



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119630790 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 14

(21) 申请号 202380056691.4

(22) 申请日 2023.06.29

(30) 优先权数据

2022-125238 2022.08.05 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.01.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/024137 2023.06.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/029242 JA 2024.02.08

(71) 申请人 一丸自然美健有限公司

地址 日本国岐阜县

(72) 发明人 坂元孝太郎

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

专利代理师 李宏轩 王刚

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/64 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书6页 说明书28页

序列表(电子公布) 附图6页

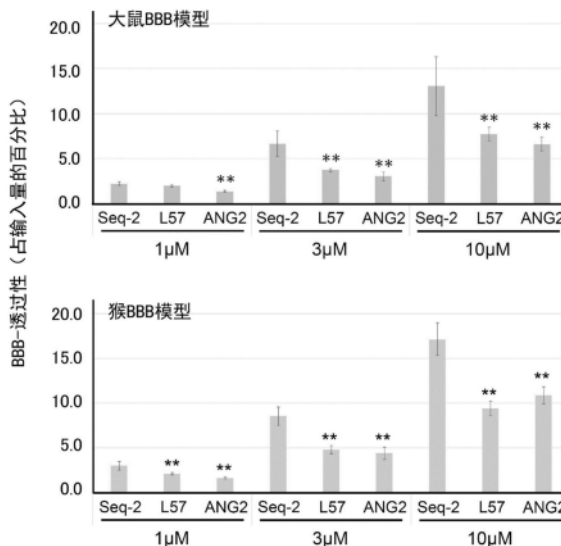
(54) 发明名称

新型LRP1结合肽

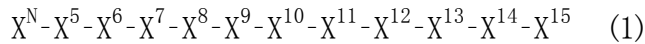
(57) 摘要

一种直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐,其具有下述式(1)所示的氨基酸序列。 $X^N-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}$

(1) 该肽通过与LRP1结合,能够通过经由LRP1的胞吞转运将任意的药物递送至脑组织。

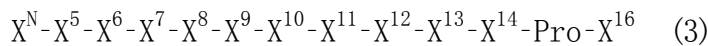


1. 一种直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐,其特征在于,具有下述式(1)所示的氨基酸序列:



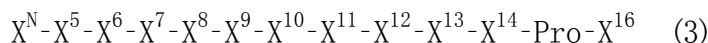
式(1)中, $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基, $X^5$ 和 $X^{15}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸, $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸, $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸, $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸, $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸, $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸, $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸, $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸,N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰、或者、缺失或未缺失, $X^5$ 和 $X^{15}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸,在各个侧链-SH基之间,经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键,由此式(1)的肽在分子内具有或不具有1个环状结构。

2. 一种直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐,其特征在于,具有下述式(3)所示的氨基酸序列:



式(3)中, $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基, $X^5$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸, $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸, $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸, $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸, $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸, $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸, $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸, $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸,N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰、或者、缺失或未缺失, $X^5$ 和 $X^{16}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸,在各个侧链-SH基之间,经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键,由此式(3)的肽在分子内具有或不具有1个环状结构。

3. 一种直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐,其特征在于,具有下述式(3)所示的氨基酸序列:



式(3)中, $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基, $X^6$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸, $X^5$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸

或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸, N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰、或者、缺失或未缺失,  $X^6$ 和 $X^{16}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键, 由此式(3)的肽在分子内具有或不具有1个环状结构。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐, 其中,  $X^N$ 为Lys-Gly-Thr-Pro或Gly-Thr-Pro。

5. 一种具有LRP1结合活性的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐, 其特征在于, 包含权利要求1~3中任一项中所述的氨基酸序列中缺失、添加和/或替换了1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列。

6. 权利要求1~3中任一项所述的肽的衍生物和/或修饰体。

7. 根据权利要求6所述的肽的衍生物或修饰体, 其中, 所述衍生物或修饰体在N末端、C末端或氨基酸的侧链直接或经由连接基团而具有叠氮基、炔烃基、环辛炔基或四嗪基。

8. 一种医药、诊断药和/或试剂, 其特征在于, 包含权利要求1~3中任一项所述的肽或其衍生物或其修饰体。

9. 一种肽药物复合体, 其特征在于, 权利要求6所述的肽的衍生物或修饰体与药物直接连接或经由连接基团连接而成。

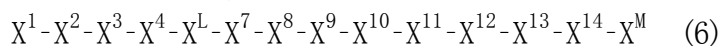
10. 根据权利要求9所述的肽药物复合体, 其中, 所述药物为抗体、核酸或生物活性肽。

11. 一种多核苷酸, 其特征在于, 是编码权利要求1~3中任一项中所述的氨基酸序列中仅由天然氨基酸构成的氨基酸序列的多核苷酸, 或者是具有与所述多核苷酸的序列一致性为70%以上的碱基序列且编码具有LRP1结合活性的肽的多核苷酸。

12. 一种表达载体, 其特征在于, 包含权利要求11所述的多核苷酸。

13. 一种细胞、酵母、细菌、病毒、脂质体或纳米颗粒, 其特征在于, 呈递权利要求1~3中任一项所述的氨基酸序列。

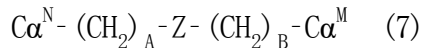
14. 一种直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐, 其特征在于, 包含下述式(6)所示的氨基酸序列:



式(6)中,  $X^L$ 为 $X^5-X^6$ ,  $X^M$ 为 $X^{15}-X^{16}$ , 在参与肽分子内的环化的情况下, 各自独立地表示具有氨基、羧基、硫醇基、烯丙基、炔基、叠氮基或卤素原子的氨基酸残基、或者它们的衍生物, 在不参与肽分子内的环化的情况下,  $X^5$ 、 $X^6$ 或 $X^{15}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基、或它们的衍生物,  $X^{16}$ 表示任意的氨基酸残基、它们的衍生物或缺失,  $X^7$ 表示具备具有或不具有取代基的烃基的氨基酸残基、具备具有或不具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基、具备具有或不具有取代基的芳香族杂环基的氨基酸残基、或者它们的衍生物,  $X^8$ 表示具有正电荷的氨基酸残基、或它们的衍生物,  $X^{11}$ 、 $X^{12}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示具备具有或不具有取代基的烃基的氨基酸残基、或它们的衍生物,  $X^{13}$ 表示具备具有或不具有取代基的烃基的氨基酸残

基、具有负电荷的氨基酸残基、或它们的衍生物,  $X^9$ 、 $X^{10}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基、或它们的衍生物,  $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基、它们的衍生物或缺失,  $X^1$ 与 $X^M$ 之间形成直接的共价键或经由连接基团的间接的共价键, 由此式(6)的肽在分子内具有或不具有1个环状结构, 该情况下的 $X^1$ 与 $X^M$ 之间的共价键是它们的主链-主链间、主链-侧链间、侧链-主链间或侧链-侧链间的任意键, N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰、或者、缺失或未缺失。

15. 根据权利要求14所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐, 其中,  $X^5$ 与 $X^{15}$ 的 $\text{Ca}$ 碳原子间的键、 $X^6$ 与 $X^{15}$ 的 $\text{Ca}$ 碳原子间的键、 $X^5$ 与 $X^{16}$ 的 $\text{Ca}$ 碳原子间的键、或 $X^6$ 与 $X^{16}$ 的 $\text{Ca}$ 碳原子间的键各自独立地包含下述式(7)所示的结构:

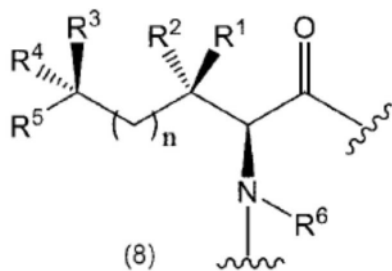


式(7)中, N为4或5, M为14或15, A和B各自独立地表示0~2中的任一整数, A与B的总和为0~4中的任一整数, Z表示S-S、 $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ 、S- $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2$ -S、O- $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2$ -O、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})$ 、 $\text{NH}-\text{C}(=\text{S})$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{S})$ 、O- $\text{C}(=\text{O})$ 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{NH}$ 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{CH}_3)$ 、 $\text{C}(=\text{S})-\text{NH}$ 、 $\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{CH}_3)$ 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ 、 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、S- $\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$ 、 $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$ 、O- $\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ 、 $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2$ 、S- $\text{CH}_2-\text{S}$ 、S- $\text{C}(=\text{CH}_2)-\text{S}$ 、S- $(\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3)-\text{S}$ 、S- $(\text{CH}_2)_2-\text{S}$ 、S- $(\text{CH}_2)_3-\text{S}$ 、S- $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{S}$ 、S- $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{CH}_2)-\text{CH}_2-\text{S}$ 、S- $(\text{CH}_2)_4-\text{S}$ 、S- $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}$ 、S- $\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{S}$ 、S- $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{S}$ 或S- $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{CH}_2)-\text{CH}_2-\text{S}$ , 其中, 在S- $\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{S}$ 中, 亚甲基在亚苯基环上的键合部位为邻位、间位和对位中的任一者。

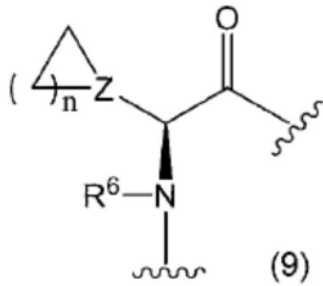
16. 根据权利要求14或15所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐, 其中,  $X^8$ 为2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸、高精氨酸、它们的D型氨基酸、它们的N甲基化氨基酸、它们的 $\alpha$ 甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

17. 根据权利要求14或15所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐, 其中,  $X^{12}$ 为丙氨酸、D型丙氨酸、2-氨基异丁酸、2-氨基丁酸、D型2-氨基丁酸、异缬氨酸、D型异缬氨酸、缬氨酸、D型缬氨酸、异亮氨酸、D型异亮氨酸、亮氨酸、D型亮氨酸、它们的N甲基化氨基酸、它们的 $\alpha$ 甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

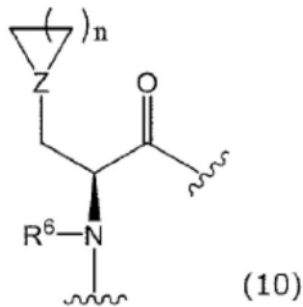
18. 根据权利要求14或15所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐, 其中,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地为蛋氨酸、下述式(8)或下述式(9)或下述式(10)所示的氨基酸残基、或者它们的衍生物:



式(8)中, 波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的附着点,  $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^6$ 各自独立地表示氢原子或甲基,  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 各自独立地表示氢原子、甲基或卤素原子, 所述卤素原子为F、Cl、Br、I, n表示0~10中的任一整数;

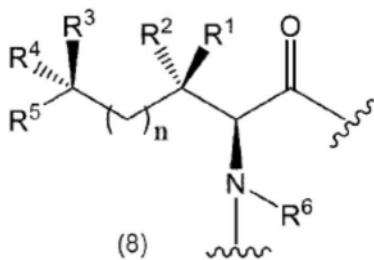


式(9)中,Z表示C或N, $\text{R}^6$ 表示氢原子或甲基,n表示1~6中的任一整数;

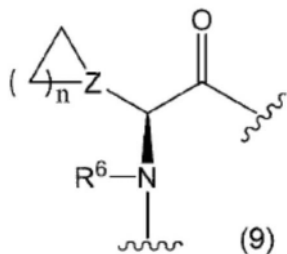


式(10)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的键合部位,Z表示C或N, $\text{R}^6$ 表示氢原子或甲基,n表示1~6中的任一整数。

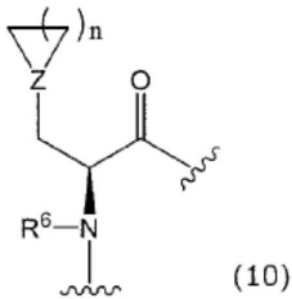
19. 根据权利要求14或15所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, $\text{X}^7$ 为下述式(8)、下述式(9)、下述式(10)、下述式(11)、下述式(12)或下述式(13)所示的氨基酸残基、或者它们的衍生物:



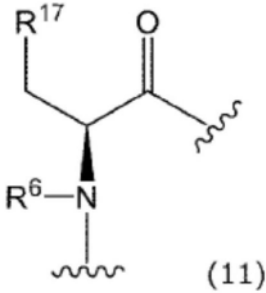
式(8)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的附着点, $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 和 $\text{R}^6$ 各自独立地表示氢原子或甲基, $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 各自独立地表示氢原子、甲基或卤素原子,所述卤素原子为F、Cl、Br、I,n表示0~10中的任一整数;



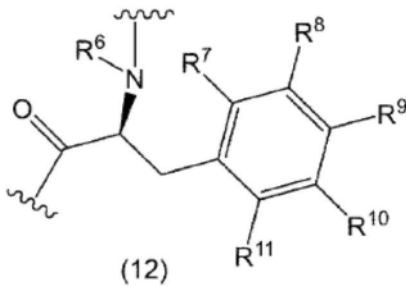
式(9)中,Z表示C或N, $\text{R}^6$ 表示氢原子或甲基,n表示1~6中的任一整数;



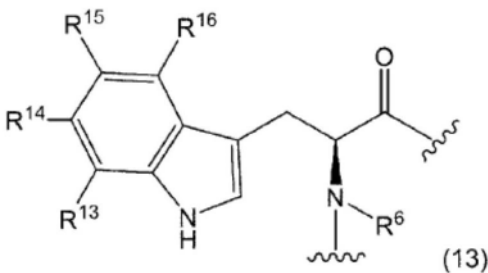
式(10)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的键合部位, $Z$ 表示C或N, $R^6$ 表示氢原子或甲基, $n$ 表示1~6中的任一整数;



式(11)中, $R^{12}$ 表示2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-噻唑基、4-噻唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、1-吡唑基、1H-咪唑-4-基、1-咪唑基、1,2,3-三唑-1-基或1,2,4-三唑-1-基, $R^6$ 表示氢原子或甲基;



式(12)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的附着点, $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 各自独立地表示氢原子、羟基、甲氧基、甲基、叔丁基、卤代甲基或卤素原子,所述卤素原子为F、Cl、Br、I, $R^6$ 表示氢原子或甲基;



式(13)中, $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 各自独立地表示氢原子、羟基、甲氧基、甲基、叔丁基、卤代甲基或卤素原子,所述卤素原子为F、Cl、Br、I, $R^6$ 表示氢原子或甲基。

20. 根据权利要求14或15所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, $X^{13}$ 为甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、D型丙氨酸、D型天冬氨酸、D型谷氨酸、D型天冬酰胺、D型谷氨酰胺、它们的N甲基化氨基酸、它们的 $\alpha$ 甲基化氨基酸、或

它们的衍生物。

21. 根据权利要求14或15所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中,不参与肽分子内的环化的 $X^L$ 和 $X^M$ 各自独立地为丙氨酸、异缬氨酸、正缬氨酸、丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、0-甲基化丝氨酸、0-甲基化高丝氨酸、0-甲基化苏氨酸、0-甲基化别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸、反式-4-羟基脯氨酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、哌可酸、D型丝氨酸、D型高丝氨酸、D型苏氨酸、D型别苏氨酸、D型0-甲基化丝氨酸、D型0-甲基化高丝氨酸、D型0-甲基化苏氨酸、D型0-甲基化别苏氨酸、D型2,3-二氨基丙酸、D型2,4-二氨基丁酸、D型鸟氨酸、D型赖氨酸、D型精氨酸、D型脯氨酸、D型顺式-4-羟基脯氨酸、D型反式-4-羟基脯氨酸、D型氮杂环丁烷-2-羧酸、D型哌可酸、它们的N甲基化氨基酸、它们的 $\alpha$ 甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

## 新型LRP1结合肽

[0001] 交叉参照

[0002] 本申请基于2022年8月5日在日本申请的日本特愿2022-125238主张优先权,该申请中记载的内容全部通过参照而直接援引于本说明书。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及与LRP1结合的肽等。本发明涉及经由与LRP1的结合而能够穿过将末梢组织与脑组织隔开的屏障组织、例如血脑屏障(BBB)的肽等。详细而言,涉及具有特定氨基酸序列的直链状肽或环状肽等。

### 背景技术

[0004] 痴呆症、精神分裂症、自闭症谱系障碍等中枢神经系统疾病(精神疾病)被认为患者数量在世界范围内达到10亿人,占最大的伤残调整寿命年,因此其总社会负担非常大。例如,2030年的美国和欧洲的经济负担总额预计为6兆美元(非专利文献1)。从这些背景出发,关于针对中枢神经系统疾病的药物开发,期待其成功关系到巨大的市场,但另一方面,也已知是失败率最高的药物开发领域(非专利文献1)。其原因之一是在生物体中存在着隔开末梢组织和脑组织的屏障组织:血脑屏障、血脑脊液屏障、血脊髓屏障、血蛛网屏障。其中,特别是血脑屏障(Blood-Brain Barieer:BBB)是针对中枢神经系统疾病的药物开发的障碍。血脑屏障是通过周细胞、进一步地星形胶质细胞覆盖以紧密结合方式连接的脑毛细血管内皮细胞的周围而形成的物理屏障,严格地控制末梢组织与脑组织之间的物质的流入流出(非专利文献2)。例如,已知以被动扩散的方式从未梢组织向脑组织转移的物质优选分子量为400g/mol以下、物性为高脂溶性。因此,针对中枢神经系统疾病的药物开发大多是以低分子化合物来尝试的,但担心由脱靶效应引起的副作用,药物开发靶标也受到限制。

[0005] 特别是近年来受到关注的蛋白质-蛋白质间相互作用这样的药物开发靶标中,以往的低分子化合物能够结合的明确的口袋少,肽这样的中分子、抗体这样的高分子的控制优异。另外,由于中分子、高分子相对于药物开发靶标的特异性高,因此也可期待由脱靶效应引起的副作用的降低。然而,如上所述,由于屏障组织的存在,技术问题是中分子、高分子以被动扩散的方式从未梢组织转移至脑组织是极其困难的。

[0006] 迄今为止,作为使中分子、高分子从未梢组织转移至脑组织的方法之一,研究了为了使特定的营养物质、必需成分转移至脑而通过血脑屏障中表达的受体的胞吞转运(受体介导的细胞转运(receptor-mediated transcytosis)RMT)。例如可举出以葡萄糖、氨基酸为底物的转运蛋白、胰岛素、转铁蛋白、脂蛋白的受体等(非专利文献2)。关于将与人的转铁蛋白受体结合的抗体和药效分子偶联,将药效分子运送至中枢组织的尝试,已经有上市药,在人临床试验中进行了RMT的概念验证(非专利文献3)。

[0007] 低密度脂蛋白受体相关蛋白质1(Low density lipoprotein receptor-related protein1:LRP1)也是RMT期待的受体之一。LRP1在血脑屏障中的表达量在人-猴-小鼠之间非常相关。另外,作为与多种内源性配体相互作用的配体结合域的簇2(CL2)和簇4(CL4)的

氨基酸序列在种间极高度地保存。而且,在作为LRP1结合肽已知的Angiopep-2(ANG2)上偶联了作为抗癌剂的紫杉醇的分子结束了人临床试验的第二期,证实了基于LRP1的RMT在人的安全性(非专利文献4)。

[0008] 现有技术文献

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:L Ereshefsky,R Evans,R Sood,Dwilliamson And B.AEnglish. “VENTURING INTO ANEW ERA OF CNSDRUG DEVELOPMENT TO IMPROVE SUCCESS”2015.

[0011] 非专利文献2:V.M Pulgar.Front Neurosci(《神经科学前沿》).2019,12:1019.

[0012] 非专利文献3:R Yamamoto and S Kawashima.Nihon Yakugaku Zasshi(《日本药理学杂志》).2022,157(1):62-75.

[0013] 非专利文献4:P Kumthekar,Sc Tang,A.J Brenner,S Kesari,D.VPiccioni,C Anders,J Carrillo,P Chalasani,P Kabos,S Puhalla,K Tkaczuk,A.AGarcia,M.S Ahluwalia,J.S Wefel,N Lakhani and N Lbrahm.Clin Cancer Res.(《临床癌症研究》)2020,26(12):2789-2799.

[0014] 非专利文献5:K Sakamoto,T Shinohara,Y Adachi,T Asami and TOhtaki.Biochem Biophys Rep.(《生物化学和生物物理学报告》)2017,12:135-139.

[0015] 非专利文献6:F Tanaka,SDohgu,A Yamauchi,J Matsumoto,T Machida,K Fujishita,K Shibata,Y Shinozaki,K Sato,Y Kataoka and S Koizumi.PLoS One.(《公共科学图书馆一号》)2013,8(1):e55166.

[0016] 非专利文献7:D Watanabe,S Nakagawa,Y Morofuji,A Toth,m vastag,j aruga, m niwa and m deli.pharmaceutics.(《药剂学》)2021,13(9):1484.

[0017] 非专利文献8:DP Fairlie and A Dantas.Biopolymers(《生物聚合物》)2016,106(6):843-852.

[0018] 非专利文献9:YH Lau,P Andrade,Y Wu,and DR Spring.Chem Soc Rev.(《化学会评论》)2015,44(1)91-102.

## 发明内容

[0019] 发明所要解决的技术问题

[0020] 本说明书中记载的发明的目的在于提供与LRP1结合的新型肽。本发明的目的还在于提供一种通过将肽与“某分子”组合,经由基于LRP1的RMT将“某分子”运送至脑组织,从而将“某分子”用作医药品、诊断药和/或研究试剂的方法。

[0021] 用于解决技术问题的技术方案

[0022] 本发明人探索与LRP1结合的分子,从而完成了本发明。即,本发明的一个方式为具有下述式(1)所示的氨基酸序列的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐。

[0023]  $X^N-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}$  (1)

[0024] 其中,式(1)中, $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基, $X^5$ 和 $X^{15}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸, $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟

苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸, N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失,  $X^5$ 和 $X^{15}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键, 由此式(1)的肽可以在分子内具有1个环状结构。

[0025] 上述式(1)的肽中的 $X^1 \sim X^{15}$ 的各氨基酸残基的优选方式在以下的实施方式中详细说明, 各自的优选实施方式可以相互独立地任意组合。

[0026] 本发明更具体而言包含以下的实施方式。

[0027] (1)

[0028] 一种具有下述式(1)所示的氨基酸序列的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐。

[0029]  $X^N-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}$  (1)

[0030] (式中,  $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基,  $X^5$ 和 $X^{15}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸,  $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸,  $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸, N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失,  $X^5$ 和 $X^{15}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键, 由此式(1)的肽可以在分子内具有1个环状结构。)

[0031] (2)

[0032] 一种具有下述式(3)所示的氨基酸序列的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐。

[0033]  $X^N-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-\text{Pro}-X^{16}$  (3)

[0034] (式中,  $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基,  $X^5$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸,  $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸,  $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或

4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸, N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失,  $X^5$ 和 $X^{16}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键, 由此式(3)的肽可以在分子内具有1个环状结构。)

[0035] (3)

[0036] 一种具有下述式(3)所示的氨基酸序列的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐。

[0037]  $X^N-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-\text{Pro}-X^{16}$  (3)

[0038] (式中,  $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基,  $X^6$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸,  $X^5$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸,  $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸, N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失,  $X^6$ 和 $X^{16}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团形成共价键, 由此式(3)的肽可以在分子内具有1个环状结构。)

[0039] (4)

[0040] 根据(1)~(3)中任一项所述的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐, 其中,  $X^N$ 为Lys-Gly-Thr-Pro或Gly-Thr-Pro。

[0041] (5)

[0042] 一种具有LRP1结合活性的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐, 其包含(1)~(4)中任一项中所述的氨基酸序列中缺失、添加和/或替换了1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列。

[0043] (6)

[0044] (1)~(5)、以下(14)~(21)中任一项所述的肽的衍生物和/或修饰体。

[0045] (7)

[0046] 根据(6)所述的肽的衍生物或修饰体, 其中, 所述衍生物或修饰体在N末端、C末端或氨基酸的侧链直接或经由连接基团而具有叠氮基、炔烃基、环辛炔基或四嗪基。

[0047] (8)

[0048] 一种医药、诊断药和/或试剂, 其包含(1)~(7)、以下(14)~(21)中任一项所述的肽或其衍生物或者其修饰体。

[0049] (9)

[0050] 一种肽药物复合体,其为(6)所述的肽的衍生物或修饰体与药物直接连接或经由连接基团连接而成。

[0051] (10)

[0052] 根据(9)所述的肽药物复合体,其中,所述药物为抗体、核酸或生物活性肽。

[0053] (11)

[0054] 一种多核苷酸,其为编码(1)~(5)、以下(14)~(21)中任一项中所述的氨基酸序列中仅由天然氨基酸构成的氨基酸序列的多核苷酸、或者是具有与所述多核苷酸的序列一致性为70%以上的碱基序列且编码具有LRP1结合活性的肽的多核苷酸。

[0055] (12)

[0056] 一种表达载体,其包含(11)所述的多核苷酸。

[0057] (13)

[0058] 一种细胞、酵母、细菌、病毒、脂质体或纳米颗粒,其呈递(1)~(5)、以下(14)~(21)中任一项中所述的氨基酸序列。

[0059] (14)

[0060] 一种包含下述式(6)所示的氨基酸序列的直链状肽或环状肽、或者它们的药理学上可接受的盐。

[0061]  $X^1-X^2-X^3-X^4-X^L-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^M$  (6)

[0062] ( $X^L$ 为 $X^5-X^6$ , $X^M$ 为 $X^{15}-X^{16}$ ,在参与肽分子内的环化的情况下,各自独立地表示具有氨基、羧基、硫醇基、烯丙基、炔基、叠氮基或卤素原子的氨基酸残基、或者它们的衍生物,在不参与肽分子内的环化的情况下, $X^5$ 、 $X^6$ 或 $X^{15}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基、或它们的衍生物, $X^{16}$ 表示任意的氨基酸残基、它们的衍生物或缺失, $X^7$ 表示具有可具有取代基的烃基的氨基酸残基、具有可具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基、具有可具有取代基的芳香族杂环基的氨基酸残基、或者它们的衍生物, $X^8$ 表示具有正电荷的氨基酸残基或它们的衍生物, $X^{11}$ 、 $X^{12}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示具有可具有取代基的烃基的氨基酸残基、或它们的衍生物, $X^{13}$ 表示具有可具有取代基的烃基的氨基酸残基、具有负电荷的氨基酸残基、或它们的衍生物, $X^9$ 、 $X^{10}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基、或它们的衍生物, $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基、它们的衍生物或缺失, $X^L$ 与 $X^M$ 之间形成直接的共价键或经由连接基团的间接的共价键,由此式(6)的肽可以在分子内具有1个环状结构,该情况下的 $X^L$ 与 $X^M$ 之间的共价键可以是它们的主链-主链间、主链-侧链间、侧链-主链间或侧链-侧链间的任意键,N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失)。

[0063] (15)

[0064] 根据(14)所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, $X^5$ 与 $X^{15}$ 的 $\text{C}\alpha$ 碳原子间的键、 $X^6$ 与 $X^{15}$ 的 $\text{C}\alpha$ 碳原子间的键、 $X^5$ 与 $X^{16}$ 的 $\text{C}\alpha$ 碳原子间的键或 $X^6$ 与 $X^{16}$ 的 $\text{C}\alpha$ 碳原子间的键各自独立地包含下述式(7)所示的结构。

[0065]  $\text{C}\alpha^L-(\text{CH}_2)_A-Z-(\text{CH}_2)_B-\text{C}\alpha^M$  (7)

[0066] (式中,L为4或5,M为14或15,A和B各自独立地表示0~2中的任一整数,A与B的总和为0~4中的任一整数,Z表示S-S、 $\text{CH}_2-\text{CH}_2$ 、S- $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2$ -S、O- $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2$ -O、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})$ 、 $\text{NH}-\text{C}(=\text{S})$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{S})$ 、O- $\text{C}(=\text{O})$ 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{NH}$ 、 $\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{CH}_3)$ 、 $\text{C}(=\text{S})-$

NH、C(=S)-N(CH<sub>3</sub>)、C(=O)-O、CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S、CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>、O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O、CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>、S-CH<sub>2</sub>-S、S-C(=CH<sub>2</sub>)-S、S-(C(=O)-CH<sub>3</sub>)-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-S(亚甲基在亚苯基环上的键合部位为邻位、间位和对位中的任一者)、S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S、或S-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-S。

[0067] (16)

[0068] 根据(14)或(15)所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, X<sup>8</sup>为2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸、高精氨酸、它们的D型氨基酸、它们的N甲基化氨基酸、它们的α甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

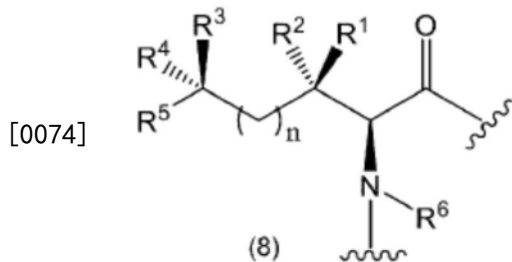
[0069] (17)

[0070] 根据(14)~(16)中任一项所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, X<sup>12</sup>为丙氨酸、D型丙氨酸、2-氨基异丁酸、2-氨基丁酸、D型2-氨基丁酸、异缬氨酸、D型异缬氨酸、缬氨酸、D型缬氨酸、异亮氨酸、D型异亮氨酸、亮氨酸、D型亮氨酸、它们的N甲基化氨基酸、它们的α甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

[0071] (18)

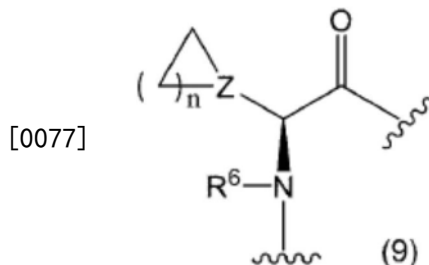
[0072] 根据(14)~(17)中任一项所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, X<sup>11</sup>和X<sup>14</sup>各自独立地为蛋氨酸、下述式(8)或下述式(9)或下述式(10)所示的氨基酸残基、或者它们的衍生物。

[0073] [化1]



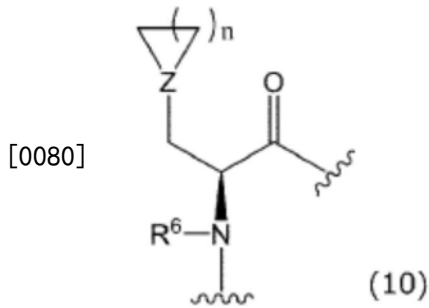
[0075] (式中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的附着点, R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>6</sup>各自独立地表示氢原子或甲基, R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>各自独立地表示氢原子、甲基或卤素原子(F、Cl、Br、I), n表示0~10中的任一整数)

[0076] [化2]



[0078] (式中, Z表示C或N, R<sup>6</sup>表示氢原子或甲基, n表示1~6中的任一整数)

[0079] [化3]

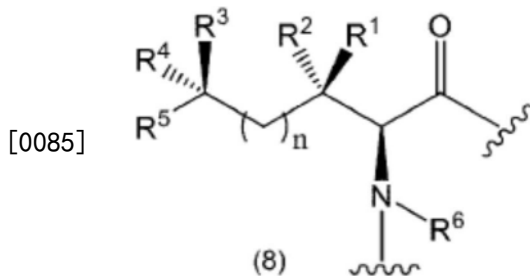


[0081] (式中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的键合部位,Z表示C或N, $R^6$ 表示氢原子或甲基,n表示1~6中的任一整数)

[0082] (19)

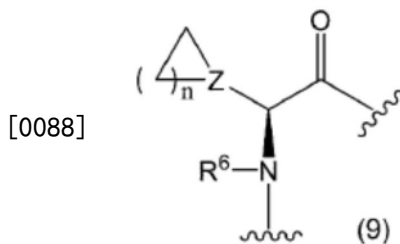
[0083] 根据[14]~[18]中任一项所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中, $X^7$ 为下述式(8)、下述式(9)、下述式(10)、下述式(11)、下述式(12)或下述式(13)所示的氨基酸残基,或者它们的衍生物。

[0084] [化4]



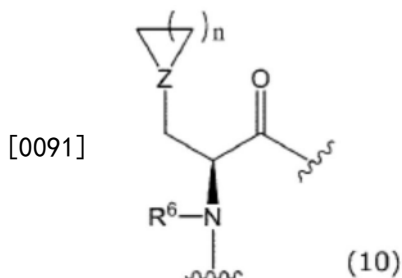
[0086] (式中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的附着点, $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^6$ 各自独立地表示氢原子或甲基, $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 各自独立地表示氢原子、甲基或卤素原子(F、Cl、Br、I),n表示0~10中的任一整数)

[0087] [化5]



[0089] (式中,Z表示C或N, $R^6$ 表示氢原子或甲基,n表示1~6中的任一整数)

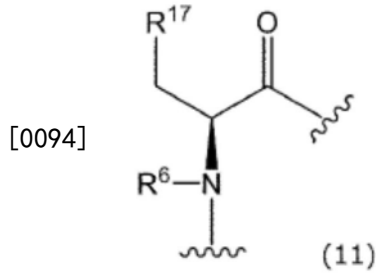
[0090] [化6]



[0092] (式中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的键合部位,Z表示C或N,

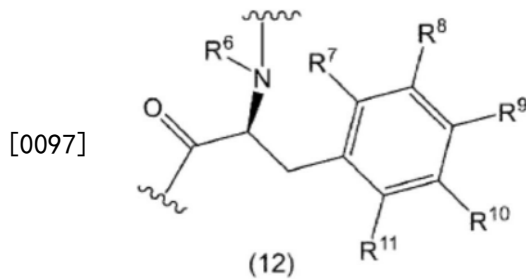
$R^6$ 表示氢原子或甲基,  $n$ 表示1~6中的任一整数)

[0093] [化7]



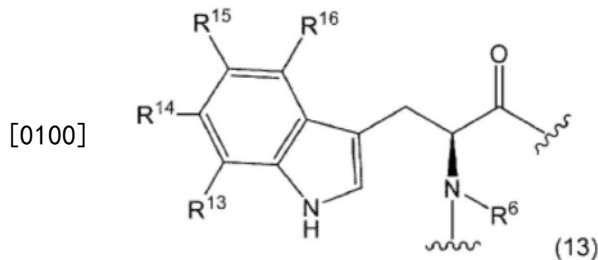
[0095] (式中,  $R^{12}$ 表示2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-噻唑基、4-噻唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、1-吡唑基、1H-咪唑-4-基、1-咪唑基、1,2,3-三唑-1-基或1,2,4-三唑-1-基,  $R^6$ 表示氢原子或甲基)

[0096] [化8]



[0098] (式中, 波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的附着点,  $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 各自独立地表示氢原子、羟基、甲氧基、甲基、叔丁基、卤代甲基或卤素原子(F、Cl、Br、I),  $R^6$ 表示氢原子或甲基。)

[0099] [化9]



[0101] (式中,  $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 各自独立地表示氢原子、羟基、甲氧基、甲基、叔丁基、卤代甲基或卤素原子(F、Cl、Br、I),  $R^6$ 表示氢原子或甲基。)

[0102] (20)

[0103] 根据[14]~[19]中任一项所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中,  $X^{13}$ 为甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、D型丙氨酸、D型天冬氨酸、D型谷氨酸、D型天冬酰胺、D型谷氨酰胺、它们的N甲基化氨基酸、它们的 $\alpha$ 甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

[0104] (21)

[0105] 根据[14]~[20]中任一项所述的直链状肽和环状肽、或它们的药理学上可接受的盐,其中,不参与肽分子内的环化的 $X^1$ 和 $X^M$ 各自独立地为丙氨酸、异缬氨酸、正缬氨酸、丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、O-甲基化丝氨酸、O-甲基化高丝氨酸、O-甲基化苏氨酸、O-

甲基化别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸、反式-4-羟基脯氨酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、哌可酸、D型丝氨酸、D型高丝氨酸、D型苏氨酸、D型别苏氨酸、D型O-甲基化丝氨酸、D型O-甲基化高丝氨酸、D型O-甲基化苏氨酸、D型O-甲基化别苏氨酸、D型2,3-二氨基丙酸、D型2,4-二氨基丁酸、D型鸟氨酸、D型赖氨酸、D型精氨酸、D型脯氨酸、D型顺式-4-羟基脯氨酸、D型反式-4-羟基脯氨酸、D型氮杂环丁烷-2-羧酸、D型哌可酸、它们的N甲基化氨基酸、它们的 $\alpha$ 甲基化氨基酸、或它们的衍生物。

[0106] 发明效果

[0107] 根据本发明,提供一种为了将与本肽组合的“某分子”通过经由与LRP1的结合的RMT转移至脑组织而用作医药品、诊断药和/或研究试剂的有用且新型的直链状肽和环状肽。

### 附图说明

[0108] 图1是对作为生物素标记的本发明肽的代表例的序列45和序列46相对于LRP1簇2 (CL2) -Fc嵌合蛋白、LRP1簇3 (CL3) -Fc嵌合蛋白、LRP1簇4 (CL4) -Fc嵌合蛋白的浓度依赖性结合活性进行评价的结果。实验中使用的生物素标记肽的浓度,对于各个蛋白质,从左起依次为(1)1000nM、(2)330nM、(3)110nM、(4)37nM、(5)12nM、(6)4.1nM、(7)1.4nM和0nM,对柱赋予浓淡而示出。

[0109] 图2表示为了评价本发明肽相对于LRP1簇4的结合活性和相对于蛋白酶分解的耐性这两者而使用的基于ELISA法的竞争结合试验的概要。图中,SA表示链霉亲和素,B表示生物素,HRP表示辣根过氧化物酶。

[0110] 图3是在与小鼠血浆刚混合后或混合24小时后的序列2 (2000~63nM) 存在下对作为生物素标记的本发明肽的代表例的序列46 (500nM) 相对于LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的结合活性 (Binding (%)) 进行评价的结果。序列2的肽浓度分别从左起依次为(1)2000nM、(2)1000nM、(3)500nM、(4)250nM、(5)130nM和(6)63nM,对柱赋予浓淡而示出。

[0111] 图4是在与小鼠血浆刚混合后或混合24小时后的序列1~序列44 (2000nM) 存在下对作为生物素标记的本发明肽的代表例的序列46 (500nM) 相对于LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的抑制活性 (Inhibition (%)) 进行评价的结果。

[0112] 图5表示用于评价穿过血脑屏障的能力的体外的血脑屏障模型的概要。

[0113] 图6表示使用体外的血脑屏障模型 (大鼠型和猴型) 评价作为5-FAM (荧光色素) 标记的本发明肽的代表例的序列2穿过血脑屏障的能力的结果。

[0114] 图7表示作为实施例中使用的本发明肽的代表例的序列2和序列46的结构式。

[0115] 图8是用RP-HPLC分析本发明的肽修饰型DBCO-KS-487 (反应前) 与6-叠氮己酸在室温下反应 (反应后) 的溶液的结果。

### 具体实施方式

[0116] 接下来,参照附图对本发明的各实施方式进行说明。需要说明的是,以下说明的各实施方式并不限定权利要求书涉及的发明,另外,在各实施方式中说明的各要素及其组合的全部并不一定是本发明的解决方法所必需的。

[0117] (定义)

[0118] 在本说明书中,肽是指2个以上的氨基酸通过酰胺键(肽键)键合而得到的物质,例如可以是2~20个氨基酸进行酰胺键合而得到的物质。另外,根据肽标记的惯例,左端为N末端(氨基末端),右端为C末端(羧基末端)。将与形成肽键的羰基邻接的第一个碳原子称为C $\alpha$ 碳。

[0119] 本说明书中,“任意的氨基酸残基或它们的衍生物”以其最广泛的含义使用,除了天然氨基酸以外,还包括具有非天然结构的人工氨基酸、具有作为氨基酸的特征的本领域公知的特性的化学合成的化合物、以及具有官能团的羧酸。作为非天然氨基酸的例子,可举出:D型氨基酸、主链的结构与天然型不同的 $\alpha/\alpha$ -二取代氨基酸(2-氨基异丁酸之类的 $\alpha$ -甲基化氨基酸等)、N-烷基氨基酸(N-甲基化氨基酸等)、N-取代甘氨酸(肽)、主链延长的氨基酸( $\beta$ -高氨基酸、 $\gamma$ -高氨基酸)、侧链的结构与天然型不同的氨基酸(环己基丙氨酸、烯丙基甘氨酸、2-(2-吡啶基)-甘氨酸、3-(1H-苯并咪唑-2-基)-丙氨酸等)、侧链的一部分被取代的氨基酸(正亮氨酸、二氨基丙酸、3-(2-吡啶基)-丙氨酸等)、侧链具有多余的官能团的氨基酸;侧链具有多余的C-烷基、甲基的氨基酸(高正亮氨酸、 $\gamma$ -甲基亮氨酸等)、侧链具有卤素原子(F、Cl、Br、I)的氨基酸(3-氯丙氨酸等)、侧链具有卤素原子(F、Cl、Br、I)的羧酸(3-氯丙酸等)、侧链具有官能团的羧酸(3-丁烯酸等)、侧链具有多余的N-氨基的氨基酸( $\beta$ -叠氮丙氨酸、鸟氨酸等)、侧链具有多余的O-甲氧基的氨基酸(O-甲基丝氨酸、O-甲基苏氨酸等)、侧链具有多余的羟基的氨基酸(3-羟基苯丙氨酸等)、侧链具有多余的羧基(-COOH)的氨基酸(3-羧基苯丙氨酸等)、侧链具有多余的S的氨基酸(乙硫氨酸等)、侧链中的羧酸官能团被酯保护的氨基酸(天冬氨酸-4-甲酯等)、侧链的巯基(-S-)被氧化而变换为亚磺酰基(-S(=O)-)、磺酰基(-S(=O)<sub>2</sub>-)的氨基酸(蛋氨酸亚砷)等,但并不限于这些。

[0120] 本说明书中,“LRP1”是指小鼠、大鼠、狗、猴、人等哺乳类的LRP1。

[0121] 本说明书中,“具有LRP1结合活性”的情况是指,在体外试验中,本发明的肽或本发明的肽与“某分子”的组合体相对于LRP1的全长蛋白、簇4等部分蛋白、或它们以外的蛋白的嵌合体浓度依赖性地结合等。LRP1结合活性的有无本领域技术人员可以参考非专利文献5等,按照公知的方法来确认,但并不限于此。

[0122] 在本说明书中,“屏障组织”是指小鼠、大鼠、狗、猴、人等哺乳类的屏障组织。

[0123] 在本说明书中,“穿过屏障组织”的情况是指:(1)在使用体外的血脑屏障模型的试验中,本发明的肽或本发明的肽与“某分子”的组合体从血管侧孔转移至脑侧的孔;(2)在使用LC-MS/MS等的药代动力学试验中,从脑组织中检测出从未梢给药的本发明的肽或本发明的肽与“某分子”的组合体;(3)在使用体内成像系统等的药代动力学试验中,在脑中检测出从未梢给药的本发明的肽或本发明的肽与“某分子”的组合体等,在以这些效果中的任一个表示的情况下,称为“穿过屏障组织”。关于穿过屏障组织的能力的有无,本领域技术人员可以参考非专利文献6和7等,按照公知的方法来确认,但并不限于此。

[0124] (本发明的肽)

[0125] [1]本发明的一个实施方式中的直链状肽和环状肽具有下述式(1)所示的氨基酸序列。

[0126]  $X^N-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}$  (1)

[0127] 式(1)中, $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基, $X^5$ 和 $X^{15}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、

半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸,  $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸,  $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失,  $X^5$ 和 $X^{15}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团而形成共价键, 由此式(1)的肽可以在分子内具有1个环状结构。

[0128] 上述式(1)的肽中,  $X^N$ 优选为Lys-Gly-Thr-Pro或Gly-Thr-Pro。在N末端为赖氨酸的情况下, 可以经由其侧链的 $\epsilon$ 氨基与某分子键合。在N末端为甘氨酸的情况下, 可以经由其 $\alpha$ 氨基与某分子键合。优选地,  $X^5$ 和 $X^{15}$ 为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 各自的侧链-SH基之间经由二硫键或亚甲基的连接基团而形成共价键, 从而在分子内形成1个环状结构。

[0129] 作为上述式(1)的肽中进一步优选的实施方式, 例如可举出以下的式(2)所示的氨基酸序列。在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键或亚甲基的连接基团而形成共价键, 由此可以在分子内具有1个环状结构, 也可以经由Lys1的 $\epsilon$ 氨基与某分子键合。

[0130] Ac-Lys-Gly-Thr-Pro-Cys- $X^6$ - $X^7$ -Lys- $X^9$ - $X^{10}$ -Leu-Ala-Glu- $X^{14}$ -Cys-OH(2)

[0131] 式(2)中,  $X^6$ 表示丝氨酸、苏氨酸或2,3-二氨基丙酸,  $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸,  $X^9$ 表示酪氨酸、蛋氨酸、正亮氨酸或精氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、精氨酸或赖氨酸,  $X^{14}$ 表示亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸或正亮氨酸。

[0132] [2]本发明的其他实施方式中的直链状肽和环状肽具有下述式(3)所示氨基酸序列。

[0133]  $X^N$ - $X^5$ - $X^6$ - $X^7$ - $X^8$ - $X^9$ - $X^{10}$ - $X^{11}$ - $X^{12}$ - $X^{13}$ - $X^{14}$ -Pro- $X^{16}$ (3)

[0134] 上述式(3)中,  $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基,  $X^5$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸,  $X^6$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸,  $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸,  $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、0-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸,  $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸,  $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸,  $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸,  $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸。N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失,  $X^5$ 和 $X^{16}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸, 在各个侧链-SH基之间, 经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团而形成共价键, 由此式(3)的肽可以在分子内具有1个环状结构。

[0135] 上述式(3)的肽中, $X^N$ 优选为Lys-Gly-Thr-Pro或Gly-Thr-Pro。在N末端为赖氨酸的情况下,可以经由其侧链的 $\epsilon$ 氨基与某分子键合。在N末端为甘氨酸的情况下,可以经由其 $\alpha$ 氨基与某分子键合。优选地, $X^5$ 和 $X^{16}$ 为半胱氨酸或D型半胱氨酸,各自的侧链-SH基之间经由二硫键或亚甲基的连接基团而形成共价键,从而在分子内形成1个环状结构。

[0136] 作为上述式(3)的肽中进一步优选的实施方式,例如可举出以下的式(4)所示的氨基酸序列。在各个侧链-SH基之间,经由二硫键或亚甲基的连接基团而形成共价键,由此可以在分子内具有1个环状结构,也可以经由Lys1的 $\epsilon$ 氨基与某分子键合。

[0137] Ac-Lys-Gly-Thr-Pro-Cys- $X^6$ - $X^7$ -Lys- $X^9$ - $X^{10}$ -Leu-Ala-Glu- $X^{14}$ -Pro-Cys-OH(4)

[0138] 式(4)中, $X^6$ 表示丝氨酸、苏氨酸或2,3-二氨基丙酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸, $X^9$ 表示酪氨酸、蛋氨酸、正亮氨酸或精氨酸, $X^{10}$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、精氨酸或赖氨酸, $X^{14}$ 表示亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸或正亮氨酸。

[0139] [3]本发明的另一个实施方式中的直链状肽和环状肽具有下述式(3)所示的氨基酸序列。

[0140]  $X^N$ - $X^5$ - $X^6$ - $X^7$ - $X^8$ - $X^9$ - $X^{10}$ - $X^{11}$ - $X^{12}$ - $X^{13}$ - $X^{14}$ -Pro- $X^{16}$ (3)

[0141] 上述式(3)中, $X^N$ 为1~4个任意的氨基酸残基, $X^6$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、D型半胱氨酸或脯氨酸, $X^5$ 表示丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸或反式-4-羟基脯氨酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸, $X^8$ 表示鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、精氨酸或高精氨酸, $X^9$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、O-甲基酪氨酸、苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸或4-氯苯丙氨酸, $X^{10}$ 表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸或精氨酸, $X^{11}$ 和 $X^{14}$ 各自独立地表示蛋氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、2-氨基庚酸或2-氨基辛酸, $X^{12}$ 表示丙氨酸、D型丙氨酸或2-氨基异丁酸, $X^{13}$ 表示甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸,N末端氨基和C末端羧基可以被修饰也可以缺失, $X^6$ 和 $X^{16}$ 在参与环化的情况下为半胱氨酸或D型半胱氨酸,在各个侧链-SH基之间,经由二硫键、亚甲基、乙酰基亚甲基、亚乙基或亚丙基的连接基团而形成共价键,由此式(3)的肽可以在分子内具有1个环状结构。

[0142] 上述式(3)的肽中, $X^N$ 优选为Lys-Gly-Thr-Pro或Gly-Thr-Pro。在N末端为赖氨酸的情况下,可以经由其侧链的 $\epsilon$ 氨基与某分子键合。在N末端为甘氨酸的情况下,可以经由其 $\alpha$ 氨基与某分子键合。优选地, $X^6$ 和 $X^{16}$ 为半胱氨酸或D型半胱氨酸,各自的侧链-SH基之间经由二硫键或亚甲基的连接基团而形成共价键,从而在分子内形成1个环状结构。

[0143] 作为上述式(3)的肽中进一步优选的实施方式,例如可举出以下的式(5)所示的氨基酸序列。在各个侧链-SH基之间,经由二硫键或亚甲基的连接基团而形成共价键,由此可以在分子内具有1个环状结构,也可以经由Lys1的 $\epsilon$ 氨基与某分子键合。

[0144] Ac-Lys-Gly-Thr-Pro- $X^5$ -Cys- $X^7$ -Lys- $X^9$ - $X^{10}$ -Leu-Ala-Glu- $X^{14}$ -Pro-Cys-OH(5)

[0145] 式(5)中, $X^5$ 表示丝氨酸、苏氨酸或2,3-二氨基丙酸, $X^7$ 表示组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸, $X^9$ 表示酪氨酸、蛋氨酸、正亮氨酸或精氨酸, $X^{10}$ 表示蛋氨酸、正亮氨酸、精氨酸或赖氨酸, $X^{14}$ 表示亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸或正亮氨酸。

[0146] [4]本实施方式涉及的肽包括即使是在上述[1]~[3]所示的氨基酸序列中缺失、

添加和/或替换了1~数个氨基酸的具有同源性的肽,也具有对LRP1的结合活性的肽。在本说明书中,在称为“缺失、添加和/或替换了1~数个氨基酸的肽”的情况下,这些氨基酸的个数只要该肽具有LRP1结合活性就没有特别限定,优选为1~5个,进一步优选为1个或2个。缺失、添加和/或替换的部位可以是肽的末端,也可以是中间,可以是1处,也可以是2处以上。

[0147] 作为这样的在上述氨基酸序列中缺失、添加和/或替换了1~数个氨基酸的氨基酸序列,可举出在使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(美国国立生物学信息中心的基本局部比对检索工具))等(例如使用默认即初始设定的参数)进行计算时,具有与上述氨基酸序列至少50%以上、优选70%以上、进一步优选80%以上、特别优选90%以上的一致性的氨基酸序列。

[0148] 另外,已知也存在即使一级结构上的同源性低,立体结构却高度类似的肽、蛋白质结构域。因此,具有与上述氨基酸序列至少50%以上、优选70%以上、进一步优选80%以上、特别优选90%以上的立体结构同源性,且具有Ras结合活性的肽也包含在本实施方式中。这样的肽彼此的立体结构的同源性可以使用同源建模法等,根据立体结构未知的肽的氨基酸序列,如下预测其立体结构来进行。例如,在给出具有与本实施方式的环状肽(参照肽)类似的序列的任意氨基酸序列(目标序列)时,给出目标序列与参照序列之间的比对(将序列并排放置)。如果使用通过FASTA、PSI-BLAST、LIBRA等计算出的比对,则确定目标序列与参照序列间的每个氨基酸的对应关系,因此基于该关系,由参照肽的3维坐标制作目标序列上的每个氨基酸的3维坐标。在3维坐标的构建中,有时在氨基酸残基间产生结构上不适当的间隙、冲突、变形,因此通过能量极小化计算来消除这些结构上的变形。根据建模软件,为了顺利地进行该结构上的变形的消除,有时不是对肽的全部原子同时进行,而是阶段性地进行。即,首先对形成肽的骨架的 $\alpha$ 碳原子进行,接着对包含 $\alpha$ 碳原子的主链原子进行,最后对包含侧链原子的肽整体进行。如果以这种方式获得针对目标序列的比对,则可以预测构建其立体结构。关于立体结构同源性的指标,可以使用最佳重合时的XYZ坐标之差,即RMSD(Root Mean Square Deviation)等进行比较。

[0149] 本实施方式的肽也包含肽的盐。作为肽的盐,可使用与生理学上可接受的碱、酸的盐,例如可举出:无机酸(盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等)的加成盐,有机酸(对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯磺酸、羧酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等)的加成盐,无机碱(氢氧化铵、或碱、或者碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)、氨基酸的加成盐等。

[0150] (肽的衍生物和修饰体)

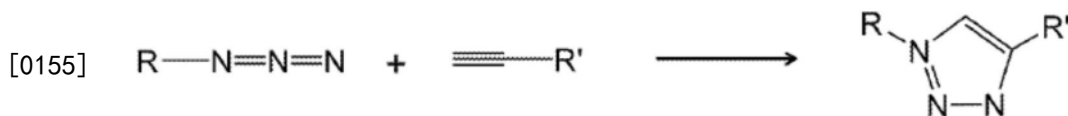
[0151] 本实施方式的肽只要解决本发明的技术问题,则也包含其各种衍生物和/或修饰体。作为所述衍生物,可举出:肽的饱和脂肪链被替换为不饱和脂肪链的衍生物、肽的一部分原子被替换为包含放射性或非放射性的同位素原子的其他原子的衍生物、肽的酰胺键被替换为硫代酰胺键(-NH-C(=S)-)的衍生物、肽的酰胺键被替换为烯炔(-C=C-)的衍生物、肽的酰胺键被替换为烷基(-C-C-)的衍生物、肽的酰胺键被替换为羟基亚乙基(-C(-OH)-C-)的衍生物、肽的酰胺键被替换为酯(-O-C(=O)-)的衍生物、肽的酰胺键被替换为烯炔(-C=C-)的衍生物、肽的酰胺键被替换为(-C-NH-)的衍生物、或肽的酰胺键被替换为(-C(=O)-C-)的衍生物等;作为所述修饰体,可举出:肽的 $\alpha$ 位碳被二取代的修饰体、肽的酰胺键被N-烷基化的修饰体、肽的一部分官能团受到卤化、氰化、硝化、氧化、羟基化、氨基化、脱氨基化、脱氢化、酰胺化、乙酰化、甲氧基化、异戊二烯化、烷基化等修饰的修饰体(例如,肽的

一部分氨基被乙酰化、烷基化、脱氨基化的修饰体、肽的一部分羧基成为酰胺、酯的修饰体等)、肽的S成为亚砷S(=O)或砷S(=O)<sub>2</sub>的修饰体、肽经由化学连接基团多聚化的修饰体、肽被生物素标记化的修饰体、肽被荧光标记化的修饰体、肽被发光标记化的修饰体,以及直接或经由连接基团使烷基链、聚乙二醇、抗体、凝集素类、糖链、酶、肽、类肽、膜渗透性肽、低分子化合物、核酸或诱导蛋白质的泛素化的分子等与肽融合·偶联而成的修饰体等,但并不限于这些。

[0152] 根据本发明的一些实施方式,本发明的肽在其N末端或C末端包含具有叠氮基的氨基酸残基。因此,具有炔烃基的“某分子”可以通过“一价铜催化型炔烃-叠氮化物环加成(CuAAC)反应”(或简称为“点击”反应)共价键合至本发明肽的N末端或C末端。根据本发明的另一个实施方式,通过使具有叠氮基和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯基的连接基团与本发明肽的 $\alpha$ 氨基或 $\epsilon$ 氨基反应来引入叠氮基。因此,具有炔烃基的“某分子”可以通过CuAAC反应与本发明的肽共价键合。根据本发明的另一个实施方式,本发明的肽在其N末端或C末端包含具有炔烃基的氨基酸残基。由此,具有叠氮基的“某分子”可以通过CuAAC反应与本发明的肽的N末端或C末端共价键合。根据本发明的另一个实施方式,通过使具有炔烃基和NHS酯基的连接基团与本发明肽的 $\alpha$ 氨基或 $\epsilon$ 氨基反应来引入炔烃基。因此,具有叠氮基的“某分子”可以通过CuAAC反应与本发明的肽共价键合。CuAAC反应如下方案1:

[0153] [化10]

[0154] 方案1

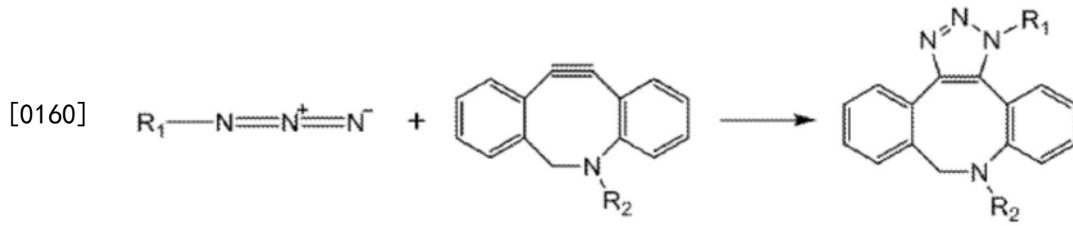


[0156] 通过CuAAC反应,得到1,5-二取代-1,2,3-三唑。炔烃与叠氮化物之间的反应是非常选择性的,天然生物分子中不存在炔烃基和叠氮基。进而,该反应迅速且为pH不敏感性。

[0157] 上述炔烃基可替换为环辛炔基。根据本发明的一些实施方式,本发明的肽在其N末端或C末端包含具有叠氮基的氨基酸残基。因此,具有环辛炔基的“某分子”可以通过“应变促进型叠氮化物-炔烃点击化学(SPAAC)反应”共价键合至本发明肽的N末端或C末端。根据本发明的另一个实施方式,通过使具有叠氮基和NHS酯基的连接基团与本发明肽的 $\alpha$ 氨基或 $\epsilon$ 氨基反应来引入叠氮基。因此,具有环辛炔基的“某分子”可以通过SPAAC反应与本发明的肽共价键合。根据本发明的另一个实施方式,本发明的肽在其N末端或C末端包含具有环辛炔基的氨基酸残基。由此,具有叠氮基的“某分子”可以通过SPAAC反应与本发明的肽的N末端或C末端共价键合。根据本发明的另一个实施方式,通过使具有环辛炔基和NHS酯基的连接基团与本发明肽的 $\alpha$ 氨基或 $\epsilon$ 氨基反应来引入环辛炔基。因此,具有叠氮基的“某分子”可以通过SPAAC反应与本发明的肽共价键合。SPAAC反应如下方案2:

[0158] [化11]

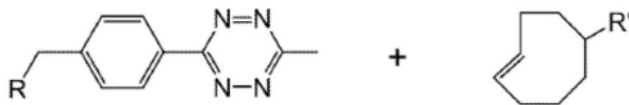
[0159] 方案2



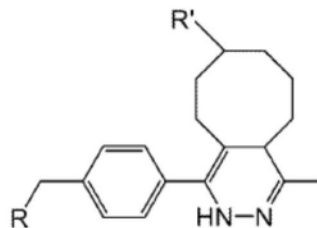
[0161] 或者,在特定的实施方式中,具有四嗪基或环辛烯基的“某分子”如以下的方案3所示,通过“逆电子需求狄尔斯-阿尔德 (IEDDA) 反应”与肽或连接基团所对应的环辛烯基或四嗪基键合。

[0162] [化12]

[0163] 方案3



[0164]

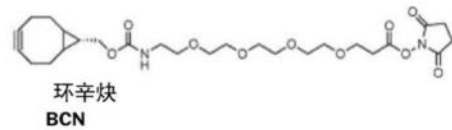


[0165] 作为具有叠氮基的氨基酸残基,可举出:L-叠氮高丙氨酸(AHA)、4-叠氮-L-苯丙氨酸、4-叠氮-D-苯丙氨酸、3-叠氮-L-丙氨酸、3-叠氮-D-丙氨酸、4-叠氮-L-高丙氨酸、4-叠氮-D-高丙氨酸、5-叠氮-L-鸟氨酸、5-叠氮-d-鸟氨酸、6-叠氮-L-赖氨酸和6-叠氮-D-赖氨酸等。作为具有炔烃基的氨基酸残基,例如可举出L-高炔丙基甘氨酸(L-HPG)、D-高炔丙基甘氨酸(D-HPG)和 $\beta$ -高炔丙基甘氨酸( $\beta$ -HPG)。

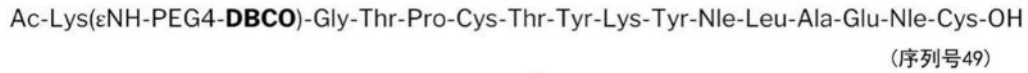
[0166] 存在于连接基团的游离末端的变形了的炔烃基可以是环辛烯基,例如反式环辛烯(TCO)基;或者是环辛炔基,例如二苯并环辛炔(DBCO)基、二氟环辛炔(DIFO)基、双环壬炔(BCN)基和二苯并环辛炔(DICO)基。或者,存在于连接基团的游离末端的四嗪基可举出1,2,3,4-四嗪基、1,2,3,5-四嗪基和1,2,4,5-四嗪基,以及它们的衍生物,如6-甲基四嗪基,但不限定于这些。

[0167] 在本发明的优选实施方式中,肽的衍生物和修饰体在N末端、C末端或氨基酸侧链上直接或经由连接基团具有叠氮基、炔烃基或四嗪基。作为这样的衍生物的一例,可举出以下的例子。例如,如果使DBCO-PEG4-NHS酯(D5922)或BCN-PEG4-NHS酯(BP-22851)与肽的N末端赖氨酸的 $\epsilon$ 氨基反应,则可得到经由PEG连接基团加成有DBCO或BCN的肽(序列号49和50)。

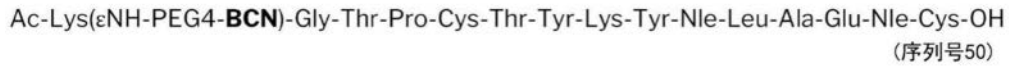
[0168] [化13]



[0169]



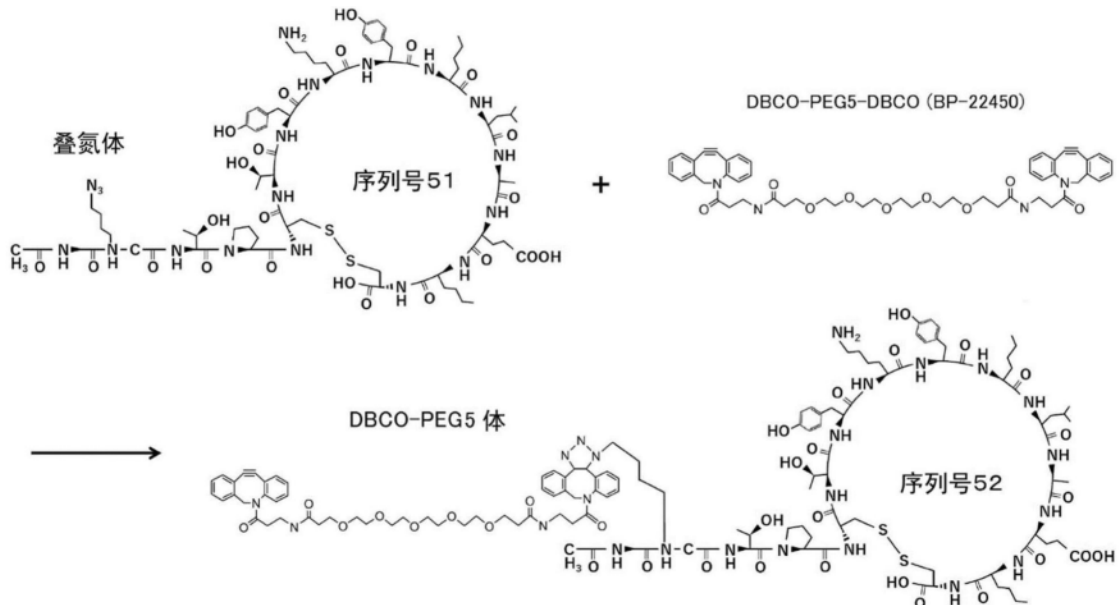
或



[0170] 或者,如以下的方案4所示,通过使DBCO-PEG5-DBCO(BP-22450)与预先用Fmoc-Lys( $\epsilon$ N<sub>3</sub>)-OH导入有叠氮基的N末端赖氨酸反应,也可以得到在氨基酸的侧链导入有DBCO基的肽(序列号51和序列号52)。

[0171] [化14]

[0172] 方案4

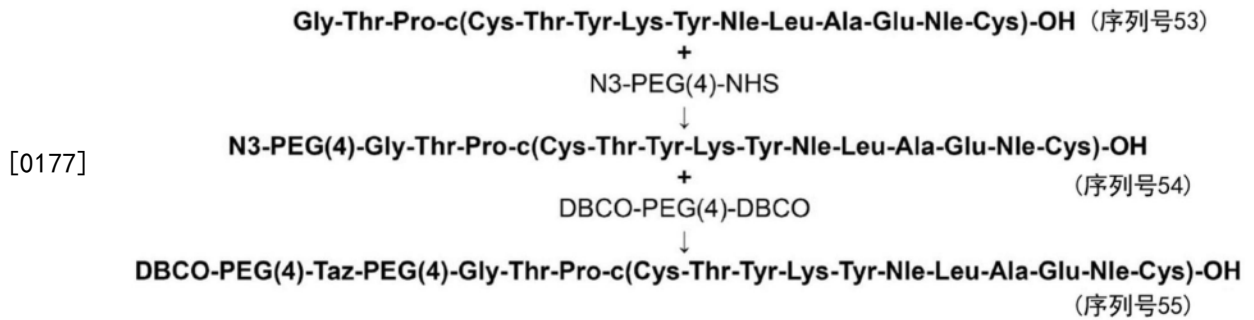


[0173]

[0174] 进而,在以下的方案5中,可以使N3-PEG4-NHS (N-Succinimidyl 15-azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoate, N-琥珀酰亚胺基15-叠氮-4,7,10,13-四氧十五烷酸酯)与序列号53所示的肽的N末端的甘氨酸的 $\alpha$ -氨基反应,合成导入有叠氮基的肽(序列号54),进而使用DBCO-PEG5-DBCO得到在N末端导入有DBCO基的肽(序列号55)。

[0175] [化15]

[0176] 方案5



[0178] (肽药物复合体)

[0179] 本发明的肽可以是偶联体(复合体)。该复合体是包含本发明的肽、与该肽结合的连接基团和与连接基团结合的“某分子”的复合体。该复合体优选为至少“某分子”能够穿过屏障组织的复合体。也可以是作为复合体整体而能够穿过屏障组织。

[0180] 连接基团例如可举出:由1~15个残基左右的氨基酸构成的连接基团、由脂肪酸构成的连接基团、由聚乙二醇构成的连接基团、或它们的衍生物等,但并不限于这些。连接基团可以是在特定的环境、条件下背离·分离的连接基团,也可以是保持稳定的结构的连接基团。

[0181] 本说明书中所述的“某分子”只要是期望递送到脑的分子,则可以是本领域技术人员期望的任何分子。但是,由于穿过屏障组织的机制是经由与LRP1的结合的RMT,因此,无法以相同机制搬运的过大的分子是不优选的。作为“某分子”的例子,可举出荧光色素、低分子化合物、肽、类肽、核酸、糖链、脂质、抗体、蛋白质、酶、脂质体、胶束、纳米颗粒、碳纳米管、碳纳米角、碳纳米片、它们的放射同位素标记体等,但并不限于这些。在优选的实施方式中,“某分子”是指药物,例如可以是抗体、核酸或生物活性肽。

[0182] 本发明的肽与“某分子”的复合体可以是融合体、移植体。例如,可以将本发明肽移植到与抗体、蛋白质的N末端和/或C末端融合的环区域。

[0183] 上述的融合体、移植体可以作为细胞·菌类·病毒等的胞外结构域的一部分而表达,也可以与细胞·菌类·病毒等的胞外结构域偶联。

[0184] 本发明的肽与“某分子”的复合体可以经由“具有与某分子的结合活性的分子”。本发明的肽和“具有与某分子的结合活性的分子”可以是偶联体、融合体和/或移植体中的任一种。“某分子”与“具有与某分子的结合活性的分子”之间的结合可以是可逆的,也可以是不可逆的。

[0185] 本发明的肽与“某分子”的复合体可以是晶体,晶型可以是单一的,也可以是晶型混合物,都包含在本发明的肽中。晶体可以通过应用自身公知的结晶化法进行结晶化来制造。

[0186] 本发明的肽与“某分子”的复合体可以是药学上可接受的共结晶、共结晶盐。在此,共结晶或共结晶盐是指具有各不相同的物理特性(例如结构、熔点、熔解热、吸湿性、溶解性和稳定性等),且在室温下由两种或两种以上的独特的固体构成的结晶性物质。共结晶或共结晶盐可以按照自身公知的共结晶化法来制造。

[0187] (环状肽的作用效果)

[0188] 如后述的实施例所示,作为本实施方式所示的氨基酸序列组的代表例的序列1~46具有LRP1结合活性。而且,序列2在体外血脑屏障模型中从血液侧孔转移到脑侧孔,因此

具有穿过血脑屏障的能力。本实施方式所示的氨基酸序列组具有与这些代表例类似的氨基酸序列和立体结构特征,因此认为它们极有可能也具有LRP1结合活性和穿过血脑屏障的能力。而且,认为与本发明的肽的偶联体、融合体、移植体也极有可能具有LRP1结合活性和穿过血脑屏障的能力。

[0189] 如后述的实施例所示,作为本实施方式所示的氨基酸序列组的代表例的序列1~46具有LRP1结合活性。这表示以下情况。 $X^5$ 与 $X^{15}$ 的 $\alpha$ 碳原子间的键、 $X^6$ 与 $X^{15}$ 的 $\alpha$ 碳原子间的键、 $X^5$ 与 $X^{16}$ 的 $\alpha$ 碳原子间的键或 $X^6$ 与 $X^{16}$ 的 $\alpha$ 碳原子间的键包容酰胺键、二硫键、硫醚键、C=C键、C-C键、经由三唑的键、经由二硫四氟苯的键、经由二甲基亚苯基(亚甲基与亚苯基环的键合部位为邻位、间位和对位中的任一种均可)的键等广泛形状的结构。

[0190] LRP1簇4的氨基酸序列在哺乳类中高度保存,作为本发明肽的代表例的序列2在大鼠型和猴型的体外血脑屏障模型中显示出穿过血脑屏障的能力,因此认为包含本实施方式所示的氨基酸序列的肽组、以及该肽组与“某分子”的复合体极有可能也与小鼠、大鼠、狗、猴等人以外的哺乳类的LRP1结合,显示穿过屏障组织的能力。

[0191] (环状肽的制造方法)

[0192] 本实施方式的肽可以通过液相法、固相法、或组合液相法与固相法的混合法等化学合成法等公知的肽的制造方法来制造。

[0193] 固相法可以使用市售的自动合成机。例如,使具有羟基的树脂的羟基与 $\alpha$ 位氨基被Fmoc基之类保护基保护的第一氨基酸(通常为肽的C末端氨基酸)的羧基进行酯化反应。作为酯化催化剂,可以使用1-均三甲苯磺酰基-3-硝基-1,2,4-三唑(MSNT)、二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)等公知的脱水缩合剂。接着,使第一氨基酸的 $\alpha$ 位氨基的保护基脱离,并且加入主链的羧基以外的全部官能团被保护的氨基酸,使该羧基活化,使第一氨基酸和氨基酸键合。进而,将第二氨基酸的 $\alpha$ 位氨基脱保护,加入主链的羧基以外的全部官能团被保护的氨基酸,使该羧基活化,使第二氨基酸和氨基酸键合。重复该操作,合成目标长度的肽。将直链肽从树脂切断,纯化后,将用于将肽环化的官能团脱保护,按照常规方法将肽环化。

[0194] 作为固相合成的树脂,可举出Merrifield树脂(Merrifield resin)、MBHA树脂(MBHA resin)、Cl-Trt树脂(Cl-Trt resin)、SASRIN树脂(SASRIN resin)、王树脂(Wang resin)、Rink酰胺树脂(Rink amide resin)、HMFS树脂(HMFS resin)、Amino-PEGA树脂(Amino-PEGA resin,默克公司)、HMPA-PEGA树脂(HMPA-PEGaresin,默克公司)等。这些树脂可以用溶剂(二甲基甲酰胺(DMF)、2-丙醇、二氯甲烷等)清洗后使用。作为 $\alpha$ 位氨基的保护基,可举出苄氧基羰基(Cbz)基、叔丁氧基羰基(Boc)基、苄基甲氧基羰基(Fmoc)基、苄基、烯丙基、烯丙氧基羰基(Alloc)基等。Cbz基可通过氢氟酸、氢化等脱保护,Boc基可通过三氟乙酸(TFA)脱保护,Fmoc基可通过利用哌啶的处理脱保护。 $\alpha$ 位羧基的保护可以使用甲酯、乙酯、苄酯、叔丁酯、环己酯等。作为氨基酸的其他官能团,丝氨酸、苏氨酸等的羟基可以用苄基、叔丁基保护,酪氨酸等的羟基可以用2-溴苄氧基羰基、叔丁基保护。赖氨酸等的侧链的氨基、谷氨酸、天冬氨酸等的羧基可以与 $\alpha$ 位氨基、 $\alpha$ 位羧基同样地进行保护。

[0195] 羧基的活化可以使用缩合剂来进行。作为缩合剂,例如可举出:二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)、1-乙基3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC或WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)、1-[双(二甲基氨基)甲

基]-1H-苯并三唑鎓-3-氧化物六氟磷酸盐(HBTU)。从树脂切断肽链可以通过利用TFA、氟化氢(HF)等酸进行处理来进行。

[0196] 关于本发明的肽,作为一个方式,其可以被环化。在本说明书中,环化是指在1个肽内,相隔1个氨基酸以上的2个以上的氨基酸直接地共价键合或经由连接基团间接地共价键合,在分子内制作出1个以上的环状结构。环化可以按照非专利文献8、非专利文献9中记载的方法来实施。例如,可以通过氨基与羧基间的酰胺键、硫醇基与硫醇基间的二硫键、硫醇基与卤素基间的硫醚键、硫醇基与烯丙基间的基于硫醇-烯反应形成的硫醚键、烯丙基与烯丙基间的基于烯炔复分解反应形成的C=C键(该C=C键可以通过还原反应转化为C-C键)、炔基与叠氮基间的经由基于点击反应形成的三唑的键、具有卤素基的连接基团与两个硫醇基间的硫醚键等来环化,但不限于这些。用于环化的直接的共价键或经由连接基团的间接的共价键可以是主链-主链间、主链-侧链间、侧链-主链间、侧链-侧链间中的任一种。

[0197] 本发明的肽的环化中,例如,可以使用:(1)分别独立地将具有硫醇基的半胱氨酸、D型半胱氨酸、高半胱氨酸、D型高半胱氨酸作为氨基酸1和氨基酸2,在它们的硫醇基间形成的二硫键;(2)将具有作为亲核基团的卤素原子(氯、溴或碘)的氨基酸(例如3-氯丙氨酸)、或具有卤素原子(氯、溴或碘)的羧酸(例如3-氯丙酸)作为氨基酸1,在氨基酸1与具有硫醇基的氨基酸2之间形成的硫醚键;(3)在具有硫醇基的氨基酸1和氨基酸2、以及具有作为亲核基团的卤原子(氯、溴或碘)的连接基团(例如1,1-二碘甲烷、1,1-二氯丙酮、1,2-二碘乙烷、1,3-二碘丙烷、1,4-二碘丁烷、 $\alpha,\alpha'$ -二溴-邻二甲苯、 $\alpha,\alpha'$ -二溴-间二甲苯、 $\alpha,\alpha'$ -二溴-对二甲苯、六氟苯)之间形成的硫醚键;(4)将具有叠氮基的 $\beta$ 叠氮丙氨酸作为氨基酸1,将具有炔基的2-氨基5-己炔酸作为氨基酸2,经由通过其间的点击反应而形成的三唑的共价键;(5)将具有烯丙基的氨基酸(例如烯丙基甘氨酸、D型烯丙基甘氨酸、高烯丙基甘氨酸、D型高烯丙基甘氨酸等)、或具有烯丙基的羧酸(例如3-丁烯酸)作为氨基酸1,通过与具有硫醇基的氨基酸2之间的硫醇-烯反应而形成的硫醚键;(6)分别独立地将具有烯丙基的氨基酸或具有烯丙基的羧酸作为氨基酸1和氨基酸2,通过这些烯丙基间的烯炔复分解反应而形成的C=C键;(7)将通过烯炔复分解反应形成的C=C键还原而形成的C-C;(8)具有氨基的氨基酸1(例如2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、它们的D型氨基酸、 $\beta$ 丙氨酸等)与具有羧基的氨基酸2(天冬氨酸、谷氨酸、它们的D型氨基酸等)或C末端羧基之间的酰胺键;(9)N末端氨基与具有羧基的氨基酸或C末端羧基之间的酰胺键。氨基酸1和氨基酸2中的任一者可以位于N末端侧。

[0198] (包含环状肽的医药、诊断药、研究用试剂)

[0199] 本发明涉及的医药组合物包含含有上述氨基酸序列的肽作为有效成分,肽与LRP1结合,能够经由LRP1的RMT转移到中枢神经系统组织。上述医药组合物的给药方式没有特别限定,可以为口服给药或非口服给药。作为非口服给药,例如可举出肌内注射、静脉内注射、皮下注射等注射给药、经皮给药、经粘膜给药(经鼻、口服腔、经眼、经肺、经阴道或经直肠给药)等。医药组合物中的肽可以鉴于易于代谢和排泄的性质进行各种修饰。例如,通过对肽附加烷基链、聚乙二醇或糖链等,能够延长血中滞留时间,降低抗原性。另外,也可以使用聚乳酸·二醇(PLGA)等生物体内分解性的高分子化合物、多孔性羟基磷灰石、脂质体、表面修饰脂质体、由不饱和脂肪酸制备的乳液、纳米颗粒、微米颗粒、纳米微球等作为缓释化基剂,使肽内包于其中。在经皮给药的情况下,也可以使弱电流流过皮肤表面而透过角质层(离子

电渗法)。

[0200] 上述医药组合物可以直接使用有效成分,也可以加入药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂等进行制剂化。作为剂型,例如可举出:液剂(注射剂等)、分散剂、混悬剂、片剂、丸剂、粉末剂、栓剂、散剂、细粒剂、颗粒剂、胶囊剂、糖浆剂、锭剂、吸入剂、软膏剂、滴眼剂、滴鼻剂、滴耳剂、药膏等。这些制剂可以是速释制剂或缓释制剂等控释制剂(缓释微胶囊等)。制剂化例如可以适当使用赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、溶解剂、助溶剂、着色剂、矫味矫臭剂、稳定剂、乳化剂、吸收促进剂、表面活性剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂等,通过常规方法进行。作为制剂化中使用的成分的例子,可举出:纯化水、食盐水、磷酸缓冲液、葡萄糖(dextrose)、甘油、乙醇等药学上可接受的有机溶剂、动植物油、乳糖、甘露醇、葡萄糖(glucose)、山梨糖醇、结晶纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、玉米淀粉、硅酸酐、硅酸铝镁、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、黄蓍胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、高级醇、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白等,但不限于这些。在肽难以经粘膜吸收的情况下,作为改善难吸收性药物的吸收的吸收促进剂,可以使用聚氧乙烯月桂基醚类、月桂基硫酸钠、皂苷等表面活性剂;甘氨酸、脱氧胆酸、牛磺胆酸等胆汁酸盐;EDTA、水杨酸类等螯合剂;己酸、癸酸、月桂酸、油酸、亚油酸、混合胶束等脂肪酸类;烯胺衍生物、N-酰基胶原肽、N-酰基氨基酸、环糊精类、壳聚糖类、一氧化氮供体等。

[0201] 丸剂或片剂也可以用糖衣、胃溶性物质、肠溶性物质包覆。注射剂可以包含注射用蒸馏水、生理盐水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、醇类等。进而,可以加入湿润剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、溶解剂、助溶剂、防腐剂等。根据需要,也可以适当、适量使用常规的防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、吸附剂、湿润剂等添加物。

[0202] 本发明的医药组合物通过与LRP1的结合,将某分子运送至中枢神经系统组织,某分子对作为靶标的各种疾病的治疗或预防有效。例如,在某分子为抗癌剂的情况下,可举出脑肿瘤(例如,松果体星形细胞肿瘤、毛细胞星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、退行性星形细胞瘤等)、神经鞘瘤等,在某分子以与中枢神经系统疾病相关的分子为靶标的情况下,可举出精神障碍(精神分裂症、分裂情感性障碍、类精神分裂症、妄想障碍等)、儿童精神障碍(注意力缺陷障碍、注意力缺陷/多动障碍、行为障碍、自闭症等)、神经变性障碍、神经干细胞障碍、神经前体障碍、缺血性障碍、神经外伤性障碍、情感障碍、精神运动障碍、睡眠障碍(过眠症、昼夜节律睡眠障碍、失眠、睡眠时异常行为、睡眠阻断等)、焦虑之类的精神障碍(急性应激障碍、广泛性焦虑障碍、社会焦虑障碍、恐慌障碍、创伤后应激障碍、广场恐怖症、强迫性障碍等)、假性精神障碍(急性幻觉性躁狂症等)、冲动控制障碍(强迫性赌博、间歇性爆发性障碍等)、情绪障碍(双极I型障碍、双极II型障碍、躁狂症、混合情绪状态等)、重度抑郁症、慢性抑郁症、季节性抑郁症、精神病性抑郁症、季节性抑郁症、认知障碍(健忘、老年痴呆症、HIV相关痴呆症、阿尔茨海默病、亨廷顿病、路易体痴呆症、血管性痴呆症、药物相关痴呆症、迟发性运动障碍、肌阵挛症、肌张力障碍、谵妄、皮克病、克雅氏病、艾滋病、抽动秽语综合征、癫痫、肌痉挛、轻度认知障碍等)、智力低下(痉挛、唐氏综合症、脆性X综合征等);月经前综合征(PMS)、月经前心境不良障碍(PDD)、产后抑郁症、神经元损伤障碍(眼损伤、眼的视网膜病或黄斑变性、耳鸣、听觉障碍、脑水肿等)、帕金森病、帕金森病样障碍、偏头痛、癫痫、阿

尔茨海默病、脑损伤、脑卒中、脑血管疾病(脑动脉硬化症、脑淀粉样血管症、遗传性脑出血、脑缺氧症-缺血等)、药物依赖症(麻药依赖症、酒精中毒、苯丙胺依赖症、可卡因成瘾、烟碱依赖症、药物戒断综合征等)、进食障碍(食欲不振症、过食症、暴食症、多食症、肥胖、强迫性进食障碍、食冰癖等)等,但不限于这些。

[0203] 本发明的医药组合物也可以与针对上述疾病有用的其他医药、治疗方法并用给药。例如如果是恶性肿瘤,则可以与各种化学疗法、外科治疗、放射线疗法组合。

[0204] 将本发明的医药组合物投药给哺乳类(例如人、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、马、猴、猪等)、特别是人的情况下的给药量根据症状、患者的年龄、性别、体重、敏感性差、给药方法、给药间隔、有效成分的种类、制剂的种类而不同,没有特别限定,例如可以将30 $\mu$ g ~ 1000mg、100 $\mu$ g ~ 500mg、100 $\mu$ g ~ 100mg 1次给药或分数次给药。

[0205] (编码本发明的肽的多核苷酸)

[0206] 在一个实施方式中,提供编码本发明的肽的多核苷酸。该多核苷酸可以是编码本发明的肽的氨基酸序列中仅由天然氨基酸构成的氨基酸序列的多核苷酸或具有与该多核苷酸具有规定的序列一致性的碱基序列的多核苷酸。碱基序列的一致性的程度可以为约70%以上,优选为约80%以上,更优选为约90%以上,进一步更优选为约95%以上。碱基序列一致性可以通过自身公知的方法来确定。例如,碱基序列一致性(%)可以通过与上述氨基酸序列一致性(%)同样的方法来确定。

[0207] 在另一实施方式中,上述多核苷酸可以是在编码本发明的肽的氨基酸序列中仅由天然氨基酸构成的氨基酸序列的多核苷酸的碱基序列中1个以上的核苷酸被实施了选自替换、添加、缺失和插入中的1种以上的修饰的碱基序列。修饰的核苷酸的数量只要为1个以上就没有特别限定,例如可以为1 ~ 约50个、优选为1 ~ 约30个、更优选为1 ~ 约10个、进一步更优选为1 ~ 约5个(例如1个或2个)。

[0208] (表达载体)

[0209] 本发明的一个实施方式的表达载体可以包含编码应表达的目标多肽的多核苷酸或应表达的目标多核苷酸、以及与该多核苷酸功能性地连接的启动子。“启动子与多核苷酸功能性地连接”是指启动子与编码该基因的多核苷酸结合,以使处于其控制下的多核苷酸自身的表达或由多核苷酸编码的多肽的表达成为可能。

[0210] 作为本实施方式的表达载体的骨干,只要能够在规定的细胞中产生目标物质就没有特别限制,例如可举出质粒载体、病毒载体。在将表达载体用作医药的情况下,作为适于对哺乳动物给药的载体,可举出腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘苗病毒、痘病毒(poxvirus)、脊髓灰质炎病毒、辛德毕斯病毒、仙台病毒等病毒载体。

[0211] 在使用原核生物细胞作为宿主细胞的情况下,可以使用能够将原核生物细胞用作宿主细胞的表达载体。这样的表达载体可以包含例如启动子-操纵子区、起始密码子、编码本实施方式的多肽或其部分肽的多核苷酸、终止密码子、终止子区、复制起点等元素。用于在细菌中表达本发明的多肽的启动子-操纵子区包含启动子、操纵子和Shine-Dalgarno(SD)序列。关于这些元素,可以使用自身公知的元素。

[0212] 另外,在使用真核生物细胞作为宿主细胞的情况下,可以使用能够将真核生物细胞用作宿主细胞的表达载体。此时,所使用的启动子只要是能够在哺乳动物等真核生物中发挥功能的启动子就没有特别限制。在以多肽的表达为目的的情况下,作为这样的启动子,

例如可举出来自SV40的初始启动子、巨细胞病毒LTR、Rous肉瘤病毒LTR、来自MoMuLV的LTR、来自腺病毒的初始启动子等病毒启动子、以及 $\beta$ -肌动蛋白基因启动子、PGK基因启动子、转铁蛋白基因启动子等哺乳动物的结构蛋白质基因启动子等。在以多核苷酸的表达为目的的情况下,启动子可以是polIII启动子(例如tRNA启动子、U6启动子、H1启动子)。

[0213] 本发明的表达载体还可以包含用于转录起始和转录终止的位点,以及在转录区中翻译所需的核糖体结合位点、复制起点和选择性标记基因(例如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、壮观霉素、红霉素、氯霉素)等。本发明的表达载体可以通过自身公知的方法制作(例如,参照上述的Molecular Cloning等)。

[0214] (呈递本发明的肽的细胞、脂质体或纳米颗粒)

[0215] 在本发明的另一个方式中,提供了一种呈递本发明的肽的细胞、脂质体或纳米颗粒。该细胞可以如下制作:从生物体中分离所期望的细胞,将本发明的肽在体外与该细胞偶联,或者将表达本发明的肽的载体导入至细胞内并使其呈递在细胞表面。该脂质体或纳米颗粒可通过以下方式制作:偶联本发明的肽、或者制备本发明肽与脂肪链的偶联体,并经由脂肪链插入脂质膜中,从而使其呈递在脂质体或纳米颗粒的表面。

[0216] 以下所示的实施例仅是例示,仅意图与上述的实施方式一起详细地说明本发明,并不限定本发明。本领域技术人员能够在不脱离本发明的意义的情况下将本发明变更为各种方式,所述变更也包含在本发明的范围内。

[0217] 实施例

[0218] 本说明书中使用的缩写表示下述含义。

[0219] BSA:牛血清白蛋白

[0220] RP-HPLC:反相高效液相色谱

[0221] HRP:辣根过氧化物酶

[0222] SA:链霉亲和素

[0223] D-PBS:杜氏磷酸缓冲盐溶液

[0224] ELISA:酶联免疫吸附试验

[0225] Ac:乙酰基

[0226] Cys:L-半胱氨酸

[0227] Gly:甘氨酸

[0228] Ala:L-丙氨酸

[0229] Ser:L-丝氨酸

[0230] Thr:L-苏氨酸

[0231] Pro:L-脯氨酸

[0232] cHyp:顺式-4-羟基-L-脯氨酸

[0233] tHyp:反式-4-羟基-L-脯氨酸

[0234] Tyr:L-酪氨酸

[0235] Trp:L-色氨酸

[0236] Phe:L-苯丙氨酸

[0237] 4fF:4-氟-L-苯丙氨酸

[0238] 4cF:4-氯-L-苯丙氨酸

- [0239] His:L-组氨酸
- [0240] Lys:L-赖氨酸
- [0241] Orn:L-鸟氨酸
- [0242] Arg:L-精氨酸
- [0243] Val:L-缬氨酸
- [0244] Leu:L-亮氨酸
- [0245] Ile:L-异亮氨酸
- [0246] Nle:L-正亮氨酸
- [0247] Ahep: (S) -2-氨基庚酸
- [0248] Aoc: (S) -2-氨基辛酸
- [0249] Aib:2-氨基异丁酸
- [0250] Asp:L-天冬氨酸
- [0251] Glu:L-谷氨酸
- [0252] 5-FAM:5-羧基荧光素
- [0253] DX:D-氨基酸X
- [0254] c(XY):氨基酸X与氨基酸Y之间的环化
- [0255] (肽合成)

[0256] 本实施例中使用的全部的肽的化学合成委托给株式会社SCRUM(东京、日本),利用自动合成机SyroII (Biotage公司制造)实施将9-芴基甲氧基羰基(Fmoc基)用作 $\alpha$ 氨基的保护基的标准的固相合成法。将位于C末端的侧链保护氨基酸-树脂放入合成柱,设置装置。接着,在利用Fmoc基保护的次氨基酸中加入1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)/二异丙基乙胺(DIEA)进行活化,放入柱中进行反应。反应结束后清洗,使用20%哌啶将Fmoc基脱保护。通过重复本工序,使肽链延伸,将最终氨基酸的Fmoc基脱保护后,从装置中取出肽树脂。在肽树脂中加入30%六氟-2-丙醇(HFIP)/二氯甲烷(DCM),从树脂中切出直链的侧链保护肽,通过醚沉淀回收侧链保护肽。通过使用了SunFire C18柱(10×150mm)(Waters公司制造)的RP-HPLC,纯化侧链保护肽后,进行冷冻干燥。肽的环化参考非专利文献8、非专利文献9中记载的方法。将本实施例中合成的肽的理论分子量、实测分子量、纯度、环化类型、氨基酸序列示于表1和表2。另外,将它们中的序列2和序列46的结构式示于图7。需要说明的是,表1和表2中,没有D型表述的氨基酸残基表示L型。

- [0257] [表1]

[0258]

名称	理论分子量MW	实测分子量MW	模式	纯度 (%)	环化	序列
序列1	2101.3	2101.906	NEG	73	无	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号1)
序列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 (序列号2)
序列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 (序列号3)
序列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 (序列号4)
序列5	2101.3	2102.233	POS	99	无	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro- <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys-OH (序列号5)
序列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 (序列号6)
序列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 (序列号7)
序列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 (序列号8)
序列9	2101.3	2102.504	POS	99	无	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys-OH (序列号9)
序列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 (序列号10)
序列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 (序列号11)
序列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 (序列号12)
序列13	2101.3	2101.122	POS	99	无	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro- <sup>D</sup> Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle- <sup>D</sup> Cys-OH (序列号13)
序列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 (序列号14)
序列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 (序列号15)
序列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 (序列号16)
序列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 (序列号17)
序列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 (序列号18)
序列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 (序列号19)
序列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 (序列号20)
序列21	2122.3	2122.918	NEG	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Trp-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号21)
序列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 (序列号22)
序列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 (序列号23)
序列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 (序列号24)

[0259]

[表2]

[0260]

名称	理论分子量MW	实测分子量MW	模式	纯度 (%)	环化	序列
序列25	2049.3	2050.56	NEG	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Nle-Nle-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号25)
序列26	2135.3	2134.939	NEG	96	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Arg-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号26)
序列27	2142.3	2142.915	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Arg-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号27)
序列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 (序列号28)
序列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 (序列号29)
序列30	2099.3	2099.247	POS	95	S-S(5-15)	Ac-Lys(5FAM)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号30)
序列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 (序列号31)
序列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 (序列号32)
序列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 (序列号33)
序列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-Aib-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号34)
序列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 (序列号35)
序列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-Nle-Cys)-OH (序列号36)
序列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 (序列号37)
序列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 (序列号38)
序列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 (序列号39)
序列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 (序列号40)
序列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 (序列号41)
序列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 (序列号42)
序列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 (序列号43)
序列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 (序列号44)
序列45	1970.3	1971.794	NEG	95	无	Ac-Lys(Biotin)-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys-OH (序列号45)
序列46	1968.3	1969.916	NEG	96	S-S	Ac-Lys(Biotin)-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH (序列号46)
序列47	2845.0	2846.358	NEG	99	无	Lys(5FAM)-Gly-Thr-Phe-Tyr-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Phe-Lys-The-Glu-Glu-Tyr-OH (序列号47)
序列48	3069.7	3070.886	POS	96	无	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 (序列号48)

[0261] (利用ELISA法的结合试验的构建)

[0262] 为了评价肽相对于LRP1的结合活性,构建了利用ELISA法的结合试验。以下,简单地说明本ELISA法。首先,使用D-PBS将山羊抗人IgG-Fc  $\gamma$  多克隆抗体(目录No.109-0005-

008、Jackson ImmunoResearch公司制造)以 $1\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ /孔添加到96孔Maxisorp板(目录No.439454、Nunc公司制造)中,在 $4^{\circ}\text{C}$ 下包被一夜后,进一步以 $300\mu\text{L}$ /孔添加 $0.5\%$ BSA/D-PBS,在室温下封闭30分钟。用 $0.1\%$ Tween20/D-PBS清洗板后,使用 $0.5\%$ BSA/D-PBS,以 $100\text{ng}/50\mu\text{L}$ /孔添加作为LRP1的重组蛋白质的LRP1簇2-Fc嵌合蛋白(目录No.2368-L2-050、R&D system公司制造)、LRP1簇3-Fc嵌合蛋白(目录No.48248-L3-050、R&D system公司制造)、或LRP1簇4-Fc嵌合蛋白(目录No.5395-L4-050、R&D system公司制造),在室温下与包被的抗体反应30分钟。用 $0.1\%$ Tween20/PBS清洗板后,使用 $0.5\%$ BSA/D-PBS,将作为生物素化肽的序列45和序列46制备成任意的浓度,以 $50\mu\text{L}$ /孔添加。室温下反应30分钟后,用 $0.1\%$ Tween20/D-PBS清洗板。用SA-HRP(目录No.ab7403、Abcam公司制造)检测捕获在板上的与LRP1的重组蛋白结合的序列45和序列46。HRP的定量时,使用TMB-ELISA Substrate Solution(目录No.34028、Thermo Fisher公司制造)测定吸光度 $450\text{nm}$ 。

[0263] 将本结合试验中使用的序列45和序列46相对于LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的选择性且肽浓度依赖性的结合示于图1( $n=4, \pm\text{SEM}$ )。从在捕获了LRP1的重组蛋白的孔中添加生物素化肽(Biotin化肽)时得到的吸光度中,减去在未捕获LRP1的重组蛋白的孔中添加生物素化肽时得到的吸光度,估算特异性的结合活性。其结果,序列45和序列46均相对于LRP1簇4-Fc嵌合蛋白选择性且依赖于肽的添加浓度地结合。相对于LRP1簇2-Fc嵌合蛋白和LRP1簇3-Fc嵌合蛋白的结合,几乎未显示或很少。序列45和序列46的结合 $\text{EC}_{50}$ 值计算为 $10.5\text{nM}$ 和 $11.0\text{nM}$ ,与有无环状结构无关,显示出同等的结合活性。

[0264] (利用ELISA方法的竞争结合试验的构建)

[0265] 为了将序列1中导入了氨基酸替换的肽相对于LRP1的结合活性和相对于基于蛋白酶的分解的耐性与序列2的这些性能进行比较,构建了图2所示的利用ELISA法的竞争结合试验。将序列2或氨基酸替换肽与小鼠血浆刚混合(Plasma incubation)后(0小时)或在 $37^{\circ}\text{C}$ 下24小时后,以血浆浓度充分降低的方式进一步稀释至任意的终浓度,与序列46( $500\text{nM}$ )混合,供于上述竞争结合试验。序列46与LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的结合,由于与溶液中共存的序列2或氨基酸替换肽与LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的结合竞争,因此,依赖于序列2或氨基酸替换肽浓度而受到抑制。即,序列2或氨基酸替换肽与LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的结合活性,作为相对于序列46的结合的竞争性抑制活性而被检测。将序列46相对于未捕获LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的孔的结合值设为抑制活性 $100\%$ ,将序列46相对于未添加序列2、氨基酸替换肽的孔的结合值设为抑制活性 $0\%$ ,以 $\%$ 算出序列2和氨基酸替换肽的抑制活性值。

[0266] (氨基酸替换肽与LRP1的结合活性的评价)

[0267] 将在 $n=4(\pm\text{SEM})$ 下研究与LRP1簇4-Fc嵌合蛋白的竞争结合试验的结果示于图3。血浆与培养0小时的序列2依赖于添加浓度地抑制了序列46的结合。添加了 $500\text{nM}$ 的序列2的孔中的序列46( $500\text{nM}$ )的结合平均为 $52.4\%$ ,显示出序列2和序列46以 $1:1$ 竞争与LRP1簇4的结合。血浆与培养24小时的序列2也依赖于添加浓度地抑制了序列46的结合。但是,添加了相当于 $2000\text{nM}$ 的序列2的孔中的序列46( $500\text{nM}$ )的结合平均为 $50.6\%$ 。即,尽管在孔中添加了相当于 $2000\text{nM}$ ,但只显示出相当于 $500\text{nM}$ 的抑制活性,表明约 $75\%$ 的序列2在与小鼠血浆培养24小时的期间被分解。将DMSO与小鼠血浆混合后立即供于同样的试验,结果显示,序列46( $500\text{nM}$ )的结合完全未被抑制,混入结合体系的血浆未发生体系抑制。

[0268] 将序列1~序列44与小鼠血浆混合后立即或在 $37^{\circ}\text{C}$ 下24小时后,以血浆浓度充分

降低的方式进一步稀释至终浓度2000nM,与序列46(500nM)混合,供于上述竞争结合试验。将结果示于图4。序列1和序列2的抑制活性分别估算为70.7%和79.4%。序列6、序列7、序列9、序列19、序列24、序列34、序列43的抑制活性分别为91.9%、87.6%、85.8%、79.1%、77.4%、82.0%、83.5%,显示出与序列1、序列2同等以上的抑制活性。其他序列具有抑制活性减弱的倾向。

[0269] 与序列2相同,很多氨基酸替换肽在与小鼠血浆混合24小时后,与在与小鼠血浆混合后立即供于竞争试验的情况相比,抑制活性也同样减弱,因此显示出在小鼠血浆中被分解。

[0270] (利用体外的血脑屏障模型的评价)

[0271] 图5表示用于评价穿过血脑屏障的能力的体外的血脑屏障模型的概要。使用大鼠型BBB试剂盒(目录No.RBT-24H、Pharmacocell株式会社制造)和猴型BBB试剂盒(目录No.MBT-24H、Pharmacocell株式会社制造)进行试验。这些试剂盒保持在生物体内的BBB特性(各种受体、转运体的表达的有无、紧密连接的形成能力等),作为估计药物的脑内转移性的评价体系被广泛利用(非专利文献6和7)。将嵌入孔作为血管侧,将底部孔作为脑侧,对在嵌入孔中添加的肽透过由内皮细胞/滤膜/周细胞构成的三层的底面的量进行评价。另外,在试验前后测定表示BBB功能的TEER值(经上皮电阻值),确认了肽的添加不影响BBB功能。

[0272] 将报告了LRP1结合活性和BBB透过性的ANG2(非专利文献4)和L57(非专利文献5)作为比较对象,将评价了序列2的BBB透过性的结果示于图6。将5-FAM标记的ANG(序列47)、5-FAM标记的L57(序列48)、序列2分别以终浓度成为10 $\mu$ M、3 $\mu$ M、1 $\mu$ M的方式添加到嵌入孔中,在37 $^{\circ}$ C下培养24小时后,回收底部孔的培养上清。将各5-FAM标记肽以成为任意浓度的方式用培养基进行阶段稀释,由此制作标准曲线,算出回收的各培养上清中包含的5-FAM标记肽的浓度。将嵌入孔(血管侧)中添加的肽量(摩尔数)设为100%,将转移到底部孔(脑侧)的肽量(摩尔数)计为%算出。关于序列2的BBB透过性,无论是上段图所示的大鼠BBB还是下段图所示的猴BBB,在任一浓度下均显著高于5-FAM标记的ANG和L57( $n=4$ 、 $\pm$ SD、\* $p<0.01$ 、对序列2的Dunnett's检验)。培养24小时后,所有孔的TEER值(经上皮电阻值)均为150 $\Omega \times \text{cm}^2$ 以上,显示维持BBB功能。这些结果表明,本发明的肽能够穿过屏障组织、特别是血脑屏障。而且,确认了作为本发明的肽的代表例的序列2的BBB透过性比现有的ANG2、L57优异。

[0273] (肽修饰体DBC0-KS-487的合成和评价)

[0274] <合成方法>

[0275] 合成委托给株式会社SCRUM(东京、日本)。利用自动合成机SyruiI(Biotage公司制造)实施将9-芴基甲氧基羰基(Fmoc基)用作 $\alpha$ 氨基的保护基的标准的固相合成法,由此首先合成以下的直链状肽前体。

[0276]  $\text{NH}_2$ -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)-树脂

[0277] 接着,将树脂浸渍在二甲基甲酰胺(DMF)中,通过加入二异丙基乙胺(DIEA)使其为pH8。作为该pH8,加入溶解于DMF的N3-PEG4-NHS(Cas#944251-24-5,目录#J64834,Alfa Aesar公司制造)进行反应,由此在N末端 $\alpha$ 氨基中导入叠氮基(N3-),得到以下物质。

[0278] 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)-树脂

[0279] 接着,为了各氨基酸残基的侧链的脱保护和从树脂中切出肽,添加三氟乙酸(TFA)/超纯水(Water)/茴香硫醚(Thioanisole)/1,2-乙二硫醇(EDT)/三异丙基氯硅烷(Tips)(83/5/5/5/2)。该添加后,在室温下进行2小时反应。该反应后,过滤树脂,将得到的滤液加入冷却醚中,由此使其沉淀。将沉淀物溶解于少量的超纯水中,进行冷冻干燥,由此得到以下物质。

[0280] N3-PEG4-Gly-Thr-Pro-Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys-OH(序列号56)

[0281] 将冷冻干燥物溶解于DMSO中,每次少量地添加0.1M  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 水溶液,在室温下一边搅拌1~2天一边进行氧化反应,由此在Cys残基的侧链间形成S-S键。利用RP-HPLC进行分离纯化,进行冷冻干燥,由此得到以下的环状肽。

[0282] N3-PEG4-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH(序列号54)

[0283] 将纯化后的环状肽和DBC0-PEG5-DBC0(Cas#2363130-04-3、目录#BP-22450、BROADPHARM公司制造)分别溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,混合后,添加50mM磷酸缓冲液。该添加后,在常温下反应2小时。利用RP-HPLC进行分离纯化,进行冷冻干燥,由此得到以下DBC0-KS-487(理论分子量2701.3、实测分子量2702.0、纯度95.0%)。在此,将去除了N末端的修饰部分(DBC0-PEG5-Taz-PEG4)的环状肽部分称为KS-487。

[0284] DBC0-PEG5-Taz-PEG4-Gly-Thr-Pro-c(Cys-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Nle-Leu-Ala-Glu-Nle-Cys)-OH(序列号55)

[0285] <DBC0的反应性的确认>

[0286] 将适当量的DBC0-KS-487和6-叠氮己酸在DMSO/PBS(50/50)(pH7.5)中混合,使其在室温下反应后,利用RP-HPLC评价DBC0-KS-487的峰位置的移动。将其结果示于图8。在图8的反应前的图表中示出了来自DBC0-KS-487的峰(10.200min),但在图8的反应后的图表中,来自DBC0-KS-487的峰(10.248min)几乎消失。如图8的反应后的图表所示,产生了新的峰(7.904min和9.285min)。由图8(反应前和反应后)所示的结果显示,附加于环状肽的DBC0基保持着用于点击反应的活性。

[0287] 工业实用性

[0288] 本发明涉及的肽具有LRP1结合活性,通过肽与LRP1结合,能够经由LRP1的RMT而穿过隔开末梢组织和脑组织的屏障组织、例如血脑屏障(BBB)。因此,认为本发明涉及的肽通过与任意的分子组合,作为用于将任意的分子运送至脑组织的手段是有用的。

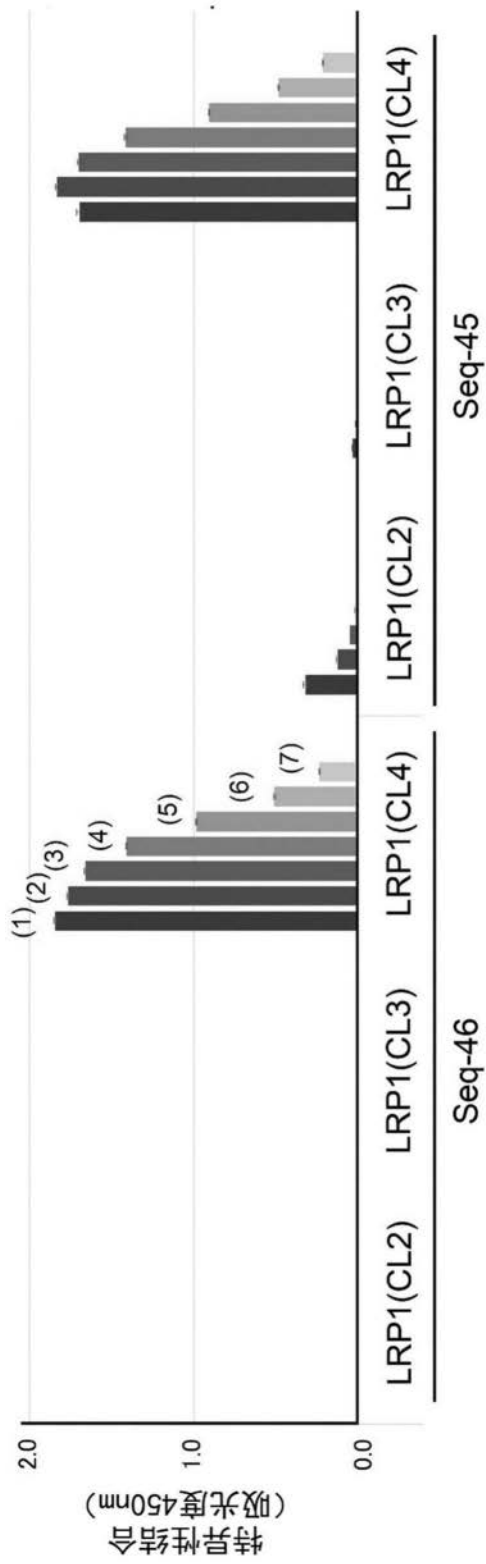


图1

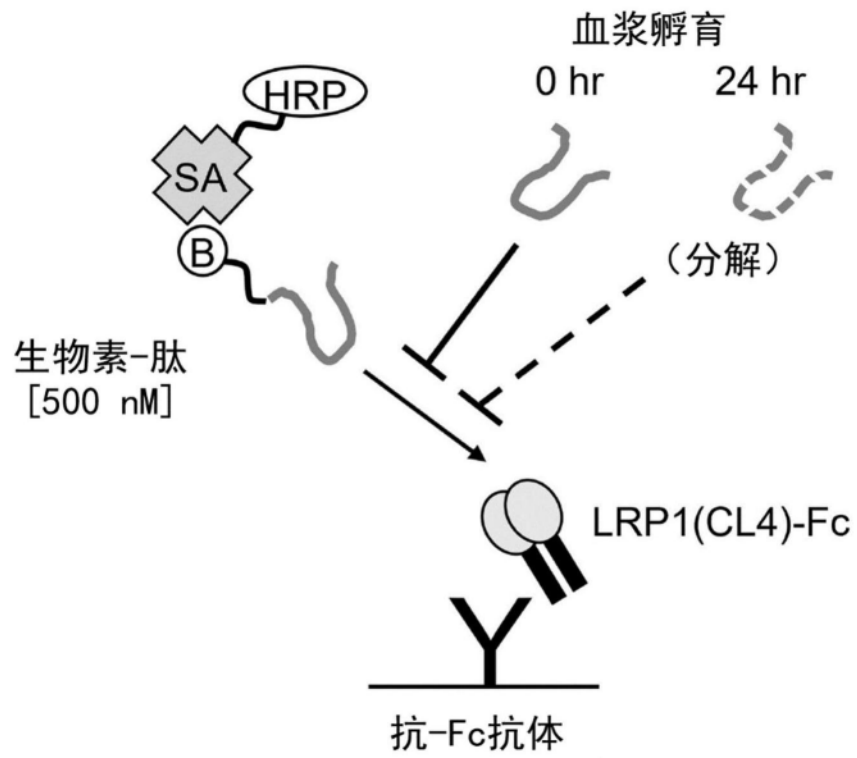


图2

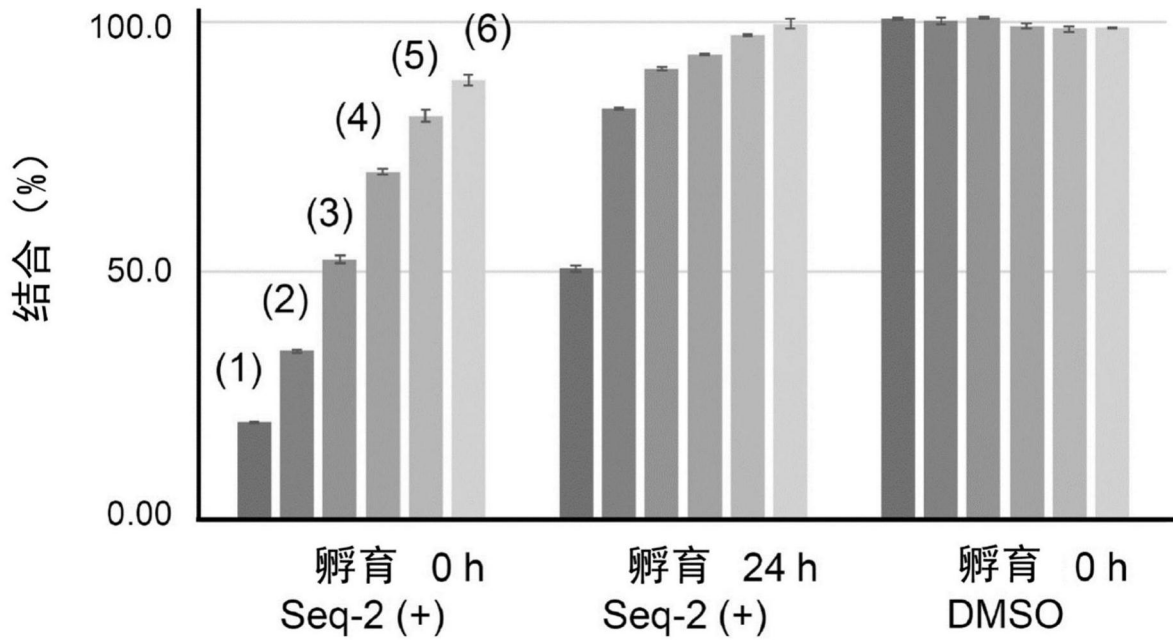


图3

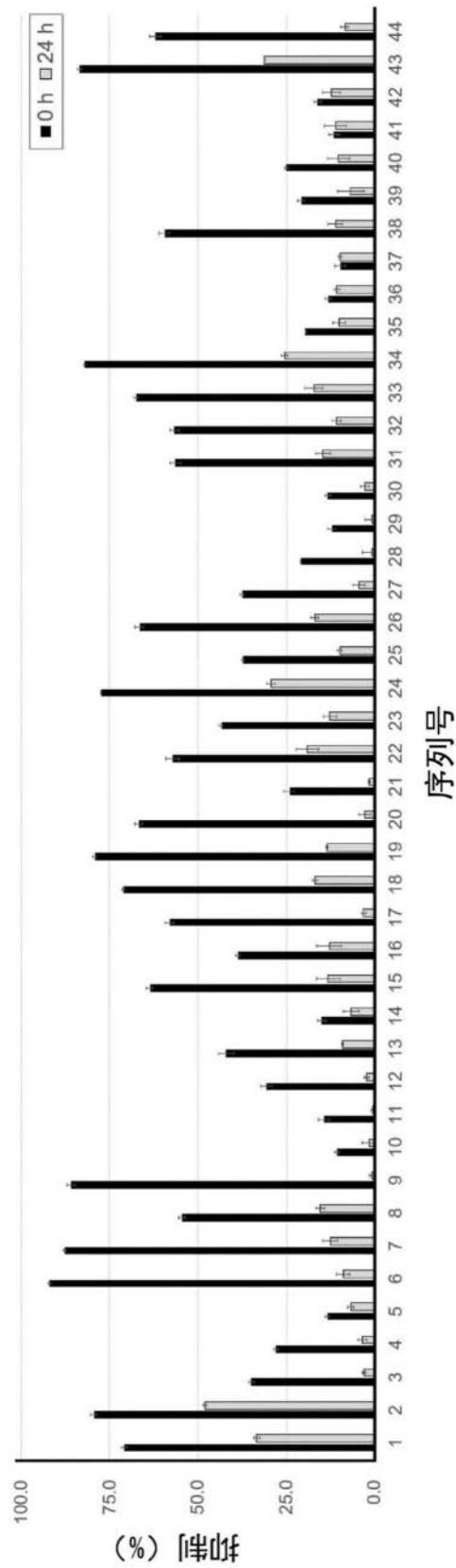


图4

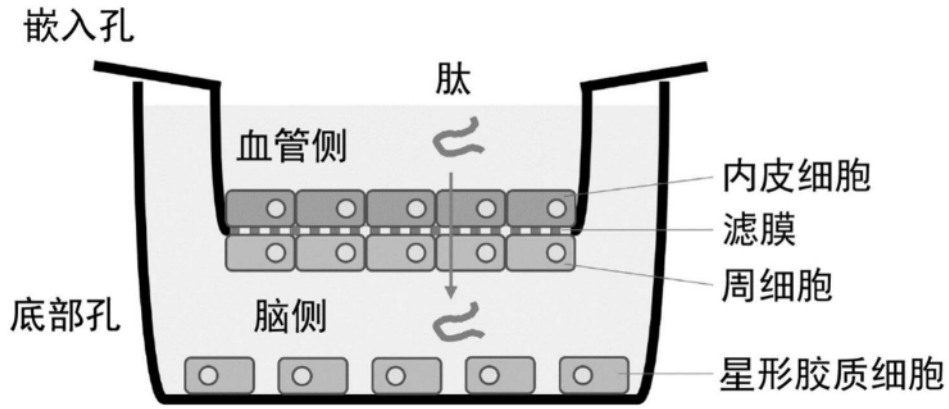


图5

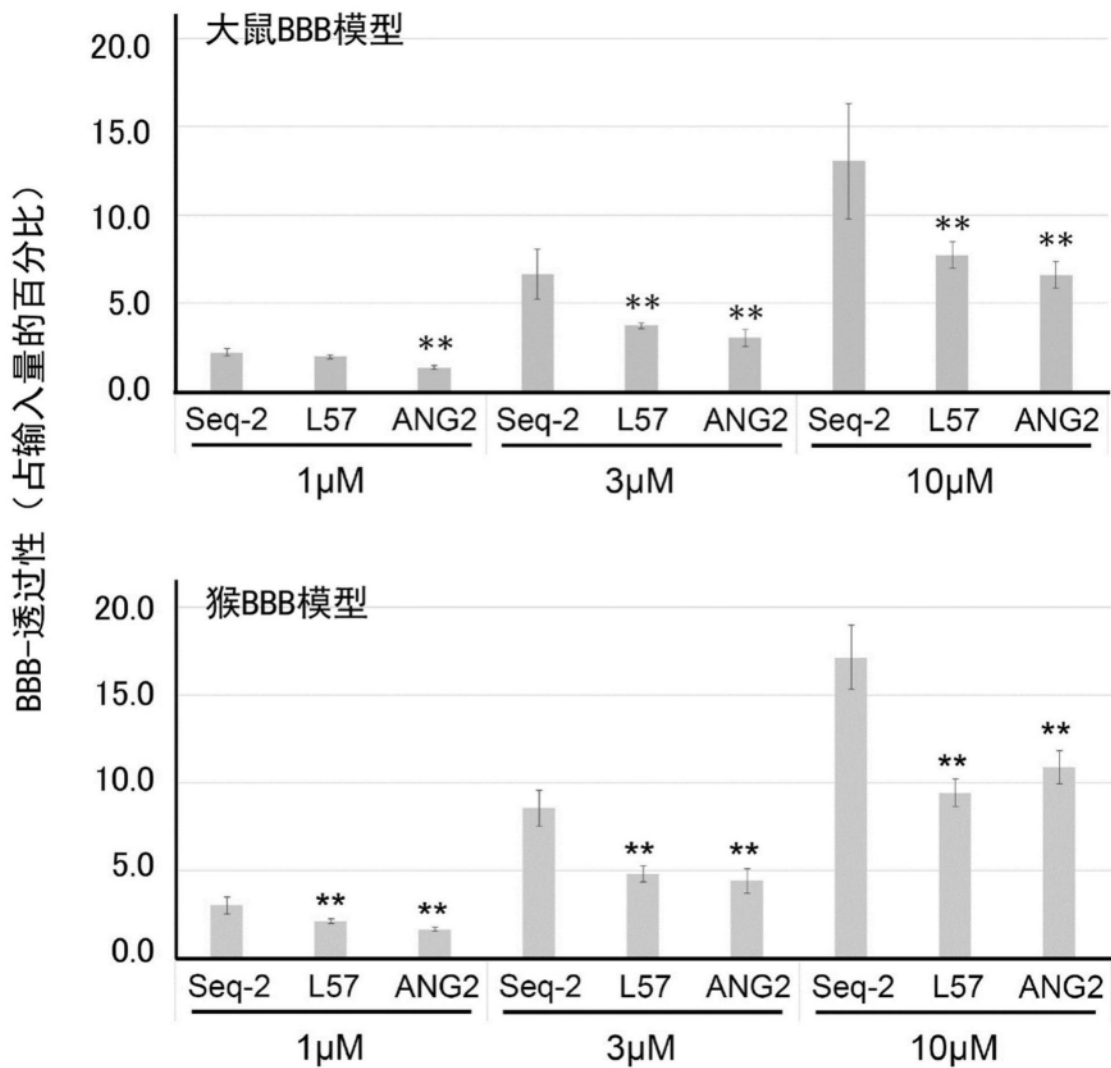


图6



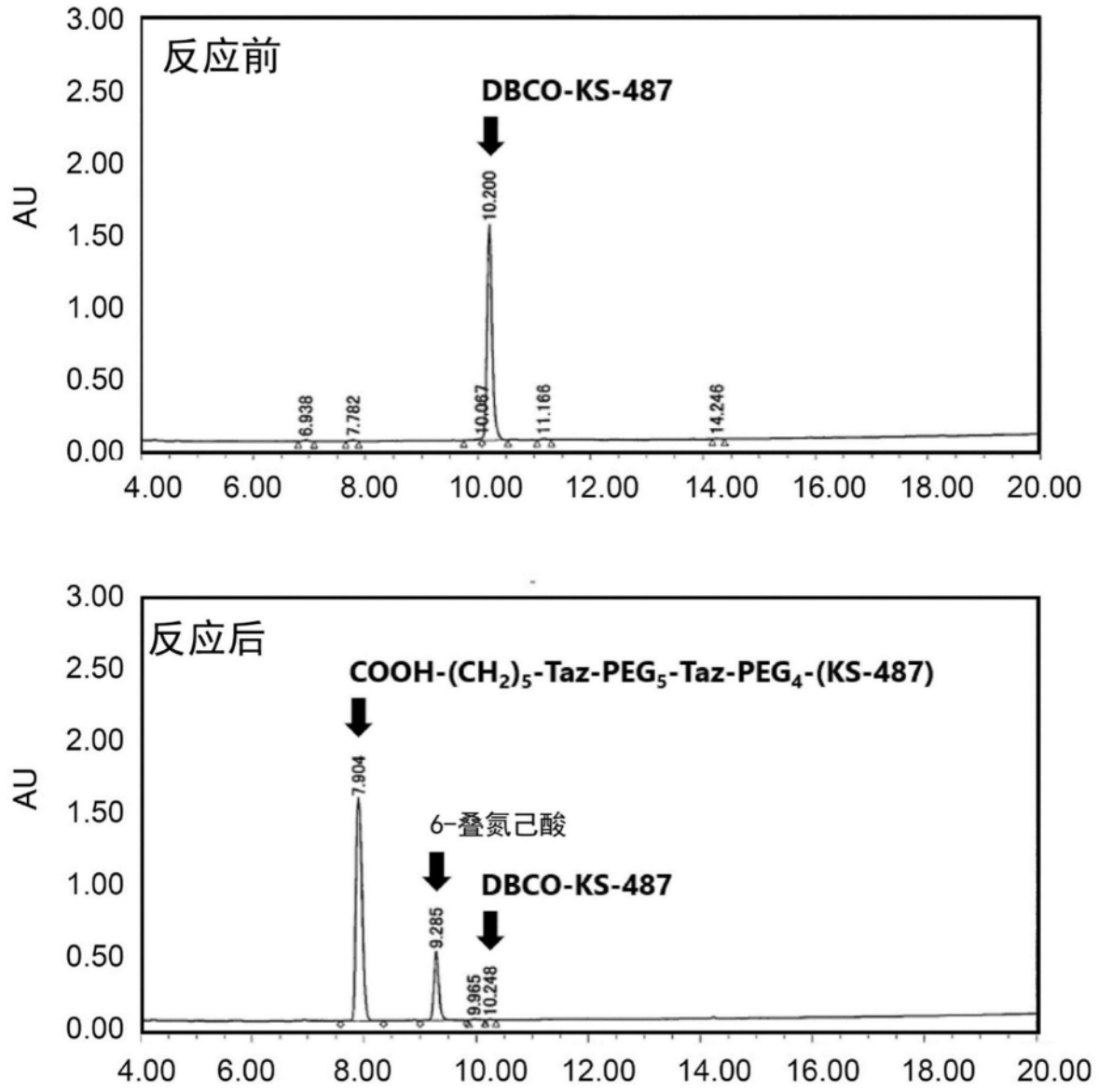


图8