



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202140513 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110106195

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 22 日

(51)Int. Cl.：

*C07K7/06 (2006.01)**C07K7/08 (2006.01)**A61K38/08 (2019.01)**A61K38/10 (2006.01)**A61P21/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/02/22 日本

2020-028879

(71)申請人：日商 J C R 製藥股份有限公司 (日本) JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD. (JP)

日本

日商肽夢想股份有限公司 (日本) PEPTIDREAM INC. (JP)

日本

(72)發明人：高橋健一 TAKAHASHI, KENICHI (JP)；余田英士 YODEN, EIJI (JP)；橋本秀彥  
HASHIMOTO, HIDEHIKO (JP)；藤山紗希 FUJIYAMA, SAKI (JP)；大內政輝  
OHUCHI, MASAKI (JP)；中村菜穗子 NAKAMURA, NAOKO (JP)；巴西魯汀 加  
藤納希魯 BASHIRUDDIN, KATO NASIR (US)；澤井直己 SAWAI, NAOKI (JP)；  
江原武 EHARA, TAKERU (JP)；多久和正訓 TAKUWA, MASATOSHI (JP)；舛屋  
圭一 MASUYA, KEIICHI (JP)；稻葉慎之介 INABA, SHINNOSUKE (JP)

(74)代理人：侯德銘；林彥丞

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：40 項 圖式數：5 共 185 頁

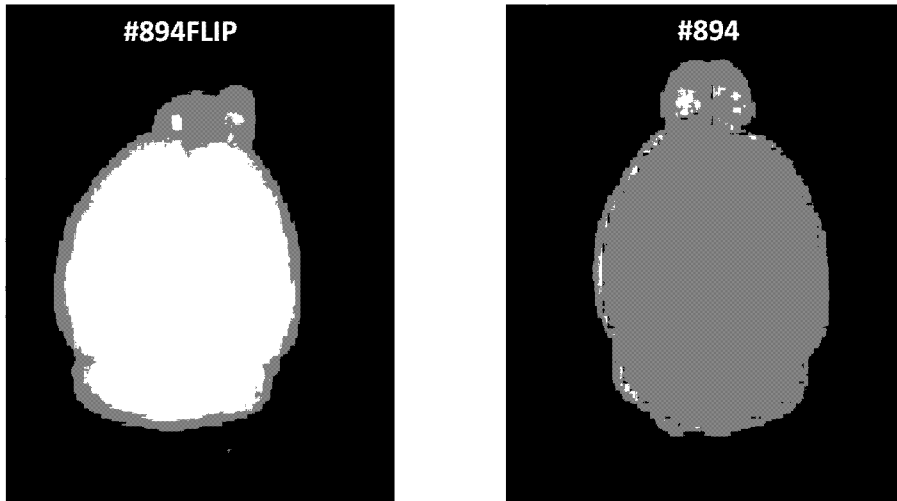
(54)名稱

人類運鐵蛋白受體結合肽

(57)摘要

[課題]提供藉由與人類運鐵蛋白受體 (hTfR) 結合而可通過血腦障壁 (BBB) 之肽等。[解決手段]一種肽等，其具有：序列識別號 1 所記載之胺基酸序列 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)；或在序列識別號 1 所記載之胺基酸序列中具有 1 以上且 10 以下的胺基酸殘基的取代、缺失、加成及/或插入之胺基酸序列。

指定代表圖：



【圖 2】



202140513

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

人類運鐵蛋白受體結合肽

### 【中文】

[課題]提供藉由與人類運鐵蛋白受體(hTfR)結合而可通過血腦障壁(BBB)之肽等。[解決手段]一種肽等，其具有：序列識別號1所記載之胺基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)；或在序列識別號1所記載之胺基酸序列中具有1以上且10以下的胺基酸殘基的取代、缺失、加成及/或插入之胺基酸序列。

### 【指定代表圖】

圖2

### 【代表圖之符號簡單說明】

無。

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

人類運鐵蛋白受體結合肽

### 【技術領域】

【0001】 本發明關於可與人類運鐵蛋白受體（hTfR）結合之肽。此發明關於可通過血腦障壁（BBB）之肽、對於肌肉組織具有指向性之肽、具有細胞穿透性之肽。再者，本發明關於藉由此等肽而將任意物質送達腦內之方法及將任意物質送達肌肉組織之方法等。

### 【先前技術】

【0002】 除了包含腦室周圍器官（松果體、腦下垂體、最後區等）之幾個區域以外，對於腦的大部分組織供給血液之毛細血管係與存在於肌肉等其他組織之毛細血管不同，形成其內皮之內皮細胞彼此藉由穩固的細胞間接合而相互附著。因此，會阻礙從血液往腦被動運輸物質，雖也有例外，但除了脂溶性高的物質或分子量小（200~500道耳頓以下）且在生理pH附近呈電中性的物質以外，難以從毛細血管移行至腦。此種經由腦內的毛細血管內皮而限制血液與腦的組織液之間的物質交換之機制，被稱為血腦障壁（Blood-Brain Barrier, BBB）。並且，血腦障壁不僅限制腦，亦限制包含腦及脊髓之中樞神經系統的組織液與血液之間的物質交換。藉由血腦障壁的存在，中樞神經系統的大部分細胞不會受到血中的激素、淋巴激素等物質的濃度變動的影響，能保持其生化學的恆常性。

【0003】 作為通過血腦障壁使高分子物質到達腦內之方法，已報導各種將該高分子物質進行修飾以使其與存在於腦內毛細血管的內皮細胞上之膜蛋白質亦即運鐵蛋白受體具有親和性之方法（專利文獻1~3）。例如，在專利文獻1中，記載一種血腦障壁穿梭體，其與運鐵蛋白受體具有親和性，且可與該受體結合。

[習知技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1]日本特表2015-528452號公報

[專利文獻2]日本特開H06-228199號公報

[專利文獻3]WO2016/208695

[專利文獻4]WO2019/151539

## 【發明內容】

### 【0005】 [發明所欲解決的課題]

此說明書所記載之一發明之目的在於提供一種與人類運鐵蛋白受體 (hTfR) 結合之新穎的肽。

另一發明之目的在於進一步提供一種可通過血腦障壁 (BBB) 的肽、對於肌肉組織具有指向性且可有效率地移行至肌肉組織的肽及具有細胞穿透性的肽。

另一發明之目的在於提供上述的新穎的肽之各種用途。

### 【0006】 [解決課題的技術手段]

此說明書所記載之一發明關於與運鐵蛋白受體結合之肽。

此肽具有：序列識別號 1 所記載之胺基酸序列 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)；或在序列識別號 1 所記載之胺基酸序列中具有 1 以上且 10 以下的胺基酸殘基的取代、缺失、加成及/或插入之胺基酸序列。

### 【0007】 [發明功效]

根據此說明書所記載之發明，如同由實施例所證實，可提供與人類運鐵蛋白受體 (hTfR) 結合之肽、可通過血腦障壁 (BBB) 之肽、對於肌肉組織具有指向性之肽、具有細胞穿透性之肽等。

## 【圖式簡單說明】

### 【0008】

圖1為取代圖式並表示各組織中之螢光強度量測結果之照片。

圖1-2為取代圖式並表示各組織中之螢光強度量測結果之照片。

圖1-3為取代圖式並表示各組織中之螢光強度量測結果之照片。

圖2為取代圖式並表示在已放大的腦中之螢光強度量測結果之照片。

圖3為取代圖式並表示小鼠腦內局部存在確認試驗 (單劑量) 結果之照片。

圖4為取代圖式並表示小鼠腦內局部存在確認試驗 (多劑量) 結果之照片。

圖5為取代圖式並表示往人類乳癌細胞移行之螢光顯微鏡照片。

### 【實施方式】

【0009】 以下，使用圖式說明用於實施本發明之方式。本發明並不限於以下所說明的方式，亦包含在本發明所屬技術領域中具有通常知識者可理解的範圍內從以下方式進行適當修正者。

【0010】 此說明書所記載之一發明係關於與運鐵蛋白受體結合且能通過血腦障壁之肽。

### 【0011】 運鐵蛋白受體

所謂運鐵蛋白受體，表示一種受體，其被包含在血漿中，且與和鐵離子結合的蛋白質亦即運鐵蛋白結合，並具有被攝入細胞內的功能。運鐵蛋白受體係在網狀紅血球、胎盤的滋胚層細胞、淋巴球等各種細胞上表現，尤其被暗示會在腫瘤細胞表現。並且，運鐵蛋白受體因具有藉由血漿中的鐵離子的結合刺激而觸發細胞的胞吞作用之性質，故正進行將結合至運鐵蛋白受體的抗體等使用作為 DDS 而使物質通過 BBB 之研究。在本案說明書中，只要沒有特別標記，則將人類型的運鐵蛋白受體標記為人類 TfR、hTfR 或僅 TfR。

### 【0012】 與運鐵蛋白受體結合之肽

所謂與運鐵蛋白受體結合（亦稱具有結合活性、具有親和性），意指對於運鐵蛋白受體進行特異性結合。

親和性雖藉由針對運鐵蛋白受體與結合肽的解離之平衡常數（KD）表示，但其為表示運鐵蛋白受體與結合肽上的抗原結合部位之間的結合強度的尺度，隨著 KD 的值變小，運鐵蛋白受體與結合肽之間的結合強度變強（作為取代，親和性亦能以  $1/KD$  亦即親和性常數（KA）表示）。如本發明所屬技術領域中具有通常知識者所能理解（例如，基於本說明書中的進一步開示），親和性能因應目標的特定抗原而確定其本身眾所周知的樣式。結合活性係運鐵蛋白受體與結合肽之間的結合強度的尺度。結合活性係關於運鐵蛋白受體與其在結合肽上的結合部位之間的親和性，以及存在於結合分子上之相關結合部位的數量這兩者。

【0013】 運鐵蛋白受體與結合肽之特異性結合例如能以包含本說明書所記載之表面電漿子共振（SPR）分析、斯卡查德分析（Scatchard analysis）以及

／或放射免疫分析（RIA）、酵素免疫分析（EIA）及三明治競爭分析等競爭結合分析，以及在所屬技術領域中其本身眾所周知之其不同的變異體之其本身眾所周知的任意適當樣式而定。較佳為，本發明的肽與運鐵蛋白受體之親和性為小於 100nM，較佳為小於 50nM 的 KD。

**【0014】 能通過血腦障壁（BBB）**

所謂能通過 BBB，意指例如可使物質通過 BBB 至腦內，在腦內的任意部位中於投予後的某時間能檢測該物質或其代謝物，或者能獲得可類推該物質在腦內造成影響的見解。

**【0015】 腦相關疾病**

所謂腦相關疾病，表示由腦中發生的某種異常所導致之疾病，例如中樞神經（CNS）疾病。作為腦相關疾病的例子，未被限定，但可為阿茲海默氏症、帕金森氏症、普里昂疾病、杭丁頓氏舞蹈症、胞溶體貯積症、中樞神經障礙、包含腦腫瘤之中樞神經系統的腫瘤、大腦局部缺血、伴隨腦障礙之疾病、外傷性的中樞神經系統障礙、病毒性及細菌性之中樞神經系統疾病、思覺失調症、憂鬱症等造成精神性影響的疾病等。

**【0016】 對於肌肉組織具有指向性**

所謂肌肉組織，可為心肌、骨骼肌及平滑肌之任一種。特佳的肌肉組織為心肌或骨骼肌。所謂對於肌肉組織具有指向性，意指具有特異性、有效率地移行至肌肉組織之性質。

**【0017】 神經肌肉疾病**

所謂神經肌肉疾病，表示由腦、脊髓、末梢神經等神經或肌肉的病變所導致之肌力的降低等運動障礙之疾病。神經肌肉疾病的例子，未被限定，但可為脊髓小腦改質症、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、重症肌無力症、肌肉萎縮症、多發性肌炎、遺傳性肌病變、神經肌肉疾病、肌萎縮症、藥物誘發性肌病變、急性心臟衰竭、慢性心臟衰竭、心肌梗塞、慢性疲勞症候群、粒線體疾病、粒線體呼吸鏈複合體異常症及格巴二氏症候群。

**【0018】 具有細胞穿透性之肽**

具有細胞穿透性之肽，例如如同日本特許第 6478632 號公報及日本特許第 6708770 號（具有細胞通透性之肽）所記載，為眾所周知。而且，如同實施例所示，本發明的肽係與運鐵蛋白受體結合，並被攝入細胞內。因此，若使用本發

明的肽或其複合體，則能將目標的有效成分遞輸至細胞內，例如，能將核酸醫藥送至細胞內。

### 【0019】 肽

係指連續多個胺基酸之結構，其意義中亦包含多肽、蛋白質。此外，在本案中，所謂胺基酸，不僅包含在細胞內轉譯 mRNA 並被併入肽鏈之天然存在的胺基酸（天然胺基酸），亦包含可藉由肽結合而構成肽鏈的一部分之非天然存在的胺基酸（非天然胺基酸）。胺基酸可為人工合成者，亦可為存在於自然界者。

並且，在本案中，本發明的肽、肽與物質之複合體亦包含藉由合成後環狀化而形成環狀部之肽（亦稱為環狀肽），將該肽進行進一步化學修飾而得之肽，肽與結合至肽的物質之複合體，肽與物質透過連結子而結合之複合體。

在本說明書中，所謂環狀肽，係指在肽中，其胺基酸序列中間隔 1 個以上的胺基酸殘基而分離之 2 個胺基酸彼此互相結合，藉此其全部或一部分成為環狀者。此外，於此，該 2 個胺基酸彼此的結合形式未被特別限定，但環狀肽亦包含以下者：藉由其中一個胺基酸的羧基與另一個胺基酸的胺基之間的醯胺鍵、其中一個胺基酸的羧基與另一個胺基酸的硫醇基之間的硫醚鍵、其中一個胺基酸的硫醇基與另一個胺基酸的硫醇基之間的硫醇鍵、內醯胺環形成或巨環化反應而形成環狀結構者；或具有套索肽（lasso peptide）狀結構者等。但是，該 2 個胺基酸彼此藉由醯胺鍵而結合之情形，該醯胺鍵不限於藉由其中一個胺基酸的羧基與另一個胺基酸的胺基結合而形成者，只要合成反應的結果是藉由醯胺鍵進行結合即可。針對其他結合形式亦同樣。

亦即，在本案中，環狀肽只要其一部分為形成環狀結構者即可，亦可具有直鏈部。

【0020】 此外，在本說明書中，為了肽的環狀化而有改變胺基酸的一部分之情形。亦包含此種已被改變一部分的胺基酸。可列舉例如，像是在位於 N 端之胺基酸加成氯乙醯基且與肽中的半胱胺酸殘基結合而進行環狀化之情形，本案的胺基酸亦包含已加成氯乙醯基的各種（天然／非天然）胺基酸。

【0021】 所謂非天然胺基酸，係指天然胺基酸以外的，具有胺基酸的特性之化合物。例如，雖不限於此，但可列舉  $\beta$ -胺基酸、 $\gamma$ -胺基酸、L-胺基酸；D-胺基酸（亦稱為 D 型胺基酸）；胺基酸變異體、胺基酸衍生物等經化學修飾

之胺基酸；正白胺酸、 $\beta$ -丙胺酸、鳥胺酸等在活體內無法成為蛋白質的構成材料之胺基酸等。可列舉 N-甲基胺基酸、N-乙基胺基酸、D-胺基酸、類組胺酸胺基酸、在側鏈具有多餘的亞甲基、芳環等結構之胺基酸及具有側鏈中的羧酸官能基胺基酸被磺酸基取代的結構之胺基酸衍生物等。

以下揭示非天然胺基酸的例子與本說明書中之簡稱。括弧內表示 CAS 參考編號或購入來源公司名，針對新合成者則是表示合成例編號。此外，針對 CAS 編號，是該非天然胺基酸單體或保護基結合者，但特殊胺基酸不受限於此等，例如，此等分子中的氫原子的 1 個或多個被取代成烷基之結構者亦為特殊胺基酸。氫原子被取代成烷基之情形，烷基較佳為甲基、乙基，更佳為甲基。此外，在本說明書中，在胺基酸名的前方記載有 Me 或 N-Me- 之胺基酸，只要沒有特別記載則表示 N-甲基胺基酸。例如，丙胺酸 (Ala 或 A) 的 N-甲基化胺基酸表示為 MeAla、N-MeAla、MeA 或 N-MeA。並且，針對為單字母標記的胺基酸標記且其前方記載有 d 之胺基酸，表示為 D-胺基酸。例如，針對丙胺酸 (Ala 或 A) 的 D-胺基酸，表示為 da。未記載 CAS 編號、購入來源者，可作為一般的試劑而購入。此外，關於以下的胺基酸，在肽合成中，能藉由以既知的方法將阿伐胺基進行 Fmoc 保護而使用。

**【0022】** Yph (S)-2-胺基-3-(4-苯氧基苯基)丙酸 (CAS 編號：180414-93-1)

W7OMe (S)-2-胺基-3-(7-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：2416720-26-6)

W7N (S)-2-胺基-3-(1H-吡咯并[2,3- $\beta$ ]吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：737007-45-3)

W7F (S)-2-胺基-3-(7-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：1956434-65-3)

W6N (S)-2-胺基-3-(1H-吡咯并[2,3-c]吡啶-3-基)丙酸 (KISHIDA CHEMICAL 股份有限公司)

W6F (S)-2-胺基-3-(6-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：908847-01-8)

W5OMe 5-甲氧基-L-色胺酸 (CAS 編號：460751-69-3)

W5F (S) -2-胺基-3-(5-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：908846-88-8)

W4OMe 4-甲氧基-L-色胺酸 (CAS 編號：1205553-56-5)

W4N (S) -2-胺基-3-(1H-吡咯并[3,2-β]吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：149818-23-5)

W4F (S) -2-(((9H-芴-9-基)-甲氧基)羰基)胺基-3-(1-(tert-丁氧基羰基)-4-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：2244532-65-6)

W4C (S) -2-胺基-3-(4-氯-1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：2244532-68-9)

W2N (S) -2-胺基-3-(1H-吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號：2305185-20-8)

W1iPr 1-異丙基-L-色胺酸 (CAS 編號：1496563-42-8)

W1Et7Cl (S) -2-胺基-3-(7-氯-1-乙基-1H-吡啶-3-基)丙酸 (合成例 2-1)

W1Et 1-乙基-L-色胺酸 (CAS 編號：168471-23-6)

Tbg (S) -2-胺基-3,3-二甲基丁酸 (CAS 編號：33105-81-6)

pHPeG N-(4-羥基苯乙基)甘胺酸 (CAS 編號：258332-56-8)

PeG N-(2-苯基乙基)-甘胺酸 (CAS 編號：540483-58-7)

Nva L-正纈胺酸 (CAS 編號：6600-40-4)

Nle N-α-氯乙醯基-L-正白胺酸 (CAS 編號：688-12-0)

Nal2 β-(2-萘基)L-丙胺酸 (CAS 編號：58438-03-2)

Nal1 β-(1-萘基)L-丙胺酸 (CAS 編號：2353616-32-5)

MeoBph N-α-甲基-2-苯基-L-苯丙胺酸

MeNal2 N-α-甲基-β-(2-萘基)-L-丙胺酸 (CAS 編號：179385-30-9)

MeNal1 N-α-甲基-β-(1-萘基)-L-丙胺酸 (CAS 編號：1380327-68-3)

MemBph N-α-甲基-3-苯基-L-苯丙胺酸

Hph L-單苯丙胺酸 (CAS 編號：943-73-7)

- Hly (S) -2,7-二胺基庚酸 (CAS 編號: 498-56-6)
- F4OMe (S) -2-胺基-3-(4-甲氧基苯基)丙酸 (CAS 編號: 7635-29-2)
- F4G (4-胍基)-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 59574-11-7)
- F4F 4-氟-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 1132-68-9)
- F4C N- $\alpha$ -氯乙醯基-4-氯-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 14173-39-8)
- F3OMe (S) -2-胺基-3-(3-甲氧基苯基)丙酸 (CAS 編號: 98813-19-5)
- F3F 3-氟-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 19883-77-3)
- F3C N- $\alpha$ -氯乙醯基-3-氯-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 80126-51-8)
- F2OMe (S) -2-胺基-3-(2-甲氧基苯基)丙酸 (CAS 編號: 206060-41-5)
- F2C (S) -2-胺基-3-(2-氯苯基)丙酸 (CAS 編號: 198560-41-7)
- MeF4OMe (s) -3-(4-甲氧基苯基)-2-(甲基胺基)丙酸 (CAS 編號: 1260595-45-6)
- MeF4F N- $\alpha$ -甲基-4-氟-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 1979176-87-8)
- MeF3F N- $\alpha$ -甲基-3-氟-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 1820567-10-9)
- MeF3C N- $\alpha$ -甲基-3-氯氟-L-苯丙胺酸 (CAS 編號: 1446478-28-9)
- MeBph N- $\alpha$ -甲基-4-苯基-L-苯丙胺酸
- Me4Py N- $\alpha$ -甲基-4-吡啶基-L-丙胺酸
- Me3Py N- $\alpha$ -甲基-3-吡啶基-L-丙胺酸
- dr D-精胺酸
- dp D-脯胺酸
- dc D-半胱胺酸

- dk D-離胺酸
- Dap L- $\alpha,\beta$ -二胺基丙酸 (CAS 編號: 515-94-6)
- Dab (S)-4-胺基-2-(2-氯乙醯胺)丁酸 (CAS 編號: 25691-37-6)
- Cit 2-胺基-5-脲戊酸 (CAS 編號: 627-77-0)
- Cha  $\beta$ -環己基-L-丙胺酸 (CAS 編號: 4441-50-3)
- CeG N-(2-羧基乙基)-甘胺酸 (CAS 編號: 174799-89-4)
- Cbg (S)-2-胺基-2-環丁基乙酸 (CAS 編號: 1391630-31-1)
- Cba 環丁基丙胺酸 (CAS 編號: 478183-62-9)
- aMeY  $\alpha$ -甲基-L-酪胺酸 (CAS 編號: 658-48-0)
- aMeW  $\alpha$ -甲基-色胺酸 (CAS 編號: 153-91-3)
- aMeK  $\alpha$ -甲基-離胺酸 (CAS 編號: 111717-28-3)
- aMeC  $\alpha$ -甲基-L-半胱胺酸 (CAS 編號: 441317-73-3)
- Aib  $\alpha$ -甲基丙胺酸 (CAS 編號: 62-57-7)
- Ahp/Alahp (S)-2-胺基庚酸 (CAS 編號: 1115-90-8)
- Abu L- $\alpha$ -胺基丁酸 (CAS 編號: 1492-24-6)
- A4paa (S)-2-胺基-3-(1-(羧甲基)哌[口井]-4-基)丙酸 (KISHIDA CHEMICAL 股份有限公司)
- 5Ind (S)-2-胺基-3-(1H-吡啶-5-基)丙酸 (CAS 編號: 1655518-66-3)
- 4Py2NH2 (S)-2-胺基-3-(2-胺基吡啶-4-基)丙酸 (KISHIDA CHEMICAL 股份有限公司)
- 4Py 4-吡啶基-L-丙胺酸 (CAS 編號: 1956-21-4)
- 3Py6NH2 2-胺基-3-(6-胺基吡啶-3-基)丙酸 (合成例 2-3)
- 3Py 3-吡啶基-L-丙胺酸 (CAS 編號: 17470-24-5)
- W1aa 1-(羧甲基)-L-色胺酸 (CAS 編號: 773823-50-0)
- KCOpipzMe N6-(4-甲基哌[口井]-1-羰基)-L-離胺酸 (KISHIDA CHEMICAL 股份有限公司)
- W1mCON 1-(2-胺基-2-氧代乙基)-L-色胺酸 (合成例 2-5)
- W1EtOH 1-(2-羥乙基)-L-色胺酸 (合成例 2-9)

3Py6OMe (S) -2-胺基-3-(6-甲氧基吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號: 1270317-99-1)

Epyrl2RCOO 2-(5-(R)-2-(烯丙氧基)羰基)吡咯啉-1-基)-5-側氧戊酸

Dpyrl2RCOO 2-(4-(R)-2-(烯丙氧基)羰基)吡咯啉-1-基)-4-側氧丁酸 (實施例 9-16)

MeF3COO 3-羧基-N-甲基-苯丙胺酸 (CAS 編號: 1499826-56-0)

3Imp 2-胺基-3-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)丙酸 (CAS 編號: 2276942-95-9)

KaAc N6-甘胺醯基-L-離胺酸 (合成例 2-8)

AlMe4pip 4-胺基-1-甲基哌[口井]-4-羧酸 (CAS 編號: 15580-66-2)

Har N6-甲脒基-L-離胺酸 (CAS 編號: 156-86-5)

Acpr (S) -2-胺基-3-環丙基丙酸 (CAS 編號: 1492156-90-7)

Atb (S) -2-胺基-4,4-二甲基戊酸 (CAS 編號: 1934633-35-8)

MeF35dC (S) -3-(3,5-二氯苯基)-2-(甲基胺基)丙酸 (CAS 編號: 1542508-65-5)

Adod 12-胺基十二酸

Hly L-高離胺酸 (L-HOMOLYSINE)

W5C 5-氯-L-色胺酸

F3COO L-3-羧基苯丙胺酸

F3CON L-3-胺甲醯苯丙胺酸

Hgl L-2-胺基己二酸

Ndm N,N-二甲基-L-天冬醯胺酸

KN3 或者 LysN3 6-疊氮基-L-正白胺酸

KAc N6-乙醯基-L-離胺酸

dorn D-鳥胺酸

Nle L-正白胺酸

F3H 3-羥基-L-苯丙胺酸

Yae O-(2-胺基甲基)-L-酪胺酸

F4aao	O-(2-羧甲基)-L-酪胺酸
F4OEt	O-乙基-L-酪胺酸
F34dOMe	3,4-二甲氧基-L-苯丙胺酸
alT	L-別蘇胺酸
alI	L-別異白胺酸
MeK	N-甲基-L-離胺酸
Tbg	(S)-2-胺基-3,3-二甲基酪酸
Nva	L-正纈胺酸
Abu	(S)-(+)-2-胺基酪酸
da	D-丙胺酸
Bph	4-苯基-L-苯丙胺酸
de	D-麩胺酸
MeA	N-甲基-L-丙胺酸
PEG4c 或者 PEG3	1-胺基-3,6,9,12-四氧雜十五烷酸-15-羧酸
MeR	N-甲基-L-精胺酸
MeW	N-甲基-L-色胺酸
PEG8c	1-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷基-27-羧酸
PEG12c 或者 PEG11 或者 PEG12	1-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氧雜三十九烷-39-羧酸

此外，新穎合成胺基酸因在製造各種肽衍生物之際有可在各種肽加成新功能的可能性，故為有用。

**【0023】** 本發明的肽具有：序列識別號 1 所記載之胺基酸序列 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)；或在序列識別號 1 所記載之胺基酸序列中具有 1 以上且 10 以下的胺基酸殘基的取代、缺失、加成及／或插入之胺基酸序列。

**【0024】** 針對肽序列

胺基酸的被取代、缺失、加成及／或插入的胺基酸的數只要為 1 個以上且 10 個以下即可，其下限為 1 個。其上限為 10 個、9 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個、3 個、2 個，最少 1 個。此胺基酸的取代，較佳為保存性胺基酸取代。

**【0025】** 保存性胺基酸取代

所謂「保存性胺基酸取代 (conservative amino acid substitution)」，意指與功能性等價或類似的胺基酸之取代。肽中之保存性胺基酸取代是對於該肽的胺基酸序列造成靜態變化。例如，具有同樣極性之一個或二個以上的胺基酸是功能性等價地進行作用，對於此肽的胺基酸序列造成靜態變化。一般而言，某一群組內的取代可被認為對於結構及功能為保存性。然而，如本發明所屬技術領域中具有通常知識者可理解的，特定的胺基酸殘基所發揮的作用，能由包含該胺基酸之分子在三維結構中之意義而決定。例如，半胱胺酸殘基可為氧化型的（二硫化物）形式，其相較於還原型的（硫醇）形式極性更低。精胺酸側鏈的長的脂族的部分能構成結構性及功能性重要的特徵。並且，包含芳環的側鏈（色胺酸、酪胺酸、苯丙胺酸）能有助於離子-芳族相互作用或陽離子- $\pi$  相互作用。在此情形中，即使將具有此等側鏈之胺基酸取代成屬於酸性或非極性群組之胺基酸，結構性及功能性仍能為保存性。脯胺酸、甘胺酸、半胱胺酸（二硫化物形式）等的殘基有對於主鏈的立體結構帶來直接效果的可能性，無法屢次無結構上變形地進行取代。

**【0026】** 保存性胺基酸取代係如同以下所示，包含基於側鏈的類似性之特異性取代(Lehninger, 生化學, 改訂第 2 版, 1975 年刊登, 73 至 75 頁: L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)) 及典型性取代。

**【0027】** 此肽的較佳例，包含具有選自以下群組之 1 個以上的取代之胺基酸序列：

(I) 序列識別號 1 的第 1 個丙胺酸殘基被脂族胺基酸或甲基化脂族胺基酸取代；

(II) 序列識別號 1 的第 2 個纈胺酸殘基被鹼性胺基酸殘基或甲基化鹼性胺基酸殘基取代；

(III) 序列識別號 1 的第 3 個苯丙胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(IV) 序列識別號 1 的第 4 個纈胺酸殘基被甲基化纈胺酸殘基取代；

(V) 序列識別號 1 的第 5 個色胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基色胺酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VI) 序列識別號 1 的第 6 個天冬醯胺酸殘基被中性胺基酸或甲基化中性胺基酸取代；

(VII) 序列識別號 1 的第 7 個及第 8 個酪胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VIII) 序列識別號 1 的第 9 個異白胺酸殘基被脂族胺基酸殘基、甲基化脂族胺基酸殘基或具有支鏈結構的胺基酸殘基取代；

(IX) 序列識別號 1 的第 10 個異白胺酸殘基被任意胺基酸取代；及

(X) 序列識別號 1 的第 11 個絲胺酸殘基被中性胺基酸殘基取代。

**【0028】** (1) 非極性胺基酸群組：丙胺酸（以下，標記為「Ala」或僅標記為「A」）、纈胺酸（以下，標記為「Val」或僅標記為「V」）、白胺酸（以下，標記為「Leu」或僅標記為「L」）、異白胺酸（以下，標記為「Ile」或僅標記為「I」）、脯胺酸（以下，標記為「Pro」或僅標記為「P」）、苯丙胺酸（標記為「Phe」或僅標記為「F」）、色胺酸（以下，標記為「Trp」或僅標記為「W」）、甲硫胺酸（以下，標記為「Met」或僅標記為「M」）。

**【0029】** (2) 非荷電極性胺基酸群組：甘胺酸（以下，標記為「Gly」或僅標記為「G」）、絲胺酸（以下，標記為「Ser」或僅標記為「S」）、蘇胺酸（以下，標記為「Thr」或僅標記為「T」）、半胱胺酸（以下，標記為「Cys」或僅標記為「C」）、酪胺酸（以下，標記為「Tyr」或僅標記為「Y」）、天冬醯胺酸（以下，標記為「Asn」或僅標記為「N」）、麩醯胺酸（以下，標記為「Gln」或僅標記為「Q」）。

**【0030】** (3) 酸性胺基酸群組：天冬胺酸（以下，標記為「Asp」或僅標記為「D」）、麩胺酸（以下，標記為「Glu」或僅標記為「E」）。

**【0031】** (4) 鹼性胺基酸群組：離胺酸（以下，標記為「Lys」或僅標記為「K」）、精胺酸（以下，標記為「Arg」或僅標記為「R」）、組胺酸（以下，標記為「His」或僅標記為「H」）。

並且，存在於自然界的胺基酸，可基於其共通的側鏈的性質而分成如以下般的群組。

**【0032】** (1) 疏水性胺基酸群組：正白胺酸（Norleucine）、Met、Ala、Val、Leu、Ile

- (2) 中性親水性胺基酸群組：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln
- (3) 酸性胺基酸群組：Asp、Glu
- (4) 鹼性胺基酸群組：His、Lys、Arg
- (5) 對主鏈的方向造成影響之胺基酸的群組：Gly、Pro
- (6) 芳族胺基酸群組：Trp、Tyr、Phe

此外，在各群組中，亦包含被 N-甲基化的胺基酸等非天然胺基酸。

**【0033】** 此肽的較佳例係具有序列識別號 2 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeTyr-Cys) 所記載之胺基酸序列的肽。

**【0034】** 此肽的較佳例，包含在序列識別號 2 所記載之胺基酸序列中具有選自以下群組之 1 個以上的取代之胺基酸序列：

(I) 序列識別號 2 的第 1 個丙胺酸殘基被脂族胺基酸或甲基化脂族胺基酸取代；

(II) 序列識別號 2 的第 2 個纈胺酸殘基被鹼性胺基酸殘基或甲基化鹼性胺基酸殘基取代；

(III) 序列識別號 2 的第 3 個苯丙胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(IV) 序列識別號 2 的第 4 個纈胺酸殘基被甲基化纈胺酸殘基取代；

(V) 序列識別號 2 的第 5 個色胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VI) 序列識別號 2 的第 6 個天冬醯胺酸殘基被中性胺基酸或甲基化中性胺基酸取代；

(VII) 序列識別號 2 的第 7 個及第 8 個酪胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VIII) 序列識別號 2 的第 9 個異白胺酸殘基被脂族胺基酸殘基、甲基化脂族胺基酸殘基或具有支鏈結構的胺基酸殘基取代；

(IX) 序列識別號 2 的第 10 個異白胺酸殘基被任意胺基酸取代；

(XI) 序列識別號 2 的第 11 個及第 12 個精胺酸殘基被鹼性胺基酸殘基取代；

(XII) 序列識別號 2 的第 13 個酪胺酸殘基被親水性胺基酸殘基取代；

(XIII) 序列識別號 2 的第 14 個甲基酪胺酸殘基被酪胺酸殘基、芳族胺基酸殘基或甲基化芳族胺基酸殘基取代；及

(XIV) 序列識別號 2 的第 15 個半胱胺酸殘基被甲基化半胱胺酸殘基取代。

**【0035】** 此肽較佳的另一例為，若將肽 A 設為包含序列識別號 18 (Ala - Val - Phe - Val - Trp - Asn - Tyr - Tyr - Ile - Ile - Ser - Cys) 的第 1 個~第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 10 以上且 17 以下，則前述肽為以下之肽：

肽 A；或

在肽 A 中，具有含 1 以上且 6 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及/或插入的胺基酸序列之肽。

**【0036】** 此說明書中之較佳的肽的例子，與上述的肽同樣為可結合至人類運鐵蛋白受體 (hTfR) 之肽。並且，較佳例係可通過血腦障壁 (BBB) 之肽、對於肌肉組織具有指向性之肽或具有細胞穿透性之肽。

**【0037】** 亦可為以下之肽：在肽 A 中，具有序列識別號 18 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

所謂「胺基酸殘基被取代」，意指特定的胺基酸殘基被取代成其他可被修飾的胺基酸殘基。

**【0038】** 亦可為以下之肽：在肽 A 中，

序列識別號 18 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val) 或可被修飾的麩胺酸 (Glu)，

序列識別號 18 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe)，

序列識別號 18 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp)，

序列識別號 18 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr)，

序列識別號 18 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile) 或可被修飾的纈胺酸 (Val)。

**【0039】** 所謂「可被修飾的」，意指可進行眾所周知的胺基酸修飾或改變。修飾的例子為 N-甲基化、後述具有簡稱之胺基酸修飾、往 D 型的修飾(轉換)、往眾所周知的該胺基酸的衍生物的轉換。

**【0040】** 此肽較佳為肽長度為 11 以上且 13 以下。

**【0041】** 此肽進一步更佳為具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 18 的第 2 個胺基酸殘基為 Val 或 Glu，

第 15 頁，共 169 頁 (發明說明書)

序列識別號 18 的第 3 個胺基酸殘基為 Phe 或 MeF3C，  
序列識別號 18 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp 或 MeTrp，  
序列識別號 18 的第 8 個胺基酸殘基為 Tyr 或 F4OMe，  
序列識別號 18 的第 10 個胺基酸殘基為 Ile 或 Val 之肽。

【0042】 再者，此肽為在肽 A 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 18 的第 11 個胺基酸殘基為 Ser 或 His，  
序列識別號 18 的第 12 個胺基酸殘基為 Cys 或 Hgl 之肽。

【0043】 此肽較佳的另一例為，若將肽 B 設為包含序列識別號 15 (Ala—Val—Phe—Val—Trp—Asn—Tyr—Tyr—Ile—Val—Pro—Arg—Asp—Cys) 的第 1 個～第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 10 以上且 19 以下，則前述肽為以下之肽：

肽 B；或

在肽 B 中，具有含 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入的胺基酸序列之肽。

【0044】 亦可為以下之肽：在肽 B 中，具有序列識別號 15 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

【0045】 亦可為以下之肽：在肽 B 中，

序列識別號 15 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val) 或可被修飾的麩胺酸 (Glu)，

序列識別號 15 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) 或色胺酸 (Trp)，

序列識別號 15 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp)，

序列識別號 15 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr)，

序列識別號 15 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile) 或可被修飾的纈胺酸 (Val)。

【0046】 此等肽的肽長度可為 13 以上且 15 以下。

【0047】 此肽進一步更佳具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 15 的第 2 個胺基酸殘基為 Val 或 Glu，

序列識別號 15 的第 3 個胺基酸殘基為 Phe、Trp 或 MeF3C，

序列識別號 15 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp 或 MeTrp，

第 16 頁，共 169 頁 (發明說明書)

序列識別號 15 的第 8 個胺基酸殘基為 Tyr、Phe 或 F4OMe，

序列識別號 15 的第 10 個胺基酸殘基為 Ile 或 Val 之肽。

**【0048】** 再者，此肽為在肽 B 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 15 的第 11 個胺基酸殘基為 Phe，

序列識別號 15 的第 12 個胺基酸殘基為 Arg，

序列識別號 15 的第 13 個胺基酸殘基為 Glu、Asn、Asp、His、Gln 或 MeTrp，

序列識別號 15 的第 14 個胺基酸殘基為 Cys 之肽。

**【0049】** 此肽較佳的另一例為，若將肽 C 設為包含序列識別號 214 (MeA—Val—MeF3C—Val—MeW—Asn—Tyr—F4OMe—Ile—Ile—Arg—Arg—Phe—MeY—Cys) 的第 1 個～第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 11 以上且 19 以下，則前述肽為以下之肽：

肽 C；或

在肽 C 中，具有含 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入的胺基酸序列之肽。

**【0050】** 亦可為以下之肽：在肽 C 中，具有序列識別號 214 的第 1、3、5 及 8 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

**【0051】** 亦可為以下之肽：在肽 C 中，

序列識別號 214 的第 1 個胺基酸殘基為可被修飾的丙胺酸 (Ala) 或可被修飾的麩胺酸 (Glu)，

序列識別號 214 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe)，

序列識別號 214 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp)，

序列識別號 214 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe)。

**【0052】** 此等肽較佳為肽長度為 15 以上且 18 以下。

**【0053】** 此肽進一步更佳為具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 214 的第 1 個胺基酸殘基為 Ala、Aib、Abu、Glu、Gly、Ser、Phe、Pro 或 MeA，特佳為 Ala 或 MeA，

序列識別號 214 的第 3 個胺基酸殘基為 Phe、F3C、F2C、F2OMe、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF4Ome、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me3OMe、MeF3COO、MeF3F、Glu、Epyrl2RCOO、Dpyrl2RCOO 或 MeF3C，特佳為 Phe、MeF 或 MeF3C，

序列識別號 214 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON 或 W6F，特佳為 Trp、MeW，

序列識別號 214 的第 8 個胺基酸殘基為 Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aa、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn 或 Nal1，特佳為 Tyr 或 F4OMe 之肽。

**【0054】** 再者，此肽為在肽 C 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 214 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

序列識別號 214 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 214 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr，

序列識別號 214 的第 14 個胺基酸殘基為 MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、MeW 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 MeW，

序列識別號 214 的第 15 個胺基酸殘基為 Cys 或 Hgl 之肽。

**【0055】** 此肽較佳的另一例為，若將肽 D 設為包含序列識別號 219 (Ala—Glu—Phe—Val—Trp—Asn—Tyr—Tyr—Ile—Ile—Arg—Arg—Tyr—MeY—Cys) 的第 1 個～第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 11 以上且 19 以下，則前述肽為以下之肽：

肽 D；或

在肽 D 中，具有 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入之胺基酸序列之肽。

**【0056】** 亦可為以下之肽：在肽 D 中，具有序列識別號 219 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

**【0057】** 亦可為以下之肽：在肽 D 中，

序列識別號 219 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val)、可被修飾的麩胺酸 (Glu)、可被修飾的精胺酸 (Arg)、可被修飾的離胺酸 (Lys)、可被修飾的天冬胺酸 (Asp) 或可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,

序列識別號 219 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,

序列識別號 219 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp) ,

序列識別號 219 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) ,

序列識別號 219 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile)、可被修飾的麩胺酸 (Glu) 或可被修飾的離胺酸 (Lys) 。

**【0058】** 此等肽較佳為肽長度為 15 以上且 18 以下。

**【0059】** 此肽進一步更佳為具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 219 的第 2 個胺基酸殘基為 Val、Glu、Ala、Arg、Lys、Asp、Phe、Dap、Har、Abu、Nva、AcPr、AtbAhp 或 Hgl, 特佳為 Gln 或 Val ,

序列識別號 219 的第 3 個胺基酸殘基為第 3 個胺基酸殘基為 Phe、F3C、F2C、F2OMe、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF4OMe、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me3OMe、MeF3COO、MeF3F、Glu、Epyr12RCOO、Dpyr12RCOO 或 MeF3C, 特佳為 Phe、MeF 或 MeF3C ,

序列識別號 219 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON 或 W6F, 特佳為 Trp、MeW ,

序列識別號 219 的第 8 個胺基酸殘基為 Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aaO、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn 或 Nal1, 特佳為 Tyr 或 F4OMe ,

序列識別號 219 的第 10 個胺基酸殘基為 Ala、Abu、Acpr、Ahp、Aib、all、alT、Atb、Dab、Dap、dorn、Gln、Hly、Ile、Lys、KCOpipzMe、Leu、Nle、Nva、Pro、Arg、Ser、Thr、Tbg、Val 或 Tyr, 特佳為 Ile 或 all 之肽。

**【0060】** 再者, 此肽係在肽 C 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 219 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn, 特佳為 Lys 或 Arg ,

第 19 頁, 共 169 頁 (發明說明書)

序列識別號 219 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 219 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr，

序列識別號 219 的第 14 個胺基酸殘基為 MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、MeW 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 MeW，

序列識別號 219 的第 15 個胺基酸殘基為 Cys 或 Hgl 之肽。

**【0061】** 此肽較佳的另一例為，若將肽 E 設為包含序列識別號 296 (Ala—Val—MeF—Val—Trp—Asn—Tyr—Tyr—Ile—Ile—Arg—Arg—Tyr—MeY—Cys) 的第 1 個～第 15 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 15 以上且 18 以下，則前述肽為以下之肽：

肽 E；或

在肽 E 中，具有 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入的胺基酸序列之肽。

**【0062】** 亦可為以下之肽：在肽 E 中，具有序列識別號 296 的第 3、5、7、8、11、12、13 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

**【0063】** 亦可為以下之肽：在肽 E 中，

序列識別號 296 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe)，

序列識別號 296 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp)，

序列識別號 296 的第 7 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr)，

序列識別號 296 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr)，

序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為可被修飾的精胺酸 (Arg) 或可被修飾的丙胺酸 (Ala)，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為可被修飾的精胺酸 (Arg) 或可被修飾的離胺酸 (Lys)，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) 或可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) 中之任一者。

**【0064】** 並且，亦可為以下之肽：在肽 E 中，

序列識別號 296 的第 3 個胺基酸殘基為第 3 個胺基酸殘基為 Phe、F3C、F2C、F2OMe、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF4Ome、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me3OMe、MeF3COO、MeF3F、Glu、Epyrl2RCOO、Dpyrl2RCOO 或 MeF3C，特佳為 Phe、MeF 或 MeF3C，

序列識別號 296 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON 或 W6F，特佳為 Trp、MeW，

序列識別號 296 的第 7 個胺基酸殘基為 Tyr、3Py6OMe、Ala、Ahp、Phe、F3H、F4C、Nal1、Arg 或 Trp，特佳為 Tyr，

序列識別號 296 的第 8 個胺基酸殘基為 Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aa、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn 或 Nal1，特佳為 Tyr 或 F4OMe，

序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr。

**【0065】** 再者，此肽為在肽 C 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr，

序列識別號 214 的第 14 個胺基酸殘基為 MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、MeW 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 MeW，

序列識別號 296 的第 15 個胺基酸殘基為 Cys 或 Hgl 之肽。

【0066】 再者，亦可為以下之肽：在肽 E 中，

序列識別號 296 的第 3 個胺基酸殘基為苯丙胺酸 (Phe)、甲基化苯丙胺酸 (MeF)，或 N- $\alpha$ -甲基-N- $\alpha$ -氯乙醯基-3-氯-L-苯丙胺酸 (MeF3C)，

序列識別號 296 的第 5 個胺基酸殘基為色胺酸 (Trp) 或甲基化色胺酸 (MeW)，

序列識別號 296 的第 7 個胺基酸殘基為酪胺酸 (Tyr)，

序列識別號 296 的第 8 個胺基酸殘基為酪胺酸 (Tyr) 或 (S)-2-胺基-3-(4-甲氧基苯基)丙酸 (F4OMe)，

序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為精胺酸 (Arg) 或離胺酸 (Lys)，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為精胺酸 (Arg) 或 D-精胺酸 (dr)，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為酪胺酸 (Tyr) 或苯丙胺酸 (Phe)。

【0067】 此肽的較佳例為由序列識別號 3~200 中任一胺基酸序列所組成，或由在序列識別號 3~200 中任一胺基酸序列中 N 端為氯乙醯基-Ala 的胺基酸序列所組成之肽。

【0068】 此肽的較佳例為上述任一種肽，且為環狀肽。

【0069】 此肽的較佳例為包含序列識別號 1~552 中任一者所記載之胺基酸序列或胺基酸序列與連結子的複合體之第 1 個至第 10 個胺基酸序列，且胺基酸序列部位具有環狀結構之肽。

【0070】 此肽的特佳例為由在序列識別號 2、9、21~148、159~200、213~448、450~552 中任一者所記載之胺基酸序列或胺基酸序列與連結子的複合體中之第 1 個至第 15 個胺基酸序列所組成，且胺基酸序列部位具有環狀結構之肽。

【0071】 關於環狀肽

係指肽中的 2 個胺基酸結合，其全部或一部分成為環狀者。此外，在本案中，亦包含肽中的胺基酸形成交聯結構者、藉由形成內醯胺環或巨環化反應而形成環狀結構者、具有套索肽狀結構者等。亦即，在本案中，環狀肽只要其一部分為形成環狀結構者即可，亦可具有直鏈部。

一般而言，肽在活體內的代謝穩定性差，且因尺寸大而有難以通過細胞膜的問題。對於此種課題，已有使肽進行環狀化的方法。若將肽進行環狀化，則蛋白酶耐性提升，代謝穩定性提升，且不會對構形改變造成限制，因此暗示剛性增加且膜通透性及與目標蛋白質的親和性提升。

#### 【0072】 環化法

關於肽的環化，可依循眾所周知的方法進行。

雖不限於此，但例如藉由設計成在肽中包含 2 個以上的半胱胺酸殘基，而在轉譯後，可藉由雙硫鍵而形成環狀結構。並且，依循 Goto 等人的方法(Y. Goto、et al. *Acss Chem. Biol.* 3 120-129 (2008))，藉由遺傳密碼的重編程(reprogramming)技術，合成在 N 端具有氯乙醯基之肽，在肽中配置半胱胺酸殘基，藉此亦可環狀化。藉此，在轉譯後巯基自動地對於氯乙醯基進行親核攻擊(nucleophilic attack)，肽藉由硫醚鍵而環狀化。亦可藉由遺傳密碼的重編程技術，將進行結合而形成環狀之其他胺基酸的組合配置在肽內而進行環狀化。並且，合成在 N 端具有環醯胺之肽，在肽中配置 Hgl 殘基，藉此亦可進行環狀化。如此，只要為眾所周知的環狀化方法，則可未被特別限制地進行。

【0073】 此肽的較佳例為上述中任一種肽，且為由 15 胺基酸殘基所組成之肽。

#### 【0074】 肽長度

肽、肽部位的醯胺鍵的數量(胺基酸的數量、長度)未被特別限制，但較佳為總胺基酸殘基(結合至肽之物質或結合該物質與肽之連結子包含胺基酸之情形，不包含該等胺基酸)為 20 殘基以內。較佳為胺基酸為 6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、11 以上，較佳為胺基酸為 19 以下、18 以下、17 以下、16 以下、15 以下。

【0075】 此說明書所記載之一發明係關於複合體(complex)。此複合體為包含上述中任一種肽、與此肽結合之連結子，以及結合至此連結子之物質的複合體。較佳為至少物質能通過血腦障壁的複合體。亦可為複合體全體能通過血腦障壁。複合體較佳為對於肌肉組織具有指向性。複合體較佳為至少可將物質搬運往肌肉組織者。複合體較佳為具有細胞穿透性。此複合體較佳為至少可將物質搬運往細胞者。

**【0076】** 連結子的例子係連結子的胺基酸長度為 1 以上且 15 以下，而且連結子包含 1 個以上的甘胺酸 (Gly) 或絲胺酸 (Ser) 者。

此連結子的較佳例係 N 端為可被修飾的半胱胺酸 (Cys) 或可被修飾的離胺酸 (Lys)。

**【0077】** 連結子的另一例係胺基酸長度為 1 以上且 5 以下，而且包含 D 型的麩胺酸 (de) 及甲基化甘胺酸 (MeG) 中任一者或兩者。

此連結子的較佳例係 N 端為可被修飾的半胱胺酸 (Cys) 或可被修飾的離胺酸 (Lys) 之複合體。

**【0078】** 連結子的另一例係包含聚乙二醇 (PEG) 或聚乙二醇的衍生物之 PEG 連結子。聚乙二醇的衍生物包含所有眾所周知的 PEG 連結子。

較佳為 PEG 連結子係進一步包含甘胺酸 (Gly)、絲胺酸 (Ser)、麩胺酸 (Glu)、精胺酸 (Arg) 或離胺酸 (Lys) 者。

此連結子的較佳例係 N 端為可被修飾的半胱胺酸 (Cys) 或可被修飾的離胺酸 (Lys) 之複合體。

**【0079】** 連結子的另一例係連結子為具有由序列識別號 201、553~644 中任一者所示的序列之連結子。

**【0080】** 此複合體的較佳例係連結子為：

聚乙二醇 (PEG)；

由 Gly 或 MeG 所組成之肽連結子、亦即 G 連結子，由 Gly 或 MeG 與 Ser 所組成之肽連結子、亦即 GS 連結子；或

具有由序列識別號 201、553~644 中任一者所示的胺基酸序列之連結子。

**【0081】** 在本說明書中，連結子 (亦稱為交聯劑) 表示與運鐵蛋白受體結合之肽與欲送達腦之物質的分子間連結，可為眾所周知或本說明書所記載之任意的連結子。在特定的實施方式中，前述連結子例如為化學連結子、脂肪酸連結子、肽連結子 (多肽連結子)。並且，例如可為化學連結子與肽連結子等之複合體。例如，可為序列識別號 616 或序列表 627 等所示之具有 PEG 及胺基酸殘基或肽部分的連結子結構。

連結子例如可為藉由環境、條件而分散、分離者，亦可為保持穩定結構者。

**【0082】** 化學連結子：在一些實施方式中，連結子可為化學連結子。作為化學連結子，雖不受限於此，但例如包含：取代或非取代伸烷基、取代或非取

代伸雜烷基、取代或非取代伸環烷基、取代或非取代伸雜環烷基、取代或非取代丙炔及／或取代或非取代雜丙。並且，肽與連結子可透過硫氫基、胺基（胺）及／或者碳水化合物或任意的適當反應基而成為複合體。同質二官能性及異質二官能性交聯劑（共軛劑）能來自許多商業來源。交聯劑可包含可撓性臂，例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 個碳原子。作為交聯劑的例子，可列舉 BSS3（〔雙（硫代琥珀醯亞胺）辛二酸酯〕、NHSS／EDC（N-羥基琥珀醯亞胺與 N-乙基-（二甲基胺基丙基）碳化二亞胺、磺酸基-EMCSS（〔N-e-順丁烯二醯亞胺己酸〕醯肼、醯肼以及 SSATA（N-琥珀醯亞胺基-SS-乙醯硫基乙酸）等。

【0083】 化學連結子的較佳例為 PEG (Polyethyleneglycol) 連結子。例如，PEG 連結子可為由 1~24 個乙二醇單元所組成之 PEG 連結子。

【0084】 脂肪酸連結子：連結子可為由脂肪酸所誘導之包含二價化學部分的脂肪酸連結子。例如，脂肪酸連結子可為具有 12-胺基十二酸的連結子。

【0085】 肽連結子：肽連結子包含至少 1 個胺基酸（例如，至少 2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、40 或 50 個胺基酸的肽）。在特定的實施方式中，連結子為 1 個胺基酸（例如，Cys 等任意的天然胺基酸）。在其他實施方式中，使用如美國專利第 7,271,149 號所記載般之具有序列〔Gly-Gly-Gly-Gly-Ser〕<sub>n</sub>（式中，n 為 1、2、3、4、5 或 6）的肽等富含甘胺酸的肽。在另一實施方式中，使用如美國專利第 5,525,491 號所記載般之富含絲胺酸的肽連結子。作為富含絲胺酸的肽連結子，可列舉式〔X-X-X-X-Gly〕<sub>y</sub>（式中，X 之中最多 2 個為 Thr，其他 X 為 Ser，y 為 1~5）者（例如，Ser-Ser-Ser-Ser-Gly（式中，y 為 2 以上））。在一些事例中，連結子為 1 個胺基酸（例如，Gly 或 Ala 等任意的胺基酸）。

【0086】 此說明書所記載之一發明係關於腦相關疾病的預防或治療劑。此腦相關疾病的預防或治療劑包含上述的複合體，且上述的物質為有效成分。

【0087】 物質為送達腦之物質。物質只要為希望送達腦之物質，則可為本發明所屬技術領域中具有通常知識者所希望的任何物質。但是，BBB 的通過係由與運鐵蛋白受體結合進行胞吞作用、胞吞轉送等的機制所導致，因此無法在該等機制中進行搬運之過大的物質較為不佳。作為該物質的例子，雖未被限制，但可列舉以下：

化合物：不僅低分子化合物、中分子化合物，只要為能藉由細胞的細胞攝食過程（cytosis）機制導入的化合物即可。可列舉例如眾所周知的低分子藥劑。

肽：可為與體內的目標結合而表現某種效果之肽，例如可為環狀肽。

RI：經放射性同位素標幟之低分子、中分子化合物或抗體等，只要為可被放射性同位素標幟的化合物即可。可列舉例如 PET 檢查用的化合物。

蛋白質：只要為抗體、酵素等在體內表現有用功能之蛋白質即可。可列舉例如用於酵素補充療法之酵素。

核酸：只要為 DNA、RNA 等包含鹼基序列者即可。可列舉例如核酸醫藥品。

DDS：可為脂質體或微胞等 DDS 分子。在該 DDS 分子中，內部可進一步包含醫藥品等化合物。

以及，可為上述所列舉之該等的複合體。

**【0088】** 此說明書所記載之一發明係關於腦相關疾病的預防或治療劑之製造方法。此方法係包含獲得上述的複合體的步驟之腦相關疾病的預防或治療劑之製造方法。

**【0089】** 此方法的較佳例係連結子為：

聚乙二醇（PEG）；

G 連結子、GS 連結子；或

具有由序列識別號 201、553~644 中任一者所示的胺基酸序列之連結子。

**【0090】** 此說明書所記載之一發明係關於包含上述的複合體之腦相關疾病的診斷藥。

**【0091】** 此說明書所記載之一發明係包含上述的複合體之神經肌肉疾病的預防或治療劑。此情形，物質為神經肌肉疾病的預防或治療劑中之有效成分。此說明書所記載之一發明包含上述的複合體。此說明書所記載之一發明係關於包含上述的複合體之神經肌肉疾病的診斷藥。

**【0092】** 本發明的肽可藉由液相法、固相法、組合液相法與固相法之雜合法等化學合成法，基因重組法等眾所周知的肽之製造方法而進行製造。

**【0093】** 固相法例如使具有羥基之樹脂的羥基與  $\alpha$ -胺基被保護基保護之第一胺基酸（通常係作為目標的肽的 C 端胺基酸）的羧基進行酯化反應。酯化觸媒，可使用 1-三甲苯基磺酸基-3-硝基-1,2,4-三唑（MSNT）、二環

己基碳化二亞胺 (DCC)、二異丙基碳化二亞胺 (DIPCDI) 等眾所周知的脫水縮合劑。

接著，使第一胺基酸的  $\alpha$ -胺基的保護基脫離，且添加主鏈的羧基以外的所有官能基被保護之第二胺基酸，使該羧基活化，而使第一及第二胺基酸結合。再者，將第二胺基酸的  $\alpha$ -胺基進行去保護，添加主鏈的羧基以外的所有官能基被保護之第三胺基酸，使該羧基活化，而使第二及第三胺基酸結合。重複此操作，當合成目標長度的肽，則將所有官能基進行去保護。

**【0094】** 作為固相合成的樹脂，可列舉 Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin (Merck 公司)、HMPA-PEGA resin (Merck 公司) 等。此等樹脂可在利用溶劑 (二甲基甲醯胺 (DMF)、2-丙醇、氯甲烷等) 清洗後使用。

作為  $\alpha$ -胺基的保護基，可列舉苯甲氧羰基 (Cbz 或 Z)、tert-丁氧羰基 (Boc)、芴甲氧羰基 (Fmoc)、苯甲基、烯丙基、烯丙氧基羰基 (Alloc) 等。

Cbz 基可藉由氫氟酸、氫化等而去保護，Boc 基可藉由三氟乙酸 (TFA) 進行去保護，Fmoc 基可利用由哌啶所進行之處理而去保護。

$\alpha$ -羧基的保護可使用甲酯、乙酯、苄酯、tert-丁酯、環己酯等。

作為胺基酸的其他官能基，絲胺酸或蘇胺酸的羥基可被苯甲基或 tert-丁基保護，酪胺酸的羥基可被 2-溴苯甲氧羰基或 tert-丁基保護。離胺酸側鏈的胺基、麩胺酸或天冬胺酸的羧基可與  $\alpha$ -胺基、 $\alpha$ -羧基同樣地保護。

**【0095】** 羧基的活化可使用縮合劑進行。作為縮合劑，可列舉例如二環己基碳化二亞胺 (DCC)、二異丙基碳化二亞胺 (DIPCDI)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺 (EDC 或者 WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基) 參 (二甲基胺基) 六氟磷酸鎂 (BOP)、1-[雙 (二甲基胺基) 甲基]-1H-苯并三唑鎂鹽-3-氧化物六氟磷酸鹽 (HBTU) 等。

**【0096】** 來自樹脂之肽鏈的剪切可藉由以 TFA、氟化氫 (HF) 等酸進行處理而進行。

**【0097】** 由基因重組法 (轉譯合成系統) 所進行之肽的製造，可使用編碼本發明的肽之核酸而進行。編碼本發明的肽之核酸可為 DNA，亦可為 RNA。

編碼本發明的肽之核酸，可利用眾所周知之方法或遵循其之方法而製備。例如，可藉由自動合成裝置而進行合成。為了將所得之 DNA 插入載體，可添加

限制酵素辨識部位，或組入編碼用於以酵素等剪切所得的肽鏈之胺基酸序列的鹼基序列。

如同上述，在使本發明的肽與膜通透性肽等進行融合之情形，上述核酸亦包含編碼膜通透性肽之核酸。

為了抑制由源自宿主的蛋白酶所進行之分解，亦可使用以與其他肽之嵌合體肽的形式表現目標肽之嵌合體蛋白質表現法。此情形，作為上述核酸，能使用編碼作為目標的肽及結合至此的肽之核酸。

**【0098】** 接下來，使用編碼本發明的肽之核酸製備表現載體。核酸可直接、或以限制酵素進行消化、或加成連結子等，而插入表現載體的啟動子的下游。作為載體，可列舉源自大腸桿菌的質體（pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pBluescript II 等）、源自枯草桿菌的質體（pUB110、pTP5、pC1912、pTP4、pE194、pC194 等）、源自酵母的質體（pSH19、pSH15、YEp、YRp、YIp、YAC 等）、噬菌體（ $\phi$  噬菌體、M13 噬菌體等）、病毒（反轉錄病毒、痘瘡病毒、腺病毒、腺相關病毒（AAV）、花椰菜嵌紋病毒、菸草鑲嵌病毒、桿狀病毒等）、黏接質體等。

**【0099】** 啟動子可因應宿主的種類而適當選擇。在宿主為動物細胞之情形，例如可使用源自 SV40（simian virus 40，猿猴病毒 40）的啟動子、源自 CMV（cytomegalovirus，巨細胞病毒）的啟動子。在宿主為大腸桿菌之情形，可使用 trp 啟動子、T7 啟動子、lac 啟動子等。

在表現載體中，亦可組入編碼 DNA 複製起始點（ori）、選擇標記（抗生素抗性、營養要求性等）、強化子、剪接訊號、聚 A 加成訊號、標籤（FLAG、HA、GST、GFP 等）之核酸等。

**【0100】** 接著，利用上述表現載體將適當的宿主細胞進行轉形。宿主可依據與載體的關係而適當選擇，例如能使用大腸桿菌、枯草桿菌、芽孢桿菌屬菌、酵母、昆蟲或昆蟲細胞、動物細胞等。作為動物細胞，例如可使用 HEK293T 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、骨髓瘤細胞、HeLa 細胞、Vero 細胞。轉形可因應宿主的種類，遵循脂質轉染法、磷酸鈣法、電穿孔法、顯微注射法、粒子槍法等眾所周知的方法而進行。藉由遵循常規方法培養轉形體，而使作為目標的肽表現。

**【0101】** 來自轉形體的培養物之肽的精製係藉由以下方式獲得粗萃取液：回收培養細胞，將其懸浮於適當緩衝液後，藉由超音波處理、冷凍融解等方法而破壞細胞，並進行離心分離及過濾。在培養液中分泌肽之情形中，回收上清液。

來自粗萃取液或培養上清液之精製亦可藉由眾所周知的方法或遵循其的方法（例如、鹽析、透析法、超過濾法、凝膠過濾法、SDS-PAGE 法、離子交換層析法、親和力層析法、逆相高速液體層析法等）而進行。

所得之肽亦可利用眾所周知的方法或遵循其的方法而從遊離體轉換成鹽或從鹽轉換成遊離體。

**【0102】** 轉譯合成系統可設為無細胞轉譯系統。無細胞轉譯系統例如包含核糖體蛋白質、胺基醯基 tRNA 合成酵素 (ARS)、核糖體 RNA、胺基酸、rRNA、GTP、ATP、轉譯起始因子 (IF) 伸長因子 (EF)、釋放因子 (RF) 及核糖體再循環因子 (RRF)，以及轉譯所需要的其他因子。為了提高表現效率，亦可添加大腸桿菌萃取液或小麥胚芽萃取液。另外，亦可添加兔紅血球萃取液或昆蟲細胞萃取液。

在包含此等的系統中，藉由使用透析連續地供給能量，而可生產數 100 $\mu$ g 至數 mg/mL 的蛋白質。為了一併進行來自基因 DNA 的轉錄，亦可設為包含 RNA 聚合酶的系統。作為市售的無細胞轉譯系統，作為源自大腸桿菌的系統可使用 Roche Diagnostics 公司的 RTS-100 (註冊商標) GeneFrontier 公司的 PURESYSTEM、NEW ENGLAND Biolabs 公司的 PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit 等，作為使用小麥胚芽萃取液的系統可使用 ZOEGENE 公司、CellFree Sciences 公司的產品等。

若根據無細胞轉譯系統，能以不需精製的高純度形式獲得表現產物。

**【0103】** 在無細胞轉譯系統中，亦可使用將所期望的胺基酸或羧基酸與 tRNA 連結(醯基化)而成之人工的胺基醯基 tRNA，以取代天然的胺基醯基 tRNA 合成酵素所合成之胺基醯基 tRNA。此胺基醯基 tRNA 可使用人工的核糖核酸酵素進行合成。

作為此核糖核酸酵素，可列舉彈性酶 (flexizyme) (H. Murakami, H. Saito, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; H. Murakami, D. Kourouklis, and H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 1077-1084; H.

第 29 頁，共 169 頁 (發明說明書)

Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga (2006) Nature Methods 3, 357-359 ” The flexizyme system : a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the synthesis of nonnatural peptides” ; N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga (2009) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19, 3892-3894 ” A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group” ; 及 WO2007/066627 等)。彈性酶亦被稱為原型的彈性酶 (Fx) 及由此改變之二硝基苄基彈性酶 (dFx)、增強彈性酶 (eFx)、胺基彈性酶 (aFx) 等。

【0104】 藉由使用由彈性酶所生成之連結所期望的胺基酸或羧基酸之 tRNA，而可使所期望的密碼子與所期望的胺基酸或羧基酸相關聯並進行轉譯。作為所期望的胺基酸，亦可使用特殊胺基酸。例如，上述的環狀化所需要的非天然胺基酸亦可藉由此方法而導入結合肽。

【0105】 本發明的大環狀肽與其類似物的化學合成，可使用包含階段性固相合成、經過構形性所支援之再連接之肽片段的半合成、化學連接之在各種的該技術領域中所泛用的方法進行合成。本說明書所記載之肽與其類似物的合成，例如為使用 K. J. Jensen, P. T. Shelton, S. L. Pedersen, Peptide Synthesis and Applications, 2nd Edition, Springer, 2013 等所記載般之各種固相技術的化學合成。作為較佳的策略，係根據暫時地保護  $\alpha$ -胺基及能藉由鹼基而選擇性去除之 Fmoc 基、與暫時地保護側鏈官能基且在去 Fmoc 條件下穩定之保護基的組合。此種一般的肽側鏈的選擇，已知前述的 Peptide Synthesis and Applications, 2nd edition, G. B. Fields, R. L. Noble, Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 1990, 161-214 等，但作為較佳的肽側鏈保護基，有對於以離胺酸為首的胺基之 Boc 基或 Mtt 基、對於麩胺酸或天冬胺酸的羧基之 tert-butyl 基，以及對於半胱胺酸的硫醇基之 Trt 及 Mmt 基。

【0106】 本發明所記載之肽與其類似物，可在前述的固相樹脂上且在階段性方法中合成。所使用之 C 端胺基酸及合成所使用之所有胺基酸及肽， $\alpha$ -胺基保護基在合成過程中，必須選擇性地被去除。較佳為使用前述的固相樹脂，藉由適當的試劑將 N 端被 Fmoc 等適當保護之肽的 C 端羧基或被 Fmoc 保護之胺基酸的 C 端羧基做成活化酯後，藉由加成至固相樹脂上的胺基而開始。連續的肽鏈的伸長，能遵循作為目標的肽的胺基酸序列，藉由依序重複 N 端保護基(Fmoc

基) 的去除、接著保護胺基酸衍生物的縮合而達成。此外，此等可在最終階段使目標的肽遊離。例如，作為使其遊離的條件，可列舉 Teixeira, W.E. Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. P. M. Valentijn, J. W. Drijfhout, Protein Pept. Lett., 2002, 9, 379-385 等，在 TFA 中，作為捕捉劑，可利用包含水／氫矽烷 (silyl hydride)／硫醇之 TFA 溶液使其遊離。作為典型的例子，可列舉 TFA／Water／TIS／DOTD (體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5)。

**【0107】** 本說明書所記載之肽類似物的合成，可藉由使用單或多通道肽合成儀，例如 CEM 公司的 Liberty Blue 合成儀或 Biotage 公司的 Syro I 合成儀而實施。

**【0108】** 羧基的活化可使用縮合劑而進行。作為縮合劑，可列舉例如二環己基碳化二亞胺 (DCC)、二異丙基碳化二亞胺 (DIPCDI)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺 (EDC 或者 WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基) 參(二甲基胺基) 六氟磷酸鎂 (BOP)、1-[雙(二甲基胺基) 甲基]-1H-苯并三唑鎂鹽-3-氧化物六氟磷酸鹽 (HBTU) 等。

**【0109】** 此說明所公開之另一實施態樣係關於醫藥。此醫藥包含上述的肽、其藥學上所容許之鹽或溶劑合物(為了簡化，以下亦將此等僅標記為肽)。此醫藥較佳為包含有效量之上述的肽作為有效成分。

**【0110】** 在本說明書中，醫藥組成物的投予形態未被特別限定，可經口投予亦可非經口投予。作為非經口投予，可列舉例如、肌肉內注射、靜脈內注射、皮下注射等注射投予、經皮投予、經黏膜投予(經鼻、經口腔、經眼、經肺、經陰道、經直腸) 投予等。

**【0111】** 上述醫藥組成物可鑑於多肽容易被代謝及排泄的性質而進行各種的修飾。例如，在多肽加成聚乙二醇 (PEG) 或糖鏈可增長血中滯留時間、使抗原性降低。並且，亦可將聚乳酸-乙二醇 (PLGA) 等活體內分解性的高分子化合、多孔性羧基磷灰石、脂質體、表面修飾脂質體、不飽和脂肪酸所製備之乳化、奈米粒子、奈米球等使用作為緩釋化基劑，並在此中包含多肽。在進行經皮投予之情形，亦可將弱電流流經皮膚表面而使其穿透角質層(離子電滲法)。

**【0112】** 上述醫藥組成物，可直接使用有效成分，亦可添加藥學上可容許的載體、賦形劑、添加劑等而進行製劑化。作為劑形，可列舉例如液劑(例如注射劑)、分散劑、懸浮劑、錠劑、丸劑、粉末劑、坐劑、散劑、細粒劑、顆

粒劑、膠囊劑、糖漿劑、錠劑、吸入劑、軟膏劑、點眼劑、點鼻劑、點耳劑、泥罨劑等。

製劑化可適當使用例如賦形劑、結合劑、崩解劑、潤滑劑、溶解劑、溶解補助劑、著色劑、矯味矯臭劑、穩定化劑、乳化劑、吸收促進劑、界面活性劑、pH 調整劑、防腐劑、抗氧化劑等並藉由常規方法而進行。

作為能使用於製劑化之成分的例子，可列舉精製水、食鹽水、磷酸緩衝液、葡萄糖、甘油、乙醇等藥學可容許之有機溶劑、動植物油、乳糖、甘露醇、葡萄糖、山梨醇、結晶纖維素、羥丙基纖維素、澱粉、玉米澱粉、二氧化矽、矽酸鋁鎂、膠原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、羧乙基聚合物、羧甲基纖維素鈉、聚丙烯酸鈉、藻酸鈉、水溶性葡聚糖、羧甲基澱粉鈉、果膠、甲基纖維素、乙基纖維素、黃原膠、阿拉伯膠、黃蓍膠、酪蛋白、瓊脂、聚乙二醇、雙甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蠟、肉荳蔻酸十二烷基酯、肉荳蔻酸異丙酯、高級醇、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白等，但不受限於此等。

有鑑於肽難以經黏膜吸收，上述醫藥組成物可包含改善難吸收性藥物的吸收之吸收促進劑。作為此吸收促進劑，可使用聚氧乙炔月桂基醚類、月桂基硫酸鈉、皂苷等界面活性劑；甘膽酸、脫氧膽酸、牛磺膽酸等膽汁酸鹽；EDTA、水楊酸類等螯合劑；己酸、癸酸、月桂酸酯酸、油酸、亞麻油酸、混合膠束等脂肪酸類；烯胺衍生物、N-醯基膠原蛋白肽、N-醯基胺基酸、環糊精類、幾丁聚糖類、一氧化氮供體等。

**【0113】** 丸劑或錠劑亦可被覆糖衣、胃溶性、腸溶性物質。

注射劑可包含注射用蒸餾水、生理食鹽水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、醇類等。再者，可添加濕潤劑、乳化劑、分散劑、穩定化劑、溶解劑、溶解補助劑、防腐劑等。

**【0114】** 將本發明的醫藥組成物投予至哺乳類（例如，人類、小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、狗、馬、猴、豬等），尤其人類之情形的投予量，係依據症狀、患者的年齡、性別、體重、感受性差異、投予方法、投予間隔、有效成分的種類、製劑的種類而異，雖未被特別限定，但例如可將 30 $\mu$ g $\sim$ 100g、100 $\mu$ g $\sim$ 500mg、100 $\mu$ g $\sim$ 100mg 以 1 次或分成數次進行投予。注射投予之情形，可依據患者的體重，將 1 $\mu$ g/kg $\sim$ 3000 $\mu$ g/kg、3 $\mu$ g/kg $\sim$ 1000 $\mu$ g/kg 以 1 次或分成數次進行投予。

【0115】 使用本發明的肽之腦相關疾病的預防或治療方法，可參照上述醫藥組成物之記載而實施。

【0116】 包含上述的複合體之神經肌肉疾病的預防或治療劑只要使用上述醫藥組成物即可。

【0117】 此說明書所公開之另一實施態樣係關於腦相關疾病檢測藥。此腦相關疾病檢測藥包含上述的肽、其鹽或其溶劑合物。

【0118】 腦相關疾病檢測藥及檢測用套組

本發明亦包含含有本發明的肽之腦相關疾病檢測藥。使用作為檢測藥之情形，本發明的肽亦可標識成能檢測。肽的標識例如能使用藉由過氧化物酶、鹼性磷酸酶等酵素、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H 等放射性物質、螢光異硫氰酸鹽、玫瑰紅、丹磺醯氯、藻紅素、四甲基若丹明異硫氰酸鹽、近紅外螢光材料等螢光物質、螢光素酶、螢光素、水母素等發光物質所標識之抗體。其他，亦可檢測以金膠體、量子點等奈米粒子所標識之抗體。例如，藉由與腦相關疾病相關之特定標的進行結合的抗體與本發明的肽製作複合體，製作已標識該抗體或本發明的肽之複合體，將其進行投予、檢測，藉此可檢測腦相關疾病。

並且，在免疫分析中，亦可將本發明的肽以生物素進行標識，使其與以酵素等標識之抗生物素蛋白或卵白素進行結合而進行檢測。

在免疫分析中，使用酵素標識之 ELISA 法亦因可簡便且迅速地量測抗原而較佳。例如，將抗體固定於固相載體，添加樣本使其反應後，添加已標識之本發明的肽並使其反應。清洗後，與酵素基質進行反應，使其發色，量測吸光度，藉此可檢測腦相關疾病。可在使固定於固相載體之抗體與試料進行反應後，添加未標識之本發明的肽，將針對本發明的肽之抗體進行酵素標識並進一步添加。

酵素基質在酵素為過氧化酶之情形可使用 3,3'-diaminobenzidine (DAB)、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)、o-phenylenediamine (OPD) 等，在酵素為鹼性磷酸酶之情形可使用 p-nitropheny phosphate (NPP) 等。

【0119】 在本說明書中，「固相載體」只要為可固定抗體之載體則未被特別限定，可列舉玻璃製、金屬性、樹脂製等的微孔盤、基板、珠粒、硝基纖維素膜、尼龍膜 (nylon membrane)、PVDF 膜等，標的物質可遵循眾所周知的方法而固定於此等固相載體。

【0120】 本發明之檢查用套組包含上述檢測所需要的試劑及器具(包含本發明的肽、抗體、固相載體、緩衝液、酵素反應停止液、微量盤讀取器等，但不限定於此等)。

【0121】 此說明書所公開之另一實施態樣亦能被考慮使用作為包含上述的腦相關疾病檢測藥之腦相關疾病檢測用套組、用於發現腦相關疾病及伴隨其之各種細胞功能或生命現象的工具。

【0122】 此說明書亦提供用於製造腦相關疾病的預防或治療用的醫藥之肽的使用。在此情形中之肽只要為上述之任一者即可。

【0123】 並且，此說明書亦提供用於製造神經肌肉疾病的預防或治療用的醫藥之肽的使用。在此情形中之肽只要為上述之任一者即可。

【0124】 本說明書亦提供一種腦相關疾病的預防或治療方法，其包含對於人類、非人類哺乳動物或鳥類亦即對象投予有效量的肽、其藥學上可容許的鹽、或其溶劑合物、或複合體之步驟。肽可適當使用上述的肽。非人類哺乳動物的例子為人類以外之靈長類、豬、牛、狗、貓、馬、綿羊、大鼠及小鼠。

【0125】 此說明書亦提供一種腦相關疾病的預防或治療方法，其包含對於人類、非人類哺乳動物或鳥類亦即對象投予有效量的肽、其藥學上可容許的鹽、或其溶劑合物、或複合體之步驟。

【0126】 本說明書中，尤其下述代表性實施例所使用之縮寫對於本發明所屬技術領域中具有通常知識者而言為周知。所使用之一些縮寫係如同下述：

Fmoc 為 9-芴甲氧羰基；

HOAt 為 1-羥基苯并三唑；

HATU 為 O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽；

MeCN 為乙腈；

DBU 為 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一烯；

DIPEA 為 N,N-二異丙基乙基胺；

DODT 為 3,6-二噁烷-1,8-辛烷-二硫醇；

DMSO 為二甲亞砜；

DMF 為 N,N-二甲基甲酰胺；

Mtt 為單甲基三苯甲基；

Mmt 為單甲氧基三苯甲基；

o-Ns 為 2-硝基苯磺酸；

TFA 為三氟乙酸；

TIS 為三異丙基矽烷；

Trt 為三苯甲基；

mL 為毫升（單位）；

M 為莫耳濃度（單位）；

v/v 為 volume/volume（體積/體積）；

Adod 為 12-胺基十二酸。

### 【0127】 [實施例 1]

#### 化學合成

以下的實施例中之在化學合成中所使用的全部原料、結構單元、試劑、酸、鹼、固相樹脂、溶媒係直接使用市售品，或者為本發明所屬技術領域中具有通常知識者使用有機化學的手法可合成者。此外，包含保護基的胺基酸只要未被特別註明則是直接使用市售品。

【0128】 固相樹脂中之肽鏈的伸長係將各實施例所記載之樹脂作為起始原料，利用通常所使用之肽偶合反應條件與 Fmoc 去除反應條件而進行。反應係使用肽自動合成儀亦即 CEM 公司 Liberty Blue 並遵循製造商的手冊而進行。下述列舉能使用之一般的胺基酸，側鏈保護基表示於括號內。

【0129】 Fmoc-Trp (Boc) -OH；Fmoc-Thr (tBu) -OH；Fmoc-N-Me-Gly-OH；Fmoc-Asp (OtBu) -OH；Fmoc-N-Me-Phe-OH；Fmoc-Ala-OH；Fmoc-N-Me-Ala-OH；Fmoc-His (Trt) -OH；Fmoc-Tyr (tBu) -OH；Fmoc-Val-OH；Fmoc-HydPro (tBu) -OH；Fmoc-Cys (Trt) -OH；Fmoc-Lys (Mtt) -OH；Fmoc-Ser (tBu) -OH；Fmoc-N-Me-Ser (tBu) -OH。

【0130】 氯乙醯基的導入係藉由下述方式而進行：對於已保持前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將氯乙酸（3 等量）添加 3 等量之 N,N'-二異丙基碳化二亞胺的 DMF 溶液（0.5M）、3 等量之 HOAt 的 DMF 溶液（0.5M），在室溫振盪 40 分鐘。

【0131】 側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 與氯甲烷分別各清洗 5 次，並在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 (cocktail) – A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 150 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液進行再度振盪後，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 3min)，並傾析溶液。將所得之個體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。

【0132】 肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 6 等量的三乙胺，在室溫攪拌約 16 小時攪拌而進行。將所得之反應溶液以乙酸調製成酸性，使用 Biotage (註冊商標) V-10 (Biotage Japan 公司) 進行減壓濃縮。

【0133】 作為所得之粗精製肽的精製方法，利用 Waters 公司 AutoPurification System – SQD2 single quadruple mass spectrometer，使用逆相分取 HPLC，一邊監視源自目標物之 m/z 離子一邊將其溶出。確認在包含由 ESI – positive 的掃描模式所得之質譜與由目標物的分子式所計算之多價離子的質譜在所使用之質量分析器的誤差範圍中為一致。此外，包含所使用之管柱的精製條件係顯示於各實施例。

【0134】 本發明中，化學合成之肽的純度係利用以下任一分析方法而決定。

(分析條件)

分析條件 A

管柱：CORTECS (註冊商標) UPLC (註冊商標) C18 column (Nihon Waters 公司)、90Å、1.6μm、2.1x100mm

移動相：0.025% TFA in MeCN / 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O

溫度：40°C

梯度：5 – 95% MeCN / 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O in 5.56min；線性梯度

流量：0.4mL / min

檢測法：UV 220nm

**【0135】 分析條件B**

管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1 IDx150mm、100Å（Phenomenex 公司）

管柱溫度：60°C

移動相 A：0.025%TFA in H<sub>2</sub>O

移動相 B：0.025%TFA in CH<sub>3</sub>CN

梯度：各實施例所記載

流速：0.25mL/min

檢測：PDA（225nm）

**【0136】** 化學合成之肽的結構決定，係將考慮遵循目標序列所使用之胺基酸與因應需要所使用之結構單元所計算之分子量，藉由質譜分析法中之 ESI-MS（+）進行確認。此外，所謂「ESI-MS（+）」，表示在正離子模式所實施之電灑游離質譜分析法。所檢測之質量係以「m/z」單位標記表示。此外，分子量約大於 1000 之化合物係作為 2 價離子或 3 價離子而以高頻率檢測。

**【0137】 與 hTfR 結合之特殊環狀肽的化學合成**

利用國際公開 WO2014/119600 號、國際公開 WO2012/033154 號或國際公開 WO2007/066627 號所記載之篩選方法，辨識 hTfR 結合肽。以確認該肽是否實際具有對於 hTfR 之結合活性為目的，進行化學合成。將所合成之肽的序列表示於表 1。

【0138】 [表 1]

專利 編號	名稱	序列																	ESI(m/z)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
2	JCR_hTFR_000894	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys				2083.9
3	JCR_hTFR_100022	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Arg	Phe	Gly	Thr	Gly	Cys		2051.2
4	JCR_hTFR_100025	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Arg	Asn	Val	Pro	Asn	Cys		2055.8
5	JCR_hTFR_000809	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Pro	Arg	MeHis	Cys		2220.4
6	JCR_hTFR_000837	Ala	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Phe	Ile	Ile	Pro	Arg	His	Cys					1844.7
7	JCR_hTFR_000895	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeTyr	Cys		2270.1
8	JCR_hTFR_000812	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeHis	Cys		2245.6
9	JCR_hTFR_000690	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Cys				2005.9
10	JCR_hTFR_100014	Ala	Ser	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asn	Arg	Trp	Ala	Cys		2117.6
11	JCR_hTFR_100019	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	Glu	Cys					1799.7
12	JCR_hTFR_000687	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	Asn	Cys					1784.7
13	JCR_hTFR_100017	Ala	Asn	Ser	Arg	Thr	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Thr	Arg	Cys		2172.0
14	JCR_hTFR_000696	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Pro	Arg	MeTyr	Cys		2245.2
15	JCR_hTFR_000692	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys					1785.8
16	JCR_hTFR_100003	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	His	Cys							1554.6
17	JCR_hTFR_100016	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Pro	Arg	MeTrp	Cys					1870.9
18	JCR_hTFR_000554	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Ser	Cys							1504.4
19	JCR_hTFR_000109	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Ser	Cys							1519.2
20	JCR_hTFR_000569	Ala	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asn	Cys							1584.4

【0139】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.6mmol/g, 0.33g), 遵循前述的一般方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。縮合反應係將在 75°C 反應 10 分鐘作為基本條件。去 Fmoc 化係將在 20% piperidine in DMF 中, 在 75°C 反應 3 分鐘作為基本條件。氯乙醯基的導入係藉由以下方式進行: 對於已保持前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 添加 5 等量之氯乙酸的 DMF 溶液 (0.2M)、5 等量之 HATU 的 DMF 溶液 (0.5M)、10 等量之 DIPEA 的 DMF 溶液 (1M), 在室溫振盪 30 分鐘。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次, 並以氯甲烷清洗 3 次, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪, 由玻璃料回收溶液成分, 並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1), 則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min), 並傾析溶液。將所得之個體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後, 將所得之固體進行乾燥, 使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後, 添加 6 等量之三乙胺, 在室溫攪拌約 16 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

【0140】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 5-30%, 之後耗費 8 分鐘 30-35%, 之後耗費 1 分鐘 35-60%; 流量: 120mL/min)。

【0141】 所得之目標物係以前述的分析條件 A 或分析條件 B 進行分析, 藉由質譜分析法中之 ESI-MS (+) 確認結構。將所得之 ESI-MS (+) 觀測值、與將在該情形中之質子加成數 (M+XH) 顯示為 X+時的 X 的值表示於表 1。

【0142】 [實施例 2]

由表面電漿共振 (SPR) 所進行之運鐵蛋白受體 (hTfR) 與肽之分子間相互作用評價試驗

針對所合成的各種肽，將對於運鐵蛋白受體 (hTfR) 之肽的表面電漿共振 (SPR) 所導致之分子間相互作用，藉由以下所示的方法實施試驗。將具體的試驗方法顯示於以下。

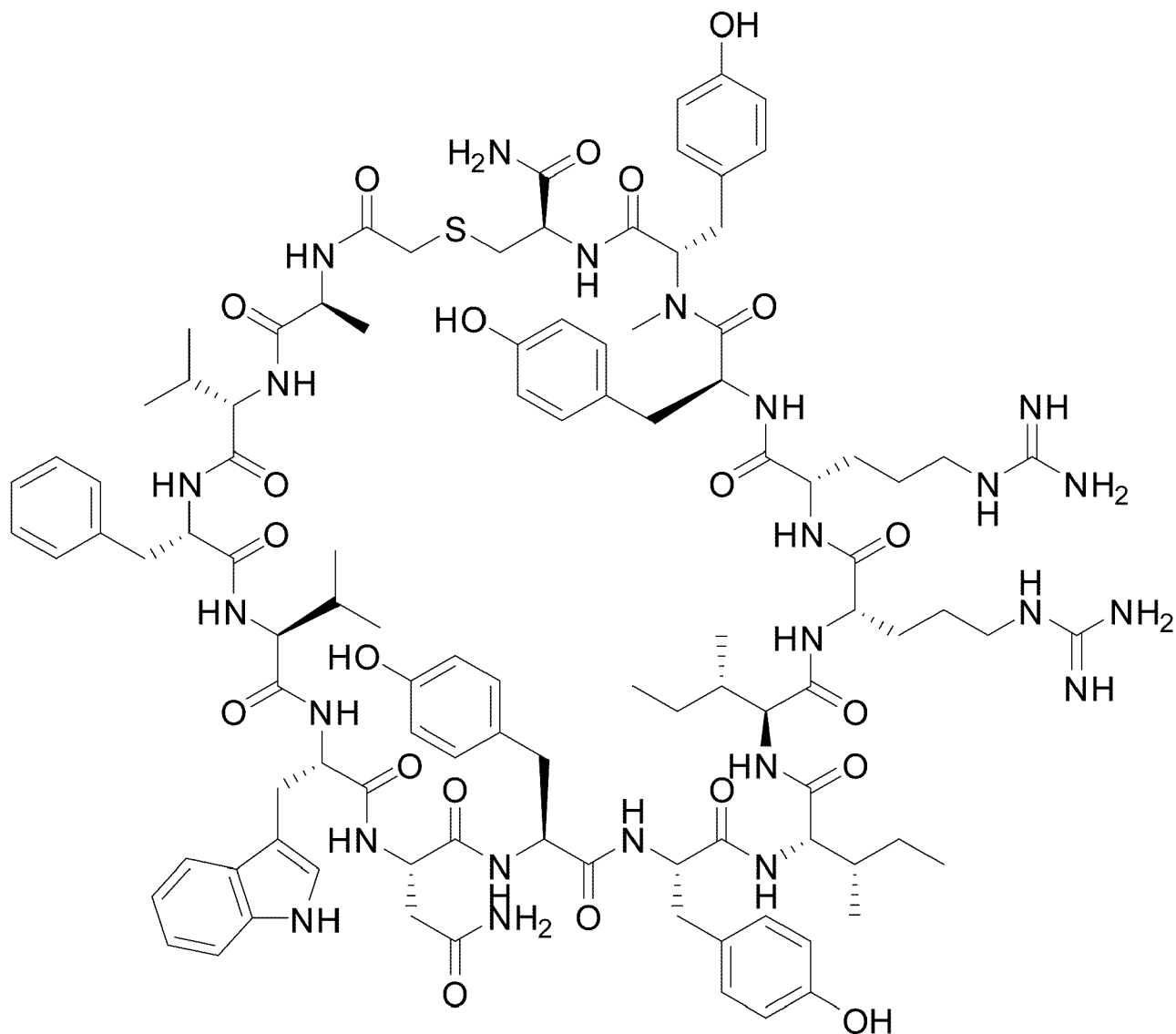
**【0143】** [ SPR 量測 ]

將 NTA 感測晶片 (Global Life Science Technologies Japan 股份有限公司) 插入 BiacoreT200 (Global Life Science Technologies Japan 股份有限公司)，以電泳緩衝液: 10mM HEPES pH8.0 (nacalai tesque 股份有限公司)、150mM NaCl (nacalai tesque 股份有限公司)、0.05% Tween 20 (nacalai tesque 股份有限公司)、0.1% BSA (SIGMA-ALDRICH)、1.0% DMSO (富士薄膜和光純藥股份有限公司) 實施 3 次初始操作，以流速 30 $\mu$ L/min 進行平衡化。使 350mM EDTA 溶液以流速 10 $\mu$ L/min 反應 60 秒鐘，並使 0.5mM NiCl<sub>2</sub> 溶液 (KISHIDA CHEMICAL) 以流速 10 $\mu$ L/min 反應 60 秒鐘後，將 3mM EDTA 溶液 (nacalai tesque 股份有限公司) 以流速 10 $\mu$ L/min 清洗 NTA 感測晶片 60 秒鐘。使 60mM EDC 溶液 (Global Life Science Technologies Japan 股份有限公司)、650mM NHS 溶液 (Global Life Science Technologies Japan 股份有限公司) 各混合 50 $\mu$ L 後，以流速 10 $\mu$ L/min 使其反應 420 秒鐘。以電泳緩衝液進行稀釋，製備 3.2 $\mu$ M hTfR 溶液 150 $\mu$ L，以流速 10 $\mu$ L/min 使其反應 600 秒鐘，將 hTfR 固定化在 NTA 感測晶片。固定化後，使 1.0M 乙醇胺水溶液 (Global Life Science Technologies Japan 股份有限公司) 以流速 10 $\mu$ L/min 反應 420 秒鐘，進行加帽 (capping)。將在 DMSO 溶液中製備成 10mM 之肽溶解液，以最終濃度成為 10 $\mu$ M 的肽溶解液之方式，以電泳緩衝液進行稀釋後，製作 100nM、50nM、25nM、10nM、5nM 的肽溶液。使用上述的樣本，藉由 SPR 量測而取得對於 hTfR 之肽的動力學。動力學評價模型設為 Single Cycle，使用 KineticsBiacore T200 Evaluation Software Version 3.0 (Global Life Science Technologies Japan 股份有限公司) 而進行曲線擬合。對於所得之感應分析圖 (sensorgram)，實施由最小平方法所進行之曲線擬合，藉由求取其 KD 值而評價肽對於 hTfR 的結合。針對如此所求得之 KD 值，KD 值小於 1nM 之情形標記為 A，1nM 以上且小於 100nM 之情形標記為 B，100nM 以上且小於 1 $\mu$ M 之情形標記為 C，1 $\mu$ M 以上之情形標記為 D，並表示於表 1。其結果，針對

第 40 頁，共 169 頁 (發明說明書)

hTfRNo.894 及具有與其類似的胺基酸序列之環狀肽，顯示與 hTfR 具有顯著的結合能力。hTfRNo.894 的化學結構係如同以下。

【0144】 [化 1]



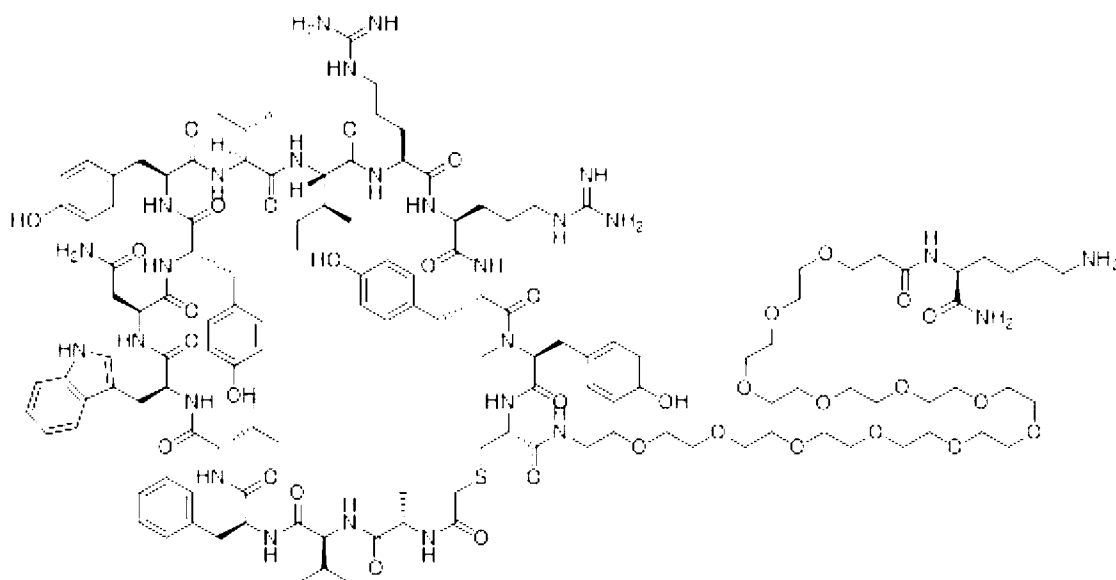
【0145】 [實施例 3]

**hTfR 結合肽-PEG11-Vivotag750 複合體 (hTfRNo.894-vivotag750) 的合成**

針對 hTfRNo.894，合成使作為有效負載 (payload) 之近紅外螢光標識物質亦即 Vivotag750 (VivoTag-S (商標) 750, PerkinElmer 公司) 透過 PEG11 連結子而結合之化合物(表示為 hTfRNo.894-vivotag750 或 hTfR\_\_000894\_\_PEG11\_\_ (VivoTag)) (序列識別號 146)。hTfR 結合肽-PEG11 的化學結構係如同

以下，藉由使該化合物與 Vivo-tag750 結合而合成標記化合物。詳細內容於以下記載。

[化 2]



**【0146】 hTfRNo.894-PEG11-vivotag750 的合成**

化學合成係如同以下般進行：

使用 Fmoc-NH-SAL-PEG-resin 1500-2000Da (渡邊化學, 0.38mmol/g), 依循一般的方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue 作為固相合成儀, 依循製造商的手冊進行。縮合反應的基本條件設為在縮合劑中使用 HATU 並以 75°C 使其在 10 分鐘反應 1 次。但是, 第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。第 13 個殘基、第 14 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次重複反應。第 15 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。第 16 個殘基係在 25°C 下, 於 60 分鐘進行 1 次

反應。並且，Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是，關於第 13 個殘基、第 15 個殘基，Fmoc 去除係藉由在 25°C 下使其反應 5 分鐘後，使其反應 10 分鐘而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於前步驟所得之樹脂，將 5 等量之氯乙酸的 DMF 溶液 (0.2M)、5 等量之 HATU 的 DMF 溶液 (0.5M)、10 等量之 DIPEA 的 DMF 溶液 (1M) 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA / H<sub>2</sub>O / TIS / DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚與己烷之混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，傾析上清液。將所得之固體以已冰冷的乙醚清洗後，使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 6 等量之三乙胺，在室溫進行整夜振盪後，以 Savant Explorer SpeedVac 進行減壓濃縮後、以逆相 HPLC 進行精製。將所得之肽 (26.1mg, 9.30umol) 溶解於 DMSO / H<sub>2</sub>O (9 / 1)，添加 0.91 等量之 VivoTag-NHS、4.5 等量之 DIEA，攪拌 45 分鐘。在反應溶液中添加 AcOH 並驟冷。

【0147】 所得之反應液係使用以下的條件進行精製 (管柱：XSelect CSH C18 5um 10x150mm (Lot No.147i362781)；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度：40°C；梯度 (%B)：耗費 3 分鐘 7-32%，之後耗費 8 分鐘 32-37%，之後耗費 1 分鐘 37-60%；流量：5mL/min)。

【0148】 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 97.1%。

分析條件 B：保持時間=13.20 分鐘；梯度 (%B conc)：耗費 20 分鐘 20-60%，之後耗費 1 分鐘 60-95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1226.4 (M+3H)^{3+}$ 。

【0149】 並且，針對所合成之前述複合體，遵循實施例 2，確認由 SPR 所進行之與 hTfR 的結合能力後， $KD = 1.09nM$ 。

**【0150】 [實施例 4]****成為控制組之肽複合體：hTfRNo.894FLIP—vivotag750 的合成**

作為 hTfRNo.894—vivotag750 的控制組，合成使 No.894 的序列反轉之具有以下的胺基酸序列的環狀肽與 vivotag750 透過 PEG11 連結子而結合之下述複合體(表示為 hTfRNo.894FLIP—vivotag750 或 FLIP\_\_000894\_\_PEG11\_\_K\_\_FITC)。

FLIP 序列：ClAc—Ala—MeTyr—Tyr—Arg—Arg—Ile—Ile—Tyr—Tyr—Asn—Trp—Val—Phe—Val—Cys (序列識別號 202)。

**【0151】 hTfRNo.894FLIP—PEG11—vivotag750 的合成**

肽複合體的合成及精製，除了將 Sieber amide resin (渡邊化學，0.6mmol/g，0.33g) 使用作為起始樹脂以外，與實施例 3 同樣地進行。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 95.5%。

分析條件 B：保持時間=13.5 分鐘；梯度 (%B conc)：耗費 20 分鐘 20—60%，之後耗費 1 分鐘 60—95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI—MS (+) 觀測值  $m/z = 1226.4 (M + 3H)^{3+}$ 。

將如同上述所得之化合物的 N 端，遵循 Vivotag750 (VivoTag—S(商標)750、PerkinElmer 公司) 的程序進行標識，獲得標題的化合物。

並且，針對所合成之前述複合體，遵循實施例 2，確認由 SPR 所進行之與 hTfR 的結合能力後，未確認到與 hTfR 的結合。

**【0152】 [實施例 5]****hTfRNo.894—vivotag750 之使用 hTfR—KI 小鼠的腦移行性評價試驗**

[試液的製備]

將羥丙基—β—環糊精 (和光純藥工業公司) 以成為 20w/v% 的濃度之方式溶解於水中，將此作為 20% 羥丙基—β—環糊精溶液。

**【0153】 [投予液的製備]**

hTfRNo.894—vivotag750 conjugate 投予液 (No.894 投予液)：在 6mL 之由實施例 2 所合成之 hTfRNo.894—vivotag750 conjugate 的 5mM 溶液中，添加 4.8μL 之二甲亞砜 (DMSO、Sigma-Aldrich 公司)，再添加 66μL 之 20% 羥丙基—β—環糊精溶液，並仔細混合。在此中，進一步添加 48μL 之聚乙二醇 400，將已混

合者作為 No.894 投予液。No.894 投予液中的 hTfRNo.894-FITC conjugate 濃度成為 250 $\mu$ M。

hTfRNo.894FLIP-vivotag750 conjugate 投予液(No.894NC 投予液):在 6 $\mu$ L 之前述的 hTfRNo.894FLIP-vivotag750 conjugate 的 5mM 溶液中,添加 66 $\mu$ L 之 20%羥丙基- $\beta$ -環糊精溶液並仔細混合。在此中,進一步添加 48 $\mu$ L 之聚乙二醇 400,將已混合者作為 No.894NC 投予液。No.894FLIP 投予液中的 hTfRNo.894FLIP-vivotag750conjugate 濃度成為 250 $\mu$ M。

#### 【0154】〔TfR-KI 小鼠的製作〕

遵循國際公開 WO2016-208695 的記載,製作標靶載體,其具有編碼細胞內區域為小鼠 hTfR 的胺基酸序列且細胞外區域為人類 hTfR 的胺基酸序列之嵌合體 hTfR 的 cDNA 的 3'側,具有配置被 loxP 序列夾住之新黴素耐性基因的鹼基序列之 DNA 片段、5'臂序列、3'臂序列。將所製作之標靶載體,藉由電穿孔法導入小鼠 ES 細胞。將基因導入後的小鼠 ES 細胞,在新黴素存在下進行選擇培養,選擇標靶載體藉由同質重組被併入染色體之小鼠 ES 細胞。將所得之基因重組小鼠 ES 細胞注入 ICR 小鼠的 8 細胞期胚(宿主胚),移植至藉由與已進行輸精管結紮的小鼠交配而得之假孕小鼠(受胚小鼠)。針對所得之胎鼠(嵌合體小鼠)進行毛色判定,篩選 ES 細胞有助於高效率地形成活體之個體,亦即白色毛佔全體毛之比例高的個體。將此嵌合體小鼠個體與 C57BL6/J 小鼠交配而獲得 F1 小鼠。篩選白色的 F1 小鼠,分析由尾組織所萃取之 DNA,將染色體上小鼠運鐵蛋白受體基因被異質取代成嵌合體 hTfR 之小鼠作為 TfR-KI 小鼠。

#### 【0155】〔使用 TfR-KI 小鼠之腦移行性評價試驗〕

接著,實施使用 TfR-KI 小鼠之腦移行性評價試驗。對於表現 hTfR 之 TfR-KI 小鼠(雌、12 週齡),將 No.894 投予液或 No.894NC 投予液各 100 $\mu$ L 地急速投予至尾靜脈內。在投予起 1 小時後,以異氟醚麻醉小鼠,由左心室灌流 4~5 分鐘生理食鹽水,進行放血處理。之後,採取量測螢光強度的組織(腦、心臟、肺、肝臟、脾臟、腎臟、大腿四頭肌、胸腺、胸椎、大腿骨),以不使其乾燥之方式保管在生理食鹽水中。使用 In vivo 發光-螢光成像系統 IVIS LuminaIII (PerkinElmer 公司)及螢光色素 VivoTag750 用的過濾器組,遵照操作說明書,量測螢光強度。

#### 【0156】〔使用 hTfR-KI 小鼠之腦移行性評價的結果〕

第 45 頁,共 169 頁(發明說明書)

將各組織中之螢光強度量測結果表示於圖 1、圖 1-2、圖 1-3 及圖 2。

圖中之“# 894”標記表示 hTfRNo.894 – vivotag750 conjugate 的投予組，“# 894FLIP”標記表示 hTfRNo.894FLIP – vivotag750 conjugate 投予組。此外，各照片的右側的柱 (bar) 表示平均放射效率 (Average Radiant Efficiency,  $[\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}] / [\mu\text{W/cm}^2]$ )。

圖 1-1 的 (1) Brain 表示腦的照片，(2) Liver (Left lateral lobe) 表示肝臟的外側左葉區域的照片，(3) Kidney 表示腎臟的照片，(4) Lung 表示肺的照片，(5) Thoracic vertebrae 表示胸椎的照片。色標針對 (1) 係表示最低值為  $5.00 \times 10^7$  且最大值為  $1.3 \times 10^8$ ，針對 (2) 及 (3) 係表示最低值為  $6.00 \times 10^8$  且最大值為  $2.4 \times 10^{10}$ ，針對 (3) 及 (4) 係表示最低值為  $4.5 \times 10^8$  且最大值為  $5.4 \times 10^9$ 。圖 1-2 的 (1) Heart 表示心臟的照片，(2) Spleen 表示脾臟的照片，(3) Thymus 表示胸腺的照片。此外，色標表示最低值為  $4.83 \times 10^7$  且最大值為  $4.8 \times 10^9$ 。

圖 1-3 的 (1) Quadriceps 表示大腿四頭肌的照片，(2) Femur 表示大腿骨的照片。此外，色標表示最低值為  $1.5 \times 10^8$  且最大值為  $1.5 \times 10^9$ 。圖 2 為圖 1-1 (1) 腦的放大照片。

由圖 1-1、1-2、1-3 及圖 2 可知，在 hTfRNo.894 – vivotag750 conjugate 投予組檢測到比 hTfRNo.894FLIP – vivotag750 conjugate 投予組更強的螢光之組織為腎臟、胸椎、心臟、大腿骨、大腿四頭肌及腦。在 hTfRNo.894FLIP – vivotag750 conjugate 投予組檢測到比 hTfRNo.894 – vivotag750 conjugate 投予組更強的螢光之組織為肝臟與脾臟。

**【0157】** 由兩投予組皆在腎臟檢測到最強的螢光且肝臟的螢光為次強可知，兩試驗物質主要係藉由腎、肝而被代謝、排泄。並且，在 No.894 投予組中可見胸椎、心臟、大腿骨、大腿四頭肌及腦的螢光比 No.894NC 投予組強。此等組織因 TfR 表現量較多，故兩者的組織分布差異被認為是起因於有無 hTfR 結合能力。

藉由本試驗，可確認到 hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 在 hTfR – KI 小鼠中透過與 TfR 結合而通過 BBB 並移行至腦內，以及移行至以肌肉組織為中心的各組織。

**【0158】** [實施例 6]

使用 hTfR 結合性特殊環狀肽－螢光標識探針複合體之小鼠腦內局部存在確認試驗

〔hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 與螢光物質 FITC 之複合體的製作〕

針對 hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 與螢光物質 FITC 之複合體，使用由實施例 3 所合成之 hTfRNo.894－PEG11，遵循 FITC 標識套組（同仁化學公司）的程序進行合成。並且，針對所合成之前述複合體，遵循實施例 2，確認由 SPR 所進行之與 hTfR 的結合能力後， $KD=0.28nM$ 。

【0159】〔單劑量實驗〕

與實施例 5 同樣地，將 hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 與螢光物質 FITC 之複合體投予至 hTfR－KI 小鼠。投予量成為  $3.7mg/kg$ 。

在投予起 1 小時後，以異氟醚麻醉小鼠，由左心室灌流 4~5 分鐘生理食鹽水，進行放血處理。之後，採取量測螢光強度之腦，以不使其乾燥之方式保管在生理食鹽水中。使用此腦組織，使用抗 FITC 抗體（MLB Bioscience 公司）進行免疫組織化學染色。腦組織中的抗 FITC 抗體的免疫組織化學染色係藉由眾所周知的方法進行，並藉由螢光顯微鏡進行觀察。將結果表示於圖 3。此外，圖中之紅箭號指向腦毛細血管，箭頭指向 Purkinje 氏細胞。（1）表示 #894－FITC 投予組的照片，（2）表示作為控制組而未投予 #894－FITC 的組別的照片。

【0160】〔多劑量實驗〕

每 10 分鐘投予  $3.7mg/kg$  的投予量，共計 6 次，除此之外，與前述單劑量同樣地將 hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 與螢光物質 FITC 之複合體投予至 hTfR－KI 小鼠，藉由免疫組織化學染色確認腦組織中的前述複合體的局部存在。將結果表示於圖 4。此外，圖中之紅箭號指向腦毛細血管，箭頭指向 Purkinje 氏細胞，黃箭號指向樹突。（1）表示 #894－FITC 投予組的照片，（2）表示作為控制組而未投予 #894－FITC 的組別的照片。

【0161】藉由本試驗，在任一劑量試驗中，皆確認到 hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 與螢光物質 FITC 之複合體通過 BBB 而被導入小腦內部。並且，在多劑量試驗結果中，可得知該複合體到達如 Purkinje 氏細胞般的神經元。

【0162】〔實施例 7〕

由 SPR 所進行之運鐵蛋白受體（hTfR）與 hTfRNo.894 的變異體肽、連結子加成肽及有效負載複合體之分子間相互作用評價試驗

## 〔hTfRNo.894 的變異體、連結子加成肽的合成〕

合成具有在 hTfRNo.894 的胺基酸序列中數個胺基酸被插入、缺失、取代的序列之肽（亦稱為變異體）及各種連結子所結合之肽，同樣地確認由 SPR 所進行之與 hTfR 的結合能力。變異體肽只要實施例 9 或 10 中未記載則是遵循實施例 1 進行合成。連結子加成肽在連結子為 PEG 之情形中，使用 Fmoc-NH-SAL-PEG resin（渡邊化學）作為肽合成的樹脂，除此之外，遵循實施例 1 進行合成。針對肽、脂肪酸、PEG 與其等的複合體的連結子所加成之肽，亦只要實施例 9 或 10 中未記載則是遵循實施例 1 進行合成。針對由其等的 SPR 量測所求得之 KD 值，KD 值小於 1nM 之情形標記為 A，1nM 以上且小於 100nM 之情形標記為 B，100nM 以上且小於 1 $\mu$ M 之情形標記為 C，1 $\mu$ M 以上之情形標記為 D，將結果表示於表 2~表 4。

表 2：肽或連結子加成肽

【0163】 [表2-1]

專利編號	名稱															序列	連結子	KD	ESI(m/z)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				
21	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2683.8	
22	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2698.8	
23	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2670.9	
24	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2712.9	
25	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2684.8	
26	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2656.8	
27	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.3	
28	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.5	
29	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.6	
30	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2359.4	
31	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.5	
32	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2303.5	
33	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2331.5	
34	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2331.3	
35	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.6	
36	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	aMeK	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.5	
37	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeBph	Cys	PEG4c	B	2391.6	
38	Ala	Val	MePhe	Val	W1Et	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.2	
39	Ala	Val	MePhe	Val	W1Pr	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2359.2	
40	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Hly	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.3	
41	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2331.5	
42	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeNal2	Cys	PEG4c	B	2365.5	
43	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2423.1	
44	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Om	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	A	2289.7	
45	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.6	
46	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MePhe	Cys	PEG4c	B	2315.7	
47	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Hly	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.3	
48	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTrp	Cys	PEG4c	B	2354.7	
49	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeoBph	Cys	PEG4c	B	2391.8	
50	Ala	Val	F2OMe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2347.2	

【0164】 [表2-2]

51	894_v4_PEG04c_3_Cha	Ala	Val	Cha	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2323.4
52	894_v04_PEG04_14_MeNal1	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeNal1	Cys	PEG4c	B	2365.5
53	894_v04_PEG04_14_MemBph	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MemBph	Cys	PEG4c	B	2391.8
54	894_Nal25_PEG8Me	Ala	Val	MePhe	Val	Nal2	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2420.1
55	894_v4_PEG04c_14_pHPeG	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	pHPeG	Cys	PEG4c	C	2331.5
56	894v1_PEG04_5_W1E17Cl	Ala	Val	MePhe	Val	W1E17Cl	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	C	2379.8
57	894_MeNal13_PEG8Me	Ala	Val	MeNal1	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2472.4
58	894_v04_PEG04_12_Cit	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Cit	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2332.3
59	894_v04_PEG04_11_Dap	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Dap	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2289.4
60	894_Nal25_F4COO114_PEG8Me	Ala	Val	MePhe	Val	Nal2	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2495.4
61	894_v1_PEG04_5_Yph	Ala	Val	MePhe	Val	Yph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2370.4
62	894_v04_PEG04_12_Dab	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Dab	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2275.4
63	894_v1_PEG04_5_MeNal2	Ala	Val	MePhe	Val	MeNal2	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2342.5
64	894_v1_PEG04_5_MemBph	Ala	Val	MePhe	Val	MemBph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2368.5
65	894_v04_PEG04_11_F4G	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	F4G	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2409.0
66	894_v04_PEG04_12_F4G	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2379.5
67	894_v1_PEG04_5_MeNal1	Ala	Val	MePhe	Val	MeNal1	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2342.5
68	894_MeNal13_F4G12_PEG8Me	Ala	Val	MeNal1	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	F4G	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2548.4
69	894_v04_PEG04_10_S	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2305.3
70	894_v04_PEG04_15Ame	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	aMeC	PEG4c	B	2345.5
71	894_v4_PEG04c_3_F2C	Ala	Val	F2C	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2351.6
72	894_v04_PEG04_11_Orn	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Orn	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2317.3
73	894_v04_PEG04_14Ame	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	aMeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.5
74	894_v04_PEG04_12_Dap	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Dap	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2261.3
75	894_v4_PEG04c_13_pHPeG	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	pHPeG	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.5
76	894_v04_PEG04_11_Dab	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Dab	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2303.4
77	894_v04_PEG04_1Ame	AlaIb	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	C	2345.5
78	894_v04_PEG04_9_L	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.2
79	894_MeNal13_F4G11_PEG8Me	Ala	Val	MeNal1	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	F4G	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	C	2548.4
80	894_v04_PEG04_6_Q	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2345.5

【0165】 [表2-3]

81	894_v04_PEG04_7_Na1	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Na1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2365.3
82	894_4xNa1_PEG8Me	Ala	Val	MeNa1	Val	MeNa12	Asn	Na1	Na1	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	D	2551.5
83	894_v4_PEG04c_1_P	Pro	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2357.6
84	894_v4_PEG04c_3_F4C	Ala	Val	F4C	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2351.6
85	894_v04_PEG04_10_P	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Pro	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2315.4
86	894_v04_PEG04_5Ame	Ala	Val	MePhe	Val	aMeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	B	2331.4
87	894_v1_PEG04_5_MeoBph	Ala	Val	MePhe	Val	MeoBph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG4c	D	2368.5
88	894v04_12Om_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Orn	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2797.0
89	894v04_11Hy_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Hly	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2853.0
90	894v04_11Om_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Orn	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2825.0
91	894v04_11Dap_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Dap	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2796.9
92	894v04_14MemBph_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MemBph	Cys	PEG12c	B	2899.1
93	894v04_7Na1_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Na1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2873.1
94	894v04_10P_PEG12_Azi	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Pro	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2822.9
95	894_v4_PEG08Me_5_dp	Ala	Val	MePhe	Val	dp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	D	2347.5
96	894_v4_PEG08Me_9_Tbg	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Tbg	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2450.6
97	894_v4_PEG08Me_10_Tbg	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Tbg	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG8Me	B	2450.7
98	894_3MeF4F	Ala	Val	MePhe4F	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2716.9
99	894_3MeF3C	Ala	Val	MePhe3C	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2733.3
100	894_3m_8F4OMe	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	F4OMe	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2713.0
101	894_3MeF3F	Ala	Val	MePhe3F	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2716.9
102	894_3m_13F	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Phe	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2681.4
103	894_v01_PEG12	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2698.8
104	894_3m_8W	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Trp	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2720.6
105	894_3MeF3OMe	Ala	Val	MePhe3OMe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2728.9
106	894_3m_12Y	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Tyr	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2704.4
107	894_3m_8F	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Phe	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2683.5
108	894_1m_3m	MeAla	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2712.8
109	894_3m_5F3C	Ala	Val	MePhe	Val	F3C	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2695.0
110	894_3m_2A	Ala	Ala	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2670.8

【0166】 [表2-4]

111	894_3m_1Abu	Alabu	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2712.9
112	894_3m_11m	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	MeAlarg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2711.5
113	894_3m_5F3OMe	Ala	Val	MePhe	Val	F3OMe	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	A	2689.9
114	894_3m_5F4C	Ala	Val	MePhe	Val	F4C	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2694.3
115	894_3m_10Y	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2748.8
116	894_3m_12cr	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	dr	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2699.5
117	894_3m_14A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Ala	Cys	PEG12c	B	2592.8
118	894_3m_5F4OMe	Ala	Val	MePhe	Val	F4OMe	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2690.6
119	894_3m_5F4F	Ala	Val	MePhe	Val	F4F	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2678.0
120	894_3m_8m	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	MeTyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2711.5
121	894_3m_11Y	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2706.5
122	894_3m_5F3F	Ala	Val	MePhe	Val	F3F	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2676.5
123	894_3m_13A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Ala	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2605.4
124	894_3m_14E	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Glu	Cys	PEG12c	C	2649.4
125	894_3m_7W	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Trp	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2722.7
126	894_3m_4G	Ala	Val	MePhe	Gly	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2657.5
127	894_3m_14R	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Arg	Cys	PEG12c	B	2676.5
128	894_3m_5Hph	Ala	Val	MePhe	Val	Hph	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2672.4
129	894_3m_10A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ala	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2656.8
130	894_3m_2Ahp	Ala	Alahp	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2726.9
131	894_3m_1G	Gly	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2684.8
132	894_3m_1S	Ser	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2714.8
133	894_3m_2F	Ala	Phe	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2746.8
134	894_3m_6D	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2698.4
135	894_3m_7F	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Phe	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2683.6
136	894_3m_4OMe	Ala	Val	MePheOMe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2729.1
137	894_3m_6A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2654.4
138	894_3m_1F	Phe	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2774.9
139	894_3m_8Ahp	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Alahp	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2662.8
140	894_3m_7A	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Ala	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2606.7
141	894_3m_4S	Ala	Val	MePhe	Ser	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2686.9
142	894_3m_7F4C	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	F4C	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2715.9
143	894_3m_7Ahp	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Alahp	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2661.4
144	894_3m_4A	Ala	Val	MePhe	Ala	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	C	2670.7
145	894_3m_7R	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Arg	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys	PEG12c	B	2690.4

[0167] [表 3-1]

專利 編號	名稱	序列																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
146	hTFR_000894_PEG11_(VivoTag)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
147	JCR_hTFR_000894_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
148	JCR_hTFR_000690_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Cys		
149	JCR_hTFR_000812_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeHis	Cys
150	JCR_hTFR_000895_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Arg	Ser	MeTyr	Cys
151	JCR_hTFR_100022_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Arg	Phe	Gly	Thr	Gly	Cys
152	JCR_hTFR_100025_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Arg	Asn	Val	pro	Asn	Cys
153	JCR_hTFR_000696_PEG11_K(FITC)	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	pro	Arg	MeTyr	Cys
154	JCR_hTFR_000809_PEG11_K(FITC)	Ala	Asn	Arg	Ile	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	pro	Arg	MeHis	Cys
155	JCR_hTFR_100014_PEG11_K(FITC)	Ala	Ser	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Asn	Arg	Trp	Ala	Cys
156	JCR_hTFR_100018_PEG11_K(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	PeG	Asn	Gly	Ser	Asn	Ser	Cys
157	JCR_hTFR_100017_PEG11_K(FITC)	Ala	Asn	Ser	Arg	Thr	Val	Trp	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Val	Thr	Arg	Cys
158	FLIP_000894_PEG11_K_FITC	Ala	MeTyr	Tyr	Arg	Arg	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Trp	Val	Phe	Val	Cys		
159	SP01_hTFR_894_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
160	SP15_hTFR_894_15(d)_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	dc		
161	SP16_hTFR_894_01(me)_FITC	MeAla	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
162	SP18_hTFR_894_03(me)_FITC	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
163	SP20_hTFR_894_05(me)_FITC	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
164	SP26_hTFR_894_11(me)_FITC	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	MeArg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
165	894_v00_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
166	894_v01_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
167	894_v02_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
168	894_v03_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
169	894_v04_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		
170	894_v04_PEG4_C_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys		

專利 編號	專利 連結子 編號	有效負載	KD	ESI (m/z)
146	PEG12	K(VivoTag)	B	3679.2
147	PEG11	K(FITC)	A	3172.8
148	PEG11	K(FITC)	B	3093.0
149	PEG11	K(FITC)	B	3331.4
150	PEG11	K(FITC)	B	3357.4
151	PEG11	K(FITC)	A	3142.2
152	PEG11	K(FITC)	A	3142.2
153	PEG11	K(FITC)	B	3332.5
154	PEG11	K(FITC)	B	3306.4
155	PEG11	K(FITC)	B	3204.3
156	PEG11	K(FITC)	B	3250.2
157	PEG11	K(FITC)	B	3259.1
158	PEG11	K(FITC)	No Bind	3171.3
159	PEG4c	Dap(FITC)	B	4163.6
160	PEG4c	Dap(FITC)	B	4163.6
161	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.3
162	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.8
163	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.8
164	PEG4c	Dap(FITC)	B	2789.8
165	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3215.6
166	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3229.5
167	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3201.4
168	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3243.3
169	PEG12c	dc(MalFITC)	B	3215.6
170	PEG4c	dc(MalFITC)	B	2862.9

【0168】 [表 3-2]

171	894_v06_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
172	894_v07_PEG12_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
173	894_v07_PEG4_C_Mal(FITC)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
174	894v04_12Om_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Om	Tyr	MeTyr	Cys
175	894v04_11Hly_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Hly	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
176	894v04_11Om_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Om	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
177	894v04_11Dap_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Dap	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
178	894v04_14MemBph_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MemBph	Cys
179	894v04_7Nal1_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Nal1	Tyr	Ile	Ile	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
180	894v04_10P_PEG12_Mal(FITC)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	pro	Lys	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
181	894_3m_PEG4_PEG4_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
182	894_3m_PEG4_PEG4_PEG4_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
183	894_3_5m_PEG12_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
184	894_3_5m_PEG04_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
185	894_3_5m_PEG08_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
186	894_3m_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
187	894_3m_GGGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
188	894_3m_G_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
189	894_3m_G2SGSGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
190	894_3m_GSGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
191	894_3m_GSGES_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
192	894_3m_GGEGES_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
193	894_3m_GGSS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
194	894_3m_GGS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
195	894_3m_GG_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
196	894_3m_G2SGG2SGS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	Trp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
197	894_5m_GSSGSS_K(Mal)	Ala	Val	Phe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
198	894_3m_5m_GGRGRS_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
199	894_3m_5m_GGRSES_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys
200	894_3_5m_G4S2_K(Mal)	Ala	Val	MePhe	Val	MeTrp	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	MeTyr	Cys



【0169】 [表4-1]

專利 編號	名稱	序列														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
203	109_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	S	C			
204	JCR_hTfR_100003_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	H	C			
205	36_A_hgl_CycloAmide	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	S	Hgl			
206	100019_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	V	P	R	E	C	
207	887_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	V	P	R	N	C	
208	JCR_hTfR_000837_PEG11_K(FI TC)	A	V	W	V	W	N	Y	F	I	I	P	R	H	C	
209	JCR_hTfR_000692_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	D	C	
210	JCR_hTfR_100016_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	MeW	C	
211	JCR_hTfR_100019_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	E	C	
212	JCR_hTfR_000687_PEG11_K(FI TC)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	V	P	R	N	C	
213	894_variant_08	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
214	894_variant_09	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
215	894_variant_19	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
216	894_variant_24	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	da	F	MeY	C
217	894_variant_17	E	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
218	hTfR_894_E1_PEG12_(Hydrazide )	E	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
219	JCR_hTfR_000894_E2	A	E	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
220	894_variant_142	A	E	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	KCOlpipzaa	MeY	C
221	894_variant_156	A	E	MeF	V	W	N	Y	Y	I	KCOlpipzaa	R	R	Y	MeY	C
222	894_v164_K(Mal)	A	E	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
223	894_variant_178	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
224	894_variant_178_GKN3	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
225	894_variant_28	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A	K	F	MeY	C
226	894_variant_29	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A	dr	F	MeY	C
227	894_variant_1	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	D	R	F	R	C
228	894_variant_30	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
229	894_variant_170	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
230	894_variant_172	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C

專利 編號	連結子					有效負載	KD	ESI (m/z)
203							B	1625.1
204	PEG11	K				FITC	C	2641.5
205							C	1500.4
206							B	1906.1
207							B	1891.5
208	PEG11	K				FITC	B	2932.0
209	PEG11	K				FITC	B	2872.9
210	PEG11	K				FITC	B	2958.1
211	PEG11	K				FITC	B	2887.1
212	PEG11	K				FITC	B	2871.8
213							B	2130.6
214							B	2158.6
215							B	2159.0
216							D	2073.4
217							B	2202.4
218	PEG12	Hydrazide					B	2755.4
219							B	2114.0
220	de						D	2392.3
221	de						D	2442.4
222	G	G	S	G	S	G	B	2910.5
223	G	G	G	G	S	S	B	2696.1
224	G	KN3					B	2401.6
225							B	2061.7
226							C	2089.8
227							B	2112.8
228							B	2146.9
229	G	G	G	G	S	S	B	2651.9
230	de	G	G	G	S	S	B	2724.3

【0170】 [表4-2]

231	894_variant_180	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	E	F	MeY	C
232	894_variant_180_GKN3	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	E	F	MeY	C
233	894_variant_16	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
234	894_variant_159	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
235	894_variant_171	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
236	894_variant_158	A	D	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
237	JCR_hTIR_000894_R2	A	R	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
238	JCR_hTIR_000894_K2	A	K	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
239	894_variant_160	A	Dap	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
240	894_variant_78	A	E(PEG8Me)	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
241	894_variant_85	A	E(de)	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
242	894_variant_90	A	Har	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
243	894_variant_32	A	Abu	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
244	894_variant_33	A	Nva	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
245	894_variant_35	A	Acpr	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
246	894_variant_36	A	Atb	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
247	JCR_hTIR_000894_E10	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	E	R	R	Y	MeY	C
248	JCR_hTIR_000894_R10	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	R	R	R	Y	MeY	C
249	JCR_hTIR_000894_K10	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	K	R	R	Y	MeY	C
250	JCR_hTIR_000894_Ahp10	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	Ahp	R	R	Y	MeY	C
251	JCR_hTIR_000894_E11_Re180111	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	E	R	Y	MeY	C
252	JCR_hTIR_000894_E11A12	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	E	A	Y	MeY	C
253	JCR_hTIR_000894_A11	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	A	R	Y	MeY	C
254	JCR_hTIR_000894_11MeK	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	MeK	R	Y	MeY	C
255	JCR_hTIR_000894_K11	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
256	JCR_hTIR_000894_A12	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	A	Y	MeY	C
257	JCR_hTIR_000894_E12_Re180111	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	E	Y	MeY	C
258	JCR_hTIR_000894_K12	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	K	Y	MeY	C
259	JCR_hTIR_000894_E13	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	E	MeY	C
260	JCR_hTIR_000894_R13	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	R	MeY	C

231	G	G	G	G	G	G	S	S	S	C	B	2653.1
232	G	KN3									B	2358.7
233											A	2174.5
234	G	G	G	G	G	G	S	S	S	C	B	2680.1
235	de	G	G	G	G	G	S	S	S	C	C	2752.0
236	G	G	G	G	G	G	S	S	S	C	C	2666.2
237											B	2141.2
238											B	2113.2
239	G	G	G	G	G	G	S	S	S	C	B	2637.1
240											B	2539.9
241											B	2304.0
242											B	2215.5
243	PEG4c										B	2378.2
244	PEG4c										B	2392.2
245	PEG4c										B	2403.7
246	PEG4c										B	2419.8
247											B	2100.1
248											B	2127.1
249											A	2099.2
250											B	2098.2
251											B	2057.2
252											C	1971.8
253											B	1999.1
254											B	2069.8
255											A	2056.2
256											B	1999.1
257											B	2057.1
258											B	2056.1
259											B	2050.0
260											B	2077.1

【0171】 [表4-3]

261	JCR_hTRR_000894_K13	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	R	R	K	MeY	C
262	894_v157_K(Mal)	A	V	F	V	W	N	N	Y	Y	I	I	R	R	F	Y	C
263	894_5m	A	V	F	V	MeW	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
264	894_5m_PEG04	A	V	F	V	MeW	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
265	894_variant_129	A	V	F3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
266	894_3m-4.9Chg-PEG12	A	V	MeF	Chg	W	N	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
267	894_3m-4.9Chg	A	V	MeF	Chg	W	N	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
268	894_3m_5W5CI	A	V	MeF	V	W5C	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
269	894_3m_5W5F	A	V	MeF	V	W5F	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
270	894_3m_5W6F	A	V	MeF	V	W6F	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
271	894_3m_5W1EtOH	A	V	MeF	V	W1EtOH	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
272	894 var.187	A	V	MeF	V	W5C	N	N	Y	Y	I	I	R	KCOpipzaa	KCOpipzaa	MeY	C
273	894 var.188	A	V	MeF	V	W5C	N	N	Y	Y	I	I	E(PEG8Me)	KCOpipzaa	KCOpipzaa	MeY	C
274	894_3m_6H	A	V	MeF	V	W	H	H	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
275	894_3m_6Ndm	A	V	MeF	V	W	Ndm	Ndm	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
276	894_3m_7Ahp_GKN3	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	F4C	I	I	R	R	Y	MeY	C
277	894_3m_7F4C_GKN3	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Ahp	I	I	R	R	Y	MeY	C
278	894_variant_147	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	4Py	I	I	R	R	4Py	MeY	C
279	894_variant_148	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	4Py	I	KCOpipzaa	R	R	4Py	MeY	C
280	894_variant_149	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	4Py	I	KCOpipzaa	R	R	KCOpipzaa	MeY	C
281	894_variant_150	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	4Py	I	KCOpipzaa	KCOpipzaa	R	4Py	MeY	C
282	894_3m-9Chg	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
283	894_3m-9Chg-PEG12	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	Chg	I	R	R	Y	MeY	C
284	894_variant_141	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	KCOpipzaa	R	R	KCOpipzaa	MeY	C
285	894_variant_143	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	KCOpipzaa	KCOpipzaa	R	Y	MeY	C
286	894_variant_144	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	KCOpipzaa	R	R	Y	MeY	C
287	894_variant_145	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	KCOpipzaa	R	R	KCOpipzaa	MeY	C
288	894_variant_146	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	E	R	R	KCOpipzaa	MeY	C
289	894_variant_153	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	E	KCOpipzaa	Y	Y	MeY	C
290	894_variant_92_PEG04	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	Alb	KCOpipzMe	Y	Y	MeY	C



【0172】 [表 4-4]

291	894_variant_097	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	A	R	Y	MeY	C
292	JCR_hTR_000894_3MeF_11Me_K	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	MeK	R	Y	MeY	C
293	JCR_hTR_000894_3MeF_11K	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
294	894_variant_154	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	KCOpipzaa	KCOpipzaa	MeY	C
295	894_variant_155	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	E	KCOpipzaa	MeY	C
296	894_v01	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
297	894_3m_G_Azi_Re200923	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
298	894_3m_MeG3	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
299	894_v03	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
300	JCR_hTR_000894_3MeF_5meW_11K	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
301	894_variant_128	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
302	894_variant_045	A	V	MeF35dC	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
303	894_variant_122	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
304	894_variant_123	A	V	MeF3C	V	W1mCON	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
305	894_variant_124	A	V	MeF3C	V	W1EtOH	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
306	894_variant_052	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
307	894_variant_10	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	D	K	F	MeY	C
308	894 var.189	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	E(PEG3Me)	KCOpipzaa	KCOpipzaa	MeY	C
309	894 var.186	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	Y	I	I	R	KCOpipzaa	KCOpipzaa	MeY	C
310	894_variant_130	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
311	894_v158_K(Mal)	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
312	894_v159_K(Mal)	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
313	894_v160_KN3	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C
314	894_v161_KN3	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
315	894_variant_046	A	V	MeF3C	V	MeW	N	3Py6NH2	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
316	894_variant_057	A	V	MeF3C	V	MeW	N	4Py2NH2	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
317	894_variant_058	A	V	MeF3C	V	MeW	N	F3H	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
318	894_variant_047	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F34dOMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
319	894_variant_048	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OEt	I	I	R	dr	F	MeY	C
320	894_variant_049	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aaO	I	I	R	dr	F	MeY	C

291	de			B	2142.4
292				B	2083.8
293				B	2069.7
294	de			B	2505.5
295	de			C	2335.3
296				B	2098.4
297	G	KN3		B	2309.3
298	MeG	MeG	MeG	B	2311.6
299				B	2112.5
300				B	2084.2
301	PEG4c			B	2286.5
302				B	2165.3
303				B	2117.8
304				C	2116.7
305				C	2103.8
306				B	2189.0
307				B	2047.8
308	de			B	2878.3
309	de			B	2538.9
310	PEG4c			D	2307.5
311	G	G	S	G	K(Maleimide) C
312	G	G	S	G	K(Maleimide) C
313	G	G	S	G	KN3
314	G	G	S	G	KN3
315				B	2144.5
316				B	2144.6
317				B	2144.5
318				B	2175.0
319				B	2158.5
320				B	2188.9

【0173】 [表 4-5]

321	894_variant_050	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Yae	I	I	R	dr	F	MeY	C
322	894_variant_131	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
323	894_variant_125	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	3y6OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
324	894_variant_126	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4aac	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
325	894_variant_37	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Abu	R	dr	F	MeY	C
326	894_variant_38	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Nva	R	dr	F	MeY	C
327	894_variant_39	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Tbg	R	dr	F	MeY	C
328	894_variant_40	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Acpr	R	dr	F	MeY	C
329	894_variant_41	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Ab	R	dr	F	MeY	C
330	894_variant_42	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	all	R	dr	F	MeY	C
331	894_variant_43	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	T	R	dr	F	MeY	C
332	894_variant_44	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	alT	R	dr	F	MeY	C
333	894_variant_71	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Alb	R	dr	F	MeY	C
334	894_variant_72	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Nle	R	dr	F	MeY	C
335	894_variant_73	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Ahp	R	dr	F	MeY	C
336	894_variant_74	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Dap	R	dr	F	MeY	C
337	894_variant_75	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Dab	R	dr	F	MeY	C
338	894_variant_76	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	dorn	R	dr	F	MeY	C
339	894_variant_77	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Hly	R	dr	F	MeY	C
340	894_variant_161_GKN3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
341	894_variant_164	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Hly	R	dr	F	MeY	C
342	894_variant_161	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E	R	dr	F	MeY	C
343	894_variant_162	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	Dap	R	dr	F	MeY	C
344	894_variant_163	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	K	R	dr	F	MeY	C
345	894_variant_79	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E(PEG8Me)	R	dr	F	MeY	C
346	894_variant_83	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E(e-Medk)	R	dr	F	MeY	C
347	894_variant_86	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	E(de)	R	dr	F	MeY	C
348	894_variant_165	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	E	dr	F	MeY	C
349	894_variant_100	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A	dr	F	MeY	C
350	894_variant_099_PEG4	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	KAc	F	MeY	C



【0174】 [表 4-6]

351	894_variant_132	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	R	F	MeY	C
352	894_variant_133	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	Y	C
353	894_variant_120	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
354	894_variant_61	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
355	894_variant_134	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
356	894_variant_135	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
357	894_variant_136	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
358	894_variant_61_G4S2C	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
359	894_variant_62	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Abu	dr	F	MeY	C
360	894_variant_63	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Nva	dr	F	MeY	C
361	894_variant_64	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Nle	dr	F	MeY	C
362	894_variant_65	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Ahp	dr	F	MeY	C
363	894_variant_80	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	E(PEG8Me)	dr	F	MeY	C
364	894_variant_121	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	A1Me4pip	dr	F	MeY	C
365	894_variant_66	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Dap	dr	F	MeY	C
366	894_variant_67	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Dab	dr	F	MeY	C
367	894_variant_166	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Dap	dr	F	MeY	C
368	894_variant_68	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	dojn	dr	F	MeY	C
369	894_variant_69	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
370	894_variant_168	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
371	894_variant_04	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
372	894_variant_23	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	da	F	MeY	C
373	894_variant_18	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
374	894_variant_18_PEG4	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
375	894_v163_KN3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
376	894_variant_167	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C
377	894_variant_21	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeK	dr	F	MeY	C
378	894_variant_26	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeK	da	F	MeY	C
379	894_variant_01	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	aMeK	R	F	MeY	C
380	894_variant_70	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	aMeK	dr	F	MeY	C



【0175】 [表 4-7]

381	894_variant_02	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	R	F	MeY	C
382	894_variant_20	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
383	894_variant_25	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	da	F	MeY	C
384	894_variant_81	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	E(PEG8Me)	F	MeY	C
385	894_variant_88	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	E(de)	F	MeY	C
386	894_variant_06	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
387	894_variant_14	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
388	894_variant_15	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
389	894_variant_82	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	E(PEG8Me)	MeY	C
390	894_variant_84	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	E(e-Medk)	MeY	C
391	894_variant_89	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	E(de)	MeY	C
392	894_variant_051	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F4C	MeY	C
393	894_variant_053	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3C	MeY	C
394	894_variant_054	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3OMe	MeY	C
395	894_variant_056	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F3H	MeY	C
396	894_variant_22	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	dc
397	894_variant_03	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
398	894_variant_03_PEG4	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
399	894_variant_03_MeG3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
400	894_variant_31	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
401	894_variant_03_G4S2C	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
402	894_variant_173	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
403	894_variant_175	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
404	894_variant_177	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
405	894_variant_03_G_Azl_Re200923	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
406	894_v162_KN3	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C
407	894_variant_169	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C
408	894_A_hgl_CycloAmide	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	Hgl
409	894_Bicycle_001	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
410	894_Bicycle_002	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	Hly	R	Y	MeY	C

381						B	2159.0
382						B	2158.8
383						C	2073.4
384						A	2483.3
385						B	2246.9
386						B	2144.7
387	de	-OH				B	2274.5
388	Bph					D	2367.7
389						A	2491.8
390						B	2268.7
391						B	2255.5
392						B	2179.4
393						B	2179.4
394						B	2175.0
395						B	2160.4
396						B	2144.5
397						B	2144.9
398	PEG4c					B	2392.2
399	MeG	MeG	MeG	MeG		B	2358.1
400	PEG4c					B	2391.7
401	G	G	G	G	S	B	2650.2
402	de	G	G	S	S	B	2722.3
403	G	de	G	S	S	B	2794.3
404	G	de	G	dk	S	B	2793.4
405	G	KN3				B	2356.1
406	G	G	S	G	S	B	2673.3
407	G	G	G	S	S	B	2622.0
408						B	2066.0
409						B	2144.6
410						B	2158.6

【0176】 [表4-8]

411	894_Bicycle_003	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	Hly	R	Y	MeY	C
412	894_Bicycle_004	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
413	894_Bicycle_005	A	V	Epyr2RCOO	V	MeW	N	Y	K	I	I	R	R	Y	MeY	C
414	894_Bicycle_006	A	V	Dpyr2RCOO	V	MeW	N	Y	K	I	I	R	R	Y	MeY	C
415	894_Bicycle_007	A	V	E	V	MeW	N	Y	Orn	I	I	R	R	Y	MeY	C
416	894_Bicycle_009	A	Epyr2RCOO	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
417	894_Bicycle_010	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I	I	KaAc	R	Y	MeY	C
418	894_Bicycle_011	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
419	894_bicycle_012	A	Hgl	MeF3C	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	Hly	dr	F	MeY	C
420	894_v01_PEG12	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
421	894_3m_G	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
422	894_3m_GLinker1(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
423	894_3m_GLinker2(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
424	894_3m_GLinker4(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
425	894_3m_GLinker5(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
426	894_3m_GLinker7(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
427	894_3m_GLinker8(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
428	894_3m_GLinker9(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
429	894_3m_GLinker10(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
430	894_3m_GLinker11(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
431	894_3m_GLinker12(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
432	894_3m_GLinker13(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
433	894_3m_GLinker14(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
434	894_3m_GLinker15(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
435	894_3m_GLinker16(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
436	894_3m_GLinker17(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
437	894_3m_GLinker18(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
438	894_3m_GLinker19(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
439	894_3m_GLinker20(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
440	894_3m_GLinker21(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
441	894_3m_GLinker22(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
442	894_3m_GLinker23(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
443	894_3m_G4S2C(AcNMe)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
444	894_var.184	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
445	894_var.185	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
446	894_3m_PEG4_KFITC	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
447	894_variant61_PEG4_KFITC	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Alb	dr	F	MeY	C
448	894_variant03_PEG4_KFITC	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
449	Flip_894_v61_PEG4_KFITC	A	MeY	F	dr	Alb	I	Y	F4OMe	Y	N	MeW	V	MeF3C	V	C



【0177】 [表 4-9]

專利 編號	名稱	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
450	894_variant_101	A	V	Me3Py	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
451	894_variant_102	A	V	Me4Py	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
452	894_variant_103	A	V	MeF3COO	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
453	894_variant_104	A	V	MeF3C	V	W1mCON	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
454	894_variant_105	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	3Py	I	I	R	dr	F	MeY	C
455	894_variant_106	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	4Py	I	I	R	dr	F	MeY	C
456	894_variant_107	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	3Imp	I	I	R	dr	F	MeY	C
457	894_variant_108	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F3CON	I	I	R	dr	F	MeY	C
458	894_variant_109	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F3COO	I	I	R	dr	F	MeY	C
459	894_variant_110	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	4Py	MeY	C
460	894_variant_111	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	3Py	MeY	C
461	894_variant_112	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F3COO	MeY	C
462	894_variant_113	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F3CON	MeY	C
463	894_variant_114	A	V	MeF3C	V	W40Me	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
464	894_variant_115	A	V	MeF3C	V	W5C	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
465	894_variant_116	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4C	I	I	R	dr	F	MeY	C
466	894_variant_117	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F3C	I	I	R	dr	F	MeY	C
467	894_variant_118	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4F	I	I	R	dr	F	MeY	C
468	894_variant_119	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4F	I	I	R	dr	F	MeY	C
469	894_variant_204	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	Alb	R	Y	MeY	C
470	894_variant_205	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F40Me	I	E	K	R	F	MeY	C
471	894_variant_206	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F40Me	I	E	R	R	F	MeY	C
472	894_variant_207	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	Y	F40Me	I	E	R	dr	F	MeY	C
473	894_variant_211	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	E	R	dr	Y	MeY	C
474	894_0250	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY	C
475	894_0251	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F40Me	I	I	R	R	F	MeY	C
476	894_0252	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
477	894_0253	A	V	MeF	V	W5C	N	Y	F40Me	I	I	R	dr	F	MeY	C
478	894_0254	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	R	F	MeY	C
479	894_0255	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F40Me	I	I	R	R	F	MeY	C
480	894_0256	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C

Patent ID	Linker	KD	ESI (m/z)
450		B	1055.70
451		C	1055.68
452		C	1077.04
453		B	1093.97
454		B	1057.93
455		B	1057.90
456		B	1077.45
457		B	1078.94
458		B	1079.45
459		B	1072.92
460		B	1072.41
461		B	1093.91
462		B	1093.81
463		B	1080.43
464		D	1081.95
465		C	1074.87
466		B	1074.64
467		B	1066.43
468		B	1066.39
469		B	1042.60
470	de	B	1152.87
471	de	B	1166.84
472	de	B	1166.84
473	de	C	1150.64
474	PEG4c	A	1181.91
475	PEG4c	A	1188.93

【0178】 [表 4-10]

481	894_0257	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
482	894_0258	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
483	894_0259	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
484	894_0260	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	R	dr	F	MeY	C
485	894_0261	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
486	894_0262	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	dr	F	MeY	C
487	894_0263	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	K(MePEG4c)	R	F	MeY	C
488	894_0264	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	K(MePEG4c)	F	MeY	C
489	894_0267	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	Y	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
490	894_0268	A	V	MeF4F	V	W5C	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
491	894_0269	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K(MePEG4c)	dr	F	MeY	C
492	894_0270	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K(MePEG4c)	dr	F	MeY	C
493	894_0271	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	Y	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
494	894_0272	A	V	MeF4F	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	MeR	K(MePEG4c)	F	MeY	C
495	894_0273_GLinker4	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
496	894_0274_GLinker4	A	V	MeF	V	W	N	Y	F4aa	I	I	R	R	Y	MeY	C
497	894_0275_GLinker4	A	V	MeF	V	W1aa	N	Y	F4aa	I	I	R	R	Y	MeY	C
498	894_3m_G_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
499	894_3m_G_short_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
500	894_3m_G_middle_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
501	894_3m_G_long_Azi	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
502	894_0280	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	R	R	F	MeY	C
503	894_0281	A	V	MeF3C	V	W	N	Y	F4OMe	I	I	K	R	F	MeY	C
504	894_3m_GLinker24	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
505	894_3m_GLinker25	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
506	894_3m_Link01_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
507	894_3m_Link02_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
508	894_3m_Link03_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
509	894_3m_Link04_dk(Mal)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
510	894_v03_Link01_dk(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C



【0179】 [表4-11]

511	894_v03_Linked02_ck(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
512	894_v03_Linked03_ck(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
513	894_v03_Linked04_ck(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
514	894_v03_Linked04_ck(Mal)	A	V	MeF3C	V	MeW	N	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C
515	894_variant_201	A	V	MeF	V	W1aa	N	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C
516	894_variant_202	A	V	MeF	V	W1aa	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
517	894_variant_203	A	V	MeF	V	W1aa	N	N	Y	Y	I	I	R	dr	Y	MeY	C
518	894_variant_208	A	V	MeF3C	V	W1aa	N	N	Y	F4OMe	I	E	Alb	R	F	MeY	C
519	894_variant_209	A	V	MeF	V	W1aa	N	N	Y	Y	I	E	K	R	Y	MeY	C
520	894_variant_212	A	V	MeF	V	W1aa	N	N	Y	Y	I	E	Alb	R	Y	MeY	C
521	894_variant_214	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Yee	I	I	K	R	F	MeY	C
522	894_variant_215	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Yee	I	I	R	R	F	MeY	C
523	894_variant_216	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Yee	I	I	R	dr	F	MeY	C
524	894_variant_217	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Yee	I	I	Alb	R	F	MeY	C
525	894_variant_218	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C
526	894_variant_219	A	V	MeF	V	W	N	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C

511	G	G	G	S	G	S	S	S	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	dk(Maleimide)	B	1080.24
512	G	G	G	de	G	de	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	dk(Maleimide)	B	993.16
513	G	G	G	de	G	de	G	G	G	G	de	G	G	G	G	G	G	G	dk(Maleimide)	B	1112.35
514	G	G	G	de	G	de	G	G	G	G	de	G	G	G	G	G	G	G	dk(Maleimide)	B	1112.35
515																				B	1064.11
516																				B	1078.11
517																				B	1078.10
518	de																			B	1131.34
519	de																			C	1136.58
520	de																			C	1150.64
521																				B	1048.60
522																				C	1062.64
523																				C	1062.64
524																				C	1027.09
525	G	K																		B	761.42
526	G	K																		B	1127.65

【0180】 由結果可知，針對 hTfRNo.894 及其胺基酸序列中數個胺基酸被插入、缺失、取代之序列及各種連結子所結合之肽，顯示具有與 hTfR 的結合能力。

【0181】 [實施例 8]

[細胞培養]

在人類乳癌細胞 BT-549 (COSMO BIO 公司) 的培養中, 使用包含 10% FBS 及 2mmol/L L-Glutamine 之 RPMI-1640 培養基 (Thermo Fisher Scientific)。培養係在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 條件下進行。

**【0182】** [細胞的播種]

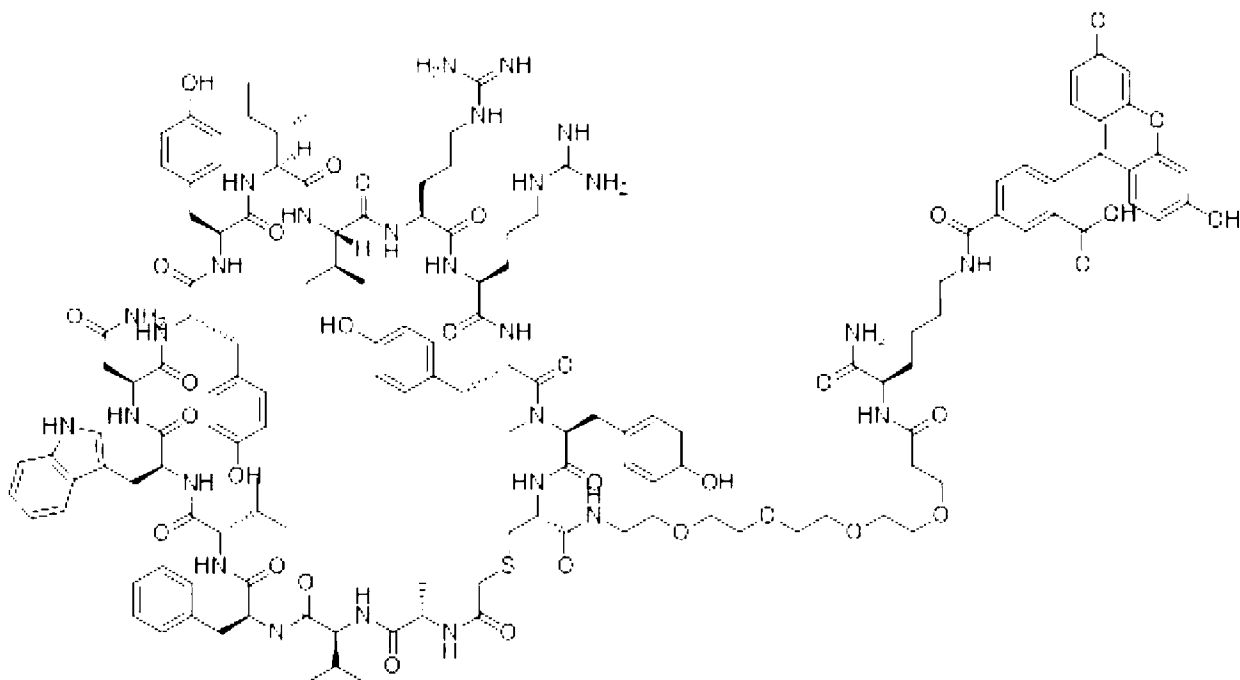
利用 20mmol/L 乙酸, 將 Collagen Type I (康寧公司) 以成為 50µg/mL 之方式進行稀釋。在 24 孔盤的各孔中各放置 1 片已滅菌的蓋玻片, 添加已稀釋之 Collagen Type I 溶液後, 在 37°C 保溫 1 小時。去除 Collagen Type I 溶液, 以 PBS 清洗 3 次。每 1 孔播種 1×10<sup>5</sup> 個人類乳癌細胞 BT-549, 在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 條件下培養一晚。

**【0183】** [各種肽複合體的合成]

hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4dk5FAM (序列識別號 446)、hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4dk5FAM (序列識別號 448)、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM (序列識別號 447) 及作為負控制組而將 Flip894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FA (序列識別號 449) M 使用作為試料。

**【0184】** hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4dk5FAM 的合成

[化 3]



【0185】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.53g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 以下述作為基本條件: 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure=4.2eq/4eq/8eq, 在 75°C 下使其反應 10 分鐘。但是, 第 2 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次反應。第 13 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 25°C 下, 進行 20 分鐘反應。去 Fmoc 化係以下述作為基本條件: 與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下, 使其反應 3 分鐘。但是第 2 個殘基、第 13 個殘基的 Fmoc 基的去除係藉由在 25°C 下進行 5 分鐘反應後, 使其反應 10 分鐘而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 將 10eq 之氯乙酸、10eq 之 DIPC1、10eq 之

HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM / DMF 溶液，添加固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，在氯乙醯基導入步驟後，將所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次、以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA / H<sub>2</sub>O / TIS / DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚 / 己烷 (1 / 1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 5 等量之三乙胺，在室溫振盪約 14 小時。將由 1.1eq 之 5-FAM (Funakoshi)、1.2eq 之 EDC、1.2eq 之 HOSu 調整後之 F-FAM-NHS 添加至反應溶液，在室溫攪拌 3 小時。使用 Savant Explorer SpeedVaC 將所得之反應溶液進行減壓濃縮。

所得之粗中間體肽係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m $\mu$ m OBD (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 9-34%, 之後耗費 8 分鐘 34-39%, 之後耗費 1 分鐘 39-60%; 流量: 120mL/min)。冷凍乾燥後，使用以下的條件進行再度精製 (管柱: COSMOSIL PBr 10x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 21-46%, 之後耗費 8 分鐘 46-51%, 之後耗費 1 分鐘 51-60%; 流量: 5mL/min)。

**【0186】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 95.3%。

分析條件 B: 保持時間=4.47 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20-60%, 之後耗費 0.3 分鐘 60-95%, 之後耗費 1.6 分鐘 95%; 流量: 0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值 m/z=944.42 (M+3H)<sup>3+</sup>。

第 81 頁，共 169 頁 (發明說明書)

[0139]hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4dk5FAM、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM 及作為負控制組之 Flip894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM 的合成

對於與 hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4dk5FAM 同樣地合成、環化之 hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4、hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4 及 Flip894\_\_variant61\_\_PEG4，同樣地添加由 5-FAM 所調整之 F-FAM-NHS，獲得前述的複合體。

此外，針對所合成之各種複合體，與實施例 2 同樣地利用 SPR 確認與 hTfR 的結合。僅 Flip894\_\_variant91\_\_PEG4 未確認到與 hTfR 的結合。

**【0187】**〔試料溶液的製備及往細胞的添加〕

在試料的稀釋中，使用稀釋用培養基(包含 0.5%牛血清白蛋白及 20 $\mu$ g/mL 人類運鐵蛋白全型之 RPMI 1640 培養基)。以稀釋用培養基將試料稀釋成 100nmol/L。

確認在 24 孔盤中已一晚培養之細胞 BT-549 與蓋玻片接著後，以 RPMI 1640 培養基清洗 2 次。以 500 $\mu$ L/well 添加包含 0.5%牛血清白蛋白之 RPMI 1640 培養基，在冰上靜置 15 分鐘後，以 500 $\mu$ L/well 添加已稀釋之試料溶液，在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 條件下靜置 3 小時。

**【0188】**〔細胞的固定、核染色、封片〕

從 24 孔盤去除試料溶液，以 PBS 將細胞 BT-549 清洗 3 次。以 500 $\mu$ L/well 添加 4%多聚甲醛磷酸緩衝液(富士薄膜和光純藥公司)，在室溫靜置 15 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次。再者，以 500 $\mu$ L/well 添加已以 PBS 稀釋成 2 $\mu$ g/mL 之赫斯特 33342 (Hoechst 33342) (Thermo Fisher Scientific)，在室溫、遮光下靜置 10 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次。從 24 孔盤取出蓋玻片，使用 Fluorescent Mounting Medium (Agilent 公司)，在載玻片上進行封片，在室溫、遮光下靜置一晚。觀察係使用倒立型螢光顯微鏡 DMI6000B (Leica Microsystems 公司)，以 FITC 及 DAPI 檢測用的波長進行觀察。將結果表示於圖 5。此外，圖中的線狀比例尺表示 50 $\mu$ m。

如由圖 5 可確認般，hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4dk5FAM、hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4dk5FAM、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM 雖確認到往細胞內的移行，但具有無與 hTfR 的結合能力的肽之 Flip894\_\_variant91\_\_PEG4 不會往細胞

內移行。由此結果可知，hTfR\_\_894 及具有與 hTfR 的結合能力之變異體，顯示會透過與 hTfR 的結合而移行至細胞內。

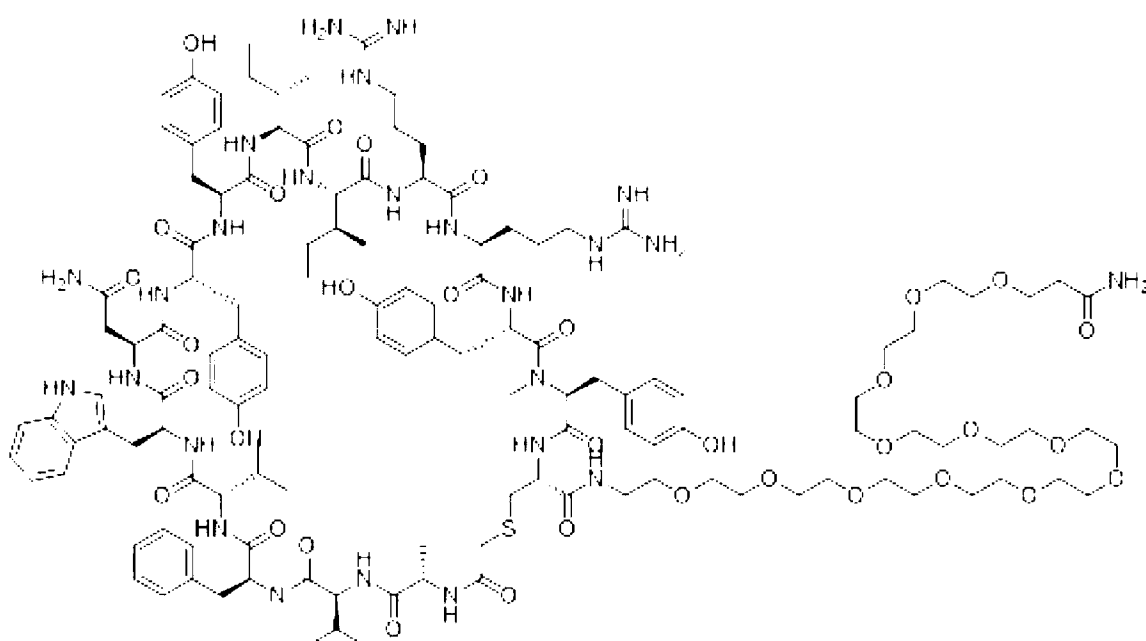
**【0189】 [實施例 9]**

合成以下的肽或連結子加成肽。

**【0190】 [實施例 9-1]**

894\_\_v01\_\_PEG12 (序列識別號 102) 的合成

[化 4]



**【0191】** 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.52mmol/g, 0.19g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 Biotage 公司的 SyroI 作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。縮合反應的基本條件為在 75°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。但是, 在導入第 15、16 個殘基之際, 在室溫進行 60 分鐘、15 分鐘反應。又, 在導入 PEG 之際, 進行 1 次縮合反應, 在導入第 11

個殘基胺基酸之際進行 3 次縮合反應。去 Fmoc 化的基本條件為在哌[口井] (5%) 與 Oxima pure (0.2M) 的 DMF 溶液中，在 50°C 使其反應 5 分鐘後，使其再度反應 15 分鐘。但是，第 15 及 16 個殘基的 Fmoc 基的去除係藉由在 25°C 進行 5 分鐘後，再度進行 15 分鐘反應而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，添加 5 等量之 ClAcOSu 的 DMF 溶液，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次，並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 1 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

接下來，使用所得之固相樹脂，遵循前述的一般方法，進行側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切及環化反應。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m $\mu$ m OBD (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 8-33%, 之後耗費 8 分鐘 33-38%, 之後耗費 1 分鐘 38-60%; 流量: 120mL/min)。

**【0192】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 91.5%。

分析條件 A: 保持時間=3.57 分鐘; ESI-MS (+) 觀測值  $m/z$ =理論值  $(M+3H)^{3+}$ 。

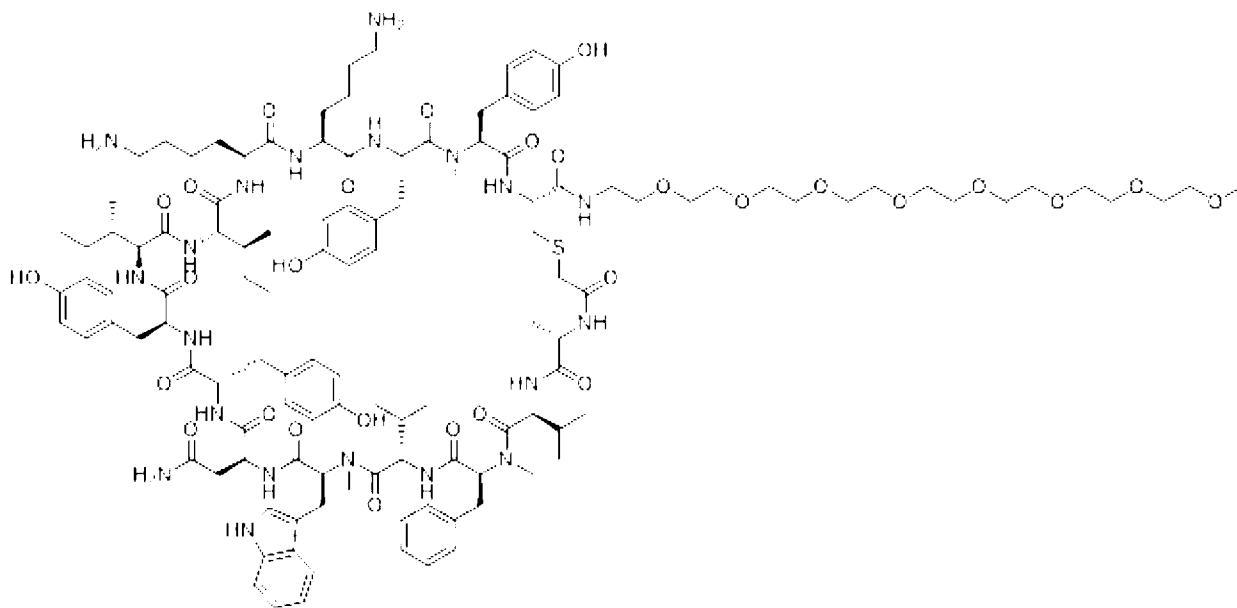
分析條件 B: 保持時間=12.8 分鐘; 梯度 (%B conc): 耗費 20 分鐘 20-60%, 之後耗費 1 分鐘 60-95%, 之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 899.6 (M+3H)^{3+}$ 。

【0193】 [實施例9-2]

894\_v05\_PEG8Me (序列識別號 43) 的合成

[化 5]



【0194】 將 Cl-Trt(2-Cl) resin (1g, 1.6mmol, 渡邊化學工業, 1.6mmol/g) 以 DCM (脫水, 10mL, nacalai tesque) 膨潤 10 分鐘, 以過濾後 DCM (脫水、10mL) 清洗 2 次。對於已膨潤的樹脂, 依序添加 Fmoc-CyS (CH<sub>2</sub>COOH) -PEG8Me (767mg, 1mmol) 的 DCM (脫水、10mL) 溶液、DIEA (836uL, 4.8mmol, 渡邊化學工業), 在室溫振盪 35 分鐘。再者, 添加 MeOH (1mL, KISHIDA CHEMICAL), 振盪 10 分鐘後, 將樹脂以 DMF (10mL, KISHIDA CHEMICAL) 清洗 3 次, 以 DCM (10mL, KISHIDA CHEMICAL) 清洗 3 次, 以乙醚 (10mL, KISHIDA CHEMICAL) 清洗 3 次清洗後, 進行減壓乾燥, 獲得

Fmoc-CyS [ CH<sub>2</sub>COO-Trt (2-Cl) -resin ] -PEG8Me (1.686g, 94%)。使用所得之樹脂，利用前述的一般方法，從 Fmoc 基的去除開始，合成目的之肽。此時，將 Biotage 公司的 SyroI 使用作為固相合成儀，遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中，對於樹脂 1eq，使用 Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA (3.2eq/3eq/6.3eq)，在 DMF 中，在室溫下，於 30 分鐘進行 2 次重複反應。但是，第 1 個殘基、導入第 2 個殘基、第 4 個殘基之際係在室溫下，於 60 分鐘進行 3 次反應。導入第 3 個殘基之際係在 25°C 下，於 60 分鐘進行 2 次重複反應。導入第 9 個殘基之際係在室溫下，於 30 分鐘進行 3 次反應。並且，Fmoc 去除係藉由在與 20% piperidine 的 DMF 溶液在室溫下進行 5 分鐘反應後，使其再度反應 15 分鐘而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除 α-胺基的 Fmoc 基後，將 3 等量之氯乙酸的 DMF 溶液 (0.45M)、3 等量之 HCTU 的 DMF 溶液 (0.43M)、3 等量之 DIPEA 的 DMF 溶液 (1.57M) 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-HFIP/DCM (1/4)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，重複 3 次與前述濾液進行混合之操作。將此濾液使用 GenevaC EZ-2 Elite 進行減壓濃縮後，若添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 5min)，並傾析上清液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 2.5mM 之方式溶解於 DMF 後，添加 1.1 等量之 HATU 的 DMF 溶液 (0.43M)、1.5 等量之 DIPEA，在室溫振盪約 1 小時。在所得之反應溶液中以室溫添加 3 等量之乙酸後，使用 GenevaC EZ-2 進行減壓濃縮。在所得之殘渣中添加已冰冷的二異丙醚，產生白色沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 10 分鐘)，並傾析上清液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的乙醚清洗，並進行減壓乾燥。在所得之固體中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 60 分鐘。添加已冰冷之過剩的二異丙醚，產生沉澱。將此混合物進

行離心分離（9000rpm，5min），並傾析上清液。將所得之固體再度以已冰冷的乙醚清洗後，使其減壓乾燥。

**【0195】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）30x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 8–33%，之後耗費 8 分鐘 33–38%，之後耗費 1 分鐘 38–60%；流量：45mL/min）。

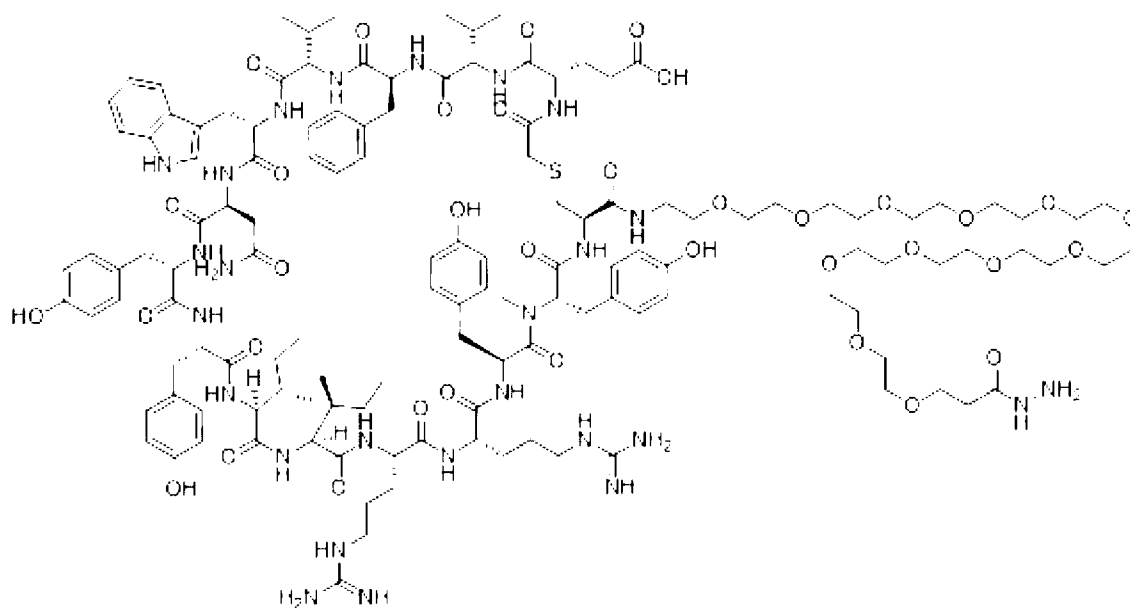
目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 97.4%。

分析條件 B：保持時間=11.93 分鐘；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1211.6$ （ $M+2H$ ）<sup>2+</sup>。

**【0196】** [實施例 9-3]

hTfR\_\_894\_\_E1\_\_PEG12\_\_（Hydrazide）（序列識別號 218）的合成  
[化 6]



【0197】 使用  $\text{NH}_2\text{NH}-\text{Trt}(2-\text{Cl})-\text{resin}$  (渡邊化學,  $0.78\text{mmol/g}$ ,  $0.13\text{g}$ ), 遵循前述的一般方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 基本條件為對於樹脂  $1\text{eq}$  使用 Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA ( $5.3\text{eq}/5\text{eq}/10\text{eq}$ ), 縮合反應係在  $75^\circ\text{C}$  下反應 10 分鐘。在導入第 11 個、第 12 個殘基胺基酸之際, 分別在  $25^\circ\text{C}$  下, 於 30 分鐘進行 2 次縮合反應。第 13 個殘基、第 14 個殘基係在  $75^\circ\text{C}$  下, 於 10 分鐘進行 2 次。第 15 個殘基係在  $25^\circ\text{C}$  下, 於 30 分鐘進行 1 次。第 16 個殘基係使用 Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA ( $3\text{eq}/3\text{eq}/6\text{eq}$ ) 並在  $25^\circ\text{C}$  下, 於 120 分鐘進行 1 次。去 Fmoc 化的基本條件為在 20% piperidine in DMF 中, 在  $75^\circ\text{C}$  下使其反應 3 分鐘。但是第 13、15 個殘基的 Fmoc 基的去除係藉由在  $25^\circ\text{C}$  下進行 5 分鐘後, 使其反應 10 分鐘而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相

樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 10eq 之氯乙酸、10eq 之 DIPCI、10eq 之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 NMP，製備 ClAcOSu 的 DCM/NMP 溶液 (0.2M)，添加固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次，以氯甲烷清洗 3 次，並在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min)，並傾析溶液。將所得之個體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體進行乾燥，使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 5 等量之三乙胺，在室溫攪拌約 14 小時。以乙酸進行驟冷，將反應溶液使用 Biotage V-10 進行減壓濃縮。

**【0198】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 30x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 5-29%, 之後耗費 8 分鐘 29-34%, 之後耗費 1 分鐘 34-60%; 流量: 45mL/min。

**【0199】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 77.0%。

分析條件 B: 保持時間=10.57 分鐘; 管柱 Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B conc) 耗費 20 分鐘 20-60%, 之後耗費 1 分鐘 60-95%, 之後耗費 5 分鐘 95-95%; 流量: 0.25mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1378.48 (M+2H)^{2+}$ 。

**【0200】** [實施例 9-4]

894\_\_3m\_\_G\_\_Azi (序列識別號 297) 的合成

[化 7]



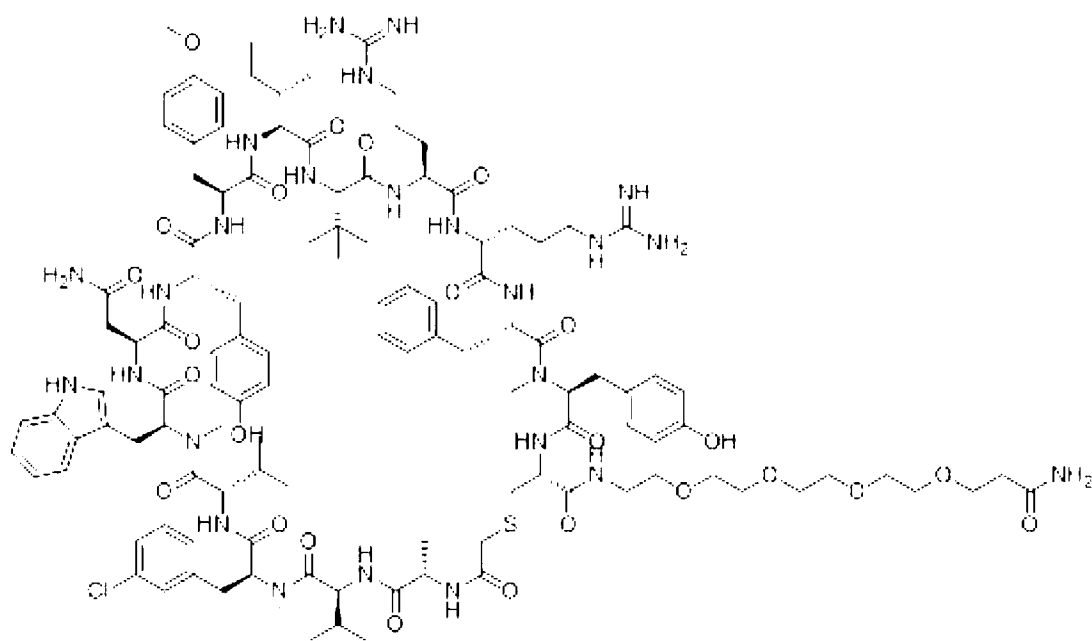
分析條件 B：保持時間=4.29 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1154.72$  (M+2H)<sup>2+</sup>。

【0203】 [實施例 9-5]

894\_\_variant\_\_39 (序列識別號 327) 的合成

[化 8]



【0204】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA-OH/DIPCI/Oxima pure (5.3eq

／10eq／5eq），在 DMF 中，在 90°C 下，於 3 分鐘進行 1 次重複反應。但是，導入第 2 個殘基、第 4 個殘基之際係在 75°C 下，於 30 分鐘進行 2 次反應。第 9 個殘基係在 90°C 下，於 10 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 50°C 下，於 15 分鐘進行 2 次反應。第 13 個殘基係在 90°C 下，於 3 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 50°C 下，於 15 分鐘進行 1 次反應。並且，Fmoc 去除的基本條件為與 20%piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是，第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下於 5 分鐘進行 2 次重複反應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 5eq 之氯乙酸 in DMF、5eq 之 HATU in DMF、10eq 之 DIEA in DMF 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚／己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 1.5min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，以室溫振盪約 24 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0205】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱：WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度 (%B)：耗費 3 分鐘 11-36%，之後耗費 8 分鐘 36-41%，之後耗費 1 分鐘 41-60%；流量：120mL/min。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 93.1%。

分析條件 B：保持時間 = 12.76 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A = 0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B = 0.025%TFA in MeCN；

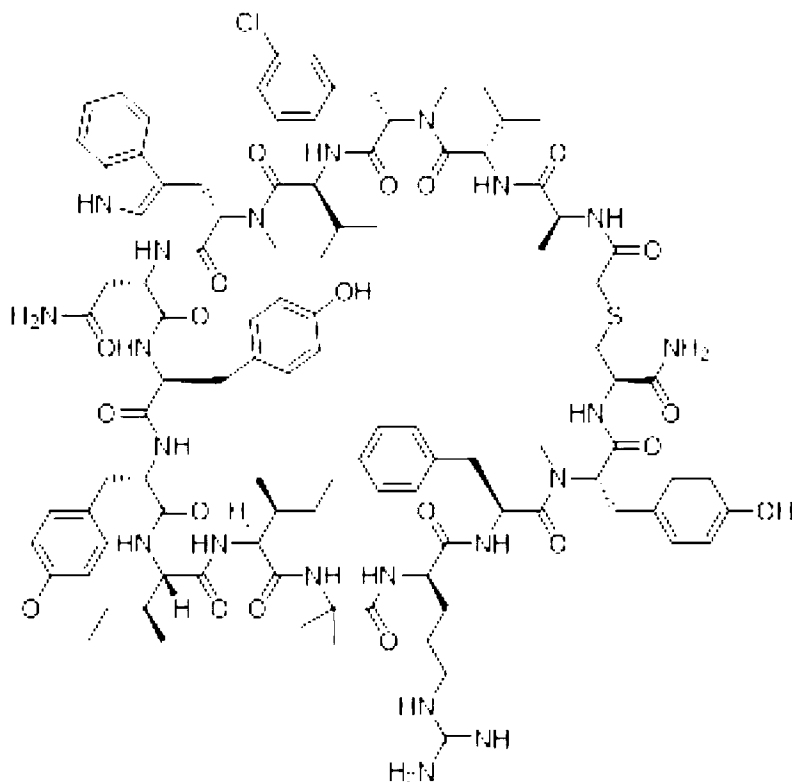
溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1196.12 (M+2H)^{2+}$ 。

【0206】 [實施例 9-6]

894\_\_variant\_\_120 (序列識別號 353) 的合成

[化 9]



【0207】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.43g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA-OH/HATU/DIEA (5eq/5eq/10eq), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 1 個殘基、第 3 個殘基係在 75°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。第 2 個殘基、第 4 個殘

基係在 75°C 下，於 30 分鐘進行 1 次反應。第 9 個殘基、第 10 個殘基、第 11 個殘基係在 75°C 下，於 20 分鐘進行 2 次反應。第 12 個殘基係在 25°C 下，於 30 分鐘進行 2 次反應。第 13 個殘基係在 75°C 下，於 10 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 25°C 下，於 30 分鐘進行 1 次反應。並且，Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是，第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下，於 5 分鐘進行 2 次重複反應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 5eq 之 ClAcOH in DMF、5eq 之 HATU in DMF、10eq 之 DIEA in DMF 添加至固相樹脂，在 25°C 振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 之少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 16 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0208】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱：WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度 (%B)：耗費 3 分鐘 16-41%，之後耗費 8 分鐘 41-46%，之後耗費 1 分鐘 46-60%；流量：120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 97.5%。

分析條件 B：保持時間=6.07 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；

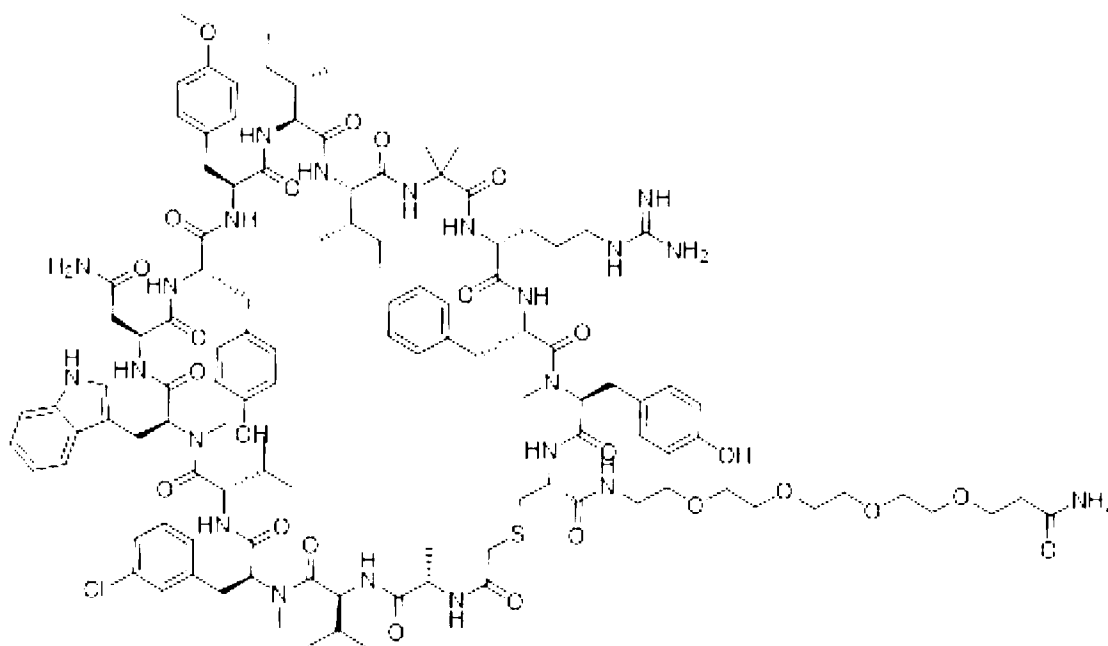
溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1036.90 (M+2H)^{2+}$ 。

【0209】 [實施例 9-7]

894\_\_variant\_\_61 (序列識別號 354) 的合成

[化 10]



【0210】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA-OH/DIPCI/Oxima pure (5.3eq/10eq/5eq), 在 DMF 中, 在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 10 個殘基、第 11

個殘基係在 90°C 下，於 10 分鐘進行 2 次反應。第 12 個殘基係在 50°C 下，於 15 分鐘進行 2 次反應。第 13 個殘基係在 90°C 下，於 3 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 50°C 下，於 15 分鐘進行 1 次反應。並且，Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是，第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下，於 5 分鐘進行 2 次重複反應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 10eq 之氯乙酸、5eq 之 DIPCI、5eq 之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M)，添加至固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 5eq 之三乙胺，在室溫振盪約 14 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0211】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱：WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度 (%B)：耗費 3 分鐘 15-40%，之後耗費 8 分鐘 40-45%，之後耗費 1 分鐘 45-60%；流量：120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 87.5%。

分析條件 B：保持時間 = 16.50 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；

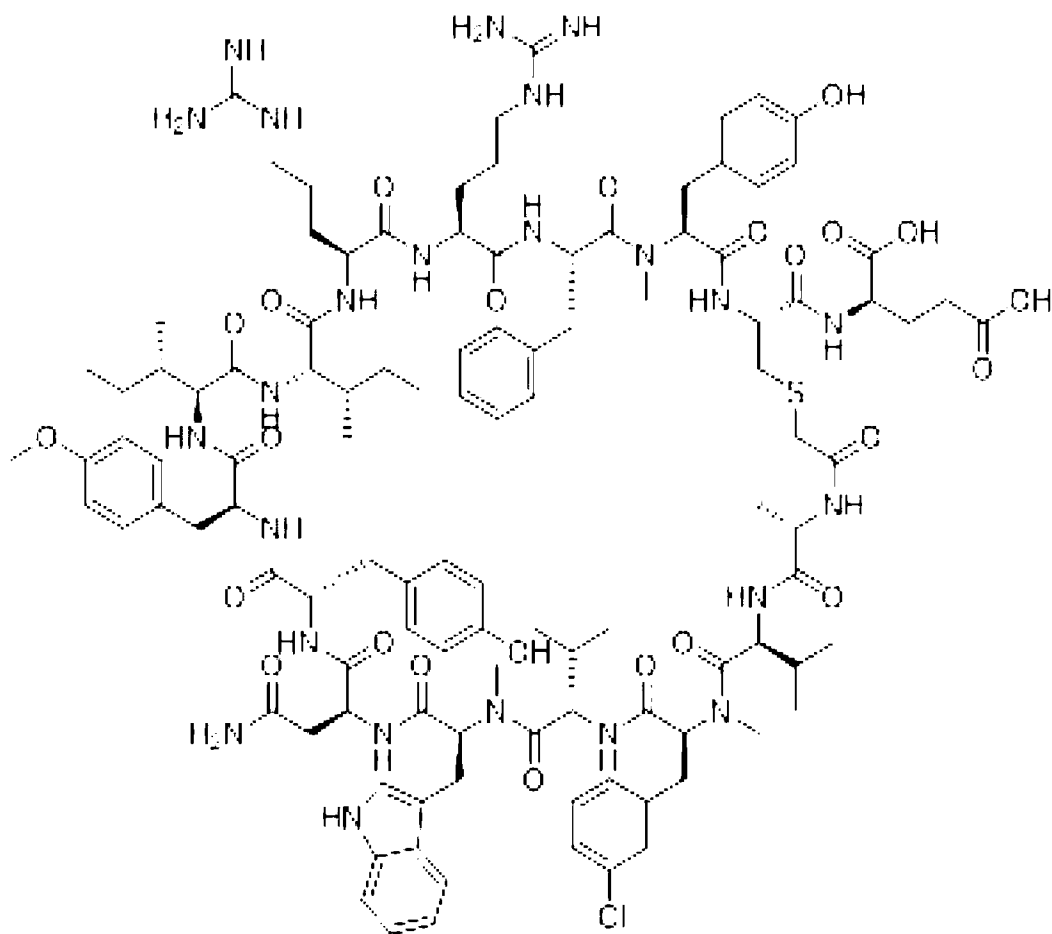
溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1160.58 (M+2H)^{2+}$ 。

【0212】 [實施例 9–8]

894\_\_variant\_\_14 (序列識別號 387) 的合成

[化 11]



【0213】 使用 Fmoc-D-Glu(OtBu)-wang resin (渡邊化學, 0.68mmol/g, 184mg), 依循一般的方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 依循製造商的手冊進行。縮合反應的基本條件為在縮合劑中使用 HATU, 並在 75°C 下, 使其於 10 分鐘反應 2 次。但是, 第 2 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 6 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行

1 次反應。第 7 個殘基係在 75°C 下，於 10 分鐘進行 1 次反應。第 8 個殘基係在 75°C 下，於 10 分鐘進行 1 次反應。第 10 個殘基係在 75°C 下，於 10 分鐘進行 1 次反應。第 11 個殘基係在 30°C 下，於 30 分鐘進行 2 次反應。第 12 個殘基係在 30°C 下，於 30 分鐘進行 1 次反應。第 15 個殘基係在 30°C 下，於 30 分鐘進行 1 次反應。並且，Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是，關於第 2 個殘基、第 4 個殘基、第 13 個殘基，Fmoc 去除係在室溫下，使其於 5 分鐘反應 2 次。氯乙醯基的導入係藉由將氯乙酸（5 等量）、DIPCI（5 等量）、HOSu（5 等量）在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液，添加至由前步驟所得之固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 -A（TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物），在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 的過剩的乙醚/己烷（3/1），則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（9500rpm，1min），傾析上清液後，利用已冷卻至 0°C 的乙醚進行清洗，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 4mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 16 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC EZ-2 Elite 進行減壓濃縮。

**【0214】** 所得之反應液係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 11-36%，之後耗費 8 分鐘 36-41%，之後耗費 1 分鐘 41-60%；流量：120mL/min）。

**【0215】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 88.60%。

分析條件 B：保持時間=13.03 分鐘；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20-60%，之後耗費 1 分鐘 60-95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

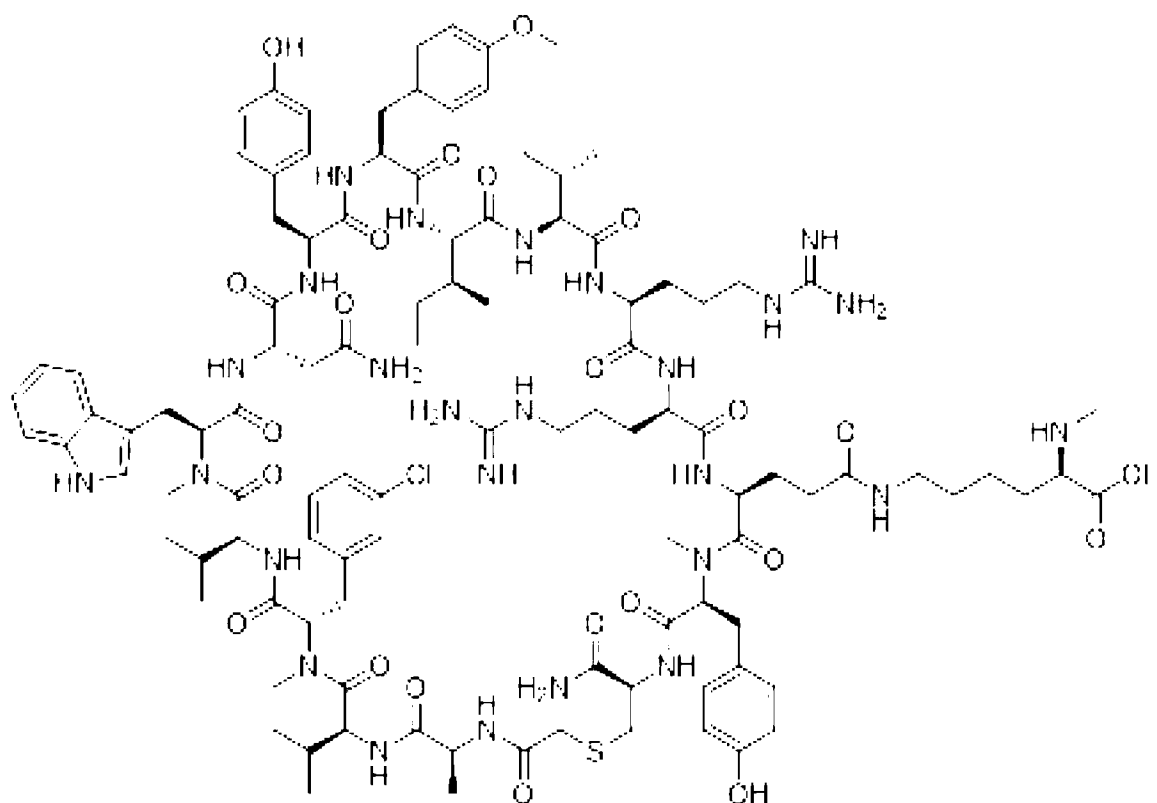
ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1137.23$ （ $M+2H$ ）<sup>2+</sup>。

第 98 頁，共 169 頁（發明說明書）

【0216】 [實施例 9-9]

894\_\_variant84 (序列識別號 390) 的合成

[化 12]



【0217】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure = 5.3eq/10eq/5eq, 在 DMF 中, 在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 45 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次重複反應。導入第 13 個殘基之際係在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 2 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下, 使其於 3 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基

及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 於 5 分鐘進行 2 次重複反應。在連第 1 個殘基都伸長後，將樹脂懸浮於 DCM 中，添加 Pd(PpH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/pHSiH<sub>3</sub> (0.2eq/10eq)，在室溫振盪 1 小時。氯乙醯基的導入係藉由將已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂以 DMF 清洗 3 次、以 DCM 清洗 3 次後，利用前述的方法去除 α-胺基的 Fmoc 基後，添加 5eq 之氯乙酸 in DMF、5eq 之 HATU in DMF、10eq 之 DIEA in DMF，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫進行整夜振盪。使用 Savant Explorer SpeedVaC 將反應溶液進行減壓濃縮。將所得之混合物溶解於 DMSO (4mL)，添加 HOSu (10eq)、EDC HCl (10eq)，在室溫攪拌 2 小時。

**【0218】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5μm (註冊商標) 30x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 11-36%，之後耗費 8 分鐘 36-41%，之後耗費 1 分鐘 41-60%; 流量: 45mL/min)。

將所得之環狀肽-NHS 酯 (25mg, 11.3μmol) 溶解於 DMF (225μL)，添加 Fmoc-MeK-OH 鹽酸鹽 (5mg, 11.9μmol) 及 DIEA (5.9μL, 33.9μmol) 並進行攪拌。1 小時後，在反應液中添加 Et<sub>2</sub>NH (5.9μL, 56.5μmol) 並進行攪拌。1 小時後，以乙酸進行驟冷。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5μm (註冊商標) 19x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1



【0220】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure/DIEA (5.3eq/10eq/5eq), 在 DMF 中且 90°C 下, 於 3 分鐘進行 1 次反應。但是, 導入第 2 個殘基、第 4 個殘基之際係在 75°C 下, 於 45 分鐘進行 2 次反應。導入第 11 個殘基、第 12 個殘基之際係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次重複反應。導入第 13 個殘基之際係在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 2 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20%piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下, 使其於 3 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下, 於 5 分鐘進行 2 次重複反應。在連第 1 個殘基都伸長後, 將樹脂懸浮於 DCM 中, 添加 Pd (PpH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/pHSiH<sub>3</sub> (0.2eq/10eq), 在室溫振盪 1 小時。將固相樹脂以 DMF 清洗 3 次, 且以 DCM 清洗 3 次後, 使其減壓乾燥。將樹脂 (60μmol) 懸浮於 DMF 中, 添加 H-D-Glu (OtBu) - OtBu 鹽酸鹽 (71mg, 0.24mmol)、0.5M Oxyma pure in DMF (0.48mL, 0.24mmol)、DIPCI (37μL, 0.24mmol) 及 DIEA (42μL, 0.24mmol), 在微波照射下, 使其在 75°C 於 30 分鐘反應 2 次。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除 α-胺基的 Fmoc 基後, 添加 5eq 之氯乙酸 in DMF、5eq 之 HATU in DMF、10eq 之 DIEA in DMF, 在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪, 由玻璃料回收溶液成分, 並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒, 則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min), 並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後, 在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後, 添加 10eq

之三乙胺，在室溫進行整夜振盪。使用 Savant Explorer SpeedVaC 將反應溶液進行減壓濃縮。

【0221】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 8–33%，之後耗費 8 分鐘 33–38%，之後耗費 1 分鐘 38–60%；流量：120mL/min）。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 94.9%。

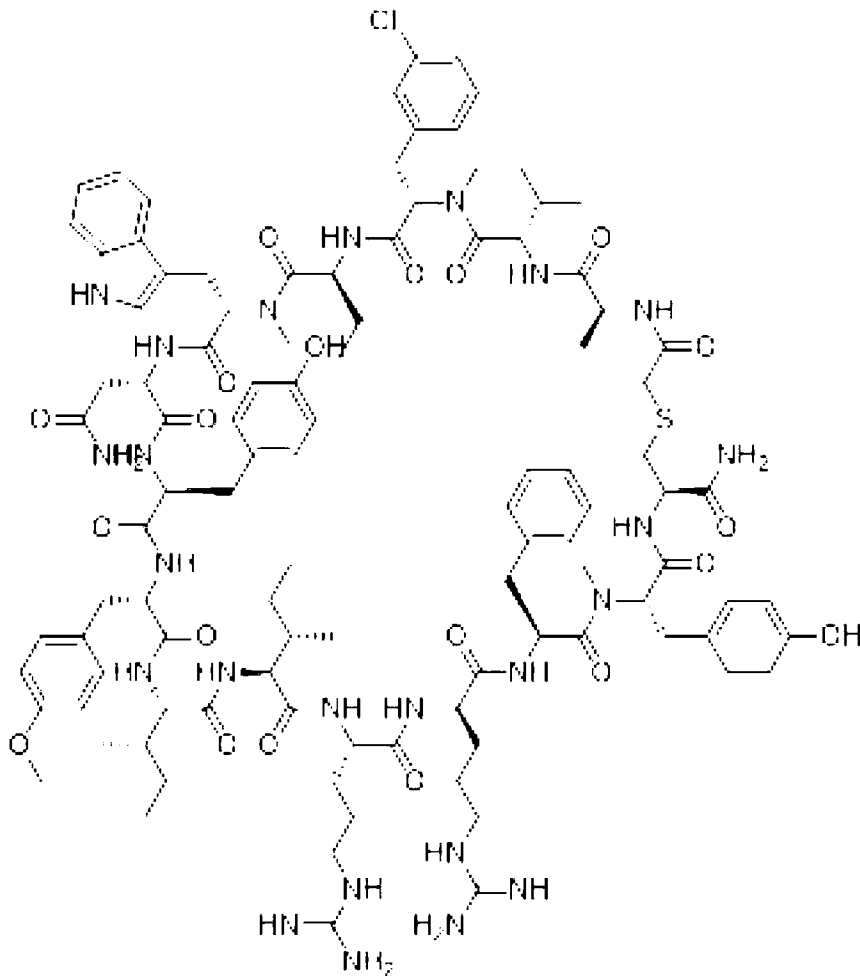
分析條件 B：保持時間=11.81 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1127.76$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

【0222】 [實施例 9–11]

894\_\_variant\_\_03（序列識別號 397）的合成

[化 14]



【0223】 使用 Sieber amide resin（渡邊化學，0.47mmol/g，0.21g），利用前述的一般方法，從 Fmoc 基的去除開始，合成目的之肽。此時，使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀，遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中，對於樹脂 1eq，使用 Fmoc-AA/DIPCI/Oxima pure（4.2eq/4eq/8eq），在 DMF 中且 75°C 下，於 10 分鐘進行 1 次反應。但是，第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下，於 30 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 90°C 下，於 10 分鐘進行 2 次反應。第 13 個殘基係在 75°C 下，於 10 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 25°C 下，於 20 分鐘進行 1 次反應。並且，Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下，使其反應 3 分鐘。但是，第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下於 5 分鐘進行反應後，在 25°C 下於 10 分鐘進行反應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基

的 Fmoc 基後，將氯乙酸（10 等量）、10 等量之 DIPEI、10 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液（0.2M），添加至固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A（TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物），在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷（1/1）的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（9000rpm，2min），並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 50%MeCN 水溶液後，添加 5 等量之三乙胺，在室溫振盪約 14 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0224】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 10-35%，之後耗費 8 分鐘 35-40%，之後耗費 1 分鐘 40-60%；流量：120mL/min。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 98.2%。

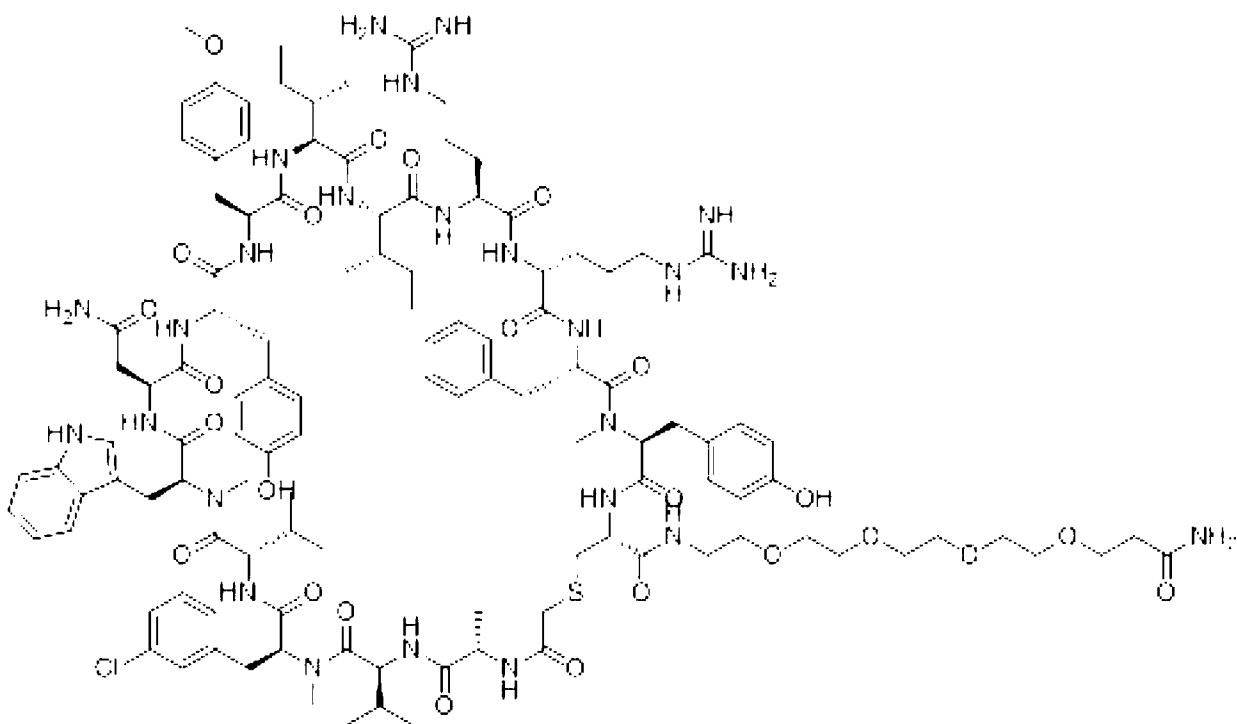
分析條件 B：保持時間=13.18 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20-60%，之後耗費 1 分鐘 60-95%，之後耗費 5 分鐘 95-95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS（+）觀測值 m/z=1072.49（M+2H）<sup>2+</sup>。

**【0225】** [實施例 9-12]

894\_\_variant\_\_31（序列識別號 400）的合成

[化 15]



【0226】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA / DIPCI / Oxima pure (4.2eq / 4eq / 8eq), 在 DMF 中, 在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 2 次重複反應。但是, 導入第 2 個殘基、第 4 個殘基之際係在 75°C 下, 於 45 分鐘進行 2 次反應。第 3 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 7 個殘基、第 8 個殘基係在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 1 次反應。導入第 11 個殘基、第 12 個殘基之際係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基、第 16 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 於 5 分鐘進行 2 次重複反應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前

步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將氯乙酸（5 等量）、5 等量之 DIPCI、5 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液（0.2M），添加至固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A（TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物），在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（9500rpm，1min），並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 4mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 7 等量之三乙胺，在室溫振盪約 12 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC EZ-2 Elite 進行減壓濃縮。

**【0227】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 15-40%，之後耗費 8 分鐘 40-45%，之後耗費 1 分鐘 45-60%；流量：120mL/min。

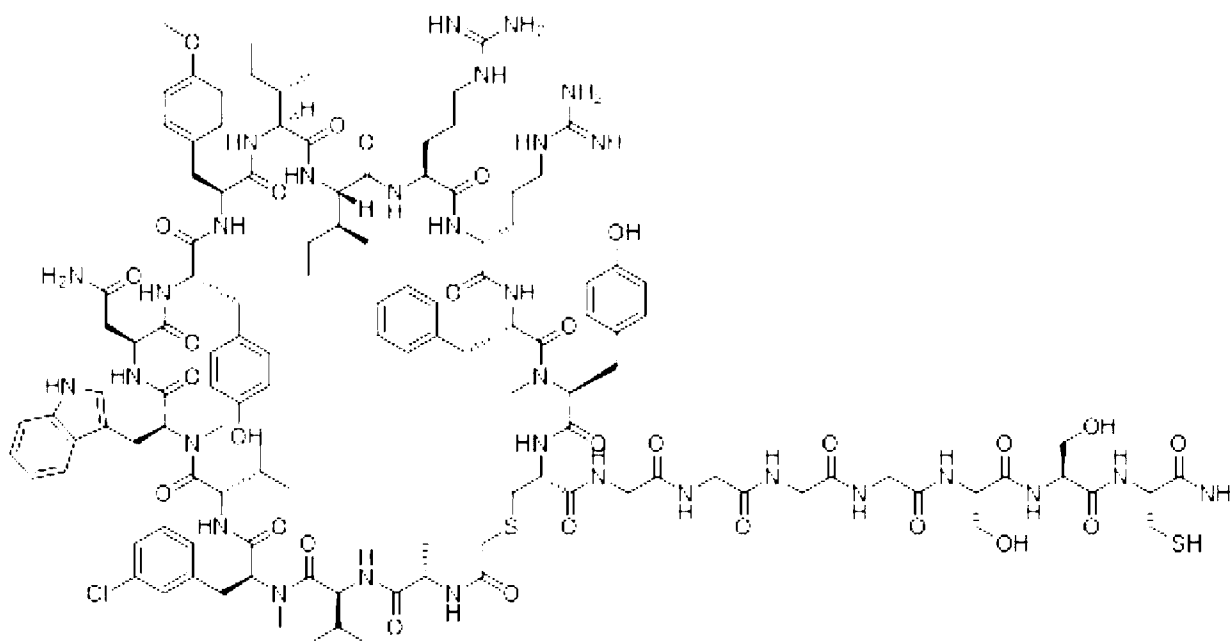
目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 95.4%。

分析條件 B：保持時間=12.64 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20-60%，之後耗費 1 分鐘 60-95%，之後耗費 5 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1195.87$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

**【0228】** [實施例 9-13]

894\_\_variant\_\_03\_\_G4S2C（序列識別號 401）的合成  
[化 16]



【0229】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.73mmol/g, 1.37g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2eq/4eq/8eq), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。第 13 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基、第 22 個殘基係在 25°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下進行 5 分鐘反應後, 在室溫下使其反應 10 分鐘。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -

胺基的 Fmoc 基後，將 10eq 之氯乙酸、10eq 之 DIPCI、10eq 之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M)，添加至固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 90:2.5:2.5:5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9500rpm, 1min)，將溶液進行傾析並使其在減壓下進行乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10eq 之三乙胺，在室溫振盪約 15 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC HT-12 進行減壓濃縮。將所得之混合物溶解於 DMSO，添加 3eq 之乙酸銀，振盪 3 小時。添加 2M DTT 水溶液 (11eq) 後，進行離心分離，回收上清液後，在減壓下進行濃縮而獲得粗生成物。

**【0230】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 11-11%, 之後耗費 3 分鐘 11-36%, 之後耗費 8 分鐘 36-41%, 之後耗費 1 分鐘 41-60%; 流量: 120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 94.8%。

分析條件 B: 保持時間=4.31 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20-60%, 之後耗費 0.3 分鐘 60-95%, 之後耗費 1.6 分鐘 95-95%; 流量: 0.5mL/min。

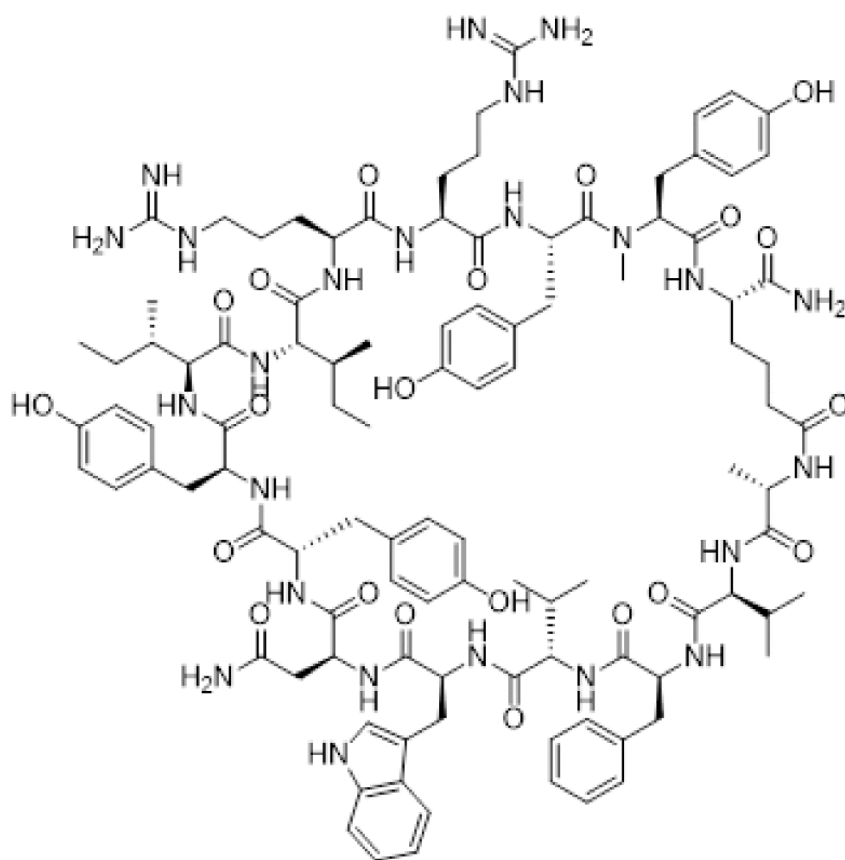
ESI-MS (+) 觀測值 m/z=1324.94 (M+2H)<sup>2+</sup>。

**【0231】** [實施例 9-14]

894\_\_A\_\_hgl\_\_CyCloamide (序列識別號 408) 的合成

第 109 頁，共 169 頁 (發明說明書)

[化17]



【0232】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g), 依循一般的方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 依循製造商的手冊進行。縮合反應的基本條件係在縮合劑中使用 DIPEI、Oxyma pure, 在 90°C 下, 於 3 分鐘使其進行 1 次反應。但是, 第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次重複反應。第 13 個殘基係在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 2 次重複反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 關於第 13 個殘基, Fmoc 去除係藉由在 25°C 下, 於 5 分鐘使其進行 2 次反應而進行。將所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃

料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚與己烷之混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（9000rpm，2min），並傾析上清液。將所得之固體以已冰冷的乙醚清洗後，使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMF 後，添加 1.5 等量之 HATU、3 等量之三乙胺，在室溫振盪約 1 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

【0233】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）30x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 6–31%，之後耗費 8 分鐘 31–36%，之後耗費 1 分鐘 36–60%；流量：45mL/min）。

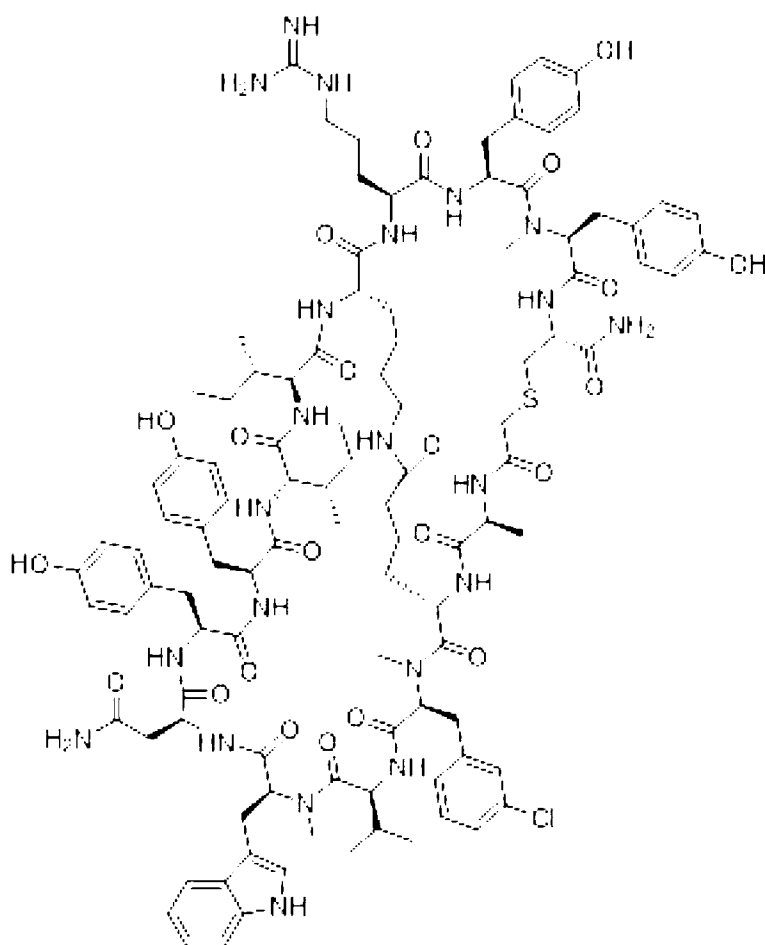
【0234】 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 96.8%。

分析條件 B：保持時間=10.03 分鐘；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1033.0$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

【0235】 [實施例 9–15]

894\_\_BiCyCle\_\_001（序列識別號 409）的合成  
[化 18]



【0236】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.53mg), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2 等量/4 等量/8 等量), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。但是, 第 1 個殘基、第 6 個殘基、第 10 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。第 2 個殘基、第 3 個殘基係在 75°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次反應。第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 14 個殘基係在 75°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。第 12 個殘基、第 15 個殘基係在 30°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下, 使其於 3 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基、第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下, 於 5 分鐘進行 2 次重複反應。氯乙醯基的導入係藉

由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 5 等量之氯乙酸、5 等量之 DIPCI、5 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M)，添加至固相樹脂，在室溫振盪 75 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9500rpm, 1min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 4mM 之方式溶解於 5% 含水 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 12 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaCEZ-2 Elite 進行減壓濃縮。對於所得之混合物，以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 25mM 之方式溶解於 DMF，添加 1 等量之 HATU、3 等量之 DIEA，在室溫振盪約 30 分鐘。

**【0237】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 11-36%, 之後耗費 8 分鐘 36-41%, 之後耗費 1 分鐘 41-60%; 流量: 120mL/min。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 94.8%。

分析條件 B: 保持時間 = 13.78 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度°C: 60°C; 梯度 (%B conc): 耗費 20 分鐘 20-60%, 之後耗費 1 分鐘 60-95%, 之後耗費 5 分鐘 95-95; 流量 0.25%。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1072.26 (M+2H)^{2+}$ 。

**【0238】** [實施例 9-16]

第 113 頁，共 169 頁 (發明說明書)



除係在 25°C 下，於 5 分鐘進行 2 次重複反應。將固相樹脂以 DMF、DCM 進行依序清洗並減壓乾燥後，以 DCM 使其膨潤，添加 10 等量之  $\text{pHSiH}_3$ 、0.2 等量之  $\text{Pd}(\text{PpH}_3)_4$ ，在室溫振盪 1 小時。將固相樹脂以 DCM 清洗 5 次、以 DMF 清洗 5 次、以乙醚清洗 3 次並使其乾燥。將固相樹脂以 NMP 進行膨潤，添加 5 等量之 HATU、5 等量之 DIEA，在室溫振盪 30 分鐘。將樹脂清洗後，再度添加 5 等量之 HATU、5 等量之 DIEA，在室溫振盪 30 分鐘。將固相樹脂以 DCM 清洗 5 次、以 DMF 清洗 5 次、以乙醚清洗 3 次。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 5 等量之氯乙酸、5 等量之 DIPCI、5 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M)，添加至固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9500rpm, 1min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 3.3mM 之方式溶解於 5% 含水 DMSO 後，添加 7 等量之三乙胺，在室溫振盪約 12 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC EZ-2 Elite 進行減壓濃縮。

**【0240】** 所得之粗生成物係使用以下的條件 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu\text{m}$  (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度°C: 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 7-32%, 之後耗費 8 分鐘 32-37%, 之後耗費 1 分鐘 37-60%; 流量: 120mL/min) 精製後，進行冷凍乾燥，利用以下的條件進行再度精製。(管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu\text{m}$  (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B

=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 11–36%，之後耗費 8 分鐘 36–41%，之後耗費 1 分鐘 41–60%；流量：120mL/min）。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 89.0%。

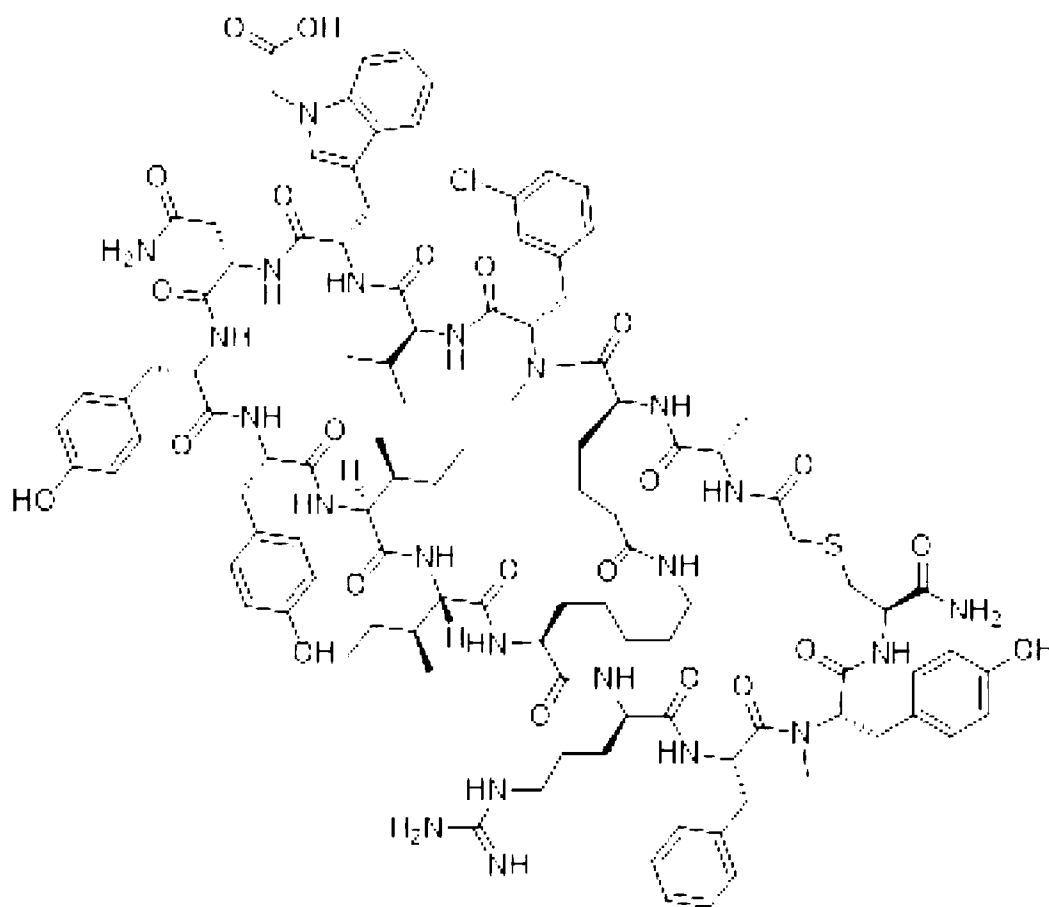
分析條件 B：保持時間=3.67 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B conc）：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1055.13$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

【0241】 [實施例 9-17]

894\_BiCyCle\_012（序列識別號 419）的合成

[化 20]



【0242】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 213mg), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。使用 Fmoc-W1aa (Allyl)-OH、Fmoc-Hgl (tBu)-OH、Fmoc-Hly (Boc)-OH 作為胺基酸原料, 除此之外, 參考 Bicycle\_01 及 Bicycle\_06 的合成, 以同樣的方法獲得粗生成物。

【0243】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 19x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 11-36%, 之後耗費 8 分鐘 36-41%, 之後耗費 1 分鐘 41-60%; 流量: 17mL/min。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算, 且為 94.8%。

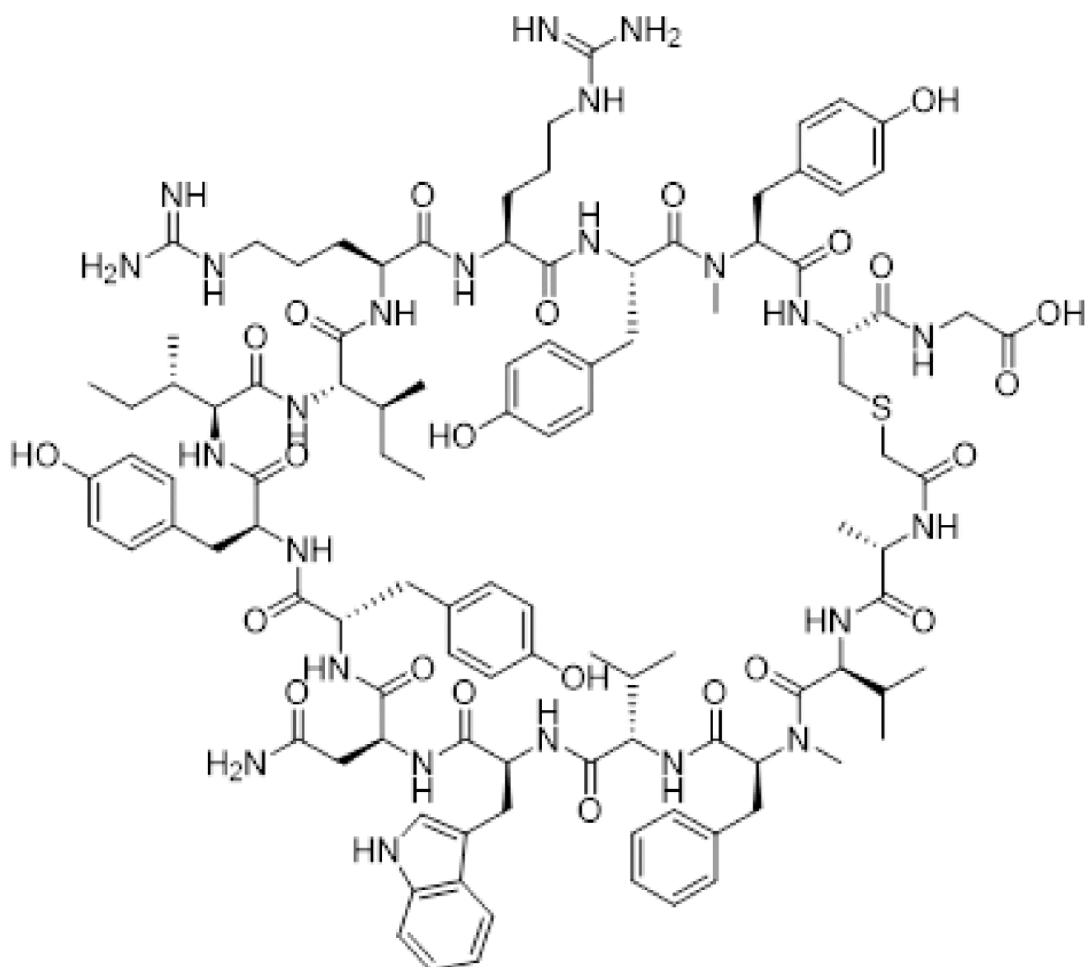
分析條件 B: 保持時間=4.76 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20-60%, 之後耗費 0.3 分鐘 60-95%, 之後耗費 1.6 分鐘 95%。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1093.23 (M+2H)^{2+}$ 。

【0244】 [實施例 9-18]

894\_3m\_G (序列識別號 421) 的合成

[化 21]



【0245】 使用 Fmoc-Gly-wang resin (渡邊化學, 0.78mmol/g, 1.31g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2 等量/4 等量/8 等量), 在 DMF 中, 在 60°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次重複反應。但是, 導入第 15 個殘基之際係在 25°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。導入第 11 個殘基、第 12 個殘基之際係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。導入第 10 個殘基之際係在 60°C 下, 於 15 分鐘進行 1 次反應。導入第 7 個殘基之際係在 60°C 下, 於 15 分鐘進行 1 次反應。導入第 5 個殘基之際係在 60°C 下, 於 15 分鐘進行 1 次反應。導入第 3 個殘基之際係在 60°C 下, 於 45 分鐘進行 2 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 於 5 分鐘進行 2 次重複反

應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將氯乙酸（5 等量）、5 等量之 DIPCI、5 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液（0.2M），添加至固相樹脂，以室溫振盪 240 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A（TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物），在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（9500rpm，1min），並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 4mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，以室溫振盪約 12 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC EZ-2 進行減壓濃縮。

【0246】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x250mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B）：耗費 5 分鐘 0-0%，之後耗費 2 分鐘 0-4.2%，之後耗費 3 分鐘 4.2-28.6%，之後耗費 15.5 分鐘 28.6-33.7%，之後耗費 1.5 分鐘 33.7-60%；流量：5 分鐘 18mL/min 之後，耗費 2 分鐘 18mL/min-118mL/min，之後為 118mL/min）。

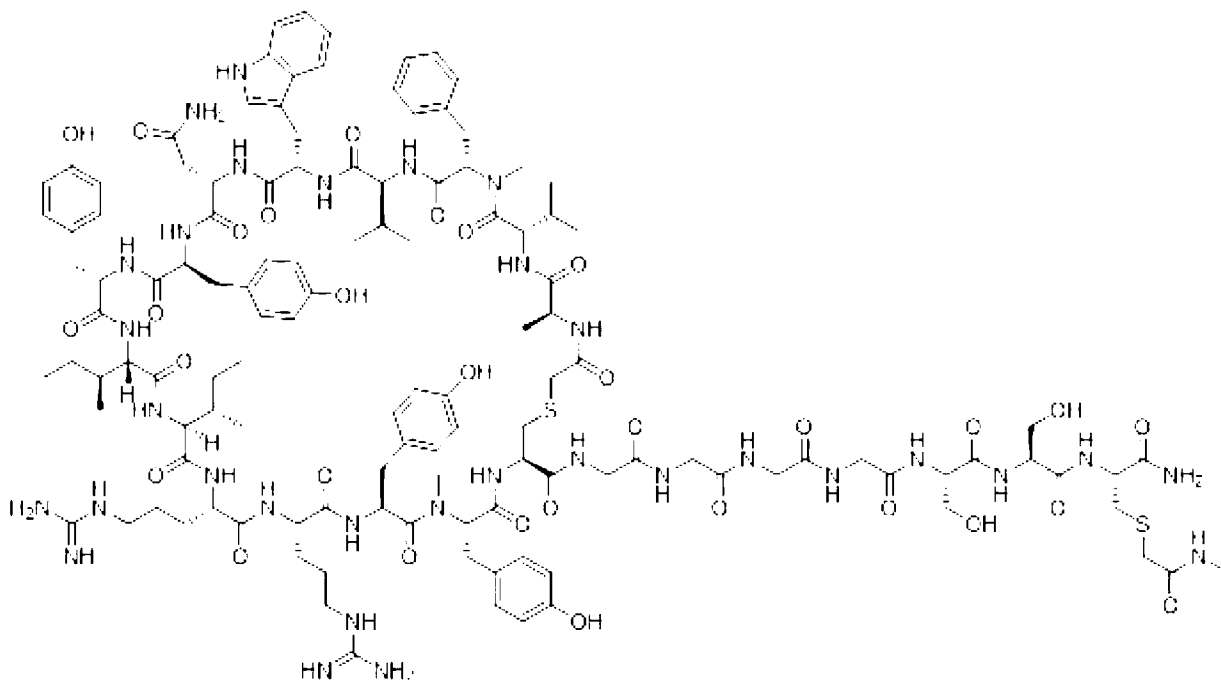
目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 92.2%。

分析條件 B：保持時間=11.52 分鐘；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20-60%，之後耗費 1 分鐘 60-95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1078.24$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

【0247】 [實施例 9-19]

894\_\_3m\_\_G4S2C（ACNMe）（序列識別號 443）的合成  
[化 22]



【0248】 將另外合成之 894\_3m\_G4S2C (20mg, 7.07 $\mu$ mol) 溶解於 DMF (0.1mL)，添加 4 等量之 TEA (3.94 $\mu$ L, 28.3 $\mu$ mol) in DMF (39 $\mu$ L)、1.1 等量之 2-Iodo-N-Methylacetamide (39.1mg, 0.25mmol) in DMF (15 $\mu$ L)，在室溫攪拌 1 小時。

【0249】 所得之混合物係使用以下的條件進行精製(管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 6–31, 之後耗費 8 分鐘 31–36%, 之後耗費 1 分鐘 36–60%; 流量: 17mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算, 且為 97.3%。

分析條件 B: 保持時間=3.53 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN;

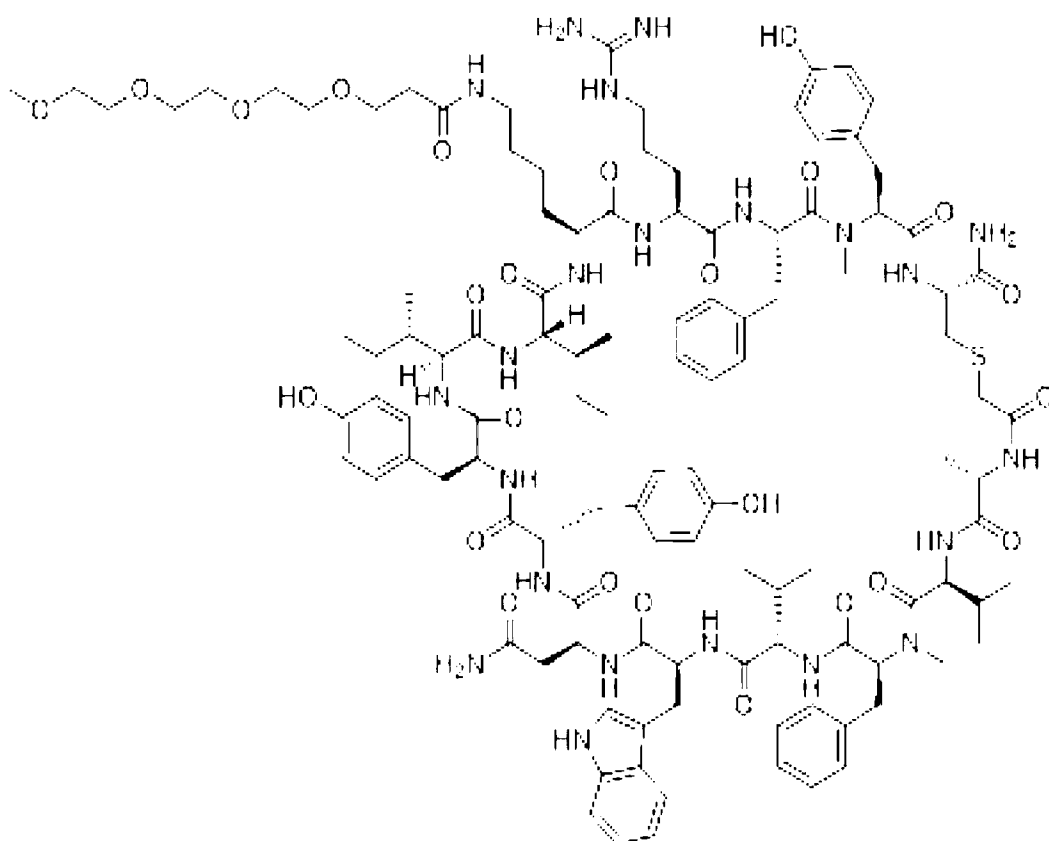
溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1337.32 (M+2H)^{2+}$ 。

【0250】 [實施例 9–20]

894\_0263 (序列識別號 487) 的合成

[化 23]



【0251】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.26g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure/DIEA (4.2 等量/8 等量/4 等量) 進行反應。並且, Fmoc 去除係藉由與 20% piperidine 的 DMF 溶液進行反應而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得

之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，添加 5 等量之氯乙酸 in DMF、5 等量之 HATU in DMF、10 等量之 DIEA in DMF，在 25°C 下，振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 -A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫進行整夜振盪。使用 Savant Explorer SpeedVaC 將反應溶液進行減壓濃縮。將所得之固體以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 MePEG4c (1.2 等量)、HATU (1.1 等量)、DIEA (3 等量)，在室溫振盪 1 小時。

**【0252】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 13-38%, 之後耗費 8 分鐘 38-43%, 之後耗費 1 分鐘 43-60%; 流量: 120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 92.3%。

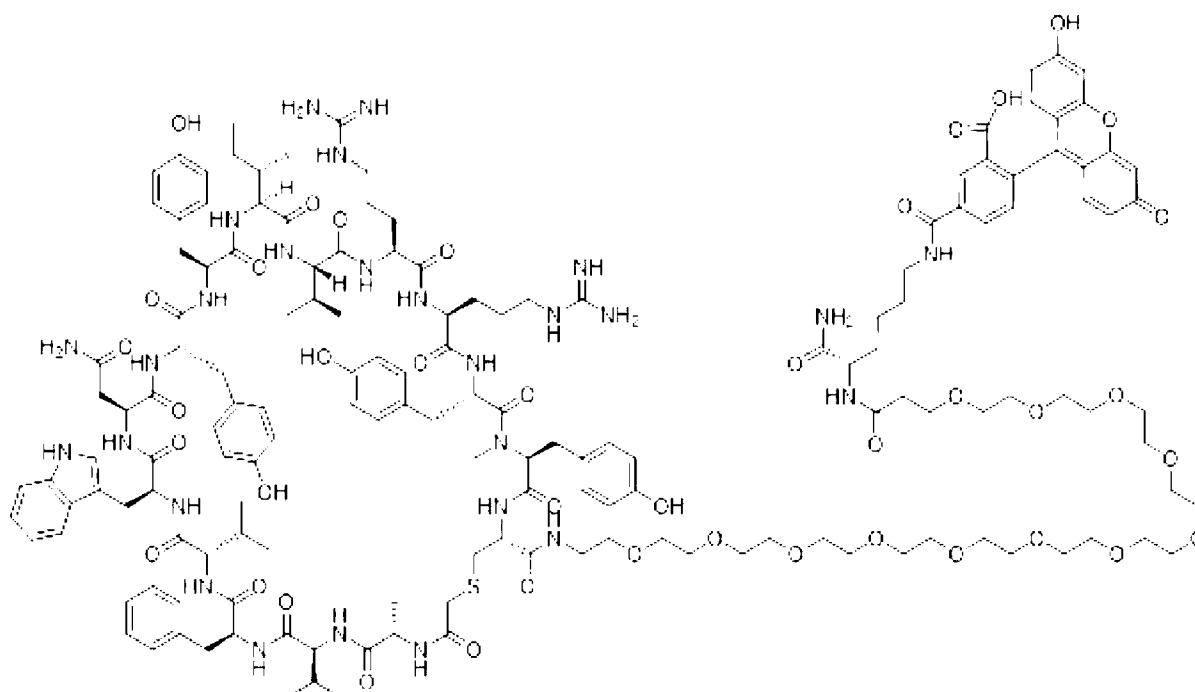
分析條件 B: 保持時間 = 5.28 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20-60%, 之後耗費 0.3 分鐘 60-95%, 之後耗費 1.6 分鐘 95-95%; 流量: 0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1136.17 (M+2H)^{2+}$ 。

**【0253】** 合成以下的肽、連結子及有效負載之複合體。

[實施例 10-1]

JCR\_hTfR\_000894\_PEG11\_K\_FITC (序列識別號 147) 的合成  
[化 24]



【0254】 使用 Fmoc-NH-SAL-PEG-resin 1500-2000Da (渡邊化學, 0.38mmol/g), 依循一般的方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 依循製造商的手冊進行。縮合反應的基本條件係在縮合劑中使用 HATU, 在 75°C 下, 使其於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。第 13 個殘基、第 14 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次重複反應。第 15 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。第 16 個殘基係在 25°C 下, 於 60 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件為與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 關於第 13 個殘基、第 15 個殘基, Fmoc 去除係藉由在 25°C 下, 使其反應 5 分鐘後, 使其反應 10 分鐘而進行。氯乙醯基

的導入係藉由對於由前步驟所得之樹脂，將 5 等量之氯乙酸的 DMF 溶液 (0.2M)、5 等量之 HATU 的 DMF 溶液 (0.5M)、10 等量之 DIPEA 的 DMF 溶液 (1M) 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚與己烷之混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，並傾析上清液。將所得之固體以已冰冷之乙醚清洗後，使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 6 等量之三乙胺，在室溫進行整夜振盪。在所得之反應溶液中添加 1.1 等量之 FAM-OSu 的 DMSO 溶液 (0.71M)，攪拌 30 分鐘。在反應溶液中添加 AcOH 進行驟冷，在減壓下濃縮溶媒。

**【0255】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製(管柱: XSeleCt C18 30x150mm (Lot No.151i3629811308) ; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B) : 耗費 3 分鐘 6-31%, 之後耗費 8 分鐘 31-36%, 之後耗費 1 分鐘 36-60%; 流量: 45mL/min)。

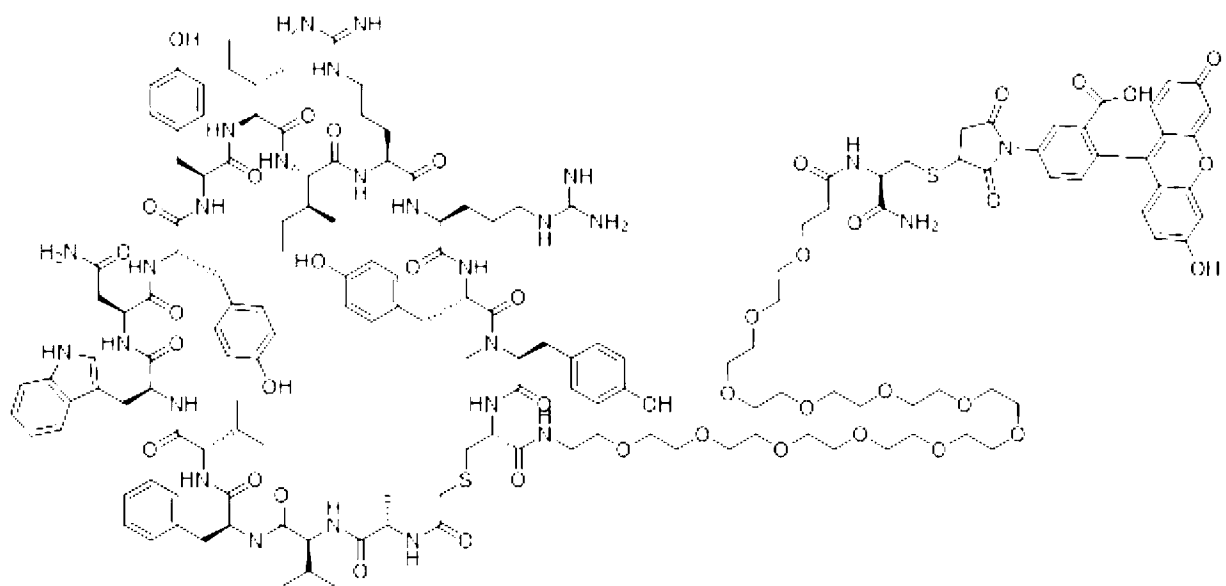
**【0256】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 97.1%。

分析條件 B: 保持時間=13.20 分鐘; 梯度 (%B conc) : 耗費 20 分鐘 20-60%, 之後耗費 1 分鐘 60-95%, 之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=793.2$  理論值  $792.6 (M+4H)^{4+}$ 。

**【0257】** [實施例 10-2]

894\_v01\_PEG12\_C\_Mal (FITC) (序列識別號 166) 的合成  
[化 25]



【0258】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.6mmol/g, 0.19g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (5.3 等量/5 等量/10 等量), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 13 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。第 15 個殘基、第 17 個殘基係在 25°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下, 於 3 分鐘使其反應。但是, 第 2 個殘基、第 13 個殘基、第 15 個殘基、第 17 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下, 於 5 分鐘進行反應後, 在 25°C 下反應 10 分鐘。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的

Fmoc 基後，將 5 等量之氯乙酸 in DMF、5 等量之 HATU in DMF、10 等量之 DIEA in DMF 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液－A（TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物），在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷（1/1）的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（10000rpm，1min），將溶液進行傾析，將固體以已冷卻至 0°C 的乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 6 等量之三乙胺，在室溫進行整夜振盪。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVac 進行減壓濃縮。將所得之混合物溶解於 DMSO，添加 3 等量之乙酸銀，振盪 3 小時。添加 10 等量之 DTT 後，進行離心分離，回收上清液。

**【0259】** 所得之粗中間體肽係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 9–34%，之後耗費 8 分鐘 34–39%，之後耗費 1 分鐘 39–60%；流量：120mL/min）。

將已精製的中間體肽（29.8mg，10.6 $\mu$ mol）溶解於 DMSO（424 $\mu$ L），添加 1.1 等量之螢光素－5－順丁烯二醯亞胺、5 等量之 DIEA，攪拌 1 小時後，以乙酸進行驟冷。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：COSMOSIL PBr 10x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 23–48%，之後耗費 8 分鐘 48–53%，之後耗費 1 分鐘 53–60%；流量：5mL/min）。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 82.8%。

分析條件 B：保持時間 = 13.93 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A = 0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B = 0.025%TFA in MeCN；

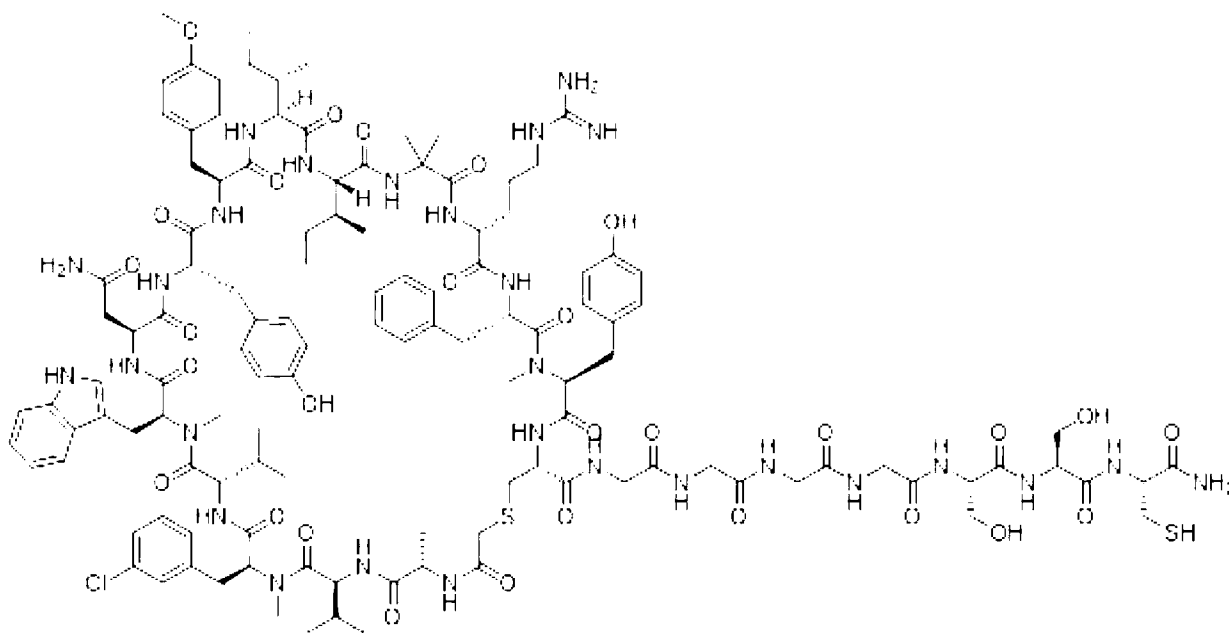
溫度 40°C；梯度 (%B conc)：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1076.51$  理論值  $(M+2H)^{2+}$ 。

【0260】 [合成例 10-3]

894\_\_variant\_\_61\_\_G4S2C (序列識別號 358) 的合成

[化 26]



【0261】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.73mmol/g, 1.37g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2 等量/4 等量/8 等量), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。第 12 個殘基係在 25

°C下，於 20 分鐘進行 2 次重複反應。第 13 個殘基係在 75°C 下，於 10 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基、第 22 個殘基係在 25°C 下，於 30 分鐘進行 1 次反應。並且，Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下反應 3 分鐘。但是第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下進行 5 分鐘反應後，在室溫反應 10 分鐘。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 10 等量之氯乙酸、10 等量之 DIPCI、10 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M)，添加至固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 90:2.5:2.5:5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9500rpm, 1min)，將溶液進行傾析，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 15 小時。將反應液以乙酸進行驟冷，使用 GenevaC HT-12 進行減壓濃縮。將所得之混合物溶解於 DMSO (20mL)，添加 3 等量之乙酸銀，振盪 3 小時。添加 2M DTT 水溶液 (11 等量) 後，進行離心分離，回收上清液後，在減壓下進行濃縮，獲得粗生成物。

**【0262】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x250mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B): 耗費 5 分鐘 6.7-6.7%, 之後耗費 2 分鐘 6.7-10.3%, 之後耗費 3 分鐘 10.3-35.8%, 之後耗費 15.5 分鐘 35.8-40.8%, 之後耗費 1.5 分鐘 40.8-60%; 流量: 耗費 5 分鐘 18mL/min-18mL/min, 之後耗費 2 分鐘 18mL/min-118mL/min, 之後 118mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 94.8%。

分析條件 B：保持時間 = 5.45 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A = 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O、B = 0.025% TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1289.65 (M+2H)^{2+}$ 。

**【0263】** 如同以下，合成肽或連結子加成肽。此外，所合成之肽、連結子加成肽表示於表5，連結子表示於表6。

【0264】 [表5]

專利編號	名稱	序列															連結子
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
527	894_v166	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	de -OH
528	894_v167	A	E	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	de -OH
529	894_v168	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	E	dr	F	MeY	C	de -OH
530	894_v169	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hgl	dr	F	MeY	C	de -OH
531	894_v170	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	K	dr	F	MeY	C	de -OH
532	894_v171	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dr	F	MeY	C	de -OH
533	894_v172	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dk	F	MeY	C	de -OH
534	894_v173	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Hly	dk	F	MeY	C	de -OH
535	36_GG_G(NHS)	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	S	C				G G G -NHS ester
536	36_G4S2_G(NHS)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	S	C				G G G -NHS ester
537	894_3m_GG_G(NHS)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	G G G -NHS ester
538	894_3m_G4S2_G(NHS)	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I	I	R	R	Y	MeY	C	G G G -NHS ester
539	894_variant_03_G_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G KN3
540	894_variant_03_G_short_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G PEG4c KN3
541	894_variant_03_G_middle_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G PEG8c KN3
542	894_variant_03_G_long_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	dr	F	MeY	C	G PEG12c KN3
543	894_variant_61_G_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Aib	dr	F	MeY	C	G KN3
544	894_variant_61_G_short_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Aib	dr	F	MeY	C	G PEG4c KN3
545	894_variant_61_G_middle_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Aib	dr	F	MeY	C	G PEG8c KN3
546	894_variant_61_G_long_Azi	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	Aib	dr	F	MeY	C	G PEG12c KN3
547	894_3142	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C	G KN3
548	894_3143	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	K	R	Y	MeY	C	G KN3
549	894_3144	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I	I	D	R	F	R	C	G KN3
550	894_3145	A	V	MeF	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	all	R	dr	F	MeY	C	G KN3
551	894_3147	A	V	MeNa1	V	MeNa1	N	Na1	Na1	I	I	K	K	Y	MeY	C	G KN3
552	894_3148	MeA	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I	I	R	da	F	MeY	C	G KN3

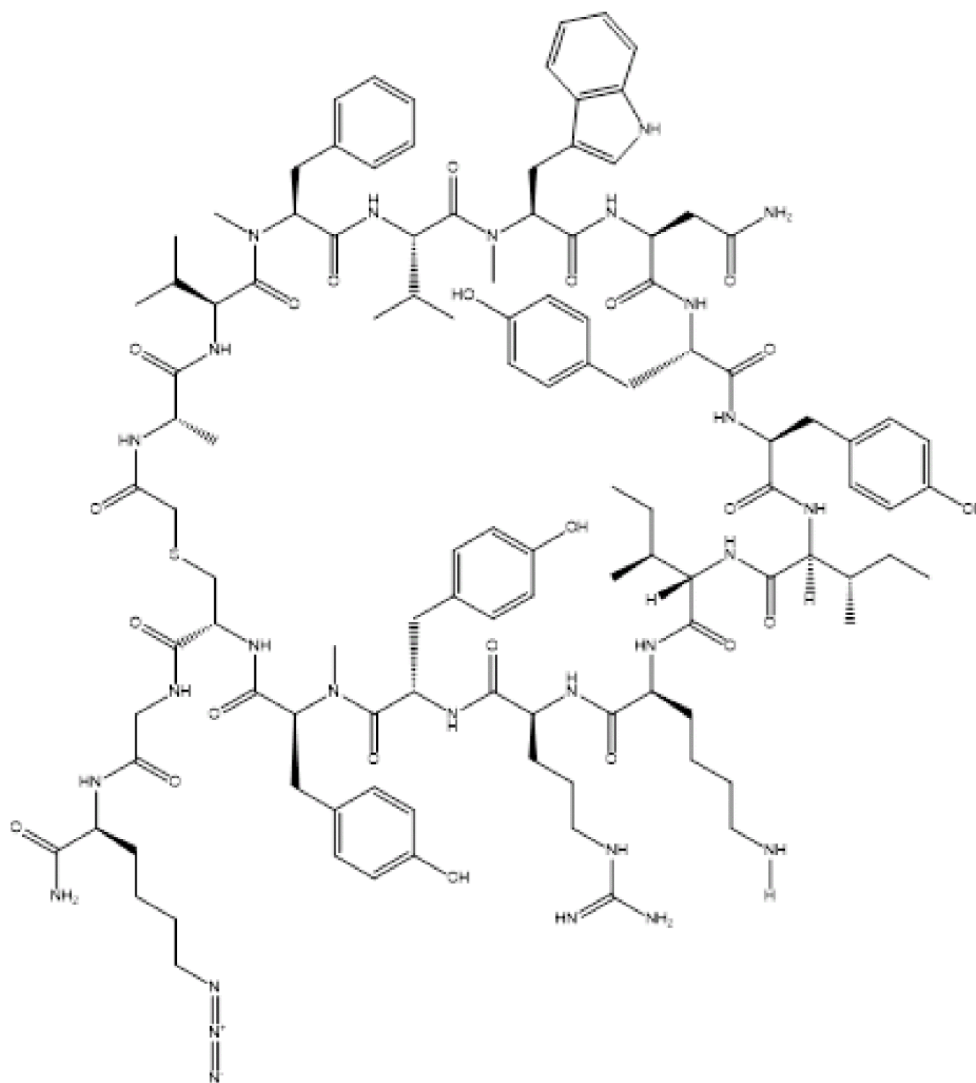
【0265】 [表 6-1]

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

【0266】 [表6-2]

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





【0269】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.52g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。合成係與實施例 1 同樣地進行。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度: 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 7–32%, 之後耗費 8 分鐘 32–37%, 之後耗費 1 分鐘 37–60%; 流量: 120mL/min)。

【0270】 目的物之純度係由以下的分析條件的 LC/MS(UV 波長 225nm) 層析圖的面積比所算出, 且為 94.20%。

分析條件 B: 保持時間=4.12 分; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN;

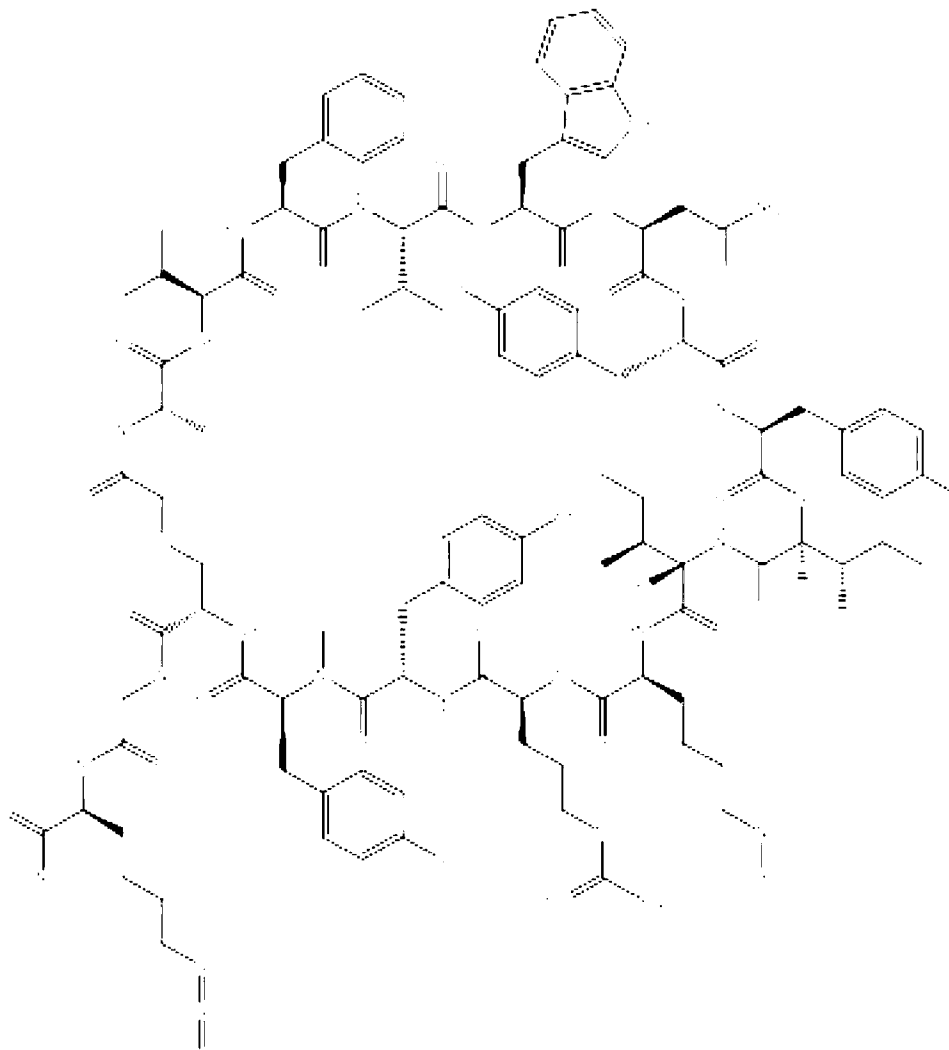
溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.15 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.55 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1147.70$  ( $M+2H$ )<sup>2+</sup>。

【0271】 [實施例 1–2]

894\_3143 (序列識別號 548) 的合成

[化 28]



【0272】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.52g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue HT 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。合成係與實施例 1 同樣地進行。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度: 40°C; 梯度 (%B): 耗費 2 分鐘 6–6%, 之後耗費 1

分鐘 6–31%，之後耗費 8 分鐘 31–36%，之後耗費 1 分鐘 36–60%；流量：耗費 1 分鐘 20–20mL/min，之後耗費 1 分鐘 20–120mL/min，之後 120mL/min）。

【0273】 目的物之純度係由以下的分析條件的 LC/MS(UV 波長 225nm) 層析圖的面積比所算出，且為 97.61%。

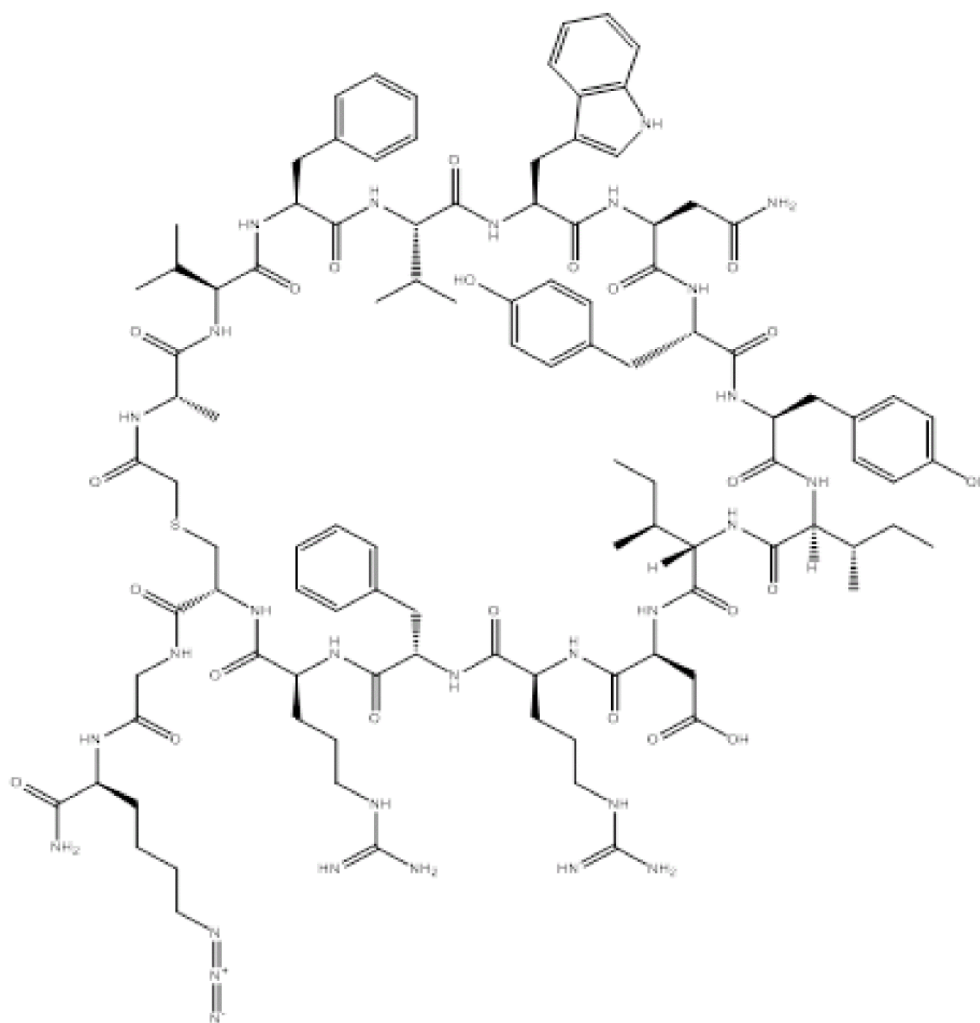
分析條件：保持時間 = 3.75 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å；移動相：A = 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O、B = 0.025% TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度 (%B conc) 耗費 7.15 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.55 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1133.66 (M+2H)^{2+}$ 。

【0274】 [實施例 1–3]

894\_3144 (序列識別號 549) 的合成

[化 29]



【0275】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.52g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。合成係與實施例 1 同樣地進行。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度: 40°C; 梯度 (%B): 耗費 2 分鐘 8—8%, 之後耗費 1 分鐘 8—33%, 之後耗費 8 分鐘 33—38%, 之後耗費 1 分鐘 38—60%; 流量: 耗費 1 分鐘 20—20mL/min, 之後耗費 1 分鐘 20—120mL/min, 之後 120mL/min)。

【0276】 目的物之純度係由以下的分析條件的 LC/MS(UV 波長 225nm) 層析圖的面積比所算出, 且為 97.52%。

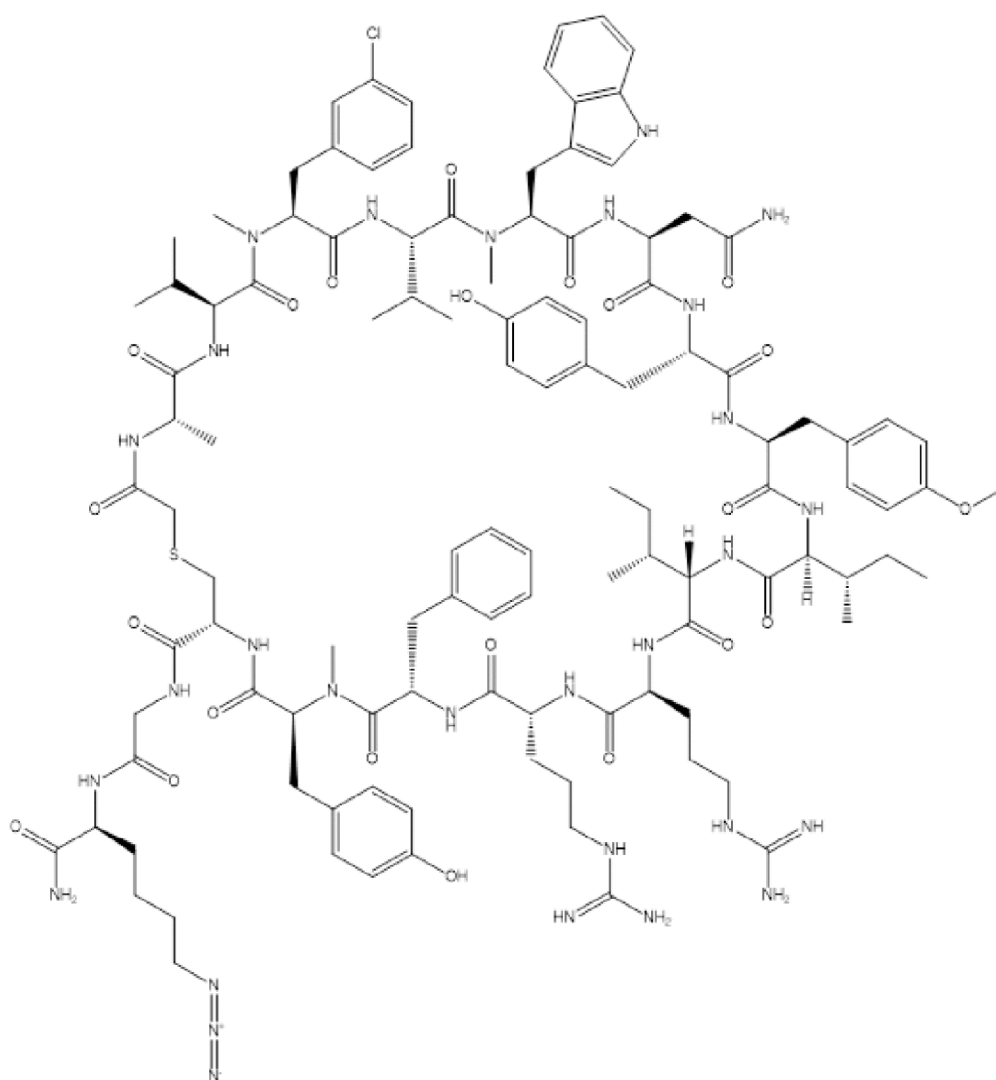
分析條件 B：保持時間=3.97 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B conc）耗費 7.15 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.55 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1108.62$  (M+2H)<sup>2+</sup>。

【0277】 [實施例 1-4]

894\_3145 (序列識別號 550) 的合成

[化 30]



【0278】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.52g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。合成係與實施例 1 同樣地進行。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度：40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 13–38%，之後耗費 8 分鐘 38–43%，之後耗費 1 分鐘 43–60%；流量：120mL/min）。

【0279】 目的物之純度係由以下的分析條件的 LC/MS(UV 波長 225nm) 層析圖的面積比所算出，且為 98.02%。

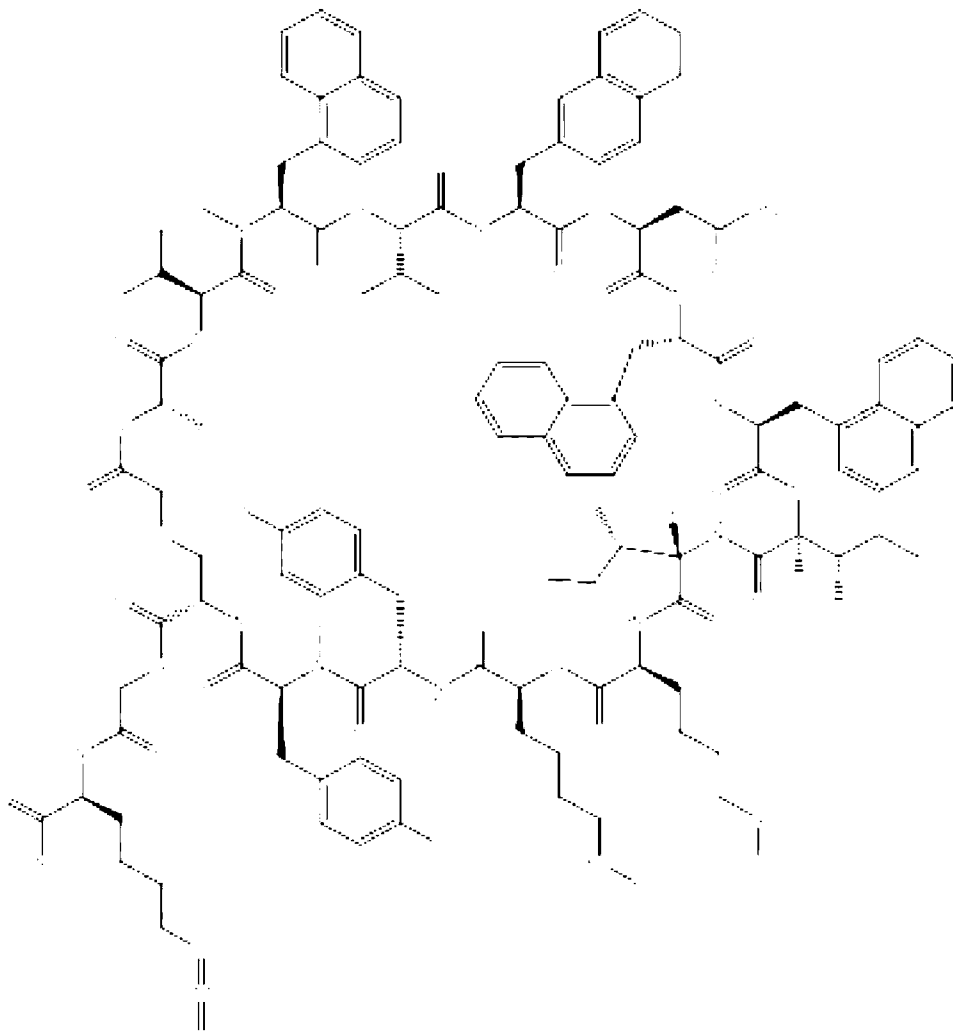
分析條件：保持時間=4.91 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B conc）耗費 7.15 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.55 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1177.95$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

【0280】 [實施例 1–5]

894\_\_3147（序列識別號 551）的合成

[化 31]



【0281】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.52g), Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。合成係與實施例 1 同樣地進行。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度: 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 21–46%, 之後耗費 8 分鐘 46–51%, 之後耗費 1 分鐘 51–60%; 流量: 120mL/min)。

【0282】 目的物之純度係由以下的分析條件的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比所算出, 且為 96.34%。

分析條件: 保持時間 = 6.24 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN;

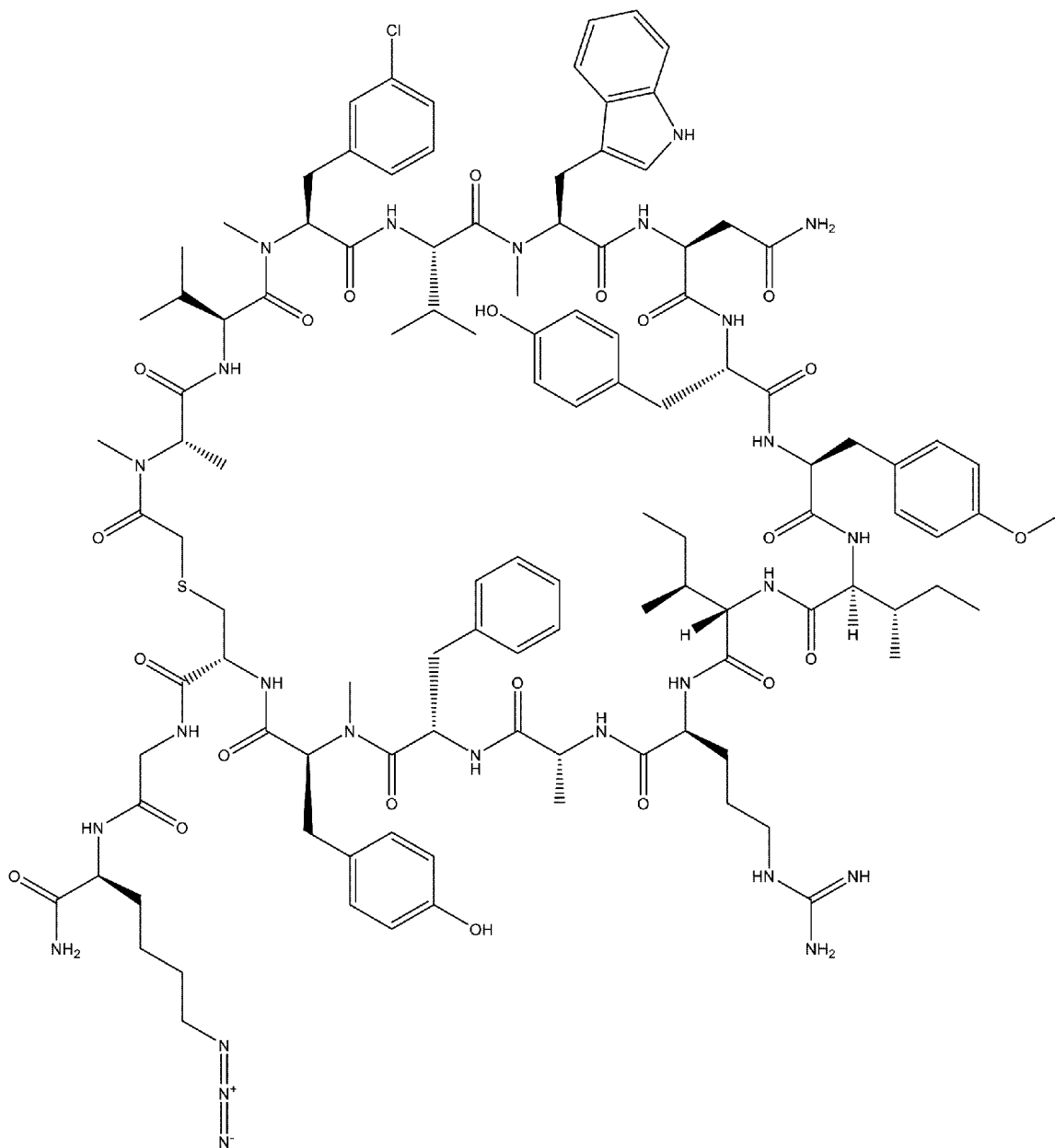
溫度 60°C；梯度 (%B conc) 耗費 7.15 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.55 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1198.29$  ( $M+2H$ )<sup>2+</sup>。

【0283】 [實施例 1–6]

894\_3148 (序列識別號 552) 的合成

[化 32]



【0284】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.48mmol/g, 0.52g), Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。合成係與實施例 1 同樣地進行。



**【0286】** 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (5.3 等量/5 等量/10 等量), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。第 10 個殘基、第 11 個殘基、第 13 個殘基係在 75°C 下, 10 分鐘進行 2 次重複反應。第 12 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下進行 5 分鐘反應後, 在 25°C 下反應 10 分鐘。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 將 10 等量之氯乙酸、10 等量之 DIPC1、10 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌, 添加與 DCM 同量的 DMF, 製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M), 添加至固相樹脂, 在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪, 由玻璃料回收溶液成分, 並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒, 則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min), 將溶液進行傾析, 使其在減壓下進行乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後, 添加 5 等量之三乙胺, 在室溫振盪約 14 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0287】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 17-42%, 之後耗費 8 分鐘 42-47%, 之後耗費 1 分鐘 47-60%; 流量: 120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 92.8%。

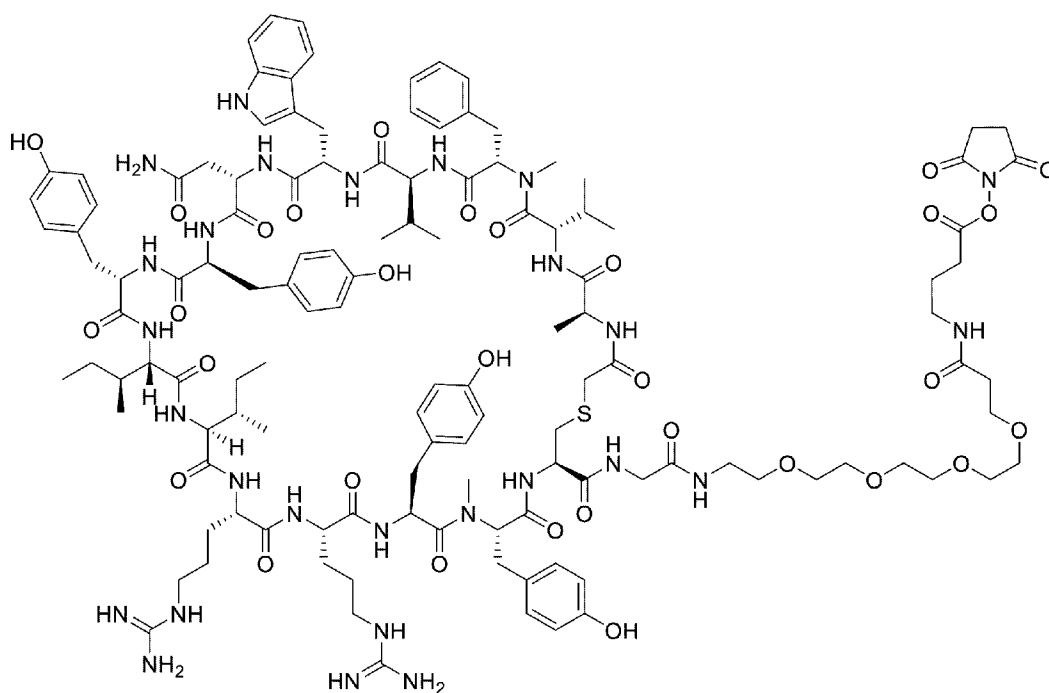
分析條件 B：保持時間 = 6.22 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A = 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O、B = 0.025% TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1142.31 (M+2H)^{2+}$ 。

[合成例 1-8]

hTfR\_894\_3m\_G\_PEG4\_gAbu (NHS) (序列識別號 635 記載之連結子與序列識別號 296 之肽的複合體) 的合成

[化 34]



【0288】 使用遵循一般的固相合成而由 Fmoc-Abu (4) - Alko resin (渡邊化學，1.00mmol/g，0.1g) 所製備之 Fmoc-PEG4c-Abu-Alko resin，遵循前述的一般方法，從 Fmoc 的去除開始，合成 C 端羧酸肽。此時，將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀，遵循製造商的手冊進行合成。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 0.2M 氯乙酸 in DMF (5 等量)、0.5M HATU

in DMF (5 等量)、1M DIEA in DMF (10 等量) 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，並傾析溶液。將所得之個體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體進行乾燥，使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫攪拌約 17 小時。使用 Savant Explorer SpeedVaC 將反應溶液進行減壓濃縮。以將固相樹脂的莫耳數作為基準而所得之 C 端羧酸肽的終濃度成為 5mM 之方式，將混合物溶解於 DMSO/H<sub>2</sub>O (9/1, 4mL)，添加 HOSu (230mg, 20 等量) 及 EDC HCl (383.4mg, 20 等量) 並進行攪拌。

**【0289】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 30x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 9–34%，之後耗費 8 分鐘 34–39%，之後耗費 1 分鐘 39–60%; 流量: 45mL/min。

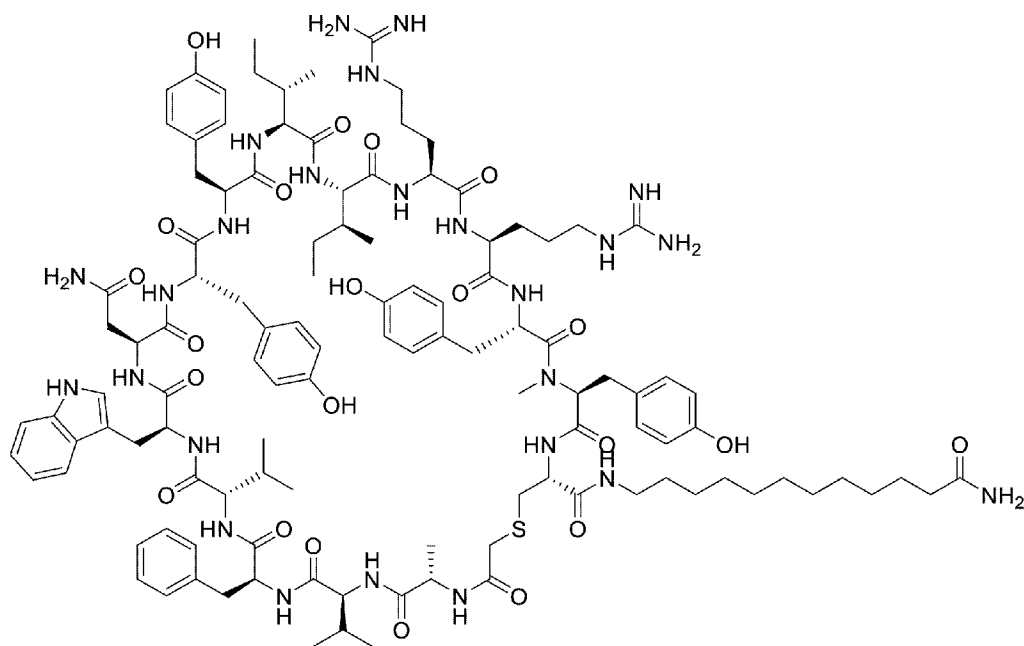
**【0290】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 87.4%。

分析條件 B: 保持時間=4.25 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%; 流量: 0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 1292.86 (M + 2H)^{2+}$ 。

[合成例 1-9]

894\_\_C12NH<sub>2</sub> (脂肪酸連結子與序列識別號 1 之複合體) 的合成  
[化 35]



【0291】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.53mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (5.3 等量/5 等量/10 等量), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 進行 10 分鐘反應。但是, 第 1 個殘基、第 9 個殘基、第 10 個殘基、第 13 個殘基、第 14 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 30°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次反應。導入第 15 個殘基之際係在 30°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 11 個殘基、第 12 個殘基、第 14 個殘基、第 15 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下進行 5 分鐘反應後, 在 25°C 下進行 10 分鐘反應。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 將氯乙酸 (5 等量)、5 等量之 DIPC1、5 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌, 添加與 DCM 同量的 DMF, 製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M), 添加至固相樹脂, 在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於

第 146 頁, 共 169 頁 (發明說明書)

反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（6000rpm，4min），並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 5 等量之三乙胺，在室溫振盪約 2 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0292】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）30x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 11–36%，之後耗費 3 分鐘 36–41%，之後耗費 1 分鐘 41–60%；流量：45mL/min）。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 96.3%。

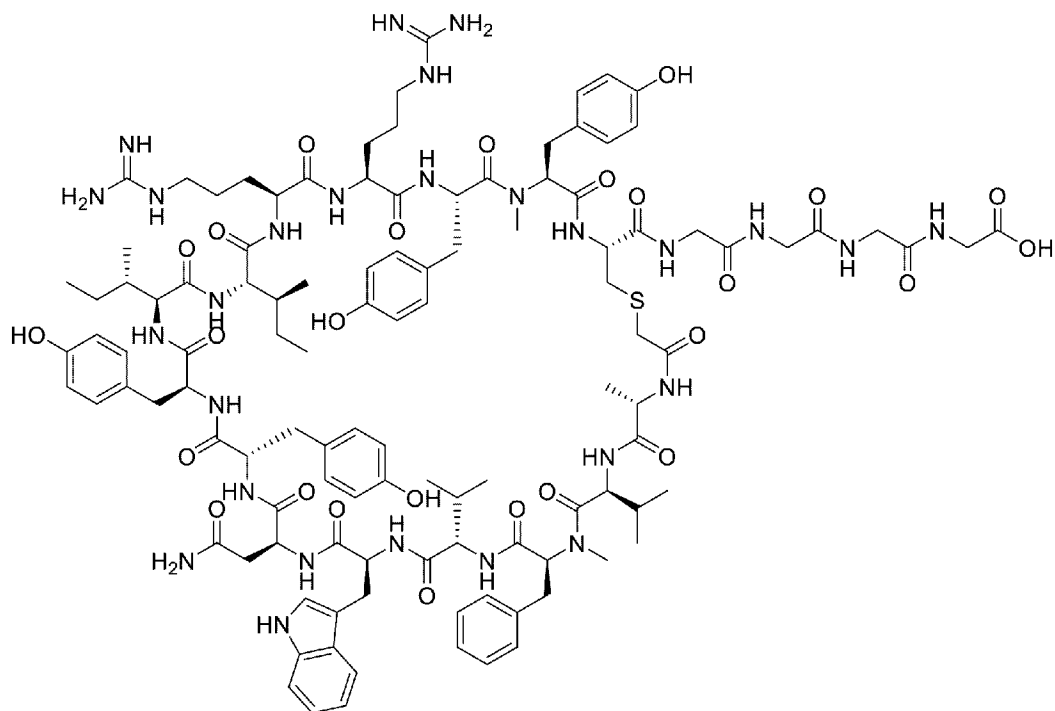
分析條件 B：保持時間 = 12.61 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025% TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20–60%，之後耗費 1 分鐘 60–95%，之後耗費 5 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z = 1140.56$ （ $M+2H$ ）<sup>2+</sup>。

**【0293】** [合成例 1–10]

894\_\_3m\_\_G4(序列識別號 643 記載的連結子與序列識別號 296 的肽之複合體)的合成

[化 36]



【0294】 使用 Fmoc-Gly-wang resin (渡邊化學, 0.7mmol/g, 1.43g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。縮合反應的基本條件係在縮合劑中使用 HATU, 在 75°C 下, 於 10 分鐘使其進行 1 次反應。但是, 導入第 15 個殘基之際係在 25°C 下, 於 20 分鐘進行 1 次反應。導入第 13 個殘基之際係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次重複反應。導入第 2 個殘基之際係在 75°C 下, 於 45 分鐘進行 2 次重複反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係藉由在 25°C 下反應 5 分鐘後, 使其反應 10 分鐘而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 添加氯乙酸 (4 等量) 的 DMF 溶液 (0.2M)、4 等量之 DIPEA 的 DMF 溶液 (0.5M)、4 等量之 HOSu 的 DMF 溶液 (0.5M), 在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器

的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。濾取此混合物，以乙醚清洗後，在減壓下使其乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO/IPA/H<sub>2</sub>O (90/5/5) 後，添加 5 等量之三乙胺，在室溫攪拌約 16 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC HT-12 進行減壓濃縮。

**【0295】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）30x250mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 0.1 分鐘 50-7%，之後耗費 1.9 分鐘 7-7%，之後耗費 3 分鐘 7-32%，之後耗費 11 分鐘 32-37%，之後耗費 1 分鐘 37-60%；流量：120mL/min）。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 90.6%。

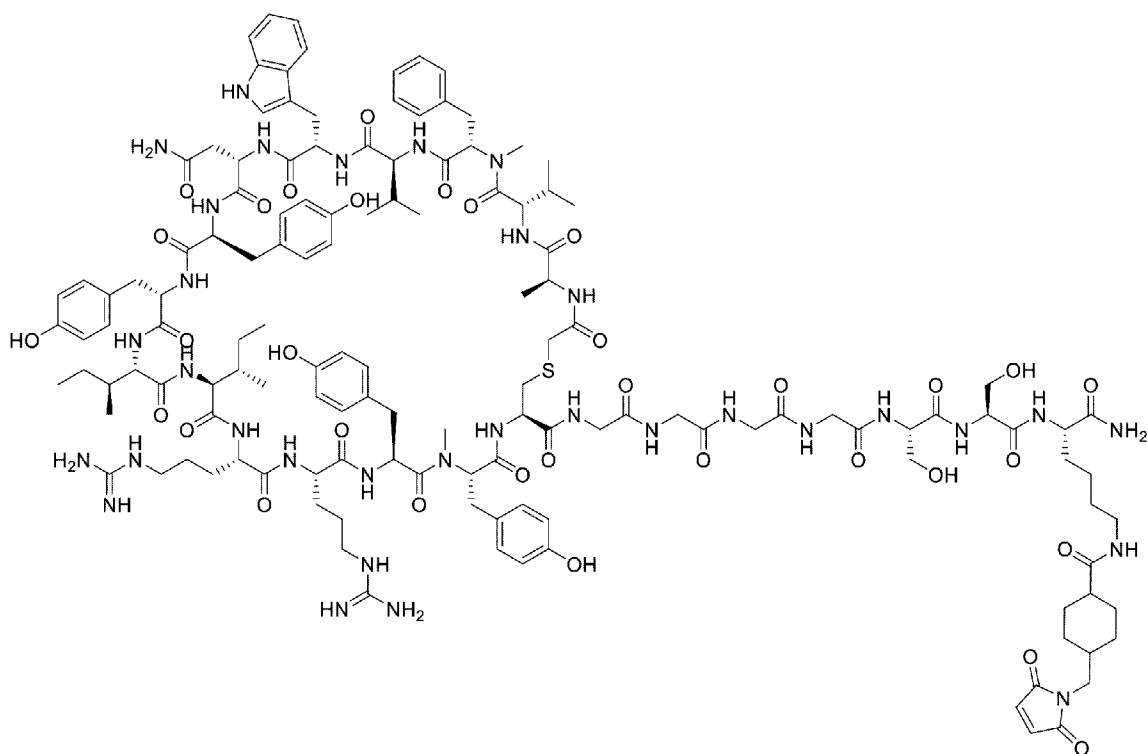
分析條件 B：保持時間=11.34 分鐘；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20-60%，之後耗費 1 分鐘 60-95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1163.59$ （M+2H）<sup>2+</sup>。

**【0296】** [合成例 1-11]

894\_3m\_G4S2\_K（Mal）（序列識別號 561 記載的連結子與序列識別號 296 的肽之複合體）的合成

[化 37]



【0297】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.52mmol/g, 2.4g X 3), 依循一般的方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue 使用作為固相合成儀, 依循製造商的手冊進行。縮合反應的基本條件係在縮合劑中使用 DIPICI、Oxyma pure, 在 75°C 下使其於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 15 個殘基係在 50°C 下進行 20 分鐘反應。第 3 個殘基、第 4 個殘基、第 8 個殘基、第 10 個殘基、第 13 個殘基、第 14 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 50°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次反應。第 2 個殘基係在 75°C 下, 於 60 分鐘進行 3 次反應。第 1 個殘基係在 75°C 下, 於 20 分鐘進行 2 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘反應。但是, 關於第 15 個殘基、第 16 個殘基、第 17 個殘基, Fmoc 去除係藉由在室溫使其反應 5 分鐘後, 在 75°C 使其反應 3 分鐘而進行。氯乙醯基的導入, 首先, 對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法, 去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基。之後, 藉由將氯乙酸 (5 等量)、DIPICI (5 等量)、HOSu (5 等量) 在 DCM 中進行攪拌, 添加與 DCM 同量的 DMF, 製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.15M), 添加至固相樹脂, 在室溫振盪 180 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷

第 150 頁, 共 169 頁 (發明說明書)

清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚，則產生白濁沉澱。濾取此混合物，以已冷卻至 0°C 的乙醚清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 4.9mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 7 等量之三乙胺，在室溫振盪約 1 小時。在所得之反應溶液中添加 1.05 等量之 SMCC，在室溫振盪 1.5 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC EZ-2 Elite 進行減壓濃縮。

**【0298】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x250mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B): 耗費 5.1 分鐘 0-0%, 之後耗費 1.9 分鐘 0-5%, 之後耗費 5 分鐘 5-29%, 之後耗費 13.5 分鐘 29-34%, 之後耗費 1.5 分鐘 34-60%; 流量: 1mL/min 至 0-5.1 分鐘為止, 從 5.1 分鐘至 7.0 分鐘為止為 1-119mL/min, 之後 119mL/min)。

**【0299】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算, 且為 94.1%。

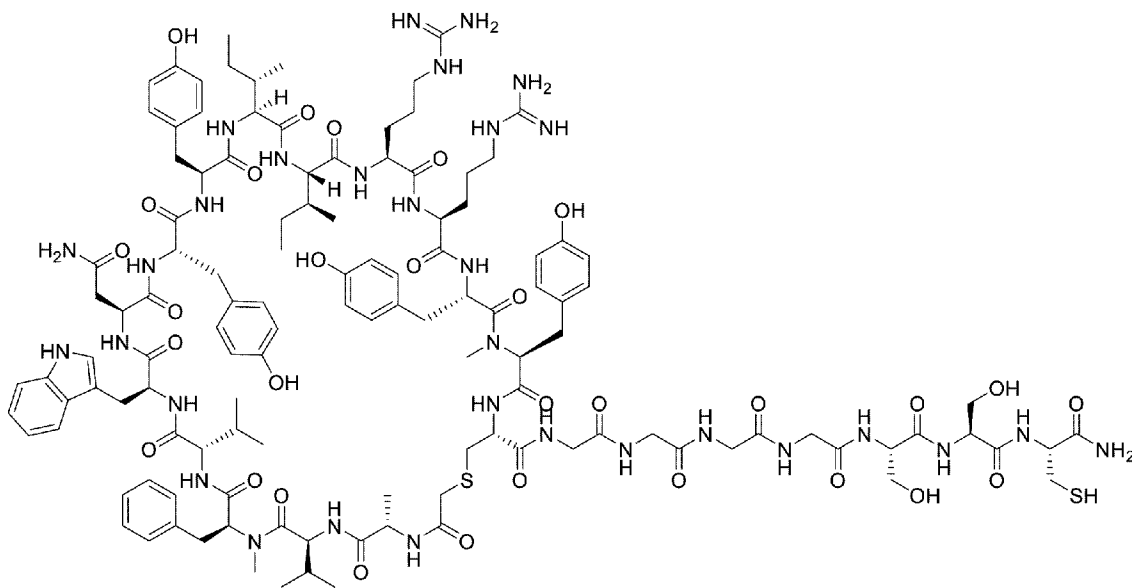
分析條件 B: 保持時間=11.33 分鐘; 梯度 (%B conc): 耗費 20 分鐘 20-60%, 之後耗費 1 分鐘 60-95%, 之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1424.0 (M+2H)^{2+}$ 。

**【0300】** [合成例 1-12]

894\_\_3m\_\_G4S2C (序列識別號 644 記載的連結子與序列識別號 296 的肽之複合體) 的合成

[化 38]



【0301】 將另外合成之 894\_3m\_G (500mg, 0.21mmol) 溶解於 DMF (5mL), 使用以眾所周知的方法所合成之 1.2 等量之 H-Gly-Gly-Gly-Ser (OtBu)-Ser (OtBu)-CyS (Trt)-NH<sub>2</sub> (207mg, 0.25mmol)、1.2 等量之 EDC (39.1mg, 0.25mmol)、1.2 等量之 DIEA (35.8mg, 0.25mmol), 在室溫下攪拌 2.5 小時。添加 0.24 等量之 H-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)-Ser(OtBu)-CyS (Trt)-NH<sub>2</sub> (41.4mg, 0.05mmol)、0.24 等量之 7.8mg, 0.05mmol)、0.24 等量之 DIEA (7.2mg, 0.05mmol), 在室溫攪拌 2 小時。以 Biotage 公司 V-10 濃縮後, 將所得之混合物在 TFA/TIS/H<sub>2</sub>O/DODT(92.5/2.5/2.5/2.5) 中, 在室溫下使其反應 75 分鐘。若將反應液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚, 則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min), 並傾析溶液。將所得之固體以已冷卻至 0°C 的乙醚清洗, 離心分離後 (9000rpm, 2min), 並傾析溶液。

【0302】 所得之混合物係使用以下的條件進行精製(管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 5-30%, 之後耗費 8 分鐘 30-35%, 之後耗費 1 分鐘 35-60%; 流量 120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算, 且為 96.1%。

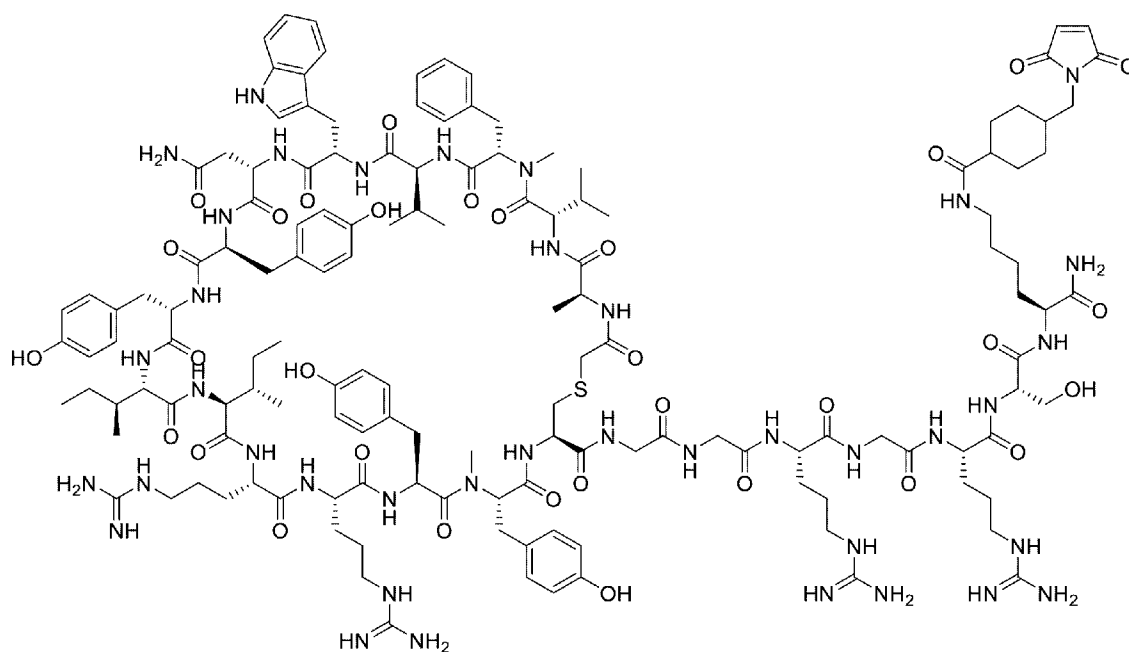
分析條件 B：保持時間=3.52 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度 (%B conc)：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1301.89 (M+2H)^{2+}$ 。

【0303】〔合成例 1–13〕

894\_\_3m\_\_GGRGRS\_\_K (Mal) (序列識別號 573 記載的連結子與序列識別號 296 的肽之複合體) 的合成

[化 39]



【0304】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 532mg), 依循一般的方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 依循製造商的手冊進行。縮合反應的基本條件為在縮合劑中使用 HATU, 並在 75°C 下使其於 10 分鐘反應 2 次。但是, 第 2 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 5 個殘基、第 6 個殘基、第 7 個殘基、第 16 個殘基、第 17 個殘基、第 19 個殘基、第 21 個殘基、第 22 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。第 11 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次反應。第 12 個殘基、第 18 個殘基、第 20 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 1 次反應。第 15 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc

去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是，關於第 2 個殘基、第 13 個殘基，Fmoc 去除係在室溫下使其於 5 分鐘反應 2 次。氯乙醯基的導入係藉由將氯乙酸（5 等量）、DIPCI（5 等量）、HOSu（5 等量）在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 DMF，製備 ClAcOSu 的 DCM / DMF 溶液（0.15M），添加至由前步驟所得之固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 - A（TFA / H<sub>2</sub>O / TIS / DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物），在室溫振盪 150 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚與己烷之混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（9500rpm，1min），傾析上清液後，利用已冷卻至 0°C 的乙醚進行清洗，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO（5% 含水）後，添加 7 等量之三乙胺，在室溫振盪約 3 小時。在所得之反應溶液中，添加 1.1 等量之 SMCC，在室溫振盪 3 小時。將所得之反應溶液使用 GenevaC EZ-2 Elite 進行減壓濃縮。

**【0305】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m（註冊商標）50x250mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 5—29%，之後耗費 8 分鐘 29—34%，之後耗費 1 分鐘 34—60%；流量：120mL / min）。

**【0306】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC / MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 95.4%。

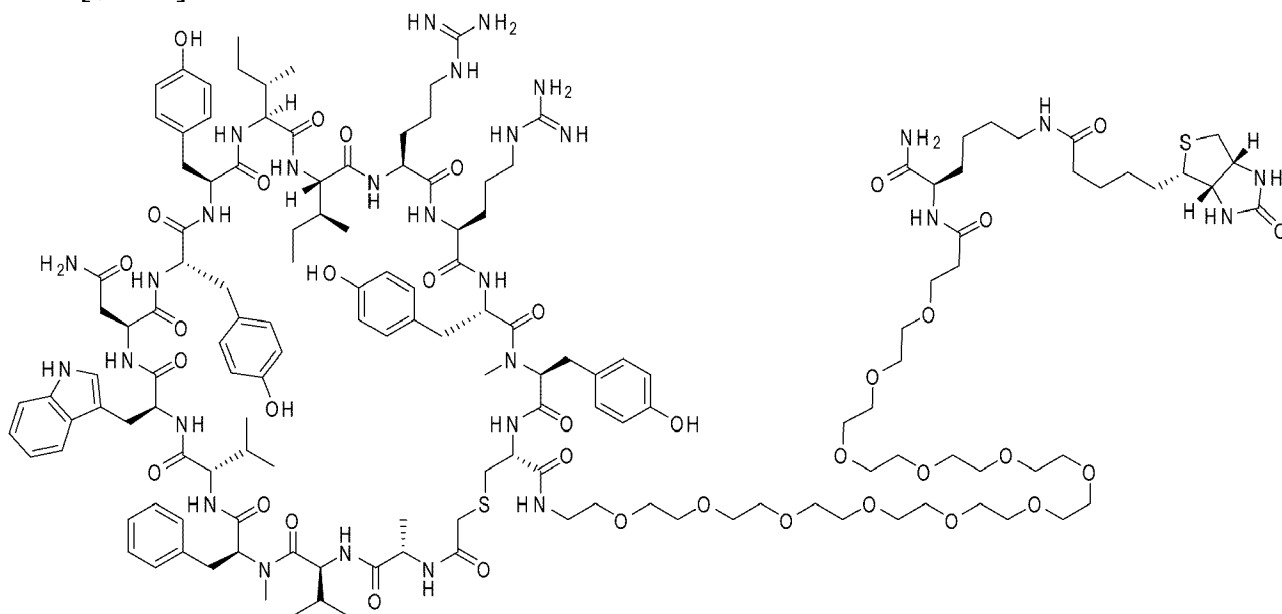
分析條件 B：保持時間=9.53 分鐘；梯度（%B conc）：耗費 20 分鐘 20—60%，之後耗費 1 分鐘 60—95%，之後耗費 5 分鐘 95%。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1005.7$ （ $M+3H$ ）<sup>3+</sup>。

**【0307】** [ 合成例 1—14 ]

894\_\_3m\_\_PEG12dk（Biotin）（序列識別號 613 記載的連結子與序列識別號 296 的肽之複合體）的合成

[化 40]



**【0308】** 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.65mmol/g, 0.54g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 CEM 公司的 Liberty Blue HT 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 其基本條件係相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure = 5.3 等量/10 等量/5 等量, 在 90°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 2 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 50°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次反應。第 13 個殘基係在 90°C 下, 於 3 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基係在 50°C 下, 進行 15 分鐘反應。去 Fmoc 化的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是第 2 個殘基、第 13 個殘基的 Fmoc 基的去除係藉由在 25°C 下, 於 5 分鐘進行 2 次反應而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 添加 5 等量之 ClAcOH in DMF、5 等量之 HATU in DMF、10 等量之 DIEA in DMF, 在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次, 並以氯甲烷清洗 3 次, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪, 由玻璃料回收溶液成分, 並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚/己烷 (1/

1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離（10000rpm，1min），並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 5% 含水 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 16 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

所得之粗中間體肽係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m OBD（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 5–30%，之後耗費 8 分鐘 30–35%，之後耗費 1 分鐘 35–60%；流量：120mL/min）。

對於所得之中間體肽的 DMSO 溶液（22mM、160 $\mu$ L），添加 1.3 等量之 Biotin-NHS 及 5 等量之 DIEA，在室溫進行攪拌。2.5 小時後，將反應液以乙酸進行驟冷。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m OBD（註冊商標）19x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 10–35%，之後耗費 8 分鐘 35–40%，之後耗費 1 分鐘 40–60%；流量：17mL/min）。

**【0309】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 98.7%。

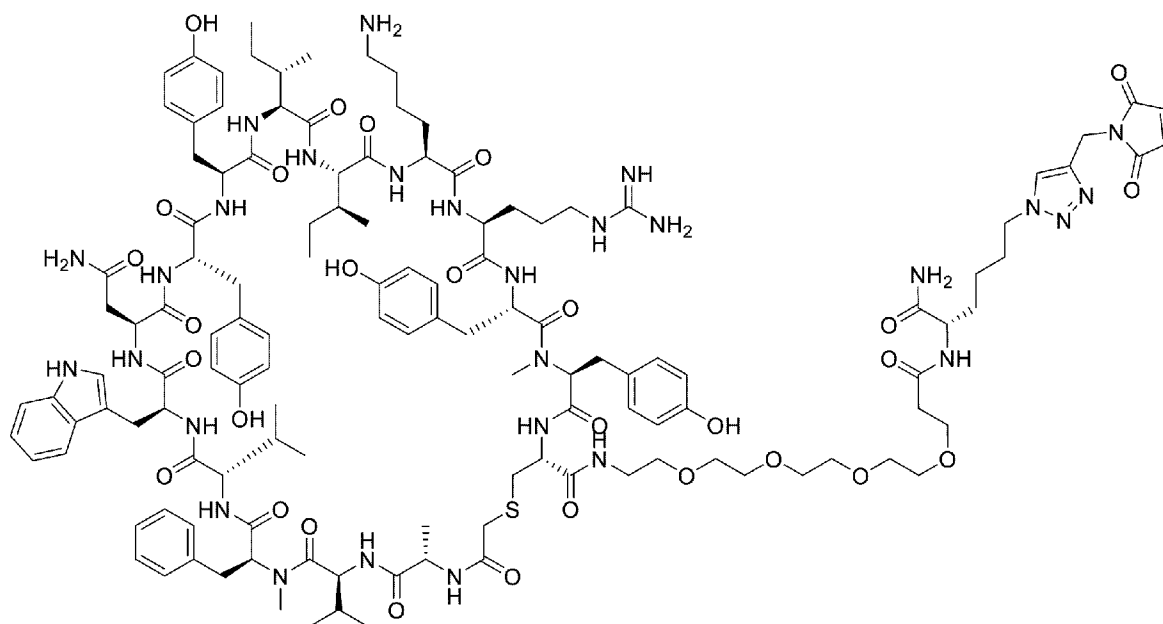
分析條件 B：保持時間=4.30 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 60°C；梯度（%B conc）：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95%；流量：0.5mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z=1017.76$ （M+3H）<sup>3+</sup>。

**【0310】** [合成例 1–15]

894\_\_11K\_\_3Me\_\_PEG4C\_\_KTrzMal（序列識別號 624 記載的連結子與序列識別號 293 的肽之複合體）的合成

[化 41]



【0311】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.52mmol/g, 0.19g), 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 將 Biotage 公司的 SyroI 使用作為自動合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 其基本條件係相對於樹脂 1 等量, 使用 Fmoc-AA/DIC/Oxyma pure=3.2 等量/3 等量/6.3 等量, 在 75°C 下, 於 20 分鐘使其進行 2 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 13 個殘基、第 17 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 3 次反應。第 15 個殘基係在 25°C 下, 於 15 分鐘進行 2 次反應。第 16 個殘基係在 25°C 下, 於 60 分鐘進行反應。去 Fmoc 化係藉由與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 25°C 下進行 5 分鐘反應後, 進行 15 分鐘反應而進行。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 將 5 等量之氯乙酸、5 等量之 DIPCI、5 等量之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌, 添加與 DCM 同量的 NMP, 製備 ClAcOSu 的 DCM/NMP 溶液 (0.2M), 添加至固相樹脂, 在室溫振盪 90 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次, 並以氯甲烷清洗 3 次, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液-A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪, 由玻璃料回收溶液成分, 並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的二異丙醚/己烷(1/1), 則產生白濁沉澱。

將此混合物進行離心分離（9000rpm，3min），並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚及己烷清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 9% 含水 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫振盪約 1.5 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

所得之粗中間體肽係使用以下的條件進行精製（管柱：WaterS Xbridge（註冊商標）C18 5 $\mu$ m OBD（註冊商標）50x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 9–34%，之後耗費 8 分鐘 34–39%，之後耗費 1 分鐘 39–60%；流量：120mL/min）。

冷凍乾燥後，對於所得之中間體肽的 DMF 溶液（15mM），添加 2 等量之 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 水溶液（100mM）及 10 等量之抗壞血酸水溶液（500mM）後，添加 2 等量之 N-炔丙基順丁烯二醯亞胺的 DMF 溶液（100mM），在室溫進行攪拌。

所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製（管柱：COSMOSIL PBr 10x150mm；移動相：A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B）：耗費 3 分鐘 17–42%，之後耗費 8 分鐘 42–47%，之後耗費 1 分鐘 47–60%；流量：5mL/min）。

**【0312】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS（UV 波長 225nm）層析圖的面積比進行計算，且為 82.7%。

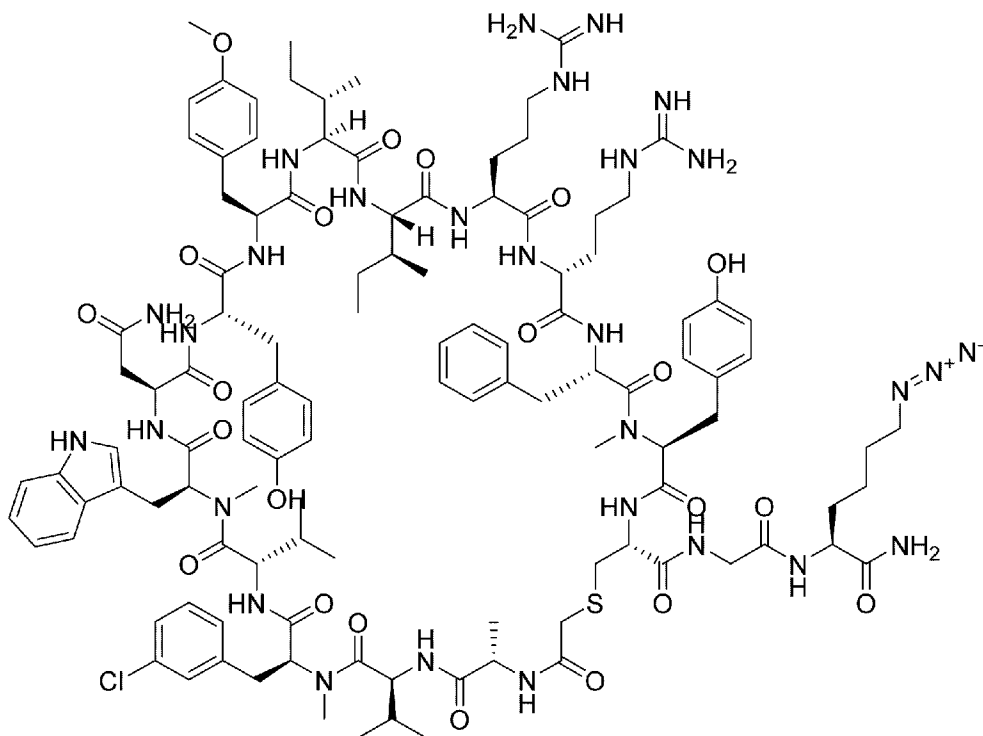
分析條件 B：保持時間 = 11.37 分鐘；管柱：Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å；移動相：A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN；溫度 40°C；梯度（%B conc）：耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95%；流量：0.25mL/min。

ESI-MS（+）觀測值  $m/z = 1303.33$ （M+3H）<sup>3+</sup>。

**【0313】** [合成例 1–16]

894\_\_variant\_\_03\_\_GKN3（序列識別號 554 記載的連結子與序列識別號 397 之複合體）的合成

[化 42]



【0314】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.47mmol/g, 0.21g), 利用前述的一般方法, 從 Fmoc 基的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。在各殘基的導入中, 對於樹脂 1eq, 使用 Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2eq/4eq/8eq), 在 DMF 中, 在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 1 次反應。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基係在 75°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。第 11 個殘基、第 12 個殘基係在 25 度下, 於 20 分鐘進行 2 次重複反應。第 13 個殘基係在 75°C 下, 於 10 分鐘進行 2 次反應。第 15 個殘基、第 22 個殘基係在 25°C 下, 於 30 分鐘進行 1 次反應。並且, Fmoc 去除的基本條件係與 20% piperidine 的 DMF 溶液在 75°C 下使其反應 3 分鐘。但是, 第 2 個殘基、第 4 個殘基及第 13 個殘基的 Fmoc 去除係在 25°C 下, 於 5 分鐘進行反應後, 在室溫使其反應 10 分鐘。氯乙醯基的導入係藉由對於已保持由前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 將 5eq 之氯乙酸、5eq 之 DIPEA、10eq 之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌, 添加與 DCM 同量的 DMF, 製備 ClAcOSu 的 DCM/DMF 溶液 (0.2M), 添加至固相樹脂, 在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次後, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反

第 159 頁, 共 169 頁 (發明說明書)

應容器中，添加反應劑混合液－A(TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 20 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1) 的混合溶媒，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，將溶液進行傾析，使其在減壓下進行乾燥。將所得之固體使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 5% 含水 DMSO 後，添加 6 等量之三乙胺，在室溫振盪約 16 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

**【0315】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 11–36%, 之後耗費 8 分鐘 36–41%, 之後耗費 1 分鐘 41–60%; 流量: 120mL/min)。

目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 95.5%。

分析條件 B: 保持時間=4.84 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 60°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20–60%, 之後耗費 0.3 分鐘 60–95%, 之後耗費 1.6 分鐘 95%; 流量: 0.5mL/min。

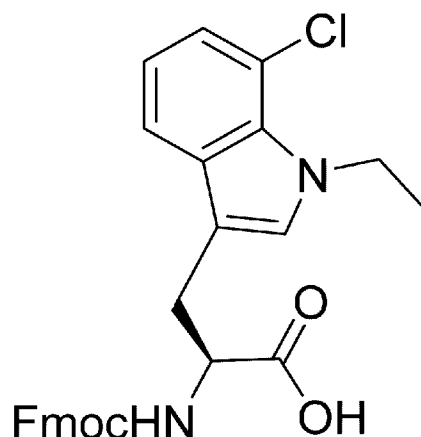
ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1178.06 (M+2H)^{2+}$ 。

**【0316】** 如同以下，合成新的胺基酸。

[合成例 2-1]

(S)-2-[[ (9H-芴-9-基甲氧基) 羰基] 胺基]-3-(7-氯-1-乙基-1H-吡啶-3-基) 丙酸 (W1Et7Cl) 的合成

**【0317】** [化 43]



【0318】 對於 7-氯-3-碘-1H-吲哚 (18g, 64.9mmol) 的 DMF 溶液 (500mL), 在 0°C 下, 分批添加 NaH (60wt%, 8.7g, 361mmol)。接下來, 在 0°C 下, 分批添加碘化乙酯 (10.3mL, 130.4mmol) 後, 將此在室溫攪拌約 16 小時。以水將反應溶液稀釋後, 以乙酸乙酯 (3x200mL) 進行萃取。將合併的有機層以水 (100mL) 清洗三次, 以無水硫酸鈉進行乾燥, 並進行過濾。將有機層進行濃縮後, 將殘渣以矽凝膠管柱層析法 (乙酸乙酯: 石油醚=1:5) 進行精製。

氮氣環境下, 在鋅 (8g, 122mmol) 的 DMF 懸浮液 (50mL) 中添加碘 (1.6g, 12.6mmol), 接著添加甲基 (2R) - 2 - [ [ (9H-芴-9-基甲氧基) 羰基 ] 胺基 ] - 3 - 碘丙酸酯 (18.5g, 41mmol), 在室溫攪拌 30 分鐘。在此反應液中, 添加由前述所得之生成物的一部分 (15g, 49mmol) 的 DMF (300mL) 溶液, 接下來, 添加 SpHos (0.84g, 2.0mmol) 與 Pd<sub>2</sub> (dba)<sub>3</sub> (1.1g, 1.2mmol), 將混合物在 50°C 攪拌 4 小時。以水將反應停止, 濾去固體, 將濾液以乙酸乙酯 (400mL) 萃取四次。將合併的有機層以水 (200mL) 清洗四次。將有機層以無水硫酸鈉進行乾燥, 過濾後進行濃縮。將所得之殘渣以矽凝膠管柱層析法 (乙酸乙酯: 石油醚=2:8) 進行精製。

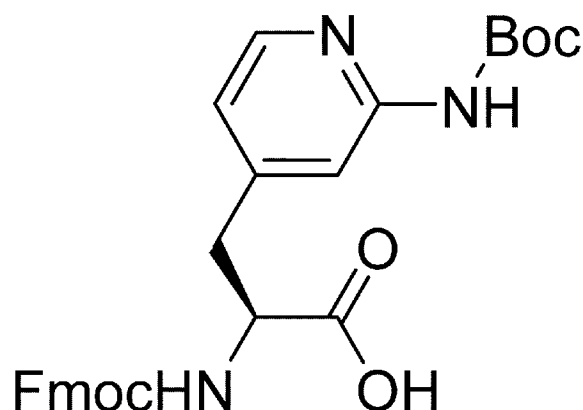
在所得之生成物的一部分 (18g, 35.8mmol) 與 1,4-二[口喙]烷 (200mL) 的混合物中, 吹入氯化氫 (60g, 1.7mol), 在 100°C 攪拌 4 小時。將反應液進行濃縮後, 將殘渣以逆相矽凝膠管柱層析法 (水: 乙腈=100:0-0:100) 進行精製, 獲得標題物質。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=489.10$  (M+H)<sup>+</sup>。

## 【0319】 [合成例 2-2]

(S)-2-[[[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基]-3-(2-((三級丁基氧基羰基)胺基)吡啶-4-基)丙酸(4Py6NH<sub>2</sub>)的合成

## 【0320】 [化 44]



【0321】 在氮氣環境下，在鋅(5.8g, 88.6mmol)的 DMF (200mL) 懸浮液中添加碘(4.5g, 17.7mmol)後，在室溫滴下甲基(2R)-2-[[[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基]-3-碘丙酸酯(20g, 44.32mmol, 1.0 等量)的 DMF 溶液(50mL)。將混合物在室溫攪拌 1 小時。接著，添加 4-溴吡啶-2-胺(7.7g, 44.3mmol, 1 等量)、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>(2.0g, 2.2mmol, 0.05 等量)、SpHos(1.8g, 4.4mmol, 0.1 等量)後，將此在 50°C 攪拌約 16 小時。添加水 500mL 使反應停止後，濾去固體。將濾液以乙酸乙酯(300mL)萃取三次。將合併的有機萃取物以飽和食鹽水(300mL)清洗三次，以無水硫酸鈉進行乾燥，並進行過濾，將濾液進行濃縮。將所得之殘渣以矽凝膠管柱層析法(乙酸乙酯：石油醚=25：75)進行精製。

將由上述所得之生成物的一部分(10g, 24.0mmol)，在三級丁醇(110mL)中，添加 Boc<sub>2</sub>O(6.3g, 28.7mmol)、NaI(4.3g, 28.7mmol)，在室溫攪拌約 16 小時。將反應液進行濃縮後，將所得之殘渣溶解於乙酸乙酯 80mL 後，以飽和食鹽水(100mL)清洗三次。將有機層以無水硫酸鈉進行乾燥，且進行過濾，並進行濃縮。

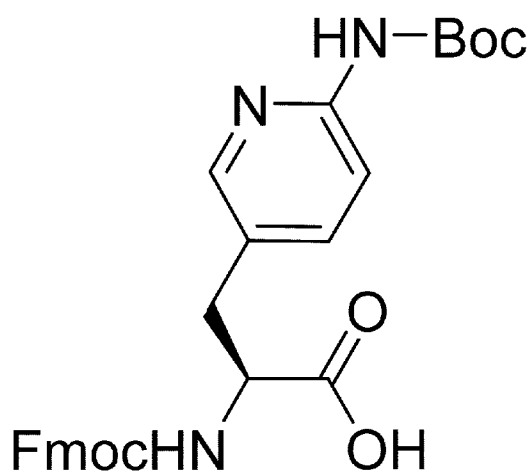
在所得之生成物的一部分(3g, 5.8mmol)的 2-丙醇(30mL)溶液中，添加 CaCl<sub>2</sub>(6.4g, 58.0mmol)後，在 0°C 添加 LiOH·H<sub>2</sub>O(0.28g, 11.6mmol)的水溶液(5mL)。將混合液在室溫攪拌約 16 小時後，以水 60mL 進行稀釋，濾

去固體。使用檸檬酸水溶液將濾液的 pH 調整成約為 6，以乙酸乙酯 (40mL) 萃取三次。將合併的有機萃取物以飽和食鹽水 (50mL) 清洗三次，以無水硫酸鈉進行乾燥後，進行過濾，並進行濃縮。將殘渣以矽凝膠管柱層析法 (二氯甲烷：甲醇 = 92 : 8) 進行精製，獲得標題物質。ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 504.15$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

【0322】 [合成例 2-3]

(S)-2-[[[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]胺基]-3-(6-((三級丁基氧基羰基)胺基)吡啶-3-基)丙酸 (3Py6NH<sub>2</sub>) 的合成

【0323】 [化 45]

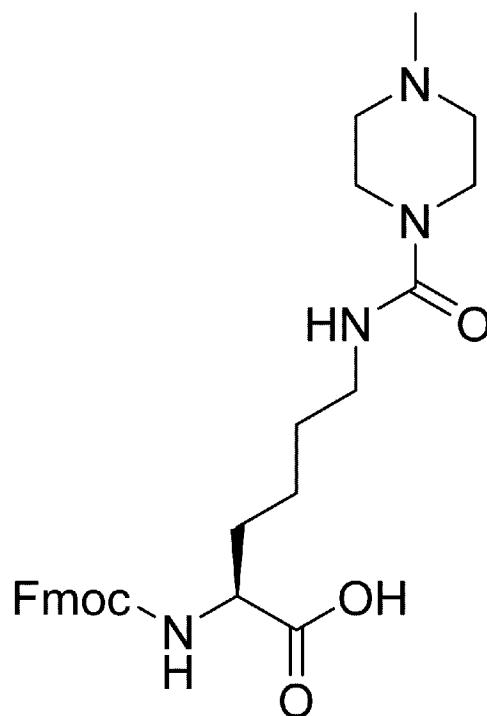


【0324】 標題物質係遵循合成例 [1-x]，使用 5-溴吡啶-2-胺以取代 4-溴吡啶-2-胺，並以同樣的方法獲得。ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 504.15$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

【0325】 [合成例 2-4]

N<sub>2</sub>-[[[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-N<sub>6</sub>-(4-甲基哌[口井]-1-羰基)-L-離胺酸 (KCOpipzMe) 的合成

【0326】 [化 46]

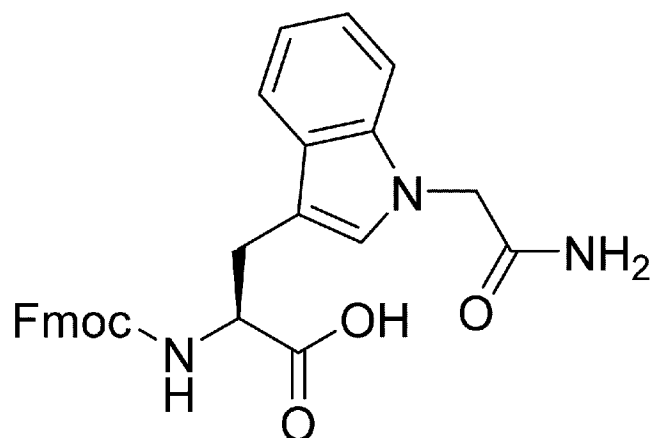


【0327】 在已溶解於二氯甲烷（20mL）之 1-甲基哌[口井]（1.4mL，12.7mmol）中，在 0°C 添加 DIPEA（2.3mL，13.0mmol）及三光氣（1.23g，4.2mmol）。在同溫下攪拌 1 小時後，進行濃縮。在所得之殘渣中，在 0°C 下，添加〔（9H-芴-9-基甲氧基）羰基〕-L-離胺酸與 DIPEA（2.8mL，16.3mmol）的二氯甲烷溶液（20mL）。將混合液在 0°C 下攪拌約 16 小時。以飽和碳酸氫鈉水溶液停止反應後，以二氯甲烷進行稀釋，以水清洗一次，以 5% 乙酸水溶液清洗二次，以飽和碳酸氫鈉水溶液清洗一次，最後以飽和食鹽水清洗一次。將有機層以無水硫酸鈉進行乾燥，並進行濃縮。將殘渣以矽凝膠管柱層析法（二氯甲烷：甲醇 = 100：0-80：20）進行精製，獲得標題化合物。ESI-MS（+）觀測值  $m/z = 495.40$ （ $M+H$ ）<sup>+</sup>。

【0328】 〔合成例 2-5〕

N $\alpha$ -〔（9H-芴-9-基甲氧基）羰基〕-1-（2-胺基-2-氧代乙基）-L-色胺酸（W1mCON）的合成

【0329】 [化 47]



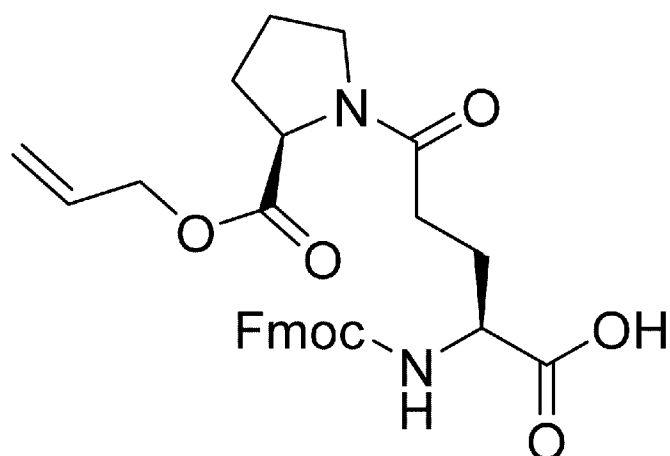
【0330】 在氮氣環境下，在 N-Boc-色胺酸（5g，16.4mmol）的 DMF（30mL）與 THF（30mL）之混合溶液中，在 0°C 下，分成數次添加三級丁醇鉀（3.7g，32.9mmol）。在同溫下攪拌 0.5 小時後，在 0°C 下，分成數次添加 2-氯乙醯胺（1.5g，16.4mmol）後，將其混合物在室溫下攪拌 3 小時。添加水（100mL）而使反應停止後，以乙酸乙酯（50mL）萃取三次。將合併的有機層以飽和食鹽水（50mL）清洗三次後，以無水硫酸鎂進行乾燥，且進行過濾，並將濾液進行濃縮。將所得之殘渣以矽凝膠管柱層析法（乙酸乙酯：石油醚=90：10）進行精製。

在所得之生成物的一部分（6g，16.6mmol）的乙酸乙酯溶液（30mL）中，添加氯化氫的乙酸乙酯溶液（2M，30mL），在室溫攪拌約 16 小時。濾取所生成之固體，將此以乙酸乙酯、乙醚進行清洗。將所得之固體溶解於 1,4-二[口]呋喃（50mL）與水（10mL）後，在 0°C 下添加 2,5-二氧基吡咯啉-1-基-9H-芴-9-基-碳酸甲酯（5.9g，17.5mmol）及碳酸氫鈉（5.9g，69.9mmol）。將混合物在室溫攪拌 3 小時後，以水 200mL 進行稀釋。添加檸檬酸將 pH 調整成 5-6 後，以乙酸乙酯（60mL）萃取三次。將合併的有機萃取物以飽和食鹽水（100mL）清洗三次。將有機層以無水硫酸鈉進行乾燥，且進行過濾，並進行濃縮。將殘渣以矽凝膠管柱層析法（二氯甲烷/甲醇=92/8）進行精製，獲得標題化合物。ESI-MS（+）觀測值  $m/z=484.25$ （M+H）<sup>+</sup>。

【0331】 [合成例 2-6]

Fmoc-Glu(d-Pro-O-allyl)-OH (Epryl2RCOO) 的合成

【0332】 [化 48]



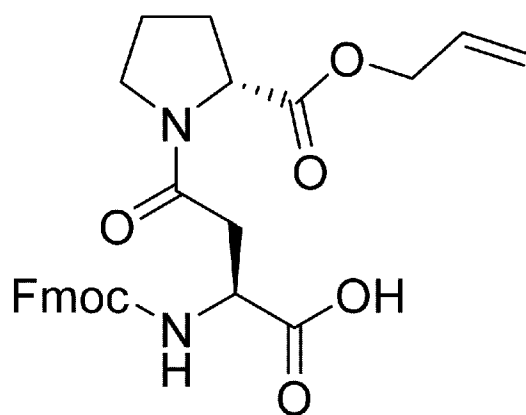
**【0333】** 在 4-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-5-(三級丁氧基)-5-側氧戊酸(2.5g, 5.8mmol)的 DMF 溶液(10mL)中, 添加 HATU (2.7g, 7.0mmol)、DIPEA (1.3mL, 7.5mmol)、烯丙基-D-脯胺酸(0.9g, 5.80mmol), 在 0°C 攪拌 1 小時。以水稀釋反應溶液後, 以乙酸乙酯、己烷的混合溶媒進行萃取。將有機層以水清洗 4 次後, 以無水硫酸鈉進行乾燥, 過濾後, 進行減壓濃縮。將殘渣以矽凝膠管柱層析法進行精製。

將由前述反應所得之生成物的一部分(2.6g, 4.5mmol)與二氯甲烷/TFA (1:1、30mL)在室溫下攪拌 3 小時。將反應溶液進行濃縮後, 將殘渣溶解於二氯甲烷, 添加飽和碳酸氫鈉水溶液, 將 pH 調整成 8 以上。接著, 添加鹽酸, 將 pH 調整成 3-4, 以乙酸乙酯進行萃取。將有機層以無水硫酸鈉進行乾燥, 且進行過濾, 並進行減壓濃縮, 獲得標題化合物。ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 507.40 (M+H)^+$ 。

**【0334】** [合成例 2-7]

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

**【0335】** [化 49]

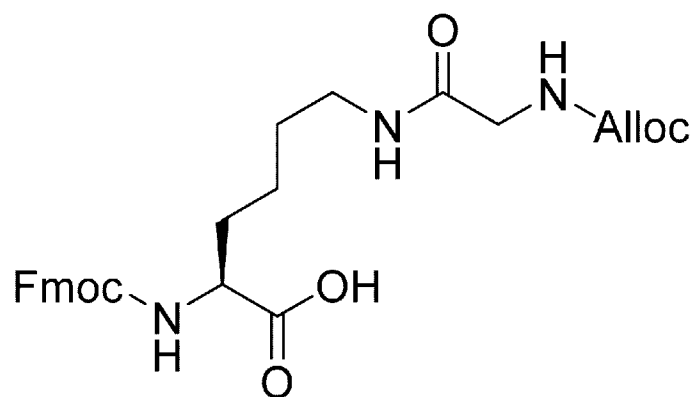


標題物質係遵循合成例〔1-x〕，使用 3-（（（9H-芴-9-基）甲氧基）羰基）胺基）-4-（三級丁氧基）-4-側氧丁酸以取代 4-（（（9H-芴-9-基）甲氧基）羰基）胺基）-5-（三級丁氧基）-5-側氧戊酸，並以同樣的方法獲得。ESI-MS（+）觀測值  $m/z=493.30$ （ $M+H$ ）<sup>+</sup>。

【0336】〔合成例 2-8〕

Fmoc-Lys（Gly-O-allyl）-OH（KaAC）的合成

【0337】〔化 50〕



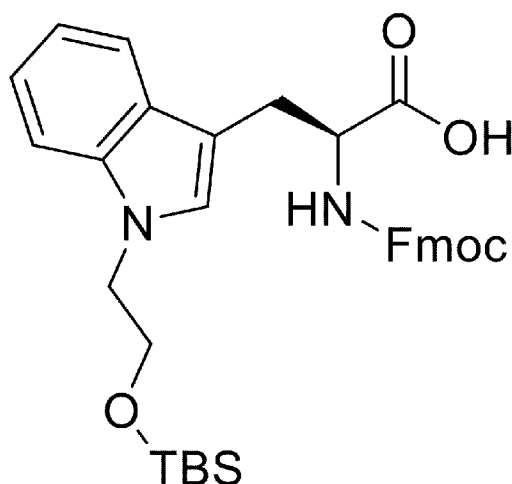
【0338】在三級丁基（（（9H-芴-9-基）甲氧基）羰基）-L-離胺酸甲基-鹽酸鹽（1.2g，2.6mmol）、（（烯丙氧基）羰基）甘胺酸（0.46g，2.9mmol）、DIPEA（0.59mL，3.4mmol）的 DMF 溶液中，添加 HATU（1.22g，3.1mmol）的 DMF 溶液（20mL），在 0°C 下攪拌 1 小時。以乙酸乙酯、己烷的混合溶媒進行稀釋，將有機層以水清洗 4 次。將有機層以無水硫酸鈉進行乾燥，並在進行濃縮後，將殘渣以矽凝膠管柱層析法（乙酸乙酯：己烷=0：100-80：20）進行精製。

在由前述所合成之生成物的一部分(1.5g, 2.6mmol)的二氯甲烷溶液(10mL)中添加 TFA (10mL), 在室溫下攪拌約 16 小時。將反應溶液進行濃縮, 使用甲苯進行 3 次共沸操作。將所得之殘渣以二異丙醚進行清洗, 在 55°C 下進行減壓乾燥, 獲得標題化合物。ESI-MS (+) 觀測值  $m/z = 510.40 (M+H)^+$ 。

【0339】 [合成例 2-9]

$N^\alpha$ -((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)-1-(2-((三級丁基二甲基矽基)氧基)乙基)-L-色胺酸 (Fmoc-W1EtOH-OH) 的合成

【0340】 [化 51]



【0341】 在 N-Boc-色胺酸 (20g, 64.9mmol) 的 THF (100mL) 與 DMF (100mL) 混合液中, 在 0°C 下添加三級丁醇鉀 (14.8g, 69.0mmol)。在攪拌 15 分鐘後, 添加 2-溴乙氧基 (三級丁基) 二甲基矽烷 (16.5g, 69.0mmol), 在室溫攪拌約 16 小時。在 0°C 下, 在反應溶液中添加檸檬酸水溶液, 將 pH 調整成 6, 以 200mL 的水進行稀釋。將反應溶液以乙酸乙酯 (100mL) 萃取三次, 將合併的有機萃取物以飽和食鹽水 (100mL) 清洗三次。將有機層以硫酸鈉進行乾燥, 過濾後, 進行濃縮。將殘渣以矽凝膠管柱層析法 (乙酸乙酯: 己烷 = 1:5) 進行精製。

在氮氣環境下, 在所得之生成物的一部分 (16g, 34.6mmol) 的二氯甲烷 (150mL) 溶液中, 添加 2,6-二甲吡啶 (2,6-lutidine) (20mL, 172.9mmol), 在 0°C 下添加 TMSOTf (25mL, 112mmol)。將混合液升溫至室溫, 攪拌 24 小時。將反應溶液進行濃縮。在所得之混合物中添加二[口罈]烷 (300mL)、水 (150mL) 後, 添加碳酸氫鈉 (9.3g, 110.35mmol, 3.19 等量)、9-芴基甲基

—N—琥珀醯亞胺基碳酸酯（14.0g，41.4mmol），在室溫攪拌約 16 小時。將固體進行過濾，在濾液中添加檸檬酸，將 pH 調整成 7。以水 200mL 進行稀釋，以乙酸乙酯（200mL）萃取三次萃取。將合併的有機萃取物以飽和食鹽水（200mL）清洗三次。將有機層以硫酸鈉進行乾燥，過濾後，進行濃縮。將殘渣以矽凝膠管柱層析法（乙酸乙酯：己烷（1：15）進行精製，獲得標題化合物。ESI-MS（+）觀測值  $m/z = 585.15$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[產業可利用性]

【0342】 此發明能被利用於醫藥產業。

## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種肽，其與運鐵蛋白受體結合，且具有：

序列識別號 1 所記載之胺基酸序列（Ala－Val－Phe－Val－Trp－Asn－Tyr－Tyr－Ile－Ile－Ser－Cys）；或

在序列識別號 1 所記載之胺基酸序列中具有 1 以上且 10 以下的胺基酸殘基的取代、缺失、加成及／或插入之胺基酸序列。

【請求項 2】如請求項 1 之肽，其包含具有選自以下群組之 1 個以上的取代之胺基酸序列：

(I) 序列識別號 1 的第 1 個丙胺酸殘基被脂族胺基酸或甲基化脂族胺基酸取代；

(II) 序列識別號 1 的第 2 個纈胺酸殘基被鹼性胺基酸殘基或甲基化鹼性胺基酸殘基取代；

(III) 序列識別號 1 的第 3 個苯丙胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(IV) 序列識別號 1 的第 4 個纈胺酸殘基被甲基化纈胺酸殘基取代；

(V) 序列識別號 1 的第 5 個色胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基色胺酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VI) 序列識別號 1 的第 6 個天冬醯胺酸殘基被中性胺基酸或甲基化中性胺基酸取代；

(VII) 序列識別號 1 的第 7 個及第 8 個酪胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VIII) 序列識別號 1 的第 9 個異白胺酸殘基被脂族胺基酸殘基、甲基化脂族胺基酸殘基或具有支鏈結構的胺基酸殘基取代；

(IX) 序列識別號 1 的第 10 個異白胺酸殘基被任意胺基酸取代；及

(X) 序列識別號 1 的第 11 個絲胺酸殘基被中性胺基酸殘基取代。

【請求項 3】如請求項 1 之肽，其具有序列識別號 2（Ala－Val－Phe－Val－Trp－Asn－Tyr－Tyr－Ile－Ile－Arg－Arg－Tyr－MeTyr－Cys）所記載之胺基

酸序列，或包含在序列識別號 2 所記載之胺基酸序列中具有選自以下群組之 1 個以上的取代之胺基酸序列：

(I) 序列識別號 2 的第 1 個丙胺酸殘基被脂族胺基酸或甲基化脂族胺基酸取代；

(II) 序列識別號 2 的第 2 個纈胺酸殘基被鹼性胺基酸殘基或甲基化鹼性胺基酸殘基取代；

(III) 序列識別號 2 的第 3 個苯丙胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(IV) 序列識別號 2 的第 4 個纈胺酸殘基被甲基化纈胺酸殘基取代；

(V) 序列識別號 2 的第 5 個色胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VI) 序列識別號 2 的第 6 個天冬醯胺酸殘基被中性胺基酸或甲基化中性胺基酸取代；

(VII) 序列識別號 2 的第 7 個及第 8 個酪胺酸殘基被芳族胺基酸殘基、甲基化芳族胺基酸殘基、已加成芳環的胺基酸殘基或已加成縮合環的胺基酸殘基取代；

(VIII) 序列識別號 2 的第 9 個異白胺酸殘基被脂族胺基酸殘基、甲基化脂族胺基酸殘基或具有支鏈結構的胺基酸殘基取代；

(IX) 序列識別號 2 的第 10 個異白胺酸殘基被任意胺基酸取代；

(XI) 序列識別號 2 的第 11 個及第 12 個精胺酸殘基被鹼性胺基酸殘基取代；

(XII) 序列識別號 2 的第 13 個酪胺酸殘基被親水性胺基酸殘基取代；

(XIII) 序列識別號 2 的第 14 個甲基酪胺酸殘基被酪胺酸殘基、芳族胺基酸殘基或甲基化芳族胺基酸殘基取代；及

(XIV) 序列識別號 2 的第 15 個半胱胺酸殘基被甲基化半胱胺酸殘基取代。

**【請求項 4】** 如請求項 1 之肽，其中，

若將肽 A 設為包含序列識別號 18 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys) 的第 1 個~第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 10 以上且 17 以下，則前述肽為以下任一種肽：

肽 A；

在肽 A 中，具有含 1 以上且 6 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入的胺基酸序列之肽；

在肽 A 中，具有序列識別號 18 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列之肽；及

在肽 A 中，

序列識別號 18 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val) 或可被修飾的麩胺酸 (Glu)，

序列識別號 18 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe)，

序列識別號 18 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp)，

序列識別號 18 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr)，

序列識別號 18 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile) 或可被修飾的纈胺酸 (Val) 之肽。

【請求項 5】如請求項 4 之肽，其係肽長度為 11 以上且 13 以下之肽。

【請求項 6】如請求項 1 之肽，其中，

若將肽 B 設為包含序列識別號 15 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Val-Pro-Arg-Asp-Cys) 的第 1 個～第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 10 以上且 19 以下，則前述肽為以下任一種肽：

肽 B；

在肽 B 中，具有含 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入的胺基酸序列之肽；

在肽 B 中，具有序列識別號 15 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列之肽；及

在肽 B 中，

序列識別號 15 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val) 或可被修飾的麩胺酸 (Glu)，

序列識別號 15 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) 或色胺酸 (Trp)，

序列識別號 15 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp)，

序列識別號 15 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) ,  
序列識別號 15 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile) 或可  
被修飾的纈胺酸 (Val) 之肽。

【請求項 7】如請求項 6 之肽，其係肽長度為 13 以上且 15 以下之肽。

【請求項 8】如請求項 1 之肽，其中，

若將肽 C 設為包含序列識別號 214 (MeA-Val-MeF3C-Val-MeW-Asn  
-Tyr-F4OMe-Ile-Ile-Arg-Arg-Phe-MeY-Cys) 的第 1 個~第 10 個所  
記載之胺基酸序列並且肽長度為 11 以上且 19 以下，則前述肽為以下任一種肽：

肽 C；

在肽 C 中，具有含 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及/或插入  
的胺基酸序列之肽；

在肽 C 中，具有序列識別號 214 的第 1、3、5 及 8 個中之任一個胺基酸殘  
基被取代的胺基酸序列之肽；及

在肽 C 中，

序列識別號 214 的第 1 個胺基酸殘基為可被修飾的丙胺酸 (Ala) 或可被  
修飾的麩胺酸 (Glu) ，

序列識別號 214 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ，

序列識別號 214 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp) ，

序列識別號 214 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸(Phe)之肽。

【請求項 9】如請求項 1 之肽，其中，

若將肽 D 設為包含序列識別號 219 (Ala-Glu-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr  
-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys) 的第 1 個~第 10 個所記載之胺  
基酸序列並且肽長度為 11 以上且 19 以下，則前述肽為以下任一種肽：

肽 D；

在肽 D 中，具有含 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及/或插入  
的胺基酸序列之肽；

在肽 D 中，具有序列識別號 219 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基  
酸殘基被取代的胺基酸序列之肽；及

在肽 D 中，

序列識別號 219 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val)、可被修飾的麩胺酸 (Glu)、可被修飾的精胺酸 (Arg)、可被修飾的離胺酸 (Lys)、可被修飾的天冬胺酸 (Asp) 或可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,

序列識別號 219 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,  
 序列識別號 219 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp) ,  
 序列識別號 219 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) ,  
 序列識別號 219 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile)、可被修飾的麩胺酸 (Glu) 或可被修飾的離胺酸 (Lys) 之肽。

**【請求項 10】**如請求項 9 或 10 之肽,其係肽長度為 15 以上且 18 以下之肽。

**【請求項 11】**如請求項 1 之肽,其中,

若將肽 E 設為包含序列識別號 296 (Ala-Val-MeF-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys--) 的第 1 個~第 15 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 15 以上且 18 以下,則前述肽為:

肽 E; 或

在肽 E 中,具有含 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及/或插入的胺基酸序列之肽。

**【請求項 12】**如請求項 11 之肽,其係以下之肽:在肽 E 中,具有序列識別號 296 的第 3、5、7、8、11、12、13 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

**【請求項 13】**如請求項 11 之肽,其係以下之肽:

在肽 E 中,

序列識別號 296 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,  
 序列識別號 296 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp) ,  
 序列識別號 296 的第 7 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) ,  
 序列識別號 296 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) ,  
 序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為可被修飾的精胺酸 (Arg) 或可被修飾的離胺酸 (Lys) ,

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為可被修飾的精胺酸 (Arg) 或可被

修飾的離胺酸 (Lys) ，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) 或可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) 之任一者。

**【請求項 14】** 如請求項 11 之肽，其係以下之肽：

在肽 E 中，

序列識別號 296 的第 3 個胺基酸殘基為苯丙胺酸 (Phe) 、甲基化苯丙胺酸 (MeF) 或 N- $\alpha$ -甲基-N- $\alpha$ -氯乙醯基-3-氯-L-苯丙胺酸 (MeF3C) ，

序列識別號 296 的第 5 個胺基酸殘基為色胺酸 (Trp) 或甲基化色胺酸 (MeW) ，

序列識別號 296 的第 8 個胺基酸殘基為酪胺酸 (Tyr) 或 (S)-2-胺基-3-(4-甲氧基苯基) 丙酸 (F4OMe) ，

序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為精胺酸 (Arg) 或離胺酸 (Lys) ，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為精胺酸 (Arg) 或 D 型精胺酸 (dr) ，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為酪胺酸 (Tyr) 或苯丙胺酸 (Phe) 。

**【請求項 15】** 如請求項 1 之肽，其係由序列識別號 3~200 中之任一胺基酸序列所組成，或由在序列識別號 3~200 中之任一胺基酸序列中 N 端為氯乙醯基-Ala 之胺基酸序列所組成。

**【請求項 16】** 如請求項 1 之肽，其包含序列識別號 1~552 中任一者所記載之胺基酸序列或胺基酸序列與連結子的複合體之第 1 個至第 10 個胺基酸序列，且胺基酸序列部位具有環狀結構。

**【請求項 17】** 如請求項 16 之肽，其係由序列識別號 2、9、21~148、159~200、213~448、450~552 中任一者所記載之胺基酸序列或胺基酸序列與連結子的複合體中之第 1 個至第 15 個胺基酸序列所組成，且胺基酸序列部位具有環狀結構。

**【請求項 18】** 如請求項 1 至 16 中任一項之肽，其為環狀肽。

**【請求項 19】** 如請求項 16 或 17 之肽，其係由 15 胺基酸殘基所組成。

**【請求項 20】** 如請求項 1 之肽，其能通過血腦障壁。

【請求項 21】如請求項 1 之肽，其對於肌肉組織具有指向性。

【請求項 22】如請求項 1 之肽，其具有細胞穿透性。

【請求項 23】一種複合體，其包含：如請求項 1 之肽、與前述肽結合之連結子，以及結合至前述連結子之物質。

【請求項 24】如請求項 23 之複合體，其中，前述物質能通過血腦障壁。

【請求項 25】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的胺基酸長度為 1 以上且 15 以下，而且前述連結子包含 1 個以上的甘胺酸(Gly)或絲胺酸(Ser)。

【請求項 26】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的 N 端為可被修飾的半胱胺酸(Cys)或可被修飾的離胺酸(Lys)。

【請求項 27】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的胺基酸長度為 1 以上且 5 以下，而且包含 D 型的麩胺酸(de)及甲基化甘胺酸(MeG)中任一者或兩者。

【請求項 28】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的 N 端為可被修飾的 Cys 或可被修飾的離胺酸(Lys)。

【請求項 29】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子為包含聚乙二醇(PEG)或聚乙二醇的衍生物之 PEG 連結子。

【請求項 30】如請求項 29 之複合體，其中，前述 PEG 連結子進一步包含甘胺酸(Gly)、絲胺酸(Ser)、麩胺酸(Glu)、精胺酸(Arg)或離胺酸(Lys)。

【請求項 31】如請求項 29 或 30 之複合體，其中，前述連結子的 N 端為可被修飾的半胱胺酸(Cys)或可被修飾的離胺酸(Lys)。

【請求項 32】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子具有由序列識別號 201、553~642 中任一者所示的序列。

【請求項 33】如請求項 22 之複合體，其中，前述連結子為：

聚乙二醇(PEG)；

G 連結子、GS 連結子；或

具有由序列識別號 201、553~644 中任一者所示的胺基酸序列之連結子。

第 7 頁，共 8 頁(發明申請專利範圍)

【請求項 34】一種預防或治療劑，其係包含如請求項 23 之複合體之腦相關疾病的預防或治療劑，其中，前述物質為有效成分。

【請求項 35】一種腦相關疾病的預防或治療劑之製造方法，其包含獲得如請求項 23 之複合體的步驟。

【請求項 36】如請求項 35 之方法，其中，前述連結子為：  
聚乙二醇（PEG）；  
G 連結子、GS 連結子；或  
具有由序列識別號 201、553～644 中任一者所示的胺基酸序列之連結子。

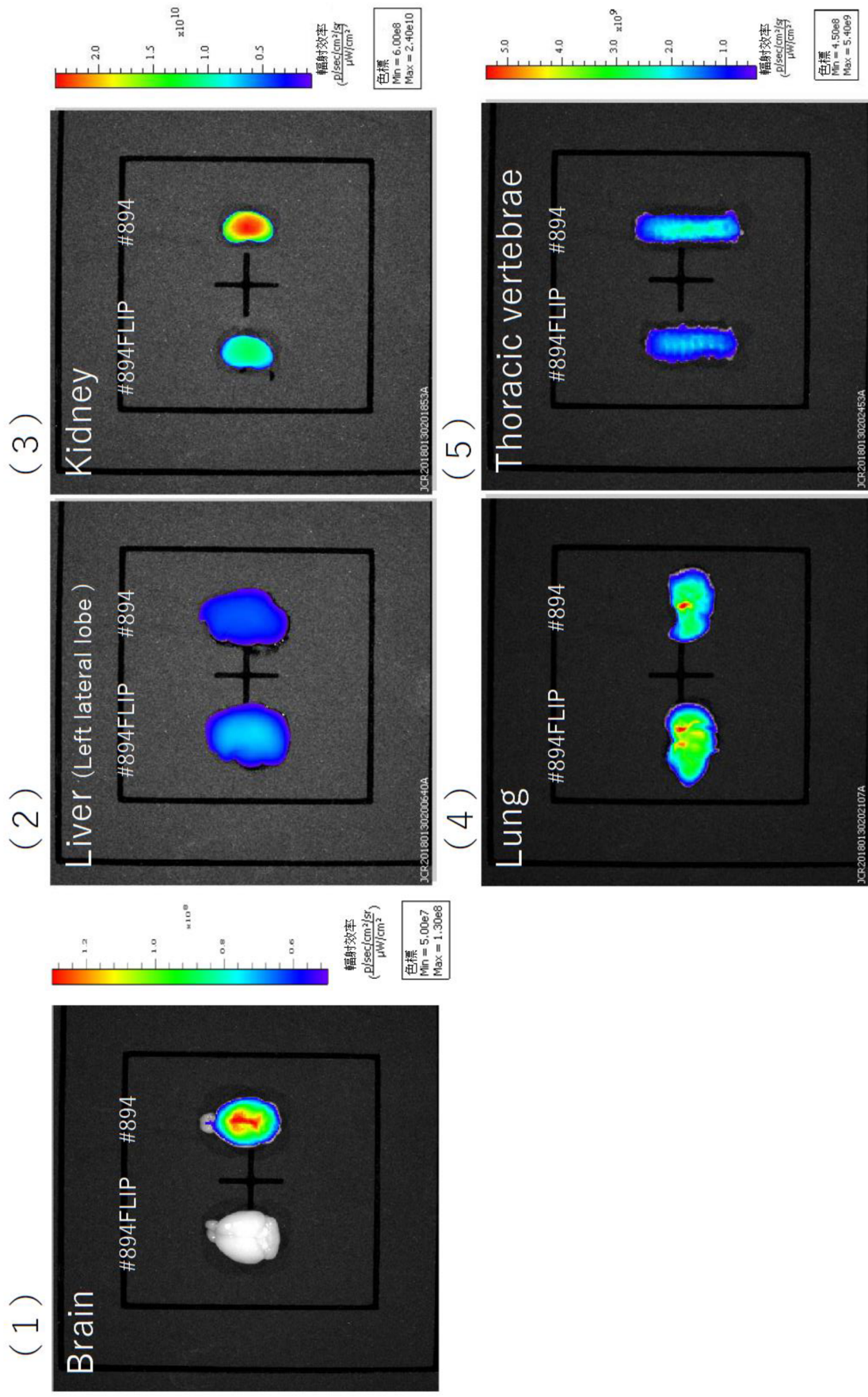
【請求項 37】一種腦相關疾病的診斷藥，其包含如請求項 23 之複合體。

【請求項 38】如請求項 23 之複合體，其對於肌肉組織具有指向性。

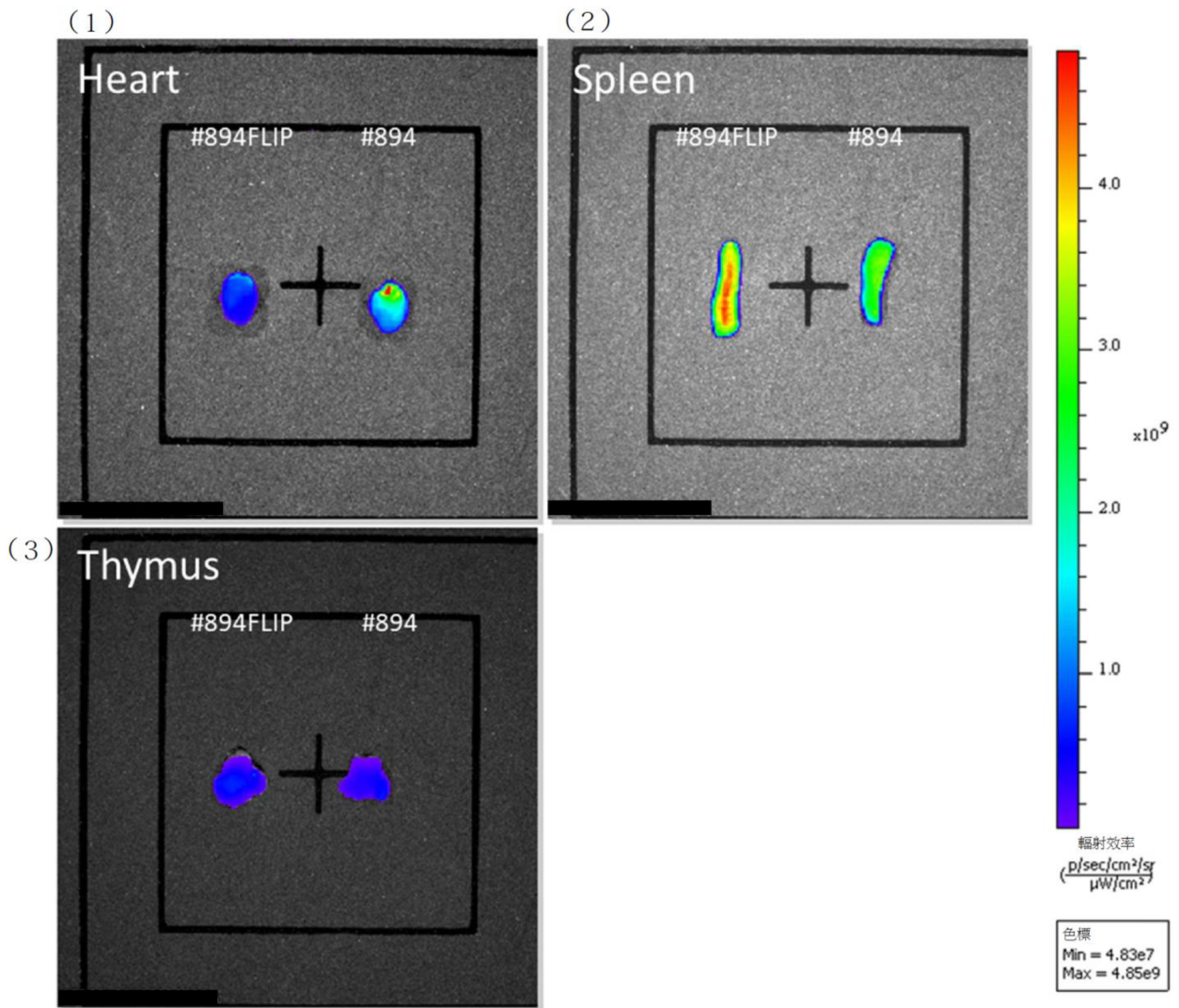
【請求項 39】一種預防或治療劑，其係包含如請求項 23 之複合體之神經肌肉疾病的預防或治療劑，其中，前述物質為有效成分。

【請求項 40】一種神經肌肉疾病的診斷藥，其包含如請求項 23 之複合體。

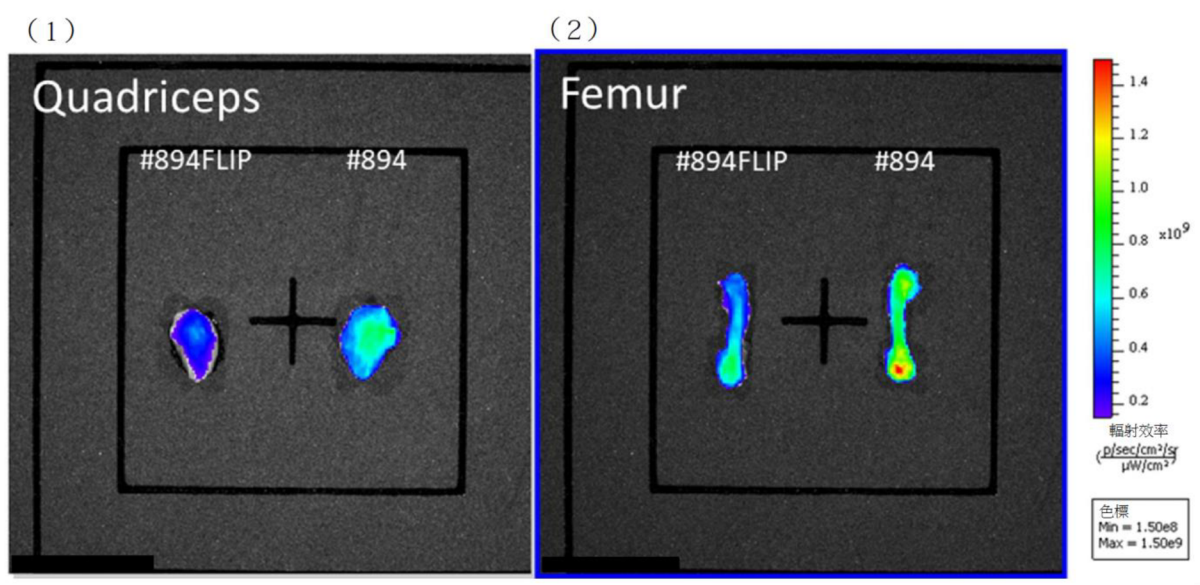
【發明圖式】



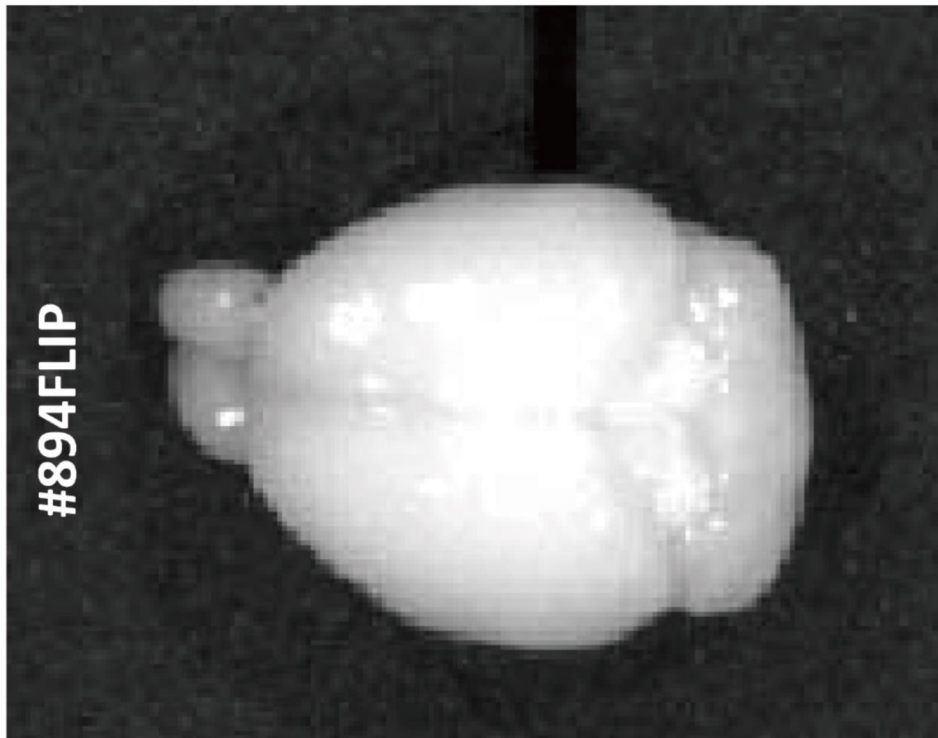
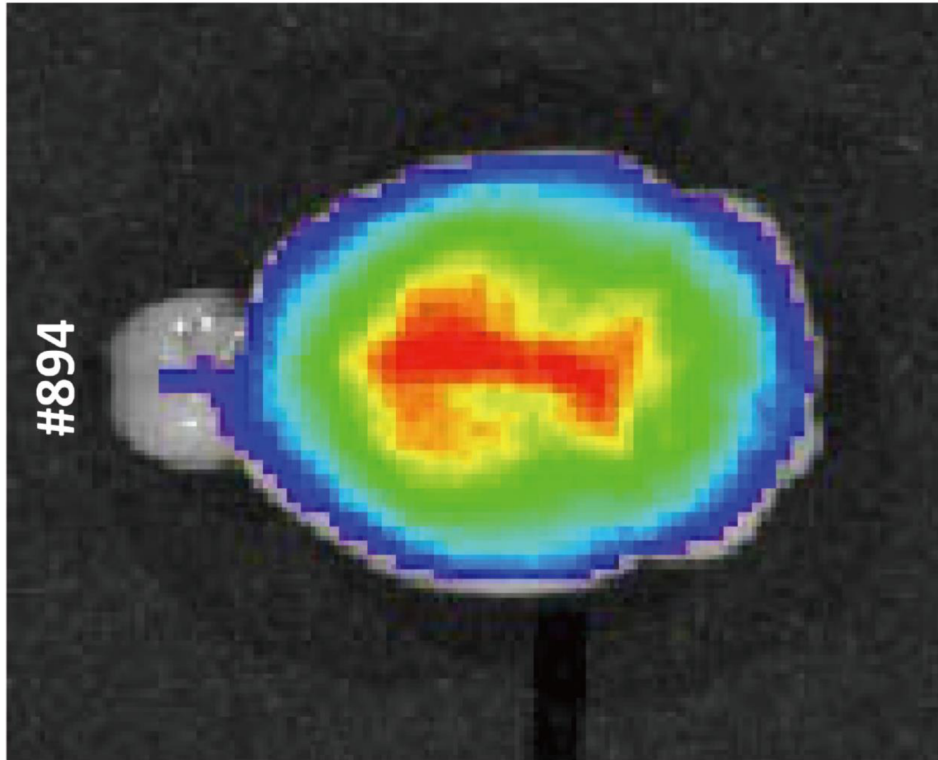
【圖 1-1】



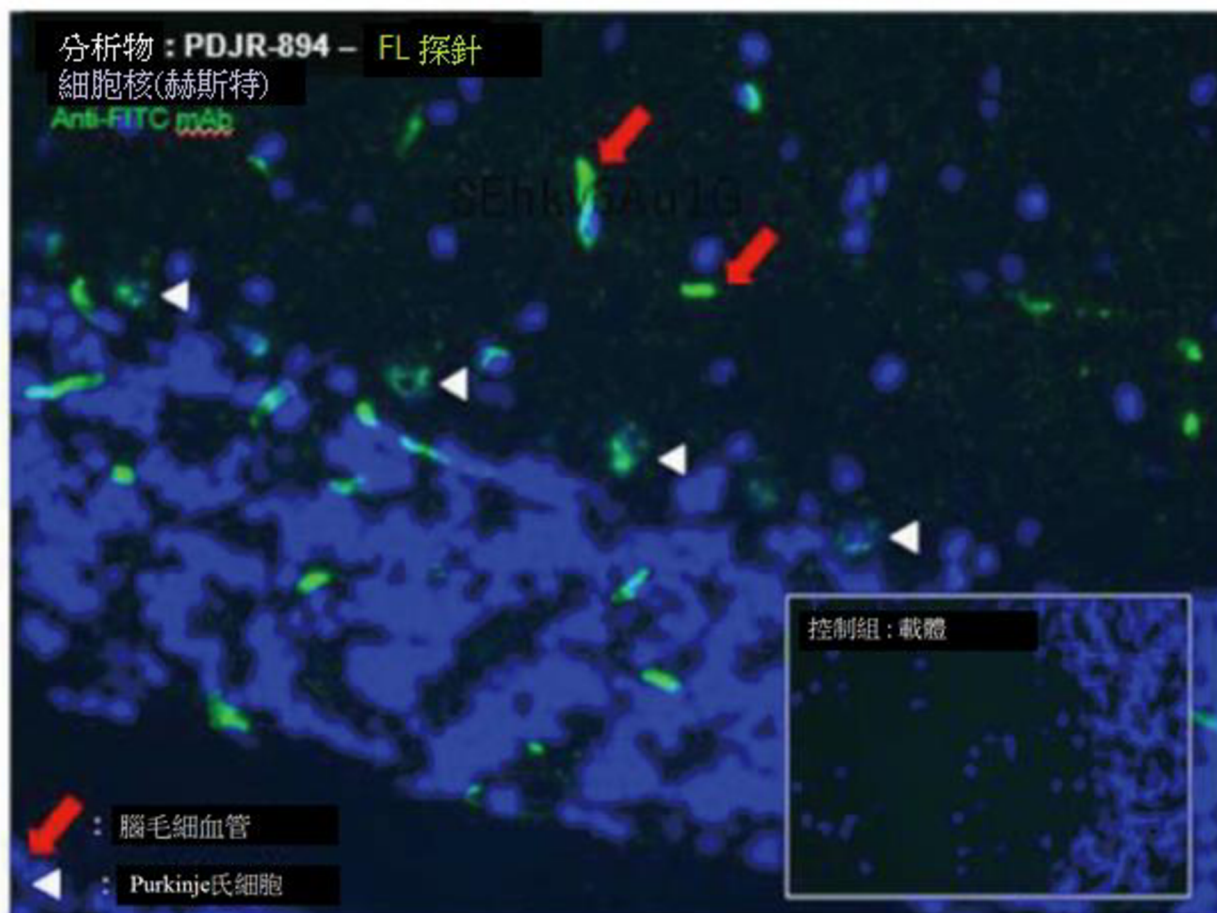
【圖 1-2】



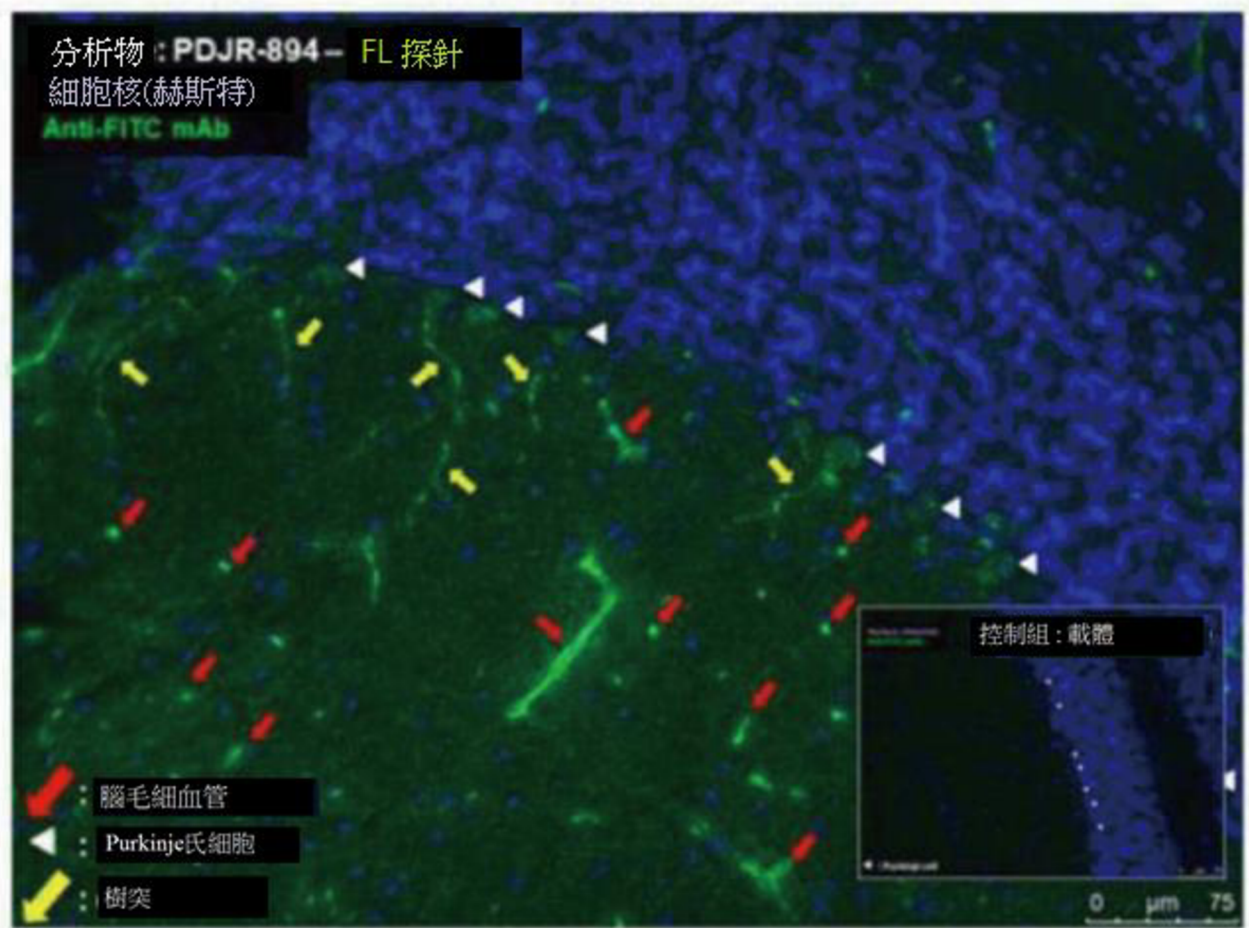
【圖 1-3】



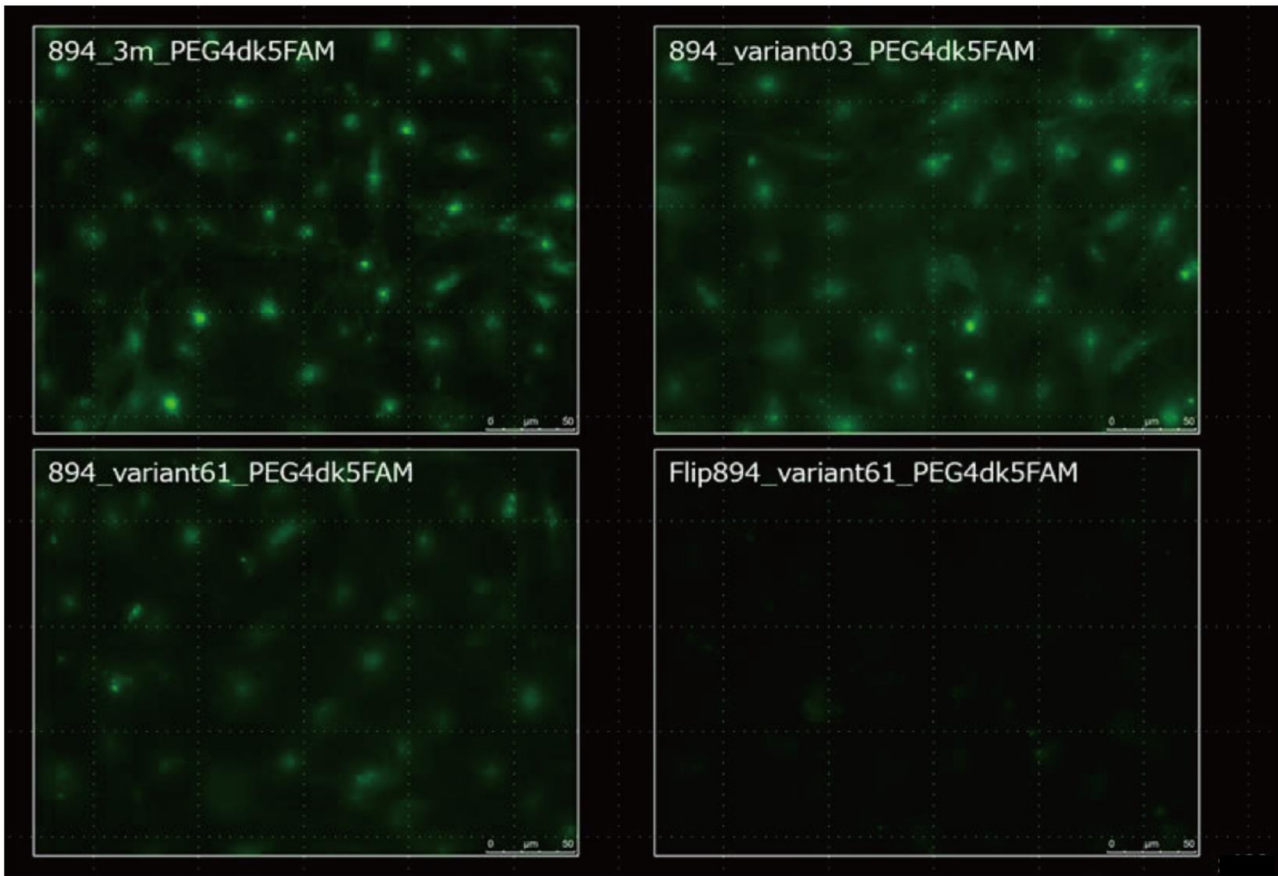
【圖 2】



【圖 3】



【圖 4】



【圖 5】

[專利文獻2]日本特開H06-228199號公報

[專利文獻3]WO2016/208695

[專利文獻4]WO2019/151539

## 【發明內容】

### 【0005】 [發明所欲解決的課題]

此說明書所記載之一發明之目的在於提供一種與人類運鐵蛋白受體（hTfR）結合之新穎的肽。

另一發明之目的在於進一步提供一種可通過血腦障壁（BBB）的肽、對於肌肉組織具有指向性且可有效率地移行至肌肉組織的肽及具有細胞穿透性的肽。

另一發明之目的在於提供上述的新穎的肽之各種用途。

### 【0006】 [解決課題的技術手段]

此說明書所記載之一發明關於與運鐵蛋白受體結合之肽。

此肽具有：序列識別號 1 所記載之胺基酸序列（Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys）；或在序列識別號 1 所記載之胺基酸序列中具有 1 以上且 10 以下的胺基酸殘基的取代、缺失、加成及/或插入之胺基酸序列。

### 【0007】 [發明功效]

根據此說明書所記載之發明，如同由實施例所證實，可提供與人類運鐵蛋白受體（hTfR）結合之肽、可通過血腦障壁（BBB）之肽、對於肌肉組織具有指向性之肽、具有細胞穿透性之肽等。

## 【圖式簡單說明】

### 【0008】

圖1-1為取代圖式並表示各組織中之螢光強度量測結果之照片。

圖1-2為取代圖式並表示各組織中之螢光強度量測結果之照片。

圖1-3為取代圖式並表示各組織中之螢光強度量測結果之照片。

圖2為取代圖式並表示在已放大的腦中之螢光強度量測結果之照片。

圖3為取代圖式並表示小鼠腦內局部存在確認試驗（單劑量）結果之照片。

圖4為取代圖式並表示小鼠腦內局部存在確認試驗（多劑量）結果之照片。

序列識別號 214 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON 或 W6F，特佳為 Trp、MeW，

序列識別號 214 的第 8 個胺基酸殘基為 Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aaO、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn 或 Nal1，特佳為 Tyr 或 F4OMe 之肽。

【0054】 再者，此肽為在肽 C 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 214 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

序列識別號 214 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 214 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr，

序列識別號 214 的第 14 個胺基酸殘基為 MeTyr、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、MeW 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 MeW，

序列識別號 214 的第 15 個胺基酸殘基為 Cys 或 Hgl 之肽。

【0055】 此肽較佳的另一例為，若將肽 D 設為包含序列識別號 219 (Ala—Glu—Phe—Val—Trp—Asn—Tyr—Tyr—Ile—Ile—Arg—Arg—Tyr—MeY—Cys) 的第 1 個～第 10 個所記載之胺基酸序列並且肽長度為 11 以上且 19 以下，則前述肽為以下之肽：

肽 D；或

在肽 D 中，具有 1 以上且 5 以下的胺基酸殘基的取代、缺失及／或插入之胺基酸序列之肽。

【0056】 亦可為以下之肽：在肽 D 中，具有序列識別號 219 的第 2、3、5、8 及 10 個中之任一個胺基酸殘基被取代的胺基酸序列。

【0057】 亦可為以下之肽：在肽 D 中，

序列識別號 219 的第 2 個胺基酸殘基為可被修飾的纈胺酸 (Val)、可被修飾的麩胺酸 (Glu)、可被修飾的精胺酸 (Arg)、可被修飾的離胺酸 (Lys)、可被修飾的天冬胺酸 (Asp) 或可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,

序列識別號 219 的第 3 個胺基酸殘基為可被修飾的苯丙胺酸 (Phe) ,

序列識別號 219 的第 5 個胺基酸殘基為可被修飾的色胺酸 (Trp) ,

序列識別號 219 的第 8 個胺基酸殘基為可被修飾的酪胺酸 (Tyr) ,

序列識別號 219 的第 10 個胺基酸殘基為可被修飾的異白胺酸 (Ile)、可被修飾的麩胺酸 (Glu) 或可被修飾的離胺酸 (Lys) 。

**【0058】** 此等肽較佳為肽長度為 15 以上且 18 以下。

**【0059】** 此肽進一步更佳為具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 219 的第 2 個胺基酸殘基為 Val、Glu、Ala、Arg、Lys、Asp、Phe、Dap、Har、Abu、Nva、AcPr、AtbAhp 或 Hgl，特佳為 Gln 或 Val，

序列識別號 219 的第 3 個胺基酸殘基為第 3 個胺基酸殘基為 Phe、F3C、F2C、F2OMe、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF4Ome、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me3OMe、MeF3COO、MeF3F、Glu、Epyr12RCOO、Dpyr12RCOO 或 MeF3C，特佳為 Phe、MeF 或 MeF3C，

序列識別號 219 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON 或 W6F，特佳為 Trp、MeW，

序列識別號 219 的第 8 個胺基酸殘基為 Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aaO、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn 或 Nal1，特佳為 Tyr 或 F4OMe，

序列識別號 219 的第 10 個胺基酸殘基為 Ala、Abu、Acpr、Ahp、Aib、all、alT、Atb、Dab、Dap、dorn、Gln、Hly、Ile、Lys、KCOpipzMe、Leu、Nle、Nva、Pro、Arg、Ser、Thr、Tbg、Val 或 Tyr，特佳為 Ile 或 all 之肽。

**【0060】** 再者，此肽係在肽 C 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 219 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

第 19 頁，共 169 頁 (發明說明書)

序列識別號 296 的第 3 個胺基酸殘基為 Phe、F3C、F2C、F2OMe、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF4Ome、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me3OMe、MeF3COO、MeF3F、Glu、Epyrl2RCOO、Dpyrl2RCOO 或 MeF3C，特佳為 Phe、MeF 或 MeF3C，

序列識別號 296 的第 5 個胺基酸殘基為 Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F3OMe、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNal1、MeNal2、MeoBph、W4OMe、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W4OMe、W1mCON 或 W6F，特佳為 Trp、MeW，

序列識別號 296 的第 7 個胺基酸殘基為 Tyr、3Py6OMe、Ala、Ahp、Phe、F3H、F4C、Nal1、Arg 或 Trp，特佳為 Tyr，

序列識別號 296 的第 8 個胺基酸殘基為 Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F4OMe、3Imp、4Py、3Py、3Py6OMe、F3C、F3CON、F4C、F4aaO、F4F、F4OEt、MeF34dOMe、Yae、Lys、Orn 或 Nal1，特佳為 Tyr 或 F4OMe，

序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr。

**【0065】** 再者，此肽為在肽 C 的 N 端具有以下的胺基酸序列之肽。

可為序列識別號 296 的第 11 個胺基酸殘基為 Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KCOpipzMe、F4G、Nle、Nva 或 Orn，特佳為 Lys 或 Arg，

序列識別號 296 的第 12 個胺基酸殘基為 Lys、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap 或 Dab，特佳為 Lys、Arg 或 dr，

序列識別號 296 的第 13 個胺基酸殘基為 Ala、Phe、Asn、Tyr 或 pHPeG，特佳為 Phe 或 Tyr，

【0131】 側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 與氯甲烷分別各清洗 5 次，並在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 (cocktail) – A (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 的混合物)，在室溫振盪 150 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液進行再度振盪後，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 3min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體使用於後續的環化反應。

【0132】 肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 6 等量的三乙胺，在室溫攪拌約 16 小時攪拌而進行。將所得之反應溶液以乙酸調製成酸性，使用 Biotage (註冊商標) V-10 (Biotage Japan 公司) 進行減壓濃縮。

【0133】 作為所得之粗精製肽的精製方法，利用 Waters 公司 AutoPurification System – SQD2 single quadruple mass spectrometer，使用逆相分取 HPLC，一邊監視源自目標物之 m/z 離子一邊將其溶出。確認在包含由 ESI – positive 的掃描模式所得之質譜與由目標物的分子式所計算之多價離子的質譜在所使用之質量分析器的誤差範圍中為一致。此外，包含所使用之管柱的精製條件係顯示於各實施例。

【0134】 本發明中，化學合成之肽的純度係利用以下任一分析方法而決定。

(分析條件)

分析條件 A

管柱：CORTECS (註冊商標) UPLC (註冊商標) C18 column (Nihon Waters 公司)、90Å、1.6μm、2.1x100mm

移動相：0.025% TFA in MeCN / 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O

溫度：40°C

梯度：5 – 95% MeCN / 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O in 5.56min；線性梯度

流量：0.4mL / min

檢測法：UV 220nm

【0139】 使用 Sieber amide resin (渡邊化學, 0.6mmol/g, 0.33g), 遵循前述的一般方法, 從 Fmoc 的去除開始, 合成目的之肽。此時, 使用 CEM 公司的 Liberty Blue HT 作為固相合成儀, 遵循製造商的手冊進行合成。縮合反應係將在 75°C 反應 10 分鐘作為基本條件。去 Fmoc 化係將在 20% piperidine in DMF 中, 在 75°C 反應 3 分鐘作為基本條件。氯乙醯基的導入係藉由以下方式進行: 對於已保持前步驟所得之被 Fmoc 保護的肽之固相樹脂, 利用前述方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後, 添加 5 等量之氯乙酸的 DMF 溶液 (0.2M)、5 等量之 HATU 的 DMF 溶液 (0.5M)、10 等量之 DIPEA 的 DMF 溶液 (1M), 在室溫振盪 30 分鐘。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切, 首先, 將氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次, 並以氯甲烷清洗 3 次, 在減壓下進行乾燥。接著, 在已裝入固相樹脂的反應容器中, 添加反應劑混合液 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物), 在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪, 由玻璃料回收溶液成分, 並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1), 則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min), 並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後, 將所得之固體進行乾燥, 使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後, 添加 6 等量之三乙胺, 在室溫攪拌約 16 小時。將所得之反應溶液使用 Savant Explorer SpeedVaC 進行減壓濃縮。

【0140】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m $\mu$ m (註冊商標) 50x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 5-30%, 之後耗費 8 分鐘 30-35%, 之後耗費 1 分鐘 35-60%; 流量: 120mL/min)。

【0141】 所得之目標物係以前述的分析條件 A 或分析條件 B 進行分析, 藉由質譜分析法中之 ESI-MS (+) 確認結構。將所得之 ESI-MS (+) 觀測值、與將在該情形中之質子加成數 (M+XH) 顯示為 X+時的 X 的值表示於表 1。

【0142】 [實施例 2]

將各組織中之螢光強度量測結果表示於圖 1-1、圖 1-2、圖 1-3 及圖 2。

圖中之“#894”標記表示 hTfRNo.894 – vivotag750 conjugate 的投予組，“#894FLIP”標記表示 hTfRNo.894FLIP – vivotag750 conjugate 投予組。此外，各照片的右側的柱 (bar) 表示平均放射效率 (Average Radiant Efficiency,  $[p/sec/cm^2/sr] / [\mu W/cm^2]$ )。

圖 1-1 的 (1) Brain 表示腦的照片，(2) Liver (Left lateral lobe) 表示肝臟的外側左葉區域的照片，(3) Kidney 表示腎臟的照片，(4) Lung 表示肺的照片，(5) Thoracic vertebrae 表示胸椎的照片。色標針對 (1) 係表示最低值為  $5.00 \times 10^7$  且最大值為  $1.3 \times 10^8$ ，針對 (2) 及 (3) 係表示最低值為  $6.00 \times 10^8$  且最大值為  $2.4 \times 10^{10}$ ，針對 (3) 及 (4) 係表示最低值為  $4.5 \times 10^8$  且最大值為  $5.4 \times 10^9$ 。圖 1-2 的 (1) Heart 表示心臟的照片，(2) Spleen 表示脾臟的照片，(3) Thymus 表示胸腺的照片。此外，色標表示最低值為  $4.83 \times 10^7$  且最大值為  $4.8 \times 10^9$ 。

圖 1-3 的 (1) Quadriceps 表示大腿四頭肌的照片，(2) Femur 表示大腿骨的照片。此外，色標表示最低值為  $1.5 \times 10^8$  且最大值為  $1.5 \times 10^9$ 。圖 2 為圖 1-1 (1) 腦的放大照片。

由圖 1-1、1-2、1-3 及圖 2 可知，在 hTfRNo.894 – vivotag750 conjugate 投予組檢測到比 hTfRNo.894FLIP – vivotag750 conjugate 投予組更強的螢光之組織為腎臟、胸椎、心臟、大腿骨、大腿四頭肌及腦。在 hTfRNo.894FLIP – vivotag750 conjugate 投予組檢測到比 hTfRNo.894 – vivotag750 conjugate 投予組更強的螢光之組織為肝臟與脾臟。

**【0157】** 由兩投予組皆在腎臟檢測到最強的螢光且肝臟的螢光為次強可知，兩試驗物質主要係藉由腎、肝而被代謝、排泄。並且，在 No.894 投予組中可見胸椎、心臟、大腿骨、大腿四頭肌及腦的螢光比 No.894NC 投予組強。此等組織因 TfR 表現量較多，故兩者的組織分布差異被認為是起因於有無 hTfR 結合能力。

藉由本試驗，可確認到 hTfR 結合性特殊環狀肽 No.894 在 hTfR – KI 小鼠中透過與 TfR 結合而通過 BBB 並移行至腦內，以及移行至以肌肉組織為中心的各組織。

**【0158】** [實施例 6]

hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4dk5FAM、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM 及作為負控制組之 Flip894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM 的合成對於與 hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4dk5FAM 同樣地合成、環化之 hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4、hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4 及 Flip894\_\_variant61\_\_PEG4，同樣地添加由 5-FAM 所調整之 F-FAM-NHS，獲得前述的複合體。

此外，針對所合成之各種複合體，與實施例 2 同樣地利用 SPR 確認與 hTfR 的結合。僅 Flip894\_\_variant91\_\_PEG4 未確認到與 hTfR 的結合。

**【0187】**〔試料溶液的製備及往細胞的添加〕

在試料的稀釋中，使用稀釋用培養基(包含 0.5%牛血清白蛋白及 20 $\mu$ g/mL 人類運鐵蛋白全型之 RPMI 1640 培養基)。以稀釋用培養基將試料稀釋成 100nmol/L。

確認在 24 孔盤中已一晚培養之細胞 BT-549 與蓋玻片接著後，以 RPMI 1640 培養基清洗 2 次。以 500 $\mu$ L/well 添加包含 0.5%牛血清白蛋白之 RPMI 1640 培養基，在冰上靜置 15 分鐘後，以 500 $\mu$ L/well 添加已稀釋之試料溶液，在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 條件下靜置 3 小時。

**【0188】**〔細胞的固定、核染色、封片〕

從 24 孔盤去除試料溶液，以 PBS 將細胞 BT-549 清洗 3 次。以 500 $\mu$ L/well 添加 4%多聚甲醛磷酸緩衝液(富士薄膜和光純藥公司)，在室溫靜置 15 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次。再者，以 500 $\mu$ L/well 添加已以 PBS 稀釋成 2 $\mu$ g/mL 之赫斯特 33342 (Hoechst 33342) (Thermo Fisher Scientific)，在室溫、遮光下靜置 10 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次。從 24 孔盤取出蓋玻片，使用 Fluorescent Mounting Medium (Agilent 公司)，在載玻片上進行封片，在室溫、遮光下靜置一晚。觀察係使用倒立型螢光顯微鏡 DMI6000B (Leica Microsystems 公司)，以 FITC 及 DAPI 檢測用的波長進行觀察。將結果表示於圖 5。此外，圖中的線狀比例尺表示 50 $\mu$ m。

如由圖 5 可確認般，hTfR\_\_894\_\_3m\_\_PEG4dk5FAM、hTfR\_\_894\_\_variant03\_\_PEG4dk5FAM、hTfR\_\_894\_\_variant61\_\_PEG4dk5FAM 雖確認到往細胞內的移行，但具有無與 hTfR 的結合能力的肽之 Flip894\_\_variant91\_\_PEG4 不會往細胞

樹脂，利用前述的方法去除  $\alpha$ -胺基的 Fmoc 基後，將 10eq 之氯乙酸、10eq 之 DIPEA、10eq 之 HOSu 在 DCM 中進行攪拌，添加與 DCM 同量的 NMP，製備 ClAcOSu 的 DCM/NMP 溶液 (0.2M)，添加固相樹脂，在室溫振盪 60 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次，以氯甲烷清洗 3 次，並在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 60 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (9000rpm, 2min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體進行乾燥，使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 5 等量之三乙胺，在室溫攪拌約 14 小時。以乙酸進行驟冷，將反應溶液使用 Biotage V-10 進行減壓濃縮。

【0198】 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 30x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 5-29%, 之後耗費 8 分鐘 29-34%, 之後耗費 1 分鐘 34-60%; 流量: 45mL/min。

【0199】 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 77.0%。

分析條件 B: 保持時間=10.57 分鐘; 管柱 Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m、2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B conc) 耗費 20 分鐘 20-60%, 之後耗費 1 分鐘 60-95%, 之後耗費 5 分鐘 95-95%; 流量: 0.25mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1378.48 (M+2H)^{2+}$ 。

【0200】 [實施例 9-4]

894\_3m\_G\_Azi (序列識別號 297) 的合成

[化 7]

in DMF (5 等量)、1M DIEA in DMF (10 等量) 添加至固相樹脂，在室溫振盪 30 分鐘而進行。側鏈的去保護及從固相樹脂的剪切，首先，將在氯乙醯基導入步驟後所得之樹脂以 DMF 清洗 5 次並以氯甲烷清洗 3 次，在減壓下進行乾燥。接著，在已裝入固相樹脂的反應容器中，添加反應劑混合液 (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/DODT 的體積比 92.5:2.5:2.5:2.5 的混合物)，在室溫振盪 90 分鐘。由玻璃料過濾回收反應液。殘留於反應容器的固相樹脂係與剪切用混合液再度進行振盪，由玻璃料回收溶液成分，並與前述的濾液混合。若將此濾液添加至已冷卻至 0°C 之過剩的乙醚/己烷 (1/1)，則產生白濁沉澱。將此混合物進行離心分離 (10000rpm, 1min)，並傾析溶液。將所得之固體再度以已冷卻至 0°C 的少量乙醚清洗後，將所得之固體進行乾燥，使用於後續的環化反應。肽的環化反應係以將固相樹脂的莫耳數作為基準而肽的終濃度成為 5mM 之方式溶解於 DMSO 後，添加 10 等量之三乙胺，在室溫攪拌約 17 小時。使用 Savant Explorer SpeedVaC 將反應溶液進行減壓濃縮。以將固相樹脂的莫耳數作為基準而所得之 C 端羧酸肽的終濃度成為 5mM 之方式，將混合物溶解於 DMSO/H<sub>2</sub>O (9/1, 4mL)，添加 HOSu (230mg, 20 等量) 及 EDC HCl (383.4mg, 20 等量) 並進行攪拌。

**【0289】** 所得之粗生成物係使用以下的條件進行精製 (管柱: WaterS Xbridge (註冊商標) C18 5 $\mu$ m (註冊商標) 30x150mm; 移動相: A=0.1%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.1%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B): 耗費 3 分鐘 9–34%，之後耗費 8 分鐘 34–39%，之後耗費 1 分鐘 39–60%; 流量: 45mL/min。

**【0290】** 目的物之純度係由分析條件 B 的 LC/MS (UV 波長 225nm) 層析圖的面積比進行計算，且為 87.4%。

分析條件 B: 保持時間=4.25 分鐘; 管柱: Kinetex EVO C18 2.6 $\mu$ m 2.1x150mm、100Å; 移動相: A=0.025%TFA in H<sub>2</sub>O、B=0.025%TFA in MeCN; 溫度 40°C; 梯度 (%B conc): 耗費 7.2 分鐘 20–60%，之後耗費 0.3 分鐘 60–95%，之後耗費 1.6 分鐘 95–95%; 流量: 0.5mL/min。

ESI-MS (+) 觀測值  $m/z=1292.86 (M+2H)^{2+}$ 。

[合成例 1-9]

894\_C12NH<sub>2</sub> (脂肪酸連結子與序列識別號 1 之複合體) 的合成

[化 35]

【請求項 19】如請求項 16 或 17 之肽，其係由 15 胺基酸殘基所組成。

【請求項 20】如請求項 1 之肽，其能通過血腦障壁。

【請求項 21】如請求項 1 之肽，其對於肌肉組織具有指向性。

【請求項 22】如請求項 1 之肽，其具有細胞穿透性。

【請求項 23】一種複合體，其包含：如請求項 1 之肽、與前述肽結合之連結子，以及結合至前述連結子之物質。

【請求項 24】如請求項 23 之複合體，其中，前述物質能通過血腦障壁。

【請求項 25】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的胺基酸長度為 1 以上且 15 以下，而且前述連結子包含 1 個以上的甘胺酸(Gly)或絲胺酸(Ser)。

【請求項 26】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的 N 端為可被修飾的半胱胺酸(Cys)或可被修飾的離胺酸(Lys)。

【請求項 27】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的胺基酸長度為 1 以上且 5 以下，而且包含 D 型的麩胺酸(de)及甲基化甘胺酸(MeG)中任一者或兩者。

【請求項 28】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子的 N 端為可被修飾的 Cys 或可被修飾的離胺酸(Lys)。

【請求項 29】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子為包含聚乙二醇(PEG)或聚乙二醇的衍生物之 PEG 連結子。

【請求項 30】如請求項 29 之複合體，其中，前述 PEG 連結子進一步包含甘胺酸(Gly)、絲胺酸(Ser)、麩胺酸(Glu)、精胺酸(Arg)或離胺酸(Lys)。

【請求項 31】如請求項 29 或 30 之複合體，其中，前述連結子的 N 端為可被修飾的半胱胺酸(Cys)或可被修飾的離胺酸(Lys)。

【請求項 32】如請求項 23 之複合體，其中，前述連結子具有由序列識別號 201、553~644 中任一者所示的序列。

【請求項 33】如請求項 22 之複合體，其中，前述連結子為：