

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7514846号
(P7514846)

(45)発行日 令和6年7月17日(2024.7.17)

(24)登録日 令和6年7月3日(2024.7.3)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	Z N A	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
	A 6 1 P 1/16		
請求項の数 8 (全115頁)			

(21)出願番号	特願2021-542311(P2021-542311)	(73)特許権者	508000700 シンガポール・ヘルス・サービシーズ・ ピーティーイー・リミテッド シンガポール・1 6 8 5 8 2・シンガポ ール・アウトラム・コミュニティ・ホス ピタル・# 1 9 - 0 1・ホスピタル・ブ ールヴァード・1 0
(86)(22)出願日	令和2年1月21日(2020.1.21)	(73)特許権者	507335687 ナショナル ユニヴァーシティー オブ シンガポール シンガポール・1 1 9 0 7 7・シンガポ ール・ローワー・ケント・リッジ・ロー ド・2 1
(65)公表番号	特表2022-518251(P2022-518251 A)	(74)代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍
(43)公表日	令和4年3月14日(2022.3.14)		
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/051332		
(87)国際公開番号	WO2020/152122		
(87)国際公開日	令和2年7月30日(2020.7.30)		
審査請求日	令和5年1月20日(2023.1.20)		
(31)優先権主張番号	1900811.9		
(32)優先日	平成31年1月21日(2019.1.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		
(31)優先権主張番号	1907839.3		
(32)優先日	令和1年6月3日(2019.6.3)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝毒性の治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制する薬剤を有効成分として含有することを特徴とする、薬物誘発性肝障害 (DILI) の治療または予防用医薬品であって

前記薬剤が、(i) IL-11媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合断片、(ii) IL-11媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11R アンタゴニスト抗体もしくはその抗原結合断片、(iii) IL-11のデコイ受容体、(iv) W147A置換を有するIL-11のムテイン、(v) IL-11標的siRNAおよび(vi) IL-11R 標的siRNAからなる群から選択される、医薬品。

【請求項 2】

前記IL-11のデコイ受容体が、(i) gp130のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列と、(ii) IL-11R のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列とを含む、請求項1に記載の医薬品。

【請求項 3】

前記IL-11標的siRNAが、配列番号12、13、14または15の配列を含む、請求項1または2に記載の医薬品。

【請求項 4】

前記IL-11R 標的siRNAが、配列番号16、17、18または19の配列を含む、請求項1または2に記載の医薬品。

【請求項 5】

前記薬物誘発性肝障害 (DILI) が、アセトアミノフェン (APAP) 誘発性肝毒性である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬品。

【請求項 6】

N - アセチルシステインと組み合わせて使用される、請求項 5 に記載の医薬品。

【請求項 7】

インターロイキン 11 (IL-11) または IL-11 受容体 (IL-11R) の発現がアップレギュレートされている対象に前記医薬品が投与されるように用いられる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬品。

【請求項 8】

インターロイキン 11 (IL-11) またはインターロイキン 11 受容体 (IL-11R) の発現がアップレギュレートされていることが判明している対象に前記医薬品が投与されるように用いられる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願は、2019年1月21日に出願された英国特許公開第1900811.9号、2019年6月3日に出願された英国特許公開第1907839.3号および2019年10月17日に出願された英国特許公開第1915003.6号の優先権を主張するものであり、これらの文献に記載の内容および構成要素は、本明細書の一部を構成するものとして引用によりあらゆる目的で援用される。

【0002】

本発明は、肝毒性に関連する疾患および状態の診断、治療および予防に関する。

【背景技術】**【0003】**

肝毒性とは、肝臓への中毒性障害を指し、特に、肝臓内の肝細胞の機能障害および死滅のことを指す。肝毒性は化学物質を原因とすることが多く、例えば、薬物、化学物質（例えばアルコール）、ハーブ系サプリメントまたは栄養サプリメントにより肝損傷または肝障害が起こる。また、感染症（例えば肝炎ウイルスによるものなど）、栄養失調または遺伝子疾患によっても肝毒性が起こることがある。

【0004】

鎮痛剤であるアセトアミノフェン (APAP、N - アセチル - p - アミノフェノールまたはパラセタモールとも呼ぶ) は、発熱や軽度から中程度の疼痛を緩和するために一般に使用されている。アセトアミノフェンの過剰摂取は、肝障害の原因としてよく見られ、米国では毎年、最多で80,000件の救急外来、2500件の入院および500件の致命的な中毒症が起こっている (Lee WM. Hepatology (2004) 40(1):6-9; Budnitz DS et al. Am J Prev Med (2011) 40(6):585-92)。さらに、低用量のアセトアミノフェンの慢性使用により肝障害が起こることがあり、特に、慢性飲酒 (アルコール中毒)、絶食、栄養失調、HIV感染症、肝炎ウイルス感染症、がん、薬物相互作用などのその他の素因がある場合に肝障害が起こる (McClain et al., Curr. Gastroenterol. Rep. 1999;1:42-49)。

【0005】

アセトアミノフェン誘発性肝毒性の病態生理は、ここ数年にわたり広範囲に研究されている。アセトアミノフェンの摂取による肝臓の損傷は、この薬物自体の作用によるものではなく、その毒性代謝物であるN - アセチル - p - ベンゾキノニンイミン (NAPQI) によって起こり、この代謝物は、肝臓内のシトクロムP450酵素群により生成される。NAPQIは、正常な状態では無害であり、内在性グルタチオンと抱合して生体から排出される。しかし、アセトアミノフェンの過剰摂取では、シトクロムP450 (CYP450) (主にCYP2E1アイソフォーム) によりアセトアミノフェンが生体内変化を受けるものの、グルタチオンが欠乏することによって、NAPQIが過剰に蓄積される。この結果、肝細胞障害が発生し、肝細胞死が増加する (Jollow et al., J Pharmacol Exp Ther, 1973 Oct; 187(1):195

10

20

30

40

50

-202; Dahlin et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1984 Mar; 81(5):1327-31; Moore et al., The Journal of Biological Chemistry Vol. 260. No.24, October 25, pp, 13035-13040, 1985; Kyle et al., Biochemical Pharmacology Volume 40, issue 6, 15 September 1990)。N - アセチルシステインの投与により肝臓内のグルタチオンを補充することができ、これによって、肝障害を抑制することができる。さらなる治療アプローチおよび予防アプローチが必要とされている。

【 0 0 0 6 】

サイトカインの一種であるインターロイキン11 (IL-11) は、アセトアミノフェンにより誘発される肝損傷および肝毒性に対して保護効果を有することが報告されている (Trepicchio WL et al., Toxicol Pathol. 2001; 29(2):242-9; Nishina T et al., J Biol Chem. 2017; 292(1): 205-216)。IL-11などのサイトカインによりSTAT3経路を活性化すると、肝再生を担う原理として重要な肝細胞の代償性増殖を誘導できることが示されており、IL-11の投与は、その他のSTAT3活性化サイトカインのなかでも、APAPの毒性に対する治療アプローチとなることが示唆されている (Muhl H, Front Immunol. 2016 2;7:163)。また、Nishina T et al., Sci Signal. 2012; 5(207):ra5では、IL-11が、酸化ストレスと肝細胞の代償性増殖の間の機能的関係を仲介することが報告されており、IL-11受容体アゴニストが、アセトアミノフェン誘発性肝障害の発生時に肝細胞の増殖を増強し、酸化ストレスを緩和することが見出されている。

10

【 0 0 0 7 】

IL-11で処置することによって、肝虚血/再灌流障害 (IRI)、慢性C型肝炎に関連する免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) (HpC-ITP)、急性内毒素血症、T細胞媒介性肝障害などの、その他の肝臓疾患の予防および/または治療を行えることが報告されている (Yu J et al., Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2016; 40(5):562-570; Zhu M et al., PLoS ONE 10(5): e0126296; Fontana V et al., Acta Haematol. 2008;119(2):126-32; Maeshima et al., Shock (2004) 21(2):134-8; Bozza et al., Hepatology (1999) 30(6):1441-7)。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

肝損傷に対するIL-11の保護効果が報告されていることとは対照的に、本発明は、IL-11のシグナル伝達を抑制することにより、肝毒性および肝毒性に関連する障害、疾患または状態の治療および/または予防を行うことに関する。

30

【 0 0 0 9 】

本発明の一態様において、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療方法または予防方法において使用するための、インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を提供する。

【 0 0 1 0 】

本発明の別の態様において、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療方法または予防方法において使用するための医薬品の製造における、インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の使用を提供する。

40

【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様において、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を治療または予防する方法であって、治療を必要とする対象に、インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、インターロイキン11受容体 (IL-11R) へのインターロイキン11 (IL-11) の結合を阻止または低減することができる薬剤である。

【 0 0 1 3 】

50

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、インターロイキン11 (IL-11) またはインターロイキン11受容体 (IL-11R) に結合することができる。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、抗体またはその抗原結合断片、ポリペプチド、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、アプタマーおよび小分子からなる群から選択される。前記薬剤は、抗体またはその抗原結合断片であってもよい。前記薬剤は、デコイ受容体であってもよい。

【0014】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11 媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11 アンタゴニスト抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11 媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11R アンタゴニスト抗体またはその抗原結合断片である。

【0015】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11のデコイ受容体である。いくつかの実施形態において、前記IL-11のデコイ受容体は、(i) gp130のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列と、(ii) IL-11R のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列とを含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11のムテインである。いくつかの実施形態において、前記IL-11のムテインは、W147A置換を有するムテインである。

【0017】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、インターロイキン11 (IL-11) またはインターロイキン11受容体 (IL-11R) の発現を阻止または低減することができる。前記薬剤は、オリゴヌクレオチドであってもよく、小分子であってもよい。

【0018】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11の発現を阻止または低減することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、IL-11の発現を阻止または低減することができる前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号12、13、14または15の配列を含むIL-11標的siRNAである。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11R の発現を阻止または低減することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、IL-11R の発現を阻止または低減することができる前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号16、17、18または19の配列を含むIL-11R 標的siRNAである。

【0019】

本明細書で提供する実施形態において、前記インターロイキン11受容体は、IL-11R であるか、IL-11R を含む。

【0020】

本明細書で提供する実施形態において、前記薬剤は、肝毒性の原因の発生前、その発生と同時に、またはその発生後に投与してもよく、例えば、肝毒性誘発性薬物の投与もしくは摂取の前もしくは肝毒性誘発性の環境要因への曝露の前、それらと同時に、またはそれらの後に投与してもよい。

【0021】

本明細書で提供する実施形態において、肝毒性に関連する障害、疾患または状態は、肝毒性が病理学的に関与する疾患である。

【0022】

いくつかの実施形態において、肝毒性が病理学的に関与する疾患は、薬物誘発性肝障害 (DILI)、急性肝障害 (ALI)、急性肝不全、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝損傷、肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、肝虚血再灌流障害 (IRI)、温虚血再灌流 (WIR)、放射線誘発性肝疾患 (RILD)、薬物誘発性特異体質性肝障害 (IDILI)、自己免疫性肝障害、胆汁うっ滞性肝疾患、HIVおよびがんから選択される。

【0023】

実施形態において、本明細書に記載の薬剤、使用および方法は、薬物誘発性肝障害 (DI

10

20

30

40

50

LI)の予防および/または治療を目的として提供される。薬物誘発性肝障害(DILI)は、内因性肝毒性および/または特異体質性肝毒性であってもよい。実施形態において、本明細書に記載の薬剤、使用および方法は、アセトアミノフェン(APAP)誘発性肝毒性の予防および/または治療を目的として提供される。いくつかの実施形態において、前記方法は、N-アセチルシステインで処置することをさらに含む。

【0024】

実施形態において、前記治療方法または予防方法は、インターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現がアップレギュレートされている対象に前記薬剤を投与することを含む。

【0025】

実施形態において、前記治療方法または予防方法は、インターロイキン11(IL-11)またはインターロイキン11受容体(IL-11R)の発現がアップレギュレートされていることが判明している対象に前記薬剤を投与することを含む。

【0026】

いくつかの実施形態において、前記治療方法または予防方法は、インターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現が対象においてアップレギュレートされているか否かを判定すること、およびインターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現がアップレギュレートされている対象に前記薬剤を投与することを含む。

【0027】

また、インターロイキン11(IL-11)媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療または予防に対する対象の適性を判定する方法であって、インターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現が対象においてアップレギュレートされているか否かを(インピトロで)判定することを含む方法を提供する。

【0028】

さらに、インターロイキン11(IL-11)媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療または予防を行う対象を選択する方法であって、インターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現が対象においてアップレギュレートされているか否かを(インピトロで)判定することを含む方法を提供する。

【0029】

一態様において、対象において肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を診断するか、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクを対象において診断する方法であって、対象から得られた試料において、インターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現がアップレギュレートされているか否かを(インピトロで)判定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、この診断方法は、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している疑いのある対象において、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の診断を確認する方法である。いくつかの実施形態において、前記診断方法および/または前記診断を確認する方法は、インターロイキン11(IL-11)媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療を行う対象を選択することを含む。

【0030】

さらに、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している対象、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している疑いのある対象に予後を提供する方法であって、前記対象から得られた試料において、インターロイキン11(IL-11)またはIL-11受容体(IL-11R)の発現がアップレギュレートされているのか否かを(インピトロで)判定すること、およびこの判定に基づいて、インターロイキン11(IL-11)媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いて前記対象を治療した場合の予後を提供することを含む方法を提供する。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態において、この予後の提供方法は、インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療を行うことを目的として、インターロイキン11 (IL-11) またはIL-11受容体 (IL-11R) の発現がアップレギュレートされていることが確認された対象を選択することを含む。

【0031】

別の一態様において、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を診断するか、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクを診断する方法であって、IL-11もしくはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションまたはIL-11媒介性シグナル伝達のアップレギュレーションを予測する1つ以上の遺伝因子を対象において (インビトロで) 測定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、この方法は、インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療を行う対象を選択することを含む。

10

【0032】

また、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している対象、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している疑いのある対象に予後を提供する方法であって、IL-11もしくはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションまたはIL-11媒介性シグナル伝達のアップレギュレーションを予測する1つ以上の遺伝因子を対象において (インビトロで) 測定することを含む方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

20

【0033】

例えば、薬物誘発性肝障害 (DILI) を原因とする肝毒性などの肝毒性の効果的な予防および治療が依然として必要とされている。肝毒性の一般的な原因として、アセトアミノフェン (APAP) の過剰摂取による肝損傷がある。

【0034】

サイトカインの一種であるIL-11は、APAP誘発性肝障害に対する保護効果、より一般的には肝毒性に対する保護効果を有することが繰り返し報告されている。これに対して、本発明者らは、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することにより、APAP誘発性肝毒性を効果的に緩和することができ、このことから肝毒性を治療するための新規治療アプローチおよび/または予防アプローチを提供できることを見出した。

30

【0035】

インターロイキン11およびIL-11受容体

脂肪細胞化抑制因子としても知られているインターロイキン11 (IL-11) は多形質発現性サイトカインであり、IL-6、IL-11、IL-27、IL-31、オンコスタチン、白血病抑制因子 (LIF)、カルジオトロフィン - 1 (CT-1)、カルジオトロフィン様サイトカイン (CLC)、毛様体神経栄養因子 (CNTF) およびneuropoetin (NP-1) を含むIL-6サイトカインファミリーのメンバーである。

【0036】

インターロイキン11 (IL-11) は、様々な間葉系細胞において発現される。IL-11のゲノム配列は、7番染色体の動原体領域と19番染色体にマッピングされており、IL-11を細胞から効率的に分泌させる古典的シグナルペプチドが付加された状態で転写される。IL-11遺伝子のプロモーター配列内にあるアクチベータータンパク質複合体 (cJun/AP-1) は、IL-11の基礎転写調節に重要である (Du and Williams., Blood 1997, Vol 89: 3897-3908)。ヒトIL-11の前駆体は199個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、成熟型のIL-11は178個のアミノ酸残基からなるタンパク質である (Garbers and Scheller., Biol. Chem. 2013; 394(9):1145-1161)。ヒトIL-11のアミノ酸配列はUniProtアクセス番号P20809 (P20809.1 GI:124294; 配列番号1) から入手可能である。組換えヒトIL-11 (オペレルベキン) も市販されている。その他の生物種由来のIL-11のいくつか、例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、硬骨魚の数種、霊長類などのIL-11もクローニングされており、その配列が決定されている。

40

50

【0037】

本明細書において、IL-11は、あらゆる生物種由来のIL-11を指し、あらゆる生物種から得られたIL-11のアイソフォーム、断片、バリエーションまたはホモログを含む。好ましい実施形態において、この生物種はヒト（ホモ・サピエンス）である。IL-11のアイソフォーム、断片、バリエーションまたはホモログは、所定の生物種（例えばヒト）に由来するIL-11前駆体または成熟型IL-11のアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%のアミノ酸配列同一性を有することを特徴としてもよい。IL-11のアイソフォーム、断片、バリエーションまたはホモログは、（好ましくは同じ生物種由来の）IL-11R と結合することにより、IL-11R およびgp130を発現する細胞のシグナル伝達を刺激することができる能力（例えばCurtis et al. Blood, 1997, 90(11)またはKarpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80に記載されているような能力）を特徴としてもよい。IL-11断片の長さは、どのような長さ（アミノ酸長）であってもよいが、成熟型IL-11の長さの少なくとも25%であってもよく、最長で成熟型IL-11の長さの50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%であってもよい。IL-11断片の長さは、最短で10アミノ酸長であってもよく、最長で15アミノ酸長、20アミノ酸長、25アミノ酸長、30アミノ酸長、40アミノ酸長、50アミノ酸長、60アミノ酸長、70アミノ酸長、80アミノ酸長、90アミノ酸長、100アミノ酸長、110アミノ酸長、120アミノ酸長、130アミノ酸長、140アミノ酸長、150アミノ酸長、160アミノ酸長、170アミノ酸長、180アミノ酸長、190アミノ酸長または195アミノ酸長であってもよい。

10

20

【0038】

IL-11は、普遍的に発現される糖タンパク質130（gp130；糖タンパク質130、IL-6ST、IL-6- またはCD130としても知られている）のホモダイマーを介してシグナルを伝達する。gp130は膜貫通タンパク質であり、IL-6受容体ファミリーと会合することによってI型サイトカイン受容体を形成する受容体サブユニットである。特異性は個々のインターロイキン11受容体 サブユニット（IL-11R ）によって発揮される。IL-11 受容体はシグナル伝達に直接関与はしないものの、 受容体にサイトカインが結合すると、gp130と会合して最終的な複合体を形成する。

【0039】

ヒトgp130（22個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを含む）は、918個のアミノ酸からなるタンパク質であり、その成熟形態は866個のアミノ酸からなり、597個のアミノ酸からなる細胞外ドメイン、22個のアミノ酸からなる膜貫通ドメインおよび277個のアミノ酸からなる細胞内ドメインを含む。ヒトgp130の細胞外ドメインは、gp130のサイトカイン結合モジュール（CBM）を含む。gp130のCBMは、Ig様ドメインD1と、gp130のフィブロネクチンIII型ドメインD2およびD3とを含む。ヒトgp130のアミノ酸配列は、UniProtアクセッション番号P40189-1（配列番号2）から入手可能である。

30

【0040】

ヒトIL-11R は422個のアミノ酸からなるポリペプチド（UniProt Q14626；配列番号3）であり、マウスIL-11R と約85%のヌクレオチド配列同一性およびアミノ酸配列同一性を有する。IL-11R は、細胞内ドメインが異なる2種のアイソフォームが存在することが報告されている（DuおよびWilliams, 上掲）。IL-11受容体 鎖（IL-11R ）は、IL-6受容体 鎖（IL-6R ）と構造および機能の面で多くの類似点がある。IL-11R とIL-6R の細胞外ドメインは24%のアミノ酸同一性を有し、特徴的なTrp-Ser-X-Trp-Ser（WSXWS）保存モチーフを含む。IL-11R とIL-6 の短い細胞内ドメイン（34アミノ酸長）には、JAK/STATシグナル伝達経路の活性化に必要とされるBox1領域およびBox2領域が含まれていない。

40

【0041】

マウスIL-11の受容体結合部位はマッピングされており、3つの部位（部位I、部位IIおよび部位III）が同定されている。部位II領域の置換や部位III領域の置換によって、gp130への結合力が低下する。部位III変異は検出可能なアゴニスト活性を示さず、IL-11R

50

に対してアンタゴニスト活性を示す (Cytokine Inhibitors Chapter 8; Gennaro Ciliberto, Rocco Savino共編、Marcel Dekker, Inc. 2001)。

【0042】

本明細書において、IL-11受容体 (IL-11R) は、IL-11に結合可能なポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指す。いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、IL-11に結合することができ、かつIL-11受容体を発現する細胞においてシグナル伝達を誘導することができる。

【0043】

IL-11受容体は、どのような生物種に由来するものであってもよく、あらゆる生物種から得られたIL-11受容体のアイソフォーム、断片、バリエーションまたはホモログを含む。好ましい実施形態において、この生物種はヒト (ホモ・サピエンス) である。

【0044】

いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、IL-11R であってもよく、IL-11R を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、IL-11R を含むポリペプチド複合体であってもよい。いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、gp130であってもよく、gp130を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、gp130を含むポリペプチド複合体であってもよい。いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、IL-11R およびgp130を含むポリペプチド複合体であってもよい。いくつかの実施形態において、IL-11受容体は、IL-11が結合するgp130またはgp130含有複合体であってもよい。

【0045】

IL-11R のアイソフォーム、断片、バリエーションまたはホモログは、所定の生物種 (例えばヒト) に由来するIL-11R のアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%のアミノ酸配列同一性を有することを特徴としてもよい。IL-11R のアイソフォーム、断片、バリエーションまたはホモログは、(好ましくは同じ生物種由来の) IL-11と結合することにより、IL-11R およびgp130を発現する細胞のシグナル伝達を刺激する能力 (例えばCurtis et al. Blood, 1997, 90(11)またはKarpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80に記載されているような能力) を特徴としてもよい。IL-11受容体の断片の長さは、どのような長さ (アミノ酸長) であってもよいが、成熟型IL-11R の長さの少なくとも25%であってもよく、最長で成熟型IL-11R の長さの50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%であってもよい。IL-11受容体の断片の長さは、最短で10アミノ酸長であってもよく、最長で15アミノ酸長、20アミノ酸長、25アミノ酸長、30アミノ酸長、40アミノ酸長、50アミノ酸長、100アミノ酸長、110アミノ酸長、120アミノ酸長、130アミノ酸長、140アミノ酸長、150アミノ酸長、160アミノ酸長、170アミノ酸長、180アミノ酸長、190アミノ酸長、200アミノ酸長、250アミノ酸長、300アミノ酸長、400アミノ酸長または415アミノ酸長であってもよい。

【0046】

IL-11のシグナル伝達

IL-11は、低い親和性 ($K_d = \text{約} 10 \text{nmol/L}$) でIL-11R に結合し、これらの結合パートナー間での相互作用のみでは生体シグナルを伝達することはできない。高い親和性 ($K_d = \text{約} 400 \sim 800 \text{pmol/L}$) で結合してシグナルを伝達できる受容体の形成には、IL-11R とgp130の共発現が必要とされる (Curtis et al Blood 1997; 90 (11):4403-12; Hilton et al., EMBO J 13:4765, 1994; Nandurkar et al., Oncogene 12:585, 1996)。細胞表面のIL-11R にIL-11が結合すると、ヘテロ二量体化、チロシンのリン酸化、gp130の活性化および下流のシグナル伝達が誘導され、このシグナル伝達は、主として、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) カスケードおよびヤヌスキナーゼ/シグナル伝達兼転写活性化因子 (Jak/STAT) 経路を介して行われる (GarbersおよびScheller、上掲)。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

さらに、原則として、可溶性IL-11R はIL-11と結合して生物学的に活性な可溶性複合体を形成することができることから (Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122)、IL-6と同様に、IL-11は、細胞表面のgp130に結合する前に、可溶性IL-11R に結合する場合があると考えられる (GarbersおよびScheller, 上掲)。Curtisら (Blood 1997 Dec 1; 90 (11):4403-12) は、可溶性マウスIL-11受容体 鎖 (sIL-11R) を発現させて、gp130発現細胞におけるシグナル伝達を検討したことを報告している。この研究では、gp130は存在するが、膜貫通型IL-11Rが存在しない条件下において、膜貫通型IL-11Rを介したシグナル伝達と同様に、可溶性IL-11Rによって、IL-11依存性のM1白血病細胞の分化とBa/F3細胞の増殖、および初期の細胞内事象 (gp130、STAT3およびSHP2のリン酸化など) が誘導されたことが報告されている。可溶性IL-11R に結合したIL-11による膜結合型gp130を介したシグナル伝達の活性化が、近年実証されている (Lokau et al., 2016 Cell Reports 14, 1761-1773)。このいわゆるIL-11のトランスシグナル伝達は、疾患の発生病序に重要である可能性があるが、ヒト疾患におけるその役割はさらなる研究が待たれる。

10

【 0 0 4 8 】

本明細書において、「IL-11のトランスシグナル伝達」は、IL-11R に結合したIL-11が、さらにgp130に結合することによって惹起されるシグナル伝達を指す。IL-11は、非共有結合によりIL-11R と結合して複合体を形成することができる。gp130は、膜結合型であり、細胞により発現され、IL-11:IL-11R 複合体がgp130に結合することによってシグナル伝達が起こる。いくつかの実施形態において、IL-11R は、可溶性IL-11Rであってもよい。いくつかの実施形態において、可溶性IL-11R は、(例えば膜貫通ドメインを欠く) IL-11R の可溶性 (分泌型) アイソフォームである。いくつかの実施形態において、可溶性IL-11R は、膜結合型IL-11R の細胞外ドメインがタンパク質分解されることによって遊離した産物である。いくつかの実施形態において、IL-11R は、膜結合型であってもよく、gp130を介したシグナル伝達は、膜結合型IL-11R に結合したIL-11が、さらにgp130に結合することによって惹起されてもよい。これを「IL-11のシスシグナル伝達」と呼ぶ。

20

【 0 0 4 9 】

IL-11媒介性シグナル伝達は、造血および血小板生成を刺激し、破骨細胞の活性を刺激し、神経新生を刺激し、脂肪細胞化を抑制し、炎症促進性サイトカインの発現を低減し、細胞外マトリックス (ECM) の代謝を調節し、かつ消化管上皮細胞の正常な増殖制御を媒介することが示されている (DuおよびWilliams, 上掲)。

30

【 0 0 5 0 】

インターロイキン11 (IL-11) の生理学的役割は未だ解明されていない。IL-11は、造血細胞の活性化および血小板産生との関連が最も強く示されている。また、IL-11は、移植片対宿主病、炎症性関節炎および炎症性腸疾患に対する保護効果を付与することも示されており、このことから、IL-11は、抗炎症性サイトカインであると考えられている (Putoczki and Ernst, J Leukoc Biol 2010, 88(6):1109-1117)。一方で、IL-11は、炎症促進性でも抗炎症性でもあり、血管新生促進性でもあり、腫瘍形成において重要であることも示唆されている。最近の研究では、マウス関節炎モデルおよびがんにおけるウイルス誘発性炎症においてIL-11が容易に検出されることが示されており、このことから、IL-11の発現が病的刺激によって誘導されることが示唆されている。さらに、IL-11は、腫瘍性消化管上皮においてStat3に依存的な腫瘍促進性標的遺伝子の活性化に関連することが報告されている (PutoczkiおよびErnst, 上掲)。

40

【 0 0 5 1 】

本明細書において、「IL-11のシグナル伝達」および「IL-11媒介性シグナル伝達」は、IL-11受容体へのIL-11の結合を介したシグナル伝達、または成熟IL-11分子の機能を有するIL-11断片のIL-11受容体への結合を介したシグナル伝達を指す。また、「IL-11のシグナル伝達」および「IL-11媒介性シグナル伝達」は、例えば、IL-11受容体への結合などを

50

介してIL-11またはその機能性断片により開始されるシグナル伝達を指すことは十分に理解できるであろう。したがって、「シグナル伝達」は、細胞活動を制御するシグナル変換およびその他の細胞プロセスを指す。

【0052】

肝毒性

本発明の態様は、肝毒性ならびに肝毒性を特徴とする障害、疾患および状態の診断、治療および予防に関する。

【0053】

本明細書において、「肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態」は、肝毒性、肝毒性に関連する障害、肝毒性に関連する疾患、または肝毒性に関連する状態を指す。

10

【0054】

本明細書において、肝毒性は、肝細胞/肝組織の損傷および/または肝細胞/肝組織の死滅を指す。また、肝毒性とは、肝臓への中毒性障害が発生している状態を指し、特に、肝臓内の肝細胞の死滅を伴った中毒性障害を指す。肝毒性は、後述するように、肝毒性に関連する1つ以上の因子の検出により判定/診断してもよい。

【0055】

肝毒性は、肝毒性傷害を原因として発症するものであってもよい。本明細書において、「肝毒性傷害」は、肝毒性を誘発する何らかの処置、イベントまたは状態を指す。例えば、肝毒性傷害は、化学物質による処置、物理的な処置、化学物質への曝露、物理的な曝露または気体に関連する状態により引き起こされてもよい。いくつかの実施形態において、例えば、薬物誘発性肝障害(例えばAPAP誘発性肝毒性)の場合、肝毒性傷害は化学物質によるものである。いくつかの実施形態において、例えば、肝臓への外科的損傷、例えば、疾患の治療および/または肝移植のための外科手術の際などに発生しうる肝臓への外科的損傷に起因する肝毒性の場合、肝毒性傷害は物理的なものである(例えば、肝毒性は、医原性のものであってもよい)。いくつかの実施形態において、肝毒性傷害は、低酸素に起因し、例えば、虚血を原因とするものであってもよく、再灌流を原因とするものであってもよい(例えば、肝毒性傷害は、肝虚血再灌流障害(IRI)に起因するものであってもよい)。

20

【0056】

肝毒性は化学物質を原因とする肝損傷であってもよく、例えば、薬物、化学物質、虚血、再灌流、敗血症、ハーブ系サプリメントまたは栄養サプリメントによる肝損傷または肝障害であってもよい。いくつかの実施形態において、肝毒性は、薬物誘発性肝障害(DILI)を指す。いくつかの実施形態において、肝毒性は、肝毒素による肝障害を指す。肝毒素はアルコールであってもよい。肝毒性は、「中毒性肝炎」と呼んでもよい。また、肝毒性は、急性肝毒性および/または慢性肝毒性を指してもよい。

30

【0057】

肝毒性は、アルコールの摂取(例えば慢性アルコール摂取)により直接的または間接的に引き起こされたものであってもよい。本明細書において、肝毒性は、絶食、栄養失調、感染因子(例えば、肝炎ウイルス(例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎またはE型肝炎)、HIV)による感染症、がんまたは薬物相互作用により直接的または間接的に引き起こされたものであってもよい。

40

【0058】

肝毒性は、その他の障害、疾患および状態に付随するものであってもよい。肝毒性に関連する障害、疾患または状態として、急性肝障害(ALI)、急性肝不全、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝損傷、肝炎(例えば、ウイルス性肝炎)、アルコール性肝炎、肝虚血再灌流障害(IRI)(例えば、温虚血再灌流(WIR))、放射線誘発性肝疾患(RILD)、薬物誘発性肝障害(DILI)、自己免疫性肝障害、胆汁うっ滞性肝疾患、HIVおよびがんが挙げられる。

【0059】

50

薬物誘発性肝障害（DILI）は、内因性肝毒性および特異体質性肝毒性を含み、薬物誘発性特異体質性肝障害は、アレルギー性反応および非アレルギー性反応をさらに含む。肝毒性の内因性機構は、用量依存的な肝毒性と関連しているが、特異体質性肝毒性は、用量依存的ではなく、予測不能に発症することがある。さらに、アレルギー性の特異体質性肝毒性は、獲得免疫系反応に典型的な症状および徴候の存在を特徴とし、これらの症状および徴候には、発熱、皮膚反応、好酸球の増加、自己抗体の形成、および特に再曝露後の短い潜伏時間が含まれる（Khoury et al., J Clin Transl Hepatol. 2015 Jun 28; 3(2): 99-108）。

【0060】

また、本発明の態様は、アセトアミノフェン（APAP）誘発性肝毒性の診断、治療および予防に関する。アセトアミノフェンは、N - アセチル - p - アミノフェノールまたはパラセタモールの名称でも知られており、タイレノールまたはパナドールの商標名でも知られている。アセトアミノフェン中毒によって、肝細胞由来逸脱酵素（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸脱水素酵素、アラニンアミノトランスフェラーゼなど）の血清中濃度の上昇、肝小葉中心部の変性および壊死、ならびにクッパー細胞の活性化を伴う肝毒性が起こる（Trepicchio WL et al., Toxicol Pathol. 2001; 29(2):242-9）。

【0061】

IL-11の作用を抑制することができる薬剤

本発明の態様は、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制を含む。

【0062】

本明細書において、「抑制」は、コントロール条件と比較して減少、低下または低減していることを指す。例えば、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤によるIL-11の作用の抑制とは、該薬剤の非存在下かつ/または適切なコントロール薬剤の存在下でのIL-11媒介性シグナル伝達の強度/程度が、減少、低下または低減することを指す。

【0063】

また、本明細書において、「抑制」は、中和または拮抗作用を指してもよい。すなわち、IL-11媒介性シグナル伝達（例えば、IL-11またはIL-11含有複合体を介した相互作用、シグナル伝達またはその他の活性）を抑制することができる薬剤は、関連する機能またはプロセスに対する「中和」剤または「拮抗」剤であると言ってもよい。例えば、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を、IL-11媒介性シグナル伝達を中和することができる薬剤と呼んでもよく、またはIL-11媒介性シグナル伝達のアンタゴニストと呼んでもよい。

【0064】

IL-11のシグナル伝達経路には、IL-11のシグナル伝達を抑制することができる複数のルートが存在する。IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、例えば、IL-11受容体を介したシグナル伝達に参与する1つ以上の因子の作用、またはIL-11受容体を介したシグナル伝達に必要な1つ以上の因子の作用を抑制することによって、IL-11のシグナル伝達を抑制してもよい。

【0065】

例えば、IL-11のシグナル伝達の抑制は、IL-11（またはIL-11含有複合体、例えばIL-11とIL-11R からなる複合体）とIL-11受容体（例えばIL-11R、IL-11Rを含む受容体複合体、gp130、またはIL-11Rとgp130を含む受容体複合体）の間の相互作用を破壊することによって達成してもよい。いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、例えばIL-11、IL-11R およびgp130のうちの1つ以上の遺伝子またはタンパク質の発現を抑制することによって達成される。

【0066】

別の実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、IL-11媒介性トランスシグナル伝達を破壊せずに、IL-11媒介性シグナル伝達を破壊することによって達成され、例えば、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、膜結合型IL-11Rを含むgp130媒介性シ

10

20

30

40

50

ス複合体を抑制することによって達成される。別の実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、IL-11媒介性シスシグナル伝達を破壊せずに、IL-11媒介性トランスシグナル伝達を破壊することによって達成され、すなわち、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、可溶性IL-11R に結合したIL-11や、可溶性IL-6Rに結合したIL-6などの、gp130媒介性トランスシグナル伝達複合体を抑制することによって達成される。別の実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、IL-11媒介性シスシグナル伝達およびIL-11媒介性トランスシグナル伝達を破壊することによって達成される。IL-11媒介性シスシグナル伝達および/またはIL-11媒介性トランスシグナル伝達の抑制には、本明細書に記載の薬剤のいずれを使用してもよい。好ましい実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、IL-11媒介性シスシグナル伝達を破壊することによって達成される。別の例において、IL-11のシグナル伝達の抑制は、IL-11/IL-11R /gp130の下流のシグナル伝達経路を破壊することによって達成してもよい。すなわち、いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抑制/拮抗作用は、IL-11とIL-11受容体からなる複合体を介したシグナル伝達の下流のシグナル伝達経路/シグナル伝達プロセス/シグナル伝達因子の抑制を含む。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抑制/拮抗作用は、IL-11とIL-11受容体からなる複合体により活性化される細胞内シグナル伝達経路を介したシグナル伝達の抑制を含む。いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抑制/拮抗作用は、IL-11とIL-11受容体からなる複合体を介したシグナル伝達により発現/活性がアップレギュレートされる1つ以上の因子の抑制を含む。

20

【0068】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、JAK/STATシグナル伝達を抑制することができる薬剤を使用する。いくつかの実施形態において、JAK/STATシグナル伝達を抑制することができる薬剤は、JAK1、JAK2、JAK3、TYK2、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5Bおよび/またはSTAT6の作用を抑制することができる。例えば、JAK/STATシグナル伝達を抑制することができる薬剤は、JAK/STATタンパク質の活性化を抑制可能であってもよく、JAKタンパク質もしくはSTATタンパク質と細胞表面受容体(例えばIL-11R もしくはgp130)の間の相互作用を抑制可能であってもよく、JAKタンパク質のリン酸化を抑制可能であってもよく、JAKタンパク質とSTATタンパク質の間の相互作用を抑制可能であってもよく、STATタンパク質のリン酸化を抑制可能であってもよく、STATタンパク質の二量体化を抑制可能であってもよく、STATタンパク質の細胞核への輸送を抑制可能であってもよく、STATタンパク質のDNAへの結合を抑制可能であってもよく、かつ/またはJAKタンパク質および/もしくはSTATタンパク質の分解を促進可能であってもよい。いくつかの実施形態において、JAK/STAT阻害剤は、ルキソリチニブ(Jakafi/ジャカピ; インサイト)、トファシチニブ(Xeljanz/Jakvinus; NIH/ファイザー)、オクラシチニブ(Apoquel)、バリシチニブ(オルミエント; インサイト/イーライリリー)、フィルゴチニブ(G-146034/GLPG-0634; Galapagos NV)、ガンドチニブ(LY-2784544; イーライリリー)、レスタウルチニブ(CEP-701; テバ)、モメロチニブ(GS-0387/CYT-387; ギリアド・サイエンシズ)、パクリチニブ(SB1518; CTI)、PF-04965842(ファイザー)、ウバダシチニブ(ABT-494; アッヴィ)、ペフィシチニブ(ASP015K/JNJ-54781532; アステラス)、フェドラチニブ(SAR302503; セルジーン)、ククルピタシンI (JSI-124) およびCHZ868から選択される。

30

40

【0069】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、MAPK/ERKシグナル伝達を抑制することができる薬剤を使用する。いくつかの実施形態において、MAPK/ERKシグナル伝達を抑制することができる薬剤は、GRB2の作用を抑制することができ、RAFキナーゼの作用を抑制することができ、MEKタンパク質の作用を抑制することができ、MAP3K/MAP2K/MAPKおよび/もしくはMycの活性化を抑制することができ、かつ/またはSTATタンパク質のリン酸化を抑制することができる。いくつかの実施形態において、ERKシグナル伝

50

達を抑制することができる薬剤は、ERK p42/44を抑制することができる。いくつかの実施形態において、ERK阻害剤は、SCH772984、SC1、VX-11e、DEL-22379、ソラフェニブ（ネクサバル；バイエル/Onyx）、SB590885、PLX4720、XL281、RAF265（ノバルティス）、エンコラフェニブ（LGX818/ピラフトビ；Array BioPharma）、ダブラフェニブ（タフィンラー；GSK）、ベムラフェニブ（ゼルボラフ；ロシュ）、コピメチニブ（Cotellic；ロシュ）、CI-1040、PD0325901、ピニメチニブ（MEK162/メクトビ；Array BioPharma）、セルメチニブ（AZD6244；Array/アストラゼネカ）およびトラメチニブ（GSK1120212/メキニスト；ノバルティス）から選択される。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、c-Jun N末端キナーゼ（JNK）のシグナル伝達/活性を抑制することができる薬剤を使用する。いくつかの実施形態において、JNKのシグナル伝達/活性を抑制することができる薬剤は、JNK（例えばJNK1やJNK2など）の作用および/またはリン酸化を抑制することができる。いくつかの実施形態において、JNK阻害剤は、SP600125、CEP 1347、TCS JNK 60、c-JUNペプチド、SU3327、AEG 3482、TCS JNK 5a、BI78D3、IQ3、SR3576、IQ1S、JIP-1（153-163）およびCC 401二塩酸塩から選択される。

10

【0070】

本発明者らは、本発明の実施例において、IL-11/IL-11R /gp130を介したシグナル伝達によりNOX4の発現および活性がアップレギュレートされることを示している。NOX4は、NADPHオキシダーゼであり、活性酸素種（ROS）の供給源である。Nox4の発現は、肝細胞特異的にIL-11を発現させたトランスジェニックマウスにおいてアップレギュレートされ、IL-11でヒト初代肝細胞を刺激することによっても、NOX4の発現がアップレギュレートされる。

20

【0071】

いくつかの実施形態において、本発明は、NOX4の発現（遺伝子もしくはタンパク質の発現）またはその機能を抑制することができる薬剤を使用する。いくつかの実施形態において、本発明は、IL-11を介したNOX4の発現/機能のアップレギュレーションを抑制することができる薬剤を使用する。NOX4の発現またはその機能を抑制することができる薬剤は、本明細書においてNOX4阻害剤と呼ぶこともある。例えば、NOX4阻害剤は、NOX4の発現（例えば、遺伝子および/もしくはタンパク質の発現）の低減が可能であってもよく、NOX4をコードするRNAの発現量の低減が可能であってもよく、NOX4タンパク質の発現量の低減が可能であってもよく、かつ/またはNOX4の活性レベルの低減が可能であってもよい（例えば、NOX4を介したNADPHオキシダーゼの活性の低減が可能であってもよく、かつ/もしくはNOX4を介したROSの産生の低減が可能であってもよい）。

30

【0072】

NOX4阻害剤には、NOX4に結合する分子、およびNOX4の発現を低減することができる分子が含まれる。NOX4に結合する阻害剤として、NOX4の機能に対するアンタゴニストとして挙動するペプチド/核酸アプタマー、抗体（および抗体の断片）、およびNOX4の相互作用パートナーの断片、ならびにNOX4の低分子阻害剤が挙げられる。NOX4の発現を低減することができる分子には、NOX4のアンチセンスRNA（例えば、siRNAやshRNAなど）が含まれる。いくつかの実施形態において、NOX4阻害剤は、Altenhofer et al., *Antioxid Redox Signal.* (2015) 23(5): 406-427またはAugsburder et al., *Redox Biol.* (2019) 26: 101272に記載のNOX4阻害剤から選択され、例えば、GKT137831が挙げられる。

40

【0073】

結合薬剤

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、IL-11に結合してもよい。いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、IL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11Rおよび/もしくはgp130を含む複合体）に結合してもよい。このような薬剤がIL-11またはIL-11受容体に結合すると、IL-11受容体に対するIL-11の結合能が低減/阻害され

50

て、IL-11媒介性シグナル伝達が抑制され、その結果、下流のシグナル伝達が抑制されてもよい。また、このような薬剤がIL-11またはIL-11受容体に結合すると、IL-11受容体（例えばIL-11R および/またはgp130）に対するIL-11の結合能が低減/阻害されて、IL-11媒介性シグナル伝達および/またはIL-11媒介性トランスシグナル伝達が抑制され、その結果、下流のシグナル伝達が抑制されてもよい。前記薬剤は、IL-11と可溶性IL-11R からなる複合体などのトランスシグナル伝達複合体に結合して、gp130媒介性シグナル伝達を抑制してもよい。

【0074】

IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる薬剤は、どのような種類のものであってもよいが、いくつかの実施形態において、該薬剤は、抗体、その抗原結合断片、ポリペプチド、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、アダプター、小分子のいずれであってもよい。前記薬剤は、単離または精製された形態で提供してもよく、医薬組成物または医薬品として製剤化してもよい。

10

【0075】

抗体および抗原結合断片

いくつかの実施形態において、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる薬剤は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる薬剤は、ポリペプチド、例えばデコイ受容体分子である。いくつかの実施形態において、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる薬剤は、アダプターであってもよい。

20

【0076】

いくつかの実施形態において、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる薬剤は、抗体またはその抗原結合断片である。本明細書において「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、関連する標的分子に対して結合性を示すモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）および抗体断片を包含する。

【0077】

近年のモノクローナル抗体技術に関する手法によれば、大部分の抗原に対して抗体を作製することが可能である。抗原結合部分は、抗体の一部（例えばFab断片）であってよく、合成抗体断片（例えば一本鎖Fv断片[scFv]）であってよい。選択された抗原に対するモノクローナル抗体は、公知の技術によって作製してもよく、このような公知技術として、例えば、“Monoclonal Antibodies: A manual of techniques”, H Zola (CRC Press, 1988)に記載されているものや、“Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982)に記載されているものが挙げられる。また、キメラ抗体は、Neubergerら（1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799）によって報告されている。モノクローナル抗体（mAb）は、本発明の方法において特に有用である。モノクローナル抗体（mAb）とは、抗原上の単一のエピトープを特異的な標的とする均質な抗体集団である。

30

【0078】

また、本発明の方法では、ポリクローナル抗体も有用である。単一特異性ポリクローナル抗体が好ましい。好適なポリクローナル抗体は、当技術分野でよく知られている方法を使用して作製することができる。

40

【0079】

Fab断片やFab₂断片などの、抗体の抗原結合断片を使用/提供してもよく、遺伝子組換え抗体および遺伝子組換え抗体断片を使用/提供することもできる。抗体の重鎖可変（V_H）領域および軽鎖可変（V_L）領域は、抗原の認識に関与することが知られているが、これは、初期のプロテアーゼ消化実験によって最初に見出され、げっ歯類の抗体を「ヒト化」した実験においても確認されている。げっ歯類由来の可変領域をヒト由来の定常領域に融合させて、げっ歯類由来の親抗体の抗原特異性を保持した抗体を作製することができる（

50

Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。

【0080】

本開示による抗体および抗原結合断片は、関連する標的分子（すなわち、IL-11 / IL-11含有複合体 / IL-11受容体）に結合することができる抗体の相補性決定領域（CDR）を含む。

【0081】

IL-11に結合することができる抗体としては、例えばBockhorn et al. Nat. Commun. (2013) 4(0):1393において使用されたモノクローナルマウス抗ヒトIL-11抗体クローン# 22626；カタログNo. MAB218（R&Dシステムズ、米国ミネソタ州）、クローン6D9A（Abbiotec）、クローンKT8（Abbiotec）、クローンM3103F11（BioLegend）、クローン1F1（Abnova Corporation）、クローン3C6（Abnova Corporation）、クローンGF1（LifeSpan Biosciences）、クローン13455（Source BioScience）、11h3/19.6.1（Hermann et al., Arthritis Rheum. (1998) 41(8):1388-97)、AB-218-NA（R&Dシステムズ）、X203（Ng et al., Sci Transl Med. (2019) 11(511) pii: eaaw1237）ならびに米国特許公開第2009/0202533(A1)号明細書、WO99/59608(A2)およびWO2018/109174(A2)に開示されている抗IL-11抗体が挙げられる。

10

【0082】

特に、抗IL-11抗体クローン22626（MAB218としても知られている）は、例えば、Schaefer et al., Nature (2017) 552(7683):110-115において、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニストであることが示されている。Hermann et al., Arthritis Rheum. (1998) 41(8):1388-97では、モノクローナル抗体11h3/19.6.1が、抗IL-11 IgG1中和抗体であることが開示されている。例えば、McCoy et al., BMC Cancer (2013) 13:16などにおいて使用されているR&DシステムズのAB-218-NAは、抗IL-11中和抗体の別の一例である。さらに、WO 2018/109174(A2)では、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11アンタゴニスト抗体の例が開示されている。

20

【0083】

IL-11R に結合することができる抗体としては、例えば、モノクローナル抗体クローン025（Sino Biological）、クローンEPR5446（Abcam）、クローン473143（R&Dシステムズ）、米国特許公開第2014/0219919(A1)号明細書に記載されているクローン8E2、8D10および8E4、ならびに8E2の親和性成熟バリエーション、Blancら（J. Immunol Methods. 2000 Jul 31;241(1-2):43-59）に記載されているモノクローナル抗体、X209（Widjaja et al., Gastroenterology (2019) 157(3):777-792）、WO2014121325(A1)および米国特許公開第2013/0302277(A1)号明細書に開示されている抗体、ならびに米国特許公開第2009/0202533(A1)号明細書、WO99/59608(A2)およびWO2018/109170(A2)に開示されている抗IL-11R 抗体が挙げられる。

30

【0084】

特に、抗IL-11R 抗体クローン473143（MAB1977としても知られている）は、例えば、Schaefer et al., Nature (2017) 552(7683):110-115において、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニストであることが示されている。米国特許公開第2014/0219919(A1)号では、抗ヒトIL-11R 抗体クローン8E2、8D10および8E4の配列が提供されており、これらの抗ヒトIL-11R 抗体クローンが、IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用を有することが開示されている（例えば、米国特許公開第2014/0219919(A1)号の段落[0489]～[0490]を参照されたい）。さらに、米国特許公開第2014/0219919(A1)号では、クローン8E2の62種の親和性成熟バリエーションの配列情報も提供されており、そのうちの61種が、IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用を有することが開示されている（米国特許公開第2014/0219919(A1)号の表3を参照されたい）。また、WO 2018/109170(A2)では、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11R アンタゴニスト抗体の別の例が開示されている。

40

【0085】

当業者であれば、所定の生物種 / 対象での治療用途に適した抗体を作製する技術を熟知

50

しているであろう。例えば、ヒトでの治療用途に適した抗体を作製するための手順は、Park and Smolen *Advances in Protein Chemistry* (2001) 56: 369-421に記載されている（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

【0086】

所定の標的タンパク質（例えば、IL-11またはIL-11R）に対する抗体は、モデル生物種（例えば、げっ歯類やウサギ）において作製することができ、次いで、所定の生物種/対象における治療用途での適合性を向上させるために遺伝子組換えを行うことができる。例えば、モデル生物種の免疫処置により作製したモノクローナル抗体の1個以上のアミノ酸を置換することにより、ヒト生殖細胞系の免疫グロブリンの配列により近い抗体配列を得ることができる（これにより、この抗体による処置を受けるヒト対象において、抗異種抗体により免疫応答が起こる可能性を低減することができる）。抗体可変ドメインの修飾を行う際には、抗体のパラトープの保存を目的として、フレームワーク領域に焦点を当てて修飾を行ってもよい。抗体のヒト化は、抗体技術の分野で日常的に行われており、例えば、Almagro and Fransson, *Frontiers in Bioscience* (2008) 13:1619-1633, Safdari et al., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (2013) 29(2): 175-186およびLo et al., *Microbiology Spectrum* (2014) 2(1)においてレビューされている（これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に援用される）。抗体のヒト化は省略が可能であり、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックモデル生物種において、所定の標的タンパク質（例えば、IL-11またはIL-11R）に対する抗体を作製して、完全ヒト型抗体を得ることによって省略することができる（例えば、Brugemann et al., *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2015) 63(2):101-108に記載されており、この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

【0087】

また、ファージディスプレイ技術を使用して、所定の標的タンパク質（例えばIL-11またはIL-11R）に対する抗体を同定してもよく、この方法は当業者によく知られている。ファージディスプレイを使用した、ヒト標的タンパク質に対する完全ヒト型抗体の同定は、例えば、Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* (2005) 23, 1105-1116およびChan et al., *International Immunology* (2014) 26(12): 649-657においてレビューされている（これらの文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

【0088】

前記抗体/断片は、IL-11の生物学的活性を抑制または低減するアンタゴニスト抗体/断片であってもよい。前記抗体/断片は、IL-11の生物学的効果を中和する中和抗体であってもよく、例えば、IL-11受容体を介してタンパク質合成シグナル伝達を刺激するIL-11の能力を中和する中和抗体であってもよい。中和活性は、T11マウス形質細胞腫細胞株においてIL-11誘導性増殖に対する中和能を評価することによって測定してもよい（Nordan, R. P. et al. (1987) *J. Immunol.* 139:813）。

【0089】

IL-11に結合する抗体またはIL-11Rに結合する抗体は、例えば、米国特許公開第2014/0219919(A1)号やBlancら（*J. Immunol Methods.* 2000 Jul 31;241(1-2):43-59）に記載されているアッセイを使用して、IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用を評価することができる。簡潔に述べると、IL-11に結合する抗体およびIL-11Rに結合する抗体は、適切な生物種由来のIL-11による刺激に応答して適切な生物種に由来するIL-11Rおよびgp130を発現するBa/F3細胞の増殖を抑制する能力をインビトロで評価することができる。別の方法では、IL-11に結合する抗体およびIL-11Rに結合する抗体は、（例えば、WO 2018/109174(A2)（実施例6）およびWO 2018/109170(A2)（実施例6）ならびにNg et al., *Sci Transl Med.* (2019) 11(511) pii: eaaw1237およびWidjaja et al., *Gastroenterology* (2019) 157(3):777-792に記載されているように）TGF- β 1で線維芽細胞を刺激した後、SMAの発現を評価することによって、線維芽細胞から筋線維芽細胞への転換を抑制する能力をインビトロで分析することができる。

【0090】

抗体は、通常、軽鎖可変領域（VL）の3つのCDR（LC-CDR1、LC-CDR2およびLC-CDR3）と、重鎖可変領域（VH）の3つのCDR（HC-CDR1、HC-CDR2およびHC-CDR3）からなる6つのCDRを含む。これら6つのCDRが一緒になって抗体のパラトープを定義しており、パラトープとは、標的分子に結合する抗体の一部分を指す。抗体のCDRを定義する慣例的な方法がいくつかあり、例えば、Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)およびChothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)に記載の方法、ならびにRetter et al., *Nucl. Acids Res.* (2005) 33 (suppl 1): D671-D674に記載のVBASE2などが挙げられる。

【0091】

本開示による抗体および抗原結合断片は、関連する標的分子に結合することができるモノクローナル抗体（mAb）の配列を使用して設計および調製してもよい。また、一本鎖可変断片（scFv）、Fab断片、Fab₂断片などの、抗体の抗原結合領域を使用/提供してもよい。「抗原結合領域」または「抗原結合断片」は、元の抗体が特異性を示す標的に結合することが可能な抗体断片である。

【0092】

いくつかの実施形態において、前記抗体/断片は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる抗体のVL領域およびVH領域を含む。抗体の抗原結合領域にあるVL領域およびVH領域は、一緒になってFv領域を構成する。いくつかの実施形態において、前記抗体/断片は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる抗体のFv領域を含むか、またはこのFv領域からなる。Fv領域は、例えば柔軟なオリゴペプチドなどで共有結合されたVH領域およびVL領域を含む一本鎖として発現されてもよい。したがって、前記抗体/断片は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる抗体のVL領域およびVH領域を含むscFvを含んでいてもよく、このscFvからなってもよい。

【0093】

抗体の抗原結合領域にある軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）と重鎖可変領域（VH）および重鎖定常領域1（CH1）は、一緒になってFab領域を構成する。いくつかの実施形態において、前記抗体/断片は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる抗体のFab領域を含むか、またはこのFab領域からなる。

【0094】

いくつかの実施形態において、前記抗体/断片は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる全長抗体を含むか、またはこの全長抗体からなる。「全長抗体」は、免疫グロブリン（Ig）の構造と実質的に似た構造を有する抗体を指す。例えば、Schroeder and Cavacini *J Allergy Clin Immunol.* (2010) 125(202): S41-S52（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）に、様々な種類の免疫グロブリンおよびそれらの構造が記載されている。免疫グロブリンG（すなわちIgG）は、2つの重鎖と2つの軽鎖を含む約150kDaの糖タンパク質である。重鎖は、N末端からC末端の方向に、重鎖可変領域（VH）と、それに続く3つの定常領域（CH1、CH2およびCH3）を含む重鎖定常領域とを含み、これと同様に、軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）とそれに続く軽鎖定常領域（CL）とを含む。免疫グロブリンは、重鎖の種類によって、IgG（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgA（例えばIgA1、IgA2）、IgD、IgEまたはIgMに分類されてもよい。軽鎖は、カッパ（ κ ）鎖であってもよく、ラムダ（ λ ）鎖であってもよい。

【0095】

Fab抗体断片、Fv抗体断片、scFv抗体断片およびdAb抗体断片はいずれも、大腸菌において発現させて分泌させることが可能であることから、容易に大量生産することができる。

【0096】

全長抗体およびF(ab')₂断片は「二価」である。「二価」とは、全長抗体およびF(ab')₂断片が、2つの抗原結合部位を有していることを意味する。これに対して、Fab断片、Fv

10

20

30

40

50

断片、scFv断片およびdAb断片は、1つの抗原結合部位しか持たないため、一価である。IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる合成抗体は、当技術分野でよく知られているファージディスプレイ技術を使用して作製することもできる。

【0097】

抗体は、非修飾の親抗体と比較して抗原に対する親和性が向上された修飾抗体を作製するための親和性成熟法によって作製してもよい。親和性成熟抗体は、当技術分野で公知の手法によって作製してもよく、親和性成熟抗体を作製するための手法は、例えば、Marks et al., *Rio/Technology* 10:779-783 (1992); Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. U SA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-159 (1995); およびHawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)に記載されている。

10

【0098】

抗体/断片は、二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、例えば、2種の抗体のそれぞれに由来する2種の断片で構成されており、それによって2種の抗原に結合することができる。二重特異性抗体は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる本明細書に記載の抗体/断片を含む。二重特異性抗体は、第2の抗原に対する親和性を有する別の断片を含んでいてもよく、この第2の抗原は所望のものであればどのような抗原であってもよい。二重特異性抗体の作製技術は当技術分野でよく知られており、例えば、Mueller, Dら (2010 *Biodrugs* 24 (2): 89-98)、Wozniak-Knopp Gら (2010 *Protein Eng Des* 23 (4): 289-297.)、およびBaeuerle, PAら (2009 *Cancer Res* 69 (12): 4941-4944)を参照されたい。二重特異性抗体および二重特異性抗原結合断片は、好適であればどのような形態で提供してもよく、例えば、Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-197 (この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)に記載されているような形態で提供してもよい。例えば、二重特異性抗体または二重特異性抗原結合断片は、二重特異性抗体複合体 (例えばIgG₂、F(ab')₂またはCovX-Body)、二重特異性IgGまたはIgG様分子 (例えばIgG、scFv₄-Ig、IgG-scFv、scFv-IgG、DVD-Ig、IgG-sVD、sVD-IgG、2 in 1-IgG、mAb²、または軽鎖 (LC) が共通化されたTandemab)、非対称性の二重特異性IgGまたはIgG様分子 (例えばkih IgG、軽鎖 (LC) が共通化されたkih IgG、CrossMab、kih IgG-scFab、mAb-Fv、電荷対を有するIgG、またはSEED-body)、小さな二重特異性抗体分子 (例えばDiabody (Db)、dsDb、DART、scDb、tandAb、tandem scFv (taFv)、tandem dAb/VHH、triple body、triple head、Fab-scFvまたはF(ab')₂-scFv₂)、二重特異性Fc-C_H3融合タンパク質 (例えばtaFv-Fc、Di-diabody、scDb-C_H3、scFv-Fc-scFv、HCAb-VHH、scFv-kih-FcまたはscFv-kih-C_H3)、二重特異性融合タンパク質 (例えばscFv₂-アルブミン、scDb-アルブミン、taFv-毒素、DNL-Fab₃、DNL-Fab₄-IgG、DNL-Fab₄-IgG-cytokine₂)のいずれであってもよい。具体的には、Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-19の図2を参照されたい。

20

30

【0099】

二重特異性抗体の製造方法としては、例えばSegal and Bast, 2001. *Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology.* 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16 (この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)に記載されているように、例えば還元可能なジスルフィド結合または還元不能なチオエーテル結合を介して、抗体または抗体断片を化学的に架橋する方法が挙げられる。例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオナート (SPDP) を使用して、ヒンジ領域のSH-基を介して、例えばFab断片を化学的に架橋することによって、ジスルフィド結合で連結された二重特異性F(ab)₂ヘテロ二量体を作製することができる。

40

【0100】

二重特異性抗体の別の製造方法としては、例えばD. M. and Bast, B. J. 2001. *Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology.* 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16に記載されているように、抗体を産生するハイブリドーマを、例えばポリ

50

エチレングリコールを使用して融合させ、二重特異性抗体を分泌することができるクアドローム細胞を作製する方法が挙げられる。

【0101】

二重特異性抗体および二重特異性抗原結合断片は、組換え技術によって作製することもでき、例えばAntibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012)のChapter 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Farber-Schwarz)、またはFrench, How to make bispecific antibodies, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339に記載されているように、例えば抗原結合分子のポリペプチドをコードする核酸構築物から二重特異性抗体および二重特異性抗原結合断片を発現させることができる。

10

【0102】

例えば、2種の抗原結合領域の軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードし(すなわち、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる抗原結合領域の軽鎖可変領域および重鎖可変領域と、別の標的タンパク質に結合することができる抗原結合領域の軽鎖可変領域および重鎖可変領域とをコードし)、かつこれらの抗原結合領域を連結する適切なリンカーまたは二量体化領域をコードする配列を含むDNA構築物を、分子クローニング技術によって作製することができる。次いで、このDNA構築物を好適な宿主細胞(例えば哺乳動物の宿主細胞)において(例えばインビトロで)発現させて、組換え二重特異性抗体を産生させることができ、発現された組換え二重特異性抗体を必要に応じて精製することができる。

20

【0103】

デコイ受容体

IL-11またはIL-11含有複合体に結合することが可能な、ペプチドベースまたはポリペプチドベースの薬剤は、IL-11受容体に基づいて作製されたものであってもよく、例えばIL-11受容体のIL-11結合断片に基づいて作製されたものであってもよい。

【0104】

いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、IL-11R鎖のIL-11結合断片を含んでもよく、好ましくは可溶性であってもよく、かつ/または1つ以上の膜貫通ドメインを含んでいなくてもよく、膜貫通ドメインを全く含んでいなくてもよい。いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、gp130のIL-11結合断片を含んでもよく、好ましくは可溶性であってもよく、かつ/または1つ以上の膜貫通ドメインを含んでいなくてもよく、膜貫通ドメインを全く含んでいなくてもよい。このような分子をデコイ受容体と呼んでもよい。このような薬剤がIL-11に結合すると、IL-11受容体(例えばIL-11Rまたはgp130)に対するIL-11の結合能が低減/阻害されて、IL-11媒介性シグナル伝達および/またはトランスシグナル伝達が抑制され、その結果、下流のシグナル伝達が抑制されてもよい。

30

【0105】

Curtisら(Blood 1997 Dec 1; 90(11):4403-12)は、膜貫通型のIL-11Rおよびgp130を発現する細胞で試験した場合に、可溶性マウスIL-11受容体鎖(sIL-11R)がIL-11の活性に対して拮抗作用を発揮することができたことを報告している。この研究で観察されたIL-11に対するsIL-11Rの拮抗作用は、膜貫通型IL-11Rを既に発現している細胞上における利用可能なgp130分子の数に依存することが提唱されている。

40

【0106】

シグナル伝達の抑制および治療的介入を目的とした可溶性デコイ受容体の使用は、例えばVEGFとVEGF受容体などの他のシグナル伝達分子とその受容体のペアでも報告されている(De-Chao Yu et al., Molecular Therapy (2012); 20(5), 938-947; Konner and Dupont Clin Colorectal Cancer 2004 Oct; 4 Suppl 2:S81-5)。

【0107】

このように、いくつかの実施形態において、結合薬剤はデコイ受容体であってもよく、例えば、IL-11および/またはIL-11含有複合体の可溶性受容体であってもよい。デコイ受

50

容体によってIL-11および/またはIL-11含有複合体に対する競合が起こり、IL-11に対する拮抗作用が発揮されることが報告されている（Curtisら，上掲）。IL-11のデコイ受容体は、WO 2017/103108(A1)およびWO 2018/109168(A1)にも記載されている（これらの文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

【0108】

IL-11のデコイ受容体は、IL-11および/またはIL-11含有複合体と結合することによって、gp130、IL-11R および/またはgp130:IL-11R 受容体へのIL-11および/またはIL-11含有複合体の結合を阻害できることが好ましい。このように、IL-11のデコイ受容体は、TNF のデコイ受容体として作用するエタネルセプトと非常によく似た方法で、IL-11およびIL-11含有複合体の「デコイ」受容体として作用する。IL-11媒介性シグナル伝達は、デコイ受容体の非存在下でのシグナル伝達よりも減少する。

10

【0109】

IL-11のデコイ受容体は、1つ以上のサイトカイン結合モジュール（CBM）を介してIL-11に結合することが好ましい。CBMは、天然のIL-11受容体分子のCBMであるか、天然のIL-11受容体分子のCBMに由来するものであるか、あるいは天然のIL-11受容体分子のCBMと相同なものである。例えば、IL-11のデコイ受容体は、gp130および/またはIL-11R の1つ以上のCBMを含むもの、gp130および/またはIL-11R の1つ以上のCBMからなるもの、gp130および/またはIL-11R のCBMに由来する1つ以上のCBMを含むもの、gp130および/またはIL-11R のCBMに由来する1つ以上のCBMからなるもの、gp130および/またはIL-11R のCBMと相同な1つ以上のCBMを含むもの、gp130および/またはIL-11R のCBMと相同な1つ以上のCBMからなるものうちのいずれであってもよい。

20

【0110】

いくつかの実施形態において、IL-11のデコイ受容体は、gp130のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列を含んでいてもよく、gp130のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列からなってもよい。いくつかの実施形態において、IL-11のデコイ受容体は、IL-11R のサイトカイン結合モジュールに対応するアミノ酸配列を含んでいてもよい。本明細書において、所定のペプチド/ポリペプチドの参照領域または参照配列に「対応する」アミノ酸配列は、該参照領域/参照配列のアミノ酸配列と少なくとも60%の配列同一性を有しており、例えば、該参照領域/参照配列のアミノ酸配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有している。

30

【0111】

いくつかの実施形態において、デコイ受容体は、例えば、少なくとも100 μ M以下の結合親和性でIL-11に結合することが可能であってもよく、10 μ M以下、1 μ M以下、100 nM以下、または約1 ~ 100 nMの結合親和性でIL-11に結合してもよい。いくつかの実施形態において、デコイ受容体は、IL-11結合ドメインの全体またはその一部を含んでいてもよく、膜貫通ドメインの全体またはその一部を欠損していてもよい。デコイ受容体は、免疫グロブリンの定常領域（例えばIgG Fc領域）に融合させたものであってもよい。

【0112】

阻害剤

本発明は、IL-11、IL-11含有複合体、IL-11R 、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体のうちの1つ以上に結合して、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる阻害剤分子の使用を企図する。

40

【0113】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11、例えばIL-11の変異体、バリエーションまたは結合断片に基づいた、ペプチドベースまたはポリペプチドベースの結合薬剤である。好適なペプチドベースまたはポリペプチドベースの薬剤は、IL-11受容体（例えばIL-11R 、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体）に結合することによってシグナル伝達の開始を阻害したり、不十分なシグナル伝達しか起こさないもので

50

あってもよい。このようなタイプのIL-11変異体は、内在性IL-11の競合阻害物質として作用してもよい。

【0114】

例えば、W147Aは、147番目のアミノ酸をトリプトファンからアラニンに変異させたことによって、IL-11のいわゆる「部位III」が破壊されたIL-11アンタゴニストである。この変異体はIL-11R に結合することができるが、gp130ホモダイマーとの会合は起こらず、その結果、IL-11のシグナル伝達が効率的に遮断される (Underhill-Day et al., 2003; *Endocrinology* 2003 Aug;144(8):3406-14)。また、Leeら (*Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Dec; 39(6):739-746) は、IL-11R へのIL-11の結合を特異的に抑制することができるIL-11アンタゴニスト変異体(「ムテイン」)の作製を報告している。IL-11のムテインは、WO 2009/052588(A1)にも記載されている。

10

【0115】

Menkhorstら (*Biology of Reproduction* May 1, 2009 vol.80 no.5 920-927) は、雌性マウスにおいてIL-11の作用を効果的に抑制できるペグ化IL-11アンタゴニストPEGIL11A (CSL Limited、オーストラリア、ビクトリア州パークビル)を報告している。

【0116】

さらに、Pasqualiniら (*Cancer* (2015) 121(14):2411-2421) は、IL-11R に結合することができるリガンド標的ペプチド模倣薬bone metastasis-targeting peptidomimetic-11 (BMTP-11)を報告している。

【0117】

いくつかの実施形態において、IL-11受容体に結合することができる結合薬剤は、IL-11R、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体の小分子阻害剤の形態で提供してもよい。いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、IL-11またはIL-11含有複合体の小分子阻害剤の形態で提供してもよく、例えば、Lay et al., *Int. J. Oncol.* (2012); 41(2): 759-764 (この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)に記載のIL-11阻害剤の形態で提供してもよい。

20

【0118】

アプタマー

いくつかの実施形態において、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体(例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体)に結合することができる薬剤は、アプタマーである。核酸リガンド/ペプチドリガンドとも呼ばれるアプタマーは、高い特異性および高い親和性で標的分子に結合する能力を特徴とする核酸分子またはペプチド分子である。現在までに同定されたアプタマーの大部分は非天然分子である。

30

【0119】

所定の標的(例えば、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体)に結合するアプタマーは、Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEXTM)法で同定および/または作製してもよく、あるいはSOMAmer (slow off-rate modified aptamers)(Gold L et al. (2010) *PLoS ONE* 5(12):e15004)を構築することにより、同定および/または作製してもよい。アプタマーおよびSELEX法は、TuerkおよびGold (*Science* (1990) 249(4968):505-10)によって報告されており、WO91/19813にも記載されている。SELEX法およびSOMAmer技術では、例えばアプタマーの化学的多様性を拡大するためにアミノ酸側鎖を模倣した官能基の付加が行われる。その結果、標的に対して高親和性のアプタマーが濃縮され、同定される。

40

【0120】

アプタマーはDNA分子であってもよく、RNA分子であってもよく、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。また、アプタマーは化学的に修飾された核酸を含んでいてもよく、例えば、糖、リン酸塩および/または塩基が化学的に修飾された核酸を含んでいてもよい。このような修飾は、アプタマーの安定性を向上させるものであってもよく、アプタマーに分解抵抗性を付与するものであってもよく、リボースの2'位に修飾を含んでいて

50

もよい。

【0121】

アプタマーは、当業者によく知られている方法によって合成してもよい。例えば、アプタマーを、例えば固相支持体上で化学的に合成してもよい。ホスホロアミダイト法を用いた固相合成法を使用してもよい。簡潔に述べると、固相化したヌクレオチドを脱トリチル化した後、適切に活性化されたヌクレオシドホスホロアミダイトとカップリングさせ、亜リン酸トリエステル結合を形成させる。次いでカップリングを行い、酸化剤（通常ヨウ素）で亜リン酸トリエステルを酸化することができる。このサイクルを繰り返し、アプタマーを構築することができる（例えば、Sinha, N. D.; Biernat, J.; McManus, J.; Koster, H. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 4539; およびBeaucage, S. L.; Lyer, R. P. (1992). *Tetrahedron* 48 (12): 2223を参照されたい）。

10

【0122】

好適な核酸アプタマーの長さの下限は、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、26ヌクレオチド長、27ヌクレオチド長、28ヌクレオチド長、29ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、31ヌクレオチド長、32ヌクレオチド長、33ヌクレオチド長、34ヌクレオチド長、35ヌクレオチド長、36ヌクレオチド長、37ヌクレオチド長、38ヌクレオチド長、39ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長のいずれであってもよい。好適な核酸アプタマーの長さの上限は、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、26ヌクレオチド長、27ヌクレオチド長、28ヌクレオチド長、29ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、31ヌクレオチド長、32ヌクレオチド長、33ヌクレオチド長、34ヌクレオチド長、35ヌクレオチド長、36ヌクレオチド長、37ヌクレオチド長、38ヌクレオチド長、39ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長、41ヌクレオチド長、42ヌクレオチド長、43ヌクレオチド長、44ヌクレオチド長、45ヌクレオチド長、46ヌクレオチド長、47ヌクレオチド長、48ヌクレオチド長、49ヌクレオチド長、50ヌクレオチド長、51ヌクレオチド長、52ヌクレオチド長、53ヌクレオチド長、54ヌクレオチド長、55ヌクレオチド長、56ヌクレオチド長、57ヌクレオチド長、58ヌクレオチド長、59ヌクレオチド長、60ヌクレオチド長、61ヌクレオチド長、62ヌクレオチド長、63ヌクレオチド長、64ヌクレオチド長、65ヌクレオチド長、66ヌクレオチド長、67ヌクレオチド長、68ヌクレオチド長、69ヌクレオチド長、70ヌクレオチド長、71ヌクレオチド長、72ヌクレオチド長、73ヌクレオチド長、74ヌクレオチド長、75ヌクレオチド長、76ヌクレオチド長、77ヌクレオチド長、78ヌクレオチド長、79ヌクレオチド長、80ヌクレオチド長のいずれであってもよい。好適な核酸アプタマーの長さは、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、26ヌクレオチド長、27ヌクレオチド長、28ヌクレオチド長、29ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、31ヌクレオチド長、32ヌクレオチド長、33ヌクレオチド長、34ヌクレオチド長、35ヌクレオチド長、36ヌクレオチド長、37ヌクレオチド長、38ヌクレオチド長、39ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長、41ヌクレオチド長、42ヌクレオチド長、43ヌクレオチド長、44ヌクレオチド長、45ヌクレオチド長、46ヌクレオチド長、47ヌクレオチド長、48ヌクレオチド長、49ヌクレオチド長、50ヌクレオチド長、51ヌクレオチド長、52ヌクレオチド長、53ヌクレオチド長、54ヌクレオチド長、55ヌクレオチド長、56ヌクレオチド長、57ヌクレオチド長、58ヌクレオチド長、59ヌクレオチド長、60ヌクレオチド長、61ヌクレオチド長、62ヌクレオチド長、63ヌクレオチド長、64ヌクレオチド長、65ヌクレオチド長、66ヌクレオチド長、67ヌクレオチド長、68ヌクレオチド長、69ヌクレオチド長、70ヌクレオチド長、71ヌクレオチド長、72ヌクレオチド長、73ヌクレ

20

30

40

50

オチド長、74ヌクレオチド長、75ヌクレオチド長、76ヌクレオチド長、77ヌクレオチド長、78ヌクレオチド長、79ヌクレオチド長、80ヌクレオチド長のいずれであってもよい。

【0123】

アプタマーは、特定の標的分子に結合するように選択または構築されたペプチドであってもよい。ペプチドアプタマーならびにその作製方法および同定方法は、Reverdatto et al., Curr Top Med Chem. (2015) 15(12):1082-101 (この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)でレビューされている。ペプチドアプタマーの長さの下限は、2アミノ酸長、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長のいずれであってもよい。ペプチドアプタマーの長さの上限は、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸長、25アミノ酸長、26アミノ酸長、27アミノ酸長、28アミノ酸長、29アミノ酸長、30アミノ酸長、31アミノ酸長、32アミノ酸長、33アミノ酸長、34アミノ酸長、35アミノ酸長、36アミノ酸長、37アミノ酸長、38アミノ酸長、39アミノ酸長、40アミノ酸長、41アミノ酸長、42アミノ酸長、43アミノ酸長、44アミノ酸長、45アミノ酸長、46アミノ酸長、47アミノ酸長、48アミノ酸長、49アミノ酸長、50アミノ酸長のいずれであってもよい。好適なペプチドアプタマーの長さは、2~30アミノ酸長、2~25アミノ酸長、2~20アミノ酸長、5~30アミノ酸長、5~25アミノ酸長、5~20アミノ酸長のいずれであってもよい。

【0124】

アプタマーは、nMオーダーまたはpMオーダーの K_d を有していてもよく、 K_d は、例えば、500nM未満、100nM未満、50nM未満、10nM未満、1nM未満、500pM未満、10pM未満のいずれであってもよい。

【0125】

IL-11結合薬剤の特性

IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる本発明の薬剤は、以下の特性のいずれか1つ以上を示してもよい。

- ・IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に対する特異的結合
- ・10 μ M以下の K_D 、好ましくは5 μ M以下、1 μ M以下、500nM以下、100nM以下、10nM以下、1nM以下または100pM以下の K_D での、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体への結合
- ・IL-11とIL-11R の間の相互作用の抑制
- ・IL-11とgp130の間の相互作用の抑制
- ・IL-11とIL-11R :gp130受容体複合体の間の相互作用の抑制
- ・IL-11:IL-11R 複合体とgp130の間の相互作用の抑制

【0126】

これらの特性は、適切なアッセイにおいて関連因子を分析することによって測定することができ、適切なコントロールと性能を比較することを含んでもよい。当業者であれば、所定のアッセイにおける適切なコントロール条件を決定することができる。

【0127】

例えば、IL-11 / IL-11含有複合体 / IL-11受容体に対する試験抗体 / 抗原結合断片の結合能の分析に適したネガティブコントロールは、非標的タンパク質に対する抗体 / 抗原結合断片 (すなわち、IL-11 / IL-11含有複合体 / IL-11受容体に特異的ではない抗体 / 抗原結合断片) であってもよい。適切なポジティブコントロールは、検証済みの (例えば市販の)、IL-11に結合する公知の抗体またはIL-11受容体に結合する公知の抗体であってもよい。コントロールは、分析対象としての、推定上のIL-11 / IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合する抗体 / 抗原結合断片と同じアイソタイプのものであってもよく、例えば同じ定常領域を有していてもよい。

【0128】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体）に特異的に結合可能であってもよい。所定の標的分子に特異的に結合する薬剤は、他の非標的分子に対する結合よりも高い親和性および/または長い持続期間で該標的分子に結合することが好ましい。

【0129】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、その他のIL-6サイトカインファミリーのメンバー（例えば、IL-6、白血病抑制因子（LIF）、オンコスタチンM（OSM）、カルジオトロフィン-1（CT-1）、毛様体神経栄養因子（CNTF）およびカルジオトロフィン様サイトカイン（CLC））のうちの1つ以上に対する結合よりも高い親和性でIL-11またはIL-11含有複合体に結合してもよい。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、その他のIL-6受容体ファミリーのメンバーの1つ以上に対する結合よりも高い親和性でIL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体）に結合してもよい。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-6R、白血病抑制因子受容体（LIFR）、オンコスタチンM受容体（OSMR）、毛様体神経栄養因子受容体（CNTFR）およびサイトカイン受容体様因子1（CRLF1）のうちの1つ以上に対する結合よりも高い親和性でIL-11R に結合してもよい。

10

【0130】

いくつかの実施形態において、例えば、ELISA、SPR、バイオレイヤー干渉法（BLI）、マイクロスケール熱泳動（MST）またはラジオイムノアッセイ（RIA）で測定した場合、非標的分子に対する結合薬剤の結合の程度は、標的分子に対する該結合薬剤の結合の程度の約10%未満である。あるいは、結合特異性は、結合親和性として反映されてもよく、この場合、結合薬剤は、非標的分子に対する K_D よりも少なくとも0.1桁（すなわち 0.1×10^n （ n は桁数を表す整数））小さい K_D でIL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合する。この桁数は、少なくとも0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0のいずれであってもよい。

20

【0131】

標的に対する所定の結合薬剤の結合親和性は、その解離定数（ K_D ）で表されることが多い。結合親和性は、当技術分野で公知の方法により測定することができ、このような方法として、例えば、ELISA、表面プラズモン共鳴（SPR；例えばHearty et al., *Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442；またはRich et al., *Anal Biochem.* 2008 Feb 1; 373(1):112-20を参照されたい）、バイオレイヤー干渉法（例えばLad et al., (2015) *J Biomol Screen* 20(4): 498-507；またはConcepcion et al., *Comb Chem High Throughput Screen.* 2009 Sep; 12(8):791-800を参照されたい）、マイクロスケール熱泳動（MST）分析（例えばJerabek-Willemsen et al., *Assay Drug Dev Technol.* 2011 Aug; 9(4): 342-353を参照されたい）、または放射標識抗原結合アッセイ（RIA）などが挙げられる。

30

【0132】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、 $50 \mu\text{M}$ 以下の K_D 、好ましくは、 $10 \mu\text{M}$ 以下、 $5 \mu\text{M}$ 以下、 $4 \mu\text{M}$ 以下、 $3 \mu\text{M}$ 以下、 $2 \mu\text{M}$ 以下、 $1 \mu\text{M}$ 以下、 500nM 以下、 100nM 以下、 75nM 以下、 50nM 以下、 40nM 以下、 30nM 以下、 20nM 以下、 15nM 以下、 12.5nM 以下、 10nM 以下、 9nM 以下、 8nM 以下、 7nM 以下、 6nM 以下、 5nM 以下、 4nM 以下、 3nM 以下、 2nM 以下、 1nM 以下、 500pM 以下、 400pM 以下、 300pM 以下、 200pM 以下または 100pM 以下の K_D で、IL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる。

40

【0133】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、（例えばELISAで測定した場合） EC_{50} が $10,000\text{ng/ml}$ 以下、好ましくは EC_{50} が $5,000\text{ng/ml}$ 以下、 1000ng/ml 以下、 900ng/ml 以下、 800ng/ml 以下、 700ng/ml 以下、 600ng/ml 以下、 500ng/ml 以下、 400ng/ml 以下、 300ng/ml 以下、 200ng/ml 以下、 100ng/ml 以下、 90ng/ml 以下、 80ng/ml 以

50

下、70ng/ml以下、60ng/ml以下、50ng/ml以下、40ng/ml以下、30ng/ml以下、20ng/ml以下、15ng/ml以下、10ng/ml以下、7.5ng/ml以下、5ng/ml以下、2.5ng/ml以下または1ng/ml以下の結合親和性でIL-11、IL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合する。ELISAは、例えばAntibody Engineering, vol. 1 (2nd Edn), Springer Protocols, Springer (2010), Part V, pp657-665の記載に従って実施することができる。

【0134】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11受容体またはIL-11含有複合体の受容体（例えばgp130またはIL-11R）への結合に重要な領域においてIL-11またはIL-11含有複合体に結合し、それによって、IL-11またはIL-11含有複合体とIL-11受容体の間の相互作用を抑制し、かつ/またはIL-11受容体を介したシグナル伝達を抑制する。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11またはIL-11含有複合体への結合に重要な領域においてIL-11受容体に結合し、それによって、IL-11またはIL-11含有複合体とIL-11受容体の間の相互作用を抑制し、かつ/またはIL-11受容体を介したシグナル伝達を抑制する。

10

【0135】

2つのタンパク質間の相互作用に対する所定の結合薬剤（例えば、IL-11もしくはIL-11含有複合体またはIL-11受容体に結合することができる薬剤）の抑制能は、例えば、該結合薬剤の存在下において、または該結合薬剤を相互作用パートナーの片方もしくは両方とインキュベートした後に、これらの相互作用パートナー間の相互作用を分析することにより測定することができる。所定の結合薬剤が2つの相互作用パートナー間の相互作用を抑制できるかどうかを判定することができる好適なアッセイとしては、競合ELISAが挙げられる。

20

【0136】

所定の相互作用（例えばIL-11とIL-11R間の相互作用、IL-11とgp130の間の相互作用、IL-11とIL-11R :gp130の間の相互作用、またはIL-11:IL-11R とgp130の間の相互作用）を抑制することができる結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）相互作用の程度と比較して、該結合薬剤の存在下において、または該結合薬剤を相互作用パートナーの片方もしくは両方とインキュベートした後に、これらの相互作用パートナー間の相互作用の程度が低下/減少していることから同定される。好適な分析は、例えば、組換え相互作用パートナーまたは相互作用パートナーを発現する細胞を使用してインビトロで実施することができる。相互作用パートナーを発現する細胞は、内因性に該相互作用パートナーを発現してもよく、細胞に導入された核酸から該相互作用パートナーを発現してもよい。このようなアッセイを行う目的で、相互作用パートナーの片方もしくは両方および/または結合薬剤を、検出可能な物質で標識するか、このような標識とともに使用して、相互作用の程度を検出および/または測定してもよい。例えば、放射性原子、色素分子、蛍光分子、またはその他の任意の方法で容易に検出することができる分子で結合薬剤を標識してもよい。検出可能な分子として好適なものとしては、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、酵素基質および放射性標識が挙げられる。結合薬剤は、検出可能な標識で直接標識してもよく、間接的に標識してもよい。例えば、結合薬剤は、標識されていないとしてもよく、標識された別の結合薬剤を使用して検出してもよい。あるいは、第2の結合薬剤をビオチンに結合してもよく、標識されたストレプトアビジンを該ビオチンに結合させて、第1の結合薬剤を間接的に標識してもよい。

30

40

【0137】

また、2つの結合パートナー間の相互作用に対する結合薬剤の抑制能は、このような相互作用の下流の機能の帰結（例えばIL-11媒介性シグナル伝達）を分析することによって同定することもできる。例えば、IL-11とIL-11R :gp130の間の相互作用またはIL-11:IL-11R とgp130の間の相互作用の下流の機能の帰結としては、例えば、IL-11媒介性プロセス、または例えば、コラーゲンもしくはIL-11の遺伝子発現/タンパク質発現が含まれていてもよい。

【0138】

50

IL-11またはIL-11含有複合体とIL-11受容体の間の相互作用の抑制は、例えばCurtis et al. Blood, 1997, 90(11)およびKarpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80に記載されているような、 ^3H -チミジン取り込みアッセイ、および/またはBa/F3細胞増殖アッセイを使用して分析することもできる。Ba/F3細胞は、IL-11R とgp130を共発現する。

【0139】

いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11とIL-11R の間の相互作用の程度と比較して、その100%未満、例えば99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下にまでIL-11とIL-11R の間の相互作用を抑制可能であってもよい。いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11とIL-11R の間の相互作用の程度と比較して、その1倍未満、例えば0.99倍以下、0.95倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.75倍以下、0.7倍以下、0.65倍以下、0.6倍以下、0.55倍以下、0.5倍以下、0.45倍以下、0.4倍以下、0.35倍以下、0.3倍以下、0.25倍以下、0.2倍以下、0.15倍以下または0.1倍以下にまでIL-11とIL-11R の間の相互作用を抑制可能であってもよい。

10

【0140】

いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11とgp130の間の相互作用の程度と比較して、その100%未満、例えば99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下にまでIL-11とgp130の間の相互作用を抑制可能であってもよい。いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11とgp130の間の相互作用の程度と比較して、その1倍未満、例えば0.99倍以下、0.95倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.75倍以下、0.7倍以下、0.65倍以下、0.6倍以下、0.55倍以下、0.5倍以下、0.45倍以下、0.4倍以下、0.35倍以下、0.3倍以下、0.25倍以下、0.2倍以下、0.15倍以下または0.1倍以下にまでIL-11とgp130の間の相互作用を抑制可能であってもよい。

20

30

【0141】

いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11とIL-11R :gp130の間の相互作用の程度と比較して、その100%未満、例えば99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下にまでIL-11とIL-11R :gp130の間の相互作用を抑制可能であってもよい。いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11とIL-11R :gp130の間の相互作用の程度と比較して、その1倍未満、例えば0.99倍以下、0.95倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.75倍以下、0.7倍以下、0.65倍以下、0.6倍以下、0.55倍以下、0.5倍以下、0.45倍以下、0.4倍以下、0.35倍以下、0.3倍以下、0.25倍以下、0.2倍以下、0.15倍以下または0.1倍以下にまでIL-11とIL-11R :gp130の間の相互作用を抑制可能であってもよい。

40

【0142】

いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下における（または適切なコントロール結合薬剤の存在下における）IL-11:IL-11R 複合体とgp130の間の相互作用の程度と比較して、その100%未満、例えば99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下

50

、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下にまでIL-11:IL-11R 複合体とgp130の間の相互作用を抑制可能であってもよい。いくつかの実施形態において、前記結合薬剤は、該結合薬剤の非存在下におけるIL-11:IL-11R 複合体とgp130の間の相互作用の程度と比較して、その1倍未満、例えば0.99倍以下、0.95倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.75倍以下、0.7倍以下、0.65倍以下、0.6倍以下、0.55倍以下、0.5倍以下、0.45倍以下、0.4倍以下、0.35倍以下、0.3倍以下、0.25倍以下、0.2倍以下、0.15倍以下または0.1倍以下にまでIL-11:IL-11R 複合体とgp130の間の相互作用を抑制することができる。

【0143】

IL-11またはIL-11受容体の発現を低減することができる薬剤

10

本発明の態様において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、IL-11、IL-11R またはgp130のうちの1つ以上の発現を阻止または低減できるものであってもよい。

【0144】

前記発現は、遺伝子発現であってもよく、タンパク質発現であってもよく、本明細書に記載の方法で測定してもよく、当業者によく知られている当技術分野の方法で測定してもよい。前記発現は、対象における細胞/組織/器官/器官系による発現であってもよい。

【0145】

好適な薬剤はどのような種類のものであってもよいが、いくつかの実施形態において、IL-11、IL-11R またはgp130のうちの1つ以上の発現を阻止または低減することができる薬剤は、小分子であってもよく、オリゴヌクレオチドであってもよい。

20

【0146】

IL-11、IL-11R またはgp130のうちの1つ以上の発現を阻止または低減することができる薬剤は、例えば、IL-11、IL-11R もしくはgp130をコードする遺伝子の転写の抑制、IL-11、IL-11R もしくはgp130をコードするRNAの転写後プロセシングの抑制、IL-11、IL-11R もしくはgp130をコードするRNAの安定性の低減、IL-11、IL-11R もしくはgp130をコードするRNAの分解の促進、IL-11ポリペプチド、IL-11R ポリペプチドもしくはgp130ポリペプチドの翻訳後プロセシングの抑制、IL-11ポリペプチド、IL-11R ポリペプチドもしくはgp130ポリペプチドの安定性の低減、またはIL-11ポリペプチド、IL-11R ポリペプチドもしくはgp130ポリペプチドの分解の促進を介して、IL-11、IL-11R またはgp130のうちの1つ以上の発現を阻止または低減してもよい。

30

【0147】

Takira (Clin Exp Immunol (1998) Apr; 112(1): 133-138) は、インドメタシン、デキサメタゾンまたはインターフェロン (IFN) で処理したリウマチ滑膜細胞においてIL-11の発現が低下することを報告している。

【0148】

さらに本発明は、IL-11、IL-11R またはgp130の発現を阻止/低減するための、アンチセンス核酸の使用を企図する。いくつかの実施形態において、IL-11、IL-11R またはgp130の発現を阻止または低減することができる薬剤は、RNA干渉 (RNAi) によって該発現を低減してもよい。

40

【0149】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、アンチセンスRNAや低分子干渉RNAなどの抑制性核酸であってもよく、shRNAまたはsiRNAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0150】

いくつかの実施形態において、前記抑制性核酸は、ベクターに組み込まれて提供される。例えば、いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11、IL-11R またはgp130のうちの1つ以上に対するshRNAをコードするレンチウイルスベクターであってもよい。

【0151】

オリゴヌクレオチド分子 (特にRNA) を使用して遺伝子の発現を調節してもよい。この

50

ようなオリゴヌクレオチド分子としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド；低分子干渉RNA（siRNA）によるmRNAを標的とした分解；転写後遺伝子サイレンシング（PTG）；マイクロRNA（miRNA）を使用した、発生過程で調節される配列に特異的なmRNA翻訳の抑制；および標的化された転写遺伝子サイレンシングが挙げられる。

【0152】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的オリゴヌクレオチド（例えばmRNA）を標的とし、相補配列結合を介してこれに結合するオリゴヌクレオチド（好ましくは一本鎖オリゴヌクレオチド）である。標的オリゴヌクレオチドがmRNAである場合、mRNAにアンチセンスオリゴヌクレオチドが結合することによって、mRNAの翻訳が阻害されて、遺伝子産物の発現が阻害される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ゲノム核酸のセンス鎖に結合して標的ヌクレオチド配列の転写を抑制するように設計してもよい。

10

【0153】

公知のIL-11、IL-11R およびgp130の核酸配列（例えば、アクセッション番号：BC012506.1 GI:15341754（ヒトIL-11）、BC134354.1 GI:126632002（マウスIL-11）、AF347935.1 GI:13549072（ラットIL-11）、NM_001142784.2 GI:391353394（ヒトIL-11R）、NM_001163401.1 GI:254281268（マウスIL-11R）、NM_139116.1 GI:20806172（ラットIL-11R）、NM_001190981.1 GI:300244534（ヒトgp130）、NM_010560.3 GI:225007624（マウスgp130）、NM_001008725.3 GI:300244570（ラットgp130）でGenBankから入手可能な公知のmRNA配列）を考慮に入れて、IL-11、IL-11R またはgp130の発現を抑制またはサイレンシングするオリゴヌクレオチドを設計してもよい。

20

【0154】

このようなオリゴヌクレオチドはどのような長さであってもよいが、短いことが好ましく、例えば100ヌクレオチド長未満、例えば10～40ヌクレオチド長、または20～50ヌクレオチド長であってもよく、標的オリゴヌクレオチド（例えばIL-11 mRNA、IL-11R mRNAまたはgp130 mRNA）中の対応する長さのヌクレオチド配列と、完全な相補性または実質的な相補性（例えば80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の相補性）を有するヌクレオチド配列を含んでいてもよい。ヌクレオチド配列の相補領域はどのような長さであってもよいが、少なくとも5ヌクレオチド長であることが好ましく、50ヌクレオチド長以下であってもよく、例えば、6ヌクレオチド長、7ヌクレオチド長、8ヌクレオチド長、9ヌクレオチド長、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、26ヌクレオチド長、27ヌクレオチド長、28ヌクレオチド長、29ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、31ヌクレオチド長、32ヌクレオチド長、33ヌクレオチド長、34ヌクレオチド長、35ヌクレオチド長、36ヌクレオチド長、37ヌクレオチド長、38ヌクレオチド長、39ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長、41ヌクレオチド長、42ヌクレオチド長、43ヌクレオチド長、44ヌクレオチド長、45ヌクレオチド長、46ヌクレオチド長、47ヌクレオチド長、48ヌクレオチド長、49ヌクレオチド長、50ヌクレオチド長のいずれであってもよい。

30

40

【0155】

IL-11、IL-11R またはgp130の発現を抑制することによって、細胞／組織／器官／器官系／対象により発現されるIL-11、IL-11R またはgp130の量が低下することが好ましい。例えば、適切な核酸の投与により所定の細胞におけるIL-11、IL-11R またはgp130を抑制することによって、該細胞により発現されるIL-11、IL-11R またはgp130の量が非処理細胞よりも低下する。抑制は部分的であってもよい。抑制の程度は少なくとも50%であることが好ましく、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%のいずれかであることがより好ましい。抑制の程度が90%～100%である場合、発現または機能が「サイレンシング」されていると考えられる。

50

【0156】

ヘテロクロマチン複合体のターゲティングおよび特定の染色体座位のエピジェネティックな遺伝子サイレンシングにおいて、RNAi機構およびsmall RNAが果たす役割が実証されている。RNA干渉 (RNAi) としても知られている二本鎖RNA (dsRNA) 依存性転写後サイレンシングは、dsRNA複合体が、特定の遺伝子の相同部分を標的として短時間でサイレンシングすることができる現象である。RNAiは、配列同一性を有するmRNAの分解を促進するシグナルとして作用する。20ntのsiRNAであれば、通常、遺伝子特異的なサイレンシングを誘導するのに十分に長く、宿主応答を回避するのに十分に短い。標的遺伝子産物の発現の低下は、何種類かのsiRNA分子を使用することによって、90%にも達するサイレンシングを誘導することができる。RNAiを用いた治療薬は、様々な適応症を対象に第I相、第II相および第III相の臨床試験まで進んでいる (Nature 2009 Jan 22; 457(7228): 426-433)。

10

【0157】

当技術分野において、上述のようなRNA配列は、その由来に応じて「短鎖干渉RNA」もしくは「低分子干渉RNA」(siRNA)または「マイクロRNA」(miRNA)と呼ばれる。これらのRNA配列を使用して、相補的RNAに結合させてmRNAの排除を誘導すること (RNAi) によって、遺伝子発現をダウンレギュレートしてもよく、あるいはmRNAからタンパク質への翻訳を阻害することによって遺伝子発現をダウンレギュレートしてもよい。siRNAは、長い二本鎖RNAがプロセシングされることによって得られ、天然のsiRNAは、通常、外来性である。マイクロ干渉RNA (miRNA) は、内在性にコードされた小さな非コードRNAであり、短いヘアピン構造がプロセシングされることによって得られる。siRNAおよびmiRNAはいずれも、RNAを切断することなく、部分的に相補的な標的配列を有するmRNAの翻訳を抑制することができ、完全な相補配列を有するmRNAを分解することができる。

20

【0158】

siRNAリガンドは、通常、二本鎖であり、このRNAによる標的遺伝子の機能のダウンレギュレーションの有効性を最適化するためには、siRNAによる標的mRNAの認識を仲介するRISC複合体によってsiRNAが正確に認識されるように十分に長く、かつ宿主応答を低く抑えることができるように十分に短くなるように、siRNA分子の長さを選択することが好ましい。

30

【0159】

miRNAリガンドは、通常、一本鎖であり、ヘアピン構造を形成することが可能な部分相補領域を有している。miRNAは、DNAから転写されるが、タンパク質には翻訳されないRNA遺伝子である。miRNA遺伝子をコードするDNA配列はmiRNAよりも長く、miRNA配列と、これとほぼ相補的な逆相補配列とを含む。このDNA配列が一本鎖RNA分子に転写されると、miRNA配列とその逆相補配列からなる塩基対から、部分的に二本鎖のRNAセグメントが形成される。マイクロRNA配列の設計は、John et al, PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004において報告されている。

【0160】

siRNAまたはmiRNAの効果を模倣した前記RNAリガンドは、通常、10~40リボヌクレオチド長であり (またはその合成類似体であり)、17~30リボヌクレオチド長であることがより好ましく、19~25リボヌクレオチド長であることがより好ましく、21~23リボヌクレオチド長であることが最も好ましい。二本鎖siRNAを使用した本発明の実施形態のいくつかにおいて、二本鎖siRNA分子は対称な3'末端オーバーハングを有していてもよく、この3'末端オーバーハングは、例えば1個または2個の(リボ)ヌクレオチドで構成されていてもよく、通常、3'末端UUまたはdTdTオーバーハングである。当業者であれば、本明細書の開示に基づき、例えばAmbion siRNA finderなどのライブラリーを使用して、適切なsiRNA配列および適切なmiRNA配列を容易に設計することができる。siRNA配列およびmiRNA配列は、合成的に作製し、細胞外から添加することによって遺伝子のダウンレギュレーションを誘導することができ、あるいは発現系 (例えばベクター) を使用して

40

50

作製することもできる。好ましい一実施形態において、siRNAは合成的に作製される。

【0161】

長鎖の二本鎖RNAを細胞内でプロセシングしてsiRNAを作製してもよい（例えばMyers (2003) Nature Biotechnology 21:324-328を参照されたい）。長鎖dsRNA分子は、対称な3'末端または5'末端オーバーハングを有していてもよく、この3'末端または5'末端オーバーハングは、例えば1個または2個の（リボ）ヌクレオチドで構成されていてもよく、あるいは長鎖dsRNA分子は平滑末端を有していてもよい。長鎖dsRNA分子は、25ヌクレオチド長以上であってもよい。長鎖dsRNA分子は、25~30ヌクレオチド長であることが好ましい。長鎖dsRNA分子は、25~27ヌクレオチド長であることがより好ましい。長鎖dsRNA分子は、27ヌクレオチド長であることが最も好ましい。30ヌクレオチド長以上のdsRNAは、pDECAPベクターを使用して発現させてもよい（Shinagawa et al., Genes and Dev., 17, 1340-5, 2003）。

10

【0162】

別の方法では、ショートヘアピン構造のRNA分子（shRNA）を細胞において発現させる。shRNAは合成siRNAよりも安定である。shRNAは、短いループ配列で連結された短い逆方向反復配列からなる。一方の逆方向反復配列は、標的遺伝子に相補的である。細胞内においてshRNAは、DICERによるプロセシングを受けてsiRNAになり、このsiRNAが標的遺伝子のmRNAを分解して、その発現を抑制する。好ましい一実施形態において、shRNAは、ベクターからの転写によって内因性に（細胞内で）生成される。shRNAは、RNAポリメラーゼIIIプロモーター（ヒトH1プロモーターやヒト7SKプロモーターなど）またはRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下でshRNA配列をコードするベクターで細胞をトランスフェクトすることによって細胞内で生成させてもよい。あるいは、shRNAは、ベクターからの転写によって外因性に（インビトロで）合成してもよい。次いで得られたshRNAを細胞内に直接導入してもよい。shRNA分子は、IL-11、IL-11R またはgp130の部分配列を含むことが好ましい。shRNA配列の長さは40~100塩基長であることが好ましく、40~70塩基長であることがより好ましい。ヘアピン構造のステム部分の長さは19~30塩基対であることが好ましい。ステム部分は、ヘアピン構造を安定化させるためにG-U対を含んでいてもよい。

20

【0163】

siRNA分子、長鎖dsRNA分子またはmiRNA分子は、（好ましくはベクター内に組み込まれた）核酸配列の転写による組換え技術によって作製してもよい。siRNA分子、長鎖dsRNA分子またはmiRNA分子は、IL-11、IL-11R またはgp130の部分配列を含むことが好ましい。

30

【0164】

一実施形態において、siRNA、長鎖dsRNAまたはmiRNAは、ベクターからの転写によって内因性に（細胞内で）生成される。ベクターは、当技術分野で公知の方法であればどのような方法で細胞に導入してもよい。これらのRNA配列の発現は、必要に応じて、組織に特異的な（例えば心臓、肝臓または腎臓に特異的な）プロモーターを使用して調節することができる。さらなる一実施形態において、siRNA、長鎖dsRNAまたはmiRNAは、ベクターからの転写によって外因性に（インビトロで）生成させてもよい。

40

【0165】

好適なベクターは、IL-11、IL-11R またはgp130を抑制することができるオリゴヌクレオチド薬を発現するように構成されたオリゴヌクレオチドベクターであってもよい。このようなベクターは、ウイルスベクターであってもよく、プラスミドベクターであってもよい。オリゴヌクレオチド治療薬は、ウイルスベクターのゲノム中に組み込まれてもよく、発現を誘導する調節配列（例えばプロモーター）に作動可能に連結されていてもよい。「作動可能に連結する」とは、ヌクレオチド配列が調節配列の影響下または制御下で発現されるように、選択されたヌクレオチド配列と調節ヌクレオチド配列が共有結合で連結されている状態を含んでいてもよい。したがって、調節配列が、選択されたヌクレオチド配列の全体またはその一部を構成するヌクレオチド配列の転写を誘導することができる場合

50

、該調節配列は、選択されたヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。

【0166】

プロモーターによって発現が誘導されるsiRNA配列をコードするウイルスベクターは、当技術分野で公知であり、オリゴヌクレオチド治療薬を長期にわたって発現できるという利点がある。ウイルスベクターとしては、レンチウイルス (Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433)、アデノウイルス (Shen et al., FEBS Lett 2003 Mar 27;539(1-3)111-4) およびレトロウイルス (Barton and Medzhitov PNAS November 12, 2002 vol.99, no.23 14943-14945) が挙げられる。

【0167】

別の実施形態において、IL-11、IL-11R またはgp130の発現の抑制が必要とされる部位へのオリゴヌクレオチド治療薬の送達を補助するように構成された担体を使用してもよい。このような担体としては、一般に、オリゴヌクレオチドと複合体化された正電荷を持つ担体 (例えば、細胞透過性カチオン性ペプチド、カチオン性ポリマー、カチオン性 dendrimer、およびカチオン性脂質) ; オリゴヌクレオチドに結合された小分子 (例えば、コレステロール、胆汁酸および脂質)、ポリマー、抗体およびRNA ; または、ナノ粒子製剤中にカプセル化されたオリゴヌクレオチド (Wang et al., AAPS J. 2010 Dec; 12(4): 492-503) が挙げられる。

10

【0168】

一実施形態において、ベクターは、核酸配列がRNAとして発現された場合に、センス鎖部分とアンチセンス鎖部分とが会合して二本鎖RNAが形成されるように、センス鎖方向とアンチセンス鎖方向の両方に核酸配列を含んでいてもよい。

20

【0169】

あるいは、siRNA分子は、当技術分野で公知の標準的な固相合成法または液相合成法を使用して合成してもよい。ヌクレオチド間の結合は、リン酸ジエステル結合またはその他の結合であってもよく、例えば、P(O)S (チオエート) ; P(S)S (ジチオエート) ; P(O)NR₂ ; P(O)R' ; P(O)OR₆ ; CO ; またはCONR₂' (式中、RはH (または塩) またはアルキル (C₁~12) であり、R₆はアルキル (C₁~9) である) の式で表される連結基が、-O-または-S-を介して隣接するヌクレオチドに連結したものが挙げられる。

【0170】

天然の塩基に加えて、修飾ヌクレオチド塩基を使用することができ、修飾ヌクレオチド塩基は、これらを含むsiRNA分子に有利な特性を付与することができる。

30

【0171】

例えば、修飾塩基は、siRNA分子の安定性を向上させ、それによって、サイレンシングに必要とされるsiRNA分子の量を低減することができる。修飾塩基を付加することによって、未修飾のsiRNAよりも安定性が向上または低下したsiRNA分子を作製することができる。

【0172】

「修飾ヌクレオチド塩基」は、修飾塩基および/または修飾糖が共有結合されたヌクレオチドを包含する。例えば、修飾ヌクレオチドとしては、3'位のヒドロキシル基および5'位のリン酸基以外の低分子量有機基が共有結合された糖を有するヌクレオチドが挙げられる。したがって、修飾ヌクレオチドは、さらに、2'-O-メチルリボース、2'-O-アルキルリボース、2'-O-アリルリボース、2'-S-アルキルリボース、2'-S-アリルリボース、2'-フルオロリボース、2'-ハロリボース、2'-アジドリボースなどの2'位置換糖 ; 炭素環式糖類似体 ; -アノマー糖 ; アラビノース、キシロース、リキソースなどのエピマー糖 ; ピラノース糖、フラノース糖、およびセドヘプツロースを含んでいてもよい。

40

【0173】

修飾ヌクレオチドは当技術分野で公知であり、例えば、アルキル化プリン、アルキル化ピリミジン、アシル化プリン、アシル化ピリミジン、その他の複素環が挙げられる。このような部類のピリミジンおよびプリンは当技術分野で公知であり、例えば、プソイドイソ

50

シトシン、 N^4 、 N^4 -エタノシトシン、8-ヒドロキシ- N^6 -メチルアデニン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、 N^6 -イソペンチルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、 N^6 -メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルケウオシン、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ- N^6 -イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、プソイドウラシル、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、ケウオシン、2-チオシトシン、5-プロピルウラシル、5-プロピルシトシン、5-エチルウラシル、5-エチルシトシン、5-ブチルウラシル、5-ペンチルウラシル、5-ペンチルシトシン、2, 6-ジアミノプリン、メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニンおよび1-メチルシトシンが挙げられる。

【0174】

RNAiを使用して、*C.elegans*、ショウジョウバエ、植物および哺乳動物の遺伝子をサイレンシングする方法は、当技術分野で公知である (Fire A, et al., 1998 Nature 391:806-811; Fire, A. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., et al., Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. et al., Science 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., et al., Nature 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., et al., Cell 101, 25-33 (2000); Bernstein, E., et al., Nature 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., et al., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); WO0129058; WO9932619およびElbashir S M, et al., 2001 Nature 411:494-498)。

【0175】

したがって、本発明は、IL-11、IL-11R またはgp130を発現する哺乳動物細胞 (例えばヒト細胞) に適切に導入または発現された場合に、RNAi法によってIL-11、IL-11R またはgp130の発現を抑制することができる核酸を提供する。

【0176】

IL-11、IL-11R またはgp130 (例えば、アクセッション番号: BC012506.1 GI:15341754 (ヒトIL-11)、BC134354.1 GI:126632002 (マウスIL-11)、AF347935.1 GI:13549072 (ラットIL-11)、NM_001142784.2 GI:391353394 (ヒトIL-11R)、NM_001163401.1 GI:254281268 (マウスIL-11R)、NM_139116.1 GI:20806172 (ラットIL-11R)、NM_001190981.1 GI:300244534 (ヒトgp130)、NM_010560.3 GI:225007624 (マウスgp130)、NM_001008725.3 GI:300244570 (ラットgp130) でGenBankから入手可能な公知のmRNA配列) に対するオリゴヌクレオチドの核酸配列は、IL-11、IL-11R またはgp130の発現を抑制またはサイレンシングするように設計してもよい。

【0177】

前記核酸は、IL-11、IL-11R またはgp130のmRNAの一部と実質的な配列同一性を有していてもよく、例えば、GenBankアクセッション番号NM_000641.3 GI:391353405 (IL-11)、NM_001142784.2 GI:391353394 (IL-11R) もしくはNM_001190981.1 GI:300244534 (gp130) で示される配列またはこれらのmRNAに相補的な配列などの一部と実質的な配列同一性を有していてもよい。

【0178】

前記核酸は二本鎖siRNAであってもよい。(当業者であれば十分に理解できるように、siRNA分子は3'末端に短いDNA配列をさらに含んでいてもよく、これについては後で詳し

10

20

30

40

50

く説明する。)

【0179】

あるいは、前記核酸はDNA(通常二本鎖DNA)であってもよく、このDNAが哺乳動物細胞内で転写されると、スパーサーを介して連結された2つの相補的部分を有するRNAが得られ、このRNAは、2つの相補的部分が互いにハイブリダイズした場合にヘアピン構造を取る。哺乳動物細胞において、このヘアピン構造部分は、DICERと呼ばれる酵素によってRNA分子から切断されて、2本の異なるRNA分子がハイブリダイズされた二本鎖RNAを得ることができる。

【0180】

好ましい実施形態のいくつかにおいて、前記核酸は、通常、配列番号4~7(IL-11)のいずれかで示す配列、または配列番号8~11(IL-11R)のいずれかで示す配列を標的とする。

10

【0181】

mRNA転写産物の一本鎖領域(すなわち自己ハイブリダイズしていない領域)のみがRNAiの標的として適していると予想される。したがって、IL-11またはIL-11RのmRNA転写産物のうち、配列番号4~7および8~11のいずれかによって示される配列に非常に類似しているその他の配列もRNAiの標的として適していると考えられる。このような標的配列の長さは、17~23ヌクレオチド長であることが好ましく、配列番号4~7および8~11のいずれかと(一方の末端で)少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個もしくは18個のヌクレオチドまたは19個のヌクレオチドすべてがオーバーラップしていることが好ましい。

20

【0182】

したがって、本発明は、IL-11またはIL-11Rを発現する哺乳動物細胞に適切に導入または発現された場合に、RNAi法によってIL-11またはIL-11Rの発現を抑制することができる核酸を提供し、この核酸は、通常、配列番号4~7および8~11のいずれかで示される配列を標的とする。

【0183】

「通常の標的とする」とは、前記核酸が、配列番号4~7および8~11のいずれかとオーバーラップする配列を標的としてもよいことを指す。具体的には、前記核酸は、配列番号4~7および8~11のいずれかで示される配列よりもわずかに長い、わずかに短いことを除いては、これらの配列と同一のヒトIL-11 mRNA配列またはヒトIL-11R mRNA配列(好ましくは17~23ヌクレオチド長)を標的としてもよい。

30

【0184】

本発明の核酸と標的配列の間で完全な同一性/相補性があることが好ましいが、これは必須ではないと予想される。したがって、本発明の核酸は、IL-11 mRNAまたはIL-11R mRNAと比較して単一塩基ミスマッチを含んでいてもよい。しかしながら、単一塩基ミスマッチであっても、その存在によって効率の低下が予想されるため、ミスマッチが存在しないことが好ましい。3'末端オーバーハングが存在する場合、3'末端オーバーハングはミスマッチの数として考慮に入れなくてもよい。

【0185】

「相補性」とは、通常見られるような、天然のリボヌクレオチドおよび/またはデオキシリボヌクレオチドからなる核酸同士の塩基対合に限定されず、非天然ヌクレオチドを含む本発明の核酸とmRNAの間の塩基対合も包含する。

40

【0186】

一実施形態において、前記核酸(本明細書において二本鎖siRNAと呼ぶ)には、配列番号12~15に示す二本鎖RNA配列が含まれる。別の実施形態において、前記核酸(本明細書において二本鎖siRNAと呼ぶ)には、配列番号16~19に示す二本鎖RNA配列が含まれる。

【0187】

しかしながら、同じIL-11 mRNA領域またはIL-11R mRNA領域を標的とするわずか

50

に短いか、わずかに長い配列でも、効果的であると予想される。具体的には、17～23bpの長さの二本鎖配列でも効果的であると予想される。

【0188】

前記二本鎖RNAを構成する各鎖は2塩基の短い3'末端オーバーハングを有していてもよく、このオーバーハングはDNAであってもよく、RNAであってもよい。3'末端DNAオーバーハングは、3'末端RNAオーバーハングを使用した場合と比べてsiRNA活性に対する効果が見られないが、核酸鎖を化学合成する際のコストが低くなる(Elbashirら, 2001c)。この理由から、2塩基のDNAが好ましい場合がある。

【0189】

両3'末端に2塩基のオーバーハングが存在する場合、これらのオーバーハングは互いに対称であってもよいが、対称であることが必須ではない。実際、センス鎖(上の鎖)の3'末端オーバーハングは、mRNAの認識と分解に関与しないため、RNAi活性には関連しない(Elbashirら, 2001a, 2001b, 2001c)。

【0190】

ショウジョウバエでのRNAi実験では、アンチセンス鎖の3'末端オーバーハングがmRNAの認識および標的指向性に関与している可能性が示されているが(Elbashirら, 2001c)、哺乳動物細胞では、3'末端オーバーハングはsiRNAのRNAi活性に必要なとは考えられていない。したがって、3'末端オーバーハングが誤ったアニーリングを起こしても、哺乳動物細胞では影響はほとんどないと考えられる(Elbashirら, 2001c; Czaudernaら, 2003)。

【0191】

したがって、siRNAのアンチセンス鎖においては、どのような2塩基オーバーハングを使用してもよい。しかしながら、2塩基のオーバーハングは-UUまたは-UG(オーバーハングがDNAである場合は-TTまたは-TG)であることが好ましく、-UU(または-TT)であることがより好ましい。-UU(または-TT)からなる2塩基オーバーハングが最も効果的であり、RNAポリメラーゼIIIの転写終結シグナル(転写終結シグナルはTTTTTである)と一致する(すなわち転写終結シグナルの一部を構成することができる)。したがって、この2塩基が最も好ましい。AA、CCおよびGGの2塩基を使用することもできるが、それほど効果的ではなく、よってあまり好ましくない。

【0192】

さらに、siRNAは3'末端オーバーハングを全く含んでいなくてもよい。

【0193】

さらに、本発明は、前述の二本鎖核酸の一方を構成鎖とする一本鎖核酸(本明細書において一本鎖siRNAと呼ぶ)を提供し、この一本鎖siRNAは、3'末端オーバーハングを有していることが好ましいが、3'末端オーバーハングを有していなくてもよい。さらに、本発明は、このような一本鎖核酸のペアを含むキットを提供し、これらの一本鎖核酸はインビトロで互いにハイブリダイズして前述の二本鎖siRNAを形成することができ、この二本鎖siRNAは次いで細胞に導入されてもよい。

【0194】

さらに、本発明は、哺乳動物細胞において、2つの相補的部分が自己ハイブリダイズして二本鎖モチーフを形成することができるRNA(本明細書においてshRNAとも呼ぶ)に転写されるDNAを提供し、形成される二本鎖モチーフとしては、例えば、配列番号12～15および16～19からなる群から選択される配列、またはこれらの配列のいずれかにおいて単一の塩基対が置換されている配列が挙げられる。

【0195】

前記相補的部分は、通常、スペーサーによって連結され、このスペーサーは、これら2つの相補的部分が互いにハイブリダイズすることが可能となるような適切な長さで配列を有する。2つの相補的部分(すなわちセンス鎖およびアンチセンス鎖)は、5'末端と3'末端で連結されていてもよく、どちらが5'末端側であってもよい。前記スペーサーは、通常、約4～12ヌクレオチド長、好ましくは4～9ヌクレオチド長、より好ましくは6～9ヌ

10

20

30

40

50

クレオチド長の短い配列であってもよい。

【0196】

前記スパーサーの5'末端(上流の相補的部分の3'末端の直後)は、-UU-または-UG-の2塩基からなることが好ましく、ここでも、-UU-がより好ましい(しかし、ここでも、これらの特定の2塩基の使用は必須ではない)。OligoEngine社(米国ワシントン州シアトル)のpSuperシステムでの使用に推奨される好適なスパーサーはUUCAAGAGAである。このスパーサーやその他のスパーサーを用いた場合、スパーサーの両末端は互いにハイブリダイズされるため、例えば、配列番号12~15または16~19に示される配列そのものよりも、少数の塩基対(例えば1塩基対または2塩基対)だけ長い二本鎖モチーフが得られる。

10

【0197】

同様に、転写されたRNAは、下流の相補的部分に由来する3'末端オーバーハングを含むことが好ましい。ここでも、このオーバーハングとしては-UUまたは-UGが好ましく、-UUがより好ましい。

【0198】

前述したように、このようなshRNA分子は哺乳動物細胞内でDICER酵素によって切断され、ハイブリダイズされたdsRNAを構成する各一本鎖の一方またはその両方が3'末端オーバーハングを含む二本鎖siRNAを形成してもよい。

【0199】

本発明の核酸を合成するための技術は当技術分野においてよく知られていることは言うまでもない。

20

【0200】

当業者であれば、よく知られている技術および市販の材料を使用して、本発明のDNAに適した転写ベクターを容易に構築することができるであろう。具体的には、本発明のDNAには、プロモーターや転写終結配列などの制御配列が連結される。

【0201】

OligoEngine社製(米国ワシントン州シアトル)の市販品であるpSuperシステムおよびpSuperiorシステムが特に好適である。これらのシステムでは、ポリメラーゼIIIプロモーター(H1)とT₅転写終結配列を使用しており、T₅転写終結配列は転写産物の3'末端に2個のU残基を付加する(この転写産物がDICERでプロセシングされることによって、一方のRNA鎖に3'末端UUオーバーハングが付加されたsiRNAが得られる)。

30

【0202】

別の好適なシステムは、Shinら(RNA, 2009 May; 15(5): 898-910)に記載されており、このシステムでは、別のポリメラーゼIIIプロモーター(U6)が使用されている。

【0203】

本発明の二本鎖siRNAは、後述するような公知の技術を使用して、インビトロまたはインビボにおいて哺乳動物細胞に導入することにより、IL-11またはIL-11受容体の発現を抑制してもよい。

【0204】

同様に、本発明のDNAを含む転写ベクターは、後述するような公知の技術を使用してインビトロまたはインビボにおいて腫瘍細胞に導入し、RNAを一時的または安定に発現させることにより、IL-11またはIL-11受容体の発現を抑制してもよい。

40

【0205】

したがって、本発明はさらに、哺乳動物(例えばヒト)細胞においてIL-11またはIL-11受容体の発現を抑制する方法であって、本発明の二本鎖siRNAまたは本発明の転写ベクターを前記細胞に投与することを含む方法を提供する。

【0206】

同様に、本発明はさらに、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を治療する方法であって、本発明の二本鎖siRNAまたは本発明の転写ベクターを対象に投与することを含む方法を提供する。

50

【 0 2 0 7 】

さらに、本発明は、治療方法、好ましくは、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を治療する方法において使用するための、本発明の二本鎖siRNAおよび本発明の転写ベクターを提供する。

【 0 2 0 8 】

さらに、本発明は、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療用医薬品の調製における、本発明の二本鎖siRNAおよび本発明の転写ベクターの使用を提供する。

【 0 2 0 9 】

さらに、本発明は、本発明の二本鎖siRNAまたは本発明の転写ベクターと、1種以上の薬学的に許容される担体との混合物を含む組成物を提供する。好適な担体としては、細胞膜透過性を向上させることができる親油性担体または小胞が挙げられる。

10

【 0 2 1 0 】

本発明の二本鎖siRNAおよびDNAベクターの投与に適した材料および方法は当技術分野でよく知られており、RNAi技術は様々な可能性を秘めていることから、改良された方法が開発中である。

【 0 2 1 1 】

核酸を哺乳動物細胞に導入するにあたり、通常、様々な技術を利用することができる。使用する技術は、核酸をインビトロで培養細胞に導入するのか、それともインビボで患者の細胞に導入するのかによって選択される。インビトロにおける哺乳動物細胞への核酸の導入に適した技術としては、リポソームの使用、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、細胞融合法、DEAEデキストラン法およびリン酸カルシウム沈殿法が挙げられる。インビボにおける遺伝子導入技術としては、ウイルスベクター（通常、レトロウイルスベクター）を使用したトランスフェクション、ウイルス外被タンパク質-リポソーム複合体を使用したトランスフェクション（Dzau et al. (2003) Trends in Biotechnology 11, 205-210）が挙げられる。

20

【 0 2 1 2 】

具体的には、インビトロまたはインビボにおいて本発明の核酸を細胞に投与するのに好適な技術は、以下の文献に記載されている。

【 0 2 1 3 】

総説：Borkhardt, A. 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? Cancer Cell. 2:167-8. Hannon, G.J. 2002. RNA interference. Nature. 418:244-51. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 3:737-47. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003b. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. Curr Med Chem. 10:245-56. Shuey, D.J., D.E. McCallus, and T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov Today. 7:1040-6.

30

【 0 2 1 4 】

リポソームを使用した全身送達：Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. W olff, and H. Herweijer. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet. 32:107-8. Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nat Biotechnol. 20:505-8. Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med. 9:347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal, and M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. J Mol Biol. 327:761-6.

40

【 0 2 1 5 】

ウイルスを使用した移入：Abbas-Terki, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralo

50

ng, and P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther.* 13:2197-201. Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14943-5. Devroe, E., and P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol.* 2:15. Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisziewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. *Am J Pharmacogenomics.* 2:245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh, and P.M. Chaudhary. 2003. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol Ther.* 2:206-10. Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:183-8. Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser, and M. Eder. 2003a. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle.* 2:251-7. Shen, C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler, and S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett.* 539:111-4.

10

【 0 2 1 6 】

ペプチドの送達 : Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 11:461-6. Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. 2003. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31:2717-24.

20

標的細胞へのsiRNAの送達に適していると考えられる他の技術としては、米国特許第6,649,192(B)号明細書および米国特許第5,843,509(B)号明細書に記載されているような、ナノ粒子またはナノカプセルを使用した方法が挙げられる。

【 0 2 1 7 】

IL-11媒介性シグナル伝達の抑制

本発明の実施形態において、IL-11の作用を抑制することができる薬剤は、以下の機能特性のうちの一つ以上を有していてもよい。

- ・ IL-11媒介性シグナル伝達の抑制
- ・ IL-11R :gp130受容体複合体へのIL-11の結合を介したシグナル伝達の抑制
- ・ gp130へのIL-11:IL-11R 複合体の結合を介したシグナル伝達(すなわちIL-11のトランスシグナル伝達)の抑制
- ・ IL-11媒介性プロセスの抑制
- ・ IL-11、IL-11R および/またはgp130の遺伝子発現/タンパク質発現の抑制

30

【 0 2 1 8 】

これらの特性は、適切なアッセイにおいて関連因子を分析することによって測定することができ、適切なコントロールと前記薬剤の性能を比較することを含んでいてもよい。当業者であれば、所定のアッセイにおいて適切なコントロール条件を決定することができる。

【 0 2 1 9 】

IL-11媒介性シグナル伝達および/またはIL-11媒介性プロセスは、IL-11断片を介したシグナル伝達、およびIL-11またはその断片を含むポリペプチド複合体を介したシグナル伝達を含む。IL-11媒介性シグナル伝達は、ヒトIL-11および/またはマウスIL-11を介したシグナル伝達であってもよい。IL-11媒介性シグナル伝達は、IL-11またはIL-11含有複合体が結合する受容体に、IL-11またはIL-11含有複合体が結合することによって起こるシグナル伝達であってもよい。

40

【 0 2 2 0 】

いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、IL-11またはIL-11含有複合体の生物学的活性を抑制可能であってもよい。

【 0 2 2 1 】

50

いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、IL-11R および/またはgp130を含む受容体（例えばIL-11R :gp130）を介したシグナル伝達により活性化される1つ以上のシグナル伝達経路に対するアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、IL-11R および/またはgp130を含む1つ以上の免疫受容体複合体（例えばIL-11R :gp130）を介したシグナル伝達を抑制することができる。本発明の様々な態様において、本明細書で提供する薬剤は、IL-11媒介性のシスシグナル伝達および/またはトランスシグナル伝達を抑制することができる。本発明の様々な態様によるいくつかの実施形態において、本明細書で提供する薬剤は、IL-11媒介性シスシグナル伝達を抑制することができる。

【0222】

いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、該薬剤の非存在下における（または適切なコントロール薬剤の存在下における）IL-11媒介性シグナル伝達の量と比較して、その100%未満、例えば99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下にまでIL-11媒介性シグナル伝達を抑制可能であってもよい。いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、該薬剤の非存在下における（または適切なコントロール薬剤の存在下における）IL-11媒介性シグナル伝達の量と比較して、その1倍未満、例えば0.99倍以下、0.95倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.75倍以下、0.7倍以下、0.65倍以下、0.6倍以下、0.55倍以下、0.5倍以下、0.45倍以下、0.4倍以下、0.35倍以下、0.3倍以下、0.25倍以下、0.2倍以下、0.15倍以下または0.1倍以下にまでIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる。

【0223】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達は、IL-11R :gp130受容体へのIL-11の結合を介したシグナル伝達であってもよい。このようなシグナル伝達は、例えばIL-11R およびgp130を発現する細胞をIL-11で処理するか、またはIL-11R とgp130を発現する細胞においてIL-11の産生を刺激することによって分析することができる。

【0224】

本発明の薬剤によるIL-11媒介性シグナル伝達の抑制のIC₅₀は、例えば、IL-11R およびgp130を発現するBa/F3細胞を、ヒトIL-11および本発明の薬剤の存在下で培養し、DNAへの³H-チミジンの取り込みを測定することによって測定してもよい。いくつかの実施形態において、このようなアッセイにおける本発明の薬剤のIC₅₀値は、10 μg/ml以下であってもよく、好ましくは、5 μg/ml以下、4 μg/ml以下、3.5 μg/ml以下、3 μg/ml以下、2 μg/ml以下、1 μg/ml以下、0.9 μg/ml以下、0.8 μg/ml以下、0.7 μg/ml以下、0.6 μg/ml以下または0.5 μg/ml以下である。

【0225】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達は、gp130へのIL-11:IL-11R 複合体の結合を介したシグナル伝達であってもよい。いくつかの実施形態において、IL-11:IL-11R 複合体は可溶性であってもよく、例えばIL-11R の細胞外ドメインとIL-11の複合体であってもよく、可溶性IL-11R アイソフォーム/断片とIL-11の複合体であってもよい。いくつかの実施形態において、可溶性IL-11R は、IL-11R の可溶性（分泌型）アイソフォームであるか、または膜結合型IL-11R の細胞外ドメインがタンパク質分解されることによって遊離した産物である。

【0226】

いくつかの実施形態において、IL-11:IL-11R 複合体は、膜結合型であってもよく、例えば膜結合型IL-11R とIL-11からなる複合体であってもよい。gp130へのIL-11:IL-11R 複合体の結合を介したシグナル伝達は、IL-11:IL-11R 複合体でgp130発現細胞を処理することによって分析することができる。例えば、ペプチドリンカーを介してIL-11R の細胞外ドメインに連結されたIL-11を含む組換え融合タンパク質（例えばhyper IL-11）でgp130発現細胞を処理することによって分析することができる。hyper IL-11は、IL-1

10

20

30

40

50

1R (ドメイン1~3を構成する1~317番目のアミノ酸残基; UniProtKB: Q14626)の断片と、IL-11 (UniProtKB: P20809の22~199番目のアミノ酸残基)と、20アミノ酸長のリンカー(配列番号20)を使用して構築した。hyper IL-11のアミノ酸配列を配列番号21に示す。

【0227】

いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、gp130へのIL-11:IL-11R 複合体の結合を介したシグナル伝達を抑制可能であってもよく、IL-11R :gp130受容体へのIL-11の結合を介したシグナル伝達を抑制することもできる。

【0228】

いくつかの実施形態において、本発明の薬剤は、IL-11媒介性プロセスを抑制可能であってもよい。

10

【0229】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11および/またはIL-11R の遺伝子/タンパク質の発現を抑制可能であってもよい。遺伝子および/またはタンパク質の発現は、本明細書に記載の方法または当技術分野において当業者によく知られている方法により測定することができる。

【0230】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11および/またはIL-11R の遺伝子/タンパク質の発現を、該薬剤の非存在下(または適切なコントロール薬剤の存在下)での発現量の100%未満に抑制可能であってもよく、例えば、99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または1%以下に抑制可能であってもよい。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、IL-11および/またはIL-11R の遺伝子/タンパク質の発現を、該薬剤の非存在下(または適切なコントロール薬剤の存在下)での発現量の1倍未満に抑制することができる。例えば、0.99倍以下、0.95倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.75倍以下、0.7倍以下、0.65倍以下、0.6倍以下、0.55倍以下、0.5倍以下、0.45倍以下、0.4倍以下、0.35倍以下、0.3倍以下、0.25倍以下、0.2倍以下、0.15倍以下または0.1倍以下に抑制することができる。

20

【0231】

肝毒性の治療/予防

本発明は、例えば、本明細書で述べるような、肝毒性ならびに肝毒性に関連する障害、疾患および状態の治療/予防のための方法ならびに発明品(薬剤および組成物)を提供する。さらに、例えば、本明細書で述べるような、肝毒性ならびに肝毒性に関連する障害、疾患および状態の治療/予防のための方法を提供する。

30

【0232】

治療は、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制(すなわちIL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用)により達成される。すなわち、本発明は、例えば、細胞、組織/器官/器官系、対象などにおいて、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制を介して、肝毒性ならびに肝毒性に関連する障害、疾患および状態を治療/予防するものである。いくつかの実施形態において、本開示によるIL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、肝臓の細胞(例えば肝細胞)のIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することを含む。

40

【0233】

肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療方法または予防方法において使用するための、インターロイキン11(IL-11)媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を提供する。

【0234】

また、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療方法または予防方法において使用するための医薬品の製造における、インターロイキン11(IL-11)媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の使用を提供する。

50

【0235】

さらに、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を治療または予防する方法であって、治療を必要とする対象に、インターロイキン11 (IL-11) 媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0236】

いくつかの実施形態において、本発明は、疾患/状態において、肝毒性に関連する病態を治療/予防するものである。すなわち、本発明は、肝毒性が病理学的に関与する疾患/状態を治療/予防するものである。肝毒性に関連する病態は、本明細書において説明されている。

10

【0237】

肝毒性および/または肝毒性に関連する病態の抑制により利益を受け得る疾患/状態であれば実質的にどのようなものであっても、本発明の治療的有用性および予防的有用性を適用できることは、当業者であれば容易に理解できるであろう。本発明の治療的有用性および予防的有用性は、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している対象であれば、どのような対象にでも適用することができる。また、本発明の治療的有用性および予防的有用性は、肝毒性に関連する病態が存在する疾患に罹患している対象であれば、どのような対象にでも適用することができる。

【0238】

いくつかの実施形態において、本発明は、肝毒性により引き起こされる疾患/状態または肝毒性により悪化する疾患/状態を治療/予防するものである。いくつかの実施形態において、予後不良の肝毒性を有する対象の疾患/状態の治療/予防を提供する。

20

【0239】

いくつかの実施形態において、本発明により治療/予防される肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態は、病変を起こした器官/組織/対象において、例えば、正常で病変のない器官/組織/対象(すなわち、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態による影響を受けていない器官/組織/対象)と比較して、以下の1つ以上の特徴を有していてもよい。

・肝機能の低下。

・アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT / SGPT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、および/またはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST / SGOT) などの肝臓酵素の血清中濃度の上昇。

30

・0.5を超えるAST / ALT比、1を超えるAST / ALT比、または2を超えるAST / ALT比。

・血液中アルカリホスファターゼ (ALP) 濃度の上昇。

・ - グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) 濃度の上昇。

・TNF、IL-1、IFNなどのサイトカインの血清中濃度の上昇。

・血清中アルブミン濃度の低下。

・例えば、VanWagner LB, JAMA. 313 (5): 516-517 (この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される) に記載の基準範囲を超える総ビリルビン (非抱合型 (間接型) ビリルビンと抱合型 (直接型) ビリルビン) 濃度の上昇。

40

・肝重量の減少。

・肝細胞におけるアクチンストレスファイバーの形成の増加。

・小葉中心壊死 (すなわち肝小葉中心部の組織の壊死) の増加。

【0240】

前記段落に記載の特徴は、本明細書において、「肝毒性の症状」または「肝毒性に関連する因子」と呼んでもよい。

【0241】

研究室で行われる肝臓を用いた試験の基準値は、例えば、Gowda S et al., Pan Afr Med J. 2009; 3: 17に記載されている (この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される)。

50

【0242】

いくつかの実施形態において、本発明により治療／予防される肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態は、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態により病変を起こした器官／組織／対象において、例えば、正常な器官／組織／対象（すなわち、肝毒性や肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態のない器官／組織／対象）と比較して、IL-11およびIL-11R の一方または両方の発現が増加していることを特徴としてもよい。

【0243】

いくつかの実施形態において、本発明は、例えば、本明細書で述べるような、肝毒性に関連する疾患／障害／状態における肝毒性を治療／予防するものである。いくつかの実施形態において、本発明は、肝毒性および肝毒性に関連する基礎疾患／障害／状態を治療／予防するものである。例えば、IL-11媒介性シグナル伝達の抑制は、化学療法に関連する肝毒性におけるIL-11の役割に対する拮抗作用として有用であるとともに、がんにおけるIL-11の役割に対する拮抗作用としても有用である。

10

【0244】

本発明による、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療／予防は、IL-11のアップレギュレーションに関連した、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療／予防であってもよく、例えば、前記疾患／障害／状態の症状が現れた細胞もしくは組織、もしくは前記疾患／障害／状態の症状が現れる細胞もしくは組織におけるIL-11のアップレギュレーションまたは細胞外のIL-11もしくはIL-11R のアップレギュレーションに関連した、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の治療／予防であってもよい。

20

【0245】

肝毒性に関連する障害、疾患または状態は、どのような組織、器官または器官系に影響を及ぼすものであってもよい。いくつかの実施形態において、前記疾患／障害／状態は、いくつかの組織／器官／器官系に影響を及ぼすものであってもよい。いくつかの実施形態において、前記疾患／障害／状態は、肝臓に影響を及ぼす。

【0246】

いくつかの実施形態において、肝毒性に関連する障害、疾患または症状は、循環器系、消化器系、排泄器系、呼吸器系、腎臓系、生殖器系、循環系、筋肉系、内分泌系、外分泌系、リンパ系、免疫系、神経系および／または骨格系のうちの1つ以上に影響を与える。

30

【0247】

いくつかの実施形態において、本発明は、急性肝障害（ALI）、急性肝不全、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝損傷、肝炎（例えば、ウイルス性肝炎）、アルコール性肝炎、肝虚血再灌流障害（IRI）（例えば、温虚血再灌流（WIR））、放射線誘発性肝疾患（RILD）、薬物誘発性肝障害（DILI）、薬物誘発性特異体質性肝障害（IDILI）、自己免疫性肝障害、胆汁うっ滞性肝疾患、HIVおよびがんにおける、肝毒性に関連する病態を治療／予防するものである。

【0248】

前記治療は、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の進行の阻止に有効であってもよく、例えば、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の悪化の低減／遅延／予防に有効であってもよく、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症の低減／遅延／予防に有効であってもよい。いくつかの実施形態において、前記治療によって、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の症状が改善されてもよく、例えば、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の症状の重症度が低下してもよく、かつ／または肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の症状が緩和してもよい。いくつかの実施形態において、前記治療によって生存率が上昇してもよい。いくつかの実施形態において、前記治療は、肝毒性および／または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の作用および／または症状の緩和に効果的である。

40

50

【0249】

特に、本発明者らは、IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用を介して、肝毒性および急性肝不全（ALF）の症状の低減（すなわち緩和）ならびに急性肝不全に関連する死亡率の低減が可能であることを実証している。

【0250】

「予防」は、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症の予防、ならびに/または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の悪化の予防を指してもよく、例えば、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の後期段階または慢性段階への進行の予防を指してもよい。

【0251】

いくつかの実施形態において、本発明は、肝移植における肝毒性を治療/予防するものである。IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニストは、移植片の採取前にドナーである対象に投与することにより、移植片への損傷を最小限に抑えてもよい。IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニストは、移植片の採取前および/または採取後にドナーである対象に投与することにより、ドナーである該対象の肝毒性を治療/予防してもよい。IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニストは、移植前および/または移植後にレシピエントである対象に投与することにより、レシピエントである該対象の肝毒性を治療/予防してもよい。いくつかの実施形態において、前記治療は、移植の受容の向上/移植の拒絶の抑制に効果的であってもよい。

【0252】

本発明の様々な態様によれば、本発明に従って、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を治療および/または予防する方法は、

肝組織への損傷を低減すること；

肝細胞死を低減すること；

肝細胞におけるIL-11媒介性シグナル伝達を低減すること；

肝臓におけるCASP3の活性化を低減すること；

肝機能を向上させること；

血清中ALT濃度を低減すること；

血清中AST濃度を低減すること；

肝臓中GSH濃度を増加させること；

急性肝不全を低減すること；

劇症肝不全を低減すること；

急性肝不全に関連する死亡を低減すること；

肝重量を増加させること；

肝組織を再生させること；

肝臓におけるERKおよび/またはJNKの活性化（すなわちリン酸化）を低減させること；

肝臓における炎症促進遺伝子/タンパク質の発現を低減させること；

NOX4遺伝子/タンパク質の発現を低減させること；

肝臓におけるROSの産生を低減させること；

肝臓におけるPCNA、サイクリンD1、サイクリンD3および/またはサイクリンE1の遺伝子/発現を増加させること；ならびに

肝臓におけるRbの活性化（リン酸化）を増加させること

のうちの1つ以上を含んでいてもよい。

【0253】

さらに、本発明は、肝組織への損傷の低減、肝細胞死の低減、肝細胞におけるIL-11媒介性シグナル伝達の低減、肝臓におけるCASP3の活性化の低減、肝機能の向上、血清中ALT濃度の低減、血清中AST濃度の低減、肝臓中GSH濃度の増加、急性肝不全の低減、劇症肝不全の低減、急性肝不全に関連する死亡の低減、肝重量の増加、肝組織の再生、肝臓におけるERKおよび/またはJNKの活性化（すなわちリン酸化）の低減、肝臓における炎症促進遺伝子/タンパク質の発現の低減、NOX4遺伝子/タンパク質の発現の低減、肝臓に

10

20

30

40

50

おけるROSの産生の低減、肝臓におけるPCNA、サイクリンD1、サイクリンD3および/もしくはサイクリンE1の遺伝子/タンパク質の発現の増加、ならびに/または肝臓におけるRbの活性化(リン酸化)の増加に使用するための、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を提供する。

【0254】

いくつかの実施形態において、本発明は、急性肝障害(ALI)、急性肝不全、急性肝疾患、慢性肝疾患、肝損傷、肝炎(例えば、ウイルス性肝炎)、アルコール性肝炎、肝虚血再灌流障害(IRI)(例えば、温虚血再灌流(WIR))、放射線誘発性肝疾患(RILD)、薬物誘発性肝障害(DILI)、薬物誘発性特異体質性肝障害(IDILI)、自己免疫性肝障害、胆汁うっ滞性肝疾患、HIVおよびがんを治療/予防するものである。

10

【0255】

本明細書で述べる「がん」は、望ましくない細胞増殖(もしくは望ましくない細胞増殖によって発症する疾患)、新生物または腫瘍であればどのようなものであってもよく、あるいは望ましくない細胞増殖、新生物もしくは腫瘍のリスクの上昇または望ましくない細胞増殖、新生物もしくは腫瘍の素因であってもよい。がんは良性でも悪性でもよく、原発性でも二次性(転移性)でもよい。新生物または腫瘍は、細胞のどのような異常成長または異常増殖であってもよく、どのような組織で発生したものであってもよい。新生物または腫瘍が発生しうる組織の例として、副腎、副腎髄質、肛門、虫垂、膀胱、血液、骨、骨髓、脳、乳房、盲腸、中枢神経系(脳を含むか、脳を除く)、小脳、子宮頸部、大腸、十二指腸、子宮内膜、上皮細胞(例えば腎臓の上皮)、胆嚢、食道、グリア細胞、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、喉頭、肝臓、肺、リンパ液、リンパ節(腹部リンパ節、腋窩リンパ節、頸部リンパ節、鼠径リンパ節、縦隔リンパ節、骨盤リンパ節、大動脈周囲リンパ節を含む)、リンパ芽球、上顎、縦隔、腸間膜、子宮筋層、鼻咽腔、網、口腔、卵巣、膵臓、耳下腺、末梢神経系、腹腔、胸膜、前立腺、唾液腺、S状結腸、皮膚、小腸、軟部組織、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、扁桃腺、気管、子宮、外陰および白血球が挙げられる。

20

【0256】

がんは、特定の種類のがんであってもよい。がんの種類例として、星状細胞腫、癌腫(例えば、腺癌、肝細胞癌、髄様癌、乳頭状癌、扁平上皮癌)、神経膠腫、リンパ腫、髄芽腫、悪性黒色腫、骨髄腫、髄膜腫、神経芽腫、および肉腫(例えば、血管肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫)が挙げられる。

30

【0257】

本明細書において、「がん」は、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、副腎皮質がん、肛門がん、膀胱がん、血液がん、骨がん、脳腫瘍、乳がん、女性生殖系のがん、男性生殖系のがん、中枢神経系リンパ腫、子宮頸がん、小児横紋筋肉腫、小児肉腫、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、結腸・直腸がん、結腸がん、子宮内膜がん、子宮内膜肉腫、食道がん、眼がん、胆嚢がん、胃がん、消化管がん、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、肝細胞がん、ホジキン病、下咽頭がん、カポジ肉腫、腎臓がん、喉頭がん、白血病、白血病、肝臓がん、肺がん、悪性線維性組織球腫、悪性胸腺腫、悪性黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄腫、鼻腔・副鼻腔がん、鼻咽腔がん、神経系がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、下垂体腫瘍、形質細胞腫、中枢神経原発リンパ腫、前立腺がん、直腸がん、呼吸器系がん、網膜芽細胞腫、唾液腺がん、皮膚がん、小腸がん、軟部肉腫、胃がん、胃がん、睾丸がん、甲状腺がん、泌尿器系がん、子宮肉腫、膣がん、血管系がん、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症およびウィルムス腫瘍のうちの1つ以上を含んでいてもよい。

40

【0258】

特定の実施形態において、本発明は、肝毒性を予防するものである。いくつかの実施形態において、肝毒性傷害(例えば、物理的な肝毒性傷害および/または化学的な肝毒性傷害)の発症前に、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することにより、肝毒性に対する保護

50

効果を提供する。肝毒性傷害の発症前にIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することによって、肝毒性傷害により生じる肝毒性の1つ以上の症状を低減してもよい。

【0259】

特定の実施形態において、本発明は、肝毒性を治療するものである。いくつかの実施形態において、肝毒性傷害（例えば、物理的な肝毒性傷害、灌流に関連する肝毒性傷害および/または化学的な肝毒性傷害）の発症後に、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することにより、肝毒性を低減する。肝毒性傷害の発症後にIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することによって、肝毒性の1つ以上の症状を低減してもよい。

【0260】

さらなる態様において、本発明は、肝毒性（例えば、薬物誘発性肝障害（例えば、アセトアミノフェン（APAP）誘発性肝毒性））の治療/予防を目的として、別の治療的介入/予防的介入と組み合わせて使用するための、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を提供する。APAPの過剰摂取（および長期摂取）（APAP誘発性肝毒性）に対する治療的介入/予防的介入は、例えば、Park et al., BMJ Clin Evid. (2015) 2015: 2101においてレビューされている（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

10

【0261】

そのような介入として、経口摂取後に消化管からのアセトアミノフェン（APAP）の取り込みを最小限に抑えることを目的とした治療/処置が挙げられる。そのような治療/処置として、胃洗浄、催吐薬の投与または活性炭の投与が挙げられる。

20

【0262】

さらなる介入として、グルタチオン濃度の維持/増加を目的とした治療/処置が挙げられる。そのような治療/処置には、アセチルシステイン（例えばN-アセチルシステイン（NAC））、メチオニン、システアミンまたはカルシトリオールが挙げられる。

【0263】

さらなる介入として、例えば、肝不全の発症後、または肝不全の発症が予想される場合に、機能性の肝組織を対象に提供することを目指した治療/処置が挙げられる。そのような治療/処置として、肝移植が挙げられる。

【0264】

別の一態様において、本発明は、対象においてアセトアミノフェン（APAP）誘発性肝毒性を治療/予防する方法において使用するための、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を提供し、前記方法は、(i) IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤および(ii) APAP誘発性肝毒性の治療/予防に有用な別の（異なる）薬剤を対象に投与することを含む。さらに、対象においてAPAP誘発性肝毒性を治療/予防する方法において使用するための、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤とAPAP誘発性肝毒性の治療/予防に有用な別の（異なる）薬剤とを含む組み合わせ（例えば組成物）を提供し、前記方法は、前記組み合わせを対象に投与することを含む。

30

【0265】

さらに、対象におけるAPAP誘発性肝毒性の治療用/予防用医薬品の製造における、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の使用を提供し、前記方法は、(i) IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤および(ii) APAP誘発性肝毒性の治療/予防に有用な別の（異なる）薬剤を対象に投与することを含む。さらに、対象におけるAPAP誘発性肝毒性の治療用/予防用医薬品の製造における、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤とAPAP誘発性肝毒性の治療/予防に有用な別の（異なる）薬剤とを含む組み合わせ（例えば組成物）の使用を提供し、前記方法は、前記組み合わせを対象に投与することを含む。

40

【0266】

さらに、対象においてAPAP誘発性肝毒性を治療/予防する方法であって、(i) IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤および(ii) APAP誘発性肝毒性の治療/予防に有用な別の（異なる）薬剤を対象に投与することを含む方法を提供する。さらに、

50

対象においてAPAP誘発性肝毒性を治療／予防する方法であって、(i) IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤と(ii) APAP誘発性肝毒性の治療／予防に有用な別の(異なる)薬剤とを含む組み合わせ(例えば組成物)を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0267】

本明細書に記載の態様による実施形態のいくつかにおいて、(IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤以外の) APAP誘発性肝毒性の治療／予防に有用な薬剤は、アセチルシステイン(例えばNAC)、メチオニン、システアミン、カルシトリオール、催吐剤および活性炭から選択される。特定の実施形態において、(IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤以外の) APAP誘発性肝毒性の治療／予防に有用な薬剤は、アセチルシステイン(例えばNAC)である。

10

【0268】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤とAPAP誘発性肝毒性の治療／予防に有用な別の(異なる)薬剤とを使用する態様は、いずれか薬剤のみを使用した場合(すなわち単剤療法とした場合)に観察される効果と比較して向上した治療効果を提供する。いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤とAPAP誘発性肝毒性の治療／予防に有用な別の(異なる)薬剤とを使用する態様は、いずれか薬剤のみを使用した場合に観察される効果と比較して相乗的な治療効果(すなわち相乗効果)を達成する。

【0269】

20

投与

IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の投与は、対象が利益を受けるのに十分な「治療に有効な」量または「予防に有効な」量で行うことが好ましい。

【0270】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害(すなわち肝毒性の原因)の発症前に、それと同時にまたはその後に投与してもよい。いくつかの実施形態において、肝毒性傷害は、化学物質によるものであり、例えば、肝毒性薬剤(例えば、肝毒性薬物(例えばAPAP))の投与または摂取による肝毒性傷害である。いくつかの実施形態において、肝毒性の原因は物理的処置であり、例えば、外科手術、虚血／再灌流または物理的障害を原因とした、例えば、肝細胞／肝組織の物理的損傷である。いくつかの実施形態において、肝毒性傷害は、肝毒性を有する環境要因によるものである。

30

【0271】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、肝毒性傷害の発症前に投与される。前記薬剤は、肝毒性傷害の発症が予想される場合に投与してもよい。前記薬剤は、後に発症する肝毒性傷害により生じる肝毒性を予防／低減するために投与してもよい。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害の発症前の所定の時間内に投与される。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害の発症前の1週間以内に投与され、例えば、肝毒性傷害の発症前の72時間以内、60時間以内、48時間以内、36時間以内、24時間以内、16時間以内、12時間以内、10時間以内、8時間以内、6時間以内、4時間以内、2時間以内、1時間以内または30分以内に投与される。

40

【0272】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、肝毒性傷害の発症と同時に投与される。前記薬剤は、肝毒性傷害により生じる肝毒性を予防／低減するために投与してもよい。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害の発症と同時に投与され、例えば、肝毒性傷害が発症する前後の6時間以内、4時間以内、2時間以内、1時間以内または30分以内に投与される。

【0273】

いくつかの実施形態において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、肝毒性傷害の発症後に投与される。前記薬剤は、過去に発症した肝毒性傷害により生

50

じる肝毒性を予防／低減するために投与してもよい。前記薬剤は、肝毒性の発症後に投与してもよい。前記薬剤は、肝毒性に相関する因子が検出された後に投与してもよい。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害を発症してから所定の時間内に投与される。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害を発症してから1ヶ月以内に投与され、例えば、肝毒性傷害を発症してから3週間以内、2週間以内、1週間以内、6日以内、5日以内、4日以内、72時間以内、60時間以内、48時間以内、36時間以内、24時間以内、16時間以内、12時間以内、8時間以内、6時間以内、4時間以内、2時間以内、1時間以内または30分以内に投与される。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、肝毒性傷害を発症してから、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、16時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間または1ヶ月が経過してから投与される。

10

【0274】

特定の実施形態において、肝毒性傷害は、肝毒性薬剤の投与／摂取により発症したものである。いくつかの実施形態において、肝毒性薬剤は、直接的または間接的に肝毒性を起こす化学物質である。いくつかの実施形態において、肝毒性薬剤はアセトアミノフェンである。

【0275】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は、アセトアミノフェンを過剰摂取してから、48時間以内、36時間以内、24時間以内、16時間以内、12時間以内、8時間以内、6時間以内、4時間以内、2時間以内、1時間以内または30分以内に投与される。いくつかの実施形態において、前記薬剤は、アセトアミノフェンの過剰摂取後、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、16時間、24時間、36時間または48時間が経過してから投与される。

20

【0276】

実際の投与量、投与速度および投与後の時間推移は、肝毒性の特性および重症度ならびに薬剤の特性に左右される。治療の処方（例えば用量の決定など）は、一般医およびその他の分野の医師の責任下で行われ、通常、治療の対象となる疾患／状態、個々の対象の状態、送達部位、投与方法、および医師によく知られているその他の要因を考慮に入れて行われる。このような手法およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkinsに記載されている。

30

【0277】

本発明の薬剤は、複数回投与してもよい。1回以上の投与または各回の投与と同時にまたは連続して別の治療剤を投与してもよい。

【0278】

複数回の投与は所定の時間間隔を空けて行ってもよく、この時間間隔は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日もしくは31日、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月もしくは6ヶ月であってもよい。一例として、7日ごとに1回、14日ごとに1回、21日ごとに1回、または28日ごとに1回（±3日、2日または1日）投与してもよい。

40

【0279】

治療用途において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤は、当業者によく知られている1種以上の薬学的に許容されるその他の成分とともに医薬品または医薬製剤として製剤化することが好ましい。薬学的に許容されるその他成分としては、薬学的に許容される担体、アジュバント、賦形剤、希釈剤、充填剤、緩衝剤、保存剤、抗酸化剤、滑沢剤、安定剤、可溶化剤、界面活性剤（例えば湿潤剤）、マスキング剤、着色剤、香味剤および甘味剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0280】

本明細書において、「薬学的に許容される」とは、合理的なベネフィット・リスク比に相応して、過度の毒性、刺激、アレルギー反応またはその他の問題や合併症を引き起こす

50

ことなく、妥当な医学的判断の範囲内において、投与対象（例えばヒト）の組織との接触における使用に適した化合物、成分、材料、組成物、剤形などを指す。さらに、担体、アジュバント、賦形剤などはそれぞれ、製剤中の他の成分との適合性の点において「許容される」ものでなければならない。

【0281】

好適な担体、アジュバント、賦形剤などは、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990；および Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994などの、医薬品についての標準的な教科書に記載されている。

【0282】

前記製剤は、薬学分野でよく知られている方法であれば、どのような方法で調製してもよい。このような方法は、1種以上の副成分を構成する担体と活性化合物とを混合する工程を含む。一般に、製剤は、担体（例えば、液体担体、微粉碎された固体担体など）と活性化合物を均一かつ密に混合し、得られた混合物を必要に応じて成形することによって調製される。

【0283】

前記製剤は、局所投与経路、非経口投与経路、全身投与経路、静脈内投与経路、動脈内投与経路、筋肉内投与経路、髄腔内投与経路、眼内投与経路、結膜内投与経路、皮下投与経路、経口投与経路、経皮投与経路（注射を含んでいてもよい）で投与される製剤として調製してもよい。注射製剤は、滅菌溶媒または等張溶媒中に選択された薬剤を含んでいてもよい。前記製剤および投与方法は、本発明の薬剤および治療を受ける疾患/障害/状態に応じて選択してもよい。

【0284】

場合によっては、本明細書に記載の発明品（例えば薬剤/組成物）は、肝毒性に関連する疾患/障害/状態の別の治療と併用して、本明細書に記載の治療を行うために投与される。肝毒性に関連する疾患/障害/状態に適した別の治療は、当技術分野で公知である。本発明の組成物は、治療を受ける疾患/障害/状態に応じて、単独で投与してもよく、別の治療と組み合わせて、同時にまたは連続して投与してもよい。例えば、本発明品は、別の治療の前、これと同時にまたはその後に投与してもよい。本発明品および別の治療剤は、例えば前述したような製剤の形態で、一緒に配合して製剤化してもよく、別々に製剤化してもよい。

【0285】

薬剤の組み合わせを使用する態様によるいくつかの実施形態において、これらの薬剤は、同時に投与してもよく、連続して投与してもよい。「同時投与」は、両方の薬剤を含有する医薬組成物（複合製剤）として投与すること、または、任意で同一の投与経路を介して、例えば、同じ動脈、静脈またはその他の血管などを介して、一方の薬剤を投与した直後にもう一方の薬剤を投与することを指す。「連続投与」は、一方の薬剤を投与した後に、所定の時間間隔を空けてもう一方の薬剤を投与することを指す。2種の薬剤を同一経路で投与することは必要とされないが、いくつかの実施形態においては、2種の薬剤を同一経路で投与することが必要とされる。前記時間間隔は、どのような時間間隔であってもよい。

【0286】

IL-11およびIL-11受容体の検出

本発明の態様および実施形態のいくつかは、対象から得られた試料における、IL-11またはIL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11R および/もしくはgp130を含む複合体）の発現の検出に関する。

【0287】

いくつかの態様および実施形態において、本発明は、（タンパク質としての、またはIL-11もしくはIL-11受容体をコードするオリゴヌクレオチドとしての）IL-11またはIL-11受容体の発現のアップレギュレーション（過剰発現）と、IL-11の作用を抑制することが

10

20

30

40

50

できる薬剤またはIL-11もしくはIL-11受容体の発現を阻害もしくは低減することができる薬剤を用いた治療に対する適合性の指標としての、IL-11またはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションの検出に関する。

【0288】

発現のアップレギュレーションは、所定の種類の細胞または組織において通常予想される発現量を上回る発現を含む。細胞または組織において関連因子の発現量を測定することによってアップレギュレーションを測定してもよい。対象から得られた細胞試料または組織試料における関連因子の発現量を、該関連因子の基準量（例えば、同じ種類の細胞もしくは組織または対応する細胞もしくは組織における該関連因子の正常な発現量を示す数値または数値範囲）と比較してもよい。いくつかの実施形態において、基準量は、コントロール試料（例えば、健常対象から得られた対応する細胞もしくは組織、または同じ対象の健常組織から得られた対応する細胞もしくは組織）におけるIL-11またはIL-11受容体の発現を検出することによって決定してもよい。いくつかの実施形態において、基準量は、標準曲線または標準データセットから得てもよい。

10

【0289】

発現量は、絶対比較で定量してもよく、あるいは相対比較で定量してもよい。

【0290】

いくつかの実施形態において、試験試料中の発現量が基準量の少なくとも1.1倍である場合に、IL-11またはIL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11Rおよび/もしくはgp130を含む複合体）がアップレギュレートされていると考えてもよい。より好ましくは、アップレギュレートされている場合の発現量は、基準量の少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3.0倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4.0倍、少なくとも5.0倍、少なくとも6.0倍、少なくとも7.0倍、少なくとも8.0倍、少なくとも9.0倍および少なくとも10.0倍から選択してもよい。

20

【0291】

発現量は、PCRを用いたアッセイ、インサイチューハイブリダイゼーションアッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、免疫学的アッセイ、免疫組織化学的アッセイなどの公知の様々なインビトロ分析技術のいずれかによって測定してもよい。

30

【0292】

一例として、好適な技術は、IL-11またはIL-11受容体に結合することができる薬剤と試料を接触させ、IL-11またはIL-11受容体と該薬剤からなる複合体の形成を検出することによって、該試料中のIL-11またはIL-11受容体の量を検出する方法を含む。前記薬剤は、適切な結合分子であればどのようなものであってもよく、例えば、抗体、ポリペプチド、ペプチド、オリゴヌクレオチド、アプタマー、小分子などであってもよく、形成された複合体が検出（例えば可視化）できるように標識されていてもよい。このような複合体の検出に適した標識および方法は当技術分野でよく知られており、例えば、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、ローダミン、エオシン、NDB、緑色蛍光タンパク質（GFP）；ユーロピウム（Eu）、テルビウム（Tb）、サマリウム（Sm）などの希土類元素キレート；テトラメチルローダミン、テキサスレッド、4-メチルウンベリフェロン、7-アミノ-4-メチルクマリン、Cy3、Cy5）、同位体マーカー、放射性同位元素（例えば、³²P、³³P、³⁵S）、化学発光標識（例えば、アクリジニウムエステル、ルミノール、イソルミノール）、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ）、抗体、リガンドおよび受容体が挙げられる。検出技術は当業者によく知られており、標識剤に応じて選択することができる。適切な技術としては、オリゴヌクレオチドタグのPCR増幅、質量分析、（例えばレポータータンパク質による基質の酵素変換によって生成される）蛍光または色の検出、または放射能の検出が挙げられる。

40

50

【0293】

アッセイは、試料中のIL-11またはIL-11受容体の量を定量できるように構成されていてもよい。試験試料から定量したIL-11またはIL-11受容体の量を基準量と比較してもよく、このような比較によって、試験試料中に含まれるIL-11またはIL-11受容体の量が、選択した統計学的有意差の程度で基準値よりも高いのか、あるいは低いのかを判断してもよい。

【0294】

検出されたIL-11またはIL-11受容体を定量することによって、IL-11またはIL-11受容体をコードする遺伝子のアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションまたは増幅を測定してもよい。試験試料が線維化細胞を含んでいる場合、このようなアップレギュレーション、ダウンレギュレーションまたは増幅を基準量と比較して、統計学的有意差の有無を判断してもよい。

10

【0295】

対象から得られる試料はどのような種類のものであってもよい。生体試料は、どのような組織または体液から得てもよく、例えば、血液試料、血液由来試料、血清試料、リンパ液試料、精液試料、唾液試料、滑液試料のいずれであってもよい。血液由来試料は、患者の血液に由来する選択された画分であってもよく、例えば、選択された細胞含有画分、血漿画分、血清画分のいずれであってもよい。試料は、組織試料もしくは生検試料、または対象から単離した細胞を含んでもよい。また、試料は、生検や穿刺吸引などの公知の技術で採取してもよい。さらに、試料は、IL-11の発現量を測定するまで保存し、かつ/またはIL-11の発現量を測定する前に処理を行ってもよい。

20

【0296】

対象から得られた試料を使用して、該対象におけるIL-11またはIL-11受容体のアップレギュレーションを測定してもよい。

【0297】

好ましい実施形態のいくつかにおいて、試料は、肝組織、心組織、内臓器官組織、呼吸器系器官組織または腎・泌尿器系組織から得られた組織試料（例えば生検試料）であってもよい。試料は細胞を含んでもよい。

【0298】

対象においてIL-11またはIL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11Rおよび/もしくはgp130を含む複合体）の発現のアップレギュレーションが確認されたことに基づいて、本発明に従って治療/予防を行う対象を選択してもよい。また、IL-11またはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションを、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療に適した、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態のマーカーとして使用してもよい。

30

【0299】

アップレギュレーションは、所定の組織におけるアップレギュレーションであってもよく、所定の組織に由来する選択された細胞におけるアップレギュレーションであってもよい。好ましい組織は、肝組織であってもよい。IL-11またはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションは、循環体液（例えば血液）において測定してもよく、または血液由来試料において測定してもよい。アップレギュレーションは、細胞外IL-11またはIL-11Rのアップレギュレーションであってもよい。いくつかの実施形態において、発現は、局所または全身でアップレギュレートされていてもよい。

40

【0300】

以下の節で述べる説明では、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を対象に投与してもよい。

【0301】

診断および予後

IL-11またはIL-11受容体（例えば、IL-11R、gp130、またはIL-11Rおよび/もしくはgp130を含む複合体）の発現のアップレギュレーションの検出は、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を診断して、肝毒性および/または肝毒

50

性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症のリスクがある対象を特定する方法において使用してもよく、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療に対する対象の反応性の予後判定または予測を行う方法において使用してもよい。

【0302】

「発症する」および「発症」という用語、ならびにその他の形態の「発症する」という用語は、障害/疾患の発症、または障害/疾患の継続もしくは進行を指してもよい。

【0303】

いくつかの実施形態において、例えば、対象の生体またはこれに由来する選択された細胞/組織において肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の存在を示すその他の症状の有無などに基づいて、対象が肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を保有または罹患している疑いがあると判断してもよく、あるいは、例えば、遺伝的素因があること、または肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の危険因子であることが知られている環境条件への曝露があることから、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症のリスクがあると考えてもよい。また、IL-11またはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションを測定することによって、診断の確定または疑いがあるという診断の確定を行ってもよく、あるいは対象が肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクがあることを確認してもよい。また、IL-11またはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションを測定することによって、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態または素因が、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤による治療に適していることを診断してもよい。

【0304】

したがって、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している対象、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している疑いがある対象に予後を提供する方法であって、前記対象から得られた試料において、IL-11またはIL-11受容体の発現がアップレギュレートされているのか否かを判定すること、および前記判定に基づいて、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた前記対象の治療の予後を提供することを含む方法を提供してもよい。

【0305】

いくつかの態様において、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療に対する対象の反応性の予後判定もしくは予測を行う方法または診断方法は、IL-11またはIL-11受容体の発現量の測定を必要としなくてもよいが、IL-11またはIL-11受容体の発現または活性のアップレギュレーションを予測する遺伝因子を対象において測定することに基づいていてもよい。そのような遺伝因子としては、IL-11もしくはIL-11受容体の発現もしくは活性のアップレギュレーションまたはIL-11媒介性シグナル伝達のアップレギュレーションと相関し、かつ/またはこれらを予測可能な、IL-11、IL-11R および/またはgp130の遺伝子変異、一塩基変異多型(SNP)または遺伝子増幅の測定が挙げられる。遺伝因子を使用して病態の素因または治療に対する反応性を予測することは当技術分野で知られており、例えば、Peter Starkel Gut 2008;57:440-442; Wright et al., Mol. Cell. Biol. March 2010 vol. 30 no. 6 1411-1420を参照されたい。

【0306】

遺伝因子は、PCRを用いたアッセイ、例えば定量PCRや競合PCRなどの、当業者に公知の方法で分析してもよい。例えば、対象から得られた試料などにおいて、遺伝因子の有無を測定することによって、診断を確定してもよく、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症のリスクがあるとして対象を分類してもよく、かつ/またはIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療に対象が適していることを特定してもよい。

【0307】

いくつかの方法は、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症に対する感受性またはIL-11の分泌に関連した1つ以上のSNPの有無を特定するこ

10

20

30

40

50

とを含んでいてもよい。SNPは、通常、二対立遺伝子であり、したがって、当業者に公知の様々な従来のアッセイのいずれかを使用して容易に特定することができる（例えば、Anthony J. Brookes. The essence of SNPs. Gene Volume 234, Issue 2, 8 July 1999, 177-186; Fan et al., Highly Parallel SNP Genotyping. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2003. 68: 69-78; Matsuzaki et al., Parallel Genotyping of Over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. Genome Res. 2004. 14: 414-425を参照されたい）。

【0308】

前記方法は、対象から得られた試料中にどのSNPアレルが存在するのかを特定することを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、マイナーアレルの有無を特定することによって、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症に対する感受性またはIL-11の分泌の増加を特定してもよい。

10

【0309】

したがって、本発明の一態様において、対象をスクリーニングする方法であって、対象から核酸試料を得る工程；および

前記試料中において、WO 2017/103108(A1)（この文献は引用により本明細書に援用される）の図33、図34または図35に挙げた1つ以上のSNPの多型ヌクレオチドの位置に、どのアレルが存在するのかを特定するか、またはこれらの図に挙げたSNPのいずれか1つと $r^2 \geq 0.8$ の連鎖不均衡を示すSNPを特定する工程を含む方法を提供する。

20

【0310】

アレルまたはSNPを特定する前記工程は、試料中において、選択された多型ヌクレオチドの位置においてマイナーアレルの有無を特定することを含んでいてもよい。また、この工程は、0個、1個または2個のマイナーアレルの有無を特定することを含んでいてもよい。

【0311】

前記スクリーニング方法は、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症に対する対象の感受性を特定する方法、または前述の診断方法もしくは予後判定方法であってもよく、これらの方法の一部を構成してもよい。

【0312】

前記方法は、例えば、対象が前記多型ヌクレオチドの位置にマイナーアレルを有していると特定された場合に、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症に対する感受性を有しているものとして、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクが高いものとして前記対象を特定する工程をさらに含んでいてもよい。前記方法は、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療を行う対象を選択する工程、および/またはIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を前記対象に投与して、該対象における肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を治療するか、または肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の発症もしくは進行を前記対象において予防する工程をさらに含んでいてもよい。

30

40

【0313】

特定することができるSNPとしては、WO 2017/103108(A1)（この文献は引用により本明細書に援用される）の図33、図34または図35に挙げたSNPのうち1つ以上が挙げられる。SNPは、P値またはFDR（偽発見率）が低いと特定されたことに基づいて選択されてもよい。

【0314】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、対象において、肝毒性に関連する遺伝因子の有無を判定することを含んでいてもよく、肝毒性に関連する遺伝因子として、例えば、Njoku DB Int J Mol Sci. 2014; 15(4): 6990-7003; Khoury T et al., J Clin Transl Hepatol. 2015; 3(2): 99-108; Ahmad J and Odin JA, Clin Liver D

50

is. 2017; 21(1):55-72; Clare et al., Curr Hepatol Rep. 2017; 16(3): 258-264およびUrban TJ et al., Pharmacogenomics. 2012 May; 13(7): 735-738に記載されている遺伝因子が挙げられる（これらの文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、治療を受ける対象が、シトクロムP450（CYP450）アイソフォームであるCYP2E1のヘテロ接合型またはホモ接合型であるか否かを判定することを含んでいてもよい。また、本発明による方法および使用は、対象のCYP2E1の遺伝子型を決定する工程、および/またはCYP2E1のヘテロ接合型もしくはホモ接合型の対象を選択して治療を行う工程を含んでいてもよい。

【0315】

いくつかの実施形態において、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を診断して、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクがある対象を特定する方法、またはIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療に対する対象の反応性の予後判定もしくは予測を行う方法は、IL-11もしくはIL-11受容体の発現のアップレギュレーションの検出用ではなく、遺伝因子でもない指標を使用する。

10

【0316】

いくつかの実施形態において、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を診断して、肝毒性および/もしくは肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクがある対象を特定する方法、またはIL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤を用いた治療に対する対象の反応性の予後判定もしくは予測を行う方法は、以下の指標の1つ以上を検出し、測定し、かつ/または同定することに基づく。

20

・アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT/SGPT）、乳酸脱水素酵素（LDH）、および/またはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST/SGOT）などの肝臓酵素の血清中濃度の上昇

・0.5を超えるAST/ALT比、1を超えるAST/ALT比、または2を超えるAST/ALT比

・血液中アルカリホスファターゼ（ALP）濃度の上昇

・ - グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）濃度の上昇

・TNF、IL-1、IFNなどのサイトカインの血清中濃度の上昇

・血清中アルブミン濃度の低下

・例えば、VanWagner LB, JAMA. 313 (5): 516-517（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）に記載の基準範囲を超える総ビリルビン（非抱合型（間接型）ビリルビンと抱合型（直接型）ビリルビン）濃度の上昇

30

・肝重量の減少

・肝細胞におけるアクチンストレスファイバーの形成の増加

・小葉中心壊死（すなわち肝小葉中心部の組織の壊死）の増加

・皮膚および白目の黄変（黄疸）

・そう痒

・右上腹部における腹痛

・倦怠感

・食欲不振

40

・悪心および嘔吐

・発疹

・体重減少

・濃い色の尿または褐色尿

【0317】

研究室で行われる肝臓を用いた試験の基準値は、例えば、Gowda S et al., Pan Afr Med J. 2009; 3: 17に記載されている（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

【0318】

診断方法または予後判定方法は、対象から得られた試料を用いてインビトロで行っても

50

よく、あるいは対象から得られた試料を処理した後にインビトロで行ってもよい。試料が採取された患者は、インビトロでの診断方法または予後判定方法が実施されるまで待機しておく必要はなく、したがって、これらの方法はヒトまたは動物の生体上で実施する必要はない。対象から得られた試料は、前述したように、どのような種類のものであってもよい。

【0319】

本明細書に記載の方法は、その他の診断検査または予後検査と併用してもよく、これによって、診断または予後判定の精度を高めたり、本明細書に記載の試験方法を使用して得られた結果を確認したりすることができる。

【0320】

対象

対象は、動物であってもよく、ヒトであってもよい。対象は、哺乳動物であることが好ましく、ヒトであることがより好ましい。対象は、非ヒト哺乳動物であってもよいが、ヒトであることがより好ましい。対象は、雄性であってもよく、雌性であってもよい。対象は患者であってもよい。該患者は、本明細書に記載の肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を有していてもよい。対象は、治療を必要とする肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患していると診断された対象であってもよく、このような肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態に罹患している疑いがある対象であってもよく、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態を発症するリスクのある対象であってもよい。

【0321】

本発明による実施形態において、前記対象はヒト対象であることが好ましい。本発明による実施形態において、肝毒性および/または肝毒性に関連する障害、疾患もしくは状態の1つ以上のマーカー（相関する因子/症状）が特定されたことに基づいて、本発明の方法による治療を行う対象を選択してもよい。

【0322】

いくつかの実施形態において、対象が肝毒性傷害を経験したことがあるか、対象がこれから肝毒性傷害を経験することが予測されるか、または対象が肝毒性傷害を現在経験しているという判定に基づいて対象を選択して、本発明による治療を行ってもよい。いくつかの実施形態において、予想される介入（例えば外科手術や、例えば肝毒性に関連する薬剤を用いた治療）が、肝毒性を起こすことが分かっていたり、肝毒性を起こす可能性があったりする場合、この予想される介入に先立って対象を選択し、本発明による治療を行ってもよい。いくつかの実施形態において、対象が肝毒性もしくは肝毒性傷害を経験したことがあるか、または対象が肝毒性もしくは肝毒性傷害を現在経験しているという判定がなされた後に、該対象を選択して、本発明による治療を行ってもよい。

【0323】

本発明により提供されるさらなる方法および使用

本発明は、さらに、肝組織への損傷を低減する方法、肝細胞死を低減させる方法、肝機能を向上させる方法、血清中ALT濃度を低下させる方法、肝重量を増加させる方法、肝組織を再生させる方法、もしくは肝臓中のERKおよび/もしくはJNKの活性化（すなわちリン酸化）を低減させる方法において使用するための、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤、または前記方法における、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の使用を提供する。

【0324】

また、本発明は、肝組織への損傷を低減する方法、肝細胞死を低減させる方法、肝機能を向上させる方法、血清中ALT濃度を低下させる方法、肝重量を増加させる方法、肝組織を再生させる方法、または肝臓中のERKおよび/もしくはJNKの活性化（すなわちリン酸化）を低減させる方法において使用するための組成物の製造における、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の使用を提供する。

【0325】

10

20

30

40

50

さらに、本発明は、肝組織への損傷を低減する方法、肝細胞死を低減させる方法、肝機能を向上させる方法、血清中ALT濃度を低下させる方法、肝重量を増加させる方法、肝組織を再生させる方法、または肝臓中のERKおよび/もしくはJNKの活性化(すなわちリン酸化)を低減させる方法であって、IL-11媒介性シグナル伝達を抑制することができる薬剤の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0326】

配列同一性

2つ以上のアミノ酸配列間または核酸配列間の同一性(%)を求めるためのペアワイズ配列アラインメントおよび多重配列アラインメントは、当業者に公知の様々な方法を使用して行うことができ、例えば、ClustalOmegaソフトウェア(Soding, J. 2005, *Bioinformatics* 21, 951-960)、T-coffeeソフトウェア(Notredame et al. 2000, *J. Mol. Biol.* (2000) 302, 205-217)、Kalignソフトウェア(Lassmann and Sonnhammer 2005, *BMC Bioinformatics*, 6(298))、MAFFTソフトウェア(Katoh and Standley 2013, *Molecular Biology and Evolution*, 30(4) 772-780)などの一般公開されているコンピュータソフトウェアを使用して行うことができる。このようなソフトウェアを使用する場合、例えばギャップペナルティや伸長ペナルティなどにおいて、デフォルトパラメータを使用することが好ましい。

【0327】

10

20

30

40

50

【表 1】

配列

配列番号	説明	配列
1	ヒト IL-11 (UniProt P20809)	MNCVCRLVLVLSLWPD TAVAPGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLADTRQLA AQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGVLRRLRADLLSYLRHVQWLRRRA GGSSSKTLEPELGLTQARLDRLRLQLLMSRLALPQPPDPAPPLAPSSAWGGI RAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLKTRL
2	ヒト gp130 (UniProt P40189-1)	MLTLQTVLWVQALFIFLTTESTGELLDPGCGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYF HVNANYIWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFDIASLNIQLTCNLTFGQLEQNVYIGITI ISGLPPEKPKNLSCIVNEGKMRCEWDGGREHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRD TPTSCTVDYSTVYFVNIIEVWVEAENALGKVTSDHINFDVPYKVPNPPHNLSVINSEE LSSILKLTWTPNSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEY VFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFYKIDPSHTQGYRTVQLWW KTLPPFEANGKILDYEVTLRWWSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKS DAAVLTIPACDFQATHPMDLKAFPKDNMLWVWETTPRESVKYILEWCVLSDKAPC ITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGP VRTKKVGNKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNVDSHTEYTLSSLT SDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIAIVVPVCLAFLLTLLGLVLCF NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDMYSDGNFTDVSVEIEA NDKKPFPELDKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSSSSDENESSQNTSST VQYSTVVHSGYRHRQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQ QYFKQNCSEQHESPDIHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMCMF QEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ
3	ヒト IL11RA (UniProt Q14626)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYQPGRSVKLCCPGVTAGD PVSWFRDGEKLLQGPDSGLGHELVAQADSTDEGTIYICQLDGLGTTVTLQLGY PPARPVVSCQAADYENFCTWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRRSPSTGP WPCPDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLSILRPDPPQGL RVESVPGYPRRLRASWTYPASWPCQPHLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEEV TDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQPEV EPQVDSAPPRPSLQPHPRLLDHRDSVEQVAVLASLGLSFLGLVAGALALGLWLRLR RGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL
4	IL-11 標的 siRNA	CCTTCCAAAGCCAGATCTT
5	IL-11 標的 siRNA	GCCTGGGCAGGAACATATA
6	IL-11 標的 siRNA	CCTGGGCAGGAACATATAT
7	IL-11 標的 siRNA	GGTTCATTATGGCTGTGTT
8	IL-11 α 標的 siRNA	GGACCATACCAAGGAGAT
9	IL-11 α 標的 siRNA	GCGTCTTTGGGAATCCTTT
10	IL-11 α 標的 siRNA	GCAGGACAGTAGATCCCT
11	IL-11 α 標的 siRNA	GCTCAAGGAACGTGTGTAA
12	IL-11 に対する siRNA (NM_000641.3)	CCUUCCAAAGCCAGAUUUdTdT-AAGAUCUGGCUUUGGAAGGdTdT
13	IL-11 に対する siRNA (NM_000641.3)	GCCUGGGCAGGAACAUUAUAdTdT-UAUUAUGUUCUGCCCAGGCdTdT
14	IL-11 に対する siRNA (NM_000641.3)	CCUGGGCAGGAACAUUAUAdTdT-AUAUAUGUUCUGCCCAGGdTdT
15	IL-11 に対する siRNA (NM_000641.3)	GGUUCAUUUUGGCUUGUUdTdT-AACACAGCCAUAAUGAACCDdTdT
16	IL-11 α に対する siRNA (U32324.1)	GGACCAUACCAAGGAGAUdTdT-AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT
17	IL-11 α に対する siRNA (U32324.1)	GCGUCUUUGGGAUCCUUdTdT-AAAGGAUCCCAAAGACGCdTdT
18	IL-11 α に対する siRNA (U32324.1)	GCAGGACAGUAGAUCCUAdTdT-UAGGGAUCUACUGUCCUGCdTdT

10

20

30

40

19	IL-11Ra に対する siRNA (U32324.1)	GCUCAAGGAACGUGUGUAAAdTdT-UUACACACGUUCCUUGAGCdTdT	
20	20 アミノ 酸長の リンカー	GPAGQSGGGGGSGGGSGGGSV	
21	Hyper IL-11 (IL-11RA:IL-11 融合タンパク質)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCQAWGPPGVQYQQPGRSVKLCCPGVTAGD PVSWFRDGEKLLQGPDSGLGHELVLAQADSTDEGTICQTLGDALGGTVTLQLGY PPARPVVSCQAADYENFSCWSPSQISGLPTRYLTSYRKKTVLGADSQRSPSTGP WPCPQDPLGAARCVVHGAEFWSQYRINVTEVNPLGASTRLLDVSLSILRPDPPQGL RVESVPGYPRRLRASWTYPASWPCQPHLLKFRLLQYRPAQHPAWSTVEPAGLEEV TDAVAGLPHAVRVSARDFLDAGTWSTWSPEAWGTPSTGPAGQSGGGGGSGGGSG GGSVPGPPPGRVSPDPRAELDSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGDHNL SLPTLAMSAGALGALQLPGVLRRLRADLLSYLRHVQWLRAGGSSSLKLEPELGT ARLDRLRLRLQLLSRLALPQPPDPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLTL DWA VRGLLLKTRL	10
22	IL11 ジェノタイプ用 プライマーF	GGAGGGAGGGGACGCCAATGACC	
23	IL11 ジェノタイプ用 プライマーR	TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG	
24	IL11-ルシフェラーゼ ジェノタイプ用 プライマーF	AATCCGTGGTGTGTCG	
25	IL11-ルシフェラーゼ ジェノタイプ用 プライマーR	TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG	
26	IL11-EGFP ジェノタイプ用 プライマーF	GAAATGAGAGCCTAGAGTCCAGAG	20
27	IL11-EGFP ジェノタイプ用 プライマーR	GAGGCTTGAAGAATGCACAATTA	

【0328】

本発明は、本明細書に記載の態様や好ましい特徴の組み合わせを包含し、そのような組み合わせが明らかに許容できない場合や明らかに回避すべき場合は除かれる。

【0329】

前述の詳細な説明、後述の請求項もしくは添付の図面において、特定の形態として、もしくは開示された機能を実行するための手段として表現された本開示の特徴、または本開示の結果を適宜得るための方法もしくはプロセスは、様々な形態で本発明を実現するために、別個にまたは組み合わせて使用してもよい。

【0330】

誤解を避けるために明記しておく、本明細書で提供する論理的説明は、読み手の理解を深める目的で記載されている。本発明者らは、これらの論理的説明により本発明が拘束されることを望むものではない。

【0331】

本明細書において使用された節の見出しは、いずれも本発明を系統立てて述べることを目的として設けられており、本明細書に記載の主題を制限するものであると解釈すべきではない。

【0332】

後述の請求項を包含する本明細書を通して、特に記載がない限り、「含む (comprise)」および「含む (include)」という用語、ならびにこれらの変化形である「含む (comprises)」、「含んでいる (comprising)」および「含んでいる (including)」という用語は、記載の要素もしくは工程または要素群もしくは工程群を包含すると理解されるが、記載されているもの以外の要素もしくは工程または要素群もしくは工程群を除外するものではない。

【0333】

本明細書および添付の請求項において使用されているように、単数形の「a」、「an」

10

20

30

40

50

および「the」は、明確な記載がない限り、複数のものを含むことに留意されたい。本明細書において数値範囲は、「おおよその (about)」特定の値、および/または「おおよその」特定の値から「おおよその」別の特定の値までの範囲として示される。このような範囲が記載されている場合、別の一実施形態は、概数ではない前記特定の値、および/または概数ではない前記特定の値から前記別の特定の値までの範囲を含む。同様に、「約 (about)」という先行詞を使用することによって特定の値がおおよその値として記載されている場合、概数ではない前記特定の値によって別の一実施形態を構成することができる。数値に関連する「約」という用語は、任意であることを示し、平均値 (例えば ±10%) を意味する。

【0334】

10

本明細書に開示されている方法は、インビトロ、エクスピボ、インビボのいずれで行ってもよく、また、本発明の製品は、インビトロ製品、エクスピボ製品、インビボ製品のいずれであってもよい。「インビトロ」は、実験室条件または培養において、材料、生体物質、細胞および/または組織を使用した実験を包含する。これに対して、「インビボ」は、生きたままの多細胞生物を使用した実験および操作を包含する。「エクスピボ」は、例えばヒトまたは動物の体外などの生体外に存在するもの、または生体外で実施されるものを指し、生物から採取された組織 (例えば器官全体) または細胞に存在するものや、このような組織または細胞において実施されるものであってもよい。

【0335】

20

本明細書において核酸配列が開示されている場合、その逆相補鎖も明確に想定されている。

【0336】

標準的な分子生物学的技術については、Sambrook, J., Russel, D.W. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

【0337】

30

本発明の態様および実施形態を、添付の図面を参照しながら以下に述べる。さらなる態様および実施形態は、当業者であれば容易に理解できるであろう。本明細書において引用された文献はいずれも、本明細書の一部を構成するものとして援用される。以下の代表的な実施形態とともに本発明を述べるが、当業者であれば、本開示を参照することにより、様々な等価の変更および変形を容易に理解できるであろう。したがって、前述した本発明の代表的な実施形態は、一例であり、本発明を何ら限定するものではないことが考慮される。本発明の要旨および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の実施形態に様々な変更を加えてもよい。

【0338】

以下、添付の図面を参照しながら、本発明の原理を示す実施形態および実験を説明する。

【図面の簡単な説明】

【0339】

40

【図1A - 1C】肝細胞に対するIL-11の効果を示す。(図1A) ヒト初代肝細胞はIL-11R 受容体を発現する。(図1B) IL-11 (0.019 ~ 10ng/ml) で肝細胞を処理した後の、培養上清中における用量依存的なALT濃度の上昇および肝細胞におけるアクチンストレスファイバーの本数の増加を示す。(図1C) H₂O₂誘導性のIL-11の発現を示す。

【0340】

【図2A - 2E】アセトアミノフェン (APAP) 誘発性肝障害マウスモデルにおける肝毒性に対する抗IL-11療法の効果を示す。IgG抗体をコントロールとして使用した。(図2A) 治療レジメンの概略図である。(図2B) APAP誘発性毒性の誘導後の血清中IL-11濃度である。(図2C) 肝損傷の程度を示すALT濃度である。(図2D) APAP誘発性の肝重量の減少の程度である。(図2E) 抗IL11R 抗体またはIgGコントロールで処置したマウスから得た肝組織における小葉中心壊死の程度を示すヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色である。

50

【0341】

【図3】抗IL11RA抗体がAPAP媒介性肝細胞死を阻止することを示す散布図である。抗IL11RA抗体（X209、2 µg/ml）またはIgGコントロール抗体の存在下または非存在下（BL）において、ヒト肝細胞をAPAP（20mM）で処理した。次に、細胞をアネキシンVおよびPIで染色し、フローサイトメトリーで細胞死を分析した。BL = ベースライン。

【0342】

【図4】抗IL11RA抗体が、APAPを介したErkおよびJnkの活性化を阻止することを示すウエスタンブロットの写真である。抗IL11RA抗体（X209、2 µg/ml）またはIgGコントロール抗体の存在下または非存在下（BL）において、ヒト肝細胞をAPAP（10mM）で処理した。ErkキナーゼおよびJnkキナーゼの活性化（リン酸化）状態を評価するために、細胞抽出物を調製し、ウエスタンブロットを行った。BL = ベースライン。

10

【0343】

【図5A - 5B】過剰摂取量のAPAPを投与する16時間前に抗IL11RA療法を行うことによって、急性肝障害を予防できることを示す箱ひげ図および写真である。20mg/kgの抗IL11RA抗体（ENx209）またはIgGコントロール抗体をマウスに腹腔内投与（IP）し、その16時間後に、重度の過剰摂取に相当する量のAPAP（400mg/kg）を投与した。24時間後にマウスを安楽死させた。（図5A）急性肝損傷および肝細胞死のマーカーとして血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）を測定した。（図5B）肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、脱水し、パラフィンブロックに包埋し、薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色して、APAPの過剰摂取に特徴的な小葉中心部の肝細胞壊死を可視化した。

20

【0344】

【図6A - 6B】過剰摂取量のAPAPを投与した10時間後に抗IL11RA療法を行うことによって、急性肝障害を治療できることを示す写真および箱ひげ図である。重度の過剰摂取に相当する量のAPAP（400mg/kg）をマウスに投与し、その10時間後に、20mg/kgの抗IL11RA抗体（ENx209）またはIgGコントロール抗体をマウスに腹腔内投与（IP）した。（図6A）図に示した時点で肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、肉眼的形態および外観を記録した。（図6B）図に示した時点において、急性肝損傷および肝細胞死のマーカーとして血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）を測定した。

【0345】

【図7】過剰摂取量のAPAPを投与した10時間後に抗IL11RA療法を行うことによって、JnkおよびERKの活性化を抑制できることを示すウエスタンブロットの写真である。重度の過剰摂取に相当する量のAPAP（400mg/kg）をマウスに投与し、その10時間後に、20mg/kgの抗IL11RA抗体（ENx209）またはIgGコントロール抗体をマウスに腹腔内投与（IP）した。図に示した時点で肝臓を摘出し、ウエスタンブロットを実施して、ErkキナーゼおよびJnkキナーゼの活性化（リン酸化）状態を評価した。

30

【0346】

【図8A - 8C】過剰摂取量のAPAPを投与した10時間後に抗IL11RA療法を行うことによって、急性肝障害による死亡を防ぐことができ、かつ肝機能を回復できることを示すグラフ、写真および箱ひげ図である。致死的な過剰摂取に相当する量のAPAP（550mg/kg）をマウスに投与し、その10時間後に、20mg/kgの抗IL11RA抗体（ENx209）またはIgGコントロール抗体をマウスに腹腔内投与（IP）した。（図8A）2つの処置群における過剰摂取量の投与後8日間にわたる死亡率を示すグラフである。（図8B）図に示した時点で肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、肉眼的形態および外観を記録した。（図8C）過剰摂取量のAPAPを投与した8日後に、ENx209処置マウスにおいて、肝損傷および肝細胞死のマーカーとして血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）を測定し、正常なコントロールマウスと比較した。

40

【0347】

【図9A - 9J】障害を受けた肝細胞からのアセトアミノフェン誘発性のIL11の分泌が細胞死を引き起こすことを示すグラフおよび写真である。（A）APAP処置マウスにおける血

50

清中IL11濃度を示す。(B) APAP障害後の肝臓中IL11 mRNAを示す。(C) コントロールIL11 - ルシフェラーゼマウスおよびAPAPでチャレンジしたIL11 - ルシフェラーゼマウスから得た肝臓におけるルシフェラーゼ活性を示す代表的な写真である。(D) APAP処置マウスの肝臓におけるIL11の発現を示すウエスタンブロットを示す。(E) APAP処置後のIL11-EGFPマウスの肝臓におけるEGFPの発現および切断型カスパーゼ3 (Cl.CASP3) の発現を示す代表的な免疫蛍光画像 (スケールバー = 100 μ m) である。(A~E) APAP = 400mg/kg。(F) APAPで刺激した肝細胞から分泌されたIL11のELISA分析の結果を示す。(G) rhIL11による刺激に応答した肝細胞におけるリン酸化ERKタンパク質、リン酸化JNKタンパク質およびリン酸化Cl.CASP3タンパク質、ならびにこれらの総発現量を示すウエスタンブロットを示す。(H) rhIL11で刺激した肝細胞におけるヨウ化プロビジウム陽性細胞 (PI⁺ve) の定量を示す。(I) IgGまたは抗IL11RA (X209; 2 μ g/ml) の存在下においてAPAP (20mM) で処理した肝細胞における、ERK、JNKおよびCASP3の活性化状態を示すウエスタンブロットと、(J) 陽性細胞の定量を示す。(F~J) ヒト初代肝細胞。(F、H~J) 24時間後。(A、B、F、H~I) データは、中央値 (中央線)、25~75パーセンタイル (箱)、および最小値から最大値の範囲 (ひげ) を示す箱ひげ図として示す。(A、B) 両側Studentの t 検定; (F、H) 両側Dunnettの検定; (J) Tukeyの補正法を用いた両側Studentの t 検定。

10

【0348】

【図10A - 10L】マウス肝細胞において組換えヒトIL11がマウスIL11の効果を抑制することを示す写真、グラフおよび概略図である。(A) マウス肝細胞におけるERK、JNKおよびCASP3の活性化状態に対する組換えヒトIL11 (rhIL11、10ng/ml) または組換えマウスIL11 (rmIL11、10ng/ml) の効果を示す。(B) rmIL11 (10ng/ml) または徐々に用量を増加させたrhIL11 (1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、15ng/mlおよび20ng/ml) で刺激したマウス肝細胞の上清中ALT濃度を示す。(C) 生理食塩水、rhIL11またはrmIL11 (500 μ g/kg) をマウスに単回皮下注射する実験の概略図である。(D) 図10Cに示した実験における肝臓中p-ERK、p-JNKおよびCl.CASP3のウエスタンブロット分析と(E) 血清中ALT濃度を示す。各時点 (6時間後および24時間後) において、左から右に順に、生理食塩水、rmIL11またはrhIL11による処置を示す。(F) 過剰摂取量のAPAPを投与する2時間前に生理食塩水、rhIL11またはrmIL11をマウスに皮下注射する実験の概略図である。(G) 過剰摂取量のAPAPの投与前のrhIL11注射またはrmIL11注射の効果を示す (各時点 (6時間後および24時間後) において、左から右に順に、生理食塩水、rmIL11またはrhIL11による処置を示す)。(H) 過剰摂取量のAPAPの投与前のrhIL11注射またはrmIL11注射の効果を示す (各時点 (6時間後および24時間後) において、左から右に順に、生理食塩水、rmIL11またはrhIL11による処置を示す)。(I) 固定化したrhIL11 (左側) またはrmIL11 (中央) へのmIL11RA1の結合と固定化したrhIL11 (右側) へのhIL11RA1の結合を示すセンサーグラムである。実験データおよび理論曲線にフィッティングさせた曲線 (ラングミュア型の1:1結合モデル) を示す。(J) rmIL11 (濃い灰色の点、上の線) およびrhIL11 (薄い灰色の点、下の線) の2倍段階希釈液の存在下におけるmIL11RA1へのビオチン化rmIL11の結合を競合ELISAで測定した結果を示す。マウス肝細胞においてrmIL11により誘導された(K) ALTの分泌および(L) CASP3の活性化に対するrhIL11の用量依存的な抑制効果を示す。(A、B、K、L) 24時間後。(B、K) データを平均値 \pm SDとして示す。(E、G) データは、中央値 (中央線)、25~75パーセンタイル (箱)、および最小値から最大値の範囲 (ひげ) を示す箱ひげ図として示す。(B、K) Tukeyの補正法を用いた両側Studentの t 検定; (E) 両側Studentの t 検定; (G) 両側Dunnettの検定。FC : fold change。

20

30

40

【0349】

【図11A - 11Q】IL11がNOX4依存性のグルタチオン枯渇を介して肝不全を引き起こすことを示す概略図、写真およびグラフである。(A) AAV8-ALB-Null (コントロール) またはAAV8-ALB-Cre (IL11-Tg) をRosa26^{IL11/+}マウスに単回静脈内注射することに

50

より、アルブミン発現細胞（肝細胞）においてIL11の過剰発現を特異的に誘導する実験の概略図を示す（ALB：アルブミン）。注射の3週間後のコントロールマウスおよびIL11-Tgマウスにおける、（B）肝臓の代表的な肉眼的解剖所見、（C）肝重量、（D）血清中ALT濃度、（E）肝臓の代表的なH&E染色写真（スケールバー = 100 μ m）、（F）p-ERK、p-JNKおよびCl.CASP3のウエスタンブロット、（G）肝臓中GSH濃度、および（H）Nox4 mRNAの発現量を示す。rhIL11で処理したヒト初代肝細胞における、（I）GSH濃度の時間経過、（J）用量依存的なGSH濃度の低下、および（K）NOX4タンパク質の発現量の増加を示すウエスタンブロットを示す。（L）rhIL11またはrmIL11で刺激したマウス肝細胞におけるNOX4のウエスタンブロットを示す。APAPで刺激後にIgGまたはX209（20 mM）で処理したヒト肝細胞における、（M）NOX4の発現のウエスタンブロットおよび（N）GSH濃度を示す。（O）rhIL11で刺激したヒト肝細胞におけるGSH濃度とCASP3の活性化に対する用量依存的なGKT-13781の抑制効果を示す。ヒト肝細胞における、rhIL11誘導性の（P）ERK、JNKおよびCASP3の活性化および（Q）GSH濃度の枯渇に対するsiNOX4の効果を示す。（I~Q）rhIL11/rmIL11（特に明記しない限り、10ng/ml）、APAP（20mM）、IgG/X209（2 μ g/ml）、siNT（非標的指向性siRNAコントロール）/siNOX4（50nM）。（I~K、M~Q）ヒト初代肝細胞、（L）マウス初代肝細胞。（J、L~Q）24時間後。（C~D、G~J、N、O、Q）データは、中央値（中央線）、25~75パーセンタイル（箱）、および最小値から最大値の範囲（ひげ）を示す箱ひげ図として示す。（C~D、G~H）両側Studentのt検定；（I~J）両側Dunnettの検定；（N、O、Q）Tukeyの補正法を用いた両側Studentのt検定。

10

20

【0350】

【図12A - 12H】肝細胞特異的にIL11ra1を欠失させることにより、APAP誘発性肝障害からマウスを保護できることを示す概略図、写真およびグラフである。（A）IL11ra1^{loxP/loxP}マウスにおいてAPAP誘発性肝障害を誘発させる実験の概略図である。IL11ra1^{loxP/loxP}マウスにAAV8-ALB-Null（コントロール）またはAAV8-ALB-Cre（CKO）を静脈内注射して、肝細胞のIL11ra1を特異的に欠失させた。これらのウイルスを投与してから3週間後に、一晩絶食させたコントロールマウスおよびCKOマウスにAPAP（400mg/kg）または生理食塩水を注射した（ALB：アルブミン）。生理食塩水またはAPAPを注射したコントロールマウスおよびCKOマウスにおける（B）肝臓の代表的な肉眼的解剖所見および（C）H&E染色写真（スケールバー = 500 μ m）を示す。（D）血清中ALT濃度、（E）血清中AST濃度、（F）肝臓中GSH濃度、（G）IL11RA、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK、Cl.CASP3、CASP3およびGAPDHのウエスタンブロット、ならびに（H）肝臓における炎症促進性遺伝子のmRNAの相対発現量を示す。（D~F、H）データは、中央値（中央線）、25~75パーセンタイル（箱）、および最小値から最大値の範囲（ひげ）を示す箱ひげ図として示す；Sidakの補正法を用いたStudentのt検定。

30

【0351】

【図13A - 13L】抗IL11RA抗体および/またはNACによるAPAP誘発性肝障害の処置を示す概略図、写真およびグラフである。（A）APAPを過剰摂取（OD）させたマウスにおいて抗IL11RA抗体（X209）の予防的投与を行う実験の概略図である。APAP（400mg/kg）注射の16時間前の絶食期間の開始時にX209またはIgG（10mg/kg）を投与した。コントロールマウスには生理食塩水を注射した。図13Aに示した実験における（B）血清中ALT濃度、（C）代表的なH&E染色写真（スケールバー = 500 μ m）および肝臓中GSH濃度を示す。（E）抗IL11RA抗体（X209）の用量を決定するための実験の概略図である。APAP注射の3時間後にX209（2.5~10mg/kg）またはIgG（10mg/kg）をマウスに投与した。図13Eに示した実験における（F）血清中ALT濃度（生理食塩水を使用した際の血清中ALT濃度は、図5Bで示したものと同一）、（G）肝臓中GSH濃度、および（H）肝臓におけるERKおよびJNKの活性化を示すウエスタンブロットを示す。（I）X209の単独投与、N - アセチル - システイン（NAC、500mg/kg）の単独投与、またはX209（5mg/kg）とN - アセチル - システイン（NAC、500mg/kg）の併用投与の治療効果を比較する実験の概略図である。（J~L）一晩絶食させたマウスにAPAPを注射し、その3時間後に

40

50

IgG、NACまたはNAC + X209で処置し、図にデータを示した。(H)血清中ALT濃度に対するNACまたはNAC + X209による処置の効果、(I)肝臓中GSH濃度に対するNACまたはNAC + X209による処置の効果、ならびに(J) p-ERK、p-JNKおよびCl.CASP3の発現量に対するNACまたはNAC + X209による処置の効果を示す。(B、C、F、G、J、K)データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す; Tukeyの補正法を用いた両側Studentのt検定。

【0352】

【図14A - 14K】APAPの過剰摂取から時間が経過してから抗IL11RA抗体を投与する治療法による肝再生および肝不全の緩和を示す概略図、写真およびグラフである。(A) APAP誘発性肝障害マウスにおいて、時間が経過してから治療的投与を行う実験の概略図である。一晩絶食させたマウスにAPAPを投与し、その10時間後にIgG / X209 (20mg/kg) を投与した。図14Aに示したように、時間が経過してから(APAPの投与の10時間後に) X209を投与したAPAP誘発性肝障害マウスにおける(B) 代表的な肝臓の肉眼的解剖所見、(C) 肝臓の代表的なH&E染色写真(スケールバー = 500 μ m)、(D) 血清中IL11濃度、(E) 血清中ALT濃度、(F) p-ERK、p-JNK、Cl.CASP3、PCNA、サイクリンD1/D3/E1およびp-RBのウエスタンブロット、ならびに(G) 肝臓の代表的なEdU染色写真(スケールバー = 100 μ m)を示す。(H) NACまたはNAC + X209で処置したAPAP誘発性肝障害マウス(図13G)から得た肝臓におけるPCNA、サイクリンD1/D3/E1、p-RBのタンパク質レベルでの発現量を示すウエスタンブロットを示す。(I) 致命的な過剰摂取量のAPAP (550mg/kg) を投与し、その10時間後にX209 (20mg/kg) でマウスを処置した実験の概略図であり、このデータを(J~K)に示す。(J) 致命的な過剰摂取量のAPAPを投与してから10時間後にIgGまたはX209で処置したマウスの生存曲線を示す。(K) コントロールマウス(8日目)、IgG処置マウス(24時間後)およびX209処置マウス(8日目)の肝臓の肉眼的解剖所見を示す。(D、E) データは平均値 \pm SDである; 2元配置分散分析; (J) Gehan-Breslow-Wilcoxonの検定。

【0353】

【図15】IL11 - ルシフェラーゼノックインマウスの作製に関する概略図である。CRISPR/Cas9を使用した、IL11遺伝子座のエキソン1へのコザック - ルシフェラーゼ - WPRE - ポリAのノックイン法を示す。ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)の転写後調節エレメント(WPRE)を使用した。

【0354】

【図16】IL11-EGFPノックインマウスの作製に関する概略図である。IL11遺伝子のエキソン5への2A-EGFPカセットのノックイン法を示し、TGA終止コドンを書換えることにより、IL11-2A-EGFPタンパク質が翻訳される。また、2Aリンカーが切断されることから、IL11を発現および分泌する細胞においてEGFPが保持される。

【0355】

【図17A - 17B】IL11の肝毒性効果を示す散布図である。IgGまたはX209 (2 μ g/ml) の存在下において、(A) 徐々に用量を増加させたrhIL11または(B) APAPで刺激したヒト初代肝細胞を、ヨウ化プロピジウム(PI)で染色し、フローサイトメトリーで分析した代表的な前方散乱(FSC)プロットである。

【0356】

【図18A - 18F】ヒト肝細胞またはマウス肝細胞に対するヒトIL11またはマウスIL11の生物種特異的な効果を示す写真、グラフおよび表である。(A) ヒト肝細胞におけるERK、JNKおよびCASP3の活性化状態に対する組換えヒトIL11 (rhIL11、10ng/ml) または組換えマウスIL11 (rmIL11、10ng/ml) の効果を示す。(B) rhIL11 (10ng/ml) または徐々に用量を増加させたrmIL11 (1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、15ng/mlもしくは20ng/ml) で刺激したヒト肝細胞の上清中のALT濃度を示す。(C) マウスの血清中AST濃度に対するrhIL11単独処置もしくはrmIL11単独処置の効果(図10C)、または(D) APAPをマウスに投与した場合のマウスの血清中AST濃度に対するrhIL11単独処置もしくはrmIL11単独処置の効果(図10F)を示す。各時点(6時間後および24時間後)

10

20

30

40

50

において、左から右に順に、生理食塩水、rmIL11およびrhIL11による処置を示す。(E) マウスIL11またはヒトIL11とマウスIL11RAの相互作用、およびヒトIL11とヒトIL11RAの相互作用における結合親和性と速度定数を示す。(F) rmIL11 (10ng/ml、24時間) で刺激したマウス肝細胞におけるp-ERK、ERK、p-JNKおよびJNKに対するrhIL11の用量依存的な抑制効果を示すウエスタンブロットを示す。(B) データは平均値 \pm SDとして示す。(C、D) データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す。(B) Tukeyの補正法を用いた両側Studentのt検定；(C) 両側Studentのt検定；(D) 両側Dunnettの検定。FC : fold change。

【0357】

【図19A - 19E】肝細胞特異的なIL11の過剰発現によって肝臓の壊死炎症が起こることを示すグラフおよび写真である。コントロールマウスおよびIL11-Tgマウス(図11A)における(A)心臓、肺および腎臓の重量、(B)血清中AST濃度、(C)門脈の直径の測定値、(D)総ERK、総JNKおよびCASP3のウエスタンブロット、ならびに(E)肝臓における炎症促進性マーカーのmRNAの相対発現量を示す。(A~C、E) データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す；両側Studentのt検定。

【0358】

【図20A - 20D】肝細胞において生物種特異的なIL11のみによりNOX4が誘導され、グルタチオンが枯渇することを示す写真およびグラフである。(A) NOX4タンパク質の発現量に対するrhIL11およびrmIL11 (10ng/ml) の効果、(B) ヒト肝細胞におけるGSHの濃度に対するrhIL11およびrmIL11 (10ng/ml) の効果、ならびに(C) マウス肝細胞におけるGSHの濃度に対するrhIL11およびrmIL11 (10ng/ml) の効果を示す。(D) マウスにrhIL-11またはrmIL-11を投与した後(図10C)の肝臓中GSH濃度を示す。各時点(6時間後および24時間後)において、左から右に順に、生理食塩水、rmIL11およびrhIL11による処置を示す。(B~D) データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す；両側Dunnettの検定。

【0359】

【図21A - 21B】障害を受けたマウス肝臓において、組換えヒトIL11 (rhIL11) によりGSH濃度が回復することを示すグラフである。(A) rmIL11で刺激したマウス初代肝細胞のGSH濃度に対するrhIL11の用量依存的な抑制効果を示す；Tukeyの補正法を用いた両側Studentのt検定。(B) 図10Fに示した実験により測定した、APAP誘発性肝障害を発症したマウスの肝臓中のGSH濃度に対するrhIL11またはrmIL11の効果を示す；両側Dunnettの検定。各時点(6時間後および24時間後)において、左から右に順に、生理食塩水、rmIL11およびrhIL11による処置を示す。(A、B) データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す。

【0360】

【図22A - 22B】NOX4阻害剤であるGKT-137831によりIL11の肝毒性効果を阻止できることを示す写真およびグラフである。rhIL-11 (10ng/ml、24時間) で刺激したヒト肝細胞における(A) ERKおよびJNKの活性化ならびに(B) ALTの分泌に対するNOX4阻害剤GKT-137831の用量依存的な抑制効果を示す。(B) データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す；Tukeyの補正法を用いた両側Studentのt検定。FC : fold change。

【0361】

【図23A - 23B】NOX4がIL11の肝毒性効果に重要であることを示す写真およびグラフである。(A) siNOX4のノックダウン効率を示すウエスタンブロットである。(B) rhIL11で誘導されたヒト初代肝細胞の死滅およびALTの放出に対するsiNOX4の効果を示す。(A~B) rhIL11 (10ng/ml) ; siNT (非標的指向性siRNAコントロール) / siNOX4

10

20

30

40

50

(50nM) ; 24時間後 ; データは、中央値 (中央線)、25 ~ 75パーセンタイル (箱)、および最小値から最大値の範囲 (ひげ) を示す箱ひげ図として示す ; Tukeyの補正法を用いた両側Studentの t 検定。FC : fold change。

【0362】

【図24A - 24B】APAPを投与してから24時間後の血清中APAP濃度および血清中APAP - グルタチオン濃度が、コントロールマウスとCKOマウスとで同程度であることを示すグラフである。コントロールマウスおよびCKOマウスの血清中の (A) APAP濃度および (B) APAP - グルタチオン濃度をLC-MS/MSで定量した結果を示す。データは、中央値 (中央線)、25 ~ 75パーセンタイル (箱)、および最小値から最大値の範囲 (ひげ) を示す箱ひげ図として示す ; 両側Studentの t 検定。

10

【0363】

【図25A - 25C】抗IL11RA抗体 (X209) によりAPAP誘発性肝障害の発症後の血清中AST濃度が低下することを示すグラフである。(A) APAPを投与する16時間前に予防的用量 (10mg/kg) のX209を投与したAPAPマウスまたは生理食塩水マウス (図13A) における血清中AST濃度を示す。(B) APAPを投与した3時間後に治療的用量のX209を投与したAPAPマウスにおける血清中AST濃度に対するX209の用量依存的な効果を示す (図13D、生理食塩水を使用した際の血清中AST濃度は、図S11Aで示したものと同一)。(C) APAP誘発性肝障害を発症した3時間後に、NAC (500mg/kg) 単独で処置したマウスまたはX209 (5mg/kg) を併用したNAC (500mg/kg) で処置したマウス (図13G) における血清中AST濃度を示す。(A ~ C) データは、中央値 (中央線)、25 ~ 75パーセンタイル (箱)、および最小値から最大値の範囲 (ひげ) を示す箱ひげ図として示す ; Tukeyの補正法を用いた両側Studentの t 検定。

20

【0364】

【図26A - 26B】APAPを過剰摂取させた24時間後のマウスの血清中APAP濃度および血清中APAP - グルタチオン濃度を示すグラフである。APAPを投与した24時間後にIgGもしくはX209で処置したマウスまたは生理食塩水コントロールマウスにおける (A) APAP濃度および (B) APAP - グルタチオン濃度をLC-MS/MSで定量した結果を示す。データは、中央値 (中央線)、25 ~ 75パーセンタイル (箱)、および最小値から最大値の範囲 (ひげ) を示す箱ひげ図として示す ; Tukeyの補正法を用いた両側Studentの t 検定。

【0365】

【図27A - 27B】X209によりAPAP誘発性肝障害が緩和することを示すグラフおよび写真である。図14Aに示した緩和実験群のマウスにおける (A) 血清中AST濃度ならびに (B) 肝臓中のERKの総含量、JNKの総含量、CASP3の総含量およびRBの総含量を示すウェスタンブロットである。

30

【0366】

【図28A - 28B】致死的な用量のAPAPを投与した後、X209で処置したマウスの回復を示す写真およびグラフである。(A) IgGで処置したマウス (APAPの投与の24時間後) およびX209で処置したマウス (APAPの投与から8日目) の肝臓の代表的なH&E染色写真を示す (スケールバー = 500 μ m)。(B) 生理食塩水で処置したコントロールマウスおよびX209で処置したマウス (APAPの投与から8日目) の血清中ALT濃度を示す。

40

【0367】

【図29】本発明者らによって提案された、APAP誘発性肝毒性におけるIL11の機構およびその役割を示す概略図である。肝臓でAPAPが代謝されることによって、NAPQIを介してROSが産生され、IL11の分泌が誘導される。肝細胞に対するIL11のシグナル伝達のオートクリンループよりNOX4を介したROSの産生が継続することによって、持続的な細胞死が起こり、APAPおよびその代謝産物とは無関係に肝再生が制限される。IL11経路が遺伝的に遮断されたり、治療薬により遮断されると、肝細胞死を防ぐことができ、肝再生が回復する。

【0368】

【図30A - 30B】過剰摂取量のAPAPを投与する16時間前に抗IL11療法を行うことに

50

よって、急性肝障害を予防できることを示す箱ひげ図である。20mg/kgの抗IL11抗体（ENx203）またはIgGコントロール抗体をマウスに腹腔内投与（IP）し、その16時間後に、重度の過剰摂取に相当する量のAPAP（400mg/kg）を投与した。24時間後にマウスを安楽死させた。急性肝損傷および肝細胞死に相関する因子として、（図30A）血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）および（図30B）血清中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を測定した。

【0369】

【図31A - 31K】ヒト初代肝細胞におけるIL-11受容体およびIL-6受容体の発現ならびにIL-11のシグナル伝達の効果およびIL-6のシグナル伝達の効果に関する散布図、箱ひげ図、ヒストグラムおよび写真である。（図31A）肝細胞のIL11RA、IL6Rおよびgp130を染色した代表的なフローサイトメトリーの前方散乱（FSC）プロットと蛍光強度プロットを示す。（図31B）RNA-seq解析（左側）およびRibo-seq解析（右側）に基づく、基礎状態の肝細胞におけるIL11RA1のリードおよびIL6Rのリードの存在量（Transcripts per million（TPM））を示す。（図31Cおよび図31D）ヒト肝細胞のRNA-seq解析およびRibo-seq解析に基づく、（図31C）IL11RA1の転写産物のリードカバレッジおよび（図31D）IL6Rの転写産物のリードカバレッジを示す（n=3）。（図31Eおよび図31F）一定の用量範囲のhyper IL11またはhyper IL6で刺激した肝細胞における（図31E）ERK、JNKおよびSTAT3の活性化状態を示すウエスタンプロットならびに（図31F）ALTの分泌を示す。（図31G）hyper IL11単独で刺激した肝細胞の上清中、または徐々に量を増加させた可溶性gp130（sgp130）の存在下においてhyper IL11で刺激した肝細胞の上清中のALT濃度を示す。（図31Hおよび図31I）（図31H）hyper IL11単独での刺激またはsgp130の存在下でのhyper IL11による刺激に応答したリン酸化ERKおよびリン酸化JNKの発現量、ならびにERKおよびJNKの総発現量を示す肝細胞溶解物のウエスタンプロットと、（図31I）sgp130の存在下または非存在下におけるhyper IL6による刺激に応答したリン酸化STAT3の発現量および総STAT3の発現量を示す肝細胞溶解物のウエスタンプロットを示す。（図31J）sgp130または可溶性IL11RA（sIL11RA）の存在下においてIL11で刺激した肝細胞のヨウ化プロピジウム（PI）染色の代表的なFSCプロットを示す。（図31K）IL11単独での刺激またはsgp130もしくはsIL11RAの存在下におけるIL11での刺激に応答した肝細胞におけるp-ERKおよびp-JNKの発現量ならびにERKおよびJNKの総発現量を示すウエスタンプロットを示す。（図31A～31K）ヒト初代肝細胞；（図31E～31K）24時間の刺激；（図31E～31K）hyper IL11、hyper IL6、IL11（20ng/ml）、sgp130、sIL11RA（1μg/ml）。（図31B、図31F～31G）データは、中央値（中央線）、25～75パーセンタイル（箱）、および最小値から最大値の範囲（ひげ）を示す箱ひげ図として示す。

【0370】

【図32A - 32H】ヒト初代肝細胞におけるIL-11受容体およびIL-6受容体の発現ならびにIL-11のシグナル伝達の効果およびIL-6のシグナル伝達の効果に関する散布図、箱ひげ図、ヒストグラム、写真およびグラフである。（図32A）活性化されたTHP-1細胞のIL11RA、IL6Rおよびgp130を染色した代表的なFSCプロットを示す。（図32B）RNA-seq解析およびRibo-seq解析に基づく、ヒト初代肝細胞におけるgp130転写産物の発現量（Transcripts per million（TPM））を示す。（図32C）ヒト初代肝細胞のRNA-seq解析およびRibo-seq解析に基づく、gp130転写産物のリードカバレッジを示す（n=3）。（図32D）ヒト初代肝細胞および活性化されたTHP-1細胞におけるIL11RA、IL6R、gp130、およびアルブミンの発現を示す免疫蛍光画像を示す（スケールバー=100μm）。（図32E）肝細胞培地における基礎状態での可溶性IL6Rの濃度を示す。（図32F）sgp130またはsIL11RAの存在下においてIL11で刺激したヒト初代肝細胞（陽性細胞）のPI染色の定量を示す。（図32G）1μg/mlのsgp130またはsIL11RAの存在下においてIL11の濃度を徐々に増加させた場合の、ヒト初代肝細胞により分泌されたALTの濃度に対するIL11の用量依存的な効果を示す。（図32H）IL11により誘導されたALTの分泌に対する、徐々に濃度を増加させたsgp130またはsIL11RAの用量依存的な効果を示す。（図32B、図32G

~32H) データは、中央値(中央線)、25~75パーセンタイル(箱)、および最小値から最大値の範囲(ひげ)を示す箱ひげ図として示す。(図32E~32F) データは平均値 \pm SEMとして示す。(図32F~32H) Tukeyの補正法を用いたStudentのt検定。

【実施例】

【0371】

以下の実施例において、本発明者らは、IL-11が直接的に肝細胞の生存を損なうこと、および抗IL-11療法により肝毒性を緩和することができることを実証する。また、本発明者らは、薬物誘発性肝障害(DILI)の発症前に投与されたIL-11アンタゴニストが肝細胞を細胞死から保護し、かつ肝機能を維持する能力を有することを実証するとともに、薬物誘発性肝障害(DILI)の発症後に投与されたIL-11アンタゴニストが肝損傷の症状を緩和し、かつ肝機能を回復させることができることも示している。

10

【0372】

実施例1：肝細胞に対するIL-11の効果

肝細胞に対するIL-11の効果を調べるため、ヒト初代肝細胞を用いて細胞培養を行うことにより実験を行った。

【0373】

ヒト肝細胞(5200、ScienCell)を37℃、5%CO₂で増殖させ、維持した。2%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した肝細胞培地(5201、ScienCell)を2~3日ごとに交換し、標準的なトリプシン処理技術を用いて80%コンフルエントで細胞を継代した。すべての実験は、継代数の少ない細胞(P2~P3)を用いて行い、細胞を16時間血清飢餓状態とした後、無血清肝細胞培地中でそれぞれの刺激を行った(24時間)。刺激した細胞を、刺激を与えなかったこと以外は同じ条件下(無血清肝細胞培地)で同じ時間にわたり増殖させた非刺激細胞と比較した。

20

【0374】

ヒト肝細胞からのIL-11R α の発現を免疫蛍光染色により測定した。染色の24時間前に、ヒト肝細胞を8ウェルのチャンバースライドに播種した(1.5 \times 10⁴個/ウェル)。細胞を4%PFAで20分間固定し、PBSで洗浄し、非特異的部位をブロッキング緩衝液(5%BSAのPBS溶液)で2時間ブロッキングした。抗IL11R α 抗体[EPR5446](ab125015、Abcam、1:100)とともに細胞を一晩(4℃)インキュベートし、続いてヤギ抗ウサギIgG H&L(Alexa Fluor 488)(ab150077、Abcam、1:200)とともに1時間インキュベートした。チャンバースライドを暗所で乾燥させ、DAPIを含む封入剤5滴をスライドに載せ、15分間経過後に蛍光顕微鏡(ライカ)による画像化を行った。ネガティブコントロール試料は、抗IL11R α 抗体とのインキュベーション工程を除いて同じ手順で染色を行った。

30

【0375】

一定用量範囲のIL-11(0.019~10ng/ml)で肝細胞を処理した後、肝細胞の培養上清中のアラニントランスアミナーゼ(ALT)の濃度を測定することによって、IL-11を介した肝細胞死を測定した。ALTの濃度は、製造業者のプロトコルに従ってALT活性アッセイキット(ab105134、Abcam)を使用して測定した。これと同時に、IL-11刺激の24時間後のストレスファイバーの本数をローダミン-ファロイジン染色により検出した。

40

【0376】

さらに、ヒト初代肝細胞に対する活性酸素種(ROS; 過酸化水素(0.2mM H₂O₂、24時間、31642、シグマ)で刺激)の効果を調べた。

【0377】

結果を図1A~図1Cに示す。IL-11は肝細胞の生存を直接的に損なうことが見出された。

【0378】

ヒト初代肝細胞は、IL-11R α 受容体を高発現することが見出された(図1A)。IL-11で刺激すると、生理学的に意義のある用量範囲においてアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)が段階的に上昇したことから、IL-11は、用量依存的に肝細胞死を誘導することが見出された(図1B)。さらに、IL-11は、この用量範囲において、肝細胞におけるア

50

クチンストレスファイバーの増加を段階的に刺激した（図1B；この用量範囲における顕微鏡写真）。アクチンストレスファイバーは、肝細胞の機能障害を引き起こすことが知られている肝細胞の部分的な上皮間葉転換を反映する（Grant Rowe et al. *Molecular and Cellular Biology* 2011; 31 (12): 2392-2403）。

【0379】

アセトアミノフェン（APAP）は、ROS依存的に肝障害を誘導することが知られていることを踏まえ、H₂O₂でヒト肝細胞を刺激したところ、上清中のIL-11が10倍アップレギュレートされることを見出された（図1C）。したがって、IL-11は、肝細胞死を直接的に引き起こし、部分的な上皮間葉細胞転換（EMT）により肝細胞の機能不全を引き起こすことが分かった。上皮間葉細胞転換（EMT）は、肝臓の再生能を抑制することが知られている（Grant Roweら、上掲）。

10

【0380】

実施例2：肝毒性に対する抗IL-11療法の効果

アセトアミノフェン（APAP）誘発性肝障害マウスモデルを用いて、肝毒性に対する抗IL-11療法の効果を調べた。

【0381】

この動物実験は、SingHealthの動物実験委員会（IACUC）により承認されたものであり、動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。飢餓期間中を除き、すべてのマウスに対して食物および水を自由に与えた。

【0382】

簡潔に述べると、12～14週齢の雄性マウスを飢餓状態にした後、10mg/kgの抗IL-11 R 抗体またはIgGアイソタイプコントロールを腹腔内注射（IP）し、その16時間後にAPAP（A3035、シグマ）を注射した（IP、400mg/kg）。APAPの投与の24時間後にマウスを殺した。

20

【0383】

製造業者のプロトコルに従って、マウスIL-11 DuoSet（DY418およびDY008、R&Dシステムズ）を使用してマウス血清中のIL-11濃度を定量し、製造業者のプロトコルに従って、ヒトIL-11 Quantikine ELISAキット（D1100、R&Dシステムズ）を使用して肝細胞の培養上清中のIL-11濃度を定量した。

【0384】

肝臓試料を切除し、10%中性緩衝ホルマリン（NBF）で室温にて48時間固定し、脱水し、パラフィンブロックに包埋し、7μmに薄切した。標準的なプロトコルに従って、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）で切片を染色し、光学顕微鏡で観察した。

30

【0385】

結果を図2A～図2Eに示す。治療レジメンの概略図を図2Aに示す。

【0386】

図に示すように、APAPにより毒性を負荷した後に血清中IL-11の顕著な上昇が見られた（図2B）（平均値±SD、コントロール：n=2；APAP：n=3）。抗IL11R 抗体の単回投与療法を行ったマウスは、ALT濃度が有意に低くなり（IgGコントロールと比較して55%低くなった；図2C）、すなわち、肝損傷の程度が著しく低下したことが見出された。肝重量は肝細胞の破壊を反映するが、IgGコントロール抗体ではAPAPの誘導により肝重量が24%減少したが、これに対して抗IL-11療法では、肝重量の減少が阻止されたことが見出された（肝指数；図2D）。図2Eに示すヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色による肝臓の組織学的試験では、IgG処置マウスにおいてAPAP毒性に特徴的な組織学的所見である重度の小葉中心壊死が示されたが、抗IL11R 療法により小葉中心壊死が軽減されることを見出された。

40

【0387】

IgGコントロールまたは抗IL11R 抗体で処置したマウスの運動性および活動性を、APAP処置の24時間後に観察した。コントロールIgGで処置したマウスは、静止状態/瀕死状態となり、目視で確認可能な体調不良の特徴（例えば、立毛や背中を丸める）が見られた

50

が、抗IL11R 抗体で処置したマウスは、正常な運動性および活動性を示した。

【0388】

したがって、広く受け入れられているAPAP誘発性肝障害(DILI)のトランスレーショナルモデルにおいて、IL11R の遮断を介してIL-11のシグナル伝達を抑制することにより、肝毒性を予防することができる。

【0389】

実施例3：IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用による、薬物誘発性細胞死からの肝細胞の保護

IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用が肝細胞の生存率に及ぼす効果をインビトロで分析した。

【0390】

2%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した肝細胞培地(5201、ScienCell)中でヒト肝細胞(5200、ScienCell)を37℃、5%CO₂で培養した。培地を2~3日ごとに交換し、標準的なトリプシン処理技術を用いて80%コンフルエントで細胞を継代した。すべての実験は、継代数の少ない細胞(P2~P3)を用いて行った。細胞は、実験に使用する前に、無血清肝細胞培地中で培養することによって16時間にわたり血清飢餓状態とした。

【0391】

第1の実験では、抗IL11RAアンタゴニスト抗体(X209、2μg/ml)またはアイソタイプ適合IgGコントロール抗体(IgG、2μg/ml)の非存在下(ベースライン(BL))または存在下において、最終濃度20mMのAPAP(A3035、シグマ)とともに肝細胞を24時間処理した。

【0392】

次に、製造業者の説明書に従って、FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit(V13242、サーモフィッシャー)を使用して肝細胞を染色し、アネキシンV-FITC/PIで染色された細胞を、BD LSRFortessaフローサイトメーター(BDバイオサイエンス)を使用したフローサイトメトリーで分析した。1試料あたり10,000個の細胞を分析した。FlowJoバージョン7ソフトウェアを使用してデータを分析した。

【0393】

結果を図3に示す。IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤により肝細胞を処理することによって、死滅する肝細胞の割合を大幅に低減できることが見出された。

【0394】

別の実験において、抗IL11RAアンタゴニスト抗体(X209、2μg/ml)またはアイソタイプ適合IgGコントロール抗体(IgG、2μg/ml)の非存在下(ベースライン(BL))または存在下において、最終濃度10mMのAPAP(A3035、シグマ)で肝細胞を24時間処理した。

【0395】

プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤(サーモサイエンティフィック)を含む放射免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液を使用して肝細胞からタンパク質抽出物を調製し、遠心分離により溶解物を清澄化した。ブラッドフォードアッセイ(バイオ・ラッド)によりタンパク質濃度を測定した。等量の各タンパク質溶解物をSDS-PAGEで分離し、PVD F膜に転写し、図に示した一次抗体(ERK、pERK、pJNK)を加えてイムノブロット分析を行った。ECL検出システム(Pierce)を使用して、適切な二次抗体でタンパク質を可視化した。

【0396】

結果を図4に示す。APAPで肝細胞を処理すると、p-ERKの発現量とpJNKの発現量が有意にアップレギュレートされることが見出された(BLとIgGの比較を参照されたい)。一方、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤により肝細胞を処理することによって、p-ERKの発現量とp-JNKの発現量が大幅に低減されることが分かった(1

10

20

30

40

50

gGとX209の比較を参照されたい)。

【0397】

実施例4：IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用による、薬物誘発性肝障害からの保護

20mg/kgの抗IL11RAアンタゴニスト抗体(X209)またはアイソタイプ適合IgGコントロール抗体を12~14週齢の雄性マウスに腹腔内投与(IP)し、その16時間後に、重度の過剰摂取に相当する量のAPAP(400mg/kg)またはこれと同じ量の生理食塩水を腹腔内注射(IP)により投与した。

【0398】

APAP投与の24時間後に、マウスを安楽死させた。製造業者の説明書に従ってALT活性アッセイキット(ab105134、Abcam)を使用して、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の濃度を測定した。肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン(NBF)で室温にて48時間固定し、脱水し、パラフィンブロックに包埋し、7µmに薄切した。標準的なプロトコルに従って、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)で切片を染色し、光学顕微鏡で観察した。

10

【0399】

結果を図5Aおよび図5Bに示す。血清中ALT濃度が大幅に低下したことから、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11R アンタゴニスト抗体阻害剤で前処置することによって、薬物誘発性肝障害(DILI)に関連する肝機能の抑制からマウスを有意に保護できることが示された(図5A)。また、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤で前処置したマウスの肝臓は、IgG処置コントロールから得た肝臓と比較して、肝細胞の壊死が大幅に少なかった(図5B)。

20

【0400】

さらなる実験では、20mg/kgの抗IL11アンタゴニスト抗体(X203)またはアイソタイプ適合IgGコントロール抗体を12~14週齢の雄性マウスに腹腔内投与(IP)し、その16時間後に、重度の過剰摂取に相当する量のAPAP(400mg/kg)を腹腔内注射(IP)により投与した。

【0401】

APAP投与の24時間後に、製造業者のプロトコルに従ってALT活性アッセイキット(ab105134、Abcam)およびAST活性アッセイキット(ab105135、Abcam)を使用して、マウス血清中のアラニントランスアミナーゼ(ALT)濃度およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)濃度を測定した。

30

【0402】

結果を図30Aおよび図30Bに示す。血清中のALT濃度およびAST濃度が大幅に低下したことから、IL-11媒介性シグナル伝達に対する抗IL-11アンタゴニスト抗体阻害剤で前処置することによって、薬物誘発性肝障害(DILI)に関連する肝機能の抑制からマウスを有意に保護できることが示された。

【0403】

実施例5：薬物誘発性肝障害発症後のIL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用による肝損傷の症状の緩和と肝機能の回復

40

重度の過剰摂取に相当する量のAPAP(400mg/kg)またはこれと同じ量の生理食塩水を腹腔内注射(IP)により12~14週齢の雄性マウスに投与し、その10時間に、20mg/kgの抗IL11RAアンタゴニスト抗体(X209)またはアイソタイプ適合IgGコントロール抗体を腹腔内投与(IP)するか、何も処置を行わなかった。

【0404】

24時間後、36時間後および48時間後にマウスを安楽死させた。実施例4と同様にして血清中ALT濃度を分析した。肝臓を摘出し、実施例4と同様にして固定して、デジタル写真を撮影した。

【0405】

結果を図6Aおよび図6Bに示す。重度の過剰摂取に相当する量のAPAPを投与した10時

50

間後に、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤を投与すると、肝臓の肉眼的形態を、APAPで処置しなかったマウスの肝臓の肉眼的形態にまで回復可能であることが示された（図6A）。また、重度の過剰摂取に相当する量のAPAPを投与した10時間後に、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤を投与すると、血清中ALT濃度が大幅に低下したことから、薬物誘発性肝障害（DILI）に関連する肝機能の抑制からマウスをレスキューできることが実証された（図6B）。

【0406】

さらに、マウスの肝臓から調製したタンパク質抽出物に対してウエスタンブロットを行った。プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤（サーモサイエンティフィック）を含む放射免疫沈降アッセイ（RIPA）緩衝液中で肝組織をホモジナイズし、溶解物をSDS-PAGEで分離し、実施例3と同様にしてウエスタンブロットにより分析した。

10

【0407】

結果を図7に示す。過剰摂取量のAPAPの投与により、p-ERK、p-JNK1およびp-JNK2の発現量が有意にアップレギュレートされた（コントロールと10時間後の比較を参照されたい）。IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤で後処置すると、p-ERK、p-JNK1およびp-JNK2の発現量が大幅に低下した（IgGとX209の比較を参照されたい）。

【0408】

さらなる実験では、致死的な過剰摂取に相当する量のAPAP（550mg/kg）またはこれと同じ量の生理食塩水を腹腔内注射（IP）により12～14週齢の雄性マウスに投与し、その10時間後に、20mg/kgの抗IL11RAアンタゴニスト抗体（X209）またはアイソタイプ適合IgGコントロール抗体を腹腔内投与（IP）するか、何も処置を行わなかった。

20

【0409】

APAPまたは生理食塩水を投与してから8日間にわたりマウスの生存率をモニターした。この結果を図8Aに示す。致死用量のAPAPを投与したマウスを、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤で処置することにより、IgG処置コントロールと比較して生存率が有意に改善した。

【0410】

24時間後および192時間後（8日後）にマウスを安楽死させた。実施例4と同様にして血清中ALT濃度を分析した。肝臓を摘出し、実施例4と同様にして固定して、デジタル写真を撮影した。

30

【0411】

結果を図8Bおよび図8Cに示す。致死的な過剰摂取に相当する量のAPAPを投与した10時間後に、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤を投与すると、8日後には、肝臓の肉眼的形態を、APAPで処置しなかったマウスの肝臓の肉眼的形態にまで回復可能であることが示された（図8B）。また、致死的な過剰摂取に相当する量のAPAPを投与した10時間後に、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニスト抗体阻害剤を投与すると、8日後の血清中ALT濃度は、正常（生理食塩水投与）コントロールマウスと有意差がなかったことから（図8C）、薬物誘発性肝障害（DILI）に関連する肝機能の抑制からマウスをレスキューできることが実証された。

40

【0412】

肝毒性傷害の誘発の10時間後に、IL-11媒介性シグナル伝達に対するアンタゴニストを投与することによる処置は、重度または致死的な過剰摂取に相当する量のAPAPを投与した対象の薬物誘発性肝障害（DILI）に関連する肝毒性を緩和し、その死亡を防ぐことができるという知見は、真に注目すべき結果であった。過剰摂取量の投与から10時間経過したマウスは、過剰摂取量の投与から約24時間経過したヒトと同等であると考えられる。

【0413】

これらの結果から、IL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用は、肝毒性傷害後の肝障害およびこれに関連する罹患率/死亡率を低減するための治療戦略として極めて有望であることが確認できた。

50

【0414】

実施例6：薬物誘発性肝障害発症後のIL-11媒介性シグナル伝達に対する拮抗作用による肝損傷の症状の緩和と肝機能の回復

6.1 概要

アセトアミノフェン（APAP）の過剰摂取は、肝不全の主な原因である。APAP誘発性肝障害（AILI）のマウスモデルに対して、組換えヒトインターロイキン11（rhIL11）の投与は保護効果を発揮する。

【0415】

本開示は、マウスのAPAP誘発性肝障害（AILI）におけるrhIL11の有益な効果が、マウスの内因性IL11の活性に対して外来性rhIL11が予想外にも抑制効果を発揮することによるものであることを示す。広く受け入れられている認識とは異なり、IL11は、損傷を受けた肝細胞によって分泌され、アポトーシスを誘導し、肝臓の再生を抑制する。

10

【0416】

肝細胞特異的にIL11を発現するマウスは、肝損傷を自然に発症するが、Il11ra1を欠損するマウスはAPAP誘発性肝障害（AILI）から堅牢に保護される。致死的な過剰摂取に相当する量のAPAPを投与してから10時間後に、瀕死のマウスに抗IL11R中和抗体を投与すると、生存率が90%となる。

【0417】

本開示のデータにより、誤った認識が覆され、疾患の機序が示され、治療標的が特定された。

20

【0418】

6.2 序論

アセトアミノフェン（N - アセチル - p - アミノフェノール（APAP））は、一般医薬品として販売されている鎮痛剤であり、過剰摂取（OD）に至ることが多く、過剰摂取によりAPAP誘発性肝障害（AILI）を起こす。APAP誘発性肝障害（AILI）は、急性肝不全の主な原因である（1）。抗酸化剤であるN - アセチルシステイン（NAC）は、APAPの過剰摂取の初期の患者には有益であるが（2）、過剰摂取後8時間を超えると、薬物を用いた治療法はなく、肝移植が不可能であれば死に至ることもある（3,4）。

【0419】

肝細胞において、APAPは、N - アセチル - p - ベンゾキノニンイミン（NAPQI）に代謝され、これにより、細胞内のグルタチオン（GSH）濃度が枯渇し、ミトコンドリアタンパク質が損傷を受け、活性酸素種（ROS）の発生とJNKの活性化が起こる（5）。ROSに関連して起こるJNKの活性化により、肝細胞の壊死、アポトーシスおよびその他の形態の細胞死が複合的に起こり、肝不全を引き起こす（1,6,7）。JNK阻害剤およびASK1阻害剤は、マウスモデルではAPAP誘発性肝障害（AILI）に対して部分的な保護効果を発揮することが認められているが、この保護効果は臨床へは移行されていない（8,9）。げっ歯類やヒトでの部分肝切除後に肝再生が認められることから、肝再生は、プロメテウスの神話のように人類の興味を惹きつけて止まず、大いに研究の余地がある（10,11）。一方で、APAP誘発性肝障害が発症すると、肝再生は持続的に抑制されるため、永久的な障害が起こり、患者が死に至る。肝臓の並外れた再生能力を妨げる経路を標的とすれば、自然再生を誘導できる可能性があり、これは、APAP誘発性肝障害において特に有用である可能性がある（12,13）。

30

40

【0420】

インターロイキン11（IL11）は、ほとんど研究されていないサイトカインであるが、筋線維芽細胞の活性化や、心臓、腎臓、肺および肝臓の線維症において極めて重要な役割を果たしている（14~16）。IL11は、損傷した肝細胞から分泌され、APAP誘発性肝障害マウスモデルの血清中では、高濃度のIL11が検出されることがあることが立証されており、このマウスモデルにおけるIL11の発現は代償性かつ細胞保護性であると考えられている（17）。このような認識に沿うと、組換えヒトIL11（rhIL11）の投与は、APAP誘発性肝障害マウスモデルの治療に有効であり、肝虚血、内毒素血症または炎症からマウスを

50

保護する(17~22)。最近では、2016年に、rhIL11がAPAP誘発性肝障害の患者の治療薬として提案されている(23)。

【0421】

本発明者らは、肝線維症の研究を行った際に、線維炎症性肝疾患モデルの一部において、IL11が肝細胞機能に有害な作用を発揮するという予想外の結果を観察した(14)。過去の文献とは明らかに一致しないこのような結果が得られたことをきっかけに、本発明者らは、線維症とは無関係な、肝細胞に対するIL11の効果のより詳細な検討を始め、IL11が高度にアップレギュレートされているAPAP誘発性肝障害マウスモデルにおいて詳細な検討を行うこととした(17)。

【0422】

6.3 IL11によるAPAP誘発性肝細胞死の誘導

過去の報告と同様に(17)、APAP誘発性肝障害(AILI)は、肝障害マウスにおける血清中IL11濃度の上昇を特徴とすることが確認された(図9A)。次に、本発明者らは、APAP誘発性肝障害マウスモデルにおける血清中IL11濃度の上昇が肝臓に起因するものであるか否かを検討した。APAPによって、肝臓内のIL11転写産物が強くアップレギュレートされた(35倍、 $P = 0.0001$)。IL11の開始コドンにルシフェラーゼをクローニングしたレポーターマウスの生物発光を画像化したところ、肝臓全体においてIL11が発現していることが示された(図9B、図9Cおよび図15)。また、ウエスタンブロットにより、APAP誘発性肝障害を発症した後の時間経過全体を通してIL11がタンパク質レベルでアップレギュレートされていたことが確認された(図9D)。EGFPレポーター構築物をIL11の3'UTRに挿入した第2のレポーターマウスを使用した実験(図16)では、APAPの投与後、カスパーゼ3の切断(CI.CASP3)と一致して、IL11タンパク質が肝小葉中心部の壊死性肝細胞において高発現されることが示され、これは、APAP誘発性肝障害に特有の特徴であった(図9E)。

【0423】

インビボでのAPAP誘発性肝障害におけるIL11のアップレギュレーションの起源が特定されたことから、本発明者らは、その発症機序を調査するためインビトロ実験を行った。ヒト初代肝細胞をAPAPに曝露させたところ、用量依存的なIL11の分泌が認められた(図9F)。肝細胞はインターロイキン11受容体サブユニット(IL11RA)を発現しており、一部の種類の細胞ではERKを活性化することが知られている(14)。これを踏まえ、本発明者らは、APAP誘発性肝障害において重要な役割を果たしている肝細胞でのERKおよびJNKの活性化に対するIL11の効果を調べた。IL11は、CASP3を切断すると同時に、遅延性に(>6時間)ERKおよびJNKの活性化を誘導し、これを持続させた(図9G)。FACSによる分析では、IL11の誘導による用量依存的な肝細胞死が示された(図9Hおよび図17A)。さらに、本発明者らは、APAPによるチャレンジを受けた肝細胞におけるIL11シグナル伝達の役割を調べるため、IL11RA中和抗体(X209)を使用したところ(14)、このIL11RA中和抗体は、CASP3の切断および細胞死、ならびにERKおよびJNKの活性化を抑制した(図9I、図9Jおよび図17B)。これらのデータから、APAP誘発性肝障害におけるIL11のアップレギュレーションが確認されたが、この結果は、IL11のアップレギュレーションが肝障害において代償性かつ保護的な効果を有するという一般的な認識に疑問を投げかけるものであった。

【0424】

6.4 組換えヒトIL11の生物種特異的な効果

rhIL11は、げっ歯類の肝損傷モデルにおいて保護効果を有することが一貫して報告されているが(17~20,23)、実施例6.3で述べた結果では、rhIL11がインビトロのヒト肝細胞に対して正反対の効果と及ぼすことが示唆された(図9)。これを受けて、本発明者らは、この結果の不一致をさらに調べるため、ヒトIL11タンパク質とマウスIL11タンパク質の配列相同性が82%に過ぎないことを踏まえ、rhIL11タンパク質を別の生物種に使用した場合を試験した。本発明者らは、まず、マウス肝細胞に対するrhIL11の効果と組換えマウスIL11(rmIL11)の効果と比較した。生物種を一致させたrmIL11は、マウス肝細

10

20

30

40

50

胞においてERKおよびJNKのリン酸化を刺激し、CASP3の切断を誘導したが、rhIL11は何ら効果を及ぼさなかった(図10A)。これと同様に、rmIL11はマウス肝細胞死を誘導したが、rhIL11はマウス肝細胞死を誘導しなかった。実際に、rhIL11は、高用量においてマウス肝細胞死を抑制する傾向が見られた(図10A)。これらの実験とは関係性を逆にしてヒト肝細胞を用いた実験では、rhIL11がERKおよびJNKのシグナル伝達と肝細胞死を刺激するのに対して、rmIL11はこのような刺激をもたらさないことが見出された(図18Aおよび図18B)。

【0425】

これらの結果から、肝細胞死におけるIL11のシグナル伝達の役割は、様々な生物種間で保存されているが、組換えIL11タンパク質は生物種に特異的な効果を発揮し、異なる生物種ではIL11のシグナル伝達経路を活性化しないことが示された。この仮説を検証するため、rmIL11またはrhIL11をマウスに注射したインビボ試験を行った(図10C)。rmIL11を注射すると、ERKが徐々に活性化され、JNKが即時に活性化された。これに対して、rhIL11は、ERKおよびJNKをリン酸化しなかった(図10D)。また、rmIL11を注射すると、肝損傷が起こり、ALTおよびASTが上昇した(図10Eおよび図18C)。これとはまったく対照的に、ナイーブマウスにrhIL11を注射すると、注射から24時間後にALT濃度およびAST濃度がわずかに低下した(ALT、 $P=0.018$; AST、 $P=0.0017$)。rhIL11がマウスにおいて保護効果を有する可能性が示されたことを確認するため、2001年に報告されているAPAP誘発性肝障害研究(20)と同様のプロトコルを実施し、過剰摂取量のAPAPをマウスに投与した後にrhIL11を注射した(図10F)。この結果、rhIL11によってマウスのAPAP誘発性肝障害の重症度が低下するが(低下: ALT、52%、 $P=0.0001$; AST、39%、 $P=0.0001$)、生物種が一致しているrmIL11はマウスに対して保護効果を発揮しないことが確認された(図10Gおよび図18D)。rhIL11の治療効果によって、肝臓におけるERKおよびJNKの活性化が低下し(図10H)、このことから、rhIL11が、IL11RA抗体と同様に、肝臓においてIL11誘導性のシグナル伝達経路を遮断することが示された(図9I)。

【0426】

表面プラズモン共鳴(SPR)を使用することにより、rhIL11が、72nMのKDでマウスインターロイキン11受容体鎖1(mIL11RA1)に結合することが見出されたが、この親和性は、rmIL11とmIL11RA1の相互作用におけるKD(94nM)よりもわずかに強く、過去に報告されているrhIL11とhIL11RAの相互作用における親和性(50nM)に近いものであり、この結果は再確認された(図10Iおよび図18E)(24)。次に、本発明者らは、競合ELISAアッセイを実施したところ、rhIL11が、mIL11RA1への結合に対してrmIL11と競合し、mIL11RA1に対する親和性が高いことから示唆されたように、非常に有効な遮断剤として作用することを見出した(図10J)。マウスの肝細胞では、rhIL11は、rmIL11の誘導によるシグナル伝達経路および細胞傷害活性の強力な阻害剤として用量依存的に作用することが認められた(図10K、図10Lおよび図18F)。したがって、逆説的だが、外来性のrhIL11は、インビトロでもインビボでもマウスIL11の中和剤として作用し、この観察結果から、肝障害および肝疾患におけるIL11の役割をより深く理解する必要があると考えられた。

【0427】

6.5 肝細胞特異的なIL11の発現による肝不全の自然発症

インビボで肝細胞から分泌されるマウス内因性IL11の効果を試験するため、アルブミンプロモーターにより駆動されるCre構築物をコードするAAV8ウイルスをRosa26^{fl/fl}/+マウス(15,16)に注射することによって、IL11導入遺伝子を肝細胞において特異的に発現させた(IL11-Tgマウス、図11A)。導入遺伝子の誘導の3週間後に、IL11-Tgマウスの肝臓は、異常な肉眼的所見を呈すとともに縮小しており(38%、 $P=0.0001$)、血清中ALT濃度およびAST濃度も上昇していたが、その他の器官は影響を受けていなかった(図11A~図11Dならびに図19Aおよび図19B)。組織学的試験では、顕著な門脈の拡張および類洞における血液蓄積(類洞閉塞症候群を示唆する所見)が認められ、門脈三管の周囲へ

10

20

30

40

50

の浸潤が見られた(図11Eおよび図19C)。肝臓におけるIL11-Tgを分子解析したところ、ERKおよびJNKの活性化とCASP3の切断が見られるとともに、炎症促進遺伝子の発現の増加が認められた(図11F、図19Dおよび図19E)。したがって、APAPの毒性において見られるように(図9)、肝細胞から分泌されるIL11は肝毒性を有する。

【0428】

6.6 IL11による刺激によるNOX4媒介性の活性酸素種の生成

APAPの誘導によるJNKの活性化は、ROSの生成とGSHの枯渇に続いて起こることが知られているが、インビトロでのAPAPの誘導によるJNKの活性化には、IL11のシグナル伝達が必要とされる(図9Iおよび図9J)。IL11-Tgマウスにおいて肝臓中のGSH濃度を調べたところ、低下していることが見出されたが(62%、 $P = 0.0001$)、これは、IL11のシグナル伝達によって直接的または間接的にROSが誘導されることを示している(図11G)。

10

【0429】

NADPHオキシダーゼの一種であるNOX4は、ROSの発生源となるが、線維芽細胞におけるNOX4の発現は、IL11の発現と強く関連しており(15,25)、肝細胞特異的にNox4が欠失すると、JNKの病的活性化が阻害される(26)。これを踏まえ、本発明者らは、IL11とNOX4とROSの関係性をより詳細に調査した。IL11-Tgマウスでは、肝臓中のNox4の発現がアップレギュレートされていた(図11H)。ヒト初代肝細胞では、IL11で刺激することによって、GSHが用量依存的かつ経時的に枯渇し、これを反映してERKおよびJNKが活性化され、NOX4がアップレギュレートされた(図9Gおよび図11I~図11K)。予想されたとおり、生物種特異的なIL11のみによってNOX4のアップレギュレーションが誘導され、GSH濃度が低下した(図11Lおよび図20A~図20D)。

20

【0430】

APAPによる刺激によっても、肝細胞のNOX4がアップレギュレートされ、これと一致して肝臓中のGSH濃度が枯渇したが、これは、抗IL11RA抗体(X209)により阻害された(図11Mおよび図11N)。マウス肝臓における内因性IL11の誘導による細胞死に対するrhIL11の抑制効果を再検討したところ(図10Jおよび図10K)、rmIL11で刺激したマウス細胞におけるGSH濃度の低下が、rhIL11により用量依存的に回復されるという明確な効果が認められた(図21A)。同様に、マウスにおけるAPAP誘発性のGSHの枯渇はrhIL11により回復されたが、rmIL11では、このような回復は認められなかった(図21B)。

特異的NOX4阻害剤であるGKT-13781は、IL11で刺激することにより誘導されるGSHの枯渇、CASP3の活性化および細胞死を用量依存的に阻止した(図11O、図22Aおよび図22B)。siRNAを使用することにより、IL11誘発性の肝毒性を予防できたことから、薬理的なNOX4の抑制の特異性が確認された(図11P、図11Q、図23Aおよび図23B)。以上のデータから、IL11で刺激することにより誘導されるNOX4の活性は、ミトコンドリアROSにも影響を及ぼしうが、APAP誘発性肝障害(AILI)発症時のGSHの枯渇に対して重要な役割を果たすことが示された。

30

【0431】

6.7 肝細胞特異的なIL11ra1の欠失によるAPAP誘発性肝不全の予防

IL11ra1を成体マウスの肝臓において特異的に欠失させるため、LoxP部位に挟まれたIL11ra1アレルのホモ接合型マウスにAAV8-ALB-Creウイルスを注射することによって条件付きIL11ra1ノックアウト(CKO)を作製した。これと同時に、同じマウスを使用して野生型コントロールも作製した。ウイルスに感染させてから3週間後に、コントロールマウスおよびCKOマウスにAPAP(400mg/kg)を投与した(図12A)。APAP投与の翌日に、肉眼的解剖学的試験を行ったところ、コントロールマウスでは縮小し変色した肝臓が見られたが、CKOマウスの肝臓は正常な状態を呈した(図12B)。組織学的試験では、コントロールマウスは典型的な小葉中心壊死を広範に呈したが、このような小葉中心壊死はCKOでは観察されなかった(図12C)。

40

【0432】

驚くべきことに、CKOマウスは、コントロールと比較して、ALT濃度が99%低く、AST

50

濃度も95%低く、GSH濃度はベースラインと同等であった。CKO群およびコントロール群の血清中のAPAP濃度およびAPAP - グルタチオン (APAPの代謝産物) の濃度は、ほぼ同程度であったことから、IL11ra1の欠失はAPAPの代謝に影響を及ぼさないことが判明した (図12D ~ 図12F、図24Aおよび図24B)。コントロールマウスでは、ERKおよびJNKの活性化が観察されたが、CKOでは観察されなかった (図12G)。また、肝細胞においてIL11ra1受容体を欠失させたことにより、炎症マーカーが著しく低下し、このことから、APAP誘発性肝障害 (AILI) における炎症が、肝実質組織の障害に続いて起こることが示唆された (図12H)。以上のデータから、肝細胞特異的なIL11のシグナル伝達がAPAP誘発性肝障害 (AILI) の発生機序において主要な役割を果たしていることが示された。肝細胞におけるIL11ra1の欠失が、APAPの過剰摂取からの保護に十分であるという結果から、血清中に遊離した可溶性IL11RA1や、その他の細胞からの受容体のシェディングは、トランスシグナル伝達を介した疾患の発生機序には寄与しないことが示された。

【0433】

6.8 APAP誘発性肝障害の初期における抗IL11RA投与の効果

次に、IL11のシグナル伝達の治療的抑制がAPAP誘発性肝障害 (AILI) の軽減に有効であるか否かを、抗IL11RA (X209) 抗体を投与することにより試験した (14)。まず、APAPを投与する16時間前に、X209またはコントロール抗体 (10mg/kg) を注射することにより予防処置を行った。このアプローチにより、肝損傷の血清マーカーが70%を超える低下を示し、肝臓中のGSH濃度がほぼ回復し、組織学的試験で確認された小葉中心壊死が抑制された (図13A ~ 図13Dおよび図25A)。

【0434】

次に、APAPを投与してから3時間後、すなわちAPAPが代謝されて毒性が確立され、これ以降の介入の大半はAPAP誘発性肝障害 (AILI) マウスモデルに対して効果を発揮しない時点において、抗体を投与することにより、治療上意義のある方法で抗IL11RA療法を実施した (図13E) (9)。一定の用量範囲 (2.5 ~ 10mg/kg) のX209は、APAP誘発性肝障害 (AILI) を抑制し、肝損傷マーカーおよび肝臓中GSH濃度が用量依存的に改善された。JNKおよびERKの活性化が低下したことから、用量依存的に標的をカバーできることが確認された (図13F ~ 図13H、および図25B)。

【0435】

さらに、APAP投与の3時間後に、現在の標準治療であるNACと組み合わせた場合に、IL11のシグナル伝達の抑制が付加価値を有するか否かを判定した (図13I)。NACの単独投与により、血清中のALT濃度およびAST濃度は低下した。一方、NACをX209と組み合わせると、NACの単独投与やX209の単独投与の場合よりもさらに有効であった (ALTの低下: NAC、38%、 $P = 0.0007$; X209、47%、 $P = 0.0001$; NAC + X209、75%; $P = 0.0001$) (図13F、図13Jおよび図25C)。分子レベルでは、NACの単独投与またはNACとX209の併用投与によるERKおよびJNKの抑制の程度は、血清中ALTの低下の程度と肝臓中GSH濃度の回復を反映するものであった (図13Kおよび図13L)。したがって、抗IL11RA療法は、現在の標準治療と組み合わせて実施すると、さらなる利点が得られる。

【0436】

6.9 抗IL11RA療法による肝再生

APAPを過剰摂取してから8時間以降に緊急処置室に搬送された患者に対して有効な処置は存在しない。このような事態を踏まえ、本発明者らは、マウスにAPAP (400mg/kg) を投与してから10時間後の抗IL11RAの効果を試験した (図14A)。マウスではAPAPの代謝が加速していることを考慮に入れると、このモデルでの10時間後の治療は、APAPを過剰摂取してから最大24時間後のヒトに対する治療と同等であると見なせる。血清中のAPAPおよびAPAP - グルタチオンを質量分析により定量したところ、予想したとおり、生理食塩水処置コントロールよりも濃度が上昇しており、実験群間では同程度であることが分かった (図26Aおよび図26B)。肉眼的解剖学的試験、組織学的試験ならびに血清中のIL11濃度、ALT濃度およびAST濃度を分析したところ、X209はAPAPの過剰摂取後2日目までには肝損傷を大幅に緩和したが、IgG処置マウスでは深刻かつ持続的な肝損傷が認め

られることが明らかになった（図14B～図14E、および図27A）。この治療抗体は、実験全体を通してERKおよびJNKの活性化を効果的に阻害し、これは、24時間後の切断型CAS P3の低下に先行して見られた（図14Fおよび図27B）。

【0437】

肝再生を促進する介入は、非常に大きな可能性を有しており、APAP誘発性肝障害（AILI）を治療するための新たな手段となりうる（12）。このことから、肝再生に重要な遺伝子の状態を評価した（10）。部分肝切除後の肝再生に見られるように（10）、IL11のシグナル伝達の抑制は、PCNAおよびサイクリンD1/D3/E1の強いアップレギュレーションならびにRBのリン酸化が見られる肝再生の顕著な特徴との関連性が認められた。EdUを注射して組織学的分析を行ったところ、X209処置マウスでは、コントロールと比較して、最近のDNA合成の証拠を示す非常に多数の核が見られた（図14G）。APAPの過剰摂取の3時間後に投与したX209の効果（図13I～図13L）を再評価して、肝再生がより早い時点でのIL11のシグナル伝達の抑制とも関連するか否かを調べた。これは実際にそのような関連性があることが判明し、X209とNACの組み合わせは、NAC単独よりも、肝再生を示す分子マーカーを増加させるのに有効であり、そのうちでも特に、サイクリンD1およびサイクリンD3の増加に有効であった（図14H）。

10

【0438】

さらに、致死的な高用量のアセトアミノフェン（550mg/kg）を投与し、その10時間後にマウスが瀕死状態となり、肝臓が劇症型の壊死性炎症を起こした時点において、X209（20mg/kg）を投与した（図14I）。X209で処置したマウスは回復し、試験終了時まで90%の生存率を示した。これとは対照的に、IgGで処置したマウスは回復せず、48時間以内に100%の死亡率で死亡した（図14J）。致死量のAPAPを投与してから8日目に、X209で処置したマウスは、正常な形態の肝臓を有する健康な状態であることが観察され、ALT濃度は、APAPを投与しなかったコントロールと同程度であった（図14K、図28Aおよび図28B）。

20

【0439】

6.10 考察

英国では、毎年最大で50,000人ももの患者がAPAPの過剰摂取で緊急処置室を受診するほどAPAPの過剰摂取は一般的であり、その中には移植が必要な肝不全を発症する患者もいる（1）。IL11は、APAPにより誘発された肝不全（17,20）、肝虚血（18,21）、内毒素血症（22）および炎症（19）に対して保護効果を発揮することが過去に報告されているが、実際には、肝毒性を有し、APAPの過剰摂取後の肝不全において中心的かつ重要な役割を担っていることが示されている。

30

【0440】

30個を超える文献において、rhIL11がヒト疾患のげっ歯類モデルにおいて細胞保護効果および/または抗炎症効果を有することが報告されていることから（表1および表2）、内因性IL11が肝毒性を有するという観察結果は、最も驚くべきことである。rhIL11は、IL11RA1に結合するマウスIL11の競合的阻害剤であることが示されており、これは、APAP誘発性肝障害（AILI）および肝疾患におけるIL11の役割に関する過去の理解をより一般的に覆すものである。また、rhIL11が、IL11RA1に結合するマウスIL11の競合的阻害剤であることは、マウスモデルにおいてrhIL11が保護効果を発揮することが示された別の疾患（関節リウマチ（27）や大腸炎（28）など）においても、抗IL-11療法が有効である可能性を示唆するものである（表2）。rhIL11がマウスにおいて機能獲得型の有益なIL11となるという誤った仮定に基づいて、rhIL11を使用した多数の臨床試験が患者において実施されてきた（表3）。

40

【0441】

【表 2】

表 1. 肝障害げっ歯類モデルにおける組換えヒト IL11(rhIL11)の保護効果を示す文献の一覧	
Yu et al. 2016. "Interleukin-11 Protects Mouse Liver from Warm Ischemia/reperfusion (WI/Rp) Injury." <i>Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology</i> 40 (5): 562–70	温虚血／再灌流による障害の発症前に rhIL11 をインビボ投与 (500 μg/kg、静脈内投与) すると、 <u>マウスの肝臓</u> を保護することができる。インビトロにおいて rhIL11 で前処置 (2 μg/mL、12 時間) を行うと、低酸素／再灌流に起因する <u>マウス肝細胞のアポトーシス</u> が軽減される。
Zhu et al. 2015. "IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice." <i>PloS One</i> 10 (5): e012629.	虚血／再灌流障害 (IRI) の発症の 1 時間前に rhIL11 (500 μg/kg、腹腔内投与) を単回注射したマウスにおける rhIL11 の肝臓保護効果。インビトロにおいて <u>マウス肝細胞</u> を 1 μg/ml の rhIL11 で処理した。
Nishina et al. 2012. "Interleukin-11 Links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation." <i>Science Signaling</i> 5 (207):ra5.	アセトアミノフェン (APAP) 注射の 2 時間前に、rhIL11 受容体のスーパーアゴニスト (Nr-3N、500 μg/kg) を投与すると、 <u>マウスの急性肝障害</u> が軽減される。
Maeshima et al. 2004. "A Protective Role of Interleukin 11 on Hepatic Injury in Acute Endotoxemia." <i>Shock</i> 21 (2): 134–38.	<u>ラット</u> における LPS 誘発性肝障害 (急性内毒素血症) において rhIL11 (150 μg/kg、腹腔内投与) が有意な保護効果を発揮すると結論付けている。
Trepicchio et al. 2001. "Protective Effect of rhIL-11 in a Murine Model of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity." <i>Toxicologic Pathology</i> 29 (2): 242-249.	アセトアミノフェン投与の 2 時間前に rhIL11 (250 μg/kg または 500 μg/kg、皮下投与) をマウスに注射したところ、 <u>rhIL11</u> がアセトアミノフェン誘発性肝障害に対して保護効果を発揮したことが示されている。
Bozza et al. 1999. "Interleukin-11 Reduces T-Cell-Dependent Experimental Liver Injury in Mice." <i>Hepatology</i> 30 (6): 1441–47.	コンカナバリン A 誘発性の T 細胞媒介性肝毒性を誘導する 2 時間前に rhIL11 (50~500 μg/kg、腹腔内投与) を投与すると、 <u>マウスの肝臓壊死</u> が減少し、生存率が向上する。

10

20

【 0 4 4 2 】

30

40

50

【表 3】

表 2. その他の疾患のげっ歯類モデルにおける rhIL11 の保護効果および/または抗炎症効果を示す文献の一覧		
	Gibson et al. 2010. "Interleukin-11 Reduces TLR4-Induced Colitis in TLR2-Deficient Mice and Restores Intestinal STAT3 Signaling." <i>Gastroenterology</i> 139 (4): 1277–88.	TLR2 欠損マウスにおいて、rhIL11 (5 μg/kg、腹腔内投与) の投与が感染性大腸炎を改善させ、細胞保護効果を発揮することが報告されている。
	Boerma et al. 2007. "Local Administration of Interleukin-11 Ameliorates Intestinal Radiation Injury in Rats." <i>Cancer Research</i> 67 (19): 9501–6.	放射線照射の 2 日前から放射線照射後 2 週間にわたって rhIL11 (2mg/kg/日) をラットに毎日注射したところ、IL11 が初期の放射線腸管障害を改善することが結論付けられている。
	Opal et al. 2003. "Orally Administered Recombinant Human Interleukin-11 Is Protective in Experimental Neutropenic Sepsis." <i>The Journal of Infectious Diseases</i> 187 (1): 70–76.	シクロホスファミドの初回投与前日から計 12 日間にわたり rhIL11 (0.5mg/kg/日) をラットに毎日経口投与して観察された効果から、化学療法剤であるシクロホスファミドによる細胞減少療法中に IL11 が上皮細胞の完全性を維持することが示唆されている。
	Ropeleski et al. 2003. "Interleukin-11-Induced Heat Shock Protein 25 Confers Intestinal Epithelial-Specific Cytoprotection from Oxidant Stress." <i>Gastroenterology</i> 124 (5): 1358–68.	IL11 が腸上皮障害において上皮特異的な細胞保護効果を付与することが結論付けられている。ラット、マウスおよびイヌの細胞株 (IEC-18、YAMC、NIH3T3、MDCK-HR) が、高濃度 (50 ~ 100ng/ml) の rhIL11 で刺激された。
	Greenwood-Van Meerveld et al 2000. "Recombinant Human Interleukin-11 Modulates Ion Transport and Mucosal Inflammation in the Small Intestine and Colon." <i>Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology</i> 80 (8): 1269–80.	ラット粘膜シートにおける rhIL11 (10~10,000ng/ml) の効果およびラットにおける rhIL11 (33 μg/kg、1 日おきに 1 週間または 2 週間) の効果に基づいて、IL11 が、腸管炎症において上皮輸送の調節因子または抗炎症性サイトカインとして作用することが結論付けられている。
腸管	Du et al 1997. "Protective Effects of Interleukin-11 in a Murine Model of Ischemic Bowel Necrosis." <i>American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology</i> .	腸管虚血誘発前の 3 日間および腸管虚血誘発後の 7 日間にわたって rhIL11 (250 μg/kg/日) を投与したところ、虚血性腸壊死に対する保護効果がもたらされたことから、胃腸粘膜疾患用の治療薬として rhIL11 を使用することが示唆されている。
	Orazi et al. 1996. "Interleukin-11 Prevents Apoptosis and Accelerates Recovery of Small Intestinal Mucosa in Mice Treated with Combined Chemotherapy and Radiation." <i>Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology</i> 75 (1): 33–42.	rhIL-11 (250 μg/kg) の投与により、化学療法および放射線により誘発されたマウス小腸粘膜の損傷の回復が促進される。
	Potten et al 1996. "Protection of the Small Intestinal Clonogenic Stem Cells from Radiation - Induced Damage by Pretreatment with Interleukin 11 Also Increases Murine Survival Time." <i>Stem Cells</i> .1996 14(4):452-9.	細胞傷害性曝露の前後に rhIL11 (100 μg/kg、皮下投与) をマウスに投与すると、放射線曝露後の腸陰窩のクローン原性細胞が保護され、マウスの生存期間が延長される。
	Qiu et al. 1996. "Protection by Recombinant Human Interleukin-11 against Experimental TNB-Induced Colitis in Rats." <i>Digestive Diseases and Sciences</i> 41 (8): 1625–30.	ラットのトリニトロベンゼンスルホン酸誘発性大腸炎における rhIL11 の保護効果について報告されている。TNB の投与前の 3 日間または TNB を投与後 3 日間、7 日間もしくは 14 日間にわたり rhIL11 (100 μg/kg、300 μg/kg または 1000 μg/kg、皮下投与) をラットに毎日注射した。
	Du et al. 1994. "A Bone Marrow Stromal-Derived Growth Factor, Interleukin-11, Stimulates Recovery of Small Intestinal Mucosal Cells after Cytoablative Therapy." <i>Blood</i> 83 (1): 33–37.	rhIL11 (250 μg/kg/日、皮下投与) の投与により、放射線と化学療法の併用後のマウス小腸粘膜の回復が促進される。

10

20

30

40

50

表 2. その他の疾患のげっ歯類モデルにおける rhIL11 の保護効果および/または抗炎症効果を示す文献の一覧

心臓	Tamura et al. 2018. "The Cardioprotective Effect of Interleukin-11 against Ischemia-Reperfusion Injury in a Heart Donor Model." <i>Annals of Cardiothoracic Surgery</i> 7 (1):99-105.	rhIL11 (18 μ g/ml、静脈内投与、心臓摘出の 10 分前) の投与により、エクスビボ冷虚血ラットモデルにおいて心機能が維持され、アポトーシス指数が低下する。	
	Obana et al. 2012. "Therapeutic Administration of IL-11 Exhibits the Postconditioning Effects against Ischemia-Reperfusion Injury via STAT3 in the Heart." <i>American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology</i> 303 (5): H569-77.	虚血再灌流障害誘発性急性心筋梗塞後のマウスに rhIL11 (20 μ g/kg、再灌流開始時に静脈内投与) を投与すると、有害な心臓のリモデリングおよびアポトーシスを予防できる。	10
	Obana et al. 2010. "Therapeutic Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-11 Ameliorates Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction." <i>Circulation</i> 121 (5): 684-91.	左冠動脈結紮誘発性心筋梗塞 (MI) の 24 時間後と、その後 24 時間ごとに 4 日間連続して rhIL11 (8 μ g/kg、静脈内投与) を投与すると、マウスの MI 後の癒痕量が減少する。	
	Kimura et al. 2007. "Identification of Cardiac Myocytes as the Target of Interleukin 11, a Cardioprotective Cytokine." <i>Cytokine</i> 38 (2):107-115	心臓の虚血再灌流の 15 時間前にマウスに投与された rhIL11 (8 μ g/kg) の効果に基づいて、IL11 が心臓保護効果を有することが結論付けられている。	
免疫系	Bozza et al. 2001. "Interleukin-11 Modulates Th1/Th2 Cytokine Production from Activated CD4 T Cells." <i>Journal of Interferon & Cytokine Research</i> 21(1):21-30.	rhIL11 (1~500 ng/ml) で刺激すると、IL11 が、活性化マウス CD4+T 細胞に直接的に作用し、免疫応答を抑制するのではなく調節することが主張されている。	20
	Opal et al. 2000. "Recombinant Human Interleukin - 11 Has Anti - inflammatory Actions Yet Does Not Exacerbate Systemic Listeria Infection." <i>The Journal of Infectious Diseases</i> 181(2): 754-756	リステリア感染症前に rhIL11 (150mg/kg、静脈内投与) を 7 日間にわたり毎日投与すると、インターフェロン γ レベルが低下する。興味深いことに、抗 IL11mAb (10mg/kg) による処置後に、炎症マーカーである IL-6/IFN- γ が低下する傾向があることが報告されている。	
	Hill et al. 1998. "Interleukin-11 Promotes T Cell Polarization and Prevents Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation." <i>The Journal of Clinical Investigation</i> 102 (1): 115-23.	高用量の rhIL11 (250 μ g/kg、皮下投与、1 日 2 回) を移植片対宿主病 (GVHD) のマウスモデルに注射した実験の結果に基づいて、IL11 が T 細胞の偏向を介して GVHD を予防すると結論付けている。	30
	Sonis et al. 1997. "Mitigating Effects of Interleukin 11 on Consecutive Courses of 5-Fluorouracil-Induced Ulcerative Mucositis in Hamsters." <i>Cytokine</i> 9 (8): 605-12.	5-フルオロウラシルで誘発した潰瘍性粘膜炎を有するハムスターに、rhIL11 (50~100 μ g/匹/日、皮下投与) を投与することにより、潰瘍性粘膜炎からハムスターを保護することができる。	
Trepicchio et al. 1997. "IL-11 Regulates Macrophage Effector Function through the Inhibition of Nuclear Factor-kappaB." <i>Journal of Immunology</i> 159 (11): 5661-70.	IL11 がマクロファージによる炎症促進性サイトカインの分泌を抑制することが結論付けられている。マウス初代マクロファージが rhIL11 (10~100ng/ml) で処理された。		
Trepicchio et al. 1996. "Recombinant Human IL-11 Attenuates the Inflammatory Response through down-Regulation of Proinflammatory Cytokine Release and Nitric Oxide Production." <i>Journal of Immunology</i> 157 (8): 3627-34.	IL11 が、LPS で処置したマウスの血清中および LPS で刺激したマクロファージの培地中の TNF- α 濃度、IL-1 β 濃度および IFN- γ 濃度を低下させることが報告されている。マウスが rhIL11 (500 μ g/kg) で処置され、マウスマクロファージが rhIL11 (10~100ng/ml) で処理された。	40	

10

20

30

40

50

表 2. その他の疾患のげっ歯類モデルにおける rhIL11 の保護効果および/または抗炎症効果を示す文献の一覧		
関節	Anguita et al. 1999. "Selective Anti-Inflammatory Action of Interleukin-11 in Murine Lyme Disease: Arthritis Decreases While Carditis Persists." <i>The Journal of Infectious Diseases</i> 179 (3): 734-37.	ボレリア・ブルグドルフェリ感染症マウス（ライム病マウスモデル）に rhIL11（0.1~2 μ g/匹/日、週 5 日を 3 週間）を投与すると、心炎は軽減されないものの、関節炎が軽減される。
	Walmsley et al. 1998. "An Anti-Inflammatory Role for Interleukin-11 in Established Murine Collagen-Induced Arthritis." <i>Immunology</i> 95 (1): 31-37.	コラーゲン誘発性関節炎マウスモデルに rhIL11（0.3~100 μ g/匹/日、腹腔内投与、10 日間）を毎日投与すると、炎症が軽減される。
腎臓	Lee et al. 2012. "Interleukin-11 Protects against Renal Ischemia and Reperfusion Injury." <i>American Journal of Physiology. Renal Physiology</i> 303 (8): F1216-24.	マウスにおいて、rhIL11 または PEG 化 rhIL11（100~1000 μ g/kg、腹腔内投与）で前処置（腎虚血の 10 分前）および後処置（腎虚血の 30~60 分後）を行った際の効果に基づいて、IL11 が腎保護効果を有することが結論付けられている。
	Stangou et al. 2011. "Effect of IL-11 on Glomerular Expression of TGF-Beta and Extracellular Matrix in Nephrotoxic Nephritis in Wistar Kyoto Rats." <i>Journal of Nephrology</i> 24 (1): 106-111.	ラットにおいて腎毒性腎炎の 2 時間前に rhIL11（800~1360 μ g/kg、腹腔内投与）を投与し、その後 1 日 1 回 6 日間にわたり投与を継続すると、ECM の沈着が抑制される。
肺	Sheridan et al 1999. "Interleukin-11 Attenuates Pulmonary Inflammation and Vasomotor Dysfunction in Endotoxin-Induced Lung Injury." <i>The American Journal of Physiology</i> 277 (5): L861-67.	rhIL11（200mg/kg、腹腔内投与）が、LPS 誘発性肺障害および LPS 誘発性致死からラットを保護する抗炎症活性を発揮することが結論付けられている。
	Waxman et al. 1998. "Targeted Lung Expression of Interleukin-11 Enhances Murine Tolerance of 100% Oxygen and Diminishes Hyperoxia-Induced DNA Fragmentation." <i>J. Clin. Invest.</i> 101(9):1970-1982	マウスにおける肺特異的ヒト IL11 の過剰発現の効果から、IL11 が、高酸素誘発性肺障害に対する保護効果を有することが結論付けられている。

10

20

【 0 4 4 3 】

30

40

50

【表 4】

表 3. げっ歯類の疾患モデルに対して使用した際に推測された rhIL11 の保護効果に主に基づいて、rhIL11 が患者に投与された臨床試験に関する文献の一覧	
<i>Herrlinger et al. 2006. "Randomized, Double Blind Controlled Trial of Subcutaneous Recombinant Human Interleukin-11 versus Prednisolone in Active Crohn's Disease." The American Journal of Gastroenterology 101 (4): 793–797.</i>	rhIL11 (1mg、週 1 回を 12 週間、皮下投与) を活動性クローン病の患者 51 人に投与したところ、プレドニゾロンによる処置よりもかなり劣ることが分かった。
<i>Lawitz et al. 2004. "A Pilot Study of Interleukin-11 in Subjects with Chronic Hepatitis C and Advanced Liver Disease Nonresponsive to Antiviral Therapy." The American Journal of Gastroenterology 99 (12): 2359–64.</i>	rhIL11 (5 μg/kg、12 週間にわたり毎日、皮下投与) を慢性 C 型肝炎の患者および後期肝疾患患者の計 20 人に投与した。試験の終了時に血清中 ALT 値の低下が観察された。最もよく見られた副作用は下肢の浮腫であり、これはすべての対象において観察された。
<i>Sands et al. 2002. "Randomized, Controlled Trial of Recombinant Human Interleukin-11 in Patients with Active Crohn's Disease." Alimentary Pharmacology & Therapeutics 16 (3): 399–406.</i>	rhIL11 (15 μg/kg、週 1 回を 6 週間、皮下投与) をクローン病患者 49 人に投与した。rhIL11 を投与した患者の多くが、プラセボと比較して寛解に至った。浮腫などの副作用が観察された。
<i>Moreland et al. 2001. "Results of a Phase-III Randomized, Masked, Placebo-Controlled Trial of Recombinant Human Interleukin-11 (rhIL-11) in the Treatment of Subjects with Active Rheumatoid Arthritis." Arthritis Research 3 (4): 247–252.</i>	関節リウマチ患者に対して最大 15 μg/kg の rhIL11 を週 1 回、12 週間にわたり (皮下) 投与したところ、安全であることが確認されたが、治療上の利点は観察されなかった。さらに、rhIL11 を投与した患者の 60.6%において、注射部位における軽度の有害作用 (硬結を伴う／伴わない紅斑) が認められた。
<i>Trepicchio et al. 1999. "Interleukin-11 Therapy Selectively Downregulates Type I Cytokine Proinflammatory Pathways in Psoriasis Lesions." The Journal of Clinical Investigation 104 (11): 1527–1537.</i>	広範な乾癬を有する患者を、2.5mg/kg または 5mg/kg の rhIL11 (8 週間にわたり毎日、皮下投与) で処置した。12 人の患者のうち、1つのサブセット (n=7) において応答 (炎症マーカーの RNA の発現) が観察されたが、残りの 5 人の患者は、反応性を示さず、改善は観察されなかった。

10

20

【 0 4 4 4 】

本発明者らは、NAPQIにより損傷を受けたミトコンドリアがROSを産生することによって、IL11依存的にNOX4のアップレギュレーションが促進され、これにより、ROSの産生がさらに持続するというAPAPの毒性の緻密な機構を提案している (図29)。この機構によって、JNKおよびカスパーゼの活性化を介した肝細胞の死滅と、肝細胞再生の阻害という2つの病態が誘導されると考えられるが、その詳細はまだ解明されていない。APAP誘発性肝障害 (AILI) のマウスモデルは、ヒト疾患によく似ているため、IL11のシグナル伝達を標的とする治療法は、APAP誘発性肝毒性を有する患者の治療に有用であることが期待される。IL11の中和療法は、APAPの代謝を変化させることに依存しておらず (図12F)、組織の再生を特異的に促進することから、現在の標準治療と比べて、発症からかなり時間が経過した後でも有効であり、緊急処置室への搬送が遅れた患者に対して特に有用である可能性がある。

30

【 0 4 4 5 】

6.11 実施例 6 の材料および方法

40

抗体

切断型カスパーゼ3抗体 (9664、CST)、カスパーゼ3抗体 (9662、CST)、サイクリンD1抗体 (55506、CST)、サイクリンD3抗体 (2936、CST)、サイクリンE1抗体 (20808、CST)、p-ERK1/2抗体 (4370、CST)、ERK1/2抗体 (4695、CST)、GAPDH抗体 (2118、CST)、GFP抗体 (ab6673、Abcam)、IgG抗体 (Aldevron)、p-JNK抗体 (4668、CST)、JNK抗体 (9258、CST)、抗IL11RA中和抗体 (X209、Aldevron; インビボ研究用)、IL11RA抗体 (130920、Santa Cruz; ウエスタンブロット用)、NOX4抗体 (110-58849、Novus Biologicals)、PCNA抗体 (13110、CST)、p-RB抗体 (8516、CST)、RB抗体 (9313、CST)、抗ウサギHRP抗体 (7074、CST)、抗マウスHRP抗体 (7076、CST)、抗ウサギAlexa Fluor 488抗体 (ab150077

50

、Abcam)、抗ウサギAlexa Fluor 647抗体(ab150079、Abcam)、抗マウスAlexa Fluor 488抗体(ab150113、Abcam)、抗ヤギAlexa Fluor 488抗体(ab150129、Abcam)。

【0446】

組換えタンパク質

組換えヒトIL11(rhIL11、UniProtKB:P20809、Genscript)、組換えマウスIL11(rmIL11、UniProtKB:P47873、Genscript)、ヒトIL11RA(10252-H08H、Sino Biological)、マウスIL11RA(50075-M08H、Sino Biological)。

【0447】

化学物質

アセトアミノフェン(APAP、A3035、シグマ)、DAPI(D1306、サーモフィッシャーサイエンティフィック)、D-ルシフェリン(L6882、シグマ)、GKT-137831(17764、Cayman Chemical)、N-アセチル-L-システイン(NAC、A7250、シグマ)。

【0448】

LC-MS/MS用試薬

参照用標準アセトアミノフェン(APAP、P0300000、シグマ)、内部標準(IS)用アセトアミノフェン-d4(APAP-D4、A161222、Toronto Research Chemicals)、内部標準(IS)用アセトアミノフェン-グルタチオン(APAP GLUT、A161223、Toronto Research Chemicals)、アセトニトリル(900667、シグマ)、ギ酸アンモニウム(A115-50、シグマ)、ギ酸(F0507、シグマ)、マウス血清(IGMSCD1SER50ML、i-DNA Biotechnology)。化学物質、試薬および溶媒はいずれもLC-MSグレードの品質であった。

【0449】

動物モデル

動物実験は、SingHealthの動物実験委員会(IACUC)により承認されたものであり、動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。水のみを自由に与えた絶食期間中を除き、すべてのマウスに対して食物および水を自由に与えた。

【0450】

アセトアミノフェン中毒マウスモデル

12~14週齢の雄性マウス(特に明記しない限り、C57BL6/NTACマウス)にアセトアミノフェン(APAP)を投与する前に、一晚絶食させた。次に、重度の過剰摂取に相当する用量(400mg/kg)または致死用量(550mg/kg)のAPAPをマウスに腹腔内(IP)投与した。前述の説明または図面の凡例に示したように、様々な時点および様々な用量で抗IL11RA抗体(X209)またはIgGアイソタイプコントロール抗体をマウスに投与した。前述の説明または図面の凡例に示したように、APAPを投与してから10時間後~8日後の様々な時点でマウスを安楽死させた。

【0451】

IL11-ルシフェラーゼマウス

マウスのIL11遺伝子は5つのエキソンからなり、エキソン1に開始コドンATGを有し、エキソン5に終止コドンTGAを有する。マウスIL11では、3種の転写産物が同定されている(ENSMUSG00000004371)。そのうちの1つであるIL11-201は、最も長い転写産物であり、199アミノ酸長のプロペプチドをコードする。残りのIL11-202およびIL11-203は、選択的エキソン1を含み、シグナルペプチドを持たない140アミノ酸長の短いアイソフォームをコードすると予測されている。CRISPR/Cas9技術を使用して、コザック-ルシフェラーゼ-WPRE-ポリA配列をIL11-201(ENSMUST00000094892.11)のエキソン1に導入することにより、開始コドンATGを置換して、この特定の転写産物の翻訳を阻害した。エキソン1に認識部位を有する単鎖ガイドRNA(sgRNA)を、コザック-ルシフェラーゼ-WPRE-ポリA配列を含む標的構築物およびCas9とともに受精接合子に顕微注入し、偽妊娠マウスに移植した(Shanghai Model Organisms Center, Inc)。IL11遺伝子座へのルシフェラーゼカセットの挿入はシーケンシングにより確認した。C57B

10

20

30

40

50

L/6を遺伝背景とするマウスを用いてII11 - ルシフェラーゼ変異体の子孫を作製し、野生型II11アレルに対応する818bpの領域を増幅するプライマー（5'-GGAGGGAGGGGACGC CAATGACC-3'（配列番号22）および5'-TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG-3'（配列番号23））、ならびにルシフェラーゼ構築物を含む標的アレルに対応する928bpの領域を増幅する第2のプライマーセット（5'-AATTCCGTGGTGTGTCG-3'（配列番号24）および5'-TCTGCCTCCCCTGCCTGTTTCTCG-3'（配列番号25））を使用してジェノタイピングによる同定を実施し、エキソン1へのルシフェラーゼ構築物の挿入を検出した。

【0452】

前述したように、ヘテロ接合型II11 - ルシフェラーゼマウスにおいてAPAP誘発性肝障害を誘導した。24時間後、150mg/kgのD - ルシフェリンのPBS溶液をマウスに腹腔内注射し、製造業者の説明書に従ってIVIS Lumina System（パーキンエルマー）を使用して、肝臓の生物発光画像を撮影した。

10

【0453】

II11-EGFPマウス

Cyagen Biosciences Inc.において、II11遺伝子にEGFPを構成的にノックインしたトランスジェニックマウスを作製した。簡潔に述べると、エキソン5に挿入された2A-EGFPカセットで終止コドン配列TGAが置換されたノックインマウスを作製し、標的転写産物を翻訳することにより、全長IL11プロペプチドとEGFPの間に2A自己切断ペプチドリンカーが挿入された構築物を得た。C57BL/6ライブラリーから得たBACクローンを使用して、イントロン4に挿入されたNeoカセット（自己欠失アンカー部位（SDA）に挟まれている）およびエキソン5に挿入された2A-EGFPカセットを含むII11遺伝子の相同アームを含む標的ベクターをPCRにより作製した。C57BL/6 ES細胞を遺伝子標的に使用して、標的が導入されたクローンをC57BL/6アルビノ胚に注入し、CD-1偽妊娠雌性マウスに再移植した。初代マウスを毛色で同定し、C57BL/6雌性マウスと交配し、その子孫をジェノタイピングにより分析して生殖系列移行を確認した。ジェノタイピング用プライマーは、イントロン4の選択された領域（NeoカセットのSDA部位に挟まれた領域）が増幅されるように設計した。プライマー配列は、5'-GAAATGAGAGCCTAGAGTCCAGAG-3'（配列番号26）および5'-GAGGCTTGGAAGAATGCACAATTA-3'（配列番号27）であった。

20

【0454】

肝細胞特異的II11過剰発現マウス（II11-Tg）

Creリコンビナーゼを用いた除去によりII11が細胞種特異的に過剰発現されるように、過去の報告（15）に従って、loxP-Stop-loxP部位の制御下のRosa26遺伝子座にマウスII11 cDNAを導入した。このマウスは、ジャクソン研究所（C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor⁺m1(CAG-II11)Cook/J）から入手可能である。肝細胞においてII11の特異的発現を誘導するため、AAV8-ALB-Null（コントロール）またはAAV8-ALB-Cre（II11-Tg）のPBS溶液を、マウス1匹あたり 4×10^{11} ゲノムコピーでヘテロ接合型II11-Rosa26マウスに静脈内（IV）注射した（VectorBiolabs）。3週間後に肝臓および血清を評価した。

30

【0455】

肝細胞特異的II11ra1欠失マウス

II11ra1遺伝子のエキソン4～7がloxP部位に挟まれたII11ra1-floxedマウスが最近になって作製され、その検証が行われたことから、Creリコンビナーゼを用いた除去によりII11ra1を空間的かつ一時的に欠失させることが可能となった（Ng et al., Sci Transl Med. (2019) 11(511) pii: eaaw1237）。肝細胞特異的にII11ra1を欠失させるため、ホモ接合型II11ra1-floxedマウスに、AAV8-ALB-Creウイルス（マウス1匹あたりPBS中 4×10^{11} ゲノムコピー、VectorBiolabs）を尾静脈から静脈内注射した。コントロールとして、同等の量のAAV8-ALB-Nullウイルスをホモ接合型II11ra1-floxedマウスに注射した。APAP誘発性肝障害の発症の3週間前に、AAV8でマウスを処置することによって肝障害が回復した。ノックダウン効率は、肝臓内のIL11RAのウエスタンブロットによって測定した。

40

【0456】

50

細胞培養

ヒト初代肝細胞およびマウス初代肝細胞をそれぞれ37℃、5%CO₂で増殖させ、維持した。増殖培地を2~3日ごとに交換し、標準的なトリプシン処理技術を用いて80%コンフルエントで細胞を継代した。すべての実験は、継代数の少ない細胞(P1~P3)を用いて行った。刺激した細胞は、刺激を与えなかったこと以外は同じ条件下で同じ時間にわたり増殖させた非刺激細胞と比較した。

【0457】

ヒト初代肝細胞

ヒト肝細胞(5200、ScienCell)は、2%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した肝細胞培地(520、ScienCell)中で維持した。細胞を16時間血清飢餓状態にした後、前述した刺激または図面の凡例に示した刺激を無血清肝細胞培地中で24時間にわたりそれぞれ実施した。

【0458】

マウス初代肝細胞

マウス肝細胞(ABC-TC3928、AcceGen Biotech)は、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したマウス肝細胞培地(ABC-TM3928、AcceGen Biotech)中で維持した。前述の説明または図面の凡例に示したように、様々な処理条件で細胞を24時間刺激した。

【0459】

siRNAのトランスフェクション

トランスフェクションの16時間前に、ヒト初代肝細胞を6ウェルプレートに播種し、60~70%コンフルエントまで培養した。Lipofectamine RNAiMAXトランスフェクション試薬(13778150、サーモフィッシャー)を含むOptiMEM培地(31985070、サーモフィッシャー)中で37℃で24時間培養することにより、50nMのNOX4 siRNA(ON-TARGETplus SMARTpool siRNA、L-010194-00-0005、Dharmacon)またはコントロールsiRNA(D-001810-10-05、Dharmacon)を細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をrhIL11で24時間刺激した。ノックダウン効率は、NOX4のイムノブロットにより測定した。

【0460】

フローサイトメトリー

FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit(V13242、サーモフィッシャー)を製造業者の説明書に従って使用して、ヒト初代肝細胞(5×10^5 個)を染色した。陽性細胞をフローサイトメーター(Fortessa、BDバイオサイエンス)で定量し、FlowJoバージョン7ソフトウェア(TreeStar)で分析した。

【0461】

比色アッセイ

ALT活性アッセイキット(ab105134、Abcam)またはAST活性アッセイキット(ab105135、Abcam)を使用して、マウス血清中または肝細胞の培養上清中のアラニン转ランスアミナーゼ(ALT)濃度またはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)濃度を測定した。肝臓中のグルタチオンスルフィドリル(GSH)の測定は、グルタチオン比色定量検出キット(EIAGSHC、サーモフィッシャー)を使用して行った。比色アッセイはいずれも製造業者のプロトコルに従って行った。

【0462】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

製造業者のプロトコルに従ってマウスIL-11 DuoSet(DY418およびDY008、R&Dシステムズ)を使用してマウス血清中のIL-11濃度を定量し、製造業者のプロトコルに従ってヒトIL-11 Quantikine ELISAキット(D1100、R&Dシステムズ)を使用して肝細胞の培養上清中のIL-11濃度を定量した。

【0463】

競合ELISA

10

20

30

40

50

96ウェルプレートにマウスIL11RA (1 µg/mlのPBS溶液)を(4 で一晚)コーティングし、ブロッキング緩衝液(0.05% Tween20を含む1% BSAのPBS溶液)でブロッキングした。Lightning-Link Rapid Biotin type A kit (Expedeon)を製造業者の説明書に従って使用して、ビオチン化マウスIL11を調製した。rhIL11またはrmIL11をブロッキング緩衝液で2倍段階希釈(5 µg/mlから開始)し、0.01 µg/mlのビオチン化マウスIL11と混合した。コーティングした前記プレートに、ビオチン化マウスIL11とrhIL11またはrmIL11の混合物を添加し、室温で1時間インキュベートした。ストレプトアビジン - HRP (ブロッキング緩衝液で1:1000希釈)とTMB色原体溶液(002023、サーモフィッシャーサイエンティフィック)を添加して発色させた。

【0464】

イムノプロット法

肝細胞の溶解物または肝組織の溶解物を使用してウエスタンプロットを行った。プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤(サーモフィッシャー)を含む放射免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液中で肝細胞または肝組織をホモジナイズし、遠心分離して溶解物を清澄化した。ブラッドフォードアッセイ(バイオ・ラッド)によりタンパク質濃度を測定した。等量の各タンパク質溶解物をSDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写し、図に示した一次抗体を加えてイムノプロット分析を行った。ECL検出システム(Pierce)を使用して、適切な二次抗体でタンパク質を可視化した。

【0465】

定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)

急速凍結した肝組織または肝細胞溶解物をTrizol(インビトロジェン)で処理し、RNeasyカラム(キアゲン)で精製して全RNAを抽出した。製造業者の説明書に従ってiScript™ cDNA合成キット(バイオ・ラッド)を用いてcDNAを合成した。StepOnePlus™(アプライドバイオシステムズ)を使用したTaqMan法(アプライドバイオシステムズ)またはfast SYBR Green法(キアゲン)によって、二連の試料に対して遺伝子発現解析を40サイクルで実施した。発現データはGAPDH mRNAの発現に対して正規化し、 2^{-Ct} 法を用いてfold changeを算出した。特異的なTaqManプローブおよびSYBR Greenプライマーの配列は、所望により入手可能である。

【0466】

表面プラズモン共鳴(SPR)

表面プラズモン共鳴(SPR)測定は、BIAcore T200(GEヘルスケア)を用いて25で行った。緩衝液を使用前に脱気し、0.2 µmのフィルターに通してフィルター滅菌した。標準的なアミンカップリング化学反応を使用して、rhIL11またはrmIL11をカルボキシメチル化デキストラン(CM5)センサーチップに固定化した。動態分析を行うため、rhIL11固定化表面、rmIL11固定化表面または基準物質固定化表面に対して、ヒトIL11RAまたはマウスIL11raの濃度系列(3.125 nM ~ 100 nM)を40 µl/分の流速で注入した。分析物はいずれも、1 mg/mlのBSAを含むHBS-EP+緩衝液(BR100669、GEヘルスケア)に溶解した。会合を150秒間測定し、解離を200秒間測定した。各分析物の注入後、pH2.5のグリシンを30秒間注入して、5分間安定化させることによって表面を再生した。すべてのセンサーグラムをアライメントし、ダブルリファレンスを取った。親和定数および速度定数は、BIAevaluation v3.0ソフトウェア(GEヘルスケア)を使用して、補正したセンサーグラムをラングミュア型の1:1結合モデルにフィッティングさせることによって決定した。平衡結合定数(KD)は、結合速度定数の比率(kd/ka)から決定した。

【0467】

組織学的試験

ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色

肝臓を10%中性緩衝ホルマリン(NBF)で室温(RT)にて48時間固定し、脱水し、パラフィンブロックに包埋し、7 µmに薄切した。標準的なプロトコルに従ってH&E染色で切片を染色し、光学顕微鏡で観察した。

【0468】

10

20

30

40

50

EdU染色

肝臓を冷PBSですすぎ、糸くずの出ない紙で軽く叩いて乾燥させ、OCTコンパウンド（4583、Tissue-Tek（登録商標））中で凍結包埋した。OCTコンパウンドの凍結後、肝臓標本をアルミニウム箔で包み、-80℃で保存した。凍結包埋した肝臓から厚さ7μmの凍結切片を作製し（-20℃）、スライド上で1時間乾燥させた後、製造業者のプロトコルに従ってBaseclick社のEdU IV Imaging Kit 488L（BCK488-IV-IM-L）を使用してEdUを検出した。

【0469】

免疫蛍光染色

前述（「EdU染色」の節）と同様に肝臓を処理し、凍結した。凍結肝組織を-20℃で7μmに薄切りし、1時間（RT）乾燥させた。肝臓切片を冷アセトンで15分間固定した後、PBSで短時間洗浄し、0.1% Triton X-100（T8787、シグマ）で透徹し、2.5%正常ヤギ血清（S-1012、Vector Labs）で1時間（RT）ブロッキングした。GFP一次抗体（1:500）またはカスパーゼ3一次抗体（1:1000）とともに肝臓切片を一晩（4℃）インキュベートし、適切なAlexa Fluor 488/647二次抗体（1:250）とともに1時間（RT）インキュベートした。DAPIを使用して核染色し、蛍光顕微鏡（ライカ）で画像化した。

【0470】

LC-MS/MS

マウス血清試料（20μL）、標準物質およびQC試料を96ディープウェルプレートに移し、10μg/LのAPAP-D4重同位体標準物質50μLを添加（スパイク）した。0.1%ギ酸を含む氷冷アセトニトリル360μLで処理したプレートを混合し（1000rpm/分、10分間）、遠心分離（2270×g、50分間、4℃）した。96マイクロウェルプレートに上清140μLを慎重に移し、オートサンプラーに設置して、LC-MS/MSで分析した。次に、標準曲線による定量を行う前に、APAP-D4重同位体標準物質に対してイオンカウントを補正した。40℃に維持したPEEK被覆SeQuant（登録商標）ZIC（登録商標）-cHILIC HPLCカラム（3mm、100μm、100×2.1mm）（Merck Pte Ltd）を装着したAgilent 1290 Infinity II LCシステム（アジレント・テクノロジー）を用いた液体クロマトグラフィー（LC）より、前記バイオマーカーを分離した。有機溶媒として、0.1%ギ酸を含むアセトニトリル（溶媒A）を使用し、水性溶媒として、20mMギ酸アンモニウム（pH4.0）（溶媒B）を使用した。液体クロマトグラフィー（LC）の線形勾配は、バイナリポンプA（G7120A、アジレント・テクノロジー）を用いて、溶媒Bの割合を、0.4ml/分の流速において、0分で10%、9分で70%、11分で70%および11.1~11.5分で10%に設定した。その後、10%の溶媒Bでカラムを11.5分間平衡化した。Quick-Changeバルブヘッド（2ポジション/10ポート、1,300パール）（5067-4240、アジレント）を取り付けて、追加の高速ポンプとしてバイナリポンプBを使用することにより、交互にカラムを自動再生してサイクル時間を短縮した。バイナリポンプBにおける溶媒Bの割合は、0.3ml/分の流速で10%に維持した。エレクトロスプレーのイオン源を用いてポジティブイオン化モードまたはネガティブイオン化モードで動作するAgilent 6495 Triple Quadrupole MSシステム（G6495A、アジレント・テクノロジー）にLC溶離液を導入して、質量を検出した。エレクトロスプレーイオン化のイオン源の条件は、キャピラリー電圧：4.0kV、ノズル電圧：500V、iFunnelパラメータ：高圧RF/低圧RF：90V、ネブライザー圧力：60psi、ガス温度：290℃、シースガス温度：350℃、ネブライザー：35psi、およびシースガス流速：12L/分とした。APAPに使用した多重反応モニタリング（MRM）条件は、衝突エネルギー（CE）16eVおよび衝突加速電圧（CAV）5Vにおいて152.1→110であり、APAP-D4に使用した多重反応モニタリング（MRM）条件は、衝突エネルギー（CE）8eVおよび衝突加速電圧（CAV）5Vにおいて156→114であった。APAP-グルタチオンに使用した多重反応モニタリング（MRM）条件は、衝突エネルギー（CE）42eVおよび衝突加速電圧（CAV）5Vにおいて457.1→140であった。

【0471】

キャリブレーションおよび線形性

10

20

30

40

50

薬物を投与していないマウスの血清にAPAPの希釈標準溶液またはAPAP - グルタチオンの希釈標準溶液を加えて9点の検量線をそれぞれ得た。APAPの最終濃度は、0.32mg/l、0.46mg/l、2.6mg/l、5.2mg/l、10.3mg/l、20.6mg/l、41.3mg/l、82.5mg/lおよび330mg/lとした（低濃度のQC試料：1.29mg/l；高濃度のQC試料：165mg/l）。APAP - グルタチオンの最終濃度は、0.244mg/l、0.49mg/l、0.98mg/l、1.95mg/l、3.91mg/l、7.81mg/l、15.6mg/l、62.5mg/l、125mg/lおよび250mg/lとした（低濃度のQC試料：1.95mg/l；高濃度のQC試料：31.3mg/l）。内部標準（IS）に対する各分析物のピーク面積比に対応する標準曲線は、APAPでは、重み付け $1/x^2$ の線形最小二乗回帰を使用し、APAP - グルタチオンでは、重み付け $1/x$ の線形最小二乗回帰を使用し、線形回帰の決定係数（ r^2 ）は、APAPでは $r^2 = 0.97807145$ であり、APAP - グルタチオンでは $r^2 = 0.99655914$ であった。マウス血清試料を使用したアッセイの精度および正確度は、過去に報告されている方法で測定した（32）。

【0472】

統計分析

統計分析は、GraphPad Prismソフトウェア（バージョン6.07）を使用して行った。Dunnnettの方法（1つの条件に対していくつかの実験群を比較する場合）、Tukeyの方法（1つの実験内でいくつかの条件を比較する場合）、またはSidakの方法（2つの異なる遺伝子型においていくつかの条件を比較する場合）を使用した多重検定を行ってP値を補正した。2つの異なる群を比較する際の2つのパラメータの分析は、二元配置分散分析により行った。生存曲線は、Gehan-Breslow-Wilcoxonの検定により分析した。統計学的有意差の基準はP = 0.05とした。

【0473】

6.12 実施例6の参考文献

1. W. Bernal, J. Wendon, Acute liver failure. *N. Engl. J. Med.* 370 (2014), pp. 1170-1171.
2. W. M. Lee, L. S. Hyman, L. Rossaro, R. J. Fontana, R. T. Stravitz, A. M. Larson, T. J. Davern 2nd, N. G. Murray, T. McCashland, J. S. Reisch, P. R. Robuck, Acute Liver Failure Study Group, Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Gastroenterology.* 137, 856-64, 864.e1 (2009).
3. H. Jaeschke, Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Dig. Dis.* 33, 464-471 (2015).
4. A. L. Chiew, C. Gluud, J. Brok, N. A. Buckley, Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD003328 (2018).
5. S. Win, T. A. Than, J. Zhang, C. Oo, R. W. M. Min, N. Kaplowitz, New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology.* 67, 2013-2024 (2018).
6. H. Zhang, J. Cook, J. Nickel, R. Yu, K. Stecker, K. Myers, N. M. Dean, Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Biotechnol.* 18, 862-867 (2000).
7. R. F. Schwabe, T. Luedde, Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 738-752 (2018).
8. B. K. Gunawan, Z. Liu, D. Han, N. Hanawa, W. A. Gaarde, N. Kaplowitz, c-Jun N-Terminal Kinase Plays a Major Role in Murine Acetaminophen Hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 131 (2006), pp. 165-178.
9. Y. Xie, A. Ramachandran, D. G. Breckenridge, J. T. Liles, M. Lebofsky, A. Farhood, H. Jaeschke, Inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase 1 protects against acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 286, 1-9 (2015).
10. S. Sekiya, A. Suzuki, Glycogen synthase kinase 3 -dependent Snail degr

10

20

30

40

50

- adation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11175-11180 (2011).
11. A. Marcos, R. A. Fisher, J. M. Ham, M. L. Shiffman, A. J. Sanyal, V. A. Luketic, R. K. Sterling, A. S. Fulcher, M. P. Posner, Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation.* 69, 1375-1379 (2000).
 12. B. Bhushan, U. Apte, Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Am. J. Pathol.* 189, 719-729 (2019).
 13. G. K. Michalopoulos, Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology.* 65, 1384-1392 (2017). 10
 14. A. A. Widjaja, B. K. Singh, E. Adami, S. Viswanathan, J. Dong, G. A. D'Agostino, B. Ng, W. W. Lim, J. Tan, B. S. Paleja, M. Tripathi, S. Y. Lim, S. G. Shekaran, S. P. Chothani, A. Rabes, M. Sombetzki, E. Bruinstroop, L. P. Min, R. A. Sinha, S. Albani, P. M. Yen, S. Schafer, S. A. Cook, Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* (2019), doi:10.1053/j.gastro.2019.05.002.
 15. S. Schafer, S. Viswanathan, A. A. Widjaja, W.-W. Lim, A. Moreno-Moral, D. M. DeLaughter, B. Ng, G. Patone, K. Chow, E. Khin, J. Tan, S. P. Chothani, L. Ye, O. J. L. Rackham, N. S. J. Ko, N. E. Sahib, C. J. Pua, N. T. G. Zhen, C. Xie, M. Wang, H. Maatz, S. Lim, K. Saar, S. Blachut, E. Petretto, S. Schmidt, T. Putoczki, N. Guimaraes-Camboa, H. Wakimoto, S. van Heesch, K. Sigmundsson, S. L. Lim, J. L. Soon, V. T. T. Chao, Y. L. Chua, T. E. Tan, S. M. Evans, Y. J. Loh, M. H. Jamal, K. K. Ong, K. C. Chua, B.-H. Ong, M. J. Chakaramakkil, J. G. Seidman, C. E. Seidman, N. Hubner, K. Y. K. Sin, S. A. Cook, IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature.* 552, 110-115 (2017). 20
 16. S. Cook, B. Ng, J. Dong, S. Viswanathan, G. D'Agostino, A. Widjaja, W.-W. Lim, N. Ko, J. Tan, S. Chothani, B. Huang, C. Xie, A.-M. Chacko, N. Guimaraes-Camboa, S. Evans, A. Byrne, T. Maher, J. Liang, P. Noble, S. Schafer, IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis (2018), , doi:10.1101/336537. 30
 17. T. Nishina, S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D.-M. Zheng, J.-H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura, H. Nakano, Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci. Signal.* 5, ra5 (2012).
 18. M. Zhu, B. Lu, Q. Cao, Z. Wu, Z. Xu, W. Li, X. Yao, F. Liu, IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice. *PLoS One.* 10, e0126296 (2015).
 19. M. Bozza, J. L. Bliss, R. Maylor, J. Erickson, L. Donnelly, P. Bouchard, A. J. Dorner, W. L. Trepicchio, Interleukin-11 reduces T-cell-dependent experimental liver injury in mice. *Hepatology.* 30, 1441-1447 (1999). 40
 20. W. L. Trepicchio, M. Bozza, P. Bouchard, A. J. Dorner, Protective effect of rhIL-11 in a murine model of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 29, 242-249 (2001).
 21. J. Yu, Z. Feng, L. Tan, L. Pu, L. Kong, Interleukin-11 protects mouse liver from warm ischemia/reperfusion (WI/Rp) injury. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 40, 562-570 (2016).
 22. K. Maeshima, T. Takahashi, K. Nakahira, H. Shimizu, H. Fujii, H. Katayama, M. Yokoyama, K. Morita, R. Akagi, S. Sassa, A protective role of interleukin 50

- 11 on hepatic injury in acute endotoxemia. *Shock*. 21, 134-138 (2004).
23. H. Muhl, STAT3, a key parameter of cytokine-driven tissue protection during sterile inflammation - the case of experimental acetaminophen (Paracetamol)-induced liver damage. *Front. Immunol.* 7, 163 (2016).
24. K. Schleinkofer, A. Dingley, I. Tacke, M. Federwisch, G. Muller-Newen, P. C. Heinrich, P. Vusio, Y. Jacques, A. Grotzinger, Identification of the Domain in the Human Interleukin-11 Receptor that Mediates Ligand Binding. <http://www.idealibrary.com>からオンラインで入手可能。 *J. Mol. Biol.* 306, 263-274 (2001).
25. C. P. Denton, V. H. Ong, S. Xu, H. Chen-Harris, Z. Modrusan, R. Lafyatis, D. Khanna, A. Jahreis, J. Siegel, T. Sornasse, Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the fasScinate clinical trial in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 1362-1371 (2018). 10
26. A. Bettaieb, J. X. Jiang, Y. Sasaki, T.-I. Chao, Z. Kiss, X. Chen, J. Tian, M. Katsuyama, C. Yabe-Nishimura, Y. Xi, C. Szyndralewicz, K. Schroder, A. Shah, R. P. Brandes, F. G. Haj, N. J. Torok, Hepatocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 4 Regulates Stress Signaling, Fibrosis, and Insulin Sensitivity During Development of Steatohepatitis in Mice. *Gastroenterology*. 149, 468-80.e10 (2015).
27. M. Walmsley, D. M. Butler, L. Marinova-Mutafchieva, M. Feldmann, An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis. *Immunology*. 95, 31-37 (1998). 20
28. B. S. Qiu, C. J. Pfeiffer, J. C. Keith, Protection by recombinant human interleukin-11 against experimental TNB-induced colitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 41 (1996), pp. 1625-1630.
29. T. V. A. Murray, X. Dong, G. J. Sawyer, A. Caldwell, J. Halket, R. Sherwood, A. Quaglia, T. Dew, N. Anilkumar, S. Burr, R. K. Mistry, D. Martin, K. Schroder, R. P. Brandes, R. D. Hughes, A. M. Shah, A. C. Brewer, NADPH oxidase 4 regulates homocysteine metabolism and protects against acetaminophen-induced liver damage in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 918-930 (2015). 30
30. L. Hecker, R. Vittal, T. Jones, R. Jagirdar, T. R. Luckhardt, J. C. Horowitz, S. Pennathur, F. J. Martinez, V. J. Thannickal, NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat. Med.* 15, 1077-1081 (2009).
31. P. J. Wermuth, F. A. Mendoza, S. A. Jimenez, Abrogation of transforming growth factor- β -induced tissue fibrosis in mice with a global genetic deletion of Nox4. *Lab. Invest.* 99, 470-482 (2019).
32. T. Gicquel, J. Aubert, S. Lepage, B. Fromenty, I. Morel, Quantitative Analysis of Acetaminophen and its Primary Metabolites in Small Plasma Volumes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 37 (2013), pp. 110-116. 40

【 0 4 7 4 】

実施例 7 : ヒト初代肝細胞におけるIL-11受容体およびIL-6受容体の発現とそれらのシグナル伝達

7.1 序論

IL11は、インターロイキン6 (IL6) サイトカインファミリーのメンバーであり、IL6と同様に、細胞膜に結合した受容体 (IL11RA) と糖タンパク質130 (gp130) に結合してシグナル伝達を行う。IL6は、肝機能に関連することが報告されており、複数の文献において概して有益な効果が示唆されている (Kleinら、2005 ; Kroyら、2010 ; Matthewsら、2010 ; Schmidt-ArrasおよびRose-John、2016 ; Wuestefeldら、2003) 50

。しかし、IL6は、可溶性のIL6受容体 (sIL6R) とともに結合して、トランスシグナル伝達を行うことがあると考えられており、このことから、適切な調節ができないと考えられている (Schmidt-ArrasおよびRose-John, 2016)。IL6と同様に、IL11でも、病原性のトランスシグナル伝達が起こる可能性があるが、これまでの実験結果では、腫瘍または生殖組織においてこのようなトランスシグナル伝達が見られたという証拠は報告されていない (Agtheら, 2017; Balicら, 2017)。

【0475】

7.2 結果

まず、ヒト初代肝細胞におけるIL6R、IL11RAおよびgp130の発現量をフローサイトメトリーで評価した。ヒト初代肝細胞の大部分において、IL11RAの堅牢な発現 (92.6%) とgp130の堅牢な発現 (91.9%) が観察されたが、IL6Rを発現していた肝細胞はごくわずかしき認められず (3.0%)、その発現量も低かった (図31Aおよび図32A)。この結果と一致して、RNA-seq分析およびRibo-seq分析から、肝細胞においてIL11RA転写産物およびgp130転写産物が高発現されており、活発に翻訳されていることが見出された。これとは対照的に、IL6R転写産物はほとんど観察されず、IL6Rの翻訳もほとんど検出されなかった (図31B~図31D、図32Bおよび図32C)。肝細胞を免疫蛍光染色したところ、Ribo-seqデータを裏付けるように、IL11RAの高発現が認められたが、IL6Rの発現は検出されなかった (図32D)。培養培地中でも有意な量のIL6Rは検出されなかった (検出限界をわずかに上回る量のIL6Rしか検出されなかった)。この結果から、IL6Rのシェディングの可能性は除外された (図32E)。以上のデータから、ヒト初代肝細胞ではIL6Rの発現量が非常に低いことが示され、このことから、ヒト初代肝細胞におけるIL6のシグナル伝達の役割は限定的であることが示唆された。一方で、ヒト初代肝細胞は、IL11RAおよびgp130の強い共発現を示す。

【0476】

ヒト肝細胞ではIL6Rの発現が見られないことを踏まえ、トランスシグナル伝達を行うIL6の合成構築物 (hyper IL6) を使用することにより、ヒト肝細胞におけるIL6のシグナル伝達を活性化させ、トランスシグナル伝達を行うIL11合成複合体 (hyper IL11) によるシグナル伝達と比較した。hyper IL11は、IL11と同様に (実施例6参照)、ERKおよびJNKを用量依存的に活性化した (2.5ng/ml~20ng/ml)。これに対して、IL6のトランスシグナル伝達は、非古典的シグナル伝達経路を活性化しなかったが、用量依存的にSTAT3の活性化を誘導した (図31E)。したがって、IL11またはIL6を認識する受容体とあらかじめ複合体化させたIL11またはIL6は、肝細胞上のgp130と結合することにより、それぞれ異なる細胞内経路を活性化することが分かった。これは新規かつ興味深い知見であった。

【0477】

hyper IL11は、ヒト初代肝細胞の培養培地中においてアラニントランスアミナーゼ (ALT) を用量依存的に増加させたが、hyper IL6 (20ng/ml) は、限定的ではあるものの、有意な細胞保護効果を有することが見出された (fold change (FC) = 0.9; P = 0.0468) (図31F)。可溶性gp130 (sgp130) は、gp130を介して作用するトランスシグナル伝達複合体の阻害剤である (Schmidt-ArrasおよびRose-John, 2016)。過去に報告されているこのようなデコイ効果と一致して、sgp130は、hyper IL11の下流のシグナル伝達経路 (p-ERK/p-JNK) およびhyper IL6の下流のシグナル伝達経路 (p-STAT3) の活性化を遮断するとともに、hyper IL11の肝毒性効果を抑制した (図31G~図31I)。

【0478】

次に、人工タンパク質複合体であるhyper IL6またはhyper IL11の非存在下において、IL11のトランスシグナル伝達を検出するために実験を行った。可溶性gp130 (sgp130; トランスシグナル伝達と推定されるシグナル伝達を抑制する目的で使用) または可溶性IL11RA (sIL11RA; トランスシグナル伝達と推定されるシグナル伝達を増強する目的で使用) の存在下において、細胞をIL11で刺激した。IL11で誘導された肝細胞死およびシグナル伝達は、sgp130やsIL11RAによる影響を受けなかった (図31J~図31Kおよび図32F)。さらに、IL11は、用量依存的に (0.625ng/ml~20ng/ml) 肝細胞死を引き起

10

20

30

40

50

こしたが、これは、sgp130 (1 µg/ml) またはsIL11RA (1 µg/ml) の添加による影響を受けなかった (図32G)。逆に、sgp130またはsIL11RAの用量を増加させても、IL11で刺激した肝細胞からのALTの放出には影響は見られなかった (図32H)。これらのデータから、合成構築物が存在しない場合、IL11のトランスシグナル伝達は存在しないことが示唆された。

【0479】

7.3 実施例7の材料および方法

抗体

アルブミン抗体 (ab207327、Abcam)、Alexa Fluor 488二次抗体 (ab150077、Abcam)、p-ERK1/2抗体 (4370、CST)、ERK1/2抗体 (4695、CST)、gp130抗体 (PA5-28932、サーモフィッシャー)、IL6抗体 (AF506、R&Dシステムズ)、IL6R抗体 (フローサイトメトリー用、ab222101、Abcam)、IL6R抗体 (免疫蛍光染色用、MA1-80456、サーモフィッシャー)、IL11抗体 (Aldevron)、IL11RA抗体 (フローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色用、ab125015、Abcam)、IL11RA抗体 (ウエスタンブロット用、130920、Santa Cruz)、p-JNK抗体 (4668、CST)、JNK抗体 (9258、CST)、p-STAT3抗体 (4113、CST)、STAT3抗体 (4904、CST)、マウスHRP抗体 (7076、CST)、ウサギHRP抗体 (7074、CST)。

【0480】

組換えタンパク質

市販の組換えタンパク質：ヒトhyper IL6 (IL6R:IL6融合タンパク質、8954-SR、R&Dシステムズ)、ヒト可溶性gp130 Fc (671-GP-100、R&Dシステムズ)、ヒトIL11RA (8895-MR-050、R&Dシステムズ)。

カスタム組換えタンパク質：ヒトIL11 (UniProtKB: P 20809、Genscript)。トランスシグナル伝達複合体を模倣するヒトhyper IL11 (IL11RA:IL11融合タンパク質) は、IL11RAの断片 (1~317番目のアミノ酸残基; UniProtKB: Q14626) およびIL11 (22~199番目のアミノ酸残基; UniProtKB: P20809) を、20アミノ酸長のリンカー (配列番号20; Schaferら、2017) とともに使用して構築した。

【0481】

化学物質

パラホルムアルデヒド (PFA、28908; サーモフィッシャー)、ホルボール12-ミリスレート13-アセテート (PMA、P1585、シグマ)、Triton X-100 (T8787、シグマ)、および4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (D1306; サーモフィッシャー)。

【0482】

ヒト初代肝細胞の培養

ヒト初代肝細胞 (5200、ScienCell) は、2%ウシ胎児血清および1%ペニシリン - ストレプトマイシンを添加した肝細胞培地 (520、ScienCell) 中で37 °C、5%CO₂で維持した。本発明の方法において特に明記しない限り、肝細胞 (P2~P3) を血清飢餓状態で一晚培養した後、本明細書および/または図面の凡例に概説したように、様々な用量の様々な組換えタンパク質で24時間刺激した。

【0483】

THP-1細胞の培養

10%FBSおよび0.05mM β-メルカプトエタノールを添加したRPMI 1640 (A1049101、サーモフィッシャー) 中でTHP-1細胞 (ATCC) を培養した。次に、RPMI 1640において10ng/ml PMAで48時間刺激することにより、THP-1細胞の分化を誘導した。

【0484】

フローサイトメトリー

細胞表面のIL11RA、IL6Rおよびgp130を分析するため、IL11RA抗体、IL6R抗体またはgp130抗体と、これらに対応するAlexa Fluor 488二次抗体で、ヒト初代肝細胞およびTHP-1細胞を染色した。また、アネキシンV-FITCとPIを使用したDead Cell Apoptosis Kit (V13242、サーモフィッシャー) でヒト初代肝細胞を染色して、細胞の死滅を分析し

10

20

30

40

50

た。次に、陽性細胞をフローサイトメーター（Fortessa、BDバイオサイエンス）で定量し、FlowJoバージョンXソフトウェア（TreeStar）で分析した。

【0485】

免疫蛍光法

染色の24時間前に、ヒト初代肝細胞を8ウェルのチャンバースライドに播種した（ 1.5×10^4 個/ウェル）。細胞を4%PFAで20分間固定し、PBSで洗浄し、非特異的部位を5%BSAのPBS溶液で2時間ブロッキングした。IL11RA抗体、IL6R抗体、gp130抗体またはアルブミン抗体とともに細胞を一晩（4）インキュベートし、適切なAlexa Fluor 488二次抗体とともに細胞を1時間インキュベートした。チャンバースライドを暗所で乾燥させ、DAPIを含む封入剤5滴をスライドに載せ、15分間経過後に蛍光顕微鏡（ライカ）による画像化を行った。

10

【0486】

RNAシーケンシング（RNA-seq）およびリボソームプロファイリング（Ribo-seq）

RNA-seqライブラリーおよびRibo-Seqライブラリーの調製は、過去の報告（Chothaniら、2019）に従って行った。

【0487】

RNA-seqライブラリーの作製

RNeasyカラム（キアゲン）を使用して、ヒト肝細胞から全RNAを抽出した。Qubit RNA High-Sensitivity Assayキット（Life Technologies）を使用してRNAを定量した。次に、LabChip GX RNA Assay Reagent Kit（パーキンエルマー）を使用して求めたRIN値（RNA integrity number）に基づき、RNAの品質を評価した。製造業者の標準的な説明書に従ってTruSeq Stranded mRNAライブラリー調製キット（イルミナ）を使用して、転写産物量を測定した。

20

【0488】

Ribo-seqライブラリーの作製

10cmの培養ディッシュで肝細胞を90%コンフルエントまで増殖させ、0.1mg/mLのシクロヘキシミドを添加した1mLの氷冷溶解緩衝液（TruSeq（登録商標）Ribo Profile Mammalian Kit（RPHMR12126、イルミナ社）の処方など）に溶解した。次に、溶解物をホモジナイズおよび清澄化し、製造業者の説明書に従ってTruseq Nuclease（イルミナ）を用いてフットプリント法を行った。イルミナ社のSephacryl S400カラム（GEヘルスケア）を使用してリボソームを精製し、標準的なフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール法を使用して、保護されたRNA断片を抽出した。リボソームRNAを除去した後（Mammalian RiboZero Magnetic Gold、イルミナ）、製造業者のプロトコルに従ってTruSeq（登録商標）Ribo Profile Mammalian Kitを使用して、フットプリント法により抽出されたRNAからシーケンシングライブラリーを調製した。最終的に得られたRNA-seqライブラリーおよびリボソームプロファイリングライブラリーは、製造業者のプロトコルに従って、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム（アプライドバイオシステムズ）においてKAPAライブラリー定量キット（KAPA Biosystems）を使用することにより定量した。

30

【0489】

LabChip GX DNA High Sensitivity Reagent Kit（パーキンエルマー）を使用して、最終ライブラリーの品質および平均断片サイズを測定した。固有のインデックスを有するライブラリーをプールし、NextSeq 500 High Output v2 kitおよび75bpのペアエンドシーケンスケミストリーを使用して、NextSeq 500ベンチトップシーケンサー（イルミナ）でシーケンシングを行った。

40

【0490】

RNAシーケンシングおよびリボソームプロファイリングのデータ処理および分析

生のシーケンシングデータをbc12fastq V2.19.0.316でデマルチプレックスし、Trimomatic（Bolgerら、2014）V0.36を用いてアダプターをトリミングして、トリミング後に20ntを超えたリードを保持した。Bowtie（Langmeadら、2009）を用いて、既知

50

のmtRNA配列、rRNA配列およびtRNA配列 (RNACentral (The RNACentral Consortium、2017)、リリース5.0) に対してRibo-seqリードをアラインメントし、アラインメントされなかったリードのみを、リボソームで保護された断片 (RPF) として保持した。さらに、STAR (Dobinら、2012) を用いて、ヒトゲノム (hg38) に対するアラインメントを行った。featureCounts (Liaoら、2014) を用いて、Ribo-seqのCDS (コード配列) 領域およびRNA-seqのエキソン領域にユニークにマッピングされたリード (Ensemblデータベース、リリースGRCh38 v86) の遺伝子発現を定量した。TPMを算出し、箱ひげ図に可視化することで、IL11RA (ENSG00000137070)、IL6R (ENSG00000160712) およびgp130 (ENSG00000134352) のベースラインにおける発現を比較した。IL11RA、IL6Rおよびgp130のRibo-seqリードおよびRNA-seqリードによるリードカバレッジを、鎖特異的アラインメントファイルを用いたGviz Rパッケージ (HahneおよびIvanek、2016) により可視化した。

10

【0491】

比色アッセイ

細胞培養上清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性は、ALT活性アッセイキット (ab105134、Abcam) を製造業者のプロトコルに従って使用して測定した。

【0492】

イムノブロット法

肝細胞から得た総タンパク質抽出物に対してウエスタンブロットを行った。プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含むRIPA Lysis and Extraction Buffer (89901、サーモサイエンティフィック) 中で肝細胞の溶解物をホモジナイズした。タンパク質溶解物をSDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写した。ECL検出システム (Pierce) を使用して、適切な二次抗体 (抗ウサギHRP抗体または抗マウスHRP抗体) でタンパク質バンドを可視化した。

20

【0493】

統計分析

すべての統計分析は、GraphPad Prismソフトウェア (バージョン6.07) を使用して行った。1つの実験においていくつかの条件を比較する場合、Tukeyの方法により多重検定を行ってP値を補正した。統計学的有意差の基準はP 0.05に設定した。

【0494】

30

7.4 実施例7の参考文献

Agthe, M., Garbers, Y., Putoczki, T., and Garbers, C. (2017). Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice. *Placenta* 57, 13-16.

Balic, J.J., Garbers, C., Rose-John, S., Yu, L., and Jenkins, B.J. (2017). Interleukin-11-driven gastric tumourigenesis is independent of trans-signalling. *Cytokine* 92, 118-123.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.

Chothani, S., Schafer, S., Adami, E., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Langley, S.R., Tan, J., Wang, M., Quaife, N.M., Jian Pua, C., et al. (2019). Widespread Translational Control of Fibrosis in the Human Heart by RNA-Binding Proteins. *Circulation* 140, 937-951.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.

Hahne, F., and Ivanek, R. (2016). Visualizing Genomic Data Using Gviz and Bioconductor. In *Statistical Genomics*, (Humana Press, New York, NY), pp. 335-351.

Klein, C., Wustefeld, T., Assmus, U., Roskams, T., Rose-John, S., Muller, M., Manns, M.P., Ernst, M., and Trautwein, C. (2005). The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J.*

40

50

Clin. Invest. 115, 860-869.

Kroy, D.C., Beraza, N., Tschaharganeh, D.F., Sander, L.E., Erschfeld, S., Giebel er, A., Liedtke, C., Wasmuth, H.E., Trautwein, C., and Streetz, K.L. (2010). Lac k of interleukin-6/glycoprotein 130/signal transducers and activators of tran scription-3 signaling in hepatocytes predisposes to liver steatosis and injury in mice. *Hepatology* 51, 463-473.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Ge nome Biol.* 10, R25.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinfor matics* 30, 923-930.

10

Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H.S., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., et al. (2010). Interleukin-6 -deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53, 2431-2441.

Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.-W., Moreno-Moral, A., DeL aughter, D.M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., et al. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552, 110-115.

Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 64, 1403-1415.

20

The RNAcentral Consortium (2017). RNAcentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 45, D128-D134.

Wuestefeld, T., Klein, C., Streetz, K.L., Betz, U., Lauber, J., Buer, J., Manns, M .P., Muller, W., and Trautwein, C. (2003). Interleukin-6/glycoprotein 130-dep endent pathways are protective during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 11281-11288.

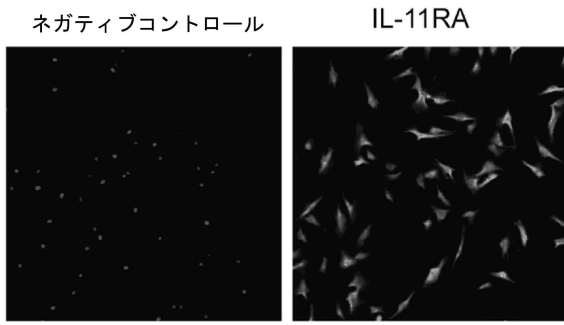
30

40

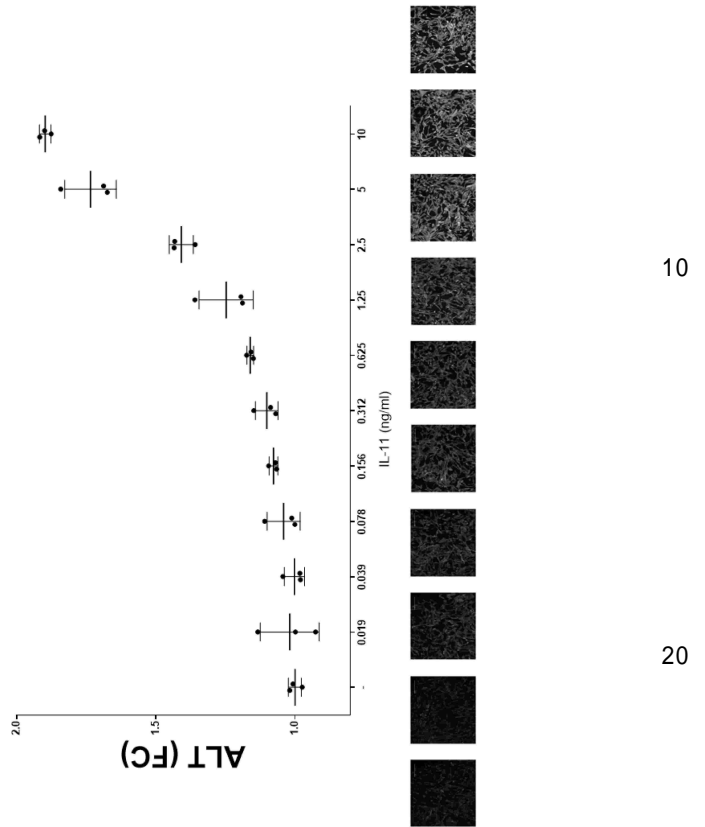
50

【図面】

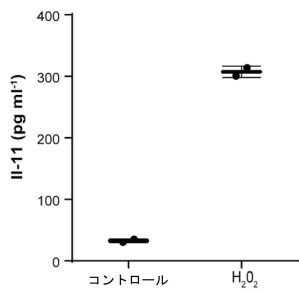
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A - 2 B】

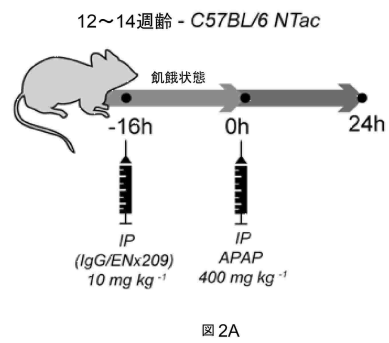


図 2A

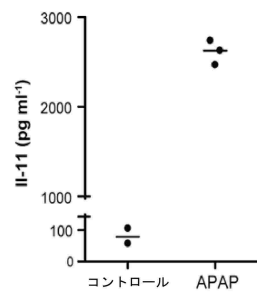


図 2B

10

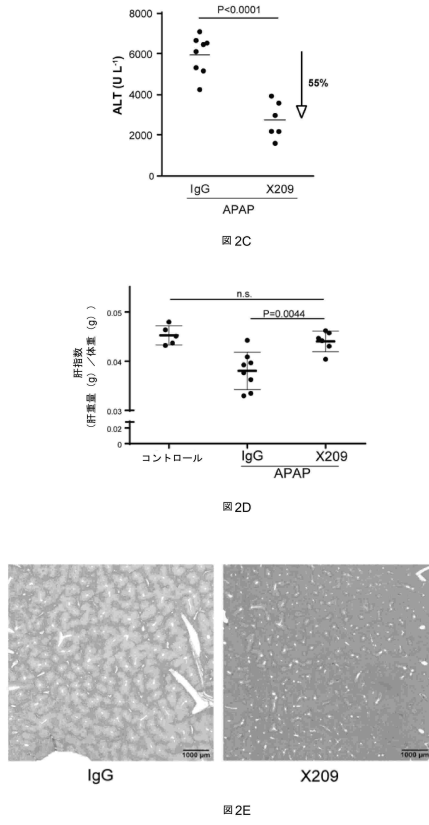
20

30

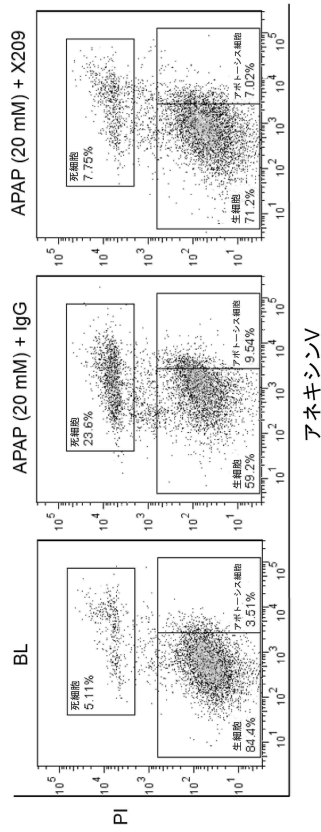
40

50

【 図 2 C - 2 E 】



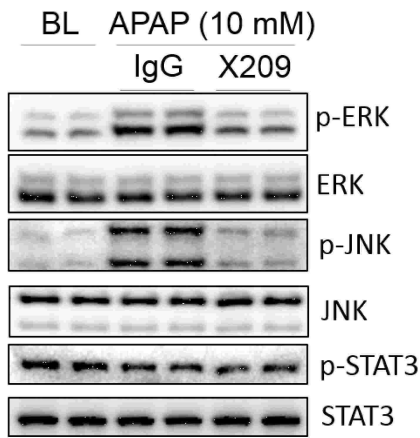
【 図 3 】



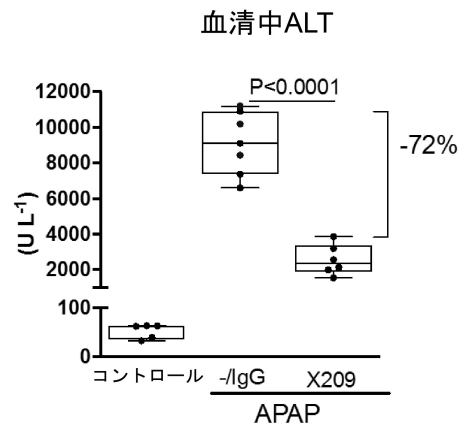
10

20

【 図 4 】



【 図 5 A 】

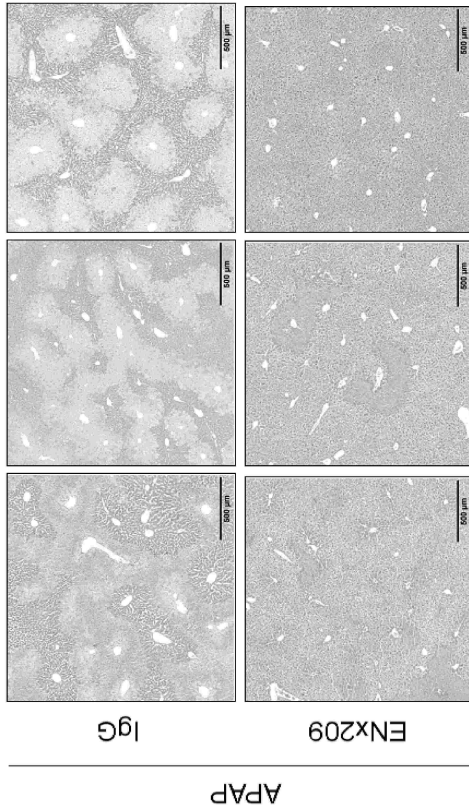


30

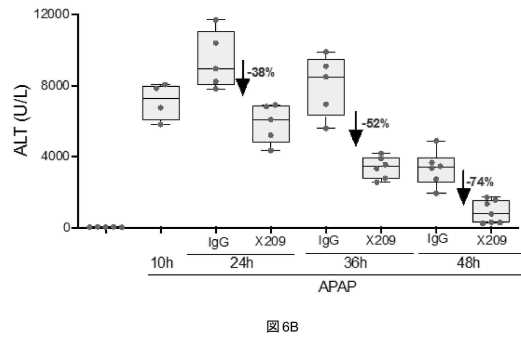
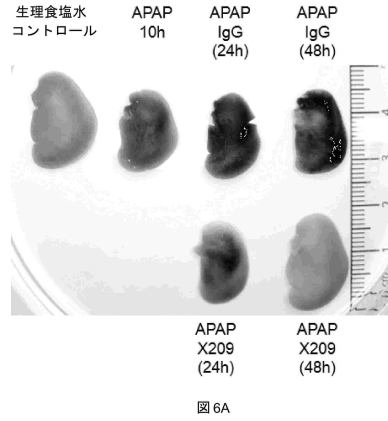
40

50

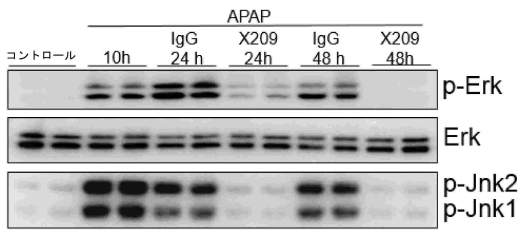
【 図 5 B 】



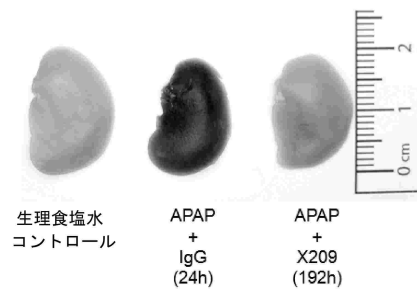
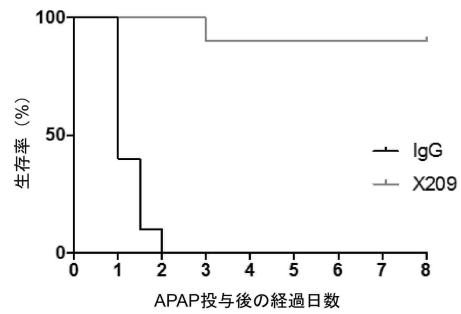
【 図 6 A - 6 B 】



【 図 7 】



【 図 8 A - 8 B 】



10

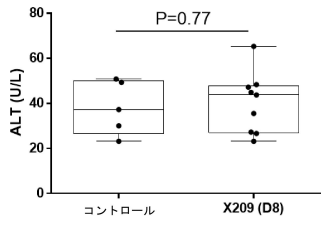
20

30

40

50

【 図 8 C 】



【 図 9 A - 9 B 】

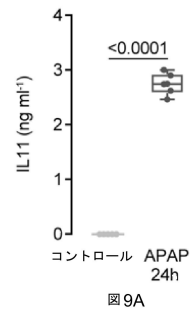


図9A

10

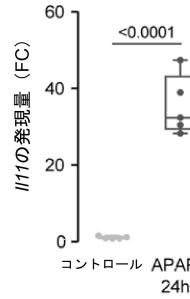


図9B

20

【 図 9 C - 9 D 】

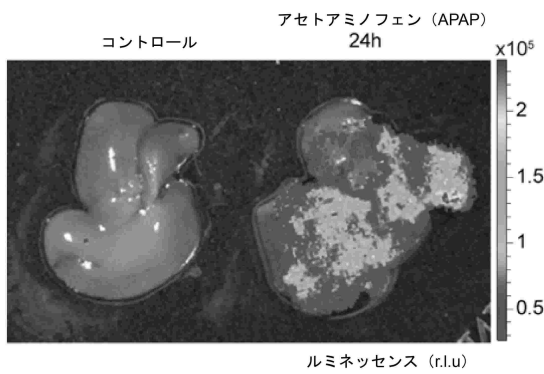


図9C

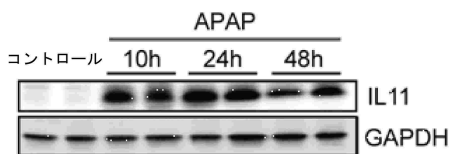
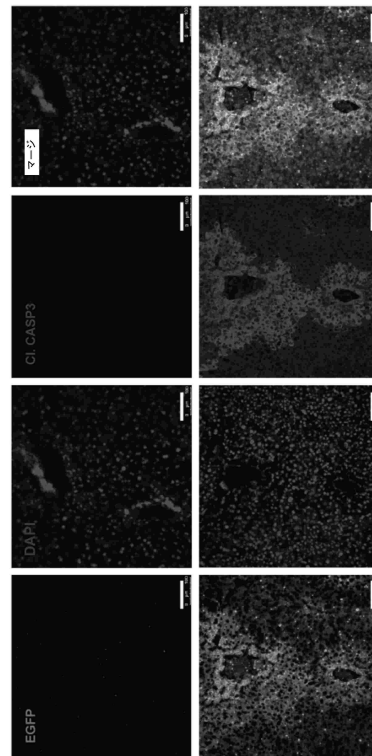


図9D

【 図 9 E 】



30

40

50

【 図 9 F - 9 H 】

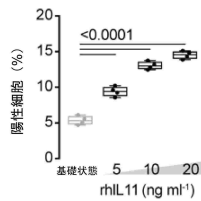
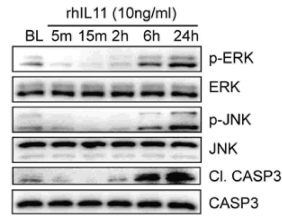
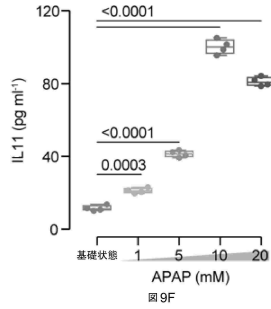


図 9G

図 9H

【 図 9 I - 9 J 】

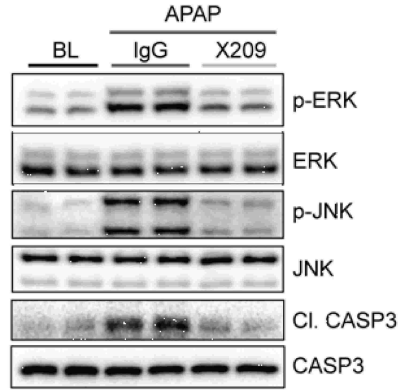


図 9I

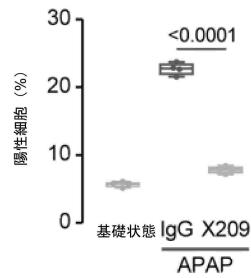


図 9J

【 図 10 A - 10 C 】

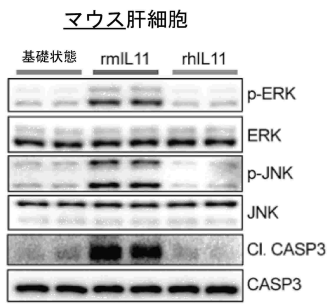


図 10A

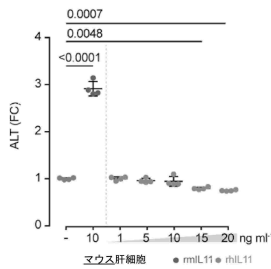


図 10B

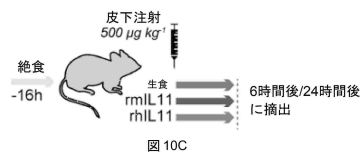


図 10C

【 図 10 D - 10 F 】

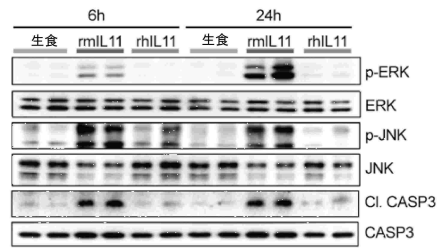


図 10D

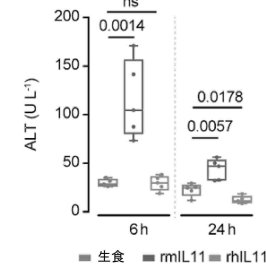


図 10E

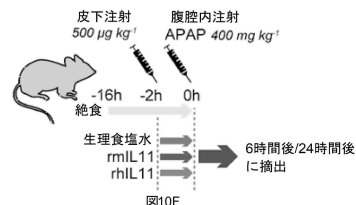


図 10F

10

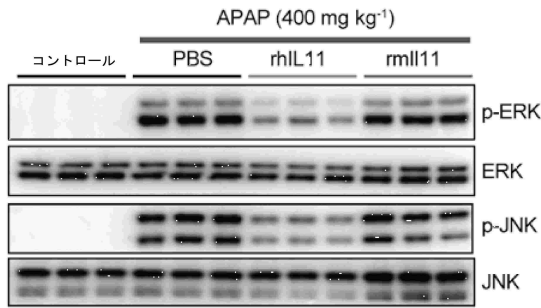
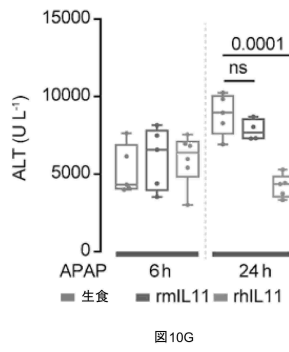
20

30

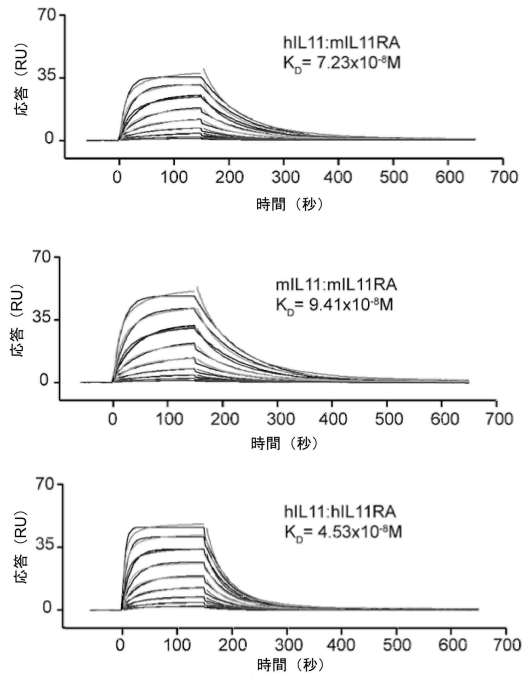
40

50

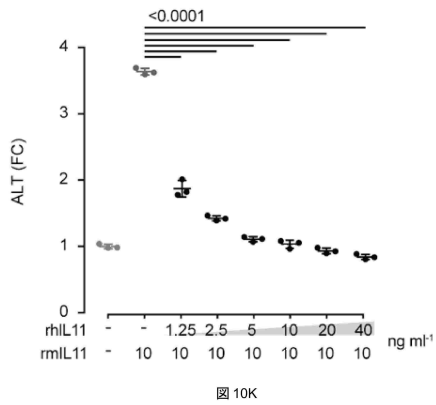
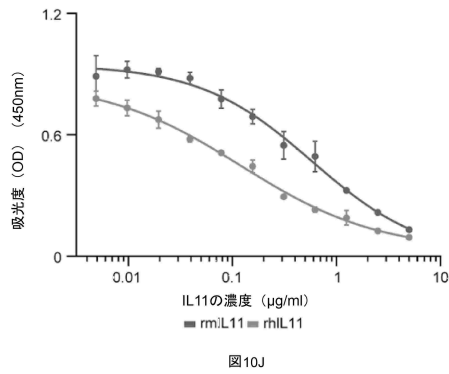
【 図 1 0 G - 1 0 H 】



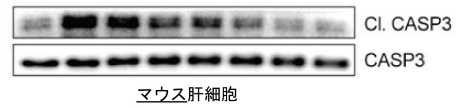
【 図 1 0 I 】



【 図 1 0 J - 1 0 K 】



【 図 1 0 L 】



【図11A - 11C】

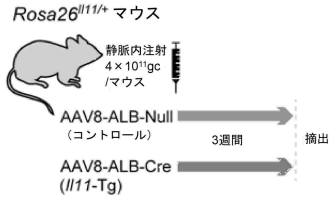


図11A

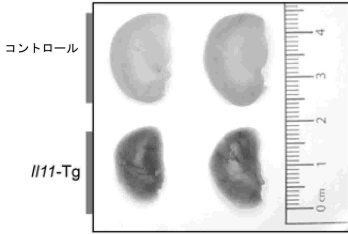


図11B

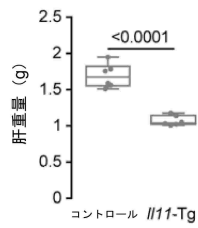


図11C

【図11D - 11F】

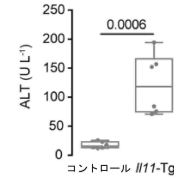


図11D

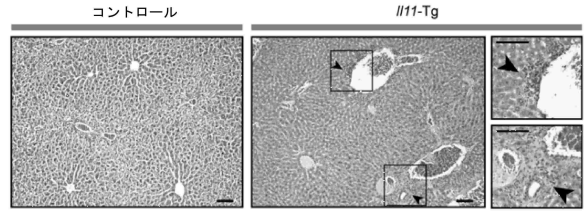


図11E

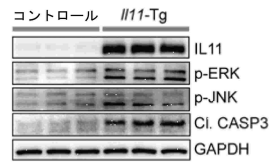


図11F

【図11G - 11I】

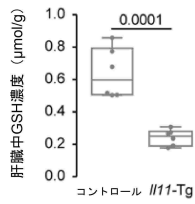


図11G

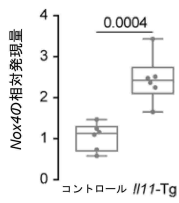


図11H

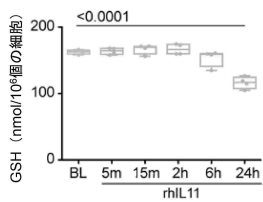


図11I

【図11J - 11L】

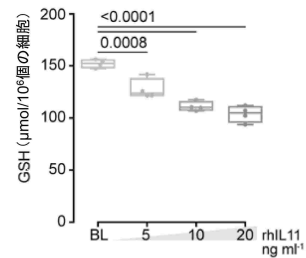


図11J

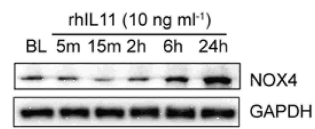


図11K

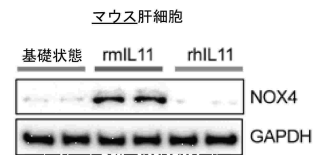


図11L

10

20

30

40

50

【 図 1 1 M - 1 1 O 】

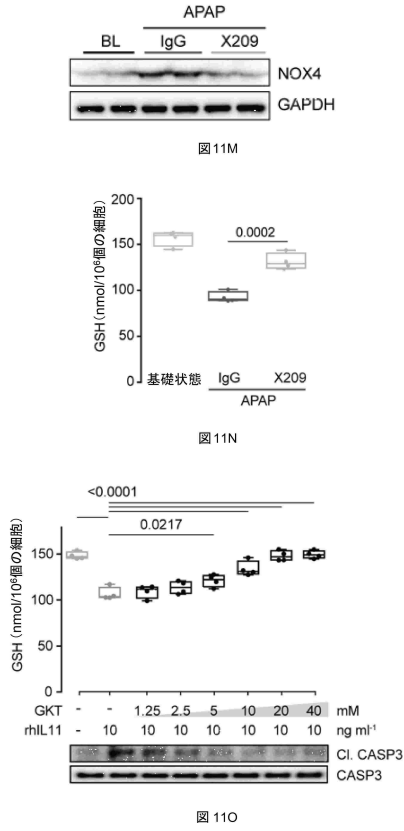


図 11O

【 図 1 1 P - 1 1 Q 】

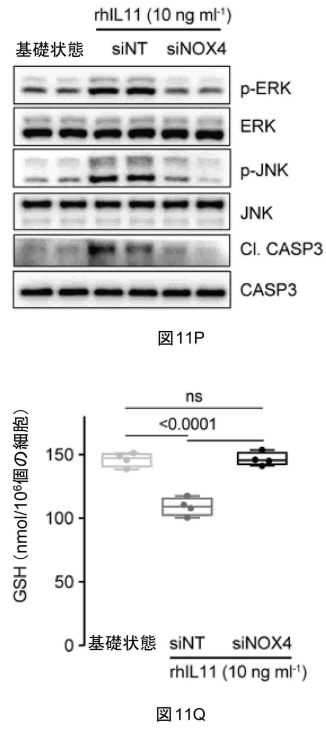


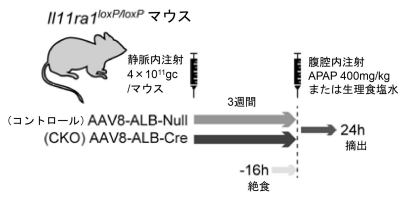
図 11P

図 11Q

10

20

【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B - 1 2 D 】

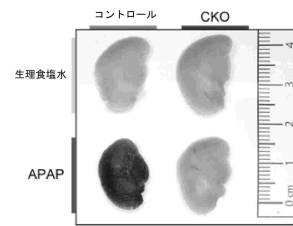


図 12B

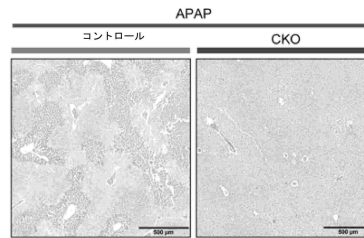


図 12C

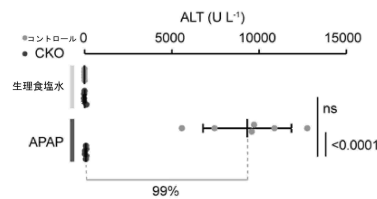


図 12D

30

40

50

【 図 1 2 E - 1 2 G 】

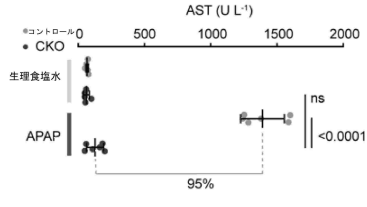


図 12E

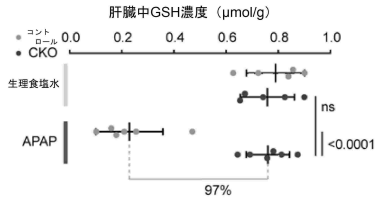


図 12F

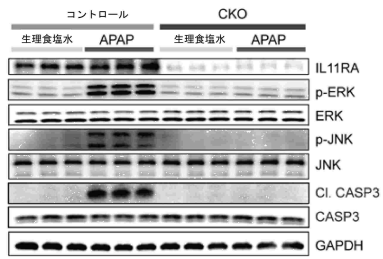
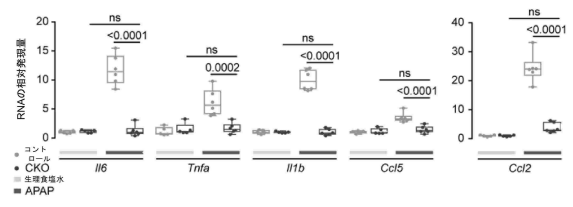


図 12G

【 図 1 2 H 】



10

20

【 図 1 3 A - 1 3 B 】

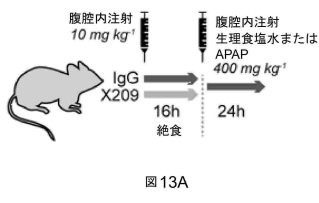


図 13A

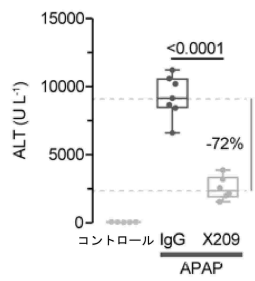


図 13B

【 図 1 3 C - 1 3 E 】

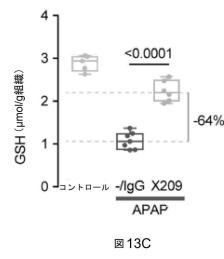


図 13C

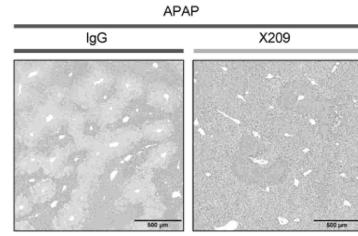


図 13D

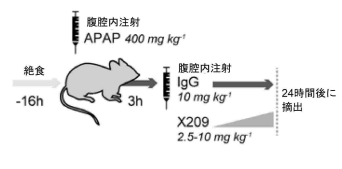


図 13E

30

40

50

【 図 1 3 F - 1 3 H 】

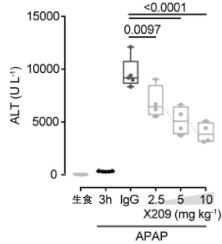


図13F

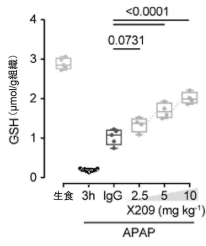


図13G

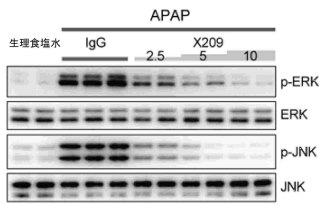


図13H

【 図 1 3 I - 1 3 K 】

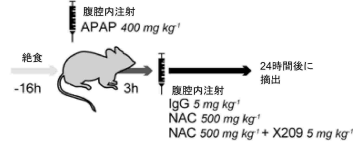


図13I

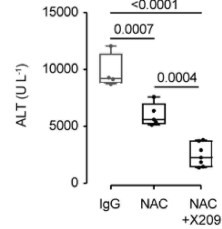


図13J

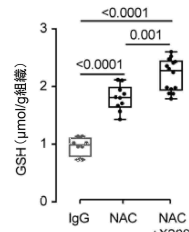
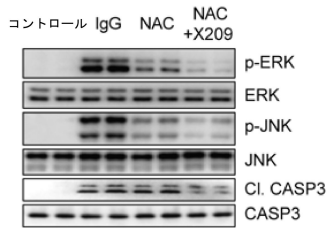


図13K

【 図 1 3 L 】



【 図 1 4 A - 1 4 B 】

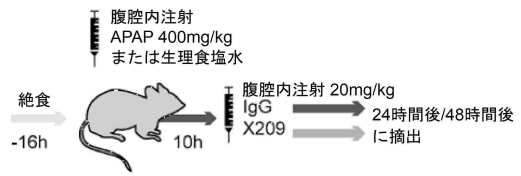


図14A

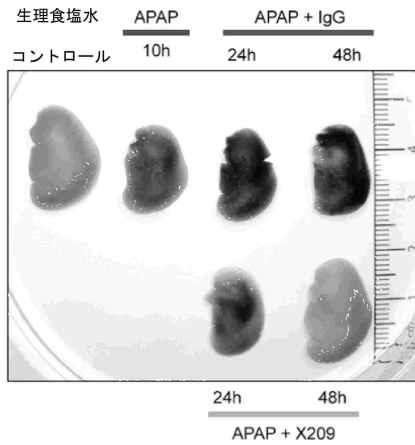


図14B

10

20

30

40

50

【図14C - 14D】

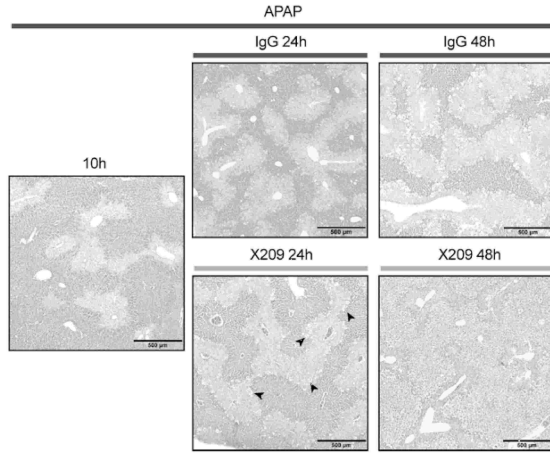


図14C

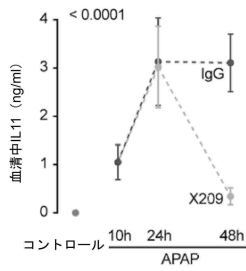


図14D

【図14E - 14F】

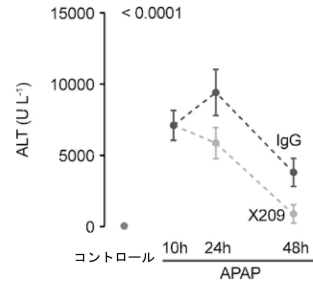


図14E

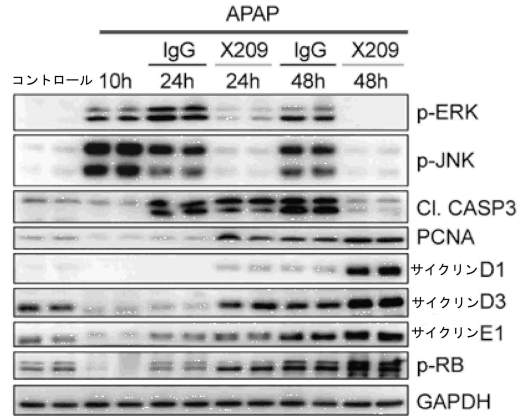


図14F

【図14G - 14H】

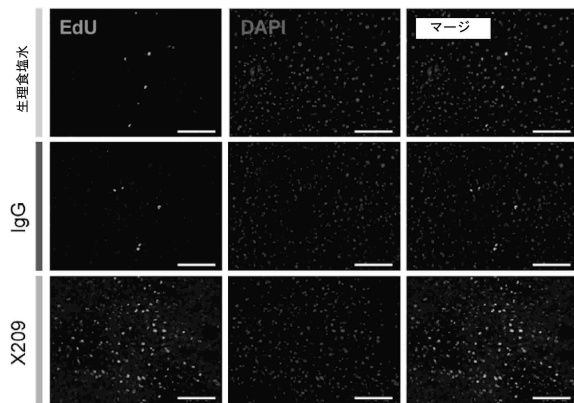


図14G

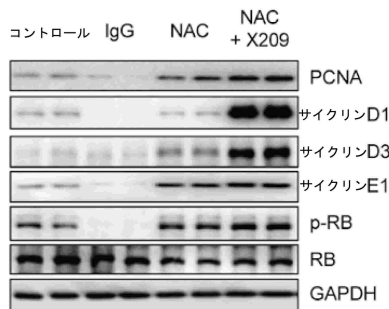


図14H

【図14I - 14K】

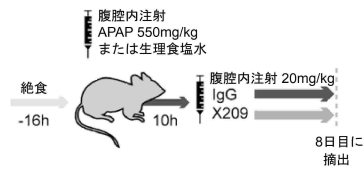


図14I

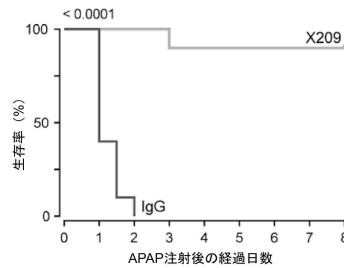


図14J

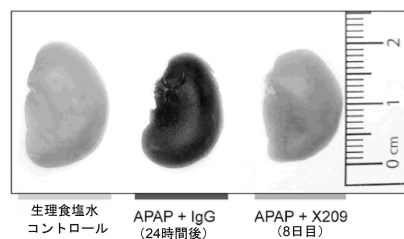


図14K

10

20

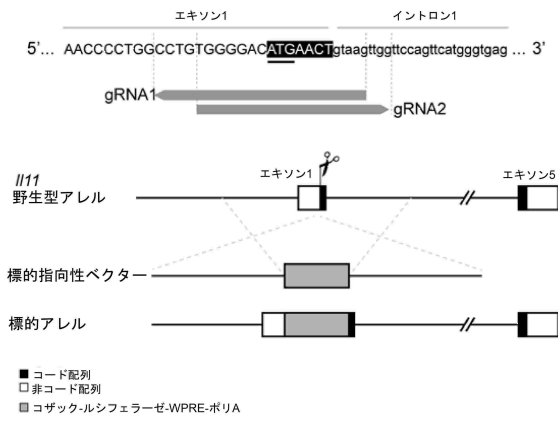
30

40

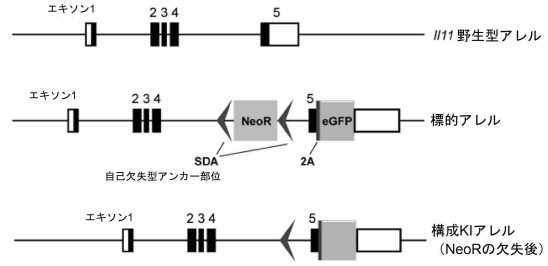
50

【 図 1 5 】

遺伝子座へのノックインの詳細

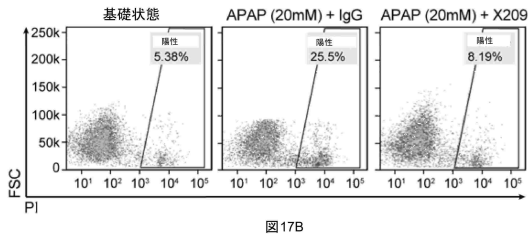
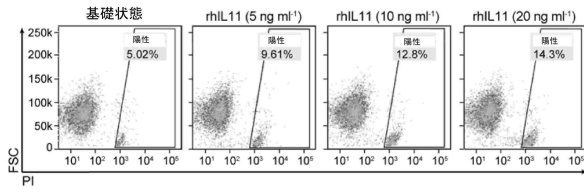


【 図 1 6 】

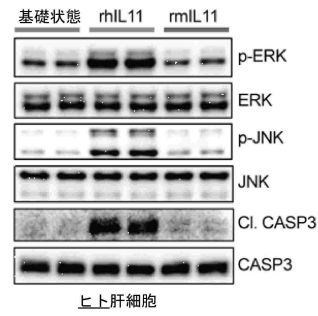


10

【 図 1 7 A - 1 7 B 】



【 図 1 8 A 】



20

30

40

50

【 図 18 B - 18 D 】

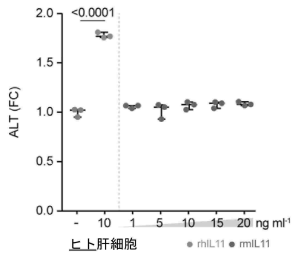


図18B

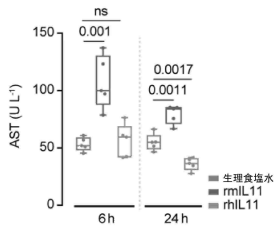


図18C

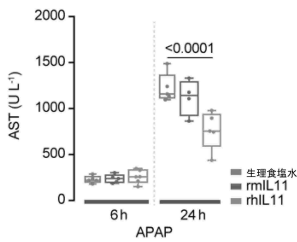


図 18D

【 図 18 E - 18 F 】

リガンド	分析物	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
hIL11	mIL11RA	1.66×10^5	1.20×10^{-2}	7.23×10^{-8}
mL11	mIL11RA	1.22×10^5	1.15×10^{-2}	9.41×10^{-8}
hIL11	hIL11RA	4.51×10^5	2.04×10^{-2}	4.53×10^{-8}

図18E

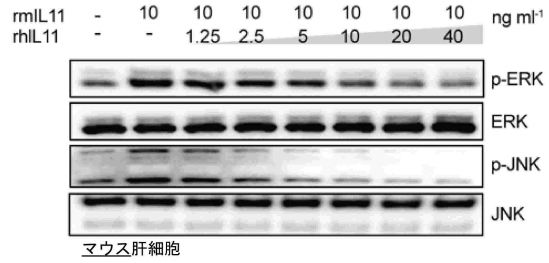
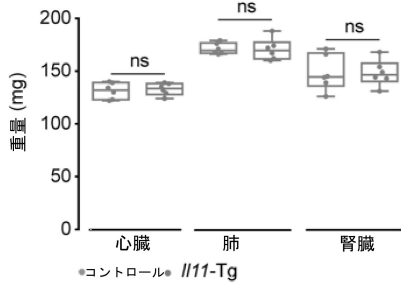


図 18F

【 図 19 A 】



【 図 19 B - 19 D 】

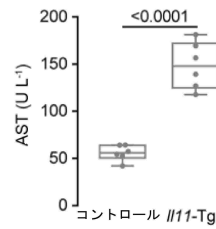


図 19B

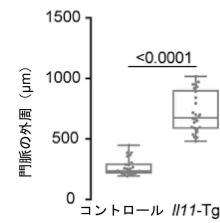


図 19C

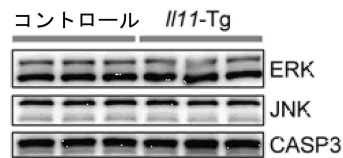


図 19D

10

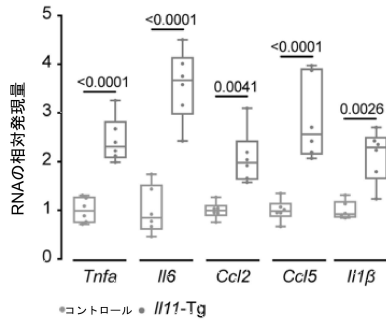
20

30

40

50

【 図 1 9 E 】



【 図 2 0 A - 2 0 B 】

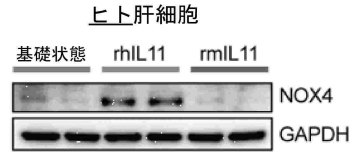


図 20A

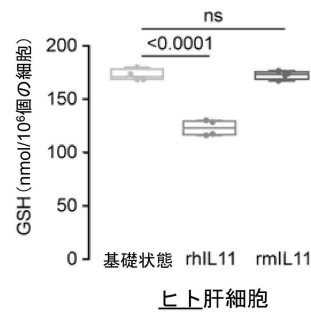


図 20B

10

20

【 図 2 0 C - 2 0 D 】

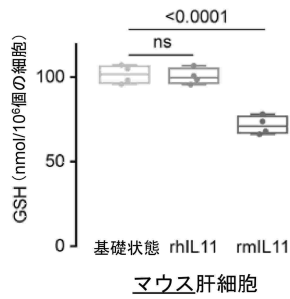


図 20C

【 図 2 1 A - 2 1 B 】

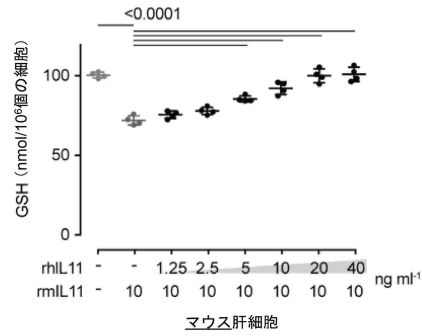


図 21A

30

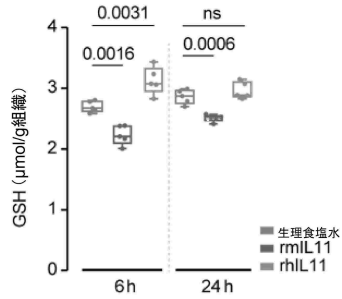


図 20D

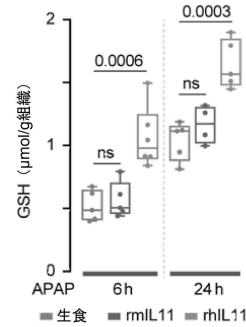
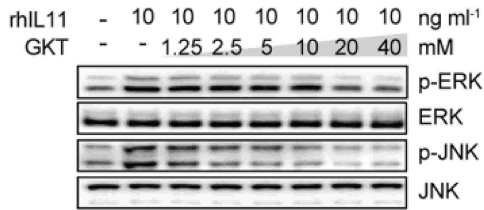


図 21B

40

50

【 図 2 2 A - 2 2 B 】



ヒト肝細胞

図 22A

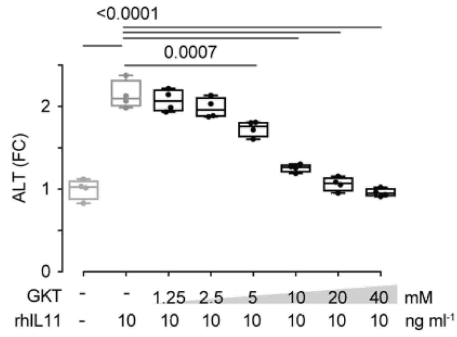
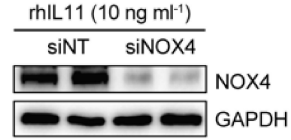


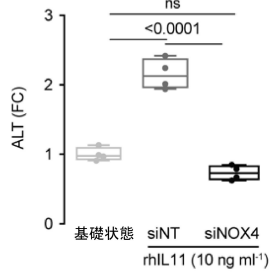
図 22B

【 図 2 3 A 】

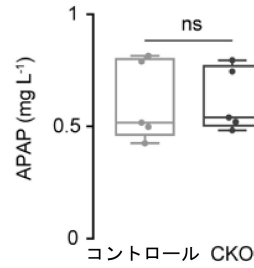


10

【 図 2 3 B 】

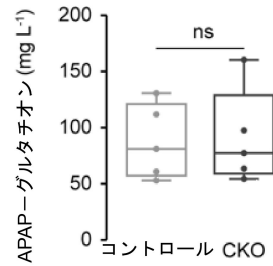


【 図 2 4 A - 2 4 B 】



30

図 24A



40

図 24B

【 図 2 5 A - 2 5 C 】

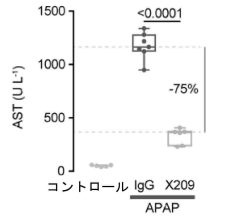


図 25A

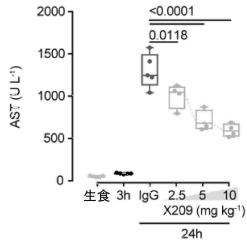


図 25B

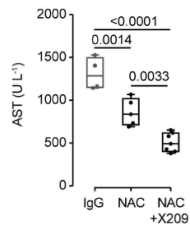


図 25C

【 図 2 6 A - 2 6 B 】

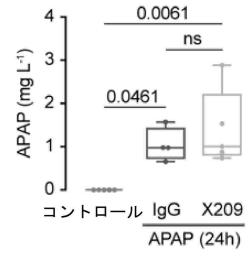


図 26A

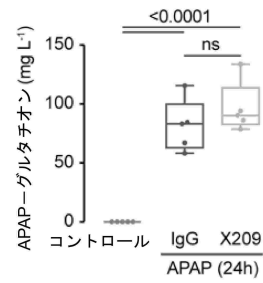
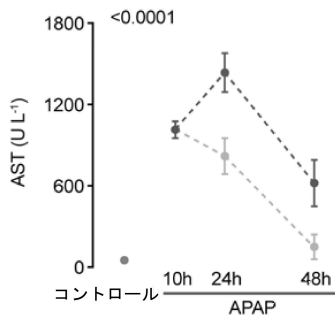


図 26B

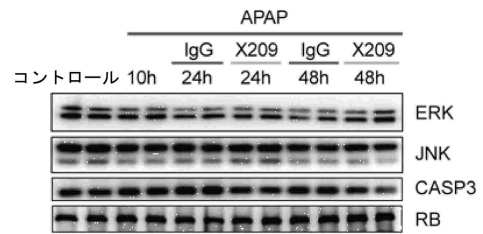
10

20

【 図 2 7 A 】



【 図 2 7 B 】



30

40

50

【 図 2 8 A - 2 8 B 】

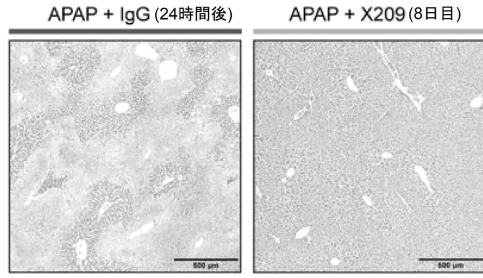


図28A

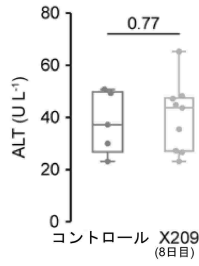
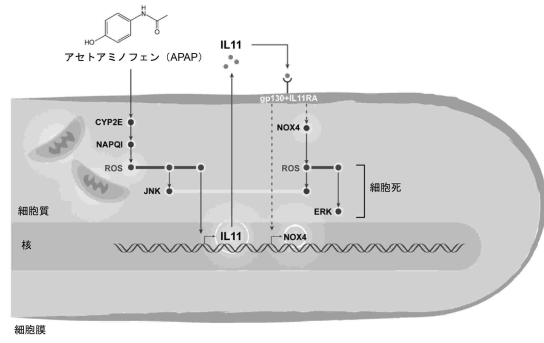


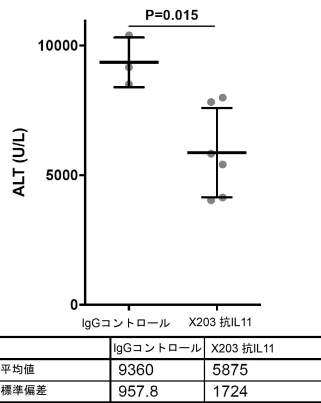
図28B

【 図 2 9 】

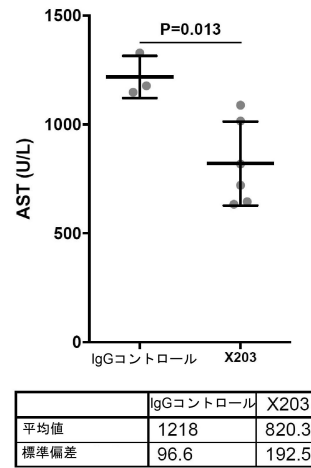


10

【 図 3 0 A 】



【 図 3 0 B 】



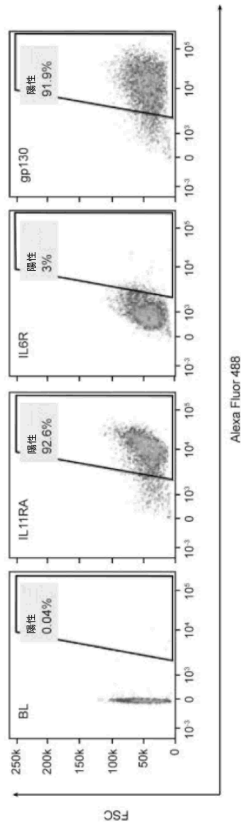
20

30

40

50

【 図 3 1 A 】



【 図 3 1 B - 3 1 C 】

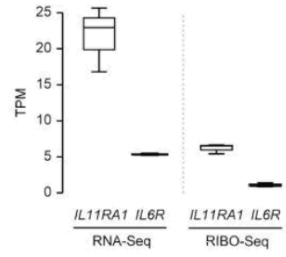


図31B

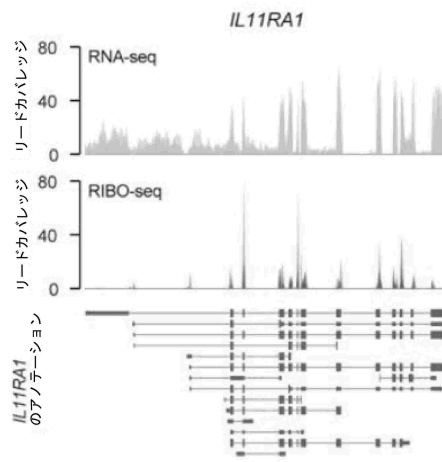


図31C

【 図 3 1 D - 3 1 E 】

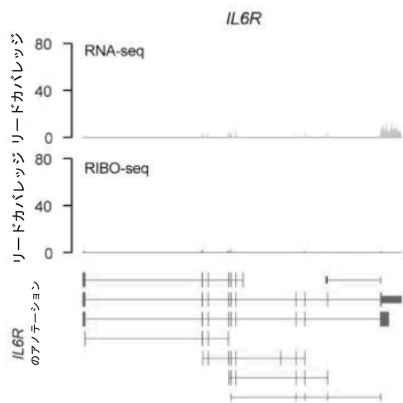


図31D

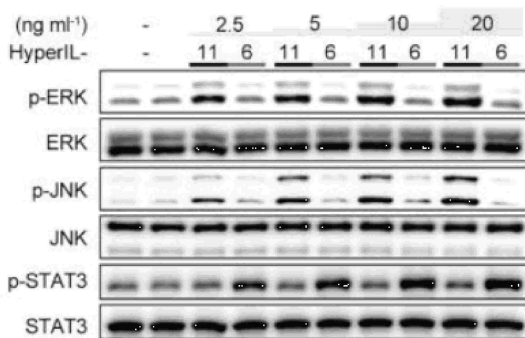


図31E

【 図 3 1 F - 3 1 G 】

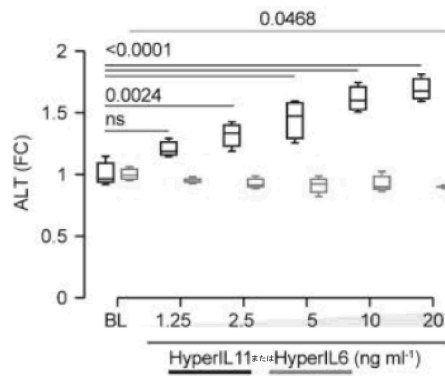


図31F

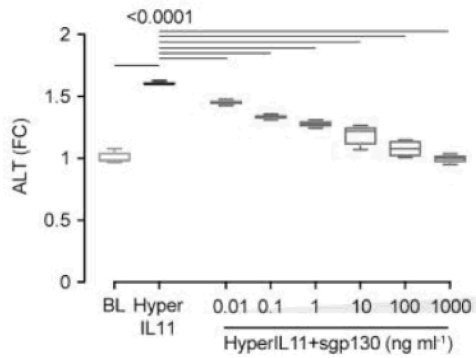


図31G

10

20

30

40

50

【 図 3 1 H - 3 1 I 】

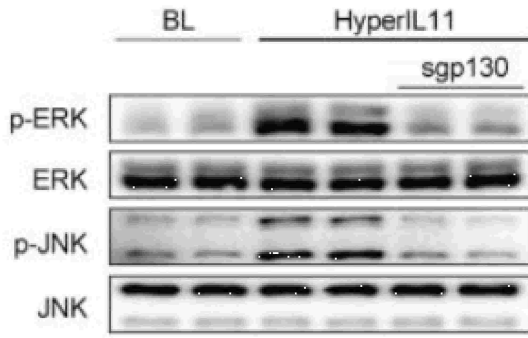


図31H

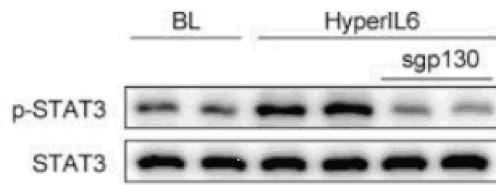


図31I

【 図 3 1 J - 3 1 K 】

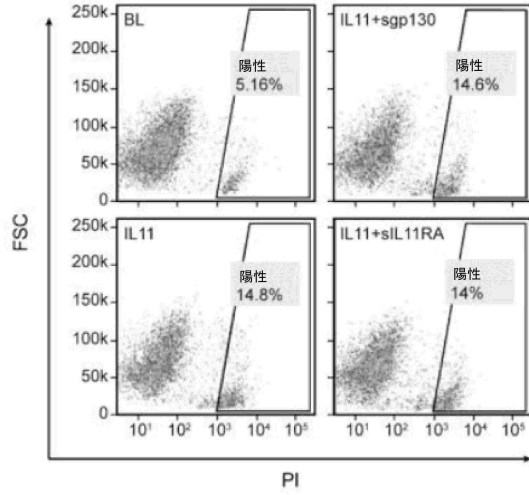


図31J

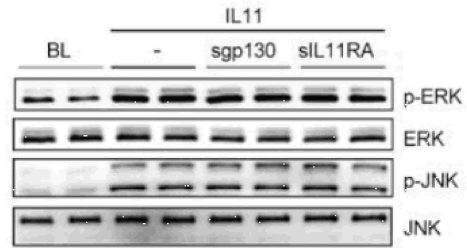
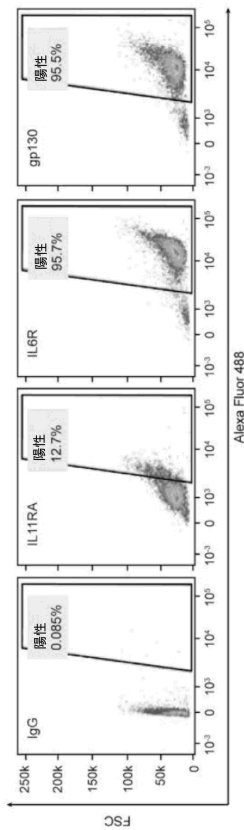
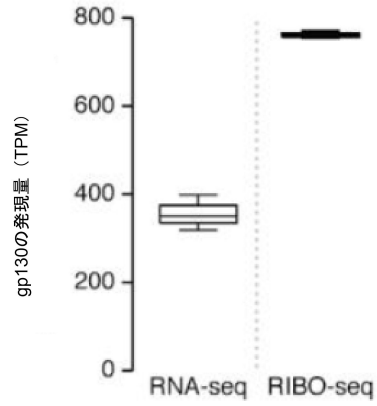


図31K

【 図 3 2 A 】



【 図 3 2 B 】



10

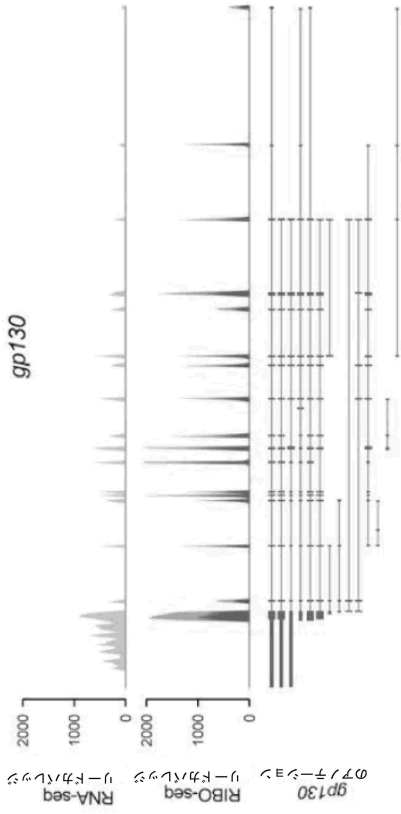
20

30

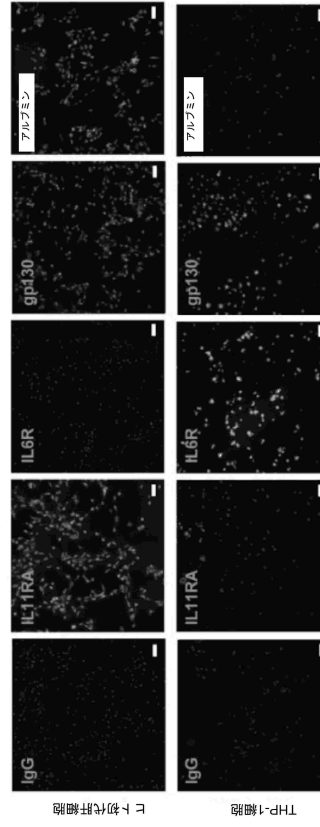
40

50

【図 3 2 C】



【図 3 2 D】



10

20

【図 3 2 E - 3 2 F】

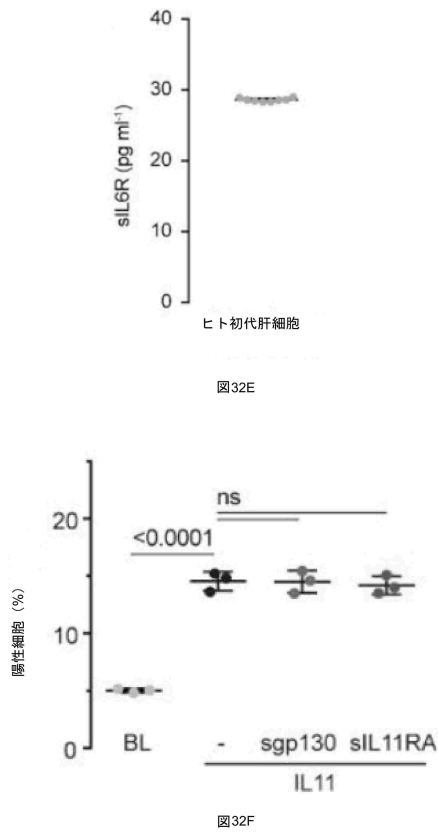
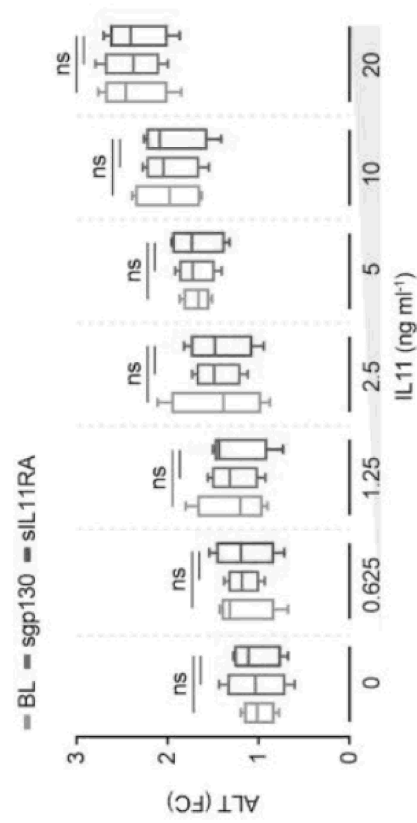


図32E

図32F

【図 3 2 G】

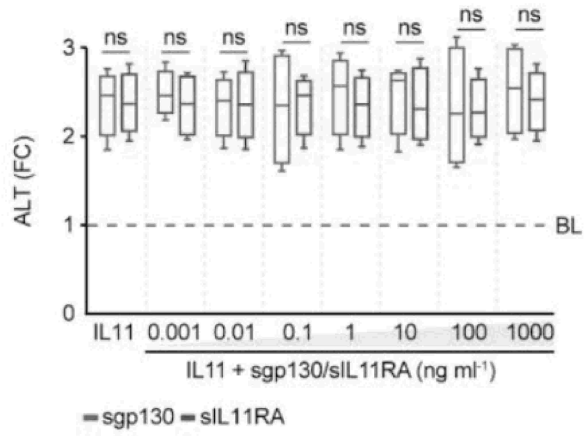


30

40

50

【 3 2 H 】



10

【 配列表 】

[0007514846000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1915003.6

(32)優先日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(72)発明者 クック, スチュアート アレクサンダー

シンガポール共和国 5 9 7 3 0 4 シンガポール, クレメンティ パーク, サンセット スクウェア 6

(72)発明者 シェイファー, セバスチャン

シンガポール共和国 4 3 7 0 9 8 シンガポール, タンジョン ケイトン ロード 3 1 5 シー

(72)発明者 ウイドジャジャ, アニッサ アニンドヤ

シンガポール共和国 6 4 9 9 2 8 シンガポール, ブーン レイ ドライブ 8 # 0 6 - 1 7

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 WIDJAJA, A.A. et al., Hepatology, 2018年, Vol. 68, Suppl. 1, p. 1348A

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)