

明 細 書

発明の名称：ヒトトランスフェリンレセプター結合ペプチド

技術分野

[0001] この発明は、ヒトトランスフェリンレセプター（h T f R）に結合できるペプチドに関する。

背景技術

[0002] 脳室周囲器官（松果体、脳下垂体、最後野等）を含む幾つかの領域を除き脳の大半の組織に血液を供給する毛細血管は、筋肉等その他の組織に存在する毛細血管と異なり、その内皮を形成している内皮細胞同士が強固な細胞間接合によって密着し合っている。そのため、血液から脳への物質の受動輸送が妨げられ、例外はあるものの、脂溶性の高い物質、又は分子量が小さく（200～500ダルトン以下）且つ生理pH付近において電氣的に中性な物質以外、毛細血管から脳へ移行しにくい。このような、脳内の毛細血管内皮を介した、血液と脳の組織液との間での物質交換を制限する機構は、血液脳関門（Blood-Brain Barrier, BBB）と呼ばれている。また、血液脳関門は、脳のみならず、脳及び脊髄を含む中枢神経系の組織液と血液との間の物質交換をも制限している。血液脳関門の存在により、中枢神経系の細胞の大半は、血中のホルモン、リンホカイン等の物質の濃度変動の影響を受けることなく、その生化学的な恒常性が保たれる。

[0003] 血液脳関門を通して高分子物質を脳内に到達させる方法として、脳内毛細血管の内皮細胞上に存在する膜蛋白質であるトランスフェリン受容体と親和性を持つように当該高分子物質を修飾する方法が種々報告されている（特許文献1～3）。例えば、特許文献1には、トランスフェリン受容体と親和性を有し該受容体と結合することができる血液脳関門シャトルが記載されているように、トランスフェリン受容体と結合できる物質は、血液脳関門を通過できる蓋然性を有することが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2015-528452号公報

特許文献2：特開H06-228199号公報

特許文献3：WO2016/208695

特許文献4：WO2019/151539

非特許文献

[0005] 非特許文献1：PLOS ONE 2014, 9, e96340.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] この明細書に記載されるある発明は、ヒトトランスフェリンレセプター（hTfR）に結合する新規なペプチドを提供することを目的とする。別の発明は、上記の新規なペプチドの各種用途を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] この明細書に記載されるある発明は、トランスフェリンレセプターに結合するペプチド又はその薬学的に許容される塩（以下、これらをまとめて単にペプチドとも表記する。）に関する。

Ala-VaI-MeF3C-VaI-W7N-Asn-3Py6NH2-F4OMe-Ile-Ile-Arg-Arg-4Py-MeTyr-Cys（配列番号1）に記載のアミノ酸配列を有するペプチドであるか、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、以下のグループ：

（I）配列番号1の2番目のバリン残基の極性アミノ酸への置換；

（II）配列番号1の3番目のMeF3C残基の、芳香環又は複素環を側鎖に有するN-メチルアミノ酸への置換；

（III）配列番号1の5番目のW7N残基の、置換基を有していてもよく、インドール環上のCがNに置換されていてもよいトリプトファン、又はN-メチルトリプトファンへの置換；

（IV）配列番号1の6番目のアスパラギン残基のNmmへの置換；

(V) 配列番号1の7番目の3 P y 6 N H 2 残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(V I) 配列番号1の8番目のF 4 O M e 残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(V I I) 配列番号1の9番目のイソロイシン残基のE v a への置換；

(V I I I) 配列番号1の10番目のイソロイシン残基の、任意のアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号1の11番目のアルギニン残基の、側鎖に置換基を有していてもよいリシン、又は側鎖に置換基を有していてもよいグルタミンへの置換；

(X) 配列番号1の12番目のアルギニン残基の、側鎖に置換基を有していてもよいリシン、ヒスチジン、又はグルタミンへの置換；

(X I) 配列番号1の13番目の4 P y 残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸、又は側鎖に置換基を有していてもよいグルタミンへの置換；

(X I I) 配列番号1の14番目のM e T y r 残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するN-メチルアミノ酸への置換；

から選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、ペプチドである。

発明の効果

[0008] この明細書に記載される発明によれば、実施例により実証された通り、ヒトトランスフェリンレセプター (h T f R) に結合するペプチドなどを提供できる。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明を実施するための形態について説明する。本発明は、以下に説明する形態に限定されるものではなく、以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものも含む。

[0010] この明細書に記載されるある発明は、トランスフェリンレセプターに結合

するペプチドに関する。

[0011] トランスフェリンレセプター

トランスフェリンレセプター（トランスフェリン受容体ともいう）とは、血漿に含まれ、鉄イオンと結合するタンパク質であるトランスフェリンと結合し、細胞内に取り込む機能を有する受容体であり、ダイマー構造を取ることが知られているタンパク質を示す。トランスフェリンレセプターは、網状赤血球、胎盤の栄養膜細胞、リンパ球など様々な細胞上に発現しており、特に腫瘍細胞での発現が示唆されている。また、トランスフェリンレセプターは、血漿中の鉄イオンの結合刺激により細胞のエンドサイトーシスをトリガーするという性質を有しているため、トランスフェリンレセプターに結合する抗体等をDDSとして用い、所望の物質についてBBBを通過させるという研究が進められている。また、トランスフェリンレセプターにはI型とII型が知られているが、本発明におけるトランスフェリンレセプターとしては、I型（Gene ID: 7037）が好ましい。本願明細書においては、特記が無い限りはヒト型のトランスフェリンレセプターをヒトTfR、hTfR又は単にTfRと記す。

[0012] トランスフェリンレセプターに結合するペプチド

トランスフェリンレセプターに結合する（結合活性を有する、親和性を有するともいう）とは、トランスフェリンレセプターに特異的に結合することを意味する。

親和性は、トランスフェリンレセプターと結合ペプチドの解離についての平衡定数（KD）により表されるが、これはトランスフェリンレセプターと結合ペプチドの結合強度を表す尺度であり、KDの値が小さくなるに従ってトランスフェリンレセプターと結合ペプチドの間の結合強度は強くなる（代わりに、親和性は $1/KD$ のことである親和性定数（KA）として表すことも可能である）。当業者には明らかであるように（例えば、本明細書でのさらなる開示に基づいて）、親和性は結合する物質の種類や性質に応じて、それ自体公知である様式で決定することが可能である。また、結合活性は、ト

ランスフェリンレセプターと結合ペプチドの間の結合の強さの尺度である。結合活性は、トランスフェリンレセプターと結合ペプチド上のその結合部位の間の親和性と結合分子上に存在する関連する結合部位の数の両方に関する。

[0013] トランスフェリンレセプターと結合ペプチドの特異的結合は、例えば、本明細書に記載される表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ、スキャッチャード解析ならびに／または放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイ、ならびに当技術分野でそれ自体公知であるその異なるバリエーションを含む、それ自体公知である任意の適切な様式で決定することが可能である。好ましくは、本発明のペプチドとトランスフェリンレセプターとの親和性は、100 nM未満、好ましくは50 nM未満、より好ましくは20 nM未満、さらに好ましくは10 nM未満のKDであり、限定されるものではないが、約 10^{-5} M～約 10^{-9} M、又は別の態様では約 10^{-7} M以下、例えば 10^{-7} M～ 10^{-13} M、例えば 10^{-9} M～ 10^{-13} Mであってよい。本明細書において、トランスフェリンレセプターとの結合能が上記の範囲で、低いものから、高いものまで、さまざまな強さの結合能を有するペプチドが提供される。

[0014] ペプチド

ペプチドは、アミノ酸が複数連続した構造を言い、ポリペプチド、タンパク質をもその意味に包含する。なお、本願においてアミノ酸とは、細胞内でmRNAが翻訳されてペプチド鎖に取り込まれる天然に存在するアミノ酸（天然アミノ酸）だけでなく、ペプチド結合によりペプチド鎖の一部を構成することのできる、天然に存在しないアミノ酸（非天然アミノ酸）をも包含する。アミノ酸は、人工的に合成したものであっても、自然界に存在するものであってもよい。

また、本願においては、合成後環状化により環状部が形成されたペプチド（環状ペプチドともいう）、当該ペプチドをさらに化学修飾して得られるペプチドも、本発明のペプチドに含まれる。

本明細書において、環状ペプチドとは、ペプチド中、そのアミノ酸配列において間に1以上のアミノ酸残基を介して離れた2つのアミノ酸どうしが互いに結合することにより、その全部または一部が環状になっているものをいう。なお、ここで当該2つのアミノ酸どうしの結合型に特に限定はないが、一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基との間のアミド結合、一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のチオール基との間のチオエーテル結合、一方のアミノ酸のチオール基と他方のアミノ酸のチオール基との間のチオール結合、ラクタム環形成又はマクロ環化反応により環状構造を形成したものや、ラッセペプチド状構造を有するもの等も環状ペプチドに包含される。但し、当該2つのアミノ酸どうしがアミド結合により結合している場合、当該アミド結合は、一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基が結合することにより形成されたものに限られず、合成反応の結果としてアミド結合により結合していればよい。他の結合型についても同様である。

すなわち、本願において環状ペプチドは、その一部が環状構造を形成するものであればよく、直鎖部を有していてもよい。また、1つの環状構造をなす環状ペプチドに含まれる2つのアミノ酸がさらに結合しているようなバイサイクリックな構造など、複合的な環状構造を取っていてもよい。

[0015] なお、本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。例えば、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合が挙げられ、クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。

[0016] 非天然アミノ酸とは、天然アミノ酸以外であって、アミノ酸の特性を有する化合物を言う。例えば、これに限られないが、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、 L -アミノ酸、 D -アミノ酸（ D 型アミノ酸とも言う）、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシン、 β -アラ

ニン、オルニチン等、生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが挙げられる。また、N-メチルアミノ酸、N-エチルアミノ酸、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸、側鎖に余分なメチレンや芳香環などの構造を有するアミノ酸および側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換された構造を有するアミノ酸誘導体等が挙げられる。

非天然アミノ酸の例と、本明細書における略語を以下に示す。括弧内にCAS参照番号または購入先を示し、新たに合成したものについては合成例番号を示した。なお、特殊アミノ酸はこれらに限られるものではなく、例えば、これらの分子中の水素原子の1個又は複数がアルキル基に置換した構造のものも特殊アミノ酸である。水素原子がアルキル基に置換される場合、アルキル基は好ましくはメチル基、エチル基であり、より好ましくはメチル基である。なお、本明細書においてアミノ酸名の前にMe又はN-Meの記載があるアミノ酸は、特記が無い限りN-メチルアミノ酸を示す。例えば、アラニン(AIa又はA)のN-メチル化アミノ酸は、MeAIa、N-MeAIa、MeA又はN-MeAと示す。また、1文字表記のアミノ酸表記であって、その前にdの記載があるアミノ酸については、D-アミノ酸を示す。例えば、アラニン(AIa又はA)のD-アミノ酸については、daと示す。CAS番号や購入先の記載がないものは、一般的試薬として購入することができる。なお、以下のアミノ酸に関し、ペプチド合成には既知の方法でアルファアミノ基をFmoc保護することで用いることが可能である。

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

KCOpipzaa : N6-(4-(カルボキシメチル)ピペラジン-1-カルボニル)-L-リシン (キシダ化学株式会社)

4Py : L-4-ピリジルアラニン (CAS No. 37535-49-2)

PeG : N-フェネチルグリシン (CAS No. 7738-38-7)

3Py : 3-(3-ピリジル)-L-アラニン (CAS No. 64090)

－98－8)

3Py6NH₂: (S)－2－アミノ－3－(6－アミノピリジン－3－イル)プロパン酸 (CAS No. 1269968-61-7)

A4paa: (S)－2－アミノ－3－(1－(カルボキシメチル)ピペリジン－4－イル)プロパン酸 (キシダ化学株式会社)

dkCOmeglumine: N6－(メチル((2S, 3R, 4R, 5R)－2, 3, 4, 5, 6－ペンタヒドロキシヘキシル)カルバモイル)－D－リシン (合成例1－7)

F3COO: (S)－3－(2－アミノ－2－カルボキシエチル)安息香酸 (CAS No. 13861-02-4)

F3COO(allyl): (S)－3－(3－((アリルオキシ)カルボニル)フェニル)－2－アミノプロパン酸 (合成例1－1)

F4aao: (S)－2－アミノ－3－(4－(カルボキシメトキシ)フェニル)プロパン酸 (CAS No. 24558-63-2)

F4COO(allyl): (S)－3－(4－((アリルオキシ)カルボニル)フェニル)－2－アミノプロパン酸 (合成例1－2)

F4OMe: (S)－2－アミノ－3－(4－メトキシフェニル)プロパン酸 (CAS No. 6230-11-1)

KdMe: N6, N6－ジメチル－L－リシン (CAS No. 2259-86-1)

Kmor: (S)－2－アミノ－6－モルフォリノヘキサン酸 (CAS No. 960135-14-2) (合成例1－10)

KN3: N6－ジアゾ－L－リシン (CAS No. 159610-92-1)

Me3Py: (S)－2－(メチルアミノ)－3－(ピリジン－3－イル)プロパン酸 (CAS No. 2651172-69-7)

Me4Py: (S)－2－(メチルアミノ)－3－(ピリジン－4－イル)プロパン酸

MeA : メチル-L-アラニン (CAS No. 3913-67-5)

MeF : メチル-L-フェニルアラニン (CAS No. 2566-30-5)

MeF3C : (S)-3-(3-クロロフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (CAS No. 2255324-91-3) MeF3COO : (S)-3-(2-カルボキシ-2-(メチルアミノ)エチル)安息香酸 (CAS No. 1499826-56-0)

MeF3COO (allyl) : (S)-3-(3-(アリルオキシ)カルボニル)フェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (合成例1-3)

MeF4F : (S)-3-(4-フルオロフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (CAS No. 347851-71-2)

MeR : メチル-L-アルギニン (CAS No. 2480-28-6)

MeW : メチル-L-トリプトファン (CAS No. 526-31-8)

MeY : メチル-L-チロシン (CAS No. 537-49-5)

QhEt : N5-(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミン (CAS No. 2650-74-0) (合成例1-4)

Qpipzaa : (S)-2-アミノ-5-(4-(カルボキシメチル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸 (合成例1-5)

W1aa : 1-(カルボキシメチル)-L-トリプトファン (CAS No. 773823-50-0)

W1aa (allyl) : 1-(2-(アリルオキシ)-2-オキソエチル)-L-トリプトファン (合成例1-6)

W5C : (S)-2-アミノ-3-(5-クロロ-1H-インドール-3-イル)プロパン酸 (CAS No. 52448-15-4)

Ndm : N4, N4-ジメチル-L-アスパラギン (CAS No. 62937-43-3)

F4C : N- α -クロロアセチル-4-クロロ-L-フェニルアラニン (CAS 番号 : 14173-39-8)

d r : D-アルギニン

d k : D-リジン

A i b : α -メチルアラニン (CAS 番号 : 62-57-7)

A h p / A l a h p : (S)-2-アミノヘプタン酸 (CAS 番号 : 1115-90-8)

M e F 3 C O O (P E G 4 M e) : (S)-3-(3-((2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)カルバモイル)フェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (合成例 1-11)

M e F 4 C O O (P E G 4 M e) : (S)-3-(4-((2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)カルバモイル)フェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (合成例 1-8)

F 3 C O O (P E G 4 M e) : (S)-3-(3-((2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)カルバモイル)フェニル)-2-アミノプロパン酸 (合成例 1-12)

K (M e c a r) : N6-(メトキシカルボニル)-L-リシン (CAS No. 74761-45-8)

K (M e P E G 4 c) : (S)-20-アミノ-14-オキソ-2, 5, 8, 11-テトラオキサ-15-アザヘニコサン-21-オイック酸 (CAS No. 1188295-19-3)

E (P E G 1 M e) : N5-(2-メトキシエチル)-L-グルタミン (CAS No. 132432-96-3)

E (N H d P E G 1 M e) : N5-(1, 3-ジメトキシプロパン-2-イル)-L-グルタミン

E (P E G 4 M e) : (S)-18-アミノ-15-オキソ-2, 5, 8, 11-テトラオキサ-14-アザノナデカン-19-オイック酸 (CAS No. 2234872-12-7)

E (P E G 8 M e) : (S)-30-アミノ-27-オキソ-2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサ-26-アザヘントリアコン

タン-31-オイック酸

E (Glucamine) : N5-((2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル)-L-グルタミン (CAS No. 1956384-48-7)

MeF4COO (PEG8Me) : (S)-3-(4-((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサペンタコサン-25-イル)カルバモイル)フェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (合成例1-13)

F3COO (PEG8Me) : (S)-3-(3-((2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサペンタコサン-25-イル)カルバモイル)フェニル)-2-アミノプロパン酸 (合成例1-9)

F4aaO (PEG8Me) : (S)-2-アミノ-3-(4-((27-オキソ-2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサ-26-アザオクタコサン-28-イル)オキシ)フェニル)プロパン酸

all : L-アロイソロイシン (CAS No. 1509-34-8)

da : D-アラニン

de : D-グルタミン酸

ds : D-セリンK (Mecar) : N6-(メトキシカルボニル)-L-リジン (CAS No. 74761-45-8)

PEG4cもしくはPEG3:1-アミノ-3, 6, 9, 12-テトラオキサペンタデカン-15-オイック酸 (CAS No. 663921-15-1)

PEG8c:1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-オクタオキサヘプタコサン-27-オイック酸 (CAS No. 756526-04-2)

PEG8Me:2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサペンタコサン-25-アミン (CAS No. 869718-81-0)

PEG12cもしくはPEG11もしくはPEG12:1-アミノ-3, 6

, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36-ドデカオキサノナトリアコンタン-39-オイック酸 (CAS No. 1415408-69-3)

MePEG4c : 2, 5, 8, 11-テトラオキサテトラデカン-14-オイック酸 (CAS No. 67319-28-2)

PEG1Me : 2-メトキシエタン-1-アミン (CAS No. 109-85-3)

PEG4Me : 2, 5, 8, 11-テトラオキソトリデカン-13-アミン (CAS No. 85030-56-4)

NHdPEG1Me : 1, 3-ジメトキシプロパン-2-アミン (CAS No. 78531-29-0)

BCNOCO : ((1R, 8S, 9s)-ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン-9-イル)メチル(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル)カルボネート (CAS No. 1426827-79-3)

K(BCNOCO) : N6-(メチル((2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル)カルバモイル(((1R, 8S, 9s)-ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-L-リジン (CAS No. N/A) 1493802-96-2)

C(AcNMe) : S-(2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル)-L-システイン

Cit : L-シトルリン (CAS No. 372-75-8)

K(Ac) : N6-アセチル-L-リジン (CAS No. 692-04-6)

K(C5Mal) : N6-(6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル)-L-リジン

PEG24c : 1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24,

27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72-テトラコサオキサペンタヘプタコンタン-7-5-オイック酸 (CAS No. 2563873-76-5)

K (Maleimide) : N6-(4-((2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)メチル)シクロヘキサン-1-カルボニル)-L-リジン

F4aa (Glucamine) : (S)-2-アミノ-3-(4-(2-オキソ-2-((2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-ペンタヒドロキシヘキシル)アミノ)エトキシ)フェニル)プロパン酸

F4aa (pipzaa) : (S)-2-アミノ-3-(4-(2-(4-(カルボキシメチル)ピペラジン-1-イル)-2-オキソエトキシ)フェニル)プロパン酸

YaeCOpipzaa : (S)-2-アミノ-3-(4-(2-(4-(カルボキシメチル)ピペラジン-1-カルボキサミド)エトキシ)フェニル)プロパン酸

Har : N6-カルバムイミドイル-L-リジン (CAS No. 156-86-5)

W1EtOH : 1-(2-ヒドロキシエチル)-L-トリプトファン

Nmm : N4-メチル-L-アスパラギン (CAS No. 7175-34-0)

Eva : (S)-2-アミノ-3エチルペンタン酸 (CAS No. 14328-49-5)

Mor : (S)-モルホリン-3-カルボン酸 (CAS No. 106825-79-0)

Hpr : (S)-ピペリジン-2-カルボン酸 (CAS No. 3105-95-1)

Y26dF : (S)-2-アミノ-3-(2,6-ジフルオロ-4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 (CAS No. 182756-57-6)

W1Me : 1-メチル-L-トリプトファン (CAS No. 21339-55-9)

MeF4COO : (S)-4-(2-カルボキシ-2-(メチルアミノ)エチル)安息香酸

Y3Me : (S)-2-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)プロパン酸 (CAS No. 17028-03-4)

3Imp : (S)-2-アミノ-3-(イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル)プロパン酸 (CAS No. 2276942-95-9)

3Py6OMe : (S)-2-アミノ-3-(6-メトキシピリジン-3-イル)プロパン酸 (CAS No. 1270178-24-9)

3Py6NHaa : (S)-2-アミノ-3-(6-(カルボキシメチル)アミノ)ピリジン-3-イル)プロパン酸

MeF4C : (S)-3-(4-クロロフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (CAS No. 347851-70-1)

MeF4OMe : (S)-3-(4-メトキシフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸 (CAS No. 52939-33-0)

MeF3OMe : (S)-3-(3-メトキシフェニル)-2-(メチルアミノ)プロパン酸

3Py6Me : (S)-2-アミノ-3-(6-メチルピリジン-3-イル)プロパン酸 (CAS No. 1270288-73-7)

4Py2Me : (S)-2-アミノ-3-(2-メチルピリジン-4-イル)プロパン酸 (CAS No. 1269969-41-6)

4Py2OMe : (S)-2-アミノ-3-(2-メトキシピリジン-4-イル)プロパン酸 (CAS No. 1269920-00-4)

4Py2NH2 : (S)-2-アミノ-3-(2-アミノピリジン-4-イル)プロパン酸 (CAS No. 1269969-46-1)

E(PEG8c) : (S)-32-アミノ-29-オキソ-4,7,10,13,16,19,22,25-オクタオキサ-28-アザトリトリアコン

タンジオイック酸

F3COO(PEG8c): (S)-1-(3-(2-アミノ-2-カルボキシエチル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26-オクタオキサ-2-アザノナコサン-29-オイック酸

E(PEG4c): (S)-20-アミノ-17-オキソ-4, 7, 10, 13-テトラオキサ-16-アザヘニコサンジオイック酸

F3COO(PEG4c) もしくは F3CONPEG4c: (S)-1-(3-(2-アミノ-2-カルボキシエチル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14-テトラオキサ-2-アザヘプタデカン-17-オイック酸

E(apa): N5-(3-アミノプロピル)-L-グルタミン

MeF4COO(PEG4c): (S)-1-(4-(2-アミノ-2-カルボキシエチル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14-テトラオキサ-2-アザヘプタデカン-17-オイック酸

なお、新規合成アミノ酸は、各種ペプチド誘導体を製造する際に各種ペプチドに新たな機能を付加できる可能性があるため、有用である。

[0018] 本発明のペプチドは、以下のペプチド(ペプチドA)であることが好ましい。

Ala-Val-MeF3C-Val-W7N-Asn-3Py6NH2-F4OMe-Ile-Ile-Arg-Arg-4Py-MeTyr-Cys (配列番号1) に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、以下のグループ:

(I) 配列番号1の2番目のバリン残基の極性アミノ酸への置換;

(II) 配列番号1の3番目のMeF3C残基の、芳香環又は複素環を側鎖に有するN-メチルアミノ酸への置換;

(III) 配列番号1の5番目のW7N残基の、置換基を有していてもよく、インドール環上のCがNに置換されていてもよいトリプトファン、又はN-メチルトリプトファンへの置換;

(IV) 配列番号1の6番目のアスパラギン残基のNmへの置換;

(V) 配列番号1の7番目の3Py6NH₂残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(V I) 配列番号1の8番目のF4OMe残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(V I I) 配列番号1の9番目のイソロイシン残基のEvaへの置換；

(V I I I) 配列番号1の10番目のイソロイシン残基の、任意のアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号1の11番目のアルギニン残基の、側鎖に置換基を有していてもよいリシン、又は側鎖に置換基を有していてもよいグルタミンへの置換；

(X) 配列番号1の12番目のアルギニン残基の、側鎖に置換基を有していてもよいリシン、ヒスチジン、又はグルタミンへの置換；

(X I) 配列番号1の13番目の4Py残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸、又は側鎖に置換基を有していてもよいグルタミンへの置換； 及び

(X I I) 配列番号1の14番目のMeTyr残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するN-メチルアミノ酸への置換；
から選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列からなる、ペプチドである。

なお、上記(I)～(X I I)のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得る。

また、本発明のペプチドは、上記のいずれかの配列から1～3個のアミノ酸残基が、置換、欠失、付加又は挿入したアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。これらの場合、ペプチドは、hTfRとの結合能を有するペプチドであることが好ましい。ペプチドは、ペプチドそのものであってもよいし、薬学的に許容される塩（例えば、ナトリウム塩やカリウム塩）のようなものであってもよい。

[0019] 保存的アミノ酸置換

「保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価または類似のアミノ酸との置換を意味する。一般に、あるグループ内の置換は構造および機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の(チオール)フォームと比較してより極性の低い、酸化型の(ジスルフィド)フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分は構造的および機能的に重要な特徴を構成し得る。また、芳香環を含む側鎖(トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン)はイオン-芳香族相互作用または陽イオン- π 相互作用に寄与し得る。かかる場合において、これらの側鎖を有するアミノ酸を、酸性または非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的および機能的には保存的であり得る。プロリン、グリシン、システイン(ジスルフィド・フォーム)等の残基は主鎖の立体構造に直接的な効果を与える可能性があり、しばしば構造的ゆがみなしに置換することはできない。

[0020] 保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換(レーニンジャー, 生化学, 改訂第2版, 1975年刊行, 73乃至75頁: L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975))および典型的置換を含む。

[0021] また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のように天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けたグループにおいて、あるアミノ酸が属するグループと同じグループに属するアミノ酸への置換が好ましい。

[0022] (1) 疎水性(非極性とも言う)アミノ酸: 疎水性(非極性)を示すアミノ酸であって、アラニン(「Ala」または単に「A」とも記す)、グリシン(「Gly」または単に「G」とも記す)、バリン(「Val」または単に「V」とも記す)、ロイシン(「Leu」または単に「L」とも記す)、イ

ソロイシン（「I l e」または単に「I」とも記す）、プロリン（「P r o」または単に「P」とも記す）、フェニルアラニン（「P h e」または単に「F」とも記す）、トリプトファン（「T r p」または単に「W」とも記す）、チロシン（「T y r」または単に「Y」とも記す）、メチオニン（「M e t」または単に「M」とも記す）を含む。

なお、疎水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

脂肪族アミノ酸：側鎖に脂肪酸又は水素を有するアミノ酸であって，A l a，G l y，V a l，I l e，L e uを含む。

脂肪族・分岐鎖アミノ酸：側鎖に分岐型脂肪酸を有するアミノ酸であって，V a l，I l e，L e uを含む。

芳香族アミノ酸：芳香環を側鎖に有するアミノ酸であって，T r p，T y r，P h eを含む。

[0023] （２）親水性（極性とも言う）アミノ酸：親水性（極性）を示すアミノ酸であって，セリン（「S e r」または単に「S」とも記す），スレオニン（「T h r」または単に「T」とも記す），システイン（「C y s」または単に「C」とも記す），アスパラギン（「A s n」または単に「N」とも記す），グルタミン（「G l n」または単に「Q」とも記す），アスパラギン酸（「A s p」または単に「D」とも記す），グルタミン酸（「G l u」または単に「E」とも記す），リジン（リシンとも記す。「L y s」または単に「K」とも記す），アルギニン（「A r g」または単に「R」とも記す），ヒスチジン（「H i s」または単に「H」とも記す）を含む。

なお，親水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

酸性アミノ酸：側鎖が酸性を示すアミノ酸であって，A s p，G l uを含む，

塩基性アミノ酸：側鎖が塩基性を示すアミノ酸であって，L y s，A r g，H i sを含む。

中性アミノ酸：側鎖が中性を示すアミノ酸であって，S e r，T h r，A s n，G l n，C y sを含む。

また、G l y 及び P r o については、「主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸」に分けることもでき、側鎖に硫黄分子を含むアミノ酸、C y s 及び M e t は、「含硫アミノ酸」に分けることもできる。

また、側鎖に芳香族を有するグループとして、T r p, T y r, P h e が含まれる。

[0024] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のアミノ酸がN-アルキル化されたN-アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級（例えば、C₁-C₅の、好ましくは、C₁-C₃、より好ましくはC₁）のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。N-アルキルアミノ酸においては、好ましくはN-エチルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸又はN-メチルアミノ酸であり、さらに好ましくはN-メチルアミノ酸である。C₄以上のアルキル基とは、炭素数が4以上の直鎖又は分岐のアルキル基を意味する。C₄以上のアルキル基の例はC₄₋₁₀アルキル基であり、C₄₋₆アルキル基でもよいし、C₆₋₁₀アルキル基でもよい。また、非天然のアミノ酸には、D型アミノ酸（D-アミノ酸とも記する）、β-アミノ酸、γ-アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸（例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基やアルキル基のC数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換された構造を有するアミノ酸誘導体等、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

[0025] なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加または置換等されることで、天然のアミノ酸とは異なる性質を付与することができる。すなわち、天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けた、前述のグル

ープに、同様の側鎖の性質を有する非天然アミノ酸を含めることができる。例えば、脂肪族アミノ酸に属するアラニンの主鎖窒素原子がメチル化されたアミノ酸であるN-メチルアラニン（MeA）は、非天然アミノ酸であるが、疎水性（非極性）を示し、疎水性のアミノ酸に分類することができる。このように、あるアミノ酸と同様の側鎖の性質を示す非天然アミノ酸についても、保存的アミノ酸置換の対象として含むことができる。

[0026] 本明細書において、「非限定的に」、「一態様において」は、同義に用いられ得る。

非限定的に、非天然のアミノ酸の保存的アミノ酸置換の例として、以下のものを含む。

MeA：N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

MeF；N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

MeW：N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

MeY：N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

MeR：N-メチル化されたアミノ酸であって、親水性アミノ酸グループかつ塩基性アミノ酸グループ

da：D型アミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

de：D型アミノ酸であって、親水性アミノ酸グループかつ酸性アミノ酸グループ

dr：D型アミノ酸であって、親水性アミノ酸グループかつ塩基性アミノ酸グループ

ds：D型アミノ酸であって、親水性アミノ酸グループかつ中性アミノ酸グループ

4 P y : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

3 P y : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 C : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 O M e : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 a a o : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 3 C O O : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

M e F 3 C : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

M e F 4 F : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

M e 3 P y : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

M e 4 P y : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

M e F 3 C O O : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

M e F 4 C O O : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 5 C : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 1 a a : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 7 N : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 5 C : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

3 P y 6 N H 2 : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

a l l : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

A i b : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

A h p : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

A 4 p a a : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

K m o r : 親水性アミノ酸グループ

K d m e : 親水性アミノ酸グループ

K C O p i p z a a : 親水性アミノ酸グループ

Q h E t : 親水性アミノ酸グループ

W 1 E t O H : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 1 M e : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

3 l m p : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

N m m : 親水性アミノ酸グループ

Y 2 6 d F : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

3 P y 6 N H a a : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

Y 3 M e : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 a a o (G l u c a m i n e) : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 a a o (p i p z a a) : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

Y a e C O p i p z a a : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

3 P y 6 O M e : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

E v a : 疎水性グループかつ脂肪族・分岐鎖アミノ酸グループ

H a r : 親水性アミノ酸グループ

M o r : 親水性アミノ酸グループ

H p r : 疎水性アミノ酸グループ

E (G l u c a m i n e) : 親水性アミノ酸グループ

E (P E G 8 M e) : 親水性アミノ酸グループ

Q P E G 8 M e : 親水性アミノ酸グループ

E (P E G 8 c) : 親水性アミノ酸グループ

E (P E G 4 c) : 親水性アミノ酸グループ

F 3 C O N P E G 4 c : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

- 3 P y 6 M e : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- 4 P y 2 M e : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- 4 P y 2 O M e : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- 4 P y 2 N H 2 : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- F 3 C O O (P E G 4 c) : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- F 3 C O O (P E G 8 c) : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- M e F 4 C : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- M e F 4 O M e : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- M e F 3 O M e : N-メチル化されたアミノ酸であって、疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- F 4 a a o (P E G 8 M e) : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- F 3 C O O (P E G 8 M e) : 親水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ
- E (a p a) : 塩基性アミノ酸グループかつ親水性アミノ酸グループ
- M e F 4 C O O (P E G 4 c) : N-メチル化されたアミノ酸であって、酸性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

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

この明細書において「正電荷を有するアミノ酸」は、天然のアミノ酸であっても非天然のアミノ酸であってもよく、天然の正電荷を有するアミノ酸の例は、リシン、アルギニン、及びヒスチジンである。「正電荷を有するアミ

ノ酸」は、正電荷（例えば NH_3^+ ）を有するアミノ酸であればよく、各種置換基を有するものであってもよい。

[0027] この明細書における好ましいペプチドの例は、上記したペプチドと同様にヒトトランスフェリンレセプター（hTfR），特にTfR1に結合できるペプチドである。

本発明のペプチドの一態様として、以下の（I）～（V）の少なくとも1つを満たすアミノ酸配列を含む、ペプチドであってよい。

（I）配列番号1の1番目が、アラニン残基である。

（II）配列番号1の4番目が、バリン残基である。

（III）配列番号1の6番目が、アスパラギン残基である。

（IV）配列番号1の7番目が、チロシン残基又は $3\text{Py}6\text{NH}_2$ 残基である。

（V）配列番号1の9番目が、イソロイシン残基である。

ここで、（I）のアラニン残基はその誘導体であってもよく、（II）のバリン残基はその誘導体であってもよく、（III）のアスパラギン残基はその誘導体であってもよく、（IV）のチロシン残基又は $3\text{Py}6\text{NH}_2$ 残基はその誘導体であってもよく、（V）のイソロイシン残基はその誘導体であってもよい。

また、上記（I）～（V）のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得るが、（I）～（V）の少なくとも1つを満たすアミノ酸配列を含む、ペプチドであってよい。

実施例3によると、（I）～（V）は、TfR1との結合に大きく影響を与えるアミノ酸残基と考えられる。従って、配列番号1のアミノ酸残基が、上記の（I）～（V）の少なくとも1つを、好ましくはすべてを満たしている場合、TfR1との強い結合を得ることができる。これらのペプチドとトランスフェリンレセプターとの親和性は、限定するものではないが、 50 nM 未満、より好ましくは 20 nM 未満、さらに好ましくは 10 nM 未満の K_D であってよい。

なお、本明細書において提供される本発明のペプチドの一態様は、配列番号1の4番目がバリン残基であるが、これもT f R 1との強い結合のために重要な残基であることが、実施例から裏付けられる。

[0028] 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドにおいて、配列番号1の2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13及び14番目のいずれかのアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を有するペプチドでもよい。

「アミノ酸残基が置換された」とは、特定のアミノ酸残基が、ほかの修飾されていてもよいアミノ酸残基に置換されたことを意味する。ここにおいてアミノ酸残基の置換は、好ましくは保存的アミノ酸置換である。

[0029] 「修飾されてもよい」とは、公知のアミノ酸修飾や改変がなされてもよいという意味である。修飾の例は、N-メチル化や、前述の略語を有するアミノ酸修飾や、D型への修飾（変換）や、公知の当該アミノ酸の誘導体への変換である。

[0030] 「リンカーを有していてもよい」とは、リンカーが当該アミノ酸残基に結合していてもよいという意味である。リンカーを有するアミノ酸の例は、リジン残基の側鎖アミノ基に、MePEG4cが結合しているK (MePEG4c)、グルタミン酸残基の側鎖のカルボキシ基にPEG1Meが結合しているE (PEG1Me)、F4aaの側鎖のカルボキシ基にPEG8Meが結合しているF4aa (PEG8Me)、グルタミン酸残基の側鎖のカルボキシ基にPEG8Meが結合しているE (PEG8Me)、グルタミン酸残基の側鎖のカルボキシ基にPEG8cが結合しているE (PEG8c)、グルタミン酸残基の側鎖のカルボキシ基にPEG4cが結合しているE (PEG4c)、グルタミン残基の側鎖のアミド基にPEG8Meが結合しているQPEG8Me、F3CONの側鎖のアミド基にPEG4cが結合しているF3CONPEG4c、F3COOの側鎖のカルボキシ基にPEG4Meが結合しているF3COO (PEG4Me)、F3COOの側鎖のカルボキシ基にPEG4cが結合しているF3COO (PEG4c)、F3COO

の側鎖のカルボキシ基に PEG8c が結合している F3COO (PEG8c) , F3COO の側鎖のカルボキシ基に PEG8Me が結合している F3COO (PEG8Me) , MeF3COO の側鎖のカルボキシ基に PEG4Me が結合している MeF3COO (PEG4Me) , C 末端のカルボキシ基に PEG4c が結合しているシステイン残基である。

[0031] 本発明の一態様において、このペプチドは、以下のアミノ酸配列を有するペプチド (ペプチド B) であってよい。

(I) 配列番号 1 の 2 番目のバリン残基の、T 及び Kmor からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(II) 配列番号 1 の 3 番目の MeF3C 残基の、MeF 及び Me3Py からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(III) 配列番号 1 の 5 番目の W7N 残基の、W1aa, W, W1EtOH, W1Me, 3Imp 及び MeW からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(IV) 配列番号 1 の 7 番目の 3Py6NH2 残基の、Y, Y26dF, 3Py6NHaa, Y3Me 及び R からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(V) 配列番号 1 の 8 番目の F4OMe 残基の、F4aa, F4aa (Glucamine), F4aa (pipzaa), YaeCOpipzaa, 3Py6OMe, 3Py6NHaa, 3Imp, Y 及び F4aa (PEG8Me) からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(VI) 配列番号 1 の 10 番目のイソロイシン残基の、Har, Kmor, T, Mor, Hpr 及び S からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(VII) 配列番号 1 の 11 番目のアルギニン残基の、Kmor, KCOpipzaa, K, E (Glucamine), Q, 側鎖にリンカーを有していてもよい Q, 側鎖にリンカーを有していてもよい E 及び E (apa) からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(V I I I) 配列番号 1 の 1 2 番目のアルギニン残基の, K m o r, K C O p i p z a a, Q 及び H からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換;

(I X) 配列番号 1 の 1 3 番目の 4 P y 残基の, F 3 C O O, F, F 3 C O N P E G 4 c, Y 3 M e, 3 P y 6 M e, 3 P y 6 O M e, 3 P y 6 N H 2, 4 P y 2 M e, 4 P y 2 O M e, 4 P y 2 N H 2, 3 P y, Y, リンカーを有していてもよい F 3 C O O 及び側鎖にリンカーを有していてもよい E からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換; 及び

(X) 配列番号 1 の 1 4 番目の M e T y r 残基の, M e F 4 C O O, M e F 3 C O O, M e F 4 C, M e F 4 O M e, M e F 3 C, M e F 3 O M e, M e 4 P y, M e 3 P y 及び M e F 4 C O O (P E G 4 c) からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換;

から選択される 1 以上の置換を有するアミノ酸配列からなる, 前記ペプチドであってよい。

なお, 上記 (I) ~ (X) のそれぞれの選択肢は, 任意の組み合わせで選択し得る。

また, 本発明のペプチドは, 上記のいずれかの配列から 1 ~ 3 個のアミノ酸残基が, 置換, 欠失, 付加又は挿入したアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。これらの場合, ペプチドは, h T f R との結合能を有するペプチドであることが好ましい。

[0032] 本発明のさらなる一態様は, 以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

(I) 配列番号 1 の 2 番目のアミノ酸残基が, V, T 又は K m o r であり,

(I I) 配列番号 1 の 3 番目のアミノ酸残基が, M e F 3 C, M e F, 又は M e 3 P y であり,

(I I I) 配列番号 1 の 5 番目のアミノ酸残基が, W 7 N, W 1 a a, W, W 1 E t O H, W 1 M e, 3 I m p 又は M e W であり,

(I V) 配列番号 1 の 6 番目のアミノ酸残基が, N 又は N m m であり,

(V) 配列番号1の7番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂, Y, Y26dF, 3Py6NHaaY3Me又はRであり、

(VI) 配列番号1の8番目のアミノ酸残基が、F4OMe, F4aaο, F4aaο(Glucamine), F4aaο(pipzaa), YaeCOpipzaa, 3Py6OMe, 3Py6NHaa, 3Imp, Y又はF4aaο(PEG8Me)であり、

(VII) 配列番号1の9番目のアミノ酸残基が、I又はEvaであり、

(VIII) 配列番号1の10番目のアミノ酸残基が、I, Har, Kmοr, T, Mor, Hpr又はSであり、

(IX) 配列番号1の11番目のアミノ酸残基が、R, Kmοr, KCOpipzaa, K, E(Glucamine), E(PEG8Me), Q, QPEG8Me, E(PEG8c), E(PEG4c)又はE(apa)であり、

(X) 配列番号1の12番目のアミノ酸残基が、R, Kmοr, KCOpipzaa, Q又はHであり、

(XI) 配列番号1の13番目のアミノ酸残基が、4Py, F3COO, F, F3CONPEG4c, Y3Me, 3Py6Me, 3Py6OMe, 3Py6NH₂, 4Py2Me, 4Py2OMe, 4Py2NH₂, 3Py, F3COO(PEG4c), Y, E(PEG8c), F3COO(PEG8c), E(PEG4c)又はF3COO(PEG8Me)であり、

(XII) 配列番号1の14番目のアミノ酸残基が、MeY, MeF4COO, MeF3COO, MeF4C, MeF4OMe, MeF3C, MeF3OMe, Me4Py, Me3Py又はMeF4COO(PEG4c)である、ペプチドであってもよい。

なお、上記(I)～(XII)のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得る。

また、この明細書に記載される発明によれば、hTfRに結合し、かつ、結合能がpH依存的に変化するペプチドが提供される。

限定するものではないが、本明細書においてペプチドの結合能がpH依存的に変化する（本明細書において、「pH依存的結合能を有する」ともいう）とは、少なくとも2つの異なるpHにおけるペプチドとhTfRとの結合能について、一方の値が他方の値の少なくとも2倍以上、5倍以上、好ましくは10倍以上であることを意味する。ここにおいて、前記結合能は親和性（KDで表すことができる）であってもよく、又、解離速度（解離速度定数：k_{off}で表すことができる）であってもよい。なお、この時の温度は、例えば、25℃又は37℃であってよい。

また、限定するものではないが、上記2つの異なるpHは、一方が酸性pH、他方が中性又は生理学的pHであってよい。酸性pHは、好ましくはpH4～6.8、より好ましくはpH5.5～6.8である。中性pHは、好ましくはpH7～8、より好ましくはpH7.3～7.5である。生理学的pHは、ヒトの正常な生理学的条件におけるpHを意味し、pH7.3～7.4、pH7.35～7.45又はpH7.4であってよい。

トランスフェリン受容体と結合する物質は、トランスサイトosisによって、血液脳関門を通過し、脳内に到達することができる。その際、トランスサイトosisに影響をあたえる因子は、当該物質とトランスフェリンレセプターとの結合能に加え、エンドソームの酸性化である。酸性化したエンドソームにおいては、トランスフェリンレセプターとの結合能が低下した抗体のトランスサイトosisが促進されることが報告されている（非特許文献1）。つまり、中性pHではトランスフェリンレセプターと強く結合し、酸性pHではその結合能が低下するような、pH依存的結合能を有する物質を用いた場合に、トランスサイトosisが促進されることが示唆される。

限定するものではないが、本発明のペプチドは、酸性pHにおける解離速度が、中性又は生理学的pHにおける解離速度の少なくとも2倍以上、5倍以上、好ましくは10倍以上であるようなpH依存的結合能を有するものを含む。この性質を有するペプチドは、血液中ではトランスフェリンレセプターに強く結合してエンドソームに取り込まれ、その後、酸性化したエンドソ

ームにおいて、トランスフェリンレセプターとの結合能が低下し、トランスサイトーシスが促進されることによって、より効率よく、血液脳関門を通過し、脳内に到達することができると思われる。

上記のようなpH依存的結合能を有するペプチドは、上記ペプチドA及び／又はペプチドBのアミノ酸配列を有するペプチドであって、さらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、

(I) 配列番号1の1番目が、アラニン残基である；

(II) 配列番号1の4番目が、バリン残基である；

(III) 配列番号1の6番目が、アスパラギン残基である；

(IV) 配列番号1の7番目が、チロシン残基又は3Py6NH₂残基である；

(V) 配列番号1の9番目が、イソロイシン残基である；

の少なくとも1つを満たし、かつ、次のAまたはBの少なくともいずれかに該当するアミノ酸配列を含む、ペプチドであることが好ましい。

A：(a) 配列番号1の5番目が、W7N残基又は3Imp残基である；

(b) 配列番号1の7番目が、3Py6NH₂残基である；

(c) 配列番号1の8番目が、F4aaopipzaa残基である；

(d) 配列番号1の13番目が、4Py残基である；

の少なくとも2つを満たす。

B：(i) 配列番号1の8番目が、F4aaopipzaa残基、F4aaop(Gluamine)残基、F4aaop(PEG8Me)残基又はYaecOpipzaa残基である。

ここで、(I)のアラニン残基はその誘導体であってもよく、(II)のバリン残基はその誘導体であってもよく、(III)のアスパラギン残基はその誘導体であってもよく、(IV)のチロシン残基又は3Py6NH₂残基はその誘導体であってもよく、(V)のイソロイシン残基はその誘導体であってもよい。

また、(a)のW7N残基又は3Imp残基はその誘導体であってもよく

、(b)の3Py6NH₂残基はその誘導体であってもよく、(c)F4aao(pipzaa)残基はその誘導体であってもよく、(d)の4Py残基はその誘導体であってもよい。

また、(i)のF4aao(pipzaa)残基、F4aao(Gluamine)残基、F4aao(PEG8Me)残基又はYaecOpipzaa残基は、いずれもその誘導体であってもよい。

また、上記(I)～(V)、(a)～(d)、(i)のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得る。

ただし、好ましくは、上記したいずれかのペプチドにおいて、配列番号162に記載のアミノ酸配列を有するペプチドは除く。

[0033] 本発明のペプチドの好ましい例は、配列番号1-202のいずれかに記載のアミノ酸配列、好ましくは配列番号1-161及び168-202、さらに好ましくは配列番号1-149及び168-197、最も好ましくは1-68、又は配列番号1-202、好ましくは配列番号1-161及び168-202、さらに好ましくは配列番号1-149及び168-197、最も好ましくは1-68のいずれかに記載のアミノ酸配列とリンカーの結合体の、1から15番目のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列部位が環状構造を有するペプチドである。

[0034] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドであって、環状ペプチドである。

[0035] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドの、上記1から15番目のアミノ酸配列部位が環状構造を有する、ペプチドである。

[0036] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドであって、そのN末端すなわち1番目のアミノ酸がクロロアセチル化され、そのアセチル基とC末端に位置するアミノ酸であるシステインとが環化したアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0037] 環状ペプチドについて

ペプチド中の2つのアミノ酸が結合し、その全部または一部が環状になっ

ているものをいう。なお、本願においては、ペプチド中のアミノ酸が架橋構造を形成したもの、ラクタム環形成又はマクロ環化反応により環状構造を形成したものや、ラッセペプチド状構造を有するもの等をも包含される。すなわち、本願において環状ペプチドは、その一部が環状構造を形成するものであればよく、直鎖部を有していてもよい。

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

[0038] 環化法

ペプチドの環化については、公知の方法に従って行うことができる。

これに限られるものではないが、例えば、ペプチドに2個以上のシステイン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Gotoらの方法(Y. Goto, et al. *Accs Chem. Biol.* 3 120-129 (2008))に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、N末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中にシステイン残基を配置しておくことによっても環化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環化してもよい。また、N末端にシクロアミドを有するペプチドを合成し、ペプチド中にHgl残基を配置しておくことによっても環化できる。このように、公知の環化方法であれば特に制限されず行うことができる。

[0039] 前記ペプチドは、N末端アミノ酸(1番目のアミノ酸残基)と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様に

において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる15番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したN末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる15番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。「クロロアセチル化」は、他のハロゲンによる「ハロゲンアセチル化」でもよい。また、「アセチル化」は、アセチル基以外のアシル基による「アシル化」でもよい。

[0040] 本明細書において、ペプチドの環化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も包含する。例えば、上述したように、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合がある、このような、クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。

[0041] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドであって、15アミノ酸残基からなる、ペプチドである。

[0042] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドであって、アミノ酸配列の8番目、11番目、13番目又は15番目のアミノ酸残基にリンカーが結合している、前記ペプチドである。さらに好ましくは、配列番号1-202のいずれかに記載のアミノ酸配列、好ましくは配列番号1-161及び168-202、さらに好ましくは配列番号1-149及び168-197、最も好ましくは1-68のいずれかに記載の、前記ペプチドである。

[0043] ペプチド長

ペプチド、ペプチド部位のアミド結合の数（アミノ酸の数・長さ）は特に限定されないが、総アミノ酸残基（ペプチドに結合した物質又は当該物質とペプチドを結合するリンカーがアミノ酸を含む場合は、それらのアミノ酸は含めない）が20残基以内が好ましい。好ましくは総アミノ酸残基が10以上、11以上、12以上、13以上、14以上であり、好ましくは総アミノ

酸残基が19以下, 18以下, 17以下, 16以下である。

[0044] この明細書に開示される別の実施態様は、複合体（コンジュゲート）に関する。この複合体は、上記したいずれかのペプチドと、このペプチドと結合したリンカーと、このリンカーに結合した物質とを含む複合体である。少なくともTfRに結合可能である複合体であることが好ましい。

上記複合体は、上記いずれかのペプチドが有するシステイン（Cys）のC末端と前記物質とが結合してなされた複合体であってもよく、前記C末端に結合したリンカーと前記物質とが結合してなされた複合体であってもよい。

また、上記いずれかのペプチドのアミノ酸残基に含まれる側鎖末端が有する官能基と前記物質とが結合してなされた複合体であってもよく、前記官能基に結合したリンカーと前記物質とが結合してなされた複合体であってもよい。

[0045] リンカーの例は、リンカーのアミノ酸長が1以上15以下であり、リンカーがグリシン（Gly）又はセリン（Ser）を1つ以上含むものである。

このリンカーの好ましい例は、N末端が修飾されてもよいシステイン（Cys）又は修飾されてもよいリジン（Lys）である。

[0046] リンカーの別の例は、アミノ酸長が1以上5以下であり、D体のグルタミン酸（de）及びメチル化グリシン（MeG）のいずれか又は両方を含むものである。

このリンカーの好ましい例は、N末端が修飾されてもよいシステイン（Cys）又は修飾されてもよいリジン（Lys）である。

[0047] リンカーの別の例は、ポリエチレングリコール（PEG）又はポリエチレングリコールの誘導体を含むPEGリンカーである。ポリエチレングリコールの誘導体は、PEGリンカーとして公知であるすべてのものを含む。また、一部が官能基に置換又は官能基が付加されていてもよい。例えば、非限定的に、メチル基、アミノ基、アジド基などが挙げられる。

好ましくは、PEGリンカーが、PEG4c、PEG8c、PEG12c、PEG8Me、MePEG4c、PEG1Me、PEG4Me又はNHd

PEG1Meである。

また、さらに、リンカーには、所望の物質を結合させるための、反応性官能基が含まれていてもよい。反応性官能基の例としては、マレイミドやヒドラジドが挙げられる。

[0048] リンカーの別の例は、リンカーが、表1-1に表される配列番号1-68の、Linker記載部分の配列であってもよい。例えば、配列番号1においては、PEG4cがリンカーにあたり、配列番号64においては、Linker行に記載されたアミノ酸残基であるグリシンからはじまる[G-KN3]配列がリンカーにあたる。

[0049] このリンカーが結合しているペプチド又は複合体の好ましい例は、リンカーが、ポリエチレングリコール(PEG)、Gly又はMeGからなるペプチドリンカーであるGリンカー、Gly又はMeGとSerからなるペプチドリンカーであるGSリンカー、並びに、Gly及びKN3からなるペプチドリンカーであるGKN3リンカーである。

[0050] リンカー(クロスリンカーともいう)は、本明細書では、トランスフェリンレセプターに結合するペプチドの環状アミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基にさらに付加的に結合している構造、又は、前記ペプチドとTfRに送達したい物質との分子間連結を示し、公知または本明細書に記載の任意のリンカーであってよい。特定の実施形態においては、前記リンカーは、例えば、化学リンカー、脂肪酸リンカー、ペプチドリンカー(ポリペプチドリンカー)である。また、例えば化学リンカーとペプチドリンカーなどの複合体であってもよい。

リンカーは、例えば、環境・条件によって乖離・分離するようなものであってもよく、安定的な構造を保つものでもよい。

[0051] 化学リンカー：いくつかの実施形態においては、リンカーは化学リンカーであってよい。化学リンカーとしては、これに限られないが、例えば、置換または非置換アルキレン、置換または非置換ヘテロアルキレン、置換または非置換シクロアルキレン、置換または非置換ヘテロシクロアルキレン、置換

または非置換アリーレンおよび／または置換または非置換ヘテロアリーレンを含む。また、ペプチドとリンカーは、スルフヒドリル基、アミノ基（アミン）、および／もしくは炭水化物または任意の好適な反応基を介してコンジュゲートさせることができる。ホモ二官能性およびヘテロ二官能性交叉リンカー（コンジュゲーション剤）が、多くの商業的起源から利用可能である。交叉リンカーは、可撓性アーム、例えば、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14または15個の炭素原子を含んでもよい。交叉リンカーの例としては、BSS3（[ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート]）、NHSS/EDC（N-ヒドロキシスクシンイミドとN-エチルー（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、スルホ-EMCSS（[N-ε-マレイミドカプロン酸]ヒドラジド、ヒドラジド、ならびにSSATA（N-スクシンイミジル-SS-アセチルチオ酢酸）などが挙げられる。

- [0052] 化学リンカーの好ましい例は、PEG（Polyethyleneglycol）リンカーである。例えば、PEGリンカーは、1～24個のエチレングリコール単位からなるPEGリンカーであってよい。
- [0053] 脂肪酸リンカー：リンカーは、脂肪酸から誘導される二価化学部分を含む脂肪酸リンカーでもよい。例えば、脂肪酸リンカーは、12-アミノドデカン酸を有するリンカーであってよい。
- [0054] ペプチドリリンカー：ペプチドリリンカーは、少なくとも1個のアミノ酸（例えば、少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 25, 40または50個のアミノ酸のペプチド）を含む。特定の実施形態においては、リンカーは1個のアミノ酸（例えば、Cysなどの任意の天然アミノ酸）である。他の実施形態においては、米国特許第7, 271, 149号に記載のような、配列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n（式中、nは1, 2, 3, 4, 5または6である）を有するペプチドなどのグリシン-リッチペプチドを用いる。他の実施形態においては、米国特許第5, 525, 491号に記載のような、セリン-リッチペプチドリリンカーを用いる。セリ

ンリッチペプチドリンカーとしては、式 $[X-X-X-X-Gly]_y$ (式中、Xのうち最大2個はThrであり、残りのXはSerであり、yは1～5である) のもの (例えば、Ser-Ser-Ser-Ser-Gly (式中、yは2以上である)) が挙げられる。いくつかの事例においては、リンカーは1個のアミノ酸 (例えば、GlyまたはAlaなどの任意のアミノ酸) である。

[0055] この明細書に開示される別の実施態様は、上記したリンカーが結合しているペプチド又は上記した複合体を含み、上記した物質が、有効成分である。この明細書に開示される別の実施態様は、ペプチド又はリンカーに結合した物質を含む複合体であってもよい。「結合した物質」は、ペプチド又はリンカーと結合した物質であればよく、結合した物質の例は医薬や医薬の有効成分である。

[0056] 上記の物質は、TfRに送達することを希望する物質であれば、当業者の希望する何らの物質であってよい。また、上述のpH依存性を有する本発明のペプチドを使用する場合は、上記の物質は、脳内に送達することを希望する物質であってよい。該物質の例としては、限られないが、以下が挙げられる：

化合物：低分子化合物、中分子化合物だけではなく、細胞のサイトーシス機構で導入可能な化合物であれば何でもよい。例えば公知の低分子薬剤が挙げられる。

ペプチド：体内の標的に結合して何らかの効果を示すペプチドであってよく、例えば環状ペプチドであってよい。

R1：放射性同位元素でラベルした低分子、中分子化合物や抗体等、放射性同位元素でラベルできる化合物であれば何でもよい。例えば、PET検査用の化合物が挙げられる。

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

核酸：DNA、RNA等、塩基配列を含むものであれば何でもよい。例え

ば、核酸医薬品が挙げられる。

DDS：リポソームやミセルなどのDDS分子であってよい。当該DDS分子には内部にさらに医薬品などの化合物が含まれていてもよい。

また上記の物質は、上記に挙げたそれらの複合体であってよい。

[0057] この明細書に開示される別の実施態様は、前記したいずれかのペプチドを含む組成物や、前記したいずれかの複合体を含む組成物に関する。組成物は、ペプチドや複合体の他に公知の素材（例えば、担体や溶媒）を含んでもよい。この明細書に開示される別の実施態様は、医薬用又は診断用の組成物の製造方法に関する。この方法は、上記した複合体を得る工程を含む、予防剤、治療剤又は診断薬の製造方法である。

[0058] この方法の好ましい例は、リンカーが、ポリエチレングリコール（PEG）、Gリンカー、GSリンカー、及び、GKN3リンカーである。または、リンカーが、表1-1に表される配列番号1-68の、Linker記載部分の配列であってもよい。または、リンカーが、表1-3に表される配列番号168-197の、Linker記載部分の配列であってもよい。

[0059] この明細書に開示される別の実施態様は、上記したペプチド又はペプチドとリンカーの結合体にさらに結合した物質とを含む複合体を含む、医薬用又は診断用の組成物に関する。好ましくはTfR関連疾患の医薬用又は診断用の組成物である。

[0060] 本発明のペプチドは、液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法；遺伝子組み換え法等、公知のペプチドの製造方法によって製造することができる。

[0061] 固相法は、例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 α -アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常、目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては、1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール（MSNT）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI）等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。

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

[0062] 固相合成のレジンとしては、Merrifield resin, MBH A resin, Cl-Trt resin, SASRIN resin, Wang resin, Rink amide resin, HMFS resin, Amino-PEGA resin (メルク社), HMPA-PEGA resin (メルク社) 等が挙げられる。これらのレジンは、溶剤 (ジメチルホルムアミド (DMF), 2-プロパノール, 塩化メチレン等) で洗浄してから用いることができる。

α -アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル (Cbz 又は Z) 基, tert-ブトキシカルボニル (Boc) 基, フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基, ベンジル基, アリル基, アリルオキシカルボニル (Alloc) 基等が挙げられる。

Cbz 基はフッ化水素酸, 水素化等によって脱保護でき, Boc 基はトリフルオロ酢酸 (TFA) により脱保護でき, Fmoc 基はピペリジンによる処理で脱保護できる。

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

アミノ酸のその他の官能基として, セリンやトレオニンのヒドロキシ基はベンジル基や tert-ブチル基で保護することができ, チロシンのヒドロ

キシ基は2-ブロモベンジルオキシカルボニル希やtert-ブチル基で保護する。リジン側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシ基は、 α -アミノ基、 α -カルボキシ基と同様に保護することができる。

[0063] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCあるいはWSC)、(1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート(BOP)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート(HBTU)等が挙げられる。

[0064] レジンからのペプチド鎖の切断は、TFA、フッ化水素(HF)等の酸で処理することによって行うことができる。

[0065] 遺伝子組み換え法(翻訳合成系)によるペプチドの製造は、本発明のペプチドをコードする核酸を用いて行うことができる。本発明のペプチドをコードする核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。

本発明のペプチドをコードする核酸は、公知の方法又はそれに準ずる方法で調製することができる。例えば、自動合成装置によって合成することができる。得られたDNAをベクターに挿入するために制限酵素認識部位を加えてもよく、できたペプチド鎖を酵素などで切り出すためのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を組み込んでもよい。

上述のとおり、本発明のペプチドを膜透過性ペプチド等と融合させる場合、上記核酸は、膜透過性ペプチドをコードする核酸も含む。

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

[0066] 続いて、本発明のペプチドをコードする核酸を用いて発現ベクターを調製する。核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加する等して、発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することができる。ベクターとしては、大腸菌由来プラスミド（pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pBluescript II等）、枯草菌由来プラスミド（pUB110, pTP5, pC1912, pTP4, pE194, pC194等）、酵母由来プラスミド（pSH19, pSH15, YE p, YRp, Ylp, YAC等）、バクテリオファージ（φファージ, M13ファージ等）、ウイルス（レトロウイルス, ワクシニアウイルス, アデノウイルス, アデノ随伴ウイルス（AAV）, カリフラワーモザイクウイルス, タバコモザイクウイルス, バキュロウイルス等）、コスミド等が挙げられる。

[0067] プロモーターは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、SV40（simian virus 40）由来プロモーター、CMV（cytomegalovirus）由来プロモーターを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター等を用いることができる。

発現ベクターには、DNA複製開始点（ori）、選択マーカー（抗生物質抵抗性、栄養要求性等）、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、タグ（FLAG, HA, GST, GFPなど）をコードする核酸等を組み込むこともできる。

[0068] 次に、上記発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換する。宿主は、ベクターとの関係で適宜選択することができ、例えば、大腸菌、枯草菌、バチルス属菌、酵母、昆虫又は昆虫細胞、動物細胞等が用いられる。動物細胞として、例えば、HEK293T細胞、CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、HeLa細胞、Vero細胞を用いることができる。形質転換は、宿主の種類に応じ、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレ

ーション法，マイクロインジェクション法，パーティクルガン法等，公知の方法に従って行うことができる。形質転換体を常法に従って培養することにより，目的とするペプチドが発現する。

[0069] 形質転換体の培養物からのペプチドの精製は，培養細胞を回収し，適当な緩衝液に懸濁してから超音波処理，凍結融解などの方法により細胞を破壊し，遠心分離やろ過によって粗抽出液を得る。培養液中にペプチドが分泌される場合には，上清を回収する。

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

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

[0070] 翻訳合成系は，無細胞翻訳系としてもよい。無細胞翻訳系は，例えば，リボソームタンパク質，アミノアシル tRNA 合成酵素（ARS），リボソーム RNA（rRNA），アミノ酸，GTP，ATP，翻訳開始因子（IF），伸長因子（EF），終結因子（RF），及びリボソーム再生因子（RRF），並びに翻訳に必要なその他の因子を含む。発現効率を高くするために大腸菌抽出液や小麦胚芽抽出液を加えてもよい。他に，ウサギ赤血球抽出液や昆虫細胞抽出液を加えてもよい。

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

社やセルフリースサイエンス社のもの等を使用できる。

無細胞翻訳系によれば、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる。

[0071] 無細胞翻訳系においては、天然のアミノアシル tRNA 合成酵素に合成されるアミノアシル tRNA に代えて、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸を tRNA に連結（アシル化）した人工のアミノアシル tRNA を用いてもよい。かかるアミノアシル tRNA は、人工のリボザイムを用いて合成することができる。

かかるリボザイムとしては、フレキシザイム (flexizyme) (H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; H. Murakami, D. Kourouklis, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 1077-1084; H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga (2006) Nature Methods 3, 357-359 "The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the synthesis of nonnatural peptides"; N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga (2009) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19, 3892-3894 "A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group"; 及び WO2007/066627 等) が挙げられる。フレキシザイムは、原型のフレキシザイム (Fx), 及び、これから改変されたジニトロベンジルフレキシザイム (dFx), エンハンスドフレキ

シザイム (e F x) , アミノフレキシザイム (a F x) 等の呼称でも知られる。

[0072] フレキシザイムによって生成された、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸が連結された t R N A を用いることにより、所望のコドン、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸と関連付けて翻訳することができる。所望のアミノ酸としては、特殊アミノ酸を用いてもよい。例えば、上述した環化に必要な非天然アミノ酸もこの方法により、結合ペプチドに導入することができる。

[0073] 本発明の大環状ペプチドとそのアナログの化学合成は、段階的固相合成、配座的に支援される再ライゲーションを経るペプチドフラグメントの半合成、化学ライゲーションを含めた様々な当該技術分野において汎用される方法を使用して合成できる。本明細書に記されるペプチドとそのアナログの合成は、たとえば K. J. Jensen, P. T. Shelton, S. L. Pedersen, Peptide Synthesis and Applications, 2nd Edition, Springer, 2013 などに記載されるような種々の固相技術を使用する化学合成である。好ましい戦略として、 α -アミノ基を一時的に保護および塩基による選択的除去を可能とする Fmoc 基と、側鎖官能基を一時的に保護しかつ脱 Fmoc 条件に安定な保護基の組み合わせに基づく。そのような一般的なペプチド側鎖の選択は前述の Peptide Synthesis and Applications, 2nd edition や G. B. Fields, R. L. Noble, Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 1990, 161-214 などで知られているが、好ましいペプチド側鎖保護基としては、リシンをはじめとするアミノ基に対する Boc 基や Mtt 基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシル基に対する tert-butyl 基、またシステインのチオール基に対する Tr

t および M m t 基がある。

[0074] 本発明に記載されるペプチドとそのアナログは、前述した固相樹脂上で段階的方法において合成できる。使用するC末端アミノ酸および合成に使用するすべてのアミノ酸やペプチドは、 α -アミノ保護基が合成過程において、選択的に除去されなければならない。好ましくは前述の固相樹脂を用い、N末端がFmoc等適切に保護されたペプチドのC末端カルボキシ基またはFmocで保護されたアミノ酸のC末端カルボキシ基を適切な試薬により活性化エステルとしたのち固相樹脂上のアミノ基に付加することにより開始する。引き続くペプチド鎖の伸長は、目的とするペプチドのアミノ酸配列に従って、N末端保護基（Fmoc基）の除去、次いで保護アミノ酸誘導体の縮合を順次繰り返すことにより達成することが可能である。なお、これらは目的のペプチドを最終段階で遊離させることができる。たとえば遊離させる条件として、Teixeira, W. E. Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. P. M. Valentijn, J. W. Drijfhout, Protein Pept. Lett., 2002, 9, 379-385などに挙げられる、TFA中に捕捉剤として、水／シリルヒドリド／チオールを含むTFA溶液で遊離させることができる。典型的な例として、TFA／Water／TIS／DODT（体積比92.5：2.5：2.5：2.5）が挙げられる。

[0075] 本明細書に記載するペプチドアナログの合成は、単または多チャネルペプチド合成機、たとえばCEM社のLiberty Blue 合成機またはBiotage社のSyro 1 合成機を使用することで実施できる。

[0076] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDCあるいはWSC）、（1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキ

サフルオロホスファート（BOP），1－[ビス（ジメチルアミノ）メチル]
－1H－ベンゾトリアゾリウム－3－オキシドヘキサフルオロホスファート（HBUTU）等が挙げられる。

[0077] この明細書に開示される別の実施態様は、医薬に関する。この医薬組成物は、上記したペプチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物（簡単のため、以下ではこれらを単にペプチドとも表記する）、若しくは、上記したペプチドとリンカーの結合体にさらに結合した物質とを含む複合体を含む。この医薬組成物は、上記したペプチドを有効成分として有効量含むものが好ましい。

[0078] 本明細書において、医薬組成物の投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膈、経直腸）投与等が上げられる。

[0079] 上記医薬組成物は、ポリペプチドが代謝及び排泄されやすい性質に鑑みて、各種の修飾を行うことができる。例えば、ポリペプチドにポリエチレングリコール（PEG）や糖鎖を付加して血中滞留時間を長くし、抗原性を低下させることができる。また、ポリ乳酸・グリコール（PLGA）などの生体内分解性の高分子化合物、多孔性ヒドロキシアパタイト、リポソーム、表面修飾リポソーム、不飽和脂肪酸で調製したエマルジョン、ナノパーティクル、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これにポリペプチドを内包させてもよい。経皮投与する場合、弱い電流を皮膚表面に流して角質層を透過させることもできる（イオントフォoresis法）。

[0080] 上記医薬組成物は、有効成分をそのまま用いてもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。

製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助

剤，着色剤，矯味矯臭剤，安定化剤，乳化剤，吸収促進剤，界面活性剤，pH調整剤，防腐剤，抗酸化剤などを適宜使用し，常法により行うことができる。

製剤化に用いられる成分の例としては，精製水，食塩水，リン酸緩衝液，デキストロース，グリセロール，エタノール等薬学的に許容される有機溶剤，動植物油，乳糖，マンニトール，ブドウ糖，ソルビトール，結晶セルロース，ヒドロキシプロピルセルロース，デンプン，コーンスターチ，無水ケイ酸，ケイ酸アルミニウムマグネシウム，コラーゲン，ポリビニルアルコール，ポリビニルピロリドン，カルボキシビニルポリマー，カルボキシメチルセルロースナトリウム，ポリアクリル酸ナトリウム，アルギン酸ナトリウム，水溶性デキストラン，カルボキシメチルスターチナトリウム，ペクチン，メチルセルロース，エチルセルロース，キサンタンガム，アラビアゴム，トラガント，カゼイン，寒天，ポリエチレングリコール，ジグリセリン，グリセリン，プロピレングリコール，ワセリン，パラフィン，ミリスチン酸オクチルドデシル，ミリスチン酸イソプロピル，高級アルコール，ステアリルアルコール，ステアリン酸，ヒト血清アルブミン，等が挙げられるがこれらに限定されない。

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

[0081] 丸剤又は錠剤は，糖衣，胃溶性物質，腸溶性物質で被覆することもできる。

注射剤は、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えることができる。

[0082] 本発明の医薬組成物を哺乳類（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル、ブタ等）、特にヒトに投与する場合の投与量は、症状、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、特に限定されないが、例えば、 $30\mu\text{g}\sim 100\text{g}$ 、 $100\mu\text{g}\sim 500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ を1回又は数回に分けて投与することができる。注射投与の場合、患者の体重により、 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3\mu\text{g}/\text{kg}\sim 1000\mu\text{g}/\text{kg}$ を1回又は数回に分けて投与してもよい。

[0083] 「TfR関連疾患」とは、TfRが治療ターゲットタンパク質である疾患や、TfRを発現している細胞又は組織において引き起こされる疾患などという。また、TfRに結合することで血液脳関門を通過することができるため、脳疾患（脳に何らかの異常が起こることによりきたす疾患であり、例えば中枢神経（CNS）疾患などを示す）や、筋組織にTfRが多く発現していることから、神経筋疾患（脳・脊髄・末梢神経などの神経または筋肉の病変によって筋力の低下などの運動障害をきたす疾患）などを含む。

[0084] TfR関連疾患検出薬及び検出用キット

本発明は、本発明のペプチドを含むTfR関連疾患検出薬も包含する。検出薬として用いる場合、本発明のペプチドは、検出可能に標識してもよい。ペプチドの標識は、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体が用いられる。その他、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子で標識し

た抗体を検出することもできる。例えば、TfR関連疾患に関係する特定の標的に結合する抗体と本発明のペプチドとで複合体を作成し、当該抗体又は本発明のペプチドに標識した複合体を作成し、それを投与、検出することで、TfR関連疾患を検出することができる。

また、イムノアッセイでは、本発明のペプチドをビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出することもできる。

イムノアッセイの中でも、酵素標識を用いるELISA法は、簡便且つ迅速に抗原を測定することができて好ましい。例えば、抗体を固相担体に固定し、サンプルを添加して反応させた後、標識した本発明のペプチドを添加して反応させる。洗浄後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定することにより、TfR関連疾患を検出することができる。固相担体に固定した抗体と試料を反応させた後、標識していない本発明のペプチドを添加し、本発明のペプチドに対する抗体を酵素標識してさらに添加してもよい。

酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、3, 3'-diaminobenzidine (DAB), 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB), o-phenylenediamine (OPD) 等を用いることができ、アルカリホスファターゼの場合、p-nitrophenyl phosphate (NPP) 等を用いることができる。

[0085] 本明細書において「固相担体」は、抗体を固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、金属性、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられ、標的物質は、これらの固相担体に公知の方法に従って固定することができる。

[0086] 本発明に係る検査用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（本発明のペプチド、抗体、固相担体、緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー等を含むが、これらに限定されない）を含む。

- [0087] この明細書に開示される別の実施態様は、上記した T f R 関連疾患検出薬を含む検出用キットや、T f R 関連疾患、及びそれに伴う種々の細胞機能や生命現象を解明するためのツールとして用いることも考慮されうる。
- [0088] この明細書は、医薬用又は診断用の組成物を製造するための、ペプチドの使用をも提供する。この場合におけるペプチドは、上記したいずれかのものであればよい。
- [0089] 本明細書は、ヒト、非ヒト哺乳動物又は鳥類である対象に、有効量のペプチド、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物、又は複合体を投与する工程を含む、T f R 関連疾患の予防又は治療方法をも提供する。ペプチドは、上記したペプチドを適宜用いることができる。非ヒト哺乳動物の例は、ヒト以外の霊長類、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ラット及びマウスである。
- [0090] この明細書は、ヒト、非ヒト哺乳動物又は鳥類である対象に、有効量のペプチド、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物、又は複合体を投与する工程を含む、T f R 関連疾患の予防又は治療方法をも提供する。
- [0091] 本明細書は、ペプチド、及び／又はペプチドとリンカーの結合体にさらに結合した物質とを含む複合体について、
- a) 溶媒への溶解度、
 - b) h T f R との結合能、
 - c) 細胞及び／又は組織への毒性、
 - d) 実験動物への毒性、
- の少なくとも 1 つを試験するペプチド及び／又は複合体の試験方法であって、
- 前記ペプチドは、本発明のペプチドが有するアミノ酸配列において、1 ～ 3 個のアミノ酸残基を、欠失、置換、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列を有するペプチドである、前記方法を提供する。
- また、前記方法の限定的な一態様として、b) h T f R との結合能は、h T f R との pH 依存的結合能であってよい。

[0092] 前記本発明のペプチドは、本明細書に記載のペプチドであればよいが、好ましい一態様としては、ペプチドA及び／又はペプチドBのアミノ酸配列を有するペプチドであって、さらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、

(I) 配列番号1の1番目が、アラニン残基である；

(II) 配列番号1の4番目が、バリン残基である；

(III) 配列番号1の6番目が、アスパラギン残基である；

(IV) 配列番号1の7番目が、チロシン残基又は3Py6NH₂残基である；

(V) 配列番号1の9番目が、イソロイシン残基である；

の少なくとも1つを満たすアミノ酸配列を含む、ペプチドであってよく、また、これらをすべて満たすペプチドであってよい。

なお、上記において、(I)のアラニン残基はその誘導体であってもよく、(II)のバリン残基はその誘導体であってもよく、(III)のアスパラギン残基はその誘導体であってもよく、(IV)のチロシン残基又は3Py6NH₂残基はその誘導体であってもよく、(V)のイソロイシン残基はその誘導体であってもよい。

また、上記(I)～(V)のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得る。

また、前記本発明のペプチドは、限定されるものではないが、一態様において、配列番号1-202のいずれかに記載のアミノ酸配列、好ましくは配列番号1-161及び168-202、さらに好ましくは配列番号1-149及び168-197、最も好ましくは1-68、のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号1-202のいずれかに記載のアミノ酸配列、好ましくは配列番号1-161及び168-202、さらに好ましくは配列番号1-149及び168-197、最も好ましくは1-68、のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、環状ペプチドである。限定されるものではない

が、当業者は、配列番号 1-202、好ましくは 1-161 及び 168-202 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列において、アミノ酸を 1~3 個適宜選択し、欠失、置換、挿入及び／又は付加した配列を作成することができる。前記方法において、欠失、置換、挿入及び／又は付加するアミノ酸の数は、1~3 個、好ましくは 1~2 個、より好ましくは 1 個である。

[0093] また、アミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加については、限定するものではないが、置換が好ましく、保存的アミノ酸置換がより好ましい。

前記ペプチドは、本発明のペプチドが有するアミノ酸配列に対して、少なくとも 80% 以上、好ましくは 85% 以上、86% 以上、87% 以上、88% 以上、90% 以上、91% 以上、92% 以上、93% 以上、94% 以上のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、又はからなるペプチドであってもよい。

2 つのアミノ酸配列の同一性%は、視覚的検査および数学的計算によって決定してもよい。あるいは、2 つのタンパク質配列の同一性パーセントは、Needleman, S. B. 及び Wunsch, C. D. (J. Mol. Biol., 48: 443-453, 1970) のアルゴリズムに基づき、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWCGC) より入手可能な GAP コンピュータープログラムを用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAP プログラムの好ましいデフォルトパラメーターには: (1) Henikoff, S. 及び Henikoff, J. G. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992) に記載されるような、スコアリング・マトリックス, blosum62; (2) 12 のギャップ加重; (3) 4 のギャップ長加重; 及び (4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。

当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、用いてもよい。同一性のパーセントは、例えば Altschul ら (Nucl. Acid

s. Res., 25, p. 3389-3402, 1997)に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI), あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ)のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる同一性検索の各種条件(パラメーター)は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。又は、2つのアミノ酸配列の同一性%は、遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX Ver. 7(ゼネティックス製)などのプログラム、又は、FASTAアルゴリズムなどを用いて決定してもよい。その際、検索はデフォルト値を用いてよい。

当業者は、このようにして作成したアミノ酸配列を基に、上述の液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法; 遺伝子組み換え法等、公知のペプチドの製造方法によって本発明の試験方法に供するペプチドを作製することができる。

限定されるものではないが、前記1~3個のアミノ酸残基を、欠失、置換、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列を有するペプチド(すなわち、前記試験方法に記載の試験に供するペプチド)は、上記ペプチドA及び/又はペプチドBのアミノ酸配列を有するペプチドであって、さらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、

(I) 配列番号1の1番目が、アラニン残基である;

(II) 配列番号1の4番目が、バリン残基である;

(III) 配列番号1の6番目が、アスパラギン残基である;

(IV) 配列番号1の7番目が、チロシン残基又は3Py6NH₂残基である;

(V) 配列番号1の9番目が、イソロイシン残基である;

の少なくとも1つを満たすアミノ酸配列を含む、ペプチドであってよく、ま

た、これらをすべて満たすペプチドであってよい。このようなペプチドは、h T f Rとの結合能が高いと考えられる。

なお、上記において、(I)のアラニン残基はその誘導体であってもよく、(II)のバリン残基はその誘導体であってもよく、(III)のアスパラギン残基はその誘導体であってもよく、(IV)のチロシン残基又は3 P y 6 N H 2残基はその誘導体であってもよく、(V)のイソロイシン残基はその誘導体であってもよい。

また、上記(I)～(V)のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得る。

さらに限定されるものではないが、前記試験方法に供するペプチドは、上記ペプチドA及び／又はペプチドBのアミノ酸配列を有するペプチドであって、さらに、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、上記(I)～(V)の少なくとも1つを満たし、かつ、次のAまたはBの少なくともいずれかに該当するアミノ酸配列を含む、ペプチドであることが好ましい。

A：(a) 配列番号1の5番目が、W 7 N残基又は3 I m p残基である；

(b) 配列番号1の7番目が、3 P y 6 N H 2残基である；

(c) 配列番号1の8番目が、F 4 a a o (p i p z a a)残基である；

(d) 配列番号1の13番目が、4 P y残基である；

の少なくとも2つを満たす。

B：(i) 配列番号1の8番目が、F 4 a a o (p i p z a a)残基、F 4 a a o (G l u c a m i n e)残基、F 4 a a o (P E G 8 M e)残基又はY a e C O p i p z a a残基である。

このようなペプチドは、h T f Rとの結合能が高く、かつ、p H依存性の結合能を有すると考えられる。

なお、上記において、(a)のW 7 N残基又は3 I m p残基はその誘導体であってもよく、(b)の3 P y 6 N H 2残基はその誘導体であってもよく、(c) F 4 a a o (p i p z a a)残基はその誘導体であってもよく、(d)の4 P y残基はその誘導体であってもよい。

なお、上記において、(i)のF4aaopipzaa残基、F4aaop(Glucamine)残基、F4aaop(PEG8Me)残基又はYaecOpipzaa残基は、いずれもその誘導体であってもよい。

また、上記(I)～(V)，(a)～(d)，(i)のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得る。

ただし、好ましくは、上記したいずれかのペプチドにおいて、配列番号162に記載のアミノ酸配列を有するペプチドは除く。

[0094] 前記試験方法について、ペプチドの、溶媒への溶解度の試験は、溶解度の測定であってよい。溶解度の測定にあたっては、溶媒は限定されるものではなく、目的に応じて自由に選択してよい。また、溶解度の測定方法に関しては、溶媒の種類に応じて、公知の方法を適切に選択することができる。

hTfRとの結合能の試験は、hTfRとの結合能の測定であってよく、限定されるものではないが、上述の表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイ、スキャチャード解析ならびに／または放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイ法など、公知の方法を好ましく使用することができる。また、hTfRとのpH依存的結合能の試験は、上述の各種pHにおいて行う、hTfRとの結合能の測定であってよい。

細胞及び／又は組織への毒性の試験は、細胞及び／又は組織を用いた公知の毒性評価試験であってよく、例えば、*in vitro*で実施する方法であってよい。細胞や組織は、医薬品について通常、毒性評価試験を行う細胞及び／又は組織であってよく、限定されるものではない。

実験動物の毒性の試験方法は、実験動物を使用した公知の毒性評価試験であってよい。実験動物について、通常使用されているものであれば特に限定されないが、例として、マウス、ラット、モルモット、スナネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウマ、ウシ、鳥類（例えば、ニワトリ、ウズラなど）、サル、ヒトを除く霊長類（例えば、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルなど）などが挙げられる。

上記の毒性評価試験は、限定されるものではないが、医薬品の非臨床試験において通常行われる安全性に関する試験であってよく、例として、一般毒性試験（単回投与毒性試験／反復投与毒性試験）、遺伝毒性試験（Ame s試験／染色体異常試験／In vitro小核試験）、がん原性試験、生殖発生毒性試験（ICH-I, II, III）、局所刺激性試験（眼刺激性試験、皮膚刺激性試験等）、その他の毒性試験（皮膚感作性試験、光毒性試験、抗原性試験）、化学分析・生体分析（TK／PK）などが挙げられる。

[0095] 本明細書、特に下記の代表的な実施例に使用した略語は、当業者には周知である。使用された幾つかの略語は次のとおりである：

Alexa Fluor（登録商標） 647としてAF647；

オングストローム（単位）としてÅ；

クロロアセチルとしてClAc；

Sulfo-Cy5-alkyneとしてCy5SAIk；

ジクロロメタンとしてDCM；

トリイソプロピルシリルとしてTIPS；

ターシャリーブチルとしてtBu；

ジチオトレイトールとしてDTT；

ジメチルスルホキシドとしてDMSO；

トリチルとしてTrit；

ターシャリーブトキシカルボニルとしてBoc；

N，N-ジメチルホルムアミドとしてDMF；

N，N-ジイソプロピルエチルアミンとしてDIEAもしくはDIPEA；

N，N'-ジイソプロピルカルボジイミドとしてDIPCI；

シアノ（ヒドロキシイミノ）酢酸エチルとしてOxyma pure；

3，6-ジオキサー1，8-オクタンジチオールとしてDODT；

9-フルオレニルメチルオキシカルボニルとしてFmoc；

グラム（単位）としてg；

O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N，N，N'，N'-テ

トラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩としてHATU；
N-ヒドロキシスクシンイミドとしてHOSu；
高速液体クロマトグラフィーとしてHPLC；
液体クロマトグラフィー質量分析計としてLC-MSもしくはLC/MS
ミリリットル（単位）としてmL；
モラー（単位）としてM；
マイクロリットル（単位）として μ L；
ミリモラー（単位）としてmM；
マイクロモラー（単位）として μ M；
ミリモル（単位）としてmmol；
ミリグラム（単位）としてmg；
アセトニトリルとしてMeCNもしくはCH₃CN；
分（単位）としてmin；
ミリメートル（単位）としてmm；
マイクロメートル（単位）として μ m；
ナノメートル（単位）としてnm；
ナノモラー（単位）としてnM；
スクシンイミドとしてOSu；
ポリエチレングリコールとしてPEG；
回転毎分（単位）としてrpm；
ターシャリーブチルとしてtBu；
トリフルオロ酢酸としてTFA；
トリイソプロピルシランとしてTIS；
トリチル基としてTrtまたはTr；
2，5，8，11-テトラオキサトリデカン-13-アミンとしてH-PEG4Me；
2，5，8，11，14，17，20，23-オクタオキサペンタコサン-
25-アミンとしてH-PEG8Me（CAS No. 869718-81

—O) ;

アミノ酸としてAA ;

7—((アザベンゾトリアゾール—1—イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸としてPyAOP ;

10—カンファースルホン酸としてCSA ;

N—(9—フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)スクシンイミドとしてFmoc—OSu ;

テトラヒドロフランとしてTHF ;

N—(クロロアセトキシ)スクシンイミドとしてClAcOSu ;

トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0)としてPd₂(dba)₃ ;

2—ジシクロヘキシルホスフィノ—2' , 6'—ジメトキシビフェニルとしてSPhos ;

1—(3—ジメチルアミノプロピル)—3—エチルカルボジイミド塩酸塩としてEDCI·HCl ;

テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) ;

ターシャリーブチル2—(ピペラジン—1—イル)アセテートとしてH—pipzaa(tBu)としてPd(PPh₃)₄(CAS No. 827614—56—2) ;

ターシャリーブチル1—アミノ—3, 6, 9, 12—テトラオキサペンタデカン—15—オエーテとしてH—PEG4c(tBu)(CAS No. 581065—95—4) ;

酢酸トリエチルアンモニウムとしてTEAA ;

(S)—2—(((9H—フルオレン—9—イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)—3—(3—((アリルオキシ)カルボニル)フェニル)プロパン酸としてFmoc—F₃COO(allyl)—OH(CAS No. 293141—52—1) ;

(S)—2—(((9H—フルオレン—9—イル)メトキシ)カルボニル

) アミノ) - 5 - (アリルオキシ) - 5 - オキソペンタン酸として Fmoc-E(aillyl)-OH (CAS No. 133464-46-7) ;
 ターシャリーブチル (3 - アミノプロピル) カーバメートとして Boc-apa-H (CAS No. 75178-96-0) ;
 プロパン - 1, 3 - ジアミンとして apa (CAS No. 109-76-2) ;
 (S) - 2 - ((((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) (メチル) アミノ) - 3 - (4 - (アリルオキシ) カルボニル) フェニル) プロパン酸として $\text{Fmoc-MeF}_4\text{COO(aillyl)-OH}$ (CAS No. 2973754-47-9) 。

実施例 1

[0096] 化学合成

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

[0097] 固相樹脂におけるペプチド鎖の伸長は、それぞれの実施例に記載された樹脂を出発原料とし、通常用いられるペプチドカップリング反応条件と Fmoc 除去反応条件を用いて行った。反応はペプチド自動合成機である CEM 社 *Liberty Blue* を使用し、製造元のマニュアルに従って行った。使用される一般的なアミノ酸を下記に列挙し、側鎖保護基はカッコ内に示した。

[0098] Fmoc-Trp(Boc)-OH ; Fmoc-Thr(tBu)-OH ; Fmoc-N-Me-Gly-OH ; Fmoc-Asp(OtBu)-OH ; Fmoc-N-Me-Phe-OH ; Fmoc-Ala-OH ; Fmoc-N-Me-Ala-OH ; Fmoc-His(Trt)-OH ; Fmoc-Tyr(tBu)-OH ; Fmoc-Val-OH ; Fmoc-Hyd

Pro (tBu) -OH; Fmoc-Cys (Trt) -OH; Fmoc-Lys (Mtt) -OH; Fmoc-Ser (tBu) -OH; Fmoc-N-Me-Ser (tBu) -OH。

- [0099] クロロアセチル基の導入は、前工程にて得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（3等量）を3等量のN, N'-ジイソプロピルカルボジイミドのDMF溶液（0.5 M），3等量のHOAtのDMF溶液（0.5 M）を加え室温にて40分振盪することにより行った。
- [0100] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFと塩化メチレンでそれぞれ5回ずつ洗浄して減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5の混合物）を加え、室温で150分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪後し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテルに加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 3 min），溶液をデカンテーションした。得られた個体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、得られた固体を次の環化反応に用いた。
- [0101] ペプチドの環化反応は、ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSOに溶解後、6等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約16時間攪拌することで行った。得られた反応溶液を酢酸で酸性にしてBiotage（登録商標）V-10（バイオタージ・ジャパン社）を用いて減圧濃縮した。
- [0102] 得られた粗精製ペプチドの精製方法として、Waters社AutoPurification System-SQD2 single quadrupole mass spectrometerで逆相分取HPLCを使用し、目的物由来のm/zイオンをモニタリングしながら溶出した。ESI

— p o s i t i v e のスキャンモードで得られるマスペクトルと目的物の分子式より計算される多価イオンを含むマスペクトルが使用した質量分析器の誤差範囲で一致しているのを確認した。なお、使用したカラムを含む精製条件はそれぞれの実施例に示した。

[0103] 化学合成されたペプチドの構造決定は、目的配列に従って用いたアミノ酸と必要に応じて用いたビルディングブロックを考慮し計算された分子量を、質量スペクトル分析法における E S I − M S (+) により確認した。なお、” E S I − M S (+) ” とは、正イオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は “ m / z ” 単位表記によって報告された。なお、分子量がおおよそ 1 0 0 0 より大きい化合物は、2 価イオンまたは 3 価イオンとして高頻度で検出された。分析方法については以下の方法（分析条件 A , B ）, もしくは、各実施例に記載した方法で行った。

分析方法

分析条件 A

カラム ; K i n e t e x E V O C 1 8 2 . 6 μ m , 2 . 1 I D × 1 5 0 m m , 1 0 0 Å (P h e n o m e n e x 社)

カラム温度 : 6 0 ° C

移動相 A : 0 . 0 2 5 % T F A i n H ₂ O

移動相 B : 0 . 0 2 5 % T F A i n C H ₃ C N

グラジエント : 7 . 2 分かけて 5 − 4 5 %

流速 : 0 . 5 m L / m i n

検出 : P D A (2 2 5 n m)

分析条件 B

カラム ; K i n e t e x E V O C 1 8 2 . 6 μ m , 2 . 1 I D × 1 5 0 m m , 1 0 0 Å (P h e n o m e n e x 社)

カラム温度 : 6 0 ° C

移動相A：0.025%TFA in H_2O

移動相B：0.025%TFA in CH_3CN

グラジエント：7.2分かけて20-60%

流速：0.5mL/min

検出：PDA (225nm)

実施例 2

[0104] hTfRに結合する特殊環状ペプチドの化学合成

hTfRに対する結合活性を有するペプチド及びリンカーを付与したhTfR結合ペプチドを化学合成した。合成したペプチドの配列を、表1-1, 1-2, 表2及び表3に示す。合成したペプチドは各実施例に記載する分析条件で分析し、質量スペクトル分析法におけるESI-MS(+)により構造を確認した。得られたESI-MS(+)観測値と、その場合におけるプロトン付加数($M+XH$) $X+$ として示したときのXの値を表1-1, 1-2, 1-3, 表2-1, 2-2及び表3に示す。なお、ペプチドのN末端は全て-NH₂である。

[0105] なお、配列表中の配列と以下の表中の配列との間に齟齬がある場合、以下の表中の配列が正しい。

[0106] [表1-1]

[表1-1-1-1]

SEQ ID No.	Peptide ID	Peptide SEQ												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	894_0462	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py
2	894_0463	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	R	4Py
3	894_0464	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	Kmor	4Py
4	894_0465	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	Kmor	4Py
5	894_0466	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	KCOpipzaa	4Py
6	894_0467	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	Kmor	4Py
7	894_0468	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aac	I	I	Kmor	Kmor	4Py
8	894_0469	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	KCOpipzaa	4Py
9	894_0470	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aac	I	I	Kmor	KCOpipzaa	4Py
10	894_471	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	E(Glucamine)	R	4Py
11	894_472	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py
12	894_473	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aac(Glucamine)	I	I	E(Glucamine)	R	4Py
13	894_474	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aac(Glucamine)	I	I	E(Glucamine)	Kmor	4Py
14	894_479	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aac	I	I	KCOpipzaa	R	4Py
15	894_480	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aac	I	I	KCOpipzaa	Kmor	4Py
16	894_483	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aac(pipzaa)	I	I	Q	R	4Py
17	894_485	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aac(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	Kmor	4Py
18	894_486	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aac(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	R	4Py
19	894_487	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aac(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	Kmor	4Py
20	894_488	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	E(Glucamine)	Kmor	4Py
21	894_490	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aac(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F3COO

[表1-1-1-2]

SEQ ID No.	Linker	hTfR SPR pH7.4 KD(nM)	hTfR SPR pH6.0 KD(nM)	依存性koff pH6.0/7.4	依存性KD pH6.0/7.4	m/z	[M+XH] ⁺	分析 条件
1	PEG4c	1.56 × 10 ⁻⁹	1.82 × 10 ⁻⁸	39.79	11.66	793.93	3	A
2	PEG4c	8.88 × 10 ⁻¹⁰	1.62 × 10 ⁻⁸	112.65	18.23	807.95	3	A
3	PEG4c	2.63 × 10 ⁻⁹	1.61 × 10 ⁻⁸	51.40	6.12	807.98	3	A
4	PEG4c	2.19 × 10 ⁻⁹	2.97 × 10 ⁻⁸	56.94	13.59	821.94	3	A
5	PEG4c	6.31 × 10 ⁻⁹	1.17 × 10 ⁻⁷	74.33	18.53	855.34	3	A
6	PEG4c	6.56 × 10 ⁻⁹	2.10 × 10 ⁻⁸	38.89	3.19	840.68	3	B
7	PEG4c	1.63 × 10 ⁻⁸	8.98 × 10 ⁻⁸	61.90	5.51	836.70	3	A
8	PEG4c	1.07 × 10 ⁻⁸	1.13 × 10 ⁻⁷	72.99	10.55	1310.60	2	B
9	PEG4c	2.91 × 10 ⁻⁸	7.74 × 10 ⁻⁷	57.29	26.64	870.00	3	A
10	PEG4c	2.50 × 10 ⁻⁹	3.66 × 10 ⁻⁸	41.87	14.64	839.31	3	A
11	PEG4c	7.10 × 10 ⁻⁹	1.10 × 10 ⁻⁷	57.53	15.49	906.45	3	B
12	PEG4c	7.12 × 10 ⁻⁹	1.37 × 10 ⁻⁷	56.55	19.24	908.38	3	A
13	PEG4c	1.14 × 10 ⁻⁸	1.33 × 10 ⁻⁷	62.46	11.67	922.42	3	A
14	PEG4c	3.08 × 10 ⁻⁸	1.08 × 10 ⁻⁷	63.64	3.51	855.75	3	A
15	PEG4c	1.59 × 10 ⁻⁸	1.02 × 10 ⁻⁷	43.85	6.42	869.77	3	A
16	PEG4c	2.94 × 10 ⁻⁹	4.03 × 10 ⁻⁸	28.19	13.71	841.02	3	B
17	PEG4c	4.25 × 10 ⁻⁹	5.01 × 10 ⁻⁷	74.44	117.77	1395.67	2	A
18	PEG4c	1.88 × 10 ⁻⁹	3.00 × 10 ⁻⁸	25.31	16.00	1346.07	2	A
19	PEG4c	4.82 × 10 ⁻⁹	7.92 × 10 ⁻⁹	10.08	1.64	1367.13	2	A
20	PEG4c	4.08 × 10 ⁻⁹	4.13 × 10 ⁻⁸	42.49	10.13	853.02	3	A
21	PEG4c	5.37 × 10 ⁻⁹	1.01 × 10 ⁻⁷	11.57	18.80	991.43	3	B

[表1-1-2-1]

SEQ ID No.	Peptide ID	Peptide SEQ												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
22	894_491	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py
23	894_493	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	Q	Kmor	4Py
24	894_494	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	Q	Kmor	F3COO
25	894_495	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	Q	Kmor	4Py
26	894_0496	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(Glucamine)	I	I	E(Glucamine)	R	4Py
27	894_0497	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(Glucamine)	I	I	E(Glucamine)	Kmor	4Py
28	894_0498	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(Glucamine)	I	I	Q	R	4Py
29	894_0499	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(Glucamine)	I	I	Q	Kmor	4Py
30	894_0503	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F
31	894_0504	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F3COO
32	894_0505	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	Kmor	Kmor	F3COO
33	894_0506	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	Kmor	4Py
34	894_0507	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	R	4Py
35	894_0508	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	Q	Kmor	F3COO
36	894_0509	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	Q	R	F3COO
37	894_0510	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	E(Glucamine)	Q	F
38	894_0511	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	Q	F
39	894_0512	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao(Glucamine)	I	I	E(Glucamine)	Q	F
40	894_0513	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	E(Glucamine)	Kmor	4Py
41	894_0514	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	YaeCOpipzaa	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py
42	894_0516	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO
43	894_0532	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	E(PEG8Me)	R	F3COO

[表1-1-2-2]

SEQ ID No.	Linker	hTfR SPR pH7.4		hTfR SPR pH6.0		依存性koff pH6.0/7.4	依存性KD		m/z	[M+X(H)] ⁺	分析 条件
		KD(nM)		KD(nM)			pH6.0/7.4				
22	PEG4c	4.11 × 10 ⁻⁹		2.05 × 10 ⁻⁷		61.58	49.93		1493.80	2	B
23	PEG4c	3.45 × 10 ⁻⁹		3.34 × 10 ⁻⁸		26.28	9.67		855.36	3	A
24	PEG4c	2.01 × 10 ⁻⁹		2.67 × 10 ⁻⁸		21.07	13.28		869.68	3	A
25	PEG4c	3.35 × 10 ⁻⁹		5.79 × 10 ⁻⁸		29.22	17.27		874.07	3	B
26	PEG4c	1.73 × 10 ⁻⁹		1.34 × 10 ⁻⁸		12.10	7.76		908.40	3	A
27	PEG4c	3.03 × 10 ⁻⁹		1.54 × 10 ⁻⁸		12.09	5.09		922.40	3	A
28	PEG4c	1.26 × 10 ⁻⁹		1.11 × 10 ⁻⁸		11.37	8.81		853.71	3	A
29	PEG4c	2.17 × 10 ⁻⁹		1.11 × 10 ⁻⁸		13.62	5.12		867.70	3	A
30	PEG4c	1.02 × 10 ⁻⁸		9.56 × 10 ⁻⁸		30.37	9.37		1493.32	2	B
31	PEG4c	2.43 × 10 ⁻⁹		1.71 × 10 ⁻⁸		6.19	7.04		1486.29	2	B
32	PEG4c	2.18 × 10 ⁻⁹		2.70 × 10 ⁻⁸		25.96	12.39		1367.10	2	B
33	PEG4c	8.50 × 10 ⁻⁹		2.21 × 10 ⁻⁸		15.77	2.60		1395.66	2	B
34	PEG4c	5.22 × 10 ⁻⁹		1.49 × 10 ⁻⁸		28.93	2.85		916.70	3	B
35	PEG4c	1.74 × 10 ⁻⁹		3.70 × 10 ⁻⁸		19.32	21.26		1332.05	2	B
36	PEG4c	2.47 × 10 ⁻⁹		4.40 × 10 ⁻⁸		25.12	17.81		1311.00	2	B
37	PEG4c	1.54 × 10 ⁻⁹		2.79 × 10 ⁻⁸		33.88	18.12		1328.06	2	B
38	PEG4c	4.75 × 10 ⁻⁹		1.48 × 10 ⁻⁸		12.54	3.12		887.80	3	B
39	PEG4c	1.48 × 10 ⁻⁹		1.24 × 10 ⁻⁸		25.60	8.37		1346.55	2	B
40	PEG4c	4.38 × 10 ⁻⁸		4.26 × 10 ⁻⁸		23.48	0.97		1392.63	2	B
41	PEG4c	1.45 × 10 ⁻⁸		9.14 × 10 ⁻⁸		21.19	6.30		1005.91	3	B
42	PEG4c	5.11 × 10 ⁻⁹		3.44 × 10 ⁻⁸		20.73	6.73		977.44	3	B
43	PEG4c	1.07 × 10 ⁻⁷		6.01 × 10 ⁻⁷		27.60	5.62		940.20	3	B

[表1-1-3-1]

SEQ ID No.	Peptide ID	Peptide SEQ												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
44	894_0533	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	Q	R	F3CONPEG4c
45	894_0535	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	Q	R	F3COO
46	894_0537	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	Eva	I	Kmor	R	4Py
47	894_0538	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	Q	Kmor	4Py
48	894_0539	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	E(PEG8Me)	R	4Py
49	894_0543	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	Q	Kmor	4Py
50	894_0544	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	E(PEG8Me)	R	4Py
51	894_0547	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	Q	Kmor	F3COO
52	894_0548	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	Eva	I	Q	Kmor	F3COO
53	894_0552	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	Y	F4aao	Eva	I	Q	R	F3COO
54	894_0574	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	Eva	I	Kmor	R	4Py
55	894_0582	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	Eva	I	Kmor	Kmor	F3COO
56	894_0583	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao(pipzaa)	Eva	I	Kmor	Kmor	4Py
57	894_0594	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	K	R	4Py
58	894_0595	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	K	R	4Py
59	894_0596	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	K	R	4Py
60	894_0597	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	K	R	4Py
61	894_0610	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	Y	Y	I	I	K	R	Y
62	894_0429	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8c)	R	4Py
63	894_0434	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG4c)	R	4Py
64	894_3434	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4aao(PEG8Me)	I	I	R	R	Y
65	894_0621	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py
66	894_3427	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py
67	894_3426	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	Y	F4aao	Eva	I	Q	R	F3COO
68	894_3428	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	Kmor	4Py

[表1-1-3-2]

SEQ ID No.	Linker	hTfR SPR pH7.4		hTfR SPR pH6.0		依存性k _{off} pH6.0/7.4	依存性KD pH6.0/7.4	m/z	[M+XHX] ⁺	分析 条件
		KD(nM)	KD(nM)	KD(nM)	KD(nM)					
44	PEG4c	3.66 × 10 ⁻⁸	3.39 × 10 ⁻⁷	3.39 × 10 ⁻⁷	3.39 × 10 ⁻⁷	21.28	9.26	1349.97		2 B
45	PEG4c	7.55 × 10 ⁻⁸	8.69 × 10 ⁻⁷	8.69 × 10 ⁻⁷	8.69 × 10 ⁻⁷	22.41	11.51	827.40		3 B
46	PEG4c	2.65 × 10 ⁻⁹	1.44 × 10 ⁻⁸	1.44 × 10 ⁻⁸	1.44 × 10 ⁻⁸	18.44	5.43	812.70		3 A
47	PEG4c	1.16 × 10 ⁻⁷	2.49 × 10 ⁻⁷	2.49 × 10 ⁻⁷	2.49 × 10 ⁻⁷	14.63	2.15	1254.51		2 B
48	PEG4c	1.11 × 10 ⁻⁷	5.36 × 10 ⁻⁷	5.36 × 10 ⁻⁷	5.36 × 10 ⁻⁷	16.57	4.83	944.76		3 B
49	PEG4c	1.58 × 10 ⁻⁵	5.76 × 10 ⁻⁷	5.76 × 10 ⁻⁷	5.76 × 10 ⁻⁷	12.22	0.04	1268.46		2 B
50	PEG4c	6.50 × 10 ⁻⁶	1.78 × 10 ⁻⁶	1.78 × 10 ⁻⁶	1.78 × 10 ⁻⁶	17.69	0.27	1430.52		2 B
51	PEG4c	1.56 × 10 ⁻⁶	6.92 × 10 ⁻⁷	6.92 × 10 ⁻⁷	6.92 × 10 ⁻⁷	42.98	0.44	897.36		3 B
52	PEG4c	5.82 × 10 ⁻⁶	6.26 × 10 ⁻⁷	6.26 × 10 ⁻⁷	6.26 × 10 ⁻⁷	32.48	0.11	892.74		3 B
53	PEG4c	2.16 × 10 ⁻⁸	5.30 × 10 ⁻⁷	5.30 × 10 ⁻⁷	5.30 × 10 ⁻⁷	20.30	24.54	818.33		3 B
54	PEG4c	1.38 × 10 ⁻⁹	9.20 × 10 ⁻⁹	9.20 × 10 ⁻⁹	9.20 × 10 ⁻⁹	13.66	6.67	812.37		3 B
55	PEG4c	2.64 × 10 ⁻⁸	3.85 × 10 ⁻⁸	3.85 × 10 ⁻⁸	3.85 × 10 ⁻⁸	13.49	1.46	925.77		3 B
56	PEG4c	1.26 × 10 ⁻⁸	7.20 × 10 ⁻⁸	7.20 × 10 ⁻⁸	7.20 × 10 ⁻⁸	28.15	5.71	911.44		3 B
57	PEG4c	9.71 × 10 ⁻¹⁰	5.40 × 10 ⁻⁹	5.40 × 10 ⁻⁹	5.40 × 10 ⁻⁹	14.31	5.56	783.91		3 A
58	PEG4c	1.34 × 10 ⁻⁹	5.39 × 10 ⁻⁹	5.39 × 10 ⁻⁹	5.39 × 10 ⁻⁹	8.19	4.02	788.60		3 A
59	PEG4c	1.46 × 10 ⁻⁹	9.57 × 10 ⁻⁹	9.57 × 10 ⁻⁹	9.57 × 10 ⁻⁹	16.00	6.55	793.23		3 A
60	PEG4c	7.55 × 10 ⁻¹⁰	4.71 × 10 ⁻⁹	4.71 × 10 ⁻⁹	4.71 × 10 ⁻⁹	9.02	6.24	797.88		3 A
61	PEG4c	8.61 × 10 ⁻¹⁰	7.47 × 10 ⁻⁹	7.47 × 10 ⁻⁹	7.47 × 10 ⁻⁹	15.37	8.68	1176.36		2 A
62	PEG4c	2.85 × 10 ⁻⁸	9.21 × 10 ⁻⁸	9.21 × 10 ⁻⁸	9.21 × 10 ⁻⁸	13.44	3.23	940.42		3 B
63	PEG4c	2.36 × 10 ⁻⁸	8.77 × 10 ⁻⁸	8.77 × 10 ⁻⁸	8.77 × 10 ⁻⁸	10.39	3.72	881.84		3 B
64	G KN3	8.74 × 10 ⁻⁹	3.23 × 10 ⁻⁸	3.23 × 10 ⁻⁸	3.23 × 10 ⁻⁸	6.94	3.70	911.32		3 B
65	PEG4c	5.43 × 10 ⁻⁹	5.65 × 10 ⁻⁸	5.65 × 10 ⁻⁸	5.65 × 10 ⁻⁸	14.41	10.41	793.63		3 A
66	G KN3	2.27 × 10 ⁻⁹	1.61 × 10 ⁻⁸	1.61 × 10 ⁻⁸	1.61 × 10 ⁻⁸	14.94	7.09	781.65		3 A
67	G KN3	2.16 × 10 ⁻⁸	4.44 × 10 ⁻⁷	4.44 × 10 ⁻⁷	4.44 × 10 ⁻⁷	31.32	20.56	1208.36		2 B
68	G KN3	2.06 × 10 ⁻⁹	1.24 × 10 ⁻⁸	1.24 × 10 ⁻⁸	1.24 × 10 ⁻⁸	42.54	6.02	809.62		3 A

[表 1 - 2]

[表1-2-1-1]

SEQ ID No.	Peptide ID	Peptide SEQ												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
69	894_0500	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Kmor	Kmor	4Py
70	894_0515	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG4Me)	R	F3COO
71	894_0517	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	Har	Q	R	F3COO
72	894_0518	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO
73	894_0519	A	V	MeF3C	V	W1EtOH	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO
74	894_0520	A	V	MeF3C	V	W	Nmm	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO
75	894_0521	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aa	Eva	I	Q	R	F3COO
76	894_0523	A	V	MeF3C	V	W1EtOH	N	Y	F4aa	I	T	Q	R	F3COO
77	894_0524	A	T	MeF3C	V	W1EtOH	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO
78	894_0527	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y26dF	F4aa	I	I	Q	R	F3COO
79	894_0528	A	V	MeF3C	V	W1Me	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO
80	894_0530	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	Q	R	MeF4COO
81	894_0531	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	Q	R	MeF3COO
82	894_0536	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	Eva	I	E(PEG8Me)	R	MeY
83	894_0540	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	Eva	I	Kmor	Kmor	MeY
84	894_0541	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	Eva	I	Q	R	MeY
85	894_0542	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	Eva	I	E(PEG8Me)	R	MeF4COO
86	894_0545	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	Eva	I	Kmor	Kmor	MeF4COO
87	894_0546	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	Eva	I	Q	R	MeF4COO
88	894_0549	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	Eva	I	Q	R	MeY
89	894_0551	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y3Me	F4aa	Eva	I	Q	R	MeY
90	894_0553	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py6OMe	Eva	I	Q	R	MeY
91	894_0555	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Imp	Eva	I	Q	R	MeY
92	894_0556	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	Eva	I	Q	R	MeF4C
93	894_0557	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	Eva	I	Q	R	MeF4OMe

[表1-2-1-2]

SEQ ID No.	Linker	hTfR SPR pH7.4 KD(nM)	hTfR SPR pH6.0 KD(nM)	依存性koff pH6.0/7.4	依存性KD pH6.0/7.4	m/z	[M+XH] ⁺	分析条件
69	PEG4c	8.57×10 ⁻⁹	3.35×10 ⁻⁸	9.63	3.91	1282.50	2	B
70	PEG4c	6.85×10 ⁻⁹	4.24×10 ⁻⁸	20.00	6.19	1314.10	2	B
71	PEG4c	1.80×10 ⁻⁸	7.52×10 ⁻⁸	12.78	4.18	1276.45	2	B
72	PEG4c	3.34×10 ⁻⁹	6.32×10 ⁻⁹	5.72	1.89	1218.90	2	B
73	PEG4c	1.85×10 ⁻⁹	4.78×10 ⁻⁹	7.54	2.58	1240.96	2	B
74	PEG4c	4.53×10 ⁻⁸	7.62×10 ⁻⁸	3.53	1.68	1225.93	2	B
75	PEG4c	1.62×10 ⁻⁹	6.33×10 ⁻⁹	34.44	3.91	1225.91	2	B
76	PEG4c	1.30×10 ⁻⁸	1.70×10 ⁻⁸	3.37	1.31	1234.90	2	B
77	PEG4c	1.28×10 ⁻⁸	2.55×10 ⁻⁸	4.46	1.99	1241.94	2	B
78	PEG4c	3.34×10 ⁻⁹	4.48×10 ⁻⁹	4.38	1.34	1265.94	2	B
79	PEG4c	2.69×10 ⁻⁹	3.76×10 ⁻⁹	5.31	1.40	1225.94	2	B
80	PEG4c	5.29×10 ⁻¹⁰	5.73×10 ⁻⁹	22.20	10.83	1210.93	2	B
81	PEG4c	1.87×10 ⁻⁹	9.19×10 ⁻⁹	13.49	4.91	1210.93	2	B
82	PEG4c	2.71×10 ⁻⁸	2.52×10 ⁻⁷	20.39	9.30	939.85	3	B
83	PEG4c	4.37×10 ⁻⁸	1.44×10 ⁻⁷	32.62	3.30	1311.05	2	B
84	PEG4c	1.91×10 ⁻⁶	2.19×10 ⁻⁷	17.42	0.11	1254.86	2	B
85	PEG4c	2.34×10 ⁻⁷	1.07×10 ⁻⁶	14.96	4.57	949.08	3	B
86	PEG4c	1.53×10 ⁻⁶	4.06×10 ⁻⁷	28.16	0.27	884.10	3	A
87	PEG4c	1.75×10 ⁻⁷	4.66×10 ⁻⁷	17.51	2.66	1268.87	2	B
88	PEG4c	6.96×10 ⁻⁹	5.11×10 ⁻⁸	8.60	7.34	1255.02	2	B
89	PEG4c	5.00×10 ⁻⁸	2.50×10 ⁻⁷	8.08	5.00	842.01	3	B
90	PEG4c	3.94×10 ⁻⁹	2.98×10 ⁻⁸	8.01	7.56	823.08	3	B
91	PEG4c	5.13×10 ⁻⁹	4.49×10 ⁻⁸	9.32	8.75	826.04	3	B
92	PEG4c	1.38×10 ⁻⁸	4.41×10 ⁻⁸	5.47	3.20	1264.60	2	B
93	PEG4c	1.01×10 ⁻⁸	4.91×10 ⁻⁸	7.99	4.86	842.02	3	B

[表1-2-2-2]

SEQ ID No.	Linker	hTfR SPR pH7.4 KD(nM)	hTfR SPR pH6.0 KD(nM)	依存性koff pH6.0/7.4	依存性KD pH6.0/7.4	m/z	[M+XH] ⁺	分析条件
94	PEG4c	1.20×10 ⁻⁸	6.20×10 ⁻⁸	7.12	5.17	1264.21	2	B
95	PEG4c	1.06×10 ⁻⁸	6.79×10 ⁻⁸	9.73	6.41	1262.38	2	B
96	PEG4c	1.82×10 ⁻⁸	9.19×10 ⁻⁸	7.63	5.05	1247.48	2	B
97	PEG4c	2.26×10 ⁻⁸	1.05×10 ⁻⁷	7.82	4.65	831.96	3	B
98	PEG4c	2.06×10 ⁻⁸	1.45×10 ⁻⁷	7.68	7.04	1245.49	2	B
99	PEG4c	9.08×10 ⁻⁹	5.62×10 ⁻⁸	6.08	6.19	1247.98	2	B
100	PEG4c	1.27×10 ⁻⁸	1.13×10 ⁻⁷	9.77	8.90	1240.45	2	B
101	PEG4c	8.63×10 ⁻⁹	6.67×10 ⁻⁸	8.46	7.73	1248.49	2	B
102	PEG4c	9.81×10 ⁻⁹	7.64×10 ⁻⁸	14.56	7.79	1240.98	2	B
103	PEG4c	1.15×10 ⁻⁸	9.50×10 ⁻⁸	8.16	8.26	1248.53	2	B
104	PEG4c	1.07×10 ⁻⁸	7.82×10 ⁻⁸	9.39	7.31	1240.98	2	B
105	PEG4c	1.06×10 ⁻⁸	6.79×10 ⁻⁸	7.93	6.41	1233.50	2	B
106	PEG4c	2.60×10 ⁻⁸	9.01×10 ⁻⁸	9.13	3.47	940.09	3	B
107	PEG4c	1.33×10 ⁻⁸	3.12×10 ⁻⁸	6.37	2.35	900.38	3	B
108	PEG4c	1.39×10 ⁻⁸	3.61×10 ⁻⁸	5.94	2.60	827.41	3	B
109	PEG4c	6.99×10 ⁻⁹	1.11×10 ⁻⁸	6.69	1.59	1311.10	2	B
110	PEG4c	7.46×10 ⁻⁹	1.28×10 ⁻⁸	3.59	1.72	909.38	3	B
111	PEG4c	2.06×10 ⁻⁹	3.47×10 ⁻⁹	2.68	1.68	894.74	3	B
112	PEG4c	3.53×10 ⁻⁹	1.15×10 ⁻⁸	5.70	3.26	900.05	3	B
113	PEG4c	7.76×10 ⁻¹⁰	1.43×10 ⁻⁹	2.34	1.84	890.16	3	B
114	PEG4c	1.33×10 ⁻⁹	1.06×10 ⁻⁸	14.51	7.97	821.70	3	B
115	PEG4c	1.84×10 ⁻⁹	1.26×10 ⁻⁸	16.37	6.85	890.09	3	B
116	PEG4c	8.49×10 ⁻⁹	3.52×10 ⁻⁸	12.40	4.15	904.72	3	B
117	PEG4c	7.64×10 ⁻⁹	1.38×10 ⁻⁸	3.29	1.81	782.12	3	B
118	PEG4c	1.11×10 ⁻⁹	4.31×10 ⁻⁹	4.21	3.88	786.96	3	B

[表1-2-3-1]

SEQ ID	Peptide	Peptide SEQ														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
119	894_0593	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	Eva	I	K	R	Y	MeF4COO	C
120	894_0598	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	Eva	I	K	R	F3COO(PEG4c)	MeY	C
121	894_0599	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	F3COO(PEG4c)	MeF4COO	C
122	894_0600	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	Eva	I	K	R	F3COO(PEG4c)	MeF4COO	C
123	894_0601	A	V	MeF	V	W	N	3Py6NH2	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
124	894_0602	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
125	894_0603	A	V	MeF	V	W	N	3Py6NH2	Y	I	I	K	R	Y	MeF4COO	C
126	894_0604	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	I	I	K	R	Y	MeF4COO	C
127	894_0605	A	V	MeF3C	V	W1Me	N	Y	Y	Eva	I	K	R	4Py	MeY	C
128	894_0606	A	V	MeF3C	V	W1Me	N	Y	F4OMe	Eva	I	K	R	4Py	MeY	C
129	894_0607	A	V	MeF3C	V	W1Me	N	Y	Y	I	I	K	R	4Py	MeY	C
130	894_0608	A	V	MeF3C	V	W1Me	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	4Py	MeY	C
131	894_0611	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	Eva	S	K	R	Y	MeY	C
132	894_0612	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	Eva	S	K	R	Y	MeY	C
133	894_0613	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	Eva	I	K	R	Y	MeY	C
134	894_0614	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	Eva	I	K	R	Y	MeY	C
135	894_0615	A	V	Me3Py	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
136	894_0616	A	V	Me3Py	V	MeW	N	Y	Y	Eva	I	K	R	Y	MeY	C
137	894_0619	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	I	S	K	R	Y	MeY	C
138	894_0620	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	I	S	K	R	Y	MeY	C
139	894_0430	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	E(PEG8c)	MeY	C
140	894_0431	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG8c)	MeY	C
141	894_0432	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG8c)	R	E(PEG8c)	MeY	C
142	894_0433	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG8c)	R	F3COO(PEG8c)	MeY	C
143	894_0435	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	E(PEG4c)	MeY	C
144	894_0436	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4c)	MeY	C
145	894_0437	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG4c)	R	E(PEG4c)	MeY	C
146	894_0438	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG4c)	R	F3COO(PEG4c)	MeY	C
147	894_3435	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	E(PEG8Me)	R	Y	MeY	C
148	894_3436	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	F3COO(PEG8Me)	MeY	C
149	894_3437	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY	C

[表1-2-3-2]

SEQ ID No.	Linker	hTIR SPR pH7.4 KD(nM)	hTIR SPR pH6.0 KD(mM)	依存性koff pH6.0/7.4	依存性KD pH6.0/7.4	m/z	[M+XH] ⁺	分析条件
119	PEG4c	3.61×10 ⁻⁹	9.52×10 ⁻⁹	3.72	2.64	791.61	3	B
120	PEG4c	5.80×10 ⁻⁹	1.32×10 ⁻⁸	3.40	2.28	874.04	3	B
121	PEG4c	1.84×10 ⁻⁹	7.50×10 ⁻⁹	5.54	4.08	878.60	3	B
122	PEG4c	5.19×10 ⁻⁹	1.53×10 ⁻⁸	3.83	2.95	883.26	3	B
123	PEG4c	5.30×10 ⁻⁹	1.74×10 ⁻⁸	8.89	3.28	1158.69	2	B
124	PEG4c	6.37×10 ⁻⁹	1.89×10 ⁻⁸	6.50	2.97	777.45	3	A
125	PEG4c	7.31×10 ⁻⁹	3.50×10 ⁻⁸	11.35	4.79	1172.64	2	A
126	PEG4c	3.51×10 ⁻⁹	1.67×10 ⁻⁸	7.83	4.76	786.95	3	A
127	PEG4c	1.57×10 ⁻⁹	5.22×10 ⁻⁹	7.58	3.32	1182.36	2	B
128	PEG4c	1.10×10 ⁻⁹	3.23×10 ⁻⁹	6.68	2.94	793.43	3	B
129	PEG4c	5.46×10 ⁻¹⁰	2.04×10 ⁻⁹	7.49	3.74	784.05	3	B
130	PEG4c	6.78×10 ⁻¹⁰	1.74×10 ⁻⁹	5.96	2.57	788.77	3	B
131	PEG4c	3.04×10 ⁻⁸	6.63×10 ⁻⁸	4.83	2.18	773.66	3	B
132	PEG4c	5.67×10 ⁻⁹	1.32×10 ⁻⁸	6.71	2.33	785.07	3	B
133	PEG4c	1.65×10 ⁻⁸	2.02×10 ⁻⁸	3.75	1.22	782.31	3	B
134	PEG4c	4.58×10 ⁻⁹	3.95×10 ⁻⁹	4.01	0.86	793.64	3	B
135	PEG4c	1.66×10 ⁻⁸	1.53×10 ⁻⁸	2.87	0.92	777.77	3	B
136	PEG4c	4.17×10 ⁻⁸	5.08×10 ⁻⁸	3.41	1.22	782.50	3	B
137	PEG4c	2.76×10 ⁻⁸	1.26×10 ⁻⁷	12.22	4.57	768.78	3	A
138	PEG4c	4.97×10 ⁻⁹	1.62×10 ⁻⁸	12.52	3.26	1169.86	2	A
139	PEG4c	1.07×10 ⁻⁷	5.24×10 ⁻⁷	10.59	4.90	933.91	3	B
140	PEG4c	5.63×10 ⁻⁹	2.21×10 ⁻⁸	8.23	3.93	954.59	3	B
141	PEG4c	1.42×10 ⁻⁷	2.12×10 ⁻⁷	7.39	1.49	1060.73	3	B
142	PEG4c	2.15×10 ⁻⁹	1.78×10 ⁻⁸	15.28	8.28	1081.40	3	B
143	PEG4c	5.91×10 ⁻⁸	2.71×10 ⁻⁷	9.77	4.59	875.15	3	B
144	PEG4c	3.56×10 ⁻⁹	1.74×10 ⁻⁸	9.40	4.89	895.81	3	B
145	PEG4c	4.85×10 ⁻⁸	1.99×10 ⁻⁷	9.27	4.10	943.24	3	B
146	PEG4c	2.75×10 ⁻⁹	1.14×10 ⁻⁸	10.23	4.15	963.85	3	B
147	G KN3	1.16×10 ⁻⁸	4.12×10 ⁻⁸	6.89	3.55	1323.94	2	B
148	G KN3	2.00×10 ⁻⁹	6.72×10 ⁻⁹	5.75	3.36	901.10	3	B
149	G KN3	3.57×10 ⁻⁹	2.81×10 ⁻⁸	23.09	7.87	1200.89	2	B

[表1 - 3]

[表1-3-1-1]

SEQ ID No.	Peptide ID	Peptide SEQ														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
168	894_0636	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
169	894_0637	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Q	R	F	MeY	C
170	894_0638	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Q	R	F	MeY	C
171	894_0639	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	E(apa)	R	F	MeY	C
172	894_0640	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	E(apa)	R	F	MeY	C
173	894_0641	A	V	MeF3C	V	MeW	N	R	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
174	894_0642	A	V	MeF3C	V	MeW	N	R	F4OMe	I	I	Q	R	F	MeY	C
175	894_0643	A	V	MeF3C	V	MeW	N	R	F4OMe	I	I	E(apa)	R	F	MeY	C
176	894_0644	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aao	I	I	K	R	F	MeY	C
177	894_0645	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aao	I	I	K	R	F3COO	MeY	C
178	894_0646	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aao	I	I	K	R	F3COO	MeF4COO(PEG4c)	C
179	894_0647	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aao	I	I	K	R	F	MeF4COO(PEG4c)	C
180	894_0648	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F3COO	MeF4COO(PEG4c)	C
181	894_3489	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	Eva	I	R	R	4Py	MeF4COO	C
182	894_3490	A	V	MeF	V	W	N	R	Y	I	I	R	R	Y	MeF4COO	C

[表1-3-1-2]

SEQ ID No.	Linker		hTfR SPR pH7.4 KD(nM)	hTfR SPR pH6.0 KD(nM)	依存性koff pH6.0/7.4	依存性KD pH6.0/7.4	m/z	[M+X(H)]X+	分析 条件
168	PEG4c	NH2	2.26 × 10 ⁻¹⁰	8.10 × 10 ⁻¹⁰	5.55	3.58	1181.87	2	B
169	PEG4c	NH2	8.59 × 10 ⁻¹⁰	4.86 × 10 ⁻⁹	9.23	5.66	1181.86	2	B
170	PEG4c	NH2	1.34 × 10 ⁻⁹	7.61 × 10 ⁻⁹	12.27	5.68	788.31	3	B
171	PEG4c	NH2	1.10 × 10 ⁻¹⁰	6.78 × 10 ⁻¹⁰	13.80	6.12	807.43	3	B
172	PEG4c	NH2	2.15 × 10 ⁻¹⁰	2.59 × 10 ⁻⁹	24.82	12.05	807.44	3	B
173	PEG4c	NH2	3.81 × 10 ⁻⁹	1.33 × 10 ⁻⁸	3.44	3.49	1178.39	2	B
174	PEG4c	NH2	2.06 × 10 ⁻⁸	7.55 × 10 ⁻⁸	4.85	3.67	785.98	3	B
175	PEG4c	NH2	3.04 × 10 ⁻⁹	1.22 × 10 ⁻⁸	5.14	4.01	805.08	3	B
176	PEG4c	NH2	3.22 × 10 ⁻¹⁰	7.64 × 10 ⁻¹⁰	4.92	2.37	1204.04	2	B
177	PEG4c	NH2	1.34 × 10 ⁻¹⁰	2.26 × 10 ⁻⁹	34.80	16.79	1225.97	2	B
178	PEG4c	NH2	3.91 × 10 ⁻¹⁰	3.10 × 10 ⁻⁹	12.99	7.93	909.45	3	B
179	PEG4c	NH2	1.42 × 10 ⁻¹⁰	7.60 × 10 ⁻¹⁰	9.27	5.35	894.71	3	B
180	PEG4c	NH2	2.29 × 10 ⁻¹⁰	9.57 × 10 ⁻¹⁰	5.85	4.18	894.78	3	B
181	G	KN3 NH2	2.45 × 10 ⁻⁸	1.24 × 10 ⁻⁷	5.23	5.06	795.68	3	A
182	G	KN3 NH2	9.21 × 10 ⁻⁸	3.47 × 10 ⁻⁷	2.14	3.77	777.18	3	A

[表1-3-2-1]

SEQ ID No.	Peptide ID	Peptide SEQ														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
183	894_3491	A	V	MeF	V	W	N	R	Y	I	I	R	R	F3COO(PEG4c)	MeF4COO	C
184	894_3492	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	Eva	I	R	R	4Py	MeF4COO	C
185	894_3497	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
186	894_3498	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	I	I	K	R	Y	MeF4COO	C
187	894_3499	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	Eva	I	K	R	Y	MeF4COO	C
188	894_3500	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	Eva	I	K	R	Y	MeF4COO	C
189	894_3503	A	V	MeF	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeF4COO	C
190	894_3504	A	V	MeF	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
191	894_3447	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
192	894_3448	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	Kmor	Kmor	4Py	MeY	C
193	894_3488	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	F3COO(PEG4c)	MeF4COO	C
194	894_3485	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	Eva	I	K	R	F3COO(PEG4c)	MeF4COO	C
195	894_3484	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	Eva	I	K	R	F3COO(PEG4c)	MeY	C
196	894_3486	A	V	MeF	V	MeW	N	3Py6NH2	Y	I	I	K	R	Y	MeF4COO	C
197	894_3487	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C

[表1-3-2-2]

SEQ ID No.	Linker				hTfR SPR pH7.4		hTfR SPR pH6.0		依存性koff	依存性KD	m/z	M+X H X+	分析 条件
					KD(nM)	KD(nM)	KD(nM)	KD(nM)	pH6.0/7.4	pH6.0/7.4			
183	G	KN3	NH2				7.99×10^{-7}	2.14×10^{-7}	2.44	3.73	868.96	3	A
184	G	de	de	ds	KN3	NH2	1.21×10^{-7}	1.36×10^{-7}	0.19	0.89	982.78	3	A
185	G	de	de	ds	KN3	NH2	3.81×10^{-7}	2.87×10^{-8}	15.95	13.28	1452.72	2	A
186	G	de	de	ds	KN3	NH2	1.45×10^{-7}	1.88×10^{-8}	10.84	7.71	1442.46	2	A
187	G	KN3	NH2				3.07×10^{-8}	0.99×10^{-8}	4.06	3.07	779.56	3	B
188	G	de	de	ds	KN3	NH2	1.75×10^{-7}	3.40×10^{-8}	7.17	5.15	1449.24	2	A
189	G	KN3	NH2				3.84×10^{-7}	8.12×10^{-8}	5.10	4.73	779.55	3	A
190	G	KN3	NH2				1.77×10^{-7}	5.71×10^{-8}	2.30	3.10	1154.76	2	A
191	G	G	G	S	KN3	NH2	3.82×10^{-9}	8.90×10^{-10}	8.79	4.29	896.40	3	A
192	G	G	G	S	KN3	NH2	1.05×10^{-8}	1.49×10^{-9}	27.09	7.05	924.78	3	A
193	G	KN3	NH2				5.15×10^{-9}	1.60×10^{-9}	5.15	3.22	1299.41	2	B
194	G	KN3	NH2				1.49×10^{-8}	4.62×10^{-9}	4.44	3.23	1306.42	2	B
195	G	KN3	NH2				1.48×10^{-8}	5.77×10^{-9}	4.33	2.56	1292.43	2	B
196	G	KN3	NH2				1.39×10^{-8}	2.94×10^{-9}	8.92	4.73	1161.62	2	B
197	G	KN3	NH2				4.39×10^{-8}	5.09×10^{-9}	6.70	8.62	1171.93	2	A

[表 2 - 1]

[表2-1-1]

SEQ ID	Peptide	Amino Acid Sequence														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
150	894_0550	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NHaa	F4aao	Eva	I	Q	R	F3COO	MeY	C
151	894_0554	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py6NHaa	Eva	I	Q	R	F3COO	MeY	C
152	894_0567	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	Eva	I	Q	R	4Py2Me	MeY	C
153	894_475	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
154	894_476	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY	C
155	894_478	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY	C
156	894_481	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	R	4Py	MeY	C
157	894_482	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	Kmor	4Py	MeY	C
158	894_484	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	KCOpipzaa	R	4Py	MeY	C
159	894_489	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
160	894_492	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
161	894_0534	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	Eva	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeF4COO	C

[表2-1-2]

SEQ ID No.	Linker	hTfR SPR pH7.4	hTfR SPR pH6.0	m/z	[M+XH] ⁺ X ⁺	分析条件
		KD(nM)	KD(nM)			
150	PEG4c	LS	5.89 × 10 ⁻⁸	856.67	3	B
151	PEG4c	LS	4.82 × 10 ⁻⁸	837.39	3	B
152	PEG4c	LS	1.16 × 10 ⁻⁷	1240.48	2	B
153	PEG4c	4.43 × 10 ⁻⁸	LS	722.65	4	A
154	PEG4c	3.26 × 10 ⁻⁸	LS	977.25	3	A
155	PEG4c	2.84 × 10 ⁻⁸	LS	996.13	3	B
156	PEG4c	1.60 × 10 ⁻⁸	LS	897.74	3	A
157	PEG4c	1.50 × 10 ⁻⁸	LS	1367.13	2	A
158	PEG4c	2.02 × 10 ⁻⁸	LS	1374.65	2	A
159	PEG4c	6.55 × 10 ⁻⁹	LS	977.47	3	B
160	PEG4c	2.08 × 10 ⁻⁸	LS	982.19	3	B
161	PEG4c	1.22 × 10 ⁻⁵	LS	949.79	3	A

[表2-2]

SEQ ID	Peptide ID	Peptide SEQ														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
No.																
198	894_3493	A	V	MeF	V	W	N	R	Y	I	I	R	R	Y	MeF4COO	C
199	894_3495	A	V	MeF	V	W	N	R	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
200	894_3496	A	V	MeF3C	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeF4COO	C
201	894_3501	A	V	MeF	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeF4COO	C
202	894_3502	A	V	MeF	V	3Imp	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C

SEQ ID	Linker							hTfR SPR pH7.4	hTfR SPR pH6.0	m/z	[M+XH] ⁺	分析条件
	No.	G	de	de	ds	KN3	NH2	KD(nM)	KD(nM)			
198	G	de	de	de	ds	KN3	NH2	1.04 × 10 ⁻⁶	LS	1446.04	2	A
199	G	de	de	de	ds	KN3	NH2	5.31 × 10 ⁻⁷	LS	954.93	3	A
200	G	de	de	de	ds	KN3	NH2	8.16 × 10 ⁻⁸	LS	1466.74	2	A
201	G	de	de	de	ds	KN3	NH2	2.12 × 10 ⁻⁷	LS	966.62	3	A
202	G	de	de	de	ds	KN3	NH2	5.15 × 10 ⁻⁷	LS	1435.46	2	A

[表3]

SEQ	Peptide	Amino Acid Sequence														
ID No.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
162	894_477	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao(pipzaa)	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F3COO	MeY	C
163	894_0522	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	Kmor	Q	R	F3COO	MeY	C
164	894_0525	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	Mor	Q	R	F3COO	MeY	C
165	894_0526	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	Hpr	Q	R	F3COO	MeY	C
166	894_0529	A	Kmor	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	Kmor	Q	R	F3COO	MeY	C
167	894_0579	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4c)	MeF4COO	C

SEQ ID No.	Linker	hTfr SPR pH7.4 KD(nM)	hTfr SPR pH6.0 KD(nM)	m/z	[M+XH] ⁺ X ⁺	分析条件
162	PEG4c	LS	ND	991.43	3	B
163	PEG4c	LS	ND	860.68	3	B
164	PEG4c	LS	ND	1248.00	2	B
165	PEG4c	LS	ND	1246.95	2	B
166	PEG4c	LS	ND	874.79	3	A
167	PEG4c	4.51 × 10 ⁻⁹	2.51 × 10 ⁻⁹	904.69	3	B

実施例 3

[0107] 表面プラズモン共鳴（SPR）によるトランスフェリン受容体（hTfR）とペプチドとの分子間相互作用評価試験

合成した各種ペプチドについて、トランスフェリン受容体（hTfR）に対するペプチドの表面プラズモン共鳴（SPR）による分子間相互作用を、以下に示す方法によって試験を実施した。具体的な試験方法を以下に示す。

[SPR測定]

pH 6.0 条件における SPR 測定

Biacore T200 (Cytiva) に NTA センサーチップ (Cytiva) を挿入し、ランニング緩衝液：HBS-P+, pH 6.0 (Cytiva) でプライム操作を 3 回実施し、流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で平衡化した。流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ でリガンド固定化操作を実施した。

350 mM EDTA 溶液で NTA センサーチップ表面を洗浄し、500 μM 塩化ニッケル水溶液でセンサーチップカルボメチルデキストラン鎖にニッケルイオンを充填後、3 mM EDTA 溶液で洗浄操作を実施した。60 mM EDC 溶液 (Cytiva), 650 mM NHS 溶液 (Cytiva) を各々 $50 \mu\text{L}$ ずつ混合させた後、流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させた。10 mM 酢酸溶液 (pH 5.0) で希釈して 0.2 μM hTfR 溶液 $150 \mu\text{L}$ 調製し、流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させ NTA センサーチップに hTfR を固定化した。なお、ヒトトランスフェリン受容体 (hTfR) については、WO 2018/124121 の実施例 2 に記載した組換え hTfR を使用した。固定化後、1.0 M エタノールアミン水溶液 (Cytiva) を流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させキャッピングを行った。DMSO 溶液中で 10 mM に調製されたペプチド溶解液を、終濃度が 10 μM のペプチド溶解液になるようにランニング緩衝液で希釈した後、250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 25 nM, 12.5 nM のペプチド溶液を作製した。上述のサンプルを用い、hTfR に対するペプチドのカイネティクスを SPR 測定により取得した。

pH 7.4 条件における SPR 測定

Biacore T200 (Cytiva) に NTA センサーチップ (Cytiva) を挿入し、ランニング緩衝液: 10 mM HEPES pH 8.0 (ナカライテスク株式会社), 150 mM NaCl (ナカライテスク株式会社), 0.05% Tween 20 (ナカライテスク株式会社), 0.1% BSA (SIGMA-ALDRICH), 1.0% DMSO (富士フィルム 和光純薬株式会社) でプライム操作を 3 回実施し、流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で平衡化した。350 mM EDTA 溶液を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 60 秒反応させ、0.5 mM NiCl_2 溶液 (キシダ化学) を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 60 秒反応させた後、3 mM EDTA 溶液 (ナカライテスク株式会社) を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 60 秒間、NTA センサーチップを洗浄した。60 mM EDC 溶液 (Cytiva), 650 mM NHS 溶液 (Cytiva) を各々 50 μL ずつ混合させた後、流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させた。ランニング緩衝液で希釈して 0.5 μM hTfR ダイマー溶液 150 μL 調製し、流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 300 秒反応させ NTA センサーチップに hTfR を固定化した。なお、ヒトトランスフェリン受容体 (hTfR) については、WO 2018/124121 の実施例 2 に記載した組換え hTfR を使用した。固定化後、1.0 M エタノールアミン水溶液 (Cytiva) を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させ キャッピングを行った。DMSO 溶液中で 10 mM に調製されたペプチド溶解液を、終濃度が 10 μM のペプチド溶解液になるようにランニング緩衝液で希釈した後、100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM, 5 nM のペプチド溶液を作製した。上述のサンプルを用い、hTfR に対するペプチドのカイネティクスを SPR 測定により取得した。

あるいは、以下の方法で、pH 7.4 条件における SPR 測定を行った。

Biacore T200 (Cytiva) に CM3 センサーチップ (Cytiva) を挿入し、ランニング緩衝液: HBS-P+, pH 7.4 (Cytiva) でプライム操作を 3 回実施し、流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で平衡化し

た。流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ でリガンド固定化操作を実施した。

60 mM EDC 溶液 (Cytiva), 650 mM NHS 溶液 (Cytiva) を各々 $50 \mu\text{L}$ ずつ混合させた後, 流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させた。 10 mM 酢酸溶液 ($\text{pH} 5.0$) で希釈して $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ THE His Tag Antibody, mAb, Mouse (GenScript) $150 \mu\text{L}$ を調製し, 流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させ CM3 センサーチップに Capture 分子として THE His Tag Antibody, mAb, Mouse (GenScript) を固定化した。固定化後, 1.0 M エタノールアミン水溶液 (Cytiva) を流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 420 秒反応させキャッピングを行った。 300 nM hTfR を流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ でキャプチャーさせ, DMSO 溶液中で 10 mM に調製されたペプチド溶解液を, 終濃度が $10 \mu\text{M}$ のペプチド溶解液になるようにランニング緩衝液で希釈した後, 250 nM , 125 nM , 62.5 nM , 25 nM , 12.5 nM のペプチド溶液を作製した。上述のペプチドサンプルを流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で 120 秒間反応させ, 乖離を 600 秒間実施し, hTfR に対するペプチドのカイネティクスを SPR 測定により取得した。

koff 及び KD (nM) の測定

カイネティクス評価モデルは, Single Cycle Kinetics とし, Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0 (Cytiva) を使用してカーブフィッティングを行った。得られたセンサーグラムに対して, 最小二乗法によるカーブフィッティングを実施し, その kon 値, koff 値及び KD 値を求めることでペプチドの hTfR に対する結合を評価した。 $\text{pH} 7.4$ の測定において上記いずれの方法においても同様な結果を示した。このようにして求めた KD 値を表 1-1, 1-2, 1-3, 表 2-1, 2-2 及び表 3 に示す。なお, 各表中の LS は TfR 結合活性が測定閾値以下に低かったことを表す Low signal を示し, ND は No Data を示す。

結果として、合成した表 1-1, 1-2, 1-3, 及び表 2-1, 2-2 (並びに表 3) に記載の特殊環状ペプチドについて、h T f R との結合能があることが示された。

なお、表 3 の配列番号 162 に記載の特殊環状ペプチドについては、p H 7.4 条件でシグナルが検出できなかった。

p H 依存性の評価

算出された k o f f 及び K D 値について、p H 6.0 条件の k o f f 値又は K D 値と p H 7.4 条件の k o f f 値又は K D 値との比を算出し、p H 依存性を確認した。そのようにして得られた k o f f 比較値 (p H 6.0 / 7.4) 及び K D 比較値 (p H 6.0 / 7.4) を表 1-1 及び 1-2 に示す。

結果として、合成した表 1-1, 表 1-2 及び表 1-3 に記載の特殊環状ペプチドについて、p H 依存的に h T f R と結合することが示された。また、表 2-1, 2-2 に記載の特殊環状ペプチドについても、p H 6.0 又は 7.4 のどちらかの条件でのみ T f R 結合活性が示されたことから、表 2-1, 2-2 の特殊環状ペプチドについても p H 依存性があることが示された。

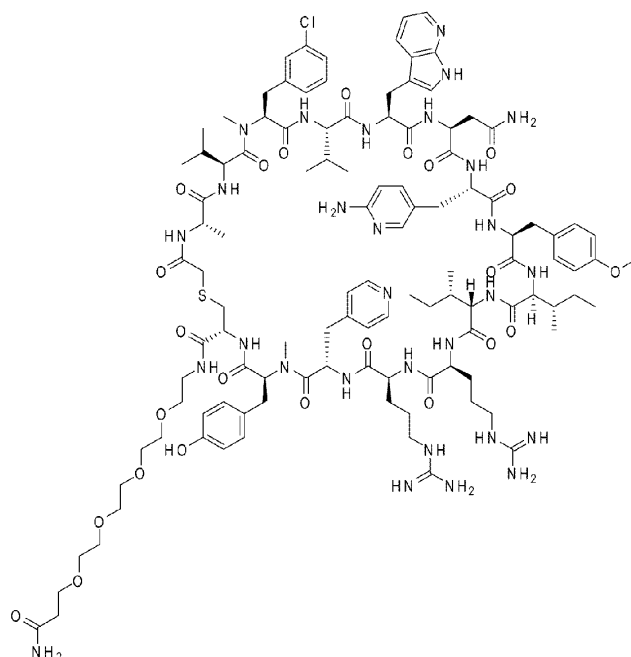
実施例 4

[0108] 以下のペプチド又はリンカー付与ペプチドを合成した。

[0109] [実施例 4-1]

894__0462 (配列番号 1) の合成

[化1]



[0110] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.10 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, 16 残基目から 13 残基目の伸長は Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 75℃ 下, 10 分間 1 回反応を行った。12 残基目から 1 残基目の伸長は Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (5.3 当量/15 当量/7.5 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 3 残基目は 75℃ 下, 15 分間 2 回反応を行った。11 残基目, 12 残基目は 50℃ 下, 15 分間 2 回反応を行った。13 残基は 75℃ 下, 10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下, 15 分間 1 回反応を行った。また, 16 残基目から 13 残基目の Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と 75℃ 下 3 分間反応させることで行った。12 残基目から 1 残基目の Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DM

F 溶液と 90℃下 1 分間反応させることで行った。ただし、2 残基目、13 残基目の Fmoc 除去は 25℃下、1 分間反応させた後、1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち、クロロ酢酸（約 10 当量）、DIPCI（約 10 当量）、HOSu（約 10 当量）を DCM 中 60 分間振盪した後、DCM と同量の DMF を加えることで調製した CIAcOSu（0.2 M）を加え 25℃下、60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A（3 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物）を加え、室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 0℃, 2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように DMSO/水/アセトニトリル（1/1/1）に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 5 時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac EZ11-e lite を用いて減圧濃縮した。

[0111] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 30×150mm；移動相：A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）：3 分かけて 5

− 24%, 8分かけて24−29%, 1分かけて29−60%; 流量: 45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し95.5%であった。

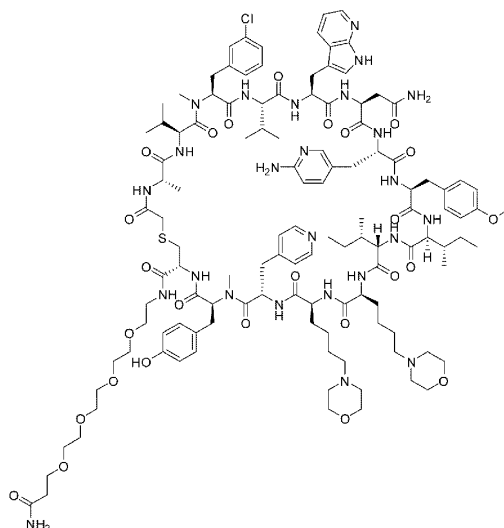
分析条件: 保持時間=4.88分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて5−45%, その後0.3分間かけて45−95%, その後1.55分間かけて95−95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 793.93 (M+3H)³⁺

[0112] [実施例4-2]

894__0465 (配列番号4) の合成

[化2]



[0113] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.10 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Libert

y Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従い合成は894__0462と同様に行った。固相合成において、Fmoc-Kmor-OHとの反応はFmoc-Kmor-OH/HATU/Oxyma Pure (5.3当量/5当量/15当量)を用いDMF中75℃下、10分間行った。

[0114] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 30x150mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50℃; グラジエント (%B): 3分かけて5-24%, 8分かけて24-29%, 1分かけて29-60%; 流量: 45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し90.1%であった。

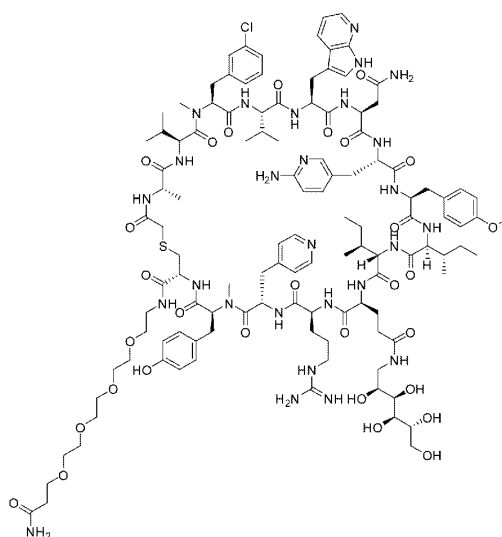
分析条件: 保持時間=4.98分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60℃; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて5-45%, その後0.3分間かけて45-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値m/z=821.94 (M+3H)³⁺

[0115] [実施例4-3]

894__471 (配列番号10) の合成

[化3]



[0116] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.10 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Prime を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (5.3 当量/20 当量/7.5 当量) を用い DMF 中 105℃下, 1.5 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃下, 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃下, 15 分間 2 回反応を行った。13 残基は 90℃下, 10 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 50℃下, 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 25% ピロリジンの DMF 溶液と 110℃下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃下, 1.5 分間反応させた後, 1.5 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち, クロロ酢酸 (約 5 当量), DIPCl (約 5 当量), HOSu (約 5 当量) を DCM 中 60 分間振盪した後, DCM と同量の DMF を加えることで調製した ClAcOSu (

0.1 M) を加え 25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (2 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物) を加え、室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように DMSO/水/イソプロパノール (90/5/5) に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 5 時間攪拌した。反応溶液を Genevac EZ11-e lite を用いて減圧濃縮した。得られた混合物をペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 12 mM となるように DMSO に溶解後、1.1 当量の D-グルカミン、4 当量の DIEA、2 当量の PyAOP を加え室温で 60 分攪拌し酢酸でクエンチした。

[0117] 得られた混合物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μm 30×150 mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50℃; グラジエント (%B): 3 分かけて 5–24%, 8 分かけて 24–29%, 1 分かけて 29–60%; 流量: 45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 88.3% であった。

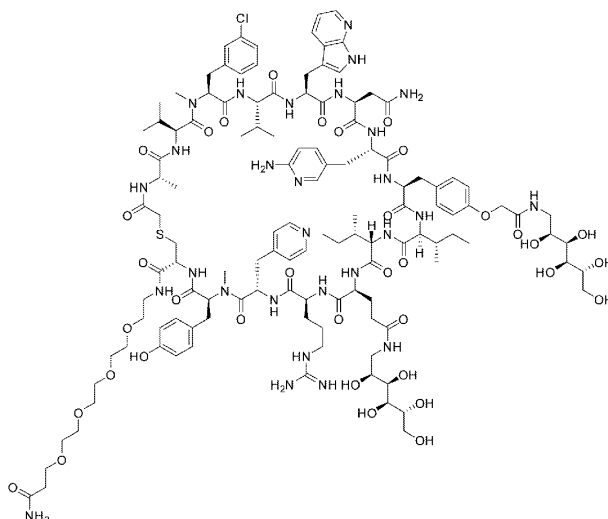
分析条件：保持時間＝5.12分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150 mm, 100 Å；移動相：A＝0.025% TFA in H₂O, B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて5－45%，その後0.3分間かけて45－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5 mL/min

ES I-MS (+) 観測値 $m/z = 839.31$ $(M+3H)^{3+}$

[0118] [实施例 4-4]

894 473 (配列番号12) の合成

[化4]



[0119] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48mmol /g, 0.10 g)を用い, 前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社のLiberty Primeを固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従い合成は894__471と同様に行った。8残基目及び11残基目側鎖カルボン酸とD-グルカミンとの縮合は2.2当量のD-グルカミン, 8当量のDIEA

， 4 当量の P y A O P を用いた。

[0120] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：W a t e r s X b r i d g e（登録商標） C 1 8 5 μ m 3 0 x 1 5 0 m m；移動相：A = 0. 1 % T F A i n H 2 O, B = 0. 1 % T F A i n M e C N；温度：5 0 $^{\circ}$ C；グラジエント（% B）：3 分かけて 5 – 1 9 %，8 分かけて 1 9 – 2 4 %，1 分かけて 2 4 – 6 0 %；流量：4 5 m L / m i n）。

目的物の純度は分析条件の L C / M S（U V 波長 2 2 5 n m）クロマトグラムの面積比から算出し 9 0. 6 % であった。

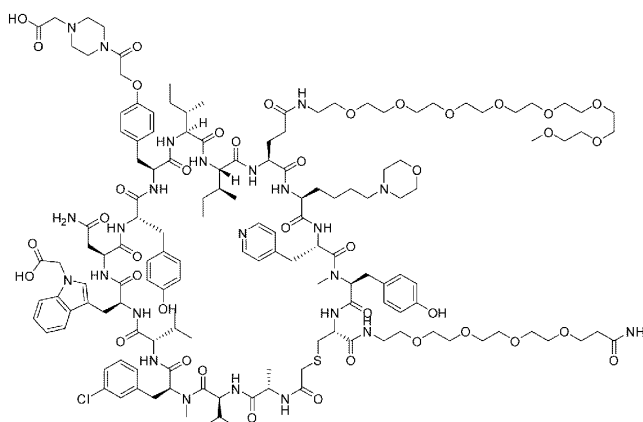
分析条件：保持時間 = 4. 4 8 分；カラム：K i n e t e x E V O C 1 8 2. 6 μ m 2. 1 x 1 5 0 m m, 1 0 0 $\text{\AA}$ ；移動相：A = 0. 0 2 5 % T F A i n H 2 O, B = 0. 0 2 5 % T F A i n M e C N；温度：6 0 $^{\circ}$ C；グラジエント（% B c o n c）：7. 1 5 分間かけて 5 – 4 5 %，その後 0. 3 分間かけて 4 5 – 9 5 %，その後 1. 5 5 分間かけて 9 5 – 9 5 %；流量：0. 5 m L / m i n

E S I – M S（+） 観測値 m/z = 9 0 8. 3 8（M + 3 H）³⁺

[0121] [実施例 4 – 5]

8 9 4 _ 4 9 1（配列番号 2 2）の合成

[化 5]



[0122] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.59 mmol / g, 0.11 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社の Liberty Blue HT を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, 16 残基目から 14 残基目までの伸長は Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma Pure (4.2 当量 / 8 当量 / 4 当量) を用い DMF 中 75℃ 下, 10 分間 1 回反応を行った。13 残基目から 1 残基目までの伸長は Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma Pure (4.2 当量 / 12 当量 / 6 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。11 残基目の反応には Fmoc-E (allyl) -OH, 8 残基目の反応には Fmoc-F4aaO (allyl) -OH を用いた。ただし, 2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 90℃ 下 3 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下 15 分間 1 回反応を行った。また, 16 残基目から 14 残基目の Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と 75℃ 下 3 分間反応させることで行った。13 残基目から 1 残基目の Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃ 下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下, 1 分間反応させた後, 1 分間反応させることで行った。上記, 固相合成において 11 残基目まで伸長した後, 固相合成基から固相樹脂を取り出し得られた固相樹脂 1 当量に対し, 5 当量の Fmoc-OSu の DMF 溶液と 1 時間振盪し DMF で洗浄した。固相樹脂を DCM に懸濁させ, 樹脂 1 当量に対し 0.2 当量のテトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) 及び 10 当量のフェニルシランを加え, 1 時間振盪し DCM 及び DMF で洗浄した。樹脂を DMF に懸濁し, 樹脂 1 等量に対し H-PEG8Me / DIPCI / Oxyma pure (4 当量 / 8 等量 / 4 等量) と 75℃ 下 20 分間反応させた。得られた固相樹脂を DMF で洗浄し, 上記の方法により固相合成機でペプチドを伸長した。8 残基目まで伸長した後, 固相合成基から固相樹脂を取り出し得られた固相樹脂 1 当量に対し

、5当量のFmoc-OsuのDMF溶液と1時間振盪しDMFで洗浄した。固相樹脂をDCMに懸濁させ、固相樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）及び10当量のフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMFで洗浄した。固相樹脂をDMFに懸濁し、固相樹脂1等量に対しH-Pipz aa (tBu) / DIPCI / Oxyma pure（4当量／8等量／4等量）と25℃下60分間反応させた。得られた固相樹脂をDMFで洗浄し、上記の方法により固相合成機でペプチドを伸長した。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分間反応させα-アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、クロロ酢酸（約10当量）、DIPCI（約10当量）、HOSu（約10当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したClAcOsu（0.31M）を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A（3 mL, TFA／H₂O／TIS／DODTの体積比92.5／2.5／2.5／2.5の混合物）を加え、室温で90分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル／ヘキサン（1／1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 0℃, 2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにアセトニトリル／水（1／1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で2時間攪拌した。反

応溶液を酢酸でクエンチ後, Genevac EZ-11 eliteを用いて減圧濃縮した。

[0123] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μm 30 $\times$ 150mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50 $^{\circ}\text{C}$; グラジエント (%B): 3分かけて5–30%, 8分かけて30–35%, 1分かけて35–60%; 流量: 45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し92.7%であった。

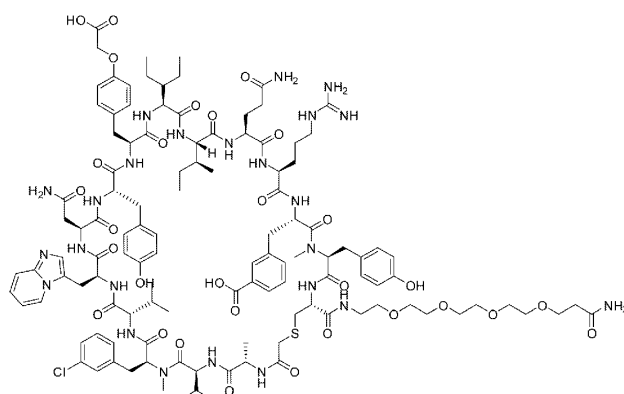
分析条件: 保持時間=3.88分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100 $\text{\AA}$; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60 $^{\circ}\text{C}$; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20–60%, その後0.3分間かけて60–95%, その後1.55分間かけて95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1493.80$ ($M+2H$)²⁺

[0124] [実施例4–6]

894__0552 (配列番号53) の合成

[化6]



[0125] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.10 g)を用い, 前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社のLiberty Primeを固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し, Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (4.2当量/16当量/6当量)を用いDMF中105℃下, 1.5分間1回反応を行った。ただし, 2残基目は75℃下, 30分間2回反応を行った。12残基目は50℃下, 15分間2回反応を行った。13残基は90℃下, 10分間2回反応を行った。15残基目は50℃下, 15分間1回反応を行った。5残基目は固相合成機より固相樹脂を取りだし, Fmoc-AA/HATU/DIEA (4当量/4当量/8当量)と25℃下60分間振盪することで反応を行った。DMFで固相樹脂を洗浄後, 固相合成機を使用し続くペプチド伸長を行った。また, Fmoc除去は4%ピロリジン及び83 mM Oxyma pureのDMF溶液と110℃下1分間反応させることで行った。ただし, 2残基目, 13残基目のFmoc除去は25℃下, 10%ピロリジンのDMF溶液と1.5分間反応させた後, 1.5分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法でα-アミノ基のFmoc基を除去したのち, N-(クロロア

セトキシ) スクシンイミド (約 5 当量) の DMF 溶液を加え 25℃下, 60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは, まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後, ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に, 反応剤カクテル A (3 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物) を加え, 室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し, フリットより溶液成分を回収, 前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると, 白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後, 減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 2.5 mM となるようにアセトニトリル/水 (1/1) に溶解後, 10 当量のトリエチルアミンを加えて, 室温で 16 時間攪拌した後, 酢酸で反応をクエンチした。反応溶液を Genevac EZ11-e lite を用いて減圧濃縮した。

[0126] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 30×150mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50℃; グラジエント (%B): 3 分かけて 5–29%, 8 分かけて 29–34%, 1 分かけて 34–60%; 流量: 45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 92.1% であった。

分析条件: 保持時間 = 3.23 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100 Å; 移動相: A = 0.

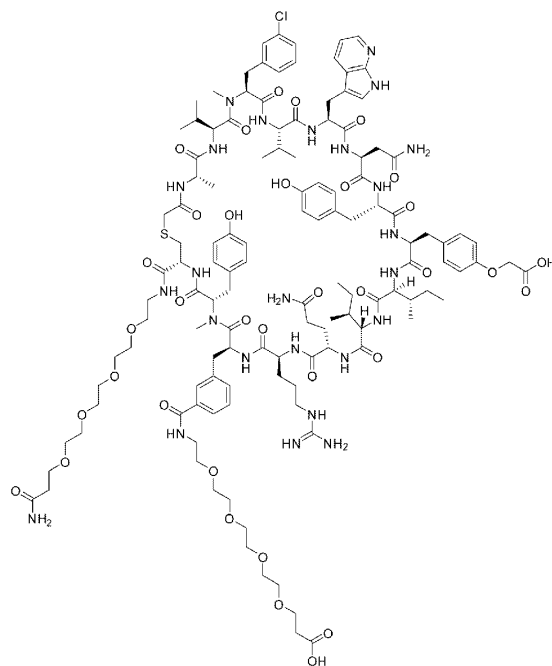
0.25% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60℃; グラジエント (% B conc): 7. 15分間かけて20–60%, その後0.3分間かけて60–95%, その後1.55分間かけて95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 818.33$ ($M + 3H$)³⁺

[0127] [実施例4–7]

894__0436 (配列番号144) の合成

[化7]



[0128] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.21 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (5.3 当量/10 当量/5 当量) を用い DMF

中 90℃下、10分間1回反応を行った。13残基目の反応には Fmoc-F3COO(allyl)-OH を用いた。ただし、2残基目は 75℃下、30分間2回反応を行った。5残基目、6残基目、7残基目は 90℃下、3分間反応を行った。12残基目は 50℃下15分間2回反応を行った。13残基目は 90℃下3分間2回反応を行った。14残基目、16残基目は 90℃下3分間反応を行った。15残基目は 50℃下15分間反応を行った。また、Fmoc 除去は 10%ピロリジンの DMF 溶液と 90℃下1分間反応させることで2残基目まで行った。ただし、2残基目、13残基目の Fmoc 除去は 25℃下、1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。得られた固相樹脂1当量に対し、5当量の Fmoc-Osu の DMF 溶液と1時間振盪し DMF で洗浄した。固相樹脂を DCM に懸濁させ、樹脂1当量に対し 0.2 当量の テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) 及び 10 当量の フェニルシランを加え、1時間振盪し DCM 及び DMF で洗浄した。得られた固相樹脂を DMF に懸濁し、固相樹脂1等量に対し H-PEG4c(tBu)/DIPCI/Oxymapure (4 当量/8 等量/4 等量) と 75℃下30分間反応させ、DMF で洗浄した。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し 20%ピペリジンの DMF 溶液と 25℃下5分間2回反応させ α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち DMF で洗浄後、クロロ酢酸(約 5 当量)、DIPCI (約 5 当量)、HOSu (約 5 当量) を DCM 中 60 分間振盪した後、DCM と同量の DMF を加えることで調製した CIAcOSu (0.05 M) を加え 25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (4 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物) を加え、室温で 60 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切

り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル／ヘキサン（1／1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 2 min），溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO／水（9／1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で15時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0129] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×250mm；移動相：A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）：4.9分かけて0-0%，2分かけて0-4.2%，3分かけて4.2-29.7%，15分かけて29.7-34.7%，3分かけて34.7-60%；流量：4.9分かけて18-18 mL/min，その後2分かけて18-118 mL/min，その後118 mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し97.8%であった。

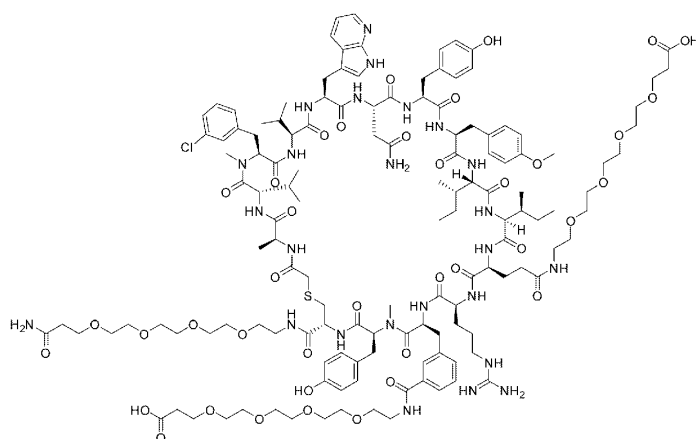
分析条件：保持時間=3.91分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100 Å；移動相：A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60%，その後0.3分間かけて60-95%，その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 895.81$ ($M+3H$)³⁺

[0130] [実施例4-8]

894__0438 (配列番号146) の合成

[化8]



[0131] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.21 g)を用い, 前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従い, 894__0436と同様に合成を行った。固相合成において, 11残基目の反応にはFmoc-E(allyl)-OH, 13残基目の反応にはFmoc-F3COO(allyl)-OHを用いた。11残基目及び13残基目側鎖カルボン酸とH-PEG4c(tBu)との縮合は, H-PEG4c(tBu)/DIPCl/Oxyma pure (8当量/16等量/8等量)を用いた。

[0132] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 30 $\times$ 150mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50 $^{\circ}$ C; グラジエント (%B): 4.9分かけて2.2-2.2%, 1分かけて2.2-6.0%, 3分かけて6.0-31.6%, 9分かけて31.6-36.7%, 1分かけて36.7-60%;

流量：4.9分かけて9-9 mL/min, その後1分かけて9-44 mL/min, その後44 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し95.7%であった。

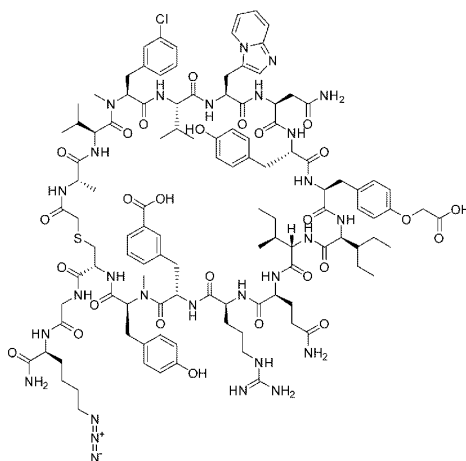
分析条件：保持時間=4.28分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å；移動相：A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60°C；グラジエント (% B conc)：7.15分間かけて20-60%, その後0.3分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 963.85 (M+3H)³⁺

[0133] [実施例4-9]

894__3426 (配列番号67) の合成

[化9]



[0134] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.54 mmol/g, 0.93 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Libert

y Blueを固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2当量/8当量/4当量)を用いDMF中75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、2残基目は75℃下、30分間2回反応を行った。8残基目、9残基目、13残基目は75℃下、10分間2回反応を行った。12残基目は50℃下、15分間2回反応を行った。15残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。5残基目は固相合成機より固相樹脂を取りだし、Fmoc-AA/HATU/DIEA (5当量/5当量/10当量)と40℃下60分間振盪することで反応を行った。DMFで固相樹脂を洗浄後、固相合成機を使用し続くペプチド伸長を行った。Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と75℃下3分間反応させることで行った。ただし、2残基目、13残基目のFmoc除去は25℃下、5分間反応させた後、5分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド(約10当量)のDMF溶液を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (30 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で90分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた

固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように DMSO/水 (9/1) に溶解後, 10 当量のトリエチルアミンを加えて, 室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後, Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。

[0135] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xselect CSH PrepC18 5 μ m 50x250mm; 移動相: A = 20 mM TEAA in H₂O, B = 0 mM TEAA in MeCN, C = 200 mM TEAA in H₂O, D = MeCN; 温度: 50°C; グラジエント (%A): 5 分かけて 0.1-0.1%, 0.1 分かけて 0.1-71.1%, その後 (100-%B), グラジエント (%B): 5 分かけて 0-0%, 0.1 分かけて 0-28.9%, 1.9 分かけて 28.9-30.7%, 3 分かけて 30.7-30.7%, 15.5 分かけて 30.7-35.8%, 1.5 分かけて 35.8-60%, 4 分かけて 60-90%, グラジエント (%C): 5 分かけて 71.0-71.0%, 0.1 分かけて 71.0-0%, その後 0%, グラジエント (%D): 5 分かけて 28.9-28.9%, 0.1 分かけて 28.9-0%, その後 0%; 流量: 5.1 分かけて 18-18 mL/min, その後 1.9 分かけて 18-118 mL/min, その後 118 mL/min)。

目的物の純度は分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 95.7% であった。

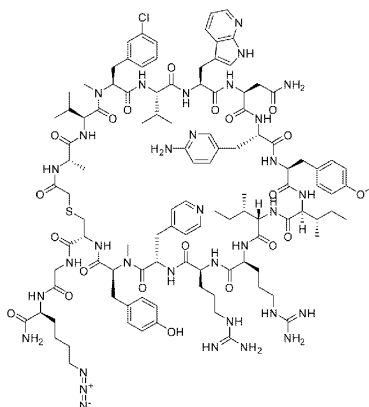
分析条件: 保持時間 = 3.58 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15 分間かけて 20-60%, その後 0.3 分間かけて 60-95%, その後 1.55 分間かけて 95-95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1208.36$ ($M+2H$)²⁺

[0136] [実施例4－10]

894__3427 (配列番号66) の合成

[化10]



[0137] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.54 mmol/g, 0.46 g×2) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 90℃下, 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 15 残基目は 50℃下, 15 分間 1 回反応を行った。13 残基目は 90℃下, 3 分間 2 回反応を行った。11 残基目, 12 残基目は 50℃下, 15 分間 2 回反応を行った。9 残基目は 90℃下, 10 分間 2 回反応を行った。8 残基目は 90℃下, 10 分間 1 回反応を行った。2 残基目は 75℃下, 30 分間 2 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃下, 1 分間反応させた後, 1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の

導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち、N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド(約 10 当量)を加え 25℃下、60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (33 mL, TFA / H₂O / TIS / DODT の体積比 92.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5 の混合物)を加え、室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン (1 / 1) の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように DMSO / 水 (9 / 1) に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を 15 当量の酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。

[0138] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 50 x 150 mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40℃; グラジエント (%B): 2 分かけて 5-5%, 1 分かけて 5-23%, 8 分かけて 23-28%, その後 1 分かけて 28-60%; 流量: 1 分かけて 20-20 mL/min, その後 1 分かけて 20-120 mL/min, その後 120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラム の面積比から算出し 93.3% であった。

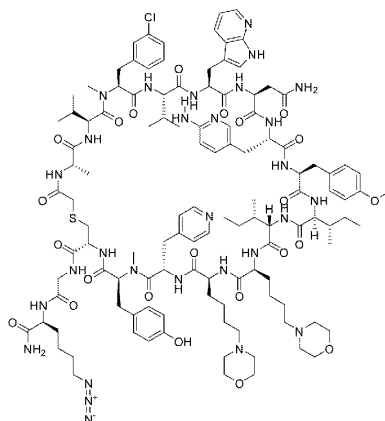
分析条件：保持時間＝5.11分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100Å；移動相：A＝0.025% TFA in H₂O, B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて5－45%，その後0.3分間かけて45－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z＝781.65（M+3H）³⁺

[0139] [実施例4－11]

894__3428（配列番号68）の合成

[化11]



[0140] Sieber amide resin（渡辺化学，0.54mmol/g，0.46g $\times$ 2）を用い，前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し，目的のペプチドを合成した。その際，CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し，製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し，Fmoc-AA/DIC/Oxyma Pure（4.2当量/8当量/4当量）を用いDMF中90℃下，3分間1回反応を行った。ただし，15残基目は50℃下，15分間1回反応を行った。13残基目は90℃下，3分間2回反応を行った。

1 残基目, 3 残基目, 4 残基目, 5 残基目, 6 残基目, 7 残基目, 8 残基目, 9 残基目, 10 残基目, 11 残基目は40℃下, 30分間1回反応を行った。2 残基目は75℃下, 30分間2回反応を行った。また, Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分間反応させることで行った。ただし, 1 残基目, 2 残基目, 3 残基目, 4 残基目, 5 残基目, 6 残基目, 7 残基目, 8 残基目, 9 残基目, 10 残基目, 11 残基目, 12 残基目, 13 残基目のFmoc除去は25℃下, 1分間反応させた後, 1分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち, N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド(約10当量)を加え25℃下, 60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは, まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後, ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に, 反応剤カクテルA(30 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え, 室温で90分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し, フリットより溶液成分を回収, 前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると, 白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後, 減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO/水(9/1)に溶解後, 10当量のトリエチルアミンを加えて, 室温で2時間攪拌した。反応溶液を15当量の酢酸でクエンチ後, Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0141] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した(カラム: Waters

X b r i d g e (登録商標) C 1 8 5 μ m 5 0 $\times$ 1 5 0 mm ; 移動相 : A = 0 . 1 % T F A i n H 2 O , B = 0 . 1 % T F A i n M e C N ; 温度 : 4 0 $^{\circ}$ C ; グラジエント (% B) : 2 分かけて 5 - 5 % , 1 分かけて 5 - 2 3 % , 8 分かけて 2 3 - 2 8 % , その後 1 分かけて 2 8 - 6 0 % ; 流量 : 1 分かけて 2 0 - 2 0 mL / m i n , その後 1 分かけて 2 0 - 1 2 0 mL / m i n , その後 1 2 0 mL / m i n) 。

目的物の純度は分析条件の LC / MS (UV 波長 2 2 5 n m) クロマトグラムの面積比から算出し 9 7 . 3 % であった。

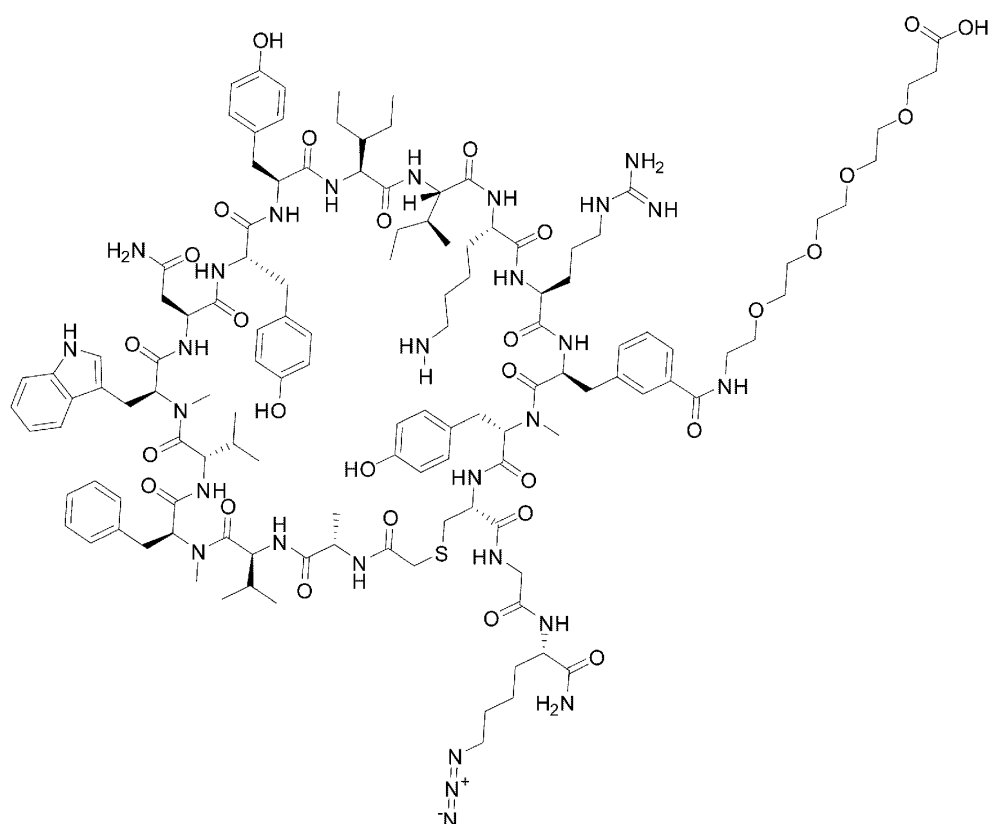
分析条件 : 保持時間 = 5 . 1 5 分 ; カラム : K i n e t e x E V O C 1 8 2 . 6 μ m 2 . 1 $\times$ 1 5 0 mm , 1 0 0 $\text{\AA}$; 移動相 : A = 0 . 0 2 5 % T F A i n H 2 O , B = 0 . 0 2 5 % T F A i n M e C N ; 温度 : 6 0 $^{\circ}$ C ; グラジエント (% B c o n c) : 7 . 1 5 分間かけて 5 - 4 5 % , その後 0 . 3 分間かけて 4 5 - 9 5 % , その後 1 . 5 5 分間かけて 9 5 - 9 5 % ; 流量 : 0 . 5 mL / m i n

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 8 0 9 . 6 2$ ($M + 3 H$) $^{3+}$

[0142] [実施例 4 - 1 2]

8 9 4 _ 3 4 8 4 (配列番号 1 9 5) の合成

[化12]



[0143] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.60 mmol/g, 0.83 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue HT を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 75℃ 下, 10 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目, 4 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。13 残基目は Fmoc-F3COO (allyl)-OH を用い 75℃ 下 10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と室温で 5 分間 2 回反応させることで行った。ただし, 3 残基目, 5 残基目の Fmoc 除去は 5 分間反応させた後, 10 分間反応させるこ

とで行った。14残基目、15残基目、16残基目、17残基目のFmoc除去は75℃下、3分間反応させることで行った。固相合成基から固相樹脂を取り出し得られた固相樹脂をDCM/HFIP(99/1)に懸濁させ、樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)及び10当量のフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMFで洗浄した。樹脂をDMFに懸濁し、樹脂1等量に対しH-PEG4c(tBu)/HATU/DIEA(4.2当量/4等量/8等量)と室温で30分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し10%ピロリジンのDMF溶液と室温で2分間反応させα-アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド(約10当量)のDMF溶液と60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A(25 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で40分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO/アセトニトリル/水(1/1/1)に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で2時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0144] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xselect CSH（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 250mm；移動相：A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）：5分かけて1.1%，2分かけて1.1–5.2%，3分かけて5.2–30.7%，15.5分かけて30.7–35.8%，1.5分かけて35.8–60%；流量：8分かけて18mL/min，2分かけて18–118mL/min，その後118mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し96.4%であった。

分析条件：保持時間=4.10分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150mm, 100Å；移動相：A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20–60%，その後0.3分間かけて60–95%，その後1.55分間かけて95–95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z = 1292.43（M+2H）²⁺

[0145] [実施例4-13]

894__3486（配列番号196）の合成

。15残基目は50℃下、15分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分間反応させることで行った。ただし、2残基目、4残基目、9残基目、13残基目のFmoc除去は25℃下、10%ピロリジンのDMF溶液と1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂を混合し、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド(約5当量)のDMF溶液を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (25 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で60分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.8 mMとなるようにDMSO/水(9/1)に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で3時間攪拌した後、酢酸で反応をクエンチした。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0146] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した(カラム: Waters Xselect CSH (登録商標) C18 5 μ m 50x250 mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50℃; グラジエント(%B): 5分

けて0%, 2分かけて0-4.2%, 3分かけて4.2-25.6%, 15.5分かけて25.6-30.7%, 1.5分かけて30.7-60%; 流量: 8分かけて18 mL/min, 2分かけて18-118 mL/min, その後118 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し94.9%であった。

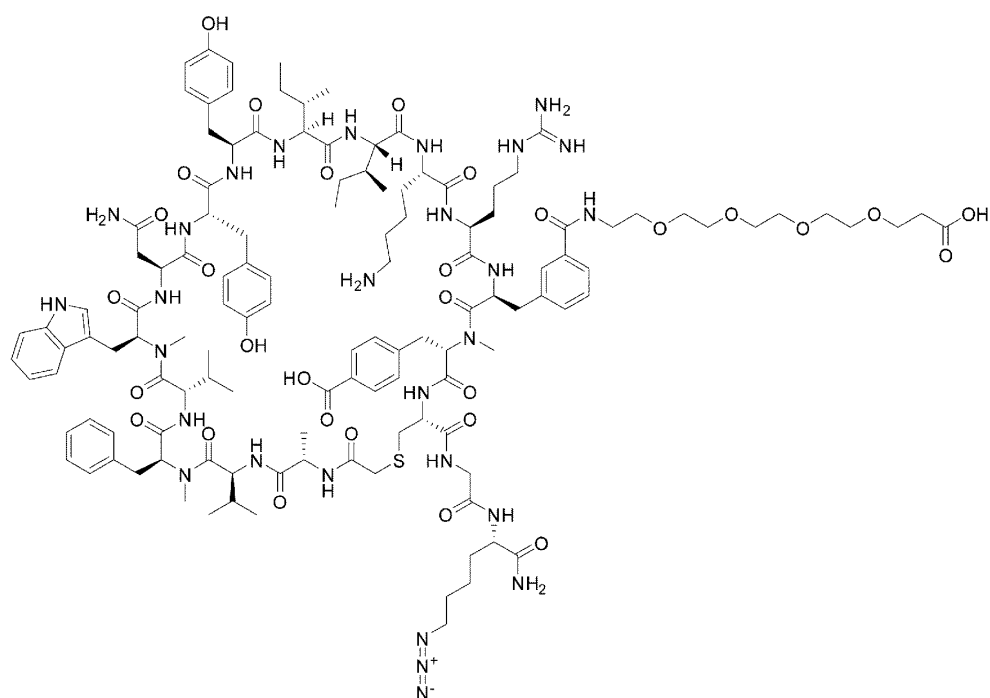
分析条件: 保持時間=3.02分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.3分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1161.72$ ($M+2H$)²⁺

[0147] [実施例4-14]

894__3488 (配列番号193) の合成

[化14]



[0148] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.60 mmol/g, 0.83 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue HT を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 75℃下, 10 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目, 4 残基目は 75℃下, 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃下 20 分間 2 回反応を行った。13 残基目は Fmoc-F3COO(allyl)-OH を用い 75℃下 30 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃下 20 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 75℃下 3 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 4 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は室温で 5 分間反応させた後, 5 分間反応させることで行った。得られた固相樹脂 1 当量に対し, 5 当量の Fmoc-OSu の DCM 溶

液と60分間振盪しDMFで洗浄した。固相合成基から固相樹脂を取り出し得られた固相樹脂をDCMに懸濁させ、樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)及び10当量のフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMFで洗浄した。樹脂をDMFに懸濁し、樹脂1等量に対しH-PEG4c(tBu)/DIC/Oxyma Pure(4当量/8等量/4等量)と75℃下30分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し10%ピロリジンのDMF溶液と室温で5分間反応させα-アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド(約5当量)のDMF/DCM(1/1)溶液と60分間振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルB(20 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比90/2.5/2.5/5.0の混合物)を加え、室温で60分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm, 0℃, 2 min), 溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるように1%トリエチルアミン含有アセトニトリル/水(1/1)に溶解後、室温で1時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0149] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した(カラム: Waters Xselect CSH(登録商標) C18 5 μm 50×250m

m; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 50°C; グラジエント (%B): 5分かけて1.1%, 2分かけて1.1–5.2%, 3分かけて5.2–30.7%, 15.5分かけて30.7–35.8%, 1.5分かけて35.8–60%; 流量: 8分かけて18 mL/min, 2分かけて18–118 mL/min, その後118 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し94.0%であった。

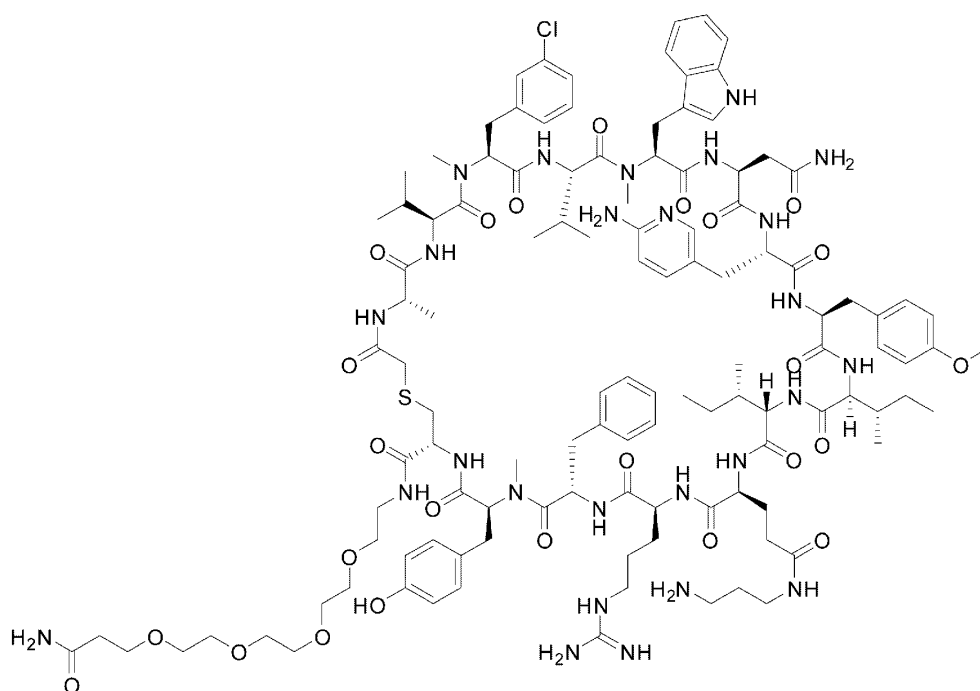
分析条件: 保持時間=4.05分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20–60%, その後0.3分間かけて60–95%, その後1.55分間かけて95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1299.41 (M+2H)²⁺

[0150] [実施例4–15]

894__0640 (配列番号172) の合成

[化15]



[0151] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.60 mmol/g, 1.67 g)を用い, 前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し, Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (4.2当量/8当量/4当量)を用いDMF中90℃下, 10分間1回反応を行うことで12残基目まで伸長した。12残基目は50℃下20分間2回反応を行った。13残基目は75℃下30分間2回反応を行った。14残基目は75℃下30分間1回反応を行った。15残基目は20分間1回反応を行った。16残基目は75℃下10分間1回反応を行った。また, Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と75℃下3分間反応させることで行った。ただし, 12残基目, 13残基目, 16残基目は25℃下1分間反応させた後, 1分間反応させることで行った。

1 残基目の導入は樹脂 1 当量に対し Fmoc-E (a l l y l) -OH / HATU / DIEA (5 当量 / 5 当量 / 10 当量) を用い、室温で 60 分間 1 回反応を行った。得られた固相樹脂を DCM に懸濁させ、樹脂 1 当量に対し 0.2 当量のテトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) 及び 10 当量のフェニルシランを加え、1.5 時間振盪し DCM 及び DMF で洗浄した。得られた固相樹脂を DMF に懸濁し、固相樹脂 1 等量に対し Boc-ap a -H / PyAOP / DIEA (10 当量 / 10 等量 / 10 等量) と 25℃ 下 120 分間反応させ、DMF で洗浄した。続く各残基の導入は得られた固相樹脂 1 当量に対し、Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma Pure (5.3 当量 / 10 当量 / 5 当量) を用い DMF 中 90℃ 下、10 分間 1 回反応を行うことで続く伸長反応を行った。ただし、1 残基目、6 残基目、8 残基目は 90℃ 下 3 分間一回反応を行った。2 残基目、4 残基目は 90℃ 下 10 分間 2 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃ 下 1 分間反応させることで行った。ただし、2 残基目、4 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下、1 分間反応させた後、1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し 10% ピロリジンの DMF 溶液と 25℃ 下 1 分間 2 回反応させ α-アミノ基の Fmoc 基を除去したのち DMF で洗浄後、N- (クロロアセトキシ) スクシンイミド (約 10 当量) の DMF 溶液と 60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (4 mL, TFA / H₂O / TIS / DODT の体積比 92.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5 の混合物) を加え、室温で 60 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル / ヘキサン (1 / 1) の

混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO／水／アセトニトリル（2／1／1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で1時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac EZ-11 eliteを用いて減圧濃縮した。

[0152] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×150mm；移動相：A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分かけて5%，1分かけて5－28%，8分かけて28－33%，1分かけて33－60%；流量：1分かけて20 mL/min，その後1分かけて20－120 mL/min，その後120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し90.9%であった。

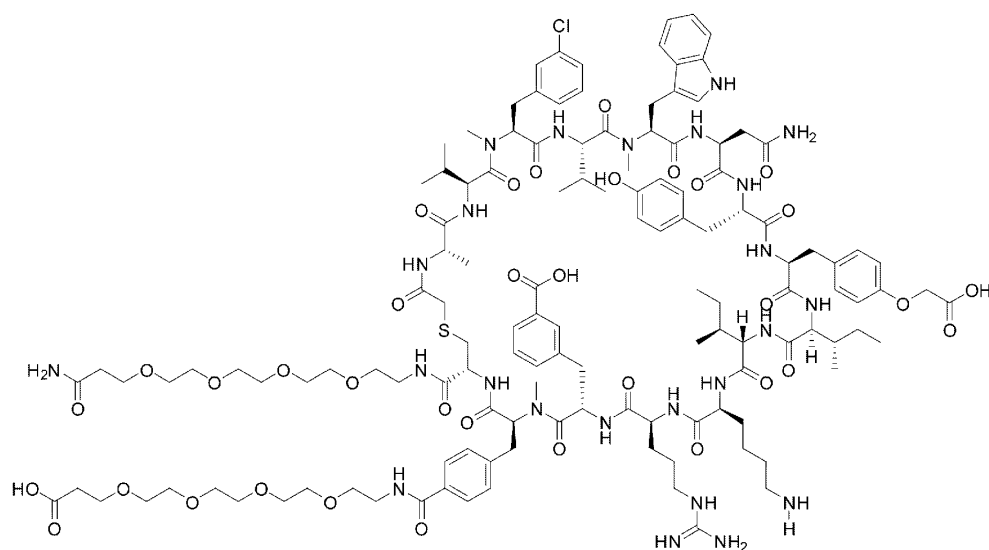
分析条件：保持時間＝3.51分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100Å；移動相：A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%，その後0.3分間かけて60－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z ＝807.44（M+3H）³⁺

[0153] [実施例4－16]

894__0646（配列番号178）の合成

[化16]



[0154] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.60 mmol/g, 0.21 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目, 4 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 75℃ 下 10 分間 1 回反応を行った。13 残基目は 90℃ 下 10 分間 2 回反応を行った。14 残基目は Fmoc-MeF₄COO(allyl)-OH を用い, 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃ 下 1 分間 1 回反応させることで行った。ただし, 4 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は室温で 1 分間反応させた後, 1 分間反応させることで行った。1 残基目の Fmoc 除去は MeF₄COO 側鎖と H-PEG₄-OtBu との反応後行った。固相合成基から固相樹脂を取り出し得られた固相樹脂を DCM/酢酸 (99/1) に

懸濁させ、樹脂 1 当量に対し 0.2 当量のテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）及び 10 当量のフェニルシランを加え、1 時間振盪し DCM 及び DMF で洗浄した。樹脂を DMF に懸濁し、樹脂 1 等量に対し H-PEG4c(tBu)/HATU/DIEA（4.2 当量/4 等量/8 等量）と室温で 10 分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し 10%ピロリジンの DMF 溶液と室温で 5 分間反応させた後、5 分間反応させ α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち DMF で洗浄後、クロロ酢酸/HATU/DIEA（5 当量/5 当量/10 当量）の DMF 溶液と 30 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A（5 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物）を加え、室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 0℃, 2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように DMSO/水（95/5）に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac EZ-11 elite を用いて減圧濃縮した。

[0155] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XBridge（登録商標） C18 5 μ m 50 x 150 mm；移動相：A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA

in MeCN; 温度: 40°C; グラジエント (%B): 2分かけて6%, 1分かけて6-31%, 8分かけて31-36%, 1分かけて36-60%; 流量: 1分かけて20 mL/min, 1分かけて20-120 mL/min, その後120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し91.8%であった。

分析条件: 保持時間=3.95分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.3分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min
ESI-MS (+) 観測値 m/z = 909.45 (M+3H)³⁺

産業上の利用可能性

[0156] この発明は、医薬産業において利用されうる。

請求の範囲

[請求項1]

以下のアミノ酸配列：

A l a - V a l - M e F 3 C - V a l - W 7 N - A s n - 3 P y 6 N
H 2 - F 4 O M e - l l e - l l e - A r g - A r g - 4 P y - M e
T y r - C y s (配列番号1) に記載のアミノ酸配列からなるペプチ
ド又はその薬学的に許容される塩であるか、配列番号1に記載のアミ
ノ酸配列において、以下のグループ：

- (I) 配列番号1の2番目のバリン残基の極性アミノ酸への置換；
- (II) 配列番号1の3番目のM e F 3 C残基の、芳香環又は複素環を側鎖に有するN-メチルアミノ酸への置換；
- (III) 配列番号1の5番目のW 7 N残基の、置換基を有していてもよく、インドール環上のCがNに置換されていてもよいトリプトファン、又はN-メチルトリプトファンへの置換；
- (IV) 配列番号1の6番目のアスパラギン残基のN m mへの置換；
- (V) 配列番号1の7番目の3 P y 6 N H 2残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸への置換；
- (VI) 配列番号1の8番目のF 4 O M e残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸への置換；
- (VII) 配列番号1の9番目のイソロイシン残基のE v aへの置換；
- (VIII) 配列番号1の10番目のイソロイシン残基の、任意のアミノ酸への置換；
- (IX) 配列番号1の11番目のアルギニン残基の、側鎖に置換基を有していてもよいリシン、又は側鎖に置換基を有していてもよいグルタミンへの置換；
- (X) 配列番号1の12番目のアルギニン残基の、側鎖に置換基を有していてもよいリシン、ヒスチジン、又はグルタミンへの置換；

(X I) 配列番号 1 の 13 番目の 4 P y 残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有するアミノ酸、又は側鎖に置換基を有していてもよいグルタミンへの置換； 及び

(X I I) 配列番号 1 の 14 番目の M e T y r 残基の、置換基を有していてもよい芳香環又は複素環を側鎖に有する N-メチルアミノ酸への置換；

から選択される 1 以上の置換を有するアミノ酸配列からなる、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。

[請求項2]

請求項 1 に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド又はその薬学的に許容される塩であるか、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、以下のグループ：

(I) 配列番号 1 の 2 番目のバリン残基の、T 及び K m o r からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(I I) 配列番号 1 の 3 番目の M e F 3 C 残基の、M e F 及び M e 3 P y からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(I I I) 配列番号 1 の 5 番目の W 7 N 残基の、W 1 a a, W, W 1 E t O H, W 1 M e, 3 I m p 及び M e W からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(I V) 配列番号 1 の 7 番目の 3 P y 6 N H 2 残基の、Y, Y 2 6 d F, 3 P y 6 N H a a, Y 3 M e 及び R からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(V) 配列番号 1 の 8 番目の F 4 O M e 残基の、F 4 a a o, F 4 a a o (G l u c a m i n e), F 4 a a o (p i p z a a), Y a e C O p i p z a a, 3 P y 6 O M e, 3 P y 6 N H a a, 3 I m p, Y 及び F 4 a a o (P E G 8 M e) からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換；

(V I) 配列番号 1 の 10 番目のイソロイシン残基の、H a r, K m

o r, T, M o r, H p r及びSからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(V I I) 配列番号1の11番目のアルギニン残基の, K m o r, K C O p i p z a a, K, E (G l u c a m i n e), Q, 側鎖にリンカーを有していてもよいQ, 側鎖にリンカーを有していてもよいE及びE (a p a) からなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(V I I I) 配列番号1の12番目のアルギニン残基の, K m o r, K C O p i p z a a, Q及びHからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号1の13番目の4 P y残基の, F 3 C O O, F, F 3 C O N P E G 4 c, Y 3 M e, 3 P y 6 M e, 3 P y 6 O M e, 3 P y 6 N H 2, 4 P y 2 M e, 4 P y 2 O M e, 4 P y 2 N H 2, 3 P y, Y, リンカーを有していてもよいF 3 C O O及び側鎖にリンカーを有していてもよいEからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；及び

(X) 配列番号1の14番目のM e T y r残基の, M e F 4 C O O, M e F 3 C O O, M e F 4 C, M e F 4 O M e, M e F 3 C, M e F 3 O M e, M e 4 P y, M e 3 P y及びM e F 4 C O O (P E G 4 c) からなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

から選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列からなる, 前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩。

[請求項3] 請求項1又は2に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって,

(I) 配列番号1の1番目が, アラニン残基である；

(I I) 配列番号1の4番目が, バリン残基である；

(I I I) 配列番号1の6番目が, アスパラギン残基である；

(I V) 配列番号1の7番目が, チロシン残基又は3 P y 6 N H 2残基である；

(V) 配列番号1の9番目が、イソロイシン残基である；
の少なくとも1つを満たすアミノ酸配列を含む、前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩。

[請求項4] 請求項3に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、
かつ、

A：(a) 配列番号1の5番目が、W7N残基又は3Imp残基である；

(b) 配列番号1の7番目が、3Py6NH2残基である；

(c) 配列番号1の8番目が、F4aaopipzaa残基である；

(d) 配列番号1の13番目が、4Py残基である；

の少なくとも2つを満たすアミノ酸配列、

又は、

B：(i) 配列番号1の8番目が、F4aaopipzaa残基、
F4aaoglucamine残基、F4aaopeg8me残基又はYaecOpipzaa残基であるアミノ酸配列；

の少なくともいずれかに該当するアミノ酸配列からなる、前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩。

[請求項5] 請求項1に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、
配列番号1～202のいずれかに記載のアミノ酸配列、又は配列番号
1～202のいずれかに記載のアミノ酸配列とリンカーの結合体の1
から15番目のアミノ酸配列からなり、アミノ酸配列部位が環状構造
を有する、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。

[請求項6] 請求項1に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、
環状ペプチドである、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。

[請求項7] 請求項3に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、
hTfR結合活性を有する、ペプチド又はその薬学的に許容される
塩。

- [請求項8] 請求項4に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、pH依存的にh T f R結合活性を有する、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項9] 請求項1に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、配列番号1の8番目、11番目、13番目又は15番目のアミノ酸にリンカーが結合している、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項10] 請求項9に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、配列番号1～167のいずれかに記載の、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項11] 請求項9に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩であって、前記リンカーが、
ポリエチレングリコール（PEG）リンカー又はGKN3リンカーである、ペプチド又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項12] 請求項9に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩と、前記リンカーに結合した物質とを含む複合体。
- [請求項13] 請求項12に記載の複合体であって、前記リンカーが、
ポリエチレングリコール（PEG）リンカー又はGKN3リンカーである、複合体。
- [請求項14] 請求項1に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩を含む、組成物。
- [請求項15] 請求項1に記載のペプチド又はその薬学的に許容される塩を含む、医薬用又は診断用の組成物。
- [請求項16] 請求項12又は13に記載の複合体を含む、組成物。
- [請求項17] 請求項12又は13に記載の複合体を含む、医薬用又は診断用の組成物。
- [請求項18] 請求項12又は13に記載の複合体を得る工程を含む、医薬用又は診断用の組成物の製造方法。

- [請求項19] 請求項18に記載の方法であって、前記リンカーが、
ポリエチレングリコール（PEG）リンカー又はGKN3リンカーで
ある、方法。
- [請求項20] ペプチド又はその薬学的に許容される塩について
- a) 溶媒への溶解度
 - b) h T f Rとの結合能
 - c) 細胞及び／又は組織への毒性
 - d) 実験動物への毒性
- の少なくとも1つを試験するペプチド又はその薬学的に許容される塩
の試験方法であって、
- 前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩は、請求項1に記載の
ペプチド又はその薬学的に許容される塩が有するアミノ酸配列におい
て、1～3個のアミノ酸残基を、欠失、置換、挿入及び／又は付加し
たアミノ酸配列を有するペプチド又はその薬学的に許容される塩であ
る、前記方法。