

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7665261号  
(P7665261)

(45)発行日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(24)登録日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	

請求項の数 5 (全39頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-538862(P2024-538862)  
 (86)(22)出願日 令和5年6月29日(2023.6.29)  
 (86)国際出願番号 PCT/JP2023/024137  
 (87)国際公開番号 WO2024/029242  
 (87)国際公開日 令和6年2月8日(2024.2.8)  
 審査請求日 令和6年7月24日(2024.7.24)  
 (31)優先権主張番号 特願2022-125238(P2022-125238)  
 (32)優先日 令和4年8月5日(2022.8.5)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 日本国(JP)  
 早期審査対象出願

(73)特許権者 000119472  
 一丸ファルコス株式会社  
 岐阜県本巣市浅木3 1 8 番地 1  
 (74)代理人 110003557  
 弁理士法人レクシード・テック  
 (72)発明者 坂元 孝太郎  
 岐阜県本巣市浅木3 1 8 番地 1 一丸フ  
 アルコス株式会社内  
 審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規LRP1結合ペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1～46からなる群から選択される配列番号で表されるアミノ酸配列を含み、LRP1結合活性を有する直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

【請求項2】

請求項1に記載のペプチドを含む医薬、診断薬、及び/又は試薬。

【請求項3】

請求項1に記載のアミノ酸配列の中で天然アミノ酸のみで構成されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】

請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項5】

請求項1に記載のアミノ酸配列を提示する細胞、酵母、バクテリア、ウイルス、リポソーム、又はナノ粒子。

【発明の詳細な説明】

【クロスリファレンス】

【0001】

本出願は、2022年8月5日に日本国において出願された特願2022-125238に基づき優先権を主張し、当該出願に記載された内容は全て、参照によりそのまま本明

細書に援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、LRP1に結合するペプチド等に関する。本発明は、LRP1への結合を介して、末梢組織と脳組織を隔てる関門組織、例えば血液脳関門(BBB)を通過できるペプチド等に関する。詳細には特定のアミノ酸配列を有する直鎖状ペプチド又は環状ペプチド等に関する。

【背景技術】

【0003】

認知症、統合失調症、自閉スペクトラム症などの中枢神経系疾患(精神疾患)は、罹患10  
者数が世界で10億人にのぼるとされ、障害調整生命年の最大を占めるため、その総社会  
負荷は甚大である。例えば、2030年の米国と欧州における経済的負担額は合わせて6  
兆ドルとの試算がある(非特許文献1)。これらの背景から、中枢神経系疾患に対する創  
薬は、その成功が莫大な市場につながることを期待されるが、一方で失敗率が最も高い創  
薬領域であることも知られている(非特許文献1)。その原因の一つは、生体において末  
梢組織と脳組織を隔てる関門組織:血液脳関門、血液脳脊髄液関門、血液脊髄関門、血液  
クモ膜関門の存在である。この中でも特に血液脳関門(Blood-Brain Bar  
i e e r : B B B ) は、中枢神経系疾患に対する創薬のハードルである。血液脳関門は密  
着結合で連結された脳毛細血管内皮細胞の周辺をペリサイト、さらにアストロサイトが覆  
うことで形成される物理的な障壁であり、末梢組織と脳組織の間の物質の流入出を厳密に  
制御している(非特許文献2)。例えば、末梢組織から脳組織に受動拡散で移行する物質  
は、分子量が400g/mol以下であり、物性が高脂溶性であることが望ましいと知ら  
れている。このため、中枢神経系疾患に対する創薬の多くは低分子化合物で試みられて  
いるが、オフターゲット効果による副作用が懸念され、創薬標的も限られてしまう。

【0004】

特に近年注目されているタンパク質-タンパク質間相互作用といった創薬標的には、従  
来の低分子化合物が結合できる明確なポケットが少なく、ペプチドといった中分子や抗体  
といった高分子の方がその制御に優れている。また、中分子や高分子は創薬標的に対する  
特異性が高いため、オフターゲット効果による副作用の低減も見込める。しかしながら、  
上述のように関門組織の存在によって、中分子や高分子は、末梢組織から脳組織に受動拡  
散で移行することが極めて難しいことが課題である。

【0005】

これまで、中分子や高分子を末梢組織から脳組織に移行させる方法の一つとして、特定  
の栄養物質や必須成分を脳に移行させるために血液脳関門に発現する受容体を介したトラ  
ンスサイトーシス(Receptor-mediated transcytosis:  
RMT)が検討されてきた。例えば、グルコースやアミノ酸を基質とするトランスポー  
ター、インスリン、トランスフェリン、リポタンパク質の受容体などが挙げられる(非特許  
文献2)。ヒトのトランスフェリン受容体に結合する抗体と薬効分子をコンジュゲートし  
、薬効分子を中枢組織に運ぶ試みについては、既に上市薬があり、ヒト臨床試験にてRM  
Tの概念実証がなされている(非特許文献3)。

【0006】

低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1(Low density lipop  
r o t e i n r e c e p t o r - r e l a t e d p r o t e i n 1 : L R P 1 ) も R M  
Tが期待される受容体の一つである。LRP1の血液脳関門における発現量は、ヒト-サ  
ル-マウスの間でよく相関している。また、多様な内因性リガンドと相互作用するリガ  
ンド結合ドメインであるクラスター2(CL2)とクラスター4(CL4)のアミノ酸配列  
は、種間で極めて高度に保存されている。そして、LRP1結合ペプチドとして知られる  
A n g i o p e p - 2 ( A N G 2 ) に抗癌剤であるパクリタキセルをコンジュゲートした  
分子がヒト臨床試験の第二相を終了しており、LRP1によるRMTのヒトにおける安全  
性が実証されている(非特許文献4)。

10

20

30

40

50

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

【0007】

【文献】L Ereshefsky, R Evans, R Sood, D Williams on And B. A English. "VENTURING INTO A NEW ERA OF CNS DRUG DEVELOPMENT TO IMPROVE SUCCESS" 2015.

【文献】V. M Pulgar. Front Neurosci. 2019, 12:1019.

【文献】R Yamamoto and S Kawashima. Nihon Yakugaku Zasshi. 2022, 157(1):62-75. 10

【文献】P Kumthekar, Sc Tang, A. J Brenner, S Kesari, D. V Piccioni, C Anders, J Carrillo, P Chalasani, P Kabos, S Puhalla, K Tkaczuk, A. A Garcia, M. S Ahluwalia, J. S Wefel, N Lakhani and N Lbrahm. Clin Cancer Res. 2020, 26(12):2789-2799.

【文献】K Sakamoto, T Shinohara, Y Adachi, T Asami and T Ohtaki. Biochem Biophys Rep. 2017, 12:135-139. 20

【文献】F Tanaka, S Dohgu, A Yamauchi, J Matsumoto, T Machida, K Fujishita, K Shibata, Y Shinozaki, K Sato, Y Kataoka and S Koizumi. PLoS One. 2013, 8(1):e55166.

【文献】D Watanabe, S Nakagawa, Y Morofuji, A Toth, m vastag, j aruga, m niwa and m deli. pharmaceuticals. 2021, 13(9):1484.

【文献】DP Fairlie and A Dantas. Biopolymers 2016, 106(6):843-852.

【文献】YH Lau, P Andrade, Y Wu, and DR Spring. C hem Soc Rev. 2015, 44(1)91-102. 30

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

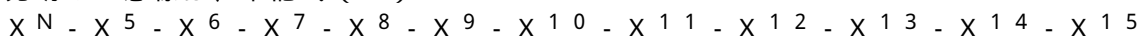
【0008】

本明細書に記載される発明は、LRP1に結合する新規なペプチドを提供することを目的とする。さらに、本ペプチドと「ある分子」を組み合わせ、LRP1によるRMTを介して「ある分子」を脳組織に運ぶことで、「ある分子」を医薬品、診断薬、及び/又は研究試薬として使用するための方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、LRP1に結合する分子を探索し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明の一態様は、下記式(1)：



(1)で表されるアミノ酸配列を有する直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩である。 40

【0010】

ここで、式(1)中、 $X^N$ は、1~4個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^5$ と $X^{15}$ は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D体システイン、又はプロリンを表し、 $X^6$ は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、c i 50

s - 4 - ヒドロキシ - プロリン、又は *trans* - 4 - ヒドロキシ - プロリンを表し、 $X^7$  は、ヒスチジン、チロシン、O - メチル - チロシン、フェニルアラニン、4 - アミノ - フェニルアラニン、4 - フルオロ - フェニルアラニン、又は 4 - クロロ - フェニルアラニンを表し、 $X^8$  は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$  は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O - メチル - チロシン、フェニルアラニン、4 - アミノ - フェニルアラニン、4 - フルオロ - フェニルアラニン、又は 4 - クロロ - フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$  は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$  と  $X^{14}$  は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2 - アミノヘプタン酸、又は 2 - アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$  は、アラニン、D 体アラニン、又は 2 - アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$  は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表し、N 末端アミノ基及び C 末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^5$  と  $X^{15}$  は環状化に關与する場合はシステイン又は D 体システインであり、それぞれの側鎖 - SH 基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式 ( 1 ) のペプチドは分子内に 1 つの環状構造を有していてもよい。

【 0 0 1 1 】

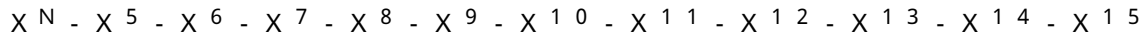
上記式 ( 1 ) のペプチドにおける  $X^1$  から  $X^{15}$  の各アミノ酸残基の好ましい態様は、以下の実施形態において詳細に説明するが、それぞれの好ましい実施形態は相互に独立して任意に組み合わせることができるものとする。

【 0 0 1 2 】

本発明は、さらに具体的には以下の実施形態を含む。

{ 1 }

上述の式 ( 1 ) :

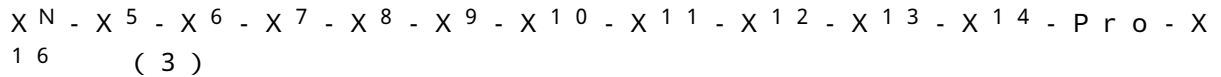


( 1 )

( 式中、 $X^N$  は、1 ~ 4 個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^5$  と  $X^{15}$  は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D 体システイン、又はプロリンを表し、 $X^6$  は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2 , 3 - ジアミノプロピオン酸、2 , 4 - ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、*cis* - 4 - ヒドロキシ - プロリン、又は *trans* - 4 - ヒドロキシ - プロリンを表し、 $X^7$  は、ヒスチジン、チロシン、O - メチル - チロシン、フェニルアラニン、4 - アミノ - フェニルアラニン、4 - フルオロ - フェニルアラニン、又は 4 - クロロ - フェニルアラニンを表し、 $X^8$  は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$  は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O - メチル - チロシン、フェニルアラニン、4 - アミノ - フェニルアラニン、4 - フルオロ - フェニルアラニン、又は 4 - クロロ - フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$  は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$  と  $X^{14}$  は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2 - アミノヘプタン酸、又は 2 - アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$  は、アラニン、D 体アラニン、又は 2 - アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$  は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表し、N 末端アミノ基及び C 末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^5$  と  $X^{15}$  は環状化に關与する場合はシステイン又は D 体システインであり、それぞれの側鎖 - SH 基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式 ( 1 ) のペプチドは分子内に 1 つの環状構造を有していてもよい。 ) で表されるアミノ酸配列を有する直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

{ 2 }

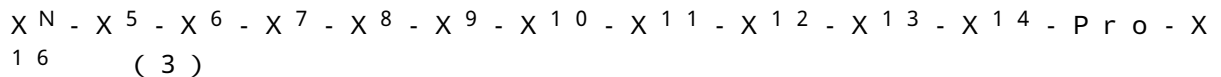
下記式(3)：



(式中、 $X^N$ は、1～4個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^5$ と $X^{16}$ は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D体システイン、又はプロリンを表し、 $X^6$ は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、cis-4-ヒドロキシ-プロリン、又はtrans-4-ヒドロキシ-プロリンを表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^8$ は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$ は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$ は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$ と $X^{14}$ は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2-アミノヘプタン酸、又は2-アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$ は、アラニン、D体アラニン、又は2-アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$ は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表し、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^5$ と $X^{16}$ は環状化に関与する場合はシステイン又はD体システインであり、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式(3)のペプチドは分子内に1つの環状構造を有していてもよい。)で表されるアミノ酸配列を有する直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

[3]

下記式(3)：



(式中、 $X^N$ は、1～4個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^6$ と $X^{16}$ は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D体システイン、又はプロリンを表し、 $X^5$ は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、cis-4-ヒドロキシ-プロリン、又はtrans-4-ヒドロキシ-プロリンを表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^8$ は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$ は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$ は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$ と $X^{14}$ は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2-アミノヘプタン酸、又は2-アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$ は、アラニン、D体アラニン、又は2-アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$ は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表し、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^6$ と $X^{16}$ は環状化に関与する場合はシステイン又はD体システインであり、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式(3)のペプチドは分子内に1つの環状構造を有していてもよい。)で表されるアミノ酸配列を有する直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれら

10

20

30

40

50

の薬理的に許容される塩。

〔 4 〕

$X^N$ が、Lys - Gly - Thr - Pro又はGly - Thr - Proである、〔 1 〕 ~ 〔 3 〕のいずれか一つに記載の直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

〔 5 〕

〔 1 〕 ~ 〔 4 〕のいずれかに記載のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換したアミノ酸配列を含み、LRP1結合活性を有する直鎖状ペプチド若しくは環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

〔 6 〕

〔 1 〕 ~ 〔 5 〕、以下〔 1 4 〕 ~ 〔 2 1 〕のいずれか一つに記載のペプチドの誘導体、及び/又は修飾体。

〔 7 〕

前記誘導体又は修飾体が、N末端、C末端、又はアミノ酸の側鎖に直接又はリンカーを介して、アジド基、アルキン基、シクロオクチン基又はテトラジン基を有する〔 6 〕に記載の、ペプチドの誘導体又は修飾体。

〔 8 〕

〔 1 〕 ~ 〔 7 〕、以下〔 1 4 〕 ~ 〔 2 1 〕のいずれか一つに記載のペプチド又はその誘導体若しくはその修飾体を含む医薬、診断薬、及び/又は試薬。

〔 9 〕

〔 6 〕に記載のペプチドの誘導体又は修飾体と、薬物とが直接又はリンカーを介して連結されている、ペプチド薬物複合体。

〔 1 0 〕

前記薬物が、抗体、核酸、又は生理活性ペプチドである〔 9 〕に記載のペプチド薬物複合体。

〔 1 1 〕

〔 1 〕 ~ 〔 5 〕、以下〔 1 4 〕 ~ 〔 2 1 〕のいずれか一つに記載のアミノ酸配列の中で天然アミノ酸のみで構成されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドと配列同一性70%以上の塩基配列を有し、かつLRP1結合活性を有するペプチドをコードするポリヌクレオチド。

〔 1 2 〕

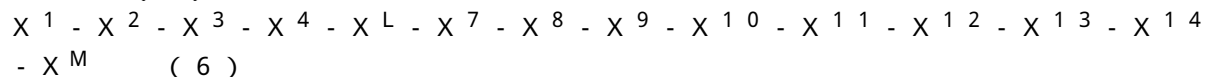
〔 1 1 〕に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

〔 1 3 〕

〔 1 〕 ~ 〔 5 〕、以下〔 1 4 〕 ~ 〔 2 1 〕のいずれか一つに記載のアミノ酸配列を提示する細胞、酵母、バクテリア、ウイルス、リボソーム、又はナノ粒子。

〔 1 4 〕

下記式(6)：



( $X^L$ は、 $X^5 - X^6$ であり、 $X^M$ は、 $X^{15} - X^{16}$ であり、ペプチド分子内の環状化に関与する場合、それぞれ独立にアミノ基、カルボキシ基、チオール基、アリル基、アルキニル基、アジド基、若しくはハロゲン原子を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、ペプチド分子内の環状化に関与しない場合、 $X^5$ 、 $X^6$ 、又は $X^{15}$ は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 $X^{16}$ は、任意のアミノ酸残基、それらの誘導体、又は欠失を表し、 $X^7$ は、置換基を有していてもよい炭化水素基を有するアミノ酸残基、置換基を有していてもよい芳香族炭素環基を有するアミノ酸残基、置換基を有していてもよい芳香族複素環基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 $X^8$ は、正電荷を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 $X^{11}$ 、 $X^{12}$ 及び $X^{14}$ は、それぞれ独立に置換基を有していてもよい炭化水素基を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 $X^{13}$ は、置換基を有していてもよい炭化水素基を有するア

10

20

30

40

50

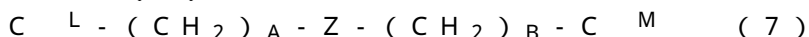
ミノ酸残基、負電荷を有するアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 $X^9$ 、 $X^{10}$ は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基、又はそれらの誘導体を表し、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ は、それぞれ独立に任意のアミノ酸残基、それらの誘導体、又は欠失を表し、 $X^L$ と $X^M$ の間は直接的な又はリンカーを介した間接的な共有結合を形成することで式(6)のペプチドは分子内に1つの環状構造を有していてもよく、その場合の $X^L$ と $X^M$ の間の共有結合は、それらの主鎖-主鎖間、主鎖-側鎖間、側鎖-主鎖間、又は側鎖-側鎖間のいずれの結合であってもよく、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよい。) )

で表されるアミノ酸配列からなる直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理学的に許容される塩。

10

[15]

$X^5$ と $X^{15}$ のC炭素原子間の結合、 $X^6$ と $X^{15}$ のC炭素原子間の結合、 $X^5$ と $X^{16}$ のC炭素原子間の結合、又は $X^6$ と $X^{16}$ のC炭素原子間の結合が、それぞれ独立に下記式(7)：



(式中、Lは4又は5であり、Mは14又は15であり、AとBは、それぞれ独立に0~2のいずれかの整数を表し、AとBの総和は、0~4のいずれかの整数であり、Zは、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、O- $CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、O- $C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、O- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、S- $CH_2-S$ 、S- $C(=CH_2)-S$ 、S- $(C(=O)-CH_3)-S$ 、S- $(CH_2)_2-S$ 、S- $(CH_2)_3-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ 、S- $(CH_2)_4-S$ 、S- $CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ (フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい)、S- $CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、又はS- $CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ を表す。)

20

で表される構造を含む[14]に記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理学的に許容される塩。

30

[16]

$X^8$ が、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、ホモアルギニン、それらのD体アミノ酸、それらのNメチル化アミノ酸、それらのメチル化アミノ酸、又はそれらの誘導体である、請求[14]又は[15]に記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理学的に許容される塩。

[17]

$X^{12}$ が、アラニン、D体アラニン、2-アミノイソ酪酸、2-アミノブタン酸、D体2-アミノブタン酸、イソバリン、D体イソバリン、バリン、D体バリン、イソロイシン、D体イソロイシン、ロイシン、D体ロイシン、それらのNメチル化アミノ酸、それらのメチル化アミノ酸、又はそれらの誘導体である、[14]から[16]のいずれか一つに記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理学的に許容される塩。

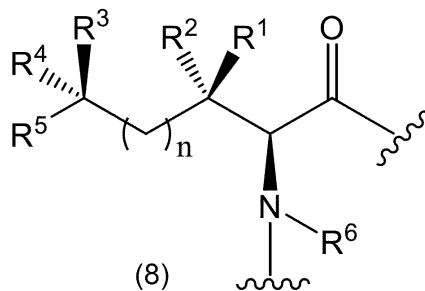
40

[18]

$X^{11}$ と $X^{14}$ が、それぞれ独立にメチオニン、下記式(8)：

50

## 【化 1】

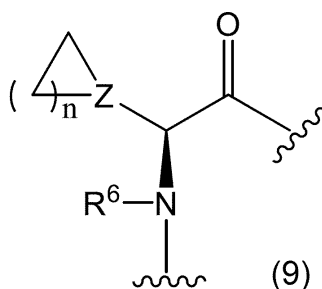


10

(式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との付着点を表し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は、それぞれ独立に水素原子、又はメチル基を表し、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>は、それぞれ独立に水素原子、メチル基、又はハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を表し、nは、0～10のいずれかの整数を表す)；又は

下記式(9)

## 【化 2】

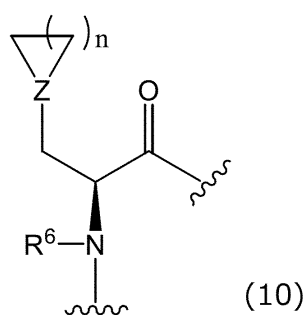


20

(式中、Zは、C又はNを表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、又はメチル基を表し、nは、1～6のいずれかの整数を表す)；又は

下記式(10)

## 【化 3】



40

(式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との結合部位を表し、Zは、C又はNを表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、又はメチル基を表し、nは、1～6のいずれかの整数を表す。)

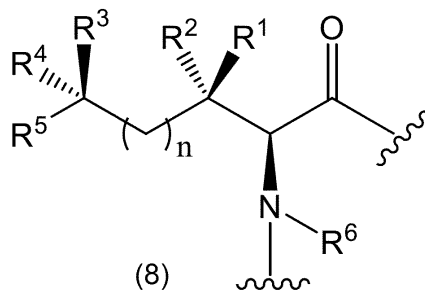
で表されるアミノ酸残基であるか、又はそれらの誘導体である、〔14〕～〔17〕のいずれか一つに記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

〔19〕

X<sup>7</sup>が、下記式(8)：

50

## 【化4】

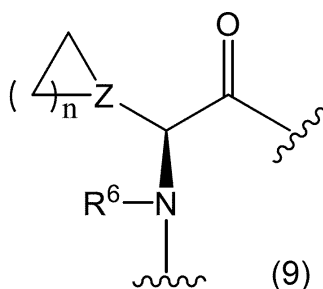


10

(式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との付着点を表し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は、それぞれ独立に水素原子、又はメチル基を表し、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>は、それぞれ独立に水素原子、メチル基、又はハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を表し、nは、0～10のいずれかの整数を表す)；又は

下記式(9)

## 【化5】



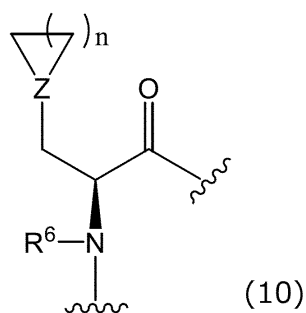
20

(式中、Zは、C又はNを表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、又はメチル基を表し、nは、1～6のいずれかの整数を表す)；又は

下記式(10)

30

## 【化6】



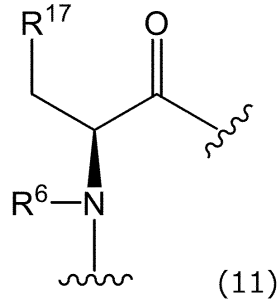
40

(式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との結合部位を表し、Zは、C又はNを表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、又はメチル基を表し、nは、1～6のいずれかの整数を表す。)；又は

下記式(11)

50

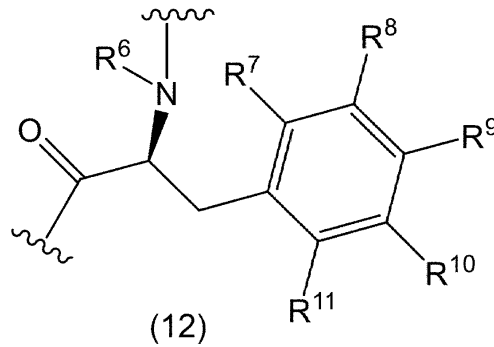
## 【化 7】



10

(式中、 $R^{12}$ は、2 - チエニル基、3 - チエニル基、2 - ピリジル基、3 - ピリジル基、4 - ピリジル基、2 - チアゾリル基、4 - チアゾリル基、2 - オキサゾリル基、4 - オキサゾリル基、1 - ピラゾリル基、1H - イミダゾル - 4 - イル基、1 - イミダゾリル基、1, 2, 3 - トリアゾール - 1 - イル基、又は1, 2, 4 - トリアゾール - 1 - イル基を表し、 $R^6$ は、水素原子、又はメチル基を表す) ; 又は下記式 (12)

## 【化 8】

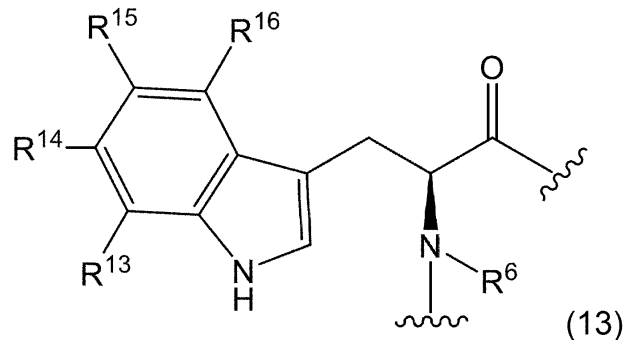


20

(式中、波線は主鎖のアミド結合を形成するカルボニル基又は窒素原子との付着点を表し、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ は、それぞれ独立に水素原子、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、tert - ブチル基、ハロゲン化メチル基、又はハロゲン原子 (F、Cl、Br、I) を表し、 $R^6$ は、水素原子、又はメチル基を表す。) ; 又は下記式 (13)

30

## 【化 9】



40

(式中、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ は、それぞれ独立に水素原子、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、tert - ブチル基、ハロゲン化メチル基、又はハロゲン原子 (F、Cl、Br、I) を表し、 $R^6$ は、水素原子、又はメチル基を表す。)

で表されるアミノ酸残基であるか、又はそれらの誘導体である、〔14〕から〔18〕

50

のいずれか一つに記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

〔 2 0 〕

$X^{13}$ が、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、D体アラニン、D体アスパラギン酸、D体グルタミン酸、D体アスパラギン、D体グルタミン、それらのNメチル化アミノ酸、それらのメチル化アミノ酸、又はそれらの誘導体である、〔 1 4 〕から〔 1 9 〕のいずれか一つに記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

〔 2 1 〕

ペプチド分子内の環状化に関与しない $X^L$ と $X^M$ が、それぞれ独立にアラニン、イソバリン、ノルバリン、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、O-メチル化-セリン、O-メチル化-ホモセリン、O-メチル化-スレオニン、O-メチル化-アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、cis-4-ヒドロキシ-プロリン、trans-4-ヒドロキシ-プロリン、アゼチジン-2-カルボン酸、ピペコリン酸、D体セリン、D体ホモセリン、D体スレオニン、D体アロスレオニン、D体O-メチル化-セリン、D体O-メチル化-ホモセリン、D体O-メチル化-スレオニン、D体O-メチル化-アロスレオニン、D体2,3-ジアミノプロピオン酸、D体2,4-ジアミノブタン酸、D体オルニチン、D体リジン、D体アルギニン、D体プロリン、D体cis-4-ヒドロキシ-プロリン、D体trans-4-ヒドロキシ-プロリン、D体アゼチジン-2-カルボン酸、D体ピペコリン酸、それらのNメチル化アミノ酸、それらのメチル化アミノ酸、又はそれらの誘導体である、〔 1 4 〕から〔 2 0 〕のいずれか一つに記載の直鎖状ペプチド及び環状ペプチド、又はそれらの薬理的に許容される塩。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 〕

本発明によれば、本ペプチドと組み合わせる「ある分子」を、LRP1への結合を介したRMTによって脳組織に移行させ、医薬品、診断薬、及び/又は研究試薬として使用するために有用かつ新規な直鎖状ペプチド及び環状ペプチドが提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 〕

【図1】図1は、ビオチン標識した本発明ペプチドの代表例である配列45および配列46のLRP1クラスター2(CL2)-Fcキメラタンパク質、LRP1クラスター3(CL3)-Fcキメラタンパク質、LRP1クラスター4(CL4)-Fcキメラタンパク質に対する濃度依存的な結合活性を評価した結果である。実験に用いたビオチン標識ペプチドの濃度は、それぞれのタンパク質について、左から順に(1)1000nM、(2)330nM、(3)110nM、(4)37nM、(5)12nM、(6)4.1nM、(7)1.4nM及び0nMであり、バーに濃淡をつけて示した。

【図2】図2は、本発明ペプチドのLRP1クラスター4に対する結合活性とプロテアーゼ分解に対する耐性の両方を評価するために用いたELISA法による競合結合試験の概要を示す。図中、SAはストレプトアビジン、Bはビオチン、HRPは西洋わさびペルオキシダーゼを示す。

【図3】図3は、ビオチン標識した本発明ペプチドの代表例である配列46(500nM)のLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する結合活性(Binding(%))をマウス血漿と混合直後又は24時間後の配列2(2000~63nM)存在下で評価した結果である。配列2のペプチド濃度は、それぞれ、左から順に(1)2000nM、(2)1000nM、(3)500nM、(4)250nM、(5)130nM、及び(6)63nMであり、バーに濃淡をつけて示した。

【図4】図4は、ビオチン標識した本発明ペプチドの代表例である配列46(500nM)のLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する阻害活性(Inhibition(%))をマウス血漿と混合直後又は24時間後の配列1~配列44(2000nM

10

20

30

40

50

)存在下で評価した結果である。

【図5】図5は、血液脳関門を通過する能力を評価するためのインビトロの血液脳関門モデルの概要を示す。

【図6】図6は、5-FAM(蛍光色素)標識した本発明ペプチドの代表例である配列2の血液脳関門を通過する能力をインビトロの血液脳関門モデル(ラット型及びサル型)を用いて評価した結果を示す。

【図7】図7は、実施例で用いた本発明ペプチドの代表例である配列2及び配列46の構造式を示す。

【図8】図8は、本発明のペプチド修飾体DBC0-KS-487(反応前)と、6-アジド-ヘキサン酸と室温で反応させた(反応後)の溶液をRP-HPLCで分析した結果である。

10

【発明を実施するための形態】

【0015】

次に、本発明の各実施形態について、図面を参照して説明する。なお、以下に説明する各実施形態は、特許請求の範囲に係る発明を限定するものではなく、また、各実施形態の中で説明されている諸要素及びその組み合わせの全てが本発明の解決手段に必須であるとは限らない。

【0016】

(定義)

本明細書においてペプチドは、2つ以上のアミノ酸がアミド結合(ペプチド結合)で結合しているものを指し、例えば2~20アミノ酸がアミド結合したものとすることができる。また、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシ末端)である。ペプチド結合を形成するカルボニル基に隣接する1番目の炭素原子をC炭素と称する。

20

【0017】

本明細書において「任意のアミノ酸残基、又はそれらの誘導体」は、その最も広い意味で用いられ、天然アミノ酸に加え、非天然構造を有する人工のアミノ酸、アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物、さらに官能基を有するカルボン酸も含む。非天然アミノ酸の例として、D体アミノ酸、主鎖の構造が天然型と異なるノニ置換アミノ酸(2-アミノイソ酪酸といったニ置換アミノ酸など)、N-アルキル-アミノ酸(N-メチル化アミノ酸など)、N-置換グリシン(ペプトイド)、主鎖が伸長しているアミノ酸(ホモアミノ酸やホモアミノ酸)、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸(シクロヘキシルアラニンやアリルグリシンや2-(2-ピリジル)-グリシンや3-(1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-アラニンなど)、側鎖の一部が置換されているアミノ酸(ノルロイシンやジアミノプロパン酸や3-(2-ピリジル)-アラニンなど)、側鎖に余分の官能基を有するアミノ酸;側鎖に余分のCやアルキル基やメチル基を有するアミノ酸(ホモノルロイシンやニ置換ロイシンなど)、側鎖にハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を有するアミノ酸(3-クロロ-アラニンなど)、側鎖にハロゲン原子(F、Cl、Br、I)を有するカルボン酸(3-クロロプロパン酸など)、側鎖に官能基を有するカルボン酸(3-ブテン酸など)、側鎖に余分のNやアミノ基を有するアミノ酸(ニ置換アラニンやオルニチンなど)、側鎖に余分のOやメトキシ基を有するアミノ酸(O-メチル-セリンやO-メチル-スレオニンなど)、側鎖に余分のヒドロキシ基を有するアミノ酸(3-ヒドロキシ-フェニルアラニンなど)、側鎖に余分のカルボキシ基(-COOH)を有するアミノ酸(3-カルボキシ-フェニルアラニンなど)、側鎖に余分のSを有するアミノ酸(エチオニンなど)、側鎖中のカルボン酸官能基がエステルで保護されているアミノ酸(アスパラギン酸-4-メチルエステルなど)、側鎖のチオ基(-S-)が酸化されてスルフィニル基(-S(=O)-)やスルホニル基(-S(=O)<sub>2</sub>-)に変換されているアミノ酸(メチオニンスルホキシド)などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0018】

50

本明細書において、「LRP1」はマウス、ラット、イヌ、サル、ヒトなどの哺乳類のLRP1を意味する。

【0019】

本明細書において、「LRP1結合活性を有する」という場合、インビトロ試験において、本発明のペプチド又は本発明のペプチドと「ある分子」の組合せ体が、LRP1の全長タンパク質、クラスター4などの部分タンパク質、又はそれらと他のタンパク質のキメラ体に対して濃度依存的に結合すること、などを意味する。LRP1結合活性の有無は、非特許文献5などを参考にして、当業者が公知の方法に従って確認することができるが、これらに限定されない。

【0020】

本明細書において、「関門組織」はマウス、ラット、イヌ、サル、ヒトなどの哺乳類の関門組織を意味する。

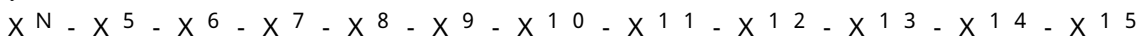
【0021】

本明細書において、「関門組織を通過する」という場合、(1)インビトロの血液脳関門モデルを用いた試験において、本発明のペプチド又は本発明のペプチドと「ある分子」の組合せ体が、血管側ウェルから脳側のウェルに移行すること、(2)LC-MS/MSなどを用いた薬物動態試験において、末梢から投与された本発明のペプチド又は本発明のペプチドと「ある分子」の組合せ体が、脳組織から検出されること、(3)インビボイメージングシステムなどを用いた薬物動態試験において、末梢から投与された本発明のペプチド又は本発明のペプチドと「ある分子」の組合せ体が、脳で検出されること、などを意味し、これらの効果のうちいずれか一つでも示す場合には、「関門組織を通過する」という。関門組織を通過する能力の有無は、非特許文献6及び7などを参考にして、当業者が公知の方法に従って確認することができるが、これらに限定されない。

【0022】

(本発明のペプチド)

[1]本開示の1つの実施形態における直鎖状ペプチド及び環状ペプチドは、下記式(1)：



(1)

で表されるアミノ酸配列を有する。

式(1)において、 $X^N$ は、1~4個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^5$ と $X^{15}$ は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D体システイン、又はプロリンを表し、 $X^6$ は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、cis-4-ヒドロキシ-プロリン、又はtrans-4-ヒドロキシ-プロリンを表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^8$ は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$ は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$ は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$ と $X^{14}$ は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2-アミノヘブタン酸、又は2-アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$ は、アラニン、D体アラニン、又は2-アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$ は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表わす。N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^5$ と $X^{15}$ は環状化に関与する場合はシステイン又はD体システインであり、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式(1)のペプチドは分子内に1つの環状構造を有し

10

20

30

40

50

ていてもよい。

【0023】

上記式(1)のペプチドにおいて、 $X^N$ は、Lys - Gly - Thr - Pro又はGly - Thr - Proであることが好ましい。N末端がリジンの場合、その側鎖のアミノ基を介してある分子と結合していても良い。N末端がグリシンの場合、そのアミノ基を介してある分子と結合していても良い。 $X^5$ と $X^{15}$ はシステイン又はD体システインであって、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、又はメチレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって分子内に1つの環状構造を形成することが好ましい。

【0024】

上記式(1)のペプチドにおいてさらに好ましい実施形態としては、例えば、以下の式(2)で表されるアミノ酸配列を挙げることができる。それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、又はメチレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって分子内に1つの環状構造を有していてもよく、Lys1のアミノ基を介して、ある分子と結合していても良い。

【0025】

Ac - Lys - Gly - Thr - Pro - Cys -  $X^6$  -  $X^7$  - Lys -  $X^9$  -  $X^{10}$  - Leu - Ala - Glu -  $X^{14}$  - Cys - OH (2)

式(2)において、 $X^6$ は、セリン、スレオニン、又は2,3-ジアミノプロピオン酸を表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンを表し、 $X^9$ は、チロシン、メチオニン、ノルロイシン、又はアルギニンを表わし、 $X^{10}$ は、メチオニン、ノルロイシン、アルギニン、又はリジンを表し、 $X^{14}$ は、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、又はノルロイシンを表す。

【0026】

[2]本開示の他の実施形態における直鎖状ペプチド及び環状ペプチドは、下記式(3)：  
 $X^N$  -  $X^5$  -  $X^6$  -  $X^7$  -  $X^8$  -  $X^9$  -  $X^{10}$  -  $X^{11}$  -  $X^{12}$  -  $X^{13}$  -  $X^{14}$  - Pro -  $X^{16}$  (3)

で表されるアミノ酸配列を有する。

上記式(3)において、 $X^N$ は、1~4個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^5$ と $X^{16}$ は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D体システイン、又はプロリンを表し、 $X^6$ は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、cis-4-ヒドロキシ-プロリン、又はtrans-4-ヒドロキシ-プロリンを表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^8$ は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$ は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$ は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$ と $X^{14}$ は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2-アミノヘブタン酸、又は2-アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$ は、アラニン、D体アラニン、又は2-アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$ は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表わす。N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^5$ と $X^{16}$ は環状化に関与する場合はシステイン又はD体システインであり、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式(3)のペプチドは分子内に1つの環状構造を有していてもよい。

【0027】

10

20

30

40

50

上記式(3)のペプチドにおいて、 $X^N$ は、Lys - Gly - Thr - Pro又はGly - Thr - Proであることが好ましい。N末端がリジンの場合、その側鎖のアミノ基を介してある分子と結合していても良い。N末端がグリシンの場合、そのアミノ基を介してある分子と結合していても良い。 $X^5$ と $X^{16}$ はシステイン又はD体システインであって、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、又はメチレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって分子内に1つの環状構造を形成することが好ましい。

【0028】

上記式(3)のペプチドにおいてさらに好ましい実施形態としては、例えば、以下の式(4)で表されるアミノ酸配列を挙げることができる。それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、又はメチレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって分子内に1つの環状構造を有していてもよく、Lys 1のアミノ基を介して、ある分子と結合していても良い。

10

【0029】

Ac - Lys - Gly - Thr - Pro - Cys -  $X^6$  -  $X^7$  - Lys -  $X^9$  -  $X^{10}$  - Leu - Ala - Glu -  $X^{14}$  - Pro - Cys - OH (4)

式(4)において、 $X^6$ は、セリン、スレオニン、又は2,3-ジアミノプロピオン酸を表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンを表し、 $X^9$ は、チロシン、メチオニン、ノルロイシン、又はアルギニンを表わし、 $X^{10}$ は、メチオニン、ノルロイシン、アルギニン、又はリジンを表し、 $X^{14}$ は、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、又はノルロイシンを表す。

20

【0030】

[3]本開示の他の1つの実施形態における直鎖状ペプチド及び環状ペプチドは、下記式(3)：

$X^N$  -  $X^5$  -  $X^6$  -  $X^7$  -  $X^8$  -  $X^9$  -  $X^{10}$  -  $X^{11}$  -  $X^{12}$  -  $X^{13}$  -  $X^{14}$  - Pro -  $X^{16}$  (3)

で表されるアミノ酸配列を有する。

上記式(3)において、 $X^N$ は、1~4個の任意のアミノ酸残基であり、 $X^6$ と $X^{16}$ は、それぞれ独立にセリン、スレオニン、システイン、D体システイン、又はプロリンを表し、 $X^5$ は、セリン、ホモセリン、スレオニン、アロスレオニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、アルギニン、プロリン、cis-4-ヒドロキシ-プロリン、又はtrans-4-ヒドロキシ-プロリンを表し、 $X^7$ は、ヒスチジン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^8$ は、オルニチン、リジン、ホモリジン、アルギニン、又はホモアルギニンを表し、 $X^9$ は、メチオニン、ノルロイシン、リジン、アルギニン、チロシン、O-メチル-チロシン、フェニルアラニン、4-アミノ-フェニルアラニン、4-フルオロ-フェニルアラニン、又は4-クロロ-フェニルアラニンを表し、 $X^{10}$ は、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、リジン、又はアルギンを表し、 $X^{11}$ と $X^{14}$ は、それぞれ独立にメチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、バリン、2-アミノヘブタン酸、又は2-アミノオクタン酸を表し、 $X^{12}$ は、アラニン、D体アラニン、又は2-アミノイソ酪酸を表し、 $X^{13}$ は、グリシン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、又はグルタミン酸を表し、N末端アミノ基及びC末端カルボキシ基は、修飾されていても欠失していてもよく、 $X^6$ と $X^{16}$ は環状化に関与する場合はシステイン又はD体システインであり、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、メチレン基、アセチルメチレン基、エチレン基、又はプロピレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって式(3)のペプチドは分子内に1つの環状構造を有していてもよい。

30

40

【0031】

上記式(3)のペプチドにおいて、 $X^N$ は、Lys - Gly - Thr - Pro又はGly

50

y - Thr - Proであることが好ましい。N末端がリジンの場合、その側鎖のアミノ基を介してある分子と結合していても良い。N末端がグリシンの場合、そのアミノ基を介してある分子と結合していても良い。X<sup>6</sup>とX<sup>16</sup>はシステイン又はD体システインであって、それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、又はメチレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって分子内に1つの環状構造を形成することが好ましい。

【0032】

上記式(3)のペプチドにおいてさらに好ましい実施形態としては、例えば、以下の式(5)で表されるアミノ酸配列を挙げることができる。それぞれの側鎖-SH基の間で、ジスルフィド結合、又はメチレン基のリンカーを介して共有結合を形成し、それによって分子内に1つの環状構造を有していてもよく、Lys1のアミノ基を介して、ある分子と結合していても良い。

10

【0033】

Ac - Lys - Gly - Thr - Pro - X<sup>5</sup> - Cys - X<sup>7</sup> - Lys - X<sup>9</sup> - X<sup>10</sup> - Leu - Ala - Glu - X<sup>14</sup> - Pro - Cys - OH (5)

式(5)において、X<sup>5</sup>は、セリン、スレオニン、又は2,3-ジアミノプロピオン酸を表し、X<sup>7</sup>は、ヒスチジン、チロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンを表し、X<sup>9</sup>は、チロシン、メチオニン、ノルロイシン、又はアルギニンを表わし、X<sup>10</sup>は、メチオニン、ノルロイシン、アルギニン、又はリジンを表し、X<sup>14</sup>は、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、又はノルロイシンを表す。

20

【0034】

[4]本実施形態に係るペプチドは、上記[1]~[3]で表されるアミノ酸配列において、1~数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換された相同性を有するペプチドであっても、LRP1に対する結合活性を有するものは包含する。本明細書において、「1~数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換されているペプチド」という場合、それらのアミノ酸の個数は、そのペプチドがLRP1結合活性を有する限りは特に限定されないが、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1個若しくは2個である。欠失、付加、及び/又は置換されている場所は、ペプチドの末端であっても、中間であってもよく、1ヶ所であっても2ヶ所以上であってもよい。

【0035】

このような上記アミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が欠失、付加、及び/又は置換されたアミノ酸配列として、前記アミノ酸配列と、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに、少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の同一性を有しているものが挙げられる。

30

【0036】

また、一次構造上の相同性が低くても、立体構造が高度に類似しているペプチドやタンパク質ドメインも存在することが知られている。したがって、上記アミノ酸配列と少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の立体構造相同性を有するペプチドであって、Ras結合活性を有するペプチドも本実施形態に含まれる。このようなペプチド同士の立体構造の相同性は、ホモロジーモデリング法などを用いて、立体構造未知のペプチドのアミノ酸配列から、その立体構造を以下のように予測して行うことができる。例えば、本実施形態の環状ペプチド(参照ペプチド)と類似の配列を有する任意のアミノ酸配列(目的配列)が与えられたとき、目的配列と参照配列の間のアライメント(配列を並置したものを)を与える。FASTA、PSI-BLAST、LIBRAなどにより算出したアライメントを用いれば、目的配列と参照配列間のアミノ酸ごとの対応関係が決まるので、この関係に基づき、参照ペプチドの3

40

50

次元座標から目的配列上のアミノ酸ごとの3次元座標を作成する。3次元座標の構築では、アミノ酸残基間に構造的に不適切な隙間や衝突や歪みが生じることがあるので、エネルギー極小化計算により、これらの構造的な歪みを解消する。モデリングソフトによっては、この構造的な歪みの解消をスムーズに行うため、ペプチドの全原子に対して同時に行うのではなく、段階的に行うものもある。即ち、まずペプチドの骨格を形成する炭素原子について行い、次いで炭素原子を含む主鎖原子について行い、最後に側鎖原子を含むペプチド全体について行うものである。このようにして目的配列に対するアライメントが得られれば、その立体構造を予測構築することができる。立体構造相同性の指標は、最適に重ね合わせたときのXYZ座標の差であるRMSD(Root Mean Square Deviation)などを用いて比較することができる。

10

## 【0037】

本実施形態のペプチドは、ペプチドの塩も包含する。ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基や酸との塩が用いられ、例えば、無機酸(塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等)の付加塩、有機酸(p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-ブロモフェニルスルホン酸、カルボン酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等)の付加塩、無機塩基(水酸化アンモニウム、又はアルカリ、若しくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等)、アミノ酸の付加塩等が挙げられる。

## 【0038】

(ペプチドの誘導体及び修飾体)

本実施形態のペプチドは、本発明の課題を解決するものである限り、その種々の誘導体、及び/又は修飾体も包含する。係る誘導体としては、ペプチドの飽和脂肪鎖が不飽和脂肪鎖に置換されているもの、ペプチドの原子の一部が放射性または非放射性の同位体原子を含む他の原子に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がチオアミド結合(-NH-C(=S)-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がアルケン(-C=C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がアルキル(-C-C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がヒドロキシエチレン(-C(OH)-C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がエステル(-O-C(=O)-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合がアルケン(-C=C-)に置換されているもの、ペプチドのアミド結合が(-C-NH-)に置換されているもの、又はペプチドのアミド結合が(-C(=O)-C-)に置換されているものなどが挙げられ、係る修飾体としては、ペプチドの位炭素が二置換されているもの、ペプチドのアミド結合がN-アルキル化されているもの、ペプチドの官能基の一部がハロゲン化、シアノ化、ニトロ化、オキシ化、ヒドロキシ化、アミノ化、デアミノ化、デヒドロ化、アミド化、アセチル化、メトキシ化、プレニル化、アルキル化などの修飾を受けているもの(例えば、ペプチドのアミノ基の一部がアセチル化やアルキル化やデアミノ化されているもの、ペプチドのカルボキシ基の一部がアミドやエステルになっているものなど)、ペプチドのSがスルホキシドS(=O)又はスルホンS(=O)<sub>2</sub>になっているもの、ペプチドがケミカルリンカーを介して多量体化しているもの、ペプチドがビオチン標識化されているもの、ペプチドが蛍光標識化されているもの、さらには直接的又はリンカーを介してアルキル鎖、ポリエチレングリコール、抗体、レクチン類、糖鎖、酵素、ペプチド、ペプトイド、膜透過性ペプチド、低分子化合物、核酸、又はタンパク質のユビキチン化を誘導する分子などとペプチドを融合・コンジュゲートさせたもの等が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

## 【0039】

本開示のいくつかの実施形態によれば、本発明のペプチドは、そのN末端又はC末端に、アジド基を有するアミノ酸残基を含む。従って、アルキン基を有する「ある分子」は、「銅(I)触媒型アルキン-アジド環化付加(CuAAC)反応」(又は「クリック」反応と略称する)により本発明のペプチドのN末端又はC末端に共有結合可能となる。本開示の他の実施形態によれば、アジド基とN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)エステル基を有するリンカーを、本発明ペプチドのアミノ基又はアミノ基と反応させること

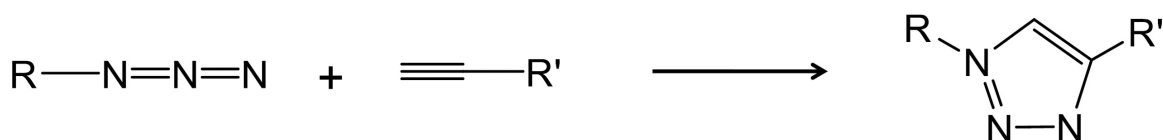
50

で、アジド基を導入する。従って、アルキン基を有する「ある分子」は、CuAAC反応により本発明のペプチドに共有結合可能となる。本開示の他の実施形態によれば、本発明のペプチドは、そのN末端又はC末端に、アルキン基を有するアミノ酸残基を含む。それにより、アジド基を有する「ある分子」は、CuAAC反応により本発明のペプチドのN末端又はC末端に共有結合可能となる。本開示の他の実施形態によれば、アルキン基とNHSEステル基を有するリンカーを、本発明ペプチドのアミノ基又はアミノ基と反応させることで、アルキン基を導入する。従って、アジド基を有する「ある分子」は、CuAAC反応により本発明のペプチドに共有結合可能となる。CuAAC反応は、以下のスキーム1の通りである。

【0040】

【化10】

スキーム1



【0041】

CuAAC反応により、1,5-二置換-1,2,3-トリアゾールが得られる。アルキンとアジドとの間の反応は、非常に選択的であり、天然の生体分子の中にアルキン基およびアジド基は存在しない。さらに、この反応は迅速かつpH非感受性である。

【0042】

上記のアルキン基はシクロオクチン基に代替してもよい。本開示のいくつかの実施形態によれば、本発明のペプチドは、そのN末端又はC末端に、アジド基を有するアミノ酸残基を含む。従って、シクロオクチン基を有する「ある分子」は、「ひずみ促進型アジド-アルキクリックケミストリー(SPAAC)反応」により本発明のペプチドのN末端又はC末端に共有結合可能となる。本開示の他の実施形態によれば、アジド基とNHSEステル基を有するリンカーを、本発明ペプチドのアミノ基又はアミノ基と反応させることで、アジド基を導入する。従って、シクロオクチン基を有する「ある分子」は、SPAAC反応により本発明のペプチドに共有結合可能となる。本開示の他の実施形態によれば、本発明のペプチドは、そのN末端又はC末端に、シクロオクチン基を有するアミノ酸残基を含む。それにより、アジド基を有する「ある分子」は、SPAAC反応により本発明のペプチドのN末端又はC末端に共有結合可能となる。本開示の他の実施形態によれば、シクロオクチン基とNHSEステル基を有するリンカーを、本発明ペプチドのアミノ基又はアミノ基と反応させることで、シクロオクチン基を導入する。従って、アジド基を有する「ある分子」は、SPAAC反応により本発明のペプチドに共有結合可能となる。SPAAC反応は、以下のスキーム2の通りである。

【0043】

10

20

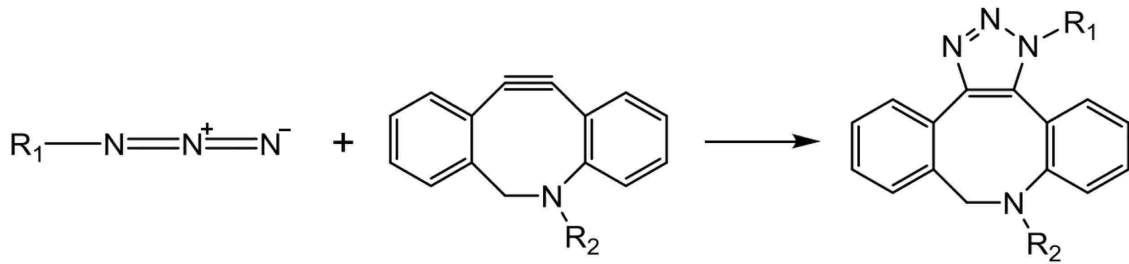
30

40

50

## 【化 1 1】

スキーム2



10

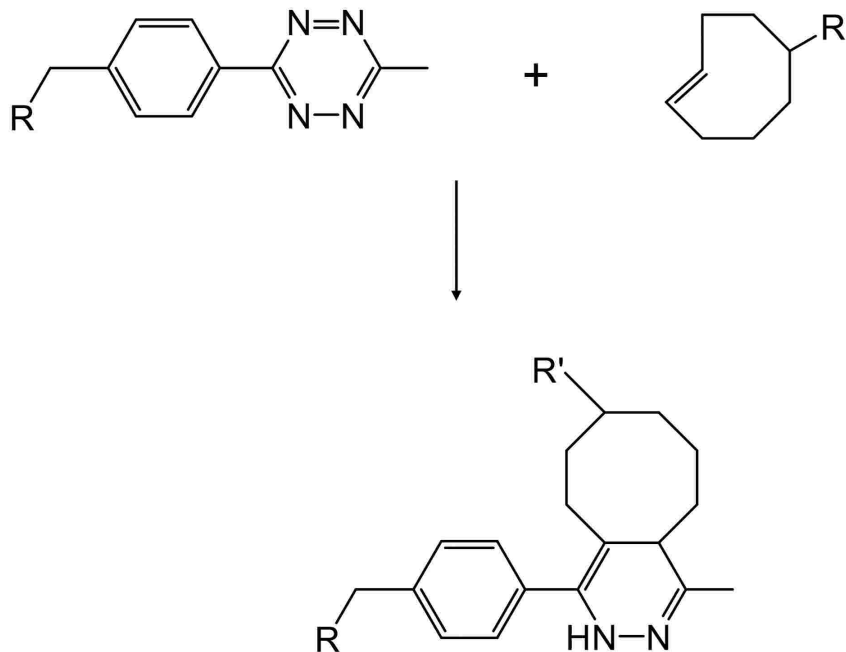
## 【0044】

或いは、特定の実施形態において、テトラジン基若しくはシクロオクテン基を有する「ある分子」は、以下のスキーム3に示すように「逆電子要請型ディールス・アルダー (iEEDA) 反応」により、ペプチド又はリンカーの対応するシクロオクテン基又はテトラジン基に結合される。

## 【0045】

## 【化 1 2】

スキーム3



20

30

40

## 【0046】

アジド基を有するアミノ酸残基として、L-アジドホモアラニン (AHA)、4-アジド-L-フェニルアラニン、4-アジド-D-フェニルアラニン、3-アジド-L-アラニン、3-アジド-D-アラニン、4-アジド-L-ホモアラニン、4-アジド-D-ホモアラニン、5-アジド-L-オルニチン、5-アジド-d-オルニチン、6-アジド-L-リジン、及び6-アジド-D-リジン等が挙げられる。アルキン基を有するアミノ酸残基として、例えば、L-ホモプロパギルグリシン (L-HPG)、D-ホモプロパギルグリシン (D-HPG)、及び -ホモプロパギルグリシン (-HPG) が挙げられる。

50

## 【 0 0 4 7 】

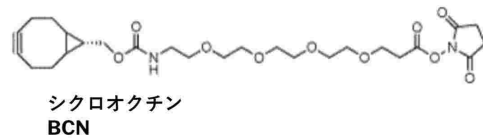
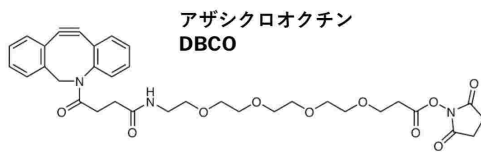
リンカーの遊離末端にある歪んだアルキン基は、シクロオクテン基、例えば、トランス-シクロオクテン ( T C O ) 基；又は、シクロオクチン基、例えば、ジベンゾシクロオクチン ( D B C O ) 基、ジフルオロシクロオクチン ( D I F O ) 基、ビスクロノニン ( B C N ) 基、及びジベンゾシクロオクチン ( D I C O ) 基であり得る。或いは、リンカーの遊離末端にあるテトラジン基は、1, 2, 3, 4 - テトラジン基、1, 2, 3, 5 - テトラジン基、及び1, 2, 4, 5 - テトラジン基、並びに、それらの誘導体、例えば、6 - メチルテトラジン基が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 4 8 】

本開示の好ましい実施形態において、ペプチドの誘導体及び修飾体は、N末端、C末端、又はアミノ酸の側鎖に直接又はリンカーを介して、アジド基、アルキン基又はテトラジン基を有する。このような誘導体の一例として、以下のような例が挙げられる。例えば、ペプチドのN末端リジンのイプシロンアミノ基に、D B C O - P E G 4 - N H S エステル ( D 5 9 2 2 ) 又は B C N - P E G 4 - N H S エステル ( B P - 2 2 8 5 1 ) を反応させると、P E G リンカーを介して D B C O 又は B C N が付加したペプチド ( 配列番号 4 9 及び 5 0 ) が得られる。

## 【 0 0 4 9 】

## 【 化 1 3 】



Ac-Lys( $\epsilon$ NH-PEG4-**DBCO**)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys-OH  
(配列番号49)

又は

Ac-Lys( $\epsilon$ NH-PEG4-**BCN**)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys-OH  
(配列番号50)

## 【 0 0 5 0 】

あるいは以下のスキーム4のように、Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OHでアジド基を導入しておいたN末端リジンにD B C O - P E G 5 - D B C O ( B P - 2 2 4 5 0 ) を反応させることでもアミノ酸の側鎖にD B C O 基が導入されたペプチド ( 配列番号 5 1 及び 配列番号 5 2 ) を得ることができる。

## 【 0 0 5 1 】

10

20

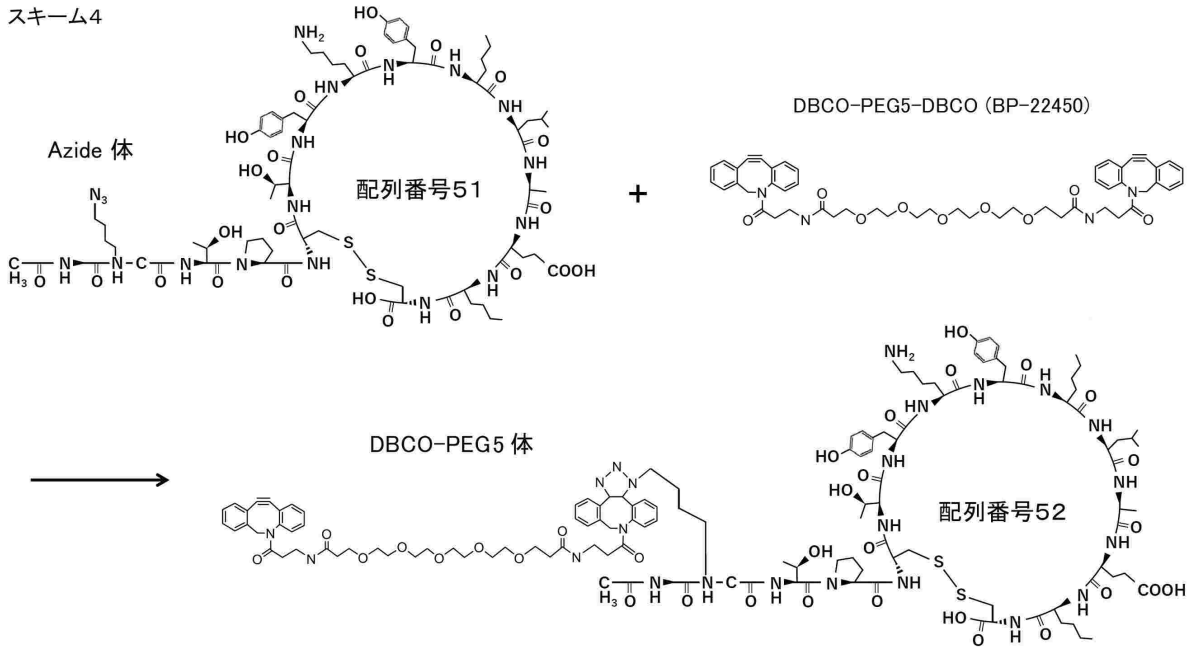
30

40

50

## 【化14】

スキーム4



10

20

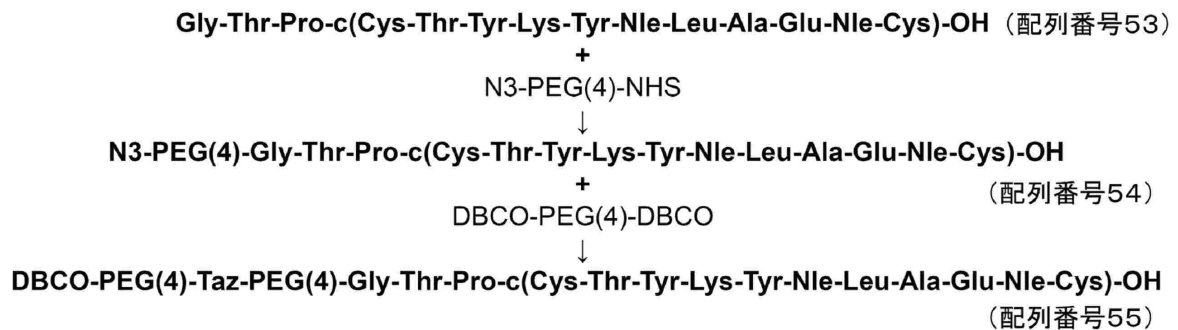
## 【0052】

さらに、以下のスキーム5では、配列番号53で示すペプチドのN末端のグリシンの - アミノ基に、N3-PEG4-NHS (N-Succinimidyl 15-azido-4,7,10,13-tetrapentadecanoate) を反応させてアジド基が導入されたペプチド (配列番号54) を合成し、さらに、DBCO-PEG5-DBCOを用いてN末端にDBCO基が導入されたペプチド (配列番号55) を得ることができる。

## 【0053】

## 【化15】

スキーム5



40

## 【0054】

(ペプチド薬物複合体)

本開示のペプチドは、コンジュゲート (複合体) であってもよい。この複合体は、本開示のペプチドと、このペプチドに結合したリンカーと、リンカーに結合した「ある分子」とを含む複合体である。この複合体は、少なくとも「ある分子」が関門組織を通過可能である複合体であることが好ましい。複合体全体として関門組織を通過可能であってもよい。

## 【0055】

リンカーは、例えば、1~15残基程度のアミノ酸で構成されるもの、脂肪酸で構成さ

50

れるもの、ポリエチレングリコールで構成されるもの、又はそれらの誘導体などが挙げられるが、それらに限定されない。リンカーは、特定の環境や条件下で乖離・分離するようなものであってもよく、安定な構造を保つものでもよい。

【0056】

本明細書に記載の「ある分子」とは、脳に送達することを希望する分子であれば、当業者の希望する何らの分子であってよい。ただし、関門組織の通過のメカニズムは、LRP1への結合を介したRMTであるため、同メカニズムで運搬できないような大きすぎる分子は好ましくない。「ある分子」の例としては、蛍光色素、低分子化合物、ペプチド、ペプトイド、核酸、糖鎖、脂質、抗体、タンパク質、酵素、リポソーム、ミセル、ナノパーティクル、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、カーボンナノシート、それらの放射同位元素ラベル体などが挙げられるが、それらに限定されない。好ましい実施形態では、「ある分子」とは、薬物であり、例えば、抗体、核酸、又は生理活性ペプチドであってよい。

10

【0057】

本開示のペプチドと「ある分子」の複合体は、融合体や移植体であってよい。例えば、本発明ペプチドを抗体やタンパク質のN末端及び/又はC末端に融合させる、ループ領域に移植させてもよい。

【0058】

上記の融合体や移植体は細胞・菌類・ウイルスなどの外部ドメインの一部として発現されていてもよく、細胞・菌類・ウイルスなどの外部ドメインにコンジュゲートされていてもよい。

20

【0059】

本開示のペプチドと「ある分子」の複合体は、「ある分子への結合活性を有する分子」を介していてもよい。本開示のペプチドと「ある分子への結合活性を有する分子」は、コンジュゲート体、融合体、及び/又は移植体のいずれであってよい。「ある分子」と「ある分子への結合活性を有する分子」との間の結合は、可逆的なものでも不可逆的なものでもよい。

【0060】

本開示のペプチドと「ある分子」の複合体は、結晶であってよく、結晶形が単一であっても結晶形混合物であっても本発明のペプチドに含まれる。結晶は、自体公知の結晶化法を適用して、結晶化することによって製造することができる。

30

【0061】

本開示のペプチドと「ある分子」の複合体は、薬学的に許容され得る共結晶や共結晶塩であってよい。ここで共結晶、又は共結晶塩とは、各々が異なる物理的特性（例えば、構造、融点、融解熱、吸湿性、溶解性及び安定性等）を持つ、室温で二種、又はそれ以上の独特な固体から構成される結晶性物質を意味する。共結晶、又は共結晶塩は、自体公知の共結晶化法に従い製造することができる。

【0062】

(環状ペプチドの作用効果)

後述する実施例に示される通り、本実施形態で表されるアミノ酸配列群の代表例である配列1～46は、LRP1結合活性を有している。そして、配列2は、インビトロ血液脳関門モデルにおいて血液側ウェルから脳側ウェルに移行するため、血液脳関門を通過する能力を有している。本実施形態で表されるアミノ酸配列群は、これらの代表例と類似のアミノ酸配列及び立体構造的な特徴を有することから、それらもLRP1結合活性と血液脳関門を通過する能力を有している可能性が極めて高いと考えられる。そして、本発明のペプチドとのコンジュゲート体、融合体、移植体もLRP1結合活性と血液脳関門を通過する能力を有している可能性が極めて高いと考えられる。

40

【0063】

後述する実施例に示される通り、本実施形態で表されるアミノ酸配列群の代表例である配列1～46は、LRP1結合活性を有している。これは以下のことを示している。X<sup>5</sup>

50

と X<sup>15</sup> の C 炭素原子間の結合、X<sup>6</sup> と X<sup>15</sup> の C 炭素原子間の結合、X<sup>5</sup> と X<sup>16</sup> の C 炭素原子間の結合、又は X<sup>6</sup> と X<sup>16</sup> の C 炭素原子間の結合は、アミド結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、C = C 結合、C - C 結合、トリアゾールを介した結合、ジチオテトラフルオロベンゼンを介した結合、ジメチルフェニレン基（フェニレン環へのメチレン基の結合部位は、オルト、メタ及びパラの何れであってもよい）を介した結合などの幅広い形状の構造を受容する。

#### 【0064】

L R P 1 クラスター 4 のアミノ酸配列は、哺乳類で高度に保存されており、本発明ペプチドの代表例である配列 2 はラット型とサル型のインビトロ血液脳関門モデルにおいて血液脳関門を通過する能力を示すことから、本実施形態で表されるアミノ酸配列からなるペプチド群、及びそのペプチド群と「ある分子」の複合体は、マウス、ラット、イヌ、サルなどのヒト以外の哺乳類の L R P 1 に対しても結合し、関門組織を通過する能力を示す可能性が極めて高いと考えられる。

10

#### 【0065】

（環状ペプチドの製造方法）

本実施形態のペプチドは、液相法、固相法、又は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等、公知のペプチドの製造方法などによって製造することができる。

#### 【0066】

固相法には、市販の自動合成機を用いることができる。例えば、水酸基を有するレジンの水酸基と、 $\alpha$  位アミノ基が Fmoc 基といった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 (DIPEDI) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。次に、第一アミノ酸の  $\alpha$  位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  $\alpha$  位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を合成する。直鎖ペプチドをレジンから切断し、精製後、ペプチドを環状化するための官能基を脱保護し、定法にしたがって、ペプチドを環状化する。

20

30

#### 【0067】

固相合成のレジンとしては、Merri field 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てもよい。 $\alpha$  位アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル (Cbz) 基、tert - ブトキシカルボニル (Boc) 基、フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル (Alloc) 基等が挙げられる。Cbz 基はフッ化水素酸、水素化等によって脱保護でき、Boc 基はトリフルオロ酢酸 (TFA) により脱保護でき、Fmoc 基はピペリジンによる処理で脱保護できる。 $\beta$  位カルボキシ基の保護は、メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル、tert - ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等を用いることができる。アミノ酸のその他の官能基として、セリンやスレオニンなどのヒドロキシ基はベンジル基や tert - ブチル基で保護することができ、チロシンなどのヒドロキシ基は 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル基や tert - ブチル基で保護できる。リジンなどの側鎖のアミノ基、グルタミン酸やアスパラギン酸などのカルボキシ基は、 $\alpha$  位アミノ基、 $\beta$  位カルボキシ基と同様に保護することができる。

40

50

## 【 0 0 6 8 】

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 (DIPECDI)、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。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。

## 【 0 0 6 9 】

本開示のペプチドは、一態様として環状化されていてもよい。本明細書において環状化とは、1つのペプチド内において、1アミノ酸以上離れた2つ以上のアミノ酸が直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合し、分子内に1つ以上の環状構造を作ることができる。環状化は、非特許文献8や非特許文献9に記載の手法に則って、実施することができる。例えば、アミノ基とカルボキシ基間のアミド結合、チオール基とチオール基間のジスルフィド結合、チオール基とハロゲン基間のチオエーテル結合、チオール基とアリル基間のチオール エン反応によるチオエーテル結合、アリル基とアリル基間のオレフィンメタセシス反応によるC=C結合(当該C=C結合は還元反応によって、C-C結合に変換されていてもよい)、アルキニル基とアジド基間のクリック反応によるトリアゾールを介した結合、ハロゲン基を有するリンカーと二つのチオール基間のチオエーテル結合などによることができるが、これらに限定されない。環状化のための直接的な又はリンカーを介した間接的な共有結合は、主鎖-主鎖間、主鎖-側鎖間、側鎖-主鎖間、側鎖-側鎖間のいずれであってもよい。

## 【 0 0 7 0 】

本開示のペプチドの環状化には、例えば、(1)チオール基を有するシステイン、D体システイン、ホモシステイン、D体ホモシステインをそれぞれ独立にアミノ酸1及びアミノ酸2とし、それらのチオール基間で形成されるジスルフィド結合を用いることができる、(2)求核基であるハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するアミノ酸(例えば3-クロロアラニン)、又はハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するカルボン酸(例えば3-クロロプロパン酸)をアミノ酸1とし、チオール基を有するアミノ酸2との間で形成されるチオエーテル結合を用いることができる、(3)チオール基を有するアミノ酸1及びアミノ酸2、そして求核基であるハロゲン原子(クロロ、プロモ、又はヨード)を有するリンカー(例えば1,1-ジヨードメタン、1,1-ジクロロアセトン、1,2-ジヨードエタン、1,3-ジヨードプロパン、1,4-ジヨードブタン、1,1'-ジプロモ-o-キシレン、1,1'-ジプロモ-m-キシレン、1,1'-ジプロモ-p-キシレン、ヘキサフルオロベンゼンなど)の間で形成されるチオエーテル結合を用いることができる、(4)アジド基を有するアジドアラニンをアミノ酸1、アルキニル基を有する2-アミノ-5-ヘキシン酸をアミノ酸2とし、その間のクリック反応によって形成されるトリアゾールを介した共有結合を用いることができる、(5)アリル基を有するアミノ酸(例えばアリルグリシン、D体アリルグリシン、ホモアリルグリシン、D体ホモアリルグリシンなど)、又はアリル基を有するカルボン酸(例えば3-ブテン酸)をアミノ酸1とし、チオール基を有するアミノ酸2との間のチオール エン反応によって形成されるチオエーテル結合を用いることができる、(6)アリル基を有するアミノ酸、又はアリル基を有するカルボン酸をそれぞれ独立にアミノ酸1及びアミノ酸2とし、それらのアリル基間のオレフィンメタセシス反応によって形成されるC=C結合を用いることができる、(7)オレフィンメタセシス反応によって形成されたC=C結合を還元することで形成されるC-Cを用いることができる、(8)アミノ基を有するアミノ酸1(例えば2,3-ジアミノプロパン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、それらのD体アミノ酸、アラニンなど)とカルボキシ基を有するアミノ酸2(アスパラギン酸、グルタミン酸、それらのD体アミノ酸など)又はC末端カルボキシ基の間のアミド結

10

20

30

40

50

合を用いることができる、(9) N末端アミノ基とカルボキシ基を有するアミノ酸又はC末端カルボキシ基の間のアミド結合を用いることができる。アミノ酸1とアミノ酸2は、どちらがN末端側にきてもよい。

【0071】

(環状ペプチドを含む医薬、診断薬、研究用試薬)

本開示に係る医薬組成物は、上述したアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含み、ペプチドがLRP1に結合し、LRP1のRMTを介して中枢神経系組織に移行することが可能である。上記の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、又は経直腸投与)等が挙げられる。医薬組成物中のペプチドは、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、ペプチドにアルキル鎖、ポリエチレングリコール、又は糖鎖などを付加することで、血中滞留時間を長くする、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、マイクロ粒子、ナノスフェア等を徐放化基剤として用い、これに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)。

10

【0072】

上記の医薬組成物は、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(注射剤など)、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。これらの製剤は、速放性製剤又は徐放性製剤等の放出制御製剤(徐放性マイクロカプセルなど)であってもよい。製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤などを適宜使用し、常法により行うことができる。製剤化に用いられる成分の例としては、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等の薬学的に許容される有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン等が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチドが経粘膜吸収されにくい場合は、難吸収性薬物の吸収を改善する吸収促進剤として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル類、ラウリル硫酸ナトリウム、サポニン等の界面活性剤；グリココール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸等の胆汁酸塩；EDTA、サリチル酸類等のキレート剤；カブロン酸、カブリン酸、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てもよい。

20

30

40

【0073】

丸剤又は錠剤は、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆することもできる。注射剤は、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えることができる。必要に応じ、通常の防腐剤、抗酸化剤、着

50

色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

【0074】

本開示の医薬組成物は、LRP1への結合を通じて、ある分子を中枢神経系組織に運び、ある分子が標的とする種々の疾患の治療又は予防に有効である。例えば、ある分子が抗癌剤である場合、脳腫瘍（例えば、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫等）や神経鞘腫などが挙げられ、ある分子が中枢神経系疾患に関わる分子を標的とする場合、精神障害（統合失調症、統合失調情動障害、統合失調症様、妄想障害など）、小児精神障害（注意欠陥障害、注意欠陥/多動性障害、行為障害、自閉症など）、神経変性障害、神経幹細胞障害、神経前駆体障害、虚血性障害、神経外傷性障害、情動障害、精神運動障害、睡眠障害（過眠症、概日リズム睡眠障害、不眠症、睡眠時異常行動、睡眠遮断など）、不安といった精神障害（急性ストレス障害、全般性不安障害、社会不安障害、パニック障害、外傷後ストレス障害、広場恐怖、強迫性障害など）、虚偽性精神障害（急性幻覚性躁病など）、衝動制御障害（強迫性賭博、間欠性爆発性障害など）、気分障害（双極Ⅰ型障害、双極Ⅱ型障害、躁病、混合情動状態など）、大うつ病、慢性うつ病、季節性うつ病、精神病性うつ病、季節性うつ病、認知障害（健忘、老年認知症、HIV関連認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、レビー小体型認知症、血管性認知症、薬物関連認知症、遅発性ジスキネジー、間代性筋痙攣、ジストニー、譫妄、ピック病、クロイツフェルト・ヤコブ病、HIV疾患、ジル・ドゥ・ラ・トゥレット症候群、てんかん、筋痙攣、軽度認知障害など）、精神薄弱（痙攣、ダウン症候群、脆弱X症候群など）；月経前症候群（PMS）、月経前不快気分障害（PDD）、産後うつ病、ニューロン損傷障害（眼損傷、眼の網膜症または黄斑変性、耳鳴、聴覚障害、脳浮腫など）、パーキンソン病、パーキンソン病様障害、偏頭痛、てんかん、アルツハイマー病、脳損傷、脳卒中、脳血管疾患（脳動脈硬化症、脳アミロイド血管症、遺伝性脳出血、脳低酸素症 - 虚血など）、薬物依存症（麻薬依存症、アルコール中毒、アンフェタミン依存症、コカイン嗜癖、ニコチン依存症、薬物禁断症候群など）、摂食障害（食欲不振症、過食症、気晴らし食い障害、多食症、肥満、強迫性摂食障害、氷食症など）などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0075】

本開示の医薬組成物は、上記疾患に有用な他の医薬や治療法と併用投与してもよい。例えば悪性腫瘍であれば、各種の化学療法、外科的治療、放射線療法と組み合わせてもよい。

30

【0076】

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

【0077】

（本開示のペプチドをコードするポリヌクレオチド）

一実施形態では、本開示のペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。このポリヌクレオチドは、本開示のペプチドのアミノ酸配列の中で天然アミノ酸のみで構成されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド又は当該ポリヌクレオチドと所定の配列同一性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドであり得る。塩基配列の同一性の程度は、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらにより好ましくは約95%以上であり得る。塩基配列同一性は自体公知の方法により決定できる。例えば、塩基配列同一性（%）は、上述したアミノ酸配列同一性（%）と同様の方法により決定できる。

40

【0078】

別の実施形態では、上記ポリヌクレオチドは、本開示のペプチドのアミノ酸配列の中で天然アミノ酸のみで構成されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの塩基配列において1以上のヌクレオチドが置換、付加、欠失及び挿入から選ばれる1以上の修飾を施

50

された塩基配列であり得る。修飾されるヌクレオチドの数は、1以上であれば特に限定されないが、例えば1～約50個、好ましくは1～約30個、より好ましくは1～約10個、さらにより好ましくは1～約5個（例、1個又は2個）であり得る。

【0079】

（発現ベクター）

本開示の一実施形態に係る発現ベクターは、発現されるべき目的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又は発現されるべき目的ポリヌクレオチド、及び当該ポリヌクレオチドに機能的に連結されたプロモーターを含み得る。「プロモーターがポリヌクレオチドに機能的に連結されている」とは、プロモーターが、その制御下にあるポリヌクレオチド自体の発現又はポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの発現を可能とするように、該遺伝子をコードするポリヌクレオチドに結合していることを意味する。

10

【0080】

本実施形態の発現ベクターのバックボーンとしては、所定の細胞で目的の物質を産生できるものであれば特に制限されないが、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクターが挙げられる。発現ベクターを医薬として用いる場合、哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。

【0081】

宿主細胞として原核生物細胞を用いる場合、原核生物細胞を宿主細胞として利用可能な発現ベクターが用いられ得る。このような発現ベクターは、例えば、プロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本実施形態のポリペプチド又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、終止コドン、ターミネーター領域、複製起点等のエレメントを含み得る。細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーター及びShine-Dalgarno (SD) 配列を含むものである。これらのエレメントについては、自体公知のものを用いることができる。

20

【0082】

また、宿主細胞として真核生物細胞を用いる場合、真核生物細胞を宿主細胞として利用可能な発現ベクターが用いられ得る。この場合、使用されるプロモーターは、哺乳動物等の真核生物で機能し得るものであれば特に制限されない。ポリペプチドの発現を目的とする場合、このようなプロモーターとしては、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR、ラウス肉腫ウイルスLTR、MoMuLV由来LTR、アデノウイルス由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びに-アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成タンパク質遺伝子プロモーターなどが挙げられる。ポリヌクレオチドの発現を目的とする場合、プロモーターは、polIIIプロモーター（例、tRNAプロモーター、U6プロモーター、H1プロモーター）であり得る。

30

【0083】

本発明の発現ベクターはさらに、転写開始及び転写終結のための部位、及び転写領域において翻訳に必要とされ得るリボソーム結合部位、複製起点並びに選択マーカ遺伝子（例、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、スペクチノマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール）などを含み得る。本発明の発現ベクターは、自体公知の方法により作製できる（例えば、上掲のMolecular Cloningなど参照）。

40

【0084】

（本開示のペプチドを提示する細胞、リボソーム、又はナノ粒子）

本開示の別の態様において、本開示のペプチドを提示する細胞、リボソーム、又はナノ粒子が提供される。当該細胞は、生体から所望の細胞を単離し、この細胞に本開示のペプチドを体外でコンジュゲートするか、又は本開示のペプチドを発現するベクターを細胞内に導入して細胞表面に提示させることにより作製することができる。当該リボソーム又はナノ粒子は、本開示のペプチドをコンジュゲートするか、本開示ペプチドと脂肪鎖のコン

50

ジュゲート体を調製し、脂肪鎖を介して脂質膜に挿入することでリポソーム又はナノ粒子の表面に提示させることにより作製することができる。

【0085】

以下に示す実施例は、単なる例示であって、上述した実施形態と共に本発明を詳細に説明することのみを意図しており、本発明を限定するものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、係る変更も本発明の範囲に含まれる。

【実施例】

【0086】

本明細書中で用いられている略号は下記の意味を表す。

BSA: Bovine serum albumin	10
RP-HPLC: Reverse-phase high performance liquid chromatography	
HRP: Horseradish peroxidase	
SA: Streptavidin	
D-PBS: Dulbecco's Phosphate buffered saline	
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay	
Ac: Acetyl	
Cys: L-Cysteine	
Gly: Glycine	20
Ala: L-Alanine	
Ser: L-Serine	
Thr: L-Threonine	
Pro: L-Proline	
cHyp: cis-4-Hydroxy-L-Proline	
tHyp: trans-4-Hydroxy-L-Proline	
Tyr: L-Tyrosine	
Trp: L-Tryptophan	
Phe: L-Phenylalanine	
4fF: 4-fluoro L-Phenylalanine	30
4cF: 4-chloro L-Phenylalanine	
His: L-Histidine	
Lys: L-Lysine	
Orn: L-Ornithine	
Arg: L-Arginine	
Val: L-Valine	
Leu: L-Leucine	
Ile: L-Isoleucine	
Nle: L-Norleucine	
Ahep: (S)-2-Aminoheptanonic acid	40
Aoc: (S)-2-Amino-octanonic acid	
Aib: 2-Aminoisobutyric acid	
Asp: L-Aspartic acid	
Glu: L-Glutamic acid	
5-FAM: 5-Carboxyfluorescein	
DX: D-amino acid X	
c(XY): Cyclization between amino acid X to amino acid Y	
【0087】	
(ペプチド合成)	50

本実施例に使用した全てのペプチドの化学合成は、株式会社スクラム（東京、日本）に委託し、9-フルオレニルメトキシカルボニル基（Fmoc基）をアミノ基の保護基として用いる標準的な固相合成法を自動合成機 Syro II（Biotage社製）で実施した。C末端に位置する側鎖保護アミノ酸-レジン合成カラムに入れて、装置をセットした。続いて、Fmoc基で保護した次アミノ酸に1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロフォスフェート（HATU）/ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）を加えて活性化し、カラムに入れて反応させた。反応終了後に洗浄し、20%ピペリジンを用いて、Fmoc基を脱保護した。本工程を繰り返すことで、ペプチド鎖を伸長し、最終アミノ酸のFmoc基を脱保護した後、装置からペプチドレジンを取り出した。ペプチドレジンに30%ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）/ジクロロメタン（DCM）を加えて、レジンから直鎖の側鎖保護ペプチドを切り出し、エーテル沈殿によって側鎖保護ペプチドを回収した。SunFire C18カラム（10×150mm）（Waters社製）を用いたRP-HPLCによって、側鎖保護ペプチドを精製した後、凍結乾燥した。ペプチドの環状化は、非特許文献8や非特許文献9に記載の手法を参考とした。本実施例で合成したペプチドの理論分子量、実測分子量、純度、環状化タイプ、アミノ酸配列を表1及び表2に示す。また、これらの中で配列2と配列46の構造式を図7に示す。なお、表1及び表2において、D体表記のないアミノ酸残基はL体を示す。

【0088】

10

20

30

40

50

【表 1】

Name	Calcd MW	Obsvd MW	Mode	Purity (%)	Cyclization	Sequence
配列1	2101.3	2101.906	NEG	73	None	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号1)
配列2	2099.3	2099.4	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号2)
配列3	2113.3	2113.947	POS	100	S-C-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号3)
配列4	2141.4	2141.838	POS	90	S-C3-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号4)
配列5	2101.3	2102.233	POS	99	None	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro- <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号5)
配列6	2099.3	2099.962	POS	100	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c( <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号6)
配列7	2113.3	2113.69	POS	98	S-C-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c( <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号7)
配列8	2141.4	2142.991	POS	77	S-C3-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c( <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号8)
配列9	2101.3	2102.504	POS	99	None	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号9)
配列10	2099.3	2099.154	POS	100	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号10)
配列11	2113.3	2113.114	POS	100	S-C-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号11)
配列12	2141.4	2141.921	POS	99	S-C3-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号12)
配列13	2101.3	2101.122	POS	99	None	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro- <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号13)
配列14	2099.3	2099.328	POS	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c( <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号14)
配列15	2115.3	2114.823	POS	98	S-C-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c( <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号15)
配列16	2141.4	2141.838	POS	98	S-C3-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c( <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys)-OH (配列番号16)
配列17	2085.3	2085.897	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Ser-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号17)
配列18	2111.3	2111.941	POS	99	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-chyp-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号18)
配列19	2111.3	2111.103	NEG	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-thyp-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号19)
配列20	2083.3	2086.899	NEG	97	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Phe-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号20)
配列21	2122.3	2122.918	NEG	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Trp-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号21)
配列22	2073.3	2074.369	POS	97	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-His-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号22)
配列23	2085.3	2085.859	POS	90	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Orn-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号23)
配列24	2127.3	2127.357	POS	98	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Arg-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号24)

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 2】

Name	Calcd MW	Obsvd MW	Mode	Purity (%)	Cyclization	Sequence
配列25	2049.3	2050.56	NEG	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Nle-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号25)
配列26	2135.3	2134.939	NEG	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Arg-Arg-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号26)
配列27	2142.3	2142.915	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号27)
配列28	2085.3	2084.384	NEG	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Val-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号28)
配列29	2099.3	2099.841	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Ile-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号29)
配列30	2099.3	2099.247	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Nle-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号30)
配列31	2113.3	2113.929	NEG	100	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Ahep-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号31)
配列32	2127.4	2127.928	POS	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Aoc-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号32)
配列33	2099.3	2099.997	NEG	91	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-DAla-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号33)
配列34	2113.3	2113.833	NEG	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Alb-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号34)
配列35	2084.3	2085.861	NEG	99	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Asp-Nle-Cys)-OH (配列番号35)
配列36	2041.3	2042.942	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Ala-Nle-Cys)-OH (配列番号36)
配列37	2027.2	2027.255	NEG	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Gly-Nle-Cys)-OH (配列番号37)
配列38	2085.3	2085.807	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Val-Cys)-OH (配列番号38)
配列39	2099.3	2099.413	NEG	88	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Leu-Cys)-OH (配列番号39)
配列40	2099.3	2099.813	POS	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Ile-Cys)-OH (配列番号40)
配列41	2113.3	2113.904	POS	97	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Ahep-Cys)-OH (配列番号41)
配列42	2127.3	2127.864	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Aoc-Cys)-OH (配列番号42)
配列43	2196.4	2196.703	NEG	95	S-S(5-16)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Pro-Cys)-OH (配列番号43)
配列44	2196.4	2196.878	NEG	96	S-S(6-16)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-Thr-c(Cys-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Pro-Cys)-OH (配列番号44)
配列45	1970.3	1971.794	NEG	95	None	Ac-Lys(Biotin)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys-OH (配列番号45)
配列46	1968.3	1969.916	NEG	96	S-S	Ac-Lys(Biotin)-Gly-Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Phe-Lys-The-Glu-Glu-Tyr-OH (配列番号47)
配列47	2845.0	2846.358	NEG	99	None	Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (配列番号46)
配列48	3069.7	3070.886	POS	96	None	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Trp-Pro-Lys-His-Phe-Asp-Lys-His-Thr-Phe-Tyr-Ser-Ile-Leu-Lys-Leu-Gly-Lys-His-OH (配列番号48)

10

20

30

40

【0090】

(ELISA法による結合試験の構築)

ペプチドのLRP1に対する結合活性を評価するため、ELISA法による結合試験を構築した。以下、本ELISA法を簡単に説明する。まず、ヤギ抗ヒトIgG-Fcポリクローナル抗体(カタログNo. 109-0005-008、Jackson ImmunoResearch社製)をD-PBSを用いて、1µg/50µL/ウェルで96穴マキシソーププレート(カタログNo. 439454、Nunc社製)に添加し、4で一晩コートした後、0.5%BSA/D-PBSをさらに300µL/ウェルで添加し、室温で30分間ブロックした。0.1%Tween 20/D-PBSでプレートを洗浄

50

後、LRP1の組み換えタンパク質であるLRP1クラスター2-Fcキメラタンパク質（カタログNo. 2368-L2-050、R&D system社製）、LRP1クラスター3-Fcキメラタンパク質（カタログNo. 48248-L3-050、R&D system社製）、又はLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質（カタログNo. 5395-L4-050、R&D system社製）を0.5%BSA/D-PBSを用いて、100ng/50 $\mu$ L/ウェルで添加し、室温で30分間、コートされた抗体と反応させた。0.1%Tween20/PBSでプレートを洗浄後、0.5%BSA/D-PBSを用いて、ビオチン化ペプチドである配列45と配列46を任意の濃度に調製し、50 $\mu$ L/ウェルで添加した。室温で30分間反応後、0.1%Tween20/D-PBSでプレートを洗浄した。プレートにキャプチャーされたLRP1の組み換えタンパク質に結合した配列45と配列46をSA-HRP（カタログNo. ab7403、アブカム社製）で検出した。HRPの定量には、TMB-ELISA Substrate Solution（カタログNo. 34028、サーモフィッシャー社製）を用いて、吸光度450nmを測定した。

#### 【0091】

本結合試験に用いた配列45と配列46のLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する選択的かつペプチド濃度依存的な結合を図1に示す（ $n = 4$ 、 $\pm$ SEM）。LRP1の組み換えタンパク質をキャプチャーしたウェルにBiotin化ペプチドを添加した場合に得られた吸光度から、LRP1の組み換えタンパク質をキャプチャーしていないウェルにBiotin化ペプチドを添加した場合に得られた吸光度を差し引き、特異的な結合活性を見積もった。この結果、配列45と配列46はいずれも、LRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対して、選択的かつペプチドの添加濃度依存的に結合した。LRP1クラスター2-Fcキメラタンパク質とLRP1クラスター3-Fcキメラタンパク質に対する結合は、ほとんど示されないか、又は僅かであった。配列45と配列46の結合EC50値は10.5nMと11.0nMと算出され、環状構造の有無に関わらず、同等の結合活性を示した。

#### 【0092】

（ELISA法による競合結合試験の構築）

配列1にアミノ酸置換を導入したペプチドのLRP1に対する結合活性及びプロテアーゼによる分解に対する耐性を配列2のそれらと比較するため、図2に示すELISA法による競合結合試験を構築した。配列2又はアミノ酸置換ペプチドをマウス血漿と混合(Plasma incubation)した直後（0時間）又は37 $^{\circ}$ Cで24時間後、血漿濃度が十分に低くなるように、さらに任意の終濃度となるように希釈して配列46（500nM）と混合し、上述の競合結合試験に供した。配列46のLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する結合は、溶液中に共存する配列2又はアミノ酸置換ペプチドのLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する結合と競合するため、配列2又はアミノ酸置換ペプチドの濃度依存的に阻害される。すなわち、配列2又はアミノ酸置換ペプチドのLRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する結合活性は、配列46の結合に対する競合的な阻害活性として検出される。LRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質をキャプチャーしていないウェルに対する配列46の結合値を阻害活性100%、配列2やアミノ酸置換ペプチドを添加していないウェルに対する配列46の結合値を阻害活性0%として、配列2及びアミノ酸置換ペプチドの阻害活性値を%で算出した。

#### 【0093】

（アミノ酸置換ペプチドのLRP1に対する結合活性の評価）

LRP1クラスター4-Fcキメラタンパク質に対する競合結合試験を $n = 4$ （ $\pm$ SEM）で検討した結果を図3に示す。血漿と培養0時間の配列2は添加濃度依存的に配列46の結合を阻害した。500nMの配列2が添加されたウェルにおける配列46（500nM）の結合は平均52.4%であり、配列2と配列46がLRP1クラスター4に対する結合を1:1で競合していることが示された。血漿と培養24時間の配列2も添加濃度依存的に配列46の結合を阻害した。しかしながら、2000nM相当の配列2が添加さ

10

20

30

40

50

れたウェルにおける配列 46 (500 nM) の結合は平均 50.6% であった。すなわち、2000 nM 相当がウェルに添加されたにも関わらず 500 nM 相当の阻害活性しか示さなかったことになり、およそ 75% の配列 2 がマウス血漿と 24 時間培養している間に分解されたことが示された。DMSO をマウス血漿と混合した直後に同様の試験に供した結果、配列 46 (500 nM) の結合は、まったく阻害されず、結合系に混入する血漿が系阻害していないことが示された。

#### 【0094】

配列 1 ~ 配列 44 をマウス血漿と混合した直後又は 37 で 24 時間後、血漿濃度が十分に低くなるように、さらに終濃度 2000 nM となるように希釈して配列 46 (500 nM) と混合し、上述の競合結合試験に供した。結果を図 4 に示す。配列 1 と配列 2 の阻害活性は、それぞれ 70.7% と 79.4% と見積もられた。配列 6、配列 7、配列 9、配列 19、配列 24、配列 34、配列 43 の阻害活性は、それぞれ 91.9%、87.6%、85.8%、79.1%、77.4%、82.0%、83.5% とであり、配列 1 や配列 2 と同等以上の阻害活性を示した。その他の配列は阻害活性が減弱する傾向にあった。配列 2 と同様に多くのアミノ酸置換ペプチドも、マウス血漿との混合 24 時間後は、マウス血漿との混合直後に競合試験に供した場合と比較して、一様に阻害活性が減弱したことから、マウス血漿中で分解されたことが示された。

#### 【0095】

(インビトロの血液脳関門モデルによる評価)

図 5 には、血液脳関門を通過する能力を評価するためのインビトロの血液脳関門モデルの概要を示す。ラット型 BBB キット (カタログ No. RBT-24H、ファーマコセル社製) とサル型 BBB キット (カタログ No. MBT-24H、ファーマコセル社製) を用いて試験を行った。これらのキットは生体内での BBB 特性 (各種の受容体やトランスポーターの発現の有無やタイトジャンクションの形成能など) を保持しており、薬物の脳内移行性を見積もる評価系として幅広く利用されている (非特許文献 6 および 7)。インサートウェルを血管側、ボトムウェルを脳側とし、インサートウェルに添加されたペプチドが内皮細胞 / メンブレンフィルター / ペリサイトで構成される三層の底面を透過する量を評価した。また、BBB 機能を表す TEE R 値 (経上皮電気抵抗値) を試験前後で測定し、ペプチドの添加が BBB 機能に影響しないことを確認した。

#### 【0096】

LRP1 結合活性と BBB 透過性が報告されている ANG2 (非特許文献 4) と L57 (非特許文献 5) を比較対象として、配列 2 の BBB 透過性を評価した結果を図 6 に示す。5-FAM 標識した ANG (配列 47)、5-FAM 標識した L57 (配列 48)、配列 2 をそれぞれ終濃度 10 μM、3 μM、1 μM となるようにインサートウェルに添加し、37 で 24 時間培養後、ボトムウェルの培養上清を回収した。各 5-FAM 標識ペプチドを任意の濃度となるように培地で段階希釈することで検量線を作成し、回収した各培養上清中に含まれる 5-FAM 標識ペプチドの濃度を算出した。インサートウェル (血管側) に添加したペプチド量 (モル数) を 100% とし、ボトムウェル (脳側) に移行したペプチド量 (モル数) を % として算出した。配列 2 の BBB 透過性は、上段グラフで示されるラット BBB、下段グラフで示されるサル BBB に関わらず、いずれの濃度でも 5-FAM 標識した ANG 及び L57 よりも有意に高かった (n = 4、±SD、\* p < 0.01、配列 2 に対する Dunnett's テスト)。培養 24 時間後、いずれのウェルも TEE R 値 (経上皮電気抵抗値) が 150 × cm<sup>2</sup> 以上であり、BBB 機能を維持していることが示された。これらの結果から、本発明のペプチドは、関門組織、特に血液脳関門を通過できることが示された。そして、本発明のペプチドの代表例である配列 2 の BBB 透過性は既存の ANG2 や L57 よりも優れていることが確認された。

#### 【0097】

(ペプチド修飾体 DBCO-KS-487 の合成と評価)

< 合成方法 >

合成は株式会社スクラム (東京、日本) に委託した。9-フルオロメトキシカルボニル

10

20

30

40

50

基 (Fmoc) を アミノ基の保護基として用いる標準的な固相合成法を自動合成機 Syru II (Bio tag e社製) で実施することで、まず以下の直鎖状ペプチド前駆体を合成した。

【0098】

NH<sub>2</sub> - Gly - Thr (tBu) - Pro - Cys (Trt) - Thr (tBu) - Tyr (tBu) - Lys (Boc) - Tyr (tBu) - Nle - Leu - Ala - Glu (OtBu) - Nle - Cys (Trt) - Trt (2-Cl) - Resin

【0099】

次に、レジンをジメチルホルムアミド (DMF) に浸し、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を加えることでpH8とした。当該pH8として、DMFに溶解したN3 - PEG4 - NHS (Cas # 944251 - 24 - 5、カタログ# J64834、Alfa Aesar社製) を加えて反応させることで、N末端 アミノ基にアジド基 (N3 - ) を導入し、以下を得た。

10

【0100】

N3 - PEG4 - Gly - Thr (tBu) - Pro - Cys (Trt) - Thr (tBu) - Tyr (tBu) - Lys (Boc) - Tyr (tBu) - Nle - Leu - Ala - Glu (OtBu) - Nle - Cys (Trt) - Trt (2-Cl) - Resin

【0101】

続いて、各アミノ酸残基の側鎖の脱保護とレジンからペプチドを切り出すためにトリフルオロ酢酸 (TFA) / 超純水 (Water) / Thioanisole / 1, 2 - エタンジチオール (EDT) / トリイソプロピルシリルクロリド (Tips) (83 / 5 / 5 / 5 / 2) を添加した。当該添加後、室温で2時間反応を行った。当該反応後、レジンを濾過し、得られた濾液を冷却エーテルに加えることで沈殿させた。沈殿物を少量の超純水に溶解し、凍結乾燥することで以下を得た。

20

【0102】

N3 - PEG4 - Gly - Thr - Pro - Cys - Thr - Tyr - Lys - Tyr - Nle - Leu - Ala - Glu - Nle - Cys - OH (配列番号56)

【0103】

凍結乾燥物をDMSOに溶解し、0.1M NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>水溶液を少量ずつ加えて室温で1~2日間攪拌しながら酸化反応させることで、Cys残基の側鎖間でS - S結合を形成させた。RP - HPLCにて分取精製し、凍結乾燥することで以下の環状ペプチドを得た。

30

【0104】

N3 - PEG4 - Gly - Thr - Pro - c (Cys - Thr - Tyr - Lys - Tyr - Nle - Leu - Ala - Glu - Nle - Cys) - OH (配列番号54)

【0105】

精製後の環状ペプチドとDBCO - PEG5 - DBCO (Cas # 2363130 - 04 - 3、カタログ# BP - 22450、BROADPHARM社製) をそれぞれジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、混合した後、50mMリン酸バッファーを添加した。当該添加後、常温で2時間反応した。RP - HPLCにて分取精製し、凍結乾燥することで以下DBCO - KS - 487 (理論分子量2701.3、実測分子量2702.0、純度95.0%) を得た。ここで、N末端の修飾部分 (DBCO - PEG5 - Taz - PEG4) を除いた環状ペプチド部分をKS - 487と称する。

40

【0106】

DBCO - PEG5 - Taz - PEG4 - Gly - Thr - Pro - c (Cys - Thr - Tyr - Lys - Tyr - Nle - Leu - Ala - Glu - Nle - Cys) - OH (配列番号55)

【0107】

< DBCOの反応性の確認 >

DBCO - KS - 487と6 - アジド - ヘキサン酸をDMSO / PBS (50 / 50) (pH7.5) 中で適量混合し、室温で反応させた後、RP - HPLCでDBCO - K

50

S - 487のピーク位置の移動を評価した。この結果を図8に示す。図8の反応前のグラフにはD B C O - K S - 487に由来するピーク(10.200min)が示されるが、図8の反応後のグラフにはD B C O - K S - 487に由来するピーク(10.248min)がほぼ消失した。図8の反応後のグラフに示すように、新たなピーク(7.904min及び9.285min)が生まれた。図8(反応前及び反応後)に示す結果より、環状ペプチドに付加させたD B C O基はクリック反応するための活性を保持していることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0108】

本発明に係るペプチドは、LRP1結合活性を有しており、LRP1にペプチドが結合することで、LRP1のRMTを介して末梢組織と脳組織を隔てる関門組織、例えば血液脳関門(BBB)を通過できる。従って、本発明に係るペプチドは、任意の分子と組み合わせることで、任意の分子を脳組織に運ぶための手段として有用であると考えられる。

10

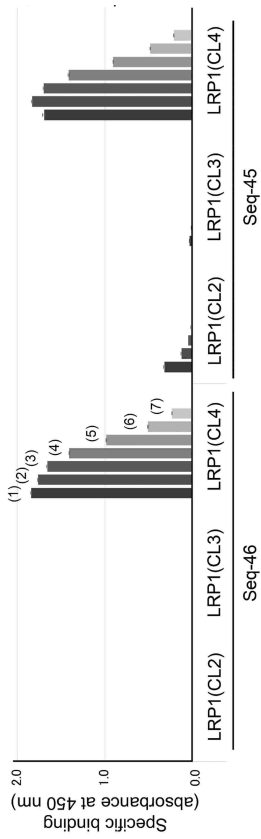
20

30

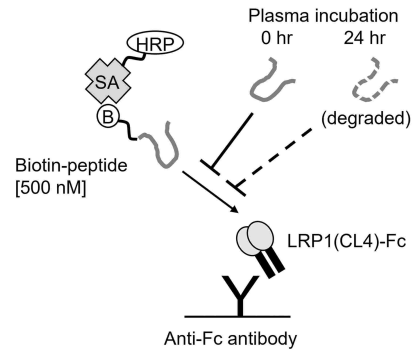
40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】



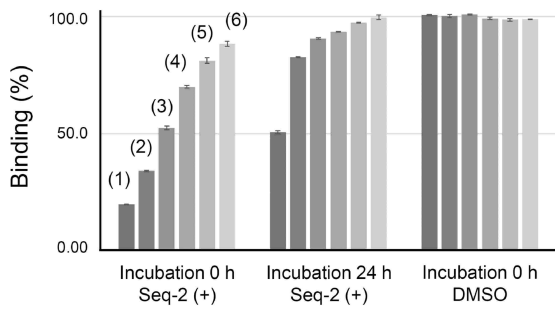
【 図 2 】



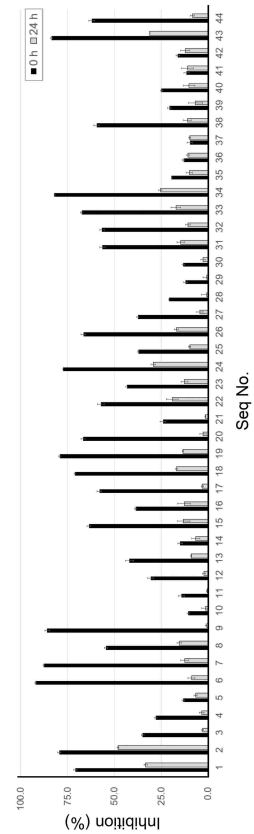
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

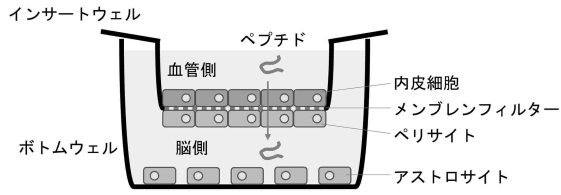


30

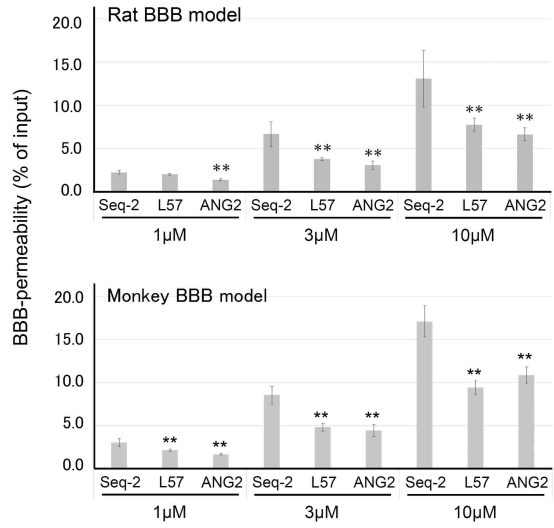
40

50

【 図 5 】

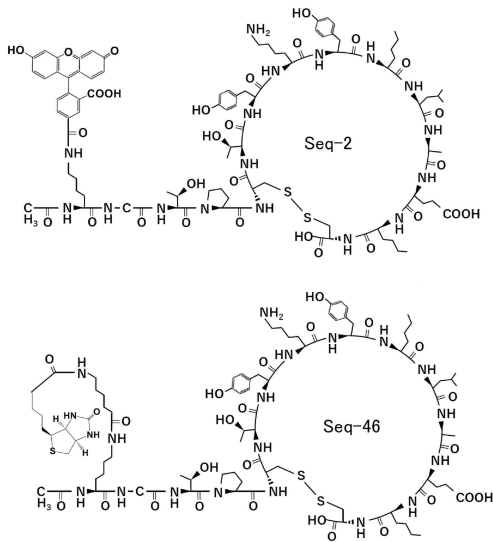


【 図 6 】

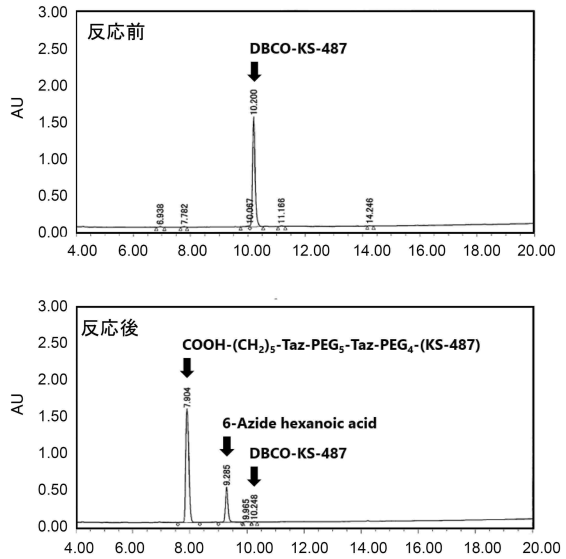


10

【 図 7 】



【 図 8 】



20

30

40

50

【配列表】

0007665261000001.xml

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 7/01 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)  
 C 0 7 K 17/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)  
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/64 (2017.01)

## F I

C 1 2 N 7/01  
 C 1 2 N 1/15  
 C 0 7 K 17/00  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 K 38/10  
 A 6 1 P 43/00 1 1 1  
 A 6 1 K 39/395 A  
 A 6 1 K 39/395 H  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 K 47/64

## (56)参考文献

特開 2 0 2 2 - 0 3 3 0 2 7 ( J P , A )

特表 2 0 1 5 - 5 2 6 4 3 4 ( J P , A )

RUAN Huitong et al. , Stapled RAP12 peptide ligand of LRP1 for micelles-based multifunctional glioma-targeted drug deliver , Chemical Engineering Journal , 2021年 , Vol.403 , 12 6296 , doi:10.1016/j.cej.2020.126296

ANDRE Severine et al. , Development of an LDL Receptor-Targeted Peptide Susceptible to Facilitate the Brain Access of Diagnostics , Biology , 2020年 , Vol.9 , 161 , doi:10.3390/biology9070161

SAKAMOTO Kotaro , Generation of KS-487 as a novel LRP1-binding cyclic peptide with higher affinity, higher stability and BBB permeability , Biochemistry and Biophysics Reports , 2022年10月08日 , Vol.32 , 101367 , doi:10.1016/j.bbrep.2022.101367

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )