

明 細 書

発明の名称：ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、その一実施形態において、中枢神経系（CNS）において機能させるべき化合物（蛋白質、核酸、低分子化合物等）をして血液脳関門を通過させるために、それらの化合物と結合させて用いる、ヒトトランスフェリン受容体に親和性を有するペプチド、及びその使用法に関する。

背景技術

[0002] 脳室周囲器官（松果体、脳下垂体、最後野等）を含む幾つかの領域を除き脳の大半の組織に血液を供給する毛細血管は、筋肉等その他の組織に存在する毛細血管と異なり、その内皮を形成している内皮細胞同士が強固な細胞間結合によって密着し合っている。そのため、血液から脳への物質の受動輸送が妨げられ、例外はあるものの、脂溶性の高い物質、又は分子量が小さく（200～500ダルトン以下）且つ生理pH付近において電氣的に中性な物質以外、毛細血管から脳実質へ移行し難い。このような、脳内の毛細血管内皮を介した、血液と脳の組織液との間で物質交換を制限する機構は、血液脳関門（Blood Brain Barrier, BBB）と呼ばれている。また、血液脳関門は、脳のみならず、脳及び脊髄を含む中枢神経系の組織液と血液との間の物質交換をも制限している。

[0003] 血液脳関門の存在により、中枢神経系の細胞の大半は、血中のホルモン、サイトカイン等の物質の濃度変動の影響を受けることなく、その生化学的な恒常性が保たれる。しかしながら、血液脳関門の存在は、薬剤開発の上で問題を提起する。例えば、イズロン酸-2-スルファターゼの欠損に起因する遺伝性代謝疾患であるムコ多糖症II型（ハンター症候群）に対しては、組換えイズロン酸-2-スルファターゼを静脈内投与する酵素補充療法が行われているが、ハンター症候群において認められる顕著な中枢神経系（CNS）の異常に対しては、イズロン酸-2-スルファターゼが血液脳関門を通過できないことから有

効性が低い。その他、アルツハイマー病、脳腫瘍等の中枢神経系の疾患に対しては、薬剤を中枢神経系に到達させる必要があるが、血液脳関門を通過できない薬剤は薬効を発揮できない。

[0004] 中枢神経系において作用させるべきそのような蛋白質等の高分子物質に血液脳関門を通過させるための方法が、種々開発されている。そのような方法として、脳内毛細血管の内皮細胞上に存在する膜蛋白質と親和性を持つように高分子物質を修飾する方法が種々報告されている。脳内毛細血管の内皮細胞上に存在する膜蛋白質としては、インスリン、トランスフェリン、インスリン様成長因子（IGF-I, IGF-II）、LDL、レプチン等の化合物に対する受容体が挙げられる。これらの中で、トランスフェリン受容体に対する抗体については、血液脳関門を通過して脳実質に移行することができ、且つ中枢神経系で作用させるべき薬剤と結合させることにより、当該薬剤を脳内に移行させることのできるものが報告されている（特許文献1～8）。

[0005] 更に、抗トランスフェリン受容体抗体にイズロン酸-2-スルファターゼを結合させた、血液脳関門を通過させて中枢神経系において薬効を発揮し得る、ハンター症候群治療剤（イズカーゴ（登録商標））が2021年に上市されている（非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：US2007/0082380
特許文献2：US2008/0152645
特許文献3：US2009/0053219
特許文献4：US2011/0110935
特許文献5：US2018/0171012
特許文献6：US2018/0179291
特許文献7：US2020/0317798
特許文献8：US2020/0384061

非特許文献

[0007] 非特許文献1：添付文書「イズカーゴ点滴静注用10mg」2021年3月（第1版）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記背景の下で、本発明の目的の一つは、中枢神経系（CNS）において機能させるべき化合物（蛋白質，核酸，低分子化合物等）が血液脳関門を通過できるようにするために、それらの化合物と結合させて用いることのできる、ヒトトランスフェリン受容体に親和性を有するペプチド、及びその使用方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 上記目的に向けた研究において、本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、本明細書において詳述する作製法により得られる、ヒトトランスフェリン受容体（hTfR）の細胞外領域を特異的に認識する抗hTfR重鎖抗体の可変領域を含むhTfRに対する親和性を有するペプチド（抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチド）が、効率よく血液脳関門を通過することを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下を含むものである。なお、以下の1.～104.において示される発明において、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの語は、重鎖抗体の可変領域を含むペプチドに置き換えることができ、また、ペプチドの語を蛋白質に置き換えることもできる。

1. 以下の（1）～（2）からなる群より選ばれるものである、CDR1、CDR2、及びCDR3の3箇所の相補性決定領域を有する重鎖抗体の可変領域を含む、ヒトトランスフェリン受容体に対する親和性を有するペプチド（ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド）；

（1）CDR1のアミノ酸配列が配列番号7又は配列番号8のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列であり、及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列であるもの、

（2）CDR1のアミノ酸配列が配列番号13又は配列番号14のアミノ

酸配列であり、C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 1 5 又は配列番号 1 6 のアミノ酸配列であり、及びC D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 1 7 又は配列番号 1 8 のアミノ酸配列であるもの。

2. 以下の(1)～(3)からなる群より選択されるものである、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド；

(1) 配列番号 4 のアミノ酸配列と 8 0 % 以上のアミノ酸配列の同一性を有し、且つ、上記 1 の(1)に示されるアミノ酸配列を有するC D R 1、C D R 2、及びC D R 3 の 3 箇所の相補性決定領域を有するもの、

(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列と 8 0 % 以上のアミノ酸配列の同一性を有し、且つ、上記 1 の(1)に示されるアミノ酸配列を有するC D R 1、C D R 2、及びC D R 3 の 3 箇所の相補性決定領域を有するもの、及び

(3) 配列番号 6 のアミノ酸配列と 8 0 % 以上のアミノ酸配列の同一性を有し、且つ、上記 1 の(2)に示されるアミノ酸配列を有するC D R 1、C D R 2、及びC D R 3 の 3 箇所の相補性決定領域を有するもの。

3. 該アミノ酸配列の同一性が 8 5 % 以上である、上記 2 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

4. 該アミノ酸配列の同一性が 9 0 % 以上である、上記 2 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

5. 該アミノ酸配列の同一性が 9 5 % 以上である、上記 2 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

6. 以下の(1)～(3)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである、上記 1 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド；

(1) 配列番号 4 のアミノ酸配列中の 1 ～ 1 0 個のアミノ酸を置換、欠失又は付加させたものであり、且つ、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 7 又は配列番号 8 のアミノ酸配列であり、C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 9 又は配列番号 1 0 のアミノ酸配列であり、及びC D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 1 1 又は配列番号 1 2 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列中の 1 ～ 1 0 個のアミノ酸を置換、欠失

又は付加させたものであり、且つ、CDR1のアミノ酸配列が配列番号7又は配列番号8のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列であり、及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(3) 配列番号6のアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸を置換、欠失又は付加させたものであり、且つ、CDR1のアミノ酸配列が配列番号13又は配列番号14のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号15又は配列番号16のアミノ酸配列であり、及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号17又は配列番号18のアミノ酸配列である、アミノ酸配列。

7. 該置換、欠失又は付加させたアミノ酸の個数が1～5個である上記6に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

8. 該置換、欠失又は付加させたアミノ酸の個数が1～3個である上記6に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

9. ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域の双方に対して親和性を有するものである、上記1～8の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

10. ヒトトランスフェリン受容体及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ～ $5 \times 10^{-7} \text{M}$ である、上記9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

11. ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ～ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ である上記9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

12. ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数の値を1としたときの、サルトランスフェリン受容体との解離定数の値が、1～10である、上記9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

13. ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数の値を1としたときの、サルトランスフェリン受容体との解離定数の値が、3～10である、上記9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

14. 上記1～13の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの複数個を結合させたものである、以下の(1)～(3)からなる群より選択されるものである、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドペプチド;

(1) 上記1～12に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの2～10個を直接又はリンカーを介して結合させたもの、

(2) 上記1～12に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの2又は3個を直接又はリンカーを介して結合させたもの、

(3) 上記1～12に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの2個を直接又はリンカーを介して結合させたもの。

15. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの複数個を結合させるリンカーのそれぞれが1～60個のアミノ酸からなるペプチドリinkerである、上記14に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

16. 該ペプチドリinkerのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25のアミノ酸配列からなる群より選ばれるものである、上記14に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

17. 該ペプチドリinkerのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、及び配列番号21からなる群より選ばれるアミノ酸配列が、2～10個直列したアミノ酸配列からなるものである、上記14に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

18. 配列番号4、配列番号5、及び配列番号6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである、上記1のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

19. 配列番号4、配列番号5、及び配列番号6からなる群より選択される

アミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸が置換、欠失又は付加したものであるアミノ酸配列を含むものである、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

20. 置換、欠失又は付加したアミノ酸の個数が1～5個である上記37のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

21. 置換、欠失又は付加したアミノ酸の個数が1～3個である上記37のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

22. 上記1～21の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと、薬物が結合した、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドー薬物複合体。

23. 該薬物が、他の蛋白質（A）、核酸、又は低分子化合物の何れかである、上記22に記載の複合体。

24. 上記1～21の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと他の蛋白質（A）との融合蛋白質。

25. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが、該他の蛋白質（A）のC末端において、直接又はリンカーを介して結合しているものである、上記24に記載の融合蛋白質。

26. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが、該他の蛋白質（A）のN末端において、直接又はリンカーを介して結合しているものである、上記24に記載の融合蛋白質。

27. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと該他の蛋白質（A）を結合させるリンカーが1～60個のアミノ酸からなるペプチドリinkerである、上記25又は26に記載の融合蛋白質。

28. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと該他の蛋白質（A）を結合させるペプチドリinkerのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25のアミノ酸配列からな

る群より選ばれるものである、上記 27 に記載の融合蛋白質。

29. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと該他の蛋白質 (A) を結合させるペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1 個のアミノ酸、アミノ酸配列 Gly-Ser, アミノ酸配列 Ser-Ser, アミノ酸配列 Gly-Gly-Ser, アミノ酸配列 Gly-Gly-Gly, 配列番号 19, 配列番号 20, 及び配列番号 21 の各アミノ酸配列のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列が、2~10 個直列したアミノ酸配列からなるものである、上記 27 に記載の融合蛋白質。

30. 該他の蛋白質 (A) が、ヒト由来のものである、上記 24~29 の何れかに記載の融合蛋白質。

31. 該他の蛋白質 (A) が、サイトカイン、成長因子、又は抗体医薬である、上記 24~30 の何れかに記載の融合蛋白質。

32. 該他の蛋白質 (A) が、脳由来神経成長因子 (BDNF), 神経成長因子 (NGF), リソソーム酵素, 毛様体神経栄養因子 (CNTF), グリア細胞株神経栄養因子 (GDNF), ニューロトロフィン 3, ニューロトロフィン 4/5, ニューロトロフィン 6, ニューレグリン 1, エリスロポエチン, ダルベポエチン, アクチビン, 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF), 線維芽細胞成長因子 2 (FGF2), 上皮細胞増殖因子 (EGF), 血管内皮増殖因子 (VEGF), インターフェロン α , インターフェロン β , インターフェロン γ , インターロイキン 6, 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF), 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF), マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF), 腫瘍壊死因子 α 受容体 (TNF- α 受容体), PD-1 リガンド, PD-L1, PD-L2, ベータアミロイドを分解する活性を有する酵素, 抗ベータアミロイド抗体, 抗 BACE 抗体, 抗 EGF R 抗体, 抗 PD-1 抗体, 抗 PD-L1 抗体, 抗 PD-L2 抗体, 抗 HER2 抗体, 抗 TNF- α 抗体, 及び抗 CTLA-4 抗体からなる群から選択されるものである、上記 24~30 の何れかに記載の融合蛋白質。

33. 該他の蛋白質 (A) が、リソソーム酵素であり、該リソソーム酵素が

、 α -L-イズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、酸性 α -グルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、GM2活性化蛋白質、 β -ヘキソサミニダーゼA、 β -ヘキソサミニダーゼB、N-アセチルグルコサミン-1-フォスフォトランスフェラーゼ、 α -マンノシダーゼ、 β -マンノシダーゼ、ガラクトシルセラミダーゼ、サボシンC、アリールスルファターゼA、 α -L-フコシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、 α -ガラクトシダーゼA、 β -グルクロニダーゼ、ヘパランN-スルファターゼ、 α -N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチルCoA α -グルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-6-硫酸スルファターゼ、酸性セラミダーゼ、アミロ-1、6-グルコシダーゼ、シアリダーゼ、パルミトイル蛋白質チオエステラーゼ-1、トリペプチジルペプチダーゼ-1、ヒアルロニダーゼ-1、CLN1及びCLN2からなる群より選択されるものである、上記24～30の何れかに記載の融合蛋白質。

34. 血清アルブミンが結合したものである、上記24～33の何れかに記載の融合蛋白質。

35. ヒトIgG Fc領域又はその一部が結合したものである、上記24～33の何れかに記載の融合蛋白質。

36. 上記1～21の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドをコードする核酸。

37. 上記24～35の何れかに記載の融合蛋白質をコードする核酸。

38. 上記36又は37に記載の核酸を組み込んでなる、発現ベクター。

39. 上記38に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

40. 該細胞が哺乳動物由来である、上記39に記載の細胞。

41. 以下の(1)～(3)からなる群より選ばれるものである、上記1のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド；

(1) 配列番号4のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し、且つ、CD

R 1 のアミノ酸配列が配列番号 7 又は配列番号 8 のアミノ酸配列であり、C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 9 又は配列番号 1 0 のアミノ酸配列であり、及びC D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 1 1 又は配列番号 1 2 のアミノ酸配列であるもの、

(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有し、且つ、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 7 又は配列番号 8 のアミノ酸配列であり、C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 9 又は配列番号 1 0 のアミノ酸配列であり、及びC D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 1 1 又は配列番号 1 2 のアミノ酸配列であるもの、

(3) 配列番号 6 のアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有し、且つ、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 1 3 又は配列番号 1 4 のアミノ酸配列であり、C D R 2 のアミノ酸配列が配列番号 1 5 又は配列番号 1 6 のアミノ酸配列であり、及びC D R 3 のアミノ酸配列が配列番号 1 7 又は配列番号 1 8 のアミノ酸配列であるもの。

4 2. 該アミノ酸配列の同一性が 8 5 % 以上である、上記 4 1 のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

4 3. 該アミノ酸配列の同一性が 9 0 % 以上である、上記 4 1 のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

4 4. 該アミノ酸配列の同一性が 9 5 % 以上である、上記 4 1 のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

4 5. 上記 3 7 ~ 4 4 の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと、薬物が結合したヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドー薬物複合体。

4 6. 該薬物が、他の蛋白質 (A)、核酸、又は低分子化合物の何れかである、上記 4 5 の複合体。

4 7. 血管内皮細胞の表面に存在する分子を抗原とするヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと他の蛋白質 (A) との融合蛋白質であって、該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが該他の蛋白質 (A) の C 末端に

において、直接又はリンカーを介して結合しているもの、又は該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが該他の蛋白質（A）のN末端において、直接又はリンカーを介して結合しているものである融合蛋白質。

48. 該リンカーが1～60個のアミノ酸からなるペプチドリンカーである、上記47の融合蛋白質。

49. 該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25からなる群より選ばれるものである、上記48の融合蛋白質。

50. 該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、及び配列番号21からなる群より選ばれるアミノ酸配列が、2～10個直列したアミノ酸配列からなるものである、上記48の融合蛋白質。

51. 該他の蛋白質（A）が、ヒト由来のものである、上記46～50の何れかの複合体又は融合蛋白質。

52. 該他の蛋白質（A）が、サイトカイン、成長因子、又は抗体医薬である、上記46～51の何れかの複合体又は融合蛋白質。

53. 該他の蛋白質（A）が、脳由来神経成長因子（BDNF）、神経成長因子（NGF）、リソソーム酵素、毛様体神経栄養因子（CNTF）、グリア細胞株神経栄養因子（GDNF）、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4／5、ニューロトロフィン6、ニューレグリン1、エリスロポエチン、ダルベポエチン、アクチビン、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、線維芽細胞成長因子2（FGF2）、上皮細胞増殖因子（EGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、インターロイキン6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロ

ファージコロニー刺激因子 (M-CSF), 腫瘍壊死因子 α 受容体 (TNF- α 受容体), PD-1リガンド, PD-L1, PD-L2, ベータアミロイドを分解する活性を有する酵素, 抗ベータアミロイド抗体, 抗BACE抗体, 抗EGFR抗体, 抗PD-1抗体, 抗PD-L1抗体, 抗PD-L2抗体, 抗HER2抗体, 抗TNF- α 抗体, 及び抗CTLA-4抗体からなる群から選択されるものである, 上記46~51の何れかの複合体又は融合蛋白質。

54. 該他の蛋白質(A)が, リソソーム酵素であり, 該リソソーム酵素が, α -レーイズロニダーゼ, イズロン酸-2-スルファターゼ, 酸性 α -グルコシダーゼ, グルコセレブロシダーゼ, β -ガラクトシダーゼ, GM2活性化蛋白質, β -ヘキソサミニダーゼA, β -ヘキソサミニダーゼB, N-アセチルグルコサミン-1-フォスフォトランスフェラーゼ, α -マンノシダーゼ, β -マンノシダーゼ, ガラクトシルセラミダーゼ, サポシンC, アリールスルファターゼA, α -レーフコシダーゼ, アスパルチルグルコサミニダーゼ, α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ, 酸性スフィンゴミエリナーゼ, α -ガラクトシダーゼA, β -グルクロニダーゼ, ヘパランN-スルファターゼ, α -N-アセチルグルコサミニダーゼ, アセチルCoA α -グルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ, N-アセチルグルコサミン-6-硫酸スルファターゼ, 酸性セラミダーゼ, アミロー-1, 6-グルコシダーゼ, シアリダーゼ, パルミトイル蛋白質チオエステラーゼ-1, トリペプチジルペプチダーゼ-1, ヒアルロニダーゼ-1, CLN1及びCLN2からなる群より選択されるものである, 上記46~51の何れかの複合体又は融合蛋白質。

55. 血清アルブミンが更に結合したものである, 上記46~54の何れかの融合蛋白質。

56. ヒトIgG Fc領域又はその一部が更に結合したものである, 上記46~54の何れかの融合蛋白質。

57. 血管内皮細胞が, 脳血管内皮細胞である, 上記45~56の何れかの

複合体又は融合蛋白質。

58. 該血管内皮細胞の表面に存在する分子が、トランスフェリン受容体 (TfR), インスリン受容体, レプチン受容体, リポ蛋白質受容体, IGF 受容体, OATP-F, 有機アニオントランスポーター, MCT-8, 及びモノカルボン酸トランスポーターからなる群から選択されるものである, 特にヒト由来のものである, 上記45~57の何れかの複合体又は融合蛋白質。

59. 該血管内皮細胞の表面に存在する分子が、トランスフェリン受容体 (TfR), 特にヒト由来のものである, 上記45~57の何れかの複合体又は融合蛋白質。

60. 該薬物が、該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖類、デキストラン、ポリビニルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、ヒアルロン酸、ビオチン-ストレプトアビジン、及びこれらの誘導体からなる群から選択されるリンカーを介して結合したものである, 上記45又は46の複合体。

61. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが、ラクダ科の動物に由来する重鎖抗体又は軟骨魚類に由来する免疫グロブリン新抗原受容体の全部又は一部である, 上記45~60の複合体又は融合蛋白質。

62. 該重鎖抗体が単一重鎖抗体である, 上記61の複合体又は融合蛋白質。

63. 該重鎖抗体が、以下の(1)~(4)からなる群から選択されるものである, 上記61又は62の複合体又は融合蛋白質:

- (1) 重鎖の可変領域の全部又はその一部のみからなるもの,
- (2) 重鎖の可変領域の全部又はその一部とヒンジ領域の一部からなるもの,
- (3) 重鎖の可変領域とヒンジ領域の全部からなるもの, 及び

(4) 重鎖の可変領域とヒンジ領域に加え定常領域の一部を含むもの。

64. 上記47～59, 61～63の何れかの融合蛋白質をコードする核酸。

65. 上記64の核酸を組み込んでなる, 発現ベクター。

66. 上記65の発現ベクターで形質転換された細胞。

67. 該細胞が哺乳動物由来である, 上記66の細胞。

68. 上記45～63の複合体又は融合蛋白質を有効成分として含有してなる医薬組成物, 特に該有効成分が, 血液脳関門を通過して, 中枢神経において薬効を示すものである医薬組成物。

69. 以下の(1)～(2)からなる群より選ばれるものである, CDR1, CDR2, 及びCDR3の3箇所の相補性決定領域を有する, ヒトトランスフェリン受容体に対する親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチド;

(1) CDR1のアミノ酸配列が配列番号7又は配列番号8のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列であり, 及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列であるもの, ここで, CDR1, CDR2, 及びCDR3の各アミノ酸配列の組み合わせは任意のものであってよく, 但し, 好ましくは, CDR1のアミノ酸配列が配列番号7のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号9のアミノ酸配列であり, 及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号11のアミノ酸配列であるもの, 又は, CDR1のアミノ酸配列が配列番号8のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号10のアミノ酸配列であり, 及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号12のアミノ酸配列であるもの,

(2) CDR1のアミノ酸配列が配列番号13又は配列番号14のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号15又は配列番号16のアミノ酸配列であり, 及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号17又は配列番号18のアミノ酸配列であるもの, ここで, CDR1, CDR2, 及びCDR3の各アミノ酸配列の組み合わせは任意のものであってよく, 但し, 好

ましくは、CDR1のアミノ酸配列が配列番号13のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号15のアミノ酸配列であり、及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号17のアミノ酸配列であるもの、又は、CDR1のアミノ酸配列が配列番号14のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号16のアミノ酸配列であり、及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号18のアミノ酸配列であるもの。

70. 以下の(1)～(3)からなる群より選ばれるものである、CDR1、CDR2、及びCDR3の3箇所の相補性決定領域を有する、ヒトトランスフェリン受容体に対する親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチド；

(1) 配列番号4で示されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、CDR1、CDR1、及びCDR3のアミノ酸配列が、上記69の選択肢(1)に示されるものであるもの、

(2) 配列番号5で示されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、CDR1、CDR1、及びCDR3のアミノ酸配列が、上記69の選択肢(1)に示されるものであるもの、

(3) 配列番号6で示されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、CDR1、CDR1、及びCDR3のアミノ酸配列が、上記69の選択肢(2)に示されるものであるもの。

71. 該同一性が85%以上である、上記70の(1)～(3)からなる群より選ばれるものである、重鎖抗体可変領域ペプチド。

72. 該同一性が90%以上である、上記70の(1)～(3)からなる群より選ばれるものである、重鎖抗体可変領域ペプチド。

73. 該同一性が95%以上である、上記70の(1)～(3)からなる群より選ばれるものである、重鎖抗体可変領域ペプチド。

74. 以下の(1)～(3)からなる群より選ばれるものである、CDR1、CDR2、及びCDR3の3箇所の相補性決定領域を有する、ヒトトランスフェリン受容体に対する親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチド；

(1) 配列番号4で示されるアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸が置

換，欠失又は付加したものであるアミノ酸配列を含み，且つ，CDR1，CDR1，及びCDR3のアミノ酸配列が，上記69の選択肢（1）に示されるものであるもの，

（2）配列番号5で示されるアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸が置換，欠失又は付加したものであるアミノ酸配列を含み，且つ，CDR1，CDR1，及びCDR3のアミノ酸配列が，上記69の選択肢（1）に示されるものであるもの，

（3）配列番号6で示されるアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸が置換，欠失又は付加したものであるアミノ酸配列を含み，且つ，CDR1，CDR1，及びCDR3のアミノ酸配列が，上記69の選択肢（2）に示されるものであるもの。

75．該置換，欠失又は付加したアミノ酸の個数が1～5個である，上記74の（1）～（3）からなる群より選ばれるものである，重鎖抗体可変領域ペプチド。

76．該置換，欠失又は付加したアミノ酸の個数が1～3個である，上記74の（1）～（3）からなる群より選ばれるものである，重鎖抗体可変領域ペプチド。

77．ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域の双方に対して親和性を有するものである，上記69～76の何れかの重鎖抗体可変領域ペプチド。

78．ヒトトランスフェリン受容体及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ～ $5 \times 10^{-7} \text{M}$ である，上記77の重鎖抗体可変領域ペプチド。

79．ヒトトランスフェリン受容体及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ～ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ である，上記77の重鎖抗体可変領域ペプチド。

80．ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数の値を1としたときの，サルトランスフェリン受容体との解離定数の値が，1～10であ

る，上記 77 の重鎖抗体可変領域ペプチド。

81. ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数の値を 1 としたときの，サルトランスフェリン受容体との解離定数の値が，3～10 である，上記 77 の重鎖抗体可変領域ペプチド。

82. 上記 69～81 の重鎖抗体可変領域ペプチドの複数個を結合させたものである，以下の (1)～(3) からなる群より選択されるものである，重鎖抗体可変領域ペプチド；

(1) 上記 41～53 の重鎖抗体可変領域ペプチドの 2～10 個を直接又はリンカーを介して結合させたもの，

(2) 上記 41～53 の重鎖抗体可変領域ペプチドの 2 又は 3 個を直接又はリンカーを介して結合させたもの，

(3) 上記 41～53 の重鎖抗体可変領域ペプチドの 2 個を直接又はリンカーを介して結合させたもの。

83. 該重鎖抗体可変領域ペプチドの複数個を結合するリンカーのそれぞれが 1～60 個のアミノ酸からなるペプチドリinkerである，上記 82 の重鎖抗体可変領域ペプチド。

84. 該ペプチドリinkerのアミノ酸配列が，1 個のアミノ酸，アミノ酸配列 Gly-Ser，アミノ酸配列 Ser-Ser，アミノ酸配列 Gly-Gly-Ser，アミノ酸配列 Gly-Gly-Gly，配列番号 19，配列番号 20，配列番号 21，配列番号 22，配列番号 23，配列番号 24，及び配列番号 25 のアミノ酸配列からなる群より選ばれるものである，上記 83 の重鎖抗体可変領域ペプチド。

85. 該ペプチドリinkerのアミノ酸配列が，1 個のアミノ酸，アミノ酸配列 Gly-Ser，アミノ酸配列 Ser-Ser，アミノ酸配列 Gly-Gly-Ser，アミノ酸配列 Gly-Gly-Gly，配列番号 19，配列番号 20，及び配列番号 21，のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列が，2～10 個直列したアミノ酸配列からなるものである，の重鎖抗体可変領域ペプチド。

86. 重鎖抗体可変領域ペプチドと薬物が結合した重鎖抗体可変領域ペプチドー薬物複合体であって，該重鎖抗体可変領域ペプチドが上記 69～85 の

何れかのものである，複合体。

８７．該薬物が，他の蛋白質（Ａ），核酸，又は低分子化合物の何れかである，上記８６の複合体。

８８．重鎖抗体可変領域ペプチドと他の蛋白質（Ａ）との融合蛋白質であって，該重鎖抗体可変領域ペプチドが上記６９～８５の何れかのものである，融合蛋白質。

８９．該重鎖抗体可変領域ペプチドが，該他の蛋白質（Ａ）のＣ末端において，直接又はリンカーを介して結合しているものである，上記８８の融合蛋白質。

９０．該重鎖抗体可変領域ペプチドが，該他の蛋白質（Ａ）のＮ末端において，直接又はリンカーを介して結合しているものである，上記８８の融合蛋白質。

９１．該リンカーが１～６０個のアミノ酸からなるペプチドリinkerである，上記８９又は９０の融合蛋白質。

９２．該ペプチドリinkerのアミノ酸配列が，１個のアミノ酸，アミノ酸配列Gly-Ser，アミノ酸配列Ser-Ser，アミノ酸配列Gly-Gly-Ser，アミノ酸配列Gly-Gly-Gly，配列番号１９，配列番号２０，配列番号２１，配列番号２２，配列番号２３，配列番号２４，及び配列番号２５のアミノ酸配列からなる群より選ばれるものである，上記９１に記載の融合蛋白質。

９３．該ペプチドリinkerのアミノ酸配列が，１個のアミノ酸，アミノ酸配列Gly-Ser，アミノ酸配列Ser-Ser，アミノ酸配列Gly-Gly-Ser，アミノ酸配列Gly-Gly-Gly，配列番号１９，配列番号２０，及び配列番号２１のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列が，２～１０個直列したアミノ酸配列からなるものである，上記９１の融合蛋白質。

９４．該他の蛋白質（Ａ）が，ヒト由来のものである，上記８７～９３の何れかの複合体又は融合蛋白質。

９５．該他の蛋白質（Ａ）が，サイトカイン，成長因子，又は抗体医薬である，上記８７～９４の何れかの複合体又は融合蛋白質。

96. 該他の蛋白質（A）が、上記35に示されるものから選択されるものである、上記87～94の何れかの複合体又は融合蛋白質。

97. 該他の蛋白質（A）が、リソソーム酵素であり、該リソソーム酵素が上記36に示されるものから選択されるものである、上記87～94の何れかの複合体又は融合蛋白質。

98. 血清アルブミンが結合したものである、上記87～94の何れかの複合体又は融合蛋白質。

99. ヒトIgG Fc領域又はその一部が結合したものである、上記87～94の何れかの複合体又は融合蛋白質。

100. 上記69～85の何れかの重鎖抗体可変領域ペプチドをコードする核酸。

101. 上記88～99の何れかの融合蛋白質をコードする核酸。

102. 上記100又は101の核酸を組み込んでなる、発現ベクター。

103. 上記102の発現ベクターで形質転換された細胞。

104. 該細胞が哺乳動物由来である、上記103に記載の細胞。

発明の効果

[0010] 本発明の一実施形態であるヒトトランスフェリン受容体に親和性を有するペプチド（hTfR親和性ペプチド）は、血液脳関門を殆ど又は全く通過することができない物質と結合させることにより、当該物質をして血液脳関門を通過させて中枢神経系にまで到達させることができるので、当該物質の機能を中枢神経系において発揮させることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ及びトラスツズマブをそれぞれ投与した6時間後の野生型マウスの、小脳中に含まれるこれら物質の定量値を示すグラフ。(1)はトラスツズマブ、(2)はhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1、(3)はhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ3、(4)はhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ（参照品）の定量値をそれぞれ示す。縦軸は湿重量(g)当たりに含まれるこれら物質の量(μ g)を示す。

[図2]hTfR親和性ペプチドートラスツズマブを投与した6時間後の野生型マウスの小脳の、抗hTfR抗体に対する免疫組織化学染色の結果を示す図面代用写真。(a)はトラスツズマブ、(b)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1、(c)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3、(d)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ(参照品)をそれぞれ投与したものをそれぞれ投与したもの。各写真は倍率40Xで撮影されたものである。

[図3]hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ及びトラスツズマブ投与6時間後のhTfRノックインマウスの、小脳中に含まれるこれら物質の定量値を示すグラフ。(1)はトラスツズマブ、(2)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2、(3)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3の定量値をそれぞれ示す。縦軸は湿重量(g)あたりに含まれるこれら物質の量(μ g)を示す。

[図4]hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ投与6時間後のhTfRノックインマウスの小脳の、抗hTfR抗体に対する免疫組織化学染色の結果を示す図面代用写真。(a)はトラスツズマブ、(b)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2、(c)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3をそれぞれ投与したもの。各写真は倍率40Xで撮影されたものである。

発明を実施するための形態

[0012] ヒト、マウスを含む多くの哺乳動物の抗体の単量体は、2本のH鎖と2本のL鎖がジスルフィド結合により共有結合したヘテロ4量体として形成される。それぞれの鎖のN末端には、異なる抗体どうしでアミノ酸配列に違いのある領域があり、これを可変領域という。H鎖の可変領域には、抗原との特異的結合に大きく寄与する3か所の相補性決定領域が存在する。これら3か所の相補性決定領域はN末端からCDR1、CDR2、及びCDR3という。L鎖にも同様に抗原との特異的結合に大きく寄与する3か所の相補性決定領域が存在し、これら3か所の相補性決定領域はN末端からCDR1、CDR2、及びCDR3という。

[0013] 1本のH鎖と1本のL鎖は対になって抗原と特異的に結合する。つまり、抗原との特異性は、H鎖の3か所のCDRとL鎖の3か所のCDRの計6か所のCDRのアミノ酸配列により概ね決定される。多くの哺乳動物の抗体の単量体には2組のH鎖

とL鎖のペアが存在するので、一つの抗体の分子中に2か所の抗原と結合できる領域を有する。

- [0014] 可変領域においてCDR以外の領域はフレームワーク領域（FR）という。H鎖とL鎖には、それぞれ4箇所のFRが存在し、N末端からFR1、FR2、FR3及びFR4という。CDRは可変領域においてFRに挟まれて存在する。
- [0015] FR1は重鎖抗体の可変領域のN末端からCDR1のN末端に隣接するアミノ酸までの領域である。FR2は、CDR1とCDR2との間の領域である。FR3は、CDR2とCDR3との間の領域である。FR4は、CDR3のC末端に隣接するアミノ酸から重鎖抗体の可変領域のC末端までの領域である。
- [0016] 上記の多くの哺乳動物の抗体の単量体（通常の抗体）に対し、L鎖がなく重鎖のみを含む抗体（重鎖抗体）が存在する。例えば、ラクダ科の動物により産生される重鎖抗体（hcIg）、サメを含む多くの軟骨魚類により産生される免疫グロブリン新抗原受容体（IgNAR）がこれに該当する。ラクダ科の重鎖抗体（hcIg）は、2本の重鎖がジスルフィド結合により共有結合したホモダイマーである。それぞれの重鎖はN末端に可変領域を有し、この可変領域には抗原との特異的結合に大きく寄与する3か所の相補性決定領域（CDR）がある。これら3か所の相補性決定領域はN末端からCDR1、CDR2、及びCDR3という。hcIgを構成する各重鎖は、モノマーであっても抗原と特異的に結合することができるので、一つのhcIgは分子中に2か所の抗原と結合できる領域を有する。可変領域においてCDR以外の領域はフレームワーク領域（FR）ということ、及びそれらの配置は、hcIgも通常の抗体と同様である。
- [0017] IgNARも、hcIgと同様に2本の重鎖がジスルフィド結合により共有結合したホモダイマーである。それぞれの重鎖はN末端に可変領域を有し、この可変領域には抗原との特異的結合に大きく寄与する3か所の相補性決定領域（CDR）を有する。これら3か所の相補性決定領域はN末端からCDR1、CDR2、及びCDR3という。IgNARを構成する各重鎖は、モノマーであっても抗原と特異的に結合することができるので、一つのIgNARは分子中に2か所の抗原と結合できる領域を有する。可変領域においてCDR以外の領域はフレームワーク領域（FR）と

いうこと、及びそれらの配置は、IgNARも通常の抗体と同様である。

[0018] hcIgやIgNARの可変領域中のフレームワーク領域及びCDRは、生殖細胞系列抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベース等から特定することができる。例えば、ヒト重鎖の可変領域遺伝子の生殖細胞系列DNA配列及びアミノ酸配列は、「VBase」ヒト生殖細胞系配列データベース（インターネットにおいて www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase で入手可能）から選択することができる。この他、公表された文献、例えば「Kabat EA. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 米国保健福祉省, NIH Publication No. 91-3242 (1991)」, 「Tomlinson IM. J. Mol. Biol. 227, 776-98 (1992)」, 「Cox JPL. Eur. J Immunol. 24:827-836 (1994)」等に記載されたDNA配列及びアミノ酸配列から特定することもできる。例えば、ヒト重鎖の可変領域遺伝子はhcIgの可変領域と相同性があるので、ヒト重鎖の可変領域遺伝子の情報をもとにhcIgのフレームワーク領域及びCDRを特定することもできる。フレームワーク領域及びCDRを特定する方法に特に限定はない。

[0019] 但し、これに限らず、FR領域と特定された各領域において、（１）そのN末端から１～５個のアミノ酸及び／又はC末端の１～５個のアミノ酸を含む領域、（２）そのN末端から１～３個のアミノ酸及び／又はC末端の１～３個のアミノ酸を含む領域、又は（３）そのN末端から１又は２個のアミノ酸及び／又はC末端の１又は２個のアミノ酸を含む領域をFR領域に含めずに、CDR領域に含めることもできる。一般にFRとされる領域であっても、それがCDRの構造保持あるいは抗原との結合に関与しており、実質的に抗体の相補性を決定する機能を有していると考えられるものである限り、本発明においてはCDRに含めることができる。逆に、CDR領域と特定された各領域において、（１）そのN末端から１～５個のアミノ酸及び／又はC末端の１～５個のアミノ酸を含む領域、（２）そのN末端から１～３個のアミノ酸及び／又はC末端の１～３個のアミノ酸を含む領域、又は（３）そのN末端から１又は２個のアミノ酸及び／又はC末端の１又は２個のアミノ酸を含む領域をCDR領域に含めずに、FR領域に含めることもできる。一般にCDRとされる領域であっても、それがCDRの構

造保持あるいは抗原との結合に関与しておらず、実質的に抗体の相補性を決定する機能を実質的に有しないと考えられるものである限り、本発明においてはFRに含めることができる。

[0020] 重鎖抗体の可変領域のC末端にはヒンジ領域を介して定常領域が存在する。IgNARの可変領域のC末端にも定常領域が存在する。これら定常領域は重鎖抗体の抗原への特異的結合にほとんど寄与しない。

[0021] 重鎖抗体はヒンジ領域でジスルフィド結合により共有結合したホモダイマーである。しかし、重鎖抗体が抗原に結合するためにホモダイマーである必要はなく、重鎖抗体を構成するそれぞれの重鎖は単独で抗原に結合し得る。

[0022] 重鎖抗体を構成する重鎖のモノマーは、重鎖のヒンジ領域のアミノ酸配列中のジスルフィド結合を形成するシステイン残基を欠失させるか、又は他のアミノ酸に置換することにより得ることができる。このような重鎖のモノマーは遺伝子組み換え技術を用いて組換え蛋白質として製造することができる。本明細書中において、かかる重鎖を「単一重鎖抗体」という。単一重鎖抗体は、元となった重鎖抗体の抗原に結合することができる限り、重鎖抗体に含まれる。単一重鎖抗体はこれを直列に連結したものとすることができる。各々の単一重鎖抗体は、例えば一つの重鎖抗体のC末端に別の重鎖抗体のN末端が、直接又はペプチドリンカーにより、結合する。連結させる単一重鎖抗体の数は、2～10個であり、例えば、2個である。ペプチドリンカーの配列は、本明細書に記載のものを適用することができる。かかる複数の単一重鎖抗体を連結させたものも、単一重鎖抗体に含まれる。

[0023] 重鎖抗体を構成するそれぞれの重鎖の可変領域は、ヒンジ領域又は／及び定常領域が存在しなくとも抗原に結合し得る。そのような可変領域からなる蛋白質は、例えば、重鎖抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列のみをコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに組み込み宿主細胞に導入することにより、組換え蛋白質として製造することができる。

[0024] 本明細書中において、便宜上、重鎖抗体を構成する重鎖の可変領域の一部又は全部を含み、抗原に対して親和性を有するものは、全て重鎖抗体に含ま

れるものとする。また、重鎖抗体を構成する重鎖の可変領域の一部又は全部に加え、（１）ヒンジ領域の一部又は全部、（２）ヒンジ領域に加えて重鎖の定常領域の一部を含むものも重鎖抗体に含まれる。重鎖抗体には、hcIgに由来するものと、IgNARに由来するものとがある。このような重鎖抗体のモノマーも単一重鎖抗体に含まれる。

[0025] hcIgに由来する重鎖抗体としては、（１h）重鎖の可変領域の全部又はその一部のみからなるもの、（２h）重鎖の可変領域の全部又はその一部とヒンジ領域の一部からなるもの、（３h）重鎖の可変領域とヒンジ領域の全部からなるもの、（４h）重鎖の可変領域とヒンジ領域に加え定常領域の一部を含むものがある。ここで、重鎖抗体に含まれる定常領域の一部は、例えば、重鎖のC_H2の一部又は全部に相当する部分である。IgNARに由来する重鎖抗体としては、（１l）重鎖の可変領域の全部又はその一部のみからなるもの、（２l）重鎖の可変領域とヒンジ領域の一部からなるもの、（３l）重鎖の可変領域とヒンジ領域の全部からなるもの、（４l）重鎖の可変領域とヒンジ領域に加え定常領域の一部を含むものがある。ここで、重鎖抗体に含まれる定常領域の一部は、例えば、重鎖のC_H2の一部又は全部に相当する部分である。本明細書中において、hcIgに由来する重鎖抗体の可変領域を含む（１h）～（４h）の蛋白質、及びIgNARに由来する重鎖抗体の可変領域を含む（１l）～（４l）の蛋白質を総称して、重鎖抗体可変ドメインペプチド（重鎖抗体可変領域ペプチド）という。従って、重鎖抗体可変領域ペプチドには、２つのペプチド鎖がジスルフィド結合で結合した抗原結合部位が２か所あるものと、１つのペプチド鎖からなる抗原結合部位が１か所あるものとが存在する。

[0026] 本明細書中において、重鎖抗体は、血管内皮細胞、特に脳血管内皮細胞の表面に存在する分子を抗原として認識するものである。血管内皮細胞及び脳血管内皮細胞の生物種に特に制限はないが、好ましくはヒトの細胞である。これら細胞の表面に存在し重鎖抗体により抗原として認識されるべき分子は、好ましくはトランスフェリン受容体（TfR）、インスリン受容体（IR）、レプチン受容体、リポ蛋白質受容体、IGF受容体、OATP-F、有機アニオンラン

スポンター、MCT-8、及びモノカルボン酸トランスポーターであり、より好ましくはTfR、インスリン受容体であり、更に好ましくはTfRである。

[0027] 血管内皮細胞、特に脳血管内皮細胞の表面に存在する分子に親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチドは、血液脳関門重鎖抗体可変領域ペプチド（BBB重鎖抗体可変領域ペプチド）という。また、BBB重鎖抗体可変領域ペプチド、及びBBB重鎖抗体可変領域ペプチドから派生する、血管内皮細胞の表面に存在する分子に親和性を有する全てのペプチドを、BBB親和性ペプチドという。本明細書において、hcIgに由来する重鎖抗体の可変領域を含む、上記（1 h）又は（2 h）の蛋白質であって1つのペプチド鎖からなるものを、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド（免疫グロブリン単一可変領域ペプチド）という。BBB重鎖抗体可変領域ペプチドに含まれる免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドは、特にBBB免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドということもできる。本発明において、VHH、VHHドメイン、VHH抗体、及びナノボディ（Ablynx N.V. 社商標）は、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドに含まれ、文脈によっては互換的に用いられる。従って、例えばTfRに親和性を有するVHHはBBB免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドに含まれる。

[0028] 抗hTfRに親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチドは、抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドという。また、抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチド、及び抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドから派生する、抗hTfRに親和性を有する全てのペプチドを、hTfR親和性ペプチドという。hTfRに親和性を有するVHHは、特にhTfR親和性ペプチドに含まれる。他の該細胞の表面に存在する分子に親和性を有するVHHについても同様であり、例えばhIRに親和性を有するVHHは、hIR親和性ペプチドに含まれる。BBB親和性ペプチドを構成するアミノ酸の個数に特に制限はないが、通常は80～200個、好ましくは80～150個、より好ましくは100～130個、更に好ましくは110～125個のアミノ酸から構成されるペプチドである。例えば、BBB親和性ペプチドは、113個、115個、119個、又は120個のアミノ酸から構成される。なお、本明細書において「ペプチド」との語は、「ポリペプチド」又は「蛋白質」と同義であり、適宜、相互に置き換えること

ができる。以下、ヒトトランスフェリン受容体 (hTfR) に親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチドを例に挙げて、その特性等につき詳しく記載するが、これらの記載は他の該細胞の表面に存在する分子に親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチドにも概ね適用できる。

[0029] 抗体は通常軽鎖と重鎖とからなる、一方、VHHは1本の重鎖からなるので、hTfR親和性ペプチドとして他の蛋白質 (A) と結合させた融合蛋白質を製造する場合の工程が簡略化できる。例えば、通常の抗体をhTfR親和性ペプチドとして使用する場合、2つの蛋白質を発現させる必要があるが、VHHであれば一つの蛋白質を発現させれば足りる。

[0030] ヒトトランスフェリン受容体に親和性を有する重鎖抗体可変領域ペプチドは、特に抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドという。本明細書において、hcIgに由来する重鎖抗体の可変領域を含む、上記 (1 h) 又は (2 h) の蛋白質であって一つのペプチド鎖からなるものを、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドという。ヒトトランスフェリン受容体 (hTfR) に親和性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドは、特にhTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド又はヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド (hTfR親和性ペプチド) という。hTfR親和性ペプチドは、好ましくは100~130個、より好ましくは110~125個のアミノ酸から構成されるペプチドである。例えば、hTfR親和性ペプチドは、113個、115個、又は119個のアミノ酸から構成される。また、hTfRに親和性を有するVHH、VHHドメイン、VHH抗体、及び、ナノボディは、それぞれhTfR-VHH、hTfR-VHHドメイン、hTfR-VHH抗体、及びhTfR-ナノボディという。

[0031] なお、hTfR親和性ペプチドには、上記 (1 h) ~ (4 h) , (1 l) ~ (4 l) として記載されたタイプのものに加えて、これらに置換、欠失、付加等の変異を加えたものも、hTfRに対して親和性を有するものである限り、含まれる。また、hTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドには、(1 h) 又は (2 h) として記載されたタイプのものに加えて、これに置換、欠失、付加等の変異を加えたものも、hTfRに対して親和性を有するものである限

り，含まれる。hTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドへの変異については，以下に詳述される。

[0032] 本発明において，「ヒトトランスフェリン受容体」又は「hTfR」の語は，配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する膜蛋白質をいう。本発明の抗hTfR抗体は，その一実施態様において，配列番号1で示されるアミノ酸配列中N末端から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの部分（hTfRの細胞外領域）に対して特異的に結合するものであるが，これに限定されない。また，本発明において「サルトランスフェリン受容体」又は「サルTfR」の語は，特に，カニクイザル（*Macaca fascicularis*）由来の配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する膜蛋白質である。また，本発明において「マウストランスフェリン受容体」又は「マウスTfR」の語は，特に，マウス由来の配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する膜蛋白質である。本発明の抗hTfR抗体は，その一実施態様において，配列番号2で示されるアミノ酸配列の中N末端から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの部分（サルTfRの細胞外領域），及び／又は配列番号3で示されるアミノ酸配列の中N末端から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの部分（マウスTfRの細胞外領域）に対しても結合するものであるが，これに限定されない。

[0033] 複数のhTfR親和性ペプチドを，直接又はペプチドリンカーを介して結合させることもできる。このとき結合させる複数のhTfR親和性ペプチドは，全て同一のアミノ酸配列を有するものでもよく，また，異なるアミノ酸配列を有するものであってもよい。結合させるhTfR親和性ペプチドの個数に特に制限はないが，例えば，2～10個，2～5個，2個，3個等である。複数のhTfR親和性ペプチドを結合させることにより，抗hTfRへの親和性を向上させる等の性質を付与することができる。本明細書中，このように複数個のhTfR親和性ペプチドを連結させたものを，タンデム型hTfR親和性ペプチドという。なお，タンデム型hTfR親和性ペプチドは，hTfR親和性ペプチドに含まれる。免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド及び抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチ

ドについても同様のことがいえる。

[0034] hTfR親和性ペプチドも同様の手法により組換え蛋白質として得ることができる。

(1 a) hTfR遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した細胞を用いて、組換えヒトトランスフェリン受容体 (rhTfR) を作製する。

(2 a) rhTfRを用いて、hcIgを産生することのできるラクダ科の動物、又はサメ等のIgNAR産生することのできる魚類、特に軟骨魚類を免疫する。

(3 a) rhTfRを用いて免疫した生物から抗体産生細胞を取り出す。ここで抗体産生細胞は特に末梢血、骨髓、及び脾臓等に存在するので、末梢血中の細胞、骨髓由来細胞、脾細胞等が、抗体産生細胞として回収される。

(4 a) 抗体産生細胞から抽出したmRNAからcDNAを逆転写反応により合成する。

(5 a) cDNAを鋳型としてPCR反応を行い、重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅する。

(6 a) 重鎖抗体の可変領域をコードするDNA断片を発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換させて、重鎖抗体の可変領域の発現細胞を得る。

(7 a) 重鎖抗体の可変領域の発現細胞から、hTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を発現する細胞 (抗hTfR重鎖抗体の可変領域の発現細胞) を選択する。ここで選択された細胞から、hTfRを認識する重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子をPCR反応を行い増幅させて単離することもできる。

(8 a) 抗hTfR重鎖抗体の可変領域の発現細胞を培養して、培養液中又は細胞中に組換え抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドを発現させる。

(9 a) 発現させた組換え抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドを精製する。

[0035] 上記のhTfRを認識する抗hTfR重鎖抗体を取得する工程 (6 a) において得られる重鎖抗体の可変領域の発現細胞は、必ずしもhTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を発現しない。従って、上記工程 (6 a) で得られた重鎖抗体の可変領域の発現細胞から、所望の特性 (hTfRに対する親和性) を有する重鎖

抗体の可変領域を産生する細胞を選択するステップ、すなわち上記工程（7 a）が必要となる。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドを産生する細胞を選択する方法として、以下に詳述する方法が有効である。

[0036] 上記工程（6 a）で得られた重鎖抗体の可変領域の発現細胞を、概ね1つのウェルに1つの細胞が含まれるように96ウェルプレートに播種して培養し、次いで各ウェルから培養上清を回収する。組換えhTfRをプレートに添加してこれに保持させた後、回収した培養上清を添加し、培養上清に含まれる抗hTfR重鎖抗体の可変領域をプレート上の組換えhTfRに結合させる。次いでプレートから培養上清を除き更にプレートを洗浄して組換えhTfRと結合していない抗体を除去する。次いでプレートに保持された抗体の量を測定する。この方法によれば、プレートに添加した抗体産生細胞の培養上清に含まれる抗体のhTfRに対する親和性が高いほど、プレートに保持される抗体の量が多くなる。従って、プレートに保持された抗体の量を測定し、より多くの抗体が保持されたプレートに対応する細胞を、hTfRに対して相対的に高い親和性を有する抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドを産生する細胞株として選択することができる。この様にして選択された細胞株から抽出したmRNAを逆転写して得たcDNAを鋳型としてPCR反応を行い、抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドをコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅して単離することもできる。

[0037] 抗hTfR重鎖抗体を組換え蛋白質として得る別の方法として、以下の工程からなる方法がある。この方法は、重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子にコードされた重鎖抗体の可変領域をファージ上に提示させて、所望の性質を有する重鎖抗体の可変領域を提示するファージを選択する工程を含む。かかる工程はファージディスプレイ法と呼ばれ、国際公開公報（WO 1 9 9 7 / 0 9 4 3 6, WO 1 9 9 5 / 1 1 3 1 7）等に記載されている周知技術である。ファージディスプレイ法を応用してhTfRを認識する抗hTfR重鎖抗体を組換え蛋白質として得る方法は、例えば以下の（1 b）から（9 b）の工程を含むものである。hTfR親和性ペプチドも同様の手法により組換え蛋白質として得ることができる。

(1 b) hTfR遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した細胞を用いて、組換えヒトトランスフェリン受容体 (rhTfR) を作製する。

(2 b) rhTfRを用いて、hcIgを産生することのできるラクダ科の動物、又はサメ等のIgNAR産生することのできる魚類、特に軟骨魚類を免疫する。

(3 b) rhTfRを用いて免疫した生物から抗体産生細胞を取り出す。ここで抗体産生細胞は特に末梢血、骨髓、及び脾臓等に存在するので、末梢血中の細胞、骨髓由来細胞、脾細胞等が、抗体産生細胞として回収される。

(4 b) 抗体産生細胞から抽出したmRNAからcDNAを逆転写反応により合成する。

(5 b) cDNAを鋳型としてPCR反応を行い、重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅する。

(6 b) 重鎖抗体の可変領域をコードするDNA断片をファージミドに組み込み、このファージミドを宿主細胞に導入し、次いで宿主細胞を培養して培地中に重鎖抗体の可変領域をカプシド表面に有するファージを放出させる。

(7 b) rhTfRを保持した担体を充填したカラムに、回収したファージを含む溶液を負荷し、rhTfRに親和性を有する重鎖抗体の可変領域をカプシド表面に有するファージをカラムに結合させる。カラムを洗浄した後に、hTfRに結合したファージをカラムから溶出させる。又は、rhTfRを保持したプレートに、回収したファージを含む溶液を加え、rhTfRに親和性を有する重鎖抗体の可変領域をカプシド表面に有するファージをプレートに結合させる。

(8 b) カラム又はプレートに保持されたhTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を提示するファージのみを回収し、このファージに含まれるファージミドを鋳型にして、hTfRを認識する重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子をPCR反応により増幅する。

(9 b) 増幅させた遺伝子を発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換させて、hTfRを認識する重鎖抗体の可変領域の発現細胞を得る。

(10 b) 抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドの発現細胞を培養して、培養液

中又は細胞中に組換え抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドを発現させる。

(11b) 発現させた組換え抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドを精製する。

[0038] 上記のファージディスプレイ法の工程(1b)～(3b)では、rhTfRで免疫した生物から抗体産生細胞を取り出すことが必要となる。これに代えて、予め重鎖抗体を発現することのできる生物の抗体産生細胞から得たmRNA又はこれを鋳型にして合成したDNA断片をプールしておき、これを鋳型にして重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅させることもできる。ファージディスプレイ法によれば、例えば 1×10^{10} 個のファージを一度にスクリーニングできるので、非免疫動物の細胞からであってもhTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を提示するファージを選択できる可能性がある。この場合、生物を免疫する必要もなく、そして生物から抗体産生細胞を取り出す必要もない。

[0039] 上記工程(7b)は、rhTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を提示するファージを選択するためのものである。ここで、ファージをカラム(又はプレート)に結合させる条件、及び／又はカラム(又はプレート)を洗浄する条件を調整することにより、選択されるファージのrhTfRへの親和性を調整することができる。また、当該条件を徐々に厳しくしながら上記工程(7b)を繰り返して行うことによって、当該工程が繰り返される毎に、rhTfRへの親和性がより高いファージが選択されるので、rhTfRへの高い親和性を有する重鎖抗体の可変領域を提示するファージのみを効率よく取得することもできる。また、ファージゲノムが複製される過程で、ゲノム中に変異が導入されることがある。これによりファージゲノムにコードされる重鎖抗体の可変領域のrhTfRへの親和性が変化するので、上記工程(7)を繰り返して行うことにより、ゲノム中にランダムに変異が導入されてrhTfRに対してより高い親和性を有する抗体が得られる可能性がある。

[0040] なお、上記工程(7b)を繰り返す場合の工程は、例えば下記の(7b')に示されるものである。

(7b') rhTfRを保持した担体を充填したカラムに、回収したファージを含

む培養液を負荷し、rhTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を提示するファージをカラムに結合させる。又は、rhTfRを保持したプレートに、回収したファージを含む溶液を加え、rhTfRに親和性を有する重鎖抗体の可変領域をカプシド表面に有するファージをプレートに結合させる。カラム又はプレートを洗浄した後に、hTfRを認識する重鎖抗体の可変領域を提示するファージをカラム又はプレートから溶出させる。溶出させたファージを宿主細胞に感染させてから宿主細胞を培養し、培養液中に表面に重鎖抗体の可変領域を提示するファージを回収する。この回収したファージを含む培養液を、rhTfRを保持した担体を充填したカラムクロマトグラフィーに負荷するか、又はrhTfRを保持したプレートに加える。この工程（7 b'）において、ファージを変異原に接触させることにより、又はファージを感染させた宿主細胞の培養液に変異原を加えることにより、ファージゲノムに積極的に変異を導入することもできる。ファージ又はファージを感染させた宿主細胞に紫外線、ガンマ線等の電磁波を照射することによっても、ファージゲノムに積極的に変異を導入することができる。

[0041] 上記工程（1 a）～（9 a）及び上記工程（1 b）～（11 b）の何れの工程も抗hTfR重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を単離するステップを含むことができる。単離された抗hTfR重鎖抗体をコードする遺伝子の塩基配列から抗hTfR重鎖抗体の可変領域を含むアミノ酸配列を翻訳し、このアミノ酸配列をコードするDNA断片を人工的に合成することもできる。DNA断片を人工的に合成する場合、宿主細胞で遺伝子を発現させるために適したコドンを選択して合成することができる。このようなDNA断片を組み込んだ発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、宿主細胞における抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドの発現量を増加させることができる。rhTfR親和性ペプチドについても同様にして発現量を増加させることができる。

[0042] また、上記工程において宿主細胞として用いる細胞としては、重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入することにより重鎖抗体の可変領域を含むペプチドを発現させることのできる細胞であれ

ば原核細胞，真核細胞を問わず特に限定はないが，特に大腸菌やチャイニーズハムスター卵巢由来のCHO細胞，又はマウス骨髓腫に由来するNS/O細胞が好ましい。また，重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を組み込んで発現させるために用いる発現ベクターは，宿主細胞内に導入されたときに，該重鎖抗体の可変領域を含むペプチドを発現することのできるものであれば特に限定なく用いることができる。発現ベクターに組み込まれた該遺伝子は，宿主細胞内で遺伝子の転写の頻度を調節することができるDNA配列（遺伝子発現制御部位）の下流に配置される。本発明において用いることのできる遺伝子発現制御部位としては，例えば，サイトメガロウイルス由来のプロモーター，SV40初期プロモーター，ヒト伸長因子-1 α （EF-1 α ）プロモーター，ヒトユビキチンCプロモーター等が挙げられる。

[0043] 上記工程により得られる抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチド中の可変領域のアミノ酸配列は，基本的にはN末端から，FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，及びFR4と4つのFRと3つのCDRのアミノ酸配列を含む。但し，これに限らず，hTfRに特異的に結合することができる限り，可変領域のアミノ酸配列は，FR1の一部又は全部を欠失するもの，FR4の一部又は全部を欠失するもの，FR1の一部又は全部を欠失し，且つFR4の一部又は全部を欠失するものであってもよい。これら，FR領域の一部を欠失するものも，抗hTfR重鎖抗体の可変領域に含まれる。hTfR親和性ペプチドについても同様である。

[0044] 本発明の一実施形態における好適な抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドとして，hTfR親和性ペプチド1～3のアミノ酸配列を含むものがある。hTfR親和性ペプチド1～3はそれぞれ配列番号4，5，6で示されるアミノ酸配列を含む。配列番号4，5，6で示されるアミノ酸配列は，何れも重鎖抗体の可変領域のアミノ酸配列である。hTfR親和性ペプチド1～3は，いずれもN末端から，FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，及びFR4と4つのFRと3つのCDRのアミノ酸配列を含む。hTfR親和性ペプチド1～6は全てhTfR親和性ペプチドに含まれる。

[0045] hTfR親和性ペプチド1のCDR1は配列番号7又は8のアミノ酸配列を含む領域

であり、そのCDR2は配列番号9又は10のアミノ酸配列を含む領域であり、そしてそのCDR3は配列番号11又は12のアミノ酸配列を含む領域である。hTfR親和性ペプチド1において、それぞれのCDRのアミノ酸配列は任意に組み合わせることができる。例えば、CDR1が配列番号7、CDR2が配列番号9、及びCDR3が配列番号11のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号8、CDR2が配列番号10、及びCDR3が配列番号12のアミノ酸配列を含む領域であるものである。また、CDR2は配列番号10のC末端に更にVKGのアミノ酸配列を含むものであってもよい。また、何れのCDRもこれらのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0046] hTfR親和性ペプチド2のCDR1は配列番号7又は8のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号9又は10のアミノ酸配列を含む領域であり、そしてそのCDR3は配列番号11又は12のアミノ酸配列を含む領域である。hTfR親和性ペプチド2において、それぞれのCDRのアミノ酸配列は任意に組み合わせることができる。例えば、CDR1が配列番号7、CDR2が配列番号9、及びCDR3が配列番号11のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号8、CDR2が配列番号10、及びCDR3が配列番号12のアミノ酸配列を含む領域であるものである。また、CDR2は配列番号10のC末端に更にVKGのアミノ酸配列を含むものであってもよい。また、何れのCDRもこれらのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0047] hTfR親和性ペプチド3のCDR1は配列番号13又は14のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号15又は16のアミノ酸配列を含む領域であり、そしてそのCDR3は配列番号17又は18のアミノ酸配列を含む領域である。hTfR親和性ペプチド3において、それぞれのCDRのアミノ酸配列は任意に組み合わせることができる。例えば、CDR1が配列番号13、CDR2が配列番号15、及びCDR3が配列番号17のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号14、CDR2が配列番号16、及びCDR3が配列番号18のアミノ酸配列を含む領域であるものである。また、CDR2は配列番号16のC末端に更にVKGのアミノ酸配列を含むものであってもよい。また、何れのCDRもこれらの

アミノ酸配列からなるものであってもよい。

[0048] また、上記のhTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列は、hTfRに特異的に結合することができる限り、これに変異が加えられたものであってもよい。かかる変異を加える場合、変異を加えた後のhTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列は、元のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を有し、より好ましくは85%以上の同一性を有し、更に好ましくは90%以上の同一性を有し、より更に好ましくは95%以上の同一性を有し、例えば、98%以上の同一性を有するものである。

[0049] また、可変領域のアミノ酸配列に変異を加える場合、CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列に変異を加えず、FR領域にのみ変異を加えることもできる。かかる変異を加える場合、変異を加えた後の可変領域のアミノ酸配列は、元のアミノ酸配列と、好ましくは85%以上の同一性を有し、より好ましくは90%以上の同一性を有し、更に好ましくは95%以上の同一性を有し、例えば、98%以上の同一性を有するものである。また、可変領域のアミノ酸配列に変異を加える場合、FR領域のアミノ酸配列に変異を加えず、CDR領域にのみ変異を加えることもできる。かかる変異を加える場合、変異を加えた後の可変領域のアミノ酸配列は、元のアミノ酸配列と、好ましくは90%以上の同一性を有し、より好ましくは95%以上の同一性を有し、例えば、98%以上の同一性を有するものである。また、FR領域とCDR領域の両方に変異を加えることもできる。

[0050] 元の可変領域のアミノ酸配列と変異を加えた可変領域との同一性は、周知の相同性計算アルゴリズムを用いて容易に算出することができる。例えば、そのようなアルゴリズムとして、B L A S T (Altschul SF. J Mol. Biol. 215. 403-10, (1990)), Pearson及びLipmanの類似性検索法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズム(Adv. Appl. Math. 2. 482-9(1981))等がある。また、本明細書全体において同一性というときは、これらアルゴリズムにより算出される同一性のことをいう。なお、本明細書中で、アミノ酸配列の相同性及びアミノ酸配列の同一性の語は互換的に用いられる。

[0051] hTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列に置換、欠失、及び付加の変異を加える場合について、以下に詳述する。

[0052] hTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列のアミノ酸を他のアミノ酸へ置換させる場合、置換させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～20個であり、より好ましくは1～15個であり、更に好ましくは1～10個であり、更により好ましくは1～5個であり、例えば、1個、2個又は3個である。可変領域のアミノ酸配列中のアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～20個であり、より好ましくは1～15個であり、更に好ましくは1～10個であり、更により好ましくは1～5個であり、例えば、1個、2個又は3個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。可変領域にアミノ酸を付加させる場合、可変領域のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～20個、より好ましくは1～15個、更に好ましくは1～10個、更により好ましくは1～5個のアミノ酸、例えば、1個、2個又は3個のアミノ酸が付加される。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。

[0053] hTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列に置換、欠失、及び付加の変異を加える場合、CDR領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）のアミノ酸配列に変異を加えず、FR領域にのみ変異を加えることもできる。FR領域にのみ置換を加える場合の置換させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～12個であり、より好ましくは1～10個であり、更に好ましくは1～8個であり、更により好ましくは1～4個であり、例えば、1個、2個、又は3個である。またFR領域のアミノ酸配列中にのみアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～8個であり、より好ましくは1～4個であり、更に好ましくは1～3個であり、更により好ましくは1～2個であり、例えば、1個又は2個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。またFR領域のアミノ酸配列中にのみアミノ酸を付加させる場合、可変領域のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、

好ましくは1～8個、より好ましくは1～4個、更に好ましくは1～3個、更により好ましくは1～2個のアミノ酸、例えば、1個又は2個のアミノ酸が付加される。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。

[0054] FR領域にのみ変異を加える場合、hTfR親和性ペプチドのFR領域のアミノ酸残基を、IgGタイプのヒト抗体の可変領域中のFR領域の対応するアミノ酸残基に置換する方法が知られている。本明細書中において、この方法をhTfR親和性ペプチドのヒト化という。かかる方法は、例えば、Vincle C., et. Al., J biol Chem. 284. 3273-84 (2009)に開示されている。元の抗体がアルパカの抗体である場合、その抗体はヒトに投与したときに抗原として認識される可能性がある。ヒト化された抗体は、元の抗体と比較して抗原性が低いことが期待される。FR領域にのみ変異を加える場合、ヒト化は好ましい実施形態の一つである。本明細書中において、hTfR親和性ペプチドには、ヒト化されたhTfR親和性ペプチドも含まれるものとする。当該ヒト化hTfR親和性ペプチドには、hTfR親和性ペプチドがVHHである場合には、当該ヒト化VHHも含まれる。

[0055] hTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列に置換、欠失、及び付加の変異を加える場合、FR領域のアミノ酸配列に変異を加えず、CDR領域にのみ変異を加えることもできる。CDR領域にのみ置換を加える場合の置換させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、更に好ましくは1～2個であり、例えば、1個又は2個である。またCDR領域のアミノ酸配列中にのみアミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～4個であり、より好ましくは1～3個であり、更に好ましくは1～2個であり、例えば、1個又は2個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせた変異を加えることもできる。またFR領域のアミノ酸配列中にのみアミノ酸を付加させる場合、可変領域のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、更に好ましくは1～2個のアミノ酸、例えば、1個又は2個のアミノ酸が付加される。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせた変

異を加えることもできる。

[0056] hTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列に置換、欠失、及び付加の変異を加える場合、上記のFR領域への変異とCDR領域への変異を組み合わせた変異を当該アミノ酸配列に加えることもできる。

[0057] 上記の可変領域のアミノ酸配列中のアミノ酸の他のアミノ酸による置換は、例えば、アミノ酸のそれらの側鎖及び化学的性質で関連性のあるアミノ酸ファミリー内で起こるものである。このようなアミノ酸ファミリー内での置換は、抗hTfR重鎖抗体の機能に大きな変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。かかるアミノ酸ファミリーとしては、例えば以下のものがある：

- (1) 酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸、
- (2) 塩基性アミノ酸であるヒスチジン、リシン、及びアルギニン
- (3) 芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、
- (4) 水酸基を有するアミノ酸（ヒドロキシアミノ酸）であるセリンとトレオニン、
- (6) 中性の親水性アミノ酸であるシステイン、セリン、トレオニン、アスパラギン、及びグルタミン、
- (7) ペプチド鎖の配向に影響するアミノ酸であるグリシンとプロリン、
- (8) アミド型アミノ酸（極性アミノ酸）であるアスパラギンとグルタミン、
- (9) 脂肪族アミノ酸である、アラニン、ロイシン、イソロイシン、及びバリン、
- (10) 側鎖の小さいアミノ酸であるアラニン、グリシン、セリン、及びトレオニン、
- (11) 側鎖の特に小さいアミノ酸であるアラニンとグリシン、
- (12) 分岐鎖を有するアミノ酸であるバリン、ロイシン、及びイソロイシン。

- [0058] 上記の保存的アミノ酸置換は、ヒト血清アルブミン（HSA）等の他の蛋白質のアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する場合にも適用される。
- [0059] なお、可変領域に変異を加えてC末端又はN末端にアミノ酸を付加した場合において、その付加したアミノ酸が、hTfR親和性ペプチドを他の蛋白質(A)と融合させたときにhTfR親和性ペプチドと蛋白質(A)との間に位置することとなった場合、当該付加したアミノ酸は、hTfR親和性ペプチドの一部を構成するものとする。hTfR親和性ペプチドと蛋白質(A)との融合蛋白質において、hTfR親和性ペプチドと蛋白質(A)との間に位置するリンカーについては後に詳述する。なお、本明細書中において、他の蛋白質(A)というときは、hTfR親和性ペプチドと結合させた形態でヒトに投与してヒトの体内で生理活性を発揮させるべき蛋白質であって、hTfR親和性ペプチドとは異なる蛋白質のことをいう。
- [0060] 上記の工程等によって選択されたhTfR親和性ペプチドは、hTfRに対して一定の親和性を有する。このhTfR親和性ペプチドの可変領域に、そのアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を導入することにより所望の特性を有する抗hTfR重鎖抗体の可変領域に改変させることができる。抗hTfR重鎖抗体の可変領域のアミノ酸配列への変異の導入は、そのアミノ酸配列に対応する遺伝子に変異を加えることによって行われる。
- [0061] hTfR親和性ペプチドの可変領域は、これを構成するアミノ酸配列に置換、欠失、付加等の変異を加えることにより、hTfRに対する親和性を適宜調整させることができる。例えば、hTfR親和性ペプチドと抗原との親和性が高く、水性液中での解離定数が著しく低い場合、これを生体内に投与したときに、当該可変領域が抗原と解離せず、その結果、機能上の不都合が生じる可能性がある。このような場合に、可変領域に変異を導入することにより、解離定数を、元の可変領域のそれと2～5倍、5～10倍、10～100倍等と段階的に調整し、目的に合致した最も好ましいhTfR親和性ペプチドを獲得し得る。逆に、当該変異の導入により、解離定数を、元の可変領域の1/2～1

／5倍，1／5～1／10倍，1／10～1／100倍等と段階的に調整することもできる。

- [0062] hTfR親和性ペプチドとトランスフェリン受容体との結合親和性，すなわち解離定数は，例えばバイオレイヤー干渉法（BLI）を用いた方法，具体的にはOctetシステムを用いて測定することができる。適当な動物に由来するトランスフェリン受容体の全部又は一部をセンサーに固定し，hTfR親和性ペプチドの可変領域を含む溶液を試料として結合速度定数（ K_{on} ）や解離速度定数（ K_{off} ）を測定し，その結果から解離定数を算出することができる。また同様に，表面プラズモン共鳴（SPR）技術を用いた方法，具体的にはBiacoreを用いる方法を使用して解離定数を算出することもできる。例えば，実施例7に記載の測定方法は，hTfR親和性ペプチドとトランスフェリン受容体との結合親和性を測定する方法として好適に使用できる。
- [0063] hTfR親和性ペプチドの可変領域のアミノ酸配列への置換，欠失，付加等の変異の導入は，例えば，抗hTfR重鎖抗体の可変領域をコードする遺伝子を鋳型にして，PCR等の方法により，遺伝子の塩基配列の特定の部位に変異を導入するか，又はランダムに変異を導入することにより行うことができる。
- [0064] hTfR親和性ペプチドとhTfRとの親和性の調整を目的とした，hTfR親和性ペプチドのアミノ酸配列への変異の導入は，例えば，hTfR親和性ペプチドをコードする遺伝子をファージミドに組み込み，このファージミドを用いてカプシド表面上にhTfR親和性ペプチドを発現させたファージを作製し，このファージに変異原等を作用させることにより行うことができる。変異原によりhTfR親和性ペプチドをコードする遺伝子に変異を導入させながらファージを増殖させ，増殖させたファージから，所望の解離定数を有する一本鎖抗体を発現するファージを，上述の方法により選択することができる。
- [0065] 上記の方法により得られる，hTfRに対して相対的に高い親和性を有するhTfR親和性ペプチドは，好ましくは，実施例7に記載の方法により測定されるhTfRとの解離定数（ K_D ）が，好ましくは $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下であるものであり，より好ましくは $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下であるものであり，例えば， $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 以

下のものであり、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下のものであり、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下のものである。例えば好適なものとして、解離定数が $5 \times 10^{-11} \text{M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ であるもの、 $2 \times 10^{-11} \text{M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ であるもの、 $1 \times 10^{-10} \text{M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $1.0 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ であるものを挙げることができる。

[0066] 上記のようにして得られるhTfR親和性ペプチドから、サルTfRに対する親和性を有するhTfR親和性ペプチドを選択することにより、ヒト及びサルのTfRの何れにも親和性を有するものを得ることができる。サルTfRに対する親和性を有するhTfR親和性ペプチドは、例えば、遺伝子組換え技術を用いて作製した組換えサルTfRを用いたELISA法等により選択することができる。このELISA法では、組換えサルTfRをプレートに固相化した後、hTfR親和性ペプチドを接触させ、次いで組換えサルTfRと結合していないものをプレートから除去し、プレートに保持されたhTfR親和性ペプチドの量が測定される。組換えサルTfRに対する親和性が高いほどプレートに保持されるhTfR親和性ペプチドの量が多くなるので、より多くのhTfR親和性ペプチドが保持されたプレートに対応するhTfR親和性ペプチドを、サルTfRに親和性を有するhTfR親和性ペプチドとして選択することができる。なお、ここでいう「サル」とは、好ましくはヒトを除く真猿類に分類されるものであり、より好ましくはオナガザル科に分類されるものであり、更に好ましくはマカク属に分類されるものであり、例えば、カニクイザル又はアカゲザルであり、特にカニクイザルである。カニクイザルは、hTfR親和性ペプチドを応用した薬剤の薬効の評価に用いる上で都合が良い。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドについても同様にして、ヒト及びサルのTfRの何れにも親和性を有するものを得ることができる。

[0067] ヒト及びサルのhTfRのいずれにも親和性を有するhTfR親和性ペプチドは、これを投与したときのヒト生体内での薬物動態を、サルを用いて観察できるという有利な効果を有する。例えば、本発明の一実施形態のhTfR親和性ペプチドを利用して医薬を開発する場合、当該医薬の薬物動態試験等の非臨床試験の一部をサルを用いて実施することにより、より正確に当該ペプチドをヒ

トに投与したときの薬物動態等を予測できる。これにより当該医薬の開発を著しく促進することができる。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドについても同様のことがいえる。

[0068] 本発明において、hTfRに対して相対的に高い親和性を有し且つサルTfRに対しても親和性を有するhTfR親和性ペプチドは、特に、実施例7に記載の方法により測定したとき、ヒト及びサルのTfRとの解離定数が次のものである：

(a) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M} \sim 5 \times 10^{-7} \text{M}$ であるもの、

(b) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ であるもの、

(c) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $5 \times 10^{-10} \text{M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ であるもの、

(d) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $1 \times 10^{-10} \text{M} \sim 5 \times 10^{-7} \text{M}$ であるもの。

特に、上記(a)～(d)にあつては、hTfRとの解離定数とサルTfRとの解離定数の比が、hTfRとの解離定数の値を1としたときの、サルTfRとの解離定数の値が、1～10であるものが好ましく、例えば3～10であるもの、5～10であるもの、3～5であるものが好ましい。

[0069] 本発明の一実施形態におけるhTfR親和性ペプチド1～3は、ヒト及びサルのTfRとの解離定数が、上記の(a)～(e)の何れかであるので、これらをサルに投与したときのサル体内での挙動は、ヒトに投与したときの挙動に近似するといえる。従って、hTfR親和性ペプチド1～3を応用した薬物にあつては、サルを用いた試験で、よりヒトに投与したときの挙動を反映した結果が得られる。従って、サルを用いた試験により、ヒトを用いた臨床試験を実施する際の判断材料として、より有益な結果が得られることになる。特に、hTfR親和性ペプチド1及び2は、hTfRとの解離定数とサルTfRとの解離定数の比が、hTfRとの解離定数の値を1としたときに、サルTfRとの解離定数の値が1～10の範囲にあるので、サル体内での挙動からヒト体内における挙動を容易に推測

でき好適である。

[0070] 本発明の一実施形態におけるhTfR親和性ペプチドは、これを静脈注射等により生体内に投与した場合、脳内の毛細血管の内皮細胞上に存在するhTfRに効率良く結合することができる。hTfRと結合したhTfR親和性ペプチドは、エンドサイトーシス、エクソサイトーシス、トランスサイトーシス等の機構により血液脳関門を通過して脳内に取り込まれる。従って、脳内で機能させるべき蛋白質、低分子化合物等を、これらhTfR親和性ペプチドと結合させることにより、これらの物質を効率良く血液脳関門を通過させて脳内に到達させることができる。また、本発明の一実施形態におけるhTfR親和性ペプチドは、血液脳関門を通過した後に、大脳の脳実質、海馬の神経様細胞、及び小脳の脳実質等に、又は少なくともこれらのいずれかに到達する。従って、これら組織又は細胞に作用させるべき薬物、具体的には蛋白質、低分子化合物、核酸等を、本発明のhTfR親和性ペプチドと結合させることにより、当該薬物をこれら組織又は細胞にまで到達させることができる。このようにhTfR親和性ペプチドと薬物を結合させたものを、本明細書中ではhTfR親和性ペプチドー薬物複合体という。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチド及びhTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド（VHHを含む）についても同様のことがいえる。以下、hTfR親和性ペプチドについて、その用途等を詳述するが、当該用途等は、抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチド、hTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド、hTfR-VHH等についても適用される。

[0071] 通常であれば血液脳関門を通過することができず、そのため静脈内投与では脳内で生理的、薬理的な作用を殆ど又は全く発揮できない物質（蛋白質、低分子化合物、核酸等）を、血中から脳内に到達させそこで作用を発揮させる上で、本発明の一実施形態におけるhTfR親和性ペプチドと複合体を形成させることは、有効な手段となり得る。特に、本発明のhTfR親和性ペプチドは血液脳関門を通過した後に、大脳の脳実質、海馬の神経様細胞、小脳の脳実質等に、又は少なくともこれらのいずれかに到達する。従って、それらの物質を本発明のhTfR親和性ペプチドと結合した形として静脈内投与等により血

中投与することにより、それらの物質をして血液脳関門を通過させて、中枢神経組織に到達させて、そして、その生理活性を、中枢神経系の組織又は細胞において発揮させ又は強化することが可能となる。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドについても同様のことがいえる。

[0072] hTfR親和性ペプチドとそのような物質（蛋白質、低分子化合物、核酸等）とを結合させる方法としては、非ペプチドリinker又はペプチドリinkerを介して結合させる方法がある。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドについても同様のことがいえる。非ペプチドリinkerとしては、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとの共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖類、デキストラン、ポリビニルエーテル、生分解性高分子、脂質重合体、キチン類、及びヒアルロン酸、又はこれらの誘導体、若しくはこれらを組み合わせたものを用いることができる。ペプチドリinkerは、ペプチド結合した1～60個のアミノ酸から構成されるペプチド鎖若しくはその誘導体であって、そのN末端とC末端が、それぞれhTfR親和性ペプチド又は蛋白質、低分子化合物、核酸等のいずれかと共有結合を形成することにより、抗hTfR抗体と蛋白質、低分子化合物、核酸等とを結合させるものである。

[0073] 非ペプチドリinkerとしてPEGを用いて本発明のhTfR親和性ペプチドと所望の他の蛋白質(A)とを結合させたものは、特に、hTfR親和性ペプチド-PEG-蛋白質という。hTfR親和性ペプチド-PEG-蛋白質は、hTfR親和性ペプチドとPEGを結合させてhTfR親和性ペプチド-PEGを作製し、次いでhTfR親和性ペプチド-PEGと他の蛋白質(A)とを結合させることにより製造することができる。又は、hTfR親和性ペプチド-PEG-蛋白質は、他の蛋白質(A)とPEGとを結合させて蛋白質-PEGを作製し、次いで蛋白質-PEGとhTfR親和性ペプチドを結合させることによっても製造することができる。PEGをhTfR親和性ペプチド及び他の蛋白質(A)と結合させる際には、カーボネート、カルボニルイミダゾール、カルボン酸の活性エステル、アズラクトン、環状イミドチオン、イソシアネート、イソチオシアネート、イミデート、又はアルデヒド等の官能基で修飾されたP

EGが用いられる。これらPEGに導入された官能基が、主にhTfR親和性ペプチド及び他の蛋白質(A)分子内のアミノ基と反応することにより、PEGとhTfR親和性ペプチド及び他の蛋白質(A)が共有結合する。このとき用いられるPEGの分子量及び形状に特に限定はないが、その平均分子量(MW)は、好ましくは500～60000であり、より好ましくは500～20000である。例えば、平均分子量が約300、約500、約1000、約2000、約4000、約10000、約20000等であるPEGは、非ペプチドリinkerとして好適に使用することができる。hTfR親和性ペプチドと所望の低分子化合物、核酸等を結合させる場合も同様である。

[0074] 例えば、hTfR親和性ペプチド-PEGは、hTfR親和性ペプチドとアルデヒド基を官能基として有するポリエチレングリコール(ALD-PEG-ALD)とを、該抗体に対するALD-PEG-ALDのモル比が1:11, 1:12.5, 1:15, 1:110, 1:120等になるように混合し、これにNaCNBH₃等の還元剤を添加して反応させることにより得られる。次いで、hTfR親和性ペプチド-PEGを、NaCNBH₃等の還元剤の存在下で、他の蛋白質(A)と反応させることにより、hTfR親和性ペプチド-PEG-蛋白質が得られる。逆に、先に他の蛋白質(A)とALD-PEG-ALDとを結合させて蛋白質-PEGを作製し、次いで蛋白質-PEGとhTfR親和性ペプチドを結合させることによっても、hTfR親和性ペプチド-PEG-蛋白質を得ることができる。

[0075] hTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)とは、hTfR親和性ペプチドのC末端又はN末端に、ペプチドリinkerを介して又は直接に、それぞれ他の蛋白質(A)のN末端又はC末端をペプチド結合により結合させることもできる。このようなhTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)とを結合させてなる融合蛋白質は、hTfR親和性ペプチドをコードするcDNAの3'末端又は5'末端に、直接又はペプチドリinkerのアミノ酸配列をコードするDNA断片を挟んで、他の蛋白質(A)をコードするcDNAがインフレームで配置されたDNA断片を、哺乳動物細胞、酵母等の真核生物又は大腸菌等の原核生物細胞用の発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを導入した宿主細胞を培養することにより、組換え蛋白質として得ることができる。本明細書中において、かかるhTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)を結合させた組換え蛋白質を、hTfR親和性ペプチド-蛋白質(

A)融合蛋白質という。同様にして、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドと他の蛋白質(A)を結合させた組換え蛋白質を、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質という。また、重鎖抗体可変領域ペプチドと他の蛋白質(A)を結合させた組換え蛋白質を、重鎖抗体可変領域ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質という。hTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質、及び重鎖抗体可変領域ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質は、本明細書中において文脈により相互に置き換えることができる。

[0076] このときhTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)との間に配置されるペプチドリンカーは、好ましくは1～60又は1～50個、より好ましくは1～17個、更に好ましくは1～10個、更により好ましくは1～5個のアミノ酸から構成されるペプチド鎖であるが、抗hTfR抗体に結合させるべき他の蛋白質(A)によって、ペプチドリンカーを構成するアミノ酸の個数は、1個、2個、3個、1～17個、1～10個、10～40個、20～34個、23～31個、25～29個、27個等と適宜調整できる。そのようなペプチドリンカーは、これにより連結されたhTfR親和性ペプチドがhTfRとの親和性を有し、且つ当該ペプチドリンカーにより連結された他の蛋白質(A)が、生理的条件下で所望の生理活性を発揮できる限り、そのアミノ酸配列に限定はないが、好ましくは、グリシンとセリンから構成されるものである。

[0077] 好ましいペプチドリンカーとしては、例えば、1個のアミノ酸（例えば、グリシン又はセリン）からなるもの、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、配列番号19のアミノ酸配列、配列番号20のアミノ酸配列、配列番号21のアミノ酸配列、配列番号22のアミノ酸配列、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25のアミノ酸配列が挙げられる。また、好ましいペプチドリンカーとしては、例えば、1個のアミノ酸（例えば、グリシン又はセリン）からなるもの、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、配列番号19のアミノ酸配列、配列番号20のアミノ酸配列、及び配列番号21のアミノ酸配列が

らなる群から選択されるアミノ酸配列が2～10個、あるいは2～5個連続してなる配列を含むものが挙げられる。かかるペプチドリンカーは、2～50個のアミノ酸からなる配列、2～17個、2～10個、10～40個、20～34個、23～31個、25～29個、又は27個のアミノ酸からなる配列を有する。例えば、アミノ酸配列Gly-Serを含むものはペプチドリンカーとして好適に用いることができる。また、配列番号19のアミノ酸配列が5個連続してなる計25個のアミノ酸配列を含むものもペプチドリンカーとして好適に用いることができる。

[0078] hTfR親和性ペプチドは、ヒトIgGのFc領域（hIgG Fc領域）と結合させることもできる。hIgG Fc領域をhTfR親和性ペプチドに結合させることにより、hTfR親和性ペプチドの生体内での安定性、例えば血中滞留性を高めることができる。かかるhIgG Fc領域を結合させたhTfR親和性ペプチドとしては、例えば、hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はペプチドリンカーを介してhIgG Fc領域が結合してなるもの、又は、hTfR親和性ペプチドのN末端に直接又はペプチドリンカーを介してhIgG Fc領域が結合してなるものがある。Fc領域をhTfR親和性ペプチドに結合させた結合体は、これを通常であれば血液脳関門を通過することができず、そのため静脈内投与では脳内で生理的、薬理的な作用を殆ど又は全く発揮できない物質（蛋白質、低分子化合物、核酸等）と更に結合させて複合体を形成させることができる。かかる物質は、上述の手法、例えばPEGを用いた手法により、Fc領域とhTfR親和性ペプチドとの結合体に結合させることができる。当該複合体は、静脈注射等により生体内に投与した場合に血液脳関門を通過して、大脳の脳実質、海馬の神経様細胞、小脳の脳実質等に到達できると予測される。従って、当該結合体とすることで、これらの物質の生理活性をこれら中枢神経系の組織又は細胞において発揮させることができる。また、当該複合体は、血中での安定性がhIgG Fc領域がないものに比較して血中での安定性が高められるので、生体内に投与したときに、より長期間にわたって薬効を奏することができる。hTfR親和性ペプチドをヒトIgGのFc領域と結合させた蛋白質は、hTfR親和性ペプチド-蛋白

質(A)融合蛋白質と同様に、組換え蛋白質として得ることができる。

[0079] hTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)とhIgG Fc領域とを結合させることもできる。hIgG Fc領域を結合させることにより、当該結合体の生体内での安定性、例えば血中滞留性を高めることができる。かかるFc領域を結合させた蛋白質としては、例えば、他の蛋白質(A)のC末端に直接又はペプチドリンカーを介してhIgG Fc領域が結合してなり、更に、該hIgG Fc領域のC末端に直接又はペプチドリンカーを介してhTfR親和性ペプチドが結合してなるものがある。また、hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はペプチドリンカーを介してhIgG Fc領域が結合してなり、更に、該hIgG Fc領域のC末端に直接又はリンカー配列を介して他の蛋白質(A)が結合してなるものもある。また、hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はペプチドリンカーを介して他の蛋白質(A)が結合してなり、更に、該他の蛋白質(A)のC末端に直接又はリンカー配列を介してhIgG Fc領域が結合してなるものもある。また、他の蛋白質(A)のC末端に直接又はペプチドリンカーを介してhTfR親和性ペプチドが結合してなり、更に、該hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はリンカー配列を介してhIgG Fc領域が結合してなるものもある。また、hIgG Fc領域のC末端に直接又はペプチドリンカーを介してhTfR親和性ペプチドが結合してなり、更に、該hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はリンカー配列を介して他の蛋白質(A)が結合してなるものもある。hIgG Fc領域のC末端に直接又はペプチドリンカーを介して他の蛋白質(A)が結合してなり、且つ、該他の蛋白質(A)のC末端に直接又はリンカー配列を介してhTfR親和性ペプチドが結合してなるものもある。hTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)とhIgG Fc領域とを結合させた蛋白質は、hTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質と同様に、組換え蛋白質として得ることができる。こうして得られた組換え蛋白質もhTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質に含まれる。ここで用いることのできるペプチドリンカーとして、上述のhTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)との間に配置されるペプチドリンカーを用いることができる。

[0080] 結合させるhIgG Fc領域のIgGのタイプには特に限定はなく、IgG1～IgG5の

いずれであってもよい。また、導入されるhIgG Fc領域は、Fc領域の全体でもよくその一部であってもよい。かかるhIgG Fc領域の好ましい一実施形態として、ヒトIgG1のFcの全領域である、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

[0081] hTfR親和性ペプチドは、ヒト血清アルブミン（HSA）と結合させることもできる。HSAをhTfR親和性ペプチドに結合させることにより、hTfR親和性ペプチドの生体内での安定性、例えば血中滞留性を高めることができる。かかるHSAを結合させたhTfR親和性ペプチドとしては、例えば、hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はペプチドリinkerを介してHSAが結合してなるもの、又は、hTfR親和性ペプチドのN末端に直接又はペプチドリinkerを介してHSAが結合してなるものがある。HSAをhTfR親和性ペプチドに結合させた結合体は、これを通常であれば血液脳関門を通過することができず、そのため静脈内投与では脳内で生理的、薬理的な作用を殆ど又は全く発揮できない物質（蛋白質、低分子化合物、核酸等）と更に結合させて複合体を形成させることができる。かかる物質は、上述の手法、例えばPEGを用いた手法により、HSAとhTfR親和性ペプチドとの結合体に結合させることができる。当該複合体は、静脈注射等により生体内に投与した場合に血液脳関門を通過して、大脳の脳実質、海馬の神経様細胞、小脳の脳実質等に到達できると予測される。従って、当該結合体とすることで、これらの物質の生理活性をこれら中枢神経系の組織又は細胞において発揮させることができる。また、当該複合体は、血中での安定性がHSAを有さないものに比較して血中での安定性が高められるので、生体内に投与したときに、より長期間にわたって薬効を奏することができる。hTfR親和性ペプチドをHSAと結合させた蛋白質は、hTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質と同様に、組換え蛋白質として得ることができる。

[0082] hTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質に更にHSAを結合させることもできる。かかるHSAを結合させた蛋白質としては、例えば、他の蛋白質(A)のC末端に直接又はペプチドリinkerを介してHSAが結合してなり、更に、該HSAのC末端に直接又はペプチドリinkerを介してhTfR親和性ペプチドが結合してな

るものがある。また、hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はペプチドリナーを介してHSAが結合してなり、更に、該HSAのC末端に直接又はリンカー配列を介して他の蛋白質(A)が結合してなるものもある。また、hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はペプチドリナーを介して他の蛋白質(A)が結合してなり、更に、該他の蛋白質(A)のC末端に直接又はリンカー配列を介してHSAが結合してなるものもある。また、他の蛋白質(A)のC末端に直接又はペプチドリナーを介してhTfR親和性ペプチドが結合してなり、更に、該hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はリンカー配列を介してHSAが結合してなるものもある。また、HSAのC末端に直接又はペプチドリナーを介してhTfR親和性ペプチドが結合してなり、更に、該hTfR親和性ペプチドのC末端に直接又はリンカー配列を介して他の蛋白質(A)が結合してなるものもある。また、HSAのC末端に直接又はペプチドリナーを介して他の蛋白質(A)が結合してなり、更に、該他の蛋白質(A)のC末端に直接又はリンカー配列を介してhTfR親和性ペプチドが結合してなるものもある。hTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドと他の蛋白質(A)とHSAとを結合させた蛋白質は、hTfR免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質と同様に、組換え蛋白質として得ることができる。こうして得られた組換え蛋白質もhTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質に含まれる。ここで用いることのできるペプチドリナーとして、上述のhTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)との間に配置されるペプチドリナーを用いることができる。

[0083] 上記のHSAは、配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する野生型HSAであることが好ましいが、これに限らず、これに結合させた物質の血中における安定性を向上させることができるものである限り、野生型HSAのアミノ酸配列中に、置換、欠失、付加を加えた変異型HSAであってもよい。

[0084] HSAに代えてアルブミンに対して親和性を有する物質を使用することもできる。アルブミンに対して親和性を有する物質は、血中においてアルブミンと結合するので、HSAを用いたときと同様に、生体内に投与した抗hTfR重鎖抗体と他の蛋白質(A)との融合蛋白質等の血中での半減期を増大することができる。

。アルブミンに対して親和性を有する物質としては、例えば、配列番号 28 で示されるアミノ酸配列を有する、Streptococcus strain G418由来の蛋白質のアルブミン結合ドメイン (Alm T. Biotechnol J. 5. 605-17 (2010)) を、アルカリ耐性を示すように改変したペプチドを用いることができる。

[0085] アルブミン親和性ペプチドを導入したhTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質のアルブミンとの結合親和性は、実施例7に記載のバイオレイヤー干渉法に準拠して測定したとき、好ましくは 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 5×10^{-7} M以下、更に好ましくは 1×10^{-8} M以下、更により好ましくは 1×10^{-9} M以下である。

[0086] 複数のhTfR親和性ペプチドを、直接又はペプチドリinkerを介して結合させることもできる。このとき結合させる複数のhTfR親和性ペプチドは、全て同一のアミノ酸配列を有するものでもよく、また、異なるアミノ酸配列を有するものであってもよい。結合させるhTfR親和性ペプチドの個数に特に制限はないが、例えば、2~10個、2~5個、2個、3個等である。複数のhTfR親和性ペプチドを結合させることにより、抗hTfRへの親和性を向上させる等の性質を付与することができる。本明細書中、このように複数個のhTfR親和性ペプチドを連結させたものを、タンデム型hTfR親和性ペプチドという。なお、タンデム型hTfR親和性ペプチドは、hTfR親和性ペプチドに含まれる。免疫グロブリン単一可変ドメインペプチド及び抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドについても同様のことがいえる。

[0087] 上記のhTfR親和性ペプチドと、hIgG Fc領域又はHSAを連結させるために用いられるペプチドリinkerは好ましくは1~60又は1~50個のアミノ酸から構成される。ここに、アミノ酸の個数は、1~17個、1~10個、10~40個、20~34個、23~31個、25~29個、27個等と適宜調整される。このようなペプチドリinkerは、これにより連結されたhTfR親和性ペプチドがhTfRとの親和性を有し、且つ当該ペプチドリinkerにより連結されたhIgG Fc領域又はHSAが、生理的条件下で所望の機能を発揮できるものである限り、そのアミノ酸配列に限定はないが、好ましくは、グリシンと

セリンから構成されるものである。hTfR親和性ペプチド、他の蛋白質(A)、及びhIgG Fc領域を結合させるために用いられるペプチドリンカーについても同様である。hTfR親和性ペプチド、他の蛋白質(A)、及びHSAを結合させるために用いられるペプチドリンカーについても同様である。また、複数のhTfR親和性ペプチドを結合させるためのペプチドリンカーについても同様である。

[0088] 好ましいペプチドリンカーとしては、例えば、1個のアミノ酸（例えば、グリシン又はセリン）からなるもの、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、配列番号19のアミノ酸配列、配列番号20のアミノ酸配列、配列番号21のアミノ酸配列、配列番号22のアミノ酸配列、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25のアミノ酸配列が挙げられる。また、好ましいペプチドリンカーとしては、例えば、1個のアミノ酸（例えば、グリシン又はセリン）からなるもの、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、配列番号19のアミノ酸配列、配列番号20のアミノ酸配列、及び配列番号21のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列が2～10個、あるいは2～5個連続してなる配列を含むものが挙げられる。かかるペプチドリンカーは、2～50個のアミノ酸からなる配列、2～17個、2～10個、10～40個、20～34個、23～31個、25～29個、又は27個のアミノ酸からなる配列を有する。例えば、アミノ酸配列Gly-Serを含むものはペプチドリンカーとして好適に用いることができる。また、配列番号19のアミノ酸配列が5個連続してなる計25個のアミノ酸配列を含むものもペプチドリンカーとして好適に用いることができる。

[0089] hTfR親和性ペプチド及びhTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質は、上記以外の方法でも血中で安定化させることができる。例えば、これらの蛋白質は、PEG修飾することにより血中での安定性を高めることができる。かかる手法は、蛋白質医薬の分野で一般的に実施されており、PEG化されたエリスロポエチン、インターフェロン等が医薬品として実用化されている。また、hTfR親和性ペプチドは、これに変異を導入することによっても安定化

させることができる。

[0090] hTfR親和性ペプチドと結合させるべき他の蛋白質(A)に特に限定はないが、生体内において生理活性を発揮し得るものであり、特に、脳内に到達させてその機能を発揮させるべきものであるにも拘らず、そのままでは血液脳関門を通過することができないため、静脈内投与では脳内で機能させることが期待できない蛋白質である。そのような蛋白質としては、例えば、イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS)，グルコセレブロシダーゼ (GBA)， β -ガラクトシダーゼ，GM 2 活性化蛋白質， β -ヘキソサミニダーゼ A， β -ヘキソサミニダーゼ B，N-アセチルグルコサミン-1-フォスフォトランスフェラーゼ， α -マンノシダーゼ (LAMN)， β -マンノシダーゼ，ガラクトシルセラミダーゼ (GALC)，サポシン C，アリールスルファターゼ A (ARSA)， α -L-フコシダーゼ (FUCA1)，アスパルチルグルコサミニダーゼ， α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ，酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM)， α -ガラクトシダーゼ A， β -グルクロニダーゼ (GUSB)，ヘパラン N-スルファターゼ (SGSH)， α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAGLU)，アセチル CoA α -グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ，N-アセチルグルコサミン-6-硫酸スルファターゼ，酸性セラミダーゼ (AC)，アミロ-1，6-グルコシダーゼ，シアリダーゼ，アスパルチルグルコサミニダーゼ，パルミトイル蛋白質チオエステラーゼ-1 (PPT-1)，トリペプチジルペプチダーゼ-1 (TPP-1)，ヒアルロニダーゼ-1，酸性 α -グルコシダーゼ (GAA)，CLN1，CLN2等のリソソーム酵素が挙げられる。抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドについても同様のことがいえる。

[0091] α -L-イズロニダーゼ (IDUA) と結合させたhTfR親和性ペプチドはハーラー症候群又はハーラー・シャイエ症候群の治療剤として、イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS) と結合させたものはハンター症候群の治療剤として、グルコセレブロシダーゼ (GBA) と結合させたものはゴーシェ病の治療剤として、 β ガラクトシダーゼと結合させたものはGM 1-ガングリオシドーシス 1~3 型の治療剤として、GM 2 活性化蛋白質と結合させたものはGM 2-ガ

ングリオシドーシス A B 異型の治療剤として、 β -ヘキソサミニダーゼ A と結合させたものはサンドホフ病及びティサックス病の治療剤として、 β -ヘキソサミニダーゼ B と結合させたものはサンドホフ病の治療剤として、N-アセチルグルコサミン-1-フォスフォトランスフェラーゼと結合させたものは I-Cell 病の治療剤として、 α -マンノシダーゼ (LAMN) と結合させたものは α -マンノシドーシスの治療剤として、 β -マンノシダーゼと結合させたものは β -マンノシドーシスの治療剤として、ガラクトシルセラミダーゼ (GALC) と結合させたものはクラッペ病の治療剤として、サポシン C と結合させたものはゴーシェ病様蓄積症の治療剤として、アリールスルファターゼ A (ARSA) と結合させたものは異染性白質変性症 (異染性白質ジストロフィー) の治療剤として、 α -L-フコシダーゼ (FUCA1) と結合させたものはフコシドーシスのとして、アスパルチルグルコサミニダーゼと結合させたものはアスパルチルグルコサミン尿症のとして、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼと結合させたものはシンドラー病及び川崎病の治療剤として、酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) と結合させたものはニーマン・ピック病の治療剤として、 α -ガラクトシダーゼ A と結合させたものはファブリー病の治療剤として、 β -グルクロニダーゼ (GUSB) と結合させたものはスライ症候群の治療剤として、ヘパラン N-スルファターゼ (SGSH) と結合させたものはサンフィリップ症候群 A の治療剤として、 α -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAGLU) と結合させたものはサンフィリップ症候群 B の治療剤として、アセチル Co A α -グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ及び N-アセチルグルコサミン-6-硫酸スルファターゼとそれぞれ結合させたものはサンフィリップ症候群の治療剤として、酸性セラミダーゼ (AC) と結合させたものはファーバー病の治療剤として、アミロー 1, 6-グルコシダーゼと結合させたものはコリ病 (フォーブス・コリ病) の治療剤として、シアリダーゼと結合させたものはシアリダーゼ欠損症における中枢神経障害治療剤として、パルミトイル蛋白質チオエステラーゼ-1 (PPT-1) と結合させたものは神経セロイドリポフスチン症又は Santavuori-Haltia 病の治療剤と

して、トリペプチジルペプチダーゼー 1 (TPP-1) と結合させたものは神経セロイドリポフスチン症又はJansky-Bielschowsky病の治療剤として、ヒアルロニダーゼー 1 と結合させたものはヒアルロニダーゼ欠損症の治療剤として、酸性 α -グルコシダーゼ (GAA) と結合させたものはポンペ病の治療剤として、CLN1及び2と結合させたものはそれぞれバッテン病の治療剤として使用できる。上記のリソソーム酵素と結合させたhTfR親和性ペプチドは、特に、リソソーム病における中枢神経障害治療剤として利用できる。例えば、 α -リーイズロニダーゼ (IDUA) と結合させたhTfR親和性ペプチドはハーラー症候群又はハーラー・シャイエ症候群における中枢神経障害治療剤として使用できる。なお、医薬用途はこれらの疾患に限られるものではない。

[0092] その他、hTfR親和性ペプチドと結合させて薬効を発揮できる蛋白質としては、成長因子、抗体医薬、サイトカイン、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経成長因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4／5、ニューロトロフィン6、ニューレグリン1、エリスロポエチン、ダルベポエチン、アクチビン、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、線維芽細胞成長因子2 (FGF2)、上皮細胞増殖因子 (EGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、インターロイキン6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 α 受容体 (TNF- α R)、PD-1リガンド、PD-L1、PD-L2、ベータアミロイドを分解する活性を有する酵素、抗ベータアミロイド抗体、抗BACE抗体、抗EGFR抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗HER2抗体、抗TNF- α 抗体、及び抗CTLA-4抗体が挙げられる。

[0093] 神経成長因子 (NGF) と結合させたhTfR親和性ペプチドは、アルツハイマー病の神経疾患治療薬として、脳由来成長因子 (BDNF) と結合させたものはハンチントン症、アルツハイマー病等の神経疾患治療薬として、CNTFと結合させたものは筋萎縮性側索硬化症の治療剤として、GDNF、ニューロトロフィン

3又はニューロトロフィン4／5と結合させたものはそれぞれ脳虚血の治療剤として、GDNFと結合させたものはパーキンソン病の治療剤として、ニューレグリン1と結合させたものは統合失調症の治療剤として、エリスロポエチン又はダルベポエチンと結合させたものはそれぞれ脳虚血の治療剤として、bFGF又はFGF2と結合させたものはそれぞれ外傷性の中樞神経系障害の治療剤、脳外科手術、脊椎外科手術後の回復に、ベータアミロイドを分解する活性を有する酵素、抗ベータアミロイド抗体又は抗BACE抗体と結合させたものはアルツハイマー病の治療剤として、抗EGFR抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗HER2抗体、又は抗CTLA-4抗体と結合させたものは脳腫瘍を含む中樞神経系の腫瘍の治療剤として、TNF α Rと結合させたものは脳虚血及び脳炎症性疾患の治療剤として使用できる。

[0094] アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病等の神経変性疾患、統合失調症、うつ症等の精神障害、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脳腫瘍を含む中樞神経系の腫瘍、脳障害を伴うリソソーム病、糖原病、筋ジストロフィー、脳虚血、脳炎症性疾患、プリオン病、外傷性の中樞神経系障害等の疾患に対する治療剤は、概ねhTfR親和性ペプチドと融合させるべき他の蛋白質(A)となり得る。また、ウイルス性及び細菌性の中樞神経系疾患に対する治療剤も、概ねhTfR親和性ペプチドと融合させるべき他の蛋白質(A)となり得る。更には、脳外科手術、脊椎外科手術後の回復にも用いることができる薬剤も、概ねhTfR親和性ペプチドと融合させるべき他の蛋白質(A)となり得る。

[0095] なお、本発明において治療剤として用いられるものには、疾患の発症を予防するために用いるものも含まれる。

[0096] hTfR親和性ペプチドと結合させるべき他の蛋白質(A)として上記に列挙された蛋白質は、通常、野生型のものである。但し、これら野生型の蛋白質を構成するアミノ酸の1個又は複数個のアミノ酸が、他のアミノ酸へ置換、欠失等された変異体も、蛋白質の本来の生理活性を有する限り、これら蛋白質に含まれる。ここで、その蛋白質が本来の生理活性を有するとは、その蛋白質

の野生型蛋白質の生理活性に対して20%以上の生理活性を有することを意味する。その蛋白質の野生型蛋白質の生理活性に対する生理活性は、40%以上であることがより好ましく、50%以上であることが更に好ましく、80%以上であることがより更に好ましく、90%以上であることがなおも更に好ましい。

[0097] 変異型の蛋白質のアミノ酸配列は、対応する野生型の他の蛋白質(A)のアミノ酸配列と、好ましくは80%以上の同一性を有し、より好ましくは85%以上の同一性を有し、更に好ましくは90%以上の同一性を有し、より更に好ましくは95%以上の同一性を有し、例えば、98%以上の同一性を有するものである。

[0098] 野生型の他の蛋白質(A)のアミノ酸配列を他のアミノ酸へ置換して変異型にする場合、置換させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個である。アミノ酸を欠失させる場合、欠失させるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個である。また、これらアミノ酸の置換と欠失を組み合わせ、所望の変異型とすることもできる。更には、野生型の他の蛋白質(A)又はその変異体のアミノ酸配列中若しくはN末端又はC末端に、1個又は複数個のアミノ酸が付加されたものも、これら蛋白質としての機能を完全に又は部分的に有する限り、これら蛋白質に含まれる。このとき付加されるアミノ酸の個数は、好ましくは1～10個であり、より好ましくは1～5個であり、更に好ましくは1～3個である。これらアミノ酸の付加、置換及び欠失を組み合わせ、所望の変異型とすることもできる。

[0099] なお、これら他の蛋白質(A)に変異を加えてC末端又はN末端にアミノ酸を付加した場合、その付加したアミノ酸が、これら蛋白質をhTfR親和性ペプチドと融合させたときに、これら蛋白質とhTfR親和性ペプチドとの間に位置することとなった場合、当該付加したアミノ酸は他の蛋白質(A)の一部を構成するものとする。

[0100] 他の蛋白質(A)がヒトIDSである場合の、好適な融合蛋白質として以下の(1)～(4)が挙げられる；

(1) 配列番号4, 配列番号5, 又は配列番号6のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチドのC末端に, 配列番号25のアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して, hIDSのN末端が結合したものである融合蛋白質,

(2) 配列番号5のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド2のC末端に, 配列番号25のアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して, hIDSのN末端が結合したものである融合蛋白質,

(3) 配列番号5のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド2のC末端に, 配列番号25のアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して, 配列番号5のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド2のN末端が結合し, 更にそのC末端に, アミノ酸配列GSを有するペプチドリンカーを介して, hIDSのN末端が結合したものである融合蛋白質。

[0101] 他の蛋白質(A)がヒトSGSHである場合の, 好適な融合蛋白質として以下のものが挙げられる。すなわち,

(1) 配列番号4, 配列番号5, 又は配列番号6のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチドのC末端に, 配列番号25のアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して, hSGSHのN末端が結合したものである融合蛋白質,

(2) 配列番号7のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド2のC末端に, 配列番号25のアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して, hSGSHのN末端が結合した融合蛋白質。

[0102] トラスツズマブは, ヒト癌遺伝子HER2/neu (c-erbB-2) にコードされるHER2に特異的に結合することにより抗腫瘍効果を発揮する抗体医薬である。トラスツズマブは重鎖と軽鎖からなり, それぞれのアミノ酸配列は, それぞれ配列番号29と30で示される。

[0103] 本発明における, hTfR親和性ペプチドと他の蛋白質(A)との融合蛋白質の具体的な態様の一例として, トラスツズマブの重鎖のC末端にリンカーを介してhTfR親和性ペプチド1が結合した, hTfR親和性ペプチドとトラスツズマブの融合蛋白質が挙げられる。hTfR親和性ペプチド1とトラスツズマブの融合蛋白質は, 例えばトラスツズマブの重鎖のC末端に配列番号24のアミノ酸配列を有

するペプチドリinkerを介して配列番号4のアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド1が結合した配列番号31のアミノ酸配列を有する蛋白質（hTfR親和性ペプチド1-トラスツズマブ重鎖融合蛋白質）の発現ベクターと、トラスツズマブ軽鎖の蛋白質の発現ベクターとを導入した宿主細胞を培養することにより製造することができる。hTfR親和性ペプチド1-トラスツズマブ重鎖融合蛋白質の発現ベクターの発現ベクターに代えて、配列番号32のアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド2-トラスツズマブ重鎖融合蛋白質、配列番号33のアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド3-トラスツズマブ重鎖融合蛋白質の発現ベクターを用いることにより、別態様のhTfR親和性ペプチドとトラスツズマブの融合蛋白質を製造することもできる。

- [0104] トラスツズマブは主に乳癌の治療剤として用いられるが、静脈注射した場合にはBBBを通過できないので、中枢神経系の癌に対しては薬効を発揮し得ない。しかし、トラスツズマブを抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドと結合させることにより、BBBを通過できるようになるので、中枢神経系のHER2を発現する癌に対しても作用することができるようになる。乳癌は中枢神経系に転移することがあるので、TfR親和性ペプチドとトラスツズマブの融合蛋白質は、かかる乳癌から転移した中枢神経系の癌に対して効果が期待できる。
- [0105] トラスツズマブ以外の抗体医薬も、トラスツズマブと同様にして、抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドとの融合蛋白質として製造することができる。この場合、抗hTfR重鎖抗体可変領域ペプチドは、抗体医薬の有効成分である抗体の重鎖のC末端に結合させてもよく、抗体の重鎖のN末端に結合させてもよく、抗体の軽鎖のC末端に結合させてもよく、また抗体の軽鎖のN末端に結合させてもよい。
- [0106] hTfR親和性ペプチドに結合させて薬物複合体とするべき薬物は低分子化合物であってもよい。ここで低分子化合物は、好ましくはBBBを通過させて中枢神経系で作用させるべき化合物であるが、これに限らず造影剤、蛍光色素、又はリポソームの構成成分となり得るリン脂質、脂質ナノ粒子の構成成分となり得る機能性脂質等であってもよい。低分子化合物の分子量は、例えば1～

50 kDであり、0.5～20 kDであり、1～5 kDである。5～20個のアミノ酸からなるペプチド、5～20個の単糖類が脱水縮合した構造の多糖類も低分子化合物に含まれる。

[0107] hTfR親和性ペプチドと低分子化合物は、直接又はリンカーを介して共有結合により結合される。hTfR親和性ペプチドと低分子化合物の結合様式は、hTfR親和性ペプチドのhTfRへの結合親和性が保持され、且つ、hTfR親和性ペプチドー薬物複合体を生体内に投与したときに、当該薬剤が中枢神経系で薬効を発揮するものである限り、特に限定されない。リンカーとしては、例えば、カテプシンBで切断されるバリリン-シトルリン又はバリリン-アラニンを含むリンカーやシステイン-システインを含むリンカーが好適に用いられる。このようなリンカーは生体内に投与したときに、生体内の代謝メカニズム、例えば酵素により切断され得るので、低分子化合物がhTfR親和性ペプチドから切り離されて、単独で薬効を発揮し得る。本明細書中において、このような生体内で切断され得るリンカーを、生体分解性リンカーという。

[0108] 生体分解性リンカーによりhTfR親和性ペプチドと低分子化合物を結合させる場合には、これら間にリンカーに加えてスペーサーを配置することが可能である。スペーサーを配置することにより、リンカーを切断する酵素の複合体へのアクセシビリティが向上する。そのようなスペーサーとしては、特にこれらに限定されないが、p-アミノカーバメート基/カーバメート基が好適に用いられる。

[0109] hTfR親和性ペプチドー薬物複合体における薬物は、核酸であってもよい。ここで核酸は、1本鎖DNA、2本鎖DNA、1本鎖RNA、及び2本鎖RNAの何れであってもよい。核酸の生体内でのヌクレアーゼによる分解を防止するため、これら核酸を構成するヌクレオチドを修飾し、ヌクレアーゼ耐性のある核酸とすることもできる。核酸の鎖長に特に限定はないが、例えば10 bp～1000 bpであり、10 bp～100 bpである。当該複合体において、hTfR親和性ペプチドと核酸は、直接又はリンカーを介して共有結合により結合される。免疫グロブリン単一可変ドメインと低分子化合物の結合様式は、hTfR親和性ペプチドのhTf

Rへの結合親和性が保持され、且つ、hTfR親和性ペプチド-核酸複合体を生体内に投与したときに、当該薬剤が中枢神経系で薬効を発揮するものである限り、特に限定されない。リンカーとしては、好ましくは生体分解性リンカーが用いられる。

[0110] 生体分解性リンカーによりhTfR親和性ペプチドと核酸を結合させる場合には、これら間にリンカーに加えてスペーサーを配置することが可能である。スペーサーを配置することにより、リンカーを切断する核酸の複合体へのアクセシビリティが向上する。そのようなスペーサーとしては、特にこれらに限定されないが、p-アミノカーバメート基/カーバメート基が好適に用いられる。

[0111] hTfR親和性ペプチドに結合させるべき核酸は、例えば、中枢神経系疾患の治療に用いられる核酸である。かかる核酸としては、中枢神経系で発現が異常に亢進しているmRNAに対するアンチセンス核酸である。このようなアンチセンス核酸は、異常に発現しているmRNAに結合してその蛋白質への翻訳を阻害する効果を示す。

[0112] hTfR親和性ペプチド-薬物複合体（hTfR親和性ペプチド-蛋白質(A)融合蛋白質を含む）は、これを有効成分として含む薬剤（医薬組成物）として、凍結乾燥品、又は水性液剤等の形態で医療機関に供給することができる。水性液剤の場合、hTfR親和性ペプチド-薬物複合体を、安定化剤、緩衝剤、等張化剤を含有する溶液に予め溶解したものを、バイアル又は注射器に封入した製剤として供給できる。注射器に封入された製剤は、一般にプレフィルドシリンジ製剤と呼称される。プレフィルドシリンジ製剤とすることにより、患者自身による薬剤の投与を簡易にすることができる。薬剤の投与は、非経口的手段、例えば静脈注射によって行われる。投与された薬剤は、血液脳関門を通過して、中枢神経系において薬効を示すことができ、例えば、大脳皮質、小脳、海馬、中脳、脳橋、延髄、尾状核、果核、淡蒼球、視床、及び視床下部で薬効を示すことができ、特に、大脳皮質、小脳、海馬、及び中脳で薬効を示すことができる。

[0113] hTfR親和性ペプチドは、薬物を封入させることのできる小胞の表面を修飾するために使用することができる。小胞としては、例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子 (Lipid Nanoparticle; LNP) が挙げられる。リポソームとは、脂質二重層を持つ球状の小胞をいい、リン脂質、特にホスファチジルコリンを構成成分として含むものが一般的である。リポソームは更に卵黄ホスファチジルエタノールアミン等の他の脂質を構成成分として含むものであってもよい。脂質ナノ粒子は、直径10 nmから1000 nm、典型的には約200 nm未満の、脂質を主成分とする粒子をいい、疎水性（親油性）分子を内包させることができ、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、脂肪酸、ステロイド等の生体適合性のある脂質を主な構成成分とする。これら小胞には、薬物を封入させることができる。hTfR親和性ペプチドに脂質ナノ粒子を構成成分を結合させたものを作製し、これを脂質ナノ粒子の製造過程で添加することにより、表面がhTfR親和性ペプチドで修飾された脂質ナノ粒子を製造することができる。リポソームについても同様である。

[0114] 薬物を封入させた小胞を生体内に投与すると、小胞を構成する膜が細胞膜と融合し、細胞内に薬物が放出される。つまり、これら小胞は薬物のキャリアとして用いることができる。このような小胞の表面にhTfR親和性ペプチドを配置させると、小胞が当該ペプチドを介して血液脳関門を構成する脳血管内皮細胞上のhTfRに結合し、小胞内に封入された薬物を、小胞が脳血管内皮細胞の細胞膜と融合することにより、あるいは小胞がエンドサイトーシス等により細胞に取り込まれることにより、小脳の脳実質等の脳実質内に放出させることができる。

[0115] 本明細書において小胞というときは、上記のリポソーム及び脂質ナノ粒子に加え、ポリマーナノ粒子、ミセル、エマルジョン、ナノエマルジョン、マイクロスフェア、ナノスフェア、マイクロカプセル、ナノカプセル、デンドリマー、ナノゲル、金属ナノ粒子、その他薬物送達システム (DDS) として用いられることのできるあらゆるナノ・マイクロ粒子を含むものとする。

実施例

[0116] 以下、実施例を参照して本発明を更に詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されることは意図しない。

[0117] [参考例1] hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ（参照品）発現ベクターの作製

公知のhTfR親和性ペプチドとトラスツズマブの融合蛋白質を、参照品として用いるために、参考例1～2に示す方法で作製した。この融合蛋白質は、国際特許公開公報W02023/090409において、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5として開示されているものと同じのアミノ酸配列を有するものである。

[0118] pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega社)をMluIとNotIで消化した。配列番号29で示されるアミノ酸配列を有するトラスツズマブ重鎖のC末端に、配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して、配列番号42で示されるhTfR親和性ペプチド5が結合した配列番号43で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする配列番号44で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にMluIサイト、3'側にNotIサイトを有するDNA断片を人工的に合成した。これをMluIとNotIで消化し、pCI-neo Mammalian Expression VectorのMluIサイトとNotIサイトの間に組み込み、hTfR親和性ペプチド5とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質の発現ベクターを作製した。この発現ベクターをpCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5)と命名した。

[0119] また、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有するトラスツズマブの軽鎖をコードする、配列番号35で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にMluIサイト、3'側にNotIサイトを有するDNA断片を人工的に合成し、これをMluIとNotIで消化し、先に調製したMluIとNotIで消化したpCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega社)とライゲートさせて、トラスツズマブ軽鎖の発現ベクターを構築した。この発現ベクターをpCI-neo-Trastuzumab(LC)とした。

[0120] [参考例2] hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ（参照品）の作製

参考例1で作製したpCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5)とpCI-neo-Trastuzumab(LC)

ab(LC)とを、ExpiCHO Expression System(ThermoFisher Scientific社)を使用して、添付のプロトコールに従い同時にCHO-S細胞に導入し、hTfR親和性ペプチド5とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質と、トラスツズマブ軽鎖とをCHO-S細胞内で共発現させた。この細胞は、hTfR親和性ペプチド5とトラスツズマブとを融合させた蛋白質を発現し、これを培養液中に分泌する。以下、この融合蛋白質をhTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5とする。この細胞を、添付のプロトコールに従いネオマイシン存在下で培養した。具体的には、濃度が 6×10^6 個/mLとなるようにCHO-S細胞を1.5 mLの培地に懸濁し、これを150 mL容の三角フラスコに移し、37°Cで、5% CO₂と95% 空気からなる湿潤環境で約120 rpmの撹拌速度で1日間培養した。ExpiCHO Expression Systemに付属のFeed液とEnhancer液を添加し、32°Cで、5% CO₂と95% 空気からなる湿潤環境で約120 rpmの撹拌速度で9日間培養し、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5を発現させた。培養後、培養液を遠心(3000×g, 5分間)して得た上澄みを、0.22 μmフィルター(Millipore社)でろ過し、これらを培養上清として回収した。

[0121] 1 mLのMabSelect SuRe LX (Cytiva社)を充填したオープンカラムを、カラム体積の5倍容の、50mM NaClを含有する25mM HEPES緩衝液(pH7.5)を通液して平衡化した。次いで培養上清をカラムに負荷し、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5を樹脂に結合させた。カラム体積の5倍容の、50 mM NaClを含有する25 mM HEPES緩衝液(pH7.5)を通液してカラムを洗浄した後、100 mM NaClを含有する150 mM Glycine (pH3.0)を通液してhTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5を溶出させた。hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5を含む溶出液に、5%相当量の1 M Tris-HCl (pH 8.0)を添加してpHを中性に調整した。これを、PD-10カラム(Cytiva社)を用いてバッファー交換を行い、溶媒をPBS(-)に置換した。得られた溶液をhTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5の精製品とし、これをhTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ(参照品)として用いた。

[0122] [実施例1] hTfR発現用ベクターの構築

ヒト脾臓Quick Clone cDNA (Clontech社) を鋳型として、プライマーhTfR5' (配列番号36) 及びプライマーhTfR3' (配列番号37) を用いて、PCRによりヒトトランスフェリン受容体 (hTfR) をコードする遺伝子断片を増幅させた。増幅させたhTfRをコードする遺伝子断片を、MluIとNotIで消化し、pCI-neoベクター (Promega社) のMluIとNotI間に挿入した。得られたベクターを、pCI-neo(hTfR)と名付けた。次いで、このベクターを、MluIとNotIで消化して、hTfRをコードする遺伝子断片を切り出し、国際公開公報 (WO 2012/063799) に記載された発現ベクターであるpE-mIRES-GS-puroのMluIとNotIの間に組み込むことにより、hTfR発現用ベクターであるpE-mIRES-GS-puro(hTfR)を構築した。

[0123] [実施例2] 組換えhTfRの作製

エレクトロポレーション法により、CHO-K1細胞にpE-mIRES-GS-puro(hTfR)を導入した後、メチオニンスルホキシミン (MSX) 及びピューロマイシンを含むCD OPTICHO™培地 (Invitrogen社) を用いて細胞の選択培養を行い、組換えhTfR発現細胞を得た。この組換えhTfR発現細胞を培養して、組換えhTfR (rhTfR) を調製した。

[0124] [実施例3] ファージライブラリーの作製

実施例2で調製したrhTfRを抗原として用いてアルパカを免疫した。免疫後のアルパカの血液を採取し、血液から末梢血リンパ球を単離した。末梢血リンパ球からRNAを抽出し、これを逆転写してcDNAを得た。得られたcDNAを鋳型として、PCR法により重鎖抗体の可変領域をコードする塩基配列を含むDNA断片を増幅させた。増幅させたDNA断片を、ファージにパッケージングされたときに、重鎖抗体の可変領域がファージの表面に提示されるようにファージミドに組み込み、これを大腸菌にエレクトロポレーション法で導入した。ファージミドを導入した大腸菌に、ヘルパーファージ (M13K07) を更に感染させてから、大腸菌を培養し、培養液中にファージを放出させた。培養終了後、培地を遠心してファージを含む培養上清を回収した。この回収したファージを含む培養上清をファージライブラリーとした。ファージライブラリーの濃

度は、 3.36×10^{13} PFU/mLであった。

[0125] 〔実施例4〕抗hTfR重鎖抗体発現ファージクローンの単離

実施例3で作製したファージライブラリーからバイオパニング法により、hTfRに特異的に結合する重鎖抗体の可変領域を発現するファージ（抗hTfR重鎖抗体発現ファージ）をクローニングした。クローニングは概ね以下に示すとおり実施した。実施例2で作製したrhTfRを含む溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、rhTfRをプレートに固定させた。次いで各ウェルを0.05% PBST溶液で3回洗浄した後、ブロッキング剤を各ウェルに添加して、各ウェルをブロッキングした。次いで各ウェルを0.05% PBST溶液で3回洗浄し、これにブロッキング剤で希釈したファージライブラリーを加えた。プレートを静置して抗hTfR重鎖抗体を表面に有するファージをrhTfRに結合させた。次いで、各ウェルを0.05% PBST溶液で5回洗浄して、rhTfRに結合しないファージを除去した。次いで、rhTfRに結合したファージを酸性溶出液を加えてrhTfRから解離させて溶液として回収した。

[0126] 回収した溶液を希釈して大腸菌を含む溶液に加え、ファージを大腸菌に感染させた。ファージを感染させた大腸菌に、ヘルパーファージ（M13K07）を更に感染させてから、大腸菌を培養し、培養液中にファージを放出させた。PEG溶液を用いてファージを精製した。

[0127] 精製したファージを大腸菌に感染させてから寒天培地上に播種した。培地上にシングルコロニーを形成した大腸菌を採取し、これを更に培地中で培養した後、ヘルパーファージ（M13K07）を感染させて、培養液中にファージを放出させた。培養液中に放出されたファージを抗hTfR重鎖抗体発現ファージクローンとして、それぞれ培養液を遠心分離して得た培養上清中に回収した。培養上清に含まれる各ファージクローンを、PEG溶液を用いて精製した。

[0128] 〔実施例5〕各抗hTfR重鎖抗体発現ファージクローンが発現する抗hTfR重鎖抗体の可変領域のアミノ酸配列の決定

実施例4で単離された抗hTfR重鎖抗体発現ファージから2個のクローンを選択し、それぞれクローン1及び2と命名した。各クローンからファージミ

ドを精製し、精製した各ファージミドがコードする抗hTfR重鎖抗体の可変領域の塩基配列を決定し、これに基づき各クローンが発現する抗hTfR重鎖抗体の可変領域のアミノ酸配列を決定した。ここで、クローン1の抗hTfR重鎖抗体の可変領域を有するペプチドをhTfR親和性ペプチド1とし、又、クローン2の抗hTfR重鎖抗体の可変領域を有するペプチドをhTfR親和性ペプチド3とした。また、hTfR親和性ペプチド1については、これをヒト化したアミノ酸配列を有するものを、hTfR親和性ペプチド2とした。hTfR親和性ペプチド1～3のアミノ酸配列を表1に示す。

[0129] [表1]

表1 hTfR親和性ペプチド1～3のアミノ酸配列

hTfR親和性ペプチド	アミノ酸配列
1	配列番号4
2	配列番号5
3	配列番号6

[0130] hTfR親和性ペプチド1～3は、それぞれCDR1～3を含む。なお、hTfR親和性ペプチド1とhTfR親和性ペプチド2のCDRのアミノ酸配列は、同一である。それぞれのCDRのアミノ酸配列を表2に例示す。

[0131] [表2]

表2 hTfR親和性ペプチド1～3のCDR1～3に含まれるアミノ酸配列の配列番号（各CDRのアミノ酸配列の例示）

名称	アミノ酸配列		
	CDR1	CDR2	CDR3
hTfR親和性ペプチド1	7, 8	9, 10	11, 12
hTfR親和性ペプチド2	7, 8	9, 10	11, 12
hTfR親和性ペプチド3	13, 14	15, 16	17, 18

[0132] 〔実施例 6〕 hTfR親和性ペプチド1及び3の作製

N末端に配列番号 4 1 で示されるペプチドタグが付加されたhTfR親和性ペプチド1をコードする遺伝子を含むDNA断片を人工的に合成し、これをpCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega社) のMluIサイトとNotIサイトの間に組み込み、hTfR親和性ペプチド1発現ベクターとした。この発現ベクターをExpiCHO Expression System(ThermoFisher Scientific社)を使用して、添付のプロトコールに従いCHO-S細胞に導入し、hTfR親和性ペプチド1をCHO-S細胞内で発現させた。この細胞は、hTfR親和性ペプチド1を発現し、これを培養液中に分泌する。この細胞を、添付のプロトコールに従いネオマイシン存在下で培養した。具体的には、濃度が 6×10^6 個/mLとなるようにCHO-S細胞を15 mLの培地に懸濁し、これを150 mL容の三角フラスコに移し、37℃で、5% CO₂と95% 空気からなる湿潤環境で約120 rpmの撹拌速度で1日間培養した。ExpiCHO Expression System に付属のFeed液とEnhancer液を添加し、32℃で、5% CO₂と95% 空気からなる湿潤環境で約120 rpmの撹拌速度で9日間培養し、hTfR親和性ペプチド1を発現させた。培養終了後、培養液を遠心 (3000 g, 5分間) して得た上澄みを、0.22 μ mフィルター (Millipore社) でろ過し、これを培養上清として回収した。回収した培養上清から、以下の方法でhTfR親和性ペプチド1を精製し精製品を得た。

[0133] 回収した培養上清を、Anti-FLAG M1 Agarose Affinity Gelカラム(Sigma-Aldrich)にカラム体積の5倍容の150 mM NaClと1mM CaCl₂を含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)を平衡化溶液として通した。次いで培養上清をカラムに負荷し、hTfR親和性ペプチド1をアフィニティーカラムに吸着させた。次いでカラム体積の5倍容の平衡化溶液でカラムを洗浄した。カラムに溶出液 (150mM NaClを含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)) 通じてhTfR親和性ペプチド1を溶出させた。溶出させたhTfR親和性ペプチド1を精製品として以下の実験に使用した。hTfR親和性ペプチド3についてもhTfR親和性ペプチド1と同様にして精製品を得た。

[0134] 〔実施例 7〕 hTfR親和性ペプチド1及び3のヒトTfR, サルTfR及びマウスTfRに

対する結合活性の評価

hTfR親和性ペプチド1及び3の、ヒトTfR (hTfR) , サルTfR及びマウスTfRへの結合活性の測定は、バイオレイヤー干渉法 (BioLayer Interferometry: BLI) を用いた生体分子相互作用解析システムであるOctetRED96 (ForteBio社, a division of Pall Corporation) を用いて実施した。バイオレイヤー干渉法の基本原理について、簡単に説明する。センサーチップ表面に固定された生体分子の層 (レイヤー) に特定波長の光を投射したとき、生体分子のレイヤーと内部の参照となるレイヤーの二つの表面から光が反射され、光の干渉波が生じる。測定試料中の分子がセンサーチップ表面の生体分子に結合することにより、センサー先端のレイヤーの厚みが増加し、干渉波に波長シフトが生じる。この波長シフトの変化を測定することにより、センサーチップ表面に固定された生体分子に結合する分子数の定量及び速度論的解析をリアルタイムで行うことができる。測定は、概ねOctetRED96に添付の操作マニュアルに従って実施した。ヒトTfRとしては、N末端にヒスチジンタグが付加した、配列番号1に示されるアミノ酸配列の中でN末端から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの、hTfRの細胞外領域のアミノ酸配列を有する組換えhTfRを用いた (rhTfR, Sino Biological社)。サルTfRとしては、N末端にヒスチジンタグが付加した、配列番号2に示されるアミノ酸配列の中でN末端から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの、カニクイザルのTfRの細胞外領域のアミノ酸配列を有する組換えサルTfR (rサルTfR, Sino Biological社) を用いた。マウスTfRとしては、N末端にヒスチジンタグが付加した、配列番号3に示されるアミノ酸配列の中でN末端から89番目のシステイン残基からC末端のフェニルアラニンまでの、マウスTfRの細胞外領域のアミノ酸配列を有する組換えマウスTfR (rマウスTfR) を用いた。

- [0135] 実施例6で得たhTfR親和性ペプチド1及び3の精製品を、それぞれHBS-P+ (150 mM NaCl, 1% BSA, 50 μ M EDTA及び0.05% Surfactant P20を含む10 mM HEPES) で希釈し、10~40 nMの3段階の濃度の溶液を調製した。この溶液をサ

ンプル溶液とした。rhTfR、rサルTfR及びrマウスTfRとを、それぞれHBS-P+で希釈し、15 μg/mLの溶液を調製し、それぞれhTfR-ECD (Histag) 溶液、サルTfR-ECD (Histag) 溶液及びマウスTfR-ECD (Histag) とした。

[0136] 上記のサンプル溶液を、96 well plate, black (greiner bio-one社) に200 μL/ウェルずつ分注した。また、上記調製したhTfR-ECD (Histag) 溶液、サルTfR-ECD (Histag) 溶液及びマウスTfR-ECD (Histag) を、所定のウェルにそれぞれ200 μL/ウェルずつ分注した。ベースライン、解離用及び洗浄用のウェルには、HBS-P+を200 μL/ウェルずつ分注した。再生用のウェルには、10 mM Glycine-HCl (pH 1.7) を200 μL/ウェルずつ分注した。活性化用のウェルには、1% BSAを含む0.5 mM NiCl₂溶液を200 μL/ウェルずつ分注した。このプレートと、バイオセンサー (Biosensor/Ni-NTA : ForteBio社, a division of Pall Corporation) を、OctetRED96の所定の位置に設置した。

[0137] OctetRED96を下記の表3に示す条件で作動させてデータを取得後、OctetRED96付属の解析ソフトウェアを用いて、結合反応曲線を1:1結合モデルあるいは2:1結合モデルにフィッティングし、各hTfR親和性ペプチドと、hTfR、サルTfR及びマウスTfRに対する会合速度定数 (kon) 及び解離速度定数 (koff) を測定し、解離定数 (K_D) を算出した。なお、測定は25～30℃の温度下で実施した。

[0138] [表3]

表3 OctetRED96の作動条件

	ステップ	接触時間(sec)	速度(rpm)	閾値
1	再生	5	1000	-
2	洗浄	5	1000	-
上記1～2のステップを6回繰り返す。				
3	活性化	60	1000	1.0
4	ベースライン1	120	1000	-
5	負荷	600	1000	-
6	ベースライン2	150	1000	-
7	会合	120	1000	-
8	解離	200	1000	-
全てのサンプルの測定が終了するまで、1～8のステップを繰り返して行う。				

[0139] 表4にhTfR親和性ペプチド1及び3のhTfR、サルTfR及びマウスTfRに対する解離定数 (K_D) を示す。その結果、hTfR親和性ペプチド1のhTfR、サルTfR及びマウスTfRに対する K_D 値は、それぞれ $9.32 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $8.24 \times 10^{-9} \text{M}$ 及び $5.31 \times 10^{-9} \text{M}$ と測定された。また、hTfR親和性ペプチド3のhTfR、サルTfR及びマウスTfRに対する K_D 値は、それぞれ $4.40 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $1.74 \times 10^{-8} \text{M}$ 及び $5.75 \times 10^{-9} \text{M}$ と測定された。これらの結果は、各hTfR親和性ペプチドの、hTfRとの K_D 値が概ね $1.0 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ であり、サルTfRとの K_D 値が概ね $5.0 \times 10^{-9} \text{M} \sim 5.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 、マウスTfRとの K_D 値が概ね $1.0 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ であることを示す。

[0140] [表4]

表4 hTfR親和性ペプチド1及び3の、hTfR、サルTfR及びマウスTfRに対する親和性 (K_D 値)

名称	ヒト	サル	マウス
hTfR親和性ペプチド1	9.32×10^{-10}	8.24×10^{-9}	5.31×10^{-9}
hTfR親和性ペプチド3	4.40×10^{-9}	1.74×10^{-8}	5.75×10^{-9}

[0141] 上記の結果から、各hTfR親和性ペプチドのhTfRとの解離定数の値を1としたときの、サルTfR及びマウスTfRとの解離定数の相対値を算出した(表5)。いずれのhTfR親和性ペプチドも、サルTfR及びマウスTfRに対する親和性の相対値は1.0~10.0の範囲にあった。これらの結果は、hTfRへの親和性とサルTfR及びマウスTfRへの親和性がそれぞれ近似すること示す。従って、これらのhTfR親和性ペプチドは、サル又はマウスに投与したときの生体内での薬物動態がヒトに投与したときの薬物動態に極めて近似することが当然に予測されるので、これらを応用して医薬を開発する場合、当該医薬の薬物動態試験等の非臨床試験の一部を、サル又はマウス、又はその両者を用いて実施できるため、当該医薬の開発を著しく促進することができる。

[0142]

[表5]

表5 hTfR親和性ペプチド1及び3の、サルTfR及びマウスTfRへの親和性の相対値

名称	相対値	
	サル	マウス
hTfR親和性ペプチド1	8.84	5.70
hTfR親和性ペプチド3	3.95	1.31

[0143] [実施例8] hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ発現ベクターの作製

pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega社) をMluIとNotIで消化した。配列番号29で示されるアミノ酸配列を有するトラスツズマブ重鎖のC末端に、配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカーを介して、hTfR親和性ペプチド1が結合した配列番号31で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする配列番号34で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にMluIサイト、3'側にNotIサイトを有するDNA断片を人工的に合成した。これをMluIとNotIで消化し、pCI-neo Mammalian Expression VectorのMluIサイトとNotIサイトの間に組み込み、hTfR親和性ペプチド1とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質の発現ベクターを作製した。この発現ベクターをpCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1)と命名した。同様に、hTfR親和性ペプチド2についても、これらとトラスツズマブ重鎖がそれぞれ結合した蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片をそれぞれ人工的に合成した。これらのDNA断片をMluIとNotIで消化し、それぞれpCI-neo Mammalian Expression VectorのMluIサイトとNotIサイトの間に組み込み、hTfR親和性ペプチド2とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質の発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターをそれぞれpCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2)とした。同様に、hTfR親和性ペプチド3についても、これらとトラスツズマブ重鎖がそれぞれ結合した蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片をそれぞれ人工的に合成した。これらのDNA断片をMluIとNotIで消化し、それぞれpCI-neo Mammalian Expression VectorのMluIサイトとNotIサイトの間に組み込み、hTfR親和性ペプチ

ド3とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質の発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターをそれぞれpCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(3)とした。

[0144] また、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有するトラスツズマブの軽鎖をコードする、配列番号35で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にMluIサイト、3'側にNotIサイトを有するDNA断片を人工的に合成し、これをMluIとNotIで消化し、先に調製したMluIとNotIで消化したpCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega社)とライゲートさせて、トラスツズマブ軽鎖の発現ベクターを構築した。この発現ベクターをpCI-neo-Trastuzumab(LC)とした。

[0145] [実施例9] hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブの作製

実施例8で作製したpCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1)とpCI-neo-Trastuzumab(LC)とを、ExpiCHO Expression System(ThermoFisher Scientific社)を使用して、添付のプロトコールに従い同時にCHO-S細胞に導入し、hTfR親和性ペプチド1とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質と、トラスツズマブ軽鎖とをCHO-S細胞内で共発現させた。この細胞は、hTfR親和性ペプチドとトラスツズマブとを融合させた蛋白質を発現し、これを培養液中に分泌する。以下、この融合蛋白質をhTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ1とする。この細胞を、添付のプロトコールに従いネオマイシン存在下で培養した。具体的には、濃度が 6×10^6 個/mLとなるようにCHO-S細胞を1.5mLの培地に懸濁し、これを150 mL容の三角フラスコに移し、37℃で、5% CO₂と95% 空気からなる湿潤環境で約120 rpmの撹拌速度で1日間培養した。ExpiCHO Expression Systemに付属のFeed液とEnhancer液を添加し、32℃で、5% CO₂と95% 空気からなる湿潤環境で約120 rpmの撹拌速度で9日間培養し、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ1を発現させた。培養後、培養液を遠心(3000 g, 5分間)して得た上澄みを、0.22 μmフィルター (Millipore社)でろ過し、これらを培養上清として回収した。

[0146] 1mLのMabSelect SuRe LX (Cytiva社)を充填したオープンカラムを、カラム体積の5倍容の、50mM NaClを含有する25mM HEPES緩衝液 (pH7.5) を通液して

平衡化した。次いで培養上清をカラムに負荷し、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1を樹脂に結合させた。カラム体積の5倍容の、50 mM NaClを含有する25 mM HEPES緩衝液 (pH7.5) を通液してカラムを洗浄した後、100 mM NaClを含有する150 mM Glycine (pH3.0) を通液してhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1を溶出させた。hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1を含む溶出液に、5%相当量の1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpHを中性に調整した。これを、PD-10カラム (Cyteva社) を用いてバッファー交換を行い、溶媒をPBS(-)に置換した。得られた溶液をhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1の精製品として以下の実験に用いた。

[0147] pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2)についても、pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1)と同様に、pCI-neo-Trastuzumab(LC)と同時にCHO-S細胞に導入し、hTfR親和性ペプチド2とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質と、トラスツズマブ軽鎖とを、それぞれCHO-S細胞内で共発現させた。この細胞は、hTfR親和性ペプチド2とトラスツズマブとを融合させた蛋白質を発現し、これを培養液中に分泌する。以下、この細胞が発現する融合蛋白質を、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2とする。hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2についても、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1と同様に精製品を得た。また、pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(3)についても、pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(1)と同様に、pCI-neo-Trastuzumab(LC)と同時にCHO-S細胞に導入し、hTfR親和性ペプチド3とトラスツズマブ重鎖が結合した蛋白質と、トラスツズマブ軽鎖とを、それぞれCHO-S細胞内で共発現させた。この細胞は、hTfR親和性ペプチド3とトラスツズマブとを融合させた蛋白質を発現し、これを培養液中に分泌する。以下、この細胞が発現する融合蛋白質を、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3とする。hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3についても、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1と同様に精製品を得た。hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1,2及び3を総称してhTfR親和性ペプチドートラスツズマブとする。

[0148] [実施例10] hTfR親和性ペプチドートラスツズマブのマウスTfR及びhTfRに

対する結合活性の評価

実施例7に記載の方法に準じて、実施例9で作製したhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3のマウスTfRに対する親和性を測定した。その結果、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3のマウスTfRに対する親和性に対する解離定数 (K_D) は、それぞれ $4.03 \times 10^{-10} \text{M}$ 及び $3.44 \times 10^{-10} \text{M}$ と測定された。これらの結果は、hTfR親和性ペプチド1及び3のN末端に他の蛋白質を融合させた融合蛋白質が、何れもマウスTfRに対する親和性を維持することを示す。また、実施例7に記載の方法に準じて、実施例9で作製したhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2及び3のhTfRに対する親和性を測定した。その結果、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2及び3のhTfRに対する親和性に対する解離定数 (K_D) は、それぞれ $1.55 \times 10^{-10} \text{M}$ 及び $2.28 \times 10^{-10} \text{M}$ と測定された。これらの結果は、hTfR親和性ペプチド2及び3のN末端に他の蛋白質を融合させた融合蛋白質が、何れもhTfRに対する親和性を維持することを示す。

[0149] 〔実施例11〕野生型マウスを用いたhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの脳移行性評価

次いで、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3が、これをそれぞれ静脈注射したときに、BBBを通過して脳内に移行するか否かを、野生型マウス (WTマウス) を用いて評価した。

[0150] 実施例9で得たhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3の精製品を、5 mg/kgとなるように、各2匹の雄性WTマウスにそれぞれ静脈内投与した。また、陰性対照として、トラスツズマブを、5 mg/kgとなるように、2匹の雄性WTマウスに静脈内投与した。また、参考例2で作製したhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ (参照品) を、5 mg/kgとなるように、各2匹の雄性hTfR-KIマウスにそれぞれ静脈内投与した。投与6時間後にマウスを安楽死させ、末梢血を採取した後に生理食塩液で全身灌流し、脳 (大脳と小脳を含む部分) を採取した。摘出した脳の重量 (湿重量) を測定した後、矢状面で分割し、一方を組織中のhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの濃度測定に、一方を免疫組織染色に供した。

[0151] 濃度測定用の脳組織を、Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich社)を含むT-PER (ThermoFisher Scientific社)中でホモジナイズした。得られたホモジネートを遠心(3000×g, 5 min)して上清を回収した。ホモジネート上清に含まれるhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ及びトラスツマブの量を以下の方法で測定した。まず、SULFO-Goat Anti Human IgG (h+l) (Bethyl社) (0.5 μ g/mL)とGoat Anti Human Kappa Light chain-biotin (IBL) (0.5 μ g/mL)を等量混合して、サンプリングプレート (BM6025 テストプレート 96 well V底 ワイドウェル, ビーエム機器株式会社)に25 μ Lずつ分注して、マイクロプレートミキサーで1時間、室温で振とうして反応溶液とした。SuperBlock blocking buffer in PBS (37515, Thermo Scientific社)をStreptavidin Gold plate (Meso Scale Diagnostics社)に150 μ Lずつ添加して、マイクロプレートミキサーで1時間、室温で振とうしてプレートをブロッキングした。PBSTで洗浄した後、反応溶液を25 μ Lずつ添加して、マイクロプレートミキサーで1時間、室温で振とうした。次いで、各ウェルにRead buffer T (Meso Scale Diagnostics社)を150 μ Lずつ添加し、Sector™ Imager 6000 readerを用いて各ウェルからの発光量を測定した。既知濃度のhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの標準試料の測定値から検量線を作成し、これに各検体の測定値を内挿することにより、脳のグラム重量(湿重量)あたりに含まれるhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの量(脳組織中のhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの濃度)を算出した。その結果を図1に示す。トラスツズマブと比較して、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3の脳組織における濃度はそれぞれ約26倍及び約21倍であった。また、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ(参照品)と比較しても、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3の脳組織における濃度はそれぞれ約2.0倍及び約1.6倍であった。これらの結果は、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3がBBBを通過して脳組織に蓄積する性質を顕著に有することを示すものである。

[0152] 脳組織中のhTfR親和性ペプチドの免疫組織化学染色は、概ね以下の手順で行った。免疫組織染色用に採取した脳組織をOCTコンパウンド(サクラファイ

ンテックジャパン株式会社)に浸漬し、ヒストテックピノ(サクラファインテックジャパン株式会社)を用いて-80℃にまで急速冷凍し、組織の凍結ブロックを作製した。この凍結ブロックを4 μm に薄切後、MASコートスライドガラス(松浪ガラス株式会社)に貼り付けた。スライドガラスを4℃の4% パラホルムアルデヒド(和光純薬工業株式会社)に5分間浸漬し、標本を固定した。次いで、スライドガラスを1% BSAを含むPBSに浸漬しブロッキングした。次いで、組織薄片に適当に希釈したGoat Anti hIgG-heavy and light chain Antibody (Bethyl Laboratories社)を滴下し、1時間反応させた。次いで、組織薄片にTSA-Plus Fluorescenceキット(PerkinElmer社)に含まれるFluorescein Amplification Working Solutionを滴下し、遮光して15分間反応させた。次いで、組織薄片にCSA II Biotin-FRee Tyramide Signal Amplification System (Dako社)に含まれるAnti-Fluorescein-HRPを滴下し、15分間反応させた。次いで、組織薄片にDAB基質(3, 3'-diaminobenzidine, Vector Laboratories社)を反応させ、発色させた。次いで、マイヤー・ヘマトキシリン(Merck社)で対比染色を行い、脱水、透徹した後に封入し、光学顕微鏡で観察した。

[0153] 図2はhTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ投与6時間後に採取した組織の染色像である。陰性対照としてトラスツズマブを投与したマウスの小脳組織では染色は認められず、静脈注射したトラスツズマブは小脳の脳実質に達しないこと、及び、バックグラウンド染色が殆どないことが示された(図2(a))。一方、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ1を投与したマウスの小脳組織では脳実質に染色が認められ、静脈注射したトラスツズマブ1は小脳の脳実質に達することが示された(図2(b))。hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ3を投与したマウスの小脳組織でも脳実質に染色が認められ、静脈注射したトラスツズマブ3も小脳の脳実質に達することが示された(図2(c))。hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ(参照品)を投与したマウスの小脳組織でも脳実質に染色が認められ、静脈注射したトラスツズマブ(参照品)も小脳の脳実質に達することが示された(図2(d))。ここで、トラス

ツズマブ1及び3の何れかを投与したマウスの小脳組織の染色強度と、トラスツズマブ（参照品）を投与したものと比較を比較すると、トラスツズマブ1及び3の何れかを投与した小脳組織の染色強度が顕著に高いことが容易に確認できる。これらの結果は、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3がBBBを通過して小脳の脳実質に顕著に達することを示すものである。

[0154] 〔実施例 1 2〕 hTfRノックインマウスを用いたhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの脳移行性評価 1

hTfR親和性ペプチドトラスツズマブが、これを静脈注射したときに、hTfRとの結合を介してBBBを通過して脳内に移行するか否かは、マウストランスフェリン受容体の細胞外領域をコードする遺伝子をヒトトランスフェリン受容体遺伝子の細胞外領域をコードする遺伝子に置換したhTfRノックインマウス（hTfR-KIマウス）を用いて評価することができる。hTfR-KIマウスは、概ね下記の方法で作製できる。

[0155] 細胞内領域がマウスhTfRのアミノ酸配列であり、細胞外領域がヒトhTfRのアミノ酸配列であるキメラhTfRをコードするcDNAの3' 側に、loxP配列で挟み込んだネオマイシン耐性遺伝子を配置した、配列番号38で示される塩基配列を有するDNA断片を化学的に合成する。このDNA断片を、5' アーム配列として配列番号39で示される塩基配列、3' アーム配列として配列番号40で示される塩基配列を有するターゲティングベクターに、常法により組み込み、これをマウスES細胞にエレクトロポレーション法により導入する。遺伝子導入後のマウスES細胞を、ネオマイシン存在下で選択培養し、ターゲティングベクターが相同組換えにより染色体に組み込まれたマウスES細胞を選択する。得られた遺伝子組換えマウスES細胞を、ICRマウスの8細胞期胚（宿主胚）へ注入し、精管結紮を行ったマウスとの交配によって得られた偽妊娠マウス（レシピエントマウス）に移植する。得られた産仔（キメラマウス）について毛色判定を行い、ES細胞が生体の形成に高効率で寄与した個体、すなわち全体毛に対する白色毛の占める比率の高い個体を選別する。このキメラマウス個体をICRマウスと掛け合わせてF1マウスを得る。白色のF1マウスを

選別し、尻尾の組織より抽出したDNAを解析し、染色体上でマウストランスフェリン受容体遺伝子がキメラhTfRに置き換わっているマウスをhTfR-KIマウスとする。

[0156] 実施例 9 で得たhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの精製品を、実施例 1 1 に記載の方法に準じて、hTfR-KIマウスに静脈内投与する。その後、hTfR-KIマウスより採取した各組織について、実施例 1 1 及び実施例 1 2 に記載の方法に準じて評価を行うことで、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブの精製品が脳に移行したか否かを評価できる。

[0157] 〔実施例 1 3〕 カニクイザルを用いたhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの脳移行性評価

カニクイザルを用いてhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの脳移行性を評価することができる。実施例 9 で得たhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの精製品、トラスツズマブを、5 mg/kgとなるように、各1匹の雄性カニクイザル (*Macaca fascicularis*) の静脈内に単回投与する。また、コントロールとして、同容量の生理食塩水を1匹の雄性のカニクイザルに静脈内投与する。投与20分、1時間、2時間、4時間、8時間後に末梢血を採取し末梢血中に含まれるhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ及びトラスツズマブの濃度を実施例 1 1 に記載の方法で測定し、その測定値からCmax($\mu\text{g/mL}$)、AUC0-8hr($\mu\text{g/hr/mL}$)、及びt_{1/2} β (hr)を算出する。

[0158] 投与8時間後に、生理食塩液でカニクイザルサルの全身灌流を実施する。灌流後、延髄を含む脳組織及び各種臓器を摘出する。この摘出した脳組織及び各種臓器に含まれるhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ及びトラスツズマブの濃度を実施例 1 1 に記載の方法で測定する。

[0159] 脳組織については、これを大腦皮質、小脳、海馬、中脳、脳橋、延髄、尾状核、果核、淡蒼球、視床、視床下部、頸髄、胸髄、及び腰髄に分けて、それぞれについて測定を行う。また、各種臓器については、網膜、肝臓、腎臓、心臓（左心室）、心臓（大動脈弁）、肺、骨髓、脾臓、胸腺、精巣、前立腺、大腿直筋、EDL、ヒラメ筋、三頭筋、及び横隔膜を採取して、それぞれに

ついて測定を行う。

- [0160] 〔実施例 1 4〕 hTfRノックインマウスを用いたhTfR親和性ペプチドトラスツズマブの脳移行性評価 2

hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2及び3が、これらをそれぞれ静脈注射したときに、BBBを通過して脳内に移行するか否かを、マウストランスフェリン受容体の細胞外領域をコードする遺伝子をヒトトランスフェリン受容体遺伝子の細胞外領域をコードする遺伝子に置換したhTfRノックインマウス (hTfR-KIマウス) を用いて評価した。

- [0161] 実施例 9 で得たhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2及び3の精製品を、5 mg/kgとなるように、各2〜3匹の雄性hTfR-KIマウス (20〜26週齢) にそれぞれ静脈内投与した。また、陰性対照として、トラスツズマブを、5 mg/kgとなるように、2匹の雄性野生型マウス (WTマウス) に静脈内投与した。投与6時間後に全てのマウスを安楽死させ、末梢血を採取した後に生理食塩液で全身灌流し、脳 (大脳と小脳を含む部分) を採取した。摘出した脳の重量 (湿重量) を測定した後、矢状面で分割し、一方を組織中のhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2及び3の濃度測定に、一方を免疫組織染色に供した。

- [0162] 濃度測定用の脳組織を、Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich社) を含むT-PER (Thermo Fisher Scientific社) 中でホモジナイズした。得られたホモジネートを遠心 (3000 ×g, 5 min) して上清を回収した。ホモジネート上清に含まれるhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2もしくは3、又はトラスツズマブの量を以下の方法で測定した。まず、SULF0-Goat Anti Human IgG (h+l) (Bethyl社) (0.5 μg/mL) と Goat Anti Human Kappa Light chain-biotin (IBL) (0.5 μg/mL) を等量混合して、サンプリングプレート (BM6025 テストプレート 96well V底 ワイドウェル, ビーエム機器株式会社) に25 μLずつ分注して、マイクロプレートミキサーで1時間、室温で振とうして反応溶液とした。SuperBlock blocking buffer in PBS (37515, Thermo Scientific社) をStreptavidin Gold plate (Meso Scale Diagnostics社) に150 μLずつ添加して、マイクロプレートミキサーで1時間、室温で振とうしてプレー

トをブロッキングした。PBSTで洗浄した後、反応溶液を25 μ Lずつ添加して、マイクロプレートミキサーで1時間、室温で振とうした。次いで、各ウェルにRead buffer T (Meso Scale Diagnostics社) を150 μ Lずつ添加し、Sector TM Imager 6000 readerを用いて各ウェルからの発光量を測定した。既知濃度のhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2もしくは3、又はトラスツマブの標準試料の測定値から検量線を作成し、これに各検体の測定値を内挿することにより、脳のグラム重量（湿重量）あたりに含まれるhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2もしくは3、又はトラスツマブの量（脳組織中のhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2もしくは3、又はトラスツマブの濃度）を算出した。その結果を図3に示す。トラスツズマブと比較して、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2及び3の脳組織における濃度はそれぞれ約16倍及び約15倍であった。これらの結果は、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブがBBを通過して脳組織に蓄積する性質を有することを示すものである。

[0163] 次に、脳組織中のhTfR親和性ペプチドの免疫組織化学染色を、概ね以下の手順で行った。免疫組織染色用に採取した脳組織をOCTコンパウンド（サクラファインテックジャパン株式会社）に浸漬し、ヒストテックピノ（サクラファインテックジャパン株式会社）を用いて-80℃にまで急速冷凍し、組織の凍結ブロックを作製した。この凍結ブロックを4 μ mに薄切後、MASコートスライドガラス（松浪ガラス株式会社）に貼り付けた。スライドガラスを4℃の4%パラホルムアルデヒド（和光純薬工業株式会社）に5分間浸漬し、標本を固定した。次いで、スライドガラスを1% BSAを含むPBSに浸漬しブロッキングした。次いで、組織薄片に適当に希釈したGoat Anti hIgG-heavy and light chain Antibody (Bethyl Laboratories社) を滴下し、1時間反応させた。次いで、組織薄片にTSA-Plus Fluorescenceキット（PerkinElmer社）に含まれるFluorescein Amplification Working Solutionを滴下し、遮光して15分間反応させた。次いで、組織薄片にCSA II Biotin-FRee Tyramide Signal Amplification System (Dako社) に含まれるAnti-Fluorescein-HRPを滴下し、15分間反応させた。次いで、組織薄片にDAB基質（3, 3'-diaminobenzidine, Vecto

r Laboratories社)を反応させ、発色させた。次いで、マイヤー・ヘマトキシリン(Merck社)で対比染色を行い、脱水、透徹した後に封入し、光学顕微鏡で観察した。

- [0164] hTfR親和性ペプチド1、2もしくは3又はトラスツズマブの投与6時間後に採取した組織の染色像を図4に示す。陰性対照であるトラスツズマブを投与したマウスの小脳組織では染色は認められず、静脈注射したトラスツズマブは小脳の脳実質に達しないこと、及び、バックグラウンド染色が殆どないことが示された(図4(a))。一方、hTfR親和性ペプチド1、2を投与したマウスの小脳組織では脳実質に染色が認められ、静脈注射したトラスツズマブ1は小脳の脳実質に達することが示された(図4(b))。hTfR親和性ペプチド3を投与したマウスの小脳組織でも脳実質に染色が認められ、静脈注射したトラスツズマブ3も小脳の脳実質に達することが示された(図4(c))。

産業上の利用可能性

- [0165] 本発明の一実施形態によれば、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと薬理活性物質を結合させた、血液脳関門を通過して中枢神経系において発揮し得る薬剤を提供することができる。

符号の説明

- [0166] 1 血管
2 脳実質

配列表フリーテキスト

- [0167] 配列番号1：ヒトトランスフェリン受容体のアミノ酸配列
配列番号2：カニクイザルトランスフェリン受容体のアミノ酸配列
配列番号3：マウストランスフェリン受容体のアミノ酸配列
配列番号4：hTfR親和性ペプチド1のアミノ酸配列
配列番号5：hTfR親和性ペプチド2のアミノ酸配列
配列番号6：hTfR親和性ペプチド3のアミノ酸配列
配列番号7：hTfR親和性ペプチド1及び2のCDR1のアミノ酸配列1

- 配列番号 8 : hTfR親和性ペプチド1及び2のCDR1のアミノ酸配列2
- 配列番号 9 : hTfR親和性ペプチド1及び2のCDR2のアミノ酸配列1
- 配列番号 10 : hTfR親和性ペプチド1及び2のCDR2のアミノ酸配列2
- 配列番号 11 : hTfR親和性ペプチド1及び2のCDR3のアミノ酸配列1
- 配列番号 12 : hTfR親和性ペプチド1及び2のCDR3のアミノ酸配列2
- 配列番号 13 : hTfR親和性ペプチド3のCDR1のアミノ酸配列1
- 配列番号 14 : hTfR親和性ペプチド3のCDR1のアミノ酸配列2
- 配列番号 15 : hTfR親和性ペプチド3のCDR2のアミノ酸配列1
- 配列番号 16 : hTfR親和性ペプチド3のCDR2のアミノ酸配列2
- 配列番号 17 : hTfR親和性ペプチド3のCDR3のアミノ酸配列1
- 配列番号 18 : hTfR親和性ペプチド3のCDR3のアミノ酸配列2
- 配列番号 19 : ペプチドリンカー1のアミノ酸配列
- 配列番号 20 : ペプチドリンカー2のアミノ酸配列
- 配列番号 21 : ペプチドリンカー3のアミノ酸配列
- 配列番号 22 : ペプチドリンカー4のアミノ酸配列
- 配列番号 23 : ペプチドリンカー5のアミノ酸配列
- 配列番号 24 : ペプチドリンカー6のアミノ酸配列
- 配列番号 25 : ペプチドリンカー7のアミノ酸配列
- 配列番号 26 : ヒトIgGのFc領域のアミノ酸配列の一例
- 配列番号 27 : ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列
- 配列番号 28 : Streptococcus strain G418由来の蛋白質のアルブミン結合ドメイン
- 配列番号 29 : トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 30 : トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 31 : hTfR親和性ペプチド1とトラスツズマブの重鎖の融合蛋白質のアミノ酸配列
- 配列番号 32 : hTfR親和性ペプチド2とトラスツズマブの重鎖の融合蛋白質のアミノ酸配列

配列番号 33 : hTfR親和性ペプチド3とトラスツズマブの重鎖の融合蛋白質のアミノ酸配列

配列番号 34 : hTfR親和性ペプチド1とトラスツズマブの重鎖の融合蛋白質をコードするDNAの塩基配列, 合成配列

配列番号 35 : トラスツズマブの軽鎖をコードするDNAの塩基配列, 合成配列

配列番号 36 : プライマー hTfR5' の塩基配列, 合成配列

配列番号 37 : プライマー hTfR3' の塩基配列, 合成配列

配列番号 38 : キメラhTfRをコードするcDNAの3' 側にI o x P配列で挟み込んだネオマイシン耐性遺伝子を配置したDNAの塩基配列, 合成配列

配列番号 39 : ターゲティングベクターの5' アームの塩基配列, 合成配列

配列番号 40 : ターゲティングベクターの3' アームの塩基配列, 合成配列

配列番号 41 : ペプチドタグ

配列番号 42 : hTfR親和性ペプチド5のアミノ酸配列

配列番号 43 : hTfR親和性ペプチド5とトラスツズマブの重鎖の融合蛋白質のアミノ酸配列

配列番号 44 : hTfR親和性ペプチド5とトラスツズマブの重鎖の融合蛋白質をコードするDNAの塩基配列, 合成配列

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（１）～（２）からなる群より選ばれるものである，ＣＤＲ１，ＣＤＲ２，及びＣＤＲ３の３箇所の相補性決定領域を有する重鎖抗体の可変領域を含む，ヒトトランスフェリン受容体に対する親和性を有するペプチド（ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド）；
- （１）ＣＤＲ１のアミノ酸配列が配列番号７又は配列番号８のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号９又は配列番号１０のアミノ酸配列であり，及びＣＤＲ３のアミノ酸配列が配列番号１１又は配列番号１２のアミノ酸配列であるもの，
- （２）ＣＤＲ１のアミノ酸配列が配列番号１３又は配列番号１４のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号１５又は配列番号１６のアミノ酸配列であり，及びＣＤＲ３のアミノ酸配列が配列番号１７又は配列番号１８のアミノ酸配列であるもの。
- [請求項2] 以下の（１）～（３）からなる群より選択されるものである，ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド；
- （１）配列番号４のアミノ酸配列と８０％以上のアミノ酸配列の同一性を有し，且つ，請求項１の（１）に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ１，ＣＤＲ２，及びＣＤＲ３の３箇所の相補性決定領域を有するもの，
- （２）配列番号５のアミノ酸配列と８０％以上のアミノ酸配列の同一性を有し，且つ，請求項１の（１）に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ１，ＣＤＲ２，及びＣＤＲ３の３箇所の相補性決定領域を有するもの，及び
- （３）配列番号６のアミノ酸配列と８０％以上のアミノ酸配列の同一性を有し，且つ，請求項１の（２）に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲ１，ＣＤＲ２，及びＣＤＲ３の３箇所の相補性決定領域を有するもの。
- [請求項3] 該アミノ酸配列の同一性が８５％以上である，請求項２に記載のヒ

トランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項4] 該アミノ酸配列の同一性が90%以上である、請求項2に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項5] 該アミノ酸配列の同一性が95%以上である、請求項2に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項6] 以下の(1)～(3)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである、請求項1に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド；

(1) 配列番号4のアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸を置換，欠失又は付加させたものであり，且つ，CDR1のアミノ酸配列が配列番号7又は配列番号8のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列であり，及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(2) 配列番号5のアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸を置換，欠失又は付加させたものであり，且つ，CDR1のアミノ酸配列が配列番号7又は配列番号8のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列であり，及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(3) 配列番号6のアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸を置換，欠失又は付加させたものであり，且つ，CDR1のアミノ酸配列が配列番号13又は配列番号14のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号15又は配列番号16のアミノ酸配列であり，及びCDR3のアミノ酸配列が配列番号17又は配列番号18のアミノ酸配列である，アミノ酸配列。

[請求項7] 該置換，欠失又は付加させたアミノ酸の個数が1～5個である請求項6に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

- [請求項8] 該置換，欠失又は付加させたアミノ酸の個数が1～3個である請求項6に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。
- [請求項9] ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域の双方に対して親和性を有するものである，請求項1～8の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。
- [請求項10] ヒトトランスフェリン受容体及びサルトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ～ $1 \times 10^{-8} \text{M}$ である，請求項9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。
- [請求項11] ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ～ $5 \times 10^{-7} \text{M}$ である請求項9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。
- [請求項12] ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数の値を1としたときの，サルトランスフェリン受容体との解離定数の値が，1～10である，請求項9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。
- [請求項13] ヒトトランスフェリン受容体の細胞外領域との解離定数の値を1としたときの，サルトランスフェリン受容体との解離定数の値が，3～10である，請求項9に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。
- [請求項14] 請求項1～13の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの複数個を結合させたものである，以下の(1)～(3)からなる群より選択されるものである，ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドペプチド；
- (1) 請求項1～12に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの2～10個を直接又はリンカーを介して結合させたもの，
- (2) 請求項1～12に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの2又は3個を直接又はリンカーを介して結合させたもの，

(3) 請求項 1 ～ 12 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの 2 個を直接又はリンカーを介して結合させたもの。

[請求項15] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドの複数個を結合させるリンカーのそれぞれが 1 ～ 60 個のアミノ酸からなるペプチドリンカーである、請求項 14 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項16] 該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1 個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、及び配列番号 25 のアミノ酸配列からなる群より選ばれるものである、請求項 14 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項17] 該ペプチドリンカーのアミノ酸配列が、1 個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号 19、配列番号 20、及び配列番号 21 からなる群より選ばれるアミノ酸配列が、2 ～ 10 個直列したアミノ酸配列からなるものである、請求項 14 に記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項18] 配列番号 4、配列番号 5、及び配列番号 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 1 のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項19] 配列番号 4、配列番号 5、及び配列番号 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列中の 1 ～ 10 個のアミノ酸が置換、欠失又は付加したものであるアミノ酸配列を含むものである、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項20] 置換、欠失又は付加したアミノ酸の個数が 1 ～ 5 個である上記 19 のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

[請求項21] 置換、欠失又は付加したアミノ酸の個数が 1 ～ 3 個である上記 20

のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

- [請求項22] 請求項1～21の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと、薬物が結合した、ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドー薬物複合体。
- [請求項23] 該薬物が、他の蛋白質（A）、核酸、又は低分子化合物の何れかである、請求項22に記載の複合体。
- [請求項24] 請求項1～21の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと他の蛋白質（A）との融合蛋白質。
- [請求項25] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが、該他の蛋白質（A）のC末端において、直接又はリンカーを介して結合しているものである、請求項24に記載の融合蛋白質。
- [請求項26] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドが、該他の蛋白質（A）のN末端において、直接又はリンカーを介して結合しているものである、請求項24に記載の融合蛋白質。
- [請求項27] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと該他の蛋白質（A）を結合させるリンカーが1～60個のアミノ酸からなるペプチドリリンカーである、請求項25又は26に記載の融合蛋白質。
- [請求項28] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと該他の蛋白質（A）を結合させるペプチドリリンカーのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25のアミノ酸配列からなる群より選ばれるものである、請求項27に記載の融合蛋白質。
- [請求項29] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドと該他の蛋白質（A）を結合させるペプチドリリンカーのアミノ酸配列が、1個のアミノ酸、アミノ酸配列Gly-Ser、アミノ酸配列Ser-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Ser、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly、配列番号19、配列番号20、及

び配列番号 21 の各アミノ酸配列のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列が、2～10 個直列したアミノ酸配列からなるものである、請求項 27 に記載の融合蛋白質。

[請求項30] 該他の蛋白質（A）が、ヒト由来のものである、請求項 24～29 の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項31] 該他の蛋白質（A）が、サイトカイン、成長因子、又は抗体医薬である、請求項 24～30 の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項32] 該他の蛋白質（A）が、脳由来神経成長因子（BDNF）、神経成長因子（NGF）、リソソーム酵素、毛様体神経栄養因子（CNTF）、グリア細胞株神経栄養因子（GDNF）、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4／5、ニューロトロフィン6、ニューレグリン1、エリスロポエチン、ダルベポエチン、アクチビン、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、線維芽細胞成長因子2（FGF2）、上皮細胞増殖因子（EGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、インターロイキン6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子 α 受容体（TNF- α 受容体）、PD-1 リガンド、PD-L1、PD-L2、ベータアミロイドを分解する活性を有する酵素、抗ベータアミロイド抗体、抗BACE抗体、抗EGFR抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗HER2抗体、抗TNF- α 抗体、及び抗CTLA-4抗体からなる群から選択されるものである、請求項 24～30 の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項33] 該他の蛋白質（A）が、リソソーム酵素であり、該リソソーム酵素が、 α -レーイズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、酸性 α -グルコシダーゼ、グルコセレブロンダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、GM2 活性化蛋白質、 β -ヘキソサミニダーゼA、 β -ヘキソ

サミニダーゼB, N-アセチルグルコサミン-1-フォスフォトランスフェラーゼ, α -マンノシダーゼ, β -マンノシダーゼ, ガラクトシルセラミダーゼ, サポシンC, アリールスルファターゼA, α -ラーフコシダーゼ, アスパルチルグルコサミニダーゼ, α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ, 酸性スフィンゴミエリナーゼ, α -ガラクトシダーゼA, β -グルクロニダーゼ, ヘパランN-スルファターゼ, α -N-アセチルグルコサミニダーゼ, アセチルCoA α -グルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ, N-アセチルグルコサミン-6-硫酸スルファターゼ, 酸性セラミダーゼ, アミロ-1, 6-グルコシダーゼ, シアリダーゼ, パルミトイル蛋白質チオエステラーゼ-1, トリペプチジルペプチダーゼ-1, ヒアルロニダーゼ-1, CLN1及びCLN2からなる群より選択されるものである, 請求項24~30の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項34] 血清アルブミンが結合したものである, 請求項24~33の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項35] ヒトIgGFc領域又はその一部が結合したものである, 請求項24~33の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項36] 請求項1~21の何れかに記載のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドをコードする核酸。

[請求項37] 請求項24~35の何れかに記載の融合蛋白質をコードする核酸。

[請求項38] 請求項36又は37に記載の核酸を組み込んでなる, 発現ベクター。
。

[請求項39] 請求項38に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

[請求項40] 該細胞が哺乳動物由来である, 請求項39に記載の細胞。