

明細書

発明の名称: ペプチド及び当該ペプチドを含むコンジュゲート

技術分野

本発明は、ペプチド、当該ペプチド及びペイロードを含むコンジュゲート（「ペプチ
5 ドコンジュゲート」、「ペプチド複合体」又は単に「コンジュゲート」とも呼称する場合もある）、並びに、当該ペプチド又はコンジュゲートの利用に関する。

背景技術

CA9（Carbonic anhydrase IX、炭酸脱水酵素－9）は1
5 種類ある炭酸脱水酵素の1つであり、ホモ2量体で細胞膜上に局在する膜貫通タンパク質である（非特許文献1）。また、CA9は触媒ドメイン、プロテオグリカン様ドメイン、膜型貫通ドメイン、細胞質尾部の3つのドメインを有しており、その機能の1つとして、触媒ドメインに水分子と二酸化炭素を水素イオンと炭酸水素イオンに変換する亜鉛要求性の活性を持ち、細胞内外のpHを細胞増殖に適した状態に調整する（非特許文献2）。実際にCA9をノックアウトした腫瘍細胞では、野生型に比べて
15 、腫瘍細胞の増殖が遅くなる事が*in vitro*及び担癌マウスでの検討において確認されており、CA9が腫瘍細胞の増殖に関与している事が実験的に証明されている（非特許文献3）。また種々の腫瘍患者において、CA9の発現量が全生存期間、無病生存期間、局所制御、疾患特異的生存期間、無転移生存期間及び無増悪生存期間と有意な関連が認められる事から、CA9が高発現している腫瘍を有する患者は、腫瘍
20 のタイプや部位とは無関係に、局所再発、病状進行、転移のリスクが高いことが示唆されている（非特許文献4）。これらの報告から、CA9は予後不良な腫瘍の検出に有望なターゲットであると期待されている。

CA9が発現誘導される機序としては、低酸素誘導因子HIF（Hypoxia inducible factor）1 α 経路の活性化が報告されており（非特許文
25 献5）、特に明細胞型腎細胞癌や大腸癌においてCA9の発現量が高い患者数が多い事が報告されている（非特許文献6）（非特許文献7）。大腸癌においては、低酸素に伴うHIF1 α 経路の活性化によって約7割の患者の腫瘍組織でCA9が高発現している（非特許文献7）。一方、明細胞型腎細胞癌患者においては半数以上の患者で癌抑制遺

伝子であるVHL (Von Hippel-Lindau) 遺伝子の体細胞変異又はプロモーター領域の過剰なメチル化に伴い (非特許文献8)、通常酸素条件においても慢性的にHIF1 α 経路が活性化しており (非特許文献5)、約9割の患者の腫瘍組織でCA9が高発現していると報告されている (非特許文献6)。転移性大腸がん及び転

5 移性腎細胞癌は5年生存率が20%以下であり、非常に予後不良な疾患であるため、その診断及び治療法の確立は急務である。

これまで、CA9を標的とした癌治療薬はギレンツキシマブ (Girentuximab) などの抗体を用い開発されてきたが、有効性を示す事はできなかった (非特許文献9)。そのため、ギレンツキシマブにキレート剤を結合させ、PET及び治療核

10 種を付与した抗体-RI複合体が開発されている。抗体-RI複合体によるPETイメージングでは高感度に腫瘍を検出することが可能ではあるが、抗体の血中半減期の長さにより、高エネルギー核種を使用する必要があり、投与後5日後に腫瘍を検出可能となるため、腫瘍を検出まで時間を要している (非特許文献10)。また、治療においては同様に血中半減期が長いこと、RIによる血小板減少が長期間持続するため、

15 反復投与が難しく、実際に第二相臨床試験では血小板減少が回復しなかったため、3回反復投与はできなかった (非特許文献11)。

そのため、依然としてCA9を標的とし且つ有効成分として抗体ではない化合物を含む、新規の癌治療薬や診断薬、例えばPET用のイメージング薬の開発が待たれている。

20 先行技術文献

非特許文献

[非特許文献1] Mayank Aggarwal, et, al. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2013 Apr; 28 (2): 267-77.

25 [非特許文献2] Pawel Swietach, et, al. J. Biol Chem. 2009 Jul 24; 284 (30): 20299-310

[非特許文献3] Scott K Parks, et, al. Oncot

arget 2017 Feb 7;8(6):10225-10237

[非特許文献4] Simon J A van Kuijk, et, al.
Front Oncol. 2016 Mar 29;6:69.

[非特許文献5] C C Wykoff, N J Beasley et,
5 al. Cancer Res. 2000 Dec 15;60(24):7075
-83.

[非特許文献6] Matthew H T Bui, et, al. Clin.
n. Cancer Res. 2003 Feb;9(2):802-11.

[非特許文献7] Emese Sarolta Bádon, et, al.
10 Int. J. Mol. Sci. 2023 Jan 30;24(3):258
1.

[非特許文献8] Yusuke Sato, et, al. Nat. Gen
et. 2013 Aug;45(8):860-7.

[非特許文献9] Karim Chamie, et, al. JAMA O
15 ncol. 2017 Jul 1;3(7):913-920.

[非特許文献10] Brian M. Shuch, et, al. Res
ults from phase 3 study of ⁸⁹Zr-DFO-gi
rentuximab for PET/CT imaging of clear
cell renal cell carcinoma (ZIRCON). 2023
20 ASCO Genitourinary Cancers Symposium
Meeting Abstract

[非特許文献11] Constantijn H J Muselaers,
et, al. Eur. Urol. 2016 May;69(5):767-7
0.

25 発明の概要

発明が解決しようとする課題

本発明者らは、CA9結合活性を有する化合物を創出することを目的として鋭意研究に努めた結果、本発明を想到した。また、本発明者は、CA9結合活性を有する化

合物と、放射性物質や蛍光物質等のペイロードとのコンジュゲートをも見出した。本発明は、CA9結合活性を有する新規なペプチド、当該ペプチドとペイロードとのコンジュゲート、当該ペプチド又はコンジュゲートを含む組成物（医薬組成物、診断用組成物、研究用組成物）、並びに、当該ペプチド又はコンジュゲートの利用に関する。

5 課題を解決するための手段

非限定的に、本出願は以下の発明を含む。

[1]

以下のアミノ酸配列：

d a - T b g - 3 P y 6 C O N - H g l - M e d a - A h p - P e G - S - 3 P y
10 6 N H 2 - H s e M e - d k - Y（配列番号1）

あるいは、

上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、

1 - 10個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配
15 列、
を含む、ペプチド。

[2]

（1）配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMeC、C又はMeCtが付加されている；

20 あるいは、

（2）配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMeA、MeS、MeN、Hpr、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてMeG、G、da、又はMedaが付加されている、

[1]に記載のペプチド。

25 [3]

配列番号1のアミノ酸配列の1番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1 - 7個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む、[1]又は

[2] に記載のペプチド。

[4]

以下の：

- 1 番目のアミノ酸残基が、da、dq、de、dhgl、又はdkである；
- 5 2 番目のアミノ酸残基が、I 又はTbgである；
- 3 番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂又は3Py6CONである；
- 4 番目のアミノ酸残基が、S、Hgl、Hgl (PEG8Me)、alT、Hgn、SMe、KCOpipzaa、又はDabAcである；
- 5 番目のアミノ酸残基が、PeG、MeG、Meda、又はMedkCOpipz
- 10 aaである；
- 7 番目のアミノ酸残基が、PeG、pMeOPeG、MsMeapG、3OMePeG、pHPPeG、PpG、pFPeG、mCPeG、pCPeG、4HPpG、4OMePpG、4PypG、4COOPeG、3COOPeG、又は3FPeGである；
- 15 8 番目のアミノ酸残基が、H、S、P、D、KCOpipzaa、Q (PEG8Me)、P4Sh、Hse、SMe、Qmm、又はQdmである；
- 9 番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂、5Inda、Y又はF4OMeである；
- 10 番目のアミノ酸残基が、Ahp、HseMe、又はEである；
- 20 並びに、
- 11 番目のアミノ酸残基が、dk、G、da、dq、dkCOpipzaa、dk(t4amCh)、de、Ac b、又はdkAcである、
- 1つ又は2以上の要件を具備する、[1] - [3] のいずれか1項に記載のペプチド。
- [5]
- 25 以下の、
- 2 番目のアミノ酸残基がTbgである；
- 3 番目のアミノ酸残基が3Py6NH₂である；
- 5 番目のアミノ酸残基がMedaである；

7 番目のアミノ酸残基が P e G 又は p H P e g である；

9 番目のアミノ酸残基が 3 P y 6 N H 2 又は 5 I n d a である；

並びに、

1 0 番目のアミノ酸残基が H s e M e である、

- 5 1 つ又は 2 以上の要件を具備する、[1] – [4] のいずれか 1 項に記載のペプチド。
[6]

2 番目のアミノ酸残基が T b g であり；

3 番目のアミノ酸残基が 3 P y 6 N H 2 であり；

5 番目のアミノ酸残基が M e d a であり；

- 10 7 番目のアミノ酸残基が P e G 又は p H P e g であり；

9 番目のアミノ酸残基が 3 P y 6 N H 2 又は 5 I n d a であり；

並びに、

1 0 番目のアミノ酸残基が H s e M e である、

[1] – [4] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

- 15 [7]

配列番号 2 – 5 4 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、若しくは、からなる、[1] – [6] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[8]

- さらに、付加的なアミノ酸残基を有する、[1] – [7] のいずれか 1 項に記載のペ
20 プチド。

[9]

前記ペプチドが、環状ペプチドである、[1] – [8] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[1 0]

- 25 クロロアセチル化した配列番号 1 のアミノ酸配列の 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、[1] – [9] のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[1 1]

前記ペプチドに含まれる配列番号1のアミノ酸配列の1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、14番目のアミノ酸残基のカルボキシ基が結合された環状構造を有する、[1] - [9] のいずれか1項に記載のペプチド。

[12]

- 5 (a) 前記ペプチドのC末端に、リンカー及び／又はペイロードが結合可能である；

あるいは、

- (b) 配列番号1のアミノ酸配列の1番目、4番目、8番目、11番目又は13番目のアミノ酸残基が、リンカー及び／又はペイロードが結合可能なアミノ酸残基である、

[1] - [11] のいずれか1項に記載のペプチド。

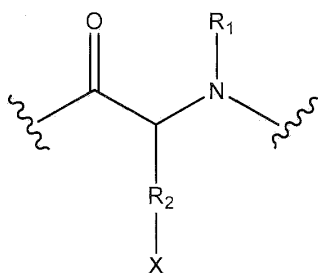
[13]

[1] - [12] のいずれか1項に記載のペプチドと、ペイロードとを含むコンジュゲートであって、

- 15 (i) 配列番号1の13番目のアミノ酸残基に、リンカーを介し又は介さずに、任意のペイロードと結合している；あるいは、

(i i) 以下の式(I)で示されるように、配列番号1の1、4、8又は11番目のアミノ酸残基にペイロードが結合している；

[化1]



(I)

20

[式(I)中、

R_1 は、H又はC1-3アルキル基であり；

R_2 は、C1-6アルキル-NH-、C1-6アルキル-C6アリール-O-C1-3アルキル-NH-、C1-6アルキル-NH(=O)-CH(C1-6アルキル

フェニル) -NH-, C 1 - 6 アルキル-NH (=O) -CH (C 1 - 6 アルキル)
-NH-, 又は、C 1 - 6 アルキル-NH (=O) -C 3 - 8 シクロアルキル-C 1
- 3 アルキル-NH-であり;

Xは、任意のペイロードである]、

5 前記コンジュゲート。

[1 4]

R₂が、C 1 - 6 アルキル-NH-である、[1 3] に記載のコンジュゲート。

[1 5]

Xが、キレート剤である、[1 3] 又は [1 4] に記載のコンジュゲート。

10 [1 6]

前記キレート剤が、放射性物質に結合している、[1 5] に記載のコンジュゲート。

[1 7]

前記キレート剤が、DOTA、DOTAGA、又はNODAGAである、[1 5] 又
は [1 6] に記載のコンジュゲート。

15 [1 8]

[1] - [1 2] のいずれか1項に記載のペプチドを含む、医薬組成物。

[1 9]

[1] - [1 2] のいずれか1項に記載のペプチドを含む、CA 9 関連疾患を予防
、又は治療するための医薬組成物。

20 [2 0]

[1 3] - [1 7] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物。

[2 1]

[1 3] - [1 7] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、CA 9 関連疾患を
予防、又は治療するための医薬組成物。

25 [2 2]

[1] - [1 2] のいずれか1項に記載のペプチドを含む、診断用又は研究用の組
成物。

[2 3]

[1] - [12] のいずれか1項に記載のペプチドを含む、CA9関連疾患を診断するための診断用又は研究用の組成物。

[24]

[13] - [17] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、診断用又は研究用の組成物。

[25]

[13] - [17] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、CA9関連疾患を診断するための診断用又は研究用の組成物。

[26]

10 [13] - [17] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、イメージング剤。

[27]

[13] - [17] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、腫瘍診断用のために用いられる、イメージング剤。

[28]

15 [13] - [17] のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、陽電子放出断層撮影法に用いられる、放射性リガンドイメージング剤。

[29]

ペプチドについて

- a) 溶媒への溶解度
- 20 b) CA9結合活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- 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、[1] - [12] のいずれか1項に記載のペプチドである、

25 前記方法。

[30]

コンジュゲートについて

- a) 溶媒への溶解度

- b) CA9 結合活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- d) 実験動物への毒性

の少なくとも1つを試験する、コンジュゲートの試験方法であって、

- 5 前記コンジュゲートは、[13]－[17]のいずれか1項に記載のコンジュゲートである、
前記方法。

[31]

以下の：

- 10 1 番目のアミノ酸残基が、de (PEG8Me)、dk、dyae又はdkCOpipzaaである；
2 番目のアミノ酸残基が、I又はTbgである；
3 番目のアミノ酸残基が、3Py6NH2又は3Py6CONである；
4 番目のアミノ酸残基が、K、KCOpipzaa、Hgn (Qglucamine-NH2)、Hgn (KCOpipzaa-NH2) 又はQglucamineである；
15 5 番目のアミノ酸残基が、PeG、MeG、Meda、又はMedkCOpipzaaである；
7 番目のアミノ酸残基が、PeG、pMeOPeG、MsMeapG、3OMePeG、pHPeG、PpG、pFPeG、mCPeG、pCPeG、4HPpG、4OMePpG、4PypG、4COOPeG、3COOPeG、又は3FPeGである；
20 8 番目のアミノ酸残基が、Kである；
9 番目のアミノ酸残基が、3Py6NH2、5Inda、Y、又はF4OMeである；
25 10 番目のアミノ酸残基が、Ahp、HseMe、又はEである；
並びに、
11 番目のアミノ酸残基が、dk (F) 又はdk (PEG8c) である、

1つ又は2以上の要件を具備する、[1]－[3]のいずれか1項に記載のペプチド。
[32]

配列番号55－103のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、若しくは、かかるなる、[1]－[6]のいずれか1項に記載のペプチド。

5 [33]

[32]に記載のペプチドと、ペイロードとを含むコンジュゲートであって、1、4、8、11又は13番目のアミノ酸残基に、リンカーを介し又は介さずに、任意のペイロードが結合している：

前記コンジュゲート。

10 [34]

表8又は表18に記載のコンジュゲート番号1－81のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

発明の効果

本発明に係るペプチド及びコンジュゲートは、CA9結合活性を有するため、CA
15 9関連症状の予防又は治療用の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等として有用である。

図面の簡単な説明

[図1] 図1は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁷Gaをペイロードとして有する各コンジュゲートの投与後4時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各
20 組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度(%ID/g)を示す。

[図2] 図2は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁷Gaをペイロードとして有する各コンジュゲートの投与後24時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は
25 各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度(%ID/g)を示す。

[図3] 図3は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁷Gaをペイロードとして有する各コンジュゲートの投与後72時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は

各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度（%ID/g）を示す。

5 [図4] 図4は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして有するコンジュゲートの投与後4時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度（%ID/g）を示す。

[図5] 図5は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして有する各コンジュゲートの投与後24時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度（%ID/g）を示す。

10 [図6] 図6は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁴Cu、DOTAGA-⁶⁴Cu又はNODAGA-⁶⁴Cuをペイロードとして有するコンジュゲートの投与後4時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度（%ID/g）を示す。

15 [図7] 図7は、本発明の各種ペプチドにDOTA-⁶⁴Cu、DOTAGA-⁶⁴Cu又はNODAGA-⁶⁴Cuをペイロードとして有する各コンジュゲートの投与後24時間経過時における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度（%ID/g）を示す。

20 [図8] 図8は、本発明のペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして有するコンジュゲートConjugate No. 64-⁶⁴Cuの投与後1、4及び23・5時間後における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの代表的なPET/CT画像である。図中の白矢印は移植した腫瘍の局在を示す。

25 [図9] 図9は、本発明のペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして有するコンジュゲートConjugate No. 62-⁶⁴Cuの投与後1、4及び23・5時間後における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの代表的なPET/CT画像である。図中の白矢印は移植した腫瘍の局在を示す。

[図10] 図10は、本発明のペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして

有するコンジュゲートConjugate No. 2- ^{64}Cu の投与後1、4及び23、5時間後における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの代表的なPET/CT画像である。図中の白矢印は移植した腫瘍の局在を示す。

[図11] 図11は、本発明のペプチドにrDOTAGA- ^{64}Cu をペイロードとして有するコンジュゲートConjugate No. 56- ^{64}Cu の投与後1、4及び23、5時間後における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの代表的なPET/CT画像である。図中の白矢印は移植した腫瘍の局在を示す。

[図12] 図12は、本発明のペプチドにrNODAGA- ^{64}Cu をペイロードとして有するコンジュゲートConjugate No. 58- ^{64}Cu の投与後1、4及び23、5時間後における、雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスの代表的なPET/CT画像である。図中の白矢印は移植した腫瘍の局在を示す。

[図13] 図13は、本発明の各種ペプチドにDOTA- ^{177}Lu をペイロードとして有するコンジュゲート、生理食塩水又はCabozantinibを投与した雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスにおける平均腫瘍体積の推移を示すグラフである。なお、横軸は投与後日数を、縦軸は腫瘍体積(mm^3)を示す。また、黒丸短破線は生理食塩水、黒三角実線はCabozantinib、黒丸長破線はConjugate No. 64- ^{177}Lu (3回投与)、白丸実線はConjugate No. 62- ^{177}Lu (3回投与)、X実線はConjugate No. 64- ^{177}Lu (1回投与)、黒四角実線はConjugate No. 62- ^{177}Lu (1回投与)、黒丸実線はConjugate No. 65- ^{177}Lu (60MBq 1回投与)を示す。

[図14] 図14は、本発明の各種ペプチドにDOTA- ^{177}Lu をペイロードとして有するコンジュゲート、生理食塩水又はCabozantinibを投与した雌BALB/cSlc-nu/nu腫瘍移植モデルマウスにおける平均体重変化率を示すグラフである。なお、横軸は投与後日数を、縦軸は体重変化率(%)を示す。また、黒丸短破線は生理食塩水、黒三角実線はCabozantinib、黒丸長破線

はConjugate No. 64-¹⁷⁷Lu (3回投与)、白丸実線はConjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (3回投与)、X実線はConjugate No. 64-¹⁷⁷Lu (1回投与)、黒四角実線はConjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (1回投与)、黒丸実線はConjugate No. 65¹⁷⁷Lu (60MBq 1回
5 投与)を示す。

[図15] 図15は、本発明のペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして有するConjugate No. 62-⁶⁴Cuの投与後4、24及び48時間経過時における、VMRC-RCW担癌マウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度(%ID/g)を示す。

10 [図16] 図16は、本発明のペプチドにDOTA-¹⁷⁷Luをペイロードとして有するConjugate No. 62-¹⁷⁷Luの投与後1、24及び48時間経過時における、VMRC-RCW担癌マウスの体内分布結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度(%ID/g)を示す。

[図17] 図17は、本発明のペプチドにDOTA-⁶⁴Cuをペイロードとして
15 有するConjugate No. 62-⁶⁴Cuの投与後1、4、23.5及び47.5時間経過時における、VMRC-RCW担癌マウスの代表的なPET/CT画像である。

[図18] 図18は、本発明のペプチドにDOTA-¹⁷⁷Luをペイロードとして有するConjugate No. 62-¹⁷⁷Lu、生理食塩水又はCabozantinibを投与したVMRC-RCW担癌マウスにおける平均腫瘍体積を示すグラフである。なお、横軸は投与後日数を、縦軸は腫瘍体積(mm³)を示す。また、
20 黒丸は1群：生理食塩水、Xは2群：Cabozantinib、チェッカーパターン三角は3群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 1回投与)、縦縞三角は4群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 2回投与)、横縞三角は5群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 3回投与)、黒三角は6群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 4回投与)、チェッカーパターン四角は7群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (60MBq 1回投与)、縦縞四角は8群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu
25

(60MBq 2回投与)を示す。

[図19] 図19は、本発明のペプチドにDOTA-¹⁷⁷Luをペイロードとして有するConjugate No. 62-¹⁷⁷Lu、生理食塩水又はCabozantinibを投与したVMRC-RCW担癌マウスにおける平均体重変化率を示す
5 グラフである。なお、横軸は投与後日数を、縦軸は体重変化率(%)を示す。また、黒丸は1群：生理食塩水、Xは2群：Cabozantinib、チェッカーパターン三角は3群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 1回投与)、縦縞三角は4群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 2回投与)、横縞三角は5群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 3回投与)、黒三角は6群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (30MBq 4回投与)、チェッカーパターン四角は7群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (60MBq 1回投与)、縦縞四角は8群：Conjugate No. 62-¹⁷⁷Lu (60MBq 2回投与)を示す。
10

[図20] 図20は、本発明のペプチドにDOTA-²²⁵Acをペイロードとして有するConjugate No. 62-²²⁵Acの投与後4、24及び48時間経過時における、HT-29担癌マウスの体内分布の結果を示すグラフである。なお、横軸は各組織を、縦軸は、各組織における放射能濃度(%ID/g)を示す。
15

[図21] 図21は、本発明のペプチドにDOTA-²²⁵Acをペイロードとして有するConjugate No. 62-²²⁵Ac、生理食塩水を投与したHT-29担癌マウスにおける平均腫瘍体積を示すグラフである。なお、横軸は投与後日数を、縦軸は腫瘍体積(mm³)を示す。また、黒四角は1群：生理食塩水、黒三角は2群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (30MBq 投与)、白三角は3群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (60MBq 投与)、Xは4群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (90MBq 投与)、黒丸は5群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (120MBq 投与)、白丸は6群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (150MBq 投与)を示す。
20
25

[図22] 図22は、本発明のペプチドにDOTA-²²⁵Acをペイロードとして有するConjugate No. 62-²²⁵Ac、生理食塩水を投与したHT-

29 担癌マウスにおける平均体重の変化を示すグラフである。なお、横軸は移植後日数を、縦軸は平均体重 (g) を示す。また、黒四角は1群：生理食塩水、黒三角は2群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (30MBq投与)、白三角は3群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (60MBq投与)、Xは4群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (90MBq投与)、黒丸は5群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (120MBq投与)、白丸は6群：Conjugate No. 62-²²⁵Ac (150MBq投与)を示す。

発明を実施するための形態

非限定的に本発明は、以下の態様を含む。本明細書において他に断りがない限り、
10 本明細書で使用される技術及び科学用語は、当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に開示された物質、材料及び例は単なる例示であり、制限することを意図していない。本明細書において「一態様において」と言及する場合は、その態様に限定されない、即ち、非限定的であることを意味する。

1. 略語

15 本明細書において、特に明記しない限り、以下の略語は下記の意味で使用される。

略語 (一般)

Å : オングストローム (単位) ;

ClAc : クロロアセチル ;

Cy5SAIk : Sulfo-Cy5-alkyne ;

20 DCM : ジクロロメタン ;

TIPS : トリイソプロピルシリル ;

tert : ターシャリー ;

DTT : ジチオトレイトール ;

DMSO : ジメチルスルホキシド ;

25 Trt : トリチル ;

Boc : ターシャリーブトキシカルボニル ;

DMF : N、N-ジメチルホルムアミド ;

DEA又はDIPEA : N、N-ジイソプロピルエチルアミン ;

- D I P C I 又は D I C : N、N' - ジイソプロピルカルボジイミド ;
- O x y m a p u r e : シアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル ;
- D O D T : 3、6 - ジオキサー 1、8 - オクタン - ジチオール ;
- D O T A - N H S エステル : 2、2', 2'' - (10 - (2 - ((2、5 - ジオキソ
5 ピロリジン - 1 - イル) オキシ) - 2 - オキソエチル) - 1、4、7、10 - テトラ
アザシクロドデカン - 1、4、7 - トリイル) トリ酢酸
- D O T A : 1、4、7、10 - テトラアザシクロドデカン - 1、4、7、10 - テ
トラ酢酸 ;
- F m o c : 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル ;
- 10 g : グラム (単位) ;
- H₂O : 水 ;
- H C l : 塩化水素 ;
- H A T U : 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 ;
- 15 H O S u : N - ヒドロキシスクシンイミド ;
- H P L C : 高速液体クロマトグラフィー ;
- L C - M S 又は L C / M S : 液体クロマトグラフィー質量分析計 ;
- M e O H : メタノール ;
- m L : ミリリットル (単位) ;
- 20 M : モーラー (単位) ;
- μ L : マイクロリットル (単位) ;
- m M : ミリモーラー (単位) ;
- μ M : マイクロモーラー (単位) ;
- m m o l : ミリモル (単位) ;
- 25 m g : ミリグラム (単位) ;
- M e C N もしくは C H₃C N : アセトニトリル ;
- m i n : 分 (単位) m i n :
- m m : ミリメートル (単位) ;

- μm : マイクロメートル (単位) ;
nm : ナノメートル (単位) ;
nM : ナノモラー (単位) ;
NMP : N-メチル-2-ピロリドン
- 5 OSu : スクシンイミド ;
PEG : ポリエチレングリコール ;
rpm : 回転毎分 (単位) ;
tBu : ターシャリーブチル ;
TFA : トリフルオロ酢酸 ;
- 10 TIS : トリイソプロピルシラン ;
Trt 又は Tr : トリチル基 ;
H-PEG4Me : 2、5、8、11-テトラオキサトリデカン-13-アミン ;
H-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 ;
- 15 AA : アミノ酸 ;
PyAOP : 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) ;
CSA : 10-カンファースルホン酸 ;
Fmoc-OSu : 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 ;
- 20 THF : テトラヒドロフラン ;
ClAcOSu : N-(クロロアセトキシ)スクシンイミド ;
Pd₂(dba)₃·CHCl₃ : トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0)-クロロホルム錯体 ;
- 25 SPhos : 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 : 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 ;

Pd (PPh₃)₄ : テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) ;

ClAcOH : クロロ酢酸 ;

conc : 濃度 ;

HFIP : 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール ;

5 Pbfc : 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホン
ル ;

Alloc : アリルオキシカルボニル ;

Allyl : アリル ;

Fmoc-Glu-NH₂ : (9H-フルオレン-9-イル) メチル
10 ((S)-1-アミノ-1, 5-ジオキソ-5-(((2S, 3R, 4R, 5R)-2,
3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル) アミノ) ペンタン-2-イル) カーバ
メート ;

H-Glu-NH₂ : (S)-4-アミノ-N¹-((2S, 3R,
4R, 5R)-2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル) ペンタンジアミド

15 H-KCOPipz (Mpe)-NH₂ : 3-メチルペンタン-3-イル (S
) -2-(4-((5, 6-ジアミノ-6-オキソヘキシル) カルバモイル) ピペラジ
ン-1-イル)

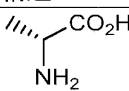
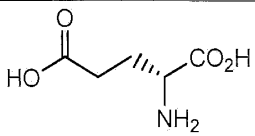
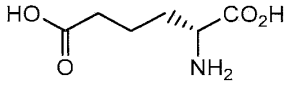
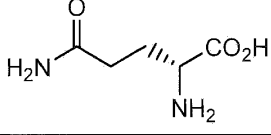
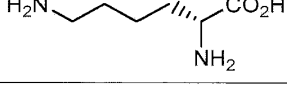
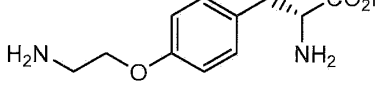
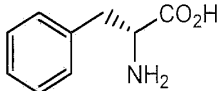
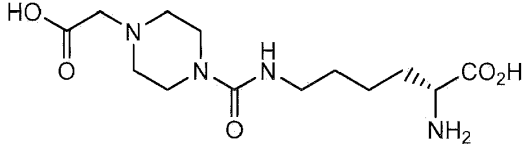
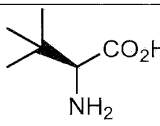
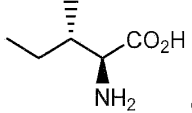
TEA : トリエチルアミン。

略語 (非天然アミノ酸)

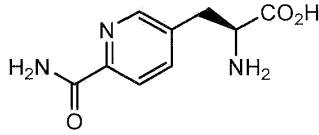
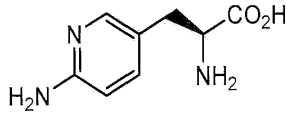
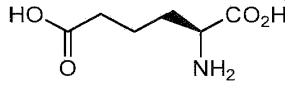
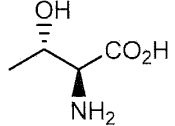
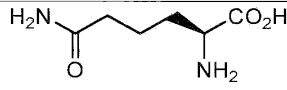
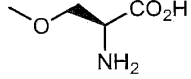
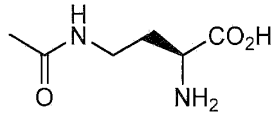
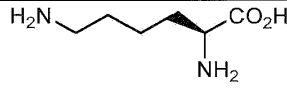
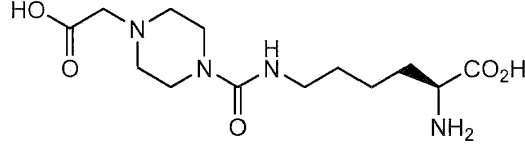
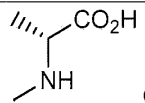
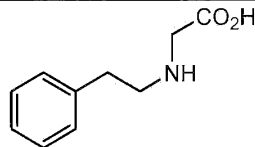
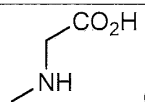
20 以下の非天然アミノ酸に関する略語は、主鎖のアミノ基がBoc基やFmoc基等
の一般的な保護基で保護されているものも含む。

[表 1-1]

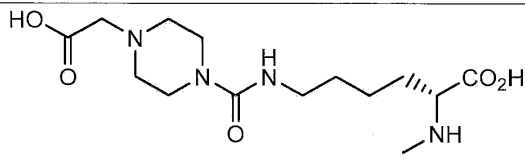
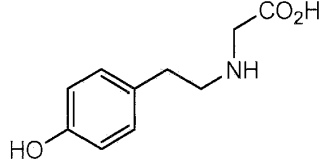
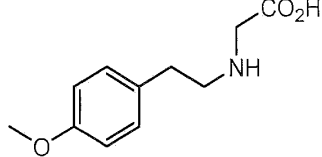
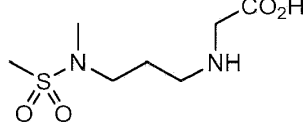
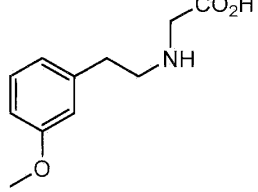
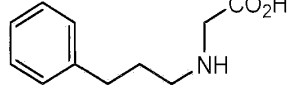
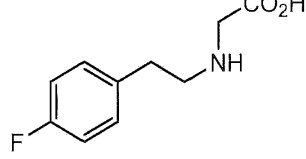
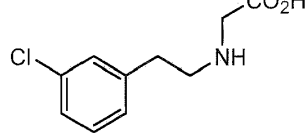
非天然アミノ酸一覧

略称	構造
da	 CAS: 338-69-2
de	 CAS: 6893-26-1
dhgl	 CAS: 7620-28-2
dq	 CAS: 5959-95-5
dk	 CAS: 923-27-3
dyaе	 (2R)-2-アミノ-3-[4-(2-アミノエトキシ)フェニル]プロパン酸
df	 CAS: 673-06-3
dkCOpipzaa	 CAS: 2973757-42-3
Tbg	 CAS: 20859-02-3
I	 CAS: 73-32-5

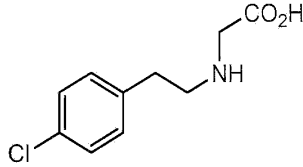
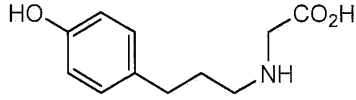
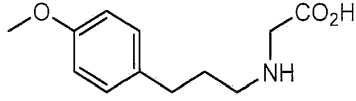
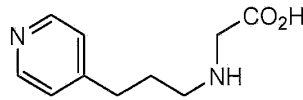
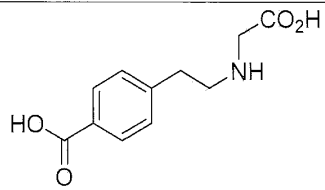
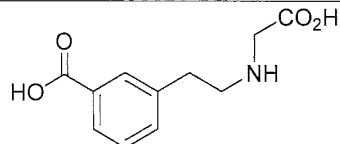
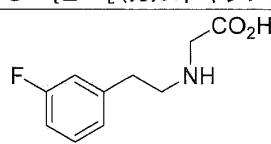
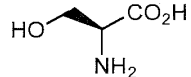
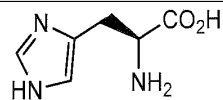
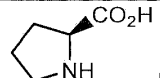
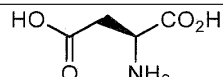
[表 1 - 2]

3Py6CON	 CAS: 2973752-27-9
3Py6NH2	 CAS: 1269968-61-7
Hgl	 CAS: 1118-90-7
aIT	 CAS: 28954-12-3
Hgn	 CAS: 7433-32-1
SMe	 CAS: 32620-11-4
DabAc	 CAS: 1190-46-1
K	 CAS: 56-87-1
KCOpipzaa	 CAS: 2913141-21-4
Meda	 CAS: 29475-64-7
PeG	 CAS: 7738-38-7
MeG	 CAS: 107-97-1

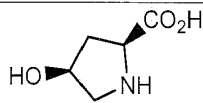
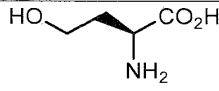
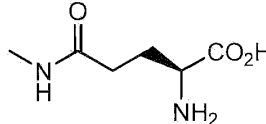
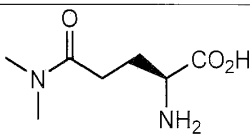
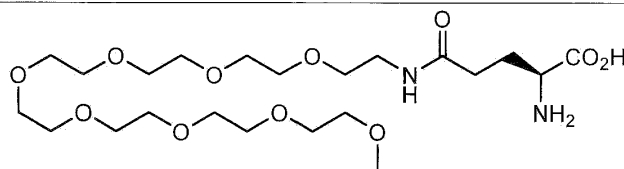
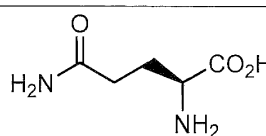
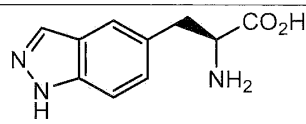
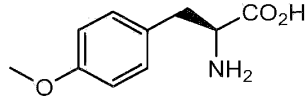
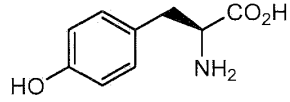
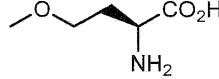
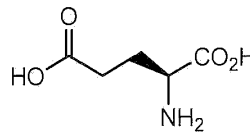
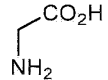
[表 1 - 3]

MedkCOpipzaa	 CAS: 2973757-43-4
Ahp	 CAS: 44902-02-5
pHPeG	 CAS: 169836-45-7
pMeOPeG	 CAS: 88720-74-5
MsMeapG	 CAS: 2030455-69-5
3OMePeG	 CAS: 1267272-96-7
PpG	 CAS: 75822-20-7
pFPeG	 CAS: 933736-89-1
mCPeG	 CAS: 1267670-63-2

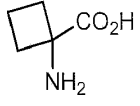
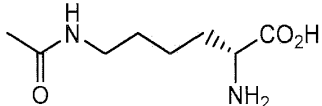
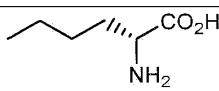
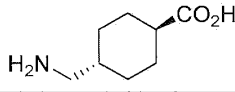
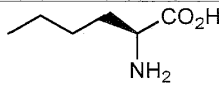
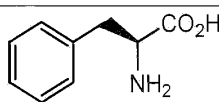
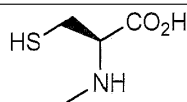
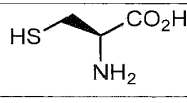
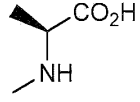
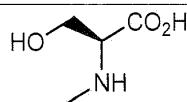
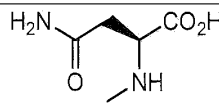
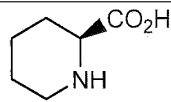
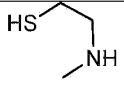
[表 1 - 4]

pCPeG	 CAS: 205124-63-6
4HPpG	 CAS: 861566-97-4
4OMePpG	 2-[[3-(4-メキシフェニル)プロピル]アミノ]酢酸
4PypG	 2-[[3-(ピリジン-4-イル)プロピル]アミノ]酢酸
4COOPeG	 4-[2-[(カルボキシメチル)アミノ]エチル]安息香酸
3COOPeG	 3-[2-[(カルボキシメチル)アミノ]エチル]安息香酸
3FPeG	 CAS: 1155577-90-4
S	 CAS: 56-45-1
H	 CAS: 71-00-1
P	 CAS: 147-85-3
D	 CAS: 56-84-8

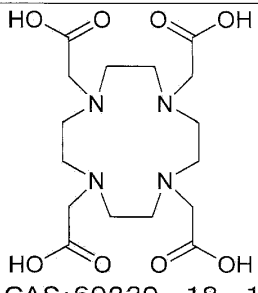
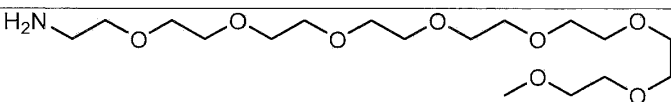
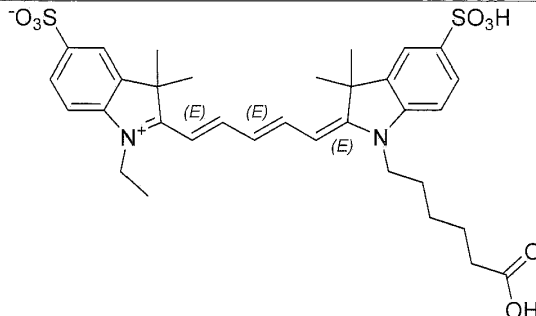
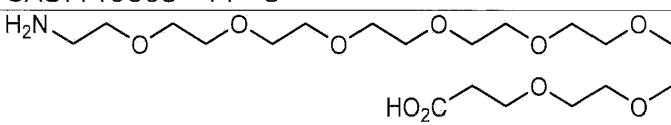
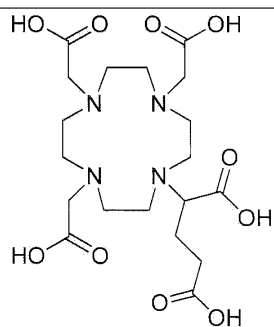
[表 1-5]

P4Sh	 CAS: 618-27-9
Hse	 CAS: 672-15-1
Qmm	 CAS: 3081-62-7
Qdm	 CAS: 21432-98-4
QPEG8Me	 CAS: 2913141-39-4
Q	 CAS: 56-85-9
5Inda	 CAS: 1335577-14-4
F4OMe	 CAS: 6230-11-1
Y	 CAS: 60-18-4
HseMe	 CAS: 3311-01-1
E	 CAS: 56-86-0
G	 CAS: 56-40-6

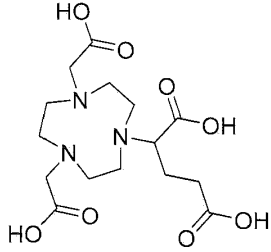
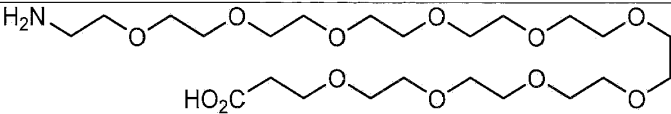
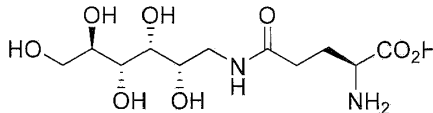
[表 1 - 6]

Acb	 CAS: 22264-50-2
dkAc	 CAS: 51621-57-9
dnle	 CAS: 327-56-0
t4amCh	 CAS: 1197-18-8
Nle	 CAS: 327-57-1
F	 CAS: 63-91-2
MeC	 CAS: 4026-48-6
C	 CAS: 52-90-4
MeA	 CAS: 3913-67-5
MeS	 CAS: 2480-26-4
MeN	 CAS: 19026-58-5
Hpr	 CAS: 3105-95-1
MeCt	 CAS: 10061-40-2

[表1-7]

DOTA	 CAS: 60239-18-1
PEG8Me	 CAS: 869718-81-0
SulfoCy5	 CAS: 146368-11-8
PEG8c	 CAS: 756526-04-2
rDOTAGA (又はDOTAGA)	 CAS: 656242-49-8

[表 1－8]

rNODAGA(又はNODAGA)	 CAS: 1092370-12-1
PEG10c	 CAS: 2170987-85-4
Qglucamine	 CAS: 1956384-48-7

2. ペプチド

本発明は、ペプチド、又はその薬学的に許容される塩に関する。本明細書において、「ペプチド」について言及する場合、特に矛盾がない限り、その薬学上許容される塩、異性体、又はその溶媒和物に関する言及も含む。

一態様において、本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

d a－T b g－3 P y 6 CON－H g l－M e d a－A h p－P e G－S－3 P y 6 NH2－H s e M e－d k－Y（配列番号1）

あるいは、

10 上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1－10個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む。

15 本発明のペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、7番目、8番目、9番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1－9個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有

するアミノ酸配列を含む、ペプチドであってもよい。

配列番号1のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-10個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有してい
5 もよい。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸の数は、1個以上10個以下であればよく、その下限は1個である。その上限は10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個であり、最小1個である。

好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列の1番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-7
10 個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列であってよい。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸の数は、1個以上7個以下であればよく、その下限は1個である。その上限は7個、6個、5個、4個、3個、2個であり、最小1個である。また、好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列の1番目、4番目、7番目、8番目、9番目及び11番目のアミノ酸残基からな
15 るグループから選択される、1-6個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列であってよい。

一態様において、好ましくは、アミノ酸の「置換」である。非限定的に、かかるアミノ酸の置換は、好適には保存的アミノ酸置換である。

「保存的アミノ酸置換 (conservative amino acid substitution)」とは、機能的に等価又は類似のアミノ酸との置換を意味する。
20 ペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、当該ペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。例えば、同様の極性を有する一つ又は二つ以上のアミノ酸は機能的に等価に作用し、かかるペプチドのアミノ酸配列に静的変化をもたらす。一般に、あるグループ内の置換は構造及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
25 ながら、当業者には自明であるように、特定のアミノ酸残基が果たす役割は当該アミノ酸を含む分子の三次元構造における意味合いにおいて決定され得る。例えば、システイン残基は、還元型の（チオール）フォームと比較してより極性の低い、酸化型の（ジスルフィド）フォームをとることができる。アルギニン側鎖の長い脂肪族の部分

は構造的及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-芳香族相互作用又は陽イオン- 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、酸性又は非極性グループに属するアミノ酸と置換しても、構造的及び機能的には保存的
5 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。

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（例えば、レーニンジャー、生化学、改訂第2版、1975年刊行、73-75頁：L.
10 Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp 73-75, Worth Publisher, New York (1975)に記載の置換）及び典型的置換を含む。また、保存的アミノ酸置換は、例えば、以下のよう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
15 。

疎水性（非極性とも言う）アミノ酸：疎水性（非極性）を示すアミノ酸であって、アラニン（「Ala」又は単に「A」とも記す）、グリシン（「Gly」又は単に「G」とも記す）、バリン（「Val」又は単に「V」とも記す）、ロイシン（「Leu」又は単に「L」とも記す）、イソロイシン（「Ile」又は単に「I」とも記す）、プロリン
20 （「Pro」又は単に「P」とも記す）、フェニルアラニン（「Phe」又は単に「F」とも記す）、トリプトファン（「Trp」又は単に「W」とも記す）、チロシン（「Tyr」又は単に「Y」とも記す）、メチオニン（「Met」又は単に「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。

25 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、Ala、Gly、Val、Ile、Leu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、Val、Ile、Leuを含む。

芳香族アミノ酸：側鎖に芳香環を有するアミノ酸であって、Trp、Tyr、Pheを含む。

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（「Ser」又は単に「S」とも記す）、スレオニン（「Thr」又は単に「T」とも記す）、システイン（「Cys」又は単に「C」とも記す）、アスパラギン（「Asn」又は単に「N」とも記す）、グルタミン（「Gln」又は単に「Q」とも記す）、アスパラギン酸（「Asp」又は単に「D」とも記す）、グルタミン酸（「Glu」又は単に「E」とも記す）、リジン（リシンとも記す。「Lys」又は単に「K」とも記す）、アルギニン（「Arg」又は単に「R」とも記す）、ヒスチジン（「His」又は単に「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、Asp、Glu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、Lys、Arg、Hisを含む。

15 中性アミノ酸：側鎖が中性を示すアミノ酸であって、Ser、Thr、Asn、Gln、Cysを含む。

また、Gly及びPro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、Cys及びMetは、「含硫アミノ酸」に分けることもできる。

20 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
25 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。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、複素環化や縮合環化したアミノ酸など）が含まれる。

なお、天然のアミノ酸の側鎖に官能基等の構造が付加又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。例えば、Dapはアラニンの側鎖にアミノ基を有するアミノ酸であるが、当該アミノ基が付加されたことで、非極性アミノ酸グループに属するアラニンとは異なり、塩基性を有する極性アミノ酸の性質を示す。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出来る。例えば、塩基性アミノ酸に属するアルギ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-メチルアルギニン(MeR)は、非天然アミノ酸であるが、塩基性を示すため、塩基性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。なお、de(D-グルタミン酸)などの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。

非限定的に、非天然のアミノ酸には、N-メチルアミノ酸、D-アミノ酸などを含み、さらに具体的には、da、de、dhgl、dq、dk、dyae、df、dkCOpipzaa、Tbg、3Py6CON、3Py6NH₂、Hgl、alT、Hgn、SMe、DabAc、KCOpipzaa、Meda、PeG、MeG、MedkCOpipzaa、Ahp、pHPeG、pMeOPeG、MsMeapG、3OMePeG、PpG、pFPeG、mCPeG、pCPeG、4HPpG、4OMePpG、4PypG、4COOPeG、3COOPeG、3FPeG、P4Sh、Hse、Qmm、Qdm、QPEG8Me、5Inda、F4OMe、HseMe、

Ac b、dkAc、dnle、t4amCh、Nle、MeC、MeA、MeS、MeN、Hpr、Hgn (Qglucamine-NH₂)、Hgn (KCOpipzaa-NH₂)、Qglucamine及びMeCtなどのアミノ酸が含まれる。

「その薬学的に許容される塩」は、いずれかのペプチドの塩を意味する。薬学的に
 5 許容される塩の例は、硫酸、塩酸、リン酸などの鉱酸との塩、酢酸、シュウ酸、乳酸、
 酒石酸、フマル酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有
 機酸との塩、トリメチルアミン、メチルアミンなどのアミンとの塩、又はナトリウム
 イオン、カリウムイオン、カルシウムイオンなどの金属イオンとの塩である。経時変
 化により、水分を含有することとなった化合物については、そのような水分も薬学的
 10 に許容される塩に含まれる。

また、前記ペプチドは、そのステレオアイソマーなどの異性体であってもよい。ペ
 プチドは、1つ又は複数の立体中心を有することがあり、それらの立体中心は、独立
 に(R)配置又は(S)配置のいずれかで存在し得る。本明細書においては、前記ペ
 プチドは、光学活性体又はラセミ体であってよく、「異性体であって良い」とは、ラセ
 15 ミ体、光学活性体、位置異性体、及び立体異性体、又はそれらの組み合わせを含むこ
 とを意味する。また、一態様において、1つ又は複数の異性体の混合物であってよい。
 なお、「ペプチドのステレオアイソマー」とは、前記ペプチドの立体異性体を意味す
 る。本明細書において、「ペプチド」と呼称する場合、特に言及しない限り、その異性
 体も含む。

20 また、前記ペプチドは、溶媒和物であってもよい。溶媒和とは、溶質分子（ペプチ
 ド又はコンジュゲート）が電離して生じたイオンと、溶媒分子とが、静電気力や水素
 結合などによって結びつき取り囲むことで溶質が溶媒中に拡散する現象を意味する。
 溶媒の種類は特に限定されない。溶媒が水である場合、特に「水和物」という。

以下のペプチドは、本明細書の実施例において、CA9結合活性を有することが確
 25 認されたペプチドの例である。

da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-PeG-S-3Py
 6NH₂-HseMe-dk-Y（配列番号1）；

配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMeC、C又はMe

C tが付加されているペプチド；並びに、

配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMe A、Me S、Me N、H p r、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてMe G、G、d a、又はMe d aが付加されているペプチド。

5 一態様において、本発明のペプチドは、

(1) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMe C、C又はMe C tが付加されている；

あるいは、

(2) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMe A、Me
10 S、Me N、H p r、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてMe G、G、d a、又はMe d aが付加されている。

前記(1)と(2)は、13番目のアミノ酸残基が異なる。一態様において、本発明のペプチドが環状ペプチドの場合、環状構造に含まれるアミノ酸残基の数が、非限
15 ミノ酸が存在する場合、それ以上であってよい。

本発明のペプチドは、一態様において、以下の：

(配列番号1の) 1番目のアミノ酸残基が、d a、d q、d e、d h g l、又はd
kである；

2番目のアミノ酸残基が、I 又はT b gである；

20 3番目のアミノ酸残基が、3 P y 6 N H 2又は3 P y 6 C O Nである；

4番目のアミノ酸残基が、S、H g l、H g l (P E G 8 M e)、a l T、H g n、
S M e、K C O p i p z a a、又はD a b A cである；

5番目のアミノ酸残基が、P e G、M e G、M e d a、又はM e d k C O p i p z
a aである；

25 7番目のアミノ酸残基が、P e G、p M e O P e G、M s M e a p G、3 O M e P
e G、p H P e G、P p G、p F P e G、m C P e G、p C P e G、4 H P p G、4
O M e P p G、4 P y p G、4 C O O P e G、3 C O O P e G、又は3 F P e Gであ
る；

8番目のアミノ酸残基が、H、S、P、D、KCOpipz aa、Q (PEG8Me)、P4Sh、Hse、SMe、Qmm、又はQdmである；

9番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂、5Inda、Y、又はF4OMeである；

- 5 10番目のアミノ酸残基が、Ahp、HseMe、又はEである；
並びに、

11番目のアミノ酸残基が、dk、G、da、dq、dkCOpipz aa、dk(t4amCh)、de、Ac b、又はdkAcである、

1つ又は2以上の要件を具備する。

- 10 1番目－12番目のアミノ酸残基の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。非限定的に、上記の要件の、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上の要件を具備する。好ましくは、上記12の要件の全てを具備する。

本発明のペプチドは、一態様において、以下の：

- 15 (配列番号1の) 1番目のアミノ酸残基が、da、dq、de、dhgl、又はdkである；

2番目のアミノ酸残基が、I又はTbgである；

3番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂又は3Py6CONである；

- 4番目のアミノ酸残基が、S、Hgl、Hgl (PEG8Me)、alT、Hgn、
20 SMe、KCOpipz aa、又はDabAcである；

5番目のアミノ酸残基が、PeG、MeG、Meda、又はMedkCOpipz aaである；

- 7番目のアミノ酸残基が、PeG、pMeOPeG、MsMeapG、3OMePeG、pHPPeG、PpG、pFPeG、mCPeG、pCPeG、4HPpG、4
25 OMePpG、4PypG、4COOPeG、3COOPeG、又は3FPeGである；

8番目のアミノ酸残基が、H、S、P、D、KCOpipz aa、Q (PEG8Me)、P4Sh、Hse、SMe、Qmm、又はQdmである；

9番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂、5Inda、Y、又はF4OMeである；

10番目のアミノ酸残基が、Ahp、HseMe、又はEである；
並びに、

- 5 11番目のアミノ酸残基が、dk、G、da、dq、dkCOpipzaa、dk
(t4amCh)、de、Ac b、又はdkAcである、
1つ又は2以上の要件を具備し、
そして、

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMeC、C又はMeCtが付加されている；
10 あるいは、

(2) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMeA、MeS、MeN、Hpr、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてMeG、G、da、又はMedaが付加されている。

- 15 1番目－12番目のアミノ酸残基の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。非限定的に、上記の要件の、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上の要件を具備する。好ましくは、上記12の要件の全てを具備する。

本発明のペプチドは、一態様において、以下の：

- 20 (配列番号1の) 2番目のアミノ酸残基がTbgである；

3番目のアミノ酸残基が3Py6NH₂である；

5番目のアミノ酸残基がMedaである；

7番目のアミノ酸残基がPeG又はpHPegである；

9番目のアミノ酸残基が3Py6NH₂又は5Indaである；

- 25 並びに、

10番目のアミノ酸残基がHseMeである、
1つ又は2以上の要件を具備する。

1番目－10番目のアミノ酸残基の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選

択しうる。非限定的に、上記の要件の、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上の要件を具備する。好ましくは、上記6の要件の全てを具備する。

本発明のペプチドは、一態様において、以下の：

(配列番号1の) 2番目のアミノ酸残基がT b gである；

5 3番目のアミノ酸残基が3 P y 6 NH₂である；

5番目のアミノ酸残基がM e d aである；

7番目のアミノ酸残基がP e G又はp H P e gである；

9番目のアミノ酸残基が3 P y 6 NH₂又は5 I n d aである；

並びに、

10 10番目のアミノ酸残基がH s e M eである、

1つ又は2以上の要件を具備し、

そして、

(1) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてM e C、C又はM e C tが付加されている；

15 あるいは、

(2) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてM e A、M e S、M e N、H p r、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてM e G、G、d a、又はM e d aが付加されている。

1番目－10番目のアミノ酸残基の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選
20 択しうる。非限定的に、上記の要件の、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上の要件を具備する。好ましくは、上記6の要件の全てを具備する。

本発明のペプチドは、一態様において以下の、

(配列番号1の) 2番目のアミノ酸残基がT b gであり；

3番目のアミノ酸残基が3 P y 6 NH₂であり；

25 5番目のアミノ酸残基がM e d aであり；

7番目のアミノ酸残基がP e G又はp H P e gであり；

9番目のアミノ酸残基が3 P y 6 NH₂又は5 I n d aであり；

並びに、

10番目のアミノ酸残基がH s e M eである。

本発明のペプチドは、一態様において

(配列番号1の) 2番目のアミノ酸残基がT b gであり；

3番目のアミノ酸残基が3 P y 6 N H 2であり；

5 5番目のアミノ酸残基がM e d aであり；

7番目のアミノ酸残基がP e G又はp H P e gであり；

9番目のアミノ酸残基が3 P y 6 N H 2又は5 I n d aであり；

並びに、

10番目のアミノ酸残基がH s e M eであり、

10 そして、

(1) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてM e C、C又はM e C tが付加されている；

あるいは、

(2) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてM e A、M e
15 S、M e N、H p r、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてM e G、G、d a、又はM e d aが付加されている。

本発明のペプチドは、一態様において、

(配列番号1の) 1番目のアミノ酸残基が、d e (P E G 8 M e)、d k、d y a e
又はd k C O p i p z a aである；

20 2番目のアミノ酸残基が、I又はT b gである；

3番目のアミノ酸残基が、3 P y 6 N H 2又は3 P y 6 C O Nである；

4番目のアミノ酸残基が、K、K C O p i p z a a、H g n (Q g l u c a m i n
e - N H 2)、H g n (K C O p i p z a a - N H 2) 又はQ g l u c a m i n eであ
る；

25 5番目のアミノ酸残基が、P e G、M e G、M e d a、又はM e d k C O p i p z
a aである；

7番目のアミノ酸残基が、P e G、p M e O P e G、M s M e a p G、3 O M e P
e G、p H P e G、P p G、p F P e G、m C P e G、p C P e G、4 H P p G、4

OMe P p G、4 P y p G、4 C O O P e G、3 C O O P e G、又は3 F P e Gである；

8番目のアミノ酸残基が、Kである；

9番目のアミノ酸残基が、3 P y 6 N H 2、5 I n d a、Y、又はF 4 O M eである；

10番目のアミノ酸残基が、A h p、H s e M e、又はEである；

並びに、

11番目のアミノ酸残基が、d k (F) 又はd k (P E G 8 c) である、

1つ又は2以上の要件を具備する。

10 1番目－12番目のアミノ酸残基の、上記一態様の選択肢は任意の組み合わせで選択しうる。非限定的に、上記の要件の、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上の要件を具備する。好ましくは、上記12の要件の全てを具備する。

また、本発明のペプチドは、一態様において、含まれるアミノ酸がさらに修飾されていることも良い。修飾とは、例えば、アミノ酸の側鎖末端に他の化合物が結合していることを示す。例えば、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、グルタミンやチロシンなどの側鎖末端に、P E Gや糖鎖等の低分子・中分子化合物が結合しているてもよく、他のアミノ酸が結合しているても良い。

前記ペプチドは、一態様において、環状ペプチドである。「環状ペプチド」は、ペプチド中の2つのアミノ酸が結合し、その全部又は一部が環状になっているものをいう。前記ペプチドは、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、ラッセペプチド状構造を有するもの等も含む。すなわち、前記環状ペプチドは、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。

25 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。

一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化したアミノ酸（好ましくは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（N-メチルシステインなど、システインの置換体を含む）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システイン（又は置換されていてもよいシステイン残基や、構造内部に-SH基を含む化合物を含む）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13番目のシステイン残基（N-メチルシステインなど、システインの置換体を含む）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13番目のシステイン残基又は-SH基を有する化合物（基）に含まれる-SH基とが結合された環状構造を有する。-SH基を有する化合物（基）としては、例えば、MeCtが含まれる。「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。一態様において、前記ペプチドは、クロロアセチル化した配列番号1のアミノ酸配列の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を結合させて得られた環状構造を有する。一態様において、前記ペプチドは、配列番号1-103のいずれかに記載のアミノ酸配列と、当該ペプチドに含まれるシステインまたはその置換体とが、アセチル基を介して結合した構造であってよい。すなわち、本明細書において、例えば「配列番号XXからなる環状ペプチド」とは、当該配列番号XXに表されるアミノ酸配列と、前記アミノ酸配列に含まれる、1番目のアミノ酸に結合したアセチル基と、システイン又はその置換体並びに-SH基を有する化合物に含まれるS（硫黄原子）、とが結合した環状構造も含む。

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（ClAc基）を付加し、ペプチド

中のシステイン残基又は—SH基を有するアミノ酸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。

また、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、C末端アミノ酸（配列番号1のアミノ酸配列のC末端側に13番目のアミノ酸残基又は14番目等のアミノ酸残基が付加されている場合は、一番C末端部分にあるアミノ酸）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）のアミノ基と、前記ペプチドに含まれる13番目のアミノ酸のカルボキシル基とが結合された環状構造を有する。また、一態様において、13番目のアミノ酸残基にさらに付加的なアミノ酸が付加されており、N末端アミノ酸（1番目のアミノ酸残基）と、13番目にさらに付加的なアミノ酸残基が付加された構造、例えば14番目、15番目のアミノ酸残基、とが結合された環状構造を有していてもよい。一態様において、前記ペプチドは、前記ペプチドに含まれる配列番号1のアミノ酸配列の1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、14番目のアミノ酸残基のカルボキシ基が結合された環状構造を有する。また、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）のアミノ基と、前記ペプチドに含まれるC末端アミノ酸の側鎖末端に存在する官能基が結合された環状構造を有する。

前記ペプチドは、一態様において、配列番号2-54のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号2-54のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、環状ペプチドである。前記ペプチドは、配列番号2-54のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、それらから1-13又は14個（好ましくは1-8個、1-7個、1-6個、1-5個、1-4個、1-3個、2個又は1個）のアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドである。なお、アミノ酸残基が付加した配列については、付加部分がリンカーであれば、多くのアミノ酸残基（例えば1-14個の残基）配列がさらに付加してもよい。また、これらアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドは、例えばCA

9 結合活性を有するものが好ましい。

また、前記ペプチドは、一態様において、配列番号 55-103 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号 55-103 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、環状ペプチドである。前記ペプチドは、配列番号 55-103 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、それらから 1-13 又は 14 個（好ましくは 1-8 個、1-7 個、1-6 個、1-5 個、1-4 個、1-3 個、2 個又は 1 個）のアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドである。なお、アミノ酸残基が付加した配列については、付加部分がリンカーであれば、
10 多くのアミノ酸残基（例えば 1-14 個の残基）配列がさらに付加してもよい。また、これらアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドは、例えば CA9 結合活性を有するものが好ましい。一態様において、本発明のペプチドは配列番号 103 を含む、又はからなる、ペプチドを含まない。

さらに、前記ペプチドは、一態様において、配列番号 55-102 のいずれか 1 つ
15 に記載のアミノ酸配列、を含む、又はからなる。前記ペプチドは、一態様において、配列番号 55-103 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、又はからなる、環状ペプチドである。前記ペプチドは、配列番号 55-102 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、それらから 1-13 又は 14 個（好ましくは 1-8 個、1-7 個、1-6 個、1-5 個、1-4 個、1-3 個、2 個又は 1 個
20 ）のアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

さらに、前記ペプチドは、一態様において、配列番号 2 又は 21 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであるか、それらから 1-13 又は 14 個（好ましくは 1-8 個、1-7 個、1-6 個、1-5 個、1-4 個、1-3 個、2 個又は 1 個）のアミノ
25 酸残基が、置換、欠失、挿入又は付加したアミノ酸配列からなる、ペプチドであってもよい。

前記ペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列に加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。非限定的に、前記ペプチドは、配列番号 2-54 又は 55-102、又

は55-103、に記載のアミノ酸配列に加えて、付加的なアミノ酸残基を含んでもよい。

「付加的なアミノ酸残基」は、環状構造を成すペプチドに含まれてもよいし、当該環状ペプチドからさらにアミノ酸残基がリンカー状に付加されていてもよい。一態様
5 において、環状ペプチドに含まれるアミノ酸残基の側鎖に付加されていてもよい。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。

また、環状ペプチドからさらにリンカーが付加されていてもよい。リンカーとしては、例えば、前述のアミノ酸リンカー（ペプチドリリンカー）、化学リンカー、脂肪酸リ
10 ンカー、核酸リンカー、糖鎖リンカーなどが挙げられ、また、例えば化学リンカーとペプチドリリンカーなどの複合体であってもよい。化学リンカーとしては、例えば、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。また、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。アミノ酸（ペプチド）リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸を含むリンカーであり、例
15 えば、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又は6である）を有するペプチドなどのグリシン-リッチペプチドや、米国特許第5、525、491号に記載のセリン-リッチペプチドリリンカーを用いることができる。また、非限定的に、K、dk、F、G、df、Nle、dnle、t4amChといったアミノ酸や、アミ
20 ノ酸が2個以上連結したペプチドリリンカーを用いることができる。なお、ペプチドリリンカーにおいては、アミノ酸-アミノ酸間又はアミノ酸-化学リンカー間の結合が、アミノ酸の側鎖を介して結合していても良い。非限定的に、リンカーの付加によりペプチドの物性（例えば溶解度）が変化する場合がある。

リンカーの付加位置については、どこに付加されていても良い。例えば、C末端側
25 に位置するアミノ酸残基に結合していてもよく、環状ペプチドに含まれるアミノ酸残基に結合していても良い。一態様において、前記ペプチドは、C末端にリンカーを含む。好ましくは、環状ペプチドに含まれるアミノ酸残基の側鎖に結合しているもの又はC末端側に位置するCys、-SH基を有する化合物又は任意のアミノ酸残基に結

合しているものであり、さらに好ましくは、1 番目、4 番目、8 番目、又は 11 番目のアミノ酸残基の側鎖に結合しているものである。

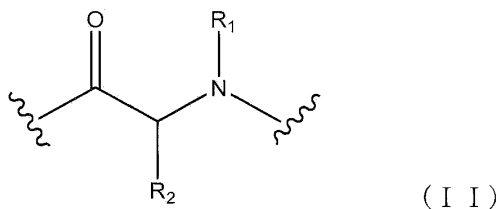
前記ペプチドは、一態様において、前記ペプチドの C 末端に、リンカー及び／又はペイロードが結合可能である、ペプチドである。

- 5 前記ペプチドは、一態様において、1 番目、4 番目、8 番目、11 番目のアミノ酸残基、又は C 末端側に位置するアミノ酸残基若しくは付加的なアミノ酸が、リンカー及び／又はペイロードが結合可能なアミノ酸残基である、ペプチドである。

- リンカー及び／又はペイロードが結合可能なアミノ酸残基とは、そのアミノ酸残基の側鎖末端に、リンカー及び／又はペイロードが結合可能な官能基を有するアミノ酸
10 残基、又は C 末端側に位置するアミノ酸残基若しくは付加的なアミノ酸残基の場合、その側鎖末端又は C 末端に、リンカー及び／又はペイロードが結合可能な官能基を有するアミノ酸残基であってよい。なお、ペイロードについては後述する。

一態様において、リンカー及び／又はペイロードが結合可能なアミノ酸残基とは、下記の式 (I I) :

- 15 [化 2]



[式 (I I) 中、

R_1 は、H 又は C 1 - 3 アルキル基であり；

- R_2 は、 R_2 : C 1 - 6 アルキル-NH- R_3 、C 1 - 6 アルキル-C 6 アリール-
20 O-C 1 - 3 アルキル-NH- R_3 、C 1 - 6 アルキル-NH (=O) -CH (C 1 - 6 アルキルフェニル) -NH- R_3 、C 1 - 6 アルキル-NH (=O) -CH (C 1 - 6 アルキル) -NH- R_3 、又は、C 1 - 6 アルキル-NH (=O) -C 3 - 8 シクロアルキル-C 1 - 3 アルキル-NH- R_3 であり、

R_3 は、H 又は任意の官能基である]

- 25 で示される構造を有する。

- R_3 は、H又は任意の官能基であり、任意の保護基により保護されている官能基を含む。 R_3 に、リンカー及び／又はペイロード結合可能となっている構造となっているのが好ましい。リンカー及び／又はペイロードが結合可能となっている構造は、例えば、アミド基のような官能基であってもよく、さらにクリックケミストリーに用い
- 5 られるアルキン化合物又はアジド基など、化合物を結合する際に用いられる公知の官能基や化合物であってもよい。「保護基」は、特に限定されないが、例えば、Fmoc（9-フルオレニルメチルオキシカルボニル）基、tertBu（ターシャリーブチル）基、Alloc（アリルオキシカルボニル）基、Boc（ターシャリーブトキシカルボニル）基などを含む。
- 10 さらに、前記ペプチドは、リンカーなどを介して多量体を形成していてもよい。多量体に含まれるペプチドの数は限定されない。一態様において、多量体は2量体、3量体、4量体、5量体、6量体、8量体又はそれ以上である。多量体は同じペプチドを複数ふくものであるであっても、あるいは、複数の異なるペプチドを含むものであるであってもよい。
- 15 一態様において、好ましくは、前記ペプチドは、CA9結合活性を有する。
- CA9とは、CA9（Carbonic anhydrase IX、炭酸脱水酵素-9）という、15種類ある炭酸脱水酵素の1つであり、ホモ2量体で細胞膜上に局在する膜貫通タンパク質であり、細胞内のpH維持等に大きな役割を果たしている。CA9は低酸素状態において発現することが知られており、特に腫瘍、子宮頸部
- 20 、子宮体部、卵巣、腎臓、食道、肺、乳房、脳、消化管、肝臓、脾臓、頭頸部、唾液腺、体腔、及び皮膚の特定の癌において発現することが知られている。そのため、CA9は、多くの固形腫瘍における腫瘍低酸素状態の一般的なマーカーであることが示唆されている。
- また、CA9は、腫瘍の有無及びその悪性度などを評価するマーカーとしてだけでなく、子宮頸部腫瘍、直腸腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍や脳腫瘍における予後不良マ
- 25 ーカーとしての使用も可能であることが知られている。
- 本明細書でいう用語「CA9」又は「CA-9」は、特別に明示しない限り、哺乳類、好ましくはマウスなどのげっ歯類やヒトなどの霊長類が有する炭酸脱水酵素-9

のことを示す。さらに好ましくはヒトCA9を示す。なお、本明細書の「ヒトCA9」は、ヒトが有する天然型CA9（例：Gene ID：768）を示す。なお、ヒト、マウス、ラット等のCA9のアミノ酸配列は類似した配列を有することが知られている。

- 5 本明細書において、CA9結合活性とは、CA9、特にヒトCA9に特異的に結合することを示す。本明細書において、特に記載がない限り、CA9結合活性とは、ヒトCA9への結合活性を意味する。

非限定的に、CA9に対する本発明のペプチドの結合状態は、親和性定数KA、解離定数KD、結合速度定数 k_{on} 、及び解離速度定数 k_{off} などを指標として表す

- 10 ことができる。

親和性定数KA及び解離定数KDは、平衡状態にある2分子間の結合親和性、すなわち結合の強さを示す指標であり、解離定数KDは親和性定数KAの逆数である。そして解離定数KDの値が小さいほど、結合が強いことを意味する。一方、平衡状態にある2分子間の結合・解離反応の速さは、反応速度論的解析によって求められる結合速度定数 k_{on} 及び解離速度定数 k_{off} によって示され、 $KD = k_{off} / k_{on}$

- 15 である。従って同等の解離定数KDを示す場合でも、ゆっくり会合するがゆっくり解離する場合（ k_{on} と k_{off} の値が共に小さい）と、速やかに会合し速やかに解離する場合（ k_{on} と k_{off} の値が共に大きい）とがあり、それぞれの結合保持状態は全く異なる。

- 20 前記ペプチドのCA9に対する結合状態を示すこれらの親和性定数KA、解離定数KD、結合速度定数 k_{on} 、及び解離速度定数 k_{off} などは、当業者に周知の任意の分子間相互作用測定法を用いて決定することができる。

- CA9に対する前記ペプチドの結合状態は、公知の方法によって測定することができる。例えば、表面プラズモン共鳴スペクトル解析（SPR）によって測定することができる。非限定的に、表面プラズモン共鳴スペクトル解析は、例えば、バイオセンサー（生体分子間相互解析装置）であるBIACOREシステム（Cytiva）を用いて行うことができる。

前記ペプチドのCA9結合活性の指標の1つとしてKD解離定数がある。解離定数

KDが低いほど結合活性（親和性）が高い。表面プラズモン共鳴スペクトル解析によれば、前記ペプチドと例えばヒトCA9との結合に関する解離定数KDは、非限定的に、50 nM以下、30 nM以下、20 nM以下、15 nM以下、10 nM以下、8 nM以下、6 nM以下、5 nM以下、4 nM以下、3 nM以下、2 nM、1 nM以下
5 である。前記ペプチドとヒトCA9との結合の解離定数KDの下限は特に限定されない。非限定的に、前記ペプチド解離定数KDは、0.01 nM以上、0.05 nM以上、0.1 nM以上、0.2 nM以上、0.3 nM以上、0.4 nM以上、0.5 nM以上である。非限定的に、前記ペプチドの解離定数KDは、0.01-50 nM、好ましくは0.05-30 nM、さらに好ましくは0.2-15 nM、特に好ましくは0.3-10 nM、最も好ましくは0.4-5 nMである。
10

CA9に対する前記ペプチドの結合は、他の公知の結合能を測定する方法、例えば、ELISA（酵素結合免疫吸着法）によって調べることも可能である。ELISAは、例えば、CA9ビーズとC末端にHAタグ配列を付加したペプチドを用い、結合活性を調べることによって、行ってもよい。また、例えば、FACS（fluorescence-activated cell sorting）を用いて調べることもできる。
15

非限定的に、前記ペプチドとCA9との結合は、好ましくは非共有結合である。

一態様において、前記ペプチドは実施例1-1~1-16、実施例11-1~5の化学式に含まれるペプチド部分に示した環状の構造を有する。

20 CA9結合活性を有するペプチドは、CA9が関与する各種疾患の評価、診断や治療に有効である。

一態様において、本発明は、CA9結合活性を有する、前記ペプチドに関する。

一態様において、本発明は、CA9に結合させるための、前記ペプチドの使用に関する。

25 一態様において、本発明は、CA9への結合に使用される、前記ペプチドに関する。

本発明において、本発明のペプチドのCA9への結合は、in vitro又はin vivoでの結合である。

他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

3. ペプチドの製造

本発明のペプチドは、例えば以下のような、ペプチド製造のための任意の公知の方法によって、製造することができる。

- 5 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

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。

- 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（DIC）等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。
- 10

- 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。
- 15
- 20

- 固相合成のレジンとしては、例えば、Merrifield resin、MBHA 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。
- 25

α -アミノ基の保護基としては、例えば、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、9-フルオレニルメチルオキ

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 基はピペリジン又はピロリジンによる処理で脱保護できる。

- 5 α -カルボキシ基の保護は、例えば、メチルエステル、エチルエステル、アリルエステル、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。

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
10 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。

- 15 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。

遺伝子組み換え法 (翻訳合成系) によるペプチドの製造は、前記ペプチドをコードする核酸を用いて行うことができる。前記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。

- 20 前記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い。あるいは、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。

- 25 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、前記核酸としては、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。

続いて、当該ペプチドをコードする核酸を用いて発現ベクターを調製する。核酸はそのまま、又は制限酵素で消化し、又はリンカーを付加する等して、発現ベクターのプロモータの下流に挿入することができる。ベクターとしては、例えば、大腸菌由来プラスミド (pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC18、
5 pUC19、pUC118、pBluescript II等)、枯草菌由来プラスミド (pUB110、pTP5、pC1912、pTP4、pE194、pC194等)、酵母由来プラスミド (pSH19、pSH15、YEp、YRp、YIp、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
10 等が挙げられる。

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

発現ベクターには、例えば、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
20 ともできる。

次に、前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る。宿主としては、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
25 、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。

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。

- 5 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
10 から遊離体に変換してもよい。

- 一態様において、翻訳合成系は、無細胞翻訳系としてもよい。無細胞翻訳系によれば、一般に、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。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）
15 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、非限定的に、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
20 NA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等を、小麦胚芽抽出液を用
25 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。

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

A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; 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。

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、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。

前記ペプチドの化学合成は、例えば、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。前記ペプチドの合成は、例えば、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しかつ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*、第2版やG. B. Fields, R. L. Noble, *Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids*, *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 1990, 161-214などに記載されているが、好ましいペプチド側鎖保護基としては、例えば、セリンやトレオニンのヒドロキシ基に対するベンジル基やtert-ブチ

- ル基及びトリチル (T r t) 基、チロシンのヒドロキシ基に対する2-ブロモベンジルオキシカルボニル基や t e r t -ブチル基、リジン側鎖のアミノ基に対するB o c基、メチルテトラゾールチオール (M t t) 基、A l l o c基、及びi v D d e基、ヒスチジンのイミダゾール基に対するT r t基やB o c基、アルギニンのグアニジル
- 5 基に対する2、2、4、6、7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル基 (P b f) 基、グルタミン酸やアスパラギン酸をはじめとするカルボキシル基に対する t e r t -ブチル基、アリル基、及び3-メチルペンタン (M p e) 基、グルタミンやアスパラギンのカルボキサミド基に対するT r t基、また、システインのチオール基に対するT r t基及びモノメトキシトリチル (M m t) 基が挙げられる。
- 10 前記ペプチドは、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末端アミノ酸及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F m o c基等により適切に保護されたペプチドのC末端カルボキシル基又はF m o c基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
- 15 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 (F m o c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.
- 20 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
- 25 :2.5:2.5) が挙げられる。

本明細書に記載するペプチドの合成は、単又は多チャネルペプチド合成機、たとえばCEM社のLiberty Blue合成機又はBiotage社のSyro I合成機やそれらの後継機などを使用することで実施できる。

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。

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。非限定的に、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. ACS 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、ペプチド中に硫黄分子を含む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。あるいは、ペプチド中にL-2-アミノアジピン酸残基を配置し、N末端の主鎖アミノ基との間で結合することによって、環状化してもよい。あるいは、N末端側のアミノ酸残基のアミド基と、C末端側のアミノ酸残基のカルボキシ基とを、アミド結合によって結合することによって、環状化してもよい。また、N末端アミノ酸(1番目のアミノ酸残基)のアミノ基と、前記ペプチドに含まれるC末端アミノ酸の側鎖末端に存在する官能基が結合することによって、環状化してもよい。このように、公知の環状化方法であれば、特に制限されず用いることができる。

25 他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

4. コンジュゲート(複合体)

本発明は、ペプチド及びペイロードを含む複合体(「ペプチドコンジュゲート」、「ペプチド複合体」又は単に「コンジュゲート」とも呼称する)、又はその薬学的に許容さ

れる塩に関する。コンジュゲートにおけるペプチドは、「2. ペプチド」の項目で説明した通り、あらゆる態様（塩、異性体、溶媒和物等を含む）を含む。本明細書において、「ペプチドコンジュゲート」、「コンジュゲート」又は「ペプチド複合体」について言及する場合、特に矛盾がない限り、その薬学的に許容される塩、異性体、又はその

5 溶媒和物、に関する言及も含む。

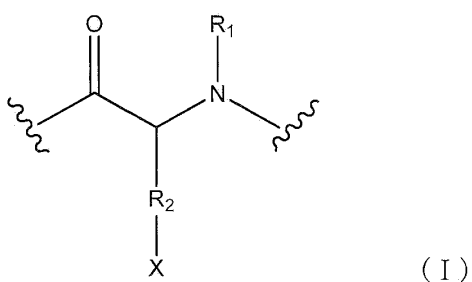
一態様において、本発明のコンジュゲートは、本発明のペプチド及びペイロードが、リンカーを介して、又は介さず、結合している複合体を示す。

一態様において、本発明のコンジュゲートは、本発明のペプチドに含まれるアミノ酸残基の側鎖に、リンカーを介し又は介さずに結合している。

10 一態様において、本発明のコンジュゲートは、配列番号1の13番目のアミノ酸残基に、リンカーを介し又は介さずに、任意のペイロードと結合している。

一態様において、本発明のコンジュゲートは、以下の式（I）で示されるように、配列番号1の1、4、8又は11番目のアミノ酸残基にペイロードが結合している。

[化3]



[式（I）中、

R_1 は、H又はC1-3アルキル基であり；

R_2 は、C1-6アルキル-NH-、C1-6アルキル-C6アリール-O-C1-3アルキル-NH-、C1-6アルキル-NH(=O)-CH(C1-6アルキルフェニル)-NH-、C1-6アルキル-NH(=O)-CH(C1-6アルキル)-NH-、又は、C1-6アルキル-NH(=O)-C3-8シクロアルキル-C1-3アルキル-NH-であり；

20

Xは、任意のペイロードである]、

なお、 R_2 の、C1-6アルキル-NH-は、Kの残基及びKの側鎖においてアル

キル鎖が伸長した改変体における残基、C 1－6 アルキル－C 6 アリール－O－C 1
 －3 アルキル－NH－は、d y a e の残基及びd y a e の側鎖においてアルキル鎖が
 伸長した改変体における残基、C 1－6 アルキル－NH（＝O）－CH（C 1－6 ア
 ルキルフェニル）－NH－は、d k－d f の残基及びd k の側鎖においてアルキル鎖
 5 が伸長した改変体と、d f の側鎖においてアルキル鎖が伸長した改変体とが結合した
 化合物における残基、C 1－6 アルキル－NH（＝O）－CH（C 1－6 アルキル）
 －NH－は、d k－d n l e の残基及びd k の側鎖においてアルキル鎖が伸長した改
 変体と、d n l e の側鎖においてアルキル基が伸長又は短縮した改変体とが結合した
 化合物における残基、そして、C 1－6 アルキル－NH（＝O）－C 3－8 シクロア
 10 ルキル－C 1－3 アルキル－NH－は、d k－t 4 a m C h の残基及びd k の側鎖に
 においてアルキル鎖が伸長した改変体と、t 4 a m C h の側鎖においてシクロアルキル
 構造に含まれるC数が増減した改変体とが結合した化合物における残基である。

なお、化合物（I）における

[化4]

15 

は、そのカルボキシ基又はアミド基が、アミノ酸配列中にて隣接するアミノ酸残基の
 アミド基又はカルボキシ基と結合していることを示す。

本明細書において、C 1－3 アルキルは、炭素数 1－3 の直鎖状及び分岐鎖状の飽
 和脂肪族炭化水素から任意の水素原子を 1 個除いて誘導される 1 価の基であることを
 20 意味する。具体例に、メチル、エチル、n－プロピル、イソプロピル等が挙げられる
 。

本明細書において、C 1－6 アルキルは、炭素数 1－6 の直鎖状及び分岐鎖状の飽
 和脂肪族炭化水素から任意の水素原子を 1 個除いて誘導される 1 価の基であることを
 意味する。具体例に、メチル、エチル、n－プロピル、イソプロピル、n－ブチル、
 25 イソブチル、s e c－ブチル、t－ブチル、1－メチルプロピル、n－ペンチル、イ
 ソペンチル、2－メチルブチル、1，1－ジメチルプロピル、1－エチルプロピル、
 ヘキシル、4－メチルペンチル等が挙げられる。

本明細書において、C 1－6 アルキルフェニルは、炭素数 1－6 の直鎖状及び分岐鎖状の飽和脂肪族炭化水素から任意の水素原子を 1 個除いて誘導される 1 価の基にフェニル基が結合した構造を意味する。

本明細書において、C 3－8 シクロアルキルは、炭素数 3－8 の環状の飽和脂肪族炭化水素から任意の水素原子を 1 個除いて誘導される 1 価の基であることを意味する。

なお、非限定的に、本発明においてコンジュゲートとは、Conjugate No. 1－81 に示されるコンジュゲート、例えば、Conjugate No. 1－69 および 74－81 に示されるコンジュゲート、を含み、また、それらコンジュゲートに含まれるペイロードが、異なるペイロードに置換されたコンジュゲートをも含む。異なるペイロードに置換されたコンジュゲートとは、例えば、表 8 又は表 18 に表される Conjugate No. 1－81 (一態様において、Conjugate No. 1－69 および 74－81) におけるペイロード、DOTA、DOTALu、SulfoCy5、DOTAZr、DOTALu-df、DOTALu-dnl
10 e、DOTALu-t4amCh、DOTALu-F、DOTALu-Nle、SulfoCy5-PEG8c、DOTACu、DOTAGA、dDOTAGA、rNOTAGA、DOTA-#Ga (DOTA に Ga (ガリウム) が結合したものを示す)、DOTALa (DOTA に La (ランタン) が結合したものを示す)、が異なるペイロードに置換されたコンジュゲートであってよい。

例えば、Conjugate No. 1 に記載のコンジュゲートにおいて、リンカーである G-PEG10c-K に結合したペイロードである sulfoCy5 が、DOTA などのキレート剤や、DOTA などのキレート剤にさらに放射性元素が結合したコンジュゲートであってよく、または、SulfoCy5 が抗体など放射性同位元素ではないペイロードに結合したコンジュゲートであってもよい。また、例えば、
25 onjugate No. 2 に記載のコンジュゲートにおいて、リンカーである K を介して結合したペイロードであるキレート剤 DOTA に、さらに放射性同位元素が結合したコンジュゲートであってよく、例えば、Conjugate No. 4 に記載のコンジュゲートにおいて、リンカーである K を介して結合したペイロードであるキ

レート剤DOTAにLu（非放射性ルテチウム）が、非放射性ルテチウムの代わりに放射性同位元素である ^{177}Lu が結合したコンジュゲートであってもよい。

ペイロード

本発明において、ペイロードとは、公知の機能性分子を示す。機能性分子とは、特
5 に制限はなく、それがターゲットに結合又は作用することにより、希望する機能を示す分子を指す。希望する機能としては、一態様において、薬理活性機能、標識機能や標的部位への送達機能などが挙げられる。なお、本明細書における「ペイロード」には、薬理活性化合物、標識化合物、蛍光物質、ペプチド、タンパク質、核酸、ドラッグデリバリーシステムに用いる分子が含まれ、分子は、低分子化合物、中分子化合物
10 、高分子化合物であり得る。

本明細書において、薬理活性化合物とは、薬理活性を有する化合物を指す。薬理活性化合物は、好ましくは、例えば、薬理活性を有する、高分子化合物である抗体やたんぱく質、核酸や、中分子化合物であるペプチドや、低分子化合物である。また、薬理活性を有する低分子化合物等をリポソームやミセル等が包含した化合物であっても
15 よい。

また、本明細書における「ペイロード」には、細胞に対して毒性を有し、特に細胞を死滅させる任意の細胞障害剤が含まれる。例としては、非限定的に、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソル
20 ビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン並びにそのアナログ又はホモログが含まれる。また、本明細書における「ペイロード」には、抗がん作用を有する治療剤、例えば、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ（thioepa）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）及び
25 びロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール

ル、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及び*c i s*-ジクロロジアミン白金（
 I I）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（「ダ
 ウノマイシン」と呼称されていた）及びドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチ
 5 ノマイシン（「アクチノマイシン」と呼称されていた）、ブレオマイシン、ミトラマイ
 シン、及びアントラマイシン（AMC）、及び抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチン
 及びビンブラスチン）が含まれるが、これらに限定されない。好ましい一態様として
 、治療剤は、細胞傷害剤である。別の一態様では、治療剤は、免疫抑制剤である。更
 に別の一態様では、治療剤は、GM-CSFである。好ましい一態様として、治療剤
 は、ドキソルビシン、シスプラチン、ブレオマイシン、硫酸塩、カルムスチン、クロ
 10 ラムブシル、シクロホスファミド又はリシンAである。

本明細書において、標識化合物とは、色素、蛍光物質、タグ、放射性同位体で標識
 化された化合物を指す。そのうち、放射性同位体で標識化された化合物は、低分子、
 中分子化合物や抗体等が、放射性同位元素で標識化された化合物を指す。また、標識
 化合物とは、色素、蛍光物質、タグ、放射性同位元素そのものであってもよい。放射
 15 性同位元素はDOTA等のキレート剤に配位結合していてもよい。

本明細書において、放射性同位元素とは、公知の放射性同位元素であってよい。一
 態様において、放射性同位元素は、アクチニウム-225、アクチニウム-227（
 225Ac、227Ac）、アスタチン-211（211At）、ビスマス-212及
 びビスマス-213（212Bi、213Bi）、銅-61、銅-62、銅-64及び
 20 銅-67（61Cu、62Cu、64Cu、67Cu）、ガリウム-64、ガリウム-
 67及びガリウム-68（64Ga、67Ga及び68Ga）、インジウム-111（
 111In）、ヨウ素-123、ヨウ素-124、ヨウ素-125又は要素-131（
 123I、124I、125I、131I）（123I）、鉛-203、鉛-212（
 203Pb、212Pb）、ルテニウム-97（97Ru）、ルテチウム-177（1
 25 77Lu）、ラジウム-223（223Ra）、サマリウム-153（153Sm）、ス
 カンジウム-44及びスカンジウム-47（44Sc、47Sc）、鉄-52（52Fe）、
 ヒ素-72、ヒ素-76（72As、76As）、エルビウム-169（169
 Er）、ストロンチウム-89、ストロンチウム-90（89Sr、90Sr）、テク

ネチウム-99 (99mTc)、テクネチウム-94 (94mTc)、イットリウム-86及びイットリウム-90 (86Y、90Y)、クロム-51 (51Cr)、レニウム-186、レニウム-188 (186Re、188Re)、ジルコニウム-89 (89Zr)、マンガン-52、マンガン-51 (52Mn、51Mn)、テルビウム-149、テルビウム-152、テルビウム-155、テルビウム-161 (149Tb、152Tb、155Tb、161Tb)、イッテルビウム-169、イッテルビウム-175 (169Yb、175Yb)、ロジウム-105 (105Rh)、ジスプロシウム-166 (166Dy)、ホルミニウム-166 (166Ho)、サマリウム-153 (153Sm)、プロモチウム-149、プロモチウム-151 (149Pm、151Pm)、ツリウム-172 (172Tm)、錫-121 (121Sn)、プラセオジウム-142、プラセオジウム-143 (142Pr、143Pr)、金-198、金-199 (198Au、199Au)、臭素-75、臭素-76、臭素-77、臭素-80、臭素-82 (75Br、76Br、77Br、80Br、82Br)、フッ素-18 (18F)、スカンジウム-43、スカンジウム-44、スカンジウム-47 (43Sc、44Sc、47Sc)、アスタチン-211 (211At)、トリウム-227、トリウム-226 (227Th、226Th)、ランタン-140 (140La)、ルビジウム-82 (82Rb)、リン-32 (32P)、銀-111 (111Ag)、エルビウム-165 (165Er) などが含まれる。

本明細書において、キレート剤とは、放射性同位元素、特に金属放射性同位元素を安定に結合させるため、金属イオンと結合して環状構造の錯体を形成する有機化合物を示す。一態様において、キレート剤は、EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、DPTA (ジエチレントリアミンペンタ酢酸)、1, 4, 8, 11-テトラアザテトラデカン、1, 4, 8, 11-テトラアザテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸、1-オキサー-4, 7, 12, 15-テトラアザヘプタデカン-4, 7, 12, 15-テトラ酢酸、DOTAGA (α -(2-カルボキシエチル)-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸) (ラセミ体であるrDOTAGAを含む)、TMT (6, 6''-ビス [N, N'', N'''-テトラ (カルボキシメチル) アミノメチル]-4'- (3-アミノ-4-メトキシフェニル)-2, 2': 6'

, 2''-ターピリジン)、DOTA (1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン
 -NN', N'' (N'''-四酢酸)、TCMC (DOTAのテトラ-1級アミド)、DO
 3A (1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7-トリス (酢酸)
 -10-(2-チオエチル) アセトアミド)、CB-DO2A (4, 10-ビス (カル
 5 ボキシメチル) -1, 4, 7, 10-テトラアザビシクロ [5. 5. 2] テトラデカ
 ン)、NOTA (1, 4, 7-トリアザシクロノナン-三酢酸)、Diamsar (3
 , 6, 10, 13, 16, 19-ヘキサアザビシクロ [6. 6. 6] エイコサン-1
 , 8-ジアミン)、DTPA (ペンテト酸又はジエチレントリアミン五酢酸)、CHX
 -A''-DTPA ([(R) -2-アミノ-3-(4-イソチオシアナトフェニル) プ
 10 ロピル] -trans-(S, S)-シクロヘキサン-1, 2-ジアミン-五酢酸)、
 TETA (1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8)、11-
 四酢酸、Te2A (4, 11-ビス (カルボキシメチル) -1, 4, 8, 11-テト
 ラアザビシクロ [6. 6. 2] ヘキサデカン)、HBED、DFO (デフェロキサミン
)、DFOsq (DFO-スクアラミド)、HOPO (3, 4, 3-(LI-1, 2-
 15 HOPO)、NODAGA (1, 4, 7-トリアザシクロノナン-1-1グルタミン酸
 -4, 7-酢酸) (ラセミ体であるrNODAGAを含む) 等が含まれ、それらの改変
 物も含む。好ましくは、DOTA、DOTAGA又はNODAGAである。なお、
 各キレート剤に光学異性体が存在する場合、それらを含む。

一態様において、ペイロードは、キレート剤に結合した放射性同位元素が好ましい
 20 。例えば、非限定的に、ルテチウムの放射性同位元素がDOTAに結合した構造、ジ
 ルコニウムの放射性同位元素がDOTAに結合した構造や、銅の放射性同位元素がD
 OTAに結合した構造、ガリウムの放射性同位元素がDOTAに結合した構造などを
 挙げることができる。

また、一態様において、ペイロードは、キレート剤に結合していない放射性同位元
 25 素であってもよい。放射性同位元素を用いた評価方法やイメージングに用いられる化
 合物であって良く、例えば、非限定的に、後述するPETやSPECT等の陽電子放
 出断層撮影法において、放射性リガンドイメージング剤に用いられる、放射性同位元
 素を含む公知の化合物であってよい。例えば、非限定的に、¹⁸F・フルオロデオキ

シグルコース（ ^{18}F -FDG）や、 ^{15}O - H_2O 、 ^{11}C -メチオニン、 ^{11}C -酢酸、 ^{11}C -コリン、 ^{11}C -ラクロプライド、 ^{11}C -フルマゼニル、 ^{13}N -アンモニア、 ^{18}F -フッ化ナトリウム、 $^{82}\text{Rn}+$ （ $^{82}\text{RbCl}$ ）、 ^{18}F -フルルピリダズ、 ^{123}I -IMP、 $^{99\text{mTc}}$ -ECD、 $^{99\text{Tc}}$ -HMPAO、 ^{123}I -イオマゼニル、 ^{123}I -イオフルパン、 ^{111}In -DTPA、 $^{99\text{mTc}}$ - O_4 -（ $\text{Na }^{99\text{mTc}}\text{O}_4$ ）、 $^{99\text{mTc}}$ -MIBI、 $^{201\text{Tl}}$ -（ $^{201\text{Tl}}\text{Cl}$ ）、 $^{99\text{mTc}}$ -テトロホスミン、 $^{99\text{mTc}}$ -ヒト血清アルブミン、 $^{131\text{I}}$ -アドステロール、 $^{99\text{mTc}}$ -フィチン酸、 $^{90\text{Y}}$ -ゼヴァリン、 $^{67\text{Ga}}$ -（ $^{67\text{Ga}}\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ）、 ^{111}In -イブリツモマブチウキセタン、 ^{111}In -ペンテトレオチド等であってよい。

本明細書において、タンパク質とは、生体内に存在するタンパク質、体内にて有用な機能を示すタンパク質であれば如何なるものでもよく、例えば、薬理作用を有するタンパク質、分子認識作用を有するタンパク質等が挙げられる。具体的には、フェブロネクチン、アビジン、抗体、Fc部位を有するタンパク質、免疫チェックポイントタンパク質、タンパク質分解酵素等の酵素等を挙げる事ができる。

本明細書において、核酸とは、ヌクレオチドの重合体であれば如何なるものでもよい。具体的には、DNA、RNAが挙げられる。本明細書において、核酸は修飾されていてもよく、例えば2'-メトキシエチル（MOE）修飾、RNAにおける2'-デオキシヌクレオシドの使用、ホスホロチオエートによるヌクレオシド間結合、ホスホジエステルによるヌクレオシド間結合、及びシトシンの5'-メチルシトシンへの変換などの修飾が挙げられる。

本明細書において、ドラッグデリバリーシステムとは、有効成分を標的細胞内へ送達させるシステムを指し、例としては、水溶性の高分子、ナノサイズの微粒子（ナノスフィア）、リポソームやミセルなどのキャリアが挙げられる。ドラッグデリバリーシステム（DDS）分子には内部にさらに低分子化合物、タンパク質、ペプチド、核酸、ワクチン等の薬物が含まれていてもよい。

一態様において、本発明は、CA9結合活性を有する、前記コンジュゲートに関する。

一態様において、本発明は、CA9に結合させるための、前記コンジュゲートの使用に関する。

一態様において、本発明は、CA9への結合に使用される、前記コンジュゲートに関する。

- 5 本発明において、本発明のコンジュゲートのCA9への結合は、*in vitro* 又は *in vivo* での結合である。

他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

5. 組成物等

- 10 本発明はまた、本発明のペプチド、コンジュゲート、又はその薬学的に許容される塩を含む組成物に関する。前記組成物は、非限定的に、医薬組成物（医療用組成物）、診断用組成物、研究用組成物、である。一態様において、医薬組成物は、放射線治療法に用いられる組成物（治療用組成物の一態様）である。

- 15 本発明はまた、本発明のコンジュゲートを含む、イメージング剤に関する。イメージング剤は、診断用組成物としても使用し得る。一態様において、診断用組成物は、イメージング剤である。

他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

医薬組成物

一態様において、本発明は、前記ペプチド、コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物に関する。

- 20 一態様において、前記医薬組成物は、CA9結合活性を有する。

一態様において、前記医薬組成物は、CA9関連疾患若しくは症状を予防、又は治療するための医薬組成物である。

「CA9関連疾患若しくは症状」とは、公知のCA9関連疾患若しくは症状を含む。例えば、腫瘍、特に悪性腫瘍、固形癌が含まれる。

- 25 一態様において、CA9関連疾患の例としては、子宮頸部及び子宮体部、乳房、卵巢、消化管（食道、胃、小腸、結腸、直腸を含む）、腎臓、肝臓、胆嚢及び胆管系、膵臓（膵管、外分泌膵臓を含む）、肺、頭頸部、唾液腺、膀胱及び尿路、体腔、上皮由来の腫瘍、などが挙げた、頭頸部、卵巢、卵管、腹膜、膈、外陰部、陰茎、子宮頸部、

子宮筋層、子宮内膜、甲状腺、副腎、前立腺、皮膚、及び付属器の癌、血液悪性腫瘍、前悪性血液障害及びリンパ系譜の血液悪性腫瘍及び関連疾患を含む境界領域悪性腫瘍、骨髓系譜の血液悪性腫瘍及び関連疾患、間葉起源の腫瘍、中枢もしくは末梢神経系の腫瘍、内分泌腫瘍、眼球及び付属器腫瘍、生殖細胞及び栄養膜腫瘍、小児性及び胎児性腫瘍等が挙げられる。好ましくは、非限定的に、腎細胞癌、頭頸部癌、尿路上皮細胞癌、膵管癌、大腸癌等である。

一態様において、前記医薬組成物は、放射線治療法に用いられる組成物（治療用組成物の一態様）である。この場合において、前記医薬組成物に含まれる成分は、放射性同位元素を含む。好ましくは、ペイロードとして放射性同位元素を含む、コンジュゲートである。なお、放射線治療法とは、放射線を照射又は放射線を発する物質を患部に投与することにより、腫瘍、特に癌、における細胞内のDNA等にダメージを与え、当該細胞を死滅させる治療法である。

前記医薬組成物は、前記ペプチド又はコンジュゲートそのものを含んでもよいが、前記ペプチドの薬学上許容される塩、異性体、又はその溶媒和物を含んでもよい。本明細書において「ペプチド」及び「コンジュゲート」は、特に明記しない限り、その薬学上許容される塩、異性体、又はその溶媒和物を含みうる。前記医薬組成物は、前記ペプチド又はコンジュゲートを有効成分として有効量含むものが好ましい。

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。

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

質層を透過させることもできる（イオントフォレシス法）。

前記医薬組成物は、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
5 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
10 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
15 ルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、
ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、
トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン
、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、
ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸
20 、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。

前記医薬組成物は、ペプチドが一般には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；
25 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。

前記医薬組成物が丸剤又は錠剤の場合、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆してもよい。

前記医薬組成物が注射剤の場合、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んでもよい。さらに、湿
5 潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えもよい。

また、前記医薬組成物は、ヒトだけではなく、非ヒト哺乳動物又は鳥類を対象としていてもよい。非ヒト哺乳動物の例は、ヒト以外の霊長類（サル、チンパンジー、ゴリラ等）、家畜動物（ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジなど）、あるいは、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、ウサギ等が含まれる。

10 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、非限定的に、例えば、 $30\mu\text{g}-100\text{g}$ 、 $100\mu\text{g}-500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g}-100\text{mg}$ 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、 $1\mu\text{g}/\text{kg}-3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3\mu\text{g}/\text{kg}-1000\mu\text{g}/\text{kg}$ を1回又は数
15 回に分けて投与してもよい。

一態様において、本発明は、本発明のペプチド、コンジュゲート（それらの薬学的に許容される塩、異性体、又は溶媒和物を含む。）を投与することによる、CA9関連疾患若しくは症状を予防又は治療する方法に関する。非限定的に、本発明の治療方法は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを対象に投与する工程を含む。投与対象や
20 投与方法は、「医薬組成物」の項目に記載したのと同様である。また、非限定的に、本発明の治療方法は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを用いて当該治療方法の薬効成分を対象となる任意の部分（患部）に送達することを目的とし、本発明のペプチド又はコンジュゲートを対象に投与する工程を含む。

一態様において、本発明は、本発明のペプチド、コンジュゲート又はその薬学的に
25 許容される塩の、CA9関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための使用、に関する。

一態様において、本発明は、本発明のペプチド、コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩の、CA9関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための医薬組成物の

製造のための使用、に関する。

一態様において、本発明は、本発明のペプチド、コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩の、CA9関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための医薬組成物としての使用、に関する。

- 5 一態様において、本発明は、CA9関連疾患若しくは症状を予防又は治療する方法に使用するための、本発明のペプチド、コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩に関する。

一態様において、本発明は、CA9関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための医薬組成物として使用されるための、本発明のペプチド、コンジュゲート又はその薬

- 10 学的に許容される塩に関する。

診断用組成物・イメージング剤

本発明はまた、本発明のペプチド、コンジュゲート又はその薬学的に許容される塩を含む、CA9関連疾患若しくは症状を診断するための診断用組成物に関する。

- 15 本発明のペプチド、コンジュゲートは、CA9関連疾患若しくは症状の診断用組成物としても使用しうる。診断薬としては、CA9関連疾患若しくは症状に罹患しているか否かを診断するための検出薬や、当該疾患の重症度を診断するための検出薬や、当該疾患の予後不良を診断するための検出薬であってよく、検出薬として用いる場合は、前記ペプチド又はコンジュゲートは、検出可能に標識してもよく、検出可能であるペイロードを含むコンジュゲートであってもよく、公知のイメージング剤をペイロ
20 ードとして含むコンジュゲートであってもよい。

- 本発明は、一態様として、コンジュゲートを含む、イメージング剤を含む。イメージング剤は、診断用組成物としても使用し得る。一態様において、診断用組成物は、イメージング剤である。本明細書において「イメージング剤」とは、診断イメージングを実施することを可能にする、その存在及び／又は位置を直接的に又は間接的に検
25 出することが可能になるような1つ又は複数の性質を有する化合物である。そのようなイメージング剤の例としては、検出を可能にする標識部分が組み入れられたタンパク質、ペプチド、中分子化合物、小分子化合物及び放射性同位元素そのものなどが挙げられる。

検出を可能にする標識部分は、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、(キレート剤に結合していてもよく、グルコースなどの化合物に結合していてもよい) 放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、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、フルオレセインアミダイト (FAM)、エオシン、カルボキシフルオレセイン、エリスロシン、カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA)、テトラメチルローダミン (TMR)、及びスルホローダミンや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もよく、また当該発光物質等で標識した抗体が用いられてもよい。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、前記抗体と前記ペプチドとで複合体を作成し、当該抗体又は前記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、CA9 関連疾患若しくは症状の重篤度などを検出することができる。また、イムノアッセイでは、前記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、標識した前記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、CA9 関連疾患若しくは症状の重篤度など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、標識していない前記ペプチドを添加し、前記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。抗体は固相担体の表面に固定されても、内部に固定されてもよい。

酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB)、o-フェニレンジアミン (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-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) 等を用いることができる。

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、金属製、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。

また、本明細書において、診断イメージングとは、免疫組織化学、免疫蛍光染色、
5 などによるイメージングや、陽電子放出断層撮影法（Positron Emission
Tomography；PET。PET-CTを含む）、単一光子放射断層撮
影法（Single Photon Emission Computed Tom
ography；SPECT）などの光学イメージング、及び磁気共鳴イメージング
（MRI）、酸化鉄ナノ粒子、及び炭素被覆鉄-コバルトナノ粒子を含む、非侵襲的（
10 分子）診断イメージングなどが含まれる。本発明のイメージ剤は、検出を可能にする
標識部分を適切に選ぶことでどの診断イメージングにも用いることができる。好まし
くは、光学イメージングであるPET、PET-CT又はSPECTに使用するため
のイメージング剤である。一態様において、本発明は、本発明のコンジュゲートを含
む、陽電子放出断層撮影法に用いられる、放射性リガンドイメージング剤、に関する
15 。

本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを含む、診断用のキットに関する。
前記診断用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（非限定的に、本発明のペプ
チド又はコンジュゲート、抗体、固相担体、緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレ
ートリーダー等のいずれか又は全てを含む）を含む。

20 本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを用いることによる、CA9関連
疾患若しくは症状を診断する方法に関する。「診断する方法」は、in vivo又は
in vitroの診断方法を含む。非限定的に、本発明の方法は、本発明のペプチ
ド又はコンジュゲートを、対象又は対象から得られた試料に投与する工程を含む。非
限定的に、本発明の方法は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを、対象又は対象
25 から得られた試料に投与し、本発明のペプチド又はコンジュゲートとCA9との結合
を検出する工程を含む。投与対象や投与方法は、「医薬組成物」の項目に記載したのと同
様である。「対象から得られた試料」は、例えば、血液、尿、便、涙液、鼻汁、組織
切片などを含む。

本発明はまた、本発明のペプチド又はコンジュゲートを用いることによる、疾患の検出方法に関する。疾患の検出は、例えば、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業等において、医師以外の、検査技師、研究者等によって行うこともできる。一態様において、疾患の検出方法は医療行為を含まない。好ましくは、PET、PET-C

5 T又はSPECTを用いた診断方法である。

本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートのCA9関連疾患若しくは症状の診断のための使用、に関する。

本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートの、CA9関連疾患若しくは症状の診断のための診断用組成物の製造のための使用、に関する。

10 本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートの、CA9関連疾患若しくは症状の診断のための診断用組成物としての使用、に関する。

本発明は、CA9関連疾患若しくは症状を診断する方法に使用するための、本発明のペプチド又はコンジュゲート、に関する。

本発明は、CA9関連疾患若しくは症状を診断するための診断用組成物として使用

15 されるための、本発明のペプチド又はコンジュゲート、に関する。

本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを含むテスターに関する。本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを含む診断用又は検出用のテスターに関する。

研究用組成物

20 本発明はまた、本発明のペプチド又はコンジュゲートを含む、研究用組成物に関する。「研究用組成物」は、研究機関（大学等の教育機関を含む）、企業、病院等において、研究者、技師、学生、医師等によって使用されるものを含む。

前記研究用組成物は、例えば、CA9の検出、CA9関連疾患若しくは症状の検出のために使用することができる。

25 本明細書において、ペプチド又はコンジュゲートを固定化するための担体は特に限定されない、例えば、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る。

本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを用いた、CA9を検出する方法を含む。「検出する方法」は、*in vivo*又は*in vitro*の検出方法を含む。非限定的に、本発明の方法は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを、対象又は対象から得られた試料に投与する工程を含む。非限定的に、本発明の方法は、本発明
5 のペプチド又はコンジュゲートを、対象又は対象から得られた試料に投与し、本発明のペプチド又はコンジュゲートとCA9との結合を検出する工程を含む。投与対象や投与方法は、「医薬組成物」の項目に記載したのと同様である。「対象から得られた試料」は、例えば、血液、尿、便、涙液、鼻汁、組織切片などを含む。

本発明はまた、本発明のペプチド又はコンジュゲートのCA9の検出のための使用
10 、を含む。

本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを含む、診断用又は検出用のキットに関する。前記診断用又は検出用キットは、上記検出に必要な試薬及び器具（非限定的に、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のいずれか又は全てを含む）を含む。

15 一態様において、本発明は、本発明のペプチド又はコンジュゲートを用いて任意のペイロードを対象に送達する方法を含む。非限定的に、本発明の方法は、本発明のペプチドおよび任意のペイロードを含むコンジュゲートを製造し、前記ペプチドを対象に投与する工程を含む。投与対象や投与方法は、「医薬組成物」の項目に記載したのと同様である。

20 一態様において、本発明は、任意のペイロードを、対象の任意の部分（患部）に送達するために、本発明のペプチド又はコンジュゲートを用いる方法に関する。非限定的に、本発明の方法における、対象の任意の部分に送達する方法は、本発明のペプチドおよび任意のペプチドを含むコンジュゲートを製造し、前記ペプチドを対象に投与する工程を含む。投与対象や投与方法は、「医薬組成物」の項目に記載したのと同様で
25 ある。

他項目に記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

7. 試験方法

本発明はまた、ペプチド、又はその薬学的に許容される塩について

- a) 溶媒への溶解度
- b) C A 9 結合活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- d) 実験動物への毒性

5 の少なくとも1つを試験する、ペプチド又はその薬学的に許容される塩の試験方法であって、

前記ペプチド又はその薬学的に許容される塩は、本発明のペプチド、又はその薬学的に許容される塩である、

前記方法、に関する。

10 本発明はまた、コンジュゲートについて

- a) 溶媒への溶解度
- b) C A 9 結合活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- d) 実験動物への毒性

15 の少なくとも1つを試験する、コンジュゲートの試験方法であって、

前記コンジュゲートは、本発明のコンジュゲートである、

前記方法、に関する。

「溶媒への溶解度」は、公知の方法を用いて測定しうる。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。非限定的に、水、グリセロール、P B S、D M S Oなど公知の溶媒に対し、
20 ペプチド又はコンジュゲートを溶解させたときの溶解度であってよい。

「C A 9 結合活性」は、例えば、「2. ペプチド」等に記載したように測定しうる。

「細胞及び／又は組織への毒性」は、公知の方法を用いて測定しうる。例えば、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、*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。
25

「実験動物への毒性」は、公知の方法を用いて測定しうる。例えば、実験動物は、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（
5 例例えば、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。

また、上記の毒性についての評価試験は、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 v i t r o 小核試験）、がん原性試験、生殖発生毒性試験（I C H
10 - I、I I、I I I）、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（T K／P K）などが挙げられる。

他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

8. 併用、組合せ

15 本発明のペプチド又はコンジュゲートは、他のC A 9 関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤と併用されてもよい。一態様において、本発明は、前記ペプチド又はコンジュゲートと、他のC A 9 関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤との組み合わせ、に関する。

前記ペプチド又はコンジュゲートと、他のC A 9 関連疾患若しくは症状の予防又は
20 治療のための薬剤は、同時に投与されても、逐次投与されてもよい。好ましくは、前記ペプチド又はコンジュゲートと、他のC A 9 関連疾患若しくは症状の予防又は治療のための薬剤の双方の相加効果、好ましくは相乗効果が得られるように投与する。逐次投与する場合に、投与の順番は問わない。逐次投与する場合には、非限定的に、双方を2 時間以内、1 時間以内、3 0 分以内、2 0 分以内、1 5 分以内、1 0 分以内、
25 5 分以内に摂取するのが好ましい。

他項目で記載した事項は、特に言及しない限り、本項目にも適用される。

実施例

以下に本発明を、実施例により、さらに具体的に説明するが、本発明はもとよりこ

れに限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。なお、以下の参考例及び実施例において示された化合物名は、必ずしもIUPAC命名法に従うものではない。なお、記載の簡略化のために略語を使用することもあるが、これらの

5 略号は前記記載のとおりである。

化合物の化学合成において使用した原料、ビルディングブロック、試薬、酸、塩基、固相樹脂、及び溶媒は、市販品をそのまま用いたか、もしくは別途記載がある場合には有機化学的手法を用いて合成したものである。なお、保護基を含むアミノ酸は市販品のものをそのまま用いた。

10 ペプチド残基の数え方として、ClAc化されるアミノ酸残基を1残基目として数え、その後樹脂に向かって2残基目、3残基目として数えることとする。使用した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。

Fmoc-Ile-OH;

Fmoc-Ser(Trt)-OH;

15 Fmoc-Ser(tBu)-OH;

Fmoc-His(Boc)-OH;

Fmoc-Pro-OH;

Fmoc-Asp(OMpe)-OH;

Fmoc-Glu(tBu)-OH;

20 Fmoc-Y(tBu)-OH;

Fmoc-Gly-OH;

Fmoc-Cys(Trt)-OH;

Boc-Phe-OH;

Fmoc-Lys(Boc)-OH。

25 また、非天然アミノ酸については、以下のもの及び略語に記載のものを使用した。

Fmoc-da-OH;

Fmoc-de(tBu)-OH;

Fmoc-dgln(Trt)-OH;

- Fmoc-dhgl (tBu) -OH;
Fmoc-dkCOpipzaa (tBu) -OH;
Fmoc-Tbg-OH;
Fmoc-3Py6CON-OH;
5 Fmoc-3Py6NH₂ (Boc) -OH;
Fmoc-Hgl (tBu) -OH;
Fmoc-alT (tBu) -OH;
Fmoc-Hgn (Trt);
Fmoc-SMe-OH;
10 Fmoc-DacAc-OH;
Fmoc-KCOpipzaa (tBu) -OH;
Fmoc-N-Me-da-OH;
Fmoc-PeG-OH;
Fmoc-MeG-OH;
15 Fmoc-MedkCOpipzaa (tBu) -OH;
Fmoc-Ahp-OH;
Fmoc-pHPeG (tBu) -OH;
Fmoc-pMeOPeG-OH;
Fmoc-MsMeapG-OH;
20 Fmoc-3OMePeG-OH;
Fmoc-PpG-OH;
Fmoc-pFPeG-OH;
Fmoc-mCPeG-OH;
Fmoc-pCPeG-OH;
25 Fmoc-4HPpG-OH;
Fmoc-4OMePpG-OH;
Fmoc-4Py pG-OH;
Fmoc-4COOPeG (tBu) -OH;

- Fmoc-3COOPeG(tBu)-OH;
Fmoc-3FPeG-OH;
Fmoc-Hse(Trt)-OH;
Fmoc-P4Sh(tBu)-OH;
5 Fmoc-Qmm-OH;
Fmoc-Qdm-OH;
Fmoc-QPEG8Me-OH;
Fmoc-5Inda-OH;
Fmoc-F4OMe-OH;
10 Fmoc-HseMe-OH;
Fmoc-Acb-OH;
Fmoc-dkAc-OH;
Boc-df-OH;
Boc-dnle-OH;
15 Fmoc-t4amCh-OH;
Boc-Nle-OH;
Fmoc-N-Me-Cys(Trt)-OH;
Fmoc-N-Me-Ala-OH;
Fmoc-N-Me-Ser(Trt)-OH;
20 Fmoc-N-Me-Asn(Trt)-OH;
Fmoc-Hpr-OH;
Boc-PEG8c-OH;
Fmoc-PEG10c-OH;
Fmoc-dk(Boc)-OH;
25 Fmoc-dp-OH;
Fmoc-dyae(Boc)-OH;
Alloc-dk(Fmoc)-OH;
Boc-PEG8c-OH;

Fmoc-de (Allyl) -OH;

Fmoc-Hgl (Allyl) -OH;

Fmoc-dk (Allo) -OH;

Fmoc-Qglucamine (acetone) -OH.

- 5 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価イオン又は3価イオンとして高頻度で検出された。

実施例1 環状ペプチドの合成及びコンジュゲートの合成

- 化学合成されたペプチドの同定は、以下のいずれかの分析方法にて得られた保持時間により行った (検出: UV波長 225 nm、島津製作所' SPD-M20A')
- 15 。

分析条件A

- カラム: Kinetex (登録商標) EVO C18 2.6 μm, 2.1 ID x 150 mm, 100 Å
- 移動相: A=0.025% TFA 水中; B=0.025% TFA CH₃CN中
- 20 温度: 60°C
- 流速: 0.5 mL/分
- グラジエント: 20-60/7.15分, 60-95/0.3分。

分析条件B

- 25 カラム: Kinetex (登録商標) EVO C18 2.6 μm, 2.1 ID x 150 mm, 100 Å
- 移動相: A=0.025% TFA 水中; B=0.025% TFA CH₃CN中

温度： 60℃

流速： 0.5mL／分

グラジエント：5－45／7.15分、45－95／0.3分。

固相樹脂におけるペプチド鎖の伸長は、市販の樹脂を出発原料とし、Fmoc法に
5 て行った。具体的には、Sieber amide resin（渡辺化学工業株式
会社）を用い、Fmoc基の除去から開始し、各Fmocアミノ酸の導入とFmoc
基の脱保護を繰り返すことにより、目的のペプチドを合成した。その際、特に記載の
ない限り、ペプチド鎖の伸長は自動合成で行い、CEM社のLiberty Blue
e 又はLiberty blue HTを固相合成機として使用し、製造元のマニ
10 ュアルに従って合成を行った。各残基の導入に際しては、必要に応じてペプチドカッ
プリング反応を二回繰り返すダブルカップリングを行った。一方、一部アミノ酸の導
入は自動合成機より樹脂を取り出し、用時調製した試薬等を用いて反応を行った（マ
ニュアルカップリング）。

例えば、固相樹脂に担持された、脱Fmoc化されたペプチド鎖に対し、約4等量
15 のFmocアミノ酸、約8等量のDIC、及び約4等量のOxyma pureを加
え、下表に示すような反応条件のいずれかにて振盪する工程を1－2回行った後、樹
脂をDMFで洗浄することで行った。

[表2]

方法	温度 (℃)	時間(分)
1-1	90	3-15
1-2	75	10-30
1-3	25-50	15-60
1-4	105	2-10

Fmoc基の除去は例えば以下の方法に従って行った。固相樹脂に担持された、F
20 mocアミノ酸導入後のペプチド鎖に対し、下表のいずれかに示すような条件にて振
盪する工程を1－2回行った後、樹脂をDMFで洗浄することで行った。

[表 3]

方法	試薬	温度	時間
2-1	20%ピペリジンDMF溶液	50-90℃	1-5分
2-2	20%ピペリジンDMF溶液	室温	1-5分
2-3	4%ピロリジン/ 83 mM Oxyma Pure DMF溶液	110℃	1-5分
2-4	10-25%ピロリジンDMF溶液	50-90℃	1-5分
2-5	10-25%ピロリジンDMF溶液	室温	1-5分

- 上記の方法に従い、各Fmocアミノ酸の導入とFmoc基の脱保護を繰り返し、目的のペプチド鎖へと伸長したのち、クロロアセチル基の導入を行った。導入法は、下表のいずれかの方法である。前工程で得られたFmoc保護されたペプチドが保持
- 5 された固相樹脂に対し、Fmoc基を除去したのち、約5-10等量のクロロ酢酸、約5-10等量の縮合剤、及び約5-10等量の添加剤の下記溶媒を含む溶液を固相樹脂に加え、室温にて30分-60分振盪することにより行った。

[表 4]

方法	縮合剤	添加剤	溶媒
3-1	DIPCI(DIC)	HOSu	DMF/DCM
3-2	HATU	DIPEA	DMF
3-3	DIPCI	HOSu	DCM/NMP

- 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しは、クロロアセチル基導入後の樹脂に結合したペプチドに対し、下表のいずれかの反応剤カクテル(TFA/H₂O/TIS
- 10 /DODTの混合物)を加え、室温で30-120分振盪することにより行った。

[表 5]

方法	TFA/H ₂ O/TIS/DODT(v/v/v/v)
4-1	92.5/2.5/2.5/2.5
4-2	90/2.5/2.5/5

- その後、反応液をフリットより濾過回収し、濾液を、0℃に冷やした過剰のジイソプロピルエーテル或いはジイソプロピルエーテルとヘキサン又はジエチルエーテルとヘキサンの混合溶媒(例えば、1/1、v/v)に加えると、白濁沈殿が生じた。この沈殿物固体を得るために遠心分離を行い、上澄みをデカンテーションした。得られた固体を再度0℃に冷やした少量のジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。
- 15

上記で得られた固体をペプチド環状化反応に用いた。ペプチドの環化反応は、ペプ

チドの終濃度が使用した固相樹脂のモル数を基に4 mM－5 mMとなるようにDMS O又はDMS O／H₂ O、Me CN／H₂ O若しくはDMS O／Me CN／H₂ Oの混合溶媒に溶解後、5－3 5等量のトリエチルアミンを加えて、室温で2時間から終夜振盪した。得られた反応溶液は減圧濃縮後精製を行った。

5 得られた残渣は、逆相分取HPLCにて下表のいずれかの方法に従って精製を行った。

[表 6]

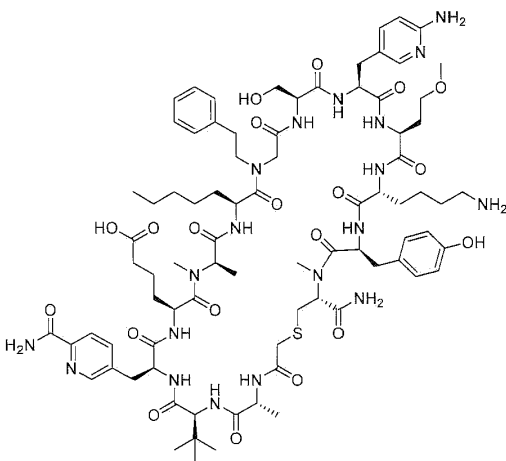
方法	カラム	移動相A	移動相B	温度	流速
P-A	Waters XBridge(登録商標)、C18 5 μm、50x150mm	0.1% TFA in H ₂ O	0.1% TFA in CH ₃ CN	40 °C	120 mL/min
P-B	Waters XBridge(登録商標)、C18 5 μm、30x150mm	0.1% TFA in H ₂ O	0.1% TFA in CH ₃ CN	40 °C	45 mL/min
P-C	Waters XBridge(登録商標)、C18 5 μm、50x250mm	0.1% TFA in H ₂ O	0.1% TFA in CH ₃ CN	50 °C	120 mL/min
P-D	Waters XSelect(登録商標)、C18 5 μm、50x150mm	0.1% TFA in H ₂ O	0.1% TFA in CH ₃ CN	40 °C	120 mL/min

以下、合成したペプチド及びコンジュゲートの具体的な構造等を示す。

実施例 1－1～実施例 1－3 は、ペプチドの合成に関する。

10 実施例 1－1 ペプチドSEQ ID No. 45. の合成

[化 5]



Sieber amide resin (渡辺化学、0.60mmol/g、1.

67 g) を用い、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。

固相樹脂上のFmocの除去のために、10%ピロリジン(DMF中)を用い、75℃下、3分間1回反応を行った。

- 5 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA(DMF中) / 1.0M DIC(DMF中) / 0.5M Oxyma pure(DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量)を用い75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、3残基目、9残基目は0.21M Fmoc-AA(NMP中) / 1.0M DIC(DMF中) / 0.5M Oxyma pure(DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量)を用い、4残基目、6残基目については、75℃下、20分間2回反応を行った。12残基目については75℃下、30分間2回反応を行った。13残基目については、50℃下、30分間1回反応を行った。
- 10

- 各残基導入後にFmoc基除去のために、Fmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、4%ピロリジン+83mM/Oxyma pure(DMF中)を用い、75℃下、3分間1回反応を行った。4残基目については、10%ピロリジンのDMF溶液を用い、室温下で5分間2回反応させた。6残基目、12残基目については、10%ピロリジンのDMF溶液を用い、室温下で5分間1回、10分間1回反応させた。
- 15

- 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溶液を、75℃下で3分間1回反応させることにより、 α -アミノ基のFmoc基を除去した。これをさらに、1.0M ClAcNHS(DMF中、10当量)と室温で60分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。
- 20

- 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、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、ジエチルエーテルで1回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂をおよそ半分に分け反応容器に、それぞれ反応剤カクテル(10mL、TFA/H₂O/TIS/DODTの体積比92.5/2.5/2.5/2.5の混合物)を加え、室温で40分間振盪した。反応液をフリットより濾
- 25

過回収した。反応容器に残った固相樹脂を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4分割しそれぞれ40 mL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、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度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（ペプチド）をまとめて次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5 mMとなるように水／アセトニトリル（1／1）に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で60分間攪拌することにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液に酢酸を加えることで反応を停止し、反応溶液をGenevac EZ-10 Eliteを用いて減圧濃縮した。

得られた粗生成物を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 250 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて4.2→0.0%、4.9分間かけて0.0→0.0%、2分間かけて0.0→4.2%、3分間かけて4.2→28.6%、15分間かけて28.6→33.7%、3分間かけて33.7→60%；流量：0.1分間かけて118→18 mL／分、4.9分間かけて18→18 mL／分、2分間かけて18→118 mL／分、その後118 mL／分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

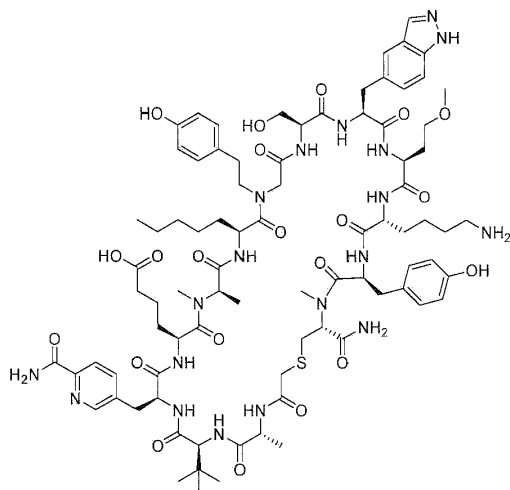
20 分析条件のLC／MS（UV波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.7%であった。

分析条件A：保持時間＝2.86分

ESI-MS（+） 観測値 m/z ＝862.37（ $M+2H$ ）²⁺

実施例1-2 ペプチドSEQ ID No. 46の合成

[化6]



Sieber amide resin (渡辺化学、0.60mmol/g、1.67g)を用い、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。

固相樹脂上のFmocの除去のために、10%ピロリジン(DMF中)を用い、75℃下、3分間1回反応を行った。

各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA(DMF中) / 0.5M HATU(DMF中) / 1.0M DIPEA(DMF中)(4.2当量 / 4当量 / 8当量)を用い75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、3残基目、9残基目は0.21M Fmoc-AA(NMP中) / 0.5M HATU(DMF中) / 1.0M DIPEA(DMF中)(4.2当量 / 4当量 / 8当量)を用い、4残基目、6残基目、12残基目については、75℃下、10分間2回反応を行った。13残基目については、40℃下、30分間1回反応を行った。

各残基導入後にFmoc基除去のために、Fmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、4%ピロリジン+83mM/Oxyma pure(DMF中)を用い、75℃下、3分間1回反応を行った。4残基目、6残基目、12残基目については、10%ピロリジンのDMF溶液を用い、室温下で5分間2回反応させた。

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溶液を、75℃下で3分間1回反応させることにより、 α -ア

ミノ基のFmoc基を除去した。これをさらに、0.25M ClAcNHS (DMF中、5当量)と室温で60分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。

側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、まずクロロアセチル基導入工程
5 後に得られた樹脂をDMF、塩化メチレン、ジエチルエーテルで1回洗浄した後、減
圧下乾燥した。続いて固相樹脂をおよそ半分に分け反応容器に、それぞれ反応剤カク
テル(20mL、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30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を切り出し用カクテルと再度振盪し、フリッ
10 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8分割し40mL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、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度ジエ
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(ペプチド)をまとめて
次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に2.5mM
15 となるように水/アセトニトリル(1/1)に溶解し、次いで、10当量のトリエチ
ルアミンを加えて、室温で16時間攪拌することにより、ペプチドの環化反応を行っ
た。反応溶液に酢酸を加えることで反応を停止し、反応溶液をGenevac HT
-12を用いて減圧濃縮した。

得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した(カラム:Waters XSe
20 lect(登録商標)、C18 5μm、50x150mm;移動相:A=0.1%
TFA(水中)、B=0.1% TFA(MeCN中);温度:40℃;グラジエント
(%B):2分間かけて5.0-5.0%、1分間かけて5.0-25.0%、8分間
かけて25.0-30.0%、1分間かけて30.0-60.0%;流量:1分間か
けて20-20mL/分、1分間かけて20-120mL/分、その後120mL/
25 分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

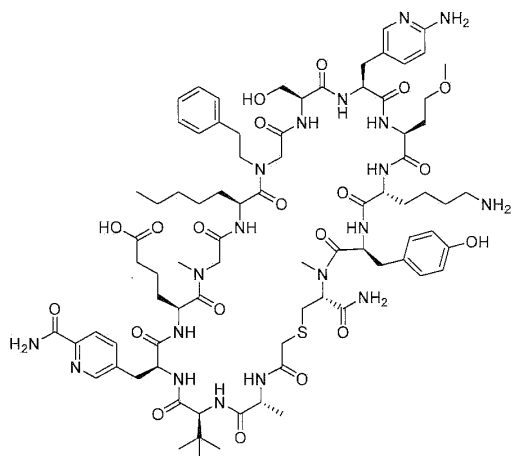
分析条件のLC/MS(UV波長 225nm)クロマトグラムの面積比から、目
的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.3%であった。

分析条件A:保持時間=3.30分

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 882.36$ ($M + 2H$) $^{2+}$

実施例 1 - 3 ペプチド SEQ ID No. 47 の合成

[化 7]



- 5 Sieber amide resin (渡辺化学、0.57mmol/g、0.53g) を用い、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。
- 固相樹脂上のFmocの除去のために、10%ピロリジン (DMF中) を用い、110℃下、1分間1回反応を行った。
- 10 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA (DMF中) / 2.0M DIC (DMF中) / 0.25M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量/8当量/4当量) を用い105℃下、2分間1回反応を行った。ただし、3残基目、9残基目は0.21M Fmoc-AA (NMP中) / 2.0M DIC (DMF中) / 0.25M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量/8
- 15 当量/4当量) を用い、4残基目については105℃下、3分間2回反応を行った。また、6残基目、12残基目については、90℃下、10分間2回反応を行い、13残基目については、40℃下、30分間1回反応を行った。

各残基導入後にFmoc基除去のために、Fmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、4%ピロリジン+83mM/Oxyma pure (DMF中)

20 を用い、110℃下、3分間1回反応を行った。4残基目、6残基目、12残基目に

については、10%ピロリジンのDMF溶液を用い、室温下で1分間2回反応させた。

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、4%ピロリジン/83mM/Oxyma Pure DMF溶液を、110℃下で1分間1回反応させることにより、 α -アミノ基のFmoc基を除去した。これをさらに、

5 0.1M ClAcOH (DMF中) / 0.1M HATU (DMF中) / 0.2M DIEA (DMF中) (5当量/5当量/10当量) と25℃下、30分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。

側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、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、ジエチルエーテルで1回洗浄した後、減

10 圧下乾燥した。続いて固相樹脂の入った反応容器に、それぞれ反応剤カクテル (14 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を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3分割しそれぞれ40mLのジイソ

15 プロピルエーテル/ヘキサン (1/1) の混合溶媒に加えると、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度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 (ペプチド) をまとめて次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5mMとなるように水/DMSO (1/9) に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で終夜攪拌することにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液に酢酸を加えることで反応を停止し、反応溶液をGenevac HT-12を用いて減圧濃縮した。

得られた粗生成物を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%

25 TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 40℃; グラジエント (%B): 2分間かけて5.0-5.0%、1分間かけて5.0-27%、8分間かけて27-32%、1分間かけて32-60%; 流量: 1分間かけて20-20mL/分、1分間かけて20-120mL/分、その後120mL/分)。目的物を含む区

分を集めて凍結乾燥後再度精製した（カラム：Waters XSelect（登録商標） C18 5 μ m 30 x 150mm；移動相：A=1.0% AcOH（水中）、B=1.0% AcOH（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて2.0-19%、8分間かけて19-24%、1分間かけて24-60%；流量：45 mL／分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

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、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.6%であった。

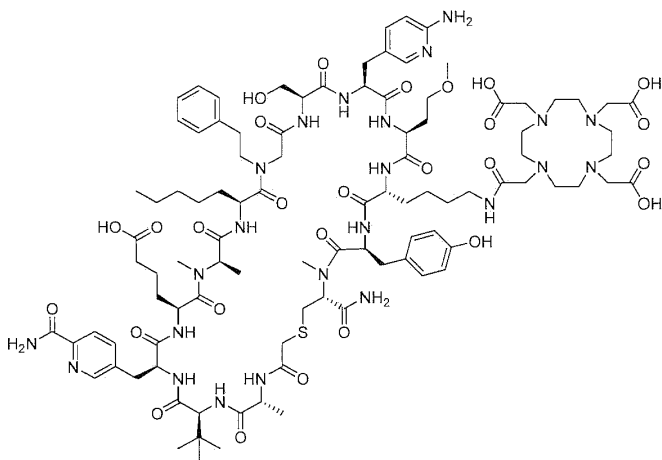
分析条件B：保持時間=5.71分

10 E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 855.30$ $(M + 2H)^{2+}$

実施例 1-4～実施例 1-16 は、コンジュゲートの合成に関する。

実施例1-4 コンジュゲート Conjugate No. 64の合成

[化8]



15 DMF (4.84 mL) に、実施例 1-1 で合成したペプチド SEQ ID No.
45 (配列: C l A c - d a - T b g - 3 P y 6 C O N - H g l - M e d a - A h
p - P e G - S - 3 P y 6 N H 2 - H s e M e - d k - Y - M e C) (200 mg)、
D I E A (225 mg) を溶解させた後、氷冷下、D O T A - N H S エステル ヘキ
20 サフルオロホスファートトリフルオロアセタート (147 mg) を加えた。反応混合
物を室温で90分間攪拌した。

得られた反応混合物を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 30 x 150 mm；移動相：A=0.1 % TFA（水中）、B=0.1 % TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて4.0-0.0%、4.9分間かけて0.0-0.0%、1分間かけて0.0-4.0%、3分間かけて4.0-28.5%、9分間かけて28.5-33.6%、1分間かけて33.6-60%；流量：0.1分間かけて44-9 mL/分、4.9分間かけて9-9 mL/分、1分間かけて9-44 mL/分、その後44 mL/分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

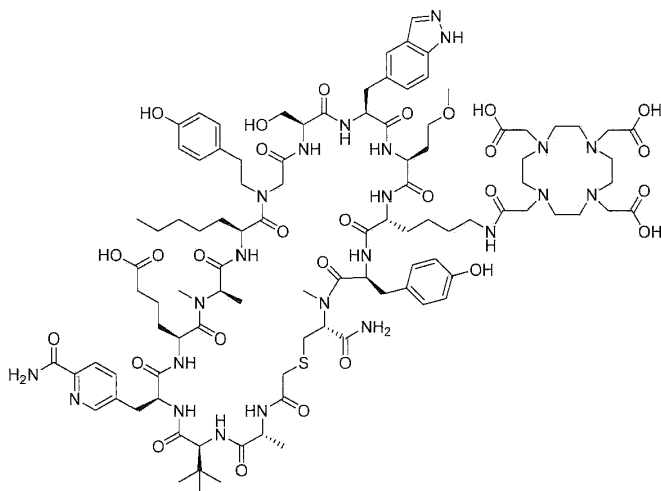
10 分析条件のLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、97.3%であった。

分析条件B：保持時間=5.74分

ES I-MS (+) 観測値 $m/z = 704.13$ $(M+3H)^{3+}$

実施例1-5 コンジュゲート Conjugate No. 62の合成

15 [化9]



DMF (2.5 mL) に、実施例 1-2 で合成したペプチド SEQ ID No. 46 (配列: ClAc-d a-T b g-3 P y 6 CON-H g l-M e d a-A h p-p H P e G-S-5 I n d a-H s e M e-d k-Y-M e C) (100 mg) と 20 DIEA (117 mg) を溶解させた後、氷冷下、DOTA-NHS エステル ヘキ

サフルオロホスファートトリフルオロアセタート（7.6 mg）を加えた。反応混合物を室温で120分間攪拌した。

得られた反応混合物を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 250 mm；移動相：A=0.1 % TFA（水中）、B=0.1 % TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて4.2-0.0%、4.9分間かけて0.0-0.0%、2分間かけて0.0-4.2%、3分間かけて4.2-25.6%、15分間かけて25.6-30.7%、3分間かけて30.7-60%；流量：0.1分間かけて118-18 mL/分、4.9分間かけて18-18 mL/分、2分間かけて18-118 mL/分、その後118 mL/分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

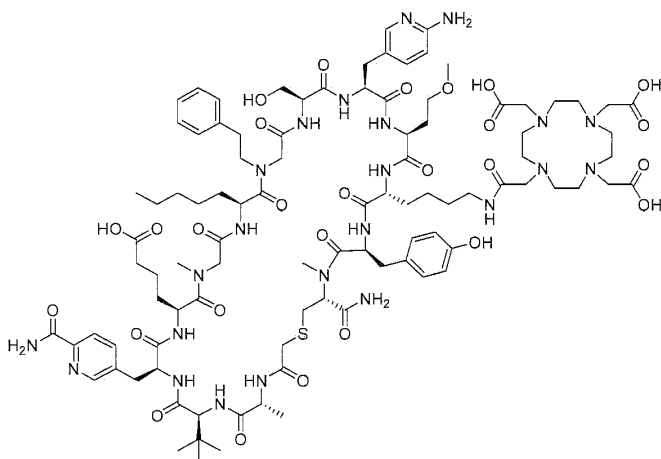
分析条件のLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.6%であった。

分析条件A：保持時間=3. 27分

15 E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 717.38$ (M + 3H)³⁺

実施例1-6 コンジュゲート Conjugate No. 65の合成

[化 1 0]



水 (3. 3mL) に、DOTA (0. 42 g、CAS : 6 0 2 3 9 - 1 8 - 1)、D
20 IEA (0. 1 4 g)、N-ヒドロキシコハク酸イミド (0. 0 8 g、CAS : 6 0 6

6-82-6)を溶解させた後、氷冷下、水(1.9 mL)に溶解させた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(0.13 g、CAS: 25952-53-8)を加えた。反応混合物を氷冷下30分間攪拌した。

DMF(561 μ L)に、実施例1-3で合成したペプチドSEQ ID No. 47(配列: ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-MeG-Ahp-PeG-S-3Py6NH₂-HseMe-dk-Y-MeC)(23 mg)、DIEA(13.0 mg)を溶解させた後、氷冷下、上記で調製した溶液(561 μ L)を加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応溶液にDIEA(13.0 mg)を加え1時間攪拌し反応をクエンチした。

10 得られた反応混合物を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 19 x 150 mm; 移動相: A=0.1% TFA(水中)、B=0.1% TFA(MeCN中); 温度: 50°C; グラジエント(%B): 3分間かけて5.0-28%、8分間かけて28-33%、1分間かけて33-60%; 流量: 17 mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的の
15 ペプチドを得た。

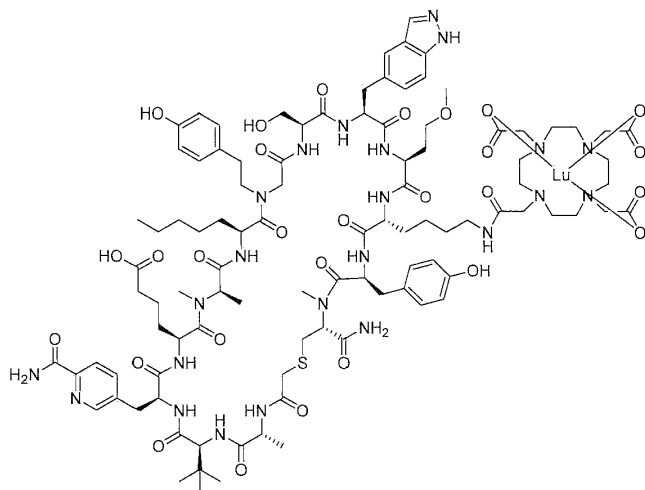
分析条件のLC/MS(UV波長 225 nm)クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、97.6%であった。

分析条件A: 保持時間=3.14分

ESI-MS(+) 観測値m/z=699.33 (M+3H)³⁺

20 実施例1-7 コンジュゲート Conjugate No. 26の合成

[化11]



水（7.2 mL）に、DOTA（0.79 g、CAS：60239-18-1）、DIEA（0.34 mL）、N-ヒドロキシコハク酸イミド（0.15 g、CAS：6066-82-6）を溶解させた後、氷冷下、水（4.17 mL）に溶解させた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（0.25 g、CAS：25952-53-8）を加えた。反応混合物を氷冷下60分間攪拌した。

DMF（1.00 mL）に、実施例1-2で合成したペプチドSEQ ID No. 46（配列：ClAc-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeC）（40 mg）とDIEA（31.6 μ L）を溶解させた後、氷冷下、上記で調製した溶液（1004 μ L）を加えた。反応混合物を室温で60分間攪拌した。反応混合物にDIEA（31.6 μ L）を加え、室温で60分間攪拌した。反応混合物に塩化ルテチウム（III）六水和物（86.0 mg、CAS：15230-79-2）、酢酸アンモニウム（17 mg、CAS：631-61-8）を溶解させた水（4420 μ L）を加えた。反応混合物を90℃で1時間攪拌した。

得られた反応混合物を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 30 x 150 mm；移動相：A=1.0 % AcOH（水中）、B=1.0 % AcOH（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：3分間かけて5.0-27%、8分間かけて27-32%、1分間

かけて32-60%；流量：45mL／分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

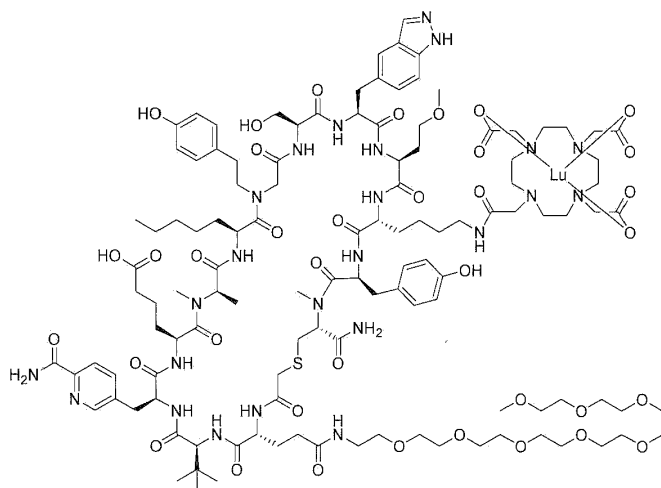
分析条件のLC／MS（UV波長 225nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.4%であった。

5 分析条件A：保持時間＝3.48分

ESI-MS（+） 観測値 $m/z = 774.79$ ($M+3H$)³⁺

実施例1-8 コンジュゲート Conjugate No. 51の合成

[化12]



10 Sieber amide resin（渡辺化学、0.60mmol／g、0.584g）を用い、目的のペプチド（配列：ClAc-de（PEG8Me）-Tb
g-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-H
seMe-dk-Y-MeC）（配列番号55）を合成した。その際、CEM社のLi
15 berty 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。

固相樹脂上のFmocの除去のために、10%ピロリジン（DMF中）を用い、90℃下、1分間1回反応を行った。

各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA（DMF中）／1.0M DIC（DMF中）／0.5M Oxyma pure（DMF中）（

20 4.2当量／8当量／4当量）を用い90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、

3残基目は0.21M Fmoc-AA (NMP中) / 1.0M DIC (DMF中) / 0.5M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用い、4残基目、6残基目、12残基目については、90℃下、10分間2回反応を行った。13残基目については、40℃下、30分間1回反応を行った。1残基目は
5 Fmoc-de (Allyl) -OHを用いた。得られた固相樹脂を0.19M Fmoc-OSu (DMF中、5当量) と室温で1時間振盪後、DMFで洗浄した。1残基目側鎖の脱保護は樹脂1当量に対し、テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) (CAS: 14221-01-3) / フェニルシラン (CAS: 694-53-1) (0.2当量 / 10当量) を用いDCM (15mL) 中で室温下、60分
10 間1回反応を行った。側鎖からの伸長反応はAllylを脱保護した後、DCM、DMFで洗浄後、得られた樹脂1当量に対し、H-PEG8Me / DIC / Oxyma pure (4.2当量 / 8当量 / 4当量) を用いてDMF (13mL) 中で、75℃下、30分間1回反応を行った。

各残基導入後にFmoc基除去のために、Fmoc保護されたペプチドが保持された固相樹脂に対し、4%ピロリジン+83mM / Oxyma pure (DMF中)
15 を用い、90℃下、1分間1回反応を行った。4残基目、6残基目、12残基目については、10%ピロリジンのDMF溶液を用い、室温下で1分間2回反応させた。

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溶液を、室温下で1分間2回反応させることにより、 α -アミノ基のFmoc基を除去した。これをさらに、0.19M ClAcNHS (DMF
20 中、5当量) と室温で60分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。

側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、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、ジエチルエーテルで1回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて反応容器に、反応剤カクテル (16mL、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
25 で30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を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3分割しそれぞれ40mL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、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度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（ペプチド）をまとめて次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に3.0 mM
5 となるように水／アセトニトリル（1／1）に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で15時間攪拌することにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液に酢酸を加えることで反応を停止し、反応溶液をGenevac EZ-II eliteを用いて減圧濃縮した。

得られた粗生成物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XSelect
10 lect（登録商標） C18 5 μ m 50 x 250 mm；移動相：A=1.0% AcOH（水中）、B=1.0% AcOH（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：5.1分間かけて0-0%、1.9分間かけて0-4.2%、3分間かけて4.2-25.6%、15.5分間かけて25.6-30.7%、1.5分間かけて30.7-60%、4分間かけて60-90%；流量：8分間かけて18-1
15 8 mL／分、2分間かけて18-118 mL／分、その後118 mL／分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し環状ペプチドを得た。

得られた環状ペプチドを原料とし、実施例1-7と同様の反応条件及び精製条件に付すことで目的のペプチドを得た。

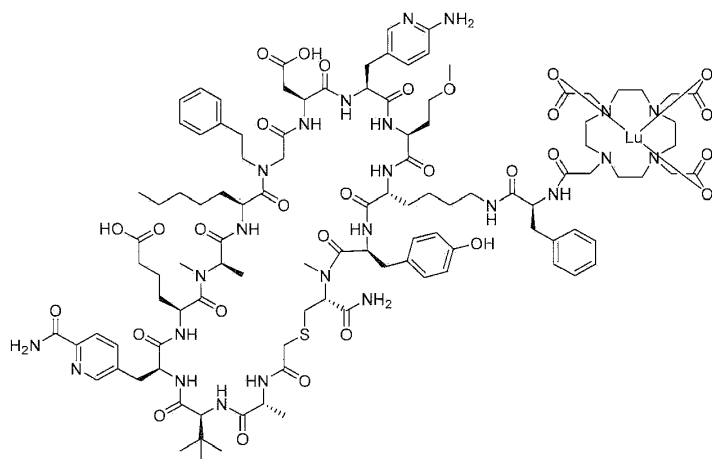
分析条件のLC／MS（UV波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、98.5%であった。
20

分析条件A：保持時間=4.12分

ESI-MS（+） 観測値 m/z =915.83 ($M+3H$)³⁺

実施例1-9 コンジュゲート Conjugate No. 35の合成

[化13]



Sieber amide resin (渡辺化学、0.54mmol/g、1.39g)を用い、目的のペプチド（配列：ClAc-da-Tbg-3Py6CONH-g1-Meda-Ahp-PeG-D-3Py6NH₂-HseMe-dk(F)-Y-MeC)（配列番号56）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。

固相樹脂上のFmocの除去のために、10%ピロリジン（DMF中）を用い、75℃下、3分間1回反応を行った。

- 10 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA（DMF中）／1.0M DIC（DMF中）／0.5M Oxyma pure（DMF中）（4.2当量／8当量／4当量）を用い75℃下、10分間1回反応を行った。ただし、3残基目は0.21M Fmoc-AA（NMP中）／1.0M DIC（DMF中）／0.5M Oxyma pure（DMF中）を用い、9残基目は0.21M
- 15 Fmoc-AA（NMP中）／0.5M HATU（DMF中）／1.0M DIEA（DMF中）（4.2当量／4当量／8当量）を用いた。3残基目については、75℃下、30分間1回反応を行った。4残基目、6残基目、12残基目については、75℃下、10分間2回反応を行った。13残基目については、50℃下、15分間1回反応を行った。11残基目はFmoc-dk（Alloc）-OHを用いた。得
- 20 られた固相樹脂を0.38M Fmoc-OSu（DMF中、5当量）と室温で1時

間振盪後、DMFで洗浄した。11残基目側鎖の脱保護は樹脂1当量に対し、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（CAS：14221-01-3）／フェニルシラン（CAS：694-53-1）（0.2当量／10当量）を用いDCM／HFIP（30mL／0.3mL）中で室温下、60分間1回反応を行った。側鎖からの伸長反応はAllocを脱保護した後、DCM、DMFで洗浄後、得られた樹脂1当量に対し、Boc-F-OH／HATU／DIEA（4.2当量／4当量／8当量）を用いてDMF（10mL）中で、75℃下、30分間1回反応を行った。

各残基導入後にFmoc基除去のために、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（DMF中）を用い、室温下、5分間2回反応を行った。9残基目、10残基目、11残基目、12残基目、13残基目について、4％ピロリジン＋83mM／Oxyma pure（DMF中）を用い、75℃下、3分間1回反応を行った。

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％ピペリジンのDMF溶液を、室温下で1分間1回反応させることにより、 α -アミノ基のFmoc基を除去した。これをさらに、0.25M ClAcNHS（DMF中、10当量）と室温で60分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。

側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、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、ジエチルエーテルで1回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて固相樹脂を三分割し反応容器に、それぞれ反応剤カクテル（12mL、TFA／H₂O／TIS／DODTの体積比92.5／2.5／2.5／2.5の混合物）を加え、室温で40分間振盪した。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を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2分割し30mL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、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度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（ペプチド）をまとめて次の環化反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5.0mM

となるようにDMSO／水／アセトニトリル（1／2／2）に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で1時間攪拌することにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液に酢酸を加えることで反応を停止し、反応溶液をGenevac EZ-II eliteを用いて減圧濃縮した。

- 5 得られた粗生成物を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 250 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：0.1分間かけて5.3-1.1%、4.9分間かけて1.1-1.1%、2分間かけて1.1-5.3%、3分間かけて5.3-30.7%、15分間かけて30.7-35.8%、3分間かけて35.8-60%；流量：0.1分間かけて118-18 mL／分、4.9分間かけて18-18 mL／分、2分間かけて18-118 mL／分、その後118 mL／分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し環状ペプチドを得た。
- 10

- 得られた環状ペプチドを原料とし、実施例1-7と同様の反応条件及び精製条件に付すことで目的のペプチドを得た。
- 15

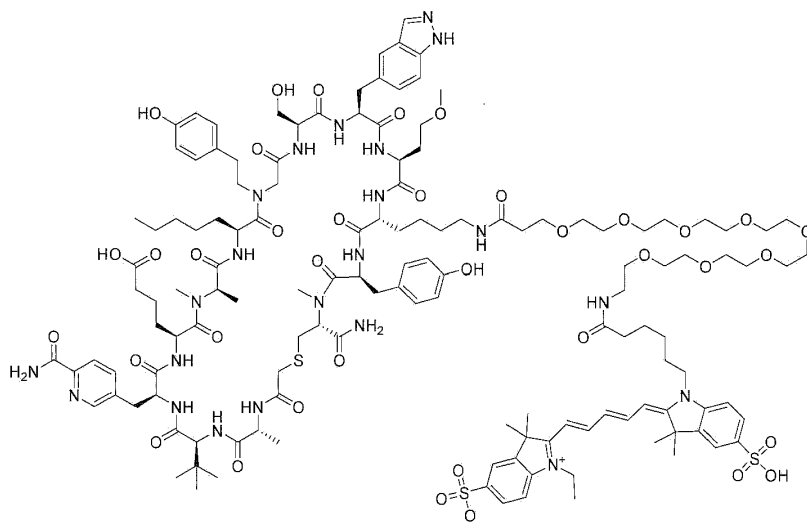
分析条件のLC／MS（UV波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、98.7%であった。

分析条件A：保持時間=3.79分

ESI-MS（+） 観測値 m/z =819.85（M+3H）³⁺

- 20 実施例1-10 コンジュゲート Conjugate No. 38の合成

[化14]



Sieber amide resin (渡辺化学、0.60mmol/g、0.21g)を用い、目的のペプチド（配列：ClAc-da-Tbg-3Py6CON
 5 -Hgl-Meda-Ahp-pHPEG-S-5Inda-HseMe-dk (PEG8c)-Y-MeC)（配列番号57）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。

固相樹脂上のFmocの除去のために、10%ピロリジン（DMF中）を用い、9
 10 0℃下、1分間1回反応を行った。

各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fmoc-AA（DMF中）／1.0M DIC（DMF中）／0.5M Oxyma pure（DMF中）（
 4.2当量／8当量／4当量）を用い90℃下、3分間1回反応を行った。ただし、
 11残基目はAlloc-dk（Fmoc）-OHを用いた。13残基目から11残
 15 基目まで伸長し、側鎖Fmoc基を除去後、側鎖からの伸長反応については、Boc-PEG8c-OHを用いた。主鎖Alloc基の脱保護は樹脂1当量に対し、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（CAS：14221-01-3）／ジメチルアミンボラン（CAS：74-94-2）（0.2当量／10当量）を用いDCM/HFIP（5mL／0.1mL）中で室温下、60分間1回反応を行った

。得られた固相樹脂に対し、続く伸長反応を行った。ただし、9残基目は0.21M Fmoc-AA (NMP中) / 1.0M DIC (DMF中) / 0.5M Oxyma pure (DMF中) (4.2当量/8当量/4当量) を用い、4残基目、6残基目、7残基目、12残基目については、90℃下、10分間2回反応を行った。15 3残基目については、40℃下、20分間1回反応を行った。

各残基導入後にFmoc基除去のために、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 (DMF中) を用い、室温下、1分間2回反応を行った。10残基目、11残基目側鎖について、4%ピロリジン+83mM/Oxyma pure (DMF中) を用い、90℃下、1分間1回反応を行った。

10 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溶液を、室温下で1分間2回反応させることにより、 α -アミノ基のFmoc基を除去した。これをさらに、0.16M ClAcNHS (DMF/DCM=1/1中、5当量) と室温で60分間振盪することにより、クロロアセチル基を導入した。

15 側鎖の脱保護及び固相樹脂からの切り出しのため、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、ジエチルエーテルで1回洗浄した後、減圧下乾燥した。続いて反応容器に、反応剤カクテル (3mL、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120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を20 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35mL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、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度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 (ペプチド) を次の環化25 反応に用いた。ペプチドをその終濃度が固相樹脂のモル数を基に5.0mMとなるように水/アセトニトリル (1/1) に溶解し、次いで、10当量のトリエチルアミンを加えて、室温で1時間攪拌することにより、ペプチドの環化反応を行った。反応溶液に酢酸を加えることで反応を停止し、反応溶液をGenevac EZ-II e

liteを用いて減圧濃縮した。

得られた残渣にその終濃度が固相樹脂のモル数を基に25mMとなるようにDMSO/水(9/1)に溶解し、ついでDIEA/SulfoCy5-NHSエステル(5当量/1.2当量)を加えて、室温で1時間攪拌した。反応溶液に酢酸を加えるこ
5 とで反応を停止した。

得られた反応混合物を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、19x150mm;移動相:A=0.1% TFA(水中)、B=0.1% TFA(MeCN中);温度:60℃;グラジエント(%B):3分間かけて12-37%、8分間かけて37-42%、1分間かけて4
10 2-60%;流量:17mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

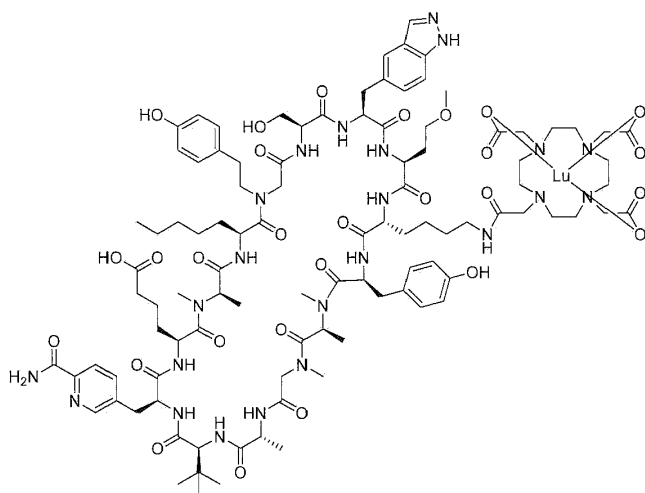
分析条件のLC/MS(UV波長 225nm)クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.0%であった。

分析条件A:保持時間=5.12分

15 ESI-MS(+) 観測値m/z=942.68 (M+3H)³⁺

実施例1-11 コンジュゲート Conjugate No. 67の合成

[化15]



H-Ser(tBu)-Trt(2-Cl) resin(渡辺化学、0.78m
20 mol/g、1.28g)を用い、目的のペプチド(配列:da-Tbg-3Py6

CON-Hg l-Me d a-A h p-p H P e G-S-5 I n d a-H s e M e-d
k-Y-Me A-Me G) (配列番号 58) を合成した。その際、CEM社のL i b e
r t y 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。

- 5 各残基の導入のため、樹脂1当量に対し、0.21M Fm o c-AA (DMF中)
/0.5M HATU (DMF中)/1.0M D I P E A (DMF中) (4.2当
量/4当量/8当量)を用い室温下、30分間1回反応を行った。ただし、3残基目
は0.21M Fm o c-AA (NMP中)/0.5M HATU (DMF中)/1
10 1M D I P E A (DMF中) (4.2当量/4当量/8当量)、9残基目は0.2
1M Fm o c-AA (NMP中)/1.0M D I C (DMF中)/0.5M O
x y m a p u r e (DMF中) (4.2当量/8当量/4当量)を用い、4残基目、
6残基目、7残基目、12残基目については、室温下、30分間2回反応を行った。
9残基目については、室温下、60分間1回反応を行った。13残基目については、
室温下、60分間2回反応を行った。
- 15 各残基導入後にFm o c基除去のために、Fm o c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 (DMF中)を用い、室温下、5分間2回反応
を行った。1残基目について、10%ピロリジン (DMF中)を用い、室温下、1分
間2回反応を行った。
- 固相樹脂からの切り出しのために、反応剤カクテルHF I P/DCM (9mL、1
20 /4)を加え、室温で60分間振盪した。反応混合物をG e n e v a c E Z-I I
e l i t eを用いて減圧濃縮した。残渣にジイソプロピルエーテルを加えることで
固化させ、遠心分離後、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度ジエチル
エーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。得られた残渣にその終濃度が固相樹脂のモ
ル数を基に5mMとなるようにDMFに溶解し、ついでD I E A/HATU (5当量
25 /1.2当量)を加えて、室温で1時間攪拌した。反応溶液に酢酸を加えることで反
応を停止した。反応混合物をG e n e v a c H T-12を用いて減圧濃縮した。得
られた残渣に、反応剤カクテル (T F A/H₂O/T I Sの体積比95/2.5/2
.5の混合物)を加え、室温で40分間振盪した。反応混合物に40mLのジイソプ

ロピルエーテルを加えると、沈殿が生じた。

この混合物を遠心分離し、溶液をデカンテーションした。得られた固体を再度ジエチルエーテルにて洗浄後、減圧下乾燥させた。

得られた残渣を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XSelect
5 ct（登録商標） C18 5 μ m 50 x 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて5-5%、1分間かけて5-27%、8分間かけて27-32%、1分間かけて32-60%；流量：1分間かけて20-20 mL/分、1分間かけて20-120 mL/分、その後120 mL/分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥した。

得られた環状ペプチドを原料とし、実施例1-7と同様の反応条件及び精製条件に付すことで目的のペプチドを得た。

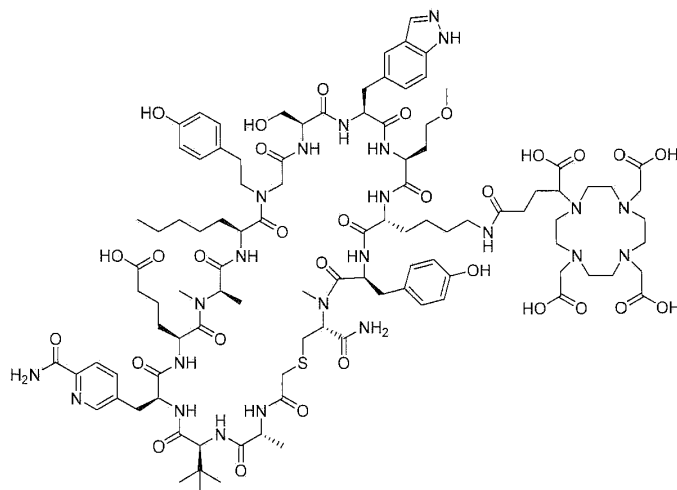
分析条件のLC/MS（UV波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.7%であった。

15 分析条件A：保持時間=4.27分

ESI-MS（+） 観測値 m/z = 768.69（M+3H）³⁺

実施例1-12 コンジュゲート Conjugate No. 56の合成

[化16]



20 DMSO（0.50 mL）に、実施例1-2で合成したペプチドSEQ ID N

o. 46 (配列: ClAc-d a-T b g-3 P y 6 CON-H g l-M e d a-A
h p-p H P e G-S-5 I n d a-H s e M e-d k-Y-M e C) (20 mg) と
D I E A (26.3 μ L) を溶解させた後、室温下、2, 2', 2''-(10-(2
5 ラアザシクロデカン-1, 4, 7-トリイル)三酢酸 (8.1 mg、CAS: 13
75475-53-8) を加えた。反応混合物を室温で5時間攪拌した。

得られた反応混合物を以下の条件を用いて精製した (カラム: Waters X B
r i d g e (登録商標) C18 5 μ m 19 x 150 mm; 移動相: A=0.1
% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 50°C; グラジエ
10 ント (%B): 3分間かけて5.0-27%、8分間かけて27-32%、1分間かけ
て32-60%; 流量: 1.7 mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的の
ペプチドを得た。

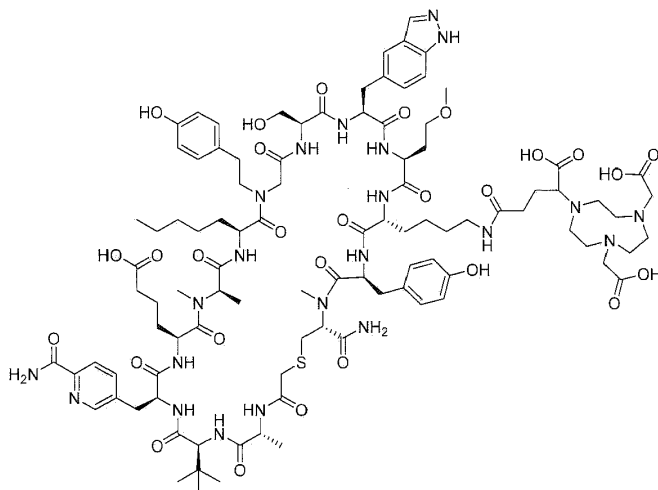
分析条件のLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目
的物の純度を算出した。目的物の純度は、97.8%であった。

15 分析条件A: 保持時間=3.40分

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 741.40$ ($M+3H$)³⁺

実施例1-13 コンジュゲート Conjugate No. 58の合成

[化17]



20 DMSO (0.50 mL) に、実施例1-2で合成したペプチドSEQ ID N

o. 46 (配列: C1Ac-d a-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk-Y-MeC) (20mg) と DIEA (26.3 μ L) を溶解させた後、室温下、2, 2'-(7-(1-カルボキシ-4-((2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-4-オキソブチル

5) -1, 4, 7-トリアゾナン-1, 4-ジイル) 二酢酸 (14mg, CAS: 1407166-70-4) を加えた。反応混合物を室温で7時間攪拌した。

得られた反応混合物を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 19x150mm; 移動相: A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 50°C; グラジエ

10ント (%B): 3分間かけて5.0-28%, 8分間かけて28-33%, 1分間かけて33-60%; 流量: 17mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

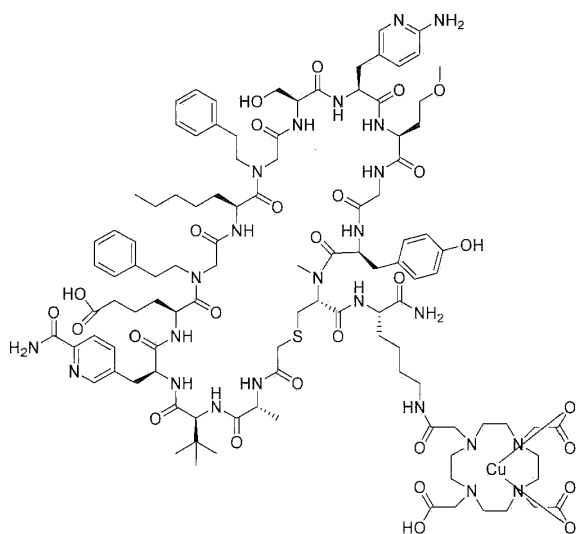
分析条件のLC/MS (UV波長 225nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.4%であった。

15 分析条件A: 保持時間=3.70分

ESI-MS (+) 観測値 m/z =1060.97 ($M+2H$)²⁺

実施例1-14 コンジュゲート Conjugate No. 21の合成

[化18]



DMF (0.40 mL) に、実施例 1-4 と同様の合成法により得られたコンジュゲート Conjugate No. 2 (10 mg) を溶解させ、塩化銅 (II) 二水和物 (0.90 mg、CAS: 10125-13-0) と 100 mM の酢酸アンモニウム水溶液 (0.20 mL) を溶解させた。反応混合物を 40℃ 下で 60 分間攪拌した。

得られた反応混合物を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 30 x 150 mm; 移動相: A=1.0% AcOH (水中)、B=1.0% AcOH (MeCN 中); 温度: 40℃; グラジエント (%B): 3 分間かけて 6.0-31%、8 分間かけて 31-36%、1 分間かけて 36-60%; 流量: 45 mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

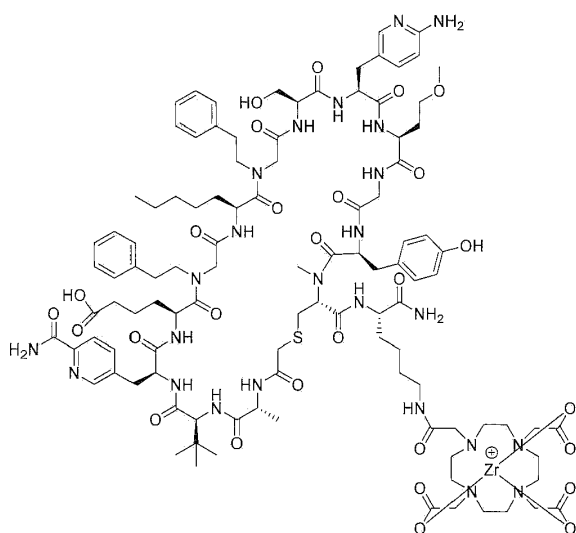
分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、97.7% であった。

分析条件 A: 保持時間 = 4.32 分

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 768.95$ ($M+3H$)³⁺

実施例 1-15 コンジュゲート Conjugate No. 22 の合成

[化 19]



DMF (0.40 mL) に、実施例 1-1 と同様の合成法により得られた環状ペプ

チド（配列：C1Ac-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-PeG-Ahp-PeG-S-3Py6NH₂-HseMe-G-Y-MeC-K）（配列番号59）（15mg）を溶解させ、氷冷下、DOTA-NHSエステル ヘキサフルオロホスファートトリフルオロアセタート（7.8mg）とDIPEA（0.018mL）を加えた。反応混合物を室温で120分間攪拌した。反応混合物にジルコニウム（IV）アセチルアセトナート（5.1mg、CAS：17501-44-9）を加え、50℃下で90分間攪拌した後、DOTA（10mg）を加えた。

得られた反応混合物を以下の条件を用いて精製した（カラム：Waters XSelect（登録商標） C18 5μm 50x250mm；移動相：A=1.0% AcOH（水中）、B=1.0% AcOH（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：5.1分間かけて0-0%、1.9分間かけて0-4.2%、3分間かけて4.2-25.6%、15.5分間かけて25.6-30.7%、1.5分間かけて30.7-60%、4分間かけて60-90%；流量：5.1分間かけて18-18mL/分、1.9分間かけて18-118mL/分、その後118mL/分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

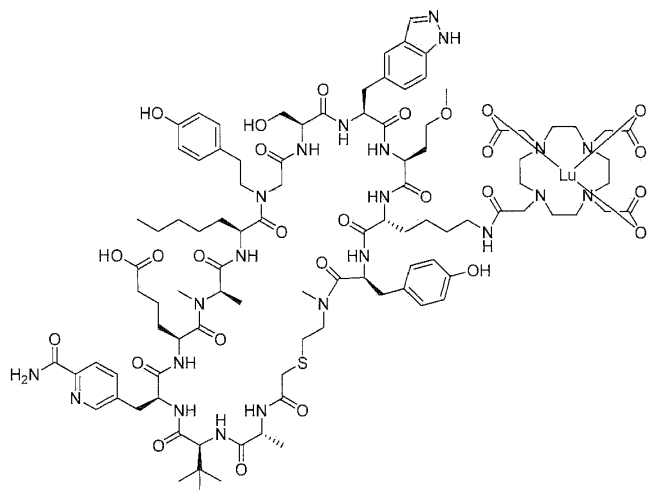
分析条件のLC/MS（UV波長 225nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.7%であった。

分析条件A：保持時間=3.66分

ESI-MS（+） 観測値m/z=1165.62（M+H）²⁺

20 実施例1-16 コンジュゲート Conjugate No. 45の合成

[化20]



Cl-Trt (2-Cl) resin (渡辺化学)とFmoc-MeCt (CAS: 2932449-54-0)を原料に、Tetrahedron Letters、43 (2002) 3419-3421に記載の合成法と同様に担持した固相樹脂
 5 (1.007mmol/g, 0.500g)を用い、目的のペプチド(配列: C1A
 c-da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-
 5Inda-HseMe-dk-Y-MeCt)(配列番号60)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
 10 アルに従って合成を行った。環状ペプチドの合成は、実施例1-2と同様に、キレー
 ト剤と金属の導入に関しては、実施例1-7と同様の反応条件及び精製条件に付すこ
 とで目的のペプチドを得た。

分析条件のLC/MS (UV波長 225nm)クロマトグラムの面積比から、目
 的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.5%であった。

15 分析条件A: 保持時間=3.85分

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 760.33$ ($M+3H$)³⁺

実施例2 環状ペプチドの合成及びコンジュゲートの合成

実施例1に記載の一般的な方法に従い、以下の表の目的のペプチド及び当該ペプチ
 ドとペイロードのコンジュゲートを合成した。

[表 7]

SEQ ID No.	Cyclization	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Additional	Terminus	m/z	[M+X] ⁺	Retention Time	Conditions	KD (M)
2	CAC	da	Tbg	3p6H2	S	PeG	Alp	PeG	H	3p6H2	Asp	G	Y	C		G	NH2	875.39	2	3.440	A	3.14E-09
3	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	PeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC		G	NH2	887.72	2	4.532	A	2.03E-10
4	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	885.28	2	4.538	A	1.73E-10
5	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	848.18	2	3.22	A	1.19E-10
6	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	PeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	884.26	2	4.84	A	1.85E-10
7	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	827.14	2	3.548	A	9.28E-11
8	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	834.18	2	3.852	A	6.85E-11
9	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	862.76	2	3.804	A	6.90E-11
10	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	859.97	2	3.36	A	1.05E-10
11	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	868.48	2	3.56	A	1.16E-10
12	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	865.93	2	3.64	A	1.76E-10
13	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	P	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	895.99	2	3.7	A	1.77E-10
14	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	897.98	2	5.088	A	1.00E-10
15	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	877.37	2	3.765	A	1.19E-10
16	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	884.78	2	5.976	B	3.94E-08
17	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	877.48	2	3.618	A	1.43E-10
18	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	Y	Asp	G	Y	MeC			NH2	862.43	2	4.752	A	9.88E-11
19	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	875.80	2	3.104	A	3.62E-10
20	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	D	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	875.45	2	3.638	A	1.16E-10
21	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	865.43	2	3.444	A	8.92E-08
22	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	865.93	2	3.895	A	1.25E-10
23	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	Y	Asp	G	Y	MeC			NH2	906.48	2	4.508	A	1.13E-10
24	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	870.33	2	5.785	B	1.18E-10
25	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	868.42	2	4.912	A	7.16E-11
26	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	871.37	2	3.972	A	9.24E-11
27	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	873.52	2	4.14	A	5.92E-11
28	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	875.53	2	4.164	A	5.47E-11
29	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	877.35	2	3.864	A	1.65E-10
30	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	864.44	2	3.94	A	1.65E-10
31	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	868.77	2	4.576	B	3.27E-10
32	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	875.43	2	3.832	A	1.19E-10
33	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	874.47	2	4.972	A	7.30E-11
34	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	846.9	2	3.976	A	8.70E-11
35	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	853.38	2	4.68	A	6.35E-11
36	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	853.38	2	5.228	A	1.65E-10
37	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	873.87	2	4.648	A	1.93E-10
38	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	868.35	2	4.938	A	1.90E-10
39	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	868.35	2	4.184	A	1.07E-10
40	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	868.35	2	4.976	A	6.89E-11
41	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	881.37	2	4.884	A	1.12E-10
42	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	881.37	2	5.128	A	1.08E-10
43	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	901.87	2	4.824	A	1.07E-10
44	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	908.89	2	5.088	A	1.25E-10
45	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	852.37	2	2.858	A	6.86E-11
46	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	862.36	2	3.296	A	5.37E-11
47	CAC	da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			NH2	865.3	2	5.708	B	1.49E-10
48	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	893.58	2	4.38	A	1.10E-10
49	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	893.58	2	4.935	A	1.53E-10
50	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	875.36	2	4.872	A	1.75E-11
51	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	902.43	2	4.14	A	7.75E-11
52	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	913.87	2	4.209	A	1.15E-10
53	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	907.42	2	4.804	A	1.55E-10
54	Free	@da	Tbg	3p6CON	Hg	MeG	Alp	PeG	S	3p6H2	Asp	G	Y	MeC			-	907.38	2	4.305	A	2.48E-10

[表 8]

Consignee No.	Operation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	14
---------------	-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----

表7に、目的物のペプチド、分析条件及び保持時間、ESI-MS (+)での観測値を記載し、表8には、目的物のコンジュゲート、分析条件及び保持時間、ESI-MS (+)での観測値を記載した。

表7において、terminusはC末端の官能基（表中、「-OH」はCOOHを
5、「-NH₂」はCO(NH₂)を示す）を示し、記載がない場合はC末端に官能基が存在しないことを示す。また、表中の「Cyclization」について、ClAcの記載があるものはクロロアセチル基を導入した1番目のアミノ酸とC末端に存在するC又はMeCとを結合させ環状化したことを示し、「Free」とは、1番目のアミノ酸のN末端アミノ基と13番目又は14番目のアミノ酸のC末端カルボキシ基が
10 結合していることを示す。また、表中のAdditional/Linkerは、環状構造に含まれない、リンカー又は付加的なアミノ酸を示し、例えばCa9_No1（配列番号3）では、X1-X13のアミノ酸配列が環状構造をとり、そのC末端X13のCからさらにグリシンがリンカーとして付加されていることを示す。

表8においても、上記表7と同じ記載方法となっている。さらに、表8においては
15、カッコ（）内で記載されているものがペイロードである、例えば、Conjugate No. 1のコンジュゲートは、X1とX13のアミノ酸残基Cが環状構造を取っており、さらにX13のCからG-PEG10c-Kというリンカー構造を含み、末端のKの側鎖にペイロードとしてSulfoCy5が結合していることを示す。また、Conjugate No. 6のコンジュゲートは、X1とX13のアミノ酸残
20 基MeCが環状構造を取っており、X1のdkの側鎖が、ペイロードであるLu結合DOTAに結合していることを示す。さらに、表8に記載のコンジュゲートConjugate No. 19は、同様にX1とX13のアミノ酸残基MeCが環状構造を取っており、X1のdkの側鎖が、ペイロードであるLu結合DOTAに、dfを介して結合していることを示す。また、表8中のNTは、not testedを示す
25 。

実施例3 表面プラズモン共鳴（SPR）によるヒトCA9とペプチド又はコンジュゲートとの分子間相互作用評価試験

実施例1、実施例2において合成した各種ペプチド又はコンジュゲートについて、ヒトCA9タンパク質に対するペプチドの表面プラズモン共鳴（SPR）による分子間相互作用を、以下に示す方法によって試験を実施した。具体的な試験方法を以下に示す。

5 SPR測定

Biacore T200（Cytiva）にProtein Aセンサーチップ（Cytiva）を挿入し、ランニング緩衝液：1X HBS-P+（Cytiva）、1.0 % DMSO（富士フィルム 和光純薬株式会社）、50 μ M 酢酸亜鉛二水和物（Hampton research）でプライム操作を実施し、流速30 μ L
10 ／分で平衡化した。ランニング緩衝液で希釈した50 nM Human CA9-Fc（SinoBiological）を流速5 μ L／分で60秒反応させ、フローセルへキャプチャーした。

DMSO溶液中で1mMに調製された、実施例1又は2で合成したペプチド又はコンジュゲート溶解液を、終濃度が100 nMになるようにランニング緩衝液で希釈
15 した後、25 nM、5 nMのペプチド又はコンジュゲート溶液を作製した。また、ペプチド又はコンジュゲートの親和性に応じて、終濃度が40 nMになるようにランニング緩衝液で希釈した後、10 nM、2 nMのペプチド又はコンジュゲート溶液を作製した。

上述のサンプルを用い、ヒトCA9に対するペプチド又はコンジュゲートのカイネティクスをSPR測定により取得した。カイネティクス評価モデルは、Single Cycle Kineticsとし、Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0（Cytiva）を使用してカーブフィッティングを行った。得られたセンサーグラムに対して、最小二乗法によるカーブフィッティングを実施し、そのKD値を求めることでペプチド又はコンジュゲートのヒトCA9に対する結合を評価した。
25

その結果を表7及び表8に示す。表7及び表8に示される通り、本発明のペプチド及びコンジュゲートは、ヒトCA9への結合活性を有することが示された。

参考例：非天然アミノ酸の合成

本参考例は、各種非天然アミノ酸の合成例を示す。

参考例において、特に明記しない限り、下記の装置、略語、分析条件等を使用した。

- 以下の合成例のプロトン核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) は、特に記述が無い場合は、
- 5 日本電子 (JEOL) 社製 JNM-ECX300、又は日本電子 (JEOL) 社製 JNM-ECX300、又はブルカー (Bruker) 社製 AscendTM500 を用いて重クロロホルム又は重ジメチルスルホキシド溶媒中で測定し、化学シフトは、テトラメチルシランを内部標準 (0.0 ppm) としたときの δ 値 (ppm) で示した。
- 10 NMR スペクトルの記載において、「s」はシングレット、「d」はダブルット、「t」はトリプレット、「q」はカルテット、「dd」はダブルットオブダブルット、「dt」はダブルットオブトリプレット、「m」はマルチプレット、「br」はブロード、「J」はカップリング定数、「Hz」はヘルツ、「CDCl₃」は重クロロホルム、「DMSO-d₆」は重ジメチルスルホキシドを意味する。
- 15 高速液体クロマトグラフィー／質量分析は、特に記載が無い場合は、Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class/QDa、Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class/SQD2、又は Shimadzu 社製 LC-20AD/Triple ToF5600 のいずれかを用いて測定した。
- 高速液体クロマトグラフィー／質量分析の記載において、ESI⁺ はエレクトロスプレーイオン化法のポジティブモードであり、(M+H)⁺ はプロトン付加イオンを意味する。(M-C₄H₈+H)⁺ は、プロトン付加とターシャリーブチル基脱離によるイオンを意味する。
- 20 高速液体クロマトグラフィー／質量分析の記載において、ESI⁻ はエレクトロスプレーイオン化法のネガティブモードであり、M-H はプロトン脱離によるイオンを意味する。
- 25

分析条件 C

カラム: ACQUITY (登録商標) 1.7 μm BEH C18、2.1 x 100 mm、Waters

移動相A：0.025%TFA 水中

移動相B：0.025%TFA CH₃CN中

カラム温度：60℃

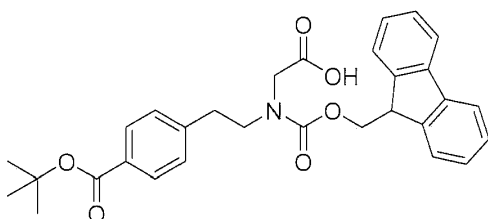
グラジエント（%B）：5.56分間かけて5-95%、その後5.56分から7.

5 22分まで95%、流量；0.6mL／分

検出：UV 254nm。

参考例1 Fmoc-4COOPeG(tBu)-OHの合成

[化21]



10 MeOH（200mL、CAS：67-56-1）にメチル 2-アミノアセテート塩酸塩（10g、CAS：5680-79-5）を室温にて溶解し、トリエチルアミン（16.12g、CAS：121-44-8）、tert-ブチルアクリレート（20.42g、CAS：1663-39-4）を加えた。反応混合物を室温で2時間
15 攪拌した後、減圧下濃縮した。得られた残渣（15g）をDCM（150mL、CAS：75-09-2）に溶解し、氷冷下DIPEA（35.69g、CAS：7087-68-5）とN-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニルオキシ]スクシンイミド（22.12g、CAS：82911-69-1）を加えた。室温で2時間攪拌した後、1M塩酸（300 mL、CAS：7647-01-0）を加えて反応を停止した。DCMで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナ
20 トリウムで乾燥した。濾過し、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（石油エーテル／酢酸エチル＝1／1）で精製し、目的物を含む画分を減圧下濃縮した。

上記反応で得られる生成物（31g）をDCM（300mL）に溶解し、氷冷下4
M HClの1，4-ジオキサン溶液（300mL）を加えた。反応混合物を2時間
25 室温で攪拌した後、減圧下濃縮した。得られた残渣（25g）をDCM（150mL

）に室温にて溶解し、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（18.75 g、CAS：25952-53-8）、N-ヒドロキシフタルイミド（11.70 g、CAS：524-38-9）を加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（200 mL）を加えて反応を停止した。得られた混合物を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー（石油エーテル／酢酸エチル＝1／1）で精製し、目的物を含む画分を減圧下濃縮した。

窒素雰囲気下、N、N-ジメチルアセトアミド（300 mL、CAS：127-19-5）に臭化ニッケル（II）三水和物（4.64 g、CAS：7789-49-3）、4,4'-ジ-tert-ブチル-2,2'-ジピリジル（4.57 g、CAS：72914-19-3）を加え、室温で15分間攪拌した。得られた混合物に4-ブromo安息香酸tert-ブチル（29.19 g、CAS：59247-47-1）、前段の反応によって得られた生成物（30 g）を加えた後、室温で亜鉛（18.56 g、CAS：7440-66-6）を10分間かけて加えた。反応混合物を室温で30分間攪拌した。混合物に水を加えて反応を停止し、不溶物を濾過し、酢酸エチルで洗浄した。濾液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し、減圧下濃縮後、得られた残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー（石油エーテル／酢酸エチル＝1／1）で精製し、目的物を含む画分を減圧下濃縮した。

得られた生成物（20 g）をイソプロピルアルコール（600 mL、CAS：67-63-0）に溶解し、氷冷下塩化カルシウム（68.88 g、CAS：10043-52-4）の水溶液（150 mL）、水酸化リチウム（3.72 g、CAS：1310-65-2）の水溶液（50 mL）を加えた。反応混合物を室温で16時間攪拌した。混合物に飽和リン酸二水素ナトリウム水溶液（CAS：7558-80-7）を加えてpHを5とした後、酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過し、減圧下濃縮後、得られた残渣を逆相シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー（カラム：C18シリカゲル、グラジ

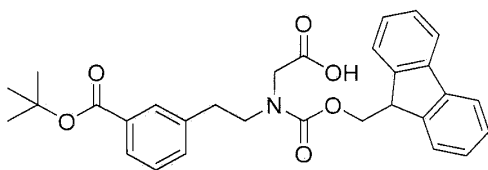
エント：10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液／アセトニトリル＝95／5－0／100）で精製した。目的物を含む画分を減圧下濃縮し、表題化合物（10.1 g）を得た。

¹H NMR（500 MHz、DMSO-d₆） δ 12.68（br, 1H）、7.92－7.86（m, 2H）、7.86－7.55（m, 4H）、7.47－7.00（m, 6H）、4.52－4.45（m, 1H）、4.28－4.14（m, 2H）、4.00－3.69（m, 2H）、3.56－3.07（m, 2H）、2.91－2.41（m, 2H）、1.55－1.51（m, 9H）。

分析条件C：保持時間＝5.44分；ESI-MS（+）観測値m/z＝446（M-C₄H₈+H）⁺、理論値m/z＝501。

参考例2 Fmoc-3COOPeG(tBu)-OHの合成

[化22]



参考例1 Fmoc-4COOPeG(tBu)-OHと同様に合成を行うことで、Fmoc-3COOPeG(tBu)-OHを得た。ただし、4-ブロモ安息香酸tert-ブチルの代わりに、3-ブロモ安息香酸tert-ブチル（CAS：69038-74-0）を原料に用いた。

¹H NMR（500 MHz、DMSO-d₆） δ 12.70（br, 1H）、7.92－7.82（m, 2H）、7.81－7.55（m, 4H）、7.52－7.10（m, 6H）、4.51－4.32（m, 1H）、4.32－4.09（m, 2H）、4.09－3.74（m, 2H）、3.53－3.12（m, 2H）、2.92－2.46（m, 2H）、1.55－1.47（m, 9H）。

分析条件C：保持時間＝5.19分；ESI-MS（+）観測値m/z＝446（M-C₄H₈+H）⁺、理論値m/z＝501。

25 実施例4 ⁶⁷Ga標識コンジュゲートの生体内分布

ペプチドへの⁶⁷Ga標識

以下のコンジュゲートを実施例 1、2 又は同様の方法で合成した。

Conjugate No. 65、

Conjugate No. 64、

Conjugate No. 70 (Conjugate No. 18 のペイロード
5 部分が DOTA のみでありルテチウムが結合していないコンジュゲート (配列: C1
Ac-de-Tbg-3Py6CON-Hg1-Meda-Ahp-PeG-D-3
Py6NH2-HseMe-dk (DOTA) -Y-MeC) (配列番号 73 に記載の
アミノ酸配列の 11 番目 dk の側鎖に DOTA が結合したもの)),

Conjugate No. 71 (Conjugate No. 29 のペイロード
10 部分が DOTA のみでありルテチウムが結合していないコンジュゲート (配列: C1
Ac-da-Tbg-3Py6CON-Hg1-Meda-Ahp-PeG-D-5
Inda-HseMe-dk (DOTA) -Y-MeC) (配列番号 77 に記載のアミ
ノ酸配列の 11 番目 dk の側鎖に DOTA が結合したもの)、

Conjugate No. 72 (Conjugate No. 15 のペイロード
15 部分が DOTA のみでありルテチウムが結合していないコンジュゲート (配列: C1
Ac-dk (DOTA) -Tbg-3Py6CON-Hg1-Meda-Ahp-P
eG-D-3Py6NH2-HseMe-dq-Y-MeC) (配列番号 70 に記載の
アミノ酸配列の 1 番目 dk の側鎖に DOTA が結合したもの)、

Conjugate No. 62、

20 および、

Conjugate No. 73 (Conjugate No. 31 のペイロード
部分が DOTA-t4amCh のみでありルテチウムが結合していないコンジュゲ
ート (配列: C1Ac-da-Tbg-3Py6CON-Hg1-Meda-Ahp-
PeG-D-5Inda-HseMe-dk (DOTA-t4amCh) -Y-Me
25 C) (配列番号 77 に記載のアミノ酸配列の 11 番目 dk の側鎖に t4amCh を介し
て DOTA が結合したもの))

各コンジュゲートを含む標識反応液 (表 9) を 95℃、10 分間加熱し、⁶⁷Ga 標
識を行った。

[表 9]

表9 標識反応液の組成

コンジュゲート	2. 8 nmol/50 μ L
DMSO	1. 43 - 1. 69 μ L/50 μ L
塩化ガリウム(⁶⁷ Ga)	10. 36 MBq(標識日の12時検定)
酢酸ナトリウム水和物	0. 40 mol/L
酢酸	0. 27 mol/L
アスコルビン酸	5. 6 mg/mL
ゲンチジン酸	1. 28 mg/mL

ラジオHPLC

上記の通り合成した、各⁶⁷Ga標識コンジュゲート（以下被験物質ともいう）とアセトニトリルを混合した後、TSK gel（登録商標） ODS-80Ts QA、4. 6mm ID×250mm、5 μ m（東ソー社）を用いて、投与前後の放射化学的純度を測定した。その結果、95. 61-91. 27%の純度であった。

ラジオTLC

被験物質をスポットしたTLCシリカゲル60 RP-18 F₂₅₄S（メルク、115389）を2mol/L酢酸アンモニウム溶液/アセトン混液（1：1）にて展開後、ラジオクロマナイザー（エネルギーレンジ60-350keV、コリメーター1. 0cm、V-shaped BGO crystal、測定時間10分）にて放射能を測定した。その結果、96. 67-94. 27%の純度であった。

評価動物（HT-29担癌マウス）の作製

5週齢の雌BALB/cSlc-nu/nuマウスを日本エスエルシー（静岡、日本）から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、PBS pH7. 4（1×）（Thermo Fisher Scientific、10010-023）とVitroGel（The Well Bioscience、VHM01）を1：2混液に懸濁した 5×10^7 細胞/mLのCA9陽性細胞であるヒト結腸癌由来HT-29に懸濁し、0. 1mLをヌードマウス（6週齢）の右側腹部皮下に針付ディスポーザブルシリンジにて移植した。

評価動物は1群例数3、全12群を使用した。使用時の評価動物は体重18.2g
−20.7g、腫瘍径21.6−90.8mm³であった。

体内分布

各被験物質をHT-29担癌マウスの静脈内に単回投与した。投与後4、24及び
572時間後に解剖を実施し、各組織の放射能濃度（%ID/g）を測定した。

結果

⁶⁷Ga標識化合物の体内分布の結果を図1、図2、図3に示す。なお、図中の「C
onjugate No. XX」は、当該Conjugate No.に記載のコン
ジュゲートにおけるペイロード部分がDOTA-⁶⁷Gaである、各コンジュゲートを
10示す。

- 図1：投与後4時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）
- 図2：投与後24時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）
- 図3：投与後72時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）

実施例5 ⁶⁴Cu標識コンジュゲートの生体内分布及びPETイメージング

15 ペプチドコンジュゲートへの⁶⁴Cu標識

実施例1又は2で合成したコンジュゲート；Conjugate No. 64、C
onjugate No. 62、Conjugate No. 2、Conjugat
e No. 56、Conjugate No. 58の各ペプチドコンジュゲートを含
む標識反応液（表10）を95℃、10分間加熱し、⁶⁴Cu標識を行った。

20 [表10]

表10 標識反応液の組成

コンジュゲート	2.8 nmol/50 μL
DMSO	1.43 - 1.64 μL/50 μL
塩化銅(⁶⁴ Cu)	31.08 MBq(投与日の12時検定)
酢酸ナトリウム水和物	0.31 mol/L
酢酸	0.21 mol/L
アスコルビン酸	5.6 mg/mL
ゲンチジン酸	1.28 mg/mL

ラジオHPLC

上記の通り合成した、各 ^{64}Cu 標識コンジュゲート（以下被験物質ともいう）とアセトニトリルとを混合後、TSK gel（登録商標） ODS-80Ts QA、
4.6 mm ID×250 mm、5 μm （東ソー）を用いて、投与前後の放射化学的
5 純度を測定した。その結果、94.14–100%の純度であった。

ラジオTLC

被験物質をスポットしたTLCシリカゲル60 RP-18 F₂₅₄S（メルク、
115389）を2 mol/L酢酸アンモニウム溶液／アセトン混液（1：1）に
て展開後、ラジオクロマナイザー（エネルギーレンジ60–350 keV、コリメー
10 ター1.0 cm、V-shaped BGO crystal、測定時間10分）に
て放射能を測定した。その結果、97.60–98.79%の純度であった。

評価動物（HT-29担癌マウス）の作製

5週齢の雌BALB/c Slc-nu/nuマウスを日本エスエルシー（静岡、日
本）から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、PBS pH7.4（1×）（
15 Thermo Fisher Scientific、10010-023）とVi
troGel（The Well Bioscience、VHM01）を1：2混
液に懸濁した 5×10^7 細胞/mLのCA9陽性細胞であるヒト結腸癌由来HT-2
9に懸濁し、0.1 mLをヌードマウス（6週齢）の右側腹部皮下に針付ディスポー
ザブルシリンジにて移植した。

20 評価動物は1群例数3、全12群を使用した。使用時の評価動物は体重17.7 g
–21.5 g、腫瘍径165–523 mm³であった。

体内分布及びPETイメージング

各被験物質をHT-29担癌マウスの静脈内に80 μL /headで単回投与した。
。投与後4及び24時間後に解剖を実施し、各組織の放射能濃度（%ID/g）を測
25 定する事で生体内分布を評価した。また、PETイメージングでは投与後1、4及び
23.5時間において、イソフルランガス麻酔下にてSi78（Bruker BioSpin MRI GmbH）でPET/CT画像の収集を行った。

結果

^{64}Cu 標識化合物の体内分布の結果を図4－図7に示す。

図4：投与後4時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）

図5：投与後24時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）

図6：投与後4時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）

5 図7：投与後24時間組織分布%ID/g（平均±SD、n=3）

PET/CTイメージング

^{64}Cu 標識化合物（4.62－4.72MBq/head）投与後1、4及び23.5時間において、イソフルランガス麻酔下にてPET/CT画像の収集を行った。

図8－図13に示す。各化合物で腫瘍への集積が確認された。なお、列ごとに同個体を示し、例えば左の列は同じ個体の投与後1時間、4時間及び23.5時間後の結果を示す。また、白矢印は移植した腫瘍を示す。

図8： ^{64}Cu 標識コンジュゲート Conjugate No. 64－ ^{64}Cu

図9： ^{64}Cu 標識コンジュゲート Conjugate No. 62－ ^{64}Cu

図10： ^{64}Cu 標識コンジュゲート Conjugate No. 2－ ^{64}Cu

15 図11： ^{64}Cu 標識コンジュゲート Conjugate No. 56－ ^{64}Cu

図12： ^{64}Cu 標識コンジュゲート Conjugate No. 58－ ^{64}Cu

実施例6 ^{177}Lu 標識コンジュゲートの薬効試験

ペプチドへの ^{177}Lu 標識

実施例1又は2で合成したコンジュゲート：Conjugate No. 64、Conjugate No. 62、Conjugate No. 65の各ペプチドを含む標識反応液（表11）を95℃、10分間加熱し、 ^{177}Lu 標識を行った。

20

[表 1 1]

表11 被験物質の組成

名称	30 MBq投与化合物	60 MBq投与化合物
コンジュゲート	2. 8 nmol／50 μL	2. 8 nmol／50 μL
DMSO	1. 43 - 1. 56 μL	1. 56 μL
塩化ルテチウム	210 MBq／50 μL (標識日の15時検定)	420 MBq／50 μL (標識日の15時検定)
酢酸ナトリウム水和物	0. 36 - 0. 38 mol／L	0. 34 mol／L
酢酸	0. 24 - 0. 25 mol／L	0. 23 mol／L
アスコルビン酸	5. 6 mg／mL	5. 6 mg／mL
ゲンチジン酸	1. 28 mg／mL	1. 28 mg／mL

ラジオHPLC

上記の通り合成した、各¹⁷⁷Lu標識コンジュゲート（以下被験物質ともいう）被
5 験物質とアセトニトリル混合後、TSK gel（登録商標） ODS－80Ts
QA、4. 6mm ID×250mm、5 μm（東ソー）を用いて、投与前後の放射
化学的純度を測定した。その結果、90. 31－100％の純度であった。

ラジオTLC

被験物質をスポットしたTLCシリカゲル60 RP－18 F₂₅₄S（メルク社
10 、115389）を2mol／L酢酸アンモニウム溶液／アセトン混液（1：1）に
て展開後、ラジオクロマナイザー（エネルギーレンジ60－350keV、コリメー
ター1. 0cm、V-shaped BGO crystal、測定時間10分）に
て放射能を測定した。その結果、97. 25－98. 23％の純度であった。

Cabozantinibの調製

15 比較例として、腎細胞癌や肝細胞癌の公知の治療薬であり、大腸癌への効果も知ら
れている、カボザンチニブ（Cabozantinib）を用いた。Cabozan
t i n i b（Selleckchem社；No. S1119）をDMSOに100m
g／mLとなるよう溶解し、分注した後凍結保存した。これをCabozantin
i b DMSO溶液とした。投与日にCabozantinib DMSO溶液を解
20 凍し、投与濃度30mg／mLとなるよう注射用水を加えた。これをCabozan
t i n i b溶液とした。

評価動物の作製

5週齢の雌BALB/cSlc-nu/nuマウスを日本エスエルシー（静岡、日本）から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、PBS pH7.4 (1×) (Thermo Fisher Scientific、10010-023) とVitroGel (The Well Bioscience、VHM01) を1:2混液に懸濁した 5×10^7 細胞/mLのヒト結腸癌由来HT-29に懸濁し、0.1mLをヌードマウス（6週齢）の右側腹部皮下に針付ディスプレイシリンジにて移植した。

評価動物は1群例数6、全9群を使用した。使用時の評価動物は体重 $16.28\text{g} - 20.05\text{g}$ 、腫瘍径 $8.8 - 22.9\text{mm}^3$ であった。

薬効評価

生理食塩水 (Saline) 及び ^{177}Lu 標識ペプチドをDay 0、11及び18に、HT-29担癌マウスの静脈内に 30MBq/head 又は 60MBq/head で投与した。また、Cabozantinib投与群は投与日の体重データを基に 30mg/kg となるように算出した投与量を、day 0からday 27まで毎日経口投与した。体重及び腫瘍体積の測定を週に2回、Day 49まで行い、測定最終日に生存していた全個体に安楽死処置を施した。

腫瘍径結果

各群の腫瘍径推移を図13に示す。Conjugate No. 64- ^{177}Lu (30MBq/head 、3回投与)、Conjugate No. 62- ^{177}Lu (30MBq/head 、3回投与)、Conjugate No. 65- ^{177}Lu (60MBq/head 、単回投与) で優れた抗腫瘍効果を示した。

体重結果

各群の体重推移を図14に示す。優れた抗腫瘍効果を示したConjugate No. 64- ^{177}Lu (30MBq/head 、3回投与)、Conjugate No. 62- ^{177}Lu (30MBq/head 、3回投与) 及びConjugate No. 65- ^{177}Lu (60MBq/head 、単回投与) では、顕著な体重減少は確認されなかった。

実施例7 ^{64}Cu または ^{177}Lu 標識コンジュゲートの生体内分布 (VMRC-R CW xenograft モデル)

ペプチドへの ^{64}Cu または ^{177}Lu の標識

- Conjugate No. 62を含む、 ^{64}Cu 標識反応液 (表12) または ^{177}Lu 標識反応液 (表13) を95℃、10分間加熱し、ペプチドの標識を行った。

標識反応液の組成 (Conjugate No. 62- ^{64}Cu)

[表12]

標識反応液の組成 (Conjugate No. 62- ^{64}Cu)

成分	分量(50 μL 中)
Conjugate No. 62	1.40nmol
DMSO	1.52 μL
塩化銅(^{64}Cu)	30.6-31.6MBq (投与日の12時検定)
酢酸ナトリウム水和物	18.52 μmol
酢酸	12.34 μmol
アスコルビン酸	0.28mg
ゲンチジン酸	64 μg

標識反応液の組成 (Conjugate No. 62- ^{177}Lu)

- 10 [表13]

標識反応液の組成 (Conjugate No. 62- ^{177}Lu)

成分	分量(50 μL 中)
Conjugate No. 62	2.79nmol
DMSO	1.52 μL
塩化ルテチウム(^{177}Lu)	39.4MBq(投与日の12時検定)
酢酸ナトリウム水和物	20.27 μmol
酢酸	13.51 μmol
アスコルビン酸	0.28mg
ゲンチジン酸	64 μg

ラジオHPLC

- 上記の通り合成した、Conjugate No. 62- ^{64}Cu またはConjugate No. 62- ^{177}Lu とアセトニトリルを混合した後、TSK gel (登録商標) ODS-80Ts QA、4.6mm ID×250mm、5 μm (東ソー) を用いて、投与前後の放射化学的純度を測定した。その結果、100%の純度であった。

ラジオTLC

各被検物質 (Conjugate No. 62-⁶⁴CuまたはConjugate No. 62-¹⁷⁷Lu) をスポットしたTLCシリカゲル60 RP-18 F₂₅₄s (メルク、115389) を2mol/L酢酸アンモニウム溶液/アセトン混液 (1:1) にて展開後、ラジオクロマナイザー (測定時間10分) にて放射能を測定した。その結果、98.26~99.27%の純度であった。

評価動物 (VMRC-RCW担癌マウス) の作製

5週齢の雌BALB/c-nuマウスをジャクソン・ラボラトリー・ジャパン (神奈川、日本) から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、EMEM (富士フィルム和光純薬、大阪、日本) に懸濁した 5×10^7 細胞/mLのヒト腎細胞癌由来VMRC-RCW細胞に懸濁し、0.1mLをヌードマウス (6週齢) の右側腹部皮下に針付ディスポーザブルシリンジにて移植した。

使用時の評価動物は体重18.2g~21. g、腫瘍径80~386mm³であった。

体内分布

15 各被検物質をVMRC-RCW担癌マウスの静脈内に単回投与した。投与4、24及び48時間後に解剖を実施し、各組織の放射能濃度 (%ID/g) を測定した。

結果

Conjugate No. 62-⁶⁴Cuの体内分布の結果を図15に、Conjugate No. 62-¹⁷⁷Luの体内分布の結果を図16に示す。

20 PET/CTイメージング

Conjugate No. 62-⁶⁴Cu投与後1、4、23.5、47.5時間において、イソフルランガス麻酔下にてPET/CT画像の収集を行い、腫瘍を鮮明に検出する事が確認できた。各時点の画像を図17に示す。なお、列ごとに同個体を示し、例えば左の列は同じ個体の投与後1時間、4時間、23.5時間、47.5時間後の結果を示す。

実施例8 ¹⁷⁷Lu標識ペプチドの薬効試験 (VMRC-RCW xenograftモデル)

ペプチドへの¹⁷⁷Luの標識

Conjugate No. 62を含む¹⁷⁷Lu標識反応液の30MBq/head投与用または60MBq/head投与用（表14）を調製し、95℃、10分間加熱し、標識を行った。

標識反応液Conjugate No. 62-¹⁷⁷Luの組成

5 [表14]

標識反応液Conjugate No. 62-¹⁷⁷Luの組成

名称	30MBq/head Conjugate No. 62- ¹⁷⁷ Lu	60MBq/head Conjugate No. 62- ¹⁷⁷ Lu
Conjugate No. 62	1.4nmol/50μL	2.8nmol/50μL
DMSO	1.52μL/50μL	1.52μL/50μL
塩化ルテチウム(以下、 ¹⁷⁷ Lu) (目標値)	210MBq/50μL (標識日の15時検定)	420MBq/50μL (標識日の15時検定)
酢酸ナトリウム水和物	0.37mol/L	0.33-0.34mol/L
酢酸	0.25mol/L	0.22mol/L
アスコルビン酸	5.6mg/mL	5.6mg/mL
ゲンチジン酸	1.28mg/mL	1.28mg/mL

ラジオHPLC

上記通り合成したConjugate No. 62-¹⁷⁷Luをアセトニトリル混合後、TSK gel（登録商標）ODS-80Ts QA、4.6mm ID×
10 250mm、5μm（東ソー）を用いて、投与前後の放射化学的純度を測定した。その結果、99.6～100%の純度であった。

ラジオTLC

Conjugate No. 62-¹⁷⁷LuをスポットしたTLCシリカゲル60
RP-18 F₂₅₄S（メルク、115389）を2mol/L酢酸アンモニウム
15 溶液/アセトン混液（1：1）にて展開後、ラジオクロマナイザー（エネルギーレンジ13-250keV、コリメーター1.0cm、V-shaped BGO crystal、測定時間10分）にて放射能を測定した。その結果、98.1～98.6%の純度であった。

Cabozantinibの調製

20 比較例として、Cabozantinib（Selleckchem社；No. S1119）をDMSOに100mg/mLとなるよう溶解し、分注した後凍結保存した。これをCabozantinib DMSO溶液とした。投与日にCabozantinib

ntinib DMSO溶液を解凍し、投与濃度12.3mg/mLとなるよう注射用水を加えた。これをCabozantinib溶液とした。

評価動物（VMRC-RCW担癌マウス）の作製

- 5 5週齢の雌BALB/c-nuマウスをジャクソン・ラボラトリー・ジャパン（神奈川県、日本）から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、EMEM（イーグル最小必須培地、富士フイルム和光純薬、大阪、日本）に懸濁した 5×10^7 細胞/mLのヒト腎細胞癌由来VMRC-RCW細胞に懸濁し、0.1mLをヌードマウス（6週齢）の右側腹部皮下に針付ディスプレイシリンジにて移植した。

- 10 使用時の評価動物は体重19.3g~21.9g、腫瘍径216~445mm³であった。

薬効評価

生理食塩液（Saline）及び上記の通り製造したConjugate No. 62-¹⁷⁷Luを、以下の表15のとおりに各群のマウス（Day 0時8週齢）に尾静脈より単回投与（80μL/head）を行った。

- 15 群ごとの投与液及び投与日の関係

[表 15]

群ごとの投与液及び投与日の関係

群	投与液	Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	投与日			
			Day0	Day7	Day14	Day21
1群	生理食塩液		○	○	○	—
3群	30 MBq/head Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	0. 2nmol/head	○	—	—	—
4群	30 MBq/head Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	0. 2nmol/head	○	—	○	—
5群	30 MBq/head Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	0. 2nmol/head	○	○	○	—
6群	30 MBq/head Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	0. 2nmol/head	○	○	○	○
7群	60 MBq/head Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	0. 4nmol/head	○	—	—	—
8群	60 MBq/head Conjugate No. 62 — ¹⁷⁷ Lu	0. 4nmol/head	○	—	○	—

○の日に投与を実施した。—の日は投与を実施しなかった。

Cabozantinib 投与群は投与日の体重データを基に 12. 3mg/kg となるように算出した投与量を、Day 0 から Day 27 まで毎日経口投与した。

腫瘍径結果

各群の腫瘍径推移を図 18 に示す。Conjugate No. 62—¹⁷⁷Lu は優れた抗腫瘍効果を示した。

体重結果

10 各群の平均体重変化率を図 19 に示す。Conjugate No. 62—¹⁷⁷Lu を投与した各群で顕著な体重減少は確認されなかった。

実施例 9 ²²⁵Ac 標識ペプチドの薬効試験・体内分布

ペプチドへの²²⁵Ac 標識

15 Conjugate No. 62 を含む標識反応液（表 16）を 95℃、20 分間加熱、標識を行い、²²⁵Ac 標識化合物を得た。

標識反応液（50 μL）の組成

[表 16]

標識反応液 (50 μ L) の組成

ペプチド	1.5 nmol
DMSO	3.22 μ L
塩化アクチニウム (^{225}Ac)	227~242 MBq (投与日の10時検定)
酢酸ナトリウム水和物	7.89 μ mol
酢酸	0.0867 μ mol
アスコルビン酸	132 μ g
Tween® 20	0.02 mg

ラジオHPLC

被験物質とアセトニトリルを混合後、TSK gel (登録商標) ODS-80T
5 s QA, 4.6 mm ID $\times$ 150 mm, 5 μ m (東ソー) を用いて、投与前の放射化学的純度を測定した。その結果、97.9%の純度であった。

ラジオTLC

被験物質をスポットしたTLCシリカゲル60 RP-18 F254s (メルク、
115389) を2 mol/L酢酸アンモニウム溶液/アセトン混液 (1:1) にて
10 展開後、ラジオクロマナイザー (エネルギーレンジ180~500 keV, コリメーター1.0 cm, V-shaped BGO crystal, 測定時間10分) にて放射能を測定した。その結果、97.7%の純度であった。

評価動物 (HT-29 担癌マウス) の作製

6週齢の雌BALB/c Slc-nu/nuマウスを日本エスエルシー (Shizuoka, Japan) から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、PBS pH7.4 (1 $\times$) (Thermo Fisher Scientific, 10010-023) とVitroGel (The Well Bioscience, VHM01) を1:2混液に懸濁した5 $\times$ 10⁷ cells/mLのヒト結腸癌由来HT-29に懸濁し、0.1 mLをヌードマウス (7週齢) の右側腹部皮下に針付ディスプレイ
20 ブルシリングにて移植した。

評価動物は1群例数3、全3群を使用した。使用時の評価動物は体重17.8 g~19.63 g、腫瘍径151~275 mm³であった。

体内分布

^{225}Ac 標識化合物をHT-29 担癌マウス (9週齢) の静脈内に単回投与した。

投与後4、24及び48時間に解剖を実施し、各組織の放射能濃度（%ID/g）を測定した。

結果

²²⁵Ac 標識化合物の体内分布の結果を図20に示す。

5 実施例10 ²²⁵Ac 標識ペプチドの薬効試験

ペプチドへの²²⁵Ac 標識

Conjugate No. 62を含む標識反応液（表17）を95℃、20分間加熱、標識を行い、被験物質を得た。

被験物質の組成

10 [表17]

被験物質の組成

成分	容量
ペプチド溶液 (10mg/mL in DMSO)	19.7 μL
²²⁵ Ac溶解液 (in 0.04 mol/L HCl)	20 μL (14580kBq)
Buffer 組成 0.2 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5) 3.3 mg/mL アスコルビン酸 0.05% Tween® 20	210.3 μL

ラジオHPLC

被験物質をJupiter（登録商標）C18 5μm 4.6x150 mm（Phenomenex）を用いて、投与前の放射化学的純度を測定した。その結果、

15 97.25%の純度であった。

ラジオTLC

被験物質をTLC-SG Paper（アジレント、SG10001）にスポットし、25mM EDTA、0.1 mol/L酢酸アンモニウム溶液にて展開後、Bioscan AR-2000（Eckert & Ziegler社）にて放射能

20 を測定した。その結果、99%以上の純度であった。

評価動物（HT-29担癌マウス）の作製

5週齢の雌BALB/cSlc nudeマウスをチャールズリバーラボラトリー (Wilmington、米国) から購入し、評価動物の作製に使用した。馴化後、PBS pH7.4 (1×) (Thermo Fisher Scientific社、10010-023) とVitroGel (The Well Bioscience社、VHM01) を1:2混液に懸濁した 5×10^7 cells/mLのヒト結腸癌由来HT-29に懸濁し、0.1 mLをヌードマウス (7週齢) の右側腹部皮下に針付ディスポーザブルシリンジにて移植した。

評価動物は1群例数10、全6群を使用した。 ^{225}Ac 標識ペプチド投与前日の評価動物は体重16.95 g~17.83 g、腫瘍径189.08~201.72 mm³であった。

薬効評価

PBS及び ^{225}Ac 標識ペプチドをHT-29細胞移植10日後に、HT-29担癌マウスの静脈内に30 kBq/head、60 MBq/head、90 MBq/head、120 MBq/headまたは、150 MBq/headで投与した。

15 体重および腫瘍体積の測定を週に2回、Day 70まで行い、測定最終日に生存していた全個体に安楽死処置を施した。

腫瘍径結果

各群の腫瘍径推移を図21に示す。 ^{225}Ac 標識Conjugate No. 62は放射能依存性に優れた抗腫瘍効果を示した。

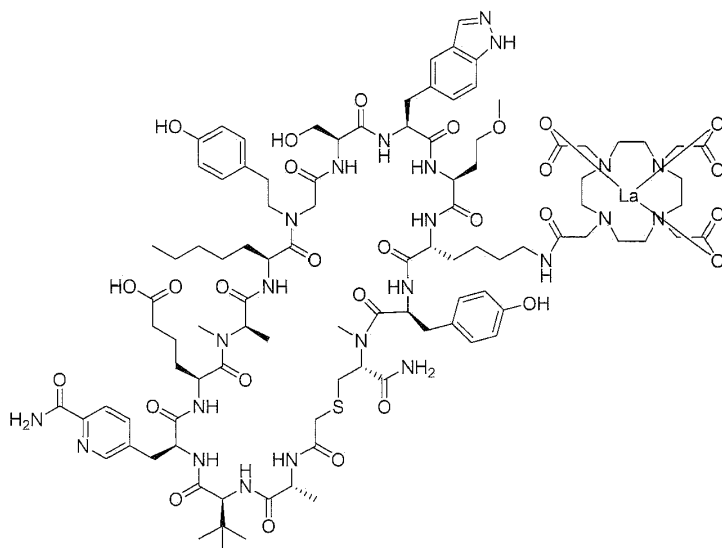
20 体重結果

各群の体重推移を図22に示す。 ^{225}Ac 標識Conjugate No. 62の投与による顕著な体重減少は確認されなかった。

実施例11 環状ペプチドの合成及びコンジュゲートの合成

実施例11-1 コンジュゲート Conjugate No. 74の合成

[化 2 3]



100 mMの酢酸ナトリウム水溶液（0.465 mL）に、実施例1-5で得られたペプチドコンジュゲート Conjugate No. 62（10 mg）を溶解させ、塩化ランタン（III）七水和物（25.9 mg、CAS：10025-84-0）を溶解させた。反応混合物を45℃下で60分間攪拌した。

得られた反応混合物を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 50 x 250 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中），B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：50℃；グラジエント（%B）：5分間かけて0-0%、2分間かけて0-4.2%、3分間かけて4.2-24.6%、15.5分間かけて24.6-29.7%、1.5分間かけて29.7-60%、4分間かけて60-90%；流量：5.0分間かけて18-18 mL／分、2分間かけて18-118 mL／分、その後118 mL／分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

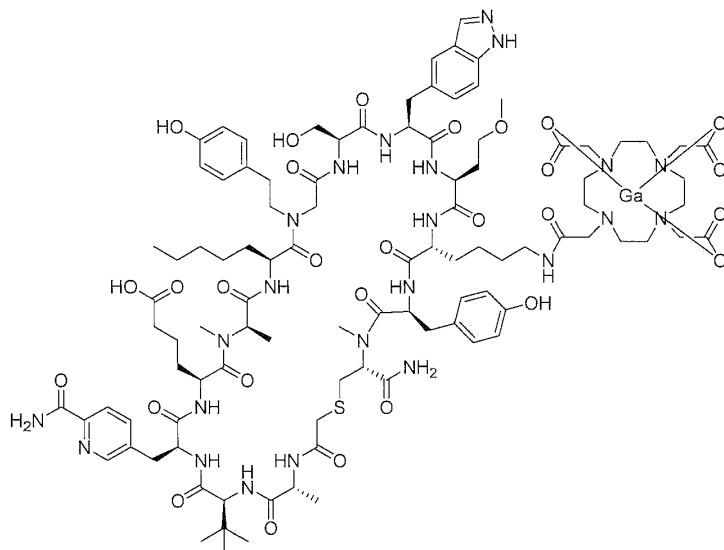
15 分析条件のLC/MS（UV波長 225 nm）クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.5%であった。

分析条件A：保持時間=3.54分

ESI-MS（+） 観測値 m/z =1143.45（ $M+2H$ ）²⁺

実施例11-2 コンジュゲート Conjugate No. 75の合成

[化 2 4]



DMF (0.50 mL) に、0℃下で実施例 1-2 で得られたペプチド SEQ ID No. 46 (10 mg) と DIEA (15.7 μ L)、DOTA-NHSEster
5 ヘキサフルオロホスファートトリフルオロアセタート (5.04 mg) を溶解させた。反応混合物を室温下で 60 分間攪拌した後、反応混合物に塩化ガリウム (III) (3.52 mg、CAS: 13450-90-3) と 50 mM の酢酸ナトリウム水溶液 (0.40 mL) を加えた。反応混合物を 90℃で 1 時間攪拌した。

得られた反応混合物を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 x 150 mm; 移動相: A=0.1
10 % TFA (水中), B=0.1 % TFA (MeCN 中); 温度: 50℃; グラジエント (%B): 3 分間かけて 5.0-27%, 8 分間かけて 27-32%, 1 分間かけて 32-60%; 流量: 4.5 mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥し目的のペプチドを得た。

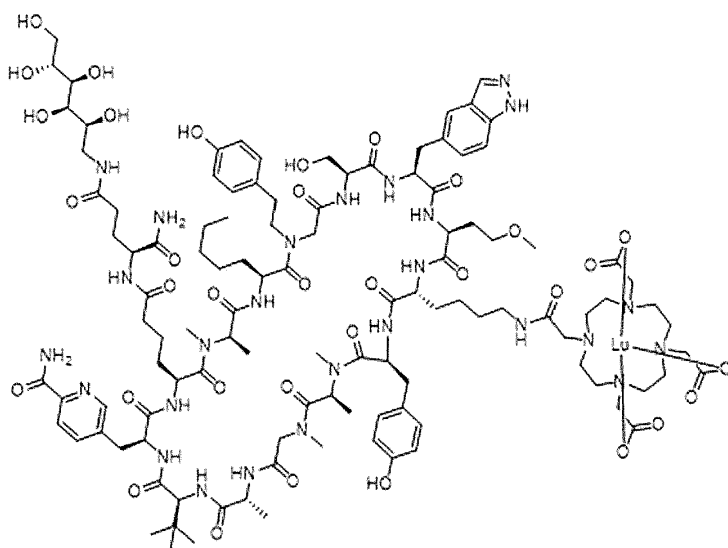
15 分析条件の LC/MS (UV 波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、99.5% であった。

分析条件 A: 保持時間 = 3.24 分

ESI-MS (+) 観測値 m/z = 1108.94 ($M+2H$)²⁺

実施例 11-3 コンjugate Conjugate No. 78 の合成

[化25]



Conjugate No. 67と同様な方法で環状ペプチド（配列：da-Tbg-3Py6CON-Hgl-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-HseMe-dk (Alloc)-Y-MeA-MeG（配列番号103））を合成した。Fmoc-dk (Boc)-OHの代わりにFmoc-dk (Alloc)-OHを用いた。

以下の条件で精製を実施した（カラム：Waters XBridge（登録商標） C18 5 μ m 50 x 150 mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて8-8%、1分間かけて8-33%、8分間かけて33-38%、1分間かけて38-60%；流量：1分間かけて20-20 mL/分、1分間かけて20-120 mL/分、その後120 mL/分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥した。

上記の方法で得た環状ペプチド（38 mg）をDMF（0.65 mL）に溶かし、2, 4, 6-トリメチルピリジン（25.8 μ L, CAS: 108-75-8）及び0.5 M HATUのDMF溶液（58.7 μ L）を加え25℃で5分間攪拌した。Fmoc-Qglucamine-NH₂（50 mg）をDMSO（0.94 mL）に溶解し、TEA（0.20 mL）を加え60℃で1時間攪拌後、バイオタージ社V-10を用い減圧下濃縮し、メチルターシャリーブチルエーテルでトリチュレーション

ンすることで合成したH-Q g l u c a m i n e -NH₂ (7.9 mg) のDMSO
溶液 (0.50 mL) を上記の環状ペプチドの反応液に加え2時間攪拌した。水 (5
0 μL) を加えた後、バイオタージ社V-10を用い減圧下濃縮した。得られた混合
物をDMF (0.67 mL) に溶解し、フェニルシラン (25 μL, CAS: 694
5 -53-1) 及びPd (PPh₃)₄ (4.6 mg, CAS: 14221-01-3
) を加え室温で50分間攪拌した。得られた混合物にDIPEA (68 μL) 及びD
OTA-NHS TFA塩 (36 mg, CAS: 2832911-57-4) を加え
25℃で終夜攪拌した。水 (100 μL) を加えた後、得られた混合物の半量をDM
SO (1 mL) 及び水 (1 mL) に希釈後、0.5 M塩化ルテチウム (III) の酢
10 酸アンモニウム水溶液 (2.4 mL, pH 5.0) と90℃で1時間攪拌した。得ら
れた懸濁液をバイオタージ社V-10を用い減圧下濃縮後、DMSO/水 (9/1,
4 mL) に溶解した。

得られた水溶液を以下の条件で精製した (カラム: Waters XSelect
(登録商標) C18 5 μm 50 x 250 mm; 移動相: A=0.1% TFA
15 (水中)、B=0.1% TFA (MeCN中); 温度: 50℃; グラジエント (%B
) : 5分間かけて0-0%, 2分間かけて0-4.2%, 3分間かけて4.2-19.
5%, 15.5分間かけて19.5-24.6%, 1.5分間かけて24.6-60
%; 流量: 5分間かけて18-18 mL/分、2分間かけて18-118 mL/分、
その後118 mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥した。

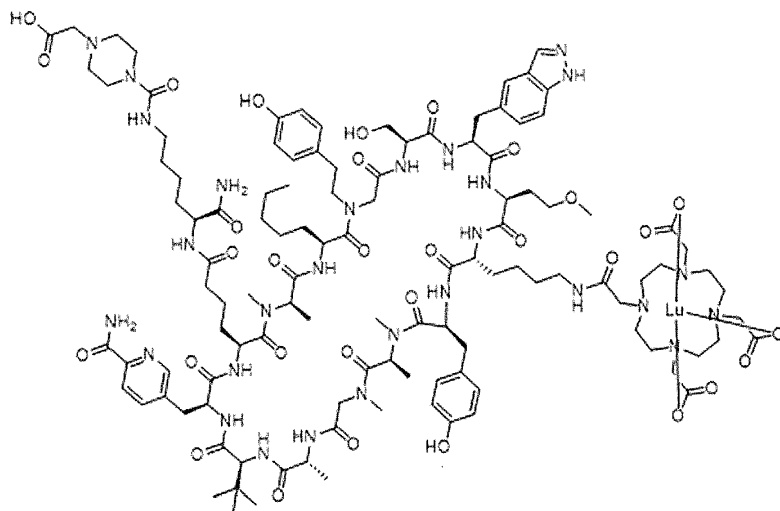
20 分析条件のLC/MS (UV波長 225 nm) クロマトグラムの面積比から、目
的物の純度を算出した。目的物の純度は、97.7%であった。

分析条件B: 保持時間=5.72分

ESI-MS (+) 観測値m/z = 865.85 (M+3H)³⁺

実施例11-4 コンジュゲート Conjugate No. 79の合成

[化 2 6]



Conjugate No. 67と同様な方法で環状ペプチド（配列：da-Tb
g-3Py6CON-Hg1-Meda-Ahp-pHPeG-S-5Inda-H
5 seMe-dk（Alloc）-Y-MeA-MeG（配列番号103））を合成した。
。Fmoc-dk（Boc）-OHの代わりにFmoc-dk（Alloc）-OH
を用いた。

以下の条件で精製を実施した（カラム：Waters XBridge（登録商標） C18 5 μ m 50 x 150mm；移動相：A=0.1% TFA（水中）、B=0.1% TFA（MeCN中）；温度：40℃；グラジエント（%B）：2分間かけて8-8%、1分間かけて8-33%、8分間かけて33-38%、1分間かけて38-60%；流量：1分間かけて20-20mL/分、1分間かけて20-120mL/分、その後120mL/分）。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥した。

上記の方法で得た環状ペプチド（3.8 mg）をDMF（0.65 mL）に溶解し、
15 2, 4, 6-トリメチルピリジン（25.8 μ L, CAS: 108-75-8）及び
0.5 M HATUのDMF溶液（58.7 μ L）を25℃で加え5分間攪拌した。
H-KCOpipzaa(Mpe)-NH₂（10.2 mg）のDMSO溶液（0.
50 mL）を上記の環状ペプチドの反応液に加え1.5時間攪拌した。水（50 μ L
）を加えた後、バイオタージ社V-10を用い減圧下濃縮した。得られた混合物をT

FA/TIS/H₂O (9.5/2.5/2.5, 0.5 mL) に溶かし、30 分間攪拌した。得られた混合物をジイソプロピルエーテル/ヘプタン (1/1, 5 mL) に加え生じた固体を遠心分離した。上清を除去し、ジイソプロピルエーテル/ヘプタン (1/1, 5 mL) で洗浄した。減圧下乾燥後、DMF (0.67 mL) に溶かし、
5 フェニルシラン (25 μ L, CAS: 694-53-1) 及び Pd(PPh₃)₄ (4.6 mg, CAS: 14221-01-3) を加え室温で 50 分間攪拌した。得られた混合物に DIPEA (68 μ L) 及び DOTA-NHS TFA 塩 (36 mg, CAS: 2832911-57-4) を加え 25℃ で終夜攪拌した。水 (100 μ L) を加えた後、得られた混合物の半量を DMSO (1 mL) 及び水 (1 mL) に希釈
10 後、0.5 M 塩化ルテチウム (III) の酢酸アンモニウム水溶液 (2.4 mL, pH 5.0) と 90℃ で 1 時間攪拌した。得られた懸濁液をバイオタージ社 V-10 を用い減圧下濃縮後、DMSO/水 (9/1, 4 mL) に溶解した。

得られた水溶液を以下の条件で精製した (カラム: Waters XSelect (登録商標) C18 5 μ m 50 x 250 mm; 移動相: A=0.1% TFA (水中)、B=0.1% TFA (MeCN 中); 温度: 50℃; グラジエント (%B): 5 分間かけて 0-0%, 2 分間かけて 0-4.2%, 3 分間かけて 4.2-19.5%, 1.5 分間かけて 19.5-24.6%, 1.5 分間かけて 24.6-60%; 流量: 5 分間かけて 1.8-1.8 mL/分、2 分間かけて 1.8-1.18 mL/分、その後 1.18 mL/分)。目的物を含む区分を集めて凍結乾燥した。

20 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、目的物の純度を算出した。目的物の純度は、96.6% であった。

分析条件 B: 保持時間 = 5.70 分

ESI-MS (+) 観測値 $m/z = 867.91$ ($M + 3H$)³⁺

実施例 11-5 コンジュゲートの合成

25 実施例 1 及び実施例 11-1、2 に記載の一般的な方法に従い、以下の表の目的のペプチド及び当該ペプチドとペイロードのコンジュゲートを合成した。

[表 18]

Conjugate No.	Cyclization	SEQ														Terminus	m/z	[M+H] ⁺	Retention Time	Conditions	KD (M)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14						
70	CAC	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	PeG	D	3PyNH2	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeC		NH2					
71	CAC	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	PeG	D	3PyNH2	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeC		NH2					
72	CAC	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	PeG	D	3PyNH2	HseMe	ds		MeC		NH2					
73	CAC	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	PeG	D	Sixd	HseMe	ds(DOTA-HenCh)	Y	MeC		NH2					
74	CAC	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeC		NH2	1143.45	2	3.54	A	1.11E-10
75	CAC	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA-MeG)	Y	MeC		NH2	1108.84	2	3.208	A	8.00E-11
76	Free	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeC		NH2	774.14	3	3.416	A	1.50E-10
77	Free	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeC		NH2	773.95	3	3.188	A	9.88E-11
78	Free	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeA		NH2	685.85	3	5.724	B	1.50E-10
79	Free	ds	Tdg	3PySCON	Hg	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeA		NH2	687.81	3	5.7	B	1.00E-10
80	Free	ds	Tdg	3PySCON	Oxycarmine	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeA		NH2	818.3	3	3.072	A	5.13E-11
81	Free	ds	Tdg	3PySCON	Oxycarbaz	Media	Alp	pHPaG	S	Sixd	HseMe	ds(DOTA)	Y	MeA		NH2	820.3	3	3.104	A	1.00E-10

表18に、目的物のコンジュゲート、分析条件及び保持時間、ESI-MS+での観測値を記載した。

表18において、terminusはC末端の官能基（表中、「-OH」はCOOHを、「-NH₂」はCO(NH₂)を示す）を示し、記載がない場合はC末端に官能基が存在しないことを示す。また、表中の「Cyclization」について、C1Acの記載があるものはクロロアセチル基を導入した1番目のアミノ酸とC末端に存在するC又はMeCとを結合させ環状化したことを示し、「Free」とは、1番目のアミノ酸のN末端アミノ基と13番目又は14番目のアミノ酸のC末端カルボキシ基が結合していることを示す。また、例えば、Conjugate No. 75のコンジュゲートは、X1とX13のアミノ酸残基Cが環状構造を取っており、さらにX11のdkの側鎖が、ペイロードであるGa結合DOTAに結合していることを示す。さらに、表8に記載のコンジュゲートConjugate No. 76は、同様にX1とX14のアミノ酸残基MeGが環状構造を取っており、X11のdkの側鎖が、ペイロードであるLu結合DOTAに結合していることを示す。

[表 19 - 1]

SEQ ID No.	SEQ														Additional
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
2	da	i	3Py6NH2	S	PeG	Atp	PaG	H	3Py6NH2	HsaMe	G	Y	C		G
3	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	G	Y	MeC		
4	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	G	Y	MeC		
5	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	G	Y	MeC		
6	de	Tbg	3Py6CON	Hgl	PeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	G	Y	MeC		
7	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
8	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
9	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
10	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
11	dhgl	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
12	da	Tbg	3Py6CON	alt	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
13	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	P	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
14	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	FCOMe	HsaMe	da	Y	MeC		
15	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pMOPaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
16	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	MeMOPaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
17	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	3OMePaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
18	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	Y	HsaMe	da	Y	MeC		
19	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
20	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	D	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
21	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	E	da	Y	MeC		
22	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
23	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pMeOPaG	S	Y	HsaMe	da	Y	MeC		
24	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pHPeG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
25	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
26	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pPeG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
27	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pPeG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
28	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	mcPeG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
29	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pCPeG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
30	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	4HPaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
31	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	4OMPaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
32	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	4PyPaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
33	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	PdSh	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
34	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
35	da	Tbg	3Py6CON	Hgn	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	da	Y	MeC		
36	da	Tbg	3Py6CON	ShMe	MeG	Atp	PaG	S	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
37	da	Tbg	3Py6CON	DabAc	MeG	Atp	PaG	S	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
38	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	4COOPaG	S	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
39	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	3COOPaG	S	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
40	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	3FPaG	S	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
41	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	Nse	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
42	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	SMe	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
43	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	Qnm	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
44	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	Qdm	5Inda	HsaMe	da	Y	MeC		
45	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	dk	Y	MeC		
46	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pHPeG	S	5Inda	HsaMe	dk	Y	MeC		
47	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	PaG	S	3Py6NH2	HsaMe	dk	Y	MeC		
48	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pHPeG	S	5Inda	HsaMe	dkAc	Y	MeA	MeG	
49	da	Tbg	3Py6CON	Hgn	MeG	Atp	pHPeG	S	5Inda	HsaMe	dkAc	Y	MeA	MeG	
50	da	Tbg	3Py6CON	alt	MeG	Atp	pHPeG	S	5Inda	HsaMe	dkAc	Y	MeA	MeG	
51	da	Tbg	3Py6CON	Hgl	MeG	Atp	pHPeG	S	5Inda	HsaMe	dkAc	Y	MeS	MeG	

[表 19 - 2]

52	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dkAc	Y	MeN	MeG
53	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dkAc	Y	Hpr	MeG
54	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dkAc	Y	MeA	dp
55	da(PEG8Me)	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
56	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	D	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk(F)	Y	MeC	
57	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk(PEG8Me)	Y	MeC	
58	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
59	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	PeG	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	G	Y	MeC	K
60	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeCl	
61	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	PEG10c
62	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	PeG	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	G	Y	MeC	dk
63	dk	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	G	Y	MeC	
64	da	Tbg	3P ₆ GCON	K	MeG	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	G	Y	MeC	
65	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	MeG	Ahp	PeG	K	3P ₆ GNH2	HsaMe	G	Y	MeC	
66	dk	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	da	Y	MeC	
67	dyae	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
68	da	Tbg	3P ₆ GCON	K	Meda	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
69	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	K	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
70	dk	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	D	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
71	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	K	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
72	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
73	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	D	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
74	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
75	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
76	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	D	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
77	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
78	da	Tbg	3P ₆ GCON	Y	Meda	Ahp	PeG	D	Y	HsaMe	dk	Y	MeC	
79	da	Tbg	3P ₆ GCON	all	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
80	da	Tbg	3P ₆ GCON	K	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
81	da	Tbg	3P ₆ GCON	all	Meda	Ahp	pHFeG	K	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
82	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
83	dkCOpip2aa	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
84	da	Tbg	3P ₆ GCON	KCOpip2aa	Meda	Ahp	PeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
85	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	KCOpip2aa	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
86	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	5inda	HsaMe	dkCOpip2aa	Y	MeC	dk
87	dkCOpip2aa	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	mCPeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
88	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	PeG	S	5inda	HsaMe	dkCOpip2aa	Y	MeC	
89	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl(PEG8Me)	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
90	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	DFEG8Me	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
91	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgn	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeC	
92	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgn	Meda	Ahp	pHFeG	S	3P ₆ GNH2	HsaMe	dk	Y	MeC	
93	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	G	G
94	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
95	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	P	da
96	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	P	Meda
97	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeS	MeG
98	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgn	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
99	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgn(OGlucamine-NH2)	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
100	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgn(KCOpip2aa-NH2)	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
101	da	Tbg	3P ₆ GCON	Glucamine	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
102	da	Tbg	3P ₆ GCON	KCOpip2aa	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk	Y	MeA	MeG
103	da	Tbg	3P ₆ GCON	Hgl	Meda	Ahp	pHFeG	S	5inda	HsaMe	dk(Alloc)	Y	MeA	MeG

[表 20 - 1]

Conjugate No.	SEQ ID No.
1	2
2	4(59)
3	4(62)
4	4(59)
5	4(62)
6	63
7	64
8	65
9	47
10	66
11	67
12	68
13	69
14	45
15	70
16	71
17	72
18	73
19	70
20	72
21	4(59)
22	4(59)
23	74
24	74
25	74
26	46
27	75
28	76
29	77
30	78
31	77
32	76
33	76
34	76
35	76(56)
36	76
37	45
38	46(57)
39	79
40	80

[表 2 0－2]

41	81
42	80
43	82
44	82
45	60
46	83
47	84
48	85
49	88(86)
50	87
51	55
52	89
53	90
54	46
55	45
56	46
57	45
58	46
59	91
60	91
61	92
62	46
63	46
64	45
65	47
66	93
67	58
68	95
69	96
70	73
71	77
72	70
73	77
74	46
75	46
76	97
77	98
78	99
79	100
80	101
81	102

表19に、実施例2及び実施例11-3で合成したペプチド及びコンジュゲートに含まれるペプチド部分のアミノ酸配列だけを示した。また、表20に、本実施例にて合成・評価したコンジュゲートと、当該コンジュゲートの環状構造部分に含まれるアミノ酸配列のSEQ ID No. との対比表を示す。なお、コンジュゲート Conjugate No. 2~5、21、22、35、38、49では、それぞれ4 (59)、4 (62)、76 (55)、46 (57)、88 (86) と記載されている。これは、例えばコンジュゲート Conjugate No. 2においては、環状構造部分に含まれるアミノ酸配列はSEQ ID No. 4に記載のアミノ酸配列であり、それにペイロードであるDOTAを結合するためのリンカーとしてのK (リジン) がC末端に結合したペプチド-リンカー複合体が、SEQ ID No. 59に表されるアミノ酸配列であることを示す。また、コンジュゲート Conjugate No. 35においては、環状構造部分に含まれるアミノ酸配列はSEQ ID No. 76に記載のアミノ酸配列であり、それにペイロードであるDOTALuを結合するためのリンカーとしてのF (フェニルアラニン) が当該環状構造部分に含まれるアミノ酸配列の11番目のdkの側鎖に結合したペプチド-リンカー複合体が、SEQ ID No. 56に表されるアミノ酸配列であることを示す。同様に、コンジュゲート Conjugate No. 38においては、環状構造部分に含まれるアミノ酸配列はSEQ ID No. 46に記載のアミノ酸配列であり、それにペイロードであるSulfoCy5を結合するためのリンカーPEG8cが当該環状構造部分に含まれるアミノ酸配列の11番目のdkの側鎖に結合したペプチド-リンカー複合体が、SEQ ID No. 57に表されるアミノ酸配列であることを示す。すなわち、表20においてカッコ内で示されている番号は、リンカー又は付加的なアミノ酸が結合した場合のアミノ酸配列SEQ ID No. を示す。

例えば、コンジュゲート Conjugate No. 1は、SEQ ID No. 2に表されるアミノ酸配列を環状構造部分として有し、さらにC末端に付加したG、PEG10c、Kのリンカーを介してペイロードであるSulfoCy5が結合した複合体である。ここで、表7で示されるように環状アミノ酸配列部分のみであっても、表8であらわされるように何らかのペイロードとのコンジュゲートであっても、

どちらでもCA9への結合能を有する。また、SEQ ID No. 45に表されるアミノ酸を環状構造部分として有し、ペイロードのみ異なるコンジュゲートが複数存在する (Conjugate No. 14、37、55、57、64) が、ペイロードを有さないSEQ ID No. 45であっても、DOTA等各種キレート剤や、

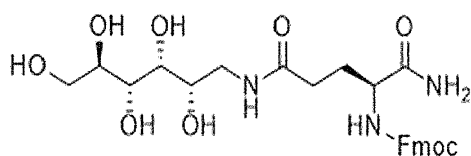
5 当該キレート剤に金属イオンが結合した構造、SulfoCy5のような低分子物質であっても、すべてCA9に対する結合能を有する。すなわち、あるコンジュゲートにおいてCA9への結合能を有する場合、当該コンジュゲートに含まれる環状構造部分のアミノ酸配列を有するペプチドであってペイロードを含まない環状ペプチド、又は、当該コンジュゲートのペイロード違いであっても、CA9への結合能を有すること

10 とは明らかである。

このように、本発明のペプチドは、ペイロードの有無及びペイロードの種類に関わらず、CA9結合能を有する。

参考例3：Fmoc-Glucamine-NH₂の合成

[化27]



15

N2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)-N5-((2S)-2-ヒドロキシ-2-((4'R, 5S)-2, 2, 2', 2'-テトラメチル[4, 4'-ビ(1, 3-ジオキソラン)]-5-イル)エチル)-L-グルタミン (200 mg, CAS: 1227510-37-3) 及び塩化アンモニウム (34.9 mg, CAS: 12125-02-9) のDMF溶液 (3.3 mL) にDIPEA (0.14 mL) 及びHATU (0.19 mg) を加え0℃で1時間攪拌した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (DCM/MeOH=100/0-80/20) で精製し、目的物を含む区分を回収した。得られた化合物の一部 (111 mg) をDCM (2.7 mL) 及びエタノール (1.8 mL) に溶解し、TFA (1 mL) と2

20

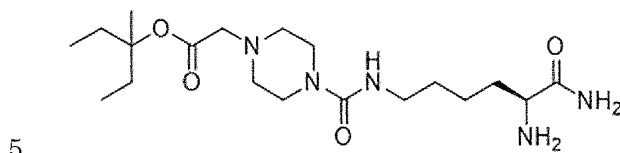
25 5℃で一週間攪拌した。得られた懸濁液をメチルターシャリーブチルエーテルに希釈し、遠心分離した。上清を除去後、メチルターシャリーブチルエーテルでトリチュレ

ーションした。表題の化合物を得た。

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 532.2$ (M+H)⁺

参考例4：H-K O p i p z a a (M p e) -NH₂の合成

[化28]



N2 - (((9H-フルオレン-9-イル) メトキシ) カルボニル) -N6 - (4 -
 (2 - ((3-メチルペンタン-3-イル) オキシ) -2-オキソエチル) ピペラジン
 -1-カルボニル) -L-リジン (200mg, CAS : 2973753-38-5
) 及び塩化アンモニウム (34.4mg, CAS : 12125-02-9) のDMF
 10 溶液 (3.2mL) にD I P E A (0.14mL) 及びH A T U (0.18mg) を
 加え25℃で2時間攪拌した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (D
 C M / M e O H = 100 / 0 - 90 / 10) で精製し、目的物を含む区分を回収した
 。得られた化合物の一部 (100mg) をDMSO (1.6mL) に溶かし、T E A
 (0.34mL) を加え60℃で1時間攪拌した。バイオタージ社V-10を用い減
 15 圧下濃縮し、メチルターシャリーブチルエーテルでトリチュレーションした。表題の
 化合物を得た。

E S I - M S (+) 観測値 $m/z = 400.3$ (M+H)⁺

産業上の利用可能性

本発明に係るペプチド及びコンジュゲートは、C A 9 結合活性を有し、C A 9 関連
 20 症状の予防又は治療用の医薬用組成物、診断用組成物、及び研究用組成物等として利
 用可能である。

請求の範囲

[請求項1]

以下のアミノ酸配列：

d a - T b g - 3 P y 6 C O N - H g l - M e d a - A h p - P e G - S - 3 P y
6 N H 2 - H s e M e - d k - Y (配列番号1)

あるいは、

上記のアミノ酸配列の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-10個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む、ペプチド。

[請求項2]

(1) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMe C、C又はMe C tが付加されている；

あるいは、

(2) 配列番号1のアミノ酸配列に、13番目のアミノ酸残基としてMe A、Me S、Me N、H p r、G又はPが付加されており、さらに、14番目のアミノ酸残基としてMe G、G、d a、又はM e d aが付加されている、

請求項1に記載のペプチド。

[請求項3]

配列番号1のアミノ酸配列の1番目、4番目、7番目、8番目、9番目、10番目及び11番目のアミノ酸残基からなるグループから選択される、1-7個のアミノ酸残基において、置換、付加、欠失又は挿入を有するアミノ酸配列、を含む、請求項1又は2に記載のペプチド。

[請求項4]

以下の：

1番目のアミノ酸残基が、d a、d q、d e、d h g l、又はd kである；

2番目のアミノ酸残基が、I 又はT b gである；

- 3 番目のアミノ酸残基が、3 P y 6 N H 2 又は 3 P y 6 C O N である；
- 4 番目のアミノ酸残基が、S、H g l、H g l (P E G 8 M e)、a l T、H g n、S M e、K C O p i p z a a、又は D a b A c である；
- 5 番目のアミノ酸残基が、P e G、M e G、M e d a、又は M e d k C O p i p z a a である；
- 7 番目のアミノ酸残基が、P e G、p M e O P e G、M s M e a p G、3 O M e P e G、p H P e G、P p G、p F P e G、m C P e G、p C P e G、4 H P p G、4 O M e P p G、4 P y p G、4 C O O P e G、3 C O O P e G、又は 3 F P e G である；
- 8 番目のアミノ酸残基が、H、S、P、D、K C O p i p z a a、Q (P E G 8 M e)、P 4 S h、H s e、S M e、Q m m、又は Q d m である；
- 9 番目のアミノ酸残基が、3 P y 6 N H 2、5 I n d a、Y 又は F 4 O M e である；
- 10 番目のアミノ酸残基が、A h p、H s e M e、又は E である；
- 並びに、
- 11 番目のアミノ酸残基が、d k、G、d a、d q、d k C O p i p z a a、d k (t 4 a m C h)、d e、A c b、又は d k A c である、
- 1 つ又は 2 以上の要件を具備する、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。
- [請求項 5]
- 以下の、
- 2 番目のアミノ酸残基が T b g である；
- 3 番目のアミノ酸残基が 3 P y 6 N H 2 である；
- 5 番目のアミノ酸残基が M e d a である；
- 7 番目のアミノ酸残基が P e G 又は p H P e g である；
- 9 番目のアミノ酸残基が 3 P y 6 N H 2 又は 5 I n d a である；
- 並びに、
- 10 番目のアミノ酸残基が H s e M e である、
- 1 つ又は 2 以上の要件を具備する、請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項6]

2番目のアミノ酸残基がT b gであり；

3番目のアミノ酸残基が3 P y 6 N H 2であり；

5番目のアミノ酸残基がM e d aであり；

7番目のアミノ酸残基がP e G又はp H P e gであり；

9番目のアミノ酸残基が3 P y 6 N H 2又は5 I n d aであり；

並びに、

10番目のアミノ酸残基がH s e M eである、

請求項1－4のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項7]

配列番号2－54のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、若しくは、からなる、請求項1－6のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項8]

さらに、付加的なアミノ酸残基を有する、請求項1－7のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項9]

前記ペプチドが、環状ペプチドである、請求項1－8のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項10]

クロロアセチル化した配列番号1のアミノ酸配列の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、請求項1－9のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項11]

前記ペプチドに含まれる配列番号1のアミノ酸配列の1番目のアミノ酸残基のアミノ基と、14番目のアミノ酸残基のカルボキシ基が結合された環状構造を有する、請求項1－9のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項12]

(a) 前記ペプチドのC末端に、リンカー及び／又はペイロードが結合可能である

；
あるいは、

(b) 配列番号1のアミノ酸配列の1番目、4番目、8番目、11番目又は13番目のアミノ酸残基が、リンカー及び／又はペイロードが結合可能なアミノ酸残基である、

請求項1-11のいずれか1項に記載のペプチド。

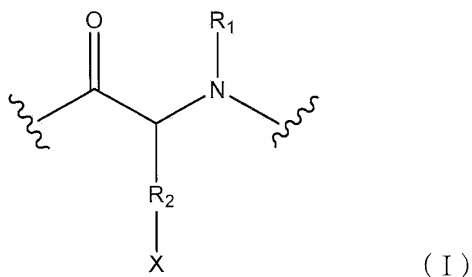
[請求項13]

請求項1-12のいずれか1項に記載のペプチドと、ペイロードとを含むコンジュゲートであって、

(i) 配列番号1の13番目のアミノ酸残基に、リンカーを介し又は介さずに、任意のペイロードと結合している；あるいは、

(ii) 以下の式(I)で示されるように、配列番号1の1、4、8又は11番目のアミノ酸残基にペイロードが結合している：

[化1]



[式(I)中、

R₁は、H又はC1-3アルキル基であり；

R₂は、C1-6アルキル-NH-、C1-6アルキル-C6アリール-O-C1-3アルキル-NH-、C1-6アルキル-NH(=O)-CH(C1-6アルキルフェニル)-NH-、C1-6アルキル-NH(=O)-CH(C1-6アルキル)-NH-、又は、C1-6アルキル-NH(=O)-C3-8シクロアルキル-C1-3アルキル-NH-であり；

Xは、任意のペイロードである]、
前記コンジュゲート。

[請求項 1 4]

R_2 が、C 1 - 6 アルキル-NH-である、請求項 1 3 に記載のコンジュゲート。

[請求項 1 5]

Xが、キレート剤である、請求項 1 3 又は 1 4 に記載のコンジュゲート。

[請求項 1 6]

前記キレート剤が、放射性物質に結合している、請求項 1 5 に記載のコンジュゲート。

[請求項 1 7]

前記キレート剤が、DOTA、DOTAGA、又はNODAGAである、請求項 1 5 又は 1 6 に記載のコンジュゲート。

[請求項 1 8]

請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、医薬組成物。

[請求項 1 9]

請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、CA 9 関連疾患を予防、又は治療するための医薬組成物。

[請求項 2 0]

請求項 1 3 - 1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物。

[請求項 2 1]

請求項 1 3 - 1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、CA 9 関連疾患を予防、又は治療するための医薬組成物。

[請求項 2 2]

請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、診断用又は研究用の組成物。

[請求項 2 3]

請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む、CA 9 関連疾患を診断するための診断用又は研究用の組成物。

[請求項 2 4]

請求項 1 3 - 1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、診断用又は研究用の

組成物。

〔請求項 2 5〕

請求項 1 3－1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、C A 9 関連疾患を診断するための診断用又は研究用の組成物。

〔請求項 2 6〕

請求項 1 3－1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、イメージング剤。

〔請求項 2 7〕

請求項 1 3－1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、腫瘍診断用のために用いられる、イメージング剤。

〔請求項 2 8〕

請求項 1 3－1 7 のいずれかに記載のコンジュゲートを含む、陽電子放出断層撮影法に用いられる、放射性リガンドイメージング剤。

〔請求項 2 9〕

ペプチドについて

- a) 溶媒への溶解度
- b) C A 9 結合活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- 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 1－1 2 のいずれか 1 項に記載のペプチドである、
前記方法。

〔請求項 3 0〕

コンジュゲートについて

- a) 溶媒への溶解度
- b) C A 9 結合活性
- c) 細胞及び／又は組織への毒性、又は、
- d) 実験動物への毒性

の少なくとも 1 つを試験する、コンジュゲートの試験方法であって、

前記コンジュゲートは、請求項13-17のいずれか1項に記載のコンジュゲートである、

前記方法。

[請求項31]

以下の：

1番目のアミノ酸残基が、de (PEG8Me)、dk、dyae又はdkCOpipzaaである；

2番目のアミノ酸残基が、I又はTbgである；

3番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂又は3Py6CONである；

4番目のアミノ酸残基が、K、KCOpipzaa、Hgn (Qglucamine-NH₂)、Hgn (KCOpipzaa-NH₂) 又はQglucamineである；

5番目のアミノ酸残基が、PeG、MeG、Meda、又はMedkCOpipzaaである；

7番目のアミノ酸残基が、PeG、pMeOPeG、MsMeapG、3OMePeG、pHPeG、PpG、pFPeG、mCPeG、pCPeG、4HPpG、4OMePpG、4PypG、4COOPeG、3COOPeG、又は3FPeGである；

8番目のアミノ酸残基が、Kである；

9番目のアミノ酸残基が、3Py6NH₂、5Inda、Y、又はF4OMeである；

10番目のアミノ酸残基が、Ahp、HseMe、又はEである；

並びに、

11番目のアミノ酸残基が、dk (F) 又はdk (PEG8c) である、

1つ又は2以上の要件を具備する、請求項1-3のいずれか1項に記載のペプチド。

[請求項32]

配列番号55-103のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、若しくは、か

らなる、請求項 1－6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

[請求項 3 3]

請求項 3 2 に記載のペプチドと、ペイロードとを含むコンジュゲートであって、1、4、8、11 又は 13 番目のアミノ酸残基に、リンカーを介し又は介さずに、任意のペイロードが結合している、前記コンジュゲート。

[請求項 3 4]

表 8 又は表 18 に記載のコンジュゲート番号 1－81 のいずれか一つに記載のコンジュゲート。