(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月26日(26.09.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/195709 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C07K 7/56 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/010163

(22) 国際出願日： 2024年3月15日(15.03.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

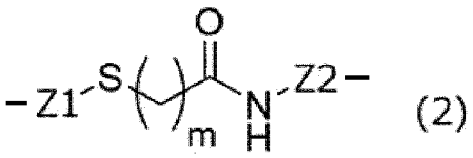
(30) 優先権データ：
特願 2023-043076 2023年3月17日(17.03.2023) JP
特願 2023-170565 2023年9月29日(29.09.2023) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 泉田 森(**IZUTA Shin**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 羽場 亮太(**HABA Ryota**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 富永 譲(**TOMINAGA Jo**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 石井 由紀子(**ISHII Yukiko**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 吉村 直子(**YOSHIMURA Naoko**); 〒2588577 神奈

(54) **Title:** CYCLIC PEPTIDE OR SALT THEREOF, AND USE FOR SAME

(54) 発明の名称： 環状ペプチド又はその塩及びそれらの利用



(2)

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a cyclic peptide or salt thereof and a cyclic peptide complex or salt thereof that have excellent stability and exhibit excellent binding to FGFR proteins, and of providing a culture medium composition, a purification material, a labeling material, a cell control material, and an accumulation material that use the cyclic peptide or salt thereof and the cyclic peptide complex or salt thereof. The present invention provides a cyclic peptide or salt thereof that includes an amino acid sequence represented by X1-Xn-X2-X3-X4, the cyclic peptide or salt thereof including a cyclized portion that has been cyclized by covalent bonding, and the cyclized portion including a structure represented by formula (2). In the formulas, X1 represents an alanine residue, a proline residue, a leucine residue, an isoleucine residue, a valine residue, a phenylalanine residue, a tyrosine residue, a tryptophan residue, an asparagine residue, a serine residue, an arginine residue, a histidine residue, or a methionine residue, Xn represents a peptide residue that includes 1 –7 arbitrary amino acid residues, X2 represents an alanine residue, a glycine residue, a leucine residue, an isoleucine residue, or a valine residue, X3 represents an arbitrary amino acid residue, X4 represents an amino acid residue having a side chain that includes an aromatic residue, Z1 and Z2 each

WO 2024/195709 A1

［続葉有］

川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 和田 史織 (WADA Shiori); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

independently represent a linking group, and m represents an integer from 1 to 10.

(57) 要約：本発明は、ＦＧＦＲタンパク質への結合性に優れ、かつ安定性に優れた、環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩を提供すること、並びに上記環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩を利用した、培地組成物、精製用材料、標識用材料、細胞制御用材料、並びに集積用材料を提供することを課題とする。 本発明によれば、Ｘ１－Ｘｎ－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ４で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、共有結合にて環状化された環化部を含み、上記環化部が、式（２）で示される構造を含む、環状ペプチド又はその塩：式中、Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、Ｘｎは、１から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、Ｚ１及びＺ２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示す、が提供される。

明　細　書

発明の名称 ： 環状ペプチド又はその塩及びそれらの利用

技術分野

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

背景技術

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

[0003] 増殖因子のうち、線維芽細胞増殖因子（Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒ、ＦＧＦ）は、広範囲の細胞の未分化能維持及び細胞増

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

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

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

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０００／００３２４５号公報

特許文献2：特開２０１７－９５４４３号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

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

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

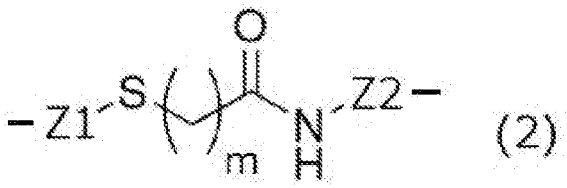
環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記環状ペプチド又はその塩及び環状ペプチド複合体又はその塩を利用した、培地組成物、培地添加剤、精製用材料、標識用材料、細胞制御用材料、並びに集積用材料を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

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

[0010] ＜１＞ Ｘ１－Ｘｎ－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ４で示されるアミノ酸配列を含むペプチドであって、共有結合にて環状化された環化部を含み、上記環化部が、式（２）：

[化1]



(2)

で示される構造を含む、環状ペプチド又はその塩：

式中、

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、１から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

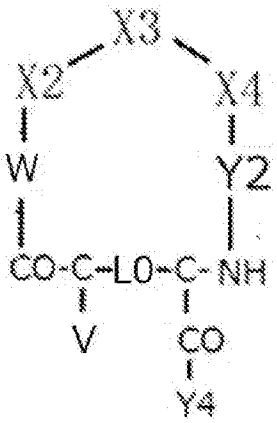
Ｚ１及びＺ２はそれぞれ独立に、連結基を示し、

ｍは、１～１０の整数を示す。

＜２＞

式（１）で示される、＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

[化2]



(1)

式中、

Ｗは、－Ｘｎ－Ｘ１－Ｙ１－、又はＸｋを示し、ここでＸｎがＸ２に結合し、Ｙ１がＣＯに結合し、

Ｗが－Ｘｎ－Ｘ１－Ｙ１－である場合、Ｖは－ＮＨ－Ｙ３を示し、かつＬ０はＬを示すか、又はＶはＲを示し、かつＬ０はＬ１を示し、

Ｗが、Ｘｋを示す場合、Ｖは－ＮＨ－Ｘ１－Ｙ５を示し、かつＬ０はＬを示す。

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、４から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘｋは、単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｙ１は、単結合、又は１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ２は、１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ３は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

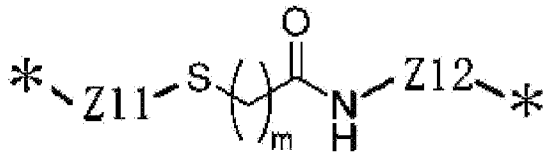
Ｙ４は、ＯＨを示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ５は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｘ１のアミノ末端がＹ１のカルボキシル末端と結合し、Ｘ１のカルボキシル末端がＸｎのアミノ末端と結合し、

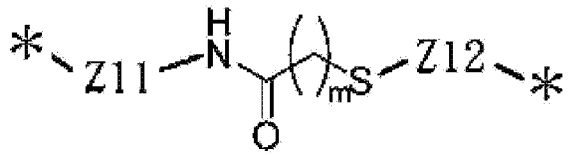
Ｌは、

[化3]



又は

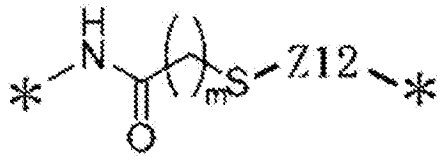
[化4]



で示される環化部を示し、Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｌ１は、

[化5]

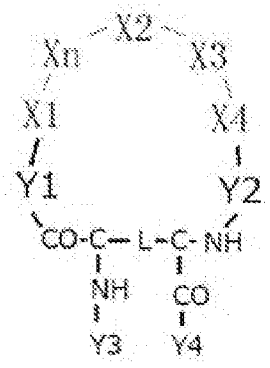


で示される環化部を示し、Ｚ１２は連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

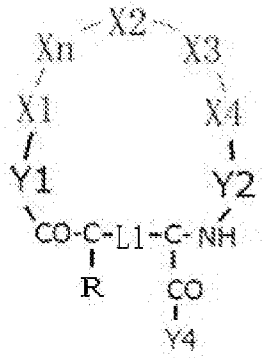
Ｒは、アミノ酸の側鎖構造を示す。

＜３＞　式（１Ａ１）、式（１Ａ２）、又は式（１Ｂ）で示される、＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

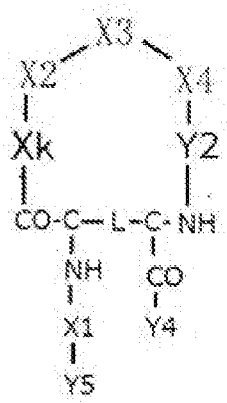
[化6]



(1A1)



(1A2)



(1B)

式中、

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、４から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘｋは、単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｙ１は、単結合、又は１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ２は、１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ３は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

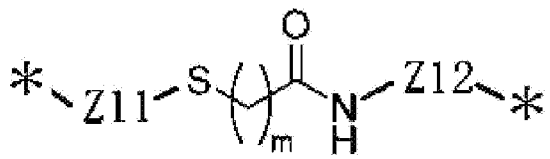
Ｙ４は、ＯＨを示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ５は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｘ１のアミノ末端がＹ１のカルボキシル末端と結合し、Ｘ１のカルボキシル末端がＸｎのアミノ末端と結合し、

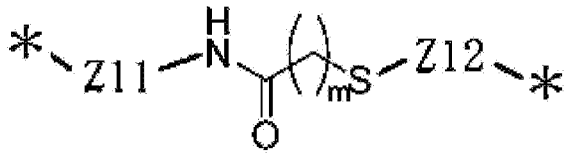
Ｌは、

[化7]



又は

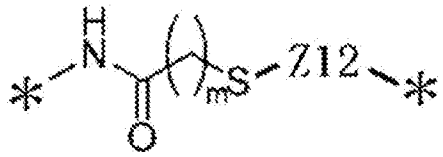
[化8]



で示される環化部を示し、Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｌ１は、

[化9]



で示される環化部を示し、Ｚ１２は連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｒは、アミノ酸の側鎖構造を示す。

＜４＞　Ｘｎが、－Ｘｍ－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘｍが、単結合、又は１から５個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す、

＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜５＞　Ｘｎが、－Ｘｍ－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、
Ｘｍが、２から５個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、
Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、
Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、
Ｘｋが、－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、
Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す、
＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。
＜６＞　Ｘｎが、－Ｘ７－Ｘ８－Ｘ９－Ｘ１０－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、
Ｘ７は、任意のアミノ酸残基を示し、
Ｘ８は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示し、
Ｘ９は、任意のアミノ酸残基を示し、
Ｘ１０は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、メチオニン残基、又はシステイン残基を示し、
Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、

又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す、

＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜７＞　環を構成するアミノ酸残基の数が１０～２２個である、＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜８＞　環化部にホモシステイン残基を含む、＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜９＞　表４～表６に記載されている配列番号３８～３８２及び配列番号３８４～３９０のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３８～３８２及び配列番号３８４～３９０のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、

＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜１０＞　表４～表６に記載されている配列番号３８～４２、配列番号４４～４５、配列番号５０～５２、配列番号５４、配列番号５６～５８、配列番号６０～６２、配列番号６４～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１１０、配列番号１１２、配列番号１１５、配列番号１１７、配列番号１２０～１２１、配列番号１２３～１２４、配列番号１２６～１３４、配列番号１３７～１３９、配列番号１４３～１４４、配列番号１４６～１５８、配列番号１６２、配列番号１６４～１７２、配列番号１７４～１７５、配列番号１７７～２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０９～２１９、配列番号２２１～２２４、配列番号２２６、配列番号２２９～２４２、配列番号２４７～２４８、配列番号２５１～２５２、配列番号２５６、配列番号２５８～２６０、配列番号２６２～２６４、配列番号２

７１～２７２、配列番号２７５、配列番号２８１、配列番号２８３～２８８、配列番号２９０、配列番号２９２、配列番号２９４～２９６、配列番号２９８、配列番号３００～３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３～３３６、配列番号３４７、配列番号３５２～３５３、配列番号３５６、配列番号３６０、配列番号３６５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８６～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３８～４２、配列番号４４～４５、配列番号５０～５２、配列番号５４、配列番号５６～５８、配列番号６０～６２、配列番号６４～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１１０、配列番号１１２、配列番号１１５、配列番号１１７、配列番号１２０～１２１、配列番号１２３～１２４、配列番号１２６～１３４、配列番号１３７～１３９、配列番号１４３～１４４、配列番号１４６～１５８、配列番号１６２、配列番号１６４～１７２、配列番号１７４～１７５、配列番号１７７～２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０９～２１９、配列番号２２１～２２４、配列番号２２６、配列番号２２９～２４２、配列番号２４７～２４８、配列番号２５１～２５２、配列番号２５６、配列番号２５８～２６０、配列番号２６２～２６４、配列番号２７１～２７２、配列番号２７５、配列番号２８１、配列番号２８３～２８８、配列番号２９０、配列番号２９２、配列番号２９４～２９６、配列番号２９８、配列番号３００～３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３～３３６、配列番号３４７、配列番号３５２～３５３、配列番号３５６、配列番号３６０、配列番号３６５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８６～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、

＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜１１＞　表４～表６に記載されている配列番号３９、配列番号４２、配列番号４４、配列番号５４、配列番号５６～５７、配列番号６１～６２、配列番号６５～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１２１、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３１、配列番号１３４、配列番号１３７～１３８、配列番号１４４、配列番号１４６～１５７、配列番号１６４～１６９、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７７～配列番号２００～２０１、配列番号２０３、配列番号２１１～２１３、配列番号２１６～２１９、配列番号２２１～２２３、配列番号２３４～２３６、配列番号２４０、配列番号２４２、配列番号２５８、配列番号２６４、配列番号２８４、配列番号２８６～２８７、配列番号２９４～２９６、配列番号３００～３０１、配列番号３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３、配列番号３２６～３３３、配列番号３３５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８７～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は
表４～表６に記載されている配列番号３９、配列番号４２、配列番号４４、配列番号５４、配列番号５６～５７、配列番号６１～６２、配列番号６５～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１２１、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３１、配列番号１３４、配列番号１３７～１３８、配列番号１４４、配列番号１４６～１５７、配列番号１６４～１６９、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７７～配列番号２００～２０１、配列番号２０３、配列番号２１１～２１３、配列番号２１６～２１９、配列番号２２１～２２３、配列番号２３４～２３６、配列番号２４０、配列番号２４２、配列番号２５８、配列番号２６４、配列番号２８４、配列番号２８６～２８７、配列番号２９４～２９６、配列番号３００～３０１、配列番号３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３、配列番号３２６～３３３、配列番号３３５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８７～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、

置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、

＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜１２＞　他の物質で修飾されている、＜１＞に記載の環状ペプチド又はその塩。

＜１３＞　２分子以上の＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。

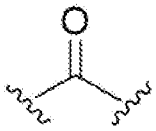
＜１４＞　２分子の＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。

＜１５＞　リンカーの長さが２０Å以下の距離である、＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩。

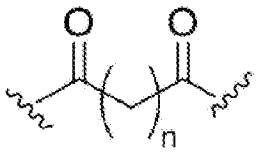
＜１６＞　リンカーが、下記構造の少なくとも１つである、＜１３＞に記載のペプチド複合体又はその塩。

[化10]

(A)

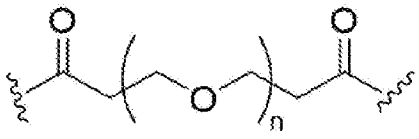


(B)



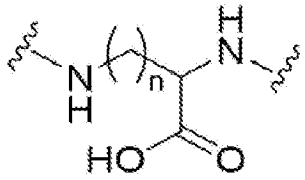
(nは２～１０の整数を示す)

(C)



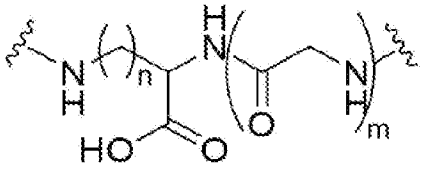
(nは１～３の整数を示す)

(D)



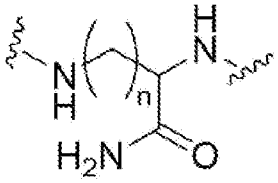
(nは１～４の整数を示す)

(E)



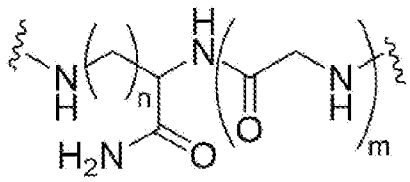
(nは１～４の整数を示し、mは１～３の整数を示す)

(F)



(nは１～４の整数を示す)

（G）



（ｎは１～４の整数を示し、ｍは１～３の整数を示す）

＜１７＞　他の物質で修飾されている、＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩。

＜１８＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。

＜１９＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、精製用材料。

＜２０＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、標識用材料。

＜２１＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、細胞制御用材料。

＜２２＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、集積用材料。

＜２３＞　＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。

＜２４＞　＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、精製用材料。

＜２５＞　＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、標識用材料。

＜２６＞　＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、細胞制御用材料。

＜２７＞　＜１３＞に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、集積用材料。

発明の効果

[0011]　本発明の環状ペプチド又はその塩は、ＦＧＦＲタンパク質への結合性に優

れ、かつ安定性に優れている。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、実施例で使用した化合物の構造を示す。

[図2]図２は、環状ペプチド複合体（配列番号３９３）の細胞増殖促進作用を示す。

[図3]図３は、環状ペプチド複合体（配列番号３９３）及びｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）の幹細胞増殖作用を示す。

[図4]図４は、環状ペプチド複合体（配列番号３９３）及びｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子）の幹細胞未分化能の維持作用を示す。

[図5]図５は、環状ペプチド複合体（配列番号３９３）のウシ細胞増殖作用を示す。

発明を実施するための形態

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

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

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

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

[0014] ＜アミノ酸、アミノ酸残基及びペプチド＞

アミノ酸は、原則として、国際純正・応用化学連合と国際生化学・分子生

物学連合による共同命名委員会（ＩＮＴＥＲＮＡＴＩＯＮＡＬ　ＵＮＩＯＮ　ＯＦ　ＰＵＲＥ　ＡＮＤ　ＡＰＰＬＩＥＤ　ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ａｎｄ　ＩＮＴＥＲＮＡＴＩＯＮＡＬ　ＵＮＩＯＮ　ＯＦ　ＢＩＯＣＨＥＭＩＳＴＲＹ　ＡＮＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ　ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ　Ｊｏｉｎｔ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ　ｏｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ　（ＪＣＢＮ））で採用された名称、略号等を用いて表す。また、アミノ酸残基は、そのアミノ酸残基が由来するアミノ酸の略号を用いて表す。なお、アミノ酸残基は、Ｎ末端アミノ酸（Ｎ末端残基）又はＣ末端アミノ酸（Ｃ末端残基）でもよい。

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

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

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

。

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

[0019] [表1]

表１

一文字略号	三文字略号	名称
A	Ala	L-アラニン
B	Asx	L-アスパラギン酸又はL-アスパラギン
C	Cys	L-システイン
D	Asp	L-アスパラギン酸
E	Glu	L-グルタミン酸
F	Phe	L-フェニルアラニン
G	Gly	グリシン
H	His	L-ヒスチジン
I	Ile	L-イソロイシン
K	Lys	L-リジン
L	Leu	L-ロイシン
M	Met	L-メチオニン
N	Asn	L-アスパラギン

一文字略号	三文字略号	名称
O	Pyl	L-ピロリシン
P	Pro	L-プロリン
Q	Gln	L-グルタミン
R	Arg	L-アルギニン
S	Ser	L-セリン
T	Thr	L-トレオニン
U	Sec	L-セレノシステイン
V	Val	L-バリン
W	Trp	L-トリプトファン
X	Xaa	任意のアミノ酸
Y	Tyr	L-チロシン
Z	Glx	L-グルタミン酸又はL-グルタミン

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

[0021]

[表2]

表2

三文字略号	名称	三文字略号	名称
Aad	ホモグルタミン酸	Gla	4-カルボキシグルタミン酸
βAad	3-アミノアジピン酸	Glp	5-オキソプロリン
Abu	2-アミノブタン酸	Hcy	ホモシステイン
Dab	2,4-ジアミノブタン酸	Hse	ホモセリン
Ahx	2-アミノヘキサン酸	Hsl	ホモセリンラクトン
Ahe	2－アミノヘプタン酸	5Hyl	5-ヒドロキシリジン(Hyl)
Aib	2－アミノイソ酪酸	aHyl	アロ-ヒドロキシリジン
εAhx	6-アミノヘキサン酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
βAla	β-アラニン	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Ape	2-アミノペンタン酸	Hph	ホモフェニルアラニン
A_2pr	2,3-ジアミノプロパン酸	Hle	ホモロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	Hty	ホモチロシン
A_2pm	2,6-ジアミノピメリン酸	aIle	アロ-イソロイシン
Cit	シトルリン	Nle	ノルロイシン
Cya	システイン酸	Nva	ノルバリン
Dbu	2,4-ジアミノブタン酸	Orn	オルニチン
Dpm	2,6-ジアミノピメリン酸	Sar	サルコシン
Dap	2,3-ジアミノプロパン酸	aThr	アロ-トレオニン
Pen	ペニシラミン	Thx	チロキシン

[0022] 芳香族残基を含むアミノ酸としては、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、及びベンゼン環、イミダゾール環、又はピリジン環を側鎖構造に含む非天然アミノ酸が挙げられ、好ましくは、フェニルアラニン、及びチロシンであり、より好ましくはフェニルアラニンである。

[0023] アミノ酸としては、メチオニン、システイン、リジンを使用してもよいが、酸化耐性の観点からメチオニン及びシステインは使用しない方が好ましく、ペプチド化学合成コストの観点からシステイン及びリジンは含まない方が好ましい。

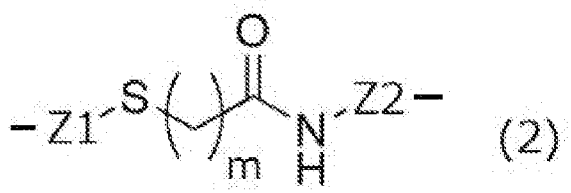
[0024] ペプチドとは、一般にアミノ酸が３～１００個連なった構造を指すが、その末端及び／又は内部に、アミノ酸以外の構造が含まれていてもよい。３～１００個のアミノ酸が内包されている物質は全てペプチドである。

環状ペプチドとは、３つ以上のアミノ酸残基からなる閉じた環構造を内包するペプチドを指す。

[0025] ＜環状ペプチド＞

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

[化11]



(2)

で示される構造を含む環状ペプチドである。

式中、

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、１から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

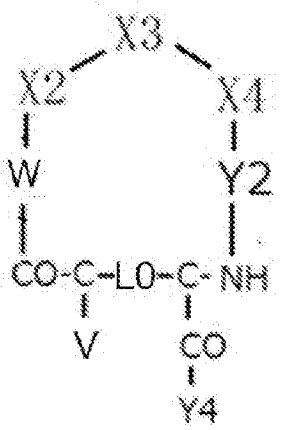
Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｚ１及びＺ２はそれぞれ独立に、連結基を示し、

ｍは、１～１０の整数を示す。

[0026] 好ましくは、本発明の環状ペプチドは、式（１）で示される。

[化12]



(1)

式中、

Wは、－Ｘｎ－Ｘ１－Ｙ１－、又はＸｋを示し、ここでＸｎがＸ２に結合し、Ｙ１がＣＯに結合し、

Wが－Ｘｎ－Ｘ１－Ｙ１－である場合、Ｖは－ＮＨ－Ｙ３を示し、かつＬＯはＬを示すか、又はＶはＲを示し、かつＬＯはＬ１を示し、

Wが、Ｘｋを示す場合、Ｖは－ＮＨ－Ｘ１－Ｙ５を示し、かつＬＯはＬを示す。

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、４から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘｋは、単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｙ１は、単結合、又は１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ２は、１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ３は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

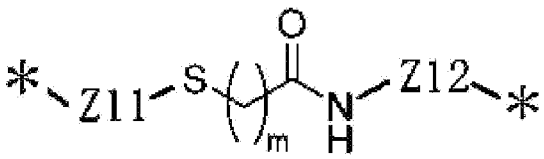
Ｙ４は、ＯＨを示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ５は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｘ１のアミノ末端がＹ１のカルボキシル末端と結合し、Ｘ１のカルボキシル末端がＸｎのアミノ末端と結合し、

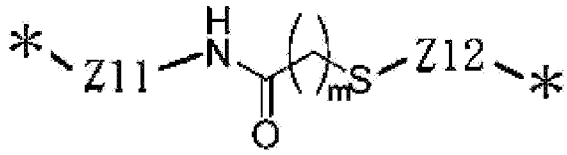
Ｌは、

[化13]



又は

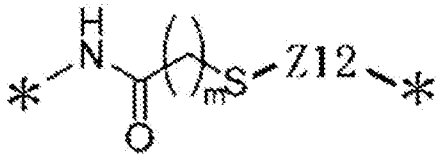
[化14]



で示される環化部を示し、Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｌ１は、

[化15]

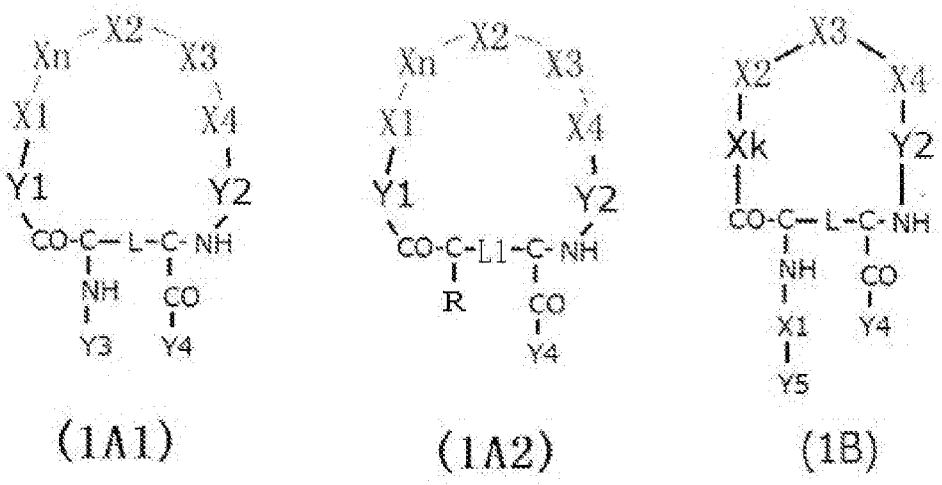


で示される環化部を示し、Ｚ１２は連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｒは、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[0027] 好ましくは、本発明の環状ペプチドは、式（１Ａ１）、式（１Ａ２）又は式（１Ｂ）で示される。

[化16]



(1A1) (1A2) (1B)

式中、

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、４から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘｋは、単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、

又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｙ１は、単結合、又は１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ２は、１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ３は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

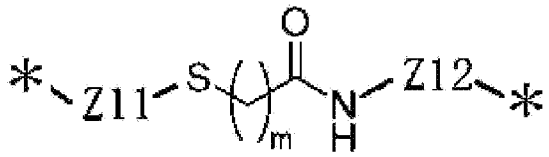
Ｙ４は、ＯＨを示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ５は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｘ１のアミノ末端がＹ１のカルボキシル末端と結合し、Ｘ１のカルボキシル末端がＸｎのアミノ末端と結合し、

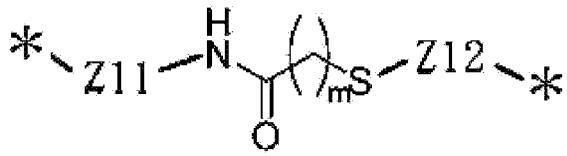
Ｌは、

[化17]



又は

[化18]

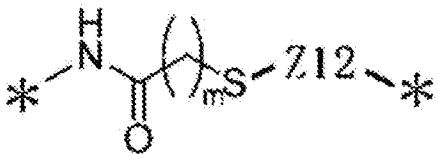


で示される環化部を示し、Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を

示し、

Ｌ１は、

[化19]



で示される環化部を示し、Ｚ１２は連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｒは、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[0028] より好ましい態様においては、

Ｘｎが、－Ｘｍ－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘｍが、単結合、又は１から５個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘｋが、－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。

より好ましい態様においては、

Ｘｎが、－Ｘｍ－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘｍが、２から５個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、

又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘｋが、－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0029] さらに好ましい態様においては、

Ｘｎが、－Ｘ７－Ｘ８－Ｘ９－Ｘ１０－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘ７は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ８は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘ９は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ１０は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、メチオニン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘｋが、－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0030] Ｘ１は、好ましくは、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ１は、より好ましくは、ロイシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ１は、特に好ましくは、ロイシン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0031] Ｘ７は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ７は、より好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ７は、特に好ましくは、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0032] Ｘ８は、好ましくは、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、トレオニン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ８は、より好ましくは、ロイシン残基、又はフェニルアラニン残基を示す。Ｘ８は、特に好ましくは、フェニルアラニン残基を示す。

[0033] Ｘ９は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニ

ン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ９は、より好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ９は、さらに好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0034] Ｘ１０は、好ましくは、グリシン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はシステイン残基を示す。Ｘ１０は、より好ましくは、グリシン残基を示す。

[0035] Ｘ５は、好ましくはプロリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、又はリジン残基を示す。Ｘ５は、よりに好ましくは、トリプトファン残基、又はヒスチジン残基を示す。Ｘ５は、特に好ましくは、ヒスチジン残基を示す。

[0036] Ｘ６は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｘ６は、より好ましくは、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0037] Ｘ２は、好ましくは、アラニン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基

を示す。Ｘ２は、より好ましくは、アラニン残基、又はバリン残基を示す。Ｘ２は、特に好ましくは、アラニン残基を示す。

[0038] Ｘ３は、好ましくは、プロリン残基、アスパラギン残基、又はアスパラギン酸残基を示す。Ｘ３は、より好ましくは、プロリン残基を示す。

[0039] Ｘ４は、好ましくは、フェニルアラニン残基、チロシン残基、又はヒスチジン残基を示す。Ｘ４は、より好ましくは、フェニルアラニン残基又はチロシン残基を示す。Ｘ４は、より好ましくは、フェニルアラニン残基を示す。

[0040] Ｙ１は、好ましくは、Ｙｍ－Ｙ１１で示される基を示し、

Ｙｍは単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ１１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、グルタミン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0041] Ｙ１１は、好ましくは、イソロイシン残基、バリン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、又はリジン残基を示す。Ｙ１１は、より好ましくは、イソロイシン残基、バリン残基、アルギニン残基、又はリジン残基を示す。

[0042] Ｙｍは、好ましくは、単結合、Ｙｍ３で示されるアミノ酸残基、Ｙｍ２－Ｙｍ３で示される２個のアミノ酸残基からなるペプチド残基、又はＹｍ１－Ｙｍ２－Ｙｍ３で示される３個のアミノ酸残基からなるペプチド残基を示す。Ｙｍは、より好ましくは、Ｙｍ３で示されるアミノ酸残基、Ｙｍ２－Ｙｍ３で示される２個のアミノ酸残基からなるペプチド残基、又はＹｍ１－Ｙｍ２－Ｙｍ３で示される３個のアミノ酸残基からなるペプチド残基を示す。

[0043] Ｙｍ１は、任意のアミノ酸残基を示す。

[0044] Ｙｍ２は、好ましくは、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、セリン残基、トレオニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｙｍ２は、より好ましくは、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、又はトレオニン残基を示す。

[0045] Ｙｍ３は、好ましくは、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、イソロイシン残基、バリン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｙｍ３は、より好ましくは、プロリン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、又はヒスチジン残基を示す。

[0046] Ｙ２は、好ましくは、Ｙ２１－Ｙ２２で示される２個のアミノ酸残基からなるペプチド残基を示す。

[0047] Ｙ２１は、好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｙ２１は、より好ましくは、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、トレオニン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0048] Ｙ２２は、好ましくは、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、アスパラギン残基、セリン残基、トレオニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｙ２２は、より好ましくは、アラニン残基、イソロイシン残基、バリン残基、チロシン残基、又はヒスチジン残基を示す。Ｙ２２は、特に好ましくは、アラニン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示す。

[0049] Ｙ３は、好ましくは、水素原子を示すか、あるいは１個の任意のアミノ酸残基を示す。

[0050] Ｙ４は、好ましくは、ＯＨを示すか、あるいは１個の任意のアミノ酸残基を示す。Ｙ４は、より好ましくは、ＯＨを示すか、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残

基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。Ｙ４は、特に好ましくは、ＯＨを示すか、アラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、チロシン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す。

[0051] Ｚ１及びＺ２はそれぞれ独立に、連結基を示し、好ましくは炭素数１～１０のアルキレン基を示し、より好ましくは炭素数１～５のアルキレン基を示し、特に好ましくは２～４のアルキレン基を示す。

ｍは、好ましくは１～５の整数を示し、より好ましくは１～３の整数を示し、特に好ましくは１の整数を示す。

[0052] Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、好ましくは炭素数１～１０のアルキレン基を示し、より好ましくは炭素数１～５のアルキレン基を示し、特に好ましくは２～４のアルキレン基を示す。

[0053] 環状ペプチドは、ポリペプチド鎖に含まれる複数のアミノ酸残基が、主鎖ペプチド結合以外の共有結合により相互に結合することにより、閉じた環構造を形成する。環状ペプチドにおいて、上記の相互に結合した複数のアミノ酸残基からなる部分構造を環化部と呼ぶ。

環状ペプチドの環化部は、安定性の観点から、ジスルフィド結合を含まない必要がある。ジスルフィド結合を含まない環化部の例としては、チオエーテル結合を含む構造が挙げられる。

[0054] チオエーテル結合を形成する場合は、例えば、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基の側鎖チオール基と、側鎖にクロロアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基の側鎖クロロアセチル基とを反応させてチオール結合を形成することができる。具体的には、例えば、Ｌ－ホモシステイン残基の側鎖チオール基とＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシン残基の側鎖クロロアセチル基との間でチオール結合を形成させることに

より、直鎖状のポリペプチドを環化することができる。

[0055] なお、側鎖にクロロアセチル基等のハロアセチル基を有するアミノ酸の代わりに、側鎖にクロロプロピオニル基等の、ハロアセチル基よりもメチレン単位の数が多いハロカルボニル基を有するアミノ酸を用いることも可能であるが、メチレン単位の数が少ないものほど環化効率が高いため好ましい。例えば、ハロプロピオニル基（－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｘ；Ｘはハロゲン原子、メチレン単位の数２）よりもアセチル基（－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_2$－Ｘ；Ｘはハロゲン原子、メチレン単位の数１）の方が、環化効率が高いため、好ましい。

[0056] チオエーテルの形成において、主鎖にハロカルボニル基を有するアミノ酸を用いるよりも、側鎖にハロカルボニル基を有するアミノ酸を用いる方が、ＦＧＦＲ結合性の観点より好ましい。

[0057] チオエーテル結合の形成において、チオール基を有するアミノ酸は、安定性、及びペプチド化学合成工程におけるラセミ化体の生成抑制の両観点から、システインよりホモシステインが好ましい。即ち、環状ペプチドの環化部はホモシステイン残基を含むことが好ましい。

[0058] 環状ペプチドの環を構成するアミノ酸残基の数は、ＦＧＦＲタンパク質結合性の観点から、１０～２２個であることが好ましく、１２～２０個がより好ましく、１４～１８個がさらに好ましく、１８個が特に好ましい。

[0059] 環状ペプチドに使用するアミノ酸は、ＦＧＦＲタンパク質結合性の観点から、類似構造（一般的に類似と見なされるもの）であってもよい。類似構造には非天然アミノ酸を含む。非天然アミン酸には炭素鎖を伸長したもの（ホモセリンなど）、メチル基を付与したもの（Ｎ－メチルアラニンなど）、及び単独又は複数の修飾を施したもの（リン酸化チロシンなど）でもよい。

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

[0060] 環状ペプチドの具体例としては、

表４～表６に記載されている配列番号３８～３８２及び配列番号３８４～３９０のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３８～３８２及び配列番号３８４～３９０のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、

環状ペプチドを挙げることができる。

[0061] 環状ペプチドの好ましい具体例としては、

表４～表６に記載されている配列番号３８～４２、配列番号４４～４５、配列番号５０～５２、配列番号５４、配列番号５６～５８、配列番号６０～６２、配列番号６４～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１１０、配列番号１１２、配列番号１１５、配列番号１１７、配列番号１２０～１２１、配列番号１２３～１２４、配列番号１２６～１３４、配列番号１３７～１３９、配列番号１４３～１４４、配列番号１４６～１５８、配列番号１６２、配列番号１６４～１７２、配列番号１７４～１７５、配列番号１７７～２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０９～２１９、配列番号２２１～２２４、配列番号２２６、配列番号２２９～２４２、配列番号２４７～２４８、配列番号２５１～２５２、配列番号２５６、配列番号２５８～２６０、配列番号２６２～２６４、配列番号２７１～２７２、配列番号２７５、配列番号２８１、配列番号２８３～２８８、配列番号２９０、配列番号２９２、配列番号２９４～２９６、配列番号２９８、配列番号３００～３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３～３３６、配列番号３４７、配列番号３５２～３５３、配列番号３５６、配列番号３６０、配列番号３６５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８６～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３８～４２、配列番号４４～４５、配列番号５０～５２、配列番号５４、配列番号５６～５８、配列番号６０～６

２、配列番号６４～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１１０、配列番号１１２、配列番号１１５、配列番号１１７、配列番号１２０～１２１、配列番号１２３～１２４、配列番号１２６～１３４、配列番号１３７～１３９、配列番号１４３～１４４、配列番号１４６～１５８、配列番号１６２、配列番号１６４～１７２、配列番号１７４～１７５、配列番号１７７～２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０９～２１９、配列番号２２１～２２４、配列番号２２６、配列番号２２９～２４２、配列番号２４７～２４８、配列番号２５１～２５２、配列番号２５６、配列番号２５８～２６０、配列番号２６２～２６４、配列番号２７１～２７２、配列番号２７５、配列番号２８１、配列番号２８３～２８８、配列番号２９０、配列番号２９２、配列番号２９４～２９６、配列番号２９８、配列番号３００～３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３～３３６、配列番号３４７、配列番号３５２～３５３、配列番号３５６、配列番号３６０、配列番号３６５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８６～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、

環状ペプチドを挙げることができる。

[0062] 環状ペプチドのより好ましい具体例としては、

表４～表６に記載されている配列番号３９、配列番号４２、配列番号４４、配列番号５４、配列番号５６～５７、配列番号６１～６２、配列番号６５～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１２１、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３１、配列番号１３４、配列番号１３７～１３８、配列番号１４４、配列番号１４６～１５７、配列番号１６４～１６９、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７７～配列番号２００～２０１、配列番号２０３、配列番号２１１～２１３、配列番号２１６～２１９、配列番号２２１～２２３、配列番号２３４～２３６、配列番号２

４０、配列番号２４２、配列番号２５８、配列番号２６４、配列番号２８４、配列番号２８６～２８７、配列番号２９４～２９６、配列番号３００～３０１、配列番号３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３、配列番号３２６～３３３、配列番号３３５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８７～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３９、配列番号４２、配列番号４４、配列番号５４、配列番号５６～５７、配列番号６１～６２、配列番号６５～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１２１、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３１、配列番号１３４、配列番号１３７～１３８、配列番号１４４、配列番号１４６～１５７、配列番号１６４～１６９、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７７～配列番号２００～２０１、配列番号２０３、配列番号２１１～２１３、配列番号２１６～２１９、配列番号２２１～２２３、配列番号２３４～２３６、配列番号２４０、配列番号２４２、配列番号２５８、配列番号２６４、配列番号２８４、配列番号２８６～２８７、配列番号２９４～２９６、配列番号３００～３０１、配列番号３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３、配列番号３２６～３３３、配列番号３３５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８７～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、

環状ペプチドを挙げることができる。

[0063] 置換、欠失又は挿入されているアミノ酸の個数は、１～４個であればよいが、好ましくは１個、２個又は３個であり、より好ましくは１個また２個である。

[0064] ＦＧＦＲタンパク質への結合性は、一定量のＦＧＦＲタンパク質に対し、環状ペプチドを特定濃度で作用させた際に、ＦＧＦＲタンパク質に結合した

環状ペプチドの量で示される。本開示ではＥＬＩＳＡ法及びＳＰＲ法を用いて測定しているが、他の手法（ＩＴＣ、ａｌｐｈａｓｃｒｅｅｎなど）でも同様に測定可能である。ＦＧＦＲタンパク質は全長体であってもよく、一部ドメインであってもよく、変異が導入されていてもよい。

[0065] 環状ペプチドの分子安定性について、本開示では還元耐性及びアルカリ耐性を指標にして測定しているが、他の刺激に対する耐性（例えば、Ｘ線耐性、γ線耐性、紫外線耐性、耐熱性、耐薬品性）においても同様に発揮される。分子安定性は、基本的には、分子が自由エネルギーの点からより安定であることを表しているためである。

[0066] 環状ペプチドは、以下に例示するような他の物質で修飾されていてもよい。

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

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

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

[0067] 環状ペプチドからアミノ酸及び／又は修飾構造が欠損していてもよい。ＦＧＦＲタンパク質結合性の観点からアミノ酸の欠損は４個以下である必要があり、欠損が２個以下の方が好ましく、欠損がない状態が特に好ましい。

[0068] 本発明の環状ペプチドは、塩であってもよい。塩は、好ましくは、生理学的に許容される無機及び有機の酸及び塩基との塩である。適切な酸塩の例には下記のものが含まれる：酢酸塩、アジピン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素 酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パモ酸塩（ｐａｌｍｏａｔｅ）、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロ酢酸塩及びウンデカン酸塩。適切な塩基から誘導される塩類には、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、アンモニウム塩 、及びＮ－（アルキル）４＋塩が含まれる。

[0069] ＜環状ペプチドの製造方法＞

環状ペプチドの製造方法は特に限定されず、化学合成、遺伝子工学的合成、又は無細胞翻訳系による酵素合成により製造することができる。純度の観点から、化学合成がより好ましい。

[0070] 化学合成によるペプチド合成としては、固相合成法でも液相合成法でもよい。少量の合成においては固相合成法が好ましく、自動ペプチド合成装置を用いた固相合成法が簡便であり好ましい。多量の合成においては液相合成が作業性の観点で好ましい。多量の目安として１ｇ以上が挙げられるが、この限りではない。

[0071] ペプチドの固相合成は、当業者には公知であり、例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、α－アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのＣ末端アミノ酸）のカルボキシル基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、１－メシチレンスルホニル－３－ニトロ－１，２，４－トリアゾール（ＭＳＮＴ）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＰＣＤＩ）等の公

知の脱水縮合剤を用いることができる。次に、第一アミノ酸のα－アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシル基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、上記カルボキシル基を活性化させて、第一及び第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸のα－アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシル基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、上記カルボキシル基を活性化させて、第二及び第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドが合成されたら、すべての官能基を脱保護する。固相合成のレジンとしては、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ　ｒｅｓｉｎ、ＭＢＨＡ　ｒｅｓｉｎ、Ｃｌ－Ｔｒｔ　ｒｅｓｉｎ、ＳＡＳＲＩＮ　ｒｅｓｉｎ、Ｗａｎｇｒｅｓｉｎ、Ｒｉｎｋａｍｉｄｅ　ｒｅｓｉｎ、ＨＭＦＳ　ｒｅｓｉｎ、Ａｍｉｎｏ－ＰＥＧＡ　ｒｅｓｉｎ（Ｍｅｒｃｋ）、ＨＭＰＡ－ＰＥＧＡｒｅｓｉｎ（Ｍｅｒｃｋ）等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤（ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、２－プロパノール、塩化メチレン等）で洗浄してから用いてもよい。α－アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル（Ｃｂｚ又はＺ）基、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）基、フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基、ベンジル基　、アリル基、アリルオキシカルボニル（Ａｌｌｏｃ）基等が挙げられる。Ｃｂｚ基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Ｂｏｃ基はトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）により脱保護でき、Ｆｍｏｃ基はピペリジンによる処理で脱保護できる。α－カルボキシル基の保護は、メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル、ｔｅｒｔ－ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いて行うことができる。アミノ酸のその他の官能基として、セリンやトレオニンの水酸基はベンジル基や　ｔｅｒｔ－ブチル基で保護することができ、チロシンの水酸基は２－ブロモベンジルオキシカルボニル基やｔｅｒｔ－ブチル基で保護する。リジン側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシル基は、α－アミノ基、α－カルボキシル基と同様に保護することができる。カルボキシル基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例

えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＰＣＤＩ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣあるいはＷＳＣ）、（１Ｈベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスファート（ＢＯＰ）、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチル］－１Ｈ－ベンゾトリアゾリウム－３－オキシドヘキサフルオロホスファート（ＨＢＴＵ）等が挙げられる。レジンからのペプチド鎖の切断は、ＴＦＡ、フッ化水素（ＨＦ）等の酸で処理することによって行うことができる。

[0072] 遺伝子工学的合成とは、細胞に遺伝子を導入し、ペプチドを合成する方法である。細胞としては、細菌、酵母、線虫細胞、昆虫細胞、動物細胞（哺乳類細胞など）等が用いられる。

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

[0073] 無細胞翻訳系は、無細胞タンパク質合成系とも呼ばれ、大腸菌等の細胞をそのまま使用せず、大腸菌などの細胞内に存在する成分を利用する翻訳系であり、細胞抽出液を用いるものと、細胞抽出液の各成分を精製したもので再構成した反応液（再構成型無細胞翻訳系）を用いるものがある。

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

[0074] 再構成型無細胞翻訳系は、それぞれ精製したリボソームタンパク質、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＲＳ）、リボソームＲＮＡ、アミノ酸、ＧＴＰ、ＡＴＰ、翻訳開始因子（ＩＦ）、伸長因子（ＥＦ）、終結因子（ＲＦ）、リボソーム再生因子、その他の翻訳に必要な因子等で構築することができる。

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

[0075] 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）、ジーンフロンティア社のＰｕｒｅｆｒｅｘ（登録商標）、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ社のＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）　Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ等が挙げられる。

[0076] ＜環状ペプチド複合体＞

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

[0077] ＦＧＦＲは一回膜貫通型の受容体チロシンキナーゼであり、ＦＧＦの結合を起点としてＦＧＦＲが二量体化し、ＦＧＦＲの細胞内キナーゼ領域が近接することにより、相互リン酸化を起こし、細胞の増殖誘起及び／又は分化状態制御を促す。そのため、ＦＧＦＲタンパク質結合性を有する環状ペプチドを、リンカー構造を介して多量体化し（多量体化した環状ペプチドを以降、環状ペプチド複合体と称する）、ＦＧＦＲを発現する細胞に作用させることで、環状ペプチド複合体を介したＦＧＦＲ多量体化を起こし、ＦＧＦＲをリン酸化することが可能だと考えられる。この際、リン酸化がＦＧＦＲの細胞内キナーゼ領域間の近接を介することを鑑みると、ＦＧＦＲを適切な距離と配向で多量体化することが好ましいと考えられる。

[0078] また、ＦＧＦＲを発現する細胞などの増殖又は分化状態の維持を意図したＦＧＦＲリン酸化には、環状ペプチドを複数含むことが必要となる場合がある。環状ペプチド複合体に含まれる複数の環状ペプチドは共有結合で複合化されていてもよく、非共有結合（例えば、錯体形成、アフィニティー結合、核酸ハイブリダイゼーション）で結合していてもよい。上記結合は、合成コ

ストの観点からは非共有結合であってもよいが、複合体安定性の観点から共有結合（例えば、アミド結合、各種クリックケミストリー）が好ましい。

[0079] 複数の環状ペプチドは環状ペプチド間の直接的な結合により複合体化していてもよく、他の分子を介して複合体化してもよい。環状ペプチド複合体に含まれる複数の環状ペプチドは、同一の構造を有していても良く、異なる構造を有していてもよい。細胞増殖促進作用及び／又は細胞分化状態制御の観点からは、異なる構造を有していてもよいが、合成コストの観点からは、同一の構造を有する方が好ましい。

[0080] リンカーの長さは、特に限定されないが、ＦＧＦＲリン酸化の観点から、好ましくは２０Å以下の距離であり、より好ましくは１０Å以下の距離である。

リンカーの長さを算出するにあたり、分子鎖の折れ曲がりを加味し、単結合一つあたり１．３３Å（１アミノ酸残基あたり４Å）という単位距離を算出した。本単位距離を用いることにより、リンカーの長さを、分子構造を基に算出可能である。

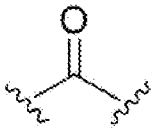
[0081] 環状ペプチド複合体において、ＦＧＦＲリン酸化の観点から、リンカーは環状ペプチドのＮ末端とＣ末端のどちらに結合していても使用できる。

環状ペプチド複合体において、ＦＧＦＲリン酸化の観点から、リンカー構造はＰＥＧ（ポリエチレングリコール）、アルキル鎖（ポリエチレン）、ポリペプチド、ポリエステル、ポリアクリルアミド、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリスチレン及び／又はポリウレタンであってもよい。また、リンカー構造が塩を形成してもよい。リンカー構造が塩を形成する場合の塩は、上述の塩であることが好ましい。環状ペプチド複合体の水溶解性の観点から、ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）、アルキル鎖（ポリエチレン）、ポリペプチド、ポリエステル及び／又はポリアクリルアミドがより好ましい。

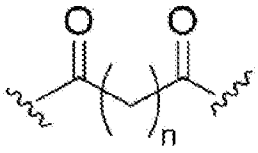
[0082] リンカーとしては、以下の構造（Ａ）～（Ｇ）が好ましい。

[化20]

(A)

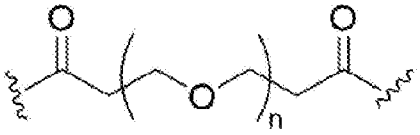


(B)



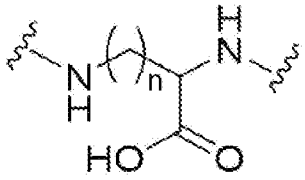
（ｎは２～１０の整数を示す）

(C)



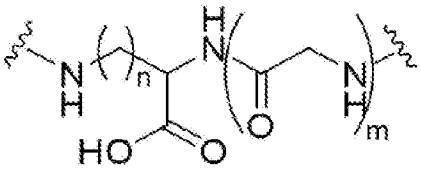
（ｎは１～３の整数を示す）

(D)



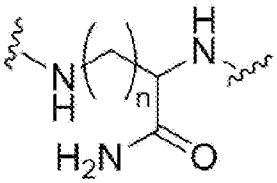
（ｎは１～４の整数を示す）

(E)



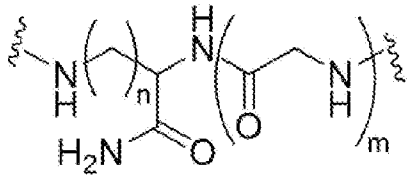
（ｎは１～４の整数を示し、ｍは１～３の整数を示す）

(F)



（ｎは１～４の整数を示す）

（G）



（ｎは１～４の整数を示し、ｍは１～３の整数を示す）

[0083] リンカーとしては、上記の構造（Ａ）、（Ｂ）、（Ｄ）、（Ｅ）、（Ｆ）又は（Ｇ）がより好ましい。上記構造（Ｂ）のリンカーとしては、ｎ＝２～６であることがさらに好ましい。上記構造（Ｅ）のリンカーとしては、ｎ＝１～４であり、ｍ＝１であることがさらに好ましい。上記構造（Ｇ）のリンカーとしては、ｎ＝１～４であり、ｍ＝１であることがさらに好ましい。

[0084] 環状ペプチド複合体の製造は、例えばアミノ基を一つ有する二つの環状ペプチドを、ＮＨＳ活性化されたカルボキシル基を２つ有するリンカー分子（以降、Ｂｉｓ－ＮＨＳリンカーと記載）を用いて連結することで実施可能である。多様なリンカー長を有するＢｉｓ－ＮＨＳリンカーが各社から販売されているが、例としてＢＳ（ＰＥＧ）５ （ＰＥＧｙｌａｔｅｄ ｂｉｓ（ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ）ｓｕｂｅｒａｔｅ）（Ｔｈｅｒｍｏ、２１５８１）やＢｉｓ（ＮＨＳ）ＰＥＧ９（東京化成工業、Ｂ４６８８）が挙げられる。Ｂｉｓ－ＮＨＳリンカーを用いた環状ペプチドの連結は、ｐＨ７付近の水中で環状ペプチドとリンカーを混合することにより実施可能である。

またペプチド固相合成及び液相合成において複数のアミノ基を有する分岐型のアミノ酸を用いることにより環状ペプチド複合体を製造することが可能である。分岐型アミノ酸の例としてはリジンや２，４－ジアミノブタン酸などが挙げられる。この場合、分岐型アミノ酸を固相樹脂や液相合成用タグに連結させたのちに、複数のアミノ基を脱保護し、両方に対してペプチド鎖の伸長を行うことで環状ペプチド複合体を固相樹脂上、又は液相合成用タグ上で合成することが可能である。ペプチド鎖の伸長は全てのアミノ基上で同時に進めてもよく、一つずつ進めてもよい。

[0085] 本発明の環状ペプチド複合体は、他の物質で修飾されていてもよい。他の

物質としては、環状ペプチドの修飾について上記したものと同様である。

[0086] ＜環状ペプチド及び環状ペプチド複合体の利用＞

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

[0087] 環状ペプチド又はその塩、又は環状ペプチド複合体又はその塩を作用させる対象は、結合性、機能制御性、標識効率、精製増殖促進及び／又は分化状態制御の観点から、ＦＧＦＲタンパク質であってもよいし、他のタンパク質、化合物及び／又は細胞であってもよいが、ＦＧＦＲタンパク質及び／又はＦＧＦＲを発現する細胞、細胞分泌物及び／又は細胞破砕液、ｂＦＧＦによる増殖や未分化維持効果が知られている細胞が好ましい。ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ３、又はＦＧＦＲ４タンパク質及び／又はＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ３、又はＦＧＦＲ４を発現する細胞、細胞分泌物及び／又は細胞破砕液がより好ましい。ＦＧＦＲ１、又はＦＧＦＲ４タンパク質及び／又はＦＧＦＲ１、又はＦＧＦＲ４を発現する細胞、細胞分泌物及び／又は細胞破砕液が特に好ましい。

[0088] 環状ペプチド又はその塩、又は環状ペプチド複合体又はその塩を作用させる対象は、ヒトに由来する物質であってもマウス、ウシ又は他の動物に由来する物質でもよい。結合性、機能制御性、標識効率、精製増殖促進及び／又は分化状態制御の観点からは、ヒトとＦＧＦＲを構成するアミノ酸配列の相同性が高い動物に由来する物質が好ましい。ヒトとＦＧＦＲを構成するアミノ酸の相同性が高い動物の例としてはウシ、ブタ、トリ、マグロが挙げられる。

[0089] 環状ペプチド又はその塩、又は環状ペプチド複合体又はその塩は、水溶液又は有機溶剤に溶解して使用してもよく、固相化担体（例えば、プレート、ビーズ）に結合させて使用してもよい。固相化担体に結合させて使用する場合は、結合効率及び／又は目的性能発現の観点から、環状ペプチド及び／又は環状ペプチド複合体に結合用の反応基（例えば、アミノ基、チオール基、ビオチン）を導入する方が好ましい。

[0090] 具体的には、本発明の環状ペプチド又はその塩及び本発明の環状ペプチド複合体又はその塩は、培地組成物、培地添加剤、精製用材料、標識用材料、細胞制御用材料、又は集積用材料として使用することができる。

[0091] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物として使用する場合、常法によって構成成分を配合することで調製することができ、その形態は細胞増殖促進作用及び／又は細胞制御等の所望の効果が得られる限り特に限定されず、例えば、液体培地、半流動培地、及び固形培地の形態として調製することができる。また、本発明の培地組成物を、粉末状の形態において調製してもよい。粉末状の形態に調製することにより、輸送や保存が極めて容易となり得る。また、使用時に滅菌水及び／又は寒天等を添加することにより、容易に液体状、半液体状、又は固形状の培地を調製することができる。液体状、半液体状、又は固形状の培地を調製する場合、環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩の調製濃度は、ＦＧＦＲリン酸化の観点から、０．００１～１００ｎｍｏｌ／Ｌであることが好ましく、０．０１～１０ｎｍｏｌ／Ｌがより好ましく、０．１～３ｎｍｏｌ／Ｌがさらに好ましく、０．３～３ｎｍｏｌ／Ｌが特に好ましい。

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

[0092] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物として使用する場合、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩に加えて、一般的に細胞培養に使用される成分、例えば、アミノ酸類、ビタミン類、緩衝材、無機塩類、炭素源、血清及び血清代替物等

を適宜採用しうる。

[0093] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地に溶解して使用する場合、ＦＧＦＲリン酸化の観点から、溶解濃度は０．００１～１００ｎｍｏｌ／Ｌであることが好ましく、０．０１～１０ｎｍｏｌ／Ｌがより好ましく、０．１～３ｎｍｏｌ／Ｌがさらに好ましく、０．３～３ｎｍｏｌ／Ｌが特に好ましい。

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

培地は血清を含んでもよいが、細胞治療品や培養肉等の細胞製品の製造に用いる場合、安全性の観点から無血清培地であることが好ましい。無血清培地は血清を含まないが、血清由来の精製された成分を含んでもよいし、血清由来成分の組換えタンパク質を含んでもよい。無血清培地は血清代替物を含有してもよく、例えば、血清アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、２－メルカプトエタノール又は３’チオールグリセロール、あるいはこれらの均等物などを適宜含有するものを挙げることができる。かかる血清代替物は、例えば、ＷＯ９８／３０６７９に記載の方法により調製することができる。本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩も血清代替物として挙げられる。血清代替物としては市販品を利用してもよい。かかる市販の血清代替物としては、例えば、ＫｎｏｃｋｏｕｔＴＭＳｅｒｕｍＲｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）、Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ－ｄｅｆｉｎｅｄＬｉｐｉｄｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅｄ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）、ＧｌｕｔａｍａｘＴＭ（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）、Ｂ２７（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）、Ｎ２（ＬｉｆｅＴ

ｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0094] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地添加剤として使用する場合、環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地に添加する際に用いることができる。本発明の培地添加剤は、細胞増殖促進作用及び／又は細胞制御等の所望の効果を損なわない限り、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩に加えて、さらに、任意の添加剤、例えば、安定化剤、等張化剤、ｐＨ調整剤等を適当量含有していてもよい。

[0095] 本発明の培地添加剤は、所望の効果が得られる限り、いかなる剤形であってもよく、例えば、溶液、固形、粉末状等が挙げられる。輸送コスト削減の観点からは、固形又は粉末状が好ましい。固形又は粉末状である場合は、適切な緩衝液や溶媒等を使用して所望の濃度になるように溶解し、使用してもよいし、固形又は粉末状のまま、使用してもよい。培地添加剤が溶液である場合、該溶液はメンブレンフィルター等を用いた濾過滅菌などの滅菌処理を行うことが好ましい。

[0096] 本発明の培地添加剤を培地に添加する回数及びタイミングは特に限定されず、細胞培養前に行ってもよく、細胞培養中に行ってもよく、細胞培養後に行ってもよいが、増殖促進及び／又は分化状態制御の観点から、細胞培養前及び／又は細胞培養中が好ましい。

[0097] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物又は培地添加剤として使用する場合、培地組成物又は培地添加剤は細胞治療品又は培養肉の製造のために用いることができる。細胞治療品又は培養肉の製造方法は、例えば環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地を使用して、細胞を培養する工程を含むことができる。

[0098] 培養肉は、細胞培養を介して製造される食肉のことをいう。家畜を飼育する従来の方法の代わりに、細胞工学を使用して培養組織から動物の肉を生産する、革新的な技術である。生産工程には、筋肉組織や脂肪に成長するよう

に作られた動物細胞の培養が含まれる。この技術により、従来の肉や魚をベースにした食品と物質的、栄養的に同等のタンパク質が豊富な食品が得られる。家畜の飼育は、明らかな動物福祉上の懸念に加えて、飼料作物の栽培のための水と土地の利用が増え続けており、非常に資源を必要とする。また、温室効果ガスの排出、森林破壊、汚染と抗生物質耐性、食肉生産の生態学的影響に対する意識の高まりと動物福祉への関心の高まりにより、従来の肉の消費を「実験室培養肉」に置き換えるために、「カルチャードミート」「クリーンミート」又は「培養肉」が提案されている。

[0099] 一般に食肉とは、筋線維、結合組織、及び脂肪の集合体をいう。培養肉は食肉の構造を模倣することが好ましいが、いわゆる食肉の構成を全て含まなくてもよく、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞から群から選ばれる培養細胞を含むものであればよい。複数種の細胞の培養物を含むことがより好ましい。

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

[0100] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を培地組成物又は培地添加剤として使用する場合、細胞の培養は、環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地に、細胞を播種することで行うことができる。培養は、本技術分野において周知の条件、例えば３７℃ＣＯ$_2$インキュベータ内で培養される。培養は平板培養であってもよいし、浮遊培養であってもよい。増殖した細胞は、トリプシン処理などにより細胞を培養物として回収することができ、回収後さらに継代培養を行ってもよい。細胞の培養は、剥離可能な構築物に細胞を播種して培養することもできる。増殖した細胞が付着された構築物を培養物として回収することができる。か

かる構築物は、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチンなどの細胞外マトリクスで構築することができ、細胞が付着した構築物を集積して培養肉を成型してもよい。

[0101] 集積工程は、回収された１又は複数種の細胞の培養物を成型することを含む。集積工程で成型された培養物は、ステーキなどのように１枚肉であってもよいし、枝肉であってもよいし、ミンチ状であってもよい。集積工程は、細胞の培養物を、他の細胞、血液及び組織からなる群から選ばれる少なくとも１の物質と合わせて集積することを含む。他の細胞としては、培養細胞であってもよいし、動物から採取された細胞であってもよい。より具体的には、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地で培養された他の細胞と合わせて成型することができる。一例として、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地で培養された筋組織由来細胞を、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地で培養された脂肪組織由来細胞及び/又は線維芽細胞と集積することができる。集積後にさらに共培養を行うこともできる。一例として、回収された１又は複数種の細胞の培養物を混合し、細胞外マトリクスに播種して共培養することができる。細胞外マトリクスとしては、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチンなどが使用しうる。この際の培地についても、本発明の環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地を用いることができる。

[0102] 集積工程は、回収された１又は複数種の細胞の培養物を、血液及び/又は組織と集積してもよい。組織としては、動物から取得されたものであっても、培養されたものであってもよい。一例として、食肉の処理過程で分離された血液、脂肪組織や筋組織などを培養物と集積して培養肉を製造してもよい。

[0103] 分化誘導工程は、細胞培養後に行われてもよいし、集積工程の前、集積工程中、集積工程後に行われてもよい。分化誘導工程により、単核の筋衛星細胞及び筋芽細胞を多核の筋管細胞へと分化させ、さらに筋線維として成熟さ

せることができる。分化誘導は、本技術分野に既知の方法により行われてよいが、一例として高い二酸化炭素濃度下で培養する手法が知られており、一例として５～１０％（ｖ／ｖ）のCO_2雰囲気下で培養することにより、筋管細胞への分化を促進することができる。

[0104] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を含む培地は、任意の動物細胞を培養することができる。培養肉を製造する観点からは、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリ、ダチョウ、カモなどの家畜由来の細胞を使用しうる。特にウシの細胞を置く場合、ホルスタイン種、ジャージー種、黒毛和種、褐毛和種、短角種、無角和種、それらの交配種のうちの任意の種の細胞であってもよいが、特に食肉製造の観点から肉用種である黒毛和種、褐毛和種、短角種、無角和種の細胞が好ましい。

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

[0105] 線維芽細胞は、結合組織を構成する細胞であり、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリクスを生成する。 筋肉に存在する線維芽細胞を特に筋線維芽細胞と呼ぶ。筋線維芽細胞は、骨格筋において筋線維の束を取り囲む結合組織を形成する。筋線維芽細胞は、α－ＳＭＡを発現し、細胞外マトリクスを産生するとともに、脂肪を蓄積することができ、歯ごたえ及び食味に寄与する。

[0106] 脂肪組織由来細胞とは、脂肪組織を構成する細胞であり、脂肪組織から分

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

[0107] 筋組織由来細胞とは、筋組織を構成する細胞であり、筋組織から分離されて培養された細胞である。筋組織由来細胞としては、筋芽細胞、筋衛星細胞、筋管細胞が挙げられるが、筋管細胞は増殖性を有さないため、増殖させる観点からは、筋芽細胞及び/又は筋衛星細胞が好ましい。筋衛星細胞は、筋肉中に含まれる体性幹細胞であり、増殖し、筋芽細胞に分化することができる。筋芽細胞とは、筋線維の由来となる細胞であり、増殖性を有する単核の細胞である。筋芽細胞が分化すると、筋芽細胞同士が融合し、多核の筋管細胞を形成し、さらに成熟して筋線維となる。筋線維は、筋肉を構成するタンパク質であるアクチン線維及びミオシン線維から構成される筋原線維を構成単位としており、ミオシンのアイソフォームにより、赤色筋線維（Ｉ型、ＩＩＡ型）と白色筋線維（ＩＩＢ）に分類され、食肉の食味の違いに寄与する。

[0108] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を精製用材料として使用する場合、環状ペプチドを固相担体に結合させて使用してもよく、結合させずに使用してもよい。結合させずに使用する方法としては、環状ペプチドに分離用の構造（例えば、ビオチンタグ、抗体エピトープ、静電分離のための極性残基）を付与する方法、又は、環状ペプチドに毒素を付与し目的外の細胞を死滅させる方法が存在する。

[0109] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を標識用材料として使用する場合、標識基として蛍光色素、放射性同位体、核偏極分子、アフィニティータグ（例えば、ビオチン、ＦＬＡＧタグ）、又は酵素類（例

えば、ルシフェラーゼ）を使用してもよい。

[0110] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を細胞制御用材料として使用する場合、環状ペプチドを固相担体（例えば、フラスコ、プレート）に結合させて使用してもよく、結合させずに使用してもよい。細胞制御の例としては、ＦＧＦＲリン酸化促進、ＦＧＦＲリン酸阻害、細胞増殖促進、細胞増殖阻害、細胞分化促進、及び細胞分化抑制が挙げられる。また環状ペプチドと他の細胞刺激剤とを連結することにより、ＦＧＦＲを有する細胞選択的に連結した細胞刺激剤の効果を発現することが可能である。

[0111] 環状ペプチド又はその塩又は環状ペプチド複合体又はその塩を、特定の分子をＦＧＦＲ近傍に集積させるための材料として使用する場合、集積させたい分子と環状ペプチドを連結する必要がある。連結は１分子対１分子でも、１分子対多分子でもよく、連結は可逆的な結合でも不可逆的な結合でもよい。

実施例

[0112] 以下に具体例を挙げて、本開示に係る環状ペプチド等をより具体的に説明する。以下の具体例に示す材料、処理手順等は、本開示の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。本開示に係る環状ペプチド等の範囲は、以下に示す具体例によって限定的に解釈されるべきではない。以下の説明において、合成、処理、製造などは、特に断りのない限り、室温（２５℃±３℃）で行った。物質濃度に係る百分率は質量基準である。

[0113] ＜実施例１：ｍＲＮＡディスプレイ法を用いたＦＧＦＲ結合候補環状ペプチド取得＞

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

ｍＲＮＡディスプレイ法のライブラリとして配列番号１の配列を用いた。このライブラリは、５’末端から８６～８８番目の開始コドン（ＡＴＧ）より翻訳が始まり、１０７番目以降の塩基群（ＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{6\sim18}$ＴＡＧＮＮＮ（ＮＮＮはトリマーオリゴヌクレオチド、ここで、Ｎはそれぞれ

独立にＡ、Ｔ、Ｇ又はＣを表す））がランダム配列、ランダム配列の３’末端側に位置する塩基群がピューロマイシンリンカーの結合部及び終止コドンである。５’末端から８５番目以前の塩基群は、Ｔ７プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列等の転写及び翻訳開始に必要な配列である。本ランダム配列中のトリプレットＴＡＧはクロロアセチル化リジンのコドンに当てているため、本ランダム配列がコードするペプチドはシステインのチオール基とクロロアセチル化リジンのクロロアセチル基とが自発的にチオエーテル結合を形成し、環状ペプチドとなる。配列番号１の配列を有する核酸において、ＮＮＮで表されるトリマーオリゴヌクレオチドは、１種類のアミノ酸に対して１種類のコドンを割り当てた、表３に示す１８種類のコドンに対応するトリマーオリゴヌクレオチドの等量混合物である。$(NNN)_{6\sim18}$部に関しては、繰り返し数が６～１８で異なるライブラリを１３種、個別に調製し、それぞれでｍＲＮＡディスプレイを実施した。

[0114] [表3]

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

[0115] 配列番号１：ＧＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＣＣＡＣＡＡＣＧＧＴＴＴＣＣＣＴＣＴＡＧＡＡＡＴＡＡＴＴＴＴＧＴＴＴＡＡＣＴＴＴＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＧＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＮＴＧＴ$(NNN)_{6\sim18}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＴＧＧＣＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣＡＧＧＡＣＧＧＧＧＧＧＣＧＧＣＧＧＧＧＧＧＴＡＡＡＴＡＡＡＴＡＡＧＣＴＴＧＡＧＴＡＴ

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

[0116] 配列番号１のライブラリは、オーバーラップエクステンションＰＣＲを行うことで作製した。具体的には、配列番号２のＤＮＡ、配列番号３のＤＮＡ、及び配列番号４～１６のいずれかのＤＮＡ、の３種のＤＮＡを、それぞれ３μｍｏｌ／Ｌ、１μｍｏｌ／Ｌ、１μｍｏｌ／Ｌとなるように混合し、Ｐｌａｔｉｎｕｍｔｍ ＳｕｐｅｒＦｉ ＩＩ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ、１２３６１０１０）存在下、９８℃／３０秒の後、９８℃／１０秒、６０℃／１０秒、７２℃／１０秒の３ステップを７サイクル繰り返し、最後に７２℃／５分の処理を行うことで、３つのＤＮＡを連結し、目的のライブラリを作製した。作製したライブラリを精製し、１０ｎｇ／μＬに希釈した。配列番号４～１７のＤＮＡにおいて、ＮＮＮで表されるトリマーオリゴヌクレオチドは、１種類のアミノ酸に対して１種類のコドンを割り当てた、表１に示す１８種類のコドンに対応するトリマーオリゴヌクレオチドの等量混合物である。

[0117] 配列番号２：ＧＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＣＣＡＣＡＡＣＧＧＴＴＴＣＣＣＴＣＴＡＧＡＡＡＴＡＡＴＴＴＴＧＴＴＴＡＡＣＴＴＴＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣ

配列番号３：ＡＴＡＣＴＣＡＡＧＣＴＴＡＴＴＴＡＴＴＴＡＴＴＡＣＣＣＣＣＣＧＣＣＧＣＣＣＣＣＣＧＴＣＣＴＧＣＴＡＣＣＧＣＣＡＧＡＡＣＣＡＣＣ

配列番号４：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_6$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号５：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_7$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号６：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡ
ＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{8}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴＴ
ＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号７：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡ
ＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{9}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴＴ
ＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号８：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡ
ＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{10}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴ
ＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号９：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡ
ＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{11}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴ
ＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１０：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡ
ＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{12}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧ
ＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１１：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡ
ＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{13}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧ
ＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１２：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡ
ＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{14}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧ
ＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１３：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡ
ＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{15}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧ
ＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１４：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡ
ＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{16}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧ
ＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１５：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡ

ＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{17}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

配列番号１６：ＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡＮＮＮＴＧＴ（ＮＮＮ）$_{18}$ＴＡＧＮＮＮＧＧＣＧＧＴＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＣ

[0118] ＦＧＦＲとしてＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＦＧＦＲ１ ａｌｐｈａ （ＩＩＩｃ） Ｆｃ Ｃｈｉｍｅｒａ Ｐｒｏｔｅｉｎ，ＣＦ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、６５８－ＦＲ－０５０）を用い、磁性ビーズ（ＮＨＳ Ｍａｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、Ｃｙｔｉｖａ、２８９５１３８０）にメーカー（Ｃｙｔｉｖａ）指定プロトコルにて固相化（固相化時ＦＧＦＲ濃度：１μｇ／μＬ）した。また磁性ビーズに結合する環状ペプチドを除くために、ＩｇＧ１ Ｆｃ， Ｈｕｍａｎ， ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ（富士フイルム和光純薬、０９８－０７１４１）を上記同様に、磁性ビーズに固相化した。

[0119] ライブラリと磁性ビーズ固相化ＦＧＦＲとを接触させてインキュベートする工程を計８ラウンド繰り返した後、シーケンサーを用いてＦＧＦＲに結合するペプチドの配列を同定した。

各ラウンドの具体的手順は下記の通りである。

[0120] まず、作製したライブラリ（配列番号１）をＴ７ ＲＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴａＫａＲａ、２５４０Ａ）存在下、３７℃で３０分間反応させることでライブラリ転写物を作製した。このＤＮＡ断片を精製し、１０μｍｏｌ／Ｌに希釈した。

次にＴＢＳバッファー（１．２５ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ、２５ｍｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ、ｐＨ７．５）中で、ライブラリ転写物（終濃度５μｍｏｌ／Ｌ）、配列番号１７のピューロマイシンリンカー（終濃度１０μｍｏｌ／Ｌ）を混合した後、９５℃で５分間加熱し、その後、ＵＶ（３６５ｎｍ）を氷上にて照射することで、ライブラリ転写物とピューロマイシンリンカーの複合体を作製した。

配列番号１７：（ＰｓｏｒａｌｅｎＣ６）－ＵＡＣＣＣＣＣＣＧＣＣＧＣＣＣＣＣＧＵＣＣＵ－（Ｓｐ１８）－（Ｓｐ１８）－（Ｓｐ１８）－（Ｓｐ１８）－ＣＣ－（Ｐｕｒｏ）

（ＰｓｏｒａｌｅｎＣ６、Ｓｐ１８、Ｐｕｒｏの構造は図１参照。下線表記のヌクレオチドはＲＮＡの２’ＯＨが２’ＯＭｅ体となったものであり、下線が付されていないヌクレオチドは未修飾のＤＮＡを表す。）

[0121] 非天然アミノ酸であるクロロアセチル化リジンを翻訳するために、アンチコドンがＣＵＡであり、ｍＲＮＡのＵＡＧコドンに対合するｔＲＮＡを配列番号１８のＤＮＡを転写することで用意した。このｔＲＮＡをＮ－クロロアセチル化リジンｐｄＣｐＡ（ｐｈｏｓｐｈｏ ２‘ｄｅｏｘｙｒｉｂｏｃｙｔｉｄｙｌｙｌｒｉｂｏａｄｅｎｏｓｉｎｅ）エステル体でアミノアシル化した。このアミノアシルｔＲＮＡを、アミノアシルｔＲＮＡ（１）という。

配列番号１８：ＧＴＴＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴＧＣＣＡＡＧＣＴＴＧＧＧＣＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＧＴＡＧＴＴＣＡＡＴＧＧＴＡＧＡＡＣＧＴＣＧＧＴＣＴＣＴＡＡＡＡＣＣＧＡＧＣＧＴＴＧＡＧＧＧＴＴＣＧＡＴＴＣＣＴＴＴＣＴＣＴＣＣＣＡＣ

[0122] ライブラリ転写物とピューロマイシンリンカーの複合体を、ＰＵＲＥｆｒｅｘ２．０（ジーンフロンティア、ＰＦ２０１－０．２５－５）及びアミノアシルｔＲＮＡを含む翻訳液中にて翻訳した。複合体５．２５μＬ、ＰＵＲＥｆｒｅｘ２．０ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ⅰ ７．５μＬ、Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ⅱ ０．７５μＬ、Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ⅲ １．５μＬ、アミノアシルｔＲＮＡ（１）の乾燥体（終濃度０．５μｇ／μＬ）を混合し、３７℃で６０分間反応させることでｍＲＮＡ－環状ペプチド連結体を作製した。

[0123] 翻訳産物１５μＬと配列番号１９のＤＮＡ（終濃度１０μｍｏｌ／Ｌ）とをＲｅｖｅｒＴｒａ Ａｃｅ（ＴＯＹＯＢＯ、ＴＲＴ－１０１）存在下で混合し（反応体積３７．５μＬ）、３７℃で３０分間反応させることで逆転写を行い、ｃＤＮＡ－ｍＲＮＡ－環状ペプチド連結体を作製した。

配列番号１９：ＧＣＴＡＣＣＧＣＣＡＧＡＡＣＣＡＣＣ

[0124] 次いで逆転写産物２２．５μＬを磁性ビーズ固相化ＩｇＧ１　Ｆｃ１０μＬと、ＴＢＳバッファー（２０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、０．１％　ＢＳＡ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．４）中で混合し（反応体積１００μＬ）、室温で４５分間反応後、上清を回収することで、磁性ビーズに結合するｃＤＮＡ－ｍＲＮＡ－環状ペプチド連結体を除去した。

[0125] 次いで上清を、磁性ビーズ固相化ＦＧＦＲ１０μＬと混合し（反応体積５０μＬ）、室温で４５分間反応後、磁性ビーズをＴＢＳバッファー１００μＬで３度洗浄することで、ＦＧＦＲに結合するｃＤＮＡ－ｍＲＮＡ－環状ペプチド連結体を抽出した。抽出したｃＤＮＡ－ｍＲＮＡ－環状ペプチド連結体を下記２段階のＰＣＲにて増幅した。

[0126] １段階目のＰＣＲでは、ｃＤＮＡ－ｍＲＮＡ－環状ペプチド連結体２５μＬを、配列番号２０のＤＮＡ（終濃度０．５μｍｏｌ／Ｌ）、及び配列番号２１のＤＮＡ（終濃度０．５μｍｏｌ／Ｌ）と混合し（反応体積５０μＬ）、Ｐｌａｔｉｎｕｍｔｍ　ＳｕｐｅｒＦｉ　ＩＩ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ、１２３６１０１０）存在下、９８℃／３０秒の後、９８℃／１０秒、６０℃／１０秒、７２℃／１０秒の３ステップを６～１５サイクル繰り返し、最後に７２℃／５分の処理を行うことで、増幅産物を得た。増幅産物を精製し、２０ｎｍｏｌ／Ｌに希釈した。

配列番号２０：ＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴＡＴＧＧＴＴＡＡＧＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣ

配列番号２１：ＣＴＧＣＴＡＣＣＧＣＣＡＧＡＡＣＣＡＣＣ

[0127] ２段階目のＰＣＲでは、１段階目ＰＣＲ増幅産物（終濃度１０ｎｍｏｌ／Ｌ）を、配列番号２のＤＮＡ（終濃度０．５μｍｏｌ／Ｌ）、及び配列番号３のＤＮＡ（終濃度０．５μｍｏｌ／Ｌ）と混合し、Ｐｌａｔｉｎｕｍｔｍ　ＳｕｐｅｒＦｉ　ＩＩ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｔｈｅｒｍｏ、１２３６１０１０）存在下、９８℃／３０秒の後、９８℃／１０秒、６０℃／１０秒、７２℃／１０秒の３ステップを６サイクル繰り返し、最後に７２

℃／５分の処理を行うことで、元のライブラリとランダム配列を除き同じ配列のＤＮＡを得た。作製したライブラリを精製し、２ｎｇ／μＬに希釈して、次ラウンドに用いた。

[0128] ８ラウンド目の１段階目ＰＣＲ産物の塩基配列を、ＭｉＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ社製）とＭｉｓｅｑ Ｒｅａｇｅｎｔ ｋｉｔ ｖ２（３００ ｃｙｃｌｅ）（ｉｌｌｕｍｉｎａ、ＭＳ－１０２－２０２２）を用い、Ｉｌｌｕｍｉｎａ社標準プロトコルにて同定した。同定した環状ペプチド群を分析したところ、下記のアミノ酸配列を含む環状ペプチドが多数見出された。

Ｘ１－Ｘｎ－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ４

Ｘ１：アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基

Ｘｎ：１～７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基

Ｘ２：アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基

Ｘ３：任意のアミノ酸残基

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

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

[0129] ＜実施例２：環状ペプチド（酵素合成品）の結合性評価＞

環状ペプチドのＦＧＦＲ結合性を、ＥＬＩＳＡ法を用いて評価した。

評価に用いる環状ペプチドは、以下の方法で酵素合成した。

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

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

配列番号２２：ＶＫＫＴＫＴ

配列番号２３：ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ

配列番号２４：ＶＳＧＷＲＬＦＫＫＩＳ

配列番号２５：ＭＶＫＫＴＫＴ［ＨＣＳＹＥＲＬＱＦＨＧＨＥＡＰＦＲＶＸＶ］ＧＳＧＳＧＳＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＧＧＳＶＳＧＷＲＬＦＫＫＩＳ

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

配列番号２６：ＧＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＣＣＡＣＡＡＣＧＧＴＴＴＣＣＣＴＣＴＡＧＡＡＡＴＡＡＴＴＴＴＧＴＴＴＡＡＣＴＴＴＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＣＡＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣＡ［ＣＡＴＴＧＣＴＣＴＴＡＣＧＡＡＣＧＴＣＴＧＣＡＧＴＴＣＣＡＴＧＧＴＣＡＴＧＡＡＧＣＴＣＣＧＴＴＣＣＧＴＧＴＴＴＡＧＧＴＴ］ＧＧＴＴＣＴＧＧＣＡＧＴＧＧＴＴＣＣＧＡＡＣＡＧＡＡＡＣＴＧＡＴＣＡＧＣＧＡＡＧＡＡＧＡＴＣＴＧＧＧＴＧＧＣＴＣＴＧＴＡＡＧＴＧＧＡＴＧＧＣＧＡＴＴＡＴＴＣＡＡＧＡＡＧＡＴＴＡＧＣＴＡＡＴＧＡＡＴＡＡＣＴＡＡＴＣＣ

（［　］内は評価したい環状ペプチドをコードするＤＮＡ配列であり、［　］内は環状ペプチドごとに異なる。）

[0130]　鋳型ＤＮＡは、２段階のオーバーラップエクステンションＰＣＲにより作製した。

１段階目のＰＣＲは、配列番号２７のＤＮＡ、配列番号２８のＤＮＡ、配列番号２９のＤＮＡ、及び配列番号３０のＤＮＡ、の４種のＤＮＡを、それぞれ０．３μｍｏｌ／Ｌ、０．３μｍｏｌ／Ｌ、０．０５μｍｏｌ／Ｌ、０．０５μｍｏｌ／Ｌとなるように混合し、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ（ＴａＫａＲａ、Ｒ０４５Ｂ）存在下、９８℃／１０秒、３９℃／５秒、７２℃／５秒、の後、９８℃／１０秒、５８℃／５秒、７２℃／５秒の３ステップを２７サイクル繰り返すことで、配列番号２９のＤＮＡと配列番号３０のＤＮＡを連結した。連結したＤＮＡを精製し、５０ｎｇ／μＬに希釈した。

配列番号２７：ＧＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧ

配列番号２８：ＧＡＡＣＣＡＣＴＧＣＣＡＧＡＡＣＣ

配列番号２９：ＧＡＡＡＴＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＣＣＡＣＡＡＣＧＧＴＴＴＣＣＣＴＣＴＡＧＡＡＡＴＡＡＴＴＴＴＧＴＴＴＡＡＣＴＴＴＡＡＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＣＡＡＴＧＧＴＴＡＡＡＡＡＡＡＣＡＡＡＡＡＣ

配列番号３０：ＧＡＡＣＣＡＣＴＧＣＣＡＧＡＡＣＣ［ＡＡＣＣＴＡＡＡＣＡＣＧＧＡＡＣＧＧＡＧＣＴＴＣＡＴＧＡＣＣＡＴＧＧＡＡＣＴＧＣＡＧＡＣＧＴＴＣＧＴＡＡＧＡＧＣＡＡＴＧ］ＴＧＴＴＴＴＴＧＴＴＴＴＴＴＴＡＡＣ

（［　］内は評価したい環状ペプチドをコードするＤＮＡ配列であり、［　］内は環状ペプチドごとに異なる。）

[0131] ２段階目のＰＣＲは、配列番号２７のＤＮＡ、配列番号３１のＤＮＡ、配列番号３２のＤＮＡ、及び１段階目の精製産物、の４種のＤＮＡを、それぞれ０．３μｍｏｌ／Ｌ、０．３μｍｏｌ／Ｌ、０．００２５μｍｏｌ／Ｌ、０．４ｎｇ／μＬとなるように混合し、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ（ＴａＫａＲａ、Ｒ０４５Ｂ）存在下、９８℃／１０秒、５８℃／５秒、７２℃／５秒の３ステップを３０サイクル繰り返すことで、配列番号３２のＤＮＡと１段階目の精製産物を連結し、鋳型ＤＮＡ（配列番号２６）を得た。鋳型ＤＮＡを精製し、５０ｎｇ／μＬに希釈した。

配列番号３１：ＧＧＡＴＴＡＧＴＴＡＴＴＣＡＴＴＡＧＣＴＡＡＴＣ

配列番号３２：ＧＧＴＴＣＴＧＧＣＡＧＴＧＧＴＴＣＣＧＡＡＣＡＧＡＡＡＣＴＧＡＴＣＡＧＣＧＡＡＧＡＡＧＡＴＣＴＧＧＧＴＧＧＣＴＣＴＧＴＡＡＧＴＧＧＡＴＧＧＣＧＡＴＴＡＴＴＣＡＡＧＡＡＧＡＴＴＡＧＣＴＡＡＴＧＡＡＴＡＡＣＴＡＡＴＣＣ

[0132] 環状ペプチドの無細胞酵素合成は、鋳型ＤＮＡ、ＰＵＲＥｆｒｅｘ２．０（ジーンフロンティア、ＰＦ２０１－０．２５－５）及びアミノアシルｔＲＮＡ（１）を含む翻訳液中にて実施した。５０ｎｇ／μＬに調製した鋳型ＤＮＡ１．７５μＬ（６２．５ｎｇ）、ＰＵＲＥｆｒｅｘ２．０ ＳｏｌｕｔｉｏｎⅠ ２．５μＬ、ＳｏｌｕｔｉｏｎⅡ ０．２５μＬ、ＳｏｌｕｔｉｏｎⅢ ０．５μＬ、アミノアシルｔＲＮＡ（１）の乾燥体（終濃度０．５μｇ／μＬ）を混合し、３７℃で１時間反応させた。

[0133] 酵素合成した環状ペプチドの濃度は、Ｃａｎ Ｇｅｔ Ｓｉｇｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ⅰ（ＴＯＹＯＢＯ、ＮＫＢ－１０１）にて希釈した環状ペプチドを、Ｎａｎｏ Ｇｌｏ ＨｉＢｉＴ Ｌｙｔｉｃ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｎ３０４０）と濃度既知の検量線用化学合成ペプチド（配列番号３３）を用い、Ｎａｎｏ Ｇｌｏ ＨｉＢｉＴ Ｌｙｔｉｃ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍの標準プロトコルに則り測定した。

配列番号３３：ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＧＧＳＶＳＧＷＲＬＦＫＫＩＳ

[0134] 酵素合成した環状ペプチドのＦＧＦＲ結合性を、ＦＧＦＲへの環状ペプチド結合量をＥＬＩＳＡ評価することで測定した。

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

ｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｉ（ＴＯＹＯＢＯ、ＮＫＢ－１０１）にて希釈した環状ペプチドを添加し、室温で３時間反応させた。０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳ（ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ）を用いて洗浄後、Ｃａｎ Ｇｅｔ Ｓｉｇｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ ＳｏｌｕｔｉｏｎＩＩ（ＴＯＹＯＢＯ、ＮＫＢ－１０１）にて希釈した抗Ｍｙｃ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１４０３８Ｓ）を添加し、室温で２時間反応させた。０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳを用いて洗浄後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ ＥＬＩＳＡ Ｆｅｍｔｏ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏ、３７０７５）を添加し、発光量を測定した。ＦＧＦＲを固定化したウェルの発光量と、ＦＧＦＲを固定化していないウェルの発光量の差分、及び反応時の環状ペプチド濃度から用量反応関係を算出し、下記の評価基準に従ってＦＧＦＲ結合性について評価した。評価基準Ａ、Ｂ又はＣであることが好ましい。

[0135]（ＦＧＦＲ結合性の評価基準）

配列番号３９の環状ペプチドが、反応濃度１０ｎｍｏｌ／Ｌにおいて発する発光シグナルの値を１として規格化した際の、上記環状ペプチドが反応濃度１０ｎｍｏｌ／Ｌで発する発光シグナル値が、

Ａ・・・０．７以上である。

Ｂ・・・０．５以上、０．７未満である。

Ｃ・・・０．１以上、０．５未満である。

Ｄ・・・０．１未満である。

[0136] 環状ペプチドの評価結果を表４に示す。

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

配列番号３４は国際公開ＷＯ２０００／００３２４５号公報（特許文献１

）で報告されている環状ペプチドであり、配列番号３６は配列番号３４をチオエーテル型の環化構造に変換した環状ペプチドである。

配列番号３５は特開２０２１－７０６５２号公報で報告されている環状ペプチドであり、配列番号３７は配列番号３５をチオエーテル型の環化構造に変換した環状ペプチドである。

配列番号３８以降が本発明の対象となる環状ペプチドである。

[0137]

[表4]

配列番号	配列	FGFR 結合性 評価結果
34	(C)-RALLRGAPFHLAE-(C)	D
35	(C)-DRTLLYYRLS-(C)	D
36	(C)-RALLRGAPFHLAE-(K(acetyl))	D
37	(C)-DRTLLYYRLS-(K(acetyl))	D
38	W-(C)-QLVWQGHKAPYLTL-(K(acetyl))-L	B
39	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
40	Q-(C)-DVWYWLGHRVPFHPV-(K(acetyl))-V	B
41	T-(C)-FVQLWFVDKPAPFLV-(K(acetyl))-T	B
42	R-(C)-WDQLTFYGHQAPFYV-(K(acetyl))-G	A
43	S-(C)-WQQLVWFQFEAPFLV-(K(acetyl))-V	C
44	F-(C)-PHIFLGHNAPFLVQ-(K(acetyl))-V	A
45	Y-(C)-FQKLEFFGHLAPFLF-(K(acetyl))-S	B
46	A-(C)-WVQYLWHGHAAPFLI-(K(acetyl))-S	C
47	S-(C)-WTQLQWQAHLAPFWT-(K(acetyl))-V	C
48	H-(C)-KVQQLWLQGHYAPYWV-(K(acetyl))-S	C
49	H-(C)-EWTQLIYYGFSAPYIV-(K(acetyl))-R	C
50	W-(C)-RLKLLGHDAPFI-(K(acetyl))-W	B
51	K-(C)-WQQLSFVGHIAPFVY-(K(acetyl))-Y	B
52	S-(C)-YERVVLFGWQAPYWA-(K(acetyl))-P	B
53	S-(C)-WYQPEWLGHHLPYLV-(K(acetyl))-W	C
54	H-(C)-YERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
55	H-(C)-ASYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
56	A-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
57	H-(C)-AYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
58	H-(C)-SYARLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
59	H-(C)-SYEALQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
60	H-(C)-SYERLAFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
61	H-(C)-SYERLQFAGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
62	H-(C)-SYERLQFHGHAAPFRV-(K(acetyl))-V	A
63	H-(C)-SYERLQFHGHEAAFRV-(K(acetyl))-V	C
64	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFAV-(K(acetyl))-V	B
65	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRA-(K(acetyl))-V	A
66	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-A	A
67	G-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
68	P-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
69	L-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
70	I-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
71	V-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A

72	F-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
73	Y-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
74	W-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
75	N-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
76	Q-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
77	S-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
78	T-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
79	D-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
80	E-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
81	R-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
82	H-(C)-GYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
83	H-(C)-PYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
84	H-(C)-LYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
85	H-(C)-IYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
86	H-(C)-VYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
87	H-(C)-FYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
88	H-(C)-YYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
89	H-(C)-WYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
90	H-(C)-NYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
91	H-(C)-QYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
92	H-(C)-TYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
93	H-(C)-DYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
94	H-(C)-EYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
95	H-(C)-RYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
96	H-(C)-HYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
97	H-(C)-SLERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
98	H-(C)-SIERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
99	H-(C)-SVERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
100	H-(C)-SFERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
101	H-(C)-SWERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
102	H-(C)-SSERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
103	H-(C)-STERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
104	H-(C)-SHERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
105	H-(C)-SYERLQFHFHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
106	H-(C)-SYERLQFHWHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
107	H-(C)-SYERLQFHNHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
108	H-(C)-SYERLQFHQHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
109	H-(C)-SYERLQFHSHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
110	H-(C)-SYERLQFHGFEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
111	H-(C)-SYERLQFHGYEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
112	H-(C)-SYERLQFHGWEAPFRV-(K(acetyl))-V	B

113	H-(C)-SYERLQFHGHEGPFRV-(K(acetyl))-V	C
114	H-(C)-SYERLQFHGHEVPFRV-(K(acetyl))-V	C
115	H-(C)-SYERLQFHGHEANFRV-(K(acetyl))-V	B
116	H-(C)-SYERLQFHGHEAQFRV-(K(acetyl))-V	C
117	H-(C)-SYERLQFHGHEADFRV-(K(acetyl))-V	B
118	H-(C)-SYERLQFHGHEAHFRV-(K(acetyl))-V	C
119	H-(C)-SYERLQFHGHEAPYRV-(K(acetyl))-V	C
120	H-(C)-SYGRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
121	H-(C)-SYPRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
122	H-(C)-SYLRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
123	H-(C)-SYIRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
124	H-(C)-SYVRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
125	H-(C)-SYFRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
126	H-(C)-SYYRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
127	H-(C)-SYWRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
128	H-(C)-SYNRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
129	H-(C)-SYQRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
130	H-(C)-SYSRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
131	H-(C)-SYTRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
132	H-(C)-SYDRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
133	H-(C)-SYRRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
134	H-(C)-SYHRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
135	H-(C)-SYEPLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
136	H-(C)-SYELLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
137	H-(C)-SYEILQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
138	H-(C)-SYEVLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
139	H-(C)-SYEQLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
140	H-(C)-SYETLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
141	H-(C)-SYEHLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
142	H-(C)-SYERFQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
143	H-(C)-SYERYQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
144	H-(C)-SYERHQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
145	H-(C)-SYERLGFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
146	H-(C)-SYERLLFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
147	H-(C)-SYERLIFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
148	H-(C)-SYERLVFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
149	H-(C)-SYERLFFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
150	H-(C)-SYERLYFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
151	H-(C)-SYERLWFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
152	H-(C)-SYERLNFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
153	H-(C)-SYERLSFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A

154	H-(C)-SYERLTFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
155	H-(C)-SYERLEFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
156	H-(C)-SYERLRFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
157	H-(C)-SYERLHFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
158	H-(C)-SYERLQLHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
159	H-(C)-SYERLQIHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
160	H-(C)-SYERLQVHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
161	H-(C)-SYERLQYHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
162	H-(C)-SYERLQWHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
163	H-(C)-SYERLQFGGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
164	H-(C)-SYERLQFLGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
165	H-(C)-SYERLQFIGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
166	H-(C)-SYERLQFVGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
167	H-(C)-SYERLQFFGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
168	H-(C)-SYERLQFYGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
169	H-(C)-SYERLQFWGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
170	H-(C)-SYERLQFNGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
171	H-(C)-SYERLQFQGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
172	H-(C)-SYERLQFSGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
173	H-(C)-SYERLQFTGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
174	H-(C)-SYERLQFEGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
175	H-(C)-SYERLQFRGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
176	H-(C)-SYERLQFHGHGAPFRV-(K(acetyl))-V	C
177	H-(C)-SYERLQFHGHPAPFRV-(K(acetyl))-V	A
178	H-(C)-SYERLQFHGHLAPFRV-(K(acetyl))-V	A
179	H-(C)-SYERLQFHGHIAPFRV-(K(acetyl))-V	A
180	H-(C)-SYERLQFHGHVAPFRV-(K(acetyl))-V	A
181	H-(C)-SYERLQFHGHFAPFRV-(K(acetyl))-V	A
182	H-(C)-SYERLQFHGHYAPFRV-(K(acetyl))-V	A
183	H-(C)-SYERLQFHGHWAPFRV-(K(acetyl))-V	A
184	H-(C)-SYERLQFHGHNAPFRV-(K(acetyl))-V	A
185	H-(C)-SYERLQFHGHQAPFRV-(K(acetyl))-V	A
186	H-(C)-SYERLQFHGHSAPFRV-(K(acetyl))-V	A
187	H-(C)-SYERLQFHGHTAPFRV-(K(acetyl))-V	A
188	H-(C)-SYERLQFHGHDAPFRV-(K(acetyl))-V	A
189	H-(C)-SYERLQFHGHRAPFRV-(K(acetyl))-V	A
190	H-(C)-SYERLQFHGHHAPFRV-(K(acetyl))-V	A
191	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFLV-(K(acetyl))-V	A
192	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFIV-(K(acetyl))-V	A
193	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFVV-(K(acetyl))-V	A
194	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFFV-(K(acetyl))-V	A

195	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFYV-(K(acetyl))-V	A
196	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V	A
197	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFNV-(K(acetyl))-V	A
198	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFQV-(K(acetyl))-V	B
199	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFSV-(K(acetyl))-V	B
200	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFTV-(K(acetyl))-V	A
201	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFHV-(K(acetyl))-V	A
202	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRL-(K(acetyl))-V	C
203	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRI-(K(acetyl))-V	A
204	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRF-(K(acetyl))-V	C
205	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRY-(K(acetyl))-V	B
206	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRN-(K(acetyl))-V	C
207	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRS-(K(acetyl))-V	C
208	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRT-(K(acetyl))-V	C
209	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRH-(K(acetyl))-V	B
210	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-G	B
211	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-L	A
212	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-I	A
213	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-Y	A
214	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-F	B
215	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-W	B
216	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-N	A
217	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-Q	A
218	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-S	A
219	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-T	A
220	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-D	C
221	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-E	A
222	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-R	A
223	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-H	A
224	H-(K(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(C)-V	B
225	H-(C)-TWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
226	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	B
227	Y-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	C
228	R-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	C
229	H-(K(acetyl))-VWERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	B
230	H-(K(acetyl))-QWERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	B
231	H-(K(acetyl))-TFERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	B
232	H-(K(acetyl))-TYERLIFLGHIAPFWV-(C)-R	B
233	H-(K(acetyl))-TWERLVFLGHIAPFWV-(C)-R	B
234	H-(K(acetyl))-TWERLRFLGHIAPFWV-(C)-R	A
235	H-(K(acetyl))-TWERLIFRGHIAPFWV-(C)-R	A

236	H-(K(acetyl))-TWERLIFQGHIAPFWV-(C)-R	A
237	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHLAPFWV-(C)-R	B
238	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHVAPFWV-(C)-R	B
239	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFLV-(C)-R	B
240	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFHV-(C)-R	A
241	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFWV-(C)-V	B
242	H-(K(acetyl))-TWERLIFLGHIAPFWV-(C)-S	A
243	L-(C)-RYVKLRVGLHIAPFLI-(K(acetyl))-S	C
244	N-(C)-WGWAYPIPFR-(K(acetyl))-V	C
245	W-(C)-QYVYLSHVAPFLVR-(K(acetyl))-E	C
246	P-(C)-TYRQVVVHGWYAPFIS-(K(acetyl))-V	C
247	A-(C)-KYVPHIFQQHQAPYLV-(K(acetyl))-S	B
248	Q-(C)-WKRVRVYGFFAPFVH-(K(acetyl))-I	B
249	R-(C)-WKVLKVLGHRAPFLIA-(K(acetyl))-Y	C
250	Q-(C)-LWAQLQLLTHLAPYIV-(K(acetyl))-I	C
251	D-(C)-IWRVTISGHLAPFWF-(K(acetyl))-Y	B
252	L-(C)-RVVLNGWIAPFWTI-(K(acetyl))-E	B
253	I-(C)-WTQLVLDGLYAPFLH-(K(acetyl))-S	C
254	W-(C)-QLRFQGHLAPFIIL-(K(acetyl))-H	C
255	R-(C)-WRQIRYGQLLAPFLV-(K(acetyl))-Q	C
256	N-(C)-WGYHYTIPFI-(K(acetyl))-F	B
257	V-(C)-PLTLQGWQAPFWVV-(K(acetyl))-E	C
258	E-(C)-YHKLIFLGWEAPFWH-(K(acetyl))-E	A
259	G-(C)-RPVVTHHPWAPFWVVT-(K(acetyl))-E	B
260	E-(C)-VLQRLFFEGHLAPFIL-(K(acetyl))-I	B
261	Q-(C)-QWNIYRHQWAPFWVIE-(K(acetyl))-S	C
262	F-(C)-YQRLYFQGHIAPYWFV-(K(acetyl))-D	B
263	I-(C)-RLSWFGFKAPFWIVDS-(K(acetyl))-Q	B
264	A-(C)-QWGRWALQGHQVPFLT-(K(acetyl))-I	A
265	F-(C)-QFETLKFFGWEAPYLV-(K(acetyl))-L	C
266	P-(C)-SWVQLQYQGFTAPFLV-(K(acetyl))-Y	C
267	A-(C)-RWAQLQFLSWGAPFLV-(K(acetyl))-T	C
268	V-(C)-RLSFWGHAAPFLSV-(K(acetyl))-T	C
269	V-(C)-YEQLVVWGHIAPFLT-(K(acetyl))-H	C
270	Q-(C)-YVQLYVWGHPAPFYWD-(K(acetyl))-T	C
271	Q-(C)-WSQVSTPWGHTAPFIF-(K(acetyl))-D	B
272	W-(C)-HIAPFLYHDGIQWGHL-(K(acetyl))-V	B
273	Q-(C)-YVQLYVWGHPAPFYWD-(K(acetyl))-N	C
274	Q-(C)-YVQLYFWGHPAPFYWD-(K(acetyl))-T	C
275	W-(C)-IRRLYSPWGHVAPFWV-(K(acetyl))-P	B
276	Q-(C)-YVQLYVWGHPAPFYWD-(K(acetyl))-S	C

277	Q-(C)-YVQLYVWGHPAPFYWD-(K(acetyl))-I	C
278	S-(C)-IVPLYIYGWRAPYWL-(K(acetyl))-V	C
279	Y-(C)-TIQRLWLLHEAPFWV-(K(acetyl))-T	C
280	P-(C)-WTRVVLLHHYAPFWA-(K(acetyl))-I	C
281	F-(C)-TIQQLILVNHRAPFWV-(K(acetyl))-T	B
282	T-(C)-QWEQLRIGPHLAPFRS-(K(acetyl))-R	C
283	K-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
284	H-(C)-KYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
285	H-(C)-SYKRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
286	H-(C)-SYEKLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
287	H-(C)-SYERLKFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
288	H-(C)-SYERLQFKGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
289	H-(C)-SYERLQFHKHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
290	H-(C)-SYERLQFHGHKAPFRV-(K(acetyl))-V	B
291	H-(C)-SYERLQFHGHEAKFRV-(K(acetyl))-V	C
292	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFKV-(K(acetyl))-V	B
293	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRK-(K(acetyl))-V	C
294	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-K	A
295	M-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
296	H-(C)-MYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
297	H-(C)-SMERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
298	H-(C)-SYMRLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
299	H-(C)-SYEMLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
300	H-(C)-SYERMQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
301	H-(C)-SYERLMFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
302	H-(C)-SYERLQMHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	B
303	H-(C)-SYERLQFMGHEAPFRV-(K(acetyl))-V	A
304	H-(C)-SYERLQFHMHEAPFRV-(K(acetyl))-V	C
305	H-(C)-SYERLQFHGHMAPFRV-(K(acetyl))-V	A
306	H-(C)-SYERLQFHGHEAMFRV-(K(acetyl))-V	C
307	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFMV-(K(acetyl))-V	A
308	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRM-(K(acetyl))-V	C
309	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-M	A
310	Y-(C)-TWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
311	R-(C)-TWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
312	H-(C)-VWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
313	H-(C)-QWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
314	H-(C)-TFERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
315	H-(C)-TYERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
316	H-(C)-TWERLVFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
317	H-(C)-TWERLRFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C

318	H-(C)-TWERLIFRGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
319	H-(C)-TWERLIFQGHIAPFWV-(K(acetyl))-R	C
320	H-(C)-TWERLIFLGHLAPFWV-(K(acetyl))-R	C
321	H-(C)-TWERLIFLGHVAPFWV-(K(acetyl))-R	C
322	H-(C)-TWERLIFLGHIAPFLV-(K(acetyl))-R	C
323	H-(C)-TWERLIFLGHIAPFHV-(K(acetyl))-R	A
324	H-(C)-TWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	B
325	H-(C)-TWERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-S	B
326	H-(C)-SYERLQFHGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
327	H-(C)-SYERLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V	A
328	H-(C)-SYERLIFHGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
329	H-(C)-SYERLRFHGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
330	H-(C)-SYERLVFHGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
331	H-(C)-SYERLIFHGHLAPFWV-(K(acetyl))-V	A
332	H-(C)-TYERLIFHGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
333	H-(C)-VYERLIFHGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
334	H-(C)-SYERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	B
335	H-(C)-SYERLIFRGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	A
336	H-(C)-TYERLIFLGHIAPFWV-(K(acetyl))-V	B
337	A-(C)-LPFLRIIIAGHWAPFLA-(K(acetyl))-Q	C
338	P-(C)-LAPYGWVILDWGLVSNW-(K(acetyl))-Y	C
339	Y-(C)-ITQHPWAPFWVVNPWDN-(K(acetyl))-L	C
340	H-(C)-LVKRLVSAWGELAPFWV-(K(acetyl))-V	C
341	A-(C)-LPFLRIIIAGHWAPFLA-(K(acetyl))-H	C
342	N-(C)-IPFWWQQHWWQYPVRVV-(K(acetyl))-T	C
343	Q-(C)-WQQAYAYFPHVLAPFLV-(K(acetyl))-S	C
344	R-(C)-QPFVQLVFRSLLAPFLV-(K(acetyl))-H	C
345	Q-(C)-YLPFWFYQKARLLFHYI-(K(acetyl))-S	C
346	A-(C)-WLRHIYQGHQAPFLIWST-(K(acetyl))-S	C
347	P-(C)-VQQISPHPWGAPFWVVTS-(K(acetyl))-F	B
348	P-(C)-TGWTPLYFFGKRAPFLVN-(K(acetyl))-A	C
349	H-(C)-LEQLVYGGDTAPFWIVVF-(K(acetyl))-D	C
350	L-(C)-SITRIQLFGYHAPFWHVV-(K(acetyl))-S	C
351	W-(C)-WQAPFNIVVNRKVSVLIV-(K(acetyl))-G	C
352	I-(C)-INRLSQGTHFAPFWLVEY-(K(acetyl))-N	B
353	P-(C)-VQQISPHPWGAPFWVVTS-(K(acetyl))-Y	B
354	A-(C)-WLRHIYQGHQAPFLIWYT-(K(acetyl))-S	C
355	R-(C)-YFSRQGFWPFTYKLPFWV-(K(acetyl))-H	C
356	A-(C)-WLRHIYQGHKAPFLIWST-(K(acetyl))-S	B
357	A-(C)-WLRHIYQGHQAPFLIWST-(K(acetyl))-Y	C
358	N-(C)-WVQWFLSGHVVPFLVSL-(K(acetyl))-S	C

359	W-(C)-PWGDIHVVPFH-(K(acetyl))-V	C
360	D-(C)-WGWHREFVPFI-(K(acetyl))-I	B
361	Q-(C)-PWSTTQQVPFI-(K(acetyl))-V	C
362	W-(C)-HYAPFWVLNEGQL-(K(acetyl))-V	C
363	T-(C)-SILKHPWGAPFLV-(K(acetyl))-T	C
364	W-(C)-QLRFQGHLAPFII-(K(acetyl))-S	C
365	N-(C)-WGYTYIIPFNYIS-(K(acetyl))-T	B
366	H-(C)-QFNIHPWGAPFLV-(K(acetyl))-E	C
367	W-(C)-RTWLWFEIPFWYQ-(K(acetyl))-E	C
368	E-(C)-KVHLHPWGAPFWI-(K(acetyl))-S	C
369	HASYER-(C)-IFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V	C
370	(C)-YERLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V	A
371	(C)-ERLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V	A
372	(C)-RLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V	C
373	(C)-ERLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))	A

[0138] ＜実施例３：環状ペプチド（化学合成品）の結合性評価＞

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

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

[0139] 化学合成した環状ペプチドのＦＧＦＲ結合性を以下の手順で評価した。

表面プラズモン共鳴装置であるＢｉａｃｏｒｅ－Ｔ２００（Ｃｙｔｉｖａ社製）にＣＭ５センサーチップ（Ｃｙｔｉｖａ、２９１４９６０３）をセットし、ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰバッファー（Ｃｙｔｉｖａ、ＢＲ１００８２６）を１０μＬ／ｍｉｎの流速で添加し、流路を平衡化した。次いで０．２ｍｏｌ／ＬのＥＤＣ（１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド）と０．０５ｍｏｌ／ＬのＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド）混合水溶液を７０μＬ添加し、センサーチップを活性化した。その後、Ａｃｅｔａｔｅ４．５バッファー（Ｃｙｔｉｖａ、ＢＲ１００３５０）で５０ｎｍｏｌ／Ｌに調製したＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＦＧＦＲ１ ａｌｐｈａ （ＩＩＩｃ） Ｆｃ Ｃｈｉｍｅｒａ Ｐｒｏｔｅｉｎ ＣＦ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、６５８－ＦＲ－０５０）を添加し、約５０００ＲＵ、固相化した。その後、エタノールアミン溶液

によってブロッキング処理を施した。また、同センサーチップの別流路にはＦＧＦＲを固定化せずに、活性化後にすぐブロッキング処理を行った。

[0140] 上記で作製したＦＧＦＲ固体化センサーチップの各流路に、２５℃にて、ＨＢＳ－ＥＰを用いて１０ｎｍｏｌ／Ｌに希釈した環状ペプチドを１０分間添加した後、ＨＢＳ－ＥＰをランニングバッファーとして３０分間流し、ＦＧＦＲに対する環状ペプチドの結合を測定した。その後、Ｇｌｙｓｉｎｅ１．５（Ｃｙｔｉｖａ、ＢＲ１００３５４）に終濃度０．１５ｍｏｌ／Ｌになるように塩化ナトリウム粉末を溶解させた再生液を１分間各流路に流すことを２回繰り返すことにより、結合した環状ペプチドを除去する再生処理を行った。１０ｎｍｏｌ／Ｌの環状ペプチドを流した際におけるＦＧＦＲ固定済みの流路におけるＢｉａｃｏｒｅ－Ｔ２００による測定値と、ＦＧＦＲ未固定の流路におけるＢｉａｃｏｒｅ－Ｔ２００による測定値の差分から、環状ペプチドの結合量を評価した。

[0141] 上記で評価した環状ペプチドの結合量を、環状ペプチドとＦＧＦＲの分子量を用いて、ＦＧＦＲ１分子あたりの環状ペプチド分子結合量に規格化し、下記の評価基準に従ってＦＧＦＲ結合性について評価した。評価基準Ａ、Ｂ又はＣであることが好ましい。

（ＦＧＦＲ結合性の評価基準）

Ａ・・・結合量が環状ペプチド０．７分子／ＦＧＦＲ１分子以上である。

Ｂ・・・結合量が環状ペプチド０．５分子／ＦＧＦＲ１分子以上、０．７分子／ＦＧＦＲ１分子未満である。

Ｃ・・・結合量が環状ペプチド０．１分子／ＦＧＦＲ１分子以上、０．５分子／ＦＧＦＲ１分子未満である。

Ｄ・・・結合量が環状ペプチド０．１分子／ＦＧＦＲ１分子未満である。

[0142] 評価結果を表５に示す。括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばＫ（ａｃｅｔｙｌ）はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基のハロゲン

原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

[0143] [表5]

配列番号	配列	FGFR結合性評価結果
374	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-VKKK	A
375	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(Orn(acetyl))-VKKK	A
376	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(Dab(acetyl))-VKKK	A
377	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(Dap(acetyl))-VKKK	A
378	H-(K(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
379	H-(Orn(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
380	H-(Dab(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
381	H-(Dap(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
382	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-VKKK	A
384	H-(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	A
385	(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-KKK	C
386	(Ac)-HASYERLIFHGHEAPFWV-(C)-VKKK	B
387	H-(Orn(acetyl))-SYER^{me}LIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	A
388	H-(Orn(acetyl))-SYERHleIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	A
389	H-(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-KKK	A
390	(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	C

[0144] ＜実施例４：環状ペプチド（化学合成品）のＦＧＦＲ汎用性評価＞

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

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

[0145] 化学合成した環状ペプチドのＦＧＦＲ結合性を以下の手順で評価した。

表面プラズモン共鳴装置であるＢｉａｃｏｒｅ－Ｔ２００（Ｃｙｔｉｖａ社製）にＣＭ５センサーチップ（Ｃｙｔｉｖａ、２９１４９６０３）をセットし、ランニングバッファーとしてＨＢＳ－ＥＰバッファー（Ｃｙｔｉｖａ、ＢＲ１００８２６）を１０μＬ／ｍｉｎの流速で添加し、流路を平衡化した。次いで０．２ｍｏｌ／ＬのＥＤＣ（１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド）と０．０５ｍｏｌ／ＬのＮＨＳ（Ｎ－ヒド

ロキシコハク酸イミド）混合水溶液を７０μＬ添加し、センサーチップを活性化した。その後ＨＢＳ－ＥＰバッファーで２ｍｇ／ｍＬに調製した環状ペプチドを添加し、約２００ＲＵ、固相化した。その後、エタノールアミン溶液によってブロッキング処理を施した。また、同センサーチップの別流路にはＦＧＦＲを固定化せずに、活性化後にすぐブロッキング処理を行った。

[0146] 上記で作製した環状ペプチド固体化センサーチップの各流路に、２５℃にて、ＨＢＳ－ＥＰを用いて１μｍｏｌ／Ｌに希釈した各種ＦＧＦＲ（ＦＧＦＲ１ Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｈｕｍａｎ，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ （Ｈｉｓ Ｔａｇ）（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、１０６１６－Ｈ０８Ｈ）、ＦＧＦＲ３ Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｈｕｍａｎ，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ （ＥＣＤ，Ｈｉｓ Ｔａｇ）（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、１６０４４－Ｈ０８Ｈ）、ＦＧＦＲ４ Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｈｕｍａｎ，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ （Ｈｉｓ Ｔａｇ）（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、１０５３８－Ｈ０８Ｈ））を１０分間添加した後、ＨＢＳ－ＥＰをランニングバッファーとして３０分間流し、環状ペプチドに対する各種ＦＧＦＲの結合を測定した。その後、Ｇｌｙｓｉｎｅ１．５（Ｃｙｔｉｖａ、ＢＲ１００３５４）に塩化ナトリウム（終濃度０．４ｍｏｌ／Ｌ）とドデシル硫酸ナトリウム水溶液（混合濃度１％、終濃度０．２％）を溶解させた再生液を１分間各流路に流すことを２回繰り返すことにより、結合したＦＧＦＲを除去する再生処理を行った。１μｍｏｌ／ＬのＦＧＦＲを流した際における環状ペプチド固定済みの流路におけるＢｉａｃｏｒｅ－Ｔ２００による測定値と、環状ペプチド未固定の流路におけるＢｉａｃｏｒｅ－Ｔ２００による測定値の差分から、環状ペプチドの結合量を評価した。

[0147] 上記で評価したＦＧＦＲの結合量を、環状ペプチドとＦＧＦＲの分子量を用いて、環状ペプチド１分子あたりのＦＧＦＲ分子結合量に規格化し、下記の評価基準に従ってＦＧＦＲ結合性について評価した。評価基準Ａ、Ｂ又はＣであることが好ましい。

（ＦＧＦＲ結合性の評価基準）

Ａ・・・結合量がＦＧＦＲ０．０５分子/環状ペプチド１分子以上である。

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

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

Ｄ・・・結合量がＦＧＦＲ０．００５分子/環状ペプチド１分子未満である。

[0148] 評価結果を表６に示す。

[0149] [表6]

配列番号	配列	FGFR1 結合性評価結果	FGFR3 結合性評価結果	FGFR4 結合性評価結果
382	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-VKKK	A	B	A

[0150] 本結果より、本発明の環状ペプチドは多様な種類のＦＧＦＲに結合可能であることが示された。

[0151] ＜実施例５：環状ペプチドの安定性評価＞

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

還元剤処理は細胞に含まれるグルタチオン濃度を基に、次の条件で行った。０．２ｍｇ／ｍＬの環状ペプチド水溶液を２５μＬ調製し、この水溶液に５８．８μＬの１２．６ｍｍｏｌ／Ｌ　ＤＴＴ水溶液を加え、室温にて１時間インキュベートすることで還元剤処理環状ペプチド水溶液を得た。ＤＴＴ水溶液は１ｍｏｌ／Ｌ（＋－）－ジチオトレイトール（ＤＴＴ）溶液（富士フイルム和光純薬、０４４－３３８７１）を水で希釈して用いた。還元剤処理前の環状ペプチドのＬＣ／ＭＳにおける全ピークの総面積を１００％とし、還元剤処理環状ペプチド水溶液のＬＣ／ＭＳにおける全ピークの総面積の割合を求めることにより、環状ペプチド残存率を算出し、以下の評価基準に従って分子安定性を評価した。評価基準Ａ、Ｂ又はＣであることが好ましい。

[0152] （環状ペプチドの残存率の評価基準）

Ａ・・・環状ペプチドの残存率が９０％以上である

Ｂ・・・環状ペプチドの残存率が７０％以上、９０％未満である

Ｃ・・・環状ペプチドの残存率が５０％以上、７０％未満である

Ｄ・・・環状ペプチドの残存率が５０％未満である

[0153] なお、分子安定性の評価に用いたＬＣは以下の条件とした。

・ＬＣ装置：Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅシリーズ（ポンプ、カラムオーブン、オートサンプラー、検出器）（（株）島津製作所製）

・検出器：フォトダイオードアレイ検出器（ＳＰＤ－Ｍ２０Ａ）、測定波長２８０ｎｍ

・カラム：ＴＳＫｇｅｌ　ＯＤＳ－１００Ｖ、内径４．６ｍｍ×長さ１５０ｍｍ、粒子径５μｍ（東ソー（株）製）

・溶離液Ａ：０．１％トリフルオロ酢酸を溶質として含み、溶媒は水１００％の溶液

・溶離液Ｂ：０．１％のトリフルオロ酢酸を溶質として含み、溶媒はアセトニトリル１００％の溶液

・流速：１．０ｍＬ／ｍｉｎ

・注入量：２５μＬ

・グラジエント：２０－５０％：溶離液Ｂ（０－１５分）、１００％：溶離液Ｂ（１５分）

・カラム温度：４０℃

[0154] 評価結果を表７に示す。括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばＫ（ａｃｅｔｙｌ）はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基のハロゲン原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

[0155]

[表7]

配列番号	配列	還元安定性評価結果
374	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-VKKK	A
375	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(Orn(acetyl))-VKKK	A
376	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(Dab(acetyl))-VKKK	A
377	H-(Hcy)-SYERLQFHGHEAPFRV-(Dap(acetyl))-VKKK	A
378	H-(K(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
379	H-(Orn(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
380	H-(Dab(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
381	H-(Dap(acetyl))-SYERLQFHGHEAPFRV-(Hcy)-VKKK	A
382	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-VKKK	A
383	H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(C)-VKKK	D
384	H-(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	B
385	(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-KKK	A
386	(Ac)-HASYERLIFHGHEAPFWV-(C)-VKKK	A
387	H-(Orn(acetyl))-SYER^{me}LIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	A
388	H-(Orn(acetyl))-SYERHleIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	A
389	H-(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-KKK	A
390	(Orn(acetyl))-SYERLIFHGHEAPFWV-(Hcy)-VKKK	A

[0156] 本結果より、チオエーテル結合により環化した環状ペプチドは、ジスルフィド結合により環化した環状ペプチドより安定であることが示された。

[0157] また環化部にシステイン残基を含む環状ペプチド（配列番号３８２）と、環化部にホモシステイン残基を含む環状ペプチド（配列番号３７４）の安定性を、より過酷な条件である下記アルカリ処理にて比較した。

アルカリ処理は次の方法で行った。０．２ｍｇ／ｍＬの環状ペプチド水溶液を２５μＬ調製し、この水溶液に５８．８μＬの０．５ｍｏｌ／Ｌ水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温にて３時間インキュベートすることでアルカリ処理環状ペプチド水溶液を得た。アルカリ処理前の環状ペプチドのＬＣ／ＭＳにおける全ピークの総面積を１００％とし、アルカリ処理環状ペプチド水溶液のＬＣ／ＭＳにおける全ピークの総面積の割合を求めることにより、環状ペプチド残存率を算出した。配列番号３８２の残存率は２６％、配列番号３７４の残存率は３２％であり、環化部にシステイン残基を含む環状ペプチドより、環化部にホモシステイン残基を含む環状ペプチドの方が安定性が

高いことが示された。

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

[0158] ＜実施例６：環状ペプチド複合体の細胞増殖促進作用評価＞

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

ＦＧＦＲを安定発現したＢａＦ３細胞は、ＦＧＦＲ遺伝子が組み込まれたベクター（ヒト：Ｇｅｎｅ　Ｃｏｐｏｅｉａ、ＥＸ－Ｙ２８２０－Ｍ６７、ウシ：Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ番号Ａ４ＩＦＬ５の配列をｐｃＤＮＡ３．１／Ｈｙｇｒｏ（＋）　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ（Ｔｈｅｒｍｏ、Ｖ８７０２０）に導入、ブタ：Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ番号Ａ０Ａ８Ｄ１Ｅ４Ｈ１の配列をｐｃＤＮＡ３．１／Ｈｙｇｒｏ（＋）　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ（Ｔｈｅｒｍｏ、Ｖ８７０２０）に導入、トリ：Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ番号Ｐ２１８０４の配列をｐｃＤＮＡ３．１／Ｈｙｇｒｏ（＋）　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ（Ｔｈｅｒｍｏ、Ｖ８７０２０）に導入）を、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ）を用いてＢａＦ３細胞に導入し、ＦＧＦＲ遺伝子が導入された細胞を、ハイグロマイシンを用いて薬剤選択することで樹立した。

[0159] 評価に用いる環状ペプチド複合体は、株式会社東レリサーチセンターにてカスタム合成した。

[0160] ＦＧＦＲを安定発現したＢａＦ３細胞の増殖促進作用評価は、以下の方法で実施した。まずＲＰＭＩ－１６４０　ｗｉｔｈ　Ｌ－Ｇｌｕｔａｍｉｎｅ　ａｎｄ　Ｐｈｅｎｏｌ　Ｒｅｄ（富士フイルム和光純薬、１８９－０２０２５）と、Ｆｅｔａｌ　Ｂｏｖｉｎｅ　Ｓｅｒｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ、１０２７０－１０６）を、体積比９：１で混合後、ヘパリン（ＳＴＥＭ　ＣＥＬＬ、０７９８０）を終濃度８μｇ／ｍＬになるよう添加することで、評価用の培地（以下、ＲＰＭＩ（１０％ＦＢＳ）培地と記載）を調製した。次いでＦ

ＧＦＲを安定発現したＢａＦ３細胞をＲＰＭＩ（１０％ＦＢＳ）培地で２回洗浄後、環状ペプチド複合体を終濃度０．００１～１０ｎｍｏｌ／Ｌになるように溶解したＲＰＭＩ（１０％ＦＢＳ）培地に懸濁し、３８４穴プレートに播種した。この際、陰性対照として環状ペプチド複合体を添加しない条件を用意した。３７℃（５％CO_2）で２晩培養後、Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２，　Ｔｒｉｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ，　Ｔｒｉｈｙｄｒａｔｅ　－１０ｍｇ/ｍＬ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｗａｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ、Ｈ３５７０）、－Ｃｅｌｌｓｔａｉｎ（登録商標）－　Ｃａｌｃｅｉｎ－ＡＭ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（１ｍｇ/ｍＬ　ＤＭＳＯ溶液）（ＤＯＪＩＮＤＯ、Ｃ３９６）、及び－Ｃｅｌｌｓｔａｉｎ（登録商標）－　ＰＩ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＤＯＪＩＮＤＯ、Ｐ３７８）をＲＰＭＩ（１０％ＦＢＳ）培地にそれぞれ終濃度で１／１０００体積量ずつ添加し、室温で１時間静置することで生死染色し、共焦点顕微鏡（横河電機、ＣＱ１）にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、下記の評価基準に従って細胞増殖促進作用について評価した。陰性対照における生細胞数は約２０ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌであった。評価基準Ａ、Ｂ又はＣであることが好ましい。

[0161]（細胞増殖促進作用の評価基準）

生細胞数が最も多い環状ペプチド複合体の添加濃度における、

Ａ・・・生細胞数が４００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ以上である。

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

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

Ｄ・・・生細胞数が１００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌ未満である。

[0162]　評価結果を表８及び図２に示す。括弧内に記載されたアミノ酸残基は、側鎖間でチオエーテル結合、又はジスルフィド結合による環化構造を構成するアミノ酸残基を示す。例えばＫ（ａｃｅｔｙｌ）はリジン残基の側鎖にハロアセチル基が修飾された構造を指し、当該環状ペプチドはハロアセチル基の

ハロゲン原子が、他残基のチオール基により置換された環化構造を有する。

[0163] [表8]

配列番号	配列	細胞増殖性評価結果				修飾情報
		ヒト	ウシ	ブタ	トリ	
391	H-(C_1)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl)$_1$)-VGH-(C_2)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl)$_2$)-V	A	A	B	A	C_1-K(acetyl)$_1$ 間で環化形成、かつ C_2-K(acetyl)$_2$ 間で環化形成
392	(CH2)2-(H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V)2	A	A	B	B	N 末端アミノ基間を HO2C-(CH2)2-CO2H でアミド架橋
393	(H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V)2-Dap	A	A	B	B	環状部の C 末端カルボン酸間を Dap の 2 アミノ基でアミド架橋、Dap の C 末端アミド化
394	(H-(C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V)2-Orn	A	A	B	B	環状部の C 末端カルボン酸間を Orn の 2 アミノ基でアミド架橋、Orn の C 末端アミド化
395	(CH2)5-((C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V)2	B	A	B	B	N 末端アミノ基間を Bis-NHS-(CH2)5 でアミド架橋
396	(CH2)2-((C)-SYERLQFHGHEAPFRV-(K(acetyl))-V)2	A	A	B	A	N 末端アミノ基間を Bis-NHS-(CH2)2 でアミド架橋
397	(H-(C)-SYERLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V)2-Dap	A	A	B	A	環状化(チオエーテル(C)-(K)結合、環状部の C 末端カルボン酸間を Dap の 2 アミノ基でアミド架橋、Dap の C 末端アミド化)

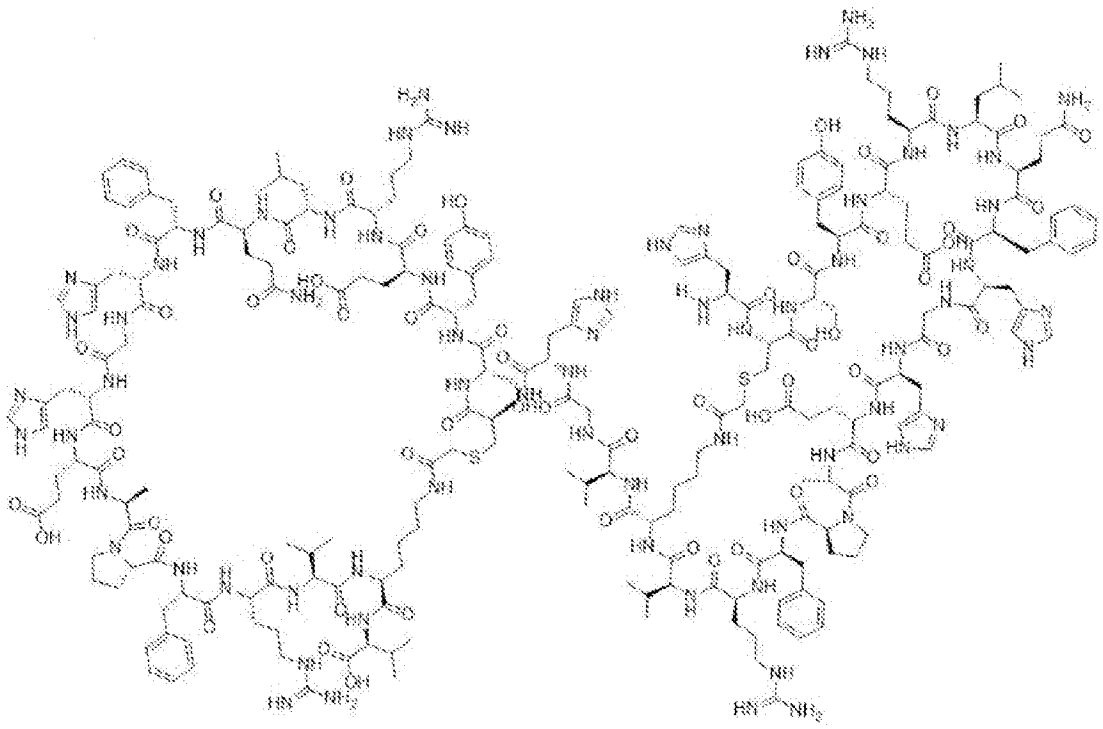
398	(H-(C)-SYERLIFHGHEAPFWV-(K(acetyl))-V)2-Dab	A	A	B	B	環状化(チオエーテル(C)-(K)結合、環状部のＣ末端カルボン酸間をDabの２アミノ基でアミド架橋、DabのＣ末端アミド化)

[0164] 本結果より、本発明の環状ペプチドを連結した環状ペプチド複合体は、多様な動物由来のＦＧＦＲをリン酸化可能であることが示された。

[0165] 上記配列番号３９１～３９８の環状ペプチド複合体の構造を以下に示す。

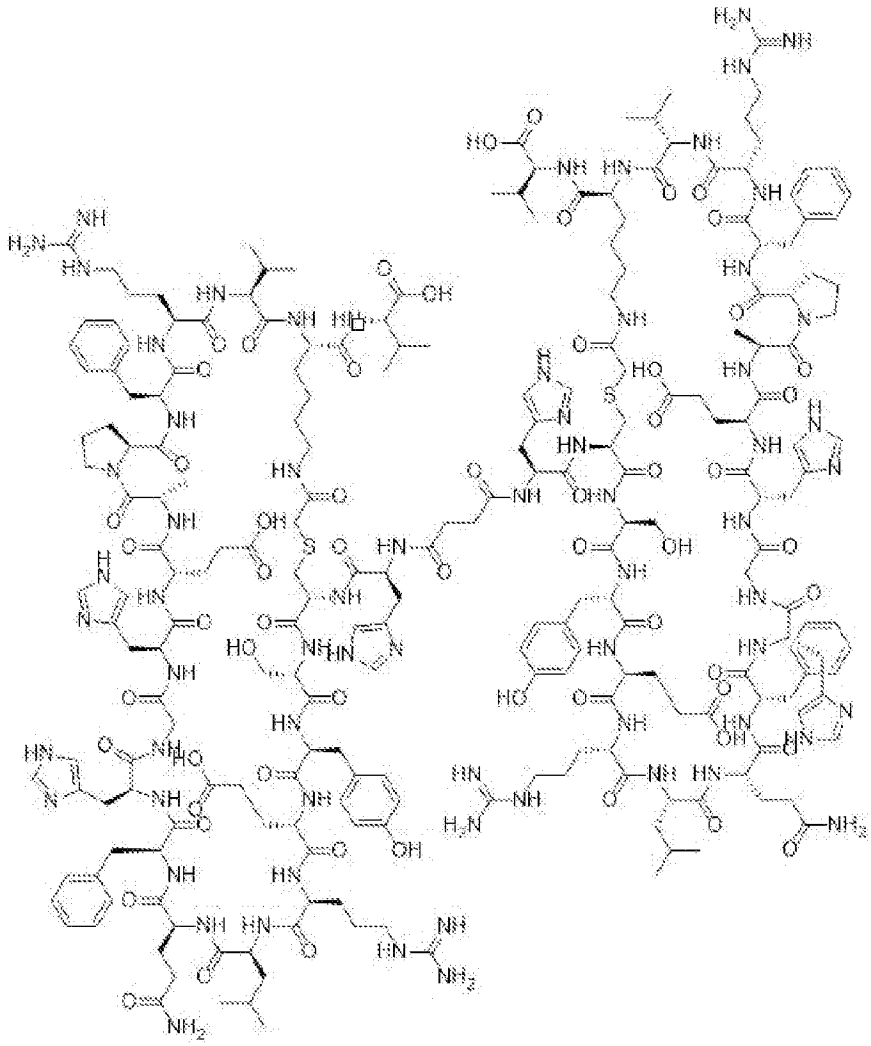
[化21]

配列番号３９１：



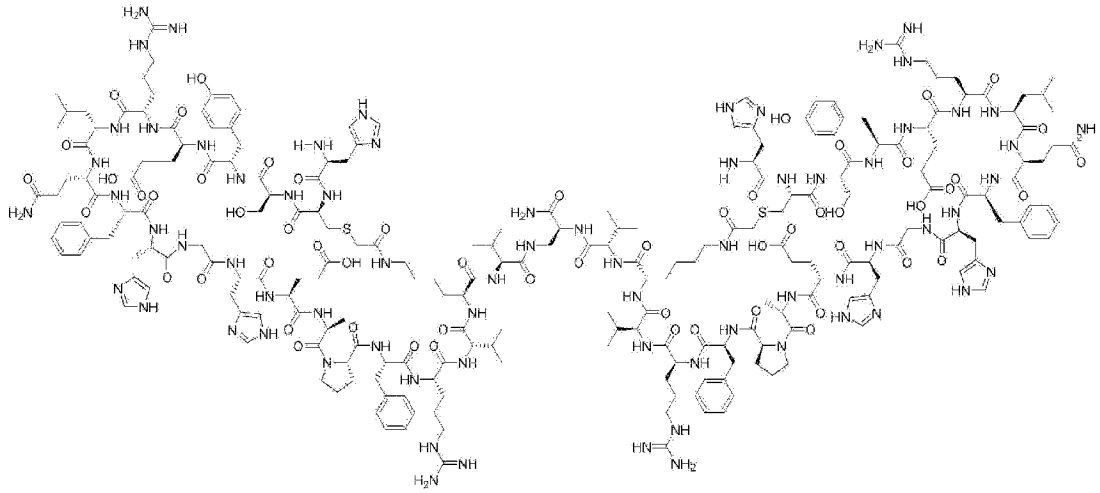
[化22]

配列番号３９２：



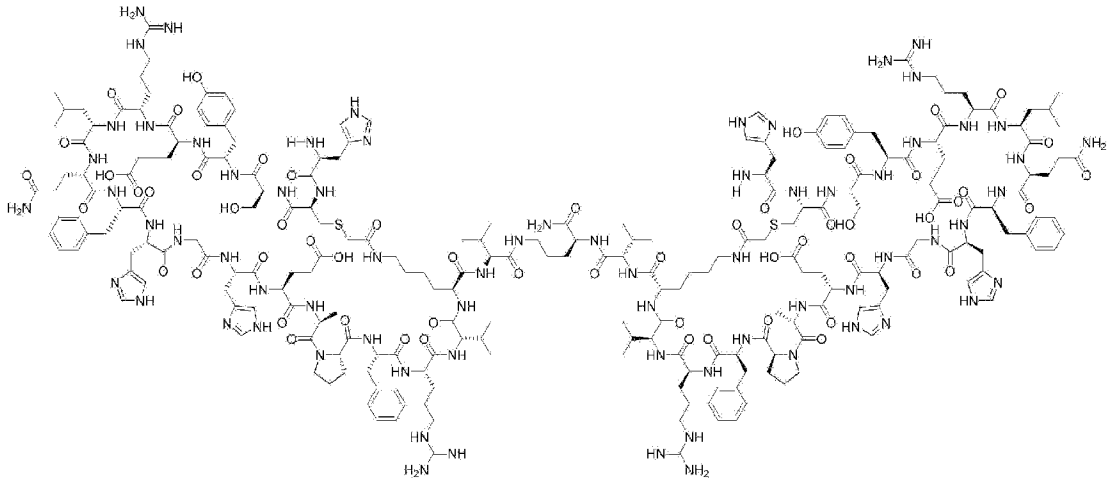
[化23]

配列番号３９３：



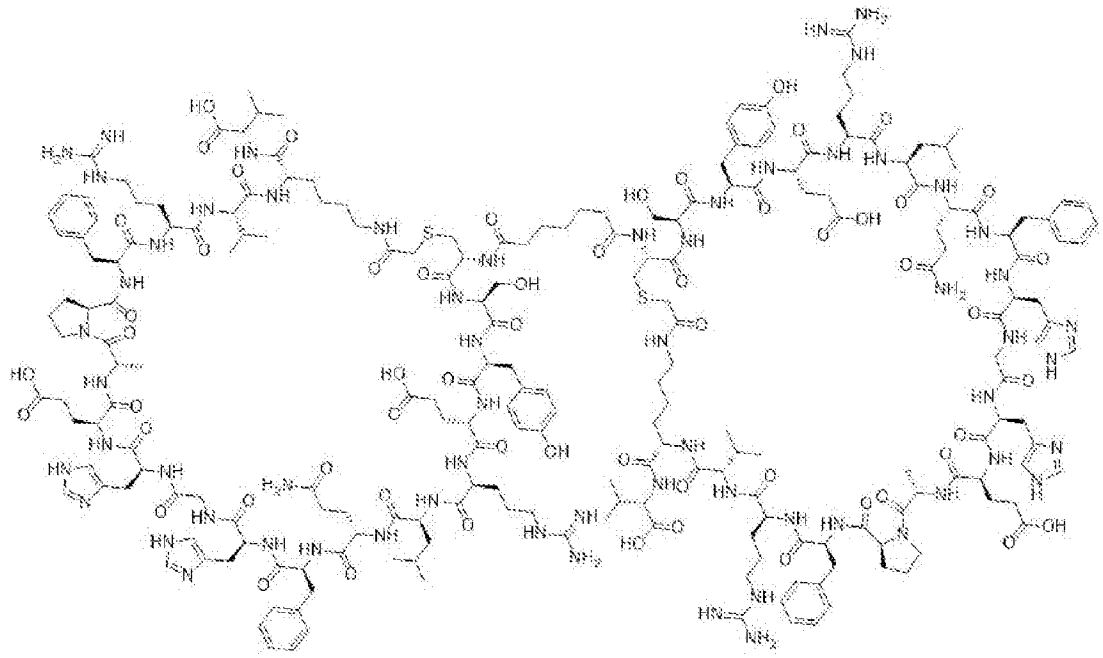
[化24]

配列番号３９４：



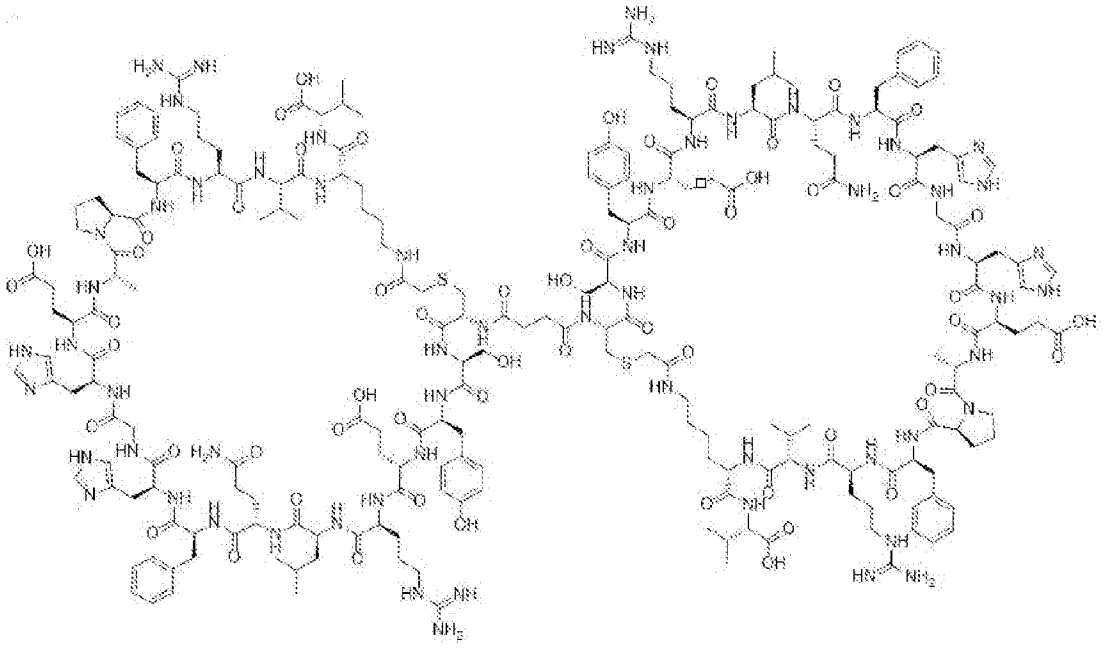
[化25]

配列番号３９５：



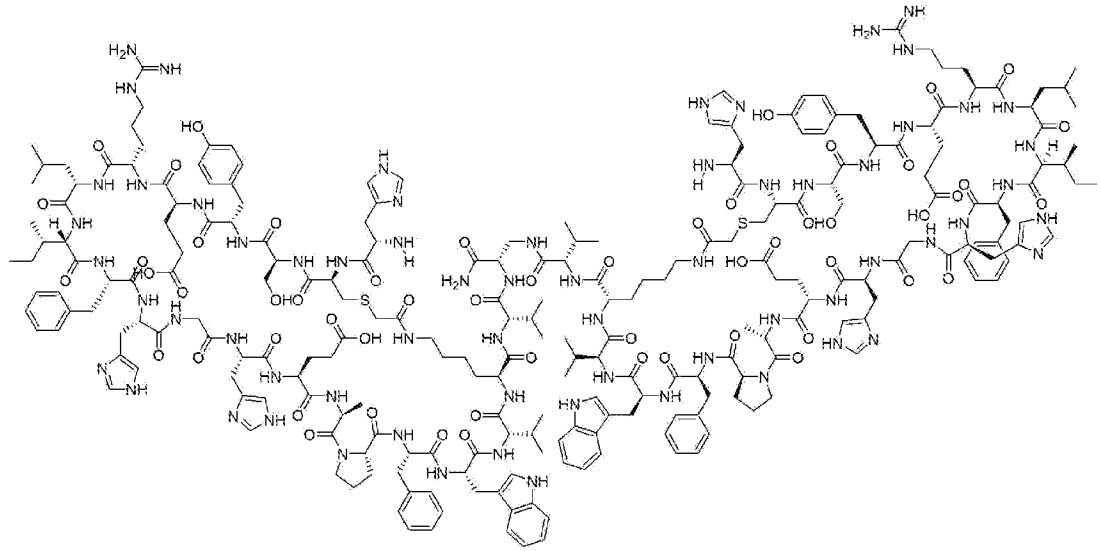
[化26]

配列番号３９６：



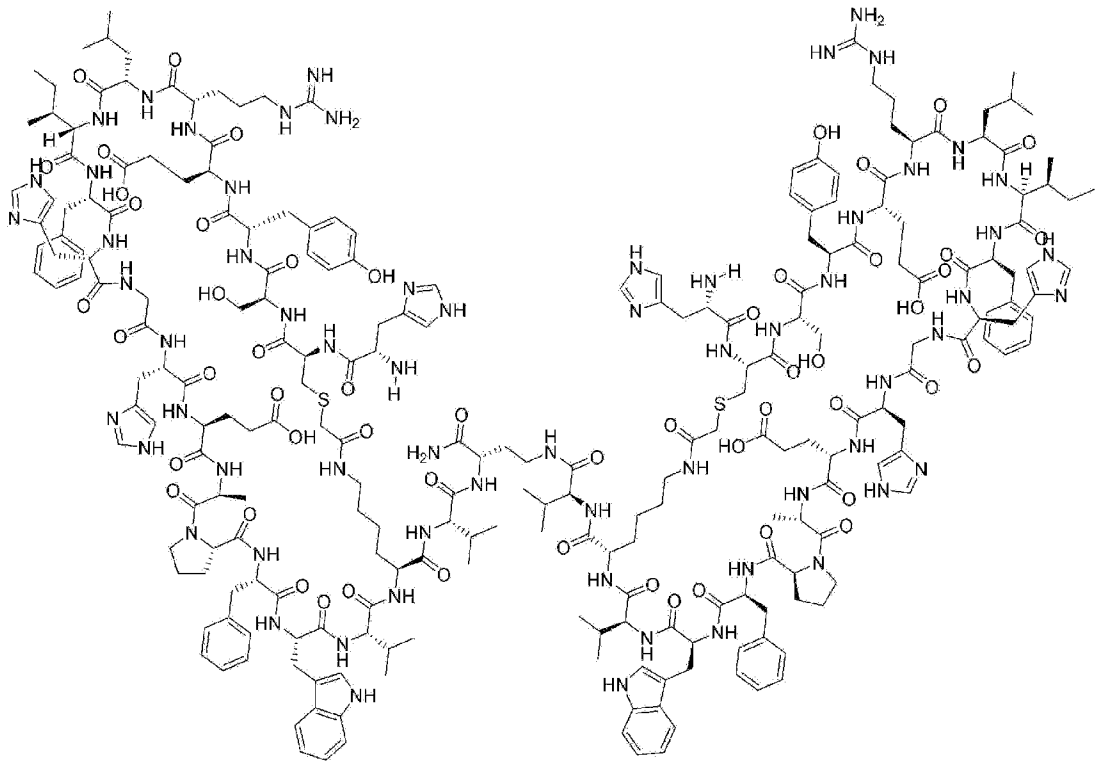
[化27]

配列番号３９７：



[化28]

配列番号３９８：



[0166] ＜実施例７：環状ペプチド複合体の幹細胞増殖促進作用評価＞

環状ペプチド複合体の、ＭＳＣ（間葉系幹細胞）増殖促進作用を評価した。

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

[0167] ＭＳＣの増殖促進作用評価は、以下の方法で実施した。まずＰＲＩＭＥ－ＸＶ ＭＳＣ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＸＳＦＭ（ＦＵＪＩＦＩＬＭ Ｉｒｖｉｎｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， Ｉｎｃ．、９１１４９）からｂＦＧＦを除いた培地（以下、カスタム培地と記載）を用意した。次いでＰｒｉｍｅ－

ＸＶ Ｈｕｍａｎ Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＦＵＪＩＦＩＬＭ Ｉｒｖｉｎｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．、３１００２）をＰＢＳ（富士フイルム和光純薬、１６４－２３５５１）に溶解し、評価に用いる９６穴プレートに２μｇ／平方センチメートルずつ添加し、室温で３時間静置することで９６穴プレートをＦｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎでコーティングした。その後、継代培養したＭＳＣをＴｒｙｐｌｅ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｔｈｅｒｍｏ、１２６０４－０１３）を用いて剥離し、カスタム培地で１回洗浄後、環状ペプチド複合体又はｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、３７１８－ＧＭＰ）を終濃度０．００１～３ｎｍｏｌ／Ｌになるように希釈したカスタム培地に懸濁し、Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎでコーティング済みの９６穴プレートに播種した。この際、陰性対照として環状ペプチド複合体及びｂＦＧＦを添加しない条件を用意した。３７℃（５％CO_2）で２晩培養後、培地上清を除き、除去したものと同一組成に調製した培地を同量添加することにより培地交換した。更に３７℃（５％CO_2）で２晩培養後、培養上清を除いてＨｏｅｃｈｓｔ ３３３４２，Ｔｒｉｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ，Ｔｒｉｈｙｄｒａｔｅ － １０ｍｇ/ｍＬ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｉｎ Ｗａｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ、Ｈ３５７０）、及び－Ｃｅｌｌｓｔａｉｎ（登録商標）－ Ｃａｌｃｅｉｎ－ＡＭ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（１ｍｇ/ｍＬ ＤＭＳＯ溶液）（ＤＯＪＩＮＤＯ、Ｃ３９６）をそれぞれ終濃度で１／１００００及び１／４０００体積量ずつ添加したカスタム培地を添加し、３７℃（５％CO_2）で３０分静置することで全細胞及び生細胞を染色し、共焦点顕微鏡（横河電機、ＣＱ１）にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、１ｎｍｏｌ／Ｌ ｂＦＧＦを添加したウェルの生細胞数を１００、陰性対照のウェルの生細胞数を０として、生細胞数を規格化した。評価結果を図３に示す。

[0168] 環状ペプチド複合体（配列番号３９３）はｂＦＧＦと同モルで同程度のＭＳＣ増殖作用を示しており、本発明の環状ペプチド複合体でｂＦＧＦのＭＳＣ増殖促進作用を代替可能であることを示している。

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

環状ペプチド複合体の、ＭＳＣ（間葉系幹細胞）未分化能の維持作用を評価した。

ＭＳＣは、実施例７と同様に調製した細胞を用いた。

ＭＳＣ未分化能の維持作用評価は、以下の方法で実施した。まずＰＲＩＭＥ－ＸＶ ＭＳＣ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＸＳＦＭ（ＦＵＪＩＦＩＬＭ Ｉｒｖｉｎｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ, Ｉｎｃ.、９１１４９）からｂＦＧＦを除いた培地（以下、カスタム培地と記載）を用意した。次いでＰｒｉｍｅ－ＸＶ Ｈｕｍａｎ Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ（ＦＵＪＩＦＩＬＭ Ｉｒｖｉｎｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ, Ｉｎｃ.、３１００２）をＰＢＳ（富士フイルム和光純薬、１６４－２３５５１）に溶解し、増殖に用いる１２穴プレートに２μｇ／平方センチメートルずつ添加し、室温で３時間静置することで１２穴プレートをＦｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎでコーティングした。その後、継代培養したＭＳＣをＴｒｙｐｌｅ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｔｈｅｒｍｏ、１２６０４－０１３）を用いて剥離し、カスタム培地で１回洗浄後、環状ペプチド複合体又はｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、３７１８－ＧＭＰ）をそれぞれ、終濃度３ｎｍｏｌ／Ｌ及び１ｎｍｏｌ／Ｌになるように希釈したカスタム培地に懸濁し、Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎでコーティング済みの１２穴プレートに播種した。この際、陰性対照として環状ペプチド複合体及びｂＦＧＦを添加しない条件を用意した。３７℃（５％CO_2）で２晩培養後、培地上清を除き、除去したものと同一組成に調製した培地を同量添加することにより培地交換した。更に３７℃（５％CO_2）で２晩培養後、ＲＮｅａｓｙ Ｐｌｕｓ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、７４１３６）を用い、メーカー既定のプロトコルに沿ってＲＮＡを抽出した。抽出したＲＮＡをＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔｔｍ ＲＴ ｒｅａｇｅｎｔ Ｋｉｔ ｗｉｔｈ ｇＤＮＡ Ｅｒａｓｅｒ （Ｐｅｒｆｅｃｔ Ｒｅａｌ Ｔｉｍｅ）（Ｔａｋａｒａ、ＲＲ０４７Ａ）をメーカー既定のプロトコルに沿って使用することで逆転写し、ＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙ（Ｔｈｅｒｍｏ、４３３１１８２、ＧＡＰＤＨ：Ｈｓ０２７５８９９１ ｇ１

、Ｓｏｘ２，　Ｈｓ０４２３４８３６　ｓ１、Ｏｃｔ４，　Ｈｓ０４２６０３６７　ｇＨ、Ｎａｎｏｇ，　Ｈｓ０２３８７４００　ｇ１）をメーカー既定のプロトコルで用いることで、未分化能維持を示す遺伝子の発現量を定量した。１ｎｍｏｌ／Ｌ　ｂＦＧＦを添加したウェルの発現量を１として各遺伝子の発現量を規格化した。評価結果を図４に示す。

[0170] 未分化能維持を示す３遺伝子（Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ４、Ｎａｎｏｇ）のうち、Ｓｏｘ２はｂＦＧＦがない条件（陰性対照）と１ｎｍｏｌ／Ｌ　ｂＦＧＦを添加した条件で発現量が変化したため、ｂＦＧＦのＭＳＣ未分化能維持作用を示す指標として使用可能であると判断した。一方、Ｏｃｔ４とＮａｎｏｇはｂＦＧＦがない条件（陰性対照）と１ｎｍｏｌ／Ｌ　ｂＦＧＦを添加した条件で発現量がほぼ変化しなかったため、ｂＦＧＦのＭＳＣ未分化能維持作用を示す指標として使用可能ではないと判断した。Ｓｏｘ２において環状ペプチド複合体（配列番号３９３）はｂＦＧＦと同程度の遺伝子発現量を示しており、本発明の環状ペプチド複合体でｂＦＧＦの未分化能維持作用を代替可能であることを示している。

[0171] ＜実施例９：環状ペプチド複合体のウシ細胞増殖促進作用評価＞

環状ペプチド複合体の、ウシ細胞（筋芽細胞）増殖促進作用を評価した。

ウシ筋芽細胞は、以下の方法によりウシ筋組織より分離した。まずウシ黒毛和種の筋組織をＨＢＳＳ（－）（フェノールレッド不含）（富士フイルム和光純薬、０８５－０９３５５）中で細切した後、ｐｒｏｎａｓｅ　ｆｒｏｍ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　Ｇｒｉｓｅｕｓ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、１０１６５９２１００１）を最終濃度１ｍｇ／ｍＬになるように添加し、３７℃で１時間静置した。静置後、１０％ＦＢＳを含むＨＢＳＳを添加し、遠心分離により細胞を取得した。取得した細胞を最終濃度１０％のウシ血清、３０ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを含むＤ－ＭＥＭ（高グルコース）（Ｌ－グルタミン、フェノールレッド含有）（富士フイルム和光純薬、０４４－２９７６５）に懸濁した。懸濁した細胞を、０．５５μｇ／平方センチメートルとなるようアイマトリックス－５１１溶液（富士フイルム和光純薬、３８

１－０７３６３）にてコーティングした培養フラスコ中で培養した。培養開始後２回以上継代したウシ筋芽細胞を評価に使用した。

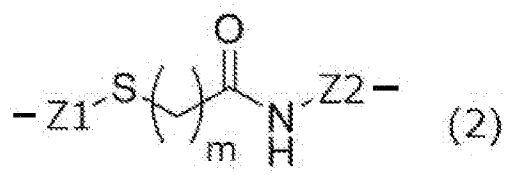
[0172] ウシ筋芽細胞の増殖促進作用評価は、以下の方法で実施した。継代培養したウシ筋芽細胞をＴｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡ（０．０５％）、ｐｈｅｎｏｌ ｒｅｄ（Ｔｈｅｒｍｏ、２５３００－０５４）を用いて剥離し、ｂＦＧＦを終濃度３０ｎｇ／ｍＬ又は環状ペプチド複合体を終濃度０．０３～１０ｎｍｏｌ／Ｌになるように希釈した１０％ＦＢＳ含有Ｄ－ＭＥＭ（高グルコース）（Ｌ－グルタミン、フェノールレッド含有）に懸濁し、アイマトリックス－５１１ ０．５５μｇ／平方センチメートルになるようにコーティングした９６穴プレートに播種した。この際、陰性対照としてｂＦＧＦ及び環状ペプチド複合体を添加しない条件を用意した。３７℃（５％CO_2）で４日間培養後、培地上清を除き、Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２, Ｔｒｉｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ, Ｔｒｉｈｙｄｒａｔｅ － １０ｍｇ/ｍＬ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｉｎ Ｗａｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ、Ｈ３５７０）、及び－Ｃｅｌｌｓｔａｉｎ（登録商標）－ Ｃａｌｃｅｉｎ－ＡＭ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（１ｍｇ/ｍＬ ＤＭＳＯ溶液）（ＤＯＪＩＮＤＯ、Ｃ３９６）をそれぞれ終濃度で１／１００００及び１／４０００体積量ずつ添加した１０％ＦＢＳ含有Ｄ－ＭＥＭ（高グルコース）（Ｌ－グルタミン、フェノールレッド含有）を添加し、３７℃（５％CO_2）で３０分静置することで全細胞及び生細胞を染色し、共焦点顕微鏡（横河電機、ＣＱ１）にて撮像した。撮像データより生細胞数を算出し、３０ｎｇ／ｍＬ ｂＦＧＦを添加したウェルの生細胞数を１００、陰性対照のウェルの生細胞数を０として、生細胞数を規格化した。評価結果を図５に示す。

[0173] 環状ペプチド複合体（配列番号３９３）は、３０ｎｇ／ｍＬ ｂＦＧＦの８０％程度のウシ筋芽細胞増殖作用を示しており、本発明の環状ペプチド複合体はウシ筋芽細胞の培養にも使用可能であることを示している。

請求の範囲

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

[化1]



(2)

で示される構造を含む、環状ペプチド又はその塩：

式中、

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、１から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

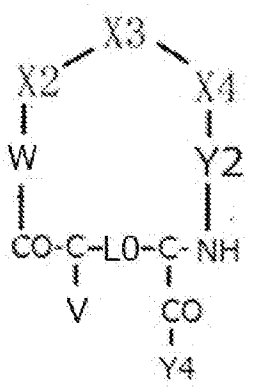
Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｚ１及びＺ２はそれぞれ独立に、連結基を示し、

ｍは、１～１０の整数を示す。

[請求項2] 式（１）で示される、請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[化2]



(1)

式中、

Ｗは、－Ｘｎ－Ｘ１－Ｙ１－、又はＸｋを示し、ここでＸｎがＸ２に結合し、Ｙ１がＣＯに結合し、

Ｗが－Ｘｎ－Ｘ１－Ｙ１－である場合、Ｖは－ＮＨ－Ｙ３を示し、かつＬ０はＬを示すか、又はＶはＲを示し、かつＬ０はＬ１を示し、

Ｗが、Ｘｋを示す場合、Ｖは－ＮＨ－Ｘ１－Ｙ５を示し、かつＬ０はＬを示す。

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、４から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘｋは、単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｙ１は、単結合、又は１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ２は、１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ３は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

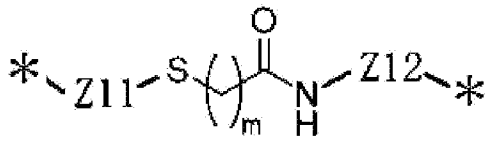
Ｙ４は、ＯＨを示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ５は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｘ１のアミノ末端がＹ１のカルボキシル末端と結合し、Ｘ１のカルボキシル末端がＸｎのアミノ末端と結合し、

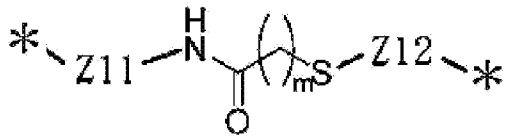
Ｌは、

[化3]



又は

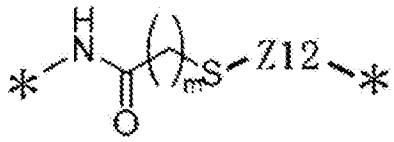
[化4]



で示される環化部を示し、Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｌ１は、

[化5]

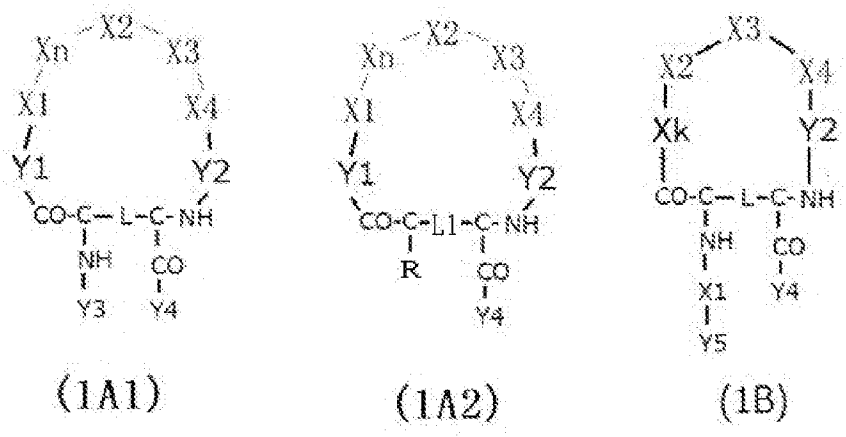


で示される環化部を示し、Ｚ１２は連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｒは、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[請求項3] 式（１Ａ１）、式（１Ａ２）、又は式（１Ｂ）で示される、請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[化6]



(1A1) (1A2) (1B)

式中、

Ｘ１は、アラニン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、セリン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘｎは、４から７個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘｋは、単結合、又は１から３個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ２は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、イソロイシン

残基、又はバリン残基を示し、

Ｘ３は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ４は、側鎖に芳香族残基を含むアミノ酸残基を示し、

Ｙ１は、単結合、又は１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ２は、１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ３は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

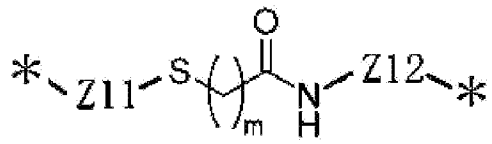
Ｙ４は、ＯＨを示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｙ５は、水素原子を示すか、あるいは１から７個の任意のアミノ酸残基を含む、アミノ酸残基又はペプチド残基を示し、

Ｘ１のアミノ末端がＹ１のカルボキシル末端と結合し、Ｘ１のカルボキシル末端がＸｎのアミノ末端と結合し、

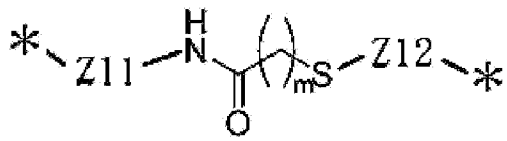
Ｌは、

[化7]



又は

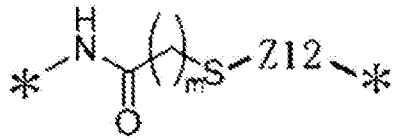
[化8]



で示される環化部を示し、Ｚ１１及びＺ１２はそれぞれ独立に、連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｌ１は、

[化9]



で示される環化部を示し、Ｚ１２は連結基を示し、ｍは、１～１０の整数を示し、＊はアミノ酸主鎖のα炭素原子の位置を示し、

Ｒは、アミノ酸の側鎖構造を示す。

[請求項4] Ｘｎが、－Ｘｍ－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘｍが、単結合、又は１から５個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す、

請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項5] Ｘｎが、－Ｘｍ－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘｍが、２から５個の任意のアミノ酸残基を含むペプチド残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘｋが、－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す、

請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項6] Ｘｎが、－Ｘ７－Ｘ８－Ｘ９－Ｘ１０－Ｘ５－Ｘ６－で示される基を示し、

Ｘ７は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ８は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示し、

Ｘ９は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ１０は、アラニン残基、グリシン残基、プロリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、メチオニン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ５が、プロリン残基、ロイシン残基、バリン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はシステイン残基を示し、

Ｘ６は、任意のアミノ酸残基を示し、

Ｘ３は、アラニン残基、プロリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、リジン残基、又はメチオニン残基を示す、

請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項7] 環を構成するアミノ酸残基の数が１０～２２個である、請求項１に記

載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項8] 環化部にホモシステイン残基を含む、請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項9] 表４～表６に記載されている配列番号３８～３８２及び配列番号３８４～３９０のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は
表４～表６に記載されている配列番号３８～３８２及び配列番号３８４～３９０のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、
請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項10] 表４～表６に記載されている配列番号３８～４２、配列番号４４～４５、配列番号５０～５２、配列番号５４、配列番号５６～５８、配列番号６０～６２、配列番号６４～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１１０、配列番号１１２、配列番号１１５、配列番号１１７、配列番号１２０～１２１、配列番号１２３～１２４、配列番号１２６～１３４、配列番号１３７～１３９、配列番号１４３～１４４、配列番号１４６～１５８、配列番号１６２、配列番号１６４～１７２、配列番号１７４～１７５、配列番号１７７～２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０９～２１９、配列番号２２１～２２４、配列番号２２６、配列番号２２９～２４２、配列番号２４７～２４８、配列番号２５１～２５２、配列番号２５６、配列番号２５８～２６０、配列番号２６２～２６４、配列番号２７１～２７２、配列番号２７５、配列番号２８１、配列番号２８３～２８８、配列番号２９０、配列番号２９２、配列番号２９４～２９６、配列番号２９８、配列番号３００～３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３～３３６、配列番号３４７、配列番号３５２～３５３、配列番号３５６、配列番号３６０、配列番号３６５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列

番号３８４及び配列番号３８６～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３８～４２、配列番号４４～４５、配列番号５０～５２、配列番号５４、配列番号５６～５８、配列番号６０～６２、配列番号６４～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１１０、配列番号１１２、配列番号１１５、配列番号１１７、配列番号１２０～１２１、配列番号１２３～１２４、配列番号１２６～１３４、配列番号１３７～１３９、配列番号１４３～１４４、配列番号１４６～１５８、配列番号１６２、配列番号１６４～１７２、配列番号１７４～１７５、配列番号１７７～２０１、配列番号２０３、配列番号２０５、配列番号２０９～２１９、配列番号２２１～２２４、配列番号２２６、配列番号２２９～２４２、配列番号２４７～２４８、配列番号２５１～２５２、配列番号２５６、配列番号２５８～２６０、配列番号２６２～２６４、配列番号２７１～２７２、配列番号２７５、配列番号２８１、配列番号２８３～２８８、配列番号２９０、配列番号２９２、配列番号２９４～２９６、配列番号２９８、配列番号３００～３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３～３３６、配列番号３４７、配列番号３５２～３５３、配列番号３５６、配列番号３６０、配列番号３６５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８６～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項11] 表４～表６に記載されている配列番号３９、配列番号４２、配列番号４４、配列番号５４、配列番号５６～５７、配列番号６１～６２、配列番号６５～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１２１、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３１、配

列番号１３４、配列番号１３７～１３８、配列番号１４４、配列番号１４６～１５７、配列番号１６４～１６９、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７７～配列番号２００～２０１、配列番号２０３、配列番号２１１～２１３、配列番号２１６～２１９、配列番号２２１～２２３、配列番号２３４～２３６、配列番号２４０、配列番号２４２、配列番号２５８、配列番号２６４、配列番号２８４、配列番号２８６～２８７、配列番号２９４～２９６、配列番号３００～３０１、配列番号３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３、配列番号３２６～３３３、配列番号３３５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８７～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つを含むか、又は

表４～表６に記載されている配列番号３９、配列番号４２、配列番号４４、配列番号５４、配列番号５６～５７、配列番号６１～６２、配列番号６５～９６、配列番号１００～１０１、配列番号１０３、配列番号１２１、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３１、配列番号１３４、配列番号１３７～１３８、配列番号１４４、配列番号１４６～１５７、配列番号１６４～１６９、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７７～配列番号２００～２０１、配列番号２０３、配列番号２１１～２１３、配列番号２１６～２１９、配列番号２２１～２２３、配列番号２３４～２３６、配列番号２４０、配列番号２４２、配列番号２５８、配列番号２６４、配列番号２８４、配列番号２８６～２８７、配列番号２９４～２９６、配列番号３００～３０１、配列番号３０３、配列番号３０５、配列番号３０７、配列番号３０９、配列番号３２３、配列番号３２６～３３３、配列番号３３５、配列番号３７０～３７１、配列番号３７３～３８２、配列番号３８４及び配列番号３８７～３８９のアミノ酸配列のいずれか１つにおいて１～４個のアミノ酸が、置換、欠失、又は挿入されているアミノ酸配

列を含み、かつＦＧＦＲタンパク質への結合能を有する、
請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項12] 他の物質で修飾されている、請求項１に記載の環状ペプチド又はその塩。

[請求項13] ２分子以上の請求項１～１２のいずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。

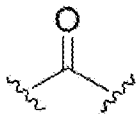
[請求項14] ２分子の請求項１～１２のいずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩がリンカーによって連結している、環状ペプチド複合体又はその塩。

[請求項15] リンカーの長さが２０Å以下の距離である、請求項１３に記載の環状ペプチド複合体又はその塩。

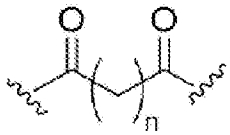
[請求項16] リンカーが、下記構造の少なくとも１つである、請求項１３に記載のペプチド複合体又その塩。

[化10]

(A)

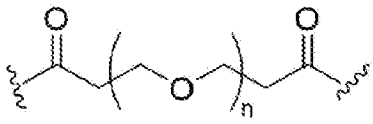


(B)



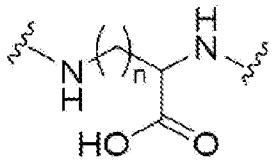
（ｎは２～１０の整数を示す）

(C)



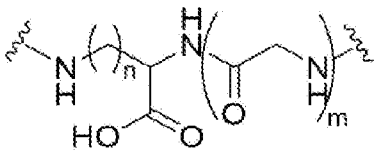
（ｎは１～３の整数を示す）

(D)



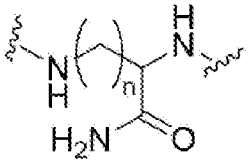
（ｎは１～４の整数を示す）

(E)



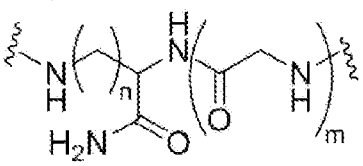
（ｎは１～４の整数を示し、ｍは１～３の整数を示す）

(F)



（ｎは１～４の整数を示す）

(G)



（ｎは１～４の整数を示し、ｍは１～３の整数を示す）

[請求項17] 他の物質で修飾されている、請求項１３に記載の環状ペプチド複合体

又はその塩。

[請求項18] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。

[請求項19] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、精製用材料。

[請求項20] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、標識用材料。

[請求項21] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、細胞制御用材料。

[請求項22] 請求項１～１２いずれか１項に記載の環状ペプチド又はその塩を含む、集積用材料。

[請求項23] 請求項１３に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、培地組成物又は培地添加剤。

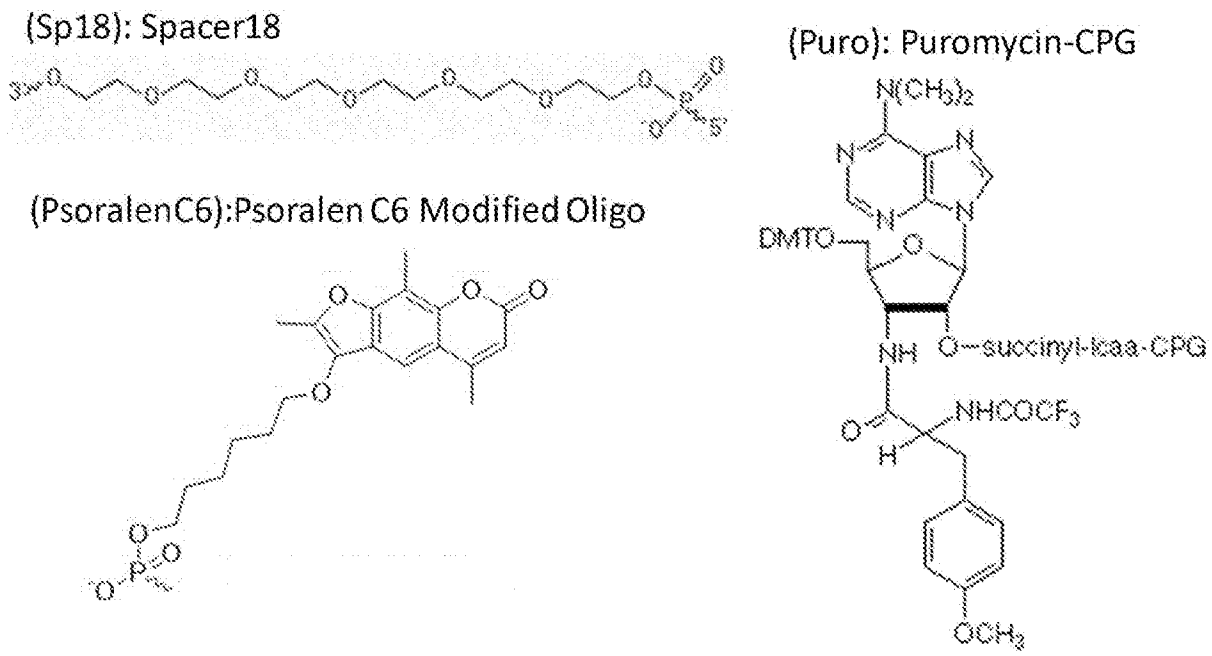
[請求項24] 請求項１３に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、精製用材料。

[請求項25] 請求項１３に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、標識用材料。

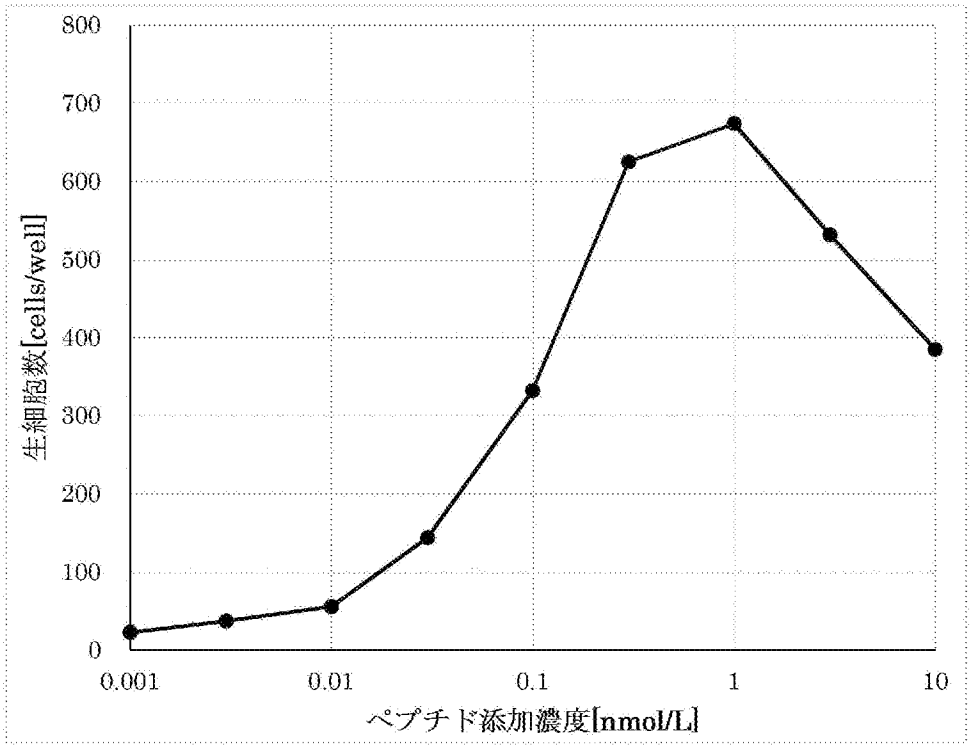
[請求項26] 請求項１３に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、細胞制御用材料。

[請求項27] 請求項１３に記載の環状ペプチド複合体又はその塩を含む、集積用材料。

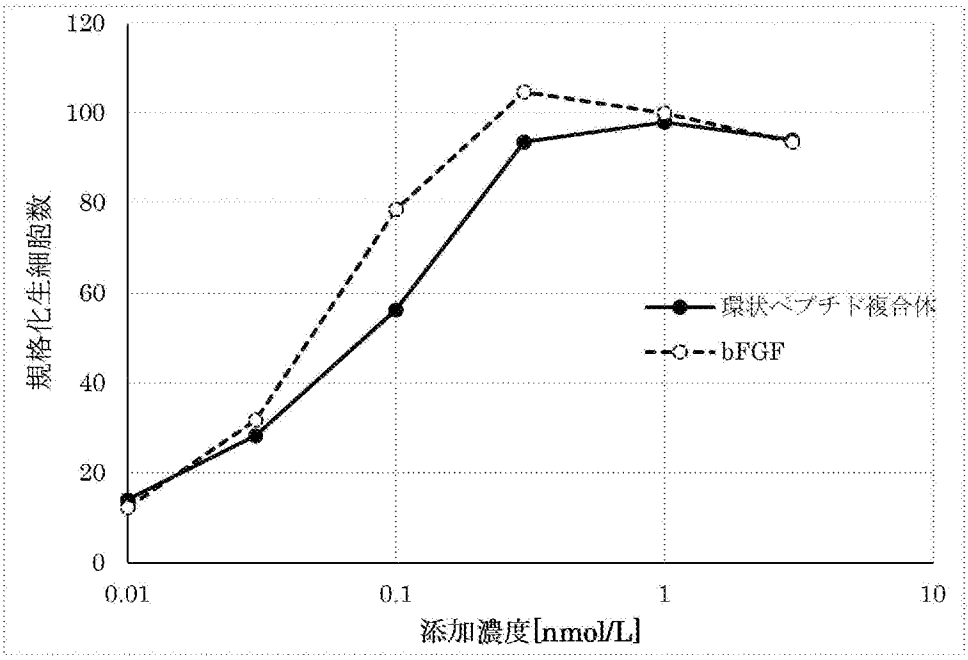
[図1]


(Sp18): Spacer18
(Puro): Puromycin-CPG
(PsoralenC6):Psoralen C6 Modified Oligo
DMTO
NH
O-succinyl-kaa-CPG
NHCOCF3
OCH3

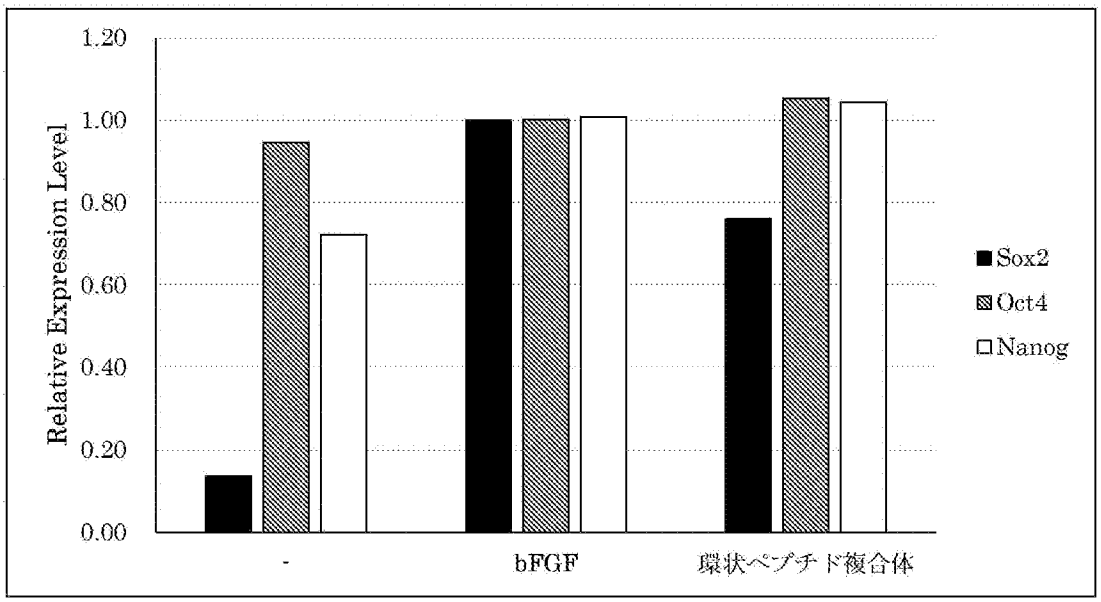
[図2]


800
700
600
500
400
300
200
100
0
生細胞数[cells/well]
0.001
0.01
0.1
1
10
ペプチド添加濃度[nmol/L]

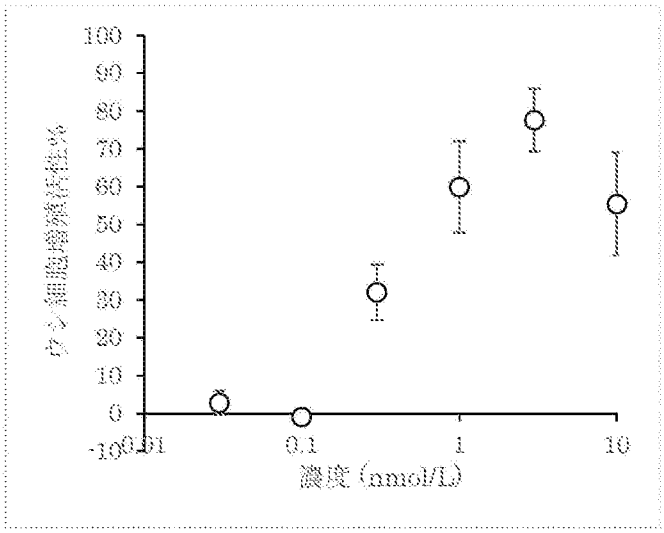
[図3]


120
100
80
60
40
20
0
規格化生細胞数
0.01
0.1
1
10
添加濃度[nmol/L]
環状ペプチド複合体
bFGF

[図4]


1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Relative Expression Level
-
bFGF
環状ペプチド複合体
Sox2
Oct4
Nanog

[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/010163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/00(2006.01)i; ***C07K 7/56***(2006.01)i; ***C12N 1/00***(2006.01)i; ***C12N 5/071***(2010.01)i; *C12N 15/11*(2006.01)n
FI: C07K7/00 ZNA; C07K7/56; C12N1/00 F; C12N5/071; C12N15/11 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K7/00; C07K7/56; C12N1/00; C12N5/071; C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2021-070652 A (AJINOMOTO CO., INC.) 06 May 2021 (2021-05-06) claims 1, 3, 9, 11, 14, 16, 19, 22, paragraph [0024], examples	1-27
Y	JP 2017-95443 A (FUJIFILM CORPORATION) 01 June 2017 (2017-06-01) claims, paragraphs [0095]-[0101], [0217]	1-27
A	WO 2022/115778 A1 (RAYZEBIO, INC.) 02 June 2022 (2022-06-02) entire text, all drawings	1-27
A	US 2009/0042802 A1 (PAN, Yijun) 12 February 2009 (2009-02-12) entire text, all drawings	1-27
A	JP 2009-511614 A (ENKAM PHARMACEUTICALS A/S) 19 March 2009 (2009-03-19) entire text, all drawings	1-27
A	JP 2008-504236 A (ENKAM PHARMACEUTICALS A/S) 14 February 2008 (2008-02-14) entire text, all drawings	1-27

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 May 2024	**04 June 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/010163

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/100724 A1 (KOBENHAVNS UNIVERSITET) 20 August 2009 (2009-08-20) entire text, all drawings	1-27
A	US 2004/0054131 A1 (BALLINGER, Marcus) 18 March 2004 (2004-03-18) entire text, all drawings	1-27
A	WO 2000/003245 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 20 January 2000 (2000-01-20) entire text, all drawings	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/010163

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/010163

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-070652 A	06 May 2021	(Family: none)	
JP 2017-95443 A	01 June 2017	US 2018/0230184 A1 claims, paragraphs [0184]-[0189], [0537] WO 2017/069269 A1 EP 3366693 A1 KR 10-2018-0041243 A CN 108137651 A	
WO 2022/115778 A1	02 June 2022	JP 2023-551539 A US 2023/0158179 A1 EP 4251639 A1 CN 116888138 A	
US 2009/0042802 A1	12 February 2009	(Family: none)	
JP 2009-511614 A	19 March 2009	WO 2007/045247 A2	
JP 2008-504236 A	14 February 2008	WO 2005/123759 A2	
WO 2009/100724 A1	20 August 2009	(Family: none)	
US 2004/0054131 A1	18 March 2004	WO 2000/018921 A2	
WO 2000/003245 A1	20 January 2000	AU 6309399 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/010163

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 7/00(2006.01)i; C07K 7/56(2006.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 15/11(2006.01)n
FI: C07K7/00 ZNA; C07K7/56; C12N1/00 F; C12N5/071; C12N15/11 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K7/00; C07K7/56; C12N1/00; C12N5/071; C12N15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2021-070652 A (味の素株式会社) 06.05.2021 (2021-05-06) [請求項1], [請求項3], [請求項9], [請求項11], [請求項14], [請求項16], [請求項19], [請求項22], [0024], 実施例	1-27
Y	JP 2017-95443 A (富士フイルム株式会社) 01.06.2017 (2017-06-01) [特許請求の範囲], [0095]-[0101], [0217]	1-27
A	WO 2022/115778 A1 (RAYZEBIO, INC.) 02.06.2022 (2022-06-02) 全文, 全図	1-27
A	US 2009/0042802 A1 (PAN, Yijun) 12.02.2009 (2009-02-12) 全文, 全図	1-27
A	JP 2009-511614 A (エンカム ファーマシューティカルズ アクティーゼルスカブ) 19.03.2009 (2009-03-19) 全文, 全図	1-27

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
23.05.2024	04.06.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
山▲崎▼　真奈 4I 7884

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2008-504236 A (エンカム ファーマシューティカルズ アクティーゼルスカブ) 14.02.2008 (2008-02-14) 全文, 全図	1-27
A	WO 2009/100724 A1 (KOBENHAVNS UNIVERSITET) 20.08.2009 (2009-08-20) 全文, 全図	1-27
A	US 2004/0054131 A1 (BALLINGER, Marcus) 18.03.2004 (2004-03-18) 全文, 全図	1-27
A	WO 2000/003245 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 20.01.2000 (2000-01-20) 全文, 全図	1-27

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/010163

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/010163

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-070652 A	06.05.2021	（ファミリーなし）	
JP 2017-95443 A	01.06.2017	US 2018/0230184 A1 Claims, [0184]-[0189], [0537] WO 2017/069269 A1 EP 3366693 A1 KR 10-2018-0041243 A CN 108137651 A	
WO 2022/115778 A1	02.06.2022	JP 2023-551539 A US 2023/0158179 A1 EP 4251639 A1 CN 116888138 A	
US 2009/0042802 A1	12.02.2009	（ファミリーなし）	
JP 2009-511614 A	19.03.2009	WO 2007/045247 A2	
JP 2008-504236 A	14.02.2008	WO 2005/123759 A2	
WO 2009/100724 A1	20.08.2009	（ファミリーなし）	
US 2004/0054131 A1	18.03.2004	WO 2000/018921 A2	
WO 2000/003245 A1	20.01.2000	AU 6309399 A	