



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113993880 A

(43) 申请公布日 2022.01.28

(21) 申请号 202080042692.X

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22) 申请日 2020.06.08

代理人 王灵菇

(30) 优先权数据

2019-108953 2019.06.11 JP

(51) Int.Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 7/08 (2006.01)

2021.12.10

C12M 3/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 5/02 (2006.01)

PCT/IP2020/022559 2020.06.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/250855 JA 2020.12.17

(71) 申请人 富士胶片株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 南高一

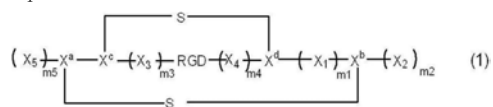
权利要求书3页 说明书35页
序列表40页

(54) 发明名称

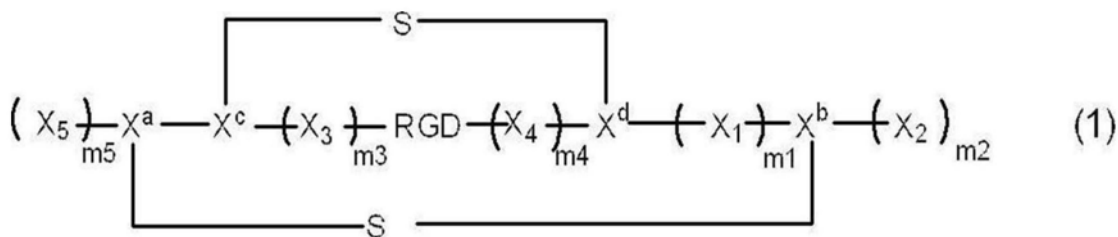
环肽、细胞支架材料、细胞分离材料及培养基

(57) 摘要

环肽具有由下述式(1)表示的氨基酸序列。式中, X^a 及 X^b 以及 X^c 及 X^d 分别独立地表示经由硫醚键交联的氨基酸残基, $X_1 \sim X_5$ 分别独立地表示氨基酸残基, R表示精氨酸残基, G表示甘氨酸残基, D表示天冬氨酸残基, $m_1 \sim m_5$ 分别独立地表示0以上的整数。其中, 由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_5 表示的氨基酸残基的总数为7~16。



1. 一种环肽,其具有下述由式(1)表示的氨基酸序列,
[化学式编号1]



式(1)中, X^{a} 及 X^{b} 以及 X^{c} 及 X^{d} 分别独立地表示经由硫醚键交联的氨基酸残基,
 $\text{X}_1 \sim \text{X}_5$ 分别独立地表示氨基酸残基,
R表示精氨酸残基,G表示甘氨酸残基,D表示天冬氨酸残基,
 $\text{m}_1 \sim \text{m}_5$ 分别独立地表示0以上的整数,其中,由 X^{a} 、 X^{b} 、 X^{c} 及 X^{d} 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~16。

2. 根据权利要求1所述的环肽,其中,

所述式(1)中的 X_2 及 X_5 含有源自侧链上具有固定化官能团的氨基酸的氨基酸残基。

3. 根据权利要求2所述的环肽,其中,

所述固定化官能团是氨基或硫醇基。

4. 根据权利要求2或3所述的环肽,其中,

所述侧链上具有固定化官能团的氨基酸是选自由L-赖氨酸、D-赖氨酸、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸、L-高半胱氨酸及D-高半胱氨酸组成的组中的至少一种氨基酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的环肽,其中,

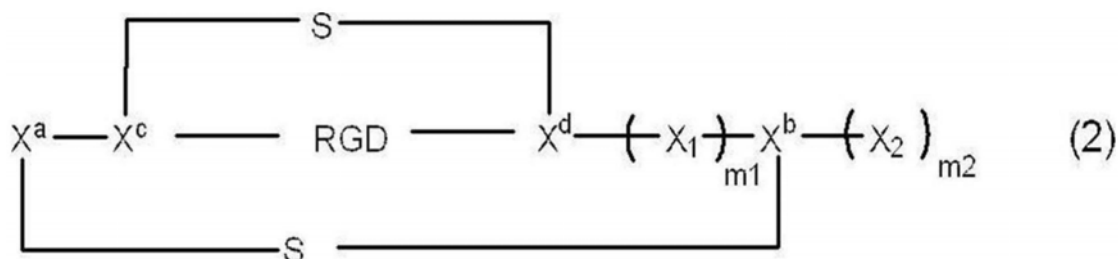
所述式(1)中的 X^{c} 及 X^{d} 中的任一个是源自选自由(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸及N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基,另一个是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的环肽,其中,

所述式(1)中的 X^{b} 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的环肽,其中,

所述由式(1)表示的氨基酸序列是下述由式(2)表示的氨基酸序列,
[化学式编号2]



式(2)中, X^{a} 及 X^{b} 以及 X^{c} 及 X^{d} 分别独立地表示经由硫醚键交联的氨基酸残基,
 X_1 及 X_2 分别独立地表示氨基酸残基,

R表示精氨酸残基,G表示甘氨酸残基,D表示天冬氨酸残基,m1及m2分别独立地表示1以上的整数,其中,由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~14。

8. 根据权利要求7所述的环肽,其中,

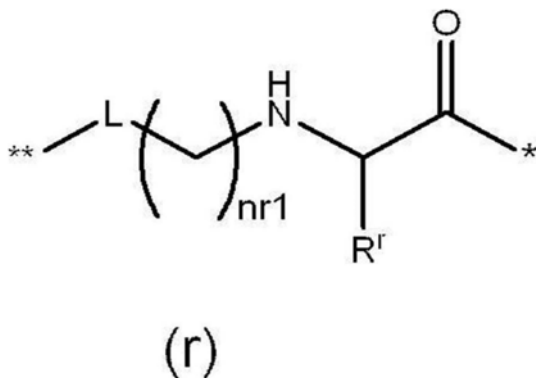
所述式(2)中的 X^c 及 X^d 中的任一个是源自选自(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸及N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸组成的组中的侧链上具有乙酰基的氨基酸的氨基酸残基,另一个是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

9. 根据权利要求7或8所述的环肽,其中,

所述式(2)中的 X^b 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

10. 根据权利要求7至9中任一项所述的环肽,其中,

所述式(2)中的 X^a 是下述由结构式(r)表示的氨基酸残基,
[化学式编号3]



结构式(r)中, R^r 表示氢原子或1价的有机基团,L表示由 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的2价的连结基团, $L1$ 表示0以上且10以下的整数, $nr1$ 表示0以上的整数,*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置,**表示与硫醚键中的硫原子的键合位置。

11. 根据权利要求7至10中任一项所述的环肽,其中,

所述式(2)中的 X^b 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基, X^a 是源自选自(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸及(2S,3S)-2-[(乙酰基)氨基]-3-甲基-戊酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的环肽,其中,

X^a 是源自乙酰基与 α 碳键合而成的任意的氨基酸的氨基酸残基, X^b 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^c 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^d 是源自N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基或源自N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基, $(X_1)_{m1}$ 整体为F,或

X^a 是源自乙酰基与 α 碳键合而成的任意的氨基酸的氨基酸残基, X^b 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^c 是源自N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基或源自N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基

酸残基, X^d 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, $(X_1)_{m1}$ 整体为 F。

13. 一种细胞支架材料, 其包含:

权利要求1至12中任一项所述的环肽; 及
基材。

14. 一种细胞分离材料, 其包含:

权利要求1至12中任一项所述的环肽; 及
保持材料。

15. 一种培养基, 其含有:

权利要求1至12中任一项所述的环肽; 及
培养成分。

环肽、细胞支架材料、细胞分离材料及培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及一种环肽、细胞支架材料、细胞分离材料及培养基。

背景技术

[0002] 整联蛋白是细胞粘附分子,是由 α 链和 β 链的两个亚基组成的异质二聚体的蛋白质。整联蛋白不仅对细胞粘附发挥作用,还发挥与细胞伸展、细胞移动、细胞增殖、组织形成、癌症转移、组织修复、血液凝固等相关的重要作用。

[0003] 作为以往的环肽,已知有一种日本特表2005-507376号公报及日本特表平6-509551号公报以及Bioconjugate Chem,1995,6,p.269-277中记载的环肽。日本特表2005-507376号公报中公开了一种通过与整联蛋白键合的二硫化物键进行环状化的环肽。对整联蛋白具有亲和性的环肽还已知例如,日本特表平6-509551号公报中作为血小板凝聚抑制剂,记载了使Tyr-Arg-Gly-Asp环状化的环肽作为对Gp II_bIII_a具有高特异性的血小板凝聚抑制剂。并且,Bioconjugate Chem,1995,6,p.269-277中记载了使用(溴乙酰基)二氨基丙酸进行肽的环化和/或与载体蛋白质或玻璃盖滑片的键合的技术。

发明内容

[0004] 发明要解决的技术课题

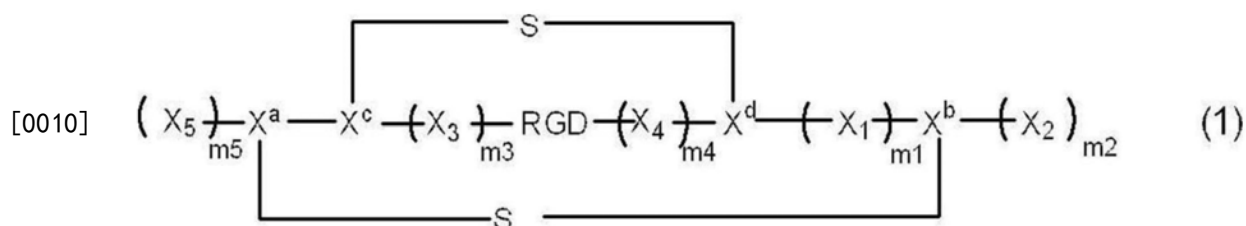
[0005] 本发明的一实施方式要解决的课题在于,提供一种整联蛋白键合性优异,且分子稳定性,例如耐碱性优异的环肽、以及含有上述环肽的细胞支架材料、细胞分离材料及培养基。

[0006] 用于解决技术课题的手段

[0007] 用于解决上述课题的方案包括以下方式。

[0008] <1>一种环肽,其具有由下述式(1)表示的氨基酸序列。

[0009] [化学式编号1]



[0011] 式(1)中, X^a 及 X^b 以及 X^c 及 X^d 分别独立地表示经由硫醚键交联的氨基酸残基,

[0012] $X_1 \sim X_5$ 分别独立地表示氨基酸残基,

[0013] R表示精氨酸残基,G表示甘氨酸残基,D表示天冬氨酸残基, $m_1 \sim m_5$ 分别独立地表示0以上的整数。其中,由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~16。

[0014] <2>根据<1>所述的环肽,其中,上述式(1)中的 X_2 及 X_5 含有源自侧链上具有固定化官能团的氨基酸的氨基酸残基。

[0015] <3>根据<2>所述的环肽,其中,上述固定化官能团是氨基或硫醇基。

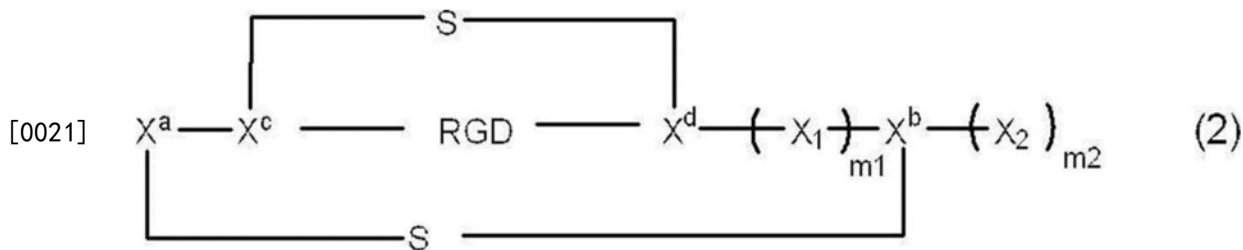
[0016] <4>根据<2>或<3>所述的环肽,其中,上述侧链上具有固定化官能团的氨基酸是选自由L-赖氨酸、D-赖氨酸、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸、L-高半胱氨酸及D-高半胱氨酸组成的组中的至少一种氨基酸。

[0017] <5>根据<1>至<4>中任一个所述的环肽,其中,上述式(1)中的 X^c 及 X^d 中的任一个是源自选自由(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸及N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基,另一个是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

[0018] <6>根据<1>至<5>中任一个所述的环肽,其中,上述式(1)中的 X^b 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

[0019] <7>根据<1>至<6>中任一个所述的环肽,其中,由上述式(1)表示的氨基酸序列是由下述式(2)表示的氨基酸序列。

[0020] [化学式编号2]



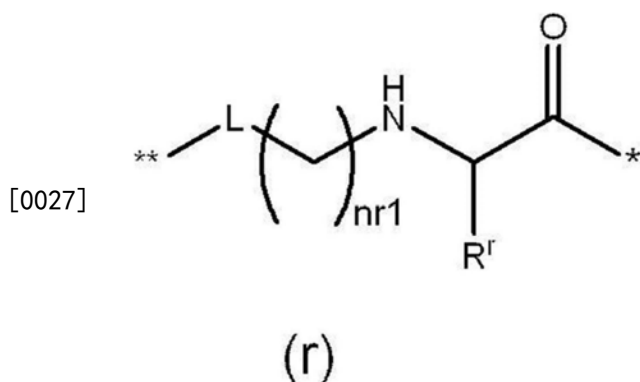
[0022] 式(2)中, X^a 及 X^b 以及 X^c 及 X^d 分别独立地表示经由硫醚键交联的氨基酸残基, X_1 及 X_2 分别独立地表示氨基酸残基,R表示精氨酸残基,G表示甘氨酸残基,D表示天冬氨酸残基, m_1 及 m_2 分别独立地表示1以上的整数。其中,由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~14。

[0023] <8>根据<7>所述的环肽,其中,上述式(2)中的 X^c 及 X^d 中的任一个是源自选自由(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸及N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸组成的组中的侧链上具有乙酰基的氨基酸的氨基酸残基,另一个是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

[0024] <9>根据<7>或<8>所述的环肽,其中,上述式(2)中的 X^b 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基。

[0025] <10>根据<7>至<9>中任一个所述的环肽,其中,上述式(2)中的 X^a 是由下述结构式(r)表示的氨基酸残基。

[0026] [化学式编号3]



[0028] 结构式 (r) 中, R^r 表示氢原子或 1 价的有机基团, L 表示由 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的 2 价的连结基团, $L1$ 表示 0 以上且 10 以下的整数, $nr1$ 表示 0 以上的整数, $*$ 表示与相邻的氨基酸残基的键合位置, $**$ 表示与硫醚键中的硫原子的键合位置。

[0029] $\langle 11 \rangle$ 根据 $\langle 7 \rangle$ 至 $\langle 10 \rangle$ 中任一个所述的环肽, 其中, 上述式 (2) 中的 X^b 是源自 L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或 D-青霉胺的氨基酸残基, X^a 是源自选自 (2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸及 (2S,3S)-2-[(乙酰基)氨基]-3-甲基-戊酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基。

[0030] $\langle 12 \rangle$ 根据 $\langle 1 \rangle$ 至 $\langle 11 \rangle$ 中任一个所述的环肽, 其中, X^a 是源自乙酰基与 α 碳键合而成的任意的氨基酸的氨基酸残基, X^b 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^c 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^d 是源自 N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基或源自 N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基, $(X_1)_{m1}$ 整体为 F, 或

[0031] X^a 是源自乙酰基与 α 碳键合而成的任意的氨基酸的氨基酸残基, X^b 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^c 是源自 N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基或源自 N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基, X^d 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, $(X_1)_{m1}$ 整体为 F。

[0032] $\langle 13 \rangle$ 一种细胞支架材料, 其包含: $\langle 1 \rangle$ 至 $\langle 12 \rangle$ 中任一个所述的环肽; 及基材。

[0033] $\langle 14 \rangle$ 一种细胞分离材料, 其包含: $\langle 1 \rangle$ 至 $\langle 12 \rangle$ 中任一个所述的环肽; 及保持材料。

[0034] $\langle 15 \rangle$ 一种培养基, 其含有: $\langle 1 \rangle$ 至 $\langle 12 \rangle$ 中任一个所述的环肽; 及培养成分。

[0035] 发明效果

[0036] 根据本发明的实施方式, 提供一种整联蛋白键合性优异, 且分子稳定性, 例如耐碱性优异的环肽、以及含有上述环肽的细胞支架材料、细胞分离材料及培养基。

具体实施方式

[0037] 以下, 对本发明的内容进行详细说明。有时根据本发明的代表性实施方式来说明以下记载的构成要件, 但本发明并不限于这种实施方式。

[0038] 在本发明中, 使用“~”表示的数值范围表示将记载于“~”前后的数值分别作为最小值及最大值而包含的范围。

[0039] 在本发明中阶段性地记载的数值范围中, 在某个数值范围中记载的上限值或下限值可以替换为其他阶段性的记载的数值范围的上限值或下限值。并且, 在本发明中记载的

数值范围中,在某个数值范围中记载的上限值或下限值也可以替换为在实施例中所示的值。

[0040] 在本发明中,两个以上的优选的方式的组合为更优选的方式。

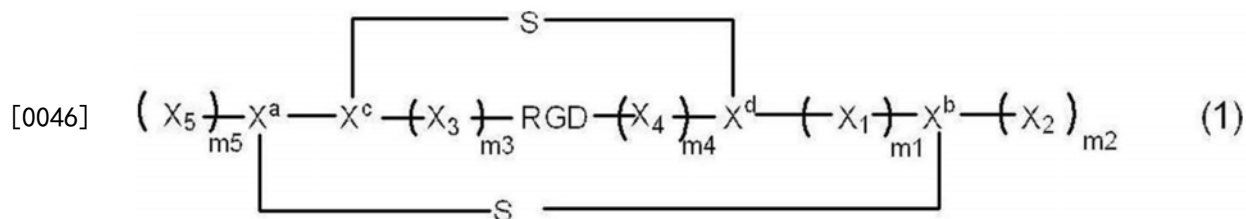
[0041] 在本发明中,在存在多种对应于各成分的物质(例如,同位素)的情况下,只要没有特别说明,则各成分的量是指多种物质的总量。

[0042] 在本发明中,术语“工序”不仅包括独立的工序,只要可实现工序的所期望的目的,还包括无法与其他工序明确区分的工序。

[0043] (环肽)

[0044] 本发明所涉及的环肽具有由下述式(1)表示的氨基酸序列(以下,也称为“特定氨基酸序列”)。

[0045] [化学式编号4]



[0047] 式(1)中, X^a 及 X^b 以及 X^c 及 X^d 分别独立地表示经由硫醚键键合的氨基酸残基, $X_1 \sim X_5$ 分别独立地表示氨基酸残基, R表示精氨酸残基, G表示甘氨酸残基, D表示天冬氨酸残基, $m_1 \sim m_5$ 分别独立地表示0以上的整数。其中, 由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基的总数为7~16。

[0048] 具有整联蛋白键合性的环肽(以下,也称为“整联蛋白键合性环肽”。)对细胞表面的细胞形质膜中的整联蛋白具有键合能力。整联蛋白是细胞粘附分子之一,由于整联蛋白键合性环肽与细胞表面的整联蛋白键合,因此整联蛋白键合性环肽能够在用于细胞培养的支架材料、用于分离细胞的细胞分离材料、各种细胞培养培养基等中使用等,是有用的分子。然而,环肽与直链肽相比,例如有时对整联蛋白等细胞粘附分子具有高键合性及特异性,另一方面,环肽的分子稳定性具有比直链肽低的倾向。

[0049] 并且,例如,环肽具有耐碱性;耐酸性;对X射线、 γ 射线等活化光线的耐性等低的倾向。整联蛋白键合性环肽由于分子稳定性低,因此长期使用或反复使用期间分解,也无法长期得到所期望的效果。而且,环肽并不总是具有比直链肽高的键合性,并且根据环肽所具有的氨基酸序列而整联蛋白键合性发生变化,因此不容易得到在环肽中分子稳定性和整联蛋白键合性这两者优异的整联蛋白键合性环肽。

[0050] 因此,发明人进行深入研究,结果发现,具有特定的氨基酸序列,且具有特定的结构的环肽的分子稳定性及整联蛋白键合性这两者优异。其理由尚不明确,但推测如下。

[0051] 本发明所涉及的特定结构的环肽在氨基酸序列中的特定的位置包括两个氨基酸残基通过硫醚键交联的环状位置(以下,有时也称为“环状链段”。),且将由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基及RGD的总氨基酸残基数设为7~14,由此由两个环状位置保持RGD序列,即两个环状位置将RGD序列保持为嵌套状。并且,由于日本特表2005-507376号公报等中记载的环肽所具有的二硫化物键是准共价键,因此通过培养基等中所包含的还原剂等容易地切断二硫化物键,因此无法得到充分的分子稳定性,与此相对,作为共价键的硫

醚键与二硫化物键相比稳定性更优异,因此推测本发明所涉及的环肽例如对耐碱性的分子稳定性优异,且整联蛋白键合性也优异。

[0052] 以下,对本发明所涉及的环肽的细节进行说明。

[0053] <氨基酸及氨基酸残基>

[0054] 在本发明中,氨基酸原则上使用由基于国际纯化学与应用化学联盟和国际生物化学与分子生物学联盟的共同命名委员会 (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY and INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)) 采用的名称、缩写等来表示。并且,氨基酸残基使用衍生该氨基酸残基的氨基酸的缩写来表示。

[0055] 在本发明中,只要没有特别说明,肽或蛋白质的氨基酸序列(也称为“1级结构”)从左端到右端,以成为从N末端到C末端的方式排列1列氨基酸残基来表示。在包括位置在内确定肽或蛋白质的氨基酸序列中的氨基酸残基的情况下,有时在氨基酸残基的缩写的右侧标注表示从N末端侧开始的第几个氨基酸残基的数字来表示。例如,有时将从N末端起第二个赖氨酸表示为Lys2。

[0056] 并且,在使用其名称表示氨基酸的情况下,且存在处于对映体关系的异构体,即L体及D体时,除了明确表示L体及D体的区别的情况以外,原则上可以是L体,也可以是D体。例如,“异亮氨酸”表示“L-异亮氨酸”或“D-异亮氨酸”,对于氨基酸残基也相同。同样地,在使用其缩写(3字符缩写或1字符缩写)表示氨基酸的情况下,且存在处于对映体关系的异构体,即L体及D体的情况下,除了明确表示L体及D体的区别的情况以外,原则上可以是L体,也可以是D体。例如,“Lys”均表示“L-赖氨酸”或“D-赖氨酸”,对于氨基酸残基也相同。并且,对于各氨基酸、各氨基酸残基,能够分别独立地选择L体和D体。其中,关于存在于环状链段中的RGD序列,全部为L体的氨基酸残基。关于上述RGD序列以外的序列,存在于环肽中的氨基酸残基可以全部为L体的氨基酸残基,也可以全部为D体的氨基酸残基,也可以存在L体的氨基酸残基和D体的氨基酸残基这两者。

[0057] 并且,在使用其名称表示氨基酸的情况下,且存在处于非对映体关系的异构体的情况下,不包含在由其名称确定的氨基酸中。非对映体使用前缀“别(allo)”作为不同种类的氨基酸进行处理。例如,“苏氨酸”不包括“别苏氨酸”。对于氨基酸残基也相同。

[0058] 将官方认可1字符缩写及3字符缩写的氨基酸的名称及缩写(1字符缩写、3字符缩写)示于表1中。

[0059] [表1]

[0060]

1字符缩写	3字符缩写	名称
A	Ala	丙氨酸
B	Asx	天冬氨酸或天冬酰胺
C	Cys	半胱氨酸
D	Asp	天冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
G	Gly	甘氨酸
H	His	组氨酸

I	Ile	异亮氨酸
K	Lys	赖氨酸
L	Leu	亮氨酸
M	Met	甲硫氨酸
N	Asn	天冬酰胺
O	Pyl	吡咯赖氨酸
P	Pro	脯氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
R	Arg	精氨酸
S	Ser	丝氨酸
T	Thr	苏氨酸
U	Sec	硒代半胱氨酸
V	Val	缬氨酸
W	Trp	色氨酸
X	Xaa	任意的氨基酸
Y	Tyr	酪氨酸
Z	Glx	谷氨酸或谷氨酰胺

[0061] 本发明所涉及的环肽中所包含的氨基酸残基并不限于源自上述表1中所举出的氨基酸的氨基酸残基,可以是源自异常氨基酸的氨基酸残基。在以下表2中举出异常氨基酸的例子,但异常氨基酸并不限于于此。

[0062] [表2]

3字符缩写	名称	3字符缩写	名称
Aad	高谷氨酸	Dpr	2,3-二氨基丙酸
β Aad	3-氨基己二酸	Gla	4-羧基谷氨酸
Abu	2-氨基丁酸	Glp	5-羧基脯氨酸
A ₂ bu	2,4-二氨基丁酸	Hcy	高半胱氨酸
Ahx	2-氨基己酸	Hly	高赖氨酸
Ahe	2-氨基庚酸	Hse	高丝氨酸
Aib	2-氨基异丁酸	Hsl	高丝氨酸内酯
ϵ Ahx	6-氨基己酸	5Hyl	5-羟基赖氨酸 (Hyl)
β Ala	β -丙氨酸	aHyl	别羟基赖氨酸
Ape	2-氨基戊酸	3Hyp	3-羟基脯氨酸
A ₂ pr	2,3-二氨基丙酸	4Hyp	4-羟基脯氨酸
Apm	2-氨基庚二酸	alle	别异亮氨酸
A ₂ pm	2,6-二氨基庚二酸	Nle	正亮氨酸
Cit	瓜氨酸	Nva	正缬氨酸
Cya	半胱氨酸	Orn	鸟氨酸
Dbu	2,4-二氨基丁酸	Sar	肌氨酸
Dpm	2,6-二氨基庚二酸	aThr	别苏氨酸
Pen	青霉素	Thx	甲状腺素

[0064] 本发明所涉及的环肽中所包含的任意的氨基酸残基也可以受到化学修饰。只要是通常对氨基酸残基进行的化学修饰,则对氨基酸残基的化学修饰没有特别限制。作为对氨基酸残基的化学修饰的例子,可举出对存在于氨基酸残基中的氨基的N-乙酰化、N-甲酰化

或N-酰化、PEG(聚乙二醇)化及对存在于氨基酸残基中的羧基的酰胺化、PEG化等。

[0065] 在特定氨基酸序列中,在式(1)中的 X_5 或 X^a 是环肽的N末端的氨基的情况下,作为N末端的氨基残基,没有特别限制,可以受到N-乙酰化、N-甲酰化、N-酰化、PEG化等N末端修饰,也可以保持氨基的状态。

[0066] 并且,在特定氨基酸序列中,在式(1)中的 X_2 及 X^b 是环肽的C末端的羧基的情况下,C末端的羧基没有特别限制,可以受到酰胺化、PEG化等C末端修饰,也可以保持羧基的状态。

[0067] 本发明所涉及的环肽具有特定氨基酸序列, X^a 及 X^b 以及 X^c 及 X^d 分别独立地表示经由硫醚键键合的氨基酸残基, $X_1 \sim X_5$ 分别独立地表示氨基酸残基。

[0068] $\langle \langle \text{氨基酸残基 } X^a \sim X^d \rangle \rangle$

[0069] 本发明所涉及的环肽具有特定氨基酸序列, X^c 及 X^d 以及 X^a 及 X^b 分别独立地表示经由硫醚键键合的氨基酸残基。

[0070] 另外,式(1)中的“-S-”表示 X^c 及 X^d 以及 X^a 及 X^b 经由硫醚键交联。

[0071] 在本发明所涉及的环肽中所包含的特定氨基酸序列中,氨基酸残基 X^c 及氨基酸残基 X^d 、以及后述的氨基酸残基 X^a 及氨基酸残基 X^b 分别通过硫醚键交联,因此其细节尚不明确,但与二硫化物键相比,结构上不可逆,因此推测与具有通过二硫化物键交联的氨基酸残基的环肽相比,分子稳定性优异。

[0072] 作为硫醚键形成前的氨基酸,没有特别限制,例如可举出 X^c 及 X^d 中的任一个是源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸,且另一个是源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸的组合。

[0073] 同样地,作为硫醚键形成前的氨基酸,没有特别限制,例如可举出 X^a 及 X^b 中的任一个是源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸,且另一个是源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸的组合。

[0074] 作为上述具有卤原子的有机基团,可优选举出卤代乙酰基等。

[0075] 在本发明中,环肽中的“主链”是指环肽中的链状部分中成为相对最长的干的肽链。“侧链”是指与环肽的主链键合的链。

[0076] 氨基酸或氨基酸残基中的主链相当于环肽中的“主链”,氨基酸或氨基酸残基中的侧链成为与环肽的主链键合的侧链。

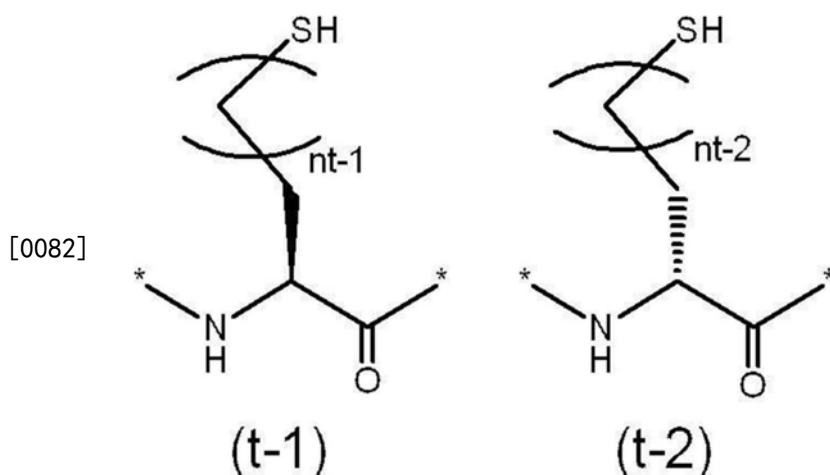
[0077] 以下,对硫醚键形成前的 $X^a \sim X^d$ 可取的源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基进行说明。

[0078] (源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基)

[0079] 作为具有硫醇基的氨基酸,从反应性的观点出发,优选为在侧链上具有硫醇基的氨基酸。氨基酸的主链优选不包含硫醇基。

[0080] 作为在侧链上具有硫醇基的氨基酸残基,没有特别限制,可优选举出由下述结构(t-1)或(t-2)表示的氨基酸残基。

[0081] [化学式编号5]



[0083] 结构(t-1)及(t-2)中,*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置,nt-1及nt-2表示0以上的整数。

[0084] 侧链中的nt-1或nt-2个碳原子及β位的碳原子也可以被选自由-NH₂、-SH、-COOH、碳原子数1~10的烷基及碳原子数6~14的芳基组成的组中的至少一种取代基取代。

[0085] 作为碳原子数1~10的烷基,也可以是直链状、支链状中的任一个。作为碳原子数1~10的烷基,例如可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等。

[0086] 并且,作为碳原子数6~14的芳基,也可以是单环或稠环。作为碳原子数6~14的芳基,例如可举出苯基、萘基、蒽基、菲基等。

[0087] 从容易形成硫醚键的观点出发,nt-1及nt-2优选为0~10的整数,更优选为0~6的整数,进一步优选为1~4的整数。

[0088] 作为在侧链上具有硫醇基的氨基酸的更具体的例子,可举出源自半胱氨酸、青霉胺、高半胱氨酸(2-氨基-4-巯基丁酸由来的氨基酸)、2-氨基-5-巯基戊酸的氨基酸等。

[0089] 其中,作为在侧链上具有硫醇基的氨基酸,从键合稳定性的观点出发,优选为源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸。

[0090] 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发,硫醚键形成前的X^c及X^d中的任一个优选为源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基,更优选为源自在侧链上具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基,进一步优选为源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基,从不易引起消旋化的观点出发,更进一步优选为L-高半胱氨酸或D-高半胱氨酸。

[0091] 在X^a是源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基的情况下,从键合稳定性及分子稳定性的观点出发,X^b优选为源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基,更优选为源自在侧链上具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基,进一步优选为源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基,从不易引起消旋化的观点出发,更进一步优选为L-高半胱氨酸或D-高半胱氨酸。

[0092] 并且,在氨基酸残基X^a及X^b中的任一个以及X^c及X^d中的任一个是源自α-氨基酸的氨基酸残基的情况下,可以是和硫醚键合前的α-氨基酸的α碳键合的氨基或修饰氨基与硫醇基键合而成的硫醚键,也可以是源自硫醚键合前的α-氨基酸的氨基酸残基的侧链与硫醚键合前的硫醇基键合而成的硫醚键。此时,氨基与硫醇基之间的键合能够经由配置在氨基上的卤代乙酰基等进行。

[0093] 同样地,在氨基酸残基X^a及X^b中的任一个以及X^c及X^d中的任一个是源自α-氨基酸

的氨基酸残基的情况下,可以是和硫醚键合前的 α -氨基酸的 α 碳键合的羧基或修饰羧基部分与硫醚键合前的硫醇基键合而成的硫醚键,也可以是源自硫醚键合前的 α -氨基酸的氨基酸残基的侧链部分与硫醚键合前的硫醇基键合而成的硫醚键。

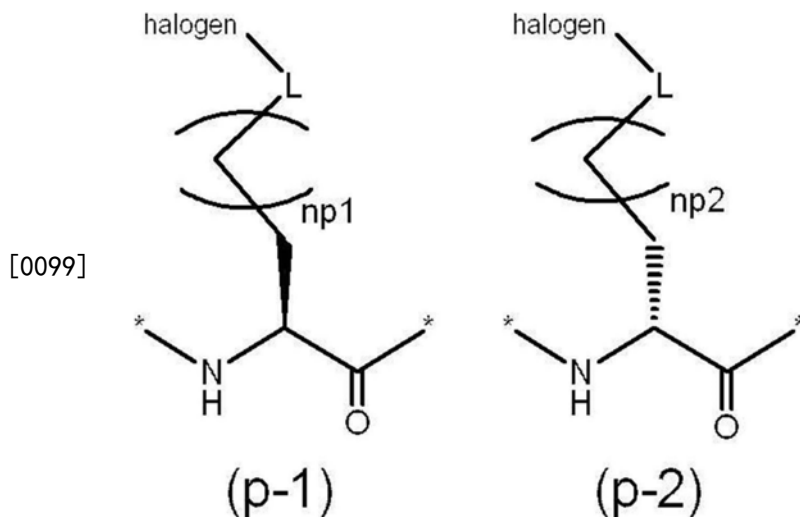
[0094] (源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基)

[0095] 作为源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基,优选为在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤原子的有机基团的氨基酸、或源自具有在氨基酸的侧链上具有卤原子的有机基团的氨基酸的氨基酸残基。作为具有卤原子的有机基团,只要是通常用作氨基酸的保护基的基团,则没有特别限制,例如,可优选举出卤代乙酰基等。例如,卤原子脱离,取而代之由硫原子键合,由此形成硫醚键,形成上述氨基酸残基。

[0096] 作为在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤原子的有机基团的氨基酸,可举出在 α 碳上的氨基上键合有卤代烷酰基的任意的氨基酸。卤代烷酰基例如是卤代乙酰基。卤代烷酰基中的卤原子例如是氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。作为成为具有卤原子的有机基团的键合对象的氨基酸,可以是L-氨基酸或D-氨基酸,可举出异亮氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸等。作为在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤原子的有机基团的氨基酸,可以是L-氨基酸或D-氨基酸,可举出N- α -氯乙酰基-异亮氨酸、N- α -氯乙酰基-赖氨酸、N- α -氯乙酰基-天冬氨酸、N- α -氯乙酰基-谷氨酸、N- α -氯乙酰基-酪氨酸、N- α -氯乙酰基-亮氨酸、N- α -氯乙酰基-苏氨酸、N- α -氯乙酰基-缬氨酸等。

[0097] 作为被上述侧链上具有卤原子的有机基团保护的氨基酸残基,从硫醚键的形成容易性的观点出发,优选为具有在氨基酸残基的侧链末端具有卤原子的有机基团的氨基酸。作为具有这种方式的氨基酸残基,可优选举出由下述结构(p-1)或(p-2)表示的氨基酸残基。

[0098] [化学式编号6]



[0100] 结构(p-1)及(p-2)中,halogen表示卤原子,L表示由 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的2价的连结基团,L1表示0以上且10以下的整数,np1及np2分别独立地表示0以上的整数,*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置。np1及np2优选分别表示0~6的整数,更优选表示0~4的整数,进一步优选表示1~3的整数。并且,在L中,卤素与左侧的末端(L1为1以上时是烷基侧的末端)键合。

[0101] 作为卤原子,例如可举出氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等。其中,从反应性及容

易形成硫醚键和安全性的观点出发,优选为溴原子或氯原子,更优选为氯原子。

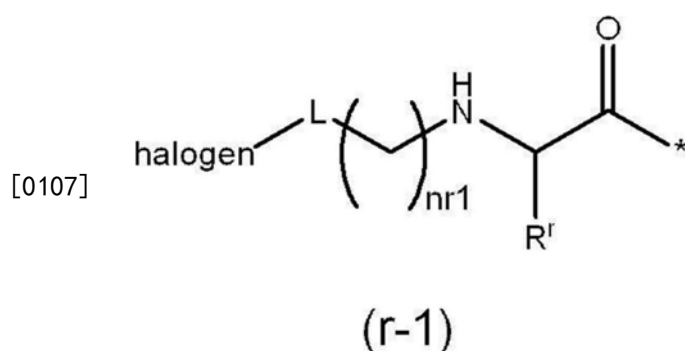
[0102] 在np1及np2为1以上的情况下,侧链中的np1或np2个碳原子及β位的碳原子也可以被选自碳原子数1~10的烷基及碳原子数6~14的芳基组成的组中的至少一种取代基取代。

[0103] L1优选为0~10的整数,更优选为1~6的整数,进一步优选为1~3的整数。

[0104] 碳原子数1~10的烷基及碳原子数6~14的芳基的具体例与上述结构(t-1)及(t-2)中的碳原子数1~10的烷基及碳原子数6~14的芳基相同。

[0105] 在源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基位于环肽的N末端的情况下,从硫醚键的形成容易性的观点出发,作为硫醚键合前的氨基酸残基,优选为具有在α-氨基上具有卤原子的有机基团的氨基酸残基,更优选由下述结构式(r-1)表示的氨基酸残基。

[0106] [化学式编号7]



[0108] 结构式(r-1)中, R^r 表示氢原子或1价的有机基团,halogen表示卤原子,L表示由 $(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的2价的连结基团, $L1$ 表示0以上且10以下的整数, $nr1$ 表示0以上的整数,*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置。

[0109] L及L1的含义与结构(p-1)及(p-2)中的L及L1相同,优选的方式也相同。 $nr1$ 的含义与结构(p-1)及(p-2)中的np1及np2相同,优选的方式也相同。

[0110] 作为 R^r 中的1价的有机基团,没有特别限制,可举出作为氨基酸的侧链可取的脂肪族烃基。作为可作为氨基酸的侧链具有的1价的有机基团,可举出表1或表2中记载的氨基酸的侧链即1价的有机基团。

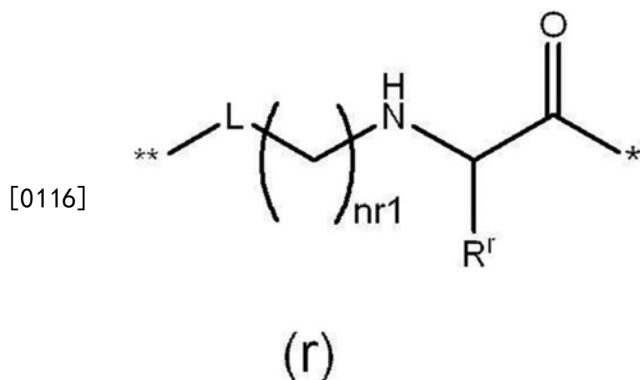
[0111] 脂肪族烃基也可以被选自 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-COOH$ 、碳原子数1~10的烷基及碳原子数6~14的芳基组成的组中的至少一种取代基取代。

[0112] 作为碳原子数1~10的烷基,也可以是直链状、支链状中的任一个。作为碳原子数1~10的烷基,例如可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等。

[0113] 并且,作为碳原子数6~14的芳基,也可以是单环或稠环。作为碳原子数6~14的芳基,例如可举出苯基、萘基、蒽基、菲基等。

[0114] 在氨基酸残基 X^a 例如位于特定氨基酸序列的N末端(X_5 的m5为0时),且是源自α-氨基酸的氨基酸残基的情况下,作为氨基酸残基 X^a ,优选为源自下述结构式(r)表示的氨基酸的氨基酸残基。

[0115] [化学式编号8]



[0117] 结构式 (r) 中, R^r 表示氢原子或1价的有机基团, L表示由 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的2价的连结基团, $L1$ 表示0以上且10以下的整数, $nr1$ 表示0以上的整数, *表示与相邻的氨基酸残基的键合位置, **表示与硫醚键中的硫原子的键合位置。

[0118] R^r 、L及 $nr1$ 的含义与结构式 (r-1) 中的 R^r 、L及 $nr1$ 相同, 优选的方式也相同。

[0119] 作为源自硫醚键合前的被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基的更具体的例子, 没有特别限制, 可举出源自2-氨基-3-[(2-卤代乙酰基)氨基]丙酸、2-氨基-4-[(2-卤代乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -卤代乙酰基鸟氨酸、N- ϵ -卤代乙酰基赖氨酸、2-[(卤代乙酰基)氨基]-3-甲基-戊酸、N- ζ -卤代乙酰基高赖氨酸等的氨基酸残基。

[0120] 作为这些氨基酸残基中的卤代乙酰基中的卤原子, 可举出氟原子、氯原子、溴原子、碘原子等, 其中优选氯原子。

[0121] 作为源自硫醚键合前的被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基, 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发, 优选为源自侧链上具有氯乙酰基的氨基酸的氨基酸残基, 更优选为选自由 (2S)-2-氨基-3-[(2-氯乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-氯乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-氯乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-氯乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -氯乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -氯乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -氯乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -氯乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -氯乙酰基-L-高赖氨酸、N- ζ -氯乙酰基-D-高赖氨酸及 (2S,3S)-2-[(氯乙酰基)氨基]-3-甲基-戊酸组成的组中的氨基酸残基。其中, 关于Xa, 也优选为源自N- α -氯乙酰基-异亮氨酸、N- α -氯乙酰基-赖氨酸、N- α -氯乙酰基-天冬氨酸、N- α -氯乙酰基-谷氨酸、N- α -氯乙酰基-酪氨酸、N- α -氯乙酰基-亮氨酸、N- α -氯乙酰基-苏氨酸、N- α -氯乙酰基-缬氨酸等在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤原子的有机基团的氨基酸的氨基酸残基。

[0122] 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发, X^c 及 X^d 中的任一个优选为源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基, 更优选为在侧链上具备具有氯原子的有机基团的氨基酸残基, 进一步优选为在侧链上具有氯乙酰基的氨基酸残基, 尤其优选为源自选自由 (2S)-2-氨基-3-[(2-氯乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-氯乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-氯乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-氯乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -氯乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -氯乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -氯乙酰基-L-赖氨酸及N- ϵ -氯乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -氯乙酰基-L-高赖氨酸及N- ζ -氯乙酰基-D-高赖氨酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基。

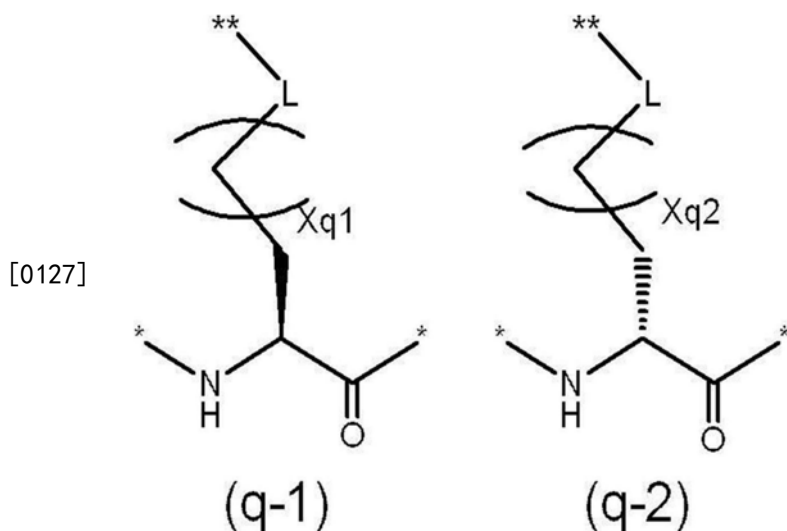
[0123] 在氨基酸残基 X^b 是源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基的情况下, 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发, X^a 优选为源自在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤

原子的有机基团的氨基酸的氨基酸残基、或源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基,更优选为源自在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有氯原子的有机基团的氨基酸的氨基酸残基、或在侧链上具备具有氯原子的有机基团的氨基酸残基,进一步优选为在与 α 碳键合的氨基上或在侧链上具有氯乙酰基的氨基酸残基,更优选为源自选自N- α -氯乙酰基-异亮氨酸、N- α -氯乙酰基-赖氨酸、N- α -氯乙酰基-天冬氨酸、N- α -氯乙酰基-谷氨酸、N- α -氯乙酰基-酪氨酸、N- α -氯乙酰基-亮氨酸、N- α -氯乙酰基-苏氨酸及N- α -氯乙酰基-缬氨酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基、或源自选自(2S)-2-氨基-3-[(2-氯乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-氯乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-氯乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-氯乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -氯乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -氯乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -氯乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -氯乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -氯乙酰基-L-高赖氨酸、N- ζ -氯乙酰基-D-高赖氨酸及(2S,3S)-2-[(氯乙酰基)氨基]-3-甲基-戊酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基。

[0124] (硫醚键形成后的氨基酸残基 $X^a \sim X^d$)

[0125] 在硫醚键形成后的氨基酸残基 $X^a \sim X^d$ 中,作为硫醚键形成后的源自被与硫原子键合的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基的结构,可举出由下述结构(q-1)或(q-2)表示的结构。

[0126] [化学式编号9]



[0128] 结构(q-1)及(q-2)中,*是与相邻的氨基酸残基的键,**是与硫醚键的配位氨基酸残基的硫原子的键, $xq1$ 及 $xq1$ 分别独立地为0以上的整数,L分别独立地表示由 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的2价的连结基团, $L1$ 表示0以上且10以下的整数。

[0129] L及 $L1$ 的含义与结构(p-1)及(p-2)中的L及 $L1$ 相同,优选的方式也相同。 $xq1$ 及 $xq1$ 的含义与结构(p-1)及(p-2)中的 $np1$ 及 $np2$ 相同,优选的方式也相同。

[0130] 作为硫醚键形成后的源自被与硫原子键合的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基的更具体的例子,可举出源自2-氨基-3-[乙酰氨基]丙酸、2-氨基-4-[乙酰氨基]丁酸、N- δ -乙酰鸟氨酸或N- ϵ -乙酰赖氨酸、N- ζ -乙酰高赖氨酸等的氨基酸残基。

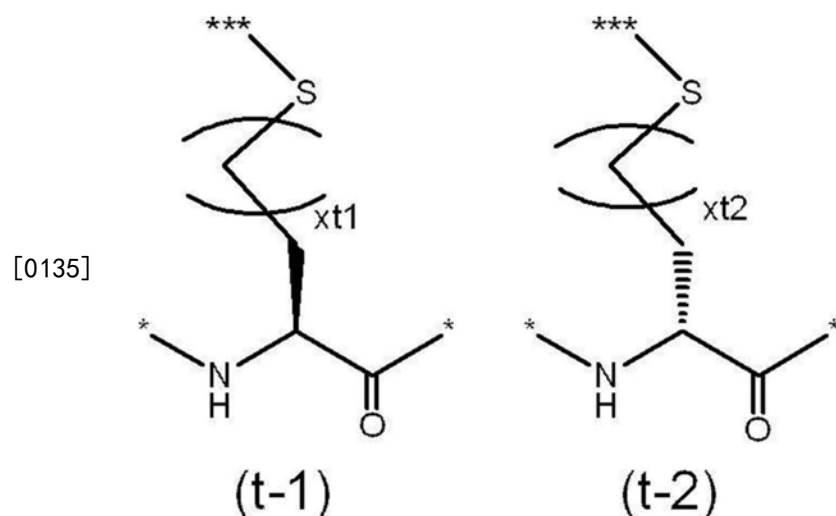
[0131] 其中,关于 Xa ,也能够由在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤原子的有机基团的氨基酸形成硫醚键,因此也可举出源自N- α -乙酰基-异亮氨酸、N- α -乙酰基-赖氨酸、N- α -乙酰基-天冬氨酸、N- α -乙酰基-谷氨酸、N- α -乙酰基-酪氨酸、N- α -乙酰基-亮氨酸、N-

α -乙酰基-苏氨酸、N- α -乙酰基-缬氨酸等的氨基酸残基。这些氨基酸残基的乙酰基部分与硫醚键的硫原子键合。

[0132] 另外,与硫醚键相关的两个氨基酸残基中,在不供给硫醚键的硫原子的一方的氨基酸残基被乙酰基等烷酰基取代的情况下,只要没有特别说明,硫醚键的硫原子与上述烷酰基键合,可以说上述烷酰基(例如乙酰基)是S-键烷酰基(例如S-乙酰基)。其中,在本发明中,只要没有特别说明,省略这种S-键烷酰基中的“S-键”的标记,简单标记为烷酰基(例如乙酰基)。

[0133] 硫醚键形成后的氨基酸残基 $X^a \sim X^d$ 中,在硫醚键形成后的氨基酸残基 $X^a \sim X^d$ 中,作为硫醚键形成后的在侧链上具有硫醇基的氨基酸残基的结构,可举出由下述结构(t-1)或(t-2)表示的氨基酸残基的结构。

[0134] [化学式编号10]



[0136] 结构(t-1)及(t-2)中,*是与相邻的氨基酸残基的键,***是与硫醚键的配位氨基酸残基的碳原子的键,xt1及xt2分别独立地为0以上的整数。

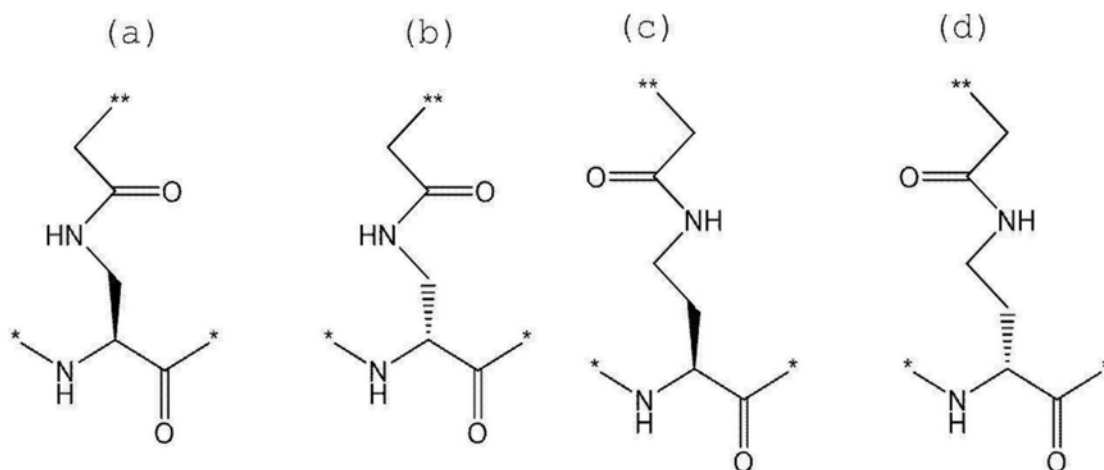
[0137] xt1及xt2的含义与结构(p-1)及(p-2)中的np1及np2相同,优选的方式也相同。

[0138] 作为硫醚键形成后的更具体的例子,可举出半胱氨酸残基、青霉胺残基、高半胱氨酸残基(源自2-氨基-4-巯基丁酸的残基)或源自2-氨基-5-巯基戊酸的氨基酸残基。

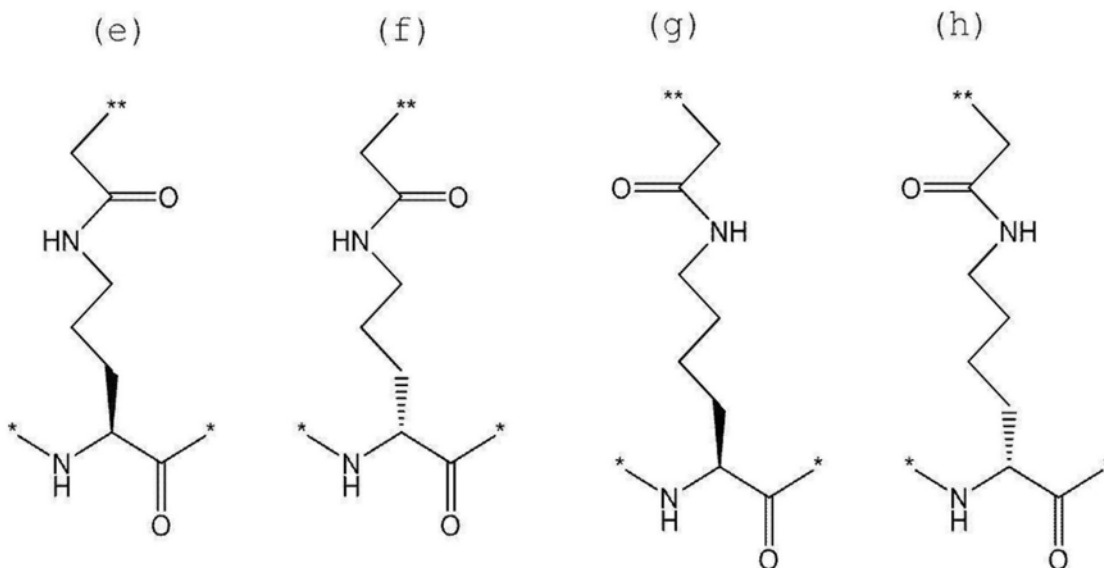
[0139] 结构(q-1)或(q-2)的氨基酸残基等源自被与硫原子键合的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基可以是环状链段中的各N末端侧的氨基酸残基 X^a 或 X^c ,也可以是环状链段中的各C末端侧的氨基酸残基 X^b 或 X^d 。与此相对应,(t-1)或(t-2)的氨基酸残基等具有硫醇基的氨基酸残基可以是环状链段的N末端侧的氨基酸残基 X^a 或 X^c ,也可以是环状链段的C末端侧的氨基酸残基 X^b 或 X^d 。

[0140] 由上述结构式(p-1)或(p-2)表示的氨基酸残基也可以是具有选自由下述结构(a)~(h)表示的氨基酸残基中的结构的氨基酸残基。

[0141] [化学式编号11]



[0142]



[0143] 其中,式中,*是与相邻的氨基酸残基的键,**是与硫醚键的配位氨基酸残基的硫原子的键。

[0144] 从分子稳定性的观点出发,氨基酸残基 X^c 及氨基酸残基 X^d 中的任一个为半胱氨酸残基时,从能够得到良好的分子稳定性的观点出发,优选设计成氨基酸残基 X^c 和氨基酸残基 X^d 中的另一个氨基酸残基的 α 碳与半胱氨酸残基被5个以上的原子隔开。能够得到上述良好的分子稳定性的理由尚不明确,但推测为通过延长从硫醚键的配位氨基酸残基的硫原子到环肽主链的碳链长,硫醚键的电子配置稳定,得到更高的键合稳定性。氨基酸残基 X^a 及氨基酸残基 X^b 中的任一个是半胱氨酸残基,且另一个是硫醚键的硫原子经由有机基团与氨基酸侧链键合的氨基酸残基时也相同。

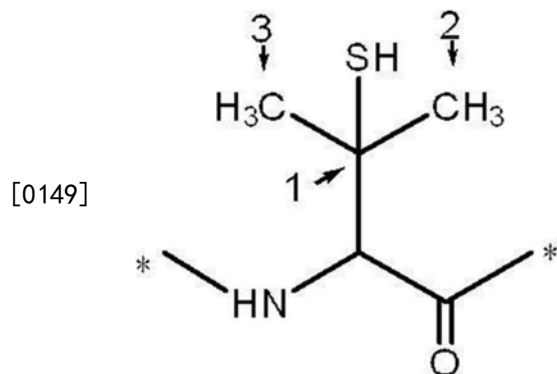
[0145] 从得到更高的分子稳定性的观点出发,在氨基酸残基 X^a 和氨基酸残基 X^b 中的源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基中,具有硫醇基的侧链上的碳原子的总数优选为1~10,更优选为1~6,进一步优选为1~4,尤其优选为2~4。

[0146] 在源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基中,具有硫醇基的侧链上的碳原子的总数是具有硫醇基的侧链中的碳原子的总数。其中,上述具有硫醇基的侧链上的碳原子的总

数中不包括主链中所包含的碳原子数。

[0147] 例如,半胱氨酸残基中的具有硫醇基的侧链上的碳原子的总数为1,高半胱氨酸残基中的具有硫醇基的侧链上的碳原子的总数为2,下述所示的青霉素残基中的侧链上的碳原子的总数为3。另外,下述所示的青霉素残基中的*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置。

[0148] [化学式编号12]

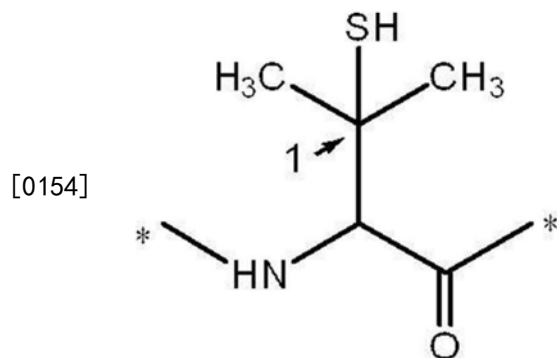


[0150] 并且,从整联蛋白键合性的观点出发,具有硫醇基的氨基酸残基中,环肽的主链与具有硫醇基的侧链中的硫原子之间的链长优选碳原子数为1~10,更优选为1~6,进一步优选为1~4,尤其优选为1~3。

[0151] 环肽的主链与具有硫醇基的侧链中的硫原子之间的链长是将连接环肽中的主链与硫醇基的侧链的原子数计数为最小的值,主链中所包含的碳原子不包括在链长的数量中。

[0152] 例如,在具有硫醇基的氨基酸残基是下述所示的青霉胺残基的情况下,环肽的主链与具有硫醇基的侧链中的硫原子之间的链长为1。另外,下述所示的青霉胺残基中的*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置。

[0153] [化学式编号13]



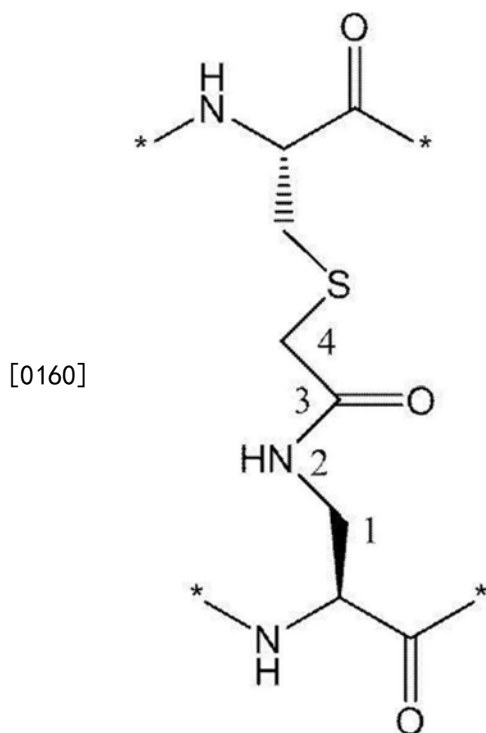
[0155] 从整联蛋白键合性的观点出发,例如在是源自具有硫醇基的 α -氨基酸的氨基酸残基的情况下,作为环肽的主链与具有硫醇基的侧链中的硫原子之间的链长,优选为1~10,更优选为1~6,进一步优选为1~4,尤其优选为1~3。

[0156] 从得到更高的分子稳定性的观点出发,氨基酸残基X^a和氨基酸残基X^b中的不供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基的α碳与供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基的硫原子之间的链长优选被4个以上的原子隔开,更优选被4个~9个原子隔开,进一步优选被4~8个原子隔开。其中,在Xa是硫醚键的硫原子经由有机基团与α-碳上的氨基键合的氨基酸残基的情况下,并不限于此。

[0157] 从相同的观点出发,氨基酸残基 X^c 及氨基酸残基 X^d 中的不供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基的 α 碳与供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基的硫原子之间的链长优选被4个以上的原子隔开,更优选被4个~9个原子隔开,进一步优选被4~8个原子隔开。

[0158] 作为不供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基的 α 碳与供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基的硫原子之间的链长被4个以上的原子隔开的例子,以下例示上述(a)的氨基酸残基与L-半胱氨酸残基键合的情况,但本发明并不限于此。

[0159] [化学式编号14]



[0161] 其中,式中,*是与相邻的氨基酸残基的键合位置。在(a)的氨基酸残基与L-半胱氨酸残基键合的情况下, α 碳与半胱氨酸残基的硫原子的链长被1个氮原子及3个碳原子隔开,因此原子数为4个。如此,将硫醚键的配位氨基酸残基的 α 碳与半胱氨酸残基的硫原子隔开的原子的数量(链长)是指连结 α 原子与硫原子的链上的原子数,不对与链上的原子键合的氢原子等未参加上述链的原子进行计数。

[0162] <<硫醚键的形成方法>>

[0163] 在硫醚键形成前的氨基酸残基 X^c 、氨基酸残基 X^d 、氨基酸残基 X^a 及氨基酸残基 X^b 中,作为形成硫醚键的方法,没有特别限定,可举出在肽中形成硫醚键的公知的方法。

[0164] 作为硫醚键,例如,通过使具有硫醇基的氨基酸残基与被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸残基在中性或碱条件下(pH7~pH9)反应,伴随卤化氢的生成,硫醇基中的硫原子与有机基团键合,由此能够形成硫醚键。

[0165] 作为上述具有卤原子的有机基团,可优选举出卤代乙酰基等保护基。

[0166] 并且,例如,作为在侧链上具有硫醇基的氨基酸残基与在与氨基酸的 α 碳键合的氨基上键合有具有卤原子的有机基团的氨基酸残基或在侧链上具备具有卤素的有机基团的氨基酸残基之间,使硫醇基与具有卤素的有机基团反应而形成硫醚键的方法,例如可举出通过使环状化前的线状的肽在中性或碱性的缓冲液中反应而形成硫醚键的方法。

[0167] 更具体而言,可优选举出将含有线状肽的水溶液缓慢地滴加到Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液中并静置的方法。在形成硫醚键的环化反应中,根据反应条件,除了环肽以外,有时形成多个非环肽通过分子间键合连结的低聚物。从提高环肽的产率的观点出发,形成硫醚键的方法优选包括提纯的工序。作为环肽的提纯方法,可举出公知的提纯方法。环肽的提纯方法优选通过反相高效液相色谱等提纯上述环化反应后的肽的方法。

[0168] $\langle\langle$ 氨基酸残基 $X_1 \sim X_5 \rangle\rangle$

[0169] 在特定氨基酸序列中, $X_1 \sim X_5$ 分别独立地表示氨基酸残基, $m_1 \sim m_5$ 分别独立地表示0以上的整数。

[0170] 关于氨基酸残基 $X_1 \sim X_5$ 的数量 $m_1 \sim m_5$,只要由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数在7~16的范围内,则没有特别限制。

[0171] 作为氨基酸残基,只要能够形成环肽,则没有特别限制,优选为源自选自上述表1所示的氨基酸(不包括B、Z及X。)及表2所示的氨基酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基,更优选为源自选自表1所示的氨基酸(不包括B、Z及X。)组成的组中的氨基酸的氨基酸残基。

[0172] 并且,在存在的情况下,也可以是源自这些氨基酸的对映体或非对映体的氨基酸残基。

[0173] 在特定氨基酸序列中, $X_1 \sim X_5$ 也可以由选自 $X_1 \sim X_5$ 组成的组中的任意的两个氨基酸残基彼此形成硫醚键。

[0174] 作为能够形成硫醚键的氨基酸残基的组合,可举出源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基,且另一个是源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基的组合。

[0175] 源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基及源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基的含义与氨基酸残基 $X^a \sim X^d$ 中的源自具有硫醇基的氨基酸的氨基酸残基及源自被具有卤原子的有机基团保护的氨基酸的氨基酸残基相同,优选的方式也相同。

[0176] 上述氨基酸残基例如也可以是在侧链上具有羧基的氨基酸残基、在侧链上具有羟基的氨基酸残基等。

[0177] 作为在侧链上具有羧基的氨基酸残基,例如可举出L-天冬氨酸残基、D-天冬氨酸残基、L-谷氨酸残基、D-谷氨酸残基、L-高谷氨酸残基及D-高谷氨酸残基等。

[0178] 作为上述在侧链上具有羟基的氨基酸残基,例如可举出L-丝氨酸残基、D-丝氨酸残基、L-高丝氨酸残基、D-高丝氨酸残基、L-酪氨酸残基、D-酪氨酸残基、L-苏氨酸残基、D-苏氨酸残基、L-别苏氨酸残基及D-别苏氨酸残基等。

[0179] 作为上述氨基酸残基,例如也可以是疏水性的氨基酸残基。

[0180] 作为疏水性的氨基酸残基,例如可举出缬氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、脯氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸等氨基酸残基。

[0181] $\langle\langle$ 由 X_1 表示的氨基酸残基 $\rangle\rangle$

[0182] 作为由 X_1 表示的氨基酸残基,从整联蛋白键合性的观点出发,优选为源自疏水性氨基酸的氨基酸残基及具有环结构的氨基酸残基中的至少一个,更优选为源自酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘酪氨酸、茶丙氨酸、高酪氨酸、脯氨酸或异亮氨酸的氨基酸残基,尤其优选为源自苯丙氨酸或酪氨酸的氨基酸残基。

[0183] 由 X_1 表示的氨基酸残基的数量 m_1 为0以上的整数,从成本的观点出发,优选为1以

上且6以下,更优选为1以上且3以下,进一步优选为1或2。

[0184] <<由 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基的数量 m_3 及 m_4 >>

[0185] 作为由 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基,没有特别限制,从整联蛋白键合性的观点出发,优选为脯氨酸、苏氨酸或天冬酰胺、丝氨酸、高丝氨酸、缬氨酸或丙氨酸的氨基酸残基。

[0186] 并且,由 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基的数量 m_3 及 m_4 分别独立地为0以上的整数。从成本的观点出发, m_3 及 m_4 分别独立地优选为0以上且2以下,更优选为0以上且1以下,进一步优选 m_3 及 m_4 这两者为0。

[0187] 在由 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基的数量 m_3 及 m_4 为2以上的情况下, X_3 及 X_4 可以是彼此相同的氨基酸残基,也可以是不同的氨基酸残基。

[0188] <<由 X_2 及 X_5 表示的氨基酸残基>>

[0189] 由 X_2 及 X_5 表示的氨基酸残基的数量 m_2 及 m_5 分别独立地为0以上的整数。从成本的观点出发, m_5 优选为0。从分子稳定性及与后述的基材或保持材料上的官能团反应而容易形成共价键的观点出发, m_2 优选为1以上,优选为1以上且6以下,更优选为1以上且4以下。

[0190] 在 m_5 为0的情况下,由 X^a 表示的氨基酸残基也可以是氨基或修饰氨基。

[0191] 在由 X_2 表示的氨基酸残基的数量 m_2 为2以上的情况下, X_2 可以是彼此相同的氨基酸残基,也可以是不同的氨基酸残基, X_2 优选为彼此相同的氨基酸残基。

[0192] <<侧链上具有固定化官能团的氨基酸>>

[0193] 从分子稳定性及与后述的基材或保持材料上的官能团反应而容易形成共价键的观点出发,由 X_5 及 X_2 表示的氨基酸残基优选含有侧链上具有固定化官能团的氨基酸残基(以下,也简称为“具有固定化官能团的氨基酸残基”)。

[0194] 上述“固定化官能团”是指能够与后述的基材或保持材料上的官能团反应而形成共价键的官能团。

[0195] 作为固定化官能团,例如可举出氨基、羧基、羟基、硫醇基、醛基(甲酰基)、氨基甲酰基、叠氮基、炔基等。

[0196] 作为具有上述固定化官能团的氨基酸中的固定化官能团,从与基材或保持材料上的官能团的反应性的观点出发,优选为选自由氨基、硫醇基及醛基组成的组中的至少一个基团,更优选为选自由氨基及硫醇基组成的组中的至少一个基团。

[0197] 在将氨基用作固定化官能团的情况下,氨基能够经由酰胺键与基材或保持材料上的羧基键合,并且能够将本发明所涉及的环肽容易地固定在基材或保持材料上。

[0198] 并且,在将硫醇基用作固定化官能团的情况下,硫醇基能够经由共价键与基材或保持材料上的环氧基键合,并且能够将本发明所涉及的环肽容易地固定在基材或保持材料上。

[0199] 作为侧链上具有氨基的氨基酸残基,可举出L-赖氨酸残基、D-赖氨酸残基等。作为侧链上具有硫醇基的氨基酸残基,可举出L-半胱氨酸残基、D-半胱氨酸残基等。侧链上具有氨基的氨基酸残基及侧链上具有硫醇基的氨基酸残基能够相对廉价地导入,因此能够控制本发明所涉及的环肽的制造成本。因此,从经济的观点出发,优选使用上述氨基酸残基。

[0200] 即,作为侧链上具有固定化官能团的氨基酸,从分子稳定性的观点出发,优选为选自由L-赖氨酸、D-赖氨酸、L-半胱氨酸、D-半胱氨酸、L-高半胱氨酸及D-高半胱氨酸组成的组中的至少一种氨基酸,更优选为选自由L-赖氨酸及D-赖氨酸组成的组中的至少一种氨基

酸。

[0201] 从与基材等的固定化的观点出发, X_5 (环肽的N末端) 及 X_2 (环肽的C末端) 中的至少一个优选含有赖氨酸残基作为具有固定化官能团的氨基酸残基, 更优选 X_2 含有赖氨酸残基作为具有固定化官能团的氨基酸残基。

[0202] 从与基材等的固定化的观点出发, X_5 (环肽的N末端) 及 X_2 (环肽的C末端) 中的至少一个优选连续含有一个以上赖氨酸残基作为具有固定化官能团的氨基酸残基, 更优选连续含有2~10个, 进一步优选连续含有2~5个。

[0203] X_5 (环肽的N末端) 及 X_2 (环肽的C末端) 可以仅由具有连续的固定化官能团的氨基酸残基 (优选为赖氨酸残基) 构成, 也可以含有具有固定化官能团的氨基酸残基以外的氨基酸残基。

[0204] 作为具有固定化官能团的氨基酸残基以外的氨基酸残基, 也可以是选自1~20个、1~10个、1~5个或1~3个丙氨酸残基、 β 丙氨酸残基、谷氨酸残基、天冬氨酸残基及甘氨酸残基中的氨基酸残基等。

[0205] 并且, 也可以在具有上述固定化官能团的氨基酸残基以外的氨基酸残基与 X^a 或 X^b 之间还夹持赖氨酸残基。

[0206] 作为本发明所涉及的环肽所具有的固定化官能团与基材或保持材料上的官能团的组合, 没有特别限制, 可举出氨基与羧基的组合、氨基与醛基的组合、氨基与环氧基的组合、羟基与环氧基的组合、羧基与羟基的组合、硫醇基与环氧基的组合、叠氮基与炔基的组合等。

[0207] 通过本发明所涉及的环肽所具有的固定化官能团与基材或保持材料上的官能团反应而形成共价键, 本发明所涉及的环肽固定在基材或保持材料上。

[0208] 另外, 只要本发明所涉及的环肽所具有的固定化官能团中的至少一部分与基材或保持材料上的官能团反应而形成共价键即可, 所有的固定化官能团也可以不与基材或保持材料上的官能团反应。

[0209] <<RGD序列>>

[0210] 本发明所涉及的环肽中所包含的特定氨基酸序列具有RGD序列, 且在作为通过硫醚键交联的氨基酸残基的 X^c 及 X^d 之间配置有RGD序列, 由此整联蛋白键合性及分子稳定性优异。

[0211] 在本发明中, “RGD序列”表示从N末端侧到C末端侧, 存在“R (精氨酸)”、“G (甘氨酸)”及“D (天冬氨酸)”这三个氨基酸残基的序列。“RGD序列”参与细胞粘附, 因此本发明所涉及的环肽通过具有“RGD序列”, 尤其能够提高对整联蛋白等细胞粘附分子的键合性。

[0212] 在本发明所涉及的环肽中所包含的特定氨基酸序列中, “RGD序列”的数量可以是2以上, 优选为1。

[0213] 从整联蛋白键合性的观点出发, RGD序列位于氨基酸残基 X^c 及氨基酸残基 X^d 之间。作为RGD序列的位置, 可以是与氨基酸残基 X^c 及氨基酸残基 X^d 相邻的位置, 也可以是与氨基酸残基 X^c 及氨基酸残基 X^d 均不相邻的位置。

[0214] 从整联蛋白键合性的观点出发, 将特定氨基酸序列中的位于N末端的 X_5 作为第1个氨基酸残基向C末端侧计数氨基酸残基时, 优选对应于第3~5个氨基酸残基。

[0215] 由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~

16. 当由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 、 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数,即在交联肽中位于通过硫醚键交联的最N末端侧的氨基酸残基(X^a)至位于最C末端侧的氨基酸残基(X^b)之间的氨基酸残基数(以下,也称为“最外环状链段的氨基酸残基数”。)为7~16时,环肽的分子内应变不会变得过大, α -螺旋等高级结构稳定,且整联蛋白键合性优异。

[0216] 从上述观点出发,作为最外环状链段的氨基酸残基数,优选为7~14,更优选为7~13。

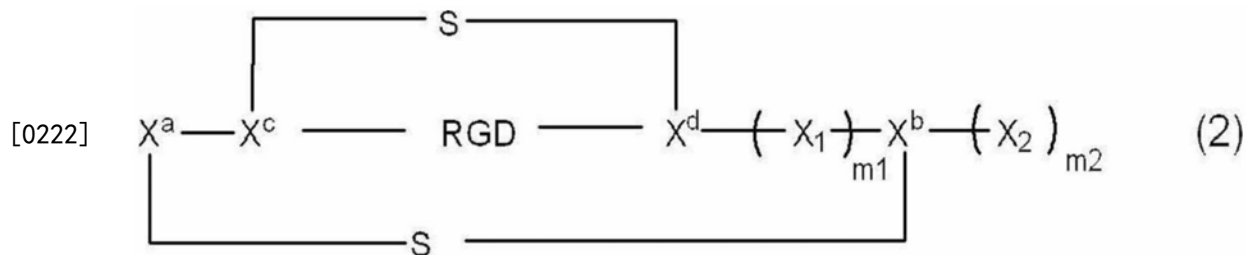
[0217] 并且,由 X^c 及 X^d 以及 X_3 及 X_4 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数,即在交联肽中位于通过硫醚键交联的氨基酸残基(X^c)至氨基酸残基(X^d)之间的氨基酸残基数(以下,也称为“最内环状链段的氨基酸残基数”。)优选为5~14,更优选为5~10,进一步优选为5~8。

[0218] 本发明所涉及的环肽所具有的氨基酸序列中所包含的氨基酸残基的总数没有特别限制,可以是7~50氨基酸残基,也可以是7~30氨基酸残基,也可以是8~20氨基酸残基,也可以是9~15氨基酸残基。环肽的全长越短,抗原性的风险越少,肽合成越容易。

[0219] <<由式(2)表示的氨基酸序列>>

[0220] 从整联蛋白键合性及分子稳定性的观点出发,本发明所涉及的环肽所具有的由上述式(1)表示的氨基酸序列(特定氨基酸序列)优选为由下述式(2)表示的氨基酸序列。

[0221] [化学式编号15]



[0223] 式(2)中, X^a 及 X^b 以及 X^c 及 X^d 分别独立地表示经由硫醚键交联的氨基酸残基, X_1 及 X_2 分别独立地表示氨基酸残基,R表示精氨酸,G表示甘氨酸,D表示天冬氨酸, m_1 及 m_2 分别独立地表示1以上的整数。其中,由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~14。

[0224] 式(2)中, X^a 、 X^b 、 X^c 、 X^d 、 X_1 、 X_2 、 m_1 及 m_2 的含义与上述式(1)中的 X^a 、 X^b 、 X^c 、 X^d 、 X_1 、 X_2 、 m_1 及 m_2 相同,优选的方式也相同。

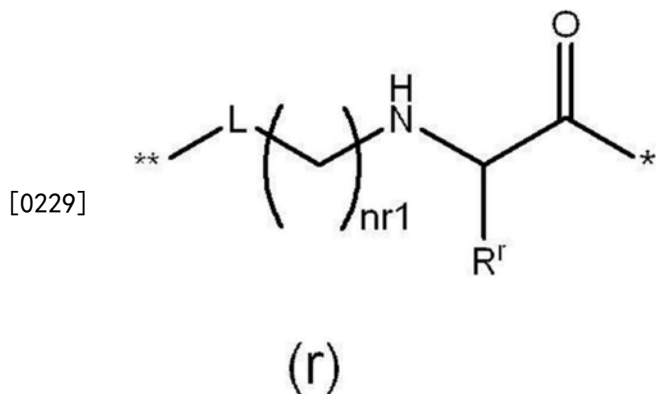
[0225] 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发,优选式(2)中的 X^c 及 X^d 中的任一个是源自选自自由(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -乙酰基-L-高赖氨酸及N- ζ -乙酰基-D-高赖氨酸组成的组中的侧链上具有乙酰基的氨基酸的氨基酸残基,另一个是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基,进一步优选是源自L-高半胱氨酸或D-高半胱氨酸的氨基酸残基。

[0226] 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发,优选式(2)中的 X^b 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基, X^a 是源自选自自由(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)

氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -乙酰基-L-高赖氨酸、N- ζ -乙酰基-D-高赖氨酸及(2S,3S)-2-[(乙酰胺基)-3-甲基-戊酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基。

[0227] 式(2)中,作为氨基酸残基 X^a ,从键合稳定性及分子稳定性的观点出发,优选为由下述结构式(r)表示的氨基酸残基。

[0228] [化学式编号16]



[0230] 结构式(r)中, R^f 表示氢原子或1价的有机基团,L表示由 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{L1}-C(=O)-NH-$ 表示的2价的连结基团, $L1$ 表示0以上且10以下的整数, $nr1$ 表示0以上的整数,*表示与相邻的氨基酸残基的键合位置,**表示与硫醚键中的硫原子的键合位置。

[0231] R^f 、L及 $nr1$ 的含义与结构式(r-1)中的 R^f 、L及 $nr1$ 相同,优选的方式也相同。

[0232] 从键合稳定性及分子稳定性的观点出发,优选式(2)中的 X^c 及 X^d 中的任一个是源自选自(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -乙酰基-L-高赖氨酸及N- ζ -乙酰基-D-高赖氨酸组成的组中的侧链上具有乙酰基的氨基酸的氨基酸残基,另一个是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基,式(2)中的 X^b 是源自L-高半胱氨酸、D-高半胱氨酸、L-青霉胺或D-青霉胺的氨基酸残基, X^a 是由上述结构式(r)表示的氨基酸残基(更优选为源自选自(2S)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2R)-2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、(2S)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、(2R)-2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-L-鸟氨酸、N- δ -乙酰基-D-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-L-赖氨酸、N- ϵ -乙酰基-D-赖氨酸、N- ζ -乙酰基-L-高赖氨酸、N- ζ -乙酰基-D-高赖氨酸及(2S,3S)-2-[(乙酰胺基)-3-甲基-戊酸组成的组中的氨基酸的氨基酸残基)。

[0233] 由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数为7~14。从环肽的分子内应变不会变得过大, α -螺旋等高级结构稳定,且整联蛋白键合性优异的观点出发,由 X^a 、 X^b 、 X^c 及 X^d 以及 X_1 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数更优选为7~13,更优选为8~10。

[0234] 并且,从上述观点出发,由 X^c 及 X^d 表示的氨基酸残基和RGD的总氨基酸残基数优选为5。

[0235] 在式(2)中,还优选如下实施方式。其中,各氨基酸残基可以是L-氨基酸残基,也可以是D-氨基酸残基。

[0236] 即, X^a 优选为环肽的N末端氨基酸残基,此时, X^a 也可以是源自乙酰基与 α 碳键合而成的异亮氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苏氨酸或缬氨酸的氨基酸残基。其中,优选为源自乙酰基与 α 碳键合而成的天冬氨酸的氨基酸残基及源自乙酰基与 α 碳键合而成的谷氨酸的氨基酸残基,更优选为乙酰基与 α 碳键合而成的谷氨酸残基。

[0237] X^b 也可以是源自半胱氨酸的氨基酸残基、源自青霉胺的氨基酸残基或源自高半胱氨酸的氨基酸残基。其中,优选为源自高半胱氨酸的氨基酸残基。

[0238] X^c 及 X^d 中,不供给硫醚键的硫原子的一方的氨基酸残基也可以是源自2-氨基-3-[(2-乙酰基)氨基]丙酸、2-氨基-4-[(2-乙酰基)氨基]丁酸、N- δ -乙酰基-鸟氨酸、N- ϵ -乙酰基-赖氨酸或N- ζ -乙酰基-高赖氨酸的氨基酸残基。其中,优选源自N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基及源自N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基,更优选源自N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基。

[0239] X^c 及 X^d 中,供给硫醚键的硫原子的一方的氨基酸残基也可以是源自半胱氨酸的氨基酸残基、源自青霉胺的氨基酸残基或源自高半胱氨酸的氨基酸残基。其中,优选为源自高半胱氨酸的氨基酸残基。

[0240] $(X_1)_{m1}$ 优选整体表示F,或表示 FX^g 。其中, X^g 表示任意的一个氨基酸残基,作为其例子,可举出丙氨酸、精氨酸。

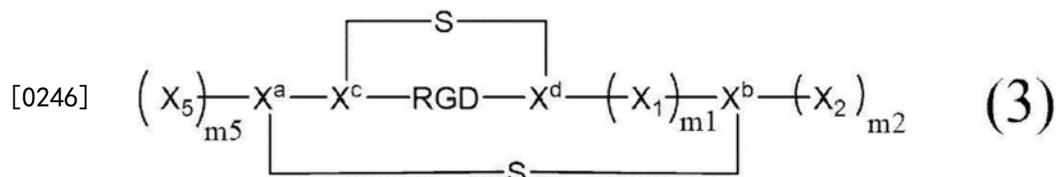
[0241] $(X_2)_{m2}$ 优选含有3个残基以上连续的K。K的反复数的上限没有特别限制,例如也可以是10、6或4。 $(X_2)_{m2}$ 也可以整体表示例如A、K、KKK、AKKK等。

[0242] 在一个优选的实施方式中, X^a 是源自乙酰基与 α 碳键合而成的任意的氨基酸的氨基酸残基, X^b 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^c 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^d 是源自N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基或源自N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基, $(X_1)_{m1}$ 整体为F。此时, X^a 优选为源自乙酰基与 α 碳键合而成的异亮氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苏氨酸或缬氨酸的氨基酸残基。并且, $(X_2)_{m2}$ 整体也可以是A、K、KKK、或AKKK。

[0243] 在另一个优选的实施方式中, X^a 是源自乙酰基与 α 碳键合而成的任意的氨基酸的氨基酸残基, X^b 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, X^c 是源自N- δ -乙酰基-鸟氨酸的氨基酸残基或源自N- ϵ -乙酰基-赖氨酸的氨基酸残基, X^d 是源自高半胱氨酸的氨基酸残基, $(X_1)_{m1}$ 整体为F。此时, X^a 优选为源自乙酰基与 α 碳键合而成的异亮氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苏氨酸或缬氨酸的氨基酸残基。并且, $(X_2)_{m2}$ 整体也可以是A、K、KKK、或AKKK。

[0244] 而且,本发明所涉及的环肽也可以是在上述式(2)的环肽的N末端添加追加的氨基酸而成的结构的环肽。这种环肽的结构能够由以下式(3)表示。

[0245] [化学式编号17]



[0247] 其中,式(3)中的 X^a 、 X^b 、 X^c 、 X^d 、 X_1 、 X_2 、 $m1$ 及 $m2$ 的含义与上述式(2)中的 X^a 、 X^b 、 X^c 、 X^d 、

X_1 、 X_2 、 m_1 及 m_2 相同,优选的方式也相同。并且, X_5 及 m_5 的含义与上述式(1)中的 X_5 及 m_5 相同,优选的方式也相同。

[0248] 其中,在式(3)的环肽中, X_a 不是硫醚键的硫原子经由有机基团与 α -碳上的氨基键合的氨基酸残基。因此,作为 X^a 及 X^b 的组合的例子及优选例,可举出在式(2)的说明中作为 X^c 及 X^d 的组合的例子及优选列举出的氨基酸残基。 X^a 和 X^b 中哪一个是供给硫醚键的硫原子的氨基酸残基没有特别限制,例如可以是 X^a 。

[0249] $(X_5)_{m_5}$ 整体也可以是A、K、KKK、或AKKK。

[0250] 关于本发明所涉及的环肽,通过实施例中的“(2)环肽的固定”及“(3)整联蛋白键合性的评价”中记载的方法测定的解离常数优选为200nM(M;mol/L)以下,更优选为100nM以下,进一步优选为50nM以下。解离常数越接近0nM越优选,从实际上的观点出发,作为能够与上述上限值组合的下限值,例如也可以使用0.1nM或0.5nM。并且,关于本发明所涉及的环肽,通过实施例中的“(4)分子稳定性的评价”中记载的方法测定的残留率优选为30%以上,更优选为50%以上,进一步优选为70%以上。残留率越接近100%越优选,因此作为能够与上述下限值组合的上限值,也可以使用100%。

[0251] 只要是识别RGD序列的整联蛋白,本发明中的整联蛋白没有特别限定。在后述的实施例中,使用整联蛋白 $\alpha v\beta 5$ 进行键合性的评价,但整联蛋白并不限于此,本发明所涉及的环肽能够与识别 $\alpha v\beta 3$ 的RGD序列的整联蛋白键合。

[0252] 并且,将耐碱性作为指标测定了本发明所涉及的环肽的分子稳定性,但本发明所涉及的环肽的分子稳定性在对于碱以外的刺激的耐性,例如在X射线耐性、 γ 射线耐性、紫外线耐性、耐热性、耐化学性方面也同样地发挥。例如,由于耐碱性优异,在细胞提纯中使用将本发明所涉及的环肽用作亲和配体的亲和色谱用担体时,即使反复用碱清洗,也维持整联蛋白键合性,能够减少细胞分离成本。

[0253] 在以下表3-1及表3-2中记载本发明所涉及的环肽的例子。表3-1及表3-2中记载的环肽1~47均为所有的氨基酸残基不具有L-氨基酸残基或甘氨酸等光学异构体的氨基酸残基。表中,Hcy表示高半胱氨酸残基,Dab(acetyl:乙酰基)表示2-氨基-4-乙酰氨基-丁酸残基,Dap(acetyl)表示2-氨基-3-乙酰氨基-丙酸残基,Orn(acetyl)表示N- δ -乙酰基-鸟氨酸残基,K(acetyl)表示N- ϵ -乙酰基-赖氨酸残基。

[0254] 含有这些乙酰基的氨基酸残基中的乙酰基中的甲基上的氢原子中的一个被作为硫醚键的键合对象的氨基酸残基中的与硫原子的键取代,形成基于硫醚键的交联。并且,在交联部氨基酸残基的栏中,省略记载乙酰基。

[0255] 表3-1及表3-2中,括号内记载的氨基酸残基及以粗体记载的氨基酸残基表示通过硫醚键交联的氨基酸残基。并且,以斜体记载的氨基酸残基彼此表示通过硫醚键交联的氨基酸残基的组合之一,以非斜体的粗体记载的氨基酸残基彼此表示通过硫醚键交联的氨基酸残基的组合之一。

[0256] 例如,在环肽1中,斜体的“Dap”和斜体的“Hcy”表示通过硫醚键交联的氨基酸残基,粗体“I”和粗体“Hcy”表示通过硫醚键交联的氨基酸残基。

[0257] 表3-1及表3-2中的 X^a 的栏中的“ α -NH₂”是指氨基酸残基的 α -NH₂经由氯乙酰基(其中,硫醚键形成后,不存在氯基)与作为键合对象的氨基酸残基形成硫醚键。

[0258] 例如,在环肽21中,氨基酸残基 X^a 是“K”:赖氨酸,表示赖氨酸不是侧链上的NH₂,而

是“α-NH₂”经由氯乙酰基与作为键合对象的氨基酸残基形成硫醚键。

[0259]

[表 3-1]

编 号	环肽						序 列 编 号
	识别名	氨基酸序列 (N末端→C末端)	交联部氨基酸残基1		交联部氨基酸残基2		
			X ^a	X ^b	X ^c	X ^d	
1	环肽1	I(Dap(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dap	Hcy	1
2	环肽2	I(Dab(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dab	Hcy	2
3	环肽3	I(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	3
4	环肽4	I(K(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	K	Hcy	4
5	环肽5	I-(Hcy)-RGD(Dap(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Dap	5
6	环肽6	ICRGD(Dap(acetyl))FCCKK	α-NH ₂	C	C	Dap	6
7	环肽7	I-(Hcy)-RGD(Dab(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Dab	7
8	环肽8	ICRGD(Dab(acetyl))FCCKK	α-NH ₂	C	C	Dab	8
9	环肽9	I-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	9
10	环肽10	ICRGD(Orn(acetyl))FCCKK	α-NH ₂	C	C	Orn	10
11	环肽11	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	11
12	环肽12	ICRGD(K(acetyl))FCCKK	α-NH ₂	C	C	K	12
13	环肽13	I(Dap(acetyl))RGD-(Hcy)-F-C-KKK	α-NH ₂	C	Dap	Hcy	13
14	环肽14	I(Dap(acetyl))RGD-C-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dap	C	14
15	环肽15	I(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-C-KKK	α-NH ₂	C	Orn	Hcy	15
16	环肽16	I(Orn(acetyl))RGD-C-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	C	16
17	环肽17	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-C-KKK	α-NH ₂	C	Hcy	K	17
18	环肽18	I-C-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	C	K	18
19	环肽19	I-(Hcy)-RGD(Dab(acetyl))F-C-KKK	α-NH ₂	C	Hcy	Dab	19
20	环肽20	I-C-RGD(Dab(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	C	Dab	20
21	环肽21	K(Dap(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dap	Hcy	21
22	环肽22	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-K	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	22
23	环肽23	I(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Pen)-KKK	α-NH ₂	Pen	Orn	Hcy	23
24	环肽24	E(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Pen)-KKK	α-NH ₂	Pen	Orn	Hcy	24

[0260]

[表 3-2]

编号	环肽					序列 编号	
	识别名	氨基酸序列 (N末端→C末端)	交联部氨基酸残基1		交联部氨基酸残基2		
			X ^a	X ^b	X ^c		X ^d
25	环肽25	Y-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	25
26	环肽26	L-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	26
27	环肽27	T-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	27
28	环肽28	V-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	28
29	环肽29	D-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	29
30	环肽30	E-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	30
31	环肽31	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))P-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	31
32	环肽32	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))Y-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	32
33	环肽33	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))FR-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	33
34	环肽34	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))FA-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	34
35	环肽35	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	35
36	环肽36	A-(Hcy)-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F(K(acetyl))KKK	Hcy	K	Hcy	K	36
37	环肽37	KKK-(Hcy)-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F(K(acetyl))A	Hcy	K	Hcy	K	37
38	环肽38	V(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	38
39	环肽39	D(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	39
40	环肽40	E(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	40
41	环肽41	V-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	41
42	环肽42	D-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	42
43	环肽43	E-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	43
44	环肽44	V-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	44
45	环肽45	D-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	45
46	环肽46	E-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	46
47	环肽47	E-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	47

[0261] 其中,优选环肽3、11、14~18、20、22~30、35、38~40及42~47,更优选环肽11、22、25~30、35、38~40及42~47,更进一步优选环肽29及30。

[0262] 序列的变化也可以将环肽整体视为基准序列来适用。因此,对序列号1~序列号47中的任一个氨基酸序列加成、缺失或取代了氨基酸残基的氨基酸基只要满足本发明所涉及的环肽的必要条件,也能够使用。其中,环状链段中的RGD区域不得改变。在对序列号1~序列号47中的任一个氨基酸序列进行氨基酸残基的加成、缺失或取代的情况下,加成、缺失或取代的氨基酸残基的总数优选为1~10,更优选为1~5,进一步优选为1~3,尤其优选为1或2。

[0263] 本发明所涉及的环肽优选与序列号1~序列号47中的任一个氨基酸序列具有70%以上的序列同源性,更优选具有80%以上的序列同源性,进一步优选具有90%以上的序列同源性。另外,例如与序列号1的氨基酸序列具有70%以上的序列同源性的氨基酸序列的范围也包含序列号1的氨基酸序列本身。

[0264] 在本发明中,如下求出两个氨基酸序列的序列同源性。

[0265] (i) 进行两个氨基酸序列的对准

[0266] 例如,使用能够在初始设定中使用的FASTA、BLAST等对准算法和/或程序,能够进行两个序列之间的对准。

[0267] (ii) 计算序列同源性

[0268] 根据所得到的对准,通过下式计算序列同源性。

[0269] 序列同源性[%] = (一致位置数/总位置数) × 100[%]

[0270] 总位置数是对准的长度,一致位置数是氨基酸的种类一致的位置的数量。

[0271] (iii) 序列同源性的计算例

[0272] 例如,考虑以下氨基酸序列。

[0273] 序列A……AYHRGELVWE

[0274] 序列B……SAWHGELVW-

[0275] 若在上述条件下对其进行对准,则变成如下。其中,在序列A、B之间氨基酸(残基)的种类一致的部位,为了便于观察,标注符号“|”。并且,“-”表示没有对应的氨基酸的部位。

[0276]

序列A	-	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	E
序列B	S	A	W	H	-	G	E	L	V	W	-

[0277] 在该例子中,总位置数为11,一致位置数为7,因此按照上述式计算出的序列同源性为 $7/11 \times 100 = 63.6\%$ 。

[0278] (细胞支架材料)

[0279] 本发明所涉及的细胞支架材料包含本发明所涉及的环肽和基材。

[0280] 由于细胞在生体内由细胞外基质支承,因此通过使用本发明所涉及的环肽作为再现相同的状态的细胞支架材料,能够更良好地培养细胞。

[0281] 作为用于细胞培养的上述基材,可举出由聚乳酸、聚乙醇酸、聚己内酯等生物可降解性聚酯类、胶原蛋白或其热变性体的明胶、纤连蛋白等糖蛋白质、或透明质酸、甲壳素、藻酸等多糖类构成的基质。例如,通过使本发明所涉及的环肽中的固定化官能团与基材中的官能团反应,能够使本发明所涉及的环肽与基材键合。例如,在本发明所涉及的环肽具有赖氨酸残基的氨基作为固定化官能团的情况下,通过使氨基与基材上的羧基反应而形成酰胺键,能够将环肽固定在基材上。通过使用这种方法,能够得到本发明所涉及的环肽与基材的

表面键合而成的细胞支架材料。本发明所涉及的环肽的量没有特别限定,相对于基材的总质量,可以是0.01质量%~100质量%,也可以是0.1质量%~50质量%。

[0282] 本发明所涉及的细胞支架材料能够赋予到培养皿、烧瓶、板(例如,聚苯乙烯孔板)、培养袋、中空纤维膜、珠等任意的培养工具上。

[0283] 由于本发明所涉及的细胞支架材料含有本发明所涉及的环肽,因此与整联蛋白具有良好的键合性,细胞能够良好地粘附在细胞支架材料上。

[0284] 作为成为培养对象的细胞,只要是表现整联蛋白的生物的细胞,则没有特别限定,可以是任意的动物细胞,也可以是任意的脊椎动物细胞,也可以是任意的哺乳类细胞,也可以是人的细胞,也可以是人以外的哺乳类细胞。

[0285] 作为细胞的例子,可举出胚胎干(ES)细胞、人工多能性干(iPS)细胞、围产期干细胞、源自羊水的干细胞(AFSC)、任意起源的间叶系干细胞(MS C)、任意组织型的已确定分化方向的前体细胞或成人细胞、成熟细胞、正常细胞、患病细胞、肿瘤细胞等。作为更具体的例子,可举出肝脏细胞、实质细胞、星形细胞、内皮细胞、肝细胞、胆管细胞、胆树细胞、胰腺细胞等。这些细胞的例示对于后述的细胞分离材料及培养基也相同。

[0286] (细胞分离材料)

[0287] 本发明所涉及的细胞分离材料包含本发明所涉及的环肽和保持材料。由于本发明所涉及的细胞分离材料包含本发明所涉及的环肽,因此能够与细胞表面的整联蛋白键合,捕捉细胞。因此,通过将本发明所涉及的细胞分离材料例如用作亲和色谱,能够有效地从细胞悬浊液中分离细胞。

[0288] 例如,通过使本发明所涉及的环肽中的固定化官能团与保持材料中的官能团反应,能够使本发明所涉及的环肽与保持材料键合。例如,在本发明所涉及的环肽具有赖氨酸残基的氨基作为固定化官能团的情况下,通过使氨基与保持材料上的羧基反应而形成酰胺键,能够将环肽固定在保持材料上。

[0289] 保持材料没有特别限制,例如可以由选自琼脂糖、葡聚糖、淀粉、纤维素、普鲁兰多糖、甲壳素、壳聚糖、三乙酸纤维素及二乙酸纤维素等多糖类及其衍生物、以及聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚烷基乙烯醚及聚乙烯醇等乙烯系聚合物等中的材料构成。

[0290] 这些材料也可以形成交联结构。交联结构具有提高机械强度的倾向。

[0291] 保持材料优选由上述材料中的一种或两种以上的材料组成。

[0292] 并且,保持材料优选为多孔质,更优选为多孔膜或多孔粒子,进一步优选为多孔粒子。

[0293] 也能够将在水不溶性的保持材料上固定本发明所涉及的环肽的细胞分离材料用于亲和色谱。

[0294] 作为水不溶性的保持材料,例如可举出结晶性纤维素、交联纤维素、交联琼脂糖、交联葡聚糖及交联普鲁兰多糖等多糖类、丙烯酸酯系聚合物及苯乙烯系聚合物等有机保持材料、玻璃珠及硅胶等无机保持材料、以及通过它们的组合而得到的有机-有机、有机-无机等复合保持材料等。

[0295] 作为水不溶性保持材料,从耐碱性的观点出发,更优选多糖类或丙烯酸酯系聚合物,进一步优选琼脂糖或纤维素等多糖类。

[0296] 作为能够用作水不溶性保持材料的市售品,例如可举出作为多孔纤维素凝胶的Cellufine GCL2000(JNC Corporation制造)(CELLUFINE为注册商标)、Cellufine MAX(JNC Corporation制造)、通过共价键将烯丙基葡聚糖与亚甲基双丙烯酰胺交联而成的Sephacryl S-1000SF(GE Healthcare制造)(SEPHACRYL为注册商标)、作为丙烯酸酯系保持材料的TOYOPEARL(Tosoh Corporation制造)(TOYOPEARL为注册商标)、TOYOPEARL AF-Carboxy-650(Tosoh Corporation制造)、TOYOPEARL GigaCap CM-650(Tosoh Corporation制造)、作为琼脂糖系交联保持材料的Sepharose CL4B(GE Healthcare制造)(SEPHAROSE为注册商标)及作为用环氧基活化的聚甲基丙烯酸酰胺的Eupergit C250L(Sigma-Aldrich Co.LLC制造)(EUPERGIT为注册商标)等。

[0297] 其中,本发明中的水不溶性保持材料并不限定于这些保持材料或活化保持材料。并且,本发明中使用的水不溶性保持材料从本吸着材料的使用目的及方法来看,优选表面积大,优选为具有多个适当的大小的细孔的多孔质。作为保持材料的形态,没有特别限定,可以是珠状、纤维状、膜状及中空丝状等任意形状,能够选择任意的形态。

[0298] 作为将本发明所涉及的环肽固定在水不溶性保持材料上的方法,如上所述,可举出使用赖氨酸残基的氨基的固定化方法,但并不限于此。

[0299] 通常能够采用将蛋白质或多肽固定在保持材料上时采用的方法。例如,可举出使保持材料与溴化氰、环氧氯丙烷、二缩水甘油醚、甲苯磺酰氯、三氟代乙烷磺酰氯及胍等反应而使保持材料活化或将反应性官能团导入到保持材料表面,与本发明所涉及的环肽反应、固定的方法、并且在保持材料和本发明所涉及的环肽存在的系统中加入如碳二亚胺那样的耦合试剂或如甘油醛那样在分子中具有多个官能团的试剂进行耦合、交联的固定化。

[0300] 在将本发明所涉及的环肽固定在保持材料上时,优选将本发明所涉及的环肽溶解(分散)在水系溶剂(水系分散介质)或有机系溶剂(有机系分散介质)中。

[0301] 作为水系溶剂(水系分散介质),没有特别限定,例如能够举出HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid;羟乙基哌嗪乙硫磺酸)缓冲液、乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、三盐酸缓冲液等。

[0302] 有机系溶剂(有机系分散介质)没有特别限定,优选为极性有机溶剂,尤其优选DMSO(dimethyl sulfoxide;二甲基亚砜)、DMF(N,N-dimethylformamide;N,N二甲基甲酰胺)或醇,例如可举出甲醇、乙醇、IPA(isopropyl alcohol;异丙醇)、TFE(2,2,2-trifluoroethanol;2,2,2-三氟乙醇)及HFIP(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol;1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇)等。

[0303] 使本发明所涉及的环肽固定化时的pH条件没有特别限定,可以是酸性、中性及碱性中的任一种,例如能够根据所使用的溶剂(分散介质)适当设定。

[0304] 例如,在设为碱性的情况下,也可以将DBU(diazabicycloundecene;二氮杂二环)或TEA(triethylamine;三乙基胺)等碱添加到DMSO(dimethyl sulfoxide;二甲基亚砜)或醇中。

[0305] 将上述细胞分离材料设为亲和色谱用填充剂时的本发明所涉及的环肽的密度没有特别限定,优选为0.1mmol/填充剂1L~1,000mmol/填充剂1L,更优选为0.1mmol/填充剂1L~100mmol/填充剂1L,进一步优选为0.5mmol/填充剂1L~20mmol/填充剂1L。若环肽的密度在上述范围内,则本发明所涉及的环肽的使用量与细胞分离性能的平衡良好,能够以更

低成本有效地分离细胞。

[0306] 只要是表现整联蛋白的生物的细胞,由本发明所涉及的细胞分离材料分离的细胞没有特别限定,可以是任意的动物细胞,也可以是任意的脊椎动物细胞,也可以是任意的哺乳类细胞,也可以是人的细胞或人以外的哺乳类细胞。

[0307] (培养基)

[0308] 本发明所涉及的培养基包含本发明所涉及的环肽和培养成分。

[0309] 通过在本发明所涉及的培养基中含有本发明所涉及的环肽,产生在培养基中培养的细胞的整联蛋白与环肽的键合,通过传递来自整联蛋白的信号,能够得到经由凋亡抑制的细胞生存率上升等效果。

[0310] 上述培养成分是指用于培养细胞的培养基成分。并且,作为成为培养对象的细胞,只要是表现整联蛋白的生物的细胞,则没有特别限定,可以是任意的动物细胞,也可以是任意的脊椎动物细胞,也可以是任意的哺乳类细胞,也可以是人的细胞,也可以是人以外的哺乳类细胞。

[0311] 作为含有培养成分的培养基,只要根据培养的细胞的种类适当选择即可,例如能够举出DMEM(达尔贝科改变伊格尔培养基)、MEM(伊格尔最小必须培养基)、F12、Ham、RPMI1640、MCDB(MCDB102、104、107、131、153、199等)、L15、SkBM(注册商标)、RITC80-7、MesenPro(Life Technologies Corporation)等。

[0312] 作为培养成分,可以将上述培养基等培养基直接以标准的组成(例如,以市售的状态)使用,也可以根据细胞种类或细胞条件适当变更其组成。因此,培养成分并不限定于公知的组成的成分,也可以是追加、去除、增量或减量一种或两种以上的成分的成分。

[0313] 作为培养成分中所包含的氨基酸,没有特别限定,可举出培养成分中所包含的公知的氨基酸。例如可举出L-精氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸等。

[0314] 作为培养成分中所包含的维生素类,没有特别限定,例如可举出D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、异肌醇、烟酰胺、核黄素、硫胺、吡哆醇、生物素、硫辛酸、维生素B12、腺嘌呤、胸苷等。

[0315] 作为培养成分中所包含的电解质,没有特别限定,可举出培养成分中所包含的公知的电解质。作为上述电解质,例如可举出 CaCl_2 、 KCl 、 MgSO_4 、 NaCl 、 NaH_2PO_4 、 NaHCO_3 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 MnSO_4 、 Na_2SiO_3 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、 NaVO_3 、 NiCl_2 、 ZnSO_4 等。

[0316] 关于培养成分,除了这些成分以外,还可以含有D-葡萄糖等糖类、丙酮酸钠、酚红等pH指示剂、腐胺、抗生素等。

[0317] 培养成分可以含有血清,也可以不含有血清。本发明所涉及的培养基中的血清的含量优选为0体积%以上且30体积%以下,更优选为0体积%以上且10体积%以下,进一步优选为0体积%以上且5体积%以下,尤其优选为0体积%以上且2体积%以下。

[0318] 本发明所涉及的培养基中的本发明所涉及的环肽的含量没有特别限定,例如是0.01ng/mL~10mg/mL,也可以是0.1ng/mL~1mg/mL。在本发明所涉及的培养基中,与细胞支架材料、细胞分离材料的情况不同,不需要固定环肽。

[0319] 如以上说明,根据本发明,能够提供一种整联蛋白键合性优异,且分子稳定性,例

如耐碱性优异的环肽、以及含有上述环肽的细胞支架材料、细胞分离材料及培养基。

[0320] 实施例

[0321] 通过以下实施例对本发明所涉及的实施方式进一步具体地进行说明,但实施方式并不限定于此。

[0322] 另外,在实施例中“M”是指“mol/L”。

[0323] (1) 环肽的合成

[0324] 使用全自动肽合成装置(型号:PSSM-8,Shimadzu Corporation制造)分别合成了表3-1及表3-2中记载的环肽1~47及下述表4中记载的环肽48及49。另外,当对于在实施例中制作的环肽中所包含的氨基酸残基存在光学异构体时,氨基酸残基均为L体。

[0325] 例如,在实施例中制作的肽中的D的标记表示L-天冬氨酸残基。

[0326] [表4]

[0327]

		环肽					序列 编号	
		识别名	氨基酸序列 (N末端→C末端)	交联部氨基酸残基1		交联部氨基酸残基2		
				X ^a	X ^b	X ^c		X ^d
比较 例	1	环肽48	KCRGDCFCCKK	α-NH ₂	C	C	C	48
	2	环肽49	ACDCRGDCFCGKKK	C	C	C	C	49

[0328] 表4中,在环肽48中,斜体的“C”和“C”表示通过二硫化物键交联的氨基酸残基,粗体的“K”和“C”表示通过硫醚键交联的氨基酸残基。并且,在环肽49中,斜体及粗体的“C”分别表示通过二硫化物键交联的氨基酸残基。

[0329] (2) 环肽的固定

[0330] 在表面等离子体激元共振装置(产品名:Biacore3000、GE Healthcare制造)中设置市售的CM5传感器芯片(羧甲基葡聚糖导入型,GE Healthcare制造),使SPR(surface plasmon resonance;表面等离子体激元共振)用HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid;羟乙基哌嗪乙硫磺酸)缓冲液(20mM:HEPES-HCl、150mM:NaCl、pH7.4)以10 μ L/分钟的流速稳定,添加0.2M的EDC(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide;1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)和0.04M的NHS(N-Hydroxysuccinimide;N-羟基琥珀酰亚胺)混合水溶液70 μ L。然后,将用HEPES缓冲液稀释至0.2g/L的上述各环肽的试样液300 μ L供给到传感器芯片,然后,用乙醇胺溶液实施封闭处理,用氢氧化钠水溶液清洗,进行了固定。其中,仅对于具有作为固定化官能团的氨基的赖氨酸残基数为1的环肽22,将供给到传感器芯片时的试样液设为5000 μ L,而不是300 μ L。同样地,在该传感器芯片的其他流路中不固定试样,添加0.2M的EDC和0.04M的NHS混合水溶液70 μ L后,进行了封闭处理和清洗处理。以下将所得到的固定化传感器芯片称为“固定化传感器芯片A”。

[0331] (3) 整联蛋白键合性的评价

[0332] 在上述(1)中制作的固定化传感器芯片A的各流路中,在25℃下,添加10分钟使用加入氯化镁以达到5mM的HEPES缓冲液稀释到30nM的人整联蛋白 α v β 5后,将该缓冲液(加入氯化镁)作为运行缓冲液流动30分钟,利用Biacore3000进行了测定。然后,通过使0.5M的EDTA水溶液在各流路中流动10分钟,进行了去除人整联蛋白 α v β 5的再生处理。进一步也对100nM的人整联蛋白 α v β 5、300nM的人整联蛋白 α v β 5及1000nM的人整联蛋白 α v β 5同样地进行由上述添加整联蛋白10分钟、使运行缓冲液流动30分钟、通过Biacore3000进行测定及通过0.5M的EDTA水溶液进行再生处理组成的测定处理。根据使各浓度的人整联蛋白 α v β 5流动时

的已固定环肽的流路中的基于Biacore3000的测定值与未固定环肽的流路中的基于Biacore3000的测定值的差分,计算环肽与人整联蛋白 $\alpha\text{v}\beta 5$ 的解离常数,按照下述的评价基准,对整联蛋白键合性进行了评价。优选为评价基准A、B或C。将评价结果示于表5-1及表5-2中。

[0333] 通过使用评价基准A、B及C的环肽,能够进行环肽与整联蛋白的特异性键合,能够进行更有效的细胞控制。

[0334] (解离常数的评价基准)

[0335] A……解离常数为50nM以下。

[0336] B……解离常数超过50nM,且为100nM以下。

[0337] C……解离常数超过100nM,且为200nM以下。

[0338] D……解离常数超过200nM。

[0339] (4) 分子稳定性的评价

[0340] 环肽的分子稳定性通过利用LC/MS(Liquid Chromatography Mass Spectroscopy;液相色谱质谱法)分析进行碱处理的环肽水溶液来进行了评价。

[0341] 碱处理通过以下方法进行。制备500 μM 的环肽水溶液,在该水溶液中加入当量的1M氢氧化钠水溶液,在15 $^{\circ}\text{C}$ 下温育20分钟,由此得到碱处理环肽水溶液。将碱处理前的环肽的LC/MS中的所有峰的总面积设为100%,通过求出碱处理环肽水溶液的LC/MS中的所有峰的总面积的比例,计算环肽残留率,按照以下的评价基准,评价了分子稳定性。优选为评价基准A、B或C。

[0342] 将评价结果示于表5-1及表5-2中。

[0343] 通过使用评价基准A、B及C的环肽,即使长期或反复使用环肽也能够与细胞特异性地键合,即使在长期或反复的工艺中使用也能够控制细胞,能够进一步减少成本。

[0344] (环肽残留率的评价基准)

[0345] A……环肽的残留率为70%以上。

[0346] B……环肽的残留率为50%以上且小于70%。

[0347] C……环肽的残留率为30%以上且小于50%。

[0348] D……环肽的残留率小于30%。

[0349] 另外,在分子稳定性的评价中使用的LC/MS设为以下条件。

[0350] • LC装置:Prominence系列(泵、柱烘箱、自动取样器、检测器)(Shimadzu Corporation制造)

[0351] • MS检测器:LC/MS2010EV(Shimadzu Corporation制造)

[0352] • 柱:Cadenza CD-C18,内径2.0mm $\times$ 长度250mm,粒径3 μm (Intact Corporation制造)

[0353] • 洗脱液A:含有10mM甲酸铵作为溶解物,溶剂为水100%的溶液(pH3)

[0354] • 洗脱液B:含有10mM甲酸铵作为溶解物,溶剂为乙腈/水=90/10的溶液(pH3)

[0355] • 流速:0.2mL/分钟

[0356] • 注入量:4 μL

[0357] • 梯度:0-30%:洗脱液B(0-30分钟)、100%:洗脱液B(30-40分钟)、0%:洗脱液B(40-60分钟)(B表示洗脱液B)

[0358] • 柱温度:45℃

[0359] • 离子化法:ESI(Electrospray Ionization;电喷雾电离)正,ESI负

[0360]

[表 5-1]

编号	环肽							性能评价		序列 编号	
	识别名	氨基酸序列 (N末端→C末端)	交联部氨基酸 残基1		交联部氨基酸 残基2		交联结构	整联蛋白 键合性	分子稳 定性		
			X ^a	X ^b	X ^c	X ^d					
实 施 例	1	环肽1	I(Dap(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dap	Hcy	硫醚键	B	A	1
	2	环肽2	I(Dab(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dab	Hcy	硫醚键	C	A	2
	3	环肽3	I(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	硫醚键	A	A	3
	4	环肽4	I(K(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	K	Hcy	硫醚键	B	A	4
	5	环肽5	I-(Hcy)-RGD(Dap(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Dap	硫醚键	B	A	5
	6	环肽6	ICRGD(Dap(acetyl))FCKKK	α-NH ₂	C	C	Dap	硫醚键	C	B	6
	7	环肽7	I-(Hcy)-RGD(Dab(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Dab	硫醚键	B	A	7
	8	环肽8	ICRGD(Dab(acetyl))FCKKK	α-NH ₂	C	C	Dab	硫醚键	A	B	8
	9	环肽9	I-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	硫醚键	B	A	9
	10	环肽10	ICRGD(Orn(acetyl))FCKKK	α-NH ₂	C	C	Orn	硫醚键	B	B	10
	11	环肽11	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	A	11
	12	环肽12	ICRGD(K(acetyl))FCKKK	α-NH ₂	C	C	K	硫醚键	A	B	12
	13	环肽13	I(Dap(acetyl))RGD-(Hcy)-F-C-KKK	α-NH ₂	C	Dap	Hcy	硫醚键	B	A	13
	14	环肽14	I(Dap(acetyl))RGD-C-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dap	C	硫醚键	A	A	14
	15	环肽15	I(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-C-KKK	α-NH ₂	C	Orn	Hcy	硫醚键	A	A	15
	16	环肽16	I(Orn(acetyl))RGD-C-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	C	硫醚键	A	A	16
	17	环肽17	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-C-KKK	α-NH ₂	C	Hcy	K	硫醚键	A	A	17
	18	环肽18	I-C-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	C	K	硫醚键	A	A	18
	19	环肽19	I-(Hcy)-RGD(Dab(acetyl))F-C-KKK	α-NH ₂	C	Hcy	Dab	硫醚键	B	A	19
	20	环肽20	I-C-RGD(Dab(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	C	Dab	硫醚键	A	A	20
	21	环肽21	K(Dap(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Dap	Hcy	硫醚键	B	A	21
	22	环肽22	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-K	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	A	22
	23	环肽23	I(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Pen)-KKK	α-NH ₂	Pen	Orn	Hcy	硫醚键	A	A	23
	24	环肽24	E(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Pen)-KKK	α-NH ₂	Pen	Orn	Hcy	硫醚键	A	A	24

实施 例

[0361]

[表 5-2]

编号	识别名	氨基酸序列 (N末端→C末端)	环肽				性能评价		序列 编号		
			交联部氨基酸 残基1		交联部氨基酸 残基2		交联蛋白质 键合性	分子稳 定性			
			X ^a	X ^b	X ^c	X ^d					
25	环肽25	Y-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	25		
26	环肽26	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	26		
27	环肽27	T-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	27		
28	环肽28	V-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	28		
29	环肽29	D-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	29		
30	环肽30	E-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	30		
31	环肽31	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))P-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	B	31		
32	环肽32	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))Y-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	B	32		
33	环肽33	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))FR-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	C	33		
34	环肽34	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))FA-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	B	34		
35	环肽35	I-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	35		
36	环肽36	A-(Hcy)-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F(K(acetyl))KKK	Hcy	K	Hcy	K	硫醚键	B	36		
37	环肽37	KKK-(Hcy)-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F(K(acetyl))A	Hcy	K	Hcy	K	硫醚键	B	37		
38	环肽38	V(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	硫醚键	A	38		
39	环肽39	D(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	硫醚键	A	39		
40	环肽40	E(Orn(acetyl))RGD-(Hcy)-F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Orn	Hcy	硫醚键	A	40		
41	环肽41	V-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	硫醚键	B	41		
42	环肽42	D-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	硫醚键	A	42		
43	环肽43	E-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-KKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	硫醚键	A	43		
44	环肽44	V-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	44		
45	环肽45	D-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	45		
46	环肽46	E-(Hcy)-RGD(K(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	K	硫醚键	A	46		
47	环肽47	E-(Hcy)-RGD(Orn(acetyl))F-(Hcy)-AKKK	α-NH ₂	Hcy	Hcy	Orn	硫醚键	A	47		
实施 例	1	环肽48	KCRGDCFCCKK	α-NH ₂	C	C	C	二硫化物键、 硫醚键	A	D	48
	2	环肽49	ACDCRGDCFCGKKK	C	C	C	C	二硫化物键	A	D	49
比较											

实施 例

比 较 例

[0362] 由表5-1及表5-2中记载的结果可知,本发明所涉及的环肽与比较例的环肽相比,分子稳定性优异。在所有的在实施例中,环肽的残留率的值为50%以上(评价B以上),与此

相对,在所有的比较例中,环肽的残留率的价值作为实际值为25%以下。由以上可知,本发明所涉及的环肽的整联蛋白键合性及分子稳定性这两者优异。

[0363] 接着,使用上述中得到的环肽,制作本发明所涉及的细胞支架材料,使用该细胞支架材料进行了iPS细胞培养实验。

[0364] (聚苯乙烯板的表面处理)

[0365] 使用等离子体处理装置(SAKIGAKE-Semiconductor Co.,Ltd.制造:SCB-106),在氩气中,在气体压力10Pa、输出700W、处理时间5分钟的条件下,实施了聚苯乙烯制6孔板(Corning Incorporated制造)的表面处理。

[0366] (CMD涂层孔的制作)

[0367] 在羧甲基葡聚糖钠(Meito Sangyo Co.,Ltd.制造,商品名:“CMD”,分子量:100万,以下也称为“CMD”。)0.5g中加入蒸馏水9.5g进行搅拌,使其充分地溶解,制备出5质量%的CMD溶液。

[0368] 接着,在1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(以下,也称为“EDC”。)(NACALAI TESQUE,INC.制造)383.4mg中加入蒸馏水1mL以制备出EDC溶液。接着,在N-羧基琥珀酰亚胺(以下,也称为“NHS”。)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)57.5mg中加入蒸馏水1mL,制备出NHS溶液。

[0369] 接着,在上述中制备的CMD溶液10g中加入EDC溶液0.05mL、NHS溶液0.05mL并搅拌,将所得到的含CMD的涂层液立即逐1mL滴加到上述中表面处理的聚苯乙烯板的一个孔中。将聚苯乙烯板在室温下静置1小时后,用蒸馏水充分地清洗孔,去除含CMD的涂层液,制作CMD涂层孔。

[0370] (配体涂层孔的制作)

[0371] 在环肽11:0.2mg中加入HBS-N缓冲液(GE Yokogawa Medical SystemsLtd.制造)1mL,制备出环肽溶液。接着,在EDC76.7mg中加入蒸馏水1mL以制备出EDC溶液。接着,在NHS:11.5mg中加入蒸馏水1mL以制备出NHS溶液。接着,在乙醇胺(BIO RAD公司制造,商品名:“ProteOn乙醇胺HCL”)1mL中加入蒸馏水1mL,制备出乙醇胺溶液。

[0372] 接着,在上述中制备的EDC溶液:0.5mL中加入NHS溶液0.5mL并搅拌,将所得到的混合液1mL立即滴加到上述CMD涂层孔。将聚苯乙烯板静置7分钟后,用蒸馏水充分地清洗孔,去除混合液。而且,将环肽溶液15:1mL滴加到孔中,静置60分钟后,用蒸馏水充分地清洗孔,去除环肽溶液。而且,将乙醇胺溶液1mL滴加到孔中,静置7分钟后,用蒸馏水充分地清洗孔,去除乙醇胺溶液,得到具有环肽11固定在作为基材的CMD上的细胞支架材料的孔(以下,也称为“配体涂层孔”)。

[0373] (γ 射线灭菌处理)

[0374] 将在上述中制作的配体涂层孔密闭到灭菌袋中,通过RADIA INDUSTRYCO.,LTD.制造的照射设施1号机在剂量25kGy的条件下实施了 γ 射线灭菌处理。

[0375] 由此,制作了“已照射 γ 射线的细胞支架材料A”。

[0376] -肽的iPS细胞培养性能的评价-

[0377] iPS细胞使用了由Fujifilm Cellular Dynamics,Inc.建立的01434克隆。以split rate=1:6将iPS细胞播种到表面具有已照射 γ 射线的细胞支架材料A的培养聚苯乙烯板上,在无饲养细胞的ES及iPS细胞培养用培养基(Stem Cell Technologies制造,产品名:

mTeSR1) 中培养3天后,通过使用细胞解离试剂(Thermo Fisher公司,产品名:TrypLE Select)的处理将iPS细胞单细胞剥离并回收。从所得到的细胞悬浊液中,使用生死细胞自动分析仪(BECKMAN COULTER制造,产品名:Vi-Cell XR)测量细胞数,判定细胞是否增殖。

[0378] 由上述结果确认到使用实施例11的肽的细胞支架材料中iPS细胞增殖。由此,本发明所涉及的环肽的整联蛋白键合性优异,因此表示具有作为细胞支架材料的功能。

[0379] 于2019年6月11日申请的日本专利申请2019-108953号的公开的全部内容通过参考而引入本说明书中。

[0380] 本说明书所记载的全部文献、专利申请以及技术标准,与具体且分别地记载将各个文献、专利申请以及技术标准通过参考而引入的情况相同程度地,通过参考而引入本说明书中。

序 列 表

<110> 富士胶片株式会社
<120> 环肽、细胞支架材料、细胞分离材料及培养基
<130> 19F00787W1
<140> PCT/JP2020/022559
<141> 2020-06-08
<150> JP2019-108953
<151> 2019-06-11
<160> 49
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽1
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 2-氨基-3-(乙酰基氨基)丙酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 1
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽2
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 2-氨基-4-(乙酰基氨基)丁酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 2
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 3

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽3
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 3
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽4
<220>

<221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 4
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽5
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)

<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 2-氨基-3-(乙酰基氨基)丙酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 5
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽6
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 2-氨基-3-(乙酰基氨基)丙酸
<400> 6
Xaa Cys Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽7
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 2-氨基-4-(乙酰基氨基)丁酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 7
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽8
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 2-氨基-4-(乙酰基氨基)丁酸
<400> 8
Xaa Cys Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽9
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 9
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽10
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)
 <223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
 <400> 10
 Xaa Cys Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽11
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 11
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 12

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽12
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<400> 12
Xaa Cys Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽13
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 2-氨基-3-(乙酰基氨基)丙酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<400> 13
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽14
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 2-氨基-3-(乙酰基氨基)丙酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)

<223> 高半胱氨酸
<400> 14
Xaa Xaa Arg Gly Asp Cys Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽15
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<400> 15
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽16

<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 16
Xaa Xaa Arg Gly Asp Cys Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽17
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<400> 17
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽18
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸

<400> 18
Xaa Cys Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 整合素结合环肽19

<220>

<221> THIOETH

<222> (1) .. (8)

<223> 残基1和8之间的硫醚键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> 高半胱氨酸

<220>

<221> THIOETH

<222> (2) .. (6)

<223> 残基2和6之间的硫醚键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> 2-氨基-4-(乙酰基氨基)丁酸

<400> 19

Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 整合素结合环肽20

<220>

<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 2-氨基-4-(乙酰基氨基) 丁酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 20
Xaa Cys Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽21
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)

<223> 2-氨基-3-(乙酰基氨基)丙酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 21
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽22
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 22
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys
1 5
<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽23
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N-乙酰基-L-异亮氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> N-δ-乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)

<223> 青霉胺
<400> 23
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽24
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N-乙酰基-L-Glutamine
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> N-δ-乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 青霉胺
<400> 24
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 25
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽25
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-tyrosine
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 25
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽26
<220>
<221> THIOETH

<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 26
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽27
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-苏氨酸

<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 27
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽28
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N-α-乙酰基-缬氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 28
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽29
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-天冬氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 29
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽30
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-谷氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 30
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys

1	5	10
<210>	31	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	整合素结合环肽31	
<220>		
<221>	THIOETH	
<222>	(1) .. (8)	
<223>	残基1和8之间的硫醚键	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	N- α -乙酰基-异亮氨酸	
<220>		
<221>	THIOETH	
<222>	(2) .. (6)	
<223>	残基2和8之间的硫醚键	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(2) .. (2)	
<223>	高半胱氨酸	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(6) .. (6)	
<223>	N- ϵ -乙酰基-赖氨酸	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(8) .. (8)	
<223>	高半胱氨酸	
<400>	31	
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Pro Xaa Lys Lys Lys		
1	5	10
<210>	32	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 整合素结合环肽32
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 32
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Tyr Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽33
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (9)
<223> 残基1和9之间的硫醚键
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9) .. (9)
<223> 高半胱氨酸
<400> 33
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Arg Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽34
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (9)
<223> 残基1和9之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)

<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9) .. (9)
<223> 高半胱氨酸
<400> 34
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Ala Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽35
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-异亮氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 35
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Ala Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽36
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (9)
<223> 残基2和9之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (3) .. (7)
<223> 残基3和7之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7) .. (7)
<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9) .. (9)

<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<400> 36
Ala Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽37
<220>
<221> THIOETH
<222> (4) .. (11)
<223> 残基4和11之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (5) .. (9)
<223> 残基5和9之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9) .. (9)
<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11) .. (11)
<223> N-ε-乙酰基-赖氨酸
<400> 37
Lys Lys Lys Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Ala
1 5 10
<210> 38
<211> 11

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽38
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-缬氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 38
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽39
 <220>
 <221> THIOETH

<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-天冬氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 39
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽40
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-谷氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 40
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽41
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-缬氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> THIOETH

<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 41
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽42
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-天冬氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 42
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 整合素结合环肽43
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (1) .. (8)
 <223> 残基1和8之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> N- α -乙酰基-谷氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> 高半胱氨酸
 <220>
 <221> THIOETH
 <222> (2) .. (6)
 <223> 残基2和6之间的硫醚键
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> 高半胱氨酸
 <400> 43
 Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Lys Lys Lys

1	5	10
<210>	44	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	整合素结合环肽44	
<220>		
<221>	THIOETH	
<222>	(1) .. (8)	
<223>	残基1和8之间的硫醚键	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	N- α -乙酰基-缬氨酸	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(2) .. (2)	
<223>	高半胱氨酸	
<220>		
<221>	THIOETH	
<222>	(2) .. (6)	
<223>	残基2和6之间的硫醚键	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(6) .. (6)	
<223>	N- ϵ -乙酰基-赖氨酸	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(8) .. (8)	
<223>	高半胱氨酸	
<400>	44	
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Ala Lys Lys Lys		
1	5	10
<210>	45	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 整合素结合环肽45
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-天冬氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 45
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Ala Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽46
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-谷氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 46
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Ala Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽47
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- α -乙酰基-谷氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)

<223> 高半胱氨酸
<220>
<221> THIOETH
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> N- δ -乙酰基-鸟氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> 高半胱氨酸
<400> 47
Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Xaa Ala Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 整合素结合环肽48
<220>
<221> THIOETH
<222> (1) .. (8)
<223> 残基1和8之间的硫醚键
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> N- ϵ -乙酰基-赖氨酸
<220>
<221> DISULFID
<222> (2) .. (6)
<223> 残基2和6之间的二硫键
<400> 48
Xaa Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Lys Lys Lys
1 5 10
<210> 49
<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 整合素结合环肽49

<220>

<221> DISULFID

<222> (2) .. (10)

<223> 残基2和10之间的二硫键

<220>

<221> DISULFID

<222> (4) .. (8)

<223> 残基4和8之间的二硫键

<400> 49

Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys Lys Lys

1

5

10