(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
2023年4月6日(06.04.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/054712 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/08 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 7/54* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/036850

(22) 国際出願日： 2022年9月30日(30.09.2022)

(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 2021-161353 2021年9月30日(30.09.2021) JP

(71) 出願人: ペプチドリーム株式会社 (PEPTIDREAM INC.) [JP/JP]; 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３丁目２５番２３号 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 鈴木 芳典 (SUZUKI, Yoshinori); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３丁目２５番２３号 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP). 杵渕 政彦 (KINEBUCHI, Masahiko); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３丁目２５番２３号 ペプチドリーム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 山本 修, 外 (YAMAMOTO, Osamu et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目２番１号 新大手町ビル２０６区 ユアサハラ法律特許事務所 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, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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)）

WO 2023/054712 A1

(54) **Title:** PEPTIDE

(54) 発明の名称： ペプチド

(57) **Abstract:** The present invention pertains to a peptide and a composition containing the peptide. The peptide according to the present invention has an amino acid sequence F-Nal1-V-V-N-V-Y-D-D-PeG-V-Nal1-Y-H-V-C-G (SEQ ID NO. 2) or has an amino acid sequence resulting from substitution, addition, deletion, or insertion at 1-11 amino acid residues selected from the group consisting of amino acid residues at positions 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, and 17 in said amino acid sequence.

(57) 要約：本発明は、ペプチド及び当該ペプチドを含む組成物に関する。本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：Ｆ－Ｎａｌ１－Ｖ－Ｖ－Ｎ－Ｖ－Ｙ－Ｄ－Ｄ－ＰｅＧ－Ｖ－Ｎａｌ１－Ｙ－Ｈ－Ｖ－Ｃ－Ｇ（配列番号２）；あるいは、上記のアミノ酸配列の２番目、４番目、７番目、８番目、９番目、１０番目、１２番目、１３番目、１４番目、１５番目及び１７番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、１－１１個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む。

明　細　書

発明の名称 ： ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチド、当該ペプチドを含む組成物、及び当該ペプチドの利用に関する。

背景技術

[0002] ＴＧＦ－β（形質転換増殖因子：ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ　β）は、ＴＧＦ－βファミリーに属するサイトカインで、多くの機能を有する。ＴＧＦ－βファミリーにはＴＧＦ－βの３つのアイソフォーム（ＴＧＦ－β１、β２及びβ３）やその他の多くのシグナル伝達タンパク質が含まれる。ＴＧＦ－βは、細胞の増殖や分化の制御、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質の産生及び沈着促進に影響するなど、多くの機能を有することが知られている。ＴＧＦ－βを介したシグナル伝達経路は、例えばがん細胞の増殖、転移や血管新生、免疫応答制御などと関係することが知られている（特表２０２１－１００９７２）。そのため、ＴＧＦ－βの機能に作用する物質、特にＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害する又は弱めるような化合物、例えばＴＧＦ－βアンタゴニストの医薬品への適用について研究開発が求められている。また、ＴＧＦ－βシグナル経路は細胞の増殖・生存・分化に大きな影響を有することから、培地への添加剤としても検討されている。

[0003] ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する物質としては、例えば抗体（ＷＯ０１／０６６１４０、ＷＯ２０１２／０３０３９４）や低分子（ＷＯ２０１５／１０３３５５）等が知られており、それらを用いた腎機能不全、心筋梗塞の治療薬などが研究されている。また近年ＴＧＦ－βのもつ腫瘍免疫抑制作用に注目し免疫チェックポイント阻害剤とＴＧＦ－β中和抗体との併用も研究されている。

[0004] しかしながら、ＴＧＦ－β結合活性、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有

するペプチドについては、報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２０２１－１００９７２

特許文献2：ＷＯ０１／０６６１４０

特許文献3：ＷＯ２０１２／０３０３９４

特許文献4：ＷＯ２０１５／１０３３５５

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｍａｓｓａｇｕｅ，　Ｎａｔ．　Ｒｅｖ．　Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．，２０１２；１３（１０）．

非特許文献2：Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｅｒｓｐｅｃｔ　Ｂｉｏｌ．２０１７；９（４）．

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007]　本発明者らは、ＴＧＦ－β結合活性、好ましくは、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有するペプチドを創出することを目的として鋭意研究に努めた結果、本発明を想到した。本発明は、ペプチド、当該ペプチドを含む組成物、及び当該ペプチドの利用を提供する。

課題を解決するための手段

[0008]　非限定的に、本出願は以下の発明を含む。

［１］

以下のアミノ酸配列：

Ｆ－Ｎａｌ１－Ｖ－Ｖ－Ｎ－Ｖ－Ｙ－Ｄ－Ｄ－ＰｅＧ－Ｖ－Ｎａｌ１－Ｙ－Ｈ－Ｖ－Ｃ－Ｇ（配列番号２）；

あるいは、

上記のアミノ酸配列の２番目、４番目、７番目、８番目、９番目、１０番目、１２番目、１３番目、１４番目、１５番目及び１７番目のアミノ酸残基

からなるグループから選択される、１－１１個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列
を含む、ペプチド。

［２］

以下のアミノ酸配列：

Ｆ－Ｘ１－Ｖ－Ｘ２－Ｎ－Ｖ－Ｘ３－Ｘ４－Ｘ５－Ｘ６－Ｖ－Ｘ７－Ｘ８－Ｘ９－Ｘ１０－Ｃ（配列番号１）

ここにおいて、

Ｘ１は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ２は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ３は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ４は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ５は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ６は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸であり；

Ｘ７は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ８は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ９は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ１０は、任意のアミノ酸である、
を含む、ペプチド。

［３］

Ｘ１が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である、［２］に記載のペプチド。

［４］

Ｘ１が、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、Ｗ７Ｎ又はＷである、［２］に記載のペプチド。

［５］

Ｘ２が、Ｖ、Ｋ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ又はＱ

である、［２］－［４］のいずれか１項に記載のペプチド。

［６］

Ｘ２が、Ｖ、Ｋ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、又はＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅである、［２］－［４］のいずれか１項に記載のペプチド。

［７］

Ｘ３が、Ｙ、４Ｐｙ、Ａ、Ｅ、Ｆ４Ｇ、Ｑ，Ｋ、Ｆ３Ｇ、又は３Ｐｙである、［２］－［６］のいずれか１項に記載のペプチド。

［８］

Ｘ３が、Ｙ又は４Ｐｙである、［２］－［６］のいずれか１項に記載のペプチド。

［９］

Ｘ４が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、［２］－［８］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１０］

Ｘ４が、Ｄ、Ａ、Ｑ、Ｋ又はＥである、［２］－［８］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１１］

Ｘ５が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、［２］－［１０］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１２］

Ｘ５が、Ｄ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、Ａ、Ｑ、又はＫである、［２］－［１０］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１３］

Ｘ６が、ＰｅＧ、Ｋ又はＭｅＧである、［２］－［１２］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１４］

Ｘ７が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である、［２］－［１３］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１５］

Ｘ７が、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、又はＷである、［２］－［１３］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１６］

Ｘ８が、Ｙ、４Ｐｙ、３Ｐｙ又はＥである、［２］－［１５］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１７］

Ｘ８が、Ｙ又は４Ｐｙである、［２］－［１５］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１８］

Ｘ９が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、［２］－［１７］のいずれか１項に記載のペプチド。

［１９］

Ｘ９が、Ｈ、Ａ、Ｑ又はＥである、［２］－［１７］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２０］

Ｘ１０が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、［２］－［１９］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２１］

Ｘ１０が、Ｖ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、Ｑ、Ｋ，又はＡである、［２］－［１９］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２２］

配列番号２－３３、あるいは、

配列番号２、４－１３、１５－３３のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列

のいずれかに１つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、［１］－［２１］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２３］

前記ペプチドが、環状ペプチドである、［１］－［２２］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２４］

クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する、［２３］に記載の環状ペプチド。

［２５］

さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、［１］－［２４］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２６］

そのＣ末端にリンカーを含む、［１］－［２１］、［２３］－［２５］のいずれか１項に記載のペプチド。

［２７］

ＴＧＦ－β結合活性を有する、［１］－［２６］いずれか１項に記載のペプチド。

［２８］

ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する、［１］－［２７］いずれか１項に記載のペプチド。

［２９］

［１］－［２８］のいずれか１項に記載のペプチドを含む、医療用、診断用組成物。

［３０］

［１］－［２８］のいずれか１項に記載のペプチドを含む、研究用組成物であって、ただし、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く、前記研究用組成物。

発明の効果

[0009] 本発明のペプチドは、ＴＧＦ－β結合活性、そして、好ましくは、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する。がんや肝疾患等の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等として有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２に対する、ＴＧＦｂ１＿０１２（配列番号１３）のＳＢＥレポーターアッセイによる阻害活性測定の結果を示す。図１中、黒丸はＴＧＦ－β１を示し、黒四角はＴＧＦ－β２を示す。横軸はＴＧＦ－β１＿０１２（配列番号１３）の濃度（ｎＭ）を、縦軸は阻害活性を示す。

発明を実施するための形態

[0011] １．略語

本明細書において、特に明記しない限り、以下の略語は下記の意味で使用される。

[0012] 略語（一般）

Å：オングストローム（単位）；

ＣｌＡｃ：クロロアセチル；

ＤＣＭ：ジクロロメタン；

ＤＭＳＯ：ジメチルスルホキシド；

ＤＭＦ：ジメチルホルムアミド；

ＤＩＥＡ又はＤＩＰＥＡ：Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン；

ＤＩＰＣＩ：Ｎ，Ｎ‘－ジイソプロピルカルボジイミド；

ＤＯＤＴ：６－ジオキサ－１，８－オクタン－ジチオール；

Ｆｍｏｃ：９－フルオレニルメチルオキシカルボニル；

ＮＨＳ：Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド；

ｇ：グラム（単位）；

ＨＡＴＵ：Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩；

ＨＯＳｕ：Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド；

ＨＰＬＣ：高速液体クロマトグラフィー；

ＬＣ－ＭＳもしくはＬＣ／ＭＳ：液体クロマトグラフィー質量分析計；

ｍＬ：ミリリットル（単位）；

Ｍ：モーラー（単位）；

μＬ：マイクロリットル（単位）；

ｍＭ：ミリモーラー（単位）；

μＭ：マイクロモーラー（単位）；

ｍｇ：ミリグラム（単位）；

ＭｅＣＮ：アセトニトリル；

ｍｍ：ミリメートル（単位）；

μｍ：マイクロメートル（単位）

ｎＭ：ナノモーラー（単位）；

ＯＳｕ：スクシンイミド；

ＰＥＧ：ポリエチレングリコール；

ｒｐｍ：回転毎分（単位）；

ｔＢｕ：ターシャリーブチル；

Ｍｐｅ：メチルペンタン－３－イル；

Ｂｏｃ：ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル；

ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸；

ＴＩＳ：トリイソプロピルシラン；

Ｔｒｔ又はＴｒ：トリチル基；

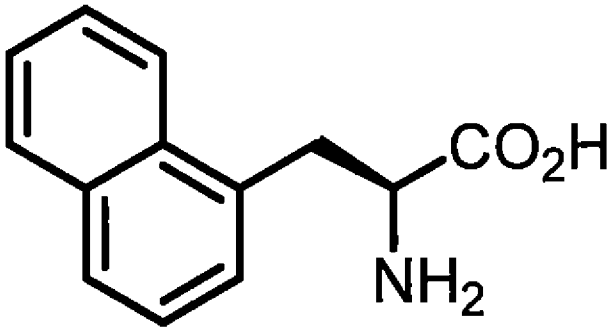
ＴＩＰＳ：トリイソプロピルシリル基。

[0013] 略語（非天然アミノ酸）

Ｎａｌ１：１－ナフチルーＬ－アラニン（ＣＡＳ　Ｎｏ．５５５１６－５４－６）；

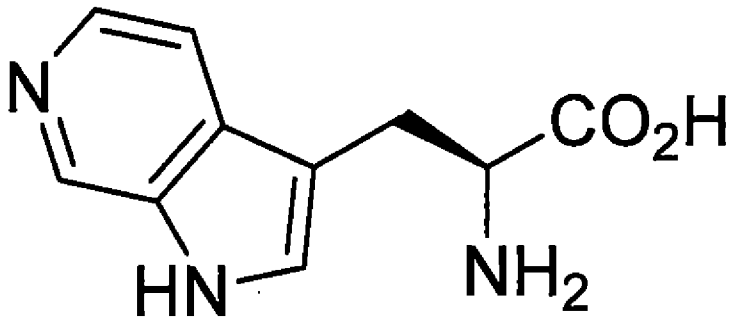
[0014]

[化1]



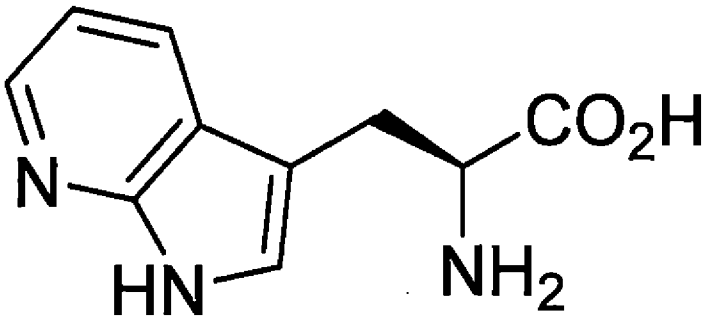
[0015] Ｗ６Ｎ：６－アザ－Ｌ－トリプトファン（ＣＡＳ Ｎｏ．１４９７０４－６３－２）；

[0016] [化2]



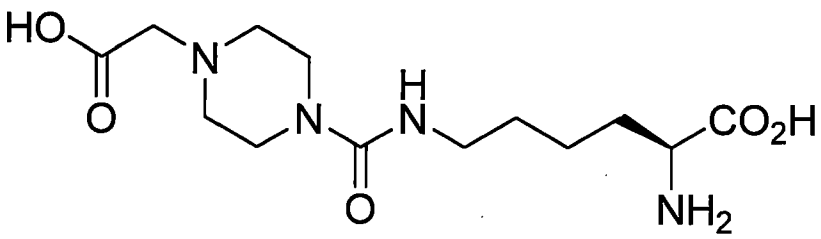
[0017] Ｗ７Ｎ：Ｌ－７－アザトリプトファン（ＣＡＳ Ｎｏ． ４９７５８－３５－２）；

[0018] [化3]



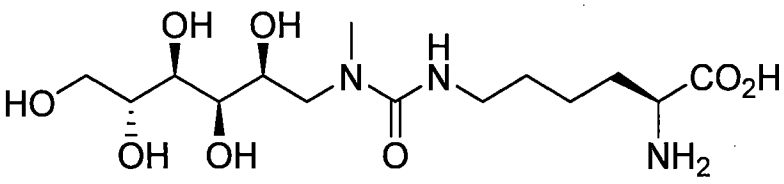
[0019] ＫＣＯｐｉｐｚａａ：Ｎ６－（４－（カルボキシメチル）ピペラジン－１－カルボニル）－Ｌ－リシン（ＣＡＳ Ｎｏ．Ｎ／Ａ）；

[0020] [化4]



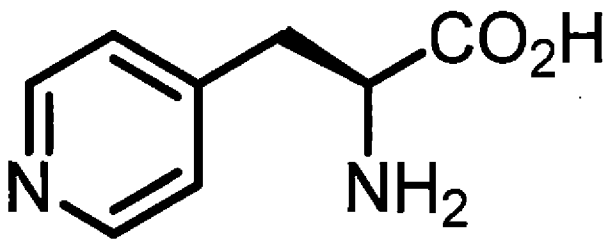
[0021] ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ：Ｎ６－（メチル（（２Ｓ，３Ｒ，４Ｒ，５Ｒ）－２，３，４，５，６－ペンタヒドロキシヘキシル）カルバモイル）－Ｌ－リシン；

[0022] [化5]



[0023] ４Ｐｙ：４－ピリジル－Ｌ－アラニン（ＣＡＳ Ｎｏ． ３７５３５－４９－２）；

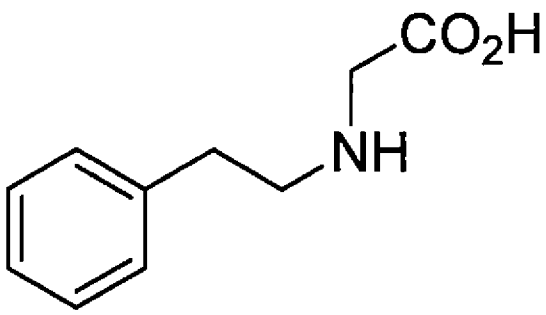
[0024] [化6]



[0025] ＰｅＧ：フェネチルグリシン（ＣＡＳ Ｎｏ．７７３８－３８－７）；

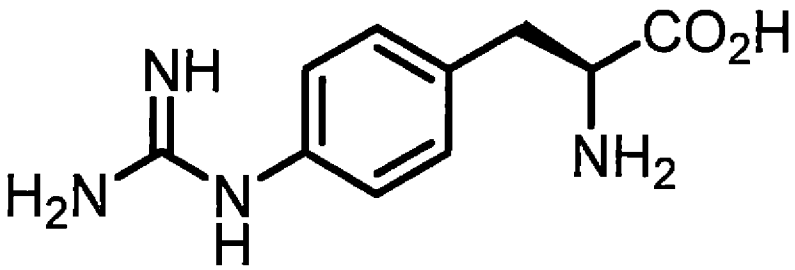
[0026]

[化7]



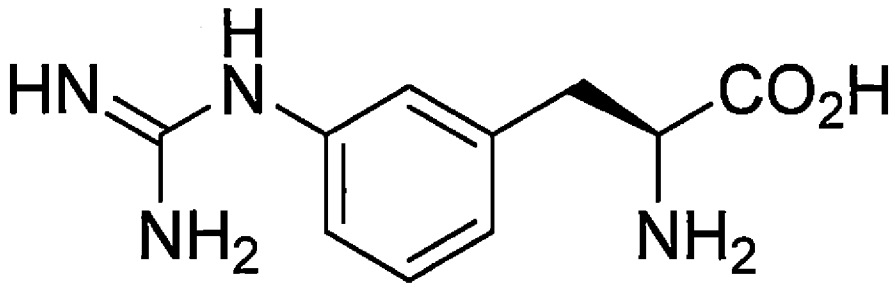
[0027] ＦＡＧ：ｐ－グアニジノ－Ｌ－フェニルアラニン（ＣＡＳ　Ｎｏ．５９５７４－１１－７）；

[0028] [化8]



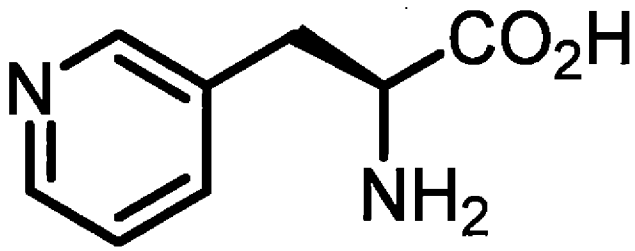
[0029] ＦＡＧ：３－［（アミノイミノメチル）アミノ］－Ｌ－フェニルアラニン（ＣＡＳ　Ｎｏ．１０１９０５７－４２－１）；

[0030] [化9]



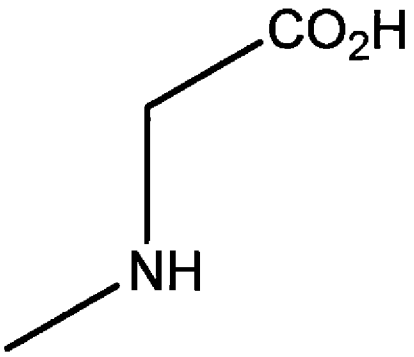
[0031] ＦＰｙ：３－（３－ピリジル）－Ｌ－アラニン（ＣＡＳ　Ｎｏ．　６４０９０－９８－８）；

[0032] [化10]



[0033] ＭｅＧ：メチルグリシン（ＣＡＳ　Ｎｏ．１０７－９７－１）；

[0034] [化11]



[0035] ＰＥＧ１０ｃ：１－アミノ－３、６、９、１２、１５、１８、２１、２４、２７、３０－デカオキサトリトリアコンタン－３３－オイック酸；

ＭｅＰＥＧ８ｃ：２，５，８，１１，１４，１７，２０，２３－オクタオキサヘキサコサン－２６－オイック酸；

ＯＣＯｍＰＥＧ１００００：メトキシポリエチレングリコールカーボネート（平均分子量１０，０００）。

[0036] ２．ペプチド（Ａ）

本発明は、ペプチドに関する。

[0037] 一態様において、本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

Ｆ－Ｎａｌ１－Ｖ－Ｖ－Ｎ－Ｖ－Ｙ－Ｄ－Ｄ－ＰｅＧ－Ｖ－Ｎａｌ１－Ｙ－Ｈ－Ｖ－Ｃ－Ｇ（配列番号２）；

あるいは、

上記のアミノ酸配列の２番目、４番目、７番目、８番目、９番目、１０番目、１２番目、１３番目、１４番目、１５番目及び１７番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、１－１１個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列

を含む、ペプチド。

[0038] 配列番号２は、本願明細書の実施例において、ＴＧＦ－β結合活性、及び、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有することが確認されたペプチドである。

[0039] 配列番号２のアミノ酸配列の２番目、４番目、７番目、８番目、９番目、１０番目、１２番目、１３番目、１４番目、１５番目及び１７番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、１－１１個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有していてもよい。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸の数は、１個以上１０個以下であればよく、その下限は１個である。その上限は１０個、９個、８個、７個、６個、５個、４個、３個、２個であり、最小１個である。好ましくは、アミノ酸の「置換」である。かかるアミノ酸の置換は、好適には保存的アミノ酸置換である。

[0040] 「保存的アミノ酸置換（ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｖｅ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）」とは、機能的に等価又は類似のアミノ酸との置換を意味する。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つ又は二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造及び機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の（チオール）フォームと比較してより極性の低い、酸化

型の（ジスルフィド）フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的及び機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖（トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）はイオン?芳香族相互作用又は陽イオン?ｐｉ相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性又は非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的及び機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン（ジスルフィド・フォーム）等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

[0041] 保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換（例えば、レーニンジャ、生化学、改訂第２版、１９７５年刊行、７３乃至７５頁：Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ、ｐｐ７３?７５、Ｗｏｒｔｈ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９７５）に記載の置換）及び典型的置換を含む。

[0042] また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のように天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けたグループにおいて、あるアミノ酸が属するグループと同じグループに属するアミノ酸への置換が好ましい。

[0043] 疎水性（非極性とも言う）アミノ酸：疎水性（非極性）を示すアミノ酸であって、アラニン（「Ａｌａ」又は単に「Ａ」とも記す）、グリシン（「Ｇｌｙ」又は単に「Ｇ」とも記す）、バリン（「Ｖａｌ」又は単に「Ｖ」とも記す）、ロイシン（「Ｌｅｕ」又は単に「Ｌ」とも記す）、イソロイシン（「Ｉｌｅ」又は単に「Ｉ」とも記す）、プロリン（「Ｐｒｏ」又は単に「Ｐ」とも記す）、フェニルアラニン（「Ｐｈｅ」又は単に「Ｆ」とも記す）、トリプトファン（Ｔｒｐ」又は単に「Ｗ」とも記す）、チロシン（「Ｔｙｒ」又は単に「Ｙ」とも記す）、メチオニン（「Ｍｅｔ」又は単に「Ｍ」とも記す）を含む。

[0044] なお、疎水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

[0045] 脂肪族アミノ酸：側鎖に脂肪酸又は水素を有するアミノ酸であって、Ａｌ

ａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕを含む。

[0046] 脂肪族・分岐鎖アミノ酸：側鎖に分岐型脂肪酸を有するアミノ酸であって、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕを含む。

[0047] 芳香族アミノ酸：側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅを含む。

[0048] 親水性（極性とも言う）アミノ酸：親水性（極性）を示すアミノ酸であって、セリン（「Ｓｅｒ」又は単に「Ｓ」とも記す）、スレオニン（「Ｔｈｒ」又は単に「Ｔ」とも記す）、システイン（「Ｃｙｓ」又は単に「Ｃ」とも記す）、アスパラギン（「Ａｓｎ」又は単に「Ｎ」とも記す）、グルタミン（「Ｇｌｎ」又は単に「Ｑ」とも記す）、アスパラギン酸（「Ａｓｐ」又は単に「Ｄ」とも記す）、グルタミン酸（「Ｇｌｕ」又は単に「Ｅ」とも記す）、リジン（リシンとも記する。「Ｌｙｓ」又は単に「Ｋ」とも記す）、アルギニン（「Ａｒｇ」又は単に「Ｒ」とも記す）、ヒスチジン（「Ｈｉｓ」又は単に「Ｈ」とも記す）を含む。

[0049] なお、親水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

[0050] 酸性アミノ酸：側鎖が酸性を示すアミノ酸であって、Ａｓｐ、Ｇｌｕを含む、

塩基性アミノ酸：側鎖が塩基性を示すアミノ酸であって、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓを含む。

[0051] 中性アミノ酸：側鎖が中性を示すアミノ酸であって、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓを含む。

[0052] また、Ｇｌｙ及びＰｒｏについては、「主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸」に分けることもでき、側鎖に硫黄分子を含むアミノ酸、Ｃｙｓ及びＭｅｔは、「含硫アミノ酸」に分けることもできる。

[0053] また、側鎖に芳香族を有するグループとして、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅが含まれる。

[0054] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のア

ミノ酸がＮ－アルキル化されたＮ－アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級（例えば、Ｃ１－Ｃ５の、好ましくは、Ｃ１－Ｃ３、より好ましくはＣ１）のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。Ｎ－アルキルアミノ酸においては、好ましくはＮ－エチルアミノ酸、Ｎ－ブチルアミノ酸又はＮ－メチルアミノ酸であり、さらに好ましくはＮ－メチルアミノ酸である。また、非天然のアミノ酸には、Ｄ型アミノ酸（Ｄ－アミノ酸とも記する）、β－アミノ酸、γ－アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸（例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基やアルキル基のＣ数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換された構造を有するアミノ酸誘導体等複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

[0055] なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加又は置換等されることで、天然のアミノ酸とは異なる性質を付与することができる。すなわち、天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けた、前述のグループに、同様の側鎖の性質を有する非天然アミノ酸を含めることが出来る。このように、あるアミノ酸と同様の側鎖の性質を示す非天然アミノ酸についても、保存的アミノ酸置換の対象として含むことができる。

[0056] 非限定的に、非天然のアミノ酸には、Ｎ－メチルアミノ酸、４Ｐｙ、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、Ｗ７Ｎ，ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、ＰｅＧ等を含む。

例えば、Ｎａｌ１、ＰｅＧは疎水性アミノ酸に、４Ｐｙ、Ｗ７Ｎ、Ｗ６Ｎは親水性アミノ酸に分けることができ、さらに、４Ｐｙ、Ｗ７Ｎ、Ｗ６Ｎは塩基性アミノ酸、４Ｐｙ、Ｎａｌ１、ＰｅＧ、Ｗ６Ｎ、Ｗ７Ｎは芳香族アミノ

酸に分けることもできる。なお、Ｎ－メチルアミノ酸については、Ｎ－アルキルアミノ酸として分類することもでき、Ｎ－メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0057] Ｄ－アミノ酸は、Ｄ－アミノ酸として分類することもできるが、その側鎖の性質に従い分類することもでき、Ｎ－メチルアミノ酸については、Ｎ－アルキルアミノ酸として分類することもでき、Ｎ－メチル化されていない元のアミノ酸の側鎖の性質に従い分類することもできる。

[0058] 前記ペプチドは、非限定的に、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」については、「３．ペプチド（Ｂ）」で詳述する。本明細書において、「非限定的に」、「一態様において」は、同義に用いられ得る。

[0059] 前記ペプチドは、一態様において、配列番号２に加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。「付加的なアミノ酸残基」については、「３．ペプチド（Ｂ）」で詳述する。

[0060] 前記ペプチドは、一態様において、リンカーを好ましくはＣ末端に含んでもよい。「リンカー」については、「３．ペプチド（Ｂ）」で詳述する。配列番号２のＣ末端（１７番目のアミノ酸残基）の「Ｇ」は、リンカーである。一態様において、前記ペプチドは、Ｇ以外のリンカー、例えばＰＥＧリンカーを有しても良い。あるいは、Ｃ末端のＧに加えて、さらに別のリンカーを有しても良い。例えば、グリシン－リッチペプチド等の態様も含まれる。

[0061] 前記ペプチドは、好ましくは、ＴＧＦ－β結合活性、さらに好ましくは、ＴＧＦ－β１結合活性を有する。前記ペプチドは、好ましくは、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する。「ＴＧＦ－β１結合活性を有する」、「ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する」については、「３．ペプチド（Ｂ）」で詳述する。

[0062] 本明細書における「ペプチド」は、特に言及しない限り、ペプチド（Ａ）及びペプチド（Ｂ）の双方を含む。

[0063] ３．ペプチド（Ｂ）

本発明はペプチドに関する。

[0064] 本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

Ｆ－Ｘ１－Ｖ－Ｘ２－Ｎ－Ｖ－Ｘ３－Ｘ４－Ｘ５－Ｘ６－Ｖ－Ｘ７－Ｘ８－Ｘ９－Ｘ１０－Ｃ（配列番号１）

ここにおいて、

Ｘ１は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ２は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ３は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ４は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ５は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ６は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸であり；

Ｘ７は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ８は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ９は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ１０は、任意のアミノ酸である、

を含む。

[0065] 「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」とは、側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、例えば芳香環としてフェニル基やインドール環を有し、その一部のＣなどがＮなど他の分子への置換があってよい。芳香族環は複素環であってもよい。また、例えば、チロシンの側鎖の水酸基が他の官能基に置換されているようなアミノ酸であっていてもよい。「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、一態様において、好ましくは側鎖に縮合環を有するアミノ酸である。例えば、インドール環やナフタレン構造を有するアミノ酸であってよく、さらにその一部のＣなどがＮなど他の分子への置換があってよい。置換基は特に限定されず、アルキル基、シクロアルキル基、水酸基、ハロゲン等に任意に選択される。「側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等を含む。非天然型アミノ

酸、例えば、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、Ｗ７Ｎ又はWであってもよい。

[0066] 「側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸」とは、側鎖にアルキル基を有するアミノ酸、例えば、リシン、アラニン、プロリン、グリシン、ロイシン等であって、これらのアミノ酸の側鎖が、置換されていても、置換されていなくてもよいアミノ酸である。アルキル基は、鎖状でも環状でもよい。「置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸」とは、二級アミノ酸であって、環状又は鎖状構造を有する、任意の天然又は非天然のアミノ酸を含む。

[0067] 一態様において、「側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸」、「置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸」の側鎖が置換されている場合、置換基は特に限定されない。側鎖のアルキル基の末端に官能基を有しても良い。末端に結合する官能基としては、例えば、非限定的に、アミノ基や、ベンジル基などが挙げられる。

[0068] Ｘ１－Ｘ１０の上記選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。

[0069] 一態様において、Ｘ１が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である。一態様において、Ｘ１が、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、Ｗ７Ｎ又はWである。

[0070] 一態様において、Ｘ２が、Ｖ、Ｋ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ又はＱである。一態様において、Ｘ２が、Ｖ、Ｋ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、又はＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅである。一態様において、Ｘ２はＥではない。

[0071] 一態様において、Ｘ３が、Ｙ、４Ｐｙ、Ａ、Ｅ、Ｆ４Ｇ、Ｑ，Ｋ、Ｆ３Ｇ、又は３Ｐｙである。一態様において、Ｘ３が、Ｙ又は４Ｐｙである。

[0072] 一態様において、Ｘ４が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。「芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等である。「含硫アミノ酸」は、例えば、メチオニン、システイン等である。一態様において、Ｘ４が、Ｄ、Ａ、Ｑ、Ｋ又はＥである。一態様において、Ｘ４が、

Ｄである。

[0073] 一態様において、Ｘ５が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。一態様において、Ｘ５が、Ｄ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、Ａ、Ｑ、又はＫである。一態様において、Ｘ５が、Ｄ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ又はＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅである。

[0074] 一態様において、Ｘ６が、ＰｅＧ、Ｋ又はＭｅＧである。一態様において、Ｘ６が、Ｐｅｇである。一態様において、Ｘ６は、Ａ、Ｎ、Ｑ，Ｓ（Ｄ体）、Ｐ（Ｄ体）ではない。

[0075] 一態様において、Ｘ７が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である。一態様において、Ｘ７が、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、又はＷである。一態様において、Ｘ７が、Ｎａｌ１である。一態様において、Ｘ７は、Ａ、Ｑ、Ｋ、Ｅではない。

[0076] 一態様において、Ｘ８が、Ｙ、４Ｐｙ、３Ｐｙ又はＥである。一態様において、Ｘ８が、Ｙ又は４Ｐｙである。一態様において、Ｘ８は、Ａ、Ｑ、Ｋ、Ｆ３Ｇ、Ｆ４Ｇではない。

[0077] 一態様において、Ｘ９が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。「芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン等である。「含硫アミノ酸」は、例えば、メチオニン、システイン等である。一態様において、Ｘ９が、Ｈ、Ａ、Ｑ又はＥである。一態様において、Ｘ９が、Ｈである。

[0078] 一態様において、Ｘ１０が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である。芳香族環を有するアミノ酸」は、例えば、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン等である。「含硫アミノ酸」は、例えば、メチオニン、システイン等である。一態様において、Ｘ１０が、Ｖ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、Ｑ、Ｋ、又はＡである。一態様において、Ｘ１０が、Ｖ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ又はＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅである。

[0079] Ｘ１－Ｘ１０の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。

[0080] 前記ペプチドは、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」は、ペプチド中の２つのアミノ酸が結合し、その全部又は一部が環状になっているものをいう。当該２つのアミノ酸同士の結合型に特に限定されない。一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基との間のアミド結合、一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のチオール基との間のチオエステル結合、一方のアミノ酸のチオール基と他方のアミノ酸のチオール基との間のジスルフィド結合、ラクタム環形成又はマクロ環化反応により環状構造を形成したものや、ラッソペプチド状構造を有するもの等も環状ペプチドに包含される。ただし、当該２つのアミノ酸同士がアミド結合により結合している場合、当該アミド結合は一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基が結合することにより形成されたものに限られず、合成反応の結果としてアミド結合により結合しておればよい。他の結合型についても同様である。好ましくは、後述のクロロアセチル化アミノ酸とシステイン残基の結合による環状化である。

[0081] 前記環状ペプチドは、その一部が環状構造を形成するものであればよく、直鎖部を有していてもよい。

[0082] ペプチドは、一般的に生体内において代謝安定性が悪く、またサイズが大きいので細胞膜を透過しづらいという問題がある。そのような課題に対し、ペプチドを環状化させるという方法がとられてきた。ペプチドを環状化すると、プロテアーゼ耐性が向上し代謝安定性が向上し、またコンフォメーション変化にも制限が加わるため、剛直性が増して膜透過性や標的タンパク質との親和性が向上することが示唆されてきた。

[0083] 一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、Ｎ末端アミノ酸（１番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、Ｎ末端アミノ酸（１番目のアミノ酸

残基）と、前記ペプチドに含まれる１６番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したＮ末端アミノ酸（１番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる１６番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。「クロロアセチル化」は、他のハロゲンによる「ハロゲンアセチル化」でもよい。また、「アセチル化」は、アセチル基以外のアシル基による「アシル化」でもよい。

[0084] 本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も包含する。例えば、上述したように、Ｎ末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合がある、このような、クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。 一態様において、前記ペプチドは、

配列番号２－３３、あるいは、

配列番号２、４－１３、１５－３３のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列

のいずれかに１つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる。

[0085] 一態様において、前記ペプチドは、

配列番号２－３３、あるいは、

配列番号２、４－１３、１５－３３のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列

のいずれかに１つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、環状ペプチドである。

[0086] 一態様において、前記ペプチドは、配列番号３４－６９、あるいは、配列番号３４－６９のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列のいずれかに１つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる。

[0087] 一態様において、前記ペプチドは、配列番号３４－６９、あるいは、配列番号３４－６９のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列のい

ずれかに１つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、環状ペプチドである。

[0088] 前記ペプチドは、配列番号２－３３、あるいは、配列番号２、４－１３、１５－３３のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列、のいずれかに加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。前記ペプチドは、配列番号３４－６９、あるいは、配列番号３４－６９のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列のいずれかに１つのアミノ酸配列のいずれかに加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。

[0089] 付加的なアミノ酸残基は、環状構造を成すペプチドに含まれてもよいし、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されていてもよい。ペプチド、ペプチド部位のアミド結合の数（アミノ酸の数・長さ）は特に限定されない。総アミノ酸残基（環状構造を成すペプチドに含まれるアミノ酸残基数をいい、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されている場合は、それらのアミノ酸は含めない）が２２残基以内が好ましい。好ましくはアミノ酸が６以上、７以上、８以上、９以上、１０以上、１１以上、１２以上であり、好ましくはアミノ酸が２０以下、１９以下、１８以下である。更に好ましくはアミノ酸が１５以上１８以下であり、最も好ましくはアミノ酸が１６又は１７である。

[0090] また、環状ペプチドからさらにリンカーが付加されていてもよい。リンカーとしては、例えば、前述のアミノ酸リンカー（ペプチドリンカー）、化学リンカー、脂肪酸リンカー、核酸リンカー、糖鎖リンカーなどが挙げられ、また、例えば化学リンカーとペプチドリンカーなどの複合体であってもよい。化学リンカーとしては、例えば、ＰＥＧ（Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｇｌｙｃｏｌ）リンカーである。例えば、１～２４個のエチレングリコール単位からなるＰＥＧリンカーであってよい。また、リンカーは、脂肪酸から誘導される二価化学部分を含む脂肪酸リンカーでもよい。アミノ酸（ペプチド）リンカーは、少なくとも１個のアミノ酸を含むリンカーであり、例えば、米国特許第７，２７１，１４９号に記載のような、配列［Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇ

ｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ］ｎ（式中、ｎは１、２、３、４、５又は６である）を有するペプチドなどのグリシン－リッチペプチドや、米国特許第５，５２５，４９１号に記載のセリン－リッチペプチドリンカーを用いることができる。非限定的に、リンカーの付加によりペプチドの物性（例えば溶解度）が変化する場合がある。

[0091] リンカーの付加位置については、どこに付加されていても良い。例えば、Ｃ末端側に位置するＣｙｓに結合していてもよく、環状ペプチドに含まれるアミノ酸に結合していても良い。好ましくはＣ末端側に位置するＣｙｓに結合しているか、環状ペプチドに含まれるアミノ酸の側鎖に結合しているものである。一態様において、リンカーはＣ末端に含まれる。

[0092] リンカーの付加は単独でもよく、あるいは、リンカーは同種のもの又は異なるものを複数個付加されていてもよい。例えば、アミノ酸リンカーとしてＧｌｙ－Ｌｙｓが結合し、さらに当該Ｌｙｓの側鎖末端にＰＥＧリンカーが結合したかたちであってよい。

[0093] さらに、前記ペプチドは、リンカーなどを介して多量体を形成していてもよい。この場合において、前記ペプチドは、同じ配列を有するペプチドからなるホモマーであってもよく、別の配列を有するペプチドからなるヘテロマーであってもよい。

[0094] 配列番号２、４－１３、１５－３３のＣ末端のグリシン（Ｇ）は、リンカーである。配列番号２のペプチドについて上述したのと同様に、一態様において、前記ペプチドは、Ｇ以外のリンカーを有しても良い。あるいは、Ｃ末端のＧに加えて、さらに別のリンカーを有しても良い。

[0095] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、ＴＧＦ－β結合活性、さらに好ましくは、ＴＧＦ－β１結合活性又はＴＧＦ－β２結合活性を有する。

[0096] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、ＴＧＦ－β１結合活性及びＴＧＦ－β２結合活性を有する。

[0097] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、ＴＧＦ－βアンタゴニス

ト活性、さらに好ましくは、ＴＧＦ－β１アンタゴニスト活性又はＴＧＦ－β２アンタゴニスト活性を有する。さらに一態様において、好ましくは、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有するペプチドは、ＴＧＦ－β１結合活性を有する。なお、「ＴＧＦ－β１結合活性を有する」とは、ＴＧＦ－β１のみに対する結合活性に限られるものではなく、ＴＧＦ－β２に対して結合を有していてもよい。

[0098] 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、ＴＧＦ－β１アンタゴニスト活性及びＴＧＦ－β２アンタゴニスト活性を有する。また、好ましくは、ＴＧＦ－β１アンタゴニスト活性及びＴＧＦ－β２アンタゴニスト活性を有するペプチドは、ＴＧＦ－β１結合活性及びＴＧＦ－β２結合活性を有する。

[0099] ＴＧＦ－β（形質転換増殖因子：ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ β）は、ＴＧＦ－βファミリーに属するサイトカインで、哺乳動物で３種類のアイソフォーム（ＴＧＦ－β１，－β２，－β３）が存在する。さらに、構造的に類似したＴＧＦ－βスーパーファミリーには、アクチビンやＢＭＰ（骨形成誘導因子）などが含まれる。

[0100] 本発明の態様となる「ＴＧＦ－β」は、ＴＧＦ－β１及び／又はＴＧＦ－β２であり、好ましくはＴＧＦ－β１である。本明細書において、「ＴＧＦ－β」とは、特に明記しない場合は、ＴＧＦ－β１のことを指す。

[0101] ＴＧＦ－βは、Ｉ型とＩＩ型の受容体サブユニットから構成されるセリン／スレオニンキナーゼ型受容体に結合し、Ｓｍａｄのリン酸化を介してシグナルを伝達することで生体において様々な反応を引き起こす。例えば、細胞の増殖や分化の制御、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質の産生及び沈着促進に影響するなど、多くの機能を有することが知られている（Ｍａｓｓａｇｕｅ，２０１２； Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。

[0102] ＴＧＦ－βは、非限定的に、哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジー等の霊長類、ラット、マウス、及びウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒ

ツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物のＴＧＦ－β、好ましくはヒトのＴＧＦ－β、さらに好ましくはヒトＴＧＦ－β１（ＮＣＢＩ　ＧＥＮＥ　ＩＤ：　７０４０）、ヒトＴＧＦ－β２（ＮＣＢＩ　ＧＥＮＥ　ＩＤ：　７０４２）を含む。

[0103] 「ＴＧＦ－β１結合活性」とは、ＴＧＦ－β１に特異的に結合する活性、又はＴＧＦ－β１及びＴＧＦ－β２の両方に特異的に結合する活性、を意味する。

[0104] 非限定的に、ＴＧＦ－β１に対する本発明のペプチドの結合状態は、親和性定数Ｋａ、解離定数Ｋｄ（ＫＤとも記す）、結合速度定数ｋｏｎ、及び解離速度定数ｋｏｆｆなどを指標として表すことができる。

[0105] 親和性定数Ｋａ及び解離定数Ｋｄは、平衡状態にある２分子間の結合親和性、すなわち結合の強さを示す指標であり、解離定数Ｋｄは親和性定数Ｋａの逆数である。そして解離定数Ｋｄの値が小さいほど、結合が強いことを意味する。一方、平衡状態にある２分子間の結合・解離反応の速さは、反応速度論的解析によって求められる結合速度定数ｋｏｎ及び解離速度定数ｋｏｆｆによって示され、Ｋｄ＝ｋｏｆｆ／ｋｏｎである。従って同等の解離定数Ｋｄを示す場合でも、ゆっくり会合するがゆっくり解離する場合（ｋｏｎとｋｏｆｆの値が共に小さい）と、速やかに会合し速やかに解離する場合（ｋｏｎとｋｏｆｆの値が共に大きい）とがあり、それぞれの結合保持状態は全く異なる。

[0106] 前記ペプチドのＴＧＦ－βに対する結合状態を示すこれらの親和性定数Ｋａ、解離定数Ｋｄ（ＫＤとも記す）、結合速度定数ｋｏｎ、及び解離速度定数ｋｏｆｆなどは、当業者に周知の任意の分子間相互作用測定法を用いて決定することができる。

[0107] ＴＧＦ－βに対する前記ペプチドの結合状態は、公知の方法によって測定することができる。例えば、表面プラズモン共鳴スペクトル解析（ＳＰＲ）によって測定することができる。非限定的に、表面プラズモン共鳴スペクトル解析は、例えば、バイオセンサー（生体分子間相互解析装置）であるＢＩ

ＡＣＯＲＥシステム（ＢＩＡＣＯＲＥ社）を用いて行うことができる。

[0108] 前記ペプチドのＴＧＦ－β結合活性の指標の１つとしてＫｄ解離定数がある。解離定数Ｋｄが低いほど結合活性（親和性）が高い。表面プラズモン共鳴スペクトル解析によれば、前記ペプチドと例えばヒトＴＧＦ－βとの結合に関する解離定数Ｋｄは、非限定的に、５０ｎＭ以下、３０ｎＭ以下、２０ｎＭ以下、１５ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、８ｎＭ以下、６ｎＭ以下、５ｎＭ以下である。前記ペプチドとヒトＴＧＦ－βとの結合の解離定数Ｋｄの下限は特に限定されない。非限定的に、前記ペプチド解離定数Ｋｄは、０．０１ｎＭ以上、０．０５ｎＭ以上、０．１ｎＭ以上、０．２ｎＭ以上、０．３ｎＭ以上、０．４ｎＭ以上、０．５ｎＭ以上である。非限定的に、前記ペプチドの解離定数Ｋｄは、０．０１－５０ｎＭ、好ましくは０．０５－３０ｎＭ、さらに好ましくは０．２－１５ｎＭ、特に好ましくは０．３－１０ｎＭ、最も好ましくは０．４－６ｎＭである。

[0109] ＴＧＦ－βに対する前記ペプチドの結合は、例えば、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着法）によって調べることも可能である。ＥＬＩＳＡは、例えば、ＴＧＦ－β１ビーズとＣ末端にＨＡタグ配列を付加したペプチドを用い、結合活性を調べることによって、行ってもよい。

[0110] 非限定的に、前記ペプチドとＴＧＦ－βとの結合は、好ましくは非共有結合である。

[0111] 一態様において、前記ペプチドは実施例１－６の化学式に示した環状の構造を有する。

[0112] 「ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性」は、ＴＧＦ－βがＴＧＦβ受容体に結合し作用することを阻害又は減弱させる活性をいう。本発明においては、特に、ＴＧＦ－βに結合することでアンタゴニスト作用を及ぼすものが好ましい。

[0113] 「ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性」は、例えば、ＳＢＥレポーター－ＨＥＫ２９３細胞系（ＢＰ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いたＳＢＥレポーターアッセイによって、評価してもよい。非限定的に、ＴＧＦ－βで誘導される

シグナルの最大値を０％阻害、無刺激を１００％阻害としてペプチドの阻害活性を算出することができる。非限定的に、適切な濃度、例えば、最適濃度のペプチドを使用した場合、阻害活性が、５％以上、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上阻害される。

[0114] ４・ペプチドの製造

本発明のペプチドは、例えば以下のような、ペプチド製造のための任意の公知の方法によって、製造することができる。

[0115] 液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法；

遺伝子組み換え法、等

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

[0116] 次に、第一アミノ酸のα－アミノ基の保護基を脱離させるとともに、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第二のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第一及び第二のアミノ酸を結合させる。さらに、第二のアミノ酸のα－アミノ基を脱保護し、主鎖のカルボキシ基以外のすべての官能基が保護された第三のアミノ酸を加え、当該カルボキシ基を活性化させて、第二及び第三のアミノ酸を結合させる。これを繰り返して、目的とする長さのペプチドが合成されたら、すべての官能基を脱保護する。

[0117] 固相合成のレジンとしては、例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ ｒｅｓｉｎ、ＭＢＨＡ ｒｅｓｉｎ、Ｃｌ－Ｔｒｔ ｒｅｓｉｎ、ＳＡＳＲＩＮ ｒｅｓｉｎ、Ｗａｎｇ ｒｅｓｉｎ、Ｒｉｎｋ ａｍｉｄｅ ｒｅｓｉｎ、ＨＭ

ＦＳ　ｒｅｓｉｎ、Ａｍｉｎｏ－ＰＥＧＡ　ｒｅｓｉｎ（メルク社）、ＨＭＰＡ－ＰＥＧＡ　ｒｅｓｉｎ（メルク社）等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤（ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、２－プロパノール、塩化メチレン等）で洗浄してから用いることができる。

[0118] α－アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル（Ｃｂｚ又はＺ）基、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）基、フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル（Ａｌｌｏｃ）基等が挙げられる。Ｃｂｚ基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Ｂｏｃ基はトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）により脱保護でき、Ｆｍｏｃ基はピペリジン又はピロリジンによる処理で脱保護できる。

[0119] α－カルボキシ基の保護は、例えば、メチルエステル、エチルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル、ｔｅｒｔ－ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いることができる。

[0120] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣあるいはＷＳＣ）、（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスファート（ＢＯＰ）、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチル］－１Ｈ－ベンゾトリアゾリウム－３－オキシドヘキサフルオロホスファート（ＨＢＴＵ）等が挙げられる。

[0121] レジンからのペプチド鎖の切断は、ＴＦＡ、フッ化水素（ＨＦ）等の酸で処理することによって行うことができる。

[0122] 遺伝子組み換え法（翻訳合成系）によるペプチドの製造は、前記ペプチドをコードする核酸を用いて行うことができる。前記ペプチドをコードする核酸は、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよい。

[0123] 前記ペプチドをコードする核酸は、公知の方法又はそれに準ずる方法で調

製することができる。例えば、自動合成装置によって合成することができる。得られたＤＮＡをベクターに挿入するために制限酵素認識部位を加えてもよい。あるいは、できたペプチド鎖を酵素などで切り出すためのアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んでもよい。

[0124] 上述のとおり、前記ペプチドを膜透過性ペプチド等と融合させる場合、前記核酸は、膜透過性ペプチドをコードする核酸も含む。

[0125] 宿主由来のプロテアーゼによる分解を抑制するため、目的のペプチドを他のペプチドとのキメラペプチドとして発現させるキメラタンパク質発現法を用いることもできる。この場合、前記核酸としては、目的とするペプチドと、これに結合するペプチドとをコードする核酸が用いられる。

[0126] 続いて、当該ペプチドをコードする核酸を用いて発現ベクターを調製する。核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加する等して、発現ベクターのプロモータの下流に挿入することができる。ベクターとしては、例えば、大腸菌由来プラスミド（ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＵＣ１２、ｐＵＣ１３、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＵＣ１１８、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ等）、枯草菌由来プラスミド（ｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５、ｐＣ１９１２、ｐＴＰ４、ｐＥ１９４、ｐＣ１９４等）、酵母由来プラスミド（ｐＳＨ１９、ｐＳＨ１５、ＹＥｐ、ＹＲｐ、ＹＩｐ、ＹＡＣ等）、バクテリオファージ（ｅファージ、Ｍ１３ファージ等）、ウイルス（レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、バキュロウイルス等）、コスミド等が挙げられる。

[0127] プロモータは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、ＳＶ４０（ｓｉｍｉａｎ　ｖｉｒｕｓ　４０）由来プロモータ、ＣＭＶ（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）由来プロモータを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、ｔｒｐプロモータ、Ｔ７プロモータ、ｌａｃプロモータ等を用いることができる。

[0128] 発現ベクターには、例えば、ＤＮＡ複製開始点（ｏｒｉ）、選択マーカー

（抗生物質抵抗性、栄養要求性等）、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、タグ（ＦＬＡＧ、ＨＡ、ＧＳＴ、ＧＦＰなど）をコードする核酸等を組み込むこともできる。

[0129] 次に、前記発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換する。宿主は、ベクターとの関係で適宜選択することができる。宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌、バチルス属菌）、酵母、昆虫又は昆虫細胞、動物細胞等が用いられる。動物細胞として、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ミエローマ細胞、ＨｅＬａ細胞、Ｖｅｒｏ細胞を用いることができる。形質転換は、宿主の種類に応じ、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等、公知の方法に従って行うことができる。形質転換体を常法に従って培養することにより、目的とするペプチドが発現する。

[0130] 形質転換体の培養物からのペプチドの精製は、培養細胞を回収し、適当な緩衝液に懸濁してから超音波処理、凍結融解などの方法により細胞を破壊し、遠心分離やろ過によって粗抽出液を得る。培養液中にペプチドが分泌される場合には、上清を回収する。

[0131] 粗抽出液又は培養上清からの精製も公知の方法又はそれに準ずる方法（例えば、塩析、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー等）で行うことができる。

[0132] 得られたペプチドは、公知の方法又はそれに準ずる方法で遊離体から塩に、又は塩から遊離体に変換してもよい。

[0133] 一態様において、翻訳合成系は、無細胞翻訳系としてもよい。無細胞翻訳系によれば、一般に、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる。無細胞翻訳系は、例えば、リボソームタンパク質、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＲＳ）、リボソームＲＮＡ、アミノ酸、ｒＲＮＡ、ＧＴＰ、ＡＴＰ、翻訳開始因子（ＩＦ）、伸長因子（ＥＦ）、終結因子（ＲＦ）、及びリボソーム再生因子（ＲＲＦ）、並びに翻訳に必要なその他の因子

を含む。発現効率を高くするために大腸菌抽出液や小麦胚芽抽出液加えてもよい。他に、ウサギ赤血球抽出液や昆虫細胞抽出液を加えてもよい。

[0134] これらを含む系に、透析を用いて連続的にエネルギーを供給することで、非限定的に、数１００μｇから数ｍｇ／ｍＬのタンパク質を生産することができる。遺伝子ＤＮＡからの転写を併せて行うためにＲＮＡポリメラーゼを含む系としてもよい。市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系としてはロシュ・ダイアグノスティックス社のＲＴＳ－１００（登録商標）ジーンフロンティア社のＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭやＮＥＷ ＥＮＧＬＡＮＤ Ｂｉｏｌａｂｓ社のＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓ Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ等、小麦胚芽抽出液を用いた系としてはゾイジーン社やセルフリーサイエンス社のもの等を使用できる。

[0135] 細胞翻訳系においては、天然のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素に合成されるアミノアシルｔＲＮＡに代えて、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸をｔＲＮＡに連結（アシル化）した人工のアミノアシルｔＲＮＡを用いてもよい。かかるアミノアシルｔＲＮＡは、人工のリボザイムを用いて合成することができる。

[0136] かかるリボザイムとしては、フレキシザイム（ｆｌｅｘｉｚｙｍｅ）（Ｈ．Ｍｕｒａｋａｍｉ、Ｈ．Ｓａｉｔｏ、ａｎｄ Ｈ．Ｓｕｇａ、（２００３）、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１０、６５５－６６２；及びＷＯ２００７／０６６６２７等）が挙げられる。フレキシザイムは、原型のフレキシザイム（Ｆｘ）、及び、これから改変されたジニトロベンジルフレキシザイム（ｄＦｘ）、エンハンスドフレキシザイム（ｅＦｘ）、アミノフレキシザイム（ａＦｘ）等の呼称でも知られる。

[0137] フレキシザイムによって生成された、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸が連結されたｔＲＮＡを用いることにより、所望のコドンを、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸と関連付けて翻訳することができる。所望のアミノ酸としては、特殊アミノ酸を用いてもよい。例えば、上述した環状化に必要な非天然アミノ酸もこの方法により、結合ペプチドに導入することができる。

[0138] 前記ペプチドの化学合成は、例えば、段階的固相合成、配座的に支援される再ライゲーションを経るペプチドフラグメントの半合成、化学ライゲーションを含めた様々な当該技術分野において汎用される方法を使用して合成できる。前記ペプチドの合成は、例えば、Ｋ．Ｊ．Ｊｅｎｓｅｎ、Ｐ．Ｔ．Ｓｈｅｌｔｏｎ、Ｓ．Ｌ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎ、Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、２ｎｄＥｄｉｔｉｏｎ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ、２０１３などに記載されるような種々の固相技術を使用する化学合成である。好ましいストラテジーとして、α－アミノ基を一時的に保護及び塩基による選択的除去を可能とするＦｍｏｃ基と、側鎖官能基を一時的に保護しかつ脱Ｆｍｏｃ条件に安定な保護基の組み合わせに基づく。そのような一般的なペプチド側鎖の選択は前述のＰｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、第２版やＧ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ、Ｒ．Ｌ．Ｎｏｂｌｅ、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｕｔｉｌｉｚｉｎｇ ９－Ｆｌｕｏｒｅｎｙｌｍｅｔｈｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．３５、１９９０、１６１－２１４などで知られているが、好ましいペプチド側鎖保護基としては、例えば、セリンやトレオニンのヒドロキシ基に対するベンジル基やｔｅｒｔ－ブチル基及びトリチル（Ｔｒｔ）基、チロシンのヒドロキシ基に対する２－ブロモベンジルオキシカルボニル基やｔｅｒｔ－ブチル基、リジン側鎖のアミノ基に対するＢｏｃ基、メチルテトラゾールチオール（Ｍｔｔ）基、Ａｌｌｏｃ基、及びｉｖＤｄｅ基、ヒスチジンのイミダゾール基に対するＴｒｔ基やＢｏｃ基、アルギニンのグアニジル基に対する２，２，４，６，７－ペンタメチルジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル基（Ｐｂｆ）基、グルタミン酸やアスパラギン酸をはじめとするカルボキシ基に対するｔｅｒｔ－ブチル基、アリル基、及び３－メチルペンタン（Ｍｐｅ）基、グルタミンやアスパラギンのカルボキサミド基に対するＴｒｔ基、また、システインのチオール基に対するＴｒｔ基及びモノメトキシトリチル（Ｍｍｔ）基がある。

[0139] 前記ペプチドは、前述した固相樹脂上で段階的方法において合成できる。使用するＣ末端アミノ酸及び合成に使用するすべてのアミノ酸やペプチドは、α－アミノ保護基が合成過程において、選択的に除去されなければならない。好ましくは前述の固相樹脂を用い、Ｎ末端がＦｍｏｃ等適切に保護されたペプチドのＣ末端カルボキシ基又はＦｍｏｃで保護されたアミノ酸のＣ末端カルボキシ基を適切な試薬により活性化エステルとしたのち固相樹脂上のアミノ基に付加することにより開始する。引き続くペプチド鎖の伸長は、目的とするペプチドのアミノ酸配列に従って、Ｎ末端保護基（Ｆｍｏｃ基）の除去、次いで保護アミノ酸誘導体の縮合を順次繰り返すことにより達成することが可能である。なお、これらは目的のペプチドを最終段階で遊離させることができる。たとえば遊離させる条件として、Ｔｅｉｘｅｉｒａ、Ｗ．Ｅ．Ｂｅｎｃｋｈｕｉｊｓｅｎ、Ｐ．Ｅ．ｄｅ　Ｋｏｎｉｎｇ、Ａ．Ｒ．Ｐ．Ｍ．Ｖａｌｅｎｔｉｊｎ、Ｊ．Ｗ．Ｄｒｉｊｆｈｏｕｔ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｅｐｔ．　Ｌｅｔｔ．、２００２、９、３７９－３８５などに挙げられる、ＴＦＡ中に捕捉剤として、水／シリルヒドリド／チオールを含むＴＦＡ溶液で遊離させることができる。典型的な例として、ＴＦＡ／Ｗａｔｅｒ／ＴＩＳ／ＤＯＤＴ（体積比９２．５：２．５：２．５：２．５）が挙げられる。

[0140] 本明細書に記載するペプチドの合成は、単又は多チャネルペプチド合成機、たとえばＣＥＭ　社のＬｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅ合成機又はＢｉｏｔａｇｅ社のＳｙｒｏ　Ｉ合成機やそれらの後継機などを使用することで実施できる。

[0141] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）、ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＰＣＤＩ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣあるいはＷＳＣ）、（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスファート（ＢＯＰ）、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチル

］－１Ｈ－ベンゾトリアゾリウム－３－オキシドヘキサフルオロホスファート（ＨＢＴＵ）等が挙げられる。

[0142] ペプチドの環化については、公知の方法に従って行うことができる。非限定的に、例えば、ペプチドに２個以上のシステイン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Ｇｏｔｏらの方法（Ｙ．Ｇｏｔｏ、 ｅｔ ａｌ．ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．３ １２０－１２９（２００８））に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、Ｎ末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中に硫黄分子を含むシステイン残基を配置しておくことによっても環状化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環状化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環状化してもよい（本願の環化方法、ＣｌＡｃ－Ｃｙｓ）。あるいは、ペプチド中にＬ－２－アミノアジピン酸残基を配置し、Ｎ末端の主鎖アミノ基との間で結合することによって、環状化してもよい。このように、公知の環状化方法であれば、特に制限されず用いることができる。

[0143] ５．複合体

一態様において、本発明は、複合体に関する。この複合体は、上記のいずれかのペプチドと、前記ペプチドと結合したリンカーと、このリンカーに結合した物質とを含む複合体である。前記ペプチドは、ＴＧＦ－βに結合することができるため、前記複合体は、前記物質をＴＧＦ－βに運搬することが可能である。

[0144] ペプチドに物質（特に、薬剤等）が結合した態様を、ＰＤＣ（ｐｅｐｔｉｄｅ ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）と呼称する場合がある。

[0145] 物質はＴＧＦ－βに送達することを希望する物質であれば，当業者の希望する何らの物質であってよい。前記物質の例としては，限られないが，以下が挙げられる：

化合物：低分子化合物，中分子化合物を含み、例えば公知の低分子薬剤が挙げられる。

[0146] ペプチド：体内の標的に結合して何らかの効果を示すペプチドであってよく、例えば、本発明のペプチドとは別の環状ペプチドであってよい。

[0147] ＲＩ：放射性同位元素でラベルした低分子、中分子化合物や抗体等、放射性同位元素でラベルできる化合物であれば何でもよい。例えば、ＰＥＴ検査用の化合物が挙げられる。

[0148] タンパク質：抗体，酵素等の、体内にて有用な機能を示すタンパク質であれば何でもよい。例えば、酵素補充療法に用いられる酵素が挙げられる。

[0149] 核酸：ＤＮＡ，ＲＮＡ等、塩基配列を含むものであれば何でもよい。例えば、核酸医薬品が挙げられる。

[0150] ドラッグデリバリーシステム（ＤＤＳ）に用いる分子：リポソームやミセルなどのＤＤＳに使われる公知の分子であってよい。当該ＤＤＳ分子には内部にさらに薬剤などの化合物が含まれていてもよい。

[0151] 上記挙げた物質が、複数結合した複合体であってよい。複数結合する物質は、同種であっても、異なる種であってもよい。

[0152] ペプチドに物質（特に、薬剤等）が結合した態様を、ＰＤＣ（ｐｅｐｔｉｄｅ　ｄｒｕｇ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）と呼称する場合がある。本明細書において、「ペプチド」と述べた場合、特に限定しない限り、物質が結合した複合体の態様も含みうる。

[0153] ６．組成物等

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、組成物に関する。本項において、「ペプチド」は、「５．複合体」の複合体も含みうる。

[0154] 前記組成物は、非限定的に、医療用組成物、診断用組成物、又は研究用組成物である。

[0155] 医薬組成物

前記医薬組成物は、前記ペプチドそのものを含んでもよいが、前記ペプチドの薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含んでもよい。本明細書にお

いて「ペプチド」は、特に明記しない限り、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物を含みうる。前記医薬組成物は、前記ペプチドを有効成分として有効量含むものが好ましい。

[0156] 前記「医薬組成物」の対象となる疾患は、上述したペプチドそのものが効果を奏する疾患、及び、ペプチドを修飾する薬剤が効果を奏する疾患の双方を含む。前記医薬組成物の対象となる疾患としては、限定するものではないが、例えば、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路が関連する疾病が挙げられ、例えば腫瘍、がん、細胞の異常線維化などの細胞増殖に関連する疾病がある。また、糸球体硬化などを含む腎機能不全や、肝硬変、心筋梗塞などの治療用医薬組成物の有効成分としても有用である。あるいは、ペプチドを修飾する薬剤が効果を奏する疾患を対象としてもよい。

[0157] 本明細書において、医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膣、経直腸）投与等が上げられる。

[0158] 前記医薬組成物は、ポリペプチドが代謝及び排泄されやすい性質に鑑みて、各種の修飾を行うことができる。例えば、ポリペプチドにポリエチレングリコール（ＰＥＧ）や糖鎖を付加して血中滞留時間を長くし、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸・グリコール（ＰＬＧＡ）などの生体内分解性の高分子化合物、多孔性ヒドロキシアパタイト、リポソーム、表面修飾リポソーム、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これにポリペプチドを内包させてもよい。経皮投与する場合、弱い電流を皮膚表面に流して角質層を透過させることもできる（イオントフォレシス法）。

[0159] 前記医薬組成物は、有効成分をそのまま用いてもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、

軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、ｐＨ調整剤、防腐剤、抗酸化剤などを適宜使用し、常法により行うことができる。

[0160] 製剤化に用いられる成分の例としては、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、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、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0161] 前記医薬組成物は、ペプチドが一般には経粘膜吸収されにくいことに鑑みて、難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤を含むことができる。かかる吸収促進剤としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、サポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸等の胆汁酸塩；ＥＤＴＡ、サリチル酸類等のキレート剤；カプロン酸、カプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体、Ｎ－アシルコラーゲンペプチド、Ｎ－アシルアミノ酸、シクロデキストリン類、キトサン類、一酸化窒素供与体等を用いることができる。

[0162] 前記医薬組成物が丸剤又は錠剤の場合、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆

してもよい。

[0163] 前記医薬組成物が注射剤の場合、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含んでもよい。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えもよい。

[0164] また、前記医薬組成物は、ヒトだけではなく、非ヒト哺乳動物又は鳥類を対象としていてもよい。非ヒト哺乳動物の例は、ヒト以外の霊長類（サル、チンパンジー、ゴリラ等）、家畜動物（ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジなど）、あるいは、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、ウサギ等が含まれる。

[0165] 特にヒトに投与する場合の投与量は、症状、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、非限定的に、例えば、３０μｇ～１００ｇ、１００μｇ～５００ｍｇ、１００μｇ～１００ｍｇを１回又は数回に分けて投与することができる。注射投与の場合、患者の体重により、１μｇ／ｋｇ～３０００μｇ／ｋｇ、３μｇ／ｋｇ～１０００μｇ／ｋｇを１回又は数回に分けて投与してもよい。

[0166] 本発明は、本発明のペプチドを投与することによる、疾患の予防又は治療する方法に関する。

[0167] 本発明は、本発明のペプチドの疾患の予防又は治療のための使用、に関する。

[0168] 本発明は、本発明のペプチドの、疾患の予防又は治療のための医薬組成物の製造のための使用、に関する。

[0169] 本発明は、疾患を予防又は治療する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0170] 診断用組成物及び研究用組成物

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、診断用組成物に関する。

[0171] 前記ペプチドは、好ましくは、ＴＧＦ－β結合活性、さらに好ましくはＴＧＦ－β１結合活性を有する。「ＴＧＦ－β１結合活性を有する」とは、「

３．ペプチド（Ｂ）」で詳述した通りである。本発明のペプチドは、ＴＧＦ－βに結合するため、ＴＧＦ－βを検出する診断薬としても使用しうる。診断薬としては、ＴＧＦ－β量の検出薬であってよく、検出薬として用いる場合は、本発明のペプチドは、検出可能に標識してもよい。標識物質により標識されている場合、前記ペプチドがＴＧＦ－βと複合体を形成することで、該標識物質を介してＴＧＦ－βの検出又は定量を行うことが可能となる。

[0172] 標識物質の種類は、特に、限定されない。非限定的に、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、化学発光色素、放射性物質（例えば、１２５Ｉ、１３１Ｉ、３５Ｓ、３Ｈ等の放射性同位元素、又は、放射性同位体金属イオンのキレート錯体、例えばＤＯＴＡ又はデスフェリオキサミンのキレート錯体）、並びにビオチン及びＧＦＰ（緑色蛍光たんぱく質）等の蛍光たんぱく質、発光たんぱく質、並びにペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素を含む。好ましい標識物質の例は、フルオレセイン及びＦＩＴＣ等のフルオレセイン誘導体、ローダミン及びテトラメチルローダミン等のローダミン誘導体、並びにテキサスレッド等の蛍光色素である。

[0173] 診断用組成物で診断し得る疾患は、特に限定されない。例えば、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路が関連する疾病が挙げられ、例えば腫瘍、がん、細胞の異常線維化などの細胞増殖に関連する疾病がある。また、糸球体硬化などを含む腎機能不全や、肝硬変、心筋梗塞などの診断用組成物としても有用である。

[0174] 本発明は、本発明のペプチドを用いることによる、疾患を診断する方法に関する。「診断する方法」は、ｉｎ ｖｉｖｏ又はｉｎ ｖｉｔｒｏの診断方法を含む。好ましくは、ｉｎ ｖｉｔｒｏの診断方法である。本発明はまた、本発明のペプチドを用いることによる、疾患の検出方法に関する。疾患の検出は、例えば、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業等において、医師以外の、検査技師、研究者等によって行うこともできる。一態様にお

いて、疾患の検出方法は医療行為を含まない。

[0175] 本発明は、本発明のペプチドの疾患の診断又は検出のための使用、に関する。

[0176] 本発明は、本発明のペプチドの、疾患の診断又は検出のための組成物の製造のための使用、に関する。

[0177] 本発明は、疾患の診断又は検出する方法に使用するための、本発明のペプチド、に関する。

[0178] 本発明はまた、本発明のペプチドを含む、研究用組成物に関する。ただし、本発明の研究用組成物は、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く。「研究用組成物」は、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業、病院等において、研究者、技師、学生、医師等によって使用されるものを含む。

[0179] 前記研究用組成物は、例えば、ＴＧＦ－βの精製又は検出、疾患の検出のために使用することができる。

[0180] 一態様において、本発明のペプチドはＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有するため、細胞や臓器の培養のための培地への添加剤としても使用しうる。また、移植用の臓器を保護するための保護溶液への添加剤としても使用しうる。非限定的に、肝臓や脳幹、などの臓器又はその断片を培養するための培地であってよく、幹細胞など全能性を有する細胞を培養するための培地であってよい。さらに、例えば再生医療における細胞療法のための細胞培養などに使用することも可能である。本発明の「研究用組成物」は、このような培養培地へ使用される組成物を含む。

[0181] ただし、本発明の研究用組成物は、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く。「オルガノイド」は、ヒト幹細胞に由来しその自己凝集能力、自己再生能力及び分化能力により三次元的に培養され、自己組織化により形成されたインビトロ培養物である。「オルガノイド」は、「臓器のミニチュア版」とも考えられている。

[0182] 前記ペプチドは、ＴＧＦ－β、特にＴＧＦ－β１に対する結合活性（親和

性）、特に高い結合活性を有するため、例えば、ヒト血清等からＴＧＦ－βを選択的に分離することが可能である。従って、前記ペプチドは、ＴＧＦ－βの精製方法に使用しうる。ＴＧＦ－βの精製方法は、例えば、前記ペプチド又は固定化された前記ペプチドをＴＧＦ－βと結合させること、並びに、結合したＴＧＦ－βを遊離させてＴＧＦ－βを回収することを含む。さらに、前記ペプチドは、ＴＧＦ－βの検出方法に使用しうる。ＴＧＦ－βの検出方法は、例えば、前記ペプチド又は固定化された前記ペプチドにサンプル中のＴＧＦ－βを結合させ、結合したＴＧＦ－βを検出することを含む。ここで、検出には、定性又は定量のいずれかの分析を含むものとする。

[0183] 本明細書において、ペプチドを固定化するための担体は特に限定されない、例えば、ラス製、金属性、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、ＰＶＤＦメンブレン等が挙げられる。

[0184] 本発明は、本発明のペプチドを用いた、ＴＧＦ－βの精製又は検出方法を含む。

[0185] 本発明はまた、本発明のペプチドのＴＧＦ－βの精製又は検出のための使用、を含む。

[0186] 本発明は、本発明のペプチドを含む、診断用又は検出用のキットに関する。前記診断用又は検出用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（非限定的に、本発明のペプチド、抗体、固相担体、緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー等のいずれか又は全てを含む）を含む。

[0187] 本発明は、本発明のペプチドを含む診断用又は検出用のテスターに関する。

実施例

[0188] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0189] 化学合成

以下の実施例における化学合成において使用された全ての原料、ビルディングブロック、試薬、酸、塩基、固相樹脂、溶媒は、市販品をそのまま用いたか、もしくは当業者にて有機化学的手法を用いて合成できるものである。なお、保護基を含むアミノ酸は特記が無い限り市販品をそのまま用いた。

[0190] 固相樹脂におけるペプチド鎖の伸長は、それぞれの実施例に記載された樹脂を出発原料とし、通常用いられるペプチドカップリング反応条件とＦｍｏｃ除去反応条件を用いて行った。反応はペプチド自動合成機であるＣＥＭ社のＬｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅ、もしくはＢｉｏｔａｇｅ社のＳｉｒｏ　Ｉを使用し、製造元のマニュアルに従い行った。

[0191] 例として、使用される一般的なアミノ酸の一部を下記に列挙し、側鎖保護基はカッコ内に示した。

[0192] Ｆｍｏｃ－Ｔｒｐ（Ｂｏｃ）－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ａｓｐ（ＯＭｐｅ）－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ｐｈｅ－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ｈｉｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ｔｙｒ（ｔＢｕ）－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ｖａｌ－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ；
Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（Ｔｒｔ）－ＯＨ。

[0193] 得られた粗精製ペプチドの精製方法として、Ｗａｔｅｒｓ社ＡｕｔｏＰｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ－ＳＱＤ２　ｓｉｎｇｌｅ　ｑｕａｄｒｕｐｌｅ　ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒで逆相分取ＨＰＬＣを使用し、目的物由来のｍ／ｚイオンをモニタリングしながら溶出した。ＥＳＩ－ｐｏｓｉｔｉｖｅのスキャンモードで得られるマススペクトルと目的物の分子式より計算される多価イオンを含むマススペクトルが使用した質量分析器の誤差範囲で一致しているのを確認した。なお、使用したカラムを含む精

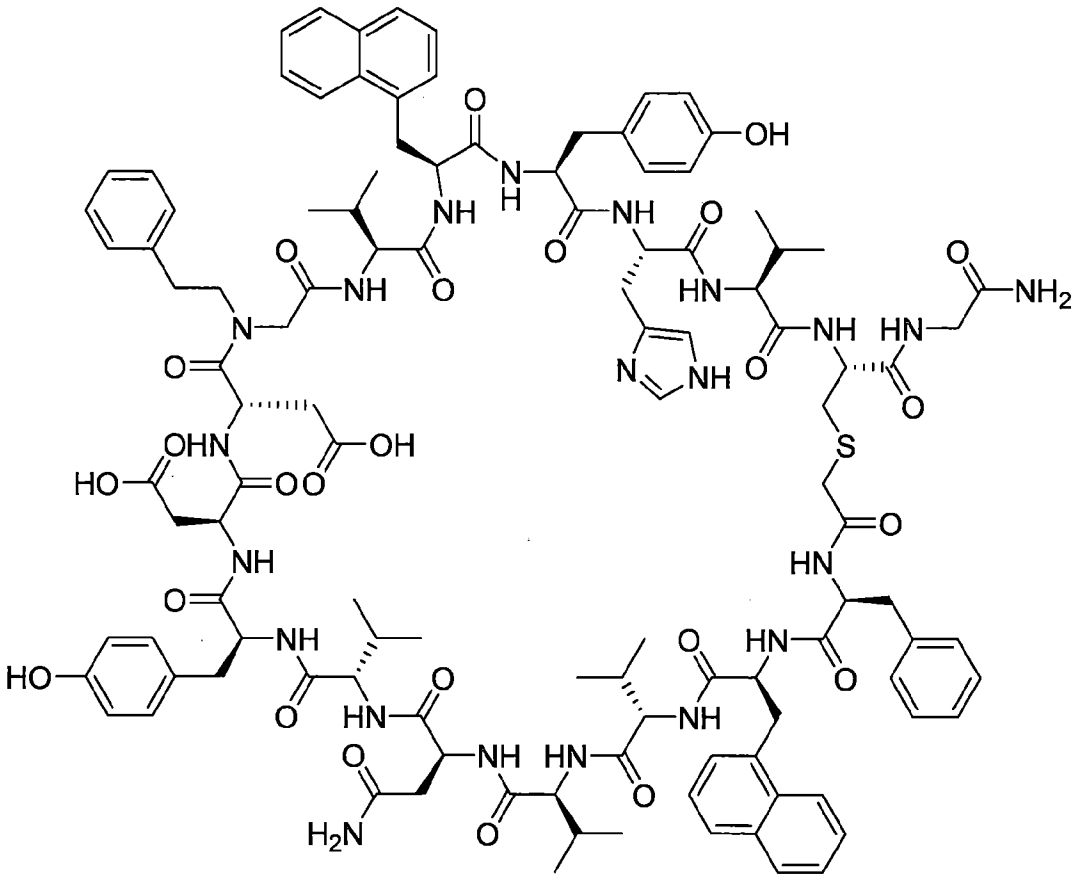
製条件はそれぞれの実施例に示した。

[0194] 化学合成されたペプチドの構造決定は、目的配列に従って用いたアミノ酸と必要に応じて用いたビルディングブロックを考慮し計算された分子量を、質量スペクトル分析法におけるＥＳＩ－ＭＳ（＋）により確認した。なお、”ＥＳＩ－ＭＳ（＋）”とは、正イオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は“ｍ／ｚ”単位表記によって報告された。なお、分子量がおおよそ１０００より大きい化合物は、２価イオン又は３価イオンとして高頻度で検出された。

[0195] 実施例１　ＴＧＦｂ１＿００１（配列番号２）の合成

本実施例では、以下の構造を有するＴＧＦｂ１＿００１（配列番号２）を合成した。

[0196] [化12]



[0197] Ｆｍｏｃ－Ｓｉｅｂｅｒ　ａｍｉｄｅ　ｒｅｓｉｎ（渡辺化学、０．４７

ｍｍｏｌ／ｇ、０．２１３ｇ）を用い、前述の一般的な化学合成方法にてＦｍｏｃ基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、ＣＥＭ社のＬｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅ　ＨＴを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0198] 各残基の導入には樹脂１当量に対し、Ｆｍｏｃ－ＡＡ／ＤＩＰＣＩ／Ｏｘｙｍａ　ｐｕｒｅ（５．２５当量／１０当量／５当量）を用い、ＤＭＦ中９０℃下、３分間１回反応を行った。ただし、９残基目は９０℃下、１０分間２回反応を行った。１４残基目、１６残基目は５０℃下１５分間１回反応を行った。

[0199] また、Ｆｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と７５℃下、３分間反応させることを基本条件とした。ただし、１残基目、２残基目、３残基目、４残基目、５残基目、６残基目、７残基目、及び８残基目のＦｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と２５℃下５分間２回反応を行った。

[0200] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたＦｍｏｃ保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法でα－アミノ基のＦｍｏｃ基を除去したのち、０．２Ｍ　クロロ酢酸（約５当量）のＤＭＦ溶液、０．５Ｍ　ＨＡＴＵ（約５当量）のＤＭＦ溶液、１Ｍ　ＤＩＥＡ（約１０当量）のＤＭＦ溶液を固相樹脂に加え室温にて３０分振盪することにより行った。

[0201] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をＤＭＦで５回と塩化メチレンで３回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル－Ａ（５ｍＬ、ＴＦＡ／H_2O／ＴＩＳ／ＤＯＤＴの体積比９２．５：２．５：２．５：２．５の混合物）を加え、室温で６０分振盪した。

[0202] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を０℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル／ヘキサン（１／１）の混合溶媒に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（９０００ｒｐｍ、１分）、溶液をデカンテーションした。得られた固体

を再度０℃に冷やした１５ｍＬのジエチルエーテルにて３回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0203] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に５ｍＭとなるようにＤＭＳＯに溶解後、１０当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約５時間振盪した。得られた反応溶液をＧｅｎｅｖａｃ社のＥＺ－２を用いて減圧濃縮した（４０℃未満、減圧時間１４時間）。

[0204] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標） Ｃ１８ ５μｍ ３０ｘ１５０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．１％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．１％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：４０℃；グラジエント（％Ｂ）：３分間かけて１３－３８％、その後８分間かけて３８－４３％、その後１分かけて４３－６０％；流量：４５ｍＬ／分。

[0205] 目的物の純度は分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２５ｎｍ）クロマトグラムの面積比から算出し９６．０％であった。

[0206] 分析条件：保持時間＝１５．０１分；カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ ＥＶＯ Ｃ１８ ２．６μｍ ２．１ｘ１５０ｍｍ、１００Å；移動相：Ａ＝０．０２５％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％ Ｂ ｃｏｎｃ）：２０分間かけて２０－６０％、その後１分間かけて６０－９５％、その後５分かけて９５－９５％；流量：０．２５ｍＬ／分

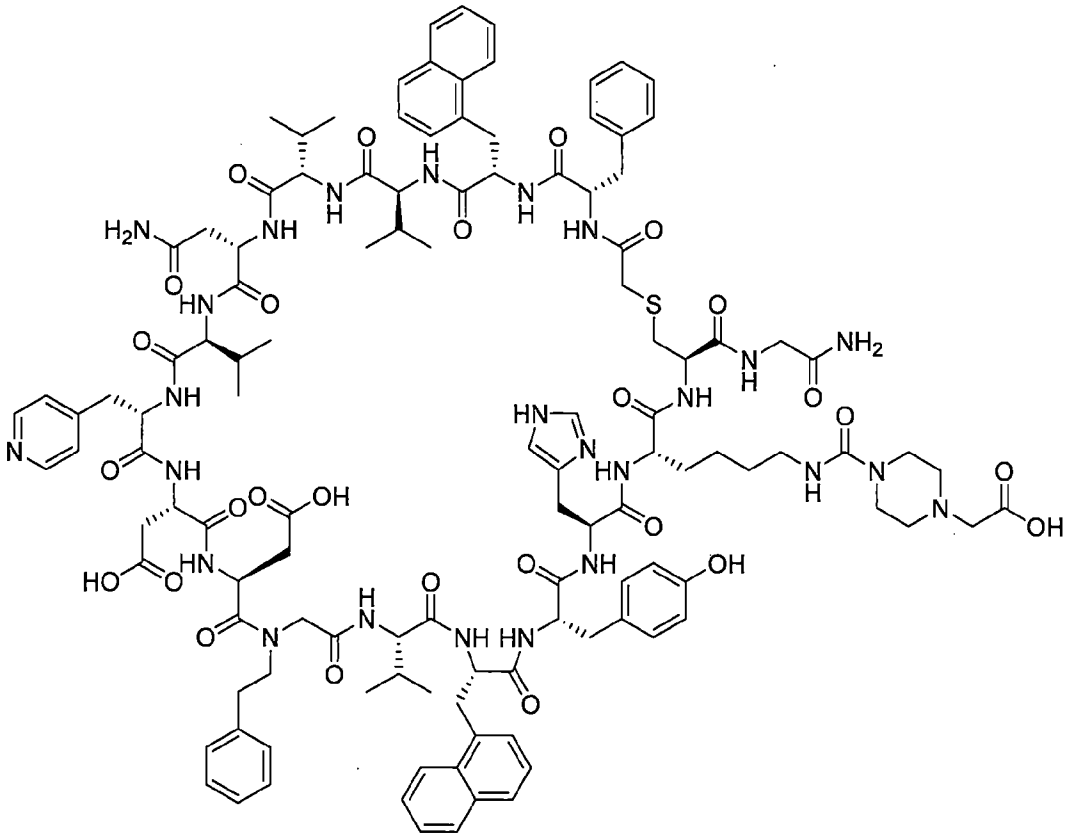
ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値ｍ／ｚ＝１１１２．５３ （Ｍ＋２Ｈ）$^{2+}$

実施例２ ＴＧＦｂ１＿０１２（配列番号１３）の合成

本実施例では、以下の構造を有するＴＧＦｂ１＿０１２（配列番号１３）を合成した。

[0207]

[化13]



[0208] Ｆｍｏｃ－Ｓｉｅｂｅｒ ａｍｉｄｅ ｒｅｓｉｎ（渡辺化学、０．６５ｍｍｏｌ／ｇ、０．１１５ｇ）を用い、前述の一般的な化学合成方法にてＦｍｏｃ基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Ｂｉｏｔａｇｅ社のＳｉｒｏ Ｉを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0209] 各残基の導入には樹脂１当量に対し、Ｆｍｏｃ－ＡＡ／ＨＡＴＵ／ＤＩＰＥＡ（４．２当量／４当量／８当量）を用い、ＤＭＦ中７５℃下、２０分間２回反応を行った。ただし、１１残基目、１２残基目、１３残基目は７５℃下、２０分間１回反応を行った。１４残基目は室温下６０分間１回反応を行った。１５残基目は７５℃下、２０分間１回反応を行った。１７残基目は７５℃下、１０分間１回反応を行った。１６残基目は室温下２０分間１回反応を行った。

[0210] また、Ｆｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と室温下、５分間、

及び１５分間反応させることを基本条件とした。

[0211] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたＦｍｏｃ保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法でα－アミノ基のＦｍｏｃ基を除去したのち、０．２Ｍ　クロロ酢酸（約５当量）のＤＭＦ溶液、０．２Ｍ　ＤＩＰＣＩ（約５当量）のＤＭＦ溶液、０．２Ｍ　ＨＯＳｕ（約５当量）のＤＭＦ溶液を固相樹脂に加え室温にて９０分振盪することにより行った。

[0212] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をＤＭＦで５回と塩化メチレンで３回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル－Ａ（３ｍＬ、ＴＦＡ／H_2O／ＴＩＳ／ＤＯＤＴの体積比９２．５：２．５：２．５：２．５の混合物）を加え、室温で６０分振盪した。

[0213] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を０℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル溶媒に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（９０００ｒｐｍ、３分）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度０℃に冷やした１０ｍＬのジエチルエーテルにて３回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0214] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に２．５ｍＭとなるようにＤＭＳＯ／水（９／１）の混合溶液に溶解後、１０当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約１８．５時間振盪した。反応液に、２０当量の酢酸を添加後、得られた反応溶液をＧｅｎｅｖａｃ社のＥＺ－２を用いて減圧濃縮した（４０℃未満、減圧時間１６時間）。

[0215] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標）　Ｃ１８　５μｍ　１９ｘ１５０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．１％　ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．１％　ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％Ｂ）：３分間かけて５－３０％、その後８分間かけて３０－３５％、その後１分かけて３５－６０％；流量：１７

ｍＬ／分。

[0216] 目的物の純度は分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２５ｎｍ）クロマトグラムの面積比から算出し９０．５％であった。

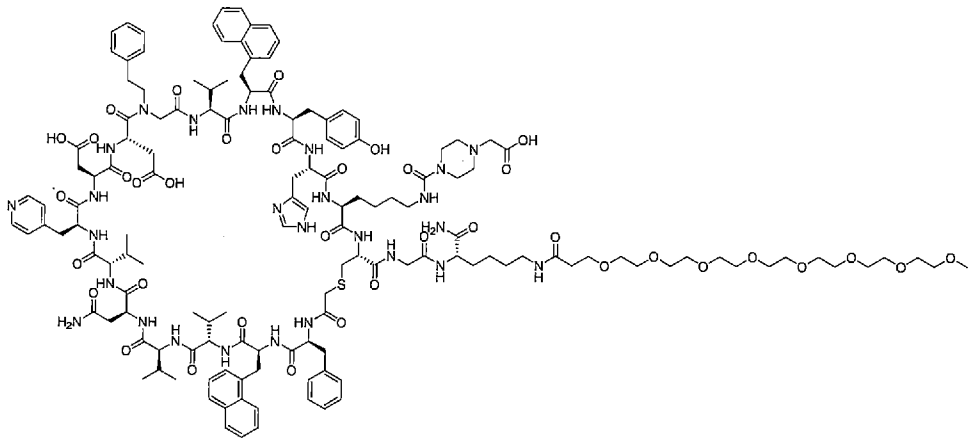
[0217] 分析条件：保持時間＝３．６２分；カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ ＥＶＯ Ｃ１８ ２．６μｍ ２．１ｘ１５０ｍｍ、１００Å；移動相：Ａ＝０．０２５％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％ Ｂ ｃｏｎｃ）：７．１５分間かけて２０－６０％、その後０．３分間かけて６０－９５％、その後１．５５分かけて９５－９５％；流量：０．５ｍＬ／分

ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値ｍ／ｚ＝１２０４．６４ （Ｍ＋２Ｈ）$^{2+}$

実施例３ ＴＧＦｂ１＿０３１（配列番号３２）の合成

本実施例では、以下の構造を有するＴＧＦｂ１＿０３１（配列番号３２）を合成した。

[0218] [化14]



[0219] Ｆｍｏｃ－Ｓｉｅｂｅｒ ａｍｉｄｅ ｒｅｓｉｎ（渡辺化学、０．４８ｍｍｏｌ／ｇ、０．５２１ｇ）を用い、前述の一般的な化学合成方法にてＦｍｏｃ基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、ＣＥＭ社のＬｉｂｅｒｔｙ Ｂｌｕｅ ＨＴを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0220] 各残基の導入には樹脂１当量に対し、Ｆｍｏｃ－ＡＡ／ＤＩＰＣＩ／Ｏｘ

ｙｍａ　ｐｕｒｅ（４．２当量／８当量／４当量）を用い、ＤＭＦ中９０℃下、３分間１回反応を行った。ただし、３残基目、４残基目、６残基目、７残基目、１１残基目、１５残基目は７５℃下、２０分間１回反応を行った。９残基目は９０℃下３分間２回反応を行った。１０残基目は７５℃下２０分間２回反応を行った。１４残基目は５０℃下１５分間１回反応を行った。

[0221] また、Ｆｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と７５℃下、３分間反応させることを基本条件とした。ただし、１残基目、２残基目、３残基目、４残基目、５残基目、６残基目、７残基目、８残基目、１１残基目、１２残基目、１３残基目、１５残基目、１７残基目、及び１８残基目のＦｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と２５℃下５分間２回反応を行った。

[0222] クロロアセチル基の導入は前工程で得られたＦｍｏｃ保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法でα－アミノ基のＦｍｏｃ基を除去したのち、０．１Ｍ　クロロ酢酸（約５当量）のＤＭＦ溶液、０．１Ｍ　ＨＡＴＵ（約５当量）のＤＭＦ溶液、０．２Ｍ　ＤＩＥＡ（約１０当量）のＤＭＦ溶液を固相樹脂に加え室温にて３０分振盪することにより行った。

[0223] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をＤＭＦで５回と塩化メチレンで３回洗浄した後、減圧下乾燥し、続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル－Ａ（５ｍＬ、ＴＦＡ／H_2O／ＴＩＳ／ＤＯＤＴの体積比９２．５：２．５：２．５：２．５の混合物）を加え、室温で６０分振盪した。

[0224] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を０℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル／ヘキサン（１／１）の混合溶媒に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（９０００ｒｐｍ、２分）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度０℃に冷やした１５ｍＬのジエチルエーテルにて３回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0225] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に５ｍＭ

となるようにＤＭＳＯに溶解後、１０当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約１６時間振盪した。得られた反応溶液をＴｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社のＳａｖａｎｔ　Ｅｘｐｌｏｒｅｒ　ＳｐｅｅｄＶａｃを用いて減圧濃縮した（４０℃未満、減圧時間３時間）。

[0226] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標）　Ｃ１８　５μｍ　５０ｘ１５０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．１％　ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．１％　ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：４０℃；グラジエント（％Ｂ）：３分間かけて５－２８％、その後８分間かけて２８－３３％、その後１分かけて３３－６０％；流量：１２０ｍＬ／分。

[0227] 目的物の純度は分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２５ｎｍ）クロマトグラムの面積比から算出し９９．２％であった。ここで得られるペプチドを、ペプチドＡとする。

[0228] 分析条件：保持時間＝１．２０分；カラム：ＣＳＨ　Ｐｈ－ｈｅｘｙｌ　１．７μｍ　２．１ｘ３０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．０２５％　ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％　ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％　Ｂ　ｃｏｎｃ）：１．１４分間かけて５－９５％、その後０．８６分間かけて９５－９５％；流量：０．７２ｍＬ／分

ＥＳＩ－ＭＳ（＋）　観測値ｍ／ｚ＝１２６９．３　（Ｍ＋４Ｈ）$^{4+}$

上記で得られたペプチドＡ（１６．５μｍｏｌ）をペプチドの終濃度が２５ｍＭとなるようにＤＭＳＯ／水（９／１）の混合溶液に溶解後、１．２当量のＭｅＰＥＧ８ｃ、１．１当量のＨＡＴＵ，３当量のＤＩＰＥＡを加えて、室温で約１時間振盪した。

[0229] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標）　Ｃ１８　５μｍ　１９ｘ１５０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．１％　ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．１％　ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：５０℃；グラジエント（％Ｂ）：３分間かけて７－３２％、その後８分間かけて３２－３７％、その後１分かけて３７－６０％；流量：１７

ｍＬ／分。

[0230] 目的物の純度は分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２５ｎｍ）クロマトグラムの面積比から算出し９８．２％であった。

[0231] 分析条件：保持時間＝４．０９分；カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ ＥＶＯ Ｃ１８ ２．６μｍ ２．１ｘ１５０ｍｍ、１００Å；移動相：Ａ＝０．０２５％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％ Ｂ ｃｏｎｃ）：７．１５分間かけて２０－６０％、その後０．３分間かけて６０－９５％、その後１．５５分かけて９５－９５％；流量：０．５ｍＬ／分

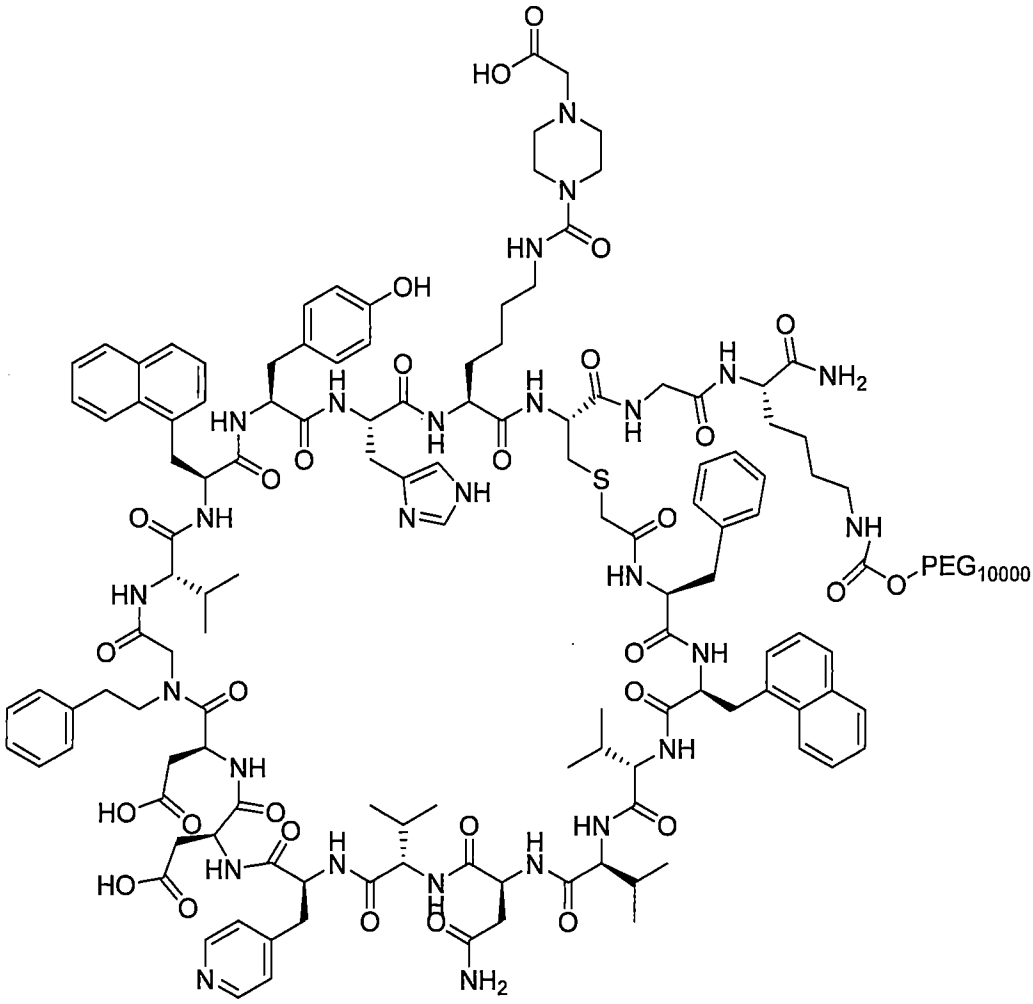
ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値ｍ／ｚ＝９７７．７０ （Ｍ＋３Ｈ）$^{3+}$

実施例４ ＴＧＦｂ１＿０３２（配列番号３３）の合成

本実施例では、以下の構造を有するＴＧＦｂ１＿０３２（配列番号３３）を合成した。

[0232]

[化15]



[0233] ＴＧＦｂ１＿０３１（配列番号３２）の合成で得られたペプチドＡ（４．５μｍｏｌ）をペプチドの終濃度が２５ｍＭとなるようにアセトニトリル／水（１／１）の混合溶液に溶解後、０．６７当量のＮＨＳ－ＯＣＯｍＰＥＧ１００００、５当量のＤＩＰＥＡを加えて、室温で約１時間振盪した。

[0234] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Ｗａｔｅｒｓ ＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標） Ｃ１８ ５μｍ ３０ｘ１５０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．１％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．１％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：５０℃；グラジエント（％Ｂ）：０．５分間かけて３５－３５％、その後１１．５分間かけて３５－６０％；流量：４５ｍＬ／分。

[0235] 目的物の純度は分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２５ｎｍ）クロマトグ

ラムの面積比から算出し９９．３％であった。

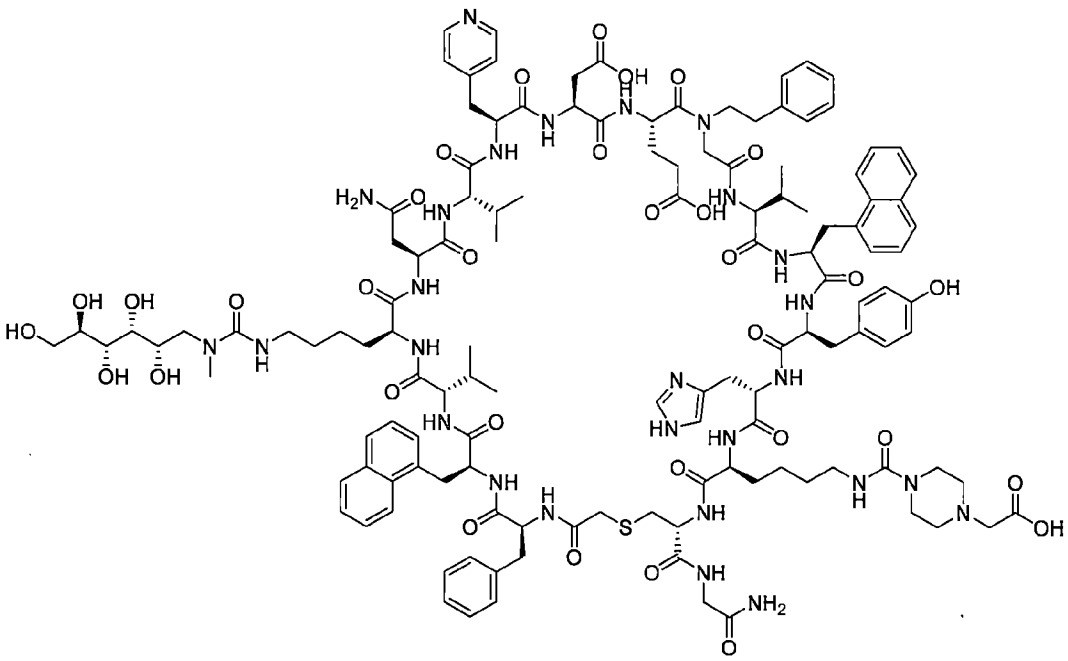
[0236] 分析条件：保持時間＝３．１６分；カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ ＥＶＯ Ｃ１８ ２．６μｍ ２．１ｘ１５０ｍｍ、１００Å；移動相：Ａ＝０．０２５％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％ Ｂ ｃｏｎｃ）：７．１５分間かけて４０－８０％、その後０．３分間かけて８０－９５％、その後１．５５分かけて９５－９５％；流量：０．５ｍＬ／分

ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値ｍ／ｚ＝１３３１．０６（中央値）

実施例５ ＴＧＦｂ１＿０２４（配列番号２５）の合成

本実施例では、以下の構造を有するＴＧＦｂ１＿０２４（配列番号２５）を合成した。

[0237] [化16]



[0238] Ｆｍｏｃ－Ｓｉｅｂｅｒ ａｍｉｄｅ ｒｅｓｉｎ（渡辺化学、０．４８ｍｍｏｌ／ｇ、０．１５６ｇ）を用い、前述の一般的な化学合成方法にてＦｍｏｃ基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Ｂｉｏｔａｇｅ社のＳｉｒｏ Ｉを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0239] 各残基の導入には樹脂１当量に対し、Ｆｍｏｃ－ＡＡ／ＨＡＴＵ／ＤＩＰＥＡ（４．２当量／４当量／８当量）を用い、ＤＭＦ中７５℃下、２０分間２回反応を行った。ただし、４残基目、９残基目は７５℃下、３０分間２回反応を行った。１４残基目は室温下３０分間２回反応を行った。１５残基目は７５℃下、２０分間１回反応を行った。１６残基目は室温下２０分間１回反応を行った。１７残基目は７５℃下、１０分間１回反応を行った。

[0240] また、Ｆｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と室温下、５分間、及び１５分間反応させることを基本条件とした。

[0241] クロロアセチル基の導入、側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出し、並びにペプチドの沈殿下は、ＴＧＦｂ１＿０１２（配列番号１３）の合成の方法に準じて行った。

[0242] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に２．５ｍＭとなるようにアセトニトリル／水（１／１）の混合溶液に溶解後、１０当量のトリエチルアミンを加えて、室温で約３時間振盪した。反応液に、２０当量の酢酸を添加後、得られた反応溶液をＧｅｎｅｖａｃ社のＥＺ－２を用いて減圧濃縮した（４０℃未満、減圧時間１６時間）。

[0243] 得られた粗生成物を、以下の条件を用いて精製した。カラム：Ｗａｔｅｒｓ　ＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標）　Ｃ１８　５μｍ　５０ｘ１５０ｍｍ；移動相：Ａ＝０．１％　ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．１％　ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：４０℃；グラジエント（％Ｂ）：３分間かけて５－２６％、その後８分間かけて２６－３１％、その後１分かけて３１－６０％；流量：１７ｍＬ／分。

[0244] 目的物の純度は分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２５ｎｍ）クロマトグラムの面積比から算出し７９．９％であった。

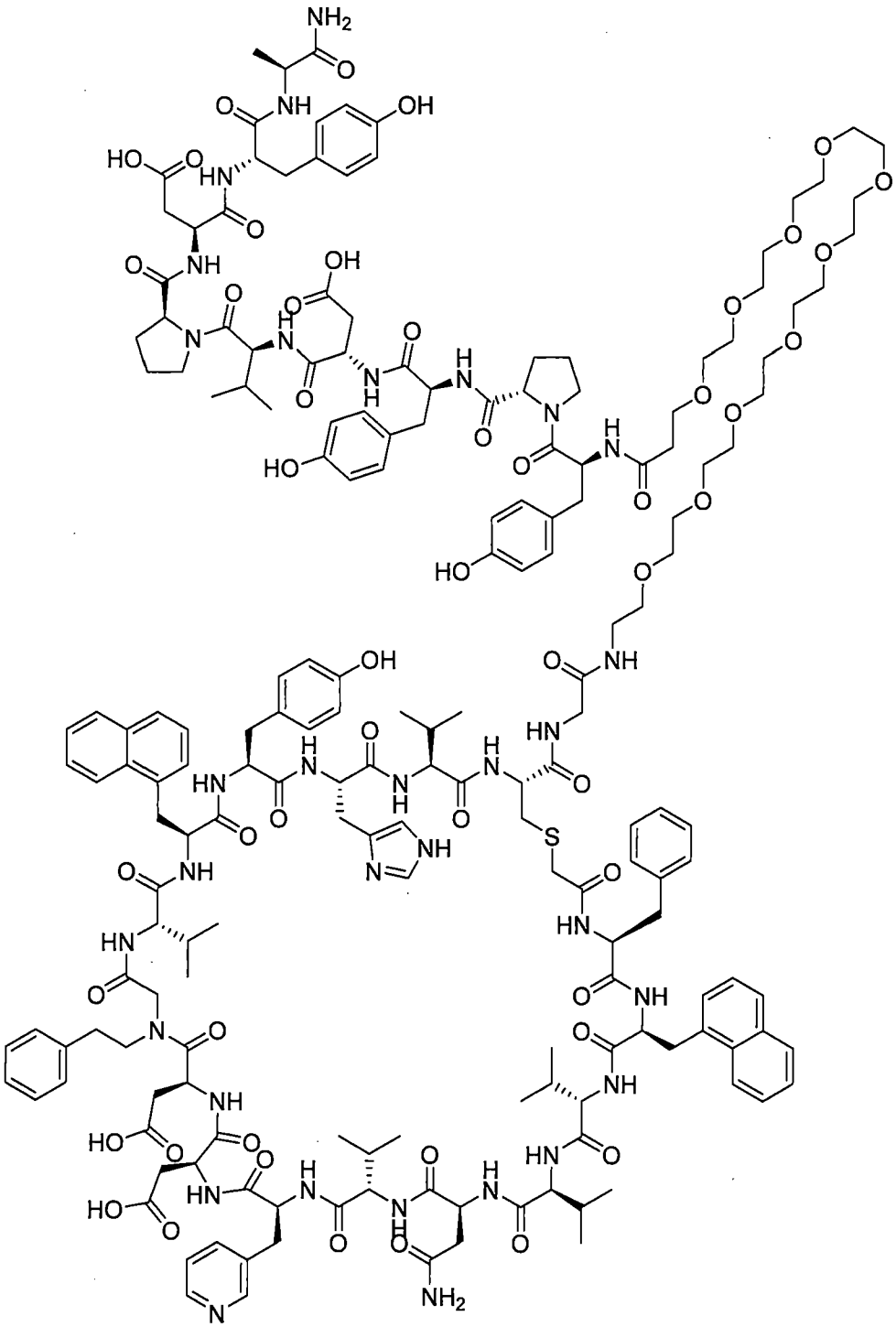
[0245] 分析条件：保持時間＝３．０１分；カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ　ＥＶＯ　Ｃ１８　２．６μｍ　２．１ｘ１５０ｍｍ、１００Å；移動相：Ａ＝０．０２５％　ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％　ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％　Ｂ　ｃｏｎｃ）：７．１５分間かけて２０－６

０％、その後０．３分間かけて６０－９５％、その後１．５５分かけて９５－９５％；流量：０．５ｍＬ／分

ＥＳＩ－ＭＳ（＋）　観測値ｍ／ｚ＝１３３６．９６　（Ｍ＋２Ｈ）$^{2+}$

実施例６　ＴＧＦｂ１＿０６８（配列番号６９）の合成

[0246] [化17]



[0247] ＨＡ ｔａｇ ｒｅｓｉｎ（０．６５ｍｍｏｌ／ｇ、０．００４ｍｇ、２．５μｍｏｌ ｓｃａｌｅ）を用い、前述の一般的方法にてＦｍｏｃ基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Ｂｉｏｔａｇｅ社のＳｉｒｏ IIを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。

[0248] 固相樹脂１当量に対し、Ｆｍｏｃ－ＡＡ／ ＨＡＴＵ／ ＤＩＰＥＡ（４．２当量／３．９当量／８．４当量）を用い、ＤＭＦ中７５℃下、２０分間２回反応を行った。ただし、５残基目、７残基目、８残基目、９残基目、１０残基目、１２残基目、１３残基目、１７残基目は７５℃下、１０分間２回反応を行った。１４残基目、１６残基目は５０℃下、３０分間２回反応を行った。１８残基目は室温下、６０分間１回反応を行った。また、Ｆｍｏｃ除去は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液と室温下、５分間反応させた後、１５分間反応させることを基本条件とした。

[0249] クロロアセチル基の導入は、前工程で得られたＦｍｏｃ保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法でα－アミノ基のＦｍｏｃ基を除去したのち、０．３Ｍ クロロ酢酸のＤＭＦ溶液（４．２当量）、０．２８Ｍ ＨＡＴＵのＤＭＦ溶液（３．９当量）、１．０５Ｍ ＤＩＰＥＡのＤＭＦ溶液（８．４当量）を固相樹脂に加え、室温下、３０分間振盪を２回繰り返すことにより行った。

[0250] 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をＤＭＦで５回と塩化メチレンで３回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル－ Ａ（ＴＦＡ／Ｈ２Ｏ／ＴＩＳ／ＤＯＤＴの体積比９２．５：２．５：２．５：２．５の混合物）を加え、室温で６０分間振盪した。

[0251] 反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を０℃に冷やしたジイソプロピルエーテル（１．５ｍＬ）に加えると、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（８５００ ｒｐｍ、

３０秒間）、溶液をデカンテーションにより除去した。得られた固体を再度０℃に冷やしたジエチルエーテル／ヘキサン（１：１、１ｍＬ）にて２回洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0252] ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に２５ｍＭ（２．５μｍｏｌ／０．１ｍＬ）となるようにイソプロピルアルコール／水／ＤＭＳＯ（１：１：１８）に溶解後、２０当量のトリエチルアミンを加えて、室温下で６３時間振盪した。得られた反応溶液に４０当量の酢酸を加えた。

[0253] 得られた上記反応溶液はギルソン社のカラムを用い固相抽出した（カラム：Ｇｉｌｓｏｎ ＡＳＰＥＣ Ｃ１８ ５００ｍｇ ３ｍＬ）。

[0254] （ｉ）カラムを抽出液Ａ（０．１％ ＴＦＡ ｉｎ ９５％ＭｅＣＮ／水、３ｍＬ）で洗浄した。

[0255] （ｉｉ）抽出液Ｂ（０．１％ ＴＦＡ ｉｎ ５％ＭｅＣＮ／水、３ｍＬ）でカラムを平衡化した。

[0256] （ｉｉｉ）上記反応溶液０．１ｍＬをカラムにローディングした。

[0257] （ｉｖ）抽出液Ｂ（４ｍＬ）でカラムを洗浄した。

[0258] （ｖ）抽出液Ａ（４ｍＬ）で抽出した。得られた抽出液をＥＺ－２ ＥＩｉｔｅを用いて減圧濃縮した。

[0259] 目的物は主たるピークの一つの純度は以下の分析条件のＬＣ／ＭＳ（ＵＶ波長２２０ ｎｍ）クロマトグラムの面積比から算出し２１．８％であった。

[0260] 分析条件：保持時間＝１．７４分；カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ ＥＶＯ Ｃ１８ １．７μｍ ２．１ｘ５０ｍｍ、１００Å；移動相：Ａ＝０．０２５％ ＴＦＡ（水中）、Ｂ＝０．０２５％ ＴＦＡ（ＭｅＣＮ中）；温度：６０℃；グラジエント（％ Ｂ ｃｏｎｃ）：２．１０分間かけて５－９５％、その後０．７５分間かけて９５－９５％；流量：０．６ｍＬ／分

ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値ｍ／ｚ＝ １９０３．５（Ｍ＋２Ｈ）$^{2+}$

実施例７ 各種ペプチド合成

本実施例では、実施例１－６と同様に、各種環状ペプチドを化学合成した。合成したペプチドの配列を、表１及び表４に示す。表１において、配列番号２、４－１３、１５－３３は、アミノ酸配列が環化構造をとる環状ペプチドのＣ末端にグリシン（Ｇ）リンカーが付加されている。配列番号３２は、Ｇリンカーの先にさらに、Ｋ（ＭｅＰＥＧ８ｃ）が、そして、配列番号３３は、Ｇリンカーの先にさらに、Ｋ（ＯＣＯｍＰＥＧ１００００）が付加されている。なお、配列番号３は、配列番号２と同じアミノ酸配列だが、Ｃ末端のグリシン（Ｇ）リンカー付加がない。なお、配列番号１４は、配列番号１３と同じアミノ酸配列だが、Ｃ末端のグリシン（Ｇ）リンカー付加がない。

[0261] 配列番号３４－６９のアミノ酸配列からなるペプチドも、環化構造をとる環状ペプチドのＣ末端にリンカーとしてＧが結合している。なお、表４において、配列番号３４－６９のアミノ酸配列からなるペプチドのＣ末端リンカーのＧの先にＨＡ－ｔａｇが結合している。これは、ＥＬＩＳＡによりＴＧＦ－β阻害ペプチドとＴＧＦ－β１との結合を評価する際に必要なアミノ酸配列で、活性に影響を及ぼすものでない。

[0262] 合成したペプチドは実施例１－６に記載する分析条件で分析し、質量スペクトル分析法におけるＥＳＩ－ＭＳ（＋）により構造を確認した。得られたＥＳＩ－ＭＳ（＋）観測値と、その場合における価数を表１、表４に示す。

[0263] 実施例８　表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によるＴＧＦ－βとペプチドとの分子間相互作用評価試験

本実施例では、（１）実施例１－５及び実施例７で合成した配列番号２－３３のアミノ酸配列からなる各種ペプチドについてのＴＧＦ－βへの結合活性を評価するため、また、（２）実施例２で合成した配列番号１３のアミノ酸配列からなるペプチドのＴＧＦ－βの２種類のアイソフォーム（ＴＧＦ－β１、β２）に対する結合活性及び選択性を確認するため、ＴＧＦ－βに対するペプチドの表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）による分子間相互作用を、以下に示す方法によって試験を実施した。具体的な試験方法を以下に示す。

［ＳＰＲ測定］

ＢｉａｃｏｒｅＴ２００（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）にＣＭ３センサーチップ（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を挿入し、ランニング緩衝液：ＨＢＳ－ＥＰ＋（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）でプライム操作を３回実施し、流速３０μＬ／分で平衡化した。

[0264] ６０ｍＭ　ＥＤＣ溶液（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）、６５０ｍＭ　ＮＨＳ溶液（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を各々５０μＬずつ混合させた後、流速１０μＬ／分で４２０秒反応させた。１０ｍＭ酢酸溶液（ｐＨ５．０）で希釈した０．２μＭ　ＴＧＦ－β溶液１５０μＬ調製し、流速１０μＬ／分で４２０秒反応させＣＭ３センサーチップにＴＧＦ－βを固定化した。ＴＧＦ－βは、ヒト由来のＴＧＦ－β１又はβ２（組換えヒトＴＧＦ－β１、２）であり、Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓより入手した。固定化後、１．０Ｍ　エタノールアミン水溶液（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を流速１０μＬ／分で４２０秒反応させキャッピングを行った。

[0265] ＤＭＳＯ溶液中で１０ｍＭに調製されたペプチド溶解液を、終濃度が１０μＭのペプチド溶解液になるようにランニング緩衝液で希釈した後、５０ｎＭ、２５ｎＭ、１２．５ｎＭ、５ｎＭ、２．５ｎＭのペプチド溶液を作製した。上述のサンプルを用い、ＴＧＦ－βに対するペプチドのカイネティクスをＳＰＲ測定により取得した。

[0266] カイネティックス評価モデルは、Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｙｃｌｅ　Ｋｉｎｅｔｉｃｓとし、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｖｅｒｓｉｏｎ　３．０（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を使用してカーブフィッティングを行った。得られたセンサーグラムに対して、最小二乗法によるカーブフィッティングを実施し、そのＫＤ値を求めることで各種ペプチドのＴＧＦ－βに対する結合を評価した。

[0267] （１）配列番号２－３３のアミノ酸配列からなるペプチドのＫＤ値を表２

、表３に示す。表２、表３に示されたとおり、配列番号２－３３のペプチドはＴＧＦ－β１に対する結合能を有することが示された。なお、配列番号３及び配列番号１４のペプチドについては、各々配列番号２及び配列番号１３と環状ペプチド構造を成すアミノ配列が同じでリンカー部位のグリシン付加の有無だけの差異である。それらペプチドのＴＧＦ－β１に対する結合能は、配列番号３のペプチドのＫＤが０．４６ｎＭ、配列番号１４のペプチドのＫＤが０．８２ｎＭであり、グリシンが付加されている配列番号２及び配列番号１３のＫＤとほぼ変わらなかった。これより、本発明のペプチドにリンカーを付加してもＴＧＦ－β１に結合可能であることが示唆された。

[0268] （２）配列番号１３のアミノ酸配列からなるペプチドのＴＧＦ－βの２種類のアイソフォーム（ＴＧＦ－β１、β２）に対するＫＤ値は、ＴＧＦ－β１については表２に記載の通り０．８６ｎＭであった。ＴＧＦ－β２については２．０ｎＭであった。以上の結果より、本発明のペプチドは、ＴＧＦ－β１，２に対し特異的に結合することが示された。

[0269] 実施例９　ＴＧＦ－β阻害活性を評価

本実施例では、実施例１－５及び実施例７で合成した配列番号２－３３のアミノ酸配列からなるペプチドのＴＧＦ－β１阻害活性を、ＳＢＥレポーター－ＨＥＫ２９３細胞系（ＢＰ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いたＳＢＥレポーターアッセイによって、下記の通り評価した。

[0270] また、本発明のペプチドのＴＧＦ－βのアイソフォーム（ＴＧＦ－β１、β２）に対する選択性を確認する為、実施例２で合成した配列番号１３のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて、ＴＧＦ－β１及びＴＧＦ－β２に対する阻害活性を評価した。

[0271] ＳＢＥレポーター－ＨＥＫ２９３細胞を１０％ＦＢＳ（Ｓｉｇｍａ）含むＥ－ＭＥＭ（Ｗａｋｏ）で培養した。アクターゼ（Ａｃｃｕｔａｓｅ）（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　ｃｅｌｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて細胞を剥離後、０．５％ＦＢＳを含むＥ－ＭＥＭに懸濁し１ウェルあたり４５，０００細胞となるように９６穴プレートに播種し、一晩培養した。翌日ペプ

チドを加え２０分静置後、組換えヒトＴＧＦ－β１（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）、組換えヒトＴＧＦ－β２（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を０．１３ｎＭになるように添加し１８時間培養を行った。

[0272] その後、各ウェルにルシフェラーゼアッセイ　ＯＮＥ－Ｇｌｏ試薬を加え５分間振とうした。シグナルの検出にはＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｐａｒａｄｉｇｍ　ｍｕｌｔｉｍｏｄｅ　ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用した。得られたシグナルをＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍで解析し、ＴＧＦ－βで誘導されるシグナルの最大値を０％阻害、無刺激を１００％阻害としてペプチドの阻害活性を算出した。

[0273] 実施例１－５及び実施例７で合成した配列番号２－３３のアミノ酸配列からなるペプチドのＴＧＦ－β１阻害活評価結果を表２、表３に示す。表２、表３に示されたとおり、合成した各種ペプチドはＴＧＦ－β１アンタゴニスト活性を有することが示された。なお、配列番号３及び配列番号１４のペプチドについては、前述のとおり各々配列番号２及び配列番号１３と環状ペプチド構造を成すアミノ配列が同じでリンカー部位のグリシンの有無だけの差異であり、実施例８より結合活性も変わらないため、ＳＢＥレポーターの結果は省略する。

[0274] また、ＴＧＦ－βのアイソフォーム（ＴＧＦ－β１、β２）に対する選択性評価の結果を図１に示す。図１に示されたとおり、実施例２で合成した配列番号１３のアミノ酸配列からなるペプチドはＴＧＦ－β１及びＴＧＦ－β２に対する阻害活性を示した。このことから、本発明の配列番号１３のアミノ酸配列からなるペプチドは、ＴＧＦ－β１だけではなく、ＴＧＦ－β２をも阻害することが示された。

[0275] 実施例１０　ＥＬＩＳＡによるＴＧＦ－βとペプチドとの結合評価

本実施例では、実施例６及び実施例７で合成した配列番号３４－６９のアミノ酸配列からなる各種ペプチドについて、ＴＧＦ－β１との結合を、ＥＬＩＳＡを用いて評価した。配列番号３４－６９のアミノ酸配列からなるペプ

チドのＣ末端リンカーのＧの先にＨＡ－ｔａｇを結合させた。本明細書中、「ＨＡ－ｔａｇ」とは、ＰＥＧ１０ｃ－Ｙ－Ｐ－Ｙ－Ｄ－Ｖ－Ｐ－Ｄ－Ｙ－Ａ（配列番号７０）のアミノ酸配列を意味する。これは、ＥＬＩＳＡによりＴＧＦ－β阻害ペプチドとＴＧＦ－β１との結合を評価する際に必要なアミノ酸配列である。ＴＧＦ－β１との結合活性に影響を及ぼすものでない。

[0276] ＨＡ－ｔａｇを結合させた配列番号３４－６９のアミノ酸配列からなるペプチドと、ＴＧＦ－β１ビーズを用いたＥＬＩＳＡにより、ペプチドとＴＧＦ－β１との結合活性を調べた。

[0277] ＜ＴＧＦ－β１ビーズの作製＞

組換えヒトＴＧＦ－β１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、Ｄｙｎａｂｅａｄ　Ｍ－２７０　Ｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ　Ａｃｉｄ（Ｔｈｅｒｍｏ　ｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に固定化しＴＧＦ－β１ビーズを作製した。固定化反応はＡｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　ｋｉｔ（同仁化学研究所）を用いた。

[0278] ＜ＥＬＩＳＡ＞

ＴＧＦ－β１ビーズとＣ末端にＨＡタグ配列を付加したペプチドを０．１％　Ｔｗｅｅｎ２０（ナカライテスク）を含むＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）中で１時間反応させた後ＰＢＳ－Ｔにより洗浄した。ＴＧＦ－β１ビーズに結合したペプチドを検出する為、１％　ＢＳＡを含むＰＢＳ－Ｔ中でＡｎｔｉ－ＨＡ－ｔａｇ　ｍＡｂ－ＨＲＰ－ＤｉｒｅｃＴ（ＭＢＬ）と前述のＴＧＦ－β１ビーズを３０分反応させた。ＰＢＳＴで洗浄後ＳｕｒｅＢｌｕｅ　ＴＭＢ　Ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）により１０分間発色後ＴＭＢ　ｓｔｏｐ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を添加し発色反応を停止させた。吸光度測定にはＥｎＳｐｉｒｅ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用した。

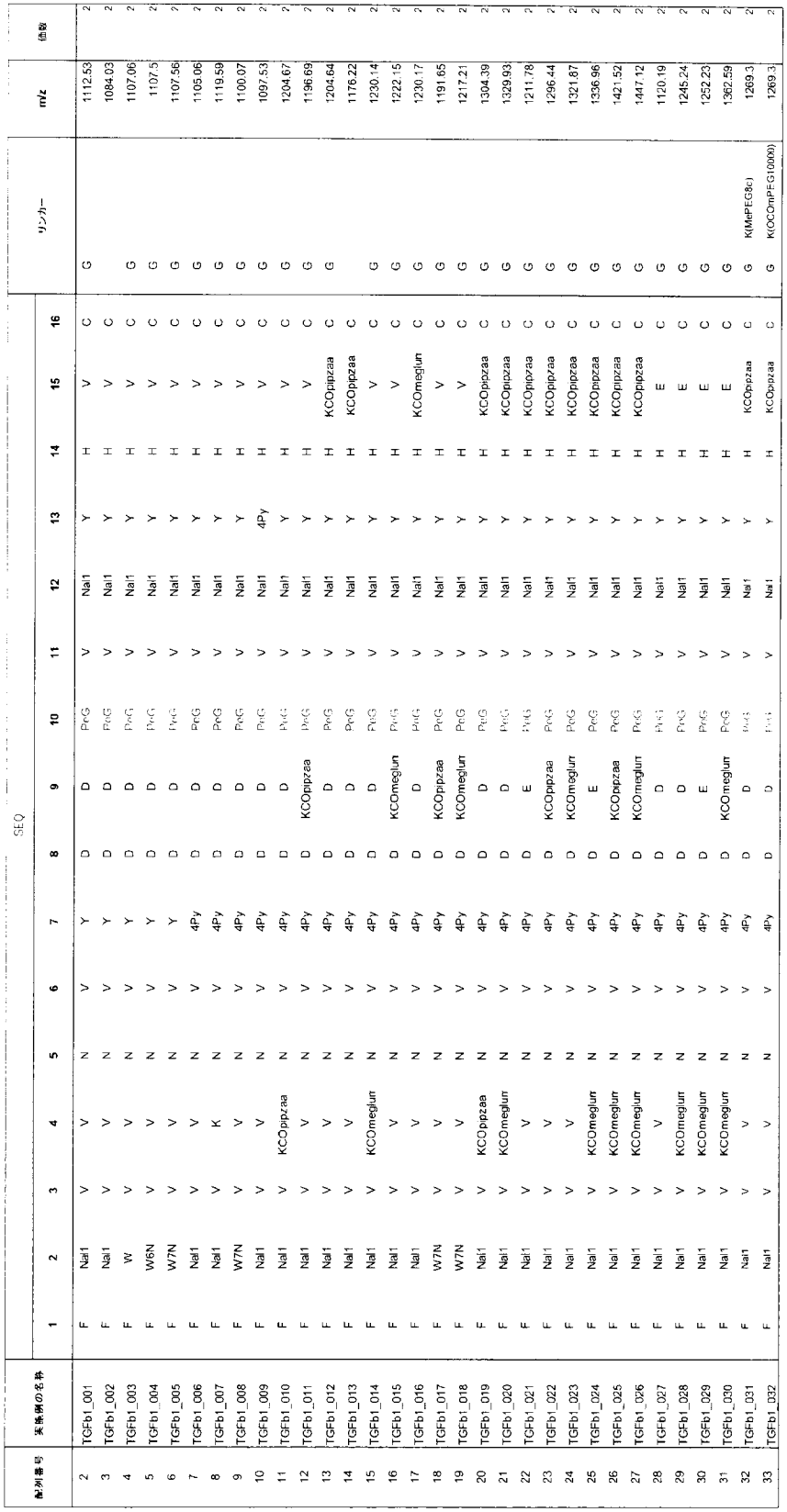
[0279] なお、結合活性はＴＧＦｂ１＿０６１（配列番号６２）のペプチドのＴＧ

Ｆ－β１に対する結合能を１００％としたときの相対値として示した。結果を表４に示す。表４に示されたとおり、配列番号３４－６９のアミノ酸配列からなるペプチドはＴＧＦ－β１に対する結合能を有することが示された。

[0280] 表１　アンタゴニスト活性を示したペプチド配列とＭＳ値（配列番号２～３３）

[0281]

[表1]



配列番号	実施例の名称	SEQ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	リンカー	m/z	価数
2	TGFb1_001	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1112.53	2
3	TGFb1_002	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C		1084.03	2
4	TGFb1_003	F	W	V	V	N	V	Y	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1107.06	2
5	TGFb1_004	F	W6N	V	V	N	V	Y	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1107.5	2
6	TGFb1_005	F	W7N	V	V	N	V	Y	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1107.56	2
7	TGFb1_006	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1105.06	2
8	TGFb1_007	F	Nal1	V	K	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1119.59	2
9	TGFb1_008	F	W7N	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1100.07	2
10	TGFb1_009	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	4Py	H	V	C	G	1097.53	2
11	TGFb1_010	F	Nal1	V	KCOpipzaa	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1204.67	2
12	TGFb1_011	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	KCOpipzaa	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1196.69	2
13	TGFb1_012	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1204.64	2
14	TGFb1_013	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C		1176.22	2
15	TGFb1_014	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1230.14	2
16	TGFb1_015	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	KCOmeglum	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1222.15	2
17	TGFb1_016	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOmeglum	C	G	1230.17	2
18	TGFb1_017	F	W7N	V	V	N	V	4Py	D	KCOpipzaa	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1191.65	2
19	TGFb1_018	F	W7N	V	V	N	V	4Py	D	KCOmeglum	PrG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	1217.21	2
20	TGFb1_019	F	Nal1	V	KCOpipzaa	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1304.39	2
21	TGFb1_020	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1329.93	2
22	TGFb1_021	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	E	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1211.78	2
23	TGFb1_022	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	KCOpipzaa	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1296.44	2
24	TGFb1_023	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	KCOmeglum	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1321.87	2
25	TGFb1_024	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	E	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1336.96	2
26	TGFb1_025	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	KCOpipzaa	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1421.52	2
27	TGFb1_026	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	KCOmeglum	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G	1447.12	2
28	TGFb1_027	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	E	C	G	1120.19	2
29	TGFb1_028	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	E	C	G	1245.24	2
30	TGFb1_029	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	E	PrG	V	Nal1	Y	H	E	C	G	1252.23	2
31	TGFb1_030	F	Nal1	V	KCOmeglum	N	V	4Py	D	KCOmeglum	PrG	V	Nal1	Y	H	E	C	G	1362.59	2
32	TGFb1_031	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G K(MePEG8c)	1269.3	2
33	TGFb1_032	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PrG	V	Nal1	Y	H	KCOpipzaa	C	G K(OCOmPEG10000)	1269.3	2

[0282] 表１の配列番号３２及び３３のｍ／ｚは、各々リンカーであるＫ（ＭｅＰ

ＥＧ８ｃ）、Ｋ（ＯＣＯｍＰＥＧ１０００００）のうち、ＭｅＰＥＧ８ｃ、ＯＣＯｍＰＥＧ１０００００構造の付加前の値である。

[0283] 表２　配列番号２～１９のペプチド配列のＳＰＲ測定結果とアンタゴニスト活性測定結果

[0284] [表2]

配列番号	実施例の名称	KD (nM)	SBE reporter %inhibition			
		(nM) 0.075	0.75	7.5	75.0	
2	TGFb1_001	0.55	19.7	69.7	98.1	100.6
4	TGFb1_003	0.72	1.6	65.2	97.3	98.8
5	TGFb1_004	1.49	0.0	0.9	70.1	94.9
6	TGFb1_005	1.15	0.4	47.0	90.8	98.9
7	TGFb1_006	1.03	2.8	69.3	97.1	99.7
8	TGFb1_007	2.70	0.1	37.5	83.5	96.7
9	TGFb1_008	4.64	3.8	56.8	94.6	98.4
10	TGFb1_009	0.58	2.7	53.0	94.8	99.6
11	TGFb1_010	0.90	2.0	63.8	97.9	99.9
12	TGFb1_011	0.62	6.1	76.3	97.9	100.0
13	TGFb1_012	0.86	10.1	65.2	96.0	99.5
15	TGFb1_014	0.66	0.0	64.8	97.2	98.8
16	TGFb1_015	0.59	0.0	76.9	98.7	98.4
17	TGFb1_016	0.97	6.1	61.0	97.6	100.2
18	TGFb1_017	1.07	21.7	60.2	97.2	100.0
19	TGFb1_018	1.42	22.2	61.0	97.6	99.9

[0285] 表３　配列番号２０－３３のペプチド配列のＳＰＲ測定結果とアンタゴニスト活性測定結果

[0286] [表3]

配列番号	実施例の名称	KD (nM)	SBE reporter %inhibition					
		(nM) 0.062	0.185	0.56	1.7	5.0	15.0	
13	TGFb1_012	0.86	4.18	19.75	48.37	80.93	94.42	98.68
20	TGFb1_019	1.41	5.21	11.33	30.18	61.64	87.75	96.36
21	TGFb1_020	1.26	8.50	15.76	36.31	70.43	89.30	96.94
22	TGFb1_021	1.37	10.20	26.85	58.89	87.77	97.12	98.85
23	TGFb1_022	0.91	6.49	20.84	53.76	85.23	97.14	99.48
24	TGFb1_023	1.04	8.58	24.45	49.71	82.35	95.98	99.52
25	TGFb1_024	1.04	5.79	16.65	45.05	80.24	95.55	98.87
26	TGFb1_025	0.83	4.81	18.38	43.34	77.51	94.70	99.42
27	TGFb1_026	1.03	6.85	17.80	41.38	74.29	93.39	98.04
28	TGFb1_027	1.11	2.53	9.14	28.41	59.38	84.91	95.51
29	TGFb1_028	1.31	0.94	6.17	20.36	47.63	73.91	91.72
30	TGFb1_029	0.94	11.97	16.91	32.43	63.66	85.78	96.75
31	TGFb1_030	1.13	10.88	14.30	29.95	52.55	80.82	95.25
32	TGFb1_031	0.91	9.29	20.14	51.88	84.94	96.73	99.09
33	TGFb1_032	3.08	2.67	7.18	1.11	4.77	53.99	91.32

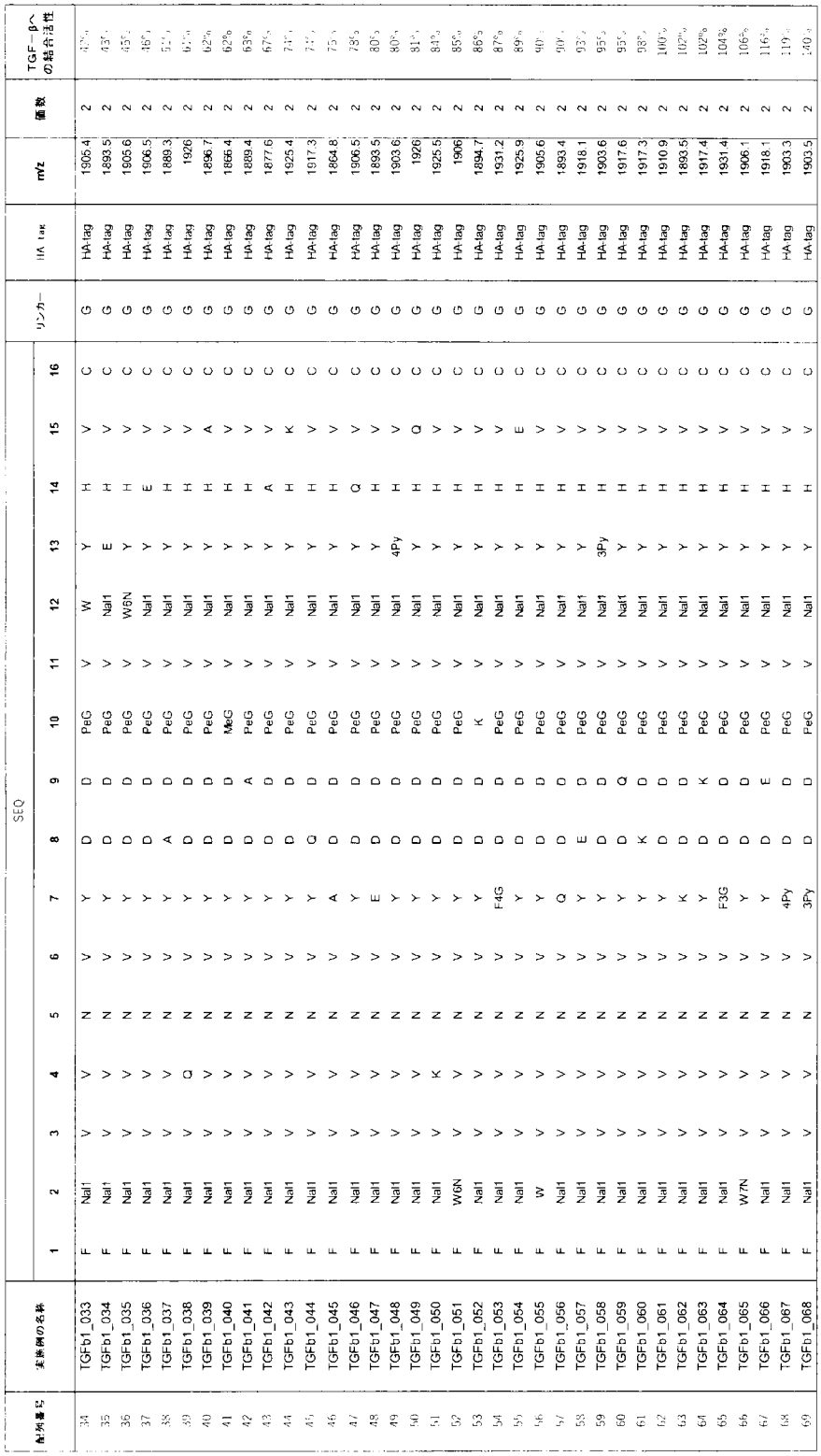
[0287] 表２及び表３のＳＢＥ　ｒｅｐｏｒｔｅｒの欄の下の濃度（ｎＭ）は、実

際の測定に使用したペプチドの濃度を記載している。

[0288] 表４　アンタゴニスト活性は測定していないが、ＴＧＦ－βへの結合活性を示したペプチド配列、ＭＳ値、ＴＧＦ－βへの結合活性測定結果（配列番号３４～６９）

[0289]

[表4]



配列番号	実施例の名称	SEQ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	リンカー	HA tag	m/z	価数	TGF－βへの結合活性
34	TGFb1_033	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	W	Y	H	V	C	G	HA-tag	1905.4	2	[illegible]
35	TGFb1_034	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	E	H	V	C	G	HA-tag	1893.5	2	43%
36	TGFb1_035	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	W6N	Y	H	V	C	G	HA-tag	1905.6	2	45%
37	TGFb1_036	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	E	V	C	G	HA-tag	1906.5	2	16%
38	TGFb1_037	F	Nal1	V	V	N	V	Y	A	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1889.3	2	51%
39	TGFb1_038	F	Nal1	V	V	Q	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1926	2	62%
40	TGFb1_039	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	MEG	V	Nal1	Y	H	A	C	G	HA-tag	1896.7	2	62%
41	TGFb1_040	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1866.4	2	63%
42	TGFb1_041	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	A	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1889.4	2	67%
43	TGFb1_042	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	A	V	C	G	HA-tag	1877.6	2	71%
44	TGFb1_043	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	K	C	G	HA-tag	1925.4	2	71%
45	TGFb1_044	F	Nal1	V	V	N	V	Y	Q	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.3	2	71%
46	TGFb1_045	F	Nal1	V	V	N	V	A	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1864.8	2	75%
47	TGFb1_046	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	Q	V	C	G	HA-tag	1906.5	2	78%
48	TGFb1_047	F	Nal1	V	V	N	V	E	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1893.5	2	80%
49	TGFb1_048	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	4Py	H	V	C	G	HA-tag	1903.6	2	80%
50	TGFb1_049	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	Q	C	G	HA-tag	1926	2	81%
51	TGFb1_050	F	Nal1	V	K	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1925.5	2	81%
52	TGFb1_051	F	W6N	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1906	2	85%
53	TGFb1_052	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	K	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1894.7	2	86%
54	TGFb1_053	F	Nal1	V	V	N	V	F4G	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1931.2	2	87%
55	TGFb1_054	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	E	C	G	HA-tag	1925.9	2	89%
56	TGFb1_055	F	W	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1905.6	2	90%
57	TGFb1_056	F	Nal1	V	V	N	V	Q	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1893.4	2	90%
58	TGFb1_057	F	Nal1	V	V	N	V	Y	E	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1918.1	2	93%
59	TGFb1_058	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	3Py	H	V	C	G	HA-tag	1903.6	2	95%
60	TGFb1_059	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	Q	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.6	2	95%
61	TGFb1_060	F	Nal1	V	V	N	V	Y	K	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.3	2	98%
62	TGFb1_061	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1910.9	2	100%
63	TGFb1_062	F	Nal1	V	V	N	V	K	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1893.5	2	102%
64	TGFb1_063	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	K	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1917.4	2	102%
65	TGFb1_064	F	Nal1	V	V	N	V	F3G	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1931.4	2	104%
66	TGFb1_065	F	W7N	V	V	N	V	Y	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1906.1	2	106%
67	TGFb1_066	F	Nal1	V	V	N	V	Y	D	E	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1918.1	2	116%
68	TGFb1_067	F	Nal1	V	V	N	V	4Py	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1903.3	2	119%
69	TGFb1_068	F	Nal1	V	V	N	V	3Py	D	D	PEG	V	Nal1	Y	H	V	C	G	HA-tag	1903.5	2	140%

[0290] 表４のＴＧＦ－βへの結合活性は、ＴＧＦｂ１＿０６１（配列番号６２）のペプチドのＴＧＦ-β１に対する結合能を１００％とした時の相対値として

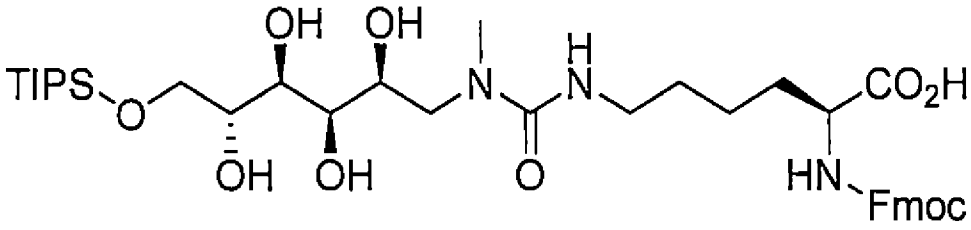
示した。

参考例　新規非天然アミノ酸の合成

本参考例は、本発明のペプチドに含まれる非天然アミノ酸の合成を示す。

[0291]　ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅの合成

[0292] [化18]



[0293]　Ｎ２－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ］カルボニル｝－Ｌ－リジン－２－プロペン－１－イルエステル塩酸塩（８．００ｇ、１７．９８ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（８０ｍＬ）溶液に、トリホスゲン（２．６７ｇ、８．９９ｍｍｏｌ）を氷冷下で加えた後、ＤＩＥＡ（１０．１ｍＬ，５７．５ｍｍｏｌ）を滴下し、氷冷下で３０分攪拌した。反応液にジオキサン（８０ｍＬ）を加えた後、メグルミン（１４．０ｇ、７１．９ｍｍｏｌ）含有０．５ｍｏｌ／Ｌ炭酸水素ナトリウム水溶液（８０ｍＬ）を加えた。反応液を終夜氷冷下で攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、有機層を水、０．５ｍｏｌ／Ｌクエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。その溶液を濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（ジクロロメタン／メタノール＝１００／０－６０／４０）、所望の生成物（８．７０ｇ、１３．８２ｍｍｏｌ）を白色アモルファスとして得た。

[0294]　得られた生成物（８．７０ｇ、１３．８２ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（１００ｍＬ）に溶かし、氷冷下でイミダゾール（２．３５ｇ、３４．５ｍｍｏｌ）、トリイソプロピルクロロシラン（３．３３ｇ、１７．２７ｍｍｏｌ）を加え、室温で５日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水で３回洗浄した。抽出層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮

した。

[0295] 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（酢酸エチル／ヘキサン＝０／１００－６０／４０　その後ジクロロメタン／メタノール＝１００／０－９０／１０）、所望の生成物（９．３０ｇ、１１．８３ｍｍｏｌ）を白色アモルファスとして得た。

[0296] 得られた生成物（１０．４ｇ、１３．２３ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（５０ｍＬ）に溶かし、フェニルシラン（３．３ｍＬ、２６．５ｍｍｏｌ）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）（０．３８ｇ、０．３３１ｍｍｏｌ）を加え室温で２時間攪拌した。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（酢酸エチル／ヘキサン＝０／１００－６０／４０　その後ジクロロメタン／メタノール＝１００／０－９０／１０）、表記物質（７．７ｇ、１０．３ｍｍｏｌ）を得た。

[0297] ＥＳＩ－ＭＳ（＋）　観測値ｍ／ｚ＝７４６．６　$(M+H)^+$

産業上の利用可能性

[0298] 本発明に係るペプチドは、ＴＧＦ－βに対し結合活性を有し、そして、好ましくは、ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する。がんや肝疾患等の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等としての利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] 以下のアミノ酸配列：

Ｆ－Ｎａｌ１－Ｖ－Ｖ－Ｎ－Ｖ－Ｙ－Ｄ－Ｄ－ＰｅＧ－Ｖ－Ｎａｌ１－Ｙ－Ｈ－Ｖ－Ｃ－Ｇ（配列番号２）；

あるいは、

上記のアミノ酸配列の２番目、４番目、７番目、８番目、９番目、１０番目、１２番目、１３番目、１４番目、１５番目及び１７番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、１－１１個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列を含む、ペプチド。

[請求項2] 以下のアミノ酸配列：

Ｆ－Ｘ１－Ｖ－Ｘ２－Ｎ－Ｖ－Ｘ３－Ｘ４－Ｘ５－Ｘ６－Ｖ－Ｘ７－Ｘ８－Ｘ９－Ｘ１０－Ｃ（配列番号１）

ここにおいて、

Ｘ１は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ２は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ３は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ４は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ５は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ６は、側鎖に置換されていてもよいアルキル基を有するアミノ酸、又は置換されていてもよいアルキル基を有する二級アミノ酸であり；

Ｘ７は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ８は、側鎖に置換されていてもよい芳香族環を有するアミノ酸であり；

Ｘ９は、任意のアミノ酸であり；

Ｘ１０は、任意のアミノ酸である、

を含む、ペプチド。

[請求項3] Ｘ１が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸である、請求項２に記載のペプチド。

[請求項4] Ｘ１が、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、Ｗ７Ｎ又はWである、請求項２に記載のペプチド。

[請求項5] Ｘ２が、Ｖ、Ｋ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ又はＱである、請求項２－４のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項6] Ｘ２が、Ｖ、Ｋ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、又はＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅである、請求項２－４のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項7] Ｘ３が、Ｙ、４Ｐｙ、Ａ、Ｅ、Ｆ４Ｇ、Ｑ，Ｋ、Ｆ３Ｇ、又は３Ｐｙである、請求項２－６のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項8] Ｘ３が、Ｙ又は４Ｐｙである、請求項２－６のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項9] Ｘ４が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項２－８のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項10] Ｘ４が、Ｄ、Ａ、Ｑ、Ｋ又はＥである、請求項２－８のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項11] Ｘ５が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項２－１０のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項12] Ｘ５が、Ｄ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、Ａ、Ｑ、又はＫである、請求項２－１０のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項13] Ｘ６が、ＰｅＧ、Ｋ又はＭｅＧである、請求項２－１２のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項14] Ｘ７が、側鎖に置換されていてもよい縮合環を有するアミノ酸であ

る、請求項２－１３のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項15] Ｘ７が、Ｎａｌ１、Ｗ６Ｎ、又はWである、請求項２－１３のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項16] Ｘ８が、Ｙ、４Ｐｙ、３Ｐｙ又はＥである、請求項２－１５のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項17] Ｘ８が、Ｙ又は４Ｐｙである、請求項２－１５のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項18] Ｘ９が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項２－１７のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項19] Ｘ９が、Ｈ、Ａ、Ｑ又はＥである、請求項２－１７のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項20] Ｘ１０が、置換若しくは未置換の芳香族アミノ酸及び含硫アミノ酸、以外のアミノ酸である、請求項２－１９のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項21] Ｘ１０が、Ｖ、Ｅ、ＫＣＯｐｉｐｚａａ、ＫＣＯｍｅｇｌｕｍｉｎｅ、Ｑ、Ｋ，又はＡである、請求項２－１９のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項22] 配列番号２－３３、あるいは、

配列番号２、４－１３、１５－３３のうちＣ末端のグリシン（Ｇ）を有しないアミノ酸配列

のいずれかに１つのアミノ酸配列を含む、又は、からなる、請求項１－２１のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項23] 前記ペプチドが、環状ペプチドである、請求項１－２２のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項24] クロロアセチル化したアミノ酸と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する、請求項２３に記載の環状ペプチド。

[請求項25] さらに、付加的なアミノ酸残基を含む、請求項１－２４のいずれか１項に記載のペプチド。

[請求項26] そのＣ末端にリンカーを含む、請求項１－２１、２３－２５のいずれか１項に記載のペプチド。

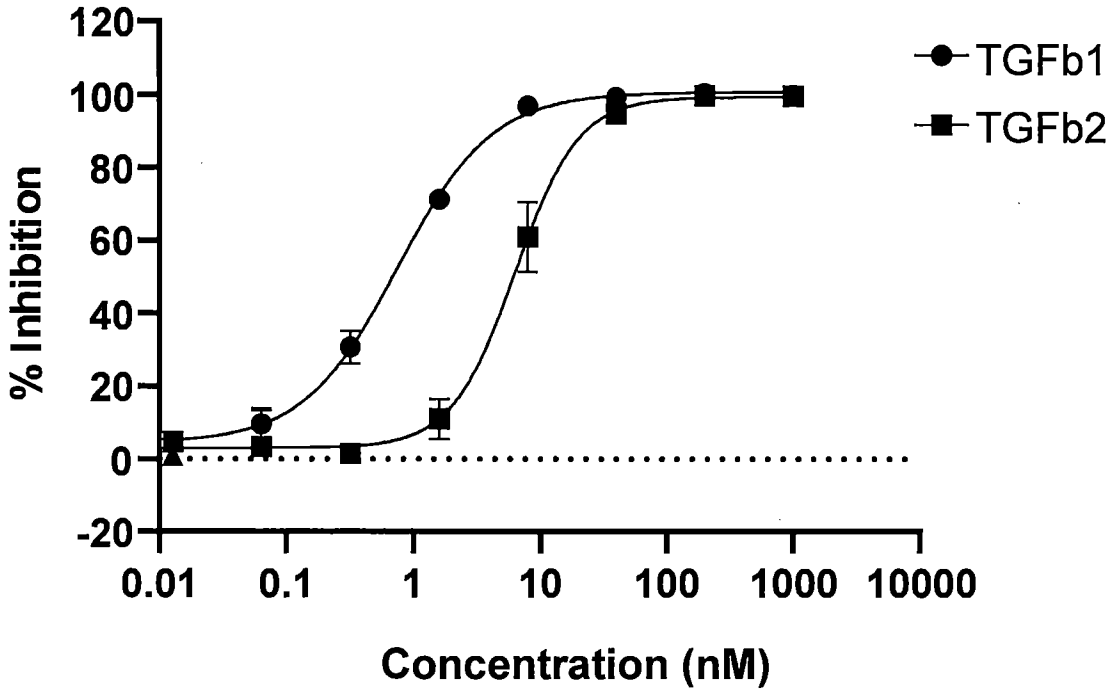
[請求項27] ＴＧＦ－β結合活性を有する、請求項１－２６いずれか１項に記載のペプチド。

[請求項28] ＴＧＦ－βアンタゴニスト活性を有する、請求項１－２７いずれか１項に記載のペプチド。

[請求項29] 請求項１－２８のいずれか１項に記載のペプチドを含む、医療用、診断用組成物。

[請求項30] 請求項１－２８のいずれか１項に記載のペプチドを含む、研究用組成物であって、ただし、オルガノイドを培養するための培地への添加剤として使用される組成物は除く、前記研究用組成物。

[図1]


120
100
80
60
40
20
0
-20
% Inhibition
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentration (nM)
TGFb1
TGFb2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/036850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08(2006.01)i; ***A61K 38/10***(2006.01)i; ***A61K 38/12***(2006.01)i; ***A61P 9/10***(2006.01)i; ***A61P 13/12***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C07K 7/54***(2006.01)i
FI: C07K7/08 ZNA; A61K38/10; A61K38/12; A61P9/10; A61P13/12; A61P35/00; A61P43/00; C07K7/54

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)

C07K7/08; A61K38/10; A61K38/12; A61P9/10; A61P13/12; A61P35/00; A61P43/00; C07K7/54

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 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-502644 A (GENZYME CORPORATION) 29 January 2004 (2004-01-29) entire text	1-30

☐ 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
18 October 2022	**01 November 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/036850

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/036850

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2004-502644 A	29 January 2004	WO 2001/066140 A1 entire text	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/036850

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 7/08(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 38/12(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 7/54(2006.01)i
FI: C07K7/08 ZNA; A61K38/10; A61K38/12; A61P9/10; A61P13/12; A61P35/00; A61P43/00; C07K7/54

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））

C07K7/08; A61K38/10; A61K38/12; A61P9/10; A61P13/12; A61P35/00; A61P43/00; C07K7/54

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	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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）

CAplus/REGISTRY (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
A	JP 2004-502644 A (ジェンザイム、コーポレーション) 29.01.2004 (2004-01-29) 全文	1-30

☐ 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
18.10.2022	01.11.2022

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）
長谷川　強 4N 1783
電話番号 03-3581-1101 内線 3446

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/036850

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:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

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/JP2022/036850

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2004-502644 A	29.01.2004	WO 2001/066140 A1 全文	