

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-533372  
(P2015-533372A)

(43) 公表日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C07K 11/00 (2006.01)	C07K 11/00	Z N A	4 B 0 2 4
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47		4 B 0 6 4
C12P 21/00 (2006.01)	C12P 21/00	C	4 C 0 7 6
A61P 31/00 (2006.01)	A61P 31/00		4 C 0 8 4
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00		4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 83 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-537303 (P2015-537303)	(71) 出願人	513170832 コンブリクス エン ヴェー
(86) (22) 出願日	平成25年10月22日 (2013.10.22)		ベルギー国 ベー-3590 ディーペン
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月17日 (2015.6.17)		ペーク ビオヴィレ アゴララーン ビル
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/072050		ディング アービス
(87) 國際公開番号	W02014/064092	(74) 代理人	110000280 特許業務法人サンクレスト国際特許事務所
(87) 國際公開日	平成26年5月1日 (2014.5.1)	(72) 発明者	ラブリクス ステファン ベルギー国 ベー-1740 テルナト
(31) 優先権主張番号	12189485.1		アウグスト デ ファイテルストラート 11
(32) 優先日	平成24年10月22日 (2012.10.22)	(72) 発明者	アーロード フィリップ ベルギー国 ベー-9820 メレルベー
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ケ ラント ファン ローデラーン 12
(31) 優先権主張番号	61/716,783		
(32) 優先日	平成24年10月22日 (2012.10.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞インターナリゼーション可能なポリペプチド

## (57) 【要約】

細胞膜を通過し、細胞内環境に侵入することができるポリペプチドであって、予防用途、治療用途または診断用途ならびにスクリーニングおよび検出に使用するのに適切なポリペプチドが本明細書において提供される。かかるポリペプチドをコードする核酸；かかるポリペプチドの調製方法、かかるポリペプチドを発現するかまたはかかるポリペプチドを発現することができる宿主細胞、特に予防目的、治療目的または診断目的のための、かかるポリペプチドを含有する組成物、特に医薬組成物も提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列と、細胞内へのポリペプチドのインターナリゼーションを確保する少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域とを含有するポリペプチドであって、前記インターナリゼーション領域が、2 個の正荷電アミノ酸残基間に及んでおり、16 個以下のアミノ酸残基の断片からなり、かつ少なくとも 50 % が前記アルファボディー構造配列内に含まれる少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とする、ポリペプチド。

**【請求項 2】**

前記インターナリゼーション領域が、  
(i) 少なくとも 4 個のアルギニン残基、または  
(ii) 少なくとも 5 個のリジン残基  
を含有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

**【請求項 3】**

少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域が、前記アルファボディー構造配列内に全体的に含まれる、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

**【請求項 4】**

少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域が、前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列の 1 個の - ヘリックス内に全体的に含まれる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

20

**【請求項 5】**

前記正荷電インターナリゼーション領域が、6 ~ 12 個のアルギニン残基を含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 6】**

そのアルファボディー配列内に、Z Z X X Z X X Z Z X X Z、Z X X Z X X Z Z X X Z X X Z、Z X X Z Z X X Z X Z Z、Z X X Z X X X Z X X Z X X Z Z、Z X X X Z X X Z X X Z Z X X Z Z X X Z X X Z Z X X Z Z、Z X X Z Z X X Z X X Z Z、Z X X Z X X Z Z X X Z Z、Z X X Z Z X X Z X Z Z、Z X X Z Z X X Z Z X X Z Z (式中、Z は、正荷電アミノ酸を表し、X は、任意のアミノ酸残基を表す) からなる群より選ばれたモチーフを含有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

30

**【請求項 7】**

前記モチーフにおいて、前記 Z の 75 ~ 100 % がアルギニンである、請求項 6 に記載のポリペプチド。

**【請求項 8】**

そのアルファボディー配列内に、配列番号：13 ~ 32 のいずれか 1 個のモチーフを含有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

**【請求項 9】**

前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列が、細胞内標的分子に対する少なくとも 1 個の結合部位をさらに含有する、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

40

**【請求項 10】**

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 11】**

前記細胞内標的分子が関連する疾患または障害の治療方法に使用するための、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 12】**

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のポリペプチドおよび任意に、1 個以上の薬学的に許容され得る担体を含有してなる、医薬組成物。

**【請求項 13】**

イン・ビトロで細胞内タンパク質の生物学的機能を調節するための、請求項 1 ~ 9 のい

50

すれかに記載のポリペプチドの使用。

**【請求項 14】**

アルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に含まれるインターナリゼーション領域を得るように、前記アルファボディー構造配列を含有するポリペプチドを製造するステップを少なくとも含む、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

**【請求項 15】**

目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列を選択するステップをさらに含む、請求項 14 に記載の製造方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

本出願は、細胞膜を通過し、細胞内環境に侵入することができる分子であって、予防用途、治療用途または診断用途ならびにスクリーニングおよび検出に使用するのに適した分子に関する。

**【背景技術】**

**【0002】**

細胞内成分と細胞との相互作用には、かかる細胞内成分と相互作用すると予想される作用物質 (agent) が細胞膜を通過することが必要である。しかしながら、かかる作用物質は、しばしば、細胞膜を通過するための生物学的および物理化学的特性、例えば疎水性、溶解性、電荷およびサイズなどの必要なバランスを欠く。

**【0003】**

多くの疾患では、低分子薬物（すなわち、100 個未満の原子を含む化合物）を発見および／または開発することは非常に困難であるため、治療分野では、高分子（例えば、ポリペプチドおよび核酸）が主に注目されている。治療剤としての高分子の使用は、小分子に対して多くの利点があり、最も重要な利点は、標的への強い結合に適した大きい安定な三次元構造を取り、それにより、低分子を使用することでは対処が困難な天然のタンパク質・タンパク質インターフェイスまたはタンパク質・核酸インターフェイスを妨げることを可能とする能力である。また、高分子の安定性、サイズおよび複雑性は、低分子を使用することでは容易に達成することができない特異性をもたらすことができる。

**【0004】**

しかしながら、高分子自体が細胞内に拡散することができないというのが大きな問題であり、そのため、目的の疾患標的の大部分が細胞内に位置するが、大部分の高分子治療薬は、細胞外標的に対処することしかできない。したがって、長年にわたって、エレクトロポレーション、超音波媒介プラスミド送達、ウイルス送達、噴霧および直接的な化学修飾などの高分子の様々な細胞内送達法が開発してきた。他の戦略は、高分子を、リピドイド、リポソーム、デンドリマー、カチオン性ポリマー、無機ナノ粒子、カーボンナノチューブ、細胞透過性ペプチド、小分子または受容体リガンドなどの非ウイルス送達ビヒクルと結合させる。

**【0005】**

哺乳動物細胞への高分子送達のために、ベクターまたは担体として過荷電タンパク質を使用することが報告されている（ローレンス・エム・エス（Lawrence, M. S.）ら、2007, J. Am. Chem. Soc. 129, (33), 10110-10112; クロニカン（Cronican）ら、2010 ACS CHEMICAL BIOLOGY; マクノートン（McNaughton）ら、2009 PNAS）。

**【0006】**

これらの戦略は、インターナリゼーションを促進し得るが、それらの適用は限定されている。例えば、これら的方法は、エフェクターをリソソームに蓄積させ、最終的にはエフェクター化合物の分解および不活性化をもたらす細胞インターナリゼーション機構を利用する。

**【発明の概要】**

10

20

30

40

50

## 【0007】

細胞膜を透過することができ、細胞内環境で極めて安定である、代替的な改善されたポリペプチドが提供される。これは、細胞内標的をターゲティングするエフェクター機能を確実に細胞に導入することができる細胞内作用物質としてそれらの使用を可能にする。

## 【0008】

特定の実施形態においては、エフェクター機能は、ポリペプチドそれ自体に組み込まれ、すなわち、これらの場合において、ポリペプチドは、細胞に侵入することができるだけではなく、細胞内の細胞内標的分子に特異的に結合して、その細胞内標的分子が役割を果たす生物学的機構および／またはシグナル伝達経路を効率的に阻害することもできるか、または少なくとも調節することもできる。

10

## 【0009】

本明細書において提供される少なくとも1個のアルファボディー構造配列を含有するポリペプチドは、前記アルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に含まれる少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域の存在を介して、細胞の内部に取り入れられることができる。本明細書において使用される正荷電インターナリゼーション領域は、典型的には、本明細書において想定されるポリペプチドの2個の正荷電アミノ酸残基間に及んでおり、これらのポリペプチドに含まれるアルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に含まれる。

## 【0010】

特定の実施形態においては、少なくとも1個のアルファボディー構造配列と、細胞内への前記ポリペプチドのインターナリゼーションを確保する少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域とを含有するポリペプチドであって、前記インターナリゼーション領域が、2個の正荷電アミノ酸残基間に及んでおり、16個以下のアミノ酸残基の断片からなり、かつ少なくとも50%が前記アルファボディー構造配列内に含まれる少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とするポリペプチドが本明細書において提供される。したがって、本明細書において提供されるポリペプチドは、正荷電アミノ酸残基で始まって正荷電アミノ酸残基で終わり、ポリペプチドが細胞に確実に侵入することができるようになる正荷電配列を含有する。特に、本明細書において想定されるポリペプチドは、ポリペプチドが細胞膜を確実に通過することができるようになるか、または細胞内輸送を増強、刺激もしくは誘発する正荷電配列を含有する。本明細書において提供されるポリペプチドは、アルファボディー配列を含有する公知のポリペプチドと比較して改変された構造を得ることにより、細胞内へのポリペプチドのインターナリゼーションを可能にするように特別に設計されたものである。

20

## 【0011】

特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド中に存在するアルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に位置する少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基、例えばアルギニンおよびリジンからなる群より選ばれた少なくとも6個のアミノ酸残基の存在を特徴とする。さらに特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド中の少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、その少なくとも4個の残基がアルギニンである少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とする。さらに特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド中の少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、その少なくとも5個の残基がリジンである少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とする。

30

## 【0012】

本明細書において想定されるポリペプチドの特定の実施形態においては、前記正荷電インターナリゼーション領域は、6～12個のアルギニン残基を含有する。

40

## 【0013】

特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、そのアルファボディー配列内に、ZZXXZXXZXXZ、ZXZXZXXZXXZ、ZX

50

X Z Z X X Z X X Z Z、Z X X Z X X Z X X X Z X X Z Z、Z X X X Z X X X Z X X Z  
 Z X X Z、Z X X Z Z X X Z X Z Z、Z Z X X Z X X X Z X X Z Z、Z X X Z X X X Z  
 X X Z Z X X Z、Z X X X Z X X Z Z X X Z Z、Z X X Z Z X X Z Z X Z、Z Z X X Z Z  
 X Z Z、Z Z X X X X Z Z X X X X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表し、Xは  
 、任意のアミノ酸残基を表す)からなる群より選ばれたモチーフを含有する。特定の実施  
 形態においては、前記モチーフ中の前記Zの75~100%は、アルギニンである。さらに特定の実施形態においては、ポリペプチドは、アルファボディー構造に対応する配列内に、配列番号：13~32から選ばれた配列を含有する。

## 【0014】

特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、  
 (i) 前記アルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に含まれる本明細書において  
 記載される少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域の存在を介して、細胞の  
 内部に取り入れられることができ、加えて、  
 (ii) アルファボディー構造配列上に存在する結合部位を主に介して、細胞内標的分子  
 に特異的に結合する少なくとも1個のアルファボディー構造配列を含有する。

## 【0015】

これらの特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、アルファボディー構造配列のB-ヘリックス上に存在する結合部位を主に介して、細胞内標的分子に特異的に結合する。

## 【0016】

ある特定の実施形態においては、アルファボディー構造を含有するポリペプチドであって、細胞内標的に結合することができ、前記ポリペプチド中に存在するアルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に位置する1個以上の正荷電インターナリゼーション領域の存在を特徴とし、当該インターナリゼーション領域が、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とする16個以下のアミノ酸残基のストレッチからなるポリペプチドが提供される。

## 【0017】

本明細書において提供されるポリペプチドのさらに特定の実施形態においては、少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域に含まれるアミノ酸残基の少なくとも80%は、1個のアルファボディー構造配列内に全体的に(fu1ly)に含まれる；またさらに特定の実施形態においては、少なくとも1個のインターナリゼーション領域は、前記少なくとも1個のアルファボディー構造配列内に完全に(entiirely)含まれる(例えば、前記少なくとも1個のアルファボディー構造配列の1個のA-ヘリックス内に(完全に(entiirely)または全体的に(fu1ly))含まれる)。さらに特定の実施形態においては、少なくとも1個のインターナリゼーション領域は、前記少なくとも1個のアルファボディー構造配列のA-ヘリックス内および/またはC-ヘリックス内に(完全にまたは全体的に)含まれる。

## 【0018】

さらに特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、配列番号：1~6、9および10から選ばれた配列を含有することを特徴とする。さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、グルタミンまたはグルタミン酸に変異させると、前記ポリペプチドの細胞取り込みをそれぞれ少なくとも50%低減させるアミノ酸残基の少なくとも30%からなる。

## 【0019】

本明細書において想定されるポリペプチドは、細胞内の細胞内標的の生物学的機能に直接的または間接的に影響を与える能力を有するので、当該ポリペプチドは、多種多様な疾患徵候において、医療用途、すなわち治療用途または予防用途に特に有用である。

## 【0020】

また、本明細書において想定される特定の実施形態のポリペプチドであって、アルファボディー構造とともに細胞内標的への結合部位も含有するポリペプチドは、2つの主な力

10

20

30

40

50

テゴリーの治療薬、すなわち、(i)低分子化学薬品および(ii)治療抗体またはタンパク質では「創薬困難」と現在考えられているタンパク質のクラスに対処する能力を有する。実際、すべての既知ヒトタンパク質標的の大部分は、低分子化学薬品または生物製剤では対処することができない。低分子化学物質は、一般的に、当該低分子化学物質の標的スペースをすべてのヒトタンパク質の約10%に限定する疎水性ポケットと相互作用する；同様に、生物製剤（すなわち、抗体のようなタンパク質ベースの治療薬）は、細胞膜を通して透過する能力を欠いているので、別の10%（細胞外タンパク質として存在するもの）に対処することができるに過ぎない。これは、すべての治療領域を通過するすべての潜在的な（主に細胞内）タンパク質標的の大部分（>80%と推定される）が、2つの主要既知クラスの治療薬では「創薬困難」と現在考えられていることを意味する。

10

#### 【0021】

多くの細胞内タンパク質は、潜在的な薬物標的、すなわち、細胞内タンパク質-タンパク質相互作用の最も興味深いクラスに属する。細胞内タンパク質-タンパク質相互作用は、多くが、癌、中枢神経系疾患または代謝疾患を引き起こすものなどの重要な疾患プロセスに関与することが知られる多種多様の基本的な細胞内プロセスを制御する。本明細書において開示されるポリペプチドは、細胞内透過能を有し、細胞内で安定なままであり、細胞内の当該ポリペプチドの標的に結合することが示される。したがって、当該ポリペプチドは、細胞内タンパク質-タンパク質相互作用を調節するための特有のツール、および広範囲の疾患に関与する多くの現在「創薬困難」な標的に対処することができる治療薬に相当する。

20

#### 【0022】

したがって、治療用医薬としての本明細書において記載されるポリペプチドの使用、より具体的には、細胞内標的分子が関与する生物学的経路または生物学的相互作用に関連する疾患または障害の治療方法における、本明細書において記載されるポリペプチドの使用も本明細書において提供される。

#### 【0023】

したがって、特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができる少なくとも1個のアルファボディーであって、例えば限定されるものではないが、細胞シグナリング、細胞シグナル伝達、細胞および分子輸送（例えば、能動輸送または受動輸送）、透過、ファゴサイトーシス、オートファジー、細胞老化、細胞接着、細胞運動、細胞遊走、細胞質流動、DNA複製、タンパク質合成、複製（例えば、細胞周期、減数分裂、有糸分裂、間期、細胞質分裂）、細胞代謝（例えば、解糖および呼吸、エネルギー供給）、細胞伝達、DNA修復、アポトーシスおよびプログラム化された細胞死からなる群より選ばれた細胞のプロセスに関するタンパク質などの細胞内標的に特異的に結合する少なくとも1個のアルファボディーを含有する本明細書において想定されるポリペプチドを使用する治療方法も本明細書において提供される。

30

#### 【0024】

特定の実施形態においては、少なくとも1個のアルファボディーを含有するポリペプチドであって、細胞によって内部に取り入れられることができ、前記少なくとも1個のアルファボディーが、例えばアポトーシス性細胞内タンパク質または抗アポトーシス性細胞内タンパク質、具体的には、MCL-1、BCL-2、BCL-XL、BCL-wおよびBFL-1/A1からなる群より選ばれたものなどのBCL-2ファミリーのタンパク質の抗アポトーシス性メンバーなどの細胞アポトーシスに関する細胞内タンパク質に特異的に結合するものであるポリペプチドが提供される。

40

#### 【0025】

したがって、特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、MCL-1に結合することができるポリペプチドが提供される。

#### 【0026】

さらなる特定の実施形態においては、前記ポリペプチドは、配列番号：3～6、9および10から選ばれた配列を含有することを特徴とする。特定の実施形態においては、細胞

50

によって内部に取り入れられることができ、MCL-1に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：7（MSIEEITKQIAAIQLRIVGDDQVQIYAMT）に定義されたポリペプチド配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上の配列同一性を有する配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0027】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、MCL-1に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：8（LRXVGDXV）に定義された配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0028】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、BCL-2aに結合することができるポリペプチドであって、配列番号：9および10から選ばれた配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

10

#### 【0029】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられことができ、BCL-XLに結合することができるポリペプチドであって、配列番号：9および10から選ばれた配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0030】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられことができ、BCL-2aおよび/またはBCL-XLに結合することができるポリペプチドであって、配列番号：11（MSIEEIAAQIAAIQLRIGDQFNIYYMT）に定義されたポリペプチド配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上の配列同一性を有する配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

20

#### 【0031】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられことができ、BCL-2aおよび/またはBCL-XLに結合することができるポリペプチドであって、配列番号：12（LRIGDQF）に定義された配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

30

#### 【0032】

前記にしたがって、本出願はさらに、本明細書において記載される少なくとも1個のポリペプチドおよび任意に、1個以上の薬学的に許容され得る担体を含有する医薬組成物を開示する。

#### 【0033】

さらなる態様において、本明細書において提供されるポリペプチドの他の用途も想定される。

#### 【0034】

特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、イン・ビトロで細胞内タンパク質の生物学的機能を調節するために、例えば、細胞内タンパク質と天然の結合パートナーとの間の相互作用に影響、特に、阻害するために使用され得る。

40

#### 【0035】

さらに、さらなる態様において、細胞の内部に取り入れられることができる本明細書において記載されるポリペプチドの製造方法であって、アルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に含まれるインターナリゼーション領域を得るように、前記アルファボディー構造配列を含有するポリペプチドを製造または改変するステップを少なくとも含む製造方法が本明細書において提供される。

#### 【0036】

特定の実施形態においては、本明細書において想定される方法は、インターナリゼーション領域を、少なくとも1個のアルファボディー構造配列の少なくとも一部に導入するステップを少なくとも含む。

50

**【0037】**

特定の実施形態においては、本明細書において想定される方法は、インターナリゼーション領域を導入するステップの前に、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも1個のアルファボディー構造を選択するステップをさらに含んでもよい。代替的な特定の実施形態においては、本明細書において想定される方法は、前記インターナリゼーション領域を導入するステップに統じて、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも1個のアルファボディー構造を選択するステップをさらに含んでもよい。よりさらなる実施形態においては、これら的方法は、前記アルファボディー構造を目的の治療分子または診断分子に連結するステップを含んでもよい。

10

**【0038】**

本明細書において想定される方法の特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域を、少なくとも1個のアルファボディー構造配列に導入するステップは、特定の変異を、選ばれたアルファボディー構造配列テンプレートに導入することを含む。代替的に、本明細書において想定される方法の特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域を、少なくとも1個のアルファボディー構造配列に導入するステップは、1個以上のインターナリゼーション領域を含有するアルファボディー構造配列をイン・シリコ設計することを含む。

**【0039】**

本明細書において想定される方法の特定の実施形態においては、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも1個のアルファボディー構造（またはポリペプチド）を選択する際、これは、少なくとも、前記細胞内標的分子に対する特異的結合について、アルファボディー構造配列（またはポリペプチド配列）のライブラリーをスクリーニングするステップを含んでもよく、または前記細胞内標的分子に対する前記少なくとも1個のアルファボディー構造配列中の結合モチーフを導入し、目的の前記細胞内標的分子に対する特異的結合親和性について試験するステップを少なくとも含んでもよい。

20

**【0040】**

本明細書において開示されるさらに詳細な説明および実施例から明らかになるように、細胞膜を通って効率的に透過することができ、細胞内環境で安定であり、そして任意に、細胞内に位置する細胞内標的に有効的かつ特異的に結合して当該細胞内標的の機能に影響を与えることができる、少なくとも1個のアルファボディー構造を含有するポリペプチドを提供することができることが、本発明者らによって明らかにされている。また本明細書においてさらに示されるように、本明細書において記載されるポリペプチドは、疾患徵候に関連する細胞内標的の機能を特異的に調節することによって、および／または細胞内標的が関与する生物学的（シグナリング）経路に影響を与えることによって、種々の疾患徵候を治療するのに使用することができる。

30

**【0041】**

以下の限定されない実施例および図面を提供する。図面にある図は、以下を示す：

**【図面の簡単な説明】**

40

**【0042】**

【図1】図1は、アルファボディーMB23\_h i R - V5（配列番号：2）の配列の図である。アルギニン修飾を太字で示し、N末端V5タグを下線で示す。異なる構造エレメント間で区別するために、それぞれ「ヘリックスA」、「ループ1」、「ヘリックスB」、「ループ2」、「ヘリックスC」、「H i s - タグ」とラベル表示されている断片として配列を示す。完全なMB23\_h i R - V5配列は、示されている順にこれらの断片からなる単一ポリペプチド配列である。

【図2】図2は、ヒト神経膠芽腫細胞（U87 MG）における312nMから1.2nMまでの2倍希釈のカチオン化MB23\_h i R - V5（配列番号：2）の細胞内取り込みの図である。10%血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに37度で2時間

50

インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V 5 抗体および Alexa 488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。対照画像 (ctrl) は、アルファボディーを用いない同じ実験条件に対応する。画像は、記録 Z スタックの 1 μm 切片の重ね合わせ画像に対応する。

【図 3】図 3 は、ヒト神経膠芽腫細胞 (U87 MG) における 625 nM の非カチオン化 MB23 - V5 およびカチオン化 MB23\_hiR - V5 (配列番号: 2) の細胞内取り込みの図である。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37 °C で 2 時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Alexa 488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。画像は、記録 Z スタックの 1 μm 切片の画像に対応する。  
10

【図 4】図 4 は、4 種の細胞株 (A : ヒト神経膠芽腫 - (U87 MG)、B : 膵臓癌 - (BxPC3)、C : 非小細胞肺癌 - (H1437) および D : ヒト脂肪肉腫 (SW82) 細胞) における 78 nM のカチオン化 MB23\_hiR - V5 (配列番号: 2) の細胞内取り込みの図である。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37 °C で 2 時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Alexa 488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。画像は、記録 Z スタックの 1 μm 切片の画像に対応する。  
20

【図 5】図 5 は、ヒト神経膠芽腫細胞 (U87 MG) における 500 nM のカチオン化アルファボディー MB23\_hiR - V5 (配列番号: 2) の細胞内取り込みの図である。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37 °C で種々の時間インキュベーションした。細胞をヘパリン (100 単位 / mL) で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Alexa 488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。画像は、記録 Z スタックの 1 μm 切片の単一細胞画像に対応する。  
30

【図 6】図 6 は、アルファボディー AB1\_hiKR1 - V5 (配列番号: 4) および AB1\_A2aF\_hiKR3 - V5 (配列番号: 6) の配列の図である。Arg / Lys 修飾を太字で示し、C 末端 V5 タグを下線で示す。  
30

【図 7】図 7 は、ヒト神経膠芽腫細胞 (U87 MG) における種々の濃度 (10 nM、20 nM、40 nM、78 nM、156 nM および 312 nM) の AB1\_hiKR1 - V5 (配列番号: 4) および AB1\_A2aF\_hiKR3 - V5 (配列番号: 6) の細胞内取り込みの図である。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37 °C で 2 時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Alexa 488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。画像は、記録 Z スタックの 1 μm 切片の画像に対応する。  
40

【図 8】図 8 は、ヒト神経膠芽腫細胞 (U87 MG) における 500 nM の AB1\_A2aF\_hiKR3 - V5 (配列番号: 6) の細胞内取り込みの動態の図である。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37 °C で 180 分間、120 分間、60 分間、30 分間、15 分間、7.5 分間および 3.5 分間インキュベーションした。細胞をヘパリン (100 単位 / mL) で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Alexa 488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。画像は、記録 Z スタックの 1 μm 切片 1 枚に対応する。  
40

【図 9】図 9 は、段階希釈のアルファボディーの存在下におけるヒト T 細胞白血病細胞 (MT4) の細胞生存率の図である。アルファボディーによる処理の 48 時間後に、細胞生存率を測定した。データは、三連の平均値 ± SD に対応する。細胞生存率は、非処理対照細胞と比べた割合として表した。  
50

【図10】図10は、段階希釈のアルファボディーの存在下におけるヒトT細胞白血病細胞(Jurkat)の細胞生存率の図である。アルファボディーによる処理の48時間後に、細胞生存率を測定した。データは、三連の平均値±SDに対応する。細胞生存率は、非処理対照細胞と比べた割合として表した。

【図11】図11は、段階希釈のアルファボディーの存在下におけるPBM Cの細胞生存率の図である。アルファボディーによる処理の48時間後に、細胞生存率を測定した。データは、三連の平均値±SDに対応する。細胞生存率は、非処理対照細胞と比べた割合として表した。

【図12】図12は、C末端His-タグおよびV5タグ(配列番号:10)を有するカルチオン化アルファボディーAB1\_pan\_hiKR3-V5の配列の図である。アルギニン/リジン修飾を太字で示し、N末端V5タグを下線で示す。異なる構造エレメント間で区別するために、それぞれ「ヘリックスA」、「ループ1」、「ヘリックスB」、「ループ2」、「ヘリックスC」、「His-タグ」とラベル表示されている断片として配列を示す。完全なAB1\_pan\_hiKR3-V5配列は、示されている順にこれらの断片からなる単一ポリペプチド配列である。10

【図13】図13は、アルファボディーAB1\_pan\_hiKR3-V5に対する組換えBC L-2ファミリータンパク質の結合の図である。マイクロタイタープレートに固定化した抗V5抗体(5μg/ml)によって、アルファボディー(500nM)を捕捉した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗GST抗体を使用して、5倍希釈のグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグ付組換えBC L-2ファミリータンパク質MCL-1、BC L-XLおよびBC L-2aの結合を検出した。プレートを492nmおよび630nmで読んだ。20

【図14】図14は、アルファボディーAB1\_pan\_hiKR3-V5、AB1\_A2aF\_hiKR3-V5およびMB23\_hiR-V5に対する組換えBC L-2ファミリータンパク質の結合の図である。マイクロタイタープレートに固定化した抗V5抗体(5μg/ml)によって、アルファボディー(500nM)を捕捉した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗GST抗体を使用して、5倍希釈のグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)タグ付組換えBC L-2ファミリータンパク質MCL-1(パネルA)、BC L-XL(パネルB)およびBC L-2a(パネルC)の結合を検出した。プレートを492nmおよび630nmで読んだ。30

【図15】図15は、ジギトニン透過処理後の細胞の細胞質ゾル画分(CF)および残りの画分(RF)のイムノプロットによって実証されるJurkat細胞の細胞質ゾル区画におけるMB23\_hiR\_no\_tagの存在の図である。

【図16】図16は、エンドソームマーカーNAG(パネルA)ならびにフロチリン-1およびLamp-1(パネルB)を使用した、細胞質ゾル内容物に対するジギトニン膜透過処理の効果の実証の図である。パネルA:酵素活性;パネルB:抗His抗体によるプロッティング。

【図17】図17は、細胞質ゾルマーカーLDH(パネルA)およびGADPH(パネルB)を使用した細胞質ゾル内容物に対するジギトニン膜透過処理の効果の実証の図である。パネルA:酵素活性;パネルB:抗His抗体によるプロッティング。40

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0043】

##### 【定義】

本明細書において、单数形「a」、「an」および「the」は、特に明記しない限り、单数形および複数形の両方の指示対象を含む。

##### 【0044】

本明細書において、「含有している(含んでいる)(comprising)」、「含有する(含む)(comprises)」および「から構成されている(comprised of)」という用語は、「含んでいる(including)」「含む(includes)」または「含有している(含んでいる)(containing)」「含有

10

20

30

40

50

する（含む）（contains）」と同じ意味であり、包括的または非限定的であり、追加の記載されていないメンバー、エレメントまたは方法のステップを排除するものではない。

#### 【0045】

端点による数値範囲の記載は、各範囲内に包含されたすべての数および有理数、ならびに記載されている端点を含む。

#### 【0046】

本明細書において、「約」という用語は、測定可能な値、例えば、パラメータ、量、持続時間などについて言及する場合、特定の値の、および特定の値から + / - 10 % 以下、好ましくは + / - 5 % 以下、より好ましくは + / - 1 % 以下、さらにより好ましくは + / - 0.1 % 以下の変動を、かかる変動が開示の方法を実施するうえで適切である限り、包含することを意味する。修飾語句「約」が言及する値は、それ自体も明確に好ましく開示されていることが理解されるべきである。10

#### 【0047】

本明細書において、「アルファボディー（Alphabody）」または「アルファボディー構造（Alphabody structure）」は、自己フォールディングしてあり、単鎖で、三重の主に - ヘリックスのコイルドコイルのアミノ酸配列、ポリペプチドまたはタンパク質として、全般に定義され得る。より具体的には、本明細書において使用する場合、アルファボディーまたはアルファボディー構造は、一般式 H R S 1 - L 1 - H R S 2 - L 2 - H R S 3 (式中、H R S 1、H R S 2 および H R S 3 は、それぞれ独立して、a b c d e f g または d e f g a b c によって一般に表される、2 ~ 7 個の連続するが必ずしも同一ではないヘプタッド反復単位を含有するヘプタッド反復配列 (H R S) ) であり、すべてのヘプタッドの a 位および d 位の少なくとも 50 % は、イソロイシン残基によって占められており、各 H R S は、「a」位または「d」位の脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸で開始しており、H R S 1、H R S 2 および H R S 3 は、ともに三重 - ヘリックスコイルドコイル構造を形成しており；かつ L 1 および L 2 は、それぞれ独立して、H R S 1 と H R S 2 とを共有結合的に連結し、H R S 2 と H R S 3 とを共有結合的に連結する、以下でさらに定義されるリンカー断片である) を有するアミノ酸配列、ポリペプチドまたはタンパク質として定義することができる。本明細書において想定されるアルファボディー構造の特定の実施形態においては、各 H R S が、ヘプタッドの a 位または d 位のいずれかに位置する脂肪族アミノ酸残基または芳香族アミノ酸残基で開始および終了するように、各 H R S は、部分ヘプタッド配列 a b c d または d e f g a で終了する。20

#### 【0048】

本明細書において、「平行アルファボディー」は、三重 - ヘリックスコイルドコイル構造の - ヘリックスが、平行コイルドコイル構造、すなわち、3 個の - ヘリックスのすべてが平行であるコイルドコイルをともに形成するアルファボディー（構造）の意味を有するものとする。30

#### 【0049】

本明細書において、「逆平行アルファボディー」は、三重 - ヘリックスコイルドコイル構造の - ヘリックスが、逆平行コイルドコイル構造、すなわち、2 個の - ヘリックスが平行であり、かつ第 3 の - ヘリックスがこれらの 2 個のヘリックスに対して逆平行であるコイルドコイルをともに形成するアルファボディー（構造）の意味を有するものとする。40

#### 【0050】

本明細書におけるさらなる説明から明らかになるように、一般式 H R S 1 - L 1 - H R S 2 - L 2 - H R S 3 を有する配列を含有する複数のポリペプチドも提供されるが、ある特定の実施形態においては、ポリペプチドは、さらなる基、部分および / または残基を含有し、これらは式 N - H R S 1 - L 1 - H R S 2 - L 2 - H R S 3 - C 中に式 H R S 1 - L 1 - H R S 2 - L 2 - H R S 3 を有する基本アルファボディー構造に共有結合的に連結され、より具体的には、N 末端および / または C 末端が共有結合的に連結される。任意選50

択のNおよびCの伸長は、例えば、検出もしくは精製用のタグ（例えば、H i s タグ）または別のタンパク質もしくはタンパク質ドメイン（例えば、毒素）であり得る。しかしながら、任意選択の伸長NおよびCは、アルファボディー構造の一部を形成しない。したがって、本明細書において、アルファボディーを含有する「（アルファボディー）ポリペプチド」について全般に言及される。本明細書において、アルファボディーに関する記載される結合特性は、前記アルファボディーを含有しているアルファボディーポリペプチドに全般に適用することもできる。本明細書において提供されるアルファボディーポリペプチドは、コイルドコイルを形成するような、少なくとも1個の（3本のヘリックスからなる）三重ヘリックス構造の存在により特徴付けられる。

## 【0051】

10

「ヘプタッド」、「ヘプタッド単位」または「ヘプタッド反復単位」という用語は、本明細書において互換的に使用され、本明細書においては、本明細書において想定されるアルファボディー、ポリペプチドまたは組成物の各ヘプタッド反復配列内で2回以上反復される7残基の（ポリ）ペプチド断片の意味を有するものとし、「a b c d e f g」または「d e f g a b c」（式中、「a」から「g」の記号は、通常のヘプタッドの位置を表わす）として表わされる。通常のヘプタッド位置は、例えば、ルパス（L u p a s）ら（サイエンス（S c i e n c e）、1991、252：1162-1164；h t t p : / / w w w . r u s s e l l . e m b l - h e i d e l b e r g . d e / c g i - b i n / c o i l s - s v r . p l ) のCOILS法などの専門のソフトウェアを使用することによって、本明細書において想定されるアルファボディー、ポリペプチドまたは組成物中に存在するヘプタッド、ヘプタッド単位またはヘプタッド反復単位内の特異的アミノ酸残基に割り当てられている。しかしながら、本明細書において想定されるポリペプチドのアルファボディー構造中に存在するヘプタッドまたはヘプタッド単位が、本明細書のさらなる説明により明らかになるように、厳密には、前記表記（すなわち、「a b c d e f g」または「d e f g a b c」）に限定されるものではなく、それらのもっとも広い意味において、少なくとも割り当て可能なヘプタッドのa位およびd位を含有する7残基（ポリ）ペプチド断片それ自体を構築することに留意すべきである。

20

## 【0052】

30

「ヘプタッドのa位」、「ヘプタッドのb位」、「ヘプタッドのc位」、「ヘプタッドのd位」、「ヘプタッドのe位」、「ヘプタッドのf位」および「ヘプタッドのg位」という用語は、それぞれ、アルファボディーまたはポリペプチドのヘプタッド、ヘプタッド反復またはヘプタッド反復単位における通常の「a」、「b」、「c」、「d」、「e」、「f」および「g」のアミノ酸位置を指す。

## 【0053】

40

本明細書において、「ヘプタッドモチーフ」は、7残基の（ポリ）ペプチドパターンの意味を有するものとする。「a b c d e f g」型の「ヘプタッドモチーフ」は、通常、「H P P H P P P」と表わされ得るが、「d e f g a b c」型の「ヘプタッドモチーフ」は、通常、「H P P P H P P P」で表わされ得、式中、記号「H」は、非極性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸残基を意味し、記号「P」は、極性アミノ酸残基または親水性アミノ酸残基を意味する。しかしながら、本明細書のさらなる説明から明らかになるように、アルファボディーまたはポリペプチド中に存在するヘプタッドモチーフは、厳密には、前記表記（すなわち、「a b c d e f g」、「H P P H P P P」、「d e f g a b c」および「H P P P H P P P」）に限定されるものではないことに留意すべきである。

## 【0054】

本明細書において、「ヘプタッド反復配列」（「H R S」）は、n個の連続する（しかし、必ずしも同一ではない）ヘプタッドを含有するアミノ酸配列または配列断片の意味を有するものであり、nは2以上の数である。

## 【0055】

50

（本明細書において定義された）アルファボディーの单鎖構造との関連において、「リンカー」、「リンカー断片」または「リンカー配列」という用語は、本明細書において互

換的に使用され、単鎖アルファボディーの隣接アミノ酸配列の一部であり、そのアルファボディーの H R S 配列を相互に共有結合的に連結するアミノ酸配列断片を指す。

#### 【 0 0 5 6 】

「アルファボディーの - ヘリックス部分」は、本明細書において、 - ヘリックス二次構造を有するアルファボディーの一部という意味を有するものである。さらに、 - ヘリックス二次構造を有するアルファボディー全体の任意の部分も、アルファボディーの - ヘリックス部分と考えられる。より具体的には、結合部位との関連において、アルファボディーの - ヘリックス部分に位置する 1 個以上のアミノ酸が結合部位に寄与している場合、当該結合部位は、アルファボディーの - ヘリックス部分により形成されると考えられる。

10

#### 【 0 0 5 7 】

アルファボディーの - ヘリックスの「溶媒配向 ( s o l v e n t - o r i e n t e d ) 」または「溶媒曝露」領域は、本明細書において、それが存在する溶媒、環境、周囲または周辺 ( m i l i e u ) に直接曝露されるか、または直接接触するアルファボディーの部分の意味を有するものである。さらに、溶媒に直接曝露されるか、または直接接触するアルファボディー全体のうちの任意の部分も、アルファボディーの溶媒配向領域または溶媒曝露領域とみなされる。より具体的には、結合部位との関連において、アルファボディーの溶媒配向部分に位置する 1 個以上のアミノ酸が結合部位に寄与している場合、結合部位は、アルファボディーの溶媒配向部分によって形成されているとみなされる。

20

#### 【 0 0 5 8 】

「アルファボディーの溝」という用語は、本明細書において、アルファボディー内の空間的に隣接した - ヘリックスの任意の対によって形成される、くぼんだ溝様の局所的形状に対応するアルファボディーの部分の意味を有するものとする。

#### 【 0 0 5 9 】

本明細書において、アミノ酸残基は、それらの正式名称によって示されるか、または標準的な 3 文字もしくは 1 文字のアミノ酸コードにしたがって示されるであろう。

#### 【 0 0 6 0 】

本明細書において、「相同性」という用語は、同じ分類群または異なる分類群に由来する 2 個の高分子間、具体的には、2 個のポリペプチド間または 2 個のポリヌクレオチド間の少なくとも二次構造の類似性を表わし、前記類似性は、共通の祖先に起因する。したがって、「ホモログ」という用語は、前記二次構造の類似性、および任意に、三次構造の類似性を有する非常に関連性のある高分子を表わす。2 個以上のヌクレオチド配列を比較するために、第 1 のヌクレオチド配列と第 2 のヌクレオチド配列との間の「配列同一性（のパーセンテージ）」は、当業者に公知の方法を使用することによって、例えば、第 1 のヌクレオチド配列中のヌクレオチドであって、第 2 のヌクレオチド配列における対応する位置のヌクレオチドと同一のヌクレオチドの数を、第 1 のヌクレオチド配列中のヌクレオチドの総数で割り、100 % を乗じることによって、またはシーケンスアライメントのための公知のコンピュータアルゴリズム、例えば、N C B I B l a s t などを使用することによって計算され得る。2 個のアルファボディー間の配列同一性の程度を決定する際、当業者であれば、いわゆる「保存的」アミノ酸置換を考慮することができ、保存的アミノ酸置換は、一般に、あるアミノ酸残基が類似の化学構造の別のアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換であって、ポリペプチドの機能、活性または他の生物学的特性に対してほとんど影響を及ぼさないか、あるいは本質的にまったく影響を及ぼさないアミノ酸置換として説明され得る。可能な保存的アミノ酸置換は、当業者には明らかであろう。アルファボディーおよび核酸配列は、これらが、それらの全長にわたって 100 % の配列同一性を有する場合、「まったく同じもの」であると言われる。

30

#### 【 0 0 6 1 】

アルファボディーまたはポリペプチドが、その標的（またはこれらの少なくとも一部もしくは断片）に対する親和性、特異性を有する、および / またはその標的を特異的に対象とする場合、（アルファボディー）ポリペプチドまたはアルファボディーは、特定の標的

40

50

「に特異的に結合する」と言われる。

#### 【0062】

本明細書において、アルファボディーまたはポリペプチドの結合の「特異性」は、親和性および／またはアビディティに基づいて決定され得る。アルファボディーまたはポリペプチドの「親和性」は、アルファボディーまたはポリペプチドと、結合する目的の標的タンパク質との解離に関する平衡定数により表わされる。K D 値が低いほど、アルファボディーまたはポリペプチドと、アルファボディーまたはポリペプチドが結合する目的の標的タンパク質との間の結合力がより強くなる。代替的には、親和性は、 $1 / K D$  に対応する親和定数（K A）としても表わされ得る。アルファボディーまたはポリペプチドの結合親和性は、具体的な目的の標的タンパク質に応じて、当業者に公知の方法で決定され得る。K D が、 $k O f f$ （秒<sup>-1</sup>またはs<sup>-1</sup>で表わされる）で示される複合体の解離速度定数の、 $k O n$ （モル<sup>-1</sup>秒<sup>-1</sup>またはM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>で表わされる）で示されるその結合速度定数に対する比として表わされ得ることが、当該技術分野において一般的に公知である。約1ミリモルより大きいK D 値は、一般に、非結合または非特異的結合を示すとみなされる。

10

#### 【0063】

所定の標的に対するアルファボディーまたはポリペプチドの「アビディティ」は、アルファボディーまたはポリペプチドと目的の所定の標的タンパク質との間の結合力の大きさの尺度である。アビディティは、目的の標的タンパク質における結合部位と、アルファボディーまたはポリペプチドにおける結合部位との間の親和性、およびアルファボディーまたはポリペプチドに存在する関連結合部位の数の両方に関係するものである。

20

#### 【0064】

アルファボディーまたはポリペプチドは、アルファボディーまたはポリペプチドが目的の第2の標的タンパク質に結合する親和性に対し、少なくとも5倍、例えば、少なくとも10倍、例えば、少なくとも100倍、好ましくは少なくとも1000倍高い親和性で目的の第1の標的タンパク質に結合する場合、「目的の第2の標的タンパク質に対してではなく目的の第1の標的タンパク質に対して特異的」であると言われる。したがって、ある実施形態においては、アルファボディーまたはポリペプチドが目的の第2の標的タンパク質に対してではなく目的の第1の標的タンパク質に対して特異的であると言われる場合、アルファボディーまたはポリペプチドは、目的の第1の標的タンパク質に（本明細書において定義したように）特異的に結合するが、目的の第2の標的タンパク質とは結合しないであろう。

30

#### 【0065】

アルファボディーまたはポリペプチドの「半減期」は、一般に、アルファボディーまたはポリペプチドのイン・ビボの血清濃度または血漿濃度が50%低減するまでに必要な時間として定義することができる。アルファボディーまたはポリペプチドのイン・ビボ半減期は、当業者に公知の任意の方法、例えば、薬物動態分析によって決定され得る。当業者に明らかであるように、半減期は、 $t_{1/2}$ 、曲線下面積（AUC）などのパラメータを使用して表わされ得る。イン・ビボの半減期の増加は、一般に、 $t_{1/2}$  - アルファ、 $t_{1/2}$  - ベータおよび曲線下面積（AUC）の1個以上のパラメータの増加、好ましくは3つすべてのパラメータの増加によって特徴付けられる。

40

#### 【0066】

本明細書において、「阻害（inhibition）」、「低減（reducing）」および／または「抑制（preventing）」という用語は、目的の標的タンパク質に特異的に結合し、当該目的の標的タンパク質とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を阻害、低減および／または抑制する本明細書において想定されるポリペプチド（の使用）を指し得る。また、「阻害」、「低減」および／または「抑制」という用語は、目的の標的タンパク質に特異的に結合し、適切なイン・ビトロアッセイ、細胞アッセイまたはイン・ビボアッセイを使用して測定した場合、当該目的の標的タンパク質の生物学的活性を阻害、低減および／または抑制する本明細書において想定されるポリペプチド（の

50

使用)も指し得る。したがって、「阻害」、「低減」および/または「抑制」は、目的の標的タンパク質に特異的に結合し、目的の標的タンパク質が関与する1つ以上の生物学的または生理学的な機構、効果、応答、機能経路または活性を阻害、低減および/または抑制するポリペプチド(の使用)も指し得る。アンタゴニストとしての前記ポリペプチドのかかる作用は、目的の標的タンパク質に応じて、任意の適切な様式で、および/または任意の適切な(イン・ビトロおよび普通は細胞またはイン・ビボの)、当該技術分野において公知のアッセイを使用して決定することができる。

#### 【0067】

本明細書において使用する場合、「増強(en hanc ing)」、「増加(in cr easing)」および/または「活性化(activat ing)」という用語は、目的の標的タンパク質に特異的に結合し、目的の標的タンパク質とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を増強、増加および/または活性化するポリペプチド(の使用)を指すことができる。また、「増強」、「増加」および/または「活性化」という用語は、目的の標的タンパク質に特異的に結合し、適切なイン・ビトロアッセイ、細胞アッセイまたはイン・ビボアッセイを使用して測定した場合、目的の標的タンパク質の生物学的活性を増強、増加および/または活性化するポリペプチド(の使用)を指すことができる。したがって、「増強」、「増加」および/または「活性化」は、目的の標的タンパク質に特異的に結合し、目的の標的タンパク質が関与する1つ以上の生物学的または生理学的な機構、効果、応答、機能経路または活性を増強、増加および/または活性化するポリペプチド(の使用)を指すこともできる。アゴニストとしての本明細書において想定されるポリペプチドのかかる作用は、目的の標的タンパク質に応じて、任意の適切な方法で、および/または当該技術分野において公知の任意の適切な(イン・ビトロおよび通常は細胞またはイン・ビボ)アッセイを使用して決定され得る。

10

20

30

#### 【0068】

本明細書において想定されるポリペプチドの阻害もしくはアンタゴニスト活性または増強もしくはアゴニスト活性は、可逆的でもよく、不可逆的であってもよいが、医薬用途および薬理用途においては、一般的に、可逆的に起こるであろう。

#### 【0069】

アルファボディーまたはポリペプチドまたは核酸配列は、それが産生される宿主細胞および/または培地から抽出または精製されている場合、本明細書においては、「本質的に単離された(形態)」であるとみなされる。

30

#### 【0070】

本明細書において想定されるポリペプチド内に含まれるアルファボディーまたはアルファボディー構造については、アルファボディーに存在する「結合領域」、「結合部位」または「相互作用部位」という用語は、本明細書において、アルファボディーに存在するアミノ酸残基の特定の部位、部分、ドメインまたは断片であって、標的分子との結合に関する特定の部位、部分、ドメインまたは断片の意味を有するものである。かかる結合領域は、標的分子と接触するアルファボディーの特異的アミノ酸残基によって形成される。

#### 【0071】

アルファボディーまたはポリペプチドは、異なる目的の標的タンパク質の両方に(本明細書において定義したように)特異的である場合、2個の異なる目的の標的タンパク質に対して「交差反応性」を示すと言われる。

40

#### 【0072】

アルファボディーまたはポリペプチドは、アルファボディーが、目的の標的のアミノ酸残基の部位、決定基(determinant)、部分、ドメインまたは断片に対する1個の結合部位またはそれらに特異的に結合する1個の結合部位を含有する場合、「一価」であると言われる。アルファボディーまたはポリペプチドの2個以上の結合部位が、目的の標的のアミノ酸残基の同じ部位、決定基、部分、ドメインまたは断片に対するものであるか、あるいは目的の標的のアミノ酸残基の同じ部位、決定基、部分、ドメインまたは断片に特異的に結合する場合、アルファボディーまたはポリペプチドは、「二価」(アルフ

50

アボディーまたはポリペプチドに2個の結合部位がある場合)または多価(アルファアボディーまたはポリペプチドに3個以上の結合部位がある場合)、例えば、三価などであると言われる。

#### 【0073】

アルファアボディーまたはポリペプチドについて言及する場合、「二重特異性(bi-specific)」という用語は、a)アルファアボディーまたはポリペプチドの2個以上の結合部位が、同じ目的の標的に対するものであるか、または当該標的に特異的に結合するが、その標的のアミノ酸残基の同じ部位、決定基、部分、ドメインまたは断片に対するものではなく(すなわち、異なる部位、決定基、部分、ドメインもしくは断片に対するもの)、またはそれらに特異的に結合しないこと、アルファアボディーは、「二重特異性」(アルファアボディーに2個の結合部位がある場合)もしくは多重特異性(アルファアボディーに3個以上の結合部位がある場合)と言われるか、あるいはb)アルファアボディーの2個以上の結合部位が異なる目的の標的分子に対するものであるか、またはそれらに特異的に結合することのいずれかを意味する。「多重特異性」という用語は、3個以上の結合部位がアルファアボディーに存在する場合に使用される。10

#### 【0074】

したがって、本明細書において、「二重特異性アルファアボディー(またはポリペプチド)」または「多重特異性アルファアボディー(またはポリペプチド)」は、それぞれ、2個または少なくとも2個の結合部位を含有する式(N-L-HRS1-L1-HRS2-L2-HRS3-C)の単鎖アルファアボディー構造(を含有するポリペプチド)であって、これらの2個以上の結合部位が異なる結合特異性を有する単鎖アルファアボディー構造(を含有するポリペプチド)の意味を有するものとする。したがって、本明細書において、それぞれ2個または3個以上の異なる結合領域が同じ单量体の單一ドメインアルファアボディー中に存在する場合、アルファアボディー(またはポリペプチド)は、「二重特異性」または「多重特異性」とされる。20

#### 【0075】

本明細書において、「予防および/または治療」という用語は、特定の疾患および/または障害を予防および/または治療すること、特定の疾患および/または障害の発症を予防すること、特定の疾患および/または障害の進行を遅延または回復させること、特定の疾患および/または障害に伴う1つ以上の症状の発症を予防または遅延させること、特定の疾患および/または障害に伴う1つ以上の症状を軽減および/または緩和すること、特定の疾患および/または障害の重症度および/または持続期間を軽減すること、ならびに一般には、治療されている対象(subject)または患者(patient)にとつて有益な本明細書において想定されるポリペプチドの任意の予防効果または治療効果を含む。30

#### 【0076】

本明細書において、「生体膜」または「膜」という用語は、細胞外空間から細胞または細胞群を隔てる脂質含有バリアをいう。生体膜は、限定されるものではないが、原形質膜、細胞壁、細胞内小器官膜、例えば、ミトコンドリア膜、核膜などが挙げられる。

#### 【0077】

本明細書に引用されたすべての文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。特に定義されない限り、専門用語および科学用語などの本開示に使用されるすべての用語は、記載されている技術貢献が属する分野の当業者によって一般に理解されている意味を有する。さらなるガイダンスによって、用語の定義は、本開示の教示をより理解するために包含される。40

#### 【0078】

##### [発明に関する説明]

細胞内に侵入することができ、細胞内で安定なままであるアルファアボディーポリペプチドを作製することができる事が見出された。特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドはさらに、細胞内の細胞内標的に特異的に結合してその機能50

を調節することができる。より具体的には、-アルファボディーを含有する従来技術のポリペプチドとは対照的に-細胞内へのインターナリゼーション(すなわち、細胞内取り込み)を可能にするように改変されているアルファボディー-ポリペプチドが得られた。また、伝統的な結合剤の親和性よりも高いかまたはこれと少なくとも同程度の親和性で、細胞内標的に結合することにより、細胞内プロセスに直接的な影響を与えることができる本明細書において想定されるアルファボディー-ポリペプチドを提供することができることが見出された。

#### 【0079】

従来技術のアルファボディー配列は、本明細書において提供されるポリペプチドの構造的特徴の特定の組み合わせを含まないことが、当業者には明らかであろう。したがって、従来技術において開示されているアルファボディー配列は、

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2010/066740号において公開された配列番号：4～10、

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2011/003935号において公開された配列番号：1～5、10、17、22、24、27、32および36、

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2011/003936号において公開された配列番号：2～7、

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2012/092970号において公開された配列番号：1～85、

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2012/092971号において公開された配列番号：1～4および8、

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2012/093013号において公開された配列番号：64～69、71～75および77～80、ならびに

-コンプリクス エン ヴェー(C o m p l i x N V)名義の国際公開第2012/093172号において公開された配列番号：1～135を含み、本明細書において想定されるインターナリゼーション領域を含有しないことは当業者には明らかであり、これらは本発明によって包含されていない。

#### 【0080】

本明細書において記載されるポリペプチドは、生体細胞膜を効率的に通過することができる。生体膜の親油性は、かかる化合物の直接的な細胞内送達を制限するので、生物学的に活性な分子の細胞内輸送は、一般的に、薬物送達一般において重要な問題の1つである。細胞膜は、能動輸送機構が関与しない限り、ペプチド、タンパク質およびDNAなどの巨大分子が細胞に自然に侵入するのを防ぐ。

#### 【0081】

細胞膜を通過することによって細胞に自発的に侵入して、細胞内環境で完全な活性および機能性を維持することができる固有かつ非常に強力なポリペプチドが本明細書において提供される。特定の実施形態においては、提供されるポリペプチドは、目的の細胞内標的と高い親和性で特異的に相互作用することをさらに特徴とする。

#### 【0082】

アルファボディー自体の-ヘリックスコイルドコイル構造は、膜透過能を与えるものではないが、1個以上のアルファボディー構造を含有するポリペプチドを細胞内に運ぶ改善された新たな技術であって、少なくとも部分的にはアルファボディー骨格内の特定のアミノ酸領域、任意に、配列パターンまたはモチーフを含むアミノ酸領域の設計を含む技術が本明細書において記載される。したがって、本明細書において想定されるポリペプチドは、少なくとも部分的にはアルファボディー構造中に存在する特定のモチーフの結果として、細胞内に侵入することができ、アルファボディー構造に連結された細胞透過性ペプチドを含むことを必要とせず、したがってこれを想定しない。より具体的には、特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、アルファボディー構造配

10

20

30

40

50

列の外側に、3個超、より具体的には2個以下の連続するアルギニンまたはリジンのストレッチを含まない。特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、アルファボディー構造配列の外側に、アルギニンまたはリジンを含まない。

#### 【0083】

アルファボディーを含有するポリペプチドを、非常に有効な細胞透過性分子、すなわち、いわゆる「細胞透過性アルファボディー」(C P A B)または「細胞透過性アルファボディーポリペプチド」に変換することを可能にする本明細書では「C P A B技術」と称される新たな高効率細胞透過技術を開発した。

#### 【0084】

C P A B技術による特定のC P A Bアルファボディーポリペプチドの設計は、少なくとも部分的には、ポリペプチドのアルファボディー構造配列内に含まれるアミノ酸領域であって、細胞内へのポリペプチドのインターナリゼーションを確保するアミノ酸領域を得るように、アルファボディー構造配列を含有するポリペプチドを製造または改変するステップを少なくとも含む。したがって、特定のC P A Bアルファボディーの設計は、(例えば、配列設計によってまたは変異によって)1個以上のインターナリゼーション領域を、アルファボディー配列またはその一部に導入することを含む。特定の実施形態においては、これは、特定のアミノ酸残基を、アルファボディー骨格配列内の特定の位置に導入することを含む。

10

#### 【0085】

かかるインターナリゼーション領域を、少なくとも部分的にアルファボディー配列に導入することによって、細胞に自発的に透過することができるポリペプチドを作り出すことができること、すなわち、細胞内への透過を可能にするいかなる他の構造も必要ないことが見出された。また、以下に詳述するように、これを任意に、アルファボディー構造内の細胞内標的への結合部位の供給と組み合わせることができ、その結果、高効率な細胞内結合剤が得られることが見出された。

20

#### 【0086】

本明細書において提供されるC P A Bポリペプチドは、アルファボディー構造を含有するポリペプチドの1個以上の限られた領域内に、より具体的には少なくとも部分的にはアルファボディー構造内に、ある特定の種類のアミノ酸残基を含有するように設計されたものである。より具体的には、特定の正荷電(カチオン性とも称される)領域は、ポリペプチドのインターナリゼーションを確保するよう特によく機能することが見出された。したがって、特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、いくつかの正荷電アミノ酸残基がアルファボディー骨格の特定の位置にあることを特徴とする少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域を含有し、これによって、細胞に侵入する能力がポリペプチドに付与される。ある特定の実施形態においては、少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、「細胞透過モチーフ」または「細胞透過パターン」(本明細書では、「C P A Bモチーフ」または「C P A Bパターン」とも称される)を含むと考えられ得る。かかるモチーフまたはパターンは、本明細書において想定されるポリペプチドに細胞透過活性を付与するための特徴であると考えられ得る。

30

#### 【0087】

第1の態様において、少なくとも1個のアルファボディー構造配列と、細胞内へのポリペプチドのインターナリゼーションを確保する少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域とを含有するポリペプチドであって、前記インターナリゼーション領域が少なくとも部分的には前記アルファボディー構造配列内に含まれるポリペプチドが本明細書において提供される。

40

#### 【0088】

正荷電インターナリゼーション領域は、アルファボディー構造配列(本明細書において定義される)の少なくとも一部であり、本明細書において想定されるポリペプチドの2個の正荷電アミノ酸残基間に及ぶ配列と考えるべきである。

#### 【0089】

50

本発明との関連において、「正荷電アミノ酸」という用語は、アルギニンおよびリジンからなる群より選ばれたアミノ酸を指す。

【0090】

したがって、本明細書において提供されるポリペプチドは、正荷電アミノ酸残基で始まって正荷電アミノ酸残基で終わり、ポリペプチドが細胞に確実に侵入することができるようにする正荷電配列を含有する。

【0091】

本明細書において想定されるポリペプチドは、本明細書において想定されるインターナリゼーション領域の外側に位置するさらなる正荷電アミノ酸残基を含んでもよい（しかし、必ずしも含むのではない）ことが、当業者には明らかであろう。そのため、本明細書において記載されるインターナリゼーション領域の一部を形成せず、したがって、ポリペプチドの細胞透過能に寄与するとは考えられない一定数の正荷電アミノ酸残基が、本明細書において想定されるポリペプチド内に存在し得る。さらに、本明細書において想定されるポリペプチドは、互いに離れて位置するか、または互いにオーバーラップする2個以上の本明細書において記載されるインターナリゼーション領域を含んでもよく、含まなくてもよい。

10

【0092】

本明細書において想定されるポリペプチドの少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在をさらに特徴とする。少なくとも6個のアミノ酸残基は、アルギニンおよびリジンからなる群より選択され得る。実際、本発明者らは、本明細書において想定されるポリペプチド内の特定の位置で、6個以上の正荷電アミノ酸残基、例えば、アルギニンもしくはリジン、またはアルギニンとリジンとの混合物などをクラスター化すると、細胞内へのポリペプチドの高効率な侵入が確保されることを見出した。

20

【0093】

さらに、インターナリゼーション領域内の少なくとも6個の正荷電残基のうちの少なくとも4個の残基がアルギニンである場合、またはインターナリゼーション領域内の少なくとも6個の正荷電残基のうちの少なくとも5個の残基がリジンである場合、高効率な細胞透過が認められることが観察された。

30

【0094】

本明細書において想定されるポリペプチド内に含まれるインターナリゼーション領域は、(i)2個の正荷電アミノ酸残基間に及んでおり、(ii)少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とするアミノ酸断片である。特定の実施形態においては、それは

(iii)最大16個のアミノ酸からなるか、または  
(iv)少なくとも35%の正荷電アミノ酸からなる  
ことをさらに特徴とする。

【0095】

従来技術のアルファボディー配列は、本明細書において提供されるポリペプチドの構造的特徴におけるこの特定の組み合わせを含まないことが、当業者には明らかであろう。それと一致して、従来技術のアルファボディー配列は、本発明によって包含されない。

40

【0096】

したがって、本明細書において記載される正荷電インターナリゼーション領域は、2個の正荷電アミノ酸残基間に及ぶ最大16個のアミノ酸の断片であって、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とする断片であり得る。ある特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、2個の正荷電アミノ酸によって区切られている16個のアミノ酸の断片であって、少なくとも6個の正荷電アミノ酸の存在を特徴とする断片である。さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、6個、7個、8個、9個もしくは10個またはそれ以上、例えば、16個の正荷電アミノ酸を含有する16個のアミノ酸の断片であって、2個の正荷電アミノ酸によって区切られている断片で

50

ある。

【0097】

さらに特定の実施形態においては、前記領域は、2個の正荷電アミノ酸によって区切られている16個のアミノ酸の断片であって、少なくとも6個の正荷電アミノ酸の存在を特徴とし、これらのうちの少なくとも4個の残基がアルギニンであるか、またはこれらのうちの少なくとも5個の残基がリジンである断片である。

【0098】

さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、7個、8個、9個、10個またはそれ以上、例えば、16個の正荷電アミノ酸を含有することができ、合計で最大7個、8個、9個、10個または10個超、例えば、16個の正荷電アミノ酸を付加するアルギニンおよびリジンの組み合わせを含有する。正荷電アミノ酸残基のかかる組み合わせとしては、例えば、4個のアルギニンと3個のリジンとの組み合わせ、5個のアルギニンと3個のリジンとの組み合わせ、6個のアルギニンと4個のリジンとの組み合わせ、4個のアルギニンと4個のリジンとの組み合わせ、5個のアルギニンと4個のリジンとの組み合わせ、5個のアルギニンと5個のリジンとの組み合わせ、6個のアルギニンと3個のリジンとの組み合わせ、合計で最大16個までの正荷電アミノ酸残基を付加するアルギニンおよびリジンの任意の適切な他の組み合わせなどが挙げられる。

【0099】

さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、少なくとも4個、例えば、5個、6個、7個、8個、9個、10個または10個超、例えば、最大16個のアルギニンを含有し得る。さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、少なくとも5個、例えば、6個、7個、9個、10個または10個超、例えば、最大16個のリジンを含有し得る。

【0100】

本発明のある特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド内に含まれる正荷電インターナリゼーション領域内の少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基は、アルギニンのみからなるか、またはリジンのみからなる。代替的には、ある特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド内に含まれる正荷電インターナリゼーション領域内の少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基は、アルギニンとリジンとからなる。

【0101】

アルファボディー構造配列を含有するポリペプチド配列内で互いに接近してクラスター化された正電荷は、ポリペプチドの細胞透過を増強することが本発明者らによって見出された。

【0102】

したがって、本明細書において想定される少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、2個の正荷電アミノ酸間に及ぶ断片であって、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とし、少なくとも35%の正荷電アミノ酸からなる断片であり得る。特定の実施形態においては、本明細書において想定される少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、少なくとも35%の正荷電アミノ酸、例えば、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大100%の正荷電アミノ酸残基からなる。正荷電アミノ酸残基は、アルギニンおよびリジンであり得る。さらに特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド内の少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、少なくとも35%の正荷電アミノ酸からなり、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とし、これらのうちの少なくとも4個の残基はアルギニンである。さらに特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチド内の少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域は、少なくとも35%の正荷電アミノ酸残基からなり、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とし、これらのうちの少なくとも5個の残基はリジンである。

10

20

30

40

50

## 【0103】

実際、本発明者らは、驚くべきことに、-アルファボディー構造内に少なくとも部分的に、好ましくは全体的に位置する-アミノ酸残基を有する異なる比較的短い断片を、互いに接近して位置するいくつかの正荷電アミノ酸残基で修飾するか、またはこれらを付加すると、細胞透過ならびに細胞内安定性および機能性の両方の点で非常に望ましい特性を有するポリペプチドを作製することができることを見出した。

## 【0104】

従来技術において、細胞透過を増強するために、タンパク質を無作為に正に荷電させるかまたはカチオン化して、タンパク質表面全体にわたって電荷を本質的に広げようとする多くの試みがなされているが、多くの副作用が観察されており、細胞内の機能性を実証することができていない。これらの副作用には、例えば、細胞小器官および細胞膜への非特異的な結合または粘性、「過荷電」による不安定性および静電反発力、凝集をもたらす変性、ならびに例えば膜成分と酸性タンパク質との偽相互作用が含まれていた。

10

## 【0105】

しかしながら、アルファボディー構造配列を含有するポリペプチド配列の狭い窓、すなわち、約15～20個のアミノ酸残基、好ましくは16個以下のアミノ酸残基に対応する窓において互いに接近して位置する正電荷によって、ポリペプチドの細胞透過を最適に達成することができることが、本発明者らによって今回見出された。

## 【0106】

本明細書において想定される特定の実施形態においては、本明細書において記載されるポリペプチドのインターナリゼーション領域の正電荷は、ポリペプチド内の狭い窓において互いに接近して位置する。正荷電インターナリゼーション領域は、ポリペプチド中の、HRS1-L1-HRS2-L2-HRS3によって一般に表されるアルファボディー構造内に少なくとも部分的に位置すると想定される。より具体的には、インターナリゼーション領域の正荷電アミノ酸の少なくとも50%は、アルファボディー構造内に位置する。この評価のために、インターナリゼーション領域は、2個の正荷電アミノ酸間に及んでおり、少なくとも6個の正荷電アミノ酸を含有するアミノ酸の最長ストレッチ（最大16AA以下）であると考えられる。ある特定の実施形態においては、本明細書において想定されるインターナリゼーション領域内の正荷電アミノ酸残基の少なくとも60%、例えば少なくとも70%、80%、90%または100%（すなわち、すべて）は、本明細書において提供されるポリペプチドのアルファボディー構造配列内に含まれる。本明細書において想定されるポリペプチドのさらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域の少なくとも80%は、限られた数のアミノ酸（例えば、多くとも約3/16個のアミノ酸）がアルファボディー構造の外側のポリペプチドに及ぶように、アルファボディー構造内に組み込まれる（または、全体的に含まれる）（例えば、少なくとも約13/16個のアミノ酸は、ポリペプチド中のアルファボディー構造内に位置する）。また、本明細書において想定されるポリペプチドは包含しないが、特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域全体は、アルファボディー構造配列内に位置すると理解されよう。

20

30

## 【0107】

特定の実施形態においては、少なくとも1個のインターナリゼーション領域は、前記少なくとも1個のアルファボディー構造配列の1個の-ヘリックス(HRS1、HRS2またはHRS3)内に完全にまたは全体的に含まれる。さらに特定の実施形態においては、少なくとも1個のインターナリゼーション領域は、-ヘリックスおよびリンカー(HRS1-L1、L1-HRS2、HRS2-L2、L2-HRS3)間のオーバーラップに対応する領域内に含まれる。よりさらなる実施形態においては、少なくとも1個のインターナリゼーション領域は、リンカー(L1、L2)内に位置する。

40

## 【0108】

このインターナリゼーション領域内の正荷電アミノ酸は、互いに隣接して位置する必要はないが、1個以上の正に荷電していないアミノ酸によって区切られ得る。実際、当業者であれば、アルファボディーモチーフによって、ある特定の制限が課されることを認識す

50

るであろう。一般的に、インターナリゼーション領域は、最大16個のアミノ酸残基の断片内において、互いから最も遠くに位置する2個の正荷電アミノ酸残基間に及ぶと考えられる。

#### 【0109】

アルファボディー内のインターナリゼーション領域の正荷電アミノ酸の位置は、インターナリゼーションの有効性に影響を与えるであろう。実際、特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域の1個以上の正荷電アミノ酸残基は、アルファボディーの外表面上、具体的には、例えば、アルファボディーの少なくとも1個のヘリックスの溶媒配向(solvent-oriented)外表面上などのアルファボディーの溶媒配向外表面上に位置する。実際、インターナリゼーション領域の正荷電アミノ酸残基が、アルファボディー構造または骨格の外表面に位置する場合、インターナリゼーションが向上することが見出された。したがって、特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域の正荷電アミノ酸は、ポリペプチド内のアルファボディー構造のヘリックスの外表面上、より具体的には、(もっぱら)アルファボディー構造のヘリックスの外表面上に位置する。

10

#### 【0110】

前記の観点から、正荷電アミノ酸がアルファボディー構造内の特定の位置に提供される場合に、改善されたインターナリゼーションを得ることができることが立証された。したがって、特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、正荷電アミノ酸の特定のモチーフを含有する。したがって、かかるモチーフまたはパターンは、特定の位置に1個以上の特徴的なアミノ酸残基(または、前記アミノ酸残基をコードする核酸配列)を含有するタンパク質レベルの異なるアミノ酸配列(または、遺伝子レベルでは核酸配列)である。ある特定のCPABモチーフ(本明細書において使用される)内の「特徴的なアミノ酸残基」は、そのCPABモチーフ内のアミノ酸残基であって、そのCPABモチーフを含有するCPABアルファボディーの細胞透過能に重要なアミノ酸残基を表す。したがって、(例えば、変異またはデ・ノボ配列設計によって)CPABアルファボディー内のCPABモチーフのいわゆる「特徴的なまたは重要な残基」の同一性を変えることは、そのCPABアルファボディーの細胞透過能に影響を与えるであろう。

20

#### 【0111】

ある特定の実施形態においては、正荷電アミノ酸残基の数が4個未満に低減した場合、本明細書において想定されるインターナリゼーション領域のCPABモチーフは、ポリペプチドの細胞インターナリゼーションをもはや媒介することができない。

30

#### 【0112】

上に詳述したように、本明細書において使用される正荷電インターナリゼーション領域、CPABモチーフまたはCPABパターンは、少なくとも部分的には、アルファボディー構造配列自体(本明細書において定義される)に組み込まれており、そのため、細胞透過を確保するためにアルファボディー配列の一方の末端に結合された(conjugated)または結合された(attached)細胞透過性ペプチドもしくはタンパク質配列または他の細胞透過性基とは異なるものである。

40

#### 【0113】

ポリペプチドのアルファボディー構造内のインターナリゼーション領域の位置は重要ではなく、すなわち、本明細書において想定される正荷電インターナリゼーション領域は、アルファボディー構造のヘリックスA、BまたはC内に位置し得ることが見出された。

#### 【0114】

特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、アルファボディー構造のヘリックスA内に位置する少なくとも1個のインターナリゼーション領域を含有する。さらに特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、アルファボディー構造のヘリックスC内に位置する少なくとも1個のインターナリゼーション領域を含有する。さらに特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、本明細書において記載されるアルファボディー構造のヘリックスA内

50

およびヘリックス C 内にそれぞれ位置する 2 個のインターナリゼーション領域を含有する。

**【 0 1 1 5 】**

ある特定の実施形態においては、アルファボディー構造の 2 個の異なる部分（例えば、A - ヘリックスおよびC - ヘリックス）内の 2 個のインターナリゼーション領域の組み合わせが、細胞内への透過性を増加させ得ることも見出された。

**【 0 1 1 6 】**

しかしながら、特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、アルファボディー構造のループまたはリンカー領域内に含まれないことが好ましい。さらに特定の実施形態においては、アルファボディー構造の 3 個のヘリックスのうちの多くとも 2 個のヘリックスは、インターナリゼーション領域を含有することが想定される。10

**【 0 1 1 7 】**

さらに特定の好ましい実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、アルファボディー構造の 1 個の - ヘリックス、例えば、A - ヘリックス、B - ヘリックスまたはC - ヘリックス内にのみ位置し、これに実質的に完全に含まれる少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域を含有する。さらに特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、アルファボディー構造の 1 個の - ヘリックス、例えば、A - ヘリックスまたはC - ヘリックス内にのみ位置し、これに実質的に完全に含まれる少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域を含有する。20

**【 0 1 1 8 】**

特定の実施形態においては、正荷電アミノ酸残基は、アルファボディー骨格の従来のヘプタッドの b 位、c 位、e 位、f 位および g 位、すなわち、非コア位置（本明細書において定義される）に位置し、これらの位置は、一般的に、外側に、すなわち、アルファボディー骨格の溶媒曝露 - ヘリックス表面に位置する。

**【 0 1 1 9 】**

したがって、特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、例えば（限定されるものではないが）、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に含まれる 16 個のアミノ酸の下記断片内に存在することができる：

X X H X X X H X X H X X X H X X

（式中、H は、疎水性アミノ酸残基および / または無極性アミノ酸残基を表し、30

X は、親水性アミノ酸残基および / または極性アミノ酸残基を表し、

少なくとも 6 個の X 残基は、アルギニンまたはリジンのいずれかである）。特定の実施形態においては、H は、イソロイシンを表す。

**【 0 1 2 0 】**

よりさらに特定の実施形態においては、前記モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に含まれる 16 個のアミノ酸の断片 X X H X X X H X X H X X X H X X

（式中、H は、疎水性アミノ酸残基および / または無極性アミノ酸残基を表し、40

X は、親水性アミノ酸残基および / または極性アミノ酸残基を表し、ただし、少なくとも 6 個の X 残基は、アルギニンまたはリジンのいずれかである）の小断片である。特定の実施形態においては、H は、イソロイシンを表す。

**【 0 1 2 1 】**

本発明者らによって、様々な有用な正荷電インターナリゼーションモチーフが同定された。以下は、非限定的な数のその例の代表的なものである。

**【 0 1 2 2 】**

（i）特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z Z X X Z X X Z Z X X Z （式中、Z は、正荷電アミノ酸を表し、X は、任意のアミノ酸残基を表す）に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P H P P H P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチ50

ーフの位置は、正荷電アミノ酸（Z）がヘリックスの外表面上に位置するような H Z Z H P Z P H Z Z H P Z P H P P H P P P H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a (式中、X a a は、極性アミノ酸である) (配列番号：13) に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

#### 【0123】

(i i ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z X X Z X X Z Z X X Z X X Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P P H P P P H P P P P H P P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P Z H P Z P H Z Z H P Z P H Z P H P P P H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：14) に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

10

#### 【0124】

(i i i ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z X X Z Z X X Z X X X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P P H P P H P P P H P P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H P Z P H Z Z H P Z P H Z Z H P P P P H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：15) に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

20

#### 【0125】

(i v ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z X X Z X X X Z X X X Z X X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P H P P P H P P P H P P P H P P P H P P P H P P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H Z P H Z P P H Z P H P Z P H Z Z H P P P P H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：16) に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

30

#### 【0126】

(v) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z X X X Z X X X Z X X Z Z X X Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P P H P P P H P P P H P P P H P P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H Z P P H Z P H P Z P H Z Z H P Z P H P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - A r g - X a a - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：17) に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

40

50

【 0 1 2 7 】

10

【 0 1 2 8 】

(v i i) さらに特定の実施形態においては、前記C P A B モチーフは、Z X X Z Z X X Z X X Z Z X X Z X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す)に対応する。より具体的には、このC P A B モチーフは、アルファアボディー構造における1個以上のヘリックスのヘブタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造H P P H P P P H P P H P P P H P P H P P P H P Pを特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H Z P H Z Z P H Z P H Z Z P H Z Z H Z Z P H P Pに対応する。特定の実施形態においては、モチーフがI l e - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a (配列番号：19)に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

20

【 0 1 2 9 】

( v i i i ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、 Z X X Z Z  
 X X Z X X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す)に対応する。より具体的には、このC P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P  
 P H P P H P P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H Z P  
 H Z Z P H Z P H Z Z P H P P H P P P H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - I l e - A r g - A r g - X a a  
 - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a  
 (配列番号：20)に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

30

[ 0 1 3 0 ]

( i x ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、 Z Z X X Z X X Z Z X X Z (式中、 Z は、正荷電アミノ酸を表す)に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P H P P H P P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、 H P P H Z Z P H Z P H Z Z P H Z P H P P P H P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号： 21 )に対応するように、 H はイソロイシンであり、 Z はアルギニンである。

40

[ 0 1 3 1 ]

(x) さらに特定の実施形態においては、前記C P A B モチーフは、Z X X Z Z X X Z X X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す)に対応する。より具体的には、このC P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造H P P H P P P H P P P H P P P H P P H P P P H P Pを特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H P P

50

P H Z P H Z Z P H Z P H Z Z P H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - X a a (配列番号：22) に対応するように、H はイソロイシンであり、Z はアルギニンである。

#### 【0132】

(x i) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z Z X X Z X X X Z X X Z Z X X Z Z X Z Z (式中、Z は、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P H P P P H P P H P P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H Z Z P H Z P H P Z P H Z Z H P Z Z H Z Z に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - A r g (配列番号：23) に対応するように、H はイソロイシンであり、Z はアルギニンである。

10

#### 【0133】

(x i i) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z Z X X Z X X X Z X X Z Z (式中、Z は、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P H P P P P H P P H P P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H Z Z P H Z P H P Z P H Z Z H P P P H P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - A r g - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：24) に対応するように、H はイソロイシンであり、Z はアルギニンである。

20

#### 【0134】

(x i i i) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z X X Z X X X Z X X Z Z X X Z (式中、Z は、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P H P P P H P P P P H P P P H P P P H P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H P Z P H Z P H P Z P H Z Z H P Z Z H P P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：25) に対応するように、H はイソロイシンであり、Z はアルギニンである。

30

#### 【0135】

(x i v) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、Z X X X Z X X Z Z X X Z Z (式中、Z は、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P P H P P P H P P P P H P P P H P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H P P P H Z P H P Z P H Z Z H P Z Z H P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - A r g - I l e - X a a - A r g - A r g - I l e - X a a - X a a (配列番号：26) に対応するように、H はイソロイシンであり、Z はアルギニンである。

40

#### 【0136】

50

( x v ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、 Z X X Z Z X X Z Z X Z (式中、 Z は、正荷電アミノ酸を表す) に対応する。より具体的には、この C P A B モチーフは、アルファボディー構造における 1 個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P P H P P H P P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、 H P P H P P P P H P P P H P Z P H Z Z H P Z Z H Z P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - A r g - I l e - A r g - X a a (配列番号： 27 ) に対応するように、 H はイソロイシンであり、 Z はアルギニンである。

10

[ 0 1 3 7 ]

(xvi) さらに特定の実施形態においては、前記C P A B モチーフは、Z Z X X Z Z X Z Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す)に対応する。より具体的には、このC P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造H P P H P P P H P P P H P P P H P P P H P P P H P P P H P P P H Z Z H P Z Z H Z Zに対応する。特定の実施形態においては、モチーフがI l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - A r g - I l e - A r g - A r g (配列番号：28)に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

20

〔 0 1 3 8 〕

30

[ 0 1 3 9 ]

( x v i i i ) さらに特定の実施形態においては、前記 C P A B モチーフは、 Z Z X X Z X X Z Z X X Z (式中、Zは、正荷電アミノ酸を表す)に対応する。より具体的には、このC P A B モチーフは、アルファボディー構造における1個以上のヘリックスのヘプタッド反復配列内に位置する。特定の実施形態においては、構造 H P P H P P P P H P P P H P P P P H P P P H P P P H P P を特徴とするヘリックス構造上のこのモチーフの位置は、H P P H P P P H Z Z H P Z P H Z Z H P Z P H P P に対応する。特定の実施形態においては、モチーフが I l e - X a a - X a a - I l e - X a a - X a a - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - X a a - X a a (配列番号：30)に対応するように、Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

40

[ 0 1 4 0 ]

50

`r g - A r g - I l e - X a a - A r g - X a a - I l e - A r g - A r g - I l e - X  
a a - A r g - X a a - I l e - A r g - X a a` (配列番号: 31) に対応するように、  
Hはイソロイシンであり、Zはアルギニンである。

【 0 1 4 1 】

[ 0 1 4 2 ]

したがって、特定の実施形態においては、インターナリゼーションモチーフは、 $Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z$ 、 $Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ （式中、Zは、正荷電アミノ酸を表し、Xは、任意のアミノ酸残基を表す）から選ばれる。さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーションモチーフは、 $Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ Z$ 、 $Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z$ 、 $Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z\ Z\ X\ X\ Z\ X\ X\ Z$ （式中、Zは、正荷電アミノ酸を表し、Xは、任意のアミノ酸残基を表す）から選ばれる。

[ 0 1 4 3 ]

当業者であれば、本明細書において示されるCPABモチーフのさらなるバリエーションを想定することは明らかであろう。

[ 0 1 4 4 ]

前記に詳述したように、本明細書において想定されるポリペプチドは、アルファボディ構造内に2個以上のインターナリゼーション領域を含有してもよい。かかるモチーフは、同じモチーフまたは異なるモチーフを含有してもよい。

( 0 1 4 5 )

本明細書において想定されるポリペプチド内の1個以上のインターナリゼーション領域（すなわち、1領域あたり最大16個のアミノ酸の断片に及ぶ）は、正味電荷を有するとして特性決定され得る。本明細書において想定される正荷電インターナリゼーション領域の正味電荷は、一般的に、インターナリゼーション領域内の正荷電アミノ酸の合計に対応する。特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域の正味電荷は、少なくとも+6である。+7、+8、+9、+10、例えば、最大+16の正味電荷を有する正荷電インターナリゼーション領域が提供され得ることがさらに想定される。

【 0 1 4 6 】

(実施例1～3に詳述されているように)CPABモチーフは、標的結合部位を破壊せずにアルファボディー骨格に組み込まれ得ることが実証された。

【 0 1 4 7 】

特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、少なくとも1個のアルファボディー構造配列を含有し、これは、

( i ) 本明細書において記載される少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域であって、少なくとも部分的には前記アルファボディー構造配列内に含まれるインターナリゼーション領域の存在によって細胞の内部に取り入れられることができ、加えて、

( i i ) 主に、アルファボディー構造配列上に存在する結合部位を介して細胞内標的分子に特異的に結合する。

【 0 1 4 8 】

これらの特定の実施形態においては、本明細書において提供されるポリペプチドは、主に、アルファボディー構造配列の B - ヘリックス上に存在する結合部位を介して細胞内標的分子に特異的に結合する。

【 0 1 4 9 】

ある特定の実施形態においては、アルファボディー構造を含有するポリペプチドであって、細胞内標的に結合することができ、前記ポリペプチド内に存在するアルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に位置する 1 個以上の正荷電インターナリゼーション領域の存在を特徴とし、インターナリゼーション領域が、少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とする 16 個以下のアミノ酸残基の断片からなるポリペプチドが提供される。  
10

【 0 1 5 0 】

ある特定の実施形態においては、アルファボディー構造を含有するポリペプチドであって、細胞内標的に結合することができ、前記ポリペプチド内に存在するアルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に位置する少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域の存在を特徴とし、インターナリゼーション領域が、少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とし、少なくとも 35 % の正荷電アミノ酸からなるポリペプチドが提供される。  
20

【 0 1 5 1 】

さらに特定の実施形態においては、アルファボディー構造を含有するポリペプチドであって、細胞内標的に結合することができ、前記ポリペプチド内に存在するアルファボディー構造配列内に少なくとも部分的に位置する 1 個以上のインターナリゼーション領域の存在を特徴とし、インターナリゼーション領域が、少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基を含有し、これらのうちの ( i ) 少なくとも 4 個の残基がアルギニンであるか、または ( i i ) 少なくとも 5 個の残基がリジンであるポリペプチドが提供される。ある特定のさらに特定の実施形態においては、少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域は、16 個以下のアミノ酸残基の断片からなる。ある特定のさらに特定の実施形態においては、少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域は、少なくとも 35 % の正荷電アミノ酸からなる。  
30

。

【 0 1 5 2 】

本明細書において提供されるポリペプチドのさらに特定の実施形態においては、少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域内に含まれる少なくとも 80 % のアミノ酸残基は、少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列内に含まれ；かつ、よりさらに特定の実施形態においては、少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域は、前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列内に実質的に完全に含まれ、例えば、前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列の 1 個の - ヘリックス内に ( 実質的に完全に ( e n t i r e l y ) ) 含まれる。さらに特定の実施形態においては、少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域は、前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列の A - ヘリックス内および / または C - ヘリックス内に ( 実質的に完全に ) 含まれる。  
40

【 0 1 5 3 】

さらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、少なくとも 30 % の正荷電アミノ酸残基からなり、全部を正に荷電していないアミノ酸に変異させると、そのインターナリゼーション領域を含有するポリペプチドの細胞取り込みが、少なくとも 50 %、例えば、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、または少なくとも 90 % またはそれ以上低減するようなものである。よりさらに特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域は、少なくとも 30 % の正荷電アミノ酸残基からなり、全部を正に荷電していないアミノ酸に変異させると、そのインターナリゼーション領域を含有するポリペプチドの細胞取り込みが、実質的に完全に無効化されるようなものであ  
50

る。

#### 【0154】

本明細書において想定されるポリペプチドは、細胞内の細胞内標的の生物学的機能に直接的または間接的に影響を与える能力を有するので、多種多様な疾患徵候において、医療、すなわち治療または予防用途に特に有用である。

#### 【0155】

##### [目的の細胞内標的]

本明細書において詳述されるように、特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、細胞内標的に影響を与える化合物を連結するための担体分子として使用されることが想定される。ある特定のさらに特定の実施形態においては、ポリペプチドは、アルファボディー構造内に、細胞内タンパク質への結合部位を含有することが想定される。10

#### 【0156】

ある特定の実施形態において想定されるアルファボディーおよびポリペプチドが特異的に結合することができる細胞内標的分子の例としては、限定されるものではないが、細胞シグナリング、細胞シグナル伝達、細胞および分子輸送（例えば、能動輸送または受動輸送）、透過、ファゴサイトーシス、オートファジー、細胞老化、細胞接着、細胞運動、細胞遊走、細胞質流動、DNA複製、タンパク質合成、複製（例えば、細胞周期、減数分裂、有糸分裂、間期、細胞質分裂）、細胞代謝（例えば、解糖および呼吸、エネルギー供給）、細胞伝達、DNA修復、アポトーシスおよびプログラム化された細胞死からなる群より選ばれた細胞のプロセスに関するタンパク質などが挙げられる。本明細書において想定されるポリペプチドは、さらに、細胞内環境でそれらの生物学的活性を維持することができる。実際、本明細書において提供されるポリペプチドは細胞内環境で安定であるだけではなく、当該ポリペプチドの細胞内標的に有効に結合し、当該細胞内標的の機能を阻害することもできることが本明細書において示された。20

#### 【0157】

本明細書において記載される特定のポリペプチドは、BCL-2ファミリーのタンパク質の抗アポトーシス性メンバーに特異的に結合することができる。BCL-2ファミリーのタンパク質の抗アポトーシス性メンバーの例としては、MCL-1、BCL-2、BCL-X<sub>L</sub>、BCL-wおよびBFL-1/A1である。1個のアルファボディーが、いくつかの（すなわち、1個以上の）目的の細胞内タンパク質に結合し得ることを理解するべきである。特定の実施形態においては、アルファボディーの結合は、アルファボディーのコイルドコイル構造内で安定化されているその1個の-ヘリックスによって行なわれる。30

#### 【0158】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、MCL-1に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：3～6、9および10から選ばれた配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0159】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、MCL-1に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：7に定義されたポリペプチド配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%またはそれ以上の配列同一性を有する配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。40

#### 【0160】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、MCL-1に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：8(LRXVGDXV)に定義された配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0161】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、BCL-50

2 a に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：9 および 10 から選ばれた配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0162】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、BCL-XL に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：9 および 10 から選ばれた配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0163】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、BCL-2a および / または BCL-XL に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：11 (MSIEEIAAQIAAIQLRIGDQFNIYYMT) に定義されたポリペプチド配列と少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95% またはそれ以上の配列同一性を有する配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。  
10

#### 【0164】

特定の実施形態においては、細胞によって内部に取り入れられることができ、BCL-2a および / または BCL-XL に結合することができるポリペプチドであって、配列番号：12 (LRIGDQF) に定義された配列を含有することを特徴とするポリペプチドが提供される。

#### 【0165】

特定の実施形態においては、ある特定の実施形態において想定されるアルファボディーおよびポリペプチドが特異的に結合することができる細胞内標的分子は、動物細胞、特に哺乳動物細胞またはヒト細胞などの真核細胞において起こるプロセスに本來的に関与する細胞内タンパク質を含む。  
20

#### 【0166】

##### [アルファボディー・ポリペプチドの結合親和性]

一般的に、本明細書において想定されるポリペプチドは、目的の標的タンパク質と、約 1 マイクロモル ( $1 \mu M$ ) 未満、好ましくは約 1 ナノモル ( $1 nM$ ) 未満の解離定数 ( $K_D$ ) [すなわち、約  $1,000,000 / \text{モル}$  ( $10^6 M^{-1}$ 、 $1 E 6 / M$ ) 以上、好ましくは約  $1,000,000,000 / \text{モル}$  ( $10^9 M^{-1}$ 、 $1 E 9 / M$ ) 以上の結合定数 ( $K_A$ ) で] で結合するものである。約 1 ミリモルより大きい  $K_D$  値は、非結合または非特異的結合を示すと一般に考えられている。 $K_D$  が、 $k_{off}$  (秒 $^{-1}$  または  $s^{-1}$  で表わされる) で表わされる複合体の解離速度定数対  $k_{on}$  (モル $^{-1} \text{秒}^{-1}$  または  $M^{-1} s^{-1}$  で表わされる) で表わされるその結合速度定数の割合として表わすことは、当該技術分野において一般的に公知である。特に、本明細書において開示されるポリペプチドは、目的の標的タンパク質と、 $0.1 \sim 0.0001 s^{-1}$  の間の範囲の  $k_{off}$  および / または  $1,000 \sim 1,000,000 M^{-1} s^{-1}$  の間の範囲の  $k_{on}$  で結合するものである。結合親和性、 $k_{off}$  および  $k_{on}$  の速度は、当業者に公知の方法、例えば、ELISA 法、等温滴定熱量計、表面プラズモン共鳴、蛍光標識細胞分取分析などを用いて決定することができる。  
30

#### 【0167】

##### [アルファボディー骨格の構造]

本明細書において記載される標的結合ポリペプチドは、一般式 HRS1-L1-HRS2-L2-HRS3 を有する 1 個以上のアルファボディー骨格を含有し、任意に、追加の N 末端連結基、C 末端連結基、残基または部分を含有するアミノ酸配列であり、HRS1、HRS2 および HRS3 は、それぞれ独立して、a b c d e f または d e f g a b c によって一般に表される、2 ~ 7 個の連続するが必ずしも同一ではないヘプタッド反復単位を含有するヘプタッド反復配列 (HRS) である。  
40

#### 【0168】

前記のようにアルファボディー構造のヘプタッド反復単位は、「a b c d e f g」または「d e f g a b c」として一般に表わされ、「a」~「g」の記号は、従来のヘプタッ

ドの位置を表わす。本明細書において記載されるアルファボディーの各ヘプタッド単位における「a位」および「d位」は、溶媒遮蔽された（すなわち、埋もれた）コア残基が位置している、コイルドコイル構造のアミノ酸残基の位置である。アルファボディー構造の各ヘプタッド単位における「e位」および「g位」は、部分的に溶媒曝露されたアミノ酸残基が位置している、コイルドコイル構造のアミノ酸残基の位置である。三重コイルドコイルにおいて、これらの「e位」および「g位」は、空間的に隣接する2個の-ヘリックス間に形成される溝中に位置し、対応するアミノ酸残基は、一般に「溝残基」と表わされる。アルファボディー構造の各ヘプタッド単位における「b位」、「c位」および「f位」は、コイルドコイル構造においてもっとも溶媒曝露された位置である。

## 【0169】

10

「a b c d e f g」型の（本明細書において定義される）ヘプタッドモチーフは、一般的に、「H P P H P P P P」として表わされ、一方、「d e f g a b c」型の「ヘプタッドモチーフ」は、一般的に、「H P P P H P P P」で表わされ、式中、記号「H」は、非極性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸残基を表わし、記号「P」は、極性アミノ酸残基または親水性アミノ酸残基を表わす。a位またはd位に位置する典型的な疎水性残基は、脂肪族アミノ酸残基（例えば、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン）または芳香族アミノ酸残基（例えば、フェニルアラニン）が挙げられる。コイルドコイル配列内のヘプタッドは、極性残基が時として「H」位に位置し、疎水性残基が「P」位に位置することもあるので、必ずしも疎水性残基および極性残基の理想的なパターンに従うものではない。したがって、パターン「H P P H P P P P」および「H P P P H P P P」は、理想的なパターンおよび特徴的な参考モチーフとして考えるべきである。時として、特徴的ヘプタッドモチーフは、「H P P H C P C」または「H x x H C x C」として表わされ、式中「H」および「P」は前記と同じ意味を有し、「C」は荷電残基（リジン、アルギニン、グルタミン酸またはアスパラギン酸）を表わし、「x」は任意の（非特定）天然アミノ酸残基を表わす。ヘプタッドは、同様に良好にd位から開始してもよく、後者のモチーフは、「H C P C H P P」または「H C x C H x x」として書くこともできる。単鎖アルファボディーは、ヘプタッドのe位およびg位の荷電（「C」）残基の間のイオン相互作用の助けを必要としないほど、本来安定あることに留意すべきである。

20

## 【0170】

30

（本明細書において定義される）アルファボディー構造の単鎖構造内のリンカーは、H R S配列、より具体的には、アルファボディーにおける第1のH R Sと第2のH R Sとを、および第2のH R Sと第3のH R Sとを相互に連結させている。アルファボディーにおける各リンカー配列は、先行するH R Sの最後の（部分）ヘプタッド残基に続いて開始し、次のH R Sの最初のヘプタッド残基に先行する残基で終了する。H R S断片間のジスルフィド架橋もしくは化学的架橋を介した、または一般に、（鎖内結合に対する）鎖間結合の任意の手段を介した連結は、単鎖アルファボディーの定義と矛盾するので、リンカー断片の定義から（少なくともアルファボディーに関連して）明白に除外される。アルファボディーにおけるリンカー断片は、好ましくは立体構造において柔軟であり、-ヘリックスコイルドコイル構造としての3個のヘプタッド反復配列の緩んだ（妨害されない）会合を確保する。さらに、アルファボディーとの関連において、「L1」は、リンカー断片1、すなわち、H R S 1とH R S 2との間のリンカーを表わし、一方、「L2」は、リンカー断片2、すなわち、H R S 2とH R S 3との間のリンカーを表わすものとする。アルファボディー構造における使用に適切なリンカーは、当業者には明らかであり、アルファボディーの特徴的な三次元コイルドコイル構造に影響を与えないという意味で、リンカーが構造的に柔軟であれば、一般にアミノ酸配列を連結する当該技術分野において使用される任意のリンカーであってよい。特定のアルファボディー構造における2個のリンカーL1およびL2は、同じであってもよく、異なっていてもよい。本明細書のさらなる開示に基づいて、当業者は、任意に、限られた数の日常的実験の実施後に、特定のアルファボディー構造に最適なリンカーを決定することができるであろう。特定の実施形態においては、リンカーL1およびL2は、少なくとも4個のアミノ酸残基、具体的には、少なくとも8

40

50

個のアミノ酸残基、さらに具体的には、少なくとも 12 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列であり、利便性の理由から選ばれた重要性の低い上限は、約 30 アミノ酸残基である。特定の限定されない実施形態においては、好ましくは、リンカー配列の少なくとも 50 % のアミノ酸残基は、プロリン、グリシンおよびセリンの群より選ばれる。さらなる限定されない実施形態においては、好ましくは、リンカー配列の少なくとも 60 %、例えば、少なくとも 70 %、例えば、80 %など、より具体的には、90 % のアミノ酸残基は、プロリン、グリシンおよびセリンの群より選ばれる。他の特定の実施形態においては、リンカー配列は、主に極性アミノ酸残基を含有し、かかる特定の実施形態においては、好ましくはリンカー配列の少なくとも 50 %、例えば、少なくとも 60 %、例えば、70 % または 80 %など、より具体的には 90 % または最大 100 % のアミノ酸残基はグリシン、セリン、スレオニン、アラニン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、リジンおよびアルギニンからなる群より選ばれる。

10

## 【0171】

ある特定の実施形態においては、アルファボディー構造内のリンカー L1 および L2 は、それぞれ独立して、HRS1 と HRS2 とを共有結合的に連結するリンカー断片、および HRS2 と HRS3 とを共有結合的に連結するリンカー断片であり、少なくとも 4 アミノ酸残基からなり、好ましくはその少なくとも 50 % がプロリン、グリシン、セリンの群より選ばれる。

## 【0172】

本開示との関連において、「コイルドコイル」または「コイルドコイル構造」は、本明細書において互換的に使用され、当業者には、共通の一般知識ならびに本明細書に引用した説明およびさらなる参考文献に基づき明らかであろう。これに関する具体的な参考文献は、コイルドコイル構造に関する総説、例えば、コヘン (Cohen) およびパリー (Parry)、Proteins 1990, 7: 1-15; コーン (Kohn) およびホッジ (Hodges)、Trends Biotechnol 1998, 16: 379-389; シュナイダー (Schneider) ら、Fold Des 1998, 3: R29-R40; ハーブリー (Harbury) ら、Science 1998, 282: 1462-1467; メーソン (Mason) およびアント (Arndt)、Chem Biochem 2004, 5: 170-176; ルパス (Lupas) およびグリューバー (Gruber)、Adv Protein Chem 2005, 70: 37-78; ウールフソン (Woolfson)、Adv Protein Chem 2005, 70: 79-112; パリー (Parry) ら、J Struct Biol 2008, 163: 258-269; マクファーレン (McFarlane) ら、Eur J Pharmacol 2009: 625: 101-107などを特に参照されたい。

20

## 【0173】

アルファボディーの「コイルドコイル」構造は、-ヘリックスヘプタッド反復配列のアセンブリであると考えることができ、ヘリックスヘプタッド反復配列は前記の定義のとおりであり、

30

- 前記 -ヘリックスヘプタッド反復配列は、左巻きの超ねじれ (super twist) (超らせん) (互いの周りに巻き付いている) で巻き上がっている;
- a 位および d 位のコア残基は、アセンブリのコアを形成し、それらは、ソケットアルゴリズム (Socket algorithm) [ウォルシャー (Walshaw) およびウールフソン (Woolfson)、J Mol Biol 2001, 307: 1427-1450]において定義され、ルパス (Lupas) およびグリューバー (Gruber)、Adv Protein Chem 2005, 70: 37-78において繰り返された knobs-into-holes 様式で、互いにパックする;
- コア残基は、普通のコアパッキング層にパックされ、この層は、シュナイダー (Schneider) ら、Fold Des 1998, 3: R29-R40において定義されている。

40

## 【0174】

50

アルファボディー構造のコイルドコイル構造は、普通の3ヘリックスバンドルと混同されるべきではない。真のコイルドコイルと非コイルドコイルのヘリカルバンドルとの識別の基準は、デスマット(Desmet)ら、国際公開第2010/066740A1号およびシュナイダー(Schneider)ら、Fold Des 1998, 3: R29-R40で与えられ、かかる基準は、本質的に、それぞれ、コイルドコイルおよびヘリックスバンドルのコア残基のパッキングにおける構造対称性の有無に関する。さらに、コイルドコイルおよびヘリックスバンドルに関する左巻きの超らせんの有無は、それぞれ両方のタイプのフォールディングを識別する有用な基準を提供する。

#### 【0175】

原則として、前述の基準は、2重、3重、4重およびさらにそれ以上のコイルドコイルに適用されるが、本明細書において想定されるアルファボディー構造は、3重コイルドコイルに限定される。アルファボディーにおけるコイルドコイル領域は、すべての - ヘリックスを平行配向(出願人コンプリクス エン ヴェー(Complix NV)による  
10  
欧洲特許出願公開第2161278号明細書に記載の「平行アルファボディー」に対応する)または3本の - ヘリックスのうちの1本を他の2本に対して逆平行(出願人コンプリクス エン ヴェーによる国際公開第2010/066740号に記載の「逆平行アルファボディー」に対応する)に組織化することができる。

#### 【0176】

一般的に、(本明細書において定義される)アルファボディー構造の - ヘリックス部分は、ヘプタッド反復配列と極めて一致するがインターフェイスの近くで違いが存在し得る。例えば、明瞭なヘプタッドモチーフを有する配列断片は、1個以上のヘリックスをゆがめる残基(helix-distorting residues)(例えば、グリシンまたはプロリン)の存在により非ヘリカルであり得る。逆に、リンカー断片の部分は、ヘプタッド反復領域の外側に位置しているという事実にもかかわらず、 - ヘリックスであり得る。さらに、1個以上の - ヘリックスヘプタッド反復配列の任意の部分が、単鎖アルファボディーの - ヘリックス部分と考えられる。

#### 【0177】

(本明細書において定義される)アルファボディー構造(の - ヘリックス)の溶媒配向領域は、重要なアルファボディー領域である。アルファボディーにおける - ヘリックスの構成の点から、ヘプタッドのa位およびd位における残基がコアを形成し、溶媒配向領域は、b残基、c残基およびf残基によって大部分が形成される。1個の単鎖アルファボディーあたり3個、すなわち、各 - ヘリックス中1個のかかる領域が存在する。かかる溶媒配向領域の任意の部分が、溶媒配向領域であるとも考えられる。また、例えば、アルファボディーの - ヘリックスにおける3個の連続するヘプタッド由来の、b残基、c残基およびf残基によって構成されるサブ領域も、溶媒配向表面領域を形成するものである。

#### 【0178】

アルファボディーにおける隣接する2個の - ヘリックスの間の溝(の表面)の形成に関係する残基は、一般に、ヘプタッドのe位およびg位に位置するが、より曝露されたb位およびc位のいくつか、ならびに大部分が埋もれたコアのa位およびd位のいくつかも、溝表面に寄与することができ、このことは、これらの位置に置かれたアミノ酸側鎖のサイズに基本的に依存するものであろう。空間的に隣接する前記 - ヘリックスが平行に延びている場合、ついで、溝の半分は、第1のヘリックス由来のb残基およびe残基により形成され、他の半分は第2のヘリックスのc残基およびg残基により形成される。前記空間的に隣接する - ヘリックスが逆平行である場合、そのとき、2つの可能性が存在する。第1の可能性において、溝の両方の半分がb残基およびe残基により形成される。第2の可能性において溝の両方の半分がc残基およびg残基により形成される。3タイプの溝候補が、本明細書においてそれらの主要な溝形成(eおよびgの)残基により表わされ、ヘリックスが平行である場合、その時は、溝はe/g溝と称され、ヘリックスが逆平行である場合、そのとき、溝は、e/e溝またはg/g溝のいずれかと称される。平行アルフ  
40  
30  
20  
10

アボディーは、3個のe/g溝を有し、一方、逆平行アルファボディーは、1個のe/g溝、1個のe/e溝および1個のg/g溝を有する。また、アルファボディー溝の任意の部分も溝領域と考えられる。

#### 【0179】

本明細書において定義される少なくとも1個のアルファボディーを含有するか、または当該少なくとも1個のアルファボディーから本質的になり、任意に、1個以上のリンカーを介して任意に連結された1個以上のさらなる基、部分、残基を含有する（アルファボディー）ポリペプチドも本明細書において想定される。したがって、これらの実施形態においては、「から本質的になる（essentially consisting of）」または「から本質的になる（consisting essentially of）」という用語は、ポリペプチド内において、アルファボディーが主成分として存在するという事実を指し、すなわち、ポリペプチドは、さらなる基、部分、残基を含有してもよいが、これらは、ポリペプチド中のアルファボディー成分よりもサイズが有意に小さい。10

#### 【0180】

したがって、本明細書において想定されるポリペプチドは、任意に、他の標的もしくは目的の標的タンパク質との結合のための1個以上のさらなる基、部分または残基を含むことができる。かかるさらなる基、残基、部分および/または結合部位は、本明細書において想定されるアルファボディーに対する（および/またはそれが存在するポリペプチドもしくは組成物に対する）さらなる機能性を与えてもよく、与えなくてもよく、それに含まれるアルファボディー（複数のアルファボディー）の特性を改変してもよく、改変しなくてもよいことが明らかである。さらに、かかる基、残基、部分または結合部位は、例えば、生物学的および/または薬理学的に活性であり得る化学基であってもよい。20

#### 【0181】

これらの基、部分または残基は、特定の実施形態においては、アルファボディー構造にN末端またはC末端で連結される。しかしながら、特定の実施形態においては、1個以上の基、部分または残基は、アルファボディー構造の本体、例えば、-ヘリックスにおける遊離のシステインに連結される。

#### 【0182】

特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、化学的に改変された1個以上のアルファボディーを含有する。例えば、かかる改変は、アルファボディー構造内または当該アルファボディー構造上への1個以上の官能基、残基または部分の導入または連結を含むことができる。これらの基、残基または部分は、1個以上の所望の特性または機能性を、ポリペプチドにもたらすことができる。かかる官能基の例は、当業者には明らかであるものとする。30

#### 【0183】

例えば、アルファボディー構造へのかかる官能基の導入または連結は、ポリペプチドの半減期、溶解度および/または安定性の増加、またはポリペプチドの毒性の低減、またはポリペプチドの任意の望ましくない副作用の除外または減衰および/または他の有利な特性をもたらすことができる。

#### 【0184】

特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、当該ポリペプチドの生物学的または血漿中の半減期が増加するように、例えば、PEG化を用いて、結合する基または血清タンパク質（血清アルブミンまたはトランスフェリンなど）である基の付加を用いて、または一般にポリペプチドの半減期を増加させる部分へのアルファボディーの連結により、化学的に改変されたアルファボディーを含有する。例として、アルファボディーは、溶媒曝露システインにおいて、マレイミドmPEG 40kD PEG (Jenkem Technology)または他の異なる分子量のPEG部分を使用して、PEG化することができる。40

#### 【0185】

特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、当該ポリペ

10

20

30

40

50

ペプチドの生物学的または血漿中の半減期が増加するように、タンパク質ドメインまたはペプチド、例えば、結合ドメインまたは血清タンパク質（血清アルブミンまたは免疫グロブリンのF<sub>c</sub>部分など）であるドメインと融合されたアルファボディーを含有する。前記タンパク質ドメインは、例えば、血清アルブミンまたはトランスフェリンなどの血清タンパク質と結合するアルファボディーであってよい。

#### 【0186】

特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、それらの（目的の細胞内標的分子、例えば、目的のBCL-2ファミリーのタンパク質の抗アポトーシス性メンバーに対する）標的結合に加えて、血清タンパク質に（血清アルブミンまたはトランスフェリンまたは免疫グロブリンのF<sub>c</sub>部分などに）、前記アルファボディーの生物学的または血漿中の半減期を増加するように結合するアルファボディーを含有する。  
10

#### 【0187】

一般的に、半減期の増加した本明細書において想定されるポリペプチドは、半減期の延長に対する前記の装備を欠く対応のアルファボディーの半減期と比較して、（ヒトにおいて、またはPK評価に関して使用される動物モデル、例えば、ラット、イヌ、サル、マウス、ウマ、ブタ、ネコなどにおいて）1週間を超える、同様に好ましくは2週間を超える半減期を有する。

#### 【0188】

本明細書において想定されるポリペプチド内に存在するアルファボディーの特定の改変は、標識されたポリペプチドの意図される使用に応じて、1個以上の検出可能な標識または他のシグナル発生基もしくは部分の導入を含有してもよい。  
20

#### 【0189】

さらなる特定の改変は、例えば、1個以上の金属または金属カチオンをキレートする、キレート化基の導入を伴ってもよい。

#### 【0190】

特定の改変は、例えば、ビオチン-（ストレプト）アビジン結合対などの特異的結合対の一部である官能基の導入を含んでもよい。

#### 【0191】

いくつかの適用に関して、具体的には、本明細書において想定されるポリペプチドが（例えば、がんの治療において）特異的に結合する標的を発現する細胞を殺すことが意図される適用、またはかかる細胞の生育および／または増殖を低減または遅延させることが意図される適用に関して、本明細書において想定されるポリペプチドは、毒素に連結、または毒性の残基もしくは部分に連結されたアルファボディー構造を含有してもよい。  
30

#### 【0192】

他の可能性のある化学的および酵素的改変は、当業者には明らかであろう。

#### 【0193】

特定の実施形態においては、1個以上の基、残基、部分は、1個以上の適切なリンカーまたはスペーサーを介してアルファボディー構造に連結される。

#### 【0194】

さらなる特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、2個以上の標的特異的アルファボディーを含有する。かかる特定の実施形態においては、2個以上の標的特異的アルファボディーは、直接または間接的な方法のいずれかで、互いに連結（カップリング、鎖状連結、相互連結、融合）することができる。2個以上のアルファボディーが互いに直接的に連結される実施形態においては、当該2個以上のアルファボディーは、スペーサーまたはリンカーの断片もしくは部分の助けなしで連結される。代替的には、2個以上のアルファボディーが互いに間接的に連結される実施形態においては、当該2個以上のアルファボディーは、適切なスペーサーまたはリンカーの断片もしくは部分を介して連結される。  
40

#### 【0195】

2個以上のアルファボディーが直接連結される実施形態においては、当該2個以上のア

10

20

30

40

50

ルファボディーは、単鎖融合構築物として（すなわち、2個以上のアルファボディー配列が直接、単一の連続するアミノ酸配列で互いに続いている単鎖タンパク質構築物として）作製されてもよい。代替的には、アルファボディーの直接連結は、2個のアルファボディー間にジスルフィド架橋を形成するシステインを介して達成されてもよい（すなわち、例えば、酸化条件などの適切な条件下で、それぞれが遊離のシステインを含む2個のアルファボディーを互いに反応させて、構成单量体が、ジスルフィド架橋を介して共有結合的に連結される二量体を形成してもよい）。

#### 【0196】

代替的には、2個以上のアルファボディーが間接的に連結される実施形態においては、当該2個以上のアルファボディーは、適切なスペーサーまたはリンカー断片またはリンカー部分を介して互いに連結されてもよい。かかる実施形態においては、アルファボディーは、単鎖融合構築物として作製されてもよい（すなわち、2個以上のアルファボディー配列が、単一の連続するアミノ酸配列で互いに続いているが、アルファボディーはスペーサー断片として作用する適切に選択されたアミノ酸配列断片の存在によって隔てられたままである単鎖タンパク質構築物として）。代替的には、アルファボディーの間接的連結は、アミノ酸側鎖を介して、またはアルファボディーのN末端もしくはC末端を介して達成されてもよい。例えば、適切な選択された条件下で、それぞれが遊離のシステインを含有する2個のアルファボディーをホモ二官能性化合物と反応させ、構成アルファボディーが前記ホモ二官能性化合物を介して共有結合的に架橋されたアルファボディー二量体を得ることができる。類似の方法で、1個以上のアルファボディーが、反応性側鎖または末端およびタンパク質の架橋のための適切に選択されたホモ二官能性化合物もしくはヘテロ二官能性化合物の任意の組み合わせを介して、架橋されてもよい。

10

20

30

#### 【0197】

連結されたアルファボディーを含有するポリペプチドの特定の実施形態においては、2個以上の連結されたアルファボディーは、同じアミノ酸配列を有していてもよく、異なるアミノ酸配列を有していてもよい。また、2個以上の連結されたアルファボディーは、同じ結合特異性を有していてもよく、異なる結合特異性を有していてもよい。また、2個以上の連結されたアルファボディーは、同じ結合親和性を有していてもよく、異なる結合親和性を有していてもよい。

#### 【0198】

本明細書において想定されるポリペプチド内の異なるアルファボディーのカップリングに使用するための適切なスペーサーまたはリンカーは、当業者には明らかであろうし、ペプチドおよび／またはタンパク質の連結に当該技術分野において使用される一般的な任意のリンカーまたはスペーサーであってよい。特に、かかるリンカーまたはスペーサーは、医薬用途が意図されるタンパク質またはポリペプチドの構築に適切である。

#### 【0199】

単鎖アミノ酸配列のアルファボディーのカップリングに特に適切ないくつかのリンカーまたはスペーサーとしては、例えば、限定されるものではないが、グリシンリンカー、セリンリンカー、混合グリシン／セリンリンカー、グリシンリッチリンカーおよびセリンリッチリンカーまたは主として極性ポリペプチド断片により構成されたリンカーなどのポリペプチドリンカーなどが挙げられる。化学的架橋によるアルファボディーのカップリングに特に適切ないくつかのリンカーまたはスペーサーとしては、例えば、限定されるものではないが、グルタルアルデヒドなどのホモ二官能性化学的架橋化合物、アジブイミド酸ジメチル(DMA)、スペルイミノ酸ジメチル(DMS)およびピメルイミド酸ジメチル(DMP)などのイミドエステルまたはジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸)(DSP)およびジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオン酸)(DTSSP)などのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルなどが挙げられる。架橋のためのヘテロ二官能性試薬の例としては、限定されるものではないが、一方のアミン反応性末端および他方の末端にスルフヒドリル反応性部分を有する架橋リンカーまたは一方の末端にNHSエステルおよび他方の末端にSH反応性基(例えば、マレイミドまたはピリジルジスル

40

50

フィド)を有する架橋リンカーなどが挙げられる。

#### 【0200】

単鎖の鎖状連接された(concatenated)アルファボディー構築物に使用するためのポリペプチドのリンカーまたはスペーサーは、1~50個のアミノ酸の長さ、例えば、1~30個、および特に1~10個のアミノ酸残基の長さを有する、任意の適切な(例えば、グリシン-リッチ)アミノ酸配列であってよい。1もしくは複数のスペーサーの長さ、柔軟性の程度および/または限定されるものではないが、目的のタンパク質に対する、または目的の1個以上の他の標的タンパク質に対する親和性、特異性またはアビデイティなどの他の特性が、本明細書において想定される最終的ポリペプチドの特性にいくらかの影響を与えることは明らかであろう。2個以上のスペーサーが本明細書において想定されるポリペプチドに使用される場合、これらのスペーサーは、同じであってもよく、異なっていてもよいことは明らかであろう。本開示との関連において、当業者は、本明細書において想定されるポリペプチド内のアルファボディーをカップリングする目的のための最適なスペーサーを、過度の実験負担をなくして決定することができる。10

#### 【0201】

本明細書において想定される連結されたアルファボディーポリペプチドは、1個以上のアルファボディーを、1個以上のさらなる基、残基、部分および/または他のアルファボディーと、任意に、1個以上の適切なリンカーを介して、本明細書において想定されるポリペプチドが提供されるように適切に連結する少なくとも1つのステップを含む方法によつて一般に調製できる。20

#### 【0202】

さらに、本明細書において想定されるポリペプチドは、(i)適切な宿主細胞または発現系において、本明細書において想定されるポリペプチドを発現させるステップ、および(ii)本明細書において想定されるポリペプチドを単離および/または精製するステップ、を少なくとも含む方法により生成され得る。前記のステップを実施するための技術は、当業者には公知である。

#### 【0203】

##### [部分/断片/アナログ/誘導体]

本明細書において開示されるポリペプチドの部分、断片、アナログ、変異体、バリエントおよび/または誘導体および/またはアルファボディーの1個以上の部分、断片、アナログ、変異体、バリエントおよび/または誘導体を含有するポリペプチドも、これらの部分、断片、アナログ、変異体、バリエントおよび/または誘導体が、本明細書において想定される予防目的、治療目的および/または診断目的に適切である限り、想定される。30

#### 【0204】

本明細書において想定されるかかる部分、断片、アナログ、変異体、バリエントおよび/または誘導体は、細胞膜を未だ通過することができ、特定の実施形態においては、例えば、目的のBCL-2ファミリーのタンパク質の抗アポトーシス性メンバーなどの細胞内標的に特異的に結合することができる。

#### 【0205】

[本明細書において想定されるアルファボディー、ポリペプチドおよび組成物の起源および形態]40

本明細書において想定されるアルファボディー、ポリペプチドまたは組成物(またはこれらを発現させるために使用される本明細書において想定されるヌクレオチド配列の)起源は、本明細書において開示される原理に重要ではないことに留意すべきである。さらに、本明細書において想定されるアルファボディー、ポリペプチドまたはヌクレオチド配列が生成または得られた方法について、特定の要件はない。したがって、本明細書において想定されるアルファボディーは、合成または半合成のアミノ酸配列、ポリペプチドまたはタンパク質であつてよい。

#### 【0206】

本明細書において提供されるアルファボディー、ポリペプチドおよび組成物は、本質的

10

20

30

40

50

に（本明細書において定義される）単離形態であってよく、または代替的には、本明細書において想定されるポリペプチドまたは組成物の一部を形成することができ、これらは少なくとも1個のアルファボディーを含有してもよく、これらは任意に、（すべてが任意に、1個以上の適切なリンカーを介して連結される）1個以上の他の基、部分もしくは残基をさらに含有してもよい。

#### 【0207】

##### [ 標的種および交差反応性 ]

本明細書における開示に基づいて、予防用途、治療用途および／または診断用途に関して、本明細書において想定されるポリペプチドおよび組成物は、原則として、ヒトの細胞内標的を対象とするか、またはヒトの細胞内標的に特異的に結合することが認識されるであろう。しかしながら、ポリペプチドおよび組成物が獣医学目的を意図するものである場合、当該ポリペプチドおよび組成物は、治療が意図される種由来の細胞内標的を対象とするか、または当該細胞内標的に特異的に結合するものであってよく、または当該ポリペプチドおよび組成物は、治療される種に由来する細胞内標的と、少なくとも交差反応性であろう。したがって、1個の対象種由来の細胞内標的に特異的に結合するポリペプチドおよび組成物は、1個以上の他の対象種由来の細胞内標的との交差反応性を示してもよく、または示さなくてもよい。当然のことながら、ヒトまたは動物における使用のためのポリペプチドの開発との関連において、治療される種ではない、別の種由来の細胞内標的と結合するポリペプチドが、調査および実験室試験における使用のために開発されてもよいことが想定される。

10

20

#### 【0208】

本明細書において想定されるポリペプチドが、細胞内標的の、多数の天然または合成のアナログ、バリアント、変異体、対立遺伝子、部分および断片に結合するものであること、期待される。より具体的には、本明細書において想定されるポリペプチドが、これらのアルファボディーおよびポリペプチドが結合する（天然／野生型）細胞内標的の結合部位、部分またはドメインを（未だ）含む細胞内標的の少なくともこれらのアナログ、バリアント、変異体、対立遺伝子、部分および断片に結合するものであることが期待される。

30

#### 【0209】

##### [ 核酸配列 ]

細胞内に侵入することができる1個以上の单鎖アルファボディー構造を含有するアルファボディーポリペプチドをコードする核酸配列ならびにかかる核酸配列を含有しているベクターおよび宿主細胞も本明細書において提供される。

#### 【0210】

したがって、本明細書において想定されるポリペプチド（またはこれらの適切な断片）をコードする核酸配列も提供される。本明細書では、これらの核酸配列も、本明細書において想定される核酸配列とみなされ、ベクターまたは遺伝子構築物またはポリヌクレオチドの形態であってもよい。核酸配列は、合成または半合成の配列、ライブラリー（および特に発現ライブラリー）から単離されたヌクレオチド配列、重複プライマーを使用したP C Rにより調製されたヌクレオチド配列、またはそれ自体が公知のD N A合成に関する技術を使用して調製されたヌクレオチド配列であってよい。

40

#### 【0211】

遺伝子構築物はD N AもしくはR N Aであってよく、好ましくは二本鎖D N Aである。また、本明細書において想定される遺伝子構築物は、意図された宿主細胞もしくは宿主生物の形質転換に適切な形態、意図される宿主細胞のゲノムD N A内への組み込みに適切な形態、または意図された宿主生物における独立した複製、維持および／または遺伝に適切な形態であってよい。例えば、遺伝子構築物は、例えば、プラスミド、コスミド、Y A C、ウイルスベクターまたはトランスポゾンなどのベクターの形態であってよい。具体的には、ベクターは、発現ベクター、すなわち、（例えば、適切な宿主細胞、宿主生物および／または発現系において）イン・ビトロおよび／またはイン・ビボの発現を提供できるベクターであってよい。本明細書において想定される遺伝子構築物は、発現されたアルファ

50

ボディーを目的とする細胞内または細胞外のコンパートメントに向かわせる適切なリーダー配列を含むことができる。例えば、本明細書において想定される遺伝子構築物は、適切なベクター中に p e 1 B リーダー配列部位において挿入され、発現されたアルファボディーを細胞の細胞膜周辺腔に向かわせることができる。さらに、ベクターは、適切なプロモーター系を備え、例えば、アルファボディーの収率を最適化することができる。したがって、単鎖アルファボディーをコードする核酸を含有しているベクターまたは前記単鎖アルファボディーを含有するポリペプチドも本明細書において提供される。

#### 【 0 2 1 2 】

細胞に侵入することができる前記単鎖アルファボディーを含有するポリペプチドをコードする核酸またはこれらの核酸を含有しているベクターを含有している宿主細胞も本明細書において提供される。したがって、特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドをコードする核酸配列を含有するベクターであって、本明細書において想定されるポリペプチドを発現できるベクターによりトランスフェクションまたは形質転換された宿主細胞が提供される。本明細書において想定されるポリペプチドの発現のための宿主または宿主細胞の適切な例は、当業者には明らかであり、任意の適切な真核細胞または原核細胞（例えば、E . c o l i などの細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞および昆虫細胞）などが挙げられ、イン・ビトロまたはイン・ビボのいずれに位置してもよい。

#### 【 0 2 1 3 】

##### [ 阻害性のアルファボディー、ポリペプチドおよび組成物 ]

特定の実施形態においては、目的の細胞内標的分子に特異的に結合する本明細書において想定されるポリペプチドは、目的の細胞内標的分子の活性の特異的な阻害、抑制もしくは低減、および／またはこれらの細胞内標的分子が役割を果たすシグナル伝達機構および生物学的な機構ならびに経路の阻害、抑制もしくは低減を行なうことができる。

#### 【 0 2 1 4 】

本明細書において想定されるポリペプチドおよび医薬組成物は、1個以上の特定の細胞内標的に結合することにより、1個以上の細胞内標的間の相互作用を抑制または阻害に用いることができ、それにより、それらの細胞内標的により媒介されるシグナル伝達経路の抑制、阻害または低減、および／またはそれらの細胞内標的が関与する生物学的な経路および機構の調節を行なうことができる。したがって、本明細書において想定されるポリペプチドおよび医薬組成物を使用して、本明細書において想定されるポリペプチドおよび組成物の1個以上が結合する、目的の細胞内標的分子が関与する対象において、免疫系および／または1つ以上の特異的免疫応答に影響を与え、変化または調節を行なうことができる。

#### 【 0 2 1 5 】

したがって、特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドおよび組成物は、B C L - 2 ファミリーのタンパク質の抗アポトーシス性メンバーに特異的に結合する。

#### 【 0 2 1 6 】

より具体的には、本明細書において想定されるポリペプチドまたは組成物を使用する「阻害」、「低減」および／または「抑制」は目的の標的タンパク質と、その天然の結合パートナーとの間の相互作用の阻害、低減および／または抑制、あるいは目的の標的タンパク質の活性の阻害、低減および／または抑制、あるいは目的の標的タンパク質が関与する1つ以上の生物学的または生理学的な機構、効果、応答、機能経路もしくは活性の阻害、低減および／または抑制のいずれかを意味することができ、例えば、適切なイン・ビトロアッセイ、細胞アッセイまたはイン・ビボアッセイを使用して測定した場合、同じアッセイにおいて、同じ条件であるが本明細書において想定されるポリペプチドまたは組成物を使用しない条件下で、目的の標的タンパク質の活性と比較して、例えば、少なくとも10%、しかしながら、好ましくは少なくとも20%、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%

10

20

30

40

50

もしくはそれ以上を阻害、低減および／または抑制する。また、「阻害」、「低減」および／または「抑制」は、同じ条件であるが、本明細書において想定されるポリペプチドまたは組成物が存在しない条件と比較して、目的の標的タンパク質の、1個以上のその天然の結合パートナーに対する親和性、アビディティ、特異性および／または選択性の低減の誘導、および／または目的の標的タンパク質の、目的の標的タンパク質が存在する培地または周囲の1つ以上の条件(ｐH、イオン強度、補因子の存在など)に対する感受性の低減の誘導もまた意味することができる。また、本開示との関連において、「阻害」、「低減」および／または「抑制」は、目的の標的タンパク質の活性のアロステリックな阻害、低減および／または抑制を伴ってもよい。

## 【0217】

10

本明細書において想定されるポリペプチドと、目的の細胞内標的分子との結合の結果は、その標的にに対する結合において、この結合が、本明細書において想定されるかかるポリペプチドまたは医薬組成物の非存在下における、標的とその天然の結合パートナーとの結合と比較して、その標的とその天然の結合パートナーとの結合、または少なくとも1個のこれらのサブユニットとの結合を、抑制、低減または阻害するようなものであってよく、これは、当該技術分野において公知の適切なアッセイにより決定される場合、少なくとも20%、例えば、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくはそれ以上を抑制、低減または阻害する。代替的には、ポリペプチドと細胞内標的分子との結合は、この結合が、この標的分子とその天然の結合パートナーとが未だ結合可能であるが、本明細書において想定されるかかるポリペプチドまたは医薬組成物の非存在下における、細胞内標的とその天然の結合パートナーとの結合におけるシグナル伝達と比較して、目的の細胞内標的分子とその結合パートナー、または少なくとも1個のこれらのサブユニットとの結合により誘発されるシグナル伝達が抑制、低減または阻害されるようなものであり、当該技術分野において公知の適切なアッセイにより決定される場合、これは、少なくとも20%、例えば、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくはそれ以上を抑制、低減または阻害する。

20

## 【0218】

30

当業者には公知であるように、本明細書において想定される前記ポリペプチドおよびポリペプチドを含有する組成物は、一般に、細胞内標的媒介性のシグナル伝達、すなわち、目的の細胞内標的分子とその天然の結合パートナーとの結合により引き起こされるシグナル伝達ならびにかかるシグナル伝達により誘導される生物学的な機構および効果のアンタゴニストとして作用するものである。

## 【0219】

40

## [刺激性のアルファボディー、ポリペプチドおよび組成物]

ある限定されない実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドまたは組成物は、目的の細胞内標的分子に特異的に結合し、それにより、細胞内標的とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を増強、増加および／または活性化できる。本明細書において想定されるかかる刺激性のポリペプチドは、目的の細胞内標的分子と特異的に結合し、それにより、その細胞内標的および／またはその天然の結合パートナーの生物学的活性および／または1つ以上の生物学的もしくは生理学的機構、効果、応答、機能もしくは経路を、適切なイン・ビトロアッセイ、細胞アッセイまたはイン・ビボアッセイを使用して測定した場合、増強、増加および／または活性化できる。当業者には明らかであるように、この特定の実施形態に従ったポリペプチドおよび組成物は、一般に、細胞内標的媒介性のシグナル伝達、すなわち、目的の細胞内標的分子とその天然の結合パートナーとの結合により引き起こされるシグナル伝達ならびにかかるシグナル伝達により誘導される生物学的な機構および効果のアゴニストとして作用するものである。

## 【0220】

50

したがって、これらの特定の実施形態においては、本明細書において開示されるポリペプチドおよび組成物の1つ以上が結合する目的の細胞内標的分子が関与する対象において

、本明細書において想定されるポリペプチドおよび医薬組成物を使用して1つ以上の特異的免疫応答を増加させることができる。例えば、免疫系を弱らせることに特徴づけられる疾患または免疫系が弱くなった結果として起こり得る疾患の予防および/または治療のために、対象において、特定の細胞内標的分子に結合する本明細書において想定される作動性のポリペプチドまたは医薬組成物を使用して1つ以上の免疫応答を刺激または増強することができる。

#### 【0221】

1個以上の細胞内標的タンパク質に対する検出可能な結合親和性または阻害活性を有する少なくとも1個のアルファボディーを含有するポリペプチドの製造方法も本明細書において提供される。かかる方法は、本明細書におけるさらなる説明に基づいて、当業者には明らかであろう。10

#### 【0222】

したがって、本明細書において記載されるポリペプチドの様々な用途も提供される。具体的には、本明細書において提供されるポリペプチドは、イン・ビトロで細胞内タンパク質の生物学的機能を調節するために、例えば、細胞内タンパク質と天然の結合パートナーとの間の相互作用に影響を与えるため、特に、阻害するために使用することができる。

#### 【0223】

##### [ポリペプチドの製造方法]

本明細書において想定されるポリペプチドは、細胞内に侵入する能力を有する。かかるポリペプチドの製造方法は、インターナリゼーション領域を、少なくとも1個のアルファボディー構造配列の少なくとも一部に導入するステップを少なくとも含む。20

#### 【0224】

インターナリゼーション領域を、少なくとも1個のアルファボディー構造配列の少なくとも一部に導入することは、例えば、特定の変異を、選ばれたアルファボディー構造配列テンプレートに導入することを含んでもよい。実際、設計されたある特定のアルファボディー配列テンプレートは、改変、すなわち、非荷電または負荷電アミノ酸残基の正荷電アミノ酸残基への置換変異または置換を創出するのに使用され得る。このように、アルファボディーテンプレート配列は、インターナリゼーション領域を含有するよう 「装飾」 または調整され得る。代替的には、前記方法は、1個以上のインターナリゼーション領域をアルファボディー骨格構造に少なくとも部分的に入れる設計を含むことが想定される。30

#### 【0225】

したがって、特定の実施形態においては、最大16個のアミノ酸残基の断片内において、少なくとも6個の非正荷電アミノ酸残基を少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基で置換することによって、または最大16個のアミノ酸残基のストレッチ内において、少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基を設計することによって、インターナリゼーション領域を含有するように、本明細書において想定されるポリペプチドに含まれるアルファボディー構造を改変または設計し得る。さらに特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドに含まれるアルファボディーテンプレート配列は、最大16個のアミノ酸残基のストレッチ内において、その少なくとも4個の残基がアルギニンであるか、またはその少なくとも5個の残基がリジンである少なくとも6個の正荷電アミノ酸残基を含有するように改変または設計され得る。40

#### 【0226】

ある特定の実施形態においては、少なくとも35%の正荷電アミノ酸からなる少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域であって、少なくとも6個の非正荷電アミノ酸残基を含有する少なくとも1個の正荷電インターナリゼーション領域を得るように、断片内において多数の残基を置換することによって、インターナリゼーション領域を含有するように、本明細書において想定されるポリペプチドに含まれるアルファボディー構造を改変または設計し得る。

#### 【0227】

したがって、本明細書において記載される方法の特定の実施形態においては、少なくと50

も 1 個のインターナリゼーション領域を含有するように、すなわち、アルファボディー構造配列のイン・シリコ設計および合成をすることによって、ポリペプチドを合成し得る。特定の実施形態においては、ポリペプチドは、少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基を含有する最大 16 個のアミノ酸残基のインターナリゼーション領域を含有する。さらに特定の実施形態においては、( i ) その少なくとも 4 個の残基がアルギニンであるか、または ( ii ) 少なくとも 5 個の残基がリジンである少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基を含有する最大 16 個のアミノ酸残基の断片を含有するインターナリゼーション領域を含有するように、本明細書において想定されるポリペプチドを設計し得る。他の特定の実施形態においては、ポリペプチドは、少なくとも 35 % の正荷電アミノ酸からなるインターナリゼーション領域であって、少なくとも 6 個の非正荷電アミノ酸残基を含有するインターナリゼーション領域を含有する。さらに特定の実施形態においては、少なくとも 35 % の正荷電アミノ酸を含有するインターナリゼーション領域であって、( i ) その少なくとも 4 個の残基がアルギニンであるか、または ( ii ) 少なくとも 5 個の残基がリジンである少なくとも 6 個の非正荷電アミノ酸残基を含有するインターナリゼーション領域を含有するように、本明細書において想定されるポリペプチドを設計し得る。前記本明細書において想定される方法において、インターナリゼーション領域は、少なくとも部分的にはアルファボディー構造中に提供され、すなわち、少なくとも部分的には、アルファボディーテンプレートに典型的な骨格中に組み込まれる。より具体的には、少なくとも 1 個のインターナリゼーション領域は、1 個のアルファボディー構造配列内の少なくとも 80 % ( すなわち、1 個のインターナリゼーション領域に含まれるアミノ酸残基の 80 % ) で提供される。より具体的には、ポリペプチドのインターナリゼーション領域のアミノ酸の 90 % または最大 100 % がアルファボディー構造に組み込まれる実施形態が想定される。また、特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域の 1 個以上またはそれぞれは、ポリペプチド中のアルファボディー構造の 1 個の - ヘリックス内に提供されることが想定される。特定の実施形態においては、1 個のインターナリゼーション領域のみが、ポリペプチドのアルファボディー構造の 1 個の - ヘリックス内に提供される。特定の実施形態においては、インターナリゼーション領域がアルファボディー構造の 2 個の - ヘリックス中に提供されるポリペプチドが想定される。インターナリゼーション領域は、アルファボディー構造の 3 個の - ヘリックスすべての中に提供されないことが好ましい。

**【 0228 】**

ある特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、細胞内標的にに対する結合親和性と、細胞内に侵入する能力とを併せ持つ。本明細書において記載されるポリペプチドの様々な製造方法が想定されることには当業者には明らかであり、これらの方は、ポリペプチドの標的特異性またはインターナリゼーション特性から開始するものである。

**【 0229 】**

したがって、特定の実施形態においては、標的結合アルファボディー配列を同定することを包含し、その後に、得られたアルファボディー-ポリペプチドのインターナリゼーションを確保するように、( アミノ酸の付加、またはアルファボディー配列の実際の改変のいずれかによって ) 前記構造を改変することを含む方法が提供される。

**【 0230 】**

実際、特定の実施形態においては、本明細書において想定される方法は、前記インターナリゼーション領域を導入するステップの前に、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも 1 個のアルファボディー構造を選択するステップを含んでもよい。

**【 0231 】**

所定の標的に対する結合親和性を有する適切なアルファボディーを得るための方法は、当業者に公知であり、本明細書において以下にさらに記載される。本出願には、そこから、細胞内にインターナリゼーションすることができるポリペプチドを得るための様々な方法がさらに記載されている。

10

20

30

40

50

**【 0 2 3 2 】**

代替的な実施形態においては、細胞の内部に取り入れられることができるポリペプチド骨格から開始し、次いで、標的結合特性について改変またはスクリーニングすることが想定され得る。

**【 0 2 3 3 】**

実際、特定の実施形態においては、本明細書において想定される方法は、インターナリゼーション領域を導入するステップに続いて、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも1個のアルファボディー構造を選択するステップをさらに含む。

**【 0 2 3 4 】**

これらの実施形態においては、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも1個のアルファボディー構造を選択するステップは、前記細胞内標的分子に対する特異的結合について、アルファボディー構造配列のライブラリーをスクリーニングするステップを少なくとも含む。

**【 0 2 3 5 】**

これらの方法の特定の実施形態においては、少なくとも1個のアルファボディー構造の存在およびさらに、1個以上のインターナリゼーション領域を特徴とするポリペプチドライブラリーであって、アルファボディーの標的結合ドメインのアミノ酸が多様化されるポリペプチドライブラリーが提供される。これらの実施形態においては、目的の細胞内標的分子に対する結合についてライブラリーをスクリーニングして、細胞内標的に結合することができるポリペプチドを得ることができる。

10

20

**【 0 2 3 6 】**

さらなる実施形態においては、細胞透過能を有する適切なポリペプチド骨格を、例えば、模倣に基づいて、適切な結合モチーフを導入するように改変することが想定され得る。これらの実施形態においては、目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも1個のアルファボディー構造を選択するステップは、前記細胞内標的分子に対する前記少なくとも1個のアルファボディー構造配列中の結合モチーフを導入するステップ、および目的の前記細胞内標的分子に対する特異的結合親和性を試験するステップを少なくとも含む。

**【 0 2 3 7 】**

30

本明細書において想定される標的特異的ポリペプチドを得るための最も適切な方法は、標的に依存するであろう。実際、所定の標的に対する結合モチーフが知られている場合、標的結合および細胞透過性の導入を、ポリペプチドに同時に導入することができる。しかしながら、結合モチーフが未だ知られていない標的の場合、標的に結合するのに適切な位置に、多様化されたアミノ酸を有するアルファボディーまたはポリペプチドのライブラリーのスクリーニングステップを含むことが想定され得る。

**【 0 2 3 8 】**

[ 標的結合アルファボディーの製造方法 ]

[ ライブラリーを用いたアルファボディーの製造方法 ]

40

本明細書において想定される特定の実施形態においては、アルファボディーのランダムライブラリーを作製すること、および目的の標的、特に目的の細胞内標的分子に特異的に結合することができるアルファボディーポリペプチドについてこのライブラリーをスクリーニングすることを含む方法によって、標的特異的アルファボディーポリペプチドを得ることができる。これらの方法は、コンプリクス エン ヴェー ( C o m p l i x N V ) 名義の公開された国際特許出願である国際公開第 2 0 1 2 / 0 9 2 9 7 0 号に詳細に記載されている。

**【 0 2 3 9 】**

国際公開第 2 0 1 2 / 0 9 2 9 7 0 号に記載の方法の選択ステップが、選択方法として周知の方法またはスクリーニング方法として周知の方法を用いて実施できることが理解されるであろう。望ましいエレメントおよび望ましくないエレメントの両方を含有する元々

50

の集合体（すなわちアルファボディーライブラー）から、望ましいエレメント（すなわちアルファボディーライブラーのメンバー）の同定およびその後の単離（すなわち選択ステップ）の両方の方法が想定される。選択方法の場合、ライブラリーメンバーは、一般的に、所望の特性を適用して所望の目標を得るステップにより単離されるものであり；かかる場合、所望の特性は、一般的に、所定の目的の細胞内標的分子に対する高い親和性に限定されており、所望の目標は、かかる高い親和性のライブラリーメンバーを、他から単離することに限定されている。かかる方法は、一般に、親和性選択方法として公知であり、本開示との関連において、かかる親和性選択方法は、目的の細胞内標的分子またはこれらのサブドメインもしくはサブ領域に対する高い親和性を有するアルファボディーを選択する目的で、単鎖アルファボディーに適用されるものである。同様に、例えば、適切な選択条件（例えば、短いインキュベーション時間もしくは長い洗浄サイクルまたは当業者に公知のライブラリーの選択技術の他の条件）を調整することによる、所定の目的の細胞内標的分子との結合に関する高いオン速度（on-rate）または前記標的に結合するライブラリーメンバーの低いオフ速度（off-rate）などの速度論的特性に関して選択することが可能である。代替的には、スクリーニング方法の場合、ライブラリーメンバーは、すべてのライブラリーメンバーまたはライブラリーメンバーの少なくとも実質的コレクションが、所与の所望の特性に関して個別に試験され、かかる所望の特性を有するメンバーが保持され、一方、かかる所望の特性を有さないメンバーは廃棄されるステップによって通常単離されるものであり、かかる場合および本開示との関連において、所望の特性は、目的の細胞内標的分子またはこれらのサブドメインもしくはサブ領域に対する高い親和性、または例えば、目的の細胞内標的分子の活性の阻害、低減および／または抑制を含む抗細胞内標的分子活性などの機能活性のいずれかに関するものであってもよい。したがって、本明細書において想定されるポリペプチドの製造方法の選択ステップは、ライブラリーの非選択ポリペプチドと比較して有利な（好ましい、望ましい、優れた）親和性または活性の特性を有する少なくとも1個の単鎖アルファボディーを含有する1個以上のポリペプチドの選択をもたらす、（親和性）選択技術または親和性もしくは活性に基づく機能性スクリーニング技術のいずれかにより達成することができる。

#### 【0240】

目的の標的分子またはタンパク質に対するアルファボディーまたはポリペプチドの特異的結合は、例えば、バイオバニング、Scatchard分析および／または放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、サンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイならびに当該技術分野において公知のこれらのさまざまな変形を含む、それ自体が公知の任意の適切な様式で決定することができる。

#### 【0241】

したがって、特定の実施形態においては、本明細書において想定されるアルファボディーまたはポリペプチドライブラーは、ファージライブラーとして提供され、結合アルファボディーまたはポリペプチドは、ファージと標識された標的分子とを接触させ、その後、標識され、結合された標的の検出または選択されたコレクションにより回収されることによって同定される。一般的に、ビオチン化標的を使用することができ、それによって、標的に結合するアルファボディーを產生するファージが、標的がストレプトアビジンによりコーティングされた支持体（例えば、磁性ビーズ）により捕捉される。

#### 【0242】

特定の実施形態においては、目的のタンパク質に対する（本明細書において定義される）検出可能な結合親和性を有する1個以上のポリペプチドを製造する方法の選択ステップは、目的のタンパク質と、単鎖アルファボディーもしくはポリペプチドライブラーまたは単鎖アルファボディーもしくはポリペプチドライブラーの混合物とを接触させるステップおよび続いて、タンパク質と接触させた単鎖アルファボディーもしくはポリペプチドライブラーまたは単鎖アルファボディーもしくはポリペプチドライブラーの混合物から、目的のタンパク質に対する検出可能な結合親和性を有する1個以上の単鎖アルファボディーまたはポリペプチドを同定するステップの反復実行により、目的のタンパク質に対

10

20

30

40

50

する検出可能な結合親和性を有するアルファボディーまたはポリペプチドに関して、アルファボディーもしくはポリペプチドライブラーまたはアルファボディーもしくはポリペプチドライブラーの混合物を(さらに)濃縮するステップを含んでもよい。

#### 【0243】

目的の標的タンパク質と相互作用させることにより、検出可能なイン・ビトロ活性を有する単鎖アルファボディー(またはポリペプチド)を選択するステップは、典型的には、a) 単鎖アルファボディー(または、前記アルファボディーを含有するポリペプチド)のライブラーまたは単鎖アルファボディーライブラーの混合物と、目的の細胞内標的分子またはその断片とを接触させるステップ、および

b) ライブラーまたはライブラーの混合物から、目的の細胞内標的分子に対する検出可能なイン・ビトロ活性を有する1個以上の単鎖アルファボディーまたはポリペプチドを同定するステップ

を含む。

#### 【0244】

より具体的には、細胞内標的分子は、膜固定受容体、可溶性受容体または前記細胞内標的分子の1個以上の外部ドメインを含有する分子であってよい。

#### 【0245】

より具体的には、細胞内標的分子の活性に対する効果または細胞内標的分子の活性は、当該技術分野において公知の方法により測定することができる。より具体的には、このことは、公知の細胞内標的媒介性効果に対するアルファボディーまたはポリペプチドの効果をイン・ビトロで決定するステップを含む。

#### 【0246】

本明細書に記載の選択方法は、スクリーニング方法として実施することもできることが理解されるであろう。したがって、本明細書において、「選択」という用語は、選択、スクリーニングまたは選択および/またはスクリーニングの技術の任意の適切な組み合わせを含むことができる。

#### 【0247】

##### [単離]

いくつかの場合において、本明細書において想定される目的の細胞内標的タンパク質に特異的に結合するアルファボディー・ポリペプチドの製造方法は、単鎖アルファボディーまたはポリペプチドライブラーから、目的の細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または検出可能なイン・ビトロ活性を有する少なくとも1個の単鎖アルファボディーまたはポリペプチドを単離するステップをさらに含むことができる。

#### 【0248】

これらの方法は、目的の細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または検出可能なイン・ビトロ活性を有する、少なくとも1個の単鎖アルファボディー(ポリペプチド)を増幅させるステップをさらに含んでもよい。例えば、本明細書において想定される選択ステップにより得られた特定の単鎖アルファボディーまたはポリペプチドをディスプレイするファージクローンは、宿主細菌の再感染および生育培地におけるインキュベーションにより増幅させることができる。

#### 【0249】

特定の実施形態においては、これらの方法は、細胞内標的分子と結合することができる1個以上のアルファボディーまたはポリペプチドの配列を決定するステップを含んでもよい。

#### 【0250】

アルファボディー・ポリペプチド配列のセット、コレクションまたはライブラーに含まれるアルファボディー・ポリペプチド配列が、適切な細胞またはファージまたは粒子にディスプレイされる場合、前記細胞またはファージまたは粒子から、アルファボディー・ポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列の単離が可能である。この方法において、選択された1もしくは複数のアルファボディーライブリーメンバーのヌクレオチド配列は、

10

20

30

40

50

日常的なシーケンシング方法により決定することができる。

【0251】

さらなる特定の実施形態においては、本明細書において想定されるアルファボディー・ポリペプチドの製造方法は、前記スクレオチド配列を、宿主生物において適切な条件下で、実際に所望の1もしくは複数のアルファボディー・ポリペプチド配列を得るように発現させるステップを含む。このステップは、当業者に公知の方法により実施することができる。

【0252】

また、目的の細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または検出可能なイン・ビトロ活性を有する得られたアルファボディーまたはポリペプチド配列は、可溶性タンパク質構築物として、任意に、それらの配列が同定された後に合成することができる。

10

【0253】

例えば、前記方法により得られたアルファボディーもしくはポリペプチド、得ることが可能なアルファボディーもしくはポリペプチド、または選択されたアルファボディーもしくはポリペプチドは、当該技術分野において公知の組み換え法または化学的合成方法を使用して、合成することができる。さらに、前記方法により得られたアルファボディーもしくはポリペプチド、得ることが可能なアルファボディーもしくはポリペプチドまたは選択されたアルファボディーもしくはポリペプチドは、遺伝子操作技術によって作製することができる。したがって、前記方法により得られた、得ることが可能なまたは選択されたアルファボディーまたはポリペプチドを合成する方法は、目的の細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または検出可能なイン・ビトロ活性を有するアルファボディーまたはポリペプチド配列をコードする核酸またはベクターによって宿主細胞を形質転換させるか、または宿主細胞に感染させるステップを含むことができる。したがって、目的の細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または検出可能なイン・ビトロ活性を有するアルファボディーまたはポリペプチド配列は、組み換えDNA法により作製することができる。アルファボディーまたはポリペプチドをコードするDNAは、従来の手順を使用して容易に合成することができる。ひとたび調製されたら、DNAを発現ベクター内に導入することができ、これらの発現ベクターを、その後組み換え宿主細胞におけるアルファボディーまたはポリペプチドの発現、および/またはこれらの組み換え宿主細胞が存在する培地におけるアルファボディーまたはポリペプチドの発現を得るために、E. coliなどの宿主細胞または任意の適切な発現系内に形質転換またはトランスフェクションすることができる。

20

【0254】

タンパク質の発現および精製の当業者には公知であるように、発現ベクターから、適切な発現系を使用して作製されるアルファボディーまたはポリペプチドは、(典型的には、アルファボディーのN末端またはC末端において)、例えば、ヒスチジンタグまたは精製が容易になるための他の配列タグを用いて、タグ付されてもよいことを理解すべきである。

30

【0255】

宿主細胞内への核酸またはベクターの形質転換またはトランスフェクションは、リン酸カルシウム-DNA共沈、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、レトロウイルス感染および微粒子銃などの当業者に公知のさまざまな手段によって達成することができる。

40

【0256】

所望のアルファボディーまたはポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、イン・ビトロに位置付られても、またはイン・ビオに位置付けられてもどちらでも、任意の真核細胞または原核細胞(例えば、E. coliなどの細菌細胞；酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、両生類細胞、植物細胞、魚類細胞、昆虫細胞など)であってもよい。例えば、宿主細胞は、トランスジェニック動物中に位置してもよい。

【0257】

50

したがって、宿主細胞を、かかるポリペプチドをコードする核酸配列またはベクターによって形質転換、トランスフェクションまたは感染させるステップおよび適切な条件下でポリペプチドを発現させるステップを含む、目的の細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または検出可能なイン・ビトロ活性を有するポリペプチドの製造方法も提供される。

#### 【0258】

##### [配列の合理化および専用ライブラリーのスクリーニング]

1個以上の標的特異的ポリペプチドの製造方法は、標的特異的ポリペプチドの結合特異性および／または有効性を改良または最適化するさらなるステップまたは方法を任意に含んでもよい。

10

#### 【0259】

特定の実施形態においては、1個以上の標的結合ポリペプチドの製造方法は、得られたアルファボディー・ポリペプチド配列または作製されたアルファボディー・ポリペプチド配列の合理化を含むステップまたは方法がさらに後に続いてもよい。かかる配列合理化プロセスは、本明細書において開示される方法を使用して作製され得る、目的の特異的標的分子に対する異なるアルファボディーまたはポリペプチドの間またはこれらの中に保存された特定のアミノ酸残基、アミノ酸残基の位置、ストレッチ、モチーフまたはパターンの同定または決定を含んでもよい。したがって、この合理化プロセスは、目的の特定の標的分子またはタンパク質に特異的な作製された異なるアルファボディーまたはポリペプチド配列を比較するステップ、およびこれらの配列間の配列コヒーレンスを同定するステップによって実施することができる。かかるプロセスは、分子モデリング、相互作用リガンド結合または生物統計のデータマイニングに関する技術を使用することによって任意に支持または実施することができる。

20

#### 【0260】

目的の特異的標的分子に対する異なるアルファボディー構造の間またはこれらの中に保存されたことが同定される特定のアミノ酸残基、アミノ酸残基位置、ストレッチ、モチーフまたはパターンは、標的特異的アルファボディーの結合または活性に寄与していると考えることができる。

#### 【0261】

特定の実施形態においては、前記のような配列合理化のプロセスは、目的の標的分子に特異的であることが同定された種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列のセットから開始するアルファボディーまたはポリペプチド配列の新しいライブラリーの作製を、さらに後に続けてもよい。かかるいわゆる「専用 (d e d i c a t e d) ライブラリー」、目的の特定の標的分子に特異的であることが同定された種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列のセットにおいて、当該種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列は、多様化されるアミノ酸残基位置の所定のセットにおいて変動する。多様化されるアミノ酸残基位置のこの所定のセットは、種々の標的結合アルファボディーもしくはポリペプチドの間またはこれらの中に保存されたアミノ酸残基、ストレッチ、モチーフまたはパターンが位置する位置以外の位置に対応する。このようにして得られたアルファボディーまたはポリペプチドライブラリーは、アルファボディーまたはポリペプチドの「専用ライブラリー」と称される。これらの専用ライブラリーは、その後再度スクリーニングされ、もっともすぐれた標的結合アルファボディーが同定される。

30

#### 【0262】

したがって、アルファボディーまたはポリペプチド配列のかかる専用ライブラリーの作製において、種々のアルファボディーもしくはポリペプチドの間または種々のアルファボディーもしくはポリペプチドの中に保存されたアミノ酸残基、ストレッチ、モチーフまたはパターンは、ライブラリーの作製プロセスの間も一定に保たれる。かかる専門ライブラリーから、目的の標的分子に対する、改良されたまたは最適化された結合特異性および／またはイン・ビトロ活性を有するアルファボディーまたはポリペプチド配列を同定し、任意に、単離することができる。

40

50

## 【0263】

特定の実施形態においては、前記のような配列合理化のプロセスは、目的の標的分子に特異的であることが同定され、本明細書において記載される方法を使用して作製され得る種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列のセットから開始したアルファボディーまたはポリペプチド配列の新しいライプラリーの創出をさらに後に続けることができる。このようないわゆる「スパイクの付いた(s p i k e d)ライプラリー」、目的の特定の標的分子に特異的であることが同定された種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列のセットにおいて、種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列は、限られた数のランダムに選択された位置へのランダムなアミノ酸置換の導入によって変動する。ライプラリー作製の当業者に公知であるように、エラープローンP C Rが、「スパイクの付いたライプラリー」の作製に便利な方法であり、これは、D N A合成の当業者に公知であるように、スパイクの付いたオリゴヌクレオチドを使用する直接D N A合成方法によって都合よく達成することができる。

10

## 【0264】

したがって、1個以上の標的結合ポリペプチドの製造方法は、ランダムライプラリーから2個以上の標的結合アルファボディーまたはポリペプチドの同定後、

- 目的の標的タンパク質に結合する作製されたアルファボディーまたはポリペプチド配列を比較するステップ、

20

- これらの種々のアルファボディーもしくはポリペプチド配列の間または種々のアルファボディーもしくはポリペプチド配列の中に保存されたアミノ酸残基、アミノ酸残基の位置、ストレッチ、モチーフまたはパターンを同定するステップ、および

- 比較された2個以上のアルファボディーまたはポリペプチド配列の少なくとも1つから開始して、ライプラリーが、限られた数のランダムに選択された位置において多様化された、種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列を含有するスパイクの付いたライプラリーを作製するステップ、またはライプラリーが、種々の標的特異的アルファボディーもしくはポリペプチド配列の間または種々の標的特異的アルファボディーもしくはポリペプチド配列の中に保存されたアミノ酸残基、アミノ酸残基の位置、ストレッチ、モチーフもしくはパターンではないアミノ酸位置のセットにおいて多様化された種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列を含有する専門ライプラリーを作製するステップ、

30

- ランダムライプラリーから、目的の標的分子に対する、改良されたまたは最適化された結合特異性および/またはイン・ビトロ活性を有するアルファボディーまたはポリペプチド配列を選択および/または同定するステップ、ならびに任意に、

- 目的の標的分子に対する改良または最適化された結合特異性および/またはイン・ビトロ活性を有するこれらのアルファボディーまたはポリペプチド配列を単離するステップ、をさらに含んでもよい。

40

## 【0265】

前記のように、専門ライプラリーまたはスパイクの付いたライプラリーを作製し、目的の標的分子に対する改良または最適化された結合特異性および/またはイン・ビトロ活性を有するアルファボディーまたはポリペプチド配列を選択し、同定し、単離する方法に含まれるステップは、標的結合アルファボディーまたはポリペプチドの製造方法の対応するステップについて記載された類似の様式で実施することができる事が理解されるであろう。

## 【0266】

本明細書においてさらに説明されるように、本明細書において想定されるポリペプチド内に存在するアルファボディー構造におけるアミノ酸残基の総数は、主にヘプタッドの数/ヘプタッド反復配列の数およびヘプタッド反復配列を相互連結する柔軟なリンカーの長さに応じて、約50～約210個の範囲内であり得る。ポリペプチドまたは組成物の部分、断片、アナログまたは誘導体は、それらの長さおよび/またはサイズに関しては、かかる部分、断片、アナログまたは誘導体が、それらが由来する本明細書において想定されるポリペプチドまたは組成物の生物学的機能を未だ有しており、想定された(薬理学的)目

50

的に未だ使用できるのであれば、特に限定されない。

#### 【0267】

また、進化分子工学 (directed evolution) 法 (DNA シャッフルィング法など) も目的の標的分子に特異的であることが同定された 1 個以上の種々のアルファボディーまたはポリペプチド配列から開始するアルファボディーまたはポリペプチドライブラーの構築に用いることができることに注目されるべきである。また、かかる「進化分子工学」ライブラーも目的の標的分子に対する、改良されたまたは最適化された結合特異性および / またはイン・ビトロ活性を有するそれらのアルファボディー配列の選択および / または同定に供することもできる。

#### 【0268】

##### [模倣に基づくアルファボディーの製造方法]

代替的な実施形態においては、すなわち、細胞内標的分子に対する検出可能な結合親和性または阻害活性を有する標的特異的ポリペプチドの製造では、模倣に基づいて、結合部位をアルファボディー構造配列に導入し得ることが想定される。細胞透過特性を導入する前後のいずれかに、アルファボディー構造の特異的標的結合部位の移植を実施することができる事が理解されるであろう。したがって、アルファボディー構造自体に対して、またはかかるアルファボディー構造を含有するかまたはアルファボディー構造から本質的になるポリペプチドに対して、本明細書における方法の下記ステップを実施することができる事が理解されるであろう。具体的には、かかる標的特異的アルファボディー構造の作製方法は、

(a) 目的のその標的分子に結合するリガンドの結合部位の少なくとも一部の模倣のために選択するべきアルファボディー - ヘリックスを同定するステップ、および

(b) 目的のその標的分子に結合する前記リガンドの前記結合部位の模倣に使用される特定のアルファボディー - ヘリックス内のセグメントを決定するステップを少なくとも含む。

#### 【0269】

この方法は、コンプリクス エン ヴェー (Complix NV) 名義の公開された国際特許出願である国際公開第 2012/093013 号に詳細に開示されている。

#### 【0270】

##### [医薬組成物]

本明細書において想定される 1 個以上のポリペプチドおよび / または核酸配列、ならびに任意に、少なくとも 1 個の薬学的に許容され得る担体を含有する医薬組成物（本明細書では、本明細書において想定される医薬組成物とも称される）も本明細書において提供される。ある特定の実施形態によれば、本明細書において想定される医薬組成物は、任意に、少なくとも 1 個の他の医薬的活性化合物をさらに含有してもよい。

#### 【0271】

本明細書において想定される医薬組成物は、目的の細胞内標的分子が関係する疾患および障害の診断、予防および / または治療に使用できる。特に、温血動物、具体的には、哺乳動物、さらに具体的には、ヒトにおける予防用途、治療用途および / または診断用途に適切な、本明細書において想定される 1 個以上のポリペプチドを含有する医薬組成物が想定される。

#### 【0272】

具体的には、目的の細胞内標的分子が関係するおよび / またはこれにより媒介される 1 つ以上の疾患、障害、または病態の予防および / または治療において、獣医学的目的のために使用できる、本明細書において想定される 1 個以上のポリペプチドを含有する医薬組成物。

#### 【0273】

一般的に、医薬用途について、本明細書において想定されるポリペプチドは、本明細書において想定される少なくとも 1 個のアルファボディーまたはポリペプチドならびに少なくとも 1 個の薬学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤および / またはアジュバ

10

20

30

40

50

ント、ならびに任意に、1個以上のさらなる医薬的に活性なポリペプチドおよび／または化合物を含有する医薬調製品または医薬組成物として製剤化できる。かかる製剤は、経口、非経口、局所投与または吸入による投与に適切であってよい。したがって、本明細書において想定されるアルファボディーまたはポリペプチドおよび／またはこれらを含む組成物は、この場合も使用される特定の医薬製剤または医薬組成物に応じて、例えば、経口で、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内、経皮的、局所的、坐薬により、吸入により投与される。臨床医は、適切な投与経路とおよびかかる投与に使用される適切な医薬製剤または医薬組成物を選択できるであろう。

#### 【0274】

医薬組成物は、適切な結合剤、崩壊剤、甘味料または香味剤をさらに含んでもよい。錠剤、丸薬またはカプセルは、例えば、ゼラチン、ワックスまたは糖などによりコーティングされてもよい。また、本明細書において想定されるポリペプチドは、持続放出性の調製品およびデバイスに組み込んでよい。

#### 【0275】

注射または注入に適した医薬剤形は、滅菌の水溶液もしくは分散液または、任意に、リポソーム中にカプセル化された、滅菌の注射可能なまたは注入可能な溶液または分散液の即時調製に適した活性成分を含有する滅菌粉末を含むことができる。すべての場合において、最終剤形は、製造および保存の条件下で滅菌され、流動性および安定でなければならない。液体の担体またはビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステルおよびこれらの適切な混合物を含有する溶媒または液体分散媒体であり得る。抗菌剤および抗真菌剤などを任意に加えることもできる。

#### 【0276】

本明細書において想定されるポリペプチドの有用な投薬量は、動物モデルにおけるそれらのイン・ビトロ活性および／またはイン・ビボ活性を測定することによって決定できる。マウスおよび他の動物、ヒトへの有効な投薬量を推定する方法は、当該技術者には公知である。

#### 【0277】

予防および／または治療における使用に必要とされる本明細書において想定されるポリペプチドの量は、選択された特定のアルファボディーまたはポリペプチドによってのみではなく、投与経路、治療される病態の性質、および患者の年齢および病態によって変動することがあり、最終的には担当の医師または臨床医の裁量である。さらに、本明細書において想定されるポリペプチドの投薬量は、標的の細胞、腫瘍、組織、移植片または器官に応じて変動し得る。

#### 【0278】

本明細書において想定されるポリペプチドおよび／またはポリペプチドを含む組成物は、予防または治療される疾患または障害の予防および／または治療に適切な治療計画に従って投与される。臨床医は、一般に、適切な治療計画を決定することができるであろう。一般的に、治療計画は、1個以上のポリペプチドまたは1個以上のポリペプチドを含む1以上の組成物を1以上の医薬的有効量または用量で投与することを含むものである。

#### 【0279】

望ましい投与は、単回用量または適切な間隔で投与される（再度副投与されてもよい）分割用量として、便宜上、提示されてもよい。投与計画は、長期（すなわち、少なくとも2週間および例えば、数か月または数年）または毎日の治療を含むことができる。

#### 【0280】

本明細書において想定されるポリペプチドは、医師により、とりわけ治療される病態および患者の重症度に基づき決定される量で投与される。一般的に、それぞれの疾患の徵候に対して、継続的に（例えば、注入により）、毎日1回の投与として、または1日複数回の分割用量としてのいずれかの投与される量／kg体重／日を規定する最適用量（optimal dosage）が決定されるであろう。臨床医は、一般に、本明細書において

10

20

30

40

50

述べた要因に応じて適切な1日用量を決定できるであろう。特定の症例において、臨床医は、例えば、上述の要因におよび彼の熟練の判断に基づき、これらの量から逸脱させることを選択してもよいことも明らかであろう。

#### 【0281】

特に、本明細書において想定されるポリペプチドは、本明細書に述べられた疾患および障害の予防および／または治療に使用されるか、または使用できる他の医薬的に活性な化合物または成分と併用でき、その結果として、相乗効果が得られても得られなくてもよい。かかる化合物および成分ならびにそれらの投与の経路、方法および医薬製剤または医薬組成物の例は、臨床医には明らかであろう。

#### 【0282】

##### [予防、治療および／または診断用途]

細胞内標的によって媒介される疾患または細胞内標的分子が関与する障害の予防用および／または治療用医薬の調製のための本明細書において想定されるポリペプチドの使用も提供される。

#### 【0283】

特定の実施形態においては、細胞内タンパク質をターゲティングすることができる分子に連結され得るポリペプチドが提供される。さらなる実施形態においては、それ自体で細胞内標的に特異的に結合するポリペプチドが提供される。これらのポリペプチドは、前記細胞内標的分子が関与する少なくとも1つの細胞内標的媒介性の疾患および／または障害の予防および／または治療における使用が想定される。特定の実施形態においては、薬学上活性な量の本明細書において記載される1個以上のポリペプチドおよび／または医薬組成物を、それらを必要とする対象に投与するステップを含む、細胞内標的媒介性の疾患および／または障害の予防および／または治療のための方法が提供される。特に、薬学上活性な量は、細胞内標的またはそれらの生物学的もしくは薬理学的な活性および／またはそれらが関与する生物学的経路もしくはシグナル伝達を、阻害、抑制または低減する（または本明細書において想定される作動性ポリペプチドの場合、増強、促進または増加する）ために（循環系において、ある程度のポリペプチドを作り出すために）十分な量であつてよい。

#### 【0284】

本明細書において想定されるポリペプチドにより治療される対象または患者は、任意の温血動物であつてよいが、具体的には、本明細書において記載されるポリペプチドが特異的に結合する細胞内標的分子が関与する疾患および障害を患うか、またはその危険性がある哺乳動物、より具体的には、ヒトである。

#### 【0285】

本明細書において想定されるポリペプチドおよびこれらを含有する組成物の有効性は、関連する特定の疾患または障害に応じて、任意の適切なイン・ビトロアッセイ、細胞ベースのアッセイ、イン・ビオアッセイおよび／またはそれ自体が公知の動物モデル、またはこれらの任意の組み合わせを使用して、試験することができる。適切なアッセイおよび動物モデルは、当業者には明らかであろう。

#### 【0286】

関連する細胞内標的に応じて、当業者は、適切なイン・ビトロアッセイ、細胞アッセイまたは動物モデルを選択し、本明細書において記載されるポリペプチドを、細胞内標的分子との結合、または当該ポリペプチドの細胞内標的分子の活性に影響を与える当該ポリペプチドの能力および／または当該ポリペプチドが関与する生物学的機構ならびに細胞内標的分子と関連する1つ以上の疾患および障害に関する治療効果および／または予防効果に關して試験することができるであろう。

#### 【0287】

したがって、本明細書において想定される特定の実施形態は、治療用医薬として使用するための、より具体的には、癌、感染性疾患、造血性疾患、代謝性疾患、免疫疾患、神経障害、増殖性障害、心血管疾患および炎症性疾患からなる群より選ばれた疾患または障害

10

20

30

40

50

の治療方法に使用するための、少なくとも1個のアルファボディーを含有するポリペプチドであって、前記アルファボディーが、細胞の内部に取り入れられることができ、前記細胞内で生物学的に活性な細胞内標的分子に特異的に結合するポリペプチドを提供する。特定の実施形態においては、本明細書において想定されるポリペプチドは、癌および新生物病態を治療、予防および／または診断するのに使用される。癌または新生物病態の例としては、限定されるものではないが、線維肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーリング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃癌、食道癌、直腸癌、肺腺癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、頭頸部癌、皮膚癌、脳癌、扁平上皮細胞癌腫、脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌、囊胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌腫、腎細胞癌腫、肝細胞癌、胆管癌腫、絨毛癌腫、精上皮腫、胎児性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣癌、小細胞肺癌腫、非小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮性癌腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭管腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、希突起神経膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、カポジ肉腫などが挙げられる。

#### 【0288】

本明細書において想定されるポリペプチドは、様々な増殖性障害を治療するためにも使用され得る。増殖性障害の例としては、造血新生物障害ならびに細胞増殖性および／または分化性障害、例えば、限定されるものではないが、上皮過形成、硬化性腺疾患、および小管乳頭腫；腫瘍、例えば、間質性腫瘍、例えば、線維腺腫、葉状腫瘍、および肉腫、ならびに上皮腫瘍、例えば、大管乳頭腫；乳癌、例えば、イン・サイチューの腺管癌（パジエット病を含む）およびイン・サイチューの小葉癌を含むイン・サイチュー（非侵襲性）癌腫、ならびに侵襲性（浸潤性）癌腫、例えば、限定されるものではないが、侵襲性腺管癌、侵襲性小葉癌、髄様癌、膠様癌（粘液性癌腫）、管状腺癌、および侵襲性乳頭状癌、種々の悪性新生物、女性化乳房癌腫、気管支原性癌、例えば、腫瘍随伴症候群、細気管支肺胞癌、神経内分泌腫瘍、例えば、気管支カルチノイド、種々の腫瘍および転移性腫瘍；胸膜の病気、例えば、炎症性胸水貯留、非炎症性胸水貯留、気胸、ならびに胸膜腫瘍、例えば、孤立性線維性腫瘍（胸膜線維腫）、悪性中皮腫、非腫瘍性ポリープ、腺腫、家族性症候群、結腸直腸発癌、結腸直腸癌、カルチノイド腫瘍、結節性過形成、腺腫、および悪性腫瘍、例えば、肝臓の原発癌および転移性腫瘍、体腔上皮の腫瘍、漿液性腫瘍、粘液性腫瘍、子宮内膜性腫瘍、明細胞腺癌、囊胞性線維腺腫、ブレンナー腫瘍、表層上皮腫瘍；胚細胞腫瘍、例えば、成熟型（良性）奇形腫、単胚葉性奇形腫、未成熟型悪性奇形腫、未分化胚細胞腫瘍、内胚葉洞腫瘍、絨毛癌；性索間質性腫瘍、例えば、顆粒膜夾膜細胞腫、莢膜細胞腫線維腫、アンドロblastoma、ヒル細胞腫瘍、および性腺芽細胞腫；ならびに転移性腫瘍、例えば、クルーケンベルグ腫瘍などが挙げられる。

#### 【0289】

本明細書において想定されるポリペプチドは、様々な免疫障害、例えば、限定されるものではないが、炎症性疾患もしくは障害、または自己免疫性疾患もしくは障害を治療するためにも使用され得る。

#### 【0290】

さらに、本明細書において想定されるポリペプチドは、造血性障害または疾患、例えば、限定されるものではないが、自己免疫性疾患（例えば、糖尿病、関節炎（慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎など）、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎など）、乾癬、シェーグレン症候群、クローン病、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、潰瘍性大腸炎、喘息、アレルギー性喘息、皮膚エリテマトーデス、強皮症、臍炎、直腸炎、蕁痺、らい逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、特発性両側性進行性知覚神経性聽力喪失、再生不良性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、慢性活性肝炎、スティーヴンズ・ジョンソン症候群、特発性スプレー、扁平苔癬、グレーヴズ病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎お

10

20

30

40

50

および間隙性肺線維症を含む)、対宿主性移植片病、移植の症例、およびアレルギーを治療するためにも使用され得る。

#### 【0291】

本明細書において想定されるポリペプチドは、心血管障害(例えば、炎症性障害)、例えば、限定されるものではないが、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、脳卒中、血栓症、動脈瘤、心不全、虚血性心疾患、狭心症、心臓突然死、高血圧性心疾患；非冠血管疾患、例えば細動脈硬化症、小血管疾患、ネフロパチー、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高脂血症、黄色腫症、喘息、高血圧、肺気腫および慢性肺疾患；または介入的治療(「手技上の血管の外傷」)、例えば、血管形成術後の再狭窄、シャント、ストント、人工の移植片もしくは天然の切除した移植片の配置、カテーテル、弁または他の植え込み型装置の留置に不隨する心血管状態を治療するためにも使用され得る。10

#### 【0292】

さらに、本明細書において記載されるポリペプチドは、神経疾患または障害、例えば、限定されるものではないが、アルツハイマー病またはパーキンソン病、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症または脊髄小脳失調症、例えば、SCA1、SCA2、SCA3(マシャド・ジョセフ病)、SCA7またはSCA8、ALS、多発性硬化症、癲癇、ダウン症候群、オランダ型遺伝性アミロイド性脳出血、反応性アミロイドーシス、尋麻疹および難聴を伴う家族性アミロイドニューロパチー、マックル・ウェルズ症候群、特発性骨髄腫；マクログロブリン血症関連骨髄腫、家族性アミロイドポリニューロパチー、家族性アミロイド心筋症、孤立性心アミロイド、全身性老人性アミロイドーシス、成人発症型糖尿病、インスリノーマ、孤立性心房性アミロイド、甲状腺の髓様癌、家族性アミロイドーシス、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、家族性アミロイドポリニューロパチー、スクレイピー、クロイツフェルトヤコブ病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群、および牛海綿状脳症、プリオン介在性疾患の危険性があるかまたはこれらに罹患しているヒトを治療するためにも使用され得る。20

#### 【実施例】

#### 【0293】

##### I . イントロダクション

細胞内で作用する多くの分子が、治療用途にとって潜在的に興味深い標的として同定されている。これらのなかでは、アポトーシスプロセスに関するタンパク質は、細胞内標的分子の重要なクラスを形成する。最近説明されているように(クイン(Quinn)ら、Expert Opinion, 2011, 20: 1397-1411; アクグル(Akgul), Cell Mol. Life Sci. 2009, 66: 1326-1336およびこれらで引用されている参考文献)、アポトーシスは、生体内の細胞ホメオスタシスの維持に重要なプロセスであることが周知である。アポトーシスは、相互に関係する2つの経路：アポトーシスの外因性経路および内因性経路によって起こり得る。外因性経路には、FasLまたはTNFなどの細胞外リガンドによる細胞表面死受容体(Fas、TNFR)の活性化が関与している。様々なストレスシグナルによって開始され得る内因性経路には、ミトコンドリア外膜の透過化が関与しており、これによってシトクロムcが放出されて、カスパーゼ-9の切断および活性化、そして最終的には細胞死を伴うアポトーシスプロセスのさらなるステップにつながる。30

#### 【0294】

BCL-2ファミリーのタンパク質(Bcl-2ファミリーのタンパク質とも表記される)のメンバーは、アポトーシスプロセスの調節および制御に関する主なタンパク質であることがさらに周知である。BCL-2ファミリーのタンパク質には、アポトーシス促進性メンバーおよび抗アポトーシス性メンバーの両方が含まれる。このファミリーのタンパク質は、B細胞リンパ腫の研究で発見されたこのファミリーのタンパク質の創始メンバーであるBCL-2にちなんで名付けられる。40

#### 【0295】

構造的および機能的特性に基づいて、BCL-2ファミリーのタンパク質は、一般的に

10

20

30

40

50

、3つのサブグループ：アポトーシス促進性BCL-2メンバーの2つのサブグループおよび抗アポトーシス性BCL-2メンバーの1つサブグループに分けられる。

#### 【0296】

抗アポトーシス性サブグループには、BCL-2、MCL-1、BCL-w、BCL-X<sub>L</sub>およびBFL-1/A1というメンバーが含まれる（これらのタンパク質は、小文字表記でBcl-2、Mcl-1、Bcl-w、Bcl-x<sub>L</sub>、Bfl-1/A1と表記されることもある）。これらのタンパク質は、アポトーシス促進性BCL-2ファミリーメンバーの重要なアポトーシス誘導ドメインに結合するかまたはこれを捕捉することによって、生存因子として作用する（Stewart (S t e w a r t) ら、Nature Chemical Biology, 2010, 6, 595-601）。このドメインは、BCL-2相同ドメイン3（BH3）として公知である。抗アポトーシス性タンパク質は、その表面に沿って、BH3-ヘリックスと会合する疎水性結合領域を有する（ザットラー（Sattler）ら、Science, 1997, 275: 983-986）。BCL-2、BCL-XLおよびBCL-Wは、4つのBH（BCL-2相同）ドメイン（BH1、BH2、BH3およびBH4と表記される）を含むのに対して、MCL-1およびBFL-1/A1は、明確に定義されたBH4ドメインを欠く。

10

#### 【0297】

2つのアポトーシス促進性サブグループの1つは、複数のBH（BCL-2相同）ドメイン（BH1、BH2およびBH3）を有するBaxおよびBak（大文字でBAXおよびBAKとも表記される）を含む。他のアポトーシス促進性サブグループのメンバー（BAD、BID、BIM、NOXA、PUMAなど）はBH3ドメインのみを含むため、BH3-オンリータンパク質と称される。

20

#### 【0298】

BCL-2ファミリーの抗アポトーシス性メンバーは、腫瘍細胞の生存に重要な役割を果たし、癌治療の有用な標的として考えることができる。実際、これらの生存タンパク質は、広範囲のヒト癌で発現している。例えば、MCL-1は、多くの癌種（乳房、卵巣、腎臓、前立腺、黒色腫、膵臓、肝細胞癌、頭頸部、多発性骨髄腫、結腸、肺、白血病およびリンパ腫）で過剰発現していることが報告されている（クイン（Quinn）ら、Expert Opinion, 2011, 20: 1397-1411）。

30

#### 【0299】

結果として、抗アポトーシス性タンパク質を遮断するBH3模倣物の開発に関連する創薬に大きな関心がある。

#### 【0300】

例えば、ABT-737は、BCL-2、BCL-XLおよびBCL-wに結合するが、MCL-1またはBFL-1/A1には結合しないBH3模倣物である（リー（Lee）ら、Cell Death and Differentiation (2007), 14, 1711-1719）。この認識の差異は、結合溝の差異によって説明することができ、MCL-1結合溝は、他の抗アポトーシス性タンパク質よりも電気的陽性であることが知られている。

40

#### 【0301】

また、親和性の最適化および結合選択性の保存を目的として、BH3-ヘリックスを模倣する炭化水素ステープルペプチドが製造されている。かかるアプローチは、抗アポトーシス性MCL-1 BH3ヘリックスから排他的MCL-1阻害剤を得たStewart (S t e w a r t) ら（Nature Chemical Biology, 2010, 6, 595-601）によって最近生み出された。

#### 【0302】

しかしながら、これらのステープルペプチドは、一般に、中間レベルの-ヘリシティーのみが観察されるという事実（例えば、二重ステープルSAH-gp41<sub>626-666</sub><sub>2</sub>ペプチドについては、36%の-ヘリシティーが認められた（バード（Bird）ら、PNAS, 2010, 107, 14093-14098））；および、ヘリックスタ

50

ーン間に必要なステーピングは、それ自体が生物学的活性に予測不可能な影響を与える人工物であるという事実に悩まされる。

### 【0303】

以下の実施例では、MCL-1とアポトーシス促進性タンパク質との相互作用を遮断して、癌/腫瘍細胞をプログラム化された細胞死に向かわせることを目的として、MCL-1のBH3ドメインを模倣しMCL-1に結合するアルファボディーをどのようにして設計したかを説明する。

### 【0304】

#### I I . C P A B モチーフを含有するアルファボディーの細胞内取り込み

実施例1. カチオン化C P A B アルファボディーMB23\_h i R - V 5 の細胞内取り込み。 10

本実施例では、癌細胞および非癌細胞を含む種々の細胞型における時間およびアルファボディー濃度に応じたカチオン化アルファボディーの細胞内への取り込みを説明する。カチオン化アルファボディーの細胞取り込み能力を検討するために、本発明者らは、まず、IL-23を対象とするMB23という名称のアルファボディーを選択した。AヘリックスおよびCヘリックス上に位置するIL-23結合部位を保存するために、8個のArgをBヘリックス内に付加し、MB23\_h i R - Vと称される正荷電アルファボディーを得た（配列番号：2）（電荷+9）（図1）。

### 【0305】

また、取り込みの温度依存性、グリコサミノグリカン存在の依存性、および血清が細胞培養培地中に存在することの細胞透過性に対する影響を検討することによって、アルファボディーの細胞取り込み機構を調べた。 20

### 【0306】

共焦点顕微鏡によって取り込みを検討し、アルファボディーのC末端にHisタグとともに融合したV5タグを認識する抗V5抗体を使用して、細胞内アルファボディーを可視化した。固定および透過処理した細胞で、すべての実験を実施した。非透過化処理実験による対照実験を含めた（データは示さず）。

### 【0307】

#### 1.1 使用した方法

6種の癌細胞株および2種の非癌細胞株を含む8種の細胞株において、参照カチオン化アルファボディーMB23\_h i R - V 5（配列番号：2）を用いて、濃度および時間に応じた細胞透過を検討した。細胞内アルファボディー取り込みの機構を理解するために、細胞透過の温度依存性、ヘパラン硫酸依存性および血清依存性を検討した。 30

### 【0308】

#### 1.1.1 MB23\_h i R - V 5 の発現および精製

E.coli細菌の可溶性画分において、カチオン化アルファボディーMB23\_h i R - V 5（配列番号：2）を発現させた。Ni-NTAクロマトグラフィーによってタンパク質を精製し、続いて脱塩および緩衝液交換の手順を行なった。20 mMクエン酸pH3.0（5.3 mg/ml）中にタンパク質を可溶化した。 40

### 【0309】

#### 1.1.2 カチオン化アルファボディーMB23\_h i R - V 5 の細胞内取り込み

6種の癌細胞株（U87 MG、BxPC-3、H1437、SW872、MT-4およびJurkat）および3種の非癌細胞株（HEK、CHO-K1およびCHO.pgSA）において、細胞内取り込みを検討した（表1）。

### 【0310】

接着性細胞株（U87 MG、BxPC-3、H1437、SW872、HEK、CHO-K1およびCHO.pgSA）をDMEM+10%ウシ胎仔血清（FBS）で培養し、細胞10,000個/チャンバーでLabTekチャンバーに播種し、37および5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベーションした。翌日、カチオン化アルファボディー（希釈系列または単一濃度）を播種細胞とともに37および5%CO<sub>2</sub>で2時間または種々の時間

10

20

30

40

50

(3.5分間～48時間の範囲)インキュベーションした。アルファボディーとともにインキュベーションした後、PBS (MgおよびCa (D PBS)を含む)で細胞を4回洗浄(5分間/洗浄)した。

## 【0311】

## 【表1】

表1：細胞内取り込み検討に用いられた細胞株

細胞株	説明	
U87, MG	ヒト神経膠芽腫細胞	10
BxPC-3	ヒト膵臓癌細胞	
H1437	ヒト非小細胞肺癌細胞	
SW872	ヒト脂肪肉腫細胞	
MT-4	ヒトT細胞白血病細胞	
Jurkat	ヒトT細胞白血病細胞	
HEK	ヒト胚腎臓細胞	20
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巣細胞	
CHO, pgSA	グリコサミノグリカン合成欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞	

## 【0312】

懸濁細胞株(MT4およびJurkat)をRPMI+10%FBSで培養し、細胞100,000個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。希釈系列のカチオン化アルファボディーを37および5%CO<sub>2</sub>の96ウェルプレート中の細胞に2時間にわたって加えた。並行して、ポリリジンをLabTekチャンバーに室温(RT)で2時間にわたって加えて、細胞付着用のLabTekチャンバーのスライドガラスを調製した。2時間後、細胞を2回洗浄(5分間/洗浄)し、ポリリジンでコーティングしたLabTekチャンバーに室温(RT)で1時間にわたって加えた(=細胞付着)。

## 【0313】

細胞内アルファボディーを可視化するために、4%ホルムアルデヒドを用いて細胞を4で10分間固定し、続いて、0.1% Triton X-100を用いて室温(RT)で15分間透過処理した。グリシン(0.75g/100ml)で細胞を2回洗浄(10分間/洗浄)し、ホルムアルデヒドによる架橋を停止させ、続いてD PBSで洗浄(5分間/洗浄)した。

## 【0314】

ブロッキング緩衝液(D PBS+1%BSA)を用いて細胞を室温(RT)で10分間ブロッキングし、続いて、アルファボディーのV5タグを対象とする一次抗体(マウス抗V5Ab、Invitrogen, 46-0705)をブロッキング緩衝液で1/400希釈したものとともに室温(RT)で1時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液で細胞を3回洗浄(5分間/洗浄)し、続いて、二次抗体(Alexa488標識ヤギ抗マウス抗体(Invitrogen, A-10680))をブロッキング緩衝液で1/300希釈したものおよびDAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩)(核染色)(1/100)を室温(RT)で30分間にわたって加えた。最後に

、ブロッキング緩衝液で細胞を3回洗浄(5分間/洗浄)し、 $150\mu l$ のD P B Sを加え、Zeiss Axiovert 200, LSM 510 Meta共焦点顕微鏡でプレートを読んだ。

【0315】

1.2 結果

1.2.1 種々の細胞株におけるカチオン化MB23\_hiR-V5の細胞内取り込み

ヒト神経膠芽腫細胞株U87.MGにおいて、 $312nM$ から開始する2倍希釈のカチオン化MB23\_hiR-V5(配列番号:2)の細胞内取り込みを検討した。アルファボディーを細胞とともに2時間インキュベーションした後、抗V5抗体およびAlexa 488標識二次抗体を用いて、細胞内アルファボディーを検出した。図2は、U87.MG細胞におけるMB23\_hiR-V5( $312nM$ ~ $1.2nM$ )の用量依存的な取り込みを示す。拡散した蛍光パターンは、アルファボディーの細胞質局在を示している。ヒト神経膠芽腫細胞におけるカチオン化MB23の検出可能な細胞内取り込みの下限濃度は、 $4.9nM$ であった。その濃度では、対照シグナル(アルファボディーを含まない細胞)よりも強い蛍光シグナルが依然として見られた。

10

【0316】

ヒト神経膠芽腫細胞において同じ条件下で、対応する非カチオン化アルファボディーMB23-V5の取り込みを検討した。非カチオン化MB23の検出可能な細胞内取り込みはなく、このことは、MB23\_hiR-V5の取り込みが、カチオン化モチーフの存在によるものであることを実証している(図3)。

20

【0317】

5種のさらなる癌細胞株(BxPC-3、H1437、SW872、MT-4、Jurkat)および2種の非癌細胞株(HEK、CHO-K1)において、MB23\_hiR-V5( $1250nM$ 、 $312.5nM$ 、 $156.3nM$ 、 $78.1nM$ 、 $39.1nM$ 、 $19.5nM$ および $9.8nM$ )の用量依存的な取り込みを検討した。非癌細胞を含む試験した細胞型すべてについて、用量依存的な細胞内取り込みが観察された。4種の細胞株(U87.MG、BxPC-3、H1437およびSW872)において、カチオン化アルファボディーMB23\_hiR-V5の細胞内取り込みを $78nM$ の濃度で調べた。カチオン化アルファボディーは、同程度ではないが、分析した細胞型すべてに透過した(定性的比較)(図4)。

30

【0318】

細胞内取り込みの下限濃度を共焦点顕微鏡画像上で定性的に決定し、表2に要約する。ヒト神経膠芽腫細胞(U87.MG)を除くすべての細胞株について、試験した最低濃度は $9.8nM$ であった。試験した最低濃度では、BxPC-3、H1437およびCHO-K1細胞において、細胞内アルファボディーが検出された。SW872およびHEK細胞については、バックグラウンドを超える蛍光シグナルを得るために、より高濃度のカチオン化アルファボディーが必要であった。ヒトT細胞白血病細胞株MT4およびJurkatでは、最高濃度のアルファボディーが細胞内取り込みに必要であった。

【0319】

## 【表2】

表2：8種の異なる細胞株におけるカチオン化MB23-hiR-V5の細胞内取り込みの下限濃度。

細胞型	取り込みの下限濃度
神経膠芽腫細胞 (U87)	4.9 nM
肺腺癌 (BxPC3)	9.8 nM
非小細胞肺癌 (H1437)	9.8 nM
脂肪肉腫細胞 (SW872)	19.5 nM
T細胞白血病 (Jurkat)	1250 nM
T細胞白血病 (MT4)	156 nM
チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1)	9.8 nM
HEK細胞	39.1 nM

10

20

30

40

50

## 【0320】

## 1.2.2 カチオン化MB23-hiR-V5の細胞内取り込み

## (i) MB23-hiR-V5の細胞内取り込みに対する血清の影響

細胞内取り込みに対する血清の存在の影響を決定するために、ヒト神経膠芽腫細胞 (U87 MG) における希釈系列のカチオン化アルファボディー-MB23-hiR-V5 (配列番号: 2) の細胞内取り込みを検討した。10% 血清の存在下および非存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37℃ で 2 時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Allexa488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。要約すると、無血清条件と 10% 血清条件との間では、取り込み効率にごくわずかな差異があった。取り込みの差異は、最高濃度のアルファボディー (1250 nM) で最も顕著であった (データは示さず)。

## 【0321】

## (ii) MB23-hiR-V5の細胞内取り込みに対するヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸の影響

ヘパラン硫酸合成が欠損している CHO-pgSA-745 細胞を使用することによって、ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸の潜在的影響を検討した。これらの細胞 (CHO-pgSA-745) は、キシロシルトランスフェラーゼに欠陥があり、それらの細胞表面でヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸を発現していない。CHO-K1 および CHO-pgSA-745 細胞における希釈系列のカチオン化アルファボディー-MB23-hiR-V5 の細胞内取り込みを検討した。10% 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37℃ で 2 時間インキュベーションした。細胞を PBS で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V5 抗体および Allexa488 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。DAPI で核を染色した。その結果、ヘパリン / コンドロイチン硫酸 (HS / CS) 欠損細胞における細胞内取り込みは、完全には無効化されていないことが示された (データは示さず)。しかし、HS / CS の欠損細胞では、取り込みは明らかに非効率的であった。これは、カチオン化アルファボディーの取り込みが、負に荷電した HS / CS 部分の存在に完全ではないが部分的に依存してい

ることを示唆する。

【0322】

(i i i) M B 2 3 \_ h i R - V 5 の細胞内取り込みに対する温度の影響

また、カチオン化アルファボディーの細胞透過がエネルギー依存的なプロセスまたはエネルギー非依存的なプロセスであるかを決定するために、カチオン化アルファボディーの取り込みを 4 °で検討した。この目的のために、ヒト神経膠芽腫細胞 (U 8 7 . M G) における希釈系列のカチオン化アルファボディー M B 2 3 \_ h i R - V 5 の細胞内取り込みを検討した。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを細胞とともに 37 °および 4 °で 2 時間インキュベーションした。細胞を P B S で洗浄し、固定および透過処理した後、一次抗 V 5 抗体および A l e x a 4 8 8 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。D A P I で核を染色した。37 °および 4 °におけるアルファボディーの細胞透過を比較すると、ごくわずかな取り込みの差異が観察された（データは示さず）。これらのデータは、アルファボディーの細胞透過機構が実質的にエネルギー非依存的であり、アルファボディーが膜を通って直接透過するのに主に依拠していることを示す。

10

【0323】

1 . 2 . 3 M B 2 3 \_ h i R - V 5 の細胞内取り込みの動態

長いインキュベーション時間後のカチオン化アルファボディーの取り込みの動態および細胞内アルファボディーの運命についての知見を得るために、ヒト神経膠芽腫細胞 (U 8 7 . M G) との短い (240 分間、120 分間、60 分間、30 分間、15 分間、7 . 5 分間、3 . 5 分間) および長い (48 時間、24 時間および 12 時間) アルファボディーインキュベーション時間を用いた実験を、2 種のアルファボディー濃度 (1250 nM および 500 nM) で実施した（データは示さず）。

20

【0324】

細胞内取り込みの動態は、両方のアルファボディー濃度で同一であった。3 . 5 分間後に、アルファボディーは、細胞で既に検出された。これらのデータは、細胞内へのアルファボディーの取り込みが高速プロセスであることを示唆する。細胞上でのカチオン化アルファボディーのインキュベーションを長くすると、特に 48 時間後に細胞内アルファボディーが消失した。

30

【0325】

1 . 2 . 4 細胞外細胞膜へのアルファボディーの結合に対するヘパリン洗浄の効果

(1) ヘパリン洗浄が細胞外膜からアルファボディーを除去したかどうかを分析するために、および (2) 観察された細胞内アルファボディーが染色手順による人為的結果（染色処理（すなわち、細胞の固定および透過処理）により細胞外アルファボディーが細胞に侵入）ではなかったことを確認するために、アルファボディーをインキュベーションした後に細胞のヘパリン洗浄 (100 U / m l) を実施した。

【0326】

アルファボディーをインキュベーションした後、細胞を P B S またはヘパリンで洗浄し、固定および透過処理したか、または透過処理せずに単に固定した (= 細胞外アルファボディー染色)。これらの実験で、2 種のアルファボディー濃度 (1250 nM および 500 nM) を検討した：

40

【0327】

ヒト神経膠芽腫細胞 (U 8 7 . M G) における 1250 nM および 500 nM のカチオン化アルファボディー M B 2 3 \_ h i R - V 5 (配列番号 : 2) の細胞内取り込み。10 % 血清の存在下で、アルファボディーを U 8 7 . M G 細胞とともに 37 °で 2 時間インキュベーションした。細胞を P B S またはヘパリンで洗浄し、固定および透過処理 / 透過処理せずに固定した後、一次抗 V 5 抗体および A l e x a 4 8 8 標識二次ヤギ抗マウス抗体を用いて、細胞内アルファボディーを可視化した。D A P I で核を染色した（データは示さず）。

50

【0328】

細胞内アルファボディーは、ヘパリン洗浄細胞およびP B S洗浄細胞の両方で観察されたのに対して、膜結合アルファボディーはP B S洗浄細胞でのみ見られた。細胞を透過処理せずに細胞外アルファボディーを可視化すると、ヘパリン洗浄細胞では、P B S洗浄細胞と比較して弱いアルファボディー染色が観察された。

#### 【0329】

これらの結果は、ヘパリンが、除去は完全ではなかったが、細胞外膜結合アルファボディーを除去し、細胞の透過処理後に検出された細胞内アルファボディーが、細胞外アルファボディーが実験手順により内部に取り入れられるという技術的な人為的結果ではないことを実証する。

#### 【0330】

#### 1.2.5 細胞外結合アルファボディーを除去した後のM B 2 3 \_ h i R - V 5 取り込みの動態

先の実験から、ヘパリンは、細胞外結合アルファボディーの大部分を除去することがわかった。したがって、ヘパリン洗浄を使用して、M B 2 3 \_ h i R - V 5（配列番号：2）の取り込みの動態を検討した。このプロトコールは、細胞外結合アルファボディーの大部分を除外しながら、細胞内アルファボディーの変動を評価することを可能にした。複数の細胞そして単一細胞においても細胞内取り込みの画像を記録して、時間依存的な細胞内取り込みのより詳細な画像が得られた（図5）。

#### 【0331】

3.5分後、対照画像（アルファボディーを含まない細胞）と比較して、細胞内アルファボディーが見られた。ヘパリンで細胞を洗浄すると、時間に応じた蛍光シグナルの増加（細胞内アルファボディーの増加）がより見られた。

#### 【0332】

単一細胞の画像を分析すると、時間に応じた蛍光パターンの変動が明らかになった。より早い時点では、細胞内膜の染色が明らかに見られた（30分まで）。30分後、膜染色が薄くなり、膜からさらに離れて移動する細胞質中にベシクルが存在していた（図5）。

#### 【0333】

#### 1.3 結論

本実施例の結果により、（Bヘリックス内に電荷を有する）カチオン化アルファボディーM B 2 3 \_ h i R - V 5は、癌細胞株および非癌細胞株を含む種々の細胞型において用量依存的に透過することが示された。取り込み効率および取り込みパターンは、細胞型依存的である。

#### 【0334】

5～10nMほどの低いアルファボディー濃度は、細胞を2時間インキュベーションした後にアルファボディーの細胞内取り込みをもたらした。

#### 【0335】

カチオン化アルファボディーの細胞内取り込みは4では無効化されず、おそらくは、アルファボディーの取り込みが、細胞膜の直接透過に依拠するエネルギー非依存的な機構によって主に支配されることを示す。

#### 【0336】

これらの知見は、カチオン化アルファボディーが異なる細胞内取り込み経路に従うことを示唆する。

#### 【0337】

カチオン化アルファボディーの取り込みプロセスは、高速プロセスである。3.5分後、アルファボディーは、細胞内部に存在した。

#### 【0338】

ヘパリンは、細胞外結合アルファボディーの大部分を除去する。細胞外結合アルファボディーの染色を除外するために、ヘパリン洗浄を使用した動態取り込み実験を実施した。結果は、P B S洗浄で得られた結果と本質的に同様であったが、細胞内アルファボディー濃度の経時的な増加がより顕著であった。単一細胞の分析により、アルファボディーが細

10

20

30

40

50

胞膜内側から細胞内空間に移動（すなわち、拡散）することを示す蛍光パターンの変動が実証された。

### 【0339】

実施例2．MCL-1を対象とするCPABアルファボディーの細胞内取り込み

本実施例では、細胞内標的MCL-1を対象とする2つのアルファボディーであるアルファボディーAB1\_h i KR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5（配列番号：6）の細胞内取り込みを説明する。これらのアルファボディーは、細胞内取り込みのために、カチオン化（すなわち、Arg/Lysアミノ酸残基を用いた修飾）によって設計した。下記のように、これらのアルファボディーは、特にT細胞白血病細胞（MT4）の生存率アッセイにおいて、48時間後に細胞死を誘導することができたことが示された。

10

### 【0340】

#### 2.1 使用した方法

癌細胞株および非癌細胞株のパネルにおいて、アルファボディー濃度に応じて、アルファボディーAB1\_h i KR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5（配列番号：6）の細胞内取り込みを検討した。共焦点顕微鏡によって取り込みを検討し、アルファボディーのC末端V5タグを認識する抗V5抗体を使用して細胞内アルファボディーを可視化した。固定および透過処理した細胞で、すべての実験を実施した。非透過化処理実験による対照実験を含めた。

20

### 【0341】

図6に示されているように、これらのアルファボディーは、Bヘリックス内にMCL-1結合部位を含み、異なるカチオン化パターンを示した。アルファボディーを修飾するのにLysおよびArg残基を使用して、それぞれAB1\_h i KR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5（配列番号：6）の正味電荷を+11および+19とした。より良いコアパッキングを示すようにアルファボディーAB1\_A2aF\_h i KR3-V5を設計した。AB1\_A2aF\_h i KR3-V5とAB1\_h i KR3-V5との間のさらなる差異は、A2aFバリエントではループ1配列がより短く、Hisタグがより長いことであった（図6）。

20

### 【0342】

6種の癌細胞株および2種の非癌細胞株を含む8種の細胞株において、濃度に応じた細胞透過を検討した。

30

### 【0343】

#### 2.1.1 AB1\_h i KR1-V5およびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5の発現および精製

E.coli細菌の可溶性画分において、カチオン化アルファボディーAB1\_h i KR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5（配列番号：6）を発現させた。Ni-NTAクロマトグラフィーによってタンパク質を精製し、続いて脱塩および緩衝液交換の手順を行なった。20mMクエン酸pH3.0（AB1\_h i KR1-V5の場合は2.8mg/mlおよびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5の場合は3.9mg/ml）中にタンパク質を可溶化した。

40

### 【0344】

#### 2.1.2 カチオン化アルファボディーAB1\_h i KR1-V5およびAB1\_A2aF\_h i KR3-V5の細胞内取り込み

6種の癌細胞株（U87 MG、BxPC-3、H1437、SW872、MT-4およびJurkat）および2種の非癌細胞株（HEK、CHO-K1）において、細胞内取り込みを検討した（表3）。

### 【0345】

接着性細胞株（U87 MG、BxPC-3、H1437、SW872、HEK、CHO-K1およびCHO.pgSA）をDMEM+10%ウシ胎仔血清（FBS）で培養し、細胞10,000個/チャンバーでLabTekチャンバーに播種し、37および50

50

% CO<sub>2</sub> で一晩インキュベーションした。翌日、カチオン化アルファボディー（希釈系列または単一濃度）を播種細胞とともに 37 および 5% CO<sub>2</sub> で 2 時間または様々な時間（3.5 分間～48 時間の範囲）インキュベーションした。アルファボディーとともにインキュベーションした後、PBS (Mg および Ca (D PBS) を含む) で細胞を 4 回洗浄（5 分間 / 洗浄）した。

## 【0346】

## 【表 3】

表 3：細胞内取り込み検討に用いられた細胞株

細胞株	説明	
U87, MG	ヒト神経膠芽腫細胞	10
BxPC-3	ヒト膵臓癌細胞	
H1437	ヒト非小細胞肺癌細胞	
SW872	ヒト脂肪肉腫細胞	
MT-4	ヒトT細胞白血病細胞	
Jurkatt	ヒトT細胞白血病細胞	20
HEK	ヒト胚腎臓細胞	
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巢細胞	

## 【0347】

懸濁細胞株（MT-4 および Jurkatt）を RPMI + 10% FBS で培養し、細胞 100,000 個 / ウェルで 96 ウェルプレートに播種した。37 および 5% CO<sub>2</sub> で、希釈系列のカチオン化アルファボディーを 96 ウェルプレート中の細胞に 2 時間にわたって加えた。並行して、ポリリジンを LabTek チャンバーに室温 (RT) で 2 時間にわたって加えて、細胞付着用の LabTek チャンバーのスライドガラスを調製した。2 時間後、細胞を 2 回洗浄（5 分間 / 洗浄）し、ポリリジンでコーティングした LabTek チャンバーに室温 (RT) で 1 時間にわたって加えた（= 細胞付着）。

## 【0348】

細胞内アルファボディーを可視化するために、4% ホルムアルデヒドを用いて細胞を 4 で 10 分間固定し、続いて、0.1% Triton X-100 を用いて室温 (RT) で 15 分間透過処理した。グリシン (0.75 g / 100 ml) で細胞を 2 回洗浄（10 分間 / 洗浄）し、ホルムアルデヒドによる架橋を停止させ、続いて D PBS で洗浄（5 分間 / 洗浄）した。

## 【0349】

ブロッキング緩衝液 (D PBS + 1% BSA) を用いて細胞を室温 (RT) で 10 分間ブロッキングし、続いて、アルファボディーの V5 タグを対象とする一次抗体（マウス抗 V5 Ab、Invitrogen, 46-0705）をブロッキング緩衝液で 1/400 希釈したものとともに室温 (RT) で 1 時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液で細胞を 3 回洗浄（5 分間 / 洗浄）し、続いて、二次抗体である Alexa 488 標識ヤギ抗マウス抗体（Invitrogen, A-10680）をブロッキング緩衝液で 1/300 希釈したものおよび DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩)（核染色）(1/100) を室温 (RT) で 30 分間にわたって加えた。最後に、ブロッキング緩衝液で細胞を 3 回洗浄（5 分間 / 洗浄）し、150 μl の D PBS を

30

40

50

加え、Zeiss Axiovert 200, LSM 510 Meta共焦点顕微鏡でプレートを読んだ。

【0350】

2.2 結果

2.2.1 ヒト神経膠芽腫細胞U87 MGにおけるAB1\_hiKR1-V5およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込み

ヒト神経膠芽腫細胞において、濃度系列のAB1\_hiKR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5（配列番号：6）の細胞内取り込みを検討した。アルファボディーを細胞とともに2時間インキュベーションした後、抗V5抗体および二次Allexa488標識抗体を用いて、細胞内アルファボディーを検出した。

10

【0351】

両方のカチオン化AB1アルファボディーについて、用量反応依存的な取り込みが観察された（図7）。

【0352】

AB1\_hiKR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5（配列番号：6）の細胞内取り込みの下限濃度を単一細胞の画像上で定性的に決定したところ、それぞれ39.1 nMおよび19.5 nMに相当した。これらの濃度では、対照シグナル（アルファボディーを含まない細胞）よりも強い蛍光シグナルが依然として見られた。

20

【0353】

2.2.2 種々の細胞株におけるAB1\_hiKR1-V5およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込み

2種の非癌細胞株（HEK、CHO-K1）および6種のさらなる癌細胞株（U87 MG、BxPC-3、H1437、SW872、MT-4、Jurkat）において、AB1\_hiKR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5（配列番号：6）（1250 nM、312.5 nM、156.3 nM、78.1 nM、39.1 nM、19.5 nMおよび9.8 nM）の用量依存的な取り込みを検討した（図7および表4）。同じ濃度で同じ細胞において、AB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込みをMB23\_hiR-V5（配列番号：2）の細胞内取り込みと定性的に比較した（共焦点顕微鏡画像の目視比較）。

30

【0354】

試験した細胞型すべてについて、用量依存的な細胞内取り込みが観察された。ヒト神経膠芽腫（U87 MG）（図7）および脂肪肉腫細胞（SW872）細胞において、非常に効率的な取り込みが観察された（データ示さず）。

【0355】

AB1\_A2aF\_hiKR3-V5およびMB23\_hiR-V5（配列番号：2）の取り込み効率は、試験した特定の細胞型の間で変化した。単一細胞画像の分析によって、AB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込みの下限濃度を定性的に決定した。結果を表4に要約する。SW872およびHEK細胞については、細胞内タンパク質を観察するためには、低濃度のアルファボディー（9.8 nM）しか必要ないことが明らかになった。U87 MG、BxPC-3、H1437、MT4、CHO-K1細胞およびJurkat T細胞白血病細胞については、バックグラウンドを超える蛍光シグナルを得るために、より高濃度のカチオン化アルファボディーが必要であった（表4）。

40

【0356】

## 【表4】

表4：8種の異なる細胞株におけるカチオン化アルファボディーMB 23\_hiR-V5  
およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込みの下限濃度

細胞型	MB 23_hiR-V5 取り込みの下限濃度	AB1_A2aF_hiKR3-V5 取り込みの下限濃度
神経膠芽腫細胞 (U87)	4.9 nM	19.5 nM
肺腺癌 (BxPC3)	9.8 nM	78.1 nM
非小細胞肺癌 (H1437)	9.8 nM	39.1 nM
脂肪肉腫細胞 (SW872)	19.5 nM	9.8 nM
T細胞白血病 (Jurkat)	1250 nM	1250 nM
T細胞白血病 (MT4)	156 nM	78.1 nM
チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1)	9.8 nM	78.1 nM
HEK細胞	39.1 nM	9.8 nM

10

20

30

40

## 【0357】

2.2.3 AB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込みに対するヘパリン洗浄の効果

細胞外結合アルファボディーを除去するためにヘパリン洗浄を使用して、3種の癌細胞株において、AB1\_A2aF\_hiKR3-V5（配列番号：6）の細胞内取り込みを検討した。同じ細胞株について、PBS洗浄による細胞内取り込みの結果とデータを比較した。

## 【0358】

細胞型に応じて、ヘパリンで洗浄した後に膜染色が部分的または完全に消失したが、これは、細胞外細胞表面上に存在する過剰なアルファボディーを除去することができたことを示す（データは示さず）。

## 【0359】

2.2.4 ヘパリン洗浄の効果およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5の取り込みの動態

ヘパリン洗浄を使用して、ヒト神経膠芽腫細胞におけるAB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞内取り込みの動態を実施した。3.5分後、アルファボディーは細胞内部に存在しており、蛍光シグナルは、180分後（測定した最長のインキュベーション時間）に最大であった（図8）。単一細胞画像を分析すると、細胞内取り込みの変動が最も見られた（データは示さず）。蛍光シグナルの増加は、インキュベーション時間に応じて観察された。短期のインキュベーション時間では、アルファボディーは細胞内膜の近くに主に存在しており、インキュベーション時間を延長すると膜から離れた。

## 【0360】

2.3 結論

（AおよびCヘリックス内に電荷を有する）カチオン化MCL-1アルファボディーは、癌細胞株および非癌細胞株を含む種々の細胞型において用量依存的に浸透する。

## 【0361】

ヒト神経膠芽腫細胞におけるMB23\_hiR-V5（配列番号：2）および2つのMCL-1アルファボディー（AB1\_hiKR1-V5およびAB1\_A2aF\_hiK

50

R 3 - V 5 ) の取り込みについて得られたデータにより、A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 の取り込み効率がM B 2 3 \_ h i R - V 5 の取り込み効率よりも高く、そして今度はM B 2 3 \_ h i R - V 5 の取り込み効率はA B 1 \_ h i K R 1 - V 5 の取り込み効率よりも高いことが示された。これらのデータは、取り込み効率が電荷数によって単に決定されないことを示している。実際、M B 2 3 \_ h i R - V 5 は 9 の正味電荷を有するのに対して、A B 1 \_ h i K R 1 - V 5 は 1 1 の正味電荷を有する。

#### 【 0 3 6 2 】

A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 の細胞内取り込みは、細胞型依存的であるように思われた。実際、アルファボディーは、ほぼすべての試験した細胞型によって内部に取り入れられたが、効率は変化した。M B 2 3 \_ h i R - V 5 について観察されたように、ヒトT細胞白血病細胞では、細胞内取り込みがより低かった。一方、癌細胞株 S W 8 7 2 および U 8 7 . M G における取り込みは、高効率であった。

10

#### 【 0 3 6 3 】

同様に、M B 2 3 \_ h i R - V 5 の取り込み効率は、細胞型依存的であるように思われた。これらのデータは、取り込み効率が、正味の正電荷だけではなくアルファボディー上の電荷分布にも関係することを裏付けている。

#### 【 0 3 6 4 】

M B 2 3 \_ h i R - V 5 の細胞取り込みと同様に、カチオン化 M C L - 1 アルファボディーの取り込みプロセスは、高速プロセスである。3 . 5 分後、アルファボディーは、細胞内部に存在した。単一細胞の分析により、アルファボディーが細胞膜内側から離れて細胞内空間に分散または拡散することを示唆する蛍光パターンの変動が実証された。

20

#### 【 0 3 6 5 】

実施例 3 . M C L - 1 を特異的に対象とする C P A B アルファボディーを用いた腫瘍細胞生存率検討

本実施例では、癌細胞株および非癌細胞株の生存率に対する M C L - 1 アルファボディーの影響を説明する。一般に、M C L - 1 と B A K との間の相互作用の阻害は、B A K の遊離、および B A K / B A X ホモ二量体化および / またはヘテロ二量体化によるミトコンドリア外膜孔 (M O M P) の形成、そして最終的には細胞のアポトーシスをもたらす。M C L - 1 を対象とするアルファボディーおよび M C L - 1 結合部位を欠く対照アルファボディーで癌細胞株のパネルを処理し、M T T ( 3 - ( 4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル ) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド ) を使用して細胞生存率をモニタリングした。

30

#### 【 0 3 6 6 】

##### 3 . 1 使用した方法

癌細胞の生存率に対するアルファボディーの影響について、本発明者らは、2つのM C L 1 結合アルファボディー、すなわち、A B 1 \_ h i K R 1 - V 5 (配列番号 : 4 ) および A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 (配列番号 : 6 ) に注目した。図 6 に示されているように、これらのアルファボディーは、B ヘリックス内に M C L - 1 結合部位を含み、異なるカチオン化パターンを示した。アルファボディーを修飾するために L y s および A r g 残基を使用して、それぞれ A B 1 \_ h i K R 1 - V 5 および A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 の正味電荷を + 1 1 および + 1 9 とした。

40

#### 【 0 3 6 7 】

6 種の癌細胞株 (M T 4 、 J u r k a t 、 S W 8 7 2 、 H 1 4 3 7 、 B x P C 3 、 U 8 7 . M G ) を含む 7 種の細胞株において、濃度に応じた細胞生存率を検討した。一次細胞 (P B M C ) において、アルファボディーによる細胞死の誘導も検討した。

#### 【 0 3 6 8 】

##### 3 . 1 . 1 A B 1 \_ h i K R 1 - V 5 および A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 の発現および精製

実施例 2 に記載されているように、カチオン化アルファボディー A B 1 \_ h i K R 1 - V 5 (配列番号 : 4 ) および A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 (配列番号 : 6 ) を発

50

現させて精製した。

【0369】

3.1.2 細胞生存率アッセイ

6種の癌細胞株（U87.MG、BxPC-3、H1437、SW872、MT-4およびJurkat）において、細胞生存率を検討した（表5）。健常ドナーから得られた一次細胞（PBMC）において、生存率に対するアルファボディーの効果も検討した。

【0370】

接着性細胞株（U87.MG、BxPC-3、H1437、SW872）をD MEMまたはRPMI + 10%ウシ胎仔血清（FBS）で培養し、96ウェルプレートに播種し、37および5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベーションした。翌日、ウシ胎仔血清（FBS）を含まないOpti-MEM細胞培養培地で、カチオン化アルファボディー（希釈系列）を播種細胞とともに2時間インキュベーションした。FBSを含まず段階希釈のアルファボディーを含むOpti-MEM細胞培養培地で、懸濁細胞株（MT4およびJurkat）を96ウェルプレートに播種し、37および5%CO<sub>2</sub>で2時間インキュベーションした。健常ドナーからPBMCを単離し、10%FBSおよびIL-2を含むRPMIで培養した。

10

【0371】

2時間後、FBSを含むOpti-MEMを加えてFBSの最終濃度を10%にし、細胞を37および5%CO<sub>2</sub>で48時間インキュベーションした。MTTを使用して、細胞生存率をモニタリングした。MTTは、生細胞によってホルマザンに還元される。ホルマザン結晶の可溶化は、540nmの分光光度測定によって測定することができる着色生成物をもたらす。細胞生存率は、非処理細胞の生存率（=生存率100%）に対する割合として表した。すべての実験は、三組ずつ実施した。データは、標準偏差付きの平均値として示す。

20

【0372】

【表5】

表5：細胞生存率検討に用いられた細胞株

細胞株	説明
U87. MG	ヒト神経膠芽腫細胞
BxPC-3	ヒト肺腺癌細胞
H1437	ヒト非小細胞肺癌細胞
SW872	ヒト脂肪肉腫細胞
MT-4	ヒトT細胞白血病細胞
Jurkat	ヒトT細胞白血病細胞

30

40

【0373】

3.2 結果

3.2.1 血液癌細胞株の細胞生存率に対するMCL-1アルファボディーによる影響

ヒトT細胞白血病細胞株MT4およびJurkatにおいて、細胞生存率に対するカチオン化MCL-1アルファボディーAB1\_hiKR1-V5（配列番号：4）およびAB1\_A2aF\_hiKR3-V5（配列番号：6）の影響を検討した。

【0374】

カチオン化アルファボディーAB1\_A2aF\_hiKR3-V5は、MT4細胞の用量依存的な細胞死を誘導し、10μMのアルファボディーでは、細胞生存がほぼ完全に無

50

効化された。A B 1 \_ h i K R 1 - V 5 アルファボディーの作用が弱かった。対照アルファボディーK L P V M - s c A B 0 1 3 - V 5 およびM B 2 3 \_ h i R - V 5 は、細胞生存率に影響を与えることなく、すなわち、100%の細胞が最高濃度でも生存可能であった（図9）。J u r k a t 細胞では、両方のM C L - 1 アルファボディーの作用がやや弱かった。最高濃度のアルファボディーによる処理は、それぞれA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 およびA B 1 \_ h i K R 1 - V 5 について、60%および40%の細胞死をもたらした（図10）。生存率データは、M T 4 およびJ u r k a t 細胞でのA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 の細胞内取り込み効率と一致した。このアルファボディーは、M T 4 細胞では、J u r k a t 細胞と比較して顕著な細胞内取り込みを示した（データは示さず）。

【0375】

### 3.2.2 種々の癌細胞株の細胞生存率に対するM C L - 1 アルファボディーによる影響

(i) ヒト脂肪肉腫細胞 (S W 8 7 2)

アルファボディーA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5（配列番号：4）およびA B 1 \_ h i K R 1 - V 5（配列番号：6）は、ヒト脂肪肉腫細胞において低い割合ではあるが、用量依存的な細胞死を誘導した（データは示さず）。試験した最高濃度のアルファボディーでは、A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5（配列番号：6）およびA B 1 \_ h i K R 1（配列番号：4）について、それぞれ40%および30%の細胞死が測定された。対照アルファボディーM B 2 3 \_ h i R - V 5 は、10 μMで10%の細胞死を誘導した。A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 および対照アルファボディーM B 2 3 \_ h i R - V 5 の両方が、S W 8 7 2 細胞によって取り込まれた（データは示さず、および図4）。

【0376】

(i i) ヒト非小細胞肺癌細胞 (H 1 4 3 7)

アルファボディーA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 は、非小細胞肺癌細胞 (H 1 4 3 7)において用量依存的な細胞死を誘導した（データは示さず）。試験した最高濃度のアルファボディー(10 μM)は、50%の細胞死を誘導した。対照アルファボディー(M B 2 3 \_ h i R - V 5)およびA B 1 \_ h i K R 1 - V 5 は、10 μMで15%の細胞死を誘導した。A B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 は、H 1 4 3 7 細胞では、対照M B 2 3 \_ h i R - V 5 と比較して非効率的に取り込まれた（図4）。

【0377】

(i i i) ヒト肺臓癌細胞 (B × P C - 3)

アルファボディーA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 は、ヒト肺臓癌細胞 (B × P C - 3)において用量依存的な細胞死を誘導した（データは示さず）。試験した最高濃度のアルファボディー(10 μM)は、60%の細胞死を誘導した。10 μMの対照アルファボディー(K L P V M - s c A B 0 1 3 - V 5)およびA B 1 \_ h i K R 1 - V 5 は、それぞれ30%および35%の細胞死を誘導した。アルファボディーA 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 は、B × P C - 3 細胞に取り込まれた（データは示さず）。

【0378】

(i v) ヒト神経膠芽腫細胞 (U 8 7 . M G)

アルファボディーA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5（配列番号：6）およびA B 1 \_ h i K R 1 - V 5（配列番号：4）は、ヒト神経膠芽腫細胞 (U 8 7 . M G)において用量依存的な細胞死を誘導した（データは示さず）。試験した最高濃度の両アルファボディー(10 μM)は、35%の細胞死を誘導した。対照アルファボディーK L P V M - s c A B 0 1 3 - V 5 は、細胞生存率にほとんど影響を与えたなかった。アルファボディーA 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 は、U 8 7 . M G 細胞において効率的に取り込まれた（図7）。

【0379】

### 3.2.3 非癌細胞株の細胞生存率に対するM C L - 1 アルファボディーによる効果

(i) P B M C

アルファボディーA B 1 \_ A 2 a F \_ h i K R 3 - V 5 は、10 μMでP B M C の35%

10

20

30

40

50

%の細胞死を誘導した(図11)。試験した他のアルファボディーは、PBM Cにおいて細胞死を誘導しなかった。

### 【0380】

#### 3.3 結論

MCL-1結合アルファボディーによる細胞死の誘導は、細胞型依存的であるように思われ、その効果は、血液癌細胞株MT4において最も顕著であった。その細胞株については、 $10\mu M$ のAB1\_A2aF\_hiKR3-V5が、48時間後に完全な細胞死を誘導した。アルファボディーAB1\_A2aF\_hiKR3-V5(配列番号:6)は、他のMCL-1アルファボディーAB1\_hiKR1-V5(配列番号:4)と比較して細胞生存率に大きな影響を与えた。

10

### 【0381】

MT4およびJurkat細胞は、両方ともT細胞性白血病細胞であるが、これらの細胞に対するMCL-1アルファボディーの挙動は異なっていた：アルファボディーは、MT4細胞では、Jurkat細胞と比較して作用が強かった。これらのデータは、これらの癌細胞株の生存機構が異なることを示唆している。

### 【0382】

AB1\_A2aF\_hiKR3-V5の細胞死誘導効果に対する異なる細胞株の感受性を比較すると、MCL-1アルファボディー感受性について以下の順序：MT4 > Jurkat = BxPC-3 > H1437 = SW872 > U87 MGを確立することができ、MT4細胞が最も感受性である。

20

### 【0383】

取り込み効率は、細胞死誘導と相關していない。種々の細胞株において非常に効率的に取り込まれた対照アルファボディーMB23\_hiR-V5(配列番号:2)は、細胞死を誘導しなかったが、このことは、内部に取り入れられたアルファボディーが細胞に対して毒性ではないことを示唆している。一方、AB1\_A2aF\_hiKR3-V5はU87 MG細胞において効率的に取り込まれたが、これは、最良の細胞殺傷活性をもたらさなかった。

### 【0384】

実施例4.BCL-2ファミリーのタンパク質の種々のメンバーを特異的に対象とするCPABアルファボディーAB1\_pan\_hiKR3-V5

30

本実施例では、タンパク質の配列が図12に詳述されているアルファボディーAB1\_pan\_hiKR3-V5(配列番号:10)の設計および結合特性を説明する。カチオニ化による(すなわち、Arg/Lysアミノ酸残基を用いた修飾による)細胞内取り込みのために、および3種の細胞内標的タンパク質(すなわち、MCL-1、BCL-XLおよびBCL-2a)に特異的に結合するようにこのアルファボディーを設計した。

### 【0385】

#### 4.1 使用した方法

##### 4.1.1 組換え細胞内の標的タンパク質の製造および精製

タンパク質のN末端にGSTタグを有するグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として、組換えヒトBCL-2ファミリータンパク質をE.coliで製造した。すべてのタンパク質について、C末端のTm(膜貫通)領域を除去した。以下の組換えタンパク質を製造した：C末端の24アミノ酸を欠失したBCL-XL、C末端の32アミノ酸を欠失したBCL-2(BCL-2a)のアイソフォーム。MCL-1を製造するために、N末端PEST領域(タンパク質の迅速な分解のためのシグナルを含む領域)およびC末端Tm領域を欠失しており、組換えMCL-1は、ヒトMCL-1の残基172~327に対応した。GST-タグを使用して、すべてのタンパク質を精製した。

40

### 【0386】

#### 4.1.2 ELISAアッセイ

炭酸緩衝液pH9.6中で、 $100\mu l$ の抗V5抗体( $5\mu g/ml$ )を用いて、Ma

50

~~x i s o r p N u n c~~ プレートを 4 度で一晩コーティングした。翌日、0.05% Tween 20 を含む Tris 緩衝生理食塩水 (TBS-T) でプレートを 3 回洗浄し、0.1% BSA および 0.5% ゼラチンを含む TBS を用いて 37 度で 2 時間プロッキングした。TBS-T でプレートを 5 回洗浄した後、振盪しながら、500 nM の AB1\_pan\_hiKR3-V5 アルファボディーをプレートに室温 (RT) で 2 時間にわたって加えた。TBS-T でプレートを 10 回洗浄し、5 倍希釈のグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) タグ付組換え BCL-2 ファミリータンパク質 (MCL-1, BCL-XL および BCL-2a) を加え、さらに振盪しながら室温 (RT) で 2 時間インキュベーションした。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗 GST 抗体を使用して、GST タグ付組換え BCL-2 ファミリータンパク質の結合を検出した。オルト - フェニレンジアミンと反応させることによってシグナルを生成し、OD が 2 ~ 3 の値に達した際に 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いて反応を停止させた。特定の BCL-2 ファミリー組換えタンパク質への AB1\_pan\_hiKR3-V5 の特異的結合を示すシグナルを 492 nm および 630 nm で読んだ。

10

### 【0387】

#### 4.2 結果

アルファボディー AB1\_pan\_hiKR3-V5 が、用量依存的に、様々な種類の BCL-2 ファミリーメンバーに特異的に結合することができることは、図 13 および 14 から明らかである。実際、AB1\_pan\_hiKR3-V5 は、約 1.9 nM の結合親和性で MCL-1 に特異的に結合する (図 13 および 14A)。図 14A にも示されているように、先の実施例で説明したアルファボディー AB1\_A2aF\_hiKR3-V5 も MCL-1 を対象とし、1.0 nM の結合親和性でこの細胞内タンパク質に特異的に結合する。細胞内タンパク質ではない IL-23 を対象とする対照アルファボディー MB23\_hiR-V5 は、MCL-1 への結合を示さない。

20

### 【0388】

図 13 および図 14 でさらに例証されているように、AB1\_pan\_hiKR3-V5 は、用量依存的に、それぞれ約 4.5 および 18.7 nM の結合親和性で、2 つの他の細胞内タンパク質、すなわち、BCL-XL および BCL-2a に特異的に結合する (図 14B および 14C)。一方、先の実施例で説明した MCL-1 を特異的に対象とする (specifically designed against) アルファボディー AB1\_A2aF\_hiKR3-V5、および IL-23 を対象とする対照アルファボディー MB23\_hiR-V5 の両方は、BCL-XL または BCL-2a のいずれにも特異的結合を示さない (図 14B および 14C)。

30

### 【0389】

これらの結果は、アルファボディー AB1\_pan\_hiKR3-V5 が、3 種の細胞内タンパク質に高い親和性で用量依存的に特異的に結合することを実証している。

### 【0390】

実施例 5. CPAB アルファボディー AB1\_pan\_hiKR3-V5 の細胞内取り込み

40

#### 5.1 使用した方法

ヒト神経膠芽腫細胞 (U87 MG) において、アルファボディー濃度に応じて、アルファボディー AB1\_pan\_hiKR3-V5 (配列番号: 10) の細胞内取り込みを検討した。共焦点顕微鏡によって取り込みを検討し、アルファボディーの C 末端 V5 タグを認識する抗 V5 抗体を使用して細胞内アルファボディーを可視化した。固定および透過処理した細胞で、すべての実験を実施した。非透過化処理細胞を用いた対照実験が含まれた。

### 【0391】

図 12 に示されているように、このアルファボディーは、その B ヘリックス上に存在する結合部位を介して 3 種の細胞内 BCL-2 ファミリータンパク質に結合し、異なるカチオン化パターンを示す。実際、アルファボディーを修飾するために、および正荷電インタ

50

ーナリゼーション領域を設計するために L y s および A r g 残基を使用した。

【 0 3 9 2 】

5 . 1 . 1 カチオン化アルファボディー A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 の発現および精製

E . c o l i 細菌の可溶性画分において、カチオン化アルファボディー A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 (配列番号 : 1 0 ) を発現させた。 N i - N T A クロマトグラフィーによってタンパク質を精製し、続いて脱塩および緩衝液交換の手順を行なった。 2 0 m M クエン酸 pH 3 . 0 中にタンパク質を可溶化した。

【 0 3 9 3 】

5 . 1 . 2 カチオン化アルファボディー A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 の細胞内取り込み

D M E M + 1 0 % ウシ胎仔血清 ( F B S ) で培養し、細胞 1 0 , 0 0 0 個 / チャンバーで L a b T e k チャンバーに播種し、 3 7 および 5 % C O 2 で一晩インキュベーションしたヒト神経膠芽腫細胞 ( U 8 7 . M G ) において、 A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 (配列番号 : 1 0 ) の細胞内取り込みを検討した。翌日、カチオン化アルファボディー ( 希釈系列 ) を播種細胞とともに 3 7 および 5 % C O 2 で 2 時間インキュベーションした。アルファボディーとともにインキュベーションした後、 ( M g および C a ( D P B S ) を含む ) P B S で細胞を 4 回洗浄 ( 5 分間 / 洗浄 ) した。

【 0 3 9 4 】

細胞内アルファボディーを可視化するために、 4 % ホルムアルデヒドを用いて細胞を 4 で 1 0 分間固定し、続いて、 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 を用いて室温 ( R T ) で 1 5 分間透過処理した。グリシン ( 0 . 7 5 g / 1 0 0 m l ) で細胞を 2 回洗浄 ( 1 0 分間 / 洗浄 ) し、ホルムアルデヒドによる架橋を停止させ、続いて D P B S で洗浄 ( 5 分間 / 洗浄 ) した。

【 0 3 9 5 】

プロッキング緩衝液 ( D P B S + 1 % B S A ) を用いて細胞を室温 ( R T ) で 1 0 分間プロッキングし、続いて、アルファボディーの V 5 タグを対象とする一次抗体 ( マウス抗 V 5 A b 、 I n v i t r o g e n , 4 6 - 0 7 0 5 ) をプロッキング緩衝液で 1 / 4 0 0 希釈したものとともに室温 ( R T ) で 1 時間インキュベーションした。プロッキング緩衝液で細胞を 3 回洗浄 ( 5 分間 / 洗浄 ) し、続いて、二次抗体 ( A l e x a 4 8 8 標識ヤギ抗マウス抗体 ( I n v i t r o g e n , A - 1 0 6 8 0 ) ) をプロッキング緩衝液で 1 / 3 0 0 希釈したものおよび D A P I ( 4 ' , 6 - デアミジノ - 2 - フェニルインドール二塩酸塩 ) ( 核染色 ) ( 1 / 1 0 0 ) を室温 ( R T ) で 3 0 分間にわたって加えた。最後に、プロッキング緩衝液で細胞を 3 回洗浄 ( 5 分間 / 洗浄 ) し、 1 5 0 μ l の D P B S を加え、 Z e i s s A x i o v e r t 2 0 0 , L S M 5 1 0 M e t a 共焦点顕微鏡でプレートを読んだ。

【 0 3 9 6 】

5 . 2 結果

5 . 2 . 1 ヒト神経膠芽腫細胞 U 8 7 . M G における A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 の細胞内取り込み

ヒト神経膠芽腫細胞において、濃度系列の A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 ( 配列番号 : 1 0 ) の細胞内取り込みを検討した。アルファボディーを細胞とともに 2 時間インキュベーションした後、抗 V 5 抗体および二次 A l e x a 4 8 8 標識抗体を用いて、細胞内アルファボディーを検出した。

【 0 3 9 7 】

用量反応依存的な取り込みが観察された ( データは示さず ) 。 A B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5 の細胞内取り込みの下限濃度を単一細胞の画像上で定性的に決定したところ、それぞれ 1 5 6 n M に相当した。これらの濃度では、対照シグナル ( アルファボディーを含まない細胞 ) よりも強い蛍光シグナルが依然として見られた。

【 0 3 9 8 】

10

20

30

40

50

### 5.3 結論

(AおよびCヘリックス内に正電荷を有する)カチオン化アルファボディーA B 1 \_ p a n \_ h i K R 3 - V 5(配列番号: 10)は、3種の細胞内タンパク質に高い親和性で特異的に結合し、用量依存的に細胞に透過することができる。

#### 【0399】

#### 実施例6.CPABアルファボディーが細胞質に存在することの実証

本明細書において想定されるCPABポリペプチドが、細胞の細胞質ゾル区画にアクセスすることができることを実証するために、エンドソーム区画またはリソソーム区画由来の小胞に影響を与えることなく、選択的な原形質膜透過処理を可能にする細胞溶解プロトコールを考案した。細胞の細胞質ゾル画分を得るためにこのプロトコールは、ジギトニン(これは、細胞分画での使用について十分に確立されている)を含有する溶解緩衝液の使用に基づいている。各細胞型について、ジギトニン濃度およびインキュベーション時間を最適化して、エンドソーム区画に影響を与えることなく選択的な透過処理を可能にし得る。得られた細胞画分中の細胞質ゾルマーカーおよびエンドソームマーカーの存在を検査することによって、適切な細胞分画を確認し得る。Jurkat細胞の細胞分画のためのこのプロトコールでは、エンドソームを確実にインタクトな状態のままにするために、本発明者らは、非常に保守的なジギトニン処理プロトコール(低いジギトニン濃度、短いジギトニンインキュベーション時間)を使用する。そうすることによって、ジギトニン放出性の細胞質ゾル内容物を含有する細胞質ゾル画分(CF)が得られるが、細胞質ゾル内容物の一部は犠牲になって、ジギトニン耐性の残りの画分(RF)に向かう。

#### 【0400】

ジギトニン細胞溶解プロトコールを以下のように適用した。10%ウシ胎児血清(FBS)を含有するOptimem(Life Technologies)中、37および5%CO<sub>2</sub>で、Jurkat細胞を24ウェルプレートに一晩播種した。Optimem+10%FBS中、最終濃度1μMで、CPABポリペプチド(MB23\_hiR\_no\_tag; MGHHHHHHHHSSGHIEGRHMSIEQIQKEITTIQEVIAAIQKYIYTMTGGSGGSGGMSIQQIQAAIRRIQRARIQRAIRRMTGSGGGSGMSIEEQKQIAAIQEQIVAIYKQIMAMAS、配列番号: 33)を細胞に加えた。37で2時間インキュベーションした後、氷冷Optimemで細胞を2回洗浄し、続いて遠心分離した。特に明記しない限り、このプロトコールにおけるすべての遠心分離ステップは、4、1000gで10分間実施した。細胞外に結合したアルファボディーを除去するために、細胞ペレットをトリプシンとともに37で15分間インキュベーションし、FBSを加えることによってトリプシンを不活性化した後、ヘパリン(100ug/mlヘパリン(Sigma-Aldrich)を含む氷冷PBS+0.1%BSA+5mMグルコース)で細胞ペレットを5分間にわたって室温で2回洗浄した。Optimemによるさらなる洗浄ステップの後、細胞ペレットを30μlのジギトニン細胞溶解緩衝液(15ug/mlジギトニン(Sigma-Aldrich)を含む1%BSA+0.3Mスクロース+0.1MKC1+2.5mMMgCl<sub>2</sub>+1mMEDTA+10mMHEPES、pH7.4)に再可溶化し、続いて氷上で振盪しながら10分間インキュベーションすることによって、細胞溶解を実施した。ジギトニン溶解緩衝液は、細胞内のエンドソームおよび他の膜区画の完全性を維持しながら、原形質膜の軽度かつ選択的な透過処理を可能にする。ジギトニン処理細胞の遠心分離(4、16000gで10分間)後に得られた上清は、ジギトニン処理により放出される細胞質ゾル内容物に対応する(細胞質ゾル画分、CF)。残ったペレットをPBSで2回洗浄し、細胞溶解緩衝液(Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technology)を含有する1% Triton-X100にペレットを再懸濁した後、ジギトニン耐性の残りの画分(RF)が得られる。

#### 【0401】

1μM CPAB MB23\_hiR\_no\_tagとともに2時間インキュベショ

10

20

30

40

50

ンし、細胞外に結合したと考えられるアルファボディーをトリプシン / ヘパリン洗浄によって洗い流した後に、ジギトニン細胞溶解プロトコールを Jurkat 細胞に適用した。得られた細胞の細胞質ゾル画分および残りの画分 (CF および RF) を、既知量のアルファボディーを含有する較正用サンプルと一緒に抗 His 抗体でプロットした。

#### 【0402】

図15は、この実験の結果を示す。Jurkat の CF および RF では、正確な分子量の MB23\_hir\_no\_tag に対応するバンドが見られる。これは、Jurkat 細胞の細胞質ゾル区画には、MB23\_hir\_no\_tag が存在することを明らかに実証している。

#### 【0403】

同じゲル上で泳動した較正用サンプルに基づいて、細胞内 CPA B 濃度を大まかに推定し得る。Jurkat 細胞の 1 p1 の推定細胞質ゾル容量に基づけば、推定細胞内 CPA B 濃度は、2 時間のインキュベーション時間後において 0.1 ~ 3 μM の範囲である。

#### 【0404】

実施した細胞分画法が、CF では細胞質ゾル内容物の部分的な放出をもたらしたが、RF では膜性の細胞器官および構造が見られたことを実証するために、細胞質ゾル (GAPDH および LDH) マーカー、エンドソーム (NAG、Lamp-1、フロチリン-1) マーカーおよび膜 (フロチリン-1) マーカーの存在について、CF および RF を試験した。図16 および 図17 は、NAG、フロチリン-1 および Lamp-1 が RF 画分内にもっぱら存在することを実証している。LDH および GAPDH は CF および RF 画分の両方に見られるが、これは、CF が一部の細胞質ゾル内容物を含有し、いくらかの細胞質ゾル内容物が RF に行ったことを示している。

#### 【0405】

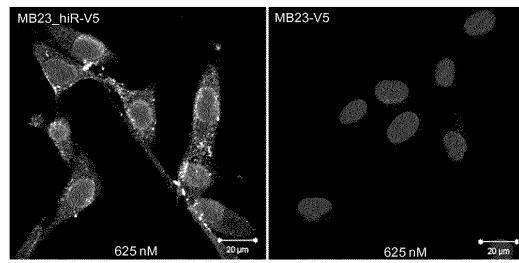
#### 一般的な結論

実施例 1 ~ 6 で得られた結果から明らかであるように、CPA B ポリペプチドおよび CPA B アルファボディーは、低 nM 範囲の濃度で様々な腫瘍細胞株によって急速に取り込まれる。この取り込みは、用量依存的であり、大部分はエネルギー非依存的である（すなわち、直接的な導入による）。抗 MCL1 活性を有する本明細書に開示されるポリペプチドは、癌細胞に効率的に透過し、標的分子 MCL-1 に結合し、有意な生物学的效果、すなわち、アポトーシスの誘導を引き起こす。加えて、AB1\_pan\_hikr3-V5 アルファボディーは、より幅広いパネルの BCL-2 ファミリータンパク質に高い親和性で結合することが示され、さらにはヒト神経膠芽腫 (U87 MG) 細胞で効率的に取り込まれた。これらの結果は、本発明のポリペプチドが、細胞内標的に対処する他の公知のアプローチよりも明らかに優れた利点を示すことを示す。

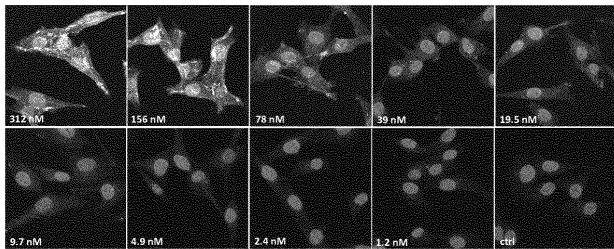
【図1】

MB23_hiR-V5 (SEQ ID NO : 2)	
A ハイクス:	MSIEQIQKEITTIQEIVIAIQLKYIYTMT
ループ1:	GGSGGGSGG
B ハイクス:	MSIQQIQAAIRRIQRAIRRIQRAIRRMT
ループ2:	GSGGGGGSG
C ハイクス:	MSIEEIQKQIAAIQEQIVAIYKQIMAMAS
His-タグ:	HHHHHH
V5-タグ:	<u>GKPIPNNPLLLGLDST</u>

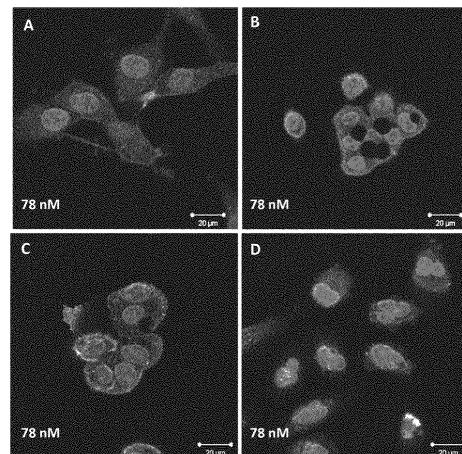
【図3】



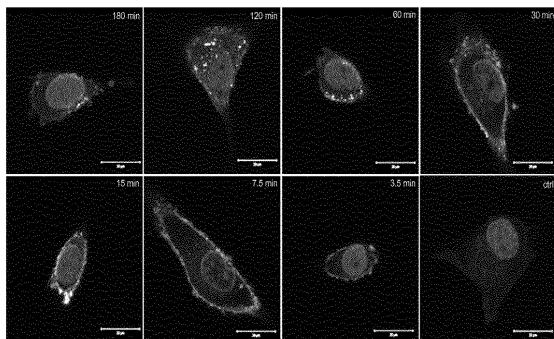
【図2】



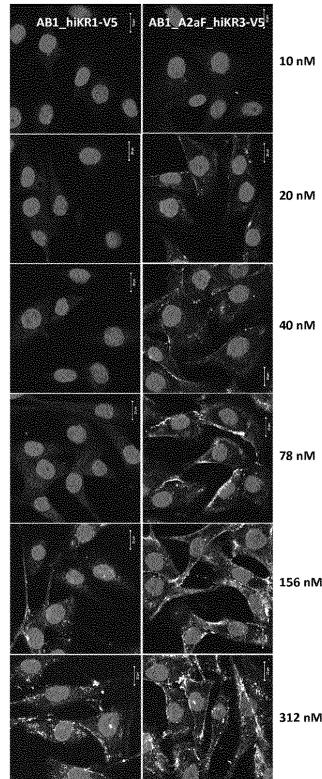
【図4】



【図5】



【図7】



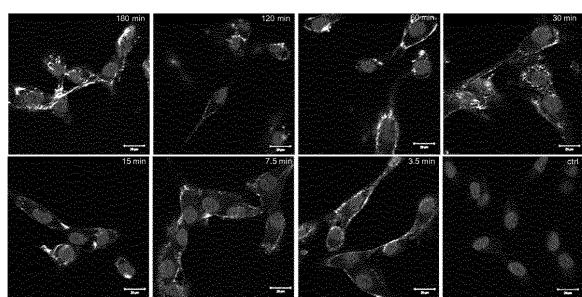
【図6】

AB1_hiKR1-V5 (SEQ ID NO: 4) (正味電荷: +11):	
A ハイクス:	MSIQQIQKQIARIQKQIARIEKQIARMNT
ループ1:	GGSGGGSGGGSGGGSG
B ハイクス:	MSIEEITKQIAAIQLRIVGDQVQIYAMT
ループ2:	GGSGGGSGGGSGGGSG
C ハイクス:	GSIEEIAKSIRAIQKEIAKIGKKIAKMTP
タグ:	HHHHHH-GKPIPNNPLLLGLDST

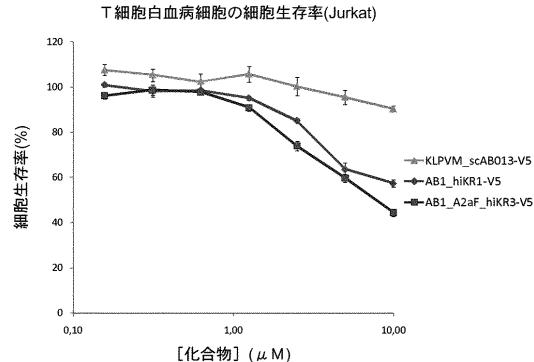
  

AB1_A2aF_hiKR3-V5 (SEQ ID NO: 6) (正味電荷: +19):	
A ハイクス:	MSIQQIQKQFKRICKQIARIEKQIARMNT
ループ1:	GGSGGGSGG
B ハイクス:	MSIEEITKQIAAIQLRIVGDQVQIYAMT
ループ2:	GGSGGGSGGGSGGGSG
C ハイクス:	GSIEEIKKSIRAIQKEIKKIQKKIKKMTP
タグ:	HHHHHHHHHHH-GKPIPNNPLLLGLDST

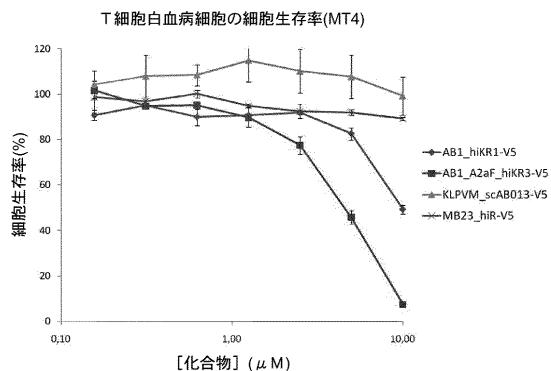
【図8】



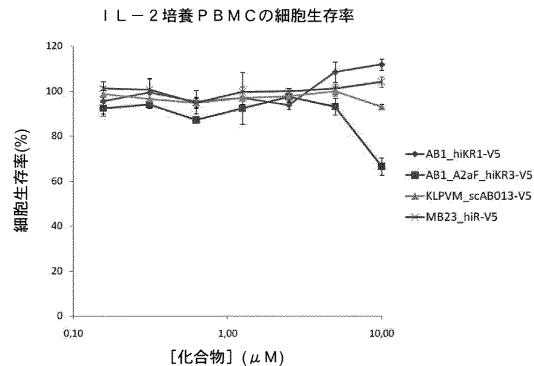
【図10】



【図9】



【図11】

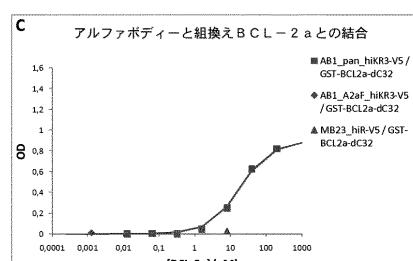
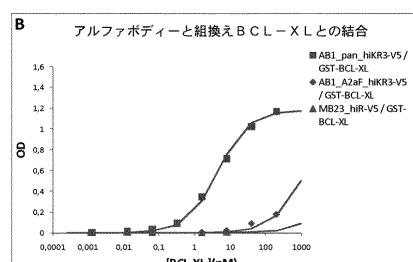
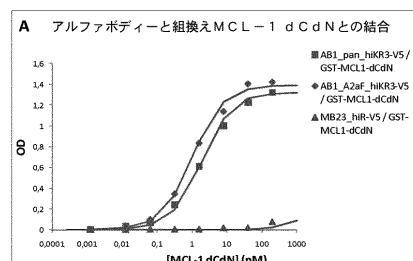


【図12】

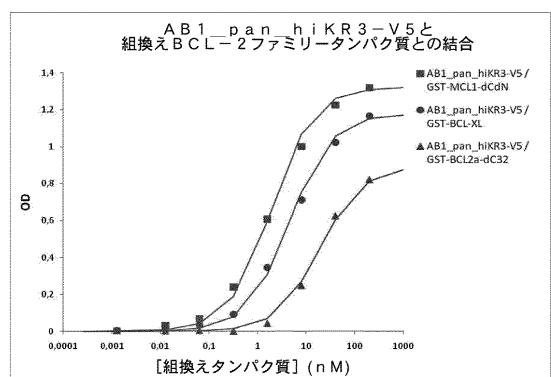
**AB1\_pan\_hiKR3-V5 (SEQ ID NO : 10)**

ペリッカ A: MSIEEIQKQFKRIQKQJIKRIAKQJIKRMT  
ペリッカ B: MSIEEIAAQIAAIQLRIIGD QFNYYMT  
ペリッカ C: GSIEEIKKSIRAIQKEIKKIQQKKKKMTP  
Hisタグ: -HHHHHHHHHH  
V5タグ: -GKPIPNNPLLGLDST

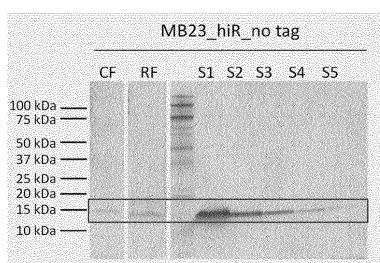
【図14】



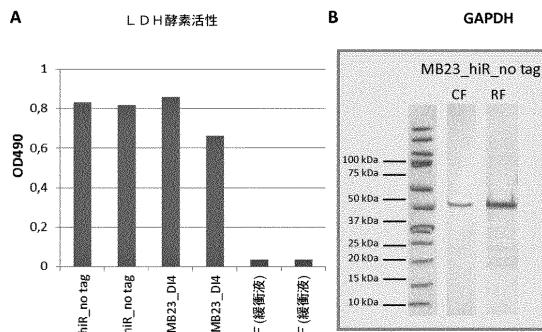
【図13】



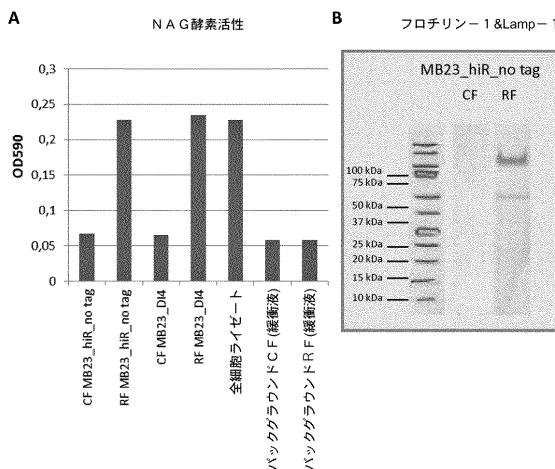
【図 15】



【図 17】



【図 16】



## 【手続補正書】

【提出日】平成26年8月18日(2014.8.18)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

一般式 H R S 1 - L 1 - H R S 2 - L 2 - H R S 3

(式中、 - H R S 1、 H R S 2 および H R S 3 は、それぞれ独立して、2 ~ 7 個の連続するヘプタッド反復単位を含有するヘプタッド反復配列 (H R S) であり、すべてのヘプタッドの a 位および d 位の少なくとも 50 % は、イソロイシン残基によって占められており、各 H R S は、ヘプタッドの a 位または d 位のいずれかに位置する脂肪族アミノ酸残基または芳香族アミノ酸残基で開始および終了しており、H R S 1、H R S 2 および H R S 3 は、ともに三重 - ヘリックスコイルドコイル構造を形成しており；かつ - L 1 および L 2 は、それぞれ独立して、H R S 1 と H R S 2 とを共有結合的に連結し、H R S 2 と H R S 3 とを共有結合的に連結するリンカー断片である)

を有する少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列を含有するポリペプチドがあり、

前記アルファボディー構造配列が、細胞内への前記ポリペプチドのインターナリゼーションを確保する少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域を含有し、前記インターナリゼーション領域が、2 個の正荷電アミノ酸残基間に及んでおり、16 個以下のアミノ酸残基の断片からなり、少なくとも 50 % が前記アルファボディー構造配列内に含まれる少なくとも 6 個の正荷電アミノ酸残基の存在を特徴とし、前記インターナリゼーション領域が、少なくとも 4 個のアルギニン残基または少なくとも 5 個のリジン残基を含有す

る、ポリペプチド。

【請求項 2】

少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域が、前記アルファボディー構造配列内に全体的に含まれる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

少なくとも 1 個の正荷電インターナリゼーション領域が、前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列の 1 個の - ヘリックス内に全体的に含まれる、請求項 1 または 2 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記正荷電インターナリゼーション領域が、6 ~ 12 個のアルギニン残基を含有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

そのアルファボディー配列内に、Z Z X X Z X X Z Z X X Z、Z X X Z X X Z Z X X Z X X Z、Z X X Z Z X X Z X Z Z、Z X X Z X X X Z X X Z Z X X Z X X Z X X Z Z X X Z、Z X X Z Z X X Z X X Z Z、Z Z X X Z X X X Z X X Z Z、Z X X Z X X Z X Z Z X X Z Z (式中、Z は、正荷電アミノ酸を表し、X は、任意のアミノ酸残基を表す) からなる群より選ばれたモチーフを含有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記モチーフにおいて、前記 Z の 75 ~ 100 % がアルギニンである、請求項 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

そのアルファボディー配列内に、配列番号：13 ~ 32 のいずれか 1 個のモチーフを含有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列が、細胞内標的分子に対する少なくとも 1 個の結合部位をさらに含有する、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 9】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記細胞内標的分子が関連する疾患または障害の治療方法に使用するための、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリペプチドおよび任意に、1 個以上の薬学的に許容され得る担体を含有してなる、医薬組成物。

【請求項 12】

イン・ビトロで細胞内タンパク質の生物学的機能を調節するための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

【請求項 13】

アルファボディー構造配列の少なくとも一部に含まれるインターナリゼーション領域を得るように、前記アルファボディー構造配列を含有するポリペプチドを製造するステップを少なくとも含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 14】

目的の細胞内標的分子に対するその特異的結合親和性について、少なくとも 1 個のアルファボディー構造配列を選択するステップをさらに含む、請求項 13 に記載の製造方法。

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP2013/072050
<b>Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)</b>	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:	
a. (means)	<input checked="" type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form
b. (time)	<input type="checkbox"/> in the international application as filed <input checked="" type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input checked="" type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purpose of search
2. <input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2013/072050						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17 ADD.								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 2012/092970 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]; HENDERIKX MAR) 12 July 2012 (2012-07-12) cited in the application the whole document ----- Y WO 2010/129023 A2 (HARVARD COLLEGE [US]; LIU DAVID R [US]; MCNAUGHTON BRIAN R [US]; CRONI) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 23,38 ----- A WO 2010/066740 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]; LOVERIX STEFA) 17 June 2010 (2010-06-17) cited in the application the whole document ----- -/-</td> <td style="padding: 2px;">1-15  1-15  1  -/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 2012/092970 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]; HENDERIKX MAR) 12 July 2012 (2012-07-12) cited in the application the whole document ----- Y WO 2010/129023 A2 (HARVARD COLLEGE [US]; LIU DAVID R [US]; MCNAUGHTON BRIAN R [US]; CRONI) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 23,38 ----- A WO 2010/066740 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]; LOVERIX STEFA) 17 June 2010 (2010-06-17) cited in the application the whole document ----- -/-	1-15  1-15  1  -/-
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
Y	WO 2012/092970 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]; HENDERIKX MAR) 12 July 2012 (2012-07-12) cited in the application the whole document ----- Y WO 2010/129023 A2 (HARVARD COLLEGE [US]; LIU DAVID R [US]; MCNAUGHTON BRIAN R [US]; CRONI) 11 November 2010 (2010-11-11) claims 23,38 ----- A WO 2010/066740 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTERS IGNACE [BE]; LOVERIX STEFA) 17 June 2010 (2010-06-17) cited in the application the whole document ----- -/-	1-15  1-15  1  -/-						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ----- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search  3 February 2014		Date of mailing of the international search report  10/02/2014						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Smalt, Rolf						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/072050

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/113687 A2 (DIATOS S A [FR]; MICHEL MATTHIEU [FR]; RAVEL DENIS [FR]; RIBES FABIEN) 11 October 2007 (2007-10-11) page 8, line 5 - line 27; claim 17 -----	1
A	WO 2012/093013 A1 (COMPLIX NV [BE]; DESMET JOHAN [BE]; LASTER IGNACE [BE]; MEERSSEMAN GE) 12 July 2012 (2012-07-12) cited in the application the whole document -----	1
A	WO 2010/068684 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; WALENSKY LOREN D [US]; STEWART MICHE) 17 June 2010 (2010-06-17) Human hydrocarbon-stapled MCL-1 SAHB peptide #3; sequence 32 -----	1
A	WO 2006/000034 A1 (INST MEDICAL W & E HALL [AU]; BAEILL JONATHAN [AU]; WEI ANDREW HENRY [A] 5 January 2006 (2006-01-05) Linear peptide control L2 -----	1
		1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) [April 2005]

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No PCT/EP2013/072050
---

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012092970	A1	12-07-2012	AU 2011354262 A1 CA 2821579 A1 CN 103328507 A EP 2661446 A1 WO 2012092970 A1	04-07-2013 12-07-2012 25-09-2013 13-11-2013 12-07-2012
WO 2010129023	A2	11-11-2010	EP 2424877 A2 JP 2012525146 A US 2012100569 A1 WO 2010129023 A2	07-03-2012 22-10-2012 26-04-2012 11-11-2010
WO 2010066740	A1	17-06-2010	AU 2009326075 A1 CA 2749558 A1 CN 102245623 A EP 2367840 A1 JP 2012510806 A US 2011294983 A1 WO 2010066740 A1	30-06-2011 17-06-2010 16-11-2011 28-09-2011 17-05-2012 01-12-2011 17-06-2010
WO 2007113687	A2	11-10-2007	AU 2007232206 A1 CA 2658015 A1 EP 1998809 A2 JP 5313867 B2 JP 2009531412 A KR 20080108592 A US 2010015136 A1 US 2013244956 A1 WO 2007113687 A2	11-10-2007 11-10-2007 10-12-2008 09-10-2013 03-09-2009 15-12-2008 21-01-2010 19-09-2013 11-10-2007
WO 2012093013	A1	12-07-2012	US 2013261049 A1 WO 2012093013 A1	03-10-2013 12-07-2012
WO 2010068684	A2	17-06-2010	CA 2746256 A1 EP 2358748 A2 JP 2012511512 A US 2012172285 A1 WO 2010068684 A2	17-06-2010 24-08-2011 24-05-2012 05-07-2012 17-06-2010
WO 2006000034	A1	05-01-2006	AU 2005256155 A1 CA 2578592 A1 EP 1781689 A1 JP 2008504239 A NZ 551934 A US 2007197430 A1 WO 2006000034 A1	05-01-2006 05-01-2006 09-05-2007 14-02-2008 25-09-2009 23-08-2007 05-01-2006

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/00 1 0 1
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/04
A 6 1 P 5/14	(2006.01)	A 6 1 P 37/00
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 5/14
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 15/02	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 15/02
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/02 1 0 1
A 6 1 P 7/08	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/08
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 7/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P 9/04	(2006.01)	A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 3/06	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/06
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P 21/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 21/02
A 6 1 P 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
		A 6 1 P 27/16
		C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG

,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,  
UA,UG,US

(72)発明者 デルー サブリーナ

フランス国 エフ - 5 7 3 3 0 ルシー - ル - ヴィラージュ グラン リュ 2 9

(72)発明者 ソーメルス クラーティエ

ベルギー国 ベー - 3 7 2 1 コルテッセム デネンドレーフ 5

(72)発明者 ラスタルス イニヤス

ベルギー国 ベー - 2 0 1 8 アントウェルペン ポスマансライ 3 8

(72)発明者 デスマット ジョアン

ベルギー国 ベー - 8 5 0 0 コルトレイク ロデ デ ボーニングラーン 1 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 DA03

EA04 GA11 HA01 HA08 HA11

4B064 AG01 CA02 CA19 CE20 DA01 DA13

4C076 AA95 CC01 CC04 CC07 CC09 CC10 CC11 CC13 CC14 CC15

CC16 CC17 CC18 CC21 CC27 CC31 CC41 EE41 EE59

4C084 AA02 AA07 BA17 BA18 NA13 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA33

ZA34 ZA36 ZA42 ZA45 ZA512 ZA52 ZA54 ZA55 ZA59 ZA66

ZA68 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15

ZB26 ZB27 ZB31 ZC06 ZC21 ZC33 ZC35

4H045 AA10 AA30 BA10 BA15 BA16 BA17 BA50 CA40 EA20 EA34

EA50 FA74