(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
2022年1月13日(13.01.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/009992 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/50 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/026039

(22) 国際出願日： 2021年7月9日(09.07.2021)

(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 2020-119488 2020年7月10日(10.07.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 菅 裕明(**SUGA, Hiroaki**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). ルミット マイニ(**RUMIT, Maini**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

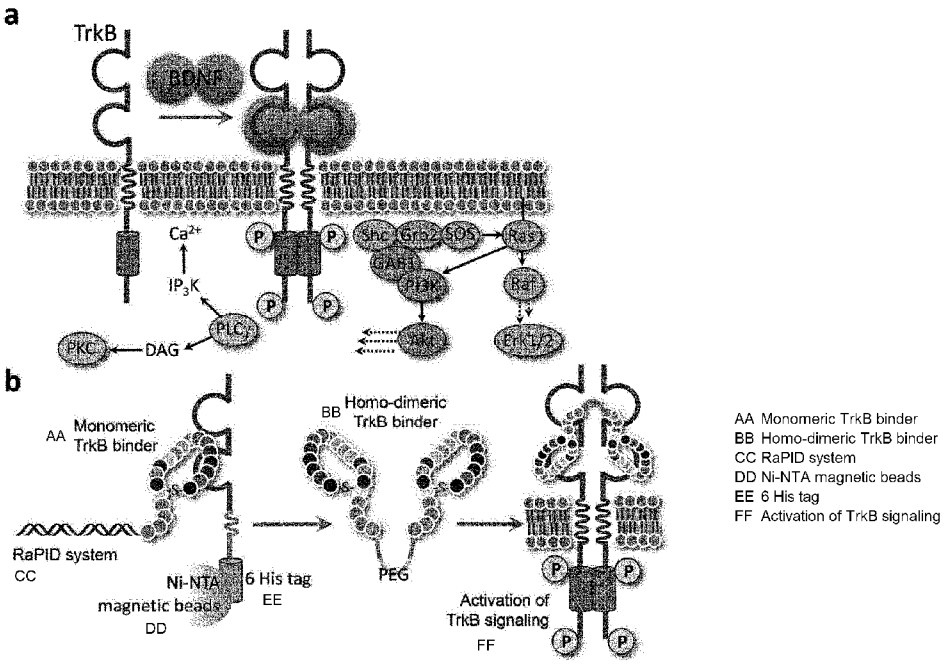
(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(**INABA, Yoshiyuki** et al.); 〒1066123 東京都港区六本木６－１０－１ 六本木ヒルズ森タワー２３階 ＴＭＩ総合法律事務所 Tokyo (JP).

(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,

(54) **Title:** CYCLIC PEPTIDE, PEPTIDE COMPLEX, AND DRUG COMPOSITION CONTAINING SAID CYCLIC PEPTIDE AND/OR SAID PEPTIDE COMPLEX

(54) 発明の名称: 環状ペプチド、ペプチド複合体、並びに、当該環状ペプチド及び／又は当該ペプチド複合体を含む医薬組成物

$$-Xaa^1-(Xaa^2)_{n1}-Xaa^3-Xaa^4- \quad (1)$$



(57) **Abstract:** The present invention relates to a cyclic peptide that contains a structure represented by formula (1) (In formula (1), Xaa^1 is a basic amino acid, Xaa^2 is any amino acid, Xaa^3 and Xaa^4 are each independently a basic amino acid or an aromatic amino acid, and n1 is an integer from 0-10.) or a pharmacologically acceptable salt of

WO 2022/009992 A1

［続葉有］

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

the cyclic peptide.

(57) 要約:本発明は、下記式(1): (式(1)中、Xaa[1]は、塩基性アミノ酸であり、Xaa[2]は、任意のアミノ酸であり、Xaa[3]、及びXaa[4]は、各々独立に、塩基性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸であり、n1は、0～10の整数を示す。)で表される構造を含む、環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩に関する。

明　細　書

発明の名称 ：

環状ペプチド、ペプチド複合体、並びに、当該環状ペプチド及び／又は当該ペプチド複合体を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、環状ペプチド、ペプチド複合体、並びに、当該環状ペプチド及び／又は当該ペプチド複合体を含む医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] ニューロトロフィンは、脳の全域におけるニューロン細胞及びネットワークについて、発生、機能及び生存を調節する内因性ポリペプチドである。近年、ニューロトロフィンファミリーメンバーの中で、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）は、神経学的障害及び精神医学的障害のための潜在的治療の主要な候補として浮上している（非特許文献１、２）。

ＢＤＮＦは、異なるクラスの２つの受容体であるトロポミオシン関連キナーゼ受容体Ｂ型（ＴｒｋＢ）及びニューロトロフィン受容体ｐ７５に対する天然リガンドとして作用し、ｐ７５よりも少なくとも１０倍高い親和性でＴｒｋＢに結合することが知られている（非特許文献３）。ＴｒｋＢ、及びそのリガンドであるＢＤＮＦは、大脳皮質、海馬、脳幹及び脊髄核を含む成体哺乳類の脳で広く発現している（非特許文献４）。

[0003] ＴｒｋＢは、膜貫通型チロシンキナーゼ受容体蛋白質であり、トロポミオシン関連キナーゼ（ＴｒＫ）ファミリーに属し、ＢＤＮＦに結合すると、細胞質側のＣ末端ドメイン近傍のチロシン残基が自己リン酸化を受ける（図１（ａ））（非特許文献１、５）。ＢＤＮＦによるＴｒｋＢのリン酸化により、ＰＬＣγ、ＰＩ３Ｋ、及びＭＥＫ－ＥＲＫ経路という３つの主要な下流経路が活性化される（非特許文献１）。

ホスホリパーゼＣ－γ１（ＰＬＣγ１）のリン酸化は、イノシトール三リン酸（ＩｎｓＰ$_3$）とジアシルグリセロール（ＤＡＧ）の生成をもたらす。こ

の生成は、細胞内カルシウムストアを放出することにより、カルシウム依存性プロテインキナーゼの活性化を介してシナプス可塑性に影響を与える。ホスホイノシチド３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）の活性化は、プロテインキナーゼＢ（ＡＫＴ）の刺激をもたらすが、それはアポトーシス促進性タンパク質の抑制をもたらし、最終的に細胞生存を促進する（非特許文献６）。発生段階における、ＢＤＮＦが関連する神経突起伸長、細胞分化、及びニューロンの生存は、マイトジェン活性化キナーゼキナーゼ１／２（ＭＥＫ１／２）及び細胞外シグナル制御キナーゼ１／２（ＥＲＫ１／２）の下流での刺激が関係している。更に、ＭＥＫ－ＥＲＫ経路の活性化は、成体脳におけるニューロンの構造及び機能の維持と関連している（非特許文献１、６）。

[0004] これに関連し、ＢＤＮＦの神経栄養作用が、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、パーキンソン病、及びアルツハイマー病等の種々の神経学的疾患にポジティブな影響を及ぼすことが示されている（非特許文献７～１１）。

げっ歯類ＡＬＳモデルでは、ＢＤＮＦを投与することにより、変性運動ニューロンの生存を導き、軸索切断した運動ニューロンを回復させた（非特許文献７）。非ヒト霊長類では、ＢＤＮＦタンパク質の注入が有益な解剖学的及び行動学的効果を示し、げっ歯類では、ＢＤＮＦ処置により黒質でのドーパミン作動性ニューロンの喪失が予防された。なお、両モデルともパーキンソン症候群が化学的に誘発されたものである（非特許文献９、１０）。アミロイド前駆体タンパク質の突然変異型を発現するトランスジェニックマウスモデルでは、ＢＤＮＦは学習と記憶を改善し、貫通線維病変後の成体ラットでは、神経細胞死を抑制した（非特許文献１１）。

[0005] 以上のように、ＢＤＮＦ療法は、様々な神経学的疾患に対する治療方法として大きな可能性を持つため、これまで、組換えＢＤＮＦを用いた臨床試験を含む、ＢＤＮＦ療法に関する種々の研究がなされている（非特許文献１２、１３、１４）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Liu, C., Chan, C.B., and Ye, K. (2016). 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. Transl Neurodegener 5, 2.

非特許文献2：Nagahara, A.H., and Tuszynski, M.H. (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov 10, 209-219.

非特許文献3：Pattarawarapan, M., and Burgess, K. (2003). Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. J Med Chem 46, 5277-5291.

非特許文献4：Yan, Q., Radeke, M.J., Matheson, C.R., Talvenheimo, J., Welcher, A.A., and Feinstein, S.C. (1997). Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult (vol 378, pg 135, 1997). J Comp Neurol 382, 546-547.

非特許文献5：Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. Cell 66, 395-403.

非特許文献6：Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. Dev Neurobiol 70, 304-322.

非特許文献7：Ekestern, E. (2004). Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegener Dis 1, 88-100.

非特許文献8：Levivier, M., Przedborski, S., Bencsics, C., and Kang, U.J. (1995). Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci 15, 7810-7820.

非特許文献9：Levivier, M., Przedborski, S., Bencsics, C., and Kang, U

.J. (1995). Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci 15, 7810-7820.

非特許文献10：Tsukahara, T., Takeda, M., Shimohama, S., Ohara, O., and Hashimoto, N. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. Neurosurgery 37, 733-739; discussion 739-741.

非特許文献11：Nagahara, A.H., Merrill, D.A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B.E., Shaked, G.M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J.M., et al. (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. Nat Med 15, 331-337.

非特許文献12：Ochs, G., Penn, R.D., York, M., Giess, R., Beck, M., Tonn, J., Haigh, J., Malta, E., Traub, M., Sendtner, M., et al. (2000). A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1, 201-206.

非特許文献13：Thoenen, H., and Sendtner, M. (2002). Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. Nat Neurosci 5 Suppl, 1046-1050.

非特許文献14：Chao, M.V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. J Neurobiol 25, 1373-1385.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、従来のＢＤＮＦ療法は、ＢＤＮＦの不十分な送達性と短いｉｎ　ｖｉｖｏ半減期のために、十分効果を有する治療方法として確立され

ていない（非特許文献１２、１３）。また、ＢＤＮＦがｐ７５に結合すると細胞死経路が活性化されることが知られており（非特許文献１４）、オフターゲット効果を緩和するために用量調節が必要である。

[0008] したがって、ＢＤＮＦに代わる、ＴｒｋＢに結合し得る新規な化合物が求められている。

[0009] 本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、ＴｒｋＢに結合し得る新規な化合物、及び／又は下流のＴｒｋＢシグナル伝達を選択的に誘起し得る化合物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 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、特定の構造を有する環状ペプチドがＴｒｋＢに結合し、また、特定の構造を有する環状ペプチドのペプチド複合体が下流のＴｒｋＢシグナル伝達を選択的に誘起しうることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は以下のとおりである。

［１］

下記式（１）：

[化1]

$$-Xaa^{1}-(Xaa^{2})_{n1}-Xaa^{3}-Xaa^{4}- \quad (1)$$

（式（１）中、

Xaa^{1}は、塩基性アミノ酸であり、

Xaa^{2}は、任意のアミノ酸であり、

Xaa^{3}、及びXaa^{4}は、各々独立に、塩基性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸であり、

ｎ１は、０～１０の整数を示す。）

で表される構造を含む、環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［２］

前記式（１）で表される構造は、下記式（２）：

[化2]

$$-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp- \qquad (2)$$

（式（２）中、

Xaa^{2}及びｎ１は、前記と同義である。）

で表される構造のいずれかである、［１］に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［３］

前記環状ペプチドの環状構造が$N-CO-CH_{2}-S$構造を含む、［１］又は［２］に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［４］

前記Ｎがチロシンのアミノ基に由来する、［３］に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［５］

前記Ｓがシステインのチオール基に由来する、［３］又は［４］に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［６］

前記環状ペプチドの環状構造を形成するアミノ酸残基の数が、６～２０個である、［１］～［５］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［７］

下記式（３）～（８）で表される環状構造のいずれか１つを含む、環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[化3]



（３）

[化4]



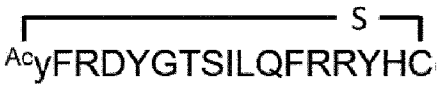
（4）

[化5]



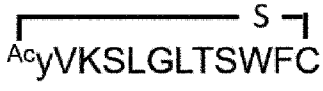
（5）

[化6]



（6）

[化7]



（7）

[化8]



（8）

（式（３）～（８）中、Ａｃは－ＣＨ$_2$－ＣＯ－であり、ＹはＬ－チロシンであり、ｙはＤ－チロシンである。）

［８］

前記環状ペプチドが更に１～２０のアミノ酸で構成される直鎖状構造を含む、［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［９］

２つの［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチドを含み、一方の環状ペプチドが他方の環状ペプチドとリンカーにより連結している、ペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［１０］

前記２つの環状ペプチドが同一である、［９］に記載のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［１１］

前記リンカーの長さが２０Å以上２００Å以下である、［９］又は［１０］に記載のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［１２］

ＴｒｋＢのリン酸化を誘導する、［９］～［１１］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

［１３］

［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つを含む、医薬組成物。

［１４］

神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防に用いられる、［１３］に記載の医薬組成物。

[0012] 本発明は以下の更なる実施態様をも提供する。

［１５］

［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つと、薬理学的に許容可能な添加剤と、を含む、医薬組成物。

［１５Ａ］

神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防に用いられる、［１５］に記載の医薬組成物。

［１６］

［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的

に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つを含む、ＴｒｋＢ結合剤。

［１６Ａ］

ヒトＴｒｋＢ結合剤である、［１６］に記載のＴｒｋＢ結合剤。

［１６Ｂ］

ＴｒｋＢのリン酸化を誘導する、［１６］又は［１６Ａ］に記載のＴｒｋＢ結合剤。

［１６Ｃ］

［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つを含む、ＴｒｋＢのリン酸化誘導剤、ニューロン遺伝子の活性化誘導剤、又は軸索の伸長促進剤。

［１７］

［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つを投与することを含む、神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防方法。

［１８］

神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防のための医薬組成物を製造するための、［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つの使用。

［１９］

神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防のための

、［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つ。

［１９Ａ］

神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防のための、［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、若しくはその薬理学的に許容可能な塩、又は、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、若しくはその薬理学的に許容可能な塩。

［２０］

神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防のための、［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つの使用。

[0013] 本発明は以下の更なる実施態様であってもよい。

［１６］～［１６Ｃ］におけるＴｒｋＢの結合剤、ＴｒｋＢのリン酸化誘導剤、ニューロン遺伝子の活性化誘導剤、又は軸索の伸長促進剤は、神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防に用いられるものであってよい。

また、［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つは、ＴｒｋＢへの結合（好ましくはヒトＴｒｋＢへの結合）、ＴｒｋＢのリン酸化誘導、ニューロン遺伝子の活性化誘導、又は軸索の伸長促進により、［１７］～［２０］における神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防に用いられてもよい。

[0014] ［１］～［７］のいずれか１つに記載の環状ペプチド、及びその薬理学的

に許容可能な塩、並びに、［９］～［１２］のいずれか１つに記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩としては、本明細書において記載する態様、並びに本明細書において好ましい、より好ましい、及び更に好ましいとして記載する態様（これらの全ての態様を総称して、好ましい態様ともいう）の任意の組み合わせであり得る。

発明の効果

[0015] 本発明は、ＴｒｋＢに結合し得る新規な化合物、及び／又は下流のＴｒｋＢシグナル伝達を選択的に誘起し得る化合物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]（ａ）ＢＤＮＦはＴｒｋＢのリン酸化を誘導し、その結果、ホスホリパーゼＣγ（ＰＬＣγ）、ホスホイノシチド３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）、並びに、マイトジェン活性化キナーゼキナーゼ及び細胞外シグナル制御キナーゼ（ＭＥＫ－ＥＲＫ）の３つの主要な下流経路を活性化する。本明細書中、主にＭＥＫ－ＥＲＫ経路に着目し、発生段階の神経突起の伸長、細胞分化、及び神経細胞の生存に関与していることを明らかにした。（ｂ）ＲａＰＩＤシステムで発見された抗ＴｒｋＢ大環状ペプチドを、適当な長さのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーを用いて、ホモ二量体の大環状体に変換した。得られたホモ二量体ペプチドは、さらにＢＤＮＦ模倣体の発見に利用された。

[図2]固相ペプチド合成化学を用いたホモ二量体大環状ペプチドの合成方法を示す。

[図3]（ａ）フレキシブルインビトロ翻訳（ＦＩＴ）システムを用いたチオエーテル－環状ペプチドライブラリーの生成戦略。（ｂ）本明細書中で使用したＲａＰＩＤスクリーニングアプローチの模式図。

[図4]ＴｒｋＢへの親和性のための最初のＲａＰＩＤスクリーニングから同定されたペプチド配列の選択結果。アフィニティー選択の進捗状況を、Ｄ－ライブラリーおよびＬ－ライブラリーのそれぞれについて、各ラウンドのアフィニティー選択で生成された総分子数に対する、ＴｒｋＢ－ビーズ複合体（

赤）または単なるビーズ（青）に結合した分子数の比率として表した。

[図5]Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００で分析したＴｒｋＢ結合モノマーペプチドのＳＰＲセンサーグラムを１～１０００ｎＭの濃度範囲で表示する。測定した曲線とフィッティングした曲線をそれぞれ青と赤で示す。

[図6]Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００で分析したＴｒｋＢ結合ホモ二量体ペプチドのＳＰＲセンサーグラムを１～１０００ｎＭの濃度範囲で表示する。測定した曲線を青、フィッティングした曲線を赤で示す。

[図7]（ａ）リン酸化されたＴｒｋ（Ｐ－Ｔｒｋ）のウェスタンブロットによるＤｉＴｒｂＬ３のスクリーニングの代表的な結果。マウス初代培養海馬ニューロン（ＤＩＶ６）をＤＭＳＯ、ＢＤＮＦ（０．１ｎＭ）、又はＤｉＴｒｂＬ３（１ｎＭ）で１５分間処理した。内部コントロール（ＴｒｋＢ）には抗ＴｒｋＢ抗体を使用した。（ｂ）ＴｒｋＢのキナーゼドメインに対する選択的阻害剤であるＡＮＡ－１２を用いて、ＤｉＴｒｂＬ３の標的特異性を評価した。ペプチド処理の３０分前にＡＮＡ－１２（１００μＭ）を培地に添加した。（ｃ）Ｔｒｋのリン酸化の半定量的結果。ＴｒｋＢのリン酸化レベルを総ＴｒｋＢで正規化し、その後、ＤＭＳＯ処理群の平均で正規化した。エラーバーは平均値の標準誤差（s.e.m.）を示し、各グループｎ＝３である。＊＊：ｐ＜０．０１（ＤＭＳＯと比較）、＃＃：ｐ＜０．０１（１００μＭ　ＡＮＡ－１２及び１ｎＭ　ＤｉＴｒｂＬ３と、１ｎＭ　ＤｉＴｒｂＬ３との間で比較）。統計解析には、一方向ＡＮＯＶＡを用い、その後、Ｔｕｋｅｙ／Ｋｒａｍｅｒの多重比較検定を行った。

[図8]マウス初代培養海馬ニューロン（ＤＩＶ６）をＤＭＳＯ（ペプチドのネガティブコントロール）、ＢＤＮＦ（０．１ｎＭ）、又はＤｉＴｒｂＬ３（１ｎＭ）で１５分間処理した。ペプチドを処理する３０分前にＡＮＡ１２（１００μＭ）を培地に添加した。（ａ）リン酸化Ａｋｔ（Ｓ４７３におけるＰ－Ａｋｔ）についての代表的なウェスタンブロット。（ｂ）リン酸化Ｅｒｋ１／２（Ｐ－Ｅｒｋ１／２）についての代表的なウェスタンブロット。（ｃ－ｅ）（ｃ）Ａｋｔ、（ｄ）Ｅｒｋ１、（ｅ）Ｅｒｋ２のリン酸化レベル

の定量的結果。矢印はそれぞれＥｒｋ１（４４ｋＤａ）、Ｅｒｋ２（４２ｋＤａ）を示す。各キナーゼの相対的なリン酸化レベルは、ＤＭＳＯ処理群の平均で正規化した。エラーバーは標準誤差（s.e.m.）を示し、各グループｎ＝３である。＊＊：ｐ＜０．０１（ＤＭＳＯと比較）、＃＃：ｐ＜０．０１、＃：ｐ＜０．０５（ＡＮＡ－１２及び１ｎＭ　ＤｉＴｒｂＬ３と、１ｎＭ　ＤｉＴｒｂＬ３との間で比較）。統計解析には、一方向ＡＮＯＶＡを用い、その後、Ｔｕｋｅｙ／Ｋｒａｍｅｒの多重比較検定を行った。

[図9]リン酸化ＲＴＫアレイの結果を示す。４０種類のＲＴＫが含まれる市販のリン酸化ＲＴＫアレイを用いた（下段）。初代培養海馬ニューロン（ＤＩＶ６）を刺激剤で１５分間インキュベートした。ＤｉＴｒｂＬ３処理の３０分前にＡＮＡ－１２（１００μM）を添加した。各スポットは各ＲＴＫのリン酸化レベルを示す。赤色の四角い部分は、重複したＴｒｋＢスポットを示している。

[図10]ＲＴＫアレイにおけるＴｒｋＢのデンシトメトリー分析を示す。ＴｒｋＢの各スポットのリン酸化レベルをＤＭＳＯ処理群の平均で正規化した。

[図11]培養した皮質ニューロン（ＤＩＶ６）を、ＢＤＮＦ（１ｎM）またはＤｉＴｒｂＬ３（１ｎM）で１時間処理し、その後、（ａ）ｃ－ｆｏｓ、（ｂ）ＡｒｃのｍＲＮＡ発現をｑＲＴ－ＰＣＲにより評価した。各処理についてｎ＝３である。エラーバーは平均値の標準誤差（s.e.m.）を示す。＊＊：ｐ＜０．０１（ＤＭＳＯと比較）。統計解析には、一方向ＡＮＯＶＡを用い、その後、Ｔｕｋｅｙ／Ｋｒａｍｅｒの多重比較検定を行った。

[図12]（ａ）ＤｉＴｒｂＬ３ペプチドで処理した初代培養海馬ニューロンの代表的な画像。海馬ニューロンを、１、１０、若しくは１００ｎMのＤｉＴｒｂＬ３、又は２ｎMのＢＤＮＦでＤＩＶ０から３まで処理し、核染色（ＤＡＰＩ；青）と共に、抗Ｔａｕ抗体（赤）、及び抗ＭＡＰ２抗体（緑）を用いて免疫細胞化学を行った。軸索は、Ｔａｕ陽性およびＭＡＰ２陰性のニューライトとして同定した。各軸索の長さをＮｅｕｒｏｎ　Ｊ４４で定量した。スケールバーは５０μｍを示す。（ｂ）軸索伸長実験の定量的結果（ＤＭ

ＳＯはｎ＝６０、ＢＤＮＦはｎ＝２０、ＤｉＴｒｂＬ３の各濃度はｎ＝３０）。エラーバーは平均値の標準誤差（s.e.m.）を示す。＊＊：ｐ＜０．０１（ＤＭＳＯと比較）。統計解析には、一方向ＡＮＯＶＡを用い、その後、Ｔｕｋｅｙ／Ｋｒａｍｅｒの多重比較検定を行った。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の本実施形態に制限されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

[0018] 本明細書中、「薬理学的に許容可能な塩」とは、例えば、医薬として許容される塩基や酸との塩を含むものである。

薬理学的に許容可能な塩の非限定的な具体例としては、無機酸（塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等）の付加塩、有機酸（ｐ－トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、ｐ－ブロモフェニルスルホン酸、カルボン酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等）の付加塩、無機塩基（水酸化アンモニウム又はアルカリ若しくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等）の付加塩、及びアミノ酸の付加塩等が挙げられる。

[0019] ［環状ペプチド］

本発明の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩は、下記式（１）：

[化9]

$$-Xaa^{1}-(Xaa^{2})_{n1}-Xaa^{3}-Xaa^{4}- \qquad (1)$$

で表される構造を環状構造の部分構造として含む。

上記式（１）中、

Xaa^{1}は、塩基性アミノ酸であり、

Xaa^{2}は、任意のアミノ酸であり、

Xaa^{3}、及びXaa^{4}は、各々独立に、塩基性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸であり、

ｎ１は、０～１０の整数を示す。

[0020] 本明細書において、「環状ペプチド」とは、５以上のアミノ酸により形成される環状構造を分子内に少なくとも有することを意味する。環状ペプチドの分子構造は、環状構造以外に、アミノ酸がペプチド結合により連結した鎖状構造を有していてもよく、また、ペプチド構造以外の構造を有していてもよい。

本明細書において、「環状構造」とは、直鎖状ペプチドにおいて、３アミノ酸残基以上離れた２つのアミノ酸が直接に、又はリンカー等を介して結合することによって分子内に形成される閉環構造を意味する。

本明細書において、「３アミノ酸残基以上離れた」とは、閉環構造を形成する２つのアミノ酸の間に存在するアミノ酸残基の個数が、少なくとも３であることを意味する。

[0021] 環状構造における閉環構造は特に限定されないが、２つのアミノ酸が、必要に応じてリンカー等を介して共有結合することにより形成される。

２つのアミノ酸間の共有結合としては、例えば、ジスルフィド結合、ペプチド結合、アルキル結合、アルケニル結合、エステル結合、チオエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ホスホネートエーテル結合、アゾ結合、Ｃ－Ｓ－Ｃ結合、Ｃ－Ｎ－Ｃ結合、Ｃ＝Ｎ－Ｃ結合、アミド結合、ラクタム架橋、カルバモイル結合、尿素結合、チオ尿素結合、アミン結合、及びチオアミド結合等が挙げられる。

また、２つのアミノ酸間の共有結合は、２つのアミノ酸の側鎖同士、２つのアミノ酸の主鎖同士、又は、２つのアミノ酸の側鎖と主鎖との結合等により形成されてもよい。２つのアミノ酸がアミノ酸の主鎖において結合する場合、ペプチド結合により閉環構造が形成される。

[0022] 環状構造は、直鎖状ペプチドのＮ末端とＣ末端のアミノ酸の結合に限られず、末端のアミノ酸と末端以外のアミノ酸との結合、又は末端以外のアミノ酸同士の結合により形成されてもよい。環状構造を形成のために結合するアミノ酸の一方が末端アミノ酸で、他方が非末端アミノ酸である場合、環状ペ

プチドは、環状構造に直鎖のペプチドが尾のように付いた構造を有する。

環状構造に直鎖のペプチドが尾のように付いた構造を有する場合、直鎖状ペプチドにおける環状構造を構成するアミノ酸のＣ末端に直鎖のペプチドが結合していることが好ましい。言い換えれば、直鎖状ペプチドにおけるＮ末端と、Ｃ末端以外のアミノ酸とが結合して環状構造を形成することが好ましい。

[0023] 環状構造を形成するアミノ酸としては、天然アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体及び／又は誘導体を含み、例えば、天然タンパク質Ｌ－アミノ酸、非天然アミノ酸、及びアミノ酸の特徴として当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物等が挙げられる。

タンパク質性アミノ酸（proteinogenic amino acids）は、当業界に周知の３文字表記により表すと、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｌａ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、及びＶａｌである。また、タンパク質性アミノ酸は、当業界に周知の１文字表記により表すと、Ｒ、Ｈ、Ｋ、Ｄ、Ｅ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｃ、Ｇ、Ｐ、Ａ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、及びＶである。

非タンパク質性アミノ酸（non-proteinogenic amino acids）としては、タンパク質性アミノ酸以外の天然又は非天然のアミノ酸を意味する。

非天然アミノ酸としては、例えば、主鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸（α，α－二置換アミノ酸（α－メチルアラニン等）、Ｎ－アルキルアミノ酸、Ｄ－アミノ酸、β－アミノ酸、γ－アミノ酸、δ－アミノ酸、及びα－ヒドロキシ酸等）；側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸（ノルロイシン、及びホモヒスチジン等）；側鎖に余分なメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、及びホモヒスチジン等）；及び、側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されているアミノ酸（システイン酸等）等が挙げられる。非天然アミノ酸の具体例としては、国際公開第２０１５／０３００１４号に記載のアミノ酸が挙げられる。

[0024] 環状構造を形成するアミノ酸残基の数は５以上であれば特に限定されないが、例えば、６以上、７以上、８以上、９以上、又は１０以上であってもよく、３０以下、２５以下、２０以下、１７以下、又は１５以下であってもよい。

環状構造を形成するアミノ酸の数は、通常５以上３０以下であり、５以上３０以下の範囲内で、環状構造を形成するアミノ酸の数を６以上、８以上、又は１０以上としてもよく、３０以下、２５以下、２０以下、又は１５以下としてもよい。

環状構造を形成するアミノ酸の数は、６以上２０以下としてもよく、８以上２０以下としてもよく、８以上１９以下としてもよく、９以上１８以下としてもよく、９以上１７以下としてもよく、１０以上１７以下としてもよく、１０以上１６以下としてもよい。

環状構造を形成するアミノ酸の数は、ＴｒｋＢとの親和性をより高める観点から、好ましくは８以上１７以下、より好ましくは９以上１５以下、さらに好ましくは１０以上１４以下である。

[0025] 本発明において、環状ペプチドは、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ＡＤＰリボシル化、糖鎖付加、及びポリエチレングリコールの付加等の修飾が加えられたものであってもよく、他のペプチド及び／又はタンパク質と融合させたものであってもよい。また、環状ペプチドは、適当なリンカーを介して、ビオチン化されていてもよい。

また、本発明において、環状ペプチドは、１つの環状構造を有する環状ペプチド２つがリンカー構造を介して結合している、分子内に２つの環状構造を有する二量体であってもよく、分子内でラクタム構造を形成した分子内ラクタムブリッジ構造を有していてもよい。なお、本明細書中、上記式（１）で表される構造を有する環状構造を含む環状ペプチド２つが、リンカー構造を介して結合している環状ペプチドの二量体は、後述するように「ペプチド複合体」と称する。

２つの環状ペプチドを繋ぐリンカー構造としては、特に限定されず、ペプ

チド合成分野においてペプチド同士を繋ぐリンカーとして周知の構造のものを採用することができる。

分子内ラクタムブリッジ構造は、環状ペプチドを構成するアミノ酸の側鎖同士が結合することによって形成されてよく、例えば、Ｌｙｓの側鎖のアミノ基と、Ａｓｐ又はＧｌｕの側鎖のカルボキシル基が結合して、ペプチド結合を形成することにより、分子内ラクタム構造が形成されてもよい。そのような環状ペプチドは、分子内にブリッジ構造として、もう１つの環状構造を有する。Ｌｙｓに代えて、例えば、ＤＡＰ、ＤＡＢ、又はＯｒｎがＡｓｐ又はＧｌｕと結合していてもよい。

[0026] 本明細書において、塩基性アミノ酸とは、分子内に塩基性を示す側鎖をもつアミノ酸であれば特に限定されるものではないが、タンパク質性アミノ酸で例示すれば、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、及びＴｒｐ等が挙げられる。

本明細書において、芳香族アミノ酸とは、分子内に芳香族環を側鎖にもつアミノ酸であれば特に限定されるものではないが、タンパク質性アミノ酸で例示すれば、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、及びＴｙｒ等が挙げられる。

[0027] 上記式（１）で表される構造において、Xaa^{1}は、塩基性アミノ酸であり、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、又はＴｒｐであってよく、好ましくはＡｒｇ又はＬｙｓであり、より好ましくはＡｒｇである。

上記式（１）で表される構造において、Xaa^{3}、及びXaa^{4}は、各々独立に、塩基性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸であり、Xaa^{3}－Xaa^{4}は、塩基性アミノ酸－塩基性アミノ酸、塩基性アミノ酸－芳香族アミノ酸、芳香族アミノ酸－塩基性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸－芳香族アミノ酸として任意の組み合わせであり得る。Xaa^{3}－Xaa^{4}中、塩基性アミノ酸としては、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、又はＴｒｐであってよく、Ａｒｇ及びＬｙｓが好ましく、芳香族アミノ酸としては、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、Ｐｈｅ、又はＴｙｒであってよく、Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、及びＴｙｒが好ましく、Ｔｒｐ及びＰｈｅがより好ましい。Xaa^{3}－Xaa^{4}中、塩基性アミノ酸がＬｙｓ又はＡｒｇであり、芳香族アミノ酸がＰｈｅ、Ｔｒｐ、又はＴｙｒである任意の組み

合わせであってよく、例えば、Ｐｈｅ－Ｔｒｐ、Ｐｈｅ－Ａｒｇ、Ｔｙｒ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ｔｙｒ、Ｔｙｒ－Ｔｒｐ、Ｔｒｐ－Ｐｈｅ、Ａｒｇ－Ｌｙｓ、及びＡｒｇ－Ｐｈｅ等が挙げられる。Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}の好ましい一態様としては、例えばＰｈｅ－Ｔｒｐ、Ａｒｇ－Ｔｙｒ、及びＴｒｐ－Ｐｈｅが挙げられる。

上記式（１）で表される構造において、ｎ１は、０～１０の整数を示すが、当該範囲内で、１以上、２以上、３以上、４以上、５以上、又は６以上であることが好ましく、９以下、又は８以下であることが好ましい。

上記式（１）中、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}及びｎ１は、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}及びｎ１として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

[0028] 本発明において、上記式（１）で表される構造は、好ましくは、下記式（２）：

[化10]

$$-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp- \qquad (2)$$

で表される構造である。

上記式（２）中、Ｘａａ^{2}及びｎ１は、上記式（１）で表される構造において記載するＸａａ^{2}及びｎ１に関する前記と同義であり、Ｘａａ^{2}及びｎ１として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

[0029] 本発明の環状ペプチドは、好ましくは、下記式（９）：

[化11]

$$(Z^{1})_{m}-Xaa^{1}-(Xaa^{2})_{n1}-Xaa^{3}-Xaa^{4}-(Z^{2})_{n} \qquad (9)$$

で表される構造を環状構造として含む。

[0030] 上記式（９）中、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}、及びｎ１は、上記式（１）で表される構造において記載するＸａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}、及びｎ１に関する前記と同義であり、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}、及びｎ１として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する

構造であり得る。

すなわち、上記式（９）は、上記式（１）で表される構造のＮ末端側に、（Ｚ^{1}）$_{m}$を、Ｃ末端側に（Ｚ^{2}）$_{n}$を結合した構造である。

上記式（９）において、ｍ及びｎは、任意の１以上の整数である。

Ｚ^{1}とＺ^{2}は、それぞれ独立して、任意のアミノ酸から選択され、Ｚ^{1}とＺ^{2}それぞれにおける１のアミノ酸が環状構造を形成することにより、環状ペプチドを形成することが好ましい。当該環状構造は、Ｎ末端のＺ^{1}が、Ｃ末端のＺ^{2}と結合して形成されていてもよく、Ｎ末端のＺ^{1}が、非Ｃ末端のＺ^{2}と結合して形成されていてもよく、非Ｎ末端のＺ^{1}が、Ｃ末端のＺ^{2}と結合して形成されていてもよく、非Ｎ末端のＺ^{1}が、非Ｃ末端のＺ^{2}と結合して形成されていてもよい。

非末端のＺ^{1}又はＺ^{2}が結合することにより、環状ペプチドは環状構造に直鎖のペプチドが尾のように付いた構造を有するため、好ましくは、Ｎ末端のＺ^{1}が、非Ｃ末端のＺ^{2}と結合して環状構造が形成される。また、Ｚ^{1}とＺ^{2}とが、リンカーを介して環状構造となっていてもよい。

ｍ及びｎについて、ｍ＋ｎが２以上であるが、ｍ及びｎは、ｍ＋ｎが２以上２０以下となるような範囲でそれぞれ独立して選択されることが好ましい。ｍ及びｎは、ｍ＋ｎが２以上２０以下となるような範囲で、環状構造を形成するアミノ酸の数が上述の好ましい範囲内となるようにそれぞれ独立して選択されることが好ましい。

Ｚ^{1}とＺ^{2}は、環状構造を形成するアミノ酸以外に、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ等の分岐鎖側鎖を有するアミノ酸や、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ等の側鎖に水酸基を有するアミノ酸や、塩基性アミノ酸や芳香族アミノ酸を含んでいてもよく、Ｌｅｕ又はＳｅｒを含むことが好ましい。

上記式（９）中、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}、Ｚ^{1}、Ｚ^{2}、ｍ、ｎ及びｎ１は、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}、Ｚ^{1}、Ｚ^{2}、ｍ、ｎ及びｎ１として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

[0031] 上記式（９）中、－Ｘａａ^{1}－（Ｘａａ^{2}）$_{n1}$－Ｘａａ^{3}－Ｘａａ^{4}－の部分構造は、上記式（２）で表される構造であることが好ましい。この場合、本発明の環状ペプチドは、下記式（１０）：

[化12]

$$(Z^{1})_{m}-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp-(Z^{2})_{n} \qquad (10)$$

で表される構造を環状構造として含む。

上記式（１０）中、Ｘａａ^{2}、Ｚ^{1}、Ｚ^{2}、ｍ、ｎ及びｎ１は、上記式（１）及び上記式（９）で表される構造において記載するＸａａ^{2}、Ｚ^{1}、Ｚ^{2}、ｍ、ｎ及びｎ１に関する前記と同義であり、Ｘａａ^{2}、Ｚ^{1}、Ｚ^{2}、ｍ、ｎ及びｎ１として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

[0032] 環状ペプチドは、Ｎ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｓ構造（すなわち、－ＮＨ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｓ－構造）を有していると好ましく、Ｎ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｓ構造により環状構造を形成していてもよい。また、当該環状構造は、環状構造を形成する前のペプチドのＮ末端のアミノ基に結合した、Ｈが脱離基Ｘで置換されたアセチル基と、Ｃ末端側のシステイン（Ｃｙｓ）におけるチオール基との結合により形成されることが好ましい。Ｈが脱離基Ｘで置換されたアセチル基としては、特に限定されず、例えば、クロロアセチル基等が挙げられる。そのような態様としては、例えば、下記式（１１）：

[化13]

$$XCH_{2}CO-(Z^{3})-(Z^{4})_{p}-Xaa^{1}-(Xaa^{2})_{n1}-Xaa^{3}-Xaa^{4}-(Z^{5})_{q}-Cys-(Xaa')_{r} \qquad (11)$$

で表されるペプチドにおいて、ＸＣＨ$_{2}$ＣＯと、Ｃｙｓのチオール基とが結合することにより環状構造が形成される場合が挙げられる。

[0033] 上記式（１１）中、Ｚ^{3}、Ｚ^{4}、Ｚ^{5}、及びＸａａ’は、それぞれ独立して、任意のアミノ酸であり、ｐはｍ－１の整数を示し、ｑはｎ－１の整数を示し、それぞれ、０以上１８以下の整数を示す。ｐ及びｑは、好ましくは、ｐ＋

ｑが０以上１８以下となるような範囲で、環状構造を形成するアミノ酸の数が上述の好ましい範囲内となるように独立して適宜選択される。

上記式（１１）中、Ｘａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}及びｎ１は、上記式（１）及び上記式（９）で表される構造において記載するＸａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}及びｎ１に関する前記と同義であり、上記式（１）及び上記式（９）で表される構造において記載するＸａａ^{1}、Ｘａａ^{2}、Ｘａａ^{3}、Ｘａａ^{4}及びｎ１として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。また、上記式（１１）中、Ｚ^{4}及びＺ^{5}は、上記式（９）で表される構造において記載するＺ^{1}及びＺ^{2}として記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

Ｚ^{3}は、Ｔｙｒであることが好ましく、Ｄ体であってもＬ体であってよい。

Ｘａａ’は、各々独立に、ＧｌｙまたはＳｅｒであることが好ましい。

ｒは０以上の整数であれば特に限定されないが、２０以下であってもよく、１０以下であってもよく、１以上であってもよく、３以上であってもよく、５以上であってもよい。ｒは０～２０であることが好ましい。

（Ｘａａ’）$_{r}$としては、例えば、（－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_{r1}$（ｒ１は０～１０の整数を示す。）で表される構造が挙げられる。

本明細書において、ｒが０である場合には、環状ペプチドはＸａａ’を有せず、また、ｒが１以上の整数である場合には、環状ペプチドにおける（Ｘａａ’）$_{r}$は、アミノ酸がペプチド結合により連結した鎖状構造に相当する。

[0034] 環状ペプチドにおける環状構造は、Ｎ－ＣＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｓ構造により形成される環状構造以外のものであってもよい。例えば、下記表１に示す官能基１を有するアミノ酸と、対応する官能基２を有するアミノ酸が環状化した環状ペプチドとすることができる。この態様において、例えば上記式（１０）で表される構造を環状構造として含む場合、少なくとも１つのＺ^{1}が官能基１を有するアミノ酸であり、かつ、少なくとも１つのＺ^{2}が対応する官能基２を有するアミノ酸であってもよく、あるいは、少なくとも１つのＺ^{1}が官能基２を有するアミノ酸であり、かつ、少なくとも１つのＺ^{2}が対応する官能基１を有

するアミノ酸であってもよい。

官能基１と２はどちらがＮ末端側にきてもよく、Ｎ末端とＣ末端に配置してもよいし、一方を末端アミノ酸、他方を非末端アミノ酸としてもよいし、両方を非末端アミノ酸としてもよい。

官能基１と官能基２により形成される結合が、環状ペプチドにおける分子環状構造を形成するための化学架橋構造といえる。

[0035] [表1]

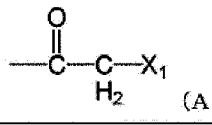
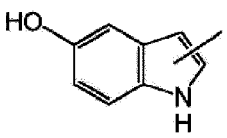
	官能基1	官能基2
(A)	 (A－1)	HS— (A－2)
(B)	—C≡C—H (B－1)	N_3— (B－2)
(C)	—Ar—CH_2NH_2 (C－1)	 (C－2)
(D)	—C≡C—CH_2—X_1 (D－1)	HS— (D－2)
(E)	—Ar—CH_2—X_1 (E－1)	HS— (E－2)

表１の化学構造式中、X_1は脱離基であり、Ａｒは置換基を有していてもよい芳香環である。脱離基としては、例えば、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩ等のハロゲン原子が挙げられる。

[0036] （Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチル化したアミノ酸を用いることができる。クロロアセチル化アミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-alanine、N-chloroacetyl-L-phenylalanine、N-chloroacetyl-L-tyrosine、N-chloroacetyl-L-tryptophan、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tryptophan、β-N-chloroacetyl-L-diaminopropanoic acid、γ-N-chloroacetyl-L-diaminobutyric acid、δ-N-chloroacetyl-L-ornithine、ε-N-chloroacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するＤ－アミノ酸誘導体等が挙げられる。

（Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-tyrosi

ne、及びN-chloroacetyl-D-tyrosineが好適に用いられる。

[0037] （Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

（Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、cysteineが好適に用いられる。

[0038] （Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Kawakami, T. et al., Nature Chemical Biology 5, 888-890 (2009)；Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009)；Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)；Goto, Y. et al., ACS Chemical Biology 3, 120-129 (2008)；Kawakami T. et al, Chemistry & Biology 15, 32-42 (2008)、及び国際公開第２００８／１１７８３３号等に記載された方法が挙げられる。

[0039] （Ｂ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、及び2-amino-8-nonynoic acid等が挙げられる。

4-pentynoyl化や5-hexynoyl化したアミノ酸を用いてもよい。

4-pentynoyl化アミノ酸としては、例えば、N-(4-pentenoyl)-L-alanine、N-(4-pentenoyl)-L-phenylalanine、N-(4-pentenoyl)-L-tyrosine、N-(4-pentenoyl)-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophan、β-N-(4-pentenoyl)-L-diaminopropanoic acid、γ-N-(4-pentenoyl)-L-diaminobutyric acid、σ-N-(4-pentenoyl)-L-ornithine、ε-N-(4-pentenoyl)-L-lysine、及びこれらに対応するＤ－アミノ酸誘導体等が挙げられる。

5-hexynoyl化アミノ酸としては、4-pentynoyl化アミノ酸として例示した化合物において、4-pentynoyl基が、5-hexynoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

[0040] （Ｂ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidoptonorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、及び2-amino-8-azidooctanoic acid等が挙げられる。

azidoacetyl化や3-azidopentanoyl化したアミノ酸を用いることもできる。

azidoacetyl化アミノ酸としては、例えば、N-azidoacetyl-L-alanine、N-azidoacetyl-L-phenylalanine、N-azidoacetyl-L-tyrosine、N-azidoacetyl-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophan、β-N-azidoacetyl-L-diaminopropanoic acid、γ-N-azidoacetyl-L-diaminobutyric acid、σ-N-azidoacetyl-L-ornithine、ε-N-azidoacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

3-azidopentanoyl化アミノ酸としては、azidoacetyl化アミノ酸として例示した化合物において、azidoacetyl基が、3-azidopentanoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

[0041] （Ｂ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｂ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)、及び国際公開第２００８／１１７８３３号等に記載された方法が挙げられる。

[0042] （Ｃ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine (AMBF)及び3-aminomethyltyrosine等が挙げられる。

（Ｃ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、5-hydroxytryptophan(WOH)等が挙げられる。

（Ｃ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｃ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009)及び国際公開第２００８／１１７８３３号に記載された方法等が挙げられる。

[0043] （Ｄ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、2-amino-6-chloro-hexynoic acid、2-amino-7-chloro-heptynoic acid、及び2-amino-8-chloro-octynoic acid等が挙げられる。

（Ｄ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

（Ｄ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｄ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、国際公開第２０１２／０７４１２９号に記載された方法等が挙げられる。

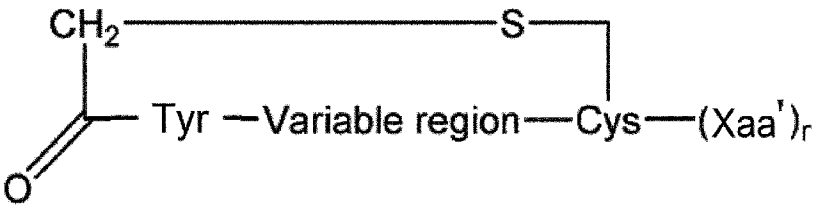
[0044] （Ｅ－１）のアミノ酸としては、例えば、N-3-chloromethylbenzoyl-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophan、及びこれらに対応するＤ－アミノ酸誘導体等が挙げられる。

（Ｅ－２）のアミノ酸としては、例えば、cysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、 mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

（Ｅ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｅ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、（Ａ－１）と（Ａ－２）の環状化方法や（Ｄ－１）と（Ｄ－２）の環状化方法を参考にして行うことができる。

[0045] 本発明の環状ペプチドの具体例として、下記式（１２）で表されるものが挙げられる。

[化14]



（１２）

[0046] 上記式（１２）において、Ｔｙｒは Ｄ体であってもよく、Ｌ体であってもよい。また、Ｓは、Ｃｙｓのチオール基を意味する。本明細書及びこれに添

付される図中では、上記構造における－ＣＨ$_2$－ＣＯ－で表される構造は、Ａｃとも記載される。

また、上記式（１２）において、「Variable region」と表される部分は、上記式（１）で表される構造を１つ以上含む限りにおいて任意の部分を表す。

Ｘａａ’、及びｒは上述したものと同義であり、好ましい態様も同様である。

[0047] 上記式（１２）において、「Variable region」は、下記式（１３）：

[化15]

$$-(Z^4)_p-Xaa^1-(Xaa^2)_{n1}-Xaa^3-Xaa^4-(Z^5)_q- \quad (13)$$

で表されることが好ましい。

上記式（１３）中、Ｘａａ^1、Ｘａａ^2、Ｘａａ^3、Ｘａａ^4、ｎ１、Ｚ^4、Ｚ^5、ｐ、及びｑは、上記式（１）及び上記式（１１）で表される構造において記載するＸａａ^1、Ｘａａ^2、Ｘａａ^3、Ｘａａ^4、ｎ１、Ｚ^4、Ｚ^5、ｐ、及びｑに関する前記と同義であり、上記式（１）及び上記式（１１）で表される構造において記載するＸａａ^1、Ｘａａ^2、Ｘａａ^3、Ｘａａ^4、ｎ１、Ｚ^4、Ｚ^5、ｐ、及びｑとして記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

上記式（１３）中、ｐは、０～３のいずれかの整数であることが好ましく、０～２のいずれかの整数であることがより好ましく、０又は１であることが更に好ましい。

上記式（１３）中、ｑは、０～３のいずれかの整数であることが好ましく、０～２のいずれかの整数であることがより好ましく、０又は１であることが更に好ましい。

上記式（１３）中、ｐ及び／又はｑが１以上である場合、Ｚ^{4}とＺ^{5}は、それぞれ独立して、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、ＩＩｅ等の分岐鎖側鎖を有するアミノ酸や、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ等の側鎖に水酸基を有するアミノ酸や、塩基性アミノ酸

や芳香族アミノ酸を含んでいてもよく、Ｌｅｕ又はＳｅｒであることが好ましい。

[0048] 上記式（１２）における、「Variable region」の好ましい例示としては、下記式（１３）～（１６）で表される構造が挙げられる。

[化16]

$$-(Z^{4})_{p}-Xaa^{1}-(Xaa^{2})_{n1}-Xaa^{3}-Xaa^{4}-(Z^{5})_{q}- \quad (13)$$

[化17]

$$-(Z^{4})_{p}-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp-(Z^{5})_{q}- \quad (14)$$

[化18]

$$-Leu-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp- \quad (15)$$

[化19]

$$-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp-Ser- \quad (16)$$

[0049] 上記式（１３）～（１６）中、Xaa^{1}、Xaa^{2}、Xaa^{3}、Xaa^{4}、ｎ１、Z^{4}、Z^{5}、ｐ、及びｑは、上記式（１）及び上記式（１１）で表される構造において記載するXaa^{1}、Xaa^{2}、Xaa^{3}、Xaa^{4}、ｎ１、Z^{4}、Z^{5}、ｐ、及びｑに関する前記と同義であり、上記式（１）及び上記式（１１）で表される構造において記載するXaa^{1}、Xaa^{2}、Xaa^{3}、Xaa^{4}、ｎ１、Z^{4}、Z^{5}、ｐ、及びｑとして記載する好ましい態様の任意の組み合わせを有する構造であり得る。

[0050] 上記式（１２）で表される環状ペプチドの好適な具体例としては、下記式（３）～（８）で表される構造のいずれかを有するものが挙げられる。ただし、下記式（３）～（８）において、上記式（１２）のＣｙｓに結合する$(Xaa')_{r}$に該当する直鎖状構造部分は省略している。したがって、下記式（３）～（８）中、Ｓに結合するＣ（Ｃｙｓ）には、$(Xaa')_{r}$が結合していてもよい（Ｘａａ’及びｒは、上記式（１２）のものと同義である。）

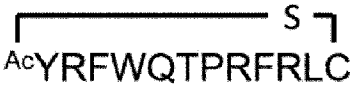
。

[0051] [化20]



（３）

[化21]



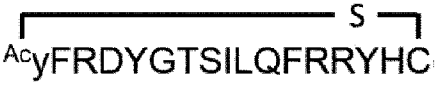
（４）

[化22]



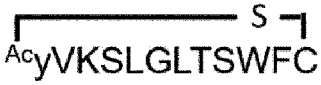
（５）

[化23]



（６）

[化24]



（７）

[化25]



（８）

上記式（３）～（８）中、Ａｃは－ＣＨ$_2$－ＣＯ－であり、ＹはＬ－チロシンであり、ｙはＤ－チロシンである。上記式（３）～（５）の構造におけるアミノ酸配列を配列番号２０～２２に示す。

[0052] ［環状ペプチドの製造方法］

本発明の環状ペプチドは、無細胞翻訳系による翻訳合成法により好適に製

造できる。

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

[0053] 無細胞翻訳系を用いる方法によれば、非天然アミノ酸でアミノアシル化したｔＲＮＡを使用して、天然アミノ酸に加え、非天然アミノ酸をペプチドに効率よく導入することができる。例えば、本発明者らが開発した人工アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素フレキシザイムを用いれば、任意の天然又は非天然のアミノ酸で、任意のアンチコドンを有するｔＲＮＡをアミノアシル化することが可能である。したがって、この技術を用いて、ｍＲＮＡのトリプレットからなる遺伝暗号が、生体の翻訳系とは異なるアミノ酸をコードするように、リプログラミングすることができる（国際公開第２００８／０５９８２３号）。

[0054] ［ペプチド複合体］

本発明のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩は、２つの、本発明の環状ペプチドを含み、一方の環状ペプチドが他方の環状ペプチドとリンカーにより連結している。

[0055] 図１に示すように、ＢＤＮＦはＴｒｋＢの細胞外ドメインに結合し、ＴｒｋＢのホモ二量体化を引き起こし、ＴｒｋＢの自己リン酸化を介して下流のシグナル伝達を活性化することが知られている。

本発明のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩は、上記のような構成を備えるため、ペプチド複合体中のそれぞれの環状ペプチドがＴｒｋＢの細胞外ドメインにそれぞれ結合し、ＴｒｋＢのホモ二量体化を引き起こすことができると考えられる。したがって、本発明のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩は、ＴｒｋＢの自己リン酸化を介して下流のシグナル伝達を活性化することができると考えられる。その結果、本発明の

ペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩は、神経突起の分枝、ニューロンの生存、及び軸索の伸長等の種々の細胞応答を刺激することができると考えられる。したがって、本発明のペプチド複合体は、好ましくは、ＴｒｋＢのリン酸化を誘導するものである。

[0056] 本発明のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩が、ＴｒｋＢの細胞外ドメインに結合し、ＴｒｋＢのホモ二量体化を引き起こし、ＴｒｋＢの自己リン酸化を生じる場合、ペプチド複合体は、ｓｈｃ（ｓｒｃ相同ドメイン含有（src homology domain containing）タンパク質）及びＩＲＳ１／２（インスリン受容体基質１／２（insulin receptor substrate 1/2））等のＳＨ２（ｓｒｃ相同型２（src homology-type 2））リンカータンパク質の会合を誘導し、ＰＩ３Ｋ及びＥＲＫシグナル伝達経路の活性化をもたらす。

[0057] 本発明のペプチド複合体は、２つの、本発明の環状ペプチドを含み、一方の環状ペプチドが他方の環状ペプチドとリンカーにより連結していれば特に限定されず、２つの環状ペプチドは、同一であってもよく、異なっていてもよい。ＴｒｋＢのホモ二量体化を一層促進する観点から、ペプチド複合体中、２つの環状ペプチドが同一であることが好ましい。

[0058] ペプチド複合体における、２つの環状ペプチドを繋ぐリンカーとしては、特に限定されず、ペプチド合成分野においてペプチド同士を繋ぐリンカーとして周知の構造のものを採用することができるが、長さが２０Å以上２００Å以下であるリンカーを用いることが好ましい。そのような態様によれば、ＴｒｋＢのホモ二量体化を一層促進することができる傾向にある。同様の観点から、リンカーの長さは、より好ましくは３０Å以上１５０Å以下であり、更に好ましくは４０Å以上１００Å以下である。

[0059] ペプチド複合体における、２つの環状ペプチドを繋ぐリンカーの非限定的な例示としては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等のポリマー、ペプチド、核酸、糖、及びこれらの組合せが挙げられる。

ＰＥＧを含むリンカーとしては、２以上の官能基を有する小分子に、２つ

のＰＥＧがそれぞれ結合したものが挙げられ、非限定的な例示としては、２，３－ジアミノプロピオン酸のアミノ基にカルボン酸変性ＰＥＧが結合したものが挙げられる。

ＰＥＧを含むリンカーにおいて、エチレングリコールの重合数は、２以上２０以下であってもよく、３以上１５以下であってもよく、４以上１０以下であってもよい。

[0060] ［ペプチド複合体の製造方法］

本発明のペプチド複合体は、上記のようにして得られる本発明の環状ペプチドを適当なリンカーによりつなぐことで、製造すればよい。

本発明の環状ペプチドをリンカーでつなぐ工程は、リンカーの種類に応じて、リンカーとペプチドをつなぐ公知の方法、又はそれに準ずる方法を用いて、当業者が行うことができる。

例えば、リンカーが上述のＰＥＧを含むリンカーである場合は、図２に示す方法により、２つの、本発明の環状ペプチドをリンカーでつなぐことができる。

また、リンカーがペプチドである場合は、２つの、本発明の環状ペプチドをコードする核酸と、リンカーペプチドをコードする核酸とを連結し、本発明の環状ペプチドとリンカーペプチドの融合タンパク質を発現させてもよい。

[0061] 本発明における環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩は、ＴｒｋＢと高い親和性を有し、ＴｒｋＢと強力に結合することができ、ＴｒｋＢアゴニストとして作用することができる。

また、本発明の環状ペプチドを含むペプチド複合体は、ＴｒｋＢの細胞外ドメインに結合することにより、ＴｒｋＢのホモ二量体化を引き起こし、それにより下流のＴｒｋＢシグナル伝達を選択的に誘起する。したがって、本発明のペプチド複合体は、神経突起の分枝、ニューロンの生存、及び軸索の伸長等の種々の細胞応答を刺激することができる。

更に、本発明の環状ペプチドは、従来研究されてきた小分子のＴｒｋＢア

ゴニストと異なり、薬物動態学的特性、特に細胞透過性が低いため、既存の方法とは異なるアプローチで神経学的疾患に対する治療法、及び研究法を提供することができる。

[0062] ［医薬組成物］

本発明の医薬組成物は、環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、ペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つを含む。したがって、本発明の医薬組成物は、好ましくは、神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防に用いられる。

医薬組成物は、有効成分として環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、ペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つをそのまま用いてもよいし、医薬的に許容可能な添加剤等を加えて製剤化してもよい。

[0063] 医薬製剤の剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、及びパップ剤等が挙げられる。

製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、ｐＨ調整剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、及び抗酸化剤等の添加剤を適宜使用して、常法により行うことができる。

[0064] 製剤化に用いられる添加剤としては、特に限定されるものではないが、例えば、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等の医薬的に許容可能な有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリ

ル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、及びヒト血清アルブミン等が挙げられる。

経粘膜吸収における吸収促進剤として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、及びサポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、及びタウロコール酸等の胆汁酸塩；ＥＤＴＡ及びサリチル酸類等のキレート剤；カプロン酸、カプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、及び混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体、Ｎ－アシルコラーゲンペプチド、Ｎ－アシルアミノ酸、シクロデキストリン類、キトサン類、並びに一酸化窒素供与体等を用いてもよい。

[0065] 錠剤又は丸剤は、糖衣、胃溶性、及び腸溶性物質等で被覆されたコート錠等であってもよい。

液剤は、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、及びアルコール類等を含んでもよい。液剤は、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、及び防腐剤等を加えてもよい。

[0066] 本発明は、医薬組成物を、それを必要とする患者に投与して、患者における疾患を治療又は予防する方法も提供する。上記疾患は、神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患であってもよい。

[0067] 本発明の医薬組成物の投与量は、当業者が、それを必要とする患者の症状、年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、及び製剤の種類等に応じて、適宜決定することができる。

患者は、哺乳動物であり、ヒトであることが好ましい。

実施例

[0068] 以下、本発明を実施例及び比較例を用いてより具体的に説明する。本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

[0069] ［環状ペプチドの調製］

環状ペプチドは、以下の手順によって調製した。

[0070] （環状ペプチドのライブラリーの調製、及びｈＴｒｋＢに結合する環状ペプチドの選択）

２つのチオエーテル－環状ペプチドライブラリー（Ｌ－ライブラリー及びＤ－ライブラリー）は、フレキシブルインビトロ翻訳（ＦＩＴ）システムを用いて構築した。以前に報告された方法を用いて、Ｌ－ライブラリー、及びＤ－ライブラリーに、それぞれ、Ｎ－（２－クロロアセチル）－Ｌ－チロシン（Ｌ－ＣｌＡｃＴｙｒ）、及びＮ－（２－クロロアセチル）－Ｄ－チロシン（Ｄ－ＣｌＡｃＴｙｒ）を導入した（Kawakami, T.; Murakami, H.; Suga, H., Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. Chem Biol 2008, 15 (1), 32-42.; Morimoto, J.; Hayashi, Y.; Suga, H., Discovery of macrocyclic peptides armed with a mechanism-based warhead: isoform-selective inhibition of human deacetylase SIRT2. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51 (14), 3423-7.; Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, H., Flexizymes for genetic code reprogramming. Nat Protoc 2011, 6 (6), 779-90.; Hayashi, Y.; Morimoto, J.; Suga, H., In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors. ACS Chem Biol 2012, 7 (3), 607-13.）。

チオエーテル－環状ペプチドライブラリーに対応するｍＲＮＡライブラリーは、順に、Ｌ－ＣｌＡｃＴｙｒ又はＤ－ＣｌＡｃＴｙｒをコードするＡＵＧ開始コドン、ランダムなタンパク質性アミノ酸残基をコードする８～１５個のＮＮＫランダムコドン（ＮはＧ、Ｃ、Ａ又はＵ；ＫはＧ又はＵ）、ＣｙｓをコードするＵＧＣコドンを持つようにデザインされた。なお、インビトロでの翻訳の後、Ｎ末端にあるＴｙｒ残基のアセチルクロライド基と、下流

のシステイン残基のスルフヒドリル基（チオール基）との間で、チオエーテル結合が自然に形成された。

ヒトＴｒｋＢ（ｈＴｒｋＢ）に結合する環状ペプチドの選択（以下、「アフィニティー選択」ともいう。）は、ＲａＰＩＤ（random non-standard peptides integrated discovery）システムを用いて、Ｌ－ライブラリー、及びＤ－ライブラリーについて、それぞれ独立に行った（図３）（Hayashi, Y.; Morimoto, J.; Suga, H., In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors. ACS Chem Biol 2012, 7 (3), 607-13.; Hipolito, C.J. & Suga, H. Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: the FIT and RaPID systems. Curr Opin Chem Biol. 16, 196-203, 2012）。

[0071] より詳細には、以下のようにして、環状ペプチドのライブラリーの調製、及びｈＴｒｋＢに結合する環状ペプチドの選択を行った。

ｍＲＮＡライブラリー、並びに、ClAc-L-Tyr-tRNA$^{fMet}_{CAU}$、及びClAc-D-Tyr-tRNA$^{fMet}_{CAU}$は以前に報告されたように調製した（Hayashi, Y.; Morimoto, J.; Suga, H., In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors. ACS Chem Biol 2012, 7 (3), 607-13.; Hipolito, C.J. & Suga, H. Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: the FIT and RaPID systems. Curr Opin Chem Biol. 16, 196-203, 2012）。

４μＭのｍＲＮＡライブラリーを、Ｔ４　ＲＮＡリガーゼを用いて１．５μＭのピューロマイシンリンカーと２５℃で３０分間連結した。上記ピューロマイシンリンカーのＤＮＡは、ｍＲＮＡライブラリーの３’末端定常領域に結合した。フェノール－クロロホルム抽出及びエタノール沈殿による精製後、１．２μＭの得られたｍＲＮＡ－ピューロマイシンコンジュゲートと、２５μＭのClAc-L-Tyr-tRNA$^{fMet}_{CAU}$、又はClAc-D-Tyr-tRNA$^{fMet}_{CAU}$とを用いて、メチオニン欠損ＦＩＴ系で、３７℃で３０分間翻訳した。次いで、反応物を２５℃で１２分間更にインキュベートすることで、ｍＲＮＡ－ペプチドコンジ

ュゲートの形成を促進した。更に、２０ｍＭ　ＥＤＴＡの存在下で、３７℃で３０分間インキュベートした。続いて、生成物をＲＮａｓｅ－Ｈマイナス型逆転写酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて、４２℃で１時間逆転写することにより、環状ペプチドをｍＲＮＡ－ｃＤＮＡハイブリッドにタグ付けした。その後、緩衝液を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５ｖｏｌ％ｔｗｅｅｎ－２０を含むものに交換した。

次いで、得られたペプチド－ｍＲＮＡ／ｃＤＮＡコンジュゲートライブラリーに対して、アフィニティー選択を行った。まず、対照選択として、ペプチド－ｍＲＮＡ／ｃＤＮＡコンジュゲートライブラリーをＨｉｓプルダウンＤｙｎａｂｅａｄｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に対して3回通過させた（各通過は、４℃の条件下、１０分間行った。）。このプロセスは、プレクリアランス（ｐｒｅ－ｃｌｉａｒａｎｃｅ）又はネガティブ選択と呼ばれるものであり、望ましくないビーズ結合を除去するものである。次いで、プレクリアランスをしたペプチド－ｍＲＮＡ／ｃＤＮＡコンジュゲートライブラリーに対して、上記のビーズに２００ｎＭのＴｒｋＢの細胞外ドメインを固定化したものを用いて、４℃の条件下、３０分間アフィニティー選択を行った。このプロセスは、ポジティブ選択と呼ばれる。

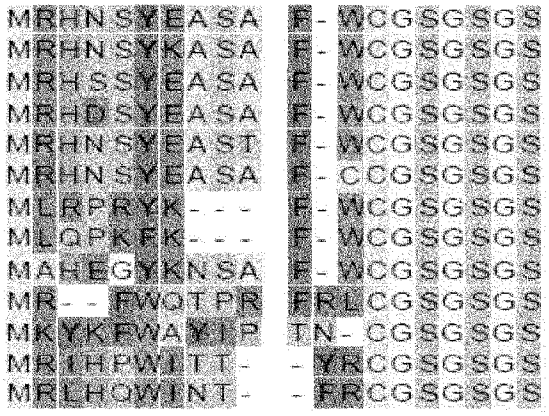
９５℃で５分間加熱することにより、ｃＤＮＡをビーズから溶出させ、溶出したｃＤＮＡの一部を、Ｓｙｂｒ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ及びサーマルサイクラー（ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（Ｒｏｃｈｅ））を用いた定量的ＰＣＲにより評価した。残りのｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅し、次のラウンドのアフィニティー選択に用いるｍＲＮＡライブラリーを転写するために用いた。

ライブラリーの調製、プレクリアランス、及びポジティブ選択を１つのラウンドとして、当該ラウンドを５回行った。５回のラウンドの後、ｃＤＮＡの有意な濃縮が観察された（ポジティブ選択においてＴｒｋＢの細胞外ドメインをビーズ上に固定化しなかった場合との比較に対して。）（図４）。回収したｃＤＮＡを、ＰＣＲにより増幅し、カラム（ヌクレオスピン（Ｍａｃ

ｈｅｒｙ－Ｎａｇｅｌ））を用いて精製した後、ハイスループットシーケンサー（ＭｉＳｅｑ（ＩｌｌｕｍｉｎａＩ））を用いて配列決定した。データ分析は、ソフトウェア（ＣＬＣシーケンスビューア７（Ｑｉａｇｅｎ））を用いて行った。

[0072] ＲａＰＩＤシステムによって選択された、ｈＴｒｋＢに結合する環状ペプチドを形成するペプチドの構造の一例を以下の表２、３に示す。

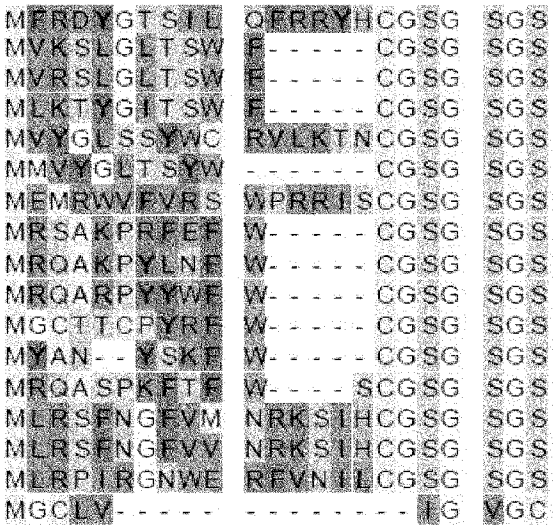
[0073] [表2]



ただし、表２の配列中、最左端のＭはＬ－ＣｌＡｃＴｙｒであり、その他の英文字は、アミノ酸の１文字表記に拠るアミノ酸を示す。表２のペプチドにおいて、最左端のＬ－ＣｌＡｃＴｙｒと、下流の最初のシステイン残基との間でチオエーテル結合が形成された。各ペプチドの下流におけるＧＳＧＳＧＳ配列は、環状構造に結合する直鎖状構造であり、あってもなくてもよい。表２中のペプチドは、上から順に、それぞれ配列番号１～１３に対応する。

[0074]

[表3]



ただし、表３の配列中、最左端のＭはＤ－ＣｌＡｃＴｙｒであり、その他の英文字は、アミノ酸の１文字表記に拠るアミノ酸を示す。表３のペプチドにおいて、最左端のＤ－ＣｌＡｃＴｙｒと、下流の最初のシステイン残基との間でチオエーテル結合が形成された。各ペプチドの下流におけるＧＳＧＳＧＳ配列は、環状構造に結合する直鎖状構造であり、あってもなくてもよい。

[0075] （環状ペプチドの化学合成）

配列が決定された環状ペプチドの中から、Ｌ－ライブラリー及びＤ－ライブラリーのそれぞれにおいて最も割合の多かった３つを化学合成により得た。すなわち、公知の方法に準拠して、Ｓｙｒｏ　Ｗａｖｅ自動化ペプチド合成機（Ｂｉｏｔａｇｅ）を用い、Ｆｍｏｃ固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）によって環状ペプチドの合成を行った（Ito, K. et al. Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds. Nature Communications 6, 6372, 2015）。

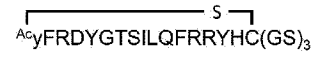
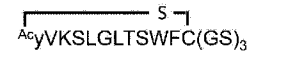
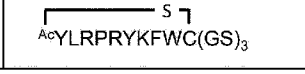
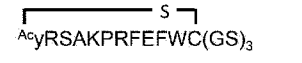
具体的には、各ペプチドの自動合成後、得られた生成物に対し、環状化のためのクロロアセチル基をN末端アミド基に結合させた。９２．５％のトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、２．５％の水、２．５％のトリイソプロピルシラン、及び２．５％のエタンジチオールの溶液によってペプチドを固相から切断

し、ジエチルエーテルで沈殿させた。環化反応を実施するために、ペプチドペレットを、ＤＭＳＯを含む１０ｍｌのトリエチルアミンに溶解し、２５℃で１時間インキュベートした。反応溶液にＴＦＡを添加して、ペプチド懸濁液を酸性化し、環化反応を停止した。

続いて、Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ　ＨＰＬＣシステム（Ｓｈｉｍａｚｕ）を用いて、線形グラジエント条件で逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）にかけることによりペプチドを精製した。０．１％ＴＦＡを含む水を含む移動相Ａに、０．１％ＴＦＡを含むアセトニトリルである移動相Ｂを混合させて、グラジエントを実現した。精製したペプチドを真空中で凍結乾燥し、ＡｕｔｏＦｌｅｘ　ｌｌ（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｄａｌｔｏｎｉｃｓ）を用いて、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析を行うことにより分子量を確認した。

[0076] ＲａＰＩＤシステムによって選択され、化学合成された、ｈＴｒｋＢに結合する環状ペプチドの構造を以下の表４に示す。

[0077] [表4]

	L-library	Abundance (%)		D-library	Abundance (%)
TrbL1		18	TrbD1		19
TrbL2		15	TrbD2		14
TrbL3		9	TrbD3		7

表中、Ａｃは－ＣＨ$_2$－ＣＯ－であり、ＹはＬ－チロシンであり、ｙはＤ－チロシンを意味する。また、「Ａｂｕｎｄａｎｃｅ」は、アフィニティー選択で得られたＬ－ペプチド、又はＤ－ペプチドの総計に対する当該ペプチドが占める割合を示しており、数値が高いほど、そのペプチドのＴｒｋＢとの結合力が強いことを示唆するものである。

[0078] ［環状ペプチドの評価］

上述のようにして得られた環状ペプチドＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３について、活性試験を行った。

[0079] （ｈＴｒｋＢに対する親和性の評価）

Ｈｉｓ６－ｔａｇを介してセンサーチップ上に固定化されたｈＴｒｋＡ、ｈＴｒｋＣ、及びｈＴｒｋＢ（以下、これらを総称として「ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質」ともいう。）の細胞外ドメインに対する環状ペプチドの結合動態（結合親和性（解離定数）K_D）について、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を利用した定量測定を行うことにより、ｈＴｒｋＡ及びｈＴｒｋＣに対する、ｈＴｒｋＢと環状ペプチドとの結合の強度及び選択性を評価した。

ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質に対する各ペプチドの結合動態は、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて測定した。０．１ｖｏｌ％ＤＭＳＯおよび１ｍＭ　ｂ－ドデシル－マルトシドを含有するＨＢＳ－Ｐ＋（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、及び０．０５ｖｏｌ％界面活性剤Ｐ２０、ｐＨ　７．４）を緩衝液として用いた。１００ｎＭ　ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質は、製造元の説明書に従って、Ni^{2+}処理ＮＴＡチップ上に固定化された（ベースライン応答１０００～３０００屈折単位）。流速６０ｍＬ・ｍｉｎ－１で、ペプチドをアナライトとして注入し、１：１結合モデルを用いて結合動態をモデル化した。

各環状ペプチド（ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３）のｈＴｒｋＢに対するＳＰＲ応答を図５に、ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質に対する結合親和性K_Dを表５に示す。

[0080] [表5]

Monomer	TrkA	TrkB	TrkC
TrbL1	N.B.	26	N.B.
TrbL2	100	70	N.B.
TrbL3	N.B.	1.5	N.B.
TrbD1	150	6	N.B.
TrbD2	N.B.	18	N.B.
TrbD3	123	15	N.B.

[0081] 表中、「Ｎ．Ｂ．」はnon-binding、すなわち、ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質が１－１０００ｎＭである範囲において、ＳＰＲ応答が検出されなかったこ

とを意味する。

[0082] 全てのペプチド（ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３）について、ｈＴｒｋＢに対するK_D値は１．５～７０ｎＭであり、全てのペプチド（ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３）がｈＴｒｋＢに対して強力な親和性を示した。中でも、３つのペプチド（ＴｒｂＬ１、ＴｒｂＬ３、及びＴｒｂＤ２）は、ｈＴｒｋＢに対して高い選択性を示し、ｈＴｒｋＡ及びｈＴｒｋＣに対して、ＳＰＲによるシグナルを示さなかった。特に、ＴｒｂＬ３はｈＴｒｋＢに対するK_Dが１．５ｎＭであり、非常に高いｈＴｒｋＢ選択性を有していた。

[0083] ［ペプチド複合体の調製］

上述のようにして得られた環状ペプチドＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３に関して、これらの環状ペプチドを含むペプチド複合体（ホモ二量体ペプチド）を、以下の手順によって調製した。

以下、ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３の各々をリンカーにより二量体化したペプチド複合体（ホモ二量体ペプチド）を、ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３に対し、それぞれＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３と称する。

[0084] 全ての二量体ペプチドは、以前に報告されたように、Ｓｙｒｏ　Ｉ自動ペプチド合成機（Ｂｉｏｔａｇｅ）によって、従来のＦｍｏｃベースのＳＰＰＳを用いて合成した（Bashiruddin, N. K.; Matsunaga, Y.; Nagano, M.; Takagi, J.; Suga, H., Facile Synthesis of Dimeric Thioether-Macrocyclic Peptides with Antibody-like Affinity against Plexin-B1. Bioconjug Chem 2018, 29 (6), 1847-1851.）（図２）。

図２中、Ｆｍｏｃ－ＤＡＰ（Ｆｍｏｃ）、Ｆｍｏｃ－ＮＨ－（ＰＥＧ）$_5$－ＣＯＯＨリンカー、及び他のＦｍｏｃ－保護アミノ酸のカップリングは、ＤＭＦを吸収したＮｏｖａＰＥＧ　Ｒｉｎｋ　Ａｍｉｄｅ樹脂上で、ＤＭＦ中、０．５Ｍ　Ｆｍｏｃ－保護アミノ酸、０．５Ｍ　ＨＢＴＵ／ＨＯＢｔ、及び０．５Ｍ　ＤＩＰＥＡの存在下で、行った。ＤＭＦによる３回のプログラ

ム洗浄の後、Ｆｍｏｃ－脱保護を、ＤＭＦ中の４０％ピペリジンによる３０分間のＲＴ処理によって実施した。二重カップリングを全ての段階に使用した。全てのアミノ酸をカップリングした後、ＤＭＦ中の０．２Ｍクロロアセチル－ＮＨＳを用いて、各ペプチドのＮ末端にクロロアセチル基を付加した。この工程を２回繰り返し、次いで、３回のＤＭＦ洗浄、６回のＤＣＭ洗浄、及び真空乾燥を行った。次いで、乾燥したペプチド結合樹脂を全体的に脱保護（Global deprotection）し、予め冷却したＴＦＡ／Ｈ２Ｏ／ＥＤＴ／ＴＩＳ（９２．５：２．５：２．５：２．５）混合物中にて室温で１時間処理することにより、二量体ペプチドを樹脂から切断した。脱保護溶液を冷却ジエチルエーテルで沈殿させ、ペレットをヒュームフード中で乾燥した。

これらのペレットを、０．１％ＴＦＡを有するＤＭＳＯに溶解した後、溶液が塩基性（H_2O及びｐＨインジケーターペーパーを用いて確認した。）になるまでＴＥＡを添加して、ペプチドの環化を誘導した。塩基性条件下、室温で３０分環化させた後、ペプチドの質量及び環化の完了をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析機（ＡｕｔｏＦｌｅｘ　ＩＩ　（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｄａｌｔｏｎｉｃｓ））により確認した。

ペプチドの質量及び環化の完了を確認した後、ペプチド溶液をＴＦＡにより酸性状態に戻し（H_2O及びｐＨインジケーターペーパーを用いて確認した。）、Ｃｈｒｏｍｏｌｉｔｈ　ＯＤＣカラムに接続したＰｒｏｍｉｎｅｎｃｅ　ＨＰＬＣシステム（Ｓｈｉｍａｚｕ）を用いて、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）にかけることによりペプチドを精製した。流速を２５ｍＬ／分、グラジエントを脱イオン化H_2O（０．１％ＴＦＡ含有）中、３２分間で１０－７０％ＭｅＣＮ（０．１％ＴＦＡ含有）とした。

[0085] これにより、ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３の各々がPEG_5－ＤＡＰ－PEG_5リンカー（長さ５８Å）により二量体化されたペプチド複合体（ホモ二量体ペプチド）である、ＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３を得た。

[0086] ［ペプチド複合体の評価方法］

上述のようにして得られたペプチド複合体について、各種活性試験を行った。各種活性試験の詳細は以下の通りであった。

[0087]（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）：結合動態（結合親和性K_D）の評価）

環状ペプチド（ＴｒｂＬ１～３、及びＴｒｂＤ１～３）に代えて、ペプチド複合体（ＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３）を用いたこと以外は、環状ペプチドの結合動態（結合親和性K_D）を評価した上述の方法と同様にして、各ペプチド複合体（ＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３）の結合動態（結合親和性K_D）を評価した。

[0088]（ウェスタンブロッティング法）

ＤＩＶ６（6 days in vitro）の海馬ニューロンを、ＤＭＳＯ、ＢＤＮＦ、又はペプチド複合体（ＤｉＴｒｂＬ３）で、１５分間処理した。ＡＮＡ－１２（１００μM）は、ＢＤＮＦ、又はペプチドの処理の３０分前に添加した。

細胞を０．１Ｍ　ＰＢＳで２回洗浄した後、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０、０．５％Ｎａ－デオキシコール酸、０．１％ＳＤＳ、５０ｍＭ　ＮａＦ、０．２ｍＭ　Na_3VO_4、１０μｇ／ｍＬアプロチニン、１０μｇ／ｍＬロイペプチン、及び１ｍＭフェニルメチルスルホニルフルオリドを含む放射性免疫沈降アッセイ（ＲＩＰＡ）緩衝液中、氷上で、３０分間細胞を溶解させた。超音波処理、及び２０，０００×ｇでの３０分間の遠心分離の後、上清をＳＤＳ－ＰＡＧＥに用いた。タンパク質量はＢｉｃｉｎｃｈｏｎｉｎｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｋｉｔ（ＢＣＡ－１、Ｓｉｇｍａ）で定量した。

細胞溶解物（タンパク質量：Ｐ－ＴｒｋＢで２０μｇ、ＴｒｋＢで１０μｇ、Ａｋｔ及びＥｒｋで５μｇ）を、８％ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，　Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ，　ＵＳＡ）に移した。当該膜をブロッキング緩衝液（０．０５％ｔｗｅｅｎ－２０を含む、５％ウシ血清アルブミン

（ＢＳＡ）トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳＴ））で１時間ブロックした後、一次抗体（ウサギ抗ＴｒｋＢ抗体、１：１，０００希釈、Ｃａｔ＃４６０３；ウサギ抗リン酸化Ｔｒｋ抗体、１：１，０００希釈、Ｃａｔ＃９１４１；マウス抗ｐａｎ－Ａｋｔ抗体、１：２，０００希釈、Ｃａｔ＃２９２０；ウサギ抗リン酸化Ａｋｔ（Ｓ４７３）抗体、１：２，０００希釈、Ｃａｔ＃４０６０；ウサギ抗Ｅｒｋ１／２抗体、１：２，０００希釈、Ｃａｔ＃４６９５；マウス抗リン酸化Ｅｒｋ１／２抗体、１：２，０００希釈、Ｃａｔ＃９１０６（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ））を含むブロッキング緩衝液中で、４℃で、一晩インキュベートした。ＴＢＳＴで１０分間の洗浄を４回した後、当該膜を二次抗体（ペルオキシダーゼと結合したヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体、１：１０，０００希釈、Ｃａｔ＃１１１－０３５－００３（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）；ペルオキシダーゼと結合したヒツジ抗マウスＩｇＧ抗体、１：１０，０００希釈、Ｃａｔ＃ＮＡ９３１０（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））と共に室温で１時間インキュベートした。

最後に、当該膜をＴＢＳＴで洗浄した後、Ｌｕｍｉｎａｔａ　Ｃｒｅｓｃｅｎｄｏ　ＨＰＲ　基質（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いた化学発光法により、免疫陽性バンドを検出した。各キナーゼの相対的リン酸化レベルは、リン酸化キナーゼ／全キナーゼの比として計算した。

[0089]（リン酸化ＲＴＫアレイ評価）

ＤＩＶ６の海馬ニューロンを、ＤＭＳＯ、ＢＤＮＦ（０．１ｎＭ）、又はＤｉＴｒｂＬ３（１ｎＭ）と共に３７℃、５％CO_2で１５分間インキュベートした。ＡＮＡ－１２（１００μＭ）は、ＤｉＴｒｂＬ３処理の３０分前に添加した。リン酸化チロシンキナーゼ受容体の包括的調査を、製造元のプロトコル（Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｐｒｏｆｉｌｅｒ　マウス　Ｐｈｏｓｐｈｏ－ＲＴＫ　Ａｒｒａｙ　Ｋｉｔ，ＡＲＹ０１４，Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）に従って、リン酸化ＲＴＫアレイを用いて実施した。リン酸化レベルは、画素強度によって評価し、Ｉｍａｇｅ　Ｊソフトウェアによって定量した。

[0090]（ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＲ）

ＤＩＶ６の初代培養皮質ニューロンをＢＤＮＦ、又はペプチド複合体（ＤｉＴｒｂＬ３）で１時間処理した後、ＳＶ　Ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｚ３１０５、Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて初代培養ニューロンから全ＲＮＡを抽出した。全ＲＮＡは、ＮａｎｏＤｒｏｐ分光計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、及びホルムアルデヒドゲル中の電気泳動で、定量的及び定性的に検証した。

次に、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、５００ｎｇの総ＲＮＡを逆転写した。定量的ＰＣＲは、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲシステムを用いて、以前に報告された方法で実施した（Akashi, M.; Takumi, T., The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. Nat Struct Mol Biol 2005, 12 (5), 441-8.）。内部対照としてＧａｐｄｈ遺伝子を用いた。以下のプライマー配列をそれぞれ用いた：Gapdh (Forward: 5'-ACGGAAGCTCACTCAGGCATGCATGCCTT-3'、及びreverse: 5'-CATGAGGTCCCCCCACCCTGTTTGCTGCTG-3'）（それぞれ、配列番号１４及び１５に示す。）、c-fos (Forward: 5'-AGTTTTCTCTACTACTACTACATCC-3'、及びreverse: 5'-AAAAGTTGGCACTAGACGACGACGACGAC-3'）（それぞれ、配列番号１６及び１７に示す。）、Arc (Forward: 5'-GGTGAGCTGACTGACCAAAT-3'及びreverse: 5'-TTCACTGGTATCATCACTGATCACTGCTGCTG-3'）（それぞれ、配列番号１８及び１９に示す。）。

[0091]（軸索伸長の評価のための免疫細胞化学）

ＤＩＶ０の海馬初代ニューロンを、ＤＭＳＯ、ＢＤＮＦ、又はＤｉＴｒｂＬ３ペプチドで処理し、ＤＩＶ３で免疫細胞化学分析を行った。

細胞を０．１Ｍリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で２回洗浄し、２％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）／４％ショ糖（０．１Ｍ　ＰＢＳ中）で１５分間固定した。ＰＢＳで３回洗浄した後、細胞を０．２％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘを含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）で３分間透過処理し、非特異的結合を防止するため

にブロッキング溶液（５％正常ヤギ血清を含むＰＢＳＴ）と共に１時間インキュベートした。続いて、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体（ウサギ抗Ｔａｕポリクローナル抗体、１：１，０００希釈；ｃａｔ＃ａｂ６４１９３（ａｂｃａｍ）；マウス抗ＭＡＰ２モノクローナル抗体、１：１，０００希釈、Ｍ４４０３（Ｓｉｇｍａ））と共に、細胞を４℃で一晩インキュベートした。細胞をＰＢＳＴで１０分間、４回洗浄した後、ブロック溶液で希釈した蛍光標識二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８で標識したヤギ抗マウスＩｇＧ抗体、１：１，０００希釈、Ａ－１１０２９；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５６８で標識したヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体、１：１，０００希釈、Ａ－２１０６９（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ））と共に、室温で２時間インキュベートした。

次に、細胞をＰＢＳＴで１０分間、４回洗浄した後、ＤＡＰＩ（Ｈ－１２００（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ））を含むＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤでマウントし、２０倍の対物レンズを有するバーチャルスライド顕微鏡システム（ＶＳ１２０（Ｏｌｙｍｐｕｓ））を用いて画像を得た。ＩｍａｇｅＪソフトウェアのニューロンＪプラグインを用いて画像を解析し、神経突起長のトレースと定量を行った（Meijering, E.; Jacob, M.; Sarria, J. C.; Steiner, P.; Hirling, H.; Unser, M., Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. Cytometry A 2004, 58 (2), 167-76.）。

[0092]（統計手法）

統計解析はＳｔａｔＶｉｅｗ　５．０（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｃａｒｙ，　ＮＣ，　ＵＳＡ）により行った。データを一方向ＡＮＯＶＡで分析し、事後比較（post hoc comparison）としてＴｕｋｅｙ／Ｋｒａｍｅｒ検定を行った。有意基準はｐ＜０．０５とした。

[0093]［ペプチド複合体の評価結果］

上述のようにして得られたペプチド複合体について、上述の各方法を用いて、各種活性試験を行った。

[0094] （ｈＴｒｋＢに対する親和性の評価）

上記（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）：結合動態（結合親和性K_D）の評価）に記載の方法を用いて、ＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３のｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質の細胞外ドメインに対するペプチド複合体の結合動態（結合親和性K_D）を測定した。これにより、ｈＴｒｋＡ及びｈＴｒｋＣに対する、ｈＴｒｋＢとペプチド複合体との結合の強度及び選択性を評価した。

各ペプチド複合体（ＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３）のｈＴｒｋＢに対するＳＰＲ応答を図６に、ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質に対する結合親和性K_Dを表６に示す。

[0095] [表6]

Homodimer	TrkA	TrkB	TrkC
DiTrbL1	N.B.	60	N.B.
DiTrbL2	7	71	N.B.
DiTrbL3	N.B.	2	N.B.
DiTrbD1	29	10	120
DiTrbD2	4	36	N.B.
DiTrbD3	7	15	N.B.

[0096] 表中、「Ｎ．Ｂ．」はnon-binding、すなわち、ｈＴｒｋＡ－Ｃタンパク質が１－１００ｎＭである範囲において、ＳＰＲ応答が検出されなかったことを意味する。

[0097] 予想されるように、各ペプチド複合体（ＤｉＴｒｂＬ１～３、及びＤｉＴｒｂＤ１～３）のｈＴｒｋＢに対する結合親和性K_Dは、単量体形態（環状ペプチド）の場合と実質的に同じであり、これはｈＴｒｋＢに結合する能力が二量化により変化しなかったことを示す。

驚くべきことに、ｈＴｒｋＢに対する選択性は、二量体化によって有意に変化した。６つのペプチドのうちの４つは、ｈＴｒｋＣに結合しなかったか、又は弱く結合した（ＤｉＴｒｂＤ１）一方で、ｈＴｒｋＡには強く結合し

た。他方、最も強力なｈＴｒｋＢ結合剤であるＤｉＴｒｂＬ３は、ｈＴｒｋＢに対する高い選択性を保持し、ｈＴｒｋＡ及びｈＴｒｋＣに対する結合はＳＰＲセンサーチップ上に観測されなかった。

[0098]（ＴｒｋＢのリン酸化の誘導能の評価）

最もＴｒｋＢへの選択性が高かったＤｉＴｒｂＬ３について、マウス初代培養海馬ニューロンにおいてマウスＴｒｋＢのリン酸化を誘導させることにより、ＴｒｋＢに対するアゴニスト活性を調べた。具体的には、陽性対照実験として天然タンパク質アゴニストであるＢＤＮＦ（０．１ｎＭ、１５分間）を、陰性対照実験としてＤＭＳＯ溶液を用いて、１ｎＭのＤｉＴｒｂＬ３が、ＴｒｋＢのリン酸化を誘導するか否かを確かめた。具体的には、抗リン酸化Ｔｒｋ抗体を用いて、上記（ウェスタンブロッティング法）に記載の方法によりＴｒｋＢのリン酸化が誘導されているか否かを確かめた。

[0099] 天然タンパク質アゴニストであるＢＤＮＦの外因性適用がＴｒｋのリン酸化を誘導することが明確に検出された（図７（ａ）、レーン２）。一方、陰性ＤＭＳＯ対照はＴｒｋのリン酸化を全く誘導しなかった（図７（ａ）、レーン１）。１ｎＭの濃度でのＤｉＴｒｂＬ３の外因性適用は、当該濃度においてＴｒｋＢのリン酸化を誘導することができることを見出した（図７（ａ）レーン３）。

[0100] 海馬ニューロンではＴｒｋＡは通常発現しないが、本解析（ウェスタンブロット法）で用いた抗リン酸化Ｔｒｋ抗体は、ＴｒｋＢだけでなくＴｒｋＡ及びＴｒｋＣも認識するため、以下のようにして、ＤｉＴｒｂＬ３がＴｒｋＢのリン酸化の誘導に対して特異性を有することを確かめた。

具体的には、ＴｒｋＢの細胞内触媒ドメインに対する特異的キナーゼ阻害剤ＡＮＡ－１２を用いたこと以外は上記と同様にして、抗リン酸化Ｔｒｋ抗体を用いたウェスタンブロット法を実施した。

[0101] 海馬ニューロンに対するＡＮＡ－１２の処理は、ＤｉＴｒｂＬ３によって誘導されるＴｒｋのリン酸化を減少させた（図７（ｂ）、レーン３対レーン４）。このことは、ＤｉＴｒｂＬ３が選択的にＴｒｋＢのリン酸化を誘発す

ることを示唆している。ＤｉＴｒｂＬ３の用量滴定におけるＴｒｋＢリン酸化の定量分析は、ＤｉＴｒｂＬ３がナノモル以下の濃度（０．２ｎＭ、ｐ＜０．０１）であっても、明らかにＴｒｋＢのリン酸化を誘導することを明らかにした（図７（ｃ））。

[0102] ＤｉＴｒｂＬ３のｈＴｒｋＢへの選択的結合に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ評価及び上記の細胞アッセイと合わせて考えると、ＤｉＴｒｂＬ３は、ＴｒｋＢリン酸化に対する選択的アゴニストであると考えられ、マウス及びヒトのＴｒｋＢタンパク質の両方に対して交差反応性を示すことがわかった。

[0103] （ＴｒｋＢの下流のシグナル伝達キナーゼの活性化についての評価）

上記（ＴｒｋＢのリン酸化の誘導能の評価）と同様に、上記（ウェスタンブロッティング法）に記載の方法を用いて、ＴｒｋＢの下流のシグナル伝達キナーゼがＤｉＴｒｂＬ３の外因性処理によって活性化されるかどうかを調べた。

予想されたように、ＤｉＴｒｂＬ３は初代培養海馬ニューロンにおけるＡｋｔ及びＥｒｋ１／２のリン酸化を劇的に活性化し（図８（ａ）及び（ｂ）、レーン３）、ＡＮＡ－１２の存在下ではそのリン酸化活性は低下した（図８（ａ）及び（ｂ）、レーン４）。これは、下流のシグナル伝達がＴｒｋＢに依存することを強く示唆する。

定量的結果は、Ａｋｔ及びＥｒｋ１／２の活性化について、ＤＭＳＯ及びＤｉＴｒｂＬ３の誘導間で有意な違いを示した（図８（ｃ）－（ｅ），ｐ＜０．０１）。更に、これらのキナーゼのリン酸化はＡＮＡ－１２処理によって抑制され（図８（ｃ）－（ｅ）、Ａｋｔでｐ＜０．０５、Ｅｒｋ１／２でｐ＜０．０１）、下流のシグナル伝達カスケードがＤｉＴｒｂＬ３によって開始され、ＴｒｋＢの自己リン酸化を誘導することが示唆された。

[0104] また、他の受容体チロシンキナーゼによるＤｉＴｒｂＬ３のオフターゲット活性を、上記（リン酸化ＲＴＫアレイ評価）に記載した方法、すなわち、４０種類の異なるＲＴＫを含むアレイベースの実験により測定した。

ＢＤＮＦと初代培養海馬ニューロンを１時間インキュベートすると、Ｔｒ

ｋＢのリン酸化が起こった（図９、左下）。この観察結果と非常によく似て、ＤｉＴｒｂＬ３はＴｒｋＢのみをリン酸化した（図９、右上）。更に、ＡＮＡ－１２処理したサンプルについて、ＲＴＫアレイ及びそのデンシトメトリー分析の両方において、ＤｉＴｒｂＬ３によって誘導されるＴｒｋＢリン酸化のシグナルが低下した（図９、右下、及び図１０）。

以上の結果から、ＤｉＴｒｂＬ３が特異的なＴｒｋＢアゴニストであることが強く証明される。

[0105]（ＤｉＴｒｂＬ３処理によるニューロン遺伝子の活性化誘導、及び軸索伸長の促進）

ＢＤＮＦがｃ－ｆｏｓやＡｒｃのような前初期遺伝子に応答するシナプス可塑性の調節に重要な役割を果たしていることから、ＤｉＴｒｂＬ３の処理下でのｃ－ｆｏｓ及びＡｒｃのｍＲＮＡ発現レベルを定量した。

初代培養皮質ニューロンをＢＤＮＦ（１ｎＭ）、又はＤｉＴｒｂＬ３（１ｎＭ）で１時間処理した後、上記（ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＲ）に記載の方法で、ＲＮＡ抽出及びｑＲＴ－ＰＣＲ測定を行った。その結果、ｃ－ｆｏｓ及びＡｒｃの発現が、ＤｉＴｒｂＬ３処理により有意に上昇した（図１１，ｐ＜０．０１）。

[0106] 次に、初代培養ニューロンに対するＤｉＴｒｂＬ３処理の細胞レベルの効果を検証した。上記（軸索伸長の評価のための免疫細胞化学）に記載の方法により、初代培養ニューロンをＤｉＴｒｂＬ３で３日間処理すると、ＢＤＮＦ処理と同様に、初代培養ニューロンの軸索長が伸長した（図１２（ａ））。定量的結果は、１０ｎＭ及び１００ｎＭのＤｉＴｒｂＬ３が軸索伸長を有意に増強することを示した（図１２（ｂ）、ＤＭＳＯ処理と比較、ｐ＜０．０１）。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（１）：

[化1]

$$-Xaa^{1}-(Xaa^{2})_{n1}-Xaa^{3}-Xaa^{4}- \quad (1)$$

（式（１）中、

Xaa^{1}は、塩基性アミノ酸であり、

Xaa^{2}は、任意のアミノ酸であり、

Xaa^{3}、及びXaa^{4}は、各々独立に、塩基性アミノ酸、又は芳香族アミノ酸であり、

ｎ１は、０～１０の整数を示す。）

で表される構造を含む、環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項2] 前記式（１）で表される構造は、下記式（２）：

[化2]

$$-Arg-(Xaa^{2})_{n1}-Phe-Trp- \quad (2)$$

（式（２）中、

Xaa^{2}及びｎ１は、前記と同義である。）

で表される構造のいずれかである、請求項１に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項3] 前記環状ペプチドの環状構造が$N-CO-CH_{2}-S$構造を含む、請求項１又は２に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項4] 前記Ｎがチロシンのアミノ基に由来する、請求項３に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

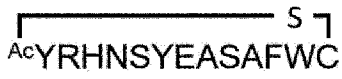
[請求項5] 前記Ｓがシステインのチオール基に由来する、請求項３又は４に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項6] 前記環状ペプチドの環状構造を形成するアミノ酸残基の数が、６～

２０個である、請求項１～５のいずれか１項に記載の環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

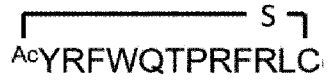
[請求項7] 下記式（３）～（８）で表される環状構造のいずれか１つを含む、環状ペプチド、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[化3]



（３）

[化4]



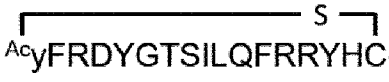
（４）

[化5]



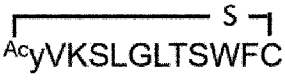
（５）

[化6]



（６）

[化7]



（７）

[化8]



（８）

（式（３）～（８）中、Ａｃは－ＣＨ$_2$－ＣＯ－であり、ＹはＬ－チロシンであり、ｙはＤ－チロシンである。）

[請求項8] 前記環状ペプチドが更に１～２０のアミノ酸で構成される直鎖状構造を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の環状ペプチド、又は

その薬理学的に許容可能な塩。

[請求項9] ２つの請求項１～７のいずれか１項に記載の環状ペプチドを含み、一方の環状ペプチドが他方の環状ペプチドとリンカーにより連結している、ペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項10] 前記２つの環状ペプチドが同一である、請求項９に記載のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

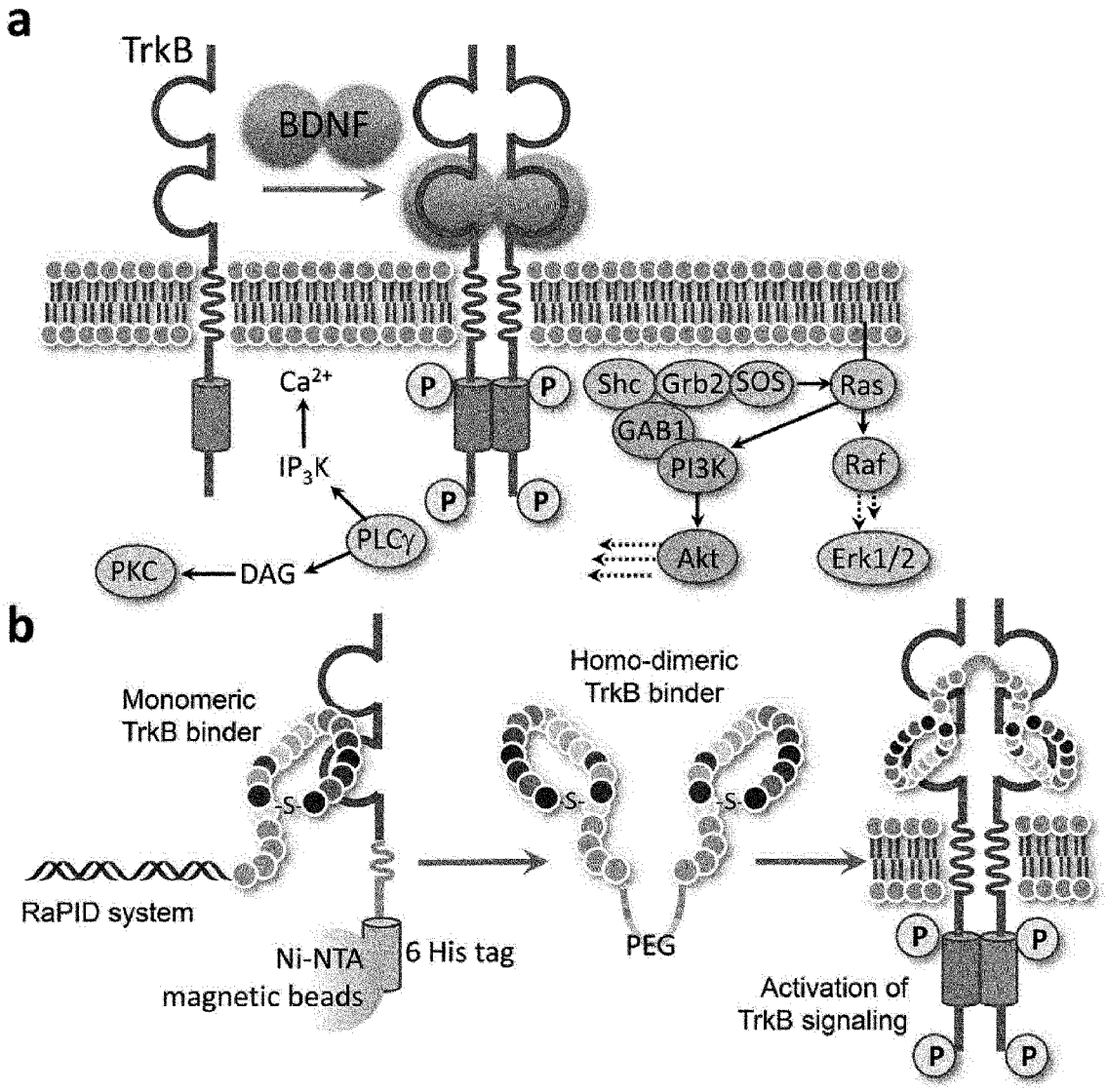
[請求項11] 前記リンカーの長さが２０Å以上２００Å以下である、請求項９又は１０に記載のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

[請求項12] ＴｒｋＢのリン酸化を誘導する、請求項９～１１のいずれか１項に記載のペプチド複合体、又はその薬理学的に許容可能な塩。

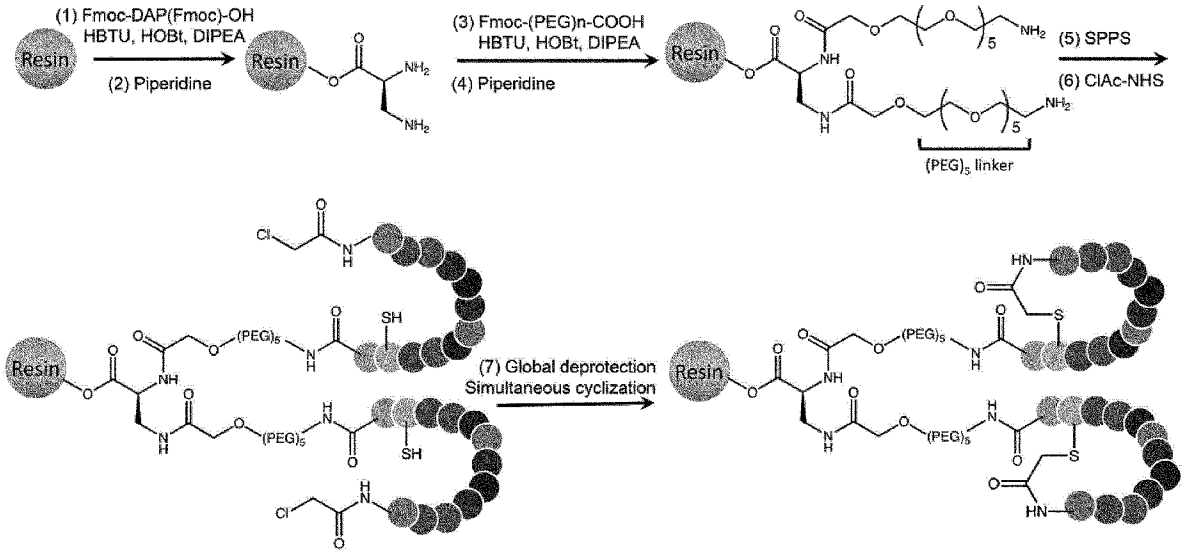
[請求項13] 請求項１～７のいずれか１項に記載の環状ペプチド、及びその薬理学的に許容可能な塩、並びに、請求項９～１２のいずれか１項に記載のペプチド複合体、及びその薬理学的に許容可能な塩からなる群より選択される少なくとも１つを含む、医薬組成物。

[請求項14] 神経変性疾患、神経発達障害、又は神経精神疾患の治療又は予防に用いられる、請求項１３に記載の医薬組成物。

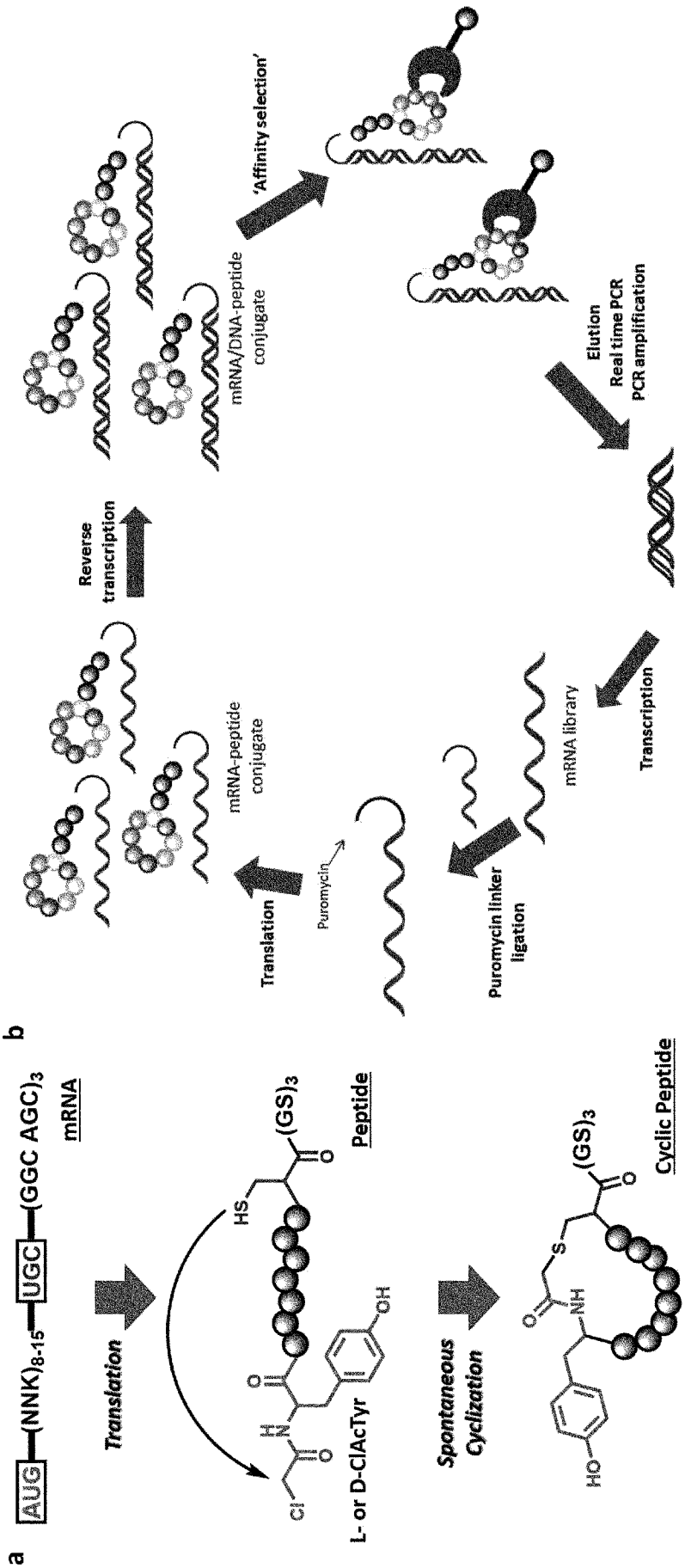
[図1]


a
TrkB
BDNF
Ca2+
IP3K
PLCγ
PKC
DAG
P
Shc
Grb2
SOS
Ras
GAB1
PI3K
Raf
Akt
Erk1/2
b
Monomeric
TrkB binder
RaPID system
Ni-NTA
magnetic beads
6 His tag
Homo-dimeric
TrkB binder
PEG
Activation of
TrkB signaling

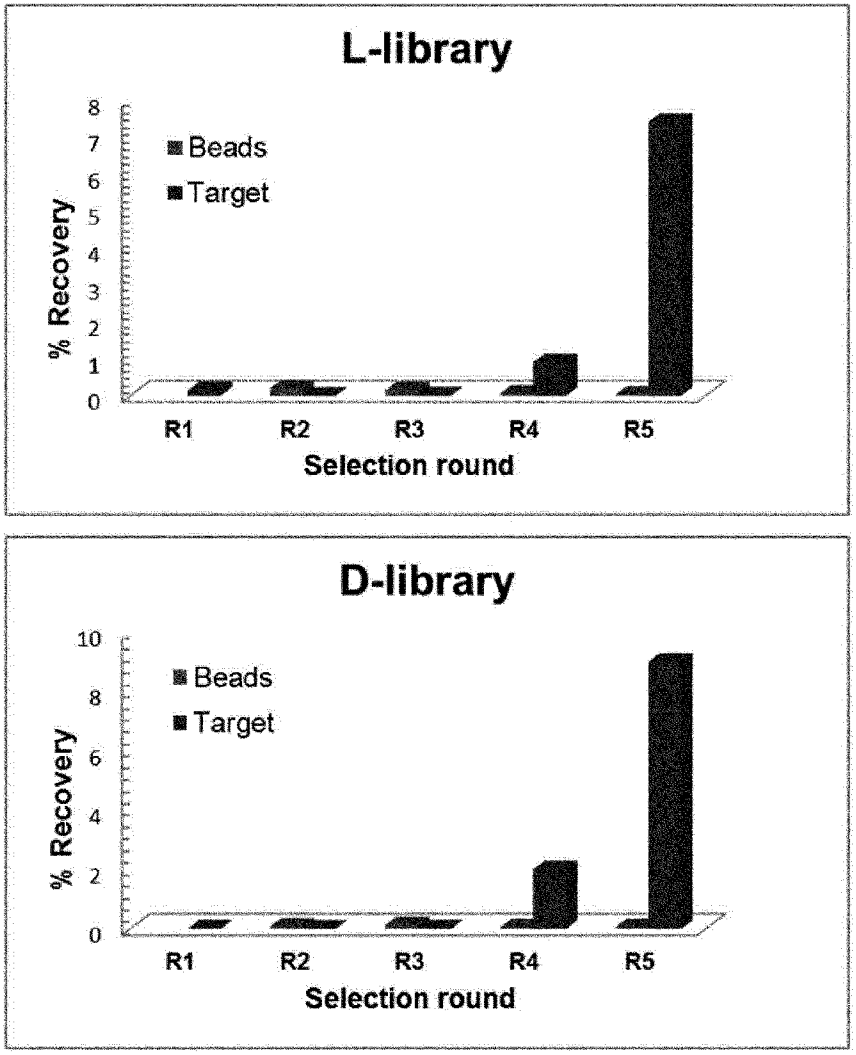
[図2]


(1) Fmoc-DAP(Fmoc)-OH
HBTU, HOBt, DIPEA
(2) Piperidine
Resin
(3) Fmoc-(PEG)n-COOH
HBTU, HOBt, DIPEA
(4) Piperidine
(5) SPPS
(6) ClAc-NHS
(PEG)5 linker
(7) Global deprotection
Simultaneous cyclization

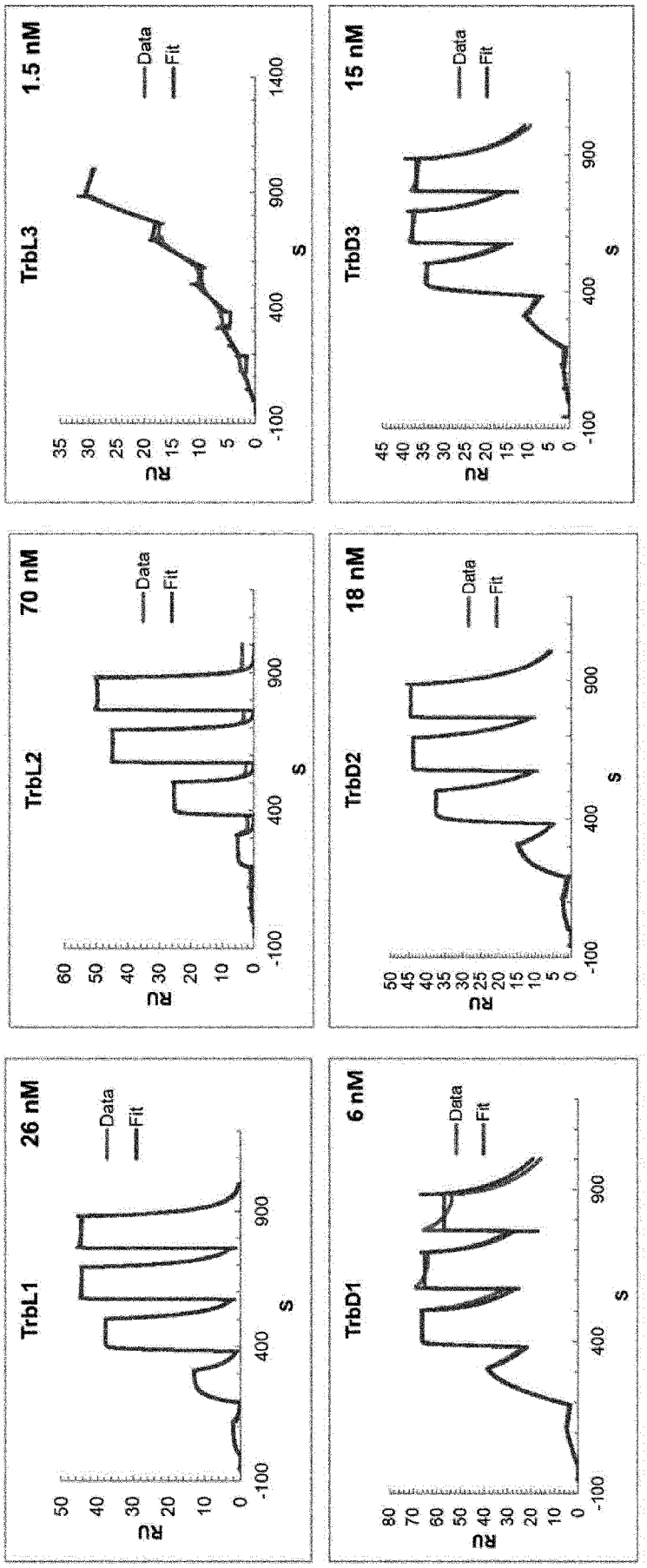
[図3]


a
AUG
(NNK)8-15
UGC
(GGC AGC)3
mRNA
Translation
HS
(GS)3
Peptide
L- or D-ClAcTyr
Spontaneous Cyclization
Cyclic Peptide
b
Translation
mRNA-peptide conjugate
Puromycin
Puromycin linker ligation
mRNA library
Transcription
Reverse transcription
mRNA/DNA-peptide conjugate
'Affinity selection'
Elution
Real time PCR
PCR amplification

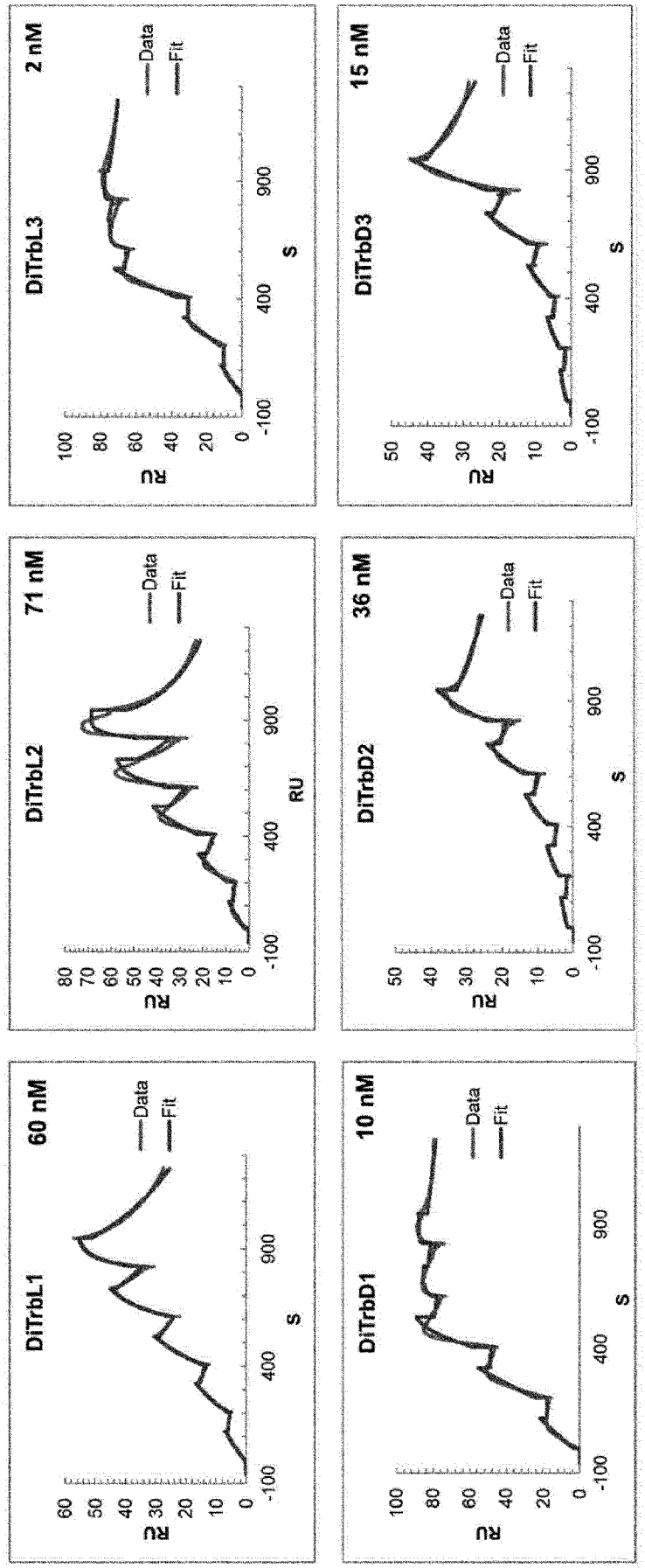
[図4]


L-library
% Recovery
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Beads
Target
R1
R2
R3
R4
R5
Selection round
D-library
% Recovery
0
2
4
6
8
10
Beads
Target
R1
R2
R3
R4
R5
Selection round

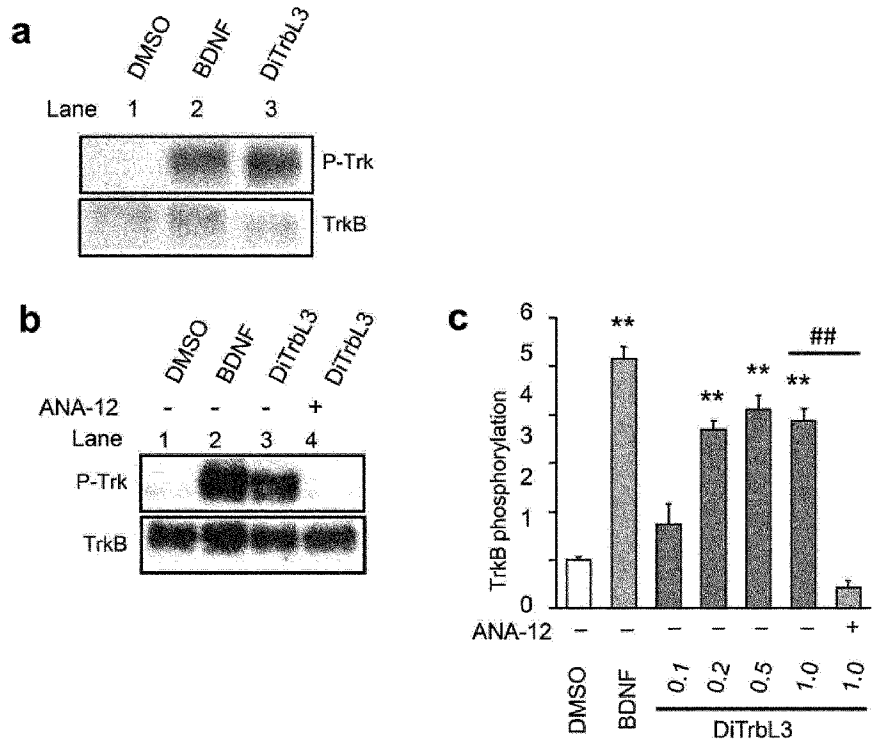
[図5]


TrbL3
1.5 nM
TrbD3
15 nM
TrbL2
70 nM
TrbD2
18 nM
TrbL1
26 nM
TrbD1
6 nM
Data
Fit
RU
s

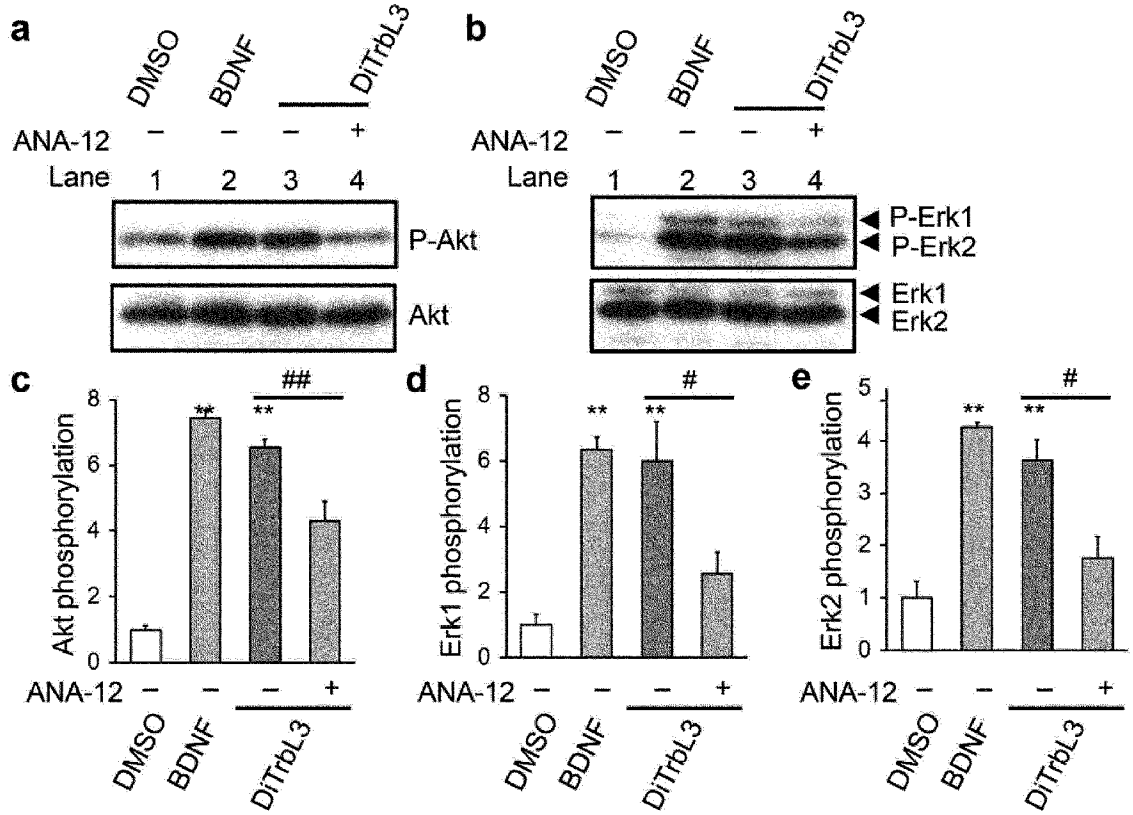
[図6]


DiTrbL1
60 nM
DiTrbL2
71 nM
DiTrbL3
2 nM
DiTrbD1
10 nM
DiTrbD2
36 nM
DiTrbD3
15 nM
Data
Fit
RU
S

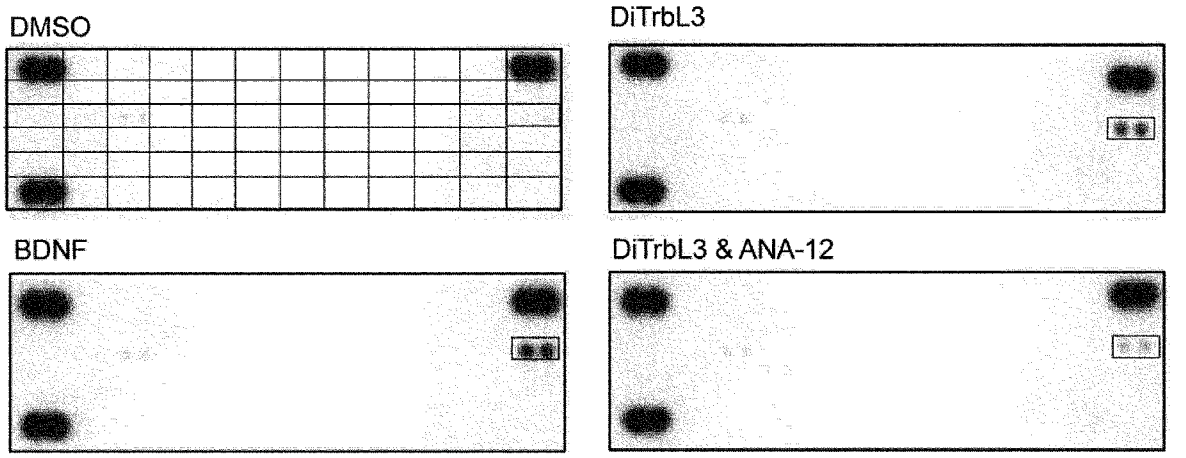
[図7]


a
DMSO
BDNF
DiTrbL3
Lane 1 2 3
P-Trk
TrkB
b
DMSO
BDNF
DiTrbL3
DiTrbL3
ANA-12 - - - +
Lane 1 2 3 4
P-Trk
TrkB
c
TrkB phosphorylation
ANA-12
DMSO
BDNF
0.1
0.2
0.5
1.0
1.0
DiTrbL3
**
##

[図8]

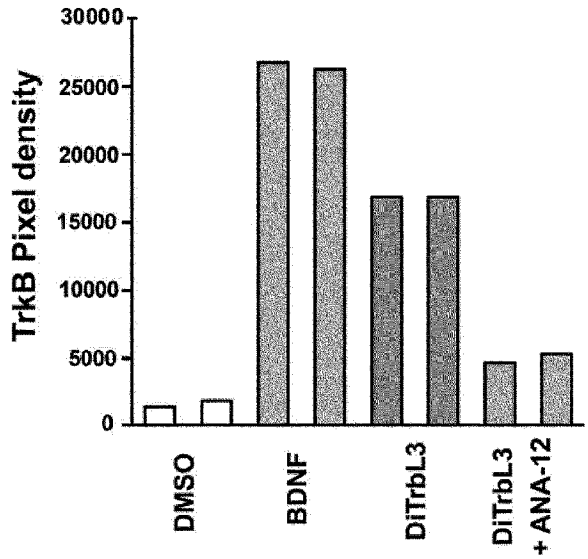

a
DMSO
BDNF
DiTrbL3
ANA-12 – – – +
Lane 1 2 3 4
P-Akt
Akt
b
DMSO
BDNF
DiTrbL3
ANA-12 – – – +
Lane 1 2 3 4
P-Erk1
P-Erk2
Erk1
Erk2
c
Akt phosphorylation
ANA-12
DMSO
BDNF
DiTrbL3
**
##
d
Erk1 phosphorylation
ANA-12
DMSO
BDNF
DiTrbL3
**
#
e
Erk2 phosphorylation
ANA-12
DMSO
BDNF
DiTrbL3
**
#

[図9]

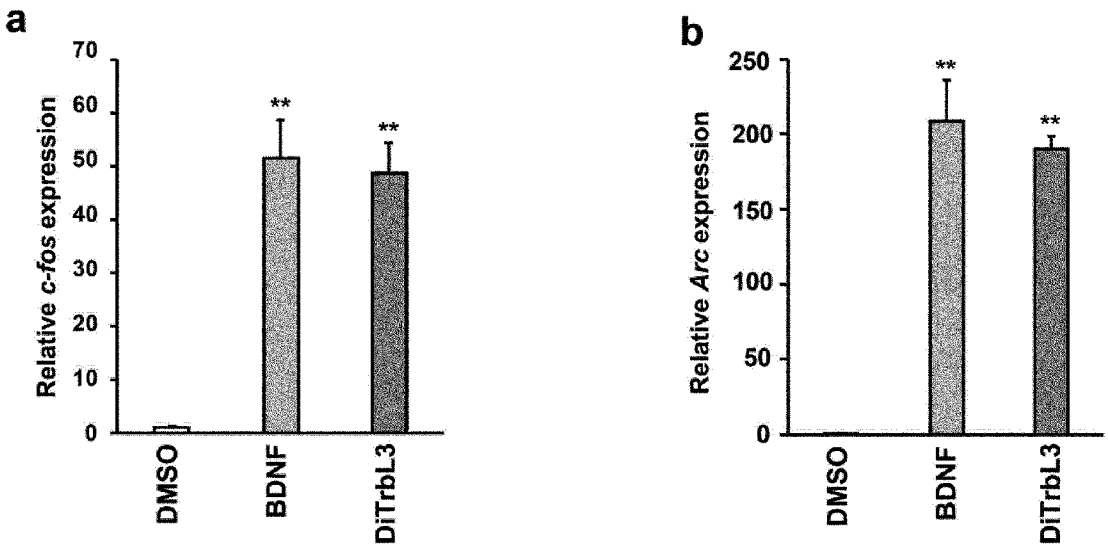


PosCTL											PosCTL
EGFR	ErbB2	ErbB3	ErbB4	FGFR2	FGFR3	FGFR4	InsulinR	IFG-IR	Axl	Dtk	Mer
HGFR	MSPR	PDGFRα	PDGFRβ	SCFR	Flt-3	M-CSFR	c-Ret	Tie-1	Tie-2	TrkA	TrkB
TrkC	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3	MuSK	EphA1	EphA2	EphA3	EphA6	EphA7	EphA8	EphB1
EphB2	EphB4	EphB6	NegCTL								
PosCTL											

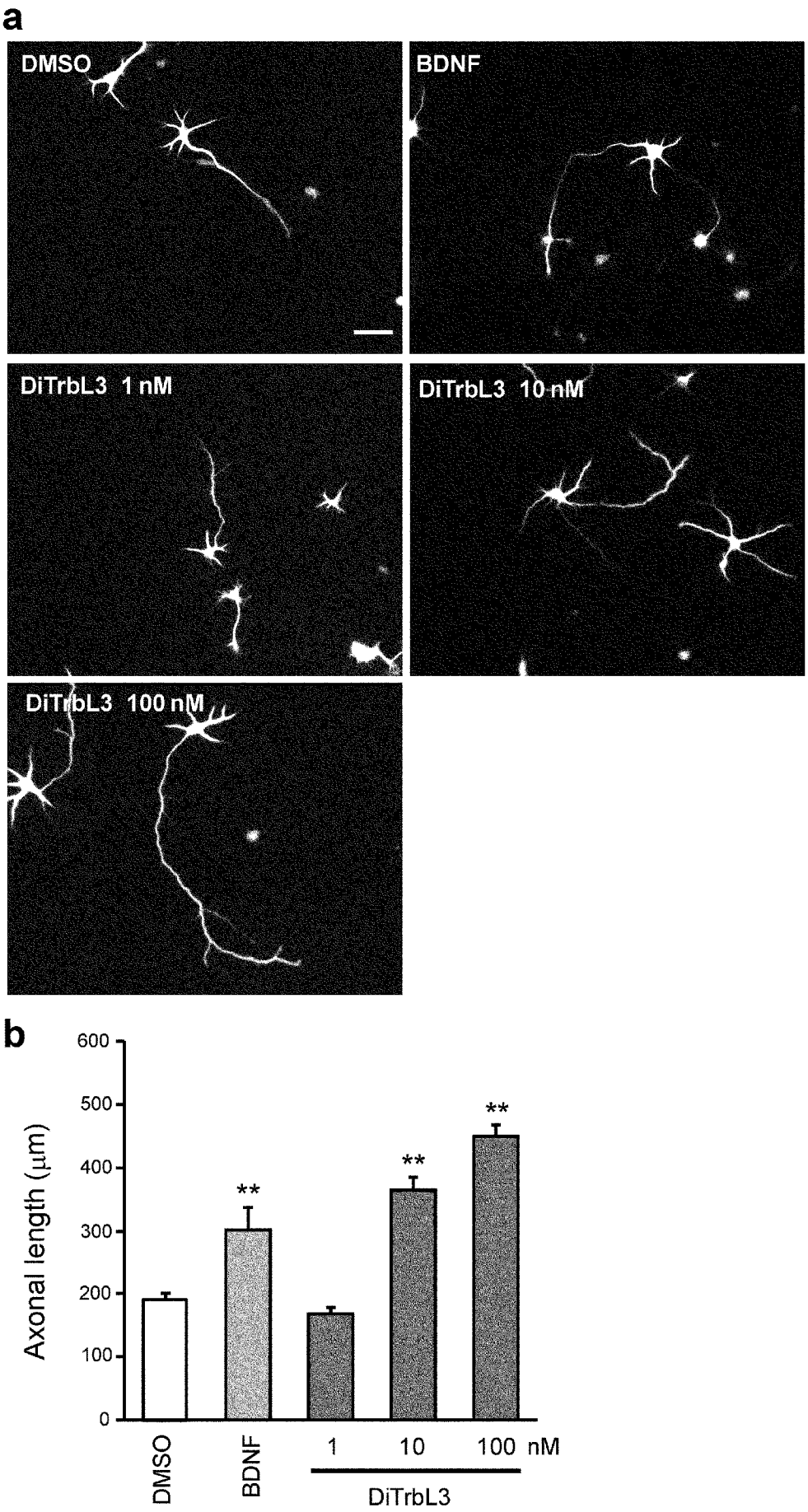
[図10]



[図11]


a
Relative c-fos expression
70
60
50
40
30
20
10
0
**
**
DMSO
BDNF
DiTrbL3
b
Relative Arc expression
250
200
150
100
50
0
**
**
DMSO
BDNF
DiTrbL3

[図12]


a
DMSO
BDNF
DiTrbL3 1 nM
DiTrbL3 10 nM
DiTrbL3 100 nM
b
Axonal length (μm)
600
500
400
300
200
100
0
**
**
**
DMSO
BDNF
1
10
100 nM
DiTrbL3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/026039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K 7/50(2006.01)i; A61K 38/08(2019_01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 38/12(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/18(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: C07K7/50 ZNA; A61K38/08; A61K38/10; A61K38/12; A61P25/28; A61P25/18; A61P25/00; A61P43/00 111; A61K38/16
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)
C07K7/50; A61K38/08; A61K38/10; A61K38/12; A61K38/16; A61P25/00; A61P25/18; A61P25/28; A61P43/00

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); (STN)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2020/027224 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 06 February 2020 (2020-02-06) claim 1, paragraph [0063], fig. 1	1-8 9-14
X Y	WO 2019/026920 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 07 February 2019 (2019-02-07) claim 1, paragraph [0066], fig. 1	1-8 9-14
X Y	JP 2003-502295 A (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 21 January 2003 (2003-01-21) example 23, table 7 claims 1, 3, 42, paragraphs [0005], [0012], [0013], [0089], fig. 8	1 9-14

☒ 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
"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
24 August 2021 (24.08.2021)	07 September 2021 (07.09.2021)

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/026039

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-505145 A (KING'S COLLEGE LONDON) 08 March 2007 (2007-03-08) claims 1, 2, 56, paragraphs [0215], [0216], [0243], [0250], [0251], fig. 18	1, 13, 14
A	US 2003/0211982 A1 (SARAGOVI, Horacio Uri) 13 November 2003 (2003-11-13) entire text	1-14
A	WO 2002/03071 A2 (PANGENE CORPORATION) 10 January 2002 (2002-01-10) entire text	1-14
A	BAEZA, Jose Luis et al., "Cyclic amino acid linkers stabilizing key loops of brain derived neurotrophic factor", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, vol. 22, pp. 444-448 entire text	1-14
A	O'LEARY, Paul D. et al., "Design of Potent Peptide Mimetics of Brain-derived Neurotrophic factor", The Journal of Biological Chemistry, 2003, vol. 278, no. 28, pp. 25738-25744 entire text	1-14
A	CHITRANSHI, Nitin et al., "Molecular determinants and interaction data of cyclic peptide inhibitor with the extracellular domain of TrkB receptor", Data in Brief, 2016, vol. 6, pp. 776-782 entire text	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/026039

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2002/027224 A1	06 Feb. 2020	EP 3831846 A1 claim 1, paragraph [0158], fig. 1 CN 112566928 A KR 20210038580 A	
WO 2019/026920 A1	07 Feb. 2019	EP 3666897 A1 claim 1, paragraph [0163], fig. 1 KR 10-2020-0032184 A CN 110997921 A	
JP 2003-502295 A	21 Jan. 2003	WO 2000/075176 A1 claims 1, 3, 42, page 2, lines 3-21, page 5, line 22 to page 6, line 3, page 40, lines 5-26, example 23, table 7, fig. 8 EP 1212353 A1	
JP 2007-505145 A	08 Mar. 2007	US 2005/0164920 A1 claims 1, 2, 56, paragraphs [0259], [0260], [0292], [0301], [0302], fig. 18 WO 2005/025514 A2 EP 1663276 A2	
US 2003/0211982 A1	13 Nov. 2003	WO 2001/052843 A1 entire text EP 1265605 A1	
WO 2002/03071 A2	10 Jan. 2002	AU 7324501 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/026039

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 7/50(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 38/12(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/18(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i
FI: C07K7/50 ZNA; A61K38/08; A61K38/10; A61K38/12; A61P25/28; A61P25/18; A61P25/00; A61P43/00 111; A61K38/16

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））

C07K7/50; A61K38/08; A61K38/10; A61K38/12; A61K38/16; A61P25/00; A61P25/18; A61P25/28; A61P43/00

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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); (STN)CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
X	WO 2020/027224 A1 (国立大学法人東京大学) 06.02.2020 (2020-02-06) 請求項１、［００６３］、図１	1-8
Y		9-14
X	WO 2019/026920 A1 (国立大学法人東京大学) 07.02.2019 (2019-02-07) 請求項１、［００６６］、図１	1-8
Y		9-14
X	JP 2003-502295 A (ザ ユニバーシティー オブ メルボルン) 21.01.2003 (2003-01-21) 実施例２３、表７	1
Y	請求項１、３、４２、段落０００５、００１２、００１３、００８９、図８	9-14
X	JP 2007-505145 A (キングズ カレッジ ロンドン) 08.03.2007 (2007-03-08) 請求項１、２、５６、段落０２１５、０２１６、０２４３、０２５０、０２５１、図１８	1,13,14

☑ 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
“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
24.08.2021	07.09.2021

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）
田中　晴絵 4B 9739
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	US 2003/0211982 A1 (SARAGOVI, Horacio Uri) 13.11.2003 (2003-11-13) 全文	1-14
A	WO 2002/03071 A2 (PANGENE CORPORATION) 10.01.2002 (2002-01-10) 全文	1-14
A	BAEZA, Jose Luis et al., Cyclic amino acid linkers stabilizing key loops of brain derived neurotrophic factor, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, vol.22, p.444-448 全文	1-14
A	O'LEARY Paul D. et al., Design of Potent Peptide Mimetics of Brain-derived Neurotrophic Factor, The Journal of Biological Chemistry, 2003, vol.278,no.28, pp.25738-25744 全文	1-14
A	CHITRANSHI, Nitin et al., Molecular determinants and interaction data of cyclic peptide inhibitor with the extracellular domain of TrkB receptor, Data in Brief, 2016, vol.6, pp.776-782 全文	1-14

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/026039

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
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

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/JP2021/026039

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/027224 A1	06.02.2020	EP 3831846 A1 請求項１、［０１５８］、図１ CN 112566928 A KR 20210038580 A	
WO 2019/026920 A1	07.02.2019	EP 3666897 A1 請求項１、［０１６３］、図１ KR 10-2020-0032184 A CN 110997921 A	
JP 2003-502295 A	21.01.2003	WO 2000/075176 A1 請求項１、３、４２、２頁３～２１行、５頁２２行～６頁３行、４０頁５～２６行、実施例２３、表７、図８ EP 1212353 A1	
JP 2007-505145 A	08.03.2007	US 2005/0164920 A1 請求項１、２、５６、［０２５９］、［０２６０］、［０２９２］、［０３０１］、［０３０２］、図１８ WO 2005/025514 A2 EP 1663276 A2	
US 2003/0211982 A1	13.11.2003	WO 2001/052843 A1 全文 EP 1265605 A1	
WO 2002/03071 A2	10.01.2002	AU 7324501 A	