

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。この発明は、血液脳関門（B B B）を通過することができるペプチドや筋組織に指向性を有するペプチド、細胞浸透性を有するペプチドに関する。さらに本発明は、これらのペプチドにより、任意の物質を脳内へ送達する方法や筋組織へ送達する方法などに関する。

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（B l o o d - B r a i n B a r r i e r, B B B）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。

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 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、さらに血液脳関門（BBB）を通過することができるペプチド、筋組織に指向性を有し、筋組織に効率的に移行することが出来るペプチド及び細胞浸透性を有する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

[0006] 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。

このペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列（Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys）；又は配列番号1に記載のアミノ酸配列中に1以上10以下のアミノ酸残基の置換，欠失，付加及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。

発明の効果

[0007] 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（hTfR）に結合するペプチド，血液脳関

門（BBB）を通過できるペプチド、筋組織へ指向性を有するペプチド、細胞浸透性を有するペプチドなどを提供できる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、各組織における蛍光強度測定結果を示す図面に代わる写真である。

[図1-2]図1-2は、各組織における蛍光強度測定結果を示す図面に代わる写真である。

[図1-3]図1-3は、各組織における蛍光強度測定結果を示す図面に代わる写真である。

[図2]図2は、拡大した脳における蛍光強度測定結果を示す図面に代わる写真である。

[図3]図3は、マウス脳内局在確認試験（シングルコース）の結果を示す図面に代わる写真である。

[図4]図4は、マウス脳内局在確認試験（マルチコース）の結果を示す図面に代わる写真である。

[図5]図5は、ヒト乳がん細胞への移行を示す図面に代わる蛍光顕微鏡写真である。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、図面を用いて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し、血液脳関門を通過可能であ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とは、血漿に含まれ、鉄イオンと結合するたんぱく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D D Sとして用い、物質をB B Bを通過させるという研究が進められている。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T f R、h T f R又は単にT f Rと記する。

[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（K D）により表されるが、トランスフェリンレセプターと結合ペプチド上の抗原結合部位の間の結合強度を表す尺度であり：K D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 $1/K D$ のことである親和性定数（K A）として表すことも可能である）。当業者には明らかになるように（例えば、本明細書でのさらなる開示に基づいて）、親和性は目的の特定の抗原に応じて、それ自体公知である様式で決定することが可能である。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係する。

[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（S P R）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（R I A）、酵素免疫アッセイ（E I A）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レセプターとの親和性は、100 nM未満、好ましくは50 nM未満のKDである。

[0014] 血液脳関門（BBB）を通過可能

BBBを通過可能とは、例えば、BBBを介して脳内に物質を通過させることができ、脳内の任意の部位において、投与後のある時間において当該物質又はその代謝物を検出可能であること、または脳内において当該物質が影響を及ぼしたと類推できる知見が得られることを意味する。

[0015] 脳関連疾患

脳関連疾患とは、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）疾患を示す。脳関連疾患の例としては、限定されないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病、ハンチントン病、ライソゾーム病、中枢神経障害、脳腫瘍を含む中枢神経系の腫瘍、脳虚血、脳障害を伴う疾患、外傷性の中枢神経系障害、ウィルス性及び細菌性の中枢神経系疾患や、統合失調症、うつ症などの精神に影響を来す疾患などである。

[0016] 筋組織に指向性を有する

筋組織とは、心筋、骨格筋および平滑筋のどれであってもよい。特に好ましい筋組織は心筋または骨格筋である。筋組織に指向性を有するとは、筋組織に特異的、効率的に移行する性質を有することを意味する。

[0017] 神経筋疾患

神経筋疾患とは、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を示す。神経筋疾患の例は、限定されないが、脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、重症筋無力症、筋ジストロフィー、多発性筋炎、遺伝性ミオパチー、神経筋疾患、筋萎縮症、薬物誘発性ミオパチー、急性心不全、慢性心不全、心筋梗塞、慢性疲労症候群、ミトコンドリア病、ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症及びギラン・バレー症候群である。

[0018] 細胞浸透性を有するペプチド

細胞浸透性を有するペプチドは、例えば特許第6478632号公報、及び特許第6708770号（細胞透過性を有するペプチド）に記載される通り、公知である。そして、実施例により示された通り、本発明のペプチドは、トランスフェリンレセプターと結合し、細胞内に取り込まれる。そのため、本発明のペプチドやその複合体を用いれば、目的の有効成分を細胞内にデリバリーすることが可能となり、例えば、核酸医薬を細胞内に届けることが可能となる。

[0019] ペプチド

アミノ酸が複数連続した構造を言い、ポリペプチド、たんぱく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）だけではなく、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、ペプチドとペプチドに結合した物質の複合体、ペプチドと物質がリンカーを介して結合した複合体も、本発明のペプチド、ペプチドと物質の複合体に含まれる。

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ル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ル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ル基と他方のアミノ酸のアミノ基が結合することにより形成されたものに限られず、合成反応の結果としてアミド結合により結合しておればよい。他の結合型についても同様である。

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。

[0020] 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包含する。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。

[0021] 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。 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アミノ酸がスルホン酸基で置換された構造を有するアミノ酸誘導体等が挙げられる。

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C A S 参照番号または購入先社名を示し、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、C A S 番号については、当該非天然アミノ酸単体又は保護基が結合したもの但し、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（Ala又はA）のN-メチル化アミノ酸は、MeAla、N-MeAla、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（Ala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。

- [0022] Yph (S)-2-アミノ-3-(4-フェノキシフェニル)プロパン酸 (CAS番号: 180414-93-1)
- W7OMe (S)-2-アミノ-3-(7-メトキシ-1H-インドール-3-イル)プロパン酸 (CAS番号: 2416720-26-6)
- W7N (S)-2-アミノ-3-(1H-ピロロ[2,3-β]ピリジン-3-イル)プロパン酸 (CAS番号: 737007-45-3)
- W7F (S)-2-アミノ-3-(7-フルオロ-1H-インドール-3-イル)プロパン酸 (CAS番号: 1956434-65-3)
- W6N (S)-2-アミノ-3-(1H-ピロロ[2,3-c]ピリジン-3-イル)プロパン酸 (キシダ化学株式会社)
- W6F (S)-2-アミノ-3-(6-フルオロ-1H-インドール-3-イル)プロパン酸 (CAS番号: 908847-01-8)
- W5OMe 5-メトキシ-L-トリプトファン (CAS番号: 460751-69-3)
- W5F (S)-2-アミノ-3-(5-フルオロ-1H-インドール-

3-イル) プロパン酸 (CAS 番号: 908846-88-8)

W4OMe 4-メトキシ-L-トリプトファン (CAS 番号: 1205553-56-5)

W4N (S)-2-アミノ-3-(1H-ピロロ[3, 2-β]ピリジン-3-イル) プロパン酸 (CAS 番号: 149818-23-5)

W4F (S)-2-((9H-フルオレン-9-イル)-メトキシ)カルボニル) アミノ)-3-(1-(tert-ブトキシカルボニル)-4-フルオロ-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (CAS 番号: 2244532-65-6)

W4C (S)-2-アミノ-3-(4-クロロ-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (CAS 番号: 2244532-68-9)

W2N (S)-2-アミノ-3-(1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (CAS 番号: 2305185-20-8)

W1iPr 1-イソプロピル-L-トリプトファン (CAS 番号: 1496563-42-8)

W1Et7Cl (S)-2-アミノ-3-(7-クロロ-1-エチル-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (合成例 2-1)

W1Et 1-エチル-L-トリプトファン (CAS 番号: 168471-23-6)

Tbg (S)-2-アミノ-3, 3-ジメチルブタン酸 (CAS 番号: 33105-81-6)

pHPeG N-(4-ヒドロキシフェネチル) グリシン (CAS 番号: 258332-56-8)

PeG N-(2-フェニルエチル)-グリシン (CAS 番号: 540483-58-7)

Nva L-ノルバリン (CAS 番号: 6600-40-4)

Nle N-α-クロロアセチル-L-ノルロイシン (CAS 番号: 688-12-0)

NaI2 β -(2-ナフチル)-L-アラニン (CAS番号: 58438-03-2)

NaI1 β -(1-ナフチル)-L-アラニン (CAS番号: 2353616-32-5)

MeoBph N- α -メチル-2-フェニル-L-フェニルアラニン

MeNaI2 N- α -メチル- β -(2-ナフチル)-L-アラニン (CAS番号: 179385-30-9)

MeNaI1 N- α -メチル- β -(1-ナフチル)-L-アラニン (CAS番号: 1380327-68-3)

MemBph N- α -メチル-3-フェニル-L-フェニルアラニン

Hph L-ホモフェニルアラニン (CAS番号: 943-73-7)

Hly (S)-2,7-ジアミノヘプタン酸 (CAS番号: 498-56-6)

F4OMe (S)-2-アミノ-3-(4-メトキシフェニル)プロパン酸 (CAS番号: 7635-29-2)

F4G (4-グアジニル)-L-フェニルアラニン (CAS番号: 59574-11-7)

F4F 4-フルオロ-L-フェニルアラニン (CAS番号: 1132-68-9)

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)

F3OMe (S)-2-アミノ-3-(3-メトキシフェニル)プロパン酸 (CAS番号: 98813-19-5)

F3F 3-フルオロ-L-フェニルアラニン (CAS番号: 19883-77-3)

F3C N- α -クロロアセチル-3-クロロ-L-フェニルアラニン (CAS番号: 80126-51-8)

F2OMe (S)-2-アミノ-3-(2-メトキシフェニル)プロパ

ン酸 (CAS 番号 : 206060-41-5)

F2C (S) - 2-アミノ-3-(2-クロロフェニル) プロパン酸 (CAS 番号 : 198560-41-7)

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 番号 : 1260595-45-6)

MeF4F N- α -メチル-4-フルオロ-L-フェニルアラニン (CAS 番号 : 1979176-87-8)

MeF3F N- α -メチル-3-フルオロ-L-フェニルアラニン (CAS 番号 : 1820567-10-9)

MeF3C N- α -メチル-3-クロロフルオロ-L-フェニルアラニン (CAS 番号 : 1446478-28-9)

MeBph N- α -メチル-4-フェニル-L-フェニルアラニン

Me4Py N- α -メチル-4-ピリジル-L-アラニン

Me3Py N- α -メチル-3-ピリジル-L-アラニン

dr D-アルギニン

dp D-プロリン

dc D-システイン

dk D-リジン

Dap L- α , β -ジアミノプロピオン酸 (CAS 番号 : 515-94-6)

Dab (S) - 4-アミノ-2-(2-クロロアセトアミド) ブタン酸 (CAS 番号 : 25691-37-6)

Cit 2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸 (CAS 番号 : 627-77-0)

Cha β -シクロヘキシル-L-アラニン (CAS 番号 : 4441-50-3)

GeG N-(2-カルボキシエチル)-グリシン (CAS 番号 : 174799-89-4)

C b g (S) - 2 - アミノ - 2 - シクロブチル酢酸 (CAS 番号 : 1 3 9 1 6 3 0 - 3 1 - 1)

C b a シクロブチルアラニン (CAS 番号 : 4 7 8 1 8 3 - 6 2 - 9)

a M e Y α - メチル - L - チロシン (CAS 番号 : 6 5 8 - 4 8 - 0)

a M e W α - メチル - トリプトファン (CAS 番号 : 1 5 3 - 9 1 - 3)

a M e K α - メチル - リジン (CAS 番号 : 1 1 1 7 1 7 - 2 8 - 3)

a M e C α - メチル - L - システイン (CAS 番号 : 4 4 1 3 1 7 - 7 3 - 3)

A i b α - メチルアラニン (CAS 番号 : 6 2 - 5 7 - 7)

A h p / A l a h p (S) - 2 - アミノヘプタン酸 (CAS 番号 : 1 1 1 5 - 9 0 - 8)

A b u L - α - アミノブタン酸 (CAS 番号 : 1 4 9 2 - 2 4 - 6)

A 4 p a a (S) - 2 - アミノ - 3 - (1 - (カルボキシメチル) ピペラジン - 4 - イル) プロパン酸 (キシダ化学株式会社)

5 l n d (S) - 2 - アミノ - 3 - (1 H - インドール - 5 - イル) プロパン酸 (CAS 番号 : 1 6 5 5 5 1 8 - 6 6 - 3)

4 P y 2 N H 2 (S) - 2 - アミノ - 3 - (2 - アミノピリジン - 4 - イル) プロパン酸 (キシダ化学株式会社)

4 P y 4 - ピリジル - L - アラニン (CAS 番号 : 1 9 5 6 - 2 1 - 4)

3 P y 6 N H 2 2 - アミノ - 3 - (6 - アミノピリジン - 3 - イル) プロパン酸 (合成例 2 - 3)

3 P y 3 - ピリジル - L - アラニン (CAS 番号 : 1 7 4 7 0 - 2 4 - 5)

W 1 a a 1 - (カルボキシメチル) - L - トリプトファン (CAS 番号 : 7 7 3 8 2 3 - 5 0 - 0)

K C O p i p z M e N 6 - (4 - メチルピペラジン - 1 - カルボニル)

－L－リジン（キシダ化学株式会社）

W1mCON 1－（2－アミノ－2－オキソエチル）－L－トリプトファン（合成例2－5）

W1EtOH 1－（2－ヒドロキシエチル）－L－トリプトファン（合成例2－9）

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番号：1270317－99－1）

Epyr12RCOO 2－（（5－（（R）－2－（（アリルオキシ）カルボニル）ピロリジン－1－イル）－5－オキソペンタン酸

Dpyr12RCOO 2－（（4－（（R）－2－（（アリルオキシ）カルボニル）ピロリジン－1－イル）－4－オキソブタン酸（実施例9－16）

MeF3COO 3－カルボキシ－N－メチル－フェニルアラニン（CAS番号：1499826－56－0）

3Imp 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番号：2276942－95－9）

KaAc N6－グリシル－L－リジン（合成例2－8）

A1Me4pip 4－アミノ－1－メチルピペラジン－4－カルボン酸（CAS番号：15580－66－2）

Har N6－カルバミミドイル－L－リシン（CAS番号：156－86－5）

Acpr (S)－2－アミノ－3－シクロプロピルプロパン酸（CAS番号：1492156－90－7）

Atb (S)－2－アミノ－4, 4－ジメチルペンタン酸（CAS番号：1934633－35－8）

MeF35dC (S)－3－（3, 5－ジクロロフェニル）－2－（メチルアミノ）プロパン酸（CAS番号：1542508－65－5）

Adod 12－アミノドデカン酸

H l y L-ホモリジン
W 5 C 5-クロロ-L-トリプトファン
F 3 C O O L-3-カルボキシフェニルアラニン
F 3 C O N L-3-カルバモイルフェニルアラニン
H g l L-2-アミノアジピン酸
N d m N, N-ジメチル-L-アスパラギン
K N 3 もしくは L y s N 3 6-アジド-L-ノルロイシン
K A c N6-アセチル-L-リシン
d o r n D-オルニチン
N l e L-ノルロイシン
F 3 H 3-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン
Y a e O-(2-アミノメチル)-L-チロシン
F 4 a a o O-(2-カルボキシメチル)-L-チロシン
F 4 O E t O-エチル-L-チロシン
F 3 4 d O M e 3, 4-ジメトキシ-L-フェニルアラニン
a l T L-アロスレオニン
a l l L-アロイソロイシン
M e K N-メチル-L-リシン
T b g (S)-2-アミノ-3, 3-ジメチル酪酸
N v a L-ノルバリン
A b u (S)-(+) -2-アミノ酪酸
d a D-アラニン
B p h 4-フェニル-L-フェニルアラニン
d e D-グルタミン酸
M e A N-メチル-L-アラニン
P E G 4 c もしくは P E G 3 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
M e R N-メチル-L-アルギニン

MeW N-メチル-L-トリプトファン

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

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

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。

[0023] 本発明のペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列 (Ala-Val-
-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-S
er-Cys) ; 又は配列番号1に記載のアミノ酸配列中に1以上10以下
のアミノ酸残基の置換, 欠失, 付加及び/又は挿入を有するアミノ酸配列を
有するペプチドである。

[0024] ペプチド配列について

アミノ酸の置換, 欠失, 付加および/又は挿入されたアミノ酸の数は, 1
個以上10個以下であればよく, その下限は1個である。その上限は10個
, 9個, 8個, 7個, 6個, 5個, 4個, 3個, 2個であり, 最小1個であ
る。かかるアミノ酸の置換は, 好適には保存的アミノ酸置換である。

[0025] 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。ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は, 該ペプチ
ドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば, 同様の極性を有する一つ
または二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し, かかるペプチドのアミ
ノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に, あるグループ内の置換は構造およ
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。

[0026] 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、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。

[0027] このペプチドの好ましい例は、以下のグループ：

(I) 配列番号1の1番目のアラニン残基の脂肪族アミノ酸又はメチル化脂肪族アミノ酸への置換；

(II) 配列番号1の2番目のバリン残基の塩基性アミノ酸残基又はメチル化塩基性アミノ酸残基への置換；

(III) 配列番号1の3番目のフェニルアラニン残基の芳香族アミノ酸残基、メチル化芳香族アミノ酸残基、芳香環を付加したアミノ酸残基、又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；

(IV) 配列番号1の4番目のバリン残基のメチル化バリン残基への置換；

(V) 配列番号1の5番目のトリプトファン残基の芳香族アミノ酸残基、メチルトリプトファン残基、メチル化芳香族アミノ酸残基、芳香環を付加したアミノ酸残基、又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；

(VI) 配列番号1の6番目のアスパラギン残基の中性アミノ酸又はメチル

化中性アミノ酸への置換；

(V I I) 配列番号1の7番目及び8番目のチロシン残基の芳香族アミノ酸残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；

(V I I I) 配列番号1の9番目のイソロイシン残基の脂肪族アミノ酸残基，メチル化脂肪族アミノ酸残基，又は分岐鎖構造を有するアミノ酸残基への置換；

(I X) 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；及び

(X) 配列番号1の11番目のセリン残基の中性アミノ酸残基への置換，から選択される1つ以上の置換を有するアミノ酸配列を含む。

[0028] (1) 非極性アミノ酸グループ：アラニン（以下，「A l a」または単に「A」と記す），バリン（以下，「V a l」または単に「V」と記す），ロイシン（以下，「L e u」または単に「L」と記す），イソロイシン（以下，「I l e」または単に「I」と記す），プロリン（以下，「P r o」または単に「P」と記す），フェニルアラニン（「P h e」または単に「F」と記す），トリプトファン（以下，「T r p」または単に「W」と記す），メチオニン（以下，「M e t」または単に「M」と記す）

[0029] (2) 非荷電極性アミノ酸グループ：グリシン（以下，「G l y」または単に「G」と記す），セリン（以下，「S e r」または単に「S」と記す），スレオニン（以下，「T h r」または単に「T」と記す），システイン（以下，「C y s」または単に「C」と記す），チロシン（以下，「T y r」または単に「Y」と記す），アスパラギン（以下，「A s n」または単に「N」と記す），グルタミン（以下，「G l n」または単に「Q」と記す）

[0030] (3) 酸性アミノ酸グループ：アスパラギン酸（以下，「A s p」または単に「D」と記す），グルタミン酸（以下，「G l u」または単に「E」と記す）

[0031] (4) 塩基性アミノ酸グループ：リジン（以下，「L y s」または単に「

K」と記す), アルギニン(以下, 「A r g」または単に「R」と記す),
ヒスチジン(以下, 「H i s」または単に「H」と記す)

また, 天然界に存在するアミノ酸は, その共通する側鎖の性質に基づいて次のようなグループに分けることができる。

- [0032] (1) 疎水性アミノ酸グループ: ノルロイシン (N o r l e u c i n e)
, M e t, A l a, V a l, L e u, I l e
(2) 中性親水性アミノ酸グループ: C y s, S e r, T h r, A s n, G l n
(3) 酸性アミノ酸グループ: A s p, G l u
(4) 塩基性アミノ酸グループ: H i s, L y s, A r g
(5) 主鎖の方角に影響を与えるアミノ酸のグループ: G l y, P r o
(6) 芳香族アミノ酸グループ: T r p, T y r, P h e

なお, 各グループにおいて, N-メチル化されたアミノ酸などの非天然アミノ酸も包含される。

- [0033] このペプチドの好ましい例は, 配列番号2 (A l a - V a l - P h e - V a l - T r p - A s n - T y r - T y r - I l e - I l e - A r g - A r g - T y r - M e T y r - C y s) に記載のアミノ酸配列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, 配列番号2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2の1番目のアラニン残基の脂肪族アミノ酸又はメチル化脂肪族アミノ酸への置換;

(II) 配列番号2の2番目のバリン残基の塩基性アミノ酸残基又はメチル化塩基性アミノ酸残基への置換;

(III) 配列番号2の3番目のフェニルアラニン残基の芳香族アミノ酸残基, メチル化芳香族アミノ酸残基, 芳香環を付加したアミノ酸残基, 又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換;

(IV) 配列番号2の4番目のバリン残基のメチル化バリン残基への置換;

(V) 配列番号2の5番目のトリプトファン残基の芳香族アミノ酸残基, メチル化芳香族アミノ酸残基, 芳香環を付加したアミノ酸残基, 又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換;

(V I) 配列番号2の6番目のアスパラギン残基の中性アミノ酸又はメチル化中性アミノ酸への置換;

(V I I) 配列番号2の7番目及び8番目のチロシン残基の芳香族アミノ酸残基, メチル化芳香族アミノ酸残基, 芳香環を付加したアミノ酸残基, 又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換;

(V I I I) 配列番号2の9番目のイソロイシン残基の脂肪族アミノ酸残基, メチル化脂肪族アミノ酸残基, 又は分岐鎖構造を有するアミノ酸残基への置換;

(I X) 配列番号2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;

(X I) 配列番号2の11番目及び12番目のアルギニン残基の塩基性アミノ酸残基への置換;

(X I I) 配列番号2の13番目のチロシン残基の親水性アミノ酸残基への置換;

(X I I I) 配列番号2の14番目のメチルチロシン残基のチロシン残基, 芳香族アミノ酸残基又はメチル化芳香族アミノ酸残基への置換; 及び

(X I V) 配列番号2の15番目のシステイン残基のメチル化システイン残基への置換,

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。

[0035] このペプチドの好ましい別の例は、ペプチドAを、配列番号18 (A l a - V a l - P h e - V a l - T r p - A s n - T y r - T y r - I l e - I l e - S e r - C y s) の1番目~10番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が10以上17以下のペプチドとすると、

ペプチドA, 又は

ペプチドAにおいて、1以上6以下のアミノ酸残基の置換, 欠失, 及び／

又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0036] 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 (h T f R) に結合できるペプチドである。また、好ましい例は、血液脳関門 (B B B) を通過することができるペプチド、筋組織に指向性を有するペプチド、又は細胞浸透性を有するペプチドである。

[0037] ペプチド A において、配列番号 18 の 2, 3, 5, 8, 及び 10 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もよいアミノ酸残基に置換されたことを意味する。

[0038] ペプチド A において、

配列番号 18 の 2 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいバリン (V a l) 又は修飾されてもよいグルタミン酸 (G l u) であり、

配列番号 18 の 3 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン (P h e) であり、

配列番号 18 の 5 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン (T r p) であり、

配列番号 18 の 8 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (T y r) であり、

配列番号 18 の 10 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいイソロイシン (I l e) 又は修飾されてもよいバリン (V a l) であるペプチドであってもよい。

[0039] 「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、後述する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。

[0040] このペプチドは、ペプチド長が 11 以上 13 以下であることが好ましい。

[0041] このペプチドは、さらに好ましくは、以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号 18 の 2 番目のアミノ酸残基が、V a l 又は G l u であり、

配列番号 18 の 3 番目のアミノ酸残基が、P h e 又は M e F 3 C であり

、

配列番号 18 の 5 番目のアミノ酸残基が、T r p 又は M e T r p であり

、

配列番号 18 の 8 番目のアミノ酸残基が、T y r 又は F 4 O M e であり

、

配列番号 18 の 10 番目のアミノ酸残基が、I l e 又は V a l であるペプチドであってもよい。

[0042] さらにこのペプチドは、ペプチド A の N 末端に以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号 18 の 11 番目のアミノ酸残基が、S e r 又は H i s であり、

配列番号 18 の 12 番目のアミノ酸残基が、C y s 又は H g l であるペプチドであってもよい。

[0043] このペプチドの好ましい別の例は、ペプチド B を、配列番号 15 (A l a - V a l - P h e - V a l - T r p - A s n - T y r - T y r - I l e - V a l - P r o - A r g - A s p - C y s) の 1 番目～10 番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が 10 以上 19 以下のペプチドとすると、

ペプチド B、又は

ペプチド B において、1 以上 5 以下のアミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0044] ペプチド B において、配列番号 15 の 2, 3, 5, 8, 及び 10 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。

[0045] ペプチド B において、

配列番号15の2番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいバリン (V a l) 又は修飾されてもよいグルタミン酸 (G l u) であり、

配列番号15の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン (P h e) 又はトリプトファン (T r p) であり、

配列番号15の5番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン (T r p) であり、

配列番号15の8番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (T y r) であり、

配列番号15の10番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいイソロイシン (I l e) 又は修飾されてもよいバリン (V a l) であるペプチドでもよい。

[0046] これらのペプチドは、ペプチド長が13以上15以下であってもよい。

[0047] このペプチドは、さらに好ましくは、以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号15の2番目のアミノ酸残基が、V a l 又はG l u であり、

配列番号15の3番目のアミノ酸残基が、P h e、T r p 又はM e F 3 C であり、

配列番号15の5番目のアミノ酸残基が、T r p 又はM e T r p であり、

配列番号15の8番目のアミノ酸残基が、T y r、P h e 又はF 4 O M e であり、

配列番号15の10番目のアミノ酸残基が、I l e 又はV a l であるペプチドでもよい。

[0048] さらにこのペプチドは、ペプチドBのN末端に以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号15の11番目のアミノ酸残基が、P h e であり、

配列番号15の12番目のアミノ酸残基が、A r g であり、

配列番号15の13番目のアミノ酸残基が、G l u、A s n、A s p、

H i s, G l n又はMe T r pであり,

配列番号15の14番目のアミノ酸残基が, C y sであるペプチドであってもよい。

[0049] このペプチドの好ましい別の例は, ペプチドCを, 配列番号214 (Me A - V a l - Me F 3 C - V a l - Me W - A s n - T y r - F 4 O Me - I l e - I l e - A r g - A r g - P h e - Me Y - C y s) の1番目~10番目に記載のアミノ酸配列を含む, ペプチド長が11以上19以下のペプチドとすると,

ペプチドC, 又は

ペプチドCにおいて, 1以上5以下のアミノ酸残基の置換, 欠失, 及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0050] ペプチドCにおいて, 配列番号214の1, 3, 5, 及び8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。

[0051] ペプチドCにおいて,

配列番号214の1番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいアラニン (A l a) 又は修飾されてもよいグルタミン酸 (G l u) であり,

配列番号214の3番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいフェニルアラニン (P h e) であり,

配列番号214の5番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいトリプトファン (T r p) であり,

配列番号214の8番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいフェニルアラニン (P h e) であるペプチドでもよい。

[0052] これらのペプチドは, ペプチド長が15以上18以下であることが好ましい。

[0053] このペプチドは, さらに好ましくは, 以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号214の1番目のアミノ酸残基が, A l a、A i b、A b u、G l u、G l y、S e r、P h e、P r o又はMe Aであり, 特に好ましく

はA l a又はMe Aであり、

配列番号214の3番目のアミノ酸残基が、P h e、F 3 C、F 2 C、F 2 OMe、F 4 C、C h a、Me F、Me F 3 5 d C、Me F 4 F、Me F 4 Ome、Me N a l 1、Me 3 P y、Me 4 P y、Me 3 OMe、Me F 3 C O O、Me F 3 F、G l u、E p y r l 2 R C O O、D p y r l 2 R C O O又はMe F 3 Cであり、特に好ましくはP h e、Me F又はMe F 3 Cであり、

配列番号214の5番目のアミノ酸残基が、T r p、Me W、a Me W、d p、F 3 C、F 3 F、F 3 OMe、F 4 C、F 4 F、H p h、Me m B p h、Me N a l 1、Me N a l 2、Me o B p h、W 4 OMe、W 1 E t、W 1 E t 7 C l、W 1 i P r、Y p h、W 1 P r、W 5 C、W 5 F、W 1 a a、W 1 E t O H、W 4 OMe、W 1 m C O N又はW 6 Fであり、特に好ましくはT r p、Me Wであり、

配列番号214の8番目のアミノ酸残基が、P h e、T y r、T y p、A h p、Me Y、F 4 OMe、3 l m p、4 P y、3 P y、3 P y 6 OMe、F 3 C、F 3 C O N、F 4 C、F 4 a a o、F 4 F、F 4 O E t、Me F 3 4 d OMe、Y a e、L y s、O r n、又はN a l 1であり、特に好ましくはT y r又はF 4 OMeであるペプチドであってもよい。

[0054] さらにこのペプチドは、ペプチドCのN末端に以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号214の11番目のアミノ酸残基が、A r g、A l a、A s p、G l y、G l u、L y s、Me K、Me R、D a p、D a p、A b u、A i b、H l y、d o r n、a Me K、A 1 Me 4 p i p、K C O p i p z M e、F 4 G、N l e、N v a又はO r nであり、特に好ましくはL y s又はA r gであり、

配列番号214の12番目のアミノ酸残基が、L y s、A r g、d r、T y r、F 4 G、O r n、H l y、d a、C i t、D a p又はD a bであり、特に好ましくはL y s、A r g又はd rであり、

配列番号214の13番目のアミノ酸残基が、Ala、Phe、Asn、Tyr、又はpHPeGであり、特に好ましくはPhe又はTyrであり、

配列番号214の14番目のアミノ酸残基が、MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBph、MeBph、MeF、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeoBph、MeW又はpHPeG、特に好ましくはPhe又はMeWであり、

配列番号214の15番目のアミノ酸残基が、Cys又はHglであるペプチドであってもよい。

[0055] このペプチドの好ましい別の例は、ペプチドDを、配列番号219 (Ala-Glu-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys) の1番目～10番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が11以上19以下のペプチドとすると、

ペプチドD、又は

ペプチドDにおいて、1以上5以下のアミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0056] ペプチドDにおいて、配列番号219の2、3、5、8、及び10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。

[0057] ペプチドDにおいて、配列番号219の2番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいバリン (Val)、修飾されてもよいグルタミン酸 (Glu)、修飾されてもよいアルギニン (Arg)、修飾されてもよいリジン (Lys)、修飾されてもよいアスパラギン酸 (Asp)、又は修飾されてもよいフェニルアラニン (Phe) であり、

配列番号219の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニル

アラニン (P h e) であり、

配列番号 2 1 9 の 5 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン (T r p) であり、

配列番号 2 1 9 の 8 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (T y r) であり、

配列番号 2 1 9 の 1 0 番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいイソロイシン (I l e) 、修飾されてもよいグルタミン酸 (G l u) 又は修飾されてもよいリジン (L y s) であるペプチドでもよい。

[0058] これらのペプチドは、ペプチド長が 1 5 以上 1 8 以下であることが好ましい。

[0059] このペプチドは、さらに好ましくは、以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号 2 1 9 の 2 番目のアミノ酸残基が、V a l 、G l u 、A l a 、A r g 、L y s 、A s p 、P h e 、D a p 、H a r 、A b u 、N v a 、A c P r 、A t b A h p 又は H g l であり、特に好ましくは G l n 又は V a l であり、

配列番号 2 1 9 の 3 番目のアミノ酸残基が、3 番目のアミノ酸残基が、P h e 、F 3 C 、F 2 C 、F 2 O M e 、F 4 C 、C h a 、M e F 、M e F 3 5 d C 、M e F 4 F 、M e F 4 O m e 、M e N a l 1 、M e 3 P y 、M e 4 P y 、M e 3 O M e 、M e F 3 C O O 、M e F 3 F 、G l u 、E p y r l 2 R C O O 、D p y r l 2 R C O O 又は M e F 3 C であり、特に好ましくは P h e 、M e F 又は M e F 3 C であり、

配列番号 2 1 9 の 5 番目のアミノ酸残基が、T r p 、M e W 、a M e W 、d p 、F 3 C 、F 3 F 、F 3 O M e 、F 4 C 、F 4 F 、H p h 、M e m B p h 、M e N a l 1 、M e N a l 2 、M e o B p h 、W 4 O M e 、W 1 E t 、W 1 E t 7 C l 、W 1 i P r 、Y p h 、W 1 P r 、W 5 C 、W 5 F 、W 1 a a 、W 1 E t O H 、W 4 O M e 、W 1 m C O N 又は W 6 F であり、特に好ましくは T r p 、M e W であり、

配列番号219の8番目のアミノ酸残基が、Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aao、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn、又はNa11であり、特に好ましくはTyr又はF4OMeであり、

配列番号219の10番目のアミノ酸残基が、Ala、Abu、Acp、Ahp、Aib、all、alT、Atb、Dab、Dap、dorn、Gln、Hly、Ile、Lys、KCOpipzMe、Leu、Nle、Nva、Pro、Arg、Ser、Thr、Tbg、Val又はTyrであり、特に好ましくはIle又はallであるペプチドであってもよい。

[0060] さらにこのペプチドは、ペプチドCのN末端に以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号219の11番目のアミノ酸残基が、Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva又はOrnであり、特に好ましくはLys又はArgであり、

配列番号219の12番目のアミノ酸残基が、Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap又はDabであり、特に好ましくはLys、Arg又はdrであり、

配列番号219の13番目のアミノ酸残基が、Ala、Phe、Asn、Tyr、又はpHPeGであり、特に好ましくはPhe又はTyrであり、

配列番号219の14番目のアミノ酸残基が、MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeoBph、MeW又はpHPeG、特に好ましくはPhe又はMeWであり、

配列番号219の15番目のアミノ酸残基が、Cys又はHglであるペプチドであってもよい。

[0061] このペプチドの好ましい別の例は、ペプチドEを、配列番号296 (Ala-Val-MeF-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys) の1番目~15番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が15以上18以下のペプチドとすると、

ペプチドE、又は

ペプチドEにおいて、1以上5以下のアミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。

[0062] ペプチドEにおいて、配列番号296の3、5、7、8、11、12、13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。

[0063] ペプチドEにおいて、

配列番号296の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン (Phe) であり、

配列番号296の5番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン (Trp) であり、

配列番号296の7番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (Tyr) であり、

配列番号296の8番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (Tyr) であり、

配列番号296の11番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいアルギニン (Arg) 又は、修飾されてもよいアラニン (Ala) であり、

配列番号296の12番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいアルギニン (Arg) 又は修飾されてもよいリジン (Lys) であり、

配列番号296の13番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (Tyr) 又は修飾されてもよいフェニルアラニン (Phe) のいずれか

であるペプチドでもよい。

[0064] また、ペプチドEにおいて、

配列番号296の3番目のアミノ酸残基が、3番目のアミノ酸残基が、Phe、F3C、F2C、F2OMe、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF4OMe、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me3OMe、MeF3COO、MeF3F、Glu、Epyr12RCOO、Dpyr12RCOO又はMeF3Cであり、特に好ましくはPhe、MeF又はMeF3Cであり、

配列番号296の5番目のアミノ酸残基が、Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON又はW6Fであり、特に好ましくはTrp、MeWであり、

配列番号296の7番目のアミノ酸残基が、Tyr、3Py6OMe、Ala、Ahp、Phe、F3H、F4C、Nal1、Arg又はTrpであり、特に好ましくはTyrであり、

配列番号296の8番目のアミノ酸残基が、Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aao、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn、又はNal1であり、特に好ましくはTyr又はF4OMeであり、

配列番号296の11番目のアミノ酸残基が、Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva又はOrnであり、特に好ましくはLys又はArgであり、

配列番号296の12番目のアミノ酸残基が、Lys、Arg、dr、

Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap又はDabであり、特に好ましくはLys、Arg又はdrであり、

配列番号296の13番目のアミノ酸残基が、Ala、Phe、Asn、Tyr、又はpHPeGであり、特に好ましくはPhe又はTyrであるペプチドであってもよい。

[0065] さらにこのペプチドは、ペプチドCのN末端に以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

配列番号296の11番目のアミノ酸残基が、Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva又はOrnであり、特に好ましくはLys又はArgであり、

配列番号296の12番目のアミノ酸残基が、Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap又はDabであり、特に好ましくはLys、Arg又はdrであり、

配列番号296の13番目のアミノ酸残基が、Ala、Phe、Asn、Tyr、又はpHPeGであり、特に好ましくはPhe又はTyrであり、

配列番号214の14番目のアミノ酸残基が、MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeoBph、MeW又はpHPeG、特に好ましくはPhe又はMeWであり、

配列番号296の15番目のアミノ酸残基が、Cys又はHglであるペプチドであってもよい。

[0066] さらに、ペプチドEにおいて、

配列番号296の3番目のアミノ酸残基が、フェニルアラニン（Phe）、メチル化フェニルアラニン（MeF）、又はN- α -メチル-N- α -

クロロアセチル-3-クロロ-L-フェニルアラニン (Me F 3 C) であり

,

配列番号 296 の 5 番目のアミノ酸残基が、トリプトファン (Trp) 又はメチル化トリプトファン (Me W) であり、

配列番号 296 の 7 番目のアミノ酸残基が、チロシン (Ty r) であり

,

配列番号 296 の 8 番目のアミノ酸残基が、チロシン (Ty r) 又は (S) - 2 - アミノ - 3 - (4 - メトキシフェニル) プロパン酸 (F 4 O M e) であり、

配列番号 296 の 11 番目のアミノ酸残基が、アルギニン (Ar g) 又はリジン (Ly s) であり、

配列番号 296 の 12 番目のアミノ酸残基が、アルギニン (Ar g) 又は D - アルギニン (d r) であり、

配列番号 296 の 13 番目のアミノ酸残基が、チロシン (Ty r) 又はフェニルアラニン (Ph e) であるペプチドでもよい。

[0067] このペプチドの好ましい例は、配列番号 3 ~ 200 のいずれかのアミノ酸配列からなるか、配列番号 3 ~ 200 のいずれかのアミノ酸配列において N 末端がクロロアセチル-Al a であるアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0068] 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。

[0069] このペプチドの好ましい例は、配列番号 1 ~ 552 のいずれかに記載のアミノ酸配列又はアミノ酸配列とリンカーの複合体の、1 番目から 10 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。

[0070] このペプチドの特に好ましい例は、配列番号 2, 9, 21 ~ 148、159 ~ 200、213 ~ 448、450 ~ 552 のいずれかに記載のアミノ酸配列又はアミノ酸配列とリンカーの複合体における、1 番目から 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、ペプチドである。

[0071] 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、ペプチドを環状化させるという方法がとられてきた。ペプチドを環状化すると、プロテアーゼ耐性が向上し代謝安定性が向上し、またコンフォメーション変化にも制限が加わるため、剛直性が増して膜透過性や標的タンパク質との親和性が向上することが示唆されてきた。

[0072] 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))の従い、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状化できる。これにより、翻訳後に自発的にメルカプト基がクロロアセチル基に求核攻撃し、ペプチドがチオエーテル結合により環状化する。遺伝暗号のリプログラミング技術により、結合して環状を形成するその他のアミノ酸の組合せをペプチド内に配置して環状化してもよい。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H g l 残基を配置しておくことによっても環状化できる。このように、公知の環状化方法であれば特に制限されず行うことができる。

[0073] 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。

[0074] 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。好ましくはアミノ酸が6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、11 以上であり、好ましくはアミノ酸が19 以下、18 以下、17 以下、16 以下、15 以下である。

[0075] この明細書に記載されるある発明は、コンジュゲート（複合体）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。少なくとも物質が血液脳関門を通過可能である複合体であることが好ましい。複合体全体として血液脳関門を通過可能であってもよい。複合体は、筋組織に指向性を有することが好ましい。複合体は、少なくとも物質を筋組織へ運搬できるものであることが好ましい。複合体は、細胞浸透性を有することが好ましい。この複合体は、少なくとも物質を細胞へ運搬できるものであることが好ましい。

[0076] 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（G l y）又はセリン（S e r）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（C y s）又は修飾されてもよいリジン（L y s）である。

[0077] 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（d e）及びメチル化グリシン（M e G）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（C

y s) 又は修飾されてもよいリジン (L y s) である、複合体。

[0078] リンカーの別の例は、ポリエチレングリコール (P E G) 又はポリエチレングリコールの誘導体を含む P E G リンカーである。ポリエチレングリコールの誘導体は、P E G リンカーとして公知であるすべてのものを含む。

P E G リンカーが、グリシン (G l y), セリン (S e r), グルタミン酸 (G l u), アルギニン (A r g), 又はリジン (L y s) をさらに含むものが好ましい。

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 (C y s) 又は修飾されてもよいリジン (L y s) である、複合体。

[0079] リンカーの別の例は、リンカーが、配列番号 2 0 1, 5 5 3 ~ 6 4 4 のいずれかによって示される配列を有するリンカーである。

[0080] この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 (P E G),

G l y 又は M e G からなるペプチドリンカーである G リンカー, G l y 又は M e G と S e r からなるペプチドリンカーである G S リンカー,

又は、配列番号 2 0 1, 5 5 3 ~ 6 4 4 のいずれかで示される、アミノ酸配列を有するリンカーのものである。

[0081] 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と、脳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。例えば、配列番号 6 1 6 や配列表 6 2 7 などに示される、P E G 及びアミノ酸残基又はペプチド部分をどちらも有するリンカー構造であってよい。

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。

[0082] 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レンおよび／または置換または非置換ヘテロアリレンを含む。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（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。

[0083] 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。

[0084] 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良い。

[0085] 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、セリンーリッチペプチドリンカーを用いる。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。

[0086] この明細書に記載されるある発明は、脳関連疾患の予防又は治療剤に関する。この脳関連疾患の予防又は治療剤は、上記した複合体を含み、上記した物質が、有効成分である。

[0087] 物質は、脳に送達する物質である。物質は、脳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。ただし、BBBの通過はトランスフェリンレセプターに結合しエンドサイトーシス、トランスサイトーシス等の機構によるため、それら機構では運搬できないような大きすぎる物質は好ましくない。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。

及び、上記に挙げたそれらの複合体であってよい。

[0088] この明細書に記載されるある発明は、脳関連疾患の予防又は治療剤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、脳関連疾患の予防又は治療剤の製造方法である。

[0089] 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、
又は、配列番号201、553～644のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するリンカーである。

[0090] この明細書に記載されるある発明は、上記した複合体を含む、脳関連疾患の診断薬に関する。

[0091] この明細書に記載されるある発明は、上記した複合体を含む神経筋疾患の予防又は治療剤である。この場合、物質が、神経筋疾患の予防又は治療剤における有効成分である。この明細書に記載されるある発明は、上記した複合体を含む。この明細書に記載されるある発明は、上記した複合体を含む、神経筋疾患の診断薬に関する。

[0092] 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。

[0093] 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 (D I P C D I) 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。

[0094] 固相合成のレジンとしては、M e r r i f i e l d r e s i n, M B H A r e s i n, C l - T r t r e s i n, S A S R I N r e s i n, W a n g r e s i n, R i n k a m i d e r e s i n, H M F S r e s i n, A m i n o - P E G A r e s i n (メルク社), H M P A - P E G A r e s i n (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 (C b z 又は Z) 基, t e r t -ブトキシカルボニル (B o c) 基, フルオレニルメトキシカルボニル (F m o c) 基, ベンジル基, アリル基, アリルオキシカルボニル (A l l o c) 基等が挙げられる。

C b z 基はフッ化水素酸, 水素化等によって脱保護でき, B o c 基はトリフルオロ酢酸 (T F A) により脱保護でき, F m o c 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, t e r t -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。

[0095] カルボキシ基の活性化は、縮合剤を用いて行うことができる。縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDCあるいはWSC)、(1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (BOP)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチル]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU) 等が挙げられる。

[0096] 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。

[0097] 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たり、できたペプチド鎖を酵素などで切り出すためのアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んでもよい。

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。

[0098] 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，YEp，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。

[0099] プロモータは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、SV40（simian virus 40）由来プロモータ，CMV（cytomegalovirus）由来プロモータを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、trpプロモータ，T7プロモータ，lacプロモータ等を用いることができる。

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。

[0100] 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。

- [0101] 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。

- [0102] 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、アミノ酸、rRNA、GTP、ATP、翻訳開始因子（IF）伸長因子（EF）、終結因子（RF）、及びリボソーム再生因子（RRF）、並びに翻訳に必要なその他の因子を含む。発現効率を高くするために大腸菌抽出液や小麦胚芽抽出液加えてもよい。他に、ウサギ赤血球抽出液や昆虫細胞抽出液を加えてもよい。

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、小麦胚芽抽出液を用いた系としてはゾイジーン社

やセルフリーサイエンス社のもの等を使用できる。

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。

[0103] 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。

[0104] 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、上述した環状化に必要な非天然アミノ酸もこの方法により、結合ペプチドに導入することができる。

[0105] 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。

[0106] 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末端カルボキシル基またはFmocで保護されたアミノ酸のC末端カルボキシル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。

[0107] 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 I合成機を使用することで実施できる。

[0108] 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。

[0109] 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）を含む。この医薬は、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。

[0110] 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。

[0111] 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、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）。

[0112] 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рил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。

[0113] 丸剤又は錠剤は、糖衣、胃溶性、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。

[0114] 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。

[0115] 本発明のペプチドを用いた脳関連疾患の予防又は治療方法は、上記医薬組成物にかかる記載を参照して実施することができる。

[0116] 上記した複合体を含む神経筋疾患の予防又は治療剤は、上記医薬組成物を用いればよい。

[0117] この明細書に開示される別の実施態様は、脳関連疾患検出薬に関する。この脳関連疾患検出薬は、上記したペプチド、その塩又はその溶媒和物を含む。

[0118] 脳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脳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、脳関連疾患に関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

、脳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、脳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' - di amino benzidine (DAB), 3, 3', 5, 5' - tetramethyl benzidine (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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] この明細書に開示される別の実施態様は、上記した脳関連疾患検出薬を含む脳関連疾患検出用キットや、脳関連疾患、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。

- [0122] この明細書は、脳関連疾患の予防又は治療のための医薬を製造するための、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。
- [0123] また、この明細書は、神経筋疾患の予防又は治療のための医薬を製造するための、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。
- [0124] 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、脳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。
- [0125] 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、脳関連疾患の予防又は治療方法をも提供する。
- [0126] 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：
- 9-フルオレニルメチルオキシカルボニルとして Fmoc；
 - 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールとして HOAt；
 - O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-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；
 - アセトニトリルとして MeCN；
 - 1, 8-ジアザビシクロ「5. 4. 0」-7-ウンデセンとして DBU；
 - N, N-ジイソプロピルエチルアミンとして DIPEA；
 - 3, 6-ジオキサー-1, 8-オクタジチオールとして DODT；
 - ジメチルスルフォキシドとして DMSO；
 - N, N-ジメチルホルムアミドとして DMF；
 - モノメチルトリチルとして Mtt；

モノメトキシトリチルとしてMmt ;
 2-ニトロベンゼンスルホンイルとしてo-Ns ;
 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 ;
 トリチルとしてTrt
 ミリリットル（単位）としてmL ;
 モーラー（単位）としてM ;
 volume / volume としてv / v ;
 12-アミノドデカン酸としてAdod。

実施例 1

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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-HydPro(tBu)-OH ;
 Fmoc-Cys(Trt)-OH ; Fmoc-Lys(Mtt)-OH ; Fmoc-Ser(tBu)-OH ; Fmoc-

N-Me-Ser(tBu)-OH 。

- [0130] 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（0.5M）、3等量のHOAtのDMF溶液（0.5M）を加え室温にて40分振盪することにより行った。
- [0131] 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（9000rpm、3min）、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。
- [0132] ペプチドの環化反応は、ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5mMとなるようにDMSOに溶解後、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。
- [0133] 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-positiveのスキャンモードで得られるマススペクトルと目的物の分子式より計算される多価イオンを含むマススペクトルが使用した質量分析

器の誤差範囲で一致しているのを確認した。なお、使用したカラムを含む精製条件はそれぞれの実施例に示した。

[0134] 本発明において化学合成されたペプチドの純度は、以下のいずれかの分析方法で決定した。

(分析条件)

分析条件A

カラム ; CORTECS (登録商標) UPLC (登録商標) C18 column (日本ウォーターズ社)、90 Å、1.6 μm、2.1 × 100 mm

移動相 : 0.025% TFA in MeCN / 0.025% TFA in H₂O

温度 : 40 °C

グラジエント : 5-95% MeCN / 0.025% TFA in H₂O in 5.56 min ; linear gradient

流量 0.4 mL / min

検出法 : UV 220 nm

[0135] 分析条件B

カラム ; Kinetex EVO C18 2.6 μm、2.1 ID × 150 mm、100 Å (Phenomenex社)

カラム温度 : 60 °C

移動相A : 0.025% TFA in H₂O

移動相B : 0.025% TFA in CH₃CN

グラジエント : 各実施例に記載

流速 : 0.25 mL / min

検出 : PDA (225 nm)

[0136] 化学合成されたペプチドの構造決定は、目的配列に従って用いたアミノ酸と必要に応じて用いたビルディングブロックを考慮し計算された分子量を、質量スペクトル分析法におけるESI-MS (+)により確認した。なお、”

ESI-MS (+) ”とは、正イオンモードで実施したエレクトロスプレーイオン化質量スペクトル分析法を示す。検出された質量は “m/z” 単位表記によって報告された。なお、分子量がおおよそ1000より大きい化合物は、2価イオンまたは3価イオンとして高頻度で検出された。

[0137] h T f Rに結合する特殊環状ペプチドの化学合成

国際公開WO2014/119600号、国際公開 WO2012/033154号、又は国際公開 WO2007/066627号に記載されているスクリーニング方法で、h T f R結合ペプチドを同定した。当該ペプチドが実際にh T f Rに対する結合活性を持つかどうかを確認する目的で、化学合成した。合成したペプチドの配列を、表1に示す。

[0138]

[表1]

Patent ID	名称		Seq																	KD	ESI (m/z)	[M+X]H ⁺
2	JCR_hTRR_000894	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	A	2083.9	2			
3	JCR_hTRR_100022	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Arg	Phe	Gly	Thr	Gly	Cys	A	2051.2	2	
4	JCR_hTRR_100025	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Arg	Asn	Val	Pro	Asn	Cys	A	2055.8	2	
5	JCR_hTRR_000809	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Pro	Arg	MeHis	Cys	A	2220.4	3	
6	JCR_hTRR_000837	Ala	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Phe	Ile	Ile	Pro	Arg	His	Cys				A	1844.7	2	
7	JCR_hTRR_000895	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeTyr	Cys	A	2270.1	2	
8	JCR_hTRR_000812	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeHis	Cys	A	2245.6	3	
9	JCR_hTRR_000890	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Cys			A	2005.9	2	
10	JCR_hTRR_100014	Ala	Ser	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asn	Arg	Trp	Ala	Cys	B	2117.6	2	
11	JCR_hTRR_100019	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	Glu	Cys				A	1799.7	2	
12	JCR_hTRR_000687	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	Asn	Cys				A	1784.7	2	
13	JCR_hTRR_100017	Ala	Asn	Ser	Arg	Thr	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Thr	Arg	Cys	B	2172.0	2	
14	JCR_hTRR_000896	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Pro	Arg	MeTyr	Cys	B	2245.2	2	
15	JCR_hTRR_000692	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys				B	1785.8	2	
16	JCR_hTRR_100003	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	His	Cys						B	1554.6	2	
17	JCR_hTRR_100016	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	MeTrp	Cys				A	1870.9	2	
18	JCR_hTRR_000554	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Ser	Cys						B	1504.4	2	
19	JCR_hTRR_000109	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Ser	Cys						B	1519.2	2	
20	JCR_hTRR_000569	Ala	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asn	Cys						B	1584.4	2	

[0139] Sieber amide resin (渡辺化学、0.6 mmol/g、0.33 g) を用い、前述の一般的方法にしたがって、Fmoc 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。縮合反応は75℃で10分間反応させることを基本条件とした。脱Fmoc化は20% piperidine in DMF中、75℃で3分間反応させることを基本条件とした。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、5等量のクロロ酢酸のDMF溶液(0.2M)、5等量のHATUのDMF溶液(0.5M)、10等量のDIPEAのDMF溶液(1M)を加え室温にて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、塩化メチレンで3回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(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)に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(10000rpm、1min)、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、得られた固体を乾燥し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5mM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時間攪拌した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

[0140] 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 μ m (登録商標) 50 $\times$ 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); 3分間かけて5

－30%、その後8分間かけて30－35%、その後1分かけて35－60%：流量120mL/min）。

[0141] 得られた目的物は、前述の分析条件A又は分析条件B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に示す。

実施例 2

[0142] 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。

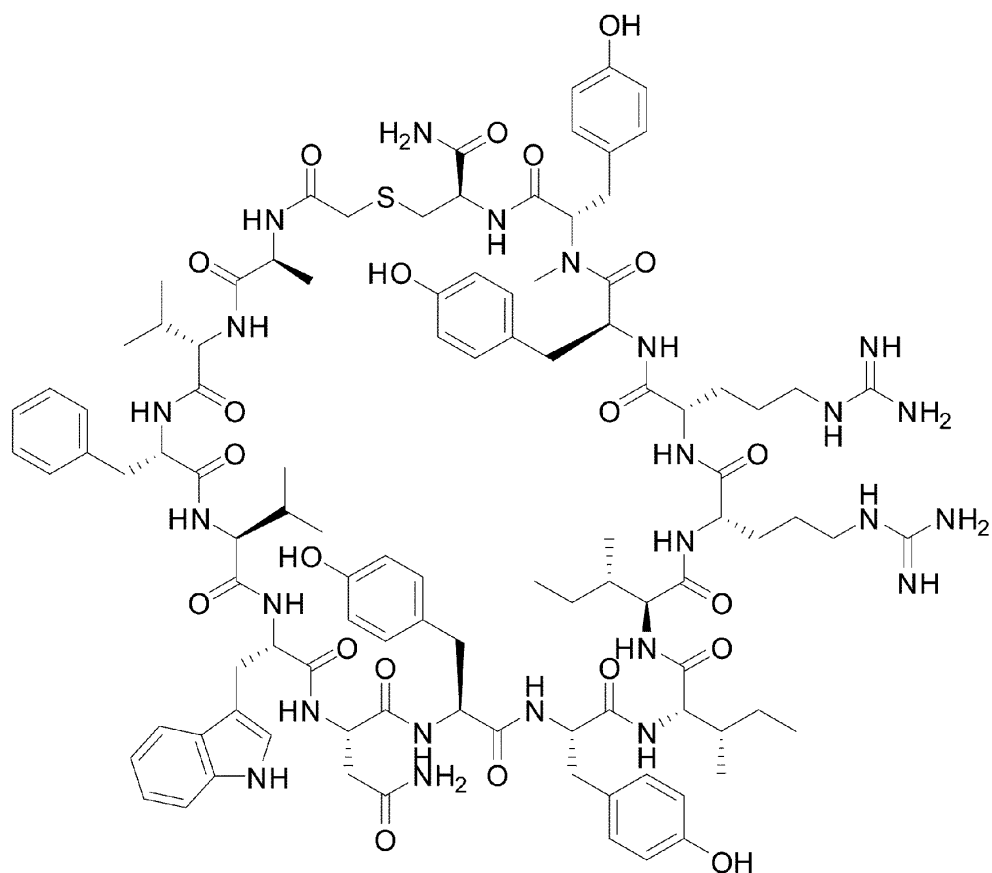
[0143] [SPR測定]

Biacore T200（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）にNTAセンサーチップ（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を挿入し、ランニング緩衝液：10mM HEPES pH8.0（ナカライテスク株式会社）、150mM 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（富士フイルム 和光純薬株式会社）でプライム操作を3回実施し、流速30μL/minで平衡化した。350mM EDTA溶液を流速10μL/minで60秒反応させ、0.5mM NiCl₂溶液（キンダ化学）を流速10μL/minで60秒反応させた後、3mM EDTA溶液（ナカライテスク株式会社）を流速10μL/minで60秒間、NTAセンサーチップを洗浄した。60mM EDC溶液（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）、650mM NHS溶液（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を各々50μLずつ混合させた後、流速10μL/minで420秒反応させた。ランニ

ング緩衝液で希釈して $3.2\ \mu\text{M}$ hTfR溶液 $150\ \mu\text{L}$ 調製し、流速 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ で600秒反応させNTAセンサーチップにhTfRを固定化した。固定化後、 $1.0\ \text{M}$ エタノールアミン水溶液（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を流速 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ で420秒反応させキャッピングを行った。DMSO溶液中で $10\ \text{mM}$ 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、 $100\ \text{nM}$ 、 $50\ \text{nM}$ 、 $25\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $5\ \text{nM}$ 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。カイネティックス評価モデルは、Single Cycle Kineticsとし、Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を使用してカーブフィッティングを行った。得られたセンサーグラムに対して、最小二乗法によるカーブフィッティングを実施し、そのKD値を求めることでペプチドのhTfRに対する結合を評価した。このようにして求めたKD値について、KD値が $1\ \text{nM}$ 未満の場合はA、 $1\ \text{nM}$ 以上 $100\ \text{nM}$ 未満の場合はB、 $100\ \text{nM}$ 以上 $1\ \mu\text{M}$ 未満の場合はC、 $1\ \mu\text{M}$ 以上の場合はDと表記して、表1に示す。結果として、hTfR No. 894及びそれと類似したアミノ酸配列を持つ環状ペプチドについて、顕著なhTfRとの結合能があることが示された。hTfR No. 894の化学構造は以下のとおりである。

[0144]

[化1]

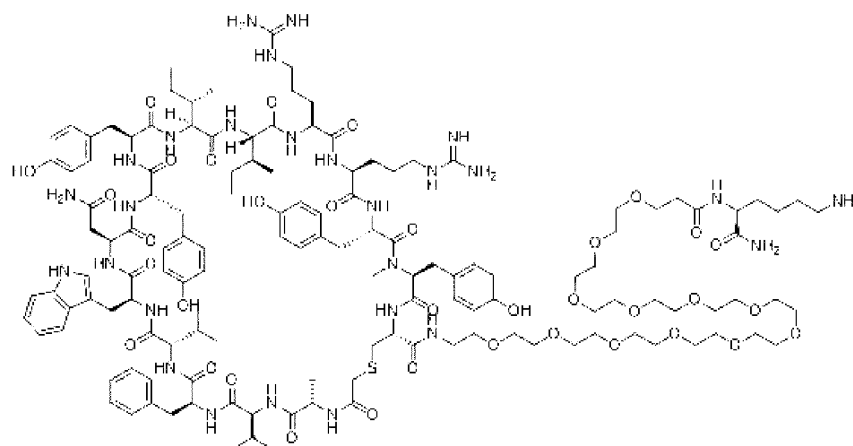


実施例 3

[0145] hTfR結合ペプチド-PEG11-Vivotag750コンジュゲート (hTfRNo. 894-vivotag750) の合成

hTfRNo. 894について、ペイロードとして近赤外蛍光標識物質であるVivotag750 (VivoTag-S (商標) 750、パーキンエルマー社) をPEG11リンカーを介して結合させた化合物を合成した (hTfRNo. 894-vivotag750、又はhTfR_000894__PEG11__ (VivoTag) と示す) (配列番号146)。hTfR結合ペプチド-PEG11の化学構造は以下のとおりであり、当該化合物にVivo-tag750を結合させることで表記の化合物を合成した。詳細については以下に記す。

[化2]

[0146] h T f R N o . 8 9 4 - P E G 1 1 - v i v o t a g 7 5 0 の合成

化学合成は以下の通り行った；

Fmoc-NH-SAL-PEG-resin 1500-2000Da (渡辺化学、0.38mmol/g)を用い、一般的方法にしたがって、Fmoc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行った。縮合反応は縮合剤にHATUを用い75℃で10分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、11残基目、12残基目は25℃で20分間2回繰り返し反応を行った。13残基目、14残基目は75℃で10分間2回繰り返し反応を行った。15残基目は25℃で20分間1回反応を行った。16残基目は25℃で60分1回反応を行った。また、Fmo

c除去は20% p i p e r i d i n eのDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、13残基目、15残基目に関してはF m o c除去は25℃で5分間反応させた後、10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樹脂に対し、5等量のクロロ酢酸のDMF溶液(0.2 M)、5等量のH A T UのDMF溶液(0.5 M)、10等量のD I P E AのDMF溶液(1 M)を固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。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 (T F A / H₂O / T I S / D O D T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とヘキサンの混溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(10000 r p m、1 m i n)、上澄みをデカンテーションした。得られた固体を氷冷したジエチルエーテルにて洗浄後、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 m M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、室温で終夜振盪した後、S a v a n t E x p l o r e r S p e e d V a cで減圧濃縮した後、逆相H P L Cで精製した。得られたペプチド(26.1 m g、9.30 u m o l)をDMSO / H₂O (9 / 1)に溶解し、0.91等量のV i v o T a g - N H S、4.5等量のD I E Aを加え45分攪拌した。反応溶液にA c O Hを加えクエンチした。

[0147] 得られた反応液は以下の条件を用いて精製した(カラム; X S e l e c t C S H C 18 5 u m 10 x 150 m m (L o t N o. 147 i 362781) : 移動相; A = 0.1% T F A i n H₂O、B = 0.1% T F A i n M e C N : 温度 40℃ : グラジエント(%B) ; 3分間かけて

7-32%、その後8分間かけて32-37%、その後1分かけて37-60%：流量5 mL/min）。

[0148] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し97.1%であった。

分析条件B：保持時間=13.20分：グラジエント（%B conc）；20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%。

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1226.4$ ($M+3H$)³⁺

[0149] また、合成した前記コンジュゲートについて、実施例2に従ってSPRによるhTfRとの結合能を確認したところ、 $KD = 1.09$ nMであった。

実施例 4

[0150] コントロールとなるペプチドコンジュゲート：hTfR No. 894 FLIP-vivotag 750の合成

hTfR No. 894-vivotag 750のコントロールとして、No. 894の配列を反転させた以下のアミノ酸配列を有する環状ペプチドと、vivotag 750とがPEG11リンカーを介して結合したコンジュゲートを合成した（hTfR No. 894 FLIP-vivotag 750又はFLIP_000894_PEG11_K_FITCと示す）。

FLIP配列：C I A c - A l a - M e T y r - T y r - A r g - A r g - I l e - I l e - T y r - T y r - A s n - T r p - V a l - P h e - V a l - C y s（配列番号202）

[0151] hTfR No. 894 FLIP-PEG11-vivotag 750の合成

ペプチドコンジュゲートの合成および精製は、Sieber amide resin（渡辺化学、0.6 mmol/g、0.33 g）を開始レジンとして用いた以外は、実施例3と同様に行った。

目的物の純度は分析条件B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B：保持時間＝13.5分：グラジエント（%B conc）；20分間かけて20－60%、その後1分間かけて60－95%、その後5分かけて95%。

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1226.4$ （ $M + 3H$ ）³⁺

上記の通り得られた化合物のN末端を、Vivotag 750（Vivotag-S（商標）750、パーキンエルマー社）のプロトコルに従って標識し、表記の化合物を得た。

また、合成した前記コンジュゲートについて、実施例2に従ってSPRによるhTfRとの結合能を確認したところ、hTfRとの結合は認められなかった。

実施例 5

[0152] hTfR No. 894-vivotag 750のhTfR-KIマウスを用いた脳移行性評価試験

〔試液の調製〕

ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（和光純薬工業社）を、20w/v%の濃度になるよう水に溶解し、これを20%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン溶液とした。

[0153] 〔投与液の調製〕

hTfR No. 894-vivotag 750 conjugate 投与液（No. 894 投与液）：実施例2で合成したhTfR No. 894-vivotag 750 conjugateの5mM溶液6μLに、ジメチルスルホキシド（DMSO、シグマアルドリッチ社）4.8μLを添加し、さらに20%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン溶液を66μLを加えてよく混合した。これに、さらにポリエチレングリコール400を48μLを加えて混和したものをNo. 894-投与液とした。No. 894 投与液中のhTfR No. 894-FITC conjugate濃度は250μMとなっている。

hTfR No. 894 FLIP-vivotag 750 conjugate

t e 投与液 (No. 894 NC 投与液) : 前述の h T f R No. 894 F L I P - v i v o t a g 7 5 0 c o n j u g a t e の 5 m M 溶液 6 μ L に、20% ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン溶液を 66 μ L を加えてよく混合した。これに、さらにポリエチレングリコール 400 を 48 μ L を加えて混和したものを No. 894 NC 投与液とした。No. 894 F L I P 投与液中の h T f R No. 894 F L I P - v i v o t a g 7 5 0 c o n j u g a t e 濃度は 250 μ M となっている。

[0154] [T f R - K I マウスの作製]

国際公開 WO 2016-208695 の記載に従って、細胞内領域がマウス h T f R のアミノ酸配列であり、細胞外領域がヒト h T f R のアミノ酸配列であるキメラ h T f R をコードする c D N A の 3' 側に、I o x P 配列で挟み込んだネオマイシン耐性遺伝子を配置した塩基配列を有する D N A 断片と、5' アーム配列、3' アーム配列を有するターゲッティングベクターを作成した。作成したターゲッティングベクターを、マウス E S 細胞にエレクトロポレーション法により導入した。遺伝子導入後のマウス E S 細胞を、ネオマイシン存在下で選択培養し、ターゲッティングベクターが相同組換えにより染色体に組み込まれたマウス E S 細胞を選択した。得られた遺伝子組換えマウス E S 細胞を、I C R マウスの 8 細胞期胚 (宿主胚) へ注入し、精管結紮を行ったマウスとの交配によって得られた偽妊娠マウス (レシピエントマウス) に移植した。得られた産仔 (キメラマウス) について毛色判定を行い、E S 細胞が生体の形成に高効率で寄与した個体、すなわち全体毛に対する白色毛の占める比率の高い個体を選別した。このキメラマウス個体を C 5 7 B L 6 / J マウスと掛け合わせて F 1 マウスを得た。白色の F 1 マウスを選別し、尻尾の組織より抽出した D N A を解析し、染色体上でマウストランスフェリン受容体遺伝子がキメラ h T f R にヘテロに置き換わっているマウスを T f R - K I マウスとした。

[0155] [T f R - K I マウスを用いた脳移行性評価試験]

次いで、T f R - K I マウスを用いた脳移行性評価試験を実施した。h T

f Rを発現しているT f R-K Iマウス（雌、12週齢）に対してNo. 894投与液またはNo. 894 NC投与液を100 μ Lずつ尾静脈内に急速投与した。投与から1時間後に、マウスをイソフルランで麻酔し、左心室より生理食塩水を4～5分間灌流して脱血処理した。その後、蛍光強度を測定する組織（脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、大腿四頭筋、胸腺、胸椎、大腿骨）を採取し、乾燥させないように生理食塩水中で保管した。In vivo発光・蛍光イメージングシステムIVIS Lumina III（パーキンエルマー社）及び蛍光色素VivoTag 750用のフィルターセットを用い、取扱説明書に従って蛍光強度を測定した。

[0156] [h T f R-K Iマウスを用いた脳移行性評価の結果]

各組織における蛍光強度測定結果を図1、図1-2、図1-3及び図2に示す。

図における“#894”表記はh T f R No. 894-v i v o t a g 7 5 0 c o n j u g a t eの投与群を、“#894 F L I P”表記はh T f R No. 894 F L I P-v i v o t a g 7 5 0 c o n j u g a t e投与群を示す。なお、各写真の右側のバーは平均放射効率（Average Radiant Efficiency、 $[p/sec/cm^2/sr] / [\mu W/cm^2]$ ）を示す。

図1-1の（1）Brainは脳の写真を示し、（2）Liver（Left lateral lobe）は肝臓の外側左葉区域の写真を示し、（3）Kidneyは腎臓の写真を示し、（4）Lungは肺の写真を示し、（5）Thoracic vertebraeは胸椎の写真を示す。カラースケールは、（1）については最低値が 5.00×10^7 、最大値が 1.3×10^8 を、（2）及び（3）については最低値が 6.00×10^8 、最大値が 2.4×10^{10} を、（3）及び（4）については最低値が 4.5×10^8 、最大値が 5.4×10^9 を示す。図1-2の（1）Heartは心臓の写真を示し、（2）Spleenは脾臓の写真を示し、（3）Thymusは胸腺n写真を示す。なお、カラースケールは最低値が 4.83×10^7 、最大値が4.

8×10^9 を示す。

図1-3の(1) Quadricepsは大腿四頭筋の写真を示し、(2) Femurは大腿骨の写真を示す。なお、カラースケールは最低値が 1.5×10^8 、最大値が 1.5×10^9 を示す。図2は図1-1(1)脳の拡大写真である。

図1-1, 1-2, 1-3及び図2より、hTfR No. 894-vivotag750 conjugate投与群の方がhTfR No. 894 FLIP-vivotag750 conjugate投与群よりも強い蛍光が検出された組織は腎臓、胸椎、心臓、大腿骨、大腿四頭筋および脳であった。hTfR No. 894 FLIP-vivotag750 conjugate投与群の方がhTfR No. 894-vivotag750 conjugate投与群よりも強い蛍光が検出された組織は肝臓と脾臓であった。

[0157] 両投与群ともに腎臓で最も強い蛍光が検出され、次いで肝臓の蛍光が強かったことから、両試験物質は主に腎・肝で代謝・排泄されていると考えられた。また、No. 894投与群ではNo. 894 NC投与群に比べて胸椎、心臓、大腿骨、大腿四頭筋及び脳により強い蛍光が見られた。これらの組織はTfR発現量が比較的多いことから、両者の組織分布の違いは、hTfR結合能の有無に起因すると考えられた。

本試験により、hTfR結合性特殊環状ペプチドNo. 894はhTfR-K1マウスにおいてTfRへの結合を介しBBBを通過し脳内へ移行すること、および筋組織を中心とした各組織へ移行することが確認された。

実施例 6

[0158] hTfR結合性特殊環状ペプチド-蛍光標識プローブコンジュゲートを用いた、マウス脳内局在確認試験

[hTfR結合性特殊環状ペプチドNo. 894と蛍光物質FITCのコンジュゲートの作成]

hTfR結合性特殊環状ペプチドNo. 894と蛍光物質FITCのコンジュゲートについては、実施例3で合成したhTfR No. 894-PEG1

1を用い、FITC標識キット（同仁化学社）のプロトコルに従って合成した。また、合成した前記コンジュゲートについて、実施例2に従ってSPRによるhTfRとの結合能を確認したところ、 $KD=0.28\text{ nM}$ であった。

[0159] [シングルドーズ実験]

実施例5と同様に、hTfR結合性特殊環状ペプチドNo. 894と蛍光物質FITCのコンジュゲートをhTfR-K1マウスに投与した。投与量は 3.7 mg/kg となるようにした。

投与から1時間後に、マウスをイソフルランで麻酔し、左心室より生理食塩水を4～5分間灌流して脱血処理した。その後、蛍光強度を測定する脳を採取し、乾燥させないように生理食塩水中で保管した。この脳組織を用いて、抗FITC抗体（MLBバイオサイエンス社）を用いて免疫組織化学染色を行った。脳組織中の抗FITC抗体の免疫組織化学染色は公知の方法により行い、蛍光顕微鏡により観察を行った。結果を図3に示す。なお、図中における赤矢印は脳毛細血管を、矢頭はプルキンエ細胞を指す。（1）は#894-FITC投与群の写真を、（2）はコントロールとして#894-FITCを投与しない群の写真を示す。

[0160] [マルチドーズ実験]

投与量を 3.7 mg/kg 、10分ごとに投与、計6回にした以外は前記single doseと同様にhTfR結合性特殊環状ペプチドNo. 894と蛍光物質FITCのコンジュゲートのhTfR-K1マウスに投与し、脳組織中の前記コンジュゲートの局在を免疫組織化学染色により確認した。結果を図4に示す。なお、図中における赤矢印は脳毛細血管を、矢頭はプルキンエ細胞を、黄矢印は樹状突起を指す。（1）は#894-FITC投与群の写真を、（2）はコントロールとして#894-FITCを投与しない群の写真を示す。

[0161] 本試験により、どちらのdose試験においても、hTfR結合性特殊環状ペプチドNo. 894と蛍光物質FITCのコンジュゲートがBBBを通

過して小脳内部に導入されることが確認された。また、multiple dose試験結果では、当該コンジュゲートはプルキンエ細胞のようなニューロンにまで到達していることが明らかになった。

実施例 7

[0162] SPRによるトランスフェリン受容体 (hTfR) と hTfR No. 894 のバリエントペプチド、リンカー付加ペプチド及びペイロードコンジュゲートとの分子間相互作用評価試験

[hTfR No. 894 のバリエント、リンカー付加ペプチドの合成]
hTfR No. 894 のアミノ酸配列に数個のアミノ酸が挿入、欠損、置換された配列を有するペプチド（バリエントとも言う）及び各種リンカーが結合したペプチドを合成し、同様に SPR による hTfR との結合能を確認した。バリエントペプチドは、実施例 9 又は 10 に記載が無い限りは実施例 1 に従って合成した。リンカー付加ペプチドは、リンカーが PEG である場合は Fmoc-NH-SAL-PEG resin（渡辺化学）をペプチド合成のレジンとして用いた以外は実施例 1 に従って合成した。ペプチドや脂肪酸、PEG とそれらの複合体のリンカーが付加したペプチドについても、実施例 9 又は 10 に記載が無い限りは実施例 1 に従って合成した。それらの SPR 測定から求めた KD 値について、KD 値が 1 nM 未満の場合は A、1 nM 以上 100 nM 未満の場合は B、100 nM 以上 1 μ M 未満の場合は C、1 μ M 以上の場合は D と表記した結果を、表 2～表 4 に示す。

表 2：ペプチド又はリンカー付加ペプチド

[0163]

[表2-1]

Patent ID	名称	1	2	3	4	5	6	7	8	Seq	10	11	12	13	14	15	Linker	KD	ESI (m/z)	[M+H] ⁺
21	894_v00_PEG12	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2683.8	2
22	894_v01_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2698.8	3
23	894_v02_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2670.9	3
24	894_v03_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2712.9	3
25	894_v04_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2684.8	3
26	894_v05_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2656.8	3
27	894_v00_PEG04	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.3	2
28	894_v01_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.5	2
29	894_v02_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.6	2
30	894_v03_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2359.4	2
31	894_v04_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.5	2
32	894_v05_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2303.5	2
33	894_v00_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2331.5	2
34	894_v01_PEG04	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2331.3	2
35	894_v04_PEG04_10_V	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Val	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.6	2
36	894_v04_PEG04_11Ame	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	alleK	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.5	2
37	894_v04_PEG04_14_MeBph	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeBph	Cys	PEG4c	B	2391.6	2
38	894_v1_PEG04_5_W1Et	Ala	Val	MePhe	Val	W1Et	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.2	2
39	894_v1_PEG04_5_W1IP	Ala	Val	MePhe	Val	W1IP	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2359.2	2
40	894_v04_PEG04_11_Hly	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Hly	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.3	2
41	894_v04_PEG04	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2331.5	2
42	894_v04_PEG04_14_MeNaI2	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeNaI2	Cys	PEG4c	B	2365.5	2
43	894_v05_PEG8Me	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2423.1	2
44	894_v04_PEG04_12_Orn	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Orn	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2289.7	2
45	894_v04_PEG04_10_L	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.6	2
46	894_v04_PEG04_14_MeF	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MePhe	Cys	PEG4c	B	2315.7	2
47	894_v04_PEG04_12_Hly	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Hly	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.3	2
48	894_v04_PEG04_14_MoW	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2354.7	2
49	894_v04_PEG04_14_MeoBph	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeoBph	Cys	PEG4c	B	2391.8	2
50	894_v4_PEG04c_3_F2OMe	Ala	Val	F2OMe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	16	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2347.2	2

[0164]

[表2-2]

51	894_v4_PEG04c_3_Cha	Ala	Val	Cha	Val	Val	Metrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MetYr	Cys	PEG4c	B	2323.4	2
52	894_v04_PEG04_14_MeNai1	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeNai1	Cys	PEG4c	B	2365.5	2
53	894_v04_PEG04_14_MemBph	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MemBph	Cys	PEG4c	B	2391.8	2
54	894_Nai25_PEG8Me	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	Nai2	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTrp	Cys	PEG8Me	B	2420.1	2
55	894_v4_PEG04c_14_pHPeG	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	pHPeG	Cys	PEG4c	C	2331.5	2
56	894v1_PEG04_5_WIE7CI	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	WIE7CI	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	C	2379.8	2
57	894_MeNai13_PEG8Me	Ala	Val	MeNai1	Val	MeNai1	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTrp	Cys	PEG8Me	B	2472.4	2
58	894_v04_PEG04_12_Cit	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Cit	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2332.3	2
59	894_v04_PEG04_11_Dap	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2289.4	2
60	894_Nai25_F4COO114_PEG8Me	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	Nai2	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTrp	Cys	PEG8Me	B	2495.4	2
61	894_v1_PEG04_5_Yph	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	Yph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2270.4	2
62	894_v04_PEG04_12_Dab	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Dab	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2275.4	2
63	894_v1_PEG04_5_MeNai2	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeNai2	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2342.5	2
64	894_v1_PEG04_5_MemBph	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MemBph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2368.5	2
65	894_v04_PEG04_11_F4G	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2409.0	3
66	894_v04_PEG04_12_F4G	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2379.5	2
67	894_v1_PEG04_5_MeNai1	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeNai1	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2342.5	2
68	894_MeNai13_F4G12_PEG8Me	Ala	Val	MeNai1	Val	MeNai1	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTrp	Cys	PEG8Me	B	2548.4	2
69	894_v04_PEG04_10_S	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Arg	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2305.3	2
70	894_v04_PEG04_15Ame	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	allMeC	PEG4c	B	2345.5	2
71	894_v4_PEG04c_3_F2C	Ala	Val	F2C	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2351.5	2
72	894_v04_PEG04_11_Orn	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Orn	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2317.3	2
73	894_v04_PEG04_14Ame	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	aMeTrp	Cys	PEG4c	B	2331.5	2
74	894_v04_PEG04_12_Dap	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Dap	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2261.3	2
75	894_v4_PEG04c_13_pHPeG	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	pHPeG	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2345.5	2
76	894_v04_PEG04_11_Dab	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Dab	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2303.4	2
77	894_v04_PEG04_1Ame	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	C	2345.5	2
78	894_v04_PEG04_9_L	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Lou	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2331.2	2
79	894_MeNai13_F4G11_PEG8Me	Ala	Val	MeNai1	Val	MeNai1	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTrp	Cys	PEG8Me	C	2549.4	2
80	894_v04_PEG04_6_Q	Ala	Val	MePhe	Val	MePhe	Val	MeTrp	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2345.5	2

[0165]

[表2-3]

81	884_v04_PEG04_7_Nal1	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Nal1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2365.3	2
82	884_4Xhal_PEG8Me	Ala	Val	MeNal1	Val	MeNal2	Asn	Nal1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	D	2551.5	2
83	884_v4_PEG04c_1_P	Pro	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2357.6	2
84	884_v4_PEG04c_3_F4C	Ala	Val	F4C	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2351.6	2
85	884_v04_PEG04_10_P	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Pro	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2315.4	2
86	884_v04_PEG04_5Ame	Ala	Val	MePhe	Val	aMeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.4	2
87	884_v1_PEG04_5_MecBph	Ala	Val	MePhe	Val	MeoBph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	D	2368.5	2
88	884v04_12Om_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Om	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2797.0	3
89	884v04_11Hy_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Hy	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2853.0	3
90	884v04_11Om_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Om	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2825.0	3
91	884v04_11Dap_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Dap	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2796.9	3
92	884v04_14MemBph_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MemBph	Cys	PEG12c	B	2899.1	3
93	884v04_7Nal1_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Nal1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2875.1	3
94	884v04_10F_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Pro	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2822.9	3
95	884_v4_PEG08Me_5_dp	Ala	Val	MePhe	Val	dp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	D	2347.5	2
96	884_v4_PEG08Me_9_Tbg	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Tbg	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2450.6	2
97	884_v4_PEG08Me_10_Tbg	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Tbg	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2450.7	2
98	884_3MeF4F	Ala	Val	MePhe4F	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2716.9	3
99	884_3MeF3C	Ala	Val	MePhe3C	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2733.3	3
100	884_3m_8F4OMe	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	F4OMe	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2713.0	3
101	884_3MeF3F	Ala	Val	MePhe3F	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2716.9	3
102	884_3m_13F	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Phe	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2681.4	2
103	884_v01_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2698.8	3
104	884_3m_8W	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2720.6	2
105	884_3MeF3OMe	Ala	Val	MePhe3OMe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2728.9	3
106	884_3m_12Y	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Tyr	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2704.4	2
107	884_3m_8F	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Phe	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2683.5	3
108	884_1m_3m	MeAla	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2712.8	3
109	884_3m_5F3C	Ala	Val	MePhe	Val	F3C	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2695.0	3
110	884_3m_2A	Ala	Ala	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2670.8	3

[0166]

[表2-4]

111	894_3m_1Abu	Alabu	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2712.9	3	
112	894_3m_11m	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	MeAlarg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2711.5	2	
113	894_3m_5F3OMe	Ala	Val	MePhe	Val	F3OMe	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2689.9	3	
114	894_3m_5F4C	Ala	Val	MePhe	Val	F4C	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2694.3	3	
115	894_3m_10Y	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2748.8	3	
116	894_3m_12dr	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2699.5	3	
117	894_3m_14A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Ala	Cys	PEG12c	B	2592.8	3	
118	894_3m_5F4OMe	Ala	Val	MePhe	Val	F4OMe	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2690.6	3	
119	894_3m_5F4F	Ala	Val	MePhe	Val	F4F	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2678.0	3	
120	894_3m_6m	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	MeTyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2711.5	2	
121	894_3m_11Y	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2706.5	3	
122	894_3m_5F3F	Ala	Val	MePhe	Val	F3F	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2676.5	2	
123	894_3m_13A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Ala	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2605.4	2
124	894_3m_14E	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Glu	Cys	PEG12c	C	2649.4	2	
125	894_3m_7W	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Trp	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2722.7	3	
126	894_3m_4G	Ala	Val	MePhe	Gly	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2657.5	3	
127	894_3m_14R	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Arg	Cys	PEG12c	B	2676.5	2	
128	894_3m_5Hph	Ala	Val	MePhe	Val	Hph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2672.4	2	
129	894_3m_10A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Ala	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2556.8	3
130	894_3m_2Ahp	Ala	Ala	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2726.9	3	
131	894_3m_1G	Gly	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2684.8	3	
132	894_3m_1S	Ser	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2714.8	3	
133	894_3m_2F	Ala	Phe	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2746.8	3	
134	894_3m_6D	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2698.4	2	
135	894_3m_7F	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Phe	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2683.6	3	
136	894_3MeF4OMe	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2729.1	3	
137	894_3m_5A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2654.4	2	
138	894_3m_1F	Phe	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2774.9	3	
139	894_3m_8Ahp	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Ala	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2662.8	3	
140	894_3m_7A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2606.7	3	
141	894_3m_4S	Ala	Val	MePhe	Ser	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2686.9	3	
142	894_3m_7F4C	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	F4C	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2715.9	2	
143	894_3m_7Ahp	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Ala	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2661.4	2	
144	894_3m_4A	Ala	Val	MePhe	Ala	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2670.7	3	
145	894_3m_7R	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Arg	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2690.4	2	

[0167]

[表3-1]

Patent ID	名称	Seq																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
146	hTR_000894_PEG11_(VivoTag)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
147	JCR_hTR_000894_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
148	JCR_hTR_000690_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Cys	
149	JCR_hTR_000812_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeHis
150	JCR_hTR_000895_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeTyr
151	JCR_hTR_100022_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Arg	Phe	Gly	Thr	Gly
152	JCR_hTR_100025_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Arg	Asn	Val	pro	Asn
153	JCR_hTR_000696_PEG11_K(FITC)	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	pro	Arg	MeTyr
154	JCR_hTR_000809_PEG11_K(FITC)	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	pro	Arg	MeHis
155	JCR_hTR_100014_PEG11_K(FITC)	Ala	Ser	Ala	Val	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asn	Arg	Trp	Ala
156	JCR_hTR_100018_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	PeG	Asn	Gly	Ser	Asn	Ser
157	JCR_hTR_100017_PEG11_K(FITC)	Ala	Asn	Ser	Arg	Thr	Val	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Thr	Arg
158	FLIP_000894_PEG11_K_FITC	Ala	MeTyr	Tyr	Arg	Arg	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Trp	Val	Phe	Val	Val	Cys	
159	SP01_hTR_894_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
160	SP15_hTR_894_15(d)_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	dc	
161	SP16_hTR_894_01(me)_FITC	MeAla	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
162	SP18_hTR_894_03(me)_FITC	Ala	Val	MePhe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
163	SP20_hTR_894_05(me)_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
164	SP26_hTR_894_11(me)_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	MeArg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
165	894_v00_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
166	894_v01_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
167	894_v02_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
168	894_v03_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
169	894_v04_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	
170	894_v04_PEG4_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	

Patent ID	Linker	ペイロード	KD	ESI (m/z)	[M+X]H ⁺
146	PEG12	K(VivoTag)	B	3679.2	3
147	PEG11	K(FITC)	A	3172.8	3
148	PEG11	K(FITC)	B	3093.0	3
149	PEG11	K(FITC)	B	3331.4	3
150	PEG11	K(FITC)	B	3357.4	3
151	PEG11	K(FITC)	A	3142.2	3
152	PEG11	K(FITC)	A	3142.2	3
153	PEG11	K(FITC)	B	3332.5	3
154	PEG11	K(FITC)	B	3306.4	3
155	PEG11	K(FITC)	B	3204.3	3
156	PEG11	K(FITC)	B	3250.2	3
157	PEG11	K(FITC)	B	3259.1	3
158	PEG11	K(FITC)	No Bind	3171.3	3
159	PEG4c	Dap(FITC)	B	4163.6	3
160	PEG4c	Dap(FITC)	B	4163.6	3
161	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.3	2
162	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.8	2
163	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.8	2
164	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.8	2
165	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3215.6	3
166	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3229.5	3
167	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3201.4	3
168	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3243.3	3
169	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3215.6	3
170	PEG4c	dc(MalFITC)	B	2862.9	3

[0168]

[表3-2]

171	894_v06_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
172	894_v07_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
173	894_v07_PEG4_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
174	894_v04_120m_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Om	Tyr	MeTyr	Cys
175	894_v04_11Hly_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Hly	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
176	894_v04_110m_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Om	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
177	894_v04_11Dap_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Dap	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
178	894_v04_14MemBph_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MemBph	Cys
179	894_v04_7Nal1_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Nal1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
180	894_v04_10P_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	pro	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
181	894_3m_PEG4_PEG4_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
182	894_3m_PEG4_PEG4_PEG4_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
183	894_3_5m_PEG12_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
184	894_3_5m_PEG04_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
185	894_3_5m_PEG08_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
186	894_3m_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
187	894_3m_GGGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
188	894_3m_G_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
189	894_3m_G2SGSGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
190	894_3m_GSGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
191	894_3m_GSGES_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
192	894_3m_GGEGES_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
193	894_3m_GGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
194	894_3m_GGS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
195	894_3m_GG_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
196	894_3m_G2SGSG2SGS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
197	894_5m_GSSGSS_K(Mal)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
198	894_3m_5m_GGRGRS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
199	894_3m_5m_GGRSES_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
200	894_3_5m_G4S2_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys

[表4-1]

Patent ID	名称	Seq														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
203	109_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	S	C			
204	JCR_h1R_100003_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	H	C			
205	36_A_hgl_CycloAmide	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	S	Hgl			
206	100019_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	V	P	R	E	C	
207	687_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	V	P	R	N	C	
208	JCR_h1R_000837_PEG11_K(FI TC)	A	V	W	V	W	N	Y	F	I	I	P	R	H	C	
209	JCR_h1R_000692_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	D	C	
210	JCR_h1R_100016_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	MeW	C	
211	JCR_h1R_100019_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	E	C	
212	JCR_h1R_000687_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	N	C	
213	894_variant_08	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
214	894_variant_09	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
215	894_variant_19	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
216	894_variant_24	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	da	F	MeY	C
217	894_variant_17	E	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
218	h1R_894_E1_PEG12 (Hydrazide)	E	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
219	JCR_h1R_000894_E2	A	E	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
220	894_variant_142	A	E	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	KCOlpzaa	MeY	C
221	894_variant_156	A	E	MeF	V	W	N	Y	Y	I	KCOlpzaa	R	R	Y	MeY	C
222	894_v164_K(MeI)	A	E	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
223	894_variant_178	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
224	894_variant_178_GKN3	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
225	894_variant_28	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A	K	F	MeY	C
226	894_variant_29	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A	dr	F	MeY	C
227	690_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	D	R	F	R	C
228	894_variant_30	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
229	894_variant_170	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
230	894_variant_172	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C

203						B	1625.1	2
204	PEG11	K			FITC	C	2641.5	3
205						C	1500.4	2
206						B	1906.1	2
207						B	1891.5	2
208	PEG11	K			FITC	B	2932.0	3
209	PEG11	K			FITC	B	2872.9	3
210	PEG11	K			FITC	B	2955.1	3
211	PEG11	K			FITC	B	2887.1	3
212	PEG11	K			FITC	B	2871.8	3
213						B	2130.6	2
214						B	2158.6	2
215						B	2159.0	2
216						D	2073.4	2
217						B	2202.4	2
218	PEG12	Hydrazide				B	2755.4	2
219						B	2114.0	2
220	de					D	2392.3	2
221	de					D	2442.4	2
222	G	G	S	G	S	B	2910.5	2
223	G	G	G	G	S	B	2696.1	2
224	G	KN3				B	2401.6	2
225						B	2061.7	2
226						C	2089.8	2
227						B	2112.8	2
228						B	2146.9	2
229	G	G	G	G	S	B	2651.9	2
230	de	G	G	G	S	B	2724.3	2

[0170]

[表4-2]

231	894_variant_180	A	E	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	E	F	MeY	C
232	894_variant_180_GKN3	A	E	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	E	F	MeY	C
233	894_variant_16	A	E	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	R	F	MeY	C
234	894_variant_159	A	E	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
235	894_variant_171	A	E	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
236	894_variant_158	A	D	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
237	JCR_HTR_000894_R2	A	R	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	R	Y	MeY	C
238	JCR_HTR_000894_K2	A	K	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	R	Y	MeY	C
239	894_variant_160	A	Dap	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
240	894_variant_78	A	E(PEG8Me)	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
241	894_variant_85	A	E(de)	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
242	894_variant_90	A	Her	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
243	894_variant_32	A	Abu	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
244	894_variant_33	A	Nva	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
245	894_variant_35	A	Acpr	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
246	894_variant_36	A	Alb	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	I	R	dr	F	MeY	C
247	JCR_HTR_000894_E10	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	E	R	R	Y	Y	MeY	C
248	JCR_HTR_000894_R10	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	R	R	R	Y	Y	MeY	C
249	JCR_HTR_000894_K10	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	K	R	R	Y	Y	MeY	C
250	JCR_HTR_000894_Ahp10	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	Ahp	R	R	Y	Y	MeY	C
251	JCR_HTR_000894_E11_Re1801	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	E	R	Y	MeY	C
252	JCR_HTR_000894_E11A12	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	E	A	Y	MeY	C
253	JCR_HTR_000894_A11	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	A	R	Y	MeY	C
254	JCR_HTR_000894_1MeK	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	MeK	R	Y	MeY	C
255	JCR_HTR_000894_K11	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	K	R	Y	MeY	C
256	JCR_HTR_000894_A12	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	A	Y	MeY	C
257	JCR_HTR_000894_E12_Re1801	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	E	Y	MeY	C
258	JCR_HTR_000894_K12	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	K	Y	MeY	C
259	JCR_HTR_000894_E13	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	R	E	MeY	C
260	JCR_HTR_000894_R13	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	I	R	R	R	MeY	C

231	G	G	G	G	G	S	S	C		B	2653.1	2	
232	G	KN3									B	2358.7	2
233													
234	G	G	G	G	G	S	S	C		B	2680.1	2	
235	de	G	G	G	G	S	S	C		C	2752.0	2	
236	G	G	G	G	G	S	S	C		C	2686.2	2	
237										B	2141.2	2	
238										B	2113.2	2	
239	G	G	G	G	G	S	S	C		B	2637.1	2	
240										B	2539.9	2	
241										B	2304.0	2	
242										B	2215.5	2	
243	PEG4c									B	2378.2	2	
244	PEG4c									B	2392.2	2	
245	PEG4c									B	2403.7	2	
246	PEG4c									B	2419.8	2	
247										B	2100.1	2	
248										B	2127.1	2	
249										A	2099.2	2	
250										B	2088.2	2	
251										B	2057.2	2	
252										C	1971.8	2	
253										B	1999.1	2	
254										B	2069.8	2	
255										A	2056.2	2	
256										B	1999.1	2	
257										B	2057.1	2	
258										B	2056.1	2	
259										B	2050.0	2	
260										B	2077.1	2	

[0171]

[表4-3]

261	CR_HTR_000894_K13	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	K	MeY	C
262	894_v157_K(Mal)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	F	Y	C
263	894_5m	A	V	F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
264	894_5m_PEG04	A	V	F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
265	894_variant_129	A	V	F3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
266	894_3m-4.9Chg-PEG12	A	V	MeF	Chg	W	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
267	894_3m-4.9Chg	A	V	MeF	Chg	W	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
268	894_3m_5W5Cl	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
269	894_3m_5W5F	A	V	MeF	V	W5F	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
270	894_3m_5W6F	A	V	MeF	V	W6F	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
271	894_3m_5W1EOH	A	V	MeF	V	W1EOH	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
272	894_var.187	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	KCOpi2aa	KCOpi2aa	MeY	C
273	894_var.188	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	EPEG5(Me)	KCOpi2aa	KCOpi2aa	MeY	C
274	894_3m_6H	A	V	MeF	V	W	H	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
275	894_3m_6Ndm	A	V	MeF	V	W	Ndm	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
276	894_3m_7Ahp_GkN3	A	V	MeF	V	W	N	F4C	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
277	894_3m_7F4C_GkN3	A	V	MeF	V	W	N	Ahp	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
278	894_variant_147	A	V	MeF	V	W	N	Y	4Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
279	894_variant_148	A	V	MeF	V	W	N	Y	4Py	I	KCOpi2aa	R	R	4Py	MeY	C
280	894_variant_149	A	V	MeF	V	W	N	Y	4Py	I	KCOpi2aa	R	R	KCOpi2aa	MeY	C
281	894_variant_150	A	V	MeF	V	W	N	Y	4Py	I	KCOpi2aa	KCOpi2aa	R	4Py	MeY	C
282	894_3m-9Chg	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
283	894_3m-9Chg-PEG12	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
284	894_variant_141	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	KCOpi2aa	R	R	KCOpi2aa	MeY	C
285	894_variant_143	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	KCOpi2aa	KCOpi2aa	R	Y	MeY	C
286	894_variant_144	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	KCOpi2aa	R	R	Y	MeY	C
287	894_variant_145	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	KCOpi2aa	R	KCOpi2aa	MeY	C
288	894_variant_146	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	E	R	KCOpi2aa	MeY	C
289	894_variant_153	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	E	KCOpi2aa	Y	MeY	C
290	894_variant_92_PEG04	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	Alb	KCOpi2Me	Y	MeY	C

261	G									B	C	2049.2	2
262	G									C	C	2804.8	3
263										A	A	2098.0	2
264	PEG4c									A	A	2345.2	2
265	PEG4c									B	B	2306.6	2
266	PEG12									C	C	2764.8	3
267										C	C	2164.2	2
268										B	B	2132.9	2
269										B	B	2116.5	2
270										B	B	2116.4	2
271										B	B	2142.0	2
272	de									B	B	2539.0	2
273	de									C	C	2878.2	3
274										C	C	2121.2	2
275										C	C	2125.6	2
276	G	KN3								C	C	2273.3	2
277	G	KN3								C	C	2327.8	2
278	de									B	B	2197.1	2
279	de									B	B	2382.4	2
280	de									C	C	2532.5	2
281	de									D	D	2524.4	2
282										B	B	2124.1	2
283	PEG12									B	B	2724.8	3
284	de									C	C	2549.1	3
285	de									D	D	2554.7	2
286	de									B	B	2369.5	2
287	de									B	B	2504.7	2
288	de									B	B	2335.5	2
289	de									C	C	2342.2	2
290	PEG4c									D	D	2371.7	2

[0172]

[表4-4]

291	894_variant_097	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	A	R	Y	MeY	C
292	JCR_HTR_000894_3MeF_11Me_K	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	MeK	R	Y	MeY	C
293	JCR_HTR_000894_3MeF_11K	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
294	894_variant_154	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	KCOplpzaa	KCOplpzaa	MeY	C
295	894_variant_155	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	E	KCOplpzaa	MeY	C
296	894_v01	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
297	894_3m_G_Azi_Re200923	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
298	894_3m_MieG3	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
299	894_v03	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
300	JCR_HTR_000894_3MeF_5meW_11K	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
301	894_variant_126	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
302	894_variant_045	A	V	MeF35dC	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
303	894_variant_122	A	V	MeF3C	V	WTaa	N	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
304	894_variant_123	A	V	MeF3C	V	WTmCON	N	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
305	894_variant_124	A	V	MeF3C	V	W1EIOH	N	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
306	894_variant_052	A	V	MeF3C	V	WTaa	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
307	894_variant_10	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	D	K	F	MeY	C
308	894_var_189	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	EPEG8Me	KCOplpzaa	KCOplpzaa	MeY	C
309	894_var_186	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	R	KCOplpzaa	KCOplpzaa	MeY	C
310	894_variant_130	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
311	894_v158_K(Mal)	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
312	894_v159_K(Mal)	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
313	894_v160_KN3	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	R	dk	F	MeY	C
314	894_v161_KN3	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	K	dr	F	MeY	C
315	894_variant_046	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
316	894_variant_057	A	V	MeF3C	V	MeW	N	4Py2NH2	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
317	894_variant_058	A	V	MeF3C	V	MeW	N	F3H	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
318	894_variant_047	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F34dOMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
319	894_variant_048	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OEt	I	I	R	dr	F	MeY	C
320	894_variant_049	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aaO	I	I	R	dr	F	MeY	C

291	de			B	2142.4	2
292				B	2083.8	2
293				B	2089.7	2
294	de			B	2505.5	3
295	de			C	2335.3	2
296				B	2098.4	2
297	G	KN3		B	2309.3	2
298	MeG	MeG		B	2311.6	2
299				B	2112.5	2
300				B	2084.2	2
301	PEG4c			B	2286.5	2
302				B	2165.3	2
303				B	2117.8	2
304				C	2116.7	2
305				C	2103.8	2
306				B	2189.0	2
307				B	2047.8	2
308	de			B	2876.3	3
309	de			B	2538.9	2
310	PEG4c			D	2307.5	2
311	G	G	S	G	2880.6	2
312	G	G	S	G	2880.4	2
313	G	G	S	G	2659.2	2
314	G	G	S	G	2659.3	2
315				B	2144.5	2
316				B	2144.6	2
317				B	2144.5	2
318				B	2175.0	2
319				B	2158.5	2
320				B	2188.9	2

[0173]

[表4-5]

321	894_variant_050	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	Yae	I	I	R	dr	F	MeY	C
322	894_variant_131	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
323	894_variant_125	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	3Py6OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
324	894_variant_126	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4aac	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
325	894_variant_37	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Abu	R	dr	F	MeY	C
326	894_variant_38	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Nva	R	dr	F	MeY	C
327	894_variant_39	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Tag	R	dr	F	MeY	C
328	894_variant_40	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Acpi	R	dr	F	MeY	C
329	894_variant_41	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Alb	R	dr	F	MeY	C
330	894_variant_42	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	all	R	dr	F	MeY	C
331	894_variant_43	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	T	R	dr	F	MeY	C
332	894_variant_44	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	aiT	R	dr	F	MeY	C
333	894_variant_71	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Alb	R	dr	F	MeY	C
334	894_variant_72	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Nle	R	dr	F	MeY	C
335	894_variant_73	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Ahp	R	dr	F	MeY	C
336	894_variant_74	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Dap	R	dr	F	MeY	C
337	894_variant_75	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Dab	R	dr	F	MeY	C
338	894_variant_76	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	dorm	R	dr	F	MeY	C
339	894_variant_77	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Hly	R	dr	F	MeY	C
340	894_variant_161_GKN3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
341	894_variant_164	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Hly	R	dr	F	MeY	C
342	894_variant_161	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
343	894_variant_162	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	Dap	R	dr	F	MeY	C
344	894_variant_163	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	K	R	dr	F	MeY	C
345	894_variant_79	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	E(PEG8Me)	R	dr	F	MeY	C
346	894_variant_83	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	E(e-Meck)	R	dr	F	MeY	C
347	894_variant_86	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	E(de)	R	dr	F	MeY	C
348	894_variant_165	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	I	E	dr	F	MeY	C
349	894_variant_100	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	I	A	dr	F	MeY	C
350	894_variant_099_PEG4	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	F4OMe	I	I	Alb	KAc	F	MeY	C

[0174]

321					B	2173.9	2
322	PEG4c				B	2306.8	2
323					B	2074.8	2
324					D	2117.7	2
325	PEG4c				B	2364.1	2
326	PEG4c				B	2378.2	2
327	PEG4c				B	2392.2	2
328	PEG4c				B	2389.8	2
329	PEG4c				B	2405.7	2
330	PEG4c				B	2391.7	2
331	PEG4c				B	2379.7	2
332	PEG4c				B	2380.2	2
333	PEG4c				B	2363.8	2
334	PEG4c				B	2391.0	2
335	PEG4c				B	2405.7	2
336	PEG4c				B	2365.2	2
337	PEG4c				B	2379.2	2
338	PEG4c				B	2393.2	2
339	PEG4c				B	2421.3	2
340	G	KN3			B	2371.8	2
341	G	G	S	S	B	2679.2	2
342	G	G	S	S	B	2666.1	2
343	G	G	S	S	B	2623.1	2
344	G	G	S	S	B	2665.1	2
345					B	2526.2	2
346					B	2302.6	2
347					B	2280.0	2
348	G	G	S	C	C	2623.0	2
349	de				D	2188.9	2
350	PEG4c				C	2334.8	2

[表4-6]

351	894_variant_132	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	R	F	MeY	C
352	894_variant_133	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	Y	C
353	894_variant_120	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
354	894_variant_61	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
355	894_variant_134	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
356	894_variant_135	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
357	894_variant_136	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
358	894_variant_61_G4S2C	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
359	894_variant_62	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Abu	dr	F	MeY	C
360	894_variant_63	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Nva	dr	F	MeY	C
361	894_variant_64	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Nle	dr	F	MeY	C
362	894_variant_65	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Ahp	dr	F	MeY	C
363	894_variant_80	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG8Me)	dr	F	MeY	C
364	894_variant_121	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A1Medpdp	dr	F	MeY	C
365	894_variant_66	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Dap	dr	F	MeY	C
366	894_variant_67	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Dab	dr	F	MeY	C
367	894_variant_166	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Dap	dr	F	MeY	C
368	894_variant_68	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	dom	dr	F	MeY	C
369	894_variant_69	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
370	894_variant_168	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
371	894_variant_04	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
372	894_variant_23	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	da	F	MeY	C
373	894_variant_18	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
374	894_variant_18_PEG4	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
375	894_v163_KN3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
376	894_variant_167	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
377	894_variant_21	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeK	dr	F	MeY	C
378	894_variant_26	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeK	da	F	MeY	C
379	894_variant_01	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	aMeK	R	F	MeY	C
380	894_variant_70	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	aMeK	dr	F	MeY	C

351	PEG4c								B	2320.1	2
352	PEG4c								B	2305.9	2
353									B	2073.8	2
354	PEG4c								A	2321.2	2
355	de								C	2202.6	2
356	de	de							B	2331.6	2
357	de	MeG	de						B	2402.7	2
358	G	G	G	S	S	C			B	2579.3	2
359	PEG4c								B	2321.2	2
360	PEG4c								B	2335.2	2
361	PEG4c								B	2348.7	2
362	PEG4c								B	2362.7	2
363									B	2483.3	2
364									B	2128.8	2
365	PEG4c								B	2322.2	2
366	PEG4c								B	2336.2	2
367	G	G	G	S	S	C			B	2580.0	2
368	PEG4c								B	2350.2	2
369	PEG4c								B	2378.3	2
370	G	G	G	S	S	C			B	2636.1	2
371									A	2116.6	2
372									B	2031.4	2
373									B	2116.9	2
374	PEG4c								B	2364.3	2
375	G	G	S	S	G	KN3			B	2673.2	2
376	G	G	G	S	S	C			B	2622.1	2
377									B	2130.5	2
378									C	2045.7	2
379									B	2130.5	2
380	PEG4c								B	2378.3	2

[0175]

[表4-7]

381 894_variant_02	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	R	F	MeY	C
382 894_variant_20	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
383 894_variant_25	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	da	F	MeY	C
384 894_variant_81	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
385 894_variant_88	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	E(de)	F	MeY	C
386 894_variant_06	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
387 894_variant_14	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
388 894_variant_15	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
389 894_variant_82	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	E(PEG8Me)	MeY	C
390 894_variant_84	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	E(Meck)	MeY	C
391 894_variant_89	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	E(de)	MeY	C
392 894_variant_051	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F4C	MeY	C
393 894_variant_053	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3C	MeY	C
394 894_variant_054	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3OMe	MeY	C
395 894_variant_056	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3H	MeY	C
396 894_variant_22	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	dc
397 894_variant_03	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
398 894_variant_03_PEG4	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
399 894_variant_03_MeG3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
400 894_variant_31	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
401 894_variant_03_G4S2C	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
402 894_variant_173	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
403 894_variant_175	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
404 894_variant_177	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
405 894_variant_03_G_Az_Re200923	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
406 894_v162_KN3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C
407 894_variant_169	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C
408 894_A_hgl_CycloAmide	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	Hgl
409 894_Bicycle_001	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
410 894_Bicycle_002	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	Hly	R	Y	MeY	C

381				B	2159.0	2
382				B	2158.8	2
383				C	2073.4	2
384				A	2483.3	2
385				B	2246.9	2
386				B	2144.7	2
387	de	-OH		B	2274.5	2
388	Bph			D	2367.7	2
389				A	2491.8	2
390				B	2268.7	2
391				B	2285.5	2
392				B	2179.4	2
393				B	2179.4	2
394				B	2175.0	2
395				B	2160.4	2
396				B	2144.5	2
397				B	2144.9	2
398	PEG4c			B	2392.2	2
399	MeG	MeG		B	2358.1	2
400	PEG4c			B	2391.7	2
401	G	G	G	B	2650.2	2
402	de	G	G	B	2722.3	2
403	G	de	G	B	2794.3	2
404	G	de	G	B	2793.4	2
405	G	KN3		B	2356.1	2
406	G	G	S	B	2673.3	2
407	G	G	G	B	2622.0	2
408				B	2066.0	2
409				B	2144.6	2
410				B	2158.6	2

[0176]

[表4-8]

411 894_Bicycle_003	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	Hly	R	Y	MeY	C
412 894_Bicycle_004	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
413 894_Bicycle_005	A	V	Epyr2RCOO	V	MeW	N	Y	K	I	I	R	R	Y	MeY	C
414 894_Bicycle_006	A	V	Dpyr2RCOO	V	MeW	N	Y	K	I	I	R	R	Y	MeY	C
415 894_Bicycle_007	A	V	E	V	MeW	N	Y	Om	I	I	R	R	Y	MeY	C
416 894_Bicycle_009	A	Epyr2RCOO	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
417 894_Bicycle_010	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	KaAc	R	Y	MeY	C
418 894_Bicycle_011	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
419 894_Bicycle_012	A	Hgl	MeF3C	V	W1Taa	N	Y	Y	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
420 894_v01_PEG12	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
421 894_3m_G	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
422 894_3m_GLinker1(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
423 894_3m_GLinker2(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
424 894_3m_GLinker4(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
425 894_3m_GLinker5(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
426 894_3m_GLinker7(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
427 894_3m_GLinker8(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
428 894_3m_GLinker9(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
429 894_3m_GLinker10(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
430 894_3m_GLinker11(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
431 894_3m_GLinker12(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
432 894_3m_GLinker13(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
433 894_3m_GLinker14(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
434 894_3m_GLinker15(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
435 894_3m_GLinker16(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
436 894_3m_GLinker17(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
437 894_3m_GLinker18(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
438 894_3m_GLinker19(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
439 894_3m_GLinker20(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
440 894_3m_GLinker21(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
441 894_3m_GLinker22(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
442 894_3m_GLinker23(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
443 894_3m_G4S2C(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
444 894_var.184	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
445 894_var.185	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
446 894_3m_PEG4_KFTC	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
447 894_variant01_PEG4_KFTC	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
448 894_variant03_PEG4_KFTC	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
449 Flip_894_v61_PEG4_KFTC	A	MeY	F	dr	Alb	I	Y	F4OMe	Y	N	MeW	V	MeF3C	V	C

411									B	2144.9	2
412									B	2130.6	2
413									C	2124.0	2
414									B	2110.3	2
415									C	2013.2	2
416									B	2227.9	2
417									B	2187.9	2
418									B	2156.9	2
419									B	2186.5	2
420	PEG12c								B	2698.8	3
421	G	-OH							B	2156.5	2
422	G	KCOipzaa	KCOipzaa	KCOipzaa	S	S	C(AcNMe)		B	3369.6	3
423	G	KCOipzaa	KCOipzaa	G	S	S	C(AcNMe)		B	3158.1	3
424	G	de	de	de	S	S	C(AcNMe)		B	2890.8	2
425	G	de	de	G	S	S	C(AcNMe)		B	2818.7	2
426	G	KCOmgluine	G	G	S	S	C(AcNMe)		B	2967.0	2
427	G	KCOipzaa	G	de	S	S	C(AcNMe)		B	2968.1	2
428	G	G	KCOipzaa	de	S	S	C(AcNMe)		B	2967.9	2
429	G	KCOipzaa	G	G	S	S	C(AcNMe)		B	2915.9	2
430	G	G	KCOipzaa	G	S	S	C(AcNMe)		B	2916.1	2
431	G	G	G	KCOipzaa	S	S	C(AcNMe)		B	2916.0	2
432	G	KCOmgluine	G	de	S	S	C(AcNMe)		B	3040.1	3
433	G	G	KCOmgluine	de	S	S	C(AcNMe)		B	3040.1	3
434	G	de	G	KCOipzaa	S	S	C(AcNMe)		B	2968.0	2
435	G	G	G	de	KCOipzaa	S	S	C(AcNMe)	B	2988.1	2
436	G	G	de	G	KCOmgluine	S	S	C(AcNMe)	B	3040.1	3
437	G	G	G	de	KCOmgluine	S	S	C(AcNMe)	B	3040.1	3
438	G	G	KCOmgluine	G	G	S	S	C(AcNMe)	B	2966.9	2
439	G	G	G	G	KCOmgluine	S	S	C(AcNMe)	B	2967.0	2
440	G	KCOipzaa	de	de	S	S	C(AcNMe)		B	3061.3	3
441	G	de	KCOipzaa	de	S	S	C(AcNMe)		B	3061.1	3
442	G	de	de	KCOipzaa	S	S	C(AcNMe)		B	3060.9	3
443	G	G	G	G	S	S	C(AcNMe)		B	2674.6	2
444	G	de	de	de	G	dk			B	2727.7	2
445	G	de	KCOipzaa	de	G	dk			B	2867.9	3
446	PEG4c	dk						FITC	A	2877.3	3
447	PEG4c	dk						FITC	B	2853.0	3
448	PEG4c	dk						FITC	B	2924.0	3
449	PEG4c	dk						FITC	No Bind	2856.8	2

[0177]

[表4-9]

Patent ID	名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
450	894_variant_101	A	V	Me3Py	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
451	894_variant_102	A	V	Me4Py	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
452	894_variant_103	A	V	MeF3COO	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
453	894_variant_104	A	V	MeF3C	V	WImCON	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
454	894_variant_105	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	3Py	I	I	R	dr	F	MeY	C
455	894_variant_106	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	4Py	I	I	R	dr	F	MeY	C
456	894_variant_107	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	3imp	I	I	R	dr	F	MeY	C
457	894_variant_108	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F3CON	I	I	R	dr	F	MeY	C
458	894_variant_109	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F3COO	I	I	R	dr	F	MeY	C
459	894_variant_110	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	4Py	MeY	C
460	894_variant_111	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	3Py	MeY	C
461	894_variant_112	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3COO	MeY	C
462	894_variant_113	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3CON	MeY	C
463	894_variant_114	A	V	MeF3C	V	W4OMe	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
464	894_variant_115	A	V	MeF3C	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
465	894_variant_116	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4C	I	I	R	dr	F	MeY	C
466	894_variant_117	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F3C	I	I	R	dr	F	MeY	C
467	894_variant_118	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4F	I	I	R	dr	F	MeY	C
468	894_variant_119	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4F	I	I	R	dr	F	MeY	C
469	894_variant_204	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	Ab	R	Y	MeY	C
470	894_variant_205	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	E	K	R	F	MeY	C
471	894_variant_206	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	E	R	R	F	MeY	C
472	894_variant_207	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
473	894_variant_211	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	E	R	dr	Y	MeY	C
474	894_0250	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY	C
475	894_0251	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
476	894_0252	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
477	894_0253	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
478	894_0254	A	V	MeFLF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY	C
479	894_0255	A	V	MeFLF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
480	894_0256	A	V	MeFLF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C

Patent ID	Linker	KD	ESI (m/z)	[M-xH] ⁺
450		B	1055.70	2
451		C	1055.66	2
452		C	1077.04	2
453		B	1093.97	2
454		B	1057.93	2
455		B	1057.90	2
456		B	1077.45	2
457		B	1078.94	2
458		B	1079.45	2
459		B	1072.92	2
460		B	1072.41	2
461		B	1093.91	2
462		B	1093.81	2
463		B	1060.43	2
464		D	1081.95	2
465		C	1074.87	2
466		B	1074.64	2
467		B	1066.43	2
468		B	1066.39	2
469		B	1042.60	2
470 de		B	1152.87	2
471 de		B	1166.84	2
472 de		B	1166.84	2
473 de		C	1150.64	2
474 PEG4c		A	1181.91	2
475 PEG4c		A	1185.93	2
476 PEG4c		B	1181.94	2
477 PEG4c		B	1188.95	2
478 PEG4c		B	1190.93	2
479 PEG4c		B	1198.00	2
480 PEG4c		B	1190.95	2

[0178]

[表4-10]

481	884_0257	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
482	884_0258	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
483	884_0259	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
484	884_0260	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
485	884_0261	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
486	884_0262	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
487	884_0263	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	K(MePEG4c)	R	F	MeY	C
488	884_0264	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	K(MePEG4c)	F	MeY	C
489	884_0267	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
490	884_0268	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
491	884_0269	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K(MePEG4c)	dr	F	MeY	C
492	884_0270	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K(MePEG4c)	dr	F	MeY	C
493	884_0271	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
494	884_0272	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
495	884_0273_GLinker4	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
496	884_0274_GLinker4	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4aao	I	I	R	R	Y	MeY	C
497	884_0275_GLinker4	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	Y	MeY	C
498	884_3m_G_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
499	884_3m_G_short_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
500	884_3m_G_middle_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
501	884_3m_G_long_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
502	884_0280	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
503	884_0281	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
504	884_3m_GLinker24	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
505	884_3m_GLinker25	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
506	884_3m_Linked01_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
507	884_3m_Linked02_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
508	884_3m_Linked03_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
509	884_3m_Linked04_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
510	884_v03_Linked01_dk(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C

481	PEG4c							C	1197.96		
482	PEG4c							B	1198.01		
483	PEG4c							B	1204.94		
484	PEG4c							B	1180.75		
485	PEG4c							B	1187.73		
486	PEG4c							B	1194.77		
487								B	1136.17		
488								B	1136.23		
489								C	1169.42		
490								B	1176.45		
491								B	1152.21		
492								B	1159.21		
493								B	1159.19		
494								B	1166.21		
495	G	de	da	de	S	S	C(Ac\NMe)	B	1439.00		
496	G	de	de	de	S	S	C(Ac\NMe)	B	1439.01		
497	G	de	de	de	S	S	C(Ac\NMe)	B	1467.98		
498	G	KN3						B	1154.6		
499	G	PfG4c	KN3					B	1278.34		
500	G	PEG8c	KN3					B	911.33		
501	G	PEG12c	KN3					B	970.12		
502	PEG4c							A	1188.91		
503	PEG4c							A	1174.95		
504	G	de	de	de	de	S	C(Ac\NMe)	B	992.00		
505	G	de	de	de	de	de	C(Ac\NMe)	B	978.03		
506	G	G	G	S	G	S	G	dk(Maleimide)	E	949.61	
507	G	G	G	S	G	S	G	G	dk(Maleimide)	E	1064.85
508	G	G	G	de	G	de	G	dk(Maleimide)	B	977.67	
509	G	G	G	de	G	G	de	G	dk(Maleimide)	B	1096.74
510	G	G	G	S	G	S	G	dk(Maleimide)	B	965.12	

[0179]

[表4-11]

511	894_v03_Linked02_dk(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OHe	I	I	R	dr	F	MeY	C
512	894_v03_Linked03_dk(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OHe	I	I	R	dr	F	MeY	C
513	894_v03_Linked04_dk(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OHe	I	I	R	dr	F	MeY	C
514	894_v03_Linked04_dk(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OHe	I	I	R	dr	F	MeY	C
515	894_variant_201	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
516	894_variant_202	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
517	894_variant_203	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	R	dr	Y	MeY	C
518	894_variant_208	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OHe	I	E	Alb	R	F	MeY	C
519	894_variant_209	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	E	K	R	Y	MeY	C
520	894_variant_212	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	E	Alb	R	Y	MeY	C
521	894_variant_214	A	V	MeF	V	W	N	Y	Yae	I	I	K	R	F	MeY	C
522	894_variant_215	A	V	MeF	V	W	N	Y	Yae	I	I	R	R	F	MeY	C
523	894_variant_216	A	V	MeF	V	W	N	Y	Yae	I	I	R	dr	F	MeY	C
524	894_variant_217	A	V	MeF	V	W	N	Y	Yae	I	I	Alb	R	F	MeY	C
525	894_variant_218	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
526	894_variant_219	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C

511	G	G	G	G	S	G	G	S	G	G	S	S	G	G	ck(Maleimide)	B	1080.24
512	G	G	G	G	de	G	G	de	G	G	ck(Maleimide)					B	993.16
513	G	G	G	G	de	G	G	de	G	G	ck(Maleimide)					B	1112.35
514	G	G	G	G	de	G	G	de	G	G	ck(Maleimide)					B	1112.35
515																B	1064.11
516																B	1078.11
517																B	1078.10
518	de															B	1131.34
519	de															C	1136.58
520	de															C	1150.64
521																B	1048.60
522																C	1062.64
523																C	1062.64
524																C	1027.09
525	G	K														B	761.42
526	G	K														B	1127.66

[0180] 結果より、h T f R N o . 8 9 4 及びそのアミノ酸配列に数個のアミノ酸が挿入、欠損、置換された配列及び各種リンカーが結合したペプチドについて、h T f R との結合能があることが示された。

実施例 8

[0181] 〔細胞培養〕

ヒト乳がん細胞 B T - 5 4 9 (コスモバイオ社) の培養には、1 0 % F B S および 2 m m o l / L L - G l u t a m i n e を含む R P M I - 1 6 4

0 培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いた。培養は 37 °C、5 %CO₂ 条件下で行った。

[0182] 〔細胞の播種〕

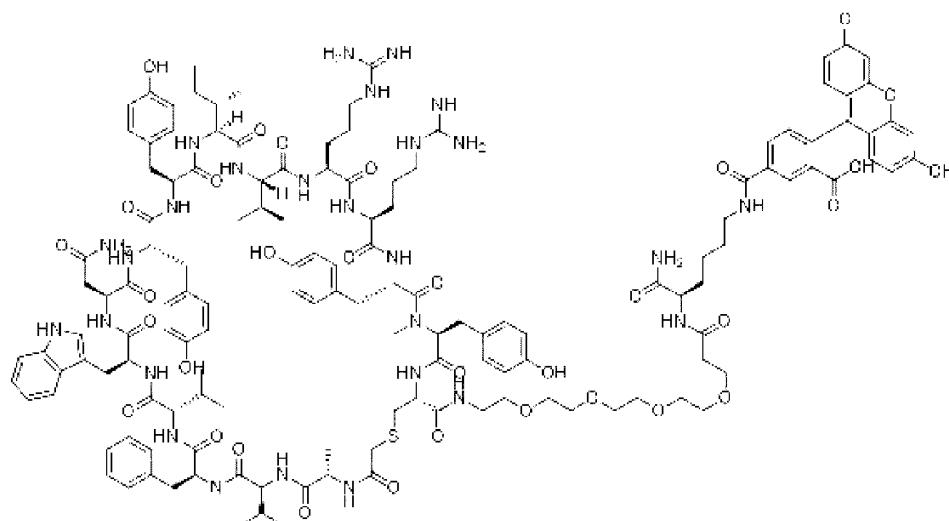
Collagen Type I（コーニング社）を 50 μg/mL となるよう 20 mmol/L 酢酸で希釈した。24 ウェルプレートの各ウェルに滅菌済みカバーガラスを 1 枚ずつ置き、希釈した Collagen Type I 溶液を添加後、37 °C で 1 時間保温した。Collagen Type I 溶液を除き、PBS で 3 回洗浄した。1 ウェルあたり 1 × 10⁵ 個のヒト乳がん細胞 BT-549 を播種し、37 °C、5 %CO₂ 条件下で一晩培養した。

[0183] 〔各種ペプチドコンジュゲートの合成〕

hTfR__894__3m__PEG4dk5FAM（配列番号 446）、hTfR__894__variant03__PEG4dk5FAM（配列番号 448）、hTfR__894__variant61__PEG4dk5FAM（配列番号 447）及びネガティブコントロールとして Flip894__variant61__PEG4dk5FA（配列番号 449）M を試料として用いた。

[0184] hTfR__894__3m__PEG4dk5FAM の合成

[化3]



[0185] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 mmol/g、0.53 g) を用い Fmoc 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 を自動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 eq に対し、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure = 4.2 eq/4 eq/8 eq を用い、75℃ 下 10 分間反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目は 75℃ 下、30 分間 2 回反応を行った。11 残基目、12 残基目は 25℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 75℃ 下、10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 25℃ 下、20 分間反応を行った。脱 Fmoc 化は 20% piperidine の DMF 溶液と 75℃ 下、3 分間反応させることを基本条件とした。ただし 2 残基目、13 残基

目のFmoc基の除去は25℃で5分間反応を行った後、10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、1.0 eqのクロロ酢酸、1.0 eqのDIPCl、1.0 eqのHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えClAcOSuのDCM/DMF溶液を調製し、固相樹脂に加え室温にて60分振盪することで行った。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、塩化メチレンで3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)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、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に溶解後、5等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約14時間振盪した。1.1 eqの5-FAM(フナコシ)、1.2 eqのEDC、1.2 eqのHOSuより調整したF-FAM-NHSを反応溶液に加え、室温で3時間攪拌した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。得られた粗中間体ペプチド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 μ m OBD(登録商標) 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); 3分間かけて9-34%、その後8分間かけて34-39%、その後1分

かけて39-60%：流量 120 mL/min)。凍結乾燥後、以下の条件を用いて再度精製した（カラム；COSMOSIL PBr 10x150 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）；3分間かけて21-46%、その後8分間かけて46-51%、その後1分かけて51-60%：流量5 mL/min）。

[0186] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し95.3%であった。

分析条件B：保持時間=4.47分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μm μm 2.1x150 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）；7.2分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.6分かけて95%：流量 0.5 mL/min。

ESI-MS（+） 観測値m/z=944.42（M+3H）³⁺

[0187] hTfR_894_variant03_PEG4dk5FAM、hTfR_894_variant61_PEG4dk5FAM及びネガティブコントロールとしてFlip894_variant61_PEG4dk5FAMの合成

hTfR_894_3m_PEG4dk5FAMと同様に合成、環化したhTfR_894_3m_PEG4、hTfR_894_variant03_PEG4、hTfR_894_variant61_PEG4及びFlip894_variant61_PEG4に対し、同様に5-FAMから調整したF-FAM-NHSを加え、前記のコンジュゲートを得た。

なお、合成した各種コンジュゲートについては、実施例2と同様にSPRにてhTfRへの結合を確認した。Flip894_variant91_PEG4のみhTfRへの結合は認められなかった。

[0188] 〔試料溶液の調製および細胞への添加〕

試料の希釈には希釈用培地（0.5%ウシ血清アルブミンおよび20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヒトトランスフェリンホロ型を含むRPMI 1640培地）を用いた。試料を100 nmol/Lとなるよう希釈用培地で希釈した。

24ウェルプレートで一晩培養した細胞BT-549がカバーガラスに接着していることを確認した後、RPMI 1640培地で2回洗浄した。0.5%ウシ血清アルブミンを含むRPMI 1640培地を500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加して氷上で15分間静置した後、希釈した試料溶液を500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加して、37°C、5%CO₂条件下で3時間静置した。

[0189] 〔細胞の固定・核染色・封入〕

24ウェルプレートから試料溶液を除き、PBSで細胞BT-549を3回洗浄した。4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（富士フィルム和光純薬社）を500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、室温で15分間静置した後、PBSで3回洗浄した。さらに、PBSで2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したHoechst 33342（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、室温、遮光下で10分間静置した後、PBSで3回洗浄した。24ウェルプレートからカバーガラスを取り出し、Fluorescent Mounting Medium（アジレント社）を用いてスライドガラス上に封入し、室温、遮光下で一晩静置した。観察には倒立型蛍光顕微鏡DMI6000B（ライカマイクロシステムズ社）を用い、FITCおよびDAPI検出用の波長で観察した。結果を図5に示す。なお、図中のスケールバーは50 μm を示す。

図5で確認できるように、hTfR__894__3m__PEG4dk5FAM、hTfR__894__variant03__PEG4dk5FAM、hTfR__894__variant61__PEG4dk5FAMは細胞内への移行が確認できたが、hTfRへの結合能を持たないペプチドを有するFlipp894__variant91__PEG4は細胞内へ移行しなかった。この結果より、hTfR__894及びhTfRへの結合能を有する改変体は、hTfRへの結合を介して細胞内に移行することが示された。

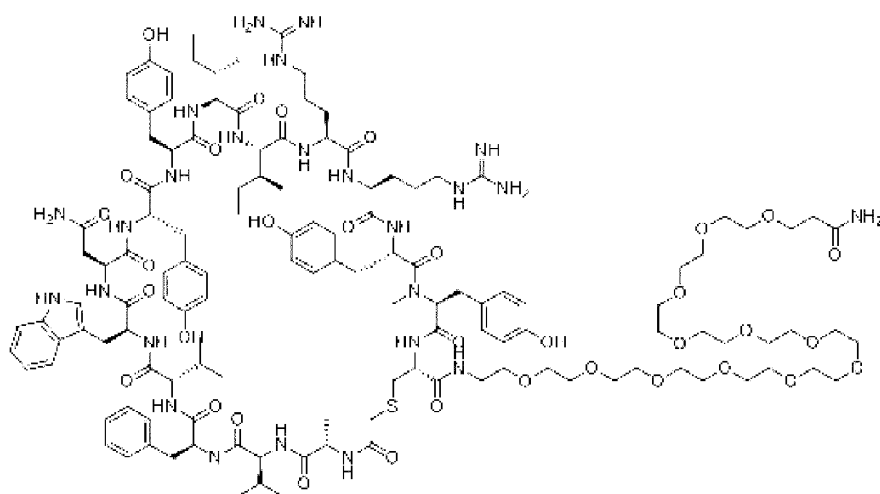
実施例 9

[0190] 以下のペプチド又はリンカー付加ペプチドを合成した。

[0191] [実施例 9 - 1]

894 v01 PEG12 (配列番号102) の合成

[化4]



[0192] Sieber amide resin (渡辺化学、0.52 mmol/g、0.19 g) を用い Fmoc の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Syro 1 を自動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。縮合反応は 75℃ で 20 分間を 2 回繰り返して反応させることを基本条件とした。ただし、15、16 残基目を導入する際には室温でそれぞれ 60 分間、15 分間反応を行った。また PEG を導入する際には反応を 1 回、11 残基目 アミノ酸を導入する際には 3

回それぞれ縮合反応を行った。脱Fmoc化はピペラジン（5%）とOximage pure（0.2M）のDMF溶液中、50℃で5分間反応させた後、再度15分間反応させることを基本条件とした。ただし15及び16残基目のFmoc基の除去は25℃で5分間行った後、再度15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、5等量のClAcOSuのDMF溶液を加え室温にて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、塩化メチレンで3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）に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（10000rpm、1min）、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、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5mMとなるようにDMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約1時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。引き続き、得られた固相樹脂を用い、前述の一般的方法に従い、側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出し、および環化反応を行った。

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 μ m OBD（登録商標） 50x150mm：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）；3分間

かけて8-33%、その後8分間かけて33-38%、その後1分かけて38-60%：流量 120 mL/min)。

[0193] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し91.5%であった。

分析条件A：保持時間=3.57分：ESI-MS (+) 観測値 m/z = 理論値 $(M+3H)^{3+}$

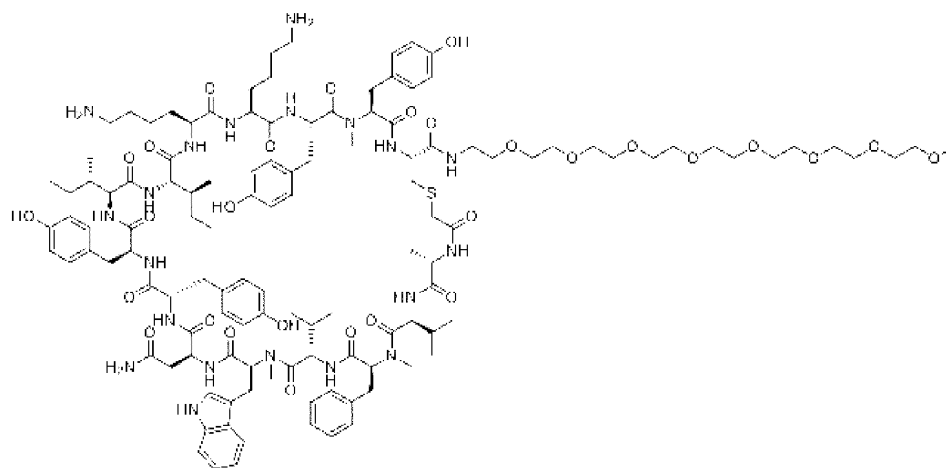
分析条件B：保持時間=12.8分：グラジエント (%B conc) ; 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%。

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 899.6 $(M+3H)^{3+}$

[0194] [実施例9-2]

894 v05 PEG8Me (配列番号43) の合成

[化5]



[0195] Cl-Trt (2-Cl) resin (1 g, 1.6 mmol, 渡辺化学工業、1.6 mmol/g) を DCM (脱水、10 mL、ナカライテスク) で 10 分膨潤し、ろ過後 DCM (脱水、10 mL) で 2 回洗浄した。膨潤した樹脂に対して Fmoc-Cys (CH₂COOH) -PEG8Me (767 mg, 1 mmol) の DCM (脱水、10 mL) 溶液、DIEA (836 μ L, 4.8 mmol, 渡辺化学工業) を順次加え、室温で 35 分振盪した。さらに MeOH (1 mL, キシダ化学) 加え 10 分振盪したのち、樹脂を DMF (10 mL, キシダ化学) で 3 回、DCM (10 mL, キシダ化学) で 3 回、ジエチルエーテル (10 mL, キシダ化学) で 3 回洗浄後、減圧乾燥し、Fmoc-Cys [CH₂COO-Trt (2-Cl) -resin] -PEG8Me (1.686 g, 94%) を得た。得られた樹脂を用い、前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Syro 1 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 eq に対し、Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA (3.2 eq/3 eq/6.3 eq) を用い、DMF 中室温下、30 分間 2 回繰り返し反応を行った。ただし、1 残基目、2 残基目、4 残基目を導入する際は室温で 60 分間 3 回反応を行った。3 残基目を導入する際は 25℃ で 60 分間 2 回繰り返し反応を行った。9 残基目を導入する際は室温で 30 分間 3 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% piperidine の DMF 溶液と室温で 5 分間反応を行った後、再度 15 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、3 等量のクロロ酢酸の DMF 溶液 (0.45 M)、3 等量の HCTU の DMF 溶液 (0.43 M)、3 等量の DIPEA の DMF 溶液 (1.57 M) を固相樹脂に加え室温にて 30 分振盪することにより行った。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、減圧下乾燥した。続く

て固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-HFIP/DCM (1/4) 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振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合する操作を3回繰り返した。この濾液をGenevaC EZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した後、0℃に冷やした過剰のジイソプロピ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、5 min)、上澄み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DMFに溶解後、1.1等量のHATUのDMF溶液(0.43 M)、1.5等量のDIPEAを加えて、室温で約1時間振盪した。得られた反応溶液に室温で3等量の酢酸を加えた後、GenevaC EZ-2を用いて減圧濃縮した。得られた残渣に氷冷したジイソプロピルエーテルを加え、白色沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm、10分)、上澄みをデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やしたジエチルエーテルで洗浄し、減圧乾燥した。得られた固体に反応剤カクテル-A (TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、室温で60分振盪した。氷冷した過剰のジイソプロピルエーテルを加え、沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000 rpm、5 min)、上澄みをデカンテーションした。得られた固体を再度氷冷したジエチルエーテルにて洗浄後、減圧乾燥させた。

[0196] 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 (登録商標) 30×150 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); 3分間かけて8-33%、その後8分間かけて33-38%、その後1分かけて38-60%: 流量45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し97.4%であった。

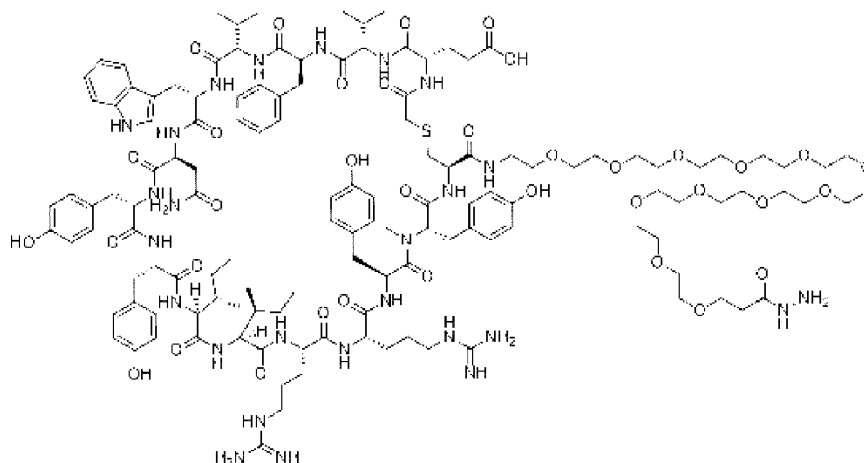
分析条件B：保持時間＝11.93分：グラジエント (%B conc) ;
20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1211.6 (M + 2H)^{2+}$

[0197] [実施例9-3]

hTfR 894 E1 PEG12 (Hydrazide) (配列番号
218) の合成

[化6]



[0198] $\text{NH}_2\text{NH}-\text{Trt} (2-\text{Cl})-\text{resin}$ (渡辺化学、0.78mmol/g、0.13g) を用い、前述の一般的方法にしたがって、Fmoc 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 eqに対し、Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA (5.3 eq/5 eq/10 eq)を用い、縮合反応は75℃下、10分間反応させることを基本条件とした。11、12残基目アミノ酸を導入する際にはそれぞれ縮合反応を25℃下、30分間2回行った。13残基目、14残基目は75℃下、10分間2回行った。15残基目は25℃下、30分間1回行った。16残基目はFmoc-AA-OH/HATU/DIEA (3 eq/3 eq/6 eq)を用い25℃下、120分間1回行った。脱Fmoc化は20% piperidine in DMF中75℃下3分間反応させることを基本条件とした。ただし13、15残基目のFmoc基の除去は25℃下、5分間行った後、10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、10 eqのクロロ酢酸、10 eqのDIPCI、10 eqのHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のNMPを加えCIAcOSuのDCM/NMP溶液(0.2 M)を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、塩化メチレンで3回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(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エチルエーテル/ヘキサン(1/1)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、得られた固体を乾

燥し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に溶解後、5等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約14時間攪拌した。酢酸でクエンチし反応溶液をBiotage V-10を用いて減圧濃縮した。

[0199] 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（登録商標） 30 $\times$ 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）； 3分間かけて5-29%、その後8分間かけて29-34%、その後1分かけて34-60%：流量 45 mL/min。

[0200] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し77.0%であった。

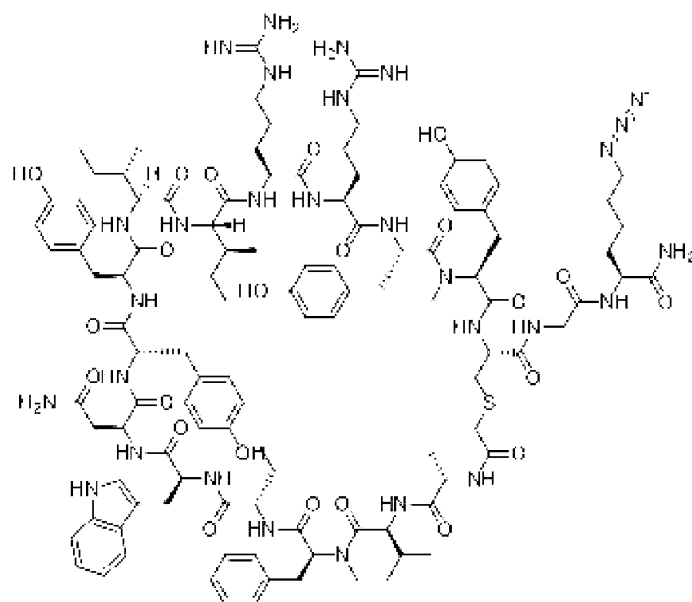
分析条件B：保持時間=10.57分：カラム Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1 $\times$ 150 mm、100 Å：移動相； A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度 40°C：グラジエント（%B conc） 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分間かけて95-95%：流量 0.25 mL/min。

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1378.48$ ($M+2H$)²⁺

[0201] [実施例9-4]

894 3m G Azi（配列番号297）の合成

[化7]



[0202] 別途合成した894_3m_G (3.3 g、1.39 mmol) に対し、公知の方法で合成した1.1 eqのH-KN₃-NH₂ (316 mg、1.52 mmol)、1.2 eqのHATU (632 mg、1.66 mmol)、5 eqのDIEA (1.21 mL、6.93 mmol) を用い室温下、30分攪拌した。

[0203] 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 (登録商標) 50×150 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分間かけて7-7%、その後1分間かけて7-32%、その後8分かけて32-37%、その後1分かけて37-60% : 流量1分間かけて20-20 mL/min、その後

1分間かけて20–120 mL/min、その後120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し97.1%であった。

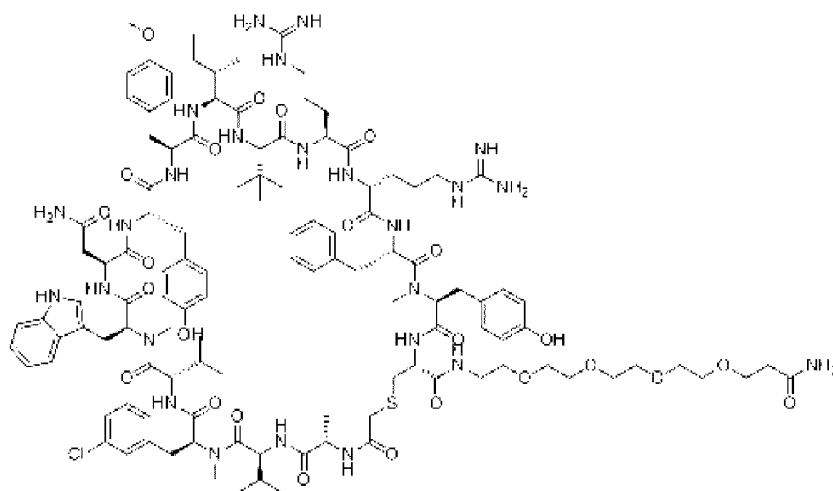
分析条件B：保持時間=4.29分；カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å；移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN；温度60°C；グラジエント (%B conc)；7.2分間かけて20–60%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.6分間かけて95–95%；流量0.5 mL/min。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1154.72$ ($M+2H$)²⁺

[0204] [実施例9–5]

894 variant 39 (配列番号327) の合成

[化8]



[0205] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 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 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 eq に対し、Fmoc-AA-OH/DIPCl/Oxima pure (5.3 eq/10 eq/5 eq) を用い、DMF 中 90℃ 下、3 分間 1 回繰り返し反応を行った。ただし、2 残基目、4 残基目を導入する際は 75℃ 下、30 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。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、Fmoc 除去は 20% piperidine の DMF 溶液と 75℃ で 3 分間反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目、4 残基目及び 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃ で 5 分間 2 回繰り返し反応を行った。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、5 eq のクロロ酢酸 in DMF、5 eq の HATU in DMF、10 eq の DIEA in DMF を固相樹脂に加え室温にて 30 分振盪することにより行った。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、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A (TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物) を加え、室温で 60 分振盪した。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、1.5 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に溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約24時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

[0206] 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（登録商標） 50×150 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）；3分間かけて11–36%、その後8分間かけて36–41%、その後1分かけて41–60%：流量 120 mL/min。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し93.1%であった。

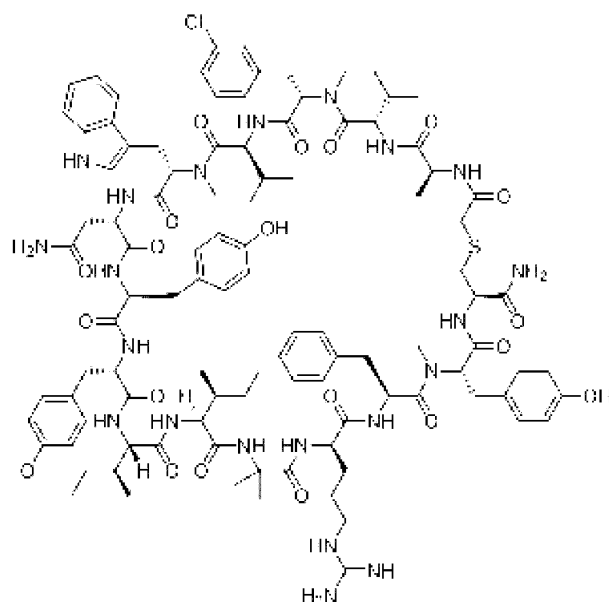
分析条件B：保持時間=12.76分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150 mm、100 Å：移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度 60℃：グラジエント（%B conc）；20分間かけて20–60%、その後1分間かけて60–95%、その後5分かけて95%：流量0.25 mL/min。

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1196.12$ ($M+2H$)²⁺

[0207] [実施例9–6]

894 variant 120（配列番号353）の合成

[化9]



[0208] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 mmol/g、0.43 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 eq に対し、Fmoc-AA-OH/HA TU/DIEA (5 eq/5 eq/10 eq) を用い、DMF 中 75℃下、10 分間 1 回反応を行った。ただし、1 残基目、3 残基目は 75℃下、20 分間 1 回反応を行った。2 残基目、4 残基目は 75℃下、30 分 2 回反応を行った。9 残基目、10 残基目、11 残基目は 75℃下、20 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 25℃下、30 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 75℃下、10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 25℃下、30 分間

1 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% piperidine の DMF 溶液と 75℃ 下、3 分間反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目、4 残基目及び 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下、5 分間 2 回繰り返して反応を行った。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、5 eq の ClAcOH in DMF、5 eq の HATU in DMF、10 eq の DIEA in DMF を固相樹脂に加え 25℃ にて 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、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物) を加え、室温で 60 分振盪した。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 に溶解後、10 等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約 16 時間振盪した。得られた反応溶液を Savant Explorer Speed Vac を用いて減圧濃縮した。

[0209] 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 (登録商標) 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) ; 3 分間かけて 16-41%、その後 8 分間かけて 41-46%、その後 1 分かけて 46-60% :

流量 120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 97.5% であった。

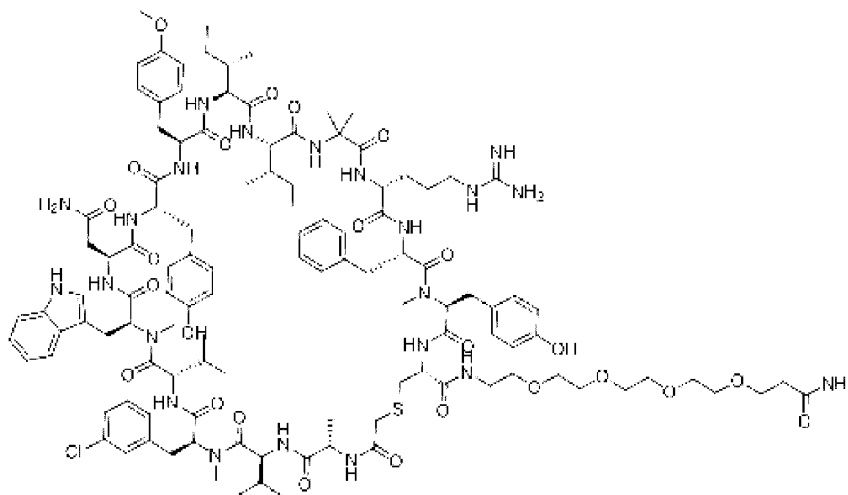
分析条件B: 保持時間 = 6.07分: カラム; Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å: 移動相; A = 0.025% TFA in H₂O、B = 0.025% TFA in MeCN: 温度 60°C: グラジエント (%B conc); 7.2分間かけて 20-60%、その後 0.3分間かけて 60-95%、その後 1.6分かけて 95-95%: 流量 0.5 mL/min。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1036.90$ ($M + 2H$)²⁺

[0210] [実施例 9-7]

894 variant 61 (配列番号 354) の合成

[化10]



[0211] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 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 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 eq に対し、Fmoc-AA-OH/DIPCl/Oximapure (5.3 eq/10 eq/5 eq) を用い、DMF 中 90 °C 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 °C 下、30 分間 2 回反応を行った。10 残基目、11 残基目は 90 °C 下、10 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50 °C 下、15 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 90 °C 下、3 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50 °C 下、15 分間 1 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% piperidine の DMF 溶液と 75 °C で 3 分間反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目、4 残基目及び 13 残基目の Fmoc 除去は 25 °C 下 5 分間 2 回繰り返し反応を行った。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、10 eq のクロロ酢酸、5 eq の DIPCl、5 eq の HOSu を DCM 中攪拌し DCM と同量の DMF を加え ClAcOSu の DCM/DMF 溶液 (0.2 M) を調製し、固相樹脂に加え室温にて 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、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 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 °C 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、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に溶解後、5 eqのトリエチルアミンを加えて、室温で約14時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer Speed Vacを用いて減圧濃縮した。

[0212] 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（登録商標） 50×150 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）；3分間かけて15→40%、その後8分間かけて40→45%、その後1分かけて45→60%：流量120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し87.5%であった。

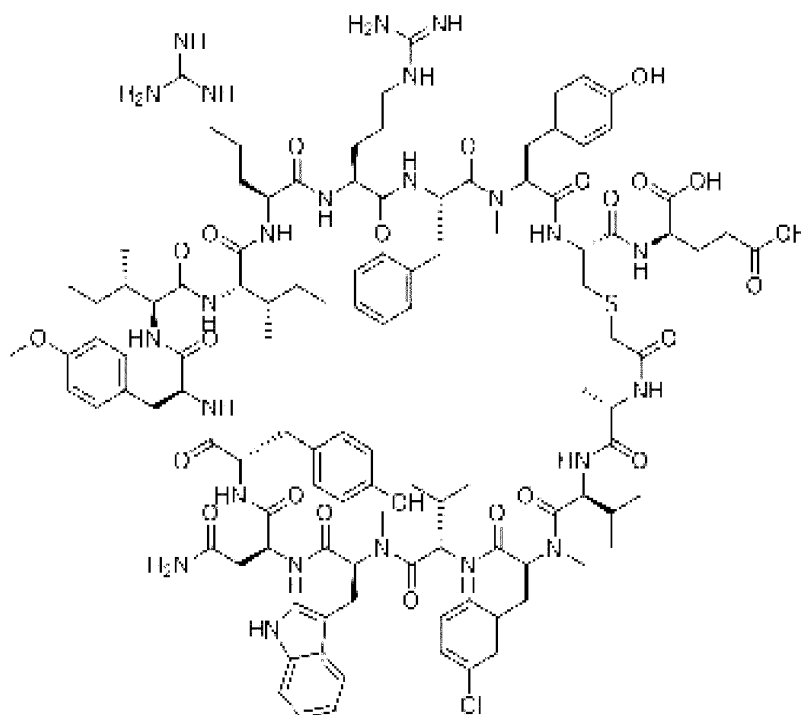
分析条件B：保持時間=16.50分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å：移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度 60℃：グラジエント（%B conc）；20分間かけて20→60%、その後1分間かけて60→95%、その後5分かけて95%：流量0.25 mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z = 1160.58（M+2H）²⁺

[0213] [実施例9-8]

894 variant 14（配列番号387）の合成

[化11]



[0214] Fmoc-D-Glu(OtBu)-wang resin (渡辺化学、0.68 mmol/g、184 mg) を用い、一般的方法にしたがって、Fmoc 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行った。縮合反応は縮合剤に HATU を用い 75℃ で 10 分間 2 回反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目は 75℃ で 30 分間 2 回反応を行った。4 残基目は 75℃ で 30 分間 2 回反応を行った。6 残基目は 75℃ で 10 分間 1 回反応を行った。7 残基目は 75℃ で 10 分間 1 回反応を行った。8 残基目は 75℃ で 10 分間 1 回反応を行った。10 残基目は 75℃ で 10 分間 1 回反応を行った。11 残基目は 30℃ で 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 30℃ で 30 分間 1 回反応を行った。15 残

基目は30℃で30分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20%piperidineのDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目、13残基目に関してはFmoc除去は室温で5分間2回反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は、クロロ酢酸（5等量）、DIPCI（5等量）、HOSu（5等量）をDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIAcOSuのDCM/DMF溶液を調製し、前工程にて得られた固相樹脂に加え室温にて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（3/1）に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9500rpm、1min）、上澄みをデカンテーション後、0℃に冷やしたジエチルエーテルにて洗浄し、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4mMとなるようにDMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約16時間振盪した。得られた反応溶液をGenevaCEZ-2Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0215] 得られた反応液は以下の条件を用いて精製した（カラム；WaterS Xbridge（登録商標） C18 5μm（登録商標） 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）；3分間かけて11-36%、その後8分間かけて36-41%、その後1分かけて41-60%；流量120mL/min）。

[0216] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し88.60%であった。

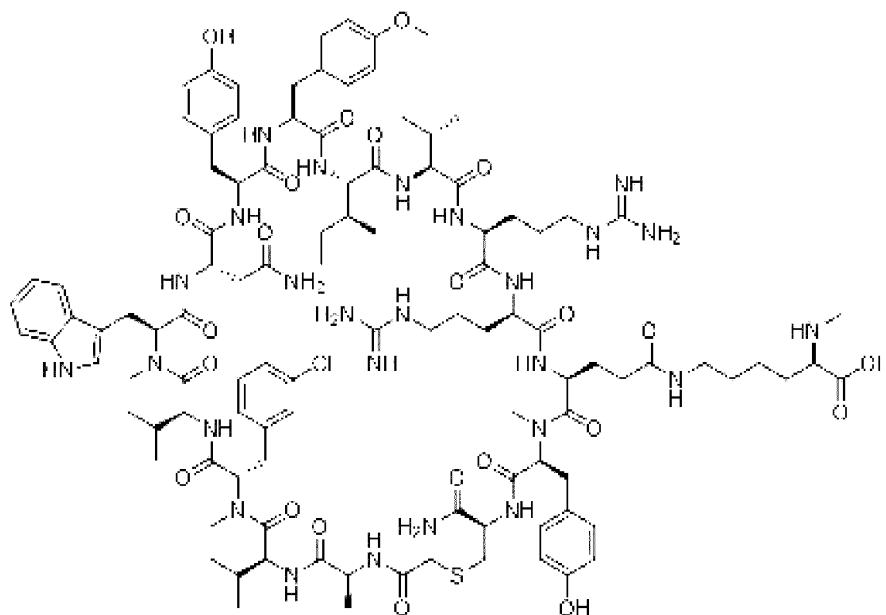
分析条件B：保持時間=13.03分：グラジエント (%B conc) ; 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1137.23$ ($M+2H$)²⁺

[0217] [実施例9-9]

894 variant 84 (配列番号390) の合成

[化12]



[0218] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47mmol/g、0.21g) 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 B1

ue 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 eqに対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure=5.3 eq/10 eq/5 eq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、45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回繰り返し反応を行った。13残基目を導入する際は90℃下、3分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃で5分間2回繰り返し反応を行った。1残基目まで伸長後、樹脂をDCMに懸濁し、Pd(PPh₃)₄/PhSiH₃ (0.2 eq/10 eq)を加え室温で1時間振盪した。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をDMFで3回、DCMで3回洗浄後、前述した方法でα-アミノ基のFmoc基を除去したのち、5 eqのクロロ酢酸 in DMF、5 eqのHATU in DMF、10 eqのDIEA in DMFを加え室温にて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、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 (10000 rpm, 1 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に溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で終夜振盪した。反応溶液をSavant Explorer Speed Vacを用いて減圧濃縮した。得られた混合物をDMSO (4 mL) に溶かし、HOSu (10 eq)、EDC HCl (10 eq) を加え室温で2時間攪拌した。

[0219] 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 (登録商標) 30 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); 3分間かけて11-36%、その後8分かけて36-41%、その後1分かけて41-60%; 流量45 mL/min)。

得られた環状ペプチド-NHSエステル (25 mg、11.3 μ mol) をDMF (225 μ L) に溶解しFmoc-MeK-OH塩酸塩 (5 mg、11.9 μ mol) 及びDIEA (5.9 μ L、33.9 μ mol) を加え攪拌した。1時間後、反応液にEt₂NH (5.9 μ L、56.5 μ mol) を加え攪拌した。1時間後、酢酸でクエンチした。

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 (登録商標) 19 x 150 mm; 移動相; A=0.1% TFA in H₂O、B=0.1% TFA in MeCN; 温度 60°C; グラジエント (%B); 3分間かけて8-33%、その後8分かけて33-38%、その後1分かけて38-60%; 流量17 mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し97.9%であった。

分析条件B: 保持時間=12.33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); 20分間かけて20-6

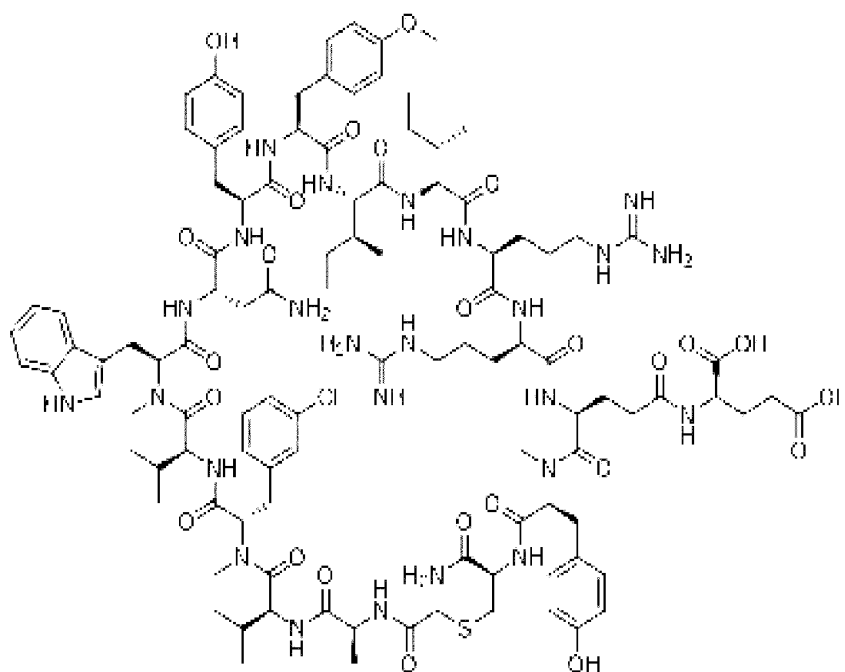
0%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1134.34$ ($M + 2H$)²⁺

[0220] [実施例9-10]

894 variant 89 (配列番号391) の合成

[化13]



[0221] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 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 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 eqに対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure/DIEA (5.3 eq/10 eq/5 eq) 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

基目を導入する際は75℃下、45分間2回反応を行った。11残基目、12残基目を導入する際は50℃下、15分間2回繰り返し反応を行った。13残基目を導入する際は90℃下、3分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃で5分間2回繰り返し反応を行った。1残基目まで伸長後、樹脂をDCMに懸濁し、Pd(PPh₃)₄/PhSiH₃ (0.2 eq/1.0 eq)を加え室温で1時間振盪した。固相樹脂をDMFで3回、DCMで3回洗浄後、減圧乾燥させた。樹脂(60 μmol)をDMFに懸濁しH-D-Glu(OtBu)-OtBu塩酸塩(71 mg、0.24 mmol)、0.5 M Oxyma pure in DMF(0.48 mL、0.24 mmol)、DIPCl(37 μL、0.24 mmol)及びDIEA(42 μL、0.24 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下75℃で、30分間2回反応させた。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前述した方法でα-アミノ基のFmoc基を除去したのち、5 eqのクロロ酢酸 in DMF、5 eqのHATU in DMF、10 eqのDIEA in DMFを加え室温にて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、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(10000 rpm、1 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に溶解後、10 eqのトリエチルアミンを加えて、室温で終夜振盪した。反応溶液をSavant Explorer Speed Vacを用いて減圧濃縮した。

[0222] 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（登録商標）50 $\times$ 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）；3分間かけて8-33%、その後8分かけて33-38%、その後1分かけて38-60%；流量 120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件B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。

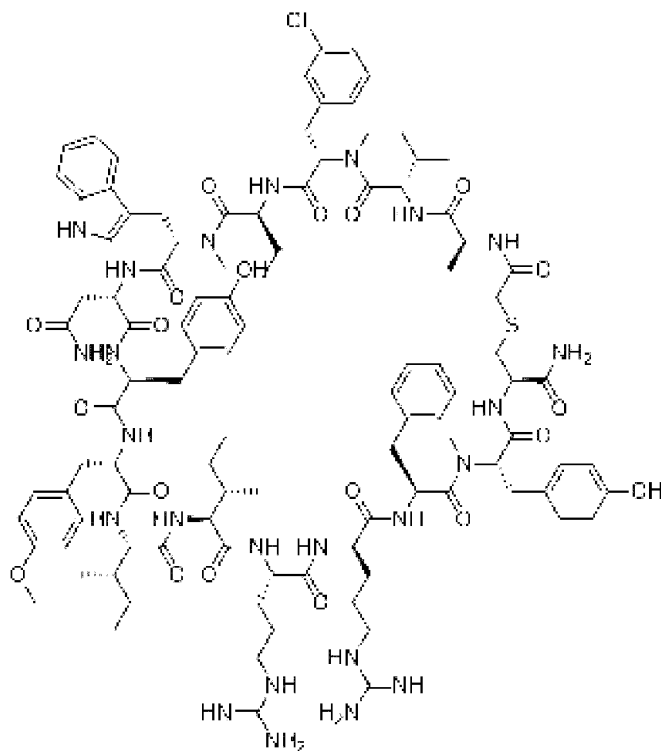
分析条件B：保持時間=11.81分；カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å；移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN；温度 40°C；グラジエント（%B conc）；20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%；流量0.25 mL/min。

ESI-MS（+） 観測値 m/z = 1127.76 ($M+2H$)²⁺

[0223] [実施例9-11]

894 variant 03（配列番号397）の合成

[化14]



[0224] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 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 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 eqに対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxima pure (4.2 eq/4 eq/8 eq)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。11残基目、12残基目は90℃下、10分間2回反応を行った。13残基目は75℃下、10分間2回反応を行った。15残基目は25℃下、20分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3分間反応させ

ることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃下5分間反応を行った後、25℃下10分間反応を行った。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（10等量）、10等量のDIPCI、10等量のHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIAcOSuのDCM/DMF溶液（0.2M）を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、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（9000rpm、2min）、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5mMとなるように50%MeCN水溶液に溶解後、5等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約14時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

- [0225] 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（登録商標）50x150mm；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）；3分間かけて10-35%、その後8分間かけて35-40%、その後1分かけて40-60%；

流量 120 mL / min。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 98.2% であった。

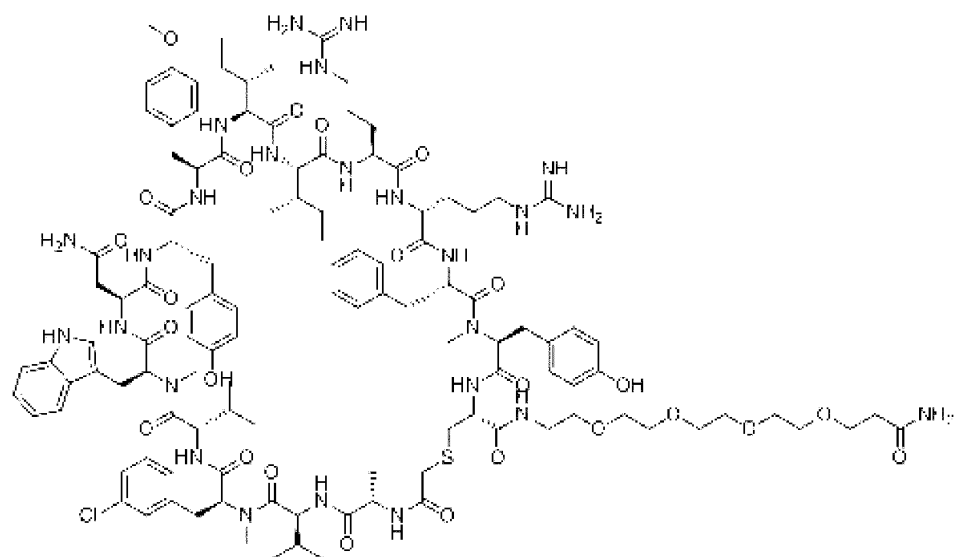
分析条件B: 保持時間 = 13.18 分: カラム; Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å: 移動相; A = 0.025% TFA in H₂O、B = 0.025% TFA in MeCN: 温度 40°C: グラジエント (%B conc); 20 分間かけて 20–60%、その後 1 分間かけて 60–95%、その後 5 分かけて 95–95%: 流量 0.25 mL / min。

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1072.49$ ($M + 2H$)²⁺

[0226] [実施例 9-12]

894 variant 31 (配列番号 400) の合成

[化15]



[0227] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 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 eq に対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxima pure (4.2 eq/4 eq/8 eq) を用い、DMF 中 90 °C 下、3 分間 2 回繰り返し反応を行った。ただし、2 残基目、4 残基目を導入する際は 75 °C 下、45 分間 2 回反応を行った。3 残基目は 75 °C、下 30 分間 2 回反応を行った。7 残基目、8 残基目は 90 °C 下、3 分間 1 回反応を行った。11 残基目、12 残基目を導入する際は 50 °C で 15 分間 2 回反応を行った。15 残基目、16 残基目は 50 °C 下、15 分間 1 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20 % piperidine の DMF 溶液と 75 °C 下 3 分間反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目、4 残基目及び 13 残基目の Fmoc 除去は 25 °C で 5 分間 2 回繰り返し反応を行った。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 (5 等量)、5 等量の DIPCI、5 等量の HOSu を DCM 中攪拌し DCM と同量の DMF を加え ClAcOSu の DCM/DMF 溶液 (0.2 M) を調製し、固相樹脂に加え室温にて 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、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 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 °C に冷やした過剰のジイソプロピ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 (9500 rpm、1 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4 mMとなるようにDMSOに溶解後、7等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約12時間振盪した。得られた反応溶液をGeneva CEZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0228] 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（登録商標）50×150 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）；3分間かけて15→40%、その後8分間かけて40→45%、その後1分かけて45→60%；流量120 mL/min。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し95.4%であった。

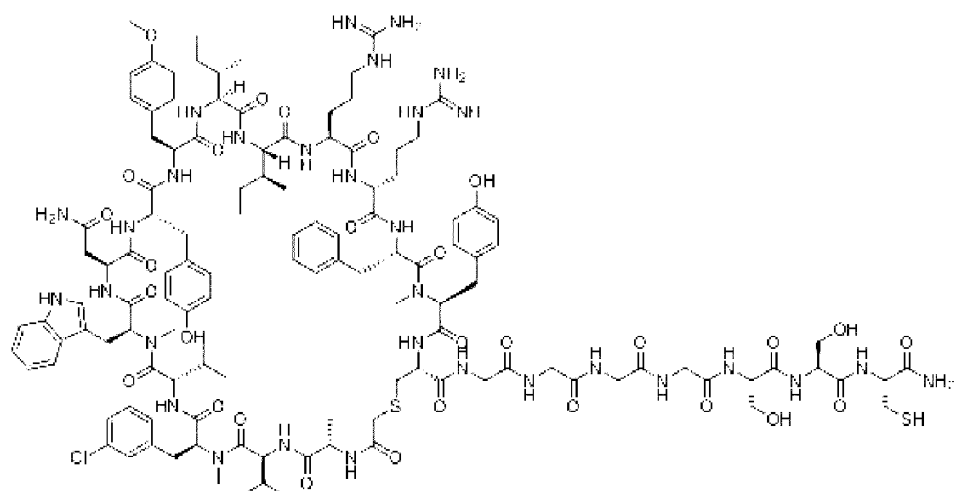
分析条件B：保持時間=12.64分；カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150 mm、100 Å；移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN；温度 60℃；グラジエント（%B conc）；20分間かけて20→60%、その後1分間かけて60→95%、その後5分かけて95%；流量0.25 mL/min

ESI-MS（+）観測値 $m/z = 1195.87$ ($M+2H$)²⁺

[0229] [実施例9-13]

894 variant 03 G4S2C（配列番号401）の合成

[化16]



[0230] Sieber amide resin (渡辺化学、0.73 mmol/g、1.37 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 eqに対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2 eq/4 eq/8 eq)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2回反応を行った。11残基目、12残基目は25℃下、20分間2回繰り返し反応を行った。13残基目は75℃下、10分間2回反応を行った。15残基目、22残基目は25℃下、30分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃で3分間反応させるこ

とを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃下5分間反応を行った後、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、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、10eqのクロロ酢酸、10eqのDIPCI、10eqのHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えClAcOSuのDCM/DMF溶液(0.2M)を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、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90:2.5:2.5:5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(9500rpm、1min)、溶液をデカンテーションし減圧下乾燥させた。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5mMとなるようにDMSOに溶解後、10eqのトリエチルアミンを加えて、室温で約15時間振盪した。得られた反応溶液をGenevacHT-12を用いて減圧濃縮した。得られた混合物をDMSOに溶解し3eqの酢酸銀を加え3時間振盪した。2M DTT水溶液(11eq)を加えた後、遠心分離し上澄みを回収後、減圧下濃縮し粗生成物を得た。

[0231] 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 (登録商標) 50x150mm: 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); 3分間かけて11-1

1%、その後3分間かけて11-36%、その後8分かけて36-41%、その後1分かけて41-60%：流量120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し94.8%であった。

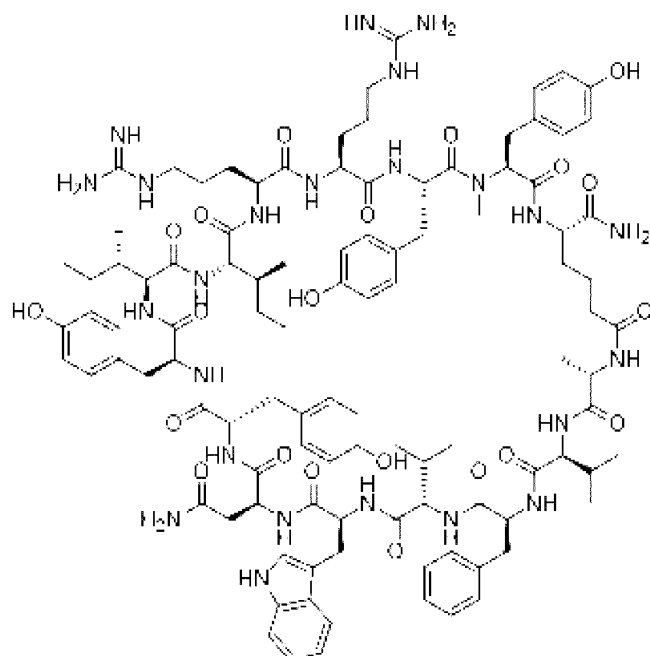
分析条件B：保持時間=4.31分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm、100 Å：移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度60°C：グラジエント（%B conc）；7.2分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.6分かけて95-95%：流量0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z = 1324.94（M+2H）²⁺

[0232] [実施例9-14]

894 Ahgl CyCloamide（配列番号408）の合成

[化17]



[0233] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 mmol/g) を用い、一般的方法にしたがって、Fmoc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行った。縮合反応は縮合剤にDIPCI、Oxyma pureを用い90℃で3分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、11残基目、12残基目は50℃で15分間2回繰り返し反応を行った。13残基目は90℃で3分間2回繰り返し反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、13残基目に関してはFmoc除去は25℃で5分間2回反応させることで行った。得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄し減圧下乾燥

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とヘキサンの混溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000rpm、2min)、上澄みをデカンテーションした。得られた固体を氷冷したジエチルエーテルにて洗浄後、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5mMとなるようにDMFに溶解後、1.5等量のHATU、3等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約1時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

[0234] 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 5μm (登録商標) 30×150mm: 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); 3分間かけて6-31%、その後8分間かけて31-36%、その後1分かけて36-60%: 流量45mL/min)。

[0235] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し96.8%であった。

分析条件B: 保持時間=10.03分: グラジエント(%B conc); 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%

ESI-MS (+) 観測値m/z=1033.0 (M+2H)²⁺

[0236] [実施例9-15]

894 BiCyCle 001 (配列番号409) の合成

p i p e r i d i n e の DMF 溶液と 75℃ 下、3 分間 1 回反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目、4 残基目、13 残基目の Fmoc 除去は 25℃ で 5 分間 2 回繰り返し反応を行った。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、5 等量のクロロ酢酸、5 等量の DIPICl、5 等量の HOSu を DCM 中攪拌し DCM と同量の DMF を加え CIAcOSu の DCM/DMF 溶液 (0.2 M) を調製し、固相樹脂に加え室温にて 75 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、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 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に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (9500 rpm、1 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 4 mM となるように 5% 含水 DMSO に溶解後、10 等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約 12 時間振盪した。得られた反応溶液を Geneva CEZ-2 Elite を用いて減圧濃縮した。得られた混合物に対しペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 25 mM となるよう DMF に溶解し、1 等量の HATU、3 等量の DIEA を加え、室温で約 30 分間振盪した。

[0238] 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 (登録商標) 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) ; 3分かけて11-36%、その後8分かけて36-41%、その後1分かけて41-60% : 流量120mL/min

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し94.8%であった。

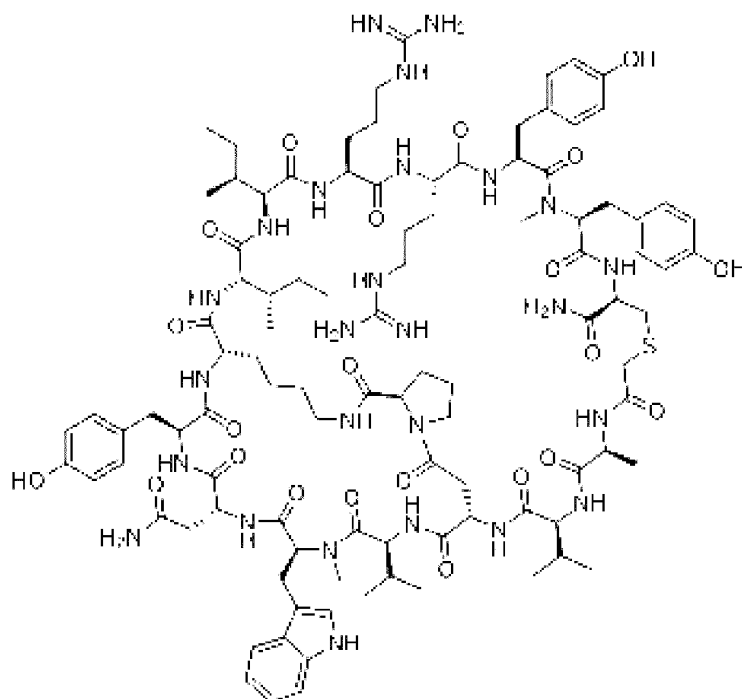
分析条件B : 保持時間=13.78分 : カラム ; Kinetex EVO C18 2.6μm 2.1×150mm、100Å ; : 移動相 ; A=0.025%TFA in H₂O、B=0.025%TFA in MeCN : 温度℃ : 60℃ : グラジエント (%B conc) ; 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95-95 : 流量0.25%

ESI-MS (+) 観測値m/z=1072.26 (M+2H)²⁺

[0239] [実施例9-16]

894 BiCyCle 006 (配列番号414) の合成

[化19]



[0240] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 mmol / g、0.32 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等量に対し、Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma pure / DIEA (5.3等量 / 10等量 / 5等量) 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、11残基目、13残基目を導入する際は90℃下、3分間2回反応を行った。12残基目を導入する際は50℃下、15分間2回反応を行った。15残基目を導入する際は50℃下、15分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3

分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目、13残基目のFmoc除去は25℃下、5分間2回繰り返し反応を行った。固相樹脂をDMF、DCMで順次洗浄し減圧乾燥後、DCMで膨潤させ、10等量のPhSiH₃、0.2等量のPd(PPh₃)₄を加え室温で1時間振盪した。固相樹脂をDCMで5回、DMFで5回、ジエチルエーテルで3回洗浄し乾燥させた。固相樹脂をNMPで膨潤し、5等量のHATU、5等量のDIEAを加え室温で30分間振盪した。樹脂を洗浄後、再度5等量のHATU、5等量のDIEAを加え室温で30分間振盪した。固相樹脂をDCMで5回、DMFで5回、ジエチルエーテルで3回洗浄した。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、前述した方法でα-アミノ基のFmoc基を除去したのち、5等量のクロロ酢酸、5等量のDIPCI、5等量のHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIAcOSuのDCM/DMF溶液(0.2M)を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、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に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9500rpm、1min)、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3.3mMとなるように5%含水DMSOに溶解後、7等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約12時間振盪した。得られた反応溶液をGenevaCEZ

－2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0241] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて（カラム；Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m（登録商標） 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）； 3分かけて7－32%、その後8分かけて32－37%、その後1分かけて37－60%：流量 120mL/min）精製後、凍結乾燥を行い、以下の条件で再度精製を行った。（カラム；Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m（登録商標） 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）；3分かけて11－36%、その後8分かけて36－41%、その後1分かけて41－60%：流量 120mL/min）

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225nm）クロマトグラムの面積比から算出し89.0%であった。

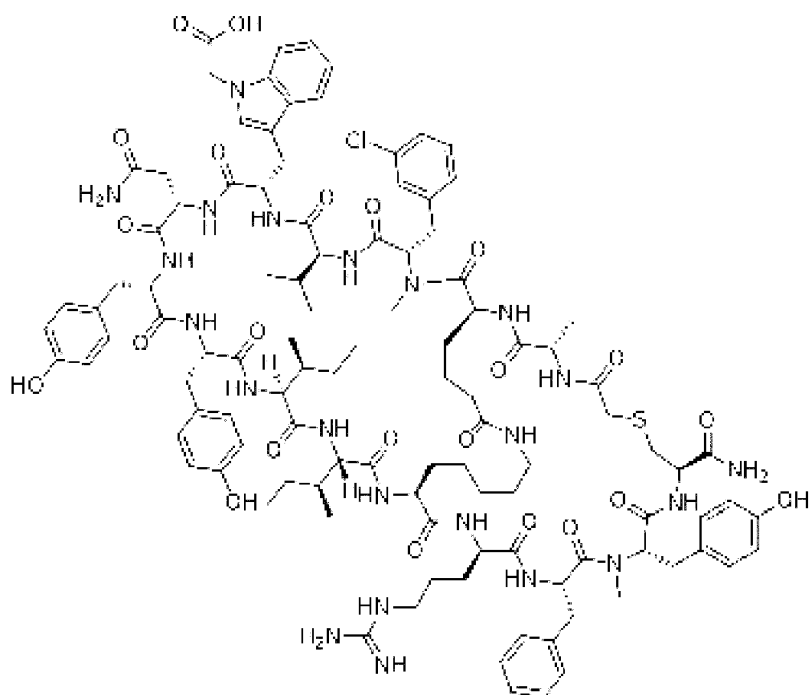
分析条件B：保持時間＝3.67分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm、100Å：移動相；A=0.025%TFA in H₂O、B=0.025%TFA in MeCN：温度 60℃：グラジエント（%B conc）；7.2分間かけて20－60%、その後0.3分間かけて60－95%、その後1.6分かけて95－95%：流量0.5mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z＝1055.13（M+2H）²⁺

[0242] [実施例9－17]

894 BiCyCle 012（配列番号419）の合成

[化20]



[0243] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 mmol/g、213 mg) 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。アミノ酸原料として Fmoc-W1aa (Allyl)-OH、Fmoc-Hgl (tBu)-OH、Fmoc-Hly (Boc)-OH を用いていること以外は Bicycle__01 及び Bicycle__06 の合成を参考に同様な方法で粗生成物を得た。

[0244] 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 (登録商標) 19 × 150 mm; 移動相; A = 0.1% TFA in H₂O、B = 0.1% TFA in

n MeCN : 温度 60℃ : グラジエント (%B) ; 3分かけて11 – 36%、その後8分かけて36 – 41%、その後1分かけて41 – 60% : 流量 1.7 mL/min

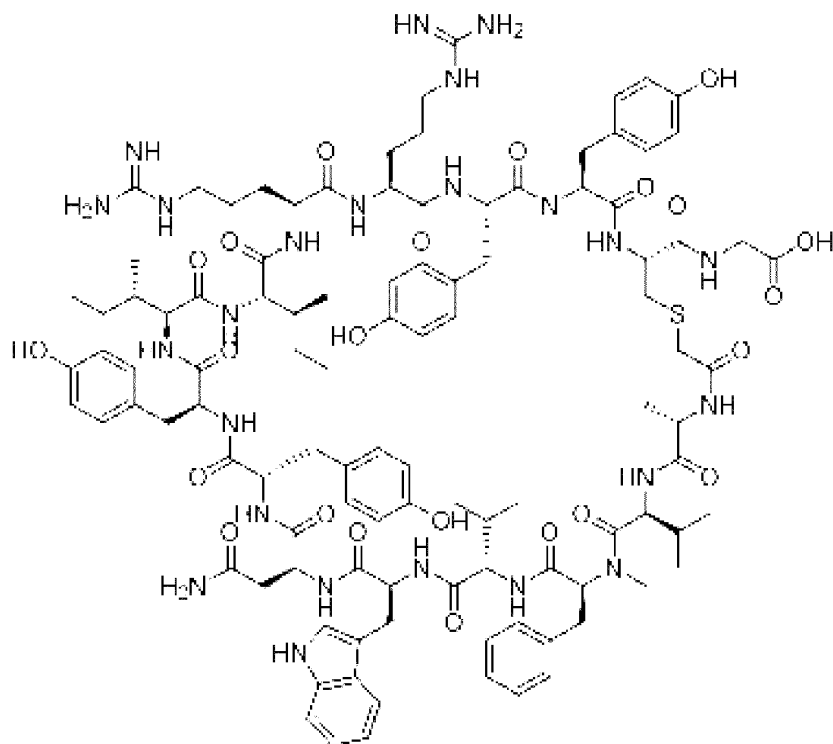
目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 94.8% であった。

分析条件B : 保持時間 = 4.76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℃ : グラジエント (%B conc) ; 7.2分間かけて20 – 60%、その後0.3分間かけて60 – 95%、その後1.6分かけて95% ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1093.23 (M + 2H)²⁺

[0245] [実施例 9 – 18]

894 3m G (配列番号 421) の合成

[化21]



[0246] Fmoc-Gly-wang resin (渡辺化学、0.78mmol/g、1.31g)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等量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2等量/4等量/8等量)を用い、DMF中60℃下、15分間2回繰り返し反応を行った。ただし、15残基目を導入する際は25℃で30分間1回反応を行った。11残基目、12残基目を導入する際は25℃で20分間2回繰り返し反応を行った。10残基目を導入する際は60℃で15分間1回反応を行った。7残基目を導入する際は60℃で15分間1回反応を行った。5残基目を導入する際は60℃で15分間1回反応を行った。

3 残基目を導入する際は、60℃で45分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidine のDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目及び13 残基目のFmoc除去は25℃で5分間2回繰り返し反応を行った。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(5等量)、5等量のDIPCI、5等量のHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIAcOSuのDCM/DMF溶液(0.2M)を調製し、固相樹脂に加え室温にて240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、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に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9500rpm、1min)、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4mMとなるようにDMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約12時間振盪した。得られた反応溶液をGeneva CEZ-2を用いて減圧濃縮した。

[0247] 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 (登録商標) 50x250mm: 移動相; A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN: 温度 60℃: グラジエント(%B); 5分間かけて0-

0%、その後2分間かけて0-4、2%、その後3分かけて4、2-28、6%、その後15、5分かけて28、6-33、7%、その後1、5分かけて33、7-60%：流量5分間18mL/minの後、2分間かけて18mL/min-118mL/min、その後は118mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し92.2%であった。

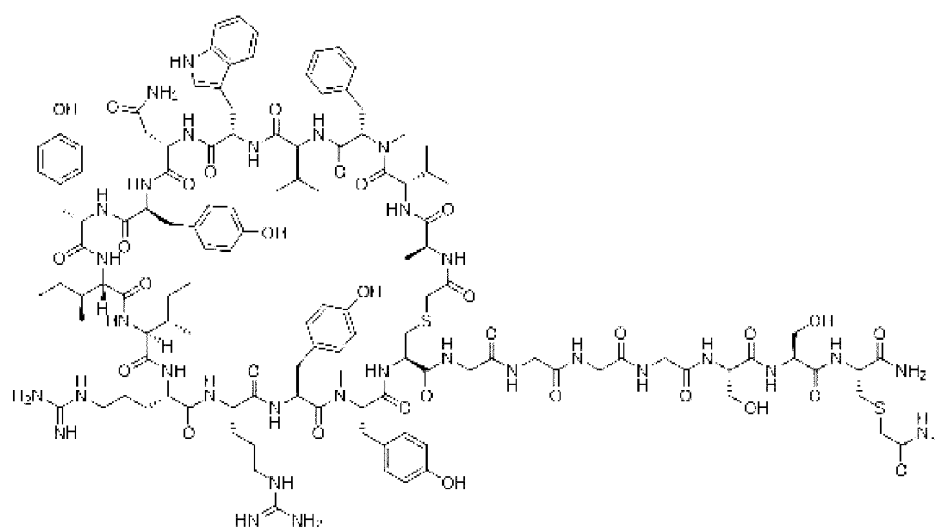
分析条件B：保持時間=11.52分：グラジエント(%B conc)；20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%

ESI-MS (+) 観測値m/z = 1078.24 (M+2H)²⁺

[0248] [実施例9-19]

894 3m G4S2C (ACNMe) (配列番号443) の合成

[化22]



[0249] 別途合成した 894__3m__G4S2C (20mg、7.07 μ mol) を DMF (0.1 mL) に溶解し、4 等量の TEA (3.94 μ L、28.3 μ mol) in DMF (39 μ L)、1.1 等量の 2-Iodo-N-Methylacetamide (39.1mg、0.25mmol) in DMF (15 μ L) を加え室温で 1 時間攪拌した。

[0250] 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 μ m (登録商標) 50 $\times$ 150 mm: 移動相; A=0.1% TFA in H₂O、B=0.1% TFA in MeCN: 温度 60°C: グラジエント (%B); 3 分間かけて 6-31、その後 8 分間かけて 31-36%、その後 1 分かけて 36-60%: 流量 17 mL/min)。

目的物の純度は分析条件 B の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 97.3% であった。

分析条件 B: 保持時間=3.53 分: カラム; Kinetex EVO C18 2.6 μ m 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°C: グラジエント (%B conc); 7.2 分間かけて 20-60%、その後 0.3 分間かけて 60-95%、その後 1.6 分間かけて 95-95%: 流量 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1337.32 ($M+2H$)²⁺

[0251] [実施例 9-20]

894 0263 (配列番号 487) の合成

Fを加え25℃下、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、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A (TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物)を加え、室温で60分振盪した。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(9000rpm、2min)、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5mMとなるようにDMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で終夜振盪した。反応溶液をSavant Explorer Speed Vacを用いて減圧濃縮した。得られた固体をペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5mMとなるようにDMSOに溶解後、MePEG4c(1.2等量)、HATU(1.1等量)、DIEA(3等量)を加え室温で1時間振盪した。

[0253] 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 5μm (登録商標) 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); 3分間かけて13-38%、その後8分かけて38-43%、その後1分かけて43-60%; 流量120mL/min。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS(UV波長225nm)クロマトグラムの面積比から算出し92.3%であった。

分析条件B: 保持時間=5.28分; カラム; Kinetex EVO C

18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å：移動相；A=0.02
5% TFA in H_2O 、B=0.025% TFA in MeCN：温度
60°C：グラジエント（%B conc）；7.2分間かけて20–60
%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.6分かけて95–9
5%：流量0.5 mL/min

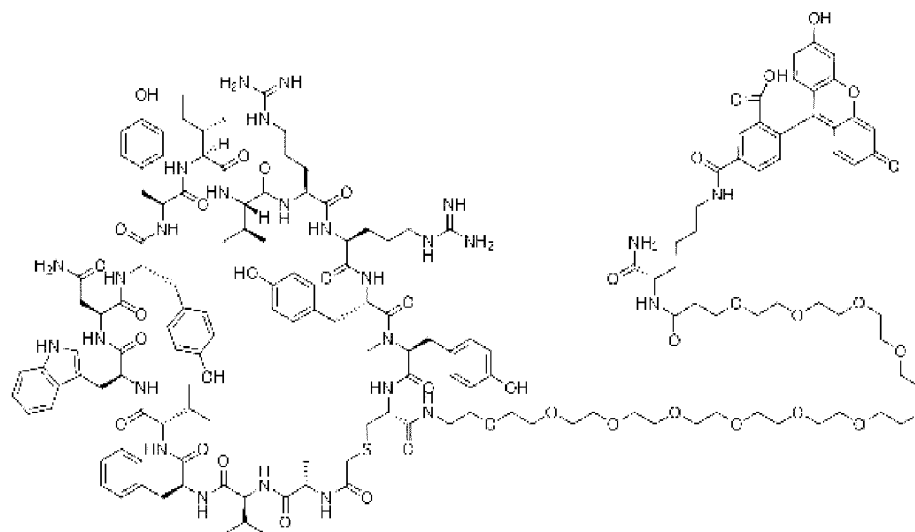
ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1136.17$ ($M+2H$)²⁺

[0254] 以下のペプチド、リンカー及びペイロードの複合体を合成した。

[実施例10-1]

JCR hTfR 000894 PEG11 K FITC (配列番号
147) の合成

[化24]



[0255] Fmoc-NH-SAL-PEG-resin 1500–2000 Da

(渡辺化学、 0.38 mmol/g)を用い、一般的方法にしたがって、Fmoc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行った。縮合反応は縮合剤にHATUを用い 75°C で10分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、11残基目、12残基目は 25°C で20分間2回繰り返し反応を行った。13残基目、14残基目は 75°C で10分間2回繰り返し反応を行った。15残基目は 25°C で20分間1回反応を行った。16残基目は 25°C で60分1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と 75°C で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、13残基目、15残基目に関してはFmoc除去は 25°C で5分間反応させた後、10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樹脂に対し、5等量のクロロ酢酸のDMF溶液(0.2 M)、5等量のHATUのDMF溶液(0.5 M)、10等量のDIEAのDMF溶液(1 M)を固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。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/ H_2O /TIS/DODTの体積比 $92.5:2.5:2.5:2.5$ の混合物)を加え、室温で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°C に冷やした過剰のジエチルエーテルとヘキサンの混溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(1000 rpm 、 1 min)、上澄みをデカンテーションした。得られた

固体を氷冷したジエチルエーテルにて洗浄後、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に溶解後、6等量のトリエチルアミンを加えて、室温で終夜振盪した。得られた反応溶液に1.1等量の

FAM-OSuのDMSO溶液(0.71M)を加え30分攪拌した。反応溶液にAcOHを加えクエンチし、減圧下溶媒を濃縮した。

[0256] 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; XSelect C18 30×150mm (Lot No. 151i3629811308): 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); 3分間かけて6-31%、その後8分間かけて31-36%、その後1分かけて36-60%: 流量45mL/min)。

[0257] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS(UV波長225nm)クロマトグラムの面積比から算出し97.1%であった。

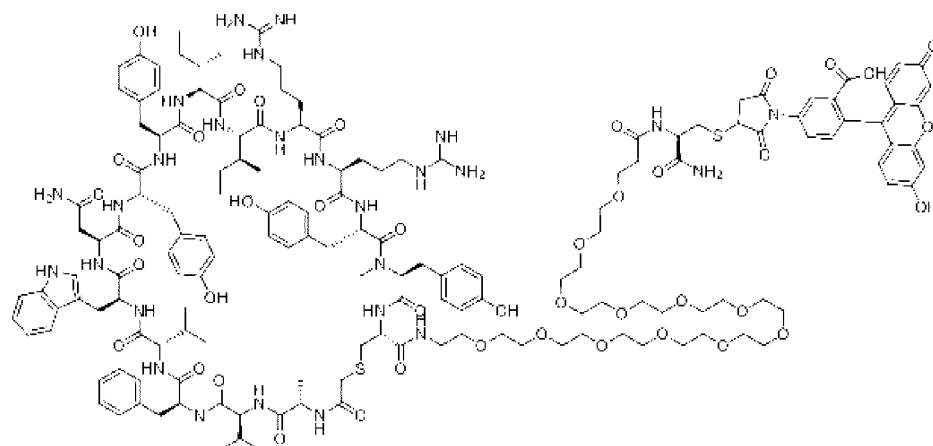
分析条件B: 保持時間=13.20分: グラジエント(%B conc); 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95%

ESI-MS(+) 観測値m/z=793.2 理論値 792.6 (M+4H)⁴⁺

[0258] [実施例10-2]

894 v01 PEG12 C Mal (FITC) (配列番号166)
の合成

[化25]



[0259] Sieber amide resin (渡辺化学、0.6 mmol/g、0.19 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等量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (5.3等量/5等量/10等量)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、13残基目は75℃下、10分2回反応を行った。11残基目、12残基目は25℃で20分間2回繰り返し反応を行った。15残基目、17残基目は25℃下、30分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、1

3 残基目、15 残基目、17 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下、5 分間反応を行った後、25℃ 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、前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち、5 等量のクロロ酢酸 in DMF、5 等量の HATU in DMF、10 等量の DIEA in DMF を固相樹脂に加え室温にて 30 分振盪することにより行った。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、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 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 (10000 rpm、1 min)、溶液をデカンテーションし、固体を 0℃ に冷やしたジエチルエーテルで洗浄後、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 に溶解後、6 等量のトリエチルアミンを加えて、室温で終夜振盪した。得られた反応溶液を Savant Explorer Speed Vac. を用いて減圧濃縮した。得られた混合物を DMSO に溶解し 3 等量の酢酸銀を加え 3 時間振盪した。10 等量の DTT を加えた後、遠心分離し上澄みを回収した。

[0260] 得られた粗中間体ペプチド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 (登録商標) 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) ; 3 分間かけて 9-34%、その後 8 分間かけて 34-39%、その後 1 分かけて 39

－60%：流量120 mL/min）。

精製した中間体ペプチド（29.8 mg、10.6 μ mol）をDMSO（424 μ L）に溶かし、1.1等量のフルオレセイン－5－マレイミド、5等量のDIEAを加え1時間攪拌後、酢酸でクエンチした。

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；COSMOS IL PBr 10×150 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）；3分間かけて23－48%、その後8分間かけて48－53%、その後1分かけて53－60%：流量5 mL/min）。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し82.8%であった。

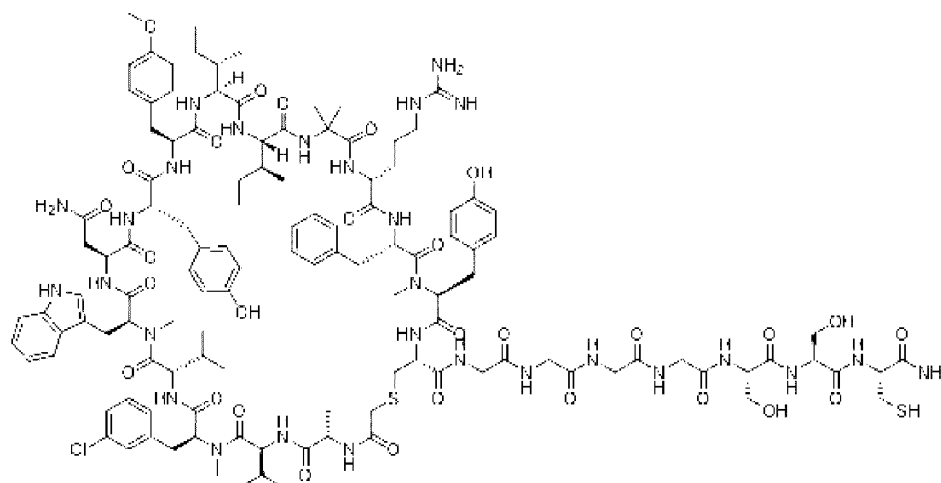
分析条件B：保持時間=13.93分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150 mm、100 Å：移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度 40℃：グラジエント（%B conc）；20分間かけて20－60%、その後1分間かけて60－95%、その後5分かけて95%：流量0.25 mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z=1076.51 理論値（M+2H）²
+

[0261] [合成例10-3]

894 variant 61 G4S2C（配列番号358）の合成

[化26]



[0262] Sieber amide resin (渡辺化学、0.73 mmol/g、1.37 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等量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2等量/4等量/8等量)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2回反応を行った。12残基目は25℃下、20分間2回繰り返し反応を行った。13残基目は75℃下、10分間2回反応を行った。15残基目、22残基目は25℃下、30分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件

とした。ただし4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃で5分間反応を行った後、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、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、10等量のクロロ酢酸、10等量のDIPCI、10等量のHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIAcOSuのDCM/DMF溶液(0.2M)を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、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90:2.5:2.5:5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(9500rpm、1min)、溶液をデカンテーションし減圧下乾燥させた。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5mMとなるようにDMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約15時間振盪した。反応液を酢酸でクエンチし、GenevacHT-12を用いて減圧濃縮した。得られた混合物をDMSO(20mL)に溶解し3等量の酢酸銀を加え3時間振盪した。2M DTT水溶液(11等量)を加えた後、遠心分離し上澄みを回収後、減圧下濃縮し粗生成物を得た。

[0263] 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 (登録商標) 50x250mm: 移動相; A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN: 温度 60℃: グラジエント(%B); 5分間かけて6.

7-6. 7%、その後2分間かけて6. 7-10. 3%、その後3分かけて10. 3-35. 8%、その後15. 5分かけて35. 8-40. 8%、その後1. 5分かけて40. 8-60%：流量5分かけて18 mL/min-18 mL/min、その後2分かけて18 mL/min-118 mL/min、その後118 mL/min、)。

目的物の純度は分析条件B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. 8%であった。

分析条件B：保持時間=5. 45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. 2分間かけて20-60%、その後0. 3分間かけて60-95%、その後1. 6分かけて95-95%：流量0. 5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1289. 65 (M+2H)²⁺

[0264] 以下のとおり、ペプチド又はリンカー付加ペプチドを合成した。なお合成したペプチド、リンカー付加ペプチドについては表5、リンカーについては表6に示した。

[0265]

[表5]

Patent ID	名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Linker
527 894_v166		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	de -OH
528 894_v167		A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	de -OH
529 894_v168		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	E	dr	F	MeY	C	de -OH
530 894_v169		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hgl	dr	F	MeY	C	de -OH
531 894_v170		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C	de -OH
532 894_v171		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C	de -OH
533 894_v172		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C	de -OH
534 894_v173		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dk	F	MeY	C	de -OH
535 36_GG_GNHS)		A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	S	C				G G G -NHS ester
536 36_G4S2_GNHS)		A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	S	C				G G G -NHS ester
537 894_3m_GG_GNHS)		A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	G G G -NHS ester
538 894_3m_G4S2_GNHS)		A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	G G G -NHS ester
539 894_variant_03_G_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G KN3
540 894_variant_03_G_short_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G PEG4c KN3
541 894_variant_03_G_middle_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G PEG3c KN3
542 894_variant_03_G_long_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G PEG12c KN3
543 894_variant_61_G_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C	G KN3
544 894_variant_61_G_short_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C	G PEG4c KN3
545 894_variant_61_G_middle_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C	G PEG3c KN3
546 894_variant_61_G_long_Azi		A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C	G PEG12c KN3
547 894_3142		A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C	G KN3
548 894_3143		A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C	G KN3
549 894_3144		A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	D	R	F	R	C	G KN3
550 894_3145		A	V	MeF	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	all	R	dr	F	MeY	C	G KN3
551 894_3147		A	V	MeNaI1	V	vleNaI	N	NaI1	NaI1	I	I	K	K	Y	MeY	C	G KN3
552 894_3148		MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	da	F	MeY	C	G KN3

[0266]

[表6-1]

Patent	Seq												
ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
553	G												
554	G	KN3											
555	G	OH											
556	G	K(Maleimide)	C										
557	G	G	K(Maleimide)	C									
558	G	G	S	K(Maleimide)	C								
559	G	G	S	S	K(Maleimide)	C							
560	G	G	G	S	S	K(Maleimide)	C						
561	G	G	G	G	S	S							
562	G	G	S	G	S	G							
563	de	G	G	G	S	S							
564	G	de	G	de	S	S							
565	G	dk	G	dk	S	S							
566	G	de	G	dk	S	S							
567	G	G	G	G	S	S							
568	G	G	R	G	R	S	K(Maleimide)						
569	G	G	G	G	S	S	K(Maleimide)						
570	G	MeG	S	MeG	S	S	K(Maleimide)						
571	G	G	G	G	S	S	K(Maleimide)						
572	G	MeG	S	MeG	S	S	K(Maleimide)						
573	G	G	G	G	S	S	K(Maleimide)						
574	G	G	S	G	S	S	K(Maleimide)	C					
575	G	G	S	G	E	S	K(Maleimide)	C					
576	G	G	E	S	E	S	K(Maleimide)	C					
577	G	S	S	G	S	S	K(Maleimide)	C					
578	G	G	R	G	R	S	K(Maleimide)	C					
579	G	G	R	S	E	S	K(Maleimide)	C					
580	G	G	G	G	S	S	K(Maleimide)	C					
581	G	G	G	G	S	S	C(AcNMe)						
582	G	KCOpi2aa	KCOpi2aa	KCOpi2aa	S	S	C(AcNMe)						

[表6-2]

583	G	KCOipizaa	KCOipizaa	G	S	S	C(AcNMe)
584	G	de	de	de	S	S	C(AcNMe)
585	G	de	de	G	S	S	C(AcNMe)
586	G	KCOmeglumine	G	G	S	S	C(AcNMe)
587	G	KCOipizaa	G	de	S	S	C(AcNMe)
588	G	G	KCOipizaa	de	S	S	C(AcNMe)
589	G	KCOipizaa	G	G	S	S	C(AcNMe)
590	G	G	KCOipizaa	G	S	S	C(AcNMe)
591	G	G	G	KCOipizaa	S	S	C(AcNMe)
592	G	KCOmeglumine	G	de	S	S	C(AcNMe)
593	G	G	KCOmeglumine	de	S	S	C(AcNMe)
594	G	de	G	KCOipizaa	S	S	C(AcNMe)
595	G	G	de	KCOipizaa	S	S	C(AcNMe)
596	G	de	G	KCOmeglumine	S	S	C(AcNMe)
597	G	G	de	KCOmeglumine	S	S	C(AcNMe)
598	G	G	KCOmeglumine	G	S	S	C(AcNMe)
599	G	G	G	KCOmeglumine	S	S	C(AcNMe)
600	G	KCOipizaa	de	de	S	S	C(AcNMe)
601	G	de	KCOipizaa	de	S	S	C(AcNMe)
602	G	de	de	KCOipizaa	S	S	C(AcNMe)
603	G	de	de	de	S	S	C(AcNMe)
604	G	G	S	G	S	S	G
605	G	G	S	G	S	S	S
606	G	G	R	G	R	S	K(Maleimide)
607	G	G	Q	G	Q	S	G
608	de						
609	de	de					
610	de	MeG	de				
611	MeG	MeG	MeG				
612	PEG4c	dk					

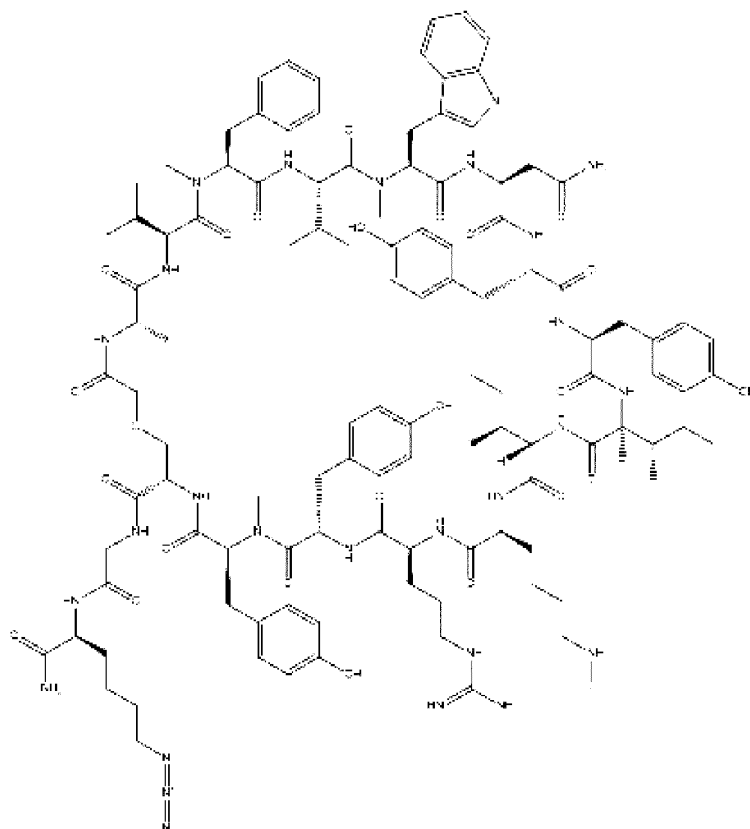
[表6-3]

613	PEG12c	dk		PEG4c	dk		
614	PEG4c	de		PEG4c	dk		
615	PEG4c	dr		PEG4c	dk		
616	PEG4c	de		PEG4c	de	PEG4c	dk
617	PEG4c	dr		PEG4c	or	PEG4c	dk
618	PEG4c	dk					
619	PEG12c	dk					
620	PEG4c	de		PEG4c	dk		
621	PEG4c	dr		PEG4c	dk		
622	PEG4c	de		PEG4c	de	PEG4c	dk
623	PEG4c	dr		PEG4c	or	PEG4c	dk
624	PEG4c	KTzMal					
625	PEG8c	KTzMal					
626	PEG12c	KTzMal					
627	PEG4c	K(Maleimide)					
628	PEG8c	K(Maleimide)					
629	PEG12c	K(Maleimide)					
630	KN3						
631	PEG4c	KN3					
632	PEG8c	KN3					
633	PEG12c	KN3					
634	G	PEG12c	gAbu				
635	G	PEG4c	gAbu				
636	G	PEG4c	PEG4c	gAbu			
637	G	G	R	G	R	S	gAbu
638	G	PEG4c	R	PEG4c	R	PEG4c	gAbu
639	G	G	Q	G	Q	S	gAbu
640	G	G	G	G	S	S	G
641	G	G	G	G	S	S	G
642	PEG12c	di(CHO4PhCO)	NH2			di(CHO4PhCO)	NH2
643	G	G	G	G			
644	G	G	G	G	S	S	C

[0269] [合成例 1 – 1]

8 9 4 3 1 4 2 (配列番号 5 4 7) の合成

[化27]



[0270] Sieber amide resin (渡辺化学、0.48 mmol/g、0.52 g) を用い Fmoc 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 を自動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。合成は実施例 1 と同様に行った。

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 (登録商標) 50 $\times$ 150 mm; 移動相: A=0.1% TFA in H_2O 、B=0.1% TFA in MeCN; 温度: 40 $^\circ\text{C}$; グラジエント (%B): 3 分間かけて 7–32%、その後 8 分間かけて 32–37%、その後 1 分かけて 37–60%; 流量: 120 mL/min)。

[0271] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し94.20%であった。

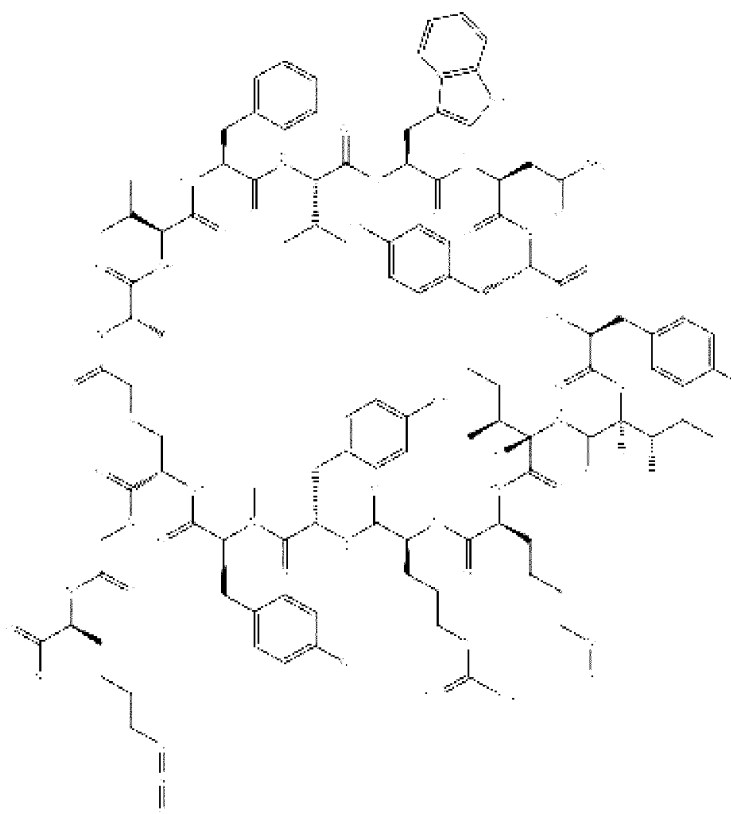
分析条件B：保持時間=4.12分；カラム Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1×150mm、100Å；移動相 A=0.025%TFA in H₂O、B=0.025%TFA in MeCN；温度60℃；グラジエント (%B conc) 7.15分間かけて20 – 60%、その後0.3分間かけて60 – 95%、その後1.55分間かけて95 – 95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS (+) 観測値m/z = 1147.70 (M+2H)²⁺

[0272] [実施例1-2]

894 3143 (配列番号548) の合成

[化28]



[0273] Sieber amide resin (渡辺化学、0.48 mmol/g、0.52 g) を用い Fmoc 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 を自動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。合成は実施例 1 と同様に行った。

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 (登録商標) 50 $\times$ 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 分間かけて 6–6%、その後 1 分間かけて 6–31%、その後 8 分かけて 31–36%、その後 1 分かけて 36–60%; 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)。

[0274] 目的物の純度は以下の分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 97.61% であった。

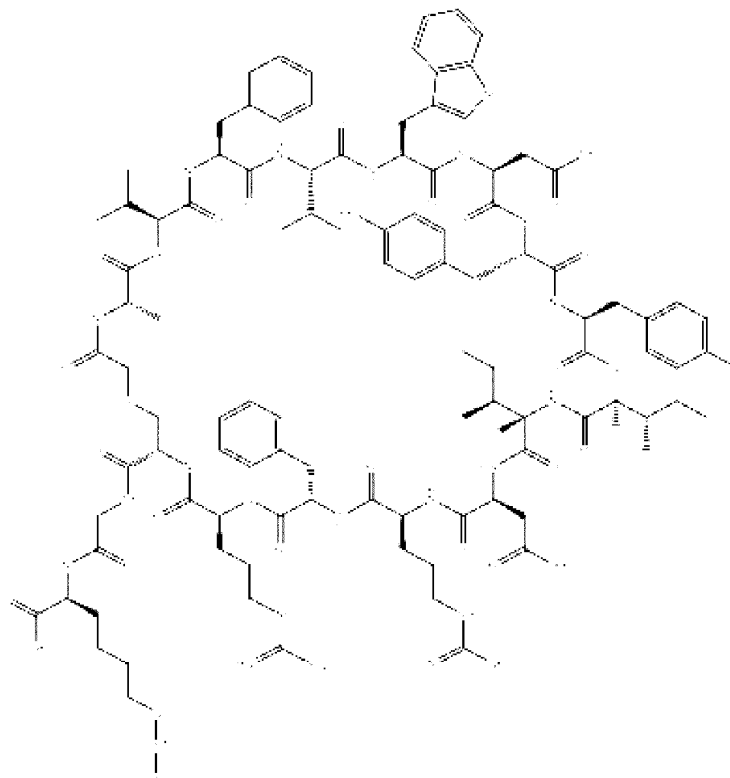
分析条件: 保持時間=3.75 分; カラム Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1 $\times$ 150 mm、100 Å; 移動相 A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN; 温度 60°C; グラジエント (%B conc) 7.15 分間かけて 20–60%、その後 0.3 分間かけて 60–95%、その後 1.55 分間かけて 95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1133.66$ ($M+2H$)²⁺

[0275] [実施例 1–3]

894 3144 (配列番号 549) の合成

[化29]



[0276] Sieber amide resin (渡辺化学、0.48 mmol/g、0.52 g) を用い Fmoc 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 を自動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。合成は実施例 1 と同様に行った。

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 (登録商標) 50 $\times$ 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 分間かけて 8–8%、その後 1 分間かけて 8–33%、その後 8 分かけて 33–38%、その後 1 分かけて 38–60%; 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)。

[0277] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し97.52%であった。

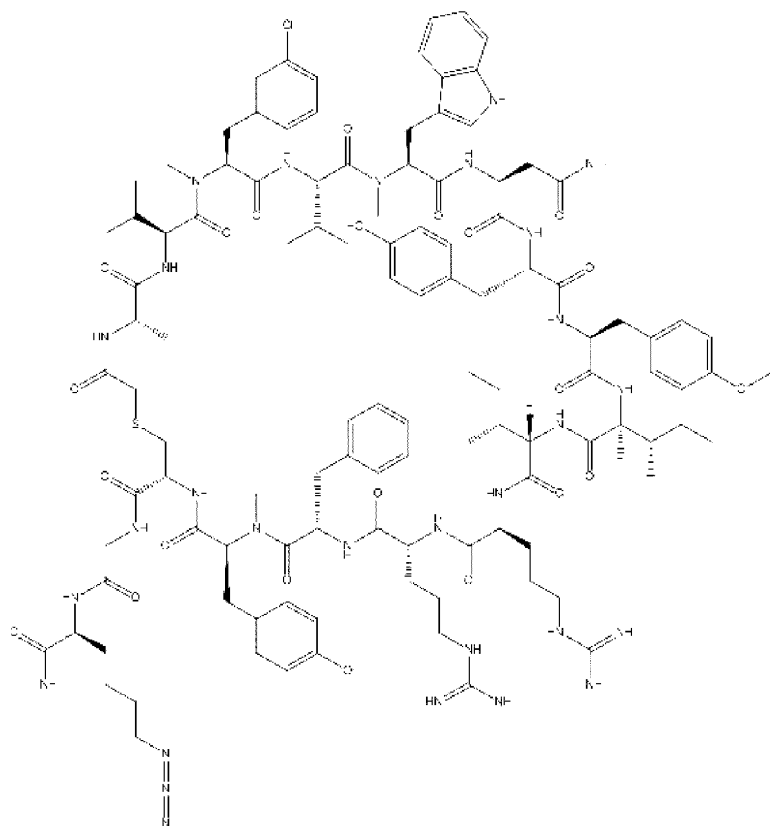
分析条件B: 保持時間=3.97分; カラム Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1×150 mm、100 Å; 移動相 A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN; 温度60℃; グラジエント (%B conc) 7.15分間かけて20－60%、その後0.3分間かけて60－95%、その後1.55分間かけて95－95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値m/z=1108.62 (M+2H)²⁺

[0278] [実施例1－4]

894 3145 (配列番号550) の合成

[化30]



[0279] Sieber amide resin (渡辺化学、 0.48 mmol/g 、 0.52 g)を用いFmoc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を自動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。合成は実施例1と同様に行った。

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 $5\text{ }\mu\text{m}$ (登録商標) $50\times 150\text{ mm}$; 移動相: $A=0.1\%\text{ TFA in H}_2\text{O}$ 、 $B=0.1\%\text{ TFA in MeCN}$; 温度: 40°C ; グラジエント(%B): 3分間かけて13–38%、その後8分間かけて38–43%、その後1分かけて43–60%; 流量; 120 mL/min)。

[0280] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長 225 nm)クロマトグラムの面積比から算出し98.02%であった。

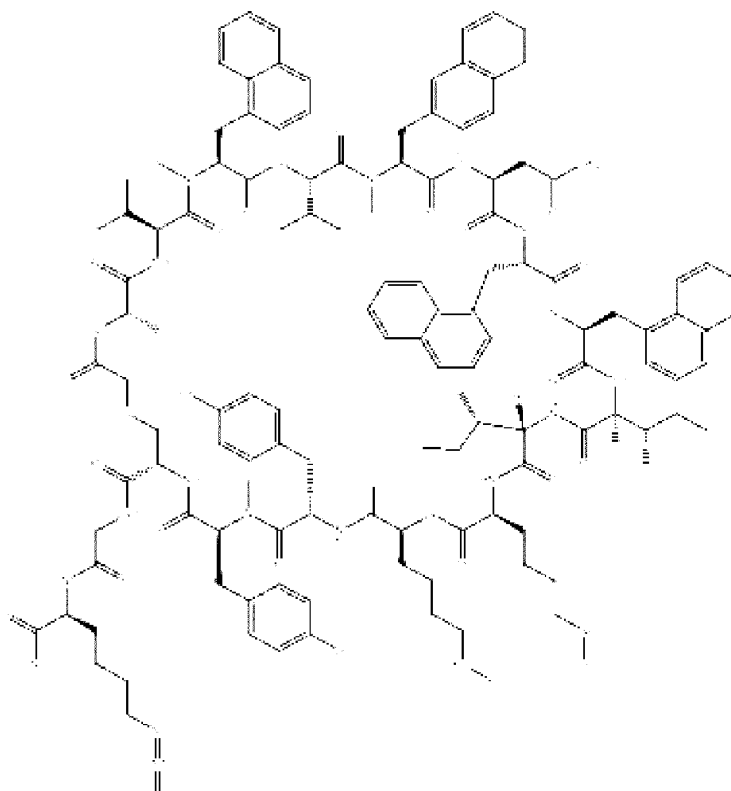
分析条件: 保持時間= 4.91 分 ; カラム Kinetex EVO C18 $2.6\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2.1\times 150\text{ mm}$ 、 $100\text{ }\text{\AA}$; 移動相 $A=0.025\%\text{ TFA in H}_2\text{O}$ 、 $B=0.025\%\text{ TFA in MeCN}$; 温度 60°C ; グラジエント(%B conc) 7.15分間かけて20–60%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.55分間かけて95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z=1177.95\text{ (M}+2\text{H)}^{2+}$

[0281] [実施例1–5]

894 3147 (配列番号551) の合成

[化31]



[0282] Sieber amide resin (渡辺化学、0.48mmol/g、0.52g)を用いFmoc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を自動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。合成は実施例1と同様に行った。

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（登録商標） 50 $\times$ 150mm；移動相：A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN；温度：40 $^{\circ}$ C；グラジエント（%B）：3分間かけて21–46%、その後8分間かけて46–51%、その後1分かけて51–60%；流量；120mL/min）。

[0283] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS (UV波長225nm) クロマトグラムの面積比から算出し96.34%であった。

分析条件：保持時間=6.24分；カラム Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1 $\times$ 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 $m/z = 1198.29$ (M+2H)²⁺

[0284] [実施例1-6]

894 3148 (配列番号552) の合成

43%、その後8分間かけて43-48%、その後1分かけて48-60%
；流量；120 mL/min）。

[0286] 目的物の純度は以下の分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し96.03%であった。

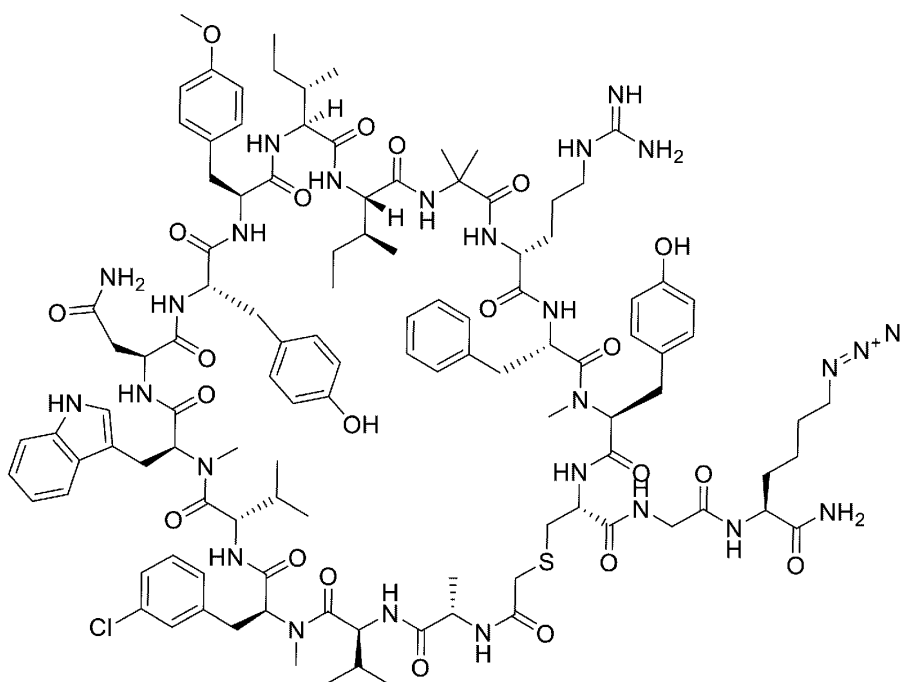
分析条件：保持時間=6.15分；カラム Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1 x 150 mm、100 Å；移動相 A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN；温度60℃；グラジエント（%B conc） 7.15分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1142.36$ ($M + 2H$)²⁺

[合成例1-7]

894 variant 61 G Azi（配列番号543）の合成

[化33]



[0287] Sieber amide resin（渡辺化学、0.47 mmol/

g、0.21g)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等量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA(5.3等量/5等量/10等量)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2回反応を行った。10残基目、11残基目、13残基目は75℃下、10分間2回繰り返し反応を行った。12残基目は25℃下、20分間2回反応を行った。15残基目は25℃下、20分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃で5分間反応を行った後、25℃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、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、10等量のクロロ酢酸、10等量のDIPCI、10等量のHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えClAcOSuのDCM/DMF溶液(0.2M)を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、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(9000rpm、2min)、溶液をデカンテーションし減圧下乾燥させた。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 に溶解後、5 等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約 14 時間振盪した。得られた反応溶液を Savant Explorer Speed Vac を用いて減圧濃縮した。

[0288] 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（登録商標） 50 $\times$ 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）；3 分間かけて 17–42%、その後 8 分かけて 42–47%、その後 1 分かけて 47–60%：流量 120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件 B の LC/MS（UV 波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し 92.8% であった。

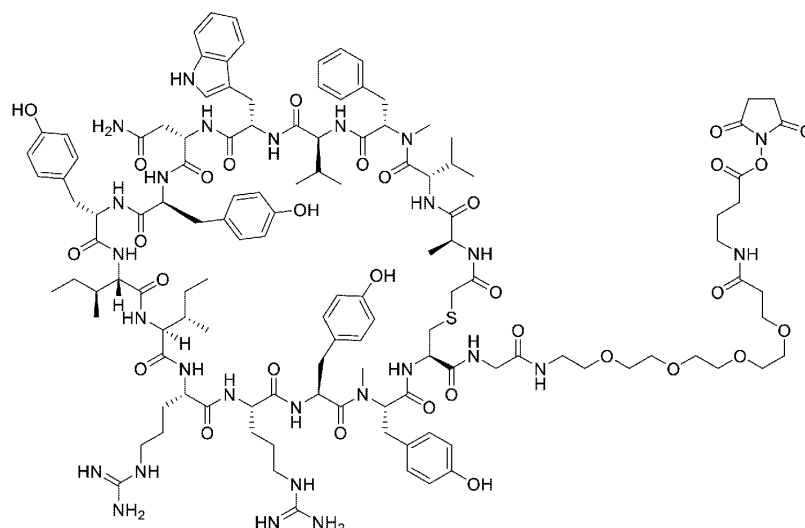
分析条件 B：保持時間=6.22 分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm、100 Å：移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度 60°C：グラジエント（%B conc）；7.2 分間かけて 20–60%、その後 0.3 分間かけて 60–95%、その後 1.6 分かけて 95–95%：流量 0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1142.31$ ($M+2H$)²⁺

[合成例 1–8]

hTfR 894 3m G PEG4 gAbu (NHS)（配列番号 635 記載のリンカーと配列番号 296 のペプチドの複合体）の合成

[化34]



[0289] Fmoc-Abu (4) -Alko resin (渡辺化学、1.00mmol/g、0.1g) より一般的な固相合成に従い調製したFmoc-PEG4c-Abu-Alko resinを用い、前述の一般的方法にしたがって、Fmocの除去から開始し、C末端カルボン酸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。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、0.2Mクロロ酢酸 in DMF (5等量)、0.5M HATU in DMF (5等量)、1M DIEA in DMF (10等量) を固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。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、塩化メチレンで3回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 (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）に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（10000 rpm、1 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、得られた固体を乾燥し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に溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約17時間攪拌した。反応溶液をSavant Explorer Speed Vacを用いて減圧濃縮した。得られたC末端カルボン酸ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるよう混合物をDMSO／H₂O（9／1、4 mL）に溶かし、HOSu（230 mg、20等量）及びEDC HCl（383.4 mg、20等量）を加え攪拌した。

[0290] 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（登録商標） 30×150 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）；3分間かけて9→34%、その後8分間かけて34→39%、その後1分かけて39→60%：流量45 mL/min。

[0291] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し87.4%であった。

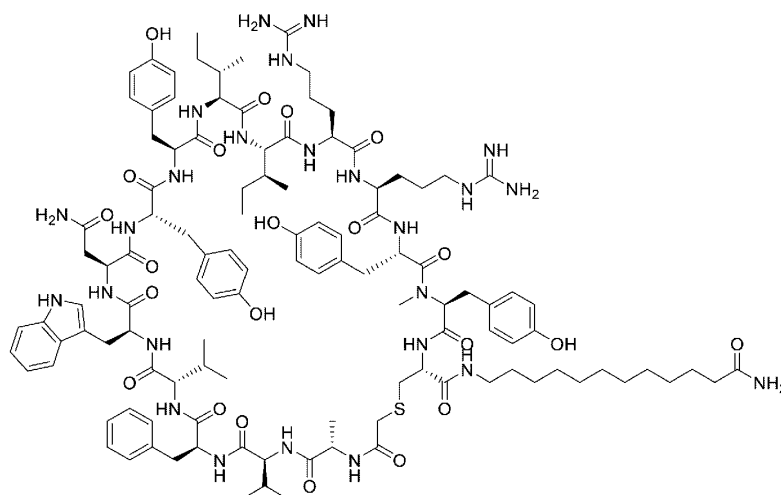
分析条件B：保持時間=4.25分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å：移動相；A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN：温度 40℃：グラジエント（%B conc）；7.2分間かけて20→60%、その後0.3分間かけて60→95%、その後1.6分間かけて95→95%：流量0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z = 1292.86（M+2H）²⁺

[合成例 1 - 9]

894 C12NH2 (脂肪酸リンカーと配列番号1の複合体) の合成

[化35]



[0292] Sieber amide resin (渡辺化学、0.53 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 等量に対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (5.3 等量/5 等量/10 等量) を用い、DMF 中 75℃ 下、10 分間反応を行った。ただし、1 残基目、9 残基目、10 残基目、13 残基目、14 残基目は 75℃ 下、10 分間 2 回反応を行った。11 残基目、12 残基目は 30℃ 下、20 分間 2 回反応を行った。15 残基目を導入する際は 30℃ 下、20 分間 1 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% piperidine の DMF 溶液と 75℃ で 3 分間反応させることを基本条件とした。ただし、11 残基目、12 残基目、14 残基目、15 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下 5 分間反応を行った後、25℃ 下 10 分間反応を行った。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（5等量）、5等量のDIPCI、5等量のHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIAcOSuのDCM/DMF溶液（0.2M）を調製し、固相樹脂に加え室温にて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、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5:2.5:2.5:2.5の混合物）を加え、室温で60分振盪した。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に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（6000rpm、4min）、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5mMとなるようにDMSOに溶解後、5等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約2時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

[0293] 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 5μm（登録商標） 30×150mm：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）； 3分間かけて11-36%、その後3分かけて36-41%、その後1分かけて41-60%：流量45mL/min）。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225nm）クロマトグラムの面積比から算出し96.3%であった。

分析条件B：保持時間=12.61分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6μm 2.1×150mm、100Å：移動相；A=0.0

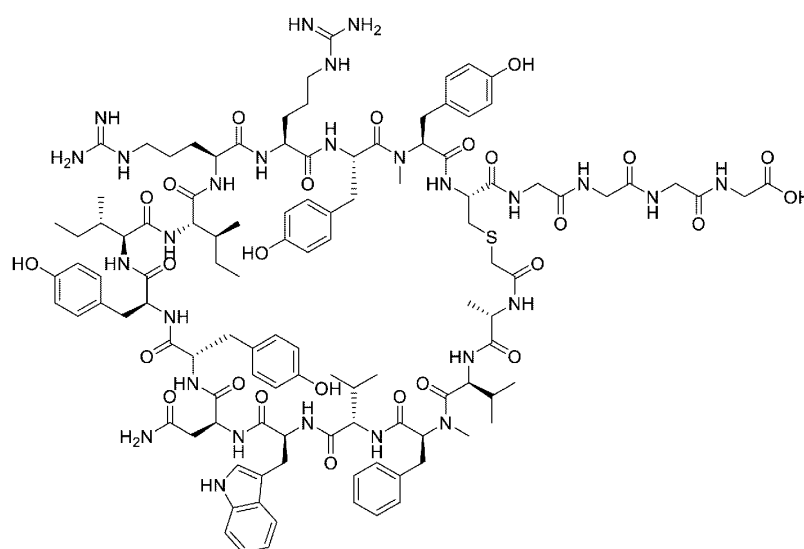
25% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN :
 温度 60℃ : グラジエント (%B conc) ; 20分間かけて20-60%、その後1分間かけて60-95%、その後5分かけて95% : 流量0.25 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1140.56$ ($M+2H$)²⁺

[0294] [合成例 1-10]

894 3m G4 (配列番号 643 記載のリンカーと配列番号 296 のペプチドの複合体) の合成

[化36]



[0295] Fmoc-Gly-wang resin (渡辺化学、0.7 mmol/g、1.43 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。縮合反応は縮合剤に HATU を用い 75℃ で 10 分間 1 回反応させることを基本条件とした。ただし、15 残基目を導入する際は 25℃ で 20 分間 1 回反応を行った。13 残基目を導入する際は 75℃ で 10 分間 2 回繰り返し反応を行った。2 残基目を導入する際は 75℃ で 45 分間を 2 回繰り返し反

応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃で5分間反応させた後、10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（4等量）のDMF溶液（0.2M）を4等量のDIPCIのDMF溶液（0.5M）、4等量のHOSuのDMF溶液（0.5M）を加え室温にて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、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に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物をろ取し、ジエチルエーテルで洗浄後、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5mMとなるようにDMSO/IPA/H₂O（90/5/5）に溶解後、5等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約16時間攪拌した。得られた反応溶液をGenevaCHT-12を用いて減圧濃縮した。

[0296] 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（登録商標） 30x250mm：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）；0.1分間かけて50-7%、その後1.9分間かけて7-7%、その後3分かけて7-32%、その後11分かけて32-37%、その後1分かけて37-60%：流

量 120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 90.6% であった。

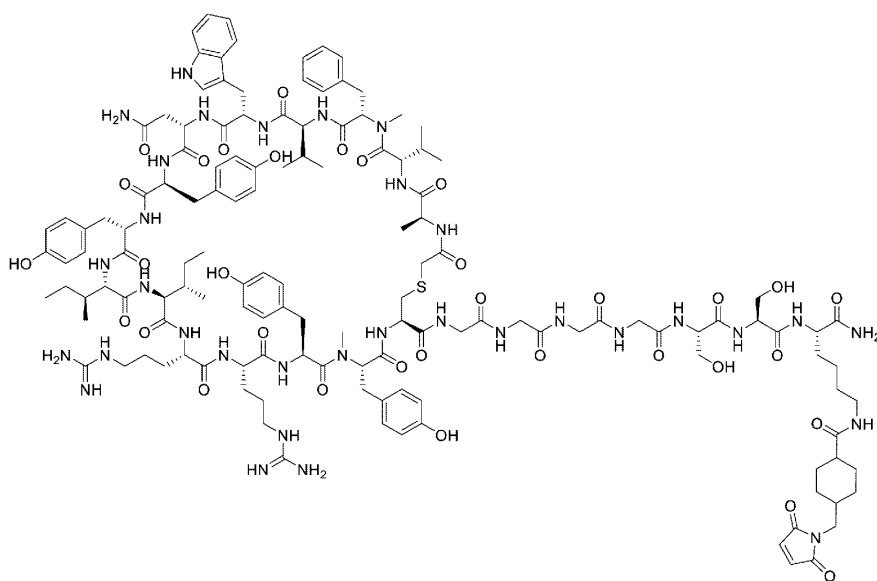
分析条件B: 保持時間 = 11.34分: グラジエント (%B conc);
20分間かけて 20-60%、その後1分間かけて 60-95%、その後5分かけて 95%

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1163.59$ ($M + 2H$)²⁺

[0297] [合成例 1-11]

894 3m G4S2 K (Mal) (配列番号561記載のリンカーと配列番号296のペプチドの複合体) の合成

[化37]



[0298] Sieber amide resin (渡辺化学、0.52 mmol/g、2.4 g X 3) を用い、一般的方法にしたがって、Fmoc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行った。縮合反応は縮合剤にDIPCI、Oxyma pureを用い75℃で10分間1回反応させることを基本条件とした。ただし、15残基目は50℃

で20分間反応を行った。3残基目、4残基目、8残基目、10残基目、13残基目、14残基目は75℃で10分間2回反応を行った。11残基目、12残基目は50℃で20分間2回反応を行った。2残基目は75℃で60分間3回反応を行った。1残基目は75℃で20分間2回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃で3分間反応させることを基本条件とした。ただし、15残基目、16残基目、17残基目に関してはFmoc除去は室温で5分間反応させた後、75℃で3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、まず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。その後、クロロ酢酸（5等量）、DIPCI（5等量）、HOSu（5等量）をDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えCIACOSuのDCM/DMF溶液（0.15M）を調製し、固相樹脂に加え室温にて180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に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物をろ取し、0℃に冷やした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。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4.9mMとなるようにDMSOに溶解後、7等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約1時間振盪した。得られた反応溶液にSMCCを1.05等量加え室温で1.5h振盪した。得られた反応溶液をGenevaC EZ-2 Eliteを用いて減圧濃縮した。

[0299] 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 (登録商標) 5 0 $\times$ 2 5 0 mm : 移動相 ; A = 0. 1 % T F A i n H₂O、B = 0. 1 % T F A i n M e C N : 温度 6 0 $^{\circ}$ C : グラジエント (% B) ; 5. 1 分間かけて 0 – 0 %、その後 1. 9 分間かけて 0 – 5 %、その後 5 分かけて 5 – 2 9 %、その後 1 3. 5 分かけて 2 9 – 3 4 %、その後 1. 5 分かけて 3 4 – 6 0 % : 流量 1 mL / m i n 0 – 5. 1 分まで、5. 1 分から 7. 0 分まで 1 – 1 1 9 mL / m i n、その後 1 1 9 mL / m i n)。

[0300] 目的物の純度は分析条件 B 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 4. 1 % であった。

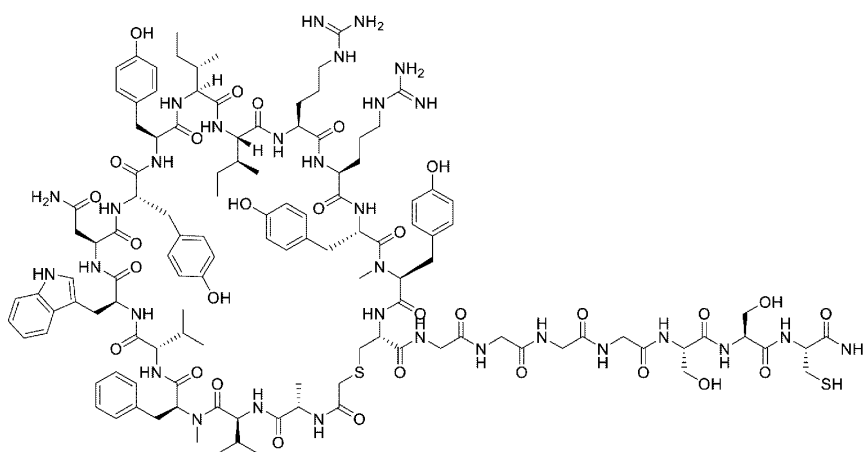
分析条件 B : 保持時間 = 1 1. 3 3 分 : グラジエント (% B c o n c) ; 2 0 分間かけて 2 0 – 6 0 %、その後 1 分間かけて 6 0 – 9 5 %、その後 5 分かけて 9 5 %

E S I – M S (+) 観測値 $m/z = 1424.0 (M + 2H)^{2+}$

[0301] [合成例 1 – 1 2]

8 9 4 3 m G 4 S 2 C (配列番号 6 4 4 記載のリンカーと配列番号 2 9 6 のペプチドの複合体) の合成

[化38]



[0302] 別途合成した 8 9 4 _ 3 m _ G (5 0 0 m g、0. 2 1 m m o l) を D M F (5 m L) に溶解し、公知の方法で合成した 1. 2 等量の H – G l y – G

$\text{Ily-Gly-Ser(OtBu)-Ser(OtBu)-Cys(Trt)}$
)-NH_2 (207 mg、0.25 mmol)、1.2等量のEDC (39
 .1 mg、0.25 mmol)、1.2等量のDIEA (35.8 mg、0.
 25 mmol)を用い室温下、2.5時間攪拌した。0.24等量のH-
 $\text{Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)-Ser(OtBu)-Cys}$
 S(Trt)-NH_2 (41.4 mg、0.05 mmol)、0.24等量
 の7.8 mg、0.05 mmol)、0.24等量のDIEA (7.2 mg
 、0.05 mmol)を加え室温で2時間攪拌した。Biotage社V-
 10で濃縮後、得られた混合物をTFA/TIS/H₂O/DODT (92.
 5/2.5/2.5/2.5)中、室温下75分間反応させた。反応液をを
 0℃に冷やした過剰のジイソプロピ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、2 min)、溶液をデカン
 テーションした。得られた固体を0℃に冷やしたジエチルエーテルで洗浄し
 、遠心分離後(9000 rpm、2 min)、溶液をデカンテーションした
 。

[0303] 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 (登録商標) 50×150
 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); 3分間かけて5-3
 0%、その後8分間かけて30-35%、その後1分かけて35-60%:
 流量120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件BのLC/MS (UV波長225 nm) クロマト
 グラムの面積比から算出し96.1%であった。

分析条件B: 保持時間=3.52分: カラム; Kinetex EVO C
 18 2.6 μm 2.1×150 mm、100 Å: 移動相; A=0.02
 5% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN: 温度
 60℃: グラジエント(%B conc); 7.2分間かけて20-60
 %、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.6分間かけて95-

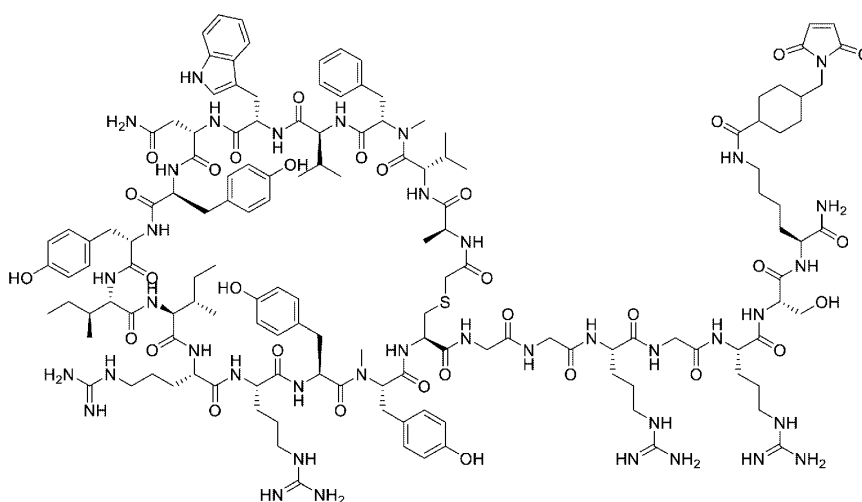
95% : 流量 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1301.89$ ($M + 2H$)²⁺

[0304] [合成例 1-13]

894 3m GGRGRS K (MaI) (配列番号 573 記載のリンカーと配列番号 296 のペプチドの複合体) の合成

[化39]



[0305] Sieber amide resin (渡辺化学、0.47 mmol/g、532 mg) を用い、一般的方法にしたがって、Fmoc 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行った。縮合反応は縮合剤に HATU を用い 75℃ で 10 分間 2 回反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目は 75℃ で 30 分間 2 回反応を行った。5 残基目、6 残基目、7 残基目、16 残基目、17 残基目、19 残基目、21 残基目、22 残基目は 75℃ で 10 分間 1 回反応を行った。11 残基目は 50℃ で 15 分間 2 回反応を行った。12 残基目、18 残基目、20 残基目は 50℃ で 15 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 50℃ で 15 分間 1 回反応を行った。また、Fmoc 除去は 20% piperidine の DMF 溶液と 75℃ で 3 分間反応させることを基本条件とした。ただし、

2 残基目、1 3 残基目に関しては F m o c 除去は室温で 5 分間 2 回反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は、クロロ酢酸（5 等量）、D I P C I（5 等量）、H O S u（5 等量）を D C M 中攪拌し D C M と同量の D M F を加え C I A c O S u の D C M / D M F 溶液（0. 1 5 M）を調製し、前工程にて得られた固相樹脂に加え室温にて 6 0 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 D M F で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄し減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A（T F A / H₂O / T I S / D O D T の体積比 9 2. 5 : 2. 5 : 2. 5 : 2. 5 の混合物）を加え、室温で 1 5 0 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とヘキサンの混溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9 5 0 0 r p m、1 m i n）、上澄みをデカンテーション後、0℃に冷やしたジエチルエーテルにて洗浄し、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 m M となるように D M S O（5 % 含水）に溶解後、7 等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約 3 時間振盪した。得られた反応溶液に S M C C を 1. 1 等量加え室温で 3 h 振盪した。得られた反応溶液を G e n e v a C E Z - 2 E l i t e を用いて減圧濃縮した。

[0306] 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（登録商標） 5 0 × 2 5 0 m m：移動相；A = 0. 1 % T F A i n H₂O、B = 0. 1 % T F A i n M e C N：温度 4 0℃：グラジエント（% B）；3 分間かけて 5 - 2 9 %、その後 8 分間かけて 2 9 - 3 4 %、その後 1 分かけて 3 4 - 6 0 %：流量 1 2 0 m L / m i n）。

[0307] 目的物の純度は分析条件 B 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 5. 4 % であった。

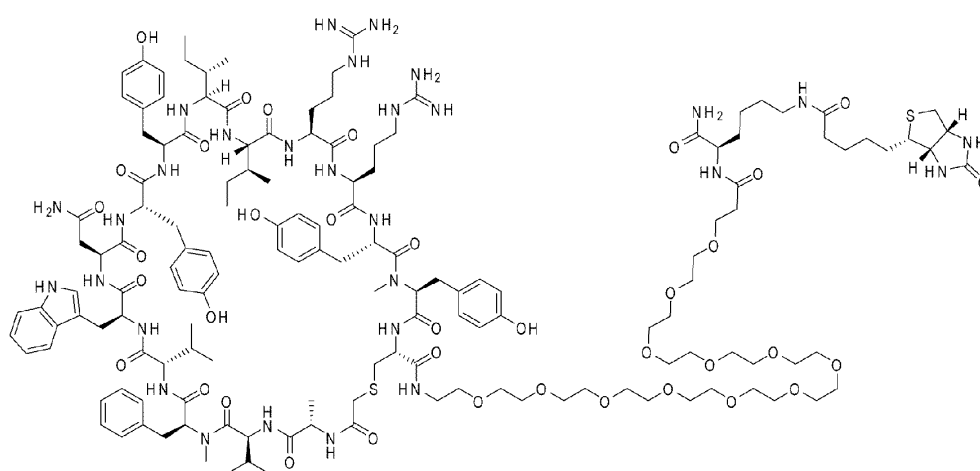
分析条件B：保持時間＝9.53分：グラジエント（%B conc）；20分間かけて20－60%、その後1分間かけて60－95%、その後5分かけて95%

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1005.7$ （ $M + 3H$ ）³⁺

[0308] [合成例1-14]

894 3m PEG12dk (Biotin) (配列番号613記載のリンカーと配列番号296のペプチドの複合体) の合成

[化40]



[0309] Sieber amide resin (渡辺化学、0.65 mmol/g、0.54 g) を用い Fmoc 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を自動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等量に対し、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure=5.3等量/10等量/5等量を用い、90℃下3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目は75℃下、30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分間反応を行った。脱Fmoc化は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3分間反応させることを基本条件とした。ただし2残基目、13残基

目のFmoc基の除去は25℃で5分間2回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、5等量のClAcOH in DMF、5等量のHATU in DMF、10等量のDIEA in DMFを加え室温にて30分振盪することで行った。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、塩化メチレンで3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)に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(10000rpm、1min)、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、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5mMとなるように5%含水DMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約16時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

得られた粗中間体ペプチド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 OBD (登録商標) 50 $\times$ 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); 3分間かけて5-30%、その後8分間かけて30-35%、その後1分かけて35-60%: 流量120mL/min)。

得られた中間体ペプチドのDMSO溶液(22mM、160 μ L)に対し、1.3等量のBiotin-NHS及び5等量のDIEAを加え室温で攪拌

した。2. 5時間後、反応液を酢酸でクエンチした。

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 O B D（登録商標） 1 9
x 1 5 0 m m：移動相；A = 0. 1 % T F A i n H₂O、B = 0. 1 % T
F A i n M e C N：温度 6 0 ° C：グラジエント（% B）；3分間かけ
て1 0 - 3 5 %、その後8分間かけて3 5 - 4 0 %、その後1分かけて4 0
- 6 0 %：流量1 7 m L / m i n）。

[0310] 目的物の純度は分析条件B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 8. 7 %であった。

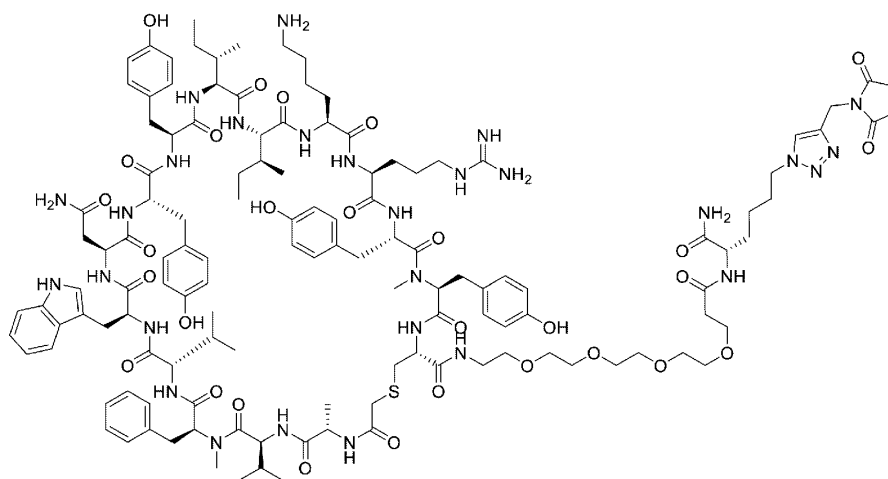
分析条件B：保持時間 = 4. 3 0 分：カラム；K i n e t e x E V O C
1 8 2. 6 μ m 2. 1 x 1 5 0 m m、1 0 0 Å：移動相；A = 0. 0 2
5 % T F A i n H₂O、B = 0. 0 2 5 % T F A i n M e C N：温度
6 0 ° C：グラジエント（% B c o n c）；7. 2分間かけて2 0 - 6 0
%、その後0. 3分間かけて6 0 - 9 5 %、その後1. 6分かけて9 5 %：
流量0. 5 m L / m i n

E S I - M S（+） 観測値 $m/z = 1 0 1 7. 7 6$ ($M + 3 H$)³⁺

[0311] [合成例 1 - 1 5]

8 9 4 1 1 K 3 M e P E G 4 C K T r z M a l（配列番号 6 2 4
記載のリンカーと配列番号 2 9 3 のペプチドの複合体）の合成

[化41]



[0312] Sieber amide resin (渡辺化学、0.52 mmol/g、0.19 g) を用い Fmoc の除去から開始し、目的のペプチドを合成した。その際、Biotage 社の Syro I を自動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 等量に対し、Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure = 3.2 等量/3 等量/6.3 等量を用い、75℃下 20 分間 2 回反応させることを基本条件とした。ただし、2 残基目、13 残基目、17 残基目は 75℃下、10 分間 3 回反応を行った。15 残基目は 25℃下、15 分間 2 回反応を行った。16 残基目は 25℃下、60 分間反応を行った。脱 Fmoc 化は 20% piperidine の DMF 溶液と 25℃下、5 分間反応させた後、15 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、5 等量のクロロ酢酸、5 等量の DIPEA、5 等量の HOSu を DCM 中攪拌し DCM と同量の NMP を加え CIAcOSu の DCM/NMP 溶液 (0.2 M) を調製し、固相樹脂に加え室温にて 90 分振盪することで行った。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

、塩化メチレンで3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)に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(9000rpm、3min)、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及びヘキサンにて洗浄後、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5mMとなるように9%含水DMSOに溶解後、10等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約1.5時間振盪した。得られた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

得られた粗中間体ペプチドは以下の条件を用いて精製した(カラム; Waters Xbridge (登録商標) C18 5μm OBD (登録商標) 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);3分間かけて9-34%、その後8分間かけて34-39%、その後1分かけて39-60%:流量120mL/min)。

凍結乾燥後、得られた中間体ペプチドのDMF溶液(15mM)に対し、2等量のCuSO₄·5H₂O水溶液(100mM)及び10等量のアスコルビン酸水溶液(500mM)を加えた後、2等量のN-プロパルギルマレイミドのDMF溶液(100mM)を加え室温で攪拌した。

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; COSMOSIL PBr 10×150mm: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);3分間かけて17-42%、その後8分間かけて42-47%、その

後1分かけて47-60%：流量5 mL/min）。

[0313] 目的物の純度は分析条件BのLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し82.7%であった。

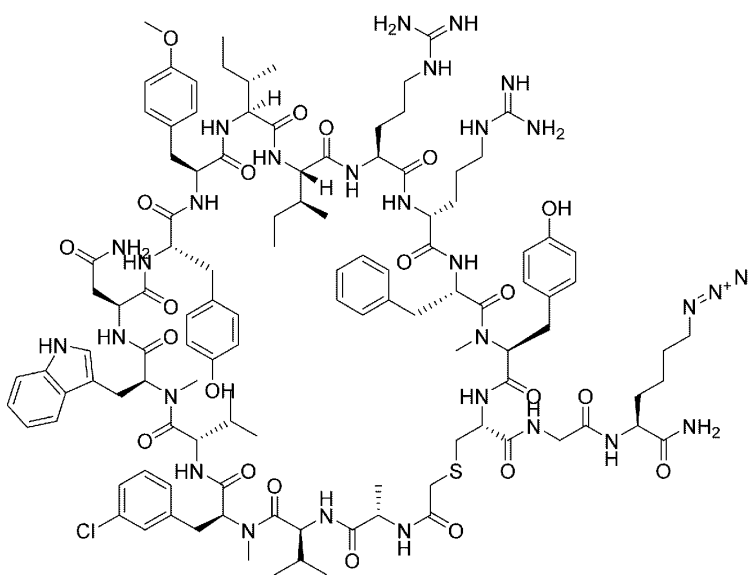
分析条件B：保持時間=11.37分：カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm、100Å：移動相；A=0.025%TFA in H₂O、B=0.025%TFA in MeCN：温度 40℃：グラジエント（%B conc）；7.2分間かけて20-60%、その後0.3分間かけて60-95%、その後1.6分かけて95%：流量0.25 mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z=1303.33（M+3H）³⁺

[0314] [合成例1-16]

894 variant 03 GKN3（配列番号554記載のリンク一と配列番号397の複合体）の合成

[化42]



[0315] Sieber amide resin（渡辺化学、0.47 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 B I

ue 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 eqに対し、Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2 eq/4 eq/8 eq)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2回反応を行った。11残基目、12残基目は25度で20分間2回繰り返し反応を行った。13残基目は75℃下、10分間2回反応を行った。15残基目、22残基目は25℃下、30分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20% piperidineのDMF溶液と75℃下、3分間反応させることを基本条件とした。ただし、2残基目、4残基目及び13残基目のFmoc除去は25℃下、5分間反応を行った後、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、前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、5 eqのクロロ酢酸、5 eqのDIPCI、10 eqのHOSuをDCM中攪拌しDCMと同量のDMFを加えClAcOSuのDCM/DMF溶液 (0.2 M) を調製し、固相樹脂に加え室温にて30分振盪することにより行った。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、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20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 (1000 rpm、1 min)、溶液をデカンテーションし減圧下乾燥させた。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5%含水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時間振盪した。得ら

れた反応溶液をSavant Explorer SpeedVacを用いて減圧濃縮した。

[0316] 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（登録商標）50 $\times$ 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）；3分間かけて11–36%、その後8分かけて36–41%、その後1分かけて41–60%；流量120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件B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B：保持時間=4.84分；カラム；Kinetex EVO C18 2.6 μ m 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°C；グラジエント（%B conc）；7.2分間かけて20–60%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.6分かけて95%；流量0.5 mL/min。

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1178.06$ ($M+2H$)²⁺

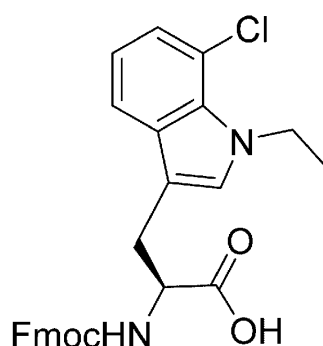
[0317] 以下のとおり、新規アミノ酸を合成した。

[合成例2-1]

(S)-2-[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] アミノ]-3-(7-クロロ-1-エチル-1H-インドール-3-イル) プロパン酸 (W1Et7Cl) の合成

[0318]

[化43]



[0319] 7-クロロ-3-ヨード-1H-インドール（18 g、64.9 mmol）のDMF溶液（500 mL）に対し、0℃にてNaH（60 wt%、8.7 g、361 mmol）を分割して加えた。続いて、0℃にてヨウ化エチル（10.3 mL、130.4 mmol）を分割して加えたのち、これを室温にて約16時間攪拌した。反応溶液を水で希釈後、酢酸エチル（3×200 mL）で抽出した。合わせた有機層を水（100 mL）で三回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過した。有機層を濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：石油エーテル＝1：5）にて精製した。

窒素雰囲気下、亜鉛（8 g、122 mmol）のDMF懸濁液（50 mL）にヨウ素（1.6 g、12.6 mmol）を加え、引き続きメチル（2R）-2-[[（9H-フルオレン-9-イルメトキシ）カルボニル]アミノ]-3-ヨードプロパノエート（18.5 g、41 mmol）を加え、室温にて30分間攪拌した。この反応液に前述で得られた生成物の一部（15 g、49 mmol）のDMF（300 mL）溶液を加え、引き続き、SPhos（0.84 g、2.0 mmol）とPd₂(dba)₃（1.1 g、1.2 mmol）を加え、混合物を50℃にて4時間攪拌した。反応を水で停止し、固体をろ別、ろ液を酢酸エチル（400 mL）で四回抽出した。合わせた有機層を、水（200 mL）で四回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラ

フィー（酢酸エチル：石油エーテル＝２：８）で精製した。

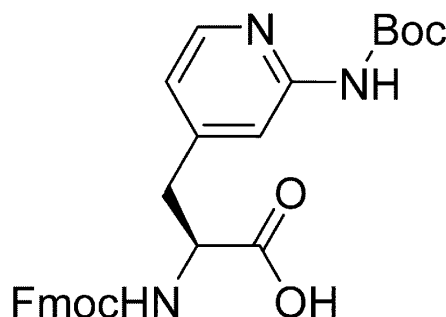
得られた生成物の一部（１８ｇ、３５．８ｍｍｏｌ）と１，４－ジオキサン（２００ｍＬ）の混合物に、塩化水素（６０ｇ、１．７ｍｏｌ）を吹き込み、１００℃にて４時間撹拌した。反応液を濃縮した後、残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（水：アセトニトリル＝１００：０－０：１００）にて精製し、表記物質を得た。

ESI-MS（＋） 観測値 m/z ＝４８９．１０（ $M+H$ ）⁺

[0320] [合成例２－２]

（Ｓ）－２－[[（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル]アミノ]－３－（２－（（ターシャリーブチルオキシカルボニル）アミノ）ピリジン－４－イル）プロパン酸（４Py6NH2）の合成

[0321] [化44]



[0322] 窒素雰囲気下、亜鉛（５．８ｇ、８８．６ｍｍｏｌ）のDMF（２００ｍＬ）懸濁液に、ヨウ素（４．５ｇ、１７．７ｍｍｏｌ）を加えた後、メチル（２Ｒ）－２－[[（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル]アミノ]－３－ヨードプロパネート（２０ｇ、４４．３２ｍｍｏｌ、１．０等量）のDMF溶液（５０ｍＬ）を室温にて滴下した。混合物を室温にて１時間撹拌した。続いて、４－ブロモピリジン－２－アミン（７．７ｇ、４４．３ｍｍｏｌ、１等量）、 $Pd_2(dba)_3$ （２．０ｇ、２．２ｍｍｏｌ、０．０５等量）、SPhos（１．８ｇ、４．４ｍｍｏｌ、０．１等量）を加

えた後、これを 50℃にて約 16 時間攪拌した。水 500 mL を加えて反応を停止した後、固体をろ別した。ろ液を酢酸エチル (300 mL) で三回抽出した。合わせた有機抽出物を飽和食塩水 (300 mL) で三回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、ろ液を濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：石油エーテル = 25 : 75) にて精製した。

上記で得られた生成物の一部 (10 g、24.0 mmol) を、ターシャリーブチルアルコール (110 mL) 中、 Boc_2O (6.3 g、28.7 mmol)、 NaI (4.3 g、28.7 mmol) を加え、室温にて約 16 時間攪拌した。反応液を濃縮したのち、得られた残渣を酢酸エチル 80 mL に溶解後、飽和食塩水 (100 mL) で三回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、濃縮した。

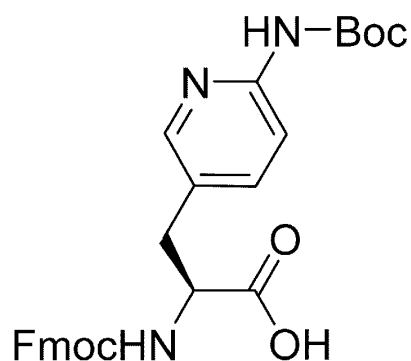
得られた生成物の一部 (3 g、5.8 mmol)、の 2-プロパノール (30 mL) 溶液に、 CaCl_2 (6.4 g、58.0 mmol) を加えた後、 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.28 g、11.6 mmol) の水溶液 (5 mL) を 0℃にて加えた。混合液を室温にて約 16 時間攪拌した後、水 60 mL で希釈し、固体をろ別した。ろ液の pH をクエン酸水溶液を用いて pH を約 6 に調整し、酢酸エチル (40 mL) で三回抽出した。合わせた有機抽出物を飽和食塩水 (50 mL) で三回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン：メタノール = 92 : 8) で精製し、表記物質を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 504.15$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺

[0323] [合成例 2-3]

(S)-2-[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ]-3-(6-((ターシャリーブチルオキシカルボニル)アミノ)ピリジン-3-イル)プロパン酸 (3Py6NH2) の合成

[0324]

[化45]

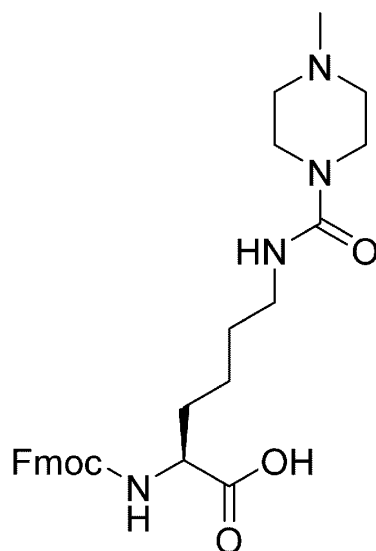


[0325] 表記物質は合成例〔1-x〕に従い、4-ブロモピリジン-2-アミンの代わりに5-ブロモピリジン-2-アミンを用いて同様の方法で得た。ESI-MS(+) 観測値 $m/z = 504.15$ ($M+H$)⁺

[0326] [合成例2-4]

N2-[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル]-N6-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)-L-リシン (KCOPipzMe) の合成

[0327] [化46]



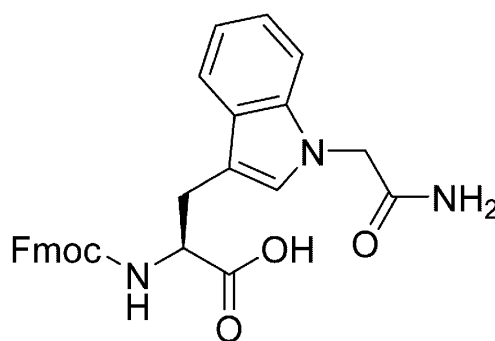
[0328] ジクロロメタン (20 mL) に溶解した 1-メチルピペラジン (1.4 m

L、12.7 mmol) に DIPEA (2.3 mL、13.0 mmol) およびトリホスゲン (1.23 g、4.2 mmol) を 0℃ にて加えた。同温にて 1 時間攪拌後、濃縮した。得られた残渣に、0℃ にて [(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] -L-リシンと DIPEA (2.8 mL、16.3 mmol) のジクロロメタン溶液 (20 mL) を加えた。混合液を 0℃ にて約 16 時間攪拌した。反応を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で停止後、ジクロロメタンで希釈し、水で一度、5% 酢酸水溶液で二度、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で一度、最後に飽和食塩水で一度洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン: メタノール = 100:0-80:20) にて精製し表題化合物を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 495.40$ ($M+H$)⁺

[0329] [合成例 2-5]

N アルファ- [(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] -1-(2-アミノ-2-オキソエチル) -L-トリプトファン (W1 mCON) の合成

[0330] [化47]



[0331] 窒素雰囲気下、N-Boc-トリプトファン (5 g、16.4 mmol) の DMF (30 mL) と THF (30 mL) の混合溶液に、カリウムターシャリーブトキシド (3.7 g、32.9 mmol) を 0℃ にて数回に分けて加えた。同温で 0.5 時間攪拌した後、2-クロロアセトアミド (1.5

g、16.4 mmol) を0℃にて数回に分けて加えたのち、その混合物を室温にて3時間攪拌した。水(100 mL)を加え反応停止した後、酢酸エチル(50 mL)で三度抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水(50 mL)で三度洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、ろ液を濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル：石油エーテル=90：10)にて精製した。

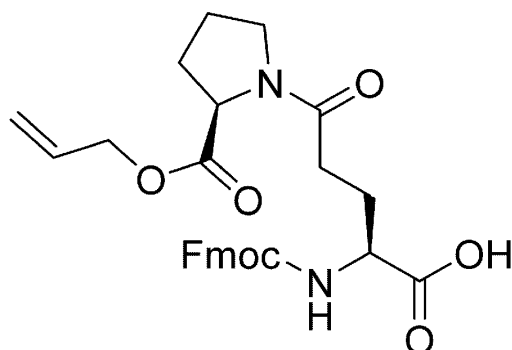
得られた成績体の一部(6 g、16.6 mmol)の酢酸エチル溶液(30 mL)に塩化水素の酢酸エチル溶液(2 M、30 mL)を加え、室温で約16時間攪拌した。生成した固体をろ取り、これを酢酸エチル、ジエチルエーテルで洗浄した。得られた固体を1,4-ジオキサン(50 mL)と水(10 mL)に溶解後、2,5-ジオキシピロリジン-1-イル-9H-フルオレン-9-イル-メチルカーボネート(5.9 g、17.5 mmol)および炭酸水素ナトリウム(5.9 g、69.9 mmol)を0℃にて加えた。混合物を室温にて3時間攪拌後、水200 mLで希釈した。クエン酸を加えてpHを5-6に調整した後、酢酸エチル(60 mL)で三度抽出した。合わせた有機抽出物を飽和食塩水(100 mL)で三度洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン／メタノール=92／8)で精製し、表記化合物を得た。ESI-MS(+) 観測値 $m/z = 484.25$ (M+H)⁺

[0332] [合成例2-6]

Fmoc-Glu(d-Pro-O-allyl)-OH(Epryl2R
COO)の合成

[0333]

[化48]



[0334] 4-((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(ターシャリーブトキシ)-5-オキソペンタン酸(2.5g、5.8mmol)のDMF溶液(10mL)にHATU(2.7g、7.0mmol)、DIPEA(1.3mL、7.5mmol)、アリル-D-プロリネート(0.9g、5.80mmol)を加え、0℃にて1時間撹拌した。反応溶液を水で希釈後、酢酸エチルヘキサンの混合溶媒で抽出した。有機層を水で4度洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

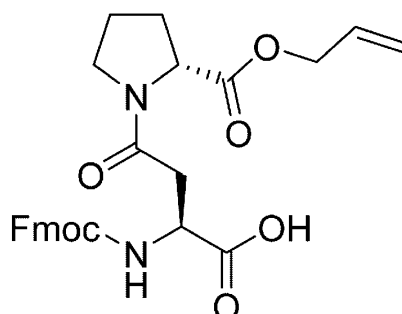
前述の反応で得られた生成物の一部(2.6g、4.5mmol)とジクロロメタン/TFA(1:1、30mL)を室温にて3時間撹拌した。反応溶液を濃縮後、残渣をジクロロメタンに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えpHを8以上に調整した。続いて塩酸を加え、pHを3-4に調整し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧濃縮し、表記化合物を得た。ESI-MS(+) 観測値m/z=507.40(M+H)⁺

[0335] [合成例2-7]

Fmoc-Asp(d-Pro-O-allyl)-OH(Dpryl2RCOO)の合成

[0336]

[化49]

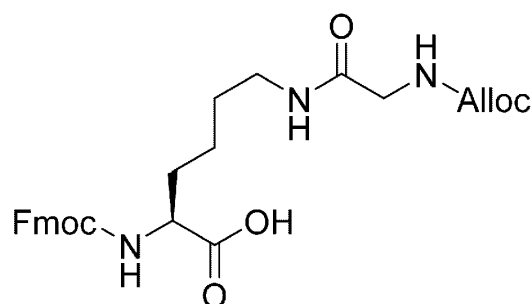


表記物質は合成例 [1-x] に従い、4-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-5-(ターシャリーブトキシ)-5-オキソペンタン酸の代わりに3-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-4-(ターシャリーブトキシ)-4-オキソブタン酸を用いて同様の方法で得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 493.30 (M+H)^+$

[0337] [合成例2-8]

Fmoc-Lys (Gly-O-allyl)-OH (KAC) の合成

[0338] [化50]



[0339] ターシャリーブチル(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-L-リジンメチル塩酸塩(1.2g、2.6mmol)、(((アリルオキシ)カルボニル)グリシン(0.46g、2.9mmol)、DIPEA(0.59mL、3.4mmol)のDMF溶液に、HATU(1

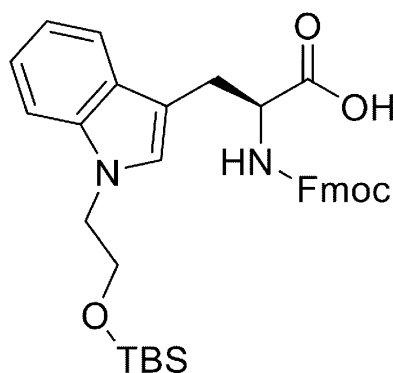
、2.2 g、3.1 mmol) のDMF溶液 (20 mL) を加え、0℃にて1時間攪拌した。酢酸エチル、ヘキサンの混合溶媒で希釈し、有機層を水で4回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：ヘキサン=0：100-80：20) で精製した。

前述で合成した生成物の一部 (1.5 g、2.6 mmol) のジクロロメタン溶液 (10 mL) にTFA (10 mL) を加え、室温にて約16時間攪拌した。反応溶液を濃縮し、トルエンを用いて3度共沸操作を行った。得られた残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄し、55℃にて減圧乾燥し、表題化合物を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 510.40$ ($M+H$)⁺

[0340] [合成例2-9]

N-((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-1-(2-((ターシャリーブチルジメチルシリル)オキシ)エチル)-L-トリプトファン (Fmoc-W1EtOH-OH) の合成

[0341] [化51]



[0342] N-Boc-トリプトファン (20 g、64.9 mmol) のTHF (100 mL) とDMF (100 mL) 混合液に、カリウムターシャリーブトキシド (14.8 g、69.0 mmol) を0℃にて加えた。15分攪拌後、2-ブロモエトキシ (ターシャリーブチル) ジメチルシラン (16.5 g、69.0 mmol) を加え室温で約16時間攪拌した。0℃にて反応溶液に

クエン酸水溶液を加えpHを6に調整し、200mLの水で希釈した。反応溶液を酢酸エチル（100mL）で三度抽出し、合わせた有機抽出物を飽和食塩水（100mL）で三回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝1：5）で精製した。

窒素雰囲気下、得られた生成物の一部（16g、34.6mmol）のジクロロメタン（150mL）溶液に、2、6-ルチジン（20mL、172.9mmol）を加え、0℃にてTMSOTf（25mL、112mmol）を加えた。混合液を室温に昇温し、24時間攪拌した。反応溶液を濃縮した。得られた混合物にジオキサン（300mL）、水（150mL）を加えた後、炭酸水素ナトリウム（9.3g、110.35mmol、3.19等量）、9-フルオレニルメチーN-スクシンイミジルカルボナート（14.0g、41.4mmol）を加え室温で約16時間攪拌した。固体を濾過し、濾液にクエン酸を加えpHを7に調整した。水200mLで希釈し、酢酸エチル（200mL）で三度抽出した。合わせた有機抽出物を飽和食塩水（200mL）で三度洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン（1：15）で精製し、表記化合物を得た。ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 585.15$ （M+H）⁺

産業上の利用可能性

[0343] 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] トランスフェリンレセプターに結合するペプチドであって、
配列番号1に記載のアミノ酸配列（A l a－V a l－P h e－V a l－T r p－A s n－T y r－T y r－l l e－l l e－S e r－C y s）；又は
配列番号1に記載のアミノ酸配列中に1以上10以下のアミノ酸残基の置換，欠失，付加及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチド。
- [請求項2] 請求項1に記載のペプチドであって，以下のグループ：
- （I）配列番号1の1番目のアラニン残基の脂肪族アミノ酸又はメチル化脂肪族アミノ酸への置換；
 - （I I）配列番号1の2番目のバリン残基の塩基性アミノ酸残基又はメチル化塩基性アミノ酸残基への置換；
 - （I I I）配列番号1の3番目のフェニルアラニン残基の芳香族アミノ酸残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；
 - （I V）配列番号1の4番目のバリン残基のメチル化バリン残基への置換；
 - （V）配列番号1の5番目のトリプトファン残基の芳香族アミノ酸残基，メチルトリプトファン残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；
 - （V I）配列番号1の6番目のアスパラギン残基の中性アミノ酸又はメチル化中性アミノ酸への置換；
 - （V I I）配列番号1の7番目及び8番目のチロシン残基の芳香族アミノ酸残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；
 - （V I I I）配列番号1の9番目のイソロイシン残基の脂肪族アミノ

酸残基，メチル化脂肪族アミノ酸残基，又は分岐鎖構造を有するアミノ酸残基への置換；

(IX) 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；及び

(X) 配列番号1の11番目のセリン残基の中性アミノ酸残基への置換，

から選択される1つ以上の置換を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[請求項3]

請求項1に記載のペプチドであって，

配列番号2 (A l a - V a l - P h e - V a l - T r p - A s n - T y r - T y r - I l e - I l e - A r g - A r g - T y r - M e T y r - C y s) 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2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2の1番目のアラニン残基の脂肪族アミノ酸又はメチル化脂肪族アミノ酸への置換；

(II) 配列番号2の2番目のバリン残基の塩基性アミノ酸残基又はメチル化塩基性アミノ酸残基への置換；

(III) 配列番号2の3番目のフェニルアラニン残基の芳香族アミノ酸残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；

(IV) 配列番号2の4番目のバリン残基のメチル化バリン残基への置換；

(V) 配列番号2の5番目のトリプトファン残基の芳香族アミノ酸残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；

(VI) 配列番号2の6番目のアスパラギン残基の中性アミノ酸又はメチル化中性アミノ酸への置換；

(VII) 配列番号2の7番目及び8番目のチロシン残基の芳香族

アミノ酸残基，メチル化芳香族アミノ酸残基，芳香環を付加したアミノ酸残基，又は縮合環を付加したアミノ酸残基への置換；

(V I I I) 配列番号 2 の 9 番目のイソロイシン残基の脂肪族アミノ酸残基，メチル化脂肪族アミノ酸残基，又は分岐鎖構造を有するアミノ酸残基への置換；

(I X) 配列番号 2 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；

(X I) 配列番号 2 の 11 番目及び 12 番目のアルギニン残基の塩基性アミノ酸残基への置換；

(X I I) 配列番号 2 の 13 番目のチロシン残基の親水性アミノ酸残基への置換；

(X I I I) 配列番号 2 の 14 番目のメチルチロシン残基のチロシン残基，芳香族アミノ酸残基又はメチル化芳香族アミノ酸残基への置換； 及び

(X I V) 配列番号 2 の 15 番目のシステイン残基のメチル化システイン残基への置換，

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。

[請求項 4]

請求項 1 に記載のペプチドであって，

ペプチド A を，配列番号 18 (A l a - V a l - P h e - V a l - T r p - A s n - T y r - T y r - I l e - I l e - S e r - C y s) の 1 番目～10 番目に記載のアミノ酸配列を含む，ペプチド長が 10 以上 17 以下のペプチドとすると，

ペプチド A，

ペプチド A において，1 以上 6 以下のアミノ酸残基の置換，欠失，及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチド，

ペプチド A において，配列番号 18 の 2，3，5，8，及び 10 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、及び

ペプチドAにおいて、

配列番号18の2番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいバリン (Val) 又は修飾されてもよいグルタミン酸 (Glu) であり、

配列番号18の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン (Phe) であり、

配列番号18の5番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン (Trp) であり、

配列番号18の8番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (Tyr) であり、

配列番号18の10番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいイソロイシン (Ile) 又は修飾されてもよいバリン (Val) であるペプチド、

のいずれかであるペプチド。

[請求項5] 請求項4に記載のペプチドであって、ペプチド長が11以上13以下であるペプチド。

[請求項6] 請求項1に記載のペプチドであって、

ペプチドBを、配列番号15 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Val-Pro-Arg-Asp-Cys) の1番目～10番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が10以上19以下のペプチドとすると、

ペプチドB、

ペプチドBにおいて、1以上5以下のアミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチド、

ペプチドBにおいて、配列番号15の2, 3, 5, 8, 及び10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、及び

ペプチドBにおいて、

配列番号15の2番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいバリン (Val) 又は修飾されてもよいグルタミン酸 (Glu) であり、

配列番号15の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン (Phe) 又はトリプトファン (Trp) であり、

配列番号15の5番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン (Trp) であり、

配列番号15の8番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいチロシン (Tyr) であり、

配列番号15の10番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいイソロイシン (Ile) 又は修飾されてもよいバリン (Val) であるペプチド、

のいずれかであるペプチド。

[請求項7] 請求項6に記載のペプチドであって、ペプチド長が13以上15以下であるペプチド。

[請求項8] 請求項1に記載のペプチドであって、

ペプチドCを、配列番号214 (MeA-Val-MeF3C-Val-MeW-Asn-Tyr-F4OMe-Ile-Ile-Arg-Arg-Phe-MeY-Cys) の1番目~10番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が11以上19以下のペプチドとすると、ペプチドC、

ペプチドCにおいて、1以上5以下のアミノ酸残基の置換、欠失、及び/又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチド、

ペプチドCにおいて、配列番号214の1, 3, 5, 及び8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、及び

ペプチドCにおいて、

配列番号214の1番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいアラニン (Ala) 又は修飾されてもよいグルタミン酸 (Glu) であ

り、

配列番号214の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン（Phe）であり、

配列番号214の5番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいトリプトファン（Trp）であり、

配列番号214の8番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン（Phe）であるペプチド、

のいずれかであるペプチド。

[請求項9]

請求項1に記載のペプチドであって、

ペプチドDを、配列番号219（Ala-Glu-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys）の1番目～10番目に記載のアミノ酸配列を含む、ペプチド長が11以上19以下のペプチドとすると、

ペプチドD、

ペプチドDにおいて、1以上5以下のアミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチド、

ペプチドDにおいて、配列番号219の2、3、5、8、及び10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、及び

ペプチドDにおいて、

配列番号219の2番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいバリン（Val）、修飾されてもよいグルタミン酸（Glu）、修飾されてもよいアルギニン（Arg）、修飾されてもよいリジン（Lys）、修飾されてもよいアスパラギン酸（Asp）、又は修飾されてもよいフェニルアラニン（Phe）であり、

配列番号219の3番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいフェニルアラニン（Phe）であり、

配列番号219の5番目のアミノ酸残基が、修飾されてもよいト

リプトファン (T r p) であり,

配列番号 2 1 9 の 8 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいチロシン (T y r) であり,

配列番号 2 1 9 の 1 0 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいイソロイシン (I l e), 修飾されてもよいグルタミン酸 (G l u) 又は修飾されてもよいリジン (L y s) であるペプチド, のいずれかであるペプチド。

[請求項10] 請求項 9 又は 1 0 に記載のペプチドであって, ペプチド長が 1 5 以上 1 8 以下であるペプチド。

[請求項11] 請求項 1 に記載のペプチドであって,
ペプチド E を, 配列番号 2 9 6 (A l a - V a l - M e F - V a l - T r p - A s n - T y r - T y r - I l e - I l e - A r g - A r g - T y r - M e Y - C y s - -) の 1 番目 ~ 1 5 番目に記載のアミノ酸配列を含む, ペプチド長が 1 5 以上 1 8 以下のペプチドとすると,
ペプチド E, 又は

ペプチド E において, 1 以上 5 以下のアミノ酸残基の置換, 欠失, 及び / 又は挿入を有するアミノ酸配列を有するペプチドであるペプチド。

[請求項12] 請求項 1 1 に記載のペプチドであって,
ペプチド E において, 配列番号 2 9 6 の 3, 5, 7, 8, 1 1, 1 2, 1 3 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。

[請求項13] 請求項 1 1 に記載のペプチドであって,
ペプチド E において,
配列番号 2 9 6 の 3 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいフェニルアラニン (P h e) であり,
配列番号 2 9 6 の 5 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいト

トリプトファン (T r p) であり,

配列番号 2 9 6 の 7 番目のアミノ酸残基が修飾されてもよいチロシン (T y r) であり,

配列番号 2 9 6 の 8 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいチロシン (T y r) であり,

配列番号 2 9 6 の 1 1 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいアルギニン (A r g) 又は, 修飾されてもよいリジン (L y s) であり,

配列番号 2 9 6 の 1 2 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいアルギニン (A r g) 又は修飾されてもよいリジン (L y s) であり,

配列番号 2 9 6 の 1 3 番目のアミノ酸残基が, 修飾されてもよいチロシン (T y r) 又は修飾されてもよいフェニルアラニン (P h e) のいずれかであるペプチド。

[請求項14]

請求項 1 1 に記載のペプチドであって,

ペプチド E において,

配列番号 2 9 6 の 3 番目のアミノ酸残基が, フェニルアラニン (P h e), メチル化フェニルアラニン (M e F), 又は N- α -メチル-N- α -クロロアセチル-3-クロロ-L-フェニルアラニン (M e F 3 C) であり,

配列番号 2 9 6 の 5 番目のアミノ酸残基が, トリプトファン (T r p) 又はメチル化トリプトファン (M e W) であり,

配列番号 2 9 6 の 8 番目のアミノ酸残基が, チロシン (T y r) 又は

(S)-2-アミノ-3-(4-メトキシフェニル)プロパン酸 (F 4 O M e) であり,

配列番号 2 9 6 の 1 1 番目のアミノ酸残基が, アルギニン (A r g) 又はリジン (L y s) であり,

配列番号 296 の 12 番目のアミノ酸残基が、アルギニン (A r g) 又は D 型アルギニン (d r) であり、

配列番号 296 の 13 番目のアミノ酸残基が、チロシン (T y r) 又はフェニルアラニン (P h e) であるペプチド。

[請求項15] 請求項 1 に記載のペプチドであって、

配列番号 3 ～ 200 のいずれかのアミノ酸配列からなるか、

配列番号 3 ～ 200 のいずれかのアミノ酸配列において N 末端がクロロアセチル- A l a であるアミノ酸配列からなる、ペプチド。

[請求項16] 請求項 1 に記載のペプチドであって、

配列番号 1 ～ 552 のいずれかに記載のアミノ酸配列又はアミノ酸配列とリンカーの複合体の、1 から 10 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。

[請求項17] 請求項 16 に記載のペプチドであって、

配列番号 2, 9, 21 ～ 148、159 ～ 200、213 ～ 448、450 ～ 552 のいずれかに記載のアミノ酸配列又はアミノ酸配列とリンカーの複合体における、1 番目から 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。

[請求項18] 請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載のペプチドであって、環状ペプチドである、ペプチド。

[請求項19] 請求項 16 又は 17 に記載のペプチドであって、15 アミノ酸残基からなる、ペプチド。

[請求項20] 請求項 1 に記載のペプチドであって、血液脳関門を通過可能であるペプチド。

[請求項21] 請求項 1 に記載のペプチドであって、筋組織に指向性を有するペプチド。

[請求項22] 請求項 1 に記載のペプチドであって、細胞浸透性を有するペプチド。

[請求項23] 請求項 1 に記載のペプチドと、前記ペプチドと結合したリンカーと

，前記リンカーに結合した物質とを含む複合体。

- [請求項24] 請求項23に記載の複合体であって、前記物質が血液脳関門を通過可能である、複合体。
- [請求項25] 請求項23に記載の複合体であって、前記リンカーのアミノ酸長が1以上15以下であり、前記リンカーがグリシン（G l y）又はセリン（S e r）を1つ以上含む複合体。
- [請求項26] 請求項23に記載の複合体であって、前記リンカーのN末端が修飾されてもよいシステイン（C y s）又は修飾されてもよいリジン（L y s）である、複合体。
- [請求項27] 請求項23に記載の複合体であって、前記リンカーのアミノ酸長が1以上5以下であり、D体のグルタミン酸（d e）及びメチル化グリシン（M e G）のいずれか又は両方を含む、複合体。
- [請求項28] 請求項23に記載の複合体であって、前記リンカーのN末端が修飾されてもよいC y s又は修飾されてもよいリジン（L y s）である、複合体。
- [請求項29] 請求項23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（P E G）又はポリエチレングリコールの誘導体を含むP E Gリンカーである、複合体。
- [請求項30] 請求項29に記載の複合体であって、
前記P E Gリンカーが、グリシン（G l y）、セリン（S e r）、グルタミン酸（G l u）、アルギニン（A r g）、又はリジン（L y s）をさらに含む、
複合体。
- [請求項31] 請求項29又は請求項30に記載の複合体であって、前記リンカーのN末端が修飾されてもよいシステイン（C y s）又は修飾されてもよいリジン（L y s）である、複合体。
- [請求項32] 請求項23に記載の複合体であって、前記リンカーが、配列番号2

01, 553~642のいずれかによって示される配列を有するリンカーである、複合体。

- [請求項33] 請求項22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）、
Gリンカー、GSリンカー、
又は、配列番号201, 553~644のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するリンカーである、複合体。
- [請求項34] 請求項23に記載の複合体を含む脳関連疾患の予防又は治療剤であって、
前記物質が、有効成分である、予防又は治療剤。
- [請求項35] 請求項23に記載の複合体を得る工程を含む、脳関連疾患の予防又は治療剤の製造方法。
- [請求項36] 請求項35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）、
Gリンカー、GSリンカー、
又は、配列番号201, 553~644のいずれかによって示されるアミノ酸配列を有するリンカーである、方法。
- [請求項37] 請求項23に記載の複合体を含む、脳関連疾患の診断薬。
- [請求項38] 請求項23に記載の複合体であって、筋組織に指向性を有する、複合体。
- [請求項39] 請求項23に記載の複合体を含む神経筋疾患の予防又は治療剤であって、前記物質が、有効成分である、予防又は治療剤。
- [請求項40] 請求項23に記載の複合体を含む神経筋疾患の診断薬。