

(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2021-530223

(P2021-530223A)

(43) 公表日 令和3年11月11日 (2021.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C 0 8 6
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 147 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2021-500723 (P2021-500723)
 (86) (22) 出願日 令和1年7月9日 (2019.7.9)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年3月5日 (2021.3.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/041067
 (87) 国際公開番号 W02020/014271
 (87) 国際公開日 令和2年1月16日 (2020.1.16)
 (31) 優先権主張番号 62/695,509
 (32) 優先日 平成30年7月9日 (2018.7.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/770,026
 (32) 優先日 平成30年11月20日 (2018.11.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 519271621
 スロゼン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, オ
 イスター ポイント ブールバード 17
 1, スイート 400
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織特異性Wntシグナル増強分子及びその使用

(57) 【要約】

本開示は、組織特異性Wntシグナル増強分子と、これら分子を用いた、肝臓組織においてWntシグナル伝達を増加させる関連の方法とを提供する。

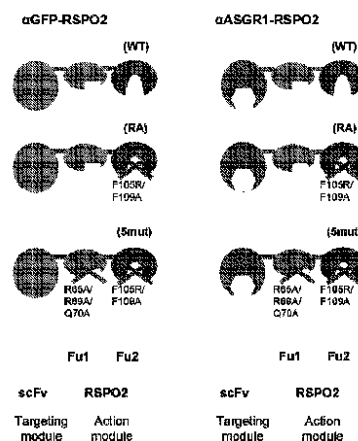


FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織特異性 Wnt（「ウイングレス関連統合部位」又は「ウイングレス及び Int-1」又は「ウイングレス-Int」）シグナル増強分子又はその薬理学的に許容可能な塩であって、亜鉛 RING フィンガー 3（ZNF3）及び RING フィンガー タンパク質 43（RNF43）から選択される 1 又は複数の膜貫通 E3 ユビキチンリガーゼに特異的に結合する第 1 のドメインと、アシアロ糖蛋白受容体 1（ASGR1）及び／又はアシアロ糖蛋白受容体 2（ASGR2）に特異的に結合する第 2 のドメインとを含み、

（a）前記第 1 のドメインは、

（i）表 2 A の抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列；及び／もしくは

（ii）表 2 A の抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、もしくは 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む、前記抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含み、前記バリエーションは、当該 CDR 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む；ならびに／又は、

（b）前記第 2 のドメインは、

（i）表 3 A の抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列；及び／もしくは

（ii）表 3 A の抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、もしくは 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む前記抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含み、前記バリエーションは、当該 CDR 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む、組織特異性 Wnt シグナル増強分子又はその薬理学的に許容可能な塩。

【請求項 2】

当該分子は、肝臓特異性 Wnt シグナル増強分子であり、また前記第 2 のドメインは、

（i）表 3 A の抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列；ならびに／もしくは

（ii）表 3 A の抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む前記抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含み、前記バリエーションは、当該 CDR 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む、請求項 1 記載の分子。

【請求項 3】

前記第 1 のドメインは、

（i）表 2 A の抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列；ならびに／もしくは

（ii）表 2 A の抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む前記抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含み、前記バリエーションは、当該 CDR 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む、請求項 1 記載の分子。

【請求項 4】

前記第 1 のドメインは R-spondin ポリペプチド配列又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含み、前記 R-spondin は、随意に R-spondin-1、R-spondin-2、R-spondin-3 又は R-spondin-4 である、請求項 1 又は 2 に記載の分子。

【請求項 5】

前記第 1 のドメインは R-spondin フューリンドメイン 1 配列、及び随意に野生型又は変異したフューリンドメイン 2 又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含み、

第 1 のポリペプチド配列は随意に、全長 R - s p o n d i n と比較して、高ロイシン反復含有 G - タンパク質結合受容体 4 ~ 6 (L G R 4 ~ 6) との結合が低下している、請求項 4 記載の分子。

【請求項 6】

前記 R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 は、配列番号 1 ~ 4 で表すフューリン 1 ドメインのいずれかに対して少なくとも 90 % の同一性を有する、請求項 4 又は 5 に記載の分子。

【請求項 7】

当該分子は、融合タンパク質であり、前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインは、リンカー部分を介して連結していてもよいポリペプチドである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の分子。

10

【請求項 8】

前記リンカー部分は、ペプチジルリンカー配列である、請求項 7 記載の分子。

【請求項 9】

当該リンカー配列は、グリシン、アスパラギン、セリン、トレオニン及びアラニンからなる群から選択される 1 又は複数のアミノ酸を含む、請求項 8 記載の分子。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の分子の少なくとも前記第 1 のドメイン又は前記第 2 のドメインをコードする、核酸配列。

【請求項 11】

20

前記核酸配列は D N A 又は m R N A である、請求項 10 記載の核酸配列。

【請求項 12】

請求項 11 の核酸配列を含む、ベクター。

【請求項 13】

前記ベクターは、前記核酸配列に作動的に連結したプロモーター配列を含む発現ベクターである、請求項 12 記載のベクター。

【請求項 14】

前記ベクターは、前記核酸配列に作動的に連結したプロモーター配列を含むウイルスである、請求項 13 記載のベクター。

【請求項 15】

30

請求項 14 のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドの産生方法であって、前記融合ポリペプチドが前記発現ベクターによって発現する条件下で請求項 15 に記載の前記宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 17】

産生した前記融合ポリペプチドを単離するステップをさらに含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

a) 有効量の、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の分子、請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の核酸配列、請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載のベクター、又は請求項 15 に記載の宿主細胞と、

40

b) 薬理学的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 19】

前記有効量の、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の前記分子と、有効量の、W n t ポリペプチド、N o r r i n ポリペプチド又は W n t シグナル伝達アゴニスト分子とを含む、請求項 18 記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記有効量の、請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の前記核酸配列と、W n t ポリペプチド、N o r r i n ポリペプチド又は W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコード

50

する有効量の核酸配列とを含み、前記Wntポリペプチド、前記Norrinポリペプチド又は前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列は随意にDNA又はmRNAである、請求項18記載の医薬組成物。

【請求項21】

請求項13から14のいずれかに記載の前記核酸配列、及び／又は前記Wntポリペプチド、前記Norrinポリペプチドもしくは前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列は、改変されたmRNAである、請求項20記載の医薬組成物。

【請求項22】

前記有効量の、請求項12から14のいずれか一項に記載の前記ベクターと、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターとを含み、前記Wntポリペプチド、前記Norrinポリペプチド又は前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列を含む前記ベクターは随意に発現ベクターである、請求項18記載の医薬組成物。

10

【請求項23】

前記Wntポリペプチドは、Wnt1、Wnt2、Wnt2B、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A、Wnt9B、Wnt10A、Wnt10B、Wnt11、ならびにWnt16、ならびに先述のいずれかの機能バリエーション及びフラグメントから選択される哺乳動物Wntポリペプチドである、請求項19から22のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項24】

前記Norrinポリペプチドは、哺乳動物のNorrinポリペプチド又はその機能バリエーションもしくはフラグメントである、請求項19から22のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項25】

前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子は、Lrp5／6と共にFrizzled(Fz)受容体を二量体形成する水溶性Wntシグナル伝達アゴニストである、請求項19から22のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項26】

前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子はポリペプチドを含む、請求項25記載の医薬組成物。

30

【請求項27】

前記ポリペプチドは、1又は複数のFzdタンパク質に対して親和性を有する結合ドメインと、Lrp5／Lrp6タンパク質に対して親和性を有する結合ドメインとを含み、また当該結合ドメインは、直接連結又はリンカーを介して連結していてもよい、請求項26記載の医薬組成物。

【請求項28】

標的組織においてWnt(「ウイングレス関連統合部位」又は「ウイングレス及びInt-1」又は「ウイングレス-Int」)シグナル伝達を増加させる方法であって、前記標的組織を、

40

a) 請求項1から9のいずれか一項に記載の分子、請求項10から11のいずれか一項に記載の核酸、請求項12から14のいずれか一項に記載のベクター、もしくは請求項15に記載の宿主細胞であって、第2のドメインが前記標的組織の細胞特異性表面分子に特異的に結合し、また請求項1から12のいずれか一項に記載の前記分子が前記標的組織に結合して、前記標的組織において亜鉛RINGフィンガー3(ZNRF3)及びRINGフィンガータンパク質43(RNF43)から選択された1もしくは複数の膜貫通E3ユビキチンリガーゼを取り込むかもしくはそのエンドサイトーシスを増加させるものである、当該請求項1から9のいずれか一項に記載の分子、請求項10から11のいずれか一項に記載の核酸、請求項12から14のいずれか一項に記載のベクター、もしくは請求項15に記載の宿主細胞、ならびに／又は

50

b) Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子；Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列；Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクター；もしくはWnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記Wnt ポリペプチド、前記Norrrin ポリペプチドもしくは前記Wnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列は随意にDNA、もしくはmRNA、随意に改変されたmRNAである、当該Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子；Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列；Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクター；もしくはWnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞、と接触させることを含む、方法。

10

【請求項 29】

前記標的組織を請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の分子と接触させることを含む、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

前記標的組織を請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の核酸と接触させることを含む、請求項 28 記載の方法。

20

【請求項 31】

前記標的組織を請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載のベクターと接触させることを含む、請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】

前記標的組織を、前記Wnt ポリペプチド、前記Norrrin ポリペプチド又は前記Wnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列と接触させることを含む、請求項 28 記載の方法。

【請求項 33】

それを必要とする対象において、肝疾患又は肝臓の症状であってWnt (「ウイングレス関連統合部位」又は「ウイングレス及びInt-1」又は「ウイングレス-Int」) シグナル伝達の低下と関連するか又はWnt シグナル伝達の増加が有益となることとなる当該肝疾患又は肝臓障害を治療又は予防する方法であって、前記対象に、有効量の、請求項 18 から 27 のいずれか一項に記載の医薬組成物を提供することを含み、随意に当該分子が請求項 2 に記載の分子である、方法。

30

【請求項 34】

薬理学的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体と、有効量の、

a) Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子；

b) Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列であって、随意にDNAもしくはmRNAである、前記Wnt ポリペプチド、前記Norrrin ポリペプチドもしくは前記Wnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列；

40

c) Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクターであって、随意に発現ベクターである、前記Wnt ポリペプチド、前記Norrrin ポリペプチドもしくは前記Wnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む前記ベクター；又は

d) Wnt ポリペプチド、Norrrin ポリペプチドもしくはWnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞とを含む医薬組成物を前記対象に提供することをさらに含む、請求項 33 記載の方法。

50

【請求項 35】

有効量の請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の分子を含む医薬組成物と、有効量の Wnt ポリペプチド、Norrin ポリペプチド又は Wnt シグナル伝達アゴニスト分子を含む医薬組成物とを、前記対象に提供することを含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

有効量の、請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の核酸配列を含む医薬組成物と、Wnt ポリペプチド、Norrin ポリペプチド又は Wnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列であって、前記核酸配列の一方又は両方が随意に DNA、又は mRNA、随意に改変された mRNA である、有効量の当該核酸配列を含む医薬組成物とを、前記対象に提供することを含む、請求項 34 記載の方法。

10

【請求項 37】

有効量の、請求項 12 から 14 のいずれか一項に記載のベクターを含む医薬組成物と、Wnt ポリペプチド、Norrin ポリペプチド又は Wnt シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクターであって、前記ベクターの一方又は両方が随意に発現ベクター、又は発現ウイルスベクターである、有効量の当該ベクターを含む医薬組成物とを、前記対象に提供することを含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 38】

前記 Wnt ポリペプチドは、Wnt 1、Wnt 2、Wnt 2B、Wnt 3、Wnt 3A、Wnt 4、Wnt 5A、Wnt 5B、Wnt 6、Wnt 7A、Wnt 7B、Wnt 8A、Wnt 8B、Wnt 9A、Wnt 9B、Wnt 10A、Wnt 10B、Wnt 11、ならびに Wnt 16、ならびに先述のいずれかの機能バリエーション及びフラグメントから選択される哺乳動物 Wnt ポリペプチドである、請求項 34 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 39】

前記 Norrin ポリペプチドは、哺乳動物の Norrin ポリペプチド又はその機能バリエーションもしくはフラグメントである、請求項 34 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記 Wnt シグナル伝達アゴニスト分子は、Lrp 5/6 と共に Frizzled (Fzd) 受容体を二量体形成する水溶性 Wnt シグナル伝達アゴニストである、請求項 34 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 41】

前記 Wnt シグナル伝達アゴニスト分子はポリペプチドを含む、請求項 40 記載の方法。

【請求項 42】

前記ポリペプチドは、1 又は複数の Fzd タンパク質に対して親和性を有する結合ドメインと、Lrp 5/Lrp 6 タンパク質に対して親和性を有する結合ドメインとを含み、また当該結合ドメインは、直接連結又はリンカーを介して連結していてもよい、請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

肝疾患又は肝臓の症状は、あらゆる原因の急性肝不全、薬物誘発性の急性肝不全、アルコール性肝疾患、あらゆる原因の慢性肝不全、肝硬変、あらゆる原因の肝線維症、門脈圧亢進、あらゆる原因の慢性肝不全、末期肝疾患 (ESLD)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) (脂肪肝)、アルコール性肝炎、C 型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患 (HCV)、B 型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患 (HBV)、他のウイルス性肝炎 (例えば、A 型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患 (HAV) 及び D 型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患 (HDV))、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、肝臓の (liver y) 外科手術、肝損傷、肝移植、肝臓の外科手術及び移植における「過小グラフト (small for size)」症候群、先天性の肝疾患及び肝障害、その他の、遺伝性疾患、変性、加齢、薬物又は損傷によりもたらされる、肝臓の障害又は

40

50

デテクト (d e t e c t) からなる群から選択される、請求項 33 から 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記医薬組成物は、非経口的に、経口的に、筋肉内に、又は局所的に、肝臓に提供される、請求項 33 から 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記対象は、哺乳動物、随意にヒトである、請求項 33 から 44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

R N F 43 又は Z N R F 3 ポリペプチドに結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、(i) 表 2 A の抗体のいずれかに記載の C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 の配列、ならびに／もしくは(i i) 表 2 A の抗体のいずれかに記載の C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3 の配列、を含む配列を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む前記抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、前記バリエーションは、当該 C D R 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む、当該単離された抗体又はその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 47】

表 2 B もしくは配列番号 78 ～ 150 又は 165 ～ 170 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域を含む、請求項 46 記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

20

【請求項 48】

表 2 B もしくは配列番号 78 ～ 150 又は 165 ～ 170 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域を含む、請求項 47 記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 49】

A S G R 1 又は A S G R 2 ポリペプチドに結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、(i) 表 3 A の抗体のいずれかに記載の C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 の配列、ならびに／もしくは(i i) 表 3 A の抗体のいずれかに記載の C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3 の配列、を含む配列を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む前記抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、前記バリエーションは、当該 C D R 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む、当該単離された抗体又はその抗原結合性フラグメント。

30

【請求項 50】

表 3 B もしくは配列番号 47 ～ 77、151 ～ 154、171 ～ 179 又は 274 ～ 305 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域を含む、請求項 49 記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 51】

表 3 B もしくは配列番号 47 ～ 77、151 ～ 154、171 ～ 179 又は 274 ～ 305 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域を含む、請求項 50 記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

40

【請求項 52】

表 3 C もしくは配列番号 180 ～ 185 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域又は軽鎖可変領域、又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む、抗体。

【請求項 53】

抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、請求項 46 から 52 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントとの結合を競合する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

50

【請求項 5 4】

請求項 4 6 から 5 3 のいずれか一項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 5 5】

肝臓の体重に対する比を増加させる、肝臓再生を促進する、肝細胞の増殖もしくは有糸分裂を増加させる、随意に慢性肝損傷の後で、肝線維症を減少させる、肝細胞機能を増加させる、又は肝臓における凝固時間を減少させるための方法であって、対象に、請求項 5 3 に記載の有効量の医薬組成物を提供することを含み、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントは、A S G R 1 又は A S G R 2 ポリペプチドに結合するものである、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本願は、2018年7月9日出願の米国仮出願第62/695,509号、2018年11月20日出願の米国仮出願第62/770,026号、及び2019年3月22日出願の米国仮出願第62/822,731号の優先権を請求し、そのそれぞれを全体として、本明細書において参照により援用する。

【0 0 0 2】

配列表に関する記載

本願と関連する配列表は、紙の写しの代わりにテキスト形式で提供され、またここで本明細書に参照により援用する。配列表を含有するこのテキストファイルの名称は、S R Z N_010_03WO_ST25.txtである。テキストファイルは661KB、また2019年7月9日に作成されたものであり、そしてE F S - W e b 経由で電子的に提出する。

20

【0 0 0 3】

本開示は、例えば融合タンパク質である、組織特異性W n t シグナル増強分子であって、E 3 ユビキチンリガーゼZ N R F 3 又はR N F 4 3 に結合するドメインと組織特異性細胞表面受容体結合ドメインとを含む当該組織特異性W n t シグナル増強分子に関するのみならず、当該E 3 リガーゼZ N R F 3 / R N F 4 3 の組織特異的なインターナリゼーション又は取り込み（s e q u e s t r a t i o n）を介在し、それによってW n t 受容体を安定化して組織特異的にW n t シグナル伝達を増強するため、ならびに種々の疾患及び障害を治療及び予防するために、当該組織特異性W n t シグナル増強分子を使用する関連の方法に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 4】

W n t（「ウイングレス関連統合部位」又は「ウイングレス及びI n t - 1」又は「ウイングレス-I n t」）リガンド及びそれらのシグナルは、骨、肝臓、皮膚、胃、腸、腎臓、中枢神経系、乳腺、口腔粘膜、味蕾、卵巣、蝸牛及び多数の他の組織を含めた、多数の重要な器官及び組織の発達、ホメオスタシス、ならびに再生の制御において重要な役割を果たす（例えば、C l e v e r s , L o h , a n d N u s s e , 2014; 346: 1248012により概説される）。W n t シグナル伝達経路の調節は、退行性の疾患及び組織損傷を治療する可能性を有する。この目的を達成するために、望まれない影響を回避するように、組織特異的に又は細胞型特異的にW n t シグナル伝達活性を調節するという方策を立てることが望まれる。治療としてW n t シグナル伝達を調節するための課題のひとつとして、多数の組織が複数の重複するF z dを発現する状態で、複数のW n t リガンド及びW n t 受容体F r i z z l e d 1 ~ 10（F z d 1 ~ 10）が存在することがある。古典的W n t シグナルはまた、共受容体として低密度リボタンパク質（L D L）受容体関連タンパク質5（L R P 5）又は低密度リボタンパク質（L D L）受容体関連タンパク質6（L R P 6）に関与し、これらは、F z dに加えて、種々の組織において広く発現する。

40

【0 0 0 5】

50

R-spondin1～4は、Wntシグナルを増幅するリガンドの群である。R-spondinのそれぞれは、亜鉛RINGフィンガー3（ZNRF3）又はRINGフィンガータンパク質43（RNF43）を一端に含有し、かつ、高ロイシン反復含有グタンパク質結合受容体4～6（LGR4～6）を他端に含有する受容体複合体を介して作用する（例えば、Knight and Hankenson 2014, Matrix Biology; 37:157-161により概説される）。R-spondinはまた、さらなる作用機序を介しても作用し得る。ZNRF3及びRNF43は、分解のためにWnt受容体（Fzd1～10及びLRP5又はLRP6）を特異的に標的とする2つの膜結合E3リガーゼである。R-spondinがZNRF3/RNF43及びLGR4～6に結合することにより、Wnt受容体からE3リガーゼを除去してWnt受容体を安定化させる三元複合体のクリアランス又は取り込みが生じ、結果的にWntシグナルの増強をもたらす。各R-spondinは、2つのフーリン（Furin）ドメイン（1及び2）であって、フーリンドメイン1はZNRF3/RNF43に結合し、またフーリンドメイン2はLGR4～6に結合する当該2つのフーリンドメインを含有する。フーリンドメイン1及び2を含有するR-spondinのフラグメントは、Wntシグナル伝達を増幅するのに十分である。R-spondinの影響は、Wntシグナルに依存するが、LGR4～6及びZNRF3/RNF43はどちらも種々の組織において広く発現することから、R-spondinの影響は組織特異的でない。

【0006】

特定の疾患及び障害を治療及び予防する組織特異性Wntシグナル増強分子が、当技術において、明らかに要望されている。本発明は、組織特異的にWnt活性を増強するのに有用な組成物及び方法を提供することによって、この要望に対処する。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、例えば標的組織におけるWntシグナル伝達を増加して、Wntシグナル伝達の増加が有益となることとなる疾患及び症状を治療する際における、組織特異性Wntシグナル増強分子及びその使用に関する。特定の実施形態においては、当該組織は肝臓である。

【0008】

一実施形態においては、本発明は、組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩であって、ZNRF3及びRNF43から選択される1又は複数の膜貫通E3ユビキチンリガーゼに特異的に結合する第1のドメインと、組織特異性細胞表面分子に特異的に結合する第2のドメインとを含み、当該分子が、当該組織におけるWntシグナル伝達を増加させる、当該組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩を提供する。ある実施形態においては、Wntシグナル増強分子は肝臓特異的であり、また第2のドメインは、肝臓特異性細胞表面分子に特異的に結合して肝臓又は肝細胞におけるWntシグナル伝達を増加させる。様々な実施形態においては、第1のドメイン及び第2のドメインのいずれか又は両方が、ポリペプチド、抗体、小分子、天然リガンド、非天然リガンド、又はそのバリエーションである。

【0009】

Wntシグナル増強分子の特定の実施形態においては、第1のドメインは第1のポリペプチド配列を含み、及び／又は、第2のドメインは第2のポリペプチド配列を含む。特定の実施形態においては、当該分子は、第1のポリペプチド配列及び第2のポリペプチド配列を含む融合タンパク質である。ある実施形態においては、第1のポリペプチド配列は、R-spondin配列又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む。特定の実施形態においては、R-spondinは、R-spondin-1、R-spondin-2、R-spondin-3、又はR-spondin-4であり、例えばヒトR-spondin-1～4である。ある実施形態においては、第1のポリペプチド配列は、R-spondinフーリンドメイン1又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む。特定の実施形態においては、第1のポリペプチド配列は、野生型のR-spondin由

10

20

30

40

50

来の配列又は改変配列である。さらに、第1のポリペプチド配列は、対応する天然の全長 R-spondin と比較して、LGR4~6 との結合が増加させるか、同様であるか又は減少させることができた。一部の実施形態においては、R-spondin 又は R-spondin フューリンドメイン1は、配列番号1~4 で表す R-spondin 又は R-spondin フューリンドメインのいずれかに対して少なくとも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%、又は少なくとも95%の同一性を有する。ある実施形態においては、第1のポリペプチドは、ZNR F3 及び/又は RNF43 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントである。特定の実施形態においては、第1のポリペプチドは、a) 表2Aの抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列、ならびに/もしくは b) 表2Aの抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、当該バリエーションは、当該 CDR 配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、第1のポリペプチドは、表2B又は配列番号78~150もしくは165~170に記載のナノボディ、VH又はVLの配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント又はそのフラグメントもしくはバリエーションである。

10

【0010】

ある実施形態においては、第2のポリペプチド配列は、ポリペプチド、抗体もしくはそのフラグメントもしくはバリエーション、又はリガンドもしくはそのフラグメントもしくはバリエーションである。ある実施形態においては、第2のポリペプチドは、ASGR1 及び/又は ASGR2 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントである。特定の実施形態においては、第2のポリペプチドは、a) 表3Aの抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列、ならびに/もしくは b) 表3Aの抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、当該バリエーションは、当該 CDR 配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、第1のポリペプチドは、表3B又は配列番号47~77、151~154、171~179もしくは274~305に記載のナノボディ、VH又はVLの配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント又はそのフラグメントもしくはバリエーションである。

20

30

【0011】

本明細書に開示する組織特異性 Wnt シグナル増強分子のある説明的な実施形態においては、組織が骨組織であり、かつ、細胞表面受容体が副甲状腺ホルモン受容体1 (PTH1R) であるか、組織が肝臓組織であり、かつ、細胞表面受容体がアシアロ糖蛋白受容体1 (ASGR1)、アシアロ糖蛋白受容体2 (ASGR2)、トランスフェリン受容体2 (TFR2) もしくは溶質輸送体ファミリー10メンバー1 (SLC10A1) であるか、又は、組織が口腔粘膜組織であり、かつ、細胞表面受容体がLY6/PLAURドメイン含有3 (LYPD3) もしくはデスモグレイン3 (DSG3) である。特定の実施形態においては、第2のポリペプチドは、表3C又は配列番号180~186に記載のナノボディ、VH又はVLの配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント又はそのフラグメントもしくはバリエーションである。

40

【0012】

本明細書に開示する組織特異性 Wnt シグナル増強分子のある説明的な実施形態においては、細胞表面分子がPTH1であり、かつ、第2のポリペプチド配列がPTH1Rに特異的に結合するか、細胞表面分子がASGR1であり、かつ、第2のポリペプチド配列がASGR1に特異的に結合するか、細胞表面分子がASGR2であり、かつ、第2のポリペプチド配列がASGR2に特異的に結合するか、細胞表面分子がSLC10A1であり、かつ、第2のポリペプチド配列がSLC10A1に特異的に結合するか、細胞表面分子がTFR2であり、かつ、第2のポリペプチド配列がTFR2に特異的に結合するか、細

50

胞表面分子が L Y P D 3 であり、かつ、第 2 のポリペプチド配列が L Y P D 3 に特異的に結合するか、又は、細胞表面分子が D S G 3 であり、かつ、第 2 のポリペプチド配列が D S G 3 に特異的に結合するものであり、第 2 のポリペプチドは、細胞表面分子の、抗体もしくはそのフラグメント、小分子、又はリガンドもしくはそのフラグメントもしくはバリアントである。

【0013】

本明細書に記載する組織特異性 W n t シグナル増強分子の特定の実施形態においては、第 1 のドメイン及び第 2 のドメインが、リンカー部分によって連結する。ある実施形態においては、リンカー部分は、ペプチジルリンカー配列である。特定の実施形態においては、ペプチジルリンカー配列は、グリシン、アスパラギン、セリン、トレオニン及びアラニンからなる群から選択される 1 又は複数のアミノ酸を含む。

10

【0014】

特定の実施形態においては、本明細書に記載する組織特異性 W n t シグナル増強分子は、単一のポリペプチド、例えば第 1 のドメイン及び第 2 のドメインを含む融合タンパク質、からなる。ある実施形態においては、本明細書に記載する組織特異性 W n t シグナル増強分子は、第 1 のドメイン及び第 2 のドメインをそれぞれが含む、2 以上の融合タンパク質を含む二量体又は多量体等の 2 以上のポリペプチドを含むものであり、当該 2 以上のポリペプチドは、例えばリンカー部分を介して、又は 2 以上のポリペプチドのそれぞれにおけるアミノ酸残基間の結合、例えばシステイン残基間の分子間ジスルフィド結合を介して、連結する。特定の実施形態においては、本明細書に記載の組織特異性 W n t シグナル増強分子は、2 以上のポリペプチド配列を含む。例えば、組織特異性 W n t シグナル増強分子は、第 1 のドメイン又は第 2 のドメインのいずれかを構成する抗体の重鎖及び軽鎖（又はその抗原結合性フラグメント）を含み得、当該他方のドメイン（すなわち、第 2 のドメイン又は第 1 のドメイン）は、融合タンパク質として又はリンカー部分を介してのいずれかで、抗体の重鎖又は軽鎖に連結する。特定の実施形態においては、当該他方のドメインは、重鎖の N 末端、重鎖の C 末端、軽鎖の N 末端、又は軽鎖の C 末端に連結する。こうした構造は、付加した I g G 足場又はフォーマットとして本明細書において言及し得る。

20

【0015】

関連する実施形態においては、本発明は、本明細書に開示する組織特異性 W n t シグナル増強融合タンパク質をコードする核酸配列又はそのサブユニット、例えば付加した又は融合した第 1 のドメイン又は第 2 のドメインを有する抗体の重鎖又は軽鎖、を含む。さらなる関連の実施形態においては、本発明は、核酸配列を含むベクターを含む。一部の実施形態においては、ベクターは、例えば細菌細胞又は真核細胞での発現に好適な様式で、核酸配列に作動的に連結したプロモーター配列を含む発現ベクターである。別の実施形態においては、ベクターは、機能的 m R N A のインビトロでの翻訳及び改変のために操作される。さらなる関連の実施形態においては、本発明は、ベクターを含む宿主細胞を含む。また別のさらなる関連の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載する組織特異性 W n t シグナル増強融合タンパク質を産生する方法であって、融合ポリペプチドが発現ベクターによって発現する条件下で宿主細胞を培養することを含む、当該方法を含む。一部の実施形態においては、当該方法は、産生された融合ポリペプチドを単離するステップをさらに含む。

30

40

【0016】

別の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載する組織特異性 W n t シグナル増強分子又はその薬理学的に許容可能な塩と、薬理学的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0017】

別の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載する組織特異性 W n t シグナル増強分子又はその薬理学的に許容可能な塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、薬理学的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、核酸配列は、D N A、又は m R N A、随意に改変 m R N A を

50

含む。

【0018】

別の実施形態においては、本発明は、組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩をコードする核酸配列を含むベクターと、薬理的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、ベクターは、組織特異性Wntシグナル増強分子の発現を駆動する、核酸配列に作動的に連結したプロモーターを含む。ある実施形態においては、ベクターは、発現ベクター又はウイルスベクターである。

【0019】

別の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩と；Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト又はその薬理的に許容可能な塩と；薬理的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0020】

別の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと；Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト又はその薬理的に許容可能な塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと；薬理的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、核酸配列は、DNA、又はmRNA、随意に改変mRNAを含む。

【0021】

別の実施形態においては、本発明は、組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩をコードする核酸配列を含むベクターと；Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト又はその薬理的に許容可能な塩をコードする核酸配列を含むベクターと；薬理的に許容可能な希釈剤、アジュバント又は担体とを含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、ベクターは、組織特異性Wntシグナル増強分子の発現を駆動する、核酸配列に作動的に連結したプロモーターを含む。ある実施形態においては、ベクターは、発現ベクター又はウイルスベクターである。

【0022】

さらなる実施形態においては、本発明は、標的組織におけるWntシグナル伝達を増加させる方法であって、当該標的組織を本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子と接触させることを含み、第2のドメインが当該標的組織上の細胞特異性表面分子に特異的に結合し、また組織特異性Wntシグナル増強分子が当該標的組織に結合して、そして当該標的組織においてZNF3及びRNF43から選択される1又は複数の膜貫通E3ユビキチンリガーゼを取り込む(sequester)又はそのエンドサイトーシスを増加する、当該方法を含む。

【0023】

本明細書に記載の方法のいずれかのある実施形態においては、組織が骨組織であり、かつ、細胞表面分子がPTH1Rであるか、組織が肝臓組織であり、かつ、細胞表面分子がASGR1、ASGR2、TFR2もしくはSLC10A1であるか、又は組織が口腔粘膜組織であり、かつ、細胞表面受容体がLYPD3もしくはDSG3である。特定の実施形態においては、標的の組織又は細胞を、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、又は組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクター、例えば発現ベクター又はウイルスベクター、と接触させる。

【0024】

さらなる実施形態においては、本発明は、標的組織におけるWntシグナル伝達を増加させる方法であって、当該標的組織を、本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子であって、第2のドメインが当該標的組織上の細胞特異性表面分子に特異的に結合

し、また組織特異性Wntシグナル増強分子が当該標的組織に結合して、そして当該標的組織においてZNF3及びRNF43から選択される1もしくは複数の膜貫通E3ユビキチンリガーゼを取り込む(sequester)もしくはそのエンドサイトーシスを増加する、当該組織特異性Wntシグナル増強分子、及びWntポリペプチド、Norrinポリペプチド、又はWntシグナル伝達アゴニスト、又はその薬理学的に許容可能な塩、と接触させることを含む、当該方法を含む。特定の実施形態においては、標的の組織又は細胞を、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸とを含むポリヌクレオチドと接触させる。他の実施形態においては、標的の組織又は細胞を、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクターと、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードするベクターと接触させる。

10

【0025】

さらに別の関連の実施形態においては、本発明は、それを必要とする対象において疾患又は症状を治療又は予防する方法であって、当該疾患又は症状がWntシグナル伝達の低下と関連する又はWntシグナル伝達の増加が有益であることとなるものであり、当該対象に、組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理学的に許容可能な塩を含む有効量の医薬組成物を、単独で又はWnt、Norrin、もしくはWnt活性化／模倣分子と組み合わせて提供することを含む、当該方法を含む。特定の実施形態においては、当該方法は、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド(例えば、DNA又はmRNA)、又は組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクター(例えば、発現ベクター又はウイルスベクター)を含む医薬組成物を、単独で用いて、又はWntポリペプチド、NorrinポリペプチドもしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド(例えば、DNA又はmRNA)もしくはWntポリペプチド、NorrinポリペプチドもしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクター(例えば、発現ベクター又はウイルスベクター)を含む医薬組成物と組み合わせて用いて実施する。

20

【0026】

本明細書に記載する治療方法のいずれかの特定の実施形態においては、疾患又は障害は、あらゆる原因の急性肝不全、薬物誘発性の急性肝不全、アルコール性肝疾患、あらゆる原因の慢性肝不全、肝硬変、あらゆる原因の肝線維症、門脈圧亢進、あらゆる原因の慢性肝不全、末期肝疾患(ESLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)(脂肪肝)、アルコール性肝炎、C型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患(HCV)、B型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患(HBV)、他のウイルス性肝炎(例えば、A型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患(HAV)及びD型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患(HDV))、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、肝臓の(liver)外科手術、肝損傷、肝移植、肝臓の外科手術及び移植における「過小グラフト(small for size)」症候群、先天性の肝疾患及び肝障害、その他の、遺伝性疾患、変性、加齢、薬物又は損傷によりもたらされる、肝臓の障害又はデテクト(detect)からなる群から選択される組織の肝臓の疾患又は障害である。本明細書に記載する治療又は予防方法のいずれかの特定の実施形態においては、医薬組成物は、全身的に、非経口的に、経口的に、筋肉内に、局所的に、又は局所的に、提供される。特定の実施形態においては、対象は、哺乳動物、随意にヒトである。

30

40

【0027】

別の実施形態においては、本開示は、RNF43又はZNF3ポリペプチドに結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、(i)表2Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列、ならびに／もしくは(ii)表2Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む、当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、当該バリエーション

50

は、当該 C D R 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む。ある実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表 2 B もしくは配列番号 7 8 ～ 1 5 0 もしくは 1 6 5 ～ 1 7 0 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は表 2 B もしくは配列番号 7 8 ～ 1 5 0 もしくは 1 6 5 ～ 1 7 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表 2 B もしくは配列番号 7 8 ～ 1 5 0 もしくは 1 6 5 ～ 1 7 0 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は表 2 B もしくは配列番号 7 8 ～ 1 5 0 もしくは 1 6 5 ～ 1 7 0 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0028】

別の実施形態においては、本開示は、A S G R 1 又は A S G R 2 ポリペプチドに結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、(i) 表 3 A の抗体のいずれかに記載の C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 の配列、ならびに／もしくは (i i) 表 3 A の抗体のいずれかに記載の C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3 の配列を含む、当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを提供するものであり、当該バリエーションは、当該 C D R 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む。ある実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表 3 B もしくは配列番号 4 7 ～ 7 7、1 5 1 ～ 1 5 4、1 7 1 ～ 1 7 9 もしくは 2 7 4 ～ 3 0 5 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は表 3 B もしくは配列番号 4 7 ～ 7 7、1 5 1 ～ 1 5 4、1 7 1 ～ 1 7 9 もしくは 2 7 4 ～ 3 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表 3 B もしくは配列番号 4 7 ～ 7 7、1 5 1 ～ 1 5 4、1 7 1 ～ 1 7 9 もしくは 2 7 4 ～ 3 0 5 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は表 3 B もしくは配列番号 4 7 ～ 7 7、1 5 1 ～ 1 5 4、1 7 1 ～ 1 7 9 もしくは 2 7 4 ～ 3 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0029】

特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表 3 C もしくは配列番号 1 8 0 ～ 1 8 5 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域又は軽鎖可変領域、又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む。

【0030】

本開示はまた、本明細書に開示する抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかとの結合を競合する抗体及びその抗原結合性フラグメントも提供する。

【0031】

関連の実施形態においては、本開示は、本明細書に開示する抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかを含む医薬組成物を提供する。

【0032】

さらなる実施形態においては、本開示は、肝臓の体重に対する比を増加させる、肝臓再生を促進する、肝細胞の増殖もしくは有糸分裂を増加させる、随意に慢性肝損傷の後で、肝線維症を減少させる、肝細胞機能を増加させる、又は肝臓における凝固時間を減少させるための方法であって、それを必要とする対象に、A S G R 1 又は A S G R 2 ポリペプチドに結合する本明細書に開示する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む有効量の医薬組成物を提供することを含む、当該方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

この特許又は出願書類は、色付きで作成された少なくとも 1 つの図面を含有する。色付きの図面を伴ったこの特許又は特許出願の公開公報の写しは、申請及び必要な料金の支払いをすると特許庁により提供されることとなる。

10

20

30

40

50

【0034】

本開示の特徴は、特に、添付の特許請求の範囲に記載されている。当該特徴のよりよい理解と本発明の利点は、本発明の原理を利用する、説明的な実施形態を記載する以下の発明の詳細な説明と、添付の図面とを参照することにより得られることとなる。

【0035】

【図1A】図1Aから1Dは、組織特異性Wntシグナル伝達エンハンサー分子の設計である。(図1A)4つのヒトR-spondinタンパク質全てのアラインメント(Rspo1(配列番号1)、Rspo2(配列番号2)、Rspo3(配列番号3)及びRspo4(配列番号4)、フーリンドメイン1(Fu1)及び2(Fu2)は、それぞれ明るい影と暗い影をつけた。Fu1ドメインは、概して、配列番号1のアミノ酸残基38～94辺り、配列番号2のアミノ酸残基37～93辺り、配列番号3のアミノ酸残基39～95辺り、及び配列番号4のアミノ酸残基32～88に対応する。Fu2ドメインは、概して、配列番号1のアミノ酸残基97～144辺り、配列番号2のアミノ酸残基96～143辺り、配列番号3のアミノ酸残基98～144辺り、及び配列番号4のアミノ酸残基91～137に対応する。(図1B)説明的な設計された分子の図。Fu1ドメイン及びFu2ドメイン(作用モジュール)にわたるRSP02のフラグメントを、scFv抗体(ターゲティングモジュール)のC末端に融合させ、配列番号5～16に記載のポリヌクレオチド及びポリペプチドの配列に相当する図1Bに示すコンストラクトを生成した。Fu1ドメイン及びFu2ドメインにおける特異的変異を示す。(図1C)図示される融合タンパク質の抗GFP系列及び抗ASGR1系列に結合するLGR5のバイオレイヤー干渉法解析。111nMのRSP02由来融合タンパク質での結合アッセイのステップ全体を、上図に示している。会合段階及び解離段階から構成される結合反応を、挿入したボックス内に別個に示している。7つの異なる濃度よりの会合段階の140～145秒の間における平均反応を、定常状態解析で解析して、 K_D 値を求めた(下図)。(図1D)図示される、RNF43及びZNF3への図示したコンストラクト(配列番号43～46)の結合の解析。

【図1B】同上。

【図1C-1】同上。

【図1C-2】同上。

【図1D-1】同上。

【図1D-2】同上。

【図1D-3】同上。

【図1D-4】同上。

【図2A】図2Aから2Cは、肝細胞特異性Wntシグナル伝達エンハンサー分子のインビトロ活性である。(図2A)HEK293細胞、HuH-7細胞及びA431細胞におけるASGR1及びASGR2(上)ならびにTFRC(下)の遺伝子発現レベルの半定量PCR解析(遺伝子毎に左から右に向かって示されている)。信号は、ACTBで正規化した。(図2B)外因性Wnt源(30% Wnt3a馴化培地)の存在下(左グラフ)又は不在下(右グラフ)での、HEK293(上方グラフ)又はHuH-7(下方グラフ)における特定のタンパク質(配列番号5～16)のSuperTOP Flash(STF)レポーター活性。(図2C)HuH-7細胞におけるLRP6受容体及びリン酸化DVL2におけるウェスタンブロット解析。星印は、使用した抗体によってHuH-7において検出された非特異的結合を示す。矢印で示した下方のバンドは、リン酸化を伴う又は伴わないDVL2に相当する。ローディングコントロールとして、チューブリン(TUB)を用いる。

【図2B】同上。

【図2C】同上。

【図3A】図3Aから3Cは、標的受容体に対する特異性Wntシグナルエンハンサー活性の依存性である。(図3A)外因性Wnt源(30% Wnt3a馴化培地)の存在下(左)又は不在下(右)のいずれかで、TFRC(対照としてのトランスフェリン受容体

T F R 1 をコードする。上)、A S G R 1 (中)、及び A S G R 2 を伴う A S G R 1 (下)により一過性導入した H E K 2 9 3 細胞における S T F 活性。(図 3 B) 特定された発現に対する、T F R C 又は A S G R 1 による A 4 3 1 細胞における S T F 活性。(図 3 C) F z d タンパク質の細胞表面レベルのフローサイトメトリー解析。H E K 2 9 3 細胞を、Z N R F 3 単独(上)又は A S G R 1 及び Z N R F 3 (下)のいずれかで一過性導入して、1 0 n M で特定した融合タンパク質により処理して、次いで p a n - F z d 抗体 1 8 R 5 で染色した。

【図 3 B】同上。

【図 3 C】同上。

【図 4 A】図 4 A から 4 E は、異なる受容体 T F R 1 を標的とする別の分子による機序の検証である。(図 4 A) バイオレイヤー干渉法解析による、抗 T F R 1 系列の融合コンストラクト(配列番号 1 7 ~ 2 2)の L G R 5 結合。1 1 1 n M の R S P O 2 由来融合タンパク質での結合アッセイのステップ全体を、上図に示している。会合段階及び解離段階からなる結合反応を、挿入したボックス内に別個に示している。7 つの異なる濃度よりの会合段階の 1 4 0 ~ 1 4 5 秒の間における平均反応を、定常状態解析で解析して、 K_D 値を求めた(下図)。(図 4 B) 左から右に向けて下方グラフに示した α T F R - R S P O 2、 α T F R - R S P O 2 - R A 及び α T F R - R P O S - 5 m u t に関する定常状態フィッティング解析による、R N F 4 3 (左) 及び Z N R F 3 (右) への抗 T F R 1 系列の融合コンストラクトの結合の解析。(図 4 C) 外因性 W n t 源(30% W n t 3 a 馴化培地)の存在下(左)又は不在下(右)での、H E K 2 9 3 (上)又は H u h - 7 (下)の特定されたタンパク質の S T F 活性。(図 4 D) H E K 2 9 3 細胞における L R P 6 受容体及びリン酸化 D V L 2 におけるウェスタンブロット解析。ローディングコントロールとして、チューブリン(T U B)を用いる。(図 4 E) 融合タンパク質又は対照での処理後の F z d タンパク質の細胞表面レベルのフローサイトメトリー解析。H E K 2 9 3 細胞を、Z N R F 3 で一過性導入して、1 0 n M で特定した融合タンパク質により処理して、次いで p a n - F z d 抗体 1 8 R 5 で染色した。

【図 4 B】同上。

【図 4 C】同上。

【図 4 D】同上。

【図 4 E】同上。

【図 5 A】図 5 A から 5 D は、肝細胞特異性 W n t シグナル増強分子による、W n t 反応遺伝子 A x i n 2 の誘発である。(図 5 A) 外因性 W n t 源(30% W n t 3 a 馴化培地)の存在下(左)又は不在下(右)での、H E K 2 9 3 (上)又は H u h - 7 (下)における I g G 形態の標的 W n t シグナル増強分子(配列番号 2 3 ~ 3 4)の S T F 活性。(図 5 B) 実験設計。 α -G F P - I g G (配列番号 2 5 ~ 2 6 及び 3 3 ~ 3 4)、F c - R S P O 2 - W T (配列番号 2 3 ~ 2 4)、 α G F P - R S P O 2 - R A - I g G (配列番号 2 5 ~ 2 8)又は α A S G R 1 - R S P O 2 - R A - I g G (配列番号 2 9 ~ 3 1) (一群当たり $n = 8$ マウス)の腹腔内注射 8 時間後の、(図 5 C) 肝臓及び(図 5 D) 小腸の A x i n 2 の発現。統計解析は 1 - w a y A N O V A で行った: (n s) 有意でない(not significant)、(*) $p < 0.05$ 、(**) $p < 0.01$ 、(***) $p < 0.001$ 。

【図 5 B】同上。

【図 5 C】同上。

【図 5 D】同上。

【図 6 A】図 6 A から 6 E は、肝細胞特異性 W n t シグナル増強分子による(配列番号 2 5 ~ 3 4)、増殖マーカー K i - 6 7 の肝臓特異的誘発である。(図 6 A) 実験設計。(図 6 B) 特定された、処理 4 8 時間後の M k i 6 7 の肝臓発現の半定量 P C R 解析(一群当たり $n = 10$ マウス)。(図 6 C) 処理後の 10 倍(10 $\times$)対物レンズ下の視野ごとの、肝臓における K i - 6 7 + 実質細胞核の平均数。統計解析は 1 - w a y A N O V A で行った: (**) $p < 0.01$ 、(***) $p < 0.0001$ 。(図 6 D) K i 6 7

タンパク質のために染色した肝臓切片の代表的な画像。(図6E)小腸におけるMki67発現の半定量PCR解析。

【図6B】同上。

【図6C】同上。

【図6D】同上。

【図6E】同上。

【図7A】図7Aから7Cは、hASGR1/2に対するバインダーの特性決定の例である。(図7A)ファージディスプレイ法で同定した3つのFab抗体(024S-D03、-E03、及び-A04;配列番号47~52)のhASGR1結合のバイオレイヤー干渉法解析。上図はセンサーグラムであり、また下図は、 K_D を求めるための定常状態フィッティング解析である。(図7B)ハイブリドーマ成長よりのhASGR2に対する2つのFabの結合(ABV-3D11及び-10B8;配列番号151~154)。(図7C)ハイブリドーマ成長よりのhASGR1に対する2つのFabの結合(LP1-2I13及びLP1-8M24;配列番号284~285及び298~299)。

【図7B】同上。

【図7C】同上。

【図8】図8は、説明的な肝臓特異性Wntシグナル伝達エンハンサーの図である。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、hASGR1もしくはhASGR2に対するIgG抗体であり得、及び/又は、作用モジュールは、野生型のもしくは変異の活性をもつRSPOT誘導体であることが可能である。RSPOT誘導体は、IgGの異なる位置(軽鎖又は重鎖のN末端又はC末端)に付加することが可能である。ある実施形態においては、活性化ドメインは、例えばナノボディ(nAb)、単鎖可変領域(scFv)、Fabフラグメント又は完全IgGの形態でヒトZNR3/RNF43に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントであり得る。nAb及びscFvと異なり、Fabは2つのポリペプチド鎖を含有するが、このいずれもが、例えば共有結合的に、ターゲティングモジュールに結合し得る。複合型IgGは、ターゲティングモジュールとしての1つのFabと、作用モジュールとしての別のFabとを含有する、別の随意の構成である。さらに、ある構成においては、ターゲティングモジュールはnAb/scFv/Fab形態であり得る一方で、作用モジュールは、IgG形態である(図示せず)。

【図9A】図9Aから9Dは、未感作健常マウスにおける肝臓特異性Wntシグナル伝達エンハンサーの用量漸増(Dose titration)である。(図9A) α ASGR1-RSPOT-RA-IgG(Fabとして発現、配列番号29~30及び161~162)を構築するために用いたASGR1抗体の異種間反応性のバイオレイヤー干渉法解析。ヒト及びマウスのASGR1ECD(配列番号35~36及び163~164)を用いた。曲線モデルフィッティングで求めた K_d を示した。肝臓(上方パネル)及び小腸(下方パネル)における(図9B)Axin2及び(図9C)Ki67の発現を、特定されたタンパク質の腹腔内注射48時間後の半定量PCRによって解析した(一群当たり $n=8$ マウス)。統計解析は1-way ANOVAで行った:(ns)有意でない(not significant)、(*) $p<0.05$ 、(**) $p<0.01$ 、(***) $p<0.001$ 。(図9D)10mg/kgの処理群よりの肝臓試料の免疫組織化学染色。抗 β -ガラクトシダーゼ(α - β -Gal-IgG、配列番号155~158)は、対照として用いた中性抗体であった。試験した他のタンパク質の配列番号は、図5の凡例に記載するとおりである。

【図9B】同上。

【図9C】同上。

【図9D】同上。

【図10A】図10Aから10Dは、慢性肝疾患のTAAマウスモデルにおける標的RSPOT模倣性の効能である。(図10A)正常マウス及びTAA処理マウスにおけるWntリガンド、及びRspo遺伝子の半定量PCR解析。(図10B)実験設計。(図10C)肝臓(上方)及び小腸(下方)での、Axin2(左)及びKi67(右)の遺伝子発

現の半定量PCR解析（一群当たり $n = 10$ マウス）。（図10D）処理中のプロトロンビン時間の国際標準比（INR）。統計解析は1-way ANOVAで行った：（**） $p < 0.01$ 、（****） $p < 0.0001$ （一群当たり $n = 10$ マウス）。抗 β -ガラクトシダーゼ（ α - β -Gal-IgG、配列番号155～156及び159～160）は、対照として用いた中性抗体であった。試験した他のタンパク質の配列番号は、図5の凡例に記載するとおりである。

【図10B】同上。

【図10C】同上。

【図10D】同上。

【図11A】図11Aから11BRは、Wntシグナルエンハンサー成分の配列である。

10

【図11B】同上。

【図11C】同上。

【図11D】同上。

【図11E】同上。

【図11F】同上。

【図11G】同上。

【図11H】同上。

【図11I】同上。

【図11J】同上。

【図11K】同上。

20

【図11L】同上。

【図11M】同上。

【図11N】同上。

【図11O】同上。

【図11P】同上。

【図11Q】同上。

【図11R】同上。

【図11S】同上。

【図11T】同上。

【図11U】同上。

30

【図11V】同上。

【図11W】同上。

【図11X】同上。

【図11Y】同上。

【図11Z】同上。

【図11AA】同上。

【図11AB】同上。

【図11AC】同上。

【図11AD】同上。

【図11AE】同上。

40

【図11AF】同上。

【図11AG】同上。

【図11AH】同上。

【図11AI】同上。

【図11AJ】同上。

【図11AK】同上。

【図11AL】同上。

【図11AM】同上。

【図11AN】同上。

【図11AO】同上。

50

【図 1 1 A P】 同上。
 【図 1 1 A Q】 同上。
 【図 1 1 A R】 同上。
 【図 1 1 A S】 同上。
 【図 1 1 A T】 同上。
 【図 1 1 A U】 同上。
 【図 1 1 A V】 同上。
 【図 1 1 A W】 同上。
 【図 1 1 A X】 同上。
 【図 1 1 A Y】 同上。
 【図 1 1 A Z】 同上。
 【図 1 1 B A】 同上。
 【図 1 1 B B】 同上。
 【図 1 1 B C】 同上。
 【図 1 1 B D】 同上。
 【図 1 1 B E】 同上。
 【図 1 1 B F】 同上。
 【図 1 1 B G】 同上。
 【図 1 1 B H】 同上。
 【図 1 1 B I】 同上。
 【図 1 1 B J】 同上。
 【図 1 1 B K】 同上。
 【図 1 1 B L】 同上。
 【図 1 1 B M】 同上。
 【図 1 1 B N】 同上。
 【図 1 1 B O】 同上。
 【図 1 1 B P】 同上。
 【図 1 1 B Q】 同上。
 【図 1 1 B R】 同上。

10

20

【図 1 2】 図 1 2 は、説明的な C C l 4 誘発性肝線維症マウスモデル及び処理プロトコールの図である。8～9 週齢 C 5 7 B L / 6 の雄（ジャクソン研究所（J a c k s o n L a b o r a t o r i e s））を、はじめの 10 日間は断続的に C C l 4（1、4、7、10 日目に 0.5 mL / kg、青矢印）と合わせてアシルアルコール（0.0125 mL / kg で、2、5、8 日目の黄色矢印）で、その後 8 週間、2 回 / 週で C C l 4 処理（0.5 mL / kg、青矢印）した。C C l 4 処理後、マウスに、2 週間タンパク質を投与した。処理群は以下のとおりである：タンパク質なし対照、n = 8；10 mpk 抗 β G a l、n = 8（2 回 / 週の投与）；4.6 mpk R S P O 2、n = 7（2 回 / 週の投与）；10 mpk 抗 e G F P - m u t R s p o 2、n = 8（毎日投与）；10 mpk α A S G R 1 - R S P O 2 - R A - I g G 2、n = 8（毎日投与）。C C l 4 処理なし（オリーブ油担体、0.5 mL / kg）、n = 8；未感作対照、n = 7 を、さらなる対照群に含めた。I N R（国際標準比）試験のために、69、72、76 日目にマウスを採血した。全てのマウスを、83 日目に終了処置した。

30

40

【図 1 3】 図 1 3 は、C C l 4 誘発性線維症モデルの様々な処理群のシリウスレッド染色率である。図 1 3 は、示したタンパク質処理の 2 週間後のマウス肝臓におけるコラーゲンのシリウスレッド染色を示すグラフである。* は α A S G R - 1 - R S P O 2 - R A - I g G 対 α e G F P - m u t R S P O 2 の統計学的有意性を表し（ $p < 0.05$ ）、** は F c - R S P O 2 - W T 対 α e G F P - m u t R S P O 2 の統計学的有意性を表し、*** は α A S G R - 1 - R S P O 2 - R A - I g G 対 α β g a l の統計学的有意性を表し、**** は F c - R S P O 2 - W T 対 α β g a l の統計学的有意性を表す。

【図 1 4 A】 図 1 4 A から 1 4 D は、内部的なハイブリドーマ由来 A S G R 1 バインダー

50

により構築されたR S P O模倣分子のインビトロ肝細胞特異性活性である。融合タンパク質（配列番号190～271）は、A S G R 1バインダーの、I g G 2重鎖のC末端に（図14A及び図14B）、又はI g G 1（N297G）重鎖のN末端に（図14C及び図14D）に、変異体R S P O 2を連結することによって構築した。精製したタンパク質は、外因性W n t代替分子（100 pMのR 2 M 3-26、国際公開第2019126398号に記載）の存在下で、H E K 2 9 3（上方グラフ）又はH u h -7（下方グラフ）におけるそれらのS u p e r T o p F l a s h（S T F）レポーター活性を試験した。用いた対照は以下のものである：F c -R S P O 2 -W T（配列番号23～24）、 α G F P -R S P O 2 -R A -I g G（重鎖のN末端に付加したR S P O 2、配列番号25～28；又は重鎖のC末端に付加したR S P O 2、配列番号25～26及び188～189）、又は α - β -G a l -R S P O 2 -R A -I g G（重鎖のC末端に付加したR S P O 2、配列番号155～156及び186～187）。各パネルに、F c -R S P O陽性対照と比較したE C 5 0及びE m a xをまとめた表を示した。

【図14B】同上。

【図14C】同上。

【図14D】同上。

【図15A】図15は、内部ハイブリドーマバインダーより誘導したR S P O模倣分子による、W n t反応遺伝子、肝臓A x i n 2、の誘発である。マウスに、タンパク質投与の5日前に、それぞれA A V -T B G -h A S G R 1及びA A V -T B G -h A S G R 2の 1×10^{11} 個のゲノム粒子を注射した。タンパク質投与の24時間後に、肝臓試料を採取して、半定量PCR解析のために処理した。（A）当該実験で用いた、配列番号、名称、投与量及びマウスの数。（B）腹腔内注射後の、A x i n 2の肝臓発現。統計解析は1-way A N O V Aで行った：（**） $p < 0.01$ 、（***） $p < 0.001$ 。

【図15B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本開示は、組織特異性W n tシグナル増強分子を提供するものであり、ある実施形態においては、当該分子は、1）組織もしくは細胞に特異的な細胞表面受容体を選択的に結合する、2）標的の組織もしくは細胞型におけるZ N R F 3 / R N F 4 3のインターナリゼーションもしくは取り込み（s e q u e s t r a t i o n）を介在する、及び／又は3）組織特異的にW n tシグナル伝達を増強する。ある実施形態においては、当該分子は、融合タンパク質である。ある実施形態においては、当該分子は、さらなる付加した結合ドメインを有する抗体である。例えば疾患又は障害の治療又は予防のために、標的の組織又は細胞型におけるW n tシグナル伝達を増強、すなわち増加させるために本明細書に開示する組成物のいずれかの、医薬組成物及びその使用方法もまた提供する。特定の実施形態においては、分子は、肝臓組織に結合し、また肝臓組織又は肝細胞におけるW n tシグナル伝達を増加させるために用いられ得る。本発明の、これらの他の目的、利点及び特徴は、以下により完全に記載される組成物及び方法の詳細を一読すれば、当業者には明らかになることとなる。

【0037】

定義

本明細書で用いる場合、「ベクター」は、ポリヌクレオチドを含む又はポリヌクレオチドと結合する巨大分子又は巨大分子の会合を指し、またそれを用いて、当該ポリヌクレオチドの細胞への送達を介在することが可能である。説明的なベクターには、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、リボソーム、及び他の遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。

【0038】

「ポリヌクレオチド」の語は、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、又はその類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドの多量体形態を指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体等の改変ヌクレオチドを含み得、また非ヌクレオチド要素によって中断されていてもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対

する改変は、ポリマーの構築前又は構築後になされ得る。本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチドの語は、区別なく、二本鎖及び一本鎖の分子を指す。別段に特定又は要求されない限り、ポリヌクレオチドである本明細書に記載の発明のいずれの実施形態も、二本鎖の形態と、二本鎖形態を作ることがわかっている又は予測される2つの相補的な一本鎖形態のそれぞれとの両方を包含する。

【0039】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、別のポリヌクレオチド又はポリペプチドに対するある特定のパーセント「配列同一性」を有し、これは、アラインしたときに、2つの配列を比較して同一である塩基又はアミノ酸の百分率を意味する。配列類似性は、いくつかの異なるやり方で決定することが可能である。配列同一性を決定するために、ワールドワイドウェブを介して `ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/` で利用可能である BLAST を含めた方法及びコンピュータプログラムを用いて、配列をアラインすることが可能である。別のアラインメントアルゴリズムは FASTA であり、これは Oxford Molecular Group 社の完全所有子会社である、米国ウィスコンシン州マディソンの Genetics Computing Group (GCG) のパッケージで利用可能である。アラインメントのための他の技術は、Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., USA に記載されている。配列内のギャップを許容するアラインメントプログラムが特に関心のものである。Smith-Waterman は、配列アラインメント内のギャップを許容するアルゴリズムの1つのタイプである。Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997) を参照されたい。また Needleman-Wunsch アラインメント法を用いた GAP プログラムを利用して配列をアラインすることも可能である。J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970) を参照されたい。

【0040】

Smith と Waterman (Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981)) の配列同一性を決定するための局所的相同性アルゴリズムを用いた Best Fit プログラムも関心のものである。ギャップ生成ペナルティは、概して、1 から 5 の範囲に及ぶこととなり、通常は 2 から 4 であり、また多くの実施形態においては 3 となることとなる。ギャップ伸長ペナルティは、概して、約 0.01 から 0.20 の範囲に及ぶこととなり、また多くの実施例においては 0.1 となることとなる。プログラムは、比較対象である入力された配列によって決定されるデフォルトパラメータを有する。好ましくは、配列同一性は、プログラムによって決定されるデフォルトパラメータを用いて決定する。このプログラムもまた、米国ウィスコンシン州マディソンの Genetics Computing Group (GCG) のパッケージから利用可能である。

【0041】

別の関心のプログラムは、FastDB アルゴリズムである。FastDB は、Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1988, Alan R. Liss, Inc. に記載されている。パーセント配列同一性は、以下のパラメータに基づいて FastDB で算出される：ミスマッチペナルティ：1.00；ギャップペナルティ：1.00；ギャップサイズペナルティ：0.33；及びジョイニングペナルティ (Joining Penalty)：30.0。

【0042】

ポリヌクレオチドに用いる場合、「組換え」は、当該ポリヌクレオチドが、クローニン

グ、制限、又は連結のステップと、天然に存在するポリヌクレオチドとは区別されるコンストラクトを結果的にもたらす他の手順との様々な組み合わせの産物であることを意味する。

【0043】

「制御因子」又は「制御配列」は、ポリヌクレオチドの複製、重複、転写、スプライシング、翻訳又は分解を含めた、ポリヌクレオチドの機能調節に寄与する分子の相互作用に関与するヌクレオチド配列である。当該調節は、プロセスの頻度、速度又は特異性に影響を及ぼし得、また実際は増強すること又は抑制であり得る。当技術で公知の制御因子は、例えば、プロモーター及びエンハンサー等である、転写調節配列が挙げられる。プロモーターは、ある条件下でRNAポリメラーゼに結合して、プロモーターから下流（3'方向に）に通常位置するコード領域の転写を開始することが可能であるDNA領域である。

10

【0044】

「作動的に連結した（operatively linked）」又は「操作可能に連結した（operably linked）」は、遺伝因子が近位であることを指すものであって、当該因子同士が、それらを予想される様式で作動することを許容する関係にある。例えば、プロモーターは、当該プロモーターがコード配列の転写の開始を促進するならば、コード領域に作動的に連結している。プロモーターとコード領域との間には、その機能的関係が維持される限り、その間に入る残基が存在してもよい。

【0045】

「発現ベクター」は、関心の遺伝子産物をコードする領域を含むベクターであり、また意図した標的細胞において当該遺伝子産物の発現を生じさせるために用いられる。発現ベクターはまた、コード領域に作動的に連結した制御因子を含み、標的において遺伝子産物の発現を促進する。発現のためにそれらが操作可能に連結する、制御因子と遺伝子との組み合わせは、「発現カセット」と呼ぶこともあり、当技術で大量の発現カセットが公知で利用可能であるか、又は当技術で利用可能である構成要素から容易に構築可能である。

20

【0046】

本明細書で用いる場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」の語は、任意の長さのアミノ酸の高分子を指す。当該語はまた、例えばジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、又は標識成分との結合を含めるように、改変されたアミノ酸高分子を包含する。

30

【0047】

本明細書で用いる場合、「抗体」の語は、抗原性エピトープに特異的に結合する必要な可変領域配列を含む、単離された又は組換えの結合剤を意味する。したがって、抗体は、例えば特定の標的抗原に結合する、所望の生物学的活性を呈する抗体又はそのフラグメントの任意の形態である。すなわち、それは最も広義で用いて、特にモノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ナノボディ、ダイアボディ、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ならびに所望の生物学的活性を呈する限り、scFv、Fab及びFab₂を含むがこれに限定されない抗体フラグメントをカバーする。

【0048】

「抗体フラグメント」は、例えばインタクトな抗体の抗原結合性領域又は可変領域である、インタクトな抗体の部分を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvフラグメント；ダイアボディ；線状抗体（例えば、Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)）；単鎖抗体分子（例えば、scFv）及び抗体フラグメントから形成される多特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化により、それぞれが単一抗原結合部位をもつ「Fab」フラグメントと、容易に結晶化する能力を反映した命名である、残りの「Fc」フラグメントと呼ばれる、2つの同一の抗原結合性フラグメントが産生される。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有してそれでもなお抗原を架橋結合することが可能である、F(ab')₂フラグメントが生じる。

40

50

【0049】

「含む (comprising)」は、記載した要素が、例えば組成物、方法、キット等において必要であるが、特許請求の範囲の範囲内で、他の要素を含んで、例えば組成物、方法、キット等を形成してもよいということの意味する。例えば、プロモーターに操作可能に連結した治療用ポリペプチドをコードする遺伝子を「含む」発現カセットは、例えばポリアデニル化配列、エンハンサー要素、他の遺伝子、リンカードメイン等の遺伝子及びプロモーターに加えて他の要素を含んでもよい発現カセットである。

【0050】

「実質的に～からなる (consisting essentially of)」は、例えば組成物、方法、キット等の基本的かつ新規の特性に実質的に影響を及ぼさない特定された材料又はステップに対して記載された、例えば組成物、方法、キット等の範囲の限定を意味する。例えば、「実質的に」プロモーターに操作可能に連結した治療用ポリペプチドをコードする遺伝子及びポリアデニル化配列「からなる」発現カセットは、それらが遺伝子の転写又は翻訳に実質的に影響を及ぼさない限り、例えばリンカー配列であるさらなる配列を含んでもよい。別の例としては、「実質的に」記載の配列「からなる」バリエーション又は変異体、ポリペプチドフラグメントは、その由来である全長の未感作ポリペプチドに基づいて、配列の境界において約10個のアミノ酸残基を足した又は引いた、当該記載の配列のアミノ酸配列を有し、例えば記載の境界のアミノ酸残基よりも10、9、8、7、6、5、4、3、2もしくは1個の残基が少ない又は記載の境界のアミノ酸残基よりも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個の残基が多い。

【0051】

「からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲において特定されていない任意の要素、ステップ又は成分を、組成物、方法又はキットから除外することを意味する。例えば、記載の配列「からなる」ポリペプチド又はポリペプチドのドメインは、当該記載の配列のみを含有する。

【0052】

本明細書で用いる場合、「発現ベクター」は、関心の遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む、例えば本明細書で述べた又は当技術で公知のプラスミド、ミニサークル、ウイルスベクター、リポソーム等であるベクターを包含し、そして意図した標的細胞における遺伝子産物の発現を生じさせるために用いる。発現ベクターはまた、コード領域に作動的に連結した制御因子を含み、標的において遺伝子産物の発現を促進する。例えばプロモーター、エンハンサー、UTR、miRNA標的配列等である制御因子と、それらが発現のために操作可能に連結する遺伝子との組み合わせを、「発現カセット」と呼ぶことがある。こうした制御因子の多数が当技術で公知であり利用可能であるか、又は当技術で利用可能である構成要素から容易に構築することが可能である。

【0053】

本明細書で用いる場合「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を司りそれによってRNA合成を促進するDNA配列、すなわち転写を司るのに十分である最小限の配列、を包含する。プロモーター及び対応するタンパク質又はポリペプチドの発現は遍在性であり得、細胞、組織及び種の広い範囲において又は細胞型特異的、組織特異的又は種特異的な、強い活性を意味する。プロモーターは、絶えず活性であることを意味する「恒常的」であり得るか、又は生物的要因又は非生物的要因の存在又は不在によって、プロモーターが活性化する又は非活性化することが可能であることを意味する「誘発的」であり得る。また本発明の核酸コンストラクト又はベクターには、プロモーター配列と近接し得る又は近接し得ないエンハンサー配列が含まれる。エンハンサー配列は、プロモーター依存性遺伝子発現に影響し、また天然遺伝子の5'又は3'領域に位置し得る。

【0054】

本明細書で用いる場合、「天然 (native)」又は「野生型」の語は、野生型の細胞、組織、器官又は有機体に存在する、例えば遺伝子であるヌクレオチド配列又は例えばRNAもしくはタンパク質である遺伝子産物を指す。本明細書で用いる場合、「バリエーション

ト」の語は、例えば天然のポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列である、参照のポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列の変異体を指し、すなわち、当該参照のポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列と100%未満の配列同一性を有する。言い換えれば、バリエーションは、例えば天然のポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列である参照ポリヌクレオチド配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸の相違（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む。例えば、バリエーションは、全長天然ポリヌクレオチド配列と50%以上、60%以上、又は70%以上の配列同一性、例えば全長天然ポリヌクレオチド配列と、例えば85%、90%又は95%又はそれ以上等である75%又は80%又はそれ以上の同一性、例えば98%又は99%の同一性、を有するポリヌクレオチドであり得る。別の例としては、バリエーションは、全長天然ポリペプチド配列と70%以上の配列同一性、例えば全長天然ポリペプチド配列と、例えば85%、90%又は95%又はそれ以上等である75%又は80%又はそれ以上の同一性、例えば98%又は99%の同一性、を有するポリペプチドであり得る。バリエーションはまた、例えば天然である参照配列のフラグメントと70%以上の配列同一性、例えば、天然配列と85%、90%又は95%又はそれ以上等である75%又は80%又はそれ以上の同一性、例えば98%又は99%の同一性、を共有する例えば天然である参照配列のバリエーションフラグメントを含み得る。

10

【0055】

本明細書で用いる場合、「生物学的活性」及び「生物学的に活性である」の語は、細胞における特定の生物学的要素によって生じる活性を指す。例えば、Respondin又はそのフラグメントもしくはバリエーションの「生物学的活性」は、Wntシグナルを増強する能力を指す。別の例としては、ポリペプチド又はその機能フラグメントもしくはバリエーションの生物学的活性は、当該ポリペプチド又はその機能フラグメントもしくはバリエーションの、例えば結合、酵素的活性等であるそれがもつ本来の機能を実行する能力を指す。第3の例としては、例えばプロモーター、エンハンサー、Kozak配列等である遺伝子調節因子の生物学的活性は、調節因子又はその機能フラグメントもしくはバリエーションの、それが操作可能に連結されている遺伝子の発現を調節する、すなわちそれぞれ当該遺伝子の翻訳を促進、増強又は活性化する、能力を指す。

20

【0056】

本明細書で用いる場合、「投与すること」又は「導入すること」又は「提供すること」の語は、組成物を、対象の、ある細胞へ、細胞へ、組織へ及び／又は器官へ、又は対象へ送達することを指す。こうした投与すること又は導入することは、インビボで、インビトロで、又はエキソビボで実施され得る。

30

【0057】

「治療」、「治療すること」等の語は、概して、所望の薬理学的効果及び／又は生理的効果を獲得することを意味するために本明細書で用いる。当該効果は、疾患もしくはその症状が対象において発症する可能性を軽減することである、当該疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防する点において予防的であり得、ならびに／又は、疾患及び／もしくは疾患に帰する悪影響の部分的もしくは完全な治癒の点で治療的であり得る。本明細書で用いる場合、「治療」は、哺乳動物における疾患のあらゆる治療をカバーし、また（a）疾患にかかり易い可能性があるがまだ罹患していると診断されていない対象において疾患が生じるのを予防すること、（b）疾患を阻害すること、すなわちその成長を抑制すること、又は（c）疾患を軽減すること、すなわち疾患の退行を引き起こすこと、を含む。治療薬は、疾患又は障害の発症前、発症中又は発症後に投与され得る。患者の望ましくない臨床症状が治療により安定化する又は軽減するような、進行中の疾患の治療が、特に関心のものである。こうした治療は、影響を受ける組織における機能の喪失が完了する前に実施することが望ましい。主題の療法は、疾患の徴候段階の間に、また一部の場合では疾患の徴候段階の後で、投与することが望ましいこととなる。

40

【0058】

「個体」、「宿主」、「対象」、及び「患者」の語は、本明細書で区別なく用いられ、

50

サル及びヒトを含むヒト及び非ヒト霊長類；スポーツ用哺乳動物（例えば、ウマ）；家畜哺乳動物（例えば、ヒツジ、ヤギ等）；愛玩用哺乳動物（イヌ、ネコ等）ならびにげっ歯類（例えば、マウス、ラット等）を含むがこれに限定されない、哺乳動物を指す。

【0059】

本発明の様々な組成物及び方法を、以下に記載する。特定の組成物及び方法について本明細書において例示するが、本発明を実施する際の使用に、いくつかの代替的な組成物及び方法のいずれかが利用可能及び適しているということが理解される。本発明の発現コンストラクト及び方法の評価は、当技術での標準手順を用いて実施してもよいということもまた理解されるであろう。

【0060】

本発明の実施では、別段に示さない限り、当業者の範囲の範囲内にある、細胞生物学、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、生化学、及び免疫学の従来技術を採用する。こうした技術は、例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989)；“Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984)；“Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987)；“Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.)；“Handbook of Experimental Immunology” (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.)；“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987)；“Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987)；“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., eds., 1994)；及び“Current Protocols in Immunology” (J. E. Coligan et al., eds., 1991)等の文献において完全に説明されており、そのそれぞれが本明細書において参照によって明示的に援用される。

【0061】

本発明のいくつかの態様は、説明のために例示的な用途を参照しながら以下に説明する。本発明の完全な理解をもたらすために、いくつかの特定の詳細、関係性及び方法を記載するということを理解されたい。しかしながら関連技術の当業者であれば、特定の詳細のうちの1もしくは複数がなくとも、又は他の方法を伴っても、本発明は実施可能であるということを容易に認識するであろう。本発明は、一部の動作は、異なる順序で及び／又は他の動作もしくは事象と同時に発生してもよいと、説明された動作又は事象の順序によって制限されない。さらに、本発明に従ってある方法論を実施するために、説明された動作又は事象の全てが必要であるとは限らない。

【0062】

本明細書で用いる専門用語は、特定の実施形態を記述することのみを目的としており、発明を限定することを意図していない。本明細書で用いる場合、文脈で別段に明示されていない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は、同様に複数形を含めることを意図している。さらに、「含むこと (including)」、「含む」、「有すること」、「有する」、「伴う」又はその変化形の語は、発明の詳細な説明及び／又は特許請求の範囲のいずれにおいても用いられる程度まで、こうした語は、「含む (comprising)」の語と同様の様式で包括的であることを意図する。

【0063】

「約」又は「およそ」の語は、ある特定の値を測定又は決定する方法に一部依存することとなる、すなわち測定系の制限である、当業者によって決定された当該値に関する許容可能な誤差範囲の範囲を意味する。例えば、「約」は、当技術の通例によって、1又は1以上の標準偏差の範囲内を意味することが可能である。あるいは、「約」は、所与の値の

10

20

30

40

50

、最大20%、好ましくは最大10%、より好ましくは最大5%、さらによりこのましくは最大1%である範囲を意味することが可能である。あるいは、特に生物学的な系又はプロセスに関して、当該語は、好ましくは5倍以内、またより好ましくは2倍以内の、ある値の倍率の程度の範囲内を意味することが可能である。本願及び特許明細書において特定の値が記載されている場合、別段に「約」の語が記載されていない限り、特定の値の許容可能な誤差範囲の範囲内の意味と仮定されたい。

【0064】

本明細書で言及した全ての公報が、それに関して公報が引用されている方法及び／又は材料を開示及び記載するために本明細書に参照によって援用される。援用した公報の、矛盾が生じる程度のいずれの開示は、本開示が代わることを理解されたい。

10

【0065】

特許請求の範囲は、任意の選択的な要素を除外するように立案されている可能性があるということにさらに留意されたい。このように、こうした記述は、例えば「単独」、「～のみ」等の除外的な語を請求項の構成要素の記載と組み合わせて使用するため、又は「否定的な」限定を使用するために、先行詞として機能することが意図される。

【0066】

別段に示さない限り、本明細書で用いる全ての語は、当業者及び採用されることとなる本発明の通例にとって、当業者の知識の範囲内にある、微生物学及び組換えDNA技術の従来技術のものと同一意味を有するものである。

【0067】

組織特異性Wntシグナル増強分子

ある態様においては、本開示は、組織又は細胞特異的にWnt活性を増強することが可能である新規の組織特異性Wntシグナル増強分子を提供する。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、1又は複数のZNR F3及び／又はRNF43リガーゼに結合する第1のドメインと、1又は複数の標的の組織又は細胞型に組織又は細胞特異的に結合する第2のドメインとを含む、二機能性分子である。第1のドメイン及び第2のドメインのそれぞれは、リガーゼ複合体又は標的の組織もしくは細胞にそれぞれ結合することができる任意の部分であり得る。例えば、第1のドメイン及び第2のドメインのそれぞれは、ポリペプチド（例えば、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は抗体とは異なるペプチドもしくはポリペプチド）、小分子、及び天然のリガンド又はそのバリエーション、フラグメントもしくは誘導体、から選択される部分であり得るがこれに限定されない。ある実施形態においては、天然リガンドは、ポリペプチド、小分子、イオン、アミノ酸、脂質又は糖分子である。第1のドメイン及び第2のドメインは、互いに同一のタイプの部分であり得るか、又はそれらは異なるタイプの部分であり得る。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、組織又は細胞特異性の細胞表面受容体に結合する。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、例えば陰性対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、又は少なくとも50倍、Wntシグナル伝達が増加又は増強する。

30

【0068】

組織特異性Wntシグナル増強分子は、様々な形態を有し得る。説明的な形態を図1A及び図8に示す。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、ZNR F3／RNF43に結合する第1のポリペプチド配列と、1又は複数の標的の組織又は細胞型に、組織又は細胞特異的に結合する第2のポリペプチド配列とを含む融合タンパク質である（例えば、図1Aを参照）。ある実施形態においては、2つのポリペプチド配列は、直接又はリンカーを介して融合し得る。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、第1のドメイン及び第2のドメインをそれぞれが含む、2以上の融合タンパク質を含む二量体又は多量体等の2以上のポリペプチドを含むものであり、当該2以上のポリペプチドは、例えばリンカー部分を介して、又は2以上のポリペプチドのそれぞれにおけるアミノ酸残基間の結合、例えばシステイン残基間の分子間ジスルフィド

40

50

結合を介して、連結する。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、第1のドメイン又は第2のドメインのいずれかを構成する抗体の重鎖及び軽鎖（又はその抗原結合性フラグメント）を含む抗体であり、当該他方のドメイン（すなわち、第2のドメイン又は第1のドメイン）は、融合タンパク質として又はリンカー部分を介してのいずれかで、抗体の重鎖又は軽鎖に連結する。特定の実施形態においては、当該他方のドメインは、重鎖のN末端、重鎖のC末端、軽鎖のN末端、又は軽鎖のC末端に連結する。こうした構造は、付加したIgG足場又はフォーマットとして本明細書において言及し得る。例えば、組織特異性Wntシグナル増強分子は、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する抗体であり得、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する当該抗体の重鎖又は軽鎖のいずれかに、組織又は細胞特異性の受容体に結合する結合ドメインが融合又は付加する。別の例では、組織特異性Wntシグナル増強分子は、組織又は細胞特異性受容体に結合する抗体であり得、組織又は細胞特異性の受容体に結合する当該抗体の重鎖又は軽鎖のいずれかに、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する結合ドメインが融合又は付加する。特定の実施形態においては、肝臓特異性Wntシグナル増強分子は、ASGR 1又はASGR 2に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントであり、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントの重鎖又は軽鎖のいずれかに、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する結合ドメインが融合又は付加する（例えば、図8を参照）。特定の実施形態においては、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する結合ドメインが、Fu 1ドメイン及びFu 2ドメインを含み、当該Fu 1ドメイン及びFu 2ドメインは、例えばF 1 0 5 R及び／又はF 1 0 9 Aである、本明細書に開示するもののいずれかを含有する1又は複数のアミノ酸改変を随意に含む。

10

20

【0069】

ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する第1のドメイン（「作用モジュール」）と、例えば高い親和性で、組織又は細胞特異性の受容体に結合する第2のドメイン（「ターゲティングモジュール」）とを含む。ある実施形態においては、これら2つのドメインのそれぞれは、活性を実質的に低下させるか、又は単独ではWntシグナルを増強させるのに不活性である。しかしながら、組織特異性Wntシグナル増強分子は、組織特異性受容体を発現する標的組織と結合する場合に、E3リガーゼZNR F 3 / R N F 4 3が組織特異性受容体との三元複合体に取り込まれ、それらが、受容体介在性のエンドサイトーシスを介して細胞表面から取り込む及び／又は除去されるように誘導する。最終的には、組織特異的にWntシグナルを増強することがもたらされる。

30

【0070】

ある実施形態においては、作用モジュールは、ZNR F 3 / R N F 4 3のE3リガーゼに対するバインダーであり、またそれは例えばR-spondin 1~4であり、ヒトR-spondin 1~4を含むがこれに限定されない、R-spondinに基づいて設計可能である。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondin、例えば野生型R-spondin 1~4、随意にヒトR-spondin 1~4であり、又はそのバリエーションもしくはフラグメントである。特定の実施形態においては、それは、対応する野生型R-spondin 1~4配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するR-spondin 1~4のいずれかのバリエーションである。ある実施形態においては、作用モジュールは、ZNR F 3 / R N F 4 3に結合する、例えばR-spondin 1~4のいずれかであるR-spondinのフューリンドメイン1を含むか又は当該フューリンドメイン1からなる。フューリンドメイン1の伸長したバージョン（もはやLGR 4~6に結合しない又はLGR 4~6への結合が低下した、変異したフューリンドメイン2を伴うものを含むがこれに限定されない）、又はZNR F 3 / R N F 4 3に特異的に結合することが可能である抗体とは異なる、操作された抗体もしくはその他の誘導体もしくは任意の操作されたポリペプチドもまた、使用することが可能である。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinの1又は複数のフューリンドメイン1を含む。ある実施形態においては、それは、R-spondinのフューリン

40

50

ドメイン 2 を含まない、又は例えば野生型フューリンドメイン 2 と比較して活性が低下したフューリンドメイン 2 である、R-spondin の改変されたもしくはバリエーションのフューリンドメイン 2 を含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondin の、フューリンドメイン 1 を含むが、フューリンドメイン 2 は含まない。ある実施形態においては、作用モジュールは、2 以上のフューリンドメイン 1、又はフューリンドメイン 1 の多量体を含む。作用ドメインは、R-spondin の 1 又は複数の野生型フューリンドメイン 1 を含み得る。特定の実施形態においては、作用モジュールは、野生型フューリンドメイン 1 と比較して、例えば ZNRF3/RNF43 に結合する、増加した活性を有する R-spondin の改変された又はバリエーションのフューリンドメイン 1 を含む。ZNRF3/RNF43 に対する結合が増加したバリエーションは、例えば、R-spondin フューリンドメイン 1 のバリエーションを含むファージディスプレイ又はイーストディスプレイのライブラリをスクリーニングすることによって特定することができる。R-spondin フューリンドメイン 1 に関連しないが、ZNRF3/RNF43 に対する結合が増加したペプチド又はポリペプチドもまた、スクリーニングを経て特定することができる。作用モジュールは、それが存在している場所において作用モジュール又は組織特異性 Wnt シグナル増強分子の構造を安定化する、例えばさらなるアミノ酸残基である、さらなる部分又はポリペプチド配列をさらに含み得る。

【0071】

ある実施形態においては、作用モジュールは、ZNRF3 及び／又は RNF43 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、a) 表 2A の抗体のいずれかに記載の CDRH1、CDRH2 及び CDRH3 の配列、ならびに／もしくは b) 表 2A の抗体のいずれかに記載の CDR L1、CDR L2 及び CDR L3 の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は 1 もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、当該バリエーションは、当該 CDR 配列において 8 未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、表 2B 又は配列番号 78～150 に記載のナノボディ、VH 又は VL の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント又はそのフラグメントもしくはバリエーションである。

【0072】

さらなる実施形態においては、作用モジュールは、ZNRF3/RNF43 の活性又は発現を低下又は防止する、例えば核酸分子等である別の阻害部分を含み、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド；低分子干渉 RNA (siRNA)；低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)；マイクロ RNA (miRNA)；又はリボザイム等である。本明細書で用いる場合、「アンチセンス」は、長さにかかわらず、核酸配列に相補的である核酸配列を指す。ある実施形態においては、アンチセンス RNA は、個々の細胞、組織又は対象に導入することが可能であり、必ずしも内因性遺伝子サイレンシング経路を当てにしない機序を介して標的遺伝子の発現の低下を結果的にもたらす、一本鎖 RNA 分子を指す。アンチセンス核酸は、改変された骨格、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、もしくは当技術で公知のその他、を含有することが可能であり、又は非天然のヌクレオシド間結合を含有してもよい。アンチセンス核酸は、例えばロック核酸 (LNA) を含むことが可能である。特定の実施形態においては、別の阻害部分が、ZNRF3/RNF43 の一方もしくは両方の活性を阻害するか、又は ZNRF3/RNF43 の一方もしくは両方の遺伝子、mRNA もしくはタンパク質の発現を阻害する。ある実施形態においては、阻害部分は、ZNRF3/RNF43 遺伝子又は mRNA 又はその補体に結合する核酸分子である。

【0073】

本明細書で用いる場合、「RNA 干渉」は、内在性遺伝子サイレンシング経路を介して標的 mRNA の分解によって標的遺伝子の発現を低下させる薬剤の使用を指す（例えば、Dicer 及び RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC)）。RNA 干渉は、shRNA 及び siRNA を含めた、様々な薬剤を使用することにより達成され得る。「低分子

ヘアピン型RNA」又は「shRNA」は、RNA干渉(RNAi)を介して標的遺伝子の発現を停止するために用いることが可能である、U字型カーブをもつ二本鎖の人工RNA分子を指す。細胞におけるshRNAの発現は、典型的には、プラスミドの送達、又はウイルスもしくは細菌のベクターを介して、達成される。shRNAは、比較的遅い分解速度と代謝回転速度を有する、RNAiの有利な伝達物質である。低分子干渉RNA(silRNA)は、miRNAと同様に、通常20~25塩基対の長さであり、またRNA干渉(RNAi)経路内で動作する、二本鎖RNA分子のクラスである。それは、転写後に、mRNAを分解して翻訳を防止することによって、相補的なヌクレオチド配列を伴う特異的な遺伝子の発現を干渉する。ある実施形態においては、silRNAは、長さが18、19、20、21、22、23又は24ヌクレオチドであり、またその3'末端において2塩基のオーバーハングを有する。silRNAを個々の細胞及び/又は培養系に導入して、標的のmRNA配列の分解を結果的にもたらしることが可能である。本明細書で用いる場合、「モルホリノ」は改変された核酸オリゴマーであって、そこで標準の核酸塩基がモルホリン環に結合してホスホロジアミデート(phosphorodiamidate)の結合を介して連結し合うものである、改変された核酸オリゴマーを指す。silRNA及びshRNAと同様に、モルホリノは相補mRNA配列に結合する。しかしながら、モルホリノは、分解するために相補mRNA配列を標的にするのではなく、mRNA翻訳の立体障害と、mRNAスプライシングの改変とを介して機能する。

【0074】

ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、例えば細胞特異性表面受容体である細胞特異性表面分子に特異的に結合し、また例えば天然リガンド、抗体、又は合成化学物質であり得る。特定の実施形態においては、細胞特異性表面分子は、標的の器官、組織又は細胞型、例えば疾患又は障害を治療又は予防するために、Wntシグナル伝達を増強することが望まれる例えば器官、組織又は細胞型、において優先的に発現する。特定の実施形態においては、細胞特異性表面分子は、標的の器官、組織又は細胞型において、例えば疾患又は障害を治療又は予防するために、Wntシグナル伝達を増強することが望まれる例えば器官、組織又は細胞型において、例えば1又は複数の他の標的でない器官、組織又は細胞型と比較して、増加又は増強した発現を有する。ある実施形態においては、細胞特異性表面分子は、1又は複数の他の器官、組織又は細胞型とそれぞれ比較して、標的の器官、組織又は細胞型の表面で優先的に発現する。例えば、特定の実施形態においては、細胞表面受容体は、1以上の、5以上の、全ての他の器官、組織もしくは細胞において発現するよりも、又は全ての他の器官、組織もしくは細胞それぞれの平均よりも、標的の器官、組織又は細胞において、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、又は少なくとも1000倍高いレベルで発現されるのであれば、組織特異性又は細胞特異性の細胞表面分子であると考えられる。ある実施形態においては、組織特異性又は細胞特異性の細胞表面分子は、細胞表面受容体であり、例えば、ターゲティングモジュールが結合することができる細胞表面膜及び細胞外領域の範囲内に位置する領域を含むポリペプチド受容体である。様々な実施形態においては、本明細書に記載する方法は、標的組織もしくは標的組織を含む組織のサブセットにおいてのみ発現する細胞表面分子を特異的に標的にすることによって、又は、全ての、大多数のもしくは相当な数の他の組織と比較して標的組織においてより高いレベルの発現、例えば少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、又は少なくとも20の他の組織におけるよりも、標的組織においてより高い発現、を有する細胞表面分子を特異的に標的にすることによって、実行され得る。

【0075】

組織特異性及び細胞特異性の細胞表面受容体は、当技術で公知である。組織及び細胞特異性の表面受容体の例としては、ASGR1(肝臓特異性のため)、ASGR2(肝臓特異性のため)、TFR2(肝臓特異性のため)、SLC10A1(肝臓特異性のため)、PTH1R(骨及び腎臓の特異性のため)、LYPD3(口腔粘膜特異性のため)、DS

G 3（口腔粘膜特異性のため）等が挙げられるがこれに限定されない。肝臓送達のためのさらなる受容体は、例えばYan et al., Tumor Biology, 2015; 36: 55-67によって記載されている。

【0076】

ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、ASGR1及び／又はASGR2に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。特定の実施形態においては、第2のポリペプチドは、a)表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列、ならびに／もしくはb)表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、表3B又は配列番号47～77もしくは151～154に記載のナノボディ、VH又はVLの配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント又はそのフラグメントもしくはバリエーションである。

10

【0077】

特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子又はその薬理的に許容可能な塩は、亜鉛RINGフィンガー3（ZNF3）及びRINGフィンガータンパク質43（RNF43）から選択される1又は複数の膜貫通E3ユビキチンリガーゼに特異的に結合する第1のドメインと、アシアロ糖蛋白受容体1（ASGR1）及び／又はアシアロ糖蛋白受容体2（ASGR2）に特異的に結合する第2のドメインとを含み、（a）第1のドメインは、（i）表2Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列；及び／もしくは（ii）表2Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、もしくは1もしくは複数のアミノ酸改変を含む、当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含み、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む；ならびに／又は、（b）第2のドメインは、（i）表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列；及び／もしくは（ii）表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、もしくは1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含み、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、それは、配列番号47～77又は151～154のいずれかに対して少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドを含む。特定の実施形態においては、それは、（i）表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列；及び／又は（ii）表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含む肝臓特異性Wntシグナル増強分子であり、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む。

20

30

40

【0078】

特定の細胞表面ポリペプチドもしくは受容体に「特異的に結合する」又は特定の細胞表面ポリペプチドもしくは受容体に「対して特異的である」、例えば抗体又はその抗原結合性フラグメントである作用モジュール又はターゲティングモジュールは、その他のポリペプチド又はポリペプチドのエピトープに実質的に結合することなく、その特定のポリペプチド又は受容体に結合するものである。一部の実施形態においては、本開示の作用モジュール及びターゲティングモジュールは、約4℃、25℃、37℃、又は42℃の温度で測定したときに、1000nM以下の、100nM以下の、10nM以下の、1nM以下の、0.5nM以下の、0.1nM以下の、0.01nM以下の、0.005nM以下の、0.001nM以下の、又は0.0005nM以下の解離定数（ K_d ）で、ZNF3／

50

RNF43又は組織特異性細胞表面分子（例えば、受容体）にそれぞれ特異的に結合する。例えば抗体であるバインダーの親和性は、従来の技術、例えばScatchardらにより記載のもの（Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660(1949)、ELISAアッセイ、バイオレイヤー干渉法(BLI)アッセイ、及び表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイ)を用いて容易に求めることが可能である。抗体のその抗原、細胞又は組織への結合特性は、概して、免疫組織化学検査(IHC)及び／又は蛍光標識細胞分取(FACS)等、例えば免疫蛍光法に基づくアッセイを含めた免疫検出法を用いて求めて評価することができる。

【0079】

ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子の作用モジュール及び／又はターゲティングモジュールは、ポリペプチドであり、一方で他の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル伝達分子の作用モジュール及び／又はターゲティングモジュールは、有機小分子である。ある実施形態においては、作用モジュール及びターゲティングモジュールは、いずれも、例えば抗体又はその抗原結合性フラグメントであるポリペプチドである。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子の作用モジュール及びターゲティングモジュールは、互いに共有結合している。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル融合分子の作用モジュール及びターゲティングモジュールは、互いに非共有結合的に結合している。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子の作用モジュール及びターゲティングモジュールは、同一の融合タンパク質内に存在している。他の実施形態においては、作用モジュールは、第1の結合ドメインをさらに含む第1のポリペプチド内に存在し、またターゲティングモジュールは、第2の結合ドメインをさらに含む第2のポリペプチド内に存在するものであり、第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインは互いに結合している。一部の実施形態においては、第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインは、同一又はそのバリエーションであり、例えばFcポリペプチド等である。一部の実施形態においては、第1の結合ドメイン及び第2の結合ドメインは、互いに異なる。特定の実施形態においては、本発明は、参照分子の機能フラグメント又はバリエーションを含めた、本明細書に記載するターゲティングモジュール又は作用モジュールのいずれかのフラグメント又はバリエーションの使用を含む。

【0080】

ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子（例えば、融合タンパク質）は、以下より選択された一般式を有する： R_1-L-R_2 及び R_2-L-R_1 、式中 R_1 はZNR3/RNF43に結合する作用モジュールであり、 R_2 は組織特異性細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールであり、またLはリンカーであって、Lは不在であっても存在していてもよい。 R_1 及び R_2 のそれぞれは、それぞれ本明細書に記載する種々の作用モジュール及びターゲティングモジュールのいずれかであり得る。 R_1 及び R_2 のそれぞれは、E3リガーゼ（ZNR3又はRNF43）又は標的の組織もしくは細胞のうちの1又は複数にそれぞれ結合することができる任意の部分であり得る。例えば、 R_1 及び R_2 のそれぞれは、ポリペプチド（例えば、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は抗体とは異なるペプチドもしくはポリペプチド）、小分子、及び天然のリガンド又はそのバリエーション、フラグメントもしくは誘導体、から選択される部分であり得るがこれに限定されない。ある実施形態においては、天然リガンドは、ポリペプチド、小分子、イオン、アミノ酸、脂質又は糖分子である。作用モジュール及びターゲティングモジュール（すなわち、 R_1 及び R_2 ）は、互いに同一のタイプの部分であり得るか、又は異なるタイプの部分であり得る。特定の実施形態においては、 R_2 はその抗原結合性フラグメントの抗体であり、またある実施形態においては、 R_2 はFcタンパク質又はその類似体を含む。

【0081】

ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、単一の分子（例えば、ポリペプチド）を含み、一方で他の実施形態においては、Wntシグナル増強融合分子は、互いに結合、例えば互いに非共有結合的に結合する、2以上の分子（例えば、ポリペ

プチド)を含む。例えば、一実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強融合体は、それぞれ一般式 R_3-L_1 及び R_4-L_2 を有する2つの分子を含み、式中 R_3 は作用モジュールであり、 R_4 はターゲティングモジュールであり、また L_1 及び L_2 の基は互いに結合して、例えば二量体を形成する。様々な実施形態においては、 L_1 及び L_2 の基は、互いに同一であるか、又は互いに異なる。 L_1 又は L_2 の基の一例は、Fc配列であり、例えばマウスFc2b又はヒトFc1であり、そのそれぞれは当技術で公知である。 R_3 及び R_4 のそれぞれは、それぞれ本明細書に記載する種々の作用モジュール及びターゲティングモジュールのいずれかであり得る。 R_3 及び R_4 のそれぞれは、E3リガーゼ(ZNRF3又はRNFB43)又は標的の組織もしくは細胞のうちの1又は複数にそれぞれ結合することができる任意の部分であり得る。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、E3リガーゼ(ZNRF3及び／又はRNFB43)のうちの1又は複数に結合する抗体又はその結合性フラグメントを含み、当該抗体の重鎖及び／又は抗体の軽鎖は、標的の組織又は細胞に結合する付加した結合ドメインを含む。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、標的の組織又は細胞に結合する抗体又はその結合性フラグメントを含み、当該抗体の重鎖及び／又は抗体の軽鎖は、E3リガーゼ(ZNRF3及び／又はRNFB43)のうちの1又は複数に結合する付加した結合ドメインを含む。付加した結合ドメインは、例えば重鎖もしくは軽鎖の融合タンパク質として、抗体のN末端もしくはC末端に直接融合し得るか、又はリンカー部分を介して、重鎖もしくは軽鎖に、例えば重鎖もしくは軽鎖のN末端、C末端もしくは内部アミノ酸に、付加し得る。ある実施形態においては、抗体はIgGである。

10

20

【0082】

ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子(例えば、融合タンパク質)は、融合タンパク質と接触した肝臓組織又は肝細胞において、Wntシグナル伝達を増加させる。特定の実施形態においては、肝臓の組織又は細胞型におけるWntシグナル伝達が、少なくとも50%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍、増加する。

【0083】

組織特異性Wntシグナル増強分子は、当技術で公知で利用可能である、有機合成及び分子生物学の標準の方法で生成され得る。例えば、組織特異性Wntシグナル増強融合タンパク質は、ターゲティングモジュール(例えば、ASGR1又はASGR2に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメント)を作用モジュール(例えば、アミノ酸残基N37~R95に相当するヒトR-spondin2フューリンドメイン1単独、又はフューリンドメイン2が続くヒトR-spondin2フューリンドメイン1、ここでLGRタンパク質とのフューリンドメイン2の相互作用は、例えばF105A及びF109Aである、単独又は組み合わせでの点変異によって無効にされる又は失われる)と融合することによって生成され得る。ある実施形態においては、ターゲティングモジュール及び作用モジュールは、いずれかのドメインが組織特異性Wntシグナル増強分子のN末端に位置している状態で、例えばグリシン-セリンリンカーであるリンカーによって融合される。ある実施形態においては、ターゲティングモジュール及び作用モジュールは、タンパク質リンカー(例えば、アルブミン)で融合する。ターゲティングモジュールを作用モジュールと「融合させる」さらなる方法としては、例えば「knob-in-hole」又はロイジンジッパーによる二量体形成が挙げられるがこれに限定されない。ターゲティングモジュール、作用モジュール(及び随意にリンカー)をコードするDNA配列は、所望の融合タンパク質をコードするように遺伝子操作されてもよい。

30

40

【0084】

抗体の重鎖及び軽鎖を含む組織特異性Wntシグナル増強融合分子に関して、融合タンパク質の異なる部分をコードするDNA配列は、標準の分子クローニング技術を用いて、細菌の又は真核生物の発現ベクター内に挿入されて、適切な宿主細胞において発現し得る。発現した融合タンパク質は、タンパク質科学の標準技術、例えばアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィーを用い

50

て、均質に精製され得る。本開示はまた、本明細書に記載する作用モジュール、ターゲティングモジュール又は融合タンパク質に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%のポリペプチド配列同一性を有するバリエーションを含めた、本明細書に記載するポリペプチドの作用モジュール、ターゲティングモジュール及び融合タンパク質のいずれかの機能フラグメント及びバリエーションを含む。こうしたバリエーションは、本明細書に開示する配列のいずれかと比較して、例えば1又は複数のアミノ酸の欠失、挿入又は置換である1又は複数のアミノ酸改変を含み得る。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強融合タンパク質の機能フラグメント及びバリエーションは、それらの誘導元である組織特異性Wntシグナル増強融合タンパク質と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、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100%、又はそれ以上のWntシグナル増強活性を有する。ある実施形態においては、ポリペプチド作用モジュールの機能フラグメント及びバリエーションは、それらの誘導元である作用モジュールと比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、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100%、又はそれ以上のWntシグナル増強活性を有する（組織特異性Wntシグナル増強分子全体の文脈で測定した場合）。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールの機能フラグメント及びバリエーションは、それらの誘導元であるターゲティングモジュールと比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、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100%、又はそれ以上の結合活性を有する。

【0085】

本開示はまた、例えば本明細書に記載する融合タンパク質又はそのバリエーションである、1又は複数の組織特異性Wntシグナル増強分子又はその成分をコードするポリヌクレオチド又は核酸配列、ならびに、発現ベクターを含めた、これらポリヌクレオチドを含むベクター、ならびにこれらベクターを含む細胞を含む。ある実施形態においては、ポリヌクレオチド又は核酸配列は、DNA又はRNAである。特定の実施形態においては、RNAはメッセンジャーRNA（mRNA）である。ある実施形態においては、RNAは、1又は複数の改変されたヌクレオシドを含む改変されたmRNAである。1又は複数の改変ヌクレオシドを含む改変mRNAは、安定性の増加、より高い発現レベル及び免疫原性の低下を含めた、改変されていないmRNAを超える利点を有することが記載されている。本発明により用いられ得る改変mRNAの非限定的な例が、例えばPCT特許出願公開公報、国際公開第2011/130624号、国際公開第2012/138453号、国際公開第2013052523号、国際公開第2013151666号、国際公開第2013/071047号、国際公開第2013/078199号、国際公開第2012045075号、国際公開第2014081507号、国際公開第2014093924号、国際公開第2014164253号、米国特許第8,278,036号（プソイドウリジンを含む改変mRNAを記載）、米国特許第8,691,966号（プソイドウリジン及び／又はN1-メチルプソイドウリジンを含む改変mRNAを記載）、米国特許第8,835,108号（5-メチルシチジンを含む改変mRNAを記載、米国特許第8,748,089号（プソイドウリジン又は1-メチルプソイドウリジンを含む改変mRNAを記載）に記載されている。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドをコードする改変mRNA配列は、改変されていないA、G、U又はCリボヌクレオシドと比較して、少なくとも1つの改変を含む。特定の実施形態においては、少なくとも1つの改変ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン及び／又は5-メチルシチジンを含む。特定の実施形態においては、改変mRNAは、組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドをコードする配列が続き、例えばポリA又はポリA-G配列等である3'

テール (t a i l i n g) 配列が続く、5'末端キャップ配列を含む。

【0086】

特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、例えば発現ベクターであるベクターであり、また発現ベクターは、例えば細胞においてポリヌクレオチドの発現を駆動するプロモーター配列であるプロモーター配列に操作可能に連結した本明細書に記載の組織特異性Wntシグナル増強融合分子（例えば、融合タンパク質、又は付加した抗体の一方もしくは両方の鎖）をコードするポリヌクレオチド配列を含む。ある実施形態においては、ベクターはウイルスベクターであり、例えば、組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドをコードするDNA又はRNA配列に操作可能に連結したプロモーターを含む発現カセットを含むポリヌクレオチドを含むウイルスである。特定の実施形態においては、発現カセットは、5'及び／又は3'の細胞UTR又はウイルスUTR又はその誘導体を含む。

10

【0087】

本開示はまた、本明細書に記載するポリヌクレオチドに対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%のポリヌクレオチド配列同一性を有するバリエーションを含めた、本明細書に記載するポリヌクレオチドの機能フラグメント及びバリエーションを含む。こうしたバリエーションは、本明細書に開示する配列のいずれかと比較して、例えば1又は複数のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換である、1又は複数のヌクレオチド又はヌクレオシドの改変を含み得る。特定の実施形態においては、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞においてコードされたポリペプチドの発現を増強するように、コドン最適化される。特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドバリエーションは、1又は複数の改変されたヌクレオチド又はヌクレオシドを含む。

20

【0088】

本開示はまた、本明細書に記載の、例えば融合タンパク質である、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードするポリヌクレオチド又はベクターを含む細胞を含む。ある実施形態においては、細胞は宿主細胞であり、例えば組織特異性Wntシグナル増強融合タンパク質を産生するために用いられ得るHEK293細胞等である。主題の組成物を調製する際に、例えば哺乳動物細胞（例えば、293細胞）、昆虫細胞（例えば、SF9細胞）、微生物及び酵母を含めるがこれに限定されない、任意の宿主細胞を採用することができる。ある実施形態においては、細胞は、本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドにより治療する対象に対して異種又は自己由来である。特定の実施形態においては、当該細胞は、対象から取得して、本明細書に記載するウイルスベクターにより形質導入された。特定の実施形態においては、形質導入された細胞は、治療のために対象に送達される。

30

【0089】

本開示はまた、1もしくは複数の組織特異性Wntシグナル増強分子（例えば、融合タンパク質）、又は組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする配列を含む1もしくは複数のポリヌクレオチドもしくはベクターを含む、医薬組成物を含む

【0090】

Wntシグナル伝達は、当技術で公知で利用可能である技術及びアッセイを用いて測定することができる。ある実施形態においては、Wntシグナル伝達の増加は、標的の組織又は細胞型に対応する細胞株を用いて決定する。特定の実施形態においては、細胞株は、Wntシグナル反応性プロモーターの制御下で、標識遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を伴うレポータープラスミドを含有する。陰性対照としてのフューリンドメイン1単独（又はF105A及び／又はF109A点変異を伴うフューリンドメイン2と共に）か又は陽性対照としての機能Respondin（全長の又はフューリンドメイン1及び2）のいずれかを添加することによって、Wnt3a、Wnt3a馴化培地又はWnt3aの組換え源への反応として増強した細胞のレポーター活性を求めることができる。組織特異性Wntシグナル増強分子に対するレポーター活性はまた、レポーター細胞株を組織特異性Wntシグナル増強分子と接触させることによって求めることもできる。陰性対照

40

50

は、レポーター活性に対して、実質的に、有意に又は完全に陰性であり得、また組織特異性Wntシグナル増強分子及び陽性対照は、レポーター活性の増加としてWntシグナル伝達反応が増加するはずである。さらなる対照としては、抗ASGR1抗体単独（陰性）、抗ASGR1抗体の代わりに抗GFP抗体を用いた融合タンパク質（陰性）、及びインタクトなフューリンドメイン1-フューリンドメイン2タンパク質（陽性）を挙げることができる。組織特異性Wntシグナル増強分子の組織特異性は、標的のものの意外の細胞型又は組織における組織特異性Wntシグナル増強分子による処理への反応としてレポーター活性を同様に測定することによって求めることができる。ある実施形態においては、レポーター活性は、組織特異性Wntシグナル増強分子が結合した標的組織では、標的でない組織と比較して、例えば少なくとも50%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍、高い。

10

【0091】

特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドは、本明細書に記載する作用モジュール及びターゲティングモジュールのいずれかの任意の組み合わせを含めた、作用モジュール及びターゲティングモジュールの任意の組み合わせを含む。特定の実施形態においては、それらは、例えばアルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）であるリンカー、ペプチジルリンカー、又は非ペプチジルリンカーによって連結するものであり、当該ターゲティングモジュール及び作用モジュールは、例えばFcもしくはアルブミン、ペプチジルリンカー又は非ペプチジルリンカーである、リンカーのN末端及びC末端上にある。

20

【0092】

組織特異性Wntシグナル増強分子はまた、インビボでの安定性を増強するために、当技術で公知である、例えばポリエチレングリコール（PEG）、Fc、アルブミン等の部分に連結可能である。

【0093】

組織特異性Wntシグナル増強分子の説明的な、非限定的な例としては、以下が挙げられる：

【0094】

a) Wntシグナル伝達を増強する能力が低下したR-spondin（例えば、ヒトR-spondin2）のバリエーションもしくはフラグメントを含む作用モジュールと、PTH1Rに特異的に結合するターゲティングモジュールとを含む骨組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドであって、骨組織のWntシグナル伝達を増加させて、また骨組織の疾患もしくは症状を治療するために用いられ得る、当該組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチド；

30

【0095】

b) Wntシグナル伝達を増強する能力が低下したR-spondin（例えば、ヒトR-spondin2）のバリエーションもしくはフラグメントを含む作用モジュールと、ASGR1、ASGR2、TFR2もしくはSLC10A1に特異的に結合するターゲティングモジュールとを含む肝臓組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドであって、肝臓組織のWntシグナル伝達を増加させて、また肝臓組織の疾患もしくは症状を治療するために用いられ得る、当該組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチド；又は、

40

【0096】

c) Wntシグナル伝達を増強する能力が低下したR-spondin（例えば、ヒトR-spondin2）のバリエーションもしくはフラグメントを含む作用モジュールと、LYPD3もしくはDSG3に特異的に結合するターゲティングモジュールとを含む口腔粘膜組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチドであって、口腔粘膜組織のWntシグナル伝達を増加させて、また口腔粘膜組織の疾患もしくは症状を治療するために用いられ得る、当該組織特異性Wntシグナル増強ポリペプチド。

【0097】

組織特異性Wntシグナル増強分子の説明的な、非限定的な例としては、添付の実施例

50

及び配列に記載のものを含み、表 1 に記載のものを含むがこれに限定されない。特定の実施形態においては、組織特異性 W n t シグナル増強分子は、例えば付加した I g G 又は抗体フォーマット内に、本明細書に開示する 2 以上のポリペプチド配列を含む。本明細書に開示するポリペプチドは、表 1 に記載の配列のいずれかならびにそのフラグメント及びバリエーションに対して、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 又は少なくとも 99 % の同一性を有する配列を含む又は当該配列からなるポリペプチドを含むが、これに限定されない。特定の実施形態においては、ポリペプチドは、表 1 に記載の配列（例えば、それらはタグ（例えば H i s タグ又は F l a g タグ）又は他の追加的な配列を欠いていてもよい）のいずれかならびにそのフラグメント及びバリエーション内に存在する作用モジュール又はターゲティングモジュールを含む。ある実施形態においては、ポリペプチドが、作用モジュール及び／又はターゲティングモジュールとしての活性を有する。

10

【0098】

本明細書に開示するポリヌクレオチドの説明的な、非限定的な例としては、上記に記載したものを含めた、本明細書に記載するポリペプチド、バリエーション及びフラグメントのいずれかをコードする任意のものを含む。ある実施形態においては、ポリヌクレオチドが、機能ドメイン及び／又はターゲティングモジュールとしての活性を有するポリペプチドをコードする。

【表 1 - 1】

表 1. 配列識別子の記載

図	配列番号	簡単な説明
1	1	全長ヒト RSP01 (PP)
1	2	全長ヒト RSP02 (PP)
1	3	全長ヒト RSP03 (PP)
1	4	全長ヒト RSP04 (PP)
1, 2, 3	5 及び 6	抗 GFP、RSP02 野生型 (PN 及び PP)
1, 2, 3	7 及び 8	抗 GFP、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
1, 2, 3	9 及び 10	抗 GFP、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) (PN 及び PP)
1, 2, 3	11 及び 12	抗 ASGR1、RSP02 野生型 (PN 及び PP)
1, 2, 3	13 及び 14	抗 ASGR1、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
1, 2, 3	15 及び 16	抗 ASGR1、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) (PN 及び PP)
4	17 及び 18	抗 TFR1、RSP02 野生型 (PN 及び PP)
4	19 及び 20	抗 TFR1、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
4	21 及び 22	抗 TFR1、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) (PN 及び PP)
5, 9~15	23 及び 24	Fc-RSP02 (PN 及び PP)
		α GFP-RSP02-RA-IgG
5, 6, 9, 13~15	25 及び 26	抗 GFP 軽鎖 (PN 及び PP)
5, 6, 9, 13 及び 15	27 及び 28	RSP02 (F105R/F109A)、抗 GFP 重鎖 IgG2 (PN 及び PP)
		α ASGR1-RSP02-RA-IgG
5, 6, 9, 13 及び 15	29 及び 30	抗 ASGR1 軽鎖 (PN 及び PP)
5, 6, 9, 13 及び 15	31 及び 32	RSP02 (F105R/F109A)、抗 ASGR1 重鎖 IgG2 (PN 及び PP)
		α GFP-IgG
5 及び 6	25 及び 26	抗 GFP 軽鎖 (PN 及び PP)
5 及び 6	33 及び 34	抗 GFP 重鎖 IgG1 (PN 及び PP)
		ASGR ECD
7 及び 9	35 及び 36	hASGR1 ECD
9	163 及び 164	mASGR1 ECD
7	37 及び 38	hASGR2 ECD
	39 及び 40	cynoASGR1 ECD
	41 及び 42	cynoASGR2 ECD

10

20

30

40

【表 1 - 2】

		<u>E3 リガーゼ ECD</u>	
1 及び 4	43 及び 44	hRNF43 ECD	
1 及び 4	45 及び 46	hZNRF3 ECD	
		<u>抗 β-Gal</u>	
9, 10, 13 及び 15	155 及び 156	抗 β -Gal 軽鎖 (PN 及び PP)	10
9	157 及び 158	抗 β -Gal 重鎖 IgG1-LALAPG (PN 及び PP)	
10, 13 及 び 15	159 及び 160	抗 β -Gal 重鎖 IgG2 (PN 及び PP)	
		<u>抗 ASGR1 Fab</u>	
9	29 及び 30	抗 ASGR1 軽鎖 (PN 及び PP)	
9	161 及び 162	抗 ASGR1 VH-CH1 (PN 及び PP)	
		<u>α-β-Gal-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	20
14	155 及び 156	抗 β -Gal 軽鎖 (PN 及び PP)	
14	186 及び 187	抗 β -Gal 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)	
		<u>α-GFP-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	
14	25 及び 26	抗 GFP 軽鎖 (PN 及び PP)	
14	188 及び 189	抗 GFP 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)	
		<u>LP1-1F8-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	
14	190 及び 191	LP1-1F8 軽鎖 (PN 及び PP)	30
14	192 及び 193	LP1-1F8 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)	
		<u>LP1-1N15-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	
14	194 及び 195	LP1-1N15 軽鎖 (PN 及び PP)	
14	196 及び 197	LP1-1N15 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)	
		<u>LP1-1P13-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	
14	198 及び 199	LP1-1P13 軽鎖 (PN 及び PP)	40
14	200 及び 201	LP1-1P13 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)	
		<u>LP1-1P5-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	
14	202 及び 203	LP1-1P5 軽鎖 (PN 及び PP)	
14	204 及び 205	LP1-1P5 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)	
		<u>LP1-2E12-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>	
14	206 及び 207	LP1-2E12 軽鎖 (PN 及び PP)	

【表 1 - 3】

14	208 及び 209	LP1-2E12 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-2I13-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	210 及び 211	LP1-2I13 軽鎖 (PN 及び PP)
14	212 及び 213	LP1-2I13 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-2I22-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	214 及び 215	LP1-2I22 軽鎖 (PN 及び PP)
14	216 及び 217	LP1-2I22 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-3A24-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	218 及び 219	LP1-3A24 軽鎖 (PN 及び PP)
14	220 及び 221	LP1-3A24 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-3E20-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	222 及び 223	LP1-3E20 軽鎖 (PN 及び PP)
14	224 及び 225	LP1-3E20 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-6H3-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	226 及び 227	LP1-6H3 軽鎖 (PN 及び PP)
14	228 及び 229	LP1-6H3 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-7B13-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	230 及び 231	LP1-7B13 軽鎖 (PN 及び PP)
14	232 及び 233	LP1-7B13 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-7I20-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	234 及び 235	LP1-7I20 軽鎖 (PN 及び PP)
14	236 及び 237	LP1-7I20 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-8M24-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	238 及び 239	LP1-8M24 軽鎖 (PN 及び PP)
14	240 及び 241	LP1-8M24 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-9C3-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	242 及び 243	LP1-9C3 軽鎖 (PN 及び PP)
14	244 及び 245	LP1-9C3 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		<u>LP1-9M16-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)</u>
14	246 及び 247	LP1-9M16 軽鎖 (PN 及び PP)
14	248 及び 249	LP1-9M16 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)

10

20

30

40

【表 1 - 4】

		LP1-10C22-RSP02-RA-IgG (付加した C-HC)
14	250 及び 251	LP1-10C22 軽鎖 (PN 及び PP)
14	252 及び 253	LP1-10C22 重鎖 IgG2、RSP02 (F105R/F109A) (PN 及び PP)
		LP1-1N15-RSP02-RA、IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	194 及び 195	LP1-1N15 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	254 及び 255	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-1N15 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
		LP1-1P13-RSP02-RA-IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	198 及び 199	LP1-1P13 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	256 及び 257	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-1P13 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
		LP1-2I13-RSP02-RA-IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	210 及び 211	LP1-2I13 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	258 及び 259	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-2I13 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
		LP1-2I22-RSP02-RA-IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	214 及び 215	LP1-2I22 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	260 及び 261	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-2I22 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
		LP1-3A24-RSP02-RA-IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	230 及び 231	LP1-7B13 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	266 及び 267	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-7B13 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
		LP1-8M24-RSP02-RA-IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	238 及び 239	LP1-8M24 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	268 及び 269	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-8M24 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
		LP1-9M16-RSP02-RA-IgG1 N297G (付加した N-HC)
14~15	246 及び 247	LP1-9M16 軽鎖 (PN 及び PP)
14~15	270 及び 271	RSP02 (F105R/F109A)、LP1-9M16 重鎖 IgG1 N297G (PN 及び PP)
15	29 及び 30	抗 ASGR1 軽鎖 (PN 及び PP)
15	272 及び 273	抗 ASGR1 重鎖 IgG2 (PN 及び PP)

10

20

30

40

【0099】

作用モジュール

R-spondinは、Wntシグナルを増幅することが可能である。R-spondinの最小機能単位は、ZNR F3/RNF43のE3リガーゼに結合するフューリンドメイン1及びLGR4~6に結合するフューリンドメイン2である2つのフューリンドメインから構成され、一緒になってR-spondin、LGR及びE3リガーゼの三元複合体をもたらす。これにより、複合体全体のインターナリゼーションと、それらの破壊の標的から離れるようにZNR F3/RNF43を除去することが結果的にもたらされる。フューリンドメイン1は単独では機能的でないが、ZNR F3及びRNF43の両方に結合することが可能である。

50

【0100】

本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子の作用モジュールは、例えばポリペプチド又は有機化合物である、ZNR F3/RNF 43のリガーゼに結合することが可能である任意の機能部分であり得るが、これに限定されない。特定の実施形態においては、作用モジュール、例えば単独か又はターゲティングモジュールを伴うかのいずれかでR-spondinのフューリンドメイン1を含むポリペプチドは、潜在的なオフターゲット効果を最小限にするように、標的でない組織において実質的に不活性である。作用モジュールは、組織特異性Wntシグナル増強分子の文脈でターゲティングモジュールに融合又は結合するものであり、また組織特異性Wntシグナル増強分子が組織特異性受容体を発現する標的組織と結合する場合に、E3リガーゼZNR F3/RNF 43が組織特異性受容体との三元複合体に取り込まれて、それらが、細胞表面上に再配置される、細胞表面から取り込まれる及び／又は除去されるように誘導する。

10

【0101】

ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinポリペプチド（例えば、R-spondin 1～4のいずれか）のフラグメントもしくはバリエーション、又はその機能フラグメントもしくはバリエーションを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、野生型R-spondinのフラグメントを含み、また他の実施形態においては、作用モジュールは、1又は複数のアミノ酸改変を含むR-spondinのフラグメントを含む。R-spondinは、当技術で公知の任意のR-spondin又はその相同体であり得、例えばヒトR-spondin等の哺乳動物種を含むがこれに限定されない任意の動物種よりのR-spondinを含む。R-spondinは、特定及び記載されており、またそれらのポリペプチド及びコードポリヌクレオチド配列は、当技術で公知で利用可能である。特定の実施形態においては、R-spondinポリペプチドは、ヒトR-spondin、又は例えばマウスR-spondinである、他の脊椎動物もしくは非脊椎動物に存在する相同体である。ヒトR-spondin 1、ヒトR-spondin 2、ヒトR-spondin 3及びヒトR-spondin 4及びそのフューリンドメイン1のアミノ酸配列を、それぞれ図1及び配列番号1～4で提供する。それらの相同体及びバリエーションは、全般的なデータベース検索で利用可能であり、例えば<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>等である。本発明は、これら又は他のR-spondinにいずれかのフラグメント及びバリエーションを含む又は当該フラグメント及びバリエーションからなる作用モジュールを含む（がこれに限定されない）。様々な実施形態においては、R-spondinポリペプチド及びそのフラグメントのいずれかのバリエーションは、野生型R-spondinポリペプチドと比較して、例えば欠失、付加又は置換である、1又は複数のアミノ酸改変を含む。当該改変は、フューリンドメイン1及び／又はフューリンドメイン2を含むがこれに限定されない、R-spondin又はそのフラグメントのバリエーションの任意の領域に存在し得る。フューリンドメイン1又はフューリンドメイン2の外側のアミノ酸改変は、得られるバリエーションが野生型R-spondin又はそのフラグメントと比較してLGR 4～6結合活性が低下するように、得られるバリエーションを変更してよいということを理解されたい。

20

30

40

【0102】

ある実施形態においては、作用モジュールは、例えば全長もしくは野生型のR-spondin-1、-2、-3もしくは-4、随意にヒトR-spondin-1、-2、-3もしくは-4、又はそのバリエーションもしくはフラグメントである、R-spondin配列を含む又は当該R-spondin配列からなる。特定の実施形態においては、それは、対応する野生型R-spondin 1～4配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するR-spondin 1～4のいずれかのバリエーションである。ある実施形態においては、作用モジュールは、本明細書に開示するもののいずれかを含むがこれに限定されない、1又は複数のアミノ酸改変を含む全長R-spondin（例えば

50

、R-spondin1～4のいずれか)を含む又は当該全長R-spondinからなる。ある実施形態においては、作用モジュールは、野生型又は改変されたR-spondin(例えば、R-spondin1～4のいずれか)のフラグメントを含む又は当該フラグメントからなる。特定の実施形態においては、当該フラグメントは、ZNR F3及び／又はRNF43に結合することが可能である。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinタンパク質のフーリンドメイン1、又はR-spondinタンパク質のフラグメントもしくはバリエントを含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinフーリンドメイン1に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する、R-spondinタンパク質(例えば、R-spondin1～4)の1もしくは複数の(例えば、1、2、もしくは3もしくはそれ以上の、フーリンドメイン1もしくはそのバリエントを含む又は当該フーリンドメイン1もしくはそのバリエントからなる。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinフーリン1ドメイン又はそのバリエントもしくはフラグメントと、R-spondinフーリン2ドメイン又はそのバリエントもしくはフラグメントとを含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、ZNR F3/RNF43に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、ZNR F3又はRNF43のいずれかに特異的に結合する。

【0103】

ある実施形態においては、作用モジュールは、例えばヒトR-spondin1又はヒトR-spondin2であるR-spondinの1又は複数のフーリンドメイン1又はそのバリエントを含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinの1又は複数のフーリンドメイン1を含むが、R-spondinのフーリンドメイン2は含まない。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinの1又は複数のフーリンドメイン1を含み、また例えば野生型フーリンドメイン2と比較して活性が低下したフーリンドメイン2である、R-spondinの改変された又はバリエントのフーリンドメイン2を含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、例えば野生型フーリンドメイン2と比較して活性が低下したフーリンドメイン2である、R-spondinの改変された又はバリエントのフーリンドメイン2を有するR-spondinタンパク質を含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、2以上のフーリンドメイン1もしくはそのバリエント、又はフーリンドメイン1の多量体もしくはそのバリエントを含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、例えばヒトR-spondin2のK58、H76、S77、R86及び／又はN91に対応するアミノ酸残基において、1又は複数の点変異を含むバリエントR-spondinフーリン1ドメインを含む。ある実施形態においては、作用モジュールは、例えばヒトR-spondin2のF105、F109及び／又はK121に対応するアミノ酸残基において、1又は複数の点変異を含むバリエントR-spondinフーリン2ドメインを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、野生型フーリンドメイン1と比較して、例えばZNR F3/RNF43に結合する、増加した活性を有するR-spondinの改変された又はバリエントのフーリンドメイン1を含む。作用モジュールは、それが存在している場所において作用モジュール又は組織特異性Wntシグナル増強分子の構造を安定化する、例えばさらなるアミノ酸残基である、さらなる部分又はポリペプチド配列をさらに含み得る。ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinに対して明白な／強い配列相同性を含まないペプチド又はポリペプチドを含むが、R-spondinのZNR F3/RNF43に対する結合親和性に匹敵する又は当該結合親和性より高い、ZNR F3/RNF43に対する結合親和性を有する。

【0104】

ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinポリペプチド(例えば、ヒトR-spondin)のフーリンドメイン1又はそのフラグメントもしくはバリエントと、R-spondinポリペプチド(例えば、ヒトR-spondin)の改

変えられた又はバリエーションのフーリンドメイン2とを含むものであり、当該改変されたフーリンドメイン2は、対応する野生型フーリンドメイン2と比較して、LGR4～6に対する結合親和性が低下している（図1及び4を参照）。ある実施形態においては、フーリンドメイン2は、例えばヒトR-spondin2のF105及び／又はF109に対応するアミノ酸残基において、1又は複数の点変異を含む。当業者は、他のR-spondinポリペプチドにおける対応するアミノ酸残基を、それらのアミノ酸配列をヒトR-spondin2と比較することによって、容易に決定することができる。ある実施形態においては、作用モジュールは、フーリンドメイン1又はそのバリエーションと、フーリンドメイン2又はそのバリエーションとを含むものであり、フーリンドメイン1及び／又はフーリンドメイン2は、1又は複数の点変異を含む。作用モジュール内の1又は複数の点変異（対応する野生型R-spondin配列と比較して）は、フーリンドメイン1及び／又はフーリンドメイン2内の任意のアミノ酸残基において生じてよく、例えば、アミノ酸残基K58、H76、S77、R86、N91、F105、F109又はK121、及びLGR4～6に対する結合親和性を低下させるように改変することが可能である他の残基におけるものを含むがこれに限定されない。保存された親水性残基S48、N51、R66、R70及びQ71、ならびにあまり保存されていない疎水性残基L46、L54、I62及びL64を含めて、その機能的活性のために重要であるヒトR-spondin1のフーリンドメイン1及びフーリンドメイン2の領域は特定されており、これらはE3リガーゼとの結合に重要である。さらに、ヒトR-spondin1フーリンドメイン1において、アミノ酸残基K59、S78、D85、R87、N88及びN92が、LGR5との親水性相互作用表面を形成し、またFSHNFアミノ酸配列は、疎水性表面に重要なループとして特定されている。特定の実施形態においては、R-spondinフーリンドメイン1及び／又はフーリンドメイン2を含む作用モジュールは、これら領域、表面又はアミノ酸残基のいずれかの範囲内における1又は複数の変異を含み得る。特定の実施形態においては、R-spondinフーリンドメイン1及び／又はフーリンドメイン2を含む作用モジュールは、これら領域、表面又はアミノ酸残基を超えた、1又は複数の変異又は他の交代（alternation）を含み得、これらは、結合表面の構造及び／又は安定性に影響を及ぼすことによって、LGR4～6結合を間接的に無効にする。ある実施形態においては、R-spondinフーリンドメイン1及び／又はフーリンドメイン2を含む作用モジュールは、添付の実施例において示すもののいずれかを含むがこれに限定されない、任意のアミノ酸残基における1又は複数の変異を含み得る。特定の実施形態においては、作用モジュールは、アミノ酸残基F105及び／又はF109におけるアミノ酸置換を含む改変されたフーリンドメイン2を含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、フーリンドメイン1と、アミノ酸残基F105及び／又はF109におけるアミノ酸置換を含む改変されたフーリンドメイン2とを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、改変されたフーリンドメイン及び改変されたフーリンドメインを含むものであって、ある実施形態においては、改変されたフーリンドメインはアミノ酸R65、R69及び／又はQ70において1又は複数のアミノ酸改変を含み、また改変されたフーリンドメインはアミノ酸F105及び／又はF109において1又は複数のアミノ酸改変を含む。特定の実施形態においては、改変されたフーリンドメイン2は、例えば全長R-spondinタンパク質の文脈で、LGR4～6に対して、対応する野生型フーリンドメイン2の結合の80%未満、50%未満、20%未満、又は10%未満の結合親和性を有する。

【0105】

ある実施形態においては、作用モジュールは、R-spondinポリペプチド（例えば、ヒトR-spondin）のフーリンドメイン1又はその機能フラグメントもしくはバリエーションと、R-spondinポリペプチド（例えば、ヒトR-spondin）の改変されていないフーリンドメイン2とを含む。ある実施形態においては、対応する野生型フーリンドメイン2と比較してLGR4～6に対する結合親和性が低下している改変されたフーリンドメイン2は、組織ターゲティングの特異性を増加させるのにより

10

20

30

40

50

望ましいが、特定の実施形態においては、ターゲティングモジュールと組み合わせた改変されていないフューリンドメイン2が、ターゲティングモジュールのない野生型R-spondinよりも組織ターゲティングを向上させて、ある文脈において有用性をもつ。

【0106】

ある実施形態においては、作用モジュールは、例えばR-spondin-1、-2、-3、-4のいずれか、随意にヒトR-spondin-1、-2、-3又は-4よりの、野生型又は改変されたR-spondinフューリンドメイン1を含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、例えばR-spondin-1、-2、-3、-4のいずれか、随意にヒトR-spondin-1、-2、-3又は-4よりの、R-spondinフューリン1ドメインと、野生型又は改変されたR-spondinフューリン2ドメインとを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、例えばR-spondin-1、-2、-3、-4のいずれか、随意にヒトR-spondin-1、-2、-3又は-4よりの、第1のR-spondinフューリン1ドメインと、野生型又は改変された第2のR-spondinフューリン1ドメインとを含む。特定の実施形態においては、改変されたフューリンドメイン2は、例えば全長R-spondinタンパク質の文脈で、対応する野生型フューリンドメイン2の結合に匹敵するLGR4~6に対する結合親和性を有するか、又はLGR4~6に対して、当該対応する野生型フューリンドメイン2の結合の80%未満、50%未満、20%未満、もしくは10%未満の結合親和性を有する。

【0107】

ある実施形態においては、作用モジュールは、ZNR F3及び／又はRNF43に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、ヒトRNF43(hRNF43、NCBI参照配列XP_011523257.1、残基44~198；配列番号43~44)又はヒトZNR F3(hZNR F3；NCBI参照配列NP_001193927.1、残基56~219；配列番号45~46)に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。特定の実施形態においては、作用モジュールは、a)表2Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列、ならびに／もしくはb)表2Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションであり、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントは、これら抗体のいずれかの重鎖可変領域、軽鎖、ナノボディ又はscFvに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、軽鎖、ナノボディ又はscFv配列、例えば配列番号78~154又は165~170のいずれか、を含む。VLは、可変軽鎖を示し、またVHは、可変重鎖配列を示す。

【表 2 - 1】

表 2 A : h R N F 4 3 / Z N R F 3 に対するバインダーのクローン I D 及び C D R 配列

クローン I D	特異性	CDRH1	配列番号	CDRH2	配列番号	CDRH3	配列番号
020S-E06	RNF43	YTFTGYMH	329	GIINPSGGSTSYA	349	CARGRQGVWDYW	393
020S-F06	RNF43	YTFTSYLH	338	GWMNPNSGNTGYA	366	CARGDFWSGYPPYYY YYGMDVW	388
028S-B01	RNF43	YTFTAYMH	327	GIINPNNGRTTYA	345	CARSFGVAGTLDYW	404
028S-E01	RNF43	YTFTSYDIN	336	GVINPGGSDTTYA	354	CARDGYYYGMDVW	379
028S-G01	RNF43	YTFTNYMH	332	GWINPHSGGTNYA	356	CAREDYNWNDGWFDPW	386
028S-H01	RNF43	GTFSNYAIS	318	GWINPNSGGTNYA	358	CAKDSGYCSSTSCYDG GYFDLW	376
028S-B02	RNF43	FTFSSYAMH	312	SAISGSGTYA	372	CARDQGHYDGYEIDY W	383
028S-C02	RNF43	YTFTNYMH	332	GIINPSGGSANYA	348	CARDPVRGISAFDYW	382
024S-A02	RNF43、 ZNRF3	YTFTSYAMH	335	GWINAGNGNTKYS	355	CARDLMVRGGPPFDYW	381
028S-D02	ZNRF3	DSVSSNSAAWY	306	GRTYYRSKWYHDYA	353	CARVVRAVDAFDIW	407
020S-H06	ZNRF3	YTFTSYMH	339	GWMNPNSGNTGYA	366	CARGRVVRGVIISYGM DVW	397
020S-A07	ZNRF3	DTFTGYYIH	307	GGIPIFDAATYA	342	CTRARGQRSGYSYFDL W	409
020S-B07	ZNRF3	GTFTSGIT	321	GWMNPNTGGIKYS	367	CAKSRALKGSYTSW	377
020S-D07	RNF43、 ZNRF3	GTFSNTDIN	317	GGIPIFGTANYA	344	CVGGRSGWIWYFDLW	410
020S-E07	ZNRF3	GTFSNYSLS	319	GIINPRRGSTRYA	347	CARDGLGVDAFDIW	378
020S-F07	RNF43、 ZNRF3	FTFSNYAMG	311	SYISRSSSTIYYA	697	CARRRDGYNWGYW	402
028S-H02	ZNRF3	YTFTNYMH	332	GRIKPNSGNTGYA	351	CARGRRSRGSSSLGYY YYMDVW	395
028S-C03	ZNRF3	YTFSRYFMH	326	GWINPNSGGTRYA	359	CARDQKGKSSSWFRFD PW	384
028S-A04	ZNRF3	YTFTNYKMH	331	GKINPSSGSTSYA	350	CARSGAGMWYFDLW	405
028S-B04	ZNRF3	YTFRRYPMH	325	GIINPSGGSTSYA	349	CARDKVGAIIDYW	380
028S-C04	ZNRF3	YTFTRYMH	334	GIINPSGGSTSYA	349	CARGGSGWLDYW	391

10

20

30

40

【表 2 - 2】

028S -D04	ZNRF3	GTFSSYAIS	320	GRISPNRGGTKYA	352	CARDSWLRCAGWY	385
028S -E04	ZNRF3	FTFNNFGMS	310	SGISASGRNTYYA	373	CARETRHGSDYW	387
028S -H04	ZNRF3	YTFIGYYMH	324	GWVNPKNIGHTGYA	368	CAKDLEHTGYSSGWAG FDYW	375
028S -B06	ZNRF3	YRFTNYMH	322	GWISPNSGATNYA	363	CARGGRTTVTTMAYW	390
028S -G06	ZNRF3	FAFSNFAMI	308	SAISGSGGSTYYA	370	CARLRANYGMDVW	400
028S -B07	ZNRF3	YTFTSYMH	328	GWMNPNSGHAGSA	365	CARGRRSGLSPPAYW	394
028S -H07	ZNRF3	YTFTNYGIS	330	GWISADNGNTNYA	362	CARGRSGNWKFW	396
028S -D08	ZNRF3	YTFTSYMH	339	GWINPNSGNTKYA	360	CARGSNGMDVW	399
028S -E08	ZNRF3	FSFSNYAMS	309	SAISGSGRTTYA	371	CARRTSSFSW	403
028S -F08	ZNRF3	GTFSSYAIS	318	GGIPIFDATNYA	343	CARRQYSGYDTHFDYW	401
028S -A09	ZNRF3	YRFTSYLH	323	GWMNPNSGGTNYA	364	CARGGRSYGYWYFDLW	389
028S -D09	ZNRF3	YTFTRYMH	333	GIINPNSGGSTYA	349	CARGSLGYFDLW	398
028S -E10	ZNRF3	YTFTSYMH	339	GWINPNTGGTKSA	361	CARVLRGSLGFDYW	406
028S -G10	ZNRF3	YTFTSYGVS	337	GIINPRGGSTYA	346	CARYSSSWPFDYW	408
028S -A11	ZNRF3	GTFSGYYMH	316	GWINPNRGGSTYA	357	CARGMYSSSWLRYW	392
SC- 01	RNF43	GFNIKDT	314	DPANGK	340	GGGYGMDY	411
SC- 02	RNF43	GFNIKDD	313	DPENG	341	SRTTALDY	412
NV- 01	ZNRF3	GTFSDY	315	KSKTDGGI	369	AIYYLEAFDV	374

10

20

30

【表 2 - 3】

表 2 A (続き)

クロー ン I D	特異性	CDRL1	配 列 番 号	CDRL2	配 列 番 号	CDRL3	配 列 番 号
020S- E06	RNF43	RSSQSIRTYLN	439	AASTLQS	448	CQQANSFPITF	473
020S- F06	RNF43	RVSQGISSYLN	441	AASTLQS	448	CQQSYGAPLTF	479
028S- B01	RNF43	RSSQSLHSHNGYNYLD	440	DASNLET	451	CMQTLHTPYTF	472
028S- E01	RNF43	KSSQSVLYSSNNKNYLA	414	WASTRES	465	CQQYSDPITF	498
028S- G01	RNF43	RASENIHKYLN	417	AASSLQS	447	CQQGYSTPYTF	477
028S- H01	RNF43	RASQNIYDWLA	426	DASNLET	451	CQQTYSTPFTF	492
028S- B02	RNF43	RSSQSLHSHNGYNYLD	440	LGSYRAS	462	CMQALQTPLTF	468
028S- C02	RNF43	RASQSIRSYLN	428	AASSLQS	447	CLQDYDYPLTF	467
024S- A02	RNF43、 ZNR43	RASQSVSSSYLA	437	GASSRAT	456	CQQYGSSPRTF	494
028S- D02	ZNR43	RASQSVNSRYLA	434	GASSRAT	456	CQQYGSSRLTF	495
020S- H06	ZNR43	RASQSVSSSNLA	436	ATSTRAT	450	CQQYGSSPITF	493
020S- A07	ZNR43	RASQNIIRSWLA	425	DASSLQR	454	CQQSYSTPPTF	487
020S- B07	ZNR43	RAGQSIIRFLN	416	AASSLQS	447	CQQSYSTPYTF	489
020S- D07	RNF43、 ZNR43	RASQSIIRWLA	429	DASSLET	452	CQQAYSFPWTF	475
020S- E07	ZNR43	QASQDISRYLN	415	AASSLQS	447	CQQSYSRPFTF	484
020S- F07	RNF43、 ZNR43	RASQDISNSLN	419	AASTLQS	448	CQQSYSPHPTF	483
028S- H02	ZNR43	RASQFISTYLN	422	DASSLPS	453	CQQSYSTSWTF	490
028S- C03	ZNR43	RSSQSLHSHNGYNYLD	440	LGSNRAS	461	CMQSLEAPLAF	471
028S- A04	ZNR43	RASQDIYRYLN	421	AASSLHS	445	CQQSYTTPITF	491
028S- B04	ZNR43	RASQGISNYLA	424	AASSLQR	446	CQQSYSTPLTF	486
028S- C04	ZNR43	RASQSIISTWLA	432	AASTLQS	448	CQQSYSSPLTF	485

10

20

30

40

【表 2 - 4】

028S-D04	ZNRF3	RASQSI SRWLA	429	AASTLQS	448	CQQSFSTPYTF	478
028S-E04	ZNRF3	TSSQSVLHSSNKNKYLA	443	WASTRAS	464	CQQYHSTPYTF	496
028S-H04	ZNRF3	KSSQSVLYSSNNKNKYLA	414	WASTRES	465	CQQYYSTPLTF	499
028S-B06	ZNRF3	RSSQSLHLSNGYNYLD	440	GASSLQS	455	CMQGTHWPRTF	469
028S-G06	ZNRF3	RASQSISSYLN	431	AASSLQS	447	CQQSYRTPYTF	481
028S-B07	ZNRF3	RASQSVSASLA	435	GASTRAT	457	CHQYFSPPMTF	466
028S-H07	ZNRF3	RASQYIGSYLN	438	AASTLQS	448	CQQSYSPPTF	482
028S-D08	ZNRF3	RSSQSLHLSNGYNYLD	440	KASSLES	458	CMQGTHWPYAF	470
028S-E08	ZNRF3	RASQSINN WLA	427	KASSLES	458	CQQANTFPITF	474
028S-F08	ZNRF3	KSSQSVLYSSNNKNKYLA	414	WASTRES	465	CQQYYSTPPTF	500
028S-A09	ZNRF3	RASQSV DSSYLA	433	AASARAA	444	CQQYYRSPPTF	497
028S-D09	ZNRF3	RASQSISSWLA	430	AASSLQS	447	CQQSYSTPLTF	486
028S-E10	ZNRF3	RASQDISRYLA	420	AASTVES	449	CQQSYRSPYTF	480
028S-G10	ZNRF3	RASQGISNNLN	423	AASTLQS	448	CQQSYSTPTF	488
028S-A11	ZNRF3	RASQGISNYLA	424	AASSLQS	447	CQQGSSFPLTF	476
SC-01	RNF43	RASESVDSYGNSFMH	418	LASNLES	459	QQNNEDPLT	502
SC-02	RNF43	KASQSVRPAVA	413	LASNRHT	460	LQHWNYPYT	501
NV-01	ZNRF3	SGDSLGSYYVH	442	RNKQRPS	463	QTYDWMYSSRV	503

10

20

30

【表 2 - 5】

表 2 B. 配列識別子の記載

配列番号	簡単な説明	配列
78	020S-E06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIRTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPIITFGGGTKVEIK
79	020S-E06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGRQGVWDYWGRTLVTVSS
80	020S-F06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYGAPLITFGGGTKVEIK
81	020S-F06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYLHWVRQAPGQGLEWMGMNPNNGTGYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGDFWSGYPPYYYYYGMVDVWGQGTTV TVSS
82	028S-B01 VL	DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYDASNLETG VPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQTLHTPYTFGGGTKLEIK
83	028S-B01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTAYYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPNGGRTTYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSFGVAGTLDYWGQGLTVTVSS
84	028S-E01 VL	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQYSDPIITFGGQTRLEIK
85	028S-E01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGVINPGSDTTYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDGYYYGMVDVWGQGTTVTVSS
86	028S-G01 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIHKYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYSTPYTFGGGTKLEIK
87	028S-G01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPHSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREYNWNGWFDPPWGGQGLTVTVSS
88	028S-H01 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYDLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSTPFTFGPGTKVDIK
89	028S-H01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAKDSGYCSSTSCYDGGYFDLWGRGLTV VSS
90	028S-B02 VL	DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLPTFGGGTKVEIK
91	028S-B02 VH	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSYAMHVVRQAPGKLEWVSAISGSGTYYADSV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDAVYYCARDQGHYDYEIDYWGQGLTVTVSS
92	028S-C02 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYDYPLTFGGGTKVEIK
93	028S-C02 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSANYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDPVRGISAFDYWGQGLTVTVSS
94	024S-D04 VHH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSVINSGGGSTSYAE SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCARGTYYSYSGSYYPALYYGMDYWGKGTQV TVSS
95	024S-A02 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRTFGGQTKVEIK
96	024S-A02 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMHVVRQAPGQRLWGMWINAGNGNTKYSQ TFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDLMVRGGPPFDYWGQGLTVTVSS
97	028S-D02 VL	ETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVNSRYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDR LTGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRLTFGGGTKVEIK
98	028S-D02 VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWYWIQSPSRGLEWLGRYYRSKWYHD

10

20

30

40

【表 2 - 6】

		YAVSVKSRITINADTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARVVRVDAFDIWGQGTMTVTVSS
99	020S-H06 VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYATSTRATGIPAR FSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK
100	020S-H06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGRVVRGVIISYGMVDVWGQGTITVTVSS
101	020S-A07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNIIRSLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQRGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGGGTKLEIK
102	020S-A07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGDTFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIDFAATYAAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRARGQRSGYSYFDLWGRGTLTVTVSS
103	020S-B07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRAGQSIIRFLNWIYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGGTKEIK
104	020S-B07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGGTFTSGITWVRQAPGQGLEWMGWMNPNTGGIKYSQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAKSRALKGSYTSWGQGTITVTVSS
105	020S-D07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIIRSLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLETGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYSFPWTFGGGTKEIK
106	020S-D07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSNTDINWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCVGGRSGWIWYFDLWGRGTLTVTVSS
107	020S-E07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDISRYLNWIYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSRPFTFGPGTKVDIK
108	020S-E07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGGTFSNYSLSWVRQAPGQGLEWMGIINPRRGSTRYAAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDGLGVDADFIDWGQGTMTVTVSS
109	020S-F07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNSLNWIYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPIHFGGGTKVEIK
110	020S-F07 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKLEWVSYISRSSSTIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARRRDGYNWGYWGQGTITVTVSS
111	028S-H02 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQFISTYLNWIYQQKPGKAPKLLIYDASSLPSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTSWTFGGGTKEIK
112	028S-H02 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYMHVVRQAPGQGLEWMGRIKPNNGNTGYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARRRRSGSSSLGYYYYYMDVWGKGTITV TVSS
113	028S-C03 VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSGYNLYDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSRASG VPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSLAPLAFGGGTKEIK
114	028S-C03 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFSRYFMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTRYAQ NLQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDQKKGSSSWFRFDPWGQGTITVTVSS
115	028S-A04 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIYRYLNWIYQQKPGKAPKLLIFAASSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPITFGGGTKVEIK
116	028S-A04 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYKMHVVRQAPGQGLEWMGKINPSSGSTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGAGMWYFDLWGRGTLTVTVSS
117	028S-B04 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQRGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIK
118	028S-B04 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFRYPMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSSGSTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDKVGAIDYWGQGTITVTVSS
119	028S-C04 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPLTFGGGTKEIK
120	028S-C04 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTTRYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSSGSTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGSGWLDYWGQGTITVTVSS
121	028S-D04 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIIRSLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRF

10

20

30

40

【表 2 - 7】

		SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSFSTPYTFGQGTKVEIK	
122	028S-D04 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRISPNRGGTKYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDSWLRGAWGYWGQGLTVTVSS	
123	028S-E04 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCTSSQSVLHSSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYHSTPYTFGQGTKVEIK	
124	028S-E04 VH	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNFGMSWVRQAPGKGLEWVSGISASGRNTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDRAVYYCARETRHGSDYWGQGLTVTVSS	
125	028S-H04 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPLTFGGGKTKVEIK	10
126	028S-H04 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIGYYMHVVRQAPGQGLEWLGWVNPKNIGHTGYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKDLEHTGYSSGWAGFDYWGQGLTVTVSS	
127	028S-B06 VL	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYGASSLQSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTHWPRTFGQGTKVDIK	
128	028S-B06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTNYYMHVVRQAPGQGLEWMGWISPNSGATNYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGRTTVTTMAYWGQGLTVTVSS	
129	028S-G06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYRTPYTFGQGTKLEIK	
130	028S-G06 VH	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNFAMIVVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLRANYGMDVWGQGTTVTVSS	20
131	028S-B07 VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSASLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF SGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCHQYFSPPMTFGQGTRLEIK	
132	028S-B07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYYMHVVRQAPGQGLEWMGMNPNSGHAGSAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGRRSGLSPPAYWGQGLTVTVSS	
133	028S-H07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQYIGSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSPPTFGQGTKVEIK	
134	028S-H07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISADNGNTNYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGRSGNWKFWGQGLTVTVSS	
135	028S-D08 VL	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYKASSLESG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTHWPYAFGQGTRLEIK	30
136	028S-D08 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLELMGWINPNSGNTKYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSNGMDVWGQGTTVTVSS	
137	028S-E08 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIINNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAQNTFPITFGQGTRLEIK	
138	028S-E08 VH	EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGRTTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTSSFSLWGQGLTVTVSS	
139	028S-F08 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPPTFGQGTKLEIK	
140	028S-F08 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASAGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIDATNYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRQYSGYDTHFDYWGQGLTVTVSS	40
141	028S-A09 VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPGQAPRLLIYAASARAAGIPAR FSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYYRSPPTFGQGTRLEIK	
142	028S-A09 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTSYLHWVRQAPGQGLEWMGMNPKSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGRSYGYWYFDLWGRGLTVTVSS	
143	028S-D09 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGKTKVEIK	
144	028S-D09 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRHYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQ	

【表 2 - 8】

		KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGSLGYFDLWGRGTLTVSS
145	028S-E10 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISRYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASVESGVPSRF SGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYRSPYTFGGGTKLEIK
146	028S-E10 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNTGGTKSAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARVLRGSLGFDYWGQGTLLTVSS
147	028S-G10 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPTFGGGTKVEIK
148	028S-G10 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYGVSWVRQAPGQGLEWMGIINPRGGSTSYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARYSSSWPFDYWGQGTLLTVSS
149	028S-A11 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQGSSFPLTFGGGTKVDIK
150	028S-A11 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGGTFSGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNRGSTSYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGMYSSSWLRYWGQGTLLTVSS
165	SC-01 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSYGNFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV PDRFSGSGSGTDFTLTITSLQAEDVAVYYCQQNNEDPLTFGGGTKVEIK
166	SC-01 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGKANYDP KFQGRVTMTRDTSTSTFYMESSLRSEDVAVYYCALGGGYYGMDYWGQGTLLTVSS
167	SC-02 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVITITCKASQSVRPAVWYQQKPGQSPKALIYLASNRRHTGVPDRF TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNPYPYTFGGGTKLEIK
168	SC-02 VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYIHWVKRPEQGLEWIGWIDPENGDTKYAS KFPKGATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTASRTTALDYWGP GTLLTVSS
169	NV-01 VL	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDSLGSYYVHWYQQKPGQAPVLVITYRNKQRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYDWMYSSRVFGGGTKLTVL
170	NV-01 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPGKLEWVGRIKSKTDGGITEY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDVAVYYCARATYYLEAFDVWGQGTLLTVSS

10

20

【表 2 - 9】

表 2 C : E 3 リガーゼバインダーの結合データ

クローン I D	特異性	Octet KD (M)	Octet KD (M)
020S-E06	RNF43	未試験	未試験
020S-F06	RNF43	未試験	未試験
028S-B01	RNF43	未試験	未試験
028S-E01	RNF43	NB	NB
028S-G01	RNF43	未試験	未試験
028S-H01	RNF43	NB	NB
028S-B02	RNF43	NB	NB
028S-C02	RNF43	NB	NB
024S-A02	RNF43、ZNR3	1.01E-05	*
028S-D02	ZNR3	3.32E-06	*
020S-H06	ZNR3	NB	NB
020S-A07	ZNR3	NB	NB
020S-B07	ZNR3	NB	NB
020S-D07	RNF43、ZNR3	NB	NB
020S-E07	ZNR3	NB	NB
020S-F07	RNF43、ZNR3	NB	NB
028S-H02	ZNR3	2.63E-06	*
028S-C03	ZNR3	2.51E-08	***
028S-A04	ZNR3	3.62E-08	***
028S-B04	ZNR3	2.56E-07	**
028S-C04	ZNR3	1.64E-07	**
028S-D04	ZNR3	8.74E-07	**
028S-E04	ZNR3	9.53E-08	***
028S-H04	ZNR3	4.80E-08	***
028S-B06	ZNR3	7.64E-07	**
028S-G06	ZNR3	1.09E-07	**
028S-B07	ZNR3	6.54E-08	***
028S-H07	ZNR3	NB	NB
028S-D08	ZNR3	1.39E-06	*
028S-E08	ZNR3	3.90E-06	*
028S-F08	ZNR3	1.04E-06	*
028S-A09	ZNR3	1.25E-05	*
028S-D09	ZNR3	3.54E-07	**
028S-E10	ZNR3	4.16E-06	*
028S-G10	ZNR3	6.84E-07	**
028S-A11	ZNR3	2.03E-07	**
SC-01	RNF43	未試験	未試験
SC-02	RNF43	未試験	未試験
NV-01	ZNR3	未試験	未試験

10

20

30

40

*は $KD \geq 1 \mu M$ を示し、**は $1 \mu M > KD \geq 100 nM$ を示し、***は $100 nM > KD$ を示し、

NBは結合なし (Non Binding) を示す。

結合特異性は、ELISAで求めた。

【0108】

50

ターゲティングモジュール

特定の組織内で特異的な細胞型及び細胞は、細胞表面受容体等である1又は複数の細胞又は組織特異性の表面分子を含み得る。本明細書において用いる場合、特定の細胞又は組織型上に、1もしくは複数の他の細胞もしくは組織型又はその他の細胞もしくは組織型と比較してより大量の分子が存在している場合、その分子を、細胞又は組織特異的であるという。ある実施形態においては、より大量とは、上記1もしくは複数の他の細胞もしくは組織型又はその他の細胞もしくは組織型での量と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、又は少なくとも100倍である。特定の実施形態においては、細胞特異性表面分子は、標的の器官、組織又は細胞型において、例えば疾患又は障害を治療又は予防するために、Wntシグナル伝達を増強することが望まれる例えば器官、組織又は細胞型において、例えば1又は複数の他の標的でない器官、組織又は細胞型と比較して、増加又は増強した発現を有する。ある実施形態においては、細胞特異性表面分子は、1又は複数の他の器官、組織又は細胞型とそれぞれ比較して、標的の器官、組織又は細胞型の表面で優先的に発現する。例えば、特定の実施形態においては、細胞表面受容体は、1以上の、5以上の、全ての他の器官、組織もしくは細胞において発現するよりも、又は全ての他の器官、組織もしくは細胞それぞれの平均よりも、標的の器官、組織又は細胞において、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、又は少なくとも1000倍高いレベルで発現されるのであれば、組織特異性又は細胞特異性の細胞表面分子であると考えられる。ある実施形態においては、組織特異性又は細胞特異性の細胞表面分子は、細胞表面受容体であり、例えば、ターゲティングモジュールが結合することができる細胞表面膜及び細胞外領域の範囲内に位置する領域を含むポリペプチド受容体である。様々な実施形態においては、本明細書に記載する方法は、標的組織もしくは標的組織を含む組織のサブセットにおいてのみ発現する細胞表面分子を特異的に標的にすることによって、又は、全ての、大多数のもしくは相当な数の他の組織と比較して標的組織においてより高いレベルの発現、例えば少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、又は少なくとも20の他の組織におけるよりも、標的組織においてより高い発現、を有する細胞表面分子を特異的に標的にすることによって、実行され得る。

【0109】

特定の実施形態においては、ターゲティングモジュールは、関心の標的の細胞又は組織型、すなわちWntシグナル伝達活性が増強又は増加することが望まれる細胞又は組織型、において発現した組織特異性表面分子に結合する。各組織特異性表面分子に結合するターゲティングモジュールは、組織又は細胞特異性受容体の、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、ペプチド、天然リガンド、又はそれらの誘導体及び合成小分子等であり得るがこれに限定されない。

【0110】

ターゲティングモジュールが結合した標的組織は、例えば任意の哺乳動物の組織又は細胞型である、任意の組織であり得る。ある実施形態においては、標的組織は、任意の器官に存在し得る。ある実施形態においては、標的組織は、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛及び前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、角膜組織、心臓組織又は肺組織であり、またターゲティングモジュールは、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛及び前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、角膜組織、心臓組織又は肺組織のそれぞれで優先的に発現した組織特異性細胞表面分子（例えば、細胞表面受容体）に結合する。

【0111】

ターゲティングモジュールは、任意の組織、器官、又は例えばヒト等の哺乳動物を含めるがこれに限定されない動物、の中の例えば任意の細胞である、任意の細胞型に結合し得

る。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、例えば標的組織と結合した特異的な細胞型である、特異的な細胞型に結合する。例えば、肝臓組織においては、ターゲティングモジュールは、肝細胞、肝細胞の前駆体及び幹細胞、胆道細胞、ならびに／又は内皮細胞もしくは他の血管細胞に結合し得る。例えば、骨組織においては、ターゲティングモジュールは、骨芽細胞、骨芽細胞の前駆体、間葉系幹細胞、骨を生じる幹細胞及び前駆細胞、軟骨細胞ならびに／又は骨組織に存在する他の細胞に結合し得る。本明細書に記載する組織を含むがこれに限定されない様々な組織に存在する細胞型は、当技術で公知であり、また様々な実施形態においては、本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子は、それらのいずれかに結合し得る。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、肝臓組織又は肝細胞に結合する。

10

【0112】

アシアロ糖蛋白受容体(ASGPR)は、ASGR1及びASGR2から構成される(例えば、Stockert, Morell and Ashwell, 1991, Targeted Diagnostics and Therapy 4:41~64により概説される)。この受容体は、露出した末端ガラクトース残基又はN-アセチルガラクトサミン残基を伴う糖タンパク質のエンドサイトーシス及びリソソーム分解を介在することによって血清糖タンパク質の恒常性に重要な役割を果たす膜貫通タンパク質である。すなわち、AGPRの天然リガンド及び合成リガンドは、ガラクトシル化したコリンエステラーゼ、ガラクトース(Gal)及びN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、例えばGalNAc末端の糖タンパク質等のGalNAc含有分子、ならびにモノー、オリゴ

20

又はポリ-サッカライドを含有する分子又はナノ粒子を含むがこれに限定されない(例えば、D'Souza and Devarajan 2015, Journal of Controlled Release, 203:126~139により概説される)。

【0113】

SLC10ファミリーは、ナトリウム依存的な様式で、胆汁酸、硫酸化溶液、及び他の生体異物を輸送する。その原型メンバー(founding member)、SLC10A1(NTCP)及びSLC10A2(ASBT)は、胆汁酸の腸肝循環を維持する働きをする。SLC10Aの天然リガンド及び合成リガンドの例としては、コール酸塩、Na(+)/胆汁酸、Na(+)/タウロコール酸塩、及びB型肝炎ウイルスのpreS1

30

ドメイン及びそのフラグメント又はバリエーションが挙げられるがこれに限定されない(例えば、Yan et al., 2012 eLife, 1:e00049により報告された)。

【0114】

トランスフェリン受容体2(TFR2)は、トランスフェリン受容体1(TFR1)、二鉄トランスフェリン(Fe₂TF)の受容体介在性のエンドサイトーシスを介して細胞に鉄を送達するタンパク質、の相同体である。またTFR2はFe₂TFに結合するが、全身的な鉄恒常性の調節において主に機能するようである(例えば、Worthen and Enns, 2014, Frontiers in Pharmacology 5:34により概説される)。TFR2の天然リガンド及び合成リガンド及び結合の相手方の例としては、例えば二鉄トランスフェリン等のトランスフェリン、ならびにヘモクロマトーシス(HFE)タンパク質及びそのフラグメント及びバリエーションを含むが、これに限定されない。

40

【0115】

副甲状腺ホルモン(PTH)の1型受容体(PTH1R)及びPTH関連ペプチド(PTHrP)は、骨及び腎臓において高度に発現する(例えば、Mannstadt, Juppner, and Gardella, 1999, American Journal of Physiology 277:F665-F675により概説される)。副甲状腺ホルモン受容体1(PTH1R)の天然リガンド及び合成リガンドは、PTH、PTHrPならびにそのフラグメント及びバリエーションを含むがこれに限定されない。

50

【0116】

Ly6/P LAURドメイン含有タンパク質3 (LYPD3) は、例えば口腔粘膜、皮膚及び食道等である組織に存在する重層扁平上皮において非常に特異的な発現を呈するGPIアンカー型タンパク質である。LYPD3発現はまた、創傷治癒中の遊走ケラチノサイトのみならず種々のがんにおいて発現上昇が見られた (例えば Jacobsen, Kriegbaum, Santoni-Rugiu and Ploug, 2014, World Journal of Clinical Oncology, 5 (4): 621-32により概説される)。LYPD3発現は報告されていたが、その正確な機能は不明なままであり、これはLYPD3遺伝子を欠いている動物が、生存可能で、繁殖性であり、また扁平上皮の発育に明らかな欠陥がないからである。LYPD3の結合の相手方として、様々な分子が特定されてきた。ラミニン1、ラミニン5及びガレクチン-3はLYPD3と結合して、細胞遊走を促進する (Paret, Bourouba, Beer, Miyazaki, Schnolzer, Fiedler and Zoller. International Journal of Cancer. 2005 Jul 10; 115 (5): 724-33)。Anterior gradient 2、AGR2は、LYPD3と相互作用して、膵管腺がん (PDAC) においてがんの成長、転移及び治療抵抗性を促進する (Arumugam, Deng, Bover, Wang, Logsdon and Ramachandran. Molecular Cancer Therapeutics. 2015 Apr; 14 (4): 941-51)。LYPD3は、限局したラミニン332の分解を介してがん細胞の運動性を促進する、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン及びマトリックスメタロプロテアーゼ14 (MMP14) との複合体を低酸素状態下で形成する (Ngora, Galli, Miyazaki and Zoller. Neoplasia. 2012 Feb; 14 (2): 95-107)。

10

20

【0117】

デスモグレイン3 (DSG3) は、タンパク質のカドヘリン細胞接着分子スーパーファミリーのメンバーであるカルシウム結合膜貫通糖タンパク質をコードする。DSG3は、上皮及び粘膜における細胞間接着に関する特別な構造である接着斑において発現する。DSG3は、DSG3細胞間相互作用に必要なCa²⁺結合部位を含有する5つの細胞外カドヘリンドメイン (ECD) を有する (例えば、Thomason, Scothern, McHarg and Garrod, 2010, Biochemical Journal, 429 (3): 419-433により概説される)。DSG3細胞間相互作用は、それらのN-末端近傍の同種親和性のトランス相互作用が介在する。動物におけるDSG3の喪失は、口腔粘膜の非常に深刻なびらん及び離乳 (weaning) 時の脱毛を引き起こすものであり、この遺伝子が、これら組織における上皮細胞の完全性にとってどれほど重要であるかを示している。単一分子の原子間力顕微鏡実験により、細胞外カドヘリンドメインを介した同種親和性トランスDSG3結合が示されている (Heupel, Zillikens, Drenckhahn and Waschke. Journal of Immunology. August 1, 2008, 181 (3) 1825-1834)。

30

【0118】

様々な実施形態においては、組織特異性表面分子は、組織特異性細胞表面受容体である。肝臓に関しては、これらは、ASGR1、ASGR2、TFR2、SLC10A1等を含むがこれに限定されない。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、ASGR1、ASGR2、TFR2、SLC10A1、LYPD3又はDSG3に結合する、天然リガンド、もしくはその機能バリエーションもしくはフラグメント、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである。骨又は腎臓に関しては、こうした組織特異性細胞表面受容体は、副甲状腺ホルモン受容体1 (PTH1R) 等を含むがこれに限定されない。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、PTH1Rに結合する、天然リガンド、もしくはその機能バリエーションもしくはフラグメント、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである。口腔粘膜に関しては、こうした組織特異性細胞表面受容体は

40

50

、LYPD3及びDSG3を含むがこれに限定されない。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、LYPD3又はDSG3に結合する、天然リガンド、もしくはその機能バリエーションもしくはフラグメント、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである。

【0119】

特定の実施形態においては、ターゲティングモジュールは、ヒトASGR1 (hASGR1; NCBI 参照配列 NP_001662. 1、残基 62～291; 配列番号 35～36)、ヒトASGR2 (hASGR2; NCBI 参照配列 NP_550436. 1、残基 66～292; 配列番号 37～38)、カニクイザルASGR1 (cynoASGR1、配列 ID XP_005582755. 1、残基 62～291; 配列番号 39～40)、又はカニクイザルASGR2 (cynoASGR2; 配列番号 41～42) に結合する。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、表3Aに列記した抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列、ならびに／もしくは表3Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列を含む、抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを含むものであり、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントは、これら抗体のいずれかの重鎖可変領域、軽鎖、ナノボディ又はscFvに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、軽鎖、ナノボディ又はscFv配列を含み、例えば配列番号47～77、151～154、171～179、180～185又は274～305のいずれかである (例えば、表3B又は3Cを参照)。

10

20

【表 3 - 1】

表 3 A : h A S G R 1 / 2 に対するバインダーのクローン I D 及び C D R 配列

クロー ン I D	特異性	CDRH1	配 列 番 号	CDRH2	配 列 番 号	CDRH3	配 列 番 号
024S- D03	ASGR1	DSVSSNSAAWN	50 5	GRTYYRSKWYNDYA	55 1	CARWNHEEHYFDYW	589
024S- E03	ASGR1	ASVSSNSAAWN	50 4	GRTYYRSKWYNDYA	55 1	CARWNHEEHYFDYW	589
024S- A04	ASGR1	DSVSSNSVAWN	50 5	GRTYYRSKWYYDYA	55 2	CASWTRGAFDIW	594
020S- A05	ASGR2	GTFSSYAIS	51 7	GGIIPIFGTANYA	54 4	CAVSDGYDLDYW	596
020S- C05	ASGR2	GTFSSYAIS	51 7	GGIIPIFGTANYA	54 4	CASFGVGAPDYW	591
020S- G06	ASGR2	YTFTSYGIS	53 3	GWISAYNGNTNYA	56 1	CASAGGGYW	590
020S- A06	ASGR2	YTFTGYHMH	53 0	GGIIPVFGAPNYA	54 6	CARDGGYGMDVW	576
020S- B06	ASGR2	YTFTGYMH	53 1	GIINPSGGGTSYA	54 8	CARDTGATAEYFQHW	580
020S- C06	ASGR2	YSFTGNMYH	52 0	GGIIPMFGTVKYA	54 5	CAKDRGYRDFDLW	570
020S- D06	ASGR2	FTFSSYAMS	50 8	SYISSYNSHTNDA	56 8	CARWAVAAGGQYYMDVW	588
020S- C07	ASGR2	YTFSNYYMH	52 5	GWINPKSGGTKYA	55 9	CARDRGITMVRGVMDYW	579
028S- H09	ASGR2	YTFTTYMH	53 5	GWINPNGGGTNYA	56 0	CAKDRTAMAPEGAFDIW	571
028S- C11	ASGR2	YTFSDYYVH	52 4	GIINPRNGRTSYA	54 7	CARDHLYGMDVW	577
028S- D11	ASGR2	FTVSSNYMS	51 4	SAISGSGGSTYYA	56 5	CAKDSPIVRRGERGRYYG MDVW	572
028S- G11	ASGR2	YTFTDYNMH	52 7	GWMNPNTGNTAYA	56 2	CARDKNYYGMDVW	578
020S- H05	ASGR2	HTFSSYAMG	51 8	AAISQSGYVRYA	53 6	CNARWGAGSLFASW	599
Abv- 3D11	ASGR2	GFSFNTY	51 5	RSKSNNYA	56 4	PRYDYWYFDV	605
Abv- 10B8	ASGR2	GFTFSSY	51 6	SSGGDY	56 7	EGTGGMDY	604
RO-01	ASGR1	GFTFSSY	516	SGSGGS	566	DFSSRRWYLEY	603
RO-02	ASGR1	FTFSSYAMS	50 9	AISGSGGSTYYA	53 8	CAKSWYLPGRGFDYW	575
RO-03	ASGR1	FTFSSYAMS	50 9	AISGSGGSTYYA	53 8	CAKSSFTFGRYFDYW	574
RO-04	ASGR1	FTFSSYAMS	50	AISGSGGSTYYA	53	CAKSSFSYLRAFIDYW	573

10

20

30

40

【表 3 - 2】

			9		8		
LP1-1F8	ASGR1	FTFSTYTMS	511	ATISSIGVNTYYP	541	CARHVDYYDGISFDYW	583
LP1-1N15	ASGR1	YTFTDYMMN	529	GRVIPSNGGTNYN	554	CARGMDYW	582
LP1-1P13	ASGR1	YSFTDYFMN	519	GRFNPFNGQTFYN	550	CARRGRYDVYYVLDYW	586
LP1-1P5	ASGR1	YTFLTYWMN	523	GQIFPATGITYYS	549	CARRRAYHSNFFDYW	587
LP1-2E12	ASGR1	YSITSGYYWN	522	GSIGYDDTNHYN	557	CAGDYPFAFW	569
LP1-2I13	ASGR1	FTFSDYGMH	507	AYISSGSSTIYYA	542	CSRKGGFGDYEKSYAMDY W	600
LP1-2I22	ASGR1	YSFTGYFMN	521	GRFNPFNGQTFYN	550	CARRGRYDVYYALDYW	585
LP1-3A24	ASGR1	YTFTDYIIN	528	GRVIPSNGGSNYN	553	CATQLGRW	595
LP1-3E20	ASGR1	YTFTSYWIH	534	GYINPSSGYAEYN	563	CARESYYSFDYTMDYW	581
LP1-6H3	ASGR1	YTFSRFDMH	526	GVIYPGNGDTSYN	558	CASSYYGNPW	593
LP1-7B13	ASGR1	FTFTDYMMN	512	GRVNPSNDTRYN	556	CTRWFYFDYW	601
LP1-7I20	ASGR1	FTFTDYMS	513	ALIRNKANGYTTEYS	539	CAVTYGAYW	597
LP1-8M24	ASGR1	YTFTNYGIN	532	GEIFPRSDNTFYN	543	CARKGRDYGTSHYFDYW	584
LP1-9C3	ASGR1	FSLSTSYMGVS	506	AHIFWDDDKRYN	537	CGGPYYPFTYW	598
LP1-9M16	ASGR1	YTFTDYMMN	529	GRVNPNGGSNYN	555	CASRNFDVW	592
LP1-10C22	ASGR1	FTFSSYGMS	510	ASISSGGSYTYYP	540	CVRHEEYGKSGFAYW	602

10

20

30

【表 3 - 3】

表 3 A (続き)

クロー ンID	特異性	CDRL1	配列 番号	CDRL2	配列 番号	CDRL3	配列 番号
024S- D03	ASGR1	RASQSVGSYLA	625	DATNRAT	644	CQHRRTF	679
024S- E03	ASGR1	RASQSVGSYLA	625	DATNRAT	644	CQHRRTF	679
024S- A04	ASGR1	RASQSVGSYLA	625	DATNRAT	644	CQHRRTF	679
020S- A05	ASGR2	RASQSVGSYLA	625	DASNRAT	643	CQQRSNWPLTF	685
020S- C05	ASGR2	RASQSVSSYLA	626	DASNRAT	643	CQQRSNWPVTF	686
020S- G06	ASGR2	RSSQSLLHSDGHNYLQ	630	LGSYRAS	651	CMQATHWPPTF	670
020S- A06	ASGR2	RASQNIYTYLN	618	AASSLQS	638	CQQYNYPIPTF	692
020S- B06	ASGR2	RASQGISSWLA	617	AASSLQS	638	CQQAYDFPLTF	682
020S- C06	ASGR2	RASQSISSWLA	623	AATTLQS	640	CQQSYSTPLTF	688
020S- D06	ASGR2	RASQGIATWLA	616	DASNLQS	641	CQQANSFPVTF	681
020S- C07	ASGR2	RASQISRYLN	622	DASNLRS	642	CQQGYTIPITF	684
028S- H09	ASGR2	RASQSISSYLN	624	QASNKDT	655	CQQGYSTPLTF	683
028S- C11	ASGR2	RASQSINNYLN	619	AASSLQS	638	CQQANSFPLTF	680
028S- D11	ASGR2	RSSQSLLHSNGYNYLD	631	AASNLQS	636	CMQALQTPLTF	669
028S- G11	ASGR2	RASQISNWLA	620	AASRLQS	637	CQQTYAIPITF	689
020S- H05	ASGR2						
Abv- 3D11	ASGR2	KSSQSLLSDGKTYLN	611	LVSCLDS	652	WQGTHFPYT	696
Abv- 10B8	ASGR2	SASSSVSSFLH	634	RTSNLAS	658	QQWSGYPYT	695
RO-01	ASGR1	QGDSLRSYYAS	613	GKNNRPS	648	NSLERIGYLSYV	694
RO-02	ASGR1	QGDSLRSYYAS	613	GKNNRPS	648	CNSRLRSGKMVVF	673
RO-03	ASGR1	QGDSLRSYYAS	613	GKNNRPS	648	CNSRKSSSKNVVF	672
RO-04	ASGR1	QGDSLRSYYAS	613	GRNNRPS	649	CNSRDRRGYSVF	671
LP1-1F8	ASGR1	KSSQSLENSRTRKNYLA	610	WASTRES	661	CKQSYLLTF	663
LP1- 1N15	ASGR1	KASQDINSHLS	606	RANRLVD	657	CLQYDEFPTF	667
LP1-	ASGR1	RTSENIYSNLA	632	AATNLAD	639	CQHFVGSTWTF	674

10

20

30

40

【表 3 - 4】

1P13							
LP1-1P5	ASGR1	KASQNVGTNVA	609	SASYRYS	659	CQQYNSYPLTF	691
LP1-2E12	ASGR1	RSSQSLANSYGNTYLS	629	GISNRFS	647	CLQGTHQPLTF	665
LP1-2I13	ASGR1	RASENIYSYLV	615	NAKTLAE	653	CQHHYGTWTF	678
LP1-2I22	ASGR1	RASENIYSNLA	614	GATNLAD	646	CQHFWGTTWTF	676
LP1-3A24	ASGR1	KASQNVGSNVA	608	SSSYRYS	660	CQQYNSFPLTF	690
LP1-3E20	ASGR1	KASQDINSYLS	607	RANRLVD	657	CLQYDDLWTF	666
LP1-6H3	ASGR1	KSSQSLLSDGKTYLN	612	LVSKLDS	652	CWQGTHTFPHTF	693
LP1-7B13	ASGR1	RASQSI SNYLH	621	FASQSI	645	CQQSNSWPPLTF	687
LP1-7I20	ASGR1	RTSENIYSYLA	633	NAKTLAK	654	CQHHYGTPTYTF	677
LP1-8M24	ASGR1	RISENIYSNLA	627	AAINLAD	635	CQHFWGTPPTF	675
LP1-9C3	ASGR1	RSSQSLANSYGNTYLS	629	GISNRFS	647	CLQATHQPWTF	664
LP1-9M16	ASGR1	KASQDINSYLS	607	RANRLAD	656	CLQYDEFPLTF	668
LP1-10C22	ASGR1	RSSQGIVHSNGNIYLE	628	KVSNRFS	650	CFQGSHVPPTF	662

10

20

【表 3 - 5】

表 3 B. 配列識別子の記載 (ASGR ターゲティングモジュール)

配列番号	簡単な説明	配列
47	024S-D03 VL	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVGSYLAWYQQRPGQAPRPLIYDATNRTGIPTRFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYY CQHRRTFGRGTKLEIK
48	024S-D03 VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWNRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDY AVSVKSRMTINPDTSRNQF SLQLNSVTLEDTAVYYCARWNHEEHYFDYWGQGLTVTVSS
49	024S-E03 VL	DVVMTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVGSYLAWYQQRPGQAPRPLIYDATNRTGIPTRFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAT YYCQHRRTFGRGTKLEIK
50	024S-E03 VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGASVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDY AVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPGDTAVYYCARWNHEEHYFDYWGQGLTVTVSS
51	024S-A04 VL	DIQLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVGSYLAWYQQRPGQAPRPLIYDATNRTGIPTRFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDF ATYYCQHRRTFGRGTKLEIK
52	024S-A04 VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSVAWNWNRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDY AVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCASWTRGAFDIWGQGMVTVSS
53	020S-A05 VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGSYLAWYQQKPGAPRLLIYDASNRTGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK
54	020S-A05 VH	EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAVSDGYDLDYWGQGLTVTVSS
55	020S-C05 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGAPRLLIHDASNRTGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQQRSNWVPTFGGGTKVEIK
56	020S-C05 VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCASFGVGAPDYWGQGLTVTVSS
57	020S-G06 VL	DVVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSDGHNYLQWYLQKPGQSPQLLILLGSYRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGYYCMQATHWPPTFGQGTKVEIK
58	020S-G06 VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQK LQGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCASAGGGYWGQGLTVTVSS
59	020S-A06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNIYTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQYYNYPITFGQGTREIK
60	020S-A06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTGYHMHVVRQAPGQGLEWVGGIIPVFGAPNYAQK FQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARDGGYGMVWGQGMVTVSS

10

20

30

40

【表 3 - 6】

61	020S-B06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITISLQPED FATYYCQQAYDFPLTFGGGKVEIK
62	020S-B06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWRQAPGGGLEWMGIINPSGGGTSYAQK FQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARDTGATAEYFQHWGQGLTVTVSS
63	020S-C06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAATTLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITISLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGGGKLEIK
64	020S-C06 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTGNMHVWRQAPGGGLEWMGGIIPMFGTVKYAQK FQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAKDRGYRFDLWGRGTLTVSS
65	020S-D06 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIATWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITISLQPEDFA TYYCQQANSFPVTFPGGTKVDIK
66	020S-D06 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSYSYSSNHTNDADS VKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWAVAAGGQYYMDVWGKGTITVTVSS
67	020S-C07 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLRSQVPSRFS GSGSGTDFLTITISLQPEDFA TYYCQQGYTIPITFGGKTKVEIK
68	020S-C07 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSNYYMHVWRQAPGGGLEWMGWINPKSGGTYAQA FQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARDRGITMVRGVMQYWGQGLTVTVSS
69	028S-H09 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYQASNKDTGVPSSRFS GSGSGTDFLTITISLQPEDFAT YYCQQGYSTPLTFGGGKVEIK
70	028S-H09 VH	QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKASGYTFTTYMHVWRQAPGGGLEWMGWINPNGGTYAQA FQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAKDRTAMAPGAFDIWGQGMVTVSS
71	028S-C11 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITISLQPEDFATY YCQQANSFPLTFGGGKVEIK
72	028S-C11 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSYVYHVWRQAPGGGLEWMGIINPRNGRTSYAQR FQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARDHLYGMDVWGQGTITVTVSS
73	028S-D11 VL	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLHSGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYAASNLQSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK
74	028S-D11 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSATSGGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDSPIVRRGERGRYYGMDVWGQGTITVTVSS
75	028S-G11 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNLWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTITISLQPEDFATY YCQQTYAIPPLTFGGGKVEIK
76	028S-G11 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMHVWRQAPGGGLEWMGMNPNTGNTAYQA FQGRVTMTRDTSTSTVYM

10

20

30

40

【表 3 - 7】

		ELSSLRSED TAVYYCARDKNYYGMDVWGQGT TTVTSS
77	020S-H05 nAb	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASGHTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAATISQSGYVRYADS VKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLKPDDTAVYYCNARWGAGSLFASWGQGTQVTSS
151	Abv-3D11 VL	EVVMTQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GVYYCWQGTHFPYTFGGGTGLEIK
152	Abv-3D11 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFSFNTYAMNWVRQAPKGLEWVARIRSKSNNTATYYA DSVKDRFTISRDDSESMLEYL QMNNLKTEDTAMYYCVRPRYDYWFVWGTTVTSS
153	Abv-10B8 VL	ENVLTQSPATMAASLGQKVTMTCSASSSVSSFLHWYQQKSGASPKPLIHRTSNLASGVPARF SGSGSGTSYSLTISSEAE DATYYCQWWSGYPYTFGGGTGLEIK
154	Abv-10B8 VH	DVKLVESGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPKRLIEWVAYISSGGDIYYVD VKGRFTISRDNARNTLYL QMSSLKSED TAVYYCTREGTGGMDYWGQGTSTVSS
171	RO-01v VL	DIETQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGNRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAE DEADYYCNSLERIGYLSYVFGGTGLTVL
172	RO-01 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGNRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAE ADYYCNSLERIGYLSYVFGGTGLTVL
173	RO-01 VH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGLEWVSATISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWLEYWGQGT LTVSS
174	RO-02 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGNRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAE DEADYYCNSRLRSGKMVVFGGGTGLTVL
175	RO-02 VH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGLEWVSATISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNT TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWYLPGRGFDYWGQGT LTVSS
176	RO-03 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGNRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAE DEADYYCNSRKSSSKNVVFGGGTGLTVL
177	RO-03 VH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGLEWVSATISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSFTFGRYFDYWGQGT LTVSS
178	RO-04 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGNRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAE DEADYYCNSRDRRGYSVFGGGTGLTVL
179	RO-04 VH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGLEWVSATISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNT YLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSFSYLRAFDYWGQGT LTVSS
274	LP1-1F8 VL	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTIT SSVQAEDLAVYYCKQSYLLTFGAGTKLEK
275	LP1-1F8 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSTYMSWVRQTPAKRLIEWVATISSIGVNTYYPDS

10

20

30

40

【表 3 - 8】

		VKGRFTISRDNARNTLYL QVSSLRSEDAMYYCARHVDYYDGISFDYWGQGTTLTVSS	
276	LP1-1N15 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSHLSWFQQKPGKSPKTLITRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTISSEPEEEM GIYYCLQYDEFPFTFGGGTKLEIK	
277	LP1-1N15 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMNWKQSHGESLEWIGRVIPSNNGTNYNQK FKGKATLTVDKSLTTA YMQNLSTSEDSAVYFCARGMDYWGPGTSVTVSS	
278	LP1-1P13 VL	DIQMTQSPASLSASVGGTVITCRTSENTYSLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFS GSGSGTQYYLKINSLQSED FGSYQCQHFHFGSTWTFGGGTCLDIK	10
279	LP1-1P13 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYFMNWKQSHGKSLEWIGRFNPFNGQTFYNQE FKGKATLTVDKSSSTA MELRSLTSEDSAVYYCARRGRYDVYVYLDYWGQGTSTVTVSS	
280	LP1-1P5 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDRFT GSGSGTDFTLTISNVQSE DLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELK	
281	LP1-1P5 VH	QVQLQQSGPELVRPGTSVKISCKASGYTFLTYWMNWKQRPQGQLEWIGQIFPATGITYYSEM FKDKATLTEDTSSTTAY MQLSSLTSEATAVYFCARRRAYHSNFFDYWGQGTTLTVSS	20
282	LP1-2E12 VL	DVVVTQTPLSLPVSGDRVSISSRSQSLANSYGNTYLSWYHLKPGQSPQLLIYGISNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISTIKP EDLGMYCQLQGTHTPLTFGAGTKLELK	
283	LP1-2E12 VH	DVQLQESGPELVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMSGIGYDDTNHYNPS LKNRISITRDTSKNQFFLK LNSVTTEDTATYYCAGDYPFAFWGQGTTLTVSA	
284	LP1-2I13 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS GSGSGTQFSLKINSLQPED FGSYQCQHHYGTWTFGGGKLEIK	
285	LP1-2I13 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPKGLEWVAYISSGSSTIYADT VKGRFTISRDNANKTL FLQMTSLRSEDAMYYCSRKGFGDYKSYAMDYWGQGTSTVTVSS	30
286	LP1-2I22 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLWYQQKQKSPQLLVYGATNLADGVTSRFS GSGSGTQFSLKIDSLQSE DFGSYYCQHFHGTWTFGGGTCLDIK	
287	LP1-2I22 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWKQSHGKSLEWIGRFNPFNGQTFYNQE FKGKATLTVDKSSSTA MELRSLTSEDSAVYYCARRGRYDVYVYLDYWGQGTSTVTVSS	
288	LP1-3A24 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQQKPGQSPKALIYSSSYRSGVPDRFT GSGSGTDFTLTITNVQSE DLAEYFCQQYNSFPLTFGAGTKLELK	40
289	LP1-3A24 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYINWVRQSHGKSLEWIGRVIPSNNGSNYNQK FKGKATLTVDKSLSTAY MHLNSLTSEDSAVYYCATQLGRWGQGTTLTVSA	
290	LP1-3E20 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTISSELEYEDM GIYYCLQYDDLWTFGGGTCLDIK	

【表 3 - 9】

291	LP1-3E20 VH	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWIHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYAEYNQK FKVRATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARESYYSFDYTM DYWGQGTSTVTVSS
292	LP1-6H3 VL	DVVMQTPTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISR EAEDLG VYYCWQGHFPHFTFGSGTKLEIK
293	LP1-6H3 VH	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFSRFDHWWVKQTPRQGLEWIGVIYPNGDTSYNQK FRDKASLTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYFCASSYYGNPWGQGTTLTVSS
294	LP1-7B13 VL	DIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSISNYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSSISGIPSRFS GSGSGTDFTLTINSVETEDFG MYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEIK
295	LP1-7B13 VH	EVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKTSGFTFTDYMNWVKQGHGKSLEWIGRVNPSNDDTRYNQK FKGKATLTVDKSLST AYMQLNSLTSEDSAVYYCTRWYFYFDYWGQGTTLTVSS
296	LP1-7I20 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAKGVPSRFS GSGSGTQFSLKINGLQPED FGNYQCQHHYGTPTYTFGGGKVEIK
297	LP1-7I20 VH	EVKLVESSGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLALIRNKANGYTTEYS ASVKGRFTISRDNQSIL YLQMNALRAEDSATYYCAVTYGAYWGQGTTLTVSA
298	LP1-8M24 VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRISSENIYSNLAWYQQKQKSPHLLVYAAINLADGVPSRFS GSGSGTQF SLKINSLQSEDFGSYYCQHFWGTPFTFGSGTKLEIK
299	LP1-8M24 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGINWVKQRTGQGLEWIGEIFPRSDNTFYNEK FKGKATLTADKS STTAYMELRSLTSEDSAVYFCARKGRDYGTSHYFDYWGQGTTLTVSS
300	LP1-9C3 VL	DVVVTQTPLSLPVSGDQVSTISCRSSQSLANSYGNLYLSWYLHKPGQSPQLLIYGISNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTL KISTIKPEDLG IYYCLQATHQPWTFGGGKLEIK
301	LP1-9C3 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSYMGVSWIRKPSGKGLEWLAHIFWDDDKRYNP SLKSRLTISKDTSSN QVFLMITSVETADTATYYCGGPPYPPTYWGQGTTLTVSA
302	LP1-9M16 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLADGVPSRFS GSGSGQDYSLTISNL EYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEIK
303	LP1-9M16 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGRVNPNNGGSNYNQK FKGKATLTVDK SLSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCASRNFDVWGAGTTVTVSS
304	LP1-10C22 VL	DVLMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSSQGIVHSNGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDLG VYYCFQGSHPPTFGGKLEIK
305	LP1-10C22 VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVASISSGGSYTYPPDS VKGRFTISRDNQAN TLYLQMSSLSKSEDTAMYYCVRHEEYGKSGFAYWGQGTTLTVSA

10

20

30

40

【表 3 - 1 0】

表 3 C. 配列識別子の記載 (代替的ターゲティングモジュール)

配列番号	簡単な説明	配列
180	GT-01 (TFR1) VH	QVQLQQSGPELVPRGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGGISTYFGRTN YNQKFKGRATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSALYYCARGLSGNYVMDYWGQGTSTVTS S
181	GT-01 (TFR1) VL	DIVLFQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDYGNFSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLE SGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEAPPTFGGGTKLEIK
182	BA-01 (LYPD3) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVSYSISSSGSTIY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLWAFDYWGQGTSLVTVTS
183	BA-01 (LYPD3) VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYVHWHYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLASEDEADYYCAAWDDRLNGPVFGGGTKLTVL
184	FR-01 (DSG3) VH	EVQLQQSGTGLARPGASVKMSCKASGYTFASYWIHWVKQRPGQGLEWIGSIYPGNSDTT YNQKFKGKAKLTVVTSASSAYMELSSLTNEDSAVYYCTEPTYYSYDDYYAMDYWGQGT STVTVSS
185	FR-01 (DSG3) VL	EIVLTQSPALMAASPGKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSGTSPKPWIYGTSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISTMEAEADAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLELK

10

20

【 0 1 2 0】

組織特異性 W n t シグナル増強分子の説明的な、非限定的な例としては、以下を含む融合タンパク質が挙げられる：1) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び A S G R 1 又は A S G R 2 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン、2) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び S L C 1 0 A 1 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン、3) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び T F R 2 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン、4) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び P T H 1 R に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン、5) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び L Y P D 3 に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン、6) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び D S G 3 に特異的に結合する、リガンド融合体、抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン、ならびに 7) R - s p o n d i n フューリンドメイン 1 又はそのバリエーションを含む第 1 のドメイン、及び T F R 1 に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン。組織特異性 W n t シグナル増強分子のさらなる説明的な、非限定的な例としては、以下を含む融合タンパク質が挙げられる：1) Z N R F 3 及び／又は R N F 4 3 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 1 のドメイン、及び A S G R 1 又は A S G R 2 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン；2) Z N R F 3 及び／又は R N F 4 3 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 1 のドメイン、及び S L C 1 0 A 1 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン；3) Z N R F 3 及び／又は R N F 4 3 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 1 のドメイン、及び T F R 2 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン；4) Z N R F 3 及び／又は R N F 4 3 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第 1 のドメイン、及び P T H 1 R に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第 2 のドメイン；5) Z N R F 3 及び／又は R N F 4 3 に特異的に結合する抗体又はそのフラグメ

30

40

50

ントを含む第1のドメイン、及びLYPD3に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第2のドメイン；6）ZNR F3及び／又はRNF43に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第1のドメイン、及びDSG3に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第2のドメイン；ならびに、7）ZNR F3及び／又はRNF43に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む第1のドメイン、及びTFR1に特異的に結合する、リガンド誘導体、抗体又はそのフラグメントを含む第2のドメイン。特定の実施形態においては、当該第1のドメインは、表2に記載の重鎖もしくは軽鎖のCDR配列の組のいずれかを含む抗体を含み、及び／又は、当該第2のドメインは、表3に記載の重鎖もしくは軽鎖のCDR配列の組のいずれかを含む抗体を含む。特定の実施形態においては、当該2つのドメインは、例えばポリペプチドリンカーであるリンカーを介して連結する。ある実施形態においては、リンカーは、例えばヒト血清アルブミンであるアルブミンであって、ターゲティングモジュール及び作用モジュールが、アルブミンのN末端及びC末端上にある。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、抗体の重鎖及び抗体の軽鎖（又は当該鎖のいずれかもしくは両方のそのフラグメントもしくはバリエーション）を含む付加した抗体（例えば、IgG）の形態を有するものであって、一方又は両方の鎖が、1又は複数のさらなる結合ドメインをさらに含む。特定の実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子は、付加した抗体（例えば、IgG）の形態を有するものであって、第2のドメインが抗体の重鎖及び抗体の軽鎖（又は当該鎖のいずれかもしくは両方のそのフラグメントもしくはバリエーション）を含み、またRespondinファミリードメイン1又はバリエーションを含む第1のドメインが、例えばいずれか又は両方の鎖のN末端及び／又はC末端のいずれか又は両方において、抗体の重鎖及び／又は軽鎖の一方又は両方に付加する。特定の実施形態においては、第1のドメインは、例えばN末端又はC末端のいずれかにおいて、重鎖に付加又は融合する。特定の実施形態においては、第1のドメインは、例えばN末端又はC末端）のいずれかにおいて、軽鎖に付加又は融合する。

【0121】

リンカー

ある実施形態においては、ターゲティングモジュール及び作用モジュールは、互いに直接結合又は融合し、一方で他の実施形態においては、それらは、例えばポリペプチドリンカー又は非ペプチジルリンカー等である、リンカーによって離間する。特定の実施形態においては、リンカーはFcリンカーであり、例えば抗体のFcドメインの領域であって例えば1又は複数のジスルフィド結合を介して別のFcリンカーと二量体形成することが可能である抗体のFcドメインの領域である。別の特定の実施形態においては、リンカーは、例えばヒト血清アルブミンであるアルブミンであって、ターゲティングモジュール及び作用モジュールが、アルブミンのN末端及びC末端上にある。

【0122】

ある実施形態においては、特に2つのポリペプチドを連結する場合に、リンカーは、ペプチド結合によって一緒になって連結されたアミノ酸で構成される。特定の実施形態においては、リンカーは、長さが、1から最大で約40のアミノ酸残基、1から最大で約20のアミノ酸残基、又は1から最大で約10のアミノ酸残基である。ある実施形態においては、リンカー内のアミノ酸残基は、20種の標準アミノ酸よりのものであり、またある実施形態においては、システイン、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及び／又はセリンから選択される。ある実施形態においては、リンカーは1又は複数の非天然アミノ酸を含む。一部の実施形態においては、ペプチジルリンカーは、ペプチド結合で連結した例えばグリシン、セリン及びアラニン等である、立体障害のない大多数のアミノ酸から構成される。あるリンカーは、ポリグリシン、ポリセリン、及びポリアラニン、又はこれらのいずれかの組み合わせを含む。一部の例示的なペプチジルリンカーは、ポリ(Gly)1~8、特に(Gly)3、(Gly)4（配列番号698）、(Gly)5（配列番号699）及び(Gly)7（配列番号700）のみならずポリ(Gly)4 Ser（配列番号701）、ポリ(Gly-Ala)2~4及びポリ(Ala)1~

8である。ペプチジルリンカーの他の特定の例としては、(G l y) 5 L y s (配列番号702)及び(G l y) 5 L y s A r g (配列番号703)が挙げられる。上記命名を説明すると、例えば(G l y) 3 L y s (G l y) 4 (配列番号704)は、G l y-G l y-G l y-L y s-G l y-G l y-G l y-G l y (配列番号704)を意味する。G l y及びA l aの他の組み合わせもまた有用である。さらに、ペプチジルリンカーはまた、例えば一般式 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ の6炭素脂肪族分子等である非ペプチジル部分を含むことが可能である。ペプチジルリンカーは、本明細書に記載するような誘導体を形成するように変更可能である。

【0123】

説明的な非ペプチジルリンカーとしては、例えば式中 $s = 2 \sim 20$ である、 $-\text{NH}-$
 $-(\text{CH}_2)_s-$ $\text{C}(\text{O})-$ 等の、例えばアルキルリンカーが挙げられる。これらアルキルリンカーは、例えば低級アルキル(例えば、 $\text{C}1-\text{C}6$)、低級アシル、ハロゲン(例えば、 $\text{C}1$ 、 Br)、 CN 、 NH_2 、フェニル等である、任意の立体障害のない基によってさらに置換されていてもよい。例えば非ペプチジルリンカー又は非ペプチドの半減期延長部分等の、本発明の組成物の要素の非ペプチド部分は、従来の有機化学反応によって合成可能である。結合ドメインの連結での使用が見出される化学基としては、当技術において公知の、カルバミン酸塩；アミド(アミンとカルボン酸)；エステル(アルコールとカルボン酸)、チオエーテル(ハロアルカンとスルフヒドリル；マレイミドとスルフヒドリル)、シッフ塩基(アミンとアルデヒド)、尿素(アミンとイソシアナ酸塩)、チオ尿素(アミンとイソチオシアナ酸塩)、スルホンアミド(アミンと塩化スルフォニル)、ジスルフィド；ヒドラゾン、脂質等が挙げられる。

【0124】

ドメイン間の結合は、例えばアルキルスパーサー等のスパーサーを含んでもよく、当該スパーサーは、直鎖又は分枝であり得、通常直鎖であり、また1又は複数の不飽和結合を含み得、通常は1から約300個の炭素原子を有し；さらに通常は約1から25個の炭素原子を有し、また約3から12個の炭素原子であってもよい。このタイプのスパーサーはまた、アミン、エーテル、リン酸ジエステル等を含む、ヘテロ原子又は官能基を含んでもよい。特定の関心の構造には、式中 n が1から約12である、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ ；式中 n が1から約12である、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n$ ；式中 n 及び m が1から約6、かつ z が1から約10である、 $[(\text{CH}_2)_n(\text{C}=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m]_z$ ；式中 n 及び m が1から約6、かつ z が1から約10である、 $[(\text{CH}_2)_n\text{OPO}_3(\text{CH}_2)_m]_z$ が含まれる。こうしたリンカーは、直鎖又は分枝であり得る、ポリエチレングリコールが含まれ得る。

【0125】

ある実施形態においては、ドメインは、ホモ又はヘテロの二官能性リンカーを介して連結してもよい。説明的な実体としては、アジドベンゾイルヒドラジド、 $\text{N}-[4-\text{p}-\text{アジドサリチルアミノ})\text{ブチル}]-3'-[2'-\text{ピリジルジチオ}]プロピオンアミド$ 、ビス-スルホスクシンイミジルスベレート、アジブイミド酸ジメチル、酒石酸ジスクシンイミジル、 $\text{N}-\gamma$ -マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジド安息香酸塩、 $[4-\text{アジドフェニル}]-1,3'$ -ジチオプロピオン酸 N -スクシンイミジル、 $[4-\text{ヨードアセチル}]$ アミノ安息香酸 N -スクシンイミジル、グルタルアルデヒド、 $\text{NHS}-\text{PEG}-\text{MAL}$ ；4- $[N$ -マレイミドメチル] $\text{シクロヘキサン}-1$ -カルボン酸スクシンイミジル；3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 N -ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPD P)； $\text{N}, \text{N}'-1,3$ -フェニレン)ビスマレイミド； N, N' -エチレン-ビス-(ヨードアセトアミド)；又は4-(N -マレイミドメチル)- $\text{シクロヘキサン}-1$ -カルボン酸 N -ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)； m -マレイミドベンゾイル- N -ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、及び4-(p -マレイミドフェニル)酪酸スクシンイミド(SMPB)、MBSの伸びきり鎖類似体、が挙げられる。ある実施形態においては、これら架橋リンカーのスクインイミジル基は一級アミンと反応し、またチオール反応性マ

レイミドは、システイン残基のチオールと共有結合を形成する。

【0126】

他の有用な試薬としては、ビスマレイミドヘキサン（“BMH”）；p, p'-ジフルオロ-m, m'-ジニトロジフェニルスルホン（アミノ基とフェノール基と共に不可逆架橋結合を形成する）；アジプイミド酸ジメチル（アミノ基に特異的である）；フェノール-1, 4-ジスルホニルクロリド（主にアミノ基と反応する）；ヘキサメチレンジイソシアン酸塩又はイソチオシアン酸塩、又はアゾフェニル-p-ジイソシアン酸塩（主にアミノ基と反応する）；ジスジアゾベンジン（disdiazobenzidine）（主にチロシン及びヒスチジンと反応する）；O-ベンゾトリアゾリルオキシテトラメスルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（HATU）、ジシクロヘキシルカルボジイミド、プロモートリス（ピロリジノ）ホスホニウムブロミド（PyBroP）；N, N-ジメチルアミノピリジン（DMA P）；4-ピロリジノピリジン；N-ヒドロキシベンゾトリアゾール；等を含めた、ホモ二官能性架橋剤が挙げられる。

10

【0127】

抗体及びその使用

様々な実施形態においては、本発明は、抗RNF43抗体、抗ZNF3抗体、及び抗ASGR1/2抗体、及びその抗原結合性フラグメント、ならびに関連する使用方法を提供する。

【0128】

一実施形態においては、本開示は、RNF43、ZNF3、ASGR1又はASGR2（随意に、ヒト）に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、（i）表2Aもしくは3Aの抗体のいずれかに記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3の配列、ならびに／もしくは（ii）表2Aもしくは3Aの抗体のいずれかに記載のCDRL1、CDRL2及びCDRL3の配列、を含む配列を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、又は1もしくは複数のアミノ酸改変を含む当該抗体もしくはその抗原結合性フラグメントのバリエーションを提供するものであり、当該バリエーションは、当該CDR配列において8未満のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表2Bもしくは表3Bに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は表2Bもしくは表3Bに記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表2Bもしくは表3Bに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又は表2Bもしくは表3Bに記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

30

【0129】

特定の実施形態においては、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、ヒト化される。ある実施形態においては、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、単鎖抗体、scFv、ヒンジ領域を欠いた一価抗体、ナノボディ又はミニボディである。特定の実施形態においては、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、VHHナノボディである。特定の実施形態においては、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、Fab又はFab'フラグメントである。

40

【0130】

ある実施形態においては、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、融合タンパク質である。

【0131】

関連の実施形態においては、本開示は、その標的ZNF3、RNF43又はASGR1/2への結合を、本明細書に開示する抗体のいずれかと競合する、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、その標的に、50 μM以下のKDで結合する。

【0132】

一実施形態においては、本発明は、ヒトASGRに結合して、ASGRのリガンドとの

50

結合を阻害する、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。別の実施形態においては、本発明は、ヒト A S G R - 1 に結合して、A S G R - 1 のリガンドとの結合及び／又は A S G R - 1 の A S G R - 2 との相互作用を阻害する、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。別の実施形態においては、本発明は、ヒト A S G R - 2 に結合して、A S G R - 2 のリガンドとの結合及び／又は A S G R - 2 の A S G R - 1 との相互作用を阻害する、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。さらに別の実施形態においては、本発明は、ヒト A S G R - 1 及びヒト A S G R - 2 に結合して、A S G R - 1 及び／又は A S G R - 2 のリガンドとの結合を阻害する、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。一部の実施形態においては、単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト A S G R、A S G R - 1 及び／又は A S G R - 2 に特異的に結合する。

10

【0133】

特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、細胞において、随意に哺乳動物細胞において、W n t シグナル伝達経路を調節する。特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、細胞において、W n t シグナル伝達経路を介したシグナル伝達を増加させる。特定の実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントのいずれかは、細胞において、W n t シグナル伝達経路を介したシグナル伝達を減少させる。ある実施形態においては、W n t シグナル伝達経路は、古典的 W n t シグナル伝達経路又は非古典的 W n t シグナル伝達経路である。

【0134】

さらなる関連の実施形態においては、本開示は、本明細書に開示される、抗体又はその抗原結合性フラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。ある実施形態においては、本開示は、単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、当該発現ベクターを含む単離された宿主細胞とを提供する。

20

【0135】

別の実施形態においては、本開示は、本明細書に開示する、生理学的に許容可能な賦形剤、希釈剤又は担体と、治療有効量の単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントとを含む医薬組成物を提供する。

【0136】

本開示は、例えば生体試料（例えば、細胞又は組織）中の Z N R F 3、R N F 4 3 又は A S G R 1 / 2 のポリペプチドの存在又は発現レベルを検出する方法であって、当該生体試料を、標的ポリペプチドに特異的に結合する本明細書に開示する抗体又はその抗原結合性フラグメントと接触させることを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、例えば蛍光タグによって、検出可能に標識されている。したがって、抗体を、抗体標的ポリペプチドを発現する細胞を染色するために用いてもよい。例えば、抗 A S G R 1 / 2 抗体及びその抗原結合性フラグメントを、肝細胞を検出又は染色するために用いてもよい。

30

【0137】

本明細書に開示する抗体又はその抗原結合性フラグメントはまた、それらが結合する細胞に薬剤を送達するために用いることができる。例えば、抗 A S G R 1 / 2 抗体及びその抗原結合性フラグメントは、治療薬と結合して、例えば正常な又はがんの肝細胞である、肝細胞に当該治療薬を送達することができる。

40

【0138】

さらなる実施形態においては、本開示は、細胞において W n t シグナル伝達経路を作動（a g o n i z i n g）する方法であって、当該細胞を、W n t シグナル伝達を増加させる、本明細書に開示する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントと接触させることを含む、当該方法を提供する。別の実施形態においては、本開示は、細胞において W n t シグナル伝達経路を阻害する方法であって、当該細胞を、W n t シグナル伝達を阻害させる、本明細書に開示する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントと接触させることを含む、当該方法を提供する。

50

【0139】

別の実施形態においては、本開示は、Wntシグナル伝達の低下と関連する疾患又は障害を有する対象を治療する方法であって、Wntシグナル伝達経路のアゴニストである、本明細書に開示する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む医薬組成物の有効量を当該対象に投与することを含む、当該方法を含む。特定の実施形態においては、当該疾患又は障害は、組織特異性Wntシグナル増強分子によって治療される、本明細書に記載するもののうちのいずれかである。

【0140】

一部の実施形態においては、本開示は、冠動脈疾患を患う又はMIを有するリスクを減少させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に開示する抗ASGR抗体又はその抗原結合性フラグメントの治療有効量を投与することを含む、当該方法を含む。一部の実施形態においては、抗体はASGR-1に結合し、また一部の実施形態においては、抗体はASGR-2に結合する。一部の実施形態においては、抗体はASGR-1及び／又はASGR-2の阻害剤である。一部の実施形態においては、冠動脈疾患又はMIの相対リスク減少率は、未治療の対象と比較して、治療した対象において少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%である。

【0141】

一部の実施形態においては、本開示は、対象において血中LDLコレステロールレベルを減少させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に開示する、治療有効量の抗ASGR抗体又はその抗原結合性フラグメントを投与することを含む、当該方法を提供する。一部の実施形態においては、抗体はASGR-1に結合し、また一部の実施形態においては、抗体はASGR-2に結合する。一部の実施形態においては、抗体はASGR-1及び／又はASGR-2の阻害剤である。一部の実施形態においては、治療した対象における血中LDLコレステロールレベルは、対象における投与前の血中LDLコレステロールレベルと比較して、少なくとも約15%減少する。本発明のこの態様の一部の実施形態においては、当該対象の血中LDLコレステロールレベルは、対象における投与前の血中LDLコレステロールレベルと比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、又は少なくとも約90%低下する。

【0142】

一部の実施形態においては、本開示は、対象において非HDLコレステロールレベルを減少させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に開示する、治療有効量の抗ASGR抗体又はその抗原結合性フラグメントを投与することを含む、当該方法を提供する。一部の実施形態においては、抗体はASGR-1に結合し、また一部の実施形態においては、抗体はASGR-2に結合する。一部の実施形態においては、抗体はASGR-1及び／又はASGR-2の阻害剤である。一部の実施形態においては、対象における非HDLコレステロールレベルは、対象における投与前の非HDLコレステロールレベルと比較して、少なくとも約5%減少する。本発明のこの態様の一部の実施形態においては、当該患者の非HDLコレステロールレベルは、患者における投与前の非HDLコレステロールレベルと比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、又は少なくとも約90%低下する。

【0143】

一部の実施形態においては、本開示は、患者においてA S G R活性の阻害を介してA L Pレベルを増加させる方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に開示する、治療有効量の抗A S G R抗体又はその抗原結合性フラグメントを投与することを含む、当該方法を提供する。一部の実施形態においては、抗体はA S G R-1に結合し、また一部の実施形態においては、抗体はA S G R-2に結合する。一部の実施形態においては、抗体はA S G R-1及び／又はA S G R-2の阻害剤である。一部の実施形態においては、患者におけるA L Pレベルは、当該患者における投与前のA L Pレベルと比較して、少なくとも約30%増加する。本発明のこの態様の一部の実施形態においては、当該対象のA L Pレベルは、対象における投与前のA L Pレベルと比較して、少なくとも約、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、又は少なくとも約90%増加する。一部の実施形態においては、A L Pレベルは、治療前に対して、少なくとも約1.25倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、及び5倍、増加する。

10

【0144】

一部の実施形態においては、本開示は、対象においてA S G R、A S G R-1及び／又はA S G R-2を作動する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に開示する、治療有効量の抗A S G R抗体又はその抗原結合性フラグメントを投与することを含む、当該方法を提供する。一部の実施形態においては、抗体はA S G R-1に結合し、また一部の実施形態においては、抗体はA S G R-2に結合する。一部の実施形態においては、抗体はA S G R-1及び／又はA S G R-2の阻害剤である。

20

【0145】

一部の実施形態においては、循環器疾患を治療又は予防する方法を提供し、またそれを必要とする対象に、本明細書に開示する、治療有効量の抗A S G R抗体又はその抗原結合性フラグメントを投与することを含む。一部の実施形態においては、抗体はA S G R-1に結合し、また一部の実施形態においては、抗体はA S G R-2に結合する。一部の実施形態においては、抗体はA S G R-1及び／又はA S G R-2の阻害剤である。一部の実施形態においては、循環器事象の相対リスク減少率は、患者において少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%である。

30

【0146】

W n t分子、N o r r i n分子及びW n tシグナル増強分子

本開示は、W n tシグナル伝達を増加させて、本明細書に記載するものを含めたW n t関連疾患又は障害を治療又は予防する、W n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド及びW n tシグナル伝達アゴニスト分子ならびにそれらの使用にさらに関する。ある実施形態においては、W n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド及びW n tシグナル伝達アゴニスト分子を、単独で、又は本明細書に記載する1又は複数の組織特異性W n tシグナル増強分子と組み合わせて、対象に提供する。

40

【0147】

W n tポリペプチド及びW n tコードポリヌクレオチド配列は、当技術で公知であり、また例えばヒトW n tポリペプチド及びポリヌクレオチド等である、哺乳動物W n tポリペプチド及びポリヌクレオチドを含めた、任意の及び全ての種のものを含めた、任意の及び全てのW n tポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む。説明的なW n tポリペプチドは、W n t 1、W n t 2、W n t 2 B、W n t 3、W n t 3 A、W n t 4、W n t 5 A、W n t 5 B、W n t 6、W n t 7 A、W n t 7 B、W n t 8 A、W n t 8 B、W n t 9 A、W n t 9 B、W n t 10 A、W n t 10 B、W n t 11、ならびにW n t 16、ならびに先述のいずれかの機能バリエーション及びフラグメントを含む。W n tポリペプチドには、天然のW n tポリペプチド、W n tポリペプチドバリエーション、W n tポリペプチドフラグ

50

メント、及びキメラWntポリペプチドを包含する。特定の実施形態においては、Wntポリペプチドは、天然のヒト完全長成熟Wntタンパク質である。

【0148】

例えば、本願において関心のヒト天然配列のWntタンパク質は、以下のものを含むがこれに限定されない：Wnt1（GenBankアクセッション番号NM_005430）；Wnt-2（GenBankアクセッション番号NM_003391）；Wnt2B（Wnt-13）（GenBankアクセッション番号NM_004185（アイソフォーム1）、NM_024494.2（アイソフォーム2））、Wnt3（RefSeq.：NM_030753）、Wnt3A（GenBankアクセッション番号NM_033131）、Wnt4（GenBankアクセッション番号NM_030761）、Wnt5A（GenBankアクセッション番号NM_003392）、Wnt5B（GenBankアクセッション番号NM_032642）、Wnt6（GenBankアクセッション番号NM_006522）、Wnt7A（GenBankアクセッション番号NM_004625）、Wnt7B（GenBankアクセッション番号NM_058238）、Wnt8A（GenBankアクセッション番号NM_058244）、Wnt8B（GenBankアクセッション番号NM_003393）、Wnt9A（Wnt-14）（GenBankアクセッション番号NM_003395）、Wnt9B（Wnt15）（GenBankアクセッション番号NM_003396）、Wnt10A（GenBankアクセッション番号NM_025216）、Wnt10B（GenBankアクセッション番号NM_003394）、Wnt11（GenBankアクセッション番号NM_004626）、Wnt16（GenBankアクセッション番号NM_016087）。各メンバーは、ファミリーとの様々な程度の配列同一性を有するが、その間隔が高度に保存されている23～24個の保存されたシステイン残基を含有する小分子の（すなわち、39～46kD）、アシル化され、パルミトイル化され、分泌された糖タンパク質を、全てのメンバーがコードする（McMahon, A. P. et al., Trends Genet. 1992; 8: 236-242; Miller, J. R. Genome Biol. 2002; 3(1): 3001. 1-3001. 15）。関心の他の天然配列のWntポリペプチドは、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、カエル、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、虫（worm）等の、家畜、及び動物園動物、実験動物又は愛玩動物を含む、任意の哺乳動物よりの上記のオルソログを含む。

【0149】

Norrinポリペプチド及びNorrinコードポリヌクレオチド配列もまた、当技術で公知であり、また例えばヒトNorrinポリペプチド及びポリヌクレオチド等である、哺乳動物Norrinポリペプチド及びポリヌクレオチドを含めた、Norrinポリペプチド又はポリヌクレオチドの任意の種、ならびにその機能バリエーション及びフラグメントを含む。

【0150】

Wntシグナル伝達アゴニスト分子は、Wntシグナル伝達を作動する任意のタイプの分子を含む。特定の実施形態においては、Wntシグナル伝達アゴニスト分子は、PCT特許出願公開公報の国際公開第2016/040895号に記載されている。Wntシグナル伝達アゴニストは、例えばタンパク質又は医薬分子（例えば、有機小分子）であり、ある実施形態においては水溶性である、任意の分子とすることが可能であり、これは1又は複数のFzdタンパク質への及びLrp5/6への結合を介して古典的Wntシグナル伝達を直接活性化する。特定の実施形態においては、それらは小分子であり、約15Kd未満であり得る。他の実施形態においては、それらはポリペプチドである。さらに、あるWntシグナル伝達アゴニストは、ポリペプチドの領域又はドメインと、非ポリペプチドの領域又はドメインとの両方を含み得る。

【0151】

本発明の一部の実施形態においては、Wntシグナル伝達アゴニスト分子は、ポリペプ

チドであり、F z d 及び L r p 5 / 6 のための離間した又は隣接し合う結合ドメイン又は要素を含むことが可能である。ポリペプチド W n t シグナル伝達アゴニストは、単鎖、二量体、又はより高次の多量体であり得る。F z d 結合ドメイン／要素及び L r p 5 / 6 結合ドメイン／要素は、直接連結してもよく、又は、例えばポリペプチドリンカー又は非ペプチドリンカー等のリンカーにより離間していてもよい。

【0152】

ポリペプチドの実施形態においては、F z d 結合ドメインは、例えば K D が少なくとも約 $1 \times 10 - 7$ M、少なくとも約 $1 \times 10 - 8$ M、少なくとも約 $1 \times 10 - 9$ M、又は少なくとも約 $1 \times 10 - 10$ M である、高い親和性で F z d に結合する任意のドメインから選択され得る。好適な F z d 結合ドメインは、デノボ設計の F z d 結合タンパク質、例えば s c F v、F a b 等である抗体由来の結合タンパク質、ならびに 1 又は複数の F z d タンパク質に特異的に結合する抗体の他の部分；ナノボディ由来の結合ドメイン；k n o t t i n 系の改変足場；N o r r i n 及びそれに由来する遺伝子操作された結合フラグメント、天然の F z d 結合ドメイン等を含むがこれに限定されない。

【0153】

一部の実施形態においては、F z d 結合ドメインは、1、2、3、4、5 又はそれ以上の異なる F r i z z l e d タンパク質、例えばヒト F r i z z l e d タンパク質 F z 1、F z 2、F z 3、F z 4、F z 5、F z 6、F z 7、F z 8、F z 9、F z 10 のうちの 1 又は複数、に結合する。一部の実施形態においては、抗体系のシグナル伝達アゴニストが、F z 1、F z 2、F z 5、F z 7 及び F z 8 に結合する。他の実施形態においては、F r i z z l e d 結合部分は、関心の 1 又は複数の F r i z z l e d タンパク質に対して選択的であり、例えば、他の F r i z z l e d タンパク質と比較して、少なくとも 10 倍、25 倍、50 倍、100 倍、200 倍又はそれ以上である 1 又は複数の所望の F r i z z l e d タンパク質に対する特異性を有する。

【0154】

ある実施形態においては、F r i z z l e d 結合ドメインは、pan 抗体である F r i z z l e d 抗体 (p a n s p e c i f i c F r i z z l e d a n t i b o d y) O M P - 1 8 R 5 (パンチクツマブ (v a n t i c t u m a b)) の 6 つの C D R 領域を含む。ある実施形態においては、F r i z z l e d 結合ドメインは、pan 抗体である F r i z z l e d 抗体 O M P - 1 8 R 5 (パンチクツマブ) の 6 つの C D R 領域を含む s c F v である。例えば、本明細書において参照により詳細に援用される、米国特許第 8 5 0 7 4 4 2 号を参照されたい。例えば、O M P - 1 8 R 5 の C D R 配列は、G F T F S H Y T L S (配列番号 7 0 5) を含む重鎖 C D R 1、V I S G D G S Y T Y Y A D S V K G (配列番号 7 0 6) を含む重鎖 C D R 2、及び N F I K Y V F A N (配列番号 7 0 7) を含む重鎖 C D R 3 と、(i i) S G D K L G K K Y A S (配列番号 7 0 8) 又は S G D N I G S F Y V H (配列番号 7 0 9) を含む軽鎖 C D R 1、E K D N R P S G (配列番号 7 1 0) 又は D K S N R P S G (配列番号 7 1 1) を含む軽鎖 C D R 2、及び S S F A G N S L E (配列番号 7 1 2) 又は Q S Y A N T L S L (配列番号 7 1 3) を含む軽鎖 C D R 3 とを含む。特定の実施形態においては、F r i z z l e d 結合ドメインは、抗体又はその誘導体であり、限定するものではないが、S c F v、ミニボディ、ナノボディ、及び O M P - 1 8 R 5 の C D R 配列を含む様々な抗体模倣物を含む。ある実施形態においては、これら C D R 配列は、O M P - 1 8 R 5 の C D R 配列と比較して 1 又は複数のアミノ酸改変を含む。

【0155】

他の実施形態においては、F z d 結合ドメインは、いくつかの F r i z z l e d 特異性抗体のいずれかよりの、可変領域配列又はその C D R を含むが、これは当技術で公知であり、かつ、市販されているか、又はデノボで生成可能である。F r i z z l e d ポリペプチドのいずれかを、免疫原として、又は抗体を開発するための選別アッセイにおいて、用いることが可能である。「F z」、「F z タンパク質」及び「F z 受容体」は、F r i z z l e d 受容体ファミリーのタンパク質を指すために本明細書で用いる。これらタンパク

質は、あるCRDドメインを含む7回膜貫通型タンパク質である (Ingham, P. W. (1996) Trends Genet. 12:382-384; Yang-Snyder, J. et al. (1996) Curr. Biol. 6:1302-1306; Bhanot, P. et al. (1996) Nature 382:225-230)。Fzファミリー (Fz1からFz10) は既知のメンバーが10個あり、そのいずれもが、Wntの受容体として機能することができる。ヒトFrizzled参照配列のGenbankアクセッション番号は、以下のとおりである: FZD1 (NM_003505); FZD2 (NM_001466); FZD3 (NM_145866); FZD4 (NM_012193); FZD5 (NM_003468); FZD6 (NM_003506); FZD7 (NM_003507); FZD8 (NM_031866); FZD9 (NM_003508); FZD10 (NM_007197)。[0076] Frizzled結合ドメインの非限定的な例としては、例えばヒトFrizzled4に特異的なクローンCH3A4A7 (CD344); ヒトFz9に特異的なクローンW3C4E11 (CD349)である、Biolegend社より利用可能な抗体; 例えばFz7に特異的なab64636; ヒトFz4に特異的なab83042; ヒトFz7に特異的なab77379; ヒトFz8に特異的なab75235; ヒトFz9に特異的なab102956である、Abcam社より利用可能な抗体等が挙げられる。好適な抗体の他の例は、とりわけ、米国特許出願第20140105917号; 米国特許出願第20130230521号; 米国特許出願第20080267955号; 米国特許出願第20080038272号; 米国特許出願第20030044409号に記載されている。

10

20

【0156】

代替物のFrizzled結合部分は、Wntタンパク質のFrizzled結合領域に対する構造的相同性のために選択される遺伝子操作されたタンパク質であり得る。こうしたタンパク質は、相同性に関する構造データベースをスクリーニングすることによって特定可能である。すなわち、特定される最初のタンパク質は、例えば、微生物Bh1478タンパク質である。当該天然タンパク質は、その後遺伝子操作されて、親和性を増加させるアミノ酸置換がもたらされて、そして所望のFrizzledタンパク質への結合における親和性及び選択性を増加させるために親和性成熟によってさらに選択され得る。Frizzled結合部分の非限定的な例としては、PCT特許出願公開公報である国際公開第2016/040895号の図1に示されるFz27及びFz27-B12タンパク質が挙げられる。

30

【0157】

あるポリペプチドの実施形態においては、Lrp5/6結合ドメイン又は要素は、例えば K_D が少なくとも約 1×10^{-7} M、少なくとも約 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} Mである高親和性でLrp5/6に結合する任意のドメインから選択され得る。好適なLrp5/6結合ドメインは、デノボ設計のLrp5/6結合タンパク質、例えばscFv、Fab等である抗体由来の結合タンパク質、ならびに1又は複数のFzdタンパク質; ナノボディ由来の結合ドメイン; knottin系の改変足場; Norrin、DKK1、DKK2、DKK3、DKK4、スクレロスチン (sclerostin) を含むがこれに限定されない天然Lrp5/6結合タンパク質又はポリペプチド等の特異的に結合する抗体の他の部分、を含むがこれに限定されない。ある実施形態においては、Lrp5/6結合ドメインは、DKK1のC末端部分である。

40

【0158】

Lrp5/6結合ドメインは、例えば K_D が少なくとも約 1×10^{-7} M、少なくとも約 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} Mで、高親和性でLrp5又はLrp6に結合する任意のドメインから選択され得る。「LRP」、「LRPタンパク質」及び「LRP受容体」は、低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質ファミリーのタンパク質を指すために本明細書で用いる。これら受容体は、受容体介在性のエンドサイトーシスの過程で、リガンドを結合して内在化する1回膜貫通型タンパク質である。LRPタンパク質LRP5 (GenBankアクセッション番号NM00

50

2335. 2) 及びLRP6 (GenBankアクセッション番号NM002336. 2) が、Wnt受容体複合体に含まれる。

【0159】

好適なLRP5/6結合ドメインは、限定するものではないが、デノボ設計のLrp5/6結合タンパク質、例えばscFv、Fab等である抗体由来の結合タンパク質、ならびに1又は複数のFzdタンパク質；ナノボディ由来の結合ドメイン；knottin系の改変足場；限定するものではないがDKK1、DKK2、DKK3、DKK4、スクレロチンを含む天然のLrp5/6；Wise；上記のいずれかを含む融合タンパク質；上記のいずれかの誘導体；上記のいずれかのバリエーション；及び上記のいずれかの生物学的活性なフラグメント等の特異的に結合する抗体の他の部分、を含む。Lrp5/6結合ドメインは、結合を増強するように選択された親和性であり得る。

10

【0160】

Dickkopf (Dkk) 遺伝子ファミリーのメンバー (Krupnik et al. (1999) Gene 238 (2): 301-13を参照) は、Dkk-1、Dkk-2、Dkk-3及びDkk-4、ならびにDkk-3関連タンパク質Soggy (Sgy) を含む。hDkk1~4は、10個のシステイン残基の位置をファミリーメンバー間で高度に保存しているものである2つの別個の高システインドメインを含有する。ヒトDkkの遺伝子及びタンパク質の例示的な配列は、公に利用可能であり、例えば、Genbankアクセッション番号NM_014419 (soggy-1)；NM_014420 (DKK4)；AF177394 (DKK-1)；AF177395 (DKK-2)；NM_015881 (DKK3)；及びNM_014421 (DKK2)である。本発明の一部の実施形態においてはLrp6結合部分は、DKK1ペプチドであって、限定するものではないがヒトDKK1のC末端ドメインを含む。図5に示すように、C末端ドメインは、配列KMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGS HGLEIFQRC YCGEGLSCR IQKDHHQASNSSRLHTCQRH (配列番号714) (Genbankアクセッション番号NP_036374を参照) 又はその生物学的活性フラグメントを含み得る。

20

【0161】

DKKタンパク質のLRP5/6への結合は、Brott and Sokol Mol. Cell. Biol. 22 (17), 6100-6110 (2002)；及びLi et al. J. Biol. Chem. 277 (8), 5977-5981 (2002)で議論されており、それぞれ、参照により本明細書において詳細に援用される。ヒトDKK2の対応する領域 (Genbank参照NP_055236) は、配列KMSHIK GHEGDPCLRSSDCIEGFCCARHFWTKICKPVLHQGEVCTKQ RKKGS HGLEIFQRC DCAKGLSCKVWKDATYSSKARLHVCK (配列番号715) 又はその生物学的活性フラグメントを含み得る。

30

【0162】

Lrp5又はLrp6に特異的に結合する抗体は、当技術において公知であり、また市販されており、又はデノボで生成可能である。Lrp5、Lrp6又はそのフラグメントは、免疫原として、又は抗体を開発するための選別アッセイにおいて、用いることが可能である。公知の抗体の例としては、Gong et al. (2010) PLoS One. 5 (9): e12682；Ettenberg et al. (2010) Proc Natl Acad Sci U S A. 107 (35): 15473-8に開示されるもの、ならびにヒト起源の合成LRP5/6に対して生じてマウス及びヒト起源のLRP6及びLRP5の完全長かつタンパク質分解性のフラグメントの両方に結合する、例えばSanta Cruz biotechnology社の抗体クローン1A12；モノクローナル抗体2B11；Cell Signaling Technology社のLRP5に特異的な抗体 (D80F2)、カタログ番号5731等、市販のものが挙げられるがこれに限定されない。

40

【0163】

50

ポリペプチド及び結合ドメインはまた、上記に記載したポリペプチドの、誘導体、バリエーション及び生物学的活性フラグメントを含み得る。「バリエーション」ポリペプチドは、提供した配列と100%未満の配列同一性を有する、以下に規定する生物学的活性ポリペプチドを意味する。こうしたバリエーションには、提供された配列と比較して例えば挿入、欠失又は置換である1又は複数のアミノ酸改変を含むポリペプチドであって、例えば1又は複数のアミノ酸残基が、天然配列のN末端もしくはC末端に又は天然配列内に付加され；約1から40個のアミノ酸残基が欠失し、また随意に1又は複数の残基により置換された、当該ポリペプチドと、上記ポリペプチドの誘導体であって、得られる産物が非天然のアミノ酸を有するようにアミノ酸残基が共有結合的に改変された、当該誘導体とが含まれる。ある実施形態においては、生物学的活性バリエーションは、天然配列ポリペプチドと少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有することとなる。配列の「機能バリエーション」は、最初の配列と同じような定性的な生物学的特徴を有する化合物である。「機能バリエーション」には、配列のフラグメント及び配列のバリエーションであって、ただしそれらは共通の生物学的活性を有するものである、配列のフラグメント及び配列のバリエーションが含まれるがこれに限定されない。「バリエーション」の語は、ポリペプチド及びその共有結合的な改変の両方のアミノ酸配列バリエーションを包含する。

10

【0164】

Fzd結合ドメイン及びLrp5/6結合ドメインは、1つの球状ドメイン内で隣接し得るか、又は例えばポリペプチドリンカー又は非ペプチドリンカー等であるリンカーによって離間され得、本明細書に記載のもののいずれかを含むがこれに限定されない。リンカーの長さ、すなわち結合ドメイン間の間隔は、シグナル強度を調節するために用いることが可能であり、またWntシグナル伝達アゴニストの所望の使用に応じて選択可能である。実施される結合ドメイン間の距離は、変動可能であるが、ある実施形態においては、約100オングストローム未満、約90オングストローム未満、約80オングストローム未満、約70オングストローム未満、約60オングストローム未満、又は約50オングストローム未満であり得る。

20

【0165】

一部の実施形態においては、リンカーは、剛直なリンカーであり、他の実施形態においては、リンカーは、フレキシブルなリンカーである。リンカーがペプチドリンカーである場合、ある実施形態においては、それは、長さが約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれ以上のアミノ酸よりであり得、また結合ドメイン間の距離を保つのに十分である長さかつアミノ酸組成のものである。一部の実施形態においては、リンカーは、1もしくは複数のグリシン及び／もしくはセリンの残基を含むか、又は1もしくは複数のグリシン及び／もしくはセリンの残基からなる。

30

【0166】

本開示はまた、1又は複数のWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするポリヌクレオチド又は核酸配列と、発現ベクターを含む、これらポリヌクレオチドを含むベクターと、これらベクターを含む細胞とを含む。ある実施形態においては、ポリヌクレオチド又は核酸配列は、DNA又はRNAである。特定の実施形態においては、RNAはメッセンジャーRNA(mRNA)である。ある実施形態においては、RNAは、1又は複数の改変されたヌクレオチドを含む改変されたmRNAである。1又は複数の改変ヌクレオチドを含む改変mRNAは、安定性の増加、より高い発現レベル及び免疫原性の低下を含めた、改変されていないmRNAを超える利点を有することが記載されている。本発明により用いられ得る改変mRNAの非限定的な例が、例えばPCT特許出願公開公報、国際公開第2011/130624号、国際公開第2012/138453号、国際公開第2013052523号、国際公開第2013151666号、国際公開第2013/071047号、国際公開第2013/07

40

50

8199号、国際公開第2012045075号、国際公開第2014081507号、国際公開第2014093924号、国際公開第2014164253号、米国特許第8,278,036号（プソイドウリジンを含む改変mRNAを記載）、米国特許第8,691,966号（プソイドウリジン及び／又はN1-メチルプソイドウリジンを含む改変mRNAを記載）、米国特許第8,835,108号（5-メチルシチジンを含む改変mRNAを記載）、米国特許第8,748,089号（プソイドウリジン又は1-メチルプソイドウリジンを含む改変mRNAを記載）に記載されている。特定の実施形態においては、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド、又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする改変mRNA配列は、改変されていないA、G、U又はCリボヌクレオシドと比較して、少なくとも1つの改変を含む。特定の実施形態においては、少なくとも1つの改変ヌクレオシドは、N1-メチルプソイドウリジン及び／又は5-メチルシチジンを含む。特定の実施形態においては、改変mRNAは、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド、又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする配列が続き、例えばポリA又はポリA-G配列等である3'テール（tailing）配列が続く、5'末端キャップ配列を含む。

10

【0167】

特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、例えば発現ベクターであるベクターであり、また発現ベクターは、例えば細胞においてポリヌクレオチドの発現を駆動するプロモーター配列であるプロモーター配列に操作可能に連結した本明細書に記載の、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド、又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む。ある実施形態においては、ベクターはウイルスベクターであり、例えば、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド、又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするDNA又はRNA配列に操作可能に連結したプロモーターを含む発現カセットを含むポリヌクレオチドを含むウイルスである。特定の実施形態においては、発現カセットは、5'及び／又は3'の細胞UTR又はウイルスUTRを含む。

20

【0168】

本開示はまた、本明細書に記載するポリヌクレオチドに対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%のポリヌクレオチド配列同一性を有するバリエーションを含めた、本明細書に記載するポリヌクレオチドの機能フラグメント及びバリエーションを含む。こうしたバリエーションは、本明細書に開示する配列のいずれかと比較して、例えば1又は複数のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換である、1又は複数のヌクレオチド又はヌクレオシドの改変を含み得る。特定の実施形態においては、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞においてコードされたポリペプチドの発現を増強するように、コドン最適化される。特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドバリエーションは、1又は複数の改変されたヌクレオチド又はヌクレオシドを含む。

30

【0169】

本開示はまた、本明細書に記載するWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするポリヌクレオチド又はベクターを含む細胞を含む。ある実施形態においては、細胞は、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子を産生するために用いられ得る、例えばHEK293細胞等である宿主細胞である。主題の組成物を調製する際に、例えば哺乳動物細胞（例えば、293細胞）、昆虫細胞（例えば、SF9細胞）、微生物及び酵母を含めるがこれに限定されない、任意の宿主細胞を採用することができる。ある実施形態においては、細胞は、本明細書に記載するWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子により治療する対象に対して異種又は自己由来である。特定の実施形態においては、当該細胞は、対象から取得して、本明細書に記載するウイルスベクターにより形質導入された。特定の実施形態においては、形質導入された細胞は、治療のために対象に送達される。本開示はまた、1もしくは複数のWntポリペプチ

40

50

ド、N o r r i nポリペプチドもしくはW n tシグナル伝達アゴニスト分子を含む医薬組成物、又はW n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチドもしくはW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする配列を含む1もしくは複数のポリヌクレオチドもしくはベクターを含む。

【0170】

医薬組成物

本明細書に記載する組織特異性W n tシグナル増強分子、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントと、1又は複数の薬理的に許容可能な希釈剤、担体、又は賦形剤とを含む医薬組成物もまた開示する。特定の実施形態においては、医薬組成物は、本明細書に記載する1又は複数のW n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をさらに含む。

10

【0171】

さらなる実施形態においては、本明細書に記載する本明細書に記載する組織特異性W n tシグナル増強分子、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、1又は複数の薬理的に許容可能な希釈剤、担体、又は賦形剤とを含む医薬組成物もまた開示する。特定の実施形態においては、医薬組成物は、本明細書に記載するW n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む1又は複数のポリヌクレオチドをさらに含む。ある実施形態においては、ポリヌクレオチドはDNA又はmRNAであって、例えば改変されたmRNAである。特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列及び／又は3'テール(t a i l i n g)配列、例えばポリA尾部、をさらに含む改変mRNAである。他の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、コード配列と作動的に連結したプロモーターを含む発現カセットである。ある実施形態においては、組織特異性W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列と、W n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、同一のポリヌクレオチド内に存在する。

20

【0172】

さらなる実施形態においては、本明細書に記載する本明細書に記載する組織特異性W n tシグナル増強分子、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む、例えばウイルスベクターである発現ベクターと、1又は複数の薬理的に許容可能な希釈剤、担体、又は賦形剤とを含む医薬組成物もまた開示する。特定の実施形態においては、医薬組成物は、本明細書に記載するW n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む、例えばウイルスベクターである発現ベクターをさらに含む。ある実施形態においては、組織特異性W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列と、W n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、例えば発現カセットである、同一のポリヌクレオチド内に存在する。

30

【0173】

本発明は、本明細書に記載する本明細書に記載する組織特異性W n tシグナル増強分子、又は抗体もしくはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸に作動的に連結したプロモーターを含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞と、1又は複数の薬理的に許容可能な希釈剤、担体、又は賦形剤とを含む医薬組成物をさらに検討する。特定の実施形態においては、医薬組成物は、本明細書に記載するW n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列に作動的に連結したプロモーターを含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞をさらに含む。ある実施形態においては、組織特異性W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列と、W n tポリペプチド、N o r r i nポリペプチド又はW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、例えば発現カセットである同一のポリヌクレオチド内に及び／又は同一の細胞内に、存在する。特定の実施形態においては、細胞は、異種細胞

40

50

胞であるか、又は処置しようとする対象から取得した自己細胞である。特定の実施形態においては、細胞は、幹細胞であり、例えば脂肪由来の幹細胞又は造血幹細胞である。

【0174】

本開示は、第1の活性薬剤として組織特異性Wntシグナル増強分子を送達するための第1の分子と、第2の活性薬剤としてWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストを送達するための第2の分子とを含む医薬組成物を検討する。第1の分子及び第2の分子は、同一の種類の分子であってもよく、又は異なる種類の分子であってもよい。例えば、ある実施形態においては、第1の分子及び第2の分子は、以下の種類の分子からそれぞれ独立に選択され得る：ポリペプチド、有機小分子、第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸（随意にDNA、又はmRNA、随意に改変RNA）、第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸配列を含むベクター（随意に、発現ベクター又は発現ウイルスベクター）、及び第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸配列を含む細胞（随意に発現カセット）。

10

【0175】

主題の分子は、単独で又は組み合わせて、概して安全で、無毒性で及び所望であり、また例えばヒト又は霊長類である哺乳動物での使用に容認可能である賦形剤を含む製剤を調製する際に有用である、薬理学的に許容可能な担体、希釈剤、ならびに薬剤と組み合わせることが可能である。こうした賦形剤は、固体、液体、半固体、又はエアロゾル組成物である場合には気体のものとするのが可能である。こうした担体又は希釈剤の例としては、水、生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖液、及び5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これに限定されない。補足的に活性化合物を、製剤中に取り入れることも可能である。製剤に用いる溶液又は懸濁剤としては、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒等である滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベン等である抗菌化合物；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム等である酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等であるキレート化合物；酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩等の緩衝剤；凝集を防止する、Tween 20等である界面活性剤；及び、塩化ナトリウム、又はブドウ糖等である張度調整用の化合物を挙げることができる。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウム等である酸又は塩基で調節可能である。特定の実施形態においては、医薬組成物は無菌である。

20

【0176】

医薬組成物は、滅菌の水溶液又は分散剤（dispersion）と、滅菌の注射可能な水溶液又は分散剤の即時調製のため滅菌粉末とをさらに含み得る。静脈内投与に関して、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、又はリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。一部の例においては、組成物は滅菌であり、また容易な通針性が存在する程度に流動的である必要がある。ある実施形態においては、当該組成物は、製造及び保存条件下で安定であり、また例えば細菌及びカビ等の微生物の汚染作用に対抗して保存される。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）及びそれらの好適な混合物を含有する、例えば溶媒又は分散媒であり得る。例えば、レシチン等のコーティングを用いることによって、分散の場合は必要な粒径を保持することによって、及び界面活性剤を用いることによって、適切な流動性を維持することが可能である。例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等である様々な抗菌剤及び抗真菌剤によって、微生物の作用を防止することが可能である。多くの場合においては、例えば糖類、マンニトール、ソルビトール等である多価アルコール、塩化ナトリウムである等張剤を組成物中に含むことが好ましいこととなる。例えばステアリン酸アルミニウム及びゼラチンである、吸収を遅延させる薬剤を組成物中に含ませることによって、体内での組成物の吸収を長引かせることが可能である。

30

40

【0177】

滅菌溶液は、適切な溶媒中で必要量の組織特異性Wntシグナル増強分子に上記の列挙した成分のうちの1つ又は組み合わせと合わせて、必要であればその後ろに濾過滅菌するこ

50

とにより、調製することが可能である。概して、分散剤は、基礎分散媒と、上記に列挙したものよりの必要な他の成分とを含有する滅菌ビヒクル内に、活性化化合物を合わせることで、調製可能である。滅菌注射液の調製のための滅菌粉剤の場合、調製方法は、予め濾過滅菌したその溶液から、いずれかのさらなる所望の成分が加わった活性成分の粉末を生じるものである、真空乾燥及び凍結乾燥である。

【0178】

一実施形態においては、医薬組成物は、体からの急速な排除から融合タンパク質を保護することとなるような担体と共に調製され、例えば、植込錠及びマイクロカプセル化送達システムを含めた放出制御製剤等である。例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸等である、生分解性の、生体適合性の高分子を用いることが可能である。こうした製剤の調製方法は、当業者にとって明らかであろう。物質はまた、市販のものを取得することもできる。リボソーム懸濁液もまた、薬理学的に許容可能な担体として使用可能である。これらは、当業者にとって公知である方法に従って調製可能である。

【0179】

投与し易さ及び投与量の均一性のために、投与単位形態で医薬組成物を製剤化することが有利であり得る。本明細書で用いる場合、投与単位形態は、処置しようとする対象に対して、単位投薬量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位が、必要な医薬担体と関連して所望の治療効果を生じるように計算された活性化化合物の所定の量を含有する。本発明の投与単位形態に関する規格は、活性化化合物の固有の特性及び達成しようとする特定の治療効果、ならびに個体の治療のためのこうした活性化化合物を調剤する技術が本来もつ制限によって決まり、またこれらに直接依存する。

【0180】

医薬組成物は、投与指示書と共に、容器、バック、又は例えばシリンジ、例えば事前充填シリンジである分注器の中に含めることが可能である。

【0181】

本発明の医薬組成物は、任意の薬理学的に許容可能な塩、エステル、もしくは当該エステルの塩、又はヒトを含めた動物に投与すると生物学的に活性である組織特異性Wntシグナル増強分子を提供（直接又は間接的に）することが可能である任意の他の化合物を包含する。

【0182】

本発明は、本明細書に記載する組織特異性Wntシグナル増強分子の薬理学的に許容可能な塩を含む。「薬理学的に許容可能な塩」の語は、本発明の化合物の生理学的及び薬理学的に許容可能な塩を指し、すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を保持して、それに対して望まない毒性効果は与えない塩である。様々な薬理学的に許容可能な塩が当技術で公知であり、例えば、“Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985（及びそのより最近の版）に、“Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology”, 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007に、及びJ. Pharm. Sci. 66:2 (1977)に記載されている。また、好適な塩の検討のためには、Stahl及びWermuthによる“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” (Wiley-VCH, 2002)を参照されたい。

【0183】

薬理学的に許容可能な塩基添加塩は、アルカリ金属及びアルカリ土類金属もしくは有機アミン等の金属又はアミンにより形成される。陽イオンとして用いられる金属には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等が含まれる。アミンには、N-N’-ジ

10

20

30

40

50

ベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジクロロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、及びプロカインが含まれる（例えば、Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharma Sci., 1977, 66, 119を参照）。当該酸性化合物の塩基添加塩は、遊離酸形態を、従来の方法で塩を生じるのに十分な量の所望の塩基と接触させることによって調製される。この遊離酸形態は、当該塩形態をある酸と接触させて、従来の方法で遊離酸を単離することによって元に戻すことができる。遊離酸形態は、例えば極性溶媒中での溶解度等である特定の物性がそれらのそれぞれの塩形態といくらか相違するが、当該塩は、本発明の目的でのそれらのそれぞれの遊離酸と等価である。

【0184】

一部の実施形態においては、本明細書で提供する医薬組成物は、例えば生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、リン酸塩及びアミノ酸、ポリマー、ポリオール、糖、緩衝液、防腐剤及び他のタンパク質である薬理学的に許容可能な担体、希釈剤ならびに／又は賦形剤との混合物中に、本明細書に記載する治療有効量の組織特異性Wntシグナル増強分子を含む。例示的なアミノ酸、ポリマー及び糖等には、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール化合物、ポリエチレングリコールモノステアレート化合物、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖、果糖、ブドウ糖、マルトース、グルコース、マンニトール、デキストラン、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、キシリトール、乳糖、トレハロース、ウシ又はヒト血清アルブミン、クエン酸塩、酢酸塩、リンゲル液及びハンクス液、システイン、アルギニン、カルニチン、アラニン、グリシン、リシン、バリン、ロイシン、ポリビニルピロリドン、ポリエチレン及びグリコールがある。この製剤は、4℃で少なくとも6ヶ月間安定であることが好ましい。

【0185】

一部の実施形態においては、本明細書で提供する医薬組成物は、例えばリン酸緩衝食塩水（PBS）又はリン酸ナトリウム／硫酸ナトリウム、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、滅菌水、及び例えばGood et al. (1966) Biochemistry 5: 467に記載のもの等の当業者に公知である他の緩衝液である、緩衝液を含む。緩衝液のpHは、6.5から7.75、好ましくは7から7.5、及び最も好ましくは7.2から7.4の範囲内にあり得る。

【0186】

Wnt活性又はWnt受容体細胞表面発現を増加させる方法

融合タンパク質に関して本明細書において例示された、組織特異性Wntシグナル増強分子を、標的の組織又は細胞型におけるWntシグナル伝達を増加させるのに用いることができる。特定の実施形態においては、Wntシグナル伝達は、古典的Wntシグナル伝達である。すなわち、一部の態様においては、本発明は、標的組織又は細胞におけるWntシグナル伝達を増加又は増強する方法であって、当該標的組織又は細胞を本明細書に開示する有効量の組織特異性Wntシグナル増強分子と接触させることを含み、当該分子は、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞における細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。一部の実施形態においては、接触させることは、インビトロ、エキソビボ、又はインビボで生じ、例えば主題の組織特異性Wntシグナル増強分子が対象に投与又は提供される。特定の実施形態においては、細胞は、培養細胞であり、また接触させることはインビトロで生じる。

【0187】

ある実施形態においては、方法は、標的組織又は細胞を、本明細書に記載する1又は複数のWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子とさらに接触させることを含む。本開示は、第1の活性薬剤として組織特異性Wntシグナル増強分子を送達するための第1の分子と、及び第2の活性薬剤としてWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストを送達するための第2の分子と、標的組織又は細胞を接触させることを検討する。第1の分子及び第2の分子は、同一の種類の分子であってもよく、又は異なる種類の分子であってもよい。例え

ば、ある実施形態においては、第1の分子及び第2の分子は、以下の種類の分子からそれぞれ独立に選択され得る：ポリペプチド、有機小分子、第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸（随意にDNA、又はmRNA、随意に改変RNA）、第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸配列を含むベクター（随意に、発現ベクター又は発現ウイルスベクター）、及び第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸配列を含む細胞（随意に発現カセット）。

【0188】

関連の態様においては、本発明は、標的組織又は細胞におけるWntシグナル伝達を増加させる方法であって、当該標的組織又は細胞を本明細書に開示する組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のポリヌクレオチドと接触させることを含み、当該分子は、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞上の細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、標的の組織又は細胞はまた、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと接触させる。ある実施形態においては、ポリヌクレオチドはDNA又はmRNAであって、例えば改変されたmRNAである。特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列及び／又は3'テール（tailing）配列、例えばポリA尾部、をさらに含む改変mRNAである。他の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、コード配列と作動的に連結したプロモーターを含む発現カセットである。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、同一のポリヌクレオチド内に存在する。

【0189】

関連の態様においては、本発明は、標的組織又は細胞におけるWntシグナル伝達を増加させる方法であって、当該標的組織又は細胞を本発明の組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターと接触させることを含み、当該分子は、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞上の細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、標的の組織又は細胞はまた、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含むベクターと接触させる。ある実施形態においては、ベクターは発現ベクターであり、また核酸配列と作動的に連結したプロモーターを含み得る。特定の実施形態においては、ベクターはウイルスベクターである。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、例えば同一の発現カセット内である、同一のベクター内に存在する。

【0190】

関連の態様においては、本発明は、標的組織におけるWntシグナル伝達を増加させる方法であって、当該標的組織を本発明の組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量の細胞と接触させることを含み、当該分子は、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞上の細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、標的組織はまた、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む細胞と接触させる。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、同一の細胞内に存在する。特定の実施形態においては、細胞は、異種細胞であるか、又は処置しようとする対象から取得した自己細胞である。ある実施形態においては、細胞は、組織特異性Wntシグナル増強分子又はWntポリペプチド、NorrinポリペプチドもしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする発現カセットを含むベクターにより形質導入された。特定の実施形態においては、細胞は、幹細胞であり、例えば脂肪由来の幹細胞又は造血幹細胞である。

【0191】

Wntシグナル伝達を増加させる本明細書に記載する方法のいずれかを、例えば肝臓組織細胞である、標的細胞の表面上のFrizzled (Fz) 受容体の数を増加させるのに用いることもできる。ある実施形態においては、標的細胞の表面のFz受容体の数が、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、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2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍、増加する。特定の実施形態においては、Fz受容体は、ヒトFrizzledタンパク質Fz1、Fz2、Fz3、Fz4、Fz5、Fz6、Fz7、Fz8、Fz9、Fz10のうちの1又は複数を含む。例えば、本開示は、標的細胞の表面上のFz受容体を増加させる方法であって、当該細胞を本明細書に開示する有効量の組織又は細胞特異性Wntシグナル増強分子と接触させることを含み、当該分子は、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞における細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。特定の実施形態においては、細胞は肝細胞であり、またターゲティングモジュールは、ASGR1又はASGR2に結合する。ある実施形態においては、ターゲティングモジュールは、本明細書に開示する抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。一部の実施形態においては、接触させることは、インビトロ、エキソビボ、又はインビボで生じ、例えば組織特異性Wntシグナル増強分子が対象に投与又は提供される。特定の実施形態においては、細胞は、培養細胞であり、また接触させることはインビトロで生じる。ある実施形態においては、標的細胞又は組織は、最初に、Wntシグナル増強分子に直接接触し、一方で他の関連の実施形態においては、細胞は、それによって細胞がポリヌクレオチドを取り込みWntシグナル増強分子を発現するものである、Wntシグナル増強分子をコードするポリヌクレオチド、例えば発現ベクター、と最初に接触する。ある実施形態においては、方法は、標的の組織又は細胞を、本明細書に記載する1又は複数のWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子とさらに接触させることを含む。

【0192】

Wntシグナル伝達を増加させる本明細書に記載する方法のいずれかを、例えば肝臓組織細胞である、標的細胞上のKif67を増加させるのに用いることもできる。

疾患及び障害を治療する方法

【0193】

融合タンパク質に関して本明細書において例示された、組織特異性Wntシグナル増強分子を、例えば標的の細胞、組織又は器官におけるWntシグナル伝達を増加させることによって、疾患、障害又は症状を治療することに用いることができる。すなわち、一部の態様においては、本発明は、それを必要とする対象において、例えばWntシグナル伝達の低下と関連する、又はそれに対してWntシグナル伝達の増加が治療効果をもたらすことになるような疾患又は障害である、疾患又は症状を治療する方法であって、当該対象を、本開示の有効量の組成物と接触させることを含み、当該方法を提供する。特定の実施形態においては、組成物は、組織特異性Wntシグナル増強分子であって、例えば小分子又はポリペプチド；組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド、例えばDNA又はmRNA、随意に改変mRNA；組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクターであって、例えば発現ベクターもしくは発現ウイルスベクター；又は、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む細胞であって、例えば組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする発現ベクターもしくは発現ウイルスベクターにより形質導入した細胞、のうちのいずれかを含む医薬組成物である。特定の実施形態においては、疾患又は症状は、病理学的な疾患もしくは障害であるか、又は、損傷であって、例えば負傷の結果による損傷である。ある実施形態においては、当該負傷は、別の治療的な処置の結果であり得る。ある実施形態においては、疾患又は症状は、組織の修復、治癒もしくは再生の不良を含むか、又は組織の修復、治癒もしくは再生を増すことが有益となることとなる。一部の実施形態においては、接触させることはインビボで生じるものであり、すなわち主題の組成物を対象に投与する。

【0194】

ある実施形態においては、方法は、対象を、本明細書に記載する1又は複数のWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子を含む医薬組成物とさらに接触させることを含む。本開示は、第1の活性薬剤として組織特異性Wntシグナル増強分子を送達するための第1の分子と、及び第2の活性薬剤としてWntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストを送達するための第2の分子と、対象を接触させることを検討する。第1の分子及び第2の分子は、同一の種類の分子であってもよく、又は異なる種類の分子であってもよい。例えば、ある実施形態においては、第1の分子及び第2の分子は、以下の種類の分子からそれぞれ独立に選択され得る：ポリペプチド、有機小分子、第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸（随意にDNA、又はmRNA、随意に改変RNA）、第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸配列を含むベクター（随意に、発現ベクター又は発現ウイルスベクター）、及び第1の活性薬剤又は第2の活性薬剤をコードする核酸配列を含む細胞（随意に発現カセット）。

10

【0195】

関連の態様においては、本発明は、例えばWntシグナル伝達の低下と関連する、又はそれに対してWntシグナル伝達の増加が治療効果をもたらすことになるような疾患又は障害である、疾患又は症状を治療する方法であって、それを必要とする対象を、本発明の組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のポリヌクレオチドを含む医薬組成物と接触させることを含み、当該分子が、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞における細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、当該対象はまた、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量のポリヌクレオチドを含む医薬組成物と接触させる。ある実施形態においては、ポリヌクレオチドはDNA又はmRNAであって、例えば改変されたmRNAである。特定の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列及び／又は3'テール（tailing）配列、例えばポリA尾部、をさらに含む改変mRNAである。他の実施形態においては、ポリヌクレオチドは、コード配列と作動的に連結したプロモーターを含む発現カセットである。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、同一のポリヌクレオチド内に存在する。

20

30

【0196】

関連の態様においては、本発明は、例えばWntシグナル伝達の低下と関連する、又はそれに対してWntシグナル伝達の増加が治療効果をもたらすことになるような疾患又は障害である、疾患又は症状を治療する方法であって、それを必要とする対象を、本発明の組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターを含む医薬組成物と接触させることを含み、当該分子が、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞における細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、当該対象はまた、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量のベクターを含む医薬組成物と接触させる。ある実施形態においては、ベクターは発現ベクターであり、また核酸配列と作動的に連結したプロモーターを含み得る。特定の実施形態においては、ベクターはウイルスベクターである。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、例えば同一の発現カセット内である、同一のベクター内に存在する。

40

【0197】

関連の態様においては、本発明は、例えばWntシグナル伝達の低下と関連する、又はそれに対してWntシグナル伝達の増加が治療効果をもたらすことになるような疾患又は障害である、疾患又は症状を治療する方法であって、それを必要とする対象を、本発明の

50

組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量の細胞を含む医薬組成物と接触させることを含み、当該分子が、組織又は細胞特異的に標的組織又は細胞における細胞表面受容体に結合するターゲティングモジュールを含む、当該方法を提供する。ある実施形態においては、対象はまた、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む細胞と接触させる。ある実施形態においては、組織特異性Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、Norrinポリペプチド又はWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが、同一の細胞内に存在する。特定の実施形態においては、細胞は、異種細胞であるか、又は処置しようとする対象から取得した自己細胞である。ある実施形態においては、細胞は、組織特異性Wntシグナル増強分子又はWntポリペプチド、NorrinポリペプチドもしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする発現カセットを含むベクターにより形質導入された。特定の実施形態においては、細胞は、幹細胞であり、例えば脂肪由来の幹細胞又は造血幹細胞である。

10

【0198】

Wntシグナル伝達は、幹細胞の発達プロセスと維持において重要な役割を担う。損傷及び疾患の後の大部分の組織の再生と修復に、Wntシグナルの再活性化が関連する。組織特異性Wntシグナル増強分子が、損傷及び疾患に対して治癒及び組織修復の利益を提供し得る。組織の損傷及び喪失の原因には、加齢、変性、遺伝性疾患、感染及び炎症、外傷、毒素／代謝による毒性、又は他の病状が挙げられるが、これに限定されない。Wntシグナル及びWntシグナルのエンハンサーが、成人の組織常在性の幹細胞を活性化することが示されている。一部の実施形態においては、本発明の化合物は、疾患の又は損傷した組織の治療での使用、組織の再生での使用、及び細胞成長及び増殖での使用、ならびに／又はティッシュエンジニアリングでの使用のために、投与される。

20

【0199】

Wnt経路の変異と関連するヒトの疾患が、疾患の治療及び予防におけるWntシグナルの増強に関して大きなエビデンスを提供する。インビボ及びインビトロでの前臨床試験により、多数の病状におけるWntシグナルの関与のさらなるエビデンスが提供され、また種々のヒト疾患における組織特異性Wntシグナル増強分子の利用がさらに裏付けられる。例えば、本発明の組成物を用いて、骨の成長又は再生、骨移植、骨折の治癒、骨粗しょう症及び骨粗しょう症性骨折の治療、脊椎融合症、整形外科的デバイスの骨結合（osseointegration）、腱－骨の統合、歯の成長及び再生、歯科インプラント、歯周病、顎顔面の再建、ならびに顎の骨壊死、を促進又は増加させることができる。それらはまた、脱毛症の治療で；例えば内耳及び外耳の聴毛細胞の再生を含めた聴覚障害の治療、前庭機能不全の治療、黄斑変性の治療、硝子体網膜症、糖尿病性網膜症、又は網膜変性の他の疾患、フックスジストロフィー、他の角膜疾患等を含めた網膜症の治療、感覚器官の再生の増強で；脳卒中、外傷性脳障害、アルツハイマー病、多発性硬化症、及び血液脳関門の変性又は完全性に影響を及ぼす他の症状の治療で；脊髄損傷、他の脊髄疾患の治療で、用いてもよい。本発明の組成物は、口腔粘膜炎症、黄斑変性症の治療、クローン病（CD）及び潰瘍性大腸炎（UC）であって特に瘻孔形成を伴うCD及びUCを含めるがこれに限定されない、短腸症候群、炎症性腸疾患（IBD）の治療で；他の胃腸障害；メタボリックシンドロームの治療で；糖尿病の治療、膵炎、膵外分泌部又は膵内分泌部の組織の損傷の症状の治療で；表皮再生の増強が望まれる症状で、例えば上皮の創傷治癒、糖尿病性足部潰瘍、歯、爪又は皮膚の形成不全等に関与する症候群、血管新生が有効である症状の治療；心筋梗塞、冠動脈疾患、心不全の治療；造血細胞の増殖の増強、例えば骨髓、誘導末梢血（mobilized peripheral blood）からの造血幹細胞移植の増強、免疫不全症、移植片対宿主病等の治療；急性腎損傷、慢性腎臓病の治療；肺疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、特発性肺線維症の治療、特に幹細胞（例えばAT2及びAT1細胞）の増殖及び分化である肺組織の再生の増強で、用いてもよい。本発明の組成物はまた、肝細胞の再生の増強、例えば肝再生、肝硬変の治療、肝移植の増強、急性肝不全の治療、肝炎（A、B又はC）ウイルス感染による又は抗ウイルス薬療法後

30

40

50

の慢性肝疾患、アルコール性肝炎を含めたアルコール性肝疾患、脂肪肝又は脂肪性肝炎による非アルコール性肝疾患等の治療で、用いてもよい。本発明の組成物は、新生細胞の増殖が望まれる症状を含むがこれに限定されない疾患及び障害を治療することができる。

【0200】

Wntシグナル伝達成分における機能喪失型変異又は機能獲得型変異に関与するヒトの遺伝学により、骨成長のためにWntシグナルが増強されることを裏付ける大きなエビデンスが示される。骨成長の増強が望まれる症状には、骨折、移植、人工装具周辺の内方成長、骨粗しょう症、骨粗しょう症性骨折、脊椎融合症、顎の骨壊死、歯科インプラント、歯周病、顎顔面の再建等を挙げることができるがこれに限定されない。組織特異性Wntシグナル増強分子は、骨再生を促進するのに重要であるWntシグナルを増強及び促進する。骨組織の再生方法は、本発明の化合物の投与により利益を受けるものであり、当該投与は、全身的又は局所的とすることが可能である。一部の実施形態においては、骨髓細胞を、本発明の分子に曝露することで、骨髓内の幹細胞が活性化することとなる。

10

【0201】

一部の実施形態においては、骨再生は、例えば骨髓、骨前駆細胞、骨幹細胞等の反応性細胞集団を、有効量の本発明の分子と接触させることによって増強される。骨組織の再生方法は、本発明の化合物の投与により利益を受けるものであり、当該投与は、全身的又は局所的とすることが可能である。一部のこうした実施形態においては、接触させることは、インビボで実施する。他のこうした実施形態においては、接触させることは、エキソビボで実施する。分子は、例えば、随意に生分解性であり、また随意に活性薬剤の徐放をもたらすような基剤に充填することによって、作用部位に局在化させてもよい。基剤担体としては、吸収性コラーゲンスポンジ、セラミックス、ハイドロゲル、重合体ミクロスフェア、ナノ粒子、骨セメント等が挙げられるが、これに限定されない。

20

【0202】

本発明の分子の1又は複数を含む組成物は、骨格組織欠乏症のインビボでの治療に用いることが可能である。「骨格組織欠乏症」は、例えば外科手術的介入の結果、腫瘍の除去、潰瘍、植込み、骨折、又は他の外傷的もしくは変性による症状のいずれであるかのような、どのように欠乏症が発生したかにかかわらず、骨又は結合組織を修復することが望まれる任意の部位での骨又は他の骨格の結合組織における欠乏症を意味する。本発明の組成物は、変性性の磨耗及び関節炎、組織に対する外傷、半月板断裂の置換、半月板切除、靱帯損傷による関節脱臼、関節のアラインメント不良、骨折等の、又は遺伝性疾患による、軟骨組織における欠陥又は損傷の修復のため、結合細胞に軟骨機能を修復するためのレジメンの一部として用いることが可能である。

30

【0203】

本発明の組成物はまた、歯周病の治療で用いてもよい。歯周病は、歯の喪失の主要原因であり、また複数の全身症状に関連する。一部の実施形態においては、歯の再生又は根底にある骨の再生は、反応性細胞集団を接触させることによって増強される。一部のこうした実施形態においては、接触させることは、インビボで実施する。他のこうした実施形態においては、接触させることは、エキソビボで実施し、その後、活性化された幹細胞又は前駆細胞の植込みを伴う。分子は、例えば、随意に生分解性であり、また随意に活性薬剤の徐放をもたらすような基剤に充填することによって、作用部位に局在化させてもよい。基剤担体としては、吸収性コラーゲンスポンジ、セラミックス、ハイドロゲル、骨セメント、重合体ミクロスフェア、ナノ粒子等が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0204】

Wntシグナル伝達及びRespondinの生物学は、損傷、加齢又は変性の後に内耳の感覚有毛細胞の再生を促進することができるということが研究により示されてきた。聴覚障害又は前庭機能不全に関与する内耳の感覚有毛細胞の喪失もまた、本発明の組成物により利益を受け得る。内耳においては、聴覚器官が、音の振動を電気インパルスに変換するために必要な機械受容性の有毛細胞を収容する。半規管(SSC)、卵形嚢及び球形嚢からなる前庭の器官もまた、頭部の位置及び動作を感知するための感覚有毛細胞を含有

50

する。本発明の組成物は、聴覚の再生を増強するために、耳への、例えば注入、基剤もしくは他の徐放性製剤の系、又は他の局所的な適用、で用いることが可能である。

【0205】

本発明の組成物はまた、網膜組織の再生に用いてもよい。成人哺乳動物の網膜においては、例えばインビボでの神経毒性の損傷の後で、ミューラーグリア細胞は視細胞を含めて網膜細胞を再生することが可能である。Wntシグナル伝達及びWntシグナルのエンハンサーにより、損傷後又は変性中のミューラーグリア細胞由来の網膜前駆細胞の増殖を促進することが可能である。本発明の組成物はまた、目の組織及び他の細胞型の再生で用いてもよい。例えば、加齢性黄斑変性（AMD）、他の網膜変性疾患、角膜の疾患、フックスジストロフィー、硝子体網膜症、遺伝性疾患等は、本発明の組成物より利益を受けることが可能である。AMDは、中心視覚及び視力の進行性低下を特徴とする。フックスジストロフィーは、角膜の内皮細胞の進行性喪失を特徴とする。Wntシグナルと、Wntシグナルの増強とにより、目の組織において、角膜の内皮細胞、網膜の上皮細胞等の再生を促進することが可能である。他の実施形態においては、本発明の組成物を、網膜の再生及び黄斑変性の治療のために、目への、例えば注入、基剤もしくは他の徐放性製剤の系、又は他の局所的な適用、で用いることが可能である。

【0206】

肝細胞の恒常的再生のための増殖細胞の特定の集団は、系列追跡研究を通して特定されており、例えば、中心静脈周囲（peri-central）領域におけるAxin2陽性細胞である。系列追跡研究によれば、さらなる潜在的な肝前駆細胞も特定されており、Lgr5陽性細胞が含まれるがこれに限定されない。Lgr5陽性細胞及びAxin2陽性細胞を含む、自己再生性の肝細胞及び潜在的な他の前駆細胞の集団は、損傷後にWntシグナル及び／又はR-spondinに応答して再生することが可能であることが特定されている。急性の肝損傷及び肝不全ならびに慢性の肝疾患の多数の前臨床モデルが、Wntシグナルの増強により利益を受ける肝細胞の回復と再生とを見せた。ある実施形態においては、本発明の組成物は、例えば、急性肝不全（あらゆる原因の）、急性アルコール性肝損傷、C型肝炎もしくはB型肝炎ウイルス感染による又は抗ウイルス薬療法後の慢性肝疾患、慢性アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）（脂肪肝）、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、肝硬変、あらゆる原因の重度の慢性肝疾患、あらゆる原因の急性肝不全、薬物誘発性の急性肝不全、アルコール性肝疾患、慢性肝不全（あらゆる原因の）、あらゆる原因の肝線維症、門脈圧亢進、あらゆる原因の慢性肝不全、アルコール性肝炎、C型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患（HCV）、B型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患（HBV）、他のウイルス性肝炎（例えば、A型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患（HAV）及びD型肝炎ウイルス誘発性の肝疾患（HDV））、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、肝臓の（liver）外科手術、肝損傷、肝移植、肝臓の外科手術及び移植における「過小グラフト（small for size）」症候群、先天性の肝疾患及び肝障害、その他の、遺伝性疾患、変性、加齢、薬物又は損傷によりもたらされる、肝臓の障害又は異常、の治療に用いることができる。それらはまた、インビボ又はインビトロにおける、肝細胞の再生を増強するのに用いてもよい。肝組織の再生方法は、本発明の化合物の投与により利益を受けるものであり、当該投与は、全身的又は局所的とすることが可能である。これらには、例えば肝細胞への注入による、肝臓に至る静脈又は血管への注入による、徐放性製剤の植込みによる等、全身的投与方法及び局所的投与方法が含まれるが、これに限定されない。

【0207】

本発明の組成物は、末期肝疾患（ESLD）の治療に用いてもよい。ESLD又は慢性肝不全は、重度の肝硬変及びその結果生じる肝線維症の結果であることが多い。ESLDは、腹水症、静脈瘤出血、肝性脳症及び／又は肝機能障害（例えば、非代償性肝疾患）の発達によって現れる。ESLDに関連するよくある疾患又は障害には、アルコール性肝炎、慢性C型肝炎感染症、慢性B型肝炎感染症、慢性D型肝炎感染症、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を含めた非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）、ならびに嚢胞性

線維症、アルファ-1アンチトリプシン欠損症、ヘモクロマトーシス、ウィルソン病、ガラクトース血症及び糖原病等の遺伝病が含まれる。薬物、毒性化学物質、寄生虫感染症に長期的に曝露すること、及びうっ血肝を伴う繰り返す心不全もまた、結果的にESLDを生じ得る。

【0208】

Wntシグナルは、種々の上皮組織の再生において重要な役割を果たす。種々の上皮の症状は、本発明の化合物による治療により利益を得る。胃腸管内を被覆する急速に分化した上皮細胞の崩壊があったときに粘膜炎が発生するが、これは粘膜組織を潰瘍及び感染を受けやすいままにさせる。口腔粘膜と呼ばれる口腔内を覆う上皮被覆層の一部は、身体のうちで最も感度が高い部分のひとつであり、特に化学療法及び放射線に対して脆弱である。口腔粘膜炎は、特に化学療法及び放射線であるガン治療の、おそらく最もよくある消耗性の合併症である。さらに、本発明の組成物はまた、腸内粘膜炎、短腸症候群、炎症性腸疾患（IBD）又は他の胃腸障害の治療に有益であり得る。他の上皮の症状には、表皮の創傷治癒、糖尿病性足部潰瘍、歯、爪又は皮膚の形成不全を伴う症候群等が含まれる。本発明の分子は、これら全ての症状で用いられてよいものであり、再生性の細胞を、本発明の化合物と接触させる。上皮組織の再生方法は、本発明の化合物の投与により利益を受けるものであり、当該投与は、全身的又は局所的とすることが可能である。接触させることは、ゲル、ローション、クリーム等で、例えば、皮内、皮下的に、標的部位に適用する等を含めて局所的とすることが可能である。

【0209】

WntシグナルならびにWntシグナルの増強及び促進はまた、皮膚及び胃腸管に加えて、前臨床モデルの膵臓、腎臓及び肺を含めた、組織の修復ならびに再生で重要な役割を果たす。組織特異性Wntシグナル増強分子は、膵外分泌部及び膵内分泌部、腎臓又は肺に関与する種々の病状に有益であり得る。本発明の組成物は、メタボリックシンドロームの治療；糖尿病の治療、急性又は慢性の膵炎、膵外分泌不全の治療、急性腎損傷、慢性腎臓病の治療、慢性閉塞性肺疾患（COPD）を含めるがこれに限定されない肺疾患、特発性肺線維症、肺上皮組織喪失が原因の他の症状の治療で用いることができる。これら組織の再生方法は、本発明の化合物の投与により利益を受けるものであり、当該投与は、全身的又は局所的とすることが可能である。

【0210】

上皮のWntシグナル伝達は、他の発生活因子を介したシグナル伝達と協働して、成人の毛包再生に重要である。脱毛はよくある問題であり、しばしば男性型禿頭症と呼ばれる男性型脱毛症は、男性における脱毛の最もよくある形態である。一部の実施形態においては、毛包再生は、反応性細胞集団を本発明の分子と接触させることによって増強される。一部のこうした実施形態においては、接触させることは、インビボで実施する。他のこうした実施形態においては、接触させることは、エキソビボで実施する。分子は、例えば外用のローション、ゲル、クリーム等、作用部位に局在化させてもよい。

【0211】

脳卒中、外傷性脳障害、アルツハイマー病、多発性硬化症、及び、血液脳関門（BBB）に影響を及ぼす他の症状を、本発明の組織特異性Wntシグナル増強分子で治療することができる。血管新生は、全身にわたって多数の組織への酸素及び栄養素の供給を確実にするために重要であり、また神経組織は低酸素症及び虚血に対して極めて敏感であるため、CNSにとって特に重要である。BBBを形成するCNS内皮細胞は、接着結合により共に結合している非常に分極した細胞であって、特異的なトランスポーターを発現するという点で、非神経組織における内皮細胞と異なる。Wntシグナル伝達は、CNSの血管形成及び／又は機能を調節する。BBBが危険に晒される症状は、本発明の化合物の投与により利益を受けることが可能であり、当該投与は、例えば直接の注入、くも膜下腔内注射、徐放性製剤の植込み等による、全身的又は局所的とすることが可能である。さらに、Wntシグナルは、神経形成に積極的に関与し、損傷後の神経保護という重要な役割を果たす。本発明の組成物はまた、脊髄損傷、他の脊髄疾患、脳卒中、外傷性脳障害等の治療

で用いてもよい。

【0212】

Wntシグナルはまた、血管新生に役立つ。組織特異性Wntシグナル増強分子は、血管新生が心筋梗塞、冠動脈疾患、心不全等の有益な治療となるような症状、及び遺伝性疾患の症状、に有益であり得る。これら組織の再生方法は、本発明の化合物の投与により利益を受けるものであり、当該投与は、全身的又は局所的とすることが可能である。

【0213】

ある実施形態においては、本発明の方法が、例えば、損傷又は組織もしくは細胞の減少もしくは喪失を被った組織において、組織の再生を促進する。喪失又は損傷は、疾患又は傷害を含めて、細胞数を減少させるあらゆるものである得る。例えば、事故、自己免疫障害、治療の副作用、又は心的外傷を構成する可能性がある病状である。組織の再生により、組織内の細胞数を増加させて、また好ましくは再び樹立しようとする組織の細胞間の結合を可能にし、またより好ましくは、組織の機能性を取り戻させることを可能にする。

【0214】

特定の実施形態においては、組成物は、例えば静脈内に非経口的に、口腔内に、直腸に、又は注入によって、投与される。一部の実施形態においては、例えば局所に又は筋肉内に、局所的に投与される。一部の実施形態においては、組成物は、例えば骨、関節、耳の組織、目の組織、胃腸管、皮膚、創傷部位、又は脊髄である、標的組織に投与される。本発明の方法は、インビボ又はエキソビボで実施され得る。一部の実施形態においては、標的の細胞又は組織を組織特異性Wntシグナル増強分子と接触させることは、エキソビボで実施されて、その後、例えば活性化された幹細胞又は前駆細胞である当該細胞又は組織の、対象への植込みが続く。当業者は、治療する疾患又は障害に基づいて、適切な投与部位及び投与経路を決定することが可能である。

【0215】

用法及び投与計画は、例えば疾患又は障害の性質、対象の特性、及び対象の病歴等である、医師によって容易に決定される種々の因子に依存し得る。特定の実施形態においては、対象に投与又は提供される、例えば融合タンパク質である組織特異性Wntシグナル増強分子の量は、対象の体重に対して約0.01mg/kgから約50mg/kg、0.1mg/kgから約500mg/kg、又は約0.1mg/kgから約50mg/kgの範囲にある。

【0216】

ある実施形態においては、対象は、例えばヒト、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、スナネズミ）、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、又は霊長類である任意の哺乳動物であり得る。

【0217】

一部の実施形態においては、主題の方法は治療効果を結果的にもたらすものであり、例えば障害の発達を予防する、障害の進行を止める、障害の進行を退行させること等である。一部の実施形態においては、主題の方法は、治療効果が達成されたことを検出するステップを含む。当業者によれば、治療効果のこうした測定が、改変しようとする特定の疾患に適用可能であるだろうということを理解することとなり、また治療効果を測定するために用いる適切な検出方法を認識することとなる。

【0218】

ある実施形態においては、本開示は、例えば骨成長が望まれる本明細書に開示する症状のいずれかである、骨組織における、Wntシグナル伝達の低下と関連する又はWntシグナル伝達活性の増加が有益となることとなる疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象に、例えばPTH1Rに特異的に結合するターゲティングモジュールである、骨組織に結合するターゲティングモジュールを含むWntシグナル増強分子を含む医薬組成物を提供することを含み、当該Wntシグナル増強分子が対象の骨組織におけるWntシグナル伝達を増加又は増強する、当該方法を提供する。ある実施形態においては、医薬組成物は、経口で、又は全身的に、例えば非経口的に、投与される。特

定の実施形態においては、Wntシグナル増強分子は、Respondinファミリードメイン1又はそのフラグメントもしくはバリエーションと、随意に変異Respondinファミリードメイン2又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む、作用モジュールを含む。

【0219】

ある実施形態においては、本開示は、例えば肝臓再生により利益を受けることとなる本明細書に開示する疾患又は障害のいずれかである、肝臓組織における、Wntシグナル伝達の低下と関連する又はWntシグナル伝達活性の増加が有益となることとなる疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象に、例えばASGR1、ASGR2、TFR2又はSLC10A1に特異的に結合するターゲティングモジュールである、肝臓組織に結合するターゲティングモジュールを含むWntシグナル増強分子を含む医薬組成物を提供することを含み、当該Wntシグナル増強分子が対象の肝臓組織におけるWntシグナル伝達を増加又は増強する、当該方法を提供する。ある実施形態においては、医薬組成物は、経口で、又は全身的に、例えば非経口的に、投与される。特定の実施形態においては、Wntシグナル増強分子は、Respondinファミリードメイン1又はそのフラグメントもしくはバリエーションと、随意に変異Respondinファミリードメイン2又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む、作用モジュールを含む。

10

【0220】

ある実施形態においては、本開示は、例えば口腔粘膜等である口腔粘膜組織における、Wntシグナル伝達の低下と関連する又はWntシグナル伝達活性の増加が有益となることとなる疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象に、例えばLYPD3又はDSG3に特異的に結合するターゲティングモジュールである、口腔粘膜組織に結合するターゲティングモジュールを含むWntシグナル増強分子を含む医薬組成物を提供することを含み、当該Wntシグナル増強分子が対象の口腔粘膜組織におけるWntシグナル伝達を増加又は増強する、当該方法を提供する。ある実施形態においては、医薬組成物は、経口で、又は全身的に、例えば非経口的に、投与される。特定の実施形態においては、Wntシグナル増強分子は、Respondinファミリードメイン1又はそのフラグメントもしくはバリエーションと、随意に変異Respondinファミリードメイン2又はそのフラグメントもしくはバリエーションを含む、作用モジュールを含む。

20

【0221】

本明細書で言及した、ならびに／又は出願データシートに列記した、上記した米国特許、米国特許出願公開公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許出版物の全ては、それらの全体として、参照により本明細書で援用する。

30

【0222】

先述より、本発明の特定の実施形態を説明の目的で本明細書に記載してきたが、本発明の趣旨及び範囲を逸脱することなく様々な変形がなされ得る、ということが理解されるであろう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲以外によつては、限定されない。

【実施例】

【0223】

以下の実施例は、完全な開示と本発明がどのようになされて使用されるかについての記載とを当業者に提供するために提案され、そして発明者が彼らの発明とみなしているものの範囲を限定する意図はなく、また以下の実験が全てである又はこれら実験のみを行ったということを示す意図もない。用いた数字（例えば、量、温度等）に関して、正確性を確実にする努力はなされたが、一部は実験的誤差及び偏差が占めているはずである。別段に示さない限り、部分は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度はセ氏であり、また圧力は大気又はほぼ大気である。

40

【0224】

分子生物学、細胞生物学及び生化学の全般的な方法は、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed.” (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001) ; “Short Protocols in Molecular Biology, 4

50

th Ed.” (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); “Protein Methods” (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); “Nonviral Vectors for Gene Therapy” (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); “Viral Vectors” (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); “Immunology Methods Manual” (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); 及び、“Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology” (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)、のような標準的な教科書に見ることができ、その開示は、参照により本明細書で援用する。本開示で言及した試薬、クローニングベクター、及び遺伝子操作キットは、例えばバイオラッド社 (BioRad)、ストラタジーン社 (Stratagene)、インビトロジェン社 (Invitrogen)、シグマアルドリッチ社 (Sigma-Aldrich)、及びクロンテック社 (Clontech) 等の商業的な売主より利用可能である。

10

【0225】

以下の実施形態において採用した材料及び方法には、以下を含める。

【0226】

公開されたASGR1 バインダー：原型的な抗ASGR1 バインダー (RO-01) 及びいくつかのその他のもの (RO-02、-03 及び -04) を、PCT 特許出願公開公報の国際公開第 2014/023709 号から選択した。抗TFR1 配列は、PCT 特許出願公開公報の国際公開第 2016/081640 号から選択した。抗LYPD3 配列は、PCT 特許出願公開公報の国際公開第 2017/0158775 号から選択した。抗DSG3 配列は、PCT 特許出願公開公報の国際公開第 2010/092457 号から選択した。ZNR F3 バインダー SC-01 及び SC-02 は、PCT 特許出願公開公報の国際公開第 2015/164392 号から選択した。RNF43 バインダー NV-01 は、PCT 特許出願公開公報の国際公開第 2013/054307 号から選択した。

20

【0227】

タンパク質産物：全ての組換えタンパク質は、別段に特定しない限り、一過性導入により、Exp i 293 F 細胞 (Thermo Fisher Scientific 社) において産生した。全ての scFv 含有融合体は、FLAG-His タグを含有しており、またはじめにメーカー推奨の手順に従って、cOmplete his タグ精製用樹脂 (cOmplete his-tag purification resin) (シグマアルドリッチ社) を用いて精製した。全ての IgG 系コンストラクト及びFc 含有コンストラクトは、まず、プロテインA 樹脂で精製し、0.1M のグリシン、pH 3.5 で溶出した。次いで全てのタンパク質を、HBS 緩衝液 (10mM の HEPES pH 7.2、150mM の NaCl) 中でサイズ排除カラムで精製した。タンパク質を、-80℃での長期保存のため、10% までグリセリンを補足した。インビトロ受容体結合解析のため、ヒトRNF3 (Q44-D198) 及びZNR F3 (K56-M219) 及びASGR1 (Q62-L291) の細胞外ドメインを、N 末端におけるHis-Avi タグを付けて発現し、またマウスASGR1 (Q61-N284) は、C 末端におけるHis-Avi タグを付けて発現した。それらを、His タグ樹脂により精製し、記載のとおりニオチン化し (Janda et al., 2017; Nature 545:234)、次いでサイズ排除クロマトグラフィーでさらに精製した。親和性測定のため、ASGR1 バインダーのFab バージョンを、5-mer リンカー (GSSGS) に続くヒトIgG1 CH1 ドメインのC 末端に (His) 6 タグを付けて生成し、His タグ樹脂で精製し、その後サイズ排除クロマトグラフィーを続けた。試験した全てのタンパク質を、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で調べ、少なくとも90% の純度であると推定された。

30

40

【0228】

50

SuperTop Flash (STF) アッセイ: Wnt シグナル伝達活性を、報告されているように (Janda et al., 2017; Nature 545: 234)、Wnt 反応性プロモーターによって制御したルシフェラーゼ遺伝子を含む細胞株を用いて測定した (Super Top Flash レポーターアッセイ、STF)。簡潔には、細胞を、処理の 24 時間前に、96 ウェルプレート中で、1 ウェル当たり 10,000 個の密度で播種して、次いで、単独で又は 30% の Wnt 3a 馴化培地と共にのいずれかで、一晚、RSP0 又は模倣タンパク質で処理した。Wnt 3a 馴化培地は、メーカーの推奨条件に従って、ATCC-CRL-2647 Wnt 3a 分泌 L 細胞から調製した。細胞は、ルシフェラーゼ細胞培養溶解試薬 (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent) (プロメガ社) で溶解させて、そして活性を、メーカーが提案する手順を用いて、ルシフェラーゼアッセイシステム (プロメガ社) で測定した。データは、3 つ組みの平均 $\pm$ 標準偏差としてプロットし、Prism (GraphPad 社のソフトウェア) を用いて非線形回帰で当てはめた。外因性受容体の過剰発現に関して、細胞は、真核生物発現プロモーターのもとで、関心の受容体を含むプラスミドで一過性導入して (ASGR1 は GenScript 社のクローン OHU03658D、ASGR2 はインハウスでクローン化したアイソフォーム d/NP_001188281.1 であり、また TFR3 は SinoBiologicals 社よりのクローン HG11020-UT であった)、次いでトランスフェクトの 24 時間後に STF アッセイのために 96 ウェルプレートに分割 (1 ウェル当たり 20,000 細胞) した。

10

【0229】

20

親和性測定: RSP0 由来のタンパク質の LGR5、RNF43 又は ZNRF3 に対する結合動態と、ヒト及び/又はマウス ASGR1 に対する抗 ASGR Fab の結合とを、Octet Red 96 (PALF ForteBio 社、カリフォルニア州フリーモント) 機器を、30°C、1000 rpm で用いて、ストレプトアビジン (SA) 又は抗 hIgG Fc 捕捉 (AHC) のいずれかのバイオセンサーを用いて、バイオレイヤー干渉法 (BLI) により求めた。RNF43 又は ZNRF3 又は ASGR1 のビオチン化細胞外ドメイン (ECD) と、ヒト IgG1 融合 LGR5-ECD の Fc 部分 (R&D システムズ社) とを、ランニング緩衝液 (PBS、0.05% Tween-20、0.5% BSA、pH 7.2) 中に 50 nM に希釈して、結合レベルが約 1.0 nm に到達するまで、それぞれ SA バイオセンサー、及び AHC バイオセンサーに捕捉させる。RNF43、ZNRF3 又は LGR5 の ECD の捕捉後、バイオセンサーを、ランニング緩衝液中に 7 つの異なる濃度に関連する試験分子を含むウェル中と、参照チャンネルとしてランニング緩衝液のみを含んだウェル中とに、浸漬させた。K_D は、LGR5、RNF43 及び ZNRF3 への結合に関して、会合段階の 140~145 秒の間における平均反応に基づいて定常状態解析によって求めた。ASGR1 に対する結合に関しては、K_D は、Octet (登録商標) Red データ解析ソフトウェア (ForteBio 社) を用いて曲線モデルフィッティングで求めた。

30

【0230】

細胞フローサイトメトリー: HEK293 細胞を、ZNRF3 を過剰発現するプラスミド (ジェンスク립ト社 (GenScript) OHU22977) 単独で又は ASGR1 と共に一過性導入して、そして 10% の Wnt 3a 馴化培地を含んで又は含まずに 10 nM の最終濃度で RSP0 誘導体分子で 24 時間処理した。細胞は、Gibco の無酵素解離培地を用いて解離させ、FACS 緩衝液 (1% BSA を含み、0.02% アジ化ナトリウムを含む、1×PBS) 中で洗浄及び再懸濁させた。細胞を、1 nM の 18R5 IgG (pan-Frizzled) で 1 時間、インキュベートした。洗浄後、細胞を、ヤギ抗ヒト IgG Alexa Fluor 647 (インビトロジェン社 (Invitrogen)) で 40 分間、インキュベートした。細胞を、FACS 緩衝液で洗浄して、BD Accuri C6 Plus フローサイトメーターを用いてマルチチャンネル解析に供した。データを、FlowJo ソフトウェアで処理して、蛍光信号を、ヒストグラムプロットで表示した。

40

50

【0231】

細胞タンパク質のウェスタンブロット解析：細胞を、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤を補足したRIPA緩衝液（50mMのTris-HCl pH7.4、150mMのNaCl、1%のIGEPAL CA630、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、0.1%のSDS及び1mMのEDTA）により溶解した。細胞溶解液を15,000rpm、4℃で5分間遠心分離して、上清をSDS-PAGEで分離して、ニトロセルロース膜に移して、一次抗体で探索して、その後にHRP結合した二次抗体と、ECLフィルム検出が続いた。抗LRP6抗体、抗phospho-LRP6抗体（Ser 1490）及び抗DLV2一次抗体は、Cell Signaling Technology社よりであった。抗αチューブリン抗体は、シグマアルドリッチ社よりであった。

10

【0232】

遺伝子発現の半定量PCR解析：ヒト細胞培養液からのRNA（HEK293、Huh-7及びA431）を、Qiagen RNeasy Microキット（キアゲン社、74004）を用いて抽出した。cDNAは、SuperScript（商標）VILLO（商標）cDNA Synthesisキット（ThermoFisher社、11754050）を用いて産生した。ヒトASGR1、ASGR2及びTFRC発現は、TaqMan（登録商標）Fast Advanced Master Mix（ThermoFisher社、4444963）と、Hs01005019__m1 ASGR1、Hs00154160__m1 ASGR2及びHs00951083__m1 TFRCのプロンプ（ThermoFisher社、4331182）を用いて測定した。値は、Hs01060665__m1プロンプ（ThermoFisher社、4331182）を用いて恒常的なActin B遺伝子の発現で正規化した。マウス組織（肝臓及び小腸の試料）よりのRNAを、MagMAX（商標）mirVana（商標）Total RNA Isolationキット（ThermoFisher社、A27828）を用いて抽出した。cDNAは、high-Capacity cDNA Reverse Transcriptionキット（ThermoFisher社、43-688-14）又はSuperScript（商標）IV VILLO（商標）Master Mix（ThermoFisher社、カタログ番号11756050）を用いて産生した。マウスAxin2及びKi67のmRNA発現は、TaqMan（登録商標）Fast Advanced Master Mix（ThermoFisher社、4444963）及び、ならびにMm00443610__m1 Axin2、Mm01278617__m1 Ki67、Mm01300555__g1 wnt1、Mm00470018__m1 wnt2、Mm00437336__m1 wnt3、Mm01194003__m1 wnt4、Mm00437347__m1 wnt5a、Mm01183986__m1 wnt5b、Mm00437353__m1 wnt6、Mm00437356__m1 wnt7a、Mm01301717__m1 wnt7b、Mm01157914__g1 wnt8a、Mm00457102__m1 wnt9b、Mm00442104__m1 wnt10b、Mm00437327__g1 wnt11、Mm00446420__m1 wnt16、Mm00507077__m1 rspo1、Mm00555790__m1 rspo2、Mm01188251__m1 rspo3、及びMm00615419__m1 rspo4のプロンプ（ThermoFisher社、4331182）を用いて測定した。値は、Mm02619580__g1プロンプ（ThermoFisher社、4351368）を用いて恒常的なActin B遺伝子の発現で正規化した。

20

30

40

【0233】

動物実験：6週齢のC57Bl/6J雄マウスを、ジャクソン研究所（Jackson Laboratories）（米国メイン州バーハーバー）より取得して、グループ飼育した。全ての動物実験は、米国科学アカデミーによる“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”の基準に従った。動物実験のプロトコルは、Surrozen社の動物実験委員会で承認された。マウスは、最低でも実験開始2日前に気候順応させた。マウスは、精製された実験室グレー

50

ドの酸性化水が無制限に与えられ、また自由に給餌された（2018 Teklad globalの18%タンパク質げっ歯類用飼料）。マウスは、30%～70%湿度環境及び20℃～26℃の室温で、12/12時間の明/暗サイクルに保たれた。

【0234】

ヒトASGR遺伝子発現のためにマウスをヒト化した場合において、各マウスに、 1×10^{11} 個のssAAV8-CAG-hASGR1ゲノムコピー（Vector Biolabs社、ペンシルベニア州モルバーン）を0日目に静脈内に投与した。7日目に、マウスを、 α GFP、Fc-RSPO2-WT、 α GFP-RSPO2-RA又は α ASGR1-RSPO2-RAで腹腔内（i.p.）に注射した。タンパク質投与後の示した時点において、マウスをイソフルランで麻酔して、心穿刺により血液を取り出した。肝左葉及び十二指腸の一部を、解析のために採取した。

10

【0235】

実施例1

組織特異性Wntシグナル伝達増強分子の特性決定

組織特異性RSPO様Wntシグナル伝達増強分子を生成するために、アシアロ糖蛋白受容体（ASGR）を標的化した。ASGRは、肝細胞上で主として発現する2つのポリペプチド、ASGR1及びASGR2から構成されるヘテロオリゴマーであり、急速なエンドサイトーシスを経る。ASGR1抗体（例えば、RO-01）は、scFv形態に変換されて、それを異なるRSPO2バリエーションのN末端に融合して、 α ASGR1-RSPO2-WT、 α ASGR1-RSPO2-RA又は α ASGR1-RSPO2-5mut（配列番号11～16、図1B、右図）を生成した。この設計において、融合体の抗体部分は、細胞/組織特異性を導く「ターゲティングモジュール」として機能し、一方でRSPO2成分は、E3リガーゼと相互作用する「作用モジュール」として機能する（図1B）。LGR結合を無効にするために、導入されたLGRタンパク質、F105R及びF109Aに結合するために重要であることが報告されているRSPO2のFu2ドメイン内の2つの高度に保存された疎水性残基内に点変異を導入した（図1B、 α ASGR1-RSPO2-RAという名称）。E3リガーゼの相互作用におけるFu1ドメインの関与を検証するために、この相互作用に重要であることが報告されているFu1ドメイン内にさらなる点変異（R65A/R69A/Q70A）をまた付加した（図1B、Fu1及びFu2の両方において5つ全ての変異F105R/F109A/R65A/R69A/Q70Aを含有する α ASGR1-RSPO2-5mut）。ターゲティングモジュール用の陰性対照として、緑色蛍光タンパク質（GFP）に対するscFv抗体を、同一のヒトRspo2フラグメントと変異体（ α -GFP-Rspo2-WT、 α -GFP-Rspo2-RA、及び α -GFP-Rspo2-5mut；配列番号5～10、図1B；左パネル）に融合した。

20

30

【0236】

LGRとE3リガーゼの結合に対するFu1及びFu2変異の影響を、Octetシステムにおけるバイオレイヤー干渉法を用いて検証した。野生型（ α GFP-RSPO2-WT）又は変異体（ α GFP-RSPO2-RA又は α GFP-RSPO2-5mut）の組換えLGR5タンパク質への結合を測定して、野生型の結合は観察されたが、2つのFu2変異体RSPO2バリエーションは観察されなかった（図1C）。Fu2変異の影響は、E3リガーゼZNF3及びRNF3への α GFP-RSPO2-RAの結合に影響を受けなかったことから、LGR相互作用に特異的である（図1D）が、一方でFu1ドメインに変異を含有する α GFP-RSPO2-5mutは、E3リガーゼとの相互作用にさらに影響を及ぼした（図1D）。

40

【0237】

Fu1及びFu2の変異の、RSPO2のWntシグナル伝達を増強する能力への影響を、HEK293及びHuh-7のWnt反応性STF細胞において試験した。図2B、右パネルに示すように、Wntの添加が何もない場合では、RSPO2タンパク質はWntシグナル伝達を活性化しなかった。Wnt3a馴化培地（CM）の存在下では、用量反

50

応性物質において、 α GFP-RSPO2-WTがWnt3a活性を増強したが、Fu1 (α GFP-RSPO2-RA) 又はFu1+Fu2 (α GFP-RSPO2-5mut) のいずれかにおける変異は、完全に不活性であり、RSPO2活性がE3リガーゼ及びLGRタンパク質の両方と結合する能力に依存するという予想と一致した。

【0238】

ターゲティングモジュールを抗GFPから抗ASGR1に切り替えることで、RSPO2のE3リガーゼ又はLGR5タンパク質に対する相互作用への影響は見られなかった。 α ASGR1-RSPO2-WTはE3リガーゼ及びLGR5の両方に結合し、 α ASGR1-RSPO2-RAは、LGR5と相互作用する能力を失い、また α ASGR1-RSPO2-5mutは、LGR5及びE3リガーゼの両方と相互作用する能力を失った (図1C及び1D)。

10

【0239】

これら分子の、Wntシグナル伝達を調節する能力もまた、HEK293 STF及びHuh-7 STFのWnt反応性レポーター細胞両方において評価した。HEK293 STF細胞においては、それらはASGR1を発現しないため (半定量PCR解析によって検証されたように。図2A)、抗ASGR1-RSPO2融合タンパク質は、それらの抗GFP抗体の相手方とほぼ同様に振る舞った (図2B)。添加されたWntの不在下では、 α ASGR1-RSPO2タンパク質はWntシグナル伝達を活性化しなかった (図2Bの右パネル)。Wnt3a馴化培地 (CM) の存在下では、 α ASGR1-RSPO2-WTが、 α GFP-RSPO2-WTと同様に用量反応性物質においてWnt3a活性を増強したが、一方で α ASGR1-RSPO2-RA及び α ASGR1-RSPO2-5mutは不活性であった (図2B)。対照的に、Huh-7 STF細胞、ASGR1を発現するヒト肝細胞腫細胞株においては、 α ASGR1 scFvの融合が、RSPO2-RA変異体のWnt3a誘発性のシグナル伝達を増強する能力を有意に回復させた (図2B、下方左パネル)。 α ASGR1-RSPO2-5mutは不活性のままであったが、これは α ASGR1-RSPO2-RAで観察された活性がそのE3リガーゼに結合する能力に依存していることを表す。興味深いことに、WT RSPO2、 α ASGR1-RSPO2-WTに対する α ASGR1 scFv融合もまた、 α GFP-RSPO2-WTと比較して用量反応曲線において、有意な、約6倍の左方シフトを示したが (図2B)、これは新規のターゲティングモジュール、 α ASGR1 scFvの結合が、LGRと相乗作用してWT RSPO2機能をさらに増強し得たことを示唆する。

20

30

【0240】

STFレポーター系に加えて、Wntシグナル伝達活性もまた、ウェスタンブロット解析で直接調べた。図2Cに示すように、10%のWnt3a CMでのHuh-7細胞の処理により、有意な変化は誘発されなかったが、 α GFP-RSPO2-WTの添加により、Wnt3a反応が増強され、またLRP6タンパク質の全体のレベルが増加したことに加えて、リン酸化されたLRP6及びDVL2タンパク質の両方を有意に増加させた。Fu2における変異は、 α GFP-RSPO2-RAで処理した細胞で見られたように、この増強活性 (enhancement activity) を無効にした。しかしながら、 α ASGR scFv、 α ASGR1-RSPO2-RAへの融合が、 α GFP-RSPO2-RAを伴う機能表現型の喪失を回復させ、全LRP6タンパク質をわずかに増加させただけでなく、リン酸化されたLRP6のレベルを有意に増加させ、またそれほどではないにせよDVL2を増加させた (図2C)。

40

【0241】

標的の受容体ASGRの存在に依存する抗ASGR1 RSPO2-RA融合タンパク質の細胞型特異的な活性をさらに確認するために、全長ヒトASGR1 cDNAをコードするプラスミドでHEK293細胞を一過性導入した。ASGR1及びASGR2が複合体を形成するため、陰性対照として無関連受容体、ヒトトランスフェリン受容体1 (TFR1。TFR1遺伝子によりコードされた) のトランスフェクションに加えて、ASGR cDNAの両方の同時トランスフェクションも実施した。トランスフェクトされな

50

った親HEK293細胞と同様に、 α GFP-又は α ASGR1-のいずれかを伴うRSP
O2-WT融合タンパク質のみが、TFR1でトランスフェクトした細胞においてWn
t 依存的にWn t シグナル伝達を増強した（図2Bの上図と図3Aの上図とを比較）。対
照的に、ASGR1単独でトランスフェクト又はASGR1及びASGR2の両方により
同時トランスフェクトした細胞において、 α ASGR1 scFvの融合が、機能RSP
O2-RA変異体の、Wn t シグナル伝達を増強する能力の喪失を一部回復させた。 α A
SGR1の融合もまた、Hu h-7細胞において観察されたものと同様に、RSP O2-
WTタンパク質の用量反応を左方シフトさせた（図2Bの下方パネルと、図3Aの中央及
び下方パネルとを比較）。 α ASGR1-RSP O融合分子の活性もまた、Wn t リガ
ンドの存在に完全に依存した（図3Aの右図）。

10

【0242】

ASGR1依存性活性はまた、別のASGR1陰性細胞株、A431において確認され
たが、これはヒト類表皮がん由来し、またASGR遺伝子を発現しない（図2A）。H
EK293トランスフェクション実験と同様に、 α ASGR1-RSP O2-RAのみが
、ASGR1発現A431細胞においてRSP O2-RA活性を回復させたが、陰性対照
受容体、TFR1を発現するA431細胞においてはしなかった（図3B）。さらに、 α
ASGR1 scFvもまた、RSP O2-WT用量反応曲線を左方シフトさせ、また全
てのRSP O誘導体の活性が、Wn t リガンドの存在に完全に依存した（図3B、右パネ
ル）。図2及び3からの全ての結果を合わせて、RSP O介在性のWn t シグナル増強活
性は、LGRの代わりに異なる細胞表面受容体、ASGR1を標的にすることによって置
き換えることが可能である、ということを示した。得られたRSP O模倣分子は、Wn t
依存性とそのE3リガーゼを介した作用とがWT RSP Oに似ているが、そのWn t シ
グナル伝達増強が細胞型特異的である点で異なる。

20

【0243】

RSP O誘導体分子の作用の機序をさらに検証するために、細胞表面におけるFr i z
z l e d (FZD) 受容体レベルを調べた。系を感作するために、処理前に一過性導入に
よりZNR F3を過剰発現した。pan-Fr i z z l e d抗体18R5（欧州特許第E
P2331136A4号に基づいてクローン化）を用いて、細胞を染色し、未処理細胞と
比較して α GFP-RSP O2-WTが信号を明らかに増加させたことが発見されたが（
予想されたとおり）、こうしたシフトは α GFP-RSP O2-RA又は α ASGR1-
RSP O2-RAでの処理では観察されなかった（図3C、上図）。このことは、HEK
293細胞においてこれら2つのRSP O-RAコンストラクトの活性が欠如しているこ
とと一貫している。一方、細胞をZNR F3及びASGR1の両方で同時トランスフェク
トした場合、 α ASGR1-RSP O2-RAが、ちょうど α GFP-RSP O2-WT
のようにpan-FZD染色を増加させ、 α GFP-RSP O2-RAは未処理細胞と同
様のままであった（図3C、底図）。このことは、RSP O又はRSP O模倣体によるZ
NR F3/RNF43のE3リガーゼの除去と一貫しており、これはWn t 受容体の安定
化を招く。

30

【0244】

さらなる細胞型において組織特異性Wn t シグナル増強分子の、Wn t シグナル伝達を
増強する能力を検証するために、異なる細胞表面受容体トランスフェリン受容体1（TF
R1）を標的とする第2の新規二重特異性コンストラクトを試験した。TFR1は、TF
RC遺伝子によりコードされ、また多数の細胞型において広く発現される。連続的なエン
ドサイトーシスを受けることが報告されている。ヒトTFR1、RSP O2-WT、RS
PO2-RA又はRSP O2-5mut（配列番号17～22）に対するscFvバイ
ンダーを含有する融合タンパク質を構築して、特性決定した。図1Bと同様の設計を有する
が、抗GFP又は抗ASGR1成分を抗TFR1 scFvで置換したことが異なる。抗
GFP又は抗ASGR1融合タンパク質と同様に、 α TFR1-RSP O2-RAタン
パク質は、LGR5と相互作用する能力を喪失しており、また α TFR1-RSP O2-5
mutは、LGR5及びE3リガーゼの両方と相互作用する能力を喪失していた（図4A

40

50

～B)。Wnt源の存在下でHEK293 STFレポーターアッセイで試験した場合に、TFR1標的RSP02-RA (α TFR1-RSP02-RA)がWntシグナル伝達を刺激して、野生型RSP0 (α GFP-RSP02-WT)と比較して約20倍高い効力を呈した (図4C)。抗TFR1 RSP02-WT融合体、 α TFR1-RSP02-WTは、さらに約20倍、EC₅₀をさらに向上させて、これは α GFP-RSP02-WTと比較してほぼ400倍改善された効力である。同様の結果がHu h-7 STF細胞でも得られたが、これは両細胞株における標的受容体の発現と一貫していた (図2A)。RSP0の機序と一貫して、抗TFR1 RSP0模倣分子ではWntリガンドの不在下では、Wntシグナル伝達は観察されなかった (図4C、右パネル)。より有力な活性が抗TFR1 RSP02融合タンパク質で観察されたことにより、受容体及びバインダーの特定の組み合わせが、組織特異性Wntシグナル増強分子の活性において重要な役割を果たし得ることが示される。

10

【0245】

α GFP-RSP02-WT、 α TFR1-RSP02-RAで見られ、 α ASGR1-RSP02-RAでは見られなかったように、HEK293 STF細胞においてWnt刺激の存在下でLRP6及びDVL2のリン酸化が刺激され、そして全LRP6タンパク質レベルが増加した (図4D)。細胞表面上のFZD受容体レベルに対するRSP0模倣分子の影響もまた、フローサイトメトリー解析で調べた。図4Eに示すように、HEK293細胞の α GFP-RSP02-WT、 α TFR1-RSP02-RAでの処理が、pan-FZD抗体により測定されたこれら細胞のFZD受容体レベルを増加させたが、HEK293細胞の α GFP-RSP02-RAでの処理では増加しなかった。

20

【0246】

実施例 2

原型的な肝臓特異性Wntシグナル伝達増強分子を用いたインビボでの肝臓効果

α ASGR1-RSP02-RAがインビボで組織特異的なWntシグナル伝達経路を活性化することが可能であることを示すために、マウスを α ASGR1-RSP02-RA及び対照タンパク質で処理した。scFv-RSP02融合タンパク質の分子量は約40kDaの範囲であるため、それらの血漿内半減期を伸ばすために、バインダーのscFvを、RSP02がIgG重鎖のN末端に融合しているIgG形態に切り替えた。 α ASGR1-RSP02-RA-IgG (配列番号29～32)は、HEK293細胞において α GFP-RSP02-RA-IgG (配列番号25～28)と同様の効力を有していたが、Hu h-7細胞においては後者よりもはるかに有力で有効であった (図5A)。実際、100pMでの α ASGR1-RSP02-RA-IgGの活性は、10nMでの α GFP-RSP02-RA-IgGのものに匹敵し (図5Aの左下図)、これは強いターゲティング効果がIgG形態内に保存されていることを示唆する。

30

【0247】

マウス肝臓におけるヒトASGR1の発現は、1マウス当たり 1×10^{11} 個のゲノム粒子を用いて、ssAAV8-CAG-hASGR1の静脈内注射で誘発し、組換えタンパク質での処理の7日前に、内因性肝臓Asgr1 mRNAと同等の導入遺伝子発現レベルを達成する投与量がわかった (データは図示せず)。

40

【0248】

第1の実験において (図5B)、マウスを、等モル用量の α GFP-IgG (配列番号25～26及び33～34) (1mg/kg)、Fc-RSP02-WT (配列番号23～24) (0.46mg/kg)、 α GFP-RSP02-RA-IgG (配列番号25～28) (1mg/kg)、又は α ASGR1-RSP02-RA-IgG (配列番号29～32) (1mg/kg)の組換えタンパク質 (概ね対応したモル濃度で。一群当たりn=8マウス)で、腹腔内注射した。肝臓及び小腸の試料を、発現解析のために8時間後に採取した。Fc-RSP02-WT及び α ASGR1-RSP02-RA-IgGでの処理により、 α GFP又は α GFP-RSP02-RA-IgG陰性対照のいずれかで処理されたマウスにおける肝臓Axin2発現と比較して、肝臓Axin2発現が有意に誘

50

発された（図5C）。対照的に、Fc-RSPO2-WTでの処理により、小腸Axin2発現が有意に増加したが、αASGR1-RSPO2-RA-IgGでは有意に増加しなかった（図5D）。これら結果は、αASGR1-RSPO2-RA-IgGがインビボで組織特異的にWnt経路を活性化することができることを示唆する。

【0249】

第2の実験において（図6A）、マウスを、αGFP-IgG（1mg/kg）、αGFP-RSPO2-RA-IgG（1mg/kg）又はαASGR1-RSPO2-RA-IgG（1mg/kg）の組換えタンパク質（一群当たりn=10マウス）で、腹腔内注射した。肝臓及び小腸の試料を、発現解析及びヒストイムノケミストリー（histoimmunocytochemistry）のために48時間後に採取した。αASGR1-RSPO2-RA-IgGによる処理が、細胞増殖マーカー遺伝子Mki67の発現を誘発し（図6B）、またαGFP-IgG又はαGFP-RSPO2-RA-IgGの陰性対照のいずれかにより処理したマウスと比較した場合に肝臓におけるKi-67陽性細胞数を有意に増加させた（図6C～D）。対照的に、このαASGR1-RSPO2-RA-IgGによるMki67の発現の誘発は、小腸では観察されなかった（図5E）。これら結果は、αASGR1-RSPO2-RA-IgGが、組織特異的に、肝実質細胞における増殖を刺激することができることを示唆する。

【0250】

実施例3

抗体の生成

ASGR、ZNRf3及びRNF43のポリペプチド配列に対する抗体を特定した。抗体のスクリーニング及び免疫化のための組換えタンパク質を産生するために、以下のタンパク質の細胞外ドメイン（ECD）をHis/Aviタグを伴うpcDNA真核生物発現ベクターにクローン化した：ヒトASGR1（hASGR1、NCBI参照配列NP_001662.1、残基62～291；配列番号35～36（それぞれ、ポリヌクレオチド及びポリペプチド））、ヒトASGR2（hASGR2、NCBI参照配列NP_550436.1、残基66～292；配列番号37～38（それぞれ、ポリヌクレオチド及びポリペプチド））、カニクイザルASGR1（cynoASGR1、配列ID XP_005582755.1、残基62～291；配列番号39～40（それぞれ、ポリヌクレオチド及びポリペプチド））、カニクイザルASGR2（cynoASGR2、Fish

er/Zyagen Labs社よりのカニクイザル肝臓cDNAサンプルからクローン化された配列；配列番号41～42（それぞれ、ポリヌクレオチド及びポリペプチド））、ヒトRNF43（hRNF43、NCBI参照配列XP_011523257.1、残基44～198；配列番号43～44（それぞれ、ポリヌクレオチド及びポリペプチド））、ZNRf3（hZNRf3；NCBI参照配列NP_001193927.1、残基56～219；配列番号45～46（それぞれ、ポリヌクレオチド及びポリペプチド））。コンストラクトは、Exp293F細胞（Thermo Fisher Scientific社）で発現し、Ni-NTA樹脂で精製し、その後サイズ排除クロマトグラフィーを続けた。ファージディスプレイ法のために、タンパク質は、公開されている方法に従ってビオチン化した（Janda et al., Nature; 545:234）。

【0251】

ビオチン化した抗原は、ファージディスプレイライブラリーに対してパニングするために固定化して、そして陽性クローンを配列決定した。Exp293F細胞における発現と抗原結合のための特性決定とを含めた、さらなる解析を行った。

【0252】

非ビオチン化抗原もまた、マウスを免疫するために用いて、ハイブリドーマを生成した。ハイブリドーマ系統を、対照として同一の精製タグを含有する対照タンパク質と共に免疫原に対してELISAによってスクリーニングして、フローサイトメトリー解析した（試験系統としてのASGRを発現するHu h-7と、対照としてのASGR非発現HEK

293)。選択されたハイブリドーマ系統を配列決定し、そしてその結果として組換えFab又はIgGをさらなる結合特性決定のために生成した。

【0253】

組換えFab又はIgGの結合特性決定は、ストレプトアビジン(SA)被覆バイオセンサー(PALL ForteBio社)を伴って、Octet Red 96プラットフォーム(PALL ForteBio社、カリフォルニア州フリーモント)を用いて、バイオレイヤー干渉法(BLI)により実施した。ビオチン化抗原を、センサー上への固定化のために50nMに希釈した。固定化後、センサーを、7つの濃度で試験分子を含むサンプル中に浸漬させた。K_Dに関する値を、得られたデータを1:1結合モデルでフィッティングすることによって求めた。表2Cは、クローン選択のための結合データを

10

【0254】

図7は、hASGR1(図7A及び7C)又はhASGR2(図7B)に対して特定された説明的な抗体の結合を示すデータを提供します。

【0255】

実施例4

未感作健常マウスにおける、抗ASGR1-RSPO2-RAのインビボでの用量漸増(dose-titration)及び組織特異性

IgG形態のASGR1標的分子及び対照分子の活性を、健常な未感作マウスにおいてさらに調べた。これら実験で用いたαASGR1抗体(例えば、RO-01)は、ヒト及びマウスのASGR1受容体の両方に対して同様の親和性を有した(図9A)。

20

【0256】

この実験において、6週齢のC57Bl/6J雄マウスに、示した投与量で、αβ-Gal-IgG、Fc-RSPO2-WT、αGFP-RSPO2-RA又はαASGR1-RSPO2-RAを腹腔内(i.p.)注射した(一群当たりn=8)。タンパク質投与の48時間後、マウスをイソフルランで麻酔して、心穿刺により血液を取り出した。肝左葉及び十二指腸の一部を採取して、qPCR解析のために急速凍結するか又は24時間ホルマリンで固定するかのいずれかとし、次いで免疫組織化学解析のために70%エタノールに移した。

【0257】

用量反応は、αGFP-RSPO2-RA-IgG(配列番号25~28)とWnt標的遺伝子Axin2誘発を調べるための他の対照と比較して、αASGR1-RSPO2-RA-IgG(配列番号29~32)に対して実施した。マウスは、試験タンパク質を0.1から30mg/kgの範囲で腹腔内(i.p.)注射した。肝臓及び小腸の試料を、遺伝子発現解析のために48時間後に採取した。Fc-RSPO2-WT(配列番号23~24)により、肝臓及び小腸の両方における1及び10mg/kgの処理で、Axin2発現を増加させた(図9B)。対照的に、10及び30mg/kgでのαASGR1-RSPO2-RA-IgGは、肝臓のみでAxin2発現を誘発させたが、小腸では見られなかった。重要なことには、この特異性は、αASGR1ターゲティングモジュールに依存するが、これは標的でない分子αGFP-RSPO2-RA-IgGが、最大30mg/kgでの処理でいずれかの組織におけるAxin2発現にインビボで影響を何も示さなかったからである(図9B)。対照抗体の抗β-ガラクトシダーゼ(αβ-Gal-IgG、配列番号155~158)による影響は、0.01及び10mg/kgでは何も観察されなかった。

30

40

【0258】

αASGR1-RSPO2-RA-IgGの類似の組織特異性及びターゲティングモジュールへの依存性もまた、増殖マーカーKi67遺伝子の発現において観察された(図9C)。肝細胞において増殖が発生するか否かを調べるために、Ki67タンパク質に対して特異的な抗体と、成熟肝細胞標識HNF4αのうちの1つとで肝臓試料を同時染色した。αASGR1-RSPO2-RA-IgG及びFc-RSPO2-WTにより処理した

50

肝臓は、HNF4 α と共局在化したKi67陽性核の数を増加させたようであったが、一方で α GFP-RSPO2-RA-IgG又は α - β -Gal-IgGで処理した肝臓は、Ki67染色がずっと少ないようであった（図9D）。これら結果を合わせると、 α ASGR1-RSPO2-RA-IgGは、インビボで、肝臓特異的にWnt経路を活性化することが可能であること、及び肝細胞がこの刺激に反応する初代細胞集団であることを示唆した。

【0259】

実施例5

肝線維症の慢性のチオアセタミド誘発性マウスモデルにおける組織標的RSPO模倣体の肝機能への影響

6週齢のC57Bl/6J雄マウスを、チオアセタミド（TAA）で処理した。実験#1（Wnt及びRspoの遺伝子発現プロファイリング）において、TAAを、27週間、200mg/Lの濃度で飲料水に加えて、肝線維症を誘発した。さらに、TAA馴化の最後の4週間、マウスにTAAを週に3回腹腔内投与した。実験#2（3日目及び7日目における肝臓及び小腸のAxin2及びKi67の発現（expression））において、TAAを、20週間、200mg/Lの濃度で飲料水に加えて、肝線維症を誘発した。さらに、TAA馴化の最後の6週間、マウスにTAAを週に3回腹腔内投与した。実験#3（3日目、7日目及び14日目におけるINR解析）において、TAAを18週間飲料水に加えた。マウスはまた、TAA曝露の最後の9週間、200mg/kgのTAAを週に3回腹腔内投与した。TAA処理は、組換えタンパク質の投与2日前に中断して、マウスは、精製された、実験室グレードの酸性化飲料水に戻した。マウスは、組換え α - β -gal-IgG（10mpk）又はFc-RSPO2-WT（10mpk）を週に2回、又は α ASGR1-RSPO2-RA-IgG（10mpk）を毎日、腹腔内（i.p.）注射した。示した時点において、Roche社のCoaguCheck-XS Plusを用いてINRを測定した。投与開始の3日後、7日後又は14日後に、マウスをイソフルランで麻酔して、心穿刺により血液を取り出した。肝左葉及び十二指腸の一部を、解析のために採取した。ホルマリン固定し、パラフィン包埋した肝臓サンプルを切片にして、抗Ki-67ウサギ抗体（Abcam社、ab15580）により染色した。無作為に選択した視野（10倍（10 $\times$ ）対物レンズを用いた100倍（100 $\times$ ）の倍率で）当たりのKi-67陽性核数を、Image Jを用いて計数した。

【0260】

α ASGR1-RSPO2-RA-IgGの活性及び有効性を、慢性チオアセタミド（TAA）モデルで調べたが、当該モデルにおいては、大規模な肝線維症が観察され、肝機能が損なわれていた。このモデルにおいて、多数のWntリガンドをコードする遺伝子を含むWntシグナル伝達経路の成分が、発現上昇した（図10A）。対照的に、4つのR-spondinの発現は変化しないままであるか、又はRspo2の場合においては減少すらしていた。Rspo4は、マウス肝臓においてほとんど検出可能でなかった（図10A）。したがって、肝臓特異性RSPO模倣体の投与は有益であり得る（図10A）。

【0261】

TAA前処理及びその後のタンパク質処理（ α ASGR1-RSPO2-RA-IgG及び対照タンパク質、配列番号23～24、29～32、155～156及び159～160）の期間を概略する実験計画を、図10Bに概説している。類似の設計の2つの実験を行った。1つ目の実験においては、マウスは、タンパク質処理開始の0日後、3日後及び7日後に終了処置した。2つ目の実験においては、マウスは、タンパク質処理開始の0日後及び14日後に終了処置した（図10B）。肝臓及び小腸のサンプルを採取して、遺伝子発現の変化を評価した。予想されたとおり、 α ASGR1-RSPO2-RA-IgGは3日目及び7日目にAxin2発現の肝臓特異的な増加を招き、一方でFc-RSPO2-WTは肝臓及び小腸の両方でAxin2を誘発した（図10C）。 α - β -Gal-IgG対照での処理により観察された変化はなかった。 α ASGR1-RSPO2-RA-IgGはまた、肝臓特異的にKi67発現を増加させた（図10C）。

【0262】

肝機能を観察するために、処理中の示した時点において、血液サンプルを取り出して、プロトロンビン時間の国際標準比（INR）を測定するために用いた。正常マウスは、INRがおよそ0.9であった。TAA処理により、重篤な肝障害に起因してINRが1.1に増加した（図10D）。TAAが除かれると、マウスは肝障害の一部の自然な回復を見せることがわかり、これは未処理動物で0日目の1.1から14日目の<1.0へとINRの低下が観察されたことと一貫する。しかしながら、 α ASGR1-RSPO2-RA-IgGで処理したマウスの100%が、3日目までにINRが0.9であったように、 α ASGR1-RSPO2-RA-IgGはINRの回復を加速させた。Fc-RSPO2-WTで処理したマウスは、7日目に、 α - β -Galで処理したマウスと比較してINRが低く、また14日目に α ASGR1-RSPO2-RA-IgGと同様の効果に達した。したがって、肝臓特異性 α ASGR1-RSPO2-RA-IgG分子は、慢性肝臓疾患モデルにおいて肝臓の合成機能を向上させることが可能である。

10

【0263】

実施例6

肝線維症の慢性のCCl₄誘発性マウスモデルにおける組織標的RSPO模倣体の肝機能への影響

α ASGR1-RSPO2-RA-IgGの活性及び有効性を、CCl₄とアリルアルコールとで発生させた肝線維症の第2のマウスモデルで調べた。54匹の8～9週齢のC57BL/6の雄（ジャクソン研究所（Jackson Laboratories））を、断続的に、CCl₄（1、4、7、10日目に0.5mL/kg）とアリルアルコール（2、5、8日目に0.0125mL/kg）とで10日間処理し、次いで8週間のCCl₄処理（0.5mL/kg、2回/週）を続けた。処理プロトコルを図12に示している。CCl₄処理後、マウスに、断続的なCCl₄処理と共に2週間タンパク質を投与した。処理群は以下のとおりである：10mg/kgの α ASGR1-RSPO2-RA-IgG2、n=8（毎日投与）；10mg/kgの α GFP-RSPO2-RA-IgG、n=8（毎日投与）；4.6mg/kgのFc-RSPO2-WT、n=7（2回/週の投与）；10mg/kgの α - β -Gal-IgG、n=8（2回/週の投与）；タンパク質なし対照、n=8。CCl₄処理なし（オリーブ油担体（0.5mL/kg）、n=8；未感作対照、n=7を、さらなる対照群に含めた。INR（国際標準比）試験のために、0、3、7日目（タンパク質投与のはじめの日を0日目と表す）にマウスを採血した。全てのマウスを、14日目に終了処置した。

20

30

【0264】

屠殺したら、全体重と肝臓の重量を測定し、血液、肝臓及び小腸の組織を回収して試験のために保存した。肝臓の重量は、RSPO2陽性対照で処理した群においてのみならずRSPO模倣体 α ASGR1-RSPO2-RA-IgG2で処理した群において、上昇傾向を示した。肝臓の重量/体重の比を測定した場合、RSPO2のみで処理したマウスは、統計学的に有意に増加していた。

【0265】

組織の修復及び線維形成の測定として、マウス血液中のプロコラーゲンIII型のN末端ペプチド（P3NP）を、タンパク質処理の0日目、7日目及び14日目に測定した。オリーブ油処理及び未感作対照と比較して、CCl₄で処理した全ての群で、有意な増加が観察されて、標識された肝線維症と一貫した。P3NPが低下して未感作マウスでのレベルに戻った（データは図示せず） α GFP-RSPO2-RA-IgGで処理した動物（肝臓を標的とする組織を欠いている）と比較して、RSPO模倣体 α ASGR1-RSPO2-RA-IgG2で処理した動物におけるP3NPレベルは高いままであり、これは組織修復と、細胞外基質の代謝回転が進行中であることを示していた。

40

【0266】

タンパク質処理の2週間後、血液凝固時間の測定としてのプロトロンビン時間（PT）は、確認された時間において増加がないこと、及びRSPO2タンパク質で処理した動

50

物においてその時間が実際に有意に減少したこと（データは図示せず）を示した。

【0267】

タンパク質処理の1週間後及び2週間後の時点において、標準の肝臓パネル測定を血清中で行った。マウス血清を、7日目の尾部出血と、14日目の最終放血とより採取した。肝臓パネル血清化学測定のために、血清をIDEXX Laboratories社（カリフォルニア州フリーモント）に送った。各群は6～8匹のマウスを含有し、そのデータは平均±SEMとして表4及び5に表す。

【表4】

表4. アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、及びアルカリホスファターゼ（ALP）のレベルを、タンパク質処理の1週間後及び2週間後に動物の血液中で測定した。

処理群	ALT U/L +/- SEM		AST U/L +/- SEM		ALP U/L +/- SEM	
	1 週	2 週	1 週	2 週	1 週	2 週
未感作	24.0 +/- 1.9	32.0 +/- 2.6	44.6 +/- 2.4	41.5 +/- 4.1	68.6 +/- 4.1	55.5 +/- 3.9
油対照	22.8 +/- 0.9	30.8 +/- 4.2	43.0 +/- 1.7	53.8 +/- 9.7	78.1 +/- 4.7	65.6 +/- 3.1
CC1 ₄ マウスで タンパク質なし	33.2 +/- 1.0	36.4 +/- 2.5	53.6 +/- 3.9	54.8 +/- 4.0	108.6 +/- 3.5	87.8 +/- 4.1
CC1 ₄ マウスで α - β -Gal-IgG	28.7 +/- 1.7	33.9 +/- 3.3	48.3 +/- 3.5	68.9 +/- 17.5	113.3 +/- 7.1	102.9 +/- 4.3
CC1 ₄ マウスで Fc-RSP02-WT	51.7 +/- 14.4	42.1 +/- 5.1	83.0 +/- 14.0	74.4 +/- 9.8	83.0 +/- 8.5	28.4 +/- 5.2
CC1 ₄ マウスで α -GFP-RSP02- RA-IgG	27.9 +/- 1.2	36.4 +/- 5.7	52.9 +/- 4.6	69.0 +/- 13.3	117.9 +/- 9.4	70.3 +/- 2.5
CC1 ₄ マウスで α ASGR1-RSP02- RA-IgG2	59.4 +/- 27.7	57.9 +/- 18.7	85.6 +/- 33.0	98.1 +/- 20.2	*411.4 +/- 63.9	**164.9 +/- 24.0

* α - β -Gal-IgG及び α GFP-RSP02-RA-IgGで処理した群とは統計学的に異なる、 $p < 0.0001$ ；** α - β -Gal-IgG（ $p = 0.0012$ ）及び α GFP-RSP02-RA-IgG（ $p < 0.0001$ ）で処理した群とは統計学的に異なる；One-way ANOVA（一元配置分散分析）。

表4に示すように、ALT及びASTの値は、タンパク質処理したもの及び対照のいずれかと統計学的に相違しない。しかしながら、ALPは、1週目及び2週目の両方の時点で統計学的により高く、これはASGR1 KOマウスモデルで記載されたとおり、ASGR受容体の除去に起因する、アルカリホスファターゼタンパク質レベルの発現上昇と一貫している（例えば、Cell Host Microbe. 2018 Oct 10；24（4）：500-513を参照）。

【表 5】

表 5. タンパク質処理の 1 週後及び 2 週後の動物の血液中で測定したアルブミン、及びビリルビン (b i l l i r u b i n) のレベル。

処理群	アルブミン g/dL +/- SEM		ビリルビン mg/dL +/- SEM	
	1 週	2 週	1 週	2 週
未感作	3.1+/-0.2	2.9+/-0.0	0.2+/-0.0	0.1+/-0.0
油対照	3.2+/-0.1	2.8+/-0.0	0.2+/-0.0	0.2+/-0.0
CC1 ₄ マウスでタンパク質なし	3.5+/-0.1	2.8+/-0.0	0.2+/-0.0	0.2+/-0.0
CC1 ₄ マウスで α - β -Gal-IgG	3.2+/-0.2	2.8+/-0.0	0.2+/-0.0	0.2+/-0.0
CC1 ₄ マウスで Fc-RSP02-WT	2.6+/-0.1	*1.6+/-0.1	0.2+/-0.0	0.1+/-0.0
CC1 ₄ マウスで α -GFP-RSP02-RA-IgG	3.0+/-0.1	2.5+/-0.0	0.2+/-0.0	0.2+/-0.0
CC1 ₄ マウスで α ASGR1-RSP02-RA-IgG2	2.5+/-0.1	*2.2+/-0.1	0.2+/-0.0	0.2+/-0.0

10

* α - β -Gal-IgG で処理した群とは統計的に異なる、Fc-RSP02-WT に関しては $p < 0.0001$ 及び α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 に関しては $p = 0.0009$; ** α - β -Gal-IgG ($p < 0.0001$) 及び α -GFP-RSP02-RA-IgG ($p < 0.0009$) で処理した群とは統計学的に異なる; One-way ANOVA (一元配置分散分析)。

20

【0268】

処理 1 週後のアルブミン、ビリルビンのレベルに対して有意な影響はなかったが、RSP02 陽性対照及び RSP0 模倣体 (α ASGR1-RSP02-RA-IgG2) 処理群の両方におけるタンパク質処理の 2 週後で、 α - β -Gal-IgG 及び α -GFP-RSP02-RA-IgG タンパク質対照と比較して、血液中のアルブミンが有意に少ないことが観察された。この結果は、Wnt シグナル伝達の増加によって誘発される、中心静脈周囲 (pericentral) 肝細胞の拡大の増加に起因した、門脈周囲肝細胞の機能の予想される一時的な停止を示唆する。

【0269】

半定量 PCR を用いて、タンパク質処理した肝臓及び小腸の遺伝子発現の変化を測定した (表 6)。

30

【表 6】

表 6. qPCR で測定した肝臓及び小腸における Wnt 誘発性遺伝子及び増殖マーカー遺伝子の発現の変化

処理群	肝臓				小腸		
	<i>Axin2</i>	<i>Hal</i>	<i>Ki67</i>	<i>Cyclin D1</i>	<i>Axin2</i>	<i>Ki67</i>	<i>Cyclin D1</i>
未感作	1.0+/- 0.1	1.0+/- 0.00	1.0+/- 0.1	1.0+/- 0.1	1.0+/- 0.1	1.0+/- 0.1	1.0+/- 0.2
油対照	0.7+/- 0.1	0.8+/- 0.0	0.6+/- 0.1	1.1+/- 0.1	0.7+/- 0.0	0.7+/- 0.1	0.7+/- 0.1
CC1 ₄ マウスでタンパク質なし	1.0+/- 0.1	1.0+/- 0.1	2.3+/- 0.4	2.0+/- 0.3	0.8+/- 0.1	0.9+/- 0.1	0.6+/- 0.1
CC1 ₄ マウスでα-βGal-IgG	2.2+/- 0.2	1.0+/- 0.1	2.8+/- 0.4	2.8+/- 0.4	1.0+/- 0.1	0.6+/- 0.1	1.4+/- 0.3
CC1 ₄ マウスでFc-RSP02-WT	3.3+/- 0.8	0.4+/- 0.2	13.8+/- 3.3	14.1+/- 4.4	1.8+/- 0.7	0.5+/- 0.2	0.6+/- 0.2
CC1 ₄ マウスでαGFP-RSP02-RA-IgG	1.8+/- 0.2	1.0+/- 0.1	7.2+/- 0.9	3.6+/- 0.5	0.6+/- 0.1	0.7+/- 0.0	0.4+/- 0.1
CC1 ₄ マウスでαASGR1-RSP02-RA-IgG2	4.2+/- 1.0	0.4+/- 0.1	11.4+/- 3.2	6.3+/- 1.8	0.6+/- 0.1	0.6+/- 0.0	0.8+/- 0.2

10

20

*統計学的に異なる変化を太字で示す。Axin2: αASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 αGFP-RSP02-RA-IgG、p=0.0092。Hal: Fc-RSP02-WT 対 αβGal-IgG、p=0.0259；αASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 αβGal-IgG、p=0.0042；αASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 αGFP-RSP02-RA-IgG、p=0.0018。Ki67: Fc-RSP02-WT 対 αβGal-IgG、p=0.0010；αASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 αβGal-IgG、p=0.0135。Cyclin D1: Fc-RSP02-WT 対 αβGal-IgG、p=0.0004。One-way ANOVA で計算した。

30

【0270】

Fc-RSP02-WT 陽性対照タンパク質又はRPSO模倣タンパク質、αASGR1-RSP02-RA-IgG2 によるマウスの処理により、いずれも、肝臓において、Wnt 誘発性 Axin2 遺伝子の発現の増加と、Wnt 抑制可能 (repressable) な Hal 遺伝子の発現の低下を招く。統計学的に有意であった測定された変化を、表 6 に太字で示している。小腸における Axin2 発現には、有意な変化はなかった。これらデータは、組織特異的に Wnt シグナル伝達が誘発されたことを示す。

【0271】

また Fc-RPSO2-WT 及び αASGR1-RSP02-RA-IgG2 による処理により、Ki67 及び Cyclin D1 増殖マーカーの増加が、肝臓では見られたが、小腸では見られなかった。統計学的有意性に達した変化を太字で示している。いずれの処理においても小腸では有意な変化は見られなかった (表 6)。これらデータは、組織特異的に増殖が誘発されたことを示す。

40

【0272】

肝細胞、胆管細胞 (cholangiocyte)、未熟肝細胞及び卵形細胞を含めた、特定の肝臓細胞型における変化を測定するために、さらなる qPCR 解析がなされた (表 7)。

【表 7】

表 7. qPCR で測定した、タンパク質処理した肝細胞型のためのマーカーとして用いた遺伝子の発現における変化

処理群	肝細胞	胆管細胞 (cholangiocyte)	未熟肝細胞	Cholangiocyte/卵形細胞
	<i>CK8</i>	<i>CK19</i>	<i>Afp</i>	<i>Sox9</i>
未感作	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
油対照	0.8+/-0.0	0.9+/-0.1	1.1+/-0.1	0.8+/-0.1
CCl ₄ マウスでタンパク質なし	0.9+/-0.1	1.4+/-0.1	1.3+/-0.2	1.2+/-0.1
CCl ₄ マウスで α - β Gal-IgG	0.7+/-0.1	1.0+/-0.1	1.3+/-0.1	1.5+/-0.1
CCl ₄ マウスで Fc-RSP02-WT	*1.4+/-0.3	0.7+/-0.1	*3.5+/-0.3	1.3+/-0.1
CCl ₄ マウスで α GFP-RSP02-RA-IgG	0.6+/-0.0	1.0+/-0.1	1.6+/-0.1	1.2+/-0.1
CCl ₄ マウスで α ASGR1-RSP02-RA-IgG2	*1.8+/-0.2	1.5+/-0.2	*3.7+/-0.7	1.0+/-0.1

10

20

*統計学的に異なる変化を太字で示す。CK8： α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 α - β Gal-IgG、 $p=0.0001$ ； α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 α -GFP-RSP02-RA-IgG、 $p<0.0001$ 。Afp：Fc-RSP02-WT 対 α - β Gal-IgG、 $p=0.0002$ ； α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 α - β Gal-IgG、 $p<0.0001$ ； α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 α -GFP-RSP02-RA-IgG、 $p=0.0001$ 。One-way ANOVA で計算した。

30

【0273】

胆管細胞マーカーCK19では見られなかったが肝細胞マーカーCK8での統計学的に有意な変化を評価すると、肝臓における増殖性の反応は肝細胞に限られるということが示される。さらに、Afpの統計学的有意な増加は、未熟肝細胞の変動(surge)を示している(表7)。卵形細胞においては有意な変化はなかった。

【表 8】

表 8. 半定量PCRにより測定した、タンパク質処理した肝細胞及び門脈周囲肝細胞の機能に関連する遺伝子の発現の変化

処理群	肝細胞機能 <i>Factor X</i>	中心静脈周囲肝細胞機能 <i>Cyp1a2</i>	中心静脈周囲肝細胞機能 <i>Cyp2e1</i>	門脈周囲肝細胞機能 <i>Cyp2f2</i>
未感作	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.2
油対照	0.9+/-0.1	0.9+/-0.1	0.9+/-1.2	0.8+/-0.1
CC1 ₄ マウスでタンパク質なし	1.1+/-0.1	0.6+/-0.0	1.0+/-0.1	1.2+/-0.1
CC1 ₄ マウスで α-βGal-IgG	1.2+/-0.1	0.8+/-0.1	1.0+/-0.1	0.8+/-0.1
CC1 ₄ マウスで Fc-RSP02-WT	*1.9+/-0.3	0.7+/-0.3	1.2+/-0.2	*0.1+/-0.0
CC1 ₄ マウスで αGFP-RSP02-RA-IgG★	1.0+/-0.2	0.5+/-0.1	0.8+/-0.1	0.8+/-0.0
CC1 ₄ マウスで αASGR1-RSP02-RA-IgG2	1.2+/-0.1	*2.0+/-0.4	*2.7+/-0.5	*0.1+/-0.0

*統計学的に異なる変化を太字で示す。Factor X: Fc-RSP02-WT対α-β-Gal-IgG、 $p=0.0463$ 。Cyp1a2: αASGR1-RSP02-RA-IgG2対α-β-Gal-IgG、 $p=0.0044$ ；αASGR1-RSP02-RA-IgG2対αGFP-RSP02-RA-IgG、 $p=0.0001$ 。Cyp2e1: αASGR1-RSP02-RA-IgG2対α-β-Gal-IgG、 $p<0.0001$ ；αASGR1-RSP02-RA-IgG2対αGFP-RSP02-RA-IgG、 $p<0.0001$ 。Cyp2f2: Fc-RSP02-WT対α-β-Gal-IgG、 $p<0.0001$ ；αASGR1-RSP02-RA-IgG2対α-β-Gal-IgG、 $p<0.0001$ ；αASGR1-RSP02-RA-IgG2対αGFP-RSP02-RA-IgG、 $p<0.0001$ 。One-way ANOVAで計算した。

【0274】

Wntシグナル伝達は、主として中心静脈周囲肝細胞において2つのCypP450酵素、Cyp2e1及びCyp1a2の発現を制御する(ref)。RSP0模倣体でのマウスの処理が、これら2つの酵素に関して遺伝子の発現を有意に増加させた(表xx)。さらに、有意により低いCyp2f2が、中心静脈周囲領域の一次的な拡大に起因して、中心静脈周囲肝細胞機能の一次的な低下を示している。

【0275】

タンパク質処理の2週後、マウス肝臓をシリウスレッド(Sirius red)で染色して、全てのマウスにおいてシリウスレッド染色コラーゲン含量のレベルを測定した(図13及び表9)。マウスをイソフルラン吸入により麻酔し、心臓放血、及びその後頸椎脱臼した。肝臓は、新鮮に採取して、一晚のインキュベーションのために、即座に10%中性緩衝ホルマリンに浸漬した。翌日、肝臓を70%エタノールに移して、パラフィン包埋のために調製した。肝臓組織は、5μmの厚さに切り出し、脱蠟して、アルコール勾配により水和した。このスライドを、ピクロシリウスレッド溶液(シグマアルドリッチ社)で染色して、酸性化水で洗浄した。100%エタノールを3回変えて脱水し、キシレン中で洗浄し、風乾して、カバーガラスを載せた。シリウスレッドで染色した範囲は、Image J(NIH)で定量化され、抗βgal対照で処理したCC1₄マウスよりの肝臓で正規化した(100%として設定)。各群は7~8匹のマウスを含有し、そのデータは平均±SDとして表す。

【表 9】

表 9. 抗 β Gal 処理した C C 1₄ マウスに対して正規化した肝臓組織のシリウスレッド染色の定量化

処理群	シリウスレッド率 (β Gal と比較)
C C 1 ₄ マウスでタンパク質なし	93.0 $\pm$ 4.8
C C 1 ₄ マウスで α - β -Gal-IgG	100 $\pm$ 5.4
C C 1 ₄ マウスで Fc-RSP02-WT	*60.0$\pm$2.9
C C 1 ₄ マウスで α GFP-RSP02-RA-IgG	87.0 $\pm$ 7.1
C C 1 ₄ マウスで α ASGR1-RSP02-RA-IgG2	*66.3$\pm$3.2

10

*統計学的に異なる変化を太字で示す。Fc-RSP02-WT 対 α - β -Gal-IgG、 $p < 0.0001$ ；Fc-RSP02-WT 対 α GFP-RSP02-RA-IgG、 $p = 0.0059$ ； α -ASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 α - β -Gal-IgG、 $p = 0.0003$ ； α -ASGR1-RSP02-RA-IgG2 対 α GFP-RSP02-RA-IgG、 $p = 0.0410$ ；One-way ANOVA で計算した。

【0276】

処理後、シリウスレッド染色を用いて、この実験における全てのマウスの肝線維症の量を定量化した。この方法のために、マウスをイソフルラン吸入により麻酔し、心臓放血、及びその後に頸椎脱臼した。肝臓は、新鮮に採取して、一晚のインキュベーションのために、即座に 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬した。翌日、肝臓を 70% エタノールに移して、パラフィン包埋のために調製した。肝臓組織は、5 μ m の厚さに切り出し、脱蠟して、アルコール勾配により水和した。このスライドを、ピクロシリウスレッド溶液（シグマアルドリッチ社）で染色して、酸性化水で洗浄した。100% エタノールを 3 回変えて脱水し、キシレン中で洗浄し、風乾して、カバーガラスを載せた。シリウスレッドで染色した範囲は、Image J (NIH) で定量化され、 α - β -Gal-IgG 対照で処理した C C 1₄ マウスよりの肝臓で正規化した（100% として設定）。各群は 7～8 匹のマウスを含有し、そのデータは平均 $\pm$ SD として表す。

20

【0277】

Fc-RSP02-WT 又は RPSO 模倣体、 α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 での処理の 2 週間後、C C 1₄ 処理マウスは、対照タンパク質で処理したマウスで見られたよりもシリウスレッド染色が約 40% 減少していたが、これは、これらマウスにおいては、対照タンパク質で処理したマウスにおけるよりもより速く肝線維症が回復していたことを示す（図 13 及び表 9）。

30

【0278】

この実験の全ての動物よりのパラフィン固定肝臓組織における、HNF4 α 及び Ki67 に対する免疫組織化学染色により、さらなる実験を行った。Fc-RSP02-WT 及び α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 の両方で処理したマウスにおいて、HNF4 α 肝細胞マーカー及び Ki67 増殖マーカーの有意な共局在が、肝臓全体にわたって見られた（データは図示せず）。対照的に、 α - β -Gal-IgG 処理した対照マウスにおいては、二重に染色された細胞はかなり少なかった。これらの結果により、Fc-RSP02-WT 及び α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 が、これらマウスにおいて肝細胞増殖を誘発することが可能であることが確認された。

40

【0279】

合わせて、これらデータは、RPSO 模倣体、 α ASGR1-RSP02-RA-IgG2 が、線維性肝疾患のこのモデルのマウスが線維症を回復して機能的な肝細胞を再生することが可能である速度に有意な影響を有することを示唆する。

【0280】

実施例 7

新規 ASGR1 バインダーを用いた肝臓標的 RPSO 模倣分子の構築

50

ヒト A S G R 1 に対する新規バインダーを、ヒト A S G R 1 に対して生じさせて、またヒト及びカニクイザルの組換え A S G R 1 E C D ドメインに対する交差反応性に基づいて選択されたハイブリドーマとして開発した。当該ハイブリドーマは、フローサイトメトリーにより H u h - 7 細胞の特異的染色でさらにランク付けされた（対照として H E K 2 9 3 を用いて）。選択されたヒットがサブクローニングされて、それらの V H 及び V L 配列を推定するためにランク付けされた（配列番号 2 7 4 ~ 3 0 5）。肝臓特異性 R S P O 模倣体を生成するために、エフェクタなし変異 N 2 9 7 G を含有するヒト I g G 2 又はヒト I g G 1 として発現した、A S G R 1 バインダーを伴う融合タンパク質を生成し、一方で、変異体 R S P O モジュールを、リンカーを介して重鎖の N 末端又は C 末端に融合した（配列番号 1 9 0 ~ 2 7 1）。組換えタンパク質を、一過性導入により E x p i 2 9 3 細胞中で発現して、プロテイン A 樹脂と、その後続くサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。肝細胞特異性 W n t シグナル増強は、ルシフェラーゼアッセイにおいて解析され、組換え W N T 代替物 R 2 M 3 - 2 6（例えば、国際公開第 2 0 1 9 / 1 2 6 3 9 8 号を参照）の存在下での H u h - 7 及び H E K 2 9 3 S T F レポーター細胞株における活性を比較した。図 1 2 は、I g G 1 又は I g G 2 での融合として、H u h - 7 細胞における 1 6 個の新規 A S G R 1 標的 R S P O 模倣分子の特異的な活性を示している。

10

【0281】

実施例 8

マウス肝臓における組織標的 R S P O 模倣体の薬力学（PD）解析

肝臓標的 R S P O 模倣体のインビボでの活性を測定するために、5 ~ 6 週齢の C 5 7 B L / 6 雄 J A X（合計 5 6 匹のマウス）を、ヒト A S G R 遺伝子発現のためにヒト化した。マウスは、h A S G R 1 及び h A S G R 2 遺伝子を発現する A A V 8 ベクター（ 1×10^{11} ゲノムコピー / マウス）で注射（IV）したマウスであった。

20

【0282】

6 日後、複数の A S G R 1 標的 R S P O 模倣体を、5 m g / k g 投与量の腹腔内注射により、対照と共にマウスに投与した（図 1 5 A）。

【0283】

2 4 時間後、マウスを安楽死させ、肝臓をばらばらにして、RNA 単離のために急速凍結した。A x i n 2 の相対的発現を求めるために、mRNA 解析を行った。半定量 PCR を用いて、処理したマウスよりの肝臓組織において相対的な遺伝子発現を測定した。値は、恒常的な A c t i n B 遺伝子発現の発現に対して正規化した（図 1 5 B）。

30

【0284】

α - β - G a l - I g G と比較して、 α A S G R 1 - I g G（R O - 0 1）は、A x i n 2 発現を誘発しなかったが、これはこのバインダーが W n t シグナル伝達に対してそれ単独では影響しないことを示唆する。同様に、 α G F P - R S P O 2 - R A - I g G は、A x i n 2 を誘発せず、変異体 R S P O 2 モジュールが単独でいずれの活性も有していないことが確認された。対照的に、 α A S G R 1 - R S P O 2 - R A - I g G（バインダー R O - 0 1 を伴って構築した原型的な肝臓標的 R S P O 模倣体）が、肝臓において有力な A x i n 2 誘発を示したが、これはターゲティングモジュールの要件と一貫した。

40

【0285】

さらなる A S G R 1 標的 R S P O 模倣分子（インハウスでレイズしたバインダーを伴って構築した）の全てが、A x i n 2 発現の誘発の傾向又は有意な誘発のいずれかを見せた。7 B 1 3、8 M 2 4、2 I 1 3 及び 9 M 1 6 系の R S P O 模倣分子が、O n e - w a y A N O V A により、 α - β - G a l - I g G 対照と比較して A x i n 2 発現の刺激を統計学的に有意に増加させたが、一方で 3 A 2 4、2 I 2 2、1 P 1 3、1 N 1 5、3 E 2 0 は、A x i n 2 発現を刺激する傾向を見せた（図 1 5 B）。

【0286】

上記に記載した様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することが可能である。本明細書で言及した、ならびに / 又は出願データシートに列記した、米国特許、米国特許出願公開公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許出版物の全

50

ては、それらの全体として、参照により本明細書で援用する。実施形態の態様は、様々な特許、出願及び公開公報の概念を採用するために必要であれば、変形して、さらなる実施形態を提供することが可能である。

【0287】

上記の詳細な説明を踏まえて、実施形態に対してこれら変更及び他の変更をなすことが可能である。概して、以下の特許請求の範囲において用いた語は、明細書及び特許請求の範囲に開示する特定の実施形態に請求項を限定するように解釈されるべきではないが、当該請求項に与えられるものと均等の全範囲に加えて、全てのあり得る実施形態を含めるように解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

10

参考文献

Clevers H, Loh KM and Nusse R. 2014, An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346 (6205): 1248-1252.

Yan JJ, Liao JZ, Lin JS and He XX. 2015, Active radar guides missile to its target: receptor-based targeted treatment of hepatocellular carcinoma by nanoparticulate systems. *Tumor Biology* 36: 55-67.

20

Stockert RJ, Morell AG and Ashwell G. 1991, Structural characteristics and regulation of the asialoglycoprotein receptor. *Targeted Diagnostic and Therapy* 4: 41-64.

D'Souza AA and Devarajan PV. 2015, Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting-strategies and applications. *Journal of Controlled Release*, 203: 126-139.

30

Janda CY, Dang LT, You C, Chang J, de Lau W, Zhong ZA, Yan KS, Marecic O, Siepe D, Li X, Moody JD, Williams BO, Clevers H, Piehler J, Baker D, Kuo CJ, and Garcia KC. 2017, Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signaling. *Nature* 545: 234-237.

【図 1 A】

Rsp01	MRLGLC-VVALVLSWTHLTSSRGKNGKQRIASGGQACAKGCELCSEVNGCLKSPK	59
Rsp02	MQFRLFSFALILNMDYSKQGR-WRRSR-ASYVSHFICGLSCSKNGCSRQQR	58
Rsp03	MHLRLISWLFILNMFYIGSNASRGRRQRPWVSGQGCACDYNGLSCSPK	53
Rsp04	MRAPLCILL-LVAHVDMLA-----LNRKKQVGTGLGQNTGCIICSENGCSTCQR	60
	*: * : : * : : * : : * : : * : : *	
Rsp01	LFILLERNDIRQGVCLSPCPGYFDARHFNKIKRIENCEACFSDHFTCKREGLI	119
Rsp02	LFFFLEERSSQYGLMSCFSGYGRAPFDRICARIEHSCDSFSDHFTCKRQVFI	118
Rsp03	LFVALERISQYGLMSCFSGYGRAPFDRICARIEHSCDSFSDHFTCKRQVFI	119
Rsp04	LFILIRREGIRQVCLMDCFPGYFIRQEVNRKKGDA-TCEGCFSGDFICRKRQFI	112
	** : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Rsp01	LHGRGCFACFESSAANNRDECSIPAQCEMSSEWSPGSCSKQQLGFRGSEERTRV	179
Rsp02	LHGRGCFDECFDGFAPLEETHECVI--GCEVHSEWSPGSCSKQQLGFRGSEERTRV	176
Rsp03	LHGRGCLDCECFDGFAPLEETHECVI--GCEVHSEWSPGSCSKQQLGFRGSEERTRV	179
Rsp04	LYNGKCLPTCFPGTLANQTRCQG--ECELPGWGWSPCTHNGKTCGSANGLESRVREA	170
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Rsp01	LHAPVGDHAACTDKTRRRTVRRVPCFEGQR--RKGQGRKRNANRLARKEKE---	234
Rsp02	VKKFVKLTILCFPIAESRCOMTNGHCFGGKRT--FKAKERKNNKKKLLERAGQESV	234
Rsp03	IQHPKAGKMLCFPIAESRCOMTNGHCFGGKRT--FKAKERKNNKKKLLERAGQESV	237
Rsp04	GRAGHEAATCQVLSERKCPQR-PCPGRSPGQKGRKRRPRKDKLDRDLVR---	226
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Rsp01	--AGAGS-RRRKQQQQQQ-----QQTVGLTSAGPA	263 (配列番号 NO:1)
Rsp02	FLA-----TRDANQ	243 (配列番号 NO:2)
Rsp03	LESSKEIPEGRNKKQQQKKRVQDKQKSVSVTVH	272 (配列番号 NO:3)
Rsp04	-----PRQGLQP	234 (配列番号 NO:4)
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Fu1
Fu2

図 1 A

【図 1 B】

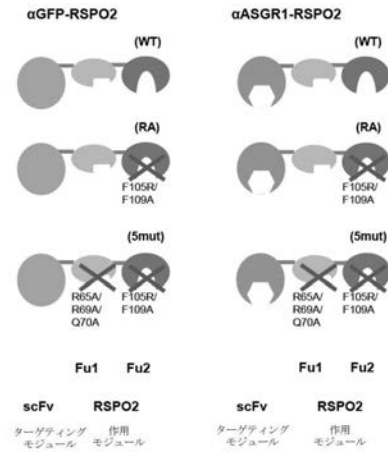


図 1 B

【図 1 C - 1】

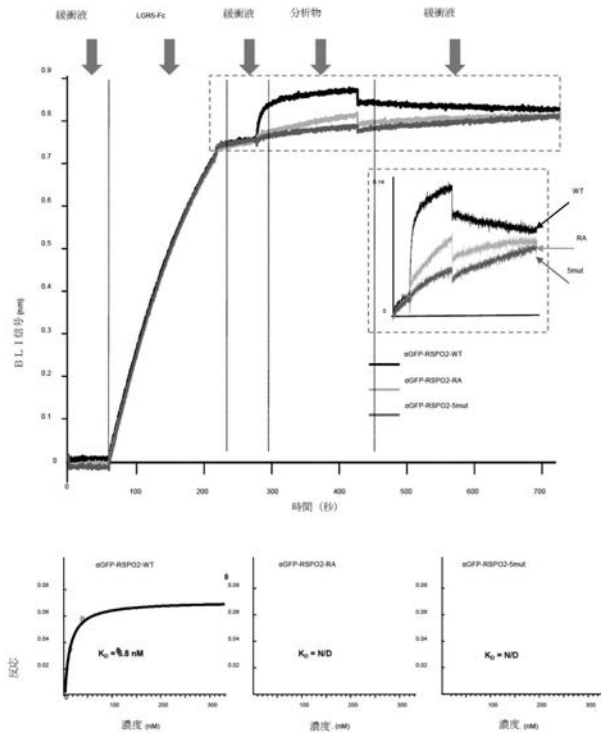


図 1 C

【図 1 C - 2】

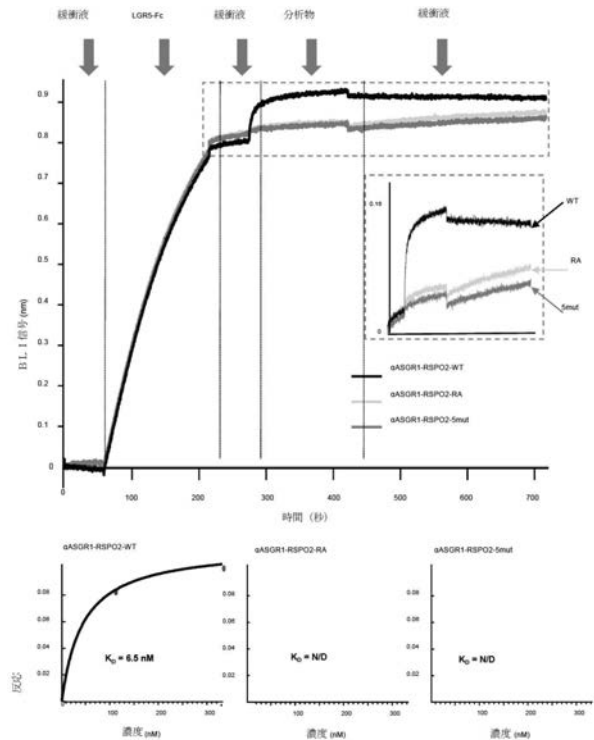


図 1 C (続き)

【図 1 D - 1】

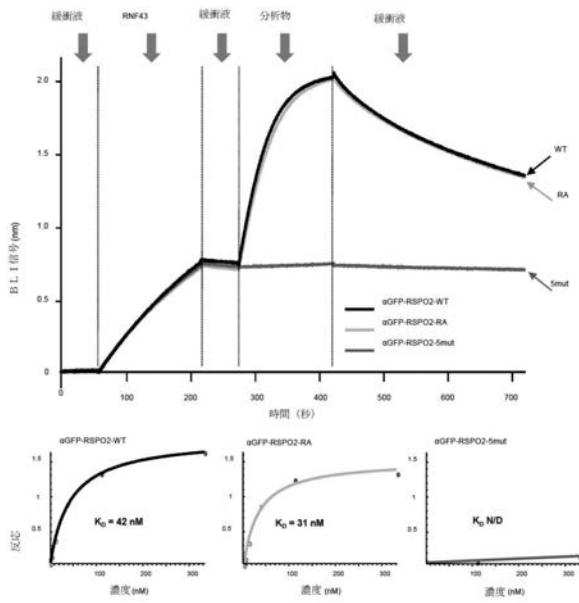


図 1 D

【図 1 D - 2】

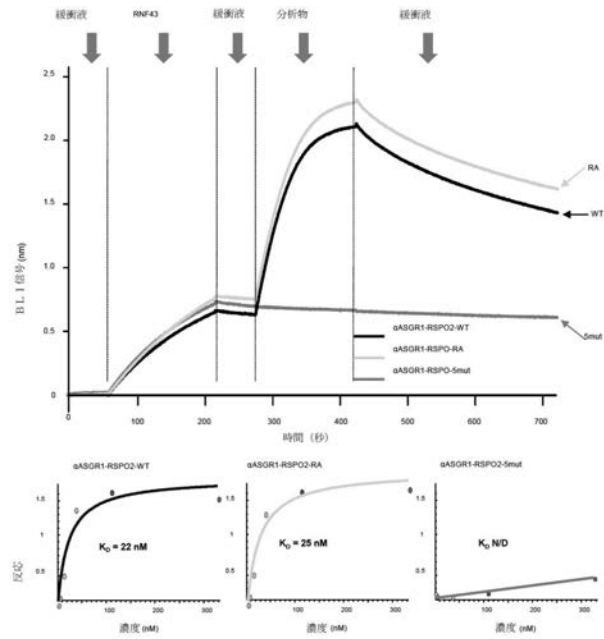


図 1 D (続き)

【図 1 D - 3】

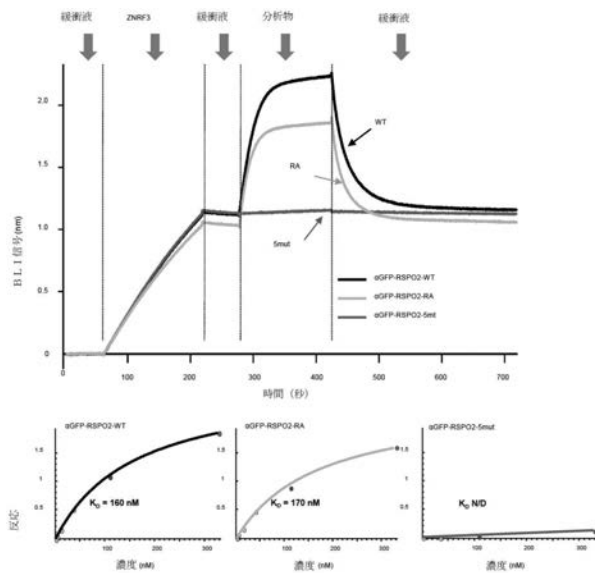


図 1 D (続き)

【図 1 D - 4】

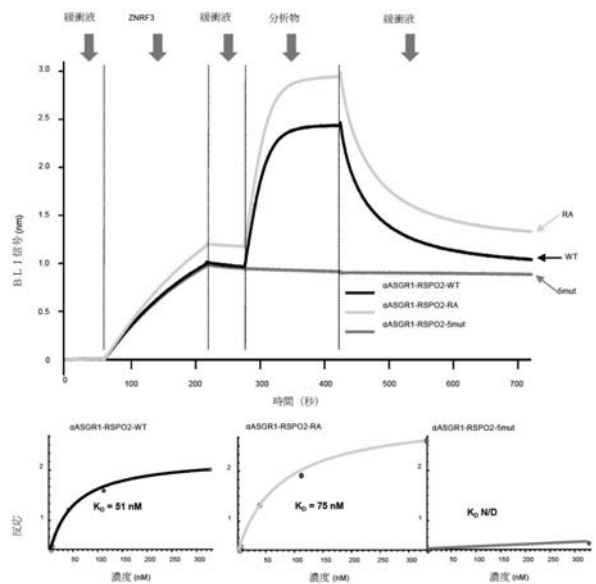


図 1 D (続き)

【図 2 A】

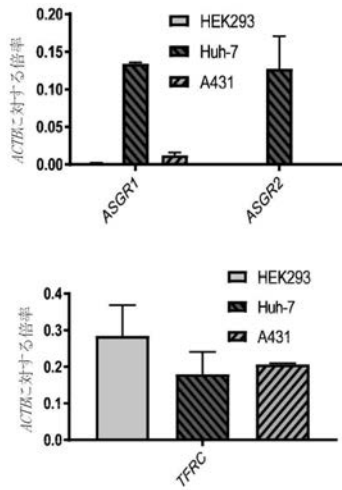


図 2 A

【図 2 B】

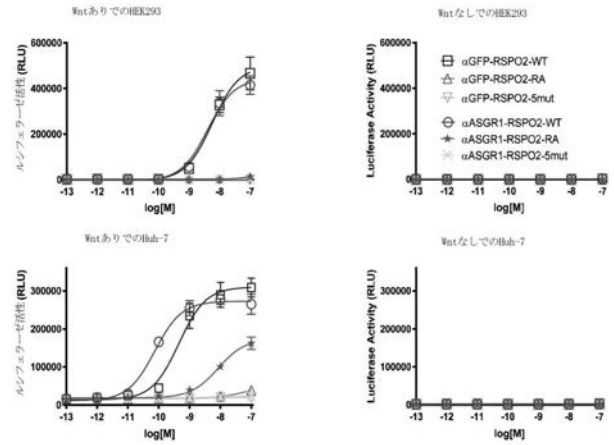


図 2 B

【図 2 C】

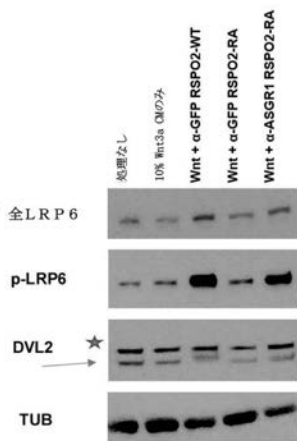


図 2 C

【図 3 A】

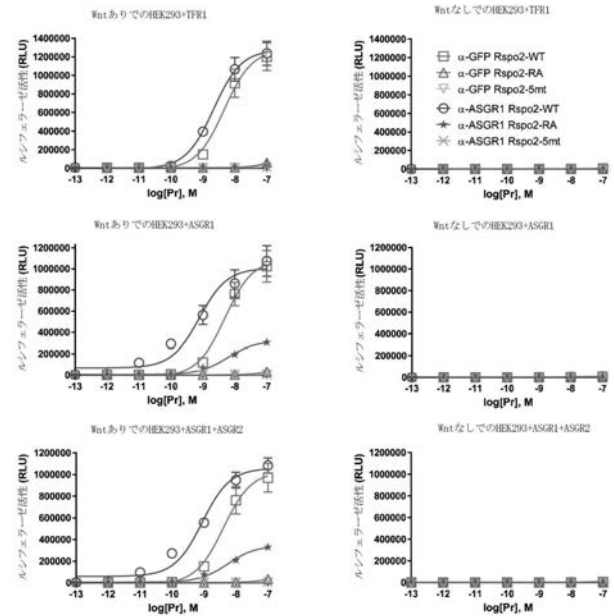


図 3 A

【図 3 B】

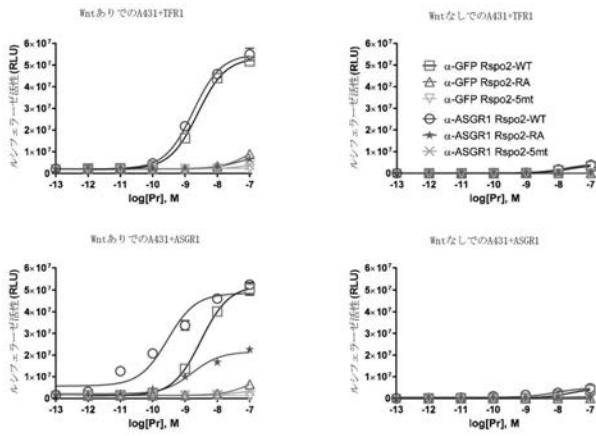


図 3 B

【図 3 C】

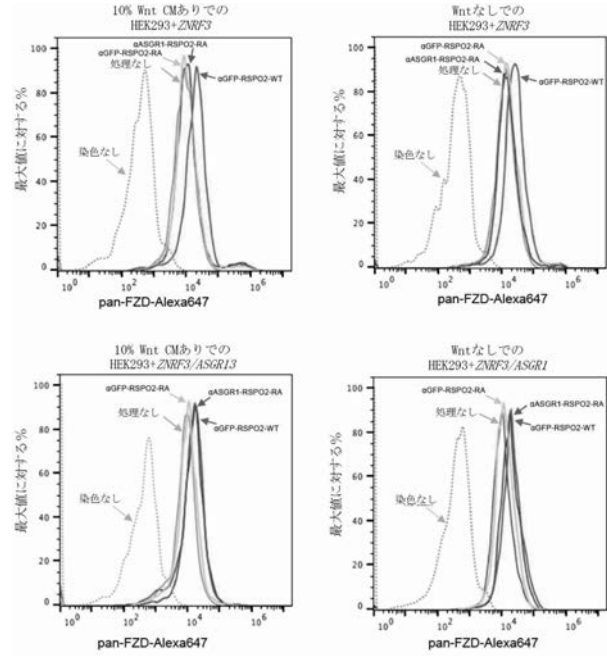


図 3 C

【図 4 A】

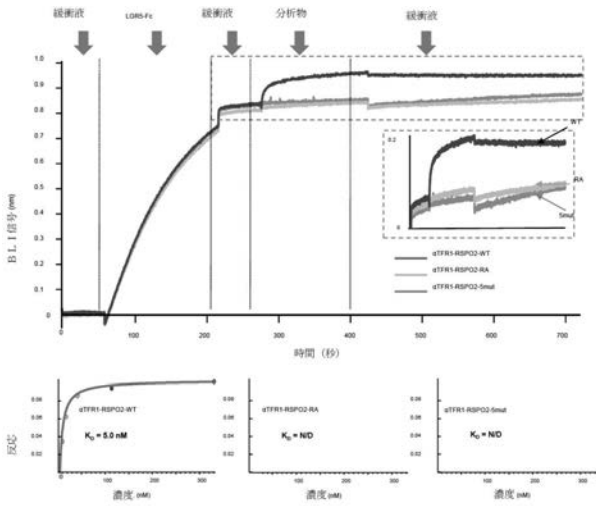


図 4 A

【図 4 B】

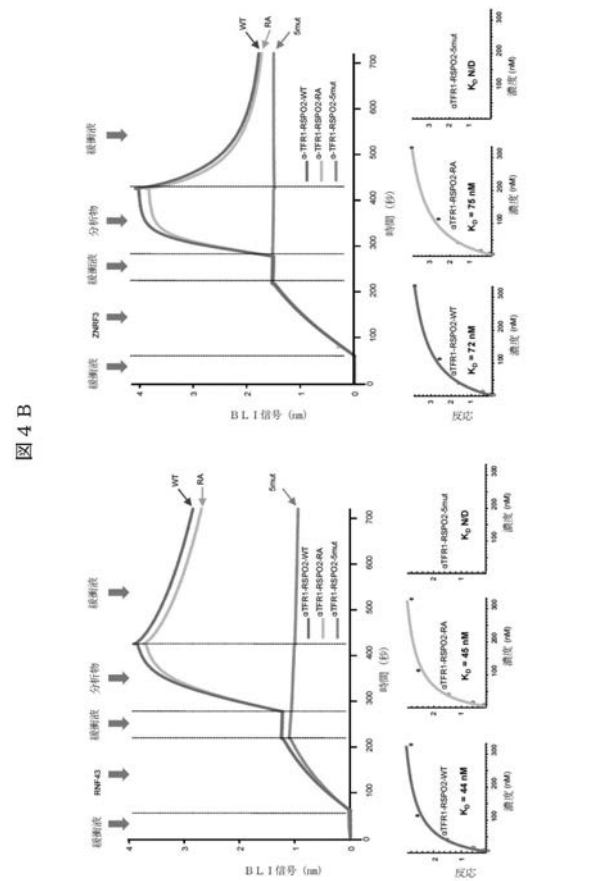


図 4 B

【図 4 C】

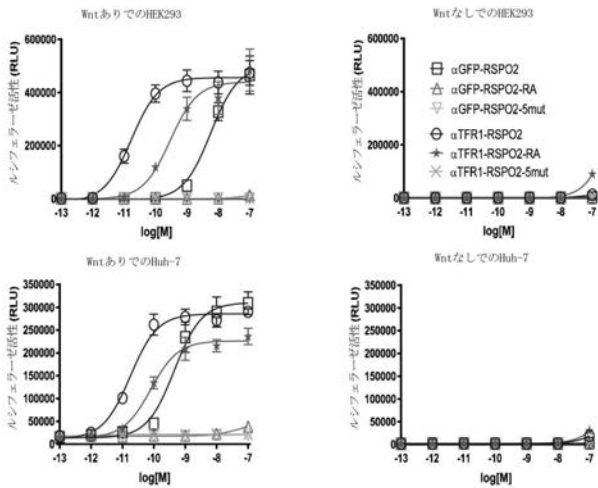


図 4 C

【図 4 D】

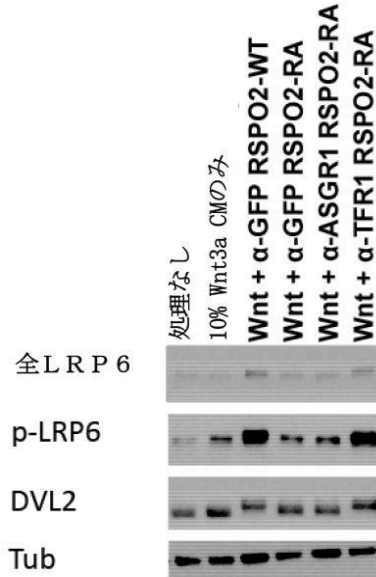


図 4 D

【図 4 E】

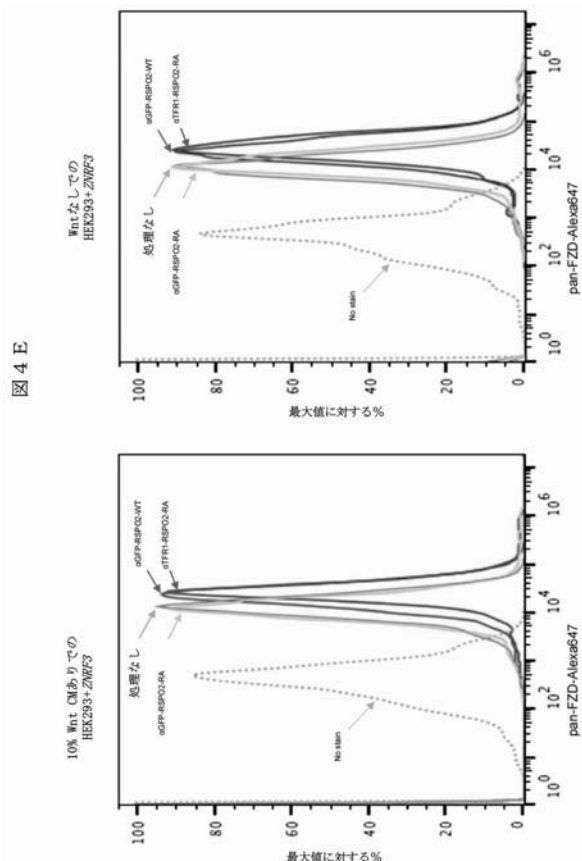


図 4 E

【図 5 A】

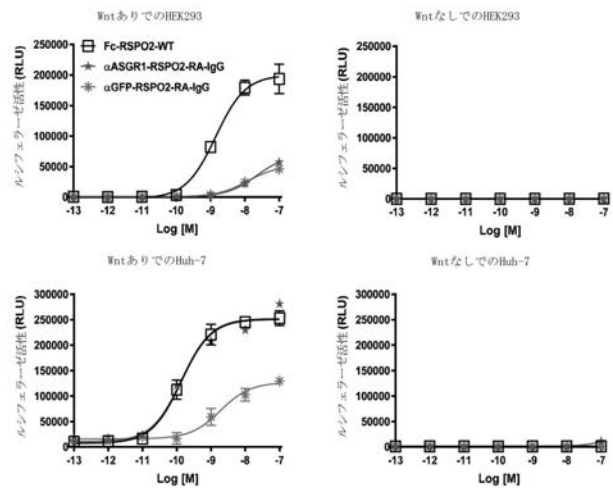


図 5 A

【図 5 B】

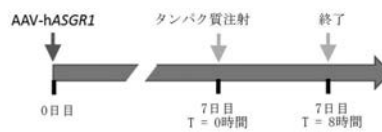


図 5 B

【図 5 C】

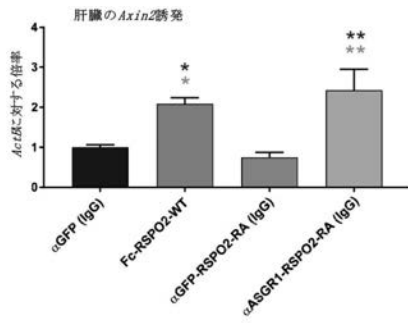


図 5 C

【図 5 D】

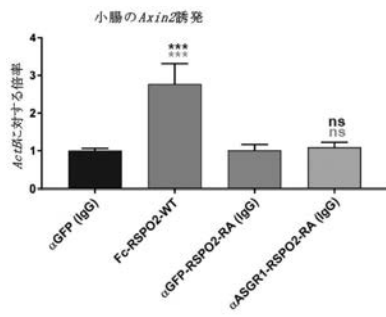


図 5 D

【図 6 A】

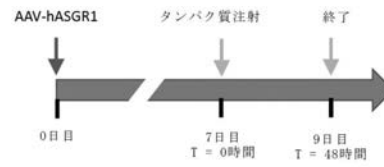


図 6 A

【図 6 B】

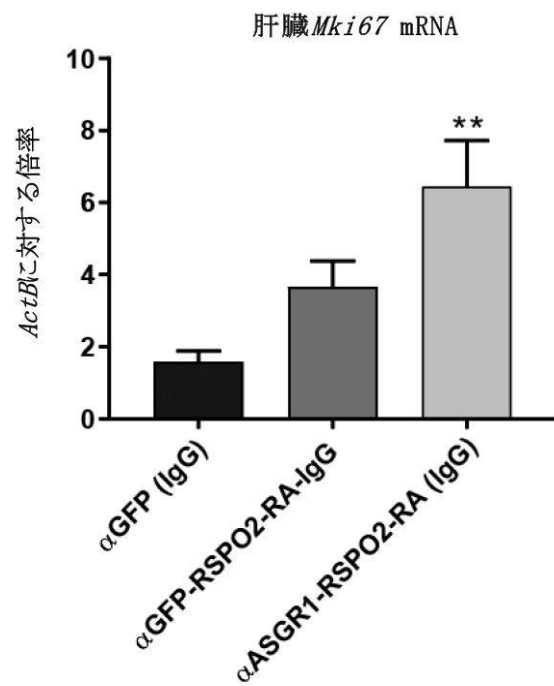


図 6 B

【図 6 C】

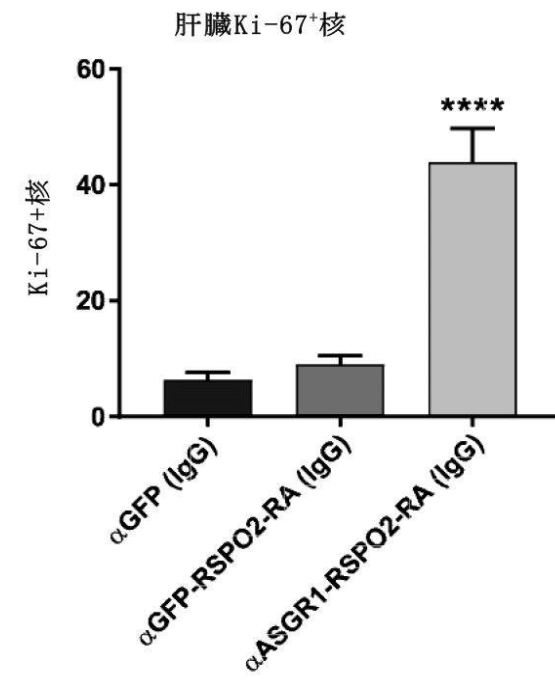


図 6 C

【図 6 D】

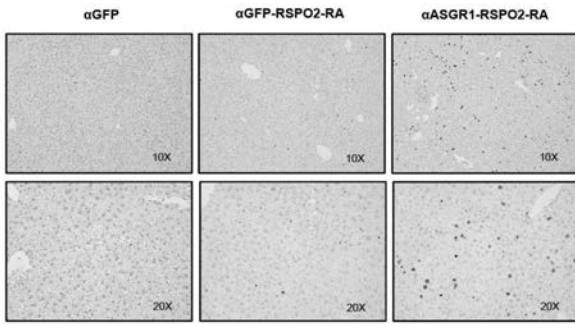


図 6 D

【図 6 E】

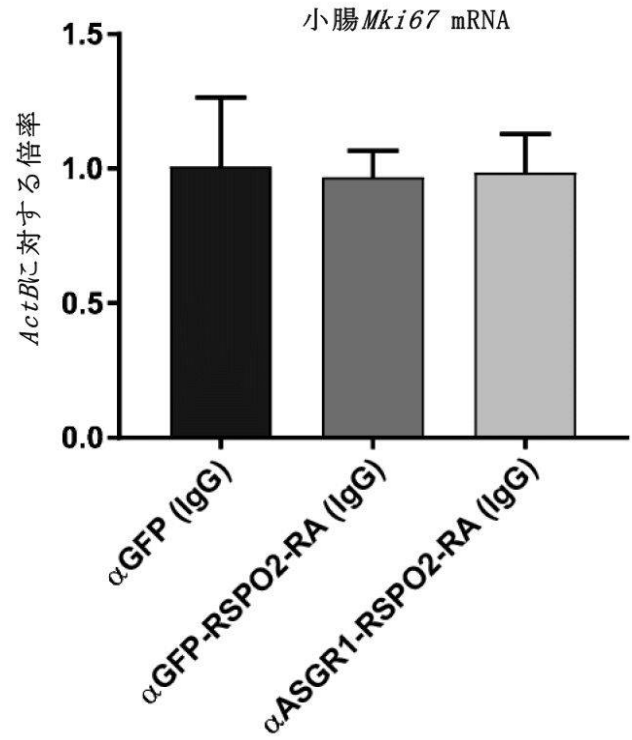


図 6 E

【図 7 A】

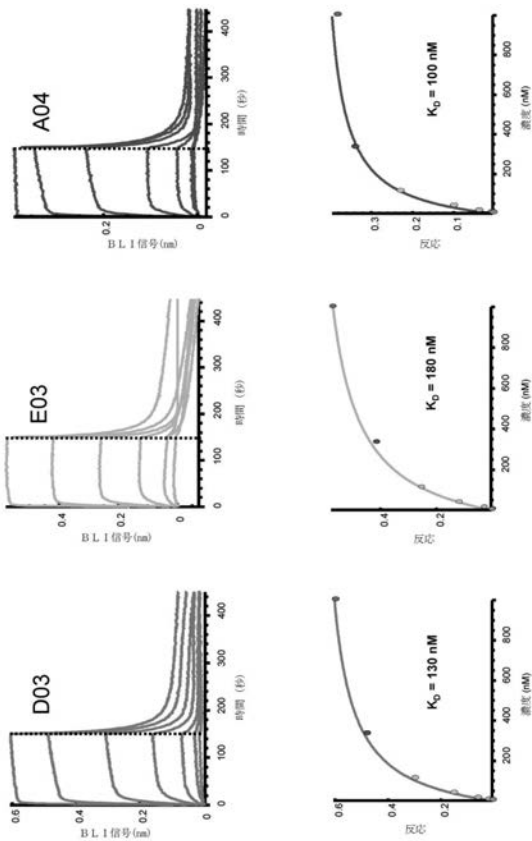


図 7 A

【図 7 B】

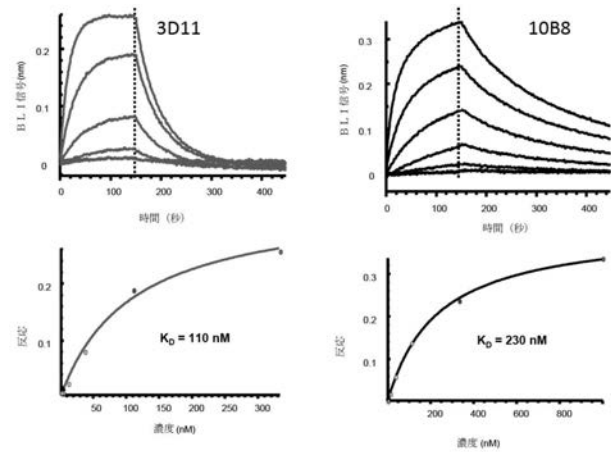


図 7 B

【図 7 C】

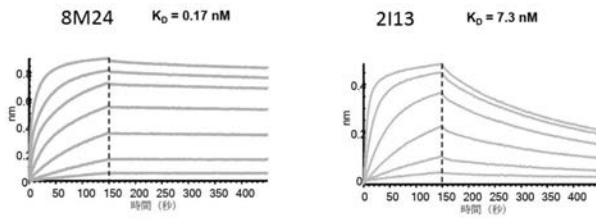


図 7 C

【図 8】

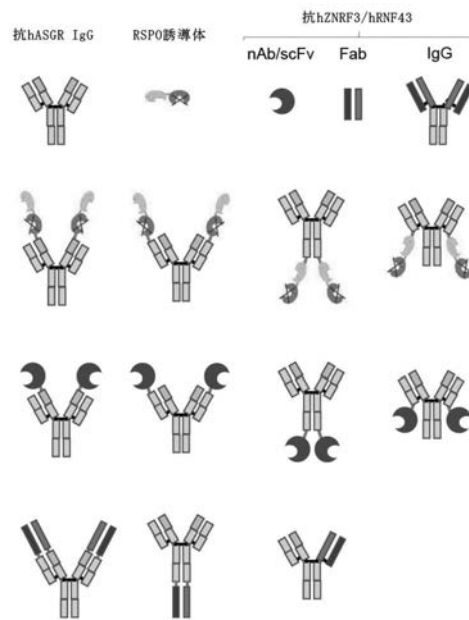


図 8

【図 9 A】

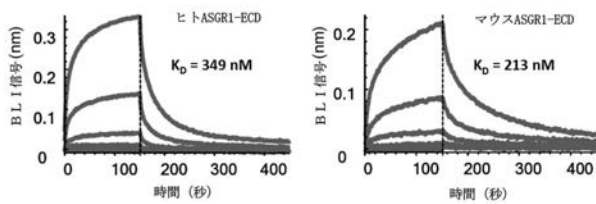
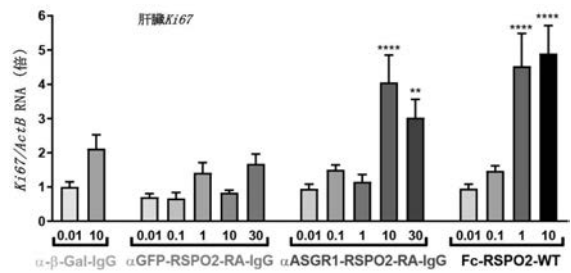


図 9 A

【図 9 C】



【図 9 B】

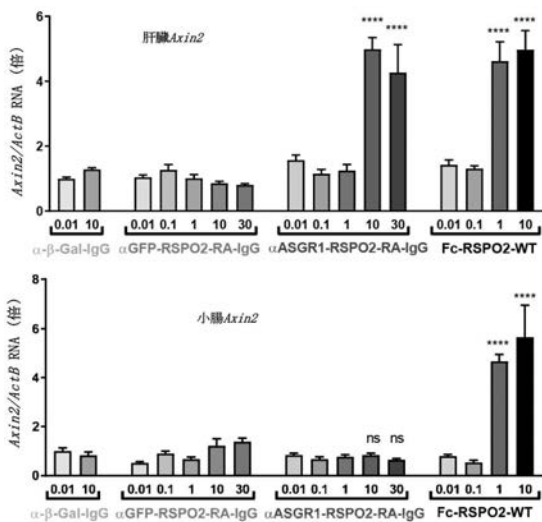


図 9 B

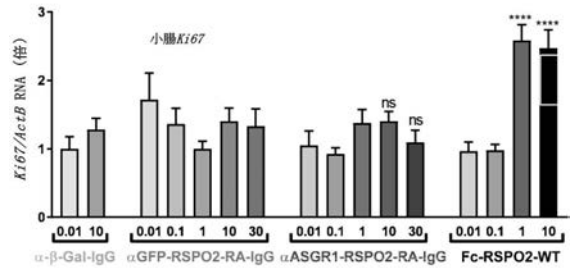


図 9 C

【図 9 D】

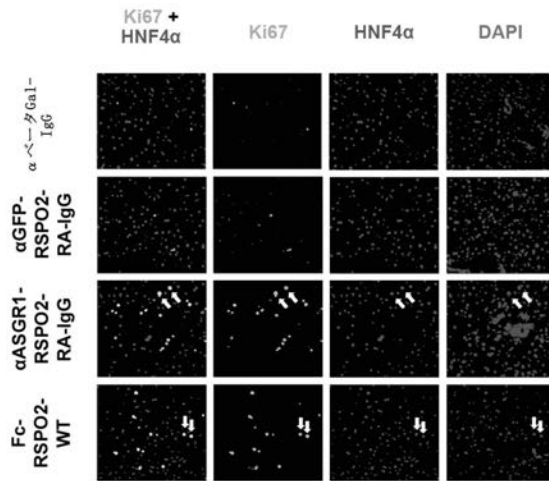


図 9 D

【図 10 A】

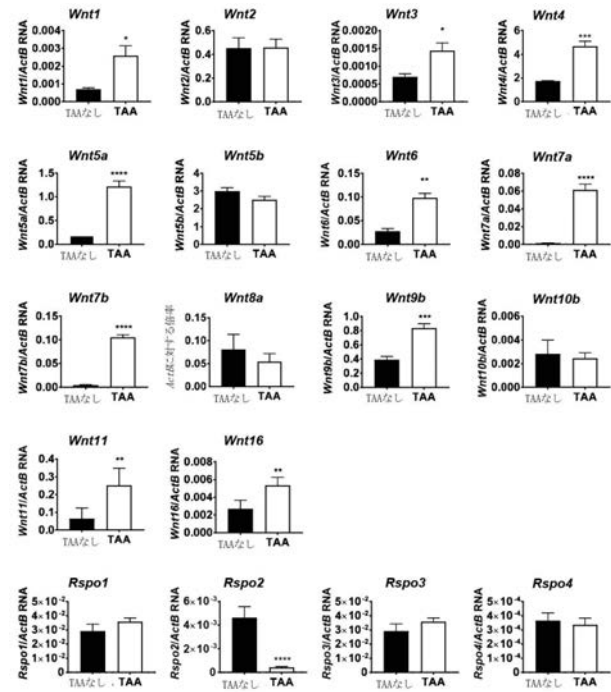


図 10 A

【図 10 B】

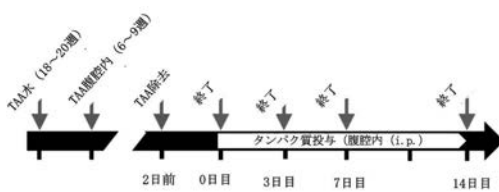


図 10 B

【図 10 C】

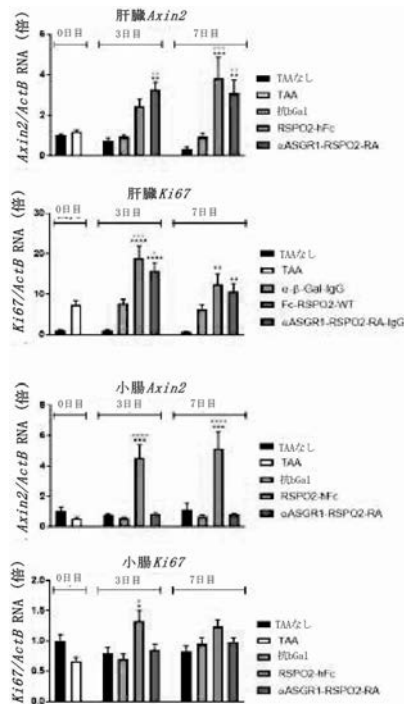


図 10 C

【図 1 0 D】

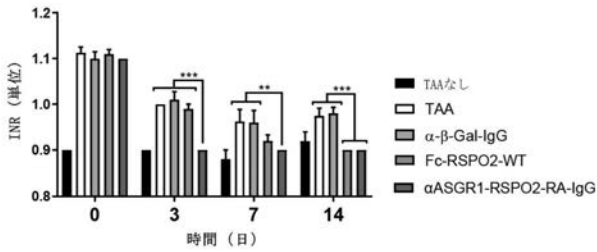


図 1 0 D

【図 1 1 A】

Wntシグナルエンハンサー配列

抗GFP、RSP02野生型ポリヌクレオチド (配列番号5)

CAGGTCCAGTTGGTGAATCCGAGGGGGTTTGGTCCAGCCTGGTGAAGCCTG
CGCTCTCATGCGCCGCTAGCGGATTACCTTCTCCGATACGGCATGCAATTGGG
TCAGACAGGCACCCGAAAGGACTCGAATGGGTGTCGGGCATTTCTCGATCG
GGTCAACACCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATAGCCGGG
ATAACAGCAAGAACAACCTCTGTACTTGCAAATGAACCTCCGCGGCTGAGGACA
CCGCCGTGACTACTGTGCGCGGTGTGACAAAGACCTATATTGACGTCTGGGACA
GGGTACCTCTGTGACCGTGTATCCGGTGGTGGAGGATCCGGAGGCGGAGGAAG
CGGAGGAGGGGGTTTACAGACATCGAATCACCAGCCCCGTGAGTGTCCGTGGC
CCCTGGACAGACTGCGCGCATCTCTGTCTCCGGCGACAACTGGGGAAGAAATA
CGTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTCAAGCCCTGTGTGGTCTATCTACGGC
GACGACGAAAGGCGGTACGGCATCCAGAGCGCTTCTCCGGTCCAACCTCCGGG
AATACTGCCACCTTACCATTTCGGGAACCCAGGCCGAGGATGAAGCGGATTACT
ATTGCGCGAGCTACGATAGCAGCCACATCTGATCGTGTGGAGGCGGTACTAA
GCTGACCGTGTGGGAAGCGGTGATCAAAACCAATTGCAAGGGATGCCTGAG
CTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTCTTCCTC
CGCGGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGCAATGTCTCCACTCTGCCCTCCGGG
TATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGATCGAG
AACTGCGATAGCTGCTTACGAAGGACTTCTGCACTAAGTGCAAAAGTCCGGCTTC
ACCTTACCGGGGACAGATGTTTTCGCAATGCCCGGATGGCTTCGCCCGCTGGA
GGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGACGACGATGACAAGG
GCTCCACCATCACCACCATCATCACCCTAG

抗GFP、RSP02野生型ポリペプチド (配列番号6)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKLEWVSGISSIGS
NTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWYKTYIDVWGQGT
LVTYSSGGGSGGGSGGGSDIELTQPPSVVAPGQTARISCSGDNLGKYYVYDY
QQKPGQAPVLYVYDGERPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASYDSS
HILIVFGGGTKLTVLGSNGSNPICKGLCSKDNNGSRCQKLFLLRREGMRQYGECL
LHSCPSGYGHRAAPDMNRCARCIENDCSRKDFCTCKVGFYLHRCRCFDECPD
GFAPLEETMECEVGDDYKDDDDKGSHHHHHHHHH

図 1 1 A

【図 1 1 B】

抗GFP、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号7)

CAGGTCCAGTTGGTGAATCCGAGGGGGTTTGGTCCAGCCTGGTGAAGCCTG
CGCTCTCATGCGCCGCTAGCGGATTACCTTCTCCGATACGGCATGCAATTGGG
TCAGACAGGCACCCGAAAGGACTCGAATGGGTGTCGGGCATTTCTCGATCG
GGTCAACACCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATAGCCGGG
ATAACAGCAAGAACAACCTCTGTACTTGCAAATGAACCTCCGCGGCTGAGGACA
CCGCCGTGACTACTGTGCGCGGTGTGACAAAGACCTATATTGACGTCTGGGACA
GGGTACCTCTGTGACCGTGTATCCGGTGGTGGAGGATCCGGAGGCGGAGGAAG
CGGAGGAGGGGGTTTACAGACATCGAATCACCAGCCCCGTGAGTGTCCGTGGC
CCCTGGACAGACTGCGCGCATCTCTGTCTCCGGCGACAACCTGGGGAAGAAATA
CGTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTCAAGCCCTGTGCTGTTTCTATCTACGGC
GACGACGAAAGGCCGTACGGCATCCAGAGCGCTTCTCCGGTCCAACCTCCGGG
AATACTGCCACCTTACCATTTCGGGAACCCAGGCCGAGGATGAAGCGGATTACT
ATTGCGCGAGCTACGATAGCAGCCACATCTGATCGTGTGGAGGCGGTACTAA
GCTGACCGTGTGGGAAGCGGTGGATCAAAACCAATTGCAAGGGATGCCTGAG
CTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTCTTCTC
CGCGGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGCGAATGTCTCCACTCTGCCCTCCGGG
TATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAG
AACTGCGATAGTGTCCGACGCAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAAAGTCCGGCTTC
TACCTTACCGGGGACAGATGTTTTCGCAATGCCCGGATGGCTTCGCCCGCTGG
AGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGACGACGATGACAAG
GGTCCACCATCACCACCATCATCACCCTAG

抗GFP、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号8)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKLEWVSGISSIGS
NTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWYKTYIDVWGQGT
LVTYSSGGGSGGGSGGGSDIELTQPPSVVAPGQTARISCSGDNLGKYYVYDY
QQKPGQAPVLYVYDGERPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASYDSS
HILIVFGGGTKLTVLGSNGSNPICKGLCSKDNNGSRCQKLFLLRREGMRQYGECL
LHSCPSGYGHRAAPDMNRCARCIENDCSRKDFCTCKVGFYLHRCRCFDECPD
GFAPLEETMECEVGDDYKDDDDKGSHHHHHHHHH

図 1 1 B

【図 1 1 C】

抗GFP、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号9)

CAGGTCCAGTTGGTGAATCCGAGGGGGTTTGGTCCAGCCTGGTGAAGCCTG
CGCTCTCATGCGCCGCTAGCGGATTACCTTCTCCGATACGGCATGCAATTGGG
TCAGACAGGCACCCGAAAGGACTCGAATGGGTGTCGGGCATTTCTCGATCG
GGTCAACACCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATAGCCGGG
ATAACAGCAAGAACAACCTCTGTACTTGCAAATGAACCTCCGCGGCTGAGGACA
CCGCCGTGACTACTGTGCGCGGTGTGACAAAGACCTATATTGACGTCTGGGACA
GGGTACCTCTGTGACCGTGTATCCGGTGGTGGAGGATCCGGAGGCGGAGGAAG
CGGAGGAGGGGGTTTACAGACATCGAATCACCAGCCCCGTGAGTGTCCGTGGC
CCCTGGACAGACTGCGCGCATCTCTGTCTCCGGCGACAACCTGGGGAAGAAATA
CGTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTCAAGCCCTGTGTGGTCTATCTACGGC
GACGACGAAAGGCCGTACGGCATCCAGAGCGCTTCTCCGGTCCAACCTCCGGG
AATACTGCCACCTTACCATTTCGGGAACCCAGGCCGAGGATGAAGCGGATTACT
ATTGCGCGAGCTACGATAGCAGCCACATCTGATCGTGTGGAGGCGGTACTAA
GCTGACCGTGTGGGAAGCGGTGGATCAAAACCAATTGCAAGGGATGCCTGAG
CTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTCTTCTC
CGGGCGGAAGGAATGCGGCATACGGCGAATGTCTCCACTCTGCCCTCCGGG
TATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGATCGAG
AACTGCGATAGTGTCCGACGCAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAAAGTCCGGCTTC
TACCTTACCGGGGACAGATGTTTTCGCAATGCCCGGATGGCTTCGCCCGCTGG
AGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGACGACGATGACAAG
GGTCCACCATCACCACCATCATCACCCTAG

抗GFP、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) ポリペプチド (配列番号10)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKLEWVSGISSIGS
NTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWYKTYIDVWGQGT
LVTYSSGGGSGGGSGGGSDIELTQPPSVVAPGQTARISCSGDNLGKYYVYDY
QQKPGQAPVLYVYDGERPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCASYDSS
HILIVFGGGTKLTVLGSNGSNPICKGLCSKDNNGSRCQKLFLLRREGMAAYGE
CLHSCPSGYGHRAAPDMNRCARCIENDCSRKDFCTCKVGFYLHRCRCFDECPD
DGFAPLEETMECEVGDDYKDDDDKGSHHHHHHHHH

図 1 1 C

【図 1 1 D】

抗ASGR1、RSP02野生型ポリヌクレオチド(配列番号11)

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGCGGACTGGTGCAACCCGGGGGATCCCTC
AGACTGTCCTGTGCCGATCGGGTTTCACTTCTCCTCCTACGCGATGTCATGGGT
CAGACAGGCCCTGGAAAAGGCTCGAATGGGTGTCGGCTATCTCCGGATCGGG
GGGATCTACTTACTACGCCGACTCCGTAAGGGGCGGTTCATCTCAGAGGAC
AATCCAAAGAATACCTGTACTTGCAATGAACTCCCTGCGCGCGAGGATACC
GCGGTGTATTACTGCGCAAGGACTTACGCTACGCCGGTGGTACCTTGTAGTACT
GGGGACAGGGAACCTTGTACCGTGTCCAGCGGTGGCGCGGAAGCGCGGGG
GCGGATCCGGTGGCGGGGGCTCAGAGCTCACCCAGGACCCCGCTGTGTCCGTGG
CCTTGGGACAGACCGTGCGCATCACATGCCAGGGCGATAGCCTGCGGAGCTATT
ACGCCTCGTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCGCGGTCTGTGTCATCTACG
GAAAGAACACCGCCCGTCCGGAATTCAGACAGGTTACGCGGATCCAGCTCGG
GGAACACCGCCTCACTGACTATCACCGGAGCACAGGCCGAAGATGAAGCCGACT
ACTACTGCAACTCCCTGGAAGCGGATGGATACCTGAGCTACGTGTTTGGTGGCGG
CAGCAAGCTACCGTGTGGGAAGCGGTGGATCAAACCAATTGCAAGGGATG
CCTGAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTTC
TTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAATGCTCCACTCTGCCCCCT
CGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGA
TCGAGAAGTGCATAGCTGCTTACGCAAGGACTTCTGCACTAAGTGCAAGTCG
GCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTGTACGAATGCCGGATGGCTTCGCCCC
GCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGACGACGATG
ACAAGGGCTCCCAACATCACCACTATCATCACTAG

抗ASGR1、RSP02野生型ポリペプチド(配列番号12)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGG
STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELTDQPAVSVVALGQTVRITCQDGLSRYSYASW
YQKPKQAPVLVIYGNKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSLER
IGYLSYVFGGKTLTVLGSAGSNPICKGLCLSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMRQY
GECILHSCPSGYGHRAPDMNRCARCIENCDSCFSKDFCTCKVGFYLHRGRCFDE
CPDGFAPLEETMECEVGGDYKDDDDKSGSHHHHHHHH

図 1 1 D

【図 1 1 E】

抗ASGR1、RSP02(F105R/F109A)ポリヌクレオチド(配列番号13)

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGCGGACTGGTGCAACCCGGGGGATCCCTC
AGACTGTCCTGTGCCGATCGGGTTTCACTTCTCCTCCTACGCGATGTCATGGGT
CAGACAGGCCCTGGAAAAGGCTCGAATGGGTGTCGGCTATCTCCGGATCGGG
GGGATCTACTTACTACGCCGACTCCGTAAGGGGCGGTTCATCTCAGAGGAC
AATCCAAAGAATACCTGTACTTGCAATGAACTCCCTGCGCGCGAGGATACC
GCGGTGTATTACTGCGCAAGGACTTACGCTACGCCGGTGGTACCTTGTAGTACT
GGGGACAGGGAACCTTGTACCGTGTCCAGCGGTGGCGCGGAAGCGCGGGG
GCGGATCCGGTGGCGGGGGCTCAGAGCTCACCCAGGACCCCGCTGTGTCCGTGG
CCTTGGGACAGACCGTGCGCATCACATGCCAGGGCGATAGCCTGCGGAGCTATT
ACGCCTCGTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCGCGGTCTGTGTCATCTACG
GAAAGAACACCGCCCGTCCGGAATTCAGACAGGTTACGCGGATCCAGCTCGG
GGAACACCGCCTCACTGACTATCACCGGAGCACAGGCCGAAGATGAAGCCGACT
ACTACTGCAACTCCCTGGAGCGGATGGATACCTGAGCTACGTGTTTGGTGGCGG
CAGCAAGCTACCGTGTGGGAAGCGGTGGATCAAACCAATTGCAAGGGATG
CCTGAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACCGTGTCCAGCAAAAGCTGTTTTTC
TTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAATGCTCCACTCTGCCCCCT
CGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGA
TCGAGAAGTGCATAGCTGCGCGCAGCAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAGTCG
GCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTGTACGAATGCCGGATGGCTTCGCCCC
GCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGACGACGATG
ACAAGGGCTCCCAACATCACCACTATCATCACTAG

抗ASGR1、RSP02(F105R/F109A)ポリペプチド(配列番号14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGG
STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELTDQPAVSVVALGQTVRITCQDGLSRYSYASW
YQKPKQAPVLVIYGNKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSLER
IGYLSYVFGGKTLTVLGSAGSNPICKGLCLSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMRQY
GECILHSCPSGYGHRAPDMNRCARCIENCDSCRSKDACTCKVGFYLHRGRCFDE
CPDGFAPLEETMECEVGGDYKDDDDKSGSHHHHHHHH

図 1 1 E

【図 1 1 F】

抗ASGR1、RSP02(R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A)ポリヌクレオチド(配列番号15)

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGCGGACTGGTGCAACCCGGGGGATCCCTC
AGACTGTCCTGTGCCGATCGGGTTTCACTTCTCCTCCTACGCGATGTCATGGGT
CAGACAGGCCCTGGAAAAGGCTCGAATGGGTGTCGGCTATCTCCGGATCGGG
GGGATCTACTTACTACGCCGACTCCGTAAGGGGCGGTTCATCTCAGAGGAC
AATCCAAAGAATACCTGTACTTGCAATGAACTCCCTGCGCGCGAGGATACC
GCGGTGTATTACTGCGCAAGGACTTACGCTACGCCGGTGGTACCTTGTAGTACT
GGGGACAGGGAACCTTGTACCGTGTCCAGCGGTGGCGCGGAAGCGCGGGG
GCGGATCCGGTGGCGGGGGCTCAGAGCTCACCCAGGACCCCGCTGTGTCCGTGG
CCTTGGGACAGACCGTGCATCACATGCCAGGGCGATAGCCTGCGGAGCTATT
ACGCCTCGTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCGCGGTCTGTGTCATCTACG
GAAAGAACACCGCCCGTCCGGAATTCAGACAGGTTACGCGGATCCAGCTCGG
GGAACACCGCCTCACTGACTATCACCGGAGCACAGGCCGAAGATGAAGCCGACT
ACTACTGCAACTCCCTGGAGCGGATGGATACCTGAGCTACGTGTTTGGTGGCGG
CAGCAAGCTACCGTGTGGGAAGCGGTGGATCAAACCAATTGCAAGGGATG
CCTGAGCTGTAGCAAGGACAACGATGTTTACCGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTTC
TTCTCCGGCGGGAAGGAATGGCGCATACCGCGAATGCTCCACTCTGCCCCCT
CGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGA
TCGAGAAGTGCATAGCTGCCGAGCAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAGTCG
GCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTGTACGAATGCCGGATGGCTTCGCCCC
GCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGACGACGATG
ACAAGGGCTCCCAACATCACCACTATCATCACTAG

抗ASGR1、RSP02(R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A)ポリペプチド(配列番号16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGG
STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELTDQPAVSVVALGQTVRITCQDGLSRYSYASW
YQKPKQAPVLVIYGNKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSLER
IGYLSYVFGGKTLTVLGSAGSNPICKGLCLSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMAAY
GECILHSCPSGYGHRAPDMNRCARCIENCDSCRSKDACTCKVGFYLHRGRCFDE
CPDGFAPLEETMECEVGGDYKDDDDKSGSHHHHHHHH

図 1 1 F

【図 1 1 G】

抗TFR1、RSP02野生型ポリヌクレオチド(配列番号17)

CAAGTGCAACTCCAACAAGCGGTCCCGAGTTGGTCCGACCCGGCGTCAGTGTG
AAAATCTCATGCAAGGGGTCCGGGTATACCTTCACTGACTATGCAATGCATGGG
TAAAGCAGAGCCACGCCAAGTCTTGGAGTGAGTCGGAGGACATTAGTACCTACT
TCGGACGCACCAACTACAATCAAAATTAAGGGTCCGCGCAACCATGACTGTAG
ATAAATCATCAAGTACCGCGTACATGGAATGGCTAGACTGACTTCTGAAGATT
CGCGCTGTATTACTGTGCTCGCGGTGTGTGTCGCAACTATGTTATGGAATTACTGG
GGCAAGGGACAGCGTCAAGGTGTCTTGGCGGAGCGGGTCCGGGGGGGGTG
GTTCTGGCGGAGGCGGATCCGATATAGTTCTGTTTCAATCCCTGCGAGCTGGC
GGTAAGTTTGGGACAGAGAGCCAGATTCTCTCGCGAGCGAGTGAAAGCGTAGA
CGACTACGGCAATTCTTTCATGCACTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAACCCGC
GAAGCTGCTTATCTATCGCGGTCCAAATTGAGTACAGGATCCCTGCAAGATT
TCAGTTCTGGAAGTAGGACAGACTTTACACTACGATAAACCCCGTGAAGCG
GATGACGTGCGAACCTACTATTGTCAACAAGCAATGAAGCACCACCTACTCTCG
GAGGTGGCACTAAATTGGAAATTAGGGGAAGCGGTGGATCAACCCCAATTGCA
AGGGATGCTGAGCTGTAGCAAGGACAACGGAATGTTACGGTGCAGCAAAAGC
TGTTTTTCTTCCCGCGGGAAGGAATGCGCGAGTACGCGGAATGTCTCACTC
CTGCCCCCTGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAG
ATGCGGATCGAGAAGTGCATAGCTGCTTACGCAAGGACTTCTGCACTAAGTG
CAAAGTCCGCTTCTACTTACCGGGGAGATGTTTGTACGAATGCCGGATGGC
TTCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGAC
GACGATGACAAGGGCTCCCAACATCACCACTATCATCACTAG

抗TFR1、RSP02野生型ポリペプチド(配列番号18)

QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKSGSYTFTDYAMHWVKQSHAKSLWIGGISTYFG
RTNYNQKFKGRATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSALYYCARGLSGNVMDYWG
QGTSTVTSSGGGGSGGGSGGGSDIVLQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDYQ
NSFMHWYQKPGQPPKLLIYRASNLGSPARFSGSGSRITDLTINPVEADVDVATY
CQQSNEAPPFTGGGKLEIRSGSGSNPICKGLCLSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMR
QYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCIENCDSCFSKDFCTCKVGFYLHRGRCF
DECPDGFAPLEETMECEVGGDYKDDDDKSGSHHHHHHHH

図 1 1 G

【図 1 1 H】

抗TFR1、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号19)

CAAGTGAACCTCCAACAAAGCGGTCCCGAGTTGGTCCGACCCGGCGTCAGTGTG
AAAATCTCATGCAAGGGGTCCGGGTATACCTTCACTGACTATGCAATGCACTGGG
TAAAGCAGAGCCACGCCAAGTCTTGGAGTGGATCGGAGGCATTAGTACCTACT
TCGGACGCACCAACTACAATCAAAAATTTAAGGGTCCGCGCAACCATGACTGTAG
ATAAATCATCAAGTACCGGTACATGGAAATGGCTAGACTGACTTCTGAAGATTCT
CGCGCTGTATTACTGTGCTCGCGGTTTGTCTGGCAACTATGTTATGGATTACTGGG
GGCAAGGGACCAGCGTACCGGTGTCCTCTGGCGGAGCGGGTCCGGGGGGGGTG
GTTCTGGCGGAGGCGGATCCGATATAGTCTGTTTCAATCCCTCGCGAGCCTGGC
GGTAAGTTTGGGACAGAGGCCACGATTTCTGCGGAGCGAGTGAAAGCGTAGA
CGACTACGGCAATTTCTTTCATGCACTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAACCGCC
GAAGCTGCTTATCTATCGCGCTCCAATTTGGAGTCAAGGATCCCTGCACGATTT
TCAGGTTCTGGAAGTAGGACAGACTTTACACTTACGATAAACCCCGTGAAGCG
GATGACGTCGCAACCTACTATTGTCAACAAAGCAATGAAGCACCACCTACCTTCG
GAGGTGGCACTAAATTGGAATAGGGGAAGCGGTGGATCAAAACCAATTTGCA
AGGGATGCCTGAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGGCAGCAAAAGC
TGTTTTTCTTCTCCGGCGGAAGGAATGCGCGAGTACGGCGAATGTCTCCACTC
CTGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAG
ATGCCGATCGAGAACTGCGATAGTGGCGAGCAAGGACGCGTGCATAAGTG
CAAAGTCGGCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTACGAATGCGCGGATGGC
TTCGCCCGCTGGAGGAGTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGAC
GACGATGACAAGGGCTCCACCATCACCACATCATCACCCTAG

抗TFR1、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号20)

QVQLQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGGISTYFG
RTINYNQKFKGRATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSALYYCARGLSGNYVMDYWG
QGTSTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVLFQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDY
NSFMHWYQKPGQPPKLLIYRASNLSEGPAPRFSGSGSRDFTLTINPVEADVDATYY
CQGSNEAPPTFGGGTKLEIRGSGGSNPICKGLSCSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMR
QYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCRINDSCRSKDACTCKVKVGYFLHRGRCF
DECPDGFAPLEETMECEVGGDYKDDDDKSGSHHHHHHHH

図 1 1 H

【図 1 1 J】

Fc-RSP02 ポリヌクレオチド (配列番号23)

GACAAAACCTCACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCG
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCC
TCAGGTGCACATGCTGGTGGTGGAGCGTGAAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGCGG
AGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACC
AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG
GAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCTCGTGTGGACTCCG
ACGGCTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGCTTCTCTATGCTCGGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAGGTGGTGGTGGCTCGGGAGGAGG
AGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGTcaAATCCCATTTGCAAGGGTGTGTTGTCTTGTT
AAAGGACAATGGGTGTAGCCGATGTCAACAGAAGTGTCTTCTTCTTCTTCAAGA
GAAGGGATGCGCCAGTATGGAGAGTGCCTGCAATCTGCCCCATCCGGGTACTAT
GGACACCGAGCCCCAGATATGAACAGATGTGAAGATGCAGAATAGAAAACCTGT
GATTTCTGCTTACGAAAGACTTTTGTACCAAGTGCAGAAAGTAGGCTTTTATTGCA
TAGAGGCCGTGCTTTGATGAATGTCCAGATGGTTTTCACCAATAGAGAAGAAC
ATGGAATGTGTGAATGA

Fc-RSP02 ポリペプチド (配列番号24)

DKHTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSKSVMIHEALHNHYTQKSLSLSP
KGKGGGSGGGGSGGGSSNPICKGLSCSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMRQYGECL
HSCPSGYGHRAPDMNRCARCRINDSCFSKDFCTCKVGYFLHRGRCFDECPD
GFAPLEETMECEV

図 1 1 J

【図 1 1 I】

抗TFR1、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号21)

CAAGTGAACCTCCAACAAAGCGGTCCCGAGTTGGTCCGACCCGGCGTCAGTGTG
AAAATCTCATGCAAGGGGTCCGGGTATACCTTCACTGACTATGCAATGCACTGGG
TAAAGCAGAGCCACGCCAAGTCTTGGAGTGGATCGGAGGCATTAGTACCTACT
TCGGACGCACCAACTACAATCAAAAATTTAAGGGTCCGCGCAACCATGACTGTAG
ATAAATCATCAAGTACCGGTACATGGAAATGGCTAGACTGACTTCTGAAGATTCT
CGCGCTGTATTACTGTGCTCGCGGTTTGTCTGGCAACTATGTTATGGATTACTGGG
GGCAAGGGACCAGCGTACCGGTGTCCTCTGGCGGAGGCGGGTCCGGGGGGGGTG
GTTCTGGCGGAGGCGGATCCGATATAGTCTGTTTCAATCCCTCGCGAGCCTGGC
GGTAAGTTTGGGACAGAGAGCCACGATTTCTCGCGAGCGAGTGAAAGCGTAGA
CGACTACGGCAATTTCTTTCATGCACTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAACCGCC
GAAGCTGCTTATCTATCGCGCTCCAATTTGGAGTCAAGGATCCCTGCACGATTT
TCAGGTTCTGGAAGTAGGACAGACTTTACACTTACGATAAACCCCGTGAAGCG
GATGACGTCGCAACCTACTATTGTCAACAAAGCAATGAAGCACCACCTACCTTCG
GAGGTGGCACTAAATTGGAATAGGGGAAGCGGTGGATCAAAACCAATTTGCA
AGGGATGCCTGAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGGCAGCAAAAGC
TGTTTTTCTTCTCCGGCGGAAGGAATGCGCCGATACGGCGAATGTCTCCACTC
CTGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAG
ATGCCGATCGAGAAGTGCATAGTGCCTGCGCAGCAAGGACGCTGCATAAGTG
CAAAGTCGGCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTACGAATGCGCGGATGGC
TTCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGCGGAGACTACAAGGAC
GACGATGACAAGGGCTCCACCATCACCACATCATCACCCTAG

抗TFR1、RSP02 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) ポリペプチド (配列番号22)

QVQLQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGGISTYFG
RTINYNQKFKGRATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSALYYCARGLSGNYVMDYWG
QGTSTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVLFQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDY
NSFMHWYQKPGQPPKLLIYRASNLSEGPAPRFSGSGSRDFTLTINPVEADVDATYY
CQGSNEAPPTFGGGTKLEIRGSGGSNPICKGLSCSKDNGCSRQKQLFFFLRAEGM
AAYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCRINDSCRSKDACTCKVKVGYFLHRGR
CFDECPDGFAPLEETMECEVGGDYKDDDDKSGSHHHHHHHH

図 1 1 I

【図 1 1 K】

抗GFP軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号25)

GACATCGAACTCACCAGCCCCCTGAGTGTCCGTGGCCCTGGACAGACTGCGC
GCATCTCTGCTCCGGCGACAACCTGGGGAAGAAATACGTGTACTGGTACCAGC
AGAAGCCAGGTCAAGCCCTGTGTTGGTCTATCTACGGCGACGACGAAAGGCCGT
CAGGCATCCCAGAGCGCTTCTCCGGCTCCAATCCCGGGAATACTGCCACCCTTAC
CATTTCCGGAACCCAGGCCGAGGATGAAGCGGATTACTATTGCGGAGCTACGA
TAGCAGCCACATCTGATCGTGTGTTGGAGGCGGTACCAAGCTTACCCTCTAGGT
CAGCCCAAGGCTGCCCTCCTGCTACTCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTC
AAGCCAAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGAGCCG
TGACAGTGGCTGGAAAGGCAGATAGCAGCCCGCTCAAGGCGGGAGTGGAGACC
ACCACACCTCCAAACAAGCAACAAGATACGGCGCCAGCAGCTATCTGAGC
CTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCGAT
GAAGGAGACACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTCTA

抗GFP軽鎖ポリペプチド (配列番号26)

DIETLQPPSVVAPGQTARISCSGDNLGKYYVYVYQKPGQAPVLYTGDDERPSGI
PERFSGSNSGNTATLISGTQAEADYDYCASYDSSHILVFGGQTKLTVLGQPKAAP
SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWADSSPVKAGVETITPSKQSN
KYAAASSYLSTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

図 1 1 K

【図 1 1 P】

ヒトASGR1細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号35)

CAGAACAGCCAGCTCCAGGAAGAACTGAGGGGCTCCGCGAAACCTTCTCCAACTTCACGGCTTCGACCGAAGCTCAAGTCAAGGGGTGTCCACACAAGCGGCAACGTCGGACGCAAGATGAAGTCGCTGGAGTCCAGCTGGAAAAGCAGCAGAAGGATCTCTCCGAGGATACAGCTCACTGCTGTTCACGTGAAGCAGTTCGTGTCGGACCTGAGGTCCCTGAGCTGTACAGATGGCGGCACTGCAGGGAAACGGTTCCGAAAGA ACTTGCTGCCCTGTGAATTTGGGTGGAGCAGAGAGAAGCTGCTACTGGTCTCGCGGTCCGGCAAAGCCTGGGCGGACGCCACAATAATTGTCGGCTGGAGGATGCGCACCTGGTGGTCTGACCTCTGGGAGGAACAGAAGTTTGTGCAGCACCATATCGGTCCCGTGAACACTTGGATGGGGTGCACGACAAAACGGACCGTGGAAATGGGTGGATGGGACTGATTACGAAACCGGATTCAAGAACTGGCGCCAGAGCAGCCGACGATTGGTACGGACATGGACTGGGGGCGGAGGAGTGCGCCACTTACCGACGACGGCCGTGGAAACGACGACGTGTGCCAGCGGCCGTACCGCTGGGTCTGCGAAACCGAGCTGGACAAGGCCAGCCAGGAGCCACCTCTCCTTTGA

ヒトASGR1細胞外ドメインポリペプチド(配列番号36)

QNSQLQEELRGLRETFNSFTASTEAVKVLSTQGGNVGRKMSLESQLEKQKQKDLSEHSSLLLVHKQFVSDLRSLSCQMAALQNGNSERTCCPVNWVEHERSCYWFSSRGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEKFVQHIGPVNTWMGLHDQNGPWKVVVDGTDYETGFKNWRPEQDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

図 1 1 P

【図 1 1 Q】

ヒトASGR2細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号37)

AGGGGCGCACAGCTGCAAGCCGAGCTGCGGTCCCTGAAGGAAGCTTTCTCAAAC TTCTCGAGCTCGACCTCACCAGAGTGCAGGCCATTAGCACCCACGGGGGTTCG TGGGGGACAAGATCACCTCGCTGGGAGCGAAGCTGGAGAAGCAGCAGCAAGAC CTCAAGGCCGACACGACGCGCTGCTGTCCACTTGAAGCACTTCCAGTGGACT TGCGGTTCGTGGCTGCCAGATGGAGCTGCTGCACTCCAATGGGAGCCAGAGAA CTGTGTGCCCTGTGAACCTGGGTGGAACACCAGGGATCTGCTACTGGTTTAGCCA CTCCGGAAGGCCCTGGGCGGAAGCCGAGAAGTACTGCCAGCTTGAGAACGCGCA CCTGGTCTGTATCAACTCCTGGGAAGAACAGAAGTTTATTGTGCAACACACTAA CCCGTCAACACCTGGATCGGCTGACCGACTCCGACGGCTCATGGAATGGGT GGACGGAACCGATTACCGGCATAACTATAAGAACTGGGCGGTGACTCAGCCGGA TAATTGGCACGGACACGAGCTGGGTGGATCCGAGGACTGCGTCGAAGTGCAGCC CGACGGCAGATGGAACGATGACTTCTGTCTGCAAGTGTACCGCTGGGTCTGCGA GAAGCGCCGCAACGCCACTGGCGAAGTGGCTTGA

ヒトASGR2細胞外ドメインポリペプチド(配列番号38)

RGAQLQAEELRSLKEAFNSFSSSTLVEVQAISTHGGSVGDKITSLGAKLEKQQQDLKA DHDALLHLKHFVVDLRFVACQMELLSHNSGQRTCCPVNWVEHQGSCYWFSSRGKAWAEAEKYQLENAHLVVINSWEEKFVQHTNPFTWIGLTDSDGSKWVVDGTDYRHNYKNWAVTQPDNWHGHELGGSEDCVEVQPDGRWNDDFCLQVYRWVCEKRR NATGEVA

図 1 1 Q

【図 1 1 R】

カニクイザルASGR1細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号39)

CAAAAACGCCAGCTGCAGCGGGAGCTGCGGGGCTGAGAGAGACGCTCAGCAA CTTCACAGCGAGCACCGAGGCCAGGTCAAGGGCTTGAGCACCCAGGGAGGCAA TGTGGGAAGAAAGATGAAGTCGCTGGAGTCCAGCTGGAGAAACAGCAGAAAGG ACTTGAGTGAAGATCACTCCAGCCTGCTGCTCCAGCTGAAGCAGTTCGTGCTGA CCTCGGAGCCTGAGCTGTACAGATGGCGGCGCTCCAGGGCAATGGCTCGGAAAG GGCCTGTGCCAGTCAACTGGGTGGAGCAGAGCGCAGCTGCTACTGGTCTCTCT CGCTCCGGGAAGGCCCTGGGCCGACCCGACAATACTGCGGCTGGAGGACGCG CACCTGGTGGTGTACGCTCCTGGGAGGAGCAGAAATTTGTCCAGCACACATA GGTCTGTGAACACCTGGATGGGCTTCCAGCACCAAAACGGGCCCTGGAAAGTGG GTGGACGGGACGGACTACGAGACGGGCTTCAAGAACTGGAGACCGGAGCAGCC GGACGACTGTTACGGCCACGGGCTCGGGGGAGGGGAGGACTGTGCCACTTAC CACGACGACGGCCGTGGAACGACGACGTGTGCCAGAGGCCCTACCGCTGGGTCTG CGAGACAGAGCTGGACAAGGCCAGTCAAGGACCCACTCTCCTT

カニクイザルASGR1細胞外ドメインポリペプチド(配列番号40)

QNAQLQRELRLRETLNSFTASTEAVKVLSTQGGNVGRKMSLESQLEKQKQKDLSEHSSLLLVHKQFVSDLRSLSCQMAALQNGNSERACCPVNWVEHERSCYWFSSRGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEKFVQHIGPVNTWMGLHDQNGPWKVVVDGTDYETGFKNWRPEQDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

図 1 1 R

【図 1 1 S】

カニクイザルASGR2細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号41)

CAAAGTGCACAGCTGCAAGCAGAGATGCGGAGCCTGAAGGAAGCTTTAGCAAC TTCTCCTCGAGCAGCTGgTGGAGGTCCATGCTCTCGGCACCCACGGAGGCGAGCG TGGGTGACAAGATCACATCCCTAGGAGACAAGTTGGAGAAACAGCAGCAcGACC TGAAAGCAGATCATGACATCCTGCTCTCCATCTGAAGCACTTCCCGTGGACCT GCGCTTCGTGGCTGCCAGATGGAGCTCTCCACAGCAACGGCTCCCAAAGGAC CTGCTGCCCTGTCAACTGGGTGGAGCACCAAGGCAGCTGCTACTGGTCTCTCGC TCCGGGAAGCCCTGGGCCGAGCGGAGAAAGTACTGCCAGCTGGAGAACTCACAC CTGGTGGTCATCAACTCCTGGGAGGAGCAGAAATTCATTGTACAACACACGAAC CCCITCAATACCTGGATAGGTCTCACGGACAGTGATGGCTCTGGAATGGGTGG ACGGCACAGACTATAGGCACAACATAAGAACTGGGCTGTCACTACGCCAGATG ATTGCCACGGGCATGAGCTGGGCGGAAGTGAAGACTGTGTTGAAGTCCGGCCGG ATGGCCGTGGAACGATGATTCTGCTGCAAGGTGACCCGTGGGTGTGTGAGA AGAGCGGAATGCCACCGCGAGGCAGCCTGA

カニクイザルASGR2細胞外ドメインポリペプチド(配列番号42)

QSAQLQAEMLRSLKEAFNSFSSSTLVEVHALGTHGGSVGDKITSLGDKLEKQQHDLKADHDILLHLKHFVVDLRFVACQMELLSHNSGQRTCCPVNWVEHQGSCYWFSSRGKAWAEAEKYQLENSHLVVINSWEEKFVQHTNPFTWIGLTDSDGSKWVVDGTDYRHNYKNWAVTQPDNWHGHELGGSEDCVEVRPDGRWNDDFCLQVHRWVCEKRR NATGEAA

図 1 1 S

【図 1 1 T】

ヒトRNF43細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号43)

CAGAAAGCTATTATCAGAGTGATCCCTTGAATAATGGACCCACAGGAAAAGT
AATCTCACTTGGGAAGGTGTGTTTGTGGTGTGCTGAAATAACTCCAGCAGAA
GAAAATTAATGCAGTCCACCCGCTGTACCTGTGCAATGCCAGTGATGACGACA
ATCTGGAGCCTGGATTATCAGCATCGTCAAGCTGGAGAGTCTCGACGGGCCCC
CCGCCCTGCTGTCTACTGGTAGCAAGGCTCGGATGGCGGGTGAGCGAGGAGC
CAGTGTGTCTCTTTGACATCACTGAGGATCGAGCTGCTGCTGAGCAGCTGCAG
CAGCGCTGGGGCTGACCTGGCCAGTGGTGTGATCTGGGGTAATGACGCTGAG
AAGCTGATGGAGTTGTGTACAAGAACAAAAGGCCATGTGAGGATTGAGCTG
AAGGAGCCCCGGCTGGCCAGATTATGATTGA

ヒトRNF43細胞外ドメインポリペプチド(配列番号44)

QKAHVRVPLKMDPTGKLNLTLEGVFAVAEITPAEGKLMQSHPLYLCNASDDDDNLEP
GFISIVKLESPRRAPRCLSLASKARMAGERGASAVLFDITEDRAAAEQQLQPLGLTW
PVVLIWGNDAEKLEFVYKNQKAHVRIELKEPPAWPDYD

図 1 1 T

【図 1 1 U】

ヒトZNR43細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号45)

AAGGAGACGGCGTTCGTGGAGGTGGTGTGTCGAGTCGAGCCCAAGCGGCGAT
TACACCACCTACACCACCGGCCTACGGGCGCTTCTCGCGGGCCGGGCCACG
CTCAGCGCCGAGGGCGAGATCGTGCAGATGCACCCACTGGGCTATGTAATAAC
AATGACGAAGAGGACTTGTATGAATATGGCTGGGTAGGAGTGGTGAAGCTGGAA
CAGCCAGAATTGGACCCGAAACCATGCCTACTTCTAGGCAAGGCCAAGCGA
GCAGTACAGCGGGGAGCTACTGCAGTCATCTTTGATGTGTCTGAAAACCCAGAA
GCTATTGATCAGCTGAACACAGGGCTCTGAAGACCCGCTCAAGAGGCCGTTGGTG
TATGTGAAGGGTGACAGATGCCATTAAGCTGATGAACATCGTCAACAAGCAGAAA
GTGGCTCGAGCAAGGATCCAGCACCGCCCTCTCGACAACCCACTGAATCTTTG
ACATGTGA

ヒトZNR43細胞外ドメインポリペプチド(配列番号46)

KETAFFEVEVLFESSPSGDYTTYTTGLTGRFSRAGATLSAEGEIVQMHPGLCNNNDE
EDLYEYGVWGVVLEQPELDPKCLTVLGAARAVQRGATAVIFDVSNPEAIDQL
NQGSDEPLKRPVVYVKGADAIKLMNIVNKQKVARARIQHRPPRPQTEYFDM

図 1 1 U

【図 1 1 V】

抗β-Gal重鎖ポリヌクレオチド(配列番号155)

CAGAGCGTGTAAACCCAGCCGCCAGCGTGAAGCGGACGCCCCGCCAGAGCATC
ACCATCAGCTGCGCCGCCAGCAGCAGCGTGGGCGGCTACAACCTAGTGAGC
TGGTACCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCAAGCTGATGATCTACGAGGACAGC
AAGAGACCCAGCGCGTGAGCAACAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACAC
CGCCAGCTGACCATCAGCGGCTCGAGGCCAGGACGAGGCCGACTACTACTG
CAGCAGCTACACCAACAGCAAGCAGAGTGTTCGGCGCGGCCACCAAGCTGGC
CGTGTGGGTGAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTGTCTCCCGCCCTCTCT
GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTAC
CGGGAGCCGTGACAGTGGCTGGAAAGCAGATAGCAGCCCCGTCAGGCGGGA
GTGGAGACCAACACCTCTCAACAAAGCAACAACAGTACGCGGCCAGCAGC
TATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG
GTCACGATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

抗β-Gal重鎖ポリペプチド(配列番号156)

QSVLTQASVSGSPGQSTISAGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIEDSKRP
SGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEADYCYSSYTRSTRVFGGGTKLAVLGQPK
AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETITPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYCSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

図 1 1 V

【図 1 1 W】

抗β-Gal重鎖IgG1-LALAPGポリヌクレオチド(配列番号157)

GAGGTGACGCTGGTGGAGAGCGCGGCAGCCTGGTGAAGCCCGCGGCAGCCTG
AGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACTTCAGCAACTACAGCATGAAGTGG
GTGAGACAGGCCCCCGGCAAGGGCTGGAGTGGATCAGCAGCATCAGCGGCAGC
AGCAGATACATCTACTACGCGGACTTCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGA
GACAACGCCACCAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACCGCGCTGTACTACTGCGTGAGAAGCAGCATCACCATTCTTGGCGCGCGCATG
GACGTGTGGGGCAGAGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCA
GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
AGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACATACACATGCCACCGTGCCAGCAC
CTGAAGCGCGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGCATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCTGCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCAACAAGCCCTCGGAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT
GACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGCA
CATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCTCCCGTGTGCTGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGTCCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

抗β-Gal重鎖IgG1-LALAPGポリペプチド(配列番号158)

EVQLVESGGSLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKLEWISSISGSSRYI
YYADFVKGRFTISRDNAATNSLYLQMNSLRAREDYAVYYCVRSSITIFGGGMDVWGRG
TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLTGTQYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEVESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFGLYSLKLVTDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図 1 1 W

【図 1 1 X】

抗β-Gal重鎖IgG2ポリヌクレオチド(配列番号159)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGCGGCAGCCTGGTGAAGCCCGCGGCAGCCTG
AGACTGAGCTGCGCCGCGCAGCGCTTACCTTACAGCACTACAGCATGAAGCTGG
GTGAGACAGGCCCCCGCAAGGGCTGGAGTGGATCAGCAGCATCAGCGGCAGC
AGCAGATACATCTACTACGCCGACTTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGA
GACAACGCCACCAACAGCCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCGTGAAGAAGCAGCATCACCATCTTCGGCGCGGCATG
GACGTGTGGGGCAGAGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGTAGCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCTCGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCCTCCGAGAGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
CTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCC
AGACCTACACCTGCAACGTAGATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
CAGTTGAGCGCAATGTTGTGTGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGC
AGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCGAG
GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCAATGCCAAGACAAAG
CCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTACAGCTCTCACCGTTG
TGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAGTGAAGGTCTCCAAACAAAG
GCCTCCACGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACAAAGGGCAGCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TCAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGACGCCGAGAAACACTACAAGACCACGCTCCCATGCTGGA
CTCCGACGGCTCTCTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGACAGGTGG
CAGCAGGGGAACGCTCTCTATGCTCCGTGATGATAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGACAGAGGCTCTCTCTCTCTCCGGGTAA

抗β-Gal重鎖IgG2ポリペプチド(配列番号160)

EVQLVESGGSLVPGGSLRLSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKLEWISSISGSSRYI
YYADFVKGRFTISRDNATNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSSITIFGGGMDVWGRG
TLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVCEPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTEPVTCTVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

図 1 1 X

【図 1 1 Y】

抗ASGR1 VH-CH1ポリヌクレオチド(配列番号161)

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGCGGACTGGTGCAACCCGGGGGATCCCTC
AGACTGCTCTGTGCCGATCGGGTTCCTCTTCTCTCTACCGCATGTGATGGGT
CAGACAGGCCCTTGAAAAGGCCCTCGAATGGGTGTCCGCTATCTCCGGATCCGG
GGGATCTACTTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCGGGTCTACTATCTCGAGGGAC
AATCCAAAGAATACCTGTACTTGCAATGAACCTCTGCGCGCCGAGGATAACC
CGCGGTATTACTGCGCAAGGACTTACGTACAGCCGCTGGTACCTTGAGTACT
GGGGACAGGGAACCTTGTACCGTGTCCAGCGTAGCACAAGGGCCCATCGG
TCTTCCCTTGGCACCTCTCCAAGAGCACCCTTGGGGGACAGCGGCCCTGGG
CTGCTGTGTAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTAGG
GCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA
GCCAAATCTTGTGGATCCGGCTCCGACATCATCATCACCATCAC

抗ASGR1 VH-CH1-ポリペプチド(配列番号162)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWSVRQAPGKLEWVSAISGGG
STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWG
QGLTVLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKKEPKSCGS
GSGHHHHHH

図 1 1 Y

【図 1 1 Z】

マウスASGR1細胞外ドメインポリヌクレオチド(配列番号163)

CAAAATTCCTCACTCCGGGAAGATCTGCTGGCTCTAAGGCAGAAATTCAGCAAC
CTCACTGTGAGCACTGAGGACAGGTCAAGGCCCTGAGCACCCAGGGAAGTGT
GTGGGAAGAAAGATGAAGTTAGTGGAGTGAAGCTGGAAGAACAGCAGAAAGGA
TCTGACTGAAGATCACTCCAGTTTCTACTGCACGTGAAGCAGTTAGTGTCTGAC
GTGCGAAGCTTGAAGTCCAGATGGCTGCAATTCGGGGCAATGGCTCTGAAAGG
ACCTGCTGCCCATCACTGGGTGGAAGTATGAAGGCAGCTGCTACTGGTCTTCCA
GCTCTGTGAGGCCCTTGGACTGAAGCTGACAAGTACTGCCAGCTGGAAATGCC
ATCTGGTGGTGGTGACCTCCAGGATGAGCAGAACTTCTCCAGCGCCACATGG
GCCCTTAAACACTTGGATTGGCTTAACCTGACCAGAAACGGGCCCTGGAATGGG
TGGATGGAACAGACTACGAGACAGGCTTCCAGAAATGGAGACAGAGCAGCAG
ATAACTGGTACGACATGGGCTTGGAGGAGGCGAGGACTGTGCCCATTCACGA
CGGATGGCCGCTGGAATGACGAGCTGTGACGAGGCCCTACCGCTGGGTCTGTG
AGACAAAGTTGGATAAGGCTAATTCGGCTCCGGAGGTCTTAATGATATTTTGA
GGCTCAGAAAGATTGAGTGGCATGAAGGATCCGGCTCCACCACCACATCACCA
CCACCAC

マウスASGR1細胞外ドメインポリペプチド(配列番号164)

QNSQLREDLLALRQNFSLTVSTEDQVKALSTQGSVGRKMKLVESKLEKQKDLT
EDHSSLLLVHVQLVSDVRLSCQMAAFRNGSERTCCPINWVEYEGSCYWFSSSVRP
WTEADKYQLENALHVVVTSRDEQNFQLRHMGPLNTWIGLTDQNGPWKVVVDGTD
YETGFQNRPEQPDNWWYGHGLGGGEDCAHFTTDRWNDDVCRPRYRWVCETKLD
KANSGLGLNDIFEAQKIEWHEGSGSHHHHHHHH

図 1 1 Z

【図 1 1 A A】

抗β-Gal重鎖IgG2、RSP02(F105R/F109A)ポリヌクレオチド(配列番号186)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGCGGCAGCCTGGTGAAGCCCGCGGCAGCCTG
AGACTGAGCTGCGCCGCGCAGCGGCTTACCTTACAGCACTACAGCATGAAGCTGG
GTGAGACAGGCCCCCGCAAGGGCTGGAGTGGATCAGCAGCATCAGCGGCAGC
AGCAGATACATCTACTACGCCGACTTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGA
GACAACGCCACCAACAGCTGTACTGACATGAACAGCTGAGAGCCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCGTGAAGAAGCAGCATCACCATCTTCGCGCGCGCATG
GACGTGTGGGGCAGAGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCTTGGCGCCCTGCTCCAGGAGACCTCCGAGAGCACAGGGC
CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGAA
CTCAGCGCTCTGACCAAGCGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCC
AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
CAGTTGAGCGCAATGTTGTGTGAGTGCCACCGTGCACAGCACCACCTGTGGC
AGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCGAG
GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTTG
TGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAAG
GCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCACTCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCGGAG
AACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TCAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCAGCATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGACGCGGAGCAACAACTACAAGACCAAGCCTCCATGCTGGA
CTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGACAGAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGAT
CCGGAGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGAGTGCCTAAGCT
GTAGCAAGGACAACGGATGTTACAGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTCTTCTCCCG
GCGGGAAGGAATGCGCGAGTACGGCGAATGTCTCACTCTGCCCTCGGGGTG
TTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGATCGAGAA
CTGCGATAGCTGCGCAGCAAGGACGCTGCACTAAGTGAAGATCGGCTCTTA
CCTTACCGGGGAGATGTTTGACGAATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAG
GAGACTATGGAATGCGTGGAG

抗β-Gal重鎖IgG2、RSP02(F105R/F109A)ポリペプチド(配列番号187)

EVQLVESGGSLVPGGSLRLSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKLEWISSISGSSRYI
YYADFVKGRFTISRDNATNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRSSITIFGGGMDVWGRG
TLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTKVERKCCVCEPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTEPVTCTVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGSGG
SGGGSNPICKGCLSCSKDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHR
APDMNRCARCRIENDCSRKDACTCKVGFYLHRCRCFDECPDGFAPLEETMECV
E

図 1 1 A A

【図 1 1 A B】

抗GFP重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号188)

CAGGTCCAGTTGGTGGAAATCCGGAGGGGGTTTGGTCCAGCCTGGTGGGAAGCCTG
CGCTCTCATGCGCGCTAGCGGATTCACTTCTCCCGATACGGCATGCAATTTGGG
TCAGACAGGACCCGGAAAGGACTCGAATGGGTGTCGGGCATTTCTCTGATCG
GGTCAAAACCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTACCAATTAGCCGGG
ATAACAGCAAGAACACTCTGTACTTGGAAATGAACTCCCTGCGGGTGGAGACA
CCGCCGTGTACTACTGTGCGCGGTGGTACAAGACCTATATTGACGTCTGGGACA
GGGTACCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC
CTGGCACCTCTCCAAGAGCACTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGCGCCCTG
ACCAGCGCGGTGCACACTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCC
TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCAGACCTACATCTG
CAACGTGAATCAACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGACAAAATCACAATGCCACCCTGCCAGCAGCTGAACTCTGGG
GGGACCTGAGTCTTCTCTTCCCGCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC
CGGACCTGAGGTACATGCGTGTGTGGTGGACGTGACCCAGAACCTGAG
GTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCTAATGCCAAGACAAAG
CCCGGGAGGAGACGATACCGGACGACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTC
CTGCACAGGACTGGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCCAGCCCCATCGGAAACCAATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAG
GTCAGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCAGACATCGCGTGGAGT
GGGAGGACCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGG
ATCCGACCGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCA
TACACGCAGAAAGACCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGA
TCCGGAGGCTCCCGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGATGCTTAAGC
TGTAGCAAGGACAAACGGATGTTACAGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTCTCC
GGCGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGCAATGTCTCACTCTGCCCTCGGGGT
ATTACGGACACCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGATCGAGA
ACTGCGATAGCTGCCGACGAAGGACGCTGCACTAAGTGAAGTGGCTTCT
ACCTTACCAGGGGAGATGTTTACGAATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGA
GGAGACTATGGAATGCGTGGAG

抗GFP重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号189)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISGS
NTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDYAVYCARWYKTYIDVWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYGSYTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIETISKAK
KGQPREPVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GSGGGGGSNPICKGCLSCSDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYG
GHRAPDMNRCARCIENCDSRSDACTCKKVGFYLRGRCFDECPDGFAPLEETM
ECVE

図 1 1 A B

【図 1 1 A D】

LP1-IF8重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号192)

GAAGTGAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTG
AAACTCTCTGTGACGCTTGGATTCACTTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGT
TCGCCAGACTCCGGCAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAAGTAGTATTGG
TGTTAAACACTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC
AATGCCAGGAACACCTGTACCTGCAAGTGAAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACAGC
GCCATGTATTACTGTGCAAGACATGTGGATTACTACGATGGGATTTCTTTGACT
ACTGGGGCCAAGGCACACTCTCACAGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCAT
CGGCTTCCCTTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTCTGGAACTC
AGGCGCTCTGACAGCGCGGTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGACGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGA
CCTACACTGCAACGTAGATACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGCAG
TTGAGCGCAAAATGTTGTGTCAGTGCACCGTGCACAGCACCACTGTGGCAGG
ACCGTCACTCTTCTTCTTCCCGCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCG
ACCCCTGAGGTACAGTGGCTGGTGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGT
CAGTTCAACTGGTACAGTGGAGCGGTGGAGGTGCAATGCAAGCAAGCAAGGCA
CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCTCTCCAGTTGTGC
ACGAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAGGCG
TCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAACCAAGGTA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCAGATCGCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCGAGCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCATGCTGGACT
CCGACGGCTCTTCTTCTTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCAACCACTAC
ACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCC
GGAGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGATGCTTAAGCTGT
GCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGC
GGGAAGGAATGCGGCAGTACGGCAATGTCTCCACTCTGCCCTCGGGGTATT
ACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAACT
CGGATAGCTGCGCGCAGCAAGGACGCTGCACTAAGTGAAGTGGCTTCTACT
TTCACCGGGGAGATGTTTACGAATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGA
GACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-IF8重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号193)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYTMSSWVRQTPAKRLEWVATISSIGN
TYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQVSSLRSEDYAVYCARHVDYDYGISFDYWGQ
GTTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVNHPKNTKVDKTVVERKCCVECP
PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDILMISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIETISKTK
QPREPVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML
DSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
GSGGGGGSNPICKGCLSCSDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYG
HRAAPDMNRCARCIENCDSRSDACTCKKVGFYLRGRCFDECPDGFAPLEETME
CVE

図 1 1 A D

【図 1 1 A C】

LP1-IF8重鎖ポリヌクレオチド (配列番号190)

GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCTCCCTGGCTGTGTACAGCAGGAGAGAAAG
TCATATGAGCTGCAAGTCCAGTCCAGTCTGTTCACAGTGAAGACCCGAAAGA
ACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCTAACTGCTGATCTA
CTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCACTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTT
ATTACTGCAAGCAATCTTATTTATCTGCTCAGCTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA
GCTGAAACGTACGGTGGCTGACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAG
CAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
GAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCC
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTACAGCTCAGCAGC
ACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACCAAGTCTACGCTCGGAA
GTCACCCATCAGGGGCTGAGCTCGCCGCTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGT

LP1-IF8重鎖ポリペプチド (配列番号191)

DIIVMSQSPSSLAIVSAGEKVTMSCKSSQSLFNSRTRKNLYAWYQKPGQSPKLLIYW
ASTRESGVPRDFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCKQSYLLTFGAGTKLEKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A C

【図 1 1 A E】

LP1-IN15重鎖ポリヌクレオチド (配列番号194)

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGATGATCTCTAGGAGAGAGAG
TTACTATCACTTGAAGGCGAGTCAGGACATTAAAGCCATTAAAGCTGGTTCGA
GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCTGATCATTTCTGCAACAGATTGGT
AGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTC
ACCATCAGCAGCCCGGAGTATGAAGAAATGGGAATTTATTACTGTCTACAGTAT
GATGAGTTTCCGTTCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGTACG
GTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCAAAAGT
ACAGTGAAGGTTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACCAAAAGTCTACGCTGCGCAAGTACCCATCAGG
CCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-IN15重鎖ポリペプチド (配列番号195)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTTTCASQDINSHLSWFQKPGKSPKTLIRANRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSPEYEEIMGIYYCLQYDEFPFTGGGTGLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A E

【図 1 1 A F】

LP1-IN15重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号196)

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCACTG
AAGATGTCTGTAAAGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACATGAAGTGGG
TGAAGCAGAGTCACTGGAGAGAGCTTGAAGTGGATTGGACGTGTATTCTAGCA
ATGGTGGTACTAATCAACAGAGAGTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTAG
ACAAATCCCTCACCACAGCTACATGCAGCTCAACAGCTGACATCTGAAAGACT
TGGCGTCTATTCTGTGCAAGAGGATGGACTACTGGGGTCCAGGAACTCAGTC
ACCGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGCCATCGGTCTTCCCGTGGCGCTGCT
CCAGGAGCAGCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGC
ACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCTCAGCAGCGTGGT
GACCGTGGCTCCAGCAACTTCGGCAGCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC
AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTGTGTGCGAG
TGCCACCGTGGCCAGCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGC
CAAAACCCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGAGCCCTGAGGTACAGTGCCTGG
TGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCTAATGCTCAAGACAAGCAACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
ACGTTCCGTGTGTGACGCTCTCACCGTGTGACAGGACTGGCTGAACGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTTCAACAAGGCCCTCCAGCCCCATGAGAAAA
CCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCC
CATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAG
GCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAG
ACAACCTACAAGACACGCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTTCTATG
CTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGCAAGAGCCTCTCCGTG
TCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGATCCGAGGCTCCGGTGGCGGTGGC
AGCAACCCCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGAGCAAGGACAACGGATGTTC
CGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGCGGGAAGGAATGCGGCAGTAC
GGGCAATGTCTTCACTCTCGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACA
TGAACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAAGTGCAGTACGTCGCGAGCAAGG
ACGCTGCACTAAGTGCAAGTGGCTTCTACCTTACCGGGCAGATGTTTTGA
CGAATGCCCGGATGGCTTCCGCCGCTGGAGGAGACTATGAAATGCGTGGAG

LP1-IN15重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号197)

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMNWVKQSHGESLEWIGRVIPNSG
GTNYNQKFKGKATLTVDKSLTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGMDYWGPGTSVTV
SSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVGHITPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVPCPPAPP
VAGPSVFLFPPKPKDILMSRTPETVTVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTRFVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSG
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGSGSGG
GSPNICKGCLSKDNGCSRQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPI
MNRRCARCIENDSCRSKDACTCKKVGFYLRHRCFDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 A F

【図 1 1 A H】

LP1-IP13重鎖IgG2、RSP02ポリヌクレオチド (配列番号200)

GAGGTCAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCACTG
AAGATATCTGCAAGGCTTCTGGTACTCAITTTACTGACTACTTTATGAAGTGGG
GAAGCAGAGCCTAGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTTTAAATCTTCAAT
GGTCAAACTTTCTACAATCAGGAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAACTGTAGAC
AAATCCCTAGCAGCCGCCATCGGAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACTCTG
CAGTCTATTATTGTGCAAGAAGAGGAAGGTACGACGTTTACTATGTCTGGACTA
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCGGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCATC
GGTCTTCCCGTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACTCCGAGAGCACAGCGGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCA
GGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGGCCTCCAGCAACTTCGGCAGCCAGAC
CTACACTGTCAACGTAGATCACAGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT
TGAGCGCAAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGG
ACCGTCACTTCTCTTCCCGCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCG
ACCCCTGAGGTACCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGACCCGAGGTC
GAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGGCA
CGGAGGAGCAGTTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTACGCTCTCAGCTGTGTC
ACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGGCC
TCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAAACCAAGGGCAGCCCGGAGAAC
CACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCTGGTCAAAAGGCTTCTACCCAGCAGCATCGCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCATGTCTGGACT
CCGACGGCTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCTCGGTATGATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCC
GGAGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGT
AGCAAGGACAACGGATGTTCACGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCCGC
GGGAAGGAATGCGGCAGTACGGCGAATGTCTTCACTCTGCCCCCTCGGGTATT
ACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCGAGATGCGGATCGAGAAGT
CGCATAGTGCCTGCGCAGCAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAGTGCCTTCTACC
TTCACCGGGCAGATGTTTTGACGAATGCCCGATGGCTTCCGCCGCTGGAGGA
GACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-IP13重鎖IgG2、RSP02ポリペプチド (配列番号201)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTDYFMNWVKQSHGKSLWIGRFNPFNG
QTFYVNEFKGKATLTVDKSSSTAHMELRSLTSEDSAVYYCARRGRYDYYVLDYW
GGQTSVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS
GVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEV
CPPCAPPPVAGPSVFLFPPKPKDILMSRTPETVTVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTRFVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSGDFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
SGSGGGGSGSPNICKGCLSKDNGCSRQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGY
GHRAPIPMNRRCARCIENDSCRSKDACTCKKVGFYLRHRCFDECPDGFAPLEETM
ECVE

図 1 1 A H

【図 1 1 A G】

LP1-IP13軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号198)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGACAAACTG
TTATCATCATATGTCGAACAAGTGAAGATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCA
GCAGAAACAGGGAAAAATCTCCTCAGCTCTGGTCTATGCTGCAACAACTTACG
AGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCAGGCACACAGTATTACCTC
AAGATCAACAGCTGCACTGGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTT
GGGTAGTACGTGGACGTTCGGTGGAGGCCAACGCTGGACATCAACGTCACGG
TGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AACTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-IP13軽鎖ポリペプチド (配列番号199)

DIQMTQSPASLSASVQGVITTCRTSENINLAWYQKQKQKSPQLLVYAATNLADG
VPSRFSGSGSGTQYYLKINSLSQSEDFGSYYCQHFWSGTWTFGGGKTLDIK

図 1 1 A G

【図 1 1 A I】

LP1-IP5軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号202)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCGTCACTGCAAGGCCAGTCAAGATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATC
AACAGAAACCCAGGACAACTCTCTAAAGCACTGATTACTCGGCATCTTATCGGTA
CAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTC
ACCATCAGCAATGTGACGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAACAATATA
ACAGCTATCCGCTACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAACGTACGG
TGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AACTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-IP5軽鎖ポリペプチド (配列番号203)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPGQSPKALIYSASYRYS
GVDPDRFTGSGSIDFTLISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELKRITVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A I

【図 1 1 A J】

LP1-1P5重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号204)

CAGGTTCACGTGACGAATCTGGACCTGAGCTGGTGGAGCCCTGGGACTTCAGTG
AAGATATCTGCAAGGCTTCTGGCTATACCTTCCTACCTACTGGATGAACCTGGG
TGAAGCAGAGGCTGGACAGGGCTTGGAGTGAATGGACAGATTTCCTGCA
CTGGTATTACTTACTACAGTGAGATGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGAAG
ACACATCTCCACCAAGCCTACATGCAACTCAGACGCTGACATCTGAGGCCAC
TGCTGTCTATTCTGTGCAAGAAAGAGGGCTACCATAGTAACCTTTTTGACTACT
GGGGCAAGGCACCACTCTACAGTCTCCAGCGTAGCACCAAGGGCCATCGG
TCTTCCCCCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCCGGTGACCGTGTCTGGAACTCAGGC
GCTCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTA
CACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGA
GCGCAATGTTGTGTGAGTGGCCACCGTGCCAGCACCCTGTGGCAGGACC
GTACGTCTTCTCTTCCCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACC
CCTGAGGTACAGTGGCTGGTGGTGGAGCGTGAGCCAGCAAGACCCCGAGGTCCAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATGCCAAGACAAGAGCCAGCG
GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCTGTGTGCTCAGCGTCTCTACCGTGTGACCC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTCCAACAAGGCCCTCC
CAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACAC
AGGTGTACACCTTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCC
TGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGACGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCATGTGGAAGTCCG
ACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAAAGCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAAACCTACAC
GAGAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGGTAAAGTGGTGGTGGCTCGGAGTCCGG
AGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAG
CAAGGACAACGGATGTTACCGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGG
GAAGGAATGCGGCAGTACGGCGAATGCTCCACTCTGCCCTCGGGGTATTAC
GGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGATCGAGAAGTGC
GATAGCTGCGCAGCAAGGACGCGTGCACCTAAGTGCAAAAGTGGCTTCTACCTTC
ACCGGGGAGATGTTTGTGCAATGCCCGATGGCTTCCGCCCGCTGGAGGAGA
CTATGGAATGCGTGGAG

LP1-1P5重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号205)

QVQLQSGPELVRPGTSVKISKASGYTLFTLYWMNVWVKRPGQGLEWIGQIFPATGI
TYSEMFKDKATLTEDTSSTAYMQLSSLTSEATAVYFCARRRAYHNSFFDYWGQG
TTLTVSSASTGKPSVFLAPCSRSTSESTAAAGCLVVDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCP
CPAPPVAGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEFNSFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGP
REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGKGGGSGSGG
SGGGSPNPKGCLSCSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHR
APDMNRCARCIENCDSCRKDACTCKVGFYLRHRCFDECPDGFAPLEETMECV
E

図 1 1 A J

【図 1 1 A L】

LP1-2E12重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号208)

GATGTACAACCTCAGGAGTCAGGACCTGGCCCTCGTAAACCTTCTCAGTCTGTG
CTCTCACTGCTGTGTCACTGGCTACTCCATCACCACTGGTATTACTTGAACCTGG
ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTCCATAGGCTACGAT
GATACCAATCACTACAACCATCTCTCAAAATCGAATCTCCATCACTCGTGACA
CATCAAGAACCAGTTTTTCTGAAGTTGAATCTGTGACAAGTGGAGCAGC
CACATATTACTGTGAGGTGACTACCCCTTTGCTTCTGGGGCCAAGGAGCTGTG
GTCACTGTCTCTGACGTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGTGGCGCCT
GCTCCAGGACACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCGAACCCGGTGACCGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTGTGACAGCGCGG
TGCACACCTTCCCAAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCCGACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT
CACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGTGTAGCGCAAAATGTTGTGTC
GAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTCTCTCTTCC
CCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTGACGTGCGT
GGTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGACCCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGGGA
CGCGTGGAGGTGACATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACA
GCAGCTTCCGTGTGTGACGCTCTCCTACCGTGTGTGACCAAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAAGGCTCCAGGCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTTACACCTGCCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTCAGCTGACCTGCCTGTGTTCA
AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGACCAATGGGACGCCGGA
GAACAACATAAGACACGCCCTCCATGTGGAAGTCCGACGGCTCTTCTCTCTC
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCAACCACTACACGACAGAGAGCTCTCCC
TGCTCCGGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGGAGGCTCCGGTGGCGGTG
GCAGCAACCAATTTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTT
CACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAGT
ACGGCGAATGTCTCACTCTCGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGTA
CATGAACCGATGCGCCAGATGCGGATCGAGAACTGCAGTACGTGCGCAGCAAA
GGACGCTGCACTAAGTGCAAAAGTGGCTTCTACCTTACCGGGCAGAGTGTIT
GACGAATGCCCGATGGCTTCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-2E12重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号209)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSTLTSVYTSYISYWNWIRQFPNGKLEWMSGISYDDT
NHYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTEDTATYTCAGDYPAFWGQGLTVTS
AASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAAGCLVVDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCEVCPAPPV
AGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNATK
REEQFNSTRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGKGGGSGSGSGG
GSPNPKGCLSCSKDNGCSRQKQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDM
NRCARCIENCDSCRKDACTCKVGFYLRHRCFDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 A L

【図 1 1 A K】

LP1-2E12重鎖ポリヌクレオチド (配列番号206)

GATGTTGTGGTGACTCAAACCTCACTCTCCCTGCCTGTACAGCTTTGGAGATCGAG
TTTCTATCTCTTTCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAACAGTATGGGAACACCTA
TTTGCTTGGTACCTGCACAGGCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTATGGG
ATTTCACAGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTACGGGA
CAGATTTCACACTCAAGATCAGCAACAATAAGCCCTGAGGACTTGGGAATGTATT
ACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCTCTCAGCTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGA
GCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAG
CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGAATACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCC
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAA
GTACCCATCAGGGCTGTAGCTCGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGT

LP1-2E12重鎖ポリペプチド (配列番号207)

DVVVTQTPLSLPVSFGRVSVISCRSSQSLANSYGNITYLSWYHLKPGQSPQLLIYGISN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFLTKISTIKPEDLGMYYQLQGTHTPLTFGAGTKLEKRTVA
APSVFIIPPDSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSYLSSTLTLSKADYEHKHYVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A K

【図 1 1 A M】

LP1-2I13重鎖ポリヌクレオチド (配列番号210)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTG
TCACCATCACATGTGAGCAAGTGAGAATATTATACAGTTATTTAGTATGGTATCA
GCAGAAACAGGGGAAATCTCCTCAGCTCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGC
AGAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTG
AAGATCAACAGCCTCGACCTGAAGATTITGGGAGTTATTACTGTCAACATCAIT
ATGGTACTTGGACGTTCCGTGGAGGCATAAAGCTGGAATCAAACTGACCGTGG
CTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
TGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAAATCTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAA
GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGCAAGTACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-2I13重鎖ポリペプチド (配列番号211)

DIQMTPSPASLSASVGETVITTCRASENIYSYLVWYQKQKSPQLLVYNAKTLAEG
VPSRFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHYGTWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
LSSTLTLSKADYEHKHYVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A M

【図 1 1 A N】

LP1-2I13重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号212)

GAGGTGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCCG
AACTCTCCTGTCAGCCTCTGGATTACATTTTCAGTGAATGGAATGCACTGGG
TCCGTACGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCTACATTAGTGGCA
GTAGTACCATCTACTATCGACAGACAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAATGCCAAGAACACCTGTTCTCTACAAATGACCAAGTCTAAGGTCTGAGGACA
CAGCATGTATTACTGTTCGAAGGAAGGGAGGGTTTGGTGAACAGAGAAAAGCT
ATGCTATGGACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCAGCGCTAGCAC
ACAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACTCCGAGAGC
ACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACCTCAGCGCTCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCAGCTGTCTAC
AGTCTCAGGACTTACTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACT
CGGCACCCAGACTACACTGCAACGTAGATCAAGCCAGCAACCAAGGT
GGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGTGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACC
ACCTGTGGCAGGACCGTCACTTCTCTTCCCTCCCAAAACCAAGGACACCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACGTGGTGGTGGTGGAGCGTGAGCCAGAA
GACCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAGCCACGGGAGGAGCAGTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCGTC
CTACCGTGTGTGCACCAAGGACTGGCTGACGGCAAGGAGTCAAGTCAAGTGC
TCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCATCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCAAGGG
CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTACGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTACCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGGCGGAGAACACTACAAGACCACGCC
TCCATGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTATGTCTCCGTGATGATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGTAAAGTGGT
GGTGGCTCGGGATCCGGAGGCTCCCGTGGCGGTGGCAGAACCAATTGCAAG
GGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTG
TTTTTCTCTCCGGCGGAAGGAATGCGGCAGTACGGCAATGTCTCCACTCT
GCCCTCGGGGATTACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGAT
GCCGATCGAGAACTGCGATAGCTGCCGACAGCAAGGACCGCTGCATTAAGTGA
AAGTGGCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTGACGAATGCCCGGATGGCT
CGCCCCGTGGAGAGACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-2I13重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号213)

EVQLVESGGGLVKPGSRKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPKGLEWVAYISSGS
TIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDITAMYYCSRKGFGDYEKSYAMD
YWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTNCNVDHKPSNTKVDKTVRKC
CVCPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI
SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPMLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGKGG
GGSGGGGGGSPICKGCLSCSKDNGCSRCKQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPS
GYIGHRAPDMNRARCRIENCDSRSDACTCKKVGFYLRGRCFDECPDGFAPLE
ETMECVE

図 1 1 A N

【図 1 1 A P】

LP1-2I22重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号216)

GAGGTCAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATATCTGCAAGGCTTCTGGTTACTACTTACTGGCTACTTTATGAACCTGGGT
GAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATGGACGTTTAACTCTTCAAT
GGTCAAACTTTTACAATCAGGAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAGTGTGAC
AAATCTCTGACACCGCCACATGGAACCTCGGAGCCTGACATCTGAGGACTCTG
CAGTCTATTATTGTGCAAGAAGAGGAGTACGACGTTTACTATGCTCTGGACTA
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCATC
GGTCTTCCCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACTCCGAGAGCAGCGGCCCTG
GGCTGCTGTGTAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTAAGTCA
GGCGCTCTGACAGCGCGCTGACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGAC
TCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCAGAC
CTACACTGCAAGCTAGATCAACAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGT
TGAGCGCAATGTGTGTGTCAGTGGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGG
ACCGTCACTTCTCTTCTTCCCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGG
ACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCGAGGT
CAGTTCAACTGGTACGCGGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGGCCA
CGGGAAGGAGCAGTTCAACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCTCCTACCGTGTGTC
ACGAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAGGAGGCC
TCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTTCCAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCTGCCCCACTCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTA
CGCTGACCTGCTGGTCAAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGACGGCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCATGCTGGACT
CCGACCGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGAGGTGGGA
GCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGAGAAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCC
GGAGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTGCAAGGGATGCTTAAGTGT
AGCAAGGACAACGGATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCCGG
GGGAAGGAATGCGGAGTACGGCAATGTCTCACTCTGCCCTCGGGGTATT
ACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGATCGAGAACT
GCGATAGCTGCCGAGCAAGGACCGCTGCATTAAGTGAAGTCCGCTTCTACC
TTCACGGGGCAGATGTTTGAAGCAATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGA
GACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-2I22重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号217)

EVQLQSGPELVKPGASVKISKASGYSFTGYFMNWVQKSHGKSLIEWGRFPNFG
QTFYNQEFKGAATLTVDKSSDTAHMELRSLTSEDSAVYYCARRGRYDVYALDYW
GQGTSVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT
SVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTNCNVDHKPSNTKVDKTVRKC
CVCPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
MLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGKGGGGS
GGSGGGGGGSPICKGCLSCSKDNGCSRCKQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSGY
GHRAPDMNRARCRIENCDSRSDACTCKKVGFYLRGRCFDECPDGFAPLEETM
ECVE

図 1 1 A P

【図 1 1 A O】

LP1-2I22軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号214)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATTCATCTGTGGGAGAAACTG
TTATCATCATATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCA
GCAGAAACAGGGAAAATCTCTCAGCTCCTGGTCTATGGTGCAACAACTTAGC
AGATGGTGTGACATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCAGGCACACAGTTTTCCCTC
AAGATCGACAGCCTGACGTCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTT
GGGCTACTACGTGGACGTTCCGTGGAGGCCAACAGCTGGAAATCAAACGTACGG
TGCTGCACCATCTGTCTTCTCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AACTGCCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAATCTTATCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTGACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAAGTCAACCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-2I22軽鎖ポリペプチド (配列番号215)

DIQMTQSPASLSASVGETVITCRASENYSNLAHWYQQKQKSPQLLYVYATNLADG
VTSRFSGSGSGTQFSLKIDSLQSEDFGSYYCQHFHWGTTWTFGGGTGLEIKRTVAAPSV
FIIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A O

【図 1 1 A Q】

LP1-3A24軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号218)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTAGTAATGTAGCCTGGTTTC
AAGAGAAACAGGGCAATCTCTAAAGCACTGATTACTCGTCACTCCACCGGTA
CAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACCGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTC
ACCATCACAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGACGAATATA
ACAGCTTTCTCTCAGTGTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAACGTACGGT
GGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAATCTTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAAGTGGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAG
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAAGTCAACCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-3A24軽鎖ポリペプチド (配列番号219)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGSNVAWFQKPGQSPKALYSSSYRYS
GVPRDFTGSGSGTDFLITITNVQSEDLAEYFCQQYNSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A Q

【図 1 1 A R】

LP1-3A24重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号220)

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCACTG
AAGATGCTCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACATAAACTGGG
TGAGGCAGAGTATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTATCTTAGCA
ATGGTGGTAGTAACATAACCAAGATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTAG
ACAAATCCCTCAGTACAGCTACACCTCAACAGCTGACATCTGAGGACCT
TGGCGTCTATTACTGTGCAACCCAGCTGGGACGCTGGGGCCAAAGGACTCTGGT
CACTGTCTCTGACGTAGCAACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCCGCTG
TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC
TTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCTCTGACAGCGCGCTG
CACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGGACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA
CAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTGTGTCGA
GTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTTCTTCTCC
CCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGACCCCTGAGGTCAAGTCAAGTGTG
GTGGTGGAGCTGAGCAAGCAAGCCCGAGGTCCAGTTCACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCTAATGCCAAGCAAGCAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAG
CAGCTTCCGTGTGCTACGCTCTCACCCTGTGTCACCAAGGACTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGCAGGCTCTCAACAAAGGCTCCAGCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCC
CCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAA
GGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCGCGGAG
AACAACATAAGACACGCTCCATGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCT
ACAGCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCT
GCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGGCTCTCCCT
GTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGGAGGCTCCGTGGCGGTG
CAGCAACCAATTTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACACCGATGTT
ACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGGAAGGAATGCGGCAGTA
CGGCAATGTCTTCACTCTGCCCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGAC
ATGAACCGATGCGCCAGATGCCGATCGAGAAGTGCATAGCTGCCGAGCAAG
GACGCTGCACTAAGTGCAAAAGTCGGCTTCTACCTTACCGGGGAGATGTTTTG
ACGAATGCCCGGATGGCTTGCCTCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-3A24重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号221)

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWVRQSHGKSLWIGRVPISNG
GSNNYQKFKGKATLTVDKSLSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAQTLGRWGQGLTVTV
SAASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAV
LQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPAPP
VAGPSVFLFPPKPKDILMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGFS
FLYSLKLVDSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGSGSGSGG
GGSNPICKGLSCSKDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPD
MNRCAACRIENCDSCRKDACTCKCVGFYLRGRCFDECPDGFAPLEETMECV

図 1 1 A R

【図 1 1 A T】

LP1-3E20重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号224)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAACTGGGGCTCAGTG
AAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGCTACTGGATACACTGGG
TAAACAGAGAGGCTGAGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATACATTAACCTAGCA
GTGGTTATGCTGAGTACAATCAGAAAGTTCAAGGTCAAGGCCACATTGACTCGAG
ACAAATCTCCAGCAGAGCTACATGCAACTAAGCAGCTGACATCTGAGGACT
CTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAAAGTTACTATAGTTTCGACTATACTATGGA
CTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTACCGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCC
ATCGGTCTTCCCTCTGGCGCTGTGCTCCAGGAGACCTCCGAGAGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAGCGGTGACGGTGTCTGTTGAAT
CAGCGCTCTGACAGCGCGCTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGG
ACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGGCTCCAGCAACTTCGGCACCCAG
ACCTACACCTGCAAGCTAGATCAAGGCCAGCAACCAAGGTGGACAGAGCA
GTTGAGCGCAATGTGTGTGCGAGTGCCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAG
GACCGTCACTTCTCTTCCCGCAAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTG
GACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGT
CCAGTTCACCTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATAATGCCAAGCAAGCC
ACGGAGGAGCAGTTCACAGCAGCTTCCGTGTGGTACGCTCTTCCAGCTGTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAAAGGC
CTCCAGGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTG
AGCTGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGACCGCGAGAACAACTACAAGACACGCTCCATGTGCTGGC
TCCGACGGCTCTTCTTCTTACAGCAAGCTACCGTGGACAAAGAGCAGGTGG
AGCAGGGGAACGCTTCTCATGTCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATC
CGGAGGTCTCCGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGGATGCTTAAGCTG
TAGCAAGGACAACGGATGTTCACCGTGGCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGG
CGGGAAGGAATGCGGAGTACGGCGAATGTCTCCACTCTGCCCTCTGGGGTAT
TACGGACACCGCGCGCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGGATCGAGAAC
TGGGATAGTGCAGCAGCAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAAAGTCTGGCTTCTAC
CTTACCGGGGACAGTGTGTTGACGAATGCCCGGATGGCTTCGCCCGCTGGAGG
AGACTATGGAATGCGTGGAG

LP1-3E20重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号225)

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWIHWVKRPPQGLEWIGYINPSSG
YAEYNQKFKVRATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARESYYSFDYTMIDY
WQGTSTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVVERKCCVE
CPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDILMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSG
SGSGGGGGSNPICKGLSCSKDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGH
RAAPDMNRCAACRIENCDSCRKDACTCKCVGFYLRGRCFDECPDGFAPLEETM
ECVE

図 1 1 A T

【図 1 1 A S】

LP1-3E20重鎖ポリヌクレオチド (配列番号222)

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAG
TCATCTACTTGAAGGCGAGTCAGGACATTAAATAGCTATTTAAGCTGGTTCCA
GCAGAAACCAAGGAAATCTCTAAGACCTGATCTATCTGCAAAACAGATTGGT
AGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATCTCTC
ACCATCAGCAGCTAGAGTATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATG
ATGACTTGTGGACGTTGCGTGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGG
CTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
TGCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAG
TGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGGCAAA
CGAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTCGCGAAGTCAACCATCAGGGCGCTG
AGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-3E20重鎖ポリペプチド (配列番号223)

DIKMTQSPSSMYASLGERVITTCASQDINSYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVDG
VPSRFSGSGSGDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDLWTFGGGTGLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSTLTLSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A S

【図 1 1 A U】

LP1-6H3重鎖ポリヌクレオチド (配列番号226)

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGTTACCATGGACAACCAAG
CTTCAATCTTCTGCAAGTCAAGTCAGAGCTCTTAGATAGTATGGAAAGACATA
TTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCTAATCTATCTG
GTGCTTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGG
ACAGATTTCACTGAGCAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTAT
TATGCTGGCAAGGTACACATTTCTTCTCACAGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGG
AAATAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGA
GCAGTTGAATCTGGAATGCTCTGTTGTGCTGCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAGCTACAGCCTCAGCAG
CACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACCAAGTCTACGCTGCGA
AGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGAGAGA
GTGT

LP1-6H3 (PN及びPP) 重鎖ポリペプチド (配列番号227)

DVVMITQPTLTVSVTIGQPASISCKSSQSLSDSGKTYLNLWLLQRPQSPKRLIYLVSK
LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYYCWQGHFPHFTFGSGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEHKHYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A U

【図 1 1 A V】

LP1-6H3重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号228)

CAGGCTTATCTACAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGGCTCAGTG
AAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACATTTTCCCGTTTCGATATGCACTGGG
TAAAGCAGACACCTAGACAGGGCTGGAATGGATTGAGTTATTTATCCAGGAA
ATGGTGATACTTCTCAATACAGAAGTTCAAGGACAAAGGCTCAGTACTGTAG
ACAAATCTCCAGCAGACAGCTACATGCACTAGCAGCTGACATCTGAAGACT
CTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGCTCTACTATGGTAAACCCCTGGGGCCAAGGCAC
CACTCTCAGAGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGGCG
CCCTGCTCCAGGAGCAGCTCCGAGAGCAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACACG
GGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
GCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGT
AGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTG
TGTGAGGTGCCACCGTGGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCACTCTTCTC
TTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGT
GCGTGGTGGTGAGCTGAGCCAGCAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTT
AACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTGTCACAGGACTGGCTGA
ACGGAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCAGCCCACTAGC
AGAAAACCATCTCCAAACCAAAAGGCGAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCC
TGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACG
CGGAGAACCACTACAAGACCACGCTCCCATGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTT
CTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGTCTCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAAGAGCTC
TCCGTGTCTCCGGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTGG
GGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAAACGGA
TGTTTACCGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTTCTTCTCCGCGGGAAGGAATCGCG
AGTACGGCAATGTCTCACTCTGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCC
TGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGATCGAGAACTGCGATAGCTGCCGAG
CAAGGACGCTGCTACTAAGTGCAAGTGGCTTCTACCTTACCGGGGAGATG
TTTTCAGCAATGCCGGATGGCTTCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTG
GAG

LP1-6H3重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号229)

QAYLQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFRSFDHWHVKQIPRQGLEWIGVIYPGN
GDTSYNQKFRDKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCASSYGNPWGQGTTL
TVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSNWNGALTSVGHITF
AVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCA
PPVAGPSVFLFPPKPKDILMSRITPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREQFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPRE
PQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGSGSGGS
GGGSPNPKGCLSCSKDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSSGYGHRA
PDMNRCARCIENCDSCRKDACTCKVGFYLRGRFCDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 A V

【図 1 1 A X】

LP1-7B13重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号232)

GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCACTG
AAGATGTCCTGTAAGACTTCTGGATTACATTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG
TGAAGCAGGGTACAGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCTACGCA
ATGATGATACTAGGTACAATCAGAAGTTCAAGGGAAGGCCACATTGACAGTAG
ACAACTCCCTCAGCAGCAGCTACATGCACTCAACAGCTGACATCTGAGGACT
CTGCGGTCTATTACTGACAAAGGTGGTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
TACTCTACAGTCTCCAGCGTAGCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGGCG
CCCTGCTCCAGGAGCAGCTCCGAGAGCAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGGGAACCTCAGGCGCTCTGACACAG
GCGGTGCACACCTTCCAGAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
CGGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGT
AGATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTG
TGTGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTTCTCTCT
TTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGT
CGGTGGTGGTGGAGTGACCAACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGTTC
AACAGCAGCTTCCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTGTCACAGGACTGGCTGA
ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCAGCCCACTAGC
AGAAAACCATCTCCAACAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGAGTGTACACCC
TGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCTGACCTGCTGCTG
TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACG
CGGAGAACCACTACAAGACCACGCTCCCATGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTT
CTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAAGAGCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTGG
GGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAAACGGA
TGTTTACCGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTTCTTCTCCGCGGGAAGGAATCGCG
AGTACGGCAATGTCTCACTCTGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCC
TGACATGAACCGATGCGCCAGATGCGGATCGAGAACTGCGATAGCTGCCGAG
CAAGGACGCTGCACTAAGTGCAAGTTCGGCTTCTACTTCAACCGGGCAGATG
TTTTGACGAATGCCGGATGGCTTCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTG
GAG

LP1-7B13重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号233)

EVQLQSGPEVVKPGASVKMSCKTSGFTIDYYMNWVKQGHGKSLIEWGRVNP
DDITRYNQKFKGKAILTVDKSLSTAYMQLNSLTSEDSAVYCTRWFYFDYWGQGT
LTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSNWNGALTSVGHITF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCA
PPVAGPSVFLFPPKPKDILMSRITPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREQFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGQPRE
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGSGSGGS
GGGSPNPKGCLSCSKDNGCSRQKQLFFLRREGMRQYGECLHSCPSSGYGHRA
PDMNRCARCIENCDSCRKDACTCKVGFYLRGRFCDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 A X

【図 1 1 A W】

LP1-7B13軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号230)

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAG
TCAGTCTTCTCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATTAGCAACTACCTACACTGGTATCA
ACAAAATACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTTTGGCTTCCAGTCCATC
TCTGGGATCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACGGATTCTACTCTCA
CTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAAATGTTATTTCTGTCAACAGAGTAA
CAGCTGGCCGCTCAGGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGT
GGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCTCTGTGTGTGCTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAG
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-7B13軽鎖ポリペプチド (配列番号231)

DIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISNYLHWYQQKSHSPRLIKFASQISIGPS
RFGSGSGGTDFLTINSVETEDFGMYFCQQSNWPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFPAKQVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSLTILSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A W

【図 1 1 A Y】

LP1-7I20軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号234)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTG
TCACCATCATGTGCGAACAAAGTGAAGAATATTACAGTTATTTAGCATGGTATCA
GCAGAAACAGGGGAAAAATCTCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGC
AAAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGITTTCTCTG
AAGATCAACGGCCTCGAGCTGAAGATTTGGGAATTAATTACTGTCAACATCATT
ATGGTACTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGGTGGAATAAAACGTACCG
TGGTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
AAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAG
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGC
CTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-7I20軽鎖ポリペプチド (配列番号235)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRSTENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAKG
VPSRFGSGSGGTQFSLKINGLQPEDFGNYQCQHHYGTPTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFPAKQVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTILSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 A Y

【図 1 1 A Z】

LP1-7I20重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号236)

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCTCTG
AGTCTCTCTGTGCAGCTTCTGGATTACCTTACTGATTACTACATGAGCTGGGT
CCGCCAGCCCCAGGGAAGGACCTTGAGTGGTTGGCTTTGATTAGAAACAAAGC
TAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTTCGGTTACCATCTCC
AGGGATAATTCCCAAAGCATCTCTTATCTTCAAATGAATGCCCTGAGAGCTGAGG
ACAGTGCCACTTATTACTGTGCACTTACCTACGGGGCTTACTGGGGCCAAGGGAC
TCTGGTCACTGTCTCTGACGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCG
CCCTGCTCCAGGAGCACTCCGAGAGCAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCA
CGGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACTACACTGCAACGT
AGATCAACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTG
TGTGAGTGCCACCCTGTCAGCAGCACCCTGTGGCAGGACCGTCACTCTCTC
TTCCCTCCAAACCCAAAGGACACCTCTATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGT
GCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGACCCCGAGGTCCAGTTCACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTT
AACAGCAGCTTCCGTGTGGTACGCTCTCAACCGTTGTGACACGAGGACTGGCTGA
ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTTCAACAAAGGCTTCCAGCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAACCAAAAGGGCAGCCCCAGAACCAAGGTGTACACCC
TGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTGACCTGACCTGCCTGG
TCAAAGGCTTCTACCCAGCGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACG
CGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCCATGCTGAGTCCGACGGCTCTCTT
CCTCTACAGCAAGCTACCGTGGAACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGCGCTC
TCCCTGTCTCCGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGTTGGC
GGTGGCAGCAACCCAATTTGCAAGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAAACGGA
TGTTCACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCCGCGGAAGGAATGCGGC
AGTACGGCGAATGTCTCACTCTGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCC
TGACATGAACCGATGCGCCAGATGCCGATCGAGAATGCGATAGCTGCGCAG
CAAGGACCGCTGCACTAAGTGCAAGTGGCTTCTACCTTACCGGGGAGATG
TTTTGAGCAATGCCGGATGGCTTCCGCCCTGAGGAGACTATGGAATGCGTG
GAG

LP1-7I20重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号237)

EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTTIDYYMSWVRQPPGKALEWLAIRNKAN
GYTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILYLQMNALRAEDSATYYCAVTVGAYWGQGLV
TVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTF
AVLQSSGLYSLSVVTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVCEPPCPA
PPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGEVHNAK
TKPREQFNSFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTIKTKGPQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDLAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGSGSGS
GGGSPICKGLSCSKDNQCSRCQKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAP
DMNRCARCRIENCDSCRKDACTCKVKGYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 A Z

【図 1 1 B B】

LP1-8M24重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号240)

GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGA
GTGACCATCACCTGTGCGATCAGCGAGAACATCTACAGCAACCTGGCCTGGTATC
AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGTGATCTACGCCCATCAATCTGG
CCGATGGCGTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTACCCCT
GACCATATCTAGCCTGAGCCTGAGGACTTGCACCTACTACTGCCAGCACTT
TGGGGCACCCCTTTCACCTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAGCGTACG
GTGGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAATGCCTCTGTTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCGTACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-8M24重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号241)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRISENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAINLADGV
PSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 B B

【図 1 1 B A】

LP1-8M24軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号238)

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGCCAGGGGCTCAGTC
AAGTTGCTCTGCACAGCTTCTGGCTTACCATTAAAGACGACTATATCTACTGGG
TGAAGCAGGGGCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGAAGAATTGATCTGCGG
ATGATGATACTAAATATGCCCGGAAGTTCAGGACAAGGCCACTATAACTGCAG
ACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACA
CTGCCGTCTATTACTGTGCTAGAAGTTCATGGCCTGGTTTGTCTACTGGGCCCA
AGGGACTCTGGTCACTGTCTACAGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCT
CTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTG
ACCAAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCC
TCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTG
CAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGGATCCGGCTCCGGCAcatcatcatcatcat

LP1-8M24軽鎖ポリペプチド (配列番号239)

EVQLQSQGAELVRPGASVKLSCTASGFTIKDDYIHWVKQGPQGLEWIGRIDPADDD
TKYAPKFDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCARSSMAWFAYWAQGLTV
TVSTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTALGLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGQTITICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHH
HHH

図 1 1 B A

【図 1 1 B C】

LP1-9C3軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号242)

GATGTTGTGGTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGTGACGCTTGGAGATCAAG
TTTCTATCTCTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAACAGTTATGGGAACACCTA
TTTGTCTTGGTACCTGCACAAGCTTGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTATGGG
ATTTCACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGTTACGGGA
CAGATTTACACTCAAGATCAGCACATAAAGCCTGAGGACTTGGGAATCTATT
ACTGCTTACAAGCTACACATAGCCGTGGAGCTTCCGTGGAGGCCACCAAGCTGG
AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCTCCCGCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGTAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCCTACAGCCTCAGCAG
CACCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTGCGA
AGTACACCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
GTGT

LP1-9C3軽鎖ポリペプチド (配列番号243)

DVVVTQIPLSLPVSFQDQVSISCRSSQLANSYGNITYLSWLHPKPGQSPQLLIYGISN
RFSGVFDRFSGSGSDFTLKISTIKPEDLGIYYCLQATHQPWTFGGGTKEIKRTVA
APSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 B C

【図 1 1 B D】

LP1-9C3重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号244)

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGACGCCCTCCAGACCCTCA
GTCTGACTGTCTTCTTCTCTGGGTTTCTAGTACTTCTTATATGGGTGTGAGC
TGGATTCTGTAAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTCTGGG
ATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGG
ATACCTCCAGCAACCAAGGTATTCTCTATGATACCAAGTGTGGAACAGATAC
TGCCACATACTACTGTGGGGTCCCTACTACTCCGTTTACTTACTGGGGCCAAGGG
ACTCTGTCTACTGTCTGCAGCTAGCACCAAGGCCCATCGGTTCTCCCCCTGG
CGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTAGGGCTCTGACCA
GCGCGGTGCACACCTTCCAGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCCGCAACCCAGACTTACACTGCAAC
GTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGAAATGT
TGTGTGAGTGCCACCGTGCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTGTCTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGCCCTGAGGTCAGTCA
GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCACTGGTA
CGTGGACGGCTGGAGGTGCAATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGT
TCAACAGCAGCTTCCGTTGGTGCAGGTCTTCCAGTTGTGCACAGGACTGGCT
GAACGGGAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTTCAACAAAGGCTCCAGGCCCAT
CGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACAC
CCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGGCT
GGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCATGTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAAGCTCAGGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGATGATGAGGCTCTGCACAACTACACGAGAAGAGC
CTTCTCTGTCTCCGGGTAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTG
GCGGTGGCAGCAACCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACG
GATGTTACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCG
GCAGTACGGCGAATGTCTTCACTCTGCCCTCGGGTATTACGGACACCGCGCG
CCTGACATGAACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAACTGCGATAGCTGCCGC
AGCAAGGACGCTGCCTAAGTGCAAGTCCGCTTACCTTACCGGGGAGCA
TGTTTTGACGAATGCCCGATGGCTTCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCG
TGGAG

LP1-9C3重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号245)

QVTLKESGPIQLPQSQTLSLTSFSGFSLSTSYMGVSWIRKPSGKLEWLHIFWDD
KRYNPSLKSLIISKDTSSNQVFLMITSVETADTATYYCGGPYYPTYWGQTLTVT
SAASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVTPSNFQTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKCCEPCPCAPP
VAGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGSGSGSGG
GGSNPICKGCLSCSKDNGCSRQCKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAFD
MNRRCARCIENDCSRKSDACTCKKVGFYLHRCGFDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 B D

【図 1 1 B F】

LP1-9M16重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリヌクレオチド (配列番号248)

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTACGTG
AAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTTACTGACTACTACATGAACCTGGG
TGAAGCAGAGCTATGGAAGAGCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCTCAACA
ATGGTGGTTCTAACTACAACAGAAATTCAGGGCAAGGCCACATTGACAGTAG
ACAAATCCCTCAGCACAGCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACT
CTCGGGTCTATTACTGTGCAAGTGCAGAACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACAC
GGTCACCGTCTCCAGCGTAGCACAAGGGCCATCGGTCTTCCCTCGGCCGCC
TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCGAAGCCGTGACGGTGTCTGTGGAACCTAGGCGCTCTGACACGCGGC
GTGCACACTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCG
TGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCCGACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGA
TCACAAGCCACAGCAACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTG
CGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTTC
CCCCAAACCCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCAATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAA
CAGCAGCTTCCGTGTGGTACGGTCTTCCAGGTGTGTCACACAGGACTGGCTGAA
GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGGCCCTCCAGCCCTCATCGAG
AAAACCATCTTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGATACACCTG
CCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGGTGC
AAAGGCTTCTACCCAGCAGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCC
GAGAACAACTACAAGACCAACGCTCCCATGCTGGACTCCGAGGGCTCTCTTCTC
TCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCT
CATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGACAGAAGAGCCTCTC
CTGTCTCCGGGTAAAGGTGGTGGTGGCTCGGGATCCGGAGGCTCCGGTGGCGG
TGGCAGCAACCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATG
TTCACGGTGCCAGCAAAAGCTGTTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGAG
TACGGCGAATGTCTTCACTCTGCCCCCTCGGGGTTATACGGACACCGCGCGCTG
ACATGAACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAAGTGCAGATAGTGCAGCAGCA
AGGACCGCTGCATAAGTGCAAGTGGCTTCTACTTACCGGGGAGCATGTTT
TGACGAATGCCCGGATGGCTTCCGCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCTGGGA
G

LP1-9M16重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A) ポリペプチド (配列番号249)

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYIMNWWVKQSHGKSLWIGRVNPN
GGSNYNQKFKGKATLTVDKSLSTAYMQLNSLTSEDSAVVYCASRNFDVWAGGTTV
TVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
AVLQSSGLYSLSSVTVTPSNFQTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKCCEPCPCPA
PPVAGPSVFLPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSG
SFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGSGSGG
GGSNPICKGCLSCSKDNGCSRQCKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAFD
DMNRRCARCIENDCSRKSDACTCKKVGFYLHRCGFDECPDGFAPLEETMECVE

図 1 1 B F

【図 1 1 B E】

LP1-9M16軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号246)

GACATCAAGATGACCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAG
TCATATCACTTGAAGCGAGTCCAGGACATTAATAGCTATTAAAGCTGGTCCCA
GCAGAAACAGGGAAATCTCTAAGACCTGATCTATCGTGCAACAGATTGGC
AGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATCTCTC
ACCATCAGCAACCTGGAGTATGAAGATATGGGAATTTATTTATGTTCTACAGTATG
ATGAGTTTCCGCTCAGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGT
GGCTGCACCATCTGTCTTCTCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAG
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGACGTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LP1-9M16軽鎖ポリペプチド (配列番号247)

DIKMTQSPSSMYASLGERVITTCASQDINSYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLADG
VPSRFSGSGSGDYSLTISNLEYEDMGIIYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFFPSDEQLKSGTASVYCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 B E

【図 1 1 B G】

LP1-10C22軽鎖ポリヌクレオチド (配列番号250)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGAGATCTAGTACAGGGCATTGTACATAGTAATGGAAACATCTA
TTTGAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAA
GTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTATT
ACTGCTTTCAAGGTTACATGTCTCTCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTTCCCGCATCTGATGAG
CAGTTGAAATCTGGAATCCGCTCTGTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACCTCC
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAA
GCTACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGT

LP1-10C22軽鎖ポリペプチド (配列番号251)

DVLTMTQPLSLPVSIGDQASISCRSSQGVHNSNGNIYEWLYKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSGSHVPPFGGGTKLEIKRTVA
APSVFIFFPSDEQLKSGTASVYCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSYTSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

図 1 1 B G

【図 1 1 B H】

LP1-10C22重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A)ポリヌクレオチド(配列番号252)

AAGGTCGACCTGGGAGGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCTCGGAGGGCTCCCT
 AAATCCCTCTGTGCAGCTCTGGATTACCTTAGCTAGTATTATGCAGTGTCTTGGGT
 TCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTGCAAGTATTAGTAGTGGTGG
 TAGTTATACTACTACTACAGACAGTGTGAAGGGCGGCACTACCATCTCCAGAGAC
 ATAGCCCAAGAACCCCTGTACCTGCAATGAGCGCTGAAGTCTTGAGGACACA
 GCCATGTATTACTGTGAAGACATGAGGAATGTGTAATCCGGATTGTGTTAC
 GGGGCAAGGGAACCTGTAATTGCTCTGCACTAGCACAAAGGGCCACTCG
 TCTTCCTCCCTGGGCGCTCTCTCAGGAGCACACTCCGAGAGACAGCGGCCCTGGG
 CTGGCTTGGTAAAGGAATCTCCCGCAACGGTGACGGTGTCTGGAATCTACGG
 GCTCTGACCAGCGCGTGACACTCTCCAGCTGTCTCTACAGTCTCCAGGAATCT
 ATCTCTCAGCAGCGGTGGTACCTGTCCCTCCAGCAACTCTCGGCAACCCAGCTCA
 CACCTGCAACGTAGATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGA
 GCGCAATGTGTGTGTGTCAGTGCCACCCTGTCAGCCAGCAACCTGTGGCAGGACC
 TGAGTCTTCTCTCTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACC
 CTTAAGTGTCAGTGCGTGTGTGGTGTGACCTGAGCCACGAAGACCCGAAGTCCAG
 CTTCACTGGTACCTGGAGCGCGTGGAGGTGCTAATAGCCAGCAACCAAGGACCGG
 GAGGAGCAGTCTACAAGCAGCATCTCCGTGTGGTGCAGGCTCTCATCCGTTGTGCAC
 AGGAATGGCTGAACCGGCAAGGATACAAGTGTCAAGTGTCTCAACAAGGCCCTC
 CAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
 AGGTGTACACTCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCTC
 TGACTCTCCGTGTACAAGGCTCTCCGACGACATCTCGCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGACCGCGGAGAACACTACAAGCAACGCACTCCATCTGTGAGTCTCG
 ACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCAAGAGCAGGATGGCAGC
 AGGGGAGACGTCTTCTACATCTCCGTGTGATGATAGGCTCTGCACAAACCTACAC
 CGAGAAGAGCTCTCTCTGTCTCCGGGTAAAGTGTGTGGTGTCTCGGATCCGG
 AGGCTCCCGTGGCGGTGGCAGCAACCAATTTGCAAGGAGTGCTTAAGCTGTAG
 CAGGACAACCGAATGTCTACGGTGCACGAAAGCTGTTTTCTCTCCGGCGG
 GAAGGAATCGCGCAGTACGGCGAATGTCTCCACTCTGCCCCCTCGGGGTATTAC
 GGACATCCGCGCGCTGCATAGTACGCTCAGCTGCGCAGATGCGGAGTGGAGAATGC
 GATAGCTGCCGACAGAAGGACGCTGCATCAAGTGCAAGTCCGGCTTCTACCTT
 ACCGGGACAGTGTGTTTGACGAATGCCCGGATGGCTCTCGCCCCGCTGGAGGAGA
 CTATGGAATCGGTGGG

LP1-10C22重鎖IgG2、RSP02 (F105R/F109A)ポリペプチド (配列番号253)

EVQLVESGGGLVKIGSISLKLSCAASGFTSSYSGMSWVRQYTHRDLEWVAISSGGSS
YTYPPDVKVGRFITSRDNAQNTLVQMSLSKSDTAMVYCYRHKYEGKSGFAWYG
QGTLITVSAASTKGPSVFPLPQSRSSTSESTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHPCHAPVQLQSGSLGLSSVTVPPSNFGQTQYTCVNDHKPSTNKTVDKVERKCCVEE
PPTAPPVAGVSGVFLFPKPKDITLMSRITPEVTCCVDVSHEDPEYQFNWYVDGVEV
HNAKTPRREEQFNSTFRVSVLVTVVHQDVLNGKEYCKCKVKNGLPAPIEKTSISKTK
GQPREPVFVTLPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTPM
LDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQGNQVFCSVFMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG
SGGSGGGGSPNICKCKGCKSDKNGCSCQOKLFLHREGMRQYGECLHSCPSGYG
HRAPDNMNRCARCIENEDCSRSKDACTCKCVGYFLHRRGRCFDECPDGFAPLEETME
CPE

图 1 1 B H

【 ㊦ 1 1 B J 】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-1P13重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号256)

AACCCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTCAAGG
 TGCCAGTCCAAAGCTGTTTCTTCTCTCCGGCGGGGAAAGATTCGGCGAGTACCGG
 GAATGTCTCAACTCTGCCCTCCGGGATTAACGGACAACCGCGCCTCAAGATGA
 ACCGATTCGCCAGCTCCGGCGATCGAGAATCGCATAGCTCCGCCAGCAAGGACG
 CTCTGCAATAAGTGCAAATCGGCTTCTACCTTACCGGGGACAGATGTTTGAACG
 ATGCGCGGAATGGCTTCCGCGCGCTGGAGGAGACATAGGAATCGTGGGAGGGTGG
 TGTGTGCTTCGGGATTCGGGAGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCA
 GCAGTCTCGGACCTCAACTGTTGAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCTCTCAA
 GGCTTCGGTGTACTAATTTAGCTACITTTATGAACCTGGGTGAAGCAGACGAT
 GGAAGAGGCTTGAGTGGATTGGACGTTTTAATCCTTTCAATGGTCAAACTTTCT
 ACAATCAGGAGTCAAGGGCAAGGCCACATTAACCTGTAGACAATACTCTATGA
 CGCCCACTATGGAGCTCCGGAGCTGCATCTAGGAGCTTCGAGTCTATGTTATTG
 TGAACAAGAGGAAAGGATACGACGTTTACTATGTTTGGGACTATCGGGGTCAAGG
 AACCTAGTCACCGTGTCTGACCGTAGCAACAGGGGCCACTCGGTTTCTCCCTCT
 GCACCTCTCTCAAAGGACCTTCTGGGGGACACGCGCCCTGGGCTGCTGGTCT
 AAGGACTACTTCCCGAAGCCGTGACGGTGTCGTGGAACCTAGGCGCCCTGACG
 CGCGGCTGCACACTCTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTACGAGACTCATCTCTCTCA
 GGAGCTGGTGACCGTGCCTCCAGCACTCTGGGACGACGACCTACATCTGCA
 ACGTGAATCACAAGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAT
 CTTGTGACCAAAATCACACATGCCACCGTGGCCAGCCACTGAACTCTGGGGG
 GACGCTCAGCTCTCTCTTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCG
 GACCTCTGAGGTCACTGCTGGTGGTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCTTGAGGT
 CAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGGTGGAGGTGGATAATGTCACGAACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCATACGCGACAGCTACCGTGTGTGACGGTCTCTCAACCTCT
 GCACAGGACTGGTGTATGCGAAGGATCAAGTGTGAAGTGTCTCAAACAAGC
 CTCTCCAGGCTCCATCGGAAAAACACTTCCAAGAGCAAGGGCGACGCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCTCGCCCACTCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGT
 CAGCTGTACCTGCTGTGTAAGAAGCTCTATCCAGCGACATTCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGACCGCGGAGAACTACATAAGACACCGCTCCCGTGTCTGGAC
 TCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGAAGCTCATCGTGGACAAGACAGGTGGC
 AGCAGGGGAAGCTGTTCTATGCTCCGTGATGAGGCTCTGCACAAACCTCA
 CACGCAAGAAGCGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

RSP02 (F105R/F109A), LP1-IP13重鎖IgG1 N297Gポリペプチド(配列番号257)

NPICKGCLSCSKDNGSRCQKQLFFLLRRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNR
CARGGSCDSCSKDCKTCKGVFLYLRHGRCFDECPDGAFLMEETCEVGGESG
GSGGSGGGGSEVQLQQSPELVPKGAISKICKASGYFTDYFMNWWVGKGSKLE
WIGRPNFPNGQITFYNQEFKGLATLTVDKSSAMHMLRSLTSDSAPVYACRRGY
DYVYVLDYWGQSTYVTSKASTKGPSVFLPASPKSTGGTAAAGLCLVGYDFPEPV
YVNSWAGLSTGVHTFAVPLQSSGLYSLVVYTPSSSLGTQYICNVNKHSPNTKVD
KVEPKSCDKTKHTPCPAEPLGLGGPSVFLFPFKPKDITLMISRPETVTCVVDVSHD
PEVKENVYDGVGEVNAKQTPKREEQYSTRYRVSLTVLHQDNGKGYEKCCKV
NKALPAIEKTICKAGKQRPQVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFEPSDIAWESE
SNGQENNYKTTTPVPLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

图 11 B J

【図 1 1 B I】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-1N15重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド(配列番号254)

AACCCAAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTCCAGG
 TGCCACGAAAGAGCTGTTTTCTTCTCCGGCCGGGAAGGAATGCGCGAGTACCGG
 GAATGTCTCCACTCTGCCCTTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTACATGTA
 ACCGATGCGCCAGATGTCGCCGATCGAGAACTCGCATAGCTGCCCGACAAGGAC
 CTGCTCAATAAGTGCAAGGTGCGGCTTACTCTTACCTGACCGGGGAGATGTTTGACGA
 ATGCCCGGATGGCTTGCTTCCGCCCTGTCGGAGGAGATCATGGAATGTGCTGGAGGGTGT
 TGTGTGCTCGGGATCCGGAGGCTTCGGGTGGCGGGTGGACGAGGGTCCAGCTGCA
 ACAGTCTGGAACCTAGCTTGCTGAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGATGCTGCTTAA
 GGCCTTCGATACACATCTACTGACTACTACTGAATCGGTTGAAGACAGTCACT
 GGAGAGAGCCTTGATGGATTGGACGTGTTATTCCTAGCAATGGTGGTACTAACT
 ACAACAGAAGTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGAGTAGACAANAATCCCTACCA
 CAGCCTCATTCAGCTACAACAGCTCGAGTCTGAAGAGCTTCGGGTTCTATTTCT
 TGCAAGAGGATGGACTACTGGGGTCCAGGAACCTCAGTCAACGCTCTCCAGCG
 TAGCCACAAGGGCCGACTCGGTTCTTCCCTGGCACCTCTCCAAGAGACACTCT
 GGGGGACACGCGGCCCTGGGCTGCTGGTTGCAAGGACTACTTCCCGAACCGGT
 ACGGTGTCGTGGAACTAGGCCGCTTACACGGCGGCTGACACAGCTTCCGGCT
 GTCTCAGCTCTAGGACTCTACTCCCTACGCTAGCAAGGTGGTACCGTGCCCTCA
 CGAAGTTGGGCCCCAGCACTCAATCGCAAGTCTACAAGCCGACAACA
 CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTGTGACAATACTACACATGCC
 CACCGTGCCACGACCTGAAGCTCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCTCTCTCCCC
 AAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGAACCTTGAGGTCAACATGCGTGT
 GGTGGACGTGAGACCAAGAAAGCTGAGTCAAGTTCACATGTCAGTGGAGCG
 CTGGAGGTTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGCGGAGGAGACGTACCGGACGA
 CGTACCGTGTGTCAGGCTCTACCGCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAA
 GGAGTACAGTGTCAAGGTTCTCAAACAAGCCCTCCAGGCCCTACGAGAAAC
 CATCTCAAAGCAAGGGCGCCCGAGAACCAACAGGTGTACAGCTGCCCTCCCC
 ATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAAGGTGACGCTGCTGCTGGTCAAAAG
 CTTCATCCAGCGACATTCGGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCCGAGAA
 CAACTACAAGCAACGCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTAC
 AGCAAGCTCACCGTGACAAGAGAGCTGGCAGAGGGGAAGCTTCCTCTATCTG
 TCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGACAGAAGGCTCTCCCTGT
 CTCGGGTAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-1N15重鎖IgG1 N297Gポリペプチド(配列番号255)

NPICKGCLSCSKDNKNSRCQKQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPEMDMNR
CARCRIENDCSKSKDACKTKCVGYLHRGCRFDECDFDGAPELETMECEVEGGGS
GSGSGGGGSEGVLTQSQPELVPKGA5SMCKSAQ5YITFDYMNWVKQSHGSEL
EWIGRVPSNGNTNYNQKFKFVALITVDKSLTATAYMLNLSLTSDESAVYFCARGMD
YWGPGTSVTSVSSATSGVSPFLAPSSSTSGTGAALGCKVDYFPEPVTYVSNWSA
LDSGVTHFPAVELVQSSGLYSVSVTVPSSSLGTQYTCINXHNPKSTKVDKKVPEKSC
DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEHNAKTKTPEEQGYSTGYRVSVSLTVLHQLVDNGKEYCKVSKNAPAPIE
KTKSAKQKPREQVTVLPSPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENF
YKTTTPVLDSGDSFELYSKLITVDKSRWQQGVFSCSMVMEALHNHYTQKSLSPG
K

图 11 B I

【図 1 1 B K】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-2I22重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド(配列番号258)

AACCCAAATTGCAAGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTCAACGG
 TGCCAGCAAAAGCTGTTTCTTTCTCTCCGGCGGGAAGGAATTGCGCGAGTACCGG
 GAATGTCTCCACTCTGCCCTCTCGGGGTATTACGGACAACCGCGCGCTACATGA
 ACCGATGCGCCAGATGTCGGGATCGGAGACTCGCATAGCTGCGGCAGGAAGCCG
 CTTGCATCAAGTGCAAAAGTCGGTCTACCTTCAACCGGGGACAGTGTGTTAGCA
 ATGCGCGGATGCGCTTCCGCCCTCGGAGGACAGTATGGAATGCTGGGAAGGTGG
 TGTGTGCTCGGAGTACCGGAGGCTCCGGTGGCGGTGCGACAGCGGCTCAACTGT
 AGAATCAGGTGGTGGTTTGGTCAAAACAGGTGGCTCTCGGAAGTTGTCCTGTGCT
 GCTCTGGATTTACATTCAGTGCATCGGTTATGCATCGGTTGCTGTCAGGCTCCAG
 AAGAGGGGCTGGAATGGGTGGCTCATATTAGTAGTGCAATGAGTACCTACTACT
 ATGCACACACAGTGAAGGGCGGATTCCACCTCTCCAGAGACAATGCCAAGAACA
 CCCTGTCTCAAAATGACGAGTTCTAAGGTTCTGAGGACAGACCAATGTATTACT
 TCAAGGAAGGAGGAGTTTGGTGACTACAGAAAGAATGTATGCTATGGACTACTG
 GGGTCAAGGAACCTCAGTCAACGGTCTACCGCGTACGCCAACCGGACCACTCGGT
 CTTCGCCCTTGCACCTCTTCCAAGAGCACTCTCGGGGACAGAGCCGCCCTGGGG
 TGCTGGTCAAGGACTCTTCCCGAAGCCGGTGAACGGGTGCTGGAACTCAGCG
 GCCCTGACCAGCGCGCTGCACACTCTCCCGGTGCTCTACAGTCTCAGGACTCT
 ATCTCCCTCAGCAGCGGTGTGACCGTGCCCTCCAGCAAGTCTGGGCAACCCAGACTA
 CATCTGCAACGCTGAATACAAGCCGCAACCAACAGGTTGGACAAAGAAAGTTGA
 GCGCCAAATTTGTGCACAAAATCAACATCGCCACCGTCCGCGACCACTGAACTC
 TCGGGGGACCGTGCAGTCTCTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGA
 TCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTACATGCTGTGTGGTGGAGCTGAGCCAGGAAGC
 CTGAGTCAAGTTTCAACTGTGACGTGACGTGGCGGTGGAGGTGACATAATGCCAAGA
 CAAGGCCGCGGGAAGGAGACATCGCCGAGCACTACCTGTGTGGTTCAGCGTCTCA
 CCGTCTGCACAGGACTGCTGTAATGCAAGGAGTACAAGTCAAGGCTTCCCA
 ACAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGC
 CCCGAGAAACACAGGTGTACCACTCGGCCCATCTCCGGAGGAGATGACCAAA
 ACAGGTGACGCTGACTCTCGTGGTCAAAAGGCTTCTATCCAGGCACATCGCGT
 GGAATGGGAGAGCAATGTGGCAGCGGAGAACAATCAAGACACCGCTCCCG
 TGTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTCTACAGAAGCTACCGTTGGAACAAG
 CAGGTGGCAGCAGGGAACGCTCTTCTATGCTCTGCTGTGATCATAGGCTCTGCAC
 AACCTCAAGTCAAGGAGAGCTCTCTCTGTCTCCGGGTAAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-2I22重鎖IgG1 N297Gポリペプチド(配列番号259)

NPICKGCLSCSKDNISRCQKCLFFLIRREGMROYQCECDHFLSPCSGYTHRAPDMNR
CARCIENDESCKRSDKACTCKVGYVLIHRGCRFDEGLALPEETMECEVGGGGS
GSGSGGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTSFSDYGMHWVRQAEKGL
EWVAITYSSGSSGYTADTVKGRFTISDNAKNTLFLQMTLSRSEDATMYCYCRKGGF
GDYEYSYAMDYWGQTSYVTSVSSATKSGVFPLAPSKTSNGTGAALGLVKDYDF
EPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVQLSSGLYSVSSVTPSSSLGTQYICNVNHNKPSNT
KVDKKVEKSGCDKTHTCPCPAEGLLGGPSVLFLFPFKPKDLMISRPTVTCVVDS
HEDPEVKFNWYDGEVHNNAKTPREEQYTSKTYRVSVSLTVLHQDVLNGKEYKC
KYSNKALPAPIETKTSKQKREPQVYTLPPSEMTNKNQVSLTCLVKGFYPSDIP
EWESNGQPENNYKTTPTVLDSGGSFFLYSKLTVDKRSRQQGNGFVSCSMHEALHNH
YTKSLSLSPGL

11BK

【図 1 1 B L】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-2I22重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号260)

AACCCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGG
TGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGC
GAATGTCTCCACTCTCGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGA
ACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAAGCTGCGATAGCTGCCGACGAAGGACG
CTGCACTAAGTGCAAAGTTCGGCTTCTACCTTACCAGGGGAGATGTTTGTACGA
ATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGTGG
TGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTGGCGGTGGACGCGAGGTCAACTGCA
GCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCACTGAAGATATCTGCA
GGCTTCTGGTTACTCAITTTACTGGCTACTTTATGAAGTGGTGAAGCAGAGCCAT
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTTTTAATCTTTCAATGGTCAAACTTTCT
ACAATCAGGAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAGTGTGACAAATCTCTGACA
CCGCCACATGGAAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTG
TGCAAGAAGAGGAAGGTACGACGTTTACTATGCTTCTGGAAGTGGGGTCAAGG
AACTCAGTACCGCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTCG
GACCCCTCTCCAGAGCACTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGTGTC
AAGGACTACTTCCCGAAGCGGTGACGGTGTCTGGAAGTACAGCGCCCTGACC
AGCGCGGTGACACTCTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCAAGGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAAT
CTTGTGACAAAATCACATGCCCCACCGTGCAGCAGCTGAACTCCTGGGGG
GACCGCTAGTCTTCTTCCCGCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTACATCGGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGT
CAAGTCAACTGGTACGTGCGCGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGGCC
CGGGGAGGAGCAGTACGCGACGCTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGTCTCT
GCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTTCAACAAAGC
CTTCCAGCCCTCATCGAGAAACCATCTCAAAAGCCAAGGGCAGCCCGGAGA
ACCAAGGTGTACACCTCGCCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGT
CAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGACCGGAGACAACCTAAGAGACACGCTCCGCTGGAC
TCCGAGCGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
ACGAGGGGACGCTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CAGCAGAAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-2I22重鎖IgG1 N297Gポリペプチド (配列番号261)

NPICKGCLSCSKDNGSRCQKQLFFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRA PMNR
CARCRIENCDSRSDACTKCKVGYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVGGGGS
GSGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYFTFYFMNWKVQGHGKSL
WIGRVNPNFGQTFYVNFQKFKATLTVDKSLSTAYMHLNSLTSEDSAVVYCYRREY
DYVYALDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFLLPSPKSDTLMSIRTEPTVTVVDSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
KKVEPKSKDTHITPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTVVDSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQEPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

図 1 1 B L

【図 1 1 B N】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-3E20重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号264)

AACCCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACCGG
TGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGC
GAATGTCTCCACTCTCGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGA
ACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAAGCTGCGATAGCTGCCGACGAAGGACG
CTGCACTAAGTGCAAAGTTCGGCTTCTACCTTACCAGGGGAGATGTTTGTACGA
ATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGTGG
TGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTGGCGGTGGACGCGAGGTCCAAGTGA
GCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAACTCGGGCCCTAGTGAAGATGTCCTGCA
GGCTTCTGGCTACACTTTACTAGTACTGGATGACTAGTGGTAAAACAGAGCGCT
GGACAGGGTCTGGAATGGAATGGATACATTAATCTAGCAGTGGTATGCTGAGT
ACAATCAGAAGTTCAAGTACAGGCCACATTAAGTGCAGACAATCTCCAGCA
CAGCTACATGCAACTAAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTG
TGCAAGAGAAGATTACTATAGTTTTCGACTACTATGACTACTGGGCTCAAGGA
ACCTCAGTACCGCTCTCAGCGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGTG
CACCTCTCTCAAGAGCACTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGCTGCA
AGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGCGCGCTGACCA
CGGCGTGCACACTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCTCTCAG
CAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGTCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCT
TGTGACAAAATCACATGCCCCACCTGCGCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGA
CCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAACAGGACACCTCATGATCTCCCGGA
CCCCTAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCGCG
GGGAGGAGCAGTACGGCAGCAGCTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGTCTGTC
ACCAGCTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACCAAGGCC
TCCAGACCCCATCGAGAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAAC
CACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGACGCGGAGAACCACTACAAGCACAGCCCTCCGCTGCTGGACTC
GACCGCTCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-3E20重鎖IgG1 N297Gポリペプチド (配列番号265)

NPICKGCLSCSKDNGSRCQKQLFFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRA PMNR
CARCRIENCDSRSDACTKCKVGYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVGGGGS
GSGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTFSYWIHWKVRQPGQL
EWIGYINPSSGYAEYNQKFKVRAITLADKSSSTAYMQLSLTSEDSAVVYCYRESY
SFDTYMDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFLLPSPKSDTLMSIRTEPTVTVVDSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
KKVEPKSKDTHITPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTVVDSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQEPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

図 1 1 B N

【図 1 1 B M】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-3A24重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号262)

AACCCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGG
TGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGC
GAATGTCTCCACTCTCGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGA
ACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAAGCTGCGATAGCTGCCGACGAAGGACG
CTGCACTAAGTGCAAAGTTCGGCTTCTACCTTACCAGGGGAGATGTTTGTACGA
ATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGTGG
TGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTGGCGGTGGACGCGAGGTCCAGCTGCA
ACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCTGGGGCTTCACTGAAGATGTCTCTGAA
GGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACTACATAAAGTGGGTGAGGCGAGGTCA
TGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTATTCTTACGATAAGTGGTGTAGTA
ACAACCCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATGACAGTAGACAAGATCCCTCA
GACCTCATGCACTTCAACAGCTGACTGACTGAGGACTGCGGCTTACTACTG
TGCAACCCAGCTGGGACGGTGGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGC
TAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTCGGACCCCTCTCCAAGAGCAGCTCT
GGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTGAAGGACTTCTCCCGACCGGTG
ACGGTGTCTGGAACTCAGCGCGCTGACACGCGGCTGACACCTTCCCGGT
GTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGGTGGTGGCCTGCCCTCA
GCAGTCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGGCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAATCTGTGACAAAATCAGACATGCC
CACCGTGCAGCAGCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCGGT
AAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGG
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGTTAGTGGAGCGG
GAGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCGCGGGAGGAGACGATACCGGACGA
CGTACCGTGTGGTACGCTCTTACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTCAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCTCATGAGAAAC
CATCTCCAAGGCCAAGGGGACGCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCGCT
ATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACGCTGACCTGGCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGGAGCAATGGGCGAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCTCCCGTCTGGACTCCGAGCGGCTCTTCTCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGCGGACCTGCTTCTCATGC
TCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAAGAGCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-3A24重鎖IgG1 N297Gポリペプチド (配列番号263)

NPICKGCLSCSKDNGSRCQKQLFFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRA PMNR
CARCRIENCDSRSDACTKCKVGYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVGGGGS
GSGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTIDYINWVRQSHGKSL
WIGRVNPNNGSNYNQKFKGKATLTVDKSLSTAYMHLNSLTSEDSAVVYCATQLGR
WGGGTGLTVSAASTKGPSVFLLPSPKSDTMSIRTEPTVTVVDSHEDPEVKFNWY
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS
CDTHITPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTVVDSHEDPEVKFNWY
DGVVHNKAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQEP
ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

図 1 1 B M

【図 1 1 B O】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-7B13重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号266)

AACCCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACCGG
TGCCAGCAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGCAGTACGGC
GAATGTCTCCACTCTCGCCCTCGGGGTATTACGGACACCGCGCGCTGACATGA
ACCGATGCGCCAGATGCGCGATCGAGAAGCTGCGATAGCTGCCGACGAAGGACG
CTGCACTAAGTGCAAAGTTCGGCTTCTACCTTACCAGGGGAGATGTTTGTACGA
ATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGTGG
TGGTGGCTCGGGATCCGAGGCTCCGGTGGCGGTGGACGCGAGGTCCAAGTGA
ACAATCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCTGGGGCTTCACTGAAGATGTCTGTAA
GACTTCTGGATTACATTACTGACTACTACATGAAGTGGGTGAAGCAGGGTCA
GGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCTAGCAATGATGATACATAGG
TACAATCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCCATCTGACAGTAGACAGTCTCAGCTCAGC
ACAGCTACATGCAAGCTCAACAGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGCTTACTTACT
GTACAAAGTGGTCTTACTTGAATCTGAGTCTGGGGGCAAGGCACTACTTCAAGTCT
CAGCCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCCTCTCCCAAGGAC
ACTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAA
CGGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGCGCGCTCAGCAGCGGCTGACACCTTC
CCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCTCAGCAGCGTGTGACGCTGTC
CTCCAGCAGTCTGGGACCCAGACTACTTGTGAACGTGATACAAAGCCCA
GCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAATCTGTGACAACAACTACA
CATGCCCCAGCTGCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGGACCGTCACTTCTCTCT
CCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCTCTGAGGTCACTATG
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACAGT
GACCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGACGACCGG
CAGCAGCTACCGTGTGGTACGCTCTTACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCTCATCGAG
AAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCAAGGTGTACACCTG
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCTGGT
AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGGAGTCAAGTGGGACCGG
GAGAACCACTACAAGACACGCTCCGCTGCTGGACTCCGAGCGGCTCTTCTCT
TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGGACGAGGGAACCTTCTCT
CATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAAGAGCTCTC
CTGTCTCCGGGTAAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-7B13重鎖IgG1 N297Gポリペプチド (配列番号267)

NPICKGCLSCSKDNGSRCQKQLFFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRA PMNR
CARCRIENCDSRSDACTKCKVGYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVGGGGS
GSGSGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKSTSGTFTIDYINWVRQSHGKSL
EWIGRVNPNDDTRYNQKFKGKATLTVDKSLSTAYMQLNSLTSEDSAVVYCYRWF
YFDYWGQTTTLTVSSASTKGPSVFLLPSPKSDTMSIRTEPTVTVVDSHEDPEVK
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEP
KSKDTHITPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTVVDSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNKAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
AIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

図 1 1 B O

【図 1 1 B P】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-8M24重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号268)

CAGGTTACGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCTGGGGCTTCACTG
AAGCTGCTCTGCAAGGCTTCTGGTACACCTTCACAAATATGGTATAAACTGGG
TGAAGCAGAGAACTGGACAGGCTTCTGAGTGGATTGGAGAGATTTCCTAGAA
GTGATAATACTTTCTACAATGAGAAATTCAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAG
ACAAATCTCCACACAGCGTACATGGAGTCCGACGCTGACATCTGAGGACT
CTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGGCAGGACTACGGTACTAGCCACTCTT
TGACTACTGGGGTCAAGGCACACTCTCAGAGTCTCCAGCGCTAGCACCAGGG
CCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCCAAAGACACCTCTGGGGGCACAGG
GCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGGGA
ACTCAGGCGCCTGACAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCT
AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGGATCCGGCTCCGGACATCATCATCACCATCAC

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-8M24重鎖IgG1 N297Gポリペプチド (配列番号269)

QVQLQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTFTNYGINWVKQRTGQGLEWIGEIPRSD
NTFYNEKFKGKALTADKSSITAYMELRSLTSEDSAVYFCARKGRDYGTSHYFDYW
GGGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKSNNTKVDKKVEPKSCGS
GSGHHHHHH

図 1 1 B P

【図 1 1 B Q】

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-9M16重鎖IgG1 N297Gポリヌクレオチド (配列番号270)

AACCAATTGCAAGGGATGCTTAAGCTGTAGCAAGGACAACGGATGTTACGG
TGCCAGCAAAAAGCTGTTTTCTTCTCCGGCGGGAAGGAATGCGGAGTACGGC
GAATGTCTCCACTCTGCCCCGCGGGATTACGGACACCCGCGCTGACATGA
ACCGATGCGCCAGATGCGGATCGAGAACTCGATAGCTGCCGAGCAAGGACG
CTGCACTAAGTGCAAAAGTCCGGTCTTACTCTACCCGGGGCAGATGTTTACGA
ATGCCCGGATGGCTTCGCCCCGCTGGAGGAGACTATGGAATGCGTGGAGGGTGG
TGGTGGCTCGGGATCCGGAGGCTCCGGTGGCGGTGGCAGCAGGTTCCAGCTGCA
ACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCACTGAAAGATGTCCTGTA
GGCTCTTGGATACACATTCAGTACTACTACATGAAGTGGGTGAAGCAGAGTCA
GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGCTGTTAATCCTAACAAATGGTGGTCTTCACT
ACAACAGAAATTCAGGGCAAGGCCACATTGACAGTAGACAAATCCCTCAGCA
CAGCTACATGACAGTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGCTATTACTG
TGCAAGTCAAACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCAACCTGCTTCCAG
CGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCCTCTTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCG
GTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCTGACAGCGGCTGCACACCTTCCCG
GCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGGCTGGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTCATCTGCAACGTGAATCAACAAGCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGCAAAATCACACAT
GCCCCAGGTGCCAGCCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCTTCCC
CCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACTGCGT
GGTGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCTGAGGTCAAGTCACTGGTACGTGGGA
CGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGCAAGCCGCGGGAGGAGTACGGCA
GCACGTACCGTGGTGCAGCTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAAGTGCAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGACACCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCAGCAGCATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACCAAGACACCGCTCCCGTGTGAGCTCCGACGGCTCTTCTTCTCT
TACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGAGGCTTGCACAACCTACACGAGAGAGGCTCTCC
TGTCTCCGGTAA

RSP02 (F105R/F109A)、LP1-9M16重鎖IgG1 N297Gポリペプチド (配列番号271)

NPICKGLCSKSDNGSRCQKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNR
CARCRIENCDCSRKDACTCKVGFYLHRGRFDECPDGFAPLEEMECVGGGGS
GSGGSGGGSEVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTFDYIMNWVKQSHGKSL
EWIGRVNPNNGGSNYNQKFKGKALTVDKSLSTAYMQLNSLTSEDSAVYVCASRNF
DVWGAGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKSNNTKVDKKVEPKS
CDKTHITCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図 1 1 B Q

【図 1 1 B R】

抗ASGR1重鎖ポリヌクレオチド (配列番号272)

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGCGGACTGGTGAACCCGGGGGATCCCTC
AGACTGCTCTGCGCCATCGGGTTTCACTTCTCTCTCAGCGATGCTATGGGT
CAGACAGGCCCTCGAAAGGCTCGAATGGGTGTCGGCTATCTCCGATCGGG
GGGATCTACTACTACCGCGACTCCGTGAAGGGCGGTTCACTATCTCGAGGGAC
AACTCCAAGATAACCTGTACTTGCAATGAACCTCTGCGCCGAGGATAC
GCGGTGTATTACTGCGCCAAGGACTTCAAGTCAAGCGGTTGACCTTGAAGTACT
GGGACAGGGAACCTTGTACCGTGTGAGTGTAGCACCAGGCGCCATCGG
TCTTCCCTTGGCGCCTGCTCCAGGAGCCTCCAGAGCAGCAGCGGCCCTGGG
CTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC
GCTCTGACAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTCCCTCAGCAACTCTCGGACCCAGACCTA
CACCTGCAACGTAGATCAAGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGA
GCGCAATGTGTGTCGAGTGCACCGTCCAGCAGCAGCAGTGTGGCAGGACC
GTCAGTCTTCTCTTCCCGCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACC
CCTGAGGTACAGTGTGCTGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCCGAGGTCCAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCTAATGCCAAGACAAAGCCACGG
GAGGAGCAGTTCAACAGCAGTTCGGTGTGGTACGCTCTCACCCTGTGTGAC
AGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAAGGCTCC
CAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAAACCA
AGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGTACCAAGAACCGGTGACGCT
TGACCTGCTGGTCAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGACGCGGAGAGCAACTACAGACCCAGCCTCCATGCTGGACTCCG
ACGGCTCTTCTCTCTACAGAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
GCAGAAAGACCTCTCCTGTCTCCGGTAA

抗ASGR1重鎖ポリペプチド (配列番号273)

EVQLLESGLGVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGG
STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYCAKDFSSRRWYLEYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSNFGTQTYICNVNHPKSNNTKVDKVERKCCVE
PPCAPPPVAGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIETISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPM
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

図 1 1 B R

【図 1 2】

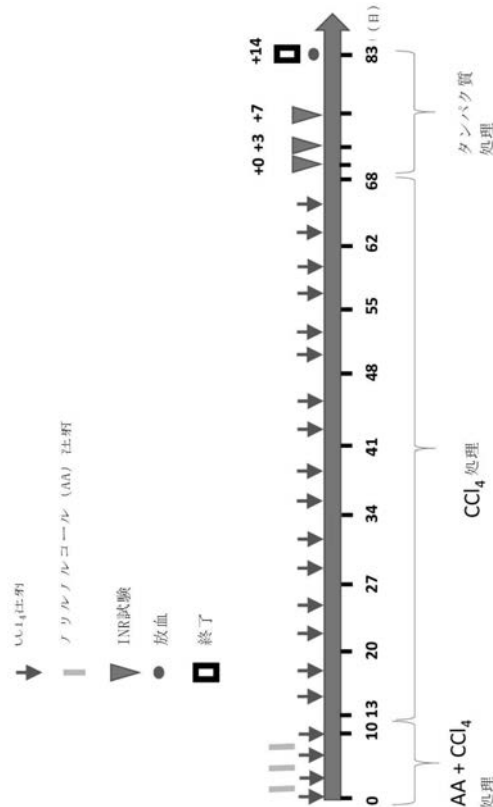


図 1 2

【図 1 3】

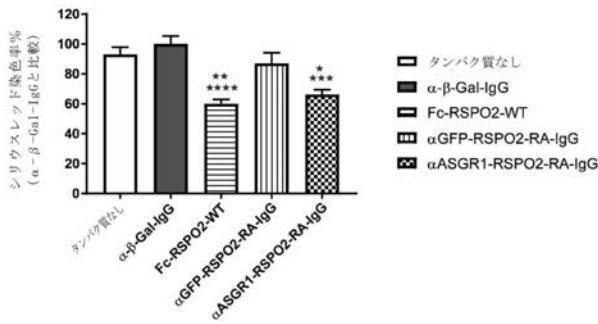
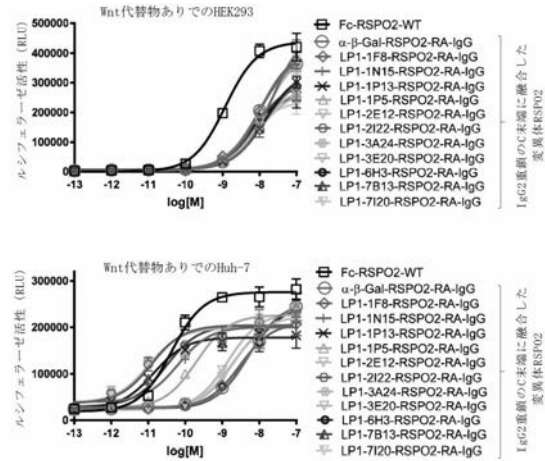


図 1 3

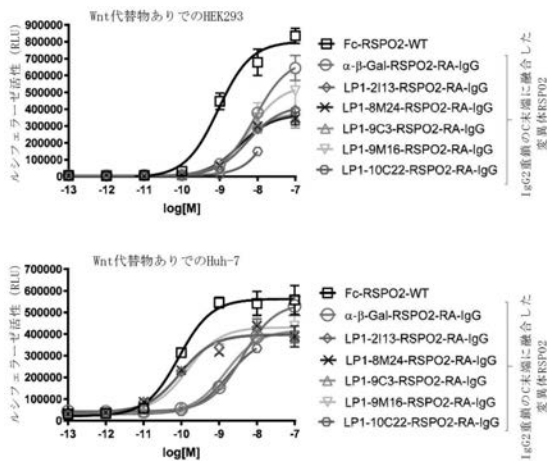
【図 1 4 A】



	HEK293		Huh-7	
	RSPO1に対するEmax %	EC50 (M)	RSPO1に対するEmax %	EC50 (M)
Fc-RSPO2-WT	100.0	1.2E-09	100.0	4.2E-11
α-β-Gal-RSPO2-RA-IgG	91.3	9.8E-09	92.0	5.4E-09
LP1-1F8-RSPO2-RA-IgG	94.1	1.0E-08	76.4	3.0E-09
LP1-1N15-RSPO2-RA-IgG	111.5	2.2E-08	72.8	6.5E-11
LP1-1P13-RSPO2-RA-IgG	78.1	1.4E-08	64.5	1.4E-11
LP1-1P5-RSPO2-RA-IgG	86.8	8.6E-09	82.1	2.0E-10
LP1-2E12-RSPO2-RA-IgG	93.7	1.5E-08	81.2	2.0E-09
LP1-2I22-RSPO2-RA-IgG	74.3	1.3E-08	74.1	1.2E-11
LP1-3A24-RSPO2-RA-IgG	62.9	9.6E-09	72.1	1.0E-11
LP1-3E20-RSPO2-RA-IgG	65.5	8.9E-09	84.0	1.4E-09
LP1-6H3-RSPO2-RA-IgG	59.9	5.0E-09	88.7	4.8E-09
LP1-7B13-RSPO2-RA-IgG	69.1	7.8E-09	74.0	3.1E-11
LP1-7I20-RSPO2-RA-IgG	54.6	4.6E-09	76.2	1.7E-09

図 1 4 A

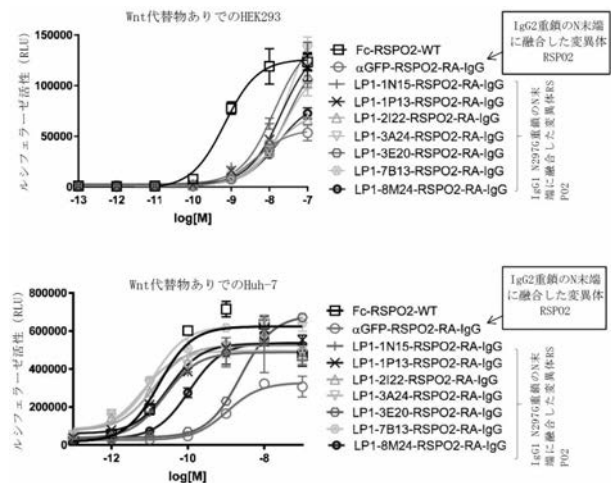
【図 1 4 B】



	HEK293		Huh-7	
	RSPO1に対するEmax %	EC50 (M)	RSPO1に対するEmax %	EC50 (M)
Fc-RSPO2-WT	148.4	9.1E-10	94.9	8.5E-11
α-β-Gal-RSPO2-RA-IgG	129.6	8.7E-09	91.8	4.1E-09
LP1-2I13-RSPO2-RA-IgG	78.2	5.6E-09	67.3	9.4E-11
LP1-8M24-RSPO2-RA-IgG	68.1	3.3E-09	66.9	9.4E-11
LP1-9C3-RSPO2-RA-IgG	70.5	3.4E-09	70.5	1.5E-09
LP1-9M16-RSPO2-RA-IgG	100.9	6.2E-09	72.8	1.5E-10
LP1-10C22-RSPO2-RA-IgG	N.D.	N.D.	65.4	1.7E-09

図 1 4 B

【図 1 4 C】



	HEK293		Huh-7	
	RSPO1に対するEmax %	EC50 (M)	RSPO1に対するEmax %	EC50 (M)
Fc-RSPO2-WT	144.7	6.752E-10	100.9	1.8E-11
αGFP-RSPO2-RA-IgG	65.3	4.399E-09	53.1	1.1E-09
LP1-1N15-RSPO2-RA-IgG	169.0	1.348E-08	78.9	2.5E-11
LP1-1P13-RSPO2-RA-IgG	163.3	2.056E-08	86.4	3.1E-11
LP1-2I22-RSPO2-RA-IgG	84.4	1.14E-08	84.7	1.3E-11
LP1-3A24-RSPO2-RA-IgG	141.0	2.49E-08	80.1	6.6E-12
LP1-3E20-RSPO2-RA-IgG	156.7	2.912E-08	110.5	2.4E-09
LP1-7B13-RSPO2-RA-IgG	210.1	3.202E-08	101.0	1.2E-11
LP1-8M24-RSPO2-RA-IgG	96.5	1.631E-08	87.0	1.1E-10

図 1 4 C

【図 1 4 D】

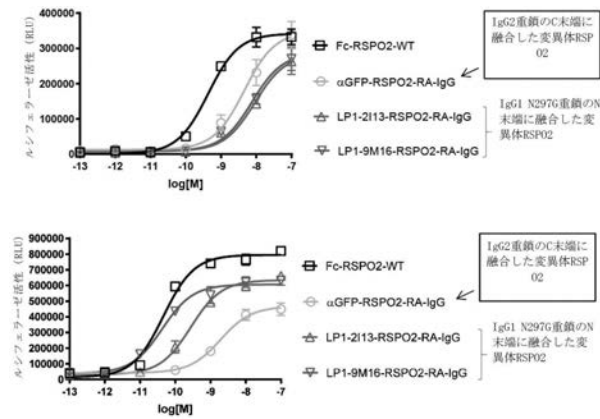


図 1 4 D

	HEK293		Huh-7	
	RSP02に対するEmax %	EC50 (M)	RSP02に対するEmax %	EC50 (M)
Fc-RSP02-WT	116.9	4.3E-10	118.8	4.6E-11
αGFP-RSP02-RA-IgG	118.9	4.6E-09	69.6	1.9E-09
LP1-2113-RSP02-RA-IgG	96.7	9.0E-09	94.8	2.7E-10
LP1-9M16-RSP02-RA-IgG	98.1	7.6E-09	90.6	4.3E-11

【図 1 5 A】

配列番号	一般名	投与量	マウス数
		mg/kg	
155, 156, 159, 160	α-p-Gal	5	3
29, 30, 272, 273	αASGR1-IgG	5	3
25-28	αGFP-RSP02-RA-IgG NG	5	3
29 - 32	αASGR1-RSP02-RA-IgG	5	3
194, 195, 254, 255	LP1-1N15-RSP02-RA-IgG	5	3
198, 199, 256, 257	LP1-1P13-RSP02-RA-IgG	5	3
210, 211, 258, 259	LP1-2113-RSP02-RA-IgG	5	2
214, 215, 260, 261	LP1-2122-RSP02-RA-IgG	5	3
218, 219, 262, 263	LP1-3A24-RSP02-RA-IgG	5	2
222, 223, 264, 265	LP1-3E20-RSP02-RA-IgG	5	3
230, 231, 266, 267	LP1-7B13-RSP02-RA-IgG	5	2
238, 239, 268, 269	LP1-8M24-RSP02-RA-IgG	5	3
246, 247, 270, 271	LP1-9M16-RSP02-RA-IgG	5	2

図 1 5 A

【図 1 5 B】

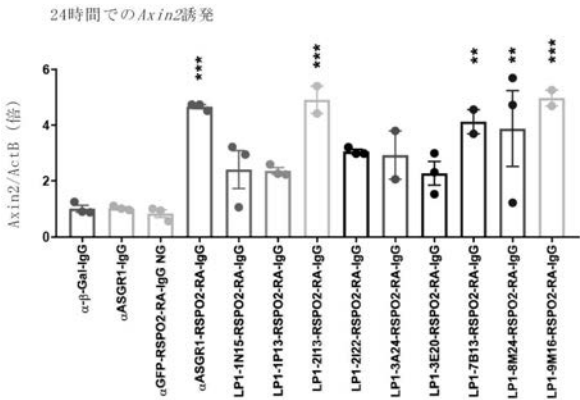


図 1 5 B

【配列表】

2021530223000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2019/041067
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/17; C07K 16/18; C07K 16/28 (2019.01) CPC - A61K 38/1709; C07K 14/47; C07K 16/18; C07K 16/28; C07K 16/2851; C07K 16/2881; C07K 16/40; C07K 2317/622; C07K 2317/71; C07K 2317/75; C07K 2319/00; C07K 2319/30 (2019.08)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 354/7.1; 424/134.1; 435/375; 435/1.1; 530/399; 530/389.2 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0240633 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 24 August 2017 (24.08.2017) entire document	1, 2, 49-51, 53
A	WO 2013/054307 A2 (NOVARTIS AG) 18 April 2013 (18.04.2013) entire document	1-3, 46-51, 53
A	WO 2017/100467 A2 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 15 June 2017 (15.06.2017) entire document	1-3, 46-51, 53
A	WO 2012/140274 A2 (KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN et al) 18 October 2012 (18.10.2012) entire document	1-3, 46-51, 53
A	WO 2015/164392 A2 (STEMCENTRX, INC.) 29 October 2015 (29.10.2015) entire document	1-3, 46-51, 53
P, A	WO 2018/140821 A1 (SURROZEN, INC.) 02 August 2018 (02.08.2018) entire document	1-3, 46-51, 53
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 18 November 2019		Date of mailing of the international search report 03 DEC 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS2019/041067

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 47, 48, and 78-117 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/041067

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-45, 54, 55
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 46-51, and 53 to the extent that they read on an anti-RNF43/anti-ASGR1 antibody of SEQ ID NOs 47, 48, 78, and 79.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/041067

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-5 and 46-53 are drawn to anti-ZNRF3/RNF43 antibodies and anti-ASGR1/ASGR2 antibodies.

The first invention of Group I+ is restricted to an anti-RNF43/anti-ASGR1 antibody, wherein the anti-RNF43 binding domain comprises a heavy chain variable region, wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:79; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:78; and wherein the anti-ASGR1 binding domain comprises a heavy chain variable region, wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:48; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:47. It is believed that claims 1-3, 46-51, and 53 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on an anti-RNF43/anti-ASGR1 antibody of SEQ ID NOs 47, 48, 78, and 79.

Applicant is invited to elect additional anti-ZNRF3/RNF43 antibodies and anti-ASGR1/ASGR2 antibodies, each with specified SEQ ID NOs for each heavy chain variable region and light chain variable region of each antigen-binding domain, to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be an anti-RNF43/anti-ASGR1 antibody, wherein the anti-RNF43 binding domain comprises a heavy chain variable region, wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:81; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:80; and wherein the anti-ASGR1 binding domain comprises a heavy chain variable region, wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:50; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:49. Additional anti-ZNRF3/RNF43 antibodies and anti-ASGR1/ASGR2 antibodies will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for binding ZNRF3 or RNF43, ASGR1, and/or ASGR2, requiring the selection of alternatives for the heavy chain variable region and light chain variable region of each antigen-binding domain, where "[the] isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to a RNF43 or a ZNRF3 polypeptide, comprising a sequence comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences set forth for any of the antibodies of Table 2A; and/or (ii) CDRL1, CDRL2 and CDRL3 sequences set forth for any of the antibodies of Table 2A, or a variant of said antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one or more amino acid modifications, wherein said variant comprises less than 8 amino acid substitutions in said CDR sequences" and "[the] isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to an ASGR1 or ASGR2 polypeptide, comprising a sequence comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences set forth for any of the antibodies of Table 3A; and/or (ii) CDRL1, CDRL2 and CDRL3 sequences set forth for any of the antibodies of Table 3A, or a variant of said antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one or more amino acid modifications, wherein said variant comprises less than 8 amino acid substitutions in said CDR sequences".

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of A tissue-specific Wnt signal enhancing molecule, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, comprising a first domain that specifically binds one or more transmembrane E3 ubiquitin ligases selected from Zinc and Ring Finger 3 (ZNRF3) and Ring Finger Protein 43 (RNF43), and a second domain that specifically binds asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1) and/or asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2), wherein: (a) the first domain comprises an antibody or antigen-binding fragment thereof comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences; and/or (ii) CDRL1, CDRL2 and CDRL3 sequences, or a variant of said antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one or more amino acid modifications, wherein said variant comprises less than 8 amino acid substitutions in said CDR sequences; and/or (b) the second domain comprises an antibody or antigen-binding fragment thereof comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences; and/or (ii) CDRL1, CDRL2 and CDRL3 sequences, or a variant of said antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one or more amino acid modifications, wherein said variant comprises less than 8 amino acid substitutions in said CDR sequences; an isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to a RNF43 or a ZNRF3 polypeptide, comprising a sequence comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences; and/or (ii) CDRL1, CDRL2 and CDRL3 sequences, or a variant of said antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one or more amino acid modifications, wherein said variant comprises less than 8 amino acid substitutions in said CDR sequences; an isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to an ASGR1 or ASGR2 polypeptide, comprising a sequence comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences; and/or (ii) CDRL1, CDRL2 and CDRL3 sequences, or a variant of said antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one or more amino acid modifications, wherein said variant comprises less than 8 amino acid substitutions in said CDR sequences; an antibody comprising a heavy chain variable region or a light chain variable region comprising an amino acid sequence, or a fragment or variant thereof; these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2013/054307 A2 to Novartis Ag discloses a tissue-specific Wnt signal enhancing molecule, or a pharmaceutically acceptable salt thereof ([the] invention provides for the modulation of ZNRF3 or RNF43 activity by antibody binding to the extracellular domain of ZNRF3 or RNF43 proteins on the surface of a eukaryotic cell to increase Wnt signaling in the eukaryotic cell, Para. [0010]; bispecific antibody, Para. [0012]; [examples of damaged tissue that can be treated using methods of the invention include, but are limited to, intestinal tissue, Para. [00183]], comprising a first domain that specifically binds one or more transmembrane E3 ubiquitin ligases selected from Zinc and Ring Finger 3 (ZNRF3) and Ring Finger Protein 43 (RNF43) ([antibodies that bind to the extracellular

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/041067

domain of ZNRF3 and RNF43 to inhibit the function of ZNRF3 and RNF43 will sensitize cells to Wnt signaling, Para. [00183]; a bispecific antibody ... part of the antibody binds to the extracellular domain of ZNRF3, Para. [00121], wherein: (a) the first domain comprises an antibody or antigen-binding fragment thereof comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences (a HCDR2 cassette in the form of polynucleotides with random sequences in of a length that could code for an HCDR2 region... HCDR1, Para. [0078]; differs from the HCDR3 of the heavy chain of the variants of Ab2, Para. [0080]); an isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to a RNF43 or a ZNRF3 polypeptide ([a]n isolated antibody, Claim 1; an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals, Para. [00109]; The invention provides for the modulation of ZNRF3 or RNF43 activity by antibody binding to the extracellular domain of ZNRF3 or RNF43 proteins on the surface of a eukaryotic cell to increase Wnt signaling in the eukaryotic cell, Para. [0010]), comprising a sequence comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences (a HCDR2 cassette in the form of polynucleotides with random sequences in of a length that could code for an HCDR2 region... HCDR1, Para. [0078]; differs from the HCDR3 of the heavy chain of the variants of Ab2, Para. [0080]); an antibody comprising a heavy chain variable region or a light chain variable region comprising an amino acid sequence, or a fragment or variant thereof (heavy chains of the variants of Ab2, Para. [0081]).

WO 2017/100467 A2 to Regeneron Pharmaceuticals, Inc. discloses an antigen-binding domain that specifically binds asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1) and/or asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2) (a bispecific antibody, Para. [0015]; the antigen-binding protein is any protein that can bind to one or more internalization effectors... the antigen-binding protein is... an antibody, Para. [0015]; the internalization effector is... ASGR1, ASGR2, Para. [0016]), an isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to an ASGR1 or ASGR2 polypeptide (the antigen-binding protein is any protein that can bind to one or more internalization effectors... the antigen-binding protein is... an antibody, Para. [0015]; an isolated complementarity determining region, Para. [0093]), comprising a sequence comprising: (i) CDRH1, CDRH2 and CDRH3 sequences (heavy chain CDRs may be abbreviated as HCDR1, HCDR2 and HCDR3, Para. [0070]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 P 43/00	1 0 1
	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	A 6 1 P 43/00	1 0 7

(31)優先権主張番号 62/822,731

(32)優先日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ジャン, ゼンジャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント ブールバード 1 7 1, スイート 4 0 0, スロゼン, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 リー, ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント ブールバード 1 7 1, スイート 4 0 0, スロゼン, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 イェー, ウェン-チェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポ

イント ブールバード 171, スイート 400, スロゼン, インコーポレイテッド 気
付

(72)発明者 ユアン, トム ジェ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポ
イント ブールバード 171, スイート 400, スロゼン, インコーポレイテッド 気
付

(72)発明者 バリボルト, ヘレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポ
イント ブールバード 171, スイート 400, スロゼン, インコーポレイテッド 気
付

(72)発明者 ライ, クオーパウ (ジミー)

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポ
イント ブールバード 171, スイート 400, スロゼン, インコーポレイテッド 気
付

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA01 AA02 AA13 BA44 BA50 CA18 MA02 MA52 MA55 MA65

NA05 NA14 ZA751 ZA752 ZB211 ZB212 ZB221 ZB222 ZC75

4C085 AA13 AA14 BB11 CC01 CC08 CC21 DD23 DD31 DD62 EE03

EE06 GG01 GG03 GG08

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA05 MA52 MA55 MA65 NA05

NA14 ZA75 ZB21 ZB22 ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 BB65 BC83 CA12 MA02 MA52 MA55

MA65 NA05 NA14 ZA75 ZB21 ZB22 ZC75

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20

FA72 FA74 GA22 GA26