

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6426103号
(P6426103)

(45) 発行日 平成30年11月21日 (2018.11.21)

(24) 登録日 平成30年11月2日 (2018.11.2)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 7/54 (2006.01)
C O 7 K 19/00 (2006.01)
C O 7 K 7/64 (2006.01)
C O 7 K 1/06 (2006.01)
A 6 1 K 38/12 (2006.01)

C O 7 K 7/54 Z N A
 C O 7 K 19/00
 C O 7 K 7/64
 C O 7 K 1/06
 A 6 1 K 38/12

請求項の数 9 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-542636 (P2015-542636)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月15日 (2014.10.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/077437
 (87) 国際公開番号 W02015/056713
 (87) 国際公開日 平成27年4月23日 (2015.4.23)
 審査請求日 平成28年4月6日 (2016.4.6)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-214771 (P2013-214771)
 (32) 優先日 平成25年10月15日 (2013.10.15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成24年度、科学技術振興機構
 の戦略的創造研究推進事業チーム型研究 (CREST)
 の「擬天然物の新機能創出分子技術」に関する「擬天然
 物の新機能創出分子技術」に関する成果事業、産業技術
 力強化法第19条の適用を受けるもの

(73) 特許権者 504137912
 国立大学法人 東京大学
 東京都文京区本郷七丁目3番1号
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦
 (74) 代理人 100134120
 弁理士 内藤 和彦
 (72) 発明者 菅 裕明
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大
 学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c-Met タンパク質アゴニスト

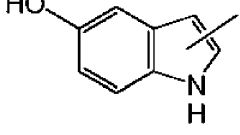
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドと、当該2以上のペプチドをつなぐリンカ
 ーとからなり、

c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドのそれぞれが、その末端又は非末端に、官
 能基1を有するアミノ酸と、対応する官能基2を有するアミノ酸を環を形成するために必要
 な2つのアミノ酸として含み、官能基1と官能基2の組合せが、(A)、(D)又は(E)
 の組合せのいずれかであり、環状化されているペプチドである、ペプチド複合体。

【化 1】

	官能基 1	官能基 2
(A)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---C---X}_1 \\ \quad \quad \text{H}_2 \end{array} \quad (\text{A}-1)$	HS— (A-2)
(B)	—C≡C—H (B-1)	N ₃ — (B-2)
(C)	—Ar—CH ₂ NH ₂ (C-1)	 (C-2)
(D)	—C≡C—CH ₂ —X ₁ (D-1)	HS— (D-2)
(E)	—Ar—CH ₂ —X ₁ (E-1)	HS— (E-2)

(式中、X₁はCl、Br、又はIであり、Arは置換基を有していてもよい芳香環を示す。)

【請求項 2】

前記c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドのそれぞれのアミノ酸数が4～30である、請求項1に記載のペプチド複合体。

【請求項 3】

前記c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドが、それぞれ独立に、以下の(i)から(vi)からなる群より選択される、請求項1又は2に記載のペプチド複合体：

(i) ISWNEFNPNWRFIT (配列番号：1)；

(ii) RQFNRRTHEVWNLD (配列番号：2)；

(iii) WYYAWDQTYKAFP (配列番号：3)；

(iv) (i)から(iii)のいずれかのアミノ酸配列において、1又は2個のアミノ酸が置換され、c-Metタンパク質に結合するペプチド；

(v) (i)から(iii)のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するペプチドであって、c-Metタンパク質に結合するペプチド；及び

(vi) (i)から(v)のいずれかのペプチドであって、少なくとも1つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）。)

【請求項 4】

前記c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドのうち少なくとも1つのペプチドの少なくとも1つのアミノ酸がN-メチル化されている、請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチド複合体。

【請求項 5】

前記リンカーが、BMH、Bis-MAL-PEG3、及びBis-MAL-PEG11からなる群より選択される、請求項1から4のいずれか1項に記載のペプチド複合体。

【請求項 6】

請求項1から5のいずれか1項に記載のペプチド複合体を含むc-Metタンパク質アゴニスト。

【請求項 7】

請求項1から5のいずれか1項に記載のペプチド複合体を含む医薬組成物。

【請求項 8】

急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血管障害、心筋梗塞、拡張型心筋症、皮膚潰瘍、脳梗塞、及び筋萎縮性側索硬化症からなる群より選択される疾患の治療又は予防に用いられる、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

請求項1から5のいずれか1項に記載のペプチド複合体を含む、臓器移植後の臓器の保護又は再生促進剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、c-Metタンパク質のアゴニストであるペプチド複合体等に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞増殖因子（HGF）受容体であるc-Metは、受容体型チロシンキナーゼであり、HGFが結合すると二量体化し、続いてチロシン残基の自己リン酸化が起こる。その結果、MAPK 10
経路やAkt経路のシグナル伝達が活性化されることにより、細胞増殖が促進される一方、細胞のアポトーシス誘導が阻害される。これらの現象は細胞の癌化につながり得るため、c-Metは、がん治療における有力な分子標的と考えられている。実際、HGFやc-Metを標的とする様々な抗がん剤の開発が行われている。

【0003】

近年、様々なペプチド医薬の研究開発が進められている。ペプチド医薬は、その化学的、生物的多様性から、低分子化合物よりも標的分子との相互作用の特異性が高いものが得られることが多く、その結果、より大きな生理活性が得られる。

一方、ペプチド医薬は、抗体などの大きなタンパク質に比較してプロテアーゼ耐性に劣るので短時間で分解されやすいという問題がある。近年、このようなペプチド医薬の問題 20
は、ペプチドに様々な修飾を加えることによって改善することが検討されている。

【0004】

本発明者らは、これまでに人工アミノアシル化RNA触媒「フレキシザイム（flexizyme）」を開発した（例えば、非特許文献1）。フレキシザイムは、任意のtRNAに任意のアミノ酸を連結させることができるアミノアシルtRNA合成酵素様活性を持つ人工RNA触媒である。フレキシザイムによれば、所望のアミノ酸を、所望のアンチコドンに有するtRNAに結合させることができるので、アミノ酸を天然の遺伝暗号とは異なる任意のコドンと対応させて、遺伝暗号表を書き換えることができる。これをコドン再割当という。

フレキシザイムを用いたコドン再割当により、非タンパク質性アミノ酸を含む任意のアミノ酸をペプチドの任意の位置に導入し、ペプチドのプロテアーゼ耐性や細胞透過性、標 30
的分子への親和性や特異性を増大させることが可能である。

【0005】

一方、近年ペプチドの大環状化も注目されている。大環状ペプチドは、自然界にも見られ、安定したコンフォメーションを有することが知られている。そのサイズと複雑性から、大環状ペプチドは、小さな非環状化ペプチドよりも高い特異性を示すことが知られており（例えば非特許文献2）、タンパク質間相互作用や、低分子化合物の結合部位が不明な分子など、難易度の高い標的に対する阻害剤となる可能性が期待されている。環状構造による拘束性は、ペプチドのバイオアベイラビリティや代謝に対する耐性も向上させると考えられる。

このように、ペプチドに様々な修飾を加えることが検討されている中で、生体内での代謝 40
に対する耐性や安定性にさらに優れたペプチドが求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662.

【非特許文献2】White, T.R. et al., Nature chemical biology, 7(11), 810-7.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述のとおり、c-Metは細胞の増殖活性や細胞の遊走活性を促進させる機能を有するので、これまで抗がん剤の標的として注目されてきた。しかしながら、逆に、この機能を亢進させて細胞の増殖や遊走を促進させることができれば、再生医療に用いられる細胞製剤などの製造や、肝硬変などの難治性臓器疾患の治療を促進できる可能性がある。

そこで、本発明は、c-Metアゴニストとして機能するペプチドを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために、大環状ペプチドライブラリを作製し、これを用いたスクリーニングによってc-Metに結合する大環状ペプチドを見出した。そして、c-Metに結合する大環状ペプチドを2つつないだペプチド複合体を形成したところ、かかるペプチド複合体の大環状ペプチドがc-Metタンパク質の自己リン酸化を促進し、c-Metシグナル経路を活性化することを確認した。

さらに、in vitroで、このペプチド複合体が実際に細胞増殖や細胞遊走を促進させることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち本発明は、

〔1〕 c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドと、当該2以上のペプチドをつなぐリンカーとからなるペプチド複合体；

〔2〕 前記c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドが、それぞれ大環状化されている、上記〔1〕に記載のペプチド複合体；

〔3〕 前記c-Metタンパク質に結合する2以上のペプチドが、それぞれ独立に、以下の(i)から(vii)からなる群より選択される、上記〔1〕又は〔2〕に記載のペプチド複合体；

(i) ISWNEFNSPNWRFIT（配列番号：1）；

(ii) RQFNRRTHEVWNLD（配列番号：2）；

(iii) WYYAWDQTYKAFP（配列番号：3）；

(iv) (i)から(iii)のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換され、c-Metタンパク質に結合するペプチド；

(v) (i)から(iii)のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するペプチドであって、c-Metタンパク質に結合するペプチド；及び

(vi) (i)から(v)のペプチドであって、少なくとも1つのアミノ酸が修飾されているペプチド；

〔4〕 前記c-Metタンパク質と結合する2以上のペプチドが、その末端又は非末端に、該ペプチドを大環状化させるためのアミノ酸残基を含む、上記〔3〕に記載のペプチド複合体；

〔5〕 前記リンカーが、BMH、Bis-MAL-PEG3、及びBis-MAL-PEG11からなる群より選択される、上記〔1〕から〔4〕のいずれか1項に記載のペプチド複合体；

〔6〕 上記〔1〕から〔5〕のいずれか1項に記載のペプチド複合体を含むc-Metタンパク質アゴニスト；

〔7〕 上記〔1〕から〔5〕のいずれか1項に記載のペプチド複合体を含む医薬組成物；

〔8〕 急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血管障害、心筋梗塞、拡張型心筋症、皮膚潰瘍、脳梗塞、及び筋萎縮性側索硬化症からなる群より選択される疾患の治療又は予防に用いられる、上記〔7〕に記載の医薬組成物；

〔9〕 上記〔1〕から〔5〕のいずれか1項に記載のペプチド複合体を含む、臓器移植後の臓器の保護又は再生促進剤；

〔10〕 標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを製造する方法であって、

前記標的物質に結合するペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基をN-メチル化又はN-アルキル化修飾する工程と、

前記ペプチドを環状化する工程と、

10

20

30

40

50

前記ペプチドの安定性を評価する工程と、
を含む方法；

〔11〕前記アミノ酸残基をN-メチル化又はN-アルキル化修飾する工程から、前記ペプチドの安定性を評価する工程を繰り返し、N-メチル化又はN-アルキル化修飾による影響をすべてのアミノ酸について網羅的に調べることを特徴とする、上記〔10〕に記載の方法；

〔12〕前記アミノ酸残基をN-メチル化又はN-アルキル化する工程において、以下のアミノ酸残基を修飾する、上記〔10〕に記載の方法：

アルギニン残基；

リシン残基；

アルギニン残基又はリシン残基から2アミノ酸以内のアミノ酸残基；

アルギニン残基及びリシン残基からなる群より選択されるアミノ酸が2以上連続している領域における、該アルギニン残基又はリシン残基；

アルギニン残基及びリシン残基からなる群より選択されるアミノ酸が2以上連続している領域における、いずれかのアルギニン残基又はリシン残基から2アミノ酸以内のアミノ酸残基；及び

〔13〕前記ペプチドの安定性を評価する工程は、前記ペプチドのタンパク質分解酵素への耐性を測定する工程を含む、上記〔10〕から〔12〕のいずれか1項に記載の方法、に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明に係るペプチド複合体によれば、c-Metの自己リン酸化の促進を通じて、細胞増殖や細胞遊走を促進することができる。したがって、HGFの発現低下をきたす慢性繊維性疾患や、臓器移植時の臓器の保護剤や再生促進剤、再生医療に用いられる細胞製剤の製造促進剤などとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、c-Met結合ダイマーペプチド（本発明に係るペプチド複合体）の例を示す概念図である。

【図2A】図2Aは、c-Metタンパク質結合ペプチド（L5-2、D5-4、D4-3、N-メチル化D4-3）及びc-Met非結合ペプチドを蛍光標識したL5-2-fluorescein、D5-4-fluorescein、D4-3-fluorescein、D4-3NMe-fluorescein、及びD4-3scr-fluoresceinを用いて、当該ペプチドのc-Met発現細胞に対する結合を評価した結果を示す。

【図2B】図2Bは、c-Metタンパク質結合ペプチド（L5-2、D5-4、D4-3、N-メチル化D4-3、D4-3scr）を蛍光標識したL5-2-fluorescein、D5-4-fluorescein、D4-3-fluorescein、D4-3NMe-fluorescein、D4-3scr-fluoresceinを用いて、当該ペプチドのc-Met非発現細胞に対する結合を評価した結果を示す。

【図3】図3は、D4-3ペプチドと、これをN-メチル化修飾したペプチド（D4-3-N6、D4-3-N7、及びD4-3-N8）の血清中での分解を評価した結果である。

【図4】図4は、c-Met結合ダイマーペプチド（本発明に係るペプチド複合体）がc-Metタンパク質の自己リン酸化を誘導することを、培養されたヒト中皮腫由来であるEHMES-1細胞に各ダイマーペプチドを至適濃度で加えて刺激し、細胞の溶解液をPhospho-RTKアレイ（R&Dシステム社）で解析することによって評価した結果を示す。

【図5】図5は、c-Met結合ダイマーペプチド（本発明に係るペプチド複合体）がc-Metタンパク質の自己リン酸化および、シグナル経路下流のGab1, Akt, Erk1/2 (MAPK)タンパク質のリン酸化を誘導することを、それぞれのリン酸化タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングで確認した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

（ペプチド複合体）

本発明に係るペプチド複合体は、c-Metタンパク質（ヒトはGenBankアクセッション番号

10

20

30

40

50

NP_000236、マウスではNP_032617) に結合する2以上のペプチドと、これらをつなぐリンカーによって構成されている。

c-Metタンパク質は、肝細胞増殖因子(HGF)受容体であり、チロシンキナーゼ活性を有する。c-Metタンパク質は、ジスルフィド結合で結合した α 及び β サブユニットで構成される膜貫通型受容体であり、生体内では、HGFが結合することにより二量体化され、続いて自己リン酸化が起こって、各種のシグナル伝達が活性化される。

【0013】

本発明に係るペプチド複合体は、c-Metタンパク質の自己リン酸化を促進する。本発明に係るペプチド複合体は、2以上のc-Metタンパク質結合ペプチドがリンカーによってつながれている。2以上のペプチドがそれぞれc-Metタンパク質に結合する結果、2以上のc-Metタンパク質が物理的に引き寄せられて多量体化し、自己リン酸化が起こるものと考えられる。

10

【0014】

本発明に係るペプチド複合体は、c-Metタンパク質結合ペプチドを2以上含む。2以上であれば何個でもよいが、例えば、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個としてもよいし、20個以上、30個以上、50個以上、100個以上、あるいはそれ以上としてもよい。c-Met結合タンパク質結合ペプチドが2個の場合は、2個のペプチドがそれぞれc-Metタンパク質に結合する結果、2個のc-Metタンパク質が物理的に引き寄せられて二量体化し、自己リン酸化が生じる。

ペプチド複合体は、リンカーによってどのような形状でつながれていてもよい。例えば、ペプチド複合体が2個のc-Metタンパク質結合ペプチドを含む場合、リンカーの両端にc-Metタンパク質結合ペプチドを結合し、ダンベル状のペプチド複合体を得てもよい。c-Metタンパク質結合ペプチドの数が多い場合、ペプチド複合体は、デンドリマー状としてもよい。

20

【0015】

本明細書において「c-Metタンパク質に結合するペプチド(c-Metタンパク質結合ペプチド)」は、これを用いて作るペプチド複合体がc-Metタンパク質の自己リン酸化を促進する限り、どのようなペプチドであってもよい。c-Metタンパク質結合ペプチドのアミノ酸数は特に限定されないが、例えばアミノ酸数を4以上、5以上、8以上、10以上、20以下、25以下、30以下とすることができる。

30

【0016】

本明細書において「アミノ酸」は、その最も広い意味で用いられ、天然アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体や誘導体を含む。アミノ酸は慣用的な一文字表記又は三文字表記で示される場合もある。本明細書においてアミノ酸又はその誘導体としては、天然タンパク質性L-アミノ酸；非天然アミノ酸；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などが挙げられる。非天然アミノ酸の例として、主鎖の構造が天然型と異なる、 α , α -二置換アミノ酸(α -メチルアラニンなど)、N-アルキル- α -アミノ酸、D-アミノ酸、 β -アミノ酸、 α -ヒドロキシ酸や、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸(ノルロイシン、ホモヒスチジンなど)、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸(「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、ホモヒスチジンなど)、及び側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されるアミノ酸(システイン酸など)が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0017】

アミノ酸は、タンパク質性アミノ酸(proteinogenic amino acids)であっても、非タンパク質性アミノ酸(non-proteinogenic amino acids)であってもよい。

本明細書において「タンパク質性アミノ酸」は、タンパク質を構成するアミノ酸(Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、及びVal)を意味する。

【0018】

c-Metタンパク質結合ペプチドは、大環状化されていてもよい。大環状化は、ペプチド

50

のN末端とC末端のアミノ酸の結合によるものに限られず、末端のアミノ酸と末端以外のアミノ酸の結合、又は末端以外のアミノ酸同士の結合によるものであってもよい。

【0019】

c-Metタンパク質結合ペプチドは、そのC末端アミノ酸が環状化に用いられていない場合、当該C末端は、カルボキシル基又はカルボキシレート基のみでなく、アミドやエステルになっていてもよい。また、本発明のc-Metタンパク質結合ペプチドには、c-Metタンパク質結合ペプチドの塩も含まれる。c-Metタンパク質結合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あり、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-ブ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。

10

【0020】

c-Metタンパク質結合ペプチドの具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

(i) ISWNEFNSPNWRFIT（配列番号：1）；

(ii) RQFNRRTHEVWNLD（配列番号：2）；

(iii) WYYAWDQTYKAFP（配列番号：3）；

【0021】

また、c-Metタンパク質結合ペプチドの例としては、配列番号：1～3で表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が付加、置換又は欠失したアミノ酸配列を含み、c-Metタンパク質に結合するペプチド(iv)も挙げられる。

20

付加等されるアミノ酸数は、得られるペプチドがc-Metタンパク質に結合する限り特に限定されないが、例えば、1個、2個、3個、4個、又は5個とすることができる。

【0022】

c-Metタンパク質結合ペプチドの例としては、配列番号：1～3で表されるアミノ酸配列と、80%以上の配列同一性を有するペプチドであって、c-Metタンパク質に結合するペプチド(v)も挙げられる。

配列同一性は、85%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上であってもよい。

【0023】

(i)から(v)のc-Metタンパク質結合ペプチドは、本発明の課題を解決するものである限り、少なくとも1つのアミノ酸が修飾されていてもよい。アミノ酸の修飾としては、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADPリボシル化、糖鎖付加などが挙げられる。

30

実施例にも示されるとおり、所定のアミノ酸をN-メチル化することにより、c-Metタンパク質への親和性を維持しつつ、血清中での安定性を高めることができる。

【0024】

(i)から(vi)のc-Metタンパク質結合ペプチドは、ペプチドを環状化させるためのアミノ酸残基（「環形成アミノ酸」後述）をさらに含んでいてもよい。ペプチドを環状化させるためのアミノ酸は、これらのペプチドのN末端及びC末端に配置してもよいし、非末端に配置してもよい。非末端の場合は、例えば末端から2番目のアミノ酸残基、3番目のアミノ酸残基、4番目のアミノ酸残基とすることができる。

40

【0025】

(i)から(vi)のc-Metタンパク質結合ペプチドは、リンカーを結合させるためのアミノ酸残基をさらに含んでいてもよい。リンカーを結合させるためのアミノ酸としては、例えばC末端に配置したCys残基が挙げられるがこれらに限定されない。

【0026】

本発明に係るペプチド複合体に用いられるリンカーは、当該ペプチド複合体がc-Metタンパク質の自己リン酸化を促進する限り、その種類や長さは特に限定されない。例えば、PEGなどのポリマー、ペプチド、核酸、糖及びこれらの組合せなどをリンカーとして用い

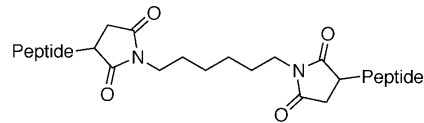
50

ることができ、公知の方法又はそれに準ずる方法でc-Metタンパク質結合ペプチドに結合させることができる。

リンカーの非限定的な例として、以下の、BMH、Bis-MAL-PEG3、Bis-MAL-PEG11などを挙げることができる。これらのリンカーは、c-Metタンパク質結合ペプチドの末端にCys残基をつけておくことにより、c-Metタンパク質結合ペプチドに結合させることができる。

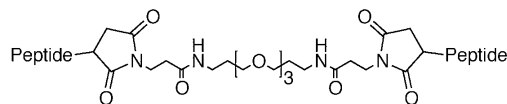
【化1】

BMH

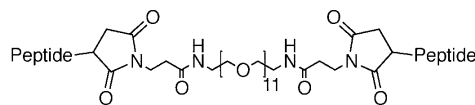


10

Bis-MAL-PEG3



Bis-MAL-PEG11



20

【0027】

本発明に係るペプチド複合体に含まれる2つのc-Metタンパク質結合ペプチドは、同一であってもよいし、異なってもよい。

【0028】

(c-Metタンパク質結合ペプチドをコードする核酸)

本発明は、c-Metタンパク質結合ペプチドをコードする核酸も包含する。

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。

【0029】

(ペプチド複合体の製造方法)

本発明に係るペプチド複合体の製造方法は特に限定されない。本発明のペプチド複合体は、例えば、c-Metタンパク質結合ペプチドを、液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法、遺伝子組み換え法、無細胞翻訳系による翻訳合成等、公知の方法又はそれに準ずる方法によって調製した後、得られたc-Metタンパク質結合ペプチドを適当なリンカーでつなぐことによって製造することができる。

30

【0030】

1. 無細胞翻訳系による翻訳合成

本発明に係るc-Metタンパク質結合ペプチドは、これをコードする核酸を調製し、当該核酸を無細胞翻訳系で翻訳することによって調製することができる。c-Metタンパク質結合ペプチドをコードする核酸は、生体の翻訳系で用いられる遺伝暗号、リプログラミングした遺伝暗号、又はこれらの組み合わせを用いて、当業者が適宜設計することができる。核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。

40

【0031】

無細胞翻訳系を用いる方法によれば、非天然アミノ酸でアミノアシル化したtRNAを使用して、天然アミノ酸に加え、非天然アミノ酸をペプチドに効率よく導入することができる。例えば、本発明者らが開発した人工アミノアシルtRNA合成酵素フレキシザイムを用いれば、任意の天然又は非天然のアミノ酸で、任意のアンチコドンを持つtRNAをアミノアシル化することが可能である。したがって、この技術を用いて、mRNAのトリプレットからなる遺伝暗号が、生体の翻訳系とは異なるアミノ酸をコードするように、リプログラミング

50

することができる (W02008/059823)。

【0032】

例えば、開始コドンAUGは、原核細胞と真核細胞では、それぞれホルミルメチオニンとメチオニンをコードする。一方、フレキシザイムによれば、開始コドンに対応するtRNAを別のアミノ酸でアミノアシル化することができるので、任意のアミノ酸でペプチド合成を開始することができる。また、開始コドン以外のコドンに対応するtRNAも、任意のアミノ酸でアミノアシル化できるので、無細胞翻訳系を用いて、任意のアミノ酸をペプチドの任意の位置に導入することができる。

なお、フレキシザイムによれば、アミノ酸以外のヒドロキシ酸やカルボン酸をtRNAに結合させることもできるので、無細胞翻訳系を用いて、任意のヒドロキシ酸やカルボン酸をペプチドの任意の位置に導入することも可能である。本発明の大環状ペプチドには、アミノ酸に代えて、ヒドロキシ酸やカルボン酸を導入してもよい。

10

【0033】

フレキシザイムとしては、例えば、以下の文献に記載されたものが知られている。

H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003) Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; H. Murakami, D. Kourouklis, and H. Suga, (2003) Chemistry & Biology, Vol. 10, 1077-1084; H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga, (2006) Nature methods 3, 357-359; N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga, (2009) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19, 3892-3894; 及びW02007/066627。

フレキシザイムは、原型のフレキシザイム (Fx)、及び改変型のジニトロベンジルフレキシザイム (dFx)、エンハンスドフレキシザイム (eFx)、アミノフレキシザイム (aFx) 等も知られている。

20

なお、任意のtRNAを任意のアミノ酸でアミノアシル化する方法は、フレキシザイムを用いる方法に限定されず、その他の方法も本発明に適用可能である。

【0034】

フレキシザイムによって導入することができる非天然アミノ酸の非限定的な例を以下に示す。なお、表中DBEとCMEは、これらのアミノ酸をフレキシザイムでtRNAに結合させるときのエステルの種類であり、DBEは、3,5-dinitrobenzyl esterを意味し、CMEは、cyanomethyl esterを意味する。

【0035】

30

【表 1】

開始アミノ酸

Acetyl-L-alanine	DBE	
Acetyl-L-phenylalanine	CME	
Acetyl-L-tyrosine	CME	
Acetyl-L-tryptophan	CME	
Acetyl-D-alanine	DBE	
Acetyl-D-phenylalanine	CME	
Acetyl-D-tyrosine	CME	10
Acetyl-D-tryptophan	CME	
N-Chloroacetyl-L-alanine	DBE	
N-Chloroacetyl-L-phenylalanine	CME	
N-Chloroacetyl-L-tyrosine	CME	
N-Chloroacetyl-L-tryptophan	CME	
N-Chloroacetyl-D-alanine	DBE	
N-Chloroacetyl-D-phenylalanine	CME	
N-Chloroacetyl-D-tyrosine	CME	
N-Chloroacetyl-D-tryptophan	CME	20
N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine	CME	
N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophane	CME	

【表 2】

ペプチド内架橋アミノ酸

N γ -(2-chloroacetyl)- α , γ -diaminobutylic acid	DBE
N γ -(2-chloroacetyl)- α , γ -diaminopropanoic acid	DBE

【表 3】

D-アミノ酸

D-Serine	DBE	30
D-Phenylalanine	CME	
D-Tyrosine	CME	
D-Tryptophan	CME	

【表 4】

N-メチルアミノ酸

N-methyl-Glycine	DBE	
N-methyl-Alanine	DBE	
N-methyl-Serine	DBE	
N-methyl-Histidine	DBE	40
N-methyl-Phenylalanine	CME	
N-methyl-Tyrosine	CME	
N-methyl-Tryptophan	CME	

【表 5】

ペプチドブロック

N-ethyl-Glycine	DBE	
N-n-propyl-Glycine	DBE	
N-n-butyl-Glycine	DBE	
N-n-pentyl-Glycine	DBE	
N-n-hexyl-Glycine	DBE	
N-n-heptyl-Glycine	DBE	
N-n-octyl-Glycine	DBE	10
N-isopentyl-Glycine	DBE	
N-(2-phenylethyl)-Glycine	CME	
N-(3-phenylpropyl)-Glycine	CME	
N-[2-(p-hydroxyphenyl)ethyl]-Glycine	CME	

【表 6】

その他の特殊アミノ酸

p-biphenylalanine	CME	
p-trifluoromethylphenylalanine	CME	
p-azidophenylalanine	CME	20
p-biotinyl-aminophenylalanine	CME	
e-N-Biotinyl-lysine	DBE	
e-N-Acetyl-lysine	DBE	
L-Citrulline	DBE	
L-5-Hydroxytryptophan	CME	
L-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid	DBE	
Aminoisobutyric acid	DBE	
N-methyl-aminoisobutyric acid	DBE	30
N-methyl-Phenylglycine	CME	

【0036】

本明細書において、「無細胞翻訳系」は、無細胞タンパク質合成系とも呼ばれ、大腸菌等の細胞をそのまま使用せず、大腸菌などの細胞内に存在する成分を利用する翻訳系であり、主として細胞抽出液を用いるものと、細胞抽出液の各成分を精製したもので再構成した反応液（再構成型無細胞翻訳系）を用いるものがある。無細胞翻訳系によれば、発現産物を精製することなく高い純度で得ることができる。

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

再構成型無細胞翻訳系は、それぞれ精製したリボソームタンパク質、アミノアシルtRNA合成酵素（ARS）、リボソームRNA、アミノ酸、rRNA、GTP、ATP、翻訳開始因子（IF）、伸長因子（EF）、終結因子（RF）、リボソーム再生因子、その他の翻訳に必要な因子等で構築することができる。 40

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

【0037】

市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系では、ロシュ・ダイアグノスティックス社のRTS-100（登録商標）、コムギ胚芽抽出液の系では、ゾイジーン社やセルフリーサイエンス社の製品、再構成型翻訳系では、PGI社のPURESYSTEM（登録商標）、New England BioLabs社のPURExpress（登録商標） In Vitro Protein Synthesis Kit等が挙げら 50

れる。

大腸菌のリボソームを用いる系として、次の文献に記載された技術が知られており、これらを用いてもよい。

H. F. Kung et al., 1997, The Journal of Biological Chemistry Vol. 252, No. 19, 6889-6894; M. C. Gonza et al., 1985, Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 82, 1648-1652; M. Y. Pavlov and M. Ehrenberg, 1996, Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 328, No.1, 9-16; Y. Shimizu et al., 2001, Nature Biotechnology Vol. 19, No. 8, 751-755; H. Ohashi et al., 2007, Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 352, No.1, 270-276.

10

【0038】

再構成型翻訳系によれば、翻訳系の構成因子を目的に合わせて自由に選択できる。したがって、特定のアミノ酸を含まない翻訳系や、特定のアミノ酸に対応するアミノアシルtRNAを含まず当該アミノアシルtRNAが産生されない翻訳系を再構成すると、そのアミノ酸に対応するコドンを読み解くtRNAが存在しなくなる。そこで、フレキシザイム等を利用して、そのコドンに対応するアンチコドンを持つtRNAを所望のアミノ酸でアミノアシル化し、これを翻訳系に加えれば、当該コドンによって、所望のアミノ酸をペプチドに導入することができるようになる。

後述する実施例で用いたFITシステムは、本発明者らが開発した遺伝暗号のリプログラミングを効率よく行うための再構成型翻訳系の一例である。

20

【0039】

上述の技術を利用すれば、本発明のc-Metタンパク質結合ペプチドにも、環を形成するために必要なアミノ酸や、修飾されたアミノ酸を、所望の位置に導入することができる。

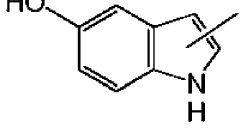
この場合、c-Metタンパク質結合ペプチドをコードする核酸に、環を形成するために必要な2つのアミノ酸（以下「環形成アミノ酸」ということもある。）をコードするコドンを入れる。

【0040】

また、ペプチドを大環状化する方法は特に限定されないが、例えば、以下の官能基1を有するアミノ酸と、対応する官能基2を有するアミノ酸を、環形成アミノ酸として含めることにより、自発的な反応によって翻訳合成されたペプチドを大環状化することができる。官能基1と2はどちらがN末端側にきてもよく、N末端とC末端に配置してもよいし、一方を末端アミノ酸、他方を非末端アミノ酸としてもよいし、両方を非末端アミノ酸としてもよい。

30

【表7】

	官能基1	官能基2
(A)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---C---X}_1 \\ \quad \quad \text{H}_2 \end{array} \quad (\text{A}-1)$	HS— (A-2)
(B)	—C≡C—H (B-1)	N ₃ — (B-2)
(C)	—Ar—CH ₂ NH ₂ (C-1)	 (C-2)
(D)	—C≡C—CH ₂ —X ₁ (D-1)	HS— (D-2)
(E)	—Ar—CH ₂ —X ₁ (E-1)	HS— (E-2)

40

式中、X₁はCl、Br、又はIであり、Arは置換基を有していてもよい芳香環を示す。

【0041】

50

(A-1) の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチル化したアミノ酸を用いることができる。クロロアセチル化アミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-alanine、N-chloroacetyl-L-phenylalanine、N-chloroacetyl-L-tyrosine、N-chloroacetyl-L-tryptophan、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tryptophane、 β -N-chloroacetyl-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-chloroacetyl-L-diaminobutyric acid、 σ -N-chloroacetyl-L-ornithine、 ϵ -N-chloroacetyl-L-lysine、およびこれらに対応するD-アミノ酸誘導体などが挙げられる。

(A-2) の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、2-amino-8-mercaptooctanoic acid、およびこれらのアミノ酸のSH基をいったん保護しておいた後に保護基を脱保護したアミノ酸、およびこれらに対応するD-アミノ酸誘導体などが挙げられる。

環状化方法は、例えば、Kawakami, T. et al., Nature Chemical Biology 5, 888-890 (2009); Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009); Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008); Goto, Y. et al., ACS Chemical Biology 3, 120-129 (2008); Kawakami T. et al, Chemistry & Biology 15, 32-42 (2008)、W02008/117833に記載された方法に従って行うことができる。

【0042】

(B-1) の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、2-amino-8-nonynoic acidを用いることができる。また、4-pentynoyl化や5-hexynoyl化したアミノ酸を用いることもできる。4-pentynoyl化アミノ酸としては、N-(4-pentenoyl)-L-alanine、N-(4-pentenoyl)-L-phenylalanine、N-(4-pentenoyl)-L-tyrosine、N-(4-pentenoyl)-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophane、 β -N-(4-pentenoyl)-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-(4-pentenoyl)-L-diaminobutyric acid、 σ -N-(4-pentenoyl)-L-ornithine、 ϵ -N-(4-pentenoyl)-L-lysine、およびこれらに対応するD-アミノ酸誘導体などが挙げられる。

(B-2) の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidopnorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、2-amino-8-azidooctanoic acidを用いることができる。また、azidoacetyl化や3-azidopentanoyl化したアミノ酸を用いることもできる。azidoacetyl化アミノ酸としては、N-azidoacetyl-L-alanine、N-azidoacetyl-L-phenylalanine、N-azidoacetyl-L-tyrosine、N-azidoacetyl-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophane、 β -N-azidoacetyl-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-azidoacetyl-L-diaminobutyric acid、 σ -N-azidoacetyl-L-ornithine、 ϵ -N-azidoacetyl-L-lysine、およびこれらに対応するD-アミノ酸誘導体などが挙げられる。

環状化方法は、例えば、Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)、W02008/117833に記載された方法に従って行うことができる。

【0043】

(C-1) の官能基を有するアミノ酸としては、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine ($_{AMB}F$)、4-3-aminomethyltyrosineが挙げられる。

(C-2) の官能基を有するアミノ酸としては、5-hydroxytryptophan (W_{OH})が挙げられる。

環状化方法は、例えば、Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009)、W02008/117833に記載された方法に従って行うことができる。

【0044】

(D-1) の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、2-amino-6-chloro-hexynoic ac

10

20

30

40

50

id、2-amino-7-chloro-heptynoic acid、2-amino-8-chloro-octynoic acid、などが挙げられる。

(D-2) の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、2-amino-8-mercaptooctanoic acid、およびこれらのアミノ酸のSH基をいったん保護しておいた後に保護基を脱保護したアミノ酸、およびこれらに対応するD-アミノ酸誘導体などが挙げられる。

環状化方法は、例えば、W02012/074129に記載された方法に従って行うことができる。

【0045】

(E-1) のアミノ酸としては、例えば、N-3-chloromethylbenzoyl-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophane、が挙げられる。

(E-2) のアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、2-amino-8-mercaptooctanoic acid、およびこれらのアミノ酸のSH基をいったん保護しておいた後に保護基を脱保護したアミノ酸、およびこれらに対応するD-アミノ酸誘導体などが挙げられる。

【0046】

2. 固相法による合成

本発明に係るc-Metタンパク質結合ペプチドは、固相合成によっても調製することができる。

固相法は、例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 α -アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、1-メチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。

次に、第一アミノ酸の α -アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第一及び第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸の α -アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第二及び第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドが合成されたら、すべての官能基を脱保護する。

【0047】

固相合成のレジンは、Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin (Merck)、HMPA-PEGA resin (Merck) 等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤（ジメチルホルムアミド (DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等）で洗浄してから用いてもよい。

α -アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル (Cbz又はZ) 基、tert-ブトキシカルボニル (Boc) 基、フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル (Alloc) 基等が挙げられる。Cbz基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Boc基はトリフルオロ酢酸 (TFA) により脱保護でき、Fmoc基はピペリジンによる処理で脱保護できる。

α -カルボキシ基の保護は、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、セリンやトレオニン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、チロシンのヒドロキシ基は2-ブロモベンジルオキシカルボニル希やtert-ブチル基で保護する。リジン側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシ基は、 α -アミノ基、 α -カルボキシ基と同様に保護することができる。

【0048】

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

10

20

30

40

50

、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDCあるいはWSC)、(1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (BOP)、1-[ビス (ジメチルアミノ) メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU) 等が挙げられる。

レジンからのペプチド鎖の切断は、TFA、フッ化水素 (HF) 等の酸で処理することによって行うことができる。

【0049】

c-Metタンパク質結合ペプチドを、リンカーでつなぐ工程は、リンカーの種類に応じて、リンカーとペプチドをつなぐ公知の方法、又はそれに準ずる方法を用いて、当業者が行うことができる。

10

例えば、リンカーが上述の、BMH、Bis-MAL-PEG3、Bis-MAL-PEG11である場合は、これらのリンカーは、c-Metタンパク質結合ペプチドの末端にCys残基をつけておくことにより、c-Metタンパク質結合ペプチドに結合させることができる。

また、リンカーがペプチドである場合は、2以上のc-Metタンパク質結合ペプチドをコードする核酸と、リンカーペプチドをコードする核酸とを連結し、c-Metタンパク質結合ペプチドとリンカーペプチドの融合タンパク質を発現させてもよい。

【0050】

本発明に係るペプチド複合体は、c-Metタンパク質の多量体化により自己リン酸化を促進することを通じて、HGF様の機能を有する。

20

したがって、本発明に係るペプチド複合体は、c-Metアゴニストや医薬組成物として有用である。また、臓器移植時の臓器の保護剤や再生促進剤として、in vitroやin vivoで用いることができる。

【0051】

本発明に係る医薬組成物は、本発明に係るペプチド複合体を有効成分として含む。HGF様の機能を有することから、細胞増殖促進、細胞遊走促進、アポトーシス抑制、形態形成誘導、血管新生、組織や臓器の再生や保護に有用であり、これらが関連する疾患の治療又は予防剤として用いられる。

かかる疾患としては、例えば、急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、胆道閉鎖症、脂肪肝、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、急性肺炎、肺線維症、血管障害、心筋梗塞、拡張型心筋症、皮膚潰瘍、脳梗塞、及び筋萎縮性側索硬化症が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0052】

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。非経口投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膈、経直腸）投与等が挙げられる。

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、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）。

40

【0053】

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。

50

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aryl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。

10

ペプチドの経粘膜吸収されにくい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

【0054】

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。

【0055】

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。

【0056】

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。

30

【0057】

（標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを製造する方法）

本発明はまた、標的物質に結合するペプチドの安定性を高める方法を包含する。

後述する実施例に示されるとおり、本発明のc-Metタンパク質結合ペプチドは、大環状ペプチドライブラリのスクリーニングによって得ることができる。

40

ペプチドを医薬として用いる場合、その血中安定性がよく問題となり、ペプチドを構成するアミノ酸に様々な修飾を加えて、タンパク質分解酵素への耐性や安定性を高める試みがなされている。

しかしながら、ペプチドライブラリは翻訳合成系で調製されることが多い。上述した遺伝暗号のリプログラミングによれば、所定のアミノ酸に修飾を加えたものを翻訳合成されるペプチドに導入することは可能であるが、複数種のアミノ酸に修飾を加えるためには、設計が非常に複雑となる。

また、ペプチドライブラリを用いるスクリーニングにおいて、mRNAディスプレイ法を用いれば、標的物質に結合するペプチドの表現型（phenotype）と遺伝子型（genotype）を同時に知ることができるが、アミノ酸が修飾されているか否かはさらに解析しなければ

50

からない。したがって、ペプチドライブラリにおいてアミノ酸を修飾しても、後でどのような修飾が有効であるのか確認するのは困難である。

【0058】

そこで、本発明者らは、標的物質に結合し、且つ安定性に優れたペプチドを効率よく得ることを課題として研究を行った。その結果、ライブラリのスクリーニングによって選択されたペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基をN-メチル化修飾し、且つペプチドを環状化してから、ペプチドの安定性を評価することにより、かかる課題を解決できることを見出した。

【0059】

したがって、本発明に係る「標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを製造する方法」は、標的物質に結合するペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基をN-メチル化あるいはN-アルキル化修飾する工程と、ペプチドを環状化する工程と、ペプチドの安定性を評価する工程と、を含む。

【0060】

本明細書において、「標的物質に結合するペプチド」は、標的物質に結合することが既に確認されているペプチドを意味するが、標的物質に結合する限り、その親和性の程度は問わない。標的物質に結合するペプチドは、例えば、ペプチドライブラリを標的物質と接触させてインキュベートし、標的物質に結合したペプチドを選択することによって得ることができる。したがって本発明に係る「標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを製造する方法」は、ペプチドライブラリを用いたスクリーニングによって標的物質に結合するペプチドを選択した後、かかるペプチドを基にして、安定性の高いペプチドを製造する方法である。

なお、「標的物質に結合するペプチド」は、ペプチドライブラリのスクリーニング以外の方法で得られたものであってもよい。

【0061】

本明細書において、「標的物質に結合するペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基をN-メチル化又はN-アルキル化修飾する工程」は、当業者が適宜行うことができる。例えば、標的物質に結合するペプチドと同一のアミノ酸配列を有するペプチドを、上述した固相合成法によって合成し、その際、1以上のN-メチル化又はN-アルキル化したアミノ酸を用いることにより、少なくとも1つのアミノ酸がN-メチル化又はN-アルキル化修飾されたペプチドを合成することができる。N-メチル化又はN-アルキル化修飾されたペプチドとは、ペプチド結合のN原子がメチル化又はアルキル化されたペプチドをいう。アルキル化の場合、アルキル基の炭素数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個等とすることができる。

少なくとも1つのアミノ酸がN-メチル化修飾されたペプチドは、上述した遺伝暗号のリプログラミングを応用した翻訳合成によっても作ることができる。

アミノ酸をN-メチル化する数は、1つ以上であればいくつでもよく、例えば、2個、3個、4個、5個等とすることができる。

【0062】

本明細書において、「ペプチドを環状化する工程」も、当業者が適宜行うことができる。少なくとも1つのアミノ酸がN-メチル化修飾されたペプチドを合成する際、上述した「環形成アミノ酸」のペアを末端又は非末端に入れることにより、合成されたペプチドが自発的に環を形成するよう構成してもよい。

大環状ペプチドは、自然界にも見られ、安定したコンフォメーションを有することが知られている。そのサイズと複雑性から、大環状ペプチドは、小さな非環状化ペプチドよりも高い特異性を示すことが知られており(White, T.R. et al., Nature chemical biology, 7(11), 810-7.)、タンパク質間相互作用や、低分子化合物の結合部位が不明な分子など、難易度の高い標的に対する阻害剤となる可能性が期待されている。環状構造による拘束性は、ペプチドのバイオアベイラビリティや代謝に対する耐性も向上させると考えられる。

したがって、ペプチドを環状化する工程を行うことにより、標的物質への特異性、結合

10

20

30

40

50

親和性に優れ、且つ安定性の高いペプチドを得ることが可能となる。

【0063】

本明細書において「ペプチドの安定性を評価する工程」は、標的物質に結合するペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基をN-メチル化し、且つ環状化したペプチドの安定性を評価する工程を意味する。

本明細書において「安定性の高いペプチド」とは、血液その他の体液中、血清中、培養液中、緩衝液中などで分解されにくいペプチドを意味し、N-メチル化修飾する前に比較して、統計的に有意に安定性が高いペプチドに加え、統計的に有意でなくても安定性が高いと当業者が認識できる程度に安定性が高いペプチドも含む。

ペプチドの安定性を評価する工程は、当業者が公知の方法に従って適宜行うことができる。例えば、ペプチドを内部標準となるペプチドと共に血清等に加えて37℃前後でインキュベートし、一定時間経過後に液体クロマトグラフ質量分析計により分子量を測定し、評価対象のペプチドについて、内部標準ペプチドに対する相対量を測定することにより、分解された量を求めて評価することができる。

本工程は、生体に由来する試料中に限らず、緩衝液に特定のペプチド分解酵素を加えて、行ってもよい。かかる方法により、特定のペプチド分解酵素に対する耐性が特に優れたペプチドを得ることができる。

【0064】

本発明に係る「標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを製造する方法」においては、アミノ酸残基をN-メチル化修飾する工程から、ペプチドの安定性を評価する工程を繰り返し、N-メチル化修飾による影響をすべてのアミノ酸について網羅的に調べてもよい。

例えば、N末端のアミノ酸から順にN-メチル化し、環状化工程及び安定性評価工程を行うことにより、標的物質の親和性を維持し、安定性が高められた最適なペプチドを見出すことができる。

【0065】

本発明に係る「標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを製造する方法」においては、N-メチル化の影響をすべてのアミノ鎖について網羅的に調べるのではなく、特定のアミノ酸について調べてもよい。

後述する実施例に示されるとおり、アルギニン又はリシン残基、又はその周辺のアミノ酸残基をN-メチル化すると、安定性が高くなる傾向があることが見出された。したがって、アルギニン残基又はリシン残基又はその周辺のアミノ酸をN-メチル化修飾することにより、標的物質に結合し、且つ安定性の高いペプチドを効率よく製造できる可能性が高い。

具体的には、アルギニン残基、リシン残基、アルギニン残基又はリシン残基から2アミノ酸以内のアミノ酸残基、アルギニン残基及びリシン残基からなる群より選択されるアミノ酸が2以上連続している領域における、当該アルギニン残基又はリシン残基、アルギニン残基及びリシン残基からなる群より選択されるアミノ酸が2以上連続している領域における、いずれかのアルギニン残基又はリシン残基から2アミノ酸以内のアミノ酸残基をN-メチル化修飾することが考えられる。

【0066】

「アルギニン残基又はリシン残基から2アミノ酸以内のアミノ酸残基」とは、あるアルギニン残基又はリシン残基について、N末端側の2アミノ酸及びC末端側の2アミノ酸からなる4アミノ酸残基のいずれかのアミノ酸残基を意味する。

「アルギニン残基及びリシン残基からなる群より選択されるアミノ酸が2以上連続している領域における、当該アルギニン残基又はリシン残基」とは、アルギニンのみ、リシンのみ、又はアルギニンとリシンが2以上連続している領域の、少なくとも1つのアルギニン又はリシンを意味する。

「アルギニン残基及びリシン残基からなる群より選択されるアミノ酸が2以上連続している領域における、いずれかのアルギニン残基又はリシン残基から2アミノ酸以内のアミノ酸残基」とは、アルギニンのみ、リシンのみ、又はアルギニンとリシンが2以上連続し

10

20

30

40

50

ている領域のN末端側の2アミノ酸及びC末端側の2アミノ酸からなる4アミノ酸残基のいずれかのアミノ酸を意味する。

【0067】

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により組み込まれる。

【実施例】

【0068】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。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、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

【0069】

1. チオエーテル大環状ペプチドライブラリの作製

セレクションに用いるペプチドライブラリにはARSリボザイム（フレキシザイム）と再構成無細胞翻訳系（PUREシステム）を組み合わせたFITシステムを用いた。

ARSリボザイム(eFx)と活性化クロロアセチルチロシン (ClAc-L-Tyr-CME, ClAc-D-Tyr-CME)を用いることで、開始tRNAの3'末端にClAc-L-Tyr, ClAc-D-Tyrが結合した開始アミノアシルtRNAを調整した。

4~15アミノ酸からなるランダム配列がチオエーテル環化に用いられるClAc-Tyrとシステイン(Cys)で挟まれているペプチドライブラリを合成するため、NNKコドンが4~15回繰り返される配列を持つcDNAを各ランダム配列の長さごとに合成した。

【0070】

上記cDNAをT7 RNA polymeraseで転写することで、ペプチドをコードするmRNAを作製し、ランダム配列の長さが違うmRNAを混合することで、mRNAライブラリを構築した。

このmRNAライブラリに対し、ピュロマイシンリンカーをT4 RNA ligaseを用いて結合させた。

続いて、メチオニン欠損PUREシステムに上で合成した開始アミノアシルtRNAを50 μ M加えた無細胞翻訳系で1.2 μ MのmRNAライブラリを翻訳した。1stラウンドは150 μ L, 2ndラウンドは5 μ L, 3rdラウンド以降は2.5 μ Lの量で翻訳反応を行った。翻訳後、ペプチドを室温で12分インキュベートすることでピュロマイシンを介してペプチドをコードしているmRNAと連結させた。20 mMのEDTAを加え、さらに37°Cで30分インキュベートすることでペプチドのチオエーテル結合形成、環化を促進し、チオエーテル大環状ペプチドライブラリを得た。

チオエーテル大環状ペプチド-mRNA連結体を逆転写酵素(RTase)によって逆転写することで、対応するcDNAを合成し、チオエーテル大環状ペプチド-mRNA-cDNA連結体を得た。

(参考文献)

Y. Goto, T. Katoh, H. Suga, Nature Protocols, 6, 779-790 (2011)

Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga, ACS Chemical Biology, 7, 607-613 (2012)

【0071】

2. c-Metに結合するチオエーテル大環状ペプチドのセレクション

Dynabeads Protein GにFcタンパク質を結合させたFc結合磁気ビーズを調整した。チオエーテル大環状ペプチドライブラリをFc結合磁気ビーズに加え、30分（2ndラウンド以降のみ、4 °Cで2回、37 °Cで1回）インキュベートすることで、Fcタンパク質もしくはDynabeads Protein Gに結合するペプチドを除去した。

セレクションに用いる標的ビーズとして、Dynabeads Protein G磁気ビーズにc-Met-Fc chimeraタンパク質を結合させたものを調製した。c-Met結合ビーズに対して上記の処理を行ったチオエーテル大環状ペプチドをインキュベートした。

各ビーズはそれぞれ氷冷したTBSTで3回洗浄し、PCRバッファー中で95 °Cで5分インキュベートすることで、各ビーズに結合したチオエーテル大環状ペプチドをコードするcDNAを単離した。

単離されたcDNAはリアルタイムPCRを用いて定量し、ライブラリ中のc-Met結合チオエー

10

20

30

40

50

テル大環状ペプチドの割合を算出した。

cDNAをPCRで増幅し、転写することで次ラウンドのmRNAライブラリを調製した。

ライブラリ中のc-Met結合チオエーテル大環状ペプチドの割合が向上したところで、cDNAの配列を解析することにより単離されたチオエーテル大環状ペプチドの配列を同定した。

(参考文献)

Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga, ACS Chemical Biology, 7, 607-613 (2012)

【0072】

配列が同定された大環状ペプチドのうち3例を以下に示す(配列番号：4～6)。

【化2】

10

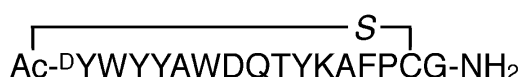
L5-2



D4-3



D5-4



20

【0073】

3. チオエーテル大環状ペプチドの化学合成

単離されたc-Met結合チオエーテル大環状ペプチド、蛍光標識化およびダイマー合成に用いたC末端リシン修飾およびシステイン修飾c-Met結合チオエーテル大環状ペプチドはFmoc固相合成により合成した。合成は一般的なFmoc固相合成を手動もしくはペプチド自動合成機を用いて行った。

Fmocアミノ酸の縮合は担体にそれぞれ担持量の5当量となるFmocアミノ酸、縮合剤(HBTUとHOBtの混合物もしくはCOMU)、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)をDMFに混合したものを加え、30分間反応させることで行った。

30

Fmoc基の脱保護は20 %ピペリジン/80 % DMFを20分反応させることで行った。

ペプチドのN末端には0.2 MのNHS-chloroacetyl/DMFを1時間反応させることで、chloroacetyl基を修飾した。

合成したペプチドはトリフルオロ酢酸(TFA)/ethanedithiol/triisopropylsilane/water (92.5:2.5:2.5:2.5)混合液を加え、室温で2時間インキュベートすることで担体から切り出し、側鎖の脱保護を行った。

切り出したペプチドは液量の10倍のジエチルエーテルを加えて固体として沈殿させ、0.1 % TFAを含むジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させた。

上記ペプチド溶液に対し、トリエチルアミン(TEA)を加える事で溶液を塩基性にし、室温で1時間インキュベートすることで合成したペプチドを環化させた。

40

環化反応をMALDI-TOF-MSによって確認し、溶液にTFAを加えることで再び酸性に戻した。

環化したペプチドはHPLCで精製し、MALDI-TOF-MSで分子量を確認した。

【0074】

4. チオエーテル大環状ペプチドの蛍光修飾

蛍光修飾したD5-4ペプチド(D5-4-fluorescein)は、以下のようにペプチド合成後に固相上でフルオレセイン修飾を行うことによって調製した。

まず、担体をDichloromethane/TFA/TIS (98:1:1)混合液で15分、3回インキュベートすることにより、D5-4ペプチドC末端のLysの側鎖Mmt保護基を脱保護した。

50

この担体に対し、DMFに溶解したNHS-フルオレセインをペプチドの3当量加え、室温で3時間インキュベートすることでC末端Lysの側鎖にフルオレセインを結合させた。

このペプチドを前述の通り切り出し、精製することでD5-4-fluoresceinを得た。

蛍光修飾したL5-2ペプチド、D4-3ペプチド、N-メチル化D4-3ペプチド及びc-Met非結合ペプチド（順にL5-2-fluorescein、D4-3-fluorescein、D4-3NMe-fluorescein及びD4-3scr-fluorescein）はC末端にリシン残基をもつL5-2、D4-3、D4-3NMe及びD4-3scrペプチドを固相合成し、上記の通り切り出してHPLC精製を行った後、DMSO溶液中で修飾を行うことにより調製した。

DMSOに溶解したペプチドの1.5当量のNHS-フルオレセインをDMSO溶液に加え、適量のTEAを加えることで塩基性にし、42℃で1時間反応することでリシンの側鎖にフルオレセインを付加した。

10

TFAを加える事で再び酸性に戻し、HPLC精製を行うことでL5-2-fluorescein及びD4-3-fluoresceinを得た。

【0075】

5. ペプチドのN-メチル化

ペプチドへのN-メチル化アミノ酸の導入は、該当するアミノ酸のアミノ基を担体上でメチル化すること、もしくは予めN-メチル化されているFmocアミノ酸を用いることで行った。

担体上でのメチル化は以下の通り行った。

該当するアミノ酸の縮合、Fmocの脱保護後、N-メチルピロリドン（NMP）で3回担体を洗浄した。

20

2-Nitrobenzenesulfonyl chloride (NBS-Cl)を担体担持量に対し4当量、2,4,6-Collidineを10当量NMPに溶解し、担体に加え15分、室温で反応させることでアミノ基をニトロベンジル化した。担体をNMPで5回洗浄した。

1,8-Diazabicyclo[5.4.0] undec-7-ene (DBU)を3当量、NMPに溶解させ担体と5分間反応させた。ジメチル硫酸をさらに10当量、NMPに溶解させた溶液を担体に加え、5分間室温で反応させた。この工程は2度繰り返すことで、アミノ基のメチル化修飾を行った。担体をNMPで5回洗浄した。

DBUを5当量、2-メルカプトエタノールを10当量NMPに溶解させ、担体に加えて5分間室温で反応させた。この工程を2度繰り返すことで、NBSの脱保護を行い、該当のアミノ酸のアミノ基がメチル化されているペプチドを得た。

30

以下のN-メチル化修飾したペプチドを得た。

【化 3】

D4-3	Ac-DYRQFNRRTHEVWNLDC	配列番号 : 25
D4-3-N2	Ac-DY ^{Me} RQFNRRTHEVWNLDC	配列番号 : 7
D4-3-N3	Ac-DYR ^{Me} QFNRRTHEVWNLDC	配列番号 : 8
D4-3-N4	Ac-DYRQ ^{Me} FNRRTHEVWNLDC	配列番号 : 9
D4-3-N5	Ac-DYRQF ^{Me} NRRTHEVWNLDC	配列番号 : 10
D4-3-N6	Ac-DYRQFN ^{Me} RRTHEVWNLDC	配列番号 : 11
D4-3-N7	Ac-DYRQFNR ^{Me} RTHEVWNLDC	配列番号 : 12
D4-3-N8	Ac-DYRQFNRR ^{Me} THEVWNLDC	配列番号 : 13
D4-3-N9	Ac-DYRQFNRR ^{Me} THEVWNLDC	配列番号 : 14
D4-3-N10	Ac-DYRQFNRRTH ^{Me} EVWNLDC	配列番号 : 15
D4-3-N11	Ac-DYRQFNRRTHE ^{Me} VWNLDC	配列番号 : 16
D4-3-N12	Ac-DYRQFNRRTHEV ^{Me} WNLDC	配列番号 : 17
D4-3-N13	Ac-DYRQFNRRTHEVW ^{Me} NLDC	配列番号 : 18
D4-3-N14	Ac-DYRQFNRRTHEVWN ^{Me} LDC	配列番号 : 19
D4-3-N15	Ac-DYRQFNRRTHEVWNL ^{Me} DC	配列番号 : 20
D4-3-N16	Ac-DYRQFNRRTHEVWNL ^{Me} DC	配列番号 : 21

10

20

30

【0076】

6. チオエーテル大環状ペプチドのダイマー化

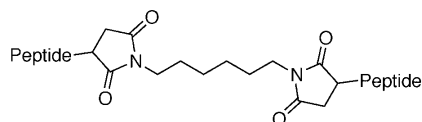
チオエーテル大環状ペプチドのC末端にCysをもつペプチドを上記の方法により化学合成し、HPLCで精製を行った。

40

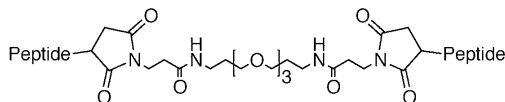
リンカーは以下に構造を示すBMH (Thermo Scientific)、Bis-MAL-PEG3、Bis-MAL-PEG11 (Quanta Biodesign)を用いた。

【化 4】

BMH

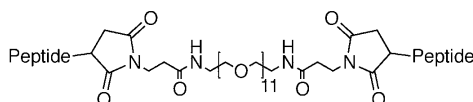


Bis-MAL-PEG3



10

Bis-MAL-PEG11



50 mM Hepes-HCl (pH 7.5)、90 % DMSO水溶液に11 mMの各ペプチドと5 mMの各リンカーを加え、42 °Cで2時間反応させることでダイマー化の反応を行った。

以下にL5-2（配列番号：22）について例示するように、リンカーはC末端のCys残基に結合する。

20

【化 5】



反応物はHPLCで精製し、MALDI-TOF-MSにより分子量を確認した。

大環状ペプチドのダイマー化の概念図を図1に示す。

【0077】

7. 細胞を用いた蛍光修飾c-Met結合チオエーテル大環状ペプチドの局在確認

ガラスボトムディッシュ上で培養されたヒトc-Met発現細胞（ヒトSNU-638細胞）、ヒトc-Met非発現細胞（ヒトSNU-216細胞）に対し、1 mg/Lの細胞核染色試薬Hoechst33342、抗ヒトc-Met抗体、1 μMのL5-2-fluorescein、D4-3-fluorescein、D5-4-fluorescein、D4-3NMe-fluoresceinまたはD4-3scr-fluoresceinを含むRPMI1640培地を加え、37 °C、5 % CO₂中で5分間インキュベートした。その後、HRP-抗ラット二次抗体、1 μMのL5-2-fluorescein、D4-3-fluorescein、D5-4-fluorescein、D4-3NMe-fluoresceinまたはD4-3scr-fluoresceinを含むRPMI1640培地を加え、37 °C、5 % CO₂中で5分間インキュベートした。

30

細胞はD-MEM培地で3回洗浄し、新しいRPMI1640培地中で顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察には共焦点蛍光顕微鏡を用いて観測することで、ペプチドの局在を観察した。

結果を図2A及びBに示す。c-Met発現細胞にはL5-2-fluorescein、D4-3-fluorescein、D5-4-fluorescein及びD4-3NMe-fluoresceinがc-Metと共局在して結合しており、D4-3scr-fluoresceinは結合していないことが確認された。また、c-Met非発現細胞にはこれらのペプチドが結合しないことが確認された。

40

【0078】

8. チオエーテル大環状ペプチドの血清中安定性評価

ヒト血清プールに評価するチオエーテル大環状ペプチドのDMSO溶液を1 μMとなるように溶解した。上記で調整したチオエーテル大環状ペプチドを含むヒト血清プールを37 °Cでインキュベートした。

評価する時間が経過したら、チオエーテル大環状ペプチドを含むヒト血清プールを氷上に置き、内標となるペプチドを1 μMとなるように加え、混合した。上記の混合物を固相抽出カラム（Hyper Sep SPE column, Thermo Scientific）に加え、0.1 % TFAを含む5 % アセトニトリル水溶液で洗浄した後、0.1 % TFAを含む70 %アセトニトリル水溶液で溶出

50

することで精製した。

精製物はLC-MSで分子量の確認を行い、血清中での切断部位の同定を行った。また、内標に対する相対量をインキュベーション時間ごとに比較することで、未切断で残っているチオエーテル大環状ペプチドの定量を行った。

結果を下表に示す。表に示されるとおり、D4-3ペプチドのアルギニンが2つ連続する領域周辺をN-メチル化修飾したD4-3-N6、D4-3-N7、及びD4-3-N8は、血清中安定性が飛躍的に改善された一方、結合能はそれほど低下しなかった。

【表 8】

Peptide	k_a (10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$)	k_d (10^{-2} s $^{-1}$)	K_D (nM)	Serum stability (1h)
D4-3	13	1.1	8.5	3.7
N2	7.1	1.0	14	5.4
N3	0.27	0.31	120	N.D.
N4	1.2	0.96	79	21.1
N5	0.19	0.39	200	N.D.
N6	1.2	0.41	34	85
N7	0.53	6.9	130	92
N8	0.27	0.60	220	81
N9	結合せず			N.D.
N10	0.25	0.75	300	N.D.
N11	0.15	0.51	350	N.D.
N12	0.55	0.86	160	N.D.
N13	0.78	0.26	33	4.5
N14	0.21	0.59	290	N.D.
N15	3.0	4.6	160	N.D.
N16	9.8	1.0	10	12

【0079】

また、図3に、D4-3、D4-3-N6、D4-3-N7、及びD4-3-N8について、未分解ペプチドの割合の経時変化を示す。

【0080】

さらに、D4-3の2つのアミノ酸をN-メチル化修飾したペプチド（D4-3NMe；配列番号：23）を作製し、結合能と血清中安定性を測定したデータを下表に示す。

【表 9】



Peptide	k_a (10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$)	k_d (10^{-2} s $^{-1}$)	K_D (nM)	Serum stability (4h)
D4-3	13	1.1	8.5	< 3.7
N6	1.2	0.41	34	67
N16	9.8	1.0	10	< 12
NMe (N6+N16)	3.9	0.21	5.2	63

【0081】

9-1. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定によるチオエーテル大環状ペプチドの結合能評価

チオエーテル大環状ペプチドの結合能評価は、Biacore (GE Healthcare)を用いたSPR測定にて行った。

センサーチップとしてSensor Chip CM5を用い、Human Antibody Capture Kitを用いて抗IgG抗体を測定レーンおよび対照レーン上に固定した。

測定レーンにはc-Met-Fcを固定し、対照レーンにはFcタンパク質を固定した。

ランニングバッファーには0.1 % DMSOを含むHBS-EP+バッファーを用い、シングルカインティクス法を用いて5点の濃度でチオエーテル大環状ペプチドの解離定数を算出した。

結果を下表に示す。D4-3NMeは、血清中安定性及び結合能に著しく優れていることが確認された。

【表10】

ペプチド	表面プラズモン共鳴による結合能測定			ヒト血清中安定性 (未分解の割合 / 時間)
	k_a ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})	K_D (nM)	
L5-2	2.3	1.2	5.4	71 % / 2 h
D4-3	2.4	0.80	3.4	6 % / 2 h
D5-4	4.5	2.1	4.6	97 % / 2 h
D4-3NMe	0.39	0.21	5.2	67 % / 4 h
D4-3scr	結合せず			未測定

ネガティブコントロール用ペプチドD4-3scr (配列番号: 24) として、以下のペプチドを用いた。

【化6】

D4-3scr



【0082】

9-2. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定によるダイマーペプチドの結合能評価

9-1と同様に、SPRにより各ダイマーペプチドの結合能を評価した結果を下表に示す。いずれのダイマーペプチドも高い結合能を示した。

【表 1 1】

ペプチド	リンカー	k_a ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (10^{-2} s^{-1})	K_D (nM)
L5-2	モノマー	2.3	1.2	5.4
	BMH	0.083	0.054	6.6
	Bis-MAL-PEG3	0.22	0.042	1.9
	Bis-MAL-PEG11	0.098	0.031	3.1
D4-3	モノマー	2.4	0.80	3.4
	BMH	2.0	0.091	0.45
	Bis-MAL-PEG3	1.1	0.070	0.64
	Bis-MAL-PEG11	1.2	0.11	0.90
D5-4	モノマー	4.5	2.1	4.6
	BMH	0.046	0.055	12
	Bis-MAL-PEG3	0.12	0.054	4.7
	Bis-MAL-PEG11	5.3	1.1	2.1
D4-3NMe	モノマー	0.39	0.21	5.2
	Bis-MAL-PEG11	0.49	0.040	0.81
D4-3scr	モノマー	結合せず		
	BMH	結合せず		

【0083】

10. Phospho-RTKアレイによるダイマーペプチドの活性評価

培養されたヒト中皮腫由来であるEHMES-1細胞に対し、各ダイマーペプチドを至適濃度で加え、10分間インキュベートすることで、細胞を刺激した。対照実験としては、組み換えヒトHGFタンパク質を2 nM加え、10分間インキュベートした。

これらの細胞を溶解し、溶解液をPhospho-RTKアレイ（R&Dシステム社）で解析することで、細胞のc-Metがリン酸化されるか評価した。

結果を図4に示す。図示されるとおり、二量化したL5-2、D4-3、D5-4およびN-メチル化D4-3ペプチドを加えた場合には、HGFを加えた場合と同様に自己リン酸化が誘導されることが確認された。また、他のRTK（受容体チロシンキナーゼ）はリン酸化を受けないことから、これらのダイマーペプチドはc-Metに対し高い選択性を持つことが明らかとなった。

【0084】

11. ウェスタンブロッティングによるダイマーペプチドの活性評価

培養されたヒト中皮腫由来であるEHMES-1細胞に対し、各ダイマーペプチドを至適濃度で加え、10分間インキュベートすることで、細胞を刺激した。対照実験としては、組み換えヒトHGFタンパク質を2 nM加え、10分間インキュベートした。

これらの細胞を溶解し、溶解液を10 % の変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。その後、分離したタンパク質をImmobilon-P PVDF膜（Millipore）に転写し、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO)でブロッキングした後、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO)中で一晩、4 °Cで一次抗体反応を行った。抗体はanti-Met (Millipore, EP1454Y), anti-Phospho-Met Tyr1234/1235 (Cell Signaling Technology, D26), anti-Phospho-Met Tyr1349 (Millipore, 07-808), anti-Akt (Cell Signaling Technology, 11E7), anti-Phospho-Akt Thr308 (Cell Signaling Technology, D25E6), anti-Erk1/2 (Cell Signaling Technology, 137F5), anti-Phospho-Erk1/2 Thr202/Tyr204 (Cell Signaling Technology, D13.14.4E), anti-Gab1 (Cell Signaling Technology) or anti-Phospho-Gab1 Tyr 627 (Cell Signaling Technology, C32H2)を用いた。続いてCan G

et Signal Solution 2 (TOYOBO) 中でanti-rabbit antibody HRP conjugateを用いて二次抗体反応を室温、1時間行った。膜にHRP基質であるLuminata Forte HRP substrate (Millipore) を加えて1分間反応させ、化学発光をImageQuant LAS 350で観察した。結果を図5に示す。全てのダイマーペプチドが、HGF同様c-Met, Gab1, Akt, Erkの各タンパク質のリン酸化を促進することが明らかとなった。これらのタンパク質はc-Metシグナル経路における重要なアダプタータンパク質であり、この結果はダイマーペプチドが天然のリガンドであるHGFによる刺激と同じc-Met経路を活性化することを明らかにするものである。

【0085】

12. ELISA法を用いたダイマーペプチドの活性評価

ヒトEHMES-1細胞に対し、各ダイマーペプチドを加え、10分間インキュベートすることで細胞の刺激を行った。

対照実験としては、組み換えヒトHGFタンパク質を加え、10分間インキュベートすることで細胞の刺激を行った。

c-Metのリン酸化レベルをELISA法を用いて定量した。

結果を表12に示す。二量化したL5-2、D4-3、D5-4およびN-メチル化D4-3ペプチドはc-Metの自己リン酸化を誘導した。自己リン酸化の程度は、リンカーの種類によって異なり、また自己リン酸化レベルが高くなるリンカーはペプチドの種類により異なった。

【表12】

ペプチド	リンカー	活性
L5-2	BMH	低
	Bis-MAL-PEG3	高
	Bis-MAL-PEG11	低
D4-3	BMH	低
	Bis-MAL-PEG3	低
	Bis-MAL-PEG11	高
D5-4	BMH	高
	Bis-MAL-PEG3	高
	Bis-MAL-PEG11	高
D4-3NMe	Bis-MAL-PEG11	高
D4-3scr	BMH	無

【0086】

13. ダイマーペプチドの細胞増殖および細胞遊走活性評価

イレッサを加えることで細胞増殖を阻害したヒトHcc-827細胞に対し、ダイマーペプチドを加えて培養することで、c-Metシグナル経路を介した細胞増殖能の活性化を行った。培養した細胞はMTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) を用いたアッセイにより、細胞数の定量を行った。

また、ヒトHuCCT1細胞を細孔含有プレート上に播種し、ダイマーペプチド混合培地で培養を行うことで遊走能の活性化評価を行った。

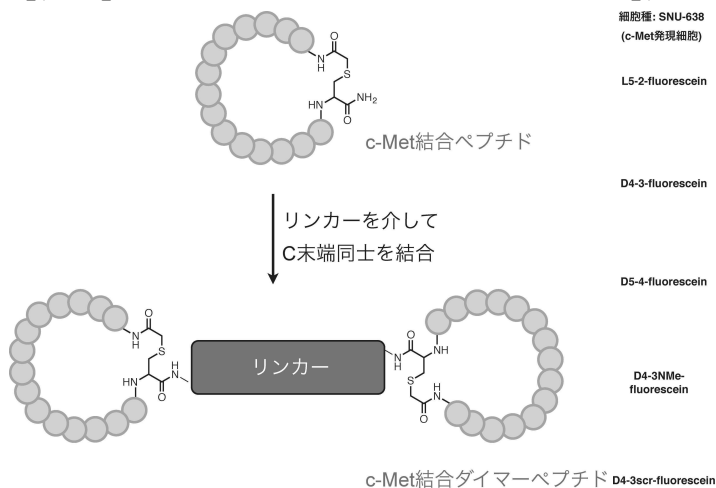
結果を表13に示す。二量化したL5-2、D4-3、D5-4およびN-メチル化D4-3ペプチドは細胞増殖および細胞遊走を活性化した。

【表 1 3】

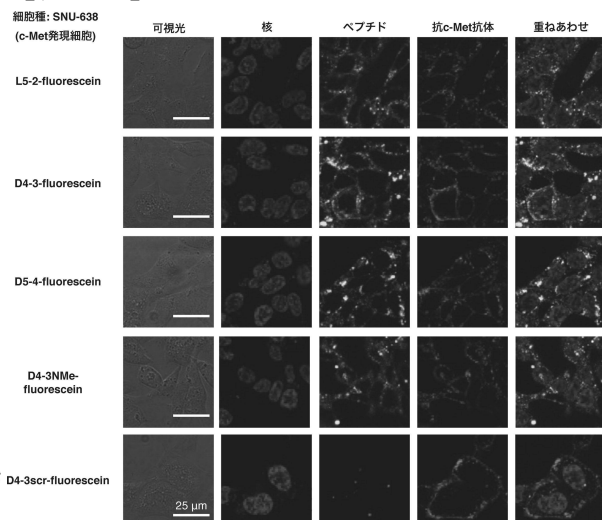
ペプチド	リンカー	c-Metリン酸化	細胞増殖	細胞遊走
L5-2	モノマー	促進しない	活性化しない	N.D.
	BMH	促進	活性化	N.D.
	Bis-MAL-PEG3	促進	N.D.	活性化
	Bis-MAL-PEG11	促進	N.D.	N.D.
D4-3	モノマー	促進しない	活性化しない	N.D.
	BMH	促進	活性化	N.D.
	Bis-MAL-PEG3	促進	N.D.	N.D.
	Bis-MAL-PEG11	促進	N.D.	活性化
D5-4	モノマー	促進しない	活性化しない	N.D.
	BMH	促進	活性化	N.D.
	Bis-MAL-PEG3	促進	N.D.	N.D.
	Bis-MAL-PEG11	促進	N.D.	活性化
D4-3NMe	モノマー	促進しない	N.D.	N.D.
	Bis-MAL-PEG11	促進	N.D.	活性化
D4-3scr	モノマー	促進しない	N.D.	N.D.
	BMH	促進しない	N.D.	活性化しない

N.D. : Not determined

【図 1】

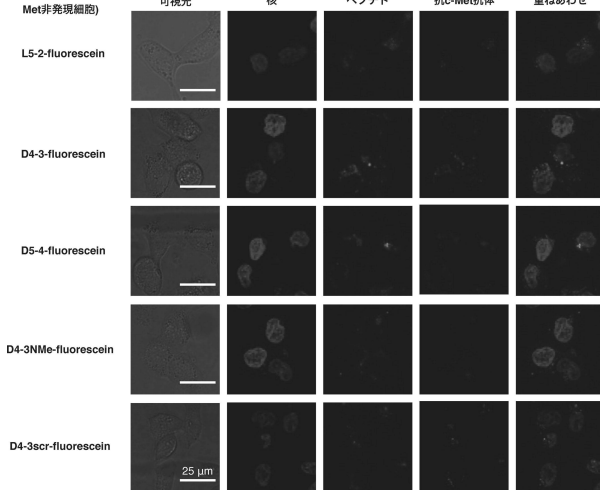


【図 2 A】

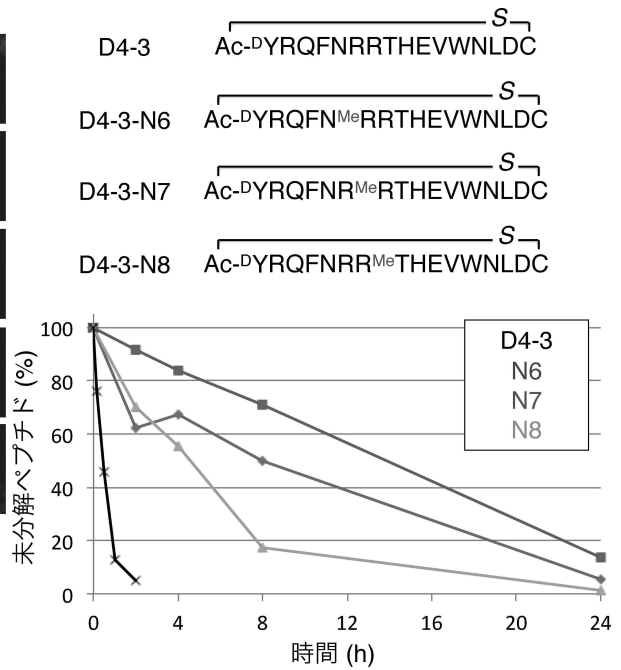


【図 2 B】

細胞種: SNU-216 (c-Met非発現細胞)



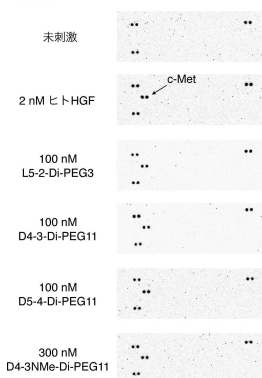
【図 3】



【図 4】

細胞種: ヒトEHMES-1細胞

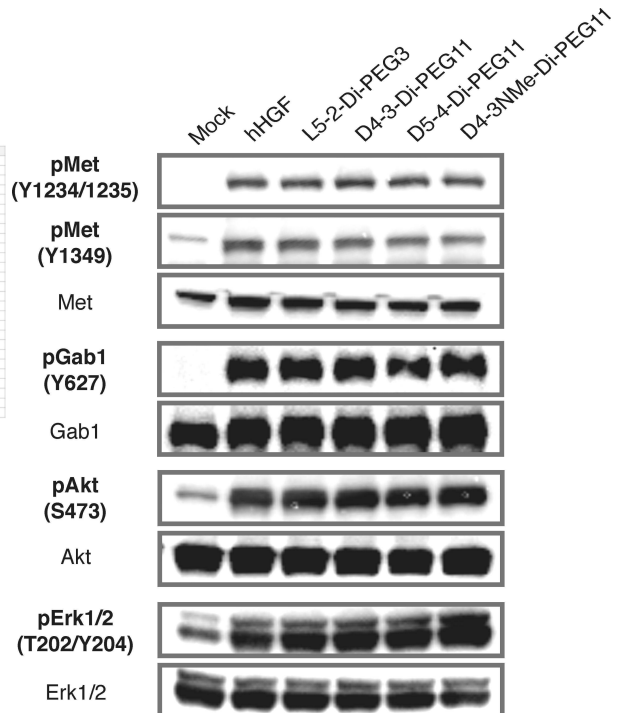
刺激時間: 10 min



Human Phospho-RTK Array Coordinates

Coordinate	Receptor Family	RTK Control	Coordinate	Receptor Family	RTK Control
A1, A2	Receptor Tyrosine Kinase	—	D1, D2	Tie	Tie-2
A23, A24	Receptor Tyrosine Kinase	—	D1, D4	NGF R	TrkA
B1, B2	EGF R	EGF R	D5, D6	NGF R	TrkB
B3, B4	EGF R	EGF R	D7, D8	NGF R	TrkC
B5, B6	EGF R	EGF R	D9, D10	NGF R	VEGF R1
B7, B8	EGF R	EGF R	D11, D12	VEGF R	VEGF R2
B9, B10	EGF R	EGF R	D13, D14	VEGF R	VEGF R3
B11, B12	EGF R	EGF R	D15, D16	VEGF R	VEGF R4
B13, B14	EGF R	EGF R	D17, D18	EGF R	EGF R
B15, B16	EGF R	EGF R	D19, D20	EGF R	EGF R
B17, B18	Insulin R	Insulin R	D21, D22	EGF R	EGF R
B19, B20	Insulin R	Insulin R	D23, D24	EGF R	EGF R
B21, B22	Ad	Ad	E1, E2	EGF R	EGF R
B23, B24	Ad	Ad	E3, E4	EGF R	EGF R
C1, C2	Ad	Ad	E5, E6	EGF R	EGF R
C3, C4	NGF R	NGF R	E7, E8	EGF R	EGF R
C5, C6	NGF R	NGF R	E9, E10	EGF R	EGF R
C7, C8	PDGF R	PDGF R	E11, E12	EGF R	EGF R
C9, C10	PDGF R	PDGF R	E13, E14	Insulin R	Insulin R
C11, C12	PDGF R	PDGF R	E15, E16	—	—
C13, C14	PDGF R	PDGF R	E17, E18	—	—
C15, C16	PDGF R	PDGF R	E19, E20	EGF R	EGF R
C17, C18	RET	RET	E21, E22	EGF R	EGF R
C19, C20	RET	RET	F1, F2	Receptor Tyrosine Kinase	—
C21, C22	RET	RET	F3, F4	EGF R	EGF R
C23, C24	Tie	Tie-1	F5, F6	—	—
			F7, F8	Control 1	PKC

【図 5】



【配列表】

0006426103000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02

(72)発明者 伊藤 健一郎
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 田中 耕一郎

(56)参考文献 特表2000-515735 (JP, A)
国際公開第2008/117833 (WO, A1)
特表2012-515144 (JP, A)
国際公開第02/051869 (WO, A1)
特表平10-503494 (JP, A)
国際公開第2012/012352 (WO, A1)
特表2015-503554 (JP, A)
特表2013-523149 (JP, A)
T.R.White, et al., Nature Chemical Biology, 2011, 7(11), pp810-817
松本邦夫ら、化学工学会秋季大会研究発表講演要旨集、SCEJ 37th Autumn Meeting、2005、E20
2-E203
井戸章雄ら、日消誌、2002、99、pp1436-1442

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 / 0 0 - C 0 7 K 1 9 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
S w i s s P r o t / G e n e S e q
P u b M e d