

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7684523号
(P7684523)

(45)発行日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(24)登録日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00	Z N A
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
請求項の数 10 (全55頁)				
(21)出願番号	特願2024-537440(P2024-537440)	(73)特許権者	501228071	
(86)(22)出願日	令和4年12月20日(2022.12.20)		エスアールアイ インターナショナル	
(65)公表番号	特表2025-501742(P2025-501742 A)		S R I I n t e r n a t i o n a l	
(43)公表日	令和7年1月23日(2025.1.23)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/082091		0 2 5 メンロパーク レイベンスウッド	
(87)国際公開番号	WO2023/122632		アベニュー 3 3 3	
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)		3 3 3 Ravenswood Aven	
審査請求日	令和6年8月20日(2024.8.20)		ue, Menlo Park, Cal	
(31)優先権主張番号	63/292,370		ifornia 9 4 0 2 5, U. S.	
(32)優先日	令和3年12月21日(2021.12.21)	(74)代理人	A.	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		100081961	
(31)優先権主張番号	63/412,220	(74)代理人	弁理士 木内 光春	
(32)優先日	令和4年9月30日(2022.9.30)		100112564	
最終頁に続く		(74)代理人	弁理士 大熊 考一	
			100163500	
		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 中枢神経系への細胞特異的輸送のための二重標的化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】
G F H N V Y P Y T W G G F S D I D L M A D E I (S E Q I D N O : 1) ; E Q R W V Q M L H L Q T R Y A G E W P G (S E Q I D N O : 2) ; 又は F Q H N P F P Y T Y S M E D T D V E I K (S E Q I D N O : 3) のアミノ酸配列を備えるペプチド。

【請求項 2】
前記ペプチドは、N末端保護基を有する、請求項 1 のペプチド。

【請求項 3】
前記N末端保護基は、アセチル基である、請求項 2 のペプチド。

【請求項 4】
前記ペプチドは、ポリマーリンカー又はケミカルリンカーをさらに備える、請求項 1 乃至 3 のペプチド。

【請求項 5】
前記ポリマーリンカー又はケミカルリンカーは、ポリエチレングリコール (P E G) リンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾシクロオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8 , 9 -ジヒドロ-1 H -ジベンゾ [1 , 2 , 3] トリアゾロ [4 , 4 5 - d] アゾシン、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 4 のペプチド。

【請求項 6】
前記 P E G リンカーは、P E G 1 2 又は P E G 1 4 である、請求項 5 のペプチド。

【請求項 7】

GFHNVPYPTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); 又は FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) のアミノ酸配列を備える分子誘導システム (MGS) ペプチドと、

前記 MGS ペプチドの C 末端に結合し得る少なくとも 1 つの反応性基及び部分と化学的に反応し得る少なくとも 1 つの追加の反応性基を備える第 1 のリンカーと、

第 2 のリンカーと、

前記 MGS ペプチドの C 末端に結合し得る少なくとも 1 つの反応性基及び他の部分と化学的に反応し得る少なくとも 1 つの追加の反応性基を備える第 3 のリンカーと、

DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又は SKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を備える前記 MGS ペプチドと、

を備え、

前記部分及び他の部分はカーゴを含む組成物。

【請求項 8】

GFHNVPYPTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); 又は FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) のアミノ酸配列を備える前記 MGS ペプチドの C' 末端は、前記第 1 のリンカーに結合する、請求項 7 の組成物。

【請求項 9】

前記第 1 のリンカーは、前記第 2 のリンカーに結合する、請求項 7 又は 8 の組成物。

【請求項 10】

前記カーゴは、色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、アミノ酸、ペプチド、脂質、抗体、放射性核種、炭水化物、ナノ粒子、又は、前記第 2 のリンカー又は他のリンカーを含むリンカー、を含む請求項 7 又は 8 の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2021 年 12 月 21 日に出願された米国仮特許出願第 63/292,370 号及び 2022 年 9 月 30 日に提出された米国仮特許出願第 63/412,220 号の利益を主張するものであり、これらの出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

2022 年 12 月 20 日に作成された「37794__0099P1.xml」という名称の ST. 26 ファイルとして提出され、2022 年 12 月 20 日に作成され、18251 バイトのサイズを有する配列リストは、連邦規則集第 37 編第 1.52 条 (e) (5) に従い、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

中枢神経系 (CNS) へのアクセスは、神経治療の開発におけるボトルネックである。これは、中枢神経系 (CNS) を保護する一連の特殊かつ高度に選択的な細胞障壁である血液脳関門 (BBB) に起因する。正常な生理学の下において必要ではあるが、BBB は神経治療薬等の多くの化学物質の脳への侵入を妨げている。その結果、低分子薬品のうち、BBB を通過するものは 5% 以下である。さらに、抗体や遺伝子治療等の新しい生物学的療法は、BBB が原因で中枢神経系から基本的に排除される。BBB は 100 年以上前に発見されたにも関わらず、CNS への輸送に関する一般的な解決策は生み出されていない。そのため、多くの中枢神経系疾患には治療の選択肢がない。

【0004】

現在、CNS への輸送についていくつかのアプローチが採用されている。アプローチの

10

20

30

40

50

1つは、BBB透過性化合物の使用である。BBB透過性化合物を使用することの問題点として、BBB透過性化合物は、（多くの場合に高脂溶性の傾向があるため）生体内分布特性が乏しく、オフターゲット効果を有する傾向がある。また、BBBを透過する低分子は5%未満であるため、BBB透過性化合物は少ない。BBB透過性薬剤の適応症も限られている。

【0005】

CNSにアクセスする別のアプローチは、脊髄や脳への直接注射である。この方法は侵襲的であり、周辺組織に構造的損傷を与える危険性があり、感染の危険性も増大する。

【0006】

また、別の方法として、BBBの破壊も用いられる。この方法は、化合物、細胞、及び病原体のCNSへの大量輸送を可能にする。この方法は、神経細胞の機能障害、及び構造的損傷を引き起こす可能性がある。

10

【0007】

また、経鼻投与も使用されている。この方法は親油性の低分子薬品に限られている。経鼻投与はCNSにわたる分布が乏しいことが示されている。さらに、経鼻投与は、投与量と患者の間で吸収が変動する。

【0008】

また、受容体介在輸送（トロイの木馬）法も採用されている。この方法は、しばしば単一のカーゴにしか有効でないため、汎用性に欠ける。受容体は複数の組織で発現するため、CNSへの取り込みが乏しく、毒性を引き起こす。さらに、受容体介在輸送は、一度BBBを通して輸送されると細胞特異性が無く、CNS全体にわたる分布は一定しない。

20

【0009】

血液脳脊髄液関門を越えてカーゴを輸送するための脈絡叢輸送剤又は代替方法は知られておらず、薬品及び高分子のCNSへの輸送に影響を与えるまたとない開発機会を提供する。従って、本明細書は、CNSを標的とする組成物及び方法を開示する。

【発明の概要】

【0010】

表1に示されるSEQ ID NO: 1～8の配列のいずれかのアミノ酸配列を備えるMGSペプチドが開示される。

【0011】

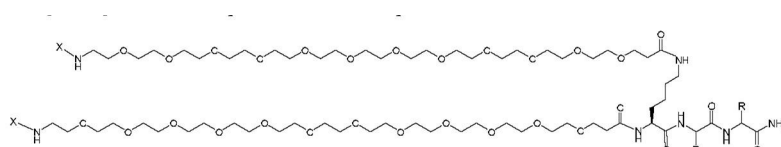
30

本明細書において、MTSペプチドが開示される。表2に示されるSEQ ID NO: 9～14の配列のいずれかのアミノ酸配列を備えるMTSペプチドが開示される。

【0012】

いくつかの形態において、リンカーは、

[式1]



40

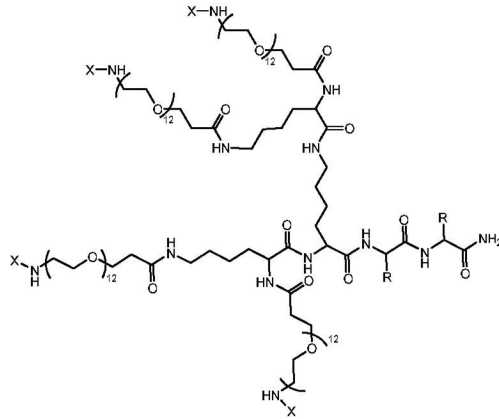
の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの形態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。いくつかの形態において、この構造は、2つのペプチドを繋ぐことができるため、二量体コアと呼ばれる。

【0013】

いくつかの形態において、リンカーは、

[式2]

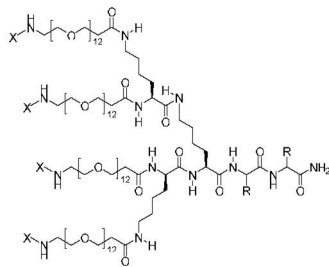
50



10

又は

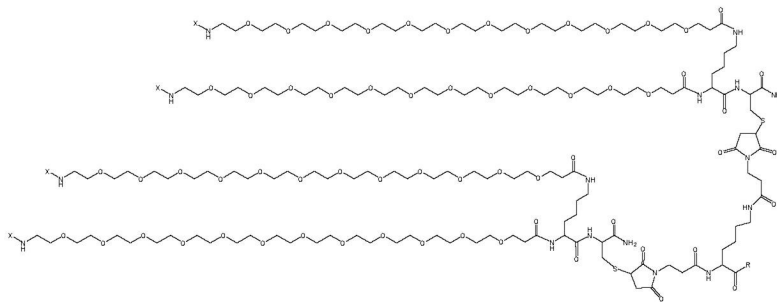
〔式 3〕



20

の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。いくつかの様態において、この構造は、4つのペプチドを繋ぐことができるため、四量体コアと呼ばれる。四量体コアの別の例は、

〔式 4〕



30

の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。

40

少なくとも1つのMTSペプチドに共役する少なくとも1つのMGSペプチドを備える組成物が開示され、MGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を備える。

〔0014〕

2つ以上のMTSペプチドに共役する2つ以上のMGSペプチドを備える組成物が開示され、2つ以上のMGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID

50

NO: 2) ; FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) ; 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を備える。

【0015】

2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドを備える組成物が開示され、4つのMGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1) ; EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2) ; FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) ; 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を備え、2つのMTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9) ; FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11) ; 又はSKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を備える。

10

【0016】

GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1) ; EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2) ; FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) のアミノ酸配列を備えるMGSペプチドと、(i) ペプチドのC末端に結合し得る少なくとも1つの反応性基及び(ii) 部分と化学的に反応し得る少なくとも1つの追加の反応性基を備える第1のリンカーと、第2のリンカーと、(i) ペプチドのC末端に結合し得る少なくとも1つの反応性基及び(ii) 部分と化学的に反応し得る少なくとも1つの追加の反応性基を備える第3のリンカーと、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9) ; FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11) ; 又はSKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を備えるMTSペプチドと、を備える組成物が開示される。

20

【0017】

本明細書に開示される組成物の1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを備える、対象のCNSへとカーゴを輸送する方法が開示され、カーゴに共役したペプチドはCNSに入る。

【0018】

本明細書に開示される組成物の1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを備える、対象のCNS障害又は傷害を治療する方法が開示され、カーゴは、CNS障害又は傷害の治療薬である

30

【0019】

本明細書に開示される組成物の1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを備える、対象のCNSを画像化する方法が開示され、カーゴは、画像化剤である。

【0020】

開示される方法及び組成物の追加の利点は、以下の説明において部分的に記載される、当該説明から部分的には説明から理解される、又は開示される方法及び組成物の実施により学習され得る。開示される方法及び組成物の利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘される要素及び組み合わせにより実現及び達成される。上記の一般的な説明及び下記の詳細な説明は、両方とも例示的及び説明的なものに過ぎず、請求される発明を限定するものではないことが理解される。

40

【0021】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、開示される方法及び組成物のいくつかの実施形態を図示し、明細書と共に、開示される方法及び組成物の原理を説明することに供される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、CH₃CO-YAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 8)、MGS₂-V₄の構造の例を示す。

【0023】

50

【図2】図2は、CH₃-CO-GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 5)、MGS__NOE3__V2の例を示す。

【0024】

【図3】図3A及び3Bは、二量体コア(A)リンカー及び四量体リンカー(B)を示し、Xは特にMGS又はMTSである任意のペプチドであり、Rは色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、炭水化物、その他のペプチド、脂質、又はその他の化学修飾等のカーゴの結合ポイントである。

【0025】

【図4】図4A乃至4Cは、MTSペプチドの構造の例を示し、図4Aは、MTS1__V2とも呼ばれるMTSペプチドAc-DAYKLQTSLDWQMWNPの例を示し、図4Bは、MTS2__V1とも呼ばれるMTSペプチドAc-FPSWTSKNQQTWNQRQの例を示し、図4Cは、MTS3__V1とも呼ばれるMTSペプチドAc-SKETYSMNAQRQHERSの例を示す。

【0026】

【図5】図5は、脂肪酸で修飾された二量体コアの構造の例を示し、得られたMTSペプチドはMTS3__V2-2と呼ばれ、この修飾は、MTS1及びMTS2についても同様に行うことができる。

【0027】

【図6】図6は、イン・ビボにおけるCNSへのMTS輸送を解決する実験的なワークフローの概略を示す。

【0028】

【図7】図7A及び7Bは、C16脂肪酸を備えるMTS3の脂質化がCSF(A)及び脳(B)への輸送を増加させることを示し、MTS3__V1-2は、二量体Ac-SKETYSMNAQRQHERS (SEQ ID NO: 14)であり、MTS3__V2-2は、Ac-SKETYSMNAQRQHERS (SEQ ID NO: 14)を有する二量体C16脂肪酸修飾コアであり、scMTS3__V2-2は、スクランブルMTS3配列(scMTS3: RKSAYNQHSSQMREET; SEQ ID NO: 15)を有する二量体C16脂肪酸修飾コアである。

【0029】

【図8】図8は、脳の切片化及び蛍光イメージングにより証明される、親MTS3__V1-2と比較して、MTS3__V2-2の脳蓄積が増加していることを示し、両方のバージョンは、同じ近赤外色素に共役し、循環時間は各パネル内に示され、強度のスケールバーは、比較のために全ての画像において一定に保たれて示される。

【0030】

【図9】図9A乃至9Cは、MGS2__V4-2がミクログリア細胞に特異的であり、高レベルの細胞取り込みを促進することを示し、図9Aは、様々な濃度のMGS2__V4-2と共に、37℃で一時間インキュベートしたHMC3細胞(ヒトミクログリア細胞株)を示し、EC50(半数取り込み)は7.3nMであり、図9Bは、一時間におけるMGS2__V4-2の取り込みは、静止又は活性化表現型を示すHMC3細胞上で決定されたことを示し、両方の細胞状態で、平均60000分子のMGS2__V4-2が内在化し、これは、MGS2__V4-2が両方の表現型状態においてミクログリア細胞への輸送に有効であることを示し、図9Cは、HMC3細胞において、取り込みが中枢神経系の他の細胞よりも顕著に高いことを示し、ミクログリア細胞に対するMGS2__V4-2の特異性を示し、全ての細胞株は、37℃で一時間、25nMのMGS2__V4-2と共にインキュベートした。

【0031】

【図10】図10は、最適化されたMGS2__V4-2がヒト血清中で安定していることを示す。

【0032】

【図11】図11は、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラの構造を示し、X

10

20

30

40

50

=MGS2__V4であり、X'=MTS3__V1であり、R=色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、その他のペプチド、炭水化物、及び／又は脂質の結合ポイントである。

【0033】

【図12】図12は、MTS-MGSキメラ(MTS3__V1-2-MGS2__V4-2)がミクログリアに内在化している二重標的化の例を示す。

【0034】

【図13】図13A乃至13Cは、共焦点顕微鏡により証明される、MTS-MGSキメラ剤(MTS3__V1-2-MGS2__V4-2)がミクログリアに内在化している二重標的化の一例を示し、シングルZスライスが示され、スケールバー=10µmである。

【0035】

【図14】図14A乃至14Cは、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラがCNSのミクログリアを標的化する二重標的化を示し、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2共役体を、Alexa Fluor 647(赤)でラベル付けし、Sprague Dawleyラットの側尾静脈に注射(0.09nmol/g)し、2時間の循環時間の後、動物を安楽死させ、脳を経心筋灌流で固定し、摘出し、凍結保護し、Leica CM1950で15µm切片に凍結切片化し、画像をZeiss LSM 800で撮影し、ミクログリアをIba-1(灰色)で染色し、細胞核をHoechst 33342(青色)で染色し、図14A及び14Bは、核周囲の染色から明らかなように、隣接する非ミクログリア細胞ではなく、ミクログリアに内在化したMTS3__V1-2-MGS2__V4-2共役体の単一Zスライス画像を図示し、図14Cは、周囲の非ミクログリア細胞ではなく、ミクログリアに内在化しているMTS3__V1-2-MGS2__V4-2共役体の3Dレンダリングである(全ての画像の倍率=630倍である)。

【0036】

【図15】図15は、フローサイトメトリーにより証明される、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラがCNSのミクログリアを標的化する二重標的化を示す。

【0037】

【図16】図16は、MTS3__V1-2-MGS2__V4-4キメラの構造を示し、X=MGS2__V4であり、X'=MTS3__V1であり、R=色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、その他のペプチド、炭水化物、及び／又は脂質の結合ポイントである。

【0038】

【図17】図17は、図16と比較して、代替結合を使用するMTS3__V1-2-MGS2__V4-4キメラの構造を示し、X=MGS2__V4であり、X'=MTS3__V1又はMTS2__V1であり、R=色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、その他のペプチド、炭水化物、及び／又は脂質の結合ポイントである。

【0039】

【図18】図18A及び18Bは、ミクログリアにおけるMGS2-MTS3キメラによるsiRNA輸送の例を提供し、図18Aは、クリックケミストリーを用いて試験siRNAに共役させたキメラMGS2__V4-4(四量体)-MTS3__V1-2を示し、図18Bは、MGS2__V4-4-MTS3__V1-2及びMGS2__V4-4-MTS3__V1-2-siRNAの取り込みを示す。

【0040】

【図19】図19は、四量体MGS__NOE3__V2-4コアの構造を示し、X=MGS__NOE3__V2ペプチド配列CH3CO-GFHNVPYPTWGGFSDLMADI(SEQ ID NO:5)であり、R=色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、及びその他のペプチドの結合ポイントである。

【0041】

【図20】図20は、MGS__NOE3__V2ペプチド配列の構造を示し、配列は、CH3-CO-GFHNVPYPTWGGFSDIDLMADEI(SEQ ID NO:5)である。

【0042】

10

20

30

40

50

【図21】図21A乃至21Cは、四量体MGS__NOE3__V2-4が神経細胞に対して特異的であり、高レベルの細胞取り込みを促進することを示し、図21Aは、MGS__NOE3__V2-4が2つの神経細胞株に結合するが、ミクログリア又はアストロサイト細胞株には結合しないことを示し、図21Bは、MGS__NOE3__V2-4の取り込みが濃度依存性であり、高レベルで内在化していることを示し、図21Cは、MGS__NOE3__V2-4の取り込みが少なくとも24時間継続し、細胞内濃度 1 μ Mに達したことを示す。

【0043】

【図22】図22は、NOE__NOE3__V2-4の細胞受容体のリサイクルされることを示し、クロロキンは、受容体のリサイクルを阻害し、シクロヘキシミドは、新しいタンパク質合成を阻害する。

10

【0044】

【図23】図23A乃至23Cは、MGS__NOE3__V2-4が神経細胞内に内在化していることを示し、スケールバーは10 μ mを表す。

【0045】

【図24】図24A乃至24Cは、髄腔内注射後にMGS__NOE3-V2-4がCNSの細胞と関連することを示し、(A)は、全脳細胞対残骸のゲーティング戦略であり、(B)は、細胞ダブルレットを除くためのゲーティング戦略であり、図24Cは、在来動物と比較した、髄腔内注射後に脳細胞に内在化したMGS__NOE3-V2-4の蛍光強度を示す。

20

【0046】

【図25】図25は、MTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラの構造を示し、X=mgs__noe3__v2であり、X'=MTS3__V1であり、R=色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、及びその他のペプチドの結合ポイントである。

【0047】

【図26】図26A乃至26Cは、MTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラがHT22神経細胞に内在化していることを示し、図26Aは、MTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラ、MGS__NOE3__V2-4又はMTS3__V1-2をHT22細胞と共に200 nMで一時間インキュベートし、ペプチド取り込みデータは、定量的フローサイトメトリーアッセイにより取得され、図26Bは、MTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラのHT22細胞への取り込みを経時的に評価し、細胞を200 nMでインキュベートし、細胞当たりの平均取り込みを決定し、図26Cは、HT22細胞をAlexa Fluor 647でラベル付けしたMTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラと共に、200 nM、37°Cで指示された時間インキュベートした。細胞膜のラベル付けにはAlexa Fluor 488共役小麦胚芽アグルチニンを用い、核の染色にはHoechst 33342を用い、ライブセルイメージングを行い、代表的な画像を示す。

30

【0048】

【図27】図27は、MTS2__V1-2がトランスフェリン受容体に結合してCNSにアクセスし、一方でMTS3__V1-2が輸送のために新規でありまだ同定されていない細胞受容体を利用することを示す。

40

【0049】

【図28】図28A乃至28Eは、PEGリンカーを備えるコアアーキテクチャであり、a)は、PEGリンカーを備える単量体コアであり、b)は、PEGリンカーを備える二量体コアであり、c)は、マレイミドを備える二量体コアでありd)は、PEGリンカーを備える四量体コアであり、e)は、マレイミドを備える四量体コアであり、R=色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、その他のペプチド、炭水化物、及び／又は脂質の結合ポイントであり、X=任意のMGS、MTS、MGS又はMTSと結合したコア、及び／又はリンカーである。

50

【0050】

【図29】図29は、マレイミドコア（二量体（図示）又は四量体）と2.2eqのペプチド（任意のコアアーキテクチャ（二量体を図示））との間の結合の例を示し、 $X = MGS$ 又は MTS であり、 $R =$ 色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、その他のペプチド、炭水化物、及び／又は脂質の結合ポイントである。

【0051】

【図30】図30は、1.2eqのマレイミド-PEG4-DBCOを1eqのペプチド（任意のコアアーキテクチャ（二量体を図示））に添加する概略図を示し、 $X = MGS$ 又は MTS である。

【0052】

【図31】図31は、DBCOが結合した1eqのペプチド（任意のコアアーキテクチャ（二量体を図示））と、コアに修飾リジンを備える1.2eqのペプチド（任意のコアアーキテクチャ（二量体を図示））との間のキメラペプチド合成の例を示し、 $X = MGS$ 又は MTS であり、 $R =$ 色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、炭水化物、その他のペプチド、及び／又は脂質の結合ポイントである。

【0053】

【図32】図32は、遊離DBCOを備える1.2eqのキメラペプチド（任意のコアアーキテクチャ（四量体／二量体キメラを図示））からなる）と、遊離アジドを備える1eqのsiRNAとの間の共役の例を示し、 $X = MGS$ 又は MTS であり、 $R =$ 色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、その他のペプチド、炭水化物、及び／又は脂質の結合ポイントである。

【発明を実施するための形態】

【0054】

開示される方法及び組成物は、特定の実施形態及びそこに含まれる実施例の以下の詳細な説明、並びに図面及びその前後の説明を参照してより容易に理解され得る。

【0055】

開示される方法及び組成物は、特に指定されない限り、特定の合成方法、特定の分析技術、又は特定の試薬に限定されず、従って、変化し得ることが理解される。また、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、限定する意図はないことが理解される。

【0056】

開示される方法及び組成物に使用可能であり、それらと組み合わせて使用可能であり、それらを調製するために使用可能であり、それらの生成物である材料、組成物、及び成分が開示される。これら及び他の材料が本明細書に開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループ等が開示される場合、これらの化合物の各種の個々及び集合的な組み合わせ及び置換の具体的な参照が明示的に開示されないとしても、各々は、本明細書において具体的に考慮及び記載されることが理解される。従って、分子A、B、及びCのクラス並びに分子D、E、及びFのクラスが開示され、例として組み合わせ分子A-Dが開示される場合、各々が個々に記載されていなくとも、それらは個々及び集合的に考慮される。従って、この例において、各組み合わせA-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E、C-Fが具体的に考慮され、A、B、及びC；D、E、及びF；並びに例示的な組み合わせA-Dの開示から開示され则认为されるべきである。同様に、これらの任意のサブセット又は組み合わせも具体的に考慮及び開示される。従って、例えば、A-E、B-F、及びC-Eのサブグループが具体的に考慮され、A、B、及びC；D、E、及びF；並びに例示的な組み合わせA-Dの開示から開示され则认为されるべきである。この概念は、開示される組成物を生成及び使用する方法における工程を含む本出願の全ての様態に適用されるが、これらに限定されない。従って、実施可能な様々な追加の工程がある場合、これらの追加の各工程は、開示される方法の任意の特定の実施形態又は実施形態の組み合わせで実施可能であること、及びそのような各組み合わせは、具体的に考慮され、開示されたとみなされるべきであることが理解される。

10

20

30

40

50

【0057】

見出しは、便宜上提供されるだけであり、いかなる方法においても本発明を限定すると解釈されるものではない。本開示の任意の見出し又は任意の部分に示される実施形態は、本開示の同じ若しくは他の見出し又は他の部分に示される実施形態と組み合わせることができる。

【0058】

A. 定義

開示される方法及び組成物は、これらが変化し得るため、記載される特定の方法論、プロトコル、及び試薬に限定されないことが理解される。また、本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、添付の特許請求の範囲によりのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図しないことを理解される。

【0059】

なお、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上明らかに示されない限り、複数の参照を含む。従って、例えば、「MGSペプチド」への参照は、そのようなMGSペプチドの複数を含み、「リンカー」への参照は、当業者に公知の1つ以上のリンカー及びその同等体への参照である。

【0060】

本明細書において使用する場合、「治療」は、疾患又は病状の影響の悪化を予防又は遅延させるために、又は疾患又は病状の影響を部分的に又は完全に逆転させるために、疾患又は病状を有するヒト又は他の哺乳動物（例えば、動物モデル）等の被験体に本発明の組成物を投与することを意味する。いくつかの態様において、疾患又は病状は、CNS関連疾患若しくは病状、又はCNS障害若しくは傷害であってよい。治療は、疾患、障害、及び／若しくは病状の徴候を示さない対象に対して、並びに／または疾患、障害、及び／若しくは病状の初期徴候のみを示す対象に対して、疾患、障害、及び／若しくは病状に関連する病態を発症するリスクを低下させる目的で施されてよい。いくつかの実施形態において、治療は、開示される1つ以上の組成物を対象に輸送することを含む。

【0061】

本明細書において使用する場合、「予防」は、疾患、障害、又は病状を発症しやすくなっている対象が疾患、障害、又は病状を発症する可能性を最小限に抑えることを意味する。

【0062】

本明細書において使用する場合、「対象」の用語は、ヒト等の投与対象を指す。従って、開示される方法の対象は、哺乳類、魚類、鳥類、爬虫類、又は両生類等の脊椎動物であってよい。また、「対象」の用語は、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌ等）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ミバエ等）を含む。一つの態様において、対象は哺乳類である。別の態様において、対象はヒトである。この用語は、特定の年齢又は性別を示さない。従って、成人、小児、思春期、新生児、及び男性又は女性に関わらず、胎児を含むことが意図される。

【0063】

本明細書において使用する場合、「患者」の用語は、疾患又は障害に罹患している対象を指す。「患者」の用語は、ヒト及び獣医用の対象を含む。開示される方法のいくつかの態様において、「患者」は、投与工程の前に治療の必要性が診断されている。いくつかの態様において、患者及び対象は互換的に使用されてよい。

【0064】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸配列」の用語は、アミノ酸残基を表す略語、文字、記号、又は単語のリストを指す。本明細書において使用されるアミノ酸の略称は、アミノ酸の従来の1文字コードであり、以下の：Aアラニン；Cシステイン；Dアスパラギン酸；Eグルタミン酸；Fフェニルアラニン；Gグリシン；Hヒスチジン；Iイソロイシン；Kリジン；Lロイシン；Mメチオニン；Nアスパラギン；Pプロリン；Qグルタミン；Rアルギニン；Sセリン；Tスレオニン；Vバリン；Wトリプトファン；Yチロシンのように表される。

【0065】

本明細書で使用する「ポリペプチド」は、任意のペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、遺伝子産物、発現産物、又はタンパク質を指す。ポリペプチドは、連続したアミノ酸から構成される。「ポリペプチド」の用語は、天然に存在する分子又は合成分子を含む。

【0066】

さらに、本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」という用語は、ペプチドイソステア等のペプチド結合又は修飾ペプチド結合により互いに結合したアミノ酸を指し、20の遺伝子にコードされたアミノ酸以外の修飾アミノ酸を含んでよい。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシング等の天然プロセス、又は当技術分野で公知の化学修飾技術のいずれかにより修飾されてよい。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、アミノ末端、又はカルボキシル末端等、ポリペプチドのどこでも起こり得る。同じ種類の修飾が、与えられるポリペプチドのいくつかの部位において、同じ又は様々な程度で存在してよい。また、与えられるポリペプチドは、多くの種類の修飾を有してよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、共有結合架橋又は環化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスフィチジルイノシトールの共有結合、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、システイン又はピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストリル化、酸化、ペギル化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化等の転移RNAを介したタンパク質へのアミノ酸付加を含むが、これらに限定されない(T. E. Creighton, *Proteins—Structure and Molecular Properties* (第2版)、W. H. Freeman and Company、ニューヨーク、1993年; 及びB. C. Johnson編、*Posttranslational Covalent Modification of Proteins*、Academic Press、ニューヨーク、1983年、1～12ページを参照)

【0067】

本明細書で使用する「核酸配列」の語句は、一本鎖又は二本鎖、センス又はアンチセンスのDNA又はRNA又はDNA-RNAハイブリッドのいずれであっても、ワトソン-クリック塩基対形成により相補的核酸にハイブリダイズ可能な天然又は合成のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを指す。また、本発明の核酸配列は、ヌクレオチドアナログ(例えば、BrdU)、及びヌクレオシド間の非ホスホジエステル結合(例えば、ペプチド核酸(PNA)又はチオジエステル結合)を含んでよい。特に、核酸配列は、DNA、RNA、cDNA、gDNA、ssDNA、dsDNA、又はそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0068】

本明細書で使用する場合、組成物の「有効量」は、所望の効果を提供するための組成物の十分な量を意味する。正確な必要量は、対象の種、年齢、及び一般的な状態、治療される疾患(又はその基礎にある遺伝的欠陥)の重症度、使用される具体的な化合物、その投与様式等に応じて、対象ごとに異なる。従って、正確な「有効量」を特定することは不可能である。しかしながら、適切な「有効量」は、当業者であれば、日常的な実験のみにより決定できる。

【0069】

本明細書で使用する場合、「選択的に結合する」は、MGS又はMTSがその標的(例えば、特定の細胞型)を認識して物理的に相互作用し、他の標的を有意に認識せず、相互作用しないことを意味する。

【0070】

「パーセント(%) 相同性」の用語は、本明細書において「パーセント(%) 同一性」の用語と互換的に使用され、配列アラインメントプログラムを使用して野生型配列又は目的の配列により配置された時の核酸又はアミノ酸配列の同一性レベルを指す。例えば、本

明細書で使用する場合、８０％相同性は、定義されたアルゴリズムにより決定される８０％の配列同一性と同じことを意味し、従って、与えられる配列の相同体は、与えられた配列にわたって８０％より大きい配列同一性を有する。配列同一性の例示的なレベルは、本明細書に記載される任意のＭＴＳ配列等の与えられる配列に対して８０、８５、９０、９５、９８％以上の配列同一性を含むが、これらに限定されない。２つの配列間の同一性を決定するために使用されてよいコンピュータプログラムの例は、インターネット上で公的に入手可能なＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ、及びＴＢＬＡＳＴＸ、ＢＬＡＳＴＰ、及びＴＢＬＡＳＴＮであるが、これらに限定されない。また、１９９０年のＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ. および１９９７年のＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ. も参照される。典型的には、配列検索は、ＧｅｎＢａｎｋ ＤＮＡ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ及び他の公開データベース内の核酸配列に対して与えられる核酸配列を評価する場合、ＢＬＡＳＴＮプログラムを使用して実施される。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、ＧｅｎＢａｎｋ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ及び他の公開データベース内のアミノ酸配列に対して、全リーディングフレームで翻訳された核酸配列の検索に好ましい。ＢＬＡＳＴＮ及びＢＬＡＳＴＸは、１１．０のオープンギャップペナルティ、１．０のエクステンデッドギャップペナルティのデフォルトパラメータを用いて実行され、ＢＬＯＳＵＭ－６２ｍａｔｒｉｘを利用する（例えば、Ａｌｔｓｃｈｕｌ, Ｓ．Ｆ．, ｅｔ ａｌ. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402、1997を参照）。例えば、２つ以上の配列間の「％同一性」を決定するために選択された配列の好ましいアラインメントは、Ｍａｃ Ｖｅｃｔｏｒバージョン１３．０．７のＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗプログラムを用いて実行され、１０．０のオープンギャップペナルティ、０．１のエクステンデッドギャップペナルティ、及びＢＬＯＳＵＭ３０類似性マトリックスを含むデフォルトパラメータで操作される。

【００７１】

最終的な誘導体、変異体、又はアナログに到達するために、置換、欠失、挿入、又はこれらの任意の組み合わせが使用されてよい。一般的に、これらの変更は、分子の変化を最小にするために、数個のヌクレオチドに対して行われる。しかしながら、状況によっては、より大きな変更が許容され得る。

【００７２】

一般的に、個々の変異配列間のヌクレオチド同一性は、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。従って、「変異体配列」は、本発明の親配列又は参照配列（例えば、野生型配列）に対して特定の同一性を有し、親配列の特異性及び／又は活性の少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を含むがこれに限定されない生物学的機能を共有する。例えば、「変異体配列」は、本発明の親配列又は参照配列と比較して、１つ、２つ、又は３つ、４つのヌクレオチド塩基の変更を含む配列であり、親配列の生物学的機能、特異性及び／又は活性を共有又は改善する配列であってよい。従って、「変異体配列」は、本発明の親配列に対して特定の同一性を有し、親配列の特異性及び／又は活性の少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を含むがこれに限定されない生物学的機能を共有するものであってよい。また、変異体配列は、参照配列（例えば、ＭＴＳ配列）の特異性及び／又は活性の少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を共有してよい。

【００７３】

「任意の」又は「任意に」は、その後に記載される事象、状況、又は材料が発生しない又は存在しなくともよく、事象、状況、又は材料が発生する又は存在する事例と、発生しない又は存在しない事例とが記載に含まれることを意味する。

【００７４】

本明細書において、範囲は、「約」特定の値のから、及び／又は「約」別の特定の値までと表現され得る。また、このような範囲が表現される場合、文脈において具体的に示さない限り、1つの特定の値から、及び／又は別の特定の値までの範囲が具体的に考慮され、開示されるとみなされる。同様に、値が概算値として表現される場合、先行詞「約」を使用することにより、文脈において具体的に示さない限り、特定の値は、開示されたとみなされるべき具体的に考慮される別の実施形態を形成することが理解される。さらに、各範囲の端点は、文脈において具体的に示さない限り、他の端点と関係する場合、及び他の端点と独立する場合の両方において有意であることが理解される。最後に、明示的に開示される範囲内に含まれる個々の値及び値のサブ範囲の全てが、文脈において具体的に示さない限り、具体的に考慮され、開示されたとみなされるべきであることが理解される。上記は、特定の場合において、これらの実施形態の一部又は全てが明示的に開示されているか否かに関係なく適用される。

10

【0075】

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、開示される方法及び組成物が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は同等の任意の方法及び材料が、本方法及び組成物の実施又は試験において使用され得るが、特に有用な方法、装置、及び材料は記載される通りである。本明細書において引用される刊行物及びそれらが引用する材料は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。本明細書のいかなる記載も、本発明が先行発明によりかかる開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されない。いかなる文献も先行技術であることを認めるものではない。参考文献の説明は、その著者が主張することを述べたものであり、出願人は、引用文献の正確性及び妥当性に異議を唱える権利を留保する。本明細書において多くの刊行物が参照されるが、このような参照は、これらの文献のいずれかが当該技術分野における一般的な知識の一部を形成していることを認めるものではないことを明確に理解される。

20

【0076】

本明細書の記載及び特許請求の範囲を通して、「備える」の語句及び「備え」、「備えて」等の語句の変形は、「含むが、これに限定されない」ことを意味し、例えば他の添加剤、成分、整数、又は工程を除外することを意図しない。具体的には、1つ以上の工程又は動作を備えると記載される方法において、各工程は、（当該工程が「からなる」等の限定用語を含まない限り）記載されるものを備えることが特に意図され、各工程は、例えば、当該工程に記載されない他の添加剤、成分、整数、又は工程を除外することを意図しないことを意味する。

30

【0077】

B. 分子誘導システム（MGS）ペプチド

本明細書において、MGSペプチドが開示される。いくつかの様態において、MGSペプチドは、特定の細胞腫に選択的に結合してよい。例えば、本明細書において、神経細胞及びミクログリア細胞等のCNSの細胞に選択的に結合し得るMGSペプチドが開示される。

【0078】

本開示は、神経細胞への治療分子の効率的な輸送を可能にする、高い親和性及び特異性を備える神経細胞標的化分子誘導システム（「MGS」）ペプチドをスクリーニングするファージディスプレイの使用を開示する。そして、この技術により、神経細胞標的化に使用可能なペプチド配列を迅速かつ効率的にスクリーニングできる。神経細胞標的化MGSペプチドは、神経細胞に対して高い親和性を示し、神経細胞内に内在化できる。さらに、神経細胞標的化MGSペプチドは、脳細胞（例えば、アストロサイト、ミクログリア）において選択性を示した。

40

【0079】

神経細胞標的化MGSペプチドは、治療目的のために、低分子、核酸、及び抗体と共役してよい。さらに、ペプチド配列の多様な化学的性質により、神経細胞標的化の感度及び

50

特異性を高める修飾と、デュアル又はマルチ標的化のための他のペプチドとの組み合わせ（例えば、血液脳関門通過ペプチドとの組み合わせ）が可能となる。また、これらの神経細胞標的化ペプチドは、高い神経細胞標的化感度及び特異性を誘導する能力を有する。従って、この神経細胞標的化ペプチドは、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経疾患に対する治療のための誘導系としての可能性を有する。

【0080】

表1に示されるSEQ ID NO: 1-8の配列のいずれかのアミノ酸配列を備えるMGSペプチドが開示される。

【表1】

表1. MGSペプチド配列の例			
SEQ ID NO	ペプチド配列	配列の別名	細胞標的
SEQ ID NO:1	GFHNVPYTWGGFSDIDLMADEI	MGS NOE3 V1	神経細胞
SEQ ID NO:5	Ac-GFHNVPYTWGGFSDIDLMADEI	MGS NOE3 V2	神経細胞
SEQ ID NO:2	EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG	MGS Neuron1 V1	神経細胞
SEQ ID NO:6	Ac-EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG	MGS Neuron1 V2	神経細胞
SEQ ID NO:3	FQHNPFYTYSMEDTDVEIK	MGS Neuron1 V1	神経細胞
SEQ ID NO:7	Ac-FQHNPFYTYSMEDTDVEIK	MGS Neuron1 V2	神経細胞
SEQ ID NO:4	YAAWPASGAWT	MGS2 V3	ミクログリア
SEQ ID NO:8	Ac-YAAWPASGAWT	MGS2 V4	ミクログリア

【0081】

表1は単量体MGSペプチド配列のみを示すが、MGSペプチドは、二量体、四量体等の多量体として使用されてもよい。いくつかの様態において、ペプチド名の末尾に「-2」がついていると、二量体MGSペプチドを指す。いくつかの様態において、ペプチド名の末尾に「-4」がついていると、四量体MGSペプチドを指す。例えば、MGS_NOE3_V1-2は、GFHNVPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1) 配列の二量体バージョンを指す。いくつかの様態において、MGS_NOE3_V1-4は、GFHNVPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1) 配列の四量体バージョンを指す。いくつかの様態において、MGS_NOE3_V2-2は、Ac-GFHNVPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 5) 配列の二量体バージョンを指す。いくつかの様態において、MGS_NOE3_V2-4は、Ac-GFHNVPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 5) 配列の四量体バージョンを指す。従って、EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2) についても同様であり、MGS_Neuron1_V1-2は二量体であり、MGS_Neuron1_V1-4は四量体である。従って、MGS_Neuron1_V2、MGS_Neuron2_V1、MGS_Neuron2_V2、MGS2_V3、及びMGS2_V4が、表1に示されるペプチドの単量体形態である場合、MGS_Neuron1_V2-2、MGS_Neuron2_V1-2、MGS_Neuron1_V2-2、MGS_Neuron2_V2-2、MGS2_V3-2、MGS2_V4-2はそれぞれ二量体であり、MGS_Neuron1_V2-4、MGS_Neuron2_V1-4、MGS_Neuron2_V2-4、MGS2_V3-4、MGS2_V4-4は四量体である。

【0082】

いくつかの様態において、1つ以上のMGSペプチドは、SEQ ID NO: 1-8の配列のいずれかと少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の配列同一性を有する。いくつかの様態において、1つ以上のMGSペプチドは、ペプチドの活性部分において100%の同一性を有し、活性部分は、CNS細胞を標的化する能力を保持する部分である。従って、いくつかの様態において、MGSペプチドのいずれかと少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性は、活性部分の外側で生じる。

【0083】

いくつかの様態において、MGSペプチドは修飾されてよい。いくつかの様態において、MGSペプチドの修飾は、ペプチドを最適化すること又はペプチドを安定化させること

を含む。いくつかの態様において、M T S ペプチドは最適化されてよい。最適化されたペプチドは、個々の親ペプチド配列に修飾を加えることにより得ることができる。これらの修飾は、血液からC S F への移動に必要な親配列内の必須アミノ酸を同定するために用いることができる。これらの修飾は、親ペプチドのアミノ末端領域及びC末端領域のアラニンスキニングと短縮との組み合わせにより得ることができる。P E G は、M G S ペプチドのC末端を保護し、ペプチドとC末端のシステインを介して結合したカーゴ分子との間にスパーサーを提供し、M G S ペプチドの溶解性を高めることができる。アセチル化（C H 3 C O -）、d（L e u）等のd-アミノ酸によるアミノ末端の修飾は、血液中のペプチダーゼによる分解から保護することができる。全てのM G S ペプチドに適用できる最適化されたペプチド長は一樣ではなく、ペプチドの取り込み及び安定性への影響を確認するために、全ての変更が試験されてよい。従って、いくつかの態様において、M G S ペプチドは、N末端保護基を有してよい。いくつかの態様において、N末端保護基は、プロテアーゼがN末端からアミノ酸を短縮することを防ぐものであれば何でもよい。いくつかの態様において、本明細書に開示されるM G S ペプチドは、アセチル化によりN末端が修飾されてよい。いくつかの態様において、N末端保護基はアセチル基（A c = C H 3 C O）である。いくつかの態様において、N末端保護基は、P E G、ホルミル、C H 3 -（C H）n - C O、フルオロフォア、脂肪酸、アルキルアミン、アリール基、炭水化物、スルホンアミド、又はカルバメートであってよいが、これらに限定されない。

【0084】

いくつかの態様において、本明細書に開示されるM G S ペプチドは、別のM G S ペプチド、カーゴ、及び／又は別のリンカーと化学的に共役してよい。いくつかの態様において、化学的共役体は、ポリエチレングリコール（P E G）であってよい。従って、いくつかの態様において、本明細書に開示されるM G S ペプチドはペギル化されてよい。いくつかの態様において、P E G ユニットの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、18、20、22、24、又はそれ以上であってよい。いくつかの態様において、P E G ユニットの数は、1つ以上のM G S ペプチドとカーゴとの間の立体的干渉を防ぐように、1つ以上のM G S ペプチドをカーゴから離すために十分な長さであってよい。従って、いくつかの態様において、本明細書に開示されるM G S ペプチドは、リンカーをさらに備えてよい。例えば、リンカーと化学的共役体は、互換的に用いられてよい。いくつかの態様において、リンカーは、M G S ペプチドのC末端上にある。1つの態様において、本明細書に開示されるM G S ペプチドは、S E Q I D N O：1-8の配列の1つ以上を備え、S E Q I D N O：1-8は、C末端で上のP E G又は別のリンカーと化学的に共役してよい。いくつかの態様において、リンカーは、2つ以上のM G S ペプチドを連結してよい。いくつかの態様において、リンカーは、カーゴと共役してよい。例として、リンカーを備えるM G S ペプチドは、図3に示される構造を備えてよく、XはM G S ペプチドであり、Rは、カーゴ又は別のリンカーと共役し得る反応性基である。

【0085】

いくつかの態様において、リンカーは、本明細書に記載されるいずれでもよい。例えば、リンカーは、M G S ペプチドと別の何かとの共役を可能にし、立体障害を防止する任意の長さであってよい。

【0086】

いくつかの態様において、リンカーは、P E G リンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリールリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8，9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1，2，3]トリアゾロ[4，45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含む。

【0087】

いくつかの態様において、M G S ペプチドの構造の例を図1及び図2に示す。図1は、M G S 2 _ V 4 ペプチド配列：C H 3 C O - Y A A W P A S G A W T（S E Q I D N O：8）の構造を示す。図2は、M G S _ N O E 3 _ V 2 ペプチド配列：C H 3 - C O -

G F H N V Y P Y T W G F S D I D L M A D E I (SEQ ID NO: 5) の構造を示す。

【0088】

いくつかの態様において、開示されるMGSペプチドは二量体であってよく、2つのMGSペプチドが共役してよい。図3Aは、二量体MGSコアの構造の例を示す。いくつかの態様において、2つのMGSペプチドは、同じMGSペプチド又は2つの異なるMGSペプチドであってよい。いくつかの態様において、2つのMGSペプチドは、リンカーを介して共役する。

【0089】

いくつかの態様において、開示されるMGSペプチドは四量体であってよく、4つのMGSペプチドが共役してよい。図3Bは、四量体MGSコアの構造の例を示す。いくつかの態様において、4つのMGSペプチドは、同じMGSペプチド又は異なるMGSペプチドの組み合わせであってよい。いくつかの態様において、4つのMGSペプチドは、リンカーを介して共役する。

【0090】

いくつかの態様において、反応性基は、カルボン酸、ハロゲン化アシル、ハロゲン化スルホニル、クロロホルメート、アルデヒド、アルキン、(アセチレン性水素を有さない)アルキン、アミド及びイミド、アミン、ホスフィン、及びピリジン、無水物、アゾ、ジアゾ、アジド、ヒドラジン、及びアジド化合物、カルバメート、エポキシド、エステル、硫酸エステル、リン酸エステル、エステル、チオリン酸エステル、及びホウ酸エステル、ハロゲン化有機化合物、イソシアネート及びイソチオシアネート、ケトン、オキシム、スルフィド(有機)であってよいが、これらに限定されない。

【0091】

C. 分子輸送システム(MTS)ペプチド

血液脳脊髄液関門を通過するカーゴの輸送は、カーゴ(例えば、薬品及び高分子)のCNSへの輸送に影響を与えるまたとない機会を提供する。従って、本明細書は、しばしば分子輸送システム(MTS)ペプチドと呼ばれる、CNSを標的とするためのペプチドである。

【0092】

本明細書は、MTSペプチドを開示する。表2に示されるSEQ ID NO: 9-14の配列のいずれかのアミノ酸配列を備えるMTSペプチドが開示される。

【表2】

表2. MTSペプチド配列の例		
SEQ ID NO	ペプチド配列	配列の別名
SEQ ID NO:9	DAYKLQTSLDWQMWNP	MTS1_DA
SEQ ID NO:10	Ac-DAYKLQTSLDWQMWNP (最適化されたSEQ ID NO:9)	MTS1_V2
SEQ ID NO:11	FPSWTSKNQQWTNQRQ	MTS2
SEQ ID NO:12	Ac-FPSWTSKNQQWTNQRQ (最適化されたSEQ ID NO:11)	MTS2_V1
SEQ ID NO:13	SKETYSMNAQRQHRS	MTS3
SEQ ID NO:14	Ac-SKETYSMNAQRQHRS (最適化されたSEQ ID NO:13)	MTS3_V1

【0093】

表2は単量体MTSペプチド配列のみを示すが、MTSペプチドは、二量体等の多量体として使用されてもよい。いくつかの態様において、ペプチド名の末尾に「-2」がついていると、二量体MTSペプチドを指す。例えば、MTS1_V2-2は、Ac-DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 10) 配列の二量体バージョンを指す。いくつかの態様において、MTS2_V1-2及びMTS3_V1-2は、それぞれ、MTS2_V1およびMTS3_V1の二量体バージョンである。いくつかの態様において、脂質化等のさらなる最適化が加えられる場合、そのペプチドの次のバージョン又は「V」を指す。例えば、MTS3_V2-2は、MTS3_V1-2の脂質化バージョンである。

【0094】

いくつかの様態において、1つ以上のMTSペプチドは、SEQ ID NO: 9-14の配列のいずれかと少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の配列同一性を有する。いくつかの様態において、1つ以上のMTSペプチドは、ペプチドの活性部分において100%の同一性を有し、活性部分は、血液からCSFへと移動する能力を保持する部分である。従って、いくつかの様態において、MTSペプチドのいずれかと少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性は、活性部分の外側で生じる。

【0095】

いくつかの様態において、MTSペプチドは修飾されてよい。いくつかの様態において、MTSペプチドの修飾は、ペプチドを最適化すること又はペプチドを安定化させることを含む。

10

【0096】

いくつかの様態において、MTSペプチドは、合成及び／又は保存中にMTSペプチドがインタクト（例えば、分解しない）であるように安定化されてよい。いくつかの様態において、MTSペプチドは、グリシンをアラニンに変えることにより安定化する。いくつかの様態において、SEQ ID NO: 9又は10の2位のグリシンは、アラニンに変えることにより安定化させることができる。

【0097】

いくつかの様態において、MTSペプチドは最適化されてよい。最適化されたペプチドは、個々の親ペプチド配列に修飾を加えることにより得ることができる。これらの修飾は、血液からCSFへの移動に必要な親配列内の必須アミノ酸を同定するために用いることができる。これらの修飾は、親ペプチドのアミノ末端領域及びC末端領域のアラニンスキヤニングと短縮との組み合わせにより得ることができる。PEG 12は、MTSペプチドのC末端を保護し、ペプチドとC末端のシステインを介して結合したカーゴ分子との間にスペーサーを提供し、MTSペプチドの溶解性を高めることができる。アセチル化（CH₃CO-）及び／又はd（Leu）等のD-アミノ酸によるMTSペプチドのN末端の修飾は、血液中のペプチダーゼによる分解から保護することができる。全てのMTSペプチドに適用できる最適化されたペプチド長は一樣ではなく、ペプチドの取り込み及び安定性への影響を確認するために、全ての変更が試験されてよい。

20

【0098】

いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは、N末端保護基を有してよい。いくつかの様態において、N末端保護基は、プロテアーゼがN末端からアミノ酸を短縮することを防ぐものであれば何でもよい。いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは、アセチル化によりN末端が修飾されてよい。いくつかの様態において、N末端保護基はアセチル基である。従って、いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは、アセチル化されてよい。いくつかの様態において、N末端保護基は、PEG、ホルミル、CH₃-(CH)_n-CO、フルオロフォア、脂肪酸、アルキルアミン、スルホンアミド、アリール基、炭水化物、D-アミノ酸、又はカルバメートであってよいが、これらに限定されない。

30

40

【0099】

いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは、別のMGSペプチド、カーゴ、及び／又は別のリンカーと化学的に共役してよい。いくつかの様態において、化学的共役体は、ポリエチレングリコール（PEG）であってよい。従って、いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドはペギル化されてよい。いくつかの様態において、PEGユニットの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、18、20、22、24、又はそれ以上であってよい。いくつかの様態において、PEGユニットの数は、1つ以上のMTSペプチドとカーゴとの間の立体的干渉を防ぐように、1つ以上のMGTペプチドをカーゴから離すために十分な長さであってよい。従って、いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチド

50

は、リンカーをさらに備えてよい。例えば、リンカーと化学的共役体は、互換的に用いられてよい。いくつかの様態において、リンカーは、MTSペプチドのC末端上にある。1つの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは、SEQ ID NO: 9-14の配列の1つ以上を備え、SEQ ID NO: 9-14は、N末端がアセチル化され、C末端で上のPEG又は別のリンカーと化学的に共役してよい。いくつかの様態において、リンカーは、2つ以上のMTSペプチドを連結してよい。いくつかの様態において、リンカーは、カーゴと共役してよい。例として、リンカーを備えるMTSペプチドは、図3に示される構造を備えてよく、XはMTSペプチドであり、Rは、カーゴ又は別のリンカーと共役し得る反応性基である。

【0100】

いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは短縮されてよい。いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドは、MTSペプチドの活性部分を除く全てのアミノ酸を除去するために短縮される。いくつかの様態において、MTSペプチドの活性部分は、開示される組成物及び方法において用いられてよい。いくつかの様態において、活性部分は、例えばアラニンスキャニング又は短縮研究等の当技術分野で公知の技術を用いて決定できる。MTSペプチドの活性部分は、血液からCSFに移動する能力を保持する部分である。例えば、SKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) は、N末端を4つのアミノ酸まで短縮できる。いくつかの様態において、アミノ酸配列YSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 16) は、SKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) の活性部分である。

【0101】

いくつかの様態において、本明細書に開示されるMTSペプチドの安定化又は最適化された変異体が開示される。

【0102】

図4は、MTSペプチドの例を示す。図4Aは、MTS1__V2とも呼ばれるMTSペプチドAc-DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 10) の例を示す。図4Bは、MTS1__V2とも呼ばれるMTSペプチドAc-FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 12) の例を示す。図4Cは、MTS3__V1とも呼ばれるMTSペプチドAc-SKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 14) の例を示す。

【0103】

いくつかの様態において、開示されるMTSペプチドは二量体であってよく、2つのMGSペプチドが共役してよい。図3Aは、二量体MTSコアの構造の例を示す。いくつかの様態において、2つのMGSペプチドは、同じMTSペプチド又は2つの異なるMTSペプチドであってよい。いくつかの様態において、2つのMTSペプチドは、リンカーを介して共役する。

【0104】

いくつかの様態において、反応性基は、カルボン酸、ハロゲン化アシル、ハロゲン化スルホニル、クロロホルメート、アルデヒド、アルキン、(アセチレン性水素を有さない)アルキン、アミド及びイミド、アミン、ホスフィン、及びピリジン、無水物、アゾ、ジアゾ、アジド、ヒドラジン、及びアジド化合物、カルバメート、エポキシド、エステル、硫酸エステル、リン酸エステル、エステル、チオリン酸エステル、及びホウ酸エステル、ハロゲン化有機化合物、イソシアネート及びイソチオシアネート、ケトン、オキシム、スルフィド(有機)であってよいが、これらに限定されない。

【0105】

D. リンカー

リンカーが開示される。いくつかの様態において、リンカーは、2つ以上のMGSペプチド、2つ以上のMTSペプチド、2つ以上のリンカー、又はリンカー若しくはペプチドとカーゴとを共役又は結合させることができる。

【0106】

いくつかの様態において、2つ以上のMGSペプチド又は2つ以上のMTSペプチドを共役するリンカーは、(2つのペプチドに結合する場合)二量体コア、又は(4つのペプチドに結合する場合)四量体コアとも呼ばれてよい。図3は、二量体コア及び四量体コアの両方の構造の例を示す。図3において、リンカーはPEG12を備えるが、いくつかの様態において、任意の長さのPEGが用いられてよい。例えば、PEG1~PEG30のいずれかが用いられてよい。いくつかの様態において、1~5000の長さのPEGが用いられてよい。いくつかの様態において、二量体コア又は四量体コアのPEG12の位置において任意のリンカーが用いられてよい。

【0107】

ペプチドのC末端に結合し得る少なくとも1つの反応性基と、部分と化学的に反応し得る少なくとも1つの追加の反応性基とを備えるリンカーが開示される。

【0108】

いくつかの様態において、リンカーはPEG5000までの長さを有する。PEGリンカーについて、いくつかの様態において、リンカーの長さは、5000PEGまで全て単一のPEGであってよい。いくつかの様態において、ペプチドとカーゴとの間のリンカーは、2つのMGS又はMTSペプチド間のリンカーよりも長くてよい。いくつかの様態において、リンカーは2~4つのPEGリンカーを備える。いくつかの様態において、2つのPEGリンカーを備えるリンカーは、二量体コアと呼ばれてよい。いくつかの様態において、4つのPEGリンカーを備えるリンカーは、四量体コアと呼ばれてよい。

【0109】

いくつかの様態において、リンカーは、少なくとも2つのPEGリンカーと、少なくとも2つのPEGリンカーの間の反応性基とを備える。いくつかの様態において、反応性基は、少なくとも2つのPEGリンカーを接続する。

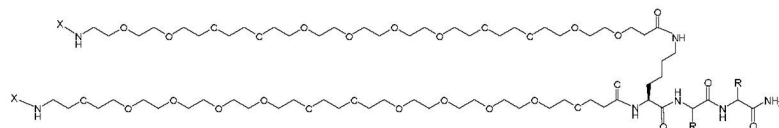
【0110】

いくつかの様態において、リンカーは、アミノ酸、ペプチド、アルキル基、マレイミド、チオール、ヒドラゾン、又はアミドを含む。いくつかの様態において、アミド酸は、修飾アミノ酸であってよい。例えば、修飾アミノ酸は、官能化リジン、官能化システイン、官能化グルタミン酸、又は官能化アスパラギン酸であってよい。いくつかの様態において、リンカーは、ビオチンを備える。

【0111】

いくつかの様態において、リンカーは、

[式5]



の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。いくつかの様態において、この構造は、2つのペプチドを結合させることができるため、二量体コアと呼ばれてよい。

【0112】

いくつかの様態において、リンカーは、脂質部分をさらに備えてよい。例えば、二量体コアからのR基の1つは、脂質部と反応してよい。従って、いくつかの様態において、リンカーは、

[式6]

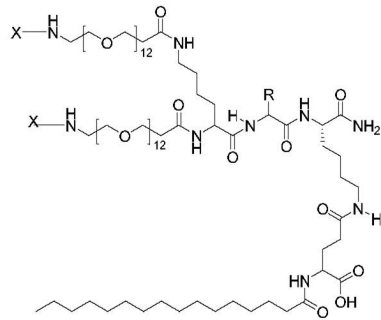
10

20

30

40

50



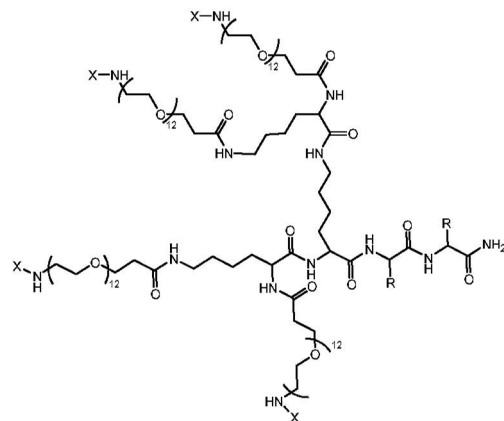
10

の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。

【0113】

いくつかの様態において、リンカーは、

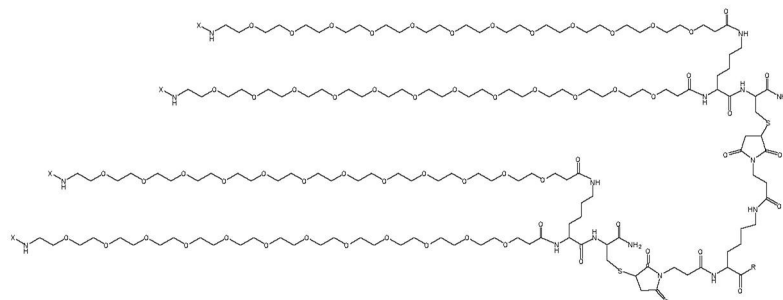
〔式7〕



20

の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。いくつかの様態において、この構造は、4つのペプチドを結合させることができるため、四量体コアと呼ばれてよい。四量体コアの別の例は、

〔式8〕



40

の構造を備え、Xはペプチドであり、Rは部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、Xは、MGSペプチド又はMTSペプチドであってよい。いくつかの様態において、反応性基は、カルボン酸、ハロゲン化アシル、ハロゲン化スルホニル、クロロホルメート、アルデヒド、アルキン、（アセチレン性水素を有さない）アルキン、アミド及びイミド、アミン、ホスフィン、及びピリジン、無水物、アゾ、ジアゾ、アジ

50

ド、ヒドラジン、及びアジド化合物、カルバメート、エポキシド、エステル、硫酸エステル、リン酸エステル、チオリン酸エステル、及びホウ酸エステル、ハロゲン化有機化合物、イソシアネート及びイソチオシアネート、ケトン、オキシム、スルフィド（有機）であってよいが、これらに限定されない。

【0114】

いくつかの様態において、部分は、カーゴであってよい。いくつかの様態において、カーゴは、色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、アミノ酸、ペプチド、脂質、抗体、放射性核種、炭水化物、又はナノ粒子であってよいが、これらに限定されない。いくつかの様態において、部分は、リンカーであってよい。従って、いくつかの様態において、リンカーを備えるリンカーが開示される。例えば、リンカーが四量体コアのである場合（すなわち、第1のリンカー）、四量体コアは、第2のリンカーである部分を備えてよい。いくつかの様態において、第2のリンカーは、四量体コアと同じ又は異なる要素を備えてよい。いくつかの様態において、第2のリンカーは、四量体コア（すなわち、第3のリンカー）を二量体コアに共役させる。

10

【0115】

いくつかの様態において、第1、第2、及び第3のリンカーのいずれかは、アミノ酸、ペプチド、アルキル基、マレイミド、チオール、ヒドラゾン、ジベンゾシクロオクチン、アジド、又はアミドを備えてよい。

【0116】

E. 組成物

20

開示されるMGSペプチド、MTSペプチド、リンカー、及び／又はそれらの組み合わせの1つ以上を備える組成物が開示される。

【0117】

少なくとも1つ以上のMTSペプチドに共役する少なくとも1つのMGSペプチドを備える組成物が開示され、MGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を含む。

【0118】

2つ以上のMTSペプチドに共役する2つ以上のMGSペプチドを備える組成物が開示され、MGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を含む。

30

【0119】

いくつかの様態において、2つ以上のMGSペプチドは、4つのMGSペプチドである。従って、例えば、少なくとも2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を含む。

40

【0120】

2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドを備える組成物が開示され、4つのMGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を含み; 2つのMTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又はSKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を含む。

50

【0121】

いくつかの様態において、2つ以上のMGSペプチドは、同じMGSペプチドである。例えば、いくつかの様態において、組成物に4つのMGSペプチドがある場合、4つのMGSペプチド全てが同じMGSペプチドである。いくつかの様態において、少なくとも1つのMGSペプチドは、他のMGSペプチドとは異なる。いくつかの様態において、各MGSペプチドは、他と異なる。

【0122】

いくつかの様態において、2つ以上のMTSペプチドは、同じMTSペプチドである。例えば、いくつかの様態において、開示される組成物に2つのMTSペプチドがあり、MTSペプチドの両方とも同じMTSペプチドである。いくつかの様態において、開示される組成物に2つのMTSペプチドがあり、2つのMTSペプチドは互いに異なる。

【0123】

いくつかの様態において、MGSペプチド及び／又はMTSペプチドは、N末端保護基を有する。いくつかの様態において、N末端保護基は、アセチル基である。

【0124】

いくつかの様態において、開示される組成物は、1つ以上のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、開示される組成物は、第1のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第1のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリールリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アジン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドを別のMGSペプチドに結合する、又はMGSペプチドをカーゴに結合する、又はMGSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MGSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MGSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

【0125】

いくつかの様態において、組成物は、第2のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第1のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第3のリンカーに結合してよい。従って、いくつかの様態において、組成物は、第3のリンカーをさらに備える。

【0126】

いくつかの様態において、第3のリンカーは、第2のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリールリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アジン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドを別のMTSペプチドに結合する、又はMTSペプチドをカーゴに結合する、又はMTSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MTSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MTSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

10

20

30

40

50

【0127】

いくつかの様態において、第1のリンカー、及び／又は第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、ジスルフィドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチン、8，9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1，2，3]トリアゾロ[4，45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの様態において、第1、第2、及び／又は第3のリンカーは、PEGリンカーを含む。いくつかの様態において、任意の長さのPEGリンカーが用いられてよい。例えば、PEG1～PEG30のいずれかが用いられてよい。いくつかの様態において、1～5000の長さのPEGが用いられてよい。

10

【0128】

いくつかの様態において、組成物は、カーゴをさらに備える。いくつかの様態において、カーゴは、色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、アミノ酸、ペプチド、脂質、小分子、抗体、放射性核種、炭水化物、又はナノ粒子であってよいが、これらに限定されない。例えば、いくつかの様態において、カーゴは、画像化剤、抗体、及び／又はsiRNAである。いくつかの様態において、カーゴは、第1のリンカー、第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーに結合する。従って、いくつかの様態において、開示される組成物は、1つ以上のカーゴを備えてよい。いくつかの様態において、1つ以上のリンカーは、カーゴを備えてよい。

20

【0129】

いくつかの様態において、MTSペプチドは、記載される任意のMTSペプチドである。いくつかの様態において、MTSペプチドは、中枢神経系を標的化する。いくつかの様態において、MTSペプチドは、SEQ ID NO: 9-14のいずれかのアミノ酸配列を備える。いくつかの様態において、MTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP（SEQ ID NO: 9）；FPSWTSKNQQTWNQRQ（SEQ ID NO: 11）；又はSKETYSMNAQRQHRS（SEQ ID NO: 13）のアミノ酸配列を含む。いくつかの様態において、MTSペプチドは、N末端保護基を備えてよい。いくつかの様態において、N末端保護基は、プロテアーゼがN末端からアミノ酸を短縮することを防ぐものであれば何でもよい。いくつかの様態において、N末端保護基は、アセチル基である。いくつかの様態において、N末端保護基は、PEG、ホルミル、CH₃-(CH)_n-CO、アリアル基、炭水化物、D-アミノ酸、フルオロフォア、脂肪酸、アルキルアミン、スルホンアミド、又はカルバメートであってよいが、これらに限定されない。

30

【0130】

いくつかの様態において、組成物は、2つのMTSペプチドを備える。いくつかの様態において、2つのMTSペプチドは、記載される二量体コアを介して結合される。

【0131】

GFHNVPYPTWGGFSDIDLMADEI（SEQ ID NO: 1）；EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG（SEQ ID NO: 2）；又はFQHNPFPYTYSMEDTDVEIK（SEQ ID NO: 3）のアミノ酸配列を備えるMGSペプチドと、（i）ペプチドのC末端に結合し得る少なくとも1つの反応性基及び（ii）部分と化学的に反応し得る少なくとも1つの追加の反応性基を備える第1のリンカーと、第2のリンカーと、（i）ペプチドのC末端に結合し得る少なくとも1つの反応性基及び（ii）部分と化学的に反応し得る少なくとも1つの追加の反応性基を備える第3のリンカーと、DAYKLQTSLDWQMWNP（SEQ ID NO: 9）；FPSWTSKNQQTWNQRQ（SEQ ID NO: 11）；又はSKETYSMNAQRQHRS（SEQ ID NO: 13）のアミノ酸配列を備えるMTSペプチドと、を備える組成物が開示される。

40

【0132】

50

いくつかの様態において、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); 又はFQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) のアミノ酸配列を備えるMGSペプチドのC末端は、第1のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第1のリンカーは、第2のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第3のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又はSKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を備えるペプチド (MTS) のC末端に結合する。

10

【0133】

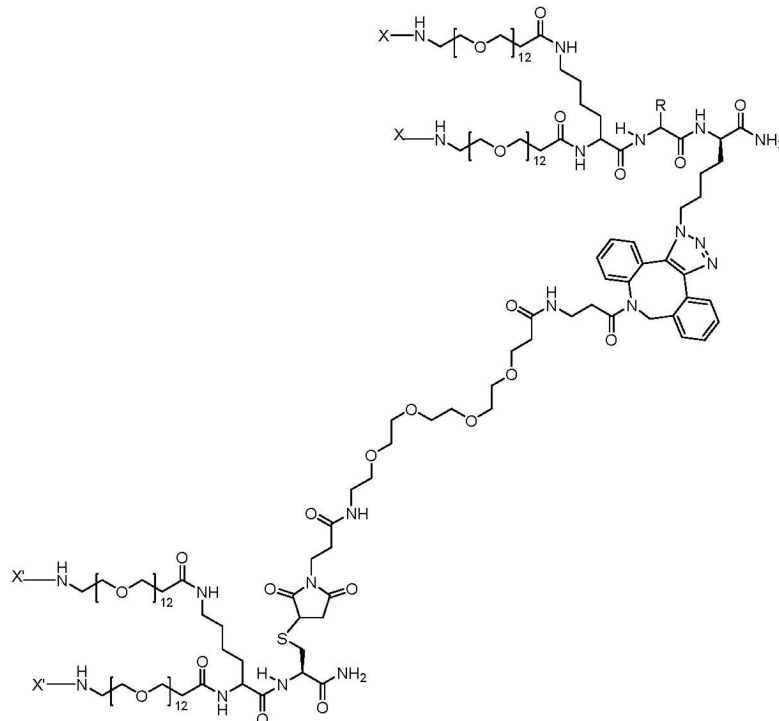
従って、いくつかの様態において、反応性基を介して第1のリンカーに結合する、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); 又はFQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3) のアミノ酸配列を備えるMGSペプチドを備える組成物が開示され、第1のリンカーは、第2のリンカーに結合し、第2のリンカーは、第3のリンカーに結合し、第3のリンカーは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又はSKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を備えるペプチド (MTS) のC末端に結合する。

20

【0134】

いくつかの様態において、組成物は、

[式9]



30

40

の構造を備え、Xは、MGSペプチドであり、X'は、MTSペプチドであり、Rは、部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの様態において、MGSペプチドは、本明細書に記載されるいずれかである。いくつかの様態において、MGSペプチドは、表1に示されるSEQ ID NO: 1~8の配列のいずれかのアミノ酸配列を備える。いくつかの様態において、MTSペプチドは、本明細書に記載されるいずれかである。いくつかの様態において、MTSペプチドは、表2に示されるSEQ ID NO: 9~14の配列

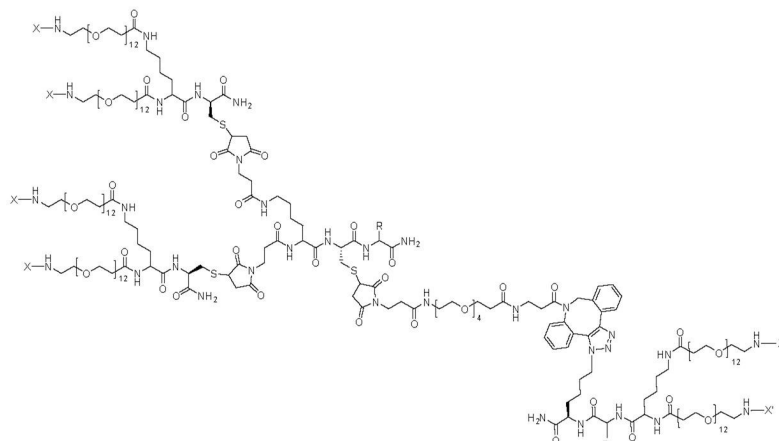
50

のいずれかのアミノ酸配列を備える。

【 0 1 3 5 】

いくつかの形態において、組成物は、

〔式 1 0〕



10

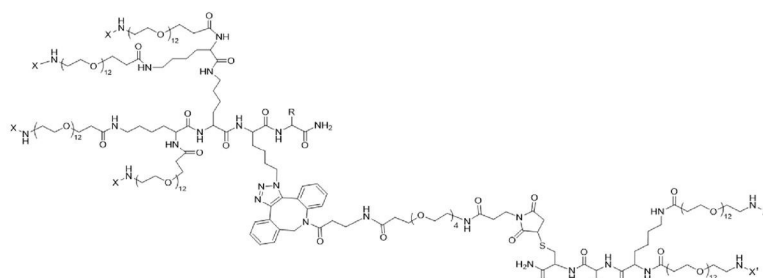
の構造を備え、X' は、MTS ペプチドであり、X は、MGS ペプチドであり、R は、部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの形態において、MGS ペプチドは、本明細書に記載されるいずれかである。いくつかの形態において、MGS ペプチドは、表 1 に示される SEQ ID NO: 1 ~ 8 の配列のいずれかのアミノ酸配列を備える。いくつかの形態において、MTS ペプチドは、本明細書に記載されるいずれかである。いくつかの形態において、MTS ペプチドは、表 2 に示される SEQ ID NO: 9 ~ 14 の配列のいずれかのアミノ酸配列を備える。

20

【 0 1 3 6 】

いくつかの形態において、組成物は、

〔式 1 1〕



30

の構造を備え、X' は、MTS ペプチドであり、X は、MGS ペプチドであり、R は、部分と化学的に反応し得る反応性基である。いくつかの形態において、MGS ペプチドは、本明細書に記載されるいずれかである。いくつかの形態において、MGS ペプチドは、表 1 に示される SEQ ID NO: 1 ~ 8 の配列のいずれかのアミノ酸配列を備える。いくつかの形態において、MTS ペプチドは、本明細書に記載されるいずれかである。いくつかの形態において、MTS ペプチドは、表 2 に示される SEQ ID NO: 9 ~ 14 の配列のいずれかのアミノ酸配列を備える。

40

【 0 1 3 7 】

いくつかの形態において、反応性基は、カルボン酸、ハロゲン化アシル、ハロゲン化スルホニル、クロロホルメート、アルデヒド、アルキン、（アセチレン性水素を有さない）アルキン、アミド及びイミド、アミン、ホスフィン、及びピリジン、無水物、アゾ、ジアゾ、アジド、ヒドラジン、及びアジド化合物、カルバメート、エポキシド、エステル、硫酸エステル、リン酸エステル、エステル、チオリン酸エステル、及びホウ酸エステル、ハ

50

ロゲン化有機化合物、イソシアネート及びイソチオシアネート、ケトン、オキシム、スルフィド（有機）であってよいが、これらに限定されない。

【0138】

医薬組成物が開示される。従って、開示される組成物は、薬学的に許容される担体をさらに備える。表1に示されるSEQ ID NO: 1～8の配列のいずれかのアミノ酸配列を備えるMGSペプチドと、薬学的に許容される担体とを備える組成物が開示される。表2に示されるSEQ ID NO: 9～14の配列のいずれかのアミノ酸配列を備えるMTSペプチドと、薬学的に許容される担体とを備える組成物が開示される。2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドと、薬学的に許容される担体とを備える組成物が開示され、4つのMGSペプチドは、GFHNVYPYTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4)のアミノ酸配列を備え、2つのMTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又はSKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13)のアミノ酸配列を備える。

10

【0139】

1. 組成物の輸送

本明細書に記載される方法において、本明細書に開示されるペプチド又は組成物の輸送（又は投与）は、様々なメカニズムを介してよい。上記において定義されるように、本明細書は、薬学的に許容される担体等の担体も含み得る組成物を作成するために使用され得る、本明細書に記載される任意の1つ以上のペプチドを備える組成物であってよい。例えば、本明細書に開示されるペプチドと、薬学的に許容される担体とを備える医薬組成物が開示される。

20

【0140】

例えば、本明細書に記載される組成物は、薬学的に許容される担体を備えてよい。「薬学的に許容される」は、当業者に周知であるように、活性成分のいかなる分解をも最小限に抑え、対象における副作用を最小限に抑えるように選択されるであろう材料又は担体を意味する。担体の例は、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、リン酸緩衝生理食塩水、又は多胞リポソームを含む。例えば、PG:PC:コレステロール:ペプチド又はPC:ペプチドが、本発明における担体として使用されてよい。他の好適な薬学的に許容される担体及びその製剤は、A. R. Gennaro編、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第19版)、Mack Publishing Company、イーストン、1995年に記載される。典型的には、製剤を等張にするために、製剤中に適切な量の薬学的に許容される塩が使用される。薬学的に許容される担体の他の例は、生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液であるが、これらに限定されない。溶液のpHは、約5～約8、又は約7～約7.5であってよい。さらなる担体は、組成物を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックス等の徐放性製剤であり、当該マトリックスは、例えば、フィルム、（血管形成手術中に血管にインプラントされる）ステント、リポソーム、又は微粒子の形態である。例えば、投与経路及び投与される組成物の濃度に応じて特定の担体がより好ましくてよいことが、当業者にとって明らかである。最も典型的には、これらは、滅菌水、生理食塩水、生理的pHの緩衝液等の溶液を含む、ヒトへの薬物投与のための標準的な担体である。

30

40

【0141】

また、医薬組成物は、本開示のポリペプチド、ペプチド、核酸、ベクターの意図された活性が損なわれない限り、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤等を含んでよい。また、医薬組成物は、（本開示の組成物に加えて）抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤等の1つ以上の有効成分を含んでよい。医薬組成物は、局所的治療が所望されるか全身的治療が所望されるか、そして治療される部位に応じて、多くの方法で投与されてよい。

50

【0142】

非経口投与の製剤の調製は、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁液、及び乳剤を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、及びオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルである。水性担体は、生理食塩水及びバッファ媒体を含む、水、アルコール／水溶液、乳剤、又は懸濁液である。非経口用ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖と塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、又は固定油を含む。静脈注射用ビヒクルは、体液及び栄養補給剤、（リンゲルブドウ糖をベースとするもの等の）電解質補給剤などである。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス等の保存剤及び他の添加剤も存在してよい。

【0143】

光学投与用の製剤は、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下剤、坐剤、散剤、液剤、粉剤を含んでよい。従来の医薬担体、水性、粉末又は油性ベース、増粘剤等が必要である又は望ましい。

【0144】

経口投与用の組成物は、粉末若しくは顆粒、水若しくは非水性媒体中の懸濁液若しくは溶液、カプセル剤、分包剤、又は錠剤が含まれる。増粘剤、香料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、又は結合剤が望ましい。組成物の一部は、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、リン酸等の無機酸、及びギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸等の有機酸との反応により形成される、又は水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム等の無機塩基、モノー、ジー、トリアルキル、アリアルアミン、置換エタノールアミン等の有機塩基との反応により形成される、薬学的に許容される酸又は塩基付加塩として投与されてよい。

【0145】

開示される輸送技術は、開示される組成物だけではなく、開示される核酸配列及びベクターのために使用されてよい。

【0146】

F. カーゴの輸送方法

本明細書に開示される組成物の1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを備える、対象のCNSへとカーゴを輸送する方法であり、カーゴに結合したペプチドはCNSに入る。

【0147】

いくつかの様態において、カーゴは、色素、画像化剤、治療薬、タンパク質、核酸、アミノ酸、ペプチド、脂質、小分子、抗体、放射性核種、炭水化物、又はナノ粒子であってよいが、これらに限定されない。例えば、いくつかの様態において、カーゴは、画像化剤、抗体、及び／又はsiRNAである。

【0148】

いくつかの様態において、組成物、従ってカーゴは、脈絡叢に入る。いくつかの様態において、組成物、従ってカーゴは、脳脊髄液(CSF)に入る。いくつかの様態において、CSFは、組成物、従ってカーゴをCNS全体に輸送する。

【0149】

いくつかの様態において、MTSペプチドは、組成物が血液脳関門を超えてCNSに入ることを可能にする。いくつかの様態において、MGSペプチドは、カーゴを、特定のCNS細胞に標的化する。いくつかの様態において、CNS細胞は、神経細胞又はミクログリアである。

【0150】

いくつかの様態において、カーゴは、CNS内部で機能活性を保持する。

【0151】

いくつかの様態において、投与は、静脈内投与又は髄腔内投与である。いくつかの様態において、本明細書に記載される任意の輸送方法が使用されてよい。

10

20

30

40

50

【0152】

いくつかの様態において、組成物は、2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドを備える組成物であり、4つのMGSペプチドは、GFHNVPYPTWGGFSDIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGWPG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を備え、2つのMTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又はSKETYSMNAQRQHERS (SEQ ID NO: 13) のアミノ酸配列を備える。

【0153】

本明細書に記載されるように、組成物は、1つ以上のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、開示される組成物は、第1のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第1のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドを別のMGSペプチドに結合する、又はMGSペプチドをカーゴに結合する、又はMGSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MGSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MGSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

【0154】

いくつかの様態において、組成物は、第2のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第1のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第3のリンカーにさらに結合する。従って、いくつかの様態において、組成物は、第3のリンカーをさらに備える。

【0155】

いくつかの様態において、第3のリンカーは、第2のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ペプチドリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドを別のMTSペプチドに結合する、又はMTSペプチドをカーゴに結合する、又はMTSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MTSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MTSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

【0156】

いくつかの様態において、第1のリンカー、及び／又は第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)リンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、ジスルフィドリンカー、ペプチドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベン

10

20

30

40

50

ゾアザシクロオクチンリンカー、8，9－ジヒドロ－1H－ジベンゾ〔1，2，3〕トリアゾロ〔4，45－d〕アゾシン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、第1、第2、及び／又は第3のリンカーは、PEGリンカーを含む。いくつかの態様において、任意の長さのリンカーが用いられてよい。例えば、PEG1～PEG30のいずれかが用いられてよい。いくつかの態様において、1～5000の長さのPEGが用いられてよい。

【0157】

いくつかの態様において、カーゴは、第1のリンカー、第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーに結合する。従って、いくつかの態様において、開示される組成物は、1つ以上のカーゴを備えてよい。いくつかの態様において、1つ以上のリンカーは、カーゴを備えてよい。

10

【0158】

いくつかの態様において、MGSペプチド、MTSペプチド、又は両方は、N末端が保護される。例えば、いくつかの態様において、MGSペプチド、MTSペプチド、又は両方は、N末端がアセチル化される。従って、いくつかの態様において、MGSペプチド又はMTSペプチドは、表1及び／又は表2中のいずれかであってよい。

【0159】

G．治療方法

本明細書に開示される組成物の1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを備える、対象のCNS障害又は傷害を治療する方法が開示され、カーゴは、CNS障害又は傷害の治療薬である。

20

【0160】

いくつかの態様において、CNS障害又は傷害は、パーキンソン病、アルツハイマー病、膠芽腫、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、又は外傷性脳損傷である。従って、いくつかの態様において、CNS障害治療薬は、抗体（例えば、モノクローナル、ポリクローナル、二重特異性）、遺伝子治療薬、化合物、核酸配列、小分子、リボ核タンパク質、又はペプチド（又はタンパク質）である。いくつかの態様において、CNS障害又は傷害治療薬の具体例は、N－メチルD－アスパラギン酸（NMDA）拮抗薬、化学療法薬、グルタミン酸拮抗薬、又は免疫調節薬（例えば、免疫抑制薬又は免疫活性化薬）であってよいが、これらに限定されない。いくつかの態様において、遺伝子治療は、治療分子をコードする遺伝物質の輸送を可能にする。いくつかの態様において、遺伝子治療は、疾患の治療又は治癒を目的として、遺伝子配列を調節、修復、置換、付加、又は欠失させるために対象に投与される、組換え核酸を含む生物学的医薬品の投与を含む。いくつかの態様において、核酸は、短鎖干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、及びpiwi相互作用RNA（piRNA）等の小分子RNAであってよいが、これらに限定されない。いくつかの態様において、治療薬は、Aβペプチド／プラーク（Donanemab、Lecanemabなど）、タウもつれ、βセクレターゼ、γセクレターゼ、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）、ブチリルコリンエステラーゼ（BuChE）を標的とする抗体であってよい。いくつかの態様において、Aβペプチド、タウもつれ、βセクレターゼ、γセクレターゼ、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）、ブチリルコリンエステラーゼ（BuChE）、CD22の発現を低下させる核酸治療を用いられてよい。

30

40

【0161】

いくつかの態様において、組成物は、2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドを備える組成物であり、4つのMGSペプチドは、GFHNVPYPTWGGFS DIDLMADEI（SEQ ID NO：1）；EQRWVQMLHLQTRYAGEWPG（SEQ ID NO：2）；FQHNPFPTYTYSMEDTDVEIK（SEQ ID NO：3）；又はYAAWPASGAWT（SEQ ID NO：4）のアミノ酸配列を備え、2つのMTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP（SEQ ID NO：9）；FPSWTSKNQQWTNQRQ（SEQ ID NO：11）；又はSKETYSMNAQRQHRS（SEQ ID NO：13）のアミノ酸配列を備える。

50

【0162】

本明細書に記載されるように、組成物は、1つ以上のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、開示される組成物は、第1のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第1のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドを別のMGSペプチドに結合する、又はMGSペプチドをカーゴに結合する、又はMGSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MGSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MGSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

10

【0163】

いくつかの様態において、組成物は、第2のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第1のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第3のリンカーにさらに結合する。従って、いくつかの様態において、組成物は、第3のリンカーをさらに備える。

20

【0164】

いくつかの様態において、第3のリンカーは、第2のリンカーに結合する。

【0165】

いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドを別のMTSペプチドに結合する、又はMTSペプチドをカーゴに結合する、又はMTSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MTSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MTSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

30

【0166】

いくつかの様態において、第1のリンカー、及び／又は第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)リンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、ジスルフィドリンカー、ペプチドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8,9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1,2,3]トリアゾロ[4,45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの様態において、第1、第2、及び／又は第3のリンカーは、PEGリンカーを含む。いくつかの様態において、任意の長さのリンカーが用いられてよい。例えば、PEG1~PEG30のいずれかが用いられてよい。いくつかの様態において、1~5000の長さのPEGが用いられてよい。

40

【0167】

いくつかの様態において、カーゴは、第1のリンカー、第2のリンカー、及び／又は第

50

3のリンカーに結合する。従って、いくつかの様態において、開示される組成物は、1つ以上のカーゴを備えてよい。いくつかの様態において、1つ以上のリンカーは、カーゴを備えてよい。

【0168】

いくつかの様態において、MGSペプチド、MTSペプチド、又は両方は、N末端が保護される。例えば、いくつかの様態において、MGSペプチド、MTSペプチド、又は両方は、N末端がアセチル化される。従って、いくつかの様態において、MGSペプチド又はMTSペプチドは、表1及び／又は表2中のいずれかであってよい。

【0169】

H. 画像化方法

本明細書に開示される組成物の1つ以上を、それを必要とする対象に投与することを備える、対象のCNSを画像化する方法が開示され、カーゴは、画像化剤である。いくつかの様態において、画像化剤は、色素、放射性核種、造影剤、蛍光タンパク質又は蛍光分子であってよいが、これらに限定されない。いくつかの様態において、画像化剤は、タンパク質。ペプチド、又は核酸に結合する。

【0170】

いくつかの様態において、組成物は、2つのMTSペプチドに共役する4つのMGSペプチドを備える組成物であり、4つのMGSペプチドは、GFHNVPYPTWGGFS DIDLMADEI (SEQ ID NO: 1); EQRWVQMLHLQTRYAGEW PG (SEQ ID NO: 2); FQHNPFPYTYSMEDTDVEIK (SEQ ID NO: 3); 又はYAAWPASGAWT (SEQ ID NO: 4)の amino 酸配列を備え、2つのMTSペプチドは、DAYKLQTSLDWQMWNP (SEQ ID NO: 9); FPSWTSKNQQWTNQRQ (SEQ ID NO: 11); 又はSK ETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 13)の amino 酸配列を備える。

【0171】

本明細書に記載されるように、組成物は、1つ以上のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、開示される組成物は、第1のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第1のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8, 9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ[1, 2, 3]トリアゾロ[4, 45-d]アゾシン、又はそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、MGSペプチドを別のMGSペプチドに結合する、又はMGSペプチドをカーゴに結合する、又はMGSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第1のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MGSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MGSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。

【0172】

いくつかの様態において、組成物は、第2のリンカーをさらに備えてよい。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第1のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第2のリンカーは、第3のリンカーにさらに結合する。従って、いくつかの様態において、組成物は、第3のリンカーをさらに備える。

【0173】

いくつかの様態において、第3のリンカーは、第2のリンカーに結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドのC末端に結合する。いくつかの様態において、第3のリンカーは、本明細書に記載される任意のリンカーであってよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、PEGリンカー、アルキルリンカー、マレイミ

10

20

30

40

50

ドリンカー、アミドリンカー、ペプチドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8, 9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ [1, 2, 3] トリアゾロ [4, 45-d] アゾシン、又はそれらの組み合わせを含んでよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、MTSペプチドを別のMTSペプチドに結合する、又はMTSペプチドをカーゴに結合する、又はMTSペプチドを別のリンカーに結合してよい。いくつかの様態において、第3のリンカーは、図3に示される構造の1つ以上を備えてよい。例えば、各MTSペプチドは、(任意の長さの)PEG等のリンカーに結合してよい。次に、各MTSペプチド-PEGは、本明細書に記載の二量体又は四量体コアを作成可能な1つ以上のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はリンカーを用いて結合してよい。例えば、いくつかの様態において、PEGは、Fmoc固相ペプチド合成中に、脱保護されたリジン(側鎖のε-アミノ基及びアミノ末端の両方)に付加されてよい。これにより、PEGを結合させる2つの遊離アミノ基が得られ、二量体を得られる。四量体の場合、完全に脱保護されたリジンを、ペプチド合成中に別のリジンと結合させてよい。この結果、PEGを結合させるために用いることができる遊離アミノ基を4つ得ることができる。

【0174】

いくつかの様態において、第1のリンカー、及び／又は第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)リンカー、アルキルリンカー、マレイミドリンカー、ジスルフィドリンカー、ペプチドリンカー、アミドリンカー、アリアルリンカー、ジベンゾオクチンリンカー、アジドリンカー、トリアゾールリンカー、ジベンゾアザシクロオクチンリンカー、8, 9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ [1, 2, 3] トリアゾロ [4, 45-d] アゾシン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの様態において、第1、第2、及び／又は第3のリンカーは、PEGリンカーを含む。いくつかの様態において、任意の長さのリンカーが用いられてよい。例えば、PEG1~PEG30のいずれかが用いられてよい。いくつかの様態において、1~5000の長さのPEGが用いられてよい。

【0175】

いくつかの様態において、カーゴは、第1のリンカー、第2のリンカー、及び／又は第3のリンカーに結合する。従って、いくつかの様態において、開示される組成物は、1つ以上のカーゴを備えてよい。いくつかの様態において、1つ以上のリンカーは、カーゴを備えてよい。

【0176】

いくつかの様態において、MGSペプチド、MTSペプチド、又は両方は、N末端が保護される。例えば、いくつかの様態において、MGSペプチド、MTSペプチド、又は両方は、N末端がアセチル化される。従って、いくつかの様態において、MGSペプチド又はMTSペプチドは、表1及び／又は表2中のいずれかであってよい。

【0177】

I. 用量

開示される組成物又はペプチドの1つ以上を単回用量で、それを必要とする対象に投与することを備える投与レジメンが開示され、単回用量は、CNSに入り、特定のCNS細胞型を標的化するために有効な量を含む。

【0178】

開示される組成物又はペプチドの1つ以上を少なくとも2回用量で、それを必要とする対象に投与することを備える投与レジメンが開示され、各用量は、同じ濃度である。いくつかの様態において、最初の用量の後の各用量は減らされてよい。いくつかの様態において、最初の用量の後の各用量は増やされてよい。

【0179】

いくつかの様態において、単回用量は、連続投与であってよい。いくつかの様態において、連続投与は、数時間、数日、数週間、又は数ヶ月であってよい。いくつかの様態において、2回以上の用量があってよい。いくつかの様態において、2回以上の用量は、数日

10

20

30

40

50

、数週間、または数ヶ月間隔で投与されてよい。

【0180】

J. キット

上記の材料及び他の材料は、開示される方法を実行するため、又はその実行を補助するために有用なキットとして、任意の好適な組み合わせで共にパッケージングすることができる。与えられるキットのキット構成要素が、開示される方法において共に使用するように設計及び適合されていれば有用である。例えば、開示されるMGSペプチド、MTSペプチド、リンカー、又はそれらの組み合わせの1つ以上を備えるキットが開示される。例えば、開示される組成物のいずれかを備えるキットが開示される。

【0181】

A. 実施例1：二重標的化

図5は、脂肪酸で修飾された二量体コアの構造の例を示す。XがCH₃O-SKETYSMNAQRQHRS (SEQ ID NO: 14) である場合、構造はMTS3__V2-2と呼ばれる。XがSEQ ID NO: 9 (MTS1)、又はSEQ ID NO: 10 (アセチル化MTS1)、又はSEQ ID NO: 11 (MTS2)、又はSEQ ID NO: 12 (アセチル化MTS2) の場合でも、同様の構造が得られる。

【0182】

図6は、CNSへの開示される組成物の輸送を評価するために用いられる一般的な実験的フローの概略図を示す。

【0183】

C16脂肪酸によるMTS3の脂質化は、CSF及び脳への輸送を増加させる(図7)。近赤外色素Alexa Fluor 750でラベル付けしたMTS変異体を、1 µg MTS/kgラット体重でSprague Dawleyラットの尾静脈に注射した。指示された時間に、大槽の毛細管穿刺によりCSFを分離した。図7Aは、指示されたイン・ビボ循環時間後のCSFを分離したMTS3変異体の濃度を示す。C16脂肪酸修飾を含むMTS3__V2は、非脂質化MTS3__V1-2よりも2.2~7.6倍高いCSF濃度を示した。脂肪酸がCNSへの輸送を促進していないことを確認するために、MTS3のアミノ酸組成を含むが配列がスクランブルされた対照ペプチドscMTS3__V2-2を脂質化した。MTS3__V2-2の取り込みはscMTS3__V2-2より9~23倍高く、輸送が脂肪酸修飾ではなくMTS3配列に依存していることを示した。図7Bは、指示された循環時間後の脳ホモジネート中の同じMTS3変異体の濃度を示す。MTS3__V2-2の脳実質への輸送は、非修飾MTS3__V1-2より10~12倍高く、これはスクランブル対照であるscMTS3__V2-2より17~31倍高い。MTS3__V1-2の濃度は24時間で検出限界未満となった。脳組織における濃度は、CSFにおける濃度より高く、脳全体に拡散し、洗い流しが遅いことを示した。

【0184】

脳蓄積は、脳の切片化及び蛍光画像化により証明されるように、親MTS3__V1-2と比較してMTS3__V2-2では向上した(図8)。冠状スライスは、1mmであり、前方(左上)から後方(右下)に配置された。脳ホモジネートからのデータと一致して、MTS3__V2-2 (C16脂肪酸修飾)は、全ての時点においてMTS3__V1-2と比較して脳の取り込みが増加した。蛍光シグナルは脳全体に見られ、実質内の拡散を示した。

【0185】

図3は、下記に示されるミクログリア標的化実験に用いられるコア構造の例を示す。図3Aは、二量体コアを示し、図3Bは、四量体コアを示す。示されるコア構造は、Xとして表現されるMGSペプチドを備えた。下記の実験において用いられた特定のMGSペプチドは、MGS2__V4、CH₃CO-YAAWPASGAWTであった。具体的には、四量体コアMGS2__V4-4が用いられた。

CH₃O-SS

【0186】

10

20

30

40

50

MGS2__V4-2は、ミクログリア細胞に特異的であり、高レベルの細胞取り込みを促進した(図9)。図9Aは、MGS2__V4-2がミクログリア細胞に高い親和性で結合し、内在化したことを示し、図9Bは、MGS2__V4-2が静止及び活性化ミクログリア細胞に結合し、内在化したことを示す。MGS2__V4-2は、神経細胞、シュワン細胞、及びアストロサイトと比較して、ミクログリア細胞に特異的であった(図9C)。

【0187】

図10は、最適化されたMGS2__V4-2がヒト血清中で安定であることを示す。Alexa Fluor 647でラベル付けしたMGS2__V4-2を、ヒト血清中、37℃でインキュベートした。指示された時間に、アリコートを除き、血清タンパク質を沈殿させ、得られた上清を650nmの吸光度をモニタリングする逆相HPLCで分析した。各時点におけるクロマトグラムを示す。不活性ペプチドの保持時間は、11.864であった。保持時間10.005分の新種が1時間で観察され、時間経過とともに増加し続けた。ピークを積分して、不活性ペプチドの割合及び観察された分解生成物の量を決定した。24時間の後、MGS2__V4-2の75%以上が不活性のままであった。10.005分の保持時間で生じたペプチド生成物に対してエレクトロスプレー質量分析を行った。この新種の質量は、MGS2__V4-2の両分岐上の3つのアミノ酸の損失に対応した。

【0188】

図12は、CNSの特定の細胞種に対する二重標的化の一般的概念を示す。図12のグラフは、HMC3細胞上で決定されたMGS2__V4-2、MGS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラ、及びMTS3__V1-2の取り込みの例を示す。細胞を、Alexa Fluor 647でラベル付けされた各ペプチド構築物の指示された濃度でインキュベートした。37℃で1時間インキュベートした後、定量的フローサイトメトリーにより取り込みを測定した。MGS2__V4-2及びMTS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラは、同じEC50及び細胞内取り込み量を示し、MTS3__V1-2の結合はMGS2__V4-2の細胞有効性に影響を与えないことを示した。予想されたように、試験したどの濃度においても、MTS3__V1-2は有意な細胞内取り込みを示さなかった。従って、取り込みは、MTSではなく、MGSにより起こった。

【0189】

図13は、共焦点顕微鏡により証明される、MTS-MGSキメラ剤(MTS3__V1-2-MGS2__V4-2)がミクログリアに内在化している二重標的化を示す。HMC3細胞を、Alexa Fluor 647でラベル付けした25nMのMTS3__V1-2-MGS2__V4-2共役体と共にインキュベートした。1時間後、ペプチド溶液を除去した。細胞膜のラベル付けにはAlexa Fluor 488共役小麦胚芽アグルチニンを用い、核の染色にはHoechst 33342を用いた。ライブセル画像化はZeiss LSM 700で行った。代表的なシングルZスライス画像が示される。Alexa Fluor 647色素のみ(図13A)又はMGS2ペプチドのスクランブル配列バージョンSAWAGAYPWAT(SEQ ID NO:17)で作製したキメラ構築物(図13B)により治療した細胞は、細胞への取り込みを示すAlexa Fluor 647染色を示さなかった。対照的に、細胞周囲の点状染色(図13C)により証明されるように、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2は、HMC3細胞に内在化された。これは、MGS2__V4-2はHMC3細胞への細胞内在化を仲介したことを示し、取り込みを定量化したフローサイトメトリーアッセイと一致していた。

【0190】

図14は、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラがCNSのミクログリアを標的化する二重標的化を示す。染色はミクログリアにおいてのみ観察された。ミクログリアの染色は、MTSのみ、MGSのみ、又は共役体のスクランブル対照バージョンでは観察されなかった。

【0191】

図15は、フローサイトメトリーにより証明される、MTS3__V1-2-MGS2__V4-2キメラがCNSのミクログリアを標的化する二重標的化を示す。MTS3__V1

10

20

30

40

50

－2－MGS2__V4－2共役体をAlexa Fluor 647（赤）でラベル付けし、Sprague Dawleyラットの側尾静脈に注射した（0.09nmol/g）。2時間の循環時間の後、動物を安楽死させ、脳組織を採取した。ミルテニーバイオテック社のgentleMACS Octo Dissociatorを用いて脳を解離した。脳細胞全体をCD11b/c（ミクログリア）Magnetic MicroBeads（ミルテニーバイオテック）と共にインキュベートし、Miltenyi QuadroMACS Separatorを用いて脳の残りの部分から分離した。その後、ミクログリアをIba1ミクログリアマーカーにより染色した。フローサイトメトリーデータをBD FACSCelestaで収集した。MTS3__V1－2－MGS2__V4－2共役体で治療した動物は、ミクログリア細胞（IBA1陽性）では陽性シフトを示したが、他のCNS細胞（IBA1陰性；図15）では示さなかった。

10

【0192】

図16は、図18に示されるsiRNA輸送実験に使用されたMTS3__V1－2－MGS2__V4－4キメラの構造を示す。図17は、代替結合を用いるMTS3__V1－2－MGS2__V4－4キメラの類似構造を示す。

【0193】

ミクログリアにおけるMGS2－MTS3キメラを用いたsiRNAデリバリーの例を図18に示す。図18Aは、キメラMGS2__V4－4（四量体）－MTS3__V1－2が、クリックケミストリーを用いて試験siRNAにコンジュゲートされた構造を示す。驚くべきことに、MGS2__V4－2（二量体）－MTS3__V1－2にsiRNAを結合させると、HMC3細胞への結合が失われた。しかしながら、この多機能キメラのターゲティングペプチドとして4量体のMGS2__V4－4を用いると、結合は回復した（パネルAに示す）。MGS2__V4－4－MTS3__V1－2およびMGS2__V4－4－MTS3__V1－2－siRNAの取り込みをパネルBに示す。

20

【0194】

図19は、神経細胞標的化を示す図20乃至24に使用される四量体MGS__NOE3__V2－4の構造を示す。

【0195】

図20は、MGS__NOE3__V2ペプチド配列の構造を示す。配列は、CH3－CO－GFHNVPYPTWGGFSDIDLMADEIであった。MGS__NOE3__V1は、同じ配列であるが、N末端保護基を含有しなかった。従って、図20の構造は、図19のXが置換された。

30

【0196】

図21は、神経細胞に対して特異的であり、高レベルの細胞取り込みを促進する四量体MGS__NOE3__V2－4を示す。単量体及び二量体MGS__NOE3__V2－4は、結合しない。作用するためには、四量体コアでなければならない。図21Aは、MGS__NOE3__V1－4の取り込みを示し、MGS__NOE3__V2－4は、指示された細胞株と共に、20nMで1時間インキュベートされた。細胞当たりの内在化されたペプチドの分子の数は、定量的フローサイトメトリーアッセイにより決定された。取り込みは、CTX TNA2（ラット前頭皮質からのアストロサイト）、HMC3（ヒトミクログリア細胞株）、H1299及びH640（共にヒト非小細胞肺癌細胞）よりも、HT22（マウスの海馬神経細胞）及びGT1/7（マウスの視床下部神経細胞）の2つの神経細胞株において顕著に高かった。MGS__NOE3__V1－4及びMGS__NOE3__V2－4は、アストロサイトよりも神経に対して5～6倍の特異性、ミクログリアと比較して3倍の特異性を示した。図21Bは、HT22へのMGS__NOE3__V2－4の取り込みが、濃度の上昇とともに増加したことを示す。また、取り込みは、単量体（MGS__NOE3__V2－1）及び二量体（MGS__NOE3__V2－2）バージョンについても評価され、HT22細胞では取り込みが見られず、神経への結合及び取り込みを誘発するためには、四量体コアでなければならないことが示された。図21Cは、のMGS__NOE3__V2－4の取り込みが経時的に増加したことを示す。HT22細胞を、200nMのMGS

40

50

__NOE3__V2-4と共に、37℃で指示された時間インキュベートした。取り込みをフローサイトメトリーアッセイにより測定した。

【0197】

MGS__NOE3__V2-4の細胞受容体をリサイクルした(図22)。HT-22細胞を、100μMのクロロキン又は50μMのシクロヘキシミドの存在下で、100nMのMGS__NOE3__V2-4を含む培養液と共に、指示された時間インキュベートした。細胞の取り込みをフローサイトメトリーにより解析した。新たなタンパク質合成を阻害するシクロヘキシミドは、MGS__NOE3__V2-4の取り込みに影響を与えず、新たなタンパク質合成は継続的な取り込みに必要ないことが示された。しかしながら、エンドソームの酸性化及び輸送を阻害するクロロキンは、1時間のインキュベーションから取り込みを大きく減少させ、24時間までMGSの内在化を抑制し続けた。MGS__NOE3__V2-4の継続的な取り込みには、エンドソームの酸性化が必要であった。MGS__NOE3__V2-4の取り込みは、時間とともに継続する。総合すると、これらのデータは、MGS__NOE3__V2-4の細胞内受容体は、内在化し、その後、細胞表面に戻り、そこでより多くのMGS__NOE3__V2-4の内在化を繰り返した。

【0198】

MGS__NOE3__V2-4は、ニューロン細胞に内在化された(図23)。HT22細胞を、200nMのMGS__NOE3__V2-4-ストレプトアビジン-AlexaFluor647共役体と共に、37℃で指示された時間インキュベートした。細胞膜のラベル付けにAlexaFluor488共役小麦胚芽アグルチニンを用い、核の染色にHoechst 33342を用いた。生細胞イメージングを行い、代表的な画像を示す。細胞内の赤色点状染色は4時間で観察され(図23B)、時間と共に増加し続けた(図23C)。ストレプトアビジン647を含むがMGS__NOE3__V2-4を含まない対照サンプルをパネルAに示す。赤色染色の欠如は、MGS__NOE3__V2-4が細胞への取り込みを媒介したことを示す。細胞の周囲に位置する赤色染色(緑色染色)は、MGS__NOE3__V2-4の細胞内への内在化を示す。

【0199】

図24A乃至24Cは、髄腔内注射後にMGS__NOE3-V2-4がCNSの細胞と会合したことを示す。MGS__NOE3-V2-4をAlexaFluor647でラベル付けし、C57BL/6マウスに髄腔内注射した。ペプチドを1時間循環させた後、動物を安楽死させ、脳組織を採取した。その後、Miltenyi Biotec gentleMACS Octo Dissociatorを用いて全脳を解離させた。脳細胞に内在化したMGS__NOE3__V2-4分子の数をフローサイトメトリー(BD FACS Celesta)により解析した。

【0200】

図35は、図26及び27に示される実験に用いられたMTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラを示す。

【0201】

図26A乃至26Cは、MTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラがHT22神経細胞に内在化されたことを示す。細胞内の穿孔染色は1時間で観察され、時間と共に増加し続けた。図26Aは、AlexaFluor647を含むがMGS__NOE3__V2-4を含まない対照サンプルとHT22細胞単体とを示す。二重標的化キメラMTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4は、細胞膜の境界内の染色により分かるように、HT22細胞に内在化された(図26Cの右下)。二重標的化キメラMTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4の取り込みは、MGS__NOE3__V2-4のみと比較して3倍減少したが、依然として有意であった。二重標的化キメラMTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4の取り込みは、経時的に継続し、24時間でほぼ250,000分子/細胞(250nM)に達した。総合すると、これらのデータは、MTS3__V1-2-MGS__NOE3__V2-4キメラは神経細胞内に取り込まれる能力を保持しており、24時間後で細胞内レベルが250nMに達し、この取り込みはキメ

ラのMGS__NOE3__V2-4成分により駆動されることを示す。

【0202】

図27は、MTS2__V1-2がトランスフェリン受容体に結合してCNSにアクセスし、MTS3__V1-2が輸送のために新規で未だ同定されていない細胞受容体を利用することを示す。リコンビナントヒトトランスフェリン受容体を1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高結合ELISAプレートに吸着させた。ビオチン化MTS2__V1-2又はMTS3__V1-2を様々な濃度で1時間インキュベートした後、サンプルを除去し、プレートを洗浄して過剰なペプチドを除去した。保持されたMTSペプチドを、ストレプトアビジン-HRP及びTMB試薬を用いて検出した。吸光度は450nmで測定され、トランスフェリン受容体に捕捉されたMTSペプチドの量に比例した。示されるように、MTS2__V1-2は、濃度依存的にヒトトランスフェリンに結合し、濃度が高くなると飽和した。比較として、MTS3__V1-2とMTS2__V1-2のスクランブル対照ペプチドとは結合を示さなかった。トランスフェリン受容体に対するMTS2__V1-2の結合親和性は、OctetRED 96システムを用いた生物層干渉法により測定した。ビオチン化MTS2__V1-2ペプチドをストレプトアビジンプローブに捕捉した。ヒト又はマウストランスフェリン受容体の様々な濃度でkonとkoff率を測定し、解離定数を決定した。トランスフェリン受容体に結合するMTS2__V1-2のKdは、ヒトタンパク質では210nM、マウス受容体では12nMであった。総合すると、これらのデータは、トランスフェリン受容体がMTS2__V1-2の標的であったことが支持される。MTS3__V1-2の受容体は不明のままであるが、データはトランスフェリン受容体ではないことを示し、このペプチドはMTS2__V1-2とは異なるメカニズムでCNSにアクセスしている可能性が高い。

【0203】

1. 材料及び方法

i. 細胞におけるペプチド内在化を定量する一般的な方法

細胞を、完全培地中、37℃で、3 Alexa Fluor 647でラベル付けした所望のペプチド(MGS、MTS、又はMGS-MTS共役体)と共にインキュベートした。ペプチド濃度、インキュベーション時間、及び使用した細胞株は、各図に示される。ペプチドを除去し、細胞を、PBS(137mMのNaCl、2.7mMのKCl、10mMのNa2HPO4、1.8mMのKH2PO4、pH7.4)で三回、0.9% NaCl中の0.1M HCL-グリシンpH2.2で二回、PBSリンスで一回洗浄した。細胞をトリプシン処理により除去した。BD FACSCelestaによりフローサイトメトリーを行い、データをFlowJo_v10.8により分析した。細胞を、前方散乱と側方散乱に基づいてゲーティングして生存細胞のみが含ませ、最低10,000イベントがカウントされた。細胞当たりの絶対的なペプチド取り込みについて、Quantum™ Alexa Fluor 647微小球を用いて標準曲線を作成した。MFIは、ピーク高さの50%で決定した。細胞当たりの内在化分子を、MESFとMFIを関連付ける標準曲線により決定し、色素分子数/MGS結合体で割算した。EC50を算出するための非線形回帰曲線フィッティングには、GraphPad Prism(登録商標)を使用した。

【0204】

細胞受容体がりサイクルされたかどうかを決定する実験のために、細胞を、100 μM のクロロキン又は250 μM のシクロヘキシミドの存在下でペプチドにより処理した。示された時点において、細胞を洗浄し、上記のように分析した。

【0205】

ii. 取り込み研究に用いられたCNS細胞株

全ての細胞株は、製造者のプロトコル及び培地供給により維持された。

10

20

30

40

50

【表 3】

細胞株	細胞種	販売会社
HT22	マウス海馬神経細胞	シグマアルドリッチ
GT1/7	マウス視床下部GnRH神経細胞	シグマアルドリッチ
HMC3	ヒトミクログリア細胞	ATCC
CTX TNA2	ラットアストロサイトタイプ1	ATCC
RN33B	ラット神経シュワン細胞	ATCC

HMC3細胞を、インターフェロン- γ (IFN- γ) (10 ng/ml、24時間)により活性化した。安静時の表現型は、IBA1、エンドトキシン受容体CD14の発現により特徴付けられたが、アストロサイトマーカーGFAPは陰性であった。活性化ミクログリアのマーカー、すなわちMHCII、CD68、CD11bは、安静時のHMC3細胞では陰性であったが、活性化後は発現が上昇した。

【0206】

i i i . イン・ビオMTS及びMTS-MGS標的化実験

Alexa Fluor 750色素に直接共役したMTSペプチド (1 μ g/g 体重) を、Sprague-Dawleyラットに側尾静脈から注射し、指示された時間 (20分、1時間、6時間、24時間) 循環させた。時間終了の10分前に動物に麻酔をかけ、200倍ヘパリン化生理食塩水を腹腔内に2 mL注射した。CSFを採取するために、頸部背面を鈍的に剥離し、脳槽を覆っている透明な硬膜を露出させた。ガラス製マイクロピペットを用い、指示された時点で大脳胞からCSFを吸引した。CSF採取後、ヘパリンを含む500 mLの氷冷1 x PBSでフラッシュして経心筋灌流を行い、体内の血液を除去した。脳とその他の組織とを分離した。脳を、Dounceホモジナイザーを用いて溶解バッファ (30 mM Tris-HCl、pH 8.0、0.05% Triton X-100) 中でホモジナイズし、可溶性画分を回収した。Alexa Fluor 750に共役したMTSペプチドを用いて標準曲線を作成し、髄液及び脳の色素量を測定した。

【0207】

組織の切片化に脳を使用する場合、最初の灌流に続いて、500 mLの氷冷5%パラホルムアルデヒドにより灌流を行う。脳マトリックスを用いて厚さ1 mmの冠状切片を作製した。このスライスをOdyssey Imagerで画像化し、800 nmの蛍光シグナルを収集した。

【0208】

i v . 共焦点顕微鏡：イン・ビトロ細胞分析

試験細胞を、処理の24時間前に35 mm共焦点顕微鏡用ディッシュに播種した。Alexa Fluor 647でラベル付けした試験ペプチドを、培地中で支持された時間、37°Cで細胞上においてインキュベートした。インキュベーション後、細胞をPBSで三回、0.9% NaCl中の0.1 M HCl-グリシン pH 2.2で二回、PBSで一回洗浄した。細胞膜のラベル付けにはAlexa Fluor 488共役小麦胚芽アグルチニンを用い、核の染色にはHoechst 33342を用いた。顕微鏡検査は、Zeiss LSM 700にPlan Apo 63x/1.4 oil DIC III対物レンズを装着して行った。画像をZenソフトウェアを用いて処理した。

【0209】

Alexa Fluor 647で直接ラベル付けする代わりにビオチン化したペプチドについて、ペプチド-S-A-AF647共役体を、Alexa FluorTM 647共役ストレプトアビジン及びビオチン化ペプチドを等しい分子比で100 μ LのPBS中で室温で30分間混合することにより調製した。共役の後、ストレプトアビジン上のすべての結合部位を飽和させるために、ビオチン (600 nM) を含む900 μ Lの培養液を混合物に追加した。その後、細胞培養液を、ペプチドを含む混合物に交換した。最終的なペプチド-S-A-AF647は各図に示される。顕微鏡観察は上記のように行った。

【0210】

v. イン・ビボ輸送実験用の共焦点顕微鏡及びフローサイトメトリー分析

上記のように、Alexa Fluor 647でラベル付けしたMTS、MGS、又はMTS-MGSをSprague-Dawleyラットに注射した。2時間の循環時間後、動物を安楽死させ、脳を経心筋灌流により固定し、採取し、凍結保護し、Leica CM1950で15 µmの切片に凍結切片化した。画像をZeiss LSM 800により撮影した。ミクログリアをIba-1により染色し、細胞核をHoechst 33342で染色した。

【0211】

フローサイトメトリーアッセイのために、Miltenyi Biotec gentleMACS Octo Dissociatorを用いて脳を解離した。全ての脳細胞を、CD11b/c (ミクログリア) Magnetic MicroBeads (ミルテニバイオテック) と共にインキュベートし、Miltenyi QuadroMACS Separatorを介して脳の残りの部分から分離した。その後、Iba1ミクログリアマーカーによりミクログリアを染色した。BD FACSCelestaによりフローサイトメトリーデータを収集した。

10

【0212】

代替的に、Miltenyi Biotec gentleMACS Octo Dissociatorを用いて脳を解離させ、全てのCNS細胞を混合物として分析した。CNS亜集団の濃縮は行わず、フローサイトメトリーにより細胞を直接分析した。細胞残屑及び細胞ダブレットを除去するために、ゲーティングを行った。

20

【0213】

vi. 血清安定性

651 nmにおける吸光度により、色素 (Alexa Fluor 647) に共役したペプチドの溶液の濃度を決定し、~14 nmolのペプチドを凍結乾燥した。凍結乾燥したペプチド粉末を400 µLのヒト血清 (Innovative Research、H6430) に溶解させ、35 µMの溶液とした。サンプルを37 °Cでインキュベートし、振盪した。各時点 (0、1、2、4、20、24時間) において、反応から50 µLのアリコート除去し、100 µLの無水エタノールを追加して血清タンパク質を沈殿させた。サンプルを氷上で15分間インキュベートした後、12000 rpmで5分間遠心分離した。その後、50 µLの上清を除去し、150 µLのPBSで希釈した。最後に、分析RP-HPLCにより、各サンプル100 µLを分析した。

30

【0214】

B. 実施例2：反応方法

図28乃至32は、開示されるペプチド及び組成物を作成する異なる反応方法の例を示す。

【0215】

二量体コア用の樹脂の調製：25 µmolのペプチド (MGS2__V2-4) を合成するために、80 mgのRink Amide MBHA樹脂 (Gyros Protein Technology、容量0.31 mmol/g) を45 mL反応容器で量り、自動合成のためにペプチド合成機 (PurePep Chorus、Gyros Protein Technology) に移動させた。樹脂を、6 mLのN,N-ジメチルホルムアミド (DMF、Fisher) /ジクロロメタン (DCM、Fisher) の1:1混合物に30分間膨潤させ、その後、水分を除去した。

40

【0216】

四量体コア用の樹脂の調製：12.5 µmolのペプチド (MGS2__V4-4) を合成するために、80 mgのRink Amide MBHA樹脂 (Gyros Protein Technology、容量0.31 mmol/g) を45 mL反応容器で量り、自動合成のためにペプチド合成機 (PurePep Chorus、Gyros Protein Technology) に移動させた。樹脂を、6 mLのN,N-ジメチルホルムアミド (DMF、Fisher) /ジクロロメタン (DCM、Fisher) の1:1混

50

合物に30分間膨潤させ、その後、水分を除去した。

【0217】

修飾アミノ酸の手動添加：（樹脂に対する）手動カップリングカクテルは、概して、1 mLのDMFに溶解した、4.4 eqのHCTU（Gyros Protein Technology）、10 eqのN-メチルモルホリン（NMM、Gyros Protein Technology）、5 eqのOxyma pure（Gyros Protein Technology）、及びFmoc-S-tert-ブチルチオール-システイン（CHEM-IMPEX INT'L INC）、N α -Fmoc-N ϵ -アジド- ϵ -リジン（CHEM-IMPEX INT'L INC）、及びFmoc-Lys（パルミトイル-Glu-OtBu）-OH（BACHEM）を含むがこれらに限定されない5 eqの修飾アミノ酸を含有した。1時間のカップリングの後、ペプチド樹脂を、3 mLのDMFで2回、3 mLのDCMで2回、3 mLのDMFで1回洗浄し、それぞれ20秒間混合した。

10

【0218】

リンカーの手動添加：1 mLのDMFに溶解した、16 eqのN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC-Gyros Protein Technology）、16 eqのN-メチルモルホリン（NMM、Gyros Protein Technology）、8 eqのFmoc-アミノPEGプロピオン酸（Polypure）、及び8 eqのOxyma pure（Gyros Protein Technology）を含有した。2時間のカップリングの後、ペプチド樹脂を（上記のように）再度洗浄した。

20

【0219】

マレイミドプロピオン酸の手動添加：1 mLのDMFに溶解した、16 eqのN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC-Gyros Protein Technology）、16 eqのN-メチルモルホリン（NMM、Gyros Protein Technology）、8 eqの3-マレイミド-プロピオン酸（Polypure）、及び8 eqのOxyma pure（Gyros Protein Technology）を含有した。2時間のカップリングの後、ペプチド樹脂を（上記のように）再度洗浄した。

【0220】

自動ペプチド合成：Fmoc固相ペプチド合成を用いて、PurePep Chorusでペプチド（MGS2__V2-4及びMGS2__V4-4）を合成した。脱保護及びカップリング工程は、混合のために窒素バブルを利用した。全ての工程は室温で行われた。

30

【0221】

脱保護：脱保護は、0.1 MのOxyma pure（Gyros Protein Technology）／DMF溶液中の2 mLの20%ピペリジン（シグマアルドリッチ）による2回の連続処理（5分及び10分）から構成された。脱保護の後、（上記のように）洗浄を行った。

【0222】

カップリング：カップリング工程は、0.25 MのOxyma pure／DMF溶液中の1 mLの0.25 MのFmoc-アミノ酸（Gyros Protein Technology）1 mL、DMF中の0.5 mLの0.44 MのHCTU（Gyros Protein Technology）L、及びDMF中の0.5 mLの1 MのN-メチルモルホリン（NMM、Gyros Protein Technology）を含んだ。30分及び1時間の連続カップリングの後、ペプチド樹脂を（上記のように）再度洗浄した。全てのカップリング工程が終了した後、ペプチド樹脂を脱保護し、N末端アミンのアセチル化に備えて洗浄した。

40

【0223】

アセチル化：N末端アミンのアセチル化は、0.2 mLの無水酢酸（Fisher）、0.2 mLのNMM、及び1.6 mLのDMFの2 mL溶液による2回の20分間の処理から構成された。アセチル化の後、3 mLのDMFで4回、3 mLのDCMで8回洗浄した。その後、ペプチド樹脂をPrelude上

50

で1時間真空乾燥した。

【0224】

開裂：ペプチド樹脂を5mLのフィルターシリンジに移動させ、92.5%トリフルオロ酢酸（TFA、Fisher）、5%トリイソプロピルシラン（Sigma-Aldrich）、及び2.5%MQ-水の5mL開裂カクテルで開裂させた。開裂混合物を2～3時間攪拌し、冷ジエチルエーテル（Fisher）に注ぎ、激しく振盪し、ペプチドを沈殿させた。混合物を室温、2000rpmで2分間遠心分離し、上清をデカントした。粗ペプチドペレットを新鮮なジエチルエーテルで2回洗浄し、ヒュームフードで乾燥させ、真空デシケーターで一晩乾燥させた。

【0225】

RP-HPLCでの粗ペプチド調製及び精製：粗ペプチドを量り、20～40%アセトニトリル（Fisher）、80～60%MQ-水、及び0.1%TFAの溶液に溶解させた。ペプチド溶液をボルテックスし、超音波処理し、1時間攪拌した。溶解した後、ペプチド溶液を0.2mmフィルターシリンジで濾過し、RP-HPLC及び分析に備えた。Waters Prep LC 2767システムを用いて、移動相としてMQ-水中の0.1%TFA（バッファA）及びアセトニトリル中の0.1%TFA（バッファB）で、ペプチドの精製を行った。各注入は、Phenomenex Jupiter 5mm C4 300Aカラム（200×212mm）を用い、室温で、20～70% Buffer Bプロファイル（0～3分20%、3～25分20～70%、25～30分90%、30～35分20%）を用いて10mL／分の流速で行った。部分を回収し、分析RP-HPLC及びESI-MSで分析して純率を評価し、凍結乾燥させた。

【0226】

マレイミドコアとペプチド（MGS又はMTS）との共役：凍結乾燥したマレイミドコアを量り、3MのGuHCl/PBSに溶解させた。その後、凍結乾燥したMGS/MTSペプチドを3MのGuHCl/PBSに別々に溶解させ、その溶液のpHを決定し、（必要であれば）～7に調整した。この溶液を合わせて、マレイミドコアとペプチドを1.0：2.2モル eq. とした。反応物を分取RP-HPLC（Agilent 1260）で精製し、その後、3時間攪拌した。ペプチド生成物を回収し、分析RP-HPLC及びESI-MSで特徴を評価し、凍結乾燥させた（図29）。

【0227】

DBCOの添加：3Mの塩化グアニジニウム（GuHCl、シグマアルドリッチ）PBS溶液に凍結乾燥ペプチドを溶解させ。溶液のpHを決定し、（必要に応じて）～6.8に調整した。その後、同じく3MのGuHCl/PBS溶液に溶解した1.2 eq. のマレイミド-PEG4-DBCO（シグマアルドリッチ）をペプチド溶液に加えた。反応物を分取RP-HPLC（Agilent 1260）で精製し、その後、30分間攪拌した。ペプチド生成物を回収し、分析RP-HPLC及びESI-MSで特性を評価し、凍結乾燥させた（図30）。

【0228】

キメラペプチド合成：

DBCOが結合した凍結乾燥ペプチド（MGS又はMTS）及びN α -Fmoc-N ϵ -アジド-ラーリジンがコアに組み込まれたペプチド（MGS又はMTS）を量り、別々に3MのGuHCl/PBSに溶解させた。各溶液のpHを決定し、（必要に応じて）～7に調整した。この溶液を合わせて、DBCOが結合したペプチドとN α -Fmoc-N ϵ -アジド-ラーリジンが結合したペプチドを1.0：2.2モル eq. とした。反応物を一晩攪拌した後、分取RP-HPLC（Agilent 1260）で精製した。ペプチド生成物を回収し、分析RP-HPLC及びESI-MSで特性を評価し、凍結乾燥させた（図31）。

【0229】

sRNAとキメラペプチドとの共役：

遊離DBCOを有するキメラペプチド（任意のコア構造からなる）をヌクレアーゼフリー

10

20

30

40

50

のPBS（NF-PBS）に溶解させ、pHを決定して（必要であれば）～7に調整した。その後、5'末端又は3'末端のいずれかにアジドを組み込んだsiRNAをNF-PBSに溶解させ、260nmにおいて吸光度を測定して濃度を決定した。この溶液を合わせて、siRNAとペプチドが1：1.2モル比とした。反応物を3～7日間攪拌し、その後、分析RP-HPLC（Agilent 1220）で精製した。部分を回収し、混合し、分析RP-HPLCで特性を評価し、凍結乾燥させた（図32）。

【0230】

当業者は、日常的な実験以上のことを行わずに、本明細書に記載される方法及び組成物の特定の実施形態に対する多くの同等物を認識又は確認することができる。このような同等は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

10

20

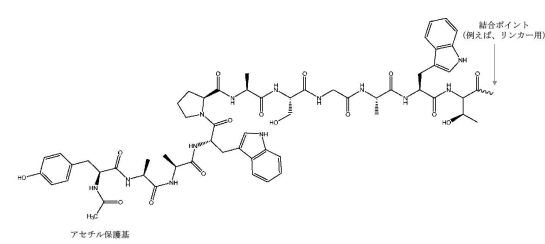
30

40

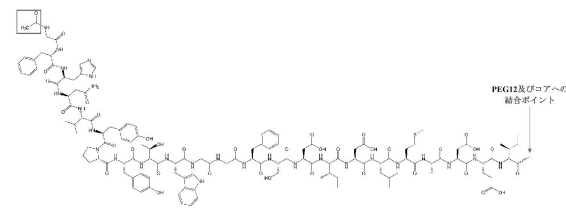
50

【図面】

【図 1】

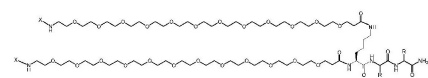


【図 2】

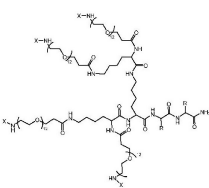


10

【図 3 A】

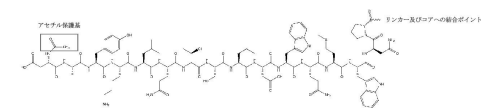


【図 3 B】

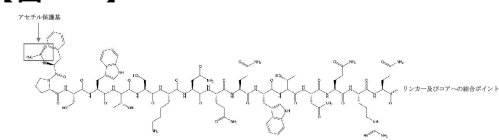


20

【図 4 A】



【図 4 B】

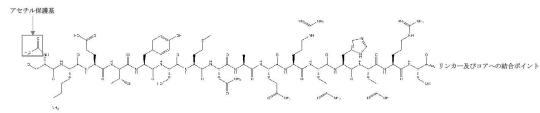


30

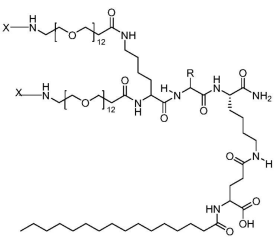
40

50

【図 4 C】

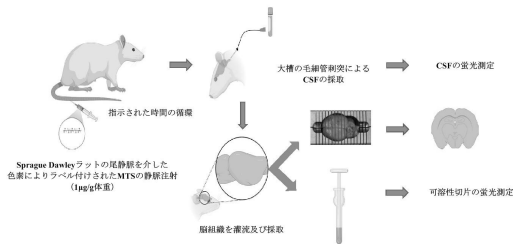


【図 5】

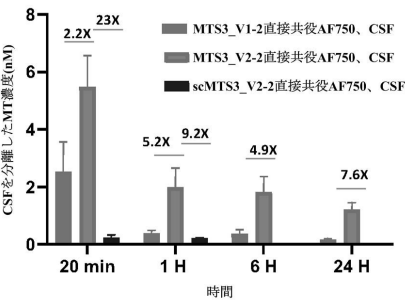


10

【図 6】

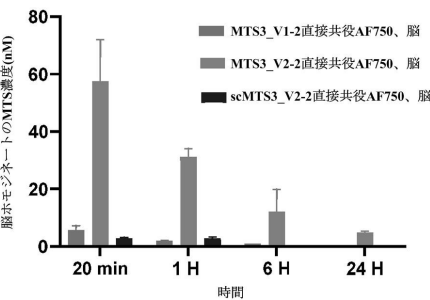


【図 7 A】

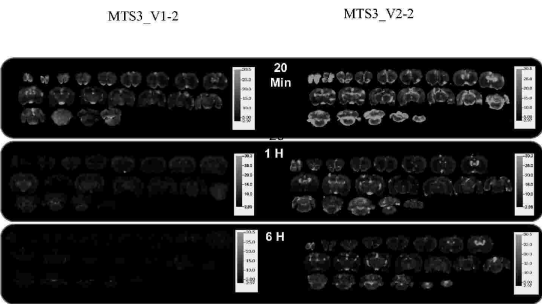


20

【図 7 B】



【図 8】

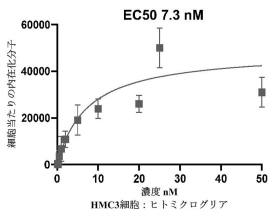


30

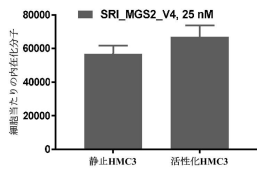
40

50

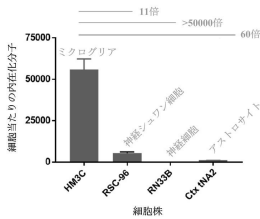
【図 9 A】



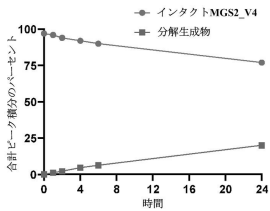
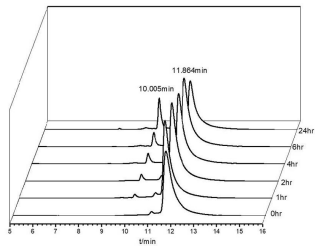
【図 9 B】



【図 9 C】



【図 10】



10

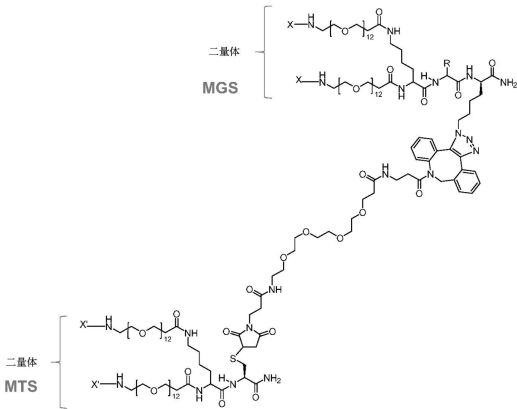
20

30

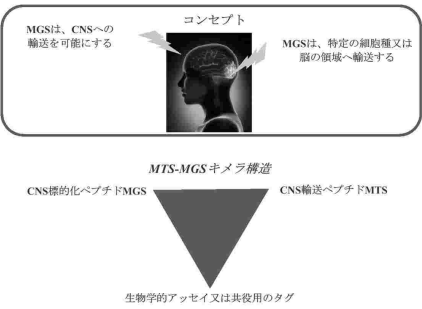
40

50

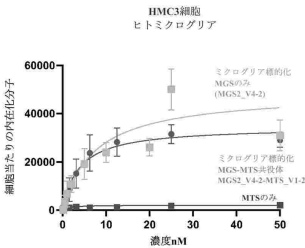
【図 1 1】



【図 1 2】



10



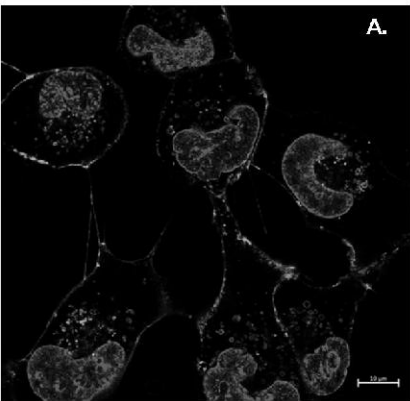
20

【図 1 3 A】

HMC3細胞ヒトミクログリア細胞株

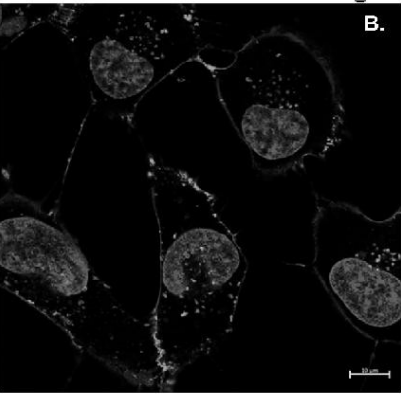
【図 1 3 B】

HMC3細胞ヒトミクログリア細胞株



Alexa Fluor 647色素のみ
対照

赤＝Alexa Fluor 647
青＝核染色
緑＝膜染色



Alexa Fluor 647によりラベル付けされた
MTS3_V1-2スクランブルMGS1_V4-2
対照

赤＝Alexa Fluor 647
青＝核染色
緑＝膜染色

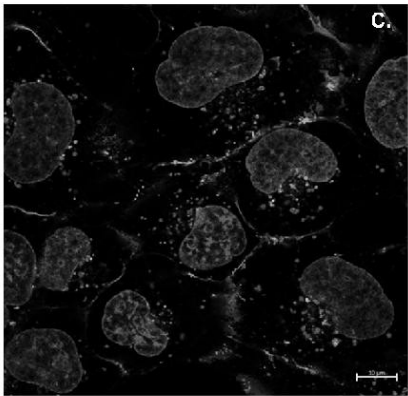
30

40

50

【図 1 3 C】

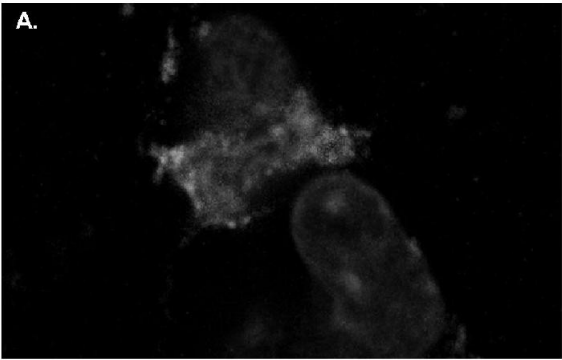
HMC3細胞ヒトミクログリア細胞株



Alexa Fluor 647によりラベル付けされた
MTS3_V1-2-MGS1_V4-2

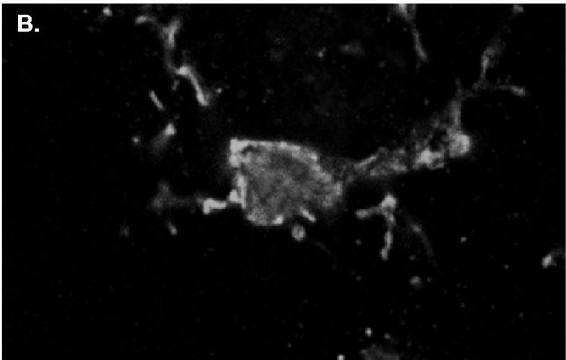
赤＝Alexa Fluor 647
青＝核染色
緑＝膜染色

【図 1 4 A】

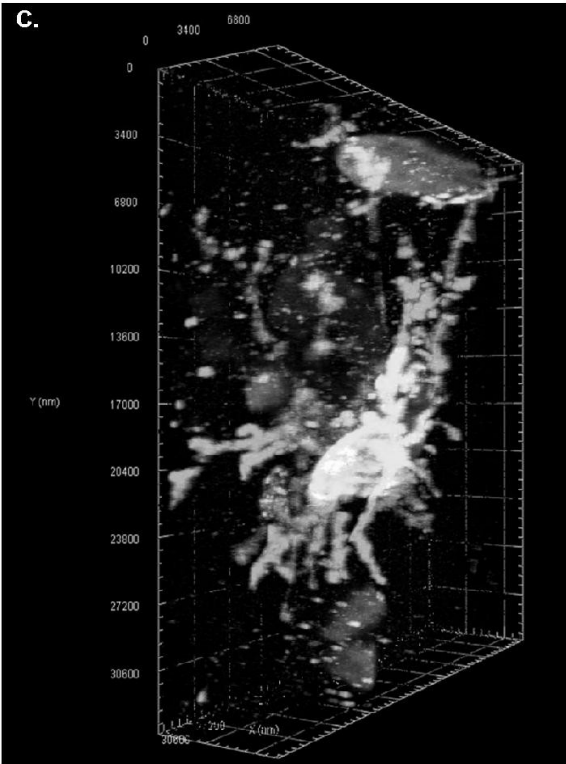


10

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】

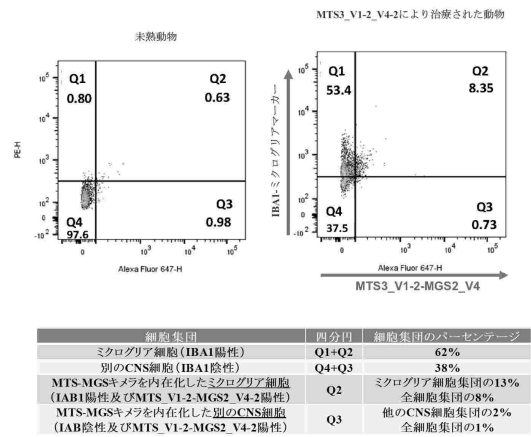


30

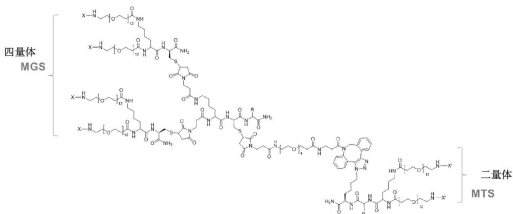
40

50

【図 1 5】

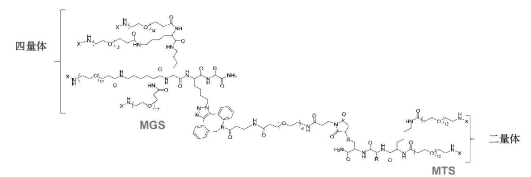


【図 1 6】

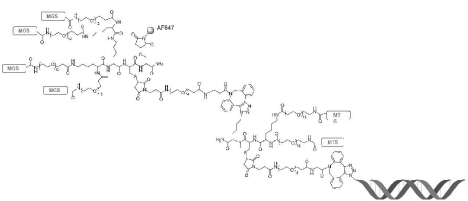


10

【図 1 7】



【図 1 8 A】



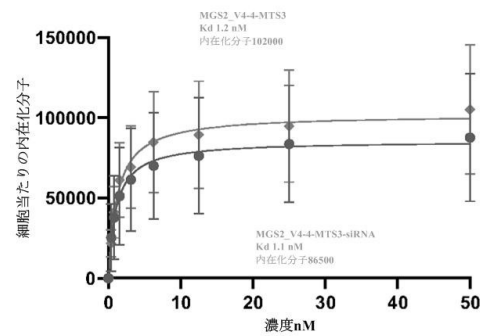
20

30

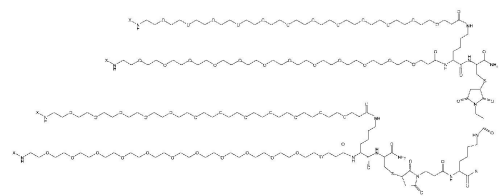
40

50

【図 1 8 B】

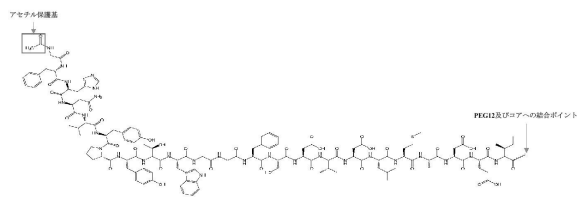


【図 1 9】

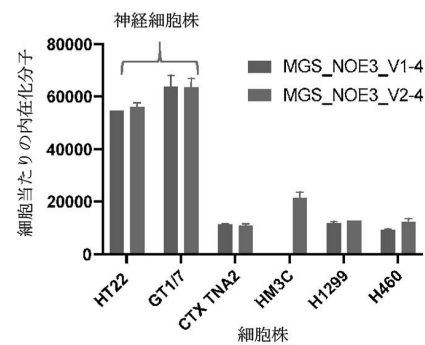


10

【図 2 0】

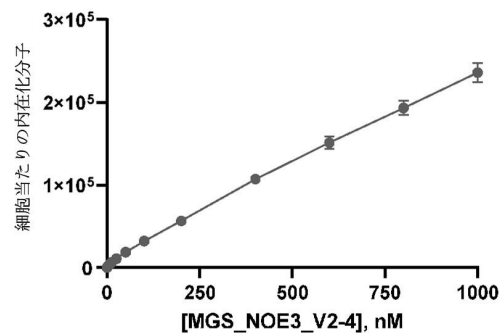


【図 2 1 A】

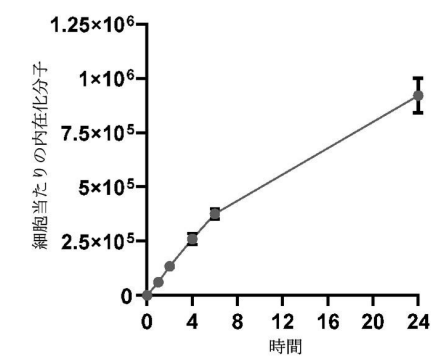


20

【図 2 1 B】



【図 2 1 C】

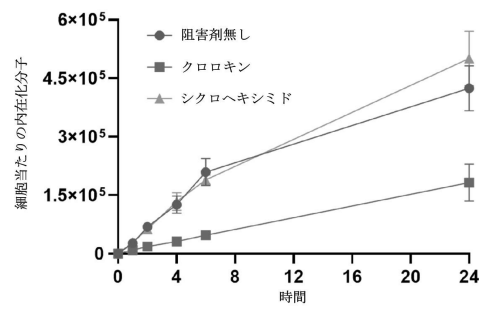


30

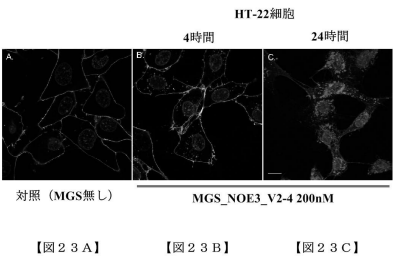
40

50

【図 2 2】

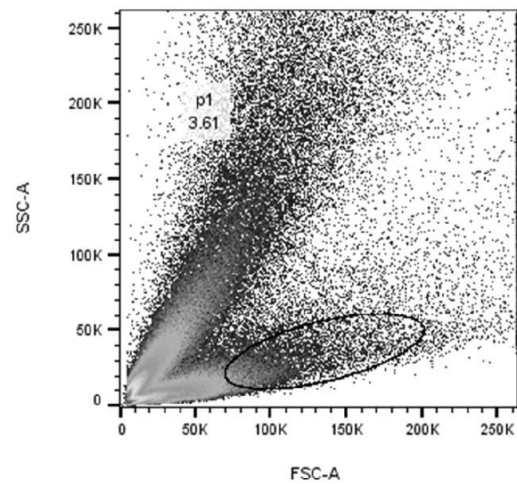


【図 2 3】

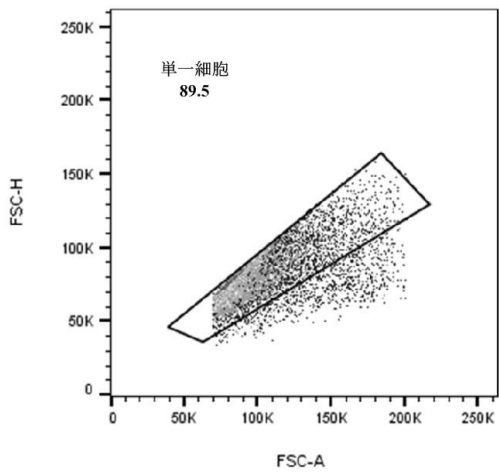


10

【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



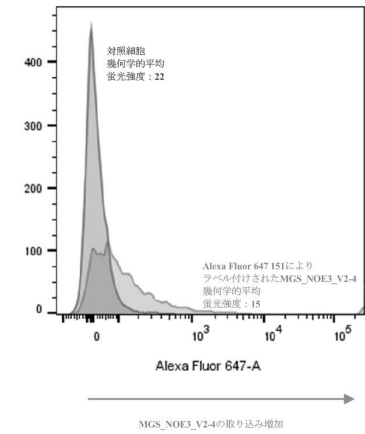
20

30

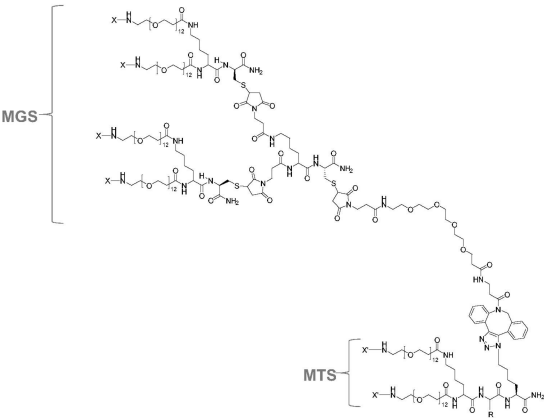
40

50

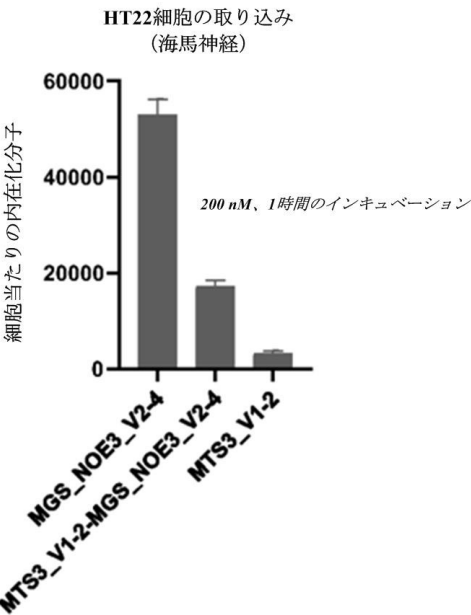
【図 2 4 C】



【図 2 5】

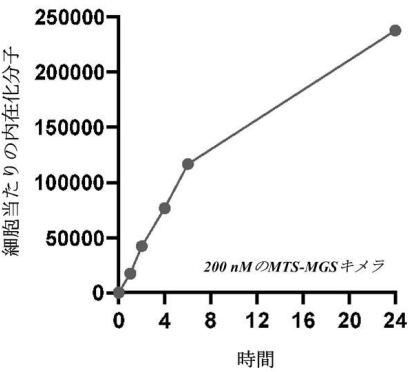


【図 2 6 A】



【図 2 6 B】

HT22細胞のMTS_NOE3_V1-2-MGS_NOE3_V2-4の取り込み



10

20

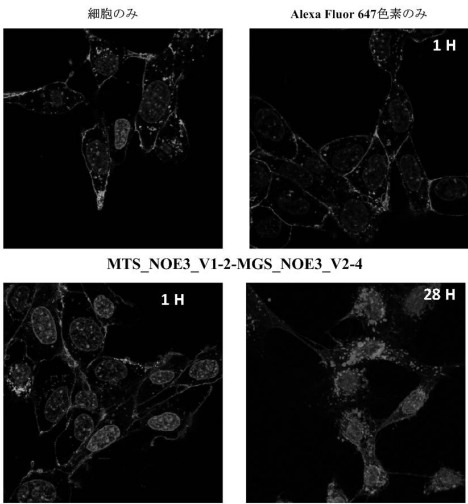
30

40

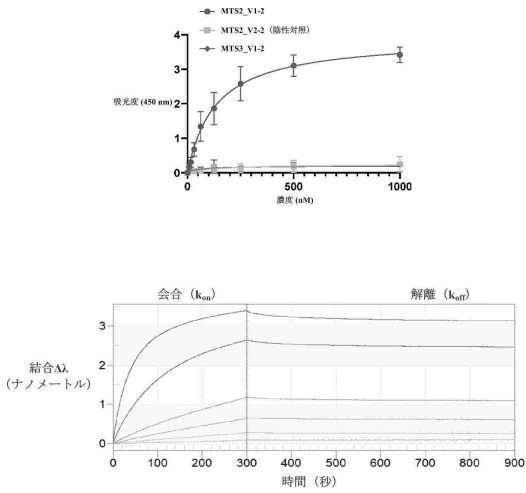
50

【図 2 6 C】

HT22細胞のMTS_NOE3_V1-2-MGS_NOE3_V2-4の取り込み

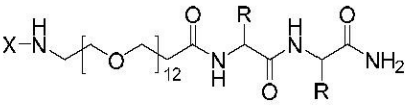


【図 2 7】

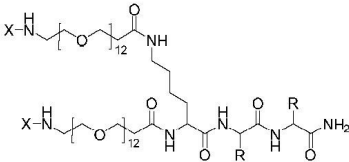


10

【図 2 8 A】



【図 2 8 B】



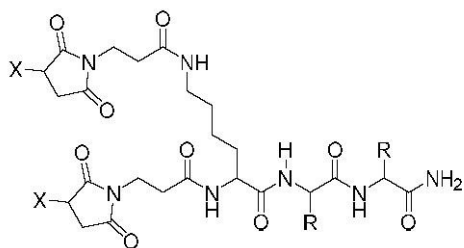
20

30

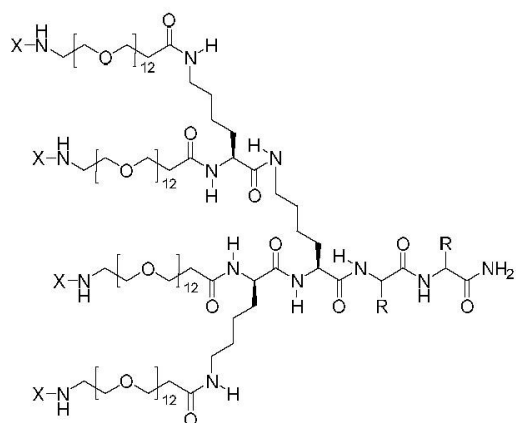
40

50

【図 28 C】

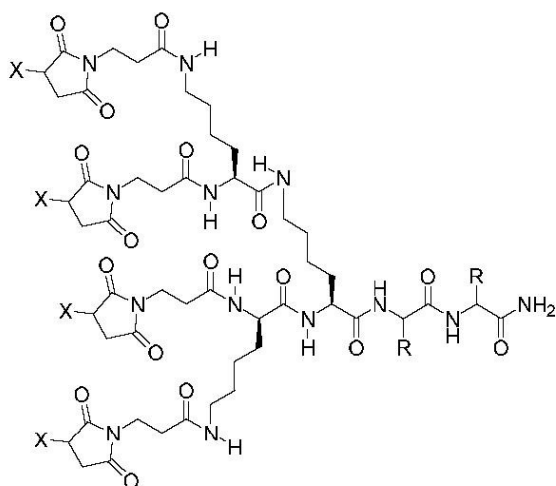


【図 28 D】

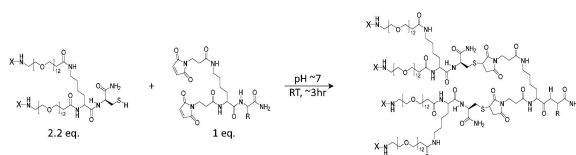


10

【図 28 E】



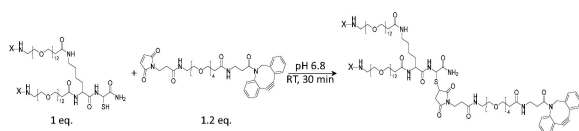
【図 29】



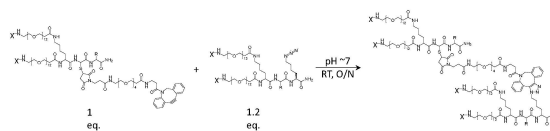
20

30

【図 30】



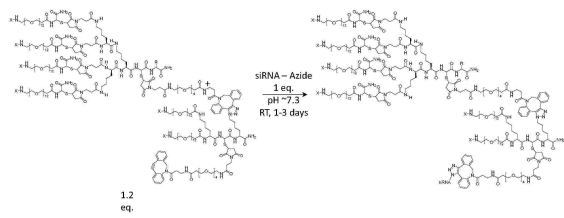
【図 31】



40

50

【図 3 2】



【配列表】

0007684523000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

早期審査対象出願

弁理士 片桐 貞典

(74)代理人 230115598

弁護士 木内 加奈子

(72)発明者 ブラウン, キャスリン シー.

アメリカ合衆国 22401 ヴァージニア州スタントン ノースオーガスタ1320番地

(72)発明者 ヴェヌゴパル, インドゥ

アメリカ合衆国 22801 ヴァージニア州ハリソンバーグ ローズデールコート2050番地

(72)発明者 マグワイア, マイケル

アメリカ合衆国 22801 ヴァージニア州ハリソンバーグ ナツメグコート3855番地

(72)発明者 シュウ, ウェイリャン

アメリカ合衆国 02180 マサチューセッツ州ストーンハム ブロードウェイ9番地

(72)発明者 パウエル, アマンダ

アメリカ合衆国 22802 ヴァージニア州シャーロットツビル ロッククリークロード704B番地

(72)発明者 リー, イートン

アメリカ合衆国 53590 ウィスコンシン州サンブレイリー ノースヘザーストーンドライブ329番地

(72)発明者 マラフィーノ, ジョン

アメリカ合衆国 22802 ヴァージニア州ハリソンバーグ スチュアートストリート1158番地

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0259924 (US, A1)

国際公開第2019/014199 (WO, A1)

国際公開第2021/188802 (WO, A1)

米国特許出願公開第2008/0193470 (US, A1)

国際公開第2010/001908 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

UniProt/GeneSeq

PubMed