

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年3月19日 (19.03.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/035092 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) A61L 17/00 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61L 27/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) A61L 31/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/066568
- (22) 国際出願日: 2008年9月12日 (12.09.2008)
- (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2007-238437 2007年9月13日 (13.09.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 Nara (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷原 正夫 (TANI-HARA, Masao) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学内 Nara (JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外 (TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル青山特許事務所 Osaka (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) 発明の名称: 新規なポリペプチドおよびその製造方法

(57) Abstract: Disclosed are: a novel polypeptide which does not have the risk of causing the infection with any pathogenic bacterium or the transfer of any pathogenic factor, which produces no adverse side effect, and which is useful as a carrier for various physiologically active substances and apatite-type substances; and a method for producing the polypeptide. Specifically disclosed are: a polypeptide which comprises a peptide unit having an amino acid sequence represented by the formula: -Pro-X-Gly- [wherein X represents Pro or Hyp] and a peptide unit having an amino acid sequence represented by the formula: -Pro-Hyp(O-Y-Z)-Gly- [wherein Y represents a carbonyl group, a saturated or unsaturated hydrocarbon group which has or does not have a carbonyl group, or a saturated or unsaturated hydrocarbon group which has an aromatic group and which has or does not have a carbonyl group; and Z represents a carboxyl group]; and a method for producing the polypeptide.

(57) 要約: 本発明は、病原体の感染や病原性因子の伝達を生じる危険性や望ましくない副作用を生じる虞がなく、種々の生理活性物質やアパタイト類の担体として有用な新規なポリペプチドおよびその製造方法を提供する。具体的には、本発明は、式: -Pro-X-Gly- (式中、XはProまたはHypを表す) で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式: -Pro-Hyp(O-Y-Z)-Gly- (式中、Yはカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、Zはカルボキシル基を表す) で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含むポリペプチドおよびその製造方法を提供する。



WO 2009/035092 A1

明 細 書

新規なポリペプチドおよびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、病原体感染の危険性や望ましくない副作用を生じる虞がなく、生理活性物質やアパタイト類の担体として有用な新規なポリペプチド、ポリペプチド誘導体およびその製造方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、安全性の高い生体材料または生体適合材料、特に生体組織の補填、修復および／または再生に有用な新規なポリペプチド、ポリペプチド誘導体およびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] コラーゲンは、あらゆる多細胞生物に見られる繊維状タンパク質であり、皮膚や骨の主成分として哺乳類では全タンパク質の25%を占める。典型的なコラーゲン分子は、三本のコラーゲンポリペプチド鎖が三重らせん構造と呼ばれるロープ状の超らせん構造をとっている。コラーゲンにはプロリン(Pro)およびグリシン(Gly)が特に多く含まれ、両アミノ酸残基とも安定な三重らせん構造の形成に重要である。

[0003] コラーゲンの生体材料としての利用方法には、例えば、ブタの皮膚組織をそのままあるいは凍結乾燥した後、火傷などによる皮膚の損傷部位に移植する方法、酵素処理などによって細胞成分を除去して用いる方法、酸性溶液や酵素処理によって可溶化したコラーゲンを、所望の形態に再構成して用いる方法がある。非特許文献1には、一般的なコラーゲンの調製方法および定性方法が記載されている。

[0004] コラーゲンの利用について種々の提案がなされている。

例えば、特許文献1には、皮膚に潤いを与え、かつ皮膚をなめらかにするため、コラーゲンを含有する動物組織をアルコールでエステル化して修飾した後、修飾コラーゲンを抽出するコラーゲン誘導体の製造方法、およびそれを用いた化粧品基剤が提案されている。

[0005] また、特許文献2には、可溶性コラーゲンを、メチレン鎖の両端にイミドエステル基を有するアルキレンジイミデート二価性架橋試薬で架橋処理することにより、熱変性後における三重らせん構造の再生率が高く、水に可溶性の架橋コラーゲンを製造する

方法が記載されている。

- [0006] また、特許文献3には、コラーゲンを第1の合成親水性ポリマーと反応させてコラーゲン-合成ポリマーマトリックスを形成し、さらにコラーゲン-合成ポリマーマトリックスを、第2の合成親水性ポリマー、生物学的活性物質、グリコサミノグリカンおよびその誘導体、化学的架橋剤、エステル化剤、アミド化剤、アシル化剤、アミノ酸、ポリペプチドなどと反応させることにより、免疫原性が低く、種々の医療用途で使用される生体適合性移植物の調製に有用なコラーゲン-合成ポリマーマトリックスが記載されている。
- [0007] また、特許文献4には、pH7で実質的に非繊維形態である化学的修飾コラーゲンと共有結合した親水性合成ポリマーを含む結合体が記載されている。この文献には、前記結合体が、特に眼科用デバイスにおいて有用であり、光学的に透明で生体適合性を有することが記載されている。
- [0008] また、特許文献5には、コラーゲンマトリックスを碎断し、この碎断マトリックスを高遠心場で遠心し、沈殿を均質化してペーストとし、該ペーストを注型し、注型したペーストを37°C以下の温度で乾燥するコラーゲン膜状物質の製法が記載されている。このコラーゲン膜状物質は、生体適合性で非炎症性、かつ人工移植体として組織の修復に有用であることも記載されている。
- [0009] また、特許文献6には、魚鱗をそのまま若しくは脱灰した後、ペプシン処理することにより、高純度の可溶性魚鱗コラーゲンとその製造方法が記載されている。
- [0010] また、特許文献7には、70~90%エタノール媒質中に、コラーゲン溶液をノズルより吐出して、糸状物あるいは膜状物を生成し、乾燥した後、裁断または粉碎することにより、粒状または粉状の可溶性コラーゲン乾燥物を製造する方法が記載されている。
- [0011] また、特許文献8には、未焼成のヒドロキシアパタイト単結晶を、低抗原性化したコラーゲン線維の少なくとも一部に付着させ、骨などの生体硬組織を修復する材料として用いることが記載されている。
- [0012] また、特許文献9には、動物または人間由来のコラーゲン中のプリオンを除去するために、コラーゲン溶液中の細胞および組織の断片を除去し、アルカリ処理する方法およびこの方法により得られるコラーゲンが記載されている。

- [0013] また、非特許文献2には、コラーゲン類似物の化学合成の方法に関して、Pro-Ser-Glyのp-ニトロフェニルエステル、あるいはPro-Ala-Glyのp-ニトロフェニルエステルをジメチルホルムアミドに溶解し、トリエチルアミンを加えて24時間静置することにより、分子量が16,000～21,000の可溶性ポリアミドが得られることが報告されている。これらの可溶性ポリアミドは円二色性スペクトルから三重らせん構造をとることが推定されているが、得られたポリマーの性質に関する記述はない。
- [0014] また、非特許文献3には、エラスチン由来のVal-Pro-Gly-Val-Gly配列を含む50量体のペプチドをジメチルスルホキシドに溶解し、2当量の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドと1当量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、および1.6当量のN-メチルモルホリンを加えて14日間静置した後、分子量カットオフが5万の透析膜で透析してポリアミドを得る方法が報告されている。
- [0015] また、特許文献10には、下記式(1)～(3)で表されるペプチドユニットで構成されているポリペプチドがコラーゲン組織を形成可能であることが開示されている。
- [0016] $[-(\text{OC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_p-(\text{Pro}-\text{Y}-\text{Gly})_n-]_a$ (1)
- $[-(\text{OC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_q-(\text{Z})_r-]_b$ (2)
- $[-\text{HN}-\text{R}-\text{NH}-]_c$ (3)
- (式中、mは1-18の整数、pおよびqは同一または異なって0または1、YはProまたはHy pを表し、nは1～20の整数を表す。Zは1～10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、rは1～20の整数を表し、Rは直鎖状または分岐鎖状アルキレン基を表す。aとbとの割合はa/b=100/0～30/70(モル比)であり、p=1およびq=0であるときc=a、p=0およびq=1であるときc=bであり、p=1およびq=1であるときc=a+bであり、p=0およびq=0であるときc=0である。)
- [0017] 一方、前記した特許文献9に記載されているように、ヒツジの振戦病やウシの海綿状脳症の原因物質がプリオンと呼ばれる伝染性タンパク質であり、この伝染性タンパク質がヒトのクロイツフェルドーヤコブ病伝染の原因の一つと言われている。非特許文献4には、プリオンはタンパク質であり、通常の滅菌、殺菌方法では失活し難く、しかも種を越えて感染することが指摘されている。
- [0018] 一般に、医療用具や医薬品、化粧品ではウシやブタ由来のコラーゲンを原料として

用いることが多い。そのため、通常の滅菌、殺菌方法では除去できないプリオンなどの病原体(または病原性因子)の感染(または伝達)の危険性が常に存在している。

[0019] また、天然のコラーゲン中には種々の細胞接着サイトが含まれているため、用途に応じた細胞選択性が発揮できない。例えば、神経の軸索誘導材料としてコラーゲンを用いると、軸索の伸長速度より周囲の繊維芽細胞の遊走、増殖速度が大きく癒痕組織化して軸索が伸長することができない。このため、繊維芽細胞の遊走を防ぐ材料でコラーゲンの周囲を覆うことなどの措置が必要となる。

[0020] 一方、生体内において、ある種のセラミックス(例えば、生体活性ガラスとしてのBioglass(登録商標)や、結晶化ガラスA-W(Cerabone(登録商標)A-W)など)が骨と結合することが知られている。このセラミックスと骨との結合は、生体内(またはヒトの体液に近いイオン濃度を有する水溶液中)で、前記セラミックス表面においてヒドロキシアパタイト層が形成されることに起因している。その結合メカニズムは、先ず、前記セラミックス表面に形成されたケイ酸イオンやシラノール基が、生体内や水溶液中のカルシウムおよびリン酸イオンと反応してヒドロキシアパタイトの核を形成し、この核をベースに生体内または水溶液中の過飽和なカルシウムおよびリン酸イオンを取り込んで成長するものと考えられている。

[0021] 特許文献11には、板状、棒状、線維状、粒状など各種の形状の金属、セラミックスなどの基材に、液状のシリカヒドロゾルまたはゲルをコーティングし、乾燥し加熱処理してシリカゲルを基材に結合させた後、ヒドロキシアパタイトに対して過飽和となる量のカルシウムとリン酸イオンを含む水溶液(疑似体液)に浸漬することにより、基材表面にヒドロキシアパタイト層をコーティングする生体活性層のコーティング方法が提案されている。この文献には、アパタイト被覆材料は、人工骨、生体埋込材料、生体埋込医療機器、器具などへ利用できることも記載されている。しかし、このような無機系の生体材料では、細胞接着性などの生体適合性が不十分である。

[0022] また、生体材料としての有機無機複合材料も検討されている。例えば、特許文献12には、平均繊維長が60 μ m以上のヒドロキシアパタイトとコラーゲン(哺乳動物、鳥類、魚類などから得られるコラーゲンまたはコラーゲン様タンパク質、遺伝子組換えコラーゲンなど)を含む複合体で構成された有機無機複合生体材料が開示され

ている。また、この文献には、前記複合材料が、反応容器内におけるカルシウムイオンおよびリン酸イオンを、例えば、出発物質濃度や送液速度を制御することなどにより、特定の濃度に維持し、得られた複合体を加圧成形することにより製造できることも記載されている。また、非特許文献5には、0.1MのCaCl₂ および0.1MのNaH₂PO₄ 存在下、酸で可溶化したラット尾腱由来のコラーゲンを中和することにより、コラーゲンとヒドロキシアパタイトとを複合化する方法が記載されている。

しかし、このような複合体においても、コラーゲンとして、天然コラーゲンを用いたのでは、病原体(または病原性因子)の感染(または伝達)の危険性がある。

- [0023] また、特許文献13には、セリシンを有するベースに、カルシウムイオンおよびリン酸イオンを含む水溶液を接触させ、前記ベースにアパタイト類を沈着させる複合体の製造方法が開示されている。
- [0024] また、特許文献14には、特定のペプチドを基材に固定化した医療用手当材が開示されており、該医療用手当材は、生理活性が高く、特に強い細胞増殖促進作用および/または細胞接着作用を有し、生体組織の治癒、接着、補強および/または再生用の材料または剤として有用であると記載されている。
- [0025] また、特許文献15には、骨折の治療、骨粗鬆症や歯周病疾患における骨量減少の抑制、骨粗鬆症やリウマチ性関節炎における骨折の予防等に有用な、骨形成作用を有するペプチドおよびそれを有効成分とする骨形成促進剤が開示されている。
- [0026] また、非特許文献6には、エチレンジアミンで架橋したアルギン酸ゲルに、骨形成作用を有するペプチド、Lys-Ile-Pro-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-Ser-Thr-Leu-Tyr-Leu-NH₂を結合して得られる材料がラットの下腿筋肉内に埋植されると、7週間以上にわたって骨様の石灰化を誘導することが記載されている。
- [0027] また、非特許文献7には、同上のアルギン酸ゲルに、神経幹細胞の分化促進作用を有するペプチド、Tyr-Arg-His-Ala-Trp-Ser-Glu-Asn-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Asn-NH₂を結合して得られる材料上で、ラット海馬由来の神経幹細胞を培養すると神経細胞への分化を著しく促進することが記載されている。
- [0028] 特許文献1:特開平08-027192号公報
特許文献2:特開平07-097454号公報

特許文献3:特開平08-053548号公報

特許文献4:特開平07-278312号公報

特許文献5:特開平05-000158号公報

特許文献6:特開平05-125100号公報

特許文献7:特開平06-228506号公報

特許文献8:特開平08-276003号公報

特許文献9:特開平08-041425号公報

特許文献10:特開2003-321500号公報

特許文献11:特開平5-103829号公報

特許文献12:特開2003-190271号公報

特許文献13:特開2003-154001号公報

特許文献14:特開2006-272002号公報

特許文献15:特開2003-73400号公報

非特許文献1:Methods Enzymol., Vol.82, pp33-64, 1982年

非特許文献2:J. Mol. Biol., Vol.63, pp.85-99, 1972年

非特許文献3:Int. J. Peptide Protein Res., Vol.46, pp.453-463, 1995年

非特許文献4:Nature Review, Vol.2, pp.118-126, 2001年

非特許文献5:Chem. Mater. Vol.15, pp3221-3226, 2003年

非特許文献6:J. Biomed. Mater Res., Vol.70A, pp115-121, 2004年

非特許文献7:Cell Transplant, Vol.14, pp665-672, 2005年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0029] したがって、本発明の目的は、病原体の感染や病原性因子の伝達を生じる危険性や望ましくない副作用を生じる虞がなく、ペプチドなどの種々の生理活性物質やアパタイト類といった有用物質の担体として有用な新規なポリペプチドおよびその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

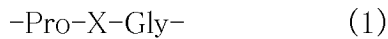
[0030] 本発明者は、前記課題を解決するため鋭意検討した結果、特定のアミノ酸配列を

有するペプチドユニットを縮合して得られるポリペプチド(繊維状集合体)が、生理活性物質やアパタイト類の担体として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0031] すなわち、本発明は、

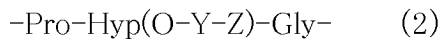
[1]

式:



(式中、XはProまたはHypを表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式:



(式中、Yはカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、Zはカルボキシル基を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含むポリペプチド;

[2]

Yが、 $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ (式中、nは0または1~18の整数を表す); $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{H}=\text{CH})_m-(\text{CH}_2)_k-$ (式中、nおよびkは独立して0または1~18の整数を表し、mは1~18の整数を表す); および $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{CH}_2)_k-$ (式中、nおよびkは独立して0または1~18の整数を表し、 C_6H_4 はフェニレン基を表す)よりなる群から選択される1つ以上の基である前記[1]記載のポリペプチド;

[3]

前記ペプチドユニット(1)と前記ペプチドユニット(2)との割合が、モル比にて(1)/(2) = 99.9/0.1~1/99である前記[1]記載のポリペプチド;

[4]

円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示す前記[1]ないし[3]のいずれか1に記載のポリペプチド;

[5]

該ポリペプチドの少なくとも一部分が三重らせん構造を形成する前記[4]記載のポリペプチド;

[6]

分子量 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ の範囲にピークを示す前記[1]ないし[5]のいずれか1に記載のポリペプチド;

[7]

コラーゲン組織を形成可能である前記[1]ないし[6]のいずれか1に記載のポリペプチド;

[8]

前記[1]ないし[7]のいずれか1に記載のポリペプチドに、ペプチド、タンパク質、ポリペプチド、核酸、糖、多糖類、脂質、ポリエチレングリコール誘導体、抗菌剤、アパタイト類およびこれらの複合体よりなる群から選択される1つ以上の物質が結合したポリペプチド誘導体;

[9]

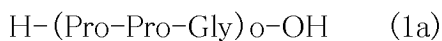
前記[8]記載の物質が、前記[1]ないし[7]のいずれか1に記載のポリペプチドのジカルボン酸リンカーを介してポリペプチドのHyp残基に結合したポリペプチド誘導体;

[10]

前記[1]ないし[9]のいずれか1に記載のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体にアパタイト類が担持されているポリペプチド誘導体;

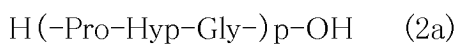
[11]

式:



(式中、 o は1以上の整数を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式:



(式中、 p は1以上の整数を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを縮合させて得られるポリペプチ

ドに、式:



(式中、Yはカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、Zはカルボキシ基を表す)

で表される化合物またはその無水物を反応させることを含む前記[1]に記載のポリペプチドの製造方法;

[12]

前記[11]に記載の製造方法において、さらに、該ポリペプチドに、ペプチド、タンパク質、ポリペプチド、核酸、糖、多糖類、脂質、ポリエチレングリコール誘導体、抗菌剤、アパタイト類およびこれらの複合体よりなる群から選択される1つ以上の物質を反応させることを含むポリペプチド誘導体の製造方法;

[13]

前記[12]に記載の製造方法において、1つ以上の該物質を、該ポリペプチドのカルボン酸リンカーを介してポリペプチドのHyp残基に結合させることを含むポリペプチド誘導体の製造方法;

[14]

前記[1]ないし[9]のいずれか1に記載のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体と、カルシウムイオンおよびリン酸イオンを含む水溶液とを接触させてアパタイト類をポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に沈着させることを含むアパタイト類が担持されているポリペプチド誘導体の製造方法;

[15]

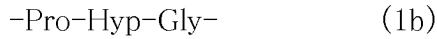
該アパタイト類がヒドロキシアパタイトである前記[14]記載の製造方法;

[16]

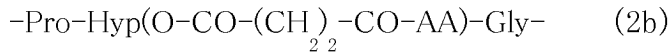
前記[14]または[15]記載の製造方法によって得られる、アパタイト類が担持されているポリペプチド誘導体;および

[17]

式:



で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式：



(式中、AAはOH、

Tyr-Arg-His-Ala-Trp-Ser-Glu-Asn-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Asn-NH₂、

Lys-Ile-Pro-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-Ser-Thr-Leu-

Tyr-Leu-NH₂、またはGly-Arg-Gly-Asp-Serを表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットを含むポリペプチド誘導体を提供する。

発明の効果

[0032] 本発明の新規なポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、病原体感染の危険性や副作用の虞がなく、安全性が高く、細胞親和性にも優れる。また、前記ポリペプチド(特にポリペプチドの繊維状集合体)は、ペプチドなどの種々の生理活性物質やアパタイト類といった有用物質を結合または担持して、生体組織を補填、修復、および/または再生するのに有用なポリペプチドとアパタイト類との複合体を形成可能である。このようなポリペプチド誘導体や複合体は、生体組織修復・再生材料または生体適合材料に適している。

発明を実施するための最良の形態

[0033] 本発明は、第1の態様において、新規なポリペプチドを提供する。

本発明のポリペプチドは、式：

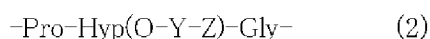
[0034] [化1]



[0035] (式中、XはProまたはHypを表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式：

[0036] [化2]



[0037] (式中、Yはカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、Zはカルボキシル基を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含む。

[0038] ポリペプチドを構成するペプチドユニット(1)とペプチドユニット(2)との割合は、モル比にて好ましくは(1)/(2)=99.9/0.1~1/99、より好ましくは99.5/0.5~2/98、最も好ましくは99/1~5/95である。(1)/(2)が99.9/0.1を超える場合は、下記に説明するリンカーを介して結合する物質の量が少なくなり、目的とする効果が十分に発揮されないため好ましくない。一方、割合が1/99未満である場合は、線維状集合体構造を形成しにくくなるため好ましくない。

[0039] 式中のYはポリペプチドに有用物質を結合するためのジカルボン酸リンカー基を表し、Zはジカルボン酸リンカー末端であってカルボキシル基を表す。Yが $-(C=O)-(CH_2)_n-$ である場合のnは好ましくは0または1~18、より好ましくは1~15、最も好ましくは2~12の整数を表す。また、Yが $-(C=O)-(CH_2)_n-(CH=CH)_m-(CH_2)_k-$ である場合のnおよびkは独立して、好ましくは0または1~18、より好ましくは1~15、最も好ましくは2~12の整数を表し、mは好ましくは0または1~18、より好ましくは1~12、最も好ましくは1~8の整数を表す。さらに、Yが $-(C=O)-(CH_2)_n-(C_6H_4)-(CH_2)_k-$ である場合のnおよびkは独立して、好ましくは0または1~18、より好ましくは0~12、最も好ましくは0~8の整数を表し、 C_6H_4 はフェニレン基を表す。

[0040] かかるジカルボン酸リンカーは、無水ジカルボン酸をポリペプチド主鎖に付加することにより形成することができる。すなわち、Yが $-(C=O)-(CH_2)_n-$ の場合は、無水シュウ酸、無水マロン酸、無水コハク酸、無水4-カルボキシ酪酸、無水5-カルボキシ吉草酸、無水6-カルボキシカプロン酸、無水7-カルボキシヘプタン酸、無水8-カルボキシカプリル酸、無水9-カルボキシペラルゴン酸などを、 $-(C=O)-(CH_2)_n-(CH=CH)_m-(CH_2)_k-$ の場合は、無水マレイン酸、ペンタ-2-エン二酸無水物、ヘキサ-3-エン二酸無水物、シトラコン酸無水物などを、 $-(C=O)-(CH_2)_n-(C_6H_4)-(CH_2)_k-$ の場合は、フタル酸無水物などをポリペプチド主鎖のヒドロキシプロリン残基のヒドロキシル基と反応させて付加することができる。

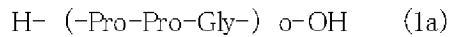
[0041] 本発明のポリペプチドは、4～60°Cで、水溶液、アルコール-水混合溶液、リン酸塩緩衝液などの緩衝液中で少なくとも一部分が三重らせん構造を形成し、円二色性スペクトル測定において波長220～230nmに正のコットン効果を示し、波長195～205nmに負のコットン効果を示す。

[0042] また、本発明のポリペプチドは、好ましくは分子量 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ の範囲、より好ましくは分子量 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ の範囲、最も好ましくは分子量 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ の範囲にピークを示す重合度を有する。

[0043] 本発明は、第2の態様において、上記のポリペプチドの製造方法を提供する。

本発明のポリペプチドは、式：

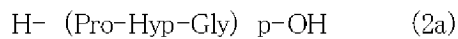
[0044] [化3]



[0045] (式中、 o は1以上の整数を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットまたはペプチドフラグメントと、式：

[0046] [化4]



[0047] (式中、 p は1以上の整数を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットまたはペプチドフラグメントとを縮合させて得られるポリペプチドに、式：

[0048] [化5]



[0049] (式中、 Y はカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、 Z はカルボキシ基を表す)

で表される化合物またはその無水物を反応させることにより製造することができる。

[0050] 本発明のポリペプチドの製造に使用し得る化合物(3)としては、例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、4-カルボキシ酪酸、5-カルボキシ吉草酸、6-カルボキシカプロン

酸、7-カルボキシヘプタン酸、8-カルボキシカプリル酸、9-カルボキシペラルゴン酸、マレイン酸、ペンタ-2-エン二酸、ヘキサ-3-エン二酸、ヘキサ-3-エン二酸、シトラコン酸、フタル酸などが挙げられる。好ましくは、マロン酸、コハク酸、4-カルボキシ酪酸、マレイン酸、フタル酸である。

[0051] 具体的には、H-Pro-Pro-Gly-OHなどのペプチドユニットまたはそれが脱水縮合したH-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-OHなどのペプチドフラグメント(1a)と、H-Pro-Hyp-Gly-OHなどのペプチドユニットまたはそれが脱水縮合したH-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-OHなどのペプチドフラグメント(2a)とを適当な緩衝液に溶解し、それに、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどの縮合助剤を加え、さらに冷却下にて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩などの脱水縮合剤を加えた後、攪拌を続けて得られた反応溶液を適当な緩衝液に対して透析することにより本発明のポリペプチドを製造し得る。

[0052] これらの成分の反応は、上記ペプチド成分および化合物を溶解または懸濁(一部または全部を溶解)し得る溶媒中で行うことができ、通常、緩衝液を使用し得る。使用し得る緩衝液としては、例えば、リン酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液などが挙げられる。

[0053] また、本発明のポリペプチドの製造に使用し得る縮合助剤としては、上記の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)などのN-ヒドロキシトリアゾール類の他に、例えば、N-ヒドロキシ多価カルボン酸イミド類[例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド(HONSu)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド(HONB)などのN-ヒドロキシジカルボン酸イミド類]、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOObt)などのトリアジン類、2-ヒドロキシイミノ-2-シアノ酢酸エチルエステルなどが挙げられる。これらの縮合助剤は単独または二種以上を組み合わせ使用し得る。好ましい縮合助剤は、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)などのN-ヒドロキシベンゾトリアゾール類である。

[0054] 縮合助剤の使用量は、溶媒の種類に関係なく、前記した反応成分(1a)、(2a)および(3)の総量1モルに対して、例えば、0.5~5モル、好ましくは0.7~2モル、さらに好ましくは0.8~1.5モル程度である。

[0055] また、本発明のポリペプチドの製造に使用し得る脱水縮合剤としては、上記の1-エ

チル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(WSCI・HCl)の他に、例えば、カルボジイミド系縮合剤[ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、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=WSCI)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)など]、フルオロホスフェート系縮合剤[O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、O-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ホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩(BO P)など]、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)などが挙げられる。これらの脱水縮合剤は単独または二種以上を組み合わせ使用し得る。好ましい脱水縮合剤は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩などのカルボジイミド系縮合剤である。

[0056] 脱水縮合剤の使用量は、前記した反応成分(1a)、(2a)および(3)の総量1モルに対して、通常、水を含まない非水系溶媒を用いる場合には0.7~5モル、好ましくは0.8~2.5モル、さらに好ましくは0.9~2.3モル(例えば1~2モル)程度である。一方、水を含む溶媒(水系溶媒)を用いる場合には、水による脱水縮合剤の失活があるので、前記した反応成分(1a)、(2a)および(3)の総量1モルに対して、通常、2~500モル(例えば、2~50モル)、好ましくは5~250モル(例えば、5~25モル)、さらに好ましくは10~125モル(例えば、10~20モル)程度である。

[0057] また、本発明のポリペプチドを製造する際の縮合反応においては、反応系のpHを調節してもよく、また反応に関与しない塩基を添加してもよい。pHの調節は、通常、無機塩基[水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなど]、有機塩基、無機酸[塩酸など]や有機酸を用いて行うことができ、通常、反応溶液を中性付近(pH=6~8程度)に調節する。また、反応に関与しない塩基としては、第三級アミン類、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンなどのトリアルキルアミン類、N-メチルモルホリン、ピリジンなどの複素環式第三級アミン類などを用いることができる。このような塩基の使用量は、通常、ペプチド成分および化合物中のアミノ基の総モル数の1~2倍程度である。

- [0058] また、本発明は、第3の態様において、上記のポリペプチドのジカルボン酸リンカーを介して有用物質が結合したポリペプチド誘導体を提供する。
- [0059] また、ジカルボン酸が付加されたポリペプチドに結合する有用物質としては、種々の生理活性および生体機能を有するオリゴまたはポリペプチドなどのペプチド、タンパク質、DNAやRNAなどの核酸、糖、多糖類、リン脂質やステロイド類などの脂質、ポリエチレングリコール誘導体などの高分子、抗菌剤およびアパタイト類などが挙げられる。また、これらの有用物質は、単独または二種以上の複合体として本発明のポリペプチドに結合することができる。
- [0060] ポリペプチドに結合する有用物質としては、例えば、アポトーシス抑制作用と神経幹細胞分化促進作用を有するTyr-Arg-His-Ala-Trp-Ser-Glu-Asn-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Asn(配列番号:1)の配列を一部または全部に有するペプチドや、骨形成作用を有するLys-Ile-Pro-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-Ser-Thr-Leu-Tyr-Leu(配列番号:2)の配列を一部または全部に有するペプチドや、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser(配列番号:3)の配列を一部または全部に有するペプチドなどの細胞接着活性を有する生理活性ペプチド;皮膚細胞増殖作用や血管新生作用を有する塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)などのタンパク質、short interference RNAs (siRNA)やshort hairpin RNAs (shRNA)、cDNA/RNAi hybrid moleculesなどの遺伝子発現の抑制作用を有するRNAやgreen fluorescence proteinをコードするプラスミドDNAなどの核酸;薬剤の包摂作用を有するシクロデキストリンなどの糖、多糖類;ホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質、エストロゲンやプロゲステロンなどのステロイド類などの脂質;PEG400アミンやPEG1500アミンなどのポリエチレングリコール誘導体などの高分子、ゲンタマイシンやペニシリン、オフロキサシンなどの抗菌剤;および、ヒドロキシアパタイトなどのアパタイト類などが挙げられる。
- [0061] 有用物質はジカルボン酸リンカーを介してポリペプチドのHyp残基に結合する。有用物質はその種類や性質にも依存するが、一般的には、本発明のポリペプチドのジカルボン酸リンカーと共有結合で結合する。アパタイト類が結合する場合は、その性質からイオン結合で結合する。アパタイト類は本発明のポリペプチドまたは有用物質が結合したポリペプチド誘導体のいずれにも担持させることが可能である。ポリペプ

チドまたはポリペプチド誘導体と、カルシウムイオンおよびリン酸イオンを含む水溶液とを接触させてアパタイト類をポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に沈着させて、担持させることができる。

- [0062] また、本発明のポリペプチドのHyp残基に有用物質が結合する割合は、好ましくは1/100～100/100、より好ましくは5/100～90/100、最も好ましくは10/100～80/100である。この割合が1/100未満である場合は有用物質の付加量が少なく、目的とする効果を十分に発揮することが困難になるため好ましくない。一方、割合が100/100である場合は、ポリペプチドのすべてのHyp残基に有用物質が付加した構造であり、これを超える割合になることはない。
- [0063] 本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の分子量は、例えば、ゲルパーミエーションクロマトグラフィーで測定することができる。
- [0064] 本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、好ましくは $1700\sim 1800\text{cm}^{-1}$ に赤外スペクトル吸収があるものである。この範囲に赤外スペクトル吸収ピークがないと、主鎖に対するジカルボン酸リンカーの量が少ないこととなり、十分な量のジカルボン酸リンカーが結合されていない可能性がある。赤外スペクトル吸収は、FT-IR (KBr法)で測定することができる。
- [0065] 本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体におけるジカルボン酸リンカーの付加量は、例えば、赤外スペクトル吸収におけるエステルとアミドのピーク強度比から測定することができる。また、より詳細には、ジカルボン酸の付加反応後、未反応のジカルボン酸の量(モル数)をHPLCで定量することにより測定することができる。すなわち、合成に用いたジカルボン酸全量より未反応のジカルボン酸量を減じた量がジカルボン酸付加量となる。
- [0066] 本発明のポリペプチド誘導体における有用物質の付加量は、例えば、ペプチド付加反応後、未反応の有用物質の量(モル数)をHPLCで定量することにより測定することができる。すなわち、合成に用いた有用物質全量より未反応の有用物質量を減じた量が有用物質の付加量となる。
- [0067] 本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、コラーゲン組織を形成可能であり、副作用を起こさない。さらに、病原体や病原性因子[例えば、病原性に転化した

タンパク質(例えば、異常型プリオンなど)などの感染や伝達の危険性がない。そのため、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、安全性が高い。また、細胞親和性や生体適合性およびガラスなどの基材に対する細胞接着促進作用にも優れている。そのため、生体材料または生体適合材料、例えば、人工コラーゲンなどとして有用である。また、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、被検体(被験体)の組織(例えば、表皮組織および真皮組織など)へ適用できる。被検体の例としては、ヒトおよび非ヒト動物(例えば、サル、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなど)を挙げることができる。

[0068] また、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、ポリペプチドに由来して生じる感染または伝達(例えば、ポリペプチドに存在する病原体または病原性因子などの感染または伝達)などを抑制または予防するために使用できる。そのため、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、例えば、患部[例えば、疾病部や損傷部(例えば、擦傷および火傷などの損傷部)など]や、切開部[例えば、手術などの切開部など]において有効に利用できる。

[0069] また、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、例えば、組織工学用の担体または支持体、再生医療用の担体または支持体(人工皮膚など)、組織接着剤や癒着防止材、手術用縫合糸、止血材、コンタクトレンズなどの医療用材料、医薬品の製剤素材(または基剤)、化粧品の素材(または基剤)、食品添加剤などとして利用できる。

[0070] 本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、公知の方法で種々の用途に応じて成形できる。そのため、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の利用形態は、液状(溶液または懸濁液など)、粉粒状、二次元的形態(フィルムまたはシートなど)や三次元的形態であってもよい。例えば、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の溶液または懸濁液を、剥離性ベース(例えば、フッ素樹脂(ポリテトラフルオロエチレン)シート)上に流延して、乾燥することにより、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体のシートやフィルムを得ることができる。

[0071] また、高濃度の塩を含む溶液またはポリペプチドを溶解しない溶剤中に、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の溶液または懸濁液をノズルから押し出すことにより織

維状物を得ることができる。

さらに、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の水溶液または懸濁液をそのまま静置したり、必要により多価架橋性試薬(グルタルアルデヒドなど)を添加して静置することによりゲル状物を得ることができる。

[0072] さらに、この生成したゲル状物を凍結乾燥することによりスポンジ状の多孔質体を得ることができる。さらには、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の水溶液または懸濁液を攪拌発泡して乾燥することによっても多孔質体を得ることもできる。

さらに、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は被覆剤として利用してもよい。例えば、前記ポリペプチドの溶液または懸濁液を、基材の表面に塗布または散布した後、乾燥することにより、基材の表面を本発明のポリペプチドで被覆することができる。前記基材は、金属、セラミックス、プラスチック、天然高分子、ガラスなどの様々な材料で作られた成形体であってもよく、成形体の形態は、粉粒状、線状または繊維状、フィルムまたはシート状などの二次元的構造や三次元的構造を有していてもよい。さらには、多孔質体(粉粒状多孔質体、セルロース繊維紙、不織布や織布などの二次元的多孔質体、円筒状などの三次元的多孔質体)にポリペプチドの溶液または懸濁液を含浸させ、ポリペプチドを保持させてもよい。

[0073] 本発明のポリペプチドを医療用途に用いる場合には、殺菌または滅菌して用いることが好ましい。殺菌、滅菌方法としては、種々の殺菌・滅菌方法、例えば、湿熱蒸気滅菌、ガンマ線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、薬剤殺菌、紫外線殺菌などが用いられる。これらの方法のうち、ガンマ線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌は、滅菌効率と材料に与える影響が少なく好ましい。

実施例

[0074] つぎに実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、これは説明することを目的とするものであって、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

[0075] 実施例1

H-Pro-Hyp-Gly-OH((株)ペプチド研究所) 100 mg (0.35 mmol)を2 mLの10 mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)に溶解した。この混合液に、9.5 mg (0.07 mmol)の1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを加え、攪拌溶解した。この混合液を4℃に冷却して攪拌しながら

、335 mg (1.75 mmol) の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに4°Cにて2時間攪拌を続けた。その後、20°Cにて2日間攪拌を続けて得られた反応溶液に、4 mLの10 mMリン酸塩緩衝生食液(0.15 MのNaClを含む、pH7.4)で希釈し、ミリQ水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。

[0076] 得られたポリペプチドをゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)、AKTApurifierシステム、カラム: Superdex 200 HR GL、流速: 0.5 mL/分、溶離液: 10 mMリン酸塩緩衝生食液(0.15 MのNaClを含む、pH7.4))に供したところ、分子量が10万以上の溶出位置にポリペプチドのピークが認められた。分子量はポリエチレングリコール標準品(Fluka社)を標準物質として使用して算出した。

また、得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、225 nmに正のコットン効果、197 nmに負のコットン効果が観測され、三重らせん構造を形成していることが確認された。

[0077] つぎに、得られたポリペプチドの水溶液を凍結乾燥してスポンジ状のポリペプチドを得た。このポリペプチド10 mgを約1 mm角に切断し、少量のジメチルホルムアミド(DMF)で2回洗浄した。洗浄後のスポンジに、熱イソプロパノールから再結晶して精製した無水コハク酸(和光純薬工業(株) 特級試薬) 37 mg(0.37 mmol)とジイソプロピルエチルアミン64 μ L(0.37 mmol)を氷冷下に加えて、その後室温にて終夜攪拌した。得られた反応液をミリQ水で約5倍に希釈した後、ミリQ水に対して2日間透析して、未反応試薬を除去した。

[0078] 得られたコハク酸付加ポリペプチドの赤外スペクトルには1735 cm^{-1} にエステル吸収が出現し、ポリペプチド主鎖に対するコハク酸リンカーの付加が確認された。また、1639 cm^{-1} のアミド吸収との強度比から、ペプチドユニット(1)と(2)の割合((1)/(2))は、31/69(モル比)であることが判明した。また、得られたコハク酸付加ポリペプチドを水溶液中20°Cで、円二色性スペクトルを測定したところ、225 nmに正のコットン効果、199 nmに負のコットン効果が観測され、三重らせん構造を形成していることが確認された。

[0079] 得られたコハク酸付加ポリペプチドを凍結乾燥し、その5 mgをDMFで1回洗浄した。

それに、N-ヒドロキシコハク酸イミド21 mg(0.185 mmol)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩35 mg(0.185 mmol)を加えて室温にて終夜攪拌した。その後、反応生成物をDMFで5回洗浄し、それに、3.2 mg(0.00185 mmol)のペプチド、Tyr-Arg-His-Ala-Trp-Ser-Glu-Asn-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Asn-NH₂ (配列番号:1) ((株)ペプチド研究所)を200 μLのDMFに溶解して添加した。さらに、ジイソプロピルエチルアミン3.2 μL(0.0185 mmol)を氷冷下に加えて、その後室温にて終夜攪拌した。その反応生成物をDMFで1回、その後メタノールで2回洗浄して、減圧乾燥した。反応前後でHPLC(カラム Waters NovaPak C18 3.9×150 mm column; 溶離液 0.05% TFA-水中のアセトニトリル リニアグラジエント(5%-50%/30分)、流速1 ml/分、検出波長215 nm)により測定した上清中のペプチド濃度から、ポリペプチド主鎖に対するペプチドの結合率は0.4 mg/mgであることが判明した。

[0080] 試験例1

実施例1で得られたポリペプチド(ペプチドが結合していないコハク酸付加ポリペプチド)および、Tyr-Arg-His-Ala-Trp-Ser-Glu-Asn-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Asn-NH₂ (配列番号:1)が結合したポリペプチド誘導体(ペプチド結合ポリペプチド)をエタノールに浸漬して殺菌した。配列番号:1のペプチドはアポトーシス抑制作用と神経幹細胞分化促進作用を有するものである。胎生16日目のWistarラット胎児脳の海馬から摘出した神経幹細胞のニューロスフェアを、殺菌したポリペプチドまたはポリペプチド誘導体とともに、1%のN-2 supplementと20 ng/mLのbFGFを含むD-MEM/F12培地中で5日間培養したところ、ニューロスフェアはペプチド結合ポリペプチド上に接着し、神経突起を伸長した。これに対して、ペプチドが結合していないコハク酸付加ポリペプチド上にはニューロスフェアは接着せず、神経突起の伸長も見られなかった。すなわち、上記ペプチド結合ポリペプチドは神経幹細胞の神経分化を促進することが判明した。

[0081] 実施例2

実施例1と同様の方法によってペプチドユニット、H-Pro-Hyp-Gly-OHから得られたポリペプチドの水溶液を凍結乾燥してスポンジ状のポリペプチドを得た。このポリペプチド10 mgを約1 mm角に切断し、少量のDMFで2回洗浄した。洗浄後のポリペプチド

ドに、熱イソプロパノールから再結晶して精製した無水コハク酸(和光純薬工業(株)、特級試薬)3.7 mg(0.037 mmol)とジイソプロピルエチルアミン6.4 μ L(0.037 mmol)を氷冷下に加えて、その後室温にて終夜攪拌した。得られた反応液にメタノールを加え、その後5回メタノールで洗浄し、未反応試薬を除去した。

[0082] 得られたコハク酸付加ポリペプチドの赤外スペクトルには1735 cm^{-1} にエステルの吸収が出現し、ポリペプチド主鎖に対するコハク酸の付加が確認された。また、1640 cm^{-1} のアミドの吸収との強度比から、ペプチドユニット(1)と(2)の割合((1)/(2))は、62/38(モル比)であることが判明した。

得られたコハク酸付加ポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、224 nmに正のコットン効果、199 nmに負のコットン効果が観測され、三重らせん構造を形成していることが確認された。

[0083] 得られたポリペプチド約5 mgを1Mの CaCl_2 水溶液中に室温にて終夜静置した。ミリQ水で2回洗浄した後、 Na^+ 213 mM、 K^+ 7.5 mM、 Ca^{2+} 3.8 mM、 Mg^{2+} 2.3 mM、 Cl^- 223.3 mM、 HCO_3^- 6.3 mM、 HPO_4^{2-} 1.5 mM、 SO_4^{2-} 0.75 mMを含み、トリス緩衝剤でpH7.25に調節した水溶液に浸漬し、37°Cにて7日間静置した。静置した後、ミリQ水で2回、メタノールで3回洗浄した後に減圧乾燥した。乾燥後のポリペプチド表面を金蒸着して、走査型電子顕微鏡((株)日立製作所、モデルS-4800N)で観察したところ、ポリペプチド表面にアパタイトの結晶が観察された。

[0084] 実施例3

Pro-Hyp-Gly((株)ペプチド研究所)100 mg(0.35 mmol)を2 mLの10 mMリン酸塩緩衝液(PB、pH 7.4)に攪拌溶解した後、この溶液にHOBt 9.5 mg(0.07 mmol)を加え、攪拌溶解した。溶解後、4°Cに冷却して攪拌しながら、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩201 mg(1.05 mmol)を添加して、さらに4°Cにて90分間攪拌した。

[0085] その溶液に4 mLの10 mMリン酸塩緩衝生食液(PBS、pH 7.4)を加え、良く攪拌した後、ミリQ水に対して2日間透析した。得られたポリペプチドをゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)、AKTApurifierシステム、カラム:S uperdex 200 HR GL、流速:0.5 mL/分、溶離液:PBS)に供したところ、分子量が10万

以上の溶出位置(7.25 mL)にポリペプチドのピークが認められた。分子量はポリエチレングリコール標準品(Fluka社)を標準物質として使用して算出した。

また、得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、225 nmに正のコットン効果、197 nmに負のコットン効果が観測され、三重らせん構造を形成していることが確認された。

[0086] つぎに、得られた0.1% poly(Pro-Hyp-Gly)水溶液1.0 mLを内径28 mmのガラス製シャーレに加え、デシケータ内に60時間静置してフィルムを得た。得られたフィルムを少量のジメチルホルムアミド(DMF)で2回洗浄した。洗浄後、熱イソプロパノールから再結晶して精製した無水コハク酸3.7 mg(0.037 mmol)とジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)6.4 μ L(0.037 mmol)を氷冷下に加えて、その後室温で終夜振盪した。DMFで2回、メタノールで5回洗浄後、減圧乾燥した。

得られたフィルムの一部を採取し、KBr法で赤外スペクトルを測定するとエステル結合に帰属される 1731 cm^{-1} に吸収ピークが認められ、コハク酸化反応が進行したことが確認された。

[0087] 得られたコハク酸付加poly(Pro-Hyp-Gly)フィルムをDMFで1回洗浄後、N-ヒドロキシコハク酸イミド4.3 mg (0.037 mmol)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩7.1 mg (0.037 mmol)を加えて室温で終夜振盪した。DMFで5回洗浄後、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser((株)ペプチド研究所) 0.18 mg (0.37 μ mol)とジイソプロピルエチルアミン 0.048mg (0.37 μ mol)を加え、さらに室温で終夜振盪した。DMFで2回、メタノールで5回洗浄後、エタノールに3回浸漬振盪して殺菌した。

[0088] 得られたGly-Arg-Gly-Asp-Ser結合poly(Pro-Hyp-Gly)フィルム上に、D-MEMに懸濁したNIH3T3細胞を 10^4 個/cm²の割合で加え、37°C、5% CO₂下、1時間静置した。接着しなかった細胞をPBSで3回洗浄して除去し、接着した細胞数をフィルム上の任意の5ヶ所の細胞数を計数することにより求めた。

[0089] その結果、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser結合poly(Pro-Hyp-Gly)フィルム上では、平均7,900個/cm²の細胞が接着していたのに対し、Gly-Arg-Gly-Asp-Serを結合していないpoly(Pro-Hyp-Gly)フィルム上では、平均2,000個/cm²、ウシ由来I型コラーゲンをコートしたプラスチックディッシュ上では、平均6,000個/cm²、非コート・プラスチックデ

ィッシュ上では、平均4,500個/cm²であることが判明し、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser結合poly(Pro-Hyp-Gly)フィルムの細胞接着促進作用が優れていることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0090] 本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は、医療、製薬、化粧品および食品の分野において、組織工学用の担体または支持体、再生医療用の担体または支持体(人工皮膚など)、組織接着剤や癒着防止材、手術用縫合糸、止血材、コンタクトレンズなどの医療用材料、医薬品の製剤素材(または基剤)、化粧品の素材(または基剤)、食品添加剤などとして利用できる。

配列表フリーテキスト

[0091] SEQ ID NO: 1

Peptide showing both inhibition of apoptosis and promotion of neuronal differentiation of neuronal stem cells.

SEQ ID NO: 2

Peptide having an osteogenesis action.

SEQ ID NO: 3

Peptide showing cell adherence activity

請求の範囲

[1] 式:

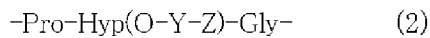
[化1]



(式中、XはProまたはHypを表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式:

[化2]



(式中、Yはカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、Zはカルボキシ基を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含むポリペプチド。

[2] Yが、 $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$ (式中、nは0または1~18の整数を表す); $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}=\text{H}-\text{CH})_m-(\text{CH}_2)_k-$ (式中、nおよびkは独立して0または1~18の整数を表し、mは1~18の整数を表す); および $-(\text{C}=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{CH}_2)_k-$ (式中、nおよびkは独立して0または1~18の整数を表し、 C_6H_4 はフェニレン基を表す)よりなる群から選択される1つ以上の基である請求項1記載のポリペプチド。

[3] 前記ペプチドユニット(1)と前記ペプチドユニット(2)との割合が、モル比にて(1)/(2)=99.9/0.1~1/99である請求項1記載のポリペプチド。

[4] 円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示す請求項1ないし3のいずれか1項に記載のポリペプチド。

[5] 該ポリペプチドの少なくとも一部分が三重らせん構造を形成する請求項4記載のポリペプチド。

[6] 分子量 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ の範囲にピークを示す請求項1ないし5のいずれか1項に記載のポリペプチド。

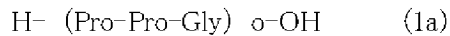
[7] コラーゲン組織を形成可能である請求項1ないし6のいずれか1項に記載のポリペ

プチド。

- [8] 請求項1ないし7のいずれか1項に記載のポリペプチドに、ペプチド、タンパク質、ポリペプチド、核酸、糖、多糖類、脂質、ポリエチレングリコール誘導体、抗菌剤、アパタイト類およびこれらの複合体よりなる群から選択される1以上の物質が結合したポリペプチド誘導体。
- [9] 請求項8記載の物質が、請求項1ないし7のいずれか1項に記載のポリペプチドのジカルボン酸リンカーを介してポリペプチドのHyp残基に結合したポリペプチド誘導体。
- [10] 請求項1ないし9のいずれか1項に記載のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体にアパタイト類が担持されているポリペプチド誘導体。

[11] 式:

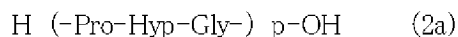
[化3]



(式中、 o は1以上の整数を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式:

[化4]



(式中、 p は1以上の整数を表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを縮合させて得られるポリペプチドに、式:

[化5]



(式中、 Y はカルボニル基、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基、または芳香族基を含む、カルボニル基を有するかまたは有しない飽和または不飽和の炭化水素基を表し、 Z はカルボキシ基を表す)

で表される化合物またはその無水物を反応させることを含む請求項1に記載のポリペ

プチドの製造方法。

- [12] 請求項11に記載の製造方法において、さらに、該ポリペプチドに、ペプチド、タンパク質、ポリペプチド、核酸、糖、多糖類、脂質、ポリエチレングリコール誘導体、抗菌剤、アパタイト類およびこれらの複合体よりなる群から選択される1つ以上の物質を反応させることを含むポリペプチド誘導体の製造方法。
- [13] 請求項12に記載の製造方法において、1つ以上の該物質を、該ポリペプチドのカルボン酸リンカーを介してポリペプチドのHyp残基に結合させることを含むポリペプチド誘導体の製造方法。
- [14] 請求項1ないし9のいずれか1項に記載のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体と、カルシウムイオンおよびリン酸イオンを含む水溶液とを接触させてアパタイト類をポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に沈着させることを含むアパタイト類が担持されているポリペプチド誘導体の製造方法。
- [15] 該アパタイト類がヒドロキシアパタイトである請求項14記載の製造方法。
- [16] 請求項14または15記載の製造方法によって得られる、アパタイト類が担持されているポリペプチド誘導体。

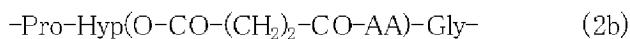
[17] 式:

[化6]



で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式:

[化7]



(式中、AAはOH、Tyr-Arg-His-Ala-Trp-Ser-Glu-Asn-Leu-Ala-Gln-Cys-Phe-Asn-NH₂、

Lys-Ile-Pro-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Pro-Thr-Glu-Leu-Ser-Ala-Ile-Ser-Thr-Leu-Tyr-Leu-NH₂、またはGly-Arg-Gly-Asp-Serを表す)

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含むポリペプチド誘導体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K19/00(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)n, A61K47/42(2006.01)n, A61L17/00(2006.01)n, A61L27/00(2006.01)n, A61L31/00(2006.01)n

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)

C07K19/00, A61K8/64, A61K47/42, A61L17/00, A61L27/00, A61L31/00

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Science Direct,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-223981 A (Nara Institute of Science and Technology), 06 September, 2007 (06.09.07), Full text (Family: none)	1-17
A	JP 2003-321500 A (Centmed Inc.), 11 November, 2003 (11.11.03), Full text & US 2003/162941 A1 & CA 2420355 A1 & EP 1340767 A2 & US 7262275 B2 & EP 1923398 A1	1-17
A	JP 2005-058499 A (Masao TANIHARA), 10 March, 2005 (10.03.05), Full text (Family: none)	1-17

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
25 December, 2008 (25.12.08)

Date of mailing of the international search report
13 January, 2009 (13.01.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066568

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/098326 A1 (Nara Institute of Science and Technology), 21 September, 2006 (21.09.06), Full text & EP 1859818 A1 & JP 2007-508158 A	1-17
A	JP 2005-060314 A (Masao TANIHARA), 10 March, 2005 (10.03.05), Full text (Family: none)	1-17
A	JP 2005-060315 A (Masao TANIHARA), 10 March, 2005 (10.03.05), Full text (Family: none)	1-17
A	WO 2006/046569 A1 (Nara Institute of Science and Technology), 04 May, 2006 (04.05.06), Full text & JP 2006-543177 A	1-17
A	JP 2004-201566 A (Masao TANIHARA), 22 July, 2004 (22.07.04), Full text (Family: none)	1-17
A	EP 1288228 A1 (NISHIMURA Y), 05 March, 2003 (05.03.03), Full text & JP 2003-073400 A & US 2003/082784 A1 & DE 60211433 E	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066568

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII),
Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)n, A61K47/42(2006.01)n, A61L17/00(2006.01)n, A61L27/00(2006.01)n, A61L31/00(2006.01)n

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))

Int.Cl. C07K19/00, A61K8/64, A61K47/42, A61L17/00, A61L27/00, A61L31/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), Cplus (STN), REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Science Direct, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII), 医学・薬学予稿集全データベース

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 請求の範囲の番号
A	JP 2007-223981 A (国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学) 2007.09.06, 全文 (ファミリーなし)	1-17
A	JP 2003-321500 A (株式会社セントメド) 2003.11.11, 全文 & US 2003/162941 A1 & CA 2420355 A1 & EP 1340767 A2 & US 7262275 B2 & EP 1923398 A1	1-17
A	JP 2005-058499 A (谷原正夫) 2005.03.10, 全文 (ファミリーなし)	1-17

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矛盾するものではなく、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

25.12.2008

国際調査報告の発送日

13.01.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

左海 匡子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 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 請求の範囲の番号
A	WO 2006/098326 A1 (国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学) 2006.09.21, 全文 & EP 1859818 A1 & JP 2007-508158 A	1 - 17
A	JP 2005-060314 A (谷原正夫) 2005.03.10, 全文 (ファミリーなし)	1 - 17
A	JP 2005-060315 A (谷原正夫) 2005.03.10, 全文 (ファミリーなし)	1 - 17
A	WO 2006/046569 A1 (国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学) 2006.05.04, 全文 & JP 2006-543177 A	1 - 17
A	JP 2004-201566 A (谷原正夫) 2004.07.22, 全文 (ファミリーなし)	1 - 17
A	EP 1288228 A1 (NISHIMURA Y) 2003.03.05, 全文 & JP 2003-073400 A & US 2003/082784 A1 & DE 60211433 E	1 - 17