

明 細 書

発明の名称：ヒトトランスフェリンレセプター結合ペプチド

技術分野

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

背景技術

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

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

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2015-528452号公報

特許文献2：特開H06-228199号公報

特許文献3：WO2016/208695

特許文献4：WO2019/151539

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、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。

Ala-Val-MePhe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-K(MePEG4c)-Arg-Phe-MeTyr-Cys（配列番号1）に記載のアミノ酸配列を有するペプチドであるか、

（I）配列番号1の1番目のアラニン残基のMeA残基への置換；

（II）配列番号1の3番目のN-メチルフェニルアラニン残基の、置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又はN-メチルアミノ酸への置換；

（III）配列番号1の5番目のトリプトファン残基の、置換基を有するトリプトファン又はN-メチルトリプトファンへの置換；

（IV）配列番号1の6番目のアスパラギン残基の、アラニン又は正電荷を有するアミノ酸への置換；

（V）配列番号1の7番目のチロシン残基の、置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又はC₄以上のアルキル基を有するアミノ酸への置換；

換；

(V I) 配列番号 1 の 8 番目のチロシン残基の、リンカーを有していてもよい置換基を有しても良い芳香環を側鎖に有するアミノ酸又は N-メチルアミノ酸への置換；

(V I I) 配列番号 1 の 9 番目のイソロイシン残基の、脂肪族アミノ酸への置換；

(V I I I) 配列番号 1 の 10 番目のイソロイシン残基の、置換基を有していてもよいブチル基を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号 1 の 11 番目の K (M e P E G 4 c) 残基の、A i b, 又はリンカーを有していてもよい親水性アミノ酸又は N-メチルアミノ酸への置換；

(X) 配列番号 1 の 12 番目のアルギニン残基の、リンカーを有していてもよい親水性アミノ酸 (D-体を含む) 又は N-メチルアミノ酸への置換；

(X I) 配列番号 1 の 13 番目のフェニルアラニンの、リンカーを有していてもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(X I I) 配列番号 1 の 14 番目の N-メチルチロシン残基の、リンカーを有していてもよい芳香環を側鎖に有する N-メチルアミノ酸への置換；
から選択される 1 以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、ペプチドである。

発明の効果

[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 (h T f R) に結合するペプチドなどを提供できる。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本発明を実施するための形態について説明する。本発明は、以下に説明する形態に限定されるものではなく、以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものを含む。

[0009] 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。

[0010] トランスフェリンレセプター

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

[0011] トランスフェリンレセプターに結合するペプチド

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

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

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

[0012] トランスフェリンレセプターと結合ペプチドの特異的結合は、例えば、本明細書に記載される表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ、スキャッチャード解析ならびに／または放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイ、ならびに当技術分野でそれ自体公知であるその異なるバリエーションを含む、それ自体公知である任意の適切な様式で決定することが可能である。好ましくは、本発明のペプチドとトランスフェリンレセプターとの親和性は、100 nM未満、好ましくは50 nM未満、より好ましくは20 nM未満、さらに好ましくは10 nM未満のKDであり、限定されるものではないが、約 10^{-5} M～約 10^{-9} M、又は別の態様では約 10^{-7} M以下、例えば 10^{-7} M～ 10^{-13} M、例えば 10^{-9} M～ 10^{-13} Mであってよい。本明細書において、トランスフェリンレセプターとの結合能が上記の範囲で、低いものから、高いものまで、さまざまな強さの結合能を有するペプチドが提供される。

[0013] 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、タンパク質をもその意味に包含する。なお、本願においてアミノ酸とは、細胞内でmRNAが翻訳されてペプチド鎖に取り込まれる天然に存在するアミノ酸（天然アミノ酸）だけではなく、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も、本発明のペプチドに含まれる。

本明細書において、環状ペプチドとは、ペプチド中、そのアミノ酸配列において間に1以上のアミノ酸残基を介して離れた2つのアミノ酸どうしが互いに結合することにより、その全部または一部が環状になっているものをいう。なお、ここで当該2つのアミノ酸どうしの結合型に特に限定はないが、一方のアミノ酸のカルボキシ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いればよい。他の結合型についても同様である。

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

[0014] なお、本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。例えば、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合が挙げられ、クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。

[0015] 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を示し、新たに合成したものについては合成例番号を示した。なお、特殊アミノ酸はこれらに限られるものではなく、例えば、これらの分子中の水素原子の1個又は複数がアルキル基に置換した構造のものも特殊アミノ酸である。水素原子がアルキル基に置換される場合、アルキル基は好ましくはメチル基、エチル基であり、より好ましくはメチル基である。なお、本明細書においてアミノ酸名の前にMe又はN-Meの記載があるアミノ酸は、特記が無い限りN-メチルアミノ酸を示す。例えば、アラニン(A l a又はA)のN-メチル化アミノ酸は、Me A l a、N-Me A l a、Me A又はN-Me A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(A l a又はA)のD-アミノ酸については、d aと示す。C A S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F m o c保護することで用いることが可能である。

[0016] W 7 N : L-7-アザトリプトファン (C A S No. 4 9 7 5 8-3 5-2)

K C O p i p z a a : N 6-(4-(カルボキシメチル)ピペラジン-1-カルボニル)-L-リシン (キシダ化学株式会社)

4 P y : L-4-ピリジルアラニン (C A S No. 3 7 5 3 5-4 9-2)

P e G : N-フェネチルグリシン (C A S No. 7 7 3 8-3 8-7)

3 P y : 3-(3-ピリジル)-L-アラニン (C A S No. 6 4 0 9 0)

－98－8)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MeA : メチル-L-アラニン (CAS No. 3913-67-5)

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

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

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

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

MeR : メチル-L-アルギニン (CAS No. 2480-28-6)

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

MeY : メチル-L-チロシン (CAS No. 537-49-5)

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

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

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

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

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

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

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

d r : D-アルギニン

d k : D-リジン

A i b : α -メチルアラニン (CAS番号 : 62-57-7)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

タン-31-オイック酸

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

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

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

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

all : L-アロイソロイシン (CAS No. 1509-34-8)

da : D-アラニン

de : D-グルタミン酸

ds : D-セリン

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

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

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

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

PEG12cもしくはPEG11もしくはPEG12:1-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36-ドデカオキサノナトリアコンタン-39-オイック酸 (CAS No. 1415408-69-3)

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

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

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

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

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

K(BCNOCO):N6-(メチル((2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル)カルバモイル(((1R, 8S, 9s)-ビスクロ[6, 1, 0]ノン-4-イン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-L-リシン (CAS No. N/A) 1493802-96-2)

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

Cit:L-シトルリン (CAS No. 372-75-8)

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

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

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

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

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

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。

[0017] 本発明のペプチドは、Ala-Val-MePhe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-K(MePEG4c)-Arg-Phe-MeTyr-Cys (配列番号1) に記載のアミノ酸配列を有するペプチドであるか、

(I) 配列番号1の1番目のアラニン残基のMeA残基への置換；

(II) 配列番号1の3番目のN-メチルフェニルアラニン残基の、置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又はN-メチルアミノ酸への置換；

(III) 配列番号1の5番目のトリプトファン残基の、置換基を有するトリプトファン又はN-メチルトリプトファンへの置換；

(IV) 配列番号1の6番目のアスパラギン残基の、アラニン又は正電荷を有するアミノ酸への置換；

(V) 配列番号1の7番目のチロシン残基の、置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又はC₄以上のアルキル基を有するアミノ酸への置換；

(VI) 配列番号1の8番目のチロシン残基の、リンカーを有していてもよい置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又はN-メチルアミノ酸への置換；

(VII) 配列番号1の9番目のイソロイシン残基の、脂肪族アミノ酸への置換；

(V I I I) 配列番号 1 の 10 番目のイソロイシン残基の、置換基を有していても良いブチル基を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号 1 の 11 番目の K (M e P E G 4 c) 残基の、A i b、又はリンカーを有していてもよい親水性アミノ酸又は N-メチルアミノ酸への置換；

(X) 配列番号 1 の 12 番目のアルギニン残基の、リンカーを有していてもよい親水性アミノ酸 (D-体を含む) 又は N-メチルアミノ酸への置換；

(X I) 配列番号 1 の 13 番目のフェニルアラニンの、リンカーを有していてもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(X I I) 配列番号 1 の 14 番目の N-メチルチロシン残基の、リンカーを有していてもよい芳香環を側鎖に有する N-メチルアミノ酸への置換；
から選択される 1 以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、ペプチドである。

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

[0018] 保存的アミノ酸置換

「保存的アミノ酸置換 (c o n s e r v a t i v e a m i n o a c i d s u b s t i t u t i o n)」とは、機能的に等価または類似のアミノ酸との置換を意味する。一般に、あるグループ内の置換は構造および機能について保存的であると考えることができる。しかしながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の (チオール) フォームと比較してより極性の低い、酸化型の (ジスルフィド) フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪酸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。

[0019] 保存的アミノ酸置換は、以下に示すとおり、側鎖の類似性に基づく特異的置換（レーニンジャー、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73乃至75頁：L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)) および典型的置換を含む。

[0020] また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のように天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けたグループにおいて、あるアミノ酸が属するグループと同じグループに属するアミノ酸への置換が好ましい。

[0021] (1) 疎水性（非極性とも言う）アミノ酸：疎水性（非極性）を示すアミノ酸であって、アラニン（「A l a」または単に「A」とも記す）、グリシン（「G l y」または単に「G」とも記す）、バリン（「V a l」または単に「V」とも記す）、ロイシン（「L e u」または単に「L」とも記す）、イソロイシン（「I l e」または単に「I」とも記す）、プロリン（「P r o」または単に「P」とも記す）、フェニルアラニン（「P h e」または単に「F」とも記す）、トリプトファン（「T r p」または単に「W」とも記す）、チロシン（「T y r」または単に「Y」とも記す）、メチオニン（「M e t」または単に「M」とも記す）を含む。

なお、疎水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

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

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

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

[0022] (2) 親水性(極性とも言う)アミノ酸:親水性(極性)を示すアミノ酸であって、セリン(「S e r」または単に「S」とも記す)、スレオニン(「T h r」または単に「T」とも記す)、システイン(「C y s」または単に「C」とも記す)、アスパラギン(「A s n」または単に「N」とも記す)、グルタミン(「G l n」または単に「Q」とも記す)、アスパラギン酸(「A s p」または単に「D」とも記す)、グルタミン酸(「G l u」または単に「E」とも記す)、リジン(リシンとも記す。「L y s」または単に「K」とも記す)、アルギニン(「A r g」または単に「R」とも記す)、ヒスチジン(「H i s」または単に「H」とも記す)を含む。

なお、親水性アミノ酸はさらに以下のグループに分けることもできる。

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

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

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

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

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

[0023] 本明細書において、「アミノ酸」は、天然のアミノ酸のみならず、非天然のアミノ酸も含む。非天然のアミノ酸には、例えば、上記記載した天然のアミノ酸がN-アルキル化されたN-アルキルアミノ酸、ペプチド結合を形成する窒素が分岐した若しくは分岐しない低級(例えば、C1-C5の、好ましくは、C1-C3、より好ましくはC1)のアルキル基で修飾されたもの、が含まれる。N-アルキルアミノ酸においては、好ましくはN-エチルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸又はN-メチルアミノ酸であり、さらに好まし

くはN-メチルアミノ酸である。C₄以上のアルキル基とは、炭素数が4以上の直鎖又は分岐のアルキル基を意味する。C₄以上のアルキル基の例はC₄₋₁₀アルキル基であり、C₄₋₆アルキル基でもよいし、C₆₋₁₀アルキル基でもよい。また、非天然のアミノ酸には、D型アミノ酸（D-アミノ酸とも記する）、β-アミノ酸、γ-アミノ酸、アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸、ノルロイシンやオルニチン等の生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸などが含まれる。さらに、天然のアミノ酸の側鎖に官能基がさらに付加された又は別の官能基に置換されたアミノ酸（例えば、側鎖のアリーレン基、アルキレン基等の部分に置換や付加を有するアミノ酸、側鎖のアリーレン基、アルキレン基やアルキル基のC数が増加したアミノ酸、側鎖の芳香環に置換を有するアミノ酸や、側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換された構造を有するアミノ酸誘導体等、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

[0024] なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加または置換等されることで、天然のアミノ酸とは異なる性質を付与することができる。すなわち、天然のアミノ酸をその共通する側鎖の性質に基づいて分けた、前述のグループに、同様の側鎖の性質を有する非天然アミノ酸を含めることができる。例えば、脂肪族アミノ酸に属するアラニンの主鎖窒素原子がメチル化されたアミノ酸であるN-メチルアラニン（MeA）は、非天然アミノ酸であるが、疎水性（非極性）を示し、疎水性のアミノ酸に分類することができる。このように、あるアミノ酸と同様の側鎖の性質を示す非天然アミノ酸についても、保存的アミノ酸置換の対象として含むことができる。

[0025] 本明細書において、「非限定的に」、「一態様において」は、同義に用いられ得る。

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

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

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

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

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

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

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

d e : D型アミノ酸であって、親水性アミノ酸グループかつ酸性アミノ酸グループ

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

d s : D型アミノ酸であって、親水性アミノ酸グループかつ中性アミノ酸グループ

4 P y : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

3 P y : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 C : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 O Me : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 4 a a o : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

F 3 C O O : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

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

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

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

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

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

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

W 5 C : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 1 a a : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 7 N : 塩基性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

W 5 C : 疎水性アミノ酸グループかつ芳香族アミノ酸グループ

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

a l l : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

A i b : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

A h p : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

A 4 p a a : 疎水性アミノ酸グループかつ脂肪族アミノ酸グループ

K m o r : 親水性アミノ酸グループ

K d m e : 親水性アミノ酸グループ

K C O p i p z a a : 親水性アミノ酸グループ

Q h E t : 親水性アミノ酸グループ

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

この明細書において「正電荷を有するアミノ酸」は、天然のアミノ酸であっても非天然のアミノ酸であってもよく、天然の正電荷を有するアミノ酸の例は、リシン、アルギニン、及びヒスチジンである。「正電荷を有するアミノ酸」は、正電荷（例えば NH_3^+ ）を有するアミノ酸であればよく、各種置換基を有するものであってもよい。

[0026] 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），特にT f R 1に結合できるペプチドである。

本発明のペプチドの一態様として、以下の（I）～（I I I）の少なくとも1つをすべて満たすペプチドであってよい。

（I）配列番号1の1番目が、アラニンである。

（I I）配列番号1の6番目が、アスパラギンである。（I I I）配列番号1の9番目が、イソロイシンである。

ここで、（I）のアラニンはその誘導体であってもよく、（I I）のアスパラギンはその誘導体であってもよく、（I I I）のイソロイシンはその誘導体であってもよい。

また、上記（I）～（I I I）のそれぞれの選択肢は、任意の組み合わせで選択し得るが、（I）～（I I I）のすべてを満たすペプチドであってもよい。

実施例7によると、（I）～（I I I）は、T f R 1との結合に大きく影響を与えるアミノ酸残基と考えられる。従って、配列番号1のアミノ酸残基が、上記の（I）～（I I I）の少なくとも1つを、好ましくはすべてを満たしている場合、T f R 1との強い結合を得ることができる。これらのペプチドとトランスフェリンレセプターとの親和性は、限定するものではないが、50 nM未満、より好ましくは20 nM未満、さらに好ましくは10 nM未満のKDであってよい。

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

[0027] 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するペプチドにおいて、配列番号1の1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13及び14番目のいずれかのアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を有するペプチドでもよい。

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

[0028] 「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。

[0029] 「リンカーを有していてもよい」とは、リンカーが当該アミノ酸残基に結合していてもよいという意味である。リンカーを有するアミノ酸の例は、リジン残基の側鎖アミノ基に、MePEG4cが結合しているK（MePEG4c），グルタミン酸の側鎖のカルボキシ基にPEG1Meが結合しているE（PEG1Me），F3COOの側鎖のカルボキシ基にPEG4Meが結合しているF3COO（PEG4Me），MeF3COOの側鎖のカルボキシ基にPEG4Meが結合しているMeF3COO（PEG4Me）である。

[0030] 本発明の一態様において、このペプチドは、以下のアミノ酸配列を有するペプチドであってよい。

（I）配列番号1の3番目のN-メチルフェニルアラニン残基の、F，MeF3C，MeF4F，Me3Py，Me4Py及びMeF3COOからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

（II）配列番号1の5番目のトリプトファン残基の、W5C，MeW，W1aa，及びW7Nからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

（III）配列番号1の6番目のアスパラギン残基の、アラニン又はNd mへの置換；

（IV）配列番号1の7番目のチロシン残基の、3Py6NH2への置換；

（V）配列番号1の8番目のチロシン残基の、4Py，F4OMe，F4aa o，3Py，W及びリンカーを有していてもよいF4aa oからなる群

より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(V I) 配列番号1の9番目のイソロイシン残基の、アラニンへの置換；

(V I I) 配列番号1の10番目のイソロイシン残基の、Eへの置換；

(V I I I) 配列番号1の11番目のK (Me P E G 4 c) 残基の、A i b, RMeR, K (Me c a r), K m o r, リンカーを有していてもよいK, E (G l u c a m i n e), Q h E t, Q p i p z a a, リンカーを有していてもよいQ及びリンカーを有していてもよいEからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号1の12番目のアルギニン残基の、d a, d r, A 4 p a a, Q h E t, Q p i p z a a, E (G l u c a m i n e), K (M e c a r), K m o r, K d M e, K C O p i p z a a, リンカーを有していてもよいQ, リンカーを有していてもよいE及びリンカーが付与していてもよいKからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(X) 配列番号1の13番目のフェニルアラニンの、Y, 4 P y, リンカーを有していてもよいF 3 C O O及びリンカーを有していてもよいEからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

(X I) 配列番号1の14番目のN-メチルチロシン残基の、M e 3 P y, リンカーを有していてもよいM e F 4 C O O及びリンカーを有していてもよいM e F 3 C O Oからなる群より選ばれる1つのアミノ酸への置換；

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

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

[0031] 本発明のさらなる一態様は、以下のアミノ酸配列を有するペプチドである。

(I) 配列番号1の1番目のアミノ酸残基が、M e A又はAであり、

(I I) 配列番号1の3番目のアミノ酸残基が、M e F 3 C, M e F, F, M e F 4 F, M e 3 P y, M e 4 P y又はM e F 3 C O Oであり、

(I I I) 配列番号 1 の 5 番目のアミノ酸残基が, W, W5C, MeW, W1aa 又は W7N であり,

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

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

(V I) 配列番号 1 の 8 番目のアミノ酸残基が, 4Py, F4OMe, Y, F4aa, 3Py, W 又は F4aa (PEG8Me) であり,

(V I I) 配列番号 1 の 9 番目のアミノ酸残基が, A 又は I であり,

(V I I I) 配列番号 1 の 10 番目のアミノ酸残基が, E 又は I であり,

(I X) 配列番号 1 の 11 番目のアミノ酸残基が, Aib, K, K (Mecar), K (MePEG4c), Kmor, R, MeR, Q, QhEt, Qpipzaa, E (PEG1Me), E (PEG4Me), E (PEG8Me), E (Glucamine) 又は E (NHdPEG1Me) であり,

(X) 配列番号 1 の 12 番目のアミノ酸残基が, da, R, dr, Q, QhEt, Qpipzaa, E (PEG8Me), E (PEG1Me), E (Glucamine), K, K (Mecar), Kmor, KdMe, K (MePEG4c), KCOpipzaa 又は A4paa であり,

(X I) 配列番号 1 の 13 番目のアミノ酸残基が, F, F3COO, F3COO (PEG4Me), 4Py, E (PEG4Me) 又は Y であり,

(X I I) 配列番号 1 の 14 番目のアミノ酸残基が, MeY, Me3Py, MeF4COO (PEG4Me) 又は MeF3COO (PEG4Me), であるペプチドであってもよい。

但し、配列番号 1 の 11 番目のアミノ酸残基と 12 番目のアミノ酸残基は、ともに E (PEG8Me) でないこと、又はともに Qpipzaa でないことが好ましい。

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

[0032] 本発明のペプチドの好ましい例は、配列番号 1 ～ 2 4 1 のいずれかに記載のアミノ酸配列又は配列番号 1 ～ 2 4 1 のいずれかに記載のアミノ酸配列とリンカーの結合体の、1 から 1 5 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。

[0033] 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。

[0034] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドの、上記 1 から 1 5 番目のアミノ酸配列部位が環状構造を有する、ペプチドである。

[0035] このペプチドの好ましい例は、上記したいずれかのペプチドであって、その N 末端すなわち 1 番目のアミノ酸がクロロアセチル化され、そのアセチル基と C 末端に位置するアミノ酸であるシステインとが環状化したアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0036] 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、ラッソ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。

[0037] 環化法

ペプチドの環化については、公知の方法に従って行うことができる。

これに限られるものではないが、例えば、ペプチドに 2 個以上のシステイ

ン残基を含むよう設計することで、翻訳された後、ジスルフィド結合により環状構造を形成できる。また、Gotoらの方法（Y. Goto, et al. *Accs Chem. Biol.* 3 120-129 (2008)）に従い、遺伝暗号のリプログラミング技術により、N末端にクロロアセチル基を有するペプチドを合成し、ペプチド中にシステイン残基を配置しておくことによっても環状化できる。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Hgl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。

[0038] 前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれるシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる15番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したN末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、前記ペプチドに含まれる15番目のシステイン残基とが結合された環状構造を有する。「クロロアセチル化」は、他のハロゲンによる「ハロゲンアセチル化」でもよい。また、「アセチル化」は、アセチル基以外のアシル基による「アシル化」でもよい。

[0039] 本明細書において、ペプチドの環状化のためにアミノ酸の一部を改変する場合がある。そのような一部の改変がなされたアミノ酸も包含する。例えば、上述したように、N末端に位置するアミノ酸にクロロアセチル基を付加し、ペプチド中のシステイン残基と結合し環状化するような場合がある、このような、クロロアセチル基が付加された各種（天然／非天然）アミノ酸も本願のアミノ酸に包含される。

[0040] 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、1

5 アミノ酸残基からなる，ペプチドである。

[0041] このペプチドの好ましい例は，上記したいずれかのペプチドであって，アミノ酸配列の 8 番目，11 番目，12 番目，13 番目，14 番目又は 15 番目のアミノ酸残基にリンカーが結合している，前記ペプチドである。さらに好ましくは，配列番号 10～241 のいずれかに記載の，前記ペプチドである。

[0042] 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 10 以上，11 以上，12 以上，13 以上，14 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 以下である。

[0043] この明細書に開示される別の実施態様は，複合体（コンジュゲート）に関する。この複合体は，上記したいずれかのペプチドと，このペプチドと結合したリンカーと，このリンカーに結合した物質とを含む複合体である。少なくとも T f R に結合可能である複合体であることが好ましい。

上記複合体は，上記いずれかのペプチドが有するシステイン（C y s）の C 末端と前記物質とが結合してなされた複合体であってもよく，前記 C 末端に結合したリンカーと前記物質とが結合してなされた複合体であってもよい。また，上記いずれかのペプチドのアミノ酸残基に含まれる側鎖末端が有する官能基と前記物質とが結合してなされた複合体であってもよく，前記官能基に結合したリンカーと前記物質とが結合してなされた複合体であってもよい。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。また、一部が官能基に置換又は官能基が付加されていてもよい。例えば、非限定的に、メチル基、アミノ基、アジド基などが挙げられる。

好ましくは、P E Gリンカーが、P E G 4 c、P E G 1 2 c、P E G 8 M e、M e P E G 4 c、P E G 1 M e、P E G 4 M e又はN H d P E G 1 M eである。

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

[0047] リンカーの別の例は、リンカーが、配列番号2 4 2～2 5 3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。また、リンカーが、表5に表される配列番号2 6 3～3 9 4の、L i n k e r記載部分の配列であってもよい。例えば、配列番号2 6 3においては、1 6番目のアミノ酸残基であるグリシンからはじまる[G-G-G-G-S-S-K N 3]配列がリンカーにあたる。

[0048] このリンカーが結合しているペプチド又は複合体の好ましい例は、リンカーが、

ポリエチレングリコール（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リンカーであるG Sリンカー、

又は、配列番号2 4 2～2 5 3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。リンカーは、配列番号 263～394 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ってもよい。

[0049] リンカー（クロスリンカーともいう）は、本明細書では、トランスフェリンレセプターに結合するペプチドの環状アミノ酸配列に含まれるアミノ酸残基にさらに付加的に結合している構造、又は、前記ペプチドと T f R 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よい。例えば、配列番号 245 などに示される、PEG 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。

[0050] 化学リンカー：いくつかの実施形態においては、リンカーは化学リンカーであってよい。化学リンカーとしては、これに限られないが、例えば、置換または非置換アルキレン、置換または非置換ヘテロアルキレン、置換または非置換シクロアルキレン、置換または非置換ヘテロシクロアルキレン、置換または非置換アリーレンおよび／または置換または非置換ヘテロアリーレンを含む。また、ペプチドとリンカーは、スルフヒドリル基、アミノ基（アミン）、および／もしくは炭水化物または任意の好適な反応基を介してコンジュゲートさせることができる。ホモ二官能性およびヘテロ二官能性交叉リンカー（コンジュゲーション剤）が、多くの商業的起源から利用可能である。交叉リンカーは、可撓性アーム、例えば、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 または 15 個の炭素原子を含んでもよい。交叉リンカーの例としては、BSS3（[ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート]）、NHSS/EDC（N-ヒドロキシスクシンイミドとN-エチル（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、スルホ-EMCSS（[N-e-マレイミドカプロン酸]ヒドラジド、ヒドラジド、ならびにSS

ATA (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。

[0051] 化学リンカーの好ましい例は、PEG (Polyethylene glycol) 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。

[0052] 脂肪酸リンカー：リンカーは、脂肪酸から誘導される二価化学部分を含む脂肪酸リンカーでもよい。例えば、脂肪酸リンカーは、12-アミノドデカン酸を有するリンカーであってよい。

[0053] ペプチドリンカー：ペプチドリンカーは、少なくとも1個のアミノ酸（例えば、少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 25, 40または50個のアミノ酸のペプチド）を含む。特定の実施形態においては、リンカーは1個のアミノ酸（例えば、Cysなどの任意の天然アミノ酸）である。他の実施形態においては、米国特許第7, 271, 149号に記載のような、配列 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n$ (式中、 n は1, 2, 3, 4, 5または6である) を有するペプチドなどのグリシン-リッチペプチドを用いる。他の実施形態においては、米国特許第5, 525, 491号に記載のような、セリン-リッチペプチドリンカーを用いる。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。

[0054] この明細書に開示される別の実施態様は、上記したリンカーが結合しているペプチド又は上記した複合体を含み、上記した物質が、有効成分である。

[0055] 上記の物質は、TfRに送達することを希望する物質であれば、当業者の希望する何らの物質であってよい。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。

R I：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，P E T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：D N A，R N A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。

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

また上記の物質は，上記に挙げたそれらの複合体であってよい。

[0056] この明細書に開示される別の実施態様は，医薬用又は診断用の組成物の製造方法に関する。この方法は，上記した複合体を得る工程を含む，予防剤，治療剤又は診断薬の製造方法である。

[0057] 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（P E G），Gリンカー，G Sリンカー，又は，配列番号2 4 2～2 5 3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。または，リンカーが，表5に表される配列番号2 6 3－3 9 4の，L i n k e r記載部分の配列であってもよい。

[0058] この明細書に開示される別の実施態様は，上記したペプチド又はペプチドとリンカーの結合体にさらに結合した物質とを含む複合体を含む，医薬用又は診断用の組成物に関する。好ましくはT f R関連疾患の医薬用又は診断用の組成物である。

[0059] 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。

[0060] 固相法は，例えば，水酸基を有するレジンの水酸基と， α -アミノ基が保護基で保護された第一のアミノ酸（通常，目的とするペプチドのC末端アミノ酸）のカルボキシ基をエステル化反応させる。エステル化触媒としては，1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール（MSNT），ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC），ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCDI）等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。

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

[0061] 固相合成のレジンとしては，Merrifield resin, MBH A resin, Cl-Trt resin, SASRIN resin, Wang resin, Rink amide resin, HMFS resin, Amino-PEGA resin（メルク社），HMPA-PEGA resin（メルク社）等が挙げられる。これらのレジンは，溶剤（ジメチルホルムアミド（DMF），2-プロパノール，塩化メチレン等）で洗浄してから用いることができる。

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

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

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

アミノ酸のその他の官能基として、セリンやトレオニンのヒドロキシ基はベンジル基やtert-ブチル基で保護することができ、チロシンのヒドロキシ基は2-ブロモベンジルオキシカルボニル希やtert-ブチル基で保護する。リジン側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸のカルボキシ基は、 α -アミノ基、 α -カルボキシ基と同様に保護することができる。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 遺伝子組み換え法（翻訳合成系）によるペプチドの製造は、本発明のペプチドをコードする核酸を用いて行うことができる。本発明のペプチドをコードする核酸は、DNAであってもRNAであってもよい。

本発明のペプチドをコードする核酸は、公知の方法又はそれに準ずる方法で調製することができる。例えば、自動合成装置によって合成することができる。得られたDNAをベクターに挿入するために制限酵素認識部位を加え

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

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。

[0065] 続いて、本発明のペプチドをコードする核酸を用いて発現ベクターを調製する。核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加する等して、発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することができる。ベクターとしては、大腸菌由来プラスミド（pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pBluescript II等）、枯草菌由来プラスミド（pUB110, pTP5, pC1912, pTP4, pE194, pC194等）、酵母由来プラスミド（pSH19, pSH15, YE p, YRp, Ylp, YAC等）、バクテリオファージ（φファージ, M13ファージ等）、ウイルス（レトロウイルス, ワクシニアウイルス, アデノウイルス, アデノ随伴ウイルス（AAV）, カリフラワーモザイクウイルス, タバコモザイクウイルス, バキュロウイルス等）、コスミド等が挙げられる。

[0066] プロモーターは、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。宿主が動物細胞である場合は、例えば、SV40（simian virus 40）由来プロモーター、CMV（cytomegalovirus）由来プロモーターを用いることができる。宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター等を用いることができる。

発現ベクターには、DNA複製開始点（ori）、選択マーカー（抗生物質抵抗性、栄養要求性等）、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ

A付加シグナル，タグ（FLAG，HA，GST，GFPなど）をコードする核酸等を組み込むこともできる。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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を加えてもよい。他に，ウサギ赤血球抽出液や昆虫細胞抽出液を加えてもよい。

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

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

[0070] 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. Yamagis

hi, 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 (eFx), アミノフレキシザイム (aFx) 等の呼称でも知られる。

[0071] フレキシザイムによって生成された、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸が連結された tRNA を用いることにより、所望のコドンを、所望のアミノ酸又はヒドロキシ酸と関連付けて翻訳することができる。所望のアミノ酸としては、特殊アミノ酸を用いてもよい。例えば、上述した環状化に必要な非天然アミノ酸もこの方法により、結合ペプチドに導入することができる。

[0072] 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

on 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 Trt および Mmt 基がある。

[0073] 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。

- [0074] 本明細書に記載するペプチドアナログの合成は、単または多チャネルペプチド合成機、たとえばCEM社のLiberty Blue 合成機またはBiotage社のSyro 1 合成機を使用することで実施できる。
- [0075] 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。
- [0076] 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。
- [0077] 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。
- [0078] 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（イオントフォレシス法）。

[0079] 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、キサントガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。

上記医薬組成物は、ペプチドが経粘膜吸収されにくいことに鑑みて、難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤を含むことができる。かかる吸収促進剤としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、サポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸等の胆汁酸塩；EDTA、サリチル酸類等のキレート剤；カプロ

ン酸、カプリン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、混合ミセル等の脂肪酸類；エナミン誘導体，N－アシルコラーゲンペプチド，N－アシルアミノ酸，シクロデキストリン類，キトサン類，一酸化窒素供与体等を用いることができる。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 「TfR関連疾患」とは、TfRが治療ターゲットタンパク質である疾患や、TfRを発現している細胞又は組織において引き起こされる疾患などをいう。また、TfRに結合することで血液脳関門を通過することができるため、脳疾患（脳に何らかの異常が起こることによりきたす疾患であり、例えば中枢神経（CNS）疾患などを示す）や、筋組織にTfRが多く発現していることから、神経筋疾患（脳・脊髄・末梢神経などの神経または筋肉の病変によって筋力の低下などの運動障害をきたす疾患）などを含む。

[0083] TfR関連疾患検出薬及び検出用キット

本発明は、本発明のペプチドを含むTfR関連疾患検出薬も包含する。検出薬として用いる場合、本発明のペプチドは、検出可能に標識してもよい。ペプチドの標識は、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等

の酵素、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体が用いられる。その他、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子で標識した抗体を検出することもできる。例えば、TfR関連疾患に関する特定の標的に結合する抗体と本発明のペプチドとで複合体を作成し、当該抗体又は本発明のペプチドに標識した複合体を作成し、それを投与、検出することで、TfR関連疾患を検出することができる。

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

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

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

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] この明細書に開示される別の実施態様は、上記した T f R 関連疾患検出薬を含む検出用キットや、T f R 関連疾患、及びそれに伴う種々の細胞機能や生命現象を解明するためのツールとして用いることも考慮されうる。

[0087] この明細書は、医薬用又は診断用の組成物を製造するための、ペプチドの使用をも提供する。この場合におけるペプチドは、上記したいずれかのものであればよい。

[0088] 本明細書は、ヒト、非ヒト哺乳動物又は鳥類である対象に、有効量のペプチド、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物、又は複合体を投与する工程を含む、T f R 関連疾患の予防又は治療方法をも提供する。ペプチドは、上記したペプチドを適宜用いることができる。非ヒト哺乳動物の例は、ヒト以外の霊長類、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ラット及びマウスである。

[0089] この明細書は、ヒト、非ヒト哺乳動物又は鳥類である対象に、有効量のペプチド、その薬学上許容される塩、又はその溶媒和物、又は複合体を投与する工程を含む、T f R 関連疾患の予防又は治療方法をも提供する。

[0090] 本明細書は、

ペプチドについて、

a) 溶媒への溶解度、

b) h T f R との結合能、

c) 細胞及び／又は組織への毒性、

d) 実験動物への毒性、

の少なくとも1つを試験するペプチドの試験方法であって、

前記ペプチドは、本発明のペプチドが有するアミノ酸配列において、1～

3個のアミノ酸残基を、欠失、置換、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列を有するペプチドである、前記方法を提供する。

[0091] 前記本発明のペプチドは、本明細書に記載のペプチドであればよいが、好ましい一態様としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、

(I) 配列番号1の1番目が、アラニンである；

(II) 配列番号1の6番目が、アスパラギンである；

(III) 配列番号1の9番目が、イソロイシンである；

の少なくとも1つを満たすペプチドであってよく、また、これらをすべて満たすペプチドであってよい。

なお、上記において、(I)のアラニンはその誘導体であってもよく、(II)のアスパラギンはその誘導体であってもよく、(III)のイソロイシンはその誘導体であってもよい。

また、前記本発明のペプチドは、限定されるものではないが、一態様において、配列番号1-241のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又ははからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号1-241のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又ははからなる、環状ペプチドである。限定されるものではないが、当業者は、1-241のいずれか1つに記載のアミノ酸配列において、アミノ酸を1~3個適宜選択し、欠失、置換、挿入及び／又は付加した配列を作成することができる。前記方法において、欠失、置換、挿入及び／又は付加するアミノ酸の数は、1~3個、好ましくは1~2個、より好ましくは1個である。

[0092] また、アミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加については、限定するものではないが、置換が好ましく、保存的アミノ酸置換がより好ましい。

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

てもよい。

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

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

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

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

（Ⅰ）配列番号1の1番目が、アラニンであり；

（ⅠⅠ）配列番号1の6番目が、アスパラギンであり；

（ⅠⅠⅠ）配列番号1の9番目が、イソロイシンである；

の少なくとも1つを満たすペプチドであってよく、また、これらをすべて満たすペプチドであってよい。このようなペプチドは、h T f Rとの結合能が高いと考えられる。

なお、上記において、（Ⅰ）のアラニンはその誘導体であってもよく、（ⅠⅠ）のアスパラギンはその誘導体であってもよく、（ⅠⅠⅠ）のイソロイシンはその誘導体であってもよい。

[0093] 前記試験方法について、ペプチドの、溶媒への溶解度の試験は、溶解度の測定であってよい。溶解度の測定にあたっては、溶媒は限定されるものではなく、目的に応じて自由に選択してよい。また、溶解度の測定方法に関しては、溶媒の種類に応じて、公知の方法を適切に選択することができる。

h T f Rとの結合能の試験は、h T f Rとの結合能の測定であってよく、限定されるものではないが、上述の表面プラズモン共鳴（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法など、公知の方法を好ましく使用することができる。

細胞及び／又は組織への毒性の試験は、細胞及び／又は組織を用いた公知の毒性評価試験であってよく、例えば、i n v i t r oで実施する方法で

あってよい。細胞や組織は、医薬品について通常、毒性評価試験を行う細胞及び／又は組織であってよく、限定されるものではない。

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

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

[0094] 本明細書、特に下記の代表的な実施例に使用した略語は、当業者には周知である。使用された幾つかの略語は次のとおりである：

Alexa Fluor（登録商標） 647としてAF647；

オングストローム（単位）としてÅ；クロロアセチルとしてClAc；

Sulfo-Cy5-alkyneとしてCy5SAIk；

ジクロロメタンとしてDCM；

トリイソプロピルシリルとしてTIPS；

ターシャリーブチルとしてtBu；

ジチオトレイトールとしてDTT；

ジメチルスルホキシドとしてDMSO；

トリチルとしてTrit；

ターシャリーブトキシカルボニルとしてBoc；

N, N-ジメチルホルムアミドとしてDMF；

N, N-ジイソプロピルエチルアミンとしてD I E AもしくはD I P E A ;

N, N'-ジイソプロピルカルボジイミドとしてD I P C I ;

シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチルとしてO x y m a p u r e ;

3, 6-ジオキサー1, 8-オクタン-ジチオールとしてD O D T ;

9-フルオレニルメチルオキシカルボニルとしてF m o c ;

グラム (単位) としてg ;

O- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テ
トラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩としてH A T U ;

N-ヒドロキシスクシンイミドとしてH O S u ;

高速液体クロマトグラフィーとしてH P L C ;

液体クロマトグラフィー質量分析計としてL C - M SもしくはL C / M S

ミリリットル (単位) としてm L ;

モラー (単位) としてM ;

マイクロリットル (単位) として μ L ;

ミリモラー (単位) としてm M ;

マイクロモラー (単位) として μ M ;

ミリモル (単位) としてm m o l ;

ミリグラム (単位) としてm g ;

アセトニトリルとしてM e C NもしくはC H 3 C N ;

分 (単位) としてm i n ;

ミリメートル (単位) としてm m ;

マイクロメートル (単位) として μ m ;

ナノメートル (単位) としてn m ;

ナノモラー (単位) としてn M ;

スクシンイミドとしてO S u ;

ポリエチレングリコールとしてP E G ;

回転毎分 (単位) としてr p m ;

ターシャリーブチルとしてt B u ;

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 TIPS ;
トリチル基として Trt または Tr ;
2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-アミンとして H-PEG4Me ;
2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサペンタコサン-25-アミンとして H-PEG8Me ;
アミノ酸として AA ;
7-((アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸として PyAOP ;
10-カンファースルホン酸として CSA ;
N-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)スクシンイミドとして Fmoc-OSu ;
テトラヒドロフランとして THF ;
N-(クロロアセトキシ)スクシンイミドとして ClAcOSu ;
 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ として トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (0) ;
SPhos として 2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2', 6'-ジメトキシビフェニル ;
EDCI · HCl として 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 ;
 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ として テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) 。

実施例 1

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] クロロアセチル基の導入は、前工程にて得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち、クロロ酢酸（3 等量）を 3 等量の N, N'-ジイソプロピルカルボジイミドの DMF 溶液（0.5 M）、3 等量の HOAt の DMF 溶液（0.5 M）を加え室温にて 40 分振盪することにより行った。

[0099] 側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF と塩化メチレンでそれぞれ 5 回ずつ洗浄して減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A（TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 の混合物）を加え、室温で 150 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪後し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やした過剰のジエチルエーテルに加えると、白濁沈殿が生じた。この

混合物を遠心分離し（9000 rpm, 3 min）, 溶液をデカンテーションした。得られた個体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、得られた固体を次の環化反応に用いた。

[0100] ペプチドの環化反応は、ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSOに溶解後、6等量のトリエチルアミンを加えて、室温で約16時間攪拌することで行った。得られた反応溶液を酢酸で酸性にしてBiotage（登録商標）V-10（バイオタージ・ジャパン社）を用いて減圧濃縮した。

[0101] 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のスキア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。

[0102] 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。分析方法については各実施例に記載した。

実施例 2

[0103] hTfRに結合する特殊環状ペプチドの化学合成

hTfRに対する結合活性を有するペプチド及びリンカーを付与したhTfR結合ペプチドを化学合成した。合成したペプチドの配列を、表1、表2

及び表5に示す。合成したペプチドは各実施例に記載する分析条件で分析し、質量スペクトル分析法におけるESI-MS(+)により構造を確認した。得られたESI-MS(+)観測値と、その場合におけるプロトン付加数 $(M+X)H^+$ として示したときのXの値を表1、表2及び表5に示す。なお、リンカー部分の配列を表3に示す。表1及び表2は、サイズの関係上2つの表部分が合わさって一つの配列についての配列部分とリンカー部分及びその観測値を示す。なお、表2のNDはNo Dataを、low signalは活性がみられなかったことを示す。また、表5の配列番号358に記載のリンカー付与ペプチドのみ、C末端は-OHとなっており、他のペプチドは全て-NH₂である。また、表5のNDはNo Dataを示す。

[0104] [表1]

[表1-1-1]

SEQ ID No.	Name	SEQ													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	894_0263	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	K(MePEG4c)	R	F	MeY
2	894_0264	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	K(MePEG4c)	F	MeY
3	894_0267	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY
4	894_0268	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY
5	894_0269	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K(MePEG4c)	dr	F	MeY
6	894_0270	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K(MePEG4c)	dr	F	MeY
7	894_0271	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY
8	894_0272	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY
9	894_3152	A	V	MeF	V	W	Ndm	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY
10	894_0287	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	da	F	MeY
11	894_3149	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY
12	894_3150	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY
13	894_3151	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY
14	894_0282	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY
15	894_0283	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY
16	894_0284	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	MeR	R	F	MeY
17	894_0285	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	R	F	MeY
18	894_0250	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY
19	894_0251	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY
20	894_0252	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY
21	894_0253	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY
22	894_0254	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY
23	894_0255	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY
24	894_0256	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY
25	894_0257	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	MeR	dr	F	MeY

[表1-1-2]

Linker	m/z	[M+X ⁺ H] ⁺	SPR
	1136.17	2	B
	1136.23	2	B
	1169.42	2	C
	1176.45	2	B
	1152.21	2	B
	1159.21	2	B
	1159.19	2	B
	1166.21	2	B
	1062.78	2	C
PEG4c	1160.49	2	B
G KN3	1170.92	2	B
G KN3	1156.94	2	B
G KN3	1154.72	2	A
PEG4c	1164.76	2	B
PEG4c	1171.74	2	B
PEG4c	1171.74	2	B
PEG4c	1178.76	2	B
PEG4c	1181.91	2	A
PEG4c	1188.93	2	A
PEG4c	1181.94	2	B
PEG4c	1188.95	2	B
PEG4c	1190.93	2	A
PEG4c	1198.00	2	A
PEG4c	1190.95	2	B
PEG4c	1197.96	2	C

[表1-2-1]

26	894_0258	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
27	894_0259	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
28	894_0260	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
29	894_0261	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
30	894_0262	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
31	894_0280	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
32	894_0281	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
33	894_0282	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
34	894_0283	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
35	894_0284	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	MeR	R	F	MeY	C
36	894_0285	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	R	F	MeY	C
37	894_0289	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY	C
38	894_0291	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY	C
39	894_3167	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	E	R	R	F	MeY	C
40	894_3168	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	F	MeY	C
41	894_3169	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	Y	MeY	C
42	894_3170	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	Y	MeY	C
43	894_0294	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	E	R	R	F	MeY	C
44	894_0295	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	F	MeY	C
45	894_0296	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	Y	MeY	C
46	894_0297	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	Y	MeY	C
47	894_3182	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa0	I	I	R	R	F	MeY	C
48	894_0306	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
49	894_0307	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
50	894_0308	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C

[0107]

[表1-2-2]

PEG4c		1198.01	2	B
PEG4c		1204.94	2	B
PEG4c		1180.75	2	B
PEG4c		1187.73	2	B
PEG4c		1194.77	2	B
PEG4c		1188.91	2	A
PEG4c		1174.95	2	A
PEG4c		1164.76	2	B
PEG4c		1171.74	2	B
PEG4c		1171.74	2	B
PEG4c		1178.76	2	B
PEG4c		1196.91	2	A
PEG4c		1197.11	2	A
G	de de de ds ds	1488.62	2	A
G	de de de ds ds	1002.06	3	A
G	de de de ds ds	1464.4	2	B
G	de de de ds ds	1493.42	2	B
PEG4c		1225.89	2	B
PEG4c		1239.9	2	B
PEG4c		1201.69	2	B
PEG4c		821.1	3	B
G	PEG8c KN3	956.06	3	B
PEG4c		1203.89	2	B
PEG4c		802.95	3	B
PEG4c		812.62	3	B

[0108]

[表1-3-1]

51	894_0309	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
52	894_0310	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
53	894_0311	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
54	894_0312	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	4Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
55	894_0313	A	V	Me3Py	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
56	894_0314	A	V	Me4Py	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
57	894_0315	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
58	894_0316	A	V	Me3Py	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
59	894_0317	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
60	894_0318	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	F	MeY	C
61	894_0319	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	4Py	I	I	R	R	F	MeY	C
62	894_0320	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	4Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
63	894_0322	A	V	Me3Py	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
64	894_0323	A	V	Me4Py	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
65	894_0324	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
66	894_0325	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	Me3Py	C
67	894_0327	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	Q	Q	4Py	MeY	C
68	894_3192	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
69	894_3193	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
70	894_0334	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
71	894_0337	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4ao	I	I	R	R	F	MeY	C
72	894_0339	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
73	894_0340	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
74	894_0341	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
75	894_0342	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	R	R	F3COO	MeY	C

[表1-3-2]

PEG4c		1174.9	2	B
PEG4c		783.62	3	B
PEG4c		793.3	3	B
PEG4c		783.58	3	B
PEG4c		1172.22	2	B
PEG4c		1172.16	2	B
PEG4c		1188.92	2	B
PEG4c		782.15	3	B
PEG4c		1189.4	2	A
PEG4c		1174.34	2	B
PEG4c		1174.39	2	B
PEG4c		783.89	3	B
PEG4c		1172.51	2	B
PEG4c		782.06	3	B
PEG4c		793.86	3	B
PEG4c		1181.94	2	B
PEG4c		1146.86	2	B
G	dkOmeeglumine dkOmeeglumine ds	1178.96	3	B
G	de de ds	1437.61	2	B
PEG4c		1387.15	2	B
PEG4c		826.98	3	B
PEG4c		1239.95	2	B
PEG4c		1372.63	2	B
PEG4c		1225.39	2	B
PEG4c		1261.9	2	B

[0110]

[表1-4-1]

76	894_0343	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	R	4Py	MeY	C
77	894_0344	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
78	894_0345	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
79	894_0347	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	R	F3COO	MeY	C
80	894_0348	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	R	4Py	MeY	C
81	894_0349	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	R	F3COO	MeY	C
82	894_0350	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
83	894_0351	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
84	894_0352	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
85	894_0353	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
86	894_0354	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
87	894_0355	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
88	894_0356	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
89	894_0362	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
90	894_0365	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
91	894_0368	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	R	F3COO	MeY	C
92	894_0369	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	R	4Py	MeY	C
93	894_0370	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
94	894_0371	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
95	894_0372	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
96	894_0373	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
97	894_0374	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
98	894_0375	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
99	894_0376	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
100	894_0377	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C

[0111]

[表1-4-2]

PEG4c	1240.39	2	B
PEG4c	1409.13	2	B
PEG4c	1387.66	2	B
PEG4c	817.29	3	B
PEG4c	1240.42	2	B
PEG4c	1261.95	2	B
PEG4c	1409.63	2	B
PEG4c	1373.1	2	B
PEG4c	1394.72	2	B
PEG4c	1394.69	2	C
PEG4c	915.78	3	C
PEG4c	954.4	3	C
PEG4c	940.08	3	C
PEG4c	1380.14	2	B
PEG4c	920.68	3	B
PEG4c	1232.95	2	B
PEG4c	807.94	3	B
PEG4c	910.73	3	B
PEG4c	896.38	3	B
PEG4c	1402.07	2	B
PEG4c	1380.62	2	B
PEG4c	1365.59	2	B
PEG4c	896.36	3	B
PEG4c	935.05	3	B
PEG4c	920.74	3	B

[0112]

[表1-5-1]

101	894_0298	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG8Me)	R	F	MeY	C
102	894_0299	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
103	894_0301	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
104	894_0302	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	Q	R	F	MeY	C
105	894_0303	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	R	Q	F	MeY	C
106	894_0393	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
107	894_0394	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
108	894_0391	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
109	894_0392	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	R	R	F	MeY	C
110	894_0395	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	R	F	MeY	C
111	894_0396	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	E(NH2PEG1Me)	R	F	MeY	C
112	849_0397	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG8Me)	R	F	MeY	C
113	849_0398	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	R	F	MeY	C
114	849_0399	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(NH2PEG1Me)	R	F3COO	MeY	C
115	849_0400	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	KCOpi2aa	F	MeY	C
116	849_0401	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	KCOpi2aa	F	MeY	C
117	849_0402	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	R	4Py	MeY	C
118	849_0403	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	KCOpi2aa	4Py	MeY	C
119	849_0404	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	Kmor	F	MeY	C
120	849_0405	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	Kmor	F	MeY	C
121	849_0406	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	K	F	MeY	C
122	849_0407	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	KdMe	F	MeY	C
123	849_0408	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	Q	F	MeY	C
124	849_0409	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	R	E(PEG4Me)	MeY	C
125	849_0410	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4ao	I	I	E(PEG4Me)	R	E(PEG4Me)	MeY	C

[0113]

[表1-5-2]

PEG4c								939.99	3	B
PEG4c								939.92	3	B
PEG4c								1431.19	2	B
PEG4c								1225.93	2	B
PEG4c								1225.95	2	B
G	de	de	de	S	S	C(AcNMe)		1409.37	2	B
G	de	de	de	de	de	C(AcNMe)		992	3	B
PEG4c								1217.93	2	A
PEG4c								1210.97	2	A
PEG4c								1321.01	2	B
PEG4c								1276.91	2	B
PEG4c								1380.09	2	A
PEG4c								1291.96	2	B
PEG4c								1269.94	2	A
PEG4c								1392.05	2	B
PEG4c								1363.06	2	B
PEG4c								1321.52	2	B
PEG4c								1363.58	2	B
PEG4c								1342.07	2	A
PEG4c								1313	2	B
PEG4c								1277.93	2	B
PEG4c								1291.99	2	B
PEG4c								1277.9	2	B
PEG4c								918.79	3	B
G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	1000.49	3	B

[0114]

[表1-6-1]

126	849_0411	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG4Me)	R	F3COO(PEG4Me)	MeY	C
127	849_0412	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4Me)	MeF4COO(PEG4Me)	C
128	849_0413	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4Me)	MeF3COO(PEG4Me)	C
129	849_0414	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4Me)	MeF3COO(PEG4Me)	C
130	849_0415	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG4Me)	R	F3COO(PEG4Me)	MeY	C
131	849_0416	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4Me)	MeF4COO(PEG4Me)	C
132	849_0417	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO(PEG4Me)	MeF3COO(PEG4Me)	C
133	849_0418	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG4Me)	R	F	MeY	C
134	894_0419	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	4Py	MeY	C
135	894_0420	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	4Py	MeY	C
136	894_0421	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY	C
137	894_0424	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	4Py	MeY	C
138	894_0425	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	4Py	MeY	C
139	894_0426	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY	C
140	894_0428	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	F3COO	MeY	C
141	894_0455	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C

[0115]

[表1-6-2]

PEG4c						1408.64	2	B
PEG4c						1422.13	2	B
PEG4c						1422.14	2	B
G	ds	ds	ds	ds	ds	1030.14	3	B
PEG4c						1409.14	2	B
PEG4c						1422.62	2	B
PEG4c						1422.63	2	B
PEG4c						1292.48	2	B
PEG4c						1226.44	2	B
PEG4c						1247.58	2	B
PEG4c						1247.94	2	B
PEG4c						798.99	3	B
PEG4c						813.06	3	B
PEG4c						935.2	3	B
PEG4c						827.44	3	B
PEG4c						920.8	3	C

[表2-1-1]

SEQ ID No.	Name	SEQ													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
142	894_3153	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY
143	894_3154	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY
144	894_3155	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY
145	894_3156	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY
146	894_3157	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY
147	894_3158	A	V	Me4Py	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY
148	894_3159	A	V	MeF3COO	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY
149	894_3160	A	V	MeF	V	W	A	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY
150	894_3161	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY
151	894_3162	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY
152	894_3163	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY
153	894_3164	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY
154	894_3165	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	Y	MeY
155	894_3166	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY
156	894_0288	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY
157	894_3171	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F	MeY
158	894_3172	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F	MeY
159	894_3173	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY
160	894_3174	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	E(PEG8Me)	F	MeY
161	894_3175	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY
162	894_3176	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F	MeY
163	894_3177	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	Q	F	MeY
164	894_3178	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	Q	F	MeY
165	894_3180	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	E	E(PEG8Me)	E(PEG8Me)	F	MeY

[0117]

[表2-1-2]

Linker		m/z	[M+XH] ⁺	SPR
G	KN3	1164.01	2	B
G	KN3	1171.05	2	B
G	KN3	1171.09	2	B
G	KN3	1180.1	2	B
G	KN3	1180.07	2	C
G	KN3	774.56	3	B
G	KN3	1182.91	2	C
G	KN3	1133.35	2	C
G	KN3	1172.1	2	B
G	KN3	1179.09	2	B
G	KN3	1188.13	2	B
G	KN3	1179.14	2	B
G	KN3	1165.1	2	B
G	KN3	1186.14	2	B
PEG4c		1189.95	2	B
		1221.95	2	B
G	KN3	1391.19	2	B
G	KN3	1391.15	2	B
G	KN3	1040.55	3	Low signal
G	KN3	942.39	3	Low signal
G	KN3	1207.92	2	B
G	KN3	1207.91	2	B
G	KN3	1193.88	2	B
G	de de de ds ds KN3	1218.65	3	Low signal

[0118]

[表2-2-1]

SEQ ID No.	Name	SEQ														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
166	894_3181	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	E(PEG8Me)	F	MeY	C
167	894_3183	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	E(PEG8Me)	F	MeY	C
168	894_3184	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	E(PEG8Me)	F3COO	MeY	C
169	894_0321	A	V	Me3Py	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
170	894_0290	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY	C
171	894_0292	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	Y	MeY	C
172	894_0293	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	Y	MeY	C
173	894_0326	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	E(PEG1Me)	E(PEG1Me)	4Py	MeY	C
174	894_0328	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	E(Glucamine)	E(Glucamine)	4Py	MeY	C
175	894_0329	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG1Me)	E(PEG1Me)	F3COO	MeY	C
176	894_0330	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG1Me)	E(PEG1Me)	F	MeY	C
177	894_0331	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	Q	Q	F	MeY	C
178	894_3185	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
179	894_3186	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
180	894_3187	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
181	894_3188	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
182	894_3189	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
183	894_3190	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
184	894_3191	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	4Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
185	894_0332	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
186	894_0333	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	3Py	I	I	R	R	F	MeY	C
187	894_0335	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
188	894_0336	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
189	894_0338	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	F	MeY	C
190	894_0357	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	F	MeY	C

[0119]

[表2-2-2]

Linker						m/z	[M+X ^H] ⁺	SPR
G	de	de	de	ds	KN3	1227.7	2	Low signal
G	PEG8c	KN3				1181.7	3	Low signal
G	KN3					1055.19	3	Low signal
PEG4c						772.49	3	B
PEG4c						1197.41	2	B
PEG4c						1183.06	2	B
PEG4c						1204.13	2	B
PEG4c						1204.92	2	B
PEG4c						1310.98	2	B
PEG4c						1291.96	2	B
PEG4c						1218.95	2	B
PEG4c						1160.9	2	B
G	KN3					790.94	3	B
G	KN3					1186.25	2	B
G	KN3					800.83	3	B
G	KN3					771.61	3	B
G	KN3					771.54	3	B
G	KN3					781.46	3	B
G	KN3					771.59	3	ND
PEG4c						812.3	3	B
PEG4c						1203.4	2	B
PEG4c						1218.4	2	B
PEG4c						1239.87	2	B
PEG4c						1203.41	2	B
PEG4c						783.43	3	B

[0120]

[表2-3-1]

SEQ ID	Name	SEQ														
No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
191	894_0358	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	F	MeY	C
192	894_0359	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
193	894_0360	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
194	894_0361	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	3Py	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
195	894_0363	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
196	894_0364	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	R	R	4Py	MeY	C
197	894_0366	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	E(PEG8Me)	4Py	MeY	C
198	894_0367	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	3Py	I	I	R	R	F3COO	MeY	C
199	894_0378	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	K(Mecar)	R	F	MeY	C
200	894_0379	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	K(Mecar)	F	MeY	C
201	894_0380	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	QhEt	R	F	MeY	C
202	894_0381	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	QhEt	F	MeY	C
203	894_0382	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	QhEt	QhEt	F	MeY	C
204	894_0383	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Qpipzaa	R	F	MeY	C
205	894_0384	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	Qpipzaa	F	MeY	C
206	894_0385	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Qpipzaa	Qpipzaa	F	MeY	C
207	894_0386	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	A4paa	R	F	MeY	C
208	894_0387	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	A4paa	F	MeY	C
209	894_0388	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	R	F	MeY	C
210	894_0389	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	Kmor	F	MeY	C
211	894_0390	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F	MeY	C
212	894_3197	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F	MeY	C
213	894_3198	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F	MeY	C
214	894_3199	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F	MeY	C
215	894_3200	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C

[0121]

[表2-3-2]

	Linker	m/z	[M+X ⁺] ⁺	SPR
PEG4c		1210.95	2	B
PEG4c		1210.92	2	B
PEG4c		1343.52	2	B
PEG4c		1196.41	2	B
PEG4c		1232.94	2	B
PEG4c		1211.43	2	B
PEG4c		1358.69	2	B
PEG4c		1196.42	2	B
PEG4c		1254.96	2	A
PEG4c		1254.97	2	B
PEG4c		1247.94	2	B
PEG4c		1247.96	2	B
PEG4c		1255.88	2	A
PEG4c		1289.48	2	B
PEG4c		1289.47	2	B
PEG4c		893.02	3	Low signal
PEG4c		1267.99	2	A
PEG4c		1267.92	2	B
PEG4c		1260.94	2	A
PEG4c		1260.96	2	A
PEG4c		1281.99	2	A
G	de de ds ds ds K(BCNOCO)	1052.2	3	A
G	ds ds ds ds ds K(BCNOCO)	1010.17	3	A
G	K(BCNOCO)	978.11	3	A
G	ds ds ds ds ds KN3	1365.7	2	A

[0122]

[表2-4-1]

SEQ ID	Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
No.																
216	894_0422	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	F3COO	MeY	C
217	894_0423	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F3COO	MeY	C
218	894_0444	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
219	894_0446	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY	C
220	894_0447	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F3COO	MeY	C
221	894_0450	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	E(PEG8Me)	MeY	C
222	894_0457	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
223	894_0458	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
224	894_0459	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
225	894_0427	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY	C
226	894_0439	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(PEG8Me)	I	I	Q	Q	F3COO(PEG8Me)	MeF4COO(PEG8Me)	C
227	894_0440	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(PEG8Me)	I	I	Q	Q	4Py	MeF4COO(PEG8Me)	C
228	894_0441	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	Q	Q	F3COO(PEG8Me)	MeF4COO(PEG8Me)	C
229	894_0442	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao(PEG8Me)	I	I	Q	Q	F3COO(PEG8Me)	MeY	C
230	894_0443	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
231	894_0445	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
232	894_0448	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	E(PEG8Me)	MeY	C
233	894_0449	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	F3COO	MeY	C
234	894_0451	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	E(PEG8Me)	MeY	C
235	894_0452	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	E(PEG8Me)	MeY	C
236	894_0453	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY	C
237	894_0454	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	E(PEG8Me)	KCOipizaa	4Py	MeY	C
238	894_0456	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
239	894_0460	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
240	894_0461	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C
241	894_3201	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C

[0123]

[表2-4-2]

	Linker	m/z	[M+X ⁺] ⁺	SPR
PEG4c		1268.99	2	B
PEG4c		968.5	3	B
PEG4c		921.23	3	B
PEG4c		954.2	3	B
PEG4c		949.49	3	B
PEG4c		1036.68	3	B
PEG4c		940.13	3	B
PEG4c		954.59	3	B
PEG4c		921.24	3	B
PEG4c		813.3	3	A
PEG4c		1178.72	3	B
PEG4c		1042.63	3	B
PEG4c		1042.27	3	B
PEG4c		1047.62	3	B
PEG4c		935.41	3	B
PEG4c		940.09	3	B
PEG4c		1036.58	3	C
PEG4c		949.46	3	B
PEG4c		1050.59	3	C
PEG4c		1035.94	3	B
PEG4c		920.44	3	B
PEG4c		953.81	3	B
PEG4c		935.06	3	B
PEG4c		935.38	3	B
PEG4c		1304.08	2	B
G	de de de ds ds KN3	1428.53	2	B

[0124] [表 3]

[表3]

SEQ ID No.	Linker									
242	G	KN3								
243	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	KN3
244	G	PEG8c	KN3							
245	G	dkCOmeglumine	dkCOmeglumine	dkCOmeglumine	ds	ds	ds	ds	ds	KN3
246	G	de	de	de	S	S	S	S	S	C
247	G	de	de	de	de	de	de	de	de	C
248	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	
249	G	de	de	de	de	de	de	de	de	KN3
250	G	de	de	de	de	de	de	de	de	KN3
251	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	K(BCNOCO)
252	G	K(BCNOCO)								
253	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	KN3

実施例 3

[0125] 表面プラスモン共鳴（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スモン共鳴（SPR）による分子間相互作用を、

以下に示す方法によって試験を実施した。具体的な試験方法を以下に示す。

[SPR測定]

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

カインेट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 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と表記して、表1に示す。結果として、合成した特殊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。

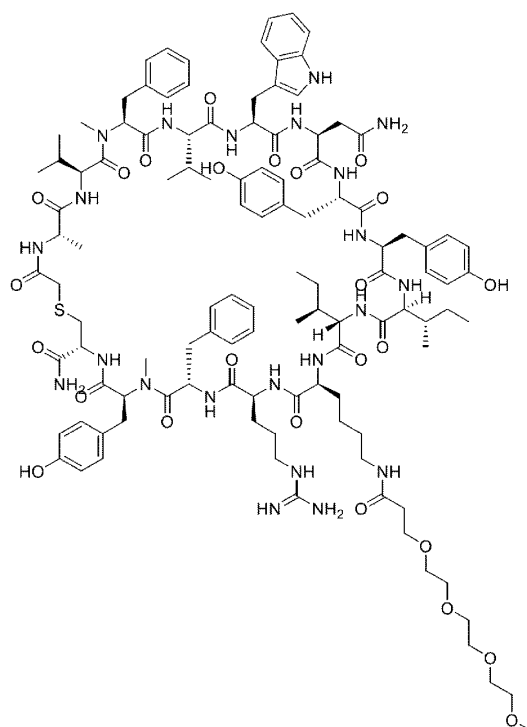
実施例 4

[0126] 以下のペプチド又はリンカー付与ペプチドを合成した。

[0127] [実施例4-1]

894__0263（配列番号1）の合成

[化1]



[0128] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.26 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue HT を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 1 残基目, 3 残基目, 4 残基目, 9 残基目, 10 残基目は 75℃ 下, 20 分間 1 回反応を行った。2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。11 残基目, 13 残基目は 90℃ 下, 3 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃ 下, 15 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下, 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と 75℃ 下 3 分間反応させ

ることで行った。ただし、2残基目、13残基目のFmoc除去は25℃下、5分間反応させた後、5分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約5当量）、HATU（約5当量）、DIEA（約10当量）を加えDMF中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、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A（4 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物）を加え、室温で60分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジ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当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で15時間攪拌した。その後、Savant Explorer Speed Vacを用いて減圧濃縮した。固相樹脂のモル数を基に25 mMになるようDMSOに溶解し、MePEG4c（1.2当量）、HATU（1.1当量）、DIEA（3当量）を加え、25℃で1時間振盪した。

[0129] 得られた反応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 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: 120 mL/min)。

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

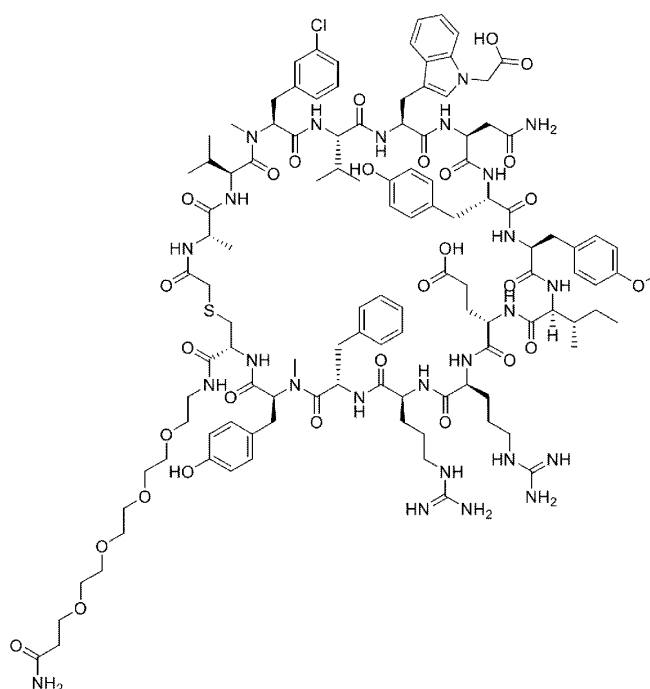
分析条件: 保持時間=5.28分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100 Å; 移動相: A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.3分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

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

[0130] [実施例4-2]

894__0294 (配列番号43) の合成

[化2]



[0131] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.26 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue HT を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCl/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 10 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。5 残基目, 6 残基目, 7 残基目, 14 残基目, 16 残基目は 90℃ 下, 3 分間 1 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 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃ 下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下, 1 分間反応させた後, 1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち, クロロ酢酸 (約 5 当量), DIPCl (約 5 当量), HOSu (約 5 当量) を DCM 中 60 分間振盪した後, DCM と同量の DMF を加えることで調製した ClAcOSu (0.025 M) を加え 25℃ 下, 60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは, まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後, ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に, 反応剤カクテル A (4 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物) を加え, 室温で 60 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し, フリットより溶液成分を回収, 前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると, 白濁沈殿が生じた

。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 2 min），溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後，減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにDMSO／水（9／1）に溶解後，10当量のトリエチルアミンを加えて，室温で15時間攪拌した。反応溶液を15当量の酢酸でクエンチ後，Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0132] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×250 mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）： 0.1分かけて7.3－3.3%，4.9分かけて3.3－3.3%，2分かけて3.3－7.3%，3分かけて7.3－32.7%，その後15分かけて32.7－37.8%，その後3分かけて37.8－60%；流量：0.1分かけて118－118 mL/min，その後4.9分かけて18－118 mL/min，その後2分かけて18－118 mL/min，その後118 mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し93.9%であった。

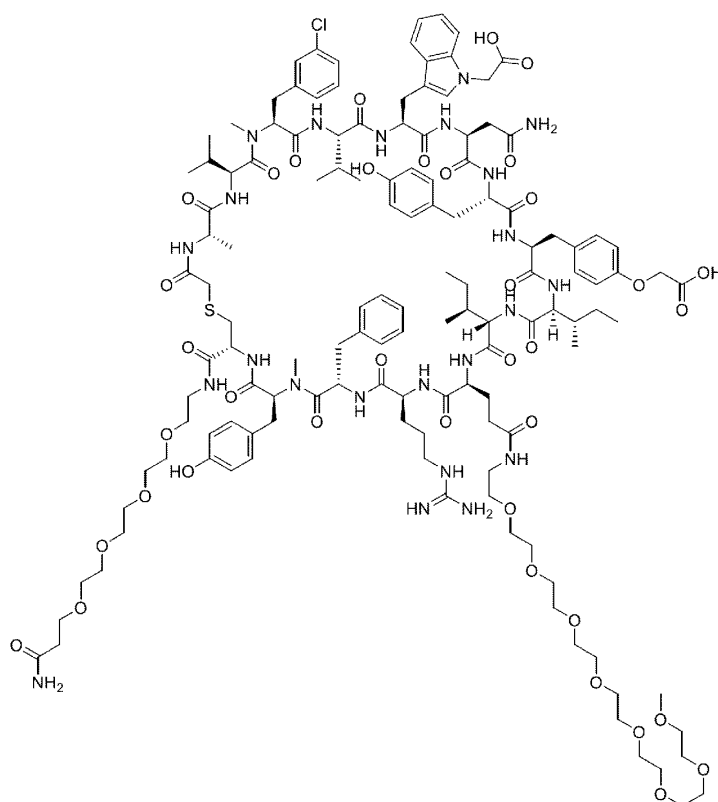
分析条件：保持時間=4.32分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150 mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%，その後0.3分間かけて 60－95%，その後1.5分間かけて95－95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1225.89$ ($M+2H$)²⁺

[0133] [実施例4-3]

894__0298（配列番号101）の合成

[化3]



[0134] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.26 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue HT を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 10 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃ 下 15 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 90℃ 下 3 分間 2 回反応を行った。14 残基目, 16 残基目は 75℃ 下 20 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 40℃ 下 30 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液

と90℃下1分間反応させることで行った。ただし、2残基目、11残基目、13残基目のFmoc除去は75℃下、1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。15残基目、16残基目のFmoc除去は25℃下3分間反応させることで行った。その後、固相樹脂1当量に対し、5当量のFmoc-OSuのDMF溶液と1時間振盪しDMFで洗浄した。固相樹脂をDCMに懸濁させ、樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)及び10当量のフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMFで洗浄した。樹脂をDMFに懸濁し、樹脂1等量に対しH-PEG8Me/DIPCI/Oxyma pure(4当量/8等量/4等量)と75℃下30分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下5分間2回反応させα-アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、クロロ酢酸(約5当量)、DIPCI(約5当量)、HOSu(約5当量)をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したCIAcOSu(0.025M)を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応液カクテルA(4mL, 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 5 mM となるように DMSO/水 (9/1) に溶解後, 10 当量のトリエチルアミンを加えて, 室温で 15 時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後, Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。

[0135] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 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の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 92.7% であった。

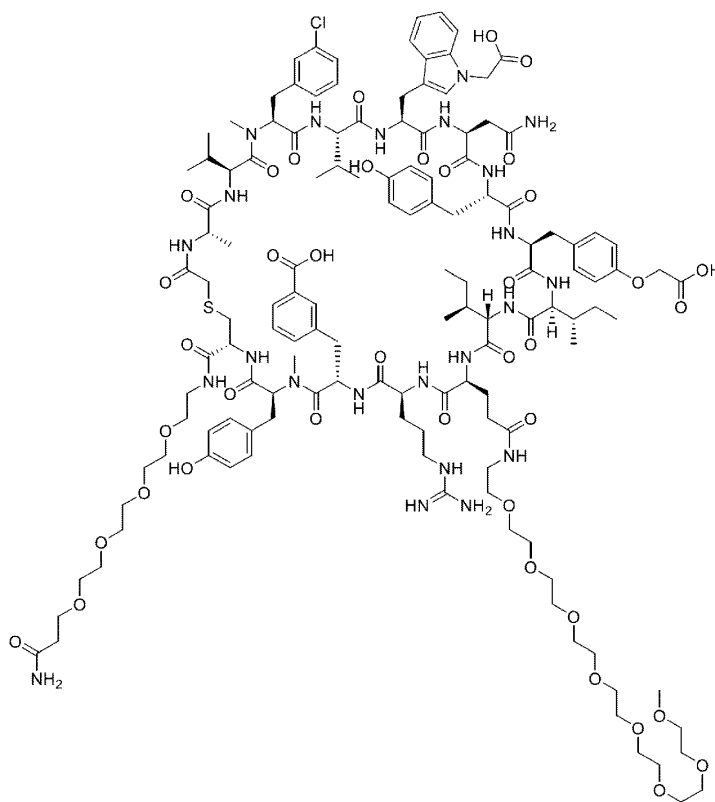
分析条件: 保持時間=5.22 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm, 100 Å; 移動相: A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15 分間かけて 20–60%, その後 0.3 分間かけて 60–95%, その後 1.5 分間かけて 95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 939.99$ ($M+3H$)³⁺

[0136] [実施例 4-4]

894__0301 (配列番号 103) の合成

[化4]



[0137] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol / g, 0.26 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。894_0298 と同様な方法で合成した。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA / DIPCl / Oxyma Pure (4.2 当量 / 8 当量 / 4 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 10 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃ 下 15 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 90℃ 下 3 分間 2 回反応を行った。14 残基目, 16 残基目は 75℃ 下 20 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 40℃ 下 30 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除

去は10% ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分間反応させることで行った。ただし、2残基目、11残基目、13残基目のFmoc除去は75℃下、1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。15残基目、16残基目のFmoc除去は25℃下3分間反応させることで行った。その後、固相樹脂1当量に対し、5当量のFmoc-OSuのDMF溶液と1時間振盪しDMFで洗浄した。固相樹脂をDCMに懸濁させ、樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)及び10当量のフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMFで洗浄した。樹脂をDMFに懸濁し、樹脂1等量に対しH-PEG8Me/DIPCI/Oxyma pure(4当量/8等量/4等量)と75℃下30分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下5分間2回反応させ α -アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、クロロ酢酸(約5当量)、DIPCI(約5当量)、HOSu(約5当量)をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したCIAcOSu(0.025M)を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A(4 mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で60分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離(9000 rpm, 2 min)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反

応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に 5 mM となるように DMSO/水 (9/1) に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 15 時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。

[0138] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 50 $\times$ 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の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 88.1% であった。

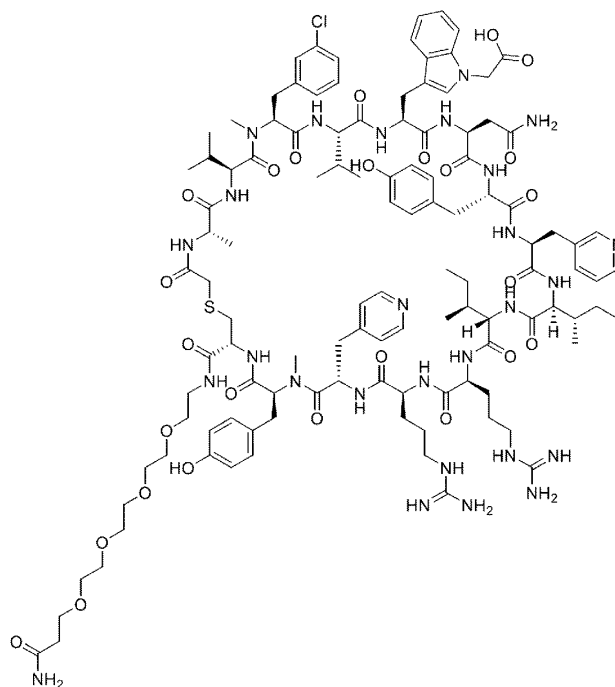
分析条件: 保持時間=5.28 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm, 100 Å; 移動相: A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15 分間かけて 20–60%, その後 0.3 分間かけて 60–95%, その後 1.55 分間かけて 95–95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1431.19$ ($M+2H$)²⁺

[0139] [実施例 4–5]

894__0306 (配列番号 48) の合成

[化5]



[0140] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.13 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Prime を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPC l/Oxyma Pure (4.2 当量/16 当量/6 当量) を用い DMF 中 105℃下, 1.5 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃下, 30 分間 2 回反応を行った。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, 10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃下, 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 4% ピロリジン含有 83 mM Oxyma pure の DMF 溶液と 110℃下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 25℃下, 1.5 分間反応さ

せた後、1.5分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約5当量）、HATU（約5当量）、DIEA（約10当量）を加えDMF中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、塩化メチレンで洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（3mL、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3mMとなるようにDMSOに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で終夜攪拌し、酢酸でクエンチした。その後、反応溶液をGenevac EZ-11 eliteを用いて減圧濃縮した。

[0141] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 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）：2分かけて5-5%，その後1分かけて5-27%，その後8分かけて27-32%，その後1分かけて32-60%；流量：20mL/minで1分，その後1分かけて20mL/min-120mL/min，その後120mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225nm）クロマトグ

ラムの面積比から算出し 86.7% であった。

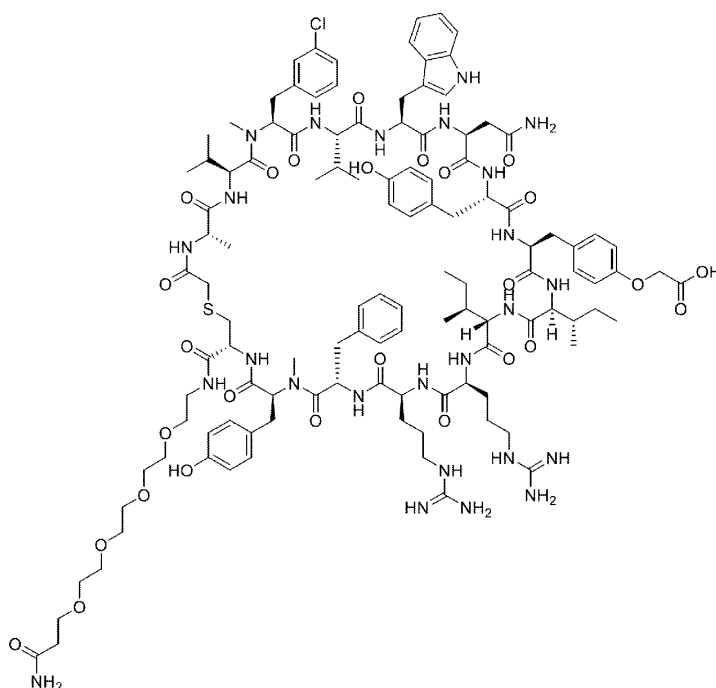
分析条件：保持時間＝3.08分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100Å；移動相：A＝0.025% TFA in H₂O, B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%，その後0.3分間かけて60－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1203.89$ ($M + 2H$)²⁺

[0142] [実施例4－6]

894__0392（配列番号109）の合成

[化6]



[0143] Sieber amide resin（渡辺化学，0.48 mmol/g，0.10 g）を用い，前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し，目的のペプチドを合成した。その際，CEM社のLiberty

B l u e を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し、F m o c - A A / D I P C I / O x y m a P u r e (5 . 3 当量 / 1 5 当量 / 7 . 5 当量) を用い DM F 中 9 0 ° C 下、3 分間 1 回反応を行った。ただし、2 残基目は 7 5 ° C 下、3 0 分間 2 回反応を行った。1 1 残基目、1 2 残基目は 5 0 ° C 下、1 5 分間 2 回反応を行った。1 3 残基目は 9 0 ° C 下、1 0 分間 2 回反応を行った。1 5 残基目は 5 0 ° C 下、1 5 分間 1 回反応を行った。また、F m o c 除去は 1 0 % ピロリジンの DM F 溶液と 9 0 ° C 下 1 分間反応させることで行った。ただし、2 残基目、1 3 残基目の F m o c 除去は 2 5 ° C 下、1 分間反応させた後、1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた F m o c 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 F m o c 基を除去したのち、クロロ酢酸 (約 5 当量)、H A T U (約 5 当量)、D I E A (約 1 0 当量) を加え DM F 中 2 5 ° C 下、3 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 DM F、塩化メチレンで洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル A (2 . 5 m L、T F A / H 2 O / 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 9 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 ° 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 (9 0 0 0 r p m、2 m i n)、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度 0 ° C 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 m M となるように D M S O / 水 (9 / 1) に溶解後、1 0 当量のトリエチルアミンを加えて、2 5 ° C で 1 5 時間攪拌し、酢酸でクエンチした。その後、反

応溶液をGenevac EZ-11 eliteを用いて減圧濃縮した。

[0144] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 150 mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分かけて11–11%，その後1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：20 mL/minで1分，その後1分かけて20 mL/min–120 mL/min，その後120 mL/min）。

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

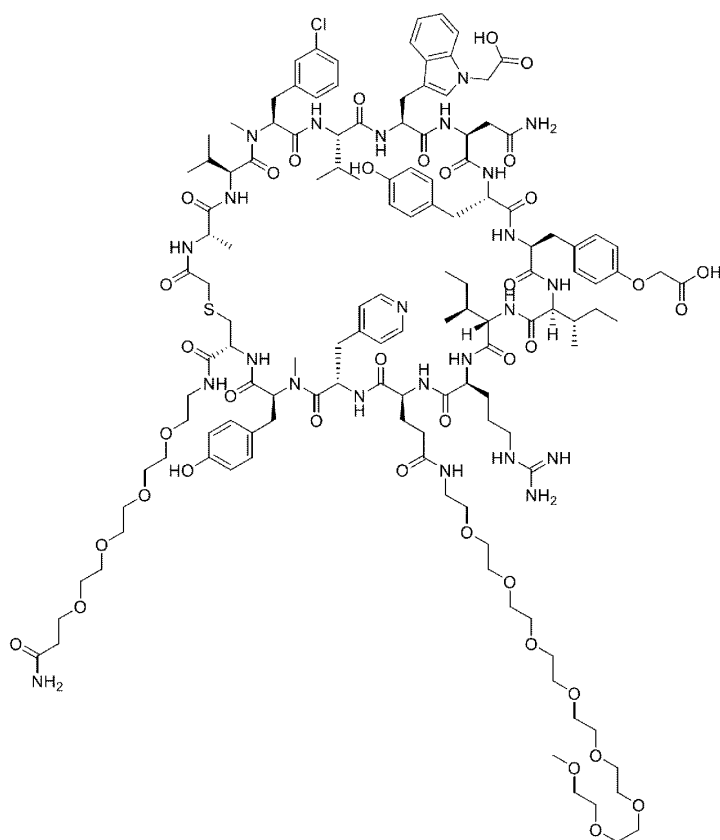
分析条件：保持時間=4.46分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20–60%，その後0.3分間かけて60–95%，その後1.55分間かけて95–95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z =1210.97（M+2H）²⁺

[0145] [実施例4–7]

894__0350（配列番号82）の合成

[化7]



[0146] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.13 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/1.2 当量/6 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。11 残基目は 50℃ 下 15 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 90℃ 下 3 分間 2 回反応を行った。14 残基目, 16 残基目は 90℃ 下 3 分間 1 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下 15 分間 1 回反応

を行った。また、Fmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下1分間反応させた後1分間反応させることで行った。ただし、13残基目、14残基目、15残基目、16残基目のFmoc除去は90℃下1分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述の方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約10当量）、DIPCI（約10当量）、HOSu（約10当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したCIAcOSu（0.025M）を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（3mL、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となるようにアセトニトリル/水（1/1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で2時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。得られた残渣を、ペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に25mMとなるようにDMFに溶解後、H-PEG8Me/HATU/DIEA（1.1当量/1.2当量/5当量）を加え、室温で1時間振盪した後酢酸でクエンチした。反応液に0.1当量のテトラキス（トリフェニルホスフィン

) パラジウム (0) 及び 10 当量のフェニルシランを加え、1 時間振盪した。反応液にジイソプロピルエーテルを加え、析出した固体を遠心分離し、(9000 rpm, 2 min), 溶液をデカンテーションした。

[0147] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters Xbridge (登録商標) C18 5 μ m 50 x 150 mm; 移動相: A = 0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN; 温度: 40°C; グラジエント (%B): 2 分かけて 7-7%, その後 1 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: 1 分かけて 20-20 mL/min, その後 1 分かけて 20-120 mL/min, その後 120 mL/min)。

目的物の純度は分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し 94.6% であった。

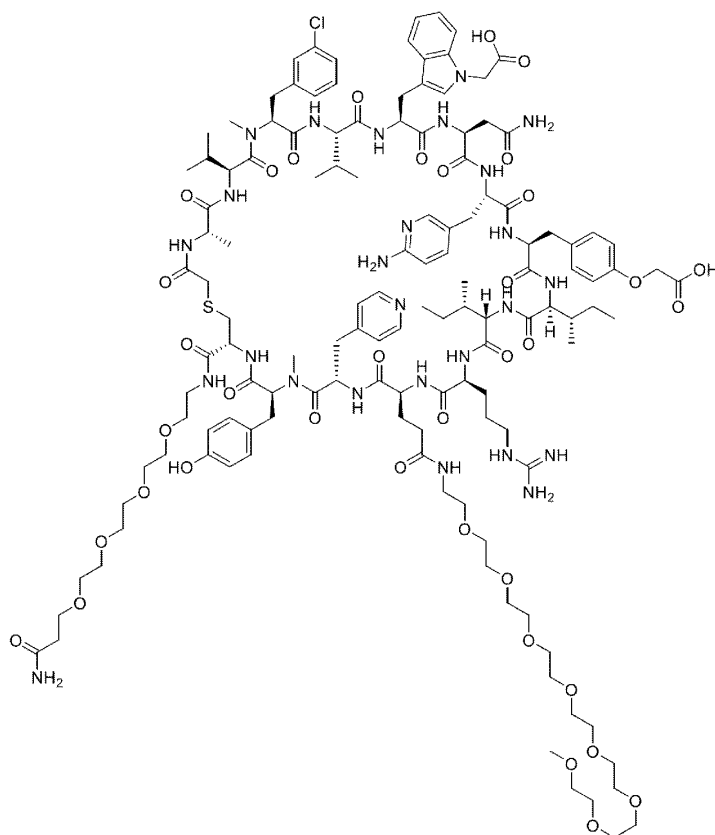
分析条件: 保持時間 = 4.71 分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å; 移動相: A = 0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15 分間かけて 20-60%, その後 0.3 分間かけて 60-95%, その後 1.5 分間かけて 95-95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1409.63$ ($M + 2H$)²⁺

[0148] [実施例 4-8]

894__0356 (配列番号 88) の合成

[化8]



[0149] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48mmol / g, 0.13 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma Pure (4.2 当量 / 12 当量 / 6 当量) を用い DMF 中

90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、2残基目は75℃下30分間2回反応を行った。3残基目、9残基目は90℃下10分間1回反応を行った。11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10% ピロリジンのDMF溶液と25℃下1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。ただし、2残基目、12残基目、13残基目のFmoc除去は90℃下1分間反応させることで行った。その後、固相樹脂1当量に対し、5当量のFmoc-OSuのDCM溶液と1時間振盪しDMFで洗浄した。固相樹脂をDCMに懸濁させ、樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム(0)、1当量のトリフェニルホスフィン及び10当量のトリフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMFで洗浄した。樹脂をDMFに懸濁し、樹脂1等量に対しH-PEG8Me/DIPCI/Oxymapure（4.2当量/8等量/4等量）と75℃下10分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し10%ピロリジンのDMF溶液と25℃下10分間反応させることで α -アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、クロロ酢酸（約10当量）、DIPCI（約10当量）、HOSu（約10当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したClAcOSu（0.013M）を加え25℃下60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（3mL, 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 5 mM となるように DMSO に溶解後、10 当量のトリエチルアミンを加えて、室温で 15 時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。

[0150] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×150mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B = 0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B）：3 分かけて 5–29%，その後 8 分かけて 29–34%，その後 1 分かけて 34–60%；流量：120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件の LC/MS（UV 波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し 89.2% であった。

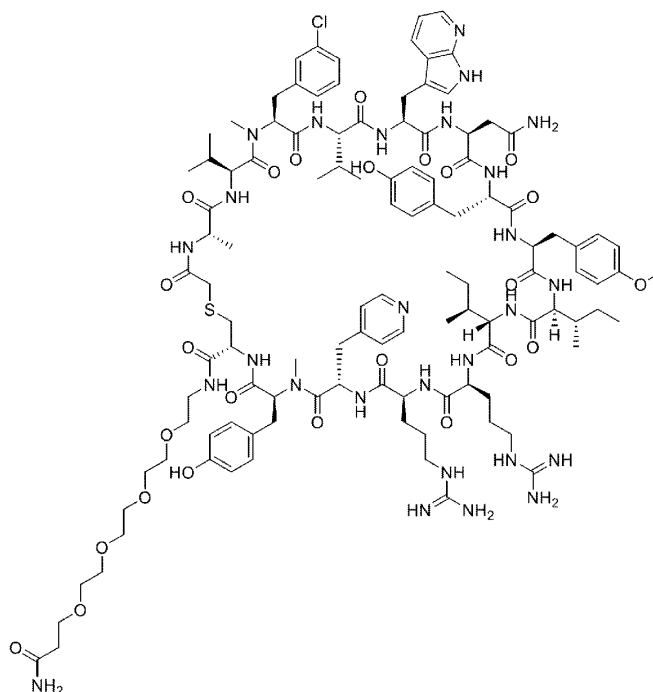
分析条件：保持時間=3.44 分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15 分間かけて 20–60%，その後 0.3 分間かけて 60–95%，その後 1.55 分間かけて 95–95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z = 940.08 ($M+3H$)³⁺

[0151] [実施例 4–9]

894__0324（配列番号 65）の合成

[化9]



[0152] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol / g, 0.10 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma Pure (5.3 当量 / 1.5 当量 / 7.5 当量) を用い DMF 中 90℃ 下, 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 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 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃ 下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 25℃ 下, 1 分間反応させた後, 1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた

Fmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約10当量）、DIPCI（約10当量）、HOSu（約10当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したClAcOSu（0.010M）を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレンで洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A（3mL、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/水（9/1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、40℃で4時間攪拌した後、ヒドラジン-水和物（DMSOに対し2%になるよう）を加えた。その後、反応溶液をGenevac EZ-11 eliteを用いて減圧濃縮した。

[0153] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 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分かけて5-26%，その後8分かけて26-31%，その後1分かけて31-60%；流量：120mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し84.5%であった。

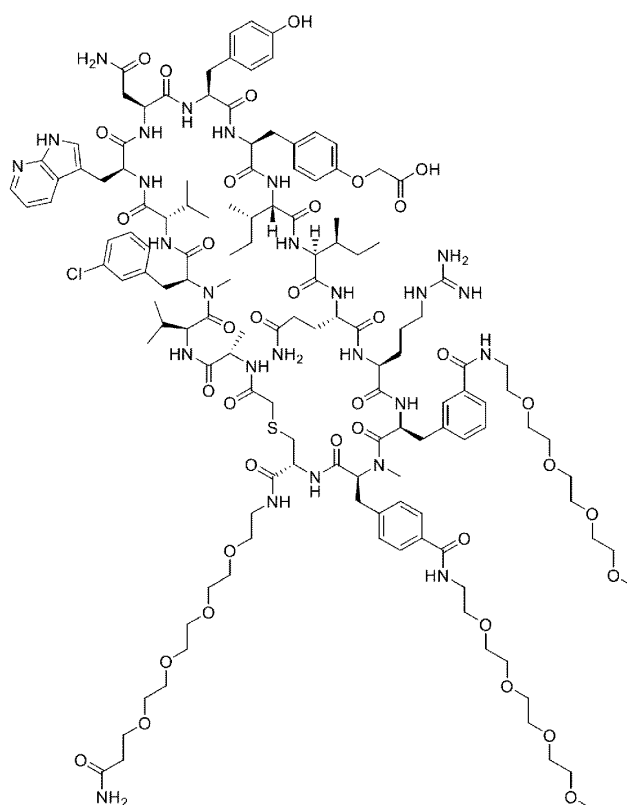
分析条件：保持時間＝5.67分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100Å；移動相：A＝0.025% TFA in H₂O, B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて5－45%，その後0.3分間かけて45－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS（+） 観測値 m/z ＝793.86（ $M+3H$ ）³⁺

[0154] [実施例4－10]

894__0416（配列番号131）の合成

[化10]



[0155] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.10 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (5.3 当量/15 当量/7.5 当量) を用い DMF 中 90℃ 下 3 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃ 下 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃ 下, 15 分間 2 回反応を行った。13 残基目は 90℃ 下 10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 90℃ 下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 10% ピロリジンの DMF 溶液と 25℃ 下 1 分間反応させた後, 1 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述の方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち, クロロ酢酸 (約 10 当量), DIPCI (約 10 当量), HOSu (約 10 当量) を DCM 中 60 分間振盪した後, DCM と同量の DMF を加えることで調製した CIAcOSu (0.013 M) を加え 25℃ 下 60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは, まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後, ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に, 反応剤カクテル A (3 mL, TFA/H₂O/TIS/DODT の体積比 92.5/2.5/2.5/2.5 の混合物) を加え, 室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し, フリットより溶液成分を回収, 前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると, 白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し (9000 rpm, 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 5 % 含水 DMSO に溶解後、5 当量のトリエチルアミンを加えて、25℃ で 2 時間攪拌した。反応溶液を Genevac HT-12 を用いて減圧濃縮した。得られた残渣を固相樹脂のモル数を基に 25 mM となるように DMF に溶解後、4.2 当量の H-PEG4Me, 4 当量の HATU, 8 当量の DIEA を加え 25℃ で 60 分反応させた後、酢酸でクエンチした。反応液に 0.1 当量のテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）及び 10 当量のフェニルシランを加え、1 時間振盪した。反応液にジイソプロピルエーテルを加え、析出した固体を遠心分離し（9000 rpm, 2 min）, 溶液をデカンテーションした。

[0156] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 $\times$ 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 5–30%，その後 8 分かけて 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の LC/MS（UV 波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し 85.7% であった。

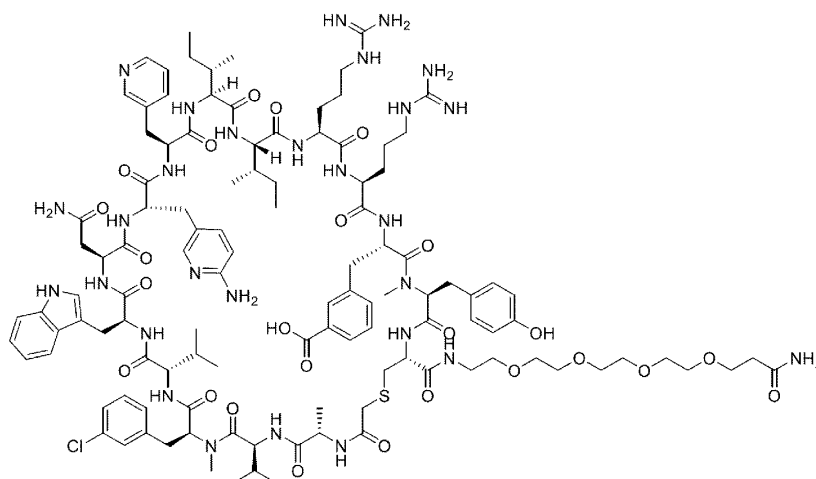
分析条件：保持時間=4.26 分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150 mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15 分間かけて 20–60%，その後 0.3 分間かけて 60–95%，その後 1.55 分間かけて 95–95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 1422.62$ ($M+2H$)²⁺

[0157] [実施例 4-11]

894__0367 (配列番号198) の合成

[化11]



[0158] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.13 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM 社の Liberty Prime を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2 当量/8 当量/4 当量) を用い DMF 中 105℃ 下, 1.5 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目は 75℃ 下, 30 分間 2 回反応を行った。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, 10 分間 2 回反応を行った。15 残基目は 50℃ 下, 15 分間 1 回反応を行った。また, Fmoc 除去は 4% ピペリジン含有 83 mM Oxyma pure の DMF 溶液と 110℃ 下 1 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 13 残基目の Fmoc 除去は 10% ピペリジンの DMF 溶液と 25℃ 下, 1.5 分間反応させた後, 1.5 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した

方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約5当量）、HATU（約5当量）、DIEA（約10当量）を加えDMF中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、塩化メチレンで洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（4 mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物）を加え、室温で90分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル/ヘキサン（1/1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5 mMとなるようにMeCN/水（1/1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で8時間攪拌した。その後、反応溶液をGenevac EZ-11 eliteを用いて減圧濃縮した。

[0159] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×150 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5–26%，その後8分かけて26–31%，その後1分かけて31–60%；流量：120 mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し82.9%であった。

分析条件：保持時間=3.16分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150 mm, 100 Å；移動相：A=0.0

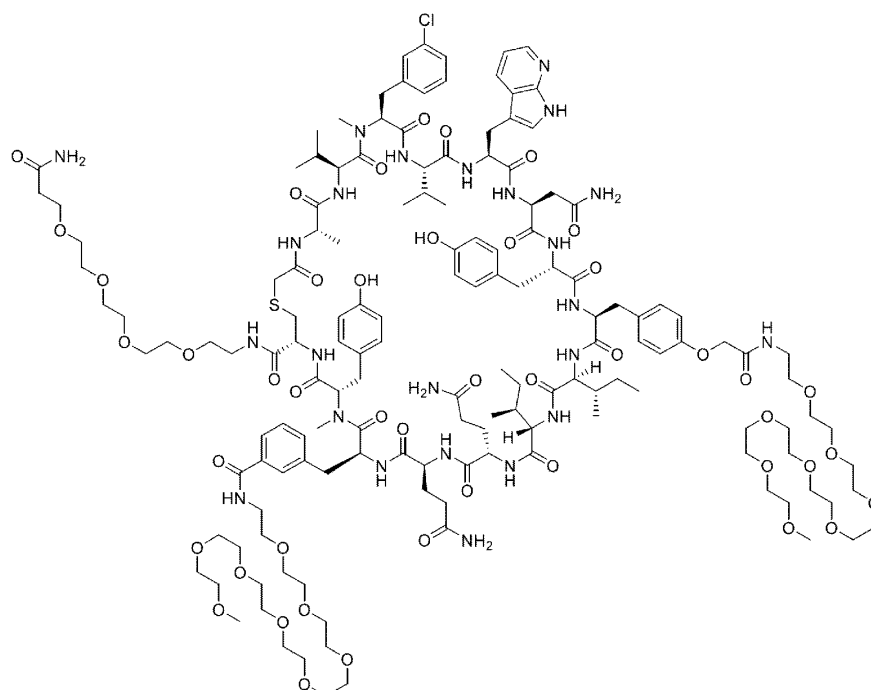
25% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.3分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1196.42$ ($M+2H$)²⁺

[0160] [実施例4-12]

894_0442 (配列番号229) の合成

[化12]



[0161] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.48 mmol/g, 0.10 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社の Liberty PRIME を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (5.3当量/20当量/7.5当量) を用い DMF

中 105℃下90秒間1回反応を行った。ただし、2残基目は75℃下30分間2回反応を行った。13残基目は90℃下10分間2回反応を行った。15残基目は50℃下15分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は4%ピロリジン含有83mM Oxyma pureのDMF溶液と110℃下1分間反応させることで行った。ただし、2残基目、13残基目のFmoc除去は10%ピロリジンのDMF溶液と室温下90秒間反応させた後、90秒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の方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約5当量）、DIPCI（約5当量）、HOSu（約5当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したCIAcOSu（0.013M）を加え25℃下60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A（2mL，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10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当量のトリエチルアミンを加えて，室温で15時間攪拌した。反応溶液をGenevac EZ-II eliteを用いて減圧濃縮した。得られた残渣を固相樹脂のモル数を基に25mMとなるようにDMFに溶解後，3.

2当量のH-PEG8Me, 2当量のPyAOP, 6当量のDIEAを加え室温で30分反応させた。

[0162] 得られた反応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 30 $\times$ 150mm; 移動相: A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN; 温度: 50 $^{\circ}$ C; グラジエント(%B): 2分かけて9 $\rightarrow$ 9%, その後3分かけて9 $\rightarrow$ 34%, その後8分かけて34 $\rightarrow$ 39%, その後1分かけて34 $\rightarrow$ 60%; 流量: 45 mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS(UV波長225 nm)クロマトグラムの面積比から算出し95.9%であった。

分析条件: 保持時間=5.02分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 $\times$ 150mm, 100 $\text{\AA}$; 移動相: A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度: 60 $^{\circ}$ C; グラジエント(% B conc): 7.15分間かけて20 $\rightarrow$ 60%, その後0.3分間かけて60 $\rightarrow$ 95%, その後1.55分間かけて95 $\rightarrow$ 95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS(+) 観測値 m/z =1047.62 (M+3H)³⁺

[0163] [実施例4-13]

894__0461(配列番号240)の合成

られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約5当量）、DIPCI（約5当量）、HOSu（約5当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したClAcOSu（0.020M）を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレンで洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（4.0mL、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/水（9/1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で15時間攪拌し、酢酸でクエンチした。その後、反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0165] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 30x150mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）： 2分かけて11-11%，その後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：45mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマト

グラムの面積比から算出し92.3%であった。

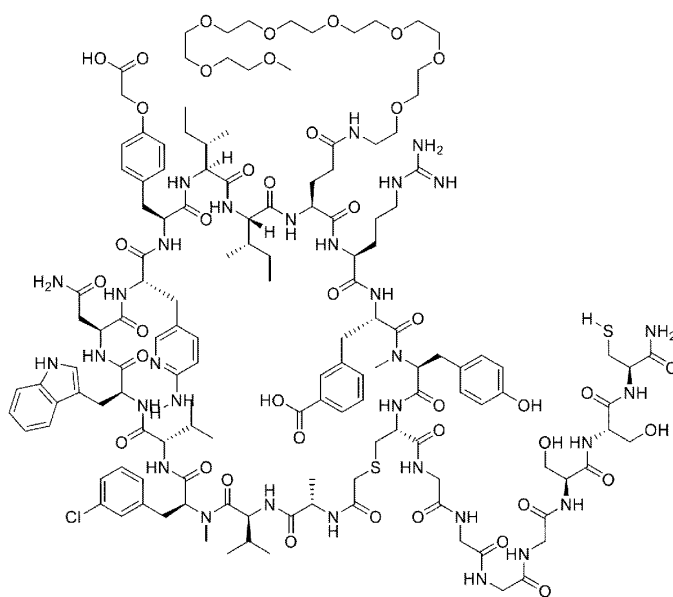
分析条件：保持時間＝4.07分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150mm, 100Å；移動相：A＝0.025% TFA in H₂O, B＝0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20－60%，その後0.3分間かけて60－95%，その後1.55分間かけて95－95%；流量：0.5mL/min

ESI-MS（+） 観測値m/z＝1304.08（M+2H）²⁺

[0166] [実施例4-14]

894 3228（配列番号362）の合成

[化14]



[0167] Sieber amide resin（渡辺化学，0.58mmol/g，0.22g）を用い，前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し，目的のペプチドを合成した。その際，CEM社のLiberty Blue HTを固相合成機として使用し，製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し，Fmoc-AA/DIP

C l / O x y m a P u r e (4.2当量/8当量/4当量)を用いDMF中、90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、2残基目は75℃下、30分間2回反応を行った。7残基目、16残基目、17残基目は90℃下、10分間1回反応を行った。12残基目は50℃下15分間2回反応を行った。15残基目、22残基目は50℃下15分間反応を行った。また、F m o c 除去は10% ピロリジンのDMF溶液と90℃下1分間反応させることで行った。ただし、1残基目、2残基目、3残基目、4残基目、5残基目、6残基目、7残基目、8残基目、9残基目、10残基目、11残基目、13残基目のF m o c 除去は25℃下、1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。その後、固相樹脂1当量に対し、5当量のF m o c - O S u のDCM溶液と1時間振盪しDMFで洗浄した。固相樹脂をDCMに懸濁させ、樹脂1当量に対し0.2当量のテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)及び10当量のフェニルシランを加え、1時間振盪しDCM及びDMF及びDCMで洗浄した。樹脂をDMFに懸濁し、樹脂1等量に対しH-PEG8Me/DIPCl/Oxyma pure (4当量/8等量/4等量)と75℃下30分間反応させた。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたF m o c 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下10分間反応させ α -アミノ基のF m o c 基を除去したのちDMFで洗浄後、クロロ酢酸(約10当量)、DIPCl(約10当量)、HOSu(約10当量)をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したClAcOSu(0.025M)を加え25℃下、60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A(12mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比90/2.5/2.5/5.0の混合物)を加え、室温で90分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し

用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジエチルエーテル／ヘキサン（1／1）の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 2 min）、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた固体を次の環化反応に用いた。ペプチドの環化反応はペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるようにアセトニトリル／水（1／1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で1時間攪拌した。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。得られた残渣をペプチドの終濃度が固相樹脂のモル数を基に25 mMとなるようにDMSOに溶解後、3当量の酢酸銀を加え室温で5時間反応させ、2 M DTT水溶液でクエンチした。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 2 min）、溶液を回収した。固体をDMSOで洗浄し、上澄みを先ほど回収した溶液と混合した。

[0168] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×150mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分かけて30–30%，その後8分かけて30–35%，その後1分かけて35–60%；流量：1分かけて20–20 mL/min, その後2分かけて20–120 mL/min, その後120 mL/min）。

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

分析条件：保持時間=3.82分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B = 0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20–60%，その後0.3分間かけて60–95%，その後1.5

残基目のFmoc除去は25℃下、1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述した方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのちDMFで洗浄後、クロロ酢酸（約10当量）、DIPCI（約10当量）、HOSu（約10当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したClAcOSu（0.25M）を加え25℃下、120分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A（7mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比90/2.5/2.5/5.0の混合物）を加え、室温で30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, 0℃, 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となるようにアセトニトリル/水（1/1）に溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で1時間攪拌後、2%ヒドラジンを加え2時間反応させた。反応溶液を酢酸でクエンチ後、Genevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0171] 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 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）： 2分かけて5-5%，その後1分かけて5-29%，その後8分かけて29-34%，その後

1分かけて34-60%；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）。凍結乾燥後，以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XSelect（登録商標） C18 5 μ m 19 x 150 mm；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）：3分かけて5-30%，その後8分かけて30-35%，その後1分かけて35-60%；流量：17 mL/min）。

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し98.4%であった。

分析条件：保持時間=3.84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=1110.97（M+3H）³⁺

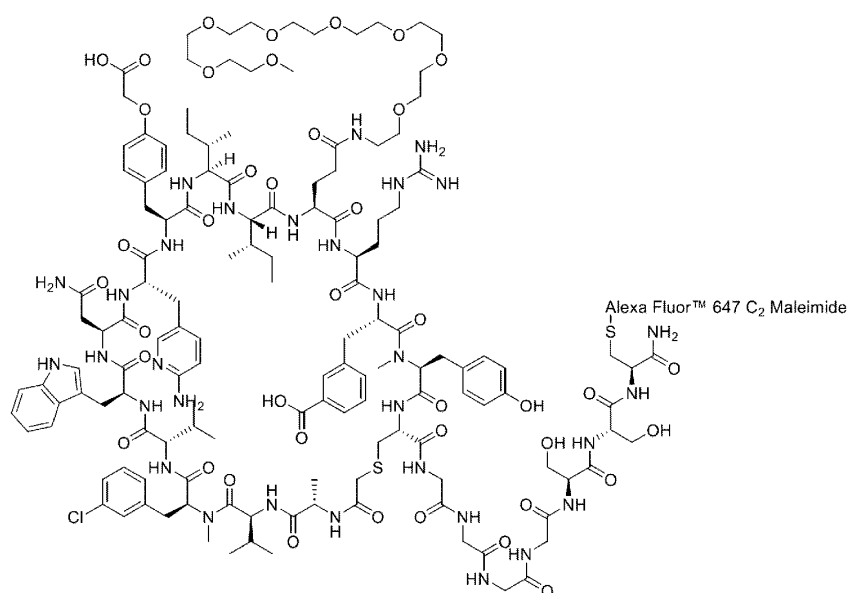
実施例 5

[0172] 表6に記載のペプチドコンジュゲート（ペプチドとペイロードがリンカーを介して結合した複合体）を合成した。本実施例では，その合成例を以下に記載する。なお、表6の894__0501および894__0502で表される蛍光物質Alexa Fluor（登録商標） 647-ペプチドコンジュゲートについては、Alexa Fluor（登録商標） 647の正確なMS値が不明であるため、[M+XH]^{X+}のXの値は記載していない。

[0173] [実施例5-1]

894__0502（表6）の合成

[化16]



[0174] 実施例4-14で合成した894_3228 (5 mg, 1.58 μmol) をDMSO (0.3 mL) に溶かし、トリエチルアミン (2.4 mg, 24.0 μmol)、Alexa Fluor (登録商標) 647 C2 Maleimide (登録商標) (1.9 mg, 1.73 μmol) を加え室温で終夜攪拌した。

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: Waters XSelect (登録商標) C18 5 μm 19 $\times$ 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): 11分かけて19-49%, その後1分かけて49-60%; 流量: 17 mL/min)。
目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し93.5%であった。

分析条件: 保持時間=5.01分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 $\times$ 150 mm, 100 Å; 移動相: A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeC

[0176] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.57 mmol / g, 0.88 g) を用い, 前述の一般的方法にて Fmoc 基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社の Liberty Blue を固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂 1 当量に対し, Fmoc-AA / DIPCI / Oxyma Pure (4.2 当量 / 8 当量 / 4 当量) を用い DMF 中 75℃ 下 10 分間 1 回反応を行った。ただし, 2 残基目, 4 残基目は 75℃ 下 30 分間 2 回反応を行った。12 残基目は 50℃ 下, 15 分間 2 回反応を行った。13 残基目, 21 残基目は 75℃ 下 10 分間 2 回反応を行った。15 残基目, 25 残基目, 29 残基目, 32 残基目, 36 残基目は 50℃ 下 15 分間 1 回反応を行った。13 残基目また, Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と 75℃ 下 3 分間反応させることで行った。ただし, 2 残基目, 4 残基目, 13 残基目, 21 残基目の Fmoc 除去は 20% ピペリジンの DMF 溶液と 25℃ 下 5 分間反応させた後, 5 分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られた Fmoc 保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述の方法で α -アミノ基の Fmoc 基を除去したのち, クロロ酢酸 (約 10 当量), DIPCI (約 10 当量), HOSu (約 10 当量) を DCM 中 60 分間振盪した後, DCM と同量の DMF を加えることで調製した ClAcOSu (5 mM) を加え 25℃ 下 60 分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは, まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂を DMF で 5 回と塩化メチレンで 3 回洗浄した後, ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に, 反応剤カクテル A (30 mL, TFA / H₂O / TIS / DODT の体積比 9.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5 の混合物) を加え, 室温で 90 分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し, フリットより溶液成分を回収, 前述の濾液と混合した。この濾液を 0℃ に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル / ヘキサン (1 / 1) の混合溶媒に加えると, 白

濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し（9000 rpm, 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10%含水DMSOに溶解後, 10当量のトリエチルアミンを加えて, 25℃で4時間攪拌した後, 酢酸で反応をクエンチした。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0177] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50 x 150 mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分かけて35-35% , その後8分かけて35-40% , その後1分かけて40-60%；流量：1分かけて20 mL/min , その後2分かけて20 mL/min-120 mL/min , その後120 mL/min）。凍結乾燥を行った後, 以下の条件を用いて精製した。（カラム：Waters Xselect Fluoro-Phenyl（登録商標） 5 μ m 10 x 150 mm；移動相：A=1.0% AcOH in H₂O, B=1.0% AcOH in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）：3分かけて5-20% , その後8分かけて20-25% , その後1分かけて25-60%；流量：5 mL/min）

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し98.7%であった。

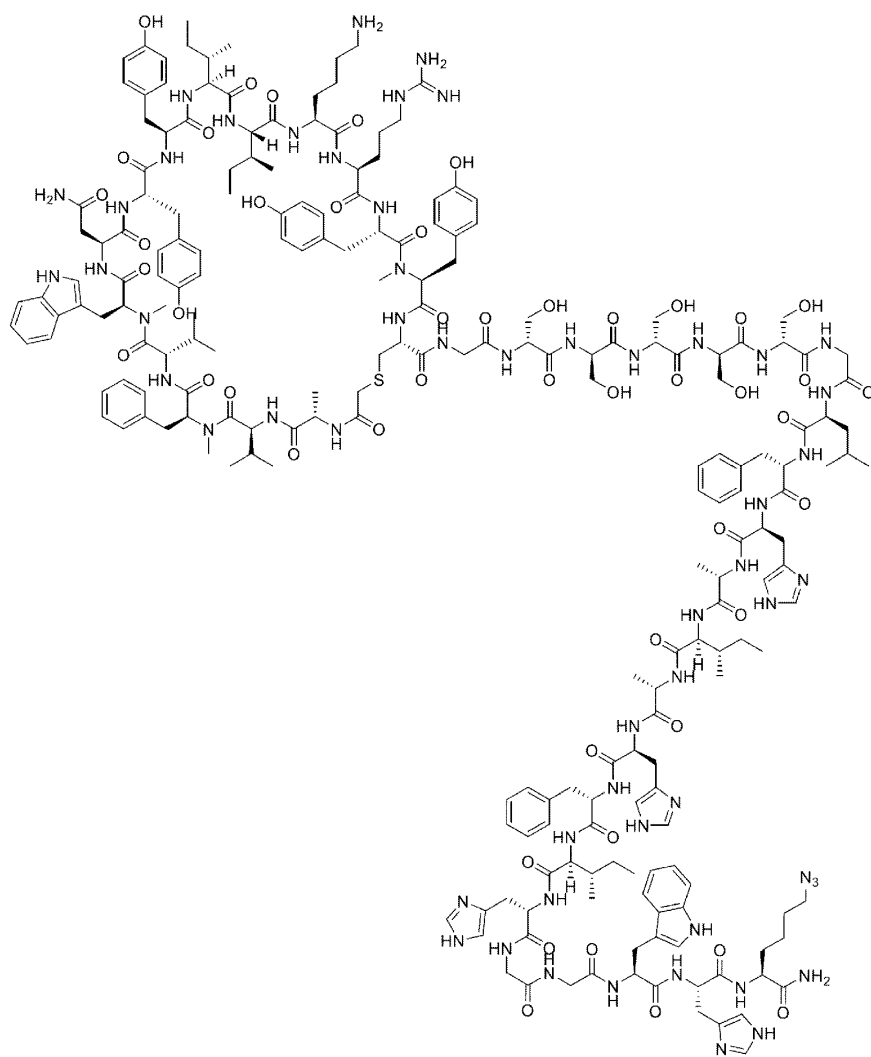
分析条件：保持時間=4.04分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20-60% , その後0.3分間かけて60-95% , その後1.55分間かけて95-95%；流量：0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 1135.17$ ($M + 4H$)⁴⁺

[0178] [実施例5-3]

894_3222 (表6) の合成

[化18]



[0179] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.57 mmol / g, 0.88 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 u e を固相合成機として使用し、製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し、Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2当量/8当量/4当量)を用いDMF中75℃下10分間1回反応を行った。ただし、2残基目、4残基目は75℃下30分間2回反応を行った。12残基目は50℃下、15分間2回反応を行った。13残基目、21残基目は75℃下20分間2回反応を行った。15残基目、25残基目、29残基目、32残基目、36残基目は50℃下15分間1回反応を行った。また、Fmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と75℃下3分間反応させることで行った。ただし、2残基目、4残基目、13残基目、21残基目のFmoc除去は20%ピペリジンのDMF溶液と25℃下5分間反応させた後、5分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述の方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸(約10当量)、DIPCI(約10当量)、HOSu(約10当量)をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したCIAcOSu(5mM)を加え25℃下60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテル-A(30mL, TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で90分振盪した。反応液をフリットより濾過回収した。反応容器に残った固相樹脂は切り出し用カクテルと再度振盪し、フリットより溶液成分を回収、前述の濾液と混合した。この濾液を0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル/ヘキサン(1/1)の混合溶媒に加えると、白濁沈殿が生じた。この混合物を遠心分離し(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5 mMとなるように10%含水DMSOに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で4時間攪拌した後、酢酸で反応をクエンチした。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0180] 得られた粗生成物は以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters Xbridge（登録商標） C18 5 μ m 50×150mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分かけて34–34%、その後8分かけて34–39%、その後1分かけて39–60%；流量：1分かけて20 mL/min、その後2分かけて20 mL/min–120 mL/min、その後120 mL/min）。凍結乾燥を行った後、以下の条件を用いて精製した。（カラム：Waters Xselect Fluoro-Phenyl（登録商標） 5 μ m 10×150mm；移動相：A=1.0% AcOH in H₂O, B=1.0% AcOH in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）：3分かけて5–19%、その後8分かけて19–24%、その後1分かけて24–60%；流量：5 mL/min）

目的物の純度は分析条件のLC/MS（UV波長225 nm）クロマトグラムの面積比から算出し98.8%であった。

分析条件：保持時間=4.43分；カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1×150mm, 100 Å；移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN；温度：60℃；グラジエント（% B conc）：7.15分間かけて20–60%、その後0.3分間かけて60–95%、その後1.55分間かけて95–95%；流量：0.5 mL/min

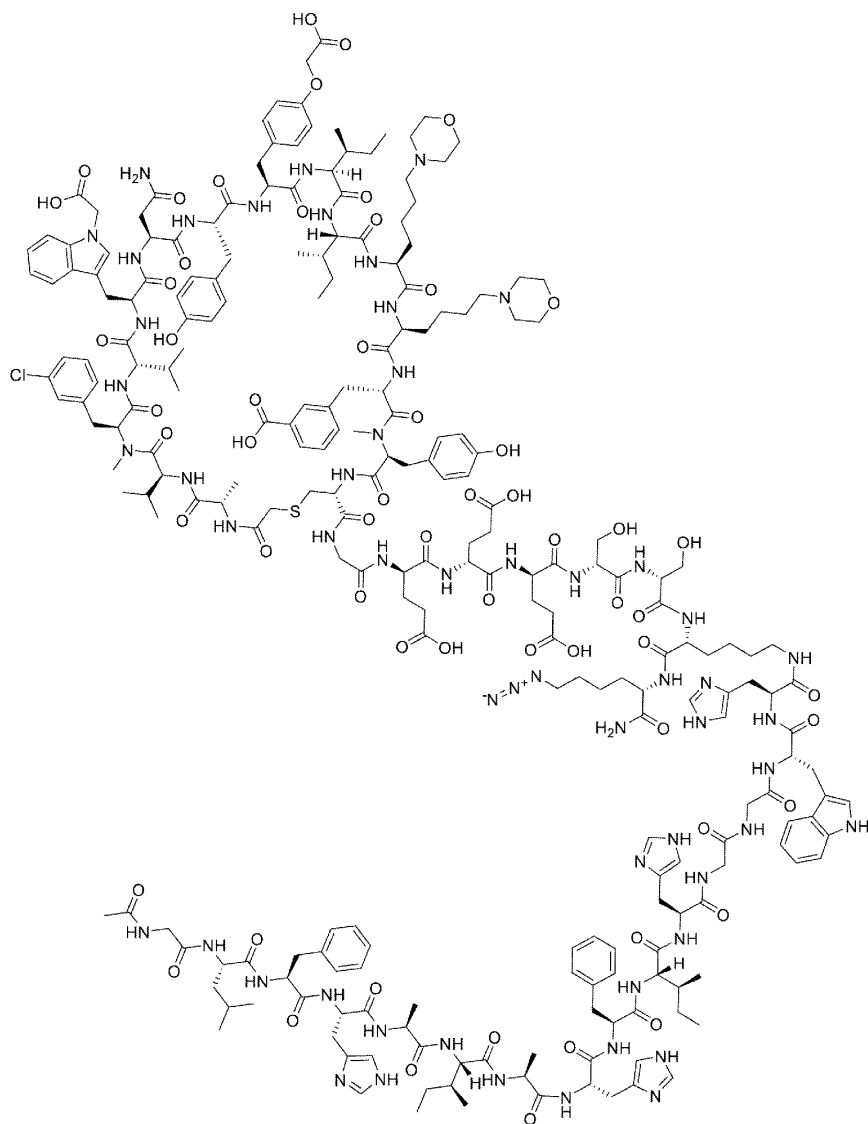
ESI-MS（+） 観測値m/z=1103.64（M+4H）⁴⁺

[0181] [実施例5-4]

894 33808（表6）の合成

本実施例においては、ペイロードとして以下のシグナルペプチド（配列番号395：G-L-F-H-A-I-A-H-F-I-H-G-G-W-H）が結合したペプチドコンジュゲートを合成した。なお、ペイロードはリンカーに含まれるdkの側鎖に結合している。

[化19]



[0182] Sieber amide resin (渡辺化学, 0.57 mmol)

／g, 0.49g)を用い, 前述の一般的方法にてFmoc基の除去から開始し, 目的のペプチドを合成した。その際, CEM社のLiberty Blueを固相合成機として使用し, 製造元のマニュアルに従って合成を行った。各残基の導入には樹脂1当量に対し, Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma Pure (4.2当量/8当量/4当量)を用いDMF中で行った。Fmoc基の除去は10%ピロリジンのDMF溶液と反応させることで行った。レジンにFmoc-KN3-OHを90℃下3分間1回反応させ導入後, Fmoc基を90℃下1分間反応させ除去した。続いてAlloc-dk(Fmoc)-OHを90℃下3分間1回反応させ導入後, Fmoc基を90℃下1分間反応させ除去し続くリジン側鎖アミノ基からのペプチド伸長を行った。Fmoc-His(Trt)-OH以外のアミノ酸は90℃下3分間1回反応させ導入した。Fmoc-His(Trt)-OHは50℃下15分間1回反応させ導入した。各アミノ酸のFmoc基は90℃下1分間反応させ除去した。リジン側鎖伸長後, 樹脂をDMFで3回洗浄し, 5%無水酢酸のジクロロメタン溶液と室温で30分間反応させ, DMF及びジクロロメタンで洗浄した。得られた樹脂をジクロロメタンに懸濁させ, 0.2当量のテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム錯体(0)及び10当量のフェニルシランと室温で1時間浸透し, ジクロロメタン及びDMFで洗浄した。得られた樹脂のリジン α 位アミノ基からペプチド伸長を行った。Fmoc-ds(tBu)-OH, Fmoc-de(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-MeY(tBu)-OHは90℃下10分間1回反応させることで導入した。Fmoc基は75℃下1分間反応させ除去した。Fmoc-C(Trt)-OHは50℃下15分間反応させることで導入した。Fmoc基は75℃下1分間反応させ除去した。Fmoc-F3COO(tBu)-OHは90℃下10分間2回反応させることで導入した。Fmoc基は75℃下1分間反応させ除去した。これら以外のアミノ酸の導入は30℃下40分間1回もしくは2回反応させることで行った。特にN末端アラニンを1残基目とし, 2残基目のFmoc-V-OHおよび9残基

目 Fmoc- I-OH を導入する際は2回反応を行った。Fmoc基の除去は25℃下1分間反応させた後、1分間反応させることで行った。クロロアセチル基の導入は前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し前述の方法で α -アミノ基のFmoc基を除去したのち、クロロ酢酸（約5当量）、DIPCI（約5当量）、HOSu（約5当量）をDCM中60分間振盪した後、DCMと同量のDMFを加えることで調製したCIAcOSu（20mM）を加え25℃下60分振盪することにより行った。側鎖の脱保護および固相樹脂からの切り出しは、まずクロロアセチル基導入工程後に得られた樹脂をDMFで5回と塩化メチレンで3回洗浄した後、ジエチルエーテルで洗浄後減圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、反応剤カクテルA（8.6mL, 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70分間振盪した。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10%含水DMSOに溶解後、10当量のトリエチルアミンを加えて、25℃で15時間攪拌した。反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

[0183] 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 50x250mm；移動相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分かけて9.3-5.6%，その後4.9分かけて5.6-5.6%，その後2分かけて5

. 6-9.3%, その後3分かけて9.3-34.7%, その後15分かけて34.7-39.8%, その後3分かけて39.8-60%; 流量: 0.1分かけて118-18 mL/min, その後4.9分かけて18 mL/min-18 mL/min, その後2分かけて18-118 mL/min, その後118 mL/min)。凍結乾燥を行った後, 以下の条件を用いて精製した。(カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 30 x 150 mm; 移動相: A=1.0% AcOH in H₂O, B=1.0% AcOH in MeCN; 温度: 40°C; グラジエント (%B): 3分かけて5-25%, その後8分かけて25-30%, その後1分かけて30-60%; 流量: 45 mL/min)

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し99.9%であった。

分析条件: 保持時間=4.36分; カラム: Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1 x 150 mm, 100 Å; 移動相: A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度: 60°C; グラジエント (% B conc): 7.15分間かけて20-60%, その後0.3分間かけて60-95%, その後1.55分間かけて95-95%; 流量: 0.5 mL/min

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1246.89 (M+4H)⁴⁺

[0184] [実施例5-5]

894-3372 (表6) の合成

相：A=0.1% TFA in H₂O, B=0.1% TFA in MeCN; 温度：60℃; グラジエント(%B)：3分かけて5-30%, その後8分かけて30-35%, その後1分かけて35-60%; 流量：17mL/min)。

目的物の純度は分析条件のLC/MS (UV波長225 nm) クロマトグラムの面積比から算出し98.4%であった。

分析条件：保持時間=4.21分; カラム：Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1x150mm, 100Å; 移動相：A=0.025% TFA in H₂O, B=0.025% TFA in MeCN; 温度：60℃; グラジエント(% B conc)：7.15分間かけて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=1337.07 (M+3H)³⁺

実施例 6

[0186] 表面プラズモン共鳴 (SPR) によるペプチドコンジュゲートとhTfRとの分子間相互作用評価試験

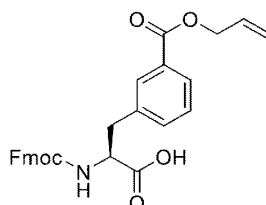
実施例5-1と同様に合成したペプチド-蛍光物質コンジュゲートである894_0501及び894_0502 (表6) について、hTfRに対するペプチドの表面プラズモン共鳴 (SPR) による分子間相互作用を、実施例3と同様の方法によって試験を実施した。求めたKD値について、KD値が1nM未満の場合はA, 1nM以上100nM未満の場合はB, 100nM以上1μM未満の場合はC, 1μM以上の場合はDとした。結果として、合成したペプチド-抗体物質コンジュゲートはhTfRへの結合活性がどちらもBであった、このことから、本発明のペプチドは、リンカーを付与または/およびペイロードを結合しても、ヒトTfRに対する顕著な結合活性を示した。

[0187] 以下のとおり、新規アミノ酸を合成した。

[0188] [合成例1-1]

Fmoc-F3COO (allyl) -OHの合成

[化21]



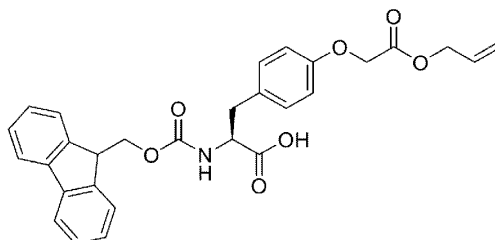
窒素雰囲気下、亜鉛（11.5 g, 175.0 mmol）をDMF（600 mL）に懸濁し、ヨウ素（1.18 g, 4.7 mmol）を加え室温で10分攪拌した。メチル（2R）-2-[[（9H-フルオレン-9-イルメトキシ）カルボニル]アミノ]-3-ヨードプロパノエート（31.6 g, 70.0 mmol）及びヨウ素（1.2 g, 4.7 mmol）を加え室温で30分攪拌した。ターシャリーブチル-3-ブロモベンゾエート（15 g, 58.3 mmol）、トリス（ジベンジリデンアセトン）ジパラジウム（0）-クロロホルム付加体（1.8 g, 1.8 mmol）及び2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2', 6'-ジメトキシビフェニル（1.2 g, 2.9 mmol）を加え50℃で2時間攪拌した。固体を濾過により除去し、濾液を水（100 mL）でクエンチした。反応液を酢酸エチル（100 mL）で3回抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水（100 mL）で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し、濾液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／石油エーテル＝1／10）。得られた生成物（20 g, 39.9 mmol）を4 N HClのジオキサン溶液中、室温下12時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、乾燥後得られた生成物（15.5 g, 34.8 mmol）をアセトニトリル（150 mL）に溶かし、DIEA（9.0 g, 69.6 mmol）、アリルブロミド（6.3 g, 52.2 mmol）と室温で12時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（100 mL）で希釈し、飽和食塩水（100 mL）で3回洗浄し

た後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／石油エーテル＝１／６）で精製した。得られた生成物（９．０ｇ，１８．５ｍｍｏｌ）をイソプロパノール（１２０ｍＬ），水（４０ｍＬ）に溶かし、塩化カルシウム（３２．９ｇ，２９６．６ｍｍｏｌ）を０℃で複数回に分けて加えた。その後、水酸化リチウム（１．８ｇ，７４．１ｍｍｏｌ）を０℃で複数回に分けて加え、室温で１時間攪拌した。反応液をクエン酸水溶液（５０ｍＬ）で希釈し、酢酸エチル（１００ｍＬ）で３回抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水（１００ｍＬ）で３回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下濃縮した。得られた残渣を分取用ＨＰＬＣで精製した（カラム：Ｃ１８シリカゲル，アセトニトリル／水＝０／１００－３８／６２（２０分かけて））。表記物質を得た。ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値 m/z ＝４９４．１０（ $M+Na$ ）⁺

[0189] [合成例１－２]

Fmoc-F4aa o (allyl) -OHの合成

[化22]



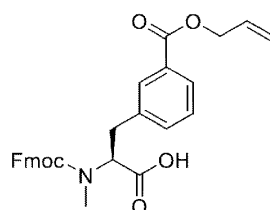
ターシャリーブチル（２Ｓ）－２－〔（ターシャリーブトキシカルボニル）アミノ〕－３－（４－ヒドロキシフェニル）プロパノエート（２０ｇ，５９．３ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２４０ｍＬ）に溶かし、炭酸カリウム（１６．４ｇ，１１８．５ｍｍｏｌ），クロロ酢酸アリル（１０，３ｇ，７６．５ｍｍｏｌ）を加え９０℃で終夜攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／

石油エーテル＝1／100－1／5）。得られた生成物（16.1 g, 37.0 mmol）をジクロロメタン（50 mL），TFA（70 mL）に溶かし、室温で1日攪拌した。反応液を減圧下濃縮し乾燥させた。得られた生成物の一部（5.2 g, 13.8 mmol）を水（25 mL）に溶かし、炭酸水素ナトリウム（3.9 g, 46.6 mmol）を加えた。反応液を攪拌しながらN－（9－フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）スクシンイミド（6.3 g, 18.6 mmol）のジオキサン溶液（25 mL）を0℃で滴下し室温で2時間攪拌した。クエン酸水溶液（40 mL）を加え反応をクエンチし、酢酸エチル（50 mL）で3回抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水（50 mL）で1回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣を分取用HPLCで精製した（カラム：C18シリカゲル，1%ギ酸含有アセトニトリル／水＝45／55－75／25（40分かけて）。表記物質を得た。ESI－MS（+） 観測値m/z＝524.10（M+Na）+

[0190] [合成例1－3]

Fmoc－MeF₃COO（allyl）－OHの合成

[化23]



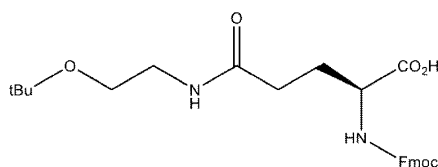
上記方法で合成した（S）－2－（（（9H－フルオレン－9－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－3－（3－（（アリルオキシ）カルボニル）フェニル）プロパン酸（7.5 g, 15.8 mmol）をトルエン（70 mL）中、酢酸（7.5 mL, 124.4 mmol），CSA（0.74 g, 3.2 mmol），パラホルムアルデヒド（4.8 g, 158.4 mmol）

1) を加え 110℃で1時間攪拌した。減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した(酢酸エチル/石油エーテル=4/1)。得られた生成物(4.3 g, 8.9 mmol)をDCM(24 mL)に溶かし攪拌しながら、TFA(24 mL)を0℃で滴下し加えた。反応液を攪拌しながらトリイソプロピルシラン(4.2 g, 26.7 mmol)を0℃で滴下し加えた。反応液を室温で2日間攪拌した。減圧下濃縮後、酢酸エチル(50 mL)で溶かし、水(50 mL)を加えた。混合物に炭酸水素ナトリウムを加えpHを6に調節し、酢酸エチル(50 mL)で4回抽出した。有機層をあわせ、水(50 mL)で3回洗浄した後、飽和食塩水(50 mL)で3回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣を分取用HPLCで精製した(カラム:C18シリカゲル, 0.1%ギ酸含有アセトニトリル/0.1%ギ酸含有水=50/50-80/20(30分かけて))。表記物質を得た。ESI-MS(+) 観測値 $m/z = 486.10$ ($M+H$)⁺

[0191] [合成例1-4]

Fmoc-QhEt-OHの合成

[化24]



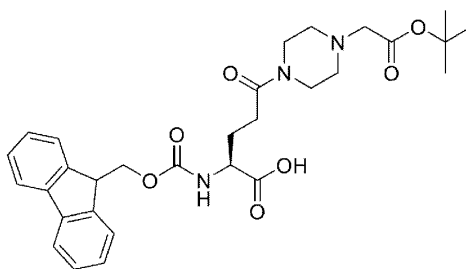
N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]-L-グルタミン酸-1-アリル(15.0 g, 36.6 mmol), 2-(ターシャリーブトキシ)エタンアミン(4.9 g, 42.1 mmol)をDMF(200 mL)に溶かし、0℃でHATU(16.7 g, 44.0 mmol), DIEA(7.1 g, 55.0 mmol)を加えた後、室温で2時間攪拌した。反応液を水でクエンチし、酢酸エチル(500 mL)で3回抽出した。

有機層をあわせ、飽和食塩水（５００ｍＬ）で３回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／石油エーテル＝６／４）。得られた生成物の一部（７．０ｇ，１３．８ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１５０ｍＬ）に溶かし、モルホリン（２．４ｇ，２７．５ｍｍｏｌ），テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）（１．６ｇ，１．４ｍｍｏｌ）を加え室温で３０分攪拌した。反応液を酢酸エチル（１００ｍＬ）で希釈し，２Ｍ塩酸を加えｐＨを５に調節した。混合物を酢酸エチル（２００ｍＬ）で２回抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水（３００ｍＬ）で３回洗浄し，無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し，濾液を減圧下濃縮後，得られた残渣を分取用ＨＰＬＣで精製した（カラム；Ｃ１８ シリカゲル；グラジエント：４０分かけてＣＨ３ＣＮ／Ｈ２Ｏ＝５／９５ — １００／０）。表記物質を得た。ＥＳＩ－ＭＳ（＋） 観測値 $m/z = 469.15$ （ $M+H$ ）⁺

[0192] [合成例１－５]

Fmoc－Qp i p z a a－OHの合成

[化25]



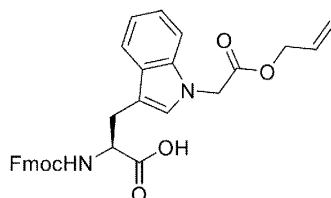
N－〔（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル〕－L－グルタミン酸－１－アリル（１５．０ｇ，３６．６ｍｍｏｌ）をDMF（５００ｍＬ）に溶かし，ターシャリーブチル２－（ピペラジーン－１－イル）アセテート（８．８ｇ，４４．０ｍｍｏｌ），HATU（２７．９ｇ，７３．３ｍｍｏｌ），DIEA（２５．５ｍＬ，１９７．５ｍｍｏｌ）を加え室温で１５

時間攪拌した。反応液を酢酸エチル（2 L）で希釈し、飽和食塩水（500 mL）で3回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。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＝1／1）で精製した。得られた生成物の一部（10.0 g, 16.9 mmol）をTHF（200 mL）に溶かし、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（2.0 g, 1.7 mmol），モルホリン（2.9 g, 33.8 mmol）を加え室温で30分攪拌した。クエン酸水溶液を加えpHを5－6に調節し、酢酸エチル（500 mL）で3回抽出した。有機層をあわせ、飽和食塩水300 mLで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／石油エーテル＝1／1）。表記物質を得た。ESI－MS（+）観測値 $m/z = 552.30$ （M+H）⁺

[0193] [合成例1－6]

Fmoc-W1aa (allyl) -OHの合成

[化26]



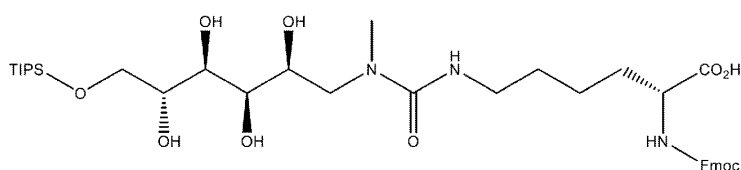
窒素雰囲気下，N－ターシャリーブトキシカルボニル－L－トリプトファン（20 g, 65.7 mmol）をTHF／DMF（100 mL／100 mL）に溶かし，0℃でターシャリーブトキシカリウム（14.8 g, 131.9 mmol）をゆっくりと加えた後，0℃で10分攪拌した。反応液を0℃で攪拌しながら，クロロ酢酸アリル（7.9 mL, 67.8 mmol）を滴下し加え5分攪拌した後，室温で終夜攪拌した。反応をクエン酸水溶液でクエンチし，酢酸エチル（50 mL）で3回抽出した。有機層をあわせ，飽和

食塩水（50 mL）で3回洗浄後，無水硫酸ナトリウムで乾燥させ，濾過し，濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／石油エーテル＝1／1）。得られた生成物の一部（15.0 g，37.2 mmol）をジクロロメタン（50 mL），TFA（50 mL）に溶かし，1時間室温で攪拌した。減圧下濃縮後，乾燥させた。得られた生成物の一部（4.0 g，13.2 mmol）をジオキサン（80 mL）に溶かし，水（40 mL），炭酸水素ナトリウム（4.5 g，53.0 mmol），N-（9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）スクシンイミド（6.7 g，19.8 mmol）を加え，室温で終夜攪拌した。固体を濾過し，クエン酸を加えpHを5に調節した。酢酸エチル（100 mL）で3回抽出した。有機層をあわせ，飽和食塩水（100 mL）で3回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させ，濾過し，濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／石油エーテル＝1／1）後，分取用HPLCで精製した（カラム：C18シリカゲル，アセトニトリル／水＝1／9－6／4）。表記物質を得た。ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 525.25$ （M+H）⁺

[0194] [合成例1-7]

Fmoc-dkCOmeglumine-OHの合成

[化27]



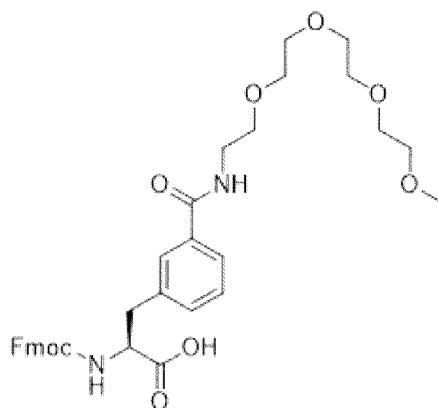
N2-[(9H-フルオレン-9イルメトキシ)カルボニル]-D-リジン-2-プロペン-1-イルエステル塩酸塩（5.0 g，11.2 mmol）をジクロロメタン（80 mL）に溶かした。トリホスゲン（1.7 g，5.6 mmol）を0℃で加えた後，DIEA（6.3 mL，36 mmol）

）を滴下し、0℃で30分攪拌した。反応液にジオキサン（80 mL）を加えた後、メグルミン（8.8 g, 44.9 mmol）含有0.5 N 炭酸水素ナトリウム水溶液（80 mL）を加えた。反応液を終夜0℃で攪拌した。反応液を酢酸エチル（300 mL）で希釈し、有機層を水、1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（ジクロロメタン／メタノール＝100／0－60／40）。得られた生成物をジクロロメタン（80 mL）に溶かし、0℃でイミダゾール（1.9 g, 28.1 mmol）、トリイソプロピルクロロシラン（3.0 g, 14.1 mmol）を加え5日間攪拌した。酢酸エチルで希釈し、水で3回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／ヘキサン＝0／100－60／40 その後ジクロロメタン／メタノール＝100／0－90／10）。得られた生成物（6.2 g, 7.9 mmol）をジクロロメタン（40 mL）に溶かし、フェニルシラン（1.9 mL, 15.8 mmol）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（0.2 g, 0.2 mmol）を加え室温で2時間攪拌した。濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（酢酸エチル／ヘキサン＝100／0－60／40 その後ジクロロメタン／メタノール＝100／0－90／10）。表記物質を得た。ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 746.6$ (M+H)⁺

[0195] [合成例 1－8]

Fmoc-F3COO(PEG4Me)-OHの合成

[化28]



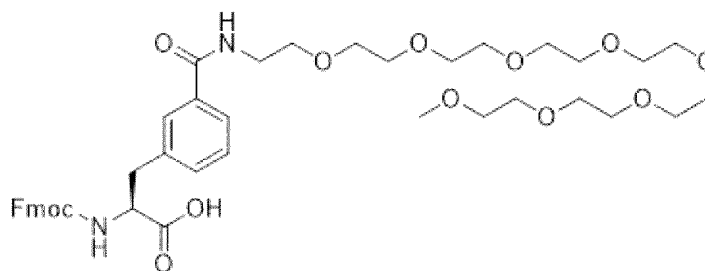
[0196] 3-ヨード安息香酸 (31.5 g, 96.5 mmol) をDMF (400 mL) に溶かし, HATU (44.0 g, 116 mmol), DIEA (24.9 g, 193 mmol) を室温で加えた後, 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-アミン (20 g, 96.5 mmol, CAS: 85030-56-4) を加え3時間攪拌した。混合物を水 (1000 mL) で希釈し, 酢酸エチル (200 mL) で3回抽出した。混合した有機層を飽和食塩水 (200 mL) で3回洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過し, 減圧下濃縮後, 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し (石油エーテル/酢酸エチル=50/50), 3-ヨードN-(2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル) ベンズアミドを得た。室温下, 亜鉛 (15.7 g, 240 mmol) をDMFに懸濁し, ヨウ素 (12.2 g, 48.0 mmol) を加え10分攪拌した。反応液にメチル(R)-((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 (36.1 g, 80.0 mmol, CAS: 847413-82-5) を加え室温で1時間攪拌した。混合物に3-ヨードN-(2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル) ベンズアミド (35 g, 80.0 mmol), Pd₂(dba)₃ (4.1 g, 4.0 mmol), SPhos (6.6 g, 16.0 mmol) を室温で加え

た後、50℃で3時間攪拌した。水（1000 mL）で希釈し、固体をろ過した。濾液を酢酸エチル（300 mL）で3回抽出した。混合した有機層を水（500 mL）で3回、飽和食塩水（500 mL）で2回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（石油エーテル／酢酸エチル＝30／70）。得られた生成物の一部（17.3 g, 27.3 mmol）をイソプロパノール（180 mL）に溶かし0℃で塩化カルシウム（48.4 g, 436 mmol）を加えた後、水酸化リチウム1水和物（4.6 g, 109 mmol）水溶液（60 mL）を滴下し加えた。滴下終了後、反応混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、リン酸二水素ナトリウム水溶液を加えpH＝4にした。生じた固体をろ過し、濾液を酢酸エチル（200 mL）で3回抽出した。混合した有機層を飽和食塩水（200 mL）で3回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した（石油エーテル／酢酸エチル＝50／50）。表記物質を得た。ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 621.3$ (M+H)⁺

[0197] [合成例1-9]

Fmoc-F3COO(PEG8Me)-OHの合成

[化29]

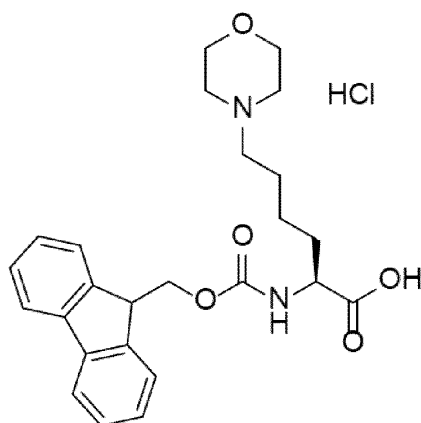


2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-アミンの代わりに2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-オクタオキサペンタコサン-25-アミン (CAS: 869718-81-0) を用い, Fmoc-F3COO(PEG4Me)-OHと同様に合成を行うことで表記物質を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 797.6$ ($M+H$)⁺

[0198] [合成例 1-10]

Fmoc-Kmor-OH塩酸塩の合成

[化30]



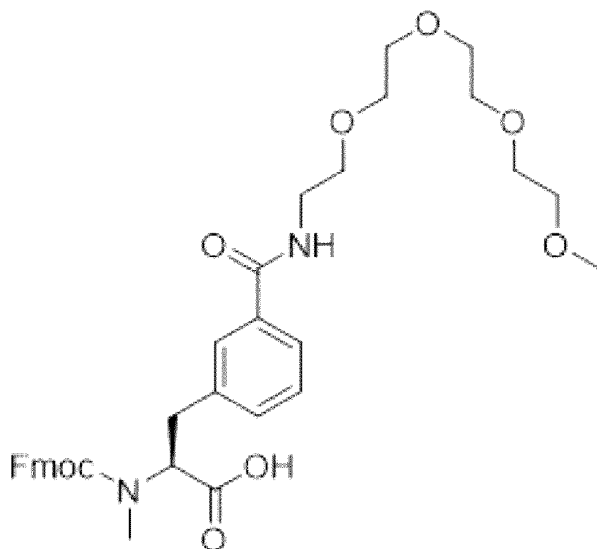
[0199] メチル ((ベンジロキシ) カルボニル) -L-リジネート塩酸塩 (15 g, 45.3 mmol, CAS: 26348-68-5) を DMF (91 mL) に溶かした。炭酸カリウム (25.1 g, 181 mmol), 1-ブロモ-2-((2-ブロモエトキシ) エタン) (12.6 g, 54.4 mmol, CAS: 5414-19-7) を室温で加えた後, 60℃で6時間攪拌した。反応を塩化アンモニウム水溶液でクエンチした後, 混合物を酢酸エチル (100 mL) で2回抽出し, 混合した有機層を水, 飽和食塩水で洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し, 濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ジクロロメタン/メタノール=97/3-60/40)。得られた生成物 (15 g, 41.2 mmol)

o l) をメタノール (206 mL) に溶かし, 0°C で 10% Pd/C (4.4 g, 4.12 mmol), トリエチルシラン (26.3 mL, 162 mmol) を加え 1 時間攪拌した。混合物をセライトろ過し, 固体をメタノールで洗浄後, 濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルで希釈し, 水で 3 回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ, 濾過し, 濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣を 1, 4-ジオキサン (62 mL) に溶解した後, 炭酸水素ナトリウム (13.8 g, 165 mmol), 水 (82 mL) を加え, Fmoc-OSu (13.2 g, 39.1 mmol) の 1, 4-ジオキサン溶液 (62 mL) を 0°C で加えた。混合物を終夜攪拌した。反応液を酢酸エチルで 2 回抽出し混合した。有機層を飽和食塩水で洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥後, ろ過し減圧下濃縮した。得られた残渣を水で希釈し, pH 1-2 になるまで 1 N 塩酸を加え, 酢酸エチルで洗浄した。水層が pH 6 になるまで炭酸水素ナトリウムを加え, 酢酸エチルで 2 回抽出後, 混合し飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後, ろ過し, 減圧下濃縮した。得られた残渣を 1, 4-ジオキサン (85 mL) に溶かし, 4 N 塩化水素 1, 4-ジオキサン溶液 (85 mL), 水 (85 mL) を加え 60°C で 4 時間攪拌した。濃縮後, 4 N 塩化水素 1, 4-ジオキサン溶液 (30 mL) を加え 60°C で終夜攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮後, トルエンで共沸させた。得られた残渣にノルマルヘキサンを加え減圧下濃縮した。表記物質を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 439.4$ (M+H)⁺

[0200] [合成例 1-11]

Fmoc-MeF3COO(PEG4Me)-OH の合成

[化31]



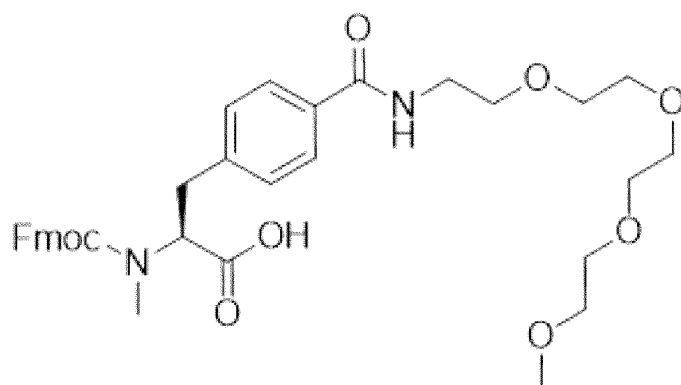
[0201] (2S)-3-[3-(ターシャリーブトキシカルボニル)フェニル]-2-{[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ}プロパン酸 (20 g, 41.0 mmol, CAS: 210282-33-0) をトルエン (250 mL) に懸濁し、室温で [7, 7-ジメチル-2-オキソビシクロ [2, 2, 1] ヘプタン-1-イル] メタンスルホン酸 (0.57 g, 2.46 mmol, CAS: 3144-16-9) 及びパラホルムアルデヒド (6.2 g, 205 mmol) を加えた。混合物を 110℃ で 1.5 時間攪拌した。0℃ に冷却し炭酸水素ナトリウム水溶液で反応をクエンチ後、酢酸エチルで 3 回抽出した。混合した有機層を飽和食塩水で 3 回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させろ過し、減圧下濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン (100 mL) に溶かし、TFA (100 mL) を加え室温で 1 時間攪拌した。混合物を減圧下濃縮した。得られた残渣を DMF (200 mL) に溶かし、室温で DIPEA (15.7 g, 121.8 mmol) 及び HATU (18.5 g, 48.7 mmol) を加えた後、2, 5, 8, 11

ーテトラオキサトリデカン-13-アミン (8.4 g, 40.6 mmol, CAS: 85030-56-4) を加え室温で3時間攪拌した。0℃下, 反応を水でクエンチし酢酸エチルで3回抽出した。混合した有機層を水で3回洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥させろ過し, 減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (石油エーテル/酢酸エチル=20/80)。得られた生成物 (21.0 g, 33.2 mmol) をジクロロエタン (130 mL) に溶かし, 室温でTFA (130 mL) 及びトリス (プロパン-2-イル) シラン (15.8 g, 99.6 mmol) を加え50℃で3時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮後, トルエンで3回共沸させた。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した (ジクロロメタン/メタノール=95/5)。表記物質を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 635.3$ ($M+H$)⁺

[0202] [合成例1-12]

Fmoc-MeF4COO(PEG4Me)-OHの合成

[化32]



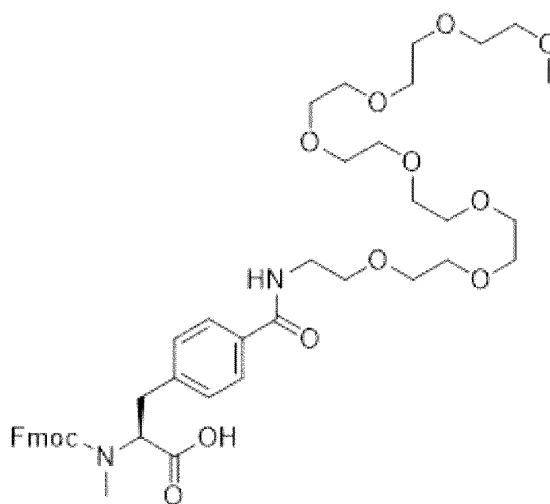
(2S)-3-[3-(ターシャリーブトキシカルボニル)フェニル]-2-{[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ}プロパン酸の代わりに(2S)-3-[4-(ターシャリーブトキシカルボニル)フェニル]-2-{[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]

ル] アミノ} プロパン酸 (CAS : 183070-44-2) を出発原料に
用い, Fmoc-MeF₃COO (PEG4Me) -OH と同様に合成を行
うことで表記物質を得た。ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 635.2$
(M+H)⁺

[0203] [合成例 1-13]

Fmoc-MeF₄COO (PEG8Me) -OH の合成

[化33]



[0204] (2S)-3-[3-(ターシャリーブトキシカルボニル)フェニル]-
2-{[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ}プロ
パン酸の代わりに (2S)-3-[4-(ターシャリーブトキシカルボニ
ル)フェニル]-2-{[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボ
ニル]アミノ}プロパン酸を出発原料に用い, 2, 5, 8, 11-テトラオ
キサトリデカン-13-アミンの代わりに 2, 5, 8, 11, 14, 17,
20, 23-オクタオキサペンタコサン-25-アミン (CAS : 8697
18-81-0) を用いて Fmoc-MeF₃COO (PEG4Me) -O
H と同様に合成を行うことで表記物質を得た。ESI-MS (+) 観測値

$$m/z = 811.7 \quad (M+H)^+$$

実施例 7

[0205] h T f R に強く結合するペプチドが有するアミノ酸残基

配列番号 254～262 のペプチドを化学合成した。合成したペプチドの配列を表 4 に示す。合成したペプチドは実施例 2 と同様に分析し、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。合成した各ペプチドについて、トランスフェリン受容体 (h T f R) 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、実施例 3 に示した方法によって試験を実施した。このようにして得られた結果について、上記実施例で合成、試験したペプチド「894-3151」(配列番号 13) との比較を行った。その結果、配列番号 13 の 1 番目のアラニン、4 番目のバリン、6 番目のアスパラギン、9 番目のイソロイシンについて、それぞれ異なるアミノ酸残基に置換した場合、KD 値が大きく増加し、結合能が大きく低下することが示された。以上から、これらの残基は、ペプチドと h T f R との高い結合能を保持するために重要であると考えられた。

[0206] [表 4]

[表4-1]

置換の位置	SEQ ID No.	名称	Seq														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1番目のAの置換	13	894_3151	A	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	254	894_3m_1F	F	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	255	894_3m_1S	S	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	256	894_3m_1G	G	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
4番目のVの置換	13	894_3151	A	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	257	894_3m_4S	A	V	MeF	S	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	258	894_3m_4A	A	V	MeF	A	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	259	894_3m_4G	A	V	MeF	G	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
6番目のNの置換	13	894_3151	A	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	260	894_3m_6D	A	V	MeF	V	W	D	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	261	894_3m_6A	A	V	MeF	V	W	A	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
9番目のIの置換	13	894_3151	A	V	MeF	V	W	N	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	
	262	894_3m_9F	A	V	MeF	V	W	N	Y	F	I	R	R	Y	MeY	C	

[0207]

[表4-2]

置換の位置	SEQ ID No.	Linker		KD (nM)	KD(各ペプチド) / KD(894_3151)
1番目のAの置換	13	G	KN3	1.3	1.0
	254	PEG12c		110	84.6
	255	PEG12c		24.4	18.8
	256	PEG12c		18.6	14.3
4番目のVの置換	13	G	KN3	1.3	1.0
	257	PEG12c		164	126.2
	258	PEG12c		177	136.2
	259	PEG12c		952	732.3
6番目のNの置換	13	G	KN3	1.3	1.0
	260	PEG12c		72.1	55.5
	261	PEG12c		279	214.6
9番目のIの置換	13	G	KN3	1.8	1.4
	262	PEG12c		218	167.7

[0208] [表 5]

[表5-1-1]

SEQ ID No.	Name	Seq													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 15
263	894_3202	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
264	894_3203	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
265	894_3204	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F	MeY C
266	894_3205	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F	MeY C
267	894_3206	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
268	894_3207	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY C
269	894_3208	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
270	894_3209	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
271	894_3210	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
272	894_3211	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
273	894_3212	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
274	894_3213	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
275	894_3214	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
276	894_3215	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
277	894_3216	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
278	894_3217	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
279	894_3218	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
280	894_3219	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
281	894_3220	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY C
282	894_3223	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
283	894_3224	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
284	894_3231	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	R	R	F	MeY C
285	894_3232	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
286	894_3233	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C

[表5-1-2]

SEQ ID No.	Linker										m/z	[M+X ^H] ⁺	SPR
263	G	G	G	G	G	S	S			KN3	1327.36	2	B
264	G	C									1129.09	2	B
265	G	de	de	de	ds	ds	ds			K	993.41	3	B
266	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds			K	951.42	3	B
267	G	C									1122.12	2	B
268	G	KN3									928.03	3	C
269	G	G	G	G	S	S	S			KN3	1038.25	3	B
270	G	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG			KN3	1041.53	3	B
271	G	KN3									923.08	3	B
272	G	de	de	de	ds	ds	ds			KN3	1110.28	3	B
273	G	KN3									1285.98	2	B
274	G	G	dr	G	dr	ds	ds			KN3	936.63	3	B
275	G	G	G	G	S	S	S			KN3	1320.33	2	B
276	G	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG			KN3	883.97	3	B
277	G	de	de	de	ds	ds	ds			KN3	1007.33	3	B
278	G	G	dr	G	dr	ds	ds			KN3	1486.72	2	B
279	G	G	G	G	S	S	S			KN3	1402.59	2	B
280	G	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG			KN3	1407.75	2	B
281	G	KN3									1171.93	2	A
282	G	PEG24c	K								1225.09	3	B
283	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds			K	994.19	3	B
284	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	1096.49	3	B
285	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds			K	957.06	3	B
286	G	K									914.67	3	A

[表5-2-1]

SEQ ID No.	Name	Seq													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 15
287	894_3234	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
288	894_3235	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
289	894_3237	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
290	894_3238	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
291	894_3239	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
292	894_3240	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
293	894_3241	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
294	894_3242	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
295	894_3243	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
296	894_3244	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
297	894_3245	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
298	894_3246	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
299	894_3247	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
300	894_3248	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
301	894_3249	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
302	894_3250	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
303	894_3251	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	R	R	4Py	MeY C
304	894_3252	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY C
305	894_3253	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
306	894_3255	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY C
307	894_3256	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
308	894_3257	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY C
309	894_3258	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
310	894_3259	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C

[表5-2-2]

SEQ ID No.	Linker										m/z	[M+XH] ⁺	SPR	
287	G	K									1216.88	2	A	
288	G	de	de	de	ds	ds	ds			K(Ac)	1007.37	3	B	
289	G	de	de	de	ds	ds	ds			K(Maleimide)	1021.6	3	B	
290	G	K(Maleimide)										1326.55	2	B
291	G	G	G	G	S	S	S			K(Maleimide)	999.82	3	B	
292	G	K(Maleimide)										922.1	3	B
293	G	G	G	G	S	S	S			K(Maleimide)	1037.21	3	B	
294	G	G	G	G	S	S	S			K(Ac)	1402.56	2	B	
295	G	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG	MeG			K(Ac)	1407.65	2	B	
296	G	V	Cit	KN3							1282.76	2	B	
297	G	E	V	Cit	KN3						1347.34	2	B	
298	G	G	G	F	G	KN3					1313.75	2	B	
299	G	V	Cit	KN3							1275.76	2	B	
300	G	E	V	Cit	KN3						893.88	3	B	
301	G	G	G	F	G	KN3					1306.79	2	B	
302	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	1110.9	3	B	
303	G	KN3										815.68	3	B
304	G	KN3										928.11	3	B
305	G	KN3										942.45	3	B
306	G	de	de	de	ds	ds	ds			K	1120.62	3	B	
307	G	de	de	de	ds	ds	ds			K	1036.15	3	B	
308	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds			K	1078.85	3	B	
309	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds			K(Ac)	1008.49	3	B	
310	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	de	de	K(Ac)	993.49	3	B	

[0212]

[表5-3-1]

SEQ ID No.	Name	Seq													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 15
311	894_3260	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
312	894_3261	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
313	894_3262	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
314	894_3263	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
315	894_3264	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
316	894_3265	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
317	894_3266	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
318	894_3267	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
319	894_3268	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
320	894_3269	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
321	894_3270	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
322	894_3271	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
323	894_3272	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
324	894_3273	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
325	894_3280	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
326	894_3282	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
327	894_3283	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
328	894_3284	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
329	894_3285	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
330	894_3286	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
331	894_3287	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
332	894_3288	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
333	894_3289	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
334	894_3290	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C

[表5-3-2]

SEQ ID No.	Linker										m/z	[M+XH] ⁺	SPR
311	G	ds	ds	de	de	ds	de	ds	ds	K(Ac)	993.81	3	B
312	G	ds	ds	ds	de	ds	de	ds	ds	K(Ac)	993.8	3	A
313	G	de	ds	ds	de	ds	de	ds	ds	K(Ac)	993.9	3	B
314	G	ds	ds	de	ds	de	ds	ds	ds	K(Ac)	993.48	3	B
315	G	de	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	979.79	3	B
316	G	ds	ds	ds	de	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	979.52	3	B
317	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	de	ds	K(Ac)	979.84	3	A
318	G	de	ds	ds	ds	ds	ds	de	ds	K(Ac)	1489.7	2	B
319	G	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1489.74	2	B
320	G	ds	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1489.7	2	B
321	G	ds	de	ds	ds	ds	de	ds	ds	K(Ac)	1489.72	2	B
322	G	de	ds	de	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1489.74	2	B
323	G	ds	ds	de	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	979.78	3	B
324	G	ds	ds	ds	de	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1468.66	2	B
325	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	K	1422.37	2	B
326	G	ds	de	de	de	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1007.51	3	B
327	G	ds	ds	de	de	de	de	ds	ds	K(Ac)	1007.49	3	B
328	G	de	de	ds	ds	ds	de	ds	ds	K(Ac)	1007.49	3	B
329	G	de	ds	ds	ds	de	de	ds	ds	K(Ac)	1007.52	3	B
330	G	de	de	ds	ds	de	ds	ds	ds	K(Ac)	1007.52	3	B
331	G	de	ds	ds	de	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1007.49	3	B
332	G	ds	de	de	ds	ds	de	ds	ds	K(Ac)	1007.49	3	B
333	G	ds	de	ds	ds	de	ds	ds	ds	K(Ac)	1007.47	3	B
334	G	de	ds	ds	de	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1007.48	3	A

[表5-4-1]

SEQ ID No.	Name	Seq													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 15
335	894_3309	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
336	894_3313	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
337	894_3314	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
338	894_3315	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
339	894_3316	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
340	894_3317	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
341	894_3318	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
342	894_3319	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
343	894_3320	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
344	894_3321	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
345	894_3323	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
346	894_3325	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	4Py	MeY C
347	894_3326	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
348	894_3328	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
349	894_3329	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
350	894_3331	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
351	894_3358	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	4Py	MeY C
352	894_3367	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
353	894_3384	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY C
354	894_3385	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY C
355	894_3386	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
356	894_3389	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
357	894_3392	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY C
358	894_3393	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C

[表5-4-2]

SEQ ID No.	Linker										m/z	[M+XH] ⁺	SPR
335	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	KN3	1068.57	3	B
336	G	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1087.61	3	B
337	G	de	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1073.57	3	B
338	G	G	G	G	S	S	S	S	S	dk	1029.53	3	B
339	G	G	G	G	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1029.53	3	B
340	G	G	ds	ds	G	ds	G	ds	ds	dk	1029.52	3	B
341	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1059.59	3	B
342	G	S	S	S	S	S	S	S	S	dk	1059.6	3	B
343	G	ds	ds	ds	ds	de	de	de	de	dk	1087.58	3	B
344	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	de	de	dk	1073.57	3	B
345	G	de	de	de	de	ds	ds	ds	ds	KN3	1110.58	3	C
346	G	de	de	de	de	ds	ds	ds	ds	KN3	1007.13	3	B
347	G	de	de	de	de	ds	ds	ds	ds	KN3	1110.6	3	B
348	G	de	de	de	de	ds	ds	ds	ds	KN3	1044.89	3	B
349	G	R	R	R	R	KN3	KN3	KN3	KN3		926.65	3	B
350	G	dr	dr	dr	dr	KN3	KN3	KN3	KN3		926.65	3	B
351	G	KN3									1229.43	2	B
352	G	G	G	G	S	S	S	C	C		864.01	3	B
353	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	KN3	KN3		1073.25	3	B
354	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	KN3	KN3		1002.88	3	B
355	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	KN3	KN3		1447.65	2	B
356	G	KN3									1230.38	2	A
357	G	G	G	G	S	S	S	K(Maleimide)			961.18	3	ND
358	G**										1071.06	2	ND

[表5-5-1]

SEQ ID No.	Name	Seq													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 15
359	894_3394	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F	MeY C
360	894_3226	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY C
361	894_3227	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
362	894_3228	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
363	894_3236	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	F	MeY C
364	894_3291	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F	MeY C
365	894_3292	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG4Me) COipzz	F	MeY C	
366	894_3293	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG4Me)	Kmor	F	MeY C
367	894_3295	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	Kmor	4Py	MeY C
368	894_3300	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
369	894_3305	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
370	894_3306	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
371	894_3307	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
372	894_3308	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
373	894_3310	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
374	894_3311	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
375	894_3312	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aa	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY C
376	894_3347	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY C
377	894_3349	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
378	894_3350	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
379	894_3351	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	Q	R	F3COO	MeY C
380	894_3352	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY C
381	894_3353	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY C
382	894_3354	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY C

[表5-5-2]

SEQ ID No.	Linker										m/z	[M+XH] ⁺ X ⁺	SPR
359	G	de	de	de	ds	ds	ds	KN3			1114.85	3	ND
360	G	de	de	de	ds	ds	ds	C			1402.96	2	ND
361	G	G	G	G	S	S	S	C			1377.08	2	ND
362	G	G	G	G	S	S	S	C			1021.25	3	ND
363	G	ds	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)			965.35	3	ND
364	G	de	de	de	ds	ds	ds	dk			1106.63	3	ND
365	G	de	de	de	ds	ds	ds	dk			1075.9	3	ND
366	G	de	de	de	ds	ds	ds	dk			1061.92	3	ND
367	G	de	de	de	ds	ds	ds	dk			1120.94	3	ND
368	G	de	de	de	ds	ds	ds	dk			1102.34	3	ND
369	G	de	de	ds	ds	ds	ds	KN3			1096.62	3	ND
370	G	de	ds	ds	ds	ds	ds	KN3			1082.58	3	ND
371	G	G	G	G	ds	ds	ds	KN3			1038.49	3	ND
372	G	G	ds	G	ds	G	ds	KN3			1038.51	3	ND
373	G	S	S	S	S	S	S	KN3			1068.52	3	ND
374	G	ds	ds	ds	de	de	de	KN3			1096.54	3	ND
375	G	ds	ds	ds	ds	ds	de	KN3			1082.61	3	ND
376	G	de	de	de	ds	ds	ds	dk			948.66	3	ND
377	G	G	G	G	S	S	S	K(C5Mal)			991.19	3	ND
378	PEG4c K(C5Mal)										939.47	3	ND
379	G	de	de	de	ds	ds	ds	K(C5Mal)			1063.22	3	ND
380	G	G	G	G	S	S	S	K(C5Mal)			1427.74	2	ND
381	PEG4c K(C5Mal)										1350.17	2	ND
382	G	de	de	de	ds	ds	ds	K(C5Mal)			768.47	4	ND

[表5-6-1]

SEQ ID	Name	Seq														
No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
383	894_3355	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
384	894_3360	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	R	R	4Py	MeY	C
385	894_3361	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
386	894_3362	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
387	894_3364	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
388	894_3366	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
389	894_3376	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY	C
390	894_3377	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
391	894_3378	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	4Py	MeY	C
392	894_3381	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C
393	894_3382	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C
394	894_3383	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C

**: C-terminus is -OH

[表5-6-2]

SEQ ID No.	Linker										m/z	[M+X ⁺ H] ⁺	SPR
383	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	K(Ac)	1443.56	2	ND
384	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	994.16	3	ND
385	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1107.03	3	ND
386	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1120.86	3	ND
387	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	1101.54	3	ND
388	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	959.39	3	ND
389	G	PEG24c	K								1187.74	3	ND
390	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	960.17	3	ND
391	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	dk	960.49	3	ND
392	G	de	de	de	ds	ds	ds	ds	ds	K(C5Mal)	1100.59	3	ND
393	G	G	G	G	S	S	S	S	S	K(C5Mal)	1028.55	3	ND
394	PEG4c	K(C5Mal)									976.8	3	ND

[表6-1]

Name	Seq														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
894_3368	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
894_3369	A	V	MeF3C	V	W7N	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
894_3370	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG4Me)	KCOipzaa	F	MeY	C
894_3371	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	Kmor	4Py	MeY	C
894_3372	A	V	MeF3C	V	W7N	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
894_3373	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	4Py	MeY	C
894_3374	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C
894_3375	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Q	R	F3COO	MeY	C
894_0501	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
894_0502	A	V	MeF3C	V	W	N	3Py6NH2	F4aao	I	I	E(PEG8Me)	R	F3COO	MeY	C
894_3221	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
894_3222	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
894_33808	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C
894_33809	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4aao	I	I	Kmor	Kmor	F3COO	MeY	C

[表6-2]

Linker										Payload	m/z	[M+XH] ⁺ X ⁺
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1336.8	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1337.1	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1310.8	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1233.7	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1337.1	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1341.8	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1271.4	3
G	de	de	de	ds	ds	KN3				Cy5Salk	1234.0	3
G	de	de	de	ds	ds	C				Maleimide-AF647	1262.7	*
G	G	G	G	S	S	C				Maleimide-AF647	1348.2	*
G	de	de	de	ds	ds					Signal Peptide-KN3-NH2	1135.2	4
G	ds	ds	ds	ds	ds					Signal Peptide-KN3-NH2	1471.2	3
G	de	de	de	ds	ds	dk(@) KN3				Signal Peptide	1246.9	4
G	de	de	de	ds	ds					Signal Peptide-KN3-NH2	1204.8	4

請求の範囲

[請求項1]

以下のアミノ酸配列：

A l a - V a l - M e P h e - V a l - T r p - A s n - T y r -
T y r - I l e - I l e - K (M e P E G 4 c) - A r g - P h e -
M e T y r - C y s (配列番号 1) に記載のアミノ酸配列を有するペ
プチドであるか、

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、以下のグループ：

(I) 配列番号 1 の 1 番目のアラニン残基の M e A 残基への置換；

(I I) 配列番号 1 の 3 番目の N - メチルフェニルアラニン残基の
、置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又は N - メチ
ルアミノ酸への置換；

(I I I) 配列番号 1 の 5 番目のトリプトファン残基の、置換基を
有するトリプトファン又は N - メチルトリプトファンへの置換；

(I V) 配列番号 1 の 6 番目のアスパラギン残基の、アラニン又は
正電荷を有するアミノ酸への置換；

(V) 配列番号 1 の 7 番目のチロシン残基の、置換基を有してもよ
い芳香環を側鎖に有するアミノ酸又は C₄ 以上のアルキル基を有する
アミノ酸への置換；

(V I) 配列番号 1 の 8 番目のチロシン残基の、リンカーを有して
いてもよい置換基を有してもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸又は
N - メチルアミノ酸への置換；

(V I I) 配列番号 1 の 9 番目のイソロイシン残基の、脂肪族アミ
ノ酸への置換；

(V I I I) 配列番号 1 の 1 0 番目のイソロイシン残基の、置換基
を有していてもよいブチル基を側鎖に有するアミノ酸への置換；

(I X) 配列番号 1 の 1 1 番目の K (M e P E G 4 c) 残基の、 A
i b, 又はリンカーを有していてもよい親水性アミノ酸又は N - メチ
ルアミノ酸への置換；

(X) 配列番号 1 の 12 番目のアルギニン残基の、リンカーを有していてもよい親水性アミノ酸 (D-体を含む) 又は N-メチルアミノ酸への置換 ;

(X I) 配列番号 1 の 13 番目のフェニルアラニンの、リンカーを有していてもよい芳香環を側鎖に有するアミノ酸への置換 ;

(X I I) 配列番号 1 の 14 番目の N-メチルチロシン残基の、リンカーを有していてもよい芳香環を側鎖に有する N-メチルアミノ酸への置換 ;

から選択される 1 以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、ペプチド。

[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 3 番目の N-メチルフェニルアラニン残基の、F, Me F 3 C, Me F 4 F, Me 3 P y, Me 4 P y 及び Me F 3 C O O からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換 ;

(I I) 配列番号 1 の 5 番目のトリプトファン残基の、W 5 C, M e W, W 1 a a, 及び W 7 N からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換 ;

(I I I) 配列番号 1 の 6 番目のアスパラギン残基の、アラニン又は N d m への置換 ;

(I V) 配列番号 1 の 7 番目のチロシン残基の、3 P y 6 N H 2 への置換 ;

(V) 配列番号 1 の 8 番目のチロシン残基の、4 P y, F 4 O M e, F 4 a a o, 3 P y, W 及びリンカーを有していてもよい F 4 a a o からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換 ;

(V I) 配列番号 1 の 9 番目のイソロイシン残基の、アラニンへの置換 ;

(V I I) 配列番号 1 の 10 番目のイソロイシン残基の、E への置換 ;

(V I I I) 配列番号 1 の 11 番目の K (Me P E G 4 c) 残基の, A i b, R M e R, K (M e c a r), K m o r, リンカーを有していてもよい K, E (G l u c a m i n e), Q h E t, Q p i p z a a, リンカーを有していてもよい Q 及びリンカーを有していてもよい E からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換;

(I X) 配列番号 1 の 12 番目のアルギニン残基の, d a, d r, A 4 p a a, Q h E t, Q p i p z a a, E (G l u c a m i n e), K (M e c a r), K m o r, K d M e, K C O p i p z a a, リンカーを有していてもよい Q, リンカーを有していてもよい E 及びリンカーが付与していてもよい K からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換;

(X) 配列番号 1 の 13 番目のフェニルアラニンの, Y, 4 P y, リンカーを有していてもよい F 3 C O O 及びリンカーを有していてもよい E からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換;

(X I) 配列番号 1 の 14 番目の N-メチルチロシン残基の, M e 3 P y, リンカーを有していてもよい M e F 4 C O O 及びリンカーを有していてもよい M e F 3 C O O からなる群より選ばれる 1 つのアミノ酸への置換;

から選択される 1 以上の置換を有するアミノ酸配列を含む, 前記ペプチド。

[請求項3]

請求項 1 又は 2 に記載のペプチドであって,

(I) 配列番号 1 の 1 番目が, アラニン残基;

(I I) 配列番号 1 の 6 番目が, アスパラギン残基;

(I I I) 配列番号 1 の 9 番目が, イソロイシン残基;

の少なくとも 1 つを満たすアミノ酸配列を含む, 前記ペプチド。

[請求項4]

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のペプチドであって,

配列番号 1 ~ 2 4 1 のいずれかに記載のアミノ酸配列, 又は配列番号 1 ~ 2 4 1 のいずれかに記載のアミノ酸配列とリンカーの結合体

の、１から１５番目のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列部位が環状構造を有する、ペプチド。

- [請求項5] 請求項１～４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6] 請求項１に記載のペプチドであって、h T f R結合活性を有する、ペプチド。
- [請求項7] 請求項１に記載のペプチドであって、配列番号１の８番目、１１番目、１２番目、１３番目、１４番目又は１５番目のアミノ酸残基にリンカーが結合している、ペプチド。
- [請求項8] 請求項７に記載のペプチドであって、配列番号１０～２４１いずれかに記載の、ペプチド。
- [請求項9] 請求項７に記載のペプチドであって、前記リンカーが、
ポリエチレングリコール（PEG）、
又は、配列番号２４２～２５３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、ペプチド。
- [請求項10] 請求項７に記載のペプチドと、前記リンカーに結合した物質とを含む複合体。
- [請求項11] 請求項１０に記載の複合体であって、前記リンカーが、配列番号２４２～２５３及び配列番号２６３～３９４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12] 請求項１０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）である、複合体。
- [請求項13] 請求項１～９のいずれか一項に記載のペプチドを含む、組成物。
- [請求項14] 請求項１～９のいずれか一項に記載のペプチドを含む、医薬用又は診断用の組成物。
- [請求項15] 請求項１０に記載の複合体を含む、組成物。
- [請求項16] 請求項１０に記載の複合体を含む、医薬用又は診断用の組成物。
- [請求項17] 請求項１０に記載の複合体を得る工程を含む、医薬用又は診断用の

組成物の製造方法。

[請求項18] 請求項17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）、
又は、配列番号242～253及び配列番号263～394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19] ペプチドについて
a) 溶媒への溶解度
b) h T f Rとの結合能
c) 細胞及び／又は組織への毒性
d) 実験動物への毒性
の少なくとも1つを試験するペプチドの試験方法であって、
前記ペプチドは、請求項1に記載のペプチドが有するアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸残基を、欠失、置換、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列を有するペプチドである、前記方法。