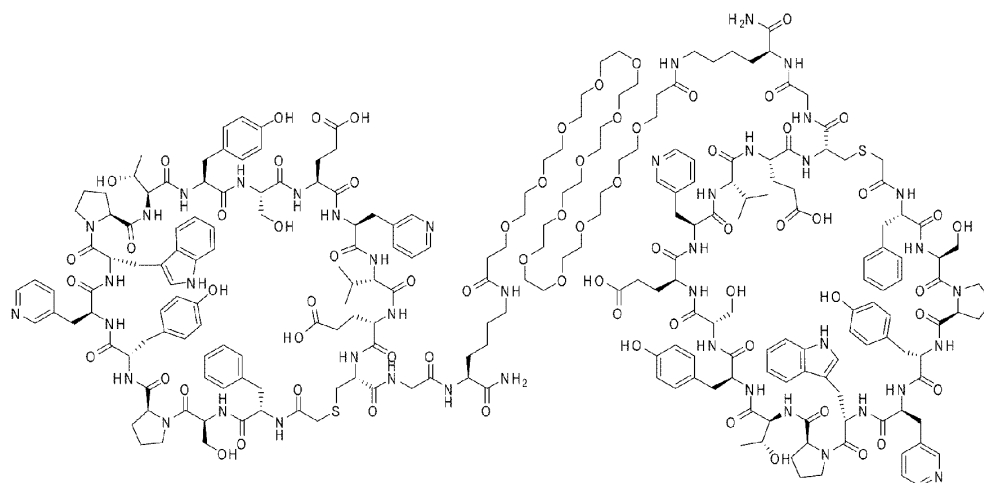
分析条件: 保持時間=4.82分; カラム: Kinetex EVO C18, 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60 °C; グラジエント (%B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.30分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流速: 0.5 mL/分

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1274.1 (M+4H)⁴⁺.

[0071] 実施例2 ペプチド複合体 (ダイマー構造番号48) 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 15 とリンカー構造番号 7 の複合体であり、表 3 のダイマー構造番号 48）を合成した。

[0072] [化2]



[0073] 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、CEM社の Liberty Blue 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 等量に対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure（4.2 当量/8 当量/4 当量）を用い DMF 中 75℃下，10 分間 1 回反応を行った。ただし 2 残基目，3 残基目，6 残基目，7 残基目は 75℃下，10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃下，20 分間 1 回反応を行った。Fmoc 除去は，75℃下 20%ピペリジンの DMF 溶液と 3 分間反応させる条件を基本として用いた。ただし 1 残基目，5 残基目は室温下 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 10 分間反応させる条件を用いた。

クロロアセチル基の導入は，前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し，前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基

を除去したのち、0.2 M クロロ酢酸（5 当量）のDMF 溶液、0.5 M H A T U（5 当量）のDMF 溶液、及び1 M D I E A（10 当量）のDMF 溶液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、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF で5 回と塩化メチレンで3 回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A（T F A / H₂O / T I S / D O D T の体積比92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物）を加え、室温で60 分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を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少量の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MeCN / H₂O（1 / 1）に溶解後、トリエチルアミン（10 当量）を加えて、室温で6 時間振盪した。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 XBridge（登録商標）C18，50 x 150 mm；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）：2 分間5%，その後1 分間かけて5 - 19%，その後8 分間かけて19 - 24%，その後1 分間かけて24 - 60%；流速：1 分間（20 mL / 分），その後1 分間かけて（20 mL / 分 - 120 mL / 分），その後（120 mL / 分）。

ここで得られた環状ペプチドをペプチドAとし、そ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

99.43%であった。

分析条件：保持時間＝4.52分；カラム：Kinetex EVO C18, 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100 Å；移動相：A＝0.025% TFA in H_2O , 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5－45%，その後0.30分間かけて 45－95%，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 ＝ 710.4 (M+3H) 3+.

ペプチド複合体の合成は、上記で得られたペプチドAをペプチド複合体の終濃度が25 mMとなるようにDMFに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えた後、0°Cで0.5当量のNHS－cPEG13c－NHSを加え、室温で1時間振盪した。

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, 30 $\times$ 150mm；移動相：A＝0.1% TFA in H_2O , B＝0.1% TFA in MeCN；温度：50 °C；グラジエント (%B conc)：3分間かけて5－26%，その後8分間かけて26－31%，その後1分間かけて31－60%；流速：45 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93.88%であった。

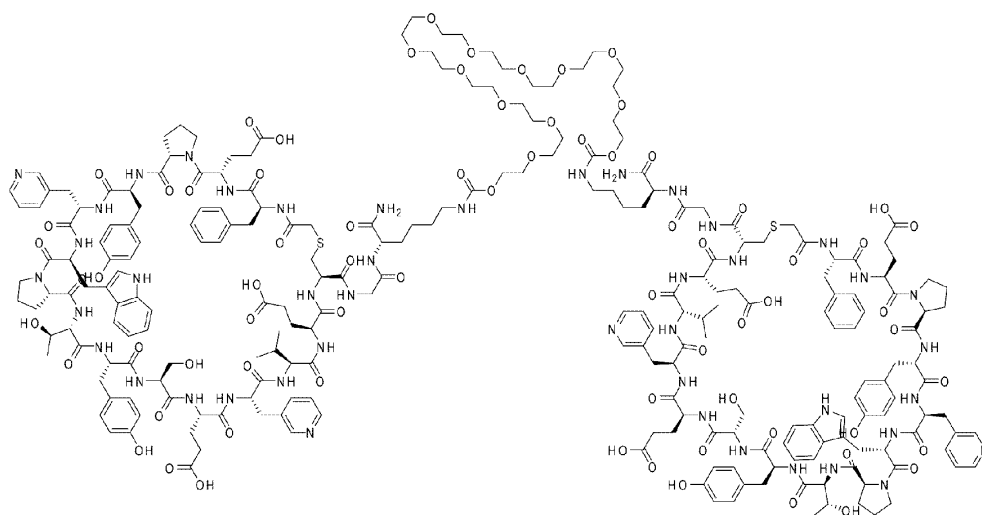
分析条件：保持時間＝6.02分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100 Å；移動相：A＝0.025% TFA in H_2O , B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60 °C；グラジエント (%B conc)：7.15分間かけて5－45%，その後0.30分間かけて 45－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流速：0.5 mL／分

ESI－MS (+) 観測値 m/z ＝ 1228.8 (M+4H) 4+.

[0074] 実施例3 ペプチド複合体 (ダイマー構造番号57) 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 17 とリンカー構造番号 14 の複合体であり、表 3 のダイマー構造番号 57）を合成した。

[0075] [化3]



[0076] 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、CEM社のLiberty Blue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 等量に対し、Fmoc-AA / DIPCl / Oxyma pure（4.2 当量 / 8 当量 / 4 当量）を用い DMF 中 75℃下、10 分間 1 回反応を行った。ただし 2 残基目、6 残基目は 75℃下、10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃下、15 分間、又は 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 10 分間反応させる条件、又は 75℃下 20% ピペリジンの DMF 溶液と 3 分間反応させる条件を用いた。

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（5当量）、DIPCI（5当量）とHOSu（5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、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-B（TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比90：2.5：2.5：5の混合物）を加え、室温で90分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶液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0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥した。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5mM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10時間振盪した。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 XBridge（登録商標） C18， 50 x 150mm；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）：2分間5%，その後1分間かけて5-19%，その後8分間かけて19-24%，その後1分間かけて24-60%；流速：1分間（20mL/分），その後1分間かけて（20mL/分-120mL/分），その後（120mL/分）。

ここで得られた環状ペプチドをペプチドBとし、そ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99.69%であった。

分析条件：保持時間=4.51分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150mm, 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5-45%，その後0.30分間かけて45-95%，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 = 724.4 (M+3H)³⁺.

ペプチド複合体の合成は、上記で得られたペプチドBをペプチド複合体の終濃度が25 mMとなるようにDMFに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えた後、0°Cで0.5当量のNHS-OCOPEG13OCO-NHSを加え、室温で1時間振盪した。

得られた混合物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XBridge (登録商標) C18, 30 x 150mm；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5-26%，その後8分間かけて26-31%，その後1分間かけて31-60%；流速：45 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91.04%であった。

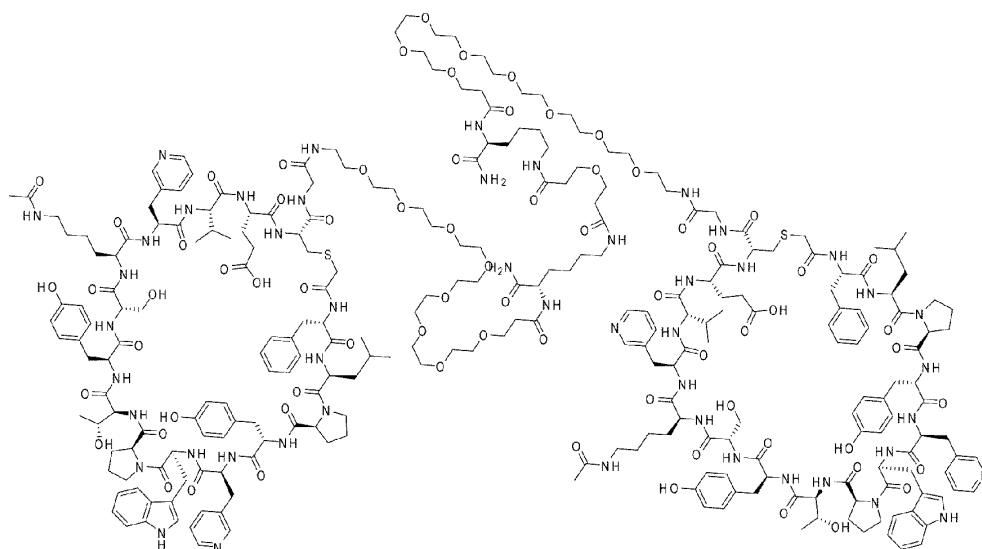
分析条件：保持時間=5.95分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150mm, 100 Å；移動相：A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60 °C；グラジエント (%B conc)：7.15分間かけて5-45%，その後0.30分間かけて45-95%，その後1.55分間かけて95-95%；流速：0.5 mL/分

ESI-MS (+) 観測値m/z = 1235.7 (M+4H)⁴⁺.

[0077] 実施例4 ペプチド複合体（ダイマー構造番号40）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36とリンカー構造番号4の複合体であり、表3のダイマー構造番号40）を合成した。

[0078] [化4]



[0079] Sieber amide resin（渡辺化学，0.48mmol/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等量に対し、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2残基目、3残基目、6残基目、7残基目は90℃下、3分間2回反応を行った。15残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。

Fmoc除去は、室温下10%ピロリジンのDMF溶液と1分間反応させた後、溶液を除去後、再度室温下10%ピロリジンのDMF溶液と1分間反応させる条件、又は90℃下10%ピロリジンのDMF溶液と1分間反応さ

せる条件を用いた。

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

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 で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A（TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物）を加え、室温で 90 分間振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を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 0℃ に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥した。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 2.5 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 4 時間振盪した。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、ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 2.5 mM となるように DMSO に溶解後、NHS-cPEG1c-NHS（0.46 当量）、及び DIEA（5 当量）を加えて室温で 2 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（登録商標） C18， 30 x 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): 0.1 分間かけて 5-1.1%, その後 4.9 分間かけて 1.1%, その後 1 分間かけて 1.1-5%, その後 3 分間かけて 5-30.6%, その後 9 分間かけて 30.6-35.7%, その後 1 分間かけて 35.7-60%; 流速: 0.1 分間かけて (4.4 mL/分-9 mL/分), その後 4.9 分間 (9 mL/分), その後 1 分間かけて (9 mL/分-4.4 mL/分), その後 (4.4 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 79.87% であった。

分析条件: 保持時間 = 3.75 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 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 = 1341.8 (M+4H)⁴⁺.

[0080] 実施例 5 各種ペプチド合成

本実施例では、実施例 1~4 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 1, リンカーの構造を表 2, 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 3 に示す。

合成したペプチド複合体は、実施例 1~4 に記載する分析条件で分析し、質量スペクトル分析法における ESI-MS (+) により構造を確認した。得られた ESI-MS (+) 観測値と保持時間, その場合における価数を表 3 に示す。

[0081]

[表1-1]

ペプチド 配列番号	ペプチド配列															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
3	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	W	C	G
4	F	E	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	W	C	G
5	F	S	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	W	C	G
6	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	W	C	G
7	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	P	C	G
8	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	Y	C	G
9	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	S	C	G
10	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	A	C	G
11	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	E	C	G
12	F	S	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	W	C	G
13	F	S	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	E	C	G
14	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G
15	F	S	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G

[0082] [表1-2]

ペプチド 配列番号	ペプチド配列															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
16	F	E	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	S	C	G
17	F	E	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G
18	F	E	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	S	C	G
19	F	S	P	Y	3Py	W	P	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
20	F	S	P	Y	3Py	W	P4Sh	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
21	F	S	P4Sh	Y	3Py	W	P4Sh	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
22	F	D	P	Y	3Py	W	P4Sh	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
23	F	S	P	F4COO	3Py	W	P4Sh	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
24	F	S	P4Sh	F4COO	3Py	W	P4Sh	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
25	F	D	P4Sh	F4COO	3Py	W	P4Sh	S	Y	S	L	4Py	V	E	C	G
26	F	Q	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	E	C	G
27	F	Cit	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	L	3Py	V	E	C	G
28	F	S	P	Y	3Py	W	P	T	Y	SMe	L	3Py	V	E	C	G
29	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G
30	4Py	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G

[0083] [表1-3]

ペプチド 配列番号	ペプチド配列															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
31	F	Q	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G
32	F	Cit	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G
33	F	L	P	F4CON	3Py	W	P	T	Y	S	E	3Py	V	E	C	G
34	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	Hgl	3Py	V	E	C	G
35	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	Atp	3Py	V	E	C	G
36	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	KAc	3Py	V	E	C	G
37	F	L	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	A4paa	3Py	V	E	C	G
38	F	S	P	Y	3Py	W	P	T	Y	SMe	E	3Py	V	E	C	G
39	F	Q	P	Y	3Py	W	P	T	Y	SMe	E	3Py	V	E	C	G
40	F	Q	P	Y	3Py	W	P	T	Y	S	Hgl	3Py	V	E	C	G
41	4Py	Q	P4Sh	F4CON	3Py	W	P	S	Y	SMe	A4paa	4Py	V	E	C	G

[0084]

[表2]

リンカー 構造番号	リンカー配列				
1	PEG4c	K	PEG4c		
2	PEG8c	K	PEG8c		
3	PEG12c	K	PEG12c		
4	PEG8c	K	cPEG1c	K	PEG8c
5	K	cPEG5c	K		
6	K	cPEG9c	K		
7	K	cPEG13c	K		
8	K	cPEG17c	K		
9	dk	cPEG17c	dk		
10	PEG2c	K	cPEG1c	K	PEG2c
11	PEG4c	K	cPEG1c	K	PEG4c
12	PEG6c	K	cPEG1c	K	PEG6c
13	PEG8c	dk	cPEG1c	dk	PEG8c
14	K	OCOPEG13OCO	K		

[0085] [表3-1]

ダイマー 構造番号	ペプチド 配列番号	リンカー 構造番号	Ret time	ESI (m/z)	[M+XH] ⁺	基本分析装置及び基本条件 1
						勾配B (%)
1	3	1	4.67	1186.06	4	X
2	3	2	4.82	1274.10	4	X
3	3	3	4.95	1362.22	4	X
4	4	2	4.34	1282.13	4	X
5	5	2	4.36	1261.04	4	X
6	6	2	4.38	1282.06	4	X
7	7	2	4.27	1229.89	4	X
8	8	2	4.28	1262.94	4	X
9	9	2	4.19	1224.60	4	X
10	10	2	4.38	1216.53	4	X
11	11	2	4.20	1245.62	4	X
12	12	2	3.85	1269.02	4	X
13	13	2	3.60	1232.83	4	X
14	14	2	3.80	1253.53	4	X
15	15	2	5.80	1240.87	4	Y
16	16	2	3.57	1232.83	4	X
17	17	2	3.25	1261.53	4	X
18	18	2	3.11	1240.81	4	X
19	19	2	3.64	1225.60	4	X
20	20	2	3.43	1233.61	4	X

[0086] [表3-2]

ダイマー 構造番号	ペプチド 配列番号	リンカー 構造番号	Ret time	ESI (m/z)	[M+XH]X+	基本分析装置及び基本条件 1
						勾配B (%)
21	21	2	3.19	1241.60	4	X
22	22	2	3.41	1247.53	4	X
23	23	2	3.32	1247.52	4	X
24	24	2	3.11	1255.41	4	X
25	25	2	3.27	1269.64	4	X
26	19	4	3.48	1293.34	4	X
27	22	4	5.88	1315.76	4	Y
28	25	4	3.12	1337.36	4	X
29	26	2	3.76	1253.17	4	X
30	27	2	3.78	1267.66	4	X
31	28	2	3.80	1239.94	4	X
32	29	4	3.72	1321.41	4	X
33	15	4	3.18	1308.38	4	X
34	30	4	5.37	1321.89	4	Y
35	31	4	3.09	1328.90	4	X
36	32	4	3.08	1343.40	4	X
37	33	4	3.70	1335.00	4	X
38	34	4	3.72	1328.28	4	X
39	35	4	3.86	1334.29	4	X
40	36	4	3.75	1341.82	4	X

[0087] [表3-3]

ダイマー 構造番号	ペプチド 配列番号	リンカー 構造番号	Ret time	ESI (m/z)	[M+XH]X+	基本分析装置及び基本条件 1
						勾配B (%)
41	37	4	3.44	1362.86	4	X
42	38	4	3.55	1315.43	4	X
43	39	4	3.46	1335.95	4	X
44	40	4	3.14	1335.90	4	X
45	41	4	4.20	928.95	6	Y
46	15	5	3.45	1140.65	4	X
47	15	6	3.58	1184.68	4	X
48	15	7	6.02	1228.75	4	Y
49	15	8	3.81	1272.83	4	X
50	15	9	3.81	1272.81	4	X
51	15	10	2.90	1176.14	4	X
52	15	11	3.00	1220.18	4	X
53	15	12	3.10	1264.27	4	X
54	15	13	3.22	1308.30	4	X
55	15	14	5.96	1214.71	4	Y
56	17	7	5.86	1249.73	4	Y
57	17	14	5.95	1235.71	4	Y

[0088] 実施例6 pERK AlphaLISAアッセイによるTrkBアゴニスト活性評価

本発明のTrkBアゴニストペプチドのTrkBの活性化能を評価する為

に、ERKのリン酸化を検証した。CellSensor（登録商標） TrkB-NFAT-bla CHO-K1 Cell（Invitrogen）を10% FBS（Thermo）と1×Non-essential amino acids（Thermo）、25mM HEPES（Thermo）、50ug/mL Gentamicin、5ug/mL Blasticidin（Thermo）、200ug/mL Zeocin（Thermo）を含むDMEM、high glucose、GlutaMAX（登録商標） Supplement、pyruvate（Thermo）で培養した。Accutase（Innovative cell technologies）を用いて細胞を剥離後、1ウェルあたり12500細胞となるように接着細胞用96穴プレートに播種し、一晚培養した。翌日スタベーションの為上記の培養液からFBSとBlasticidin、Zeocinを除いた培地に0.1% BSA（Sigma）が含まれた栄養飢餓培地に交換し4時間培養した。その後Recombinant Human BDNF Protein（R&D systems）もしくはペプチドを加え、15分刺激後、AlphaLISA SureFire Ultra p-Erk1/2（Thr202/Tyr204） 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、BDNF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。ペプチドを1nM添加時に50%以上活性があるものをA、10nM添加時に50%以上活性があるものをBとした。

BDNFの添加濃度は10nMから4倍希釈で8点（0.0006nM～10nM）で評価した。

ペプチドの添加濃度はダイマー構造番号1～3については1, 10, 100 nM, それ以外については0.1, 1, 10 nMで評価した。また濃度依存性曲線作成時は100 nMから4倍希釈で8点(0.006 nM～100 nM)で評価した。

[0089] 結果を表4及び図1に示す。表4に示されたとおり、合成したペプチド複合体はTrkBアゴニスト活性を有することが示された。また、図1に示されたとおり、合成したペプチド複合体(表3におけるダイマー構造番号48及び56)は脳由来神経栄養因子(BDNF)と同様のTrkBアゴニスト活性を有することが示された。

[0090] [表4-1]

ダイマー構造番号	pERK(aLISA)アッセイ結果	NFATアッセイ結果
1	B	C
2	B	B
3	B	B
4	B	B
5	B	not tested
6	A	A
7	B	A
8	B	not tested
9	B	A
10	B	B
11	A	A
12	A	A
13	A	A
14	A	A
15	A	A
16	A	A
17	A	A
18	A	A
19	A	A
20	A	A

[0091]

[表4-2]

ダイマー構造番号	pERK(aLISA)アッセイ結果	NFATアッセイ結果
21	A	A
22	A	A
23	A	A
24	A	A
25	A	A
26	A	A
27	A	A
28	A	A
29	A	A
30	A	A
31	A	A
32	A	A
33	A	A
34	A	A
35	A	A
36	A	A
37	A	A
38	A	A
39	A	A
40	A	A

[0092]

[表4-3]

ダイマー構造番号	pERK(aLISA)アッセイ結果	NFAT アッセイ結果
41	A	A
42	A	A
43	A	A
44	A	A
45	A	A
46	A	A
47	A	A
48	A	A
49	A	A
50	A	A
51	A	A
52	A	A
53	A	A
54	A	A
55	A	A
56	A	A
57	A	A

[0093] 実施例7 NFATアッセイによるTrkBアゴニスト活性評価

本発明のTrkBアゴニストペプチドのTrkBの活性化能を評価する為に、レポーターによる転写活性を検証した。AlphaLISAで使用したCellSensor（登録商標）TrkB-NFAT-bla CHO-K1 Cell（Invitrogen）を上記の培地で培養した。Accutase（Innovative cell technologies）を用いて細胞を剥離後、1ウェルあたり12500細胞となるように、培地からBlasticidinとZeocinを除いたアッセイ用培地で懸濁後、接着細胞用96穴プレートに播種し、一晚培養した。その後、BDNFまたはペプチドを入れてCO₂インキュベーターで5時間培養した。インキュベーターから取り出し室温に戻した後、遮光下で検出試薬（LiveB LAzer（登録商標）-FRET B/G（CCF4-AM）Substrate Mixture）を加えて、蓋をして湿箱内で遮光下2時間インキュベートした。シグナルの検出にはMultilabel Read

er Envision 2104 (PerkinElmer) を使用し、460nm/535nm 励起シグナルを算出した。得られた数値を GraphPad Prism で解析し、BDNF 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。ペプチドを 1 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを A、10 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを B、100 nM 添加時に 50% 以上活性があるものを C とした。また評価を実施しなかったものについては not tested とした。

BDNF の添加濃度は 10 nM から 4 倍希釈で 7 点 (0.0024 nM ~ 10 nM) で評価した。

ペプチドの添加濃度はダイマー構造番号 1 ~ 3 は 1, 10, 100 nM, それ以外は 0.1, 1, 10 nM で評価した。また濃度依存性曲線作成時は 25 nM から 4 倍希釈で 7 点 (0.006 nM ~ 100 nM) で評価した。

[0094] 結果を表 4 及び図 2 に示す。表 4 に示されたとおり、合成したペプチド複合体は TrkB アゴニスト活性を有することが示された。また、図 2 に示されたとおり、合成したペプチド複合体 (表 3 におけるダイマー構造番号 48 及び 56) は脳由来神経栄養因子 (BDNF) と同様の TrkB アゴニスト活性を有することが示された。

[0095] 実施例 8 PathHunter アッセイによる TrkB アゴニスト活性評価

本発明の TrkB アゴニストペプチドの TrkB の活性化能を評価する為に、TrkB のリン酸化を検証した。PathHunter (登録商標) eXpress TrkB Functional Assay キット (DiscoverX 社; 細胞, 96 穴プレート, 培地, 検出試薬付属) を用いて添付のプロトコールに沿って実施し評価した。凍結細胞を融解し培地で懸濁後 96 穴プレートに 1 ウェルあたり 10000 細胞播種し、48 時間培養した。その後 Recombinant Human BDNF Protein (R&D systems) もしくはペプチドを加え 3 時間刺激

後、検出試薬を加えた。遮光下室温で60分反応させて、SpectraMax Paradigm multimode microplate reader (Molecular Devices) で発光シグナルを測定した。得られたシグナルをGraphPad Prismで解析し、BDNF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。

BDNFの添加濃度は100 nMから4倍希釈で8点(0.006 nM~100 nM)で評価し、ペプチドの添加濃度は以下に示すA~Cの測定レンジで評価した。

測定レンジA=100 nMから5倍希釈で6点(0.032 nM~100 nM)

測定レンジB=100 nMから4倍希釈で8点(0.006104 nM~100 nM)

測定レンジC=10 nMから10倍希釈で4点(0.01 nM~10 nM)

[0096] 結果を表5及び図3に示す。表5に示されたとおり、合成したペプチド複合体はTrkBアゴニスト活性を有することが示された。また、図3に示されたとおり、合成したペプチド複合体(表3におけるダイマー構造番号48及び56)は脳由来神経栄養因子(BDNF)と同様のTrkBアゴニスト活性を有することが示された。

[0097]

[表5]

ダイマー構造番号	PathHunter		
	EC50 (nM)	E _{max}	測定範囲
2	0.8~4	89%	A
3	0.8~4	89%	A
14	0.197	86%	A
15	0.290	104%	A
18	0.260	93%	A
33	0.354	96%	A
47	0.556	107%	A
49	0.644	107%	A
51	0.599	106%	A
48	0.421	102%	B
56	0.358	93%	B
55	0.581	104%	C
57	0.669	99%	C

[0098] 実施例9 表面プラズモン共鳴 (SPR) による Trk A, Trk B, Trk C とペプチドとの分子間相互作用評価試験

本実施例では、合成したペプチド複合体 (表3におけるダイマー構造番号 48 及び 56) について、Trk A, Trk B, Trk C に対するペプチドの表面プラズモン共鳴 (SPR) による分子間相互作用を、以下に示す方法によって試験を実施した。具体的な試験方法を以下に示す。

[SPR測定]

Biacore T200 (Cytiva) に CM5 センサーチップ (Cytiva) を挿入し、ランニング緩衝液: HBS-EP+ (Cytiva) でプライム操作を3回実施し、流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で平衡化した。60 mM EDC 溶液 (Cytiva), 650 mM NHS 溶液 (Cytiva) を各々 $50 \mu\text{L}$ ずつ混合させた後、流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で420秒反応させた。10 mM 酢酸溶液 (pH 5.0) で希釈して $30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ Anti-human IgG (Fc) antibody (Cytiva) 溶液 $135 \mu\text{L}$ 調製し、流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で360秒反応させ CM3 センサーチップに Anti-human IgG (Fc) antibody を固定化し

た。固定化後、1.0M エタノールアミン水溶液 (Cytiva) を流速 $10\mu\text{L}/\text{min}$ で420秒反応させキャッピングを行った。流速 $10\mu\text{L}/\text{min}$ で200nM Recombinant Human TrkA Fc Chimera Protein, Recombinant Human TrkB Fc Chimera Protein, Recombinant Human TrkC Fc Chimera Protein (R&D systems) 溶液を60秒反応させ、キャプチャーさせた。DMSO溶液中で10mMに調製されたペプチド溶解液を、終濃度が $10\mu\text{M}$ のペプチド溶解液になるようにランニング緩衝液で希釈した後、50nM, 25nM, 12.5nM, 5nM, 2.5nMのペプチド溶液を作製した。上述のサンプルを用い、TrkA, TrkB, TrkCに対するペプチドのカイネティクスをSPR測定により取得した。TrkA, TrkB, TrkCとペプチドを反応させた後、3M MgCl溶液を $10\mu\text{L}/\text{min}$ で180秒反応させ、再生化を実施した。

カイネティクス評価モデルは、Single Cycle Kineticsとし、Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0 (Cytiva) を使用してカーブフィッティングを行った。得られたセンサーグラムに対して、最小二乗法によるカーブフィッティングを実施し、そのKd値(解離定数)を求めることでペプチドのTrkA, TrkB, TrkCに対する結合を評価した。

結果を図4に示す。図4に示されたとおり、合成したペプチド複合体(表3におけるダイマー構造番号48および56)はTrkAおよびTrkCへの結合は見られず、TrkBに対してのみ結合が確認された。合成したペプチド複合体のTrkBへの結合において、koff(解離速度定数)が測定限界を超えたため、下限理論値koff: $0.00001(1/\text{s})$ を採用してKdを算出した。Kdは100pM以下であった。

産業上の利用可能性

[0099] この発明は、医薬産業や生物工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、T r k B結合活性を有するペプチド複合体であって、

前記第1のペプチドは、

$X^1-X^2-X^3-X^4-3Py-W-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-V-X^{11}-C$ （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、1～4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、側鎖に芳香族環を有するアミノ酸であり、

X^2 は、任意のアミノ酸であり、

X^3 は、2級アミノ酸であり、

X^4 は、側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸であり、

X^5 は、2級アミノ酸であり、

X^6 は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^7 は、側鎖に置換されていても良い芳香族環を有するアミノ酸であり、

X^8 は、側鎖に鎖状アルキル基を有するアミノ酸であり、

X^9 は、任意のアミノ酸であり、

X^{10} は、側鎖に芳香族環を有するアミノ酸であり、

X^{11} は、任意のアミノ酸である、

ペプチド複合体。

[請求項2] 請求項1に記載のペプチド複合体であって、

X^2 は、側鎖に鎖状または環状アルキル基を有するアミノ酸であり、

,

X^3 は、プロリン又はプロリン誘導体であり、

X^4 は、チロシン又はチロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換

されたアミノ酸であり、

X⁵は、プロリン又はプロリン誘導体であり、

X⁶は、側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、チロシン又はチロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されたアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に鎖状アルキル基と極性基を有するアミノ酸であり、

X⁹は、側鎖における官能基の炭素数が3以上のアミノ酸である、
ペプチド複合体。

[請求項3]

請求項2に記載のペプチド複合体であって、

X²は、側鎖に極性基をさらに有するアミノ酸であり、

X⁶は、側鎖に鎖状アルキル基と水酸基を有するアミノ酸であり、

X⁷は、チロシン又はチロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されたアミノ酸であり、

X⁸は、側鎖に鎖状アルキル基と置換されても良い水酸基を有するアミノ酸であり、

X⁹は、側鎖に鎖状または環状アルキル基を有するアミノ酸である

,

ペプチド複合体。

[請求項4]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

X¹は、4 P y 又は F であり、

X²は、a l T, C i t, D, E, L, Q, 又は S であり、

X³は、P 又は P 4 S h であり、

X⁴は、F 4 C O N, F 4 C O O, 又は Y であり、

X⁵は、H y P, P, 又は P 4 S h であり、

X⁶は、S, 又は T であり、

X⁷は、F 4 C O N, 又は Y であり、

X⁸は、S, 又は S M e であり

X⁹は、A 4 p a a, A t p, E, H g l, K A c, 又は L であり

,

X¹⁰は、3 P_y又は4 P_yであり、

X¹¹は、A、E、MeE、P、S、又はWである、

ペプチド複合体。

[請求項5]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

前記第1のペプチドは、

F-L-P-Y-3 P_y-W-P-T-Y-S-L-3 P_y-V-W-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。

[請求項6]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

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。

[請求項7]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

前記第1のペプチドは、配列番号2～41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。

[請求項8]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

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。

[請求項9]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、TrkBアゴニスト活性を有するペプチド複合体。

[請求項10]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

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。

[請求項11]

請求項1に記載のペプチド複合体であって、

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、1～4 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。

[請求項12] 請求項 1 1 に記載のペプチド複合体であって、前記第 1 のペプチドと前記第 2 のペプチドの相同性が 80%以上 100%以下である、ペプチド複合体。

[請求項13] 請求項 1 1 に記載のペプチド複合体であって、前記第 1 のペプチドと前記第 2 のペプチドが実質的に同じホモダイマーである、ペプチド複合体。

[請求項14] 請求項 1 1 に記載のペプチド複合体であって、前記リンカーが PEG リンカーである、ペプチド複合体。

[請求項15] 請求項 1 に記載のペプチド複合体と担体とを含む組成物。

[請求項16] 請求項 1 に記載のペプチド複合体と担体とを含み、医療用、診断用又は研究用に用いられる組成物。

[請求項17] 請求項 1 に記載のペプチド複合体と担体とを含み、細胞培養に用いられる細胞培養用組成物。