

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7664158号
(P7664158)

(45)発行日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(24)登録日 令和7年4月9日(2025.4.9)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	Z N A
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	47/61 (2017.01)	A 6 1 K	47/61	
請求項の数 28 (全275頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-533535(P2021-533535)	(73)特許権者	522176001	
(86)(22)出願日	令和1年12月13日(2019.12.13)		フレッド ハッチンソン キャンサー センター	
(65)公表番号	特表2022-513798(P2022-513798 A)		アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0	
(43)公表日	令和4年2月9日(2022.2.9)		9 シアトル フェアビュー アベニュー	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/066376		ノース 1 1 0 0	
(87)国際公開番号	WO2020/124032	(74)代理人	100078282	
(87)国際公開日	令和2年6月18日(2020.6.18)		弁理士 山本 秀策	
審査請求日	令和4年12月12日(2022.12.12)	(74)代理人	100113413	
(31)優先権主張番号	62/779,885		弁理士 森下 夏樹	
(32)優先日	平成30年12月14日(2018.12.14)	(74)代理人	100181674	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏	
(31)優先権主張番号	62/836,520	(74)代理人	100181641	
(32)優先日	平成31年4月19日(2019.4.19)		弁理士 石川 大輔	
	最終頁に続く	(74)代理人	230113332	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスフェリン受容体標的ペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号67と少なくとも90%の配列同一性を有する操作されたペプチドを含む組成物であって、前記操作されたペプチドがトランスフェリン受容体(TfR)に結合する、組成物。

【請求項2】

前記操作されたペプチドが、配列番号339～配列番号344のいずれか1つの配列を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記操作されたペプチドが、配列番号67の配列を含む、請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記操作されたペプチドが、少なくとも4つのシステイン残基および少なくとも2つのジスルフィド結合を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】

前記配列が、少なくとも43のアミノ酸残基を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

前記操作されたペプチドにコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされた活性薬剤または検出可能な剤を更に含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記活性薬剤が、免疫治療薬、CTLA-4 標的薬剤、PD-1 標的薬剤、PDL-1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合されたIL-15 / IL-15Ra 複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキシソルピシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE 阻害薬、Bcl-xL 阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、神経伝達物質、抗炎症薬、免疫調節剤、腫瘍壊死因子阻害薬、腫瘍壊死受容体アンタゴニスト、チェックポイント阻害薬、CGRP 受容体アンタゴニスト、細胞毒性分子、チロシンキナーゼ阻害薬、EGFRvIII 阻害薬またはオリゴヌクレオチドである、請求項 6 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記活性薬剤が、EGFRvIII 阻害薬、デュベリシブ、アパルタミド、セミプリマブ-rwlc、ロルラチニブ、モキセツモマブバースードトクス-tdf、ルテチウムLu177 ドータテート、タラゾパリブ、ダコミチニブ、コパンリシブ、ブリガチニブ、アベルマブ、イノツズマブオゾガマイシン、アカラブルチニブ、エナシデニブ、デュルバルマブ、リボシクリブ、チサゲンレクルユーセル、ネラチニブ、ミドスタウリン、ダウノルビシン、シタラビン、テロトリストアットエチル、アキシカブタゲンシロルユーセル、ニラパリブ、カボザンチニブ、ペンブロリズマブ、オララツマブ、レンバチニブ、ニボルマブ、ルカパリブ、グラニセトロン、ドロナビノール、アテゾリズマブ、ベネトクラクス、アレクチニブ、コビメチニブ、ダラツムマブ、エロツズマブ、パノビノスタット、バルボシクリブ、タリモジンラヘルパレブベク、トリフルリジン、チピラシル、イキサゾミブ、ソニデジブ、イリノテカン、ネシツムマブ、オシメルチニブ、ジヌツキシマブ、ロラピタント、ウリジントリアセテート、トラベクテジン、ネツピタント、パロノセトロン、ベリノスタット、ブリナツモマブ、ラムシルマブ、イブルチニブ、オラパリブ、イデラリシブ、セリチニブ、オビヌツズマブ、アフアチニブ、ado-トラスツズマブエムタンシン、トラメチニブ、ボマリドミド、レナリドミド、レゴラフェニブ、ダブラフェニブ、メクロレタミン、デノスマブ、ラジウムRa223 二塩化物、パクリタキセル、エベロリムス、ボスチニブ、ビスモデギブ、ボナチニブ、アキシチニブ、カルフィルゾミブ、ピンクリスチン硫酸塩、tbo-フィルグラスチム、ペルツズマブ、インゲノールメブタート、フェンタニル、オマセタキシメベスクシナート、パゾパニブ、エンザルタミド、ziv-アフリベルセプト、ブレンツキシマブベドチン、アスパラギナーゼエルウィニアクリサンチミー、フェンタニルクエン酸塩、スニチニブリンゴ酸塩、ペグインターフェロンアルファ-2b、バンデタニブ、クリゾチニブ、イピリムマブ、ベムラフェニブ、アビラテロン酢酸エステル、エリブリンメシル酸塩、トラスツズマブ、カバジタキセル、シプリューセル-T、オンダンセトロン、オフアツムマブ、ベバシズマブ、ラスブリカーゼ、プララトレキセート、ロミデプシン、デガレリクス、レボロイコボリン、プレリキサフォル、ベンダムスチン塩酸塩、ラロキシフェン塩酸塩、トポテカン塩酸塩、イクサベピロン、ニロチニブ塩酸塩一水和物、テムシロリムス、ラパチニブ、ダサチニブ、スニチニブ、パニツムマブ、ネララビン、ソラフェニブ、ペメトレキセド、クロファラビン、セツキシマブ、シナカルセト、エルロチニブ、OSI774、アプレタント、ゲフィチニブ、アバレリクス、エストロゲン、アルフゾシンHCl、ボルテゾミブ、リユープロレリン酢酸塩、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、フルベストラント、イマチニブメシル酸塩、Neulasta、セクレチン、イブリツモマブチウキセタン、ゾレドロン酸、Campath、レトロゾール、トリプトレリンパモエート、Xeloda、ゲムツズマブオゾガマイシン、三酸化ヒ素、リユープロレリン酢酸塩埋め込み製剤、Aromasin、Busulflex、ドキシソルピシンHCl、Ellence、アミホスチン、Temo dar、UVADEX、Zofran、Actiq、Anzemet、Camptosar、ゲムシタピンHCL、Herceptin、Neupogen、Nolvadex、

20

30

40

50

Photofrin、Proleukin、Sclerosol、Valstar、Bromfenac、ポリフェブロサン20、インターフェロンアルファ-2b、Neumega、サマリウムSm153、Rituxan、Taxol、Anexsia、パミドロン酸二ナトリウム、アナストロゾール、Campostar、フルタミド、Kadian、サルグラモスチム、ドセタキセルおよびイオジキサノールからなる群から選択される、請求項6または請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記Kv1.3阻害薬が、Vm24、ShK-170、ShK-186、またはShK-192である、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

前記Vm24が、配列番号378もしくは配列番号391の配列を有する；または前記ShK-186が、配列番号379、配列番号390、または配列番号402の配列を有する、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記神経伝達物質が、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはそのフラグメントである、請求項7に記載の組成物。

【請求項12】

前記ニューロテンシンペプチドバリエーションが、配列番号350または配列番号365～配列番号369のいずれか1つの配列を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記検出可能な剤が、フルオロフォア、近赤外色素、造影剤、ナノ粒子、金属含有ナノ粒子、金属キレート、X線造影剤、PET剤、放射性核種、または放射性核種キレート剤である、請求項6に記載の組成物。

【請求項14】

前記活性薬剤、前記検出可能な剤、または両方が、リンカーを介して前記操作されたペプチドに連結されている、請求項6～13のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

前記リンカーが、表7または配列番号103～配列番号115、もしくは配列番号125のいずれか1つから選択される、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記操作されたペプチドに結合された半減期改変剤、細胞透過部分、核局在化シグナル、またはそれらの組み合わせを更に含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項17】

前記半減期改変剤が、ポリマー、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン水溶性ポリマー、水溶性ポリ(アミノ酸)、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、Fc領域、脂肪酸、パルミチン酸、アルブミンに結合する分子、またはSA21を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

前記細胞透過部分が、ポリカチオン、ポリ有機酸、エンドソーム放出ポリマー、ポリ(2-プロピルアクリル酸)、ポリ(2-エチルアクリル酸)、Tatペプチド、Argパッチ、ノットペプチド、CysTAT、S19-TAT、R8(配列番号73)、pAntp、Pas-TAT、Pas-R8(配列番号76)、Pas-FHV、Pas-pAntp、F2R4(配列番号79)、B55、アウレイン、IMT-P8、BR2、OMOTAG1、OMOTAG2、pVEC、SynB3、DPV1047、C105Y、トランスポーター、MTS、hLF、PFVYLI(配列番号93)、マウロカルシン、インペラトキシン、ハドルカリン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン(62-104)、MCOTI-II、クロロトキシン、DRI-TAT、cFΦR4(配列番号96)、R6W3(配列番号421)、ミリスレート、yBBR、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項16に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記細胞透過部分が、配列番号 71～配列番号 96、配列番号 98～配列番号 101、配列番号 116～配列番号 126、または配列番号 403～配列番号 455 のいずれか 1 つの配列を含む、請求項 16 または請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記核局在化シグナルが、配列番号 129～配列番号 135 のいずれか 1 つの配列を含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記活性薬剤または前記検出可能な剤にコンジュゲートされた、または連結された、または融合された、またはグラフトされた前記操作されたペプチドの融合体が、配列番号 35 または配列番号 70 を含む、請求項 6～15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 22】

前記半減期改変剤と結合した前記操作されたペプチドの融合体が、配列番号 373 または配列番号 375 を含む、請求項 16 または 17 に記載の組成物。

【請求項 23】

状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法における使用のための組成物であって、前記組成物は、配列番号 67 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する操作されたペプチドを含み、前記操作されたペプチドがトランスフェリン受容体 (TfR) に結合し、

20

前記方法は、

前記組成物を前記対象に投与することと、

前記組成物を前記対象の細胞層に送達することと、

前記操作されたペプチドをトランスフェリン受容体 (TfR) に結合させることと、

前記組成物を前記細胞層を越えて輸送し、それにより前記状態を治療することを含む、組成物。

【請求項 24】

前記状態が、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、内分泌障害、CNS 障害、神経変性障害、神経炎症性疾患、脳の自己免疫疾患、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、多発性硬化症、外傷性脳損傷、クローン病、炎症性腸疾患、または筋肉疾患である、請求項 23 に記載の組成物。

30

【請求項 25】

前記疼痛が、急性疼痛、慢性疼痛、または神経障害性疼痛である、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記がんが、脳癌、原発性 CNS 腫瘍、膠芽腫、神経膠腫、びまん性内在性橋膠腫、星細胞腫、髄芽腫、乳癌、肺癌、頭頸部癌、肝癌、腎癌、脾癌、前立腺癌、膵臓癌、皮膚癌、大腸癌、結腸癌、扁平上皮癌、白血病、リンパ腫、または骨髄細胞癌である、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記方法は、活性薬剤を前記細胞層を越えて送達することを更に含む、請求項 23～26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 28】

前記細胞層が、血液脳関門である、請求項 25 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 12 月 14 日に出願された米国特許仮出願第 62/779,885 号、及び 2019 年 4 月 19 日に出願された同第 62/836,520 号の優先権及び

50

利益を主張するものであり、そのそれぞれの内容全体は、参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表

本出願は、電子的に提出されたASCII形式の配列表を含み、その全体は、参照により本明細書に援用される。当該ASCIIのコピーは、2019年12月12日に作成され、名称は、44189-723__601__SL.txtであり、サイズは、552,571バイトである。

【背景技術】

【0003】

中枢神経系（CNS）中の標的への薬物送達は、血液脳関門（BBB）によって妨げられており、この用語は、極めて通過が困難なCNS毛細血管の血管内皮細胞を指す。BBBは、有害な代謝物及び病原体が脳内に入らないようにするために存在するが、同時に、従来の薬を使用したCNS疾患の治療を特に困難にしている。例えば、原発性CNS腫瘍（例えば、神経膠腫）ならびに神経炎症性疾患及び神経変性疾患（例えば、多発性硬化症及びアルツハイマー病）は、末梢組織に影響を及ぼす同様の疾患には高い効果を示す治療法に対して、応答が特に低い。したがって、CNSならびに他の器官及び組織に治療用及び／または診断用分子を送達する改善されたアプローチが必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

様々な態様において、本開示は、操作されたトランスフェリン受容体（TfR）結合ペプチド、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログを含む組成物を提供する。

【0005】

様々な態様において、本開示は、ペプチドコンストラクトを含む組成物を提供し、ここで、ペプチドコンストラクトは、a) トランスフェリン受容体（TfR）結合ペプチド、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログと、b) 活性薬剤とを含み、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。

【0006】

様々な態様において、本開示は、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%の配列同一性を有する操作されたペプチド、またはそのバリエーションもしくは機能性フラグメントを含む組成物を提供する。

【0007】

いくつかの態様において、ペプチドは、血液脳関門（BBB）を含む細胞層を透過する。いくつかの態様において、ペプチドは、膜を透過し、ここで、膜は、細胞の膜である。いくつかの態様において、細胞は、TfRを発現する。いくつかの態様において、ペプチドは、TfR媒介性エンドサイトーシスを介して細胞の膜を透過する。

【0008】

いくつかの態様において、ペプチドは、TfRに結合し、次いで、解離することによって、血液脳関門を越えてCNSに送達される。いくつかの態様において、ペプチドは、受容体媒介性トランスサイトーシスによって血液脳関門を越えて送達される。いくつかの態様において、細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの態様において、ペプチドが局在する細胞または器官は、TfRを過剰発現している。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344を含む。

【0009】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、G 5、A 7、S 8、N 14、L 17、E 18、E 21、L 38、L 42、L 45、D 46、H 47、S 50、及び Q 51 に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、位置 3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び 40 のいずれか 1 つに対応する親水性表面遠位残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、親水性表面遠位残基は、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、R 3、E 4、R 9、K 12、D 15、E 16、K 19、R 23、S 26、S 28、N 29、T 30、E 31、E 32、D 33、E 35、Q 36、E 37、E 39、及び D 40 に対応する親水性表面遠位残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、15、35、39、もしくは 49 のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に親水性残基を含む。いくつかの態様において、親水性残基は、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、D 15、E 35、E 39、及び H 49 に対応する親水性残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0010】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、11、25、もしくは 27、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に疎水性残基を含む。いくつかの態様において、疎水性残基は、アミノ酸 A、M、I、L、V、F、W、もしくは Y、またはこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、M 11、M 25、M 27 に対応する疎水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0011】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、位置 45 に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、脂肪族残基は、アミノ酸 A、M、I、L、または V から選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 を基準として、L 45 に対応する脂肪族残基を含む。

【0012】

いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも 1 つのジスルフィド結合、少なくとも 2 つのジスルフィド結合、少なくとも 3 つのジスルフィド結合、または少なくとも 5 つのジスルフィド結合を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つと、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 1 に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 2 に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 4 に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 30 に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 32 に示される配列を含む。

【0013】

いくつかの態様において、ペプチドは、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる。いくつかの態様において、細胞透過部分は、ポリカチオン、ポリ有機酸、エンドソーム放出ポリマー、ポリ(2-プロピルアクリル酸)、ポリ(2-エチルア

10

20

30

40

50

クリル酸)、T a t ペプチド、A r g パッチ、ノットペプチド、C y s T A T、S 1 9 - T A T、R 8 (配列番号 7 3)、p A n t p、P a s - T A T、P a s - R 8 (配列番号 7 6)、P a s - F H V、P a s - p A n t P、F 2 R 4 (配列番号 7 9)、B 5 5、アウレイン、I M T - P 8、B R 2、O M O T A G 1、O M O T A G 2、p V E C、S y n B 3、D P V 1 0 4 7、C 1 0 5 Y、トランスポーター、M T S、h L F、P F V Y L I (配列番号 9 3)、マウロカルシン、インペラトキシン、ハドルカリン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン (6 2 - 1 0 4)、M C o T I - I、クロロトキシン、D R I - T A T、c F Φ R 4 (配列番号 9 6)、R 6 W 3 (配列番号 4 2 1)、ミリスレート、y B B R、またはそのフラグメントもしくはバリエーション、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、細胞透過部分は、配列番号 7 1 ~ 配列番号 9 6、配列番号 9 8 ~ 配列番号 1 0 1、配列番号 1 1 6 ~ 配列番号 1 2 6、または配列番号 4 0 3 ~ 配列番号 4 5 5 のいずれか 1 つである。

10

【0014】

いくつかの態様において、ペプチド配列は、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、少なくとも 2 0、少なくとも 2 1、少なくとも 2 2、少なくとも 2 3、少なくとも 2 4、少なくとも 2 5、少なくとも 2 6、少なくとも 2 7、少なくとも 2 8、少なくとも 2 9、少なくとも 3 0、少なくとも 3 1、少なくとも 3 2、少なくとも 3 3、少なくとも 3 4、少なくとも 3 5、少なくとも 3 6、少なくとも 3 7、少なくとも 3 8、少なくとも 3 9、少なくとも 4 0、少なくとも 4 1、少なくとも 4 2、少なくとも 4 3、少なくとも 4 4、少なくとも 4 5、少なくとも 4 6、少なくとも 4 7、少なくとも 4 8、少なくとも 4 9、少なくとも 5 0、少なくとも 5 1、少なくとも 5 2、少なくとも 5 3、少なくとも 5 4、少なくとも 5 5、少なくとも 5 6、少なくとも 5 7、少なくとも 5 8 の残基、少なくとも 5 9、少なくとも 6 0、少なくとも 6 1、少なくとも 6 2、少なくとも 6 3、少なくとも 6 4、少なくとも 6 5、少なくとも 6 6、少なくとも 6 7、少なくとも 6 8、少なくとも 6 9、少なくとも 7 0、少なくとも 7 1、少なくとも 7 2、少なくとも 7 3、少なくとも 7 4、少なくとも 7 5、少なくとも 7 6、少なくとも 7 7、少なくとも 7 8、少なくとも 7 9、少なくとも 8 0、または少なくとも 8 1 のアミノ酸残基を含む。

20

【0015】

いくつかの態様において、ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号 3 3 ~ 配列番号 3 5、配列番号 6 8 ~ 配列番号 7 0、配列番号 1 6 8 ~ 配列番号 1 7 0、配列番号 2 0 3 ~ 配列番号 2 0 5、配列番号 2 2 5 ~ 配列番号 3 3 2、配列番号 3 5 9 ~ 配列番号 3 6 1、配列番号 3 7 3、配列番号 3 7 5、配列番号 3 8 1、配列番号 3 8 4、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 8、配列番号 3 8 9、配列番号 3 9 3、配列番号 3 9 6、配列番号 3 9 7、配列番号 4 0 0、または配列番号 4 0 1 のいずれか 1 つと、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する。

30

40

【0016】

いくつかの態様において、活性薬剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表 7 または配列番号 1 0 3 ~ 配列番号 1 1 5、もしくは配列番号 1 2 5 のいずれか 1 つから選択される。いくつかの態様において、活性薬剤は、免疫治療薬、C T L A - 4 標的薬剤、P D - 1 標的薬剤、P D L - 1 標的薬剤、I L 1 5 薬剤、融合された I L - 1 5 / I L - 1 5 R α 複合薬剤、I F N ガンマ薬剤、抗 C D 3 薬剤、イオンチャネル調節剤、K v 1 . 3 阻害薬、アウリスタチン、M M A E、メイタンシノイド、D M 1、D M 4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、S N - 3 8、B A C E 阻害薬、B c l - x L 阻害薬、W E H I - 5 3 9、ベネトクラク

50

ス、A B T-199、ナビトクラックス、A T-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である。いくつかの態様において、K v 1.3 阻害薬は、V m 24、S h K-170、S h K-186、またはS h K-192である。いくつかの態様において、V m 24 は、配列番号378または配列番号391の配列を有する。いくつかの態様において、S h k-185は、配列番号379、配列番号390、または配列番号402の配列を有する。いくつかの態様において、神経伝達物質は、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである。いくつかの態様において、ニューロテンシンペプチドバリエーションは、配列番号350または配列番号365～配列番号369に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

10

【0017】

いくつかの態様において、組成物は、ペプチドに結合された半減期改変剤を更に含む。いくつかの態様において、半減期改変剤は、ポリマー、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン水溶性ポリマー、水溶性ポリ（アミノ酸）、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、Fc領域、脂肪酸、パルミチン酸、またはアルブミンに結合する分子を含む。いくつかの態様において、半減期改変剤は、S A 21を含む。いくつかの態様において、S A 21は、配列番号376または配列番号377の配列を有する。

20

【0018】

いくつかの態様において、組成物は、リンカーによってペプチドに結合された検出可能な剤を更に含む。いくつかの態様において、検出可能な剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表7または配列番号103～配列番号115、もしくは配列番号125のいずれか1つから選択される。いくつかの態様において、検出可能な剤は、フルオロフォア、近赤外色素、造影剤、ナノ粒子、金属含有ナノ粒子、金属キレート、X線造影剤、PET剤、放射性核種、または放射性核種キレート剤である。

【0019】

様々な態様において、本開示は、本明細書に記載される組成物のいずれか、またはその塩と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

30

【0020】

様々な態様において、本開示は、組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、a) 本明細書に記載されるペプチドのいずれかを含む組成物または本明細書に記載される医薬組成物のいずれかと細胞層を接触させることと、b) 組成物を細胞層を越えて輸送することとを含む、方法を提供する。

【0021】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、a) 本明細書に記載されるペプチドのいずれかを含む組成物または本明細書に記載される医薬組成物のいずれかを対象に投与することと、b) 組成物を細胞層を越えて輸送することとを含む、方法を提供する。

40

【0022】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、対象の組織におけるT f Rの発現に基づいて、本明細書に記載されるペプチドのいずれかを含む組成物または本明細書に記載される医薬組成物のいずれかのある量を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0023】

いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である。いくつかの態様において、方法は、ペプチドの対象への投与により、疼痛のレベルを低減することを更に含む。いくつかの態様において、投与

50

は、吸入、鼻腔内投与、経口投与、局所投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、またはこれらの組み合わせである。いくつかの態様において、組成物は、ボラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される。

【0024】

いくつかの態様において、方法は、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、または内分泌障害の患者にペプチドを投与することを更に含む。いくつかの態様において、対象は、がんを有する。いくつかの態様において、対象は、CNSの疾患を有する。いくつかの態様において、対象は、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんを有する。

【0025】

様々な態様において、本開示は、請求項1～53のいずれか1項に記載の組成物または請求項54に記載の医薬組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、組成物と細胞層を接触させることと、組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、方法を提供する。

【0026】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、請求項1～53のいずれか1項に記載の組成物または請求項54に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0027】

いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRへの結合を含む。いくつかの態様において、輸送することは、トランスサイトosisを更に含む。いくつかの態様において、トランスサイトosisは、小胞性トランスサイトosisである。いくつかの態様において、トランスサイトosisは、TfR媒介性である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRからの解離を更に含む。いくつかの態様において、輸送することは、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む。

【0028】

様々な態様において、本開示は、TfR結合ペプチドを設計するための方法であって、a) コンピュータープログラムを使用して、安定性及びフォールディングが最適化されたペプチドをペプチドのライブラリーから特定することであって、ペプチドのライブラリーの各ペプチドは、少なくとも3つの分子内ジスルフィド結合を含む、特定することと、b) コンピュータープログラムを使用して、ペプチド：TfR複合体の結合パッチのアミノ酸残基を重ね合わせ、結合パッチをペプチド上にグラフトした後、TfRに結合する安定なペプチドを決定することと、c) 結合パッチをペプチド上にグラフトして、安定なペプチドを生成することを含む、方法を提供する。

【0029】

いくつかの態様において、方法は、部位飽和変異導入を実施して、安定なペプチドよりもTfRに対する結合親和性が高い変異ペプチドを得ることを更に含む。いくつかの態様において、ペプチドのライブラリーのペプチドは、20～75アミノ酸残基長である。

【0030】

様々な態様において、本開示は、組成物であって、トランスフェリン受容体(TfR)、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログに結合することが可能な非天然ペプチドを含む組成物を提供する。

【0031】

様々な態様において、本開示は、組成物であって、ペプチドコンストラクトを含む組成物であり、ここで、ペプチドコンストラクトは、トランスフェリン受容体(TfR)、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログに結合することが可能なペプチドと、活性薬剤とを含み、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、組成物を提供する。

【0032】

いくつかの態様において、トランスフェリン受容体(TfR)は、ヒトトランスフェリ

10

20

30

40

50

ン受容体、またはマウストランスフェリン受容体、またはヒトトランスフェリン受容体及びマウストランスフェリン受容体である。

【0033】

様々な態様において、本開示は、組成物であって、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%の配列同一性を有するペプチド、またはそのバリエーションもしくは機能性フラグメントを含む組成物を提供する。

10

【0034】

いくつかの態様において、ペプチドは、内皮細胞を含む細胞層を透過する。いくつかの態様において、ペプチドは、血液脳関門（BBB）を含む細胞層を透過する。いくつかの態様において、ペプチドは、TfR媒介性トランスサイトーシスを介して、内皮細胞を含む細胞層を透過する。いくつかの態様において、ペプチドは、膜を透過し、膜は、細胞の膜である。いくつかの態様において、細胞は、TfRを発現する。いくつかの態様において、ペプチドは、TfR媒介性エンドサイトーシスを介して細胞の膜を透過する。いくつかの態様において、ペプチドは、TfRを発現する任意の細胞内または細胞とともに局在することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、TfRを発現する細胞表面膜に結合した状態を保つ。いくつかの態様において、ペプチドは、TfRに結合することによって、細胞中に内在化する。いくつかの態様において、ペプチドは、TfRに結合し、次いで、解離することによって、血液脳関門を越えてCNSに送達される。いくつかの態様において、ペプチドは、受容体媒介性トランスサイトーシスによって血液脳関門を越えて送達される。

20

【0035】

いくつかの態様において、細胞は、CNS細胞、赤血球、赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、筋細胞、脳細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、骨髄細胞、虫垂細胞、リンパ節細胞、扁桃腺細胞、脾細胞、筋細胞、肝細胞、胆嚢細胞、膵細胞、消化管の細胞、腺細胞、腎細胞、膀胱細胞、内皮細胞、上皮細胞、脈絡叢上皮細胞、グリア細胞、星状膠細胞、または神経系に関連する細胞である。

30

【0036】

いくつかの態様において、細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの態様において、腫瘍細胞は、卵巣癌細胞、結腸癌細胞、肺癌細胞、骨もしくは骨髄に位置する癌細胞、膠芽腫細胞、星細胞腫細胞、神経膠腫細胞、髄芽腫細胞、上衣腫細胞、脈絡叢癌細胞、正中膠腫細胞、びまん性内性橋膠腫（DIPG）細胞、乳癌細胞、肝癌細胞、結腸癌細胞、脳癌細胞、脾癌細胞、唾液腺の癌細胞、腎癌細胞、筋肉癌細胞、骨髄細胞癌細胞、皮膚癌細胞、泌尿生殖器癌細胞、骨肉腫細胞、筋肉由来肉腫細胞、黒色腫細胞、頭頸部癌細胞、神経芽細胞腫細胞、前立腺癌細胞、膀胱癌細胞、急性リンパ性白血病細胞、急性骨髄性白血病細胞、慢性リンパ性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞、ホジキンリンパ腫細胞、非ホジキンリンパ腫細胞、またはCMYC過剰発現癌細胞である。いくつかの態様において、ペプチドは、器官または組織に局在する。

40

【0037】

いくつかの態様において、器官または組織は、脳、甲状腺、副甲状腺、副腎、骨髄、虫垂、リンパ節、扁桃腺、脾臓、筋肉、肝臓、胆嚢、膵臓、消化管、腎臓、膀胱、卵管、乳房、膣、子宮頸、子宮内膜、卵巣、胎盤、及び皮膚である。いくつかの態様において、ペプチドが局在する細胞または器官は、TfRを過剰発現している。いくつかの態様において、ペプチドは、器官の実質に局在する。

【0038】

いくつかの態様において、ペプチドは、ヒトTfR1（UniProtKB-P02786）の配列番号363（MMDQARSASF SNLFGGEPLSYTRFSLARQ

50

VDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICY
GTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPV
REEPGEDFPAA RRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLN
ENS YVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQH FV
KIQVKDSAQNSV IIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATV
TGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKV
ANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDP
YTPGFPSFNHTQFP PSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLF GN
MEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSESKNVKLT VSNVLKEIKILN
IFGVIKGFVEPDHYVV VGAQRDAWGPGA AKSGVGTALLK
LAQMFSDMV LKDGFP SRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLE
GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEK
TMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYS
GIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
AAAEVAGQFV IKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQY
RADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDR
FVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RHVFWGSGSHT
LPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQ LALATWTIQGAANA
LSGDVWDIDNEF)

に対応する残基506～510、523～531、または611～662からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及びQ51に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、位置3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び40のいずれか1つに対応する親水性表面遠位残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0039】

いくつかの態様において、親水性表面遠位残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及びD40に対応する親水性表面遠位残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、15、35、39、もしくは49のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に親水性残基を含む。

【0040】

いくつかの態様において、親水性残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、D15、E35、E39、及びH49に対応する親水性残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、11、25、もしくは27、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に疎水性残基を含む。いくつかの態様において、疎水性残基は、アミノ酸A、M、I、L、V、F、W、もしくはY、またはこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、M11、M25、M27に対応する疎水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、位置45に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、脂肪族残基は、アミノ酸A、M、I、L、またはVから選択される。

【0041】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、L45に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも1つのジスルフィド結合、少なくとも2つのジスルフィド結合、少なくとも3つのジスルフィド結合、または少なくとも5つのジスルフィド結合を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、3つのジスルフィド結合を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも2つ、少なくとも4つ、または少なくとも6つのシステイン残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、6つのシステイン残基を含む。

【0042】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、C6、C10、C20、C34、C44、及びC48、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置にシステイン残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドの少なくとも1つのシステイン残基は、ジスルフィド結合に関与する。いくつかの態様において、6つのシステイン残基は、ジスルフィド結合に関与する。いくつかの態様において、ジスルフィド結合は、ペプチドの安定性を高める。

【0043】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。

【0044】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号4に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号30に示される配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32に示される配列を含む。

【0045】

いくつかの態様において、3つのジスルフィド結合を含むペプチドは、システイン高密度ペプチド(CDP)に由来する。いくつかの態様において、3つのジスルフィド結合を含むペプチドは、CDPである。いくつかの態様において、ペプチドは、トランスフェリン、またはそのホモログ、バリエーション、もしくはフラグメントと、TfRへの結合について、競合する。いくつかの態様において、ペプチドは、TfRを隔離するか、または別のタンパク質がTfRに結合するのを妨げる。いくつかの態様において、ペプチドは、トランスフェリン、またはその内因性誘導体と比較して、TfRに対して同等またはそれより大きい親和性または特異性を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、トランスフェリン、またはその内因性誘導体と比較して、TfRに対して同等またはそれより小さい解離定数を有する。更なる態様では、ペプチドは、40 nM未満、30 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、1 nM未満または0.1 nM未満の K_D を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、標的細胞を透過するか、または標的細胞内に局在する。

【0046】

いくつかの態様において、ペプチドは、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる。いくつかの態様において、細胞透過部分は、ポリカチオン、ポリ有機酸、エンドソーム放出ポリマー、ポリ(2-プロピルアクリル酸)、ポリ(2-エチルアクリル酸)、Tatペプチド、Argパッチ、ノットペプチド、CysTAT、S19-

10

20

30

40

50

TAT、R8（配列番号73）、pAntp、Pas-TAT、Pas-R8（配列番号76）、Pas-FHV、Pas-pAntp、F2R4（配列番号79）、B55、アウリン、IMT-P8、BR2、OMOTAG1、OMOTAG2、pVEC、SynB3、DPV1047、C105Y、トランスポータン、MTS、hLF、PFVYLI（配列番号93）、マウロカルシン、インペラトキシン、ハドルカルシン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン（62-104）、MCOTIE-II、クロロトキシン、DRI-TAT、cFΦR4（配列番号96）、ミリステート、yBBR、またはそのフラグメントもしくはバリエーション、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、細胞透過部分は、マウロカルシン、インペラトキシン、ハドルカルシン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン（62-104）、MCOTIE-II、またはクロロトキシンである。

10

【0047】

いくつかの態様において、ペプチドは、組織または細胞を標的とするか、ホーミングするか、蓄積するか、または選択的に透過する。いくつかの態様において、ペプチドは、標的細胞の核内に局在する。いくつかの態様において、ペプチドは、シグナルペプチドまたは部分との製剤化、融合、またはコンジュゲーションによって、標的細胞の核内に局在する。いくつかの態様において、ペプチドは、がん性組織またはがん細胞を標的とするか、ホーミングするか、蓄積するか、または選択的に透過する部分または第2のペプチドに更にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの態様において、部分または第2のペプチドは、ノットペプチドまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである。いくつかの態様において、標的細胞は、がん性細胞または腫瘍細胞である。いくつかの態様において、標的細胞は、CNS細胞、赤血球、赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、筋細胞、脳細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、骨髄細胞、虫垂細胞、リンパ節細胞、扁桃腺細胞、脾細胞、筋細胞、肝細胞、胆嚢細胞、膵細胞、消化管の細胞、腺細胞、腎細胞、膀胱細胞、内皮細胞、上皮細胞、脈絡叢上皮細胞、グリア細胞、星状膠細胞、または神経系に関連する細胞である。

20

【0048】

いくつかの態様において、ペプチドは、ジスルフィドノットを介したジスルフィドを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、システイン残基間に形成された複数のジスルフィド架橋を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、システイン残基間に形成される3つ以上のジスルフィド架橋を含み、ジスルフィド架橋のうちの1つは、他の2つのジスルフィド架橋によって形成されるループを通過する。いくつかの態様において、ペプチドは、ジスルフィド結合もジスルフィドノットも含まない。いくつかの態様において、ペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基は、L立体配置であるか、少なくとも1つのアミノ酸残基は、D立体配置である。

30

【0049】

いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の正電荷残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10個の連続した正電荷残基を含む。いくつかの態様において、正電荷残基は、Arg、Lys、またはこれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、ペプチドは、Argパッチを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、N末端に2つ以上の連続したArg残基を含む。

40

【0050】

いくつかの態様において、ペプチドは、Tatペプチド、またはそのフラグメントを含む。いくつかの態様において、Tatペプチドは、YGRKKRRQRRR（配列番号99）、GRKKRRQRRR（配列番号100）の配列、またはそのフラグメントもしくは

50

はバリエーションを含む。いくつかの態様において、T a t ペプチドは、(G S)_x (配列番号 105) または G_x S_y (配列番号 104) の配列を有するリンカー (配列中、x 及び y は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である) を使用して、ペプチドの N 末端または C 末端に付加される。いくつかの態様において、T a t ペプチドは、ペプチドの任意の残基に付加される。

【0051】

いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、または少なくとも 16 のシステイン残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、負電荷残基の 1 つ以上の領域を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、正電荷残基の 1 つ以上の領域を含む。

10

【0052】

いくつかの態様において、ペプチド配列は、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、少なくとも 35、少なくとも 36、少なくとも 37、少なくとも 38、少なくとも 39、少なくとも 40、少なくとも 41、少なくとも 42、少なくとも 43、少なくとも 44、少なくとも 45、少なくとも 46、少なくとも 47、少なくとも 48、少なくとも 49、少なくとも 50、少なくとも 51、少なくとも 52、少なくとも 53、少なくとも 54、少なくとも 55、少なくとも 56、少なくとも 57、少なくとも 58 の残基、少なくとも 59、少なくとも 60、少なくとも 61、少なくとも 62、少なくとも 63、少なくとも 64、少なくとも 65、少なくとも 66、少なくとも 67、少なくとも 68、少なくとも 69、少なくとも 70、少なくとも 71、少なくとも 72、少なくとも 73、少なくとも 74、少なくとも 75、少なくとも 76、少なくとも 77、少なくとも 78、少なくとも 79、少なくとも 80、または少なくとも 81 のアミノ酸残基を含む。

20

【0053】

いくつかの態様において、ペプチドは、ヒトタンパク質またはヒトペプチドを含むか、またはそれに由来する。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも 1 つの他のペプチドとの多量体構造に配置される。いくつかの態様において、多量体構造は、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、または七量体を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、約 3.0 ~ 約 10.0 の範囲内の等電点を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、約 4.5 ~ 約 8.9 の範囲内の等電点を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、不均一な電荷分布を有する。いくつかの態様において、ペプチドは、生理学的または細胞内の pH 値で安定である。

30

【0054】

いくつかの態様において、ペプチドは、約 7 または 7.5 の pH で安定である。いくつかの態様において、ペプチドは、約 6.5 ~ 7.5 の pH で安定である。いくつかの態様において、ペプチドは、約 5.0 以下、約 3.0 以下、または約 3.0 ~ 約 5.0 の範囲内の pH 値で安定である。いくつかの態様において、ペプチドは、約 5.0 ~ 約 7.0 の範囲内の pH 値で安定である。いくつかの態様において、ペプチドは、疎水性コアを含む。

40

【0055】

いくつかの態様において、ペプチドは、プロテアーゼ分解に耐性がある。いくつかの態様において、プロテアーゼは、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、血清プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼのいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、ペプチドは、還元耐性があるか、または還元環境で安定である。いくつかの態様において、還元または還元環境は、D T T または G S H を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、高温で安定である。いくつかの態様において、ペプチドは

50

、抗がん作用を示す。いくつかの態様において、ペプチドは、1つ以上の化学修飾を含む。いくつかの態様において、化学修飾は、ペプチドの1つ以上の薬物動態特性を変更する。いくつかの態様において、化学修飾は、ペプチドの血漿半減期及び／または生物学的半減期を延長する。

【0056】

いくつかの態様において、化学修飾は、ペプチドのN末端をブロックングすることである。いくつかの態様において、化学修飾は、メチル化、アセチル化、またはアシル化である。いくつかの態様において、化学修飾は、1つ以上のリシン残基もしくはそのアナログのメチル化；N末端のメチル化；または1つ以上のリシン残基もしくはそのアナログのメチル化及びN末端のメチル化である。いくつかの態様において、ペプチドは、アシル付加物に連結される。いくつかの態様において、ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる。

【0057】

いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号359～配列番号361のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号359、配列番号360、または配列番号361である。いくつかの態様において、活性薬剤は、ペプチドにペプチドのN末端またはC末端で、コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの態様において、活性薬剤は、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である。

【0058】

いくつかの態様において、核酸は、DNAである。いくつかの態様において、核酸は、RNAである。いくつかの態様において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の活性薬剤は、リンカーによってペプチドに連結される。いくつかの態様において、ペプチドは、切断可能なリンカーまたはpH感受性リンカーを介して、活性薬剤に連結される。いくつかの態様において、ペプチドは、リンカーによって、ペプチドのN末端で、内部リシン残基のイプシロンアミンで、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基のカルボン酸で、またはC末端で、活性薬剤に連結される。いくつかの態様において、組成物は、非天然アミノ酸を更に含み、ここで、非天然アミノ酸は、挿入、付加、または別のアミノ酸との置換である。いくつかの態様において、ペプチドは、リンカーによって、非天然アミノ酸で活性薬剤に連結される。いくつかの態様において、リンカーは、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、カルバメート結合、カーボネート結合、ヒドラゾン結合、アゾ結合、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエステル結合、チオエーテル結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド結合、2つのシステイン間の2つの炭素架橋、2つのシステイン間の3つの炭素架橋、または炭素-窒素結合を含む。

【0059】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、プロテアーゼの切断部位を含む。いくつかの態様において、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ、トロンビン、カテプシン、またはベータグルクロニダーゼである。いくつかの態様において、リンカーは、加水分解的に不安定なリンカーである。いくつかの態様において、ペプチドは、切断不能なリンカーを介して、活性薬剤に連結される。いくつかの態様において、活性薬剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表4から選択される。いくつかの態様において、活性薬剤は、抗がん剤である。いくつかの態様において、活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤、PDL-1標的薬剤、IL15

10

20

30

40

50

薬剤、融合されたIL-15/IL-15Ra複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキシソルピシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE阻害薬、Bcl-xL阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である。

【0060】

いくつかの態様において、神経伝達物質は、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである。いくつかの態様において、機能性フラグメントは、少なくとも少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも6アミノ酸残基、少なくとも7アミノ酸残基、少なくとも8アミノ酸残基、少なくとも9アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも11アミノ酸残基、少なくとも12アミノ酸残基である。

【0061】

いくつかの態様において、ニューロテンシンペプチドバリエーションは、配列番号365～配列番号369に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ニューロテンシンは、配列番号350に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、対象の疼痛のレベルを低減することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、または内分泌障害の患者に投与される。いくつかの態様において、ペプチドは、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する。いくつかの態様において、ペプチドは、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる。いくつかの態様において、組成物は、ペプチドに結合された半減期改変剤を更に含む。いくつかの態様において、半減期改変剤は、ポリマー、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン水溶性ポリマー、水溶性ポリ(アミノ酸)、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、Fc領域、脂肪酸、パルミチン酸、またはアルブミンに結合する分子を含む。

【0062】

いくつかの態様において、組成物は、リンカーによってペプチドに結合された検出可能な剤を更に含む。いくつかの態様において、検出可能な剤は、ペプチドにペプチドのN末端またはC末端で、コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの態様において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の検出可能な剤は、ペプチドに連結される。いくつかの態様において、ペプチドは、切断可能なリンカーを介して、検出可能な剤に連結される。いくつかの態様において、ペプチドは、リンカーによって、ペプチドのN末端で、内部リシン残基のイプシロンアミンで、またはC末端で、検出可能な剤に連結される。いくつかの態様において、組成物は、非天然アミノ酸を更に含み、ここで、非天然アミノ酸は、挿入、付加、または別のアミノ酸との置換である。いくつかの態様において、ペプチドは、リンカーによって、非天然アミノ酸で検出可能な剤に連結される。いくつかの態様において、リンカーは、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、カルバメート結合、カーボネート結合、ヒドラゾン結合、アゾ結合、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエステル結合、チオエーテル結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド

10

20

30

40

50

結合、2つのシステイン間の2つの炭素架橋、2つのシステイン間の3つの炭素架橋、または炭素－窒素結合を含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、マトリックスメタロプロテアーゼ、トロンビン、カテプシン、またはバーターグルクロニダーゼの切断部位を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、安定なリンカーを介して、検出可能な剤に連結される。いくつかの態様において、検出可能な剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表4から選択される。

【0063】

いくつかの態様において、検出可能な剤は、フルオロフォア、近赤外色素、造影剤、ナノ粒子、金属含有ナノ粒子、金属キレート、X線造影剤、PET剤、放射性核種、または放射性核種キレート剤である。いくつかの態様において、検出可能な剤は、蛍光色素である。

10

【0064】

様々な態様において、本開示は、本明細書で開示される組成物のいずれか、またはその塩と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物を提供する。

【0065】

いくつかの態様において、医薬組成物は、対象への投与のために製剤化される。いくつかの態様において、医薬組成物は、経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、またはこれらの組み合わせのために製剤化される。

【0066】

様々な態様において、本開示は、組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、組成物と細胞層を接触させることと、組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、方法を提供する。

20

【0067】

いくつかの態様において、組成物は、ペプチドを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344のいずれか1つを含むアミノ酸配列、またはその機能性フラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、トランスフェリン受容体(TfR)に結合することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及びQ51に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び40に対応する1つの位置、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性表面遠位残基を含む。いくつかの態様において、親水性表面遠位残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及びD40に対応する親水性表面遠位残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、15、35、39、もしくは49に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性残基を含む。

30

40

【0068】

いくつかの態様において、親水性残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、D15、E35、E39、及びH49に対応する親水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、11、25、もしくは27に対応する位置のいずれか、またはこれらの任意の組み合わせに、疎水性残基を含む。いくつかの態様において、疎水性残基は、アミノ酸A、M、I、L、V、F、W、もしくはY、またはこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、M11、

50

M25、M27に対応する疎水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、位置45に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、脂肪族残基は、アミノ酸A、M、I、L、またはVから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、L45に対応する脂肪族残基を含む。

【0069】

いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも1つのジスルフィド結合、少なくとも2つのジスルフィド結合、少なくとも3つのジスルフィド結合、または少なくとも5つのジスルフィド結合を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、標的細胞を透過するか、または標的細胞内もしくは標的細胞上に局在する。いくつかの態様において、ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる。

【0070】

いくつかの態様において、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの態様において、活性薬剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表4から選択される。いくつかの態様において、活性薬剤は、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号359～配列番号361のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号359、配列番号360、または配列番号361である。

【0071】

いくつかの態様において、活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤、PDL-1標的薬剤、IL15薬剤、融合されたIL-15/IL-15Ra複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE阻害薬、Bcl-xL阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である。いくつかの態様において、神経伝達物質は、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである。

【0072】

いくつかの態様において、機能性フラグメントは、少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも6アミノ酸残基、少なくとも7アミノ酸残基、少なくとも8アミノ酸残基、少なくとも9アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも11アミノ酸残

10

20

30

40

50

基、少なくとも12アミノ酸残基である。いくつかの態様において、ニューロテンシンペプチドバリエーションは、配列番号365～配列番号369に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ニューロテンシンは、配列番号350に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

【0073】

いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、対象への投与により、疼痛のレベルを低減することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、または内分泌障害の患者に投与される。いくつかの態様において、ペプチドは、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する。いくつかの態様において、ペプチドは、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる。いくつかの態様において、ペプチドは、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる。いくつかの態様において、細胞層は、内皮細胞層または上皮細胞層である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、血液脳関門である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、腸管内皮細胞層である。いくつかの態様において、上皮細胞層は、腸管上皮細胞層である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRへの結合を含む。いくつかの態様において、輸送することは、トランスサイトosisを更に含む。いくつかの態様において、トランスサイトosisは、小胞性トランスサイトosisである。いくつかの態様において、トランスサイトosisは、TfR媒介性である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRからの解離を更に含む。

【0074】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、対象に組成物を投与することと、組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、方法を提供する。

【0075】

いくつかの態様において、組成物は、ペプチドを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、トランスフェリン受容体(TfR)に結合することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及びQ51に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び40に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性表面遠位残基を含む。いくつかの態様において、親水性表面遠位残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及びD40に対応する親水性表面遠位残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0076】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、15、35、39、もしくは49に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性残基を含む。いくつかの態様において、親水性残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番

号 3 2 を基準として、D 1 5、E 3 5、E 3 9、及び H 4 9 に対応する親水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 3 2 を基準として、1 1、2 5、もしくは 2 7 に対応する位置のいずれか、またはこれらの任意の組み合わせに、疎水性残基を含む。いくつかの態様において、疎水性残基は、アミノ酸 A、M、I、L、V、F、W、もしくは Y、またはこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 3 2 を基準として、M 1 1、M 2 5、M 2 7 に対応する疎水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0077】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 3 2 を基準として、位置 4 5 に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、脂肪族残基は、アミノ酸 A、M、I、L、または V から選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 3 2 を基準として、L 4 5 に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも 1 つのジスルフィド結合、少なくとも 2 つのジスルフィド結合、少なくとも 3 つのジスルフィド結合、または少なくとも 5 つのジスルフィド結合を含む。

【0078】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 1 ～配列番号 3 2、配列番号 3 6 ～配列番号 6 7、配列番号 1 3 6 ～配列番号 1 6 7、配列番号 1 7 1 ～配列番号 2 0 2、もしくは配列番号 3 5 6 ～配列番号 3 5 8 のいずれか 1 つと、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号 1 ～配列番号 3 2、配列番号 3 6 ～配列番号 6 7、配列番号 1 3 6 ～配列番号 1 6 7、配列番号 1 7 1 ～配列番号 2 0 2、もしくは配列番号 3 5 6 ～配列番号 3 5 8 のいずれか 1 つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。

【0079】

いくつかの態様において、ペプチドは、標的細胞を透過するか、または標的細胞内に局在する。いくつかの態様において、ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる。いくつかの態様において、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの態様において、活性薬剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表 4 から選択される。

【0080】

いくつかの態様において、活性薬剤は、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖 Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号 3 3 ～配列番号 3 5、配列番号 6 8 ～配列番号 7 0、配列番号 1 6 8 ～配列番号 1 7 0、配列番号 2 0 3 ～配列番号 2 0 5、配列番号 2 2 5 ～配列番号 3 3 2、及び配列番号 3 5 9 ～配列番号 3 6 1 のいずれか 1 つと、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号 3 5 9、配列番号 3 6 0、または配列番号 3 6 1 である。

【0081】

いくつかの態様において、活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4 標的薬剤、PD-1 標的薬剤、PDL-1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合された IL-15 / IL-15Ra 複合薬剤、IFN ガンマ薬剤、抗 CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、B

10

20

30

40

50

A C E阻害薬、B c l - x L阻害薬、W E H I - 5 3 9、ベネトクラクス、A B T - 1 9 9、ナビトクラックス、A T - 1 0 1、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である。

【0082】

いくつかの態様において、神経伝達物質は、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである。いくつかの態様において、機能性フラグメントは、少なくとも少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも6アミノ酸残基、少なくとも7アミノ酸残基、少なくとも8アミノ酸残基、少なくとも9アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも11アミノ酸残基、少なくとも12アミノ酸残基である。いくつかの態様において、ニューロテンシンペプチドバリエーションは、配列番号365～配列番号369に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ニューロテンシンは、配列番号350に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。

10

【0083】

いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、対象への投与により、疼痛のレベルを低減することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、または内分泌障害の患者に投与される。いくつかの態様において、ペプチドは、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する。いくつかの態様において、ペプチドは、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる。いくつかの態様において、ペプチドは、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる。いくつかの態様において、細胞層は、内皮細胞層または上皮細胞層である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、血液脳関門である。

20

【0084】

いくつかの態様において、内皮細胞層は、腸管内皮細胞層である。いくつかの態様において、上皮細胞層は、腸管上皮細胞層である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRへの結合を含む。いくつかの態様において、輸送することは、トランスサイトシスを更に含む。いくつかの態様において、トランスサイトシスは、小胞性トランスサイトシスである。いくつかの態様において、トランスサイトシスは、TfR媒介性である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRからの解離を更に含む。いくつかの態様において、輸送することは、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む。

30

【0085】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、対象におけるTfRの発現に基づいて、ある量の組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。

40

【0086】

いくつかの態様において、組成物は、ペプチドを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、トランスフェリン受容体(TfR)に結合することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及びQ51に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、3

50

0、31、32、33、35、36、37、39、及び40に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性表面遠位残基を含む。いくつかの態様において、親水性表面遠位残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及びD40に対応する親水性表面遠位残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、15、35、39、もしくは49に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性残基を含む。いくつかの態様において、親水性残基は、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、D15、E35、E39、及びH49に対応する親水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、11、25、もしくは27に対応する位置のいずれか、またはこれらの任意の組み合わせに、疎水性残基を含む。

10

【0087】

いくつかの態様において、疎水性残基は、アミノ酸A、M、I、L、V、F、W、もしくはY、またはこれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、M11、M25、M27に対応する疎水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、位置45に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、脂肪族残基は、アミノ酸A、M、I、L、またはVから選択される。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号32を基準として、L45に対応する脂肪族残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも1つのジスルフィド結合、少なくとも2つのジスルフィド結合、少なくとも3つのジスルフィド結合、または少なくとも5つのジスルフィド結合を含む。

20

【0088】

いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。いくつかの態様において、ペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。

30

【0089】

いくつかの態様において、ペプチドは、標的細胞を透過するか、または標的細胞内に局在する。いくつかの態様において、ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる。いくつかの態様において、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの態様において、活性薬剤は、リンカーを介して連結され、ここで、リンカーは、表4から選択される。

40

【0090】

いくつかの態様において、活性薬剤は、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列

50

番号 332、及び配列番号 359～配列番号 361 のいずれか 1 つと、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、配列番号 359、配列番号 360、または配列番号 361 である。

【0091】

いくつかの態様において、活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4 標的薬剤、PD-1 標的薬剤、PDL-1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合された IL-15 / IL-15Ra 複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE 阻害薬、Bcl-xL 阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である。

【0092】

いくつかの態様において、神経伝達物質は、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである。いくつかの態様において、機能性フラグメントは、少なくとも 5 アミノ酸残基、少なくとも 6 アミノ酸残基、少なくとも 7 アミノ酸残基、少なくとも 8 アミノ酸残基、少なくとも 9 アミノ酸残基、少なくとも 10 アミノ酸残基、少なくとも 11 アミノ酸残基、少なくとも 12 アミノ酸残基である。いくつかの態様において、ニューロテンシンペプチドバリエーションは、配列番号 365～配列番号 369 に対して、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有する。いくつかの態様において、ニューロテンシンは、配列番号 350 に対して、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有する。

【0093】

いくつかの態様において、ペプチドコンストラクトは、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、対象への投与により、疼痛のレベルを低減することが可能である。いくつかの態様において、ペプチドは、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、または内分泌障害の患者に投与される。いくつかの態様において、ペプチドは、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する。いくつかの態様において、ペプチドは、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる。いくつかの態様において、ペプチドは、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる。いくつかの態様において、組成物は、吸入、鼻腔内、経口、局所、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、またはこれらの組み合わせで投与される。

【0094】

いくつかの態様において、組成物は、ボラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される。いくつかの態様において、組成物または医薬組成物は、1 日に複数回、1 日 2 回、1 日 1 回、週 2 回、週 3 回、週 1 回、2 週に 1 回、または月 1 回もしくは 3 ヶ月に 1 回投与される。いくつかの態様において、組成物は、1 日 1 回、週 1 回、または月 1 回、皮下投与される。いくつかの態様において、状態は、がんである。

【0095】

いくつかの態様において、がんは、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内性橋膠腫 (DIPG)、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽

10

20

30

40

50

細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはC M Y C過剰発現癌である。いくつかの態様において、状態は、脳癌である。いくつかの態様において、脳癌は、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、またはびまん性内在性橋膠腫である。

【0096】

いくつかの態様において、状態は、C N Sの疾患である。いくつかの態様において、C N Sの疾患は、神経炎症性または神経変性疾患である。いくつかの態様において、神経変性疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症である。いくつかの態様において、状態は、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんである。いくつかの態様において、状態は、慢性疼痛、急性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、または突出痛である。

10

【0097】

いくつかの態様において、状態は、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛である。いくつかの態様において、状態は、筋ジストロフィー、または球脊髄性筋ジストロフィー（S B M A）である。いくつかの態様において、状態は、炎症性腸疾患である。いくつかの態様において、炎症性腸疾患は、クローン病である。

20

【0098】

様々な態様において、本開示は、本明細書で開示される組成物のいずれかを細胞層を越えて輸送するための方法であって、組成物と細胞層を接触させることと、組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、方法を提供する。

30

【0099】

いくつかの態様において、細胞層は、内皮細胞層または上皮細胞層である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、血液脳関門である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、腸管内皮細胞層である。いくつかの態様において、上皮細胞層は、腸管上皮細胞層である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のT f Rへの結合を含む。いくつかの態様において、輸送することは、トランスサイトーシスを更に含む。いくつかの態様において、トランスサイトーシスは、小胞性トランスサイトーシスである。いくつかの態様において、トランスサイトーシスは、T f R媒介性である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のT f Rからの解離を更に含む。いくつかの態様において、輸送することは、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む。

40

【0100】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、本明細書で開示される組成物のいずれかまたは本明細書で開示される医薬組成物のいずれかを対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0101】

いくつかの態様において、組成物は、吸入、鼻腔内、経口、局所、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、またはこれらの組み合わせで投与される。いくつかの態様において、組成物は、ボーラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される。いくつかの態様において、組成物または医薬組成物は、1日に複数回、1日2回、1日1回、週2回、週3回、週1回、2週に1回、または月1回もしくは3ヶ月に1回投与される。

50

いくつかの態様において、組成物は、1日1回、週1回、または月1回、皮下投与される。いくつかの態様において、状態は、がんである。いくつかの態様において、がんは、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髓芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌である。いくつかの態様において、状態は、脳癌である。

【0102】

いくつかの態様において、脳癌は、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髓芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、またはびまん性内在性橋膠腫である。いくつかの態様において、状態は、CNSの疾患である。いくつかの態様において、CNSの状態は、神経炎症性または神経変性疾患である。いくつかの態様において、神経変性疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症である。いくつかの態様において、状態は、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんである。

【0103】

いくつかの態様において、状態は、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛である。いくつかの態様において、状態は、筋ジストロフィー、または球脊髄性筋ジストロフィー（SBMA）である。

【0104】

いくつかの態様において、状態は、炎症性腸疾患である。いくつかの態様において、炎症性腸疾患は、クローン病である。いくつかの態様において、方法は、組成物を細胞層を越えて輸送することを更に含む。いくつかの態様において、細胞層は、内皮細胞層または上皮細胞層である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、血液脳関門である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、腸管内皮細胞層である。

【0105】

いくつかの態様において、上皮細胞層は、腸管上皮細胞層である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRへの結合を含む。いくつかの態様において、輸送することは、トランスサイトシスを更に含む。いくつかの態様において、トランスサイトシスは、小胞性トランスサイトシスである。いくつかの態様において、トランスサイトシスは、TfR媒介性である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRからの解離を更に含む。いくつかの態様において、輸送することは、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む。

【0106】

様々な態様において、本開示は、状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、対象におけるTfRの発現に依存するある量の本明細書で開示される組成物のいずれかまたは本明細書で開示される医薬組成物のいずれかを対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0107】

いくつかの態様において、組成物は、吸入、鼻腔内、経口、局所、静脈内、皮下、筋肉

10

20

30

40

50

内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、またはこれらの組み合わせで投与される。いくつかの態様において、組成物は、ボラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される。いくつかの態様において、組成物または医薬組成物は、1日に複数回、1日2回、1日1回、週2回、週3回、週1回、2週に1回、または月1回もしくは3ヶ月に1回投与される。いくつかの態様において、組成物は、1日1回、週1回、または月1回、皮下投与される。いくつかの態様において、状態は、がんである。

【0108】

いくつかの態様において、がんは、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌である。いくつかの態様において、状態は、脳癌である。いくつかの態様において、脳癌は、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、またはびまん性内在性橋膠腫である。

【0109】

いくつかの態様において、状態は、CNSの疾患である。いくつかの態様において、CNSの疾患は、神経炎症性または神経変性疾患である。いくつかの態様において、神経変性疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症である。

【0110】

いくつかの態様において、状態は、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんである。いくつかの態様において、状態は、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛である。いくつかの態様において、状態は、筋ジストロフィー、または球脊髄性筋ジストロフィー（SBMA）である。

【0111】

いくつかの態様において、状態は、炎症性腸疾患である。いくつかの態様において、炎症性腸疾患は、クローン病である。いくつかの態様において、方法は、組成物を細胞層を越えて輸送することを更に含む。いくつかの態様において、細胞層は、内皮細胞層または上皮細胞層である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、血液脳関門である。いくつかの態様において、内皮細胞層は、腸管内皮細胞層である。いくつかの態様において、上皮細胞層は、腸管上皮細胞層である。

【0112】

いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRへの結合を含む。いくつかの態様において、輸送することは、トランスサイトosisを更に含む。いくつかの態様において、トランスサイトosisは、小胞性トランスサイトosisである。いくつかの態様において、トランスサイトosisは、TfR媒介性である。いくつかの態様において、輸送することは、組成物のTfRからの解離を更に含む。いくつかの態様において、輸送することは、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む。

【0113】

様々な態様において、本開示は、T f Rに結合可能なペプチドを設計するための方法であって、コンピュータープログラムを使用して、安定性及びフォールディングが最適化されたペプチドをペプチドのライブラリーから特定することであって、ペプチドのライブラリーの各ペプチドは、少なくとも3つの分子内ジスルフィド結合を含む、特定することと、コンピュータープログラムを使用して、ペプチド：T f R複合体の結合パッチのアミノ酸残基を重ね合わせ、結合パッチをペプチド上にグラフトした後、T f Rに結合する安定なペプチドを決定することと、結合パッチをペプチド上にグラフトして、安定なペプチドを生成することを含む、方法を提供する。

【0114】

いくつかの態様において、方法は、部位飽和変異導入を実施して、安定なペプチドよりもT f Rに対する結合親和性が高い変異ペプチドを得ることを更に含む。いくつかの態様において、ペプチドのライブラリーのペプチドは、20～75アミノ酸残基長である。

【0115】

様々な態様において、本開示は、本明細書で開示される組成物のいずれかを提供し、ここで、ニューロテンシンは、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む。

【0116】

様々な態様において、本開示は、本明細書で開示される方法のいずれかを提供し、ここで、ニューロテンシンは、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む。

【0117】

様々な態様において、本開示は、本明細書で開示される方法のいずれかを提供し、ここで、ニューロテンシンは、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む。

【0118】

様々な態様において、本開示は、本明細書で開示される方法のいずれかを提供し、ここで、ニューロテンシンは、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む。

【0119】

参照による援用

本明細書で言及される全ての公開物、特許及び特許出願は、それぞれ個々の公開物、特許または特許出願が参照により本明細書に援用されることが具体的かつ個別に示される場合と同様に、参照により本明細書に援用される。

【0120】

本特許及び本出願書類は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面（複数可）を含む本特許または本特許出願公開の複写は、請求及び必要な手数料の支払に応じて特許庁より提供される。本発明の新しい特徴は、添付する特許請求の範囲に詳細に示される。本発明の原理が利用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって、本発明の特徴及び利点の更なる理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1A】ヒト可溶性トランスフェリン受容体（h T f R）エクストドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、h T f Rエクストドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。トランスフェリン受容体（T f R）タンパク質のクマシー染色ゲルを示す。

【図1B】ヒト可溶性トランスフェリン受容体（h T f R）エクストドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、h T f Rエクストドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。1回のフローソーティング後における、T f Rに結合する細胞を示すフローサイト

10

20

30

40

50

メトリープロットを示す。

【図1C】ヒト可溶性トランスフェリン受容体(hTfR)エクトドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、hTfRエクトドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。1回のフローソーティング後における、対照染色の細胞を示すフローサイトメトリープロットを示す。

【図1D】ヒト可溶性トランスフェリン受容体(hTfR)エクトドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、hTfRエクトドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。2回のフローソーティング後における、TfRに結合する細胞を示すフローサイトメトリープロットを示す。

10

【図1E】ヒト可溶性トランスフェリン受容体(hTfR)エクトドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、hTfRエクトドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。2回のフローソーティング後における、対照染色の細胞を示すフローサイトメトリープロットを示す。

【図1F】ヒト可溶性トランスフェリン受容体(hTfR)エクトドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、hTfRエクトドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。3回のフローソーティング後における、TfRに結合する細胞を示すフローサイトメトリープロットを示す。

20

【図1G】ヒト可溶性トランスフェリン受容体(hTfR)エクトドメインタンパク質をクマシー染色したゲルと、プールされた高多様性ペプチドライブラリーに由来する、hTfRエクトドメインに結合する細胞の連続的濃縮を示すフローサイトメトリープロットを示す。3回のフローソーティング後における、対照染色の細胞を示すフローサイトメトリープロットを示す。

【図2A】TfR及び単一クローンペプチドを提示する細胞を示す。本実験に使用された対照タンパク質は、配列番号333(MRLAVGALLVCAVLGLCLADYKDEHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSKTVRWCAVSEHEATKCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEADA V T L D A G L V Y D A Y L A P N N L K P V V A E F Y G S K E D P Q T F Y Y A V A V V K K D S G F Q M N Q L R G K K S C H T G L G R S A G W N I P I G L L Y C D L P E P R K P L E K A V A N F F S G S C A P C A D G T D F P Q L C Q L C P G C G C S T L N Q Y F G Y S G A F K C L K D G A G D V A F V K H S T I F E N L A N K A D R D Q Y E L L C L D N T R K P V D E Y K D C H L A Q V P S H T V V A R S M G G K E D L I W E L L N Q A Q E H F G K D K S K E F Q L F S S P H G K D L L F K D S A H G F L K V P P R M D A K M Y L G Y E Y V T A I R N L R E G T C P E A P T D E C K P V K W C A L S H H E R L K C D E W S V N S V G K I E C V S A E T T E D C I A K I M N G E A D A M S L D G G F V Y I A G K C G L V P V L A E N Y D K S D N C E D T P E A G Y F A V A V V K K S A S D L T W D N L K G K K S C H T A V G R T A G W N I P M G L L Y N K I N H C R F D E F F S E G C A P G S K K D S S L C K L C M G S G L N L C E P N N K E G Y Y G Y T G A F R C L V E K G D V A F V K H Q T V P Q N T G G K N P D P W A K N L N E K D Y E L L C L D G T R K P V E E Y A N C H L A R A P N H A V V T R K D K E A C V H K I L R Q Q Q H L F G S D V T D C S G N F C L F R S E T K D L L F R D D T V C L A K L H D R N T Y E K Y L G E E Y V K A V G N L R K C S T S S L L E A C T F R R P G S S E L Y E N K P R R P Y I L)に示されるアミノ酸配列を有する。配列番号1のペプチドを発現する細胞(x軸、GFP)及び対照タンパク質(y軸、蛍光抗His抗体で染色)のフローサイトメトリープロットを示す。

30

40

【図2B】TfR及び単一クローンペプチドを提示する細胞を示す。本実験に使用された

50

対照タンパク質は、配列番号333 (MRLAVGALLVCAVLGLCLADYKD
EHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSKTVRWCAVSEHEAT
KCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEAE
DAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYA
VAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYC
DLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGC
GCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVKHSTIFENLANK
ADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARS
MGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKD
SAHGFLKVPPrMDAKMYLGYEYVTAIRNLRREGTCPEAPT
D ECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDC
IAKIMNGEADAMS LDGGFVYIAGKCGLPVLAENYDKSDN
CEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRT
AGWNI PMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDS
SLCKLCMGSG LNLCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVA
FVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRK
PVEEYANCLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQH
LFGSDVTD CSGNFCLFRSETKD L LFRDDTVCLAKLH
DRNTYEKYLGE EYVKAVGNLRKCSTSS LLEACTFR
RPGSSSELYENKPRRPYIL) に示されるアミノ酸配列を有する。配列番号1のペプチドを発現する細胞 (x 軸、GFP) 及び対照タンパク質 (y 軸、蛍光ストレプトアビジンで染色) のフローサイトメトリーブロットを示す。

10

20

【図2C】TfR及び単一クローンペプチドを提示する細胞を示す。本実験に使用された対照タンパク質は、配列番号333 (MRLAVGALLVCAVLGLCLADYKD
EHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSKTVRWCAVSEHEAT
KCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEAE
DAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYA
VAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYC
DLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGC
GCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVKHSTIFENLANK
ADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARS
MGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKD
SAHGFLKVPPrMDAKMYLGYEYVTAIRNLRREGTCPEAPT
D ECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDC
IAKIMNGEADAMS LDGGFVYIAGKCGLPVLAENYDKSDN
CEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRT
AGWNI PMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDS
SLCKLCMGSG LNLCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVA
FVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRK
PVEEYANCLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQH
LFGSDVTD CSGNFCLFRSETKD L LFRDDTVCLAKLH
DRNTYEKYLGE EYVKAVGNLRKCSTSS LLEACTFR
RPGSSSELYENKPRRPYIL) に示されるアミノ酸配列を有する。配列番号1のペプチドを発現する細胞 (x 軸、GFP) 及びTfR (y 軸、蛍光抗His抗体で染色) のフローサイトメトリーブロットを示す。

30

40

【図2D】TfR及び単一クローンペプチドを提示する細胞を示す。本実験に使用された対照タンパク質は、配列番号333 (MRLAVGALLVCAVLGLCLADYKD
EHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSKTVRWCAVSEHEAT
KCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEAE
DAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYA
VAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYC

50

DLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFFPQLCQLCPGC
GCSTLNQYFGYSGAFKCLKDAGDVAFVKHSTIFENLANK
ADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMSG
GKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKD
SAHGFLKVPPrMDAKMYLGYEYVTAIRNLRREGTCPEAPT
ECKPVKWCALSHHERLKCD EWSVNSVGKIECVSAETTEDC
IAKIMNGEADAMS LDGGFVYIAGKCG LVPVLAENYDKSDN
CEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRT
AGWNI PMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDS SLCKL
CMGSG LNLCEPNNKEGY YGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQ
TVPQNTGGKNPD PWAKNLNEKDYELLCLDGTRKPV E EYANC
HLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSDVTDCSG
NFCLFRSETKD L LFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGE EYVK
AVGNLRK C STSS L LEACTFR R P G S S E L Y E N K P R R P Y I L) に
示されるアミノ酸配列を有する。配列番号1のペプチドを発現する細胞 (x 軸、GFP)
及びTfR (y 軸、蛍光ストレプトアビジンで染色) のフローサイトメトリープロットを
示す。

10

【図3A】部位飽和変異導入 (SSM) で濃縮されたバリエーションを順列することで生じる
ペプチドバリエーションに対するTfR結合を示す。各グラフは、1ラウンドのSSMの完了
を示し、グラフ内の色付きの棒は、SSMのラウンドが開始されたときのそれぞれのペプ
チド配列と比較したバリエーションペプチドの変異数を示す。データは、SSMの最終ステッ
プを示し、その後、次世代分子が決定される。配列番号1の配列を有するペプチドの親和
性成熟のための部位飽和変異導入 (SSM) から得られた配列番号3～配列番号23の配
列をそれぞれ含むバリエーションに結合したhTfRの量を示す。

20

【図3B】部位飽和変異導入 (SSM) で濃縮されたバリエーションを順列することで生じる
ペプチドバリエーションに対するTfR結合を示す。各グラフは、1ラウンドのSSMの完了
を示し、グラフ内の色付きの棒は、SSMのラウンドが開始されたときのそれぞれのペプ
チド配列と比較したバリエーションペプチドの変異数を示す。データは、SSMの最終ステッ
プを示し、その後、次世代分子が決定される。配列番号2の配列を有する開始ペプチドの
親和性成熟のための部位飽和変異導入 (SSM) から得られた配列番号24～配列番号3
1の配列をそれぞれ有するペプチドバリエーションに結合したhTfRの量を示す。

30

【図4A】配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32の配
列をそれぞれ有する5つの可溶性TfR結合ペプチドバリエーションの還元 (DTT) または
非還元 (PBS) 条件下におけるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気
泳動 (SDS-PAGE) 及びRP-HPLCプロットを示す。データは、TfR結合ペ
プチドが高い可溶性を呈することを示している。還元条件 (10mM DTT) 及び非還
元 (PBS) 条件下でのゲルの比較は、ペプチドがジスルフィド結合を形成することを示
している。配列番号1のSDS-PAGE及びRP-HPLCクロマトグラムを示す。

【図4B】配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32の配
列をそれぞれ有する5つの可溶性TfR結合ペプチドバリエーションの還元 (DTT) または
非還元 (PBS) 条件下におけるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気
泳動 (SDS-PAGE) 及びRP-HPLCプロットを示す。データは、TfR結合ペ
プチドが高い可溶性を呈することを示している。還元条件 (10mM DTT) 及び非還
元 (PBS) 条件下でのゲルの比較は、ペプチドがジスルフィド結合を形成することを示
している。配列番号2のSDS-PAGE及びRP-HPLCクロマトグラムを示す。

40

【図4C】配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32の配
列をそれぞれ有する5つの可溶性TfR結合ペプチドバリエーションの還元 (DTT) または
非還元 (PBS) 条件下におけるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気
泳動 (SDS-PAGE) 及びRP-HPLCプロットを示す。データは、TfR結合ペ
プチドが高い可溶性を呈することを示している。還元条件 (10mM DTT) 及び非還

50

元（PBS）条件下でのゲルの比較は、ペプチドがジスルフィド結合を形成することを示している。配列番号4のSDS-PAGE及びRP-HPLCクロマトグラムを示す。

【図4D】配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32の配列をそれぞれ有する5つの可溶性TfR結合ペプチドバリエーションの還元（DTT）または非還元（PBS）条件下におけるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）及びRP-HPLCプロットを示す。データは、TfR結合ペプチドが高い可溶性を呈することを示している。還元条件（10mM DTT）及び非還元（PBS）条件下でのゲルの比較は、ペプチドがジスルフィド結合を形成することを示している。配列番号30のSDS-PAGE及びRP-HPLCクロマトグラムを示す。

【図4E】配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32の配列をそれぞれ有する5つの可溶性TfR結合ペプチドバリエーションの還元（DTT）または非還元（PBS）条件下におけるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）及びRP-HPLCプロットを示す。データは、TfR結合ペプチドが高い可溶性を呈することを示している。還元条件（10mM DTT）及び非還元（PBS）条件下でのゲルの比較は、ペプチドがジスルフィド結合を形成することを示している。配列番号32のSDS-PAGE及びRP-HPLCクロマトグラムを示す。

【図5A】後世代のTfR結合ペプチドがグルタチオン（GSH）還元に対する耐性を改善したことを示す。処理なし（赤）、10μM GSH（青）、または10μM DTT（緑）のいずれかに供したペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号1の配列を有するTfR結合ペプチドのグルタチオン（GSH）還元に対する耐性を示す。

【図5B】後世代のTfR結合ペプチドがグルタチオン（GSH）還元に対する耐性を改善したことを示す。処理なし（赤）、10μM GSH（青）、または10μM DTT（緑）のいずれかに供したペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号2の配列を有するペプチドのグルタチオン（GSH）還元に対するTfR結合ペプチド耐性の改善を示す。

【図5C】後世代のTfR結合ペプチドがグルタチオン（GSH）還元に対する耐性を改善したことを示す。処理なし（赤）、10μM GSH（青）、または10μM DTT（緑）のいずれかに供したペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号32の配列を有するペプチドのグルタチオン（GSH）及びジチオスレイトール（DTT）還元に対するTfR結合ペプチド耐性の改善を示す。

【図5D】後世代のTfR結合ペプチドがグルタチオン（GSH）還元に対する耐性を改善したことを示す。処理なし（赤）、10μM GSH（青）、または10μM DTT（緑）のいずれかに供したペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号30の配列を有するペプチドのグルタチオン（GSH）還元に対するTfR結合ペプチド耐性の改善を示す。

【図6A】親和性成熟させたTfR結合ペプチドのペプシンに対する耐性がペプチドの成熟に伴って改善することを示す。処理なし（赤）、トリプシン（青）、またはペプシン（緑）のいずれかに供したTfR結合ペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号1の配列を有するペプチドのトリプシン（青）及びペプシン（緑）による処理を示す。

【図6B】親和性成熟させたTfR結合ペプチドのペプシンに対する耐性がペプチドの成熟に伴って改善することを示す。処理なし（赤）、トリプシン（青）、またはペプシン（緑）のいずれかに供したTfR結合ペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号2の配列を有するペプチドのトリプシン（青）及びペプシン（緑）による処理を示す。

【図6C】親和性成熟させたTfR結合ペプチドのペプシンに対する耐性がペプチドの成熟に伴って改善することを示す。処理なし（赤）、トリプシン（青）、またはペプシン（緑）のいずれかに供したTfR結合ペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに1つ）を示す。配列番号32の配列を有するペプチドのトリプシン（

10

20

30

40

50

青) 及びペプシン (緑) による処理を示す。

【図 6 D】親和性成熟させた T f R 結合ペプチドのペプシンに対する耐性がペプチドの成熟に伴って改善することを示す。処理なし (赤)、トリプシン (青)、またはペプシン (緑) のいずれかに供した T f R 結合ペプチドの逆相 H P L C トレースの重ね合わせ (試験したペプチドごとに 1 つ) を示す。配列番号 30 の配列を有するペプチドのトリプシン (青) 及びペプシン (緑) による処理を示す。

【図 7】配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 32 の h T f R への結合を示す表面プラズモン共鳴 (S P R) 曲線を示す。

【図 8】配列番号 2 の配列を有するペプチドの濃度を変えた場合の h T f R 結合を示す表面プラズモン共鳴 (S P R) トレースを示す。

【図 9】配列番号 4 の配列を有するペプチドの濃度を変えた場合の h T f R 結合を示す表面プラズモン共鳴 (S P R) トレースを示す。

【図 10】表面プラズモン共鳴 (S P R) による、捕捉させたビオチン化 h T f R に結合する配列番号 32 の結合及びシングルサイクルカイネティクスデータを示す。5 つの濃度の配列番号 32 の配列を有するペプチド (0.037 nM、0.11 nM、0.33 nM、1 nM、3 nM) が 2 つの密度の捕捉ビオチン化 (B t) - h T f R に対して注入され、グローバルに解析された。

【図 11】S P R による、捕捉させたビオチン化 h T f R に結合する配列番号 30 の結合及びシングルサイクルカイネティクスデータを示す。5 つの濃度の配列番号 30 の配列を有するペプチド (0.037 nM、0.11 nM、0.33 nM、1 nM、3 nM) が 2 つの密度の捕捉 B t - h T f R に対して注入され、グローバルに解析された。

【図 12】配列番号 2 及び配列番号 32 の配列を有するペプチドを 10 μ M の鉄負荷ヒトホロトランスフェリンまたは空のヒトアポトランスフェリンの存在下で h T f R とインキュベートした競合的結合アッセイからのフローサイトメトリーデータを定量化した棒グラフを示す。

【図 13 A】h T f R と配列番号 32 の配列を有する h T f R 結合ペプチドとの共結晶化を示す。配列番号 32 の配列を有するペプチドと共結晶させた h T f R の第 1 の図を示す。構造は、h T f R 結合ペプチドの結合部位が、内因性結合物質トランスフェリンの結合部位と重なることを示している。コイル状の黒の実線で描かれている 2 つのヘリックス間の連結配列は、結晶構造では解明されなかったため、構造モデリングに基づいている。トランスフェリン受容体 (T f R) の結晶構造は、空間充填電子密度マップで表示している。2 つの顕著な葉を持つ大きな球状のタンパク質に見える。2 つの葉の間で、配列番号 32 に対応する短いペプチドの結晶構造がトランスフェリン受容体の球状構造と相互作用しているのが示されている。配列番号 32 のペプチドは、2 つの逆平行 α -ヘリックスが左上から右下に向かって斜めに配向したカートゥーンモデルとして示されている。配列番号 32 のアミノ酸側鎖に対応する棒状モデルは、 α -ヘリックスから突き出て示されており、そのいくつかは、T f R の球状タンパク質と相互作用している。

【図 13 B】h T f R と配列番号 32 の配列を有する h T f R 結合ペプチドとの共結晶化を示す。図 13 A の拡大図を示し、配列番号 32 の配列を有するペプチドと共結晶させた h T f R を示す。内因性 C D P から変異させたアミノ酸側鎖、または界面の一部であるアミノ酸側鎖はいずれも棒で示される。界面に隣接する残基は黒で示され、一方、界面から遠位の残基はシアンで示される。配列番号 32 のペプチドと相互作用する、図 13 A に示される T f R 空間充填電子密度マップの一部を示す。配列番号 32 のペプチドは、図 13 A に示されるように、2 つの逆平行 α -ヘリックスを持つカートゥーンモデルとして示され、T f R の構造の真上に位置し、 α -ヘリックスは水平に配置されている。配列番号 32 のアミノ酸側鎖は、棒で示される。配列番号 32 の α -ヘリックスから T f R の球状構造に向かって下方に突き出している側鎖が T f R と相互作用している。

【図 13 C】h T f R と配列番号 32 の配列を有する h T f R 結合ペプチドとの共結晶化を示す。配列番号 32 の構造モデル (上段、N 末端は青、C 末端は赤、目に見える側鎖を原子の種類で色分け)、遊離の配列番号 32 の結晶構造 (中断、青; 分解能 2.55 Å、

10

20

30

40

50

4 倍の重ね合わせ)、及び T f R と複合体化したときの配列番号 32 の結晶構造 (下段、赤; 分解能 1.85 Å、2 倍の重ね合わせ) のカートゥーン表示を示す。複合体構造において T f R から 4 Å 以内に原子がある側鎖は、棒で示される。N 末端及び C 末端には表示が付けられている。赤の矢印は、配列番号 32 のモデル構造、未結合構造、及び結合構造間の N 末端近くの最も顕著な構造上の違いを示している。灰色の十字は、無秩序なヘリカル間リンカーの位置を示す。「モデル」と書かれた上段の構造は、カートゥーンモデルとして表示される配列番号 32 に対応するペプチドの *in silico* モデルを示す。水平に配向された逆平行 α-ヘリックスは、右側で短いループによって接続されている。ペプチドの N 末端は、下側のヘリックスの左側に位置し、C 末端は、上側のヘリックスの左側に位置する。アミノ酸側鎖は、α-ヘリックスから突き出た棒として示される。「4 x 遊離」と書かれた中段の構造は、カートゥーンモデルとして表示される T f R がいない状態で結晶化された配列番号 32 に対応するペプチドの結晶構造を示す。*in silico* モデルで認められたループは、この構造では表示されておらず、2 つのヘリックスの右側に X 印で示される。ペプチドの N 末端は、下側のヘリックスの左側に位置し、C 末端は、上側のヘリックスの左側に位置する。アミノ酸側鎖は、α-ヘリックスから突き出た棒として示される。「2 x T f R 結合」と書かれた下段の構造は、カートゥーンモデルとして表示される T f R がある状態で結晶化された配列番号 32 に対応するペプチドの結晶構造を示す。*in silico* モデルで認められたループは、この構造では表示されておらず、2 つのヘリックスの右側に X 印で示される。ペプチドの N 末端は、下側のヘリックスの左側に位置し、C 末端は、上側のヘリックスの左側に位置する。アミノ酸側鎖は、α-ヘリックスから突き出た棒として示される。各構造の下側のヘリックスの左端にある N 末端領域を指している 3 つの三角の矢印は、3 つの構造間で最も顕著な構造上の違いがある領域を示している。

【図 13D】h T f R と配列番号 32 の配列を有する h T f R 結合ペプチドとの共結晶化を示す。T f R に結合した配列番号 32 の結合の拡大図を示し、結合を駆動する多数の極性及び非極性の相互作用が示されている。非極性相互作用は、主に、Leu 及び Met であるが、極性相互作用は、いくつかの電荷残基及び非電荷残基の混合である。T f R の結晶構造の一部を空間充填電子密度マップとして示す。配列番号 2 に対応するペプチドは、T f R 構造の上にリボン図として示される。α-ヘリックスは、垂直に配向されており、ループは、2 つのヘリックスの上端を接続している。アミノ酸側鎖は棒で示され、T f R の構造と面する側鎖が T f R と相互作用している。配列番号 32 のアミノ酸残基は、次のとおりに書かれている (上から下へ、次いで、左から右へ) : E16、M9、S6、N12、L43、L15、L36、及び D44。

【図 13E】h T f R と配列番号 32 の配列を有する h T f R 結合ペプチドとの共結晶化を示す。T f R : 配列番号 32 の共結晶と、公開されている T f R : トランスフェリン複合体 (PDB 3S9L ; T f R 非表示) の共結晶のアライメントを示し、図 14A に示される結合相互作用を拡大したものである。構造アライメント (左) は、配列番号 32 (青) とトランスフェリン (MRLAVGALLVCAVLGLCLADYKDEHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSKTVRWCAVSEHEATKCSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEADAVTL DAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDEPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLLYCDLPEP RKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFFPQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRQYELLCLDNTTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMSGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSA HGF LKVP PRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCPEAPTDECKPV KWCA LSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIM NGEADAMS LDGGFVYIAGKCGLVPLAENYDKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKASD L TWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNI

PMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDS LCKLCMGSG
 LNLCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTPQNT
 GGKNPDPWAKNLNEKDYE LCLDGT RKPVEEYANCHLARA
 PNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQH LFGSDVTDCSGNFCLF
 RSE TKD L LFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKA VGNL
 RKCSTSS LLEACTFRRP、配列番号353、緑)の結合部位の重なりを示す。
 配列番号32の結合部位をヒト(配列番号353)及びマウス(MRLAVGALLV
 CAVLG LCLADYKDEHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSV
 PDKTVKWCAVSEHENTKCI SFRDHMKTVLPDPGPR LACVK
 KTSYPDCIKAI SASEADAMTLDGGWVYDAGLTPNNLKPV A
 AEFYGSVEHPQTYYYAVAVVKKGTD FQLNQLEGGKKSCHTG
 LGRSAGWV IPIGLLFCKLSEPRSPLEKAVSSFFSGSCVPC
 ADPVAFPKLCQLCPGCGCSSTQPF FGYVGAFKCLKDGGGD
 VAFVKHTTIFEVLP EKADR DQYEL LCLDNTRKPV DQYEDC
 YLARIPSHAVVARKNNGKEDLIWEILKVAQE HFGKGKSKD
 FQLFSSPLGKDL LFKDSA FGLLRVP PRMDYRLYLGHNYVT
 AIRNQ QEGVCPEGSIDNSPVKWCALSHLE RTKCDEWSIIS
 EGKIECESAETTEDCIEKIVNGEADAMTLDGGHAYIAGQC
 GLVPVMAEYYESSNCAIP SQQGIFPKGY YAVAVVKASDTS
 ITWNNLKGGKKSCHTGVDRTAGWNIPMGMLYNRINHCKFDE
 FFSQGCAPGYEKNSTLC D L CIGPLKCAPNNKEEYNGYTG A
 FRCLVEKGDVAFVKHQTVLDNTEGKNPAEWAKNLKQEDFE
 L LCPDGT RKPVKDFASCHLAQAPNHVVVSRKEKAARVKAV
 LTSQETLFGGSDCTGNFCLFKSTTKD L LFRDDTKCFVKLP
 EGTTP EKYLGAEYMQSVGNMRKCSSTSRLLEACTFHKH、配列
 番号354)トランスフェリン受容体の相同性に合わせて色付けしたものであり、TfR
 上の結合表面のほとんどが2つの種間で同一性または類似性を有することを示している(右)。
 左パネルは、TfRの構造の一部を空間充填電子密度マップとして示している。3
 S9L結晶構造に由来するトランスフェリンのリボン図(「3S9L由来Tfと書かれて
 いる)は、TfRの右側に配置され、TfR構造と重なり合っている。Tf構造は、TfR
 構造と一致する多数のαヘリックスを含有する。また、この構造は、右下の領域にβシ
 ート構造を含有しているだけでなく、αヘリックスの末端から多数のループが突き出し
 ている。TfRと結晶化された配列番号32の構造は、右上のTfRと相互作用するカー
 トゥーンモデルとして示される。垂直に配置された2つのαヘリックスからなり、重ね
 合わせたTf構造と重複している。右パネルは、左パネルに示されるTfRと配列番号3
 2の構造を回転させた図を示す。TfRは、空間充填電子密度マップとして示され、配列
 番号32は、左上から右下に斜めに配向された2つのαヘリックスを含有するカートゥ
 ーンモデルとして示される。TfR構造上の影付きの領域は、HsTfR及びMmTfR
 の結合部位が類似または非類似の領域を示す。例示的な類似及び非類似の領域は、矢印で
 示される。TfR構造の表面の大部分を占める、類似または非類似として示されていない
 構造の残りの領域は、同一の結合部位を有する。配列番号32の右ヘリックスの真上の小
 さな領域及び右ヘリックスの上端の真下の小さな領域は、類似の結合部位を有するもの
 として示されている。配列番号32の右ヘリックスの真上の小さな領域、右ヘリックスの
 下端の真下の小さな領域、及び左ヘリックスの下端の下小さな領域は、非類似の結合部位
 を有するものとして示されている。

【図14A】TfR：トランスフェリン複合体及びTfR：ペプチド複合体を示すものであり、トランスフェリン(公開文献から取得したデータ(RCSB PDB 1SU V))と、hTfRに結合した配列番号32の配列を有するペプチドとのそれぞれの重ね合わせを示し、トランスフェリン及び配列番号32の配列を有するペプチドは、hTfR上の結合部位が重複していることが示される。トランスフェリン(公開文献から取得したデータ

10

20

30

40

50

(RCSB PDB 1SUUV))と、hTfRに結合した配列番号32の配列を有するペプチドとのそれぞれの重ね合わせを示す。TfRの構造は、2つの葉を有する大きな球状のタンパク質の空間充填電子密度マップとして示される。1SUUV結晶構造のトランスフェリンの構造(「RCSB 1SUUV由来トランスフェリン」と書かれる)は、多数の α -ヘリックス及び接続ループを持つカートゥーンモデルとして示される。トランスフェリン構造は、TfRの右下に位置し、TfR構造と一致する。「配列番号32」と書かれた矢印は、TfRの右側のトランスフェリンの真上の部位を指しており、配列番号32に対応するペプチドの結合部位を示す。

【図14B】TfR：トランスフェリン複合体及びTfR：ペプチド複合体を示すものであり、トランスフェリン(公開文献から取得したデータ(RCSB PDB 1SUUV))と、hTfRに結合した配列番号32の配列を有するペプチドとのそれぞれの重ね合わせを示し、トランスフェリン及び配列番号32の配列を有するペプチドは、hTfR上の結合部位が重複していることが示される。TfRに結合した配列番号32の配列を有するペプチドの拡大図を示し、図14Aの内因性トランスフェリンの結合部位と比較すると、配列番号32の配列を有するペプチドとトランスフェリンの両方がhTfR上に重複する結合部位を有することを示している。内因性CDPから変異させたアミノ酸側鎖、または界面の一部であるアミノ酸側鎖はいずれも棒で示される。界面に隣接する残基は黒で示され、一方、界面から遠位の残基はシアンで示される。配列番号32のペプチドと相互作用する、図13Aに示されるTfR空間充填電子密度マップの一部を示す。配列番号32のペプチドは、図13Aに示されるように、2つの逆平行 α -ヘリックスを持つカートゥーンモデルとして示され、TfRの構造の真上に位置し、 α -ヘリックスは水平に配置されている。配列番号32のアミノ酸側鎖は、棒で示される。配列番号32の α -ヘリックスからTfRの球状構造に向かって下方に突き出している側鎖がTfRと相互作用している。

【図15A】TfR結合ペプチドが、細胞表面結合アッセイにおいて、マウスTfR(mTfR)に対して交差反応性があることを示す。表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する293F細胞を、AlexaFluor 647色素で直接標識した可溶性TfR結合ペプチドで染色した。これらの実験で使用されたTfR、この事例ではヒトTfRの種特異性を示す。データは、2つのトポグラフィー密度マップとして示され、抗hTfR(CD71)抗体で染色されたトランスフェリンのフローサイトメトリーデータを示す。左下から右上に斜めに配置された上の密度マップは、293ST+SDGF-hTfRを示す。水平に配置された下の密度マップは、293ST+SDGF-mTfRを示す。y軸は、hTfR+ストレプトアビジンを $0 \sim 10^7$ で、10刻みの対数スケールで示す。x軸は、GFPを $0 \sim 10^6$ で、10刻みの対数スケールで示す。

【図15B】TfR結合ペプチドが、細胞表面結合アッセイにおいて、マウスTfR(mTfR)に対して交差反応性があることを示す。表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する293F細胞を、AlexaFluor 647色素で直接標識した可溶性TfR結合ペプチドで染色した。これらの実験で使用されたTfR、この事例ではマウスTfRの種特異性を示す。データは、2つのトポグラフィー密度マップとして示され、抗mTfR(CD71)抗体で染色されたトランスフェリンのフローサイトメトリーデータを示す。左下から右上に斜めに配置された上の密度マップは、293ST+SDGF-mTfRを示す。3つの葉を有する下の密度マップは、293ST+SDGF-hTfRを示す。y軸は、hTfR+ストレプトアビジンを $10^{-4} \sim 10^7$ で、10刻みの対数スケールで示す。x軸は、GFPを $0 \sim 10^6$ で、10刻みの対数スケールで示す。

【図15C】TfR結合ペプチドが、細胞表面結合アッセイにおいて、マウスTfR(mTfR)に対して交差反応性があることを示す。表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する293F細胞を、AlexaFluor 647色素で直接標識した可溶性TfR結合ペプチドで染色した。配列番号1の配列を有するペプチド、配列番号2の配列を有するペプチド、配列番号30の配列を有するペプチド、及び配列番号32の配列を有するペプチドがヒトTfRに結合することを示す。データは、4つのトポグラフィー密度マップとして示され、293ST細胞+SDGF-hTfRを使用したフローサイト

10

20

30

40

50

メトリーデータを示す。3つの密度マップは、ほぼ重なっており、4つ目の密度マップの上に配置されている。下の密度マップは、水平に配置され、配列番号1を示す（第1世代）。上の3つの密度マップは、左下から右上に斜めに配置されている。他の2つよりもわずかに上にある密度マップは、配列番号32に対応する（第3世代）。他の2つよりもわずかに下にある密度マップは、配列番号2に対応する（第2世代）。3番目の密度マップは、配列番号30に対応する（第3世代）。y軸は、hTfR+ストレプトアビジンを0～ 10^7 で、10刻みの対数スケールで示す。x軸は、GFPを0～ 10^6 で、10刻みの対数スケールで示す。

【図15D】TfR結合ペプチドが、細胞表面結合アッセイにおいて、マウスTfR（mTfR）に対して交差反応性があることを示す。表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する293F細胞を、AlexaFluor 647色素で直接標識した可溶性TfR結合ペプチドで染色した。配列番号1の配列を有するペプチド、配列番号2の配列を有するペプチド、配列番号30の配列を有するペプチド、及び配列番号32の配列を有するペプチドがマウスTfRに結合することを示す。データは、4つのトポグラフィ密度マップとして示され、293ST細胞+SDGF-mTFRを使用したフローサイトメトリーデータを示す。3つの密度マップは、ほぼ重なっており、4つ目の密度マップの上に配置されている。下の密度マップは、水平に配置され、配列番号1を示す（第1世代）。上の3つの密度マップは、左下から右上に斜めに配置されている。他の2つよりもわずかに上にある密度マップは、配列番号32に対応する（第3世代）。他の2つよりもわずかに下にある密度マップは、配列番号2に対応する（第2世代）。3番目の密度マップは、配列番号30に対応する（第3世代）。y軸は、hTfR+ストレプトアビジンを0～ 10^7 で、10刻みの対数スケールで示す。x軸は、GFPを0～ 10^6 で、10刻みの対数スケールで示す。

【図16A】生体内分布を評価するために、 ^{14}C 標識TfR結合ペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。異種移植腫瘍（皮下のヒト星細胞腫U87細胞）を担持するマウスに用量100nmolのペプチド（20mg/kg、およそ25g体重と仮定）を投与して3時間後に撮像した。これらの画像は、脾臓、肝臓、腎臓にかなりの蓄積があることを示し、筋肉、骨髄、及び皮膚にも高い蓄積があることを示している。CNS蓄積は、他の組織よりも少ないが、血液脳関門（BBB）を透過しない化合物及び生物学的製剤のこれまでの値と比較して、依然としてかなりの量である（血清の25%超）。脳で認められるバックグラウンド血中レベルは、心臓の血液信号の3%である。 ^{14}C で標識した配列番号1を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図16B】生体内分布を評価するために、 ^{14}C 標識TfR結合ペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。異種移植腫瘍（皮下のヒト星細胞腫U87細胞）を担持するマウスに用量100nmolのペプチド（20mg/kg、およそ25g体重と仮定）を投与して3時間後に撮像した。これらの画像は、脾臓、肝臓、腎臓にかなりの蓄積があることを示し、筋肉、骨髄、及び皮膚にも高い蓄積があることを示している。CNS蓄積は、他の組織よりも少ないが、血液脳関門（BBB）を透過しない化合物及び生物学的製剤のこれまでの値と比較して、依然としてかなりの量である（血清の25%超）。脳で認められるバックグラウンド血中レベルは、心臓の血液信号の3%である。 ^{14}C で標識した配列番号2を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図16C】生体内分布を評価するために、 ^{14}C 標識TfR結合ペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。異種移植腫瘍（皮下のヒト星細胞腫U87細胞）を担持するマウスに用量100nmolのペプチド（20mg/kg、およそ25g体重と仮定）を投与して3時間後に撮像した。これらの画像は、脾臓、肝臓、腎臓にかなりの蓄積があることを示し、筋肉、骨髄、及び皮膚にも高い蓄積があることを示している。CNS蓄積は、他の組織よりも少ないが、血液脳関門（BBB）を透過しない化合物及び生物学的製剤の

10

20

30

40

50

これまでの値と比較して、依然としてかなりの量である（血清の25%超）。脳で認められるバックグラウンド血中レベルは、心臓の血液信号の3%である。¹⁴Cで標識した配列番号30を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図16D】生体内分布を評価するために、¹⁴C標識TfR結合ペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。異種移植腫瘍（皮下のヒト星細胞腫U87細胞）を担持するマウスに用量100nmolのペプチド（20mg/kg、およそ25g体重と仮定）を投与して3時間後に撮像した。これらの画像は、脾臓、肝臓、腎臓にかなりの蓄積があることを示し、筋肉、骨髄、及び皮膚にも高い蓄積があることを示している。CNS蓄積は、他の組織よりも少ないが、血液脳関門（BBB）を透過しない化合物及び生物学的製剤のこれまでの値と比較して、依然としてかなりの量である（血清の25%超）。脳で認められるバックグラウンド血中レベルは、心臓の血液信号の3%である。¹⁴Cで標識した配列番号32を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図17A】生体内分布を評価するために、¹⁴C標識ペプチド（配列番号1及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。脇腹の腫瘍にもかなりの蓄積がみられた。腫瘍内の蓄積は、血液の多い部位に集中するのではなく、全体に分散している。これは、血管外漏出及び腫瘍実質部全体への分散を示唆している。¹⁴Cで標識した配列番号1を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図17B】生体内分布を評価するために、¹⁴C標識ペプチド（配列番号1及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。脇腹の腫瘍にもかなりの蓄積がみられた。腫瘍内の蓄積は、血液の多い部位に集中するのではなく、全体に分散している。これは、血管外漏出及び腫瘍実質部全体への分散を示唆している。¹⁴Cで標識した配列番号1を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図17C】生体内分布を評価するために、¹⁴C標識ペプチド（配列番号1及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。脇腹の腫瘍にもかなりの蓄積がみられた。腫瘍内の蓄積は、血液の多い部位に集中するのではなく、全体に分散している。これは、血管外漏出及び腫瘍実質部全体への分散を示唆している。¹⁴Cで標識した配列番号32を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図17D】生体内分布を評価するために、¹⁴C標識ペプチド（配列番号1及び配列番号32）を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。脇腹の腫瘍にもかなりの蓄積がみられた。腫瘍内の蓄積は、血液の多い部位に集中するのではなく、全体に分散している。これは、血管外漏出及び腫瘍実質部全体への分散を示唆している。¹⁴Cで標識した配列番号32を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。

【図18】配列番号1の配列を有するTfR結合ペプチドまたは配列番号32の配列を有するペプチドのいずれかの20mg/kgのIV単回投与後におけるペプチドの生体内分布及び器官蓄積の定量化を示す。この用量では、3時間後、CNSで150nMを超えるレベル、腫瘍で約1μMのレベルに達した。棒グラフは、全身オートラジオグラフィーで測定した、同じ画像内の既知の放射能、及びペプチドを静脈内注射したマウスから投与3時間後に得た様々な組織におけるペプチド比活性に対する各¹⁴C標識ペプチドのレベルを定量化する。

【図19】配列番号1及び配列番号32の配列を有するペプチドに関するペプチドの生体内分布及び器官蓄積の定量化を示す。値は、組織中レベル対血液中レベルを示し、脳が3%の血液であるとする、脳への透過がない場合は3%のレベルになる。棒グラフは、全身オートラジオグラフィーで測定した、同じ画像内の既知の放射能を持つ対照、及びペプチドを静脈内注射したマウスから投与3時間後に得た様々な組織におけるペプチド比活性に対して正規化された各¹⁴C標識ペプチドのレベルを定量化する。

【図20A】全身オートラジオグラフィー（WBA）組織蓄積を検証する、¹⁴⁷Ci/molの比活性を持つ配列番号32の配列を有するTfR結合ペプチドの20mg/kgの投与後の様々な組織における経時的なシンチレーション計測を示す。腎臓における経時的なシンチレーション計測を示す。時間0（Y0）でのy切片は1900pCiであり、

10

20

30

40

50

半減期 ($t_{1/2}$) は 0.89 時間であり、当てはまり度合いの R^2 は 0.89 である。

【図 20 B】全身オートラジオグラフィー (WBA) 組織蓄積を検証する、 $147\text{Ci}/\text{mol}$ の比活性を持つ配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの $20\text{mg}/\text{kg}$ の投与後の様々な組織における経時的なシンチレーション計測を示す。肝臓における経時的なシンチレーション計測を示す。時間 0 (Y0) での y 切片は 400pCi であり、半減期 ($t_{1/2}$) は 7.22 時間であり、当てはまり度合いの R^2 は 0.97 である。

【図 20 C】全身オートラジオグラフィー (WBA) 組織蓄積を検証する、 $147\text{Ci}/\text{mol}$ の比活性を持つ配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの $20\text{mg}/\text{kg}$ の投与後の様々な組織における経時的なシンチレーション計測を示す。脳における経時的なシンチレーション計測を示す。時間 0 (Y0) での y 切片は 7.3pCi であり、半減期 ($t_{1/2}$) は 0.72 時間であり、当てはまり度合いの R^2 は 0.45 である。

10

【図 20 D】全身オートラジオグラフィー (WBA) 組織蓄積を検証する、 $147\text{Ci}/\text{mol}$ の比活性を持つ配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの $20\text{mg}/\text{kg}$ の投与後の様々な組織における経時的なシンチレーション計測を示す。脾臓における経時的なシンチレーション計測を示す。時間 0 (Y0) での y 切片は 168pCi であり、半減期 ($t_{1/2}$) は 12.1 時間であり、当てはまり度合いの R^2 は 0.93 である。

【図 20 E】全身オートラジオグラフィー (WBA) 組織蓄積を検証する、 $147\text{Ci}/\text{mol}$ の比活性を持つ配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの $20\text{mg}/\text{kg}$ の投与後の様々な組織における経時的なシンチレーション計測を示す。筋肉における経時的なシンチレーション計測を示す。時間 0 (Y0) での y 切片は 31.4pCi であり、半減期 ($t_{1/2}$) は 2.54 時間であり、当てはまり度合いの R^2 は 0.85 である。

20

【図 20 F】全身オートラジオグラフィー (WBA) 組織蓄積を検証する、 $147\text{Ci}/\text{mol}$ の比活性を持つ配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの $20\text{mg}/\text{kg}$ の投与後の様々な組織における経時的なシンチレーション計測を示す。皮膚における経時的なシンチレーション計測を示す。時間 0 (Y0) での y 切片は 68.3pCi であり、半減期 ($t_{1/2}$) は 0.33 時間であり、当てはまり度合いの R^2 は 0.31 である。

【図 21】高速相 (95%、 $t_{1/2}$ 15.6 分) 及び低速相 (5%、 $t_{1/2}$ 10.3 時間) のカイネティクスを示す二相消失回帰分析を含む、配列番号 32 の配列を有するペプチド $20\text{mg}/\text{kg}$ を静脈内投与したマウスにおける血清消失プロットを示す。

【図 22 A】配列番号 1 及び配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの多重時間回帰分析及び毛細血管枯渇分析を示す。配列番号 1 及び配列番号 32 の多重回帰分析を単一プロットで示すものであり、y 軸は、脳の血清に対する比を示す。

30

【図 22 B】配列番号 1 及び配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの多重時間回帰分析及び毛細血管枯渇分析を示す。配列番号 1 及び配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドの実質及び毛細血管分布を示すものであり、y 軸は、組織対血清比 ($\mu\text{L}/\text{g}$) を示す。

【図 23 A】可溶性トランスフェリン受容体 (TfR) エクトドメインの精製及び試験を示す。精製した TfR に結合するホロまたはアポトランスフェリン (Tf) の表面プラズモン共鳴 (SPR) を示す。経時的に応答 (RU) が増加することからもわかるように、ホロ Tf は TfR に結合するが、アポ Tf は TfR に結合しない。

40

【図 23 B】可溶性トランスフェリン受容体 (TfR) エクトドメインの精製及び試験を示す。ペプチドの結合特性についてのスクリーニング及び最適化に使用されるベクター提示足場及び標的結合の模式図を示す。結合物質 (例えば、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 32) の GFP タグ付コンストラクトをコードする表面提示ベクター (SDGF) は、細胞表面上に発現される。蛍光色素 (「共染色」) で標識された標的タンパク質 (例えば、TfR) は、表面に発現される結合物質に結合する。

【図 23 C】可溶性トランスフェリン受容体 (TfR) エクトドメインの精製及び試験を示す。図 23 C は、Alexa Fluor 647-TfR (図 23 B 中の共染色) の結合量によって測定した、特異的 TfR 結合についてのスクリーニングのフローサイトメトリーを示す。Machupo ウイルス糖タンパク質 (SDGF-MaCV) をトランスフ

50

エクトした細胞は、ビオチン化TfRとAlexa Fluor 647標識ストレプトアビジン (Strept-647) の組み合わせ、SDGF-MaCV細胞とAlexa Fluor 647標識エラスターゼの組み合わせ、またはSDGF-エラフィン細胞とTfR+Strept-647の組み合わせで試験される。エラスターゼ及びエラフィンの細胞コンジュゲートは、細胞に結合しない。

【図24】 ^{14}C ペプチドバリエーション分布の全身オートラジオグラフィ (WBA) を示す。 ^{14}C ペプチドバリエーションで処置したマウスの投与30分後及び180分後の組織学的切片を示す。3つのペプチド世代の代表的な脳及び心臓 (挿入図) のWBA画像と、対照である非TfR結合CDPの画像を示す。同じ切片の全身画像が図25に示され、180分の切片のいくつかは図16にも示される。

【図25】図24に示される全身X線写真の投与30分後 (左欄) 及び180分後 (右欄) の全身画像を示す。図16には、180分の切片の一部が示されている。

【図26】円二色性を使用して測定した還元及び非還元条件下における配列番号32の熱安定性を示す。 210nm での相対楕円率 (mdeg) が $^{\circ}\text{C}$ 単位の温度でプロットされている。NRは、非還元を示す。DTTは、DTTでのペプチドの還元を示す。縦線は、非線形カーブフィッティング (シグモイド、可変勾配、制約付き底=0; いずれの場合も $R^2 > 0.98$) に基づいて算出された融点 (NRでは約 74°C 、 10mM DTT処理では約 38°C) を表す。NRサンプルは 95°C まで平衡に達しないため、タンパク質は、高温で完全に「融解」せず、特に拡張ループ領域では、単純に無秩序な状態である可能性があることに留意されたい。

【図27】マウストランスフェリン、マウストランスフェリン-N融合体、及び本開示の様々なCDP-ニューロテンシン (NT) 複合体の精製及び特徴付けを示す。還元 (DTT) 及び非還元 (PBS) 条件下でのSDS-PAGEならびにクマシー色素で染色したゲルは、精製後のペプチドの純度を示す。示されるように、マウス内因性トランスフェリン (MmTfと表記、配列番号354)、ニューロテンシンにコンジュゲートされたマウス内因性トランスフェリン (MmTf-NTと表記、配列番号355)、及びCDP-NTペプチドコンストラクト (配列番号33~配列番号35) である。ゲルは、還元 (DTT) または非還元 (PBS) 条件下で実施される。 10mM DTTによる還元は、ペプチドがジスルフィド結合を形成することを示唆した。

【図28A】CRE-ルシフェラーゼ (CRE-Luc) マウスと哺乳動物細胞の両方でニューロテンシン受容体 (NTSR) の下流で IP_1 応答を誘導するCDP-NTペプチドコンストラクトを示す。CRE-LucマウスのCRE駆動型ルシフェラーゼに影響を与える関連経路を示す。PLCは、ホスホリパーゼCを示す。ACは、アデニリルシクラーゼを示す。CaMKは、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼを示す。CREBは、cAMP応答配列結合タンパク質を示す。PKAは、プロテインキナーゼAを示す。PDEは、cAMPホスホジエステラーゼを示す。FSは、フォルスコリンを指す。Rolは、ロリプラムを指す。GPCRは、Gタンパク質結合受容体を指す。

【図28B】CRE-ルシフェラーゼ (CRE-Luc) マウスと哺乳動物細胞の両方でニューロテンシン受容体 (NTSR) の下流で IP_1 応答を誘導するCDP-NTペプチドコンストラクトを示す。in vitroでのニューロテンシン (NT) 受容体結合を示しており、NTSR1を発現するHEK-293細胞において、NTまたはNTペプチドコンストラクトに応答する場合にのみ IP_1 蓄積を示す。 IP_1 は、アッセイキット (CisBio 62IPAPBE) を使用してFRET比の読み取りで測定した。ウェル数は、ビヒクルを除く全てで $N=3$ であり、ビヒクルは $N=36$ であった。横棒は、サンプルの平均を示す。mTf=マウストランスフェリン。ベースラインHEK293=NTSR1を発現していないHEK293細胞 ($N=36$ ウェル) の平均アッセイ値が参照として含まれた。

【図29】免疫組織化学的に染色したNTペプチドコンストラクトを投与したマウスの組織サンプルを示す。組織染色は、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35のCDP-NT投与から4時間後に、マウスの皮質、線条体、及び視床で、ルシフェラーゼ発現

10

20

30

40

50

の増大を示している。トランスフェリン-NT（「トランスフェリン-NT」、配列番号355）またはペプチドなし（「刺激なし」）を投与したマウスは、対照として示す。スケールバー（左上パネル）は、100 μm であり、全てのパネルは、同じ倍率である。

【図30A】CRE-ルシフェラーゼ（CRE-Luc）マウスにおけるCDP-NTペプチドコンストラクトの作用の定量化を示す。一致するコホートを使用した、親TfR結合ペプチド（「親」）（例えば、表記のとおり配列番号1、配列番号2、または配列番号32、または配列番号354）またはシステイン高密度ペプチド（CDP）-NTコンストラクトもしくはマウストランスフェリン-NTコンストラクト（例えば、表記のとおり配列番号33～配列番号35または配列番号355を含む）（「NT融合体」）を静脈内投与する前（刺激なし）または静脈内投与から4時間後（「NT融合体」または「親」と表記）のいずれかにおける発光（腹腔内ルシフェリン投与を介する）を示す。横棒は、サンプルの平均を示す。有意性は、T検定（対応なし、両側）を使用して決定した。（*： $P < 0.05$ 。**： $P < 0.01$ 。#： $P < 0.0001$ ）。親（配列番号354）及びNTトランスフェリンペプチドコンストラクト（配列番号355）の両方に、マウストランスフェリンを使用した。

10

【図30B】CRE-ルシフェラーゼ（CRE-Luc）マウスにおけるCDP-NTペプチドコンストラクトの作用の定量化を示す。図30Aで定量された配列番号32コホートの画像を疑似カラーの発光強度で示す。全ての画像は、見やすさのためだけに、背景を等しく除去し、コントラスト強調されている。

【図31】フォルスコリン及びロリプラム誘導の4時間後のin vivo CRE-ルシフェラーゼ発光を示す。画像は、マウスのルシフェラーゼ蛍光画像を示し、図30に示される実験の陽性対照となる。フォルスコリン及びロリプラムは、ニューロテンシン受容体経路に依存せずに、CRE依存性ルシフェラーゼ発現を活性化する。フォルスコリン及びロリプラムは、それぞれアデニリルシクラーゼの活性化及びcAMPホスホジエステラーゼの阻害を介してCRE発現を誘導する。N=8マウス。パネルは、ロリプラム及びフォルスコリンで同じように処置した反復実験動物を示す。1匹のマウスは、ルシフェリン注射が腹膜内に当たらなかったために打ち切った。

20

【図32】遊離ニューロテンシンペプチドを静脈内投与した後のCRE-Lucマウスにおけるルシフェラーゼ発現を示す。静脈内の遊離ニューロテンシンは、CRE-Lucマウスにおいてルシフェラーゼ発現を誘導できない。高用量の遊離ニューロテンシンペプチド（300 nmol）またはビヒクル（PBS中10% DMSO）を静脈内投与した4時間後のCRE-ルシフェラーゼマウスのin vivo発光を腹腔内ルシフェリン注射で評価し、IVISイメージャーで画像化した。「ns」は、T検定（対応なし、両側）で算出した場合、結果が有意でなかったことを示す（ $P = 0.48$ ）。

30

【図33】配列番号1の配列を有するTfR結合ペプチドまたは配列番号32の配列を有するペプチドのいずれかの20 mg/kgのIV単回投与後におけるペプチドの生体内分布及び器官蓄積の定量化を示す。ペプチドレベルを30分及び3時間に測定した（3時間のデータは図18にも示される）。この用量では、3時間後、CNSで150 nMを超えるレベル、腫瘍で約1 μM のレベルに達した。棒グラフは、全身オートラジオグラフィーで測定した、同じ画像内の既知の放射能、及びペプチドを静脈内注射したマウスから投与3時間後に得た様々な組織におけるペプチド比活性に対する各 ^{14}C 標識ペプチドのレベルを定量化する。組織データを7つのクラスターで、それぞれ4本の棒でプロットしている。4本の棒のクラスターは、異なる組織タイプに対応し、x軸に示されるように、左から右に、皮膚、脂肪、筋肉、脾臓、腎臓、肝臓、脳、及び血液である。各クラスターの4本の棒は、左から右に、配列番号1 30分（N=10切片）、配列番号1 180分（N=14切片）、配列番号32 30分（N=12切片）、及び配列番号32 180分（N=21切片）に対応する。y軸は、nmol g^{-1} 組織のペプチドを0.01～100で10刻みの対数スケールで示す。各棒の値は、左から右に、皮膚：1.33、1.12、1.70、1.02、脂肪：0.79、0.52、0.52、0.27、筋肉：0.63、0.35、0.44、0.35、脾臓：4.37、20.03、1.17、3.60、

40

50

腎臓：29.05、9.71、16.91、3.10、肝臓：4.79、22.18、1.80、8.54、脳：0.23、0.16、0.21、0.09、及び血液：1.58、0.62、0.86、0.34である。脾臓、腎臓、及び肝臓に対応する棒は、他のセットよりも明らかに高い。挿入図は、脳から得た同データを血液に対して正規化したものを示す。4本の棒は、左から右に、配列番号1 30分（N=10切片）、配列番号1 180分（N=14切片）、配列番号32 30分（N=12切片）、及び配列番号32 180分（N=21切片）に対応する。y軸は、血液に対して正規化したペプチドを1~100で、10刻みの対数スケールで示す。各棒の値は、左から右に、14%、26%、25%、及び27%の血中ペプチドレベルである。

【図34A】SA21融合ペプチドの精製を示す。配列番号373に対応する血清アルブミンペプチド（SA21）に融合させたTfR結合ペプチドの精製を示す。純度は、DTT還元（「R」）または非還元（「NR」）条件下におけるSDS-PAGE（左）及びRP-HPLC（右）によって検証された。SDS-PAGEは、切断していない（「U」）シデロカリン-CDP融合ペプチドでも実施された。

10

【図34B】SA21融合ペプチドの精製を示す。配列番号456（GSRLIEDICLPWGCLEDDGGGSGGGGSGVRIPVSCKHSGQCCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK）に対応するSA21に融合されたペプチドの精製を示す。純度は、DTT還元（「R」）または非還元（「NR」）条件下におけるSDS-PAGE（左）及びRP-HPLC（右）によって検証された。SDS-PAGEは、切断していない（「U」）シデロカリン-CDP融合ペプチドでも実施された。

20

【発明を実施するための形態】

【0122】

中枢神経系（CNS）に位置する標的への薬物送達は、血液脳関門（BBB）によって妨げられることがあり、この用語は、CNS毛細血管の血管内皮細胞を指す。このシステムは、有害な代謝物及び病原体がCNS（例えば、脳）内に入らないようにするために存在するが、同時に、従来の薬を使用したCNS疾患の治療を特に困難にしている。これは、原発性CNS腫瘍（例えば、神経膠腫）ならびに多発性硬化症及びアルツハイマー病などの神経炎症性疾患及び神経変性疾患が、標的細胞への薬物送達が阻害されにくい末梢組織を冒す同様の疾患には高い効果を示し得る治療法に対して、応答が特に低いことの理由であり得る。CNSの障害は、脳癌から神経変性、加齢に伴う炎症プロセスまで無数のにのぼり、CNSへの薬物送達には様々なアプローチが必要である。BBBは、オスモライト及び栄養素が血清から脳内に入るのを許可し、CNS星状膠細胞は、ニューロンが必要とする成長及び生存シグナルの多くを提供する一方で、トランスフェリン（鉄シャペロン）、インスリン、及びレプチンなどのいくつかの大きなホルモン及びタンパク質は、BBBを通過することができる。トランスフェリンなどの大きな分子のCNS輸送は、受容体媒介性トランスサイトosisまたは「小胞性トランスサイトosis」（例えば、細胞内の小胞での頂端側から基底側またはその逆へのカーゴの輸送）によって達成することができる。例えば、正常なエクストロメインを含有するインスリン、レプチン、及びトランスフェリンの内因性受容体（それぞれ、InsR、ObR、及びTfR）のバリエーションは、これらの分子のCNSへの輸送を促進するために、CNS血管内皮細胞によって利用することができる。このように選択性の高い方法で、トランスフェリン（分子量およそ75kDa）のような特定の大きな分子は、脳実質にアクセスすることができる。

30

40

【0123】

種々の実施形態において、本開示は、カーゴ分子または活性薬剤（例えば、小分子、ペプチド、またはタンパク質）を内皮細胞層（例えば、BBB）または上皮細胞層を含む細胞層または障壁を越えて輸送することを可能にする組成物、及びこれらの組成物を使用する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、BBBを通過することができない様々な分子をCNSに送達することを可能にする組成物及び方法を提供する。いくつかの場合において、本開示は、治療用及び／または診断用分子をCNS、例えば、脳に送達するための組成物及び方法を提供する。したがって、種々の実施形態において、本開

50

示は、BBBを通過することが可能なペプチドを提供する。これらのペプチドは、トランスフェリン受容体（TfR）に対して親和性及び選択的を有し得る。TfR結合ペプチドは、システイン高密度ペプチド（CDP）であり得る。いくつかの場合において、本開示のペプチドは、TfR媒介性トランスサイトosisを介してBBBを通過することができる。

【0124】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、小分子、ペプチド、もしくはタンパク質などの任意の分子タイプの化学コンジュゲーションによって、またはペプチドもしくはタンパク質の組換え融合によってそれぞれ連結される、ペプチドコンジュゲート、ペプチドコンストラクト、融合ペプチド、または融合分子であり得る（例えば、ペプチドコンストラクト）。「融合ペプチド」及び「ペプチド融合体」という用語は、本明細書中で区別なく使用される。いくつかの実施形態において、ペプチドコンストラクトは、生物学的または合成的に生成することができる。したがって、いくつかの場合において、TfR結合ペプチドは、小分子、ペプチド、もしくはタンパク質などの別の分子もしくは分子群、またはナノ粒子などの他の巨大分子に連結されたTfR結合ペプチドドメインを含み得る。

【0125】

いくつかの実施形態において、本開示は、細胞障壁または分子障壁を越える輸送を可能にする方法及び組成物を提供する。種々の実施形態において、本開示は、細胞層（例えば、内皮細胞または上皮細胞）または細胞膜を越えるTfR媒介性輸送を可能にする方法及び組成物を提供する。いくつかの場合において、本開示のTfR結合ペプチドは、血液脳関門（BBB）を越える輸送を可能にする。様々な態様において、本開示のペプチドは、TfRを発現する任意の細胞を標的とするために使用することができる。BBBに加えて、様々な他の細胞、組織、及び器官がTfRを発現する。TfRを発現する細胞は、肝細胞、赤血球及び骨髄中の赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、ならびに急速に分裂する細胞を含み得る。TfRを発現する組織及び器官は、脳（例えば、大脳皮質、海馬、尾状、小脳）、内分泌腺組織（例えば、甲状腺、副甲状腺、及び副腎）、骨髄及び免疫系（例えば、虫垂、リンパ節、扁桃腺、脾臓）、筋肉組織（例えば、心臓、骨格、及び平滑筋）、肝臓、胆嚢、膵臓、消化管（例えば、口腔粘膜、食道、胃、十二指腸、小腸、結腸、直腸）、腎臓、膀胱、婦人科組織（例えば、卵管、乳房、膣、子宮頸、子宮内膜、卵巣、及び胎盤）、脂肪及び軟組織、ならびに皮膚を含み得る。したがって、本開示のTfR結合ペプチドは、これらの細胞、組織、及び器官を標的とし、これらの細胞、組織、及び器官に、例えば、TfR媒介性トランスサイトosisを介して（例えば、BBBなどの細胞障壁を越えて）またはTfR媒介性エンドサイトosisを介して（例えば、細胞膜を越えて細胞内に）活性薬剤を送達するために使用することができる。

【0126】

種々の実施形態において、本開示は、いくつかの場合において、CMYC過剰発現がTfR過剰発現を生じ得るため、TfRを発現するがん細胞またはCMYC過剰発現癌へのTfR媒介性輸送及び送達を可能にする方法及び組成物を提供する。TfRを発現するがんは、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌を含み得る。

【0127】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、1つ以上の活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合された本明細書に記載される1つ以上のTfR結合ペプチドを含む、ペプチドコンストラクトであり得る。本明細書に記載されるペプチドコンストラクトは、化学コンジュゲート及び組換え融合分子を含み得る。

いくつかの場合において、化学コンジュゲートは、別の分子に化学的にコンジュゲートされるか、または連結された本明細書に記載される T f R 結合ペプチドを含み得る。分子は、小分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または他の巨大分子（例えば、ナノ粒子）及び重合体（例えば、核酸、ポリリシン、またはポリエチレングリコール）を含み得る。いくつかの場合において、本開示の T f R 結合ペプチドは、リンカーを介して別の分子にコンジュゲートされる。リンカー部分は、切断可能（例えば、pH感受性リンカーまたは酵素に不安定なリンカー）または安定なリンカーを含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチドコンストラクトは、組換え発現され得る融合分子（例えば、融合ペプチドまたは融合タンパク質）であり、融合分子は、組換え発現され得る 1 つ以上の他の分子ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または他の巨大分子に融合された 1 つ以上の T f R 結合ペプチドを含み得る。

10

【0128】

いくつかの場合において、本開示の T f R 結合ペプチドは、ある特定の生物学的作用を発揮することが可能な治療用（「活性薬剤」とも呼ばれる）カーゴ分子または診断用（「検出可能な剤」とも呼ばれる）カーゴ分子にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合されて、ペプチドコンストラクトをもたらす。いくつかの場合において、本明細書で使用される治療用または診断用カーゴ分子は、T f R 媒介性トランスサイトosisを介して BBB を越えて輸送され得る。CNS 内部に入ると、カーゴ分子は、特定の細胞、細胞集団、または組織を標的とし得る。いくつかの場合において、治療用または診断用カーゴ分子は、本明細書に開示される組成物及び方法と組み合わせて使用される場合、BBB を越えた効果的な輸送により、CNS 内で極めて高い効力を発揮することが可能な既知の化合物である。

20

【0129】

本開示のペプチド、またはその誘導体、フラグメント、もしくはバリエーションは、T f R、またはその誘導体もしくはアナログに対して、親和性及び選択的に有し得る。いくつかの場合において、本開示のペプチドは、部位飽和変異導入（SSM）を使用して操作され、改善された T f R 結合特性を示すか、またはトランスサイトosisをより効果的に促進することができる。いくつかの場合において、本開示のペプチドは、ノットペプチドまたはヒッチン由来ペプチドもしくはノッティン由来ペプチドに関連するシステイン高密度ペプチド（CDP）である。T f R 結合ペプチドは、システイン高密度ペプチド（CDP）であり得る。「ペプチド」、「CDP」、「T f R 結合ペプチド」、「T f R 結合 CDP」、及び「T f R 結合ペプチド」という用語は、本明細書中で区別なく使用される。ヒッチンは、CDP のサブクラスであり得、6 つのシステイン残基が連続性 [1-4]、2-5、3-6 に従ってジスルフィド結合を形成し、これは、1 番目のシステイン残基が 4 番目の残基と、2 番目のシステイン残基が 5 番目の残基と、3 番目のシステイン残基が 6 番目の残基とジスルフィド結合を形成することを示す。この命名法の括弧は、システイン残基がノッティングジスルフィド結合を形成することを示す。（例えば、Correnti et al. Screening, large-scale production, and structure-based classification for cystine-dense peptides. Nat Struct Mol Biol. 2018 Mar; 25 (3): 270-278 参照）。ノッティンは、CDP のサブクラスであり得、6 つのシステイン残基は、連続性 1-4、2-5、[3-6] に従ってジスルフィド結合を形成する。ノッティンは、通常、約 20 ~ 約 80 アミノ酸長の範囲のペプチドのクラスであり、多くの場合、コンパクトな構造に折り畳まれる。ノッティンは、典型的に、多数の分子内ジスルフィド架橋を特徴とし、ベータストランド及び他の二次構造を含み得る、複雑な三次構造に組み立てられる。ジスルフィド結合の存在は、ノッティンに顕著な環境安定性を付与し、それにより、ノッティンは、極端な温度及び pH に耐え、血流のタンパク質分解酵素に抵抗することができる。いくつかの場合において、本明細書に記載されるペプチドは、ノットペプチドに由来し得る。本明細書で開示されるペプチドのアミノ酸配列は、複数のシステイン残基を含み得る。いくつかの場合において、ペプチド

30

40

50

のアミノ酸配列内に存在する複数のシステイン残基の少なくともシステイン残基がジスルフィド結合の形成に関与する。いくつかの場合において、ペプチドのアミノ酸配列内に存在する複数のシステイン残基の全てのシステイン残基がジスルフィド結合の形成に関与する。本明細書に記載される場合、「ノットペプチド」という用語は、「システイン高密度ペプチド」、「CDP」、または「ペプチド」という用語と区別なく使用され得る。

【0130】

本明細書で提供されるのは、トランスフェリン受容体に結合し、対象（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における治療上適切な濃度で生物活性分子の蓄積を可能にするCDPの特定、成熟、特性評価、及び利用の方法である。本開示は、現代の創薬戦略への適用の可能性についてスクリーニングすることができる、多様な足場ファミリーとしてのCDPの実用性を示すものである。CDPは、既存の生物学的製剤、主に抗体の代替物であり、低い組織透過性、免疫原性、及び毒性が生じた場合に問題となり得る長い血清半減期を含む、免疫グロブリン足場の不利益のいくつかを回避することができる。20～80アミノ酸の範囲の本開示のペプチドは、中型であり、抗体の好ましい結合特異性及び親和性の特徴の多くを有しつつも、安定性が改善され、免疫原性が低く、製造方法がより簡単である、医学的に意味のある治療薬である。CDPの分子内ジスルフィド構造により、特に高い安定性指標が付与され、それにより、フラグメンテーション及び免疫原性が低減し、また、サイズが小さいことで、組織透過または細胞透過が改善し、血清半減期の調整が容易になる。本明細書で開示されるのは、CNS薬物送達ビヒクルとして機能することができるペプチド候補を表すペプチドである。本開示のペプチドは、細胞透過ペプチド(CPP)であり得る。CPPは、細胞透過、組織透過、またはその両方であり得る。

【0131】

いくつかの実施形態において、CPPは、CDPであり得る。CPPは、様々な部分及び薬剤の細胞の摂取または取り込みを促進するペプチドを含み得、それ自体が細胞膜を越えて移動し得る。CPPは、細胞膜を越えて移動することができる短いペプチド配列の一種であるタンパク質質導入ドメインを含有し得る。細胞透過ペプチドは、細胞のサイトゾル、細胞の核、または細胞の他の細胞成分の位置に直接的または間接的に入ることができる。細胞透過ペプチドは、核酸、ペプチド、タンパク質、siRNA、dsRNA、代替的な骨格化学特性を含む核酸（例えば、連結核酸(LNA)またはペプチド核酸(PNA)）、放射性核種、造影剤、蛍光剤、治療薬、ナノ粒子などを含む、様々なカーゴの適切な担体として使用することができる。CPPは、人工または操作された配列（例えば、合成配列）であり得る。CPPは、複数のタンパク質配列を含み得るが、かかるタンパク質配列は、天然、合成、またはバリエーション（例えば、キメラ）にかかわらない。CPPは、単一のタンパク質配列から得ることができるが、かかるタンパク質配列は、天然、合成またはバリエーション（例えば、タンパク質由来配列）にかかわらない。CPPは、カチオン性、両親媒性または疎水性などの様々な生理化学的特性を示すことができる。CPPの内在化のいくつかの機序には、直接的な細胞透過、エンドサイトーシス経路の使用、及び一時的な構造体の形成による移動が含まれる。本明細書の細胞透過ペプチド(CPP)の説明及び使用は、限定されないことが理解される。CPPの非限定的な例は、Derakhshankhah and Jafari, “Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications” (Biomedicine & Pharmacotherapy; Volume 108, December 2018, Pages 1090–1096)に見出すことができ、その全体が参照により援用される。

【0132】

本明細書で開示される方法及び組成物と組み合わせて使用することができるいくつかの治療用分子は、CNSの一部である1つ以上の特定の細胞または組織を標的とすることが可能である。例えば、Gタンパク質結合受容体であるニューロテンシン受容体(NTSR)は、ニューロテンシン（本明細書中「NT」と略される；ELYENKPRRPYIL（配列番号350））、またはNTSRと略される神経ペプチドであるその誘導体に連結

10

20

30

40

50

されたCDPを含む融合タンパク質を用いて標的化される。いくつかの場合において、CDP-NTペプチドコンストラクトは、対象（例えば、ヒト）の慢性疼痛または神経障害性疼痛を予防または治療するために使用される。

【0133】

また、本明細書で記載されるのは、侵害受容性疼痛、または本明細書に記載される他の治療適応症を含む疼痛の知覚、調節、管理、減少、除去または低減に関与する中枢神経系（CNS）の特定の領域、組織、構造または細胞に対して、選択的にホーミング、標的化、指向、移動、到達可能、保持、蓄積、及び／または結合するペプチドである。罹患領域の1つ以上の特定の領域、組織、構造または細胞に対して、ホーミング、標的化、移動、指向、保持、もしくは蓄積及び／または結合するペプチドは、オフターゲット及び潜在的な悪影響、例えば、鎮痛薬の使用及び有効性を制限することが多い副作用がより小さくなり得る。加えて、そのようなペプチドは、血液脳関門が原因で活性薬剤がCNSに治療レベルで到達することができない場合でも、CNSなどの領域に、それらの活性薬剤を送達することができる。そのようなペプチドはまた、オピオイド薬を含む他の鎮痛剤の必要性を低減することができる。加えて、そのようなペプチドは、既存の薬物を罹患領域の特定の領域、組織、構造もしくは細胞に直接標的化すること、及び罹患領域との接触を助けること、または薬剤の局所濃度を増加させることによって、既存の薬物の投与量を減らし、有効性を上げることができる。ペプチドは、それ自体が疼痛を調節することができるか、または、疼痛を調節する薬剤にコンジュゲートすることができる。そのような疼痛の調節は、炎症、自己免疫応答、疼痛受容体に対する直接的もしくは間接的作用、細胞殺傷、またはプログラム細胞死を調節することなどの様々な機序によって作用し得る（罹患した細胞または組織などのアポトーシス経路及び／または非アポトーシス経路を介するかにかわらない（Tait et al., J Cell Sci 127 (Pt 10): 2135-44 (2014)））。

【0134】

CDPは、抗体などの他の分子と比較して、サイズが小さく、組織または細胞への透過が高く、血清からのクリアランスが速いという点で、また、小さいペプチドと比較して、プロテアーゼに耐性があるという点（安定性及び免疫原性の低下の両方）で、CNSへの送達について有利であり得る。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチド（例えば、CDP、ノットペプチド、またはヒッチン）、TfR結合ペプチドコンジュゲート（例えば、1つ以上のTfR結合ペプチド及び1つ以上の活性薬剤を含む）、または操作されたTfR結合融合ペプチド（例えば、1つ以上のTfR結合ペプチド及び1つ以上のペプチドを含む）は、TfR結合抗体よりも優れた特性を有し得る。例えば、本明細書に記載されるペプチド及びコンストラクトは、細胞及び標的組織へのより優れた、より深い、及び／またはより速い組織または細胞透過（例えば、脳実質への透過、固形腫瘍への透過）、ならびに標的以外の組織及び血清からの速いクリアランスを提供し得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、TfR結合抗体よりも低い分子量を有し得る。分子量が低いことは、TfR結合抗体と比較して、本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドに有利な特性を付与し得る。例えば、本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、抗TfR抗体よりも容易に細胞または組織に透過し得るか、または抗TfR抗体よりも低いモル用量毒性を有し得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、抗体のFc機能を欠くため、有利であり得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、モル基準で、製剤の高い濃度を可能にするため、有利であり得る。

【0135】

本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、TfR結合抗体ベースの治療薬と比較して、より広い治療濃度域（例えば、治療上の薬力学応答が観察される量を上回るが、毒性が観察される量を下回る投与量

）を有し得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、TfR結合抗体ベースの治療薬と比較して、毒性のリスクが少なく、より高いモル投与量で使用され得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、TfR結合抗体ベースの治療薬と比較して、適応免疫応答を誘発するエピトープが少ないため、免疫原性が低下し得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、TfR結合抗体ベースの治療薬と比較して、活性薬剤のタンパク質融合コンストラクトへの組み込みがより容易で破壊的でないことを示し得る。本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、TfR結合抗体ベースの治療薬と比較して、表面積が小さいため、オフターゲット結合のリスクが低くなり得る。例示的な比較は、実施例54に記載される。

【0136】

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、対象に同じモル用量または同様の有効用量で投与された場合、抗TfR抗体よりも低いオンターゲット毒性を示す。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、対象に同じモル用量または同様の有効用量で投与された場合、抗体よりも低いオフターゲット毒性を示す。例えば、本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、抗体よりも約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍高いモル用量で対象に投与され得るが、観察される毒性は同等であるか、または低い。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチド、TfR結合ペプチドコンジュゲート、またはTfR結合融合ペプチドは、抗TfR抗体と同じ重量の用量で対象に投与された場合、抗TfR抗体よりも高い有効性を示す。本開示のTfR結合ペプチドは、半減期延長部分（例えば、Fc、SA21、PEG）に融合された場合、活性及び有効性を維持しながら、更に低用量で送達することができ、したがって、抗TfR抗体の投与よりもはるかに優れている。

【0137】

本開示のTfR結合ペプチドは、ペプチドコンストラクトとして活性薬剤に融合される場合、同じ標的に対する操作された抗TfR二重特異性抗体よりも高い有効性を示し得る。例えば、本明細書で開示される操作されたTfR結合ペプチドは、BACE阻害薬に更に融合され得る。これらの操作されたTfR結合ペプチド-BACE阻害薬コンストラクトは、同じまたは高い有効性を維持しながら、二重特異性抗TfR/BACE1抗体よりも高いモル用量で投与することができる。例えば、操作されたTfR結合ペプチド-BACE阻害薬コンストラクトは、網状赤血球減少症を引き起こすことがあまりなく、アミロイドベータ形成を効果的に阻害することができ、操作されたTfR結合ペプチド-BACE阻害薬コンストラクトが投与された対象に対する毒性が低いか、または全くない。対照的に、二重特異性抗TfR/BACE1抗体は、網状赤血球減少症を引き起こす可能性があり、及び／またはアミロイドベータ形成を阻害する有効性が低く、対象に対する毒性が高いことがあることから、嗜眠、苦痛、及び溶血の徴候をもたらし得る。

【0138】

いくつかの実施形態において、本開示は、TfRに結合する、ペプチド（例えば、CDP、ノットペプチド、またはヒッテン）、化学コンジュゲート（例えば、1つ以上のTfR結合ペプチド及び1つ以上の活性薬剤を含む）、または組換え発現された融合分子（例えば、1つ以上のTfR結合ペプチド及び1つ以上の活性薬剤を含む）を提供する。TfR結合ペプチドは、システイン高密度ペプチド（CDP）であり得る。「ペプチド」、「CDP」、「TfR結合ペプチド」、「TfR結合CDP」、「TfR結合ペプチド」、及び「操作されたTfR結合ペプチド」という用語は、本明細書中で区別なく使用される。本開示に記載されるペプチドのTfRへの結合は、ペプチドまたはペプチドコンストラクト（例えば、融合タンパク質、または薬剤にコンジュゲート、連結、もしくは融合され

たペプチド)の細胞障壁(例えば、BBB)を越えたトランスサイトーシスを促進することができる。また本明細書で開示されるのは、CDPの多様なライブラリーをスクリーニングし、ヒトTfRに特異的に結合するCDPを特定するための哺乳動物の表面提示スクリーニングプラットフォームの使用である。その後、更なる親和性成熟を実施して、様々な親和性を有するTfR結合CDPのアレルシリーズを得ることができる。いくつかの実施形態において、TfR結合CDPが特定され、結合は結晶学によって決定され得る。本開示のペプチドは、種間で交差反応性を有し得る。例えば、本明細書で開示されるペプチドは、いくつかの場合において、ヒト及びマウスTfRに結合する。本明細書で開示されるペプチドは、ニューロテンシンペプチドコンストラクトを使用したcAMP応答配列シグナル伝達カスケードの誘導を含め、静脈内投与後、CNSに蓄積し、TfRの結合を介してBBBを透過することができる。本明細書で開示されるのは、腫瘍学、自己免疫疾患、急性及び慢性神経変性、ならびに疼痛管理における治療薬送達剤として使用するためのTfR結合CDPである。TfR結合CDPを介した活性薬剤または医療薬剤の送達は、製造がより簡単で(ペプチドは生物学的または合成的手段により製造することができる)、安定性が改善され、サイズが小さい(カーゴ活性の立体障害の可能性が低い)ことから、従来の抗TfR抗体よりも有利であり得る。したがって、本開示の方法及び組成物は、CNS(例えば、脳)内にカーゴ分子(例えば、治療用及び/または診断用小分子、ペプチドまたはタンパク質)を効果的に輸送するという課題に対する解決策を提供することができる。例えば、本開示のペプチドは、脳に位置する腫瘍への薬物送達を助ける。

【0139】

本開示のいくつかの実施形態において、CDP、ノットペプチド、ヒッチン、またはノットペプチドもしくはヒッチンに由来するペプチドの多様なライブラリーは、哺乳動物の表面提示スクリーニングプラットフォームと組み合わせて使用することができ、ヒトTfRに特異的に結合するペプチドを特定するために使用される。(例えば、Crook et al. (2017) Mammalian display screening of diverse cysteine-dense peptides for difficult to drug targets. Nat Commun 8:2244参照)。いくつかの実施形態において、CDP、ノットペプチド、ヒッチン、またはノットペプチドもしくはヒッチンに由来するペプチドの多様なライブラリーは、内因性ペプチド配列から変異導入させることで、新規ペプチド配列が得られる。TfR結合ペプチドが特定されたら、親和性成熟(例えば、部位飽和変異導入)を実施して、TfRに対する親和性が様々な(例えば、改善された)結合物質のアレルシリーズを得ることができる。これらの技術は、ペプチド-受容体相互作用の性質(例えば、受容体結合などに重要なアミノ酸残基)を特定するために、様々な他の分析方法(例えば、結晶学または分光法)と組み合わせて使用することができる。いくつかの場合において、本開示のペプチドは、ヒトTfRに結合するように開発されるが、それらのペプチドは、マウスTfRなどの他の種に由来するTfRと交差反応性を示し得る。

【0140】

本開示のペプチドは、in vivoで様々な生体内分布パターンを有し得る。いくつかの場合において、器官分布、標的器官(例えば、脳)におけるペプチドの取り込み及び滞留時間、ならびにクリアランス様式(例えば、腎臓または肝臓)を決定するために、例えば、放射性標識ペプチド(例えば、¹⁴C標識ペプチド)を使用して、マウス生体内分布及び薬物動態学的研究が実施される。

【0141】

種々の実施形態において、本開示は、CNS(例えば、脳)に蓄積するペプチドを提供する。いくつかの場合において、それらのペプチドのCNS蓄積は、BBBを越えて透過することによる。いくつかの場合において、本明細書に記載される操作されたTfR結合ペプチドバリエーションは、TfR媒介性トランスサイトーシスによってBBBを通過する。いくつかの場合において、本開示のTfR結合ペプチドは、CNSに位置する腫瘍組織に蓄積する。いくつかの場合において、ペプチドが蓄積する腫瘍は、脳腫瘍(例えば、神経

膠腫)である。本明細書に記載される場合、「蓄積する」及び「～に蓄積する」という用語は、区別なく使用され、「細胞及び／または組織内または細胞及び／または組織上の蓄積を指すために使用され得、それぞれの分子(例えば、TfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクト)の濃度が経時的に漸増することが理解され得る。

【0142】

いくつかの実施形態において、本開示の操作されたペプチド(例えば、ヒスチジン含有またはヒスチジンリッチTfR結合ペプチド)は、生理学的なpHで高いTfR結合親和性を有するが、エンドソームのpH5.4などの低いpHレベルでは、結合親和性が著しく低下し得る。いくつかの場合において、本開示のTfR結合ペプチドは、高いTfR結合能力を保持しながら、小胞内(例えば、エンドソーム内)及び／または細胞内送達機能を改善するために最適化され得る。いくつかの場合において、ヒスチジンスキャン及び比較結合実験を実施して、そのようなペプチドを開発及びスクリーニングすることができる。加えて、いくつかのペプチドは、送達機能(例えば、治療薬の細胞内送達)を増大させるために、ペプチドまたはペプチドコンストラクトの低pHエンドソーム脱出を促進するモチーフを含み得る(例えば、コンジュゲート、連結、または融合される)。いくつかの実施形態において、本開示のペプチド中のアミノ酸残基は、TfRへのpH依存性結合親和性を変更するために、異なるアミノ酸残基で置換される。アミノ酸置換は、低いpHにおける結合親和性を増加させること、高いpHにおける結合親和性を増加させること、低いpHにおける結合親和性を減少させること、高いpHにおける結合親和性を減少させること、またはこれらの組み合わせを含み得る。

【0143】

例示的な本開示のペプチドは、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、及び配列番号171～配列番号202に示されるアミノ酸配列を含む表1に示される。

【0144】

種々の実施形態において、本開示のペプチドは、治療用及び／または診断用分子(例えば、小分子、ペプチド、またはタンパク質)を細胞層またはBBBなどの細胞障壁を越えて輸送するように設計されたペプチドコンストラクトまたは融合ペプチドなどのペプチドコンストラクトの一部(例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、配列番号359～配列番号361、配列番号373、配列番号375、配列番号381、配列番号384、配列番号385、配列番号388、配列番号389、配列番号393、配列番号396、配列番号397、配列番号400、及び配列番号401のいずれか1つのアミノ酸配列を有するもの)である。例示的なペプチドコンストラクトは、表2、表5、及び表6に示される。本開示のペプチドコンストラクトは、治療用及び／または診断用の分子または化合物に連結された(例えば、化学コンジュゲートまたは融合された)TfR標的ペプチドを含み得る。TfR結合ペプチドコンストラクトは、TfR媒介性トランスサイトシスを介してBBBを通過することができ、したがって、治療用及び／または診断用の分子または化合物をCNSに送達することができる。したがって、本開示の方法及び組成物は、様々な疾患または状態の診断、予防、及び治療に対して大きな影響を与え得る。本開示の方法及び組成物が使用され得る疾患領域としては、腫瘍学、自己免疫疾患、急性及び慢性神経変性、筋肉障害、神経心理学的障害、てんかん、統合失調症、鬱病、不安、双極性障害、脳発達障害(例えば、自閉症スペクトラム)、疼痛、てんかん、気分障害、ならびに疼痛管理が挙げられるが、これらに限定されない。

【0145】

したがって、CNSの障害を有する対象は、BBBへの透過が低いことで制限されている薬物または薬物クラスの利益を享受することができないが、本明細書で提供されるTfR結合ペプチドにコンジュゲートすることによって、CNSにおける治療上有効な薬物濃度を達成することができるので、本明細書に記載される組成物及び方法の利益を享受することができる。薬理学的利点に加えて、TfR結合ペプチドを含む本明細書に開示される

組成物及び方法は、その産生、品質管理、及び安全性の点で、従来のCNS及びTfR標的薬剤（例えば、抗TfR抗体）よりも優れていることがあり得る。例えば、本開示のペプチド及びペプチドコンストラクトは、より簡単で、より安価で、より資源効果の高い方法で製造され（例えば、ペプチドは生物学的または合成的アプローチを介して合成することができる）、本開示のペプチド及びペプチドコンストラクトは、*ex vivo*及び*in vivo*での安定性の改善を示すことができ、サイズが小さく（例えば、カーゴ活性に対する立体障害の可能性が低く、固形腫瘍などの密な組織を透過する能力があり、体循環からのクリアランスが速くなる可能性がある）、組織または細胞への高い透過を示し、低い免疫原性を有する。本開示のペプチドは、結晶学的データと、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）もしくはヒト白血球抗原（HLA）ペプチドフラグメント結合実験もしくはそのコンピューター予測、または前述の組み合わせとを組み合わせることによって、低い免疫原性を有するように操作することができる。

10

【0146】

細胞層またはBBBなどの細胞障壁を通過する能力を有する治療用または診断用薬剤の特定は、かかる方法が、高い特異性または標的化、トランスサイトーシスを促進することができる受容体（例えば、TfR）に対する親和性の高い結合物質、及び細胞を標的とし、トランスサイトーシス後に標的タンパク質に作用する能力（オフターゲットの悪影響が少ない）を必要とすることから、困難であった。いくつかの例外を除いて、小分子ライブラリーを用いた高スループットスクリーニングプロジェクトは、内皮層もしくは上皮層を通過すること及び／またはそれらの層を越えてカーゴを輸送することが可能な特定の化合物を提供することができなかった。

20

【0147】

本明細書に記載されるのは、いくつかの実施形態において、TfRなどの目的のタンパク質を標的とするペプチド及びペプチドコンストラクトならびにペプチド及びペプチドコンストラクトをスクリーニングする方法である。トランスフェリンなどの野生型または内因性分子と比較して、本明細書に記載される方法及び組成物は、TfR結合能力が改善したペプチド、もしくはBBBを越える輸送能力の改善を示すペプチド、またはこれらの任意の組み合わせを提供することができる。いくつかの場合において、本明細書中に記載されるペプチドは、カーゴ分子（例えば、治療用または診断用小分子またはタンパク質）を内皮細胞層（例えば、BBB）または上皮層を越えて効率的に輸送する。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、TfRに結合し、小胞性トランスサイトーシスを促進する。いくつかの場合において、本開示のTfR結合ペプチドは、TfRを過剰発現する細胞（例えば、がん細胞）に結合し、細胞によるペプチドの取り込みを促進する。いくつかの態様において、本明細書に記載されるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、小胞性トランスサイトーシス及びがんなどのTfR過剰発現細胞による取り込み、またはこれらの組み合わせを促進する。

30

【0148】

本開示のTfR結合ペプチドは、ヒト、サル、マウス、及びラットTfRを含む、異なる種のTfRに結合することができる。いくつかの場合において、TfR結合ペプチドのアミノ酸残基のいずれかにおける変化または変異は、交差反応性に影響し得る。いくつかの場合において、TfRの結合部位と相互作用するTfR結合ペプチドのアミノ酸残基のいずれかにおける変化または変異は、交差反応性に影響し得る。

40

【0149】

本明細書に記載されるのは、限定するものではないが、高い親和性で標的タンパク質（例えば、TfR）に結合する能力を保持しながら、カーゴ分子を運搬するのに十分な大きさでありつつ、サイトゾルもしくは核などの細胞コンパートメント、または細胞凝集塊の中心などの組織（例えば、固形腫瘍）にアクセスするのに十分な小ささであり得る、設計されたまたは操作されたペプチド、組換えペプチド、及びシステイン高密度ペプチド（CDP）／小さなジスルフィドノーットペプチド（例えば、ノーットペプチド、ヒッチン、及びそれらに由来するペプチド）を含む、ペプチドである。いくつかの場合において、本明

50

細書に記載されるペプチドは、血管のトランスサイトosisを介してBBBを越えてCNS（例えば、実質）にカーゴ分子を運搬する。いくつかの場合において、トランスサイトosisは、TfR媒介性である。

【0150】

更に、本明細書に記載されるのは、ペプチド-受容体相互作用の性質の決定（例えば、X線結晶学を使用する）ならびにCNS（例えば、脳）内の蓄積を含む*in vivo*における薬力学及び薬物動態特性の決定を行うための方法及び組成物である。本明細書に記載されるペプチドのいくつかは、腫瘍細胞を標的とし、腫瘍細胞に蓄積する能力を有する。いくつかの場合において、腫瘍細胞は、TfRを過剰発現している。いくつかの態様において、本開示のペプチドは、高い*in vivo*安定性、例えば、高いプロテアーゼ安定性、グルタチオン（GSH）などの還元剤に対する高い耐性を有し、高温（例えば、95℃まで）に耐える。

【0151】

本開示は、いくつかの実施形態において、3Dタンパク質または受容体構造に基づいた、かかる受容体に結合することが可能なペプチドまたはタンパク質を特定するためのペプチドまたはタンパク質の設計アプローチを提供する。いくつかの場合において、受容体は、トランスフェリン受容体である。

【0152】

本開示の更なる態様及び利点は、本開示の例示的な実施形態が示され、記載されている以下の詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。認識されるように、本開示は、他の実施形態及び異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、様々な点で、全て本開示を逸脱することなく、変更することが可能である。したがって、図面及び説明は、本質的に例示的なものとしてみなされるべきであり、限定的なものとしてみなされるべきではない。

【0153】

本明細書で使用される場合、天然のL-エナンチオマーアミノ酸の略号は、従来のものであり、次のとおりである：アラニン（A、Ala）；アルギニン（R、Arg）；アスパラギン（N、Asn）；アスパラギン酸（D、Asp）；システイン（C、Cys）；グルタミン酸（E、Glu）；グルタミン（Q、Gln）；グリシン（G、Gly）；ヒスチジン（H、His）；イソロイシン（I、Ile）；ロイシン（L、Leu）；リシン（K、Lys）；メチオニン（M、Met）；フェニルアラニン（F、Phe）；プロリン（P、Pro）；セリン（S、Ser）；トレオニン（T、Thr）；トリプトファン（W、Trp）；チロシン（Y、Tyr）；バリン（V、Val）。典型的に、Xaaは、任意のアミノ酸を示し得る。いくつかの実施形態において、Xは、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、ヒスチジン（H）、リシン（K）、またはアルギニン（R）であり得る。

【0154】

本開示のいくつかの実施形態は、任意の標準もしくは非標準アミノ酸またはそのアナログのD-アミノ酸残基を企図する。アミノ酸配列が一連の三文字または一文字のアミノ酸略号で表される場合、標準的な用法及び慣例に従って、左方向はアミノ末端方向、右方向はカルボキシ末端方向である。

【0155】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、「タンパク質」、「ヒッピン」、「システイン高密度ペプチド」、「ノットペプチド」または「CDP」という用語は、アミノ酸残基の重合体を指すために本明細書中で区別なく使用され得る。種々の実施形態において、「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、そのアルファ炭素がペプチド結合を介して連結されているアミノ酸の鎖であり得る。したがって、鎖の一端（例えば、アミノ末端）の末端アミノ酸は、遊離アミノ基を有し得、鎖の他端（例えば、カルボキシ末端）の末端アミノ酸は、遊離カルボキシル基であり得る。本明細書で使用される場合、「アミノ末端」（例えば、略してN末端）という用語は、ペプチドのアミノ末端のアミノ酸上の遊

10

20

30

40

50

離 α -アミノ基、またはペプチド内の任意の他の位置にあるアミノ酸の α -アミノ基（例えば、ペプチド結合に関与する場合のイミノ基）を指し得る。同様に、「カルボキシ末端」という用語は、ペプチドのカルボキシ末端上の遊離カルボキシル基、またはペプチド内の任意の他の位置にあるアミノ酸のカルボキシル基を指し得る。ペプチドはまた、限定するものではないが、アミド結合に対し、エーテルまたはチオエーテルによって連結されたアミノ酸などのペプチドミメティックを含む、本質的に任意のポリアミノ酸を含む。

【0156】

本明細書で使用される場合、「ペプチドコンストラクト」という用語は、1つ以上のカーゴ分子にコンジュゲート、連結、または融合することができる1つ以上の本開示のペプチドを含む分子を指し得る。いくつかの場合において、カーゴ分子は、活性薬剤である。

10

「活性薬剤」という用語は、任意の分子、例えば、それぞれのペプチドコンストラクトの位置測定、検出、または可視化を可能にし得る生物学的作用及び／または物理的作用（例えば、放射線の放出）を惹起することが可能な任意の分子を指し得る。種々の実施形態において、「活性薬剤」という用語は、治療剤及び／または診断剤を指す。本開示のペプチドコンストラクトは、本明細書に記載される1つ以上のリンカー部分（例えば、切断可能または安定なリンカー）を介して1つ以上の活性薬剤に連結されたTfR結合ペプチドを含み得る。

【0157】

本明細書で使用される場合、「含む」及び「有する」という用語は、区別なく使用され得る。例えば、「配列番号32のアミノ酸配列を含むペプチド」及び「配列番号32のアミノ酸配列を有するペプチド」という用語は、区別なく使用され得る。

20

【0158】

本明細書で使用される場合、別途の指定がない限り、「TfR」または「トランスフェリン受容体」という用語は、本明細書で使用されるタンパク質の一種であり、任意の種（例えば、ヒトもしくはマウスTfRまたは任意のヒトもしくは非ヒト動物TfR）に由来するトランスフェリン受容体を指し得る。いくつかの場合において、本明細書で使用される場合、「TfR」または「トランスフェリン受容体」という用語は、ヒトTfR（hTfR）を指し、TfRまたはTfR1、TfR2、可溶性TfRを含む既知のTfRホモログもしくはオルソログのいずれか、またはこれらの任意の組み合わせもしくはフラグメント（例えば、エクドメイン）を含み得る。

30

【0159】

「操作された」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドがその天然の遺伝子環境から取り出され、そのため、他の無関係なコード配列または望ましくないコード配列を含まず、遺伝子操作されたタンパク質産生系内での使用に好適な形態であることを示す。そのような操作された分子は、その天然環境から分離されたものであり、cDNA及びゲノムクローン（すなわち、異なる生物に由来するDNAのフラグメントを含有するベクターを含む原核細胞または真核細胞）を含む。本発明の操作されたDNA分子は、通常関連する他の遺伝子を含まないが、エンハンサー、プロモーター及びターミネーターなどの天然または非天然の5'及び3'非翻訳領域は含み得る。

【0160】

40

「操作された」ポリペプチドまたはタンパク質は、血液及び動物組織などから離れて、その本来の環境以外の状態で存在するポリペプチドまたはタンパク質である。好ましい形態において、操作されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。ポリペプチドは、高度に精製された形態、例えば、95%を超える純度、より好ましくは、98%を超える純度、または99%を超える純度で提供することが好ましい。本文脈で使用される場合、「操作された」という用語は、二量体、ヘテロ二量体及び多量体、またはグリコシル化、カボキシル化、修飾、もしくは誘導体化された形態などの代替の物理的形態で同じポリペプチドが存在することを排除しない。

【0161】

「操作された」ペプチドまたはタンパク質は、天然のポリペプチドの構造、配列、また

50

は組成とは明確に異なるポリペプチドである。操作されたペプチドには、非天然ペプチド、人工ペプチド、単離ペプチド、合成ペプチド、設計されたペプチド、修飾されたペプチド、または組換え発現されたペプチドが含まれる。操作されたTfR結合ペプチド、そのバリエーション、またはフラグメントが本明細書で提供される。これらの操作されたTfR結合ペプチドは、活性薬剤または検出可能な剤に更に連結され得る。活性薬剤は、半減期延長部分であり得る。

【0162】

本開示のポリペプチドは、例えば、(1) タンパク質分解に対する感受性を低減すること、(2) 酸化に対する感受性を低減すること、(3) タンパク質複合体を形成するために結合親和性を変更すること、(4) 結合親和性を変更すること、及び(5) 他の物理化学的特性または機能特性を付与または改変することが何らかの方法でなされるように修飾されたポリペプチドを含む。例えば、単一または複数のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）は、天然配列（例えば、分子間接触を形成するドメイン（複数可）以外のポリペプチドの部分）になされる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸のポリペプチドにおける、機能的に類似したアミノ酸による置換を指し得る。次の6つの群には、それぞれ互いに保存的置換ができるアミノ酸が含まれる：i) アラニン（A）、セリン（S）、及びトレオニン（T）；ii) アスパラギン酸（D）及びグルタミン酸（E）；iii) アスパラギン（N）及びグルタミン（Q）；iv) アルギニン（R）及びリシン（K）；v) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、及びバリン（V）；vi) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、及びトリプトファン（W）。

【0163】

本明細書で使用される「ポリペプチドフラグメント」及び「切断型ポリペプチド」という用語は、対応する完全長ペプチドまたはタンパク質と比較して、アミノ末端及び／またはカルボキシ末端の欠失を有するポリペプチドを指し得る。種々の実施形態において、フラグメントは、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900または少なくとも1000アミノ酸長である。種々の実施形態において、フラグメントはまた、例えば、最大1000、最大900、最大800、最大700、最大600、最大500、最大450、最大400、最大350、最大300、最大250、最大200、最大150、最大100、最大50、最大25、最大10、または最大5アミノ酸長であり得る。フラグメントは、その末端のいずれかまたは両方に、1つ以上の追加のアミノ酸、例えば、異なる天然タンパク質に由来するアミノ酸の配列（例えば、Fcまたはロイシンジッパードメイン）または人工アミノ酸配列（例えば、人工リンカー配列）を更に含み得る。

【0164】

種々の実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドの界面残基（例えば、受容体結合についてTfRと相互作用するアミノ酸残基）は、ペプチドのうち、主に2つのヘリカルドメインに分けることができる。いくつかの場合において、界面残基は、配列番号32を基準として、残基5～25に対応する残基（例えば、G5、A7、S8、M11、N14、L17、E18、及びE21の対応する残基を含む）、もしくは配列番号32を基準として、残基35～51に対応する残基（例えば、L38、L41、L42、L45、D46、H47、H49、S50、及びQ51の対応する残基を含む）、または両方を含み得る。例えば、界面残基は、配列番号32を基準として、残基5～25に対応する残基（例えば、G5、A7、S8、M11、N14、L17、E18、及びE21の対応する残基を含む）、または配列番号32を基準として、残基35～51に対応する残基（例えば、L38、L41、L42、L45、D46、H47、H49、S50、及びQ51の対応する残基を含む）を含み得る。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、本明細書で提供されるペプチドのフラグメントを含み得、ここで、フラグメントは、結合のための最小界面残基、例えば、配列番号32を基準として、残基5～25に対応する残

基（例えば、G 5、A 7、S 8、M 1 1、N 1 4、L 1 7、E 1 8、及び E 2 1 の対応する残基を含む）、または配列番号 3 2 を基準として、残基 3 5 ～ 5 1 に対応する残基（例えば、L 3 8、L 4 1、L 4 2、L 4 5、D 4 6、H 4 7、H 4 9、S 5 0、及び Q 5 1 の対応する残基を含む）を含む。いくつかの場合において、T f R 結合ペプチドは、配列番号 3 2 を基準として、ドメインの残基 G 5、A 7、S 8、M 1 1、N 1 4、L 1 7、E 1 8、及び E 2 1 に対応する T f R 結合残基、ならびに第 2 のドメインの残基 L 3 8、L 4 1、L 4 2、L 4 5、D 4 6、H 4 7、H 4 9、S 5 0、及び Q 5 1 に対応する T f R 結合残基を含む、配列番号 3 2 に示される配列を有するペプチドである。

【0165】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」「変異体」または「濃縮された変異体」または「順列濃縮された変異体」と関連する「ペプチド」または「ポリペプチド」という用語は、別のポリペプチド配列を基準として、1 つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列に挿入、欠失及び／または置換されたアミノ酸配列を含み得るペプチドまたはポリペプチドを指し得る。種々の実施形態において、挿入、欠失、または置換されるアミノ酸残基の数は、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 25、少なくとも 50、少なくとも 75、少なくとも 100、少なくとも 125、少なくとも 150、少なくとも 175、少なくとも 200、少なくとも 225、少なくとも 250、少なくとも 275、少なくとも 300、少なくとも 350、少なくとも 400、少なくとも 450 または少なくとも 500 アミノ酸長である。本開示のバリエーションは、ペプチドコンジュゲートまたは融合分子（例えば、ペプチドコンストラクト）を含む。

【0166】

ペプチドまたはポリペプチドの「誘導体」は、化学修飾、例えば、ポリエチレングリコール、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）、リン酸化、及びグリコシル化などの別の化学部分への、例えば、コンジュゲーションがなされていてもよいペプチドまたはポリペプチドであり得る。

【0167】

「% の配列同一性」という用語は、「% の同一性」と本明細書中で区別なく使用され得、配列アライメントプログラムを使用して整列させた場合における、2 つ以上のペプチド配列間のアミノ酸配列の同一性のレベル、または 2 つ以上のヌクレオチド配列間のヌクレオチド配列の同一性のレベルを指し得る。例えば、本明細書で使用される場合、80 % の同一性は、定義されたアルゴリズムによって決定された 80 % の配列同一性と同じことを意味し、所与の配列が別の長さの別の配列に対して少なくとも 80 % 同一であることを意味する。種々の実施形態において、% の同一性は、例えば、所与の配列に対して、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 99 % 以上の配列同一性から選択される。種々の実施形態において、% の同一性は、例えば、約 60 % ～ 約 70 %、約 70 % ～ 約 80 %、約 80 % ～ 約 85 %、約 85 % ～ 約 90 %、約 90 % ～ 約 95 %、または約 95 % ～ 約 99 % の範囲内である。

【0168】

「% の配列相同性」または「パーセントの配列相同性」または「パーセントの配列同一性」という用語は、「% の相同性」、「% の配列同一性」または「% の同一性」という用語と本明細書中で区別なく使用され得、配列アライメントプログラムを使用して整列させた場合における、2 つ以上のペプチド配列間のアミノ酸配列の相同性のレベル、または 2 つ以上のヌクレオチド配列間のヌクレオチド配列の相同性のレベルを指し得る。例えば、本明細書で使用される場合、80 % の相同性は、定義されたアルゴリズムによって決定された 80 % の配列相同性と同じことを意味し、したがって、所与の配列の相同性は、所与の配列の長さによって 80 % を超える配列相同性を有する。種々の実施形態において、% の相同性は、例えば、所与の配列に対して、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも

90%、少なくとも95%、または少なくとも99%以上の配列相同性から選択される。種々の実施形態において、%の相同性は、例えば、約60%～約70%、約70%～約80%、約80%～約85%、約85%～約90%、約90%～約95%、または約95%～約99%の範囲内である。

【0169】

タンパク質またはポリペプチドは、サンプルの少なくとも約60%～75%が単一種のポリペプチドを示す場合、「実質的に純粋」、「実質的に均質」、または「実質的に精製」であり得る。ポリペプチドまたはタンパク質は、単量体または多量体であり得る。実質的に純粋なポリペプチドまたはタンパク質は、典型的に、約50%、60%、70%、80%または90%W/Wのタンパク質サンプル、より一般的には約95%のタンパク質サンプルを含み得、例えば、99%を超える純度である。タンパク質の純度または均質性は、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、当該技術分野においてよく知られている染色によりゲルを染色して単一ポリペプチドバンドを可視化することなど、当該技術分野においてよく知られている多数の手段によって示すことができる。ある特定の目的のために、高速液体クロマトグラフィー（例えば、HPLC）または他の高分解能分析技術（例えば、LC質量分析）を使用することによって、高分解能が得られる。

【0170】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、一般に、動物（例えば、ヒトまたはマウス）などの対象における薬学的使用に好適な組成物を指し得る。医薬組成物は、薬理学上有効な量の活性薬剤及び薬学的に許容される担体を含み得る。「薬理学上有効な量」という用語は、意図された生物学的または薬理学的な結果をもたらすのに有効な薬剤の量を指し得る。

【0171】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、標準的な薬学的担体、ビヒクル、緩衝液、及び賦形剤、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、5%デキストロース水溶液、及び油／水または水／油乳剤などの乳剤、及び様々な種類の湿潤剤及び／またはアジュバントのいずれかを指し得る。好適な薬学的担体及び製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co, Eastonに記載されている。「薬学的に許容される塩」は、薬学的使用のための化合物に製剤化することができる塩であり得、例えば、金属塩（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど）及びアンモニアまたは有機アミンの塩を含む。

【0172】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」及び「治療」という用語は、生物学的障害及び／またはそれに付随する症状の少なくとも1つを緩和または軽減する方法を指し得る。本明細書で使用される場合、疾患、障害または状態を「緩和すること」は、例えば、疾患、障害、または状態の重症度及び／または症状の発生頻度を減らすことを意味する。更に、本明細書における「治療」への言及は、治療的、緩和的、及び予防的または診断的治療への言及を含み得る。

【0173】

一般に、本開示の細胞は、真核細胞または原核細胞であり得る。細胞は、上皮細胞であり得る。細胞は、動物細胞または植物細胞であり得る。動物細胞は、海洋無脊椎動物、魚類、昆虫、両生類、爬虫類、または哺乳動物に由来する細胞を含み得る。哺乳動物細胞は、霊長類、猿人類、ウマ科動物、ウシ亜科の動物、ブタ、イヌ科動物、ネコ科動物、またはげっ歯類から得ることができる。哺乳動物は、霊長類、猿人類、イヌ、ネコ、ウサギ、フェレットなどであり得る。げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、ハムスター、チンチラ、またはモルモットであり得る。鳥類細胞は、カナリア、インコまたはオウムに由来し得る。爬虫類細胞は、カメ、トカゲまたはヘビに由来し得る。魚類細胞は、熱帯魚に由来し得る。例えば、魚類細胞は、ゼブラフィッシュ（例えば、D a n i

no r e r i o) に由来し得る。蠕虫細胞は、線虫（例えば、C. e l e g a n s）に由来し得る。両生類細胞は、カエルに由来し得る。節足動物細胞は、タランチュラまたはヤドカリに由来し得る。

【0174】

哺乳動物細胞は、霊長類（例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類）から得られる細胞も含み得る。哺乳動物細胞は、血液細胞、幹細胞、上皮細胞、結合組織細胞、ホルモン分泌細胞、神経細胞、骨格筋細胞、または免疫系細胞を含み得る。好ましい実施形態において、本開示の方法及び組成物は、1つ以上の哺乳動物の血液細胞と組み合わせて使用される。

【0175】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、一般に、宿主細胞で複製が可能なDNA分子、及び／または別のDNAセグメントが作動可能に連結され得、それにより、その結合されたセグメントの複製が生じるDNA分子を指す。プラスミドは、例示的なベクターである。

【0176】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、一般に、ヒトまたは別の動物を指す。対象は、任意の年齢であり得、例えば、対象は、乳児、幼児、小児、思春期前の子ども、青年、成人、または高齢者の個体であり得る。

【0177】

範囲は、本明細書において、1つの特定の「おおよそ（約）」の値から、及び／または別の特定の「おおよそ（約）」の値までを表すことができる。そのような範囲が表される場合、別の実施形態は、1つの特定の値から、及び／または他の特定の値までを含む。同様に、値が「約」という先行詞の使用により近似値で表される場合、特定の値が別の実施形態を形成することが理解される。範囲のそれぞれの端点は、他の端点に対応するものであり、他の端点とは独立していることが更に理解される。本明細書で使用される「約」という用語は、特定の使用の範囲内で、指定された数値からプラスマイナス15%の範囲を指す。例えば、約10は、8.5～11.5の範囲を含み得る。

【0178】

ペプチド

本明細書で開示されるのは、T f RまたはT f R 1、T f R 2、可溶性T f Rを含む既知のT f Rホモログのいずれか、またはこれらの任意の組み合わせもしくはフラグメント（例えば、エクドメイン）に結合することが可能である、表1に列挙されるものなどのペプチド配列である。トランスフェリン受容体またはT f Rホモログに結合することが可能なペプチドは、本明細書において、トランスフェリン受容体結合ペプチドまたはT f R結合ペプチドと呼ばれ得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、T f Rを媒介した様式で標的細胞に透過、通過、または侵入することができる。これらの細胞層または細胞は、T f R発現内皮細胞、T f R発現上皮細胞、ならびに腫瘍細胞、脳細胞、がん性もしくは腫瘍細胞、肝細胞、膵細胞、結腸細胞、卵巣細胞、乳房細胞、及び／または肺細胞、またはこれらの任意の組み合わせなどの様々な組織または器官のT f R発現細胞を含み得る。

【0179】

種々の実施形態において、本開示は、細胞層（例えば、内皮細胞または上皮細胞）または細胞膜を越えるT f R媒介性輸送を可能にする方法及び組成物を提供する。B B Bに加えて、様々な他の細胞、組織、及び器官がT f Rを発現する。T f Rを発現する単一細胞は、肝細胞、赤血球及び骨髄中の赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、ならびに急速に分裂する細胞を含み得る。T f Rを発現する組織及び器官は、脳（例えば、大脳皮質、海馬、尾状、小脳）、内分泌腺組織（例えば、甲状腺、副甲状腺、及び副腎）、骨髄及び免疫系（例えば、虫垂、リンパ節、扁桃腺、脾臓）、筋肉組織（例えば、心臓、骨格、及び平滑筋）、肝臓、胆嚢、膵臓、消化管（例えば、口腔粘膜、食道、胃、十二指腸、小腸、結腸、直腸）、腎臓、膀胱、婦人科組織（例えば、卵管、乳房、膣、子宮頸、子宮内膜、卵巣、及び胎盤）、脂肪及び軟組織、ならびに皮膚を含み得る。したがって、本開示のT f

10

20

30

40

50

R結合ペプチドは、これらの細胞、組織、及び器官を標的とし、これらの細胞、組織、及び器官に、例えば、TfR媒介性トランスサイトーシスを介して（例えば、BBBなどの細胞障壁を越えて）またはTfR媒介性エンドサイトーシスを介して（例えば、細胞膜を越えて細胞内に）または組織におけるTfR媒介性蓄積を介して、活性薬剤を送達し、これらの細胞、組織、または器官のうちの1つ以上における疾患または状態を治療及び／または予防するために、使用することができる。

【0180】

種々の実施形態において、本開示は、TfRを発現するがん細胞へのTfR媒介性輸送及び送達を可能にする方法及び組成物を提供する。TfRを発現するがんは、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌を含み得る。

【0181】

がんを予防及び／または治療するために使用することができるTfR結合ペプチドコンストラクトは、TfR結合ペプチドと、融合されたIL15／IL15Ra複合体、IFNガンマ、及び抗CD3薬剤などの抗腫瘍活性を有する活性薬剤とを含むものである。そのようなペプチドコンストラクト（例えば、融合ペプチド）の例は、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332または配列番号359～配列番号361のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を有するものである。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドコンストラクトは、免疫T細胞またはNK細胞を動員及び刺激するために、IL-15に融合される。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドコンストラクトは、マクロファージを活性化し、腫瘍細胞におけるMHCを上方制御するために、INFgに融合される。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドコンストラクトは、がん細胞上のTfRへの結合に加えて、T細胞に結合して免疫シナプスを形成し、T細胞を活性化してがんを標的とするために、CD3に融合される。

【0182】

一般に、本開示のTfR結合ペプチドは、様々な種類の活性薬剤と組み合わせて使用することができる。本開示のTfR結合ペプチドは、それらの活性薬剤のうちの1つ以上にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。様々な態様において、活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤、PDL-1標的薬剤、IL15薬剤、融合されたIL-15／IL-15Ra複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキシソルピシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE阻害薬、Bcl-xL阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、またはニューロテンシンなどの神経伝達物質である。

【0183】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、例えば、TfR媒介性小胞性トランスサイトーシス及びTfR媒介性エンドサイトーシスをそれぞれ介して、細胞層もしくは障壁（例えば、BBB）または細胞膜を通過することができる。TfRに結合し、トランスサイトーシス及び／またはエンドサイトーシスを促進することに加えて、本開示のペプチドはまた、がん細胞などの細胞上の追加の標的タンパク質に結合することができる。いくつかの場合において、ペプチドは、追加の標的タンパク質（例えば、受容体または酵素）に対して親和性を有する小分子またはペプチドなどの標的化部分または活性薬剤（例えば、治療用または診断用薬剤）にコンジュゲート、連結、または融合され

10

20

30

40

50

た T f R 結合ペプチドを含む、ペプチドまたはペプチドコンストラクトである。いくつかの場合において、T f R 結合ペプチドは、カーゴ分子に連結され、B B B を越えたカーゴ分子の T f R 媒介性トランスサイトosis または細胞内への T f R 媒介性エンドサイトosis を可能にするか、または促進する。いくつかの例では、トランスサイトosis の後、T f R 結合ペプチド及びカーゴ部分を含むペプチドコンストラクトは、C N S 内の特定の細胞または組織を標的とし、当該細胞または組織に到達すると、生物学的作用（例えば、標的タンパク質への結合）を発揮することができる。いくつかの場合において、本開示のペプチドコンストラクトは、T f R 結合ペプチド、カーゴ分子もしくは活性薬剤、またはこれらの組み合わせによって媒介される生物学的作用を発揮する。いくつかの場合において、1 つ以上の活性薬剤（例えば、治療薬）を含む本開示の T f R 結合ペプチドコンストラクトは、1 つ以上の活性薬剤を、T f R を発現する細胞内に輸送及び／または送達することができる。いくつかの場合において、T f R 結合ペプチドは、C N S の組織に蓄積する。いくつかの場合において、C N S 特異的蓄積により、オフターゲット効果が減少する。いくつかの場合において、T f R 結合ペプチドは、C N S 以外の組織（例えば、肝臓、腎臓、脾臓、または皮膚）に蓄積する。いくつかの場合において、T f R を発現する細胞は、腫瘍細胞であり、T f R 結合ペプチドコンストラクトは、これらの腫瘍細胞に抗腫瘍薬剤を送達する。いくつかの場合において、抗腫瘍薬剤は、単独では、腫瘍細胞に対する治療効果が全くないか、非常に限られているが、抗腫瘍薬剤を本開示の T f R 結合ペプチドと、例えば、ペプチドコンストラクトとして組み合わせる場合、これらの抗腫瘍薬剤の治療効果が大幅に改善される。

10

20

【0184】

いくつかの実施形態において、本開示の T f R 結合ペプチドは、生物学的に関連する応答を誘導することができる。いくつかの実施形態において、生物学的に関連する応答は、静脈内投与後に誘導され得、いくつかの実施形態において、静脈内単回投与後であり得る。いくつかの実施形態において、T f R 結合ペプチドは、疼痛、神経障害性疼痛または神経変性障害、感染症、免疫障害（例えば、自己免疫疾患）などの他の神経障害を治療及び／または予防するために使用される様々な他のクラスの治療用化合物と組み合わせて使用することができる。本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲート、融合ペプチド、または組換え産生されたペプチドコンストラクト）が T f R に結合し、その後、細胞層もしくは B B B などの細胞障壁を越えて（例えば、T f R 媒介性小胞性トランスサイトosis を介して）または細胞膜を越えて（例えば、T f R 媒介性エンドサイトosis を介して）輸送されることは、対象（例えば、ヒト）における慢性疼痛（例えば、頭痛または片頭痛）、神経障害性疼痛、肥満症、インスリン抵抗性、オピオイド中毒、または他の神経障害もしくは精神障害に関連する多数の疾患、状態、または障害に影響を与え得る。

30

【0185】

本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲート、融合ペプチド、または組換え産生されたペプチドコンストラクト）が T f R に結合し、その後、細胞層もしくは B B B などの細胞障壁を越えて（例えば、小胞性トランスサイトosis を介して）または細胞膜を越えて（例えば、エンドサイトosis を介して）輸送されることは、神経変性に関連する多数の疾患、状態、または障害に影響を与え得る。本明細書に記載される T f R 結合ペプチドで治療、予防、または診断することができる神経変性疾患としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱 X 随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症を挙げることができる。

40

【0186】

本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジ

50

ュゲート、融合ペプチド、または組換え産生されたペプチドコンストラクト）がTfRに結合し、その後、細胞層もしくはBBBなどの細胞障壁を越えて（例えば、小胞性トランスサイトosisを介して）または細胞膜を越えて（例えば、エンドサイトosisを介して）輸送されることは、多数の自己免疫疾患に影響を与え、脳の自己免疫障害または炎症性障害に治療的に対応することができる。いくつかの場合において、自己免疫疾患は、TfR結合ペプチドをKv1.3カリウムチャネル阻害薬などのイオンチャネル調節剤であり得る活性薬剤にコンジュゲート、連結、または融合することによって、治療及び／または予防することができる。Kv1.3カリウムチャネル阻害薬などのイオンチャネル調節剤を使用して治療及び／または予防することができる追加の疾患としては、乾癬及びエフェクターT細胞への影響に起因する脳以外の他の自己免疫疾患、ならびに神経炎症性疾患及び神経変性疾患、例えば、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、外傷性脳損傷、または放射線療法による毒性を挙げることができる。いくつかの場合において、Kv1.3カリウムチャネル阻害薬は、小分子（例えば、トシル酸ドマチノスタット）、またはペプチド（例えば、Vm24またはShK-170、ShK-186、もしくはShK-192などのShKペプチド、またはこれらの任意のフラグメントもしくは誘導体）またはこれらの任意の組み合わせであり得る。（例えば、Bartok et al. An engineered scorpion toxin analogue with improved Kv1.3 selectivity displays reduced conformational flexibility, Sci Rep. 2015; 5: 18397 参照）。

10

20

【0187】

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、限定するものではないが、てんかん、統合失調症、鬱病、不安、双極性障害、脳発達障害（例えば、自閉スペクトラム）、または気分障害を含む様々な神経疾患の治療及び予防に使用することができる。

【0188】

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、クローン病またはより一般的には炎症性腸疾患の治療及び予防に使用することができる。いくつかの場合において、本開示のTfR結合ペプチドは、多量のTfRを発現し得る腸の腺細胞において、高い取り込み及び保持を示す。

30

【0189】

種々の実施形態において、これらの薬物の治療効果は、本開示のTfR結合ペプチドと組み合わせて使用される場合、本明細書に記載されるTfR結合ペプチドへのコンジュゲーションがない投与と比較して、大幅に改善し得る。種々の実施形態において、有効性は、目的の組織または細胞における薬物の送達及び達成レベルの高さにより、改善し得る。種々の実施形態において、有効性は、目的の組織または細胞における薬物の相対レベルを増加させ、他の組織またはコンパートメントにおける薬物のレベルを減少させることによって改善され得、それにより、治療濃度域が改善するか、または毒性副作用が低下する。

【0190】

他の実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、TfRへの結合について、内因性分子と競合する。本明細書に記載される場合、TfRなどの標的タンパク質への結合に対する「競合」またはペプチド競合は、立体障害、標的タンパク質の結合部位の占有、塩橋もしくは疎水性相互作用などの非共有結合性相互作用、架橋、共有結合性相互作用、隔離、アロステリック調節、またはこれらの任意の組み合わせを包含するが、これらに限定されない。

40

【0191】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、TfR1、TfR2、可溶性TfRを含む既知のTfRホモログのいずれか、またはこれらの任意の組み合わせもしくはフラグメント（例えば、エクドメイン）に結合することができる。したがって、本明細書で使用される場合、「TfR」は、TfR1、TfR2、及び可溶性TfRを含む、任意

50

の既知のホモログ、誘導体、フラグメント、またはTfRファミリーのメンバーを指し得る。他の実施形態において、ペプチドは、1つ、1つ以上、または全てのTfRホモログに結合することが可能である。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、TfRに結合し、小胞性トランスサイトosisなどの特定の生物学的作用を促進することができる。いくつかの実施形態において、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号356～配列番号361に示されるアミノ酸配列、ならびにその任意の誘導体またはバリエーションを含むペプチド及びペプチドコンストラクトを含む、本開示のペプチドは、内因性TfR結合物質（例えば、トランスフェリンまたはアポトランスフェリンもしくはホトランスフェリンなどの任意の誘導体）のTfRへの結合を阻止または減少させる。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号356～配列番号361に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも70%の相同性、少なくとも75%の相同性、少なくとも80%の相同性、少なくとも85%の相同性、少なくとも90%の相同性、少なくとも95%の相同性、少なくとも96%の相同性、少なくとも97%の相同性、少なくとも98%の相同性、または少なくとも99%の相同性または少なくとも100%の相同性を有する誘導体及びバリエーションを含む。

【0192】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、内因性分子（例えば、トランスフェリン、ホトランスフェリン（鉄が結合したトランスフェリン）、アポトランスフェリン（鉄が結合していないトランスフェリン）、または任意の他の内因性TfRリガンド）または他の外因性分子と比較して、同等、類似、またはより高い親和性（例えば、より低い解離定数 K_D ）でTfRに結合する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、50 μ M未満、5 μ M未満、500 nM未満、100 nM未満、40 nM未満、30 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、1 nM未満、または0.1 nM未満の K_D を有し得る。いくつかの実施形態において、TfRによるペプチド輸送は、内因性分子と比較して、より低い親和性（例えば、より高い解離定数 K_D ）を有することによって、改善される。いくつかの実施形態において、TfRによるペプチド輸送は、内因性分子よりも速いオフレートまたはより高い k_{off} を有することによって、改善される。いくつかの実施形態において、オフレートまたは k_{off} は、トランスフェリンと同様である。いくつかの実施形態において、ペプチド輸送は、より速いオンレートまたはより高い k_{on} 、任意選択によりトランスフェリンよりも高い k_{on} を有することによって、改善される。他の実施形態において、トランスフェリン（Tf）-TfR結合界面にある1つ以上の保存残基は、本明細書に記載されるペプチドのアミノ酸配列にも存在する。

【0193】

いくつかの実施形態において、TfR受容体結合の改善を示すペプチドは、トランスサイトosis機能の改善を示す。いくつかの実施形態において、TfR受容体結合の改善を示すペプチドは、トランスサイトosis機能に変化が全くないか、または小さな変化を示す。いくつかの実施形態において、TfR受容体結合の改善を示すペプチドは、トランスサイトosis機能の低下を示す。いくつかの実施形態において、ペプチドは、ヒトTfR（配列番号363）の残基506～510、523～531、及び611～662に対応するアミノ酸ドメインの1つ以上、または全てを含む、ヒトTfRとマウスTfRとの間で高い相同性を示す部位に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドまたはそのバリエーションが結合するTfRの領域は、かかるTfRドメインの全てまたは一部である。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、ヒトTfR（配列番号363）の残基506～510、523～531、及び611～662に対応するアミノ酸ドメインを含む、高い相同性を示すTfR領域のいずれか1つ、いずれか2つ、または3つ全てに結合する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、少なくともヒトTfRの残基611～662に対応するドメインに結合する。

【0194】

いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドの K_A 値及び K_D 値を調節及び最適化して（例えば、アミノ酸置換を介して）、TfR結合親和性と効率的なトランスサイトシス機能の最適な比率をもたらすことができる。

【0195】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドまたはそのバリエーションは、TfRと他の外因性または内因性リガンド（例えば、トランスフェリン（Tf）、Tf誘導体、またはTf様ペプチドもしくはタンパク質）との結合界面（例えば、結合ドメインまたは結合ポケット）に見出される残基でTfRに結合する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfRに結合するペプチドまたはそのバリエーションは、結合ポケットを構成するTfRの残基に結合する配列に対して、少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性または少なくとも100%の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfRに結合するペプチドまたはそのバリエーションは、TfRに結合することが知られている内因性もしくは外因性ポリペプチド、例えば、内因性トランスフェリン、または表1に列挙されるペプチドのいずれか1つに対して、少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性または少なくとも100%の同一性を有する。他の実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、TfR、そのフラグメント、ホモログ、またはバリエーションに対して、少なくとも70%の同一性、少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性または少なくとも100%の同一性を有する目的のタンパク質に結合する。

【0196】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドまたはそのバリエーションは、残基506～510、523～531、及び611～662に対応するアミノ酸残基を含むTfRの領域に結合する（これらのアミノ酸残基のナンバリングは、内因性ヒトTfRCの次のUniProt参照タンパク質配列UniProtKB-P02786（配列番号363、TFR1_HUMAN）に基づく）。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドまたはそのバリエーションが結合するTfRの領域は、Tf、そのフラグメント、ホモログ、またはバリエーションのものと重複する。

【0197】

他の実施形態において、核酸、ベクター、プラスミド、またはドナーDNAは、本開示に記載されるペプチド、ペプチドコンストラクト、またはそのバリエーションもしくは機能性フラグメントをコードする配列を含む。更なる実施形態において、TfR結合モチーフ（例えば、保存結合モチーフ）のある特定の部分またはフラグメントは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つの配列を含むペプチドまたはペプチドコンストラクト上にグラフトされ得る。

【0198】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、TfRとTfとの間、またはTfRと任意の他のタンパク質との間の結合を阻害する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、TfRのタンパク質-タンパク質相互作用を阻止し、及び／または細胞の核へのTfR局在化を阻止する。いくつかの場合において、ペプチドは、TfRを非活性化する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、TfRの分解を引き起こすか、またはTfRの細胞の核への局在化を阻止するか、TfRとTfもしくはTf様タンパク質との相互作用を阻

10

20

30

40

50

止することができる。

【0199】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、T f R中のある特定のアミノ酸残基またはアミノ酸残基のモチーフに結合することによって、内因性T fまたは任意の他の内因性もしくは外因性T f R結合物質と比較して、T f Rに競合的に結合する。更に、ペプチドは、ある特定のアミノ酸残基またはアミノ酸残基のモチーフに結合する能力に基づいて、更なる試験または使用のために選択され得る。T f R中のある特定のアミノ酸残基またはアミノ酸残基のモチーフは、T f RのT fへの結合に関与するアミノ酸残基またはアミノ酸残基の配列で特定することができる。ある特定のアミノ酸残基またはアミノ酸残基のモチーフは、T f R：T f複合体の結晶構造から特定することができる。いくつかの実施形態において、ペプチド（例えば、C D P）は、熱、プロテアーゼ（ペプシン）、及び還元に対する耐性を示す。

【0200】

配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号356～配列番号361に示されるアミノ酸配列のうちの1つ以上を含むペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲートまたは融合ペプチド）は、目的のタンパク質に結合することができる。いくつかの実施形態において、目的のタンパク質は、T f Rである。いくつかの実施形態において、T f Rに結合するペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲートまたは融合ペプチド）は、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号356～配列番号361に示されるアミノ酸配列のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、本開示のT f Rに結合するペプチド、ペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲート及び融合分子）は、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、及び配列番号356～配列番号361に示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも70%の相同性、少なくとも75%の相同性、少なくとも80%の相同性、少なくとも85%の相同性、少なくとも90%の相同性、少なくとも95%の相同性、少なくとも96%の相同性、少なくとも97%の相同性、少なくとも98%の相同性、または少なくとも99%の相同性または少なくとも100%の相同性を有するペプチド誘導体またはバリエーションを含む。

【0201】

いくつかの実施形態において、ペプチドまたはペプチドのライブラリーは、ノットペプチドの天然足場から導き出すのではなく、in silicoで設計される。他の実施形態において、ペプチドまたはペプチドのライブラリーは、目的のタンパク質または受容体に結合することが知られている天然ペプチドまたはタンパク質に、関連するタンパク質結合残基、またはタンパク質結合界面の保存残基をグラフト化する誘導によってin silicoで設計される。いくつかの実施形態において、ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、または配列番号171～配列番号202）は、単純なヘリックスターンヘリックスである。いくつかの実施形態において、ヘリックスターンヘリックスは、他の足場上にファーマコフォアを移すために使用することができ、例えば、融合タグを使用して、ヘリックスターンヘリックス足場上に所望のT f R係合表面を移植することができる。

【0202】

いくつかの実施形態において、配列番号1を含むペプチドは、付加、欠失、またはアミノ酸置換を含む更なる修飾のための足場またはベース配列として使用される。いくつかの実施形態において、G Sなどのアミノ酸残基の短い配列がペプチドのN末端に付加される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、N末端にG Sを欠く。いくつかの例では、ペプチドは、1つ以上の翻訳後修飾を受ける。

【0203】

表1は、本開示の方法及び組成物による例示的なペプチド配列を列挙する。

【表 1 - 1】

表 1 - 例示的なペプチド配列

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 1	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVSSMSNT EETCVQE LFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVMSMSNT EEDCEQE LEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 3	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVV SMSNT EEDCEQE LEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVMSMSNT EETCEQE LEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 5	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVMSMSNT EEDCVQE LEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 6	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVMSMSNT EEDCEQE LFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 7	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVMSMSNT EEDCEQE LEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 8	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVMSMSNT EEDCEQE LEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 9	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVV SMSNT EETCEQE LEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 10	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVV SMSNT EEDCVQE LEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 11	GSREGCASRCTKYNAE LEKCEARVV SMSNT EEDCEQE LFDLLHCLDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 1 2	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVVSMSNT EEDCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 3	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVVSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 4	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EETCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 5	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EETCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 6	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EETCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 7	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EETCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 8	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCVQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 9	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCVQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 2 0	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCVQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 2 1	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQEELFDLLHCVDHCHSQ
配列番号 2 2	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQEELFDLLHCLDHCVSQ
配列番号 2 3	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 4	GSREGCASRCMKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 5	GSREGCASRCTKYNDELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 6	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 7	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 8	GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 9	GSREGCASRCMKYNDELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 3 0	GSREGCASRCMKYNAELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 3 1	GSREGCASRCTKYNDELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 3 2	GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 3 6	REGCASRCTKYNAELEKCEARVSSMSNTEE TCVQEELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 3 7	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 3 8	REGCASRCTKYNAELEKCEARVVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 3 9	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4 0	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4 1	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4 2	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 4 3	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 4 4	REGCASRCTKYNAELEKCEARVVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4 5	REGCASRCTKYNAELEKCEARVVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4 6	REGCASRCTKYNAELEKCEARVVMSMSNTEE DCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 4 7	REGCASRCTKYNAELEKCEARVVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 4 8	REGCASRCTKYNAELEKCEARVVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 4 9	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE TCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 5 0	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE TCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 5 1	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 5 2	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 5 3	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCVQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 5 4	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCVDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 5 5	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 5 6	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 5 7	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 5 8	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCVSQ
配列番号 5 9	REGCASRCMKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 6 0	REGCASRCTKYNDELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 6 1	REGCASRCTKYNAELEKCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 6 2	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 6 3	REGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 6 4	REGCASRCMKYNDELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 6 5	REGCASRCMKYNAELEKCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 6 6	REGCASRCTKYNDELEKCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 6 7	REGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 1 3 6	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNT EETCVQELEDLLHCVDHCVSQ
配列番号 1 3 7	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 3 8	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 3 9	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EETCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 4 0	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 4 1	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 4 2	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCVDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 1 4 3	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 4 4	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNT EETCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 4 5	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNT EEDCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 4 6	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNT EEDCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 4 7	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 4 8	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 4 9	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EETCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 5 0	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EETCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 5 1	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EETCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 5 2	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EETCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 5 3	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCVQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 5 4	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCVQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 5 5	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCVQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 5 6	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQEELFDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 5 7	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQEELFDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 5 8	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCVDHCVSQ
配列番号 1 5 9	GSREGCASRCMRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 6 0	GSREGCASRCTRYNDELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 6 1	GSREGCASRCTRYNAELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 6 2	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 1 6 3	GSREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 6 4	GSREGCASRCMRYNDELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 1 6 5	GSREGCASRCMRYNAELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 1 6 6	GSREGCASRCTRYNDELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 1 6 7	GSREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 1 7 1	REGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNTEE TCVQEELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 1 7 2	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 7 3	REGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 7 4	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 7 5	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 7 6	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 7 7	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 7 8	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 7 9	REGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 8 0	REGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 8 1	REGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNTEE DCEQEELFDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 8 2	REGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCHSQ
配列番号 1 8 3	REGCASRCTRYNAELERCEARVVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCVSQ
配列番号 1 8 4	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE TCVQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 1 8 5	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE TCEQEELFDLLHCLDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

配列番号	アミノ酸配列	
配列番号 1 8 6	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCVDHCHSQ	
配列番号 1 8 7	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE TCEQELEDLLHCLDHCVSQ	
配列番号 1 8 8	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCCHSQ	
配列番号 1 8 9	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCVDHCHSQ	10
配列番号 1 9 0	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCVQELEDLLHCLDHCVSQ	
配列番号 1 9 1	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCHSQ	
配列番号 1 9 2	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCVSQ	
配列番号 1 9 3	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCVDHCVSQ	20
配列番号 1 9 4	REGCASRCMRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCCHSQ	
配列番号 1 9 5	REGCASRCTRYNDELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCCHSQ	
配列番号 1 9 6	REGCASRCTRYNAELERCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCCHSQ	
配列番号 1 9 7	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ	
配列番号 1 9 8	REGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCCHSQ	30
配列番号 1 9 9	REGCASRCMRYNDELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ	
配列番号 2 0 0	REGCASRCMRYNAELERCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ	
配列番号 2 0 1	REGCASRCTRYNDELERCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ	
配列番号 2 0 2	REGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQ	40

【0204】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREGCAX₁RCX₂KYX₄DEX₂X₃KCX₃ARMMSMSNTEEDCEQEX₂EDX₂X₂YCX₂X₃X₅CX₅X₁X₄（配列番号206）またはREGCAX₁RCX₂KYX₄DEX₂X₃KCX₃ARMMSMSNTEEDCEQEX₂EDX₂X₂YCX₂X₃X₅CX₅X₁X₄（配列番号334）を含み、配列中、X₁は、S、T、D、またはNから独立して選択することができ、X₂は、A、M、I、L、またはVから独立して選択することができ、X₃は、D、E、N、Q、S、またはTから独立して選択することができ、X₄は、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから独立して選択す

ることができ、 X_5 は、H、K、R、N、Q、S、またはTから独立して選択することができる。

【0205】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREX₁CX₂X₃RCX₄KYX₅DEX₆X₇KCX₈ARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ（配列番号207）またはREX₁CX₂X₃RCX₄KYX₅DEX₆X₇KCX₈ARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ（配列番号335）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 及び X_8 は、TfR結合界面残基であり、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQEX₁EDX₂X₃YCX₄X₅X₆CX₇X₈X₉（配列番号208）またはREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQEX₁EDX₂X₃YCX₄X₅X₆CX₇X₈X₉（配列番号336）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、及び X_9 は、TfR結合界面残基であり、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREX₁CX₂X₃RCX₄KYX₅DEX₆X₇KCX₈ARMMSMSNTEEDCEQEX₉EDX₁₀X₁₁YCX₁₂X₁₃X₁₃CX₁₅X₁₆X₁₇（配列番号209）またはREX₁CX₂X₃RCX₄KYX₅DEX₆X₇KCX₈ARMMSMSNTEEDCEQEX₉EDX₁₀X₁₁YCX₁₂X₁₃X₁₃CX₁₅X₁₆X₁₇（配列番号337）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 及び X_{17} は、TfR結合界面残基であり、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ（配列番号32）を含む。

【0206】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、X₁X₂X₃X₄GX₅ASX₆X₇MX₈X₉NX₁₀X₁₁LEX₁₂X₁₃EX₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂X₄₃（配列番号210）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} 、 X_{38} 、 X_{39} 、 X_{40} 、 X_{41} 、 X_{42} 、及び X_{43} は、独立して任意のアミノ酸であり得る。

【0207】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇LX₃₈X₃₉LLX₄₀X₄₁LDHX₄₂HSQ（配列番号211）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} 、 X_{38} 、 X_{39} 、 X_{40} 、 X_{41} 、及び X_{42} は、独立して任意のアミノ酸であり得る。

【0208】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、X₁X₂X₃X₄GX₅ASX₆X₇MX₈X₉NX₁₀X₁₁LEX₁₂X₁₃EX₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉LX₃₀X₃₁LLX₃₂X₃₃LDHX₃₄HSQ（配列番号212）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} 、 X_{38} 、 X_{39} 、 X_{40} 、 X_{41} 、及び X_{42} は、独立して任意のアミノ酸であり得る。

3、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、及びX₃₄は、独立して任意のアミノ酸であり得る。

【0209】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つ、またはその任意のバリエーション、ホモログ、もしくは機能性フラグメントに対して、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%の配列相同性を有する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つ、またはその任意のバリエーション、ホモログ、もしくは機能性フラグメントを含む。いくつかの実施形態において、TfRに結合するペプチドは、配列番号32に示されるアミノ酸配列を含む。

【0210】

いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、配列番号32を基準として、5、7、8、14、17、18、21、38、42、45、46、47、50、51に対応する位置のいずれか1つまたはこれらの組み合わせに、表面界面残基としてカノニカルアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、Q51に対応する位置のいずれか1つまたはこれらの組み合わせに、表面界面残基としてカノニカルアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のこれらの対応する残基の少なくとも1つ以上を含む。したがって、そのようなペプチドは、TfRへの結合が増大するように操作することができる。

いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、X₁X₂X₃X₄GX₅ASX₆X₇X₈X₉X₁₀NX₁₁X₁₂LX₁₃X₁₄EX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀LX₃₁X₃₂X₃₃LX₃₄X₃₅LX₃₆X₃₇SDHX₃₈X₃₉X₄₀（配列番号213）を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、及びX₃₇は、独立して任意のアミノ酸であり得る。

【0211】

いくつかの実施形態において、ペプチドのアミノ酸配列に存在する表面遠位親水性アミノ酸残基（例えば、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはT）は、ペプチドの可溶性に寄与する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、配列番号32を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、40に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに親水性アミノ酸残基を含む。いくつかの例では、本開示のペプチドは、配列番号32を基準として、次の対応する位置の親水性アミノ酸残基：R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、D40、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準と

して、対応する位置 R 3、E 4、R 9、K 12、D 15、E 16、K 19、R 23、S 26、S 28、N 29、T 30、E 31、E 32、D 33、E 35、Q 36、E 37、E 39、D 40 のいずれか 1 つまたは任意の組み合わせは、可溶性または T f R 結合に大きな影響を与えることがなければ、別の親水性残基に変更することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドは、X₁X₂REX₃X₄X₅X₆RX₇X₈KX₉X₁₀DEX₁₁X₁₂KX₁₃X₁₄X₁₅RX₁₆X₁₇SX₁₈SNTEEDX₁₉EQEX₂₀EDX₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁（配列番号 214）を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉、X₃₀、及び X₃₁ は、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドは、GSX₁X₂GCASX₃CMX₄YNX₅X₆LEX₇CEAX₈MMX₉MX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅CX₁₆X₁₇X₁₈LX₁₉X₂₀LLYCLDHCHSQ（配列番号 215）または X₁X₂GCASX₃CMX₄YNX₅X₆LEX₇CEAX₈MMX₉MX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅CX₁₆X₁₇X₁₈LX₁₉X₂₀LLYCLDHCHSQ（配列番号 338）を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、及び X₂₀ は、D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から独立して選択することができる。

【0212】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号 32 を基準として、対応する位置 15、35、39、49、またはこれらの任意の組み合わせに親水性残基（例えば、D、E、H、K、R、N、Q、S、または T）を含む。いくつかの例では、本開示のペプチドは、配列番号 32 を基準として、次の対応する位置の親水性アミノ酸残基：D 15、E 35、E 39、H 49、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、配列番号 32 を基準として、対応する位置 D 15、E 35、E 39、H 49 のいずれか 1 つまたは任意の組み合わせは、可溶性または T f R 結合に大きな影響を与えることがなければ、別の親水性残基に変更することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドは、含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドは、X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄DX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃EX₃₄X₃₅X₃₆EX₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂X₄₃X₄₄X₄₅HX₄₆X₄₇（配列番号 216）を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈、X₃₉、X₄₀、X₄₁、X₄₂、X₄₃、X₄₄、X₄₅、X₄₆、及び X₄₇ は、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドは、GSREGCASRCMKYNX₁ELEKCEARMMSMSNTEEDCX₂QELX₃DLLYCLDHCHX₄SQ（配列番号 217）または REGCASRCMKYNX₁ELEKCEARMMSMSNTEEDCX₂QELX₃DLLYCLDHCHX₄SQ（配列番号 339）を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、及び X₄ は、D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から独立して選択することができる。

【0213】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号 32 を基準として、対応する位置 15、35、39、49、またはこれらの任意の組み合わせに疎水性残基（例えば、A、M、I、L、V、F、W、または Y）を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドは、GSREGCASRCMKYNX₁ELEKCEARMMSMSNTEEDCX₂QELX₃DLLYCLDHCHX₄SQ（配列番号 2

10

20

30

40

50

18) またはREGCASRCMKYNX₁ELEKCEARMMSMSNTEEDCX₂QELX₃DLLYCLDHCHX₄SQ (配列番号340) を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、及びX₄は、A、M、I、L、V、F、W、またはYから独立して選択することができる。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準として、対応する位置15、35、39、及び49のいずれか1つの親水性アミノ酸残基は、TfRに対するより高い結合親和性 (例えば、標的結合) 及びより高い可溶性に関連する。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準として、対応する位置15、35、39、及び49のいずれか1つのアミノ酸残基の疎水性残基から親水性残基への変異は、TfRに対するより高い結合親和性 (例えば、標的結合) 及びより高い可溶性をもたらすことができる。

【0214】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号32を基準として、対応する位置11、25、27、またはこれらの任意の組み合わせに疎水性残基 (例えば、A、M、I、L、V、F、W、またはY) を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号32を基準として、対応する位置11、25、27、またはこれらの任意の組み合わせに親水性残基 (例えば、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはT) を含む。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準として、対応する位置11、25、及び27のいずれか1つの疎水性アミノ酸残基は、TfRに対するより高い結合親和性 (例えば、標的結合) 及びより高い可溶性に関連する。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準として、対応する位置11、25、及び27のいずれか1つのアミノ酸残基の親水性残基から疎水性残基への変異は、TfRに対するより高い結合親和性 (例えば、標的結合) 及びより高い可溶性をもたらすことができる。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号32を基準として、対応する位置M11、M25、M27の疎水性アミノ酸残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの例では、ペプチドは、配列番号32を基準として、対応する位置M11、M25、及びM27の疎水性アミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準として、対応する位置M11、M25、及びM27の任意の組み合わせは、可溶性またはTfR結合に大きな影響を与えることがなければ、別の疎水性残基に変更することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀MX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃MX₂₄MX₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈ (配列番号219) を含み、配列中、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈、X₃₉、X₄₀、X₄₁、X₄₂、X₄₃、X₄₄、X₄₅、X₄₆、X₄₇、及びX₄₈は、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREGCASRCX₁KYNDELEKCEARMX₂SX₃SNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ (配列番号220) またはREGCASRCX₁KYNDELEKCEARMX₂SX₃SNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ (配列番号341) を含み、配列中、X₁、X₂、及びX₃は、A、M、I、L、V、F、W、またはYから独立して選択することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREGCASRCX₁KYNDELEKCEARMX₂SX₃SNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ (配列番号221) またはREGCASRCX₁KYNDELEKCEARMX₂SX₃SNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ (配列番号342) を含み、配列中、X₁、X₂、及びX₃は、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから独立して選択することができる。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号32を基準として、対応する位置45に脂肪族アミノ酸残基 (例えば、A、M、I、L、またはV) を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、対応する位置45に芳香族アミノ酸残

10

20

30

40

50

基（例えば、F、W、またはY）を含む。いくつかの実施形態において、対応する位置45の脂肪族アミノ酸残基は、TfRへのより高い結合親和性に関連する。いくつかの例では、ペプチドは、配列番号32を基準として、L45に対応する脂肪族アミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、対応する位置45のアミノ酸残基の芳香族残基から脂肪族残基への変異は、TfRに対するより高い結合親和性（例えば、標的結合）及びより高い可溶性をもたらすことができる。いくつかの実施形態において、対応する位置L45を別の脂肪族残基に変更することは、可溶性またはTfR結合に大きな影響を与えない。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}LX_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}$ （配列番号222）を含み、配列中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} 、 X_{38} 、 X_{39} 、 X_{40} 、 X_{41} 、 X_{42} 、 X_{43} 、 X_{44} 、 X_{45} 、 X_{46} 、 X_{47} 、 X_{48} 、 X_{49} 、及び X_{50} は、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドは、GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCX₁DHCHSQ（配列番号223）またはREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCX₁DHCHSQ（配列番号343）を含み、配列中、 X_1 は、A、M、I、L、またはVから独立して選択することができる。

【0215】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、GSREGCASRCMX₁YNDELEX₂CEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ（配列番号224）またはREGCASRCMX₁YNDELEX₂CEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ（配列番号344）を含み、配列中、 X_1 及び X_2 は、KまたはRから独立して選択することができる。いくつかの実施形態において、配列番号32を基準として、対応する位置12及び19のこれらの残基は、別の分子（例えば、活性薬剤または検出可能な剤）への化学コンジュゲーションに使用することができる。いくつかの実施形態において、 X_1 及び X_2 はいずれもRであり、化学コンジュゲーションはペプチドのN末端でなされる。

【0216】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基のうちの任意の1つ以上の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善することができる。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の5～80%における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の1～100%、5～100%、または5～50%における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の15～50%における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の15～30%における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の25～30%における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。例えば、配列番号32の配列を有するペプチドの51アミノ酸残基のうちの14アミノ酸残基における変異（27.5%）は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善することができる。

【0217】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基のうちの任意の1つ以上の変異は、TfRの結合界面にあり得る。いくつかの実施形態において、ペプチドに対する変異は、結合親和性を改善することができ、これは、本明細書で開示されるペプチド

10

20

30

40

50

またはペプチドコンストラクトの結合及びトランスサイトosisに有益であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるペプチドは、最適な活性を得るために、多くの変異または少数の変異を有し得、ここで、最適な活性は、TfRの結合に十分な結合であるが、必ずしもペプチド及び／またはペプチドコンストラクトのトランスサイトosis後の放出を妨げるほど強い結合ではない。したがって、本開示のペプチドは、ペプチドまたはペプチドコンストラクトの最適な結合、機能（例えば、トランスサイトosis、BBB透過、細胞膜透過、生物学的障壁を越えた輸送）、及び放出を得るために、結合親和性及びオフレートを調整する多数の変異（変異アミノ酸残基%とも称される）を含み得る。したがって、最大限の親和性をもたらす変異は、最適な結合及びトランスサイトosisを有する優れたペプチドと必ずしも相関しない場合がある。

10

【0218】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の1～100%または5～100%は、TfRの結合界面にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の10～90%は、TfRの結合界面にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の20～80%は、TfRの結合界面にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の30～70%は、TfRの結合界面にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の40～60%は、TfRの結合界面にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の30～35%は、TfRの結合界面にある。例えば、配列番号32の配列を有するペプチドの51アミノ酸残基のうちの17アミノ酸残基（33%）は、TfRの結合界面にあり得る。

20

【0219】

いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基のうちの任意の1つ以上の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善することができる。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の1～100%または5～100%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の5～80%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の10～70%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の15～60%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の20～50%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の25～30%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。例えば、TfRの結合界面にある配列番号32の配列を有するペプチドの17アミノ酸残基のうちの5アミノ酸残基（29%）における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善することができる。

30

【0220】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基のうちの任意の1つ以上の変異は、TfRの結合界面に対して遠位にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の1～100%または5～100%は、TfRの結合界面に対して遠位にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の10～90%は、TfRの結合界面に対して遠位にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の20～80%は、TfRの結合界面に対して遠位にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の30～70%は、TfRの結合界面に対して遠位にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の40～60%は、TfRの結合界面に対して遠位にある。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基の65～70%は、TfRの結合界面に対して遠位にある。例えば、配列番号32の配列を有するペプチドの51アミノ酸残基の

40

50

うちの34アミノ酸残基(66%)は、TfRの結合界面にあり得る。

【0221】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドのアミノ酸残基のうちの任意の1つ以上の変異は、TfRの結合界面に対して遠位にあり、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面に対して遠位にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の1~100%または5~100%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面に対して遠位にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の5~80%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面に対して遠位にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の10~70%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面に対して遠位にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の15~60%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面に対して遠位にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の20~50%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。いくつかの実施形態において、TfRの結合界面に対して遠位にある本開示のペプチドのアミノ酸残基の25~30%の変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善する。例えば、TfRの結合界面に対して遠位にある17アミノ酸残基のうちの5アミノ酸残基における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善することができる。例えば、TfRの結合界面に対して遠位にある配列番号32の配列を有するペプチドの34アミノ酸残基のうちの9アミノ酸残基(26.5%)における変異は、ペプチドのTfRへの結合親和性を改善することができる。いくつかの実施形態において、いかなる理論に拘束されるものではないが、TfRの結合界面に対して遠位にあるペプチドのアミノ酸残基における1つ以上の変異は、タンパク質のフォールディングを改善し、タンパク質の可溶性を向上させ、及び／または最適化された界面形状の相補性を介して結合を改善することができる骨格の幾何学的形状を変更することができる。

【0222】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、位置11、12、13、14、19、20、21、22、36、38、39、41のうちの1つ以上にシステイン残基を有する配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、位置11、12、19、20、36、39、またはこれらの任意の組み合わせにCysを含む。例えば、特定の
実施形態において、ペプチドは、位置11にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置12にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置13にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置14にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置19にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置20にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置21にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置22にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置36にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置38にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置39にシステイン残基を有する配列を含み得る。特定の
実施形態において、ペプチドは、位置41にシステイン残基を有する配列を含み得る。いくつかの実施形態において、配列中の1番目のシステイン残基は、配列中の4番目のシステイン残基にジスルフィド結合することができ、配列中の2番目のシステイン残基は、配列中の5番目のシステイン残基にジスルフィド結合することができ、配列中の3番目のシステイン残基は、配列中の6番目のシステイン残基にジスルフィド結合することができる。任意選択により、ペプチドは、「ツー
アンドスルー」構造系としても知られる、別の2つのジスルフィド架橋によって形成される環を通過する1つのジスルフィド架橋を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、セリンに変異された1つ以上のシステインを有し得る。

【0223】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも1つのシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも2つのシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも3つのシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも4つのシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも5つのシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも6つのシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも10個のシステイン残基を含む。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、6つのシステイン残基を含む。

10

【0224】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、1つ以上の位置にシステイン残基を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のシステイン残基は、アミノ酸位置6、10、20、34、44、48のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに位置する。本開示のいくつかの態様において、1つ以上のシステイン(C)残基は、様々な対形成パターン(例えば、C10-C20)を有するジスルフィド結合に関与する。いくつかの実施形態において、対形成パターンは、C6-C48、C10-C44、及びC20-C34である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つのジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つのジスルフィド結合は、C6-C48、C10-C44、及びC20-C34対形成パターン、またはこれらの組み合わせに従って配置される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、対形成パターンC6-C48、C10-C44、及びC20-C34を有する3つのジスルフィド結合を含む。

20

【0225】

特定の実施形態において、ペプチドは、位置6にシステイン残基を有する配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドは、位置10にシステイン残基を有する配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドは、位置20にシステイン残基を有する配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドは、位置34にシステイン残基を有する配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドは、位置44にシステイン残基を有する配列を含む。特定の実施形態において、ペプチドは、位置50にシステイン残基を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、配列中の1番目のシステイン残基は、配列中の最後のシステイン残基とジスルフィド結合する。いくつかの実施形態において、配列中の2番目のシステイン残基は、配列中の最後から2番目のシステイン残基とジスルフィド結合する。いくつかの実施形態において、配列中の3番目のシステイン残基は、配列中の最後から3番目のシステイン残基とジスルフィド結合するなどである。

30

【0226】

いくつかの実施形態において、配列中の1番目のシステイン残基は、配列中の6番目のシステイン残基にジスルフィド結合し、配列中の2番目のシステイン残基は、配列中の5番目のシステイン残基にジスルフィド結合し、配列中の3番目のシステイン残基は、配列中の4番目のシステイン残基にジスルフィド結合する。任意選択により、ペプチドは、「ツーアンドスルー」構造系としても知られる、別の2つのジスルフィド架橋によって形成される環を通過する1つのジスルフィド架橋を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示されるペプチドは、セリンに変異された1つ以上のシステインを有する。

40

【0227】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、システインもジスルフィドも含まない。いくつかの実施形態において、ペプチドは、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、または15個以上のシステインまたはジスルフィドを含む。他の実施形態において、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10個以上の

50

システイン残基がセリン残基で置換されている。いくつかの実施形態において、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10個以上のシステイン残基がトレオニン残基で置換されている。

【0228】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、Cysもジスルフィドも含まない。いくつかの実施形態において、ペプチドは、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、または15個以上のCysまたはジスルフィドを含む。他の実施形態において、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10個以上のCys残基がSer残基で置換されている。いくつかの実施形態において、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10個以上のCys残基がThr残基で置換されている。

10

【0229】

いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのメチオニン残基がロイシンまたはイソロイシンによって置換される。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのトリプトファン残基がフェニルアラニンまたはチロシンによって置換される。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのアスパラギン残基がグルタミンによって置換される。いくつかの実施形態において、ペプチドのN末端は、アセチル基などによってブロックされる。代替として、または組み合わせて、いくつかの例では、ペプチドのC末端は、アミド基などによってブロックされる。いくつかの実施形態において、ペプチドは、遊離アミン上のメチル化によって修飾される。

20

【0230】

例えば、完全なメチル化は、ホルムアルデヒド及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムによる還元的メチル化の使用を介して達成することができる。

【0231】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドまたはペプチドコンストラクトは、TfR発現細胞層もしくは障壁及び／またはTfR発現細胞の膜を標的及び／または透過する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、細胞の細胞膜を標的及び／または透過し、当該細胞は、脳などのCNSに位置する。例えば、TfR結合ペプチド及び1つ以上の活性薬剤（例えば、治療用または診断用化合物）を含むペプチドコンストラクトは、細胞障壁（例えば、BBB）を小胞性トランスサイトosisを介して通過し、その後、CNS内に位置する細胞の細胞膜を標的及び／または透過して、当該細胞に当該1つ以上の活性薬剤を送達する。

30

【0232】

種々の実施形態において、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド及び1つ以上の活性薬剤（例えば、治療用または診断用化合物）を含むペプチドコンストラクトは、消化管、脾臓、肝臓、腎臓、筋肉、骨髄、脳、または皮膚内に位置するTfR発現細胞の細胞膜を標的及び／または透過する。いくつかの場合において、TfR発現細胞は、腫瘍細胞、免疫細胞、赤血球、赤血球前駆細胞、幹細胞、骨髄細胞、または幹細胞である。いくつかの場合において、例えば、細胞がTfRを過剰発現している場合において、TfR結合ペプチドは、細胞の標的化に関与する。種々の実施形態において、1つ以上のカーゴ分子（例えば、活性薬剤及び／または検出可能な剤）にコンジュゲート、連結、または融合されたTfR結合ペプチドを含む本明細書に記載されるペプチドコンストラクトは、脾臓、脳、肝臓、腎臓、筋肉、骨髄、消化管、または皮膚などの様々な器官内に位置する細胞の細胞膜を標的及び／または透過する。

40

【0233】

いくつかの場合において、カーゴ分子は、特定の細胞、細胞集団、または組織の標的化を促進する。いくつかの場合において、それは、TfR媒介性細胞標的化と、細胞標的化を促進するカーゴ分子との組み合わせである。いくつかの態様において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲートまたは融合ペプチド

50

）は、ある特定の生物学的（例えば、治療的）作用を発揮するために、当該細胞、細胞集団、または組織の標的化に使用される。いくつかの態様において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲートまたは融合ペプチド）は、当該細胞内にカーゴ分子を送達して、ある特定の生物学的作用を発揮するために使用される。

【0234】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、細胞透過を改善するための少なくとも1つ以上のタグペプチド配列を含み得る。例えば、ペプチドは、細胞透過特性を改善するために、少なくとも1つまたは複数のArg残基またはTatタンパク質に由来する残基を含み得る。追加のタグペプチド配列としては、CysTat（CYRKKRRQRRR；配列番号71）、S19-TAT（PFVIGAGVLGALGTGIGGIGRKKRRQRRR；配列番号72）、R8（RRRRRRRRR；配列番号73）、pAntp（RQIKIWFQNRRMKWKK；配列番号74）、Pas-TAT（FFLI PKGG RKKRRQRRR；配列番号75）、Pas-R8（FFLI PKGRRRRRRRRR；配列番号76）、PasFHV（FFLI PKGRRRRNRTRRNRNRVR；配列番号77）、Pas-pAntp（FFLI PKGRQIKIWFQNRRMKWKK；配列番号78）、F2R4（FFRRRRR；配列番号79）、B55（KAVLGATKIDLPVDINDPYDLGLLLRHLRHHSNLLANIGDPAVREQVLSAMQEEE；配列番号80）、アウズリン（LSTAADMQG VVT DGMASGLDKDY LKPDD；配列番号81）、IMT-P8（RRWRRWNRFNRRCR；配列番号82）、BR2（RAGLQFPVGRLLRRLLR；配列番号83）、OMOTAG1（KRAHHNALERKRR；配列番号84）、OMOTAG2（RRMKANARERNRM；配列番号85）、pVEC（LLIILRRRI RKQAH AHSK；配列番号86）、SynB3（RRLSYSRRRF；配列番号87）、DPV1047（VKRGLKL RHVRPRVTRMDV；配列番号88）、CY105Y（CSIPPEVKFNKPFVYLI；配列番号89）、トランスポータン（GWT LNSAGYLLGKINLKALAA LAKKIL；配列番号90）、MTS（KGE GA AVLLPVLLAAPG；配列番号91）、hLF（KCFQWQRNMRKV RGPVSCI KR；配列番号92）、PFVYLI（PFVYLI；配列番号93）、yBBR（VLDSLEFIASKL、配列番号94）、DRI-TAT31（rrrqrrkkrgy、配列中の小文字表示はD-アミノ酸を示す；配列番号95）、環状ヘプタペプチドシクロ（cFΦR₄）（FΦRRRRRQ、配列中のΦはL-2-ナフチルアラニンを示し、全部分が環化されており、Glnはコンジュゲーションハンドルとして作用し、Lys（アミンカップリングの場合）またはCys（スルフヒドリルカップリングの場合）などの他の官能基で置換され得る；配列番号96）、DPV3（RKKRRRES RKKRRRES；配列番号403）、C10H（RKG FYK RKQCKPSRGRKR；配列番号404）、VP22（NAATATRGRSAASRPTQRPRAPARSASRPRRPVQ；配列番号405）、TP10（AGYLLGKINLKALAA LAKKIL；配列番号406）、MAP（KLALKLALKALKAA LKLA；配列番号407）、BPrPp（MVK SKIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKR P；配列番号408）、ARF（MVR RFLVTLRI RRACGP PRVRV；配列番号409）、GALA（WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA；配列番号410）、SAP（VRLPPPVR LPPPVRLPPP；配列番号411）、MPG（GLA FLGFLGAAGSTMGAWSQP KKKRK V；配列番号412）、Pep-1（KETWWETWWTEWSQP KKKRK V；配列番号413）、[WR]4（WRWRWRWR；配列番号414）、Ig(v)（MGLGLHLLVLA AALQGAKKKRK V；配列番号415）、K-FGF（AAVALLPAVLLAHL LAP；配列番号416）、メリチン（GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ；配列番号417）、gH625（HGLASTLTRWAHYNALIRAF；配列番号418）、HIV-1 Tatタンパク質（48-60）（GRK

10

20

30

40

50

KRRQRRRPPQ；配列番号419）、MPG HIV-gp41/SV40 T-抗原（GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV；配列番号420）、R6W3（RRWWRRWRR；配列番号421）、NLS（CGYGPKKKRKVGG；配列番号422）、8-リシン（KKKKKKKKK；配列番号423）、HRSV（RRIPNRRPRR；配列番号424）、AIP6（RLRWR；配列番号425）、Pep-1（KETWWETWWTEWSQPKKKRKV；配列番号426）、MAP17（QLALQLALQALQAALQLA；配列番号427）、VT5（DPKGD PKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD；配列番号428）、Bac7（RRIRPRPRLPRPRPRPLPFPRPG；配列番号429）、（PPR）n（（PPRPPRPPR；配列番号430）、（PPRPPRPPRPPR；配列番号431）、（PPRPPRPPRPPRPPR；配列番号432）、（PPRPPRPPRPPRPPRPPR；配列番号433））、INF7（GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC；配列番号434）、CADY（GLWRALWRLRLRSLWRLLRRA；配列番号435）、Pep-7（SDLWEMMMVSLACQY；配列番号436）、TGN（TGNYKALHPHNG；配列番号437）、Ku-70（VPMLK；配列番号438）、CPP（RRRRRGGRRRRRRG；配列番号452）（RRRRRRRGGRRRRRRG；配列番号439）、SVS-1（KVKVKVKVDPTKVKVKVK；配列番号440）、L-CPP（LAGRRRRRRRRRRRK；配列番号441）、RLW（RLWMRWYSPRTRAYG；配列番号442）、K16ApoE（KKKKKKKKKKKKKKKKKKLRVRLASHLRKLRKRLLRDA；配列番号443）、Angioprep-2（TFFYGGSRGKRNNFKTEEY；配列番号444）、ACPP（EEEEEEEEPLGLAGRRRRRRRRRN；配列番号445）、KFAK（KFAKLAARLYRKALARQLGVAA；配列番号446）、hCT（9-32）（LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP；配列番号447）、VP22（バージョン2）（DAATATRGRSAASRPTQRPRAPARSASRPRRPVE；配列番号448）、MPG（GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV；配列番号449）、hPP3（KPKRKRRKKKGHWGSR；配列番号450）、PepNeg（SGTQEEY；配列番号451）、CM18-TAT（KWKLFFKKIGAVLKVLTTG；配列番号453）、PTD4（YARAAARQARA；配列番号454）、またはWATx（MKYFTLALTLLFLLLINPCKDMNFAWAESSEKVERASPPQQAKEYCYEQCNVNKVPFDQCYQMCSPLEERS；配列番号455）を挙げることができる。例えば、いくつかの実施形態において、ペプチドは、アルギニンパッチ（Argパッチ）、例えば、RRRRRRRRR（配列番号73）、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含み得、配列は、ペプチドのN末端またはC末端のいずれかに付加され得る。いくつかの実施形態において、Argパッチは、2つ以上のArg残基、またはArg_n（式中、nは、整数であり、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり得る）（配列番号98）を含む。他の実施形態において、ペプチドは、Tatペプチドを含み得る（Tatタンパク質は、Gump et al. Tat transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. Trends Mol Med. 2007 Oct;13(10):443-8及びHarada et al. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. Breast Cancer. 2006;13(1):16-26に概説されている）。Tatペプチドは、例えば、YGRKKRRQRRR（配列番号99）、GRKKRRQRRR（配列番号100）、またはその任意の修飾体、バリエーション、もしくはフラグメントの配列を有し得、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端またはC末端に付加され得る。いくつかの実施形態において、Tatペプチド配列は、GRKKRRQRRRPQ（配列番号101）、GRKKRRQRRR（

10

20

30

40

50

配列番号100)、またはそのフラグメントもしくはバリエーションであり得る。いくつかの実施形態において、Tatペプチドは、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端に、N末端GSジペプチドの後、かつスペーサー、例えば、GGGS(配列番号103)スペーサーの前に付加され得る。いくつかの実施形態において、配列番号71~配列番号96、配列番号98~配列番号101、配列番号116~配列番号124、配列番号126、または配列番号403~配列番号455のいずれか1つなどの細胞透過タグペプチドは、 G_xS_y (配列番号104)ペプチドリンカー(配列中、x及びyは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10などの任意の整数であり得る)などのペプチドリンカーを使用して、本明細書で開示される任意のペプチドのN末端またはC末端のいずれかに付加され得る。他の実施形態において、TatペプチドもしくはArgパッチなどの細胞透過ペプチド、または任意の他の部分は、 G_xS_y (配列番号104)ペプチドリンカー(配列中、x及びyは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10などの任意の整数であり得る)などのペプチドリンカーを使用して、本明細書で開示される任意のペプチドのN末端またはC末端のいずれかに付加され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、(GS)x(配列番号105)を含み、配列中、xは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10などの任意の整数であり得る。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、GGSSG(配列番号106)、GGGGG(配列番号107)、GSGSGSGS(配列番号108)、GSGG(配列番号109)、GGGGS(配列番号110)、GGGS(配列番号103)、GGS(配列番号112)、GGGSGGGSGGGGS(配列番号113)、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。更に、DKTxに由来するKKYKPYVPVTTN(配列番号114)、及びヒトIgG3に由来するEPKSSDKTHH(配列番号115)は、ペプチドリンカーとして使用され得る。他の実施形態において、タグペプチドは、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。更なる実施形態において、タグペプチドは、TfR結合活性に干渉することなく、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。いくつかの実施形態において、タグペプチドは、コンジュゲーション、連結、または融合技術を通じて付加される。他の実施形態において、Tatペプチドは、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。更なる実施形態において、Tatペプチドは、TfR結合活性に干渉することなく、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。いくつかの実施形態において、Tatペプチドは、コンジュゲーション、連結、または融合技術を通じてTfR結合ペプチドに付加され、TfR結合細胞透過ペプチド融合体(CPP融合体)が得られる。

【0235】

細胞透過ペプチドには、限定するものではないが、正の正味電荷を持つ短い両親媒性またはカチオン系短ペプチドが含まれ、細胞膜を透過し、ペプチドに共有結合または非共有結合のいずれかで結合された分子またはカーゴを細胞内に輸送することが可能である。そのような細胞透過ペプチドは、または既知のタンパク質、例えば、ペネトラチン、Tatペプチド、pVEC、またはキメラペプチド、例えば、トランスポータン、MPG、Pep-1、または合成ペプチド、例えば、ポリアルギニン、MAP、及びR₆W₃から合成または誘導することができる。

【0236】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、細胞透過を改善するための少なくとも1つ以上の細胞透過ペプチド配列を含み得る。例えば、細胞透過ペプチドとしては、マウロカリン(GDCLPHLKLCCKENKDCCKKCKRRGTNIEKRCR;配列番号116)、インペラトキシシン(GDCLPHLKRCCKADNDCCGKKCKRRGTNAEKRCR;配列番号117)、ハドルカルシン(SEKDCIKHLQRCRENKDCCKSKCSRRGTNPEKRCR;配列番号118)、ヘミカルシン(GDCLPHLKLCCKADKDCCKSKCKRRGTNPEKRCR;配列番号119)、オピカルシン-1(GDCLPHLKRCCKENNDCCSKCKCKRRGTNPEKRCR;配列番号120)、オピカルシン-2(GDCLPHLKRCCKENNDCCSKCKCKRRGANPEKRCR;配列番号121)、ミッドカイン(62-104)(C

10

20

30

40

50

KYKFENWGACDGGTGTKVRQGTLLKKARYNAQCQETIRVTKPC；配列番号122）、MCOTI-II（SGSDGGVCPKILKKCRSDSCPGACICRGNGYCG；配列番号123）、またはクロロトキシン（MCMPCFTTTHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR；配列番号124）を挙げることができる。いくつかの実施形態において、細胞透過ペプチドは、配列番号71～配列番号96、配列番号98～配列番号101、配列番号116～配列番号124、配列番号126、または配列番号403～配列番号455のいずれかの配列と、少なくとも80%、90%、95%、または99%の配列同一性を有し得る。

【0237】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、タンパク質または巨大分子カーゴを *in vivo* 送達するために、原形質膜または核に透過することが可能なアルギニンリッチ、両親媒性及びリシンリッチ、ならびに疎水性の残基またはペプチドなどの1つ以上の細胞透過ペプチドにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。コンジュゲーションまたは融合は、直接的であってもよいし、その間にスペーサーがあってもよい（化学またはペプチドベース）。スペーサーは、任意のペプチドリンカーであり得る。例えば、スペーサーは、GGGSGGSGGGS（配列番号125）、DkTxに由来するKKYKPYVPVTTN（配列番号114）、ヒトIgG3に由来するEPKSSDKTHT（配列番号115）またはその任意のバリエーションもしくはフラグメントであり得る。いくつかの実施形態において、細胞透過ペプチド配列は、ペプチドのN末端またはC末端のいずれかに付加され得る。いくつかの実施形態において、細胞透過ペプチドは、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端に、N末端GSジペプチドの後、かつスペーサー、例えば、GGGS（配列番号103）スペーサーの前に付加され得る。いくつかの実施形態において、配列番号71～配列番号96、配列番号98～配列番号101、配列番号116～配列番号124、配列番号126、または配列番号403～配列番号455のいずれか1つなどの細胞透過タグペプチドは、G_xS_y（配列番号104）ペプチドリンカー（配列中、x及びyは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10などの任意の整数であり得る）などのペプチドリンカーを使用して、本明細書で開示される任意のペプチドのN末端またはC末端のいずれかに付加され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、GGSSG（配列番号106）、GGGGG（配列番号107）、GSGSGSGS（配列番号108）、GSGG（配列番号109）、GGGGS（配列番号110）、GGGS（配列番号103）、GGS（配列番号112）、GGGSGGGSGGGG（配列番号113）、GGGSGGGSGGGG（配列番号225）、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。更に、DkTxに由来するKKYKPYVPVTTN（配列番号114）、及びヒトIgG3に由来するEPKSSDKTHT（配列番号115）は、ペプチドリンカーとして使用され得る。他の実施形態において、細胞透過ペプチドは、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。更なる実施形態において、細胞透過ペプチドは、TfR結合活性に干渉することなく、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。いくつかの実施形態において、細胞透過ペプチドは、コンジュゲーション、連結、または融合技術を通じて付加される。他の実施形態において、細胞透過ペプチドは、任意のアミノ酸残基でペプチドに付加され得る。

【0238】

他の実施形態において、細胞透過は、最大10 μM、または10 μM以上のペプチドなど、高投与量の明細書に記載されるペプチドを使用することによって増加し得る。いくつかの場合において、Argパッチは、ペプチドと融合されるか、コンジュゲートされるか、連結されるか、または同時送達され得る。最大10 μM、または10 μM以上のArgパッチは、細胞透過を促進するために、ペプチドと同時に送達され得る。タンパク質のトランスフェクション剤もまた、ペプチドの細胞透過を増加させるために使用することができる。いくつかの実施形態において、ペプチドの直接的サイトソル発現を使用することができる。他の実施形態において、エレクトロポレーションなどの物理的破壊法を使用して、ペプチドの細胞内への送達を改善することができる。

【0239】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドの細胞透過性は、改善され得る。例えば、本明細書に記載されるペプチドの結合界面は、細胞透過性であることが知られているカルシンなどの足場上にグラフトされ得る。同様に、細胞透過性であることが知られている配列は、本開示のペプチド上にグラフトされ得る。カルシンのいくつかの非限定的な例は、インペラトキシナーA、マウロカルシン、ヘミカルシン、オピクラシン1、オピカルシン2、及びハドルカルシンであり得る。足場は、配列番号116～配列番号124のいずれか1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、または98%含み得る。いくつかの実施形態において、細胞透過性ペプチドは、カルシン、修飾カルシン、カルシンの誘導体またはそのフラグメントであり得、細胞透過を増加させるために使用することができる。修飾カルシン、カルシンの誘導体、またはフラグメントは、筋小胞体リアノジン受容体の活性化、リアノジン感受性Ca²⁺チャネルのRyR1、RyR2、もしくは両方に対する活性などの細胞透過活性、または前述の選択的アゴニストとしての細胞透過活性についてスクリーニングすることができる。更に、修飾カルシンは、活性の改変及び当該カルシンの細胞透過活性またはRyR1もしくはRyR2受容体に対する活性の最適化を行うために、カルシン内にあるリシン残基または他の荷電残基の置換、付加または還元を含み得る。一例として、ヘリックス3の6アミノ酸部分(MLICLF; 配列番号126)をカルシンまたは修飾カルシン足場上に移植すると、TfR結合ペプチドの新しいTfR結合機能を有するカルシンの細胞透過を保持する二機能性ペプチドが生成され得る。別の例として、TATもしくはオクターアルギニンなどのK/Rリッチ配列の包含、ヘリカル内アルギニンパッチ、またはペネトラチンもしくはメリチンなどの細胞透過性スクリーニングにおいて特定されたタンパク質のより大きなフラグメントへの融合を含む、本明細書に記載されるペプチドは、シス作用エレメントの使用により、細胞透過能を改善することができる。

【0240】

いくつかの実施形態において、核局在化シグナルは、本明細書に記載されるペプチドに結合、コンジュゲート、連結、または融合されて、核局在化を促進し得る。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、K-K/R-X-K/R (配列番号129) (配列中、Xは、任意のアミノ酸、またはそのバリエーションであり得る)の4残基配列などの核局在化シグナルにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、PKKKRRV (配列番号130) またはKRPAATKKAGQAKKKK (配列番号131) などのLange et al., J Biol Chem. 2007 Feb 23; 282(8): 5101-5に記載されている核局在化シグナルにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、KxRy (配列番号132) (配列中、x及びyは、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり得、KKRR (配列番号133)、KKKKRR (配列番号134)、またはKKKK (配列番号135) など)を含む核局在化シグナルにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。他の細胞透過部分は、限定するものではないが、ポリカチオン、ポリ有機酸、エンドソーム放出ポリマー、ポリ(2-プロピルアクリル酸)、ポリ(2-エチルアクリル酸)、またはこれらの任意の組み合わせを含め、本明細書に記載されるペプチドに連結されるか、コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。

【0241】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチド(例えば、ヒスチジン含有またはヒスチジンリッチTfR結合ペプチド)は、生理学的なpHで高いTfR結合親和性を有するが、エンドソームのpH5.4などの低いpHレベルでは、結合親和性が著しく低下し得る。いくつかの場合において、本開示のTfR結合ペプチドは、高いTfR結合能力を保持しながら、小胞内(例えば、エンドソーム内)及び/または細胞内送達機能を改善するために最適化され得る。いくつかの場合において、ヒスチジンスキャン及び比較結合実験

10

20

30

40

50

を実施して、そのようなペプチドを開発及びスクリーニングすることができる。加えて、いくつかのペプチドは、送達機能（例えば、治療薬の細胞内送達）を増大させるために、ペプチドまたはペプチドコンストラクトの低pHエンドソーム脱出を促進するモチーフを含み得る（例えば、コンジュゲート、連結、または融合される）。いくつかの実施形態において、本開示のペプチド中のアミノ酸残基は、T f RへのpH依存性結合親和性を変更するために、異なるアミノ酸残基で置換される。アミノ酸置換は、低いpHにおける結合親和性を増加させること、高いpHにおける結合親和性を増加させること、低いpHにおける結合親和性を減少させること、高いpHにおける結合親和性を減少させること、またはこれらの組み合わせを含み得る。

【0242】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、細胞層またはBBBなどの細胞障壁を越えた小胞性トランスサイトーシスが可能である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、細胞または細胞（例えば、脳細胞）の核を標的及び／または透過する。標的とすることができる細胞または組織の例としては、CNSの細胞または組織、脳細胞、がん性細胞、及び他の細胞種などの疾患または状態に関連する細胞または組織が挙げられ、当該細胞のある特定の生物学的経路が調節不全である。標的とすることができる細胞または組織の更なる例としては、脾臓、肝臓、腎臓、筋肉、骨髄、または皮膚の細胞または組織が挙げられる。本開示のペプチドを用いて標的とすることができる細胞は、*in vivo*、または*in vitro*のヒト細胞、哺乳動物細胞、ヒトもしくは哺乳動物細胞株、がん細胞株、対象から抽出した細胞であり得る。

【0243】

いくつかの例では、本明細書で開示されるペプチドは、リシン残基を1つしか含有しないか、またはリシン残基を含有しない。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのリシン残基がアルギニン残基で置換されている。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのメチオニン残基がロイシンまたはイソロイシンによって置換される。ペプチド中の1つ以上または全てのトリプトファン残基がフェニルアラニンまたはチロシンによって置換され得る。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのアスパラギン残基がグルタミンによって置換される。いくつかの実施形態において、1つ以上または全てのアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基によって置換され得る。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上または全てのリシン残基がアラニンまたはアルギニンによって置換され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドのN末端は、アセチル基またはtert-ブチルオキシカルボニル基などによって、ブロッキングまたは保護される。代替的にまたは組み合わせで、ペプチドのC末端は、アミド基などによって、またはエステルの形成（例えば、ブチルまたはベンジルエステル）などによって、ブロッキングまたは保護され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、遊離アミン上のメチル化によって修飾される。例えば、完全なメチル化は、ホルムアルデヒド及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムによる還元的メチル化の使用を介して達成される。

【0244】

いくつかの実施形態において、ジペプチドGSは、配列番号1～配列番号35、または配列番号136～配列番号170に示されるように、最初の2つのN末端アミノ酸として追加することができ、あるいは、そのようなN末端ジペプチドGSは、配列番号36～配列番号70、もしくは配列番号171～配列番号205に示されるようになっていてもよいし、または任意の他の1つもしくは2つのアミノ酸によって置換されてもよい。いくつかの実施形態において、ジペプチドGSは、リンカーとして使用されるか、またはリンカーに結合され、ペプチドコンストラクトなどのペプチドコンジュゲートもしくは融合分子を形成するために使用される。いくつかの実施形態において、リンカーは、G_xS_y（配列番号104）ペプチドを含み、配列中、x及びyは、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10などの任意の整数である。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、(GS)_x（配列番号105）を含み、配列中、xは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10などの任意の整数であり得る。いくつかの実施形態において

10

20

30

40

50

、ペプチドリンカーは、G G S S G（配列番号106）、G G G G G（配列番号107）、G S G S G S G S（配列番号108）、G G G G S（配列番号110）、G G G S（配列番号103）、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む。

【0245】

本開示のいくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。本明細書で開示されるペプチドは、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも41、少なくとも42、少なくとも43、少なくとも44、少なくとも45、少なくとも46、少なくとも47、少なくとも48、少なくとも49、少なくとも50、少なくとも51、少なくとも52、少なくとも53、少なくとも54、少なくとも55、少なくとも56、少なくとも57、少なくとも58、少なくとも59、少なくとも60、少なくとも61、少なくとも62、少なくとも63、少なくとも64、少なくとも65残基長である、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、または配列番号171～配列番号202のいずれか1つの連続フラグメントを含むフラグメントであり得、ペプチドフラグメントは、ペプチドの任意の部分から選択される。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、追加のアミノ酸に隣接する。1つ以上の追加のアミノ酸は、例えば、特定の *in vivo* 電荷、等電点、化学コンジュゲーション部位、安定性、または生理学的特性をペプチドに付与する。

【0246】

いくつかの例では、TfRの標的化及び結合が可能な本明細書に記載されるペプチドは、80アミノ酸長以下、または70アミノ酸長以下、60アミノ酸長以下、40アミノ酸長以下、35アミノ酸長以下、30アミノ酸長以下、25アミノ酸長以下、20アミノ酸長以下、15アミノ酸長以下、もしくは10アミノ酸長以下を含む。

【0247】

他の実施形態において、ペプチドは、目的の細胞または標的細胞に対して標的化またはホーミング機能を有する担体または分子にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。他の実施形態において、ペプチドは、ペプチドの半減期の延長または薬力学及び／または薬物動態特性の変更またはこれらの任意の組み合わせをもたらす分子にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。

【0248】

いくつかの例では、ペプチドは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個のArgもしくはLys、またはこれらの任意の組み合わせなどの正電荷残基を含む。いくつかの例では、ペプチド中の1つ以上のリシン残基がアルギニン残基で置換されている。いくつかの実施形態において、ペプチドは、1つ以上のArgパッチを含む。いくつかの実施形態において、Argパッチは、ペプチドのN末端に位置する。他の態様において、Argパッチは、ペプチドのC末端に位置する。いくつかの実施形態において、Argパッチは、8つの連続したArg残基（配列番号73）を含む。いくつかの実施形態において、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、または10個以上のArgまたはLys残基は、ペプチドにおいて、

溶媒露出している。いくつかの実施形態において、A r g パッチは、2つ以上の連続した A r g 残基であり得る。いくつかの実施形態において、A r g パッチは、L y s で置換された1つ以上のA r g を含む。

【0249】

本開示のペプチドは、中性アミノ酸残基を更に含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、35個以下の中性アミノ酸残基を有する。他の実施形態において、ペプチドは、81個以下の中性アミノ酸残基、70個以下の中性アミノ酸残基、60個以下の中性アミノ酸残基、50個以下の中性アミノ酸残基、40個以下の中性アミノ酸残基、36個以下の中性アミノ酸残基、33個以下の中性アミノ酸残基、30個以下の中性アミノ酸残基、25個以下の中性アミノ酸残基、または10個以下の中性アミノ酸残基を有する。

10

【0250】

本開示のペプチドは、負のアミノ酸残基を更に含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、6個以下の負のアミノ酸残基、5個以下の負のアミノ酸残基、4個以下の負のアミノ酸残基、3個以下の負のアミノ酸残基、2個以下の負のアミノ酸残基、または1個以下の負のアミノ酸残基を有する。負のアミノ酸残基は、任意の負電荷アミノ酸残基から選択することができるが、いくつかの実施形態において、負のアミノ酸残基は、EもしくはDのいずれか、またはEとDの組み合わせである。

【0251】

本開示のいくつかの実施形態において、ペプチドの三次元または三次構造は、主に、ベータシート及び／またはアルファヘリックス構造から構成される。いくつかの実施形態において、本開示の設計または操作されたT f R結合ペプチドは、システインを形成する鎖内ジスルフィド結合（例えば、システインによって媒介される）及び疎水性コアによって安定化された小型で緻密なペプチドまたはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、操作されたT f R結合ペプチドは、アルファヘリックスのそれぞれの間に少なくとも1つのジスルフィド架橋を有するらせん状バンドルを含む構造を有し、それによって、ペプチドが安定化される。他の実施形態において、操作されたT f R結合ペプチドは、3つのアルファヘリックス及び3つの鎖内ジスルフィド結合を有する構造を含み、鎖内ジスルフィド結合は、アルファヘリックスバンドル中の3つのアルファヘリックスのそれぞれの間に1つある。

20

【0252】

他の実施形態において、ペプチドは、目的の細胞または当該細胞の表面上もしくは内部に位置する標的タンパク質に対して標的化またはホーミング機能を有する分子（例えば、小分子、ペプチド、またはタンパク質）にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。他の実施形態において、ペプチドは、ペプチドの血漿半減期及び／または生物学的半減期の延長、または薬力学（例えば、標的タンパク質への結合の向上）及び／または薬物動態特性（例えば、クリアランスの速度及び様式）の変更、またはこれらの任意の組み合わせをもたらす分子にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。

30

【0253】

一般に、関連する構造相同体の核磁気共鳴（NMR）分解構造またはX線結晶学構造を使用して、特定の生物学的機能（例えば、T f Rへの結合）を維持しながら、本明細書に記載されるペプチドのフォールディング、安定性、及び製造可能性を改善することができる変異戦略の情報を得ることができる。これらの技術を使用して、構造的に相同な足場群の3Dファーマコフォアを予測することができ、また、特性（例えば、結合特性）が改善されたキメラを生成するために、関連タンパク質のグラフト可能領域を予測することができる。例えば、この戦略は、T f R受容体結合及びトランスサイトーシス特性、高発現、i n v i v o高安定性、またはこれらの特性の任意の組み合わせが改善されたペプチドを設計するために使用される重要なアミノ酸位置及びループを特定するために使用される。

40

【0254】

いくつかの実施形態において、T f R結合及び細胞膜を越えたトランスサイトーシスが

50

可能なペプチドは、表 1 に列挙される例示的なペプチド配列（配列番号 1 ～配列番号 3 2、配列番号 3 6 ～配列番号 6 7、配列番号 1 3 6 ～配列番号 1 6 7、及び配列番号 1 7 1 ～配列番号 2 0 2）のいずれか 1 つと、少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列、またはその機能性フラグメントを含む。2 つ以上ペプチドは、ある程度の配列同一性または相同性を有し得、*in vivo* で同様の特性を有し得る。例えば、ペプチドは、配列番号 1 ～配列番号 3 2、配列番号 3 6 ～配列番号 6 7、配列番号 1 3 6 ～配列番号 1 6 7、または配列番号 1 7 1 ～配列番号 2 0 2 のペプチドのいずれか 1 つと、ある程度の配列同一性または相同性を有し得る。いくつかの実施形態において、1 つ以上の本開示のペプチドは、最大約 2 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 2 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 3 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 3 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 4 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 4 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 5 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 5 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 6 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 6 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 7 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 7 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 8 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 8 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 0 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 6 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 7 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 8 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 9 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、最大約 9 9 . 5 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性、または最大約 9 9 . 9 % のペアワイズ配列同一性もしくは相同性を有する。いくつかの実施形態において、1 つ以上の本開示のペプチドは、第 2 のペプチドと、少なくとも約 2 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 2 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 3 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 3 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 4 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 4 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 5 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 5 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 6 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 6 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 7 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 7 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 8 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 8 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 0 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 6 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 7 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 8 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 9 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 9 . 5 % のペアワイズ配列同一性または相同性、少なくとも約 9 9 . 9 % のペアワイズ配列同一性または相同性を有する。

【0 2 5 5】

いくつかの実施形態において、T f R 受容体結合の改善を示すペプチドは、トランスサイトosis機能の改善を示す。いくつかの場合において、T f R 受容体結合の改善を示すペプチドは、トランスサイトosis機能に変化が全くないか、または小さな変化を示す。いくつかの場合において、T f R 受容体結合の改善を示すペプチドは、トランスサイトosis機能の低下を示す。いくつかの実施形態において、T f R 結合ペプチドの K_A 値及び K_D 値を調節及び最適化して（例えば、アミノ酸置換を介して）、T f R 結合親和性と効率的なトランスサイトosis機能の最適な比率をもたらすことができる。

10

20

30

40

50

【0256】

2つ以上のペプチド間の相同性を決定するには、NCBI BLAST、Clustal W、MAFFT、Clustal Omega、AlignMe、Praline、または別の好適な方法もしくはアルゴリズムなどの様々な方法及びソフトウェアプログラムを使用することができる。ペアワイズ配列アライメントは、2つの生物学的配列（例えば、アミノ酸または核酸配列）間の機能的、構造的及び／または進化的関係を示すことができる類似性の領域を特定するために使用することができる。加えて、多重配列アライメント（MSA）は、3つ以上の生物学的配列のアライメントである。MSAアプリケーションの結果から、相同性が推定され、配列間の進化的関係を評価することができる。本明細書で使用される場合、「配列相同性」及び「配列同一性」及び「パーセント（％）の配列同一性」及び「パーセント（％）の配列相同性」は、区別なく使用され、必要に応じて、参照ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列に対する配列の関連性または変化量を意味する。

10

【0257】

いくつかの例では、ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントである。他の実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つまたはその機能性フラグメントに対して、99％、95％、90％、85％、または80％の配列同一性または相同性を有するペプチドを更に含む。

20

【0258】

他の例において、ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントに対して相同であるペプチドであり得る。本明細書に更に記載されるように、「相同」という用語は、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つの配列またはその機能性フラグメントに対して、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、または95％超の配列同一性または相同性を有するペプチドまたはペプチドコンストラクトを示すために本明細書で使用され得る。

30

【0259】

更に他の例において、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つのペプチドまたはペプチドコンストラクトをコードする核酸分子は、コードされたペプチドアミノ酸配列と、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、もしくは配列番号356～配列番号361のいずれか1つのアミノ酸配列との配列同一性もしくは相同性のいずれかの決定によって、または核酸ハイブリダイゼーションアッセイによって、特定することができる。配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つのそのようなペプチドバリエーションまたはペプチドコンストラクトバリエーションは、(1) 0.1×-0.2×SSC、0.1％SDS、50～65℃に相当する洗浄ストリンジェンシーの高ストリンジェントな洗浄条件下において、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つのヌクレオチド配列を有する核酸分子（またはその相補体）とハイブリダイズ状態を維持し、かつ(2) 配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％または95％超の配列同一性または相同性を有するペプチドをコードする、核酸分子として特

40

50

徴付けることができる。

【0260】

ノットペプチド

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、1つ以上のCys、または1つ以上のジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、システイン高密度ペプチド(CDP)、ノットペプチド、またはヒッチンに由来する。本明細書で使用される場合、「ペプチド」という用語は、「ノットペプチド」、「システイン高密度ペプチド」、「CDP」、及び「ヒッチン」という用語と同義であるとみなされる。(例えば、Correnti et al. Screening, large-scale production, and structure-based classification for cystine-dense peptides. Nat Struct Mol Biol. 2018 Mar; 25 (3): 270-278 参照)。

【0261】

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、TfRに結合することができ、それにより、TfRと他の外因性または内因性リガンド(例えば、Tfまたはそのホモログもしくはフラグメント)との相互作用などのTfR相互作用を阻止する。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、TfRと他の外因性または内因性リガンド(例えば、Tfまたはそのホモログもしくはフラグメント)との結合に影響を与えることなく、TfRに結合することができる。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、操作されたペプチドであり得る。操作されたペプチドは、非天然、人工、単離、合成、設計、または組換え発現されたペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、安定性、タンパク質分解に対する耐性、還元条件に対する耐性、及び／または血液脳関門を通過する能力などのCDP、ノットペプチド、またはヒッチンの1つ以上の特性を含む。

【0262】

いくつかの実施形態において、CDPまたはノットペプチドは、操作された非天然CDP及び天然に見出されるものを含め、がん細胞、脾細胞、肝細胞、結腸細胞、卵巣細胞、乳房細胞、肺細胞、またはこれらの任意の組み合わせなどの標的細胞に対する追加のホーミングまたは標的化機能を提供するために、表1に記載されるものなどの本開示のTfR結合ペプチドにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。いくつかの実施形態において、CDPまたはノットペプチドは、操作されたCDP、単離されたCDP及び天然に見出されるCDPを含め、がん細胞、脾細胞、肝細胞、結腸細胞、卵巣細胞、乳房細胞、肺細胞、またはこれらの任意の組み合わせなどの標的細胞に対する追加のホーミングまたは標的化機能を提供するために、表1に記載されるものなどの本開示のTfR結合ペプチドにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。操作されたペプチドは、非天然、人工、合成、設計、または組換え発現されたペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、TfR媒介性トランスサイトーシス及び／または細胞エンドサイトーシスを可能にし、TfR結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合される追加のCDPまたはノットペプチドは、疾患または状態に関連する細胞内の酵素または目的の他のタンパク質を選択的に標的とすることができる。いくつかの場合において、細胞は、がん細胞である。がんは、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、卵巣癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫、肺癌、骨髄細胞癌、または皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、及びびまん性内在性橋膠腫(DIPG)、またはCMYC過剰発現癌を含み得る。いくつかの場合において、他のCDPまたはノットペプチド(例えば、天然に見出されるもの)は、TfR結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合され、血液脳関門を越えてTfR結合ペプチドを局在化させ、中枢神経系の標的細胞にTfR結合ペプチドを送達することができる。

【0263】

C D P（例えば、ノットペプチド）は、通常、約11～約81アミノ酸長の範囲のペプチドのクラスであり、多くの場合、コンパクトな構造に折り畳まれる。ノットペプチドは、典型的に、多数の分子内ジスルフィド架橋を特徴とし、ベータストランド、アルファヘリックス、及び他の二次構造を含み得る、複雑な三次構造に組み立てられる。ジスルフィド結合の存在は、ノットペプチドに顕著な環境安定性を付与し、それにより、ノットペプチドは、極端な温度及びpHに耐え、血流のタンパク質分解酵素に抵抗することができる。ジスルフィドノットの存在は、還元剤による還元に対する耐性を提供し得る。ノットペプチドはまた、その剛直性により、柔軟性ペプチドが標的細胞と結合するときに生じる「エントロピーペナルティ」を受けることなく、標的への結合が可能になる。例えば、結合は、ペプチドが標的に結合して複合体を形成するときに生じるエントロピー損失により、悪影響を受ける。したがって、「エントロピーペナルティ」は、結合に対して有害な作用であり、この結合の際に生じるエントロピー損失が大きいほど「エントロピーペナルティ」が大きくなる。更に、柔軟な非結合分子は、結合して複合体になると柔軟性が失われるため、剛直性構造の分子よりも複合体を形成するときに多くのエントロピーを失う。一方、非結合分子の剛直性はまた、一般に、分子が形成することができる複合体の数を限定することで、特異性が高まる。ペプチドは、抗体と同様の親和性、またはナノモルもしくはピコモルの親和性で標的に結合することができる。ノットペプチドの配列構造及び配列同一性または相同性を詳しく調べると、あらゆる種類の動物及び植物において、ノットペプチドが収斂進化によって生じていることがわかる。動物において、ノットペプチドは、多くの場合、毒液、例えば、クモ及びサソリの毒液に見出され、イオンチャネルの調節に関与している。植物のノットタンパク質は、動物のタンパク質分解酵素を阻害するか、または抗菌活性を有し得ることから、ノットペプチドが植物に見出される分子防御系で機能し得ることを示唆している。

【0264】

本開示のペプチドは、システインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10個のシステインアミノ酸残基を有する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも8つのシステインアミノ酸残基を有する。他の実施形態において、ペプチドは、少なくとも10個のシステインアミノ酸残基、少なくとも12個のシステインアミノ酸残基、少なくとも14個のシステインアミノ酸残基または少なくとも16個のシステインアミノ酸残基を有する。

【0265】

ノットペプチドは、ジスルフィド架橋を含み得る。ノットペプチドは、残基の5%以上が分子内ジスルフィド結合を形成するシステインであるペプチドであり得る。ジスルフィド連結ペプチドは、薬物の足場であり得る。いくつかの実施形態において、ジスルフィド架橋は、ノットを形成する。ジスルフィド架橋は、例えば、システイン1と4、2と5、または3と6との間などのシステイン残基間で形成され得る。いくつかの実施形態において、1つのジスルフィド架橋は、他の2つのジスルフィド架橋によって形成されるループを通過して、例えば、ノットを形成する。他の実施形態において、ジスルフィド架橋は、任意の2つのシステイン残基間に形成され得る。

【0266】

本開示は、ペプチド足場を更に含み、これは、例えば、追加のペプチドを生成するための出発点として使用することができる。いくつかの実施形態において、これらの足場は、様々なノットペプチド（C D Pまたはノットペプチドなど）に由来し得る。特定の実施形態において、C D P（例えば、ノットペプチド）は、多数の分子内ジスルフィド架橋を特徴とし、任意選択によりベータストランド、及びアルファヘリックスなどの他の二次構造を含む、複雑な三次構造に組み立てられる。例えば、C D P（例えば、ノットペプチド）は、いくつかの実施形態において、ジスルフィドノットを介したジスルフィドを特徴とす

る小さなジスルフィドリッチタンパク質を含む。このノットは、例えば、1つのジスルフィド架橋が、他の2つのジスルフィド及びその相互接続骨格によって形成される大環状高分子を通過する場合に得ることができる。いくつかの実施形態において、ノットペプチドとしては、成長因子システインノットまたは阻害因子システインノットを挙げることができる。他の可能なペプチド構造としては、 β シートを含まずに2つのジスルフィド架橋によって連結された2つの平行ヘリックスを有するペプチド（例えば、ヘフトキシン）が挙げられる。

【0267】

いくつかの本開示のペプチドは、L立体配置である少なくとも1つのアミノ酸残基を含み得る。ペプチドは、少なくとも1つのD立体配置のアミノ酸残基を含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、15～75アミノ酸残基長である。他の実施形態において、ペプチドは、11～55アミノ酸残基長である。更に他の実施形態において、ペプチドは、11～65アミノ酸残基長である。更なる実施形態において、ペプチドは、少なくとも20アミノ酸残基長である。

【0268】

いくつかのCDP（例えば、ノットペプチド）は、毒素または毒液に存在することまたは関連することが知られているタンパク質の一種から誘導または単離することができる。いくつかの場合において、ペプチドは、サソリまたはクモに関連する毒素または毒液から得ることができる。ペプチドは、様々な属及び種のクモ及びサソリの毒液及び毒素から得ることができる。例えば、ペプチドは、*Leiurus quinquestriatus hebraeus*、*Buthus occitanus tunetanus*、*Hottentotta judaicus*、*Mesobuthus eupeus*、*Buthus occitanus israelis*、*Hadrurus gertschi*、*Androctonus australis*、*Centruroides noxius*、*Heterometrus laoticus*、*Opisthophthalmus carinatus*、*Haplopelma schmidtii*、*Isometrus maculatus*、*Haplopelma huwenum*、*Haplopelma hainanum*、*Haplopelma schmidtii*、*Agelenopsis aperta*、*Haydronyche versuta*、*Selenocosmia huwena*、*Heteropoda venatoria*、*Grammostola rosea*、*Ornithoctonus huwena*、*Hadronyche versuta*、*Atrax robustus*、*Agelenopsis aperta*、*Psalmopoeus cambridgei*、*Hadronyche infensa*、*Paracoelotes luctosus*、及び*Chilobrachys jingzhaoor* 別の好適な属または種のサソリまたはクモの毒液または毒素から得ることができる。いくつかの場合において、ペプチドは、*Buthus martensii* Karsh（サソリ）毒素から得ることができる。

【0269】

配列同一性及び相同性

パーセント（％）の配列同一性または相同性は、従来の方法によって決定される。（例えば、*Altschul et al.*（1986）、*Bull. Math. Bio.* 48:603（1986）、及び*Henikoff and Henikoff*（1992）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915参照）。簡潔に述べると、2つのアミノ酸配列は、ギャップ開始ペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ1、ならびに*Henikoff*及び*Henikoff*（同上）の「BLOSUM62」スコアリングマトリックスを使用して、アライメントスコアを最適化するように整列させることができる。次いで、配列同一性または相同性を次のように算出する：（[同一マッチ総数] / [長いほうの配列の長さ、2つの配列を整列させるために長いほうの配列に導入したギャップの数]）（100）。

【0270】

更に、2つのアミノ酸配列を整列させるには、いくつかの確立されたアルゴリズムが利用可能である。例えば、Pearson及びLipmanの「FASTA」類似性検索アルゴリズムは、本明細書で開示されるペプチドのアミノ酸配列とペプチドバリエーションのアミノ酸配列とが共有する配列同一性または相同性のレベルを調べるために好適なタンパク質アライメント法であり得る。FASTAアルゴリズムは、例えば、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)、及びPearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990) によって記載されている。簡潔に述べると、FASTAは、まず、保存的アミノ酸置換、挿入、または欠失を考慮せずに、クエリー配列（例えば、配列番号1）と、最も高い密度の一致（k t u p変数が1の場合）または一致のペア（k t u p = 2の場合）のいずれかを有する試験配列とによって共有される領域を特定することによって、配列類似性を特徴付ける。次に、アミノ酸置換マトリックスを使用して、全てのペア形成アミノ酸の類似性を比較することによって、最も高い密度の一致を有する10の領域を再スコアリングし、最も高いスコアに寄与する残基だけを含むように、領域の末端を「トリミング」する。「カットオフ」値（配列の長さ及びk t u p値に基づいて予め決定された式により計算される）よりも大きいスコアを有する複数の領域がある場合、トリミングされた初期領域を調べることにより、これらの領域を結合して、ギャップのある近似アライメントを形成することができるかどうかを決定する。最後に、2つのアミノ酸配列の最高スコアリング領域を、アミノ酸の挿入及び欠失を許容するNeedleman-Wunsch-Sellersアルゴリズム（Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers, Siam J. Appl. Math. 26: 787 (1974)）の改変を使用して整列させる。例えば、FASTA解析の例示的なパラメータは、k t u p = 1、ギャップ開始ペナルティ = 10、ギャップ伸長ペナルティ = 1、及び置換マトリックス = B L O S U M 6 2である。これらのパラメータは、Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990) の付録2に説明されているように、スコアリングマトリックスファイル（「S M A T R I X」）を改変することによって、FASTAプログラムに導入することができる。

【0271】

FASTAはまた、上に開示されている比を使用して、核酸配列または分子の配列同一性または相同性を特定するために使用することもできる。核酸配列を比較する場合、k t u p値は、1～6の範囲、好ましくは、2～6、最も好ましくは、3であり得、他のパラメータは本明細書に記載のとおり設定される。

【0272】

「保存的アミノ酸置換」である一般的なアミノ酸のいくつかの例は、次の群：（1）グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、（2）フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、（3）セリン及びトレオニン、（4）アスパラギン酸及びグルタミン酸、（5）グルタミン及びアスパラギン、ならびに（6）リシン、アルギニン及びヒスチジンのそれぞれのうちのアミノ酸間の置換によって例示される。B L O S U M 6 2表は、タンパク質配列セグメントの約2,000の局所的な多重アライメントから導出された、500を超える関連タンパク質群の高度に保存された領域を表す、アミノ酸置換マトリックスである（Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)）。したがって、B L O S U M 6 2置換頻度を使用して、本発明のアミノ酸配列へ導入することができる保存的アミノ酸置換を定義することができる。化学的特性にのみ基づいてアミノ酸置換を設計することも可能であるが（上述のとおり）、「保存的アミノ酸置換」という言葉は、好ましくは、-1よりも大きいB L O S U M 6 2値によって表される置換を指す。例えば、アミノ酸置換は、0、1、2、または3のB L O S U M 6 2値によって特徴付けられる置換である場合、保存的である。このシステムによれば、好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも1（例えば、1、2または3）のB L O S U M 6 2値によって特徴付けられ、より好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも2（例えば、2または3）のB L O S U M 6 2値

によって特徴付けられる。

【0273】

構造的完全性の維持に重要な領域またはドメイン内のアミノ酸残基の決定を行うことができる。これらの領域のうち、変化に対してある程度の耐性があり、分子の全体的な三次構造を維持することができる特定の残基を決定することができる。配列構造を解析するための方法としては、限定するものではないが、アミノ酸またはヌクレオチドの同一性または相溶性が高い多重配列のアライメント及び利用可能なソフトウェア（例えば、Insight II、RTM、ビューワー及び相溶性モデリングツール；MSI、San Diego, Calif.）を使用したコンピューター解析、二次構造傾向、バイナリーパターン、相補的パッキング及び埋没極性相互作用が挙げられる（Barton, G. J., Current Opin. Struct. Biol. 5:372-6 (1995) 及び Cordes, M. H. et al., Current Opin. Struct. Biol. 6:3-10 (1996)）。一般に、分子に対する改変の設計または特定のフラグメントの特定を行う場合、構造の決定は、典型的に、改変された分子の活性を評価することによって達成することができる。

10

【0274】

ペプチドの物理化学的特性

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、分子の大きさ及び構造、pH、等電点、ならびに全体的な分子正味電荷などの広範囲の物理化学的特性を含み得る。これらのパラメーターは、TfRに結合し、トランスサイトーシスを促進し、BBBなどの細胞障壁を越えてカーゴ分子を輸送するペプチドの能力に影響し得る。

20

【0275】

本開示のペプチドは、少なくとも1つのD立体配置のアミノ酸残基を含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約5～100アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約10～90アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約15～80アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約15～75アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約15～70アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約20～65アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約20～60アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約25～55アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約25～50アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約25～40アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約11～35アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、約10～25アミノ酸残基長である。

30

【0276】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも5アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも15アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも20アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも25アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも30アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも35アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも40アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも45アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも50アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも55アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも60アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも65アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも70アミノ酸残基長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、少なくとも75アミノ酸残基長である。

40

50

【0277】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも41、少なくとも42、少なくとも43、少なくとも44、少なくとも45、少なくとも46、少なくとも47、少なくとも48、少なくとも49、少なくとも50、少なくとも51、少なくとも52、少なくとも53、少なくとも54、少なくとも55、少なくとも56、少なくとも57、少なくとも58の残基、少なくとも59、少なくとも60、少なくとも61、少なくとも62、少なくとも63、少なくとも64、少なくとも65、少なくとも66、少なくとも67、少なくとも68、少なくとも69、少なくとも70、少なくとも71、少なくとも72、少なくとも73、少なくとも74、少なくとも75、少なくとも76、少なくとも77、少なくとも78、少なくとも79、少なくとも80、または少なくとも81のアミノ酸残基を含む。

10

【0278】

本開示のいくつかの実施形態において、ペプチドの三次元または三次構造は、主に、ベータシート及び／またはアルファヘリックス構造から構成される。いくつかの実施形態において、本開示の設計または操作されたTfR結合ペプチドは、鎖内ジスルフィド結合（例えば、システインによって媒介される）及び疎水性コアによって安定化された小型で緻密なペプチドまたはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、操作されたTfR結合ペプチドは、アルファヘリックスのそれぞれの間に少なくとも1つのジスルフィド架橋を有するらせん状バンドルを含む構造を有し、それによって、ペプチドが安定化される。他の実施形態において、操作されたTfR結合ペプチドは、3つのアルファヘリックス及び3つの鎖内ジスルフィド結合を有する構造を含み、鎖内ジスルフィド結合は、アルファヘリックスバンドル中の3つのアルファヘリックスのそれぞれの間に1つある。

20

【0279】

生理学的pHで、本明細書に記載されるペプチドは、例えば、-5、-4、-3、-2、-1、0、+1、+2、+3、+4、または+5の全体的な分子正味電荷を有し得る。正味電荷がゼロの場合、ペプチドは、非電荷または双極性イオン性であり得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、1つ以上のジスルフィド結合を含有し、生理学的pHで正の正味電荷を有し、正味電荷は、+0.5または+0.5未満、+1または+1未満、+1.5または+1.5未満、+2または+2未満、+2.5または+2.5未満、+3または+3未満、+3.5または+3.5未満、+4または+4未満、+4.5または+4.5未満、+5または+5未満、+5.5または+5.5未満、+6または+6未満、+6.5または+6.5未満、+7または+7未満、+7.5または+7.5未満、+8または+8未満、+8.5または+8.5未満、+9または+9.5未満、+10または+10未満であり得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、生理学的pHで負の正味電荷を有し、正味電荷は、-0.5または-0.5未満、-1または-1未満、-1.5または-1.5未満、-2または-2未満、-2.5または-2.5未満、-3または-3未満、-3.5または-3.5未満、-4または-4未満、-4.5または-4.5未満、-5または-5未満、-5.5または-5.5未満、-6または-6未満、-6.5または-6.5未満、-7または-7未満、-7.5または-7.5未満、-8または-8未満、-8.5または-8.5未満、-9または-9.5未満、-10または-10未満であり得る。

30

40

【0280】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3~10の等電点(pI)値を有し得る。他の実施形態において、本開示のペプチドは、4.3~8.9のpI値を有し得

50

る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3～4のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3～5のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3～6のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3～7のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3～8のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、3～9のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、4～5のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、4～6のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、4～7のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、4～8のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、4～9のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、4～10のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、5～6のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、5～7のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、5～8のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、5～9のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、5～10のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、6～7のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、6～8のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、6～9のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、6～10のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、7～8のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、7～9のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、7～10のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、8～9のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、8～10のpI値を有し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、9～10のpI値を有し得る。

【0281】

いくつかの場合において、本開示のペプチド（例えば、TfR結合ペプチド）内の1つ以上の変異の操作は、生理学的pHでの等電点、電荷、表面電荷、またはレオロジーが改変されたペプチドをもたらす。サソリまたはクモ複合体に由来し得るペプチドに対するそのような変異の操作により、例えば、正味電荷を1、2、3、4、もしくは5下げるか、または正味電荷を1、2、3、4、または5上げることによって、ペプチドの正味電荷を変えることができる。そのような場合において、操作された変異は、標的タンパク質に結合し、トランスサイトーシスを促進し、細胞、エンドソーム、または核を透過するペプチドの能力を促進することができる。ペプチドのレオロジー及び効力を改善するのに好適なアミノ酸修飾は、保存的または非保存的変異を含み得る。

【0282】

ペプチドは、ペプチドの由来となる毒液または毒素成分の配列と比較して、最大で1つのアミノ酸変異、最大で2つのアミノ酸変異、最大で3つのアミノ酸変異、最大で4つのアミノ酸変異、最大で5つのアミノ酸変異、最大で6つのアミノ酸変異、最大で7つのアミノ酸変異、最大で8つのアミノ酸変異、最大で9つのアミノ酸変異、最大で10のアミノ酸変異、または別の好適な数の変異を含み得る。他の実施形態において、ペプチド、またはその機能性フラグメントは、ペプチドの由来となる毒液または毒素成分の配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸変異、少なくとも2つのアミノ酸変異、少なくとも3つのアミノ酸変異、少なくとも4つのアミノ酸変異、少なくとも5つのアミノ酸変異、少なくとも6つのアミノ酸変異、少なくとも7つのアミノ酸変異、少なくとも8つのアミノ酸変異、少なくとも9つのアミノ酸変異、少なくとも10のアミノ酸変異、または別の好適な数の変異を含み得る。いくつかの実施形態において、ペプチド内で変異の操作を行うことで、生理学的pHで所望の電荷または安定性を有するペプチドを提供することができる。

【0283】

一般に、NMR分解構造、X線結晶構造、ならびに関連する構造ペプチドもしくはタンパク質ホモログの一次構造配列アライメントまたは*in silico*設計を使用して、特定の生物学的機能（例えば、TfR親和性／結合）を維持しながら、フォールディング、安定性、及び／または製造可能性を改善することができる変異戦略を生成することができる。ホモログまたは*in silico*設計ペプチドもしくはポリペプチドを生成するための一般的な戦略は、タンパク質の荷電表面パッチまたは保存的残基の特定、重要なアミノ酸の位置及びループの変異、続いて、ペプチドの*in vitro*及び*in vivo*試験を含み得る。全体的なペプチド最適化プロセスは、例えば、*in vitro*または*in vivo*試験中に得られた情報が次世代のペプチドの設計に使用されるという点で、反復的な性質のものであり得る。したがって、本明細書で開示される方法を使用して、特性が改善されたペプチドを設計すること、またはフォールディング及び製造可能性を困難にする有害な変異を修正することができる。重要なアミノ酸の位置及びループの保持を可能にしながら、ペプチド配列中の他の残基を変異させて、ペプチドの機能、例えば、結合、トランスサイトーシス、または細胞、エンドソーム、もしくは細胞核に浸透する能力、ホーミング、または別の活性を改善、変更、除去、または別様に修正することができる。

【0284】

本開示はまた、本明細書に記載される様々なペプチドの多量体も包含する。多量体の例としては、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体などが挙げられる。多量体は、複数の同一サブユニットから形成されるホモマーまたは複数の異なるサブユニットから形成されるヘテロマーであり得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも1つの他のペプチド、または2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上の他のペプチドとの多量体構造に配置される。特定の実施形態において、多量体構造のペプチドはそれぞれ同じ配列を有する。他の実施形態において、多量体構造の1つ以上または全てのペプチドは、異なる配列を有する。

【0285】

いくつかの実施形態において、本開示は、より特異的な特性または改善された特性を有する追加の次世代ペプチドを生成するための出発点として使用することができるペプチド足場を提供する。いくつかの実施形態において、これらの足場は、様々なCDPまたはノットペプチドに由来する。足場に好適ないくつかのペプチドとしては、クロロトキシン、ブラゼイン、サーキュリン、ステクリスプ、ハナトキシン、ミッドカイン、ヘフトキシン、ジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害薬、バブルタンパク質、アトラクチン、 α -GI、 α -GID、 μ -PIIIA、 ω -MVIIA、 ω -CVID、 χ -MrIA、 ρ -TIA、コナントキニンG、コンツラキニンG、GsMTx4、マルガトキシン、shK、毒素K、キモトリプシン阻害薬（CTI）、及びEGFエピレグリンコアを挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、追加のアミノ酸に隣接する。1つ以上の追加のアミノ酸は、所望の*in vivo*電荷、等電点、化学コンジュゲーション部位、安定性、または生理学的特性をペプチドに付与することができる。

【0286】

ペプチドの化学修飾

ペプチドは、1つ以上の様々な方法で化学修飾することができる。いくつかの実施形態において、ペプチドは、機能の追加、機能の欠失、または*in vivo*挙動の改変がなされるように変異がなされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、TfRのプロテアソーム分解をもたらす分子（例えば、ユビキチンリガーゼ結合コンジュゲートもしくは融合体またはセレブロン結合分子）で化学修飾することができる。ジスルフィド連結間の1つ以上のループを修飾または置き換えることで、他のペプチドに由来する活性成分を含めることができる（Moore and Cochran, *Methods in Enzymology*, 503, p. 223-251, 2012に記載のとおり）。アミノ酸はまた、半減期の延長、*in vivo*における結合挙動の改変、追加もしくは欠失、新しい標的化機能の追加、表面電荷及び疎水性の改変、またはコンジュゲ

ーション部位の可能をもたらすために変異がなされ得る。N-メチル化は、本開示のペプチドになされ得るメチル化の一例である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、遊離アミン上のメチル化によって修飾される。例えば、完全なメチル化は、ホルムアルデヒド及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムによる還元的メチル化の使用を介して達成され得る。
【0287】

ペプチドは、他のタンパク質またはペプチドに由来するループまたは配列を本開示のペプチド上にグラフトするなど、機能を追加するために修飾され得る。同様に、本開示に由来するドメイン、ループ、または配列は、追加の機能を有する抗体などの他のペプチドまたはタンパク質上にグラフトされ得る。
【0288】

化学修飾は、例えば、ペプチドの半減期の延長または生体内分布もしくは薬物動態プロファイルの変更をもたらすことができる。化学修飾は、ポリマー、ポリエーテル、ポリエチレングリコール、バイオポリマー、ポリアミノ酸、脂肪酸、デンドリマー、Fc領域、パルミチン酸もしくはミリスチン酸などの単純な飽和炭素鎖、またはアルブミンを含み得る。ポリアミノ酸としては、例えば、単一のアミノ酸が反復されるポリアミノ酸配列（例えば、ポリグリシン）、及びあるパターンに従っても従わなくてもよい混合ポリアミノ酸配列（例えば、gly-a-la-gly-a-la）または前述の任意の組み合わせを挙げることができる。
【0289】

本開示のペプチドは、修飾がペプチドの安定性及び／または半減期を増大させるように修飾することができる。N末端、C末端、または内部アミノ酸などへの疎水性部分の結合を使用して、本開示のペプチドの半減期を延長することができる。ペプチドはまた、ペプチドの腸透過性または細胞透過性が増加または減少するように修飾することができる。いくつかの場合において、本開示のペプチドは、腸の腺細胞に高い蓄積を示すことから、クローン病またはより一般的には炎症性腸疾患などの腸の疾患または状態の治療及び／または予防における適用可能性を示す。本開示のペプチドは、例えば、血清半減期に影響し得る翻訳後修飾（例えば、メチル化及び／またはアミド化及び／またはグリコシル化）を含み得る。いくつかの実施形態において、単純な炭素鎖（例えば、ミリストイル化及び／またはパルミチル化による）が融合タンパク質またはペプチドにコンジュゲートされ、連結され得る。単純な炭素鎖は、融合タンパク質またはペプチドを非コンジュゲート材料から容易に分離できるようにし得る。例えば、非コンジュゲート材料から融合タンパク質またはペプチドを分離するのに使用することができる方法としては、溶媒抽出及び逆相クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。親油性部分は、血清アルブミンへの可逆的結合により、半減期を延長することができる。コンジュゲート部分は、例えば、血清アルブミンへの可逆的結合により、ペプチドの半減期を延長する親油性部分であり得る。いくつかの実施形態において、親油性部分は、コレステロールまたはコレステロール誘導体であり得、コレステレン、コレスタン、コレスタジエン及びオキシステロールを含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、ミリスチン酸（テトラデカン酸）またはその誘導体にコンジュゲートされ、連結され得る。他の実施形態において、本開示のペプチドは、半減期改变剤に結合（例えば、コンジュゲート、連結、または融合）され得る。半減期改变剤の例としては、ポリマー、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン性水溶性ポリマー、水溶性ポリ（アミノ酸）、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、Fc領域、脂肪酸、パルミチン酸、またはアルブミンに結合する分子を挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、半減期改变剤は、血清アルブミン結合ペプチド、例えば、SA21（配列番号376、RLIEDICLPWGCLWEDD）であり得る。いくつかの実施形態において、SA21ペプチドは、本開示のCDP（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか）にコン

10

20

30

40

50

ジュゲートされるか、または融合され得る。S A 2 1 融合ペプチドは、本明細書で開示される S A 2 1 T f R 結合ペプチドコンストラクト（例えば、配列番号 3 7 3 または配列番号 3 7 5）を含み得る。S A 2 1 ペプチドは、1 つ以上のペプチドへのコンジュゲーション、またはその間の融合のためのリンカー配列を含み得る（例えば、配列番号 3 7 7、G G G G S G G G G S R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S）。例示的な S A 2 1 ペプチド、融合ペプチド、及びリンカーは、表 2 に記載される。対照 S A 2 1 融合ペプチドは、S A 2 1 に融合された対照ペプチド（例えば、配列番号 3 7 2（G S R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号 3 7 4（R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号 4 5 6（G S R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S V R I P V S C K H S G Q C L K P C K D A G M R F G K C M N G K C D C T P K）、または配列番号 4 5 7（R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S V R I P V S C K H S G Q C L K P C K D A G M R F G K C M N G K C D C T P K））を含み得る。更に、C y 5. 5 などの近赤外色素、または A l b u タグなどのアルブミン結合物質へのペプチドのコンジュゲーションは、本明細書に記載される任意のペプチドの血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態において、免疫原性は、最小限の非ヒトタンパク質配列を使用することによって低減され、ペプチドの血清半減期が延長される。

【表 2】

表 2－例示的な T f R 結合ペプチドコンストラクト：半減期延長のために血清アルブミン結合ペプチドと融合された T f R 結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 3 7 3	G S R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S R E G C A S R C M K Y N D E L E K C E A R M M S M S N T E E D C E Q E L E D L L Y C L D H C H S Q
配列番号 3 7 5	R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S R E G C A S R C M K Y N D E L E K C E A R M M S M S N T E E D C E Q E L E D L L Y C L D H C H S Q

【0 2 9 0】

いくつかの実施形態において、配列番号 1～配列番号 3 5 または配列番号 1 3 6～配列番号 1 7 0 の最初の 2 つの N 末端アミノ酸（G S）は、別の分子へのコンジュゲーションまたは融合を促進し、かつそのようなコンジュゲートされた分子、連結された分子、または融合された分子からのペプチドの切断を容易にするためのスペーサーまたはリンカーとして機能する。いくつかの実施形態において、本開示の融合タンパク質またはペプチドは、例えば、ペプチドの特性を改変または変化させ得る他の部分にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。

【0 2 9 1】

ペプチドと活性薬剤のコンジュゲート（「ペプチドコンストラクト」とも呼ばれる）

いくつかの実施形態において、T f R への結合に本開示のペプチド自体を使用することができる。他の実施形態において、本開示のペプチドはまた、別の活性薬剤を送達するために使用することができる。本開示に係るペプチドは、腫瘍及びがんの治療に使用される薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。例えば、特定の実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、追加の機能的能力を提供する活性薬剤などの別の分子に融合される。ペプチドは、ペプチドの配列と活性薬剤の配列とを含有するベクターの発現を介して、活性薬剤と融合され得る。種々の実施形態において、ペプチドの配列及び活性薬剤の配列は、同じオープンリーディングフレーム（O R F）から発現され得る。種々の実施形態において、ペプチドの配列及び活性薬剤の配列は、連続配列

を含み得る。ペプチド及び活性薬剤は、ペプチドコンストラクトにおいて、個別に発現された場合の機能的な能力と比較して、類似の機能的な能力をそれぞれ保持し得る。特定の実施形態において、活性薬剤の例は、他のペプチドを含み得る。

【0292】

特定の実施形態において、活性薬剤の例としては、ニューロテンシンペプチドなどの他のペプチドが挙げられる。ニューロテンシンは、13アミノ酸の神経ペプチドであり、黄体形成ホルモン及びプロラクチン放出の制御に関与し、ドーパミン作動系と相互作用することができるが、血液脳関門を通過せず、またペプチダーゼによって急速に代謝される (Wang, et al., Curr. Pharm. Des. 21 (7); 840-848 (2015))。

10

【0293】

ニューロテンシンは、中枢神経系及び消化管に見出される13アミノ酸ペプチドであり、広範な生理学的及び病理学的プロセスに関与している。ニューロテンシンの様々な活性及びニューロテンシンアゴニストの潜在的な治療上の役割については、次に記載されている: Mustain, Rychahou, and Evers, Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes (2011) 及び Boules, Li, Smith, Fredrickson, and Richelson, Front Endocrinol (Lausanne) (2013)。NTは、腸運動、心臓血管系の調節、ナロキソン非依存性抗侵害受容作用、低体温症、下垂体前葉ホルモン分泌の制御、筋肉弛緩、中心血圧、及び炎症に関与する。NTは、3つの受容体NTS1、NTS2、NTS3を介してその作用を調節する。NTS1は、高親和性受容体であり、ニューロンとグリア細胞の両方において、内側中隔核、マイネルト基底核大細胞部、視交叉上核、SN、及びVTA、脊髄の小さな後根神経節ニューロンを含め、CNS全体に広く発現している。NTS2は、嗅覚系、大脳皮質及び小脳皮質、海馬形成、ならびに選択的視床下部核、VTA、及びSNに主に位置する。NTS3はまた、脳全体の様々な場所に発現している。NTは、ドーパミン神経伝達の調節に関与しており、抗侵害受容作用、睡眠覚醒サイクル、及びストレスを含むセロトニン作動系の役割、グルタミン酸放出の役割を有し得、抗精神病作用を有し得る。NTは、パラクライン及びオートクラインの役割、CRH、GnRH、GHRH、プロラクチン、ACTH、性腺刺激ホルモン、成長ホルモン、プロラクチン、甲状腺ホルモン調節を含む神経内分泌制御、ならびに腸運動、腸炎症、脂質代謝、食欲、及び食物摂取に関与する。NTは、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病(PD)、疼痛、血圧の中枢制御、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病などのいくつかのCNS障害、ならびにがん及び炎症及び内分泌機能の他の障害の病態生理学に関与しているとされる。正常な機序の崩壊は、統合失調症から大腸癌に及ぶ疾患につながり得る。特定のニューロテンシン受容体の選択的標的化または遮断によって、研究者は、統合失調症、アルコール依存症、慢性疼痛、またはがんの治療に使用するための潜在的な薬物を特定してきた。NTは、オピオイド非依存性鎮痛作用をもたらし得、熱性、内臓性、及び持続性の炎症性疼痛、体性痛及び内臓痛を治療することができ、ストレス誘発性抗侵害受容作用の一因となる。NTは、ミューオピオイド非依存性抗侵害受容作用を発揮する。NTアゴニストは、コカイン及びアンフェタミン及びニコチンなどの精神刺激薬の作用を遮断し得る。血漿NTレベルは、パーキンソン病患者でより高く、NTの投与は、筋固縮及び振戦を減らすことができる。NTはまた、体温を下げ、血圧を下げ得る。

20

30

40

【0294】

表3は、例示的なニューロテンシン(NT)ペプチドバリエーションを開示する(Boules, et al., Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system, Frontiers in Endocrinology, 2013)。本開示の任意のペプチド(例えば、配列番号1~配列番号32、配列番号36~配列番号67、配列番号136~配列番号167、配列番号171~配列番号202、または配列番号356~配列番号358のいずれか1つ)は、本明細書で開示されるNTペプチドバリエーションのいずれか(例え

50

ば、表 3 に開示される NT ペプチドバリエーションのいずれか)、またはそのフラグメントに融合されるか、または別様にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、配列番号 350 と、少なくとも 53%、少なくとも 60%、少なくとも 69%、少なくとも 75%、少なくとも 77%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92% の配列同一性を含むニューロテンシン (NT) ペプチドバリエーションに融合されるか、または別様にコンジュゲートされる。他の実施形態において、本開示のペプチドは、配列 ELYENKP (配列番号 370) または ELYENKP-X₁-X₂-P-X₃-X₄-L (配列番号 371) (配列中、X₁ 及び X₂ は、Lys または Arg であり得、X₃ は、Trp または Tyr であり得、X₄ は、Ile または Leu であり得るか、あるいは、X₁-X₄ 及び Leu のいずれも修飾アミノ酸残基も非天然アミノ酸残基も含まないか、またはその 1 つ以上は修飾アミノ酸残基もしくは非天然アミノ酸残基を含む) を含むニューロテンシン (NT) ペプチドバリエーションに融合されるか、または別様にコンジュゲートされる。

【表 3-1】

表 3-ニューロテンシンペプチドバリエーション

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 350	ELYENKPRRPYIL
配列番号 365	ELYENKP-[N-メチル-Arg]-KP-[1-ネオ-Trp]-[tert-Leu]-L
配列番号 366	ELYENKPR-[d-Lys]-P-[1-ネオ-Trp]-[tert-Ile]-L
配列番号 367	ELYENKPR-[d-Orn]-P-[1-ネオ-Trp]-[tert-Leu]-L
配列番号 368	ELYENKP-[N-メチル-Arg]-RP-[d-3, 1-Nal]-[tert-Leu]-L

【表 3-2】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 369	ELYENKP-[H-Lys-psi[CH ₂ NH]]-KPY-[Tle]-[Leu-Oet]
配列番号 370	ELYENKP
配列番号 371	ELYENKPX ₁ X ₂ PX ₃ X ₄ L

【0295】

したがって、ニューロテンシンペプチドと血液脳関門を通過することができる本明細書に記載されるペプチドのうちの 1 つとの融合は、ニューロテンシンペプチドの機能的能力を保持することができ、血液関門を通過することが可能な融合ペプチドをもたらす得る。例えば、本開示のペプチドの DNA 配列は、ペプチド-ニューロテンシン融合体を製造するために、ニューロテンシンの遺伝子に挿入される。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、ニューロテンシンまたはその機能性フラグメントに融合される。ニューロテンシンの機能性フラグメントは、少なくとも 5 アミノ酸残基長、少なくとも 6 アミノ酸残基長、少なくとも 7 アミノ酸残基長、少なくとも 8 アミノ酸残基長、少なくとも 9 アミノ酸残基長、少なくとも 10 アミノ酸残基長、少なくとも 11 アミノ酸残基長、少なくとも 12 アミノ酸残基長、または少なくとも 13 アミノ酸残基長であり得る。

【0296】

別の例として、特定の実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、機能的能力を提供する活性薬剤などの別の分子に結合される。いくつかの実施形態において、活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4 標的薬剤、PD-1 標的薬剤、PD-L1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合された IL-15 / IL-15Ra 複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキシソルピシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE 阻害薬、Bcl-xL 阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、またはニューロテンシンなどの神経伝達物質である。

10

【0297】

いくつかの実施形態において、TfR 結合ペプチドは、活性薬剤を細胞内に誘導し得る。更なる実施形態において、TfR 結合ペプチドは、活性薬剤を核内に誘導し得る。いくつかの実施形態において、活性薬剤は、固有の腫瘍ホーミング特性を有するか、または、活性薬剤は、腫瘍ホーミング特性を有するように操作され得る。いくつかの実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の活性薬剤がペプチドに連結され得る。複数の活性薬剤は、複数のリシン残基及び／またはN末端にコンジュゲートさせるなどの方法によって、または複数の活性薬剤をポリマーもしくはデンドリマーなどの足場に連結させ、次いで、その薬剤-足場をペプチドに結合させることによって、結合され得る (Yurkovetskiy, A. V., Cancer Res 75 (16) : 3365-72 (2015) に記載のとおり)。活性薬剤の例としては、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、ポリヌクレオチド、ポリリボヌクレオチド、DNA、cDNA、ssDNA、RNA、dsRNA、マイクロRNA、オリゴヌクレオチド、抗体、一本鎖可変フラグメント (scFv)、抗体フラグメント、アプタマー、サイトカイン、インターフェロン、ホルモン、酵素、成長因子、チェックポイント阻害薬、PD-1 阻害薬、PD-L1 阻害薬、CD47 阻害薬、CTLA4 阻害薬、CD 抗原、ケモカイン、神経伝達物質、イオンチャネル阻害薬、イオンチャネル賦活剤、Gタンパク質結合受容体阻害薬、Gタンパク質結合受容体賦活剤、化学薬剤、放射線増感剤、放射線防護剤、放射性核種、治療用小分子、ステロイド類、コルチコステロイド、抗炎症薬、免疫調節剤、補体結合ペプチドもしくはタンパク質、腫瘍壊死因子阻害薬、腫瘍壊死因子賦活剤、腫瘍壊死因子受容体ファミリーアゴニスト、腫瘍壊死受容体アンタゴニスト、Tim-3 阻害薬、プロテアーゼ阻害薬、アミノ糖、化学療法剤、細胞毒性分子、毒素、チロシンキナーゼ阻害薬、抗感染症薬、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、アミノグリコシド、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID)、スタチン、ナノ粒子、リポソーム、ポリマー、バイオポリマー、多糖、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ポリエチレングリコール、脂質、デンドリマー、脂肪酸、もしくはFc領域、またはこれらの活性フラグメントもしくは修飾体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0298】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、活性薬剤に、例えば、直接的にまたはリンカーを介して共有結合的または非共有結合的に連結される。例えば、使用することができる細胞毒性分子には、アウリスタチン、MMAE、MMAF、ドロスタチン、アウリスタチンF、モノメチルオウルスタチンD、DM1、DM4、メイタンシノイド、メイタンシン、カリケアミシン、N-アセチル-γ-カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、PBD二量体、ドキシソルピシン、ピンカアルカロイド (4-デアセチルピンブラスチン)、デュオカルマイシン、キノコアマトキシンの環状オクタペプチドアナログ、エポチロン、及びアントラサイリン、CC-1065、タキサン、パクリタキセル、カバジタキセル、ドセタキセル、SN-38、イリノテカン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、白金化合物、シスプラチン、メトトレキサート、ベルベセスタット、クロラムブシル、マイトマイシンCなどのBACE (ペプターセクレターゼ1) 阻害薬が含まれる。活性薬剤の追加の例は、McCombs, J. R., AAPS J, 17 (2) : 339-51 (2015)

40

50

), Ducry, L., Antibody Drug Conjugates (2013)、及び Singh, S. K., Pharm Res. 32 (11): 3541-3571 (2015) に記載されている。本開示の組成物及び方法と組み合わせて使用した場合に治療効果が著しく改善され得る治療用ペイロードの追加の例としては、カルムスチン、シスプラチン、シクロホスファミド、エトポシド、イリノテカン、ロムスチン、プロカルバジン、テモゾロミド、ビンクリスチン、及びベバシズマブが挙げられる。治療用ペイロードの追加の例は、BACE 阻害薬などの神経変性疾患または自己免疫疾患において治療上の利益を有する化合物、ならびに CGRP 受容体アンタゴニストなどの疼痛及び片頭痛に有効な治療薬である。疼痛の治療に使用される活性薬剤もまた、本開示と一致する。例えば、いくつかの実施形態において、活性薬剤は、ニューロテンシンなどの神経伝達物質である。したがって、本明細書で開示されるペプチドコンストラクトは、ペプチド-ニューロテンシンコンストラクトである。本明細書における実施形態での使用に適した例示的なリンカーは、以下に更に詳細に考察される。

【0299】

BBB 透過能が低いいため、現在利用可能な薬物分子のうち、ごく一部のみが CNS 疾患に適用可能である。小分子薬物の約 98% が BBB を通過しないか、非常に限られた程度しか通過しない。加えて、巨大分子薬物分子（例えば、抗体）のほぼ 100% が有効な BBB 透過能を示さない。（例えば、Mikitsh et al. Pathways for Small Molecule Delivery to the Central Nervous System Across the Blood-Brain Barrier, Perspect Medicin Chem. 2014; 6: 11-24 参照）。したがって、利用可能な薬物分子または現在前臨床もしくは臨床開発中の薬物分子を本明細書に記載される方法及び組成物と組み合わせて使用して、TfR を発現している細胞、組織、または器官（例えば、がん細胞または免疫細胞）におけるこれらの薬物の治療活性に改善をもたらす、それにより、従来の治療薬と比較して優れた臨床転帰をもたらすことができる。例えば、特定の生物学的標的（例えば、タンパク質または核酸）に対する活性を示すが、細胞障壁または細胞膜により当該標的に *in vivo* で到達することができない薬物分子を本開示の TfR 結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合することで、これらの細胞障壁（例えば、BBB）または細胞膜（例えば、がん細胞の細胞膜）を越える TfR 媒介性輸送を介した送達を向上することができる。ペプチド-薬物コンジュゲートまたは融合分子は、TfR 媒介性トランスサイトーシスを介して BBB を通過することができるため、極めて高い薬物濃度（例えば、CNS 障害（例えば、脳癌）を治療または予防するための CNS における治療濃度）をもたらすことができる。例えば、パルボシクリブは乳癌の治療において有効性が示されているが、CNS 腫瘍に対する活性は限定されている。したがって、パルボシクリブ薬物を本開示の TfR 結合ペプチドにコンジュゲートすることにより、薬物分子自体がアクセスできない腫瘍、例えば、CNS に位置する腫瘍（例えば、脳腫瘍）の治療及び／または予防での使用が可能になる。1 つ以上の本開示の TfR 結合ペプチドを含むコンジュゲートまたは融合分子を使用して治療または予防することができる脳腫瘍は、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、及びびまん性内在性橋膠腫を含み得る。

【0300】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される TfR 結合ペプチドは、非 CNS 及び／または末梢の細胞、組織、または器官の疾患を治療及び／または予防するために使用することができる。例えば、本明細書に記載される TfR 結合ペプチドは、筋肉疾患を治療及び／または予防するために使用することができる。筋肉疾患を治療または予防するために TfR 結合ペプチドと組み合わせて使用され得る薬物または薬物候補は、筋ジストロフィー、球脊髄性筋ジストロフィー (SBMA)、筋強直性ジストロフィー、悪液質、またはサルコペニアのための薬物または薬物候補を含み得る。いくつかの実施形態において、薬物は、セノリティクスもしくは他の抗老化分子（例えば、カスパーゼ）、または筋肉疾患のための遺伝子治療であり得る。

10

20

30

40

50

【0301】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるTfR結合ペプチドは、疼痛の治療に使用することができる。TfR結合ペプチドは、CDP-NTペプチドコンストラクト（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361）を生成するために、ニューロテンシン（NT）に連結され得る。これらのペプチドコンストラクトは、CNSのニューロテンシン受容体を標的とし、疼痛を抑制することができる。いくつかの実施形態において、ペプチドは、投与により、対象の疼痛のレベルを低減することが可能である。

【0302】

疼痛の種類には、慢性疼痛、急性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛が含まれる。ニューロテンシンは、非オピオイドであるが、鎮痛を提供し得る。オピオイドは、中毒を引き起こす場合があり、CNSへのニューロテンシン送達は、中毒性のない疼痛緩和の可能性を提供する。ニューロテンシンとペプチドの融合体はまた、ドーパミン作動系、セロトニン作動系、GABA作動系、グルタミン酸作動系、及びコリン作動系、統合失調症、精神病、薬物乱用、パーキンソン病（PD）、疼痛、血圧の中樞制御、摂食障害、ならびにがん及び炎症を治療するために使用され得る。ニューロテンシンペプチド融合体は、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛を含む疼痛の治療に使用され得る。ニューロテンシンペプチド融合体は、バーター症候群、アンダーセン病、先天性高インスリン血症、新生児糖尿病、拡張型心筋症、反復発作性運動失調症1型、QT延長症候群、QT短縮症候群、良性新生児熱性痙攣、非症候性難聴、QT延長症候群、QT短縮症候群、多嚢胞性腎疾患、家族性エピソード性疼痛症候群、巣状分節性糸球体硬化症、網膜色素変性症、てんかん、重症ミオクロニーてんかん、QT延長症候群、小脳性運動失調症、皮膚紅痛症、発作性激痛症、先天性無痛覚症、良性家族性新生児痙攣、チモシー症候群、反復発作性運動失調症2型、乳児硬直症候群、若年性ミオクロニーてんかん、及び常染色体優性夜間前頭葉てんかんを含む疾患及び障害などにおけるACTH軸、HPA軸、ホルモン制御、及びイオンチャネル制御などの神経内分泌的制御に使用され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドコンストラクト（例えば、ペプチド-NTコンストラクト）は、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用して疼痛を低減させる。

【0303】

いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、限定するものではないが、てんかん、統合失調症、鬱病、不安、双極性障害、脳発達障害（例えば、自閉スペクトラム）、または気分障害を含む様々な神経疾患の治療及び予防に使用することができる。

【0304】

本明細書に記載される操作されたペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲート、融合ペプチド、または組換え産生されたペプチドコンストラクト）がTfRに結合し、その後、細胞層もしくはBBBなどの細胞障壁を越えて（例えば、小胞性トランスサイトosisを介して）または細胞膜を越えて（例えば、エンドサイトosisを介して）輸送されることは、神経変性に関連する多数の疾患、状態、または障害に影響を与え得る。本明細書に記載されるTfR結合ペプチドで治療、予防、または診断することができる神経変性疾患としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、

10

20

30

40

50

バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症を挙げることができる。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドは、神経変性疾患を治療及び／または予防するために、BACE阻害薬である、ガランタミン、アマンタジン、ベンザトロピン、ピペリデン、プロモクリプチン、カルビドパ、ドネペジル、エンタカポン、レボドパ、ペルゴリ、プラミペキソール、プロシクリジン、リバスチグミン、ロピニロール、セレギリン、タクリン、トルカポン、またはトリヘキシフェニジルと組み合わせて使用することができる。

【0305】

いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドを使用したKv1.3カリウムチャネルなどのイオンチャネルの調節（例えば、阻害）及びKv1.3カリウムチャネル阻害薬コンジュゲートまたはペプチドコンストラクトなどのイオンチャネル調節剤は、脳の炎症を治療または予防するために使用され得る。Kv1.3カリウムチャネルは、例えば、脳内のミクログリアに高度に発現され得る。したがって、神経炎症性及び神経変性疾患、例えば、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、外傷性脳損傷、放射線療法による毒性ならびに他の神経変性疾患及び神経炎症性疾患は、Kv1.3阻害薬にコンジュゲート、連結、または融合されたTfR結合ペプチドで治療することができる。これらの疾患は、Kv1.3の上方制御を特徴とし得る。いくつかの場合において、Kv1.3阻害薬は、エフェクターT細胞への作用により、乾癬及び他の脳以外の自己免疫疾患の治療のために使用され得る。いくつかの実施形態において、Kv1.3阻害薬ペプチドは、Vm24（配列番号378または配列番号391、GSAAAI SCVGSPECP PKCRAQGCKNGKCMNRKCKCYC）またはShK-186（配列番号379）であり得る。Kv1.3阻害薬ペプチドは、本明細書で開示されるペプチドのいずれか（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）にコンジュゲートされ得る。例示的なKv1.3阻害薬ペプチドは、表4に提供される。

【表4-1】

表4-例示的なKv1.3阻害薬ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
配列番号378	AAAI SCVGSPECP PKCRAQGCKNGKCMNRKCKCYC

【表4-2】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号379	RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
配列番号390	GSEWSSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
配列番号391	GSAAAI SCVGSPECP PKCRAQGCKNGKCMNRKCKCYC
配列番号402	EWSSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

【0306】

いくつかの実施形態において、Kv1.3阻害薬、例えば、Kv1.3ペプチド阻害薬は、本開示のTfR結合ペプチドにコンジュゲートされ得る。例示的なKv1.3阻害薬

融合ペプチドは、表5に提供される。本開示のKv1.3阻害薬融合ペプチドの対照は、Kv1.3阻害薬に融合された対照ペプチドを含み得る（例えば、配列番号380（G S A A A I S C V G S P E C P P K C R A Q G C K N G K C M N R K C K C Y Y C G G G G S G G G G S R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号382（G S E W S S R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C G G G G S G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号383（G S E W S S R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C K K Y K P Y V P V T T N K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号386（G S A A A I S C V G S P E C P P K C R A Q G C K N G K C M N R K C K C Y Y C G G G G S G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号387（G S A A A I S C V G S P E C P P K C R A Q G C K N G K C M N R K C K C Y Y C K K Y K P Y V P V T T N K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号392（A A A I S C V G S P E C P P K C R A Q G C K N G K C M N R K C K C Y Y C G G G G S G G G G S R L I E D I C L P R W G C L W E D D G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号394（E W S S R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C G G G G S G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号395（E W S S R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C K K Y K P Y V P V T T N K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、配列番号398（A A A I S C V G S P E C P P K C R A Q G C K N G K C M N R K C K C Y Y C G G G G S G G G G S G G G G S K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T）、及び配列番号399（A A A I S C V G S P E C P P K C R A Q G C K N G K C M N R K C K C Y Y C K K Y K P Y V P V T T N K C L P P G K P C Y G A T Q K I P C C G V C S H N N C T））。いくつかの実施形態において、Kv1.3ペプチド阻害薬は、TfR結合ペプチドに融合またはコンジュゲートするためのリンカーを含み得る。いくつかの実施形態において、TfR結合ペプチドに融合されるKv1.3ペプチド阻害薬は、配列番号390または配列番号402の配列を含むペプチドを含み得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号103～配列番号115または配列番号125のいずれか1つの配列を有し得る。Kv1.3結合ペプチド（例えば、配列番号378、配列番号379、配列番号391、または配列番号402）は、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列を含むTfR結合ペプチドにコンジュゲートされ得る。

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5 - ペプチド - K v 1 . 3 阻害薬の融合体

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 3 8 1	GSAAAISCVGSPECPPKCRAQGCKNGKCMN RKCKCY YCGGGGSGGGGSGRLIEDICLPRWG CLWEDDGGGGSGGGGSGREGCASRCMKYNDE LEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLD HCHSQ
配列番号 3 8 4	GSEWSSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYR LSFCRKTCGTCTGGGGSGGGGSGGGGSGREGC ASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQ ELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 3 8 5	GSEWSSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYR LSFCRKTCGTCKKYKPYVPVTTNREGCASR CMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELE DLYCLDHCHSQ
配列番号 3 8 8	GSAAAISCVGSPECPPKCRAQGCKNGKCMN RKCKCY YCGGGGSGGGGSGGGGSGREGCASR CMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELE DLYCLDHCHSQ
配列番号 3 8 9	GSAAAISCVGSPECPPKCRAQGCKNGKCMN RKCKCY YCKKYKPYVPVTTNREGCASRCMK YNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLL YCLDHCHSQ
配列番号 3 9 3	AAAI SCVGSPECPPKCRAQGCKNGKCMNRK CKCY YCGGGGSGGGGSGRLIEDICLPRWGCL WEDDGGGGSGGGGSGREGCASRCMKYNDELE KCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHC HSQ
配列番号 3 9 6	EWSSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLS FCRKTCGTCTGGGGSGGGGSGGGGSGREGCAS RCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQEL EDLLYCLDHCHSQ
配列番号 3 9 7	EWSSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLS FCRKTCGTCKKYKPYVPVTTNREGCASRCM KYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDL LYCLDHCHSQ

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 4 0 0	AAAISC VGSPECPPK CRAQGCKNGKCMNRK CKCY YCGGGGSGGGGSGGGGSGREGCASRCM KYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDL LYCLDHCHSQ
配列番号 4 0 1	AAAISC VGSPECPPK CRAQGCKNGKCMNRK CKCY YCKKYKPYVPVTTNREGCASRCMKYN DELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYC LDHCHSQ

10

【0307】

いくつかの実施形態において、本開示の T f R 結合ペプチドは、クローン病またはより一般的には炎症性腸疾患の治療及び予防に使用することができる。いくつかの場合において、本開示の T f R 結合ペプチドは、多量の T f R を発現し得る腸の腺細胞において、高い取り込み及び保持を示す。

【0308】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される T f R 結合ペプチドは、限定するものではないが、卵巣癌、結腸癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫、及び肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、及びびまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、または皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、または C M Y C 過剰発現癌を含む、C N S の内側及び外側の両方に位置する癌を治療及び／または予防するために使用され得る。

20

【0309】

いくつかの実施形態において、がんを予防及び／または治療するために使用することができる T f R 結合ペプチドコンストラクトは、T f R 結合ペプチドと、I L 1 5、融合された I L 1 5 / I L 1 5 R a、I F N ガンマ、及び抗 C D 3 薬剤などの抗腫瘍活性を有する活性薬剤とを含むものである。そのようなペプチドコンストラクト（例えば、融合ペプチド）の例は、配列番号 2 2 5 ~ 配列番号 3 3 2 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を有するものである。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドコンストラクトは、配列番号 2 2 5 ~ 配列番号 3 3 2 のいずれか 1 つと、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有し得る。本開示の例示的なペプチドコンストラクトは、以下の表 6 に示される。これらの例示的なペプチドコンストラクトは、分泌マウス I g カップリーダー配列、抗 C D 3 s c F v、s c F v のリシンからアルギニンへの変異体、短い F l a g 配列、H i s タグ、I L - 1 5 R a、I L - 1 5、I F N ガンマ、本明細書で開示される任意のリンカー、本明細書で開示される任意のペプチド、及びこれらの任意のフラグメントまたは誘導体を含み得る。また、表 6 には、ペプチド-ニューロテンシンコンストラクト（例えば、本開示のペプチドをニューロテンシンに複合体化したペプチドコンストラクト）が示され、例えば、配列番号 3 3 ~ 配列番号 3 5、配列番号 6 8 ~ 配列番号 7 0、配列番号 1 6 8 ~ 配列番号 1 7 0、及び配列番号 3 5 9 ~ 配列番号 3 6 1 に示されるものである。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドコンストラクトは、配列番号 3 3 ~ 配列番号 3 5、配列番号 6 8 ~ 配列番号 7 0、配列番号 1 6 8 ~ 配列番号 1 7 0、及び配列番号 3 5 9 ~ 配列番号 3 6 1 のいずれか 1 つと、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1

30

40

50

00%の配列同一性を有し得る。

【表6-1】

表6-例示的なペプチドコンストラクト配列

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 22 5	METDTLLLLWVLLLVPGSTGDIKLQQSGAE LARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGHHHHH HSGGGVDDIQLTQSPA IMSASPG EKVTMTC RASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKV ASGVPYRFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEADAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKG GGSREG CASRCKYNAELEKCEARVSSMSNTEETCV QELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 22 6	METDTLLLLWVLLLVPGSTGDIKLQQSGAE LARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGHHHHH HSGGGVDDIQLTQSPA IMSASPG EKVTMTC RASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKV ASGVPYRFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEADAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKG GGSREG CASRCKYNAELEKCEARVMSMSNTEEDCE QELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 22 7	METDTLLLLWVLLLVPGSTGDIKLQQSGAE LARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGHHHHH HSGGGVDDIQLTQSPA IMSASPG EKVTMTC RASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKV ASGVPYRFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEADAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKG GGSREG CASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCE QELEDLLYCLDHCHSQ

10

20

30

40

【表 6 - 2】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 2 2 8	D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S V E G G S G H H H H H H G S G G V D D I Q L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K G G G S R E G C A S R C T K Y N A E L E K C E A R V S S M S N T E E T C V Q E L F D L L H C V D H C V S Q
配列番号 2 2 9	D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S V E G G S G H H H H H H G S G G V D D I Q L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K G G G S R E G C A S R C T K Y N A E L E K C E A R V M S M S N T E E D C E Q E L E D L L H C L D H C H S Q
配列番号 2 3 0	D I K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K T S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S V E G G S G H H H H H H G S G G V D D I Q L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T K L E L K G G G S R E G C A S R C M K Y N D E L E K C E A R M M S M S N T E E D C E Q E L E D L L Y C L D H C H S Q
配列番号 2 3 1	M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D I R L Q Q S G A E L A R P G A S V R M S C R T S G Y T F T R Y T M H W V R Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y N Q R F R D R A T L T T D R S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S V E G G S G H H H H H H G S G G V D D I Q L T Q S P A I M S A S P G E R V T M T C R A S S S V S Y M N W Y Q Q R S G T S P R R W I Y D T S R V A S G V P Y R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G A G T R L E L R G G G S R E G C A S R C T R Y N A E L E R C E A R V S S M S N T E E T C V Q E L F D L L H C V D H C V S Q

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 2 3 2	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDIRLQQSGAE LARPGASVRMSCRTSGYTFTRYTMHWVRQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQRFDRATL TTDRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGHHHHH HGSGGVDDIQLTQSPA IMSASPGERVMTTC RASSSVSYMNWYQQRSGTSPRRWIYDTSRV ASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTRLELRGGGSREG CASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEEDCE QELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 3 3	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDIRLQQSGAE LARPGASVRMSCRTSGYTFTRYTMHWVRQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQRFDRATL TTDRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGHHHHH HGSGGVDDIQLTQSPA IMSASPGERVMTTC RASSSVSYMNWYQQRSGTSPRRWIYDTSRV ASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGAGTRLELRGGGSREG CASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEEDCE QELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 3 4	DIRLQQSGAELARPGASVRMSCRTSGYTF RYTMHWVRQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN NQRFRDRATLTTDRSSSTAYMQLSSLTSE SAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSS EGGSGHHHHHHHGSGGVDDIQLTQSPA IMSA SPGERVTMTCRASSSVSYMNWYQQRSGTSP RRWIYDTSRVASGVPYRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTRL ELRGGGSREGCASRCTRYNAELERCEARVS SMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 3 5	DIRLQQSGAELARPGASVRMSCRTSGYTF RYTMHWVRQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN NQRFRDRATLTTDRSSSTAYMQLSSLTSE SAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSS EGGSGHHHHHHHGSGGVDDIQLTQSPA IMSA SPGERVTMTCRASSSVSYMNWYQQRSGTSP RRWIYDTSRVASGVPYRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTRL

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

配列番号	アミノ酸配列
	ELRGGGSREGCASRCTRYNAELERCEARVM SMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 3 6	DIRLQQSGAELARPGASVRMSCRTSGYTFT RYTMHWVRQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNY NQRFRDRATLTDRSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSV EGGSGHHHHHHGSGGVDDIQLTQSPAIMSA SPGERVTMTCRASSSVSYMNWYQQRSGTSP RRWIYDTSRVASGVPRFSGSGSGTSSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTRL ELRGGGSREGCASRCMRYNDELERCEARM SMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 3 7	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVSSMSNT EETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 3 8	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 3 9	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

配列番号	アミノ酸配列
	GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 4 0	DYKDEHHHHHHHSGSGTTCPPPVSI EHADI RV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSREGCASRCTKYNAELEKC EARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVS Q
配列番号 2 4 1	DYKDEHHHHHHHSGSGTTCPPPVSI EHADI RV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSREGCASRCTKYNAELEKC EARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHS Q
配列番号 2 4 2	DYKDEHHHHHHHSGSGTTCPPPVSI EHADI RV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSREGCASRCMKYNDELEKC EARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHS Q
配列番号 2 4 3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HSGSGTTCPPPVSI EHADI RVNRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

配列番号	アミノ酸配列
	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNT EETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 4 4	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 4 5	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 4 6	DYRDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSREGCASRCTRYNAELERC EARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVS Q
配列番号 2 4 7	DYRDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSREGCASRCTRYNAELERC

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

配列番号	アミノ酸配列
	EARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHS Q
配列番号 2 4 8	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSI EHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSRREGCASRCMRYNDELERC EARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHS Q
配列番号 2 4 9	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSL FLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRRLF VLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAK KDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH QLLPESSLRKRKR SRGGGSHGTVIESLES NNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDM KILQSQIISFYLRRLFVLKDNQAISNNISV IESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNN PQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKR SRGGGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVSSM SNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 5 0	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSL FLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRRLF VLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAK KDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH QLLPESSLRKRKR SRGGGSHGTVIESLES NNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDM KILQSQIISFYLRRLFVLKDNQAISNNISV IESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNN PQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKR SRGGGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSM SNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 5 1	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSL FLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRRLF VLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAK KDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

配列番号	アミノ酸配列
	QLLPESSSLRKRKRSRGGGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSREGCASRCMKYNDELEKCEARM MSMSENTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 25 2	DYKDEHHHHHHGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSREGCASRCTKYNAEL EKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDH CVSQ
配列番号 25 3	DYKDEHHHHHHGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSREGCASRCTKYNAEL EKCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDH CHSQ
配列番号 25 4	DYKDEHHHHHHGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLRRLFVCLKDNQAISNNIS VIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSSLRKR KRSRGGGSREGCASRCMKYNDEL

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

配列番号	アミノ酸配列
	EKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 255	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSHTVIESLES LN NYFNSSGIDVEERSL FLDIWRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLF VLRDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSRAR RDAFMSIARFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH QLLPES SLRRRRRSRGGGSHGTVIESLES NNYFNSSGIDVEERSLFLDIWRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLFVLRDNQAISNNISV IESHLITTTFFSNSRAR RDAFMSIARFEVNN PQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRRRRRS RGGGSREGCASRC TRYNAELERCEARVSSM SNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 256	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSHTVIESLES LN NYFNSSGIDVEERSL FLDIWRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLF VLRDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSRAR RDAFMSIARFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH QLLPES SLRRRRRSRGGGSHGTVIESLES NNYFNSSGIDVEERSLFLDIWRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLFVLRDNQAISNNISV IESHLITTTFFSNSRAR RDAFMSIARFEVNN PQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRRRRRS RGGGSREGCASRC TRYNAELERCEARVMSM SNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 257	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSHTVIESLES LN NYFNSSGIDVEERSL FLDIWRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLF VLRDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSRAR RDAFMSIARFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH QLLPES SLRRRRRSRGGGSHGTVIESLES NNYFNSSGIDVEERSLFLDIWRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLFVLRDNQAISNNISV IESHLITTTFFSNSRAR RDAFMSIARFEVNN PQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRRRRRS RGGGSREGCASRC MRYNDELERCEARMMSM SNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 258	DYRDEHHHHHHGSHGTVIESLES LN NYFN SGIDVEERSLFLDIWRNWQRDGD MR ILQSQ IISFYLRRLFVLRDNQAISNNISVIESHLI

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 0】

配列番号	アミノ酸配列
	TTFFSNSRARRDAFMSIARFEVNNPQVQRQ AFNELIRVVHQLLPESLRRRRRSRGGGSH GTVIESLES LN NYFNSSGIDVEERSLFLDI WRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLFVLRD NQAISNNISVIESHLITTTFFSNSRARRDAF MSIARFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLP ESSLRRRRRSRGGGSREGCASRCTRYNAEL ERCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDH CVSQ
配列番号 2 5 9	DYRDEHHHHHHGSHGTVIESLES LN NYFNSS SGIDVEERSLFLDIWRNWQRDGD MR ILQSQ IISFYLRRLFVLRDNQAISNNISVIESHLI TTFFSNSRARRDAFMSIARFEVNNPQVQRQ AFNELIRVVHQLLPESLRRRRRSRGGGSH GTVIESLES LN NYFNSSGIDVEERSLFLDI WRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLFVLRD NQAISNNISVIESHLITTTFFSNSRARRDAF MSIARFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLP ESSLRRRRRSRGGGSREGCASRCTRYNAEL ERCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDH CHSQ
配列番号 2 6 0	DYRDEHHHHHHGSHGTVIESLES LN NYFNSS SGIDVEERSLFLDIWRNWQRDGD MR ILQSQ IISFYLRRLFVLRDNQAISNNISVIESHLI TTFFSNSRARRDAFMSIARFEVNNPQVQRQ AFNELIRVVHQLLPESLRRRRRSRGGGSH GTVIESLES LN NYFNSSGIDVEERSLFLDI WRNWQRDGD MR ILQSQIISFYLRRLFVLRD NQAISNNISVIESHLITTTFFSNSRARRDAF MSIARFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLP ESSLRRRRRSRGGGSREGCASRCMRYNDEL ERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDH CHSQ
配列番号 2 6 1	METDTLLLVVLLLVPGSTGDYKDEHHHHH HSGGTTCP PPVSIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

配列番号	アミノ酸配列
	GSGGGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVSS MSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 6 2	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMS MSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 6 3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMS MSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 6 4	DYKDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGGSGREGCASRCTKYNAE LEKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVD HCVSQ
配列番号 2 6 5	DYKDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGGSGREGCASRCTKYNAE

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

配列番号	アミノ酸配列
	LEKCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLD HCHSQ
配列番号 2 6 6	DYKDEHHHHHHGSGTTCPPPVSI EHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGREGCASRCMKYNDE LEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLD HCHSQ
配列番号 2 6 7	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSGREGCASRCTRYNAELERCEARVSS MSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 6 8	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSGREGCASRCTRYNAELERCEARVMS MSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 6 9	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 3】

配列番号	アミノ酸配列
	GSGGGSREGCASRCMRYNDELERCEARMMS MSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 27 0	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGREGCASRCTRYNAE LERCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVD HCVSQ
配列番号 27 1	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGREGCASRCTRYNAE LERCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLD HCHSQ
配列番号 27 2	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGREGCASRCMRYNDE LERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLD HCHSQ
配列番号 27 3	METDTLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVAMNCFLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 4】

配列番号	アミノ酸配列
	GSGGGSGGGSGREGCASRCTKYNAELEKCEA RVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 7 4	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSGGGSGREGCASRCTKYNAELEKCEA RVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 7 5	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSGGGSGREGCASRCMKYNDELEKCEA RMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 7 6	DYKDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCI RDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGGGSGREGCASRCK YNAELEKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLL HCVDHCVSQ
配列番号 2 7 7	DYKDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCI RDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGGGSGREGCASRCK

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 5】

配列番号	アミノ酸配列
	YNAELEKCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLL HCLDHCHSQ
配列番号 2 7 8	DYKDEHHHHHHGSGTTCPPPVSI EHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSGGGSGGGSGGGSSREGCASRCMK YNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLL YCLDHCHSQ
配列番号 2 7 9	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSGGGSSREGCASRCTRYNAELERCEA RVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 8 0	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG GSGGGSGGGSSREGCASRCTRYNAELERCEA RVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 8 1	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 6】

配列番号	アミノ酸配列
	GSGGGSGGGGSREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 8 2	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLQLQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGGGSGGGSGGGGSREGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 2 8 3	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLQLQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGGGSGGGSGGGGSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 2 8 4	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLQLQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSGGGSGGGSGGGGSREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 2 8 5	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVAMNCFLLQLQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP

10

20

30

40

50

【表 6 - 17】

配列番号	アミノ酸配列
	RVPITQNREGCASRCTKYNAELEKCEARVS SMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 28 6	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RVPITQNREGCASRCTKYNAELEKCEARVM SMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 28 7	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RVPITQNREGCASRCMKYNDELEKCEARM SMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 28 8	DYKDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRVPITQNREGCASRCTKYNA ELEKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHC VDHCVSQ
配列番号 28 9	DYKDEHHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRVPITQNREGCASRCTKYNA

10

20

30

40

50

【表 6 - 18】

配列番号	アミノ酸配列
	ELEKCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCL DHCHSQ
配列番号 29 0	DYKDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRVPITQNREGCASRCMKYND ELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCL DHCHSQ
配列番号 29 1	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RVPITQNREGCASRCTRYNAELERCEARVS SMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 29 2	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RVPITQNREGCASRCTRYNAELERCEARVM SMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 29 3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP

10

20

30

40

50

【表 6 - 19】

配列番号	アミノ酸配列
	RVPITQNREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 29 4	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEPRVPITQNREGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQ
配列番号 29 5	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEPRVPITQNREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQ
配列番号 29 6	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEPRVPITQNREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ
配列番号 29 7	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQGGGGSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 0】

配列番号	アミノ酸配列
	MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 2 9 8	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCKYNAELEKCEAR VMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQQG GGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 2 9 9	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCMKYNDELEKCEAR MMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQQG GGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 3 0 0	DYKDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCKY NAELEKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLH CVDHCVSQGGGGSGTTCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTS
配列番号 3 0 1	DYKDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCKY NAELEKCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLH CLDHCHSQQGGGGSGTTCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 1】

配列番号	アミノ酸配列
	NKNVAESGCKECEEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTS
配列番号 30 2	DYKDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCMKY NDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLY CLDHCHSQGGGGSGTTCPPPVSIHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTS
配列番号 30 3	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCTRYNAELERCEAR VSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQQG GGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 30 4	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCTRYNAELERCEAR VMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQGG GGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 30 5	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCMRYNDELERCEAR MMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQGG GGSGTTCPPPVSIHADIRVRNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 2】

配列番号	アミノ酸配列
	MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTTFTEFLQSFIRIVQMFINITS
配列番号 30 6	DYRDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTRY NAELERCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLH CVDHCVSQGGGGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTTFTEFLQSFIRI VQMFINITS
配列番号 30 7	DYRDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTRY NAELERCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLH CLDHCHSQGGGGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTTFTEFLQSFIRI VQMFINITS
配列番号 30 8	DYRDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCMRY NDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLY CLDHCHSQGGGGSGTTCPPPVSIHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTTFTEFLQSFIRI VQMFINITS
配列番号 30 9	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HSGTTCPPPVSIHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCIDRPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCCKVTAMNCFLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFINITSEP RIPKPSTPPGSSREGCASRCKYNAELEKC

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 3】

配列番号	アミノ酸配列
	EARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVS Q
配列番号 3 1 0	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HSGGTTCCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RIPKPSTPPGSSREGCASRCTKYNAELEKC EARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHS Q
配列番号 3 1 1	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HSGGTTCCPPPVSVIEHADIRVKNYSVNSRER YVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHW TTPSLKCI RDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCK ECEELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RIPKPSTPPGSSREGCASRCMKYNDELEKC EARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHS Q
配列番号 3 1 2	DYKDEHHHHHHHSGGTTCCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCI RDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRIPKPSTPPGSSREGCASRC TKYNAELEKCEARVSSMSNTEETCVQELFD LLHCVDHCVSQ
配列番号 3 1 3	DYKDEHHHHHHHSGGTTCCPPPVSVIEHADIRV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTTPSLKCI RDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 4】

配列番号	アミノ酸配列
	VQMFINTSEPRIPKPSTPPGSSREGCASRC TKYNAELEKCEARVMSMSNTEEDCEQELED LLHCLDHCHSQ
配列番号 3 1 4	DYKDEHHHHHHGSGTTCPPPVSI EHADI RV KNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECV INKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLEKIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLL LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NKNVAESGCKECEELEEKTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRIPKPSTPPGSSREGCASRC MKYNDELEKCEARMMSMSNTEEDCEQELED LLYCLDHCHSQ
配列番号 3 1 5	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADI RVNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RIPRPSTPPGSSREGCASRC TRYNAELERC EARVSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVS Q
配列番号 3 1 6	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADI RVNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RIPRPSTPPGSSREGCASRC TRYNAELERC EARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHS Q
配列番号 3 1 7	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYRDEHHHHH HGSGTTCPPPVSI EHADI RVNYSVNSRER YVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNTNVAHW TTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHIDTTLY TDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVILHEYSN

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 5】

配列番号	アミノ酸配列
	MTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVAESGCR ECEELEERTTFTEFLQSFIRIVQMFINTSEP RIPRPSTPPGSSREGCASRCMRYNDELERC EARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHS Q
配列番号 3 1 8	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRIIPRPSTPPGSSREGCASRC TRYNAELERCEARVSSMSNTEETCVQELFD LLHCVDHCVSQ
配列番号 3 1 9	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRIIPRPSTPPGSSREGCASRC TRYNAELERCEARVMSMSNTEEDCEQELED LLHCLDHCHSQ
配列番号 3 2 0	DYRDEHHHHHHGSGTTCPPPVSVIEHADIRV RNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECV INRNTNVAHWTTTPSLRCIRDPSLAGGGGSG GGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLI QSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLE LQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSS NRNVAESGCRECEELEERTTFTEFLQSFIRI VQMFINTSEPRIIPRPSTPPGSSREGCASRC MRYNDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELED LLYCLDHCHSQ
配列番号 3 2 1	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCTKYNAELEKCEAR VSSMSNTEETCVQELFDLLHCVDHCVSQGG GGSGGGGSGTTCPPPVSVIEHADIRVKNYSV NSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNT NVAHWTTTPSLKCIDRPSLAGGGGSGGGGSG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 6】

配列番号	アミノ酸配列
	GGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHI DTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVIL HEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVA ESGCKECEEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 3 2 2	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCTKYNAELEKCEAR VMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCHSQGG GGSGGGGSGTTCP PPVSIEHADIRVKNYSV NSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNT NVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHI DTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVIL HEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVA ESGCKECEEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 3 2 3	METDTLLLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HENLYFQGSREGCASRCMKYNDELEKCEAR MMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCHSQGG GGSGGGGSGTTCP PPVSIEHADIRVKNYSV NSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNT NVAHWTTPSLKCIRDPSLAGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSNWIDVRYDLEKIESLIQSIHI DTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLLLELQVIL HEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVA ESGCKECEEELEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 3 2 4	DYKDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTKY NAELEKCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLH CVDHCVSQGGGGSGGGGSGTTCP PPVSIEH ADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTST LIECVINKNTNVAHWTTPSLKCIRDPSLAG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWIDVRYDLEK IESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMN CFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLAN STLSSNKNVAESGCKECEEELEKTFTEFLQ SFIRIVQMFINTS
配列番号 3 2 5	DYKDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTKY NAELEKCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLH CLDHCHSQGGGGSGGGGSGTTCP PPVSIEH ADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTST

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 7】

配列番号	アミノ酸配列
	L I E C V I N K N T N V A H W T T P S L K C I R D P S L A G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S N W I D V R Y D L E K I E S L I Q S I H I D T T L Y T D S D F H P S C K V T A M N C F L L E L Q V I L H E Y S N M T L N E T V R N V L Y L A N S T L S S N K N V A E S G C K E C E E L E E K T F T E F L Q S F I R I V Q M F I N T S
配列番号 3 2 6	D Y K D E H H H H H H E N L Y F Q G S R E G C A S R C M K Y N D E L E K C E A R M M S M S N T E E D C E Q E L E D L L Y C L D H C H S Q G G G G S G G G G S G T T C P P P V S I E H A D I R V K N Y S V N S R E R Y V C N S G F K R K A G T S T L I E C V I N K N T N V A H W T T P S L K C I R D P S L A G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S N W I D V R Y D L E K I E S L I Q S I H I D T T L Y T D S D F H P S C K V T A M N C F L L E L Q V I L H E Y S N M T L N E T V R N V L Y L A N S T L S S N K N V A E S G C K E C E E L E E K T F T E F L Q S F I R I V Q M F I N T S
配列番号 3 2 7	M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D Y R D E H H H H H H E N L Y F Q G S R E G C A S R C T R Y N A E L E R C E A R V S S M S N T E E T C V Q E L F D L L H C V D H C V S Q G G G G S G G G G S G T T C P P P V S I E H A D I R V R N Y S V N S R E R Y V C N S G F R R R A G T S T L I E C V I N R N T N V A H W T T P S L R C I R D P S L A G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S N W I D V R Y D L E R I E S L I Q S I H I D T T L Y T D S D F H P S C R V T A M N C F L L E L Q V I L H E Y S N M T L N E T V R N V L Y L A N S T L S S N R N V A E S G C R E C E E L E E R T F T E F L Q S F I R I V Q M F I N T S
配列番号 3 2 8	M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D Y R D E H H H H H H E N L Y F Q G S R E G C A S R C T R Y N A E L E R C E A R V M S M S N T E E D C E Q E L E D L L H C L D H C H S Q G G G G S G G G G S G T T C P P P V S I E H A D I R V R N Y S V N S R E R Y V C N S G F R R R A G T S T L I E C V I N R N T N V A H W T T P S L R C I R D P S L A G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S N W I D V R Y D L E R I E S L I Q S I H I D T T L Y T D S D F H P S C R V T A M N C F L L E L Q V I L H E Y S N M T L N E T V R N V L Y L A N S T L S S N R N V A E S G C R E C E E L E E R T F T E F L Q S F I R I V Q M F I N T S
配列番号 3 2 9	M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D Y R D E H H H H H H E N L Y F Q G S R E G C A S R C M R Y N D E L E R C E A R M M S M S N T E E D C E Q E L E D L L Y C L D H C H S Q G G

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 8】

配列番号	アミノ酸配列
	GGSGGGGSGTTCPPPVSVSIEHADIRVRNYSV NSRERYVCNSGFRRRAGTSTLIECVINRNT NVAHWTTPSLRCIRDPSLAGGGGSGGGGSG GGGSGGGGGSNWIDVRYDLERIESLIQSIHI DTTLYTDSDFHPSCRVTAMNCFLLLELQVIL HEYSNMTLNETVRNVLYLANSTLSSNRNVA ESGCRECEELEERTFTEFLQSFIRIVQMFINTS
配列番号 330	DYRDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTRY NAELERCEARVSSMSNTEETCVQELFDLLH CVDHCVSQGGGGSGGGGSGTTCPPPVSVSIEH ADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTST LIECVINRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAG GGGSGGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLER IESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMN CFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLAN STLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQ SFIRIVQMFINTS
配列番号 331	DYRDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCTRY NAELERCEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLH CLDHCHSQGGGGSGGGGSGTTCPPPVSVSIEH ADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTST LIECVINRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAG GGGSGGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLER IESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMN CFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLAN STLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQ SFIRIVQMFINTS
配列番号 332	DYRDEHHHHHHHENLYFQGSREGCASRCMRY NDELERCEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLY CLDHCHSQGGGGSGGGGSGTTCPPPVSVSIEH ADIRVRNYSVNSRERYVCNSGFRRRAGTST LIECVINRNTNVAHWTTPSLRCIRDPSLAG GGGSGGGGSGGGGSGGGGGSNWIDVRYDLER IESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCRVTAMN CFLLLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYLAN STLSSNRNVAESGCRECEELEERTFTEFLQ SFIRIVQMFINTS
配列番号 33	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVSSMSNT EETCVQELFDLLHCVDHCVSQGSSELYENK PRRPYIL

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 9】

配列番号	アミノ酸配列
配列番号 3 4	GSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQGSSELYENK PRRPYIL
配列番号 3 5	GSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQGSSELYENK PRRPYIL
配列番号 6 8	REGCASRCTKYNAELEKCEARVSSMSNTEE TCVQELFDLLHCVDHCVSQGSSELYENKPR RPYIL
配列番号 6 9	REGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQGSSELYENKPR RPYIL
配列番号 7 0	REGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQGSSELYENKPR RPYIL
配列番号 1 6 8	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNT EETCVQELFDLLHCVDHCVSQGSSELYENR PRRPYIL
配列番号 1 6 9	GSREGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNT EEDCEQELEDLLHCLDHCHSQGSSELYENR PRRPYIL
配列番号 1 7 0	GSREGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNT EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQGSSELYENR PRRPYIL
配列番号 2 0 3	REGCASRCTRYNAELERCEARVSSMSNTEE TCVQELFDLLHCVDHCVSQGSSELYENRPR RPYIL
配列番号 2 0 4	REGCASRCTRYNAELERCEARVMSMSNTEE DCEQELEDLLHCLDHCHSQGSSELYENRPR RPYIL
配列番号 2 0 5	REGCASRCMRYNDELERCEARMMSMSNTEE DCEQELEDLLYCLDHCHSQGSSELYENRPR RPYIL
配列番号 3 5 9	METDTLLWVLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGGSQDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQ FQGKQYVVGLAGNAIILREDKDPQKMYATIY ELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPG SQPGEFTLGNIKSYPGLTSYLVRVSTNYN QHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRTKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCI DGGGSENLYFQGSREGCASRCTKYNAELEK

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 0】

配列番号	アミノ酸配列
	CEARVSSMSNTEETCVQE LFDLLHCVDHCV SQGSSELYENKPRRPYIL
配列番号 3 6 0	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGGSQDSTSDLI PAPPLSKVPLQQNFQDNQ FQGKWYVVGLAGNAI LREDKDPQKMYATIY ELKEDKSYNVT SVLFRKKKCDYWIRTFVPG SQPGEFTLGNIKSYPGLT SYLVRRVVSTNYN QHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRTKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCI DGGGSENLYFQGSREGCASRCTKYNAELEK CEARVMSMSNTEEDCEQELEDLLHCLDHCH SQGSSELYENKPRRPYIL
配列番号 3 6 1	METDTLLLLWVLLLLWVPGSTGDYKDEHHHHH HGGSQDSTSDLI PAPPLSKVPLQQNFQDNQ FQGKWYVVGLAGNAI LREDKDPQKMYATIY ELKEDKSYNVT SVLFRKKKCDYWIRTFVPG SQPGEFTLGNIKSYPGLT SYLVRRVVSTNYN QHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRTKELTS ELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCI DGGGSENLYFQGSREGCASRCMKYNDELEK CEARMMSMSNTEEDCEQELEDLLYCLDHCH SQGSSELYENKPRRPYIL

10

20

【0 3 1 0】

例示的なペプチドーニューロテンシンコンストラクトは、配列番号 3 3～配列番号 3 5、配列番号 6 8～配列番号 7 0、配列番号 1 6 8～配列番号 1 7 0、配列番号 2 0 3～配列番号 2 0 5、及び配列番号 3 5 9～配列番号 3 6 1 に示される。配列番号 1～配列番号 3 2、配列番号 3 6～配列番号 6 7、配列番号 1 3 6～配列番号 1 6 7、配列番号 1 7 1～配列番号 2 0 2、及び配列番号 3 5 6～配列番号 3 5 8 のペプチドは、ニューロテンシンに更に融合され得る。当該ペプチドまたはペプチドーNT融合体のそれぞれは、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 2（または配列番号 3 6、配列番号 3 7、もしくはN末端GSのない配列番号 6 7）のペプチドを含み得、そのそれぞれは、タンパク質の発現、分泌、及び／または精製を改善するために、遺伝子融合発現タグのシデロカリンなどの発現タグまたは配列を更に含み得る。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、EGFRvIII阻害薬、Copiktra（デュベリシブ）、Erleada（アパルタミド）、Libtayo（セミプリマブーrwlc）、Lorbrena（ロルラチニブ）、Lumoxiti（モキセツモマブパスードトクスーtdf）、Lutathera（ルテチウムLu177ドータテート）、Talzena（タラゾパリブ）、Vizimpro（ダコミチニブ）、Aliqopa（コパンリシブ）、Alunbrig（ブリガチニブ）、Bavencio（アベルマブ）、Besponsa（イノツズマブオゾガマイシン）、Calquence（アカラブルチニブ）、IDHIFA（エナシデニブ）、Imfinzi（デュルバルマブ）、Kisqali（リボシクリブ）、Kymriah（チサゲンレクルユーセル）、Nerlynx（ネラチニブ）、Rydapt（ミドスタウリン）、Vyxeos（ダウノルビシン及びシタラビン）、Xermelo（テロトリスタットエチル）、Yescarta（アキシカブタゲンシロルユー

30

40

50

セル)、Ze j u l a (ニラバリブ)、C a b o m e t y x (カボザンチニブ)、K e y
 t r u d a (ペンブロリズマブ)、L a r t r u v o (オララツマブ)、L e n v i m a
 (レンバチニブ)、O p d i v o (ニボルマブ)、R u b r a c a (ルカパリブ)、S u
 s t o l (グラニセトロン)、S y n d r o s (ドロナビノール経口溶液)、T e c e n
 t r i q (アテゾリズマブ)、V e n c l e x t a (ベネトクラクス)、A l e c e n s
 a (アレクチニブ)、C o t e l l i c (コビメチニブ)、D a r z a l e x (ダラツム
 マブ)、E m p l i c i t i (エロツズマブ)、F a r y d a k (パノビノスタット)、
 I b r a n c e (パルボシクリブ)、I m l y g i c (タリモジンラヘルパレブベク)、
 L e n v i m a (レンバチニブ)、L o n s u r f (トリフルリジン及びチピラシル)、
 N i n l a r o (イキサゾミブ)、O d o m z o (ソニデジブ)、O n i v y d e (イリ
 ノテカンリボソーム注射)、P o r t r a z z a (ネシツムマブ)、T a g r i s s o (オ
 シメルチニブ)、U n i t u x i n (ジヌツキシマブ)、V a r u b i (ロラピタント
)、V i s t o g a r d (ウリジントリアセテート)、Y o n d e l i s (トラベクテジ
 ン)、A k y n z e o (ネツピタント及びパロノセトロン)、B e l e o d a q (ベリノ
 スタット)、B l i n c y t o (ブリナツモマブ)、C y r a m z a (ラムシルマブ)、
 I m b r u v i c a (イブルチニブ)、L y n p a r z a (オラパリブ)、Z y d e l i
 g (イデラリシブ)、Z y k a d i a (セリチニブ)、G a z y v a (オビヌツズマブ)
 、G i l o t r i f (アフアチニブ)、I m b r u v i c a (イブルチニブ)、K a d c
 y l a (a d o -トラスツズマブエムタンシン)、M e k i n i s t (トラメチニブ)、
 P o m a l y s t (ポマリドミド)、R e v l i m i d (レナリドミド)、S t i v a r
 g a (レゴラフェニブ)、T a f i n l a r (ダブラフェニブ)、V a l c h l o r (メ
 クロレタミン)ゲル、X g e v a (デノスマブ)、X o f i g o (ラジウムRa223二
 塩化物)、A b r a x a n e (懸濁注射用パクリタキセルタンパク質結合粒子)、A f i
 n i t o r (エベロリムス)、A f i n i t o r (エベロリムス)、B o s u l i f (ボ
 スチニブ)、C o m e t r i q (カボザンチニブ)、E r i v e d g e (ビスモデギブ)
 、I c l u s i g (ポナチニブ)、I n l y t a (アキシチニブ)、K y p r o l i s (カ
 ルフィルゾミブ)、M a r q i b o (ピンクリスチン硫酸塩リボソーム注射)、N e u
 t r o v a l (t b o -フィルグラスチム)、P e r j e t a (ペルツズマブ)、P i c
 a t o (インゲノールメブタート)ゲル、S t i v a r g a (レゴラフェニブ)、S u b
 s y s (フェンタニル舌下スプレー)、S y n r i b o (オマセタキシムメベスクシナート)
 、V o t r i e n t (パゾパニブ)、X t a n d i (エンザルタミド)、Z a l t r
 a p (z i v -アフリベルセプト)、A b s t r a l (フェンタニル舌下錠剤)、A d c
 e t r i s (ブレンツキシマブベドチン)、A f i n i t o r (エベロリムス)、E r w
 i n a z e (アスパラギナーゼエルウィニアクリサンチミー)、L a z a n d a (フェン
 タニルクエン酸塩)鼻スプレー、S u t e n t (スニチニブリンゴ酸塩)、S y l a t r
 o n (ペグインターフェロンアルファ-2b)、V a n d e t a n i b (バンデタニブ)
 、X a l k o r i (クリゾチニブ)、Y e r v o y (イピリムマブ)、Z e l b o r a f
 (ベムラフェニブ)、Z y t i g a (アビラテロン酢酸エステル)、H a l a v e n (エ
 リ布林メシル酸塩)、H e r c e p t i n (トラスツズマブ)、J e v t a n a (カバ
 ジタキセル)、P r o v e n g e (シプリューセル-T)、X g e v a (デノスマブ)、
 Z u p l e n z (オンダンセトロン経口可溶性フィルム)、A f i n i t o r (エベロリ
 ムス)、A r z e r r a (オフアツムマブ)、A v a s t i n (ベバシズマブ)、C e r
 v a r i x [二価ヒトパピローマウイルス(16及び18型)ワクチン、組換え、E l i
 t e k (ラスブリカーゼ)、F o l o t y n (プララトレキセート注射)、I s t o d a
 x (ロミデプシン)、O n s o l i s (フェンタニルバツカル錠)、V o t r i e n t (パ
 ザパニブ)、D e g a r e l i x (注射用デガレリクス)、F u s i l e v (レボロイ
 コボリン); M o z o b i l (プレリキサフォル注射)、S a n c u s o (グラニセトロン)、
 T r e a n d a (ベンダムスチン塩酸塩)、E v i s t a (ラロキシフェン塩酸塩)
)、H y c a m t i n (トポテカン塩酸塩)、I x e m p r a (イクサベピロン)、T a
 s i g n a (ニロチニブ塩酸塩一水和物)、T o r i s e l (テムシロリムス)、T y k

10

20

30

40

50

erb (ラパチニブ)、Gardasil (四価ヒトパピローマウイルス (6、11、16、18型) 組換えワクチン)、Sprycel (ダサチニブ)、Sutent (スニチニブ)、Vectibix (パニツムマブ)、Arranon (ネララビン)、Nexavar (ソラフェニブ)、Alimta (注射用ペメトレキセド)、Avastin (ベバシズマブ); Clolar (クロファラビン)、Erbix (セツキシマブ)、Sensipar (シナカルセト)、Tarceva (エルロチニブ、OSI774)、Aloxix (パロノセトロン)、Emend (アプレピタント)、Iressa (ゲフィチニブ); Plenaxis (懸濁注射用アバレリクス); Premarin (結合型エストロゲン); UroXatral (アルフゾシンHCL徐放性錠剤); Velcade (ボルテゾミブ); Eligard (リユープロレリン酢酸塩); Eloxatin (オキサリプラチン/5-フルオロウラシル/ロイコボリン); Faslodex (フルベストラント); Gleevec (イマチニブメシル酸塩); Neulasta; SecreFlo (セクレチン); Zevalin (イブリツモマブチウキセタン); Zometa (ゾレドロン酸); Campath; Femara (レトロゾール); Gleevec (イマチニブメシル酸塩); Kytril (グラニセトロン) 溶液; Trelstar LA (トリプトレリンパモエート); Xeloda; Zometa (ゾレドロン酸); Mylotarg (ゲムツズマブオゾガマイシン); Trelstar Depot (トリプトレリンパモエート); Trisenox (三酸化ヒ素); Viadur (リユープロレリン酢酸塩埋め込み製剤); Aromasin 錠剤; Busulflex; Doxil (ドキシソルビシンHCLリポソーム注射); Ellence; Ethyol (アミホスチン); Temodar; UVADEX 無菌液; Zofran; Actiq; Anzemet; Camptosar; Gemzar (ゲムシタビンHCL); Herceptin; Inform HER-2/neu 乳癌検査; Neupogen; Nolvadex; Photofrin; Proleukin; Sclerosol Intrapleural Aerosol; Valstar; Xeloda; Zofran; Anzemet; Bromfenac; Femara (レトロゾール); Gliadel Wafer (カルムスチン含有ポリフェプロサン20埋め込み剤); IntronA (インターフェロンアルファ-2b、組換え); Kytril (グラニセトロン) 錠剤; Lupron Depot (デポ懸濁液用リユープロレリン酢酸塩); Miraluma 検査; Neumega; Quadramet (サマリウムSm153レキシドロナム注射); Rituxan; Taxol; Anexsia; Aredia (注射用パミドロン酸二ナトリウム); Arimidex (アナストロゾール); Campostar; Elliotts B 溶液 (緩衝髄腔内電解質/デキストロース注射); Eulexin (フルタミド); Gemzar (ゲムシタビンHCL); Hycamtin (トポテカン塩酸塩); Kadian; Leukine (サルグラモスチム); Lupron Depot (デポ懸濁液用リユープロレリン酢酸塩); 光線力学的療法; Taxotere (ドセタキセル); Visipaque (イオジキサノール); Ethyol (アミホスチン); IntronA (インターフェロンアルファ-2b、組換え)、及び Leukine (サルグラモスチム) を含み得る抗がん薬物にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、アベマシクリブ、アカラブルチニブ、アファチニブ、アレクチニブ、アキシチニブ、バリシチニブ、ビニメチニブ、ボスチニブ、ブリガチニブ、カボザンチニブ、セリチニブ、コビメチニブ、クリゾチニブ、ダブラフェニブ、ダコミチニブ、ダサチニブ、エンコラフェニブ、エルロチニブ、エベロリムス、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イブルチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンバチニブ、ロルラチニブ、ミドスタウリン、ネラチニブ、ニロチニブ、ニンテダニブ、オシメルチニブ、パルボシクリブ、パゾパニブ、ポナチニブ、レゴラフェニブ、リボシクリブ、ルキソリチニブ、シロリムス、ソラフェニブ、スニチニブ、テムシロリムス、トファシチニブ、トラメチニブ、バンデタニブ、ベムラフェニブ、IL15、融合されたIL15/IL15Ra、IFNガンマ、及び抗CD3薬剤、またはそのフラグメント (複数可) にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。

10

20

30

40

50

【0311】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるTfR結合ペプチドは、中枢神経系の感染症を含む感染症を治療及び／または予防するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、抗感染薬にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。抗感染薬は、抗生物質、抗ウイルス剤、及び抗真菌剤を含み得る。使用することができる抗感染薬としては、アルテミシニン、Aemcolo（リファマイシン）、Biktarvy（ビクテグラビル／エムトリシタビン／テノホビルアラフェナミド）、Nuzyra（オマダサイクリン）、Trogarzo（イバリズマブ-uiky）、Xofluz（バロキサビルマルボキシール）、Baxdela（デラフロキサシン）錠剤及び注射、Benznidazole、Giapreza（アングオテンシンII）、Hepilisav-B [B型肝炎ワクチン（組換え）、アジュバント化]、Juluca（ドルテグラビル及びリルピビル）、KedRab [狂犬病免疫グロブリン（ヒト）]、Mavyret（グレカプレビル及びビブレンタスビル）、Prevymis（レテルモビル）、Shingrix（組換え帯状疱疹ワクチン、アジュバント化）、Solosec（セクニダゾール）、Vabomere（メロペネム及びバボルバクタム）、Xepi（オゼノキサシン）、Anthim（オビルトキサキシマブ）、Descovy（エムトリシタビン及びテノホビルアラフェナミド）、Epclusa（ソホスブビル及びベルパタスビル）、Odefsey（エムトリシタビン、リルピビル、及びテノホビルアラフェナミド）、Vaxchora（コレラワクチン、生ワクチン、経口）、Vemlidy（テノホビルアラフェナミド）、Zepatier（エルバスビル及びグラソプレビル）、Zinplava（ベズロトクスマブ）、Avycaz（セフトジジム-アピバクタム）、Bexsero（B群髄膜炎菌ワクチン）、Cresemba（イサブコナゾニウム硫酸塩）、Daklinza（ダクラタスビル）、Evotaz（アタザナビル及びコビシスタット）、Fluad（三価インフルエンザワクチン）、Genvoya（エルビテグラビル、コビシスタット、エムトリシタビン、及びテノホビルアラフェナミド）、Prezcobix（ダルナビル及びコビシスタット）、Technivie、（オムビタスビル、パリタプレビル及びリトナビル）、Dalvance（ダルババンシン）、Harvoni（レジパスビル及びソホスブビル）、Impavido（ミルテホシン）、Kerydin（タバポロール）、Orbactiv（オリタババンシン）、Rapivab（ペラミビル注射）、Sivextro（トレゾリドリン酸エステル）、Triumeq（アバカビル、ドルテグラビル、及びラミブジン）、Zerbaxa（セフトロザン+タゾバクタム）、Flublok（季節性インフルエンザワクチン）、Luzu（ルリコナゾール）クリーム1%、Olysio（シメプレビル）、Sitavig（アシクロビル）バツカル錠、Sovaldi（ソホスブビル）、VarizIG、水痘帯状疱疹免疫グロブリン（ヒト）、Abthrax（ラキシバクマブ）、Afinitor（エベロリムス）、Cystaran（システアミン塩酸塩）、Dymista（塩酸アゼラスチン及びプロピオン酸フルチカゾン）、Fluclervax、インフルエンザウイルスワクチン、Jetrea（オクリプラスミン）、Linzess（リナクロチド）、Mytesi（クロフェレマー）、Sirturo（ベダキリン）、Sklice（イベルメクチン）ローション剤、Stribild（エルビテグラビル、コビシスタット、エムトリシタビン、テノホビルジソプロキシシルフマル酸塩）、Tudorza Pressair（アクリジニウム臭化物吸入粉末剤）、Afinitor（エベロリムス）、Complera（エムトリシタビン／リルピビル／テノホビルジソプロキシシルフマル酸塩）、Difficid（フィダキソマイシン）、Edurant（リルピビル）、Eylea（アフリベルセプト）、Firazyr（イカチバント）、Gralise（ガバペンチン）、Incivek（テラプレビル）、Victrelis（ボセプレビル）、Egrifta（注射用テサモレリン）、Menveo（髄膜炎ワクチン）、Zymaxid（ガチフロキサシン点眼液）、Afinitor（エベロリムス）、Bepreve（ベポタスチンベシル酸塩点眼液）、Hiberix（ヘモフィルス属b型結合型ワクチン、破傷風菌毒素結合体）、Vibativ（テラバンシン）、Aptivus（チ

10

20

30

40

50

プラナビル)、Astepro (アゼラスチン塩酸塩鼻スプレー)、Intelence (エトラビル)、Patanase (オロパタジン塩酸塩)、Viread (テノホビルジソプロキシルフマル酸塩)、Isentress (ラルテグラビル)、Selzentry (マラビロク)、Veramyst (フルチカゾンフランカルボン酸エステル)、Xyzal (レボセチリジン塩酸塩)、Eraxis (アニデュラファンギン)、Noxafil (ボサコナゾール)、Prezista (ダルナビル)、Tyzeka (テルビブジン)、Veregen (クネカテキン)、Aptivus (チプラナビル)、Baraclude (エンテカビル)、FluMist (インフルエンザウイルスワクチン)、Fuzeon (エンフビルチド)、Lexiva (ホスアンプレナビル)、Reyataz (アタザナビル硫酸塩)、Botox Cosmetic (ボツリヌス毒素A型)、Claritinex、Hepsera (アデホビルジピボキシル)、Pediarix ワクチン、Pegasys (ペグインターフェロンアルファ-2a)、Sustiva、Vfend (ポリコナゾール)、Peg-Intron (ペグインターフェロンアルファ-2b)、Rebetol (リバビル)、Spectracef、Tavist (フマル酸クレマスチン)、Twinrix、Valcyte (バルガンシクロビルHCl)、Viread (テノホビルジソプロキシルフマル酸塩)、Xigris (ドロトレコギンアルファ [活性化])、ABREVA (ドコサノール)、セファゾリン及びデキストロースUSP、子ども用 Motrin Cold、REBETRON (商標) 併用療法、Synagis、Viropitic、Aldara (イミキモド)、Ceftin (セフロキシムアキセチル)、Combivir、Famvir (ファムシクロビル)、Floxin otic、Fortovase、INFERGEN (インターフェロンアルファコン-1)、IntronA (インターフェロンアルファ-2b、組換え)、Taxol、Time ntin、Trovan、VIRACEPT (ネルフィナビルメシル酸塩)、Zerit (スタブジン)、AK-Con-A (ナファゾリン点眼液)、Allegra (フェキソフェナジン塩酸塩)、Atrovent (臭化イプラトロピウム)、Augmentin (アモキシシリン/クラブラン酸塩)、Crixivan (インジナビル硫酸塩)、Elmiron (ペントサン多硫酸ナトリウム)、Havrix、IvyBlock、Leukine (サルグラモスチム)、Merrem I. V. (メロペネム)、Tavist (クレマスチンフマル酸塩)、Videx (ジダノシン)、Viramune (ネビラピン)、Zithromax (アジスロマイシン)、Cedax (セフチブテン)、Clarithromycin (Biaxin)、Epivir (ラミブジン)、Invirase (サキナビル)、Valtrex (バラシクロビルHCl)、Zerit (スタブジン)、Zyrtec (セチリジンHCl)、またはその機能性フラグメントが挙げられる。

【0312】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される TfR 結合ペプチドは、中枢神経系及び消化 (GI) 管の炎症を含む炎症を治療及び/または予防するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本開示の TfR 結合ペプチドは、抗炎症薬にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。抗炎症薬は、ステロイド性及び非ステロイド性抗炎症薬を含み得る。非ステロイド性抗炎症薬としては、アスピリン、セレコキシブ、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ケトロラク、ナブメトン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピロキシカム、サルサレート、スリンダク、トルメチン、ピロキシカム、フルルビプロフェン、及びフェノプロフェンを挙げることができる。本明細書で開示される方法及び組成物と組み合わせ使用することができる抗炎症薬としては、コルチコステロイド及びアミノサリチル酸、例えば、限定するものではないが、メサラミン、バルサラジド、及びオルサラジンを挙げることができる。様々な場合において、抗炎症薬としては、インフリキシマブ、アダリムマブ、及びゴリムマブなどの腫瘍壊死因子 (TNF) - アルファ阻害薬、ならびにナタリズマブ、ベドリズマブ、及びウステキヌマブを含む他の生物学的標的を標的とする生物学的薬物 (例えば、抗体、フラグメントまたはその誘導体) が挙げられる。

【0313】

いくつかの態様において、本明細書に記載される活性薬剤にコンジュゲート、連結、または融合されたペプチドは、抗体－薬物コンジュゲート（例えば、A d c e t r i s、K a d c y l a、M y l o t a r g）またはトランスフェリンと比較してサイズが小さいことから、固形腫瘍またはC N Sへの良好な透過を示し得る。ある特定の態様において、本明細書に記載される活性薬剤にコンジュゲート、連結、または融合されたペプチドは、抗体－薬物コンジュゲートと比較して異なる用量またはより高用量の活性薬剤を運ぶことができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される活性薬剤にコンジュゲート、連結、または融合された記載のペプチドは、抗体－薬物コンジュゲートと比較してより高用量の活性薬剤を骨格筋組織に送達することができる。したがって、本開示のペプチドを使用した筋ジストロフィー、S B M A、または筋肉由来肉腫の治療は、特に興味深いものであり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載されるT f R結合ペプチドは、抗体または抗体－薬物コンジュゲートと比較して大幅に短い血漿半減期を示すことができることから、より迅速な末梢クリアランスが可能となり得る（例えば、放射性標識コンジュゲートが使用される場合、器官放射線量が大幅に低下するため利点であり得る）。更に他の態様において、本明細書に記載される活性薬剤にコンジュゲート、連結、または融合されたペプチドは、抗体－薬物コンジュゲートと比較して、規定された薬物比のより良好な部位特異的送達を有し得る。他の態様において、ペプチドは、有機溶媒中（水に加えて）で溶媒和になりやすい傾向があり得、これにより、薬物（多くの場合、水への可溶性が低い）の溶媒和及びコンジュゲーションの合成経路がより多くなり、コンジュゲーション収率がより高くなり、ペプチドにコンジュゲート、連結、もしくは融合された薬物の比率がより高くなり（抗体に対して）、及び／またはコンジュゲーション中の凝集／高分子量種の形成が低減し得る。更に、短い配列に存在しない残基を介して、または非天然アミノ酸の含有を介して、ユニークなアミノ酸残基（複数可）をペプチドに導入することで、ペプチドへの部位特異的コンジュゲーションが可能となり得る。

【0314】

本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトはまた、組織または体液からペプチドを回収するための親和性ハンドル（例えば、ビオチン）を提供することなどの他の役割を果たし得る他の部分にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。例えば、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、ビオチンにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。半減期の延長に加えて、ビオチンはまた、組織または他の位置からペプチドまたはペプチドコンストラクトを回収するための親和性ハンドルとして作用し得る。いくつかの実施形態において、検出可能な標識及び親和性ハンドルの両方として作用し得る蛍光ビオチンコンジュゲートを使用することができる。市販の蛍光ビオチンコンジュゲートの非限定的な例としては、A t t o 425－ビオチン、A t t o 488－ビオチン、A t t o 520－ビオチン、A t t o 550－ビオチン、A t t o 565－ビオチン、A t t o 590－ビオチン、A t t o 610－ビオチン、A t t o 620－ビオチン、A t t o 655－ビオチン、A t t o 680－ビオチン、A t t o 700－ビオチン、A t t o 725－ビオチン、A t t o 740－ビオチン、フルオレセインビオチン、ビオチン－4－フルオレセイン、ビオチン－（5－フルオレセイン）コンジュゲート、及びビオチン－B－フィコエリトリン、A l e x a f l u o r 488ビオシチン、A l e x a f l u o r 546、A l e x a F l u o r 549、ルシファーイエローカダベリンビオチン－X、ルシファーイエロービオシチン、オレゴングリーン488ビオシチン、ビオチン－ローダミン及びテトラメチルローダミンビオシチンを挙げることができる。いくつかの他の例において、コンジュゲートとしては、化学発光化合物、コロイド金属、発光化合物、酵素、放射性同位体、及び常磁性標識を挙げることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドはまた、別の分子に結合され得る。例えば、ペプチド配列はまた、別の活性薬剤（例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、アプタマー、サイトカイン、成長因子、神経伝達物質、前述の薬剤のいずれかの活性フラグメントもしくは修飾体、フルオロフォア、放射性同位体、放射性核種キレート剤、アシル付加物、化学リンカー、ま

10

20

30

40

50

たは糖)に結合され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合されるか、または共有結合的もしくは非共有結合的に連結され得る。

【0315】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトはまた、他の親和性ハンドルにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。他の親和性ハンドルは、遺伝子融合親和性ハンドルを含み得る。遺伝子融合親和性ハンドルは、6xHis(HHHHHH(配列番号345);固定化金属アフィニティーカラム精製が可能)、FLAG(DYKDDDDK(配列番号346);抗FLAG免疫沈降)、

「短い」FLAG(DYKDE(配列番号347);抗FLAG免疫沈降)、ヘマグルチニン(YPYDVPDYA(配列番号348);抗HA免疫沈降)、及びストレプトアビジン結合ペプチド(DVEAWLGAR(配列番号349);ストレプトアビジン媒介性沈殿)を含み得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトはまた、タンパク質発現及び/または精製を改善する発現タグまたは配列にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。そのような発現タグは、

遺伝子融合発現タグを含み得る。遺伝子融合発現タグは、シデロカリン(配列番号351、METDTLLLVVLLLVVPGSTGDYKDEHHHHHHHGGSQDSTSDLIIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGSQPGEFTLGNIKSYPGLTSYLVVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDGGGSENLIFYQ)を含み得る。例示的なシデロカリンペ

プチド融合体としては、シデロカリンに融合されたヒト可溶性トランスフェリン(METDTLLLVVLLLVVPGSTGDYKDEHHHHHHHGGSQDSTSDLIIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGSQPGEFTLGNIKSYPGLTSYLVVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDGGGSENLIFYQGSRLYWDDLKRKLSEKLDSTDF

TSTIKLLNENSYPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFKVQVQKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAEESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGH

AHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAGSGVGTALLLKLAAQMFSDMVLDKGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNA

AFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDTRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQALALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEFGGGSHHHHHHGGGSLNDIFE

AQKIEWHE;配列番号352)ならびにMETDTLLLVVLLLVVPGSTGDYKDEHHHHHHHGGSQDSTSDLIIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGKQWYVVGLAGNAILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGSQPGEFTLGNIKSYPGLTSYLVVRVVSTNYNQHAMVFFKKVSNREYFKITLYGRTKELT

SELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDGGGSENLY
FQGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVSSMSNTEETCVQEL
FDLLHCVDHCVSQ) (配列番号356)、METDTLLWVLLWVP
GSTGDYKDEHHHHHGGSQDSTSDLIAPPLSKVPLQQNF
QDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQKMYATIYELKEDK
SYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGSQPGEFTLGNIKSYPG
LTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRTK
ELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDGGGSE
NLYFQGSREGCASRCTKYNAELEKCEARVMSMSNTEEDCE
QELEDLLHCLDHCHSQ (配列番号357)、及び (METDTLLWVLL
LLWVPGSTGDYKDEHHHHHGGSQDSTSDLIAPPLSKVP
LQQNFQDNQFQGWYVVGLAGNAILREDKDPQKMYATIYE
LKEDKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGSQPGEFTLGNI
KSYPG LTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITL
YGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID
GGGSENLYFQGSREGCASRCMKYNDELEKCEARMMSMSNT
EEDCEQELEDLLYCLDHCHSQ (配列番号358) などのシデロカリンに
融合された様々な本開示のペプチドが挙げられる。とりわけ、CDP-NTペプチドコン
ストラクトは、N末端のシデロカリンとともに発現され得る (例えば、配列番号359～
配列番号361)。

10

20

【0316】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトはまた、非コンジュゲート治療薬を腫瘍などの標的化された組織にまたは組織内に動員するための親和性ハンドル (例えば、ビオチン) を提供することなどの他の役割を果たし得る他の部分にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。いくつかの場合において、治療薬は、小分子、ペプチド、抗体、または細胞治療薬 (例えば、CAR T細胞または別の自己由来もしくは同種異系の操作された細胞) である。例えば、親和性標識 (例えば、アビジン) を用いて操作されたCAR T細胞は、ビオチン部分を含むTfR結合ペプチドによって標的化された組織に動員され得る。加えて、本明細書に記載されるビオチン (または他の親和性標識) - TfR結合ペプチドは、TfR結合ペプチドが標的とするか、またはTfR結合ペプチドが蓄積される脳、腫瘍、または他の組織において薬理的活性をもたらすことができる小分子、ペプチド、またはタンパク質などの様々な異なるアビジンタグ付き薬物とともに投与 (例えば、共投与) され得る。

30

【0317】

更に、毒素またはノット毒液タンパク質に由来する2つ以上のペプチド配列が特定のペプチドに存在するか、コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。ペプチドは、様々な技術によって、生体分子に組み込むことができる。ペプチドは、アミド結合などの共有結合の形成などの化学変換によって組み込むことができる。ペプチドは、例えば、固相または溶液相ペプチド合成によって組み込むことができる。ペプチドは、生体分子をコードする核酸配列を調製することによって組み込むことができ、ここで、核酸配列は、ペプチドをコードする部分配列を含む。部分配列は、生体分子をコードする配列に付加されてもよいし、または生体分子をコードする配列の部分配列に代えてもよい。

40

【0318】

検出可能な剤とペプチドのコンジュゲート

ペプチドは、イメージング、研究、治療薬、セラノスティクス、医薬品、化学療法、キレート療法、標的薬物送達、及び放射線療法に使用される薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、フルオロフォア、近赤外色素、造影剤、ナノ粒子、金属含有ナノ粒子、金属キレート、X線造影剤、PET剤、金属、放射性同位体、色素、放射性核種キレート剤、またはイメージングに使用することができる別の好適な物質などの検出可能な剤にコンジュゲートされるか

50

、連結されるか、または融合される。

【0319】

いくつかの実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の検出可能な剤は、ペプチドに連結され得る。放射性同位体の非限定的な例としては、アルファ放射体、ベータ放射体、陽電子放射体、及びガンマ放射体が挙げられる。いくつかの実施形態において、金属または放射性同位体は、アクチニウム、アメリシウム、ビスマス、カドミウム、セシウム、コバルト、ユウロピウム、ガドリニウム、イリジウム、鉛、ルテチウム、マンガン、パラジウム、ポロニウム、ラジウム、ルテニウム、サマリウム、ストロンチウム、テクネチウム、タリウム、イットリウムからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、金属は、アクチニウム、ビスマス、鉛、ラジウム、ストロンチウム、サマリウム、またはイットリウムである。いくつかの実施形態において、放射性同位体は、アクチニウム-225または鉛-212である。いくつかの実施形態において、近赤外色素は、生物学的組織及び体液によって容易にクエンチされない。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、650nm~4000nmの波長で電磁放射線を放出する蛍光剤であり、そのような薬剤を検出するためにそのような放射が使用される。本開示におけるコンジュゲート分子として使用され得る蛍光色素の非限定的な例としては、DyLight-680、DyLight-750、Vivoag-750、DyLight-800、IRDye-800、Vivotag-680、Cy5.5、またはインドシアニンググリーン（ICG）が挙げられる。いくつかの実施形態において、近赤外色素は、多くの場合、シアニン色素（例えば、Cy7、Cy5.5、及びCy5）を含む。本開示におけるコンジュゲート分子として使用される蛍光色素の更なる非限定的な例としては、アクラジンオレンジまたはイエロー、Alexa Fluor（例えば、Alexa Fluor 790、750、700、680、660、及び647）及びその任意の誘導体、7-アクチノマイシンD、8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸、ATTO色素及びその任意の誘導体、オーラミン-ローダミン染色剤及びその任意の誘導体、ベンサントロン、ビマン、9-10-ビス（フェニルエチニル）アントラセン、5,12-ビス（フェニルエチニル）ナフタセン、ビスベンズイミド、ブレインボー、カルセイン、カルボジフルオレセイン及びその任意の誘導体、1-クロロ-9,10-ビス（フェニルエチニル）アントラセン及びその任意の誘導体、DAPI、DiOC6、DyLight Fluor及びその任意の誘導体、エピコッコノン、エチジウムブロミド、FLASH-EDT2、Fluo色素及びその任意の誘導体、FluoProbe及びその任意の誘導体、Fluorescein及びその任意の誘導体、Fura及びその任意の誘導体、GelGreen及びその任意の誘導体、GelRed及びその任意の誘導体、蛍光タンパク質及びその任意の誘導体、mアイソフォームタンパク及びその任意の誘導体、例えば、mCherryなど、ヘタメチン色素及びその任意の誘導体、hoeschst染色剤、イミノクマリン、インディアンイエロー、インド-1及びその任意の誘導体、ラウルダン、ルシファーイエロー及びその任意の誘導体、ルシフェリン及びその任意の誘導体、ルシフェラーゼ及びその任意の誘導体、メルコシアニン及びその任意の誘導体、ナイル色素及びその任意の誘導体、ペリレン、フロキシシン、フィコ色素及びその任意の誘導体、ヨウ化プロピウム、ピラニン、ローダミン及びその任意の誘導体、リボグリーン、RoGFP、ルブレ

10

20

30

40

50

ミンローダミンB、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン(TMR)など)、クマリン及びクマリン色素(例えば、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリン、アミノメチルクマリン(AMCA)など)、Oregon Green色素(例えば、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514など)、Texas Red、Texas Red-X、SPECTRUM RED、SPECTRUM GREEN、シアニン色素(例えば、CY-3、Cy-5、CY-3.5、CY-5.5など)、ALEXA FLUOR色素(例えば、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546、ALEXA FLUOR 568、ALEXA FLUOR 594、ALEXA FLUOR 633、ALEXA FLUOR 660、ALEXA FLUOR 680など)、BODIPY色素(例えば、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TR、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665など)、IRDye(例えば、IRD40、IRD700、IRD800など)などが挙げられるが、これらに限定されない。追加の好適な検出可能な剤は、PCT/US14/56177に記載されている。放射性同位体の非限定的な例としては、アルファ放射体、ベータ放射体、陽電子放射体、及びガンマ放射体が挙げられる。いくつかの実施形態において、金属または放射性同位体は、アクチニウム、アメリシウム、ビスマス、カドミウム、セシウム、コバルト、ユウロピウム、ガドリニウム、イリジウム、鉛、ルテチウム、マンガン、パラジウム、ポロニウム、ラジウム、ルテニウム、サマリウム、ストロンチウム、テクネチウム、タリウム、イットリウムからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、金属は、アクチニウム、ビスマス、鉛、ラジウム、ストロンチウム、サマリウム、またはイットリウムである。いくつかの実施形態において、放射性同位体は、アクチニウム-225または鉛-212である。更に、診断及び/または治療には、次の放射性核種を使用することができる：炭素(例えば、 ^{11}C または ^{14}C)、窒素(例えば、 ^{13}N)、フッ素(例えば、 ^{18}F)、ガリウム(例えば、 ^{67}Ga または ^{68}Ga)、銅(例えば、 ^{64}Cu または ^{67}Cu)、ジルコニウム(例えば、 ^{89}Zr)、ルテチウム(例えば、 ^{177}Lu)。

[0320]

ペプチドは、放射線増感剤または光増感剤コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。放射線増感剤の例としては、ABT-263、ABT-199、WEHI-539、パクリタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、ゲムシタビン、エタニダゾール、ミソニダゾール、チラパザミン、及び核酸塩基誘導体(例えば、5-フルオロデオキシウリジンなどのハロゲン化プリンまたはピリミジン)が挙げられるが、これらに限定されない。光増感剤の例としては、光を当てると熱を生じる蛍光分子またはビーズナノ粒子、ポルフィリン及びポルフィリン誘導体(例えば、クロリン、バクテリオクロリン、イソバクテリオクロリン、フタロシアニン、及びナフタロシアニン)、メタロポルフィリン、メタロフタロシアニン、アンゲリシン、カルコゲナビリウム色素、クロロフィル、クマリン、フラビン及び関連化合物、例えば、アロキサジン及びリボフラビンなど、フラレーン、フェオホルビド、ピロフェオホルビド、シアニン(例えば、メロシアニン540)、フェオフィチン、サフィリン、テキサフィリン、プルプリン、ポルフィセン、フェノチアジニウム、メチレンブルー誘導体、ナフタルイミド、ナイルブルー誘導体、キノン、ペリレンキノン(例えば、ヒペリシン、ヒポクレリン、及びセルコスポリン)、ソラレン、キノン、レチノイド、ローダミン、チオフェン、ベルジン、キサントン色素(例えば、エオシン、エリスロシン、ローズベンガル)、ポルフィリンの二量体及びオリゴマー体、ならびに5-アミノレブリン酸などのプロドラッグを挙げることができるが、これらに限定されない。有利には、このアプローチは、治療薬(例えば、薬物)と電磁エネルギー(例えば、放射線または光)の両方を同時に使用して、罹患細胞(例えば、がん細胞)を高度に特異的に標的化することを可能にする。いくつかの実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、ペプチドは、薬剤に、例えば、直接的にまたはリンカーを介して、コンジュゲートされるか、連結されるか、融合されるか、または共有結合的もしくは非共有結合的に連結される。本明細書における実施形態での使用に適した例示的なリンカーは、以下に更に詳細に考察される。

【0321】

本開示のいくつかの態様において、放射性核種は、キレート剤を使用して、本明細書に記載されるペプチドまたはペプチドコンストラクトに結合される。例示的なキレート剤部分としては、2, 2', 2''-(3-(4-(3-(1-(4-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23-ヘプタオキサ-2-アザペンタコサン-25-イル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(1-(4-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35-ウンデカオキサ-2-アザヘプタトリアコンタン-37-イル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2'-(7-(4-(3-(1-(4-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル)-1-オキソ-5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35-ウンデカオキサ-2-アザヘプタトリアコンタン-37-イル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-1, 4-ジイル)二酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(1-(4-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル)-3, 7-ジオキソ-11, 14, 17, 20, 23, 26, 29-ヘプタオキサ-2, 8-ジアザヘントリアコンタン-31-イル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(1-(4-(1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル)-3, 7-ジオキソ-11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41-ウンデカオキサ-2, 8-ジアザトリテトラコンタン-43-イル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(25, 28-ジオキソ-28-(6-(6-(ピリジン-2-イル)-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)ピリジン-3-イル)アミノ)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21-ヘプタオキサ-24-アザオクタコシル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(37, 40-ジオキソ-40-(6-(6-(ピリジン-2-イル)-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)ピリジン-3-イル)アミノ)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウンデカオキサ-36-アザテトラコンチル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(1-(4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェニル)-3-オキソ-6, 9, 12, 15, 18, 21, 24-ヘプタオキサ-2-アザヘプタコサン-27-アミド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(2-(4-(1-(4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)フェノキシ)-3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33-ウンデカオキサヘキサトリアコンタン-36-アミド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-1, 4, 7-トリイル)三酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(5-アミノ-6-(4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)ベンジル)アミノ)-6-オキソヘキシル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸; 2, 2'-(7-(4-(3-(5-アミノ-6-(4-6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)ベンジル)アミノ)-6-オキソヘキシル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-1, 4-ジイル)二酢酸; 2, 2', 2''-(3-(4-(3-(5-アミノ-6-(5-アミノ-6-(4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)ベンジル)アミノ)-6-オキソヘキシル)アミノ)-6-オキソヘキシル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリア

10

20

30

40

50

ゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸;及び2, 2', 2''-(3-(4-(3-(5-アミノ-6-(5-アミノ-6-(5-アミノ-6-(4-(6-メチル-1, 2, 4, 5-テトラジン-3-イル)ベンジル)アミノ)-6-オキソヘキシル)アミノ)-6-オキソヘキシル)アミノ)-6-オキソヘキシル)チオウレイド)ベンジル)-1, 4, 7-トリアゾナン-2, 5, 8-トリイル)三酢酸を挙げることができる。

【0322】

リンカー

本開示に係るペプチドは、リンカーを介して、またはリンカーなしで直接的に、小分子、別のペプチド、タンパク質、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、フルオロフォア、放射性同位体、放射性核種キレート剤、ポリマー、バイオポリマー、脂肪酸、アシル付加物、化学リンカー、もしくは糖などのカーゴ分子（例えば、治療活性薬剤または検出可能な剤）、または本明細書に記載される他の活性薬剤もしくは検出可能な剤に結合され得る。リンカーがない場合、カーゴ分子は、ペプチドのN末端及び／またはC末端に直接コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される。リンカーが存在する場合、リンカーは、切断可能であり得るか、または安定なリンカーが使用される。切断可能なリンカーは、組織、細胞、エンドソーム、または核内に入ると切断され得ることから、カーゴ分子の *in vivo* 送達に使用することができる。安定なリンカーは、コンジュゲートされると活性化するか、または異化作用などによって分解されるカーゴ分子の送達に使用することができる。本明細書に記載されるように、リンカーはまた、標的化、細胞毒性、治療、ホーミング、イメージング、または診断の機能などの別の機能を有する別のカーゴ部分に T f R 結合ペプチドを共有結合的に結合させるために使用することができる。

【0323】

いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、活性薬剤または検出可能な剤とペプチドのコンストラクトを生成するために、ペプチドのN末端及び／またはC末端にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。いくつかの実施形態において、T f R 標的化ペプチドは、別の機能性ペプチドまたはタンパク質のN末端、内部リシン、グルタミン酸、もしくはアスパラギン酸残基、またはC末端で、リンカーを介して、結合され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、リシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン酸、非天然アミノ酸残基、またはグルタミン酸残基の側鎖などの側鎖を介して、別の機能性ペプチドまたはタンパク質に結合され得る。本明細書で使用される場合、分子は、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、カルバメート結合、カーボネート結合、炭素-窒素結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、チオエステル結合、チオエーテル結合、ヒドラゾン結合、アゾ結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド結合、2つのシステイン間の2つの炭素架橋、2つのシステイン間の3つの炭素架橋、またはチオエーテル結合を介して、互いに連結されるか、結合されるか、または融合され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、1つ以上の非天然アミノ酸を含み、ここで、非天然アミノ酸は、挿入、付加、または別のアミノ酸との置換であり得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチド（複数可）自体の類似の領域（アミド結合、エステル結合、エーテル結合、カルバメート結合、炭素-窒素結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、ヒドラゾン結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、または本明細書に記載されるリンカーを介した、アミノ酸配列の末端、リシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン酸、非天然アミノ酸残基、またはグルタミン酸残基の側鎖などのアミノ酸側鎖など）も他の分子に連結するために使用することができる。いくつかの実施形態において、ペプチドは、より大きなポリペプチドもしくはペプチド分子のアミノ酸配列の末端に結合されるか、またはリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン酸、非天然アミノ酸残基、もしくはグルタミン酸残基の側鎖などの側鎖に結合される。

【0324】

リンカーを介した結合は、他の分子（例えば、活性薬剤及び／または検出可能な剤）とペプチドとの間のリンカー部分の組み込みを伴い得る。ペプチド及び他の分子は、両方とも、リンカーに共有結合的に結合され得る。リンカーは、切断可能、安定、自壊性、親水性、または疎水性であり得る。リンカーは、酵素、水、または他の化学物質の連結基へのアクセスを立体的に制限する嵩高い側基または側鎖を有し得る。リンカーは、1つが他の分子に結合し、1つがペプチドに結合している少なくとも2つの官能基と、2つの官能基の間の連結部分とを有し得る。いくつかのリンカーの例は、Jain, N., Pharm Res. 32 (11): 3526-40 (2015), Doronina, S. O., Bioconj Chem. 19 (10): 1960-3 (2008), Pillow, T. H., J Med Chem. 57 (19): 7890-9 (2014), Dorywalksa, M., Bioconj Chem. 26 (4): 650-9 (2015), Kellogg, B. A., Bioconj Chem. 22 (4): 717-27 (2011)、及びZhao, R. Y., J Med Chem. 54 (10): 3606-23 (2011)に記載されている。

【0325】

結合のための官能基の非限定的な例としては、例えば、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、炭素-窒素結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、ヒドラゾン結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を形成することが可能な官能基を挙げることができる。そのような結合を形成することが可能な官能基の非限定的な例としては、アミノ基；カルボキシル基；ヒドロキシル基；アルデヒド基；アジド基；アルキン基及びアルケン基；ケトン；ヒドラジド；ヒドラジン；酸フッ化物、塩化物、臭化物、及びヨウ化物などの酸ハロゲン化物；対称、混合、及び環式無水物を含む酸無水物；カーボネート；シアノ、スクシンイミジル、及びN-ヒドロキシスクシンイミジルなどの脱離基に結合したカルボニル官能基；マレイミド；加水分解するように設計されたマレイミド基含有リンカー；マレイミドカプロイル；MCC（[N-マレイミドメチル]シクロヘキサノールカルボキシレート）；N-エチルマレイミド；マレイミドアルカン；mc-vc-PABC；DUBA（デュオカルマイシンヒドロキシベンズアミド-アザインドールリンカー）；SMCCスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサノールカルボキシレート；SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート）；SPDB N-スクシンイミジル-4-（2-ピリジルジチオ）ブタノエート；スルホ-SPDB N-スクシンイミジル-4-（2-ピリジルジチオ）-2-スルホブタノエート；SPP N-スクシンイミジル-4-（2-ピリジルジチオ）ペンタノエート；ジチオピリジールマレイミド（DTM）；ヒドロキシルアミン、ビニル-ハロ基；ハロアセタミド基；プロモアセタミド；ヒドロキシル基；スルフヒドリル基；ならびに例えば、ハライド、メシレート、トシレート、トリフレート、エポキシド、リン酸エステル、硝酸エステル、及びベシレートなどのアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、またはベンジル脱離基を有する分子を挙げることができる。

【0326】

連結部分の非限定的な例としては、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ポリエーテル、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシカルボン酸、ポリエステル、ポリアミド、ポリアミノ酸、ポリペプチド、切断可能なペプチド、Val-Cit、Phe-Lys、Val-Lys、Val-Ala、Doronina et al., 2008に記載されている他のペプチドリンカー、ベータグルクロニダーゼによって切断可能なリンカー、カテプシンまたはカテプシンB、D、E、H、L、S、C、K、O、F、V、X、もしくはWによって切断可能なリンカー、Val-Cit-p-アミノベンジルオキシカルボニル、グルクロニド-MABC、バリニン-シトルリン、アミノベンジルカルバメート、D-アミノ酸、及びポリアミンを挙げることができ、これらはいずれも非置換であるか、ハロゲン、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基、アミノ基、ニトロ基、ニトロソ基、シアノ基、アジド基、スルホキシド基、スルホン基、スルホンアミド基、カルボ

キシル基、カルボキシアルデヒド基、イミン基、アルキル基、ハロールアルキル基、アルケニル基、ハロールアルケニル基、アルキニル基、ハロールアルキニル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基、アラルキル基、アリールアルコキシ基、ヘテロシクリル基、アシル基、アシルオキシ基、カルバメート基、アミド基、ウレタン基、エポキシド、荷電基、双極性イオン基、及びエステル基などの任意数の置換基で置換される。分子を互いに連結、融合、またはコンジュゲートする反応の他の非限定的な例としては、クリックケミストリー、銅フリークリックケミストリー、HIPSライゲーション、S t a u d i n g e rライゲーション、及びヒドラジン-イソ-P i c t e t -S p e n g l e rが挙げられる。

【0327】

いくつかの実施形態において、抑制ドメインをd C a s 9に連結するためのリンカーは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、または50アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約10アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約11アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約12アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約13アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約14アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約15アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約16アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約17アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約18アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約19アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約20アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約21アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約22アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約23アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約24アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約25アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約26アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約27アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約28アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約29アミノ酸残基長であり得る。リンカーは、約30アミノ酸残基長であり得る。

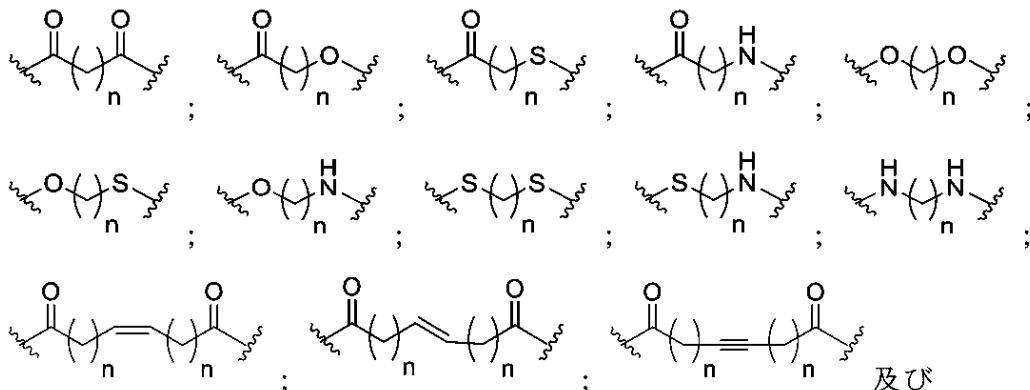
【0328】

いくつかの実施形態において、本開示のリンカーは、切断可能なリンカー部分または安定なリンカー部分を含み得る。いくつかの実施形態において、本開示の切断可能なリンカーとしては、例えば、プロテアーゼで切断可能なペプチドリンカー、ヌクレアーゼ感受性核酸リンカー、リパーゼ感受性脂質リンカー、グリコシダーゼ感受性炭水化物リンカー、pH感受性リンカー、低酸素症感受性リンカー、光で切断可能なリンカー、熱に不安定なリンカー、酵素で切断可能なリンカー（例えば、エステラーゼで切断可能なリンカー）、超音波感受性リンカー、及びX線で切断可能なリンカーを挙げることができる。いくつかの実施形態において、リンカーは、切断可能なリンカーではない。

【0329】

リンカーの非限定的な例としては、

【化1】



10

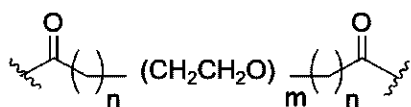
20

30

40

50

【化 2】

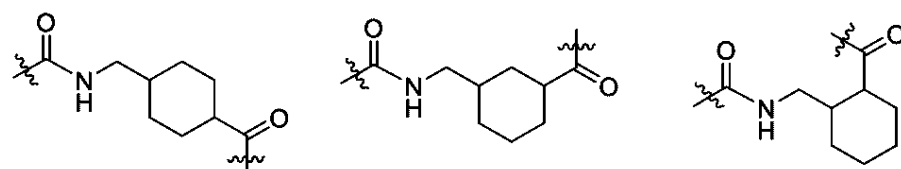


が挙げられ、式中、各 n は、独立して、0～約1,000；1～約1,000；0～約500；1～約500；0～約250；1～約250；0～約200；1～約200；0～約150；1～約150；0～約100；1～約100；0～約50；1～約50；0～約40；1～約40；0～約30；1～約30；0～約25；1～約25；0～約20；1～約20；0～約15；1～約15；0～約10；1～約10；0～約5；または1～約5である。いくつかの実施形態において、各 n は、独立して、0、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、または約50である。いくつかの実施形態において、 m は、1～約1,000；1～約500；1～約250；1～約200；1～約150；1～約100；1～約50；1～約40；1～約30；1～約25；1～約20；1～約15；1～約10；または1～約5である。いくつかの実施形態において、 m は、0、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、もしくは約50であり、または Jain, N., Pharm Res. 32 (11): 3526-40 (2015) もしくは Ducry, L., Antibody Drug Conjugates (2013) に開示されている任意のリンカーである。

【0330】

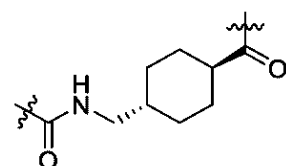
いくつかの場合において、リンカーは、有機非芳香族または芳香族環などの環状基を含み得、任意選択により環内に3～10個の炭素を含み、任意選択によりカルボン酸

【化 3】



、例えば、trans-4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸、

【化 4】

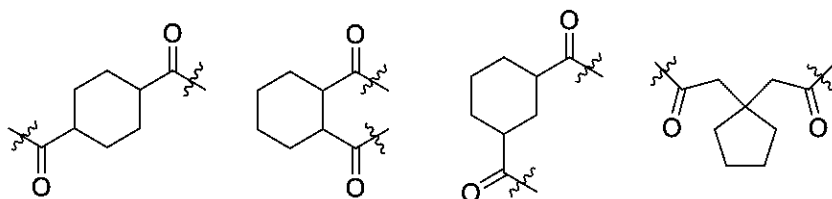


またはその置換アナログもしくは立体異性体から構築される。このリンカーは、任意選択により、カルバメート連結を形成するために使用され得る。いくつかの場合において、カルバメート連結は、加水分解、エステラーゼなどの酵素、または他の化学反応などによる切断に対して、エステル連結よりも耐性を有し得る。

【0331】

いくつかの場合において、リンカーは、環状カルボン酸、例えば、環状ジカルボン酸、例えば、次の基：1，4-シクロヘキサンジカルボン酸、1，2-シクロヘキサンジカルボン酸、または1，3-シクロヘキサンジカルボン酸のうちの1つ、1，1-シクロペンタン二酢酸、

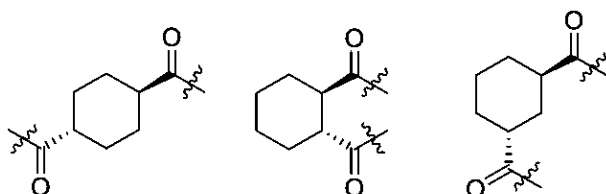
【化5】



10

またはその置換アナログもしくは立体異性体を含み得る。例えば、リンカーは、以下の群のうちの1つを含み得る。

【化6】



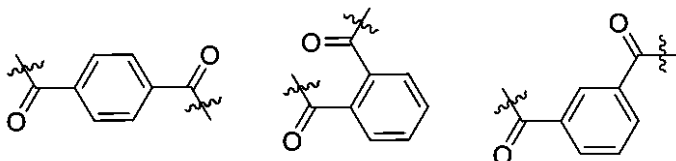
20

。いくつかの例では、リンカーは、任意選択により、エステル連結を形成するために使用され得る。いくつかの場合において、環状エステル連結は、水による加水分解、エステラーゼなどの酵素、または他の化学反応などによる切断に対して、非環状または直鎖状のエステル連結よりも立体的に耐性を有し得る。

【0332】

いくつかの場合において、リンカーは、芳香族ジカルボン酸、例えば、テレフタル酸、イソフタル酸、フタル酸

【化7】



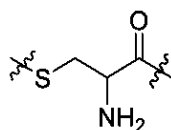
30

またはその置換アナログを含み得る。

【0333】

いくつかの場合において、リンカーは、天然もしくは非天然アミノ酸、例えば、システイン、

【化8】



40

またはその置換アナログもしくは立体異性体を含み得る。いくつかの例において、リンカーは、アラニン (A, Ala) ; アルギニン (R, Arg) ; アスパラギン (N, Asn) ; アスパラギン酸 (D, Asp) ; グルタミン酸 (E, Glu) ; グルタミン (Q, Gln) ; グリシン (G, Gly) ; ヒスチジン (H, His) ; イソロイシン (I, Ile) ; ロイシン (L, Leu) ; リシン (K, Lys) ; メチオニン (M, Met) ; フェニルアラニン (F, Phe) ; プロリン (P, Pro) ; セリン (S, Ser) ; トレ

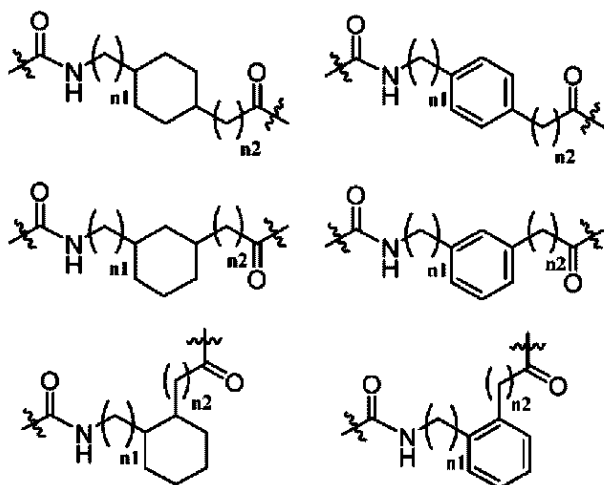
50

オニン (T、Thr) ; トリプトファン (W、Trp) ; チロシン (Y、Tyr) ; バリン (V、Val) ; または任意の複数もしくはこれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は、官能性ハンドルとして使用され得る1つ以上の官能基、例えば、アルケンまたはアルキンを含み得る。

【0334】

いくつかの場合において、リンカーは、次の基：

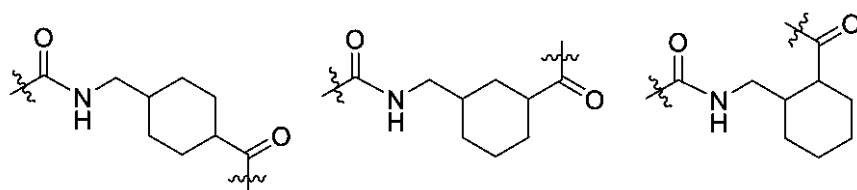
【化9】



$n1 = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, または 10
 $n2 = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, または 10

のうちの1つまたはその置換アナログもしくは立体異性体を含み得る。いくつかの例において、リンカーは、以下の群：

【化10】



のうちの1つまたはその置換アナログもしくは立体異性体から選択される。

【0335】

いくつかの場合において、リンカーは、次の基：

10

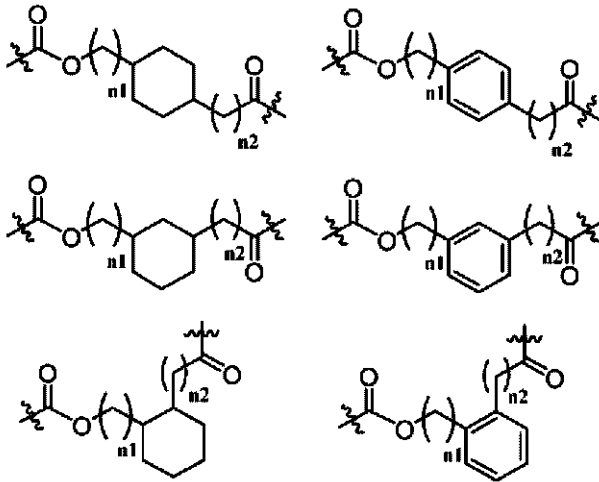
20

30

40

50

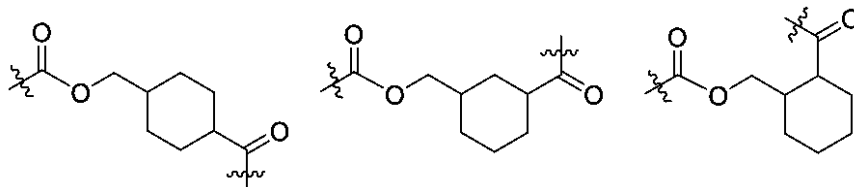
【化 1 1】



$n1 = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, または 10
 $n2 = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, または 10

のうちの1つまたはその置換アナログもしくは立体異性体を含み得る。いくつかの例において、リンカーは、以下の群：

【化 1 2】



のうちの1つまたはその置換アナログもしくは立体異性体から選択される。

【0 3 3 6】

いくつかの場合において、置換アナログまたは立体異性体は、本明細書で開示される化合物の構造的アナログであり、化合物の1つ以上の水素原子が1つ以上のハロ基（例えば、C l、F、B r）、アルキル（例えば、メチル、エチル、プロピル）、アルケニル、アルキニル、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロシクロアルキル、またはこれらの任意の組み合わせによって置換されてもよい。いくつかの場合において、立体異性体は、エナンチオマー、ジアステレオマー、シスもしくはトランス立体異性体、EもしくはZ立体異性体、またはRもしくはS立体異性体であり得る。

【0 3 3 7】

直鎖リンカーの非限定的な例としては、

10

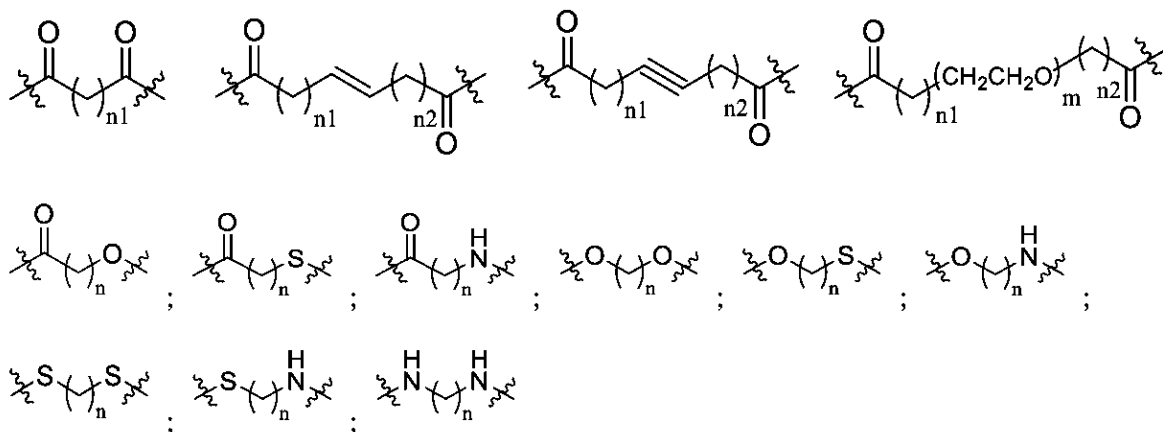
20

30

40

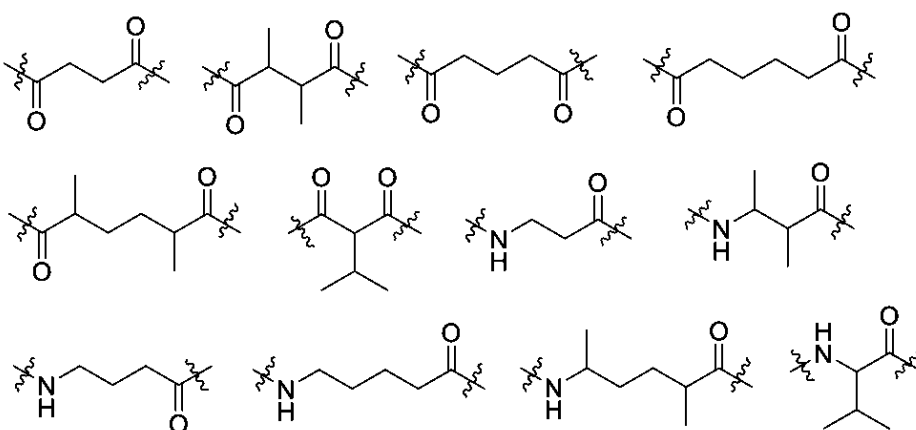
50

【化13】



が挙げられ、式中、各 $n1$ 、もしくは $n2$ または m は、独立して、 $0 \sim$ 約 $1,000$ ； $1 \sim$ 約 $1,000$ ； $0 \sim$ 約 500 ； $1 \sim$ 約 500 ； $0 \sim$ 約 250 ； $1 \sim$ 約 250 ； $0 \sim$ 約 200 ； $1 \sim$ 約 200 ； $0 \sim$ 約 150 ； $1 \sim$ 約 150 ； $0 \sim$ 約 100 ； $1 \sim$ 約 100 ； $0 \sim$ 約 50 ； $1 \sim$ 約 50 ； $0 \sim$ 約 40 ； $1 \sim$ 約 40 ； $0 \sim$ 約 30 ； $1 \sim$ 約 30 ； $0 \sim$ 約 25 ； $1 \sim$ 約 25 ； $0 \sim$ 約 20 ； $1 \sim$ 約 20 ； $0 \sim$ 約 15 ； $1 \sim$ 約 15 ； $0 \sim$ 約 10 ； $1 \sim$ 約 10 ； $0 \sim$ 約 5 ；または $1 \sim$ 約 5 である。いくつかの実施形態において、各 n は、独立して、 0 、約 1 、約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 10 、約 11 、約 12 、約 13 、約 14 、約 15 、約 16 、約 17 、約 18 、約 19 、約 20 、約 21 、約 22 、約 23 、約 24 、約 25 、約 26 、約 27 、約 28 、約 29 、約 30 、約 31 、約 32 、約 33 、約 34 、約 35 、約 36 、約 37 、約 38 、約 39 、約 40 、約 41 、約 42 、約 43 、約 44 、約 45 、約 46 、約 47 、約 48 、約 49 、または約 50 である。いくつかの実施形態において、 m は、 $1 \sim$ 約 $1,000$ ； $1 \sim$ 約 500 ； $1 \sim$ 約 250 ； $1 \sim$ 約 200 ； $1 \sim$ 約 150 ； $1 \sim$ 約 100 ； $1 \sim$ 約 50 ； $1 \sim$ 約 40 ； $1 \sim$ 約 30 ； $1 \sim$ 約 25 ； $1 \sim$ 約 20 ； $1 \sim$ 約 15 ； $1 \sim$ 約 10 ；または $1 \sim$ 約 5 である。いくつかの実施形態において、 m は、 0 、約 1 、約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 10 、約 11 、約 12 、約 13 、約 14 、約 15 、約 16 、約 17 、約 18 、約 19 、約 20 、約 21 、約 22 、約 23 、約 24 、約 25 、約 26 、約 27 、約 28 、約 29 、約 30 、約 31 、約 32 、約 33 、約 34 、約 35 、約 36 、約 37 、約 38 、約 39 、約 40 、約 41 、約 42 、約 43 、約 44 、約 45 、約 46 、約 47 、約 48 、約 49 、または約 50 である。いくつかの例では、リンカーは、直鎖ジカルボン酸、例えば、次の基：コハク酸、2,3-ジメチルコハク酸、グルタル酸、アジピン酸、2,5-ジメチルアジピン酸のうちの1つ、

【化14】



またはその置換アナログもしくは立体異性体を含み得る。いくつかの場合において、リンカーは、カルバメート連結を形成するために使用され得る。いくつかの実施形態において

、カルバメート連結は、加水分解、エステラーゼなどの酵素、または他の化学反応などによる切断に対して、エステル連結よりも耐性を有し得る。いくつかの場合において、リンカーは、直鎖状のエステル連結を形成するために使用することができる。いくつかの実施形態において、直鎖状のエステル連結は、加水分解、エステラーゼなどの酵素、または他の化学反応などによる切断に対して、環状エステルまたはカルバメート連結よりも高い感受性を有し得る。直鎖状のエステル連結上にメチル基などの側鎖があると、任意選択により、側鎖がない場合と比べて、連結の切断への感受性が低下し得る。

【0338】

いくつかの場合において、リンカーは、コハク酸リンカーであり得、薬物は、間に2つのメチレン炭素を含むエステル結合またはアミド結合を介してペプチドに結合され得る。他の場合において、リンカーは、ヒドロキシヘキサン酸または乳酸などのヒドロキシル基とカルボン酸の両方を含む任意のリンカーであり得る。

【0339】

いくつかの場合において、薬物は、以下の表7に示されるリンカーのいずれか1つ以上を使用してペプチドに結合することができる。

【表7-1】

表7-ペプチド-薬物コンジュゲートに使用される例示的なリンカー

化合物番号	化学構造	リンカーのベース
1		炭酸

10

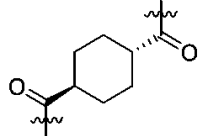
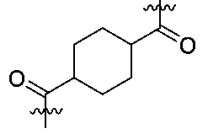
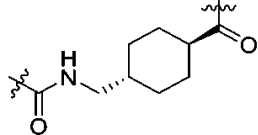
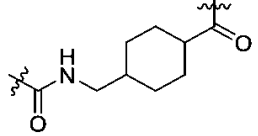
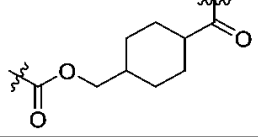
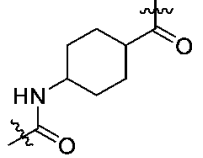
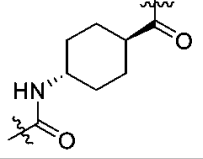
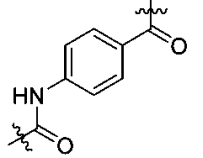
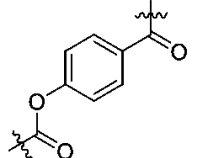
20

30

40

50

【表 7 - 2】

化合物番号	化学構造	リンカーのベース
2		トランス-1, 4-シクロ ヘキサンジカルボン酸
3		1, 4-シクロヘキサンジ カルボン酸
4		トランス-1-アミノメチ ルアミン-シクロヘキサ ン-4-カルボン酸 (カルバメート)
5		1-アミノメチルアミン- シクロヘキサ-4-カル ボン酸
6		4-(カルボキシオキシ) -メチル-シクロヘキサ ン-1-カルボン酸
7		4-(カルボキシアミノ) -シクロヘキサ-1-カ ルボン酸
8		トランス-4-(カルボキ シアミノ)-シクロヘキサ ン-1-カルボン酸
9		4-(カルボキシアミノ) 安息香酸
10		4-(カルボキシオキシ) 安息香酸

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

化合物番号	化学構造	リンカーのベース
1 1		2 - (4 - (カルボキシオキシ) フェニル) 酢酸
1 2		4 - ((カルボキシオキシ) メチル) 安息香酸
1 3		2, 2' - (シクロペンタン-1, 1'-ジイル) 二酢酸
1 4		シス-5-ノルボレン-エンド-2, 3-ジカルボン酸
1 5		(3-アミノ-3-オキシプロピル) カルバミン酸
1 6		[¹⁴ C] -システイン
1 7		システイン
1 8		コハク酸
1 9		グルタル酸
2 0		アジピン酸
2 1		2, 5-ジメチルアジピン酸 (DMA)

【表 7 - 4】

化合物番号	化学構造	リンカーのベース
2 2		トランス-β-ヒドロムコン酸

【0340】

いくつかの場合において、薬物分子は、薬物分子の求核官能基（例えば、ヒドロキシル

10

20

30

40

50

基)が求核試薬として作用し、リンカー部分上の脱離基を置き換えることにより薬物がリンカーに結合することで、リンカーに結合される。

【0341】

他の例において、薬物分子は、リンカーの求核官能基(例えば、チオール基、アミン基など)が薬物分子上の脱離基を置き換えることにより薬物がリンカーに結合することで、リンカーに結合される。そのような脱離基(または脱離基に変換され得る官能基)は、チオエーテル結合を形成する一級アルコールであり得、それにより、薬物がリンカーに結合される。一級アルコールは、求核置換反応を促進するために、メシレート、トシレート、またはノシレートなどの脱離基に変換され得る。

【0342】

本開示のペプチド薬物コンジュゲートは、本開示の薬物、リンカー、及び／またはペプチドを含み得る。これら3つの構成要素間の一般的な接続性は、リンカーが薬物とペプチドの両方に結合するように、薬物-リンカー-ペプチドであり得る。多くの場合、ペプチドは、アミド結合を介して、リンカーに結合される。アミド結合は、エステル、カーボネートなどの本明細書に記載される他の結合と比較して比較的安定であり得る(例えば、*in vivo*において)。したがって、ペプチドとリンカーとの間のアミド結合は、その*in vivo*安定性により、そのような*in vivo*切断後にリンカーが薬物に結合していない状態で、薬物がペプチド-薬物コンジュゲートから切断されるようにする場合、有利な特性を提供し得る。したがって、様々な場合において、薬物は、エステル、カーボネート、カルバメートなどの連結を介してリンカー-ペプチド部分に結合され、この場合、ペプチドは、アミド結合を介してリンカーに結合される。これにより、薬物-リンカー結合の選択的切断が可能となり得(リンカー-ペプチド結合とは対照的に)、切断後にリンカー部分が薬物に結合していない状態で、薬物を放出することが可能となる。そのような異なる薬物-リンカー結合または連結の使用により、例えば、オフターゲット効果(例えば、循環中の薬物放出の減少)を最小限にしつつ、治療機能を達成するために、*in vivo*で薬物放出を調節することが可能となり得る。

【0343】

リンカーは、切断可能なリンカーまたは安定なリンカーであり得る。切断可能なリンカーの使用により、例えば、標的の組織または細胞または細胞内コンパートメントへの標的化後における、ペプチドからのコンジュゲート部分(例えば、治療薬)の放出が可能となる。いくつかの場合において、リンカーは、酵素切断可能なリンカー、例えば、カテプシンによって切断可能なバリナーシトルリンリンカー、またはエステラーゼによって切断可能なエステルリンカーである。いくつかの実施形態において、リンカーは、自壊性部分を含有する。他の実施形態において、リンカーは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、トロンビン、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、またはカテプシン(例えば、カテプシンK)の切断部位などの、特定のプロテアーゼに対する1つ以上の切断部位を含む。

【0344】

したがって、いくつかの場合において、本開示のペプチドと活性薬剤のコンジュゲートは、酵素によって切断可能なアミノ酸配列を形成することができる1以上、約2以上、約3以上、約5以上、約10以上、または約15以上のアミノ酸を含み得る。そのような酵素は、プロテアーゼを含み得る。ペプチド-薬物コンジュゲートは、カテプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、サブチリシン、トロンビンI、もしくはウロキナーゼ、またはこれらの任意の組み合わせによって切断され得るアミノ酸配列を含み得る。

【0345】

代替として、または組み合わせて、切断可能なリンカーは、他の機序、例えば、pH、還元、または加水分解などを介して、切断、解離、または分解され得る。加水分解は、水の反応により直接生じるか、または酵素によって促進されるか、または他の化学種の存在によって促進され得る。加水分解的に不安定なリンカー(本明細書に記載される他の切断可能なリンカーのなかでも)は、ペプチドから活性薬剤を放出するという点で有利であり

10

20

30

40

50

得る。例えば、ペプチドとのコンジュゲート形態である活性薬剤は、活性でなくてもよいが、標的の組織または細胞または細胞内コンパートメントへの標的化後にはコンジュゲートから放出されて、活性薬剤は活性となる。切断された活性薬剤は、切断前の活性薬剤の化学構造を保持してもよいし、修飾されてもよい。いくつかの実施形態において、安定なリンカーは、任意選択により、長時間（例えば、数時間、数日、または数週間）にわたって緩衝液中での切断が生じ得ない。いくつかの実施形態において、安定なリンカーは、任意選択により、長時間（例えば、数時間、数日、または数週間）にわたって血漿または滑液などの体液中での切断が生じ得ない。いくつかの実施形態において、安定なリンカーは、任意選択により、細胞（マクロファージなど）、細胞コンパートメント（エンドソーム及びリソソームなど）、身体の炎症領域（炎症を起こした関節など）、または組織もしくは身体コンパートメントに存在し得る酵素、活性酸素種、他の化学物質または酵素への曝露後などに切断が生じ得る。いくつかの実施形態において、安定なリンカーは、任意選択により、*in vivo*で切断されず、ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合された場合でも活性のままである活性薬剤を提供し得る。

【0346】

リンカー（例えば、ペプチドコンジュゲートのリンカー）の加水分解速度は、調整することができる。例えば、障害にならないエステルを含むリンカーの加水分解速度は、エステルカルボニルに隣接して嵩高い基を含むリンカーの加水分解と比較してより迅速であり得る。嵩高い基は、メチル基、エチル基、フェニル基、環、もしくはイソプロピル基、または立体的な嵩高さを提供する任意の基であり得る。別の例において、加水分解速度は、アルコール、酸、もしくはエーテルなどの親水基がある場合、またはエステルカルボニルに隣接する場合、迅速になり得る。別の例において、側鎖に疎水性基がある場合、またはより長い炭化水素リンカーを有する場合は、エステルの切断が遅くなり得る。いくつかの実施形態において、カルバメート基の切断はまた、障害、疎水性などによって調整することができる。別の例において、エステルではなくカルバメートなどの反応性の低いリンカーを使用すると、リンカーの切断速度が遅くなり得る。いくつかの場合において、カルボン酸を介してコンジュゲートされたケトロラクなどのように、薬物自体が立体的な嵩高さを提供することができる。リンカーの加水分解速度は、標的の組織もしくは細胞もしくは細胞内コンパートメントにおけるコンジュゲートの滞留時間に応じて、標的の組織もしくは細胞もしくは細胞内コンパートメントにおけるペプチド蓄積の迅速さに応じて、または標的の組織もしくは細胞もしくは細胞内コンパートメントにおける活性薬剤への曝露の所望の時間枠に応じて、調整することができる。例えば、ペプチドが標的の組織または細胞または細胞内コンパートメントから比較的急速に排出される場合、リンカーを急速に加水分解するように調整することができる。対照的に、例えば、ペプチドの標的の組織または細胞または細胞内コンパートメントでの滞留時間が長い場合には、加水分解速度を遅くすることで、活性薬剤の長期送達が可能となる。これは、ペプチドが標的の組織または細胞または細胞内コンパートメント（例えば、腫瘍細胞または腫瘍組織）に薬物を送達するために使用される場合に重要であり得る。“Programmed hydrolysis in designing paclitaxel prodrug for nanocarrier assembly” *Sci Rep* 2015, 5, 12023 Fuet al. は、加水分解速度の変更の一例を提供している。いくつかの実施形態において、切断速度は、種、身体コンパートメント、及び疾患状態によって変動し得る。例えば、エステラーゼによる切断は、カルボキシエステラーゼのレベルが異なることから、ヒト血漿中よりもラットまたはマウス血漿中でより迅速であり得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、異なる種における同様の切断速度を得るために、様々な切断速度に調整され得る。

【0347】

いくつかの場合において、リンカーは、コハク酸リンカーであり得、薬物は、間に2つのメチレン炭素を含むエステル結合またはアミド結合を介してペプチドに結合され得る。他の場合において、リンカーは、ヒドロキシヘキサン酸または乳酸などのヒドロキシル基

10

20

30

40

50

とカルボン酸の両方を含む任意のリンカーであり得る。

【0348】

いくつかの実施形態において、リンカーは、活性薬剤を未修飾の形態で放出し得る。他の実施形態において、活性薬剤は、化学修飾を伴って放出され得る。更に他の実施形態において、異化作用により、リンカー及び／またはペプチドの部分に連結したままの活性薬剤が放出され得る。

【0349】

リンカーは、安定なリンカーまたは切断可能なリンカーであり得る。いくつかの実施形態において、安定なリンカーは、血清アルブミン上の遊離チオールへのコンジュゲート部分の交換によって、コンジュゲート部分をゆっくり放出し得る。いくつかの実施形態において、切断可能なリンカーの使用により、例えば、それを必要とする対象への投与後における、ペプチドからのコンジュゲート部分（例えば、治療薬）の放出が可能となり得る。他の実施形態において、切断可能なリンカーの使用により、ペプチドからのコンジュゲート治療薬の放出が可能となり得る。いくつかの場合において、リンカーは、酵素切断可能なリンカー、例えば、バリナーシトルリンリンカーである。いくつかの実施形態において、リンカーは、自壊性部分を含有する。他の実施形態において、リンカーは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、トロンビン、カテプシン、ペプチダーゼ、またはベータグルクロニダーゼの切断部位などの、特定のプロテアーゼに対する1つ以上の切断部位を含む。代替として、または組み合わせて、リンカーは、pH、還元、または加水分解などの他の機序を介して切断可能である。

【0350】

リンカーの加水分解または還元の速度は、用途に応じて微調整または変更することができる。例えば、障害にならないエステルを含むリンカーの加水分解速度は、エステルカルボニルに隣接して嵩高い基を含むリンカーの加水分解と比較してより迅速であり得る。嵩高い基は、メチル基、エチル基、フェニル基、環、もしくはイソプロピル基、または立体的な嵩高さを提供する任意の基であり得る。いくつかの場合において、カルボン酸を介してコンジュゲート、連結、または融合されたケトロラクなどのように、薬物自体が立体的な嵩高さを提供することができる。リンカーの加水分解速度は、標的位置におけるコンジュゲートまたは融合体の滞留時間に応じて、調整することができる。例えば、ペプチドが腫瘍、または脳から比較的急速に排出される場合、リンカーを急速に加水分解するように調整することができる。ペプチドの標的位置での滞留時間が長い場合には、加水分解速度を遅くすることで、活性薬剤の長期送達が可能となる。

【0351】

リンカー（例えば、ペプチドコンジュゲートのリンカー）の加水分解速度は、測定することができる。そのような測定は、対象の血漿、または滑液、または他の体液もしくは組織中の遊離活性薬剤を決定することを、*in vivo*で、及び／またはリンカーまたは本開示のリンカーを含むペプチドコンジュゲートを、緩衝液（例えば、PBS）または対象の血漿（例えば、ラット血漿、ヒト血漿など）もしくは滑液もしくは他の体液もしくは組織と*ex vivo*でインキュベートすることによって行うことを含み得る。加水分解速度を測定するための方法は、インキュベーション中または投与後にサンプルを採取し、遊離活性薬剤、遊離ペプチド、または加水分解を示す任意の他のパラメーターを決定することを含み得、また、ペプチドの総量、活性薬剤の総量、またはコンジュゲートされた活性薬剤ペプチドを測定することも含まれる。次いで、そのような測定の結果を使用して、所与のリンカーまたはリンカーを含むペプチドコンジュゲートの加水分解半減期を決定することができる。リンカーの加水分解半減期は、そのような半減期を決定するために使用される血漿または体液または種または他の条件に応じて異なり得る。これは、ある特定の血漿（例えば、ラット血漿）中に存在するある特定の酵素または他の化合物に起因し得る。例えば、異なる体液（血漿または滑液など）は、エステラーゼなどの酵素を異なる量で含有し得、これらの化合物のこれらのレベルもまた種（ラット対ヒトなど）及び疾患状態（正常に対する関節炎など）に応じて変動し得る。

【0352】

本開示のコンジュゲートは、様々な成分を含むモジュール構造を有するものとして記載され得、成分のそれぞれ（例えば、ペプチド、リンカー、活性薬剤及び／または検出可能な剤）は、任意の他の成分に依存または独立して選択することができる。例えば、疼痛の治療に使用されるコンジュゲートは、本開示のTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つのアミノ酸配列を有するもの）と、リンカー（例えば、表7に記載される任意のリンカー）と、活性薬剤（例えば、NSAID鎮痛薬、イブプロフェン、またはCNSもしくはがんの障害を治療するための分子）とを含み得る。リンカーは、例えば、ある特定の機序（例えば、酵素及び／またはpH依存性加水分解などの加水分解）を介して標的部位（例えば、脳内）である特定の活性薬剤放出（例えば、ある特定の放出速度）を達成するために、及び／または活性薬剤の全身曝露を最小限にするために、選択及び／または修飾することができる。コンジュゲートの試験中に、コンジュゲートのある特定の*in vivo*特性、例えば、薬物動態（例えば、クリアランス時間、バイオアベイラビリティ、様々な器官での取り込み及び保持）及び／または薬力学（例えば、標的結合）特性を達成するように、コンジュゲートの成分のいずれか1つ以上を修飾及び／または変更することができる。したがって、本開示のコンジュゲートは、副作用（例えば、かかる活性薬剤を単独で投与した場合（すなわち、ペプチドにコンジュゲートされていない場合）に生じる副作用）を軽減しながら、様々な疾患及び状態を予防、治療、及び／または診断するように調節することができる。

10

20

【0353】

いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は、官能性ハンドルとして使用され得る1つ以上の官能基、例えば、アルケンまたはアルキンを含み得る。例えば、そのような官能基の多重結合を使用して、1つ以上の分子をコンジュゲートに付加することができる。1つ以上の分子は、様々な合成戦略を使用して付加することができ、そのいくつかには、付加及び／または置換化学が含まれ得る。例えば、多重結合を使用する付加反応は、臭化水素酸の使用を含み得、ここで、臭素は、脱離基として作用することができるため、様々な部分、例えば、活性薬剤、検出可能な剤、コンジュゲートの薬物動態（例えば、血漿半減期、中枢神経系（CNS）または他の場所における保持及び／または取り込み）及び／または薬力学（例えば、酵素による加水分解速度などの加水分解速度）の特性を改変または変更することができる薬剤で置換され得る。

30

【0354】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるコンジュゲートは、1つ以上の非天然アミノ酸及び／または1つ以上のリンカーを含む。そのような1つ以上の非天然アミノ酸及び／または1つ以上のリンカーは、官能性ハンドルとして使用することができる、1つ以上の官能基、例えば、アルケンまたはアルキン（例えば、非末端アルケン及びアルキン）を含み得る。例えば、そのような官能基の多重結合を使用して、1つ以上の分子をコンジュゲートに付加することができる。1つ以上の分子は、様々な合成戦略を使用して付加することができ、そのいくつかには、付加及び／または置換化学、環化付加などが含まれ得る。例えば、多重結合を使用する付加反応は、臭化水素（例えば、ハロゲン化水素添加反応を介する）の使用を含み得、ここで、臭素置換基は、一度結合すると、脱離基として作用することができるため、求核官能基を含む様々な部分、例えば、活性薬剤、検出可能な剤、薬剤で置換され得る。別の例として、多重結合は、環化付加反応の官能性ハンドルとして使用することができる。環化付加反応は、1,3-双極子環化付加、[2+2]-環化付加（例えば、光触媒）、ディールス・アルダー反応、ヒュスゲン環化付加、ニトロソ-オレフィン環化付加などを含み得る。そのような環化付加反応を使用して、様々な官能基、官能性部分、活性薬剤、検出可能な剤などをコンジュゲートに結合させることができる。例えば、1,3-双極子環化付加反応を使用して分子をコンジュゲートに結合させることができ、ここで、分子は、例えば、アルキンと反応して5員環を形成すること

40

50

ができ、それにより、かかる分子がコンジュゲートに結合する、1, 3-双極子を含む。

【0355】

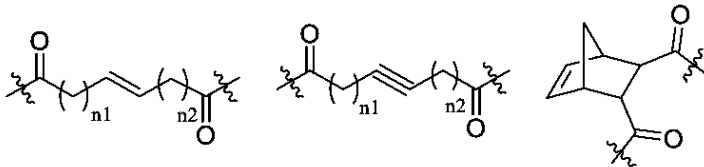
そのような薬剤または分子の付加（例えば、求核または求電子付加に続く求核置換反応を介する）は、様々な用途を有し得る。例えば、そのような分子または薬剤を結合させることで、コンジュゲートの薬物動態（例えば、血漿半減期、CNSでの保持及び／または取り込みまたは生体内分布）及び／または薬力学（例えば、酵素による加水分解速度などの加水分解速度）の特性を改変または変更することができる。また、そのような分子または薬剤を結合させることで、コンジュゲートのデポ効果を変更（例えば、増大）すること、または、例えば、蛍光もしくは他のタイプの検出可能な剤を使用して、*in vivo* 追跡の機能性を提供することができる。

10

【0356】

いくつかの実施形態において、本開示のコンジュゲートは、次の基：

【化15】



またはその置換アナログもしくは立体異性体（式中、各 n_1 及び n_2 は、独立して、1～10の値である）のうちの1つ以上を含むリンカーを含み得る。そのような基は、1つ以上の分子をコンジュゲートに結合させるハンドルとして使用して、例えば、求核または求電子付加に続く求核置換反応を介して、コンジュゲートの薬物動態（例えば、血漿半減期、中枢神経系（CNS）または他の場所における保持及び／または取り込み）及び／または薬力学の特性を変更することができる。そのような基の官能化は、基の1つ以上の多重結合（例えば、二重結合、三重結合など）を使用して行うことができる。そのような官能化は、付加及び／または置換化学を含み得る。例えば、二重結合などのリンカーの官能基は、単結合（例えば、求核付加反応などの付加反応を介して）に変換することができ、ここで、新しく形成された単結合の炭素原子の一方または両方は、それらに結合している脱離基（例えば、臭素）を有し得る。次いで、そのような脱離基を使用して（例えば、求核置換反応を介して）、特定の分子（例えば、活性薬剤、検出可能な剤など）をリンカーのその炭素原子（複数可）に結合させることができる。

20

【0357】

別の例として、多重結合は、環化付加反応の官能性ハンドルとして使用することができる。環化付加反応は、1, 3-双極子環化付加、[2+2]-環化付加（例えば、光触媒）、ディールス・アルダー反応、ヒュスゲン環化付加、ニトロノーオレフィン環化付加などを含み得る。そのような環化付加反応を使用して、様々な官能基、官能性部分、活性薬剤、検出可能な剤などをコンジュゲートに結合させることができる。例えば、1, 3-双極子環化付加反応を使用して分子をコンジュゲートに結合させることができ、ここで、分子は、例えば、アルキンと反応して5員環を形成することができ、それにより、かかる分子（例えば、活性薬剤、検出可能な剤など）がコンジュゲートに結合する、1, 3-双極子を含む。いくつかの場合において、分子は、例えば、半減期の調節、デポ効果の増大、または追跡用の蛍光などのコンジュゲートの新しい機能性の提供のために、コンジュゲートに結合され得る。

40

【0358】

ペプチドの薬物動態

本開示のペプチドのいずれかの薬物動態は、異なる投与経路を介したペプチドの投与後に決定され得る。例えば、本開示のペプチドの薬物動態パラメーターは、静脈内、皮下、筋肉内、直腸、エアロゾル、非経口、眼科用、肺、経皮、膈、眼、鼻、経口、舌下、吸入、皮膚、髄腔内、鼻腔内、腹膜、口腔、滑膜、腫瘍内、または局所投与後に定量すること

50

ができる。本開示のペプチドは、放射性標識またはフルオロフォアなどの追跡剤を使用することによって分析され得る。例えば、本開示の放射性標識ペプチドは、様々な投与経路を介して投与することができる。血漿、尿、糞便、任意の器官、皮膚、筋肉、及び他の組織などの様々な生体サンプル中のペプチド濃度または用量回収は、HPLC、蛍光検出技術（TECAN定量、フローサイトメトリー、iVIS）、または液体シンチレーション計測を含む様々な方法を使用して決定され得る。

【0359】

本明細書に記載される方法及び組成物は、任意の経路を介した対象へのペプチド投与の薬物動態に関する。薬物動態は、例えば、コンパートメントモデルまたはノンコンパートメント方法などの方法及びモデルを使用して記述され得る。コンパートメントモデルには、モノコンパートメントモデル、2コンパートメントモデル、マルチコンパートメントモデルなどが含まれるが、これらに限定されない。モデルは、多くの場合、様々なコンパートメントに分割され、対応するスキームによって記述され得る。例えば、1つのスキームは、吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）スキームである。別の例として、別のスキームは、放出、吸収、分布、代謝及び排泄（LADME）スキームである。いくつかの態様において、代謝及び排泄は、消失コンパートメントと呼ばれる1つのコンパートメントに分類することができる。例えば、放出は、送達系からの組成物の活性部分の放出を含み、吸収は、対象による組成物の活性部分の吸収を含み、分布は、血漿を介して、異なる組織への組成物の分布を含み、代謝は、組成物の代謝または不活性化を含み、最後に排泄は、組成物または組成物の代謝産物の排泄または消失を含む。対象に静脈内投与された組成物は、多相薬物動態プロファイルに供することができ、これは、組織分布及び代謝／排泄の側面を含み得るが、これらに限定されない。したがって、組成物の血漿または血清濃度の減少は、多くの場合、例えば、アルファ相及びベータ相を含む二相であり、時として、ガンマ、デルタまたは他の相が観察される。

【0360】

薬物動態は、対象へのペプチドの投与に関連する少なくとも1つのパラメーターを決定することを含む。いくつかの態様において、パラメーターは、少なくとも、用量（D）、投与間隔（ τ ）、曲線下面積（AUC）、最大濃度（ C_{max} ）、次の用量が投与されるまでに到達する最小濃度（ C_{min} ）、最小時間（ T_{min} ）、 C_{max} に到達するまでの最大時間（ T_{max} ）、分布容積（ V_d ）、定常状態分布容積（ V_{ss} ）、0時点での外挿濃度（ C_0 ）、定常状態濃度（ C_{ss} ）、消失速度定数（ k_e ）、注入速度（ k_{in} ）、クリアランス（CL）、バイオアベイラビリティ（f）、変動（%PTF）及び消失半減期（ $t_{1/2}$ ）を含む。

【0361】

特定の実施形態において、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれかのペプチドまたはペプチドコンストラクトは、経口投与後に、最適な薬物動態パラメーターを示す。他の実施形態において、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれかのペプチドまたはペプチドコンストラクトは、任意の投与経路、例えば、経口投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、静脈内投与、皮下投与、関節内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、滑液嚢、またはこれらの任意の組み合わせなどの後、最適な薬物動態パラメーターを示す。

【0362】

いくつかの実施形態において、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれかのペプチドまたはペプチドコンストラクトは、 C_{max} に到達するまでの平均 T_{max} が0.5～12時間もしくは1～48時間、経口経路による対象へのペプチド投与後の対象の血清における平均バイオアベイラビリティが0.1%～10%、消化管への送達の場合における対象への経口投与後の血清の平均バイオアベイラビリティが0.1%未満、

非経口投与後の血清における平均バイオアベイラビリティが10～100%、対象へのペプチド投与後の対象における平均 $t_{1/2}$ が0.1時間～168時間もしくは0.25時間～48時間、対象へのペプチド投与後のペプチドの平均クリアランス（CL）が0.5～100L/時間もしくは0.5～50L/時間、対象へのペプチドの全身投与後の対象の平均分布容積（ V_d ）が200～20,000mL、または任意選択により全身取り込みなし、これらの任意の組み合わせを示す。

【0363】

ペプチド安定性

本開示のペプチドは、細胞内、サイトゾル内、細胞核内もしくはエンドソーム内、または腫瘍内のpHまたは還元環境などの様々な生物学的または生理学的条件で安定であり得る。例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361の任意のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、還元剤、プロテアーゼ、酸化条件、または酸性条件に対する耐性を示し得る。

【0364】

いくつかの場合において、生体分子（ペプチド及びタンパク質など）は、治療機能を提供し得るが、そのような治療機能は、*in vivo*環境によって生じる不安定性によって減少または阻害される。（Moroz et al. Adv Drug Deliv Rev 101:108–21（2016）、Mitragotri et al. Nat Rev Drug Discov 13（9）:655–72（2014）、Bruno et al. Ther Deliv（11）:1443–67（2013）、Sinha et al. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 24（1）:63–92（2007）、Hamman et al. BioDrugs 19（3）:165–77（2005））。例えば、消化管は、低pH（例えば、pH約1）の領域、還元環境、またはペプチド及びタンパク質を分解し得るプロテアーゼの多い環境を含有し得る。口、眼、肺、鼻腔内の空洞、関節、皮膚、膈管、粘膜、及び血清などの身体の他の領域のタンパク質分解活性もまた、機能的に活性なペプチド及びポリペプチドの送達の障害となり得る。更に、血清中におけるペプチドの半減期は、プロテアーゼに部分的に起因して極めて短い場合があり、そのため、ペプチドは、妥当な投与レジメンを実施した場合、持続的な治療効果をもたらすにはあまりにも急速に分解され得る。同様に、リソソームなどの細胞内コンパートメント内のタンパク質分解活性ならびにリソソーム及びサイトゾル内の還元活性は、ペプチド及びタンパク質を分解し得るため、細胞内標的に治療機能を提供できないことがある。したがって、還元剤、プロテアーゼ、及び低pHに対して耐性のあるペプチドは、*in vivo*において、共製剤化されたまたはコンジュゲート、連結、もしくは融合された活性薬剤の治療効果の増大を提供するか、または治療効果を増大させることができ得る。

【0365】

更に、薬物の経口送達は、この投与方法によって提示される機能的に活性なペプチド及びポリペプチドの送達に対する障害にもかかわらず、ある特定の身体領域（例えば、結腸癌などの消化管の疾患、過敏性腸障害、感染症、代謝性障害、及び便秘）を標的とするためには、望ましい場合がある。例えば、薬物の経口送達は、非経口送達と比較して、患者の服用により便利な剤形を提供することにより、コンプライアンスが向上し得る。経口送達は、大きい治療濃度域を有する治療レジメンに有用であり得る。したがって、還元剤、プロテアーゼ、及び低pHに対して耐性のあるペプチドは、その治療機能を無効にすることなく、ペプチドの経口送達を可能にし得る。

【0366】

還元剤に対するペプチドの耐性。本開示のペプチドは、ペプチドのフォールディング状態を維持するのに不可欠であり得るジスルフィド架橋に関与し得る1つ以上のシステインを含有し得る。還元剤を含む生物学的環境にペプチドを曝露すると、ペプチドのアンフォールディングが生じ、機能性及び生物学的活性を失い得る。例えば、グルタチオン（GS

10

20

30

40

50

H) は、体内及び細胞内の多くの領域に存在し得、ジスルフィド結合を還元し得る還元剤である。別の例として、ペプチドは、経口投与後、消化管上皮を通過してペプチドが輸送される際に還元され得る。ペプチドは、消化管の様々な部分に曝露されると還元され得る。消化管は、還元環境であり得、ジスルフィド結合の還元により、ジスルフィド結合のある治療用分子が最適な治療効果をもたらす能力を阻害し得る。ペプチドはまた、エンドソームもしくはリソソームによる内在化後などの細胞への進入時、またはサイトゾルもしくは他の細胞コンパートメントへの進入時にも還元され得る。ジスルフィド結合の還元及びペプチドのアンフォールディングは、機能性の喪失につながるか、またはバイオアベイラビリティ、ピーク血漿中濃度、生物活性、及び半減期などの重要な薬物動態パラメーターに影響し得る。ジスルフィド結合の還元はまた、後に続くプロテアーゼによる分解に対するペプチドの感受性を増大させることから、機能性の喪失につながり得、それにより、投与後にインタクトなペプチドが急速に失われることになる。いくつかの実施形態において、還元に対して耐性のあるペプチドは、インタクトのままであり得、容易に還元されるペプチドと比較して、身体の様々なコンパートメント及び細胞において、より長期にわたって機能的活性を付与し得る。

【0367】

特定の実施形態において、本開示のペプチドは、安定なペプチドを特定するために、還元剤に対する耐性の特徴について分析され得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、0.00001M~0.0001M、0.0001M~0.001M、0.001M~0.01M、0.01M~0.05M、0.05M~0.1Mなどの異なるモル濃度の還元剤に15分間以上曝露させた後もインタクトのままであり得る。いくつかの実施形態において、ペプチド安定性を決定するために使用される還元剤は、ジチオスレイトール(DTT)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンHCl(TCEP)、2-メルカプトエタノール、(還元型)グルタチオン(GSH)、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、還元剤への曝露後、少なくとも5%~10%、少なくとも10%~20%、少なくとも20%~30%、少なくとも30%~40%、少なくとも40%~50%、少なくとも50%~60%、少なくとも60%~70%、少なくとも70%~80%、少なくとも80%~90%、または少なくとも90%~100%のペプチドがインタクトのままである。いくつかの実施形態において、ペプチドは、GSH還元条件に対して完全に耐性があり、DTT還元条件での分解に部分的に耐性がある。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、生理学的還元条件での分解に耐えることができるか、または耐性があり得る。

【0368】

プロテアーゼに対するペプチドの耐性。本開示のペプチドの安定性は、プロテアーゼによる分解に対する耐性によって決定され得る。プロテアーゼはまた、ペプチダーゼまたはプロテアーゼとも呼ばれ、隣接するアミノ酸の間の結合を破壊することによって、ペプチドとタンパク質を分解することができる酵素である。特定のアミノ酸を標的化する特異性を有するプロテアーゼのファミリーには、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、及びアスパラギンプロテアーゼが含まれ得る。更に、メタロプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼ、シトクロムP450酵素、及びカテプシンもまた、ペプチド及びタンパク質を消化することができる。プロテアーゼは、血液、粘膜、肺、皮膚、消化管、口、鼻、眼、及び細胞のコンパートメント中に高濃度で存在し得る。プロテアーゼの誤調節は、リウマチ様関節炎及び他の免疫障害などの様々な疾患にも存在し得る。プロテアーゼによる分解は、治療用分子のバイオアベイラビリティ、生体内分布、半減期、及び生物活性を低下させ得、それにより、その治療機能を果たすことができなくなる。いくつかの実施形態において、プロテアーゼに対して耐性のあるペプチドは、*in vivo*において合理的に許容される濃度で、より良好な治療活性を提供し得る。

【0369】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、任意のクラスのプロテアーゼによる分解に抵抗し得る。特定の実施形態において、本開示のペプチドは、ペプシン（胃に存在し得る）、トリプシン（十二指腸に存在し得る）、血清プロテアーゼ、またはこれらの任意の組み合わせによる分解に抵抗する。いくつかの実施形態において、ペプチド安定性を決定するために使用されるプロテアーゼは、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。特定の実施形態において、本開示のペプチドは、肺プロテアーゼ（例えば、セリン、システイニル、及びアスパルチルプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、好中球エラスターゼ、アルファ-1アンチトリプシン、分泌性ロイコプロテアーゼ阻害薬、及びエラフィン）、またはこれらの任意の組み合わせによる分解に抵抗し得る。いくつかの実施形態において、プロテアーゼへの曝露後、少なくとも5%~10%、少なくとも10%~20%、少なくとも20%~30%、少なくとも30%~40%、少なくとも40%~50%、少なくとも50%~60%、少なくとも60%~70%、少なくとも70%~80%、少なくとも80%~90%、または少なくとも90%~100%のペプチドがインタクトのままである。

【0370】

酸性条件におけるペプチド安定性。本開示のペプチドは、酸性の生物学的環境に投与され得る。例えば、経口投与後、ペプチドは、胃の胃液及び消化（GI）管の酸性環境条件に曝され得る。胃のpHは、約1~4の範囲であり得、消化管のpHは、酸性から正常な生理学的pHまでの範囲であり、上部消化管から結腸にかけて下がっていく。加えて、膈、後期エンドソーム、及びリソソームもまた、pH7未満などの酸性のpH値を有し得る。これらの酸性条件は、ペプチド及びタンパク質を変性させ、アンフォールディング状態にし得る。ペプチド及びタンパク質のアンフォールディングは、後に続く他の酵素による消化に対する感受性を増加させ、ペプチドの生物学的活性の喪失をもたらし得る。特定の実施形態において、本開示のペプチドは、酸性条件、及び酸性条件をシミュレートする緩衝液中での変性及び分解に抵抗し得る。特定の実施形態において、本開示のペプチドは、1未満のpH、2未満のpH、3未満のpH、4未満のpH、5未満のpH、6未満のpH、7未満のpH、または8未満のpHの緩衝液中での変性または分解に抵抗し得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、1~3のpHでインタクトのままである。特定の実施形態において、1未満のpH、2未満のpH、3未満のpH、4未満のpH、5未満のpH、6未満のpH、7未満のpH、または8未満のpHの緩衝液に曝露後、少なくとも5%~10%、少なくとも10%~20%、少なくとも20%~30%、少なくとも30%~40%、少なくとも40%~50%、少なくとも50%~60%、少なくとも60%~70%、少なくとも70%~80%、少なくとも80%~90%、または少なくとも90%~100%のペプチドがインタクトのままである。他の実施形態において、1~3のpHの緩衝液に曝露後、少なくとも5%~10%、少なくとも10%~20%、少なくとも20%~30%、少なくとも30%~40%、少なくとも40%~50%、少なくとも50%~60%、少なくとも60%~70%、少なくとも70%~80%、少なくとも80%~90%、または少なくとも90%~100%のペプチドがインタクトのままである。他の実施形態において、本開示のペプチドは、人工胃液（pH1~2）中の変性または分解に対して耐性があり得る。いくつかの実施形態において、人工胃液への曝露後、少なくとも5%~10%、少なくとも10%~20%、少なくとも20%~30%、少なくとも30%~40%、少なくとも40%~50%、少なくとも50%~60%、少なくとも60%~70%、少なくとも70%~80%、少なくとも80%~90%、または少なくとも90%~100%のペプチドがインタクトのままである。いくつかの実施形態において、人工胃液などの低pH溶液は、ペプチド安定性を決定するために使用され得る。

【0371】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、*in vivo*、対象の血清中、または細胞内での分解に耐性がある。いくつかの実施形態において、ペプチドは、pH約7、pH約7.5、pH約5~7.5、約6.5~7.5、pH約5~8、

またはpH約5～7などの生理学的pH範囲で安定である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、pH約5以下、pH約3以下、または約3～約5の範囲内などの酸性条件で安定である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、エンドソームもしくはリソソームの条件下、または核内部で安定している。

【0372】

高温でのペプチド安定性。本開示のペプチドは、高温の生物学的環境に投与され得る。例えば、経口投与後、ペプチドは、体内で高温に曝され得る。体温は、36℃～40℃の範囲であり得る。高温は、ペプチド及びタンパク質を変性させ、アンフォールディング状態にし得る。ペプチド及びタンパク質のアンフォールディングは、後に続く他の酵素による消化に対する感受性を増加させ、ペプチドの生物学的活性の喪失をもたらし得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、25℃～100℃の温度でインタクトのままであり得る。高温は、ペプチドのより迅速な分解をもたらし得る。高温での安定性は、熱帯環境または冷蔵へのアクセスが制限されている地域でのペプチドの保存を可能にし得る。特定の実施形態において、6ヶ月～5年間にわたる25℃への曝露後、5%～100%のペプチドがインタクトのままであり得る。15分～1時間にわたる70℃への曝露後、5%～100%のペプチドがインタクトのままであり得る。15分～1時間にわたる100℃への曝露後、5%～100%のペプチドがインタクトのままであり得る。他の実施形態において、少なくとも6ヶ月～5年間にわたる25℃への曝露後、少なくとも5%～10%、少なくとも10%～20%、少なくとも20%～30%、少なくとも30%～40%、少なくとも40%～50%、少なくとも50%～60%、少なくとも60%～70%、少なくとも70%～80%、少なくとも80%～90%、または少なくとも90%～100%のペプチドがインタクトのままである。他の実施形態において、15分～1時間にわたる70℃への曝露後、少なくとも5%～10%、少なくとも10%～20%、少なくとも20%～30%、少なくとも30%～40%、少なくとも40%～50%、少なくとも50%～60%、少なくとも60%～70%、少なくとも70%～80%、少なくとも80%～90%、または少なくとも90%～100%のペプチドがインタクトのままである。

【0373】

方法

ペプチド産生及び精製。いくつかの実施形態において、ペプチドライブラリーの一部であるアミノ酸配列は、発現ベクターまたは固相もしくは液相のペプチド合成法を使用して合成される。例えば、TfR結合ペプチドは、分泌される可溶性タンパク質産生／発現ベクターにクローニングされ、その後、精製され得る。ペプチド精製法としては、アフィニティー精製カラム、イオン交換（カチオン及び／またはアニオンカラムクロマトグラフィー）、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及びサイズ排除カラムクロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。SDS-PAGEと、それに続くクマシー染色及び逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用して、精製タンパク質のサンプルを分析することができる。タンパク質濃度は、UVスペクトル吸収（例えば、吸光度280nm）及び／またはアミノ酸分析によって決定された。いくつかの実施形態において、ペプチドは、Crook ZR et al. Methods Mol Biol. 2020; 2070: 363-396に記載されている方法を使用して、産生及び精製され得る。

【0374】

表面提示ベクターの構築。種々の実施形態において、本明細書に記載される組換えペプチドのクローニング及び発現には、元のDaedalusベクター（Bandaranaya et al., 2011）に基づいて、表面提示ベクターSDGF及びSDPR

(SDGFベクターのバリエーションであるが、トリプシン／キモトリプシン切断を防ぐために、ストーク内の全ての塩基性及び芳香族残基が除去され、ペプチドのC末端に6xHisタグ(配列番号345)が付加されているもの)が使用され得る。ペプチドは、改変されたコード配列を使用し、IRES-GFPを使用せずに、クローニングまたは発現され得る。いくつかの場合において、ベクターのコード配列は、GFP; 単回通過I型膜貫通タンパク質FASLG(ヒトFasリガンド)の膜貫通ドメイン; ポリGGGSスパーサー(配列番号103); 9残基ウシロドプシン抗原; ポリGGGSスパーサー(配列番号103); GSリンカーを含むTEV切断部位; 提示ペプチド; 及びSDPRの場合にのみ6xHisタグ(配列番号345)を含む。いくつかの場合において、コード配列は、ペプチドのN末端にシデロカリンをコードする配列を含む(例えば、配列番号352、または配列番号356~配列番号361)。元のDaedalusベクターと同様に、いくつかの実施形態において、コンストラクト全体は、レンチウイルスLTRとともにクローニングされ、一過性トランスフェクションまたは形質導入によって細胞に導入される。ペプチド配列は、SDGFベクターの場合は、ユニークなBamHIとNotIの切断部位の間、SDPRの場合は、ユニークなBamHIとAgeIの切断部位の間に挿入され得る。SDGFまたはSDPRコンストラクトのいずれにおいても、制限消化(BamHI及びNotI、NEB; T4 DNAリガーゼ、Invitrogen)、In-Fusion(Clontech)、またはGibson Assembly(NEB)を含む多数の標準的なクローニング戦略を使用して所望のコード配列を挿入することができ、形質転換体は全て、Stellarケミカルコンピテントセル(Clontech)、またはエレクトロポレーションによって形質転換されるエレクトロコンピテントセル(NEB10-ベータ細胞)が使用される。DNAは、SDGFフォワードプライマー: TGTACTTCCAGGGAGGATCC(配列番号127); SDGFリバースプライマー: AATGGTGATGAGCGGCC(配列番号128)などの例示的なプライマーを使用してPCR増幅され得る。

【0375】

磁気ソーティングとフローソーティングの両方を使用すると、約 10^9 細胞のスクリーニングが可能となり得る。最適なコンストラクト発現のための3日間及びおよそ24時間の倍加時間を考慮して、スクリーニングを行う細胞の数の $1/8$ 、または 1.2×10^8 を越える細胞が形質導入され得る。限定数のペプチド足場を試験するために、飽和変異導入(例えば、NNK)によってライブラリー多様性が達成された。しかしながら、多様性の高い足場ライブラリーが好ましい場合には、ライブラリーを約10,000メンバーに減らし、オリゴヌクレオチドプールとしてオーダーし、エラーブローンPCR変異導入によって更に多様化させてもよい。エラーブローンPCR変異導入によって多様化されるライブラリーの場合、ライブラリー全体のサイズ(ライブラリーバリエーションの数)は、課される変異導入の程度に大きく依存し得る。これは、終止コドン及びシステイントポロジの変更により、ペプチドが機能しなくなる可能性があるからである。CDPを含むライブラリーでは、変異導入率(ペプチドあたり1~1.5)を下げればシステイントポロジの破壊による問題が軽減し得るが、変異導入率は、ライブラリーごとに調整され得る。

【0376】

SDGFへの最適化されたクローニングのためのライブラリー設計の例示的な方法は、次のステップを含み得る: 1) 所望のペプチドライブラリーを決定する。ペプチドライブラリーは、既存のデータベース(例えば、UniProt)でシステインリッチ配列から特定されてもよいし、タンパク質設計ソフトウェア(例えば、Rosetta)を使用してin silicoドッキングシミュレーションから得てもよい。2) ペプチド配列をクローニング可能なオリゴヌクレオチドに変換する。ペプチド配列をクローニング可能なオリゴヌクレオチドに変換することは、次のステップを含み得る: (a) ヒトコドン最適化を使用してペプチド配列を逆翻訳すること; (b) PCR増幅及びクローニングを容易にするために均一なフランキング配列を組み込むこと; (c) NGSをライブラリー特性評価に採用する場合は、各ライブラリーメンバーにNGSリード全体でユニーク配列が含

まれることを確認すること。ユニークなマッピングを確実に可能にするためにサイレント変異が導入されてもよい。(d) 完成したライブラリーをオーダーすること。

【0377】

プールされたオリゴヌクレオチドライブラリーのSDGFへのクローニング。プールされたオリゴヌクレオチドライブラリーをSDGFにクローニングするための例示的な方法は、次のステップを含み得る：1) プールされたオリゴヌクレオチドライブラリーを50 μ Lの分子生物学等級の水またはTris-EDTA緩衝液中に再懸濁すること；2) ライブラリーをPCR増幅するために4回の反応を準備し、異なるサイクル数（例えば、14、16、18、及び20）で4回の反応を行うこと；3) 全てのPCR産物をアガロースゲルで泳動させ、プライマーが枯渇した場合にPCR産物がクロスプライミングする結果であり得る所望の産物上の不適切な高分子量アンプリコンスミアを含まないレーンから所望のバンドを抽出し、ゲル抽出キットを使用してバンドを精製すること；4) 任意選択により、更なる多様化が望まれる場合、前のステップのPCR産物を鋳型として用いて、Gene-Morph II Random Mutagenesis Kit及びSDGF Gibsonプライマーを使用して製造元が推奨する反応条件で使用してエラーブローンPCRによって変異導入を実施し、ステップ3のように、ゲルで泳動させ、実質的なクロスプライミングスミアを含まないレーンから所望のバンドを精製すること；5) BamHI/NotIで消化されたSDGF骨格をクローニングするためにライブラリーあたり2 μ gまたはシングルトンあたり100 ngを準備すること；6) アンプリコンをSDGFにクローニングすること。例えば、Gibson反応液を推奨の1時間ではなく50 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートすること；7) PCR精製キットを使用して反応液を脱塩し、溶出して20 μ Lの量に減らすこと；8) ライブラリーをコンピテントE. coliにエレクトロポレーションし、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートすること。例えば、特殊なエレクトロコンピテント細胞を使用し、エレクトロポレーションした細胞をLB寒天+カルベニシリンの大きなプレート（25 $\times$ 25 cm）に播種し、完全に広がるように注意し、完全に乾燥させてから反転させ、ライブラリーコロニー形成単位（CFU）を確立するためのライブラリーの連続希釈液を含む対照ペトリ皿とともに37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションすること；9) 対照プレートを計数してCFUを確立し、CFUが十分であれば、25～50 mLのLB培地+カルベニシリン（100 μ g/mL）を加えてプレート（複数可）をこそぎ、セルスクレーパー、リフター、またはスプレッダーでこそぎ、更なる培地を用いて繰り返し、移動が完了するまでこそぐこと；10) 最終体積200 mLの細菌を37 $^{\circ}$ Cで1時間振盪し、次いで、50 mLのアリコートペレット化すること（4000 $\times$ g、20分間）；ならびに11) 1つを除く全てのペレットを-20 $^{\circ}$ Cで凍結し、残りのペレットをマキシブレップし、好ましくは、レンチウイルス産生の前に最終DNA産物を滅菌濾過すること。

【0378】

哺乳動物表面提示。TfRに結合するペプチドまたは単一候補の検証は、HEK-293細胞の懸濁液を使用して検証することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、24ウェル懸濁組織培養皿内において、1 mL培地中の2E6細胞に対して、推定または候補のペプチドを含む2.5 μ gのSDGFベクター及び3.5 μ gのポリエチレンジオキサンでトランスフェクトされる。細胞のインキュベーション後、プールされる全てのスクリーニングは、レンチウイルスを形質導入した293T細胞（VSV-Gコーティング、293T細胞における標準的な方法によって産生）で実施され得、およそ1、または最大5のMOIでSDGFコンストラクトが送達される。形質導入またはトランスフェクトされた懸濁液HEK-293細胞は、ペレット化され（500 $\times$ g、5分）、標的タンパク質と等モル量のAlexa Fluor 647結合ストレプトアビジン（ThermoFisher）ありまたはなしで、DAPI及び標的タンパク質を含有するFlow Buffer（0.5% BSA及び2 mM EDTAを含むPBS）中に最大8E6細胞/mLで再懸濁され得る。染色インキュベーションは全て、穏やかに攪拌しながら、4 $^{\circ}$ Cで30分間実施された。低ストリンジェンシープロトコル（最初のアッセイ検証及びプール化

10

20

30

40

50

スクリーニング)では、200 nMの標的タンパク質が使用され得、ストレプトアビジンが標的タンパク質と予備混合され得る。細胞は、インキュベートされ、Flow Bufferで10倍に希釈され、ペレット化され(500×g、5分)、新鮮なFlow Bufferに再懸濁され(最大6.5E6細胞/mL)、その後、フローサイトメトリーに供され得る。中ストリンジェンシープロトコル(SSM成熟)では、20 nMの標的タンパク質のみが使用され得、細胞は、標的タンパク質のみとインキュベートされ、Flow Bufferで10倍に希釈され、ペレット化され、次いで、20 nMのストレプトアビジンとともに再懸濁され得る。細胞は、再度インキュベートされ、Flow Bufferで10倍に希釈され、ペレット化され(500×g、5分)、新鮮なFlow Bufferに再懸濁され(最大6.5E6細胞/mL)、その後、フローサイトメトリーに供された。高ストリンジェンシープロトコルは、標的タンパク質の染色の直後に、Flow Bufferのみによる追加の洗浄工程が含まれることを除き、中ストリンジェンシープロトコルと同一である。最初のスクリーニングは、弱い一価のアビディティに対する2ステップ染色プロトコルとは対照的に、四価の標的アビディティに対する1ステップ染色プロトコルを使用して、200 nMのTfR濃度で実施された。その後の親和性成熟では、20 nMの1ステップ染色(1回目の親和性成熟スクリーニング)及び8 nMの2ステップ染色(2回目の親和性成熟スクリーニング)が使用された。シングルトンバリエーションの検証及び順列試験の染色は、バリエーションの濃縮及び特定を行ったスクリーニングと同じ条件下で実施された。トランスフェリン競合染色アッセイでは、2ステップ染色で、TfRレベルが8 nM、トランスフェリンレベルが10 µMであった。トランスフェクト細胞は、まずトランスフェリン(10 µM)とインキュベートされ、次いで、最初の染色ステップのためにTfR溶液が添加された。2回目の染色ステップのために、細胞がペレット化され、次いで、ストレプトアビジン溶液中に再懸濁された。この2回目のインキュベーション後、細胞がペレット化され、フローサイトメトリーによってストレプトアビジン染色(TfR結合を示す)が分析された。マウストランスフェリン対ヒトトランスフェリン交差反応性試験では、可溶性ペプチドがNHS-エステル結合を介してAlexa Fluor 647色素で標識され、次いで、細胞表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する細胞を50 nMで染色した。共染色は必要なかったが、それ以外の点で染色プロトコルは同一である。いくつかの場合において、フローソーティングは、Beckton-Dickinson Aria IIで実施され、解析は、Beckton-Dickinson LSR IIとAcea NovoCyteフローサイトメーターの組み合わせで実施される。データ解析は、FlowJo(FlowJo, LLC)及びExcel(Microsoft)で実施され得る。

【0379】

ペプチドの部位飽和変異導入(SSM)。本開示のペプチド、例えば、最初の哺乳動物表面提示実験で特定されたペプチドの親和性成熟のために、SSMを採用することができる。各成熟ラウンド中に、可能性のある全ての非システイン点バリエーションのライブラリーを構築し、最初のスクリーニングよりも高ストリンジェンシーでTfRに対してスクリーニングすることができる。結合が改善したバリエーションをSangerシーケンシングによって濃縮及び特定することができる。このように濃縮されたバリエーション変異を様々な順列で互いに組み合わせて(データに示される)、複合的に改善された結合物質を特定することができる。

【0380】

次世代シーケンシング。いくつかの実施形態において、TfR結合に影響するバリエーションの濃縮または枯渇についてのスクリーニングは、Illuminaシーケンシングによって評価することができる。そのようなシーケンシング法は、50 µLのTerra Direct PCR Mix(Clontech製)中に再懸濁した細胞ペレットを回収し(1.5E6、3回の技術的反復)、元のクローニングプライマーを使用して16サイクルで増幅させることを含む。最大4つのアリコートが60 µLのPhusion DNAポリメラーゼ反応液に16倍で希釈され、フローセル接着のためのアダプター配列を含有

する個別のIlluminaプライマーを使用して増幅され得る。フォワードプライマーは、マルチプレックスのための6bpバーコードを含み得る。サンプル分析にはIllumina HiSeq 2500が急速モードで使用され得、マッピングにはBowtie 2ソフトウェアが使用され得、データ解析にはExcel (Microsoft) 及びMATLAB (登録商標) (MathWorks) が使用され得る。

【0381】

His-Avi-TfRの産生、精製、及びビオチン化。いくつかの実施形態において、*in vitro*アッセイを使用して、TfRへの結合能力について候補ペプチドを分析することができる。いくつかの場合において、ビオチン化されたHis-Avi-TfRは、哺乳動物細胞で発現され得る。任意選択により、タンパク質は、精製後にビオチン化され得る（例えば、BirAを使用して、コードされたAviTagをビオチン化する）。いくつかの実施形態において、発現されたペプチドは、翻訳または分泌中の安定性を高めるために、N末端でシデロカリン（配列番号351）に融合される（例えば、配列番号352、または配列番号356～配列番号361）。本明細書で開示されるペプチドは、公開されている方法論を使用して、哺乳動物細胞培養で生成することができる。（A. D. Bandaranayake, C. Correnti, B. Y. Ryu, M. Brault, R. K. Strong, D. Rawlings. 2011. Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Research*. (39) 21, e143）。ペプチド配列は、標準的な分子生物学技術を使用して、DNAに逆翻訳し、合成し、シデロカリンとインフレームでクローニングされた。（M. R. Green, Joseph Sambrook. *Molecular Cloning*. 2012 Cold Spring Harbor Press）。得られたコンストラクトは、レンチウイルスにパッケージングし、HEK-293細胞に形質導入し、拡大させ、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）によって単離し、タバコエッチウイルスプロテアーゼで切断し、アセトニトリル及び0.1% TFAのグラジエントを使用するサイズ排除クロマトグラフィーによって均質になるまで精製された（例えば、ペプチド及びシデロカリン担体（配列番号351）の分離）。シデロカリン融合体として発現されたペプチドは、タバコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼで処理してシデロカリンを切断すると、N末端GSを残すことができる。したがって、本開示の配列は、任意選択により、N末端GSを含み得る。ペプチドは、クロマトグラフィー、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）または逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を使用して、シデロカリン担体から分離することができる。精製後、各ペプチドを凍結乾燥させ、凍結保存した。あるいは、精製されたタンパク質は、抗凍結剤（例えば、5%グリセロール）を含む水溶液（例えば、PBS）中で急速凍結され、凍結保存され得る。

【0382】

フルオロフォアコンジュゲーション。いくつかの実施形態において、ペプチドまたはペプチドのライブラリーのスクリーニングは、目的のタンパク質またはタンパク質パートナーをフルオロフォアまたは任意の他の検出可能部分で標識することを含み、これにより、フルオロフォアまたは検出可能部分からのシグナルを検出することで、ペプチドへの結合が示される。使用することができるフルオロフォアの一例は、Alexa Fluor 647 NHSエステル（Life Technologies）であり、これを製造元のプロトコルに従って使用して、目的のタンパク質を標識することができる。飽和は、質量分析によって決定されるように、分子あたり約1個のフルオロフォアである。遊離色素は、標識後に除去することができる（例えば、スピンカラム透析による）。

【0383】

表面プラズモン共鳴（SPR）相互作用解析。いくつかの実施形態において、TfR結

10

20

30

40

50

合は、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用して評価することができる。本開示のペプチドは、タバコエッチウイルス（TEV）切断可能であり得、したがって、独立した可溶性タンパク質として分析され得る。

【0384】

本開示の様々なペプチドは、TfRへの結合親和性について分析され得る。結合親和性は、Series S SAチップを備えたBiacore T100機器（GE Healthcare）において25℃で実施され得る、捕捉させたビオチン化TfRを使用したSPR実験によって分析することができる。0.1mg/mLのウシ血清アルブミン（BSA）を用いる実験において、HBS-EP+（10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20）がランニング緩衝液として使用され得る。可溶性TfR結合ペプチドは、試験されるTfR結合ペプチドに応じて濃度範囲を変えることができる希釈系列を2ug/mLのTfRとインキュベーションし、SPR実験のために約300共鳴単位（RU）のタンパク質を捕捉することによって、結合を評価することができる。

【0385】

いくつかの場合において、SPRは、2つの密度の捕捉ビオチン化hTfRに対してペプチドを注入することによって実施し、次いで、得られたデータをグローバルに解析することができる。TfRとTfR結合ペプチドとの間の相互作用について、結合定数（例えば、 K_D 値）ならびにオンレート及びオフレートが算出され得る。

【0386】

いくつかの実施形態において、SPRは、精製されたアポトランスフェリン及びホロトランスフェリンを用いて実施される。ホロトランスフェリンは、アポトランスフェリンを鉄溶液に入れることによって、アポトランスフェリンから生成することができる（例えば、0.4当量の $Fe(NTA)_2$ を3.2当量が添加されるまで5分ごとに添加する）。過剰な鉄は、その後、緩衝液交換（例えば、PBSへのスピンカラム透析）を介して除去することができる。

【0387】

円二色性。タンパク質二次構造は、円二色性（CD）を使用して評価することができる。CDスペクトルは、Jasco J-720W分光旋光計により、1.0mmの光路長セルを使用して測定することができる。10mMリン酸緩衝液（pH=7.4）中のタンパク質サンプルは、25~30uMのタンパク質濃度であり得る。サンプルは、260~190nmの波長帯範囲で分析され得る。データは、相対楕円率 $[\theta]$ ；（mdeg）で表され得る。タンパク質の熱安定性を決定するために、サンプルは、2℃/分の勾配で段階的に昇温される20℃から95℃までの温度に供され得る。安定性及びタンパク質アンフォールディングは、 α ヘリックス二次構造について、210nmでモニターした。タンパク質アンフォールディングはまた、215nmまたは220nmでモニターされ得る。データは、相対楕円率 $[\theta]$ で表され得、mdeg単位で報告される。

【0388】

プロテアーゼ耐性試験。例えば、腫瘍環境は、高濃度のプロテアーゼを含有する。更に、タンパク質分解（プロテアーゼによる分解または切断）に対する耐性は、例えば、循環中におけるペプチド分解及び後に続く免疫原性の可能性を低減する。タンパク質分解に対する耐性は、更に、ペプチドの血清半減期及びペプチドの全体的なバイオアベイラビリティを増加させ得る。したがって、本開示のペプチドがプロテアーゼによる分解に対して耐性があることは、有利である。

【0389】

タンパク質分解消化に対する耐性を決定するために、本開示の様々なペプチドは、pH1.05の人工胃液中の50Uのブタペプシン（Sigma-Aldrich P7012）、またはPBS中の50Uのブタトリプシン（Sigma-Aldrich 6567）と混合され、37℃で30分間インキュベートされ、逆相HPLC（RP-HPLC）によって分析され得る。これとは別に、ペプチドは、pH1.05の人工胃液43中の

10

20

30

40

50

50 Uのブタペプシン (Sigma-Aldrich P7012)、またはPBS中の50 Uのブタトリプシン (Sigma-Aldrich 6567)と混合され、37℃で30分間インキュベートされ、RP-HPLCによって分析され得る。対照ペプチドは、PBS中でインキュベートされ得る。全てのペプチドは、非還元条件でインキュベートされ得る。

【0390】

いくつかの実施形態において、SDPRプロテアーゼ耐性試験は、トリプシン及びキモトリプシンを含むシーケンシング等級の酵素の配列を有して、実施することができる。トリプシン及びトリプシン阻害薬がHPLC分析に使用され得る。

【0391】

還元条件下におけるペプチド安定性試験。核内のタンパク質などの細胞内の1つ以上の標的タンパク質と相互作用するように設計または操作され得るペプチドは、細胞のサイトゾルコンパートメント内の還元条件に曝露され得る。したがって、本開示のペプチドが還元条件において安定性を示すことは、有利であり得る。本開示のペプチドの安定性は、10 mMジチオスレイトール (DTT) 及び／または10 mMグルタチオン (GSH) 中で試験され得る。GSHは、細胞内条件でのペプチド安定性を試験するには、より生理学的に適切な還元剤であり得る。ペプチド-標的タンパク質相互作用の一例は、TfRタンパク質へのペプチド結合である。試験ペプチドに対する安定性は、例えば、HPLC (または放射性標識ペプチドが使用される場合は放射性HPLC) を使用して評価することができる。

【0392】

熱シフトアッセイ。タンパク質の融解温度 (T_m) の決定は、SYPRO Orange色素 (Molecular Probes) を使用して、タンパク質のアンフォールディングをモニターすることによって実施することができる。簡潔に述べると、全体積20 μ LのPBS緩衝液中の0.1 mg/mLのタンパク質サンプルが2 μ Lの10X SYPRO Orange色素と混合され得る。タンパク質アンフォールディング後の疎水性タンパク質コアへの色素のインターカレーションが、CFX96 Deep Well Real-Time System (BioRad) を備えるC1000 Touch Thermal Cyclerを使用してアッセイされた。サンプルは、毎分0.5℃ずつ段階的に上げながら20℃から95℃まで加熱され、各点で5秒間保持し、続いて、蛍光の読み取りがなされた。 T_m は、相対蛍光単位 (RFU) の導関数を分析することによって算出された。

【0393】

TfR結合ペプチドのマウスTfRに対する交差反応性。本明細書で開示されるTfR結合ペプチドのヒト及びマウスTfRに対する交差反応性は、細胞表面結合アッセイを使用して実施することができる。表面提示パラダイムを逆にするについては、実施例3において更に記載される。表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する293 F細胞が、AlexaFluor 647色素で直接標識された可溶性TfR結合ペプチドで染色された。その後、フローサイトメトリーがデータ解析に使用され、TfR結合ペプチドのヒト対マウスの反応性を評価することができる。

【0394】

TfR結合ペプチドとTfRの共結晶化及び結晶構造の解明。TfR結合ペプチドとTfRの共結晶化は、次のとおりに実施することができる。ペプチドは、およそ5~15 mg/mLの標的濃度、いくつかの場合において10 mg/mLで再懸濁され得る。例えば、単一ペプチドが任意の他の成分を含まずに溶液中に存在する場合は、最大80 mg/mLの高濃度が結晶化に使用され得る。結晶化スクリーニングは、Nextal JCSG+、PEG、及び $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ファクトリアルスイート (Qiagen) ならびにサブマイクロリットルロボティクス (TTP Labtech mosquito) を使用して設定した、1:1のタンパク質溶液:リザーバー溶液シッティングドロップによる蒸気拡散によって、室温で実施され得る。回折データは、Rigaku MicroMax-

10

20

30

40

50

007 HFホームソースまたはAdvanced Light Sourceのビームライン5.0.1 (Lawrence Berkley National Laboratory, Berkeley, CA) を使用して、単一結晶から収集され得る。初期位相は、RCSB PDB (Berman, H. M., Nucleic Acids Res., 28 (1): 235-42 (2000)) から得た相同な構造を検索モデルとして使用するCCP4プログラムスイート (Winn, M. D., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 67 (Pt 4): 235-42 (2011)) でPHASER (McCoy, A. J., J Appl Crystallogr., 40 (Pt 4): 658-674 (2007)) を使用する分子置換 (MR)、またはCuK α 線を使用して異常シグナルを最大化し、SHELX (Sheldrick, G. M., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 66 (Pt 4): 479-85 (2010)) で硫黄部分構造を決定する硫黄単波長異常分散法 (sSAD) (Liu, Q., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 69 (Pt 7): 1314-32 (2013)) のいずれかによって、決定され得る。sSAD位相決定の場合、1°振幅内に180°の交互ファイ回転を有する5°ウェッジでデータを収集することによって、Bijvoetペア測定が最適化され得る。データは、HKL2000を用いて整理され、スケールングされ得る (Otwinski, Z., Methods Enzymol., 276: 307-326 (1997))。COOT (Emsely, P., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 60 (Pt 12 Pt 1): 2126-32 (2004)) 及びREFMAC (Murshudov, G. N., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 53 (Pt 3): 240-55 (1997)) を用いて、モデル構築及び精密化の反復サイクルが実施され得る。構造検証は、MolProbity (Davis, I. W., Nucleic Acids Res., 35 (Web Server issue): W375-83 (2007)) を用いて実施され得る。

【0395】

マウスにおけるTfR結合ペプチドの生体内分布を解明するための全身オートラジオグラフィ。全身オートラジオグラフィ (WBA) の矢状面切片作成は、次のステップを使用して実施することができる。各ペプチドは、実施例14に更に記載されるように、N末端のリシンをメチル化することによって放射性標識され得る。したがって、ペプチドは、メチルまたはジメチルリシン及びメチル化またはジメチル化されたアミノ末端を含有し得る。健全な腎臓を持つ、体重20~25gの雌のHarlan無胸腺ヌードマウスに、100nmolの用量の放射性標識ペプチドが尾静脈注射を介して投与され得る。各放射性標識ペプチドは、記載された時間、動物内を自由に循環させ得、その後、動物を安楽死させ、切片化する。

【0396】

処置コホートの全てのマウスには、100nmolの放射性標識ペプチドまたはペプチドコンストラクト (約20mg/kg) が投与され得る。対照マウスには、生理食塩水またはPBSが注射され得る。投与期間の終了後、マウスは、ヘキサン/ドライアイス浴中で凍結され、次いで、カルボキシメチルセルロースの凍結ブロックに包埋される。動物全体の矢状面スライスが調製され得、イメージング用の凍結薄片が得られる。凍結薄片は、ミクロトームを使用して取得され得、脳、腫瘍、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、筋肉、脂肪、胆嚢、上部消化管、下部消化管、骨、骨髄、生殖管、眼、軟骨、胃、皮膚、脊髄、膀胱、唾液腺などの組織の可視化が可能になる。切片は、イメージング前に、フリーザー内で乾燥させる。

【0397】

オートラジオグラフィのイメージングのために、テープに貼り付けられた薄片は、凍結乾燥され、放射性サンプルは、ホスフォイメージャプレートに7日間曝露され得る。これらのプレートは現像され、各器官からの信号 (デンストメトリー) が各動物の心臓

10

20

30

40

50

の血液に見られる信号に正規化された。組織内の信号が当該組織内の血液から予想される信号よりも暗い場合、その領域、組織、構造、または細胞における蓄積を示す。

【0398】

報告される組織内のペプチドの定量値 (nmol/g) は、ブロック内の標準曲線及びペプチドの ^{14}C 比活性を参照することによって達成された。

【0399】

経時的な血清及び組織のペプチドレベルの定量化。利用される放射性核種に応じて、*ex vivo* 液体シンチレーション計測 (例えば、 ^{14}C) またはガンマ計数 (例えば、全ての陽電子放出核種) のいずれかが使用されて、特定の時点での様々な器官のペプチドレベル、ならびに血液半減期及び器官取り込み及びクリアランスなどの経時的なペプチドの挙動が決定され得る。処置コホートの全てのマウスには、 100 nmol の放射性標識ペプチドまたはペプチドコンストラクト (約 20 mg/kg) が投与され得る。対照マウスには、生理食塩水または PBS が注射され得る。各放射性標識ペプチドは、記載された時間、動物内を自由に循環させ、その後、動物を安楽死させ、切片化した。腎臓、肝臓、脳、脾臓、筋肉、及び皮膚を含む、採取された器官は、計数前または後にホモジナイズされるか、または秤量され得る。内部参照標準及び対照サンプルについても計数され得る。ペプチドの取り込みデータは、組織1グラムあたりのペプチドの量として、または1グラムあたり (または1モルあたりまたは1体積あたり) の注入量パーセントとして、可視化され得る。

【0400】

細胞または組織におけるペプチドの取り込みの一般的な決定。本明細書で開示されるペプチドまたはペプチドコンストラクトの取り込みは、*ex vivo* または *in vivo* のいずれかで、特定の細胞、細胞集団、組織、または器官において決定することができる。同様に、カーゴまたはペイロード送達の有効性は、*ex vivo* で、または、例えば、カーゴ分子が検出可能な剤を含む場合、*in vivo* で、決定され得る。*ex vivo* 分析は、器官の採取及び採取された組織の分析前の固定化 (例えば、4%ホルムアルデヒドの使用) を含む。組織サンプルは、顕微鏡、分光法、フローサイトメトリー、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、及び超音波、電磁放射線 (例えば、UV/VIS、X線) または放射能の測定を介する様々な分析方法を使用して、分析することができる。例えば、組織への取り込みは、細胞、細胞集団、組織、もしくは器官サンプルの発光もしくは生物発光を測定することによって、または細胞、細胞集団、組織、もしくは器官サンプルの放射能を測定することによって、及び1グラムあたり (または1モルあたりまたは1体積あたり) の注入量パーセントなどの取り込み値を算出することによって、決定され得る。加えて、特定の時点での生体内分布 (例えば、静的イメージング) または経時的な生体内分布 (例えば、動的イメージング) を可視化する核画像の取得は、様々な技術 (例えば、PET または SPECT) 及び適切な放射性標識ペプチドを使用して実施することができる。

【0401】

MTR BBB トランスサイトーシスモデル、及び毛細血管枯渇による実質/毛細血管分布の定量化。マウス (CD-1 系統、各時点で $N=1$) に麻酔をかけ、左頸静脈及び右頸動脈が外科的に露出され得る。標識されたペプチド (例えば、約 $200\text{ }\mu\text{L}$ の体積で $0.25\sim1\text{ }\mu\text{Ci}$; 比活性度は、配列番号1で $22\sim40\text{ Ci/mol}$ 及び配列番号32で $127\sim150\text{ Ci/mol}$) が頸静脈に注射され得る。時間経過 ($0\sim30$ 分) 内の所与の時間後、動脈血を採取し、続いて、断頭及び脳の採取を行うことができる。脳及び血清は、 ^{14}C レベルについて液体シンチレーション計測を介して試験することができ、データは、多重時間回帰数学モデルに組み込んで CNS 蓄積率を定量化することができる。この CNS 蓄積が毛細血管に限定されるのか、または実際に血管トランスサイトーシスを示すのかを決定するために、別の一群の動物 ($N=3$ /ペプチド) を投与から5分後に安楽死させ、脳のホモジネートをデキストラン密度勾配による遠心分離にかけることができる。これにより、実質から毛細血管を分離することが可能になり、2つの組織を別々にシンチレーション計測にかけて ^{14}C の信号を定量化することができる。正規化された信

号比は、BBB透過の指標となり得、例えば、配列番号1は、毛細血管よりも実質で実質的に高い信号を有し得、これは、BBBトランスサイトosisの証拠と解釈される。

【0402】

NT融合体及びニューロンCREレポーターマウスの活性化の方法。環状AMP応答配列(CRE)の制御下でホタルルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスが使用され得る。これらのマウスの細胞は、環状AMP(cAMP)の上昇または転写因子CRE結合タンパク質1(CREB)を活性化する他の機序の条件下においてルシフェラーゼを発現することができ、これは、動物用途に製剤化されたルシフェリンをIV投与した後、全動物用発光装置(IVISイメージャー)で測定することができる。マウスは、フォルスコリン及びロリプラムというニューロンのcAMP産生を刺激し、その分解を阻害する薬物(それぞれ)をこれらのマウスに投与することによって、適切な応答配列制御下で導入遺伝子が発現することが検証され得る。次いで、フォルスコリン及びロリプラムを投与された動物は、本明細書に記載されるように、4時間後にルシフェラーゼ発現について試験され得る。これらの対照実験では、動物の脳からの高レベルの発光が典型的であり得る。このアッセイで検証された動物は、約1週間かけて定常状態(低)ルシフェラーゼ発現に戻し、次いで、ニューロテンシンまたはニューロテンシンに融合されたTfR結合タンパク質を用いて試験することができる。ニューロテンシン受容体の発現は、前頭葉を含むCNSの細胞のサブセットに限定され得る。活性化されると、シグナル伝達経路が活性化され得、最終的にCREBリン酸化及びCRE媒介性転写に至る。そのリガンドであるニューロテンシンは、BBBを通過することができない神経ペプチドである。したがって、ニューロテンシン及びTfR結合ペプチドを含む融合タンパク質のIV投与は、これらのマウスの脳内にCRE駆動型ルシフェラーゼが誘導される場合、BBB透過を示し得る。

【0403】

NT融合体であるペプチドコンストラクトは、配列番号33~配列番号35、配列番号68~配列番号70、配列番号168~配列番号170、配列番号203~配列番号205、または配列番号359~配列番号361のいずれか1つと、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する任意の配列を含む。

【0404】

製造方法

本明細書に記載されるペプチドの組換え発現には、様々な発現ベクター/宿主系が利用され得る。そのような系の非限定的な例としては、本明細書に記載されるペプチド、ペプチドコンストラクト、もしくはペプチド融合タンパク質/キメラタンパク質をコードする核酸配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌、上述の核酸配列を含有する組換え酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌などの微生物、上述の核酸配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系、組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)、タバコモザイクウイルス(TMV))を感染させるか、もしくは上述の核酸配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系、または安定的に増幅する(例えば、CHO/dhfr、CHO/グルタミンシンターゼ)もしくは二重微小染色体で不安定に増幅する(例えば、マウス細胞株)、上述の核酸配列の複数コピーを含有するように操作された細胞株を含む、組換えウイルス発現ベクター(例えば、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レンチウイルス)を感染させた動物細胞系が挙げられる。ペプチドのジスルフィド結合形成及びフォールディングは、発現中もしくは発現後またはその両方において生じ得る。

【0405】

宿主細胞は、本明細書に記載される1つ以上のペプチドを発現するように適応され得る

。宿主細胞は、原核生物細胞、真核生物細胞、または昆虫細胞であり得る。いくつかの場合において、宿主細胞は、挿入された配列の発現の調節、または所望の特定の様式での遺伝子もしくはタンパク質産物の修飾及びプロセッシングが可能である。例えば、ある特定のプロモーターからの発現は、ある特定の誘導物質（例えば、メタロチオニンプロモーターに対する亜鉛及びカドミウムイオン）の存在下で増加し得る。いくつかの場合において、ペプチド産物の修飾（例えば、リン酸化）及びプロセッシング（例えば、切断）は、ペプチドの機能にとって重要であり得る。宿主細胞は、ペプチドの翻訳後プロセッシング及び修飾について、特徴的かつ特異的な機序を有し得る。いくつかの場合において、ペプチドを発現するために使用される宿主細胞は、微量のタンパク質分解酵素を分泌する。

【0406】

細胞ベースまたはウイルスベースのサンプルの場合、精製前に生物を処理して標的ポリペプチドを保存及び／または遊離させることができる。いくつかの実施形態において、細胞は、固定剤を使用して固定される。いくつかの実施形態において、細胞は、溶解される。細胞材料は、細胞の多くの部分が破壊されることなく、細胞材料の表面から、及び／または細胞間の隙間からタンパク質を除去するような様式で処理され得る。例えば、細胞内空間内及び／または植物細胞壁内に位置するタンパク質を除去するために、細胞材料は、液体緩衝液中に浸漬されるか、または、植物材料の場合、真空中に供してもよい。細胞材料が微生物である場合、タンパク質は、微生物培地から抽出され得る。あるいは、ペプチドは、封入体に充填され得る。封入体は、培地中の細胞成分から更に分離され得る。いくつかの実施形態において、細胞は、破壊されない。インタクトな細胞またはウイルス粒子の結合及び／または精製のために、細胞またはウイルスによって提示される細胞またはウイルスペプチドが使用され得る。組換え系に加えて、ペプチドはまた、タンパク質及びペプチドの合成に採用される様々な既知の技術を使用して、無細胞系で合成された後、抽出され得る。

【0407】

いくつかの場合において、宿主細胞は、カーゴ分子（例えば、治療薬）の結合点を有するペプチドを産生する。結合点は、リシン残基、N末端、システイン残基、システインジスルフィド結合、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基、C末端、または非天然アミノ酸を含み得る。ペプチドは、固相ペプチド合成、または溶液相ペプチド合成などによって、合成的に産生され得る。ペプチド合成は、フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）化学またはブチルオキシカルボニル（Boc）化学によって実施され得る。ペプチドは、合成中もしくは合成後またはその両方においてフォールディングが生じ得る（ジスルフィド結合の形成）。ペプチドフラグメントは、合成的または組換え的に産生され得る。次いで、ペプチドフラグメントは、酵素的または合成的に互いに接続され得る。

【0408】

他の態様において、本開示のペプチドは、従来の固相化学合成技術によって、例えば、Fmoc固相ペプチド合成法にしたがって、調製することができる（“Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach,” edited by W. C. Chan and P. D. White, Oxford University Press, 2000）。

【0409】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、製造中により安定であり得る。例えば、本開示のペプチドは、組換え発現及び精製中により安定であり得、それにより、製造プロセスに存在するプロテアーゼによる分解速度の低下、より高いペプチド純度、より高いペプチド収率、またはこれらの任意の組み合わせがもたらされる。いくつかの実施形態において、ペプチドは、製造、保存、及び流通中における高温及び低温での分解により安定であり得る。例えば、いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、25℃で安定であり得る。他の実施形態において、本開示のペプチドは、70℃または70℃より高い温度で安定であり得る。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、100℃または100℃より高い温度で安定であり得る。

【0410】

医薬組成物

本開示の医薬組成物は、本明細書に記載される任意のペプチドと、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁化剤、粘稠化剤、抗酸化剤、溶解剤、緩衝液、オスモライト、塩、界面活性剤、アミノ酸、カプセル化剤、増量剤、抗凍結剤、及び／または賦形剤などの他の化学成分との組み合わせであり得る。医薬組成物は、本明細書に記載されるペプチドの生物への投与を容易にする。いくつかの場合において、医薬組成物は、ペプチドの半減期を延長し、及び／またはペプチドが標的細胞を透過するのを助ける因子を含む。

【0411】

医薬組成物は、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、直腸、エアロゾル、非経口、眼科用、肺、経皮、膈、眼、鼻、経口、舌下、吸入、皮膚、髄腔内、腫瘍内、鼻腔内、及び局所投与を含む、様々な形態及び経路で、医薬組成物として治療上有効な量で投与され得る。医薬組成物は、例えば、本明細書に記載されるペプチドを直接器官に注射することにより、任意選択によりデポ注射で、局所または全身に投与され得る。

【0412】

非経口注射は、ボーラス注射または連続注入用に製剤化され得る。医薬組成物は、油性または水性ビヒクル中の無菌懸濁液、溶液または乳剤として、非経口注射に好適な形態であり得、懸濁化剤、安定化剤及び／または分散剤などの製剤化剤を含有し得る。非経口投与用の医薬製剤は、水溶性形態である、本明細書に記載されるペプチドの水溶液を含む。本明細書に記載されるペプチド抗体複合体の懸濁液は、油性注射懸濁液として調製され得る。好適な親油性溶液またはビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが含まれる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含有し得る。懸濁液はまた、好適な安定剤、または本明細書に記載されるそのようなペプチド抗体複合体の可溶性を高め、及び／または凝集を減少させる薬剤を含有し得、これにより、高濃度の溶液を調製が可能となる。

【0413】

本明細書に記載される細胞透過またはペプチドを増加させるための製剤化またはアプローチは、限定するものではないが、最大10 μ Mなどの高投与量の本明細書に記載されるペプチドを使用すること；Tatペプチドもしくは細胞透過ペプチド、またはそのバリエーションもしくは誘導体をペプチドにコンジュゲートまたは融合させること；Tatペプチドもしくは細胞透過ペプチド、またはそのバリエーションもしくは誘導体とペプチドを同時送達すること；Argパッチをペプチドにコンジュゲートまたは融合させること；あるいは最大10 μ MなどのペプチドとArgパッチペプチドを同時送達することを含み得る。いくつかの実施形態において、細胞透過を増加させるために、タンパク質トランスフェクション薬剤、ペプチドの直接的サイトゾル発現、またはペプチドのエレクトロポレーションが使用され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドの細胞透過を増加させるために、“Protein and Peptide Drug Delivery: Oral Approaches” Indian J. Pharm. Sci., Shaji and Patole, v70 (3) 269–277, 2008に記載されるアプローチなどのように、他の賦形剤をペプチドと一緒に製剤化することができる。これらの製剤化またはアプローチの任意の組み合わせを使用することで、本明細書に記載されるペプチドの細胞透過が増加し得る。

【0414】

あるいは、本明細書に記載されるペプチドは、使用前に、好適なビヒクル、例えば、無菌パイロジェンフリー水で再構成するために、凍結乾燥されるか、または粉末形態であり得る。いくつかの実施形態において、精製ペプチドは、静脈内投与される。本明細書に記載されるペプチドは、CNS細胞、脳細胞、がん性細胞、または腫瘍にホーミング、標的化、移動、または誘導するために、対象に投与され得る。いくつかの実施形態において、ペプチドは、中枢神経系内または血液脳関門を越えた特定の標的細胞種に対する標的化機

10

20

30

40

50

能を提供する別のペプチドにコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合され得る。例示的な標的細胞としては、CNS細胞、赤血球、赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、筋細胞、脳細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、骨髄細胞、虫垂細胞、リンパ節細胞、扁桃腺細胞、脾細胞、筋細胞、肝細胞、胆嚢細胞、膵細胞、消化管の細胞、腺細胞、腎細胞、膀胱細胞、内皮細胞、上皮細胞、脈絡叢上皮細胞、ニューロン、グリア細胞、星状膠細胞、または神経系に関連する細胞が挙げられる。

【0415】

本開示のペプチドは、外科手術中に脳または脳組織もしくは細胞などの器官、または器官組織もしくは細胞に直接適用することができる。本明細書に記載される組換えペプチドは、局所投与することができ、溶液、懸濁液、ローション、ゲル、ペースト、薬用スティック、香膏、クリーム、及び軟膏などの様々な局所投与可能な組成物に製剤化することができる。そのような医薬組成物は、溶解剤、安定剤、張度増強剤、緩衝液及び保存剤を含有し得る。

【0416】

本明細書で提供される治療または使用の方法において、治療上有効な量の本明細書に記載されるペプチドは、免疫系に影響を及ぼす状態に罹患している対象に医薬組成物で投与され得る。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトまたは霊長類などの哺乳動物である。治療上有効な量は、疾患の重症度、対象の年齢及び相対的な健康、使用される化合物の効力、ならびに他の因子に応じて大きく変動し得る。

【0417】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、ウイルス発現ベクターまたは非ウイルス発現ベクターにクローニングされる。そのような発現ベクターは、遺伝子治療の形態で患者に投与される、ウイルス粒子、ビリオン、または非ウイルス性の担体もしくは送達機構にパッケージングされ得る。他の実施形態において、患者の細胞が抽出され、それをTfRに結合することが可能なペプチドを発現するように *ex vivo* で改変した後、その改変された細胞を細胞治療の形態で患者に戻す。それにより、その改変された細胞は、患者に移植されると、ペプチドを発現する。

【0418】

医薬組成物は、活性化合物の薬学的に使用することができる調製物への加工を容易にする賦形剤及び助剤を含む、1つ以上の生理学的に許容される担体を使用して製剤化され得る。製剤は、選択された投与経路に応じて、変更され得る。本明細書に記載されるペプチドを含む医薬組成物は、例えば、組換え系におけるペプチドの発現、ペプチドの精製、ペプチドの凍結乾燥、混合、溶解、造粒、糖衣、研和、乳化、カプセル化、封入、または圧縮の各プロセスによって、製造することができる。医薬組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と、遊離塩基もしくは薬学的に許容される塩形態である本明細書に記載される化合物とを含み得る。

【0419】

本明細書に記載される化合物を含む本明細書に記載されるペプチドを調製する方法は、本明細書に記載されるペプチドと、1つ以上の不活性な薬学的に許容される賦形剤または担体を一緒に製剤化して、固体、半固体、または液体組成物を形成することを含む。固体組成物には、例えば、散剤、錠剤、分散性顆粒剤、カプセル剤、カシェ剤、及び坐剤が含まれる。これらの組成物はまた、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、及び他の薬学的に許容される添加剤などの微量の無毒の補助物質を含有し得る。

【0420】

薬学的に許容される賦形剤の非限定的な例は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H. A. and Lach

10

20

30

40

50

man, L., Eds., *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980; 及び *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999) に見出すことができ、それぞれの内容全体が参照により援用される。
【0421】

医薬組成物はまた、浸透または吸収促進剤を含み得る (Aungst et al. *AAPS J.* 14 (1): 10-8. (2012) 及び Moroz et al. *Adv Drug Deliv Rev* 101: 108-21. (2016))。浸透促進剤は、消化管から体循環への分子の取り込みを促進し得る。浸透促進剤は、中鎖脂肪酸の塩、カプリン酸ナトリウム、カプリル酸ナトリウム、N-(8-[2-ヒドロキシベンゾイル]アミノ)カプリル酸 (SNAC)、N-(5-クロロサリチロイル)-8-アミノカプリル酸 (5-CNAC)、フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、及びフェニルアルコールなどの親水性芳香族アルコール、キトサン、アルキルグリコシド、ドデシル-2-N, N-ジメチルアミノプロピオン酸 (DDAIPP)、EDTA、EGTA、及びクエン酸を含む二価カチオンのキレート剤、アルキル硫酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、デオキシコール酸などのレシチンベースまたは胆汁酸塩由来の薬剤を含み得る。

【0422】

組成物はまた、ダイズトリプシン阻害薬、アプロチニン、グリココール酸ナトリウム、カモスタットメシル酸塩、バシトラシン、またはシクロペンタデカラクトンを含むプロテアーゼ阻害薬を含み得る。

【0423】

治療におけるペプチドの使用

いくつかの実施形態において、方法は、本明細書に記載される有効量のペプチドを、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0424】

一実施形態において、方法は、本明細書に記載される有効量のペプチドを、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0425】

TfRは、脳、胃、肝臓、胆嚢などの様々な組織に発現し得る。したがって、本開示のTfR結合ペプチドは、様々な組織及び器官に関連する疾患及び状態の診断及び治療に使用することができる。例えば、これらの組織及び器官への薬物送達は、診断用及び／または治療用ペイロードを運搬する本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクトを使用することによって、改善され得る。

【0426】

「有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、治療される疾患または状態の症状のうちの1つ以上をある程度緩和する、投与される薬剤または化合物の十分な量を指す。その結果は、疾患の徴候、症状、もしくは原因の減少及び／または緩和、または生物系の任意の他の所望の改変であり得る。そのような薬剤または化合物を含有する組成物は、予防、増強、及び／または治療的処置のために投与され得る。任意の個々の症例における適切な「有効」量は、用量漸増試験などの技術を使用して決定され得る。

【0427】

本開示の方法、組成物、及びキットは、状態の症状を予防、治療、停止、逆転、または改善するための方法を含み得る。治療は、対象（例えば、疾患または状態に罹患した個体、飼育動物、野生動物、または実験動物）を本開示のペプチドで治療することを含み得る。疾患は、がんまたは腫瘍であり得る。疾患を治療することにおいて、ペプチドは、腫瘍またはがん性細胞と接触し得る。対象は、ヒトであり得る。対象は、ヒト；チンパンジー、ならびに他の猿人類及びサル種などの非ヒト霊長類；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの家畜；ウサギ、イヌ、及びネコなどの飼育動物；ラット、マウス及びモルモットなどのげっ歯類を含む実験動物などであり得る。対象は、あらゆる年齢であり得る。対象は

、例えば、高齢者、成人、青年、前青年、子ども、幼児、乳児、及び子宮内胎児であり得る。

【0428】

治療は、疾患の臨床的な発症前に対象に提供され得る。治療は、疾患の臨床的な発症後に対象に提供され得る。治療は、疾患の臨床的な発症から1日、1週間、6ヶ月、12ヶ月、または2年以上後に対象に提供され得る。治療は、疾患の臨床的な発症から1日、1週間、1ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、2年以上にわたって対象に提供され得る。治療は、疾患の臨床的な発症から1日、1週間、1ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、または2年未満の間、対象に提供され得る。治療はまた、臨床試験においてヒトを治療することを含み得る。治療は、本開示全体を通して記載される医薬組成物のうちの1つ以上などの医薬組成物を対象に投与することを含み得る。治療は、1日1回の投与を含み得る。治療は、静脈内、皮下、筋肉内、吸入、皮膚、局所、関節内注射、経口、舌下、髄腔内、経皮、鼻腔内、腹膜経路、腫瘍へ直接、例えば、腫瘍への直接注射、脳内へ直接、例えば、脳室内経路、または関節に直接、例えば、関節内局所注射経路のいずれかで、本開示のペプチドを対象に送達することを含み得る。治療は、静脈内、皮下、筋肉内、吸入、関節内注射、皮膚、局所、経口、髄腔内、経皮、鼻腔内、非経口、経口、腹膜経路、経鼻、舌下、またはがん性組織に直接のいずれかで、ペプチド活性薬剤複合体を対象に投与することを含み得る。

【0429】

本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲートまたは組換え産生されたペプチドコンストラクト）がTfRに結合し、その後、細胞層もしくはBBBなどの細胞障壁を越えて（例えば、小胞性トランスサイトosisを介して）もしくは細胞膜を越えて（例えば、受容体媒介性エンドサイトosisなどのエンドサイトosisを介して）輸送されること、または組織に蓄積されることは、様々な細胞、組織及び器官、特に、TfRを発現及び／または過剰発現する細胞組織または器官における細胞成長、細胞増殖、血管新生、器官形成、腫瘍進行、及び／または転移、細胞死（例えば、老化）、神経変性、及び疼痛に関連するものなどの多数の疾患、状態、または障害に影響を与え得る。いくつかの実施形態において、ペプチドコンストラクト（例えば、ペプチド-N-Tコンストラクト）は、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用して疼痛を低減させる。TfRに結合する本明細書で開示されるペプチドのいずれか1つを含む組成物、またはその医薬組成物は、卵巣癌、結腸癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内性橋膠腫、及び肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、及びびまん性内性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、または皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、またはCMYC過剰発現癌を含む、がん、腫瘍進行、様々ながんにおける調節不全の細胞成長を治療、予防、または診断する方法に使用することができる。いくつかの実施形態において、本開示のTfR結合ペプチドは、腫瘍細胞、骨髄細胞（例えば、赤血球前駆細胞）、脾細胞、免疫細胞、唾液腺の癌、または筋細胞への送達を可能にする。本開示のTfR結合ペプチドは、神経系及びCNS関連障害（例えば、神経変性疾患）の治療または予防に使用される薬物と組み合わせて使用することができる。更なる疾患、障害、または状態は、多発性骨髄腫、再生不良性貧血（plastic anemia）、脊髄形成異常症、及び関連骨髄不全症候群、骨髄増殖性疾患、急性及び慢性骨髄性白血病、リンパ様細胞の悪性腫瘍、血液悪性腫瘍、血漿細胞障害、骨格筋障害、ミオパチー、筋ジストロフィー（例えば、ベッカー型筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、エメリー・ドレーフス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋無緊張症、及び筋強直性ジストロフィー）、ならびに慢性閉塞性肺障害を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される組成物／ペプチドは、次の細胞、組織、または器官の種類：脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、血液細胞、骨髄細胞、造血幹細胞、膵臓、結腸、胃、子宮頸、乳房、子宮内膜、筋肉、結合組織、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、口腔組織、及び骨髄のいずれかに関

10

20

30

40

50

連する調節不全の細胞成長、がん、腫瘍、及び／または転移を治療するために使用される。更なる実施形態において、本明細書で開示される組成物／ペプチドは、次のいずれか：肉腫、骨肉腫、筋肉由来肉腫、肝細胞癌、悪性中皮腫、シュワン腫、髄膜腫、腎癌、胆管癌、胆管過誤腫、軟部組織癌、骨髄腫、多発性骨髄腫、白血病、リンパ腫、卵巣癌、大腸腺腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、消化管過形成、線維肉腫、膵管異形成、扁平上皮癌、カポジ肉腫、及びHIV誘発性非ホジキンリンパ腫を治療するために使用される。

【0430】

種々の実施形態において、本開示は、細胞層（例えば、内皮細胞または上皮細胞）または細胞膜を越えるTfR媒介性輸送を可能にする方法及び組成物を提供する。BBBに加えて、様々な他の細胞、組織、及び器官がTfRを発現する。TfRを発現する単一細胞は、肝細胞、赤血球及び骨髄中の赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、ならびに急速に分裂する細胞を含み得る。TfRを発現する組織及び器官は、脳（例えば、大脳皮質、海馬、尾状、小脳）、内分泌腺組織（例えば、甲状腺、副甲状腺、及び副腎）、骨髄及び免疫系（例えば、虫垂、リンパ節、扁桃腺、脾臓）、筋肉組織（例えば、心臓、骨格、及び平滑筋）、肝臓、胆嚢、膵臓、消化管（例えば、口腔粘膜、食道、胃、十二指腸、小腸、結腸、直腸）、腎臓、膀胱、婦人科組織（例えば、卵管、乳房、膣、子宮頸、子宮内膜、卵巣、及び胎盤）、脂肪及び軟組織、ならびに皮膚を含み得る。したがって、本開示のTfR結合ペプチドは、これらの細胞、組織、及び器官を標的とし、これらの細胞、組織、及び器官に、例えば、TfR媒介性トランスサイトシスを介して（例えば、BBBなどの細胞障壁を越えて）またはTfR媒介性エンドサイトシスを介して（例えば、細胞膜を越えて細胞内に）活性薬剤を送達するために使用することができる。

【0431】

種々の実施形態において、本開示は、TfRを発現する腫瘍細胞へのTfR媒介性輸送及び送達を可能にする方法及び組成物を提供する。TfRを発現するがんは、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌を含み得る。脳癌としては、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、及びびまん性内在性橋膠腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【0432】

がんを予防及び／または治療するために使用することができるTfR結合ペプチドコンストラクトは、TfR結合ペプチドと、IL15、IL15／IL15Raの融合体、IFNガンマ、及び抗CD3薬剤などの抗腫瘍活性を有する活性薬剤とを含むものである。抗腫瘍活性を有する活性薬剤を含むTfR結合ペプチドコンストラクトの例は、配列番号225～配列番号332）のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を有するものである。活性腫瘍活性を有する活性薬剤（例えば、IL15、IL15／IL15Raの融合体、IFNガンマ、または抗CD3薬剤）は、TfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）に融合されて、ペプチド-活性薬剤コンストラクトを形成し得る。

【0433】

本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲートまたは組換え産生されたペプチドコンストラクト）がTfRに結合し、その後、細胞層もしくはBBBなどの細胞障壁を越えて（例えば、TfR媒介性小胞性トランスサイトシスを介して）または細胞膜を越えて（例えば、TfR媒介性エンドサイトシスを介して）輸送されることは、対象（例えば、ヒト）における慢性疼痛（例えば、頭痛または片頭痛）、神経障害性疼痛、肥満症、インスリン抵抗性、オピオイド中毒、または他

の神経障害もしくは精神障害に関連する多数の疾患、状態、または障害に影響を与え得る。いくつかの実施形態において、ペプチドコンストラクト（例えば、ペプチド-N T コンストラクト）は、ドーパミン-シグナル伝達ニューロンと相互作用して疼痛を低減させる。

【0434】

本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、ペプチドコンジュゲート、融合ペプチド、または組換え産生されたペプチドコンストラクト）が T f R に結合し、その後、細胞層もしくは B B B などの細胞障壁を越えて（例えば、小胞性トランスサイトosisを介して）または細胞膜を越えて（例えば、エンドサイトosisを介して）輸送されることは、神経変性に関連する多数の疾患、状態、または障害に影響を与え得る。本明細書に記載される T f R 結合ペプチドで治療、予防、または診断することができる神経変性疾患としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱 X 随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症を挙げることができる。いくつかの場合において、T f R 結合ペプチドは、神経変性疾患を治療及び／または予防するために、B A C E 阻害薬である、ガラントミン、アマンタジン、ベンザトロピン、ビペリデン、プロモクリプチン、カルビドパ、ドネペジル、エンタカポン、レボドパ、ペルゴリ、プラミベキソール、プロシクリジン、リバスチグミン、ロピニロール、セレギリン、タクリン、トルカポン、またはトリヘキシフェニジルと組み合わせて使用することができる。

【0435】

いくつかの実施形態において、T f R 結合ペプチドを使用した K v 1 . 3 カリウムチャネルなどのイオンチャネルの調節（例えば、阻害）及び K v 1 . 3 カリウムチャネル阻害薬コンジュゲートまたはペプチドコンストラクトなどのイオンチャネル調節剤は、脳の炎症を治療または予防するために使用され得る。K v 1 . 3 カリウムチャネルは、例えば、脳内のミクログリアに高度に発現され得る。したがって、神経炎症性及び神経変性疾患、例えば、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、外傷性脳損傷、放射線療法による毒性ならびに他の神経変性疾患及び神経炎症性疾患は、K v 1 . 3 阻害薬にコンジュゲート、連結、または融合された T f R 結合ペプチドで治療することができる。これらの疾患は、K v 1 . 3 の上方制御を特徴とし得る。いくつかの場合において、K v 1 . 3 阻害薬は、エフェクター T 細胞への作用により、乾癬及び他の脳以外の自己免疫疾患の治療のために使用され得る。

【0436】

いくつかの実施形態において、本開示の T f R 結合ペプチドは、クローン病またはより一般的には炎症性腸疾患の治療及び予防に使用することができる。いくつかの実施形態において、本開示の T f R 結合ペプチドは、多量の T f R を発現し得る腸の腺細胞において、高い取り込み及び保持を示す。

【0437】

いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクト（例えば、配列番号 1 ～配列番号 70、配列番号 136 ～配列番号 205、配列番号 225 ～配列番号 332、または配列番号 356 ～配列番号 361）は、低 pH、プロテアーゼの多い環境、酸性環境、還元環境、または温度変動のある環境を含む、様々な生物学的環境において安定性が向上していることから、これらの障害にアクセスし、治療するために使用される。

【0438】

いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書で開示される T f R 結合ペプチドのいずれか 1 つを含み、T f R 結合ペプチドにつき 1 つ以上のカーゴ分子または活性薬剤を、細胞層または内皮層（例えば、B B B）もしくは上皮層などの細胞障壁、あるいは細胞膜を越えて輸送することが可能である。いくつかの実施形態において、カーゴ分子または

活性薬剤は、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤、PD-L1標的薬剤、IL15、IL-15/IL-15Ra複合剤の融合体、IFNガンマ薬剤、抗CD3薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE阻害薬、Bcl-xL阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、またはニューロテンシンなどの神経伝達物質である。

【0439】

ペプチドキット

一態様において、本明細書に記載されるペプチドは、キットとして提供され得る。別の実施形態において、本明細書に記載されるペプチドコンストラクトは、キットとして提供され得る。別の実施形態において、キットは、本明細書に記載されるペプチドをコードするアミノ酸、ベクター、宿主生物、及び指示マニュアルを含む。いくつかの実施形態において、キットは、ペプチドの使用または投与について書かれた説明書を含む。

【0440】

番号付きの実施形態

以下の実施形態は、本明細書で開示される特徴の組み合わせの非限定的な順列を列挙する。特徴の組み合わせの他の順列も企図される。特に、これらの番号付きの実施形態のそれぞれは、列挙される順番とは関係なく、全ての前後の番号付きの実施形態に依存または関連することが企図される。1. 操作されたトランスフェリン受容体(TfR)結合ペプチド、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログを含む、組成物。2. ペプチドコンストラクトを含む組成物であって、ペプチドコンストラクトが、a) トランスフェリン受容体(TfR)結合ペプチド、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログと、b) 活性薬剤とを含み、ペプチドは、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、組成物。3. TfRが、ヒトTfR、またはマウスTfR、またはヒトTfR及びマウスTfRである、実施形態1~2のいずれか1つの組成物。4. 配列番号1~配列番号32、配列番号36~配列番号67、配列番号136~配列番号167、配列番号171~配列番号202、もしくは配列番号356~配列番号358のいずれか1つと、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%の配列同一性を有する操作されたペプチド、またはそのバリエーションもしくは機能性フラグメントを含む組成物。5. ペプチドが、内皮細胞を含む細胞層を透過する、実施形態1~4のいずれか1つの組成物。6. 内皮細胞が脳血管内皮細胞である、実施形態5の組成物。7. ペプチドが、血液脳関門(BBB)を含む細胞層を透過する、実施形態1~6のいずれか1つの組成物。8. ペプチドが、TfR媒介性トランスサイトーシスを介して、内皮細胞を含む細胞層を透過する、実施形態1~7のいずれか1つの組成物。9. ペプチドが、膜を透過し、膜は、細胞の膜である、実施形態1~8のいずれか1つの組成物。10. 細胞がTfRを発現する、実施形態9の組成物。11. ペプチドが、TfR媒介性エンドサイトーシスを介して細胞の膜を透過する、実施形態9~10のいずれか1つの組成物。12. ペプチドが、TfRを発現する任意の細胞内または細胞とともに局在することが可能である、実施形態1~11のいずれか1つの組成物。13. ペプチドが、TfRを発現する細胞表面膜に結合した状態を保つ、実施形態1~12のいずれか1つの組成物。14. ペプチドが、TfRに結合することによって、細胞中に内在化する、実施形態1~13のいずれか1つの組成物。15. ペプチドが、TfRに結合し、次いで、解離することによって、血液脳関門を越えてCNSに送達される、実施形態1~14のいずれか1つの組成物。16. ペプチドが、受容体媒介性トランスサイトーシスによって血液脳関門を越えて送達される、実施形態1~15のいずれか1つの組成物。17. 細胞が、CNS細胞、赤血球、赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、筋細胞、脳細胞、甲状腺細胞、副甲状腺

10

20

30

40

50

細胞、副腎細胞、骨髓細胞、虫垂細胞、リンパ節細胞、扁桃腺細胞、脾細胞、筋細胞、肝細胞、胆嚢細胞、膵細胞、消化管の細胞、腺細胞、腎細胞、膀胱細胞、内皮細胞、上皮細胞、脈絡叢上皮細胞、グリア細胞、星状膠細胞、または神経系に関連する細胞である、実施形態 9～16 のいずれか 1 つの組成物。18. 細胞が腫瘍細胞である、実施形態 9～17 のいずれか 1 つの組成物。19. 腫瘍細胞が、卵巣癌細胞、結腸癌細胞、肺癌細胞、骨もしくは骨髓に位置する癌細胞、膠芽腫細胞、星細胞腫細胞、神経膠腫細胞、髓芽腫細胞、上衣腫細胞、脈絡叢癌細胞、正中膠腫細胞、びまん性内在性橋膠腫 (DIPG) 細胞、乳癌細胞、肝癌細胞、結腸癌細胞、脳癌細胞、脾癌細胞、唾液腺の癌細胞、腎癌細胞、筋肉癌細胞、骨髓細胞癌細胞、皮膚癌細胞、泌尿生殖器癌細胞、骨肉腫細胞、筋肉由来肉腫細胞、黒色腫細胞、頭頸部癌細胞、神経芽細胞腫細胞、前立腺癌細胞、膀胱癌細胞、急性リンパ性白血病細胞、急性骨髄性白血病細胞、慢性リンパ性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞、ホジキンリンパ腫細胞、非ホジキンリンパ腫細胞、または C M Y C 過剰発現癌細胞である、実施形態 18 の組成物。20. ペプチドが器官または組織に局在する、実施形態 1～19 のいずれか 1 つの組成物。21. 器官または組織が、脳、甲状腺、副甲状腺、副腎、骨髓、虫垂、リンパ節、扁桃腺、脾臓、筋肉、肝臓、胆嚢、膵臓、消化管、腎臓、膀胱、卵管、乳房、膣、子宮頸、子宮内膜、卵巣、胎盤、及び皮膚である、実施形態 20 の組成物。22. ペプチドが局在する細胞または器官が、T f R を過剰発現している、実施形態 9～21 のいずれか 1 つの組成物。23. T f R を過剰発現している細胞または器官が、腫瘍細胞またはがん性組織である、実施形態 22 の組成物。24. ペプチドが器官の実質に局在する、実施形態 22～23 のいずれか 1 つの組成物。25. ペプチドが、ヒト T f R 1 (UniProtKB-P02786) の配列番号 363 に対応する残基 506～510、523～531、または 611～662 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基に結合する、実施形態 1～24 のいずれか 1 つの組成物。26. ペプチドが、配列番号 206～配列番号 224 及び配列番号 334～配列番号 344 を含む、実施形態 1～25 のいずれか 1 つの組成物。27. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及び Q51 に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 1～26 の組成物。28. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、位置 3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び 40 のいずれか 1 つに対応する親水性表面遠位残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 1～27 の組成物。29. 親水性表面遠位残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、実施形態 28 の組成物。30. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及び D40 に対応する親水性表面遠位残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 26～29 のいずれか 1 つの組成物。31. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、15、35、39、もしくは 49 のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に親水性残基を含む、実施形態 1～30 のいずれか 1 つの組成物。32. 親水性残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、実施形態 28 の組成物。33. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、D15、E35、E39、及び H49 に対応する親水性残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 31～32 のいずれか 1 つの組成物。34. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、11、25、もしくは 27、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に疎水性残基を含む、実施形態 1～33 のいずれか 1 つの組成物。35. 疎水性残基が、アミノ酸 A、M、I、L、V、F、W、もしくは Y、またはこれらの任意の組み合わせから選択される、実施形態 34 の組成物。36. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、M11、M25、M27 に対応する疎水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 34～35 のいずれか 1 つの組成物。37. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、位置 45 に対応する脂肪族残基を含む、実施形態 1～36 のいずれか 1 つの組成

10

20

30

40

50

物。38. 脂肪族残基が、アミノ酸A、M、I、L、またはVから選択される、実施形態37の組成物。39. ペプチドが、配列番号32を基準として、L45に対応する脂肪族残基を含む、実施形態37～38のいずれか1つの組成物。40. ペプチドが、少なくとも1つのジスルフィド結合、少なくとも2つのジスルフィド結合、少なくとも3つのジスルフィド結合、または少なくとも5つのジスルフィド結合を含む、実施形態1～39のいずれか1つの組成物。41. ペプチドが3つのジスルフィド結合を含む、実施形態1～40のいずれか1つの組成物。42. ペプチドが、少なくとも2つ、少なくとも4つ、または少なくとも6つのシステイン残基を含む、実施形態1～41のいずれか1つの組成物。43. ペプチドが6つのシステイン残基を含む、実施形態1～42のいずれか1つの組成物。44. ペプチドが、配列番号32を基準として、C6、C10、C20、C34、C44、及びC48、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置にシステイン残基を含む、実施形態1～43のいずれか1つの組成物。45. ペプチドの少なくとも1つのシステイン残基が、ジスルフィド結合に関与する、実施形態1～44のいずれか1つの組成物。46. 6つのシステイン残基が、ジスルフィド結合に関与する、実施形態43の組成物。47. ジスルフィド結合が、ペプチドの安定性を高める、実施形態1～46のいずれか1つの組成物。48. ペプチドが、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態1～47のいずれか1つの組成物。49. ペプチドが、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態1～48のいずれか1つの組成物。50. ペプチドが、配列番号1に示される配列を含む、実施形態1～49のいずれか1つの組成物。51. ペプチドが、配列番号2に示される配列を含む、実施形態1～49のいずれか1つの組成物。52. ペプチドが、配列番号4に示される配列を含む、実施形態1～49のいずれか1つの組成物。53. ペプチドが、配列番号30に示される配列を含む、実施形態1～49のいずれか1つの組成物。54. ペプチドが、配列番号32に示される配列を含む、実施形態1～49のいずれか1つの組成物。55. 3つのジスルフィド結合を含むペプチドが、システイン高密度ペプチド(CDP)に由来する、実施形態1～54のいずれか1つの組成物。56. 3つのジスルフィド結合を含むペプチドが、CDPである、実施形態1～55のいずれか1つの組成物。57. ペプチドが、トランスフェリン、またはそのホモログ、バリエーション、もしくはフラグメントと、TfRへの結合について、競合する、実施形態1～56のいずれか1つの組成物。58. ペプチドが、TfRを隔離するか、または別のタンパク質がTfRに結合するのを妨げる、実施形態1～57のいずれか1つの組成物。59. ペプチドが、トランスフェリン、またはその内因性誘導体と比較して、TfRに対して同等またはそれより大きい親和性または特異性を有する、実施形態1～58のいずれか1つの組成物。60. ペプチドが、トランスフェリン、またはその内因性誘導体と比較して、TfRに対して同等またはそれより小さい解離定数を有する、実施形態1～59のいずれか1つの組成物。61. ペプチドが、40nM未満、30nM未満、20nM未満、10nM未満、1nM未満、または0.1nM未満のKDを有する、実施形態60の組成物。62. ペプチドが、標的細胞を透過するか、または標細胞内に局在する、実施形態1～61のいずれか1つの組成物。63. ペプチドが、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる、実施形態1～62のいずれか1つの組成物。64. 細胞透過部分が、ポリカチオン、ポリ有機酸、エンドソーム放出ポリマー、ポリ(2-プロピルアクリル酸)、ポリ(2-エチルアクリル酸)、Tatペプチド、Argパッチ、ノットペプチド、CysTAT、S19-TAT、R8(配列番号73)、pAntp、Pas-TAT、Pas-R8(配列番号76)、Pas-FHV、Pas-pAntp、F2R4

10

20

30

40

50

(配列番号79)、B55、アウレイン、IMTP8、BR2、OMOTAG1、OMOTAG2、pVEC、SynB3、DPV1047、C105Y、トランスポータン、MTS、HLF、PFVYLI (配列番号93)、マウロカルシン、インペラトキシ、ハドルカルシン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン (62-104)、MCOTII-II、クロロトキシ、DRI-TAT、CFOR4 (配列番号96)、R6W3 (配列番号421)、ミリステート、yBBR、またはそのフラグメントもしくはバリエーション、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態63の組成物。65. 細胞透過部分が、マウロカルシン、インペラトキシ、ハドルカルシン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン (62-104)、MCOTII-II、またはクロロトキシである、実施形態63の組成物。66. 細胞透過部分が、配列番号71~配列番号96、配列番号98~配列番号101、配列番号116~配列番号126、または配列番号403~配列番号455のいずれか1つである、実施形態63の組成物。67. ペプチドが、組織または細胞を標的とするか、ホーミングするか、蓄積するか、または選択的に透過する、実施形態1~66のいずれか1つの組成物。68. ペプチドが、標的細胞の核内に局在する、実施形態1~67のいずれか1つの組成物。69. ペプチドが、シグナルペプチドまたは部分との製剤化、融合、またはコンジュゲーションによって、標的細胞の核内に局在する、実施形態68の組成物。70. ペプチドが、がん性組織またはがん細胞を標的とするか、ホーミングするか、蓄積するか、または選択的に透過する部分または第2のペプチドに更にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、実施形態1~69のいずれか1つの組成物。71. 部分または第2のペプチドが、ノットペプチドまたはそのバリエーションもしくはフラグメントである、実施形態1~70のいずれか1つの組成物。72. 標的細胞が、がん性細胞または腫瘍細胞である、実施形態68~71のいずれか1つの組成物。73. 標的細胞が、CNS細胞、赤血球、赤血球前駆細胞、免疫細胞、幹細胞、筋細胞、脳細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎細胞、骨髄細胞、虫垂細胞、リンパ節細胞、扁桃腺細胞、脾細胞、筋細胞、肝細胞、胆嚢細胞、膵細胞、消化管の細胞、腺細胞、腎細胞、膀胱細胞、内皮細胞、上皮細胞、脈絡叢上皮細胞、グリア細胞、星状膠細胞、または神経系に関連する細胞である、実施形態68~72のいずれか1つの組成物。74. ペプチドが、ジスルフィドノットを介したジスルフィドを含む、実施形態1~73のいずれか1つの組成物。75. ペプチドが、システイン残基間に形成された複数のジスルフィド架橋を含む、実施形態1~74のいずれか1つの組成物。76. ペプチドが、システイン残基間に形成される3つ以上のジスルフィド架橋を含み、ジスルフィド架橋のうちの1つは、他の2つのジスルフィド架橋によって形成されるループを通過する、実施形態1~75のいずれか1つの組成物。77. ペプチドが、ジスルフィド結合もジスルフィドノットも含まない、実施形態1~76のいずれか1つの組成物。78. ペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基がL立体配置であるか、少なくとも1つのアミノ酸残基がD立体配置である、実施形態1~77のいずれか1つの組成物。79. ペプチドが、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の正電荷残基を含む、実施形態1~78のいずれかの組成物。80. ペプチドが、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10個の連続した正電荷残基を含む、実施形態1~79のいずれかの組成物。81. 正電荷残基が、Arg、Lys、またはこれらの任意の組み合わせである、実施形態1~80のいずれかの組成物。82. ペプチドがArgパッチを含む、実施形態1~81のいずれかの組成物。83. ペプチドが、N末端に2つ以上の連続したArg残基を含む、実施形態1~82のいずれかの組成物。84. ペプチドが、Tatペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1~83のいずれかの組成物。85. Tatペプチドが、YGRKKRRQRRR (配列番号99)、GRKKRRQRRR (配列番号100)の配列、またはそのフラグメントもしくはバ

10

20

30

40

50

リアントを含む、実施形態 84 の組成物。86. Tat ペプチドが、(GS) x (配列番号 105) または G x S y (配列番号 104) の配列を有するリンカー (配列中、x 及び y は、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である) を使用して、ペプチドの N 末端または C 末端に付加される、実施形態 84 ~ 85 のいずれかの組成物。87. Tat ペプチドが、ペプチドの任意の残基に付加される、実施形態 84 ~ 86 のいずれかの組成物。88. ペプチドが、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、または少なくとも 16 のシステイン残基を含む、実施形態 1 ~ 87 のいずれか 1 つの組成物。89. ペプチドが、負電荷残基の 1 つ以上の領域を含む、実施形態 1 ~ 88 のいずれか 1 つの組成物。90. ペプチドが、正電荷残基の 1 つ以上の領域を含む、実施形態 1 ~ 89 のいずれか 1 つの組成物。91. ペプチド配列が、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、少なくとも 35、少なくとも 36、少なくとも 37、少なくとも 38、少なくとも 39、少なくとも 40、少なくとも 41、少なくとも 42、少なくとも 43、少なくとも 44、少なくとも 45、少なくとも 46、少なくとも 47、少なくとも 48、少なくとも 49、少なくとも 50、少なくとも 51、少なくとも 52、少なくとも 53、少なくとも 54、少なくとも 55、少なくとも 56、少なくとも 57、少なくとも 58 の残基、少なくとも 59、少なくとも 60、少なくとも 61、少なくとも 62、少なくとも 63、少なくとも 64、少なくとも 65、少なくとも 66、少なくとも 67、少なくとも 68、少なくとも 69、少なくとも 70、少なくとも 71、少なくとも 72、少なくとも 73、少なくとも 74、少なくとも 75、少なくとも 76、少なくとも 77、少なくとも 78、少なくとも 79、少なくとも 80、または少なくとも 81 のアミノ酸残基を含む、実施形態 1 ~ 90 のいずれか 1 つの組成物。92. ペプチドが、ヒトタンパク質またはヒトペプチドを含むか、またはそれに由来する、実施形態 1 ~ 91 のいずれか 1 つの組成物。93. ペプチドが、少なくとも 1 つの他のペプチドとの多量体構造に配置される、実施形態 1 ~ 92 のいずれか 1 つの組成物。94. 多量体構造が、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、または七量体を含む、実施形態 93 の組成物。95. ペプチドが、約 3.0 ~ 約 10.0 の範囲内の等電点を有する、実施形態 1 ~ 94 のいずれか 1 つの組成物。96. ペプチドが、約 4.5 ~ 約 8.9 の範囲内の等電点を有する、実施形態 1 ~ 95 のいずれか 1 つの組成物。97. ペプチドが、不均一な電荷分布を有する、実施形態 1 ~ 96 のいずれか 1 つの組成物。98. ペプチドが、生理学的または細胞内の pH 値で安定である、実施形態 1 ~ 97 のいずれか 1 つの組成物。99. ペプチドが、約 7 または 7.5 の pH で安定である、実施形態 1 ~ 98 のいずれか 1 つの組成物。100. ペプチドが、約 6.5 ~ 7.5 の pH で安定である、実施形態 1 ~ 99 のいずれか 1 つの組成物。101. ペプチドが、約 5.0 以下、約 3.0 以下、または約 3.0 ~ 約 5.0 の範囲内の pH 値で安定である、実施形態 1 ~ 100 のいずれか 1 つの組成物。102. ペプチドが、約 5.0 ~ 約 7.0 の範囲内の pH 値で安定である、実施形態 1 ~ 101 のいずれか 1 つの組成物。103. ペプチドが、疎水性コアを含む、実施形態 1 ~ 102 のいずれか 1 つの組成物。104. ペプチドが、プロテアーゼ分解に耐性がある、実施形態 1 ~ 103 のいずれか 1 つの組成物。105. プロテアーゼが、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、血清プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼのいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせである、実施形態 104 の組成物。106. ペプチドが、還元耐性があるか、または還元環境で安定である、実施形態 1 ~ 105 のいずれか 1 つの組成物。107. 還元または還元環境が、DTT または GSH を含む、実施形態 106 の組成物。108. ペプチドが、高温で安定である、実施形態 1 ~ 107 のいずれか 1 つの組成物。109. ペプチドが、抗がん作用を示す、実施形態 1 ~ 108 のいずれか 1 つの組成物。110. ペプチド

10

20

30

40

50

が、1つ以上の化学修飾を含む、実施形態1～109のいずれか1つの組成物。111. 化学修飾が、ペプチドの1つ以上の薬物動態特性を変更する、実施形態110の組成物。112. 化学修飾が、ペプチドの血漿半減期及び／または生物学的半減期を延長する、実施形態110～111のいずれか1つの組成物。113. 化学修飾が、ペプチドのN末端をブロックングすることである、実施形態110～112のいずれかの組成物。114. 化学修飾が、メチル化、アセチル化、またはアシル化である、実施形態110～113のいずれかの組成物。115. 化学修飾が、1つ以上のリシン残基もしくはそのアナログのメチル化；N末端のメチル化；または1つ以上のリシン残基もしくはそのアナログのメチル化及びN末端のメチル化である、実施形態110～114の組成物。116. ペプチドが、アシル付加物に連結される、実施形態1～115のいずれか1つの組成物。117. ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる、実施形態1～116のいずれか1つの組成物。118. ペプチドコンストラクトが、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、配列番号359～配列番号361、配列番号373、配列番号375、配列番号381、配列番号384、配列番号385、配列番号388、配列番号389、配列番号393、配列番号396、配列番号397、配列番号400、または配列番号401のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態117の組成物。119. ペプチドコンストラクトが、配列番号359、配列番号360、または配列番号361である、実施形態117～118のいずれか1つの組成物。120. 活性薬剤が、ペプチドにペプチドのN末端またはC末端で、コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、実施形態117～119のいずれか1つの組成物。121. 活性薬剤が、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である、実施形態117～120のいずれか1つの組成物。122. 核酸がDNAである、実施形態121の組成物。123. 核酸がRNAである、実施形態121の組成物。124. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の活性薬剤が、リンカーによって、ペプチドに連結される、実施形態117～123のいずれか1つの組成物。125. ペプチドが、切断可能なリンカーまたはpH感受性リンカーを介して、活性薬剤に連結される、実施形態117～124のいずれか1つの組成物。126. ペプチドが、リンカーによって、ペプチドのN末端で、内部リシン残基のイプシロンアミンで、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基のカルボン酸で、またはC末端で、活性薬剤に連結される、実施形態117～125のいずれか1つの組成物。127. 非天然アミノ酸を更に含み、非天然アミノ酸は、挿入、付加、または別のアミノ酸との置換である、実施形態117～126のいずれか1つの組成物。128. ペプチドが、リンカーによって、非天然アミノ酸で活性薬剤に連結される、実施形態127の組成物。129. リンカーが、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、カルバメート結合、カーボネート結合、ヒドラゾン結合、アゾ結合、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエステル結合、チオエーテル結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド結合、2つのシステイン間の2つの炭素架橋、2つのシステイン間の3つの炭素架橋、または炭素-窒素結合を含む、実施形態124～128のいずれか1つの組成物。130. 切断可能なリンカーが、プロテアーゼの切断部位を含む、実施形態125～129のいずれか1つの組成物。131. プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテアーゼ、トロンビン、カテプシン、またはベータグルクロニダーゼである、実施形態130の組成物。132. リンカーが加水分解的に不安定なリンカーである、実施形態124～131のいずれか1つの組成物。133. ペプチドが、切断不能なリンカーを介して、活性薬剤に連結される、実施形態1～132のいずれか1つの組成物。134. 活性薬剤が、リンカーを介して連結され、リンカーは、表

10

20

30

40

50

7 または配列番号 103～配列番号 115、もしくは配列番号 125 のいずれか 1 つから選択される、実施形態 1～133 のいずれか 1 つの組成物。135. 活性薬剤が抗がん剤である、実施形態 117～134 のいずれか 1 つの組成物。136. 活性薬剤が、免疫治療薬、CTLA-4 標的薬剤、PD-1 標的薬剤、PDL-1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合された IL-15 / IL-15Ra 複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗 CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルピシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE 阻害薬、Bcl-xL 阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である、実施形態 117～134 のいずれか 1 つの組成物。137. 神経伝達物質が、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである、実施形態 136 の組成物。138. 機能性フラグメントが、少なくとも少なくとも 5 アミノ酸残基、少なくとも 6 アミノ酸残基、少なくとも 7 アミノ酸残基、少なくとも 8 アミノ酸残基、少なくとも 9 アミノ酸残基、少なくとも 10 アミノ酸残基、少なくとも 11 アミノ酸残基、少なくとも 12 アミノ酸残基である、実施形態 137 の組成物。139. ニューロテンシンペプチドバリエーションが、配列番号 365～配列番号 369 に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有する、実施形態 137～138 のいずれか 1 つの組成物。140. ニューロテンシンが、配列番号 350 に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有する、実施形態 137～139 のいずれか 1 つの組成物。141. ペプチドコンストラクトが、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である、実施形態 117～140 のいずれか 1 つの組成物。142. ペプチドが、対象の疼痛のレベルを低減することが可能である、実施形態 117～141 のいずれか 1 つの組成物。143. ペプチドが、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、または内分泌障害の患者に投与される、実施形態 117～142 のいずれか 1 つの組成物。144. ペプチドが、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する、実施形態 117～143 のいずれか 1 つの組成物。145. ペプチドが、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる、実施形態 117～144 のいずれか 1 つの組成物。146. ペプチドに結合された半減期改変剤を更に含む、実施形態 1～145 のいずれか 1 つの組成物。147. 半減期改変剤が、ポリマー、ポリエチレングリコール (PEG)、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン水溶性ポリマー、水溶性ポリ (アミノ酸)、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、Fc 領域、脂肪酸、パルミチン酸、またはアルブミンに結合する分子を含む、実施形態 146 の組成物。148. リンカーによってペプチドに結合された検出可能な剤を更に含む、実施形態 1～147 のいずれか 1 つの組成物。149. 検出可能な剤が、ペプチドにペプチドの N 末端または C 末端で、コンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、実施形態 148 の組成物。150. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 の検出可能な剤が、ペプチドに連結される、実施形態 148～149 のいずれか 1 つの組成物。151. ペプチドが、切断可能なリンカーを介して、検出可能な剤に連結される、実施形態 148～150 のいずれか 1 つの組成物。152. ペプチドが、リンカーによって、ペプチドの N 末端で、内部リシン残基のイプシロンアミンで、または C 末端で、検出可能な剤に連結される、実施形態 148～151 のいずれか 1 つの組成物。153. 非天然アミノ酸を更に含み、非天然アミノ酸は、挿入、付加、または別のアミノ酸との置換である、実施形態 117～152 のいずれか 1 つの組成物。154. ペプチドが、リンカーによって、非天然アミノ酸で検

10

20

30

40

50

出可能な剤に連結される、実施形態 148～153 のいずれか 1 つの組成物。155. リンカーが、アミド結合、エステル結合、エーテル結合、トリアゾール、大環状高分子、オキシム結合、カルバメート結合、カーボネート結合、ヒドラゾン結合、アゾ結合、オキシム結合、ジスルフィド結合、チオエステル結合、チオエーテル結合、炭素-炭素単結合、二重結合、もしくは三重結合、ジスルフィド結合、2 つのシステイン間の 2 つの炭素架橋、2 つのシステイン間の 3 つの炭素架橋、または炭素-窒素結合を含む、実施形態 148～154 のいずれか 1 つの組成物。156. 切断可能なリンカーが、マトリックスメタロプロテアーゼ、トロンピン、カテプシン、またはベーターグルクロニダーゼの切断部位を含む、実施形態 151～155 の組成物。157. ペプチドが、安定なリンカーを介して、検出可能な剤に連結される、実施形態 148～150 のいずれか 1 つの組成物。158. 検出可能な剤が、リンカーを介して連結され、リンカーは、表 7 または配列番号 103～配列番号 115、もしくは配列番号 125 のいずれか 1 つから選択される、実施形態 148～157 のいずれか 1 つの組成物。159. 検出可能な剤が、フルオロフォア、近赤外色素、造影剤、ナノ粒子、金属含有ナノ粒子、金属キレート、X線造影剤、PET 剤、放射性核種、または放射性核種キレート剤である、実施形態 148～158 のいずれか 1 つの組成物。160. 検出可能な剤が蛍光色素である、実施形態 148～159 のいずれか 1 つの組成物。161. 実施形態 1～160 のいずれか 1 つの組成物、またはその塩と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。162. 医薬組成物が、対象への投与のために製剤化される、実施形態 161 の医薬組成物。163. 医薬組成物が、経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、またはこれらの組み合わせのために製剤化される、実施形態 161～162 のいずれか 1 つの医薬組成物。164. 組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、a) 組成物と細胞層を接触させることと、b) 組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、方法。165. 組成物が、操作されたペプチドを含む、実施形態 164 の方法。166. ペプチドが、配列番号 206～配列番号 224 及び配列番号 334～配列番号 344 のいずれか 1 つを含むアミノ酸配列、またはその機能性フラグメントを含む、実施形態 165 の方法。167. ペプチドが、トランスフェリン受容体 (TfR) 結合ペプチドである、実施形態 165～166 のいずれか 1 つの方法。168. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及び Q51 に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 165～167 のいずれか 1 つの方法。169. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び 40 に対応する 1 つの位置、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性表面遠位残基を含む、実施形態 165～168 のいずれか 1 つの方法。170. 親水性表面遠位残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、実施形態 169 の方法。171. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及び D40 に対応する親水性表面遠位残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 169～170 のいずれか 1 つの方法。172. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、15、35、39、もしくは 49 に対応する位置のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性残基を含む、実施形態 165～171 のいずれか 1 つの方法。173. 親水性残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、実施形態 172 の組成物。174. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、D15、E35、E39、及び H49 に対応する親水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 172～173 のいずれか 1 つの方法。175. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、11、25、もしくは 27 に対応する位置のいずれか、またはこれらの任意の組み合わせに、疎水性残基を含む、実施形態 165～174 のいずれか 1 つの方法。176. 疎水性残基が、アミノ酸 A、M、I、L、V、F、W、もしくは Y、またはこれらの任意の組み合わせから選択される、実施形態 175 の方法。177.

10

20

30

40

50

ペプチドが、配列番号 32 を基準として、M11、M25、M27 に対応する疎水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 175 ~ 176 のいずれか 1 つの方法。178. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、位置 45 に対応する脂肪族残基を含む、実施形態 165 ~ 177 のいずれか 1 つの方法。179. 脂肪族残基が、アミノ酸 A、M、I、L、または V から選択される、実施形態 178 の方法。180. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、L45 に対応する脂肪族残基を含む、実施形態 178 ~ 179 のいずれか 1 つの方法。181. ペプチドが、少なくとも 1 つのジスルフィド結合、少なくとも 2 つのジスルフィド結合、少なくとも 3 つのジスルフィド結合、または少なくとも 5 つのジスルフィド結合を含む、実施形態 165 ~ 170 のいずれか 1 つの方法。182. ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 32、配列番号 36 ~ 配列番号 67、配列番号 136 ~ 配列番号 167、配列番号 171 ~ 配列番号 202、配列番号 356 ~ 配列番号 358 のいずれか 1 つと、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態 165 ~ 181 のいずれか 1 つの方法。183. ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 32、配列番号 36 ~ 配列番号 67、配列番号 136 ~ 配列番号 167、配列番号 171 ~ 配列番号 202、もしくは配列番号 356 ~ 配列番号 358 のいずれか 1 つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態 165 ~ 182 のいずれか 1 つの方法。184. ペプチドが、標的細胞を透過するか、または標的細胞内もしくは標的細胞上に局在する、実施形態 165 ~ 183 のいずれか 1 つの方法。185. ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる、実施形態 165 ~ 184 のいずれか 1 つの方法。186. ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、実施形態 185 の方法。187. 活性薬剤が、リンカーを介して連結され、リンカーは、表 7 または配列番号 103 ~ 配列番号 115、もしくは配列番号 125 のいずれか 1 つから選択される、実施形態 185 または 186 の方法。188. 活性薬剤が、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖 Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である、実施形態 185 ~ 187 のいずれか 1 つの方法。189. ペプチドコンストラクトが、配列番号 33 ~ 配列番号 35、配列番号 68 ~ 配列番号 70、配列番号 168 ~ 配列番号 170、配列番号 203 ~ 配列番号 205、配列番号 225 ~ 配列番号 332、配列番号 359 ~ 配列番号 361、配列番号 373、配列番号 375、配列番号 381、配列番号 384、配列番号 385、配列番号 388、配列番号 389、配列番号 393、配列番号 396、配列番号 397、配列番号 400、または配列番号 401 のいずれか 1 つと、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有する、実施形態 185 ~ 188 のいずれか 1 つの方法。190. ペプチドコンストラクトが、配列番号 359、配列番号 360、または配列番号 361 である、実施形態 185 ~ 189 のいずれか 1 つの方法。191. 活性薬剤が、免疫治療薬、CTLA-4 標的薬剤、PD-1 標的薬剤、PDL-1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合された IL-15 / IL-15Ra 複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗 CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE 阻害薬、Bcl-xL 阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラクス、AT-101、オバトクラクス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスチン、または神経伝達物質である、実施形態 185 ~ 190 のいずれか 1 つの方法。192. 神経伝達物質が、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである、実施形態 191 の方法。193. 機能性フラグメントが、少なくとも

10

20

30

40

50

少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも6アミノ酸残基、少なくとも7アミノ酸残基、少なくとも8アミノ酸残基、少なくとも9アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも11アミノ酸残基、少なくとも12アミノ酸残基である、実施形態192の方法。194. ニューロテンシンペプチドバリエーションが、配列番号365～配列番号369に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態192～193のいずれか1つの方法。195. ニューロテンシンが、配列番号350に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態192～194のいずれか1つの方法。196. ペプチドコンストラクトが、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である、実施形態185～195のいずれか1つの方法。197. ペプチドが、対象への投与により、疼痛のレベルを低減することが可能である、実施形態165～196のいずれか1つの方法。198. ペプチドが、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、または内分泌障害の患者に投与される、実施形態165～197のいずれか1つの方法。199. ペプチドが、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する、実施形態165～198のいずれか1つの方法。200. ペプチドが、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる、実施形態165～199のいずれか1つの方法。201. ペプチドが、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる、実施形態165～200のいずれか1つの方法。202. 細胞層が、内皮細胞層または上皮細胞層である、実施形態164～201のいずれか1つの方法。203. 内皮細胞層が、血液脳関門である、実施形態202の方法。204. 内皮細胞層が、腸管内皮細胞層である、実施形態202の方法。205. 上皮細胞層が、腸管上皮細胞層である、実施形態202の方法。206. 輸送することが、組成物のTfRへの結合を含む、実施形態164～205のいずれか1つの方法。207. 輸送することが、トランスサイトosisを更に含む、実施形態164～206のいずれか1つの方法。208. トランスサイトosisが小胞性トランスサイトosisである、実施形態207の方法。209. トランスサイトosisがTfR媒介性である、実施形態207～208のいずれか1つの方法。210. 輸送することが、組成物のTfRからの解離を更に含む、実施形態209の方法。211. 状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、a) 対象に組成物を投与することと、b) 組成物を細胞層を越えて輸送することとを含む、方法。212. 組成物が、操作されたペプチドを含む、実施形態211の方法。213. ペプチドが、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態212の方法。214. ペプチドが、トランスフェリン受容体(TfR)結合ペプチドである、実施形態212～213のいずれか1つの方法。215. ペプチドが、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及びQ51に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態212～214のいずれか1つの方法。216. ペプチドが、配列番号32を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び40に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性表面遠位残基を含む、実施形態212～215のいずれか1つの方法。217. 親水性表面遠位残基が、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される、実施形態216の方法。218. ペプチドが、配列番号32を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及びD40に対応する親水性表面遠位残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態216～217のいずれか1つの方法。219. ペプチドが、配列番号32を基準として、15、35、39、もしくは

10

20

30

40

50

は49に対応する位置のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性残基を含む、実施形態212～218のいずれか1つの方法。220. 親水性残基が、アミノ酸D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTから選択される、実施形態219の組成物。221. ペプチドが、配列番号32を基準として、D15、E35、E39、及びH49に対応する親水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態219～220のいずれか1つの方法。222. ペプチドが、配列番号32を基準として、11、25、もしくは27に対応する位置のいずれか、またはこれらの任意の組み合わせに、疎水性残基を含む、実施形態212～221のいずれか1つの方法。223. 疎水性残基が、アミノ酸A、M、I、L、V、F、W、もしくはY、またはこれらの任意の組み合わせから選択される、実施形態222の方法。224. ペプチドが、配列番号32を基準として、M11、M25、M27に対応する疎水性残基のいずれか1つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態221～223のいずれか1つの方法。225. ペプチドが、配列番号32を基準として、位置45に対応する脂肪族残基を含む、実施形態212～224のいずれか1つの方法。226. 脂肪族残基が、アミノ酸A、M、I、L、またはVから選択される、実施形態225の方法。227. ペプチドが、配列番号32を基準として、L45に対応する脂肪族残基を含む、実施形態225～226のいずれか1つの方法。228. ペプチドが、少なくとも1つのジスルフィド結合、少なくとも2つのジスルフィド結合、少なくとも3つのジスルフィド結合、または少なくとも5つのジスルフィド結合を含む、実施形態212～227のいずれか1つの方法。229. ペプチドが、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態212～228のいずれか1つの方法。230. ペプチドが、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態212～229のいずれか1つの方法。231. ペプチドが、標的細胞を透過するか、または標細胞内に局在する、実施形態212～230のいずれか1つの方法。232. ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる、実施形態212～231のいずれか1つの方法。233. ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、実施形態232の方法。234. 活性薬剤が、リンカーを介して連結され、リンカーは、表7または配列番号103～配列番号115、もしくは配列番号125のいずれか1つから選択される、実施形態232または233の方法。235. 活性薬剤が、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である、実施形態232～234のいずれか1つの方法。236. ペプチドコンストラクトが、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、配列番号359～配列番号361、配列番号373、配列番号375、配列番号381、配列番号384、配列番号385、配列番号388、配列番号389、配列番号393、配列番号396、配列番号397、配列番号400、または配列番号401のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態232～235のいずれか1つの方法。237. ペプチドコンストラクトが、配列番号359、配列番号360、または配列番号361である、実施形態232～236のいずれか1つの方法。238. 活性薬剤が、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤

10

20

30

40

50

、PDL-1 標的薬剤、IL15 薬剤、融合された IL-15 / IL-15 Ra 複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3 薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3 阻害薬、アウリスチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキシソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE 阻害薬、Bcl-xL 阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラクス、AT-101、オバトクラクス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスチン、または神経伝達物質である、実施形態 232 ~ 237 のいずれか 1 つの方法。239. 神経伝達物質が、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである、実施形態 238 の方法。240. 機能性フラグメントが、少なくとも 5 アミノ酸残基、少なくとも 6 アミノ酸残基、少なくとも 7 アミノ酸残基、少なくとも 8 アミノ酸残基、少なくとも 9 アミノ酸残基、少なくとも 10 アミノ酸残基、少なくとも 11 アミノ酸残基、少なくとも 12 アミノ酸残基である、実施形態 239 の方法。241. ニューロテンシンペプチドバリエーションが、配列番号 365 ~ 配列番号 369 に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有する、実施形態 239 ~ 240 のいずれか 1 つの方法。242. ニューロテンシンが、配列番号 350 に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有する、実施形態 239 ~ 241 のいずれか 1 つの方法。243. ペプチドコンストラクトが、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である、実施形態 232 ~ 242 のいずれか 1 つの方法。244. ペプチドが、対象への投与により、疼痛のレベルを低減することが可能である、実施形態 232 ~ 243 のいずれか 1 つの方法。245. ペプチドが、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、または内分泌障害の患者に投与される、実施形態 212 ~ 244 のいずれか 1 つの方法。246. ペプチドが、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する、実施形態 212 ~ 245 のいずれか 1 つの方法。247. ペプチドが、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる、実施形態 212 ~ 246 のいずれか 1 つの方法。248. ペプチドが、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる、実施形態 212 ~ 247 のいずれか 1 つの方法。249. 細胞層が、内皮細胞層または上皮細胞層である、実施形態 212 ~ 248 のいずれか 1 つの方法。250. 内皮細胞層が、血液脳関門である、実施形態 249 の方法。251. 内皮細胞層が、腸管内皮細胞層である、実施形態 249 の方法。252. 上皮細胞層が、腸管上皮細胞層である、実施形態 249 の方法。253. 輸送することが、組成物の TfR への結合を含む、実施形態 211 ~ 252 のいずれか 1 つの方法。254. 輸送することが、トランスサイトシスを更に含む、実施形態 211 ~ 253 のいずれか 1 つの方法。255. トランスサイトシスが小胞性トランスサイトシスである、実施形態 254 の方法。256. トランスサイトシスが TfR 媒介性である、実施形態 254 ~ 255 のいずれか 1 つの方法。257. 輸送することが、組成物の TfR からの解離を更に含む、実施形態 253 ~ 256 のいずれか 1 つの方法。258. 輸送することが、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む、実施形態 253 ~ 257 のいずれか 1 つの方法。259. 状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、対象における TfR の発現に基づいて、ある量の組成物を対象に投与することを含む、方法。260. 組成物が、操作されたペプチドを含む、実施形態 259 の方法。261. ペプチドが、配列番号 206 ~ 配列番号 224 及び配列番号 334 ~ 配列番号 344 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 250 の方法。262. ペプチドが、トランスフェリン受容体 (TfR) 結合ペプチドである、実施形態 260 ~ 261 のいずれか 1 つの方法。263. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及び Q51 に対応する表面界面残基、ま

10

20

30

40

50

たはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 260～262 のいずれか 1 つの方法。

264. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び 40 に対応する位置のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性表面遠位残基を含む、実施形態 260～263 のいずれか 1 つの方法。

265. 親水性表面遠位残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、実施形態 264 の方法。

266. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、R3、E4、R9、K12、D15、E16、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及び D40 に対応する親水性表面遠位残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 264～265 のいずれか 1 つの方法。

267. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、15、35、39、もしくは 49 に対応する位置のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせに、親水性残基を含む、実施形態 260～266 のいずれか 1 つの方法。

268. 親水性残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、実施形態 267 の組成物。

269. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、D15、E35、E39、及び H49 に対応する親水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 260～268 のいずれか 1 つの方法。

270. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、11、25、もしくは 27 に対応する位置のいずれか、またはこれらの任意の組み合わせに、疎水性残基を含む、実施形態 260～269 のいずれか 1 つの方法。

271. 疎水性残基が、アミノ酸 A、M、I、L、V、F、W、もしくは Y、またはこれらの任意の組み合わせから選択される、実施形態 270 の方法。

272. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、M11、M25、M27 に対応する疎水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 270～271 のいずれか 1 つの方法。

273. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、位置 45 に対応する脂肪族残基を含む、実施形態 260～272 のいずれか 1 つの方法。

274. 脂肪族残基が、アミノ酸 A、M、I、L、または V から選択される、実施形態 273 の方法。

275. ペプチドが、配列番号 32 を基準として、L45 に対応する脂肪族残基を含む、実施形態 273～274 のいずれか 1 つの方法。

276. ペプチドが、少なくとも 1 つのジスルフィド結合、少なくとも 2 つのジスルフィド結合、少なくとも 3 つのジスルフィド結合、または少なくとも 5 つのジスルフィド結合を含む、実施形態 260～275 のいずれか 1 つの方法。

277. ペプチドが、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、もしくは配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つと、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態 260～276 のいずれか 1 つの方法。

278. ペプチドが、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、もしくは配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、実施形態 260～277 のいずれか 1 つの方法。

279. ペプチドが、標的細胞を透過するか、または標細胞内に局在する、実施形態 260～278 のいずれか 1 つの方法。

280. ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる、実施形態 260～279 のいずれか 1 つの方法。

281. ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、実施形態 280 の方法。

282. 活性薬剤が、リンカーを介して連結され、リンカーは、表 7 または配列番号 103～配列番号 115、もしくは配列番号 125 のいずれか 1 つから選択される、実施形態 280 または 281 の方法。

283. 活性薬剤が、抗体、抗体フラグメント、Fc、一本鎖 Fv、ポリペプチド、ペプチド、小分子、または核酸である、実施形態 280～282 のいずれか 1 つの方法。

284.

10

20

30

40

50

ペプチドコンストラクトが、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、配列番号359～配列番号361、配列番号373、配列番号375、配列番号381、配列番号384、配列番号385、配列番号388、配列番号389、配列番号393、配列番号396、配列番号397、配列番号400、または配列番号401のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態280～283のいずれか1つの方法。285. ペプチドコンストラクトが、配列番号359、配列番号360、または配列番号361である、実施形態280～284のいずれか1つの方法。286. 活性薬剤が、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤、PDL-1標的薬剤、IL15薬剤、融合されたIL-15/IL-15Ra複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキシソルビン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE阻害薬、Bcl-xL阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である、実施形態280～285のいずれか1つの方法。287. 神経伝達物質が、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである、実施形態286の方法。288. 機能性フラグメントが、少なくとも5アミノ酸残基、少なくとも6アミノ酸残基、少なくとも7アミノ酸残基、少なくとも8アミノ酸残基、少なくとも9アミノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも11アミノ酸残基、少なくとも12アミノ酸残基である、実施形態287の方法。289. ニューロテンシンペプチドバリエーションが、配列番号365～配列番号369に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態287～288のいずれか1つの方法。290. ニューロテンシンが、配列番号350に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、実施形態287～289のいずれか1つの方法。291. ペプチドコンストラクトが、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である、実施形態280～290のいずれか1つの方法。292. ペプチドが、対象への投与により、疼痛のレベルを低減することが可能である、実施形態260～291のいずれか1つの方法。293. ペプチドが、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、または内分泌障害の患者に投与される、実施形態260～292のいずれか1つの方法。294. ペプチドが、ドーパミンシグナル伝達ニューロンと相互作用する、実施形態260～293のいずれか1つの方法。295. ペプチドが、ニューロンにおけるドーパミン放出を増加させる、実施形態260～294のいずれか1つの方法。296. ペプチドが、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる、実施形態260～295のいずれか1つの方法。297. 組成物が、吸入、鼻腔内、経口、局所、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、またはこれらの組み合わせで投与される、実施形態259～296のいずれか1つの方法。298. 組成物が、ボーラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される、実施形態259～297のいずれか1つの方法。299. 組成物または医薬組成物が、1日に複数回、1日2回、1日1回、週2回、週3回、週1回、2週に1回、または月1回もしくは3ヶ月に1回投与される、実施形態259～298のいずれか1つの方法。300. 組成物が、1日1回、週1回、または月1回、皮下投与される、実施形態259～2969のいずれか1つの方法。301. 状態が、がんである、実施形態259～300のいずれ

10

20

30

40

50

か1つの方法。302. がんが、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌である、実施形態301の方法。303. 状態が、脳癌である、実施形態259～302のいずれか1つの方法。304. 脳癌が、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、またはびまん性内在性橋膠腫である、実施形態303の方法。305. 状態が、CNSの疾患である、実施形態259～304のいずれか1つの方法。306. CNSの疾患が、神経炎症性または神経変性疾患である、実施形態305の方法。307. 神経変性疾患が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症である、実施形態306の方法。308. 状態が、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんである、実施形態259～302のいずれか1つの方法。309. 状態が、慢性疼痛、急性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、または突出痛である、実施形態259～302または308のいずれか1つの方法。310. 状態が、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛である、実施形態259～302または308～309のいずれか1つの方法。311. 状態が、筋ジストロフィー、または球脊髄性筋ジストロフィー（SBMA）である、実施形態259～310のいずれか1つの方法。312. 状態が炎症性腸疾患である、実施形態259～311のいずれか1つの方法。313. 炎症性腸疾患がクローン病である、実施形態312の方法。314. 実施形態1～313のいずれか1つに記載の組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、組成物と細胞層を接触させることと、組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、方法。315. 細胞層が、内皮細胞層または上皮細胞層である、実施形態314の方法。316. 内皮細胞層が、血液脳関門である、実施形態314～315のいずれか1つの方法。317. 内皮細胞層が、腸管内皮細胞層である、実施形態314～315のいずれか1つの方法。318. 上皮細胞層が、腸管上皮細胞層である、実施形態317の方法。319. 輸送することが、組成物のTfRへの結合を含む、実施形態314～318のいずれか1つの方法。320. 輸送することが、トランスサイトosisを更に含む、実施形態314～319のいずれか1つの方法。321. トランスサイトosisが小胞性トランスサイトosisである、実施形態320の方法。322. トランスサイトosisがTfR媒介性である、実施形態320～321のいずれか1つの方法。323. 輸送することが、組成物のTfRからの解離を更に含む、実施形態319～322のいずれか1つの方法。324. 輸送することが、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む、実施形態314～323のいずれか1つの方法。325. 状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、実施形態1～324のいずれか1つの組成物または実施形態164～324のいずれか1つの医薬組成物を対象に投与することを含む、方法。326. 組成物が、吸入、鼻腔内、経口、局所、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、またはこれらの組み合わせで投与される、実施形態325の方法。327. 組成物が、ボラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される、実施形態325～326のいずれか1つの方法。328.

10

20

30

40

50

組成物または医薬組成物が、1日に複数回、1日2回、1日1回、週2回、週3回、週1回、2週に1回、または月1回もしくは3ヶ月に1回投与される、実施形態325～327のいずれか1つの方法。329. 組成物が、1日1回、週1回、または月1回、皮下投与される、実施形態325～328のいずれか1つの方法。330. 状態が、がんである、実施形態325～329のいずれか1つの方法。331. がんが、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫（DIPG）、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌である、実施形態330の方法。332. 状態が、脳癌である、実施形態325～331のいずれか1つの方法。333. 脳癌が、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、またはびまん性内在性橋膠腫である、実施形態332の方法。334. 状態が、CNSの疾患である、実施形態325～329のいずれか1つの方法。335. CNSの状態が、神経炎症性または神経変性疾患である、実施形態334の方法。336. 神経変性疾患が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、パッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症である、実施形態335の方法。337. 状態が、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんである、実施形態325～329のいずれか1つの方法。338. 状態が、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛である、実施形態325～329のいずれか1つの方法。339. 状態が、筋ジストロフィー、または球脊髄性筋ジストロフィー（SBMA）である、実施形態325～329のいずれか1つの方法。340. 状態が炎症性腸疾患である、実施形態301～305のいずれか1つの方法。341. 炎症性腸疾患がクローン病である、実施形態340の方法。342. 組成物を細胞層を越えて輸送することを更に含む、実施形態325～341のいずれか1つの方法。343. 細胞層が、内皮細胞層または上皮細胞層である、実施形態342の方法。344. 内皮細胞層が、血液脳関門である、実施形態342～343のいずれか1つの方法。345. 内皮細胞層が、腸管内皮細胞層である、実施形態342～344のいずれか1つの方法。346. 上皮細胞層が、腸管上皮細胞層である、実施形態340の方法。347. 輸送することが、組成物のTfRへの結合を含む、実施形態325～346のいずれか1つの方法。348. 輸送することが、トランスサイトーシスを更に含む、実施形態325～347のいずれか1つの方法。349. トランスサイトーシスが小胞性トランスサイトーシスである、実施形態348の方法。350. トランスサイトーシスがTfR媒介性である、実施形態348～349のいずれか1つの方法。351. 輸送することが、組成物のTfRからの解離を更に含む、実施形態347～350のいずれか1つの方法。352. 輸送することが、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む、実施形態325～351のいずれか1つの方法。353. 状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、対象の組織におけるTfRの発現に依存するある量の実施形態164～253のいずれか1つの組成物または実施形態161～163のいずれか1つの医薬組成物を対象に投与することを含む、方法。354. 組成物が、吸入、鼻腔内、経口、局所、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、髄腔内、またはこれらの組み合わせで投与される、実施形態353の

10

20

30

40

50

方法。355. 組成物が、ボラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される、実施形態353～354のいずれか1つの方法。356. 組成物または医薬組成物が、1日に複数回、1日2回、1日1回、週2回、週3回、週1回、2週に1回、または月1回もしくは3ヶ月に1回投与される、実施形態353～355のいずれか1つの方法。357. 組成物が、1日1回、週1回、または月1回、皮下投与される、実施形態353～356のいずれか1つの方法。358. 状態が、がんである、実施形態353～357のいずれか1つの方法。359. 対象の組織が、がん性組織である、実施形態354～358のいずれか1つの方法。360. がんが、卵巣癌、結腸癌、肺癌、骨もしくは骨髄に位置する癌、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、びまん性内在性橋膠腫(DIPG)、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、前立腺癌、膀胱癌、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、またはCMYC過剰発現癌である、実施形態358の方法。361. 状態が、脳癌である、実施形態353～360のいずれか1つの方法。362. 脳癌が、膠芽腫、星細胞腫、神経膠腫、髄芽腫、上衣腫、脈絡叢癌、正中膠腫、またはびまん性内在性橋膠腫である、実施形態361の方法。363. 状態が、CNSの疾患である、実施形態353～357のいずれか1つの方法。364. CNSの疾患が、神経炎症性または神経変性疾患である、実施形態363の方法。365. 神経変性疾患が、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦/失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症である、実施形態364の方法。366. 状態が、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんである、実施形態353～365のいずれか1つの方法。367. 状態が、慢性疼痛、急性疼痛、損傷、機械的疼痛、熱痛、冷痛、虚血痛、及び化学物質誘発性疼痛、炎症性疼痛、片頭痛関連疼痛、頭痛関連疼痛、過敏性腸症候群関連疼痛、線維筋痛症関連疼痛、関節炎疼痛、骨格痛、関節痛、胃腸痛、筋肉痛、狭心痛、顔面痛、骨盤痛、跛行、術後痛、外傷後痛、緊張型頭痛、産科疼痛、婦人科疼痛、または化学療法誘発性疼痛、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛、家族性エピソード性疼痛症候群、発作性激痛症、先天性無痛覚症、オピオイド離脱関連疼痛である、実施形態353～366のいずれか1つの方法。368. 状態が、筋ジストロフィー、または球脊髄性筋ジストロフィー(SBMA)である、実施形態353～367のいずれか1つの方法。369. 状態が炎症性腸疾患である、実施形態353～367のいずれか1つの方法。370. 炎症性腸疾患がクローン病である、実施形態369の方法。371. 組成物を細胞層を越えて輸送することを更に含む、実施形態353～370のいずれか1つの方法。372. 細胞層が、内皮細胞層または上皮細胞層である、実施形態371の方法。373. 内皮細胞層が、血液脳関門である、実施形態372の方法。374. 内皮細胞層が、腸管内皮細胞層である、実施形態372～373のいずれか1つの方法。375. 上皮細胞層が、腸管上皮細胞層である、実施形態372～373のいずれか1つの方法。376. 輸送することが、組成物のTfRへの結合を含む、実施形態371～375のいずれか1つの方法。377. 輸送することが、トランスサイトシスを更に含む、実施形態371～376のいずれか1つの方法。378. トランスサイトシスが小胞性トランスサイトシスである、実施形態377の方法。379. トランスサイトシスがTfR媒介性である、実施形態377～378のいずれか1つの方法。380. 輸送することが、組成物のTfRからの解離を更に含む、実施形態371～379のいずれか1つの方法。381. 輸送することが、組成物から活性薬剤を放出することを更に含む、実施形態371～380のいずれか1つの方法。382. TfR結合ペプチドを設計するための方法であって、a) コンピュータープログラムを使用して、安定性及びフォールディングが最適化されたペプチドをペプチドのライブラリーから特定するこ

10

20

30

40

50

とであって、ペプチドのライブラリーの各ペプチドは、少なくとも3つの分子内ジスルフィド結合を含む、特定することと、b) コンピュータープログラムを使用して、ペプチド：TfR複合体の結合パッチのアミノ酸残基を重ね合わせ、結合パッチをペプチド上にグラフトした後、TfRに結合する安定なペプチドを決定することと、c) 結合パッチをペプチド上にグラフトして、安定なペプチドを生成することを含む、方法。383. 部位飽和変異導入を実施して、安定なペプチドよりもTfRに対する結合親和性が高い変異ペプチドを得ることを更に含む、実施形態382の方法。384. ペプチドのライブラリーのペプチドが、20～75アミノ酸残基長である、実施形態382～383の方法。385. ニューロテンシンが、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む、実施形態137～145のいずれか1つの組成物。386. ニューロテンシンが、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む、実施形態192～200のいずれか1つの方法。387. ニューロテンシンが、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む、実施形態239～247のいずれか1つの方法。388. ニューロテンシンが、配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ、またはその機能性フラグメントを含む、実施形態287～295のいずれか1つの方法。389. Kv1.3阻害薬が、Vm24、ShK-170、ShK-186、またはShK-192である、実施形態136～163のいずれか1つの組成物。390. Vm24が、配列番号378または配列番号391の配列を有する、実施形態389の組成物。391. Shk-185が、配列番号379、配列番号390、または配列番号402の配列を有する、実施形態389の組成物。392. 半減期改変剤がSA21を含む、実施形態148～163のいずれか1つの組成物。393. SA21が、配列番号376または配列番号377の配列を有する、実施形態392の組成物。394. Kv1.3阻害薬が、Vm24、ShK-170、ShK-186、またはShK-192である、実施形態191～210、238～258、または286～313のいずれか1つの方法。395. Vm24が、配列番号378または配列番号391を含む、実施形態394の方法。396. Shk-185が、配列番号379、配列番号390、または配列番号402を含む、実施形態394の方法。397. ペプチドに結合された半減期改変剤を更に含む、実施形態165～210、213～258、または261～381のいずれか1つの方法。398. 半減期改変剤が、ポリマー、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン水溶性ポリマー、水溶性ポリ(アミノ酸)、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、Fc領域、脂肪酸、パルミチン酸、またはアルブミンに結合する分子を含む、実施形態397の方法。399. 半減期改変剤がSA21を含む、実施形態397の方法。400. SA21が、配列番号376または配列番号377を含む、実施形態399の方法。401. ペプチドが、TfR結合抗体ベースの治療薬よりも広い治療濃度域を有する、実施形態1～163、385、または389～393のいずれか1つの組成物。402. より広い治療濃度域が、治療上の薬力学応答が観察される量を上回るが、毒性が観察される量を下回る投与量である、実施形態401の組成物。403. ペプチドが、対象に同じモル用量で投与された場合、TfR結合抗体ベースの治療薬よりも、低いオンターゲット毒性、低いオフターゲット毒性、またはこれらの組み合わせを有する、実施形態1～163、385、389～393、401、または402のいずれか1つの組成物。404. ペプチドが、TfR結合抗体ベースの治療薬よりも広い治療濃度域を有する、実施形態165～210、212～258、260～384、386～388、または394～400のいずれか1つの方法。405. より広い治療濃度域が、治療上の薬力学応答が観察される量を上回るが、毒性が観察される量を下回る投与量である、実施形態404の方法。406. ペプチドが、対象に同じモル用量で投与された場合、TfR結合抗体ベースの治療薬よりも、低いオンターゲット毒性または低いオフターゲット毒性を有する、実施形態165～210、212～258、260～384、386～388、394～400

10

20

30

40

50

、404、または405のいずれか1つの方法。

【実施例】

【0441】

以下の実施例は、本開示のいくつかの態様を更に説明するために含まれるものであり、本発明の範囲を限定するために使用されるべきではない。

【0442】

実施例1

ペプチド製造

この実施例は、本明細書に記載されるペプチド及びペプチドコンストラクト（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）の製造について記載する。タンパク質由来のペプチドは、公開されている方法論を使用して、哺乳動物細胞培養で生成した。（A. D. Bandaranayake, C. Correnti, B. Y. Ryu, M. Brault, R. K. Strong, D. Rawlings. 2011. Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Research*. (39) 21, e143）。

【0443】

標準的な分子生物学技術を使用して、ペプチド配列をDNAに逆翻訳し、合成し、シデロカリンとインフレイムでクローニングした（M. R. Green, Joseph Sambrook. *Molecular Cloning*. 2012 Cold Spring Harbor Press）。得られたコンストラクトをレンチウイルスにパッケージングし、HEK-293細胞に形質導入し、拡大させ、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）によって単離し、タバコエッチウイルス（TEV）プロテアーゼで切断し、均質になるまで逆相クロマトグラフィーによって精製した。精製後、各ペプチドを凍結乾燥させ、凍結保存した。

【0444】

実施例2

哺乳動物発現系を使用したペプチド発現

本実施例は、哺乳動物発現系を使用したペプチド及びペプチドコンストラクトの発現について記載する。ペプチドは、Bandaranayake et al., *Nucleic Acids Res.* 2011 Nov; 39 (21): e143に記載されている方法に従って発現させた。ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）を、タバコエッチウイルスプロテアーゼを使用してシデロカリンから切断し、逆相HPLC（RP-HPLC）によってアセトニトリル及び0.1% TFAを含む水のグラジエントで精製し、次いで、その後の使用のために等分し、凍結乾燥させた。分子量を質量分析によって確認した。

【0445】

スクリーニング方法論を最適化及び検証するために、また、TfR結合ペプチドを特定するために、トランスフェリン受容体（TfR）エクドメイン（「可溶性TfR」、配列番号353）をDaedalus可溶性タンパク質産生レンチベクターにクローニングし、タンパク質を成長培地から精製した（可溶性TfRのゲルを図1Aに示す）。同じ戦略を使用して、ヒトアポトランスフェリン（残基23～698、配列番号364、KTVRWCAVSEHEATKCSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANEADAVTL DAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTD

F P Q L C Q L C P G C G C S T L N Q Y F G Y S G A F K C L K D G A G D V A F V K
H S T I F E N L A N K A D R D Q Y E L L C L D N T R K P V D E Y K D C H L A Q V
P S H T V V A R S M G G K E D L I W E L L N Q A Q E H F G K D K S K E F Q L F S
S P H G K D L L F K D S A H G F L K V P P R M D A K M Y L G Y E Y V T A I R N L
R E G T C P E A P T D E C K P V K W C A L S H H E R L K C D E W S V N S V G K I
E C V S A E T T E D C I A K I M N G E A D A M S L D G G F V Y I A G K C G L V P
V L A E N Y N K S D N C E D T P E A G Y F A I A V V K K S A S D L T W D N L K G
K K S C H T A V G R T A G W N I P M G L L Y N K I N H C R F D E F F S E G C A P
G S K K D S S L C K L C M G S G L N L C E P N N K E G Y Y G Y T G A F R C L V E
K G D V A F V K H Q T V P Q N T G G K N P D P W A K N L N E K D Y E L L C L D G

10

T R K P V E E Y A N C H L A R A P N H A V V T R K D K E A C V H K I L R Q Q Q H
L F G S N V T D C S G N F C L F R S E T K D L L F R D D T V C L A K L H D R N T
Y E K Y L G E E Y V K A V G N L R K C S T S S L L E A C T F R R P) を生成及び精
製し、材料の一部に鉄を付加させてホロトランスフェリンを生成した。可溶性T f Rエク
トドメインへの結合について、アポトランスフェリンとホロトランスフェリンの両方を表
面プラズモン共鳴を介して試験した(図23A)。ホロトランスフェリンのみが固定化T
f Rとの相互作用を示した。

【0446】

スクリーニングに使用される可溶性T f Rがヒト内因性タンパク質の構造を表すことを
更に検証するために、T f Rを使用して指向性を決定し、細胞進入を媒介するM a c h u
p o ウイルス糖タンパク質との相互作用を試験した(M a C Vと呼ばれる)。このために
、M a C Vを哺乳動物表面提示ベクターS D G F(図23B)にクローニングし、S D G
F-M a C Vまたは対照タンパク質(S D G F-エラフィン、いくつかの天然型C D Pに
結合することが知られているエラスターゼの阻害薬)を293 F r e e s t y l e(29
3 F)懸濁細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、各200 nMの
ビオチン化T f R(細胞結合アッセイで使用されるT f Rは全てビオチン化される)及び
A l e x a F l u o r 647標識ストレプトアビジンで染色し、次いで、フローサイト
メトリーによって分析した(図23C)。M a C Vをトランスフェクトした細胞は、T f
Rによる染色に成功したが、S D G F-エラフィン細胞は、染色されなかった。また、2
00 nMの蛍光エラスターゼとインキュベートしたS D G F-M a C V細胞は、染色され
なかった。これは、T f Rのその内因性リガンドに対する結合の特異性と、新規T f R結
合パートナーを特定するための手段としてのS D G Fの有用性の両方を示している。

20

30

【0447】

実施例3

機能性トランスフェリン受容体の発現及び精製

トランスフェリン受容体(T f R)エクトドメイン(配列番号352、UniProt
ナンバリングによるH s T f Rの残基121~760)、アポトランスフェリン(配列番
号353(ヒト)及び配列番号354(マウス))、及び全ての可溶性C D Pを実施例2
及び実施例3として生成及び精製した。簡潔に述べると、目的のタンパク質の分泌を誘導
するレンチベクターであるD a e d a l u sベクターに、関連する配列をクローニングし
た。タンパク質は、その内因性シグナルペプチドを含有するものか、または翻訳/分泌中
の安定化のためにN末端でシデロカリンに融合されたもののいずれかであり、シデロカリン
融合体は、T E Vプロテアーゼを使用して切断し、N末端「G S」を残した。V S V-
Gシュードタイプ化レンチウイルスを293細胞で標準的な方法で産生した。このウイル
スを使用して、F r e e S t y l e 293 E x p r e s s i o n M e d i u m(I n
v i t r o g e n 12338018)中、およそ10の多重感染度(M O I)で、 1×10^7 の293 F r e e s t y l e懸濁(293 F、T h e r m o F i s h e r R79
007)細胞に形質導入した。次いで、培養物を成長させ(懸濁培養インキュベーター、
125 RPM、37℃、湿度80%、8%CO₂)、10~12日かけて拡大させ(最終
体積2 L)、その後、培地を回収し、滅菌濾過した。バッチN i-NTA樹脂結合によっ

40

50

て、培地からタンパク質を精製した。CDPをTEVプロテアーゼ切断によってシデロカリン担体から分離し、SEC (AKTA Pure、GE Healthcare) またはRP-HPLC (Agilentモデル1260、C18カラム、吸光度214 nm、インラインのAgilent 6120 LC/MS) のいずれかによる最終精製を実施した (図1A)。TfR及びトランスフェリンは、PBS+5%グリセロール中で凍結させ、一方、RP-HPLCによって精製したCDPペプチドは、バイアルに分注して凍結乾燥させた。ペプチドの定量化は、*in vivo*での使用前に、アミノ酸解析によって確立した。

【0448】

精製したTfRの適切なフォールディング及び機能は、表面プラズモン共鳴を使用して検証した。精製したTfRへのアポトランスフェリン (ApoTf) またはホロトランスフェリン (HoloTf) のいずれかの結合を測定した (図23A)。ApoTfよりもHoloTfへ優先的に結合することが適切なTfR機能を示す。

【0449】

全てのタンパク質をSDS-PAGE (NuPAGE 4-12%Bis-Tris、Thermo Fisher) 及びクマシー染色によって分析した (図4及び図27)。CDPは、非還元及び10mM DTTによる還元の両方で実施した。タンパク質分解及び還元耐性試験を、人工胃液中の50Uのブタペプシン (Sigma-Aldrich P7012) またはPBS中の50Uのブタトリプシン (Sigma-Aldrich 6567) のいずれかで処理し、続いて、37℃で30分間インキュベーションした後に、精製に使用したのと同じRP-HPLC機器で実施した。同様に、グルタチオンまたはDTT還元には、PBS中10mMのグルタチオンまたはDTTでペプチドを5分を超えて処理した後、RP-HPLC分析を行うことが含まれた。配列番号32のペプチドのCDスペクトルを、10mM DTTを15~25 μ Mの濃度で含むまたは含まない20mMリン酸緩衝液 (pH7.4) 中で、Jasco J-720W分光旋光計 (1mm光路長) で測定した。データは、210nmにおける相対楕円率 $[\theta]$ の変化で表し、mdeg単位で報告する。

【0450】

ホロトランスフェリンは、Hamilton et al. の方法に従って、生成した。簡潔に述べると、4.5mM FeCl₃ (Sigma Aldrich) 及び9mM ニトロロ三酢酸 (NTA、Sigma Aldrich) を含有する水中の4.5mM Fe (NTA)₂ の10mL溶液を、HCl及びNaOHによりpH4.0まで滴定した。PBS中のアポトランスフェリン溶液にFe (NTA)₂ を、3.2当量が添加されるまで、5分ごとに0.4当量を添加した。1,000倍を超える遊離Fe (NTA)₂ クリアランスにするために、スピнкаラム透析 (Amicon Ultra-4遠心式フィルターユニット、分子量カットオフ10kDa) を使用して、溶液をPBSに緩衝液交換した。

【0451】

Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher A37573) によるCDP標識は、PBS緩衝液中、約1.5NHSEステル色素:1CDPのモル比で1時間を超えて行い、その後、1,000倍を超える遊離色素クリアランスにするために、遊離色素をスピнкаラム透析 (Amicon Ultra-4遠心式フィルターユニット、分子量カットオフ3kDa) によって除去した。BirA-500キット (Avidity) を製造元のプロトコルに従って使用してAviタグ付きTfRをビオチン化し、続いて、5%グリセロール含有PBSへの最終の緩衝液交換を行い、小分けして-80℃で保存した。

【0452】

実施例4

TfR結合ペプチドの哺乳動物表面提示

本実施例は、配列番号1 (配列番号1は配列番号36にN末端GSを付加したものである)、配列番号2 (配列番号2は配列番号37にN末端GSを付加したものである)、配

10

20

30

40

50

列番号30（配列番号30は配列番号65にN末端GSを付加したものである）、及び配列番号32（配列番号32は配列番号67にN末端GSを付加したものである）、及び配列番号33～配列番号35（配列番号33～配列番号35はそれぞれ配列番号68～配列番号70にN末端GSを付加したものである）を含む本開示のTfR結合ペプチドの哺乳動物表面提示について記載する。TfR結合ペプチドのスクリーニングは、哺乳動物細胞にトランスフェクトまたは形質導入して候補ペプチドを提示させ（図23B）、続いて、可溶性ヒトトランスフェリン受容体エクストドメイン配列番号352に対するスクリーニング（200nM、図23C、図1）によって実施した。哺乳動物細胞は、ジスルフィド架橋タンパク質のフォールディングにおける忠実度が改変されていることから、本開示のペプチドの提示に好適な細胞型となっている。

【0453】

哺乳動物細胞表面提示スクリーニングは、以下のとおりに実施した。表面提示GFP FasL（SDGF）ベクターを使用したスクリーニング戦略。ベクターにおいて、FasL-TMは、FasLタンパク質の膜貫通ドメインである。より詳細には、設計されたペプチドをプールとしてSDGFにクローニングし、次いで、それをレンチウイルスにした。このライブラリーを用いて、約1の多重感染度で293F細胞に形質導入し、3日間の増殖後、形質導入した細胞のプールをAlexa647標識TfRとともにインキュベートした。これらの実験に関して、蛍光標識は、TfRを蛍光ストレプトアビジンまたは蛍光抗His抗体と共染色することによって実施した。可溶性TfRは、Hisタグとビオチン標識の両方を含有した。抗体／ストレプトアビジン蛍光には、Alexa Fluor 647またはiFluor 647のいずれかを使用した。GFP及びTfR二重陽性細胞から最も高く染色されたTfR陽性細胞の一部をソーティングし、拡大させた。拡大ごとに細胞の一部を回収し、最後に、濃縮されたペプチドをシーケンシングによって特定した。フローサイトメトリーを使用してゲーティング基準を評価し、SDGFペプチドコンストラクトを介して表面上にタンパク質を発現しているGFP+293F細胞を特定した。ゲーティングは、FSC-H対SSC-Hを使用してデブリをゲートアウトし、FSC-H対FSC-Aを使用してダブルットをゲートアウトし、FSC-H対Pacific Blue Hを使用してDAPI+死細胞をゲートアウトし、任意選択でFITC-Hヒストグラムを使用してGFP+細胞を特定することにより進める。このようにゲーティングしたら、Alexa Fluor 647（標的結合を検出するための共染色）を使用してソーティング及び分析を行った。

【0454】

スクリーニングは、磁気ソーティングとフローソーティングの組み合わせを使用して実施した。磁気ソーティングは、次のとおりに実施した：2×10⁸ 293F細胞にSDGF CDPライブラリーを約1のMOIで形質導入し、形質導入後3日まで拡大させた。最初のスクリーニングでは、磁気セルソーティングを実施した。1×10⁹の形質導入した細胞を、最終体積25mLの200nMのビオチン化TfR、2mLの抗ビオチンMicroBeads（UltraPure、Miltenyi 130-105-637）、及び21mLのFlow Buffer（PBS+2mM EDTA及び0.5%ウシ血清アルブミン）を含有する結合緩衝液中に再懸濁した。細胞を氷上で攪拌しながら（2～5分ごとに穏やかに反転）30分間インキュベートし、次いで、Flow Bufferで10倍に希釈して250mLにし、ペレット化し（500×g、5分）、High BSA Flow Buffer（2mM EDTA及び3%BSA含有PBS）を用いて再懸濁して40mLにした。細胞を4つの10mLアリコートに分割し、「possel d」プロトコル及び各ソート後の「クイックリンス」を使用して、Miltenyi autoMACS（登録商標）Pro Separatorにかけた。ランニング緩衝液及び洗浄緩衝液はそれぞれHigh BSA Flow Buffer及びPBS+2mM EDTAであった。溶出した細胞をプールし、ペレット化し、そのCDP配列をPCR増幅した（Terra（商標）PCR Direct Polymerase Mix（Takara 639271）、16サイクル後にPhusion）。このサブライブラリー

10

20

30

40

50

を上記のようにSDGFにクローニングし、レンチウイルスにして、フローソーティングのために、新しいバッチの293F細胞（ 1×10^7 細胞、MOI約1）に形質導入した。
【0455】

フローソーティングは、次のとおりに実施した：200nMのTfR、200nMのストレプトアビジンAlexa Fluor 647コンジュゲート（ThermoFisher S21374）、及び $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ のDAPIを含む3mLのFlow Buffer中で染色した 2.4×10^7 細胞を使用してフローソーティングを行った。細胞をFlow Bufferで4倍に希釈して12mLにし、ペレット化し（ $500 \times g$ 、5分）、3.6mLのFlow Buffer中に再懸濁した。細胞をFACS Aria II System（BD）でソーティングし、FSC-A（増地）、SSC-A（増地）、DAPI-A（陰性）、GFP-A（陽性）、及びAPC-A（GFP+の上位7%）の各チャンネルに基づいてゲーティングした。各フローソーティング後、細胞を懸濁24ウェルプレートのFreeStyle Media中で0.5~1mLから培養し、300rpmで振盪し、125RPMで振盪する125mLのバッフル付きフラスコ中で最終体積30mLまで拡大した。この時点で、細胞を上記のように再びソーティングした。3回目のフローソーティング後、細胞を拡大し、 1.5×10^6 細胞のペレットで凍結した。ペレットを上記のようにPCR増幅し（Terra Direct PCRに続いてInFusion）、CDPインサートをSDGFにサブクローニングし、形質転換し（Stellarコンピテント細胞）、クローニングされたCDPのミニプレップ及びシーケンシングのためにコロニーを採取した。濃縮バリエントは、配列解析において、採取した約100のコロニーで1回を超えて出現するものとした。部位飽和変異導入（SSM）による親和性成熟スクリーニングは、次の変化を加えて全て上記のように行った：1）染色は連続的に、最初にTfRを用いて、次いで等モル量の色素標識ストレプトアビジンを用いて行った。2）TfR／ストレプトアビジン濃度を、最初のSSM成熟スクリーニングでは20nMに、2回目のSSM成熟スクリーニングでは8nMに下げた。各SSMスクリーニング後、個々の変異のうち1つまたは2つのいずれかを含有するバリエントのいずれよりも高いTfR染色を示す化合物変異体（配列番号2または配列番号32のペプチド）を組み立てるために、濃縮バリエントを調べた。

【0456】

図1のフローサイトメトリプロットは、プールした高多様性ライブラリーに由来する、TfRに結合する細胞の連続的な濃縮を示す。図1Aは、トランスフェリン受容体（TfR）タンパク質のクマシー染色ゲルを示す。図1Bは、1回のフローソーティング後における、TfRに結合する細胞を示すフローサイトメトリプロットを示す。図1Cは、1回のフローソーティング後における、対照染色の細胞を示すフローサイトメトリプロットを示す。図1Dは、2回のフローソーティング後における、TfRに結合する細胞を示すフローサイトメトリプロットを示す。図1Eは、2回のフローソーティング後における、対照染色の細胞を示すフローサイトメトリプロットを示す。図1Fは、3回のフローソーティング後における、TfRに結合する細胞を示すフローサイトメトリプロットを示す。図1Gは、3回のフローソーティング後における、対照染色の細胞を示すフローサイトメトリプロットを示す。

【0457】

各フローソーティングは、3000万細胞を超える細胞のライブラリーの成長、TfR結合の染色、及び上位の結合物質のフローソーティングを表す。ソーティングした結合物質は、成長させてから、次のフローソーティングを実施した。

【0458】

実施例5

TfR結合ペプチドの特定

本実施例は、実施例4に記載されている哺乳動物表面提示系を使用したTfR結合ペプチドの特定について記載する。

【0459】

実施例 4 の哺乳動物表面提示系を使用して、配列番号 1 の配列（配列番号 1 は配列番号 36 に N 末端 GS を付加したものである）を有する単クローンペプチドを特定した。10,000 個の CDP をコードするオリゴヌクレオチドのライブラリーを増幅し、変異導入した。CDP は、17～50 アミノ酸長であり、システインは、4、6、8、または 10 個であった。ライブラリーには、アノテーションのあるノッティンまたはデフェンシンに対してある程度の重み付けがあるが、ライブラリーにはあらゆる生物のドメイン／界の CDP が含まれた。このライブラリーを SDGF にクローニングし、レンチウイルスにし、293F 懸濁細胞に形質導入した。形質導入した細胞を TfR (200 nM) で染色し、1 ラウンドの磁気セルソーティング及び 3 ラウンドのフローソーティングの過程で共染色し、各ラウンドで TfR で染色された細胞が濃縮された。結合は、ビオチン化したものまたは His タグを付けたもののいずれかである 200 nM の可溶性 AF647-TfR を使用した表面提示アッセイにおいて、TfR に特異的に結合することを検証した。染色は、四価の標的アビディティの 1 ステップ染色プロトコルを使用して実施した。最終の濃縮細胞集団の DNA シーケンシングによって、単一 TfR 結合 CDP が特定され、配列番号 1 に指定された。これは、海洋襟鞭毛虫 *Monosiga brevicollis* に由来するシトクロム BC1 複合体サブユニット 6 (Uniprot ID: A9V0D7、DOI: 10.1093/nar/gku989) をランダム変異させたバリエーションであり、長さは 49 アミノ酸（6 つのシステイン）で、予測される分子量は 5.6 kDa である。次いで、部位飽和変異導入 (SSM) を使用して、配列番号 36 を親和性成熟に供し、可能な限りの非システイン単一アミノ酸置換を含むようにライブラリーを作成する（43 個の非 Cys アミノ酸 × 18 個の可能な非 Cys 置換 = 775 個のバリエーション、配列番号 1 を含む）。

【0460】

図 2 のフローサイトメトリープロットは、TfR 及び単クローンペプチドを提示する細胞を示す。図 2A は、配列番号 1 のペプチドを発現する細胞（x 軸、GFP）及び対照タンパク質（y 軸、蛍光抗 His 抗体で染色）のフローサイトメトリープロットを示す。図 2B は、配列番号 1 のペプチドを発現する細胞（x 軸、GFP）及び対照タンパク質（y 軸、蛍光ストレプトアビジンで染色）のフローサイトメトリープロットを示す。図 2C は、配列番号 1 のペプチドを発現する細胞（x 軸、GFP）及び TfR（y 軸、蛍光抗 His 抗体で染色）のフローサイトメトリープロットを示す。図 2D は、配列番号 1 のペプチドを発現する細胞（x 軸、GFP）及び TfR（y 軸、蛍光ストレプトアビジンで染色）のフローサイトメトリープロットを示す。

【0461】

TfR 染色は、特定されたクローンを発現する細胞で観察され、対照タンパク質では染色はみられなかった。この染色は、蛍光ストレプトアビジンまたは抗 His 抗体のいずれかが共染色であるときに観察され、これは、結合の性質が共染色ではなく TfR にのみ依存することを示している。二重陽性細胞（右上の四分円）は、TfR に結合したペプチドを発現細胞を示す。

【0462】

哺乳動物提示スクリーニングを使用する代替の方法を使用して、第 2 及び第 3 世代の結合物質である TfR 結合ペプチドを特定及び最適化（「成熟」）した。このライブラリーを、低濃度の標的及び共染色（20 nM）ならびに別個の染色ステップを使用する改変した染色プロトコルでスクリーニングした。後者は、ストレプトアビジンによって付与される四価のアビディティを排除することによって、ストリンジェンシーが更に高まる。最大 4 ラウンドのフローソーティング及び濃縮を使用して、TfR 結合特性が改善したバリエーションを特定した。濃縮されたバリエーションの順列により最適な変異体（配列番号 2（配列番号 2 は、配列番号 37 に N 末端 GS を付加したもの））を特定し、このプロセスを再度繰り返して（8 nM の TfR 共染色；それ以外は同一のプロトコル）、配列番号 32 を生成した（配列番号 32 は、配列番号 67 に N 末端 GS を付加したもの）。この 2 回成熟させたバリエーションは、元のライブラリーメンバー（GSREGCASHCTKYKAELKK

C E A R V S S R S N T E E T C V Q E L F D F L H C V D H C V S Q、配列番号 3 6 2) から 1 4 の点変異を含有する。親配列からの 4 つの点変異が配列番号 1 に認められ、配列番号 2 及び配列番号 3 2 は、先の世代から 6 及び 4 つの変異をそれぞれ含有する。

【0 4 6 3】

配列番号 1 及びそのバリエーション (例えば、配列番号 2 及び配列番号 3 2) を可溶性ペプチドとして生成し、逆相 HPLC (RP-HPLC)、SDS-PAGE、及び質量分析によって検証した (図 4 A、図 4 C、及び図 4 E)。約 5 ~ 6 kDa の質量に基づく、SDS-PAGE で移動度が予想よりも遅かったことは、一部の CDP が興味深い電気泳動移動度特性を有することを示している。全てのバリエーションは、SDS-PAGE と RP-HPLC の両方で DTT 還元 (10 mM) 時に極めて異なる移動度を示したことから、ジスルフィド結合の安定化が確認された。TfR への結合は、表面プラズモン共鳴 (図 7) によって検証され、成熟バリエーションの親和性の増加も確認された (配列番号 3 2 [$K_D = 216 \pm 1 \text{ pM}$] > 配列番号 2 [$K_D = 8.7 \pm 0.4 \text{ nM}$] > 配列番号 1 [K_D は決定されず])。還元、プロテアーゼ曝露、及び熱の各条件下における安定性についてペプチドを更に評価した (図 5、図 6、及び図 2 6)。全てのバリエーションは、細胞の還元条件 (10 mM グルタチオン) に対して完全または部分的な耐性を示したが、親和性成熟バリエーションは、ペプシンに対して部分的な耐性を示した (ただし、全てトリプシンタンパク質分解には弱かった)。配列番号 3 2 タンパク質のインタクトな非還元ペプチドは、DTT 還元タンパク質に対して実質的に改善した熱耐性を示し、一般的な周囲温度をはるかに超える (50 °C 超) まで円二色性の特徴には実質的な変化がなく、95 °C まで完全なアンフォールディングが観察されなかった。

【0 4 6 4】

実施例 6

ペプチドの部位飽和変異導入

本実施例は、有益な変異または有害な変異を特定するための本開示のペプチドの部位飽和変異導入 (SSM) について例示する。部位飽和変異導入を配列番号 1 のペプチド (配列番号 1 は配列番号 3 6 に N 末端 GS を付加したものであり、図 3 A に結果を示す) 及び配列番号 2 のペプチド (配列番号 2 は配列番号 3 7 に N 末端 GS を付加したものであり、図 3 B に結果を示す) に対して実施した。

【0 4 6 5】

図 3 は、ペプチド成熟中に特定された TfR 結合ペプチドバリエーションの TfR 結合能力を示す。最初の哺乳動物表面提示実験 (例えば、図 1 及び図 2 参照) で特定された配列番号 1 の配列を有するペプチドの親和性成熟のために、SSM を採用した。各成熟ラウンド中に、可能性のある全ての非システイン点バリエーションのライブラリーを構築し、最初のスクリーニングよりも高ストリンジェンシーで TfR に対してスクリーニングした。結合が改善したバリエーションを Sanger シーケンシングによって濃縮及び特定した。このように濃縮されたバリエーション変異を様々な順列で互いに組み合わせて (データに示される)、複合的に改善された結合物質を特定した。SSM の 2 ラウンドを完了させ、配列番号 2 及び配列番号 3 2 をそれぞれ含む成熟ペプチドを得た (配列番号 3 2 は配列番号 6 7 に N 末端 GS を付加したものである)。SSM の最初のラウンドにおける TfR 濃度は 20 nM であり、1 ステップ染色を使用して SSM を実施した。SSM の 2 回目のラウンドにおける TfR 濃度は 8 nM であり、2 ステップ染色を使用して SSM を実施した。

【0 4 6 6】

SSM ライブラリーのペプチドを発現する哺乳動物細胞の TfR 結合は、実施例 4 及び実施例 5 に記載されているように実施したが、より高いストリンジェンシープロトコルを用いた。より高いストリンジェンシープロトコルは、より低濃度の TfR (例えば、20 nM) を含んだ。

【0 4 6 7】

図 3 A は、配列番号 1 (配列番号 1 は配列番号 3 6 に N 末端 GS を付加したものである) の最初の部位飽和変異導入スクリーニングの結果を示しており、配列番号 4、配列番号

5、及び配列番号8の配列を有するペプチド（配列番号4、配列番号5、及び配列番号8はそれぞれ配列番号39、配列番号40、及び配列番号43にN末端GSを付加したものである）などのいくつかのバリエーションは、TfRに対する結合活性の改善を示している。図3Bは、第2のバリエーション変異中に特定されたバリエーションのTfR結合を示す。

【0468】

x軸は全てのバリエーションの配列番号を示し、y軸は、フローサイトメトリー実験から推定された相対蛍光単位（RFU）でのTfR結合量を示す。

【0469】

実施例7

SSMで生成されたTfR結合ペプチドバリエーションのTfR結合

本実施例は、実施例6に記載されるようにSSM中に特定された、部位飽和変異導入（SSM）で生成されたTfR結合ペプチドバリエーションのTfR結合を示す。

【0470】

in vivoにおけるBBB透過実験により、ペプチドのTfR結合能力と小胞性トランスサイトシスを促進する能力は、必ずしも一致しないことが明らかになった。

【0471】

配列番号32を基準として、残基C6、C10、C20、C34、C44、及びC48（配列番号67を基準にすると、C4、C8、C18、C32、C42、及びC46）に対応する6つのシステインは、ジスルフィドに関与し、したがって、ペプチド安定性に寄与する。

【0472】

配列番号32を基準として、残基G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、Q51、（配列番号67を基準にすると、G3、A5、S6、N12、L15、E16、E19、L36、L40、L43、D44、H45、S48、Q49）に対応する表面界面残基は、三世代全てのTfR結合ペプチドに存在するものであり、TfR結合に寄与している可能性が高い。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のこれらの対応する残基の少なくとも1つ以上を含む。したがって、そのようなペプチドは、TfRへの結合が増大するように操作することができる。

【0473】

配列番号32を基準として、次のアミノ酸残基R3、E4、R9、K12、D14、E15、K19、R23、S26、S28、N29、T30、E31、E32、D33、E35、Q36、E37、E39、及びD40（配列番号67を基準にすると、R1、E3、R7、K10、D12、E13、K17、R21、S24、S26、N27、T28、E29、E30、D31、E33、Q34、E35、E37、及びD38）に対応する、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTなどの親水性表面遠位残基は、ペプチド可溶性に寄与している可能性が高い。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のこれらの対応する残基の少なくとも1つ以上を含む。したがって、そのようなペプチドは、可溶性が増大するように操作することができる。

【0474】

より高い結合親和性は、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTなどの親水性残基の存在と関連しており、これは、配列番号32を基準として、D15、E35、E39、及びH49（配列番号67を基準にすると、D13、E33、E37、及びH47）に対応する残基で、A、M、I、L、V、F、W、またはYなどの非極性または疎水性残基ではない変異によって結合が改善することに示されるとおりである。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70

10

20

30

40

50

、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のこれらの対応する残基の少なくとも1つ以上を含む。したがって、そのようなペプチドは、結合親和性が改変するように操作することができる。

【0475】

TfRへのより高い結合親和性は、A、M、I、L、V、F、W、またはYなどの非極性または疎水性残基と関連しており、これは、配列番号32を基準として、M11、M25、及びM27（配列番号67を基準にすると、M9、M23、及びM25）に対応するアミノ酸残基で、D、E、H、K、R、N、Q、S、またはTなどの親水性残基ではない変異によって結合が改善することに示されるとおりである。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のこれらの対応する残基の少なくとも1つ以上を含む。したがって、そのようなペプチドは、結合親和性が改変するように操作することができる。

【0476】

より高いTfR結合親和性は、A、M、I、L、またはVなどの脂肪族残基と関連しており、これは、配列番号32を基準として、L45（配列番号67を基準にすると、L43）に対応するアミノ酸残基で、F、W、またはYなどの大きな芳香族残基ではない変異によって結合が改善することに示されるとおりである。本開示のペプチド中のいずれか1つ以上のF、W、またはYを、A、M、I、L、またはVを含む脂肪族残基に置換すると、ペプチドのTfRに対する結合親和性を向上させることができる。

【0477】

本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトのいずれか（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）を、本明細書に記載される対応残基のうちの1つ以上において修飾して、安定性の向上及び結合特性の増加（または減少）またはTfR結合親和性の改変及びトランスサイトーシス特性の増加（または減少）、例えば、 k_a （会合）及び k_d （解離）速度定数の改変を含む、特性が改善されたペプチドバリエーションを生成することができる。

【0478】

ある特定のTfR結合ペプチドの配列アライメントを表8に示す。TfRとの相互作用に関与する特定の残基を太字で示す。表面相互作用残基は、以下に示すものが上げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 8 - T f R 結合ペプチドの対応残基

配列番号	配列
配列番号 1	GSREGCASR CT KYNAE LEK CEARVSSMSNTEETCVQ EL FDLLHC VD HCVSQ
配列番号 2	GSREGCASR CT KYNAE LEK CEARVMSMSNTEEDCEQ EL EDLLHC LD HCHSQ
配列番号 3 0	GSREGCASR CM KYNAE LEK CEARMMSMSNTEEDCEQ EL EDLLY CL DHCHSQ
配列番号 3 2	GSREGCASR CM KYN DE LEK CEARMMSMSNTEEDCEQ EL EDLLY CL DHCHSQ
配列番号 3 3	GSREGCASR CT KYNAE LEK CEARVSSMSNTEETCVQ EL FDLLHC VD HCVSQGSS ELYENKPRRPYIL
配列番号 3 4	GSREGCASR CT KYNAE LEK CEARVMSMSNTEEDCEQ EL EDLLHC LD HCHSQGSS ELYENKPRRPYIL
配列番号 3 5	GSREGCASR CM KYN DE LEK CEARMMSMSNTEEDCEQ EL EDLLY CL DHCHSQGSS ELYENKPRRPYIL
配列番号 3 6	REGCASR CT KYNAE LEK CEARVSSMSNTEETCVQ EL FDLLHC VD HCVSQ
配列番号 3 7	REGCASR CT KYNAE LEK CEARVSSMSNTEETCVQ EL FDLLHC VD HCVSQ
配列番号 6 5	REGCASR CM KYNAE LEK CEARMMSMSNTEEDCEQ EL EDLLY CL DHCHSQ
配列番号 6 7	REGCASR CM KYN DE LEK CEARMMSMSNTEEDCEQ EL EDLLY CL DHCHSQ
配列番号 6 8	REGCASR CT KYNAE LEK CEARVSSMSNTEETCVQ EL FDLLHC VD HCVSQG SSELYENKPRRPYIL
配列番号 6 9	REGCASR CT KYNAE LEK CEARVMSMSNTEEDCEQ EL EDLLHC LD HCHSQG SSELYENKPRRPYIL

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

配列番号	配列
配列番号 7 0	REGCASRC MYNDELEK CEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQG SSELYENKPRRPYIL
配列番号 1 3 6	GSREGCASRC TRYNAELE RCEARVSSMSNTEETCVQE LFDLLHCV DHCVSQ
配列番号 1 3 7	GSREGCASRC TRYNAELE RCEARVMSMSNTEEDCEQE LEDLLHCLDHCH SQ
配列番号 1 6 5	GSREGCASRC MYNAELE RCEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQ
配列番号 1 6 7	GSREGCASRC MYNDELE RCEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQ
配列番号 1 6 8	GSREGCASRC TRYNAELE RCEARVSSMSNTEETCVQE LFDLLHCV DHCVSQGSS ELYENRPRRPYIL
配列番号 1 6 9	GSREGCASRC TRYNAELE RCEARVMSMSNTEEDCEQE LEDLLHCLDHCH SQGSS ELYENRPRRPYIL
配列番号 1 7 0	GSREGCASRC MYNDELE RCEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQGSS ELYENRPRRPYIL
配列番号 1 7 1	REGCASRC TRYNAELE RCEARVSSMSNTEETCVQE LFDLLHCV DHCVSQ
配列番号 1 7 2	REGCASRC TRYNAELE RCEARVMSMSNTEEDCEQE LEDLLHCLDHCH SQ
配列番号 2 0 0	REGCASRC MYNAELE RCEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQ
配列番号 2 0 2	REGCASRC MYNDELE RCEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQ
配列番号 2 0 3	REGCASRC TRYNAELE RCEARVSSMSNTEETCVQE LFDLLHCV DHCVSQGSS ELYENRPRRPYIL
配列番号 2 0 4	REGCASRC TRYNAELE RCEARVMSMSNTEEDCEQE LEDLLHCLDHCH SQGSS ELYENRPRRPYIL
配列番号 2 0 5	REGCASRC MYNDELE RCEARMMSMSNTEEDCEQE LEDLLYCLDHCH SQGSS ELYENRPRRPYIL

10

20

30

【0 4 7 9】

実施例 8

還元条件におけるペプチド安定性

本実施例は、還元条件における設計または操作されたペプチドの安定性について記載する。核内または細胞質内のタンパク質などの細胞内の 1 つ以上の標的タンパク質と相互作用するように設計または操作されたペプチドは、細胞のサイトゾルコンパートメント内の還元条件に曝露される。したがって、本開示のペプチドが還元条件において安定性を示すことは、有利である。本開示のペプチドの安定性を 10 mM のジチオスレイトール（DTT）及び 10 mM のグルタチオン（GSH）中で試験した。DTT は、ペプチドが生物学的環境（例えば、細胞）で曝露される条件よりも厳しい条件を表す強還元剤である。GSH は、細胞内条件でのペプチド安定性を試験するには、より生理学的に適切な還元剤である。ペプチドー標的タンパク質相互作用の一例は、TfR タンパク質へのペプチド結合である。本実施例は、還元条件下におけるペプチドの安定性について記載する。配列番号 1 及び配列番号 1 のバリエーションを可溶性タンパク質として生成し、溶液中での挙動及びジス

40

50

ルフィド還元時における移動度について試験した。

【0480】

ペプチドの安定性を10mM GSH（生物学的に適切な還元剤）及び10mM DTT（GSHよりも強い還元剤）中で試験した。図7に示されるように、配列番号1、配列番号4、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32（配列番号1、配列番号4、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32はそれぞれ配列番号36、配列番号39、配列番号37、配列番号65、及び配列番号67にN末端GSを付加したものである）の配列を有するペプチドをDTTを使用した還元条件に曝露し、ペプチドをPBS中でインキュベートした対照実験と比較した。ペプチド安定性をSDS-PAGE及びHPLCによって測定した。図4A～図4Eに示されるデータは、DTT曝露後のHPLCクロマトグラムで元のペプチドピークが保持されていることによって証明されるように、配列番号2及び配列番号32のペプチドがDTTによる還元に対して最も耐性があったことを示している。

10

【0481】

追跡研究において、配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32をそれぞれ含む4つのペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32はそれぞれ配列番号36、配列番号37、配列番号65、及び配列番号67にN末端GSを付加したものである）を、図5に示すように、10mM DTT及び10mM GSHを使用する還元条件に供した。図5A～図5Dに示される重ね合わせのHPLCクロマトグラムは、配列番号30及び配列番号32の配列を有するペプチドがGSH還元にはほぼ完全に耐性があり、配列番号1及び配列番号2の配列を有するペプチドがGSH還元には部分的にのみ耐性があったことを示す。GSH還元は、細胞内条件での安定性を試験するには、より生理学的に適した還元剤であるが、4つ全てのペプチドがDTT曝露後に還元を示した。これらの結果は、配列番号1及びそのバリエーションがジスルフィド駆動型の構造及び挙動を示すことを示した。

20

【0482】

実施例9

プロテアーゼに対するペプチド安定性

本実施例は、プロテアーゼに対する本開示のペプチドの安定性について例示する。例えば、腫瘍環境は、高濃度のプロテアーゼを含有する。更に、タンパク質分解（プロテアーゼによる分解または切断）に対する耐性は、例えば、循環中におけるペプチド分解及び後に続く免疫原性の可能性を低減する。タンパク質分解に対する耐性は、更に、ペプチドの血清半減期及びペプチドの全体的なバイオアベイラビリティを増加させ得る。したがって、本開示のペプチドがプロテアーゼによる分解に対して耐性があることは、有利である。

30

【0483】

タンパク質分解消化に対する耐性を決定するために、配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32のペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号30、及び配列番号32はそれぞれ配列番号36、配列番号37、配列番号65、及び配列番号67にN末端GSを付加したものである）を、pH1.05の人工胃液中の50Uのブタペプシン（Sigma-Aldrich P7012）、またはPBS中の50Uのブタトリプシン（Sigma-Aldrich 6567）と混合し、37℃で30分間インキュベートし、逆相HPLC（RP-HPLC）によって分析した。これとは別に、ペプチドを、pH1.05の人工胃液43中の50Uのブタペプシン（Sigma-Aldrich P7012）、またはPBS中の50Uのブタトリプシン（Sigma-Aldrich 6567）と混合し、37℃で30分間インキュベートし、RP-HPLCによって分析した。対照ペプチドをPBS中でインキュベートした。全てのペプチドを非還元条件でインキュベートした。

40

【0484】

図6は、TfR結合ペプチドのペプシン及びトリプシン処理を含むプロテアーゼに対する耐性を示す。図6は、処理なし（赤）、トリプシン（青）、またはペプシン（緑）のいずれかに供したペプチドの逆相HPLCトレースの重ね合わせ（試験したペプチドごとに

50

1つ)を示す。図6Aは、配列番号1の配列を有するペプチドのトリプシン(青)及びペプシン(緑)に対する耐性を示す。図6Bは、配列番号2の配列を有するペプチドのトリプシン(青)及びペプシン(緑)に対する耐性を示す。図6Cは、配列番号32の配列を有するペプチドのトリプシン(青)及びペプシン(緑)に対する耐性を示す。図6Dは、配列番号30の配列を有するペプチドのトリプシン(青)及びペプシン(緑)に対する耐性を示す。

【0485】

配列番号2、配列番号30、及び配列番号32の配列を有する配列は、これらの条件下において、ペプシン処理に対して部分的に耐性があったが、トリプシン処理に対しては耐性がなかった。配列番号1の配列を有するペプチドは、両方のプロテアーゼに対して脆弱であった。

【0486】

実施例10

ペプチド結合相互作用の表面プラズモン共鳴(SPR)解析

本実施例は、TfRとのペプチド結合相互作用の表面プラズモン共鳴(SPR)解析について例示する。

【0487】

本開示の様々なペプチドをTfRへの結合親和性について分析した。簡潔に述べると、Series S SAチップを備えたBiacore T100機器(GE Healthcare)において25℃で実施される、捕捉させたビオチン化TfRを使用したSPR実験によって、結合親和性を分析した。0.1mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA)を用いる実験において、HBS-EP+(10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20)をランニング緩衝液として使用した。試験されるTfR結合ペプチドに応じて濃度範囲を変えた希釈系列を2µg/mLのTfRとインキュベーションし、SPR実験のために約300共鳴単位(RU)のタンパク質を捕捉することによって、可溶性TfR結合ペプチドの結合を評価した。

【0488】

まず、図7に示されるように、様々な親和性を有するTfR結合ペプチドのアレルシリーズをSPRによって確認した。配列番号1、配列番号2、配列番号4、及び配列番号32の配列を有するペプチド(配列番号1、配列番号2、配列番号4、及び配列番号32はそれぞれ配列番号36、配列番号37、配列番号39、及び配列番号67にN末端GSを付加したものである)を300nMの濃度で試験した。その結果から、親和性成熟の後のラウンドのペプチドバリエーションは、TfRに対して異なる結合親和性を示すことが確認された。すなわち、配列番号32の配列を有する親和性成熟の最終ラウンドのペプチドは、TfRに対して最も高い結合親和性を示したのに対し、配列番号1は、ヒトTfR(hTfR)に対して最も低い結合親和性を示した。

【0489】

次に、配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32の配列をそれぞれ有する4つのペプチド(配列番号2、配列番号4、配列番号30、及び配列番号32はそれぞれ配列番号37、配列番号39、配列番号65、及び配列番号67にN末端GSを付加したものである)の、捕捉させたビオチン化hTfRに対する結合を測定した。図8は、配列番号2の配列を有するペプチドの濃度を100pM~200nMまで変えた場合のTfR結合を示す表面プラズモン共鳴(SPR)トレースを示す。図9は、配列番号4の配列を有するペプチドの濃度を100pM~200nMまで変えた場合のTfR結合を示す表面プラズモン共鳴(SPR)トレースを示す。図10は、SPRによる、捕捉させたビオチン化(Bt)hTfRに結合する配列番号32の結合及びシングルサイクルカイネティクスデータを示す。5つの濃度の配列番号32の配列を有するペプチド(0.037nM、0.11nM、0.33nM、1nM、3nM)を2つの密度の捕捉Bt-hTfRに対して注入し、グローバルに解析した。図11は、SPRによる、捕捉させたビオチン化hTfRに結合する配列番号30の結合及びシングルサイクルカイネティクスデータを

10

20

30

40

50

示す。5つの濃度の配列番号30の配列を有するペプチド（0.037 nM、0.11 nM、0.33 nM、1 nM、3 nM）を2つの密度の捕捉Bt-hTfRに対して注入し、グローバルに解析した。

【0490】

配列番号2及び配列番号4の結合は、100 pM及び200 nMの連続希釈で測定し、一方、配列番号30及び配列番号32は、37 pM〜3 nMの連続希釈で試験して、カインेटクスデータを得た。配列番号30及び配列番号32のペプチドについては、ペプチドを2つの濃度（図10及び図11に赤及び緑のトレースで示される）の捕捉ビオチン化hTfRに対して注入することによってカインेटクス試験を実施し、データをグローバルに解析した。

【0491】

以下の表9は、図8〜図11に示されるグラフを解析して得たデータをまとめたものである。配列番号2の配列を有するペプチドについては、 K_D が 8.7 ± 4 nM、 R_{max} が 23.1 ± 2 RUであることがわかった。配列番号4の配列を有するペプチドについては、 K_D が 14.8 ± 6 nM、 R_{max} が 21.2 ± 2 RUであることがわかった。配列番号32の配列を有するペプチドについては、 K_D が 216 ± 1 pMであることがわかった。配列番号30の配列を有するペプチドについては、 K_D が 468 ± 1 pMであることがわかった。 K_D 値が小さいほど結合親和性が高いことを示す。 R_{max} は、ペプチドのhTfRに対する最大結合能力を表す。以下の表に示されるように、配列番号32の K_D が最も低く、hTfRに対して最も強い結合を示すことが示されている。TfR結合親和性の増加は、トランスサイトーシス機能の改善に対応し得る。いくつかの場合において、TfR結合親和性の増加は、トランスサイトーシス機能の低下に該当する場合があります、いくつかの場合において、TfR結合親和性の増加は、参照ペプチドと比較して、トランスサイトーシス機能の変化に対応しない。いかなる理論に拘束されるものではないが、 K_a/K_d の比がペプチドのトランスサイトーシス機能に影響を与える可能性があることから、 K_a 及び/または K_d の調節を使用することで、最適なTfR結合親和性及びトランスサイトーシス機能を持つTfR結合ペプチドを生成できると考えられる。

【表9】

表9－SPR解析結果

配列番号	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D	解析方法
配列番号1			+	
配列番号2	—	—	8.7 (4) nM	定常状態
配列番号4	—	—	14.8 (6) nM	定常状態
配列番号32	8.55 (1) $\times 10^6$	1.85 (1) $\times 10^{-3}$	216 (1) pM	シングルサイクルカインेटクス
配列番号30	8.57 (2) $\times 10^6$	4.16 (1) $\times 10^{-3}$	486 (1) pM	シングルサイクルカインेटクス

* 報告された k_a は、機器で測定できる限界に近い。

【0492】

実施例11

内因性TfR結合物質の存在下におけるペプチドのTfRへの競合的結合

本実施例は、内因性 T f R 結合物質 アポトランスフェリン（鉄なし）及びホロトランスフェリン（鉄負荷あり）の存在下における、本開示のペプチドの T f R への競合的結合について記載する。

【0493】

配列番号 2 及び配列番号 32 の配列を有する S D G F - ペプチド（配列番号 2 及び配列番号 32 はそれぞれ配列番号 37 及び配列番号 67 に N 末端 G S を付加したものである）を発現する H E K - 293 懸濁細胞を、T f R + P B S、T f R + アポトランスフェリン（鉄負荷なし）10 μ M、または T f R + ホロトランスフェリン（鉄負荷あり）10 μ M のいずれかとインキュベートした。トランスフェクトした細胞をホロトランスフェリンまたはアポトランスフェリンとインキュベートし、続いて、8 n M のビオチン化 T f R を含有する T f R 溶液を添加した。細胞をペレット化し、A F 647 - ストレプトアビジン溶液中に再懸濁した。細胞をペレット化し、フローサイトメトリーによってストレプトアビジン染色について分析すると、T f R 結合が示された。

【0494】

図 12 に示されるデータは、配列番号 2 及び配列番号 32 の配列を有するペプチドが T f R 結合についてホロトランスフェリンと良好に競合したことを示している（y 軸は、フローサイトメトリー実験から得られた相対蛍光単位を示す）。ホロトランスフェリンの存在下において、配列番号 32 の配列を有する第 3 世代の S S M 生成ペプチドは、配列番号 2 の配列を有する第 1 世代のペプチドよりも T f R に対して高い競合的結合を示した。

【0495】

このデータは、血流中などのホロトランスフェリンまたはアポトランスフェリンの存在下であっても、本開示のペプチドは、依然として T f R に結合することができることを示している。これにより、親和性成熟によって、ペプチドが T f R に対して高い結合親和性を有するようになり、内因性結合物質と比較して T f R への競合的結合を示すことも更に確認された。

【0496】

実施例 12

配列番号 32 のペプチドの解明された結晶構造

本実施例は、配列番号 32 及び T f R のペプチドの解明された結晶構造について例示する。まず、T f R - 配列番号 32 複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した後、結晶トレイに加えた。

【0497】

簡潔に述べると、凍結乾燥させた配列番号 32 を 25 m M P I P E S（p H = 7.0）、150 m M N a C l、及び 1 m M E D T A 中に 11 m g / m L の濃度で再構成した。予備的な結晶化条件は、J C S G - p l u s スパースマトリックススクリーン（M o l e c u l a r D i m e n s i o n s）を蒸気平衡形式で使用して決定した。1 m L の 9 % w / w P E G（M W = 3350）、30 m M（N H₄）₂ S O₄、100 m M B i s - T r i s（p H = 5.0）のウェル上における、1 μ L のタンパク質溶液 + 1 μ L のウェル溶液を含む液滴の周囲温度における蒸気平衡によって、回折品質の結晶を得た。データ収集のために、結晶をウェル溶液 + 20 % v / v グリセロールへ移して、凍結保存した。O s m i c V a r i m a x 光学系及び R i g a k u S a t u r n 944 + C C D 検出器を備えた社内の R i g a k u M i c r o M a x - 007 H F 回転対陰極発生装置で回折データ（d m i n = 2.55 Å）を収集した。

【0498】

化学量論的複合体を単離するために、精製した配列番号 32 及び T f R を 1.2 : 1 のモル比で混合し、インキュベートし、25 m M P I P E S、150 m M N a C l、及び 1 m M E D T A（p H = 7.0）中、S u p e r o s e 6 10 / 300 カラム（G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s）におけるサイズ排除クロマトグラフィーによって分画した。h T f R - ペプチド複合体を 10 m g / m L の標的濃度で再懸濁した。N e x t a l J C S G +、P E G、及び（N H₄）₂ S O₄ ファクトリアルスイー

10

20

30

40

50

ト (Qiagen) ならびにサブマイクロリットルロボティクス (TTP Labtech mosquito) を使用して設定した、1:1のタンパク質溶液:リザーバー溶液シッティングドロップによる蒸気拡散によって、結晶化スクリーニングを室温で実施した。1 mLの5% w/w PEG (Mr=6000)、100 mM MES (pH=6.5) のウェル上における、1 μ Lのタンパク質溶液+1 μ Lのウェル溶液を含む液滴の周囲温度における蒸気平衡によって、回折品質の結晶を得た。データ収集のために、結晶をウェル溶液+15% v/vグリセロールへ移して、凍結保存した。Rigaku MicroMax-007 HFホームソースまたはAdvanced Light Sourceのビームライン5.0.1 (Lawrence Berkley National Laboratory, Berkeley, CA) を1.0000 Åの波長で使用して、単一結晶から回折データ (dmin=1.85 Å) を収集した。

【0499】

RCSB PDB (Berman, H. M., Nucleic Acids Res., 28 (1):235-42 (2000)) から得た相同な構造を検索モデルとして使用するCCP4プログラムスイート (Winn, M. D., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 67 (Pt 4):235-42 (2011)) でPHASER (McCoy, A. J., J Appl Crystallogr., 40 (Pt 4):658-674 (2007)) を使用する分子置換 (MR)、またはCukアルファ線を使用して異常シグナルを最大化し、SHELX (Sheldrick, G. M., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 66 (Pt 4):479-85 (2010)) で硫黄部分構造を決定する硫黄単波長異常分散法 (sSAD) (Liu, Q., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 69 (Pt 7):1314-32 (2013)) のいずれかによって、初期位相を決定した。sSAD位相決定の場合、1°振幅内に180°の交互ファイ回転を有する5°ウェッジでデータを収集することによって、Bijvoetペア測定を最適化した。HKL2000を用いてデータを整理し、スケールリングした (Otwinski, Z., Methods Enzymol., 276:307-326 (1997))。COOT (Emsely, P., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 60 (Pt 12 Pt 1):2126-32 (2004)) 及びREFMAC (Murshudov, G. N., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 53 (Pt 3):240-55 (1997)) を用いて、モデル構築及び精密化の反復サイクルを実施した。MolProbity (Davis, I. W., Nucleic Acids Res., 35 (Web Server issue):W375-83 (2007)) を用いて構造検証を実施した。アポ型の配列番号32の解釈可能な電子密度マップを生成するにはREFMAC5のツイン精密化が必要であった。

【0500】

配列番号32の結晶構造を、単独状態と、TfRとの結合状態の両方で解明した (図13及び図14)。構造モデリングによって示されるように、CDPは、逆平行の2ヘリックスバンドルである。単純なヘアピントポロジを持つジスルフィド結合を3つ含有する (C4:C46、C8:C42、及びC18:C32のペア) (図13C)。TfRと複合体を形成する際には、N末端及びC末端の残基が整列し、TfRと接触する。しかしながら、CDPのヘリカルコア (C8:C42ジスルフィドの間及びそれらを含む) は、結合形態と非結合形態との間でほぼ同一であり、骨格は0.331±0.049 ÅのRMSDで整合する (N=8アライメント)。いずれの結晶においても、ヘリックスを接続するループに秩序はない。図13の遊離及びTfR結合した配列番号32のカートゥーン表示は、非対称ユニットの全ての分子の重ね合わせである (遊離の配列番号32は4、TfR結合は2)。プロテアーゼ分解に耐性のある安定なペプチドは、ヒトまたは他の動物にペプチドを投与した際の免疫原性の任意のリスクを低減する。本開示のペプチドのTfR結合ファーマコフォアに関する正確な結晶学的知識により、ペプチドフラグメントの主要組

織適合遺伝子複合体 (MHC) へのいずれかの結合を更に限定するように配列を最適化することが可能になり、したがって、ペプチドの反復投与によって引き起こされるいずれかの免疫原性リスクを低減することができる。外来タンパク質の免疫認識には、抗原提示細胞におけるタンパク質のフラグメンテーションと、それらのフラグメントのMHC (ヒトではHLA) への結合が必要である。いくつかのモチーフはフラグメント:MHC結合に有利であるが、他のモチーフは不利である。結合及び非結合の両方のペプチドの構造を理解することで、重要な結合残基に影響を与えることなく、フラグメントのMHCへの結合を破壊する変異をもたらすことによって、免疫原性が低減したバリエーションを設計することができる。

【0501】

TfRへの結合は、極性と非極性の両方の相互作用によって媒介され、後者は、主に界面の小さな疎水性ポケットに収まっているMet残基及びLeu残基である (図13D)。N末端のゆがみは、TfRに対する3つの水素結合の形成に起因し、一方、結合状態と非結合状態との間のC末端ヘリックスの調整は、配列番号32のH47周辺の立体構造に対応する。N末端GSスタブは、シデロカリン融合パートナーからのTEV切断後の残りであり、これもまた無秩序である。全体として、埋没表面積 ($1001 \text{ \AA}^2$) が小さいことを考慮すると、親和性 ($K_D = 216 \pm 1 \text{ pM}$) は、極めて強い。公開されている113のヘテロ二量体複合体の親和性及び埋没表面積と比較すると、埋没表面積がより小さい86の複合体のうち、より強い親和性を示すのは2つのみであった (偶然にも、そのうちの1つは、プロテアーゼ阻害CDPとその標的である)。

【0502】

TfR:トランスフェリン共結晶構造と比較すると、配列番号32フットプリントは、トランスフェリンのものと重複しており、競合的結合が予想される (図13D)。これは、可溶性アポトランスフェリンまたはホロトランスフェリンの存在下における表面提示フローサイトメトリー結合アッセイで確認された (図12)。これは、ホロトランスフェリンの血漿レベルが高いため (報告によれば $20 \mu\text{M}$ 以上)、BBB透過を減少させる可能性があるが、最も親和性の高いTfR結合バリエーション (配列番号32) は、TfR:トランスフェリン相互作用について公開されているものと同様のオフレート (k_d) を有し、オンレート (k_a) ははるかに速い。頂端側の細胞表面にTfRを運ぶ小胞が融合し、受容体が血流に曝露されるとすぐに、配列番号32が、単純に、トランスフェリンよりも迅速に、新たに血漿に曝露されたTfRに結合することが可能であると考えられる。配列番号32の放出半減期 (約10分) は、報告されているトランスフェリンのエンドサイトーシス速度よりもはるかに長く ($t_{1/2} = 3.5 \text{ 分}$)、TfRの取り込みがリガンド依存性でないことから、配列番号32は、単純に、その結合部位についてトランスフェリンを排除し、取り込みに十分な間、結合部位を占有し得る。TfR上の配列番号32の結合部位を含む残基のほとんどは、ヒトとマウスのオルソログ間で保存されている (図13E)。これは、交差反応性を示唆するものであり、交差反応性は、表面提示されたヒトまたはマウスTfR (SDGFを介する) 及び色素結合可溶性TfR結合バリエーションを使用するフローサイトメトリー結合アッセイ (図13E及び図15) で確認された。可溶性マウスTfRエクドメインが生成できなかったため、この代替戦略 (可溶性CDP、表面結合標的) を採用したが、表面提示タンパク質として良好に挙動した。

【0503】

図13は、hTfRと配列番号32の配列を有するペプチドとの共結晶を示す。図13Aは、配列番号32の配列を有するペプチドと共結晶させたhTfRの第1の図を示し、ペプチド分子がhTfRと向かい合う面にあることを示し、結合したペプチドとhTfRとの間の2:2の結合化学量が確認される。コイル状の黒の実線で描かれている2つのヘリックス間の連結配列は、結晶構造では解明されなかったため、構造モデリングに基づいている。図13Bは、図13Aの図を拡大図を示し、配列番号32の配列を有するペプチドと共結晶させたhTfRを示し、多数の極性と非極性の相互作用が結合を誘導していることを示す。非極性相互作用は、主に、Leu及びMetであるが、極性相互作用は、い

10

20

30

40

50

くつかの電荷残基及び非電荷残基の混合である。T f Rとのそのような相互作用または結合に関与するアミノ酸残基は、配列番号32を基準として、残基G5、C6、A7、S8、C10、M11、N14、L17、E18、E21、L38、L41、L42、L45、D46、H47、H49、S50、Q51（配列番号67を基準として、G3、C4、A5、S6、C8、M9、N12、L15、E16、E19、L36、L39、L40、L43、D44、H45、H47、S48、Q49）に対応する。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のこれらの対応する残基の少なくとも1つ以上を含む。内因性CDPから変異させたアミノ酸側鎖、または界面の一部であるアミノ酸側鎖はいずれも棒で示される。界面に隣接する残基は黒で示し、一方、界面から遠位の残基はシアンで示す。図14は、いずれもhTfRに結合した、配列番号32の配列を有するペプチドと、公開文献のトランスフェリン（RCSB PDB 1SUUV）との重ね合わせを示す。同様に、図13Eは、同ペプチドと、異なる公開トランスフェリン受容体（RCSB PDB 3S9L）との重ね合わせを示す。重ね合わせは、トランスフェリン及び配列番号32の配列を有するペプチドは、TfR上の結合部位が重複していることを示している（図13E、左）。配列番号32の結合部位は、ヒト（配列番号353）とマウス（配列番号354）の両方の相同性に関して、TfR上の結合表面のほとんどが2つの種間で同一性または類似性を有することを示している（図13E、右）。図14Aは、TfRに結合した、トランスフェリン（公開文献から取得したデータ（RCSB PDB 1SUUV））と配列番号32の配列を有するペプチドとの重ね合わせを示す。図14Bは、TfRに結合した配列番号32の配列を有するペプチドの拡大図を示し、図14Aの内因性トランスフェリンの結合部位と比較すると、配列番号32の配列を有するペプチドとトランスフェリンの両方がhTfR上に重複する結合部位を有することを示している。内因性CDPから変異させたアミノ酸側鎖、または界面の一部であるアミノ酸側鎖はいずれも棒で示される。界面に隣接する残基は黒で示し、一方、界面から遠位の残基はシアンで示す。

【0504】

hTfR及び配列番号32の配列を有するTfR結合ペプチドによって形成される複合体の解明された結晶構造により、配列番号32のTfRに対する結合部位がトランスフェリンのTfRに対する結合部位と重なることが確認される。

【0505】

本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトのいずれか（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）を、上記の結晶構造で特定された対応残基のうちの1つ以上において修飾して、安定性の向上及び結合特性の増加（または減少）またはTfR結合親和性の改変及び／またはトランスサイトーシス機能の増加（または減少）を含む、特性が改善されたペプチドバリエーションを生成することができる。

【0506】

実施例13

TfR結合ペプチドのマウスTfRに対する交差反応性

本実施例は、細胞表面結合アッセイにおける、本開示のTfR結合ペプチドのマウスTfRに対する交差反応性について例示する。実施例3に記載される表面提示パラダイムを逆にして使用した。簡潔に述べると、表面上にヒトまたはマウスのいずれかのTfRを発現する293F細胞を、NHS-エステル結合を介してAlexaFluor 647色素で直接標識した可溶性TfR結合ペプチドで染色した。図15A及び図15Bは、種特異的抗体を使用して、ヒト対マウスTfR発現を検証するフローサイトメトリープロットを示す。図15C及び図15Dは、ペプチドが両方のホモログに効果的に結合することを示している。同様の実験において、フローサイトメトリーを使用して、配列番号1、配列番号2、配列番号32、及び抗Tf抗体（陽性対照）の効果的な結合を実証した。ヒト及びマウスTfRエクストドメイン（それぞれHsTfR及びMmTfR）のSDGF表面発

10

20

30

40

50

現は、種特異的抗体によって確認した。これらの細胞をAlexa Fluor 647標識CDPバリエーション（例えば、配列番号1、配列番号2、または配列番号3）で染色すると、交差反応性を示し、親和性の高いバリエーションの染色が向上した（図13E）。

【0507】

本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクトのいずれか（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）を、上記の結晶構造で特定された対応残基のうちの1つ以上において修飾して、安定性の向上及び結合特性の増加（または減少）またはTfR結合親和性の改変及び／またはトランスサイトシス機能の増加（または減少）を含む、特性が改善されたペプチドバリエーションを生成することができる。いかなる理論にも束縛されるものではないが、本明細書に記載されるデータは、TfR結合ペプチドの全てのアミノ酸残基が交差反応性に重要であり得ることを示している。

【0508】

また、表面提示フローサイトメトリーを使用して、実施例12の結晶構造で特定されたトランスフェリン受容体上の配列番号32の結合界面を検証した（図13～図14）。TfR：配列番号32の界面は、トランスフェリンの界面と重複しており、競合的結合が予想される（図14A及び図13E）。特定された配列番号1のバリエーションファミリーのうちで最も親和性の高いバリエーション（配列番号32の配列を有するバリエーション）は、TfR：トランスフェリン相互作用について公開されているものと同様のオフレート（ k_d ）を有し、オンレート（ k_a ）ははるかに速い。また、TfR上の配列番号32結合表面のマウス／ヒト相同性について調べたところ（図14A及び図13E）、マウスTfRと比較して、異なる残基がほとんどなかった。これは、交差反応性を示唆するものであり、交差反応性は、フローサイトメトリー結合アッセイで確認された（図15）。

【0509】

実施例14

TfR結合ペプチドの全身オートラジオグラフィー

本実施例は、オートラジオグラフィーを介して*in vivo*で取得された配列番号1及び配列番号32の配列を有する放射性標識ペプチド（配列番号1及び配列番号32はそれぞれ配列番号36及び配列番号67にN末端GSを付加したものである）の生体内分布の決定について例示する。

【0510】

実施例19に記載されるように、リシン及びN末端をメチル化することによって、各ペプチドを放射性標識した。したがって、ペプチドは、メチルまたはジメチルリシン及びメチル化またはジメチル化されたアミノ末端を含有し得る。体重20～25gの雌のHarlan無胸腺ヌードマウスに、100nmolの用量の放射性標識ペプチドを尾静脈注射を介して投与した。 ^{14}C 標識CDPは、マウスへの静脈内注射用に100nmolになるように100 μL のPBS中に再懸濁した。

【0511】

各放射性標識ペプチドは、記載される時間（30分または3時間）、動物内を自由に循環させ、その後、動物を安楽死させ、切片化した。

【0512】

全身オートラジオグラフィー（WBA）矢状面切片作成は、次のとおりに実施した。投与期間の終了後、マウスをヘキサン／ドライアイス浴中で凍結し、次いで、カルボキシメチルセルロースの凍結ブロックに包埋した。凍結した体を -20°C で一晩ヘキサンガスを抜き、その後、冷却した2%カルボキシメチルセルロース（Sigma Aldrich、C5013）に包埋した。次いで、各ブロックに穴を開け、PBS+0.5%BSA中の放射性 ^{14}C グリシンコントロール（0.5 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ 、American Radiolabeled Chemicals）をピペットで入れ、凍結させてから、H/I Bright 8250 Cryostat（Hacker Instruments）で切片化（40 μm ）した。動物全体の矢状面スライスを調製し、イメージング用の

凍結薄切片を得た。ミクロトームを使用して凍結薄切片を取得し、脳、腫瘍、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、筋肉、脂肪、胆嚢、上部消化管、下部消化管、骨、骨髄、生殖管、眼、軟骨、胃、皮膚、脊髄、膀胱、唾液腺などの組織の可視化を可能にした。目的の全ての組織をサンプリングするために、切片を4インチ幅のテープ (Scotch 821、ULINE) 上に2~6の深さで採取し、クライオスタットで2~3日間凍結乾燥させ、その後、丈夫な紙の上に載せ、セロハンで覆った。固定した切片を輝尽性発光体プレート (Raytest) に放射性標準曲線 (146S-PL、American Radiolabeled Chemicals) とともに7日間曝露した。イメージング前に、切片をフリーザー内で乾燥させた。

【0513】

オートラジオグラフィーのイメージングのために、テープに貼り付けられた薄切片を凍結乾燥させ、放射性サンプルをホスフォイメージャープレートに7日間曝露した。これらのプレートを現像し、各器官からの信号 (デンストメトリー) を各動物の心臓の血液に見られる信号に正規化した。組織内の信号が当該組織内の血液から予想される信号よりも暗い場合、その領域、組織、構造、または細胞における蓄積を示す。スキャンは、Raytest CR-35 イメージャーで「感度25 μm 」の設定で実施した。定量化は、AIDA Image Analyzer v5.1 Whole Body Autoradiography Professionalソフトウェア (Raytest) を使用して、バックグラウンド調整済みデンストメトリーによって実施した。定量化するために、単一切片内の単一組織から得られた目的の全ての領域の測定値を平均し、面積で調整した。血液の値は、心臓で評価した。 nmol g^{-1} 組織の単位で値を報告するには、各WBAサンプルセットと共曝露した市販の標準ストリップに対する校正が必要であった。ストリップ自体の校正は、液体シンチレーション計測 (LSC) によって決定された既知の量の組織1グラムあたりの1分あたりの放射線数 (CPM) が、11の標準ストリップ濃度データポイントで測定されたWBAデンストメトリーに対応するように行った ($6.3 \text{ nCi g}^{-1} \sim 3.3 \mu\text{Ci g}^{-1}$ に対応する線形範囲)。この校正と、ペプチドの既知の濃度及び比活性度 (液体シンチレーション計測によって決定) を組み合わせることで、 nmol g^{-1} への変換が可能となった。図18、図19、及び図33に示される定量化について、分析した切片の総数は、凡例に記載されており、全ての切片は、全ての組織を含むわけではないが、全ての組織の定量化は、3~10匹のマウスから得たマウス1匹あたり1~4切片のうち切片1つあたり1~3個の関心領域を表す。なお、用量100 nmol及びマウス平均体重25 gの場合、 4 nmol/g は、「100%注入量」を表す。いくつかの組織 (脾臓/腎臓/肝臓) では、単純な全身拡散で予想される値を超えてペプチドが組織に蓄積するので、この値を上回る。これは、ペプチドがそれらの組織に優先的に蓄積することを示し得る。したがって、非血清組織に残っている注入量パーセントを算出すると、組織固有の「時点ゼロ」の量がないので、組織分布数が不均一になり得る。

【0514】

図16は、配列番号1 (図16A)、配列番号2 (図16B)、配列番号30 (図16C)、及び配列番号32 (図16D) の配列を有するTfR結合ペプチドを投与したマウスのオートラジオグラフィーの画像を示す。生体内分布を評価するために、IV注射される ^{14}C 標識ペプチドを用いて、全身オートラジオグラフィーを使用した。画像は、100 nmolの薬物 (約25 gのマウスで約20 mg/kg) の投与から3時間後に撮影した。これらの画像は、脾臓、肝臓、腎臓にかなりの蓄積があることを示し、筋肉、骨髄、及び皮膚にも高い蓄積があることを示している。CNS蓄積は、他の組織よりも少ないが、血清レベルと比較してかなりの量であった (血清の25%超)。バックグラウンド血中レベルは、脳内では心臓の血液信号の3%であることがわかった。

【0515】

図17は、生体内分布を評価するために、 ^{14}C 標識ペプチド (配列番号1及び配列番号32) を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。脇腹の腫瘍にもかなりの蓄積がみられた。図17Aは、 ^{14}C で標識した配列番号1を静脈内注射したマ

10

20

30

40

50

ウスの白色光画像を示す。図 17B は、 ^{14}C で標識した配列番号 1 を静脈内注射したマウスの白色光画像を示す。図 17C は、 ^{14}C で標識した配列番号 32 を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。図 17D は、 ^{14}C で標識した配列番号 32 を静脈内注射したマウスの全身オートラジオグラフィーを示す。注目すべきは、右側の白色光画像では腫瘍の血管新生が不十分に見えるが、動物の背中側の脇腹の腫瘍全体に有意なレベルのペプチドが示されることから、両ペプチドの U87 腫瘍への分布が完全であることである。腫瘍は、皮下 U87 脳腫瘍であった。

【0516】

オートラジオグラフィーに加えて、配列番号 1 及び配列番号 32 の配列を有するペプチドを使用して、*ex vivo* シンチレーション計測を実施した（図 18、図 19、及び図 33）。図 18 及び図 19 は、器官取り込みデータの棒グラフを示し、それぞれ、ブロック内の放射性標識対照サンプル及び nmol/g レベルでのペプチドの比活性に正規化したもの、血清レベルの % にのみ正規化したものである。30 分と 3 時間の両時間点における nmol/g レベルでのペプチド比活性を図 33 に示す。図 18 は、配列番号 1 の配列を有する TfR 結合ペプチドまたは配列番号 32 の配列を有するペプチドのいずれかの 20mg/kg の IV 単回投与後におけるペプチドの生体内分布及び器官蓄積の定量化を示す。この用量では、3 時間後、CNS で 150nM を超えるレベル、腫瘍で約 $1\mu\text{M}$ のレベルに達した。図 19 は、配列番号 1 及び配列番号 32 をそれぞれ含む 2 つのペプチドに関するペプチドの生体内分布及び器官蓄積の定量化を示す。値は、一般的な BBB 透過測定基準（3% ベースライン）である血中レベルのパーセントとして示される。データは、配列番号 1 及び配列番号 32 の配列を有する TfR 結合ペプチドについて、ペプチドの生体内分布及び器官蓄積が脾臓、肝臓、腎臓、皮膚、骨、及び脳で生じたことを示している。

【0517】

脳については、切片化する前にマウスを灌流しなかった。したがって、CNS 毛細血管は、血液に満ちたままであり得、循環中の任意のペプチドが脳内で弱い信号を発生している可能性がある。しかしながら、CNS 血液／毛細血管は脳体積のほぼ 3% を占めることが一般に認められていることから、血液に対する 3% の信号は、「CNS 蓄積なし」と同等であるとみなされ得る。3% を超える信号は、毛細血管細胞への付着または実際の BBB 透過のいずれかであるペプチドの CNS 蓄積の証拠とみなされる。したがって、両ペプチドは、25% を超える血中レベルで、この測定基準でかなりの量の CNS 蓄積を示している。

【0518】

実施例 15

シンチレーション計測による組織中のペプチド蓄積の定量化

本実施例は、シンチレーション計測による組織の血清中のペプチドの定量化について例示する。ペプチドを実施例 19 に記載される方法によって放射性標識し、次いで、健全な腎臓を持つ雌の Harlan 無胸腺ヌードマウスに静脈内投与した。放射性標識ペプチドは、 100nmol の用量で静脈内投与した（ $14.7\mu\text{Ci}$ 、 20mg/kg ）。様々な時点でマウスを CO_2 窒息によって安楽死させ、腎臓、肝臓、脳、脾臓、筋肉、及び皮膚を含む組織及び生体液を採取した。液体シンチレーション計測前に、固形組織をホモジナイズした。組織中のペプチドの量の定量化（ nmol/g ）を、ペプチドの分子量及び ^{14}C 比活性を参照することによって実施した。図 20 は、配列番号 32 の配列を有するペプチド（配列番号 32 は配列番号 67 に N 末端 GS を付加したものである）を投与した後のシンチレーション計測によって決定された組織蓄積の定量化を示す。図 20A は、腎臓における経時的なシンチレーション計測を示す。図 20B は、肝臓における経時的なシンチレーション計測を示す。図 20C は、脳における経時的なシンチレーション計測を示す。図 20D は、脾臓における経時的なシンチレーション計測を示す。図 20E は、筋肉における経時的なシンチレーション計測を示す。図 20F は、皮膚における経時的なシンチレーション計測を示す。データは、配列番号 32 の配列を有するペプチドについて、脾

臓、肝臓、腎臓、皮膚、骨、及び脳を含む様々な組織でペプチドの蓄積が確認されたことを示す。64時間の時間経過にわたって、配列番号32の配列を有するペプチドの量は、投与後約1～2時間から腎臓、肝臓、脾臓、及び筋肉などの組織で有意に減少したが、脳内のペプチドの量は、わずかに減少するものの、その後、実験中、安定した。配列番号32は、二相性の血漿消失動態を示し、最初の消失半減期は、15.6分であった。最も高いレベルは、腎臓、肝臓、及び脾臓で認められ、腎臓は、血漿中の小さな溶質の排泄に関与し、肝臓及び脾臓の両組織は、高レベルのTfRを発現することが報告されている。脳は、小さいが、測定可能なレベルを示した。

【0519】

配列番号32のペプチドの排泄は、雌のHarlan無胸腺ヌードマウスでも試験した。配列番号32を100nmol (14.7 μ Ci、20mg/kg)の用量で静脈内投与した。図21は、高速相(95%、 $t_{1/2}$ 15.6分)及び低速相(5%、 $t_{1/2}$ 10.3時間)のカイネティクスを示す二相消失回帰分析を含む、配列番号32を静脈内投与したマウスにおける血清消失プロットを示す。

【0520】

このデータは、脾臓、肝臓、腎臓、皮膚、骨、及び脳などの器官におけるこれらのペプチドの取り込み及び保持により、本開示のTfR結合ペプチドを使用して、活性薬剤及び/または検出可能な剤をこれらの器官に効果的に標的化及び送達できることを示している。

【0521】

実施例16

ペプチドの多重時間回帰分析及び毛細血管枯渇分析

本実施例は、本開示のペプチドの多重時間回帰分析(MTR)及び毛細血管枯渇分析について例示する。

【0522】

マウス(CD-1系統、各時点でN=1)に麻酔をかけ、左頸静脈及び右頸動脈を外科的に露出させた。標識されたペプチド(200 μ Lの体積で0.45 μ Ci;比活性度は、配列番号1で32Ci/mol及び配列番号32で147Ci/mol(配列番号1及び配列番号32はそれぞれ配列番号36及び配列番号67にN末端GSを付加したものである)実施例19に記載される方法に従う)を頸静脈に注射した。時間経過(0～30分)内の所与の時間後、動脈血を採取し、続いて、断頭及び脳の採取を行った。脳及び血清の ^{14} Cレベルについて液体シンチレーション計測を介して試験し、データを多重時間回帰数学モデルに組み込んでCNS蓄積率を定量化した。このCNS蓄積が毛細血管に限定されるのか、または実際に血管トランスサイトシスを示すのかを決定するために、別の一群の動物(N=3/ペプチド)を投与から5分後に安楽死させ、脳のホモジネートをデキストラン密度勾配による遠心分離にかけた。これにより、実質から毛細血管を分離することが可能になり、2つの組織を別々にシンチレーション計測にかけて ^{14} Cの信号を定量化した。正規化された信号比は、BBB透過の指標となり、例えば、配列番号1は、毛細血管よりも実質で実質的に高い信号を示し、これは、BBBを越えたトランスサイトシスを示す。

【0523】

図22は、配列番号1及び配列番号32の配列を有するTfR結合ペプチドの多重時間回帰分析及び毛細血管枯渇分析を示す。図22Aは、配列番号1及び配列番号32の多重時間回帰分析を単一プロットで示すものであり、y軸は、脳の血清に対する比を示す。図22Bは、配列番号1及び配列番号32の配列を有するTfR結合ペプチドの実質及び毛細血管分布を示すものであり、y軸は、組織対血清(T対S)比(μ L/g)を示す。この比は、それぞれの組織(この場合、実質または毛細血管)で測定された放射能と、同じ時点で循環血清中で測定された放射能の比である。

【0524】

図22Bの棒グラフは、特に、配列番号1のペプチドのBBB輸送及び実質のアクセスを強く示唆しており、本開示のペプチドは、事実、BBBを越えたTfR媒介性輸送(例

10

20

30

40

50

例えば、小胞性トランスサイトosis)を促進することが可能であることを示している。本開示の任意のペプチドまたはペプチドコンストラクト(例えば、配列番号1~配列番号70、配列番号136~配列番号205、配列番号225~配列番号332、または配列番号356~配列番号361のいずれか1つ)は、同様に、BBBを越えたTfR媒介性輸送(例えば、小胞性トランスサイトosisを介して)を促進することが可能であり得る。本アッセイで観察された配列番号32の明確なトランスサイトosisが欠如しているのは、毛細血管枯渇実験の時間点が短いこと(30分)で説明される可能性が高いが、マウスのCRE-Lucレポーターは良好に誘導された(4時間の時点)。

【0525】

このデータは、本開示のペプチドがTfR媒介性輸送を可能にし、脳(BBBを介したトランスサイトosis)、腫瘍、骨及び骨髄、ならびに免疫細胞などのTfRを発現する組織への治療用薬剤及び/または診断用薬剤の送達を可能にすることを示している。輸送は、内皮細胞(例えば、インタクトなBBB)などの細胞層を越えて、または細胞膜を越えて、生じ得る。したがって、本開示のペプチドは、TfRを発現する任意の細胞、組織、または器官への様々な活性薬剤の効果的な送達ビヒクルとして使用することができる。加えて、このデータは、本明細書に記載されるペプチドのマウスTfRへの結合を示している。インタクトなBBBの向こう側にある腫瘍へのアクセス及び特異的な標的化は、従来の方法と比較して、本明細書に記載されるTfR結合ペプチドの特に有利な点(例えば、高いアンメットクリニカルニーズ)であり得る。

【0526】

実施例17

高温におけるペプチド安定性

本実施例は、本開示のペプチドが高温で安定していることを示す。

【0527】

タンパク質二次構造を円二色性(CD)を使用して評価した。CDスペクトルをJasco J-720W分光旋光計により1.0mmの光路長セルを使用して測定した。10mMリン酸緩衝液(pH=7.4)中のタンパク質サンプルは、25~30µMのタンパク質濃度であった。サンプルを210nmの波長で分析した。データは、相対楕円率[θ];(mdeg)で表される。タンパク質の熱安定性を決定するために、サンプルを、2℃/分の勾配で段階的に昇温される20℃から95℃までの温度に供した。安定性及びタンパク質アンフォールディングは、αヘリックス二次構造について、210nmでモニターした。データを相対楕円率[θ]で表し、mdeg単位で報告した。

【0528】

配列番号32の融解曲線を図27に示す。熱安定性を還元条件(10mM DTT)下及び非還元条件(NR)下で試験した。縦線は、非線形カーブフィッティング(シグモイド、可変勾配、制約付き底=0;いずれの場合も $R^2 > 0.98$)に基づいて算出された融点(NRでは約74℃、10mM DTT処理では約38℃)を表す。NRサンプルは95℃まで平衡に達しないため、タンパク質は、高温で完全に「融解」せず、特に拡張ループ領域では、単純に無秩序な状態である可能性があることに留意されたい。還元サンプルと非還元サンプルにおける違いは、ジスルフィド結合によって提供される融解温度の大幅な上昇及び構造上の堅牢性を示している。

【0529】

実施例18

ペプチド血漿半減期の延長

本実施例は、本明細書で開示されるペプチドの血清または血漿半減期を延長する方法を示す。配列番号1~配列番号70、配列番号136~配列番号205、配列番号225~配列番号332、または配列番号356~配列番号361のいずれか1つの配列を有するペプチドまたはペプチドコンストラクトは、その血漿半減期を延長するために修飾される。Cy5.5などの近赤外色素へのペプチドのコンジュゲーションを使用してペプチドコンストラクトの血清半減期を延長する。あるいは、AlbuTagなどのアルブミン結合物

10

20

30

40

50

質またはC14～C18脂肪酸へのペプチドのコンジュゲーションを使用して血漿半減期を延長する。任意選択により、血漿半減期は、最小限の非ヒトタンパク質配列を使用することによって免疫原性が低下した結果として、延長される。

【0530】

実施例19

¹⁴Cでのペプチド放射性標識

本実施例は、¹⁴Cを用いたペプチドの放射性標識について記載する。

【0531】

標準的な技術 (Jentoft et al. J Biol Chem. 254 (11) : 4359-65. 1979に記載されるものなど) を使用し、¹⁴Cホルムアルデヒド及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元的メチル化によって、本開示のペプチドを放射性標識した。簡潔に述べると、ペプチド (10mg) を470μLの10×PBSを含む3.2mLの水中に溶解した。0.72mCi (12.6μM) の¹⁴C-ホルムアルデヒド (57Ci/mol⁻¹, Pharmaron) 及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム (100mmolまで、水中) を加え、続いて、15秒間ボルテックスにかけた。反応物を室温で一晩インキュベートした。分析用に10μLの反応物を1mLの水中に取りおき、その後、¹⁴Cメチル化ペプチドをStrata-X逆相カラム (30mg, Phenomenex, 3mLのメタノール及び3mLの水で洗浄) で精製した。ローディングした後、カラムを4mLの水で洗浄し、メタノール中4mLの2%ギ酸で溶出した。標識したCDPをブローダウン蒸発器 (窒素流下40°C) 内で乾燥させ、使用するまで18°Cで保存した。比活性度をシンチレーション計測によって決定した。配列番号1のバリエーションのバリエーション比活性度は、次のとおりであった。配列番号1: 180分の動物で32Ci/mol、30分の動物で187Ci/mol。配列番号2: 180分の動物で260Ci/mol、30分の動物で179Ci/mol。配列番号32: 180分の動物で273Ci/mol、30分の動物で147Ci/mol。配列は、N末端に「G」及び「S」のアミノ酸を有するように操作した。Methods in Enzymology V91: 1983 p. 570及びJBC 254 (11): 1979 p. 4359を参照されたい。過剰なホルムアルデヒドを使用して、完全なメチル化 (あらゆる遊離アミンのジメチル化) を誘導した。

【0532】

実施例20

ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲート

本実施例は、ペプチドの色素標識について記載する。本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、活性化エステル (例えば、NHSエステル) を介して、ペプチドのN末端を検出可能な剤にコンジュゲート、連結、または融合させて、ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートを作製する。検出可能な剤は、Cy5.5、Alexaフルオロフォア、またはAlexa647などのシアン色素であり得る。

【0533】

ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートを対象に投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、ペプチド検出可能な剤コンジュゲートは、腎臓にホーミングする。対象、または対象からの生検を画像化し、ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートの腎臓への局在化を可視化する。いくつかの態様において、腎障害の診断は、投与後の腎臓におけるペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートの可視化に基づく。

【0534】

実施例21

ペプチドと活性薬剤のコンジュゲート

本実施例は、ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートについて記載する。本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、活性化エステル (例えば、NHSエステル) を介して、ペプチドのN末端を活性薬剤にコ

ンジュゲート、連結、または融合させて、ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートを作製する。

【0535】

ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートを、それを必要とする対象に投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートは、TfR媒介性トランスサイトーシスを介して内皮障壁を越えて器官にトランスサイトーシスされる。内皮障壁は、血液脳関門（BBB）である。ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートは、対象が治療を受けている状態、例えば、脳癌を改善する。

【0536】

実施例22

結合親和性を改善するペプチド変異

本実施例は、受容体結合のオフレートを減少させ、及び／またはオンレート増加させるペプチドの変異について例示する。

【0537】

部位飽和変異導入（SSM）または任意のランダム変異導入法を使用して本開示のペプチドを変異させることで、オフレートを増加もしくは減少させ、及び／またはオンレートを増加させることにより、結合親和性を増加または減少させる。ペプチドは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361に示されるペプチドのいずれか1つから選択する。脳実質などの標的組織へのペプチドの送達速度を測定して、所与の用途におけるペプチドの最適な結合親和性を決定する。

【0538】

実施例23

がんの治療

本実施例は、本開示のペプチドを使用したがんの治療について例示する。

【0539】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、その後、治療用分子に連結する。ペプチドまたはペプチドコンストラクトをがんの治療薬として、それを必要とする対象に医薬組成物で投与する。ペプチドは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361の配列を有するペプチドまたはペプチドコンストラクトのいずれか1つから選択する。1つ以上のペプチドを対象に投与する。対象は、ヒトまたは動物であり得る。医薬組成物は、静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。本明細書に記載されるペプチド-薬物コンジュゲートで治療されるがんは、脳癌またはCNS関連癌であり得る。

【0540】

実施例24

がんの併用治療

本実施例は、本開示のペプチドを使用したがんの併用治療について例示する。本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、直接使用する。抗がん活性を有する活性薬剤にペプチドをコンジュゲート、連結、または融合させる。ペプチドをがんの治療薬として、それを必要とする対象に医薬組成物で投与する。ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361の配列を有するペプチドのいずれか1つから選択する。

【0541】

1つ以上のペプチドを、とりわけ、シスプラチン、メトトレキサート、ドセタキセル、及びエトポシドなどの標準的な小分子または化学療法の治療レジメンとともに、対象に投与する。対象は、ヒトまたは動物である。医薬組成物を静脈内、皮下、筋肉内、経口投与するか、または腫瘍微小環境に直接注射する。標準的な小分子療法と合わせて投与されたペプチド-コンジュゲートは、対象のがん状態を治療する。がんの状態は、脳癌、乳癌、

10

20

30

40

50

肝癌、または結腸癌であり得る。

【0542】

実施例25

TfR結合ペプチドを用いた脳状態のイメージング

本実施例は、本明細書で開示されるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクト（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）を使用して、ペプチドに結合された検出可能な薬剤分子をCNSに輸送することで脳状態をイメージングすることについて例示する。

【0543】

実施例20に記載されているように、本開示のペプチドを検出可能な剤にコンジュゲートする。ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートをそれを必要とする対象に投与する。対象は、脳癌またはアルツハイマー病などの状態を有する。対象は、ヒトまたは動物である。ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートを静脈内、皮下、筋肉内、経口投与するか、または腫瘍微小環境に直接注射する。

【0544】

任意選択により、親和性部分、例えば、アミロイドプラークに対するF-18などの親和性部分にペプチドを更に連結する。ペプチドと検出可能な剤は、TfRペプチド媒介性トランスサイトシスを介してBBBを通過する。非侵襲性イメージングを実施して脳内の検出可能な剤を可視化することで、対象の状態を診断または追跡することが可能となる。

【0545】

実施例26

TfR結合ペプチドによる脳癌の治療

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクト（例えば、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ）を使用して、ペプチドに結合された治療薬分子をCNS及び腫瘍細胞に輸送することで脳癌を治療することについて例示する。

【0546】

実施例21に記載されているように、本開示のペプチドを活性薬剤に連結する。活性薬剤は、テモゾロミドである。対象は、ヒトまたは動物である。ペプチドと検出可能な剤のコンジュゲートを静脈内、皮下、筋肉内、経口投与するか、または腫瘍微小環境に直接注射する。ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートを、それを必要とする対象に投与する。対象は、脳癌を有する。投与後、ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートは、血液脳関門（BBB）を通過し、がんが局在する脳実質にアクセスする。ペプチドと活性薬剤のコンジュゲートは、脳癌を改善及び／または根治する。

【0547】

このデータは、一般に脳へのアクセスが妨げられている活性薬剤（例えば、BBBの内皮細胞の通過を妨げるP糖タンパク質トランスポーターの基質であるテモゾロミド）が、BBBを越えて効率的に輸送され、脳内に位置する疾患及び状態（例えば、がん）を予防及び／または治療することができることを示す。

【0548】

実施例27

細胞透過ペプチド融合体

本実施例は、細胞透過ペプチド融合体について記載する。本開示のTfR結合ペプチドを、追加の細胞透過ペプチド部分への融合体として組換え発現させる。TfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つから選択する。細胞透過ペプチド部分は、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端にコンジュゲート、連結、もしくは融合されたRRRRRRRR（配列番号

10

20

30

40

50

73) 配列などの1つもしくは複数のArg残基、またはN末端にコンジュゲート、連結、もしくは融合された配列YGRKKRRQRRR (配列番号99) を含むTatペプチドである。あるいは、細胞透過ペプチド部分は、マウロカリン、インペラトキシン、ハドルカルシン、ヘミカルシン、オプリカリン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン (62-104)、MCOTI-II、またはクロロトキシンから選択し、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端に融合させる。あるいは、細胞透過ペプチド部分は、TAT、例えば、CysTAT (配列番号71)、S19-TAT (配列番号72)、R8 (配列番号73)、pAntp (配列番号74)、Pas-TAT (配列番号75)、Pas-R8 (配列番号76)、Pas-FHV (配列番号77)、Pas-pAntp (配列番号78)、F2R4 (配列番号79)、B55 (配列番号80)、アズリン (配列番号81)、IMT-P8 (配列番号82)、BR2 (配列番号83)、OMOTAG1 (配列番号84)、OMOTAG2 (配列番号85)、pVEC (配列番号86)、SynB3 (配列番号87)、DPV1047 (配列番号88)、C105Y (配列番号89)、トランスポタン (配列番号90)、MTS (配列番号91)、hLF (配列番号92)、PFVYL I (配列番号93)、またはyBBR (配列番号94) から選択し、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端に融合させる。あるいは、細胞透過ペプチド部分は、リンカーによって、本開示の任意のTfR結合ペプチドのN末端に融合させる。リンカーは、GGGSGGGSGGGSGGGSG (配列番号113)、KKYKPYVPVTTN (配列番号114) (DkTx由来のリンカー)、またはEPKSSDKTHH (配列番号115) (ヒトIgG3由来のリンカー)、または任意の他のリンカーから選択する。あるいは、TfR結合ペプチド、細胞透過ペプチド部分、及び任意選択によりリンカーは、他の手段によって接続させる。例えば、他の手段としては、任意の位置での化学コンジュゲーション、細胞透過ペプチド部分及び／またはリンカーのTfR結合ペプチドのC末端への融合、リポソームとの共製剤化、または他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0549】

細胞透過ペプチド融合体またはコンジュゲートを、それを必要とする対象に投与する。対象は、ヒトまたは動物であり、脳癌または他の脳状態などの疾患を有する。投与後、TfR結合ペプチドは、BBBを越えるトランスサイトーシスを促進し、細胞透過ペプチドは、細胞膜を通過して細胞内コンパートメントにアクセスするのを促進する。

【0550】

実施例28

核局在化を促進するペプチド融合体

本実施例は、核局在化を促進するペプチド融合体について記載する。本開示のTfR結合ペプチドを組換え発現させるか、または化学合成する。ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361の任意の配列から選択する。TfR結合ペプチドをK-K/R-X-K/R (配列番号129) (配列中、Xは、任意のアミノ酸またはそのバリエーションであり得る) の4残基配列などの核局在化シグナルにコンジュゲート、連結、または融合させる (Lange et al, J Biol Chem. 2007 Feb 23; 282 (8): 5101-5)。ペプチド融合体を、それを必要とする対象に投与する。対象は、ヒトまたは動物であり、脳癌または他の脳状態などの疾患を有する。投与後、TfR結合ペプチドは、BBBを越えるトランスサイトーシスを促進し、核局在化シグナルは、核への輸送を促進する。

【0551】

実施例29

免疫療法剤による脳癌の治療

本実施例は、CTLA-4、PD-1、もしくはPDL-1標的薬剤、またはIL15、もしくは融合されたIL15/IL15Ra、IFNガンマ、または抗CD3融合ポリペプチドなどの1つ以上の免疫治療薬にコンジュゲート、連結、または融合された本開示のペプチドまたはペプチドコンストラクト (例えば、配列番号1～配列番号70、配列番

号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つ)を使用した、脳癌(例えば、膠芽腫、星細胞腫、正中腺腫、DIPG、髄芽腫、MYCもしくはMYCN増幅脳腫瘍、または上皮腫)の治療について例示する。本実験において、免疫治療薬は、ペンブロリズマブ(抗PD-1抗体)である。

【0552】

配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つの配列を有するTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。液体クロマトグラフィー(例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ)を使用して精製したら、次いで、実施例21に記載される方法に従って、ペプチドをペンブロリズマブまたはその機能性フラグメント(例えば、可変鎖フラグメント)にコンジュゲートする(あるいは、ペプチドは、ペンブロリズマブ(または任意の他の免疫治療薬)またはその機能性フラグメントに連結、または融合(例えば、組換え発現)させてもよい)。コンジュゲートを精製し、対象(例えば、マウスまたはヒト)への注射用に製剤化する。

【0553】

それを必要とする対象への投与後、ペンブロリズマブまたはその機能性フラグメントにコンジュゲートしたTfR結合ペプチドを含むペプチドコンストラクトは、小胞性トランスサイトosisを介してBBBを透過し、CNSに蓄積する。核イメージング(例えば、陽電子放出断層撮影、コンピューター断層撮影(PET)、または磁気共鳴画像法)及び脳癌を罹患している対象から採取された組織または生検サンプルは、ペプチドコンストラクトが対象の腫瘍組織量を大幅に減少させることを示す。全身イメージング(例えば、WBAMまたはPET)は、ペプチドコンストラクトが脳内だけでなく、対象の体内の他の位置(例えば、肝臓、肺、及び骨)の腫瘍サイズ及び疾患の部位も縮小させることを示す。

【0554】

実施例30

ニューロテンシン含有ペプチドコンストラクトを使用した神経障害性疼痛の治療

本実施例は、本明細書に記載されるニューロテンシン(NT)に融合、組換え発現、化学合成、または別様にコンジュゲートされたTfR結合ペプチドを使用してニューロテンシンをCNS内に輸送することで神経障害性疼痛を治療することについて例示する。

【0555】

配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列を有するTfR結合ペプチドを組換え発現させるか、または化学合成する。任意選択により、液体クロマトグラフィー(例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ)を使用してペプチドを精製し、実施例21に記載される方法に従って、更にNTにコンジュゲートする。配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つの配列を有するNTペプチド、またはその機能性フラグメントをTfR結合ペプチドと組換え発現させるか、または化学合成して、ペプチド-NTコンストラクトを形成する。あるいは、ペプチドを、ニューロテンシン、またはその機能性フラグメントと、ペプチド-NT融合体(例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361に示されるペプチド-NTコンストラクト)として組換え発現させるか、または化学合成し、任意選択により、液体クロマトグラフィー(例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ)を使用して精製する。NTの機能性フラグメントは、少なくとも8アミノ酸残基長、少なくとも10アミノ酸残基長、または少なくとも13アミノ酸残基長であるフラグメントであり得る。精製されたNTコンジュゲートまたは融合ペプチド(「ペプチドコンストラクト」)を対象(例えば、マウスまたはヒト)への注射用に製剤化する。

【0556】

投与後、ペプチドコンストラクトは、BBBを透過し、CNSに蓄積する。神経障害性疼痛の症状は、NT部分のNT受容体への効果的な標的化により、対象において大幅に減少する。

【0557】

本開示のTfR結合ペプチドは、治療上有効な濃度のNT受容体結合ペプチドをCNSに提供し、神経障害性疼痛を効果的に治療する。

【0558】

実施例31

ペプチド-NTコンストラクトによる疼痛の治療または管理

本実施例は、疼痛を治療または管理するための方法を記載する。この方法は、急性及び／または慢性症状の治療として使用される。本開示のペプチドを発現させ、本明細書に記載される損傷または他の状態の結果としての疼痛の治療薬として医薬組成物で患者に投与する。本開示のペプチドをニューロテンシンに融合させる。ペプチドを組換え発現させるか、または化学合成する。

【0559】

本明細書で開示される任意のペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号137～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）をNTに融合させて、ペプチド-NTコンストラクトを形成する。配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つの配列を有するNTペプチド、またはその機能性フラグメントをTfR結合ペプチドと組換え発現させるか、または化学合成して、ペプチド-NTコンストラクトを形成する。

【0560】

あるいは、本明細書で開示されるペプチド-NTコンストラクト（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のいずれか1つ）を使用する。任意選択により、TfR結合機能を維持しつつ、ニューロテンシンのニューロテンシン受容体との相互作用を追加または増加させるようにペプチドを変異させる。任意選択により、液体クロマトグラフィー（例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ）を使用してペプチド-NTコンストラクトを精製する。ペプチドを投与用に製剤化し、対象に投与する。投与後、ペプチドコンストラクトは、疼痛に冒されている領域、組織、または系を標的とする。ペプチドコンストラクトは、疼痛を調節することができる。そのような疼痛の調節は、炎症、自己免疫応答、疼痛受容体に対する直接的もしくは間接的作用、細胞殺傷、またはプログラム細胞死を調節することなどの様々な機序によって作用し得る。1つ以上のペプチドをヒトまたは動物に皮下、静脈内、もしくは経口投与するか、または注射する。

【0561】

実施例32

ニューロテンシン含有ペプチドコンストラクトを使用した慢性疼痛の治療

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のペプチド-NT融合体）またはNTに融合され得るペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358）を使用してニューロテンシン（NT、配列番号350）をCNS内に輸送することで神経障害性疼痛を治療することについて例示する。

【0562】

配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358の

10

20

30

40

50

いずれか1つの配列を有するTfR結合ペプチド、またはNTに融合させたTfR結合ペプチド（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のいずれか1つ）を組換え発現させるか、または化学合成することができる。液体クロマトグラフィー（例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ）を使用して精製したら、実施例21に記載される方法に従って、任意選択により、ペプチドをニューロテンシン（NT）またはその機能性フラグメントに更にコンジュゲートしてもよい。NTの機能性フラグメントは、少なくとも8アミノ酸残基長、少なくとも10アミノ酸残基長、または少なくとも13アミノ酸残基長であるフラグメントであり得る。配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つの配列を有するNTペプチド、またはその機能性フラグメントをTfR結合ペプチドと組換え発現させるか、または化学合成して、ペプチドーNTコンストラクトを形成する。あるいは、例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のペプチドーNT融合体を作製するのに使用したように、ペプチドをニューロテンシンもしくはその機能性フラグメントに融合させる（例えば、組換え発現させる）か、または、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のペプチドなどにNTを融合させるために使用し、次いで、組換え発現させ、本明細書に記載されるようにまたは他の既知の方法を使用して精製することができる。

【0563】

ペプチドーニューロテンシン融合体またはコンジュゲートを対象（例えば、マウスまたはヒト）への注射用に製剤化する。コンジュゲートの投与後、ペプチドコンストラクトは、BBBを透過し、CNSに蓄積する。慢性疼痛は、NT部分のNT受容体への効果的な標的化により、対象において大幅に減少する。

【0564】

ペプチドは、それ自体が疼痛を調節することができるか、または、疼痛を調節する薬剤にコンジュゲートすることができる。そのような疼痛の調節は、炎症、自己免疫応答、疼痛受容体に対する直接的もしくは間接的作用、細胞殺傷、またはプログラム細胞死を調節することなどの様々な機序によって作用し得る。ペプチドーNT融合体は、慢性損傷、疾病、または家族性エピソード性疼痛症候群、皮膚紅痛症、もしくは発作性激痛症を含む慢性状態に由来するものを含む、慢性疼痛の治療に使用することができる。

【0565】

実施例33

ニューロテンシン含有ペプチドコンストラクトを使用した急性疼痛の治療

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のペプチドーNT融合体）またはNTに融合され得るペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358）を使用してニューロテンシン（NT、配列番号350）をCNS内に輸送することで神経障害性疼痛を治療することについて例示する。

【0566】

配列番号1～配列番号70、配列番号136～配列番号205、または配列番号356～配列番号361のいずれか1つの配列を有し、任意選択により、NTに融合させたTfR結合ペプチドを組換え発現させるか、または化学合成することができる。液体クロマトグラフィー（例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ）を使用して精製したら、実施例21に記載される方法に従って、ペプチドをニューロテンシン（NT）またはその機能性フラグメントに更にコンジュゲートしてもよい。NTの機能性フラグメントは、少なくとも8アミノ酸残基長、少なくとも10アミノ酸残基長、または少なく

とも13アミノ酸残基長であるフラグメントであり得る。配列番号350、配列番号365～配列番号371のいずれか1つの配列を有するNTペプチド、またはその機能性フラグメントをTfR結合ペプチドと組換え発現させるか、または化学合成して、ペプチド-NTコンストラクトを形成する。あるいは、例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のペプチド-NT融合体を作製するのに使用したように、ペプチドをニューロテンシンもしくはその機能性フラグメントに融合させる（例えば、組換え発現させる）か、または、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のペプチドなどにNTを融合させるために使用し、次いで、組換え発現させ、本明細書に記載されるようにまたは他の既知の方法を使用して精製することができる。

10

【0567】

ペプチド-ニューロテンシン融合体またはコンジュゲートを対象（例えば、マウスまたはヒト）への注射用に製剤化する。コンジュゲートの投与後、ペプチドコンストラクトは、BBBを透過し、CNSに蓄積する。急性疼痛は、NT部分のNT受容体への効果的な標的化により、対象において大幅に減少する。

【0568】

ペプチドは、それ自体が疼痛を調節することができるか、または、疼痛を調節する薬剤にコンジュゲートすることができる。そのような疼痛の調節は、炎症、自己免疫応答、疼痛受容体に対する直接的もしくは間接的作用、細胞殺傷、またはプログラム細胞死を調節することなどの様々な機序によって作用し得る。ペプチド-NT融合体は、急性損傷、疾病、もしくは急性状態に由来するもの、または侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、アロディニア、幻痛、内臓痛、突出痛に由来するものを含む、急性疼痛の治療に使用することができる。対象は、5分から1時間以内に迅速な疼痛緩和を経験し、疼痛緩和は、3時間を超えて持続し得る。

20

【0569】

実施例34

イブプロフェンとペプチドのコンジュゲート

本実施例は、PEGリンカーを使用した本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358）へのイブプロフェンのコンジュゲーションについて記載する。TfR結合ペプチドを組換え発現させるか、または化学合成することができる。任意選択により、液体クロマトグラフィー（例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ）または他の既知の方法を使用してペプチドを精製する。“*In vitro and in vivo study of poly(ethylene glycol) conjugated ibuprofen to extend the duration of action,*” *Scientia Pharmaceutica*, 2011, 79:359-373, Nayak and Jainに記載されているように、加水分解され得るエステル結合を形成するPEGリンカー及びイブプロフェンを使用してペプチド-イブプロフェンコンジュゲートを生成する。Fischerエステル化を使用して、イブプロフェンと短いPEG、例えば、トリエチレングリコールをコンジュゲートして、イブプロフェン-エステル-PEG-OHを得る。

30

40

【0570】

上記のPEG-イブプロフェンコンジュゲートの調製後、PEGのヒドロキシル部分をN,N'-ジスクシンイミジルカーボネート(DSC)で活性化してイブプロフェン-エステル-PEG-スクシンイミジルカーボネートを形成し、次いで、それをペプチドのリシンまたはN末端と反応させてイブプロフェン-エステル-PEG-ペプチドコンジュゲートを形成する。ペプチド-イブプロフェン融合体またはコンジュゲートを対象（例えば、

50

マウスまたはヒト)への注射用に製剤化する。コンジュゲートの投与後、ペプチドコンストラクトは、小胞性トランスサイトosisを介してBBBを透過し、CNSに蓄積する。コンジュゲートは、抗炎症活性を呈することができ、または、遊離イブuproフェンがコンジュゲートから放出されて抗炎症活性を提供する。遊離イブuproフェンは、エステル結合での加水分解などの投与後に生じる加水分解から生じ得る。

【0571】

ペプチドは、それ自体が疼痛を調節することができるか、または、疼痛を調節する薬剤(例えば、イブuproフェン)にコンジュゲートすることができる。そのような疼痛の調節は、炎症、自己免疫応答、疼痛受容体に対する直接的もしくは間接的作用、細胞殺傷、またはプログラム細胞死を調節することなどの様々な機序によって作用し得る。イブuproフェン-ペプチドコンジュゲートを、それを必要とする対象に投与する。対象は、ヒトまたはヒト以外の動物であり得る。

10

【0572】

実施例35

ペプチドとダラザチドのコンジュゲート

本実施例は、自己免疫疾患の治療のためのKv1.3カリウムチャネル阻害薬にコンジュゲートされた本明細書に記載されるTfR結合ペプチド(例えば、配列番号1~配列番号32、配列番号36~配列番号67、配列番号136~配列番号167、配列番号171~配列番号202、または配列番号356~配列番号358のいずれか1つ)について記載する。この事例において、Kv1.3阻害薬は、ダラザチドである。

20

【0573】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、活性化エステル(例えば、NHSESTER)を介して、ペプチドのN末端をダラザチドにコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペプチド-ダラザチドコンジュゲートを作製する。

【0574】

ペプチドコンストラクトは、それを必要とする対象に投与される。ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、ペプチド-Kv1.3阻害薬コンジュゲートは、TfR媒介性トランスサイトosis及び/またはTfR媒介性エンドサイトosisを介して、目的の組織または器官に送達される。ペプチド-ダラザチドコンジュゲートは、対象が治療を受けている自己免疫疾患または状態、例えば、自己反応性Tリンパ球によって引き起こされるものを改善する。

30

【0575】

このデータは、本開示のTfR結合ペプチドが治療上有効な濃度のKv1.3阻害薬をCNSに提供し、自己免疫障害を治療することを示す。Kv1.3阻害薬単独での治療と比較して、治療活性が改善する。

【0576】

実施例36

ペプチド4SC-202コンジュゲート

本実施例は、自己免疫疾患の治療のためのKv1.3カリウムチャネル阻害薬にコンジュゲートされた本明細書に記載されるTfR結合ペプチド(例えば、配列番号1~配列番号32、配列番号36~配列番号67、配列番号136~配列番号167、配列番号171~配列番号202、または配列番号356~配列番号358のいずれか1つ)について記載する。この事例において、Kv1.3阻害薬は、4SC-202(トシル酸ドマチノスタット)である。

40

【0577】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、例えば、活性化エステル(例えば、NHSESTER)を介して、ペプチドのN末端を4SC-202にコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペ

50

プチド-4SC-202コンジュゲートを作製する。

【0578】

ペプチドコンストラクトは、それを必要とする対象に投与される。ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、ペプチド-K_v1.3阻害薬コンジュゲートは、TfR媒介性トランスサイトシス及び／またはTfR媒介性エンドサイトシスを介して、目的の組織または器官に送達される。ペプチド-4SC-202は、小胞性トランスサイトシスを介してBBBを透過し、CNSに蓄積する。ペプチド-4SC-202コンジュゲートは、対象が治療を受けている自己免疫疾患または状態、例えば、自己反応性Tリンパ球によって引き起こされるものを改善する。

10

【0579】

このデータは、本開示のTfR結合ペプチドが治療上有効な濃度のK_v1.3阻害薬を提供し、自己免疫障害を治療することを示す。K_v1.3阻害薬単独での治療と比較して、治療活性が改善する。

【0580】

実施例37

TfR結合ペプチドと抗K_v1.3ペプチドのコンジュゲート

本実施例は、自己免疫疾患の治療のためのK_v1.3カリウムチャネル阻害薬にコンジュゲート、連結、または融合された本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）について記載する。この事例において、K_v1.3阻害薬は、ペプチド（例えば、Vm24（配列番号378）、ShK-170、ShK-186（配列番号379）、またはShK-192）である。

20

【0581】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、例えば、活性化エステル（例えば、NHSエステル）を介して、ペプチドのN末端を抗K_v1.3ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペプチド-抗K_v1.3ペプチドコンストラクトまたは融合ペプチド（組換え作製の場合）を作製する。抗K_v1.3ペプチドは、Vm24（配列番号378）、ShK-170、ShK-186（配列番号379）、ShK-192、または別の抗K_v1.3ペプチド配列である。

30

【0582】

ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、TfR結合ペプチド-抗K_v1.3ペプチドコンストラクトまたは融合ペプチドは、TfR媒介性トランスサイトシス及び／またはTfR媒介性エンドサイトシスを介して、目的の組織または器官に送達される。TfR結合ペプチド-抗K_v1.3ペプチドコンストラクトまたはペプチドコンストラクトは、小胞性トランスサイトシスを介してBBBを透過し、CNSに蓄積する。TfR結合ペプチド-抗K_v1.3ペプチドコンストラクトまたはペプチドコンストラクトは、対象が治療を受けている自己免疫疾患または状態を改善する。

40

【0583】

これは、本開示のTfR結合ペプチドが治療上有効な濃度のK_v1.3阻害薬を提供し、自己免疫障害を治療することを示す。K_v1.3阻害薬単独での治療と比較して、治療活性が改善する。

【0584】

実施例38

神経変性疾患の治療のためのTfR結合ペプチドとK_v1.3阻害薬のコンジュゲート

本実施例は、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリー

50

ドライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、ライム病、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体優性小脳失調症、バッテン病、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦／失調症候群、クフォー・ラケブ症候群、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、慢性外傷性脳症、または前頭側頭型認知症）の治療のためのK_v1.3カリウムチャネル阻害薬などのイオンチャネル調節剤にコンジュゲート、連結、または融合された本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）について記載する。K_v1.3阻害薬は、小分子（例えば、ダラザチドまたは5-（4-フェノキシブトキシ）ソラレン）及びペプチド（例えば、ShK-170、ShK-186、またはShK-192）を含み得る。

10

【0585】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、例えば、活性化エステル（例えば、NHSESTER）を介して、ペプチドのN末端を1つ以上のK_v1.3阻害薬（例えば、ダラザチド、5-（4-フェノキシブトキシ）ソラレン、ShK-170、ShK-186、またはShK-192）にコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペプチド-抗K_v1.3ペプチドコンジュゲート、融合ペプチド、またはペプチドコンストラクト（該当する場合）を作製する。ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、TfR結合ペプチド-K_v1.3阻害薬コンジュゲートまたはペプチドコンストラクトは、TfR媒介性トランスサイトーシス及び／またはTfR媒介性エンドサイトーシスを介して、目的の組織または器官に送達される。TfR結合ペプチド-K_v1.3阻害薬コンジュゲートまたはペプチドコンストラクトは、小胞性トランスサイトーシスを介してBBBを透過し、CNSに蓄積する。TfR結合ペプチド-K_v1.3阻害薬コンジュゲートまたはペプチドコンストラクトは、対象が治療を受けている神経変性疾患または状態を改善する。

20

【0586】

これは、本開示のTfR結合ペプチドが治療上有効な濃度のK_v1.3阻害薬を提供し、神経変性疾患を治療することを示す。K_v1.3阻害薬単独での治療と比較して、治療活性が改善する。

30

【0587】

実施例39

TfR結合ペプチドとベルベセスタットのコンジュゲート

本実施例は、アルツハイマー病の治療のためのBACE阻害薬ベルベセスタットにコンジュゲートされた本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）について記載する。

【0588】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、次いで、DCCまたはEDCの存在下で、例えば、活性化エステル（例えば、NHSESTER）を介して、ペプチドのN末端をベルベセスタットにコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペプチド-ベルベセスタットコンジュゲートを作製する。

40

【0589】

ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。投与後、TfR結合ペプチド-ベルベセスタットコンジュゲートは、TfR媒介性トランスサイトーシス及び／またはTfR媒介性エンドサイトーシスを介して、目的の組織または器官に送達される。TfR結合ペプチド-ベルベセスタットコンジュゲートは、

50

T f R 媒介性小胞性トランスサイトosisを介してB B Bを越えて効率的に輸送され、C N Sに蓄積する。T f R結合ペプチド-ベルベセスタットコンジュゲートは、対象のアルツハイマー病を改善する。

【0590】

これは、本開示のT f R結合ペプチドが治療上有効な濃度のB A C E阻害薬を提供し、アルツハイマー病を治療することを示す。B A C E阻害薬単独での治療と比較して、治療活性が改善する。

【0591】

実施例40

非B B B透過活性薬剤を含むペプチドコンストラクトによる脳癌の治療

本実施例は、非B B B透過活性薬剤（例えば、ドキソルビシン）にコンジュゲート、連結、または融合された本明細書に記載されるT f R結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つの配列を有するペプチド）を含むT f R結合ペプチドコンストラクトを使用して、T f R媒介性トランスサイトosisを介してC N Sに薬剤を輸送し、そうでなければ治療不可能であるか、または薬物だけでは極めて限られた有効性しか示さない脳腫瘍（例えば、膠芽腫、星細胞腫、正中膠腫、D I P G、髄芽腫、M Y CもしくはM Y C N増幅脳腫瘍、または上衣腫）を治療する、脳癌の治療について例示する。

【0592】

本開示のペプチドを組換え発現させるか、または化学合成する。実施例21に記載されているように、本開示のペプチドを活性薬剤にコンジュゲート、連結、または融合させる。ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、経口投与するか、または腫瘍微小環境に直接注射する。ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。対象は、ヒトまたは動物である。対象は、脳癌を有する。投与後、ペプチドコンストラクトは、血液脳関門（B B B）を通過し、がんが局在する脳の領域（複数可）にアクセスする。非B B B透過薬剤を含むペプチドコンストラクトは、脳癌を改善及び／または根治する。

【0593】

このデータは、本開示のT f R結合ペプチドを使用して治療上有効な濃度の治療薬（例えば、ドキソルビシン）を、治療薬単独ではアクセスすることができない細胞、組織、または器官に提供することができることを示す。

【0594】

実施例41

T f R結合ペプチドを使用した骨髄への標的化

本実施例は、本明細書に記載されるT f R結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）を使用した骨髄への標的化について記載する。T f R結合ペプチドを、疾患の治療または診断のための活性薬剤または検出可能な剤にそれぞれコンジュゲート、連結、または融合することができる。

【0595】

実施例1及び／または実施例2に従って、本開示のT f R結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。T f R結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。T f R結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、経口投与するか、または腫瘍微小環境に直接注射する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、T f R結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、T f R媒介性トランスサイトosis及び／またはT f R媒介性エンドサイトosisを介して骨髄に送達される。

【0596】

対象の骨髄におけるT f R結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトの存在は、組織

10

20

30

40

50

サンプル及び／または非侵襲的イメージングを使用して確認され、それは、本開示のTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトが、TfRを発現する細胞、組織、または器官、例えば、治療的介入にとって重要な組織である骨髄を標的とすることに成功していることを示す。

【0597】

実施例42

TfR結合ペプチドを使用した赤血球細胞への標的化

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）を使用した赤血球細胞または赤血球前駆細胞への標的化について記載する。TfR結合ペプチドを、疾患の治療または診断のための活性薬剤または検出可能な剤にそれぞれコンジュゲート、連結、または融合することができる。

【0598】

実施例1及び／または実施例2に従って、本開示のTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。ペプチドまたはペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。ペプチドまたはペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、TfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、TfR媒介性トランスサイトーシス及び／またはTfR媒介性エンドサイトーシスを介して、赤血球細胞または赤血球前駆細胞に送達される。

【0599】

対象の赤血球細胞または赤血球前駆細胞におけるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトの存在は、組織（例えば、骨髄サンプル）もしくは血液サンプルまたは非侵襲的イメージングを使用して確認され、それは、本開示のTfR結合ペプチド及びペプチドコンストラクトが、TfRを発現する細胞、組織、または器官、例えば、赤血球細胞または赤血球前駆細胞を標的とすることに成功していることを示す。

【0600】

実施例43

TfR結合ペプチドを使用した筋細胞への標的化

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）を使用した筋細胞への標的化について記載する。TfR結合ペプチドを、疾患の治療または診断のための活性薬剤または検出可能な剤にそれぞれコンジュゲート、連結、または融合することができる。

【0601】

実施例1及び／または実施例2に従って、本開示のTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。TfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。TfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。投与後、TfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトは、TfR媒介性トランスサイトーシス及び／またはTfR媒介性エンドサイトーシスを介して、筋細胞または筋肉組織に送達される。

【0602】

対象の筋細胞または筋肉組織におけるTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトの存在（特に、骨格筋組織における取り込み及び保持）は、組織（例えば、筋肉または骨格筋組織サンプル）もしくは血液サンプルまたは非侵襲的イメージングを使用して確認され、それは、本開示のTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトが、TfRを発現する細胞、組織、または器官、例えば、筋細胞または筋肉組織を標的とすることに成

10

20

30

40

50

功していることを示す。

【0603】

実施例44

TfR結合ペプチドを使用した炎症性腸疾患の治療

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）を使用した炎症性腸疾患の治療について記載する。TfR結合ペプチドを、炎症性腸疾患の治療のための活性薬剤または検出可能な剤にコンジュゲート、連結、または融合させる。

【0604】

実施例1及び／または実施例2に従って、本開示のTfR結合ペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。TfR結合ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。TfR結合ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、TfR結合ペプチドコンストラクトは、腸に送達され、腸の腺細胞に蓄積する。

【0605】

活性薬剤を含むペプチドコンストラクトは、炎症性腸疾患を改善及び／または根治する。これは、本開示のTfR結合ペプチドを使用して、炎症性腸疾患などの様々な疾患の治療のために、腸管内に治療上有効な濃度を提供することができることを示す。

【0606】

実施例45

pH依存性エンドソーム送達のためのTfR結合ペプチド

本実施例は、例えば、エンドソームpH（例えば、pH5.4）で、TfRからpH依存的に解離することが可能なTfR結合ペプチドまたはペプチドコンストラクトの開発及び*in vitro*試験について記載する。

【0607】

TfR結合ペプチド（例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ）またはペプチドコンストラクト（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、または配列番号359～配列番号361のいずれか1つ）の配列中に、1つ以上の追加のヒスチジン残基を導入する。得られたヒスチジンリッチTfR結合ペプチドを、そのTfR結合について、様々なpHレベルまたは範囲での比較結合実験で評価する。生理学的なpHで高いTfR結合親和性を有するが、エンドソームのpH5.4などの低いpHレベルでは結合親和性が著しく低下するペプチドを、細胞結合、取り込み、及びエンドソーム内または小胞内放出実験のために選択する。

【0608】

エンドソーム送達能力の高いTfR結合ペプチドを特定し、特徴付ける。これらの結果は、本開示のTfR結合ペプチドが、TfR結合ペプチドならびにエンドソーム及び／または細胞内送達のための1つ以上の活性薬剤を含むTfR結合ペプチドコンストラクトの小胞内放出を可能にするpH依存性TfR結合動態を示すことができること、または示すように改変することができることを示す。

【0609】

細胞内送達機能を改善するために、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド及びTfR結合ペプチドコンストラクトを、ペプチドまたはペプチドコンストラクトの低pHエンドソーム脱出を促進するモチーフを含むように改変する。細胞取り込み及び放出実験は、低pHエンドソーム脱出のためのモチーフを含むTfR結合ペプチド及びTfR結合ペプチドコンストラクトが、低pHエンドソーム脱出のためのモチーフを含まないペプチドと比較して、より高い濃度でサイトゾルに存在することを示す。このデータは、本開示のT

10

20

30

40

50

f R 結合ペプチド及び T f R 結合ペプチドコンストラクトが、その T f R 結合能力を保持しながら、小胞内及び細胞内送達を向上するように良好に改変できることを示す。これらのペプチドは、疾患及び状態の治療及び／または診断のための様々な治療薬及び／または化合物と組み合わせて使用することができる。

【0610】

実施例 46

非 CNS 組織に位置する疾患の治療のための T f R 結合ペプチド

本実施例は、本明細書に記載される T f R 結合ペプチド（例えば、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、または配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つ）を使用して、T f R を発現する非 CNS 組織に位置する疾患の治療について記載する。

10

【0611】

実施例 1 及び／または実施例 2 に従って、本開示の T f R 結合ペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。任意選択により、疾患または状態の治療に使用される活性薬剤を、T f R 結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合させて、T f R 結合ペプチドコンストラクトを形成することができる。活性薬剤は、任意選択により、T f R 結合ペプチド（例えば、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、または配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つ）に融合された本明細書で開示される任意の NT（例えば、ニューロテンシン（配列番号 350）またはニューロテンシンバリエーション（例えば、配列番号 365～配列番号 371 のいずれか 1 つ））、またはその機能性フラグメントである。ペプチド-NT 融合体は、配列番号 33～配列番号 35、配列番号 68～配列番号 70、配列番号 168～配列番号 170、配列番号 203～配列番号 205、または配列番号 359～配列番号 361 のいずれか 1 つであり得る。T f R 結合ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。T f R 結合ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、または経口投与する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、T f R 結合ペプチドコンストラクトは、T f R を発現する非 CNS 組織に蓄積する。T f R 結合ペプチドコンストラクトは、疾患または状態を改善する。

20

【0612】

このデータは、本開示の T f R 結合ペプチドが、T f R を発現する非 CNS 組織に効果的に蓄積し、したがって、これらの組織の 1 つ以上に位置する疾患または状態の治療及び／または予防に使用することができることを示す。

30

【0613】

実施例 47

末梢性癌の治療のための T f R 結合ペプチド

本実施例は、本明細書に記載される T f R 結合ペプチド（例えば、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、または配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つ）を使用して、T f R を発現及び／または過剰発現する末梢性（例えば、非 CNS）癌の治療について記載する。末梢性癌は、乳癌、肝癌、結腸癌、脳癌、脾癌、唾液腺の癌、腎癌、筋肉癌、骨髄細胞癌、または皮膚癌、泌尿生殖器癌、骨肉腫、筋肉由来肉腫、黒色腫、頭頸部癌、神経芽細胞腫、CMYC 過剰発現腫瘍であり得る。

40

【0614】

実施例 1 及び／または実施例 2 に従って、本開示の T f R 結合ペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。任意選択により、末梢性癌の治療に使用される活性薬剤を、T f R 結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合させて、T f R 結合ペプチドコンストラクトを形成することができる。活性薬剤は、任意選択により、T f R 結合ペプチド（例えば、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、または配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つ）に融合された本明細書で開示される任意の NT

50

(例えば、ニューロテンシン(配列番号350)もしくはニューロテンシンバリエーション(例えば、配列番号365～配列番号371のいずれか1つ))、またはその機能性フラグメントである。ペプチド-NT融合体は、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、または配列番号359～配列番号361のいずれか1つであり得る。TfR結合ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。TfR結合ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、経口、または腫瘍内投与する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、TfR結合ペプチドコンストラクトは、TfRを発現及び／または過剰発現する末梢腫瘍組織に蓄積する。TfR結合ペプチドコンストラクトは、末梢性癌を改善する。

【0615】

10

このデータは、本開示のTfR結合ペプチドが、TfRを発現する及び／またはTfRを過剰発現する末梢性癌に効果的に蓄積し、したがって、これらの組織の1つ以上に位置する癌の治療及び／または予防に使用することができることを示す。

【0616】

実施例48

脾癌の治療のためのTfR結合ペプチド

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド(例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ)を使用して、TfRを発現及び／または過剰発現する脾癌の治療について記載する。

20

【0617】

実施例1及び／または実施例2に従って、本開示のTfR結合ペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。任意選択により、脾癌の治療に使用される活性薬剤を、TfR結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペプチドコンストラクトを形成することができる。TfR結合ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。TfR結合ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、経口、または腫瘍内投与する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、TfR結合ペプチドコンストラクトは、分子イメージング(例えば、CT、MRI)及び／または組織サンプルの分析によって示されるように、脾癌に蓄積する。TfR結合ペプチドコンストラクトは、脾癌を改善する。

30

【0618】

このデータは、本開示のTfR結合ペプチドが、脾癌などのTfRを発現する及び／またはTfRを過剰発現する癌に効果的に蓄積し、したがって、脾癌または他の末梢性癌の治療及び／または予防に使用することができることを示す。

【0619】

実施例49

骨髄癌の治療のためのTfR結合ペプチド

本実施例は、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド(例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358のいずれか1つ)を使用して、骨髄に位置し、TfRを発現及び／または過剰発現する癌の治療について記載する。

40

【0620】

実施例1及び／または実施例2に従って、本開示のTfR結合ペプチドコンストラクトを組換え発現させるか、または化学合成する。任意選択により、骨髄癌の治療に使用される活性薬剤を、TfR結合ペプチドにコンジュゲート、連結、または融合させて、TfR結合ペプチドコンストラクトを形成することができる。TfR結合ペプチドコンストラクトを、それを必要とする対象に投与する。TfR結合ペプチドコンストラクトを静脈内、皮下、筋肉内、経口、または腫瘍内投与する。対象は、ヒトまたは動物である。投与後、TfR結合ペプチドコンストラクトは、分子イメージング(例えば、CT、MRI)及び／または組織サンプルの分析によって示されるように、骨髄癌に蓄積する。TfR結合ペ

50

プチドコンストラクトは、骨髄癌を改善する。

【0621】

このデータは、本開示のTfR結合ペプチドが、骨髄の癌または骨髄に位置する癌などのTfRを発現する及び／またはTfRを過剰発現する末梢性癌に効果的に蓄積し、したがって、骨髄癌または他の末梢性癌の治療及び／または予防に使用することができることを示す。

【0622】

実施例50

ニューロテンシンを含むペプチドコンストラクト、CNSへの送達、及びニューロンCREレポーターマウスの活性化

本実施例は、本明細書に記載される1つ以上のTfR結合ペプチドを含むペプチドコンストラクトを使用したニューロンCREトランスポートマウスの活性化について記載する。この事例において、TfR結合ペプチド及びニューロテンシンペプチドを含む融合ペプチドを使用した。配列番号1、配列番号2、及び配列番号32に対応するペプチド（配列番号1、配列番号2、及び配列番号32はそれぞれ配列番号36、配列番号37、及び配列番号67にN末端GSを付加したものである）を、各ペプチドのC末端でニューロテンシンと融合させて、それぞれ配列番号33、配列番号34、及び配列番号35のペプチド-NT複合体を生成した（それぞれ配列番号68、配列番号69、及び配列番号70にN末端GSを付加したものである）。ニューロテンシンの下流活性には、細胞内Ca²⁺制御及びcAMP応答配列（CRE）駆動型転写プログラム（図28A）が関与しており、慢性疼痛の抑制のために、その調節が探索されている。ニューロテンシン受容体に結合するCDP-NTペプチドコンストラクト（図27）を生成した。実施例1～実施例4に記載されるように、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35を293F細胞で組換え発現させ、精製した。DTT（還元剤）で処理した精製ペプチド-NT融合体（例えば、配列番号33～配列番号35）は、非還元サンプルと比較してゲルシフトを示すことから、組換えNTペプチドがシステインを含有することが示唆される（図27）。精製ペプチドの分子量は、質量分析を使用して検証した。

【0623】

ニューロテンシン受容体への結合は、NTSR1を発現するHEK-293細胞株で実証された。様々なタンパク質に対するニューロテンシン拡張が機能的であることを示すために、HEK293細胞、またはヒトNTSR1を送達するレンチベクターを形質導入したHEK293細胞（HEK293-NTSR1）におけるNTSR活性を、IP-One-Gqキットを使用して測定した（CisBio 62IPAPEB、図28B）。細胞をDMEM+10%ウシ胎児血清中で成長させ、Accutaseを用いてプレートから取り出し、ペレット化し、ハンクス緩衝塩溶液中に1.5×10⁶細胞/mLの密度で再懸濁した。HTFR反応は、HTFR96ウェル低容量プレート（CisBio #66PL96025）で製造元の説明書に従ってセットアップした。反応液25μLにつき10,000細胞（7μL）を使用した。プレートを37℃で60分間インキュベートした。次いで、3μLのIP1-d2作業溶液を加え、続いて、3μLのAnti IP1-Cryptate作業溶液を加えた。室温で1時間のインキュベーションした後、波長665nm及び620nmの励起後の蛍光発光について、プレートをPerkin Elmer 2104EnVision Multilabel Readerでスキャンした。FRET比は、10,000×（665nmのシグナル/620nmのシグナル）で算出した。哺乳動物のHEK-293細胞において、ニューロテンシン（NT）受容体の結合は、NTまたはNTペプチドコンストラクトに応答する場合にのみIP₁蓄積を示し（配列番号33及び配列番号35、ならびにmTf-NT及びNT、配列番号1または配列番号32、ビヒクル、またはmTfについてはなし）、ウェル数は、ビヒクルを除く全てでN=3であり、ビヒクルはN=36であった（図28B）。横棒は、サンプルの平均を示す。

【0624】

CNSへのNTの送達は、環状AMP応答配列（CRE）の制御下でホタルルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスで実証した。これらのマウスの細胞は、環状AMP（cAMP）の上昇または転写因子CRE結合タンパク質1（CREB）を活性化する他の機序の条件下においてルシフェラーゼを発現し、これを、動物用途に製剤化されたルシフェリンをIV投与した後、全動物用発光装置（IVISイメージャー）で測定する。ニューロテンシン受容体の発現は、前頭葉を含むCNSの細胞のサブセットに限定された。活性化されると、シグナル伝達経路が活性化され、最終的にCREBリン酸化及びCRE媒介性転写に至る。ニューロテンシン受容体の内因性リガンドであるニューロテンシンは、それ自体ではBBBを通過することができない神経ペプチドである（図32に示されるように、300nmolのNTまたはビヒクルを投与したマウスは、同一のCRE-luc駆動発光レベルを示した）。したがって、NTのIV単独投与では、CREレポーターマウスの脳内でルシフェラーゼ産生は生じない。一方、ニューロテンシン及び本開示のTfR結合タンパク質を含む融合ペプチドをIV投与すると、CREレポーターマウスの脳内でCRE駆動型ルシフェラーゼが誘導されることから明らかなように、BBB透過が示された。試験したペプチド-NT複合体は、その3つ全て（配列番号33、配列番号34、及び配列番号35）が、免疫組織化学分析によって決定されるように、BBBを越えた脳への送達、及びNTのNT受容体上での機能的結合を示した。

【0625】

CRE駆動型ルシフェラーゼの*in vivo*誘導は、アデニリルシクラーゼの活性化及びcAMPホスホジエステラーゼの阻害をそれぞれ介した強力なCRE誘導物質であるフォルスコリン及びロリプラムの投与から4時間後にルシフェリンを投与することによって検証した（図31）。CRE-luc GPCRレポーターマウスに、1.68mgのロリプラム（Sigma Aldrich R6520）及び0.84mgのフォルスコリン（Sigma Aldrich 344270）を腹腔内（IP）注射（17%DMSO溶液中200μL）によって投与するか、またはTfR結合ペプチドもしくは他の試験及び対照ペプチドを尾静脈注射によって投与した。投与量は、100nmolのNTを含むもしくは含まないTfR結合ペプチド（配列番号1、配列番号2、または配列番号32～配列番号35）またはPBS中の12nmolのトランスフェリンもしくはトランスフェリン-NT（配列番号354または配列番号355）であった。投与から4時間後、マウスに100μLの30mg/mL D-ルシフェリン（Redi Ject D-Luciferin Ultra、PerkinElmer 770505）をIP注射によって投与し、10分の無制限の活動後、イソフルラン曝露による麻酔をかけた。麻酔をかけたマウスの発光をXenogen IVIS機器で1分の曝露により測定した。陽性対照としてロリプラム及びフォルスコリンを投与した場合、投与したマウスでは、動物の脳から高レベルの発光が認められる（図31）。比較のための試験ペプチドについては、脳全体を包含する同一の関心領域を描画し、Living Imageソフトウェア（バージョン4.0、PerkinElmer、図30）を使用して定量化した。発光レベルがコホート内の他のマウスの平均/SD発光から4SDを超える場合、またはルシフェリン注射が腹膜内に当たらなかった場合、そのマウスは打ち切った。前者の場合、これは、薬物治療またはNT受容体調節と関係のない偶発的な生理学的応答と解釈した。後者の場合、これは、蛍光色素が動物の腹部全体に均一に分布しなかったことにより特定され（Redi Ject D-Luciferin Ultraで予備製剤化、ICGフィルターで5秒以上設定された読み取り）、これは、ルシフェリンのマウス全体への不十分な灌流及び不完全な曝露を示しており、動物の脳の発光定量を疑わしいものになっている。このアッセイで検証された動物は、1週間かけて定常状態（低）ルシフェラーゼ発現に戻し、次いで、ニューロテンシンペプチドまたはニューロテンシンに融合されたTfR結合タンパク質を含む融合ペプチドを用いて試験した。

【0626】

発光（腹腔内ルシフェリン投与を介する）は、親TfR結合ペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号32、または配列番号354）またはCDP-NTペプチドコンスト

10

20

30

40

50

ラクト（配列番号33～配列番号35）もしくはマウストランスフェリン-NTコンストラクト（MRLAVGALLVCAVLGLCLADYKDEHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHEGGGSPDKTVKWCAVSEHENTKCSIFRDHMKTVLPDPGPRLACVKKTSYPDCIKAISASEADAMTLDGGWVYDAGLTPNNLKPVAAEFYGSVEHPQTYYYAVAVVKKGTD FQLNQLEGKKSCHTGLGRSAGWVPIPIGLLFCKLSEPRSPLEKAVSSFFSGSCVPCADPVAFPKLCQLCPGCGCSSTQPF FGYVGAFKCLKDGGGDVAFVKHTTIFEVLPEKADRDQYELLC LDNTRKRPVDQYEDCYLARIPSHAVVARKNNGKEDLIWEILKVAQEHFGKGKSKDFQLFSSPLGKDLLFKDSAFGLLRVPPRMDYRLYLGHNYVTAIRNQQEGVCPEGSIDNSPVKWCALS HLERTKCDEWSIISEGKIECESAETTEDCIEKIVNGEADAMTLDGGHAYIAGQCGLVPVMAEYYESSNCAIPSQQGIFPK GYYAVAVVKASDTSITWNNLKGGKSCHTGVDRTAGWNI PMGMLYNRINHCKFDEFFSQGCAPGYEKNSTLCDLCIGPLKC APNNKEEYNGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVLDNTEGKN PAEWAKNLKQEDFELLCPDGT RKPVKDFASCHLAQAPNHV VVSRKEKAARVKAVLTSQETLFGGSDCTGNFCLFKSTTKD L LFRDDTKCFVKLPEGTTPEKYLGAEYMQSVGNMRKCS TSRLLEACTFHKHGSSELYENKPRRPYIL、配列番号355）を静脈内投与する前（「刺激なし」）または静脈内投与から4時間後のいずれかに、一致するコホートを 10
使用して、画像化した（図30A）。まず、トランスジェニックマウスにルシフェリンを投与し、発光を測定した（「刺激なし」）。次いで、同じマウスを、（i）親ペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号32、または配列番号354）を投与し、次いで、ルシフェリンを再度投与し、発光量を測定すること（「親」）、または（ii）CDP-NTペプチドコンストラクト及びマウストランスフェリン-NTコンストラクト（配列番号355、配列番号33、配列番号34、配列番号35）を投与し、次いで、ルシフェリンを再度投与し、発光を測定すること（「NT融合体」）のいずれかで処置した。定 20
量化を図30Aに示す。横棒は、サンプルの平均を示す。有意性は、T検定（対応なし、両側）を使用して決定した。（*： $P < 0.05$ 。**： $P < 0.01$ 。#： $P < 0.001$ ）。配列番号32コホートの画像は、疑似カラーの発光で図30Bに示す。マウスは、脳内でルシフェラーゼ発現を駆動する測定可能な基底レベルのCRE活性を有し（「刺激なし」の測定値）、親ペプチドの投与によって増加しなかった（「親」の測定値）。一方、CRE活性のレベルは、本開示のTfR結合ペプチド及びNTを含むペプチド融合体である配列番号34及び配列番号35のCDP-NTペプチドコンストラクトを投与したマウスで有意に上昇した（図30）。CRE活性のレベルはまた、配列番号33のCDP-NTペプチドコンストラクト及び配列番号354のマウストランスフェリン-NT融合体で処置したマウスでも上昇したが、他のCDP-NTペプチドコンストラクト（配列番号34及び配列番号35）のように統計的な上昇ではなかった。ネイキッドNTペプチドを300nmolで単独投与した場合（ペプチド-NT融合コンストラクトの3倍の用 40
量）、BBBを通過しないことから予想されるように、静脈内投与後に脳内でレポーターを活性化することができない（図32）。まとめると、これは、配列番号1バリエーションに融合された分子のCNS蓄積だけでなく、BBB透過及びニューロンへのアクセスを示し、更に、本開示のペプチドのNT融合体によるニューロテンシン受容体の結合を示している。

【0627】

ペプチドがNTをCNSの領域に送達する能力を免疫組織化学（IHC）によって確認した。IHC染色によると、ルシフェラーゼレベルは、配列番号1、配列番号2、及び配列番号32（例えば、配列番号33～配列番号35）（図29）、特に、配列番号34及び配列番号35のニューロテンシンバリエーションで処置したマウスで目にみえて高く、トラ 50

ンスフェリン-N T（配列番号355）で処置したマウスでは低い染色がみられ、ペプチドを投与しなかったマウス（刺激なし）でははるかに低かった。ホルマリン固定パラフィン包埋した脳をMicrom HM 355 Sマイクロトームで6 μmに切片化し、正電荷のSuperfrost Plusスライド（Fisher 12-550-15）に載せた。染色を、Ventana Discovery Ultra IHC/ISH自動染色装置で、この機器での使用に設計されたキット及び試薬：EZ Prep脱パラフィン試薬（Ventana 950-100）、プロテアーゼ3抗原賦活化キット（Ventana 760-2020）、抗ウサギHQ（Ventana 760-4815）、抗HQ-HRP（Ventana 760-4815）、ChromoMap DABキット（Ventana 760-159）、ヘマトキシリン（Ventana 760-2021）、及びブルーイング試薬（Ventana 760-2037）を全て製造元のデフォルト設定で使用して、自動で行った。一次抗ルシフェラーゼ抗体をAbcam（ab21176、濃度1：350）から入手し、カゼインを含むVentana抗体希釈液（Ventana 760-219）で希釈した。配列は以下のとおりであった。切片を69℃で脱パラフィンした後、次いで、抗原の賦活化を35℃で4分間行った。スライドをすすぎ、37℃まで加温した後、手で一次抗体を加えた（1：350）。スライドを一次抗体と28分間インキュベートし、すすいだ。続いて、抗体の添加（それに続いてすすぎ）を抗ウサギHQ、次いで、抗HQHRPで行い、それぞれ16分間インキュベートした。次いで、スライドをDAB処理し、ヘマトキシリン及びブルーイング試薬で対比染色した（それぞれ8分）。図29の画像は、軽度にコントラスト強調しており、画像修正は全て、処理群に関係なくセット内の全ての画像で同じように実施した。免疫組織化学は、CDP-N T投与から4時間後に、マウスの皮質、線条体、及び視床で、ルシフェラーゼ発現の増大を示した。スケールバー（左上パネル）は、100 μmである（図29）。全てのパネルは、同じ倍率で示す。

【0628】

配列番号33～配列番号35のニューロテンシンに融合されたTfR結合ペプチドを含む本開示のペプチドコンストラクトは、CREレポーターマウスの脳内でCRE駆動型ルシフェラーゼを誘導したことから、これは、本開示のTfR結合ペプチドが、他の方法では脳にアクセスできないBBBを効率的に通過して、活性薬剤（例えば、ニューロテンシンなどのペプチド）を輸送することが可能であることを示している。ニューロテンシンに融合されたTfR結合ペプチドを含む本開示の他のペプチドコンストラクトは、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、及び配列番号203～配列番号205を含み、CREレポーターマウスの脳内においてCRE駆動型ルシフェラーゼを誘導し得る。

【0629】

本明細書で開示される任意のペプチド（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、もしくは配列番号359～配列番号361のペプチド-N T融合体、または配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のペプチドなどのNTに融合され得るペプチド）を使用してニューロテンシンに融合させ、CREレポーターマウスの脳内においてCRE駆動型ルシフェラーゼを誘導することができ、これは、本開示のTfR結合ペプチドが、他の方法では脳にアクセスできないBBBを効率的に通過して、活性薬剤（例えば、ニューロテンシンなどのペプチド）を輸送することが可能であることを示している。

【0630】

このデータは、本開示のTfR結合ペプチドが、治療上有効な濃度のNT受容体結合ペプチドをCNSに提供し、侵害受容性または神経障害性疼痛を効果的に治療することができることを示している。本明細書で開示される任意のペプチド（例えば、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番

号203～配列番号205、もしくは配列番号359～配列番号361のペプチド-NT融合体、または配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のペプチドなどのNTに融合され得るペプチド)を使用して、ニューロテンシン(NT)をCNS内に輸送することができる。ペプチドは、組換え融合、化学コンジュゲーションを介して、または他の手段によって、NTと複合体化して、CDP-NTペプチドコンストラクトを形成することができる。

【0631】

実施例51

システイン高密度ペプチドライブラリーの構築

本実施例は、実施例4及び実施例5のペプチドのスクリーニングに使用されるライブラリーの生成について記載する。6、8、または10個のシステインを含有する30～50アミノ酸長のタンパク質セグメントについて、Uniprotデータベース検索した。このリストは、アノテーションのあるノッティン及びデフェンシンに重点を置きつつ、それ以外は系統発生的多様性を考慮して絞り込み、他の情報源から関心のある限定数のCDPを追加することで、最終的なライブラリーサイズを10,000個のCDPとした。増幅及びクローニングに適切なフランキング配列を含有するライブラリーのオリゴヌクレオチドをオーダーし(Twist Bioscience)、増幅し(Phusion(登録商標) High-Fidelity DNA Polymerase、NEB)、変異導入を行った(GeneMorph II Random Mutagenesis Kit、Agilent; 22サイクルの増幅)後、BamHI/NotI消化したSDGFベクター(GenBank MF958494)にGibson Assemblyでクローニングした。ライブラリーをStellarコンピテント細胞(Clontech)に形質転換し、マキシプレップし(QIAGEN)、レンチウイルスにした(シュードタイプ化VSV-G、エンベローププラスミドpMD2.G及びパッケージングプラスミドpSPAXを使用して293T細胞で標準的な方法によって生成した)。個別のクローニングが必要なシングルTONCDP候補をdsDNA(gBlock、Integrated DNA Technologies)からSDGFにクローニングし、一過性トランスフェクション(上記のように、24ウェル懸濁プレートで、2.5µgのプラスミドを4µgのポリエチレンジイミン(Polysciences 23966-1)とともに1mLのFreeStyle培地中の 2×10^6 293F細胞にトランスフェクトし、振盪して2日後、結合について試験した。試験は、 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ のDAPIを含むFlow Buffer中でTfR及び色素標識ストレプトアビジンを一緒にまたは順次のいずれか(TfRに続いてペレット化してストレプトアビジン溶液中に再懸濁)で染色し、次いで、AceaNovoCytteフローサイトメーターで分析した。

【0632】

実施例52

ペプチド-活性薬剤コンストラクトによる疼痛の治療または管理

本実施例は、疼痛を治療または管理するための方法を記載する。この方法は、急性及び/または慢性症状の治療として使用される。本開示のペプチドを発現させ、本明細書に記載される損傷または他の状態の結果としての疼痛の治療薬として医薬組成物で患者に投与する。本開示のペプチドは、Nav1.7などのイオンチャネルを阻害する。ペプチドを組換え発現させるか、または化学合成し、ペプチドは、本明細書に記載されるTfR結合ペプチド(例えば、配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、または配列番号356～配列番号358)から選択する。TfR結合機能を維持しつつ、Nav1.7に対するもののなどのイオンチャネル阻害を追加または増加させるようにペプチドを変異させる。あるいは、ペプチドは、Nav1.7などのイオンチャネルと相互作用するペプチドではなく、発現または合成後、活性薬剤にコンジュゲートさせる。いくつかの態様において、活性薬剤は、NSAID鎮痛薬である。いくつかの態様において、活性薬剤は、リドカインであ

10

20

30

40

50

る。いくつかの態様において、活性薬剤は、 $Na_v1.7$ イオンチャネル阻害薬である。任意選択により、液体クロマトグラフィー（例えば、逆相、イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフ）を使用してペプチド-活性薬剤コンジュゲートを精製する。ペプチドコンストラクトを投与用に製剤化し、対象に投与する。投与後、ペプチド活性剤コンジュゲートは、疼痛に冒されている領域、組織、または系を標的とする。ペプチドは、それ自体が疼痛を調節する薬剤（例えば、 $NSAID$ 鎮痛薬）にコンジュゲートすることができる。そのような疼痛の調節は、炎症、自己免疫応答、疼痛受容体に対する直接的もしくは間接的作用、細胞殺傷、またはプログラム細胞死を調節することなどの様々な機序によって作用し得る。1つ以上のペプチドをヒトまたは動物に皮下、静脈内、もしくは経口投与するか、または注射する。

【0633】

実施例 5 3

血清アルブミン結合ペプチドコンストラクトを使用したペプチド血漿半減期の延長

本実施例は、本明細書で開示される血清アルブミン結合ペプチドコンストラクトを使用して、ペプチドの血清または血漿半減期を延長する方法を示す。配列番号 1～配列番号 70、配列番号 136～配列番号 205、配列番号 225～配列番号 332、または配列番号 356～配列番号 361 のいずれか 1 つの配列を有するペプチドまたはペプチドコンストラクトは、その血漿半減期を延長するために修飾される。ペプチド及び血清半減期延長部分を、組換え融合するか、単一融合体としての化学合成するか、別々に組換え発現させてコンジュゲートするか、または別々に化学合成してコンジュゲートする。ペプチドを血清アルブミン結合ペプチドに融合させると、ペプチドコンストラクトの血清半減期が延長する。ペプチドまたはペプチドコンストラクトを SA21（配列番号 376）などの血清アルブミン結合ペプチドにコンジュゲートする。任意選択により、SA21 に融合させたペプチドは、配列番号 373 または配列番号 375 のいずれか 1 つの配列を有する。任意選択により、SA21 に融合させたペプチドは、配列番号 377 の配列を有するペプチドリンカーを介して SA21 に連結する。配列番号 377 に対応する配列を有するリンカーは、2 つの別々の機能性 CDP を連結して、血清半減期延長機能をペプチドまたはペプチドコンストラクトに組み込む。配列番号 377 に対応する配列を有するリンカーは、ペプチドコンストラクトのいずれのメンバーからも立体的な障害を受けることなく、SA21 が環化することを可能にする。あるいは、AlbuTag などのアルブミン結合物質または C14～C18 脂肪酸などの脂肪酸へのペプチドのコンジュゲーションを使用して血漿半減期を延長する。血漿半減期はまた、任意選択により、最小限の非ヒトタンパク質配列を使用することによって免疫原性が低下した結果として、延長される。

【0634】

実施例 5 4

TfR 結合ペプチドと TfR 結合抗体の用量毒性の比較

本実施例は、マウス対象に投与した場合における本開示の TfR 結合ペプチドと抗 TfR 抗体の用量毒性の比較について記載する。Couch, et al, 2013 (Couch et al, Sci Transl Med. 2013 May 1; 5(183): 183ra57) に記載されるように、抗 TfR 抗体を 5 mg/kg 、 25 mg/kg または 50 mg/kg の用量で対象に投与する。これは、それぞれ、マウス質量 25 g あたり約 0.84 nmol 、 4.2 nmol 、及び 8.4 nmol のモル用量に相当する。本開示の TfR 結合ペプチドを約 31 mg/kg で対象に投与する。これは、マウス質量 25 g あたり約 100 nmol のモル濃度に相当する。あるいは、本開示の TfR 結合ペプチドを 0.84 nmol 、 4.2 nmol 及び 8.4 nmol または 100 nmol の用量で対象に投与する。マウス質量 25 g あたり 31 mg/kg 、または約 100 nmol の TfR 結合ペプチドを投与した対象は、少なくとも 24 時間にわたって苦痛または毒性の徴候を示すことなく、効果的な薬力学及び薬物動態特性を示す。ニューロテンシン (NT) などの活性薬剤に更に融合させると、TfR 結合ペプチドは、毒性が観察されることなく、CRE-シフェラーゼモデルマウスで評価されるような CRE 活性の効果的な薬

10

20

30

40

50

力学誘導などの効果的な治療効果を示す。一方、マウス質量25gあたり5mg/kg、または約0.84nmolの抗TfR抗体をBACE阻害抗体との二重特異性形態で投与した対象は、マウス質量25kgあたり25もしくは50mg/kg、または4.2もしくは0.4nmolを投与した対象と比較して、薬力学なアミロイドベータ阻害の低下などの治療効果の低下を示す。マウス質量25kgあたり25もしくは50mg/kg、または4.2もしくは0.4nmolの抗TfR抗体の用量は、少なくとも投与30分以内に、嗜眠、苦痛、及び溶血、または網状赤血球数の減少もしくは他の毒性を誘発する。結果は、治療濃度域（治療上の薬力学応答が認められる量を上回るが、毒性が観察される量を下回る投与量）が抗体ベースの治療薬よりもペプチドベースの治療薬でより広いことを示す。結果は、更に、TfR結合ペプチドベースの治療薬が、TfR結合抗体ベースの治療薬と比較して、オフターゲット結合が少なく、免疫応答が低いことを示しており、これは、タンパク質の長さが短いこと（およそ50アミノ酸）、適応免疫応答に対するエピトープが少なく、表面積が小さくなることに起因する。

【0635】

実施例55

TfR結合血清アルブミン結合ペプチド融合体の精製

本実施例は、血清アルブミン結合ペプチドSA21に融合させたTfR結合ペプチドの精製について記載する。図34は、SA21融合ペプチドの精製を示す。SA21をCDPとの融合ペプチドとして組換え発現させ、HPLCによって精製した。ペプチドを精製してシデロカリンに融合し（「Scn-CDP」）、切断して、切断されたSA21融合ペプチド（「CDP」）及びシデロカリン（「Scn」）を生成した。図34Aは、配列番号373に対応する血清アルブミンペプチド（SA21）に融合させたペプチドTfR結合ペプチドの精製を示す。純度は、DTT還元（「R」）または非還元（「NR」）条件下におけるSDS-PAGE（左）及びRP-HPLC（右）によって検証した。SDS-PAGEを、切断していない（「U」）シデロカリン-CDP融合ペプチドでも実施した。SDS-PAGEにおいて、切断していない（「U」）サンプルでは、シデロカリン-CDP融合体（「Scn-CDP」）に対応する明確なバンドが認められ、還元（「R」）及び非還元（「NR」）サンプルでは、切断されたSA21融合（「CDP」）、シデロカリン単独（「Scn」）、及び切断していない融合体（「Scn-CDP」）に対応するバンドが認められた。非還元RP-HPLCトレースで単一ピークが存在することは、純粋な未分解のサンプルがあることを示した。図34Bは、配列番号456に対応するSA21に融合させたペプチドの精製を示す。純度は、DTT還元（「R」）または非還元（「NR」）条件下におけるSDS-PAGE（左）及びRP-HPLC（右）によって検証した。SDS-PAGEを、切断していない（「U」）シデロカリン-CDP融合ペプチドでも実施した。SDS-PAGEにおいて、切断していない（「U」）サンプルでは、シデロカリン-CDP融合体（「Scn-CDP」）に対応する明確なバンドが認められ、還元（「R」）及び非還元（「NR」）サンプルでは、切断されたSA21融合（「CDP」）、シデロカリン単独（「Scn」）、及び切断していない融合体（「Scn-CDP」）に対応するバンドが認められた。非還元RP-HPLCトレースで単一ピークが存在することは、純粋な未分解のサンプルがあることを示した。

【0636】

本発明の好ましい実施形態を本明細書に示し、説明してきたが、かかる実施形態は、例としてのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変形形態、変更及び置換を想起するであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替が本発明の実施において採用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、この特許請求の範囲内の方法及び構造ならびにそれらの等価物を包含することが意図される。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目1）

操作されたトランスフェリン受容体（TfR）結合ペプチド、またはそのバリエーション、

ホモログ、フラグメント、もしくはアナログを含む、組成物。

(項目2)

ペプチドコンストラクトを含む組成物であって、前記ペプチドコンストラクトは、

a) トランスフェリン受容体 (TfR) 結合ペプチド、またはそのバリエーション、ホモログ、フラグメント、もしくはアナログと、

b) 活性薬剤とを含み、

前記ペプチドは、前記活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、または融合される、前記組成物。

(項目3)

配列番号1～配列番号32、配列番号36～配列番号67、配列番号136～配列番号167、配列番号171～配列番号202、もしくは配列番号356～配列番号358のいずれか1つと、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%の配列同一性を有する操作されたペプチド、またはそのバリエーションもしくは機能性フラグメントを含む組成物。

(項目4)

前記ペプチドが、血液脳関門 (BBB) を含む細胞層を透過する、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目5)

前記ペプチドが、膜を透過し、前記膜は、細胞の膜である、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目6)

前記細胞がTfRを発現する、項目5に記載の組成物。

(項目7)

前記ペプチドが、TfR媒介性エンドサイトーシスを介して前記細胞の前記膜を透過する、項目5に記載の組成物。

(項目8)

前記ペプチドが、TfRに結合し、次いで、解離することによって、前記血液脳関門を越えてCNSに送達される、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目9)

前記ペプチドが、受容体媒介性トランスサイトーシスによって前記血液脳関門を越えて送達される、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目10)

前記細胞が腫瘍細胞である、項目5に記載の組成物。

(項目11)

前記ペプチドが局在する細胞または器官が、TfRを過剰発現している、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目12)

前記ペプチドが、配列番号206～配列番号224及び配列番号334～配列番号344を含む、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目13)

前記ペプチドが、配列番号32を基準として、G5、A7、S8、N14、L17、E18、E21、L38、L42、L45、D46、H47、S50、及びQ51に対応する表面界面残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目14)

前記ペプチドが、配列番号32を基準として、位置3、4、9、11、15、16、19、23、26、28、29、30、31、32、33、35、36、37、39、及び40のいずれか1つに対応する親水性表面遠位残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 1 5)

前記親水性表面遠位残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、項目 1 4 に記載の組成物。

(項目 1 6)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、R 3、E 4、R 9、K 1 2、D 1 5、E 1 6、K 1 9、R 2 3、S 2 6、S 2 8、N 2 9、T 3 0、E 3 1、E 3 2、D 3 3、E 3 5、Q 3 6、E 3 7、E 3 9、及び D 4 0 に対応する親水性表面遠位残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、項目 1 2 に記載の組成物。

(項目 1 7)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、1 5、3 5、3 9、もしくは 4 9 のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に親水性残基を含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

(項目 1 8)

前記親水性残基が、アミノ酸 D、E、H、K、R、N、Q、S、または T から選択される、項目 1 4 に記載の組成物。

(項目 1 9)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、D 1 5、E 3 5、E 3 9、及び H 4 9 に対応する親水性残基、またはこれらの任意の組み合わせを含む、項目 1 7 または 1 8 に記載の組成物。

(項目 2 0)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、1 1、2 5、もしくは 2 7、またはこれらの任意の組み合わせに対応する位置に疎水性残基を含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

(項目 2 1)

前記疎水性残基が、アミノ酸 A、M、I、L、V、F、W、もしくは Y、またはこれらの任意の組み合わせから選択される、項目 2 0 に記載の組成物。

(項目 2 2)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、M 1 1、M 2 5、M 2 7 に対応する疎水性残基のいずれか 1 つ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、項目 2 0 に記載の組成物。

30

(項目 2 3)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、位置 4 5 に対応する脂肪族残基を含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 2 4)

前記脂肪族残基が、アミノ酸 A、M、I、L、または V から選択される、項目 2 3 に記載の組成物。

(項目 2 5)

前記ペプチドが、配列番号 3 2 を基準として、L 4 5 に対応する脂肪族残基を含む、項目 2 3 に記載の組成物。

(項目 2 6)

前記ペプチドが、少なくとも 1 つのジスルフィド結合、少なくとも 2 つのジスルフィド結合、少なくとも 3 つのジスルフィド結合、または少なくとも 5 つのジスルフィド結合を含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

(項目 2 7)

前記ペプチドが、配列番号 1 ～ 配列番号 3 2、配列番号 3 6 ～ 配列番号 6 7、配列番号 1 3 6 ～ 配列番号 1 6 7、配列番号 1 7 1 ～ 配列番号 2 0 2、配列番号 3 5 6 ～ 配列番号 3 5 8 のいずれか 1 つと、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

50

物。

(項目 28)

前記ペプチドが、配列番号 1～配列番号 32、配列番号 36～配列番号 67、配列番号 136～配列番号 167、配列番号 171～配列番号 202、配列番号 356～配列番号 358 のいずれか 1 つの配列、またはそのバリエーションもしくはフラグメントを含む、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 29)

前記ペプチドが、配列番号 1 に示される配列を含む、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 30)

前記ペプチドが、配列番号 2 に示される配列を含む、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 31)

前記ペプチドが、配列番号 4 に示される配列を含む、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 32)

前記ペプチドが、配列番号 30 に示される配列を含む、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 33)

前記ペプチドが、配列番号 32 に示される配列を含む、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 34)

前記ペプチドが、細胞透過部分と更に製剤化、融合、またはコンジュゲートされる、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 35)

前記細胞透過部分が、ポリカチオン、ポリ有機酸、エンドソーム放出ポリマー、ポリ(2-プロピルアクリル酸)、ポリ(2-エチルアクリル酸)、Tat ペプチド、Arg パッチ、ノットペプチド、CysTAT、S19-TAT、R8 (配列番号 73)、pAntp、Pas-TAT、Pas-R8 (配列番号 76)、Pas-FHV、Pas-pAntp、F2R4 (配列番号 79)、B55、アウレイン、IMT-P8、BR2、OMOTAG1、OMOTAG2、pVEC、SynB3、DPV1047、C105Y、トランスポーター、MTS、hLF、PFVYLI (配列番号 93)、マウロカルシン、インペラトキシン、ハドルカリン、ヘミカルシン、オピカルシン-1、オピカルシン-2、ミッドカイン (62-104)、MCOTI-II、クロロトキシン、DRI-TAT、cFΦR4 (配列番号 96)、R6W3 (配列番号 421)、ミリスレート、yBBR、またはそのフラグメントもしくはバリエーション、またはこれらの任意の組み合わせを含む、項目 34 に記載の組成物。

(項目 36)

前記細胞透過部分が、配列番号 71～配列番号 96、配列番号 98～配列番号 101、配列番号 116～配列番号 126、または配列番号 403～配列番号 455 のいずれか 1 つである、項目 34 に記載の組成物。

(項目 37)

前記ペプチド配列が、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、少なくとも 35、少なくとも 36、少なくとも 37、少なくとも 38、少なくとも 39、少なくとも 40、少なくとも 41、少なくとも 42、少なくとも 43、少なくとも 44、少なくとも 45、少なくとも 46、少なくとも 47、少なくとも 48、少なくとも

10

20

30

40

50

49、少なくとも50、少なくとも51、少なくとも52、少なくとも53、少なくとも54、少なくとも55、少なくとも56、少なくとも57、少なくとも58の残基、少なくとも59、少なくとも60、少なくとも61、少なくとも62、少なくとも63、少なくとも64、少なくとも65、少なくとも66、少なくとも67、少なくとも68、少なくとも69、少なくとも70、少なくとも71、少なくとも72、少なくとも73、少なくとも74、少なくとも75、少なくとも76、少なくとも77、少なくとも78、少なくとも79、少なくとも80、または少なくとも81のアミノ酸残基を含む、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目38)

前記ペプチドに活性配列がグラフトされるか、または、前記ペプチドが、活性薬剤にコンジュゲートされるか、連結されるか、もしくは融合されるか、もしくはグラフトされて、ペプチドコンストラクトがもたらされる、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目39)

前記ペプチドコンストラクトが、配列番号33～配列番号35、配列番号68～配列番号70、配列番号168～配列番号170、配列番号203～配列番号205、配列番号225～配列番号332、配列番号359～配列番号361、配列番号373、配列番号375、配列番号381、配列番号384、配列番号385、配列番号388、配列番号389、配列番号393、配列番号396、配列番号397、配列番号400、または配列番号401のいずれか1つと、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する、項目38に記載の組成物。

(項目40)

前記活性薬剤が、リンカーを介して連結され、前記リンカーは、表7または配列番号103～配列番号115、もしくは配列番号125のいずれか1つから選択される、項目1～3のいずれか1項に記載の組成物。

(項目41)

前記活性薬剤が、免疫治療薬、CTLA-4標的薬剤、PD-1標的薬剤、PDL-1標的薬剤、IL15薬剤、融合されたIL-15/IL-15Ra複合薬剤、IFNガンマ薬剤、抗CD3薬剤、イオンチャネル調節剤、Kv1.3阻害薬、アウリスタチン、MMAE、メイタンシノイド、DM1、DM4、ドキソルビシン、カリケアミシン、白金化合物、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、SN-38、BACE阻害薬、Bcl-xL阻害薬、WEHI-539、ベネトクラクス、ABT-199、ナビトクラックス、AT-101、オバトクラックス、ピロロベンゾジアゼピンもしくはピロロベンゾジアゼピン二量体、ドラスタチン、または神経伝達物質である、項目38～40のいずれか1項に記載の組成物。

(項目42)

前記Kv1.3阻害薬が、Vm24、ShK-170、ShK-186、またはShK-192である、項目41に記載の組成物。

(項目43)

前記Vm24が、配列番号378または配列番号391の配列を有する、項目42に記載の組成物。

(項目44)

前記Shk-185が、配列番号379、配列番号390、または配列番号402の配列を有する、項目42に記載の組成物。

(項目45)

前記神経伝達物質が、ニューロテンシン、ニューロテンシンペプチドバリエーション、またはその機能性フラグメントである、項目41に記載の組成物。

(項目46)

前記ニューロテンシンペプチドバリエーションが、配列番号350または配列番号365～

10

20

30

40

50

配列番号 3 6 9 に対して、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する、項目 4 5 に記載の組成物。

(項目 4 7)

前記ペプチドに結合された半減期改変剤を更に含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 4 8)

前記半減期改変剤が、ポリマー、ポリエチレングリコール (P E G)、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、水溶性ポリマー、双極性イオン水溶性ポリマー、水溶性ポリ (アミノ酸)、プロリン、アラニン及びセリンの水溶性ポリマー、グリシン、グルタミン酸、及びセリンを含有する水溶性ポリマー、F c 領域、脂肪酸、パルミチン酸、またはアルブミンに結合する分子を含む、項目 4 8 に記載の組成物。

(項目 4 9)

前記半減期改変剤が S A 2 1 を含む、項目 4 7 に記載の組成物。

(項目 5 0)

前記 S A 2 1 が、配列番号 3 7 6 または配列番号 3 7 7 の配列を有する、項目 4 9 に記載の組成物。

(項目 5 1)

リンカーによって前記ペプチドに結合された検出可能な剤を更に含む、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 5 2)

前記検出可能な剤が、リンカーを介して連結され、前記リンカーは、表 7 または配列番号 1 0 3 ～ 配列番号 1 1 5、もしくは配列番号 1 2 5 のいずれか 1 つから選択される、項目 5 1 に記載の組成物。

(項目 5 3)

前記検出可能な剤が、フルオロフォア、近赤外色素、造影剤、ナノ粒子、金属含有ナノ粒子、金属キレート、X 線造影剤、P E T 剤、放射性核種、または放射性核種キレート剤である、項目 5 1 に記載の組成物。

(項目 5 4)

項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物、またはその塩と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

(項目 5 5)

組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、

a) 項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む組成物または項目 5 4 に記載の医薬組成物と前記細胞層を接触させることと、

b) 前記組成物を前記細胞層を越えて輸送することを含む、

前記方法。

(項目 5 6)

状態を治療することを、それを必要とする対象に行うための方法であって、

a) 項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドまたは項目 5 4 に記載の医薬組成物を含む組成物を前記対象に投与することと、

b) 前記組成物を細胞層を越えて輸送することを含む、

前記方法。

(項目 5 7)

状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、前記対象の組織における T f R の発現に基づいて、項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む組成物または項目 5 4 に記載の医薬組成物のある量を前記対象に投与することを含む、前記方法。

(項目 5 8)

前記ペプチドが、ニューロテンシン受容体に結合し、活性化することが可能である、項目 5 5 ～ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記ペプチドの前記対象への投与により、疼痛のレベルを低減することを更に含む、項目 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 0)

前記投与が、吸入、鼻腔内投与、経口投与、局所投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、またはこれらの組み合わせである、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記組成物が、ボラス、注入、または持続注入として、静脈内投与される、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記ペプチドを、統合失調症、薬物乱用、パーキンソン病、高血圧、摂食障害、脳卒中、アルツハイマー病、がん、炎症、疼痛、てんかん、気分障害、または内分泌障害の患者に投与することを更に含む、項目 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記対象が、がんを有する、項目 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記対象が、C N S の疾患を有する、項目 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 5)

前記対象が、神経障害性疼痛、片頭痛、不安、またはてんかんを有する、項目 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 6)

項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物または項目 5 4 に記載の医薬組成物を細胞層を越えて輸送するための方法であって、前記組成物と前記細胞層を接触させることと、前記組成物を前記細胞層を越えて輸送することを含む、前記方法。

(項目 6 7)

状態を治療することを、それを必要とする対象に行う方法であって、項目 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物または項目 5 4 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

(項目 6 8)

前記輸送することが、前記組成物の T f R への結合を含む、項目 5 5 ～ 5 6 または 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記輸送することがトランスサイトーシスを更に含む、項目 6 8 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記トランスサイトーシスが小胞性トランスサイトーシスである、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 1)

前記トランスサイトーシスが T f R 媒介性である、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記輸送することが、前記組成物の前記 T f R からの解離を更に含む、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記輸送することが、前記組成物から活性薬剤を放出することを更に含む、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

T f R 結合ペプチドを設計するための方法であって、

a) コンピュータープログラムを使用して、安定性及びフォールディングが最適化され

10

20

30

40

50

たペプチドをペプチドのライブラリーから特定することであって、前記ペプチドのライブラリーの各ペプチドは、少なくとも3つの分子内ジスルフィド結合を含む、前記特定することと、

b) コンピュータープログラムを使用して、ペプチド：TfR複合体の結合パッチのアミノ酸残基を重ね合わせ、前記結合パッチを前記ペプチド上にグラフトした後、TfRに結合する安定なペプチドを決定することと、

c) 前記結合パッチを前記ペプチド上にグラフトして、前記安定なペプチドを生成することを含む、

前記方法。

(項目75)

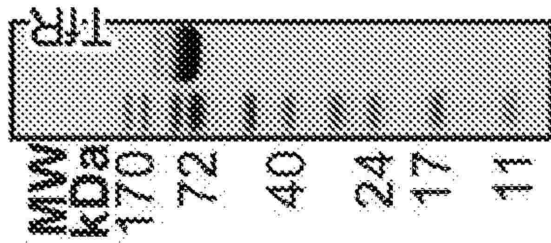
部位飽和変異導入を実施して、前記安定なペプチドよりもTfRに対する結合親和性が高い変異ペプチドを得ることを更に含む、項目74に記載の方法。

(項目76)

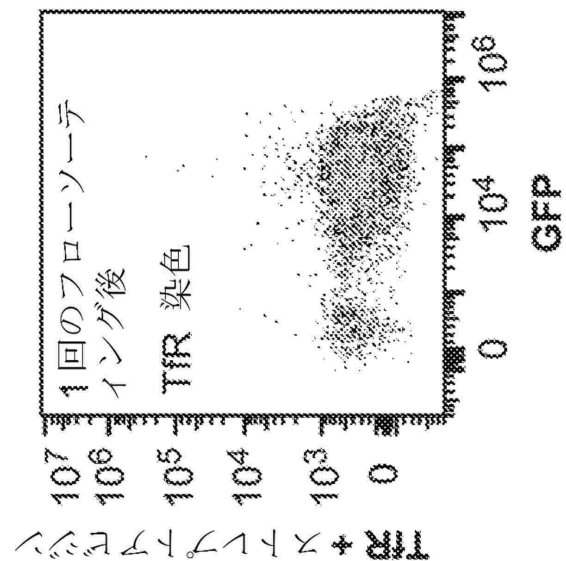
前記ペプチドのライブラリーのペプチドが、20～75アミノ酸残基長である、項目74に記載の方法。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

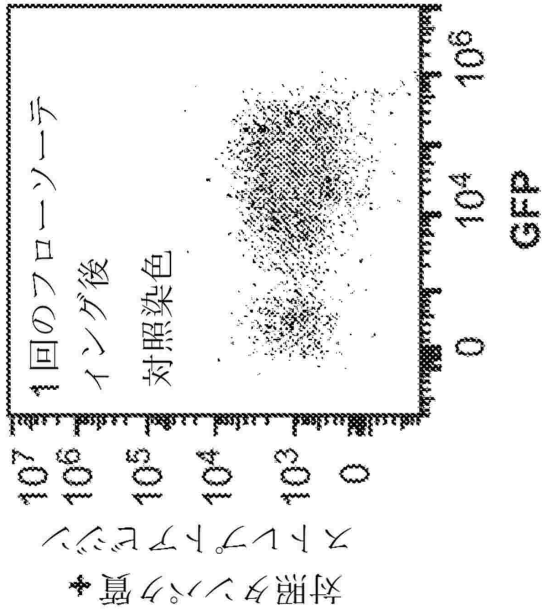
20

30

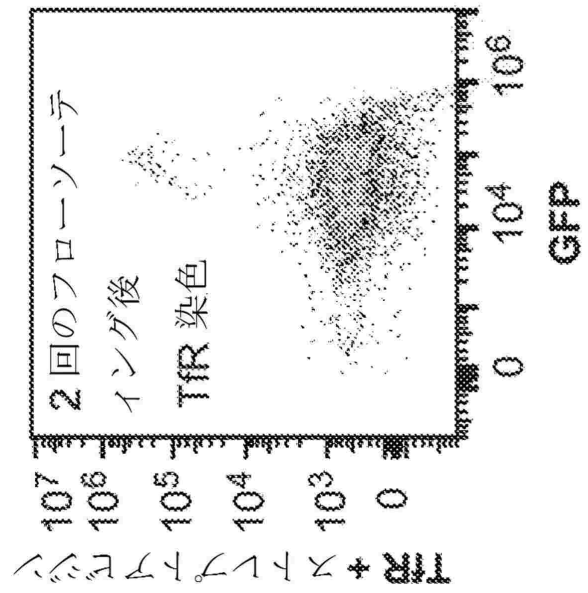
40

50

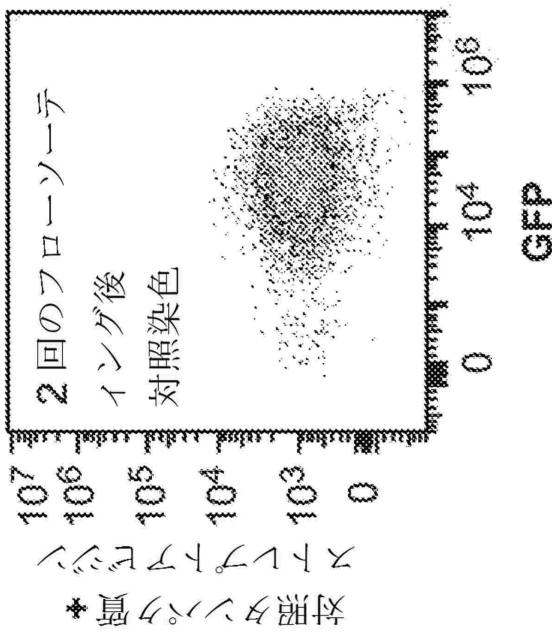
【図 1 C】



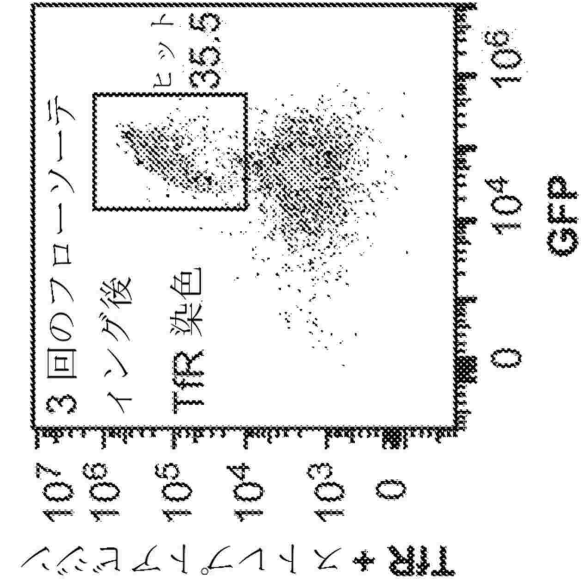
【図 1 D】



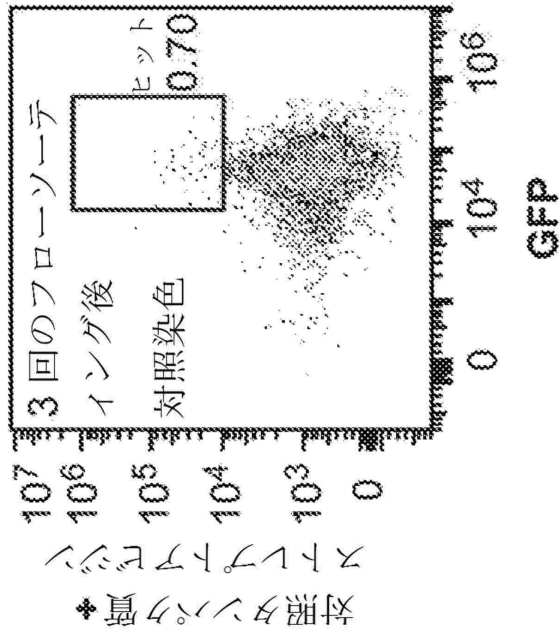
【図 1 E】



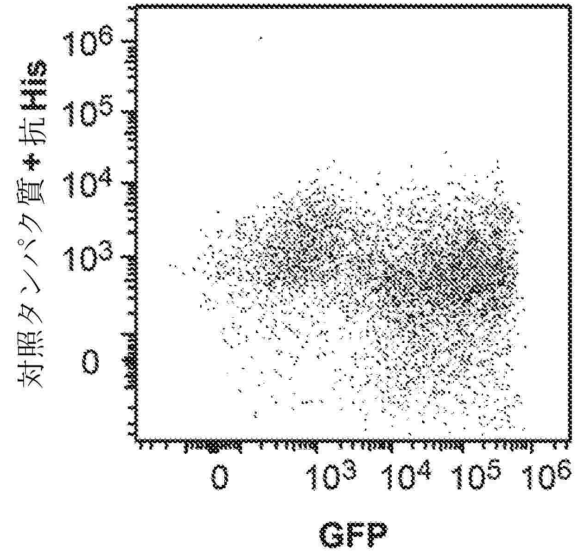
【図 1 F】



【図 1 G】

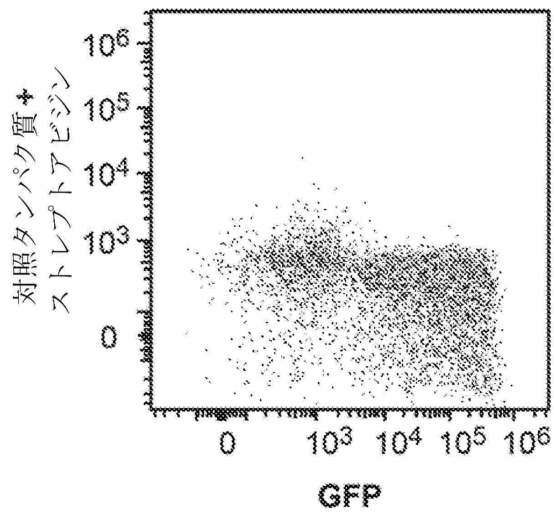


【図 2 A】

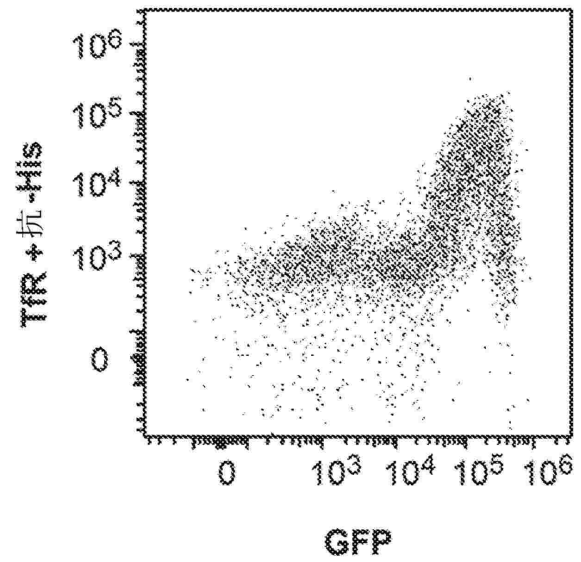


10

【図 2 B】



【図 2 C】

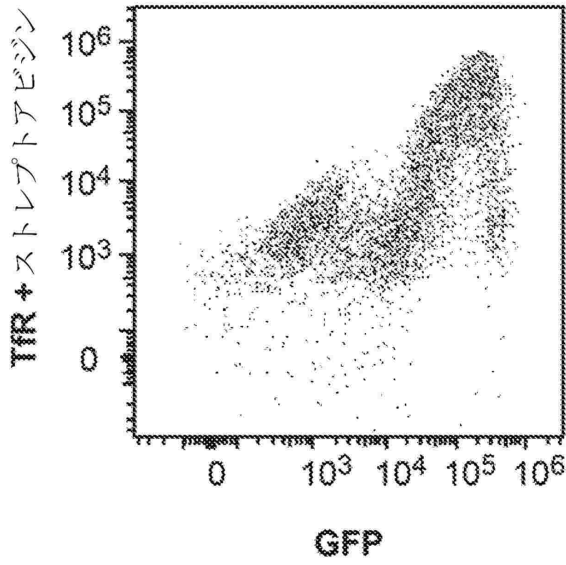


30

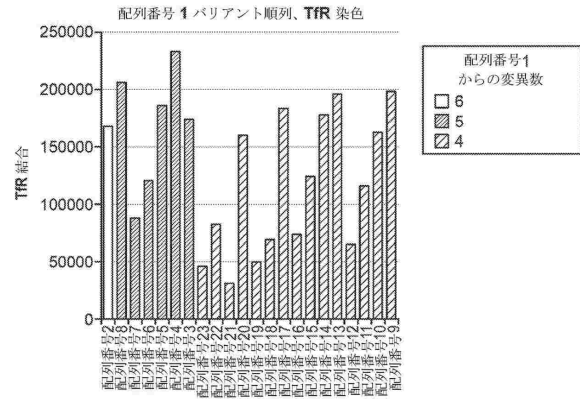
40

50

【図 2 D】

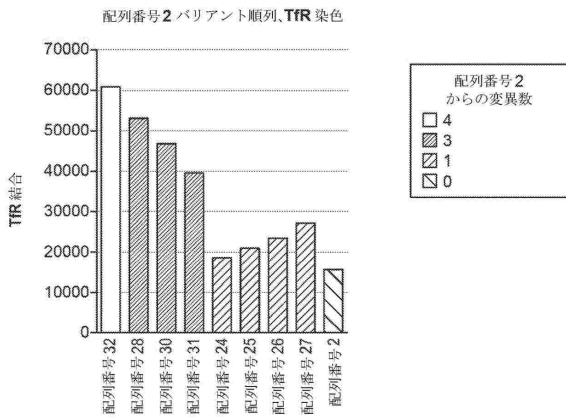


【図 3 A】

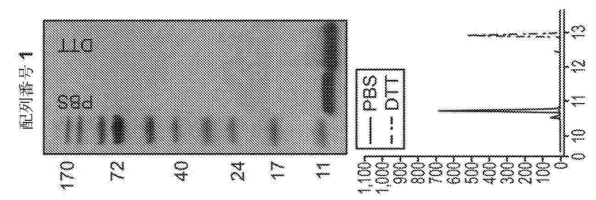


10

【図 3 B】



【図 4 A】



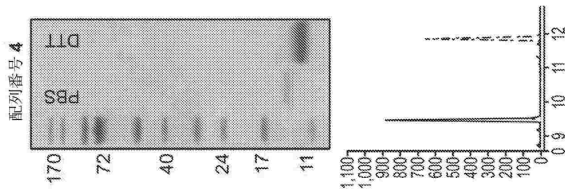
20

30

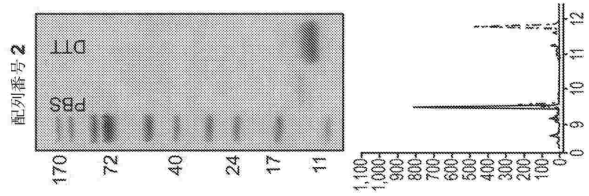
40

50

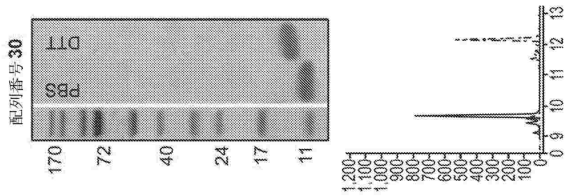
【図 4 B】



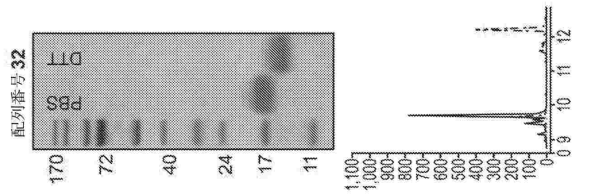
【図 4 C】



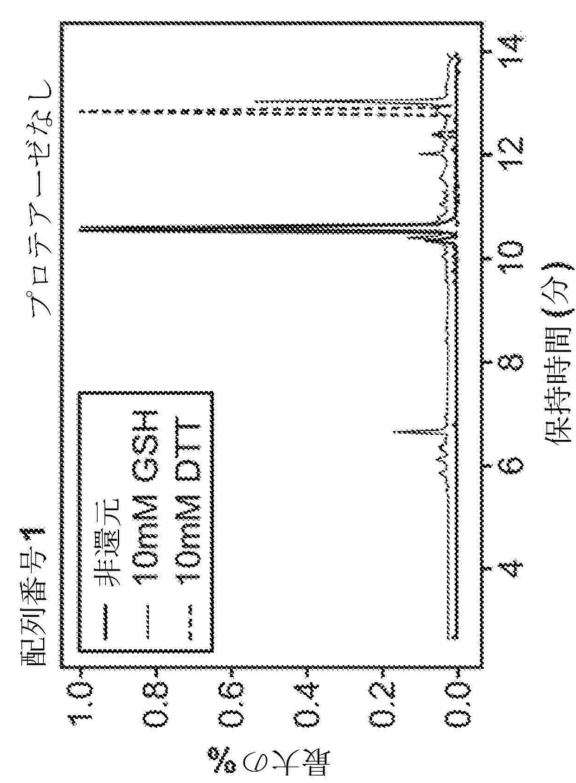
【図 4 D】



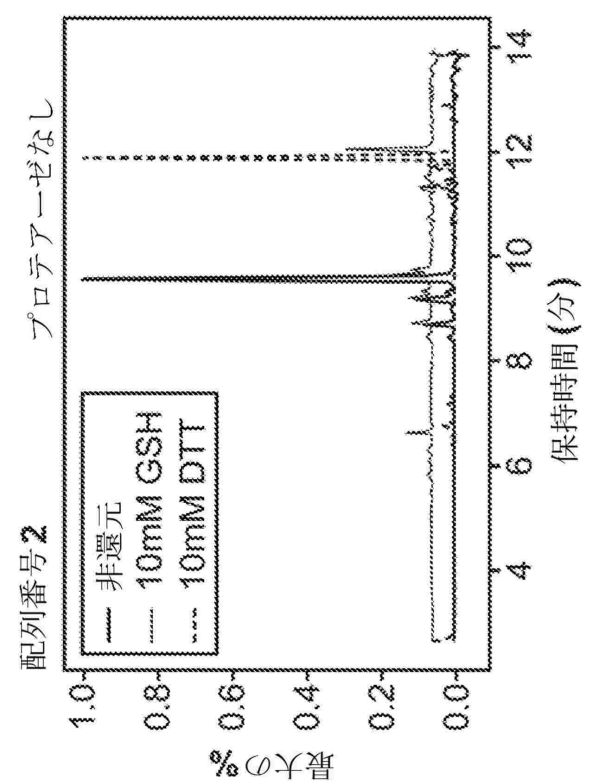
【図 4 E】



【図 5 A】



【図 5 B】



10

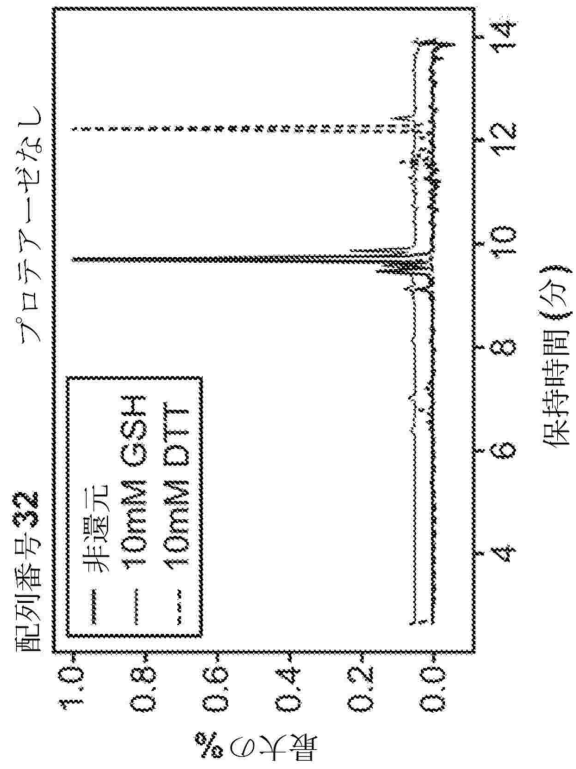
20

30

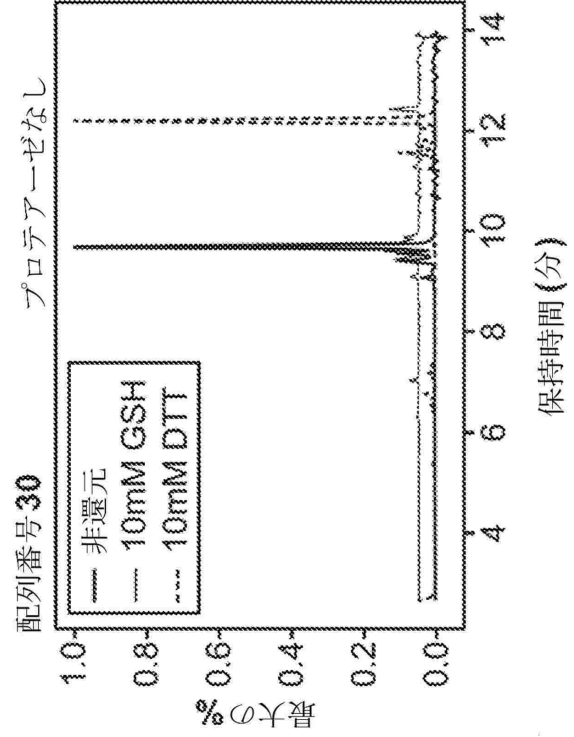
40

50

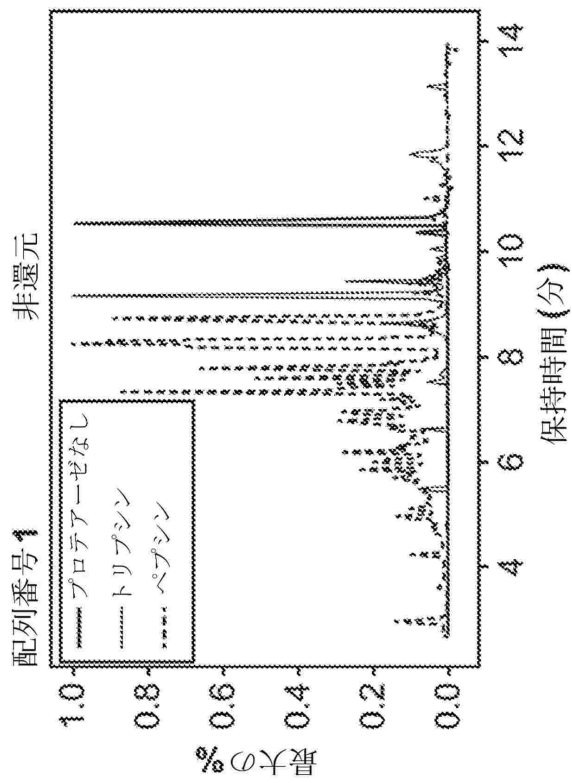
【図 5 C】



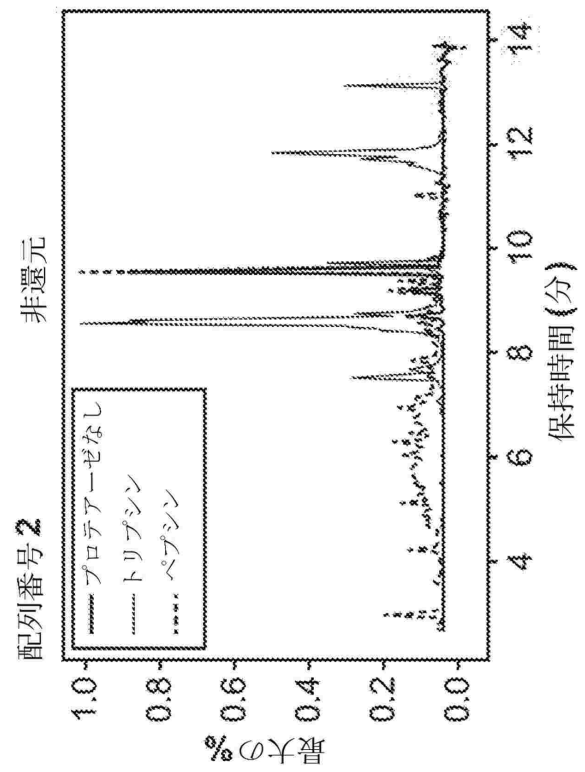
【図 5 D】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

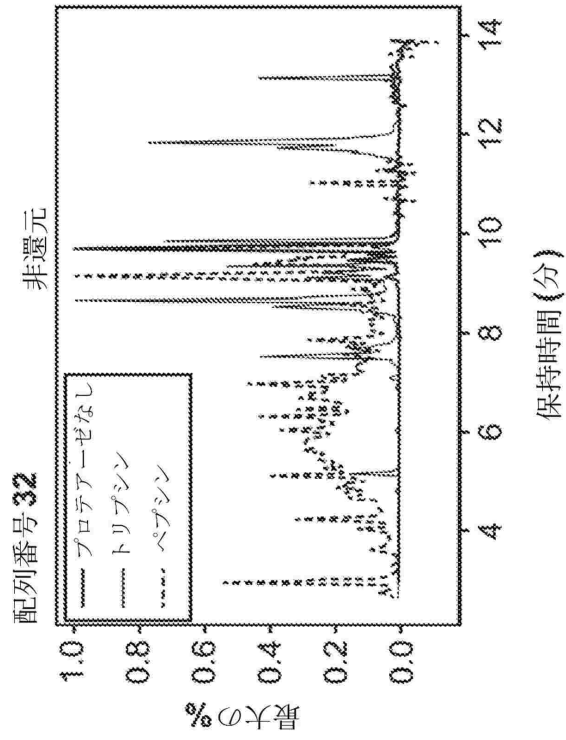
20

30

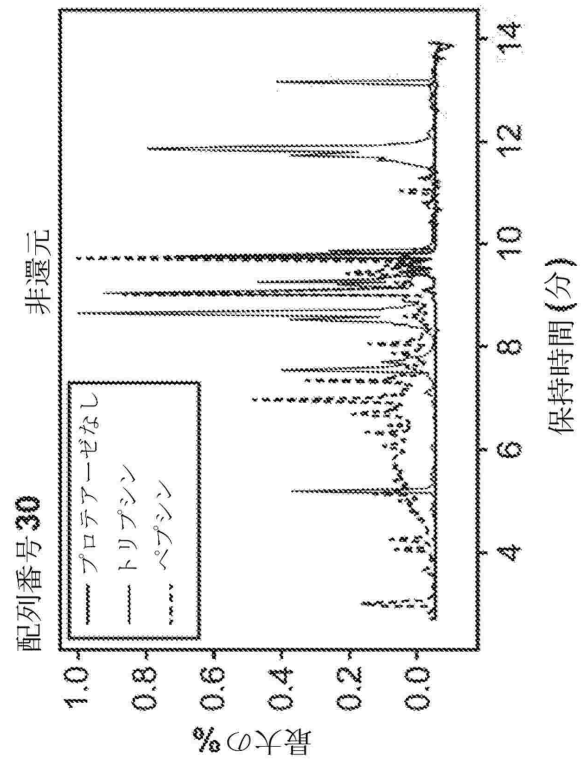
40

50

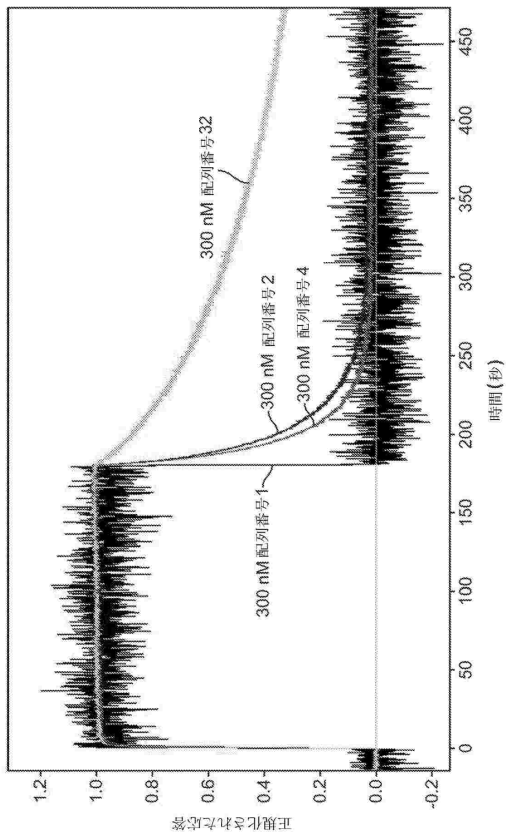
【図 6 C】



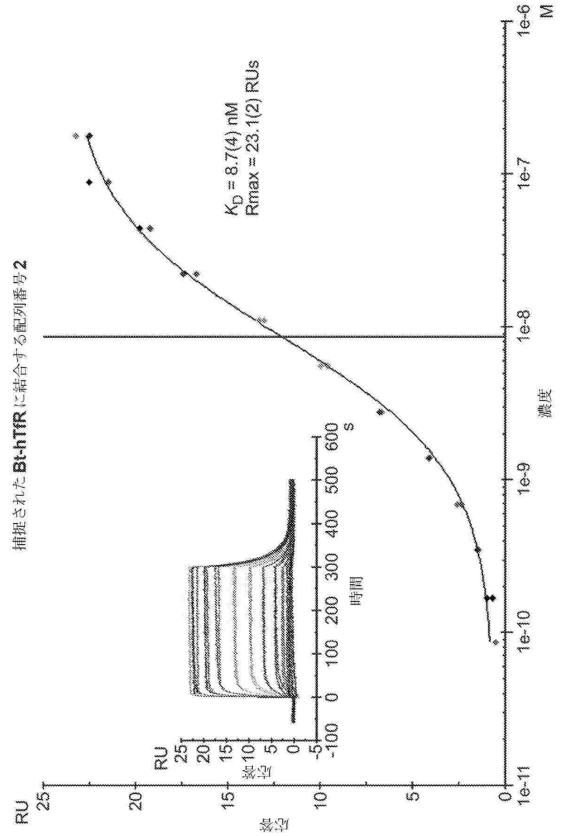
【図 6 D】



【図 7】



【図 8】



10

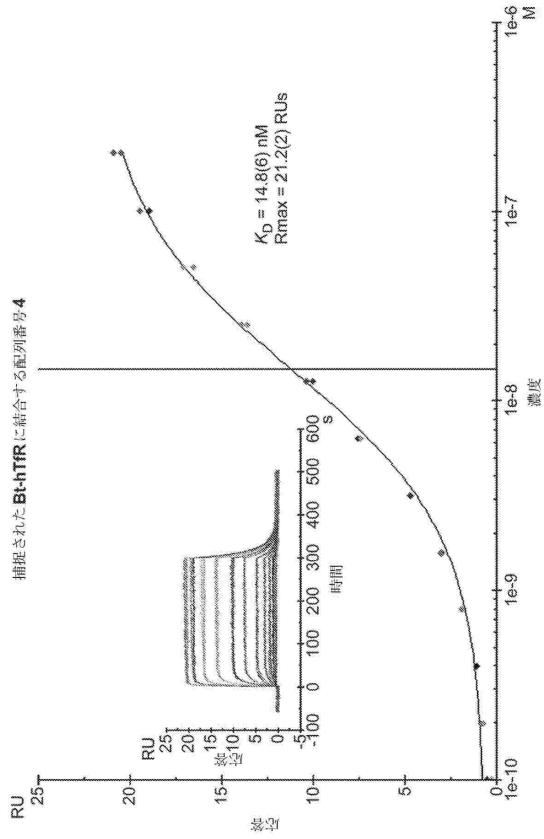
20

30

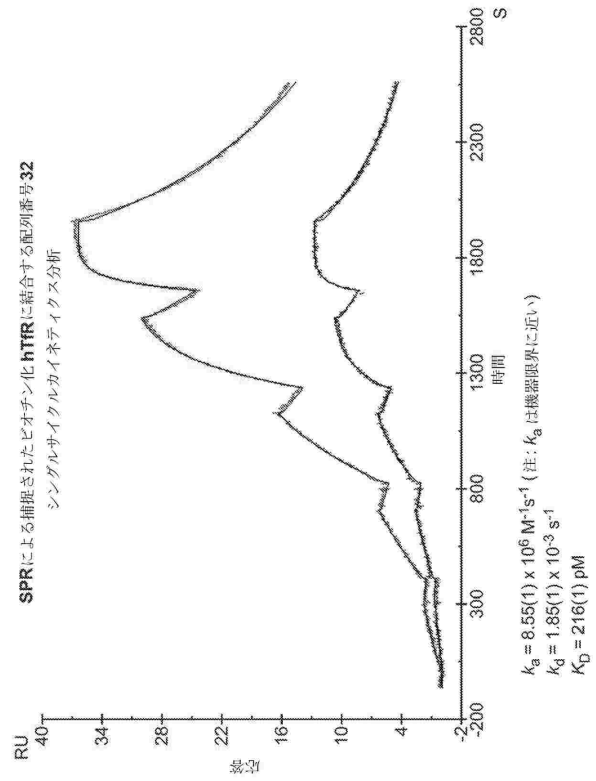
40

50

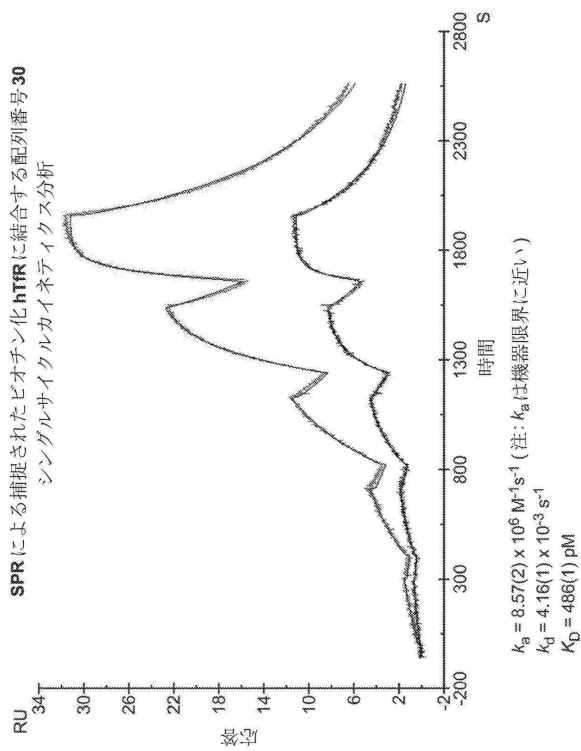
【図 9】



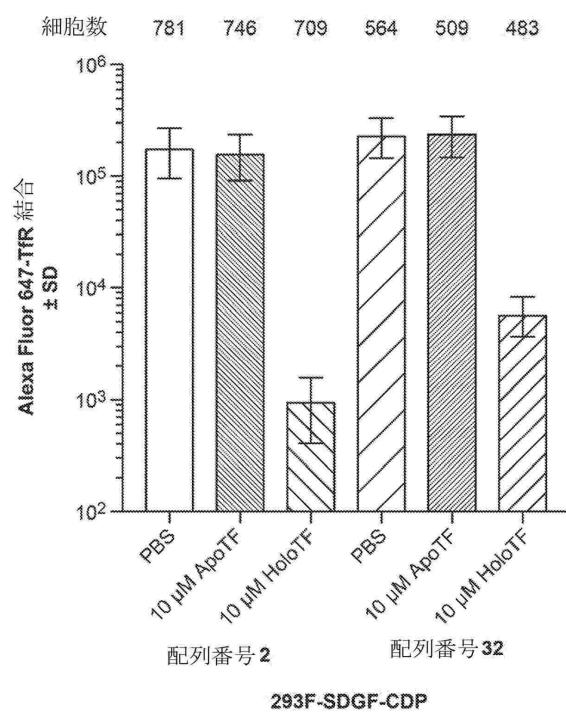
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

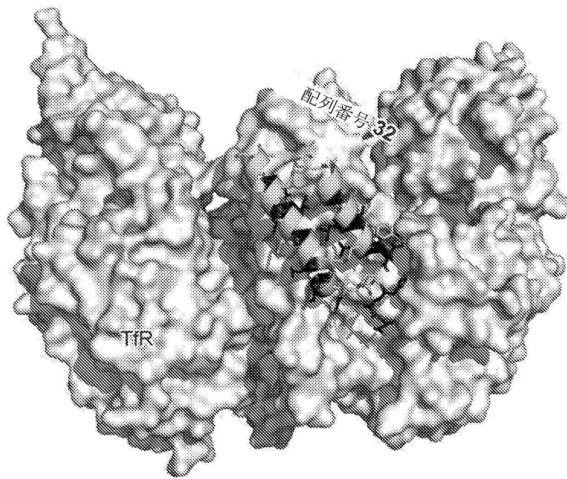
20

30

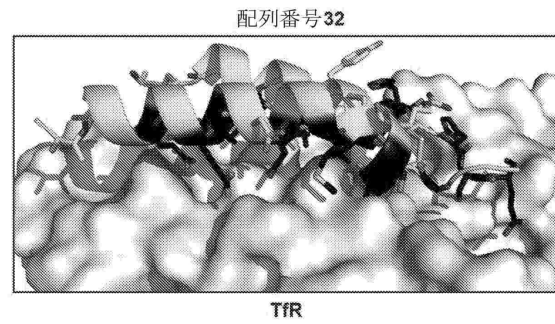
40

50

【図 13 A】

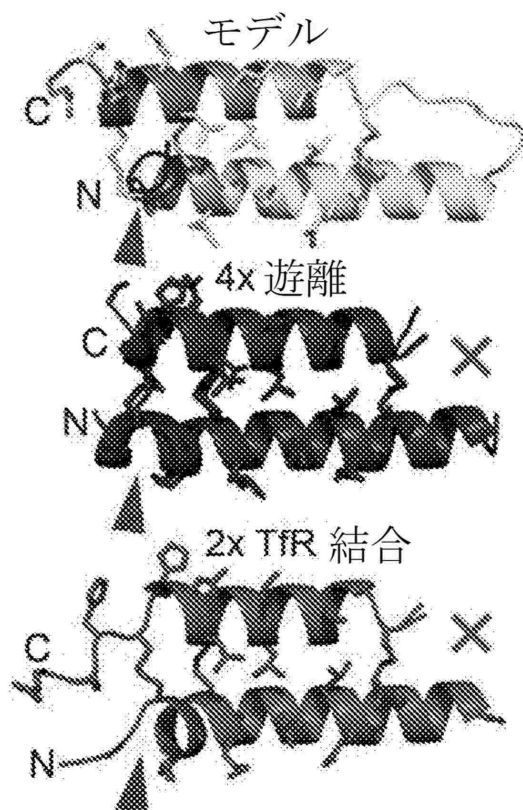


【図 13 B】

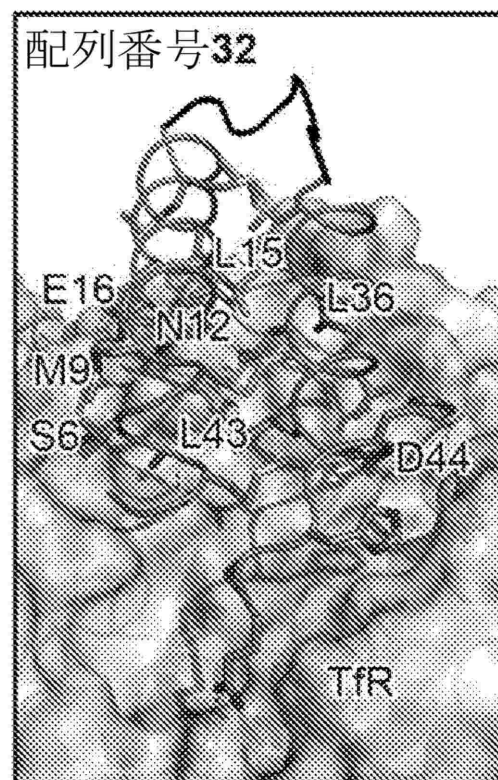


10

【図 13 C】



【図 13 D】



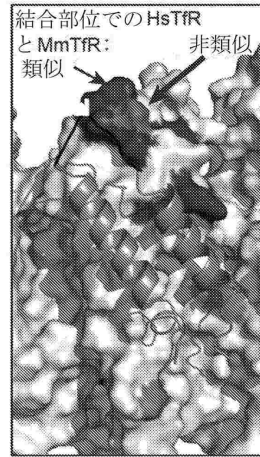
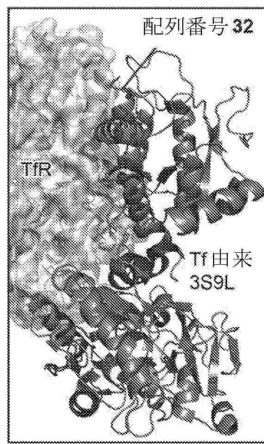
20

30

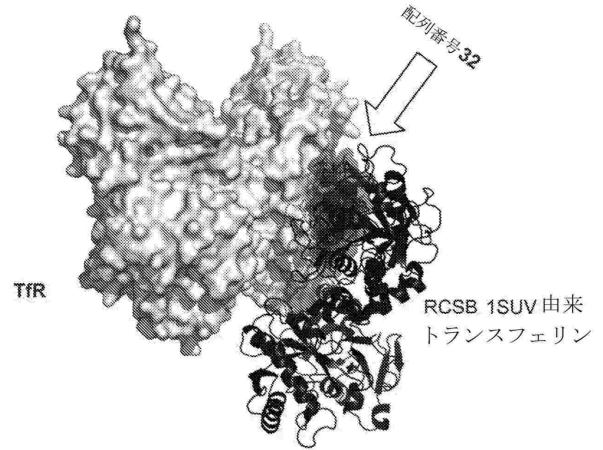
40

50

【図 1 3 E】

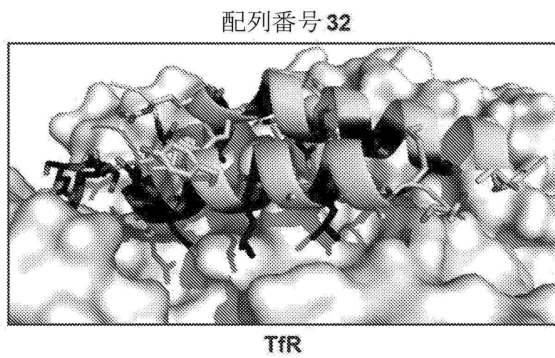


【図 1 4 A】

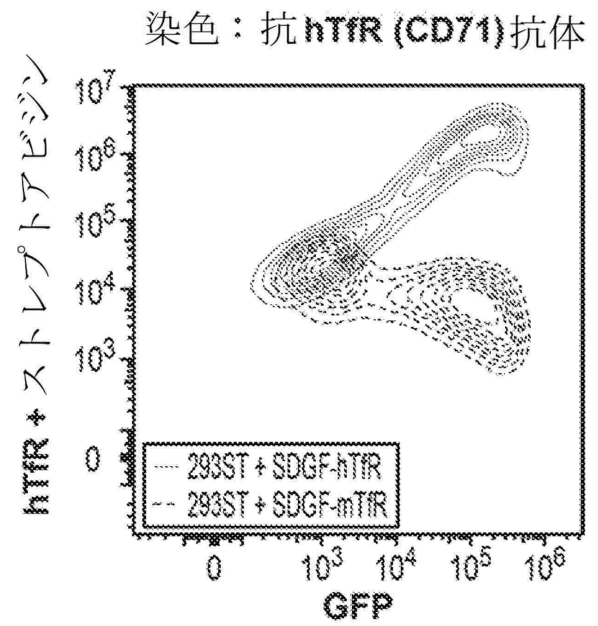


10

【図 1 4 B】



【図 1 5 A】



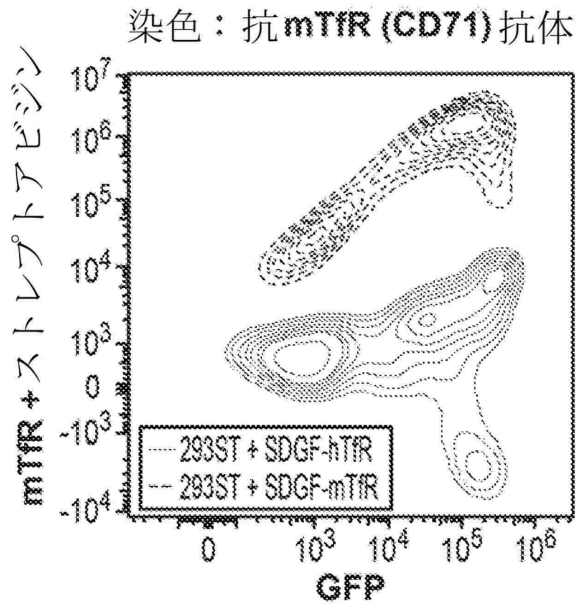
20

30

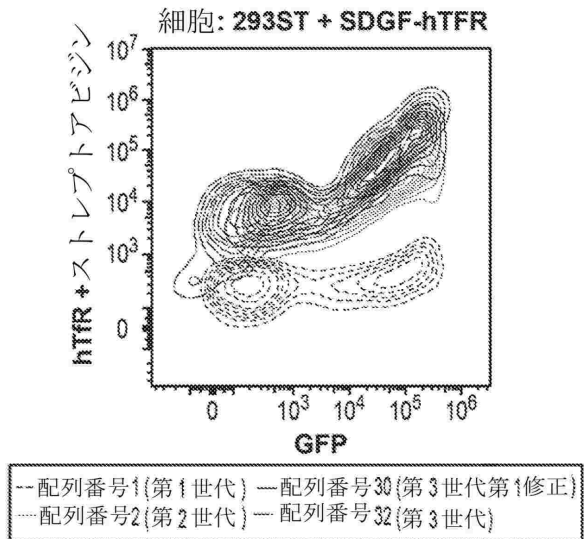
40

50

【図 1 5 B】

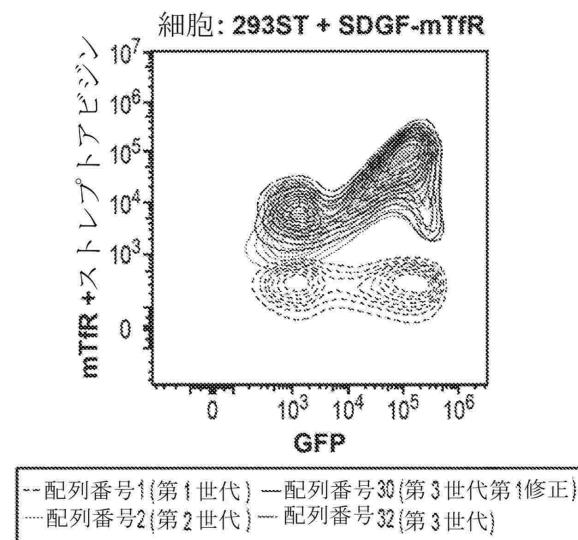


【図 1 5 C】

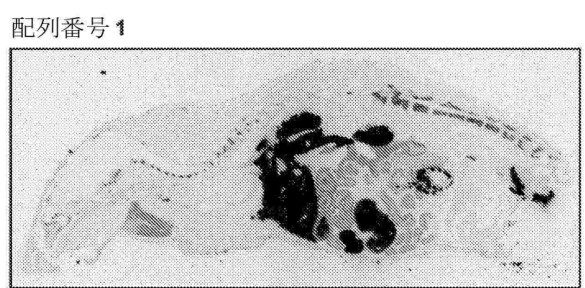


10

【図 1 5 D】



【図 1 6 A】



20

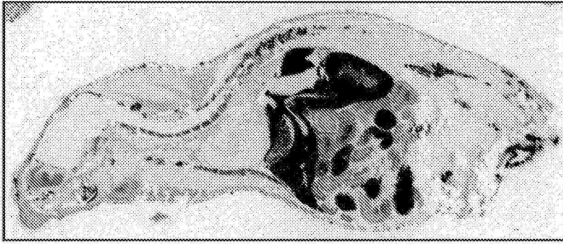
30

40

50

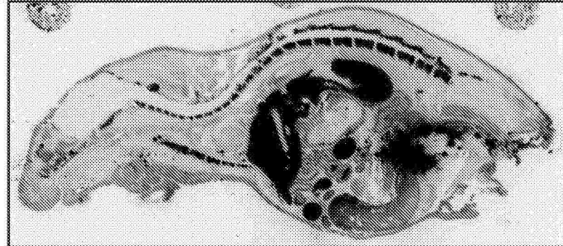
【図 1 6 B】

配列番号 2



【図 1 6 C】

配列番号 30



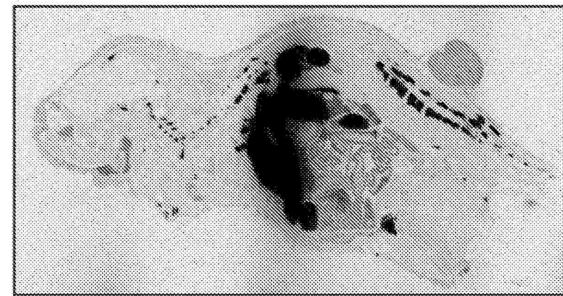
10

【図 1 6 D】

配列番号 32

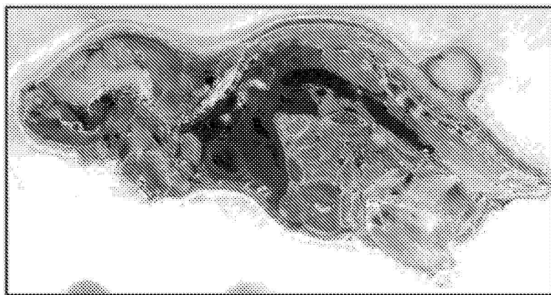


【図 1 7 A】

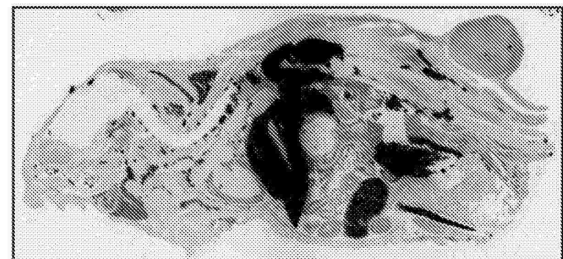


20

【図 1 7 B】



【図 1 7 C】



30

40

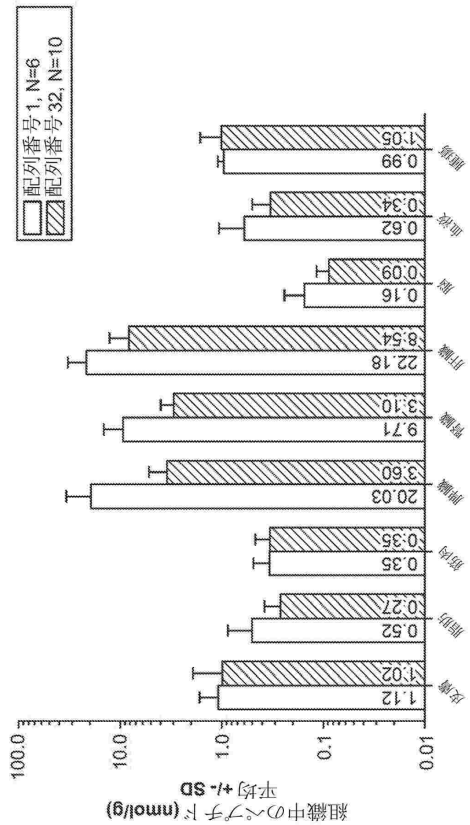
50

【図 17 D】



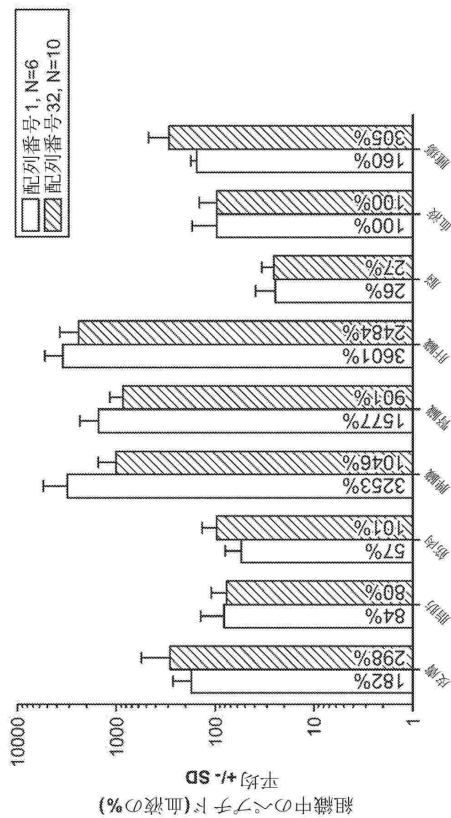
【図 18】

WBA ペプチド蓄積 (3 時間のインタクトマウス)

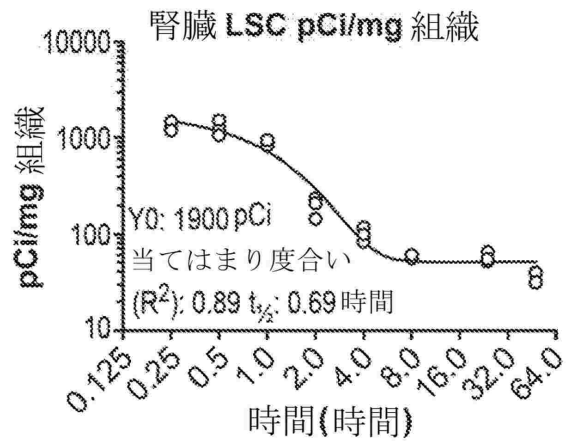


【図 19】

WBA ペプチド蓄積 (3 時間のインタクトマウス)



【図 20 A】



10

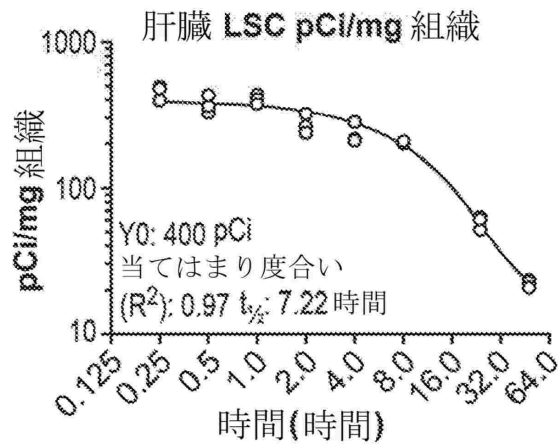
20

30

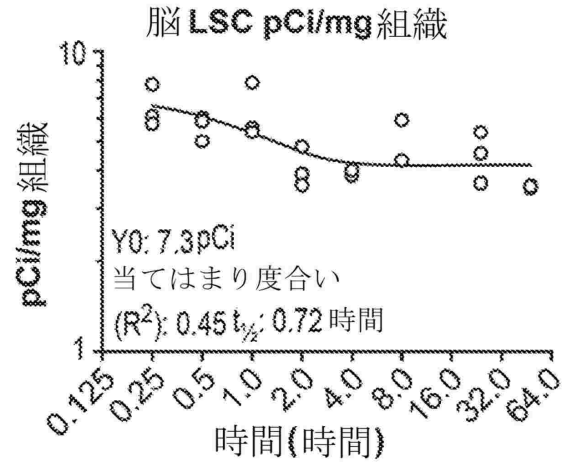
40

50

【図 20 B】

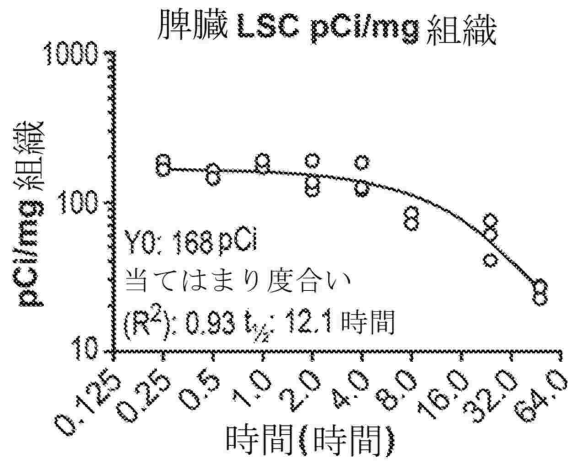


【図 20 C】

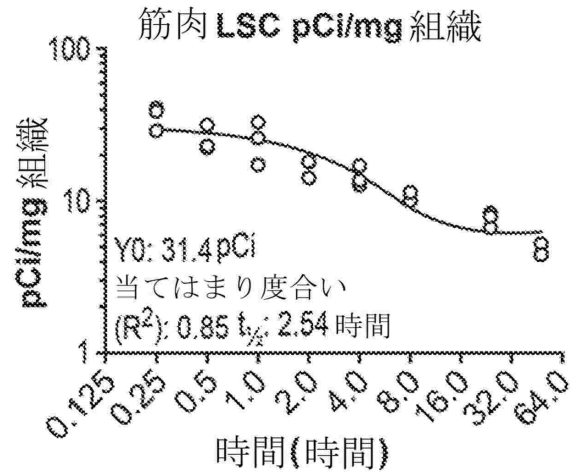


10

【図 20 D】



【図 20 E】



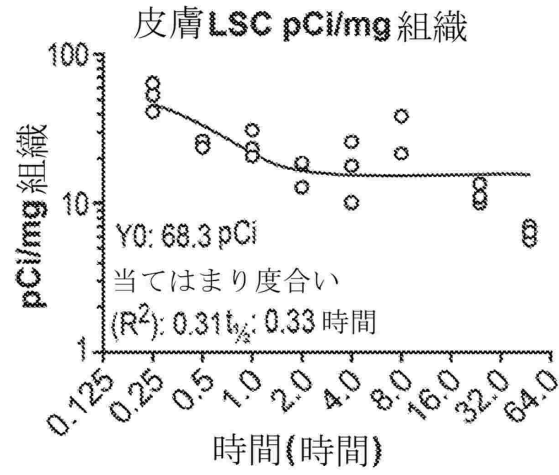
20

30

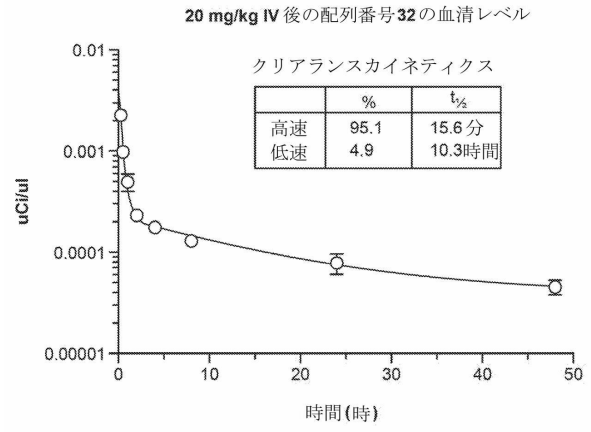
40

50

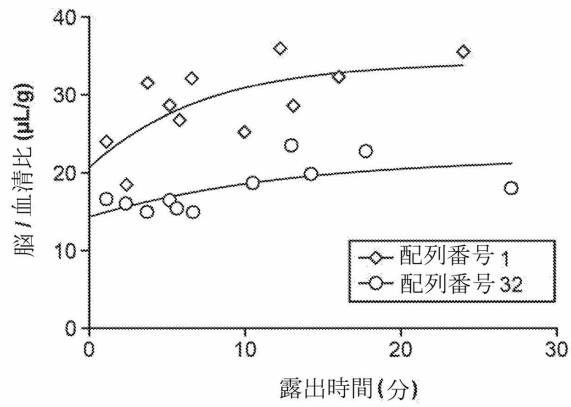
【図 2 0 F】



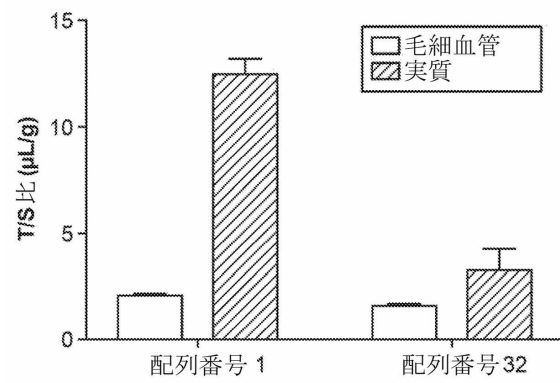
【図 2 1】



【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



10

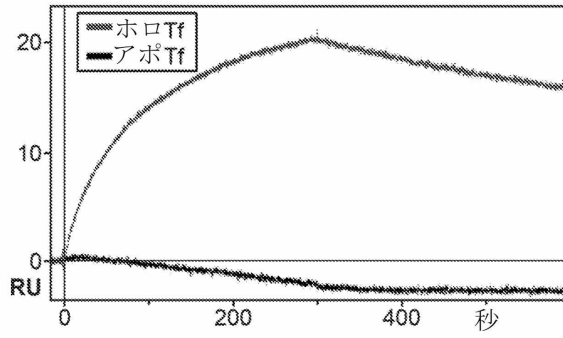
20

30

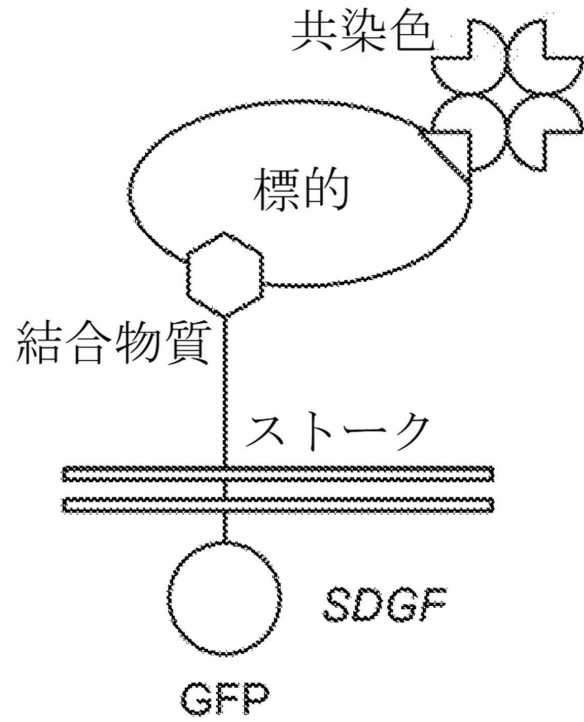
40

50

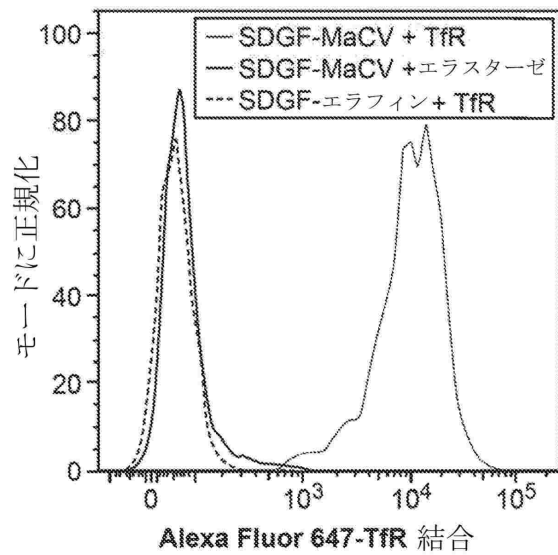
【図 2 3 A】



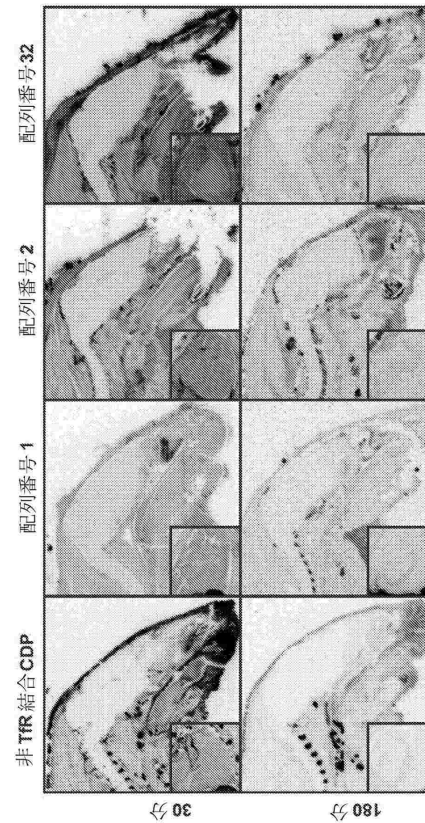
【図 2 3 B】



【図 2 3 C】



【図 2 4】



10

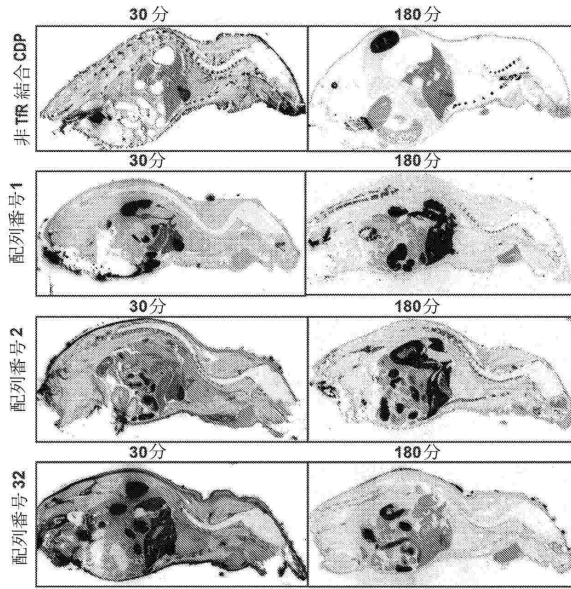
20

30

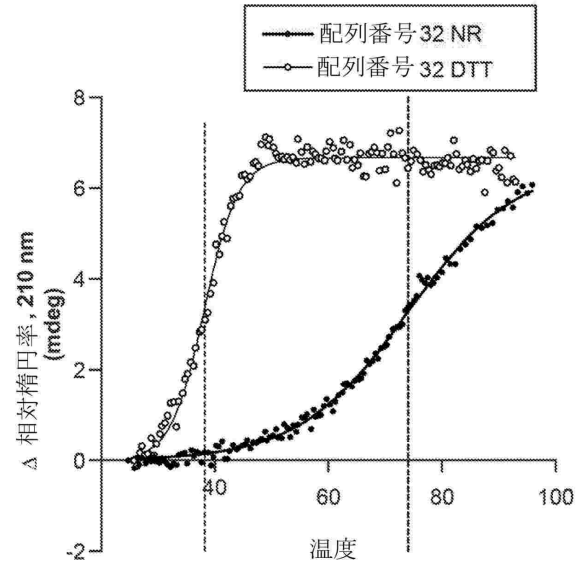
40

50

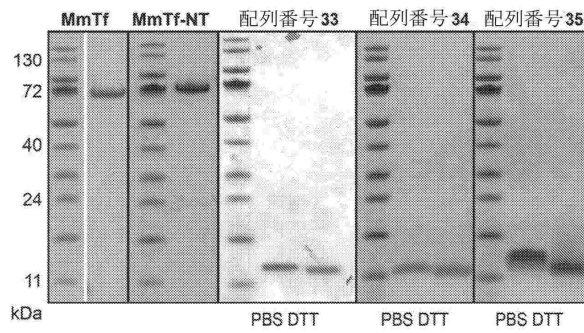
【図 2 5】



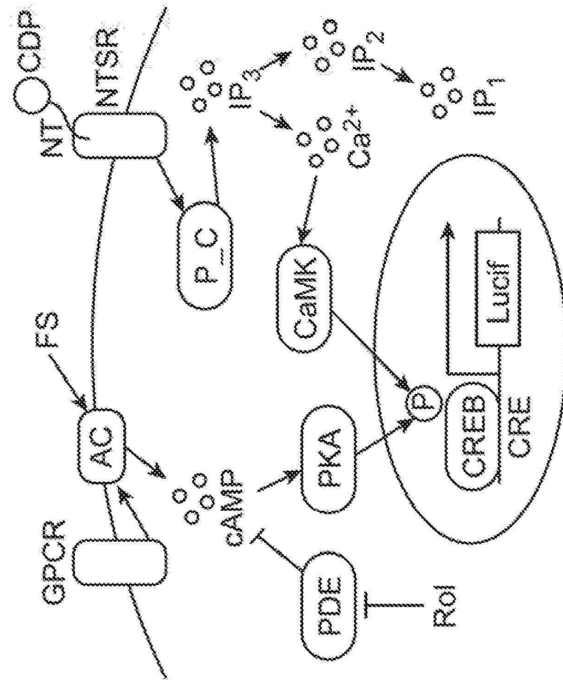
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8 A】



10

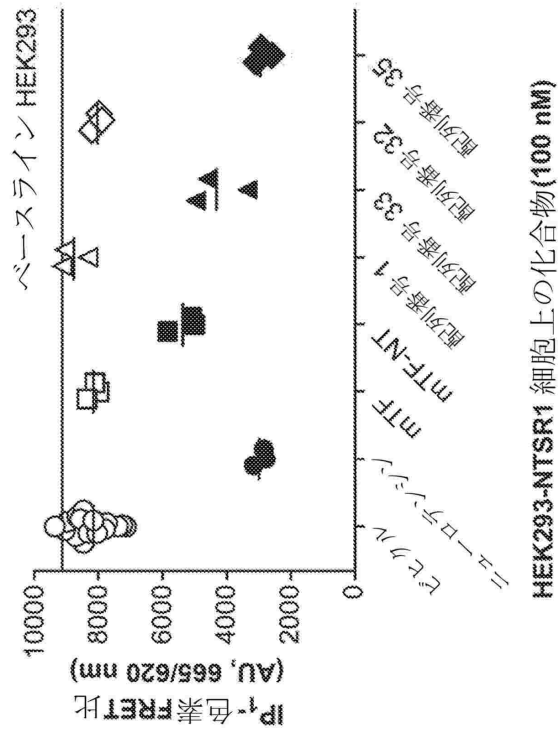
20

30

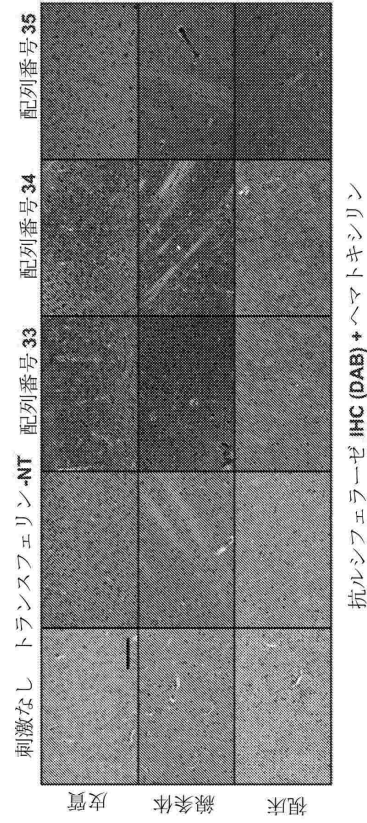
40

50

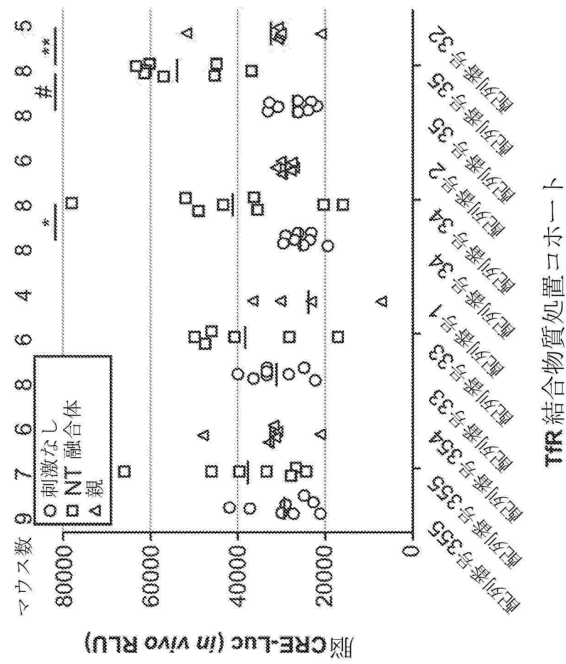
【図 28 B】



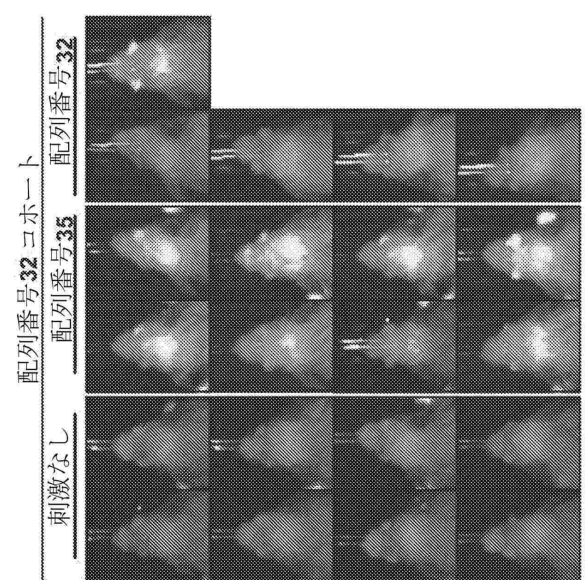
【図 29】



【図 30 A】



【図 30 B】



10

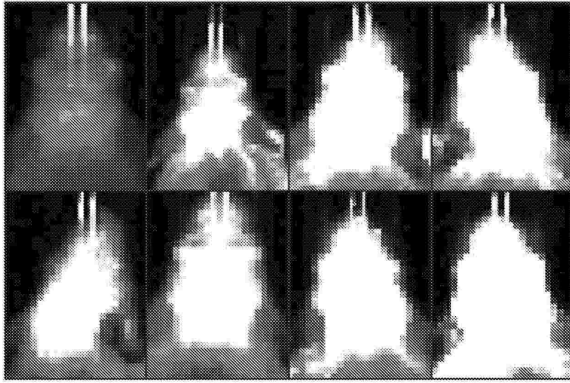
20

30

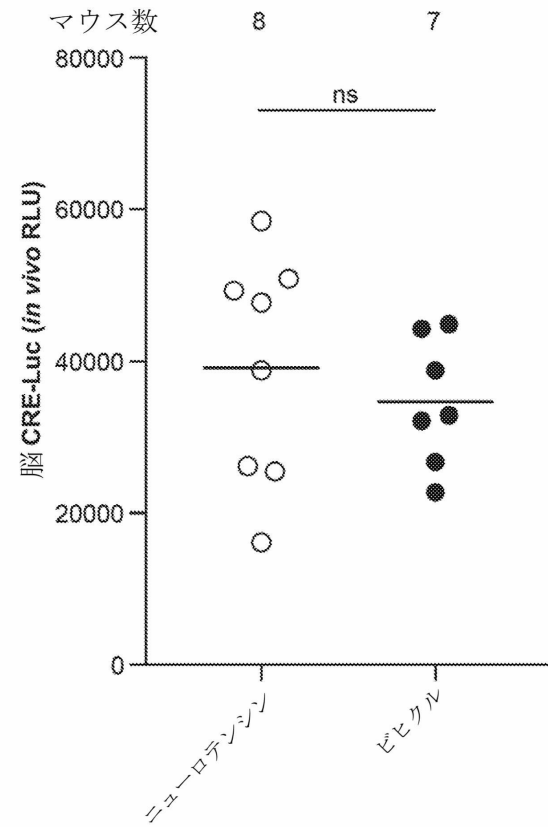
40

50

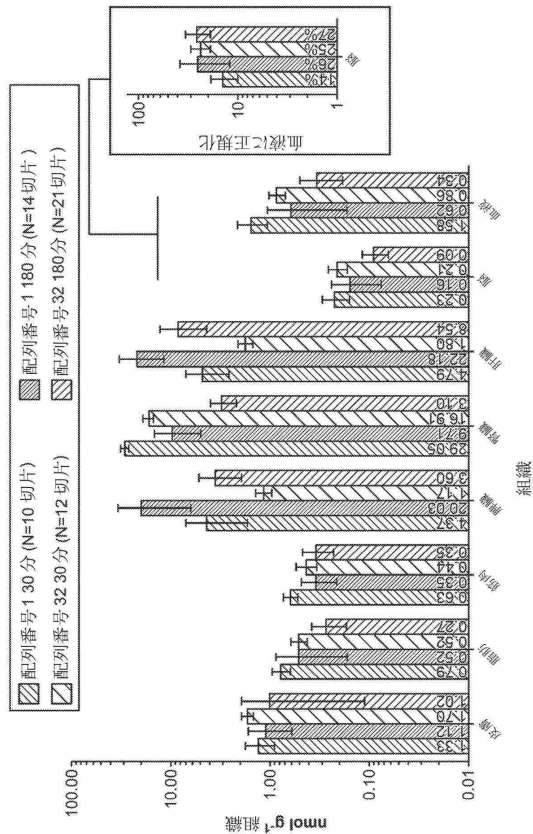
【図 3 1】



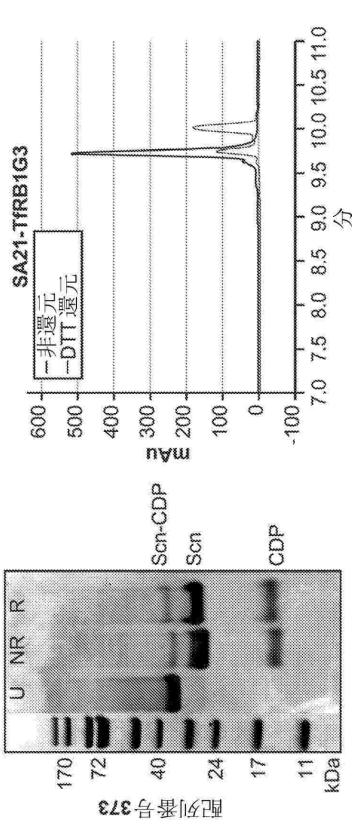
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4 A】



10

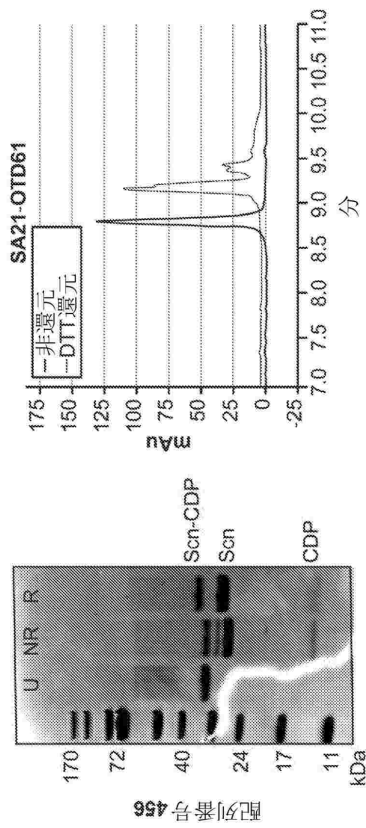
20

30

40

50

【図 3 4 B】



【配列表】

0007664158000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/58	(2017.01)	A 6 1 K	47/58	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 K	49/04	(2006.01)	A 6 1 K	49/04	
A 6 1 K	51/08	(2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	29/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	31/192	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	31/549	(2006.01)	A 6 1 K	38/10	
C 0 7 K	14/16	(2006.01)	A 6 1 K	31/192	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/549	
A 6 1 K	33/243	(2019.01)	C 0 7 K	14/16	
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K	33/243	
A 6 1 K	31/7048	(2006.01)	A 6 1 K	31/519	
			A 6 1 K	31/337	
			A 6 1 K	31/7048	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

弁護士 山本 健策

(72)発明者 クルック, ザッカリー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 ブルスニアック, ミーヨン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 オルソン, ジェイムズ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 マイア, アンドリュー ジェイムズ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 イン, チュンフェン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 ホッピング, ジーン グレゴリー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

(72)発明者 ストロング, ローランド

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 9, シアトル, フェアビュー アベニュー ノース 1 1 0 0

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 国際公開第2018/031424 (WO, A1)

国際公開第2016/077840 (WO, A1)

米国特許出願公開第2004/0157330 (US, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 9/00-9/72
A61K 47/00-47/69
C07K 1/00-19/00
A61K 38/00-38/58
A61K 39/00-39/44
A61K 45/00-45/08
A61K 49/00-51/12
A61P 1/00-43/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq