

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7698318号
(P7698318)

(45)発行日 令和7年6月25日(2025.6.25)

(24)登録日 令和7年6月17日(2025.6.17)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08 Z N A
C 0 7 K 7/54 (2006.01)	C 0 7 K 7/54
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 4 (全40頁)

(21)出願番号 特願2022-511913(P2022-511913)	(73)特許権者 000119472 一丸ファルコス株式会社 岐阜県本巣市浅木3 1 8 番地 1
(86)(22)出願日 令和3年3月19日(2021.3.19)	(74)代理人 110003557 弁理士法人レクシード・テック
(86)国際出願番号 PCT/JP2021/011316	(72)発明者 坂元 孝太郎 岐阜県本巣市浅木3 1 8 番地 1 一丸ファルコス株式会社内
(87)国際公開番号 WO2021/200259	(72)発明者 吾郷 由希夫 広島県広島市南区霞一丁目2 番 3 号 国立大学法人広島大学内
(87)国際公開日 令和3年10月7日(2021.10.7)	審査官 田ノ上 拓自
審査請求日 令和5年11月20日(2023.11.20)	
(31)優先権主張番号 特願2020-59721(P2020-59721)	
(32)優先日 令和2年3月30日(2020.3.30)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	

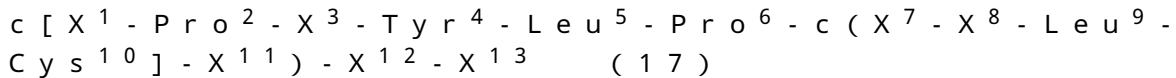
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 V I P R 2 アンタゴニストペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(17)：



(式中、X¹は、システインを表し、

X³は、2-アゼチジン-2-カルボン酸、プロリン、ヒドロキシプロリン、3,4-デヒドロプロリン、ピペコリン酸、セリン又はリジンを表し、

X⁸は、チロシン、プロリン又はアルギニンを表し、

X⁷及びX¹¹は、リジンとアスパラギン酸、アスパラギン酸とリジン、リジンとグルタミン酸、又はグルタミン酸とリジンのいずれかの組み合わせを表し、

X¹²及びX¹³は、それぞれ独立にロイシン、イソロイシン又はノルロイシンを表し、

X¹とCys¹⁰は、それぞれの側鎖の間でジスルフィド結合を形成し、X⁷とX¹¹は、それぞれの側鎖の間でアミド結合を形成し、それによって式(17)のペプチドは分子内に2つの環状構造を有し、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていてもよい。)で表されるアミノ酸配列からなり、V I P R 2 アンタゴニスト活性を有する環状ペプチド又は薬理学的に許容される塩。

【請求項 2】

X¹が、システインを表し、

X³が、プロリン又はセリンを表し、

10

20

X⁷が、リジンを表し、
 X⁸が、チロシンを表し、
 X¹¹が、アスパラギン酸を表し、
 X¹²及びX¹³が、それぞれ独立にロイシン、イソロイシン又はノルロイシンを表し、
 N末端アミノ基がアセチル化され、C末端カルボキシ基がアミド化されている、請求項1
 に記載の環状ペプチド又はその薬理的に許容される塩。

【請求項3】

配列番号1～10のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する環状ペプチド又はその薬理学的に許容される塩。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載の環状ペプチド又は薬理的に許容される塩を含む医薬、診断薬、及び/又は研究試薬。

【発明の詳細な説明】

【クロスリファレンス】

【0001】

本出願は、日本国において、2020年3月30日に出願された特願2020-059721号に基づく優先権を主張するものであり、当該出願に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。また、本願において引用した全ての特許、特許出願及び文献に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明細書に援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、VIPR2の活性を阻害するペプチド等に関し、詳細には特定のアミノ酸配列と環状構造を有する環状ペプチド等に関する。

【背景技術】

【0003】

Vasoactive intestinal peptide receptor 2 (VIPR2)は、VPAC2としても知られるクラスBのGタンパク質共役受容体(GPCR)である。中枢、末梢神経、感覚器、消化器、生殖器などの全身に発現しており、そのリガンドであるVasoactive intestinal peptide (VIP)やPituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)と相互作用することで多様な生理機能を示す。例えば、VIPR2やその受容体サブタイプであるVasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIPR1又はVPAC1)やPituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type-1 receptor (PAC1)を介したVIPやPACAPのシグナルは、神経保護作用を有することが知られている(非特許文献1および非特許文献2)。一方で興味深いことに、近年になって、VIPR2の高発現や過活性化が統合失調症や自閉症スペクトラム障害の発症に関与する可能性が報告されている(非特許文献3、非特許文献4、および非特許文献5)。また、VIPのシグナル阻害が癌の増殖を抑制することや免疫を賦活化することなどが報告されている(非特許文献6および非特許文献7)。

【0004】

2011年にVaccらは、一部の統合失調症患者と一部の自閉症スペクトラム障害患者がVIPR2をコードする遺伝子領域に重複を有し、そのリンパ球ではVIPR2のmRNA発現レベルが増加していること、さらにはVIPに対する反応性も過敏であることを報告した(非特許文献3)。また、2015年にAgoらは、新生マウスにVIPR2選択的なアゴニストRo25-1553を投与し、人工的にVIPR2過活性化状態を作り出したところ、成熟した個体が認知機能の低下を示すことを報告した(非特許文献4)。さらに、2019年にTianらは、VIPR2をコードする遺伝子領域に重複を持つトランスジェニックマウスを作製し、そのマウスがドーパミン機能異常、認知機能異常

10

20

30

40

50

、社会的行動障害といった症状を示すことを報告した（非特許文献5）。これらの知見は、VIPR2を介したシグナル伝達の過剰が統合失調症や自閉症スペクトラム障害といった精神疾患の発症に関与していることを強く示唆するものである。

【0005】

統合失調症は、全世界で2400万人が罹患していると言われ、陽性症状（幻覚や妄想など）、陰性症状（意欲低下など）、認知機能障害を引き起こすことで、個人の社会的機能を低下させるだけでなく、高い自殺率も示す精神疾患である。遺伝率は80%と高いが、患者全般に共通する特定の疾患原因遺伝子は同定されておらず、新たな治療薬や治療方法の開発が望まれている。自閉症スペクトラム障害は、全世界で1000人あたり約1~2人が罹患していると言われ、社会的及び対人的コミュニケーション能力の障害を引き起こす。先天性の要因が大きく、明確な予防法や治療法は確立されていない。

10

【0006】

前述のように一部の統合失調症の患者及び一部の自閉症スペクトラム障害の患者は、VIPR2を過剰発現していることが報告されており、VIPR2の過活性化が病状の発症に関与している可能性が示唆されている。すなわち、ゲノム解析でVIPR2をコードする遺伝子領域に重複を有することが確認された場合、VIPR2阻害剤の投与が、統合失調症や自閉症スペクトラム障害の発症予防及び/又は治療手段として有効であると期待できる。

【0007】

2018年に本発明者は、VIPR2の細胞外領域の組み換えタンパク質に結合し、細胞試験においてVIP及びPACAPのVIPR2を介したシグナルパスウェイを阻害する環状アンタゴニストペプチドVIPep-3:Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Arg-Leu-Cys)-Thr-Leu-Leu-Leu-Arg-Ser-OH(配列番号11)を見出したことを報告している（非特許文献8）。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, and Vaudry H. Pharmacol Rev. 2009, 61(3): 283-357.

30

【文献】Passemard S, Sokolowska P, Schwendimann L, and Gressens P. Curr Pharm Des. 2011, 17(10): 1036-1039.

【文献】Vacic V, McCarthy S, Malhotra D, Murray F, Chou HH, Peoples A, Makarov V, Yoon S, Bhandari A, Corominas R, Iakoucheva LM, Krastovskiy O, Krause V, Larach-Walters V, Welsh DK, Craig D, Kelsoe JR, Gershon ES, Leal SM, Dell Aquila M, Morris DW, Gill M, Corvin A, Insel PA, McClellan J, King MC, Karayiorgou M, Levy DL, DeLisi LE, and Sebat J. Nature. 2011, 471(7339): 499-503.

40

【文献】Ago Y, Condro MC, Tan YV, Ghiani CA, Colwell CS, Cushman JD, Fanselow MS, Hashimoto H, and Waschek JA. Psychopharmacology (Berl). 2015, 232(12): 2181-2189.

【文献】Tian X, Richard A, EI-Saadi MW, Bhandari A, Latimer B, Van Savage I, Holmes K, Klein R

50

L, Dwyer D, Goeders NE, Yang XW, and Lu XH. Mol Psychiatry 2019, doi: 10.1038/s41380-019-0492-3.

【文献】Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, and Jensen RT. Curr Pharm Des. 2003, 9(6): 495-509.

【文献】Li JM, Petersen CT, Li JX, Panjwani R, Chandra DJ, Giver CR, Blazar BR, and Waller EK. Cancer Res. 2016, 76(23): 6802-6815.

【文献】Sakamoto K, Koyama R, Kamada Y, Miwa M, and Tani A. Biochem Biophys Res Commun. 2018, 503: 1973-1979. 10

【文献】Fairlie DP and Dantas de Araujo. Biopolymers 2016, 106(6): 843-852.

【文献】Lau YH, de Andrade P, Wu Y, and Spring DR. Chem Soc Rev. 2015, 44(1) 91-102.

【文献】Chen S, Gopalakrishnan R, Schaer T, Marger F, Hovius R, Bertrand D, Pojer F, and Heinis C. Nat Chem 2014, 6(11) 1009-1016.

【文献】Hara Y, Ago Y, Taruta A, Katashiba K, Hasabe S, Takano E, Onaka Y, Hashimoto H, Matsuda T, and Takuma K. Autism Res. 2016, 9(9) 926-939. 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明者が見出した上記VIpep-3は、ヒトVIPR2の細胞外ドメインと強固に結合し、VIP-VIPR2シグナルパスウェイを阻害する環状アンタゴニストペプチドであるが、天然アミノ酸のみから構成されているためプロテアーゼ分解に対する耐性が低いことなどが懸念される。

【0010】

本発明は、かかる課題に鑑みてなされたものであって、医薬品、診断薬、及び/又は研究試薬としての使用に適した新規なVIPR2アンタゴニストペプチドを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、VIpep-3の最適化研究を実施する中で、新規のVIPR2アンタゴニストペプチド群を見出した。上記課題を解決するために、(1)アミノ酸残基の置換、(2)N末端アミノ酸残基及び/又はC末端アミノ酸残基の欠失による分子量の低減、そして(3)二環構造の導入を検討した結果、プロテアーゼ分解耐性とVIPR2アンタゴニスト活性を有する新規のVIPR2アンタゴニストペプチドの配列群を見出し、本発明を完成するに至った。 40

【0012】

すなわち、本発明は以下の実施形態を含む。

[1]式(1):

$$c [X^N - X^4 - X^5 - X^6 - c (X^7 - X^8 - X^9 - X^{10}] - X^{11}) - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} \quad (1)$$

又は式(2):

$$c [X^N - X^4 - X^5 - X^6 - c (X^7 - X^8 - X^9 - X^{10})] - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} \quad (2)$$

で表されるアミノ酸配列からなる環状ペプチド又はその薬理学的に許容される塩。

【 0 0 1 3 】

ここで、式(1)中、 X^N と X^{10} 及び X^7 と X^{11} とは、並びに式(2)中、 X^N と X^7 と X^{10} とは、それぞれ独立に共有結合することで分子内に2つの環状構造を形成する。これらの共有結合は、主鎖-側鎖間、又は側鎖-側鎖間で直接的な共有結合を形成してもよく、又はリンカーを介した間接的な共有結合であってもよい。

上記式(1)及び(2)において、 X^N は、 $X^1 - X^2 - X^3$ であり、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^7 、 X^{10} 及び X^{11} は、ペプチド分子内の環状化に関与する場合、それぞれ独立にアミノ基、カルボキシ基、チオール基、アリル基、アルキニル基、アジド基、若しくはハロゲン原子を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、ペプチド分子内の環状化に関与しない場合、 X^1 及び X^2 は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基又は欠失を表し、 X^3 及び X^{11} は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基である。また、 X^5 、 X^9 、 X^{12} 及び X^{13} は、それぞれ独立に置換基を有していてもよい炭化水素基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表す。 X^4 は、置換基を有していてもよい芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 X^6 と X^8 は、任意のアミノ酸残基を表し、 X^{14} と X^{15} と X^{16} は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基、又は欠失を表し、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよい。

10

【 0 0 1 4 】

本発明の好ましい又は他の実施形態、及び上記環状ペプチドにおける X^1 から X^{16} の各アミノ酸残基の好ましい態様について、以下に詳細に説明するが、それぞれの好ましい態様は相互に独立しており、それぞれの実施形態は任意に組み合わせることができるものとする。

20

【発明の効果】

【 0 0 1 5 】

本発明によれば、VIPR2アンタゴニストを医薬品、診断薬、及び/又は研究試薬として使用するために有用な新規な環状ペプチドが提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 6 】

【図1】図1は、VIPep-3のVIPR2結合活性(ファーマコフォア)と環状構造規制(S-S結合)といった機能に関わるアミノ酸配列を示している。また、VIPep-3を改変した本発明ペプチドの構造の概要を示す。

30

【図2】図2は、VIPep-3の各アミノ酸ポジションにおけるアミノ酸残基の置換研究に供したアミノ酸の例と二環化を検討したアミノ酸残基の位置を示す。

【図3】図3は、アミノ酸残基を置換したペプチドのVIPR2に対する結合活性を確認するために用いた細胞ELISA法による競合結合試験の概要を示す。図中、SAはストレプトアビジン、Bはビオチン、HRPは西洋わさびペルオキシダーゼを示す。

【図4】図4は、アミノ酸残基の置換研究に供したペプチド配列群と本発明ペプチドの代表例のVIPR2に対する結合活性を親ペプチドVIPep-3のそれと比較した結果を示す。

【図5】図5は、本発明ペプチドの代表例とVIPをVIPR2発現細胞に添加し、VIPR2下流のシグナルの一つである細胞内カルシウム濃度の変化を評価した結果を示す。

40

【図6】図6は、VIPep-3と本発明ペプチドの代表例について、ラット血漿と混合し、プロテアーゼ分解に対する耐性を比較した結果を示す。

【図7】図7は、本発明ペプチドの代表例とVIPをVIPR1発現細胞に添加し、VIPR1下流のシグナルの一つである細胞内カルシウム濃度の変化を評価した結果、本発明ペプチドの代表例とVIPをVIPR2発現細胞に添加し、VIPR2下流のシグナルの一つである細胞内カルシウム濃度の変化を評価した結果、及び本発明ペプチドの代表例とPACAPをPAC1発現細胞に添加し、PAC1下流のシグナルの一つである細胞内カルシウム濃度の変化を評価した結果を示す。

【図8】図8は、VIPのアナログであり、VIPR2に選択的なアゴニストであるRo25-1553(図中Vehicleと表示)、又は本発明ペプチドの代表例とRo25

50

- 15532の混液(図中ペプチド濃度1nmol/g又は10nmol/gと表示)として、ICRマウス(12日齢)に皮下投与後、脳の前頭前皮質の細胞内のサイクリックAMP応答配列結合タンパク質(cAMP response element binding protein; CREB)(VIPR2下流シグナルの一つ)のリン酸化を評価した結果を示す。

【図9】図9(A)は、VIPのアナログであり、VIPR2に選択的なアゴニストであるRo25-1553を投与したマウスの新奇物体に対する認識機能を評価した結果を示す。図9(B)は、Ro25-1553単独で、又は本発明ペプチドの代表例とRo25-15532の混液を投与したマウスの新奇物体に対する認識機能を評価した結果を示す。

【図10】図10は、実施例で用いた本発明ペプチドの代表例の構造式を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

次に、本発明の好適な実施形態について、図面を参照して説明する。なお、以下に説明する実施形態は、特許請求の範囲に係る発明を限定するものではなく、また、実施形態の中で説明されている諸要素及びその組み合わせのすべてが本発明の解決手段に必須であるとは限らない。また、本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、全体として本明細書に参照として組み込まれる。

【0018】

(定義)

本明細書においてペプチドは、2つ以上のアミノ酸がアミド結合(ペプチド結合)で結合しているものを指し、例えば2~20アミノ酸がアミド結合したものとすることができる。また、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシ末端)である。ペプチド結合を形成するカルボニル基に隣接する1番目の炭素原子をC炭素と称する。

20

【0019】

本明細書において「任意のアミノ酸、又はその誘導体」は、その最も広い意味で用いられ、天然アミノ酸に加え、非天然構造を有する人工のアミノ酸、アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物、さらに官能基を有するカルボン酸も含む。非天然アミノ酸の例として、D体アミノ酸、主鎖の構造が天然型と異なる / -二置換アミノ酸(2-アミノイソ酪酸といった -メチル化アミノ酸など)、N-アルキル-アミノ酸(N-メチル化アミノ酸など)、N-置換グリシン(ペプトイド)、主鎖が伸長しているアミノ酸(ホモアミノ酸や ホモアミノ酸)、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸(シクロヘキシルアラニンやアリルグリシンや2-(2-ピリジル)-グリシンや3-(1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-アラニンなど)、側鎖の一部が置換されているアミノ酸(ノルロイシンやジアミノプロパン酸や3-(2-ピリジル)-アラニンなど)、側鎖に余分の官能基を有するアミノ酸; 側鎖に余分のCやアルキル基やメチル基を有するアミノ酸(ホモノルロイシンや -メチルロイシンなど)、側鎖にハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を有するアミノ酸(3-クロロ-アラニンなど)、側鎖にハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を有するカルボン酸(3-クロロプロパン酸など)、側鎖に官能基を有するカルボン酸(3-ブテン酸など)、側鎖に余分のNやアミノ基を有するアミノ酸(-アジドアラニンやオルニチンなど)、側鎖に余分のOやメトキシ基を有するアミノ酸(O-メチル-セリンやO-メチル-スレオニンなど)、側鎖に余分のヒドロキシ基を有するアミノ酸(3-ヒドロキシ-フェニルアラニンなど)、側鎖に余分のカルボキシ基(-COOH)を有するアミノ酸(3-カルボキシ-フェニルアラニンなど)、側鎖に余分のSを有するアミノ酸(エチオニンなど)、側鎖中のカルボン酸官能基がエステルで保護されているアミノ酸(アスパラギン酸-4-メチルエステルなど)、側鎖のチオ基(-S-)が酸化されてスルフィニル基(-S(=O)-)やスルホニル基(-S(=O)₂-)に変換されているアミノ酸(メチオニンスルホキシド)などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0020】

50

本明細書において、置換基を有していてもよい炭化水素基とは、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、2-エチルブチルなどのC₁₋₁₀アルキル基、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-ヘキセニル、3-ヘキセニル、5-ヘキセニルなどのC₂₋₁₀アルケニル基、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、4-ペンチニル、1-ヘキシニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、4-ヘキシニル、5-ヘキシニル、4-メチル-2-ペンチニルなどC₂₋₁₀アルキニル基、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ピシクロ[2.2.1]ヘプチル、ピシクロ[2.2.2]オクチル、ピシクロ[3.2.1]オクチル、アダマンチルなどのC₃₋₁₀シクロアルキル基、シクロプロベニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニルなどのC₃₋₁₀シクロアルケニル基を指し、置換基を有していてもよい芳香族炭素環基とは、例えば、フェニル基やナフチル基などを指し、置換基を有していてもよい芳香族複素環基とは、例えば、ピリジル、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,3,4-オキサジアゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニルなどの5ないし6員単環式芳香族複素環基、さらにはベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾトリアゾリル、イミダゾピリジニル、チエノピリジニル、フロピリジニル、ピロロピリジニル、ピラゾロピリジニル、オキサゾロピリジニル、チアゾロピリジニル、イミダゾピラジニル、イミダゾピリミジニル、チエノピリミジニル、フロピリミジニル、ピロロピリミジニル、ピラゾロピリミジニル、オキサゾロピリミジニル、チアゾロピリミジニル、ピラゾロトリアジニル、ナフト[2,3-b]チエニル、フェノキサチイニル、インドリル、イソインドリル、1H-インダゾリル、プリニル、イソキノリル、キノリル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニルなどの8ないし14員縮合多環式(好ましくは2または3環式)芳香族複素環基を指すが、これらに限定されない。

【0021】

本明細書において、「VIPR2」はマウス、ラット、イヌ、サル、ヒトなどの哺乳類のタンパク質を意味する。

【0022】

本明細書において、「VIPR2アンタゴニスト活性を有する」という場合、インビトロ試験において、本発明ペプチドが、(1)既報告のVIPR2アンタゴニストペプチドVIPep-3のビオチン標識化体のVIPR2組換えタンパク質に対する結合を阻害すること、(2)既報告のVIPR2アンタゴニストペプチドVIPep-3のビオチン標識化体のVIPR2発現細胞に対する結合を阻害すること、(3)VIPR2組換えタンパク質に対して濃度依存的に結合すること、(4)VIPR2発現細胞に対して濃度依存的に結合すること、(5)VIPに先んじて添加、又は共添加した場合にVIPR2発現細胞内のカルシウム濃度の上昇を抑制すること、(6)VIPに先んじて添加、又はVIPと共添加した場合にVIPR2発現細胞内のcAMP濃度の上昇を抑制すること、(7)VIPに先んじて添加、又はVIPと共添加した場合にVIPR2発現細胞のアレスチンのリクルートを抑制すること、などを意味し、これらの効果のうちいずれか一つでも

10

20

30

40

50

示す場合には、「VIPR2アンタゴニスト活性を有する」という。VIPR2アンタゴニスト活性の有無は、非特許文献7などを参考にして、当業者が公知の方法に従って確認することができるが、これらに限定されない。

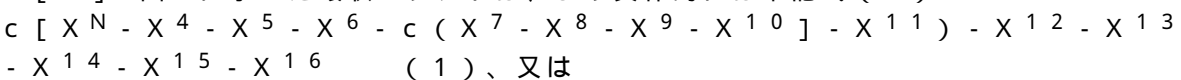
【0023】

(環状ペプチド)

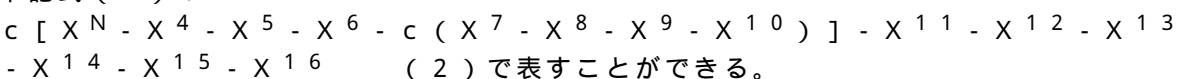
本発明の一実施形態にかかる環状ペプチドの構造を図1に基づき説明する。図1は、環状ペプチド設計の基礎としたVIPep-3のVIPR2結合活性にかかわる特徴(ファーマコフォア)と環状構造規制(S-S結合)の機能に関わる構造、そして、VIPep-3を改変した本実施形態の環状ペプチドとの関係を模式的に示したものである。VIPep-3の1~13番目のアミノ酸残基は、本実施形態の環状ペプチドの1~13番目のアミノ酸残基に対応するが、本実施形態の環状ペプチドでは、1番目のアミノ酸、又は1番目及び2番目のアミノ酸残基が欠失していてもよい。VIPep-3における1番目と10番目のシステイン残基間での環状化は、本実施形態の環状ペプチドでは、(1)1番目と10番目のアミノ酸残基間における結合Aと7番目と11番目のアミノ酸残基間における結合Bによる2つの環状構造として、(2)2番目と10番目のアミノ酸残基間における結合Cと7番目と11番目のアミノ酸残基間における結合Dによる2つの環状構造、又は2番目と10番目のアミノ酸残基間における結合Gと7番目と11番目のアミノ酸残基間における結合Hによる2つの環状構造として、(3)3番目と10番目のアミノ酸残基間における結合Eと7番目と11番目のアミノ酸残基間における結合Fによる2つの環状構造、又は3番目と10番目のアミノ酸残基間における結合Iと7番目と11番目のアミノ酸残基間における結合Jによる2つの環状構造として、(4)1番目と7番目と10番目のアミノ酸残基間における結合Kによる2つの環状構造として、(5)2番目と7番目と10番目のアミノ酸残基間における結合L又は結合Nによる2つの環状構造として、(6)3番目と7番目と10番目のアミノ酸残基間における結合M又は結合Oによる2つの環状構造として、より安定化されている。そして、VIPep-3の各アミノ酸ポジションにおけるアミノ酸残基の置換に供したアミノ酸の例と二環化を検討したアミノ酸残基の位置を図2に示した。

【0024】

[1] 図1に示した環状ペプチドは、より具体的には下記式(1)：



下記式(2)：



【0025】

ここで、式(1)において、 X^N と X^{10} 及び X^7 と X^{11} とは、並びに式(2)において、 X^N と X^7 と X^{10} とは、それぞれ独立に共有結合することで分子内に2つの環状構造を形成する。これらの共有結合は、主鎖-側鎖間、又は側鎖-側鎖間で直接的な共有結合を形成してもよく、又はリンカーを介した間接的な結合であってもよい。

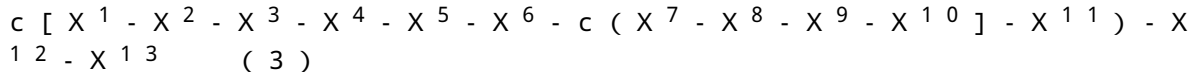
【0026】

上記式(1)及び(2)において、 X^N は、 $X^1 - X^2 - X^3$ であり、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^7 、 X^{10} 及び X^{11} は、ペプチド分子内の環状化に関与する場合、それぞれ独立にアミノ基、カルボキシ基、チオール基、アリル基、アルキニル基、アジド基、若しくはハロゲン原子を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、ペプチド分子内の環状化に関与しない場合、 X^1 及び X^2 は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基又は欠失を表し、 X^3 及び X^{11} は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基である。また、 X^5 、 X^9 、 X^{12} 及び X^{13} は、それぞれ独立に置換基を有していてもよい炭化水素基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表す。 X^4 は、置換基を有していてもよい芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 X^6 と X^8 は、任意のアミノ酸残基を表し、 X^{14} と X^{15} と X^{16} は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基、又は欠失を表し、N末

端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよい。

【0027】

[2]式(1)に含まれる好ましい実施形態は、下記式(3)：



で表されるアミノ酸配列からなる環状ペプチド又はその薬理的に許容される塩である。式(3)において、 X^1 と X^{10} 及び X^7 と X^{11} とは、それぞれ独立に共有結合することで、分子内に2つの環状構造を形成し、当該共有結合は、 X^1 の主鎖若しくは側鎖と X^{10} の側鎖との間、及び X^7 の側鎖と X^{11} の側鎖との間で形成され、 $X^1 \sim X^{13}$ は、[1]に記載したとおりである。

10

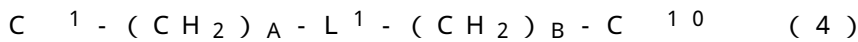
【0028】

1つの実施形態では、 X^1 はシステイン、D体システイン、3-メルカプトプロパン酸、2,3-ジアミノプロパン酸、D体2,3-ジアミノプロパン酸、アラニン、アスパラギン酸、又はグルタミン酸を表し、 X^{10} はシステイン、D体システイン、2,3-ジアミノプロパン酸、D体2,3-ジアミノプロパン酸、アスパラギン酸、又はグルタミン酸を表し、 X^2 及び X^3 はそれぞれ独立に任意のアミノ酸残基、好ましくはプロリンを表し、 X^4 及び X^8 はそれぞれ独立に芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、好ましくはチロシン、フェニルアラニン、又はそれらの誘導体を表し、 X^5 、 X^9 、 X^{12} 及び X^{13} はそれぞれ独立にロイシン、イソロイシン、又はそれらの誘導体を表し、 X^7 及び X^{11} はそれぞれ独立にリジン、オルニチン、アルギニン、2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、ホモシステイン、又はそれらの誘導体を表す。

20

【0029】

[3]ここで、 X^1 と X^{10} のC炭素原子間の結合が下記式(4)：



で表される構造を有することが好ましい。式中、AとBは、それぞれ独立に0~2のいずれかの整数を表す。AとBの総和は、1~4のいずれかの整数である。リンカー L^1 は、S、S-S、 CH_2-CH_2 、S- CH_2 、 CH_2-S 、O- CH_2 、 CH_2-O 、 $CH=CH$ 、NH-C(=O)、N(CH_3)-C(=O)、NH-C(=S)、N(CH_3)-C(=S)、O-C(=O)、C(=O)-NH、C(=O)-N(CH_3)、C(=S)-NH、C(=S)-N(CH_3)、C(=O)-O、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、S- CH_2-CH_2 、 CH_2-CH_2-S 、 CH_2-S-CH_2 、O- CH_2-CH_2 、 CH_2-CH_2-O 、 CH_2-O-CH_2 、S- CH_2-S 、S-C(=CH₂)-S、S-(CH_2)₂-S、又はトリアゾールを表す。

30

【0030】

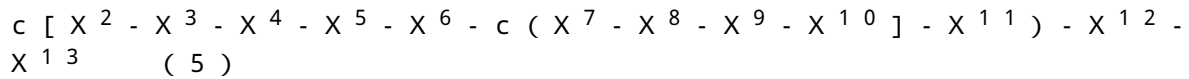
これらの中でも、 L^1 がS-S、NH-C(=O)、 CH_2-S-CH_2 、 $CH=CH$ 、 CH_2-CH_2 を表すことが好ましく、さらに好ましくは、 L^1 がS-S、又はNH-C(=O)を表す場合である。 L^1 がS-Sを表す場合とは、例えば、 X^1 と X^{10} が共にチオール基を有するアミノ酸残基又はその誘導体であり、酸化条件下でジスルフィド結合を形成させた構造である。 L^1 がNH-C(=O)を表す場合とは、例えば、 X^1 が側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基であり、 X^{10} が側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸残基であり、これらのアミノ基とカルボキシ基との脱水縮合により環化された構造である。側鎖にチオール基を有するアミノ酸残基としては、例えば、システイン、D体システイン、3-メルカプトプロパン酸、ホモシステイン、及びD体ホモシステイン等が挙げられ、側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、2,3-ジアミノプロパン酸、D体2,3-ジアミノプロパン酸、又はアラニン等が挙げられ、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、アスパラギン酸やグルタミン酸等が挙げられる。

40

【0031】

[4]上記式(1)に含まれる他の好ましい実施形態は、式(5)：

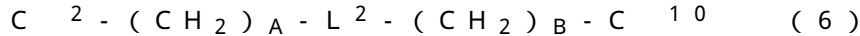
50



で表されるアミノ酸配列からなる環状ペプチド又はその薬理的に許容される塩である。式(5)において、 X^2 と X^{10} 及び X^7 と X^{11} とは、それぞれ独立に共有結合することで、分子内に2つの環状構造を形成し、当該共有結合は、 X^2 の主鎖若しくは側鎖と X^{10} の側鎖との間、及び X^7 の側鎖と X^{11} の側鎖との間に形成され、 $X^2 \sim X^{13}$ は、[1]に記載のとおりである。

【0032】

[5]ここで、 X^2 と X^{10} のC炭素原子間の結合が下記式(6)：



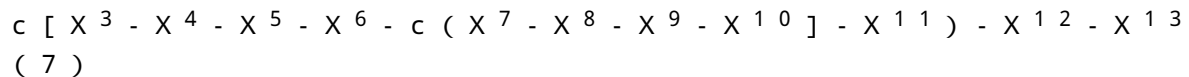
で表される構造を有することが好ましい。式中、AとBは、それぞれ独立に0~6のいずれかの整数を表し、AとBの総和は、4~7のいずれかの整数である。 L^2 は、S、S-S、 $CH_2 - CH_2$ 、S- CH_2 、 $CH_2 - S$ 、O- CH_2 、 $CH_2 - O$ 、 $CH = CH$ 、NH-C(=O)、N(CH_3)-C(=O)、NH-C(=S)、N(CH_3)-C(=S)、O-C(=O)、C(=O)-NH、C(=O)-N(CH_3)、C(=S)-NH、C(=S)-N(CH_3)、C(=O)-O、 $CH_2 - CH_2 - CH_2$ 、S- $CH_2 - CH_2$ 、 $CH_2 - CH_2 - S$ 、 $CH_2 - S - CH_2$ 、O- $CH_2 - CH_2$ 、 $CH_2 - CH_2 - O$ 、 $CH_2 - O - CH_2$ 、S- $CH_2 - S$ 、S-C(=CH₂)-S、S-(CH_2)₂-S、S-(CH_2)₃-S、S-(CH_2)₄-S、S-(CH_2)₅-S、S- $CH_2 - CH = CH - CH_2 - S$ 、S- $CH_2 - C(=O) - NH$ 、NH-C(=O)- $CH_2 - S$ 、S- $CH_2 - C_6H_4 - CH_2 - S$ (フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい)、S- $CH_2 - C_{10}H_6 - CH_2 - S$ 、S- $CH_2 - C(=O) - CH_2 - S$ 、又はS- $CH_2 - C(=CH_2) - CH_2 - S$ 、トリアゾール、又はジチオテトラフルオロベンゼンを表す。

【0033】

これらの中でも、 L^2 が、S-(CH_2)₂-S、S-(CH_2)₃-S、S-(CH_2)₄-S、S-(CH_2)₅-Sを表すことが好ましい。例えば、 X^2 と X^{10} が共にチオール基を有するアミノ酸残基又はその誘導体であり、これらの残基が有するチオール基と、1,2-ジヨードエタン、1,3-ジヨードプロパン、1,4-ジヨードブタンなどのハロゲン化アルキルリンカーとの間に、チオエーテル結合を形成させることができる。

【0034】

[6]上記式(1)に含まれるさらに他の好ましい実施形態は、式(7)：



で表されるアミノ酸配列からなる環状ペプチド又はその薬理的に許容される塩である。式(7)において、 X^3 と X^{10} 及び X^7 と X^{11} とは、それぞれ独立に共有結合することで、分子内に2つの環状構造を形成し、当該共有結合は、 X^3 の主鎖若しくは側鎖と X^{10} の側鎖との間、及び X^7 の側鎖と X^{11} の側鎖との間に形成され、 $X^3 \sim X^{13}$ は、[1]に記載のとおりである。

【0035】

1つの実施形態では、 X^3 はシステイン、D体システイン、ホモシステイン、D体ホモシステイン、3-メルカプトプロパン酸、6-メルカプトヘキサ酸、又は8-メルカプトヘキサ酸を表し、 X^{10} はシステイン、D体システイン、ホモシステイン、又はD体ホモシステインを表し、 X^4 及び X^8 はそれぞれ独立に芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、好ましくはチロシン、フェニルアラニン、又はそれらの誘導体を表し、 X^5 、 X^9 、 X^{12} 及び X^{13} はそれぞれ独立にロイシン、イソロイシン、又はそれらの誘導体を表し、 X^7 及び X^{11} はそれぞれ独立にリジン、オルニチン、アルギニン、2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、又はそれらの誘導体を表す。

【0036】

10

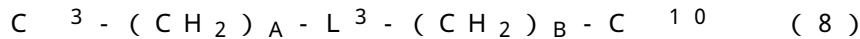
20

30

40

50

[7] ここで、 X^3 と X^{10} の C 炭素原子間の結合が下記式 (8) :



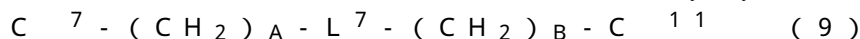
で表される構造を有することが好ましい。式中、A と B は、それぞれ独立に 0 ~ 10 のいずれかの整数を表し、A と B の総和は、7 ~ 10 のいずれかの整数であり、 L^3 は、S、S - S、CH₂ - CH₂、S - CH₂、CH₂ - S、O - CH₂、CH₂ - O、CH = CH、NH - C(=O)、N(CH₃) - C(=O)、NH - C(=S)、N(CH₃) - C(=S)、O - C(=O)、C(=O) - NH、C(=O) - N(CH₃)、C(=S) - NH、C(=S) - N(CH₃)、C(=O) - O、CH₂ - CH₂ - CH₂、S - CH₂ - CH₂、CH₂ - CH₂ - S、CH₂ - S - CH₂、O - CH₂ - CH₂、CH₂ - CH₂ - O、CH₂ - O - CH₂、S - CH₂ - S、S - C(=CH₂) - S、S - (CH₂)₂ - S、S - (CH₂)₃ - S、S - (CH₂)₄ - S、S - (CH₂)₅ - S、S - (CH₂)₆ - S、S - (CH₂)₇ - S、S - (CH₂)₈ - S、S - CH₂ - CH = CH - CH₂ - S、S - CH₂ - C(=O) - NH、NH - C(=O) - CH₂ - S、S - CH₂ - C₆H₄ - CH₂ - S (フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい)、S - CH₂ - C₆H₄ - C₆H₄ - CH₂ - S、S - CH₂ - C₅NH₃ - C₅NH₃ - CH₂ - S、S - CH₂ - C₁₀H₆ - CH₂ - S、S - CH₂ - C(=O) - CH₂ - S、又は S - CH₂ - C(=CH₂) - CH₂ - S、トリアゾール、又はジチオテトラフルオロベンゼンを表す。)

【 0037】

これらの中でも、 L^3 が、S - (CH₂)₃ - S、S - (CH₂)₄ - S、S - (CH₂)₅ - S、S - (CH₂)₆ - S、又は S - CH₂ - C₆H₄ - CH₂ - S (フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい) を表すことが好ましい。例えば、 X^3 と X^{10} が共にチオール基を有するアミノ酸残基又はその誘導体であり、これらの残基が有するチオール基と、1, 3 - ジオードプロパン、1, 4 - ジオードブタン、1, 5 - ジオードペンタン、1, 6 - ジオードヘキサン、1, 2 - ビスプロモメチルベンゼン、1, 3 - ビスプロモメチルベンゼン、又は 1, 4 - ビスプロモメチルベンゼンなどのハロゲン化アルキルリンカーとの間に、チオエーテル結合を形成させることができる。

【 0038】

[8] 上記式 (1)、(3)、(5)、(7) に含まれる他の好ましい実施形態としては、 X^7 と X^{11} の C 炭素原子間の結合が下記式 (9) :



で表される構造を有することが好ましい。式中、A と B は、それぞれ独立に 0 ~ 7 のいずれかの整数を表し、A と B の総和は、2 ~ 7 のいずれかの整数であり、 L^7 は、S、S - S、CH₂ - CH₂、S - CH₂、CH₂ - S、O - CH₂、CH₂ - O、CH = CH、NH - C(=O)、N(CH₃) - C(=O)、NH - C(=S)、N(CH₃) - C(=S)、O - C(=O)、C(=O) - NH、C(=O) - N(CH₃)、C(=S) - NH、C(=S) - N(CH₃)、C(=O) - O、CH₂ - CH₂ - CH₂、S - CH₂ - CH₂、CH₂ - CH₂ - S、CH₂ - S - CH₂、O - CH₂ - CH₂、CH₂ - CH₂ - O、CH₂ - O - CH₂、S - CH₂ - S、S - C(=CH₂) - S、S - (CH₂)₂ - S、S - (CH₂)₃ - S、S - (CH₂)₄ - S、S - CH₂ - CH = CH - CH₂ - S、S - CH₂ - C(=O) - NH、NH - C(=O) - CH₂ - S、S - CH₂ - C₆H₄ - CH₂ - S (フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい)、S - CH₂ - C(=O) - CH₂ - S、又は S - CH₂ - C(=CH₂) - CH₂ - S、トリアゾール、又はジチオテトラフルオロベンゼンを表す。

【 0039】

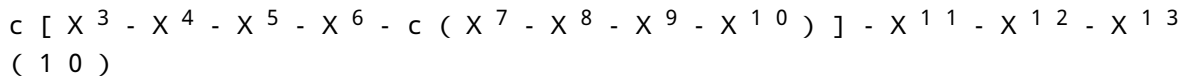
これらの中でも、 L^7 が、NH - C(=O)、S - S、又は S - (CH₂)₃ - S を表すことが好ましい。 L^7 が、NH - C(=O) を表す場合とは、例えば、 X^7 が側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基であり、 X^{11} が側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸残基であり、これらのアミノ基とカルボキシ基との脱水縮合により環化された構造である。 L^7

が、S - Sを表す場合とは、例えば、 X^7 と X^{11} が共にチオール基を有するアミノ酸残基又はその誘導体であり、酸化条件下でジスルフィド結合を形成させた構造である。 X^7 が、S - (CH₂)₃ - Sを表す場合とは、例えば、 X^7 と X^{11} が共にチオール基を有するアミノ酸残基又はその誘導体であり、これらの残基が有するチオール基と、1, 3 - ジヨードプロパンなどのハロゲン化アルキルリンカーとの間に、チオエーテル結合を形成させることができる。側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、リジンやオルニチン等が挙げられる。側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、アスパラギン酸やグルタミン酸等が挙げられる。側鎖にチオール基を有するアミノ酸残基としては、例えば、システイン、D体システイン、ホモシステイン、D体ホモシステイン等が挙げられる。

10

【0040】

[9] 上記式(2)に含まれる好ましい実施形態は、式(10)：



で表されるアミノ酸配列からなる環状ペプチド又はその薬理的に許容される塩である。式(10)において、 X^3 と X^7 と X^{10} とは、共有結合することで分子内に2つの環状構造を形成し、 $X^3 \sim X^{13}$ は、[1]に記載のとおりである。

【0041】

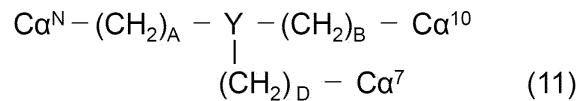
1つの実施形態では、 X^3 はシステイン、D体システイン、ホモシステイン、D体ホモシステイン、又は3 -メルカプトプロパン酸を表し、 X^7 及び X^{10} はそれぞれ独立にシステイン、D体システイン、ホモシステイン、又はD体ホモシステインを表し、 X^4 及び X^8 はそれぞれ独立に芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、好ましくはチロシン、フェニルアラニン、又はそれらの誘導体を表し、 X^5 、 X^9 、 X^{12} 及び X^{13} はそれぞれ独立にロイシン、イソロイシン、又はそれらの誘導体を表し、 X^{11} はセリン、スレオニン、ジアミノプロパン酸、ジアミノブタン酸、又はそれらの誘導体を表す。

20

【0042】

[10] ここで、上記式(2)又は式(10)に示される環状ペプチドにおいて、 X^1 と X^7 と X^{10} 、 X^2 と X^7 と X^{10} 、又は X^3 と X^7 と X^{10} のC炭素原子間の結合が下記式(11)：

【化1】



30

で表される構造を有することが好ましい。式中、Nは、1、2、又は3のいずれかを表し、AとBとDは、それぞれ独立に1、又は2のいずれかの整数を表し、Yは、[(S - CH₃)₃ - C₆H₃]、[(S - CH₂ - CH₂ - C(=O))₃ - C₃N₃H₆]、[(S - CH₂ - C(=O) - NH)₃ - C₆H₃]、[(NH - C(=O))₃ - C₆H₃]、[(S - CH₃)₃ - C₃N₃H₆]、又は[(S - CH₂ - C(=O))₃ - C₃N₃H₆]を表す。

40

【0043】

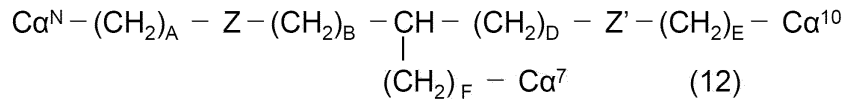
これらの中でも、Yが、[(S - CH₃)₃ - C₆H₃]を表すことが好ましい。例えば、 X^3 が3 -メルカプトプロパン酸(Mpa)、 X^7 及び X^{10} がいずれもシステイン(Cys)等のチオール基を有するアミノ酸残基の場合に、これらの残基が有するチオール基と、1, 3, 5 - トリス(プロモメチル)ベンゼンなどのハロゲン化アルキルリンカーの間のチオエーテル結合によって、ペプチドを環状化することができる。

【0044】

[11] また、上記式(2)又は式(10)に示される環状ペプチドにおいて、 X^1 と X^7 と X^{10} 、 X^2 と X^7 と X^{10} 、又は X^3 と X^7 と X^{10} のC炭素原子間の結合が下記式(12)：

50

【化2】

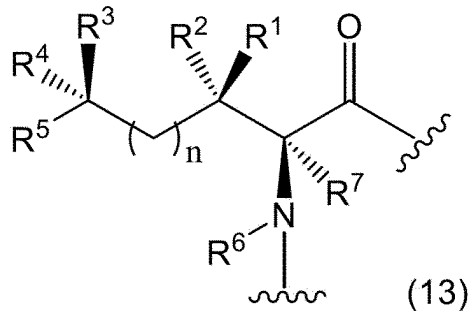


で表される構造を有することが好ましい。式中、Nは、1、2、又は3のいずれかを表し、A、B、D、E、Fは、それぞれ独立に1、又は2のいずれかの整数を表し、ZとZ'は、それぞれ独立にS、S-S、S-CH₂-S、S-C(=CH₂)-S、S-(CH₂)₂-S、S-(CH₂)₃-S、S-(CH₂)₄-S、S-CH₂-CH=CH-CH₂-S、S-CH₂-C(=O)-NH、NH-C(=O)-CH₂-S、S-CH₂-C₆H₄-CH₂-S (フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい)、S-CH₂-C₆H₄-C₆H₄-CH₂-S、S-CH₂-C₁₀H₆-CH₂-S、S-CH₂-C(=O)-CH₂-S、又はS-CH₂-C(=CH₂)-CH₂-S、又はジチオテトラフルオロベンゼンを表す。

【0045】

[12] 上記式(1)~(3)、(5)、(7)及び(10)に示した環状ペプチドにおいて、X⁵、X⁹、X¹²及びX¹³がそれぞれ独立に下記式(13)：

【化3】

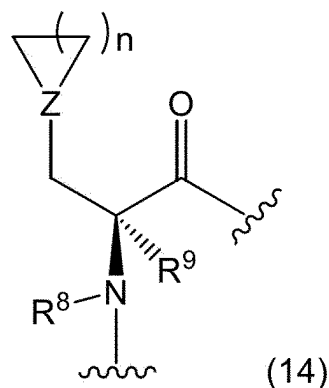


で表されるアミノ酸残基であることが好ましい。式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との付着点を表し、R¹、R²、R⁶及びR⁷は、それぞれ独立に水素原子、又はメチル基を表し、R³、R⁴、R⁵は、それぞれ独立に水素原子、メチル基、又はハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を表し、nは、0~10のいずれかの整数を表す。これらの中で特に好ましいのは、ロイシン、N-メチル化ロイシン、β-メチル化ロイシン、イソロイシン、β-ホモロイシン、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノヘプタン酸、2-アミノオクタン酸及び2-アミノノナン酸等が挙げられる。

【0046】

あるいは、X⁵、X⁹、X¹²及びX¹³が下記式(14)：

【化4】



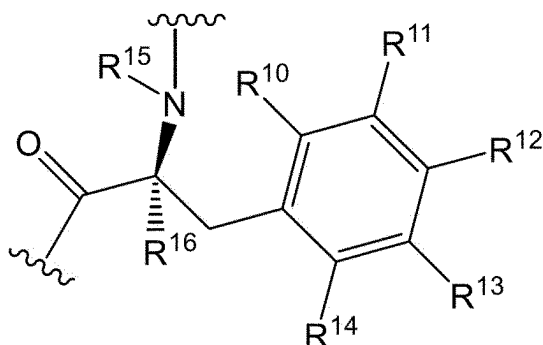
で表されるアミノ酸残基であってもよい。式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカル

ボニル基又は窒素原子との付着点を表し、Zは、C又はNを表し、 R^8 及び R^9 は、水素原子、又はメチル基を表し、nは、1～6のいずれかの整数を表す。これらの中で特に好ましいのは、シクロピルアラニン及びシクロブチルアラニン等が挙げられる。

【0047】

[13]上記式(1)～(3)、(5)、(7)及び(10)に示した環状ペプチドにおいて、 X^4 が下記式(15)：

【化5】



(15)

で表されるアミノ酸残基であることが好ましい。式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との付着点を表し、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 及び R^{14} は、それぞれ独立に水素原子、ヒドロキシ基、ヒドロキシメチル基、メトキシ基、メトキシメチル基、アミノ基、アミノメチル基、モノメチル化アミノ基、ジメチル化アミノ基、トリメチル化アミノ基、モノメチル化アミノメチル基、ジメチル化アミノメチル基、トリメチル化アミノメチル基、アセチル基、アミド基、メチル基、tert-ブチル基、ハロゲン化メチル基、又はハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を表し、 R^{15} 及び R^{16} は、水素原子、又はメチル基を表す。

【0048】

これらの中でも、 X^4 が、チロシン、3-ヒドロキシフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、4-アミノフェニルアラニン、4-アミノメチルフェニルアラニン、4-アミドフェニルアラニン、N-メチル化チロシン、O-メチル化チロシン、3-メトキシフェニルアラニン、4-アセチルフェニルアラニンを表すことが好ましい。

【0049】

[14]また、上記式(1)～(3)、(5)、(7)及び(10)に示した環状ペプチドにおいて、 X^8 が、置換基を有していてもよい芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体であることが好ましい。

【0050】

[15]芳香族炭素環基である X^8 の具体的な実施形態としては、下記式(16)：

10

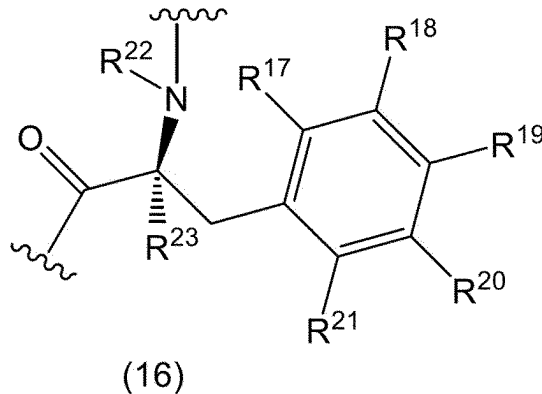
20

30

40

50

【化6】



10

で表されるアミノ酸残基であることが好ましい。式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との付着点を表し、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 及び R^{21} は、それぞれ独立に水素原子、ヒドロキシ基、ヒドロキシメチル基、メトキシ基、メトキシメチル基、アミノ基、アミノメチル基、モノメチル化アミノ基、ジメチル化アミノ基、トリメチル化アミノ基、モノメチル化アミノメチル基、ジメチル化アミノメチル基、トリメチル化アミノメチル基、アセチル基、アミド基、メチル基、*tert*-ブチル基、ハロゲン化メチル基、又はハロゲン原子（F、Cl、Br、I）を表し、 R^{22} 及び R^{23} は、水素原子、又はメチル基を表す。

20

【0051】

これらの中でも、 X^8 が、チロシン、3-ヒドロキシフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、4-アミノフェニルアラニン、4-アミノメチルフェニルアラニン、4-アミドフェニルアラニン、*N*-メチル化チロシン、*N*-メチル化チロシン、*O*-メチルチロシン、3-メトキシフェニルアラニン、4-アセチルフェニルアラニンを表すことがさらに好ましい。

【0052】

[16]さらに、上記式(1)~(3)、(5)、(7)及び(10)に示した環状ペプチドにおいて、 X^6 が、グリシン、*N*-メチル化グリシン、アラニン、*N*-メチル化アラニン、*D*体アラニン、*N*-メチル化*D*体アラニン、2-アミノイソ酪酸、*N*-メチル化2-アミノイソ酪酸、2-アゼチジン-2-カルボン酸、*D*体2-アゼチジン-2-カルボン酸、プロリン、*D*体プロリン、チオプロリン、*D*体チオプロリン、3,4-デヒドロプロリン、*D*体3,4-デヒドロプロリン、ピペコリン酸、*D*体ピペコリン酸、又はそれらの誘導体を表すことが好ましい。

30

【0053】

これらの中でも、 X^6 が、プロリン、*N*-メチル化グリシン、*N*-メチル化アラニン、2-アゼチジン-2-カルボン酸、ピペコリン酸を表すことがさらに好ましい。

【0054】

[17]本発明の1つの実施形態における環状ペプチドは、下記式(17)：
 $c[X^1 - Pro^2 - X^3 - Tyr^4 - Leu^5 - Pro^6 - c(X^7 - X^8 - Leu^9 - Cys^{10}) - X^{11}) - X^{12} - X^{13}$ (17) で表されるアミノ酸配列からなる。

40

式(17)において、 X^1 は、システイン、*Mpa*(3-メルカプトプロピオン酸)又は*D*体システインを表し、 X^3 は、*N*-メチル化グリシン、*N*-メチル化アラニン、2-アゼチジン-2-カルボン酸、プロリン、ヒドロキシプロリン、3,4-デヒドロプロリン、ピペコリン酸、セリン又はリジンを表し、 X^8 は、チロシン、プロリン又はアルギニンを表し、 X^7 及び X^{11} は、リジンとアスパラギン酸、オルニチンとグルタミン酸、アスパラギン酸とリジン、グルタミン酸とオルニチン、リジンとグルタミン酸、又はグルタミン酸とリジンのいずれかの組み合わせを表し、 X^{12} 及び X^{13} は、それぞれ独立にロイシン、イソロイシン又はノルロイシンを表し、 X^1 と Cys^{10} は、それぞれの側鎖の間でジ

50

スルフィド結合を形成し、 X^7 と X^{11} は、それぞれの側鎖の間でアミド結合を形成し、それによって式(17)のペプチドは分子内に2つの環状構造を有し、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよい。

【0055】

[18]さらに好ましい実施形態の環状ペプチドは、上記式(17)において、 X^1 が、システインを表し、 X^3 が、プロリン又はセリンを表し、 X^7 が、リジンを表し、 X^8 が、チロシンを表し、 X^{11} が、アスパラギン酸を表し、そして、 X^{12} 及び X^{13} が、それぞれ独立にロイシン、イソロイシン又はノルロイシンを表す。N末端アミノ基はアセチル化され、C末端カルボキシ基はアミド化されている。

【0056】

上記式(17)または式(18)に含まれる個々の環状ペプチドとしては、例えば、以下のような例を挙げることができる。

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

(配列番号10)

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Lys¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Lys¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Orn¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Orn¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Lys¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Lys¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Orn¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Orn¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷ - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰) - Asp¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

10

20

30

40

50

- Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ 10
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Asp¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Asp¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷ 20
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
【 0 0 5 7 】
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Asp¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂ 30
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Asp¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂ 40
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Asp¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Asp¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Orn⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂ 50

- Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Asp⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂
 Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Arg⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Orn¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂

【0059】

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂ 10

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂ 20

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Tyr⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂ 30

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Arg⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂ 40

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Pro³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Lys⁷
 - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Glu¹¹) - Leu¹² - Ile¹³ - NH₂ 50

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Ile¹³ - NH₂

Ac - c [Cys¹ - Pro² - Ser³ - Tyr⁴ - Leu⁵ - Pro⁶ - c (Glu⁷ - Pro⁸ - Leu⁹ - Cys¹⁰] - Lys¹¹) - Nle¹² - Leu¹³ - NH₂

【0060】

本発明に係るペプチドは、上記[1]～[17]で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換された相同性を有するペプチドであっても、VIPR2に対する結合活性を有するものは包含する。本明細書において、「1～数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換されているペプチド」という場合、それらのアミノ酸の個数は、そのペプチドがVIPR2結合活性を有する限りは特に限定されないが、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1個若しくは2個である。欠失、付加、及び/又は置換されている場所は、ペプチドの末端であっても、中間であってもよく、1ヶ所であっても2ヶ所以上であってもよい。

10

【0061】

このような上記アミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換されたアミノ酸配列として、前記アミノ酸配列と、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに、少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の相同性を有しているものが挙げられる。

20

【0062】

また、一次構造上の相同性が低くても、立体構造が高度に類似しているペプチドやタンパク質ドメインも存在することが知られている。したがって、上記アミノ酸配列と少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の立体構造相同性を有するペプチドであっても、VIPR2結合活性を有するペプチドも本実施形態に含まれる。このようなペプチド同士の立体構造の相同性は、ホモロジーモデリング法などを用いて、立体構造未知のペプチドのアミノ酸配列から、その立体構造を以下のように予測して行うことができる。例えば、本実施形態の環状ペプチド(参照ペプチド)と類似の配列を有する任意のアミノ酸配列(目的配列)が与えられたとき、目的配列と参照配列の間のアライメント(配列を並置したもの)を与える。FASTA、PSI-BLAST、LIBRAなどにより算出したアライメントを用いれば、目的配列と参照配列間のアミノ酸ごとの対応関係が決まるので、この関係に基づき、参照ペプチドの3次元座標から目的配列上のアミノ酸ごとの3次元座標を作成する。3次元座標の構築では、アミノ酸残基間に構造的に不適切な隙間や衝突や歪みが生じることがあるので、エネルギー極小化計算により、これらの構造的な歪みを解消する。モデリングソフトによっては、この構造的な歪みの解消をスムーズに行うため、ペプチドの全原子に対して同時に行うのではなく、段階的に行うものもある。即ち、まずペプチドの骨格を形成する炭素原子について行い、次いで炭素原子を含む主鎖原子について行い、最後に側鎖原子を含むペプチド全体について行うものである。このようにして目的配列に対するアライメントが得られれば、その立体構造を予測構築することができる。立体構造相同性の指標は、最適に重ね合わせたときのXYZ座標の差であるRMSD(Root Mean Square Deviation)などを用いて比較することができる。

30

40

【0063】

本発明ペプチドは、本発明の課題を解決するものである限り、その種々の誘導体、及び/又は修飾体も包含する。係る誘導体としては、ペプチドの飽和脂肪鎖が不飽和脂肪鎖に置換されているもの、ペプチドの原子の一部が放射性または非放射性的同位体原子を含む他の原子に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がチオアミド結合(-NH-C(=S)-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がアルケン(-C=C-)に置

50

換されているもの、ペプチドのアミド結合がアルキル(-C-C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がヒドロキシエチレン(-C(-OH)-C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がエステル(-O-C(=O)-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がアルケン(-C=C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合が(-C-NH-)に置換されているもの、又はペプチドのアミド結合が(-C(=O)-C-)に置換されているものなどが挙げられ、係る修飾体としては、ペプチドの位炭素が二置換されているもの、ペプチドのアミド結合がN-アルキル化されているもの、ペプチドの官能基の一部がハロゲン化、シアノ化、ニトロ化、オキシ化、ヒドロキシ化、アミノ化、デアミノ化、デヒドロ化、アミド化、アセチル化、メトキシ化、プレニル化、アルキル化などの修飾を受けているもの(例えば、ペプチドのアミノ基の一部がアセチル化、ホルミル化、ミリストイル化、パルミトイル化、ピログルタミン酸化、アルキル化又はデアミノ化されているもの、ペプチドのカルボキシ基の一部がN-ピロリジニル化やN-ピペリジニル化されていたり、アミド(アミド、メチルアミド、エチルアミド、p-ニトロアニリド、-ナフチルアミド等)やエステル(メチルエステル、エチルエステル、チオエステル等)になっているものなど)、ペプチドのSがスルホキシドS(=O)又はスルホンS(=O)₂になっているもの、ペプチドがケミカルリンカーを介して多量体化しているもの、ペプチドがビオチン標識化されているもの、ペプチドが蛍光標識化されているもの、ペプチドが発光標識化されているもの、さらにはアルキル鎖、ポリエチレングリコール、抗体、レクチン類、糖鎖、酵素、膜透過性ペプチド、低分子化合物、又はタンパク質のコビキチン化を誘導する分子などとペプチドを融合させたもの等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0064】

本発明ペプチドは、ペプチドの塩も包含する。ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基や酸との塩が用いられ、例えば、無機酸(塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等)の付加塩、有機酸(p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-プロモフェニルスルホン酸、カルボン酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等)の付加塩、無機塩基(水酸化アンモニウム、又はアルカリ、若しくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等)、アミノ酸の付加塩等が挙げられる。

【0065】

本発明ペプチドは、プロドラッグであってもよい。プロドラッグは、生体内における生理条件下で酵素や胃酸などによる反応によって本発明ペプチドに変換される化合物、すなわち酵素的に酸化、還元、加水分解などを起こして本発明ペプチドに変化する化合物、胃酸などにより加水分解などを起こして本発明ペプチドに変化する化合物をいう。

30

【0066】

本発明ペプチドのプロドラッグとしては、本発明ペプチドのアミノ基がアシル化、アルキル化またはリン酸化された化合物(例えば、本発明ペプチドのアミノ基がエイコサノイル化、アラニル化、ペンチルアミノカルボニル化、(5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキソレン-4-イル)メトキシカルボニル化、テトラヒドロフラン化、ピロリジルメチル化、ピバロイルオキシメチル化、又はtert-ブチル化された化合物)、本発明ペプチドのヒドロキシ基がアシル化、アルキル化、リン酸化、又はホウ酸化された化合物(例えば、本発明ペプチドのヒドロキシ基がアセチル化、パルミトイル化、プロパノイル化、ピバロイル化、スクシニル化、フマリル化、アラニル化、又はジメチルアミノメチルカルボニル化された化合物)、本発明ペプチドのヒドロキシ基やカルボキシ基がエステル化、又はアミド化された化合物(例えば、本発明ペプチドのヒドロキシ基やカルボキシ基がC₁₋₆アルキルエステル化、フェニルエステル化、カルボキシメチルエステル化、ジメチルアミノメチルエステル化、ピバロイルオキシメチルエステル化、エトキシカルボニルオキシエチルエステル化、フタリジルエステル化、(5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキソレン-4-イル)メチルエステル化、シクロヘキシルオキシカルボニルエチルエステル化、又はメチルアミド化された化合物)などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの化合物は自体公知の方法によって本発明ペプチドから製造することができる。

40

50

【 0 0 6 7 】

本発明ペプチドのプロドラッグは、広川書店 1 9 9 0 年刊「医薬品の開発」第 7 巻分子設計 1 6 3 ~ 1 9 8 頁に記載されているような生理的条件下で本発明ペプチドに変化するものであってもよい。

【 0 0 6 8 】

本明細書において、プロドラッグは塩を形成していてもよく、係る塩としては、本発明ペプチドの塩として例示したものが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

本発明ペプチドは、結晶であってもよく、結晶形が単一であっても結晶形混合物であっても本発明ペプチドに包含される。結晶は、自体公知の結晶化法を適用して、結晶化することによって製造することができる。

10

【 0 0 7 0 】

本発明ペプチドは、薬学的に許容され得る共結晶や共結晶塩であってもよい。ここで共結晶、又は共結晶塩とは、各々が異なる物理的特性（例えば、構造、融点、融解熱、吸湿性、溶解性及び安定性等）を持つ、室温で二種、又はそれ以上の独特な固体から構成される結晶性物質を意味する。共結晶、又は共結晶塩は、自体公知の共結晶化法に従い製造することができる。

【 0 0 7 1 】

（環状ペプチドの作用効果）

後述する実施例に示される通り、本実施形態で表されるアミノ酸配列群の代表例である Seq - 1 ~ 1 0 は、VIPR2 発現細胞に対する結合活性を示し、Seq - 1、6、9 及び 1 0 は VIPR2 発現細胞に対するアンタゴニスト活性、そしてプロテアーゼ分解耐性を有している。本実施形態で表されるアミノ酸配列群は、Seq - 1 ~ 1 0 と類似のアミノ酸配列及び立体構造的特徴を有することから、それらもプロテアーゼ分解に対する耐性、VIPR2 結合活性と VIPR2 アンタゴニスト活性を有している可能性が極めて高いと考えられる。

20

【 0 0 7 2 】

後述する実施例に示されるペプチドの VIPR2 結合活性は、以下のことを示している。（ 1 ）VIPep - 3 の C 末端 3 残基（ 1 4 ~ 1 6 番目のアミノ酸残基：Leu - Arg - Ser ）は、欠失させても VIPR2 に対する結合活性は失われない。（ 2 ）7 位と 1 1 位を架橋すると VIPR2 結合活性が向上する。（ 3 ）VIPep - 3 は、1 位と 1 0 位のシステイン残基間で形成される S - S 結合によって環状化しているが、VIPR2 結合活性のための環状化は 1 位と 1 0 位間に限定されず、2 位や 3 位に長い側鎖を有するアミノ酸残基を導入して直接 1 0 位と架橋したり、長さや構造の異なるリンカーを用いて間接的に架橋することで、2 位と 1 0 位間の原子間距離、そして 3 位と 1 0 位間の原子間距離を 1 位と 1 0 位間の原子間距離に近づければ、2 位と 1 0 位間、及び 3 位と 1 0 位間の架橋に代替できる。（ 4 ）3 つのアミノ酸残基間で二環化されたペプチドも VIPR2 結合活性を示しており、その架橋パターンは、1 位 - 7 位 - 1 0 位間、2 位 - 7 位 - 1 0 位間、及び 3 位 - 7 位 - 1 0 位間の組み合わせのいずれも許容すると考えられる。上記の（ 3 ）と（ 4 ）について、より具体的に説明する。後述する実施例に示される通り、VIPep - 3 の 1 ~ 3 番目のアミノ酸残基と 1 0 番目のアミノ酸残基間で形成される環状構造： $C^3 - NH - C(=O) - C^2 - NH - C(=O) - C^1 - CH_2 - S - S - CH_2 - C^10$ は、例えば非天然構造の側鎖を有する 3 番目のアミノ酸残基と 1 0 番目のアミノ酸残基間で形成される環状構造： $C^3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - S - S - CH_2 - CH_2 - C^10$ などに置換できる。すなわち、VIPep - 3 の 1 ~ 3 番目のアミノ酸残基は、VIPR2 結合活性に大きくは関与しておらず、ペプチドの環状サイズ規制が VIPR2 結合活性に重要であることを示唆しており、本発明ペプチドは、1 位 - 1 0 位間のみならず、2 位 - 1 0 位間、及び 3 位 - 1 0 位間でも環状化することが可能であり、ペプチドの環状サイズが一定範囲に収まる限り、アミド結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、C = C 結合、C - C 結合、トリアゾールを介

30

40

50

した結合、ジチオテトラフルオロベンゼンを介した結合などの幅広い形状の化学構造を受容すると考えられる。この特性は、7位を経由した場合（1位-7位-10位間、2位-7位-10位間、及び3位-7位-10位間）でも保持されると考えられる。

【0073】

上記[1]～[16]で表されるアミノ酸配列群は、ヒト、マウス、ラットのVIPR2に対するアンタゴニスト活性を有するVIPep-3と類似のアミノ酸配列及び立体構造的特徴を有することから、マウスやラットといったヒト以外の哺乳類のVIPR2に対しても結合して、その機能を阻害する可能性が極めて高いと考えられる。

【0074】

（環状ペプチドの製造方法）

本実施形態のペプチドは、液相法、固相法、又は液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法等、公知のペプチドの製造方法などによって製造することができる。

【0075】

固相法には、市販の自動合成機を用いることができる。例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 α 位アミノ基がFmoc基といった保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。次に、第一アミノ酸の α 位アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第一及び第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸の α 位アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第二及び第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドを合成する。直鎖ペプチドをレジンから切断し、精製後、ペプチドを環状化するための官能基を脱保護し、定法にしたがって、ペプチドを環状化する。

【0076】

固相合成のレジンとしては、Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin（メルク社）、HMPA-PEGA resin（メルク社）等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤（ジメチルホルムアミド(DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等）で洗浄してから用いてもよい。 α 位アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル(Cbz)基、tert-ブトキシカルボニル(Boc)基、フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル(Alloc)基等が挙げられる。Cbz基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Boc基はトリフルオロ酢酸(TFA)により脱保護でき、Fmoc基はピペリジンによる処理で脱保護できる。 β 位カルボキシ基の保護は、メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いることができる。アミノ酸のその他の官能基として、セリンやスレオニンなどのヒドロキシ基はベンジル基やtert-ブチル基で保護することができ、チロシンなどのヒドロキシ基は2-ブロモベンジルオキシカルボニル基やtert-ブチル基で保護できる。リジンなどの側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸などのカルボキシ基は、 α 位アミノ基、 β 位カルボキシ基と同様に保護することができる。

【0077】

カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCあるいはWSC)、(1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミ

10

20

30

40

50

ノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート(BOP)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート(HBTU)等が挙げられる。レジンからのペプチド鎖の切断は、TFA、フッ化水素(HF)等の酸で処理することによって行うことができる。

【0078】

本実施形態のペプチドは、一態様として環状化されている。本明細書において環状化とは、1つのペプチド内において、1アミノ酸以上離れた2つ以上のアミノ酸が直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合し、分子内に1つ以上の環状構造を作ることの意味する。環状化は、非特許文献9や非特許文献10や非特許文献11に記載の手法に則って、実施することができる。例えば、アミノ基とカルボキシ基間のアミド結合、チオール基とチオール基間のジスルフィド結合、チオール基とハロゲン基間のチオエーテル結合、チオール基とアリル基間のチオールエン反応によるチオエーテル結合、アリル基とアリル基間のオレフィンメタセシス反応によるC=C結合(当該C=C結合は還元反応によって、C-C結合に変換されていてもよい)、アルキニル基とアジド基間のクリック反応によるトリアゾールを介した結合、ハロゲン基を有するリンカーと二つのチオール基間のチオエーテル結合などによることができるが、これらに限定されない。環状化のための直接的な又はリンカーを介した間接的な共有結合は、主鎖-主鎖間、主鎖-側鎖間、側鎖-主鎖間、側鎖-側鎖間のいずれであってもよい。

【0079】

本発明ペプチドの環状化には、例えば、(1)チオール基を有するシステイン、D体システイン、ホモシステイン、D体ホモシステインをそれぞれ独立にアミノ酸1及びアミノ酸2とし、それらのチオール基間で形成されるジスルフィド結合を用いることができる、(2)求核基であるハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するアミノ酸(例えば3-クロロアラニン)、又はハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するカルボン酸(例えば3-クロロプロパン酸)をアミノ酸1とし、チオール基を有するアミノ酸2との間で形成されるチオエーテル結合を用いることができる、(3)チオール基を有するアミノ酸1及びアミノ酸2、そして求核基であるハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するリンカー(例えば1,3-ジヨードプロパン、1,4-ジヨードブタン、1,5-ジヨードペンタン、1,6-ジヨードヘキサン、1,2-ビス(プロモメチル)ベンゼン、1,3-ビス(プロモメチル)ベンゼン、1,4-ビス(プロモメチル)ベンゼンなど)の間で形成されるチオエーテル結合を用いることができる、(4)アジド基を有するアジドアラニンをアミノ酸1、アルキニル基を有する2-アミノ-5-ヘキシノ酸をアミノ酸2とし、その間のクリック反応によって形成されるトリアゾールを介した共有結合を用いることができる、(5)アリル基を有するアミノ酸(例えばアリルグリシン、D体アリルグリシン、ホモアリルグリシン、D体ホモアリルグリシンなど)、又はアリル基を有するカルボン酸(例えば3-ブテン酸)をアミノ酸1とし、チオール基を有するアミノ酸2との間のチオールエン反応によって形成されるチオエーテル結合を用いることができる、(6)アリル基を有するアミノ酸、又はアリル基を有するカルボン酸をそれぞれ独立にアミノ酸1及びアミノ酸2とし、それらのアリル基間のオレフィンメタセシス反応によって形成されるC=C結合を用いることができる、(7)オレフィンメタセシス反応によって形成されたC=C結合を還元することで形成されるC-Cを用いることができる、(8)アミノ基を有するアミノ酸1(例えば2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、それらのD体アミノ酸など)とカルボキシ基を有するアミノ酸2(アスパラギン酸、グルタミン酸、それらのD体アミノ酸など)の間のアミド結合を用いることができる、(9)N末端アミノ基(アラニンやアミノ酪酸など)とカルボキシ基を有するアミノ酸の間のアミド結合を用いることができる。これらのアミノ酸1とアミノ酸2は、どちらがN末端側にきてもよい。さらには、(10)チオール基を有するアミノ酸1、アミノ酸2及びアミノ酸3、そして求核基であるハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するリンカー(例えば、1,3,5-トリス(プロモメチル)ベンゼン)の間で形成されるチオエーテル結合を用いることができる

10

20

30

40

50

。アミノ酸 1 とアミノ酸 2 とアミノ酸 3 は、いずれが N 末端側にきてもよい。

【 0 0 8 0 】

(環状ペプチドを含む医薬、診断薬、研究用試薬)

本発明に係る医薬組成物は、上述したアミノ酸配列を有効成分として含み、ペプチドが V I P R 2 に結合することで、天然リガンドと V I P R 2 の結合を阻害し、V I P R 2 を介したシグナル伝達を抑制することが可能である。上記の医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口投与としては、例えば、経粘膜投与(経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膈、又は経直腸投与)、注射投与(静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射等)、経皮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、ペプチドにアルキル鎖、ポリエチレングリコール、又は糖鎖などを付加することで、血中滞留時間を長くする、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸・グリコール(PLGA)などの生体内分解性の高分子化合、多孔性ヒドロキシアパタイト、リポソーム、表面修飾リポソーム、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これに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)。

10

【 0 0 8 1 】

上記の医薬組成物は、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(注射剤など)、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。これらの製剤は、速放性製剤又は徐放性製剤等の放出制御製剤(徐放性マイクロカプセルなど)であってもよい。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。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、エタノール等の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、キサントガム、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。ペプチドが経粘膜吸収されにくい場合は、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。

20

30

40

【 0 0 8 2 】

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。必要に応じ、通常防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

【 0 0 8 3 】

50

本発明の医薬組成物は、VIPR2の活性化が関与する、中枢神経疾患、例えば、精神障害（統合失調症、統合失調情動障害、統合失調症様、妄想障害など）、小児精神障害（注意欠陥障害、注意欠陥/多動性障害、行為障害、自閉症など）、神経変性障害、神経幹細胞障害、神経前駆体障害、虚血性障害、神経外傷性障害、情動障害、精神運動障害、睡眠障害（過眠症、概日リズム睡眠障害、不眠症、睡眠時異常行動、睡眠遮断など）、不安といった精神障害（急性ストレス障害、全般性不安障害、社会不安障害、パニック障害、外傷後ストレス障害、広場恐怖、強迫性障害など）、虚偽性精神障害（急性幻覚性躁病など）、衝動制御障害（強迫性賭博、間欠性爆発性障害など）、気分障害（双極I型障害、双極II型障害、躁病、混合情動状態など）、大うつ病、慢性うつ病、季節性うつ病、精神病性うつ病、季節性うつ病、認知障害（健忘、老年認知症、HIV関連認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、レビー小体型認知症、血管性認知症、薬物関連認知症、遅発性ジスキネジー、間代性筋痙攣、ジストニー、譫妄、ピック病、クロイツフェルト・ヤコブ病、HIV疾患、ジル・ドゥ・ラ・トゥレット症候群、てんかん、筋痙縮、軽度認知障害など）、精神薄弱（痙縮、ダウン症候群、脆弱X症候群など）；月経前症候群（PMS）、月経前不快気分障害（PDD）、産後うつ病、ニューロン損傷障害（眼損傷、目の網膜症または黄斑変性、耳鳴、聴覚障害、脳浮腫など）、パーキンソン病、パーキンソン病様障害、偏頭痛、てんかん、アルツハイマー病、脳損傷、脳卒中、脳血管疾患（脳動脈硬化症、脳アミロイド血管症、遺伝性脳出血、脳低酸素症 - 虚血など）、薬物依存症（麻薬依存症、アルコール中毒、アンフェタミン依存症、コカイン嗜癖、ニコチン依存症、薬物禁断症候群など）、摂食障害（食欲不振症、過食症、気晴らし食い障害、多食症、肥満、強迫性摂食障害、氷食症など）などの予防及び/又は治療に有用であるが、これらに限定されない。追加の疾患としては、特に限定されないが、例えば、VIPR2を発現する癌の増殖抑制やVIPR2の機能阻害による免疫の賦活化などに使用することが挙げられる。

10

20

【0084】

本発明の医薬組成物は、上記疾患に有用な各種の化学療法、外科的治療、放射線療法といった他の医薬や治療法と組み合わせて併用してもよい。

【0085】

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、30µg~1000mg、100µg~500mg、100µg~100mgを1回、又は数回に分けて投与することができる。

30

【0086】

以下に示す実施例は、単なる例示であって、上述した実施形態と共に本発明を詳細に説明することのみを意図しており、本発明を限定するものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、係る変更も本発明の範囲に含まれる。

【実施例】

【0087】

本明細書中で用いられている略号は下記の意味を表す。
 VIPR2: Vasoactive intestinal peptide receptor 2
 VIP: Vasoactive intestinal peptide
 BSA: Bovine serum albumin
 RP-HPLC: Reverse-phase high performance liquid chromatography
 HRP: Horseradish peroxidase
 SA: Streptavidin
 HBSS: Hank's balanced salt solution

40

50

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
 Ac: Acetyl
 Cys: L-Cysteine
 hmC: L-homocystein
 Mpa: 3-mercaptopropanoic acid
 Pro: L-Proline
 Tyr: L-Tyrosine
 Leu: L-Leucine
 Ile: L-Isoleucine
 Arg: L-Arginine 10
 Asp: L-Aspartic acid
 Glu: L-Glutamic acid
 Dap: (S)-2,3-Diaminopropanonic acid
 Dab: (S)-2,4-Diaminobutanoic acid
 Tyr(Ome): O-methyl-L-Tyrosine
 4aF: 4-amino-L-Phenylalanine
 4AcF: 4-acetyl-L-Phenylalanine
 4amdF: 4-amide-L-Phenylalanine
 3hF: 3-hydroxy-L-Phenylalanine
 3(Ome)F: 3-methoxy-L-Phenylalanine 20
 4amF: 4-aminomethyl-L-Phenylalanine
 4fF: 4-fluoro-L-Phenylalanine
 Gly: Glycine
 Ala: L-Alanine
 Aze: L-Azetidine carboxylic acid
 thioP: L-Thioprolin
 Dhp: 3,4-dehydro-L-Proline
 Pip: L-Pipecolic acid
 Val: L-Valine
 Nle: L-Norleucine 30
 Ahep: (S)-2-Aminoheptanonic acid
 Aoc: (S)-2-Aminooctanonic acid
 Anon: (S)-2-Aminononanonic acid
 CprA: L-Cyclopropylalanine
 CbuA: L-Cyclobutylalanine
 hmLeu: -homo L-Leucine
 M6a: 6-Mercaptohexanoic acid
 M8a: 8-Mercaptooctanoic acid
 DIBut: 1,4-Diiodobutane
 DIPen: 1,5-Diiodopentane 40
 DIHex: 1,6-Diiodohexane
 DBoXy: 1,2-Bis(bromomethyl)benzene
 DBmXy: 1,3-Bis(bromomethyl)benzene
 DBpXy: 1,4-Bis(bromomethyl)benzene
 TBMB: 1,3,5-Tris(bromomethyl)benzene
 Nme-X: N-methylated amino acid X
 aMe-X: -methylated amino acid X
 D^DX: D-amino acid X
 c[XY], c(XY): Cyclization between amino aci
 d X to amino acid Y 50

【0088】

(ペプチド合成)

本実施例に使用した全てのペプチドの化学合成は、株式会社スクラム（東京、日本）に委託し、9-フルオレニルメトキシカルボニル基（Fmoc基）をアミノ基の保護基として用いる標準的な固相合成法を自動合成機Syro I I（Biotage社製）で実施した。C末端に位置する側鎖保護アミノ酸-レジン合成カラムに入れて、装置をセットした。続いて、Fmoc基で保護した次アミノ酸に1-[ビス（ジメチルアミノ）メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロフォスフェート（HATU）/ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）を加えて活性化し、カラムに入れて反応させた。反応終了後に洗浄し、20%ピペリジンを用いて、Fmoc基を脱保護した。本工程を繰り返すことで、ペプチド鎖を伸長し、最終アミノ酸のFmoc基を脱保護した後、装置からペプチドレジンを取り出した。

10

【0089】

ペプチドの環状化は、非特許文献8や非特許文献9や非特許文献10や非特許文献11に記載の手法を参考とした。例として、Seq-1、6、9の環状化を以下に示す。Seq-1とSeq-6については、直鎖の側鎖保護ペプチドレジンにジメチルホルムアミド（DMF）にて膨潤させ、2%ヒドラジン溶液中で5~10分間反応させることで、リジンの側鎖の保護基（Dde）とアスパラギン酸の側鎖の保護基（ODmab）を脱保護した後、カップリング試薬であるOxima Pureとジイソプロピルカルボジイミド（DIC）を加え、50℃で3時間反応させた。レジン洗浄後、TFAを加えて、チオール基の保護基を脱保護すると同時にレジンから単環ペプチドを切り出した。SunFire C18カラム（10×150mm）（Waters社製）を用いたRT-HPLCによって、単環ペプチドを精製した後、凍結乾燥した。

20

【0090】

Seq-1については、単環ペプチドをTris-HClバッファー（pH8.5）とアセトニトリルの混液に溶解後、DMSOを添加し、室温で36時間攪拌することで、ジスルフィド結合によって、ペプチドを環状化した。Seq-6については、単環ペプチドをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、DMFに溶解した3当量の1,3-ビスプロモメチルベンゼン、そして10mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）を含む0.1MのNaHCO₃とアセトニトリルを加え、室温で一晩反応させることで、チオール基とハロゲン化アルキルリンカーの間のチオエーテル結合によって、ペプチドを環状化した。SunFire C18カラム（10×150mm）（Waters社製）を用いたRT-HPLCによって、二環ペプチドであるSeq-1と6を精製した後、凍結乾燥した。最終的に得られたペプチドの分子量は、microflex（Bruker社）を用いて測定し、目的物を同定した。

30

【0091】

Seq-9については、レジン洗浄後、TFAを加えて、チオール基の保護基を脱保護すると同時にレジンから直鎖ペプチドを切り出し、SunFire C18カラム（10×150mm）（Waters社製）を用いたRT-HPLCによって、精製した後、凍結乾燥した。直鎖ペプチドをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、DMFに溶解した3当量の1,3,5-トリス（プロモメチル）ベンゼン（TBMB）、10mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）を含む0.1MのNaHCO₃、そしてアセトニトリルを加え、80℃、3時間で反応させることで、チオール基とハロゲン化アルキルリンカーの間のチオエーテル結合によって、ペプチドを環状化した。SunFire C18カラム（10×150mm）（Waters社製）を用いたRT-HPLCによって、二環ペプチドを精製した後、凍結乾燥した。最終的に得られたペプチドの分子量は、microflex（Bruker社）を用いて測定し、目的物を同定した。本実施例で合成したペプチドの理論分子量、実測分子量、純度、環状化タイプ、配列を表1に示す。また、これらの中でSeq-1~9のアミノ酸配列を以下に、その構造式を図7に示す。なお、表1及び以下のアミノ酸配列において、D体表記のないアミノ酸はL体

40

50

を示す。

【 0 0 9 2 】

【 表 1 - 1 】

【 表 1 - 1 】

Name	Calcd MW	Obsvd MW	Voltage polarity	Purity (%)	Cyclization	Sequence
Biotin-Vipep-3	2125.7	2125.456	POS	98.11	S-S(1-10)	Biotin-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Arg-Leu-Cys)-Thr-Leu-Leu-Leu-Arg-Ser-OH
Vipep-3(配列番号11)	1941.4	1941.954	POS	97.52	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Arg-Leu-Cys)-Thr-Leu-Leu-Leu-Arg-Ser-OH
3d-COOH	1506.8	1506.582	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-NH ₂	1505.8	1505.422	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-7- ^D Dap	1505.8	1505.361	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-11- ^D Dap	1505.8	1505.361	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dap-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11- ^D Dap/ ^D Dap	1505.8	1505.254	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dap-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-11-Dab	1519.9	1519.738	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11- ^D Dap/Dab	1519.9	1519.847	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-11- ^D Dap	1519.9	1519.056	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dap-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11- ^D Dap/ ^D Dap	1519.9	1519.591	NEG	98.28	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dap-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7-Dab	1519.9	1518.876	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11-Dab/ ^D Dap	1519.9	1519.841	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-7- ^D Dap	1519.9	1519.907	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dab-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11- ^D Dap/ ^D Dap	1519.9	1519.802	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dab-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11-Dab/Dab	1533.9	1533.096	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)-Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11-Dab/ ^D Dap	1533.9	1533.087	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11- ^D Dep/Dab	1533.9	1533.611	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dab-Tyr-Leu-Cys)-Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11- ^D Dap/ ^D Dap	1533.9	1533.817	POS	95.86	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- ^D Dab-Tyr-Leu-Cys)- ^D Dab-Leu-Ile-NH ₂
3d-7/11-Lys/Asp	1576.9	1576.047	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Lys-Tyr-Leu-Cys)-Asp-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-NmeTyr	1519.9	1519.586	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-NmeTyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-Tyr(Ome)	1519.9	1519.748	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr(Ome)-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-4aF	1504.9	1504.568	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4aF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-4AcF	1531.9	1531.271	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4AcF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-4amideF	1532.9	1532.892	POS	99.07	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4amideF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-3hF	1505.8	1506.663	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-3hF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-4amF	1519.9	1519.737	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4amF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-4ff	1518.9	1518.458	NEG	95.32	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4amF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-4-aMeTyr	1507.8	1507.071	NEG	98.74	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4amF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-5-NmeLeu	1519.9	1520.366	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-aMeTyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-5-aMeLeu	1519.9	1519.611	POS	97.04	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-NmeLeu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-5-aMeLeu	1519.9	1520.669	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-aMeLeu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-6-Aze	1491.8	1491.034	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-aMeLeu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-6-Pip	1519.9	1519.756	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pip-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-6-NmeAla	1493.8	1493.784	POS	100	S-S(1-11)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-NmeAla-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂

【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

Name	Calcd MW	Obsvd MW	Voltage polarity	Purity (%)	Cyclization	Sequence
3d-6-Nme ^D Ala	1493.8	1493.628	POS	100	S-S(1-11)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Nme ^D Ala-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-6-NmeGly	1479.8	1479.987	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-NmeGly-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-Tyr(OMe)	1519.9	1519.827	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr(OMe)-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-4aF	1504.9	1504.578	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4aF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-4AcF	1531.9	1531.715	POS	97.44	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4AcF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-4amideF	1532.9	1532.592	POS	99.22	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4amideF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-3hF	1505.8	1505.396	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-3hF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-3(OMe)F	1519.9	1519.651	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-3(OMe)F-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-4amF	1518.9	1518.436	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4amF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-4fF	1507.8	1507.222	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4fF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-8-aMeTyr	1519.8	1520.992	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-aMeTyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-9-aMeLeu	1519.9	1520.624	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-aMeTyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-12-Nle	1505.8	1505.361	POS	99.91	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Nle-Ile-NH ₂
3d-12-Ahep	1519.9	1519.178	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Ahep-Ile-NH ₂
3d-12-Aoc	1533.9	1533.526	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Aoc-Ile-NH ₂
3d-12-Anon	1547.9	1547.484	POS	98.54	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Anon-Ile-NH ₂
3d-12-CprA	1503.8	1503.131	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-CprA-Ile-NH ₂
3d-12-CbuA	1517.9	1518.632	POS	99.79	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-CbuA-Ile-NH ₂
3d-12-aMeLeu	1519.9	1519.697	POS	98.8	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-aMeLeu-Ile-NH ₂
3d-13-Leu	1505.8	1505.379	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-13-aMeLeu	1519.9	1520.279	POS	95.46	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-aMeLeu-NH ₂
3d-13-βhmLeu	1519.9	1519.758	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-βhmLeu-NH ₂
3d-M6a/Cys	1296.4	1296.596	POS	100	S-S(1-8)	c(M6a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-hmC)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-M8a/Cys	1324.4	1324.458	POS	97.95	S-S(1-8)	c(M8a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
3d-M8a/hmC	1338.4	1338.621	POS	100	S-S(1-8)	c(M8a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-hmC)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
Seq-1(配列番号1)	1508.8	1508.781	NEG	95.85	S-S(1-10)/amide(7-11)	c(Mpa-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-2(配列番号2)	1377.7	1377.767	POS	100	DIBut(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-3(配列番号3)	1391.7	1391.884	POS	100	DIPen(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-4(配列番号4)	1405.7	1405.871	POS	98.23	DIHex(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-5(配列番号5)	1425.7	1425.499	POS	98.04	DBoXy(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-6(配列番号6)	1425.7	1425.975	POS	100	DBmXy(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-7(配列番号7)	1425.7	1425.712	POS	98.18	DBpXy(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂
Seq-8(配列番号8)	1376.7	1376.482	NEG	96.87	TBMB(1-5-8)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-NmeGly-c(Cys)-Tyr-Leu-Cys)-Ser-Leu-Ile-NH ₂
Seq-9(配列番号9)	1374.7	1374.703	POS	95.3	TBMB(1-5-8)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-NmeGly-c(Cys)-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH ₂
Seq-10(配列番号10)	1558.8	1558.705	NEG	100	S-S(1-10)/amide(7-11)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp)-Leu-Ile-NH ₂

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

Seq-1 : c (Mpa - Pro - Pro - Tyr - Leu - Pro - c [Lys - Tyr - Leu - Cys) - Asp] - Leu - Ile - NH₂ (配列番号 1)

Seq-2 : c (Mpa - NmeTyr - Leu - Pro - c [Lys - Tyr - Leu - Cys) - Asp] - Leu - Ile - NH₂ (配列番号 2)

Seq-3 : c (Mpa - NmeTyr - Leu - Pro - c [Lys - Tyr - Leu - Cys) - Asp] - Leu - Ile - NH₂ (配列番号 3)

Seq-4 : c (Mpa - NmeTyr - Leu - Pro - c [Lys - Tyr - Leu - Cys) - Asp] - Leu - Ile - NH₂ (配列番号 4)

50

Seq - 5 : c (M p a - N m e T y r - L e u - P r o - c [L y s - T y r - L e u - C y s) - A s p] - L e u - I l e - N H ₂ (配列番号 5)

Seq - 6 : c (M p a - N m e T y r - L e u - P r o - c [L y s - T y r - L e u - C y s) - A s p] - L e u - I l e - N H ₂ (配列番号 6)

Seq - 7 : c (M p a - N m e T y r - L e u - P r o - c [L y s - T y r - L e u - C y s) - A s p] - L e u - I l e - N H ₂ (配列番号 7)

Seq - 8 : c (M p a - N m e T y r - L e u - N m e G l y - c (C y s) - T y r - L e u - C y s) - S e r - L e u - I l e - N H ₂ (配列番号 8)

Seq - 9 : c (M p a - N m e T y r - L e u - N m e G l y - c (C y s) - T y r - L e u - C y s) - D a p - L e u - I l e - N H ₂ (配列番号 9)

Seq - 10 : A c - c [C y s ¹ - P r o ² - P r o ³ - T y r ⁴ - L e u ⁵ - P r o ⁶ - c (L y s ⁷ - T y r ⁸ - L e u ⁹ - C y s ¹⁰] - A s p ¹¹) - L e u ¹² - I l e ¹³ - N H ₂ (配列番号 10)

【0095】

Seq - 1 と Seq - 10 は、V I p e p - 3 の C 末端 3 残基 (L e u - A r g - S e r) を除去し、1 位 - 10 位間の S - S 結合と 7 位 - 11 位間のアミド結合によって二環化したペプチドであり、(Seq - 2 ~ 7) は、V I p e p - 3 の N 末端 2 残基 (C y s - P r o) と C 末端 3 残基 (L e u - A r g - S e r) を除去し、3 位 - 10 位間のケミカルリンカーを介したチオエーテル結合と 7 位 - 11 位間のアミド結合によって二環化したペプチドであり、(Seq - 8 ~ 9) は、V I p e p - 3 の N 末端 2 残基 (C y s - P r o) と C 末端 3 残基 (L e u - A r g - S e r) を除去し、3 位 - 7 位 - 10 位間の T B M B リンカーを介したチオエーテル結合によって二環化したペプチドである。

【0096】

(細胞 ELISA 法による競合結合試験の構築)

アミノ酸置換したペプチドの V I P R 2 に対する結合活性を確認するため、図 3 に示した細胞 ELISA 法による競合結合試験を構築した。以下、本細胞 ELISA 法を簡単に説明する。ヒト V I P R 2 発現細胞株 (カタログ No. HTS079RTA、eurofins 社製) をメーカーから供与された培地を用いて、96 ウェルプレートに撒きこみ、CO₂ 培養機内で 37 °C にて、一晚培養した。0.1% BSA を含む HBSS でプレートを洗浄後、0.1% BSA を含む HBSS で希釈した Biotin - V I p e p - 3 (1000 nM) と任意の濃度のアミノ酸置換ペプチド又は V I p e p - 3 との混合液を調製し、50 μL / ウェルで添加した。氷上で 60 分間反応後、0.1% BSA を含む HBSS でプレートを洗浄した。プレートに接着する V I P R 2 発現細胞に結合した Biotin - V I p e p - 3 を SA - HRP (カタログ No. ab7403、アブカム社製) で検出した。HRP の定量には、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (カタログ No. 37070、サーモフィッシャー社製) を用いて、化学発光値を測定した。Biotin - V I p e p - 3 の細胞表面 V I P R 2 に対する結合は、溶液中に共存するアミノ酸置換ペプチドや V I p e p - 3 の V I P R 2 に対する結合と競合するため、アミノ酸置換ペプチドや V I p e p - 3 の濃度依存的に阻害される。すなわち、アミノ酸置換ペプチドや V I p e p - 3 の V I P R 2 に対する結合活性は、Biotin - V I p e p - 3 の結合に対する競合的な阻害活性として検出される。Biotin - V I p e p - 3 を添加していないウェルの発光値を阻害活性 100%、アミノ酸置換ペプチドや V I p e p - 3 を添加していないウェルの発光値を阻害活性 0% として、アミノ酸置換ペプチド及び V I p e p - 3 の 50% 阻害活性値を算出した。続いて、V I p e p - 3 の 50% 阻害活性値を 1 として、アミノ酸置換ペプチドの阻害活性値の相対値を算出した。

【0097】

(アミノ酸置換ペプチドの V I P R 2 に対する結合活性の評価)

V I P R 2 発現細胞に対する競合結合試験を N = 4 で実施した結果を図 4 に示す。本発明ペプチドの代表例 (Seq - 1 ~ 9) は、いずれも Biotin - V I p e p - 3 と競

合した。これらの結果から、アミノ酸置換及び二環化を導入した本発明ペプチドがVIPR2結合活性を有することが示された。特に、Seq-1~4及びSeq-6の結合活性は、VIPep-3と同等かそれ以上であった。

【0098】

(本発明ペプチドのVIPR2に対するアンタゴニスト活性の評価)

VIPR2の下流シグナルの一つとして、細胞内カルシウム濃度の変化が知られている。ヒトVIPR2発現細胞株(カタログNo. HTS079RTA、eurofins社製)に対して、Screen QuestTM Fluor-8 No Wash Calcium Assay Kit(カタログNo. 36315、AAT Bioquest社製)を用いて、細胞内カルシウム濃度の変化を蛍光で測定するための指示試薬Fluor-8を導入した。天然リガンドであるVIP(終濃度150nM)とVIPep-3(終濃度750nM)又は本発明ペプチドの代表例(Seq-1、5~9)(終濃度750nM)を共添加し、蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡で経時的に観察した。VIP添加前の蛍光強度とVIP添加後の最も強い蛍光強度の差を100%として、VIPep-3又は本発明ペプチドを共添加した場合の蛍光強度の差と比較した。

10

【0099】

図5に示される通り、VIPep-3や本発明ペプチドの代表例(Seq-1、5~9)は、VIPのVIPR2に対する受容体作動活性を阻害した。特に、Seq-1及びSeq-6の阻害活性は、VIPep-3と同等かそれ以上であった。

【0100】

(本発明ペプチドのプロテアーゼ分解に対する耐性の評価)

本発明ペプチドがVIPep-3と比較して、プロテアーゼ分解に対する耐性を有していることを確認するため、ラット血漿中にVIPep-3、又は本発明の代表的なペプチド(Seq-1、6、9、10)を混合し、一定時間の培養後にペプチドの残存をRP-HPLCのピークの有無で評価した。各10mMのペプチド1μLに対して、ラット血漿を20μL添加し、37℃にて任意の時間(0又は24時間)培養した。その後、VIPep-3に対しては80%アセトニトリル、それ以外のペプチドに対してはアセトニトリルを各200μL添加し、よく混合した後、氷上で10分間静置し、4℃下、15,000rpmの速度で10分間遠心することで、血漿タンパク質を除去した。上清を回収し、SunFire C18カラム(5μm 4.6×150mm)を用いたRP-HPLC(A液:0.1%TFA/水、B液:0.1%TFA/アセトニトリル、1mL/minにて80%A液→10%A液を20minグラジエント)でペプチドの残量を検出した。図6に示される通り、VIPep-3由来のピークは、24時間の培養後には大きく減少しており、配列中のいずれかの部分がプロテアーゼ分解を受けたことが示唆された。一方、本発明の代表的なペプチド(Seq-1、6、9、10)由来のピークは、24時間後でも培養時間0時間と比較して、ほぼ同等を維持した。これらの結果から、アミノ酸置換及び二環化を導入した本発明ペプチドがプロテアーゼ分解に対する耐性を有していることが示された。

20

30

【0101】

(本発明ペプチドのVIPR2に対する選択的なアンタゴニスト活性の評価)

任意の濃度の本発明ペプチドの代表例(Seq-10)を細胞内カルシウム濃度指示薬を導入済みのVIPR1発現細胞、細胞内カルシウム濃度指示薬を導入済みのVIPR2発現細胞、又は細胞内カルシウム濃度指示薬を導入済みのPAC1発現細胞に添加し、30分培養した。続いて、VIPR1細胞とVIPR2細胞にはVIP(25nMと150nM)を、PAC1細胞にはPACAP(35nM)を添加した直後から2分間の細胞内カルシウム濃度の変化をFLIPR Tetraで測定した。VIP又はPACAPのリガンドのみ添加した時の細胞内カルシウム濃度の変化を阻害率0%、アンタゴニストペプチドとリガンドを共に添加しなかった時の細胞内カルシウム濃度の変化を阻害率100%として、アンタゴニストペプチドの阻害率を計算した。

40

【0102】

50

図7に示される通り、本発明ペプチドの代表例(Seq-10)のアンタゴニスト活性は、VIP-VIPR1相互作用やPACAP-PAC1相互作用に対するよりも、VIP-VIPR2相互作用に対する方が有意に強かった。

【0103】

(本発明ペプチドの*in vivo*におけるVIPR2アンタゴニスト活性の評価)

VIPのアナログであり、VIPR2に選択的なアゴニストであるRo25-1553(株式会社ペプチド研究所)(0.4nmol/g body weight)をPBSに溶解した後、DMSOに溶解した本発明ペプチドの代表例(Seq-10)(1nmol/g body weight又は10nmol/g body weight)又はDMSO(vehicle群)と9:1で混合した(DMSOの終濃度10%)。これらの溶液をICRマウス(12日齢、雄)に対して皮下投与した。1時間後、脳を摘出し、前頭前皮質を取り分け、細胞内のサイクリックAMP応答配列結合タンパク質(CREB)(VIPR2下流シグナルの一つ)のリン酸化をウェスタンブロットティングで評価した。なお、ウェスタンブロットティングに使用した抗体は、Cell Signaling Technology社から購入した、抗リン酸化CREB抗体(#9198)、及び抗CREB抗体(#9197)である。

10

【0104】

図8に示される通り、Seq-10存在下では、CREBのリン酸化が明確に抑制されていることから、本発明ペプチドの代表例が*in vivo*において、VIPR2に対するアンタゴニスト活性を有することが示された。

20

【0105】

(本発明ペプチドの投与によるマウスの新奇物体に対する認識機能の改善の評価)

非特許文献12に報告されているように、Ro25-1553を出生1日目のマウスに対して1日1回の皮下投与を14日間行った後、飼育を継続して成長したマウス(8週齢)の新奇物体に対する認識機能は明確に低下する(図9(A))。本発明ペプチドが、VIPR2の活性化によって低下する新奇物体に対する認識機能を改善できるかを評価した。VIPのアナログであり、VIPR2に選択的なアゴニストであるRo25-1553(株式会社ペプチド研究所)(0.07nmol/g body weight)をPBSに溶解した後、DMSOに溶解した本発明ペプチドの代表例(Seq-10)(1nmol/g body weight)又はDMSO(vehicle群)と99:1で混合した(DMSOの終濃度1%)。これらの溶液を出生後1日目のICRマウス(雄)に対して1日1回の皮下投与を14日間行った後、飼育を継続し、8週齢時に新奇物体に対する認識試験に供した。新奇物体認識試験は非特許文献12に準じ、明期(8:00-20:00)に行った。まず30ルクスの照度に設定した防音実験室内において、木製の滅菌済みソフトチップ(三協ラボサービス株式会社)のみを敷いたアクリル変性ポリ塩化ビニル製の試験ケージ(30cm×30cm×35cm)に1日10分間、連続3日間、被験マウスを馴化させた。4日目に壁から8cm離れた位置に異なる2つの物体(object a、bはゴルフボール、レゴブロック、プラスチックの円柱およびコンセントより2つをランダムに選択)を置き、10分間自由に探索させた(訓練試行)。その24時間後に、物体bを新奇物体である物体cと置換した試験ケージ内で5分間自由に探索させた(試験試行)。訓練試行および試験試行における動物の行動をビデオ録画し、2つの物体に対するそれぞれの探索時間を計測した。試験試行における総探索時間に対する物体cと物体aの探索時間差の割合(%)を識別指数として算出した。

30

40

【0106】

図9(B)に示されるように、Ro25-1553を投与したマウスは、新奇物体に対する認識機能が明確に低下した。一方、本発明ペプチドの代表例(Seq-10)と混合して投与したマウスでは、新奇物体に対する認識機能の低下が有意に改善されていた(スチューデントt検定によるp値が0.001以下)。そして、その認識機能は、正常マウスとほぼ同等であった。この結果は、本発明ペプチドを投与することで、VIPR2の活性化によるマウスの新奇物体に対する認識機能の低下を有意に予防・改善できることを示

50

している。

【産業上の利用可能性】

【0107】

本発明に係るペプチドは、プロテアーゼ分解耐性を有しており、VIPR2にペプチドが結合することで、天然リガンドを介したVIPR2のシグナル伝達を阻害する。従って、本発明に係るペプチドは、VIPR2の活性化が関与する疾患、例えば、統合失調症や自閉症スペクトラム障害などの予防や治療に有用であると考えられる。

【0108】

本発明に係るペプチドは、そのものを薬剤として使用できるだけでなく、VIPR2を発現する組織へのデリバリー分子として、またVIPR2の発現を検出する分子として使用することも可能である。

10

【0109】

さらに本発明に係るペプチドは、他の作用機序を有する医薬品や療法と併用することで、統合失調症や自閉症スペクトラム障害などの予防や治療により効果を発揮することが期待される。

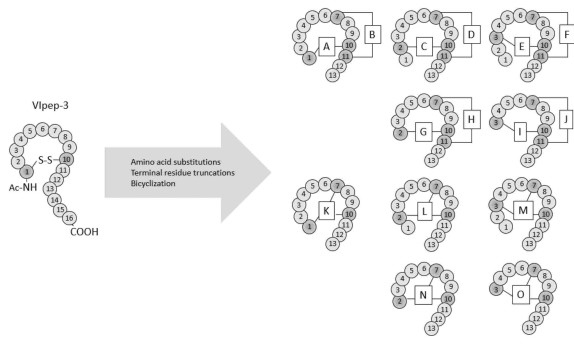
20

30

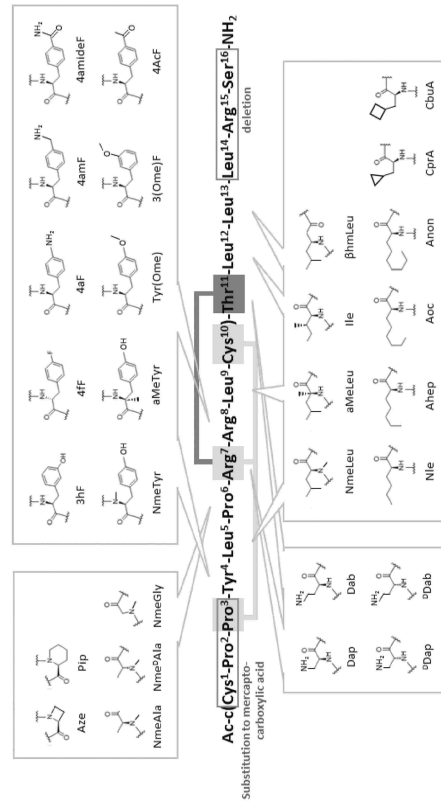
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】



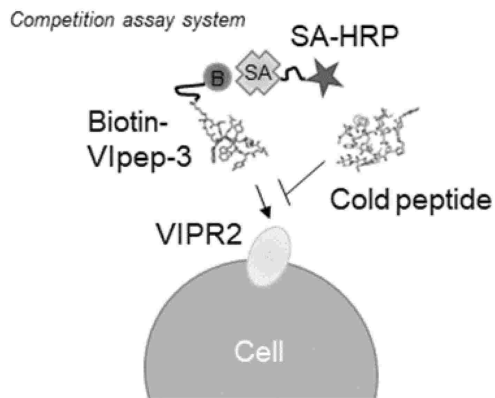
【 図 2 】



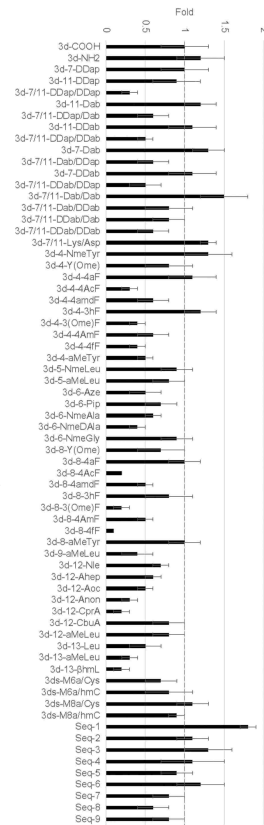
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

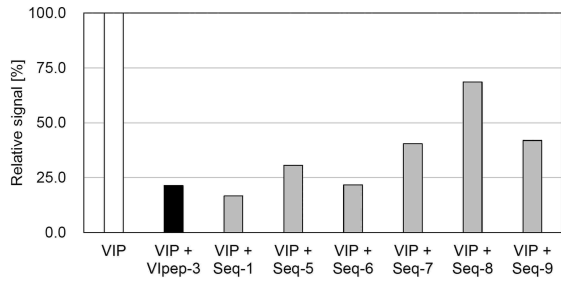


30

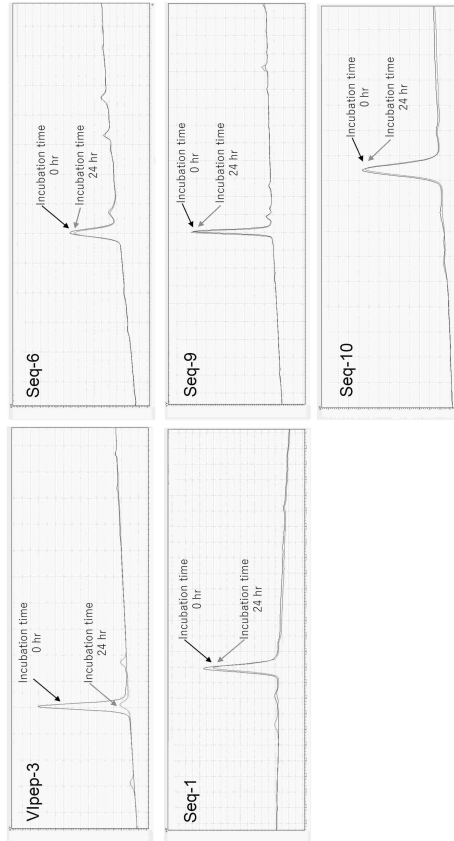
40

50

【 5 】



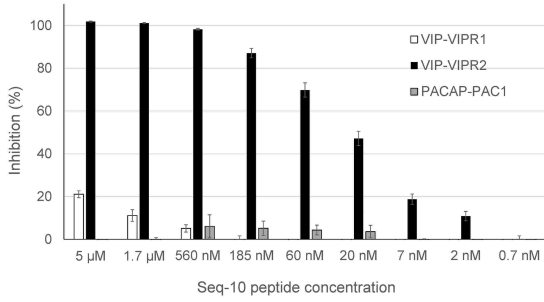
【 6 】



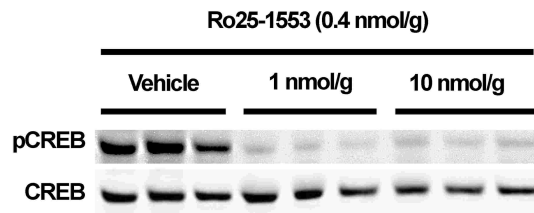
10

20

【 7 】



【 8 】

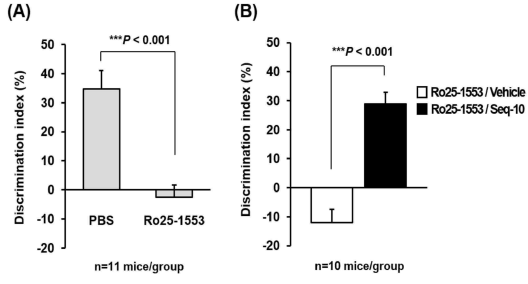


30

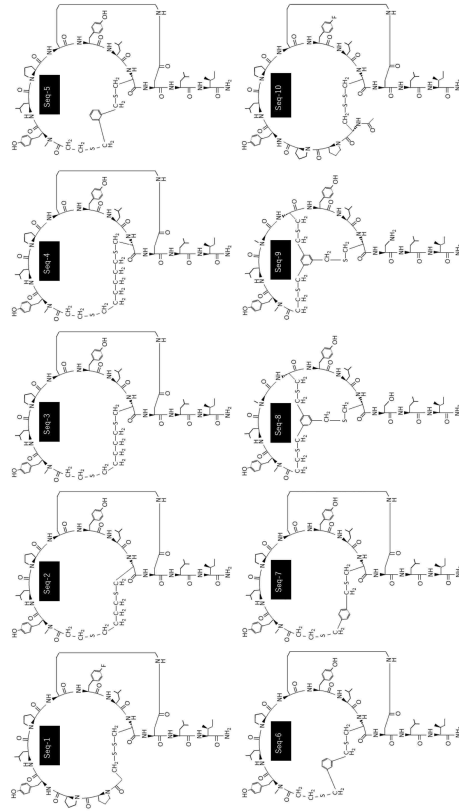
40

50

【 9 】



【 10 】



10

20

【 配列表 】

0007698318000001.app

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2008-510679(JP,A)
特表平10-504802(JP,A)
特表2009-519212(JP,A)
特表2004-512530(JP,A)
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2018年08月01日, Vol. 503, pp. 1973-1979
BIOPOLYMERS (PEPTIDE SCIENCE), 2016年05月14日, Vol. 106, No. 6, pp. 843-852
CHEM. SOC. REV., 2014年09月08日, Vol. 44, pp. 91-102
NATURE CHEMISTRY, 2014年08月31日, Vol. 6, pp. 1009-1016
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K 1/00 - 19/00
A61K 38/10
A61P 43/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)