(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
2020年12月17日(17.12.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/250855 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/022559

(22) 国際出願日： 2020年6月8日(08.06.2020)

(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 2019-108953 2019年6月11日(11.06.2019) 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: 南 高一 (**MINAMI, Koichi**); 〒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: 特許業務法人太陽国際特許事務所 (**TAIYO, NAKAJIMA & KATO**); 〒1600022 東京都新宿区新宿４丁目３番１７号 Tokyo (JP).

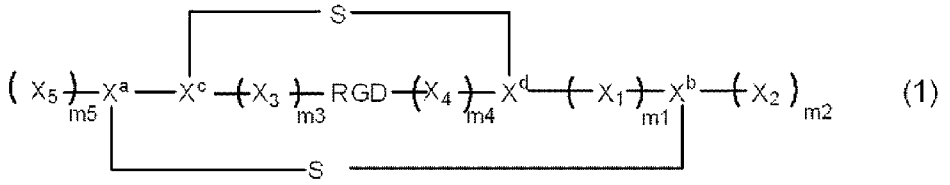
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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).

WO 2020/250855 A1

(54) Title: CYCLIC PEPTIDE, CELL SCAFFOLD MATERIAL, CELL SEPARATION MATERIAL AND CULTURE MEDIUM

(54) 発明の名称： 環状ペプチド、細胞足場材、細胞分離材、及び、培地



(1)

(57) Abstract: A cyclic peptide that has an amino acid sequence represented by formula (1). In the formula: X^a and X^b, and X^c and X^d independently represent each an amino acid residue crosslinked via a thioether bond; X_1 to X_5 independently represent each an amino acid residue; R represents an arginine residue; G represents a glycine residue; D represents an aspartic acid residue; and m1 to m5 independently represent each an integer of 0 or greater. However, it is to be noted that the sum of the amino acid residues represented by X^a, X^b, X^c and X^d and X_1, X_3 and X_4 is 7 to 16.

(57) 要約：環状ペプチドは下記式（１）で表されるアミノ酸配列を有する。式中、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して架橋されたアミノ酸残基を表し、X_1～X_5は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、Ｒはアルギニン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、Ｄはアスパラギン酸残基を表し、ｍ１～ｍ５は、それぞれ独立に、０以上の整数を表す。ただし、X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基の合計数は、７～１６である。

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　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)）

明　細　書

発明の名称 ：

環状ペプチド、細胞足場材、細胞分離材、及び、培地

技術分野

[0001] 本開示は、環状ペプチド、細胞足場材、細胞分離材、及び、培地に関する。

背景技術

[0002] インテグリンは細胞接着分子であり、αβ鎖とβ鎖の２つのサブユニットからなるヘテロダイマーのタンパク質である。インテグリンは、細胞接着だけでなく、細胞伸展、細胞移動、細胞増殖、組織形成、がんの転移、組織修復、血液凝固などにも関与する重要な役割を果たしている。

[0003] 従来の環状ペプチドとしては、特表２００５－５０７３７６号公報及び特表平６－５０９５５１号公報並びにBioconjugate Chem, 1995, 6, p. 269-277に記載のものが知られている。特表２００５－５０７３７６号公報は、インテグリンに結合する、ジスルフィド結合により環状化した環状ペプチドを開示している。インテグリンに対する親和性を有する環状ペプチドは他にも知られており、例えば、特表平６－５０９５５１号公報は血小板凝集阻害剤として、Ｔｙｒ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐを環状化させた環状ペプチドをＧｐＩＩｂＩＩＩａに対する高い特異性を有する血小板凝集阻害剤として記載している。また、Bioconjugate Chem, 1995, 6, p. 269-277は、（ブロモアセチル）ジアミノプロピオン酸を用いてペプチドの環化及び／又はキャリアタンパク質若しくはガラスカバースリップへの結合を行う技術を記載している。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本開示の一実施形態が解決しようとする課題は、インテグリン結合性に優れ、かつ、分子安定性、例えばアルカリ耐性に優れた環状ペプチド、並びに

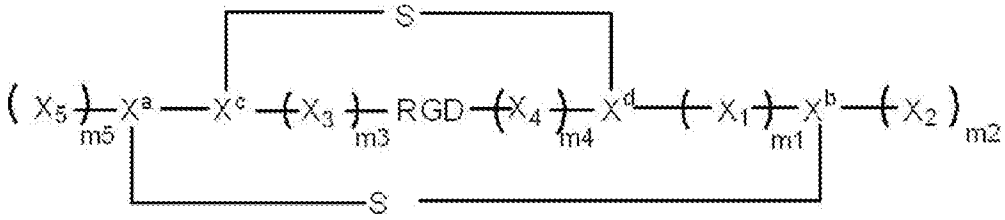
、上記環状ペプチドを含む細胞足場材、細胞分離材及び培地を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決するための手段には、以下の態様が含まれる。

＜１＞ 下記式（１）で表されるアミノ酸配列を有する、環状ペプチド。

[0006] [化1]



(1)

[0007] 式（１）中、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して架橋されたアミノ酸残基を表し、

X_1～X_5は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、

Ｒはアルギニン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、Ｄはアスパラギン酸残基を表し、ｍ１～ｍ５は、それぞれ独立に、０以上の整数を表す。ただし、X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１６である。

[0008] ＜２＞ 上記式（１）におけるX_2及びX_5が、側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を含む、＜１＞に記載の環状ペプチド。

＜３＞ 上記固定化官能基が、アミノ基、又は、チオール基である、＜２＞に記載の環状ペプチド。

＜４＞ 上記側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸が、Ｌ－リシン、Ｄ－リシン、Ｌ－システイン、Ｄ－システイン、Ｌ－ホモシステインおよびＤ－ホモシステインからなる群から選択される少なくとも１種のアミノ酸である、＜２＞又は＜３＞に記載の環状ペプチド。

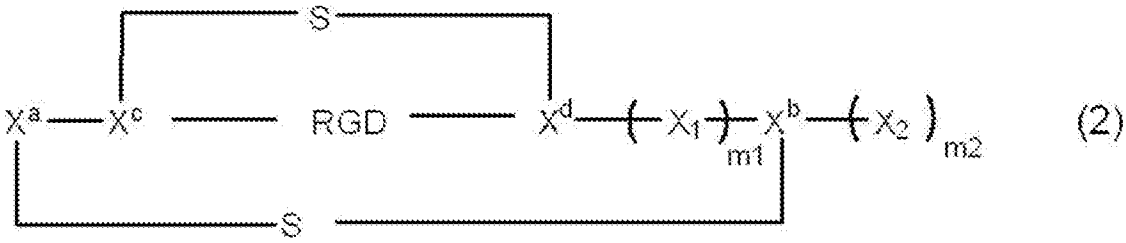
＜５＞ 上記式（１）におけるX^c及びX^dのいずれか一方が、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－ア

ミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、及び、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、＜１＞～＜４＞のいずれか１つに記載の環状ペプチド。

＜６＞　上記式（１）におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、＜１＞～＜５＞のいずれか１つに記載の環状ペプチド。

＜７＞上記式（１）で表されるアミノ酸配列が、下記式（２）で表されるアミノ酸配列である、＜１＞～＜６＞のいずれか１つに記載の環状ペプチド。

[0009] [化2]



(2)

[0010]　式（２）中、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して架橋されたアミノ酸残基を表し、X_1及びX_2は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、Ｒはアルギニン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、Ｄはアスパラギン酸残基を表し、ｍ１及びｍ２は、それぞれ独立に、１以上の整数を表す。ただし、X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１４である。

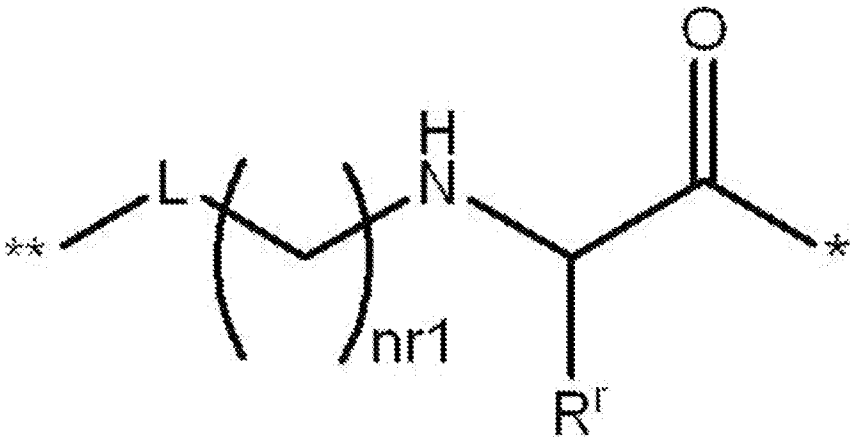
[0011] ＜８＞　上記式（２）におけるX^c及びX^dのいずれか一方が、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ

－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、及び、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシンからなる群から選択される側鎖にアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、＜７＞に記載の環状ペプチド。

＜９＞　上記式（２）におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、＜７＞又は＜８＞に記載の環状ペプチド。

＜１０＞　上記式（２）におけるX^aが、下記構造（ｒ）で表されるアミノ酸残基である、＜７＞～＜９＞のいずれか１つに記載の環状ペプチド。

[0012] [化3]



(r)

[0013]　構造式（ｒ）中、R^rは水素原子又は１価の有機基を表し、Ｌは、－（CH_2）$_{L1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（CH_2）$_{L1}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表し、ｎｒ１は、０以上の整数を表し、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表し、＊＊は

チオエーテル結合における硫黄原子との結合部位を表す。

[0014] ＜１１＞　上記式（２）におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、X^aが、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシン、及び、（２Ｓ，３Ｓ）－２－［（アセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基である、＜７＞～＜１０＞のいずれか１つに記載の環状ペプチド。

＜１２＞　X^aはα炭素にアセチル基が結合した任意のアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、X^bはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、X^cはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、X^dはＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基又はＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基であり、$(X_1)_{m1}$は、全体でＦであるか、又は

X^aはα炭素にアセチル基が結合した任意のアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、X^bはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、X^cはＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基又はＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基であり、X^dはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、$(X_1)_{m1}$は、全体でＦである、＜１＞～＜１１＞のいずれか１つに記載の環状ペプチド。

＜１３＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１つに記載の環状ペプチドと、基材と、を含む、細胞足場材。

＜１４＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１つに記載の環状ペプチドと、保持材と、

を含む、細胞分離材。

＜１５＞　＜１＞～＜１２＞のいずれか１つに記載の環状ペプチドと、培養成分と、を含む、培地。

発明の効果

[0015] 本発明の実施形態によれば、インテグリン結合性に優れ、かつ、分子安定性、例えばアルカリ耐性に優れた環状ペプチド、並びに上記環状ペプチドを含む細胞足場材、細胞分離材及び培地が提供される。

発明を実施するための形態

[0016] 以下において、本開示の内容について詳細に説明する。以下に記載する構成要件の説明は、本開示の代表的な実施態様に基づいてなされることがあるが、本開示はそのような実施態様に限定されるものではない。

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意味する。

本開示に段階的に記載されている数値範囲において、ある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、本開示に記載されている数値範囲において、ある数値範囲で記載された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。

本開示において、２以上の好ましい態様の組み合わせは、より好ましい態様である。

本開示において、各成分の量は、各成分に該当する物質が複数種存在する場合には、特に断らない限り、複数種の物質の合計量を意味する。

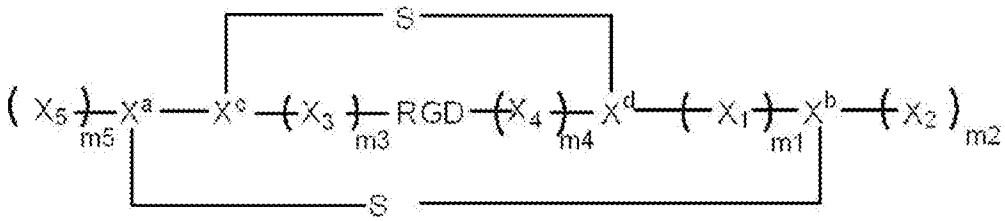
本開示において、「工程」との語は、独立した工程だけではなく、工程の所期の目的が達成される限りは、他の工程と明確に区別できない工程をも含む。

[0017] （環状ペプチド）

本開示に係る環状ペプチドは、下記式（１）で表されるアミノ酸配列（以下、「特定アミノ酸配列」ともいう。）を有する。

[0018]

[化4]



(1)

[0019] 式（１）中、Ｘ^{a}及びＸ^{b}並びにＸ^{c}及びＸ^{d}は、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して結合されたアミノ酸残基を表し、Ｘ$_{1}$～Ｘ$_{5}$は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、Ｒはアルギニン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、Ｄはアスパラギン酸残基を表し、ｍ１～ｍ５は、それぞれ独立に、０以上の整数を表す。ただし、Ｘ^{a}、Ｘ^{b}、Ｘ^{c}及びＸ^{d}並びに、Ｘ$_{1}$、Ｘ$_{3}$及びＸ$_{4}$で表されるアミノ酸残基の合計数は、７～１６である。

[0020] インテグリン結合性を有する環状ペプチド（以下、インテグリン結合性環状ペプチド」ともいう。）は、細胞表面の細胞形質膜にあるインテグリンに対する結合能を有する。インテグリンは細胞接着分子の１つであり、インテグリン結合性環状ペプチドと細胞表面のインテグリンとは結合するため、インテグリン結合性環状ペプチドは、細胞培養のための足場材、細胞を分離するための細胞分離材、各種細胞培養培地等に用いること等が可能であり、有用な分子である。しかし、環状ペプチドは、直鎖ペプチドと比較して、例えば、インテグリン等の細胞接着分子に対して高い結合性及び特異性を有する場合がある一方、環状ペプチドの分子安定性は直鎖ペプチドよりも低い傾向がある。

また、例えば、環状ペプチドは、アルカリ耐性；酸耐性；Ｘ線、γ線などの活性光線に対する耐性などが低い傾向がある。インテグリン結合性環状ペプチドも、分子安定性が低いために、長期間の使用又は繰り返しの使用の間に分解し、所望の効果を長期間にわたって得ることができなかった。さらに、環状ペプチドは、直鎖ペプチドよりも常に高い結合性を有するわけではなく、環状ペプチドが有するアミノ酸配列によって、インテグリン結合性が変

化するため、環状ペプチドにおいて分子安定性とインテグリン結合性との両方が優れるインテグリン結合性環状ペプチドを得ることは容易ではなかった。

[0021] そこで、発明者が鋭意検討した結果、特定のアミノ酸配列を有し、かつ、特定の構造を有する環状ペプチドは、分子安定性及びインテグリン結合性の両方に優れることを見出した。その理由は明らかではないが以下のように推測される。

本開示に係る特定構造の環状ペプチドは、アミノ酸配列中の特定の部位において、アミノ酸残基がチオエーテル結合により架橋された環状部位（以下、「環状セグメント」とも称する場合がある。）を２つ含み、かつ、X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基及びＲＧＤの合計アミノ酸残基数が７～１４となるようにすることで、ＲＧＤ配列を２つの環状部位によって保持、すなわち、２つの環状部位がＲＧＤ配列を入れ子状に保持されている。また、特表２００５－５０７３７６号公報等に記載された環状ペプチドが有するジスルフィド結合は、準共有結合であるので、培地等に含まれる還元剤等により、容易にジスルフィド結合が切断されてしまうため、十分な分子安定性が得られないことに対して、共有結合であるチオエーテル結合は、ジスルフィド結合よりも安定性により優れているので、本開示に係る環状ペプチドは、例えば、耐アルカリ性に対する分子安定性に優れ、かつ、インテグリン結合性にも優れると推定される。

以下、本開示に係る環状ペプチドの詳細について説明する。

[0022] ＜アミノ酸、及び、アミノ酸残基＞

本開示において、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 Ｎｏｍｅ

ｎｃｌａｔｕｒｅ（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。

[0023] 本開示において、特に明示しない限り、ペプチドまた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。ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列中のアミノ酸残基を位置も含めて特定する場合には、アミノ酸残基の略号の右側にＮ末端側からの何番目のアミノ酸残基であるかを示す数字を付して表す場合がある。例えば、Ｎ末端から２番目のリシンをＬｙｓ２と表す場合がある。

[0024] また、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体およびＤ体が存在するときは、Ｌ体およびＤ体の別を明示的に示した場合を除いて、原則として、Ｌ体であってもＤ体であっても構わない。例えば、「イソロイシン」は「Ｌ－イソロイシン」又は「Ｄ－イソロイシン」を表すものとし、アミノ酸残基についても同様である。同様に、アミノ酸をその略号（３文字略号または１文字略号）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体およびＤ体が存在する場合についても、Ｌ体およびＤ体の別を明示的に示した場合を除いて、原則として、Ｌ体であってもＤ体であっても構わない。例えば、「Ｌｙｓ」はいずれも「Ｌ－リシン」又は「Ｄ－リシン」を表すものとし、アミノ酸残基についても同様である。また、各アミノ酸、各アミノ酸残基について、それぞれ独立にＬ体とＤ体とを選択することができる。ただし、環状セグメント中に存在するＲＧＤ配列については、全てＬ体のアミノ酸残基とする。上記ＲＧＤ配列以外については、環状ペプチド中に存在するアミノ酸残基は全てＬ体のアミノ酸残基であっても、全てＤ体のアミノ酸残基であっても、Ｌ体のアミノ酸残基とＤ体のアミノ酸残基の両方が存在していてもよい。

[0025] また、アミノ酸をその名称を用いて表した場合であって、ジアステレオマ

ーの関係にある異性体が存在する場合は、その名称により特定されるアミノ酸には含まれないものとする。ジアステレオマーは接頭辞「アロ」を用いて異なる種類のアミノ酸として扱う。例えば、「トレオニン」は「アロトレオニン」を含まないものとする。アミノ酸残基についても同様である。

[0026] １文字略号および３文字略号が公式に認められたアミノ酸の名称および略号（１文字略号、３文字略号）を表１に示す。

[0027]

[表1]

一文字略号	三文字略号	名称
A	Ala	アラニン
B	Asx	アスパラギン酸又はアスパラギン
C	Cys	システイン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
F	Phe	フェニルアラニン
G	Gly	グリシン
H	His	ヒスチジン
I	Ile	イソロイシン
K	Lys	リシン
L	Leu	ロイシン
M	Met	メチオニン
N	Asn	アスパラギン
O	Pyl	ピロリシン
P	Pro	プロリン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
S	Ser	セリン
T	Thr	トレオニン
U	Sec	セレノシステイン
V	Val	バリン
W	Trp	トリプトファン
X	Xaa	任意のアミノ酸
Y	Tyr	チロシン
Z	Glx	グルタミン酸又はグルタミン

[0028] 本開示に係る環状ペプチドに含まれるアミノ酸残基は、上記表１に挙げるアミノ酸に由来するアミノ酸残基に限定されず、異常アミノ酸に由来するアミノ酸残基であってもよい。異常アミノ酸の例を以下の表２に挙げるが、異常アミノ酸はこれらに限定されるものではない。

[0029] [表2]

三文字略号	名称
Aad	ホモグルタミン酸
βAad	3-アミノアジピン酸
Abu	2-アミノブタン酸
A_2bu	2,4-ジアミノブタン酸
Ahx	2-アミノヘキサン酸
Ahe	2-アミノヘプタン酸
Aib	2-アミノイソ酪酸
εAhx	6-アミノヘキサン酸
βAla	β-アラニン
Ape	2-アミノペンタン酸
A_2pr	2,3-ジアミノプロパン酸
Apm	2-アミノピメリン酸
A_2pm	2,6-ジアミノピメリン酸
Cit	シトルリン
Cya	システイン酸
Dbu	2,4-ジアミノブタン酸
Dpm	2,6-ジアミノピメリン酸
Pen	ペニシラミン

三文字略号	名称
Dpr	2,3-ジアミノプロパン酸
Gla	4-カルボキシグルタミン酸
Glp	5-オキソプロリン
Hcy	ホモシステイン
Hly	ホモリシン
Hse	ホモセリン
Hsl	ホモセリンラクトン
5Hyl	5-ヒドロキシリシン (Hyl)
aHyl	アロ-ヒドロキシリシン
3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
aIle	アロ-イソロイシン
Nle	ノルロイシン
Nva	ノルバリン
Orn	オルニチン
Sar	サルコシン
aThr	アロ-トレオニン
Thx	チロキシン

[0030] 本開示に係る環状ペプチドに含まれる任意のアミノ酸残基は、化学修飾を受けていてもよい。アミノ酸残基に対する化学修飾は、通常、アミノ酸残基に対して行われる化学修飾であれば特に制限はない。アミノ酸残基に対する化学修飾の例としては、アミノ酸残基中に存在するアミノ基に対するＮ－アセチル化、Ｎ－ホルミル化、又は、Ｎ－アシル化、ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）化及び、アミノ酸残基中に存在するカルボキシ基に対するアミド化、ＰＥＧ化等が挙げられる。

[0031] 特定アミノ酸配列において、式（１）中のX_5又はX^aが、環状ペプチドのＮ末端のアミノ基である場合、Ｎ末端のアミノ基残基としては、特に制限はなく、Ｎ－アセチル化、Ｎ－ホルミル化、Ｎ－アシル化、ＰＥＧ化等のＮ末端修飾を受けていても、アミノ基のままであってもよい。

また、特定アミノ酸配列において、式（１）中のX_2及びX^bが、環状ペプチドのＣ末端のカルボキシ基である場合、Ｃ末端のカルボキシ基は、特に制限はなく、アミド化、ＰＥＧ化等のＣ末端修飾を受けていてもよいし、カルボキシ基のままであってもよい。

[0032] 本開示に係る環状ペプチドは、特定アミノ酸配列を有し、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して結合されたアミノ酸残基を表し、X_1～X_5は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表す。

[0033] ＜＜アミノ酸残基X^a～X^d＞＞

本開示に係る環状ペプチドは、特定アミノ酸配列を有し、X^c及びX^d並びにX^a及びX^bは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して結合されたアミノ酸残基を表す。

なお、式（１）中の「－Ｓ－」は、X^c及びX^d並びにX^a及びX^bがチオエーテル結合を介して架橋されたことを表す。

本開示に係る環状ペプチドに含まれる特定アミノ酸配列において、アミノ酸残基X^c及びアミノ酸残基X^d、並びに、後述するアミノ酸残基X^a及びアミノ酸残基X^bは、それぞれチオエーテル結合で架橋されているので、その詳細は明らかではないが、ジスルフィド結合に比べて、構造的に不可逆であるため、ジスルフィド結合により架橋されたアミノ酸残基を有する環状ペプチドよりも、分子安定性に優れると推察される。

チオエーテル結合形成前のアミノ酸としては、特に制限はないが、例えば、X^c及びX^dのいずれか一方が、チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸であり、他方が、ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸である組み合わせが挙げられる。

同様に、チオエーテル結合形成前のアミノ酸としては、特に制限はないが

、例えば、X^a及びX^bのいずれか一方が、チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸であり、他方が、ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸である組み合わせが挙げられる。

上記ハロゲン原子を有する有機基としては、ハロアセチル基等が好適に挙げられる。

[0034] 本開示において環状ペプチドにおける「主鎖」とは、環状ペプチド中の鎖状部分のうち相対的に最も長く幹となるペプチド鎖を指す。「側鎖」とは、環状ペプチドの主鎖に結合する鎖を意味する。

アミノ酸又はアミノ酸残基における主鎖は、環状ペプチドにおける「主鎖」に相当し、アミノ酸又はアミノ酸残基における側鎖は、環状ペプチドの主鎖に結合する側鎖となる。

以下、チオエーテル結合形成前のX^a～X^dが取り得るチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基について説明する。

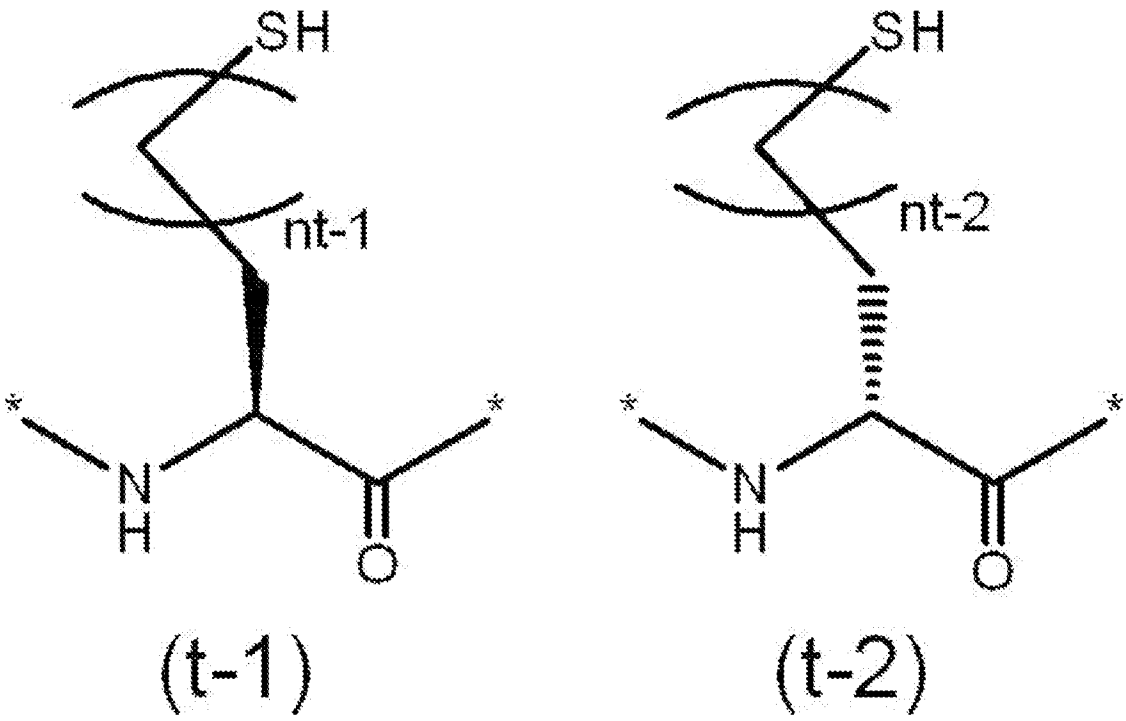
[0035] 〔チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基〕

チオール基を有するアミノ酸としては、反応性の観点から、側鎖上にチオール基を有するアミノ酸であることが好ましい。アミノ酸の主鎖にはチオール基が含まないことが好ましい。

チオール基を側鎖上に有するアミノ酸残基としては、特に制限はないが、下記構造（ｔ－１）又は（ｔ－２）で表されるアミノ酸残基が好適に挙げられる。

[0036]

[化5]



[0037] 構造（ｔ－１）及び（ｔ－２）中、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表し、ｎｔ－１及びｎｔ－２は、０以上の整数を表す。

側鎖におけるｎｔ－１又はｎｔ－２個の炭素原子、及び、β位の炭素原子は、－NH_2、－ＳＨ、－ＣＯＯＨ、炭素数１～１０のアルキル基、及び、炭素数６～１４のアリール基からなる群から選択される少なくとも１種の置換基によって置換されていてもよい。

炭素数１～１０のアルキル基としては、直鎖状、分岐鎖状のいずれであってもよい。炭素数１～１０のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基、ｔ－ブチル基等が挙げられる。

また、炭素数６～１４のアリール基としては、単環又は縮合環であってもよい。炭素数６～１４のアリール基としては、例えば、フェニル基、ナフチル基、アントラニル基、フェナントレン基等が挙げられる。

ｎｔ－１及びｎｔ－２は、チオエーテル結合の形成のし易さから、０～１０の整数であることが好ましく、０～６の整数であることがより好ましく、

１～４の整数であることが更に好ましい。

[0038] チオール基を側鎖上に有するアミノ酸のより具体的な例としては、システイン、ペニシラミン、ホモシステイン（２－アミノ－４－メルカプトブタン酸由来のアミノ酸）、２－アミノ－５－メルカプトペンタン酸に由来するアミノ酸等が挙げられる。

これらの中でも、チオール基を側鎖上に有するアミノ酸としては、結合安定性の観点から、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸であることが好ましい。

[0039] 結合安定性、及び、分子安定性の観点から、チオエーテル結合形成前のX^c及びX^dのいずれか一方が、チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましく、側鎖上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であることがより好ましく、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であることが好ましく、ラセミ化を起こしにくい点から、Ｌ－ホモシステイン、又は、Ｄ－ホモシステインは、更に好ましい。

[0040] X^aがハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合、結合安定性、及び、分子安定性の観点から、X^bが、チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましく、側鎖上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であることがより好ましく、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であることが好ましく、ラセミ化を起こしにくい点から、Ｌ－ホモシステイン、又は、Ｄ－ホモシステインは更に好ましい。

[0041] また、アミノ酸残基X^a及びX^bのいずれか一方、並びに、X^c及びX^dのいずれか一方が、α－アミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合、チオエーテル結合前のα－アミノ酸のα炭素に結合しているアミノ基又は修飾アミノ基とチオール基とが結合されたチオエーテル結合であってもよく、チオエーテル結合前のα－アミノ酸に由来するアミノ酸残基の側鎖とチオエーテル結

合前のチオール基とが結合されたチオエーテル結合であってもよい。この場合、アミノ基とチオール基との間の結合は、アミノ基上に配置されたハロアセチル基等を介して行うことができる。

同様に、アミノ酸残基X^a及びX^bのいずれか一方、並びに、X^c及びX^dのいずれか一方が、α－アミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合、チオエーテル結合前のα－アミノ酸のα炭素に結合しているカルボキシ基又は修飾カルボキシ基部分とチオエーテル結合前のチオール基とが結合されたチオエーテル結合であってもよく、チオエーテル結合前のα－アミノ酸に由来するアミノ酸残基の側鎖部分とチオエーテル結合前のチオール基とが結合されたチオエーテル結合であってもよい。

[0042] 〔ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基〕

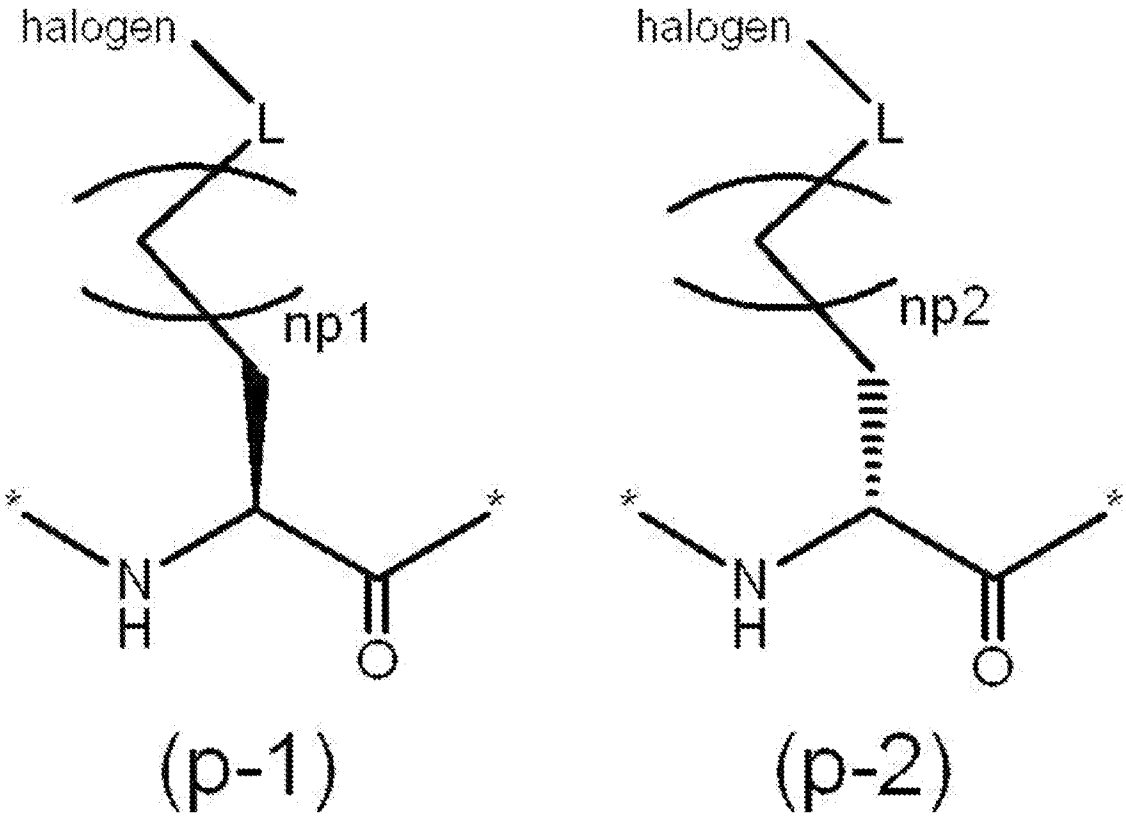
ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基としては、アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸、又はアミノ酸の側鎖にハロゲン原子を有する有機基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましい。ハロゲン原子を有する有機基としては、通常アミノ酸の保護基として用いられるものであれば特に制限はなく、例えば、ハロアセチル基等が好適に挙げられる。例えば、ハロゲン原子が脱離して代わりに硫黄原子が結合することで、チオエーテル結合が形成され、上記アミノ酸残基が形成される。

[0043] アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸としては、α炭素上のアミノ基にハロアルカノイル基が結合した任意のアミノ酸が挙げられる。ハロアルカノイル基は、例えば、ハロアセチル基である。ハロアルカノイル基中のハロゲン原子は、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子である。ハロゲン原子を有する有機基の結合対象となるアミノ酸としては、Ｌ－アミノ酸でもＤ－アミノ酸でもよく、イソロイシン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、ロイシン、トレオニン、バリン等が挙げられる。アミノ酸のα炭素に結

合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸としては、Ｌ－アミノ酸でもＤ－アミノ酸であってもよい、Ｎ－α－クロロアセチル－イソロイシン、Ｎ－α－クロロアセチル－リシン、Ｎ－α－クロロアセチル－アスパラギン酸、Ｎ－α－クロロアセチル－グルタミン酸、Ｎ－α－クロロアセチル－チロシン、Ｎ－α－クロロアセチル－ロイシン、Ｎ－α－クロロアセチル－トレオニン、Ｎ－α－クロロアセチル－バリン等が挙げられる。

[0044] 上記側鎖にハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸残基としては、チオエーテル結合の形成しやすさの観点から、アミノ酸残基の側鎖末端にハロゲン原子を有する有機基を有するアミノ酸であることが好ましい。このような態様を有するアミノ酸残基としては、下記構造（ｐ－１）又は（ｐ－２）で表されるアミノ酸残基が好適に挙げられる。

[0045] [化6]



[0046] 構造（ｐ－１）及び（ｐ－２）中、ｈａｌｏｇｅｎは、ハロゲン原子を表

し、Ｌは、－（ＣＨ$_2$）$_{Ｌ1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（ＣＨ$_2$）$_{Ｌ1}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表し、ｎｐ１及びｎｐ２は、それぞれ独立に０以上の整数を表し、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表す。ｎｐ１及びｎｐ２は、それぞれ、０～６の整数を表すことが好ましく、０～４の整数を表すことがより好ましく、１～３の整数を表すことがさらに好ましい。また、Ｌにおいて、ハロゲンは左側の末端（Ｌ１が１以上の場合はアルキル側の末端）に結合している。

ハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。これらの中でも、反応性及びチオエーテル結合の形成のし易さと安全性の観点から、臭素原子又は塩素原子であることが好ましく、塩素原子であることがより好ましい。

ｎｐ１及びｎｐ２が１以上である場合、側鎖におけるｎｐ１又はｎｐ２個の炭素原子、及び、β位の炭素原子は、炭素数１～１０のアルキル基、及び、炭素数６～１４のアリール基からなる群から選択される少なくとも１種の置換基によって置換されていてもよい。

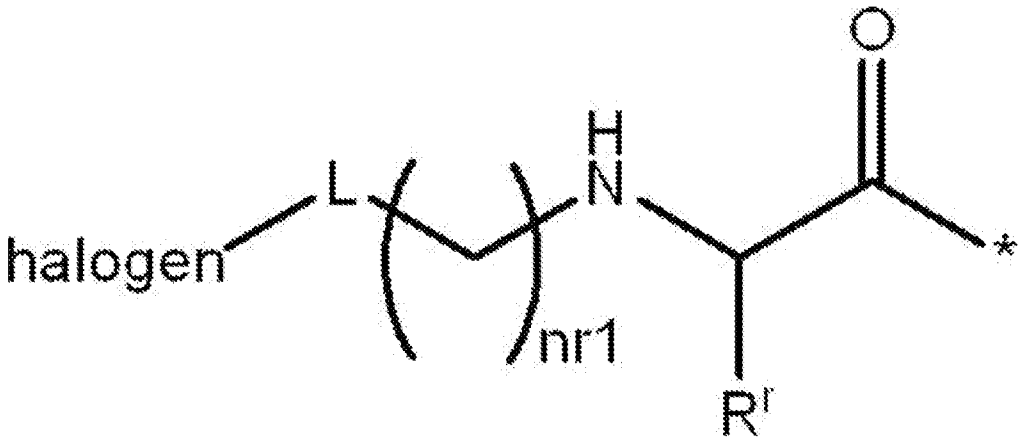
Ｌ１は、０～１０の整数であることが好ましく、１～６の整数であることがより好ましく、１～３の整数であることが更に好ましい。

炭素数１～１０のアルキル基、及び、炭素数６～１４のアリール基の具体例は、上記構造（ｔ－１）及び（ｔ－２）における炭素数１～１０のアルキル基、及び、炭素数６～１４のアリール基と同様である。

[0047] ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基が、環状ペプチドのＮ末端に位置する場合、チオエーテル結合の形成しやすさの観点から、チオエーテル結合前のアミノ酸残基としては、α－アミノ基にハロゲン原子を有する有機基を有するアミノ酸残基であることが好ましく、下記構造（ｒ－１）で表されるアミノ酸残基がより好ましい。

[0048]

[化7]



(r-1)

[0049] 構造（ｒ－１）中、Ｒｒは水素原子又は１価の有機基を表し、ｈａｌｏｇｅｎは、ハロゲン原子を表し、Ｌは、－（ＣＨ$_2$）$_{Ｌ1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（ＣＨ$_2$）$_{Ｌ1}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表し、ｎｒ１は、０以上の整数を表し、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表す。

Ｌ及びＬ１は、構造（ｐ－１）及び（ｐ－２）中のＬ及びＬ１と同義であり、好ましい態様も同様である。ｎｒ１は、構造（ｐ－１）及び（ｐ－２）中のｎｐ１及びｎｐ２と同義であり、好ましい態様も同様である。

Ｒｒにおける１価の有機基としては、特に制限はなく、アミノ酸の側鎖として取り得る脂肪族炭化水素基が挙げられる。アミノ酸の側鎖として取り得る１価の有機基としては、表１又は表２に記載のアミノ酸の側鎖である１価の有機基が挙げられる。

脂肪族炭化水素基は、－ＮＨ$_2$、－ＳＨ、－ＣＯＯＨ、炭素数１～１０のアルキル基、及び、炭素数６～１４のアリール基からなる群から選択される少なくとも１種の置換基によって置換されていてもよい。

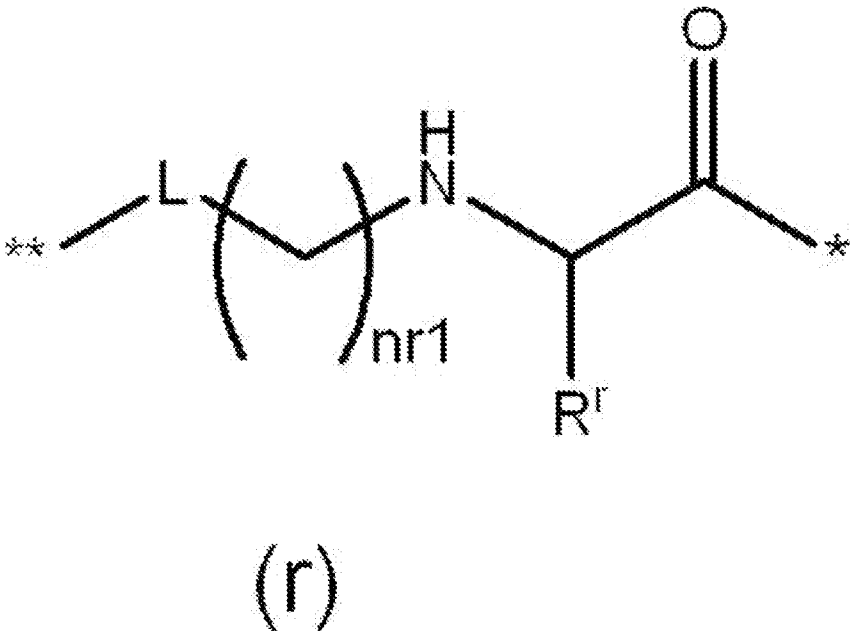
炭素数１～１０のアルキル基としては、直鎖状、分岐鎖状のいずれであっ

てもよい。炭素数１～１０のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基、ｔ－ブチル基等が挙げられる。

また、炭素数６～１４のアリール基としては、単環又は縮合環であってもよい。炭素数６～１４のアリール基としては、例えば、フェニル基、ナフチル基、アントラニル基、フェナントレン基等が挙げられる。

[0050] アミノ酸残基X^aが、例えば、特定アミノ酸配列のＮ末端に位置（X_5のｍ５が０の場合）し、かつ、α－アミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合、アミノ酸残基X^aとしては、下記構造（ｒ）で表されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましい。

[0051] [化8]



[0052] 構造（ｒ）中、R^rは水素原子又は１価の有機基を表し、Ｌは、－（CH_2）$_{L1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（CH_2）$_{L1}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表し、ｎｒ１は、０以上の整数を表し、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表し、＊＊はチオエーテル結合における硫黄原子との結合部位を表す。

R^r、Ｌ及びｎｒ１は、構造（ｒ－１における）R^r、Ｌ及びｎｒ１と同義

であり、好ましい態様も同様である。

[0053] チオエーテル結合前のハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基のより具体的な例としては、特に制限はされないが、２－アミノ－３－［（２－ハロアセチル）アミノ］プロパン酸、２－アミノ－４－［（２－ハロアセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－ハロアセチルオルニチン、Ｎ－ε－ハロアセチルリシン、２－［（ハロアセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸、Ｎ－ζ－ハロアセチルホモリシン等に由来するアミノ酸残基が挙げられる。

これらのアミノ酸残基中のハロアセチルにおけるハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられ、中でも塩素原子が好ましい。

[0054] チオエーテル結合前のハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基としては、結合安定性、及び、分子安定性の観点から、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であることが好ましく、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－クロロアセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－クロロアセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－クロロアセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－クロロアセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－クロロアセチル－Ｌ－ホモリシン、Ｎ－ζ－クロロアセチル－Ｄ－ホモリシン、及び、（２Ｓ，３Ｓ）－２－［（クロロアセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であることがより好ましい。ただし、Ｘａについては、Ｎ－α－クロロアセチル－イソロイシン、Ｎ－α－クロロアセチル－リシン、Ｎ－α－クロロアセチル－アスパラギン酸、Ｎ－α－クロロアセチル－グルタミン酸、Ｎ－α－クロロアセチル－チロシン、Ｎ－α－クロロアセチル－ロイシン、Ｎ－α－クロロアセチル－トレオニン、Ｎ－α－ク

ロロアセチル－バリン等の、アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることも好ましい。

[0055] 結合安定性、及び、分子安定性の観点から、X^c及びX^dのいずれか一方が、ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましく、塩素原子を有する有機基を側鎖上に有するアミノ酸残基であることがより好ましく、クロロアセチル基を側鎖上に有するアミノ酸残基であることが更に好ましく、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－クロロアセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－クロロアセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－クロロアセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－クロロアセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシン、及び、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－クロロアセチル－Ｌ－ホモリシン、及びＮ－ζ－クロロアセチル－Ｄ－ホモリシン、からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが特に好ましい。

[0056] アミノ酸残基X^bがチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合、結合安定性、及び、分子安定性の観点から、X^aは、アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又はハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましく、アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基に塩素原子を有する有機基が結合したアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又は塩素原子を有する有機基を側鎖上に有するアミノ酸残基であることがより好ましく、クロロアセチル基をα炭素に結合したアミノ基上又は側鎖上に有するアミノ酸残基であることが更に好ましく、Ｎ－α－クロロアセチル－イソロイシン、Ｎ－α－クロロアセチル－リシン、Ｎ－α－クロロアセチル－アスパラギン酸、Ｎ－α－クロロアセチル－グルタミン酸

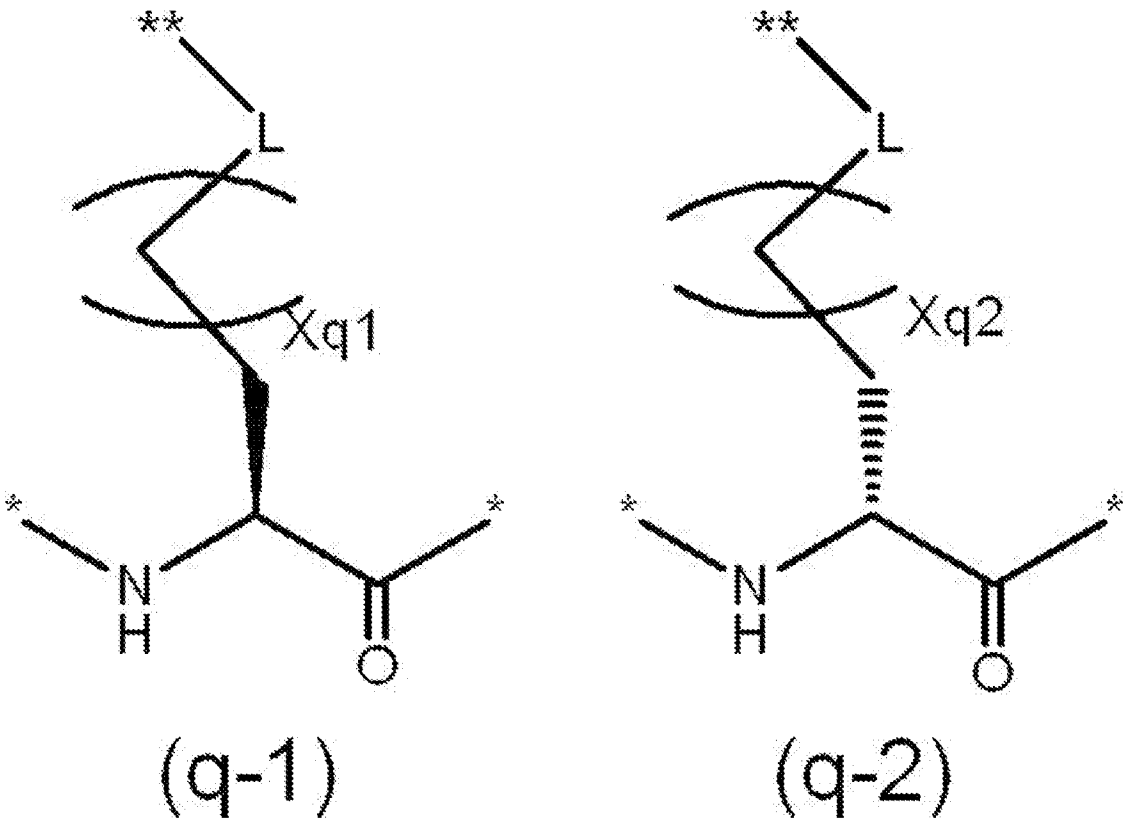
、Ｎ－α－クロロアセチル－チロシン、Ｎ－α－クロロアセチル－ロイシン、Ｎ－α－クロロアセチル－トレオニン、及びＮ－α－クロロアセチル－バリンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基、又は（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－クロロアセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－クロロアセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－クロロアセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－クロロアセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－クロロアセチル－Ｌ－ホモリシン、Ｎ－ζ－クロロアセチル－Ｄ－ホモリシン、及び、（２Ｓ，３Ｓ）－２－［（クロロアセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることがより好ましい。

[0057]〔チオエーテル結合形成後のアミノ酸残基Ｘ^{a}～Ｘ^{d}〕

チオエーテル結合形成後のアミノ酸残基Ｘ^{a}～Ｘ^{d}において、チオエーテル結合が形成された後の、硫黄原子に結合した有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基の構造としては、下記構造（ｑ－１）又は（ｑ－２）で表される構造が挙げられる。

[0058]

[化9]



[0059] 構造（ｑ－１）及び（ｑ－２）中、＊は隣接するアミノ酸残基との結合であり、＊＊はチオエーテル結合の相手方のアミノ酸残基の硫黄原子との結合であり、ｘｑ１及びｘｑ１はそれぞれ独立に０以上の整数であり、Ｌは、それぞれ独立に、－（CH_2）$_{L1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（CH_2）$_{L1}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表す。

Ｌ及びＬ１は、構造（ｐ－１）及び（ｐ－２）中のＬ及びＬ１と同義であり、好ましい態様も同様である。ｘｑ１及びｘｑ１は、構造（ｐ－１）及び（ｐ－２）中のｎｐ１及びｎｐ２と同義であり、好ましい態様も同様である。

[0060] チオエーテル結合が形成された後の硫黄原子に結合した有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基のより具体的な例としては、２－アミノ－３－［アセチルアミノ］プロパン酸、２－アミノ－４－［アセチルアミノ

］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチルオルニチン、又は、Ｎ－ε－アセチルリシン、Ｎ－ζ－アセチルホモリシンなどに由来するアミノ酸残基が挙げられる。

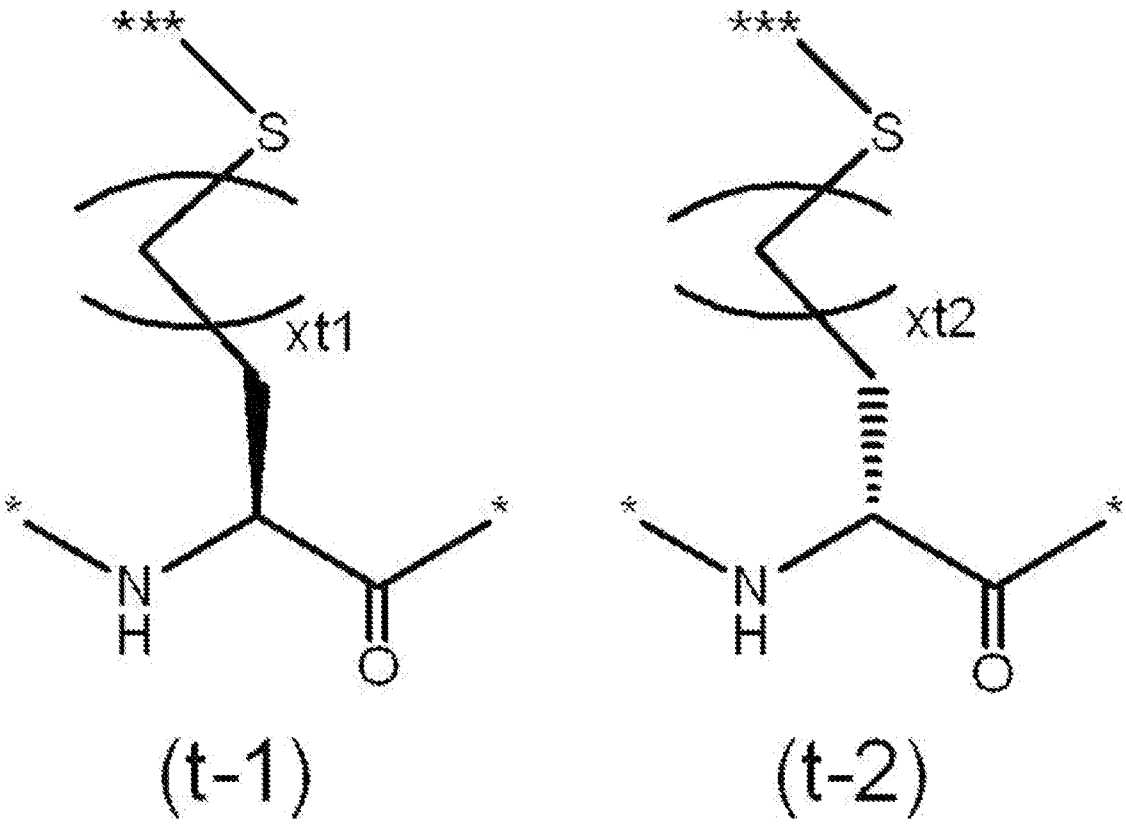
ただし、Ｘａについては、アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸からチオエーテル結合を形成させることもできるため、Ｎ－α－アセチル－イソロイシン、Ｎ－α－アセチル－リシン、Ｎ－α－アセチル－アスパラギン酸、Ｎ－α－アセチル－グルタミン酸、Ｎ－α－アセチル－チロシン、Ｎ－α－アセチル－ロイシン、Ｎ－α－アセチル－トレオニン、Ｎ－α－アセチル－バリンなどに由来するアミノ酸残基も挙げられる。これらのアミノ酸残基のアセチル基部分がチオエーテル結合の硫黄原子に結合している。

なお、チオエーテル結合に関与する２つのアミノ酸残基のうち、チオエーテル結合の硫黄原子を供給しない方のアミノ酸残基がアセチル基等のアルカノイル基により置換されている場合、特に断りの無い限りはチオエーテル結合の硫黄原子は上記アルカノイル基に結合しており、上記アルカノイル基（例えばアセチル基）はＳ－結合アルカノイル基（例えばＳ－アセチル基）であるとも言える。ただし、本開示においては、特に断りの無い限り、このようなＳ－結合アルカノイル基における「Ｓ－結合」の表記は省略し、単にアルカノイル基（例えばアセチル基）として表記している。

[0061] チオエーテル結合形成後のアミノ酸残基X^a～X^dのうち、チオエーテル結合形成後のアミノ酸残基X^a～X^dにおいて、チオエーテル結合が形成された後のチオール基を側鎖上に有するアミノ酸残基の構造としては、下記構造（ｔ－１）又は（ｔ－２）で表されるアミノ酸残基の構造が挙げられる。

[0062]

[化10]



[0063] 構造（ｔ－１）及び（ｔ－２）中、＊は隣接するアミノ酸残基との結合であり、＊＊＊はチオエーテル結合の相手方のアミノ酸残基の炭素原子との結合であり、ｘｔ１及びｘｔ２は、それぞれ独立に０以上の整数である。

ｘｔ１及びｘｔ２は、構造（ｐ－１）及び（ｐ－２）中のｎｐ１及びｎｐ２と同義であり、好ましい態様も同様である。

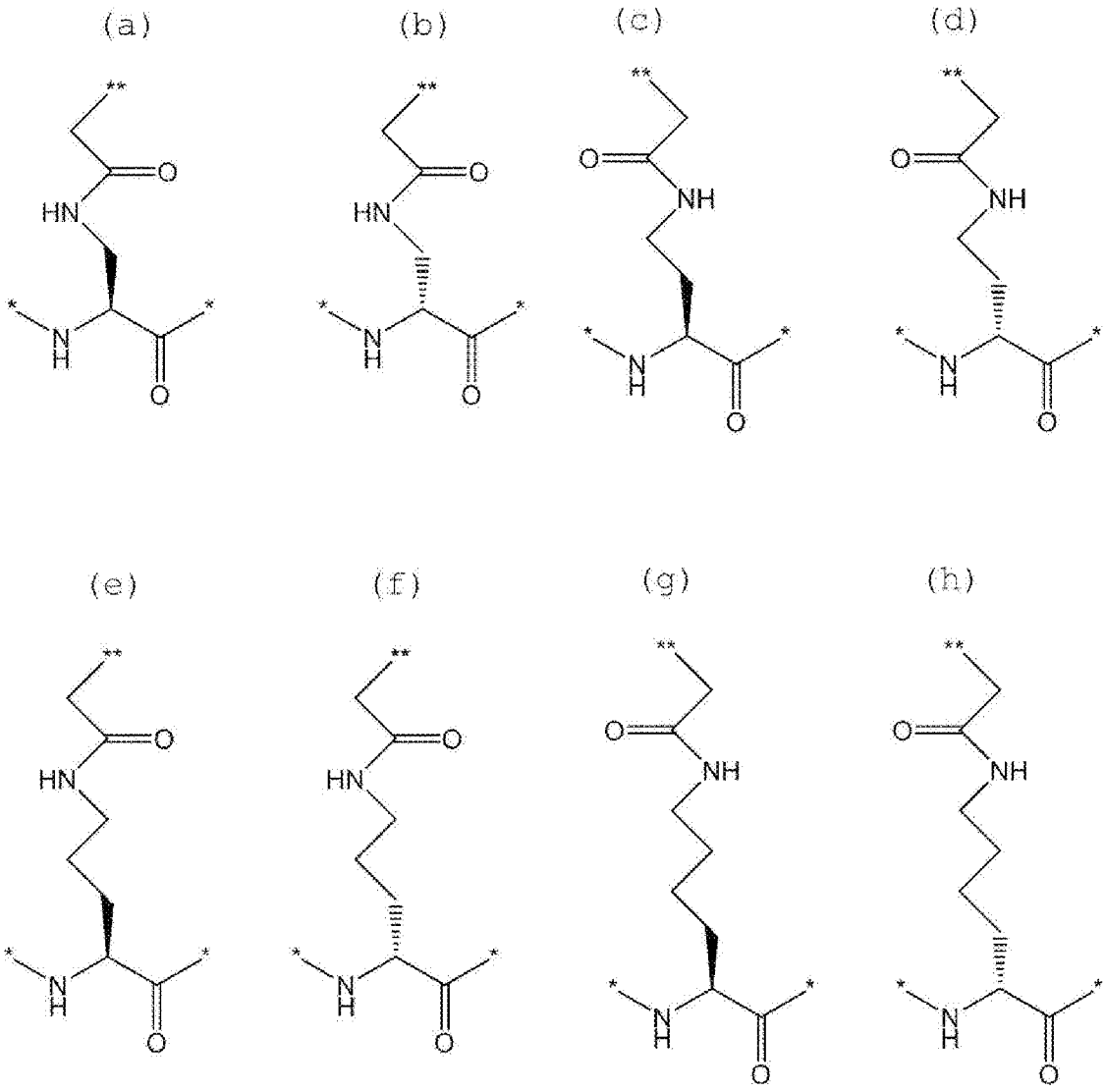
[0064] チオエーテル結合が形成された後のより具体的な例としては、システイン残基、ペニシラミン残基、ホモシステイン残基（２－アミノ－４－メルカプトブタン酸由来の残基）、又は、２－アミノ－５－メルカプトペンタン酸由来のアミノ酸残基が挙げられる。

[0065] 構造（ｑ－１）又は（ｑ－２）のアミノ酸残基等の硫黄原子に結合した有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、環状セグメントにおけるそれぞれＮ末端側のアミノ酸残基X^a又はX^cであってもよいし、環状セグメントにおけるそれぞれＣ末端側のアミノ酸残基X^b又はX^dであってもよ

い。これに対応して、（ｔ－１）又は（ｔ－２）のアミノ酸残基等のチオール基を有するアミノ酸残基は、環状セグメントのＮ末端側のアミノ酸残基X^a又はX^cであってもよいし、環状セグメントのＣ末端側のアミノ酸残基X^b又はX^dであってもよい。

[0066] 上記構造式（ｐ－１）又は（ｐ－２）で表されるアミノ酸残基は、下記構造（ａ）～（ｈ）で表されるアミノ酸残基から選択される構造を有するアミノ酸残基であってもよい。

[化11]



[0067] ここで、式中、＊は隣接するアミノ酸残基との結合であり、＊＊はチオエ

ーテル結合の相手方のアミノ酸残基の硫黄原子との結合である。

[0068] 分子安定性の観点から、アミノ酸残基X^c及びアミノ酸残基X^dのいずれか一方が、システイン残基であるとき、良好な分子安定性が得られる観点から、アミノ酸残基X^cとアミノ酸残基X^dのうち他方のアミノ酸残基のα炭素と、システイン残基とは、５個以上の原子により隔てられているように設計することが好ましい。上記良好な分子安定性が得られる理由は明らかでは無いが、チオエーテル結合の相手方のアミノ酸残基の硫黄原子から環状ペプチド主鎖までの炭素鎖長を長くすることにより、チオエーテル結合の電子配置が安定化され、より高い結合安定性が得られると推定される。アミノ酸残基X^a及びアミノ酸残基X^bのいずれか一方が、システイン残基であり、他方が、チオエーテル結合の硫黄原子が有機基を介してアミノ酸側鎖に結合したアミノ酸残基である場合も同様である。

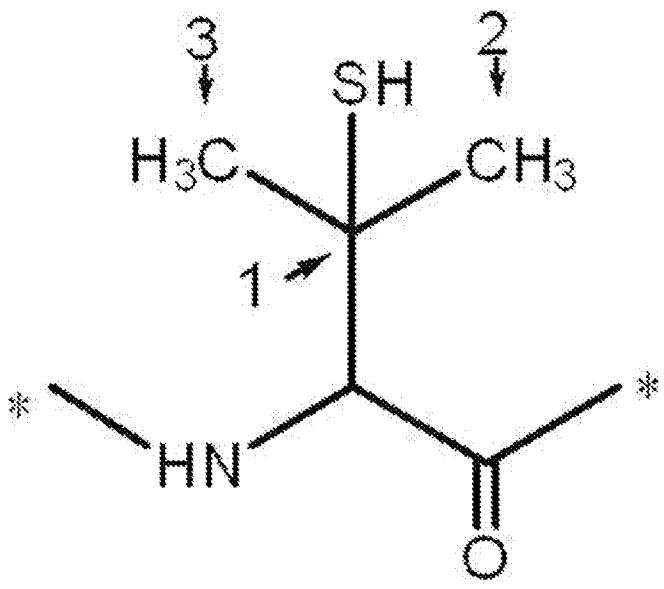
[0069] より高い分子安定性を得る観点からは、アミノ酸残基X^aとアミノ酸残基X^bのうち、チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基において、チオール基を有する側鎖上の炭素原子の合計数は、１～１０であることが好ましく、１～６であることがより好ましく、１～４であることが更に好ましく、２～４であることが特に好ましい。

チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基において、チオール基を有する側鎖上の炭素原子の合計数とは、チオール基を有する側鎖における炭素原子の合計数である。ただし、上記チオール基を有する側鎖上の炭素原子の合計数に、主鎖に含まれる炭素数は含まれない。

例えば、システイン残基におけるチオール基を有する側鎖上の炭素原子の合計数は、１であり、ホモシステイン残基におけるチオール基を有する側鎖上の炭素原子の合計数は２であり、下記に示すペニシラミン残基における側鎖上の炭素原子の合計数は、３である。 なお、下記に示すペニシラミン残基における＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を示す。

[0070]

[化12]



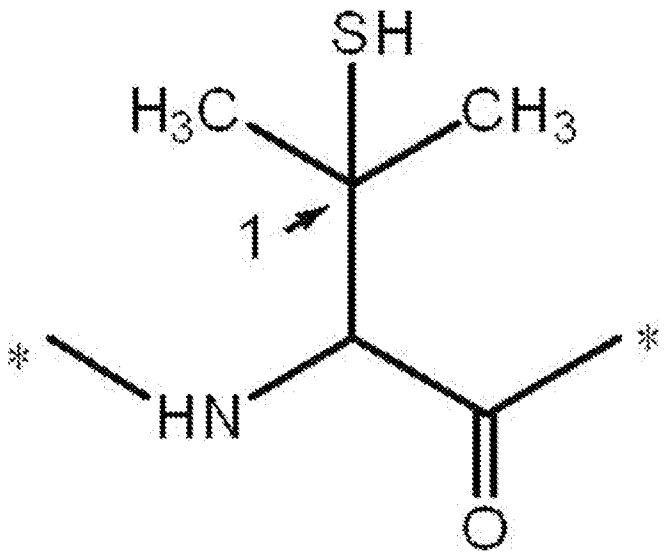
[0071] また、インテグリン結合性の観点からは、チオール基を有するアミノ酸残基は、環状ペプチドの主鎖とチオール基を有する側鎖における硫黄原子との間の鎖長が、炭素原子数１～１０であることが好ましく、１～６であることがより好ましく、１～４であることが更に好ましく、１～３であることが特に好ましい。

環状ペプチドの主鎖とチオール基を有する側鎖における硫黄原子との間の鎖長とは、環状ペプチドにおける主鎖と、チオール基とを結ぶ側鎖の原子数を、最小となるように数えた値であり、主鎖に含まれる炭素原子は鎖長の数には含まれない。

例えば、チオール基を有するアミノ酸残基が下記に示すペニシラミン残基である場合、環状ペプチドの主鎖とチオール基を有する側鎖における硫黄原子との間の鎖長は、１である。なお、下記に示すペニシラミン残基における＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を示す。

[0072]

[化13]



[0073] インテグリン結合性の観点からは、例えば、チオール基を有するα－アミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合、環状ペプチドの主鎖とチオール基を有する側鎖における硫黄原子との間の鎖長としては、１～１０であることが好ましく、１～６であることがより好ましく、１～４であることが更に好ましく、１～３であることが特に好ましい。

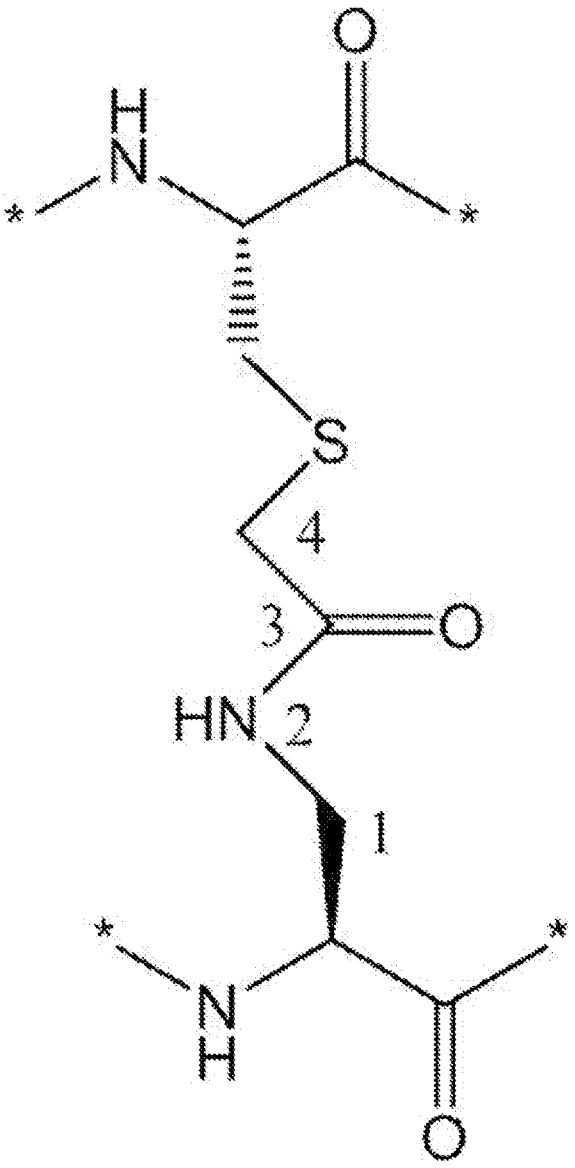
[0074] アミノ酸残基X^aとアミノ酸残基X^bのうちチオエーテル結合の硫黄原子を供給しないアミノ酸残基のα炭素と、チオエーテル結合の硫黄原子を供給するアミノ酸残基の硫黄原子と、の間の鎖長は、より高い分子安定性を得る観点から、４個以上の原子により隔てられていることが好ましく、４個～９個の原子によって隔てられていることがより好ましく、４～８個の原子によって隔てられていることが更に好ましい。ただし、Ｘａが、チオエーテル結合の硫黄原子が有機基を介してα－炭素上のアミノ基に結合しているアミノ酸残基である場合はこの限りでない。

[0075] 同様の観点から、アミノ酸残基X^c及びアミノ酸残基X^dのうちチオエーテル結合の硫黄原子を供給しないアミノ酸残基のα炭素と、チオエーテル結合の硫黄原子を供給するアミノ酸残基の硫黄原子と、の間の鎖長は、４個以上の原子により隔てられていることが好ましく、４個～９個の原子によって隔

てられていることがより好ましく、４～８個の原子によって隔てられていることが更に好ましい。

[0076] チオエーテル結合の硫黄原子を供給しないアミノ酸残基のα炭素と、チオエーテル結合の硫黄原子を供給するアミノ酸残基の硫黄原子と、の間の鎖長が、４個以上の原子により隔てられている例として、上記（ａ）のアミノ酸残基と、Ｌ－システイン残基とが結合している場合を以下に例示するが、本開示はこれに限定されることはない。

[0077] [化14]



[0078] ここで、式中、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位である。（ａ）の

アミノ酸残基と、Ｌ－システイン残基とが結合している場合には、α炭素と、システイン残基の硫黄原子との鎖長は、１個の窒素原子及び３個の炭素原子により隔てられているため、原子数は４個である。このように、チオエーテル結合の相手方のアミノ酸残基のα炭素と、システイン残基の硫黄原子とを隔てる原子の数（鎖長）は、α原子と硫黄原子とを連結する鎖上の原子数を意味し、鎖上の原子に結合している水素原子等の上記鎖に参加していない原子はカウントしない。

[0079] ＜＜チオエーテル結合の形成方法＞＞

チオエーテル結合形成前のアミノ酸残基X^c及びアミノ酸残基X^d及びアミノ酸残基X^a及びアミノ酸残基X^bにおいて、チオエーテル結合を形成させる方法としては、特に限定されず、ペプチドにおいてチオエーテル結合を形成される公知の方法が挙げられる。

チオエーテル結合としては、例えば、チオール基を有するアミノ酸残基と、ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸残基とを中性、又は、アルカリ条件下（ｐＨ７～ｐＨ９）で反応させることで、ハロゲン化水素の生成を伴いながらチオール基における硫黄原子が有機基に結合することで、チオエーテル結合を形成することができる。

上記ハロゲン原子を有する有機基としては、ハロアセチル基等の保護基が好適に挙げられる。

[0080] また、例えば、チオール基を側鎖上に有するアミノ酸残基と、アミノ酸のα炭素に結合したアミノ基にハロゲン原子を有する有機基が結合したアミノ酸残基又はハロゲンを有する有機基を側鎖上に有するアミノ酸残基との間で、チオール基とハロゲンを有する有機基とを反応させてチオエーテル結合を形成する方法としては、例えば、環状化前の線状のペプチドを中性、又は、塩基性の緩衝液中で反応させることによりチオエーテル結合を形成する方法が挙げられる。

より具体的には、線状ペプチドを含む水溶液をＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）緩衝液にゆっくりと滴下して静置する方法が好適に挙げられる。チ

オエーテル結合を形成する環化反応では、反応条件によっては環状ペプチド以外に、複数の非環状ペプチドが分子間結合により連結したオリゴマーが形成される場合がある。チオエーテル結合を形成させる方法は、環状ペプチドの収率を向上させる点から、精製する工程を含むことが好ましい。環状ペプチドの精製方法としては、公知の精製方法が挙げられる。環状ペプチドの精製方法は、上記環化反応後のペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー等により精製する方法が好ましい。

[0081] ＜＜アミノ酸残基X_1～X_5＞＞

特定アミノ酸配列において、X_1～X_5は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、ｍ１～ｍ５は、それぞれ独立に、０以上の整数を表す。

アミノ酸残基X_1～X_5の数ｍ１～ｍ５は、X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１６となる範囲であれば特に制限はされない。

アミノ酸残基としては、環状ペプチドの形成が可能であれば特に制限はされず、上記表１に示されるアミノ酸（Ｂ、ＺおよびＸを除く。）及び表２に示すアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましく、表１に示すアミノ酸（Ｂ、ＺおよびＸを除く。）からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることがより好ましい。

また、存在する場合には、これらのアミノ酸のエナンチオマーまたはジアステレオマーに由来するアミノ酸残基であってもよい。

[0082] 特定アミノ酸配列において、X_1～X_5は、X_1～X_5からなる群から選ばれる任意の２つのアミノ酸残基同士が、チオエーテル結合を形成していてもよい。

チオエーテル結合を形成可能なアミノ酸残基の組み合わせとしては、チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、ハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基である組み合わせが挙げられる。

チオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基及びハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、アミノ酸残基X^a～X^dにおけるオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基及びハロゲン原子を有する有機基で保護されたアミノ酸に由来するアミノ酸残基と同義であり、好ましい態様も同様である。

[0083] 上記アミノ酸残基は、例えば、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸残基、側鎖にヒドロキシ基を有するアミノ酸残基等であってもよい。

側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、Ｌ－アスパラギン酸残基、Ｄ－アスパラギン酸残基、Ｌ－グルタミン酸残基、Ｄ－グルタミン酸残基、Ｌ－ホモグルタミン酸残基、およびＤ－ホモグルタミン酸残基等が挙げられる。

[0084] 上記側鎖にヒドロキシ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、Ｌ－セリン残基、Ｄ－セリン残基、Ｌ－ホモセリン残基、Ｄ－ホモセリン残基、Ｌ－チロシン残基、Ｄ－チロシン残基、Ｌ－トレオニン残基、Ｄ－トレオニン残基、Ｌ－アロトレオニン残基、およびＤ－アロトレオニン残基等が挙げられる。

[0085] 上記アミノ酸残基としては、例えば、疎水性のアミノ酸残基であってもよい。

疎水性のアミノ酸残基としては、例えば、バリン、メチオニン、トリプトファン、プロライン、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、アラニン、グリシン等のアミノ酸残基が挙げられる。

[0086] ＜＜X_1で表されるアミノ酸残基＞＞

X_1で表されるアミノ酸残基としては、インテグリン結合性の観点から、疎水性アミノ酸に由来するアミノ酸残基、及び、環構造を有するアミノ酸残基の少なくとも一方であることが好ましく、チロシン、フェニルアラニン、３－ヨードチロシン、ナフチルアラニン、ホモチロシン、プロリン、又は、イソロイシンに由来するアミノ酸残基であることが更に好ましく、フェニルアラニン又はチロシンに由来するアミノ酸残基であることが特に好ましい。

[0087] X_1で表されるアミノ酸残基の数ｍ１は、０以上の整数であり、コストの観点から、１以上６以下であることが好ましく、１以上３以下であることがより好ましく、１又は２であることが好ましい。

[0088] ＜＜X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基の数ｍ３及びｍ４＞＞

X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基としては、特に制限はないが、インテグリン結合性の観点から、プロリン、トレオニン、又は、アスパラギン、セリン、ホモセリン、バリン、又は、アラニンのアミノ酸残基であることが好ましい。

また、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基の数ｍ３及びｍ４は、それぞれ独立に、０以上の整数である。コストの観点から、ｍ３及びｍ４は、それぞれ独立に、０以上２以下であることが好ましく、０以上１以下であることがより好ましく、ｍ３及びｍ４の両方が０であることが更に好ましい。

X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基の数ｍ３及びｍ４が２以上である場合は、X_3及びX_4は互いに同一のアミノ酸残基であってもよく、異なるアミノ酸残基であってもよい。

[0089] ＜＜X_2及びX_5で表されるアミノ酸残基＞＞

X_2及びX_5で表されるアミノ酸残基の数ｍ２及びｍ５は、それぞれ独立に、０以上の整数である。コストの観点から、ｍ５は０であることが好ましい。分子安定性及び後述する基材又は保持材上の官能基と反応して共有結合を形成のしやすさから、ｍ２は、１以上であることが好ましく、１以上６以下であることが好ましく、１以上４以下であることがより好ましい。

ｍ５は０である場合、X^aで表されるアミノ酸残基は、アミノ基又は修飾アミノ基であってもよい。

X_2で表されるアミノ酸残基の数ｍ２が２以上である場合は、X_2は互いに同一のアミノ酸残基であってもよく、異なるアミノ酸残基であってもよいが、X_2は互いに同一のアミノ酸残基であることが好ましい。

[0090] ＜＜側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸＞＞

X_5及びX_2で表されるアミノ酸残基は、分子安定性及び後述する基材又は

保持材上の官能基と反応して共有結合を形成のしやすさから、側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸残基（以下、単に「固定化官能基を有するアミノ酸残基」ともいう。）を含むことが好ましい。

上記「固定化官能基」とは、後述する基材又は保持材上の官能基と反応して共有結合を形成することができる官能基をいう。

固定化官能基としては、例えば、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、チオール基、アルデヒド基（ホルミル基）、カルバモイル基、アジド基、アルキニル基等が挙げられる。

[0091] 上記固定化官能基を有するアミノ酸における固定化官能基としては、基材又は保持材上の官能基との反応性の観点から、好ましくはアミノ基、チオール基、及び、アルデヒド基からなる群から選択される少なくとも１つの基であり、より好ましくはアミノ基、及び、チオール基からなる群から選択される少なくとも１つ基である。

[0092] アミノ基を固定化官能基として用いた場合、アミノ基は、アミド結合を介して、基材又は保持材上のカルボキシ基と結合することができ、本開示に係る環状ペプチドを基材又は保持材上に容易に固定することができる。

また、チオール基を固定化官能基として用いた場合、チオール基は、共有結合を介して基材又は保持材上のエポキシ基と結合することができ、本開示に係る環状ペプチドを基材又は保持材上に容易に固定することができる。

[0093] 側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基としては、Ｌ－リシン残基、Ｄ－リシン残基等が挙げられる。側鎖にチオール基を有するアミノ酸残基としては、Ｌ－システイン残基、Ｄ－システイン残基等が挙げられる。側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基及び側鎖にチオール基を有するアミノ酸残基は、比較的安価に導入することができるため、本開示に係る環状ペプチドの製造コストを抑えることができる。このため、上記のアミノ酸残基の使用は、経済的な観点から好ましい。

[0094] すなわち、側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸としては、分子安定性の観点から、Ｌ－リシン、Ｄ－リシン、Ｌ－システイン、Ｄ－システイン、Ｌ

－ホモシステイン及びＤ－ホモシステインからなる群から選択される少なくとも１種のアミノ酸であることが好ましく、Ｌ－リシン及びＤ－リシンからなる群より選ばれる少なくとも１種のアミノ酸であることがより好ましい。

[0095] X_5（環状ペプチドのＮ末端）及びX_2（環状ペプチドのＣ末端）のうち少なくとも一方が、基材等との固定化の観点から、固定化官能基を有するアミノ酸残基としてリシン残基を含むことが好ましく、X_2が固定化官能基を有するアミノ酸残基としてリシン残基を含むことがより好ましい。

基材等との固定化の観点から、X_5（環状ペプチドのＮ末端）及びX_2（環状ペプチドのＣ末端）のうち少なくとも一方が、固定化官能基を有するアミノ酸残基としてリシン残基を１つ以上連続して含むことが好ましく、２～１０個連続して含むことがより好ましく、２～５個連続して含むことが更に好ましい。

[0096] X_5（環状ペプチドのＮ末端）及びX_2（環状ペプチドのＣ末端）は、連続する固定化官能基を有するアミノ酸残基（好ましくはリシン残基）のみで構成されていてもよいが、固定化官能基を有するアミノ酸残基以外のアミノ酸残基を含んでいてもよい。

固定化官能基を有するアミノ酸残基以外のアミノ酸残基としては、１～２０個、１～１０個、１～５個、又は１～３個の、アラニン残基、βアラニン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、及びグリシン残基から選ばれるアミノ酸残基等であってもよい。

また、上記固定化官能基を有するアミノ酸残基以外のアミノ酸残基とX^a又はX^bとの間にリシン残基が更に挟まれていてもよい。

[0097] 本開示に係る環状ペプチドが有する固定化官能基と、基材又は保持材上の官能基と、の組合せとしては、特に制限はないが、アミノ基とカルボキシ基との組み合わせ、アミノ基とアルデヒド基との組み合わせ、アミノ基とエポキシ基との組み合わせ、ヒドロキシ基とエポキシ基との組み合わせ、カルボキシ基とヒドロキシ基との組み合わせ、チオール基とエポキシ基との組み合わせ、アジド基とアルキニル基との組み合わせ等が挙げられる。

本開示に係る環状ペプチドが有する固定化官能基と基材又は保持材上の官能基とが反応して共有結合を形成することにより、本開示に係る環状ペプチドが基材又は保持材に固定化される。

なお、本開示に係る環状ペプチドが有する固定化官能基の少なくとも一部が基材又は保持材上の官能基と反応して共有結合を形成すればよく、すべての固定化官能基が基材又は保持材上の官能基と反応しなくてもよい。

[0098] ＜＜ＲＧＤ配列＞＞

本開示に係る環状ペプチドに含まれる特定アミノ酸配列は、ＲＧＤ配列を有し、かつ、チオエーテル結合によって架橋されたアミノ酸残基であるX^c及びX^dの間にＲＧＤ配列が配置されていることにより、インテグリン結合性及び分子安定性に優れる。

本開示において、「ＲＧＤ配列」とは、Ｎ末端側からＣ末端側にかけて「Ｒ（アルギニン）」、「Ｇ（グリシン）」、及び「Ｄ（アスパラギン酸）」の３つのアミノ酸残基が存在する配列を示す。「ＲＧＤ配列」は、細胞接着に関与することから、本開示に係る環状ペプチドは、「ＲＧＤ配列」を有することで、特にインテグリン等の細胞接着分子に対する結合性を高めることができる。

[0099] 本開示に係る環状ペプチドに含まれる特定アミノ酸配列において、「ＲＧＤ配列」の数は、２以上であってもよいが、１であることが好ましい。

[0100] ＲＧＤ配列は、インテグリン結合性の観点から、アミノ酸残基X^c及びアミノ酸残基X^dの間に位置する。ＲＧＤ配列の位置としては、アミノ酸残基X^c及びアミノ酸残基X^dと隣接した位置であってもよいし、アミノ酸残基X^cともアミノ酸残基X^dと隣接していない位置であってもよい。

インテグリン結合性の観点から、特定アミノ酸配列におけるＮ末端にあるX_5を１番目のアミノ酸残基としてＣ末端側へとアミノ酸残基をカウントしたときに、３～５番目のアミノ酸残基に相当することが好ましい。

[0101] X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１６である。X^a、X^b、X^c及びX

^{d}並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数、すなわち、架橋ペプチドにおいてチオエーテル結合で架橋された最もＮ末端側にあるアミノ酸残基（X^{a}）から最もＣ末端側にあるアミノ酸残基（X^{b}）までの間にあるアミノ酸残基数（以下、「最外環状セグメントのアミノ酸残基数」ともいう。）が、７～１６であると、環状ペプチドの分子内ひずみが大きくなり過ぎず、α－ヘリックス等の高次構造が安定化し、かつ、インテグリン結合性に優れる。

上記観点から、最外環状セグメントのアミノ酸残基数としては、７～１４であることが好ましく、７～１３であることがより好ましい。

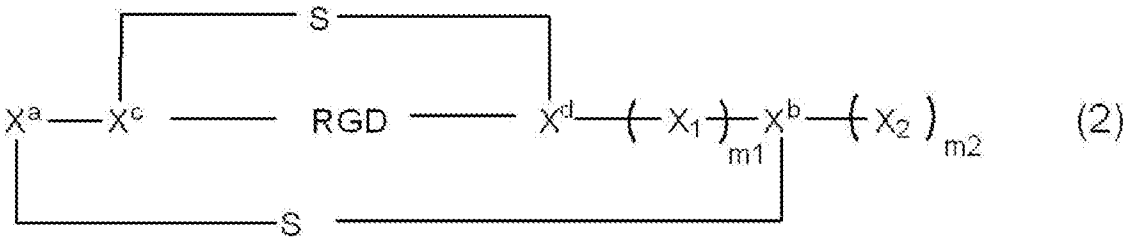
また、X^{c}及びX^{d}並びに、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数、すなわち、架橋ペプチドにおいてチオエーテル結合で架橋されたアミノ酸残基（X^{c}）からアミノ酸残基（X^{d}）までの間にあるアミノ酸残基数（以下、「最内環状セグメントのアミノ酸残基数」ともいう。）は、５～１４であることが好ましく、５～１０であることがより好ましく、５～８であることが更に好ましい。

[0102] 本開示に係る環状ペプチドが有するアミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基の合計数は、特に制限はなく、７～５０アミノ酸残基であってもよく、７～３０アミノ酸残基であってもよく、８～２０アミノ酸残基であってもよく、９～１５アミノ酸残基であってもよい。環状ペプチドの全長が短い方が抗原性のリスクが少なく、ペプチド合成が容易である。

[0103] ＜＜式（２）で表されるアミノ酸配列＞＞

本開示に係る環状ペプチドが有する上記式（１）で表されるアミノ酸配列（特定アミノ酸配列）は、インテグリン結合性及び分子安定性の観点から、下記式（２）で表されるアミノ酸配列であることが好ましい。

[0104] [化15]



(2)

[0105] 式（２）中、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して架橋されたアミノ酸残基を表し、X_1及びX_2は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、Ｒはアルギニンを表し、Ｇはグリシンを表し、Ｄはアスパラギン酸を表し、ｍ１及びｍ２は、それぞれ独立に、１以上の整数を表す。ただし、X^a、X^b、X^c及びX^d並びにX_1で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１４である。

[0106] 式（２）中、X^a、X^b、X^c、X^d、X_1、X_2、ｍ１及びｍ２は、上記式（１）中のX^a、X^b、X^c、X^d、X_1、X_2、ｍ１及びｍ２はと同義であり、好ましい態様も同様である。

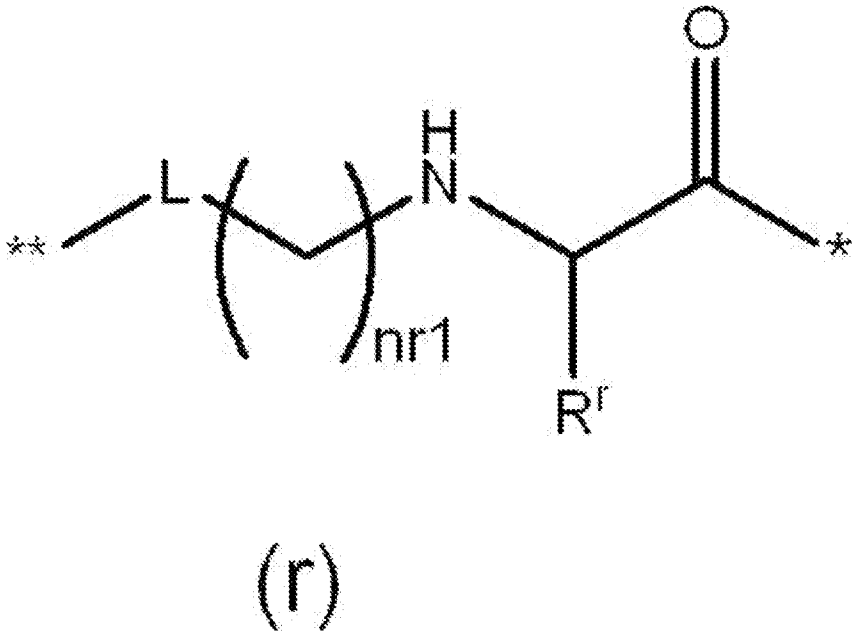
結合安定性及び分子安定性の観点から、式（２）におけるX^c及びX^dのいずれか一方が、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－アセチル－Ｌ－ホモリシン、及び、Ｎ－ζ－アセチル－Ｄ－ホモリシンからなる群から選択される側鎖にアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であることが好ましく、Ｌ－ホモシステイン、又は、Ｄ－ホモシステインに由来するアミノ酸残基が更に好ましい。

結合安定性及び分子安定性の観点から、式（２）中におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、X^aが、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－

アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－アセチル－Ｌ－ホモリシン、Ｎ－ζ－アセチル－Ｄ－ホモリシン、及び、（２Ｓ，３Ｓ）－２－［（アセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましい。

式（２）中、アミノ酸残基Ｘ^{a}としては、結合安定性及び分子安定性の観点から、下記構造（ｒ）で表されるアミノ酸残基であることが好ましい。

[0107] [化16]



(r)

[0108] 構造（ｒ）中、Ｒ^{r}は水素原子又は１価の有機基を表し、Ｌは、－（ＣＨ$_{2}$）$_{Ｌ1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{Ｌ1}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表し、ｎｒ１は、０以上の整数を表し、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表し、＊＊はチオエーテル結合における硫黄原子との結合部位を表す。

Ｒ^{r}、Ｌ及びｎｒ１は、構造（ｒ－１における）Ｒ^{r}、Ｌ及びｎｒ１と同義であり、好ましい態様も同様である。

[0109] 結合安定性及び分子安定性の観点から、式（２）におけるX^c及びX^dのいずれか一方が、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－アセチル－Ｌ－ホモリシン、及び、Ｎ－ζ－アセチル－Ｄ－ホモリシンからなる群から選択される側鎖にアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、式（２）中におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、X^aが、上記構造（ｒ）で表されるアミノ酸残基（より好ましくは、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－ζ－アセチル－Ｌ－ホモリシン、Ｎ－ζ－アセチル－Ｄ－ホモリシン及び、（２Ｓ，３Ｓ）－２－［（アセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基）であることが好ましい。

[0110] X^a、X^b、X^c及びX^d並びにX_1で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１４である。環状ペプチドの分子内ひずみが大きくなり過ぎず、α－ヘリックス等の高次構造が安定化し、かつ、インテグリン結合性に優れる観点から、X^a、X^b、X^c及びX^d並びにX_1で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１３であることがより好ま

しく、８～１０であることがより好ましい。

また、上記観点から、X^c及びX^dで表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、５であることが好ましい。

[0111] 式（２）においては以下のような実施形態もまた好ましい。ここで、各アミノ酸残基はＬ－アミノ酸残基であってもＤ－アミノ酸残基であってもよい。

すなわち、X^aは、環状ペプチドのＮ末端アミノ酸残基であることが好ましく、この場合、X^aはα炭素にアセチル基が結合したイソロイシン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、ロイシン、トレオニン、又はバリンに由来するアミノ酸残基であってもよい。中でもα炭素にアセチル基が結合したアスパラギン酸に由来するアミノ酸残基及びα炭素にアセチル基が結合したグルタミン酸に由来するアミノ酸残基が好ましく、α炭素にアセチル基が結合したグルタミン酸残基がより好ましい。

X^bは、システインに由来するアミノ酸残基、ペニシラミンに由来するアミノ酸残基、又はホモシステインに由来するアミノ酸残基であってもよい。中でもホモシステインに由来するアミノ酸残基が好ましい。

[0112] X^c及びX^dのうち、チオエーテル結合の硫黄原子を供給しない方のアミノ酸残基は、２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－リシン、又はＮ－ζ－アセチル－ホモリシンに由来するアミノ酸残基であってもよい。中でもＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基及びＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基が好ましく、Ｎ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基がより好ましい。

X^c及びX^dのうち、チオエーテル結合の硫黄原子を供給している方のアミノ酸残基は、システインに由来するアミノ酸残基、ペニシラミンに由来するアミノ酸残基、又はホモシステインに由来するアミノ酸残基であってもよい。中でもホモシステインに由来するアミノ酸残基が好ましい。

[0113] （X_1）$_{m1}$は、全体でＦを表すか、あるいはＦX^gを表すことが好ましい。ここでX^gは任意の一アミノ酸残基を表すが、その例としてはアラニン、アルギニンが挙げられる。

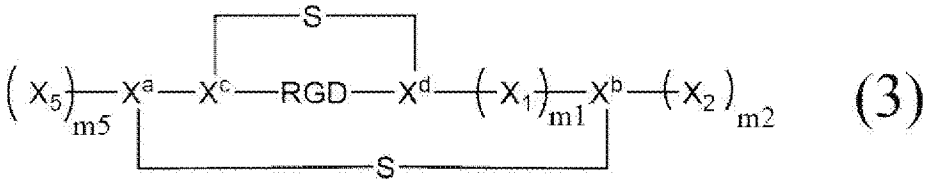
（X_2）$_{m2}$は、３残基以上連続するＫを含むことが好ましい。Ｋの繰り返し数の上限は特に制限されないが、例えば１０、６、又は４であってもよい。（X_2）$_{m2}$は、全体で、例えばＡ、Ｋ、ＫＫＫ、ＡＫＫＫ等を表していてもよい。

[0114] 一つの好ましい実施形態においては、X^aはα炭素にアセチル基が結合した任意のアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、X^bはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、X^cはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、X^dはＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基又はＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基であり、（X_1）$_{m1}$は、全体でＦである。この場合、X^aはα炭素にアセチル基が結合したイソロイシン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、ロイシン、トレオニン、又はバリンに由来するアミノ酸残基であることが好ましい。また、（X_2）$_{m2}$は、全体でＡ、Ｋ、ＫＫＫ、又はＡＫＫＫであってもよい。

[0115] 別の好ましい実施形態においては、X^aはα炭素にアセチル基が結合した任意のアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、X^bはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、X^cはＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基又はＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基であり、X^dはホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、（X_1）$_{m1}$は、全体でＦである。この場合、X^aはα炭素にアセチル基が結合したイソロイシン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、ロイシン、トレオニン、又はバリンに由来するアミノ酸残基であることが好ましい。また、（X_2）$_{m2}$は、全体でＡ、Ｋ、ＫＫＫ、又はＡＫＫＫであってもよい。

[0116] さらに、本開示に係る環状ペプチドは、上記式（２）の環状ペプチドのＮ末端に追加のアミノ酸を加えた構造の環状ペプチドであってもよい。このような環状ペプチドの構造は以下の式（３）で表すことができる。

[0117] [化17]



(3)

[0118] ここで、式（３）におけるＸ^{a}、Ｘ^{b}、Ｘ^{c}、Ｘ^{d}、Ｘ$_{1}$、Ｘ$_{2}$、ｍ１及びｍ２は、上記式（２）中のＸ^{a}、Ｘ^{b}、Ｘ^{c}、Ｘ^{d}、Ｘ$_{1}$、Ｘ$_{2}$、ｍ１及びｍ２と同義であり、好ましい態様も同様である。また、Ｘ$_{5}$及びｍ５は、上記式（１）中のＸ$_{5}$及びｍ５と同義であり、好ましい態様も同様である。

ただし、式（３）の環状ペプチドにおいては、Ｘａはチオエーテル結合の硫黄原子が有機基を介してα－炭素上のアミノ基に結合しているアミノ酸残基ではない。このため、Ｘ^{a}及びＸ^{b}の組み合わせの例及び好ましい例としては、式（２）の説明においてＸ^{c}及びＸ^{d}の組み合わせの例及び好ましい例として挙げたアミノ酸残基が挙げられる。Ｘ^{a}とＸ^{b}のうちどちらがチオエーテル結合の硫黄原子を供給しているアミノ酸残基であるかは特に制限されないが、例えばＸ^{a}の方であってもよい。

（Ｘ$_{5}$）$_{m5}$は、全体でＡ、Ｋ、ＫＫＫ、又はＡＫＫＫであってもよい。

[0119] 本開示に係る環状ペプチドは、実施例における「（２）環状ペプチドの固定」及び「（３）インテグリン結合性の評価」に記載の方法で測定した解離定数が２００ｎＭ（Ｍ；ｍｏｌ／Ｌ）以下であることが好ましく、１００ｎＭ以下であることがより好ましく、５０ｎＭ以下であることがさらに好ましい。解離定数は０ｎＭに近ければ近いほど好ましいが、実際上の観点から、上記上限値と組み合わせることができる下限値として、例えば、０．１ｎＭ、あるいは０．５ｎＭを用いてもよい。また、本開示に係る環状ペプチドは、実施例における「（４）分子安定性の評価」に記載の方法で測定した残存率が３０％以上であることが好ましく、５０％以上であることがより好ましく、７０％以上であることがさらに好ましい。残存率は１００％に近ければ近いほど好ましく、このため上記下限値と組み合わせることができる上限値として１００％を用いてもよい。

[0120] 本開示におけるインテグリンは、ＲＧＤ配列を認識するインテグリンであれば特に限定されない。後述の実施例においてはインテグリンαｖβ５を用いて結合性の評価を行っているが、インテグリンはこれに限定されず、本開示に係る環状ペプチドは、αＶβ３のＲＧＤ配列を認識するインテグリンに結合することができる。

[0121] また、本開示に係る環状ペプチドの分子安定性は、耐アルカリ性を指標にして測定しているが、本開示に係る環状ペプチドの分子安定性はアルカリ以外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。例えば、耐アルカリ性に優れることで、本開示に係る環状ペプチドをアフィニティリガンドとして用いるアフィニティクロマトグラフィー用担体を細胞精製に使用した際に、アルカリによる洗浄を繰り返し行ってもインテグリン結合性が維持され、細胞分離コストを低減することができる。

[0122] 本開示に係る環状ペプチドの例を以下の表３－１及び表３－２に記載する。表３－１及び表３－２に記載の環状ペプチド１～４７は、いずれも、全てのアミノ酸残基がＬ－アミノ酸残基又はグリシン等光学異性体を有しないアミノ酸残基である。表中、Ｈｃｙはホモシステイン残基を表し、Ｄａｂ（ａｃｅｔｙｌ）は、２－アミノ－４－アセチルアミノ－ブタン酸残基を表し、Ｄａｐ（ａｃｅｔｙｌ）は、２－アミノ－３－アセチルアミノ－プロパン酸残基を表し、Ｏｒｎ（ａｃｅｔｙｌ）は、Ｎ－δ－アセチル－オルニチン残基を表し、Ｋ（ａｃｅｔｙｌ）は、Ｎ－ε－アセチル－リシン残基を表す。

これらのアセチル基を含有するアミノ酸残基におけるアセチル基中のメチル基上の水素原子のうち１つが、チオエーテル結合の結合相手となるアミノ酸残基における硫黄原子への結合に置換して、チオエーテル結合による架橋が形成されている。また、架橋部アミノ酸残基の欄においては、アセチル基は省略して記載している。

[0123] 表３－１及び表３－２中、括弧内に記載されたアミノ酸残基及び太字の字体で記載されたアミノ酸残基は、チオエーテル結合による架橋されたアミノ

酸残基を示す。また、斜体で記載されたアミノ酸残基同士が、チオエーテル結合による架橋されたアミノ酸残基の組み合わせの１つを表し、斜体ではない太字の事体で記載されたアミノ酸残基同士が、チオエーテル結合による架橋されたアミノ酸残基の組み合わせの１つを表している。

例えば、環状ペプチド１において、斜体の「Ｄａｐ」と斜体の「Ｈｃｙ」とがチオエーテル結合による架橋されたアミノ酸残基を表し、太字の字体「Ｉ」と太字の字体「Ｈｃｙ」とがチオエーテル結合による架橋されたアミノ酸残基を表している。

[0124] 表３－１及び表３－２中のX^aの欄における「α－NH_2」は、アミノ酸残基のα－NH_2が、クロロアセチル基を介して（ただし、チオエーテル結合形成後はクロロ基は存在しない）結合相手となるアミノ酸残基とチオエーテル結合を形成していることを意味する。

例えば、環状ペプチド２１において、アミノ酸残基X^aは「Ｋ」：リシンであり、リシンは側鎖上のNH_2ではなく、「α－NH_2」がクロロアセチル基を介して結合相手となるアミノ酸残基とチオエーテル結合を形成していることを示す。

[0125]

[表3-1]

番号	環状ペプチド					配列番号
	識別名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)	架橋部アミノ酸残基1		架橋部アミノ酸残基2	
			X^a	X^b	X^c	X^d	
1	環状ペプチド1	**I(*Dap(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dap	Hcy	1
2	環状ペプチド2	**I(*Dab(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dab	Hcy	2
3	環状ペプチド3	**I(*Orn(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	3
4	環状ペプチド4	**I(*K(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	K	Hcy	4
5	環状ペプチド5	**I-*(Hcy)***-RGD(***Dap(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Dap	5
6	環状ペプチド6	**IC** RGD(***Dap(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	Dap	6
7	環状ペプチド7	**I-*(Hcy)***-RGD(***Dab(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Dab	7
8	環状ペプチド8	**IC** RGD(***Dab(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	Dab	8
9	環状ペプチド9	**I-*(Hcy)***-RGD(***Orn(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	9
10	環状ペプチド10	**IC** RGD(***Orn(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	Orn	10
11	環状ペプチド11	**I-*(Hcy)***-RGD(***K(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	11
12	環状ペプチド12	**IC** RGD(***K(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	K	12
13	環状ペプチド13	**I(*Dap(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Dap	Hcy	13
14	環状ペプチド14	**I(*Dap(acetyl)*)** RGD- **C** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dap	C	14
15	環状ペプチド15	**I(*Orn(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Orn	Hcy	15
16	環状ペプチド16	**I(*Orn(acetyl)*)** RGD- **C** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	C	16
17	環状ペプチド17	**I-*(Hcy)***-RGD(***K(acetyl)***) F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Hcy	K	17
18	環状ペプチド18	**I-C-** RGD(***K(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	C	K	18
19	環状ペプチド19	**I-*(Hcy)***-RGD(***Dab(acetyl)***) F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Hcy	Dab	19
20	環状ペプチド20	**I-C-** RGD(***Dab(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	C	Dab	20
21	環状ペプチド21	**K(*Dap(acetyl)*)** RGD- ***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dap	Hcy	21
22	環状ペプチド22	**I-*(Hcy)***-RGD(***K(acetyl)***) F-**(Hcy)**-K	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	22
23	環状ペプチド23	I(*Orn(acetyl)*)RGD-*(Hcy)*-F-(Pen)-KKK	α-NH_2	Pen	Orn	Hcy	23
24	環状ペプチド24	E(*Orn(acetyl)*)RGD-*(Hcy)*-F-(Pen)-KKK	α-NH_2	Pen	Orn	Hcy	24

[0126]

[表3-2]

番号	環状ペプチド					配列番号
	識別名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)	架橋部アミノ酸残基1		架橋部アミノ酸残基2	
			X^a	X^b	X^c	X^d	
25	環状ペプチド25	**Y-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	25
26	環状ペプチド26	**L-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	26
27	環状ペプチド27	**T-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	27
28	環状ペプチド28	**V-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	28
29	環状ペプチド29	**D-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	29
30	環状ペプチド30	**E-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	30
31	環状ペプチド31	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** P-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	31
32	環状ペプチド32	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** Y-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	32
33	環状ペプチド33	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** FR-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	33
34	環状ペプチド34	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** FA-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	34
35	環状ペプチド35	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	35
36	環状ペプチド36	A-(Hcy)-···-***(Hcy)***-RGD***(K(acetyl))***F(K(acetyl))KKK	Hcy	K	Hcy	K	36
37	環状ペプチド37	KKK-(Hcy)-···-***(Hcy)***-RGD***(K(acetyl))***F(K(acetyl))A	Hcy	K	Hcy	K	37
38	環状ペプチド38	**V(*Orn(acetyl)*)** RGD-**(*Hcy*)** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	38
39	環状ペプチド39	**D(*Orn(acetyl)*)** RGD-**(*Hcy*)** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	39
40	環状ペプチド40	**E(*Orn(acetyl)*)** RGD-**(*Hcy*)** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	40
41	環状ペプチド41	**V-*(Hcy)*-**RGD**(*Orn(acetyl)*)** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	41
42	環状ペプチド42	**D-*(Hcy)*-**RGD**(*Orn(acetyl)*)** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	42
43	環状ペプチド43	**E-*(Hcy)*-**RGD**(*Orn(acetyl)*)** F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	43
44	環状ペプチド44	**V-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	44
45	環状ペプチド45	**D-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	45
46	環状ペプチド46	**E-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))** F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	46
47	環状ペプチド47	**E-*(Hcy)*-**RGD**(*Orn(acetyl)*)** F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	47

[0127] これらの中でも、環状ペプチド３、１１、１４～１８、２０、２２～３０、３５、３８～４０、及び４２～４７が好ましく、環状ペプチド１１、２２

、２５～３０、３５、３８～４０及び４２～４７が好ましく、環状ペプチド２９及び３０がいっそう好ましい。

[0128] 配列のバリエーションは、環状ペプチド全体を基準配列と考えて適用してもよい。このため、配列番号１～配列番号４７のうちいずれか１つのアミノ酸配列に対してアミノ酸残基を付加、欠失又は置換したアミノ酸基も本開示に係る環状ペプチドの要件を満たす限り使用可能である。ただし、環状セグメントの中のＲＧＤ領域は改変してはならない。配列番号１～配列番号４７のうちいずれか１つのアミノ酸配列にアミノ酸残基の付加、欠失又は置換を行う場合、付加、欠失又は置換したアミノ酸残基の総数は、１～１０であることが好ましく、１～５であることがより好ましく、１～３であることが更に好ましく、１又は２であることが特に好ましい。

[0129] 本開示に係る環状ペプチドは、配列番号１～配列番号４７のうちいずれか１つのアミノ酸配列と７０％以上の配列同一性を有することが好ましく、８０％以上の配列同一性を有することがより好ましく、９０％以上の配列同一性を有することがさらに好ましい。なお、例えば配列番号１のアミノ酸配列と７０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列の範囲には、配列番号１のアミノ酸配列自身も含まれる。

[0130] 本開示において、２つのアミノ酸配列の配列同一性は、次のようにして求める。

（ｉ）２つのアミノ酸配列のアラインメントを行う

たとえば初期設定で使用することができるＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ等のアラインメントアルゴリズム及び／又はプログラムを使用して、２つの配列間のアラインメントを行うことができる。

（ｉｉ）配列同一性を計算する

得られたアラインメントに基づいて、次式により配列同一性を計算する。

配列同一性［％］＝（一致ポジション数／全ポジション数）×１００［％］

全ポジション数はアラインメントの長さであり、一致ポジション数はアミ

ノ酸の種類が一致するポジションの数である。

[0131] （ｉｉｉ）配列同一性の計算例

例えば、次のアミノ酸配列を考える。

配列Ａ・・・ＡＹＨＲＧＥＬＶＷＥ

配列Ｂ・・・ＳＡＷＨＧＥＬＶＷ

これを、上記した条件の下でアラインメントすると、次のようになる。ここで、配列Ａ、Ｂ間でアミノ酸（残基）の種類が一致する箇所には、見やすくするため、記号「｜」を付けている。また、「－」は対応するアミノ酸が無い箇所を示す。

配列Ａ　－ＡＹＨＲＧＥＬＶＷＥ

｜　｜　｜｜｜｜｜

配列Ｂ　ＳＡＷＨ－ＧＥＬＶＷ－

この例では、全ポジション数は１１であり、一致ポジション数は７であるから、上記式に従って算出した配列同一性は、７／１１×１００＝６３．６％である。

[0132] （細胞足場材）

本開示に係る細胞足場材は、本開示に係る環状ペプチドと、基材と、を含む。

細胞は生体内においては細胞外マトリックスによって支持されていることから、同様の状態を再現する細胞足場材として、本開示に係る環状ペプチドを使用することにより、細胞をより良好に培養することができる。

細胞培養のための上記基材としては、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン等の生分解性ポリエステル類、コラーゲン若しくはその熱変性体のゼラチン、フィブロネクチン等の糖タンパク質、又はヒアルロン酸、キチン、アルギン酸等の多糖類により構成されたマトリクスが挙げられる。例えば、本開示に係る環状ペプチド中の固定化官能基を、基材中の官能基と反応させることにより、本開示に係る環状ペプチドを基材に結合させることができる。例えば、本開示に係る環状ペプチドが固定化官能基としてリシン

残基のアミノ基を有する場合、アミノ基を基材上のカルボキシ基と反応させてアミド結合を形成することにより、環状ペプチドを基材に固定できる。このような手法を用いることにより、本開示に係る環状ペプチドが基材の表面に結合した細胞足場材を得ることができる。　本開示に係る環状ペプチドの量は特に限定はされないが、基材の全質量に対して０．０１質量％～１００質量％であってもよく、０．１質量％～５０質量％であってもよい。

[0133] 本開示に係る細胞足場材は、シャーレ、フラスコ、プレート（例えば、ポリスチレンウェルプレート）、培養バッグ、中空糸膜、ビーズ等の任意の培養ツール上に付与することができる。

本開示に係る細胞足場材は本開示に係る環状ペプチドを含むため、インテグリンへの良好な結合性を有し、細胞は細胞足場材に良好に接着することができる。

培養対象となる細胞としては、インテグリンを発現する生物の細胞であれば特に限定されないが、任意の動物細胞であってもよいし、任意の脊椎動物細胞であってもよいし、任意のほ乳類細胞であってもよいし、ヒトの細胞であってもよいし、ヒト以外のほ乳類の細胞であってもよい。

細胞の例としては、胚性幹（ＥＳ）細胞、人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞、周産期幹細胞、羊水由来幹細胞（ＡＦＳＣ）、任意の起源の間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、任意の組織型の、分化方向決定済みの前駆細胞又は成人細胞、成熟細胞、正常細胞、罹患細胞、腫瘍細胞等が挙げられる。より具体的な例としては、肝臓細胞、実質細胞、星細胞、内皮細胞、肝細胞、胆管細胞、胆樹細胞、膵臓細胞等が挙げられる。これらの細胞の例示は、後述する細胞分離材及び培地についても同様である。

[0134] （細胞分離材）

本開示に係る細胞分離材は、本開示に係る環状ペプチドと、保持材と、を含む。本開示に係る細胞分離材は、本開示に係る環状ペプチドを含むため、細胞表面のインテグリンと結合し、細胞を捕捉することができる。このため、本開示に係る細胞分離材を、例えば、アフィニティークロマトグラフィー

として用いることにより、細胞懸濁液から細胞を効率よく分離することができる。

例えば、本開示に係る環状ペプチド中の固定化官能基を、保持材中の官能基と反応させることにより、本開示に係る環状ペプチドを保持材に結合させることができる。例えば、本開示に係る環状ペプチドが固定化官能基としてリシン残基のアミノ基を有する場合、アミノ基を保持材上のカルボキシ基と反応させてアミド結合を形成することにより、環状ペプチドを保持材に固定できる。

[0135] 保持材は、特に制限はなく、例えば、アガロース、デキストラン、デンプン、セルロース、プルラン、キチン、キトサン、三酢酸セルロース、及び、二酢酸セルロース等の多糖類及びその誘導体、並びに、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアルキルビニルエーテル、及び、ポリビニルアルコール等のビニル系重合体等から選ばれる材料により構成されていてもよい。

これらの材料は架橋構造を形成していてもよい。架橋構造は、機械的強度を向上させる傾向にある。

保持材は、上記の材料のうち１種類又は２種類以上の材料からなることが好ましい。

また、保持材は好ましくは多孔質であり、より好ましくは多孔質膜又は多孔質粒子であり、更に好ましくは多孔質粒子である。

[0136] 本開示に係る環状ペプチドを水不溶性の保持材に固定化した細胞分離材をアフィニティクロマトグラフィーに用いることもできる。

水不溶性の保持材としては、例えば、結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストラン、及び、架橋プルラン等の多糖類、アクリレート系重合体、及び、スチレン系重合体等の有機保持材、ガラスビーズ、及び、シリカゲル等の無機保持材、さらにはこれらの組合せによって得られる、有機－有機、有機－無機等の複合保持材等が挙げられる。

水不溶性保持材としては、アルカリ耐性の観点から、多糖類又はアクリレ

ート系重合体がより好ましく、アガロース又はセルロース等の多糖類がさらに好ましい。

水不溶性保持材として用いることができる市販品としては、例えば、多孔質セルロースゲルであるセルファイン（Ｃｅｌｌｕｆｉｎｅ） ＧＣＬ２０００（ＪＮＣ社製）（ＣＥＬＬＵＦＩＮＥは登録商標）、セルファインＭＡＸ（Ｃｅｌｌｆｉｎｅ ＭＡＸ）（ＪＮＣ社製）、アリルデキストランとメチレンビスアクリルアミドとを共有結合で架橋したセファクリル（Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ） Ｓ－１０００ ＳＦ（ＧＥヘルスケア社製）（ＳＥＰＨＡＣＲＹＬは登録商標）、アクリレート系の保持材であるトヨパール（ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ）（東ソー（株）製）（トヨパール及びＴＯＹＯＰＥＡＲＬは登録商標）、トヨパール（ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ） ＡＦ－Ｃａｒｂｏｘｙ－６５０ （東ソー（株）製）、トヨパール（ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ） ＧｉｇａＣａｐ ＣＭ－６５０ （東ソー（株）製）、アガロース系の架橋保持材であるセファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ） ＣＬ４Ｂ（ＧＥヘルスケア社製）（ＳＥＰＨＡＲＯＳＥは登録商標）、及び、エポキシ基で活性化されたポリメタクリルアミドであるオイパーギット（Ｅｕｐｅｒｇｉｔ） Ｃ２５０Ｌ（シグマアルドリッチ社製）（ＥＵＰＥＲＧＩＴは登録商標）等が挙げられる。

ただし、本開示における水不溶性保持材は、これらの保持材又は活性化保持材にのみ限定されるものではない。また、本開示に用いる水不溶性保持材は、本吸着材料の使用目的及び方法からみて、表面積が大きいことが好ましく、適当な大きさの細孔を多数有する多孔質であることが好ましい。保持材の形態としては、特に限定されるものではないが、ビーズ状、繊維状、膜状、及び、中空糸状等、いずれも可能であり、任意の形態を選ぶことができる。

[0137] 本開示に係る環状ペプチドを水不溶性保持材に固定化する方法としては、上記のとおりリシン残基のアミノ基を用いた固定化方法が挙げられるが、これに限定されるものではない。

一般的にタンパク質又はポリペプチドを保持材に固定化する場合に採用される方法を採用することができる。例えば、保持材を臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、及び、ヒドラジン等と反応させて保持材を活性化又は保持材表面に反応性官能基を導入し、本開示に係る環状ペプチドと反応、固定化する方法、又は、保持材と本開示に係る環状ペプチドが存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、又はグリセルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化が挙げられる。

[0138] 本開示に係る環状ペプチドを保持材に固定化する際には、本開示に係る環状ペプチドを水系溶媒（水系分散媒）又は有機系溶媒（有機系分散媒）に溶解（分散）することが好ましい。

水系溶媒（水系分散媒）としては、特に限定されるものではないが、例えば、ＨＥＰＥＳ（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス－塩酸緩衝液等を挙げることができる。

有機系溶媒（有機系分散媒）は、特に限定されるものではないが、極性有機溶媒が好ましく、特に、ＤＭＳＯ（dimethyl sulfoxide；ジメチルスルホキシド）、ＤＭＦ（N,N-dimethylformamide；Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド）、又は、アルコールが好ましく、例えば、メタノール、エタノール、ＩＰＡ（isopropyl alcohol；イソプロピルアルコール）、ＴＦＥ（2,2,2-trifluoroethanol；２，２，２－トリフルオロエタノール）、及び、ＨＦＩＰ（1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol；１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール）等が挙げられる。

本開示に係る環状ペプチドを固定化する際のｐＨ条件は特に限定されず、酸性、中性、及び、アルカリ性のいずれでもよく、例えば、使用する溶媒（分散媒）に合わせて適宜設定することができる。

例えば、アルカリ性にする場合は、ＤＢＵ（diazabicycloundecene；ジアザビシクロウンデセン）やＴＥＡ(triethylamine；トリエチルアミン)等の塩

基をＤＭＳＯ（dimethyl sulfoxide；ジメチルスルホキシド）やアルコールに添加してもよい。

[0139] 上記細胞分離材をアフィニティクロマトグラフィー用充填剤とする場合の本開示に係る環状ペプチドの密度は特に限定されないが、０．１ｍｍｏｌ／充填剤１Ｌ～１，０００ｍｍｏｌ／充填剤１Ｌが好ましく、０．１ｍｍｏｌ／充填剤１Ｌ～１００ｍｍｏｌ／充填剤１Ｌがより好ましく、０．５ｍｍｏｌ／充填剤１Ｌ～２０ｍｍｏｌ／充填剤１Ｌが更に好ましい。環状ペプチドの密度が上記範囲内であると、本開示に係る環状ペプチドの使用量と細胞分離性能のバランスがよく、より低コストで、効率よく細胞を分離することができる。

[0140] 本開示に係る細胞分離材により分離される細胞は、インテグリンを発現する生物の細胞であれば特に限定されないが、任意の動物細胞であってもよく、任意の脊椎動物細胞であってもよく、任意のほ乳類細胞であってもよく、ヒトの細胞であってもヒト以外のほ乳類の細胞であってもよい。

[0141] （培地）

本開示に係る培地は、本開示に係る環状ペプチドと、培養成分と、を含む。

本開示に係る培地中に本開示に係る環状ペプチドが含まれることにより、培地中で培養される細胞のインテグリンと環状ペプチドとの結合が生じ、インテグリンからのシグナル伝達によりアポトーシス抑制を介した細胞生存率上昇などの効果が得られる。

上記培養成分とは、細胞を培養するための培地成分を指す。また、培養対象となる細胞としては、インテグリンを発現する生物の細胞であれば特に限定されないが、任意の動物細胞であってもよいし、任意の脊椎動物細胞であってもよいし、任意のほ乳類細胞であってもよいし、ヒトの細胞であってもよいしヒト以外のほ乳類の細胞であってもよい。

培養成分を含む培地としては、培養する細胞の種類に応じて適宜選択すればよく、例えば、ＤＭＥＭ（ダルベッコ改変イーグル培地）、ＭＥＭ（イー

グル最小必須培地）、Ｆ１２、Ｈａｍ、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＣＤＢ（ＭＣＤＢ１０２、１０４、１０７、１３１、１５３、１９９など）、Ｌ１５、ＳｋＢＭ(登録商標)、ＲＩＴＣ８０－７、ＭｅｓｅｎＰｒｏ（ライフテクノロジーズ）などを挙げることができる。

[0142] 培養成分として、上記培地等の培地を、標準的な組成のまま（例えば、市販されたままの状態で）用いてもよいし、細胞種や細胞条件に応じてその組成を適宜変更してもよい。 従って、培養成分は、公知の組成のものに限定されず、１又は２以上の成分が追加、除去、増量若しくは減量されたものでもよい。

[0143] 培養成分に含まれるアミノ酸としては、特に限定されず、培養成分に含まれる公知のアミノ酸が挙げられる。例えば、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、Ｌ－グルタミン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－トレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン等が挙げられる。

[0144] 培養成分に含まれるビタミン類としては、特に限定されず、例えば、Ｄ－パントテン酸カルシウム、塩化コリン、葉酸、イソイノシトール、ナイアシンアミド、リボフラビン、チアミン、ピリドキシン、ビオチン、リポ酸、ビタミンＢ１２、アデニン、チミジンなどが挙げられる。

[0145] 培養成分に含まれる電解質としては、特に限定されず、培養成分に含まれる公知の電解質が挙げられる。上記電解質としては、例えば、$CaCl_2$、ＫＣｌ、$MgSO_4$、ＮａＣｌ、NaH_2PO_4、$NaHCO_3$、$Fe(NO_3)_3$、$FeSO_4$、$CuSO_4$、$MnSO_4$、Na_2SiO_3、$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$、$NaVO_3$、$NiCl_2$、$ZnSO_4$などが挙げられる。

培養成分は、これらの成分のほか、Ｄ－グルコース等の糖類、ピルビン酸ナトリウム、フェノールレッド等のｐＨ指示薬、プトレシン、抗生物質などを含んでいてもよい。

[0146] 培養成分は、血清を含んでいてもよいし、血清を含まなくてもよい。本開

示に係る培地における血清の含有量は、０体積％以上３０体積％以下であることが好ましく、０体積％以上１０体積％以下であることがより好ましく、０体積％以上５体積％以下であることが更に好ましく、０体積％以上２体積％以下であることが特に好ましい。

[0147] 本開示に係る培地中における本開示に係る環状ペプチドの含有量は、特に限定されるものではないが、例えば０．０１ｎｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬであり、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｍｇ／ｍＬであってもよい。本開示に係る培地中においては、細胞足場材、細胞分離材の場合とは異なり、環状ペプチドを固定化する必要は特に無い。

[0148] 以上説明したとおり、本開示によれば、インテグリン結合性に優れ、かつ、分子安定性、例えばアルカリ耐性に優れた環状ペプチド、並びに上記環状ペプチドを含む細胞足場材、細胞分離材及び培地を提供することができる。

実施例

[0149] 本開示に係る実施態様を以下の実施例によりさらに具体的に説明するが、実施形態はこれらに限定されるものではない。

なお、実施例において「Ｍ」とは、「ｍｏｌ／Ｌ」を意味する。

[0150] （１）環状ペプチドの合成

表３－１及び表３－２に記載の環状ペプチド１～４７、及び、下記表４に記載の環状ペプチド４８及び４９を、それぞれ、全自動ペプチド合成装置（型番：ＰＳＳＭ－８、（株）島津製作所製）を用いて合成した。なお、実施例において作製した環状ペプチドに含まれるアミノ酸残基について光学異性体が存在する場合、アミノ酸残基はいずれもＬ体である。

例えば、実施例で作製したペプチド中におけるＤの表記は、Ｌ－アスパラギン酸残基を表す。

[0151]

[表4]

		環状ペプチド						配列番号
		識別名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)	架橋部アミノ酸残基1		架橋部アミノ酸残基2		
				X^a	X^b	X^c	X^d	
比較例	1	環状ペプチド48	KC RGDC FCKKK	α-NH_2	C	C	C	48
	2	環状ペプチド49	ACDC RGDC FCGKKK	C	C	C	C	49

[0152] 表４中、環状ペプチド４８において、斜体の「Ｃ」と「Ｃ」とはジスルフィド結合によって架橋されたアミノ酸残基を示し、太字の字体の「Ｋ」と「Ｃ」とは、チオエーテル結合により架橋されたアミノ酸残基を示す。また、

環状ペプチド４９において、斜体及び太字の字体の「C」は、それぞれ、ジスルフィド結合により架橋されたアミノ酸残基を示す。

[0153] （２）環状ペプチドの固定

表面プラズモン共鳴装置（製品名：Ｂｉａｃｏｒｅ３０００、ＧＥヘルスケア社製）に市販のＣＭ５センサーチップ（カルボキシメチルデキストラン導入タイプ、ＧＥヘルスケア社製）をセットし、ＳＰＲ（surface plasmon resonance；表面プラズモン共鳴）用ＨＥＰＥＳ（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid；ヘペス）緩衝液（２０ｍＭ：ＨＥＰＥＳ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ：ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を１０μＬ／ｍｉｎの流速で安定させ、０．２ ＭのＥＤＣ（1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide；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０．０４ ＭのＮＨＳ（N-Hydroxysuccinimide；Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド）混合水溶液を７０μＬ添加した。その後、ＨＥＰＥＳ緩衝液にて０．２ｇ／Ｌに希釈した上記の各環状ペプチドの試料液３００μＬをセンサーチップに供給し、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、水酸化ナトリウム水溶液にて洗浄して、固定化を行った。ただし、固定化官能基としてのアミノ基を有するリシン残基数が１である環状ペプチド２２についてのみ、センサーチップに供給する際の試料液を３００μＬではなく、５０００μＬとした。同様に、同センサーチップの別流路に試料を固定化せず、０．２ＭのＥＤＣと０．０４ＭのＮＨＳ混合水溶液を７０μＬ添加した後、ブロッキング処理と洗浄処理を行った。得られた固定化センサーチップを、以下「固定化センサーチップＡ」という。

[0154] （３）インテグリン結合性の評価

上記（１）で作製した固体化センサーチップＡの各流路に、２５℃にて、５ｍＭとなるように塩化マグネシウムを加えたＨＥＰＥＳ緩衝液を用いて３０ｎＭに希釈したヒトインテグリンαｖβ５を１０分間添加した後、同緩衝液（塩化マグネシウム入り）をランニングバッファーとして３０分間流し、Ｂｉａｃｏｒｅ３０００による測定を行った。その後、０．５ＭのＥＤＴＡ

水溶液を１０分間各流路に流すことにより、ヒトインテグリンαｖβ５を除去する再生処理を行った。上記の、インテグリンを１０分間添加すること、ランニングバッファーを３０分間流すこと、Ｂｉａｃｏｒｅ３０００により測定を行うこと、及び０．５ＭのＥＤＴＡ水溶液により再生処理を行うことからなる測定処理を、さらに、１００ｎＭのヒトインテグリンαｖβ５、３００ｎＭのヒトインテグリンαｖβ５、及び１０００ｎＭのヒトインテグリンαｖβ５についても同様にして行った。各濃度のヒトインテグリンαｖβ５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Ｂｉａｃｏｒｅ３０００による測定値と環状ペプチド未固定の流路におけるＢｉａｃｏｒｅ３０００による測定値の差分から、環状ペプチドとヒトインテグリンαｖβ５との解離定数を算出し、下記の評価基準に従ってインテグリン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。評価結果を表５－１及び表５－２に示す。

評価基準Ａ、Ｂ及びＣである環状ペプチドを用いることにより、環状ペプチドとインテグリンとの特異的結合が可能になり、より効率的な細胞制御が可能となる。

[0155]（解離定数の評価基準）

Ａ・・・解離定数が５０ｎＭ以下である。

Ｂ・・・解離定数が５０ｎＭを超え、１００ｎＭ以下である。

Ｃ・・・解離定数が１００ｎＭを超え、２００ｎＭ以下である。

Ｄ・・・解離定数が２００ｎＭを超える。

[0156]（４）分子安定性の評価

環状ペプチドの分子安定性は、アルカリ処理した環状ペプチド水溶液をＬＣ／ＭＳ（Liquid Chromatography Mass Spectroscopy；液体クロマトグラフィー質量分析法）により分析することで評価した。

アルカリ処理は次の方法で行った。５００μＭの環状ペプチド水溶液を調製し、この水溶液に当量の１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加え、１５℃にて２０分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、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。

評価結果を表５－１及び表５－２に示す。

評価基準Ａ、Ｂ及びＣである環状ペプチドを用いることにより、環状ペプチドを長期間又は繰り返し用いても細胞と特異的に結合することが出来、長期間又は繰り返しのプロセスに用いた場合でも細胞を制御することが可能となり、コストをより低減することができる。

[0157]（環状ペプチド残存率の評価基準）

Ａ・・・環状ペプチドの残存率が７０％以上である。

Ｂ・・・環状ペプチドの残存率が５０％以上７０％未満である。

Ｃ・・・環状ペプチドの残存率が３０％以上５０％未満である。

Ｄ・・・環状ペプチドの残存率が３０％未満である。

[0158] なお分子安定性の評価に用いたＬＣ／ＭＳ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）

・ＭＳ検出器：ＬＣ／ＭＳ２０１０ＥＶ（（株）島津製作所製）

・カラム： Ｃａｄｅｎｚａ ＣＤ－Ｃ１８、内径２．０ｍｍ×長さ２５０ｍｍ、粒子径３μｍ（インタクト（株）製）

・溶離液Ａ：１０ｍＭ ギ酸アンモニウムを溶質として含み、溶媒は水１００％の溶液（ｐＨ３）

・溶離液Ｂ：１０ｍＭ ギ酸アンモニウムを溶質として含み、溶媒はアセトニトリル／水＝９０／１０の溶液（ｐＨ３）

・流速：０．２ ｍＬ／ｍｉｎ

・注入量：４μＬ

・グラジエント：０－３０％：溶離液Ｂ（０－３０分）、１００％：溶離液

Ｂ（３０－４０分）、０％：溶離液Ｂ（４０－６０分）　（Ｂは溶離液Ｂを表す）

・カラム温度：４５℃

・イオン化法：ＥＳＩ（Electrospray Ionization；エレクトロスプレーイオン化）ポジティブ、ＥＳＩネガティブ

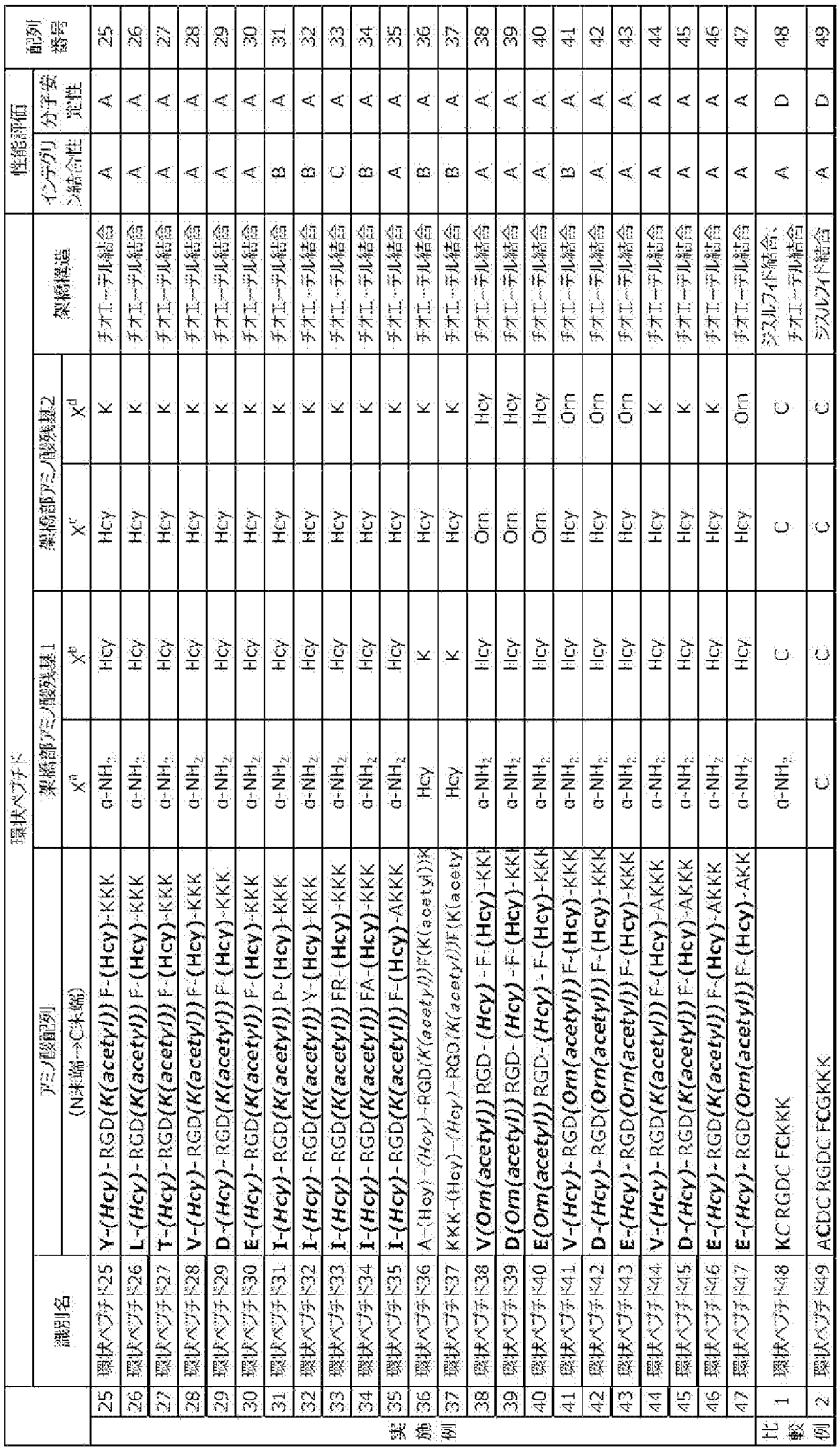
[0159]

[表5-1]

		環状ペプチド							性能評価		配列番号
		識別名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)	架橋部アミノ酸残基1		架橋部アミノ酸残基2		架橋構造	インテグリン結合性	分子安定性	
				X^a	X^b	X^c	X^d				
実施例	1	環状ペプチド1	**I(*Dap(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dap	Hcy	チオエーテル結合	B	A	1
	2	環状ペプチド2	**I(*Dab(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dab	Hcy	チオエーテル結合	C	A	2
	3	環状ペプチド3	**I(*Orn(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	3
	4	環状ペプチド4	**I(*K(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	K	Hcy	チオエーテル結合	B	A	4
	5	環状ペプチド5	**I-*(Hcy)***-RGD(***Dap(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Dap	チオエーテル結合	B	A	5
	6	環状ペプチド6	**IC**RGD(***Dap(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	Dap	チオエーテル結合	C	B	6
	7	環状ペプチド7	**I-*(Hcy)***-RGD(***Dab(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Dab	チオエーテル結合	B	A	7
	8	環状ペプチド8	**IC**RGD(***Dab(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	Dab	チオエーテル結合	A	B	8
	9	環状ペプチド9	**I-*(Hcy)***-RGD(***Orn(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	チオエーテル結合	B	A	9
	10	環状ペプチド10	**IC**RGD(***Orn(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	Orn	チオエーテル結合	B	B	10
	11	環状ペプチド11	**I-*(Hcy)***-RGD(***K(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	11
	12	環状ペプチド12	**IC**RGD(***K(acetyl)***) FCKKK	α-NH_2	C	C	K	チオエーテル結合	A	B	12
	13	環状ペプチド13	**I(*Dap(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Dap	Hcy	チオエーテル結合	B	A	13
	14	環状ペプチド14	**I(*Dap(acetyl)*)** RGD-**C** - F-***(Hcy)***-KKK	α-NH_2	Hcy	Dap	C	チオエーテル結合	A	A	14
	15	環状ペプチド15	**I(*Orn(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	15
	16	環状ペプチド16	**I(*Orn(acetyl)*)** RGD-**C** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	C	チオエーテル結合	A	A	16
	17	環状ペプチド17	**I-*(Hcy)***-RGD(***K(acetyl)***) F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	17
	18	環状ペプチド18	**I-C**-RGD(***K(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	C	K	チオエーテル結合	A	A	18
	19	環状ペプチド19	**I-*(Hcy)***-RGD(***Dab(acetyl)***) F-**C**-KKK	α-NH_2	C	Hcy	Dab	チオエーテル結合	B	A	19
	20	環状ペプチド20	**I-C**-RGD(***Dab(acetyl)***) F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	C	Dab	チオエーテル結合	A	A	20
	21	環状ペプチド21	**K(*Dap(acetyl)*)** RGD-***(Hcy)*** - F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Dap	Hcy	チオエーテル結合	B	A	21
	22	環状ペプチド22	**I-*(Hcy)***-RGD(***K(acetyl)***) F-**(Hcy)**-K	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	22
	23	環状ペプチド23	I(*Orn(acetyl)*)RGD-*(Hcy)*-F-(Pen)-KKK	α-NH_2	Pen	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	23
	24	環状ペプチド24	E(*Orn(acetyl)*)RGD-*(Hcy)*-F-(Pen)-KKK	α-NH_2	Pen	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	24

[0160]

[表5-2]



		環状ペプチド							性能評価		配列番号
		識別名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)	架橋部アミノ酸残基1		架橋部アミノ酸残基2		架橋構造	インテグリンα結合性	分子安定性	
				X^a	X^b	X^c	X^d				
実施例	25	環状ペプチド25	**Y-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	25
	26	環状ペプチド26	**L-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	26
	27	環状ペプチド27	**T-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	27
	28	環状ペプチド28	**V-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	28
	29	環状ペプチド29	**D-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	29
	30	環状ペプチド30	**E-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	30
	31	環状ペプチド31	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**P-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	B	A	31
	32	環状ペプチド32	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**Y-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	B	A	32
	33	環状ペプチド33	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**FR-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	C	A	33
	34	環状ペプチド34	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**FA-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	B	A	34
	35	環状ペプチド35	**I-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	35
	36	環状ペプチド36	A-(Hcy)-*(Hcy)*-RGD-*K(acetyl)*)F(K(acetyl))K	Hcy	K	Hcy	K	チオエーテル結合	B	A	36
	37	環状ペプチド37	KKK-(Hcy)-*(Hcy)*-RGD-*K(acetyl)*)F(K(acetyl	Hcy	K	Hcy	K	チオエーテル結合	B	A	37
	38	環状ペプチド38	**V(*Orn(acetyl)*)**RGD-**(*Hcy*)**-F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	38
	39	環状ペプチド39	**D(*Orn(acetyl)*)**RGD-**(*Hcy*)**-F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	39
	40	環状ペプチド40	**E(*Orn(acetyl)*)**RGD-**(*Hcy*)**-F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Orn	Hcy	チオエーテル結合	A	A	40
	41	環状ペプチド41	**V-*(Hcy)*-**RGD**(Orn(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	チオエーテル結合	B	A	41
	42	環状ペプチド42	**D-*(Hcy)*-**RGD**(Orn(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	チオエーテル結合	A	A	42
	43	環状ペプチド43	**E-*(Hcy)*-**RGD**(Orn(acetyl))**F-**(Hcy)**-KKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	チオエーテル結合	A	A	43
	44	環状ペプチド44	**V-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	44
	45	環状ペプチド45	**D-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	45
	46	環状ペプチド46	**E-*(Hcy)*-**RGD**(K(acetyl))**F-**(Hcy)**-AKKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	K	チオエーテル結合	A	A	46
	47	環状ペプチド47	**E-*(Hcy)*-**RGD**(Orn(acetyl))**F-**(Hcy)**-AKK	α-NH_2	Hcy	Hcy	Orn	チオエーテル結合	A	A	47
比較例	1	環状ペプチド48	**KC RGDC FCKKK**	α-NH_2	C	C	C	ジスルフィド結合、チオエーテル結合	A	D	48
	2	環状ペプチド49	**AC**DC RGDC F**C**GKKK	C	C	C	C	ジスルフィド結合	A	D	49

[0161] 表５－１及び表５－２に記載の結果から、本開示に係る環状ペプチドは、比較例の環状ペプチドに比べ、分子安定性に優れることが分かる。全ての実

施例において、環状ペプチドの残存率の値は５０％以上（評価Ｂ以上）であったのに対し、全ての比較例において環状ペプチドの残存率の値は実際の値としては２５％以下であった。以上より、本開示に係る環状ペプチドは、インテグリン結合性及び分子安定性の両方に優れることが分かる。

[0162] 次に上記で得られた環状ペプチドを用いて、本開示に係る細胞足場材を作製し、この細胞足場材を用いてｉＰＳ細胞培養実験を行った。

[0163]（ポリスチレンプレートの表面処理）

プラズマ処理装置（（株）魁半導体社製：ＳＣＢ－１０６）を用いて、アンモニアガス中でガス圧力１０Ｐａ、出力７００Ｗ、処理時間５分の条件で、ポリスチレン製６ウェルプレート（コーニング社製）の表面処理を実施した。

[0164]（ＣＭＤコーティングウェルの作製）

カルボキシメチルデキストランナトリウム（名糖産業（株）製、商品名：「ＣＭＤ」、分子量：１００万、以下「ＣＭＤ」ともいう。）０．５ｇに蒸留水９．５ｇを加えて攪拌し、十分に溶解させ、５質量％のＣＭＤ溶液を調製した。

次いで、１－エチル－３－(３－ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（以下、「ＥＤＣ」ともいう。）（ナカライテスク（株）製）３８３．４ｍｇに蒸留水１ｍＬを加えてＥＤＣ溶液を調製した。次いで、Ｎ－ヒドロキシこはく酸イミド（以下、「ＮＨＳ」ともいう。）（富士フイルム和光純薬（株）製）５７．５ｍｇに蒸留水１ｍＬを加えてＮＨＳ溶液を調製した。

次いで、上記で調製したＣＭＤ溶液１０ｇに、ＥＤＣ溶液０．０５ｍＬ、ＮＨＳ溶液０．０５ｍＬを加えて攪拌して、得られたＣＭＤ含有コーティング液をすぐに上記で表面処理したポリスチレンプレートの１つのウェルに１ｍＬずつ滴下した。ポリスチレンプレートを室温で１時間静置した後、蒸留水でウェルを充分に洗浄してＣＭＤ含有コーティング液を除去し、ＣＭＤコーティングウェルを作製した。

[0165] （リガンドコーティングウェルの作製）

環状ペプチド１１：０．２ｍｇにＨＢＳ－Ｎバッファー（ＧＥヘルスケアジャパン（株）製）１ｍＬを加えて環状ペプチド溶液を調製した。次いで、ＥＤＣ７６．７ｍｇに蒸留水１ｍＬを加えてＥＤＣ溶液を調製した。次いで、ＮＨＳ：１１．５ｍｇに蒸留水１ｍＬを加えてＮＨＳ溶液を調製した。次いで、エタノールアミン（ＢＩＯ ＲＡＤ社製、商品名：「ＰｒｏｔｅＯｎ エタノールアミン　ＨＣＬ」）１ｍＬに蒸留水１ｍＬを加えてエタノールアミン溶液を調製した。

次いで、上記で調製したＥＤＣ溶液：０．５ｍＬに、ＮＨＳ溶液０．５ｍＬを加えて攪拌し、得られた混合液をすぐに上記ＣＭＤコーティングウェルに１ｍＬ滴下した。ポリスチレンプレートを７分間静置した後、蒸留水でウェルを充分に洗浄して、混合液を除去した。さらに、環状ペプチド溶液１５：１ｍＬをウェルに滴下し、６０分間静置した後、蒸留水でウェルを充分に洗浄して環状ペプチド溶液を除去した。さらに、エタノールアミン溶液１ｍＬをウェルに滴下し、７分間静置した後、蒸留水でウェルを充分に洗浄してエタノールアミン溶液を除去し、環状ペプチド１１が基材としてのＣＭＤ上に固定された細胞足場材を有するウェル（以下、「リガンドコーティングウェル」ともいう。）を得た。

[0166] （γ線滅菌処理）

上記で作製したリガンドコーティングウェルを滅菌バッグに密閉し、ラジエ工業（株）製の照射施設１号機にて線量２５ｋＧｙの条件でγ線滅菌処理を実施した。

これにより、「γ線照射済み細胞足場材Ａ」を作製した。

[0167] －ペプチドのｉＰＳ細胞培養性能の評価－

ｉＰＳ細胞はFujifilm Cellular Dynamics社によって樹立された０１４３４クローンを使用した。γ線照射済み細胞足場材Ａを表面に有した培養ポリスチレンプレートに、ｉＰＳ細胞をｓｐｌｉｔ　ｒａｔｅ　＝１：６で播種し、フィーダーフリーのＥＳ及びｉＰＳ細胞培養用培地ｍ（Stem Cell Techn

ologies社製、製品名：ｍＴｅＳＲ１）中で３日間培養したのち、細胞解離試薬（Thermo Fisher社、製品名：ＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ）を用いた処理にてｉＰＳ細胞を単細胞剥離して回収した。得られた細胞懸濁液から、生死細胞オートアナライザー（ベックマンコールター社製、製品名：Ｖｉ－Ｃｅｌｌ　ＸＲ）を用いて細胞数を計測し、細胞が増殖したか否かを判定した。

上記結果から実施例１１のペプチドを用いた細胞足場材は、ｉＰＳ細胞が増殖したことが確認された。これより、本開示に係る環状ペプチドがインテグリン結合性に優れるので、細胞足場材として機能を有することを示している。

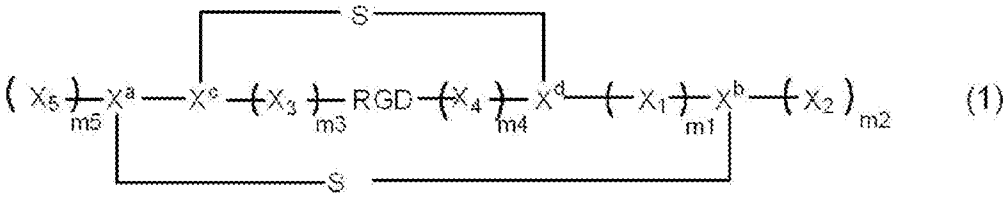
[0168] ２０１９年６月１１日に出願された日本国特許出願２０１９－１０８９５３の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（１）で表されるアミノ酸配列を有する、環状ペプチド。

[化1]



式（１）中、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して架橋されたアミノ酸残基を表し、

X_1～X_5は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、

Ｒはアルギニン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、Ｄはアスパラギン酸残基を表し、

ｍ１～ｍ５は、それぞれ独立に、０以上の整数を表す。ただし、Ｘａ、Ｘｂ、Ｘｃ及びＸｄ並びに、X_1、X_3及びX_4で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１６である。

[請求項2] 前記式（１）におけるX_2及びX_5が、側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を含む、請求項１に記載の環状ペプチド。

[請求項3] 前記固定化官能基が、アミノ基、又は、チオール基である、請求項２に記載の環状ペプチド。

[請求項4] 前記側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸が、Ｌ－リシン、Ｄ－リシン、Ｌ－システイン、Ｄ－システイン、Ｌ－ホモシステインおよびＤ－ホモシステインからなる群から選択される少なくとも１種のアミノ酸である、請求項２又は請求項３に記載の環状ペプチド。

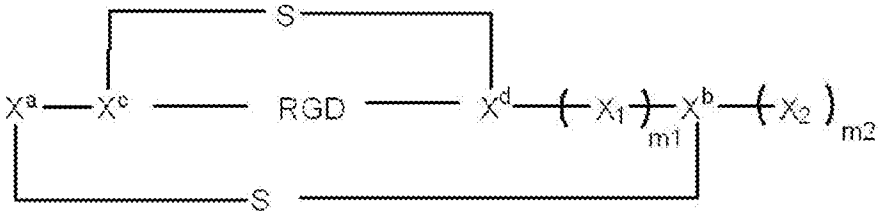
[請求項5] 前記式（１）におけるX^c及びX^dのいずれか一方が、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ

）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、及び、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、請求項１～請求項４のいずれか１項に記載の環状ペプチド。

[請求項6] 前記式（１）におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、請求項１～請求項５のいずれか１項に記載の環状ペプチド。

[請求項7] 前記式（１）で表されるアミノ酸配列が、下記式（２）で表されるアミノ酸配列である、請求項１～請求項６のいずれか１項に記載の環状ペプチド。

[化2]



(2)

式（２）中、X^a及びX^b並びにX^c及びX^dは、それぞれ独立に、チオエーテル結合を介して架橋されたアミノ酸残基を表し、

X_1及びX_2は、それぞれ独立に、アミノ酸残基を表し、

Ｒはアルギニン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、Ｄはアスパラギン酸残基を表し、ｍ１及びｍ２は、それぞれ独立に、１以上の整数を表す。ただし、X^a、X^b、X^c及びX^d並びに、X_1で表されるアミノ酸残基とＲＧＤとの合計アミノ酸残基数は、７～１４である。

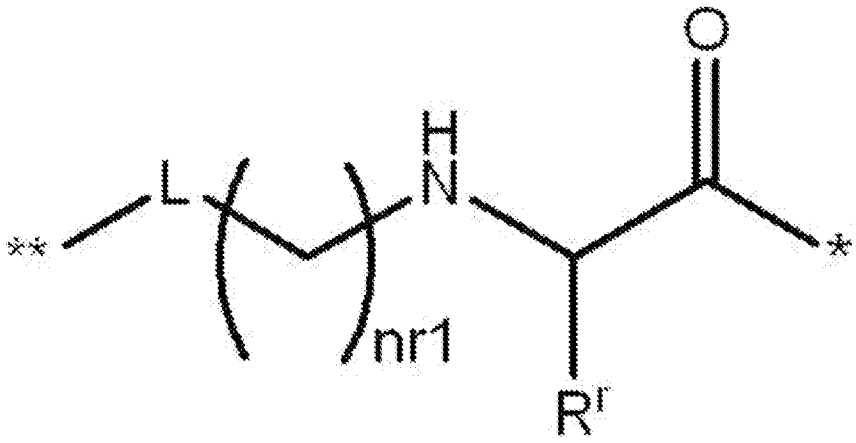
[請求項8] 前記式（２）におけるX^c及びX^dのいずれか一方が、（２Ｓ）－

２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、及び、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシンからなる群から選択される側鎖にアセチル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、請求項７に記載の環状ペプチド。

[請求項9] 前記式（２）におけるX^bが、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基である、請求項７又は請求項８に記載の環状ペプチド。

[請求項10] 前記式（２）におけるX^aが、下記構造（ｒ）で表されるアミノ酸残基である、請求項７～請求項９のいずれか１項に記載の環状ペプチド。

[化3]



(r)

構造式（ｒ）中、Ｒ^{r}は水素原子又は１価の有機基を表し、Ｌは、－（ＣＨ$_{2}$）$_{Ｌ１}$－Ｃ（＝Ｏ）－、又は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{Ｌ１}$－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で表される２価の連結基を表し、Ｌ１は０以上１０以下の整数を表し、ｎｒ１は、０以上の整数を表し、＊は隣接するアミノ酸残基との結合部位を表し、＊＊はチオエーテル結合における硫黄原子との結合部位を表す。

[請求項11] 前記式（２）におけるＸ^{b}が、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、又は、Ｄ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{a}が、（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－アセチル）アミノ］プロパン酸、（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－アセチル）アミノ］ブタン酸、Ｎ－δ－アセチル－Ｌ－オルニチン、Ｎ－δ－アセチル－Ｄ－オルニチン、Ｎ－ε－アセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－アセチル－Ｄ－リシン、及び、（２Ｓ，３Ｓ）－２－［（アセチル）アミノ］－３－メチル－ペンタン酸からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基である、請求項７～請求項１０のいずれか１項に記載の環状ペプチド。

[請求項12] Ｘ^{a}はα炭素にアセチル基が結合した任意のアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{b}はホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{c}はホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{d}はＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基又はＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基であり、（Ｘ$_{1}$）$_{ｍ１}$は、全体でＦであるか、又は

Ｘ^{a}はα炭素にアセチル基が結合した任意のアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{b}はホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{c}はＮ－δ－アセチル－オルニチンに由来するアミノ酸残基又はＮ－ε－アセチル－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘ^{d}

はホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、（X_1）$_{m1}$は、全体でＦである、請求項１～１１のいずれか１項に記載の環状ペプチド。

[請求項13] 請求項１～請求項１２のいずれか１項に記載の環状ペプチドと、
基材と、
を含む、細胞足場材。

[請求項14] 請求項１～請求項１２のいずれか１項に記載の環状ペプチドと、
保持材と、
を含む、細胞分離材。

[請求項15] 請求項１～請求項１２のいずれか１項に記載の環状ペプチドと、
培養成分と、
を含む、培地。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/022559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl. C07K7/06(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i
FI: C07K7/06 ZNA, C12M3/00 A, C12N5/02, C07K7/08
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)
Int. Cl. C07K7/06, C07K7/08, C12M3/00, C12N5/02

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 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-507376 A (AMERSHAM HEALTH AS) 17 March 2005, claims, paragraph [0016]	1-15
Y	JP 10-503205 A (MALLINCKRODT MEDICAL INC.) 24 March 1998, page 7, paragraph [0003], page 24, paragraph [0003]	1-15
Y	JP 2007-505145 A (KING S COLLEGE LONDON) 08 March 2007, paragraph [0131]	1-15
Y	BARKER, P. L. et al., Cyclic RGD peptide analogues as antiplatelet antithrombotics, J. Med. Chem. (1992) vol. 35, pp. 2040-2048, ISSN:0022-2623, page 2040, abstract, page 2041, scheme 1	1-15

☒ 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
20.07.2020	28.07.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/022559

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2017-95443 A (FUJIFILM CORP.) 01 June 2017, claims, examples	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/022559

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2005-507376 A	17.03.2005	US 2005/0070466 A1 claims, paragraph [0016] EP 1404371 A1 WO 2003/006491 A2	
JP 10-503205 A	24.03.1998	US 6664367 B1 column 1, paragraph [0003], page 14, paragraph [0002] EP 776334 A1 EP 1132394 A1	
JP 2007-505145 A	08.03.2007	US 2005/0164920 A1 paragraph [0160] EP 1663276 A1 WO 2005/025514 A2	
JP 2017-95443 A	01.06.2017	US 2018/0230184 A1 claims, examples EP 3366693 A1 WO 2017/069269 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/022559

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 7/06(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/02(2006.01)i
FI: C07K7/06 ZNA; C12M3/00 A; C12N5/02; C07K7/08

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））

C07K7/06; C07K7/08; C12M3/00; C12N5/02

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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
Y	JP 2005-507376 A (アメルシャム ヘルス アクスイェ セルスカプ) 17.03.2005 (2005-03-17) 特許請求の範囲、［００１６］	1-15
Y	JP 10-503205 A (マリンクロッド・メディカル・インコーポレイテッド) 24.03.1998 (1998-03-24) 第７頁第３段落、第２４頁第３段落	1-15
Y	JP 2007-505145 A (キングズ カレッジ ロンドン) 08.03.2007 (2007-03-08) ［０１３１］	1-15
Y	BARKER P.L., et al., Cyclic RGD peptide analogues as antiplatelet antithrombotics, J. Med. Chem. (1992) Vol.35, pp.2040-2048, ISSN:0022-2623 第２０４０頁要約、第２０４１頁スキームＩ	1-15
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、実施例	1-15

☐ 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
20.07.2020	28.07.2020

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）
藤澤　雅樹 4B 5802
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/022559

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/JP2020/022559

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2005-507376 A	17.03.2005	US 2005/0070466 A1 特許請求の範囲、［００１６］ EP 1404371 A1 WO 2003/006491 A2	
JP 10-503205 A	24.03.1998	US 6664367 B1 第１欄第３段落、第１４頁第２段落 EP 776334 A1 EP 1132394 A1	
JP 2007-505145 A	08.03.2007	US 2005/0164920 A1 ［０１６０］ EP 1663276 A1 WO 2005/025514 A2	
JP 2017-95443 A	01.06.2017	US 2018/0230184 A1 特許請求の範囲、実施例 EP 3366693 A1 WO 2017/069269 A1	