

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、脳およ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、ペプチドを蛋白質に置き換えることもできる。

1. 以下の（1）～（5）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8又は配列番号9のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号10又は配列番号11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又は配列番号13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14又は配列番号15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 6 又は配列番号 1 7 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 8 又は配列番号 1 9 のアミノ酸配列であるもの、

(3) C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 2 0 又は配列番号 2 1 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 2 2 又は配列番号 2 3 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 2 4 又は配列番号 2 5 のアミノ酸配列であるもの、

(4) C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 2 6 又は配列番号 2 7 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 2 8 又は配列番号 2 9 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 3 0 又は配列番号 3 1 のアミノ酸配列であるもの、

(5) C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 2 0 又は配列番号 2 1 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 5 6 又は配列番号 5 7 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 2 4 又は配列番号 2 5 のアミノ酸配列であるもの。

2. 以下の(1)～(6)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 3 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、請求項 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 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、請求項 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) 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、請求項 1 の(3)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、

(4) 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、請求項 1 の(4)に示されるアミノ酸配列を有するC D R 1、

CDR 2, 及び CDR 3 の 3 箇所の相補性決定領域を有するもの,

(5) 配列番号 7 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 (3) に示されるアミノ酸配列を有する CDR 1, CDR 2, 及び CDR 3 の 3 箇所の相補性決定領域を有するもの、及び

(6) 配列番号 55 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 (5) に示されるアミノ酸配列を有する CDR 1, CDR 2, 及び CDR 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 85% 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 90% 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 95% 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) ~ (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 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 3 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、CDR 1 のアミノ酸配列が配列番号 8 又は配列番号 9 のアミノ酸配列であり、CDR 2 のアミノ酸配列が配列番号 10 又は配列番号 11 のアミノ酸配列であり、及び CDR 3 のアミノ酸配列が配列番号 12 又は配列番号 13 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(2) 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、CDR 1 のアミノ酸配列が配列番号 14 又は配列番号 15 のアミノ酸配列であり、CDR 2 のアミノ酸配列が配列番号 16 又は配列番号 17 のアミノ酸配列であり、及び CDR 3 のアミノ酸配列が配列番号 18 又は配列番号 19 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(3) 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、CDR 1 のアミノ酸配列が配列番号 20 又は配列番号 21 のアミノ酸配列であり、CDR 2 のアミノ酸配列が配列番

号 2 2 又は配列番号 2 3 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 2 4 又は配列番号 2 5 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(4) 配列番号 6 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 2 6 又は配列番号 2 7 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 2 8 又は配列番号 2 9 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 3 0 又は配列番号 3 1 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(5) 配列番号 7 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 2 0 又は配列番号 2 1 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 2 2 又は配列番号 2 3 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 2 4 又は配列番号 2 5 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列、

(6) 配列番号 5 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、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 2 0 又は配列番号 2 1 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 5 5 又は配列番号 5 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 2 4 又は配列番号 2 5 のアミノ酸配列である、アミノ酸配列。

7. 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 5 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. 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 5 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の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$ 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 $8 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-8}$ 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, 0.5~2.5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, 0.7~1.2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, 重鎖抗体可変領域ペプチド;

(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が1~50個のアミノ酸からなるペプチドリンカーである, 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. 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチドを結合の複数個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32, 配列番号33, 配列番号34, 配列番号35, 配列番号36, 配列番号58, 及び配列番号69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. 該重鎖抗体可変領域ペプチド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32、配列番号33、配列番号34、配列番号58、及び配列番号69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. 上記1～17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。

19. 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18に記載の複合体。

20. 上記1～17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。

21. 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20に記載の融合蛋白質。

22. 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20に記載の融合蛋白質。

23. 該リンカーが1～50個のアミノ酸からなるペプチドリンカーである、上記21又は22に記載の融合蛋白質。

24. 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32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号58、及び配列番号69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23に記載の融合蛋白質。

25. 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 32, 配列番号 33, 配列番号 34 の各アミノ酸配列, 配列番号 58, 及び配列番号 69 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 23 に記載の融合蛋白質。

26. 該他の蛋白質 (A) が, ヒト由来のものである, 上記 20~25 の何れかに記載の融合蛋白質。

27. 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 20~26 の何れかに記載の融合蛋白質。

28. 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 20~26 の何れかに記載の融合蛋白質。

29. 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20~26の何れかに記載の融合蛋白質。

30. 血清アルブミンが結合したものである, 上記20~29の何れかに記載の融合蛋白質。

31. ヒトIgG Fc領域又はその一部が結合したものである, 上記20~29の何れかに記載の融合蛋白質。

32. 上記1~17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。

33. 上記20~31の何れかに記載の融合蛋白質をコードする核酸。

34. 上記32又は33に記載の核酸を組み込んでなる, 発現ベクター。

35. 上記34に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

36. 該細胞が哺乳動物由来である, 上記35に記載の細胞。

37. 配列番号3, 配列番号4, 配列番号5, 配列番号6, 配列番号7, 及び配列番号55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。

38. 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。

39. 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。

40. 配列番号3, 配列番号4, 配列番号5, 配列番号6, 配列番号8, 及び配列番号55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。

41. 以下の(1)~(6)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3のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し, 且つ, CDR1のアミノ酸配列が配列番号8又は配列番号9のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号10又は配列番号11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又は配列番号13のアミノ酸配列であるもの,

(2) 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, CDR1のアミノ酸配列が配列番号14又は配列番号15のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号16又は配列番号17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又は配列番号19のアミノ酸配列であるもの,

(3) 配列番号5のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し, 且つ, CDR1のアミノ酸配列が配列番号20又は配列番号21のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号22又は配列番号23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24又は配列番号25のアミノ酸配列であるもの,

(4) 配列番号6のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し, 且つ, CDR1のアミノ酸配列が配列番号26又は配列番号27のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号28又は配列番号29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30又は配列番号31のアミノ酸配列であるもの,

(5) 配列番号7のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し, 且つ, CDR1のアミノ酸配列が配列番号20又は配列番号21のアミノ酸配列であり

、CDR2のアミノ酸配列が配列番号22又は配列番号23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24又は配列番号25のアミノ酸配列であるもの、

(6) 配列番号55のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し、且つ、CDR1のアミノ酸配列が配列番号20又は配列番号21のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号56又は配列番号57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24又は配列番号25のアミノ酸配列であるもの。

42. 該アミノ酸配列の同一性が85%以上である、上記41のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

43. 該アミノ酸配列の同一性が90%以上である、上記41のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

44. 該アミノ酸配列の同一性が95%以上である、上記41のヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド。

45. 血管内皮細胞の表面に存在する分子を抗原とする重鎖抗体と薬物が結合した重鎖抗体-薬物複合体。

46. 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45の複合体。

47. 血管内皮細胞の表面に存在する分子を抗原とする重鎖抗体と他の蛋白質(A)との融合蛋白質であって、該重鎖抗体が該他の蛋白質(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、又は該重鎖抗体が該他の蛋白質(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1~50個のアミノ酸からなるペプチドリinkerである、上記47の融合蛋白質。

49. 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11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、

配列番号 15 の各アミノ酸配列，及び配列番号 11 のアミノ酸配列の 3 個が連続してなるアミノ酸配列からなる群より選ばれるものである，上記 47 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 11，配列番号 12，配列番号 13 の各アミノ酸配列，及び配列番号 11 のアミノ酸配列の 3 個が連続してなる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 47 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 -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、サポシンC、アリアルスルファターゼ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, 該重鎖抗体と, 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。該抗体と該ヒトリソソーム酵素とを, 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させたもの

61. 該重鎖抗体が, 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)～(6)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8又は配列番号9のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号10又は配列番号11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又は配列番号13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, 又は, CDR1のアミノ酸配列が配列番号9のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号11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13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14又は配列番号15のアミノ酸配列であり, CDR2のアミノ酸配列が配列番号16又は配列番号17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又は配列番号19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 C D R 3 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、又は、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 15 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 17 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 19 のアミノ酸配列であるもの、

(3) C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 20 又は配列番号 21 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 22 又は配列番号 23 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 24 又は配列番号 25 のアミノ酸配列であるもの、ここで、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 の各アミノ酸配列は任意のものであってよく、但し、好ましくは、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 20 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 22 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 24 のアミノ酸配列であるもの、又は、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 21 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 23 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 25 のアミノ酸配列であるもの、

(4) C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 26 又は配列番号 27 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 28 又は配列番号 29 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 30 又は配列番号 31 のアミノ酸配列であるもの、ここで、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 の各アミノ酸配列は任意のものであってよく、但し、好ましくは、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 26 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 28 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 30 のアミノ酸配列であるもの、又は、C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 27 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 29 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 31 のアミノ酸配列であるもの、

(5) C D R 1 のアミノ酸配列が配列番号 20 又は配列番号 21 のアミノ

酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号22又は配列番号23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24又は配列番号25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20のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号22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24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21のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号23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25のアミノ酸配列であるもの、

(6) CDR1のアミノ酸配列が配列番号20又は配列番号21のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号56又は配列番号57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24又は配列番号25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20のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号56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24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21のアミノ酸配列であり、CDR2のアミノ酸配列が配列番号57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25のアミノ酸配列であるもの。

70. 以下の(1)～(6)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3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(2)に示されるものであるもの、

(3) 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(3)に示されるものであるもの、

(4) 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(4)に示されるものであるもの、

(5) 配列番号7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(5)に示されるものであるもの、

(6) 配列番号8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(6)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)～(6)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)～(6)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)～(6)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)～(6)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3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（2）に示されるものであるもの，

（3）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（3）に示されるものであるもの，

（4）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（4）に示されるものであるもの，

（5）配列番号7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（5）に示されるものであるもの，

（6）配列番号8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（6）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）～（6）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）～（6）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の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$ 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の細胞外領域との解離定数が何れも $8 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-8}$ 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, 0.5~2.5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, 0.7~1.2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間を結合するリンカーが1~50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. 該重鎖抗体可変領域ペプチド間を結合するペプチドリ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32, 配列番号33, 配列番号34, 配列番号35, 配列番号36, 配列番号58, 及び配列番号69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．該重鎖抗体可変領域ペプチド間を結合す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３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号５８、及び配列番号６９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１～５０個のアミノ酸からなるペプチドリンカーである、上記８９又は９０の融合蛋白質。

９２．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３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３６、配列番号５８、及び配列番号６９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32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号58、及び配列番号69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親和性ペプチドートラスツズマブ投与6時間後のマウスの小脳の、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2、(d)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3、(e)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ4、(f)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5をそれぞれ投与したもの。各写真の右下のバーは50 μm のゲージを示す。

[図2]hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ投与24時間後のマウスの小脳の、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2、(d)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3、(e)はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ4をそれぞれ投与したもの。各写真の右下のバーは50 μm のゲージを示す。

[図3]hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5及びトラスツズマブ投与8時間後のカニクイザルの、各種脳組織中に含まれるこれら物質の定量値を示すグラフ。(1)は大腦皮質、(2)は小脳、(3)海馬は(4)は中脳、(5)は脳橋、(6)は延髄、(7)は尾状核、(8)は果核、(9)は淡蒼球、(10)は視床、(11)は視床下部、(12)は頸髄、(13)は胸髄、(14)は腰髄、(15)は網膜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(μg)を示す。網掛け棒はトラスツズマブ、黒棒はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5の定量値をそれぞれ示す。

[図4]hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5及びトラスツズマブ投与8時間後のカニクイザルの、各種臓器中に含まれるこれら物質の定量値を示すグラフ。(1)は肝臓、(2)は腎臓、(3)は心臓(左心室)、(4)は心臓(大動脈弁)、(

5)は肺, (6)は骨髄, (7)は脾臓, (8)は胸腺, (9)は精巣, (10)は前立腺, (11)は大腿直筋, (12)はEDL, (13)はヒラメ筋, (14)は三頭筋, (15)は横隔膜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(μg)を示す。網掛け棒はトラスツズマブ, 黒棒はhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ5の定量値をそれぞれ示す。

[図5]hTfR親和性ペプチドとヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(hIDS)の融合蛋白質を投与した後の, マウスの脳脊髄液(CSF)中に含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度の測定値を示すグラフ。縦軸は脳脊髄液(CSF)中に含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度($\mu\text{g/mL}$)を示す。縦棒はSD値を示す。

[図6]hTfR親和性ペプチドとヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(hIDS)の融合蛋白質を投与した後の, マウスの脳組織中に含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度の測定値を示すグラフ。縦軸は脳組織の乾燥重量(mg)あたりに含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度($\mu\text{g/mg}$)を示す。縦棒はSD値を示す。

[図7]hTfR親和性ペプチドとヒトヘパランN-スルファターゼ(hSGSH)の融合蛋白質を投与した後の, マウスの脳脊髄液(CSF)及び脳組織中に含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度の測定値を示すグラフ。(a)は脳組織, (b)は脳脊髄液(CSF)中に含まれるヘパラン硫酸(HS)の測定値をそれぞれ示す。(a)において, 縦軸は脳組織の乾燥重量(mg)あたりに含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度($\mu\text{g/mg}$)を示し, また縦棒はSD値を示す。(b)において, 縦軸は脳脊髄液(CSF)中に含まれるヘパラン硫酸(HS)の濃度($\mu\text{g/mL}$)を示し, また縦棒はSD値を示す。

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。
- [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。

[0018] hcIgやIgNARの可変領域中のフレームワーク領域は、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。その他、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を特定することもできる。

[0019] 但し、これに限らず、各FR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。

[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、直接又はペプチドリンカーにより、一方のC末端に他方のN末端が結合する。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に由来するものがある。
- [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，（1 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 1）重鎖の可変領域とヒンジ領域の一部からなるもの，（3 1）重鎖の可変領域とヒンジ領域の全部からなるもの，（4 1）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_H1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（1 h）～（4 h）の蛋白質，及びIgNARに由来する重鎖抗体の可変領域を含む（1 1）～（4 1）の蛋白質を総称して，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する分子は，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）の蛋白質を，免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドという。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、ナノボディ（Ablynx N.V. 社商標）、及び、Nanobody（Ablynx N.V. 社商標）の各語は、免疫グロブリン単一可変ドメインペプチドと同義であり、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。

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、これら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。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] なお、重鎖抗体可変領域ペプチドには、上記（1 h）～（4 h）、（1 l）～（4 l）として記載されたものに加えて、これらに置換、欠失、付加等の変異を加えたものも、元のペプチドが親和性を有する抗原に対して親和性を有するものである限り、含まれる。また、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、元のペプチドが親和性を有する抗原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。

[0031] 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。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）に対しても結合するものであるが、これに限定されない。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 上記工程(6a)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、培養上清中に含まれる抗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。

[0035] 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(WO1997/09436, WO1995/11317)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(1b)から(9b)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。

(1b) 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。または、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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。または、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。

[0040] 上記工程（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

ズハムスター卵巣由来のCHO細胞，又はマウス骨髓腫に由来するNS/0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，CDR1，FR3，CDR1，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1～5のアミノ酸配列を含むものがある。hTfR親和性ペプチド1～6はそれぞれ配列番号3，4，5，6，7，又は55で示されるアミノ酸配列を含む。配列番号3，4，5，6，7，又は55で示されるアミノ酸配列は，何れも可変領域のアミノ酸配列である。hTfR親和性ペプチド1～6は，いずれもN末端から，FR1，CDR1，FR2，CDR1，FR3，CDR1，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8又は9のアミノ酸配列を含む領域であり，そのCDR2は配列番号10又は11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12又は13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、CDR1が配列番号9、CDR2が配列番号11、及びCDR3が配列番号13のアミノ酸配列を含む領域であるものである。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14又は15のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号16又は17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18又は19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、CDR1が配列番号15、CDR2が配列番号17、及びCDR3が配列番号19のアミノ酸配列を含む領域であるものである。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20又は21のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号22又は23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24又は25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20、CDR2が配列番号22、及びCDR3が配列番号24のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号21、CDR2が配列番号23、及びCDR3が配列番号25のアミノ酸配列を含む領域であるものである。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] hTfR親和性ペプチド4のCDR1は配列番号26又は27のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号28又は29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30又は31のアミノ酸配列を含む領域で

ある。hTfR親和性ペプチド4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26、CDR2が配列番号28、及びCDR3が配列番号30のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号27、CDR2が配列番号29、及びCDR3が配列番号31のアミノ酸配列を含む領域であるものである。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。

[0049] hTfR親和性ペプチド5のCDR1は配列番号20又は21のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号22又は23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24又は25のアミノ酸配列を含む領域である。hTfR親和性ペプチド5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20、CDR2が配列番号22、及びCDR3が配列番号24のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号21、CDR2が配列番号23、及びCDR3が配列番号25のアミノ酸配列を含む領域であるものである。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。

[0050] hTfR親和性ペプチド6のCDR1は配列番号20又は21のアミノ酸配列を含む領域であり、そのCDR2は配列番号56又は57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24又は25のアミノ酸配列を含む領域である。hTfR親和性ペプチド6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20、CDR2が配列番号56、及びCDR3が配列番号24のアミノ酸配列を含む領域であるもの、CDR1が配列番号21、CDR2が配列番号57、及びCDR3が配列番号25のアミノ酸配列を含む領域であるものである。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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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、BLAST (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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[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，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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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およ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。

[0060] 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。

[0061] 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、hTfR親和性ペプチドとは異なる蛋白質のことをいう。

[0062] 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。

[0063] 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 $1/2 \sim 1/5$ 倍、 $1/5 \sim 1/10$ 倍、 $1/10 \sim 1/100$ 倍等と段階的に調整することもできる。

[0064] 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 (Kon) や解離速度定数 (Koff) 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を用いる方法も使用することができる。

- [0065] 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。
- [0066] 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。
- [0067] 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、 $1 \times 10^{-10} \text{M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ であるものを挙げることができる。
- [0068] 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。

[0069] 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。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。

[0070] 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 $5 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1 \times 10^{-7} \text{M}$ であるもの、

(b) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $5 \times 10^{-9} \text{M} \sim 5 \times 10^{-8} \text{M}$ であるもの、

(d) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $1 \times 10^{-8} \text{M} \sim 3 \times 10^{-8} \text{M}$ であるもの、

(e) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $1 \times 10^{-9} \text{M} \sim 2 \times 10^{-7} \text{M}$ であるもの、

(f) hTfR及びサルTfRとの解離定数が何れも $5 \times 10^{-9} \text{M} \sim 5 \times 10^{-7} \text{M}$ であるもの。

特に、上記(a)～(f)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、0.3～3.0であるものが好ましく、例えば0.5～2.5であるもの、0.8～2.5であるもの、0.5～2.5であるもの、0.8～1.5であるものが好ましい。

[0071] 本発明の一実施形態におけるhTfR親和性ペプチド1～5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1～5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3～5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0.5～1.5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。

[0072] 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、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ことが予測される。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についても同様のことがいえる。

[0073] 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ことが予測される。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。

[0074] 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、非ペプチドリンカー又はペプチドリンカー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。非ペプチドリンカーとしては、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。ペプチドリンカーは、ペプチド結合した1～50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。

[0075] 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PEG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。

[0076] 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、hTfR親和性ペプチド-PEG-蛋白質を得ることができる。

[0077] 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。

[0078] 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inkerは、好ましくは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inker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。

[0079] 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32のアミノ酸配列、配列番号33のアミノ酸配列、配列番号34のアミノ酸配列、配列番号35のアミノ酸配列、配列番号36、配列番号58、及び配列番号69のアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列が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32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。

[0080] 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することが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。

[0081] 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inker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inker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inker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inker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inker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inker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。

[0082] 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37で示されるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

[0083] 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することが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。

[0084] 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inker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inker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inker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inker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。

[0085] 上記のHSAは、配列番号38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。

[0086] 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39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。

[0087] 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より測定したとき、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、更に好ましくは 1×10^{-9} M以下である。

[0088] 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。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。

[0089] 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1~50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。

[0090] 好ましいペプチドリンカーとしては、例えば、グリシン又はセリンのいずれか1個のアミノ酸からなるもの、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32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号58、及び配列番号69のアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列が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32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。

[0091] 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。

[0092] 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、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 (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)、アミロー 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。

[0093] 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GM1-ガングリオシドーシス1~3型の治療剤として、GM2 活性化蛋白質と結合させたものはGM2-ガングリオシドーシスAB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 (LAMAN) 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、サボシン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 -レフコシダーゼ (FUCA1) と結合させたものはフコシドーシスの治療剤として、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治療剤として、 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CoA 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-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-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 -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・シャイエ症候群における中枢神経障害治療剤として使用できる。また，医薬用途はこれらの疾患に限られるものではない。

[0094] 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。

[0095] 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枢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枢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。

[0096] 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、脳腫瘍を含む中枢神経系の腫瘍、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、外傷性の中枢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枢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。

[0097] なお、本発明において治療剤として用いられるものは、疾患の発症を予防するために用いることもできる。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、又は配列番号55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59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7のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド5のC末端に、配列番号59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、配列番号62のアミノ酸配列からなる融合蛋白質

,

(3) 配列番号55のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド6のC末端に、配列番号59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、配列番号60のアミノ酸配列からなる融合蛋白質

,

(4) 配列番号7のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド5のC末端に、配列番号59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7のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド5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、配列番号64のアミノ酸配列からなる融合蛋白質。

[0103] 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3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、又は配列番号55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59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5のアミノ酸配列からなるhTfR親和性ペプチド3のC末端に、配列番号59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66のアミノ酸配列からなるhSGSHのN末端が結合した融合蛋白質。

[0104] 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40と41で示される。

[0105] 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、トラスツズマブの重鎖のC末端に配列番号69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3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42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43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44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、配列番号45のアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド4-トラスツズマブ重鎖融合蛋白質、配列番号46のアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド5-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。hTfR親和性ペプチド6と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もできる。

[0106] 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、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。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 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で切断されるバリニン-シトルリン又はバリニン-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。

[0110] 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。

[0111] 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hTfR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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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

リング製剤と呼称される。プレフィルドシリリング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。

[0115] 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。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。

[0116] 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。

[0117] 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

[0118] 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。

[0119] 〔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 49）及びプライマーhTfR3'（配列番号 50）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。

[0120] 〔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。

[0121] 〔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。

[0122] 〔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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 〔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5個のクローンを選択し、それぞれクローン1～5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（表1）。

[0126] [表1]

表1 クローン1～5が発現する抗hTfR重鎖抗体の可変領域のアミノ酸配列（各CDRのアミノ酸配列の例示）

クローン番号	抗hTfR重鎖抗体の可変領域のアミノ酸配列
1	配列番号3
2	配列番号4
3	配列番号5
4	配列番号6
5	配列番号7

[0127] ここで配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をhTfR親和性ペプチド1、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をhTfR親和性ペプチド2、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をhTfR親和性ペプチド3、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をhTfR親和性ペプチド4、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をhTfR親和性ペプチド5とした。hTfR親和性ペプチド1～5は、それぞれCDR1～3を含む。それぞれのCDRのアミノ酸配列を表2に示す。表2で例示されるhTfR親和性ペプチ

ド5のCDRのアミノ酸配列は、hTfR親和性ペプチド3と同一である。表2には、実施例6で後述するhTfR親和性ペプチド6の各CDRのアミノ酸配列も併せて示す。

[0128] [表2]

表2 hTfR親和性ペプチド1～6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	8, 9	10, 11	12, 13
hTfR親和性ペプチド2	14, 15	16, 17	18, 19
hTfR親和性ペプチド3	20, 21	22, 23	24, 25
hTfR親和性ペプチド4	26, 27	28, 29	30, 31
hTfR親和性ペプチド5	20, 21	22, 23	24, 25
hTfR親和性ペプチド6	20, 21	56, 57	24, 25

[0129] [実施例6] hTfR親和性ペプチド1～6の作製

N末端に配列番号54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 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。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。

[0130] 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2～5についてもhTfR親和性ペプチド1と同様に精製品を得た。また、hTfR親和性ペプチド5のCDR2のアミノ酸を一つ置換させた配列番号55で示されるアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド6をコードする発現ベクターを常法により作製し、これを用いてhTfR親和性ペプチド1～5と同様にhTfR親和性ペプチド6の精製品を得た。

[0131] [実施例7] hTfR親和性ペプチド1～6のヒトTfR及びサルTfRに対する結合活性の評価

hTfR親和性ペプチド1～5と、ヒトTfR(hTfR)及びサル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末端にヒスチジントグが付加した、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末端にヒスチジントグが付加した、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。

- [0132] 実施例6で得たhTfR親和性ペプチド1~6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とrサルTfRとを、それぞれHBS-P+で希釈し、15 μ g/mLの溶液を調製し、それぞれhTfR-ECD (Histag) 溶液及びサルTfR-ECD (Histag) 溶液とした。
- [0133] 上記のサンプル溶液を、96 well plate, black (greiner bio-one社) に200 μ L/ウェルずつ分注した。また、上記調製したhTfR-ECD (Histag) 溶液及びサルTfR-ECD (Histag) 溶液を、所定のウェルにそれぞれ200 μ L/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 μ L/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 μ L/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 NiCl_2 溶液を200 μ L/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。
- [0134] 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、hTfR親和性ペプチド1~6のそれぞれと、hTfR及びサルTfRに対する会合速度定数 (k_{on}) 及び解離速度定数 (k_{off}) を測定し、解離定数 (K_D) を算出した。なお、測定は25~30°Cの温度下で実施

した。

[0135] [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。				

[0136] 表4にhTfR親和性ペプチド1～6のhTfR及びサルTfRに対する会合速度定数（ k_{on} ）及び解離速度定数（ k_{off} ）の測定結果、及び解離定数（ K_D ）を示す。hTfR親和性ペプチド1及び2については、サルTfRに対する K_D 値が得られなかった。これらについては、実施例2で作製したhTfR-ECD（Histag）溶液及びサルTfR-ECD（Histag）溶液を用いてBiacoreを用いて別途、 K_D 値を測定した。その結果、hTfR親和性ペプチド1のサルTfR及びヒトTfRに対する K_D 値は、それぞれ 1.76×10^{-8} 及び 1.65×10^{-8} と測定された。また、hTfR親和性ペプチド2のサルTfR及びヒトTfRに対する K_D 値は、それぞれ 1.76×10^{-8} 及び 1.65×10^{-8} と測定された。これらの結果は、各hTfR親和性ペプチドの、サルTfRとの K_D 値が概ね $1.0 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ であり、ヒトTfRとの K_D 値が概ね $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ であることを示す。

[0137]

[表4]

表4 hTfR親和性ペプチド1～6のhTfR及びサルTfRに対する親和性

名称	動物種	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
hTfR親和性ペプチド1	サル	N/A	N/A	N/A
	ヒト	2.80×10^5	2.71×10^{-2}	9.70×10^{-8}
hTfR親和性ペプチド2	サル	N/A	N/A	N/A
	ヒト	2.37×10^5	1.46×10^{-2}	6.14×10^{-8}
hTfR親和性ペプチド3	サル	1.15×10^6	1.23×10^{-2}	1.07×10^{-8}
	ヒト	5.71×10^5	6.00×10^{-3}	1.05×10^{-8}
hTfR親和性ペプチド4	サル	3.18×10^5	3.16×10^{-3}	9.92×10^{-9}
	ヒト	2.27×10^5	2.70×10^{-3}	1.19×10^{-8}
hTfR親和性ペプチド5	サル	3.96×10^5	6.95×10^{-3}	1.75×10^{-8}
	ヒト	4.07×10^5	5.62×10^{-3}	1.38×10^{-8}
hTfR親和性ペプチド6	サル	N/A	N/A	N/A
	ヒト	4.28×10^5	5.86×10^{-2}	1.37×10^{-7}

[0138] 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親和性ペプチドの相対値も0.8～2.5の範囲であった。これらの結果は、hTfRへの親和性とサルTfRへの親和性が近似すること示す。特に、hTfR親和性ペプチド2を除く他のhTfR親和性ペプチドにあっては、相対値が0.8～1.3の範囲であり、hTfRへの親和性とサルTfRへの親和性が極めて近似することを示す。従って、これらの全てのhTfR親和性ペプチド（特にhTfR親和性ペプチド1及び3～5）は、サルに投与したときのサル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。

[0139]

[表5]

**表5 hTfR親和性ペプチド1～6のサルTfR
への親和性の相対値**

名称	相対値
hTfR親和性ペプチド1	1.06
hTfR親和性ペプチド2	2.36
hTfR親和性ペプチド3	1.02
hTfR親和性ペプチド4	0.83
hTfR親和性ペプチド5	1.27
hTfR親和性ペプチド6	N/A

[0140] [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38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69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42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47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2～5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2～5の何れか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)～pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5)とした。

[0141] また、配列番号41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48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。

[0142] [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。

[0143] 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。

[0144] pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(2)～pCI-neo-Trastuzumab(HC)-VHH(5)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2～5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、それぞれCHO-S細胞内で共発現させた。これらの細胞は、hTfR親和性ペプチド2～4の何れか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、これら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2～5とする。また、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1～5を総称してhTfR親和性ペプチドートラスツズマブとする。hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2～5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。

[0145] [実施例10] hTfR親和性ペプチドートラスツズマブのヒトTfR及びサルTfR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親和性ペプチドートラスツズマブ1～5のhTfR及びサルTfRに対する親和性を調べた。表6にhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1～5のhTfR及びサルTfRに対する会合速度定数 (kon) 及び解離速度定数 (koff) の測定結果、及び解離定数 (K_D) を示す。

[0146]

[表6]

表6 hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1～5のhTfR及びサルTfRに対する親和性

名称	動物種	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1	サル	5.72×10^6	4.92×10^{-4}	8.61×10^{-10}
	ヒト	4.73×10^5	2.26×10^{-4}	4.77×10^{-10}
hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2	サル	6.59×10^5	1.61×10^{-3}	2.45×10^{-9}
	ヒト	4.74×10^5	4.95×10^{-4}	1.04×10^{-9}
hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ3	サル	5.74×10^5	1.24×10^{-4}	2.15×10^{-10}
	ヒト	5.25×10^5	1.63×10^{-4}	3.12×10^{-10}
hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ4	サル	5.13×10^5	8.45×10^{-5}	1.65×10^{-10}
	ヒト	4.99×10^5	6.19×10^{-5}	1.24×10^{-10}
hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ5	サル	5.41×10^5	1.24×10^{-4}	2.29×10^{-10}
	ヒト	4.78×10^5	1.18×10^{-4}	2.47×10^{-10}

[0147] hTfR親和性ペプチドトラスツズマブのhTfRに対する結合活性の測定の結果、いずれのhTfR親和性ペプチドトラスツズマブとも、hTfRとの解離定数(K_D)は 1×10^{-9} M～ 1×10^{-10} Mであった。また、サルTfRとの解離定数も同様に 1×10^{-9} M～ 1×10^{-10} Mであった。これらの結果は、これらのhTfR親和性ペプチドトラスツズマブが他の蛋白質と融合させた場合であっても、hTfRとサルTfRの双方への親和性を保持することを示す。

[0148] 上記の結果から、各hTfR親和性ペプチドトラスツズマブのhTfRとの解離定数の値を1としたときの、サルTfRとの解離定数の相対値を算出した(表7)。いずれのhTfR親和性ペプチドトラスツズマブにおいても、その相対値は0.9～2.5の範囲であった。これらの結果は、各hTfR親和性ペプチドトラスツズマブのhTfRへの親和性とサルTfRへの親和性が近似すること示す。特に、各hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ2を除く他のhTfR親和性ペプチドにあっては、相対値が0.8～1.9の範囲であり、hTfRへの親和性とサルTfRへの親和性が極めて近似することがわかる。従って、これらの各hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ(特に各hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1及び3～5)は、サルに投与したときのサル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。

[0149] [表7]

表7 hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1～5のサルTfRへの親和性の相対値

名称	相対値
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1	1.81
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2	2.36
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3	0.69
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ4	1.33
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5	0.93

[0150] [実施例11] hTfRノックインマウスを用いたhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの脳移行性評価1

次いで、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1～5が、これを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。hTfR-KIマウスは、概ね下記の方法で作製した。

[0151] 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51で示される塩基配列を有するDNA断片を化学的に合成した。このDNA断片を、5'アーム配列として配列番号52で示される塩基配列、3'アーム配列として配列番号53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した。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細胞を選択した。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)に移植した。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した。このキメラマウス個体をICRマウスと掛け合わせてF1マウスを得た。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マウスとした。

[0152] 実施例9で得たhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ1～5の精製品を，5 mg/kgとなるように，各2匹の雄性hTfR-KIマウスに静脈内投与した。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hTfR-KIマウスに静脈内投与した。投与6時間及び24時間後にマウスを安楽死させ，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1～5の濃度測定に，一方を免疫組織染色に供した。

[0153] 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，SectorTM 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親和性ペプチドー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親和性ペプチドートラスツズマブの量（脳組織中のhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの濃度）を算出した。その結果を表8に示す。

[0154] [表8]

表8 hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1～5の脳組織中濃度

名称	脳組織中濃度 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{組織}$)	
	投与6時間後	投与24時間後
トラスツズマブ	0.07	0.04
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1	0.13	0.07
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ2	0.23	0.17
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3	0.37	0.15
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ4	0.42	0.33
hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5	0.33	0.16

[0155] いずれのhTfR親和性ペプチドートラスツズマブも投与6時間後及び24時間後の何れにおいても、脳組織における濃度は陰性対照群と比較して高い値を示した。この結果は、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブがBBBを脳組織に蓄積する性質を有することを示すものである。

[0156] [実施例12] hTfRノックインマウスを用いたhTfR親和性ペプチドートラスツズマブの脳移行性評価2

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°C 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 $4\text{ }\mu\text{m}$ 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°C 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。

[0157] 図1はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ投与6時間後に染色した組織切片の光学写真、図2はhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ投与24時間後に染色した組織切片の光学写真である。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、投与6時間、24時間ともに染色は認められず、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1(a)及び図2(a))。一方、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ1~5を投与したマウスの小脳組織では、投与6時間、24時間ともに脳実質に染色が認められ、静脈注射したトラスツズマブは小脳の脳実質に達することが示された(図1(b)~(f)及び図2(b)~(f))。特に、hTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3を投与したマウスの小脳組織では、投与後6時間、24時間ともに脳実質に染色が認められ、静脈注射したhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ3が効率よく小脳の脳実質に達することが示された(図1(e)及び図2(e))。

[0158] [実施例13] 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

実施例9で得たhTfR親和性ペプチドートラスツズマブ5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した。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した。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-トラスツズマブ5及びトラスツズマブの濃度を実施例11に記載の方法で測定し、その測定値から C_{max} ($\mu\text{g/mL}$), $AUC_{0-8\text{hr}}$ ($\mu\text{g/hr/mL}$), 及び $t_{1/2\beta}$ (hr)を算出した。hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5の C_{max} ($\mu\text{g/mL}$), $AUC_{0-8\text{hr}}$ ($\mu\text{g/hr/mL}$), 及び $t_{1/2\beta}$ (hr)は、それぞれ142, 816, 及び25.1であった。一方、トラスツズマブの C_{max} ($\mu\text{g/mL}$), $AUC_{0-8\text{hr}}$ ($\mu\text{g/hr/mL}$), 及び $t_{1/2\beta}$ (hr)は、それぞれ110, 509, 及び2.27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5がカニクイザルに静脈内投与したときに、血液中で比較的安定に存在することを示す。

[0159] 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した。灌流後、延髄を含む脳組織及び各種臓器を摘出した。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-トラスツズマブ5及びトラスツズマブの濃度を実施例11に記載の方法で測定した。

[0160] 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った。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った。

[0161] 図3に脳組織の測定結果を示す。大腦皮質、小脳、海馬、中脳、脳橋、延髄、尾状核、果核、淡蒼球、及び視床については、トラスツズマブは殆ど検出されなかったが、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5は、これらの臓器でトラスツズマブと比較して極めて高濃度で検出された。また、視床下部においても、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5は、トラスツズマブの2倍強の濃度で検出された。一方、頸髄、胸髄、及び腰髄においては、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5は、トラスツズマブよりも低濃度で検出された。なお、網膜では、hTfR親和性ペプチド-トラスツズマブ5及びトラスツズマブはほぼ同

濃度で検出された。これらの結果は、カニクイザルサルに静脈内投与したhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ5が、脳血管内皮細胞上に存在するトランスフェリンに結合することにより血液脳関門を通過し、大脳皮質、小脳、海馬、中脳、脳橋、延髄、尾状核、果核、淡蒼球、視床等の中枢神経系の組織に到達することを示すものである。

[0162] 図4に各種臓器の測定結果を示す。トラスツマブのターゲット分子であるHER2蛋白質の発現する心臓では、トラスツマブが高濃度で検出され、トランスフェリン受容体の発現レベルが高い骨髄では、hTfR親和性ペプチドトラスツズマブ5が高濃度で検出された。カニクイザルサルに静脈内投与したhTfR親和性ペプチドトラスツズマブ5は、肝臓、腎臓、心臓、肺、骨髄、脾臓、精巣、及び前立腺を含む多くの臓器に到達することを示すものである。

[0163] [実施例14] hTfR親和性ペプチド-hIDS発現ベクターの作製

pD2535nt-HDP_v2 (HORIZON Discovery社) をPacIとPmeIで消化した。配列番号58で示されるアミノ酸配列を有するhIDSのN末端に、配列番号59で示されるアミノ酸配列を有するペプチドリinkerを介して配列番号55で示されるアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド6が結合した、配列番号60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61で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にPacIサイト、3'側にPmeIサイトを有するDNA断片を人工的に合成した。これをPacIとPmeIで消化し、pD2535nt-HDP_v2のPacIサイトとPmeIサイトの間に組み込んだ。得られたベクターをVHH6-GS3-hIDS発現ベクターとした。また、この発現ベクターがコードする配列番号60で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質を、VHH6-GS3-hIDSとした。

[0164] pD2535nt-HDP_v2 (HORIZON Discovery社) をPacIとPmeIで消化した。配列番号58で示されるアミノ酸配列を有するhIDSのN末端に、配列番号59で示されるアミノ酸配列を有するペプチドリinkerを介して、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド5が結合した、配列番号62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63で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にPacIサイト、3'側にPmeIサイトを有す

るDNA断片を人工的に合成した。これをPacIとPmeIで消化し、pD2535nt-HDP_v2のPacIサイトとPmeIサイトの間に組み込んだ。得られたベクターをVHH5-GS3-hIDS発現ベクターとした。また、この発現ベクターがコードする配列番号62で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質を、VHH5-GS3-hIDSとした。

- [0165] pD2535nt-HDP_v2 (HORIZON Discovery社) をPacIとPmeIで消化した。配列番号58で示されるアミノ酸配列を有するhIDSのN末端に、配列番号59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7で示されるアミノ酸配列を有するhTFR親和性ペプチド5が結合し、更にこのhTFR親和性ペプチド5のN末端に、GS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5が結合した配列番号64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65で示される塩基配列を有する遺伝子の、5'側にPacIサイト、3'側にPmeIサイトを有するDNA断片を人工的に合成した。これをPacIとPmeIで消化し、pD2535nt-HDP_v2のPacIサイトとPmeIサイトの間に組み込んだ。得られたベクターをVHH5-Tandem-GS3-hIDS発現ベクターとした。また、この発現ベクターがコードする配列番号64で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質を、VHH5-Tandem-GS3-hIDSとした。

- [0166] [実施例15] hTFR親和性ペプチド-hIDSの作製

実施例14で作製したVHH5-GS3-hIDS発現ベクターを、グルタミンシンテターゼ (GS) ノックアウトCHO発現プラットフォーム (HORIZON Discovery社) を使用して、添付のプロトコールに従いGSノックアウトCHO細胞 (HD-BIOP3細胞) に導入して形質転換させ、VHH5-GS3-hIDSをHD-BIOP3細胞内で発現させた。pD2535nt-HDP_v2には、選択マーカーとしてGS遺伝子が組み込まれており、HD-BIOP3細胞に遺伝子導入し、グルタミン不含培地でのセレクションが可能である。また、低濃度 ($\sim 50 \mu\text{mol/L}$) のMSXを含有する培地を使用することでより高い選択圧を細胞に与えることも可能である。細胞の形質転換は概ね以下の方法で行った。濃度が 1×10^6 個/mLとなるようにHD-BIOP3細胞を15 mLの4 mMとなるようにL-グルタミンを添加したDynamis培地 (ThermoFisher社) に懸濁し、これを150 mL容の三角フラスコに移した。37.5 μL のFreeStyle MAX R

eagent (ThermoFisher社)を600 μ Lの0ptoPro SFM(ThermoFisher社)に混合した溶液と、37.5 μ gのVHH5-GS3-hIDS発現ベクターを600 μ Lの0ptoPro SFMに溶解した溶液を混合し、これを細胞懸濁液に全量添加した。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2日間培養した後、25 μ M、または35 μ MとなるようにMSXを含有したDynamis培地で選択培養した。選択培養によって得られたHD-BIOP3細胞は、VHH5-GS3-hIDSを発現し、これを培養液中に分泌する。この細胞を、濃度が 3×10^5 個/mLとなるように200 mLのDynamis培地に懸濁し、これを1000 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7日間培養し、VHH5-GS3-hIDSを発現させた。培養開始から3日目と5日目には、10 mLのEfficientFeed™ C+ 2X Supplement (ThermoFisher社)を添加した。培養後、培養液を遠心(3000 g, 5分間)して得た上澄みを、0.22 μ m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。

[0167] 1mLのMabSelect Xtra (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、50 mM 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、VHH5-GS3-hIDS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VHH5-GS3-hIDSを溶出させた。VHH5-GS3-hIDS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。次いで、Ultracel-30 regenerated cellulose membrane (孔径: 30 kDa, Merck社)を用いて限外ろ過し、液量が約1 mLとなるまで濃縮した。

[0168] 上記の濃縮液を、カラム体積の1.5倍容の300 mM NaClを含有する20 mM Tris緩衝液(pH 7.4)で平衡化した、サイズ排除カラムであるSuperdex 200 increase 10/300 GLカラム(カラム体積:24 mL, ベッド高:30 cm, Cytiva社)に、0.5 mL/分の一定流速で負荷し、更に、同緩衝液を同じ流速で供給した。このとき、サイズ排除カラムからの溶出液の流路に、溶出液の吸光度を連続的に測定するための吸光光度計を配置して、280 nmの吸光度をモニターし、280 n

mで吸収ピークを示した画分を、VHH5-GS3-hIDSを含む画分として回収した。

次いで、Ultracel-30 regenerated cellulose membraneを用いて50 mM NaClを含有する20 mM Tris緩衝液(pH 7.4)にバッファー交換し、得られた濃縮液をVHH5-GS3-hIDS精製品とした。

[0169] VHH6-GS3-hIDSについても、VHH5-GS3-hIDSと同様の方法により、VHH6-GS3-hIDS発現ベクターを導入したHD-BIOP3細胞を培養して得られた培養上清から、VHH6-GS3-hIDS精製品を得た。また、VHH5-Tandem-GS3-hIDSについても、VHH5-GS3-hIDSと同様の方法により、VHH5-Tandem-GS3-hIDS発現ベクターを導入したHD-BIOP3細胞を培養して得られた培養上清から、VHH5-Tandem-GS3-hIDS精製品を得た。また、VHH5-GS3-hIDS、VHH6-GS3-hIDS、VHH5-Tandem-GS3-hIDSの3種の蛋白質を総称してhTfR親和性ペプチド-hIDSとした。

[0170] [実施例 16] hTfR親和性ペプチド-hIDSのヒトTfR及びサルTfRに対する結合活性の評価

CHO細胞を用いて常法により取得したVHH5-GS3-hIDS、VHH6-GS3-hIDS、及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSのタンパクについて、ヒトトランスフェリン受容体(hTfR)に対する結合活性を、ELISA法で測定した。ELISA法は概ね以下の方法で実施した。96ウェルマイクロタイタープレート(Nunc社)の各ウェルに、配列番号1で示されるアミノ酸配列中N末端から89番目までのアミノ酸配列からなる、hTfRの細胞外領域を含む組換えhTfRを10 µg/mLとなるよう0.05M 重炭酸水素塩緩衝液(pH 9.6)で希釈したものを100 µLずつ加え、室温で少なくとも1時間静置して抗体をプレートに吸着させた。次いで、1% BSA及び0.05% Tween20を含むTBSを各ウェルに300 µLずつ加えてプレートを室温で1時間静置した。各ウェルを0.05% Tween20を含むTBS(TBS-T)で3回洗浄した後、0.1% BSA及び0.05% Tween20を含むTBSを用いてVHH5-GS3-hIDSを100, 33.33, 11.11, 3.71, 1.24, 0.41, 0.14 nM, VHH6-GS3-hIDSを333, 111, 37, 12.33, 4.11, 1.37, 0.46, 及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSを1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012, 0.041, 0.014 nMに希釈し、各ウェルに100 µLずつ加え、プレートを室温で少なくとも1時間静置した。プレートをTBS-Tで3回洗浄した後、0.1% BSA及

び0.05% Tween20を含むTBSで0.5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した抗hIDSモノクローナル抗体を、各ウェルに100 μL ずつ加え、プレート室温で少なくとも1時間静置した。TBS-Tで3回洗浄した後、0.1% BSA及び0.05% Tween20を含むTBSで50 ng/mLに希釈したHRP標識抗マウスIgGポリクローナル抗体（Bethyl社）溶液を各ウェルに100 μL ずつ加え、プレート室温で少なくとも1時間静置した。TBS-Tで各ウェルを3回洗浄後、各ウェルに50 μL の発色用基質液TMB Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase（プロメガ社）を添加し、室温で5～10分間静置した。次いで、各ウェルに100 μL の停止液（1N 塩酸）を添加した後、プレートリーダー（MOLECULAR DEVICES社）を用いて各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定した。得られた測定値より EC_{50} を算出した。その結果、VHH5-GS3-hIDS、VHH6-GS3-hIDS、及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSの EC_{50} はそれぞれ1.087、22.67及び0.077 nMであった。これらの結果は、これら3種類のhTfR親和性ペプチド-hIDSが、どれもhTfRに対し比較的高い親和性を有することを示すものである。

[0171] 〔実施例17〕IDS-KO/hTfR-KIマウスの作製

IDS-KO/hTfR-KIマウスは、イズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）遺伝子をヘミで欠損し且つキメラTfR遺伝子をヘテロで有するマウスである。IDS-KO/hTfR-KIマウスは概ね下記の方法で作製した。細胞内領域がマウスTfRのアミノ酸配列であり、細胞外領域がヒトTfRのアミノ酸配列であるキメラTfR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DNA断片を化学的に合成した。このDNA断片を、5'アーム配列及び3'アーム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、これをエレクトロポレーション法によりマウスES細胞に導入した。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細胞を選択した。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）に移植した。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した。このキメラマウス個体をICRマウスと掛け合わせてF1マウスを得た。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hTfR遺伝子がキメラTfRに置き換わっているマウスをhTfR-KIマウスとした。このマウスを元にして、IDS遺伝子をヘミで欠損し且つキメラTfR遺伝子をヘテロで有するマウス（IDS-K0/hTfR-KIマウス）を作製した。なお、IDS-K0/hTfR-KIマウスの作製は、特許文献（WO 2016/208695）に記載の手法に準じて行った。

[0172] 〔実施例 17〕 IDS-K0/hTfR-KIマウスを用いた各タンパク質の薬効評価

hIDS活性を遺伝的に欠失しているハンター症候群の患者の臓器に蓄積することが知られているヘパラン硫酸（HS）の濃度を測定することにより、hTfR親和性ペプチド-hIDSの薬効を評価した。以下に、その方法を詳述する。

[0173] 実施例 15 で得られたVHH5-GS3-hIDS、VHH6-GS3-hIDS、及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSの3種の蛋白質の精製品を生理食塩水で希釈して、それぞれの蛋白質を0.4 mg/mLの濃度で含む溶液をそれぞれ作製した。

[0174] 50週齢のIDS-K0/hTfR KIマウスに、希釈したVHH5-GS3-hIDS、VHH6-GS3-hIDS、及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSを、2 mg/kgの用量で、1週間に1回の頻度で、尾静脈注射により計3回投与した。また、野生型コントロールとしてIDS遺伝子が野生型のマウスを、病態コントロールとしてヘミでIDS-K0であるマウスを用いた。これらのコントロールマウスには、1週間に1回の頻度で、生理食塩水を計3回投与した。各群に投与する液量は、ほぼ同容量となるように調整した。なお、このとき用いたマウスの遺伝子型は表 10 に示すとおりである。また、各群のマウスの個体数も表 10 に示すとおりである。

[0175] [表9]

（表 9） hTfR親和性ペプチド-hIDSの薬効評価に用いたマウスの遺伝型、及びhTfR親和性ペプチド-hIDSの用法用量

群	遺伝子型 (hTfR/ids)	投与薬剤	用量 (mg/kg)	投与液量 (mL/kg)	投与スケジュール	投与経路	個体数
野生型コントロール	Hetero/WT	生理食塩水	-	5	1週間に1回 (計3回)	静脈注射	3
病態コントロール		生理食塩水	-				3
VHH6-GS3-hIDS投与		VHH6-GS3-hIDS投与	2				5
VHH5-GS3-hIDS投与		VHH5-GS3-hIDS	2				5
VHH5-tandem-GS3-hIDS投与		VHH5-tandem-GS3-hIDS	2				2

[0176] 3回目投与から1週間後にベトルファール (Meiji Seikaファルマ社) ・ミダゾラム (サンド社) ・ドミトール (日本全薬工業社) の3剤混合麻酔下, マウスの各個体の大槽よりCSFを採取した。CSF採取後, マウスを放血致死により安楽死させた。次いで, マウスの脳を摘出し, 急速凍結した。

[0177] [実施例 18] 脳組織及びCSF中のヘパラン硫酸の定量

脳中のヘパラン硫酸 (HS) の定量は概ね下記の方法で実施した。なお, ヘパラン硫酸は, hIDSの基質である。

[0178] 試験に用いる (a) ~ (f) の溶液を以下の手順で調製した。

(a) MeCN/water :

2 mLの注射用水 (大塚製薬工業社) と18 mLのアセトニトリル (富士フィルム和光純薬社) を混合し, これをMeCN/waterとした。

(b) 重水素ラベル化溶媒 :

氷浴下で, 1.5 mLのメタノール- d_4 (Sigma-Aldrich社) に240 μ Lのアセチルクロリド (Sigma-Aldrich社) を滴下し, これを重水素ラベル化溶媒とした。

(c) 移動相A :

475 mLの注射用水と, 25 mLの1 Mギ酸アンモニウム水溶液 (富士フィルム和光純薬社) を混合したものを移動相Aとした。

(d) 移動相B :

アセトニトリルと移動相Aを93:7 (v/v) で混合したものを移動相Bとした。

(e) ヘパラン硫酸標準原液 (HS標準原液) :

Heparan sulphate (Iduron社) を注射用水で溶解し, 5.0 mg/mLの溶液を調製した。この溶液をHS標準原液とした。

(f) ヘパラン硫酸内部標準溶液 (HS内部標準溶液) :

ホウケイ酸ねじ口試験管に40 μ LのHS標準原液を計り取り, 溶媒を窒素気流下で留去した。乾固物に400 μ Lの重水素ラベル化溶媒を添加し, 攪拌した後, 65°Cで75分間反応させて, 重水素化メタノール分解 (deuterium methanolysis reaction; メタノリシス) を行った。反応後, 溶媒を窒素気流下で留去した。乾固物に500 μ LのMeCN/waterを添加し, 超音波処理を30分間行った。

。この溶液をヘパラン硫酸内部標準溶液（HS内部標準溶液）とした。

（i）内標準溶液：

1 mLのメタノールに、1 μ LのHS内部標準溶液を添加して攪拌後、超音波処理を30分間行った。この溶液を内標準溶液とした。

（j）検量線試料：

980 μ Lの注射用水を計り取り、これにHS標準原液を10 μ Lずつ添加し、ヘパラン硫酸を50 μ g/mL含有する溶液を調製した。この溶液を注射用水で希釈し、ヘパラン硫酸を5000 ng/mL含有する溶液を調製した。この溶液を注射用水で段階希釈し、ヘパラン硫酸を25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500及び5000 ng/mLの濃度で含有する溶液を調製した。これを20 μ L計り取り、それぞれハウケイ酸ねじ口試験管に分取した。この溶液を検量線試料とした。

（k）組織抽出用溶液

1 mLのポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテルを生理食塩液に添加し、全量を500 mLとした。この溶液を組織抽出用溶液とした。

（l）10%炭酸アンモニウム溶液

5 gの炭酸アンモニウムを50 mLの注射用水に溶解した。この溶液を10%炭酸アンモニウム溶液とした。

[0179] 実施例17で採取したCSFを20 μ L計り取り、ハウケイ酸ねじ口試験管に分取した。これをCSFサンプル溶液とした。

[0180] 実施例17で摘出した脳組織を凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。凍結乾燥した組織を、組織抽出用溶液中で破碎したのち、上清を遠心分離した。これを20 μ L計り取り、ハウケイ酸ねじ口試験管に分取した。これをサンプル溶液とした。

[0181] 調製した各サンプル溶液及び検量線試料中の溶媒を窒素気流下で留去した。乾固物に、2, 2-ジメトキシプロパン（東京化成工業社）20 μ Lと、塩酸の濃度が3 mol/Lである塩酸メタノール（Sigma-Aldrich社）200 μ Lとを添加して攪拌した後、反応温度70℃、反応時間90分間でメタノリシス反応を行った。反応後、氷冷して反応を停止し、200 μ Lの10%炭酸アンモニウム溶液及び5

0 μL の内標準溶液を添加した。溶媒を窒素気流下で留去した後、乾固物に250 μL の注射用水を添加した。これを、予めメタノール及び注射用水を通液してコンディショニングした固相カートリッジ (OASIS HLB (1 cc, 30 mg, Waters社)) に負荷し、注射用水で洗浄した後、メタノール500 μL を添加し、遠心分離で溶出した。窒素気流下で溶媒を留去した後、注射用水2 mL及びアセトニトリル18 mLを添加し、超音波処理にて再溶解した。これを遠心分離した後、上清をLCバイアルに充填した。

[0182] LC/MS/MS分析は、親水性相互作用超高性能液体クロマトグラフィーとタンデム四重極型質量分析装置とを組み合わせたものを用いて実施した。質量分析装置 (MS/MS装置) として、QTRAP5500 (エー・ビー・サイエックス社) を用い、これにHPLC装置として、Nexera X2 (島津製作所) をセットした。また、LCカラムとして、Acquity UPLC™ BEH Amide 1.7 μm (2.1 X 150 mm, Waters社)を用いた。移動相として、移動相A及び移動相Bを用いた。また、カラム温度は60°Cに設定した。

[0183] 移動相Bでカラムを平衡化した後、5 μL の試料を注入し、表11に示す移動相のグラジエント条件で、クロマトグラフィーを実施した。なお、移動相の流量は0.4 mL/分とした。

[0184]

[表10]

(表10)液体クロマトグラフィーの条件

試料注入後の経過時間 (分)	移動相A (% (v/v))	移動相B (% (v/v))
0	0	100
5.00	0	100
7.00	20	80
12.5	20	80
13.0	70	30
15.0	70	30
15.5	0	100
20.0	0	100

[0185] MS/MS装置のイオン源パラメーターを、QTRAP5500（エー・ピー・サイエックス社）の使用説明書に従って、表12に示すように設定した。

[0186] [表11]

(表11) MS/MS装置のイオン源の各種パラメーターの設定

Ion Source	ESI (Turbo Spray)
Polarity	Positive
Scan type	MRM
IonSpray voltage	5500 V
Heater gas temperature	425° C
Curtain gas (CUR)	30.00
Collision gas (CAD)	8.00
Ion Source Gas 1 (GS1)	70.00
Ion Source Gas 2 (GS2)	70.00
Entrance Potential	10.00
Duration	15.00 min

[0187] 表13にMS内部パラメーターを示す。

[0188] [表12]

(表 1 2) MS内部パラメーター

	Precursor ion (m/z) Q1	Product ion (m/z) Q3	Time (msec)	DP (volts)	collision energy (volts)	CXP (volts)
HS由来物質	384.100	162.100	100.00	45.00	21.00	15.00
HS内部標準物質	390.200	162.100	100.00	45.00	21.00	15.00
DS由来物質	426.100	236.100	100.00	45.00	12.00	17.00
DS内部標準物質	432.200	239.200	100.00	45.00	12.00	17.00

[0189] 各検量線試料についてLC/MS/MS分析を行い、検量線試料中のヘパラン硫酸に由来するプロダクトイオンに対応するクロマトグラムチャート上のピークの面積（HS検出ピーク面積）を求めた。また、HS内部標準溶液に由来するプロダクトイオンに対応する検出ピークの面積（HS-IS検出ピーク面積）を求めた。

[0190] 各検量線試料における、HS内部標準溶液に由来する検出ピーク面積に対するヘパラン硫酸に由来する検出ピークの面積（HS検出ピーク面積／HS-IS検出ピーク面積）を縦軸に、各検量線試料のヘパラン硫酸濃度を横軸にとり、二次判別分析を用いて回帰式を得た。

[0191] 脳組織サンプル溶液についてLC/MS/MS分析を行い、サンプル溶液中に含まれるヘパラン硫酸を回帰式に内挿して定量した。

[0192] 図5にCSFに含まれるHSの測定結果を示す。VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS, 及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSを投与した群は、何れにおいてもCSFに含まれるHSの濃度が病態コントロールと比較して減少しており、これらの何れもが、BBBを通過して中枢神経系に到達し、そこに蓄積したHSを分解したことが分かる。VHH5-Tandem-GS3-hIDSでは、CSFに含まれるHSの濃度が病態コントロールと比較して40%弱となっていることから、hTfR親和性ペプチドを直列に2個つなげることが、融合蛋白質をBBBを通過させるうえで有効な手段であることが分かる。

[0193] 図6に脳組織に含まれるHSの測定結果を示す。VHH5-GS3-hIDS, VHH6-GS3-hIDS, 及びVHH5-Tandem-GS3-hIDSを投与した群は、何れにおいても脳組織に含まれるHSの濃度が病態コントロールと比較して減少しており、これらの何れ

もが、BBBを通過して脳組織内に到達し、そこに蓄積したHSを分解したことが分かる。VHH5-Tandem-GS3-hIDSでは、脳組織に含まれるHSの濃度が病態コントロールと比較してほぼ半減していることから、hTfR親和性ペプチドを直列に2個つなげることが、融合蛋白質をBBBを通過させるうえで有効な手段であることが分かる。また、これらの結果から、hTfR親和性ペプチドと融合させたhIDSが、これをハンター症候群の患者に静脈注射することにより、BBBを通過して患者の中枢神経系に到達し、そこに蓄積したHSを分解して薬効を発揮できることが予測できる。

[0194] 〔実施例 18〕 hTfR親和性ペプチド-hSGSH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5で示されるアミノ酸配列を有するhTfR親和性ペプチド3のC末端に、配列番号59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66で示されるヘパランN-スルファターゼ(hSGSH)のN末端に、DYKDDDDKタグが付加したものが結合した、配列番号67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68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、VHH3-GS3-hSGSHの発現ベクターを作製した。この発現ベクターをpCI-neo-VHH3-GS3-hSGSHと命名した。

[0195] 〔実施例 19〕 hTfR親和性ペプチド-hSGSHの作製

実施例18で作製したpCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH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3とhSGSHが結合した蛋白質(VHH3-GS3-hSGSH)をCHO-S細胞内で発現させた。この細胞は、VHH3-GS3-hSGSHを発現し、これを培養液中に分泌する。ここで、pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSHが導入されたCHO-S細胞を、pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH発現細胞とした。なお、hTfR親和性ペプチドとhSGSHとの融合蛋白質はhTfR親和性ペプチド-hSGSHというものと

する。

[0196] pCI-neo-VHH3-GS3-hSGSH発現細胞を、ExpiCHO Expression Systemに添付の
プロトコールに従い培養した。具体的には、濃度が 6×10^6 個/mLとなるように
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の攪拌速度で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の攪拌速度で更に9日間培養
した。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、これを培養上清として回収した。

[0197] 1mLの抗FLAG M1抗体-アガロース結合アフィニティーゲル（MERCK社）を充
填したオープンカラムを、カラム体積の5倍容の、150 mM NaCl, 1mM CaCl₂を
含有する50 mM Tris緩衝液（pH7.5）を通液して平衡化した。また、培養上清
は1 M CaCl₂を1/1000加えることで、1 mM CaCl₂となるように調製した。次い
で培養上清をカラムに負荷し、VHH3-GS3-hSGSHを樹脂に結合させた。カラム
体積の5倍容の、150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂を含有する50 mM Tris緩衝液（pH7.
5）を通液してカラムを洗浄した後、150 mM NaCl, 2mM EDTAを含有する50 mM
Tris緩衝液（pH7.5）を通液してVHH3-GS3-hSGSHを溶出させた。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7.5 mg/mL スク
ロース, 0.8 mg/mL NaClを含有する20mM リン酸緩衝液に置換した。得られた
溶液をVHH3-GS3-hSGSHの精製品として以下の実験に用いた。

[0198] 〔実施例20〕 hTfR親和性ペプチド-hSGSHのヒトTfR及びサルTfR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19で作製したVHH-GS3-hSGSHのhT
fR及びサルTfRに対する親和性を調べた。表13にVHH3-GS3-hSGSHの、hTfR及
びサルTfR（カニクイザルTfR）に対する会合速度定数（kon）及び解離速度定
数（koff）の測定結果、及び解離定数（K_D）を示す。なお、カニクイザルのTf
Rとしては、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。

[0199] [表13]

(表 1 3) hTfR親和性ペプチド-hSGSHのヒトTfR及びサルTfRに対する結合活性

	動物種	kon (1/Ms)	koff (1/s)	K _D (M)
VHH3-GS3-hSGSH	カニクイザル	4.17×10^5	4.81×10^{-7}	1.16×10^{-12}
	ヒト	4.23×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$	$<1.0 \times 10^{-12}$

[0200] [実施例 2 1] hTfR親和性ペプチド-hSGSHの薬効評価

hSGSH活性を遺伝的に欠失しているサンフィリップ症候群Aの患者の臓器に蓄積することが知られているヘパラン硫酸 (HS) の濃度を測定することにより、hTfR親和性ペプチド-hSGSHの薬効を評価した。以下に、その方法を詳述する。

[0201] 実施例 1 7 に記載の方法で作製したhTfR-KIマウスをサンフィリップ症候群AのモデルマウスであるSGSH遺伝子ノックアウトマウス (SGSH-K0マウス) と掛け合わせ、SGSH-K0/hTfR KIマウスを得た。

[0202] 実施例 2 1 で得られたVHH3-GS3-hSGSHを生理食塩水で希釈して、それぞれの蛋白質を0.4 mg/mLの濃度で含む溶液をそれぞれ作製した。

[0203] 16~19週齢のSGSH-K0/hTfR KIマウスに、希釈したVHH3-GS3-hSGSHを、2 mg/kgの用量で、1週間に一回の頻度で、尾静脈注射により計4回投与した。また、野生型コントロールとしてSGSH遺伝子が野生型のマウスを、病態コントロールとしてホモでSGSH-K0であるマウスを用いた。これらのコントロールマウスには、1週間に一回の頻度で、生理食塩水を計4回投与した。各群に投与する液量は、ほぼ同容量となるように調整した。なお、このとき用いたSGSH-K0/hTfR KIマウスの遺伝子型は表 1 2 に示すとおりである。また、各群のマウスの個体数も表 1 4 に示すとおりである。

[0204] [表14]

(表 1 4) hTfR親和性ペプチド-hSGSHの薬効評価に用いたマウスの遺伝型、及びhTfR親和性ペプチド-hSGSHの用法用量

群	遺伝子型 (hTfR/sgsh)	投与薬剤	用量 (mg/kg)	投与液量 (mL/kg)	投与スケジュール	投与経路	個体数
野生型コントロール	WT/WT	生理食塩水	-	5	1週間に1回 (計4回)	静脈注射	3
病態コントロール	Hemi/KO	生理食塩水	-				3
VHH3-GS3-hSGSH投与		VHH3-GS3-hSGSH	2				3

- [0205] 4回目投与から1週間後にベトルファール（Meiji Seikaファルマ社）・ミダゾラム（サンド社）・ドミトール（日本全薬工業社）の3剤混合麻酔下、マウスの各個体の大槽よりCSFを採取した。CSF採取後、マウスを放血致死により安楽死させた。次いで、マウスの脳を摘出し、急速凍結した。CSF及び脳組織中に含まれるHSの量を、実施例18に記載の方法により測定した。
- [0206] 図7に脳組織及びCSFに含まれるHSの測定結果を示す。VHH3-GS3-hSGSHを投与した群では、脳組織に含まれるHSの濃度が病態コントロールと比較して約37%減少しており、VHH3-GS3-hSGSHが、BBBを通過して中枢神経系に到達し、そこに蓄積したHSを分解したことが分かる（図7（a））。また、VHH3-GS3-hSGSHを投与した群では、CSFに含まれるHSの濃度が病態コントロールと比較して約13%減少しており、VHH3-GS3-hSGSHが、BBBを通過して中枢神経系に到達し、やはり、そこに蓄積したHSを分解したことが分かる（図7（b））。これらの結果から、hTfR親和性ペプチドと融合させたhSGSHが、これをサンフィリップ症候群Aの患者に静脈注射することにより、BBBを通過して患者の中枢神経系に到達し、そこに蓄積したHSを分解して薬効を発揮できることが予測できる。

産業上の利用可能性

- [0207] 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

- [0208] 1 血管
2 脳実質

配列表フリーテキスト

- [0209] 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：hTfR親和性ペプチド1のアミノ酸配列
配列番号4：hTfR親和性ペプチド2のアミノ酸配列

配列番号 5 : hTfR親和性ペプチド3のアミノ酸配列
配列番号 6 : hTfR親和性ペプチド4のアミノ酸配列
配列番号 7 : hTfR親和性ペプチド5のアミノ酸配列
配列番号 8 : hTfR親和性ペプチド1のCDR1のアミノ酸配列1
配列番号 9 : hTfR親和性ペプチド1のCDR1のアミノ酸配列2
配列番号 10 : hTfR親和性ペプチド1のCDR2のアミノ酸配列1
配列番号 11 : hTfR親和性ペプチド1のCDR2のアミノ酸配列2
配列番号 12 : hTfR親和性ペプチド1のCDR3のアミノ酸配列1
配列番号 13 : hTfR親和性ペプチド1のCDR3のアミノ酸配列2
配列番号 14 : hTfR親和性ペプチド2のCDR1のアミノ酸配列1
配列番号 15 : hTfR親和性ペプチド2のCDR1のアミノ酸配列2
配列番号 16 : hTfR親和性ペプチド2のCDR2のアミノ酸配列1
配列番号 17 : hTfR親和性ペプチド2のCDR2のアミノ酸配列2
配列番号 18 : hTfR親和性ペプチド2のCDR3のアミノ酸配列1
配列番号 19 : hTfR親和性ペプチド2のCDR3のアミノ酸配列2
配列番号 20 : hTfR親和性ペプチド3のCDR1のアミノ酸配列1
配列番号 21 : hTfR親和性ペプチド3のCDR1のアミノ酸配列2
配列番号 22 : hTfR親和性ペプチド3のCDR2のアミノ酸配列1
配列番号 23 : hTfR親和性ペプチド3のCDR2のアミノ酸配列2
配列番号 24 : hTfR親和性ペプチド3のCDR3のアミノ酸配列1
配列番号 25 : hTfR親和性ペプチド3のCDR3のアミノ酸配列2
配列番号 26 : hTfR親和性ペプチド4のCDR1のアミノ酸配列1
配列番号 27 : hTfR親和性ペプチド4のCDR1のアミノ酸配列2
配列番号 28 : hTfR親和性ペプチド4のCDR2のアミノ酸配列1
配列番号 29 : hTfR親和性ペプチド4のCDR2のアミノ酸配列2
配列番号 30 : hTfR親和性ペプチド4のCDR3のアミノ酸配列1
配列番号 31 : hTfR親和性ペプチド4のCDR3のアミノ酸配列2
配列番号 32 : ペプチドリンカー1のアミノ酸配列

配列番号 33 : ペプチドリンカー2のアミノ酸配列

配列番号 34 : ペプチドリンカー3のアミノ酸配列

配列番号 35 : ペプチドリンカー4のアミノ酸配列

配列番号 36 : ペプチドリンカー5のアミノ酸配列

配列番号 37 : ヒトIgGのFc領域のアミノ酸配列の一例

配列番号 38 : ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列

配列番号 39 : 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 40 : トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列

配列番号 41 : トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列

配列番号 42 : 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 43 : 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 44 : 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 45 : hTfR親和性ペプチド4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 46 : 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 47 : 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 48 : 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 49 : プライマー hTfR5' の塩基配列, 合成配列

配列番号 50 : プライマー hTfR3' の塩基配列, 合成配列

配列番号 51 : 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 52 : 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

列

配列番号 53 : 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 54 : ペプチドタグ

配列番号 55 : hTfR 親和性ペプチド 6 のアミノ酸配列

配列番号 56 : hTfR 親和性ペプチド 6 の CDR2 のアミノ酸配列 1

配列番号 57 : hTfR 親和性ペプチド 6 の CDR2 のアミノ酸配列 2

配列番号 58 : ペプチドリンカー 6 のアミノ酸配列

配列番号 59 : ヒト I2S のアミノ酸配列

配列番号 60 : VHH6-GS3-hI2S のアミノ酸配列

配列番号 61 : VHH6-GS3-hI2S の塩基配列

配列番号 62 : VHH5-GS3-hI2S のアミノ酸配列

配列番号 63 : VHH5-GS3-hI2S の塩基配列

配列番号 64 : VHH5-Tandem-GS3-hI2S のアミノ酸配列

配列番号 65 : VHH5-Tandem-GS3-hI2S の塩基配列

配列番号 66 : ヒト SGSH のアミノ酸配列

配列番号 67 : VHH3-GS3-hSGSH のアミノ酸配列

配列番号 68 : VHH3-GS3-hSGSH の塩基配列

配列番号 69 : ペプチドリンカー 7 のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1]

以下の（１）～（５）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８又は配列番号９のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号１０又は配列番号１１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又は配列番号１３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１４又は配列番号１５のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号１６又は配列番号１７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又は配列番号１９のアミノ酸配列であるもの，

（３）ＣＤＲ１のアミノ酸配列が配列番号２０又は配列番号２１のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号２２又は配列番号２３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２４又は配列番号２５のアミノ酸配列であるもの，

（４）ＣＤＲ１のアミノ酸配列が配列番号２６又は配列番号２７のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号２８又は配列番号２９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３０又は配列番号３１のアミノ酸配列であるもの，

（５）ＣＤＲ１のアミノ酸配列が配列番号２０又は配列番号２１のアミノ酸配列であり，ＣＤＲ２のアミノ酸配列が配列番号５６又は配列番号５７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２４又は配列番号２５のアミノ酸配列であるもの。

[請求項2]

以下の（１）～（６）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３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(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、

(3) 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(3)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、

(4) 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(4)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、

(5) 配列番号7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(3)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

(6) 配列番号55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(5)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)～(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3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8又は配列番号9のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号10又は配列番号11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又は配列番号13のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(2) 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14又は配列番号15のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号16又は配列番号17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又は配列番号19のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(3) 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20又は配列番号21のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号22又は配列番号23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24又は配列番号25のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(4) 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26又は配列番号27のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号28又は配列番号29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30又は配列番号31のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(5) 配列番号7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20又は配列番号21のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号22又は配列番号23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24又は配列番号25のアミノ酸配列である，アミノ酸配列，

(6) 配列番号55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20又は配列番号21のアミノ酸配列であり，CDR2のアミノ酸配列が配列番号55又は配列番号56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24又は配列番号25のアミノ酸配列である，アミノ酸配列。

[請求項7] 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5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] 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5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の細胞外領域との解離定数が何れも $5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$ 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 $8 \times 10^{-9} \sim 2 \times 10^{-8}$ 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，0.

5～2. 5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，0.7～1.2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，重鎖抗体可変領域ペプチド；
(1) 請求項1～13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1～13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1～13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を結合させるリンカーが1～50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] 該ヒトトランスフェリン受容体親和性ペプチド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32，配列番号33，配列番号34，配列番号35，配列番号36，配列番号59，及び配列番号69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] 該重鎖抗体可変領域ペプチド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 32, 配列番号 33, 配列番号 34, 配列番号 59, 及び配列番号 69 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] 請求項 1~17 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-薬物複合体。

[請求項19] 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 18 に記載の複合体。

[請求項20] 請求項 1~17 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21] 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 20 に記載の融合蛋白質。

[請求項22] 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 20 に記載の融合蛋白質。

[請求項23] 該リンカーが 1~50 個のアミノ酸からなるペプチドリinkerである, 請求項 21 又は 22 に記載の融合蛋白質。

[請求項24] 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 32, 配列番号 33, 配列番号 34, 配列番号 35, 配列番号 36, 配列番号 59, 及び配列番号 69 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 23 に記載の融合蛋白質。

[請求項25] 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 32, 配列番号 33, 配列番号 3

4の各アミノ酸配列、配列番号59、及び配列番号69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23に記載の融合蛋白質。

[請求項26] 該他の蛋白質(A)が、ヒト由来のものである、請求項20～25の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項27] 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20～26の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項28] 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20～26の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項29] 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, アリルスルファターゼA, α -リーフコシダーゼ, 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20~26の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項30] 血清アルブミンが結合したものである, 請求項20~29の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項31] ヒトIgG Fc領域又はその一部が結合したものである, 請求項20~29の何れかに記載の融合蛋白質。

[請求項32] 請求項1~17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33] 請求項20~31の何れかに記載の融合蛋白質をコードする核酸。

[請求項34] 請求項32又は33に記載の核酸を組み込んでなる, 発現ベクター。
。

[請求項35] 請求項34に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

[請求項36] 該細胞が哺乳動物由来である, 請求項35に記載の細胞。