

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7438119号
(P7438119)

(45)発行日 令和6年2月26日(2024.2.26)

(24)登録日 令和6年2月15日(2024.2.15)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
請求項の数 33 (全60頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-542716(P2020-542716)	(73)特許権者	503146324	
(86)(22)出願日	平成30年10月23日(2018.10.23)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド	
(65)公表番号	特表2021-500078(P2021-500078 A)		The Brigham and Women's Hospital, Inc.	
(43)公表日	令和3年1月7日(2021.1.7)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ボストン フランシス ストリート 75	
(86)国際出願番号	PCT/US2018/057016	(74)代理人	100102978	
(87)国際公開番号	WO2019/083944		弁理士 清水 初志	
(87)国際公開日	令和1年5月2日(2019.5.2)	(74)代理人	100160923	
審査請求日	令和3年9月1日(2021.9.1)		弁理士 山口 裕孝	
(31)優先権主張番号	62/575,762	(74)代理人	100119507	
(32)優先日	平成29年10月23日(2017.10.23)		弁理士 刑部 俊	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142929	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞外小胞関連疾患のための材料および方法

(57)【特許請求の範囲】

- 【請求項1】
- ペプチドを含む、細胞から細胞外小胞（EV）へのソルチリンの輸送を阻害または低減するための組成物であって、該組成物が、細胞におけるソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害し、かつ該ペプチドが、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列を含む、前記組成物。
- 【請求項2】
- ペプチドが、SEQ ID NO：1のCys⁷⁸³での分子間ジスルフィドの形成を阻害する、請求項1記載の組成物。
- 【請求項3】
- ペプチドが、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列から本質的になる、請求項1記載の組成物。
- 【請求項4】
- ペプチドが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項1記載の組成物。
- 【請求項5】
- ペプチドが、アミド化、アセチル化、環化、リン酸化、グリコシル化、ニトロシル化、メチル化、脂質化、またはPEG化されている、請求項1記載の組成物。
- 【請求項6】
- ペプチドが、少なくとも1つのDアミノ酸、ベータアミノ酸、または修飾ペプチド結合を含む、請求項1記載の組成物。
- 【請求項7】
- 細胞が、白血球、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、T細胞

胞、またはB細胞である、請求項1記載の組成物。

【請求項8】

阻害が、インビトロまたはエクスビボである、請求項1記載の組成物。

【請求項9】

阻害が、インビボである、請求項1記載の組成物。

【請求項10】

阻害が、哺乳動物における、請求項9記載の組成物。

【請求項11】

阻害が、細胞外小胞関連疾患（EV関連疾患）を有するまたは有する疑いのある対象における、請求項9記載の組成物。

【請求項12】

EV関連疾患が、石灰化大動脈弁疾患、糖尿病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、肺線維症、非アルコール性脂肪性肝疾患、骨粗鬆症、アルツハイマー病、強皮症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、高コレステロール血症、がん、関節リウマチ、および肥満からなる群より選択される、請求項11記載の組成物。

【請求項13】

糖尿病が、1型糖尿病、2型糖尿病、または若年発症成人型糖尿病である、請求項12記載の組成物。

【請求項14】

がんが、肺がんまたは膵臓がんである、請求項12記載の組成物。

【請求項15】

ペプチドを含む、対象における細胞外小胞関連疾患を処置するための組成物であって、該組成物が、それを必要とする対象において細胞中のソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害し、かつ該ペプチドが、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列を含む、前記組成物。

【請求項16】

ペプチドが、SEQ ID NO：1のCys⁷⁸³での分子間ジスルフィドの形成を阻害する、請求項15記載の組成物。

【請求項17】

ペプチドが、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列から本質的になる、請求項15記載の組成物。

【請求項18】

ペプチドが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項15記載の組成物。

【請求項19】

ペプチドが、アミド化、アセチル化、環化、リン酸化、グリコシル化、ニトロシル化、メチル化、脂質化、またはPEG化されている、請求項15記載の組成物。

【請求項20】

ペプチドが、少なくとも1つのDアミノ酸、ベータアミノ酸、または修飾ペプチド結合を含む、請求項15記載の組成物。

【請求項21】

細胞が、白血球、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、T細胞、またはB細胞である、請求項15記載の組成物。

【請求項22】

EV関連疾患が、石灰化大動脈弁疾患、糖尿病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、肺線維症、非アルコール性脂肪性肝疾患、骨粗鬆症、アルツハイマー病、強皮症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、高コレステロール血症、がん、関節リウマチ、および肥満からなる群より選択される、請求項15記載の組成物。

【請求項23】

糖尿病が、1型糖尿病、2型糖尿病、または若年発症成人型糖尿病である、請求項22記載の組成物。

【請求項24】

がんが、肺がんまたは膵臓がんである、請求項22記載の組成物。

【請求項 2 5】

(i) 細胞を試験薬剤と接触させる工程であって、細胞が、第1の標識を含む第1のソルチリンポリペプチドと、第2の標識を含む第2のソルチリンポリペプチドとを発現する、工程；

(ii) 細胞中に発現される第1のソルチリンポリペプチドと第2のソルチリンポリペプチドとの間の接触レベルを検出する工程を含む、ソルチリンの二量体化をモジュレートする試験薬剤を同定するための方法であって、

対照または参照レベルに対する接触レベルにおける変化により、該薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることが示される、方法。

10

【請求項 2 6】

検出する工程が、段階 (i) において接触された細胞を、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) を使用して分析することを含み、対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける変化により、薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることが示される、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける増加により、化合物がソルチリンの二量体化を阻害することが示される、請求項26記載の方法。

【請求項 2 8】

20

対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける減少により、化合物がソルチリンの二量体化を増加させることが示される、請求項26記載の方法。

【請求項 2 9】

対照または参照レベルが、第1のソルチリンポリペプチドまたは第2のソルチリンポリペプチドのいずれかを発現している細胞におけるFRETシグナルである、請求項26記載の方法。

【請求項 3 0】

検出する工程が、細胞を第1のリガンドおよび第2のリガンドと接触させることを含み、第1のリガンドが、第1の標識と結合可能であり、かつ蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) ドナーとコンジュゲートされており、

30

第2のリガンドが、第2の標識と結合可能であり、かつFRETアクセプターとコンジュゲートされている、請求項26記載の方法。

【請求項 3 1】

第1または第2のリガンドが、抗体である、請求項30記載の方法。

【請求項 3 2】

前記薬剤が、ソルチリンの二量体化を阻害する、請求項25記載の方法。

【請求項 3 3】

前記薬剤が、ソルチリンの二量体化を増加させる、請求項25記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、35 U.S.C.第119 (e) 条の下、2017年10月23日に出願された米国仮出願第62/575,762号の恩典を主張し、その全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本明細書に提供される技術は、ソルチリンの細胞外小胞への輸送を減少または阻害するための方法および組成物に関する。

50

【背景技術】

【0003】

背景

細胞外小胞（EV）は、マイクロRNA、脂質、およびタンパク質を隣接細胞に移動させることにより細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たす。標的タンパク質を細胞の分泌区画または細胞内区画に方向づけるソーティングレセプターであるソルチリンは、EVおよび細胞の両方に見出される。多くのヒト疾患、例えば、がんおよび心血管疾患において、ソルチリンの発現レベルは非典型的に増加している。最近の報告が、ソルチリンは複数の翻訳後修飾によって調節されると言及したものの、ソルチリン輸送の正確なメカニズムは解明されていない。ソルチリンの二量体化は、レセプターの細胞外小胞への輸送を調節する。したがって、ソルチリンの二量体化を阻害することは、とりわけ血管石灰化およびがんを含めたEV関連疾患の処置のための新しい治療戦略として作用することができる。

10

【0004】

したがって、当技術分野において、ソルチリンのEVへの輸送を阻害、減少、および防止するための方法および組成物の必要性がある。

【発明の概要】

【0005】

概要

本発明は、とりわけソルチリンがシステイン783（Cys⁷⁸³）残基での分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成し、ジスルフィド結合の形成がソルチリンの細胞外小胞（EV）への輸送をもたらすという本発明者らの発見に部分的に基づく。したがって、一局面では、細胞から細胞外小胞（EV）へのソルチリンの輸送を阻害または低減するための方法が、本明細書において提供される。一般的に本方法は、例えば、分子間ジスルフィド結合、例えば、ソルチリンのCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合の形成を阻害することにより、細胞におけるソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害することを含む。

20

【0006】

非限定的に、細胞は、ソルチリンを発現している任意の細胞であることができる。例示的な細胞には、白血球、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、T細胞、B細胞、骨芽細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞、内皮細胞、膵臓細胞（ β 、 α 、または γ ）、膵ポリペプチド（PP）細胞、肝細胞、脂肪細胞、および腎糸球体壁細胞（parietals）、有足細胞、または近位尿管細管刷子縁細胞が含まれるが、それらに限定されるわけではない。さらに、例えば、分子間ジスルフィド結合の形成を阻害、低減、または防止することによりソルチリンの二量体化を阻害、低減または防止する薬剤を、細胞に投与すること、または細胞を該薬剤と接触させることによって、二量体化を実施することができる。

30

【0007】

本明細書に論じるように、ソルチリンの二量体化を阻害することは、EV関連疾患を処置するために使用することができる。したがって、別の局面では、それを必要とする対象におけるソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害することを含む、対象における細胞外小胞関連疾患を処置する方法が、本明細書において提供される。例えばソルチリンのCys⁷⁸³などでの分子間ジスルフィド結合の形成を阻害することは、それを必要とする対象における石灰化を減少、阻害、低減、および／または処置する。

40

【0008】

別の局面では、ソルチリンの二量体化をモジュレートする試験薬剤を同定するための方法が、本明細書において提供される。本方法は、細胞を試験薬剤と接触させることを含み、その際、細胞は、第1の標識を含む第1のソルチリンポリペプチドと、第2の標識を含む第2のソルチリンポリペプチドとを発現する。これらの標識は、同じかまたは異なることができ、2つの標識の間の距離または接触レベルは、決定することができる。したがって、細胞が試験薬剤と接触された後、2つの標識の間の距離または接触レベルが測定または決定される。距離または接触レベルは、参照または距離または接触レベルと比較される。参照または対照は、試験化合物と接触されていない細胞、すなわち第1の標識を含む第1の

50

ソルチリンポリペプチドと、第2の標識を含む第2のソルチリンポリペプチドとを発現している細胞において測定された距離または接触レベルであることができる。対照または参照レベルに対する距離または接触レベルにおける変化は、薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることを示す。

【0009】

当業者に公知の任意の方法を、距離または接触レベルを測定または検出するために使用することもできる。例えば、蛍光共鳴エネルギー移動（TR-FRET）を使用して、2つの標識の間の距離または接触レベルを測定することができる。いくつかの態様では、2つの標識は、FRETドナーとアクセプターとの対であることができる。いくつかの態様では、2つの標識と結合することができるリガンドを使用することができ、その際、第1の標識と結合するリガンドは、FRETアクセプターまたはドナーの一方を含むことができ、第2の標識と結合するリガンドは、FRETアクセプターまたはドナーの他方を含むことができる。

【0010】

さらに、二量体型可溶性ソルチリンを調製するための方法が、本明細書において提供される。本方法は、細胞外ドメイン中に第1の標識を含むソルチリンポリペプチドを細胞から発現させることを含む。発現されたソルチリンポリペプチドは、アフィニティー精製により精製することができる。例えば、アフィニティー精製は、第1の標識に対する親和性に基づくことができる。一般的に、精製は、ソルチリン二量体の分離を低減する条件下である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1A～1Dは、ソルチリンがHEK293細胞の細胞表面でホモ二量体を形成することを示す。図1Aは、FLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンの概略図を示す。FLAGタグおよび6×Hisタグをソルチリン中のプロペプチドおよび3つのアミノ酸（Ser78-Ala79-Pro80）の後に挿入した。SP、シグナルペプチド；PP、プロペプチド；TMD、膜貫通ドメイン；ICD、細胞内ドメイン。図1Bは、HEK293細胞におけるFLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンの過剰発現がウエスタンブロットにおいて検証されたことを示す。図1C～Dは、TR-FRETアッセイ（図1C）およびHTRFアッセイ（図1D）におけるHEK293の細胞表面でのFLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンの結合の検出を示す。6×His-ソルチリンの発現によるFRETシグナルの変化を変化%として示した（平均±S.E.、3つの独立した実験）。t検定、*、 $p < 0.05$ ；**、 $p < 0.01$ 。

【図2A】図2A～Gは、ソルチリンがHEK293細胞において細胞外および細胞内ドメイン中で分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成することを示す。図2Aは、FLAG-ソルチリン完全長（完全）、ECD+TMDおよびICD+TMDの概略図を示す。図2B～Cは、FLAG-ソルチリン完全、ECD+TMDおよびICD+TMDのタンパク質発現が抗FLAG抗体を使用する還元（図2B）および非還元（図2C）ウエスタンブロットにおいて検証されたことを示す。FLAG-ソルチリン完全およびECD+TMDは、ホモ二量体および多量体を形成する。空のベクターを対照として使用した。図2Dは、FLAG-ソルチリン完全またはECD+TMDを一過性に過剰発現しているHEK293細胞が架橋剤で処理され、細胞溶解物が、抗FLAG抗体を用いた還元ウエスタンブロットのために使用されたことを示し、ソルチリン完全およびECD+TMDの二量体化を示す（ $n=3$ ）。図2Eは、FLAG-ソルチリンICD+TMDを安定的に過剰発現しているHEK293細胞（FLAG-ソルチリンICD+TMD HEK293細胞）がDMSO（対照）、MG-132（MG） $20 \mu\text{mol/L}$ またはクロロキン（Chlo） $10 \mu\text{mol/L}$ と共に7時間インキュベートされ、次に、抗ソルチリン抗体を使用して還元ウエスタンブロットが行われたことを示す。MG-132は、FLAG-ソルチリンICD+TMDのタンパク質発現を増加させたが、クロロキンは増加させなかった（ $n=3$ ）。図2Fは、FLAG-ソルチリンICD+TMD HEK293細胞がMG-132（ $2 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ ）と共に7または24時間インキュベートされたことを示す。MG-132は、FLAG-ソルチリンICD+TMDを時間および濃度依存的に増加させた。図2Gは、HEK293細胞（対照）またはFLAG-ソルチリンICD+TMD HEK293細胞（ICD+TMD）とMG-132（ $5 \mu\text{mol/L}$ ）との16時間のイン

キュベーションおよび抗FLAG抗体を用いた免疫沈降の後で、抗ソルチリン抗体を使用する非還元ウエスタンブロットが、ソルチリンICD+TMDの二量体化を示したことを示す。単量体、ホモ二量体および多量体をそれぞれMO、DおよびMUと略す。IB、免疫ブロット。

【図2B】説明は図2Aを参照のこと。

【図2C】説明は図2Aを参照のこと。

【図2D】説明は図2Aを参照のこと。

【図2E】説明は図2Aを参照のこと。

【図2F】説明は図2Aを参照のこと。

【図2G】説明は図2Aを参照のこと。

【図3】図3A～Dは、ソルチリンの膜貫通ドメインが、非共有結合的相互作用によりホモ二量体を形成することを示す。図3A～Dは、6×His-ソルチリン完全、ECD+TMD、およびICD+TMDが、FLAG-ソルチリン完全（図3A～B）およびECD+TMD（図3C～D）をそれぞれ安定的に過剰発現するHEK293細胞において一過性に過剰発現されたことを示す。細胞溶解物を使用して、抗FLAG M2抗体を用いた免疫沈降を行った。全細胞溶解物（図3A、C）および免疫沈降物（図3B、D）を使用してウエスタンブロットを実施した。6×His-ソルチリン完全、ECD+TMDおよびICD+TMDはFLAG-ソルチリン完全またはECD+TMD（B、D）と共沈した（n=2）。IB、免疫ブロット。

【図4A】図4A～Dは、ソルチリンの膜貫通ドメインをCD43の対応するドメインにより置換しても、二量体型のソルチリンは減少しないことを示す。図4Aは、FLAG-ソルチリンCD43-TMDの概略図を示す。ソルチリンの膜貫通ドメインをCD43の膜貫通ドメインにより置き換えた。図4Bは、FLAG-ソルチリンWTおよびFLAG-ソルチリンCD43-TMDがHEK293細胞において一過性に過剰発現され、細胞溶解物を使用して抗FLAG抗体を用いた非還元ウエスタンブロットが実施されたことを示す（n=3）。単量体、ホモ二量体、および多量体をそれぞれMO、D、およびMUと略す。図4C～Dは、6×His-ソルチリンWTまたは6×His-ソルチリンCD43-TMDがFLAG-ソルチリンを安定的に過剰発現しているHEK293細胞において一過性に過剰発現され、抗FLAG M2抗体を使用して免疫沈降が行われたことを示す。全細胞溶解物（図4C）および免疫沈降物（図4D）を使用してウエスタンブロットを実施した。6×His-ソルチリンCD43-TMDは、FLAG-ソルチリンに加えて6×His-ソルチリンWTと共沈した。矢印、ソルチリン野生型またはソルチリンCD43-TMD（n=3）。図4Eは、FLAG-ソルチリンHEK293細胞またはHEK293細胞において、6×His-ソルチリンCD43-TMDが過剰発現されたことを示す。細胞をTR-FRETアッセイに供した。6×His-ソルチリンWTまたはCD43-TMDの発現によるFRETシグナルの変化を、変化パーセントにより示す（平均 S.D.、n=4、1つの独立した実験）。エラーバーは、S.D.を表す。t検定により*P<0.05；**P<0.01。図4F～Gは、FLAG-ソルチリンHEK293細胞において、6×His-ソルチリンWTおよび6×His-ソルチリンCD43-TMDが過剰発現されたことを示す。細胞溶解物を、抗FLAG抗体（図4F）および抗6×His抗体（図4G）を用いた非還元ウエスタンブロットに供した。これは、ソルチリンの膜貫通ドメインをCD43の膜貫通ドメインにより置換しても、二量体化は減少しなかったことを実証した（n=3）。IB、免疫ブロット。

【図4B】説明は図4Aを参照のこと。

【図4C】説明は図4Aを参照のこと。

【図4D】説明は図4Aを参照のこと。

【図4E】説明は図4Aを参照のこと。

【図4F】説明は図4Aを参照のこと。

【図4G】説明は図4Aを参照のこと。

【図5】図5A～Fは、Cys⁷⁸³の変異が、ソルチリンの二量体化を打ち消したことを示す。図5Aは、FLAG-ソルチリン野生型（WT）およびC783A、ならびに6×His-ソルチリンICD TMD WTおよびC783Aの概略図を示す。システイン783をアラニンによって置き換えた。SP、シグナルペプチド；PP、プロペプチド。図5Bは、6×His-ソルチリン10CC

10

20

30

40

50

TMDの発現ベクターがHEK293細胞にトランスフェクトされたことを示す。6×His-ソルチリン10CC TMDの二量体化が、抗6×His抗体を用いた非還元ウエスタンブロットにおいて検出された (n=3)。図5C~Dは、C783Aが、非還元ウエスタンブロットにおいてHEK293細胞の細胞中 (図5C) および細胞外小胞中 (図5D) のソルチリンのホモ二量体を減少させたことを示す (n=3)。図5D~Eは、C783Aが、非還元ウエスタンブロットにおいてHEK293細胞の細胞中 (図5D) および細胞外小胞中 (図5E) の低分子量のソルチリンホモ二量体を減少させたことを示す (n=3)。図5F~Gは、2-FPA (パルミトイル化阻害剤) と一緒に24時間のインキュベーションが、FLAG-ソルチリンを安定的に過剰発現しているHEK293細胞中 (図5F) およびそれらの細胞外小胞中 (図5G) の低分子量のソルチリンホモ二量体を増加させたことを示す (n=3)。単量体ならびに高分子量および低分子量のホモ二量体を、それぞれMO、D (HMW)、およびD (LMW) と略す。IB、免疫ブロット。

10

【図6】図6A~Eは、ソルチリンS316Eおよびプロペプチドなし (wp) が、HEK293細胞における二量体化を増加させ、プロペプチドの添加が、FLAG-ソルチリンHEK293細胞の細胞外小胞中での二量体化を減少させることを示す。図6Aは、FLAG-ソルチリンWT、S316Eおよびプロペプチドなし (wp) の概略図を示す。ソルチリンにおけるセリン316をグルタミン酸によって置き換えた (S316E)。FLAG-ソルチリンwpにおけるプロペプチドを除去した。SP、シグナルペプチド；PP、プロペプチド。図6Bは、S316EがHEK293細胞におけるソルチリンの二量体化を増加させたことを示す (n=3)。図6Cは、プロペプチドの除去がHEK293細胞におけるソルチリンの二量体化を増加させたことを示す (n=3)。図6D~Eは、プロペプチド (100nmol/L) の添加がFLAG-ソルチリンHEK293細胞の細胞外小胞中のソルチリンの二量体化を減少させ (図6E)、一方で細胞中の減少は観察されなかった (図6D) ことを示す (n=2)。単量体ならびに高分子量および低分子量のホモ二量体をそれぞれMO、D (HMW)、D (LMW) と略す。Vex、ベクター；IB、免疫ブロット。

20

【図7】図7A~Eは、可溶性ソルチリンがホモ二量体を形成することを示す。図7A~Bは、FLAG-ソルチリンHEK293細胞 (図7A) およびソルチリン-3×FLAG HEK293細胞 (図7B) から分泌されたEVを使用してEV膜上のソルチリンの配向が決定されたことを示す。EVまたはそれらの溶解物を、抗FLAG M2抗体を用いた免疫沈降に供し、FLAG-ソルチリン (図7A) またはソルチリン-3×FLAG (図7B) を、抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロットで検出した (n=3)。図7C~Dは、FLAG-ソルチリン完全およびFLAG-ソルチリンECD+TMDを過剰発現しているHEK293細胞により分泌された可溶性ソルチリンが、非還元ウエスタンブロット (図7C) および還元ウエスタンブロット (図7D) で検出されたことを示し、それらがそれぞれホモ二量体および単量体であったことを示す (n=2)。図7Eは、FLAG-ソルチリン完全およびFLAG-ソルチリンECD+TMDを過剰発現しているHEK293細胞によって分泌される可溶性ソルチリンが精製され、非還元ウエスタンブロットで検出されたことを示す。IB、免疫ブロット。

30

【図8】ソルチリンの輸送についての二量体化の関与およびプロペプチドによる調節を示す概略図を示す。ソルチリンからのプロペプチドの解離は、二量体化を促進した。Cys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合による二量体化は、二量体化ソルチリンの細胞外小胞への運搬を容易にした。Cys⁷⁸³は、二量体化およびパルミトイル化と関連する。パルミトイル化ソルチリンは、ゴルジ装置に運搬し戻される。(1) プロペプチドは、ソルチリンから切断される。(2) プロペプチドは、異なる位置でソルチリンに結合する。次に、ソルチリンは、ゴルジ装置を通して運搬される。(3) ソルチリンは、10CCドメインおよびCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成する。(4) ソルチリンは、エンドサイトーシスによりエンドソームに組み入れられる。(5) パルミトイル化ソルチリン単量体は、レトロマーとの相互作用によりゴルジに運搬し戻される。(6) ソルチリンホモ二量体は、細胞外小胞 (微小胞および／またはエキソソーム) によって分泌される。(4) ソルチリンホモ二量体は、可溶性ソルチリンとして脱落および分泌される。

40

【図9】FLAG-ソルチリンHEK293細胞またはHEK293細胞において、6×His-ソルチ

50

リン、CD43-TMDが過剰発現されたことを示す。細胞をTR-FRETアッセイに供した。6×His-ソルチリン野生型(WT)またはCD43-TMDの発現によるFRETシグナルの変化を、変化%(平均±S.E., n=4、1つの独立した実験)として表示した。t検定、*P<0.05; *, p<0.01。

【図10】図10A~Bは、6×His-ソルチリン10CC+TMDの発現ベクターを構築し(図10A)、HEK293細胞にトランスフェクトしたことを示す。6×His-ソルチリン10CC+TMDの二量体化を、抗6×His抗体を用いた非還元ウエスタンブロットで検出した(図10B)(n=3)。

【図11】図11A~Bは、His-野生型ソルチリンを発現しているHCASMCにLacZ、Flag-野生型ソルチリン、Flag-C783A変異体ソルチリンおよびFlag-S316E変異体ソルチリンを感染させたことを示す。図11Aは、感染の3日後にHCASMCを溶解したことを示す。投入試料中のソルチリンの発現を非還元または還元(ジスルフィド結合の切断)ウエスタンブロットにより検出した。図11Bは、免疫沈降した試料を示す。二量体型は、C783A変異体で減少し、多量体型は、S316E変異体で増加した。MO=単量体、D=二量体およびMU=多量体。N=3人のドナー。

【図12】His-野生型ソルチリンを発現しているHCASMCにLacZ、Flag-野生型ソルチリン、Flag-C783A変異体ソルチリンおよびFlag-S316E変異体ソルチリンを感染させたことを示す。感染の3日後に培養培地からHCASMC由来EVを単離した。非還元または還元ウエスタンブロットによりソルチリンの発現を検出した。二量体型がC783A変異体で減少し、S316E変異体で増加した。これらは、EVへのソルチリンの輸送がC783A変異体で減少し、S316E変異体で増加することを示唆している。MO=単量体、D=二量体およびMU=多量体。N=3人のドナー。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

本明細書に使用される、「ソルチリン」または「ソルチリン1」という用語は、細胞外小胞の内部または表面および細胞内に見出される液胞タンパク質ソーティング10タンパク質(Vps10p)ファミリーのソーティングレセプターにおけるI型膜糖タンパク質を指す。ソルチリンのタンパク質配列は、本明細書においてSEQ ID NO:1として提供される。ソルチリンは、SORT1遺伝子(NCBI参照配列:NG_028280.1)によってコードされる。ヒトSORT1配列は、本明細書においてSEQ ID NO:3として提供される。SORT1またはソルチリンは、ヒトSORT1を、その天然の変種、分子、および対立遺伝子を含めて指すことができる。SORT1は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタなどの哺乳動物SORT1を指す。

【0013】

ヒトにおいて、ソルチリンは、脳、心臓、骨格筋、副腎、甲状腺、Bリンパ球、脂肪細胞、および脊髄を含めた広範囲の組織に発現される。ソルチリンは、トランスゴルジ網、エンドソーム、リソソーム、分泌顆粒の間、および細胞形質膜の間の細胞内タンパク質の運搬に関与する。ソルチリンによって運搬される例示的なタンパク質には、組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)、カベオリン-1、ベータ-セクレターゼ1(BACE1)、上皮増殖因子レセプター(EGFR)、トロポミオシンレセプターキナーゼB(TrkB)、アポリポタンパク質E(APOE)、プログラニュリン、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、グルコース輸送体4型(GLUT4)、低密度リポタンパク質(LDL)-コレステロール、超低密度リポタンパク質(VLDL)、およびプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型(PCSK9)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0014】

本明細書記載の様々な局面の態様では、ソルチリンの分子間二量体化は、分子間二量体化を阻害、防止、または低減する薬剤を細胞に投与するかまたは細胞を薬剤と接触させることによることができる。例えば、薬剤は、ソルチリンポリペプチドにおける分子間ジスルフィド結合の形成を阻害、防止、または低減する。

【0015】

本明細書記載の様々な局面のいくつかの態様では、SEQ ID NO: 1のCys783での分子間ジスルフィドの形成を阻害することによって、ソルチリンの分子間二量体化が阻害される。

【0016】

ソルチリンの二量体化を阻害することが可能な薬剤はまた、本明細書において「ソルチリン阻害剤」または「阻害剤」とも称される。非限定的に、阻害剤は、小分子、核酸、ポリペプチド、薬物、イオン、有機または無機小分子、サッカリン、オリゴ糖、多糖、生体高分子、例えば、ペプチド、タンパク質、ならびにペプチド類似体および誘導体；ペプチド模倣薬；抗体およびその抗原結合性フラグメント；核酸；核酸類似体および誘導体；細菌、植物、真菌、または動物細胞などの生物学的材料から作られた抽出物；動物組織；天然または合成組成物；ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されることができる。

【0017】

本明細書開示の様々な局面のいくつかの態様では、阻害剤はペプチドである。本明細書に使用される「タンパク質」および「ペプチド」という用語は、隣接残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合により他方とつながった一連のアミノ酸残基を呼ぶために本明細書において互換的に使用される。本明細書において互換的に使用される「タンパク質」および「ペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能にかかわらず、修飾アミノ酸（例えば、リン酸化、糖化など）およびアミノ酸類似体を含めたアミノ酸を指す。「タンパク質」は、比較的大きなポリペプチドに関連して使用されることが多く、「ペプチド」は、小さなポリペプチドに関連して使用されることが多いものの、当技術分野におけるこれらの用語の使用は、重複し、様々である。本明細書に使用される「ペプチド」という用語は、特に断らない限り、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質およびタンパク質のフラグメントを指す。「タンパク質」および「ペプチド」という用語は、遺伝子産物およびそのフラグメントを指す場合、本明細書において互換的に使用される。したがって、例示的なペプチドまたはタンパク質には、遺伝子産物、天然タンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、フラグメントおよび他の等価物、前記の変種、フラグメント、および類似体が含まれる。

【0018】

本明細書開示の様々な局面のいくつかの態様では、阻害剤は、ソルチリン由来プロペプチドである。本明細書に使用される「プロペプチド」という用語は、生物学的に活性になるために切断部位などの翻訳後修飾を含むペプチドまたはタンパク質の前駆体であるペプチドを指す。いくつかの態様では、プロペプチドは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む。一態様では、プロペプチドは、SEQ ID NO: 2の少なくとも1つのアミノ酸置換または保存的置換を含む。別の態様では、ソルチリン由来プロペプチドは、アミド化、アセチル化、環化、リン酸化、グリコシル化、ニトロシル化、メチル化、脂質化、またはPEG化されている。別の態様では、ペプチドは、少なくとも1つのDアミノ酸、ベータアミノ酸または修飾ペプチド結合を含む。

【0019】

ポリペプチドを記載する場合の「保存的置換」という用語は、ポリペプチドの活性を実質的に変更しないポリペプチドのアミノ酸組成の変化を指し、例えば、保存的置換は、アミノ酸残基を、類似の化学特性を有する異なるアミノ酸残基に置換することを指す。保存的アミノ酸置換は、イソロイシンまたはバリンによるロイシン、グルタミン酸塩によるアスパラギン酸塩、またはセリンによるトレオニンの置き換えを含む。「保存的アミノ酸置換」は、イソロイシンまたはバリンによるロイシン、グルタミン酸塩によるアスパラギン酸塩、またはセリンによるトレオニンの置き換えのように、あるアミノ酸を、類似の構造および／または化学特性を有する別のアミノ酸により置き換えることに起因する。したがって、特定のアミノ酸配列の「保存的置換」は、ポリペプチドに重要ではないアミノ酸の置換、または重要なアミノ酸の置換であっても活性を実質的には変更しないような類似の

特性（例えば、酸性、塩基性、正性または負性荷電、極性または非極性など）を有する他のアミノ酸によるアミノ酸の置換を指す。機能的に類似のアミノ酸を提供している保存的置換の表は、当技術分野において周知である。例えば、以下の6つのグループは相互に保存的置換であるアミノ酸をそれぞれ含有する：1) アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）；2) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3) アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4) アルギニン（R）、リジン（K）；5) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；および6) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）。（Creighton, *Proteins*, W. H. Freeman and Company (1984)も参照されたい）。加えて、コードされる配列中の単一のアミノ酸または少数のアミノ酸を変更、付加または欠失させる個別の置換、欠失または付加も「保存的置換」である。挿入または欠失は、典型的には約1～5個のアミノ酸の範囲内である。

10

【0020】

本明細書に開示する様々な局面のいくつかの態様では、インヒビターは小分子である。本明細書に使用されるように、用語「小分子」は、「天然物様」である化合物を表しうるが、しかし、用語「小分子」は、「天然物様」化合物に限定されない。むしろ小分子は、典型的には、それが数個の炭素-炭素結合を含み、5000ダルトン（5kDa）未満、好ましくは3kDa未満、なおより好ましくは2kDa未満、最も好ましくは1kDa未満の分子量を有することで特徴づけられる。ある場合には、小分子が700ダルトン以下の分子量を有することが好ましい。

【0021】

本明細書に開示する様々な局面のいくつかの態様では、インヒビターは、核酸分子またはその類似体もしくは誘導体である。本明細書に使用されるように、用語「核酸」もしくは「オリゴヌクレオチド」または本明細書における文法的等価物は、一緒に共有結合している少なくとも2個のヌクレオチド（その類似体または誘導体を含む）を意味する。例示的なオリゴヌクレオチドには、非限定的に、一本鎖および二本鎖siRNAならびに他のRNA干渉試薬（RNAi剤またはiRNA剤）、shRNA（短鎖ヘアピン型RNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、リボザイム、およびマイクロRNA（miRNA）が含まれる。核酸は、一本鎖または二本鎖でありうる。核酸は、DNA、RNA、または核酸がデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの任意の組み合わせ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシンおよびグアニンの任意の組み合わせを含有するハイブリッドでありうる。核酸は、1つまたは複数の主鎖改変、例えばホスホロアミダート（Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993)およびその中の参考文献； Letsinger, J. *Org. Chem.* 35:3800 (1970))、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、O-メチルホスホロアミダイト結合（Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press参照）、またはペプチド核酸結合（Egholm, J. *Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992)；およびNielsen, *Nature*, 365:566 (1993)を参照されたい。これら全ての内容は、参照により本明細書に組み入れられる）を含みうる。核酸は、また、ヌクレオチドの核酸塩基および／または糖部分に改変を含みうる。糖部分での例示的な糖改変には、2'-OHからハロゲン（例えばフルオロ）、O-メチル、O-メトキシエチル、NH₂、SHおよびS-メチルへの置換が含まれる。いくつかの態様では、核酸はペプチド核酸（PNA）である。理論に縛られることを望まないが、核酸インヒビターは、複合体の構成要素をコードする核酸の発現または量を低下、阻害、または低減することができる。任意のターゲット配列にターゲットニングされた核酸インヒビター、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、リボザイム、アプタマーなどを産生させるためのハイスループットスクリーニングアッセイを含む計算法および実験法は、当技術分野において公知であり、当業者に利用可能である。

20

30

40

【0022】

本明細書に使用されるように、用語「オリゴヌクレオチド」は、典型的に20以下の塩基を有する短い核酸ポリマーを指す。

50

【0023】

本明細書に使用される用語「shRNA」は、RNAiおよび／またはsiRNA種として機能する短鎖ヘアピン型RNAを表すが、shRNA種は、増加した安定性のために2本鎖ヘアピン様構造であることが異なる。本明細書に使用される用語「RNAi」は、干渉性RNAを表すか、またはRNA干渉分子は、核酸分子またはその類似体、例えば遺伝子発現を阻害するRNAに基づく分子である。RNAiは、選択的転写後遺伝子サイレンシングの手段を表す。RNAiは、特異的mRNAの破壊を招くことができ、またはmRNAなどのRNAのプロセッシングもしくは翻訳を阻止する。

【0024】

いくつかの態様では、インヒビターは短鎖干渉RNA (siRNA) である。本明細書において「低分子干渉RNA」とも呼ばれる用語「短鎖干渉RNA」(siRNA) は、ターゲット遺伝子の発現を、例えばRNAiによって阻害するように機能する薬剤として定義される。siRNAは、化学合成することができ、それはインビトロ転写によって産生させることができるか、または、宿主細胞内で産生させることができる。siRNA分子は、また、不活性化されるべきメッセージに一方の鎖が同一である二本鎖RNAの切断によって生成させることができる。用語「siRNA」は、RNA干渉(RNAi) 経路を誘導する低分子干渉RNA二本鎖を表す。これらの分子は、長さが多様な場合があり(概して塩基対18~30個)、アンチセンス鎖に、それらのターゲットmRNAに対する様々な程度の相補性を含みうる。全てではなく、いくつかのsiRNAは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'または3'末端に不對のオーバーハング塩基を有する。用語「siRNA」には、2つの別々の鎖の二本鎖および二本鎖領域を含むヘアピン構造を形成できる一本鎖が含まれる。

【0025】

いくつかの態様では、インヒビターは、ソルチリンをコードする核酸、例えばSORT1のアンチセンス配列の部分(例えば10~50、12~40、15~30、16~25、または18~22個の連続ヌクレオチド)を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNA分子である。ヒトソルチリントタンパク質の核酸配列は、NCBI参照遺伝子ID: 6272、NCBI参照配列: NG_028280.1およびSEQ ID NO: 3によってアクセスすることができる。いくつかの態様では、ソルチリンをコードする核酸はSORT mRNAである。

【0026】

いくつかの態様では、インヒビターは、アプタマーである。本明細書に使用されるように、用語「アプタマー」は、選択された非オリゴヌクレオチド分子または分子群を特異的に認識可能な、一本鎖、部分的な一本鎖、部分的二本鎖または二本鎖ヌクレオチド配列を意味する。したがって、アプタマーは、対象となる特定の分子に高い親和性および特異性で結合する核酸またはペプチド分子である(Tuerk and Gold, Science 249:505 (1990); Ellington and Szostak, Nature 346:818 (1990))。大型タンパク質から小型有機分子までの多数の異なる実体と結合するDNAまたはRNAアプタマーが、首尾よく産生されている。Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1:10-16 (1997), Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9:324-9(1999) およびHermann and Patel, Science 287:820-5 (2000)を参照。アプタマーは、RNAまたはDNAに基づきうる。分子に結合するためのアプタマーを選択するための方法は、当技術分野において広く公知であり、当業者に容易に利用可能である。一般に、アプタマーは、小分子、タンパク質、核酸などの様々な分子ターゲット、さらには細胞、組織および生物に結合するために、インビトロ選択のラウンドを繰り返すこと、すなわち言い換えるとSELEX(試験管内進化法)によって操作される。アプタマーは、合成、組み換え、および精製方法を含む任意の公知の方法によって調製することができる。さらに、より完全に本明細書に説明される用語「アプタマー」には、具体的に、所与のターゲットに対する2つ以上の公知のアプタマーを比較することから得られたコンセンサス配列を含む「二次アプタマー」が含まれる。アプタマーには、非限定的に、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、改変ヌクレオチド、ならびに主鎖改変、枝分かれ部位および非ヌクレオチド性残基、基

または架橋を含むヌクレオチドを含む、定義された配列セグメントおよび配列が含まれる。いくつかの態様では、アプタマーは、ワトソン-クリック塩基対形成または三重鎖形成以外のメカニズムにより非オリゴヌクレオチド分子または分子群を認識する。

【0027】

本明細書に使用されるように、用語「多糖」は、グリコシド結合によって互いに結合している多数の単糖分子から分子になる高分子炭水化物を表す。多糖という用語は、オリゴ糖を包含するためのものでもある。多糖は、ホモ多糖またはヘテロ多糖でありうる。ホモ多糖は1種類だけのユニットを含む一方、ヘテロ多糖は、異なる種類のモノマーユニットからなる。

【0028】

いくつかの態様では、インヒビターは、抗体またはそのフラグメントである。用語「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖Fv抗体フラグメント、Fabフラグメント、およびF(ab)₂フラグメントが含まれる。ソルチリン1に対して特異的結合親和性を有する抗体は、標準法により産生させることができる。代替として、抗体は、例えばR&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnから市販されうる。

【0029】

本明細書に使用されるように、用語「抗体」は、無傷抗体、または特異的結合を無傷抗体と競合する、その結合フラグメントを含み、それらには、キメラ、ヒト化、完全ヒト、および二重特異性抗体が含まれる。いくつかの態様では、結合フラグメントは、組み換えDNA技法によって産生される。追加的な態様では、結合フラグメントは、無傷抗体の酵素的または化学的切断によって産生される。結合フラグメントには、非限定的に、Fab、Fab', F(ab')₂、Fv、および単鎖抗体が含まれる。

【0030】

具体的に注記しない限り、抗体に関して本明細書において使用されるように、「そのフラグメント」は、免疫特異的フラグメント、すなわち抗原特異的または抗原結合フラグメントを表す。

【0031】

抗原内に含有される特定のエピトープに対する抗体の均一集団であるモノクローナル抗体は、標準的なハイブリドーマ技法を用いて調製することができる。特に、モノクローナル抗体は、Kohler, G. et al., Nature, 1975, 256:495によって記載されたような連続培養細胞系、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kosbor et al., Immunology Today, 1983, 4:72; Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:2026)、およびEBV-ハイブリドーマ技法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1983, pp. 77-96) により抗体分子の産生を提供する任意の技法によって得ることができる。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、およびそれらの任意のサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスでありうる。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養することができる。

【0032】

ポリクローナル抗体は、特定の抗原に特異的な抗体分子の不均一集団であって、免疫処置された動物の血清中に含有される不均一集団である。ポリクローナル抗体は、周知の方法を用いて産生される。キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するキメラ抗体などの、異なる部分が異なる動物種由来である分子である。キメラ抗体は、標準技法により産生させることができる。複合体の構成要素に対して特異的結合親和性を有する抗体フラグメントは、公知の技法によって生成させることができる。例えば、そのようなフラグメントには、非限定的に、抗体分子のペプシン消化によって産生されうるF(ab')₂フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成されうるFabフラグメントが含まれる。または、Fab発現ライブラリーを構築することができる。例えば、Huse et al., 1989, Science, 246: 1275を参照されたい。単鎖Fv抗体フラグメントは、アミノ酸架橋 (例えばアミノ酸

10

20

30

40

50

15～18個) を経由してFv領域の重鎖および軽鎖フラグメントを連結して単鎖ポリペプチドを生じさせることによって形成される。単鎖Fv抗体フラグメントは、標準技法により産生させることができる。例えば、米国特許第4,946,778号を参照。

【0033】

いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス性である。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントはウサギ由来である。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントはラット由来である。他の態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントはヒト性である。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、組み換え、操作、ヒト化および／またはキメラである。

【0034】

いくつかの態様では、本発明の方法に使用するための抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、ターゲット分子（例えばソルチリン1）の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合し、すなわち、それが無関係またはランダムなエピトープに結合するよりも容易にそのようなエピトープに結合し；ソルチリンの少なくとも1つのエピトープに優先的に結合し、すなわち、それが関係する、類似の、相同な、または類縁のエピトープに結合するよりも容易にそのようなエピトープに結合し；それ自体が、ターゲット分子（例えばソルチリン）のエピトープに特異的または優先的に結合する参照抗体の結合を競合的に阻害し；あるいはターゲット分子（例えばソルチリン）の少なくとも1つのエピトープに解離定数Kd約 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、約 10^{-2}M 、約 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、約 10^{-3}M 、約 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、約 10^{-4}M 、約 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、約 10^{-5}M 、約 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、約 10^{-6}M 、約 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、約 10^{-7}M 、約 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、約 10^{-8}M 、約 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、約 10^{-9}M 、約 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、約 10^{-10}M 、約 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、約 10^{-11}M 、約 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、約 10^{-12}M 、約 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、約 10^{-13}M 、約 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、約 10^{-14}M 、約 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、または約 10^{-15}M によって特徴づけられる親和性で結合する。

【0035】

いくつかの態様では、抗体またはそのフラグメントは、マウスソルチリンポリペプチドまたはそのフラグメントよりも優先的にヒトソルチリンポリペプチドまたはそのフラグメントに結合する。

【0036】

抗体結合解離定数に関連して使用されるように、用語「約」は、抗体親和性を測定するために利用される方法に固有の変動度を見込んでいる。例えば、使用される計装の精度レベル、測定される試料数に基づく標準誤差、および丸め誤差に応じて、用語「約 10^{-2}M 」は、例えば $0.05 \text{M} \sim 0.005 \text{M}$ を含みうる。

【0037】

いくつかの態様では、本明細書で提供する方法において使用するための抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、約 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、約 10^{-2}sec^{-1} 、約 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、約 10^{-3}sec^{-1} 、約 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、約 10^{-4}sec^{-1} 、約 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、約 10^{-4}sec^{-1} 、約 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 、約 10^{-5}sec^{-1} 、約 $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、約 10^{-6}sec^{-1} 、約 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 、または約 10^{-7}sec^{-1} 以下の解離速度 ($k(\text{off})$) でソルチリンポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変異体と結合する。

【0038】

他の態様では、本明細書で提供する方法において使用するための抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、約 $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、約 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、約 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、約 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、約 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、または約 $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上の結合速度 ($k(\text{on})$) でソルチリンポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変異体と結合する。本明細書で提供する方法において使用するための抗体の結合親和性および解離速度は、当技術分野において公知の任意の方法によって決定することができる。例えば、結合親和性は、競合ELISA、RIA、BIAcore（商標）、またはKINEXA（商標）技法によって測定することができる。解離速度もまた、BIAcore（商標）またはKINEXA（商標）技法によって

10

20

30

40

50

測定することができる。

【0039】

いくつかの態様では、本明細書で提供する方法において使用するための抗体または抗原結合フラグメントは、ソルチリンへの第2の分子の結合を調節する。いくつかの態様では、調節は、ソルチリンへの第2の分子の結合の強化である。いくつかの態様では、調節は、ソルチリンへの第2の分子の結合の阻害である。そのような阻害のIC50は、当技術分野において公知の任意の方法、例えばELISA、RIA、または機能的拮抗によって測定することができる。いくつかの態様では、IC50は、0.1から500nMの間である。いくつかの態様では、IC50は、10から400nMの間である。なお他の態様では、抗体またはその部分は、60nMから400nMの間のIC50を有する。

10

【0040】

本発明の方法に使用するための抗体は、適切な宿主（例えばヒト、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、爬虫類、魚類、両生類を含む脊椎動物、および鳥類、爬虫類および魚類の卵の中）の免疫処置によって生成させることができる。そのような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルでありうる。いくつかの態様では、宿主は、免疫原性ソルチリンで免疫処置される。他の態様では、宿主は、無傷細胞または破壊細胞の細胞膜に結合したソルチリンで免疫処置され、本発明の方法に使用するための抗体が、ソルチリンへの結合によって確認される。

【0041】

いくつかの態様では、ソルチリン抗原は、免疫応答を刺激するためのアジュバントと共に投与される。アジュバントは、多くの場合に、抗原に対する免疫応答を誘発するために、抗原に追加して投与する必要がある。これらのアジュバントは、通常、非特異的炎症を促進し、免疫処置部位に単核食細胞を動員する不溶性または非分解性物質である。アジュバントの例には、非限定的に、フロイントアジュバント、RIBI（ムラミルジペプチド）、ISCOM（免疫賦活複合体）またはそのフラグメントが含まれる。

20

【0042】

抗体を調製するための方法の総説については、例えば、Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); Yelton, D. E. et al., *Ann. Rev. of Biochem.* 50: 657-80. (1981); および Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley & Sons) (1989)を参照されたい。免疫原性ソルチリンポリペプチドとの免疫反応性の決定は、例えばイムノブロットアッセイおよびELISAを含む、当技術分野において周知の任意のいくつかの方法によって行うことができる。

30

【0043】

本明細書で提供する方法に使用するための抗ソルチリン抗体は、任意のアイソタイプでありうる。任意の所望のアイソタイプの抗体は、クラススイッチによって産生させることができる。クラススイッチのために、C_LまたはC_Hをコードする任意のヌクレオチド配列を含まず、V_LまたはV_Hをコードする核酸が、当技術分野において周知の方法を用いて単離される。次に、V_LまたはV_Hをコードする核酸が、所望のクラスの免疫グロブリン分子由来のC_LまたはC_Hをコードするヌクレオチド配列に機能的に連結される。これは、上記のように、C_LまたはC_H鎖を含むベクターまたは核酸を使用して達成することができる。例えば、本来IgMであった本明細書で提供する方法に使用するための抗ソルチリン抗体を、IgGにクラススイッチすることができる。さらに、クラススイッチは、あるIgGサブクラスを別のサブクラス、例えばIgG1からIgG2に変換するために用いることができる。

40

【0044】

抗ソルチリン抗体のクラスおよびサブクラスは、当技術分野において公知の任意の方法によって決定することができる。一般に、抗体のクラスおよびサブクラスは、抗体の特定のクラスおよびサブクラスに特異的な抗体を使用して決定することができる。そのような抗体は市販されている。クラスおよびサブクラスは、ELISA、ウエスタンブロット、および他の技法によって決定することができる。または、クラスおよびサブクラスは、抗体の重鎖および／または軽鎖の定常ドメインの全てまたは一部を配列決定し、それらのアミノ

50

酸配列を、多様な免疫グロブリンクラスおよびサブクラスの公知のアミノ酸配列と比較し、その抗体のクラスおよびサブクラスを決定することによって決定することができる。

【0045】

ある態様では、本明細書において開示された処置方法に使用するためのソルチリン抗体またはその免疫特異性フラグメントの可変領域および定常領域の両方は、完全にヒト性である。完全ヒト抗体は、当技術分野において公知の技法および本明細書で提供する技法を用いて調製することができる。例えば、抗原誘発に応答してそのような抗体を産生するように改変されているが、内因性遺伝子座は無効にされたトランスジェニック動物に抗原を投与することによって、特異的抗原に対する完全ヒト抗体を調製することができる。そのような抗体を調製するために使用することができる例示的な技法は、米国特許第6,150,584号；同第6,458,592号；同第6,420,140号に記載されている。他の技法は、当技術分野において公知である。完全ヒト抗体は、同様に、本明細書の他の箇所により詳細に説明されるような様々なディスプレイ技法、例えばファージディスプレイまたは他のウイルスディスプレイ系によって産生させることができる。

【0046】

本明細書に開示された処置方法に使用するための抗体またはそのフラグメントには、例えば抗体がそのコグネイトエピトープに特異的に結合するのを、共有結合が阻止しないように、抗体に任意の種類の分子を共有結合させることによって改変された誘導体が含まれる。例えば、非限定的に、抗体誘導体には、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、または公知の保護／ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質との連結によって改変された抗体が含まれる。多数の化学的改変の任意のものは、非限定的に特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化などを含む公知の技法によって実施することができる。追加的に、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有しうる。

【0047】

いくつかの態様では、本明細書において開示される方法に使用するための抗体またはそのフラグメントは、処置されるべき哺乳動物、例えばヒトにおいて有害な免疫応答を誘発しないであろう。一態様では、本明細書に開示の方法に使用するための抗体またはそのフラグメントは、それらの免疫原性を低減するために当技術分野において認識されている技法を用いて改変することができる。例えば、抗体は、ヒト化、霊長類化、脱免疫化 (deimmunized) されている場合があり、またはキメラ抗体を調製することができる。これらの種類の抗体は、親抗体の抗原結合性を保持または実質的に保持するが、ヒトにおいて免疫原性がより低い、非ヒト抗体、典型的にはマウスまたは霊長類抗体由来である。これは、(a) ヒト定常領域上に非ヒト可変ドメイン全体をグラフトしてキメラ抗体を生成させる段階；(b) 重要なフレームワーク残基を保持して、もしくは保持せずにヒトフレームワークおよび定常領域内に1つもしくは複数の非ヒト相補性決定領域 (CDR) の少なくとも部分をグラフトする段階；または(c) 非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によってそれらをヒト様セクションで「覆い隠す」段階を含む様々な方法によって達成することができる。そのような方法は、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994)、ならびに米国特許第5,585,089号；同第5,693,761号；同第5,693,762号；および同第6,190,370号に開示されており、それらの全ては、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0048】

脱免疫もまた、抗体の免疫原性を低下させるために使用することができる。本明細書に使用されるように、用語「脱免疫」には、抗体を変化させてT細胞エピトープを改変することが含まれる (例えば国際公開公報第9852976A1号、国際公開公報第0034317A2号参照)。例えば、出発抗体からVHおよびVL配列が、そして各V領域から、配列内の相補性決定領域 (CDR) および他の主要残基に関してエピトープの位置を示すヒトT細胞エピト

ープ「マップ」が分析される。最終抗体の活性を変化させるリスクが低い代替アミノ酸置換を同定するために、T細胞エピトープマップから個別のT細胞エピトープが分析される。アミノ酸置換の組み合わせを含む一連の代替VHおよびVL配列が設計され、これらの配列は、本明細書に開示される方法に使用するために、続いて一連の結合ポリペプチド、例えば抗ソルチリン抗体またはその免疫特異性フラグメントに組み入れられ、次にそれらは機能について試験される。典型的には、12種から24種の間の変異型抗体が生成され、試験される。次に、改変V領域およびヒトC領域を含む完全重鎖および軽鎖遺伝子が発現ベクター中にクローニングされ、その結果生じたプラスミドが全抗体の産生のために細胞系に導入される。次に、抗体は、適切な生化学アッセイおよび生物学的アッセイで比較され、最適な変異体が同定される。

10

【0049】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ法を含む、当技術分野において公知の多様な方法によって調製することができる。例えば、米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号；ならびにPCT出願である国際公開公報第98/46645号、国際公開公報第98/50433号、国際公開公報第98/24893号、国際公開公報第98/16654号、国際公開公報第96/34096号、国際公開公報第96/33735号、および国際公開公報第91/10741号を参照されたい。これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0050】

20

ヒト抗体は、また、機能的内因性免疫グロブリンを発現する能力がないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを使用して産生させることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、マウス胚性幹細胞に相同組み換えによってランダムに導入することができる。代替として、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域 (diversity region) をマウス胚性幹細胞に導入することができる。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別々または同時に相同組み換えにより非機能性にするすることができる。特に、JH領域のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生を防止する。改変された胚性幹細胞は、増大され、胚盤胞中にマイクロインジェクションされて、キメラマウスが産生される。次に、キメラマウスが繁殖され、ヒト抗体を発現するホモ接合型子孫が産生される。選択された抗原、例えば所望のターゲットポリペプチドの全てまたは一部が、通常の様式でトランスジェニックマウスに免疫処置される。抗原に対するモノクローナル抗体は、免疫処置されたトランスジェニックマウスから、従来のハイブリドーマ技法を用いて得ることができる。トランスジェニックマウスの内部に有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化中に再配列し、続いてクラススイッチおよび体細胞突然変異を受ける。したがって、そのような技法を用いて、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生させることが可能である。ヒト抗体を産生させるためのこの技法の概要については、Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生させるためのこの技法の詳細な考察ならびにそのような抗体を産生させるためのプロトコールについては、例えばPCT公報である国際公開公報第98/24893号；国際公開公報第96/34096号；国際公開公報第96/33735号；米国特許第5,413,923号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,569,825号；同第5,661,016号；同第5,545,806号；同第5,814,318号；および同第5,939,598号を参照されたい。これらは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0051】

40

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド付き選択 (guided selection)」と呼ばれる技法を用いて生成させることができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体が、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドするために使用される。(Jespers et al., *Bio/Technology* 12:899-903 (1988))。米国特許第5,565,332号も参照されたい。[0162]別の態様では、所

50

望のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて容易に単離および配列決定することができる（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力があるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）。単離およびサブクロニングされたハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役立つ。ひとたび単離されると、DNAは、発現ベクター内に配置することができ、それは次に、その他の場合に免疫グロブリンを産生しない、大腸菌（*E. coli*）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞または骨髓腫細胞などの原核または真核宿主細胞にトランスフェクトされる。より詳細には、単離されたDNA（本明細書で提供するように合成されたものでありうる）は、参照により本明細書に組み入れられる1995年1月25日出願の、Newmanら、米国特許第5,658,570号に記載されたような製造抗体についての定常領域および可変領域配列をクローニングするために使用することができる。本質的に、これは、選択された細胞からRNAを抽出すること、cDNAに変換すること、およびIg特異的プライマーを使用してPCRによって増幅することを伴う。この目的のために適切なプライマーは、また、米国特許第5,658,570号に記載されている。以下、より詳細に論じるように、所望の抗体を発現している形質転換細胞を比較的大量に成長させて、免疫グロブリンの臨床的および商業的供給を提供することができる。

【0052】

抗ソルチリン抗体は、Abcam（Cambridge, MA, USA）またはR&D Systems（Minneapolis, MN, USA）から購入することができる。さらに、ソルチリン1に特異的に結合する能力があるリガンドの同定および設計のための方法は、例えば、その内容が参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2011/1060439号に記載されている。

【0053】

ソルチリンの二量体化を阻害するために、薬剤、すなわち阻害剤を、細胞に投与するか、または細胞と接触させることができる。非限定的に、薬剤は、例えば、インビトロもしくはエクスピボで細胞培養物中の細胞に投与するかまたは細胞と接触させることができる、または薬剤は、例えば、インビボで対象に投与することができる。いくつかの態様では、薬剤は、ソルチリンの分子間二量体化を阻害するために対象に投与することができる。

【0054】

細胞を接触させることに関連して本明細書に使用される「接触させること」または「接触」という用語は、表示された阻害剤を含む適切な培養培地に細胞を供することを含む。細胞がインビボの場合、「接触させること」または「接触」は、阻害剤が細胞とインビボで接触するように適切な投与経路を介して薬学的組成物中の阻害剤を対象に投与することを含む。

【0055】

「エクスピボ」という用語は、生きた生物から取り出され、生物の外側（例えば、試験管中）で培養された細胞を指す。エクスピボ方法が採用されるならば、細胞または組織は、当技術分野において周知の標準的なプロトコールに従って体外に取り出し、維持されることができる。組成物は、当業者に公知かまたは利用可能な方法により、細胞内に導入することができる。例えば、細胞を培養物中に保つことができ、阻害剤を培養培地に添加することができる。次に、処理された細胞を、細胞または組織型について標準的な方法により、対象に注入する（例えば、薬学的に許容される担体中で）または同位置に移植して戻すことができる。様々な細胞を対象に移植または注入するための標準的な方法は、公知である。

【0056】

本明細書に提供されるような阻害剤は、薬学的に許容される担体中に入れて投与ことができ、当技術分野において周知の様々なメカニズムによって対象の細胞にインビボおよび／またはエクスピボで送達することができる。

【0057】

一般的に、任意の量の薬剤を細胞と接触させることができる。いくつかの態様では、薬剤は、約0.1nM～約1000mMの範囲の濃度で接触される。好ましくは、化合物は、約0.1

10

20

30

40

50

μM ～約 $10\mu\text{M}$ の範囲で接触される。追加的に、化合物を細胞によって取り込ませ、その標的と相互作用させるために十分な時間、化合物は、細胞と接触することができる。

【0058】

本明細書において開示されるような細胞は、細胞培養物中の阻害剤と、例えばインビトロもしくはエクスピボで接触させることができ、または阻害剤は、対象に、例えば、インビボで投与することができる。いくつかの態様では、阻害剤は、石灰化を減少、阻害、低減、および／または処置するために、対象に投与することができる。いくつかの態様では、細胞は、白血球、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、T細胞、またはB細胞である。いくつかの態様では、細胞は、弁間質細胞である。いくつかの態様では、細胞は、骨芽細胞である。いくつかの態様では、細胞は、破骨細胞である。いくつかの態様では、細胞は、間葉系幹細胞である。いくつかの態様では、細胞は、内皮細胞である。いくつかの態様では、細胞は、膵臓 β 、 α 、 γ 、または膵ポリペプチド(PP)細胞である。いくつかの態様では、細胞は、肝細胞である。いくつかの態様では、細胞は、腎糸球体壁細胞、有足細胞、または近位尿細管刷子縁細胞である。いくつかの態様では、細胞は、脂肪細胞である。いくつかの態様では、細胞は、マクロファージである。いくつかの態様では、細胞は、単球である。いくつかの態様では、細胞は、樹状細胞である。いくつかの態様では、細胞は、リンパ球である。いくつかの態様では、細胞は、血管平滑筋細胞である。

10

【0059】

いくつかの態様では、阻害剤は、外科的および非外科的処置と共に対象に投与することができる。いくつかの態様では、本明細書に開示される方法は、透析と共に実行することができる。

20

【0060】

本明細書に開示されるように、ソルチリンの分子間二量体化を阻害することは、EV関連疾患を処置するために有益であることができる。したがって、別の局面では、対象におけるEV関連疾患を処置するための方法が、本明細書において提供される。一般的に、本方法は、それを必要とする対象におけるソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害すること、例えば、ソルチリンのCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合の形成を阻害することを含む。いくつかの態様では、本方法は、それを必要とする対象に薬剤を投与することを含み、その際、薬剤は、分子間二量体化を阻害する。いくつかの態様では、対象に投与される薬剤は、ソルチリンプロペプチドである。

30

【0061】

本明細書に使用される「細胞外小胞関連疾患」または「EV関連疾患」は、対象において診断された、疑われる、またはまだ発症していない疾患であって、疾患の少なくとも1つの症状および／または特徴(例えば石灰化、炎症、小胞蓄積、疼痛、疲労、息切れなど)をもたらす、異常な細胞外小胞輸送、細胞外小胞の石灰化、または細胞外小胞の誤った局在化によって起こる疾患を指す。EV関連疾患は、細胞から細胞外小胞へのソルチリン、ソルチリン二量体、または多量体の輸送によって起こり得る。本明細書において提供されるEV関連疾患は、可溶性ソルチリンの単量体および二量体の様々な発現を有する場合があります、これらの疾患についての血清中の単量体／二量体比は、EV関連疾患の診断、予防、および処置のために使用することができる。

40

【0062】

細胞外小胞は、様々な疾患の生理および病理に寄与することが当技術分野において公知である(Krohn and Aikawa et al. Journal of Physiology, 2016を参照されたい)。さらに、ソルチリンは、大動脈石灰化を有する対象の血清レベルにおいて上昇していることが見出されており、ゲノムワイド関連研究は、ソルチリンが心血管石灰化に関連することを示した(Goettsch, JCI, 2016; およびGoettsch et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2018を参照されたい)。したがって、細胞外小胞によるソルチリンの二量体化および輸送は、本明細書において提供されるEV関連疾患の特徴である。

【0063】

50

EV関連疾患の非限定的な例には、石灰化大動脈弁疾患、糖尿病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、肺線維症、非アルコール性脂肪性肝疾患、骨粗鬆症、神経変性障害（例えばアルツハイマー病）、強皮症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、高コレステロール血症、がん、関節リウマチ、および肥満が含まれるが、それらに限定されるわけではない。一態様では、糖尿病は、1型糖尿病、2型糖尿病、または若年発症成人型糖尿病である。別の態様では、がんは、肺がんまたは膵臓がんである。いくつかの態様では、EV関連疾患は、急性腎障害（AKI）または慢性腎臓病（CKD）である。

【0064】

EV関連疾患は、細胞外小胞由来微小石灰化によって起こる可能性がある。これらの微小石灰化は、プラーク不安定の一因となる（Goettsch et al. Circ Research, 2013も参照されたい）。例えば大動脈弁の、細胞外小胞微小石灰化の同定は、構造化照明法、ゼータ電位、共焦点顕微鏡法、フーリエ変換型赤外分光法（FTIR）、X線分光法、走査電子顕微鏡法（SEM）、透過型電子顕微鏡法（TEM）、有限要素解析（FEA）、または微小石灰化の様々な段階を同定することができる当技術分野において公知の任意の他の方法によって決定することができる（Hutechnson et al. Nature Materials 2016も参照されたい）。

【0065】

本明細書に使用される「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、霊長類、げっ歯類、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えばアカゲザルが含まれる。げっ歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、スイギュウ、ネコ種、例えば、イエネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、トリ種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚類、例えば、マス、ナマズおよびサケが含まれる。患者または対象には、前記の任意のサブセット、例えば、ヒト、霊長類またはげっ歯類などの1つまたは複数の群または種を除く上記のすべてが含まれる。本明細書に提供される局面のある特定の態様では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「患者」および「対象」という用語は、本明細書において互換的に使用される。

【0066】

いくつかの態様では、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであることができるが、これらの例に限定されるわけではない。ヒト以外の哺乳動物は、障害の動物モデルを表す対象として有利に使用することができる。

【0067】

対象は、有資格の内科医および／または認定された開業医によって最初に診断され得、本明細書に提供される方法による予防的および／または治療的処置のためのレジメンが示唆、推奨、または処方され得る。したがって、いくつかの態様では、本方法は、EV関連疾患（例えば血管石灰化）に対する処置のための対象を選択することを含む。

【0068】

ヒトのアテローム性動脈硬化症、腎不全、高リン血症、糖尿病、加齢性血管石灰化および血管石灰化に関連する他の状態を含むが、それらに限定されるわけではないEV関連疾患の信頼できる指標である動物モデルは、当技術分野において公知である。例えば、血管壁の石灰化の実験モデルは、Yamaguchi et al., Exp. Path. 25: 185-190, 1984に記載されており、その全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0069】

「処置または回復」は、状態の進行または重症度の進行、増悪、または悪化を、後退、緩和、回復、阻害、減速、または停止させることである。いくつかの態様では、少なくとも1つの症状は、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%緩和されるが、100%は緩和されず、すなわち完全な緩和ではない。いくつかの態様では、少なくとも1つの症状が完全に緩和される。

【0070】

「治療剤」または「薬剤」という用語は、当業界において承認されており、対象において局所的または全身的に作用する生物学的、生理学的、または薬理学的活性物質である任意の化学部分を指す。「薬物」とも称される治療剤の例は、the Merck Index、the Physicians Desk Reference、およびThe Pharmacological Basis of Therapeuticsなどの周知の参考文献に記載されており、それらには、非限定的に、医薬；ビタミン；ミネラルサプリメント；疾患もしくは病気の処置、予防、診断、治療もしくは軽減のために使用される物質；身体の構造もしくは機能に影響する物質；または生理学的環境に置かれた後に生物学的に活性もしくはより高い活性になるプロドラッグが含まれる。対象に投与したときに主題組成物から隣接組織または液体中に放出されることが可能な様々な形態の治療剤を使用することができる。例には、ステロイドおよびステロイドのエステル（例えば、エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、アンドロステロン、コレステロール、ノルエチンドロン、ジゴキシゲニン、コール酸、デオキシコール酸、およびケノデオキシコール酸）、ホウ素含有化合物（例えば、カルボラン）、化学療法ヌクレオチド、薬物（例えば、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬）、エンジン（例えば、カリケアミシン、エスペラミシン、ジネミシン、ネオカルジノスタチンクロモフォア、およびケダルシジンクロモフォア）、重金属錯体（例えば、シスプラチン）、ホルモンアンタゴニスト（例えば、タモキシフェン）、非特異的（非抗体）タンパク質（例えば、糖オリゴマー）、オリゴヌクレオチド（例えば、標的核酸配列（例えば、mRNA配列）に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド）、ペプチド、タンパク質、抗体、光力学剤（例えば、ローダミン123）、放射性核種（例えば、I-131、Re-186、Re-188、Y-90、Bi-212、At-211、Sr-89、Ho-166、Sm-153、Cu-67およびCu-64）、毒素（例えば、リシン）、および転写ベースの医薬品が含まれる。

10

20

【0071】

EV関連疾患に関連して本明細書に使用される「阻害すること」、「減少させること」、「予防すること」および「処置すること」という用語は、細胞外小胞の形成、移行、および／または細胞外マトリックスのヒドロキシアパタイト結晶沈着物の成長もしくは沈着を防止、遅延、または後退させることを意味することが意図される。非限定的に、障害の重症度の改善には、疾患症状の後退のみならず、疾患の進行の減速が含まれる。

【0072】

例えば、SEQ ID NO：1のCys783での分子間ジスルフィド結合の形成を阻害すること。Cys783は、配列内で太字として下線付きで表示される（例えばC）。ソルチリンの二量体化は、薬剤、例えばソルチリン由来プロペプチドにより阻害することができる。

30

【0073】

図8は、ソルチリンの切断および細胞外小胞への輸送の分子メカニズムの概略図を示す。具体的には、概略図は、二量体化を促進するソルチリンからのプロペプチドの解離を強調している。Cys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合による二量体化は、細胞外小胞への二量体化ソルチリンの運搬を容易にする。さらに、Cys⁷⁸³は、二量体化およびパルミトイル化と関連する。

【0074】

パルミトイル化ソルチリンは、ゴルジ装置に運搬し戻される。図8によると、細胞内のソルチリン輸送段階は、以下を含む：（1）プロペプチドが、ソルチリンから切断される；（2）プロペプチドが、異なる位置でソルチリンに結合し、ソルチリンがゴルジ装置を通して運搬される；（3）ソルチリンが、10CCドメインおよびCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成する；（4）ソルチリンが、エンドサイトーシスによりエンドソームに組み入れられる；（5）パルミトイル化ソルチリン単量体が、レトロマーとの相互作用によりゴルジに運搬され戻される；（6）ソルチリンホモ二量体が、細胞外小胞（微小胞および／またはエキソソーム）により分泌される；ならびに（4）ソルチリンホモ二量体が、可溶性ソルチリンとして脱落および分泌される。したがって、本明細書に提供される試験薬剤は、図8に概略されるようにソルチリンの二量体化または輸送の

40

50

任意の部分を阻害することができる。

【0075】

一局面では、それを必要とする対象に、薬剤を投与することを含む、対象におけるソルチリンの分子間二量体化を阻害するための方法が、本明細書において提供される。いくつかの態様では、ソルチリンの阻害は、それを必要とする対象に、ペプチドを投与することを含む。

【0076】

本明細書において使用されるように、用語「投与する」は、所望の部位での薬学的活性薬剤の少なくとも部分的局在化を招く方法または経路による対象内への組成物の配置を表す。インヒビターは、任意の適切な仕方で投与することができる。投与の仕方は、例えば、局所処置または全身処置が望ましいかどうか、および処置されるべき領域に基づき選ぶことができる。したがって、組成物は、対象における有効な処置を招く任意の適切な経路によって投与することができ、すなわち投与は、薬学的活性薬剤の少なくとも一部が送達される、対象における所望の位置への送達を招く。例示的な投与様式には、非限定的に、移植、注射、注入、点滴、植え込み術、または経口摂取が含まれる。「注射」には、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、クモ膜下腔内、脳室内、関節包内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、経気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内の注射および注入が含まれる。

【0077】

いくつかの態様では、本明細書で提供する組成物は、対象に植え込むことができる。本明細書に使用されるように、用語「植え込まれた」および文法的に関係する用語は、対象における特定の場所に、一時的、半永久的、または永久的のいずれかで組成物を配置することを表す。この用語は、特定の位置または部位に組成物を永久に固定することを必要としない。

【0078】

投与または処置の期間および頻度に関して、処置が治療的利益を提供するときを決定するため、および薬用量を増加させるか、それとも低下させるか、投与頻度を増加させるか、それとも低下させるか、処置を中断するか、処置を再開するか、それとも処置方式に他の変更を加えるかどうかを決定するために、熟練の臨床医が対象をモニターすることが典型的である。投与計画は、ポリペプチドに対する対象の感受性などのいくつかの臨床因子に応じて、1週間1回から毎日まで変動しうる。所望の用量は、一度に投与するか、または部分用量、例えば2～4回の部分用量に分割し、ある期間にわたり、例えば適切な間隔で1日にわたりもしくは他の適切な計画で投与することができる。そのような部分用量は、単位投薬形態として投与することができる。いくつかの態様では、投与は、長期、例えば、数週間または数ヶ月の期間にわたり1日に1回または複数回でありうる。投与計画の例は、1週間、2週間、3週間、4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、または6ヶ月以上の期間にわたり、1ヶ月に1回、2週間毎に1回、1週間に1回、隔日1回、1日1回、1日2回、1日3回または1日4回以上の投与である。

【0079】

いくつかの態様では、ソルチリン二量体化インヒビターは、薬学的活性薬剤または治療薬と組み合わせて対象に同時投与することができる。非限定的に、インヒビターは、治療薬の投与の前、同時、または後に投与することができる。したがって、本明細書に使用されるように、用語「同時投与する」は、相互に24時間以内に2種以上の薬剤（例えばインヒビターおよび薬学的活性薬剤）を例えば臨床処置方式の部分として投与することを表す。他の態様では、「同時投与する」は、相互に12時間以内、6時間以内、5時間以内、4時間以内、3時間以内、2時間以内、1時間以内、45分以内、30分以内、20分以内、15分以内、10分以内、または5分以内の投与を表す。他の態様では、「同時投与する」は、単一製剤の部分として、または同じもしくは異なる経路によって投与される複数製剤としてのいずれかで、同時に投与することを表す。インヒビターおよび薬学的活性薬剤が異なる薬学的組成物に入れられて、または異なる回数で投与される場合、投与経路は同じかまたは異な

りうる。

【0080】

例示的な薬学的活性化合物には、非限定的に、Harrison's Principles of Internal Medicine, 13th Edition, Eds. T.R. Harrison et al. McGraw-Hill N.Y., NY; Physicians' Desk Reference, 50th Edition, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Edition, Goodman and Gilman, 1990; United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990; Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeuticsの最新版;およびThe Merck Indexの最新版に見いだされる化合物が含まれ、それらの全ての全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0081】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤には、ビタミンDステロールおよび／またはRENA GEL（登録商標）などの、心血管石灰化を処置するための当技術分野において公知の薬剤が含まれる。ビタミンDステロールには、カルシトリオール、アルファカルシドール、ドキセルカルシフェオール、マキサカルシトールまたはパリカルシトールが含まれる。

【0082】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤には、カルシウム模倣薬、ビタミンおよびそれらの類似体、抗生物質、炭酸ランタン、スタチン（例えばLIPITOR（登録商標））などの脂質低下剤、脂質プロフィルの他の修飾因子（例えばHDL増加薬）、降圧薬、抗炎症剤（ステロイド系および非ステロイド系）、炎症促進性サイトカインのインヒビター（ENBREL（登録商標）、KINERET（登録商標））、ならびに心血管作動薬が含まれる。

20

【0083】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤には、当技術分野において炎症または炎症関連障害の処置で公知の薬剤が含まれる。

【0084】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤は、ビスホスホネート（アレンドロネート、リセドロネート（Risendronate）、イバンドロネート、ゾレドロン酸）でありうる。

【0085】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤は、ホルモン関連剤でありうる。

【0086】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤は抗炎症剤である。例示的な抗炎症剤には、非限定的に、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID - アスピリン、イブプロフェン、またはナプロキセンなど、コルチコステロイド（プレドニゾン（prednisone）など）、抗マラリア薬（ヒドロクロキシンなど）、メトトレキサート（methotrexate）、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ミコフェノレート、および炎症促進性シグナル伝達経路のインヒビターが含まれる。

30

【0087】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤は、免疫応答修飾因子である。本明細書に使用されるように、用語「免疫応答修飾因子」は、対象における自己免疫応答を阻害する化合物（例えば、小分子、抗体、ペプチド、核酸、または遺伝子治療試薬）を表す。理論に縛られることを望まないが、免疫応答修飾因子は、炎症性サイトカイン（例えばIL-12、IL-23もしくはIL-27）、またはSTAT-4の活性、活性化、または発現を阻害することによって自己免疫応答を阻害する。例示的な免疫応答修飾因子には、非限定的に、米国特許第6,774,130号記載のリソフィリン（LSF）ならびにLSF類似体および誘導体からなる群のメンバーが含まれ、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0088】

いくつかの態様では、薬学的活性薬剤は、抗生剤である。用語「抗生物質」は、本明細書において、微生物の生存率を低下させるか、または微生物の成長もしくは複製を阻害する、化合物または組成物を記載するために使用される。本開示に使用されるように、抗生物質には、さらに、抗微生物、静菌、または殺菌剤を含めることが意図される。例示的な

50

抗生物質には、非限定的に、ペニシリン、セファロスポリン、ペネム、カルバペネム、モノバクタム、アミノグリコシド、スルホンアミド、マクロライド、テトラサイクリン、リンコシド (lincoside)、キノロン、クロラムフェニコール、バンコマイシン、メトロニダゾール、リファンピン、イソニアジド、スペクチノマイシン、トリメトプリム、スルファメトキサゾールなどが含まれる。

【0089】

対象に投与するために、インヒビターは、薬学的に許容される組成物中に製剤化することができ、該組成物は、1種または複数種の薬学的に許容される担体（添加剤）および／または希釈剤と一緒に製剤化されたインヒビターを含む。インヒビターは、以下のために適合されたものを含む、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化することができる：（1）経口投与、例えば、飲薬（水性または非水性の液剤または懸濁剤）、トローチ剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、錠剤（例えば、口腔、舌下、および全身吸収のためにターゲティングされたもの）、巨丸剤、散剤、顆粒剤、舌への適用のためのペースト剤；（2）非経口投与、例えば皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射による、例えば無菌溶液もしくは懸濁物、または徐放製剤として；（3）局所適用、例えば、皮膚に適用されたクリーム、軟膏、または制御放出パッチもしくはスプレーとして；（4）腔内または直腸内、例えばベッサリー、クリームまたはフォームとして；（5）舌下；（6）眼球；（7）経皮；（8）経粘膜；（9）鼻腔；または（10）局所投与（例えば薬物溶出性ステント、p
luronicゲル）。追加的に、インヒビターは、薬物送達組成物を使用して患者内に植え込むか、または注射することができる。例えば、Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); 米国特許第3,773,919号；および米国特許第35 3,270,960号を参照。

【0090】

本明細書に使用されるように、用語「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を有せずに、合理的な利益／危険率に釣り合った、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するために適切な化合物、材料、組成物、および／または投薬形態を表す。

【0091】

ここで使用されるように、用語「薬学的に許容される担体」は、液体または固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、滑沢剤、タルク性マグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸）などの薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、あるいは一器官または身体部分から別の器官または身体部分に対象化合物を運搬または輸送することに関与する溶媒封入材料を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であり、患者に傷害性ではないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として役立つ材料のいくつかの例には：（1）ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖；（2）トウモロコシデンプンおよびバレイショデンプンなどのデンプン；（3）セルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロースなどのその誘導体；（4）粉末トラガカント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなどの滑沢剤；（8）カカオバターおよび坐剤用口ウなどの賦形剤；（9）ラッカセイ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油などの油；（10）プロピレングリコールなどのグリコール；（11）グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（PEG）などのポリオール；（12）オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；（13）寒天；（14）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；（15）アルギン酸；（16）発熱物質不含水；（17）等張食塩水；（18）リンゲル液；（19）エチルアルコール；（20）pH緩衝溶液；（21）ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ酸無水物；（22）ポリペプチドおよびアミノ酸などの膨張性剤；（23）血清アルブミン、HDLおよびLDLなどの血清成分；（24）エ

タノールなどのC₂-C₁₂アルコール；(26) 脂質ナノ粒子；ならびに(27) 薬学的製剤中に用いられた他の無毒の適合性物質が含まれる。担体または賦形剤には、単独でもしくはロウと一緒にモノステアリン酸グリセリンもしくはジステアリン酸グリセリンなどの時間遅延物質(time delay material)、または当技術分野において周知の他の物質が含まれる。湿潤剤、着色料、放出剤、コーティング剤、甘味料、香味料、香料、保存料および抗酸化剤もまた、製剤中に存在しうる。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」などの用語が、本明細書において互換的に使用される。

【0092】

薬学的に許容される抗酸化剤には、非限定的に、(1) アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；(2) パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン(lecithin)、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；および(3) クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤が含まれる。

10

【0093】

薬学的組成物の調製は、当技術分野において周知であり、多数の文献および教科書に記載されている。例えば、その内容がその全体で参照により本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A.R. ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990を参照。

【0094】

20

薬学的組成物は、固体形態(顆粒剤、散剤もしくは坐剤を含む)または液体形態(例えば、液剤、懸濁剤、もしくは乳剤)に作ることができる。薬学的組成物は、滅菌などの従来の薬学的操作に供することができ、かつ／または保存料、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤などの従来の佐剤を含有しうる。

【0095】

経口投与用の固体投薬形態には、カプセル剤、錠剤、丸剤、散剤、および顆粒剤が含まれる。そのような固体投薬形態では、活性化合物は、スクロース、ラクトース、またはデンプンなどの少なくとも1種の不活性希釈剤と混合することができる。そのような投薬形態は、また、通常時のように、不活性希釈剤、例えばステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤以外に追加的な物質を含みうる。カプセル剤、錠剤、および丸剤の場合、投薬形態は、また、緩衝剤を含みうる。錠剤および丸剤は、追加的に腸溶コーティングを用いて調製することができる。

30

【0096】

経口投与用の液体投薬形態には、当技術分野において水などの通常使用される不活性希釈剤を含有する、薬学的に許容される乳剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が含まれる。そのような組成物は、また、湿潤剤、甘味料、香味料および香料などの佐剤を含みうる。

【0097】

非経口投与の目的のために、ゴマ油もしくはラッカセイ油中、または水性プロピレングリコール中の液剤、および対応する水溶性塩の無菌水性液剤を用いることができる。そのような水性液剤は、必要に応じて適切に緩衝化することができ、液体希釈剤は最初に十分な食塩水またはグルコースで等張にされる。これらの水性液剤は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内注射目的に特に適切である。これに関連して、用いられる無菌水性媒質は、全て、当業者に周知の標準技法によって容易に入手可能であり、一定量の活性成分を有する様々な薬学的組成物を調製する方法は、公知であるか、または本開示に照らして当業者に明白であろう。

40

【0098】

インヒビターは、また、低速放出または急速放出製剤などの制御放出製剤に入れて投与することができる。本発明の組み合わせのそのような制御放出製剤は、当業者に周知の方法を用いて調製することができる。投与方法は、対象の状態および必要性を評価した後に

50

、担当の医師または他の当業者によって決定される。

【0099】

1回投薬形態を産生するために担体物質と組み合わせることができるインヒビターの量は、概して、治療効果を生じるインヒビターの量である。概して、この量は、100%のうち約0.01%~99%のインヒビターであろう。いくつかの態様では、組成物中のインヒビターの量は、全組成物の約0.1%~約99% (w/w)、約1%~約90% (w/w)、約2%~約80% (w/w)、約5%~約75% (w/w)、約5%~約50% (w/w)、約10% (w/w)~約60% (w/w)、約0.01%~約95% (w/v)、約0.1%~約90% (w/w)、約1%~約85% (w/w)、約10%~約50% (w/w)、約1%~約99% (w/w)、約0.05%~約99% (w/w)、約0.1%~約90% (w/w)、約0.5%~約85% (w/w)、または約5%~約80% (w/w) の範囲より選択することができる。

10

【0100】

いくつかの態様では、対象に投与される薬剤または組成物は、細胞外小胞関連疾患（例えば心血管石灰化）の治療のための治療有効量のソルチリン二量体化インヒビターを含む。

【0101】

本明細書に使用されるように、用語「治療有効量」は、所望の転帰を提供するために有効な治療薬の量を意味する。治療有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。概して、治療有効量は、対象の病歴、年齢、状態、性別、ならびに対象における医学的状态の重症度および種類、ならびに神経変性障害における病理過程を阻害する他の薬剤の投与に応じて変動しうる。

20

【0102】

さらに、治療有効量は、当業者によって認識されるように、処置される特定の疾患、投与経路、選択された賦形剤、および併用療法の可能性に応じて変動する。いくつかの態様では、治療有効量は、ED₅₀からLD₅₀（それを投与されている対象の約50%が命を奪われる治療薬の用量）の間の範囲内でありうる。いくつかの態様では、治療有効量は、ED₅₀（それを投与されている対象の少なくとも約50%で治療効果が検出される治療薬の用量）からTD₅₀（症例の約50%で毒性が生じる用量）の範囲内でありうる。有効性、および治療有効量の化合物を送達するであろう投薬量に関する案内は、処置されるべき状態の動物モデルから得ることができる。

【0103】

毒性および治療有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50%に致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%に治療有効的な用量）を決定するための細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比は、治療指数であり、それは、比LD₅₀/ED₅₀として表現することができる。大きな治療指数を示す組成物が好ましい。

30

【0104】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための薬用量の範囲設定に使用することができる。そのような化合物の薬用量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性を有せずに、ED₅₀を含む循環濃度範囲内にある。薬用量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変動しうる。

40

【0105】

治療有効用量は、最初は細胞培養アッセイから推定することができる。1回量は、細胞培養で決定されたIC₅₀（すなわち、症状の半値阻害を達成する治療薬濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて用量設定することができる。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。任意の特定の薬用量の効果は、適切なバイオアッセイによってモニターすることができる。適切なバイオアッセイの例には、DNA複製アッセイ、転写に基づくアッセイ、および免疫学的アッセイが含まれる。

【0106】

薬用量は、医師が決定することができ、必要に応じて、観察された処置効果に適するよ

50

うに調整することができる。概して、複合インヒビターは、インヒビターが1 $\mu\text{g/kg}$ ~150mg/kg、1 $\mu\text{g/kg}$ ~100mg/kg、1 $\mu\text{g/kg}$ ~50mg/kg、1 $\mu\text{g/kg}$ ~20mg/kg、1 $\mu\text{g/kg}$ ~10mg/kg、1 $\mu\text{g/kg}$ ~1mg/kg、100 $\mu\text{g/kg}$ ~100mg/kg、100 $\mu\text{g/kg}$ ~50mg/kg、100 $\mu\text{g/kg}$ ~20mg/kg、100 $\mu\text{g/kg}$ ~10mg/kg、100 $\mu\text{g/kg}$ ~1mg/kg、1mg/kg~100mg/kg、1mg/kg~50mg/kg、1mg/kg~20mg/kg、1mg/kg~10mg/kg、10mg/kg~100mg/kg、10mg/kg~50mg/kg、または10mg/kg~20mg/kgの用量で与えられるように投与される。本明細書に示された範囲には、全ての中間範囲が含まれることを理解すべきであり、例えば、範囲1mg/kg~10mg/kgには、1mg/kg~2mg/kg、1mg/kg~3mg/kg、1mg/kg~4mg/kg、1mg/kg~5mg/kg、1mg/kg~6mg/kg、1mg/kg~7mg/kg、1mg/kg~8mg/kg、1mg/kg~9mg/kg、2mg/kg~10mg/kg、3mg/kg~10mg/kg、4mg/kg~10mg/kg、5mg/kg~10mg/kg、6mg/kg~10mg/kg、7mg/kg~10mg/kg、8mg/kg~10mg/kg、9mg/kg~10mg/kgなどが含まれる。さらに、上記の中間の範囲もまた、本発明の範囲内であることを理解すべきであり、例えば、範囲1mg/kg~10mg/kgには、2mg/kg~8mg/kg、3mg/kg~7mg/kg、4mg/kg~6mg/kgなどの用量範囲が含まれる。タンパク質に基づくインヒビター（抗体など）について、ある好ましい薬用量は、0.1mg/kg~100mg/kg体重（概して10mg/kg~20mg/kg）である。

【0107】

本明細書に開示される併用療法で病状、例えばEV関連疾患を処置するための投与方式は、患者のタイプ、年齢、体重、性別および医学的状态、疾患の重症度、投与経路ならびに用いられる特定の化合物を含む多様な要因により選択することができ、したがって、広く変動しうる。

【0108】

別の局面では、ソルチリンの二量体化をモジュレートする試験薬剤を同定するための方法が、本明細書において提供される。一般的に、本方法は、以下の工程を含む：(i) 細胞を試験薬剤と接触させる工程であって、細胞が、第1の標識を含む第1のソルチリンポリペプチドと、第2の標識を含む第2のソルチリンポリペプチドとを発現する、工程；(ii) 細胞において発現された第1のソルチリンポリペプチドと第2のソルチリンポリペプチドとの間の距離または接触レベルを検出する工程であって、対照または参照レベルに対する距離または接触レベルにおける変化により、薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることが示される、工程。

【0109】

いくつかの態様では、対照または参照レベルに対する距離または接触レベルにおける増加は、化合物が、ソルチリンの二量体化を阻害することを示す。いくつかの他の態様では、対照または参照レベルに対する距離または接触レベルにおける減少は、化合物がソルチリンの二量体化を増加させることを示す。いくつかの態様では、対照または参照レベルは、試験薬剤と接触したことがない細胞における距離または接触レベルである。

【0110】

2つの成分の間の距離または接触を決定するための、当業者に利用可能な任意の方法を使用することができる。

【0111】

例えば、第1および／または第2の標識は、検出可能な標識であることができる。本明細書に使用される、「検出可能な標識」という用語は、標的の存在を示す検出可能なシグナルを発生可能な組成物を指す。検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物が含まれる。適切な標識には、蛍光分子、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、化学発光部分、生物発光部分などが含まれる。このように、標識は、本明細書において提供される方法および装置に必要とされる、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物である。

【0112】

多種多様な蛍光体レポータ色素が当技術分野で公知である。典型的には、蛍光体は、芳香族または複素環式芳香族化合物であり、ピレン、アントラセン、ナフタレン、アクリジン、スチルベン、インドール、ベンズインドール、オキサゾール、チアゾール、ベンゾチアゾール、シアニン、カルボシアニン、サリチラート、アントラニラート、クマリン、フルオレセイン、ローダミンまたは他の類似の化合物でありうる。

【0113】

例示的な蛍光体には、非限定的に、1,5 IAEDANS ; 1,8-ANS ; 4-メチルウンベリフェロン ; 5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン ; 5-カルボキシフルオレセイン (5-FAM) ; 5-カルボキシナフトフルオレセイン (pH10) ; 5-カルボキシテトラメチルローダミン (5-TAMRA) ; 5-FAM (5-カルボキシフルオレセイン) ; 5-ヒドロキシトリプタミン (HAT) ; 5-ROX (カルボキシ-X-ローダミン) ; 5-TAMRA (5-カルボキシテトラメチルローダミン) ; 6-カルボキシローダミン6G ; 6-CR 6G ; 6-JOE ; 7-アミノ-4-メチルクマリン ; 7-アミノアクチノマイシンD (7-AAD) ; 7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン ; 9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン ; ABQ ; 酸性フクシン ; ACMA (9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン) ; アクリジンオレンジ ; アクリジンレッド ; アクリジンイエロー ; アクリフラビン ; アクリフラビン-フォイルゲンSITSA ; エクオリン (光タンパク質) ; Alexa Fluor 350 (商標) ; Alexa Fluor 430 (商標) ; Alexa Fluor 488 (商標) ; Alexa Fluor 532 (商標) ; Alexa Fluor 546 (商標) ; Alexa Fluor 568 (商標) ; Alexa Fluor 594 (商標) ; Alexa Fluor 633 (商標) ; Alexa Fluor 647 (商標) ; Alexa Fluor 660 (商標) ; Alexa Fluor 680 (商標) ; アリザリンコンプレクソン ; アリザリンレッド ; アロフィコシアン (APC) ; AMC、AMCA-S ; AMCA (アミノメチルクマリン) ; AMCA-X ; アミノアクチノマイシンD ; アミノクマリン ; アニリンブルー ; ステアリン酸アントロシル (Anthrocyl stearate) ; APC-Cy7 ; APTS ; アストラゾンブリリアントレッド4G ; アストラゾンオレンジR ; アストラゾンレッド6B ; アストラゾンイエロー7 GLL ; Atabrine ; ATTO-TAG (商標) CBQCA ; ATTO-TAG (商標) FQ ; オーラミン ; Auorophosphine G ; Auorophosphine ; BAO 9 (ビスアミノフェニルオキサジアゾール) ; BCECF (高pH) ; BCECF (低pH) ; 硫酸ベルベリン ; β ラクタマーゼ ; BFP青方偏移GFP (Y66H) ; BG-647 ; ビマン ; ビスベンズアミド ; Blancophor FFG ; Blancophor SV ; BOBO (商標) -1 ; BOBO (商標) -3 ; Bodipy 492/515 ; Bodipy 493/503 ; Bodipy 500/510 ; Bodipy 505/515 ; Bodipy 530/550 ; Bodipy 542/563 ; Bodipy 558/568 ; Bodipy 564/570 ; Bodipy 576/589 ; Bodipy 581/591 ; Bodipy 630/650-X ; Bodipy 650/665-X ; Bodipy 665/676 ; Bodipy Fl ; Bodipy FL ATP ; Bodipy Fl-セラミド ; Bodipy R6G SE ; Bodipy TMR ; Bodipy TMR-Xコンジュゲート ; Bodipy TMR-X, SE ; Bodipy TR ; Bodipy TR ATP ; Bodipy TR-X SE ; BO-PRO (商標) -1 ; BO-PRO (商標) -3 ; ブリリアントスルホフラビンFF ; カルセイン ; カルセインプルー ; Calcium Crimson (商標) ; Calcium Green ; Calcium Green-1 Ca²⁺色素 ; Calcium Green-2 Ca²⁺ ; Calcium Green-5N Ca²⁺ ; Calcium Green-C1 8 Ca²⁺ ; Calcium Orange ; カルコフロールホワイト ; カルボキシ-X-ローダミン (5-ROX) ; Cascade Blue (商標) ; Cascade Yellow ; カテコールアミン ; CFDA ; CFP - シアン蛍光タンパク質 ; クロロフィル ; クロモマイシンA ; クロモマイシンA ; CMFDA ; セレンテラジン ; セレンテラジンcp ; セレンテラジンf ; セレンテラジンfcp ; セレンテラジンh ; セレンテラジンhcp ; セレンテラジンip ; セレンテラジンO ; クマリンファロイジン ; CPMメチルクマリン ; CTC ; Cy2 (商標) ; Cy3.1 8 ; Cy3.5 (商標) ; Cy3 (商標) ; Cy5.1 8 ; Cy5.5 (商標) ; Cy5 (商標) ; Cy7 (商標) ; シアンGFP ; 環状AMPフルオロセンサー (FiCRhR) ; d2 ; ダブシル ; ダンシル ; ダンシルアミン ; ダンシルカダベリン ; ダンシルクロリド ; ダンシルDHPE ; ダンシルフルオリド ; DAPI ; ダポキシル (Dapoxyl) ; ダポキシル2 ; ダポキシル3 ; DCFDA ; DCFH (ジクロロジヒドロフルオレセインジアセタート) ; DDAO ; DHR (ジヒドロローダミン123) ; ジ-4-ANEPPS ; ジ-8-ANEPPS (ノンレシオ (non-ratio)) ; DiA (4-ジ-16-ASP) ; DIDS ; ジヒドロローダミン123 (DHR) ; DiO (DiOC18(3)) ; DiR ; DiR (DiIC18(7)) ; ドーパミン ; Ds

10

20

30

40

50

Red ; DTAF ; DY-630-NHS ; DY-635-NHS ; EBFP ; ECFP ; EGFP ; ELF 97 ; エオシン ; エリスロシン ; エリスロシンITC ; エチジウムホモダイマー-1 (EthD-1) ; オイクリシン (Euchrysin) ; 塩化ユウロピウム (III) ; ユウロピウム ; EYFP ; ファストブルー ; FDA ; フォイルゲン (パラロザニリン) ; FITC ; FL-645 ; フラゾオレンジ (Flazo Orange) ; Fluo-3 ; Fluo-4 ; フルオレセインジアセタート ; フルオロ-エメラルド ; フルオロ-ゴールド (ヒドロキシルバミジン) ; フルオロ-ルビー ; FluorX ; FM 1-43 (商標) ; FM 4-46 ; Fura Red (商標) (高pH) ; Fura-2、高カルシウム ; Fura-2、低カルシウム ; ゲナクリルブリリアントレッドB ; ゲナクリルブリリアントイエロー10GF ; ゲナクリルピンク3G ; ゲナクリルイエロー5GF ; GFP (S65T) ; GFP赤方偏移 (rsGFP) ; GFP野生型、非UV励起 (wtGFP) ; GFP野生型、UV励起 (wtGFP) ; GFPuv ; グロキサン酸 (Gloxalic Acid) ; グラニューラブルー ; ヘマトポルフィリン ; Hoechst 33258 ; Hoechst 33342 ; Hoechst 34580 ; HPTS ; ヒドロキシクマリン ; ヒドロキシルバミジン (フルオロゴールド) ; ヒドロキシトリブタミン ; インドジカルボシアニン (DiD) ; インドトリカルボシアニン (DiR) ; イントラホワイト (Intrawhite) Cf ; JC-1 ; JO-JO-1 ; JO-PRO-1 ; LaserPro ; Laurodan ; LDS 751 ; Leucophor PAF ; Leucophor SF ; Leucophor WS ; リサミンローダミン ; リサミンローダミンB ; LOLO-1 ; LO-PRO-1 ; ルシファーイエロー ; Magグリーン ; Magdalaレッド (フロキシンB) ; マグネシウムグリーン ; マグネシウムオレンジ ; マラカイトグリーン ; マリーナブルー ; Maxilon Brilliant Flavin 10 GFF ; Maxilon Brilliant Flavin 8 GFF ; メロシアニン ; メトキシクマリン ; MitotrackerグリーンFM ; Mitotrackerオレンジ ; Mitotrackerレッド ; ミトラマイシン ; モノプロモビマン ; モノプロモビマン (mBBR-GSH) ; モノクロロビマン ; MPS (メチルグリーンピロニンスチルベン) ; NBD ; NBDアミン ; ナイルレッド ; ニトロベンゾキサジドール (Nitrobenzoxadidole) ; ノルアドレナリン ; ヌクレアファストレッド ; ヌクレアイエロー ; Nylosan Brilliant Iavine E8G ; Oregon Green (商標) ; Oregon Green 488-X ; Oregon Green (商標) 488 ; Oregon Green (商標) 500 ; Oregon Green (商標) 514 ; パシフィックブルー ; パラロザニリン (フォイルゲン) ; PE-Cy5 ; PE-Cy7 ; PerCP ; PerCP-Cy5.5 ; PE-TexasRed (レッド613) ; フロキシンB (Magdalaレッド) ; Phorwite AR ; Phorwite BKL ; Phorwite Rev ; Phorwite RPA ; Phosphine 3R ; PhotoResist ; フィコエリトリンB[PE] ; フィコエリトリンR[PE] ; PKH26 ; PKH67 ; PMIA ; Pontochromeブルーブラック ; POPO-1 ; POPO-3 ; PO-PRO-1 ; PO-PRO-3 ; プリムリン ; Procionイエロー ; ヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide) (PI) ; PyMPO ; ピレン ; ピロニン ; ピロニンB ; ピロザール (Pyrozal) ブリリアントフラビン7GF ; QSY7 ; キナクリンマスタード ; レゾルフィン ; RH414 ; Rhod-2 ; ローダミン ; ローダミン110 ; ローダミン123 ; ローダミン5GLD ; ローダミン6G ; ローダミンB540 ; ローダミンB200 ; ローダミンB extra ; ローダミンBB ; ローダミンBG ; ローダミングリーン ; ローダミンファリシジン (Phalloidin) ; ローダミンファロイジン ; ローダミンレッド ; ローダミンWT ; ローズベンガル ; R-フィコエリトリン (PE) ; 赤方偏移GFP (rsGFP、S65T) ; S65A ; S65C ; S65L ; S65T ; サファイアGFP ; セロトニン ; Sevronブリリアントレッド2B ; Sevronブリリアントレッド4G ; SevronブリリアントレッドB ; Sevronオレンジ ; Sevronイエロー-L ; sgBFP (商標) ; sgBFP (商標) (スーパーグロ (super glow) BFP) ; sgGFP (商標) ; sgGFP (商標) (スーパーグロ-GFP) ; SITS ; SITS (プリムリン) ; SITS (スチルベンイソチオスルホン酸) ; SPQ (6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル)-キノリニウム) ; スチルベン ; スルホローダミンB can C ; スルホローダミンG Extra ; テトラサイクリン ; テトラメチルローダミン ; Texas Red (商標) ; Texas Red-X (商標) コンジュゲート ; チアジカルボシアニン (DiSC3) ; チアジンレッドR ; チアゾールオレンジ ; チオフラビン5 ; チオフラビンS ; チオフラビンTCN ; Thiolyte ; チオゾールオレンジ ; Tinopol CBS (カルコフロールホワイト) ; TMR ; TO-PRO-1 ; TO-PRO-3 ; TO-PRO-5 ; TOTO-1 ; TOTO-3 ; TriColor (PE-Cy5) ; TRITC (テトラメチルローダミン (Rodamine) イソチオシアナート) ; トゥルブルー (True Blue) ; TruRed ; ウルトラライト (Ultralite) ; ウラニンB ; ユビテックスS

10

20

30

40

50

FC; wt GFP; WW 781; XL665; X-ローダミン; XRITC; キシレンオレンジ; Y66F; Y66H; Y66W; イエロー-GFP; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; および YOYO-3 でありうる。これらの蛍光化合物の多数の適切な形態が入手可能であり、使用することができる。

【0114】

他の例示的な検出標識には、発光および生物発光マーカー（例えば、ビオチン、ルシフェラーゼ（例えば、バクテリア、ホタル、コメツキムシなど）、ルシフェリン、およびエクオリン）、放射性標識（例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）、酵素（例えばガラクトシダーゼ、グルコリニダーゼ、ホスファターゼ（例えばアルカリホスファターゼ）、ペルオキシダーゼ（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ）、およびコリンエステラーゼ）、ならびにコロイド金または色ガラスまたはプラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、およびラテックス）ビーズなどの比色（calorimetric）標識が含まれる。そのような標識の使用を教示している特許には、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、および第4,366,241号が含まれ、それらの各々は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0115】

そのような標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、放射性標識は、写真用フィルムまたはシンチレーション計数器を使用して検出することができ、蛍光マーカーは、放射光を検出するために光検出器を使用して検出することができる。酵素標識は、典型的には酵素に酵素基質を提供し、酵素基質に対する酵素の作用によって産生された反応産物を検出することによって検出され、着色した標識を可視化することによって比色標識を検出することができる。

【0116】

いくつかの態様では、標識は、異種タンパク質である。いくつかの態様では、異種タンパク質は、蛍光タンパク質などのタグである。いくつかの態様では、ドナーまたはアクセプターは、蛍光またはタンパク質タグとコンジュゲートされた、本明細書提供の可溶性ソルチリンタンパク質、ソルチリン由来プロペプチド、またはソルチリン由来核酸である。いくつかの態様では、タグは、タンパク質のC末端とコンジュゲートされている。いくつかの態様では、タグは、タンパク質のN末端とコンジュゲートされている。いくつかの態様では、ソルチリン由来プロペプチドは、さらに、精製のために磁気応答性ビーズとコンジュゲートされている。

【0117】

このようなタンパク質は、さらに、ソルチリンタンパク質、二量体、および多量体の追跡および／または視覚化を容易にすることができる。ソルチリン輸送アッセイ（例えばFRET）に使用することができる異種タンパク質タグの追加的な非限定的な例には、ヒスタミン（HIS）、配列モチーフDYKDDDDK（配列中、D=アスパラギン酸、Y=チロシン、およびK=リジン）、またはFLAGタグ、β-ガラクトシダーゼ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（HA）、OLLAS、c-myc、パラミクソウイルスのシミアンウイルス5エピトープ（V5）、または当技術分野において公知の任意の他のタンパク質エピトープタグが含まれる。

【0118】

いくつかの態様では、ソルチリンの二量体化は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、例えば、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動（TR-FRET）またはホモジニアス時間分解-蛍光共鳴エネルギー移動（HTRF）を使用して、接触された細胞を分析することにより検出または測定することができる。例えば、Maurel et al. Anal. Biochem (2004), 253-262 を参照されたい。

【0119】

蛍光共鳴エネルギー移動またはフェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）は、ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを使用して細胞表面の2つのタンパク質の近接を検出するための方法として当技術分野において公知である（Maurel et al. Anal. Biochem (20

10

20

30

40

50

04), 253-262)。ドナータンパク質または核酸は、アクセプタータンパク質または核酸と異なるフルオロフォア、タンパク質タグ、またはエピトープで標識することができる。したがって、ドナータンパク質または核酸は、アクセプター第2タンパク質または核酸と接触するので、蛍光またはタンパク質分解切断における変化が起こり得る。これは、このアッセイで使用されるフルオロフォアからのシグナルにおける変化の検出を可能にする。

【0120】

例えば、第1または第2の標識FRETの一方はドナーであり、他方はFRETアクセプターであり、FRETシグナルが測定される。あるいは、第1の標識と結合可能な第1のリガンドおよび第2の標識と結合可能な第2のリガンドを使用することができる。第1または第2のリガンドの一方は、FRETドナーを含むことができ、他方は、FRETアクセプターを含むことができる。接触させた細胞は、さらに、リガンドと接触し、FRETシグナルが測定される。

【0121】

FRETシグナルは、試験薬剤の存在下で（例えば、試験薬剤と接触している細胞において）および不在下で（例えば、試験薬剤と接触していない細胞において）、測定される。対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける変化は、薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることを示す。例えば、対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける増加は、化合物がソルチリンの二量体化を阻害することを示す。あるいは、対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける減少は、化合物がソルチリンの二量体化を増加させることを示す。いくつかの態様では、対照または参照レベルは、第1のソルチリンポリペプチドおよび第2のソルチリンポリペプチドの両方を発現している細胞におけるFRETシグナルである。いくつかの他の態様では、対照または参照レベルは、第1のソルチリンポリペプチドまたは第2のソルチリンポリペプチドのいずれかを発現している細胞におけるFRETシグナルである。

【0122】

標識と結合可能な任意の分子は、リガンドとして使用することができる。例えば、リガンドは、抗体、抗体の抗原結合性フラグメント、アプタマー、結合ペア（例えば、ビオチンおよびアビジン、またはビオチンおよびストレプトアビジン）の一方であることができる。いくつかの態様では、第1および／または第2のリガンドは、抗体である。

【0123】

FRETシグナルは、プレートリーダー、共焦点顕微鏡、または当技術分野において公知の任意の他の検出方法によって決定することができる。例えば、FRETシグナルは、タグ付きソルチリン（例えば6×His-ソルチリン）の発現によるカウント毎秒の比（例えば665:620）×10,000、およびFRETシグナルの変化%として計算することができる。シグナルは、また、適切な対照タグと比較することができる。FRETシグナルが、80%以上、90%以上、100%以上、110%以上、115%以上、120%以上、130%以上、140%以上、150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上、およびこれを超える場合に、ソルチリンが二量体化されていると見なすことができる。これらの値は、カウント毎秒の比、タンパク質タグ、または使用する対照などのアッセイ条件に応じて変動することができると考えられている。

【0124】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫組織化学、タンパク質コンジュゲート量子ドット、プロテオミクス、質量分析、エドマン分解、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化法（MALDI）、走査電子顕微鏡法、超解像顕微鏡法、透過電子顕微鏡法、または当技術分野において公知の、タンパク質、タンパク質の構造、組成、相互作用、もしくは局在を同定する任意の他のアッセイを含むが、それに限定されるわけではない追加的なアッセイを使用して、ソルチリンの二量体化を同定することができると考えられている。

【0125】

本明細書に使用される「試験化合物」という用語は、ソルチリンの二量体化を阻害する能力についてスクリーニングされるべき化合物および／または組成物を指す。試験化合物

は、化学化合物；化学化合物、例えば有機または無機小分子の混合物；サッカリン；オリゴ糖；多糖；生体高分子、例えば、ペプチド、タンパク質、ならびにペプチド類似体および誘導体；ペプチド模倣薬；核酸；核酸類似体および誘導体；細菌、植物、真菌、または動物細胞などの生物学的材料から作られた抽出物；動物組織；天然または合成組成物；およびその任意の組み合わせを含めた多種多様な異なる化合物を含む場合がある。いくつかの態様では、試験化合物は、小分子である。

【0126】

可能な試験化合物の数は、数百万にのぼる。小分子、ポリマーおよびゲノムに基づくライブラリーを開発するための方法は、例えば、Ding, et al. J Am. Chem. Soc. 124: 1594-1596 (2002)およびLynn, et al., J. Am. Chem. Soc. 123: 8155-8156 (2001)に記載されている。市販の化合物ライブラリーは、例えばArQule、Pharmacopia、graffinity、Panvera、Vitas-M Lab、Biomol InternationalおよびOxfordから得ることができる。これらのライブラリーは、本明細書において提供されるスクリーニング装置および方法を使用してスクリーニングすることができる。NIH Roadmap、Molecular Libraries Screening Centers Network (MLSCN) からのライブラリーなどの化学化合物ライブラリーもまた、使用することができる。

【0127】

化合物ライブラリーの包括的な一覧は、ウェブ上に、例えば、www.broad.harvard.edu/chembio/platform/screening/compound_libraries/index.htmに見出すことができる。

【0128】

化学ライブラリーまたは化合物ライブラリーは、通常、ハイスループットスクリーニングまたは工業生産で最終的に使用される保管された化学物質の収集物である。化学ライブラリーは、簡単に言えば、一連の保管された化学物質からなることができる。各化学物質は、化合物の化学構造、純度、量、および生理化学的特徴などの情報と共に、ある種のデータベースとして記憶された関連情報を有する。

【0129】

実施されている特定の態様に応じて、試験化合物は、溶液中に遊離で提供される場合があり、または担体もしくは固体支持体、例えばビーズに結びついている場合がある。いくつかの適切な固体支持体が、試験化合物の固定のために採用される場合がある。適切な固体支持体の例には、アガロース、セルロース、デキストラン（すなわちSephadex、Sephacroseとして市販されているもの）、カルボキシメチルセルロース、ポリスチレン、ポリエチレングリコール（PEG）、濾紙、ニトロセルロース、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、ポリアミンメチルビニルエーテルマレイン酸コポリマー、ガラスビーズ、アミノ酸コポリマー、エチレン-マレイン酸コポリマー、ナイロン、絹などが含まれる。追加的に、本明細書に提供される方法のために、試験化合物は、個別に、または群としてスクリーニングされる場合がある。有効な試験化合物についてのヒット率が低いと予想され、その結果、所与の群について1つを超える陽性結果が予想されない場合、群スクリーニングが特に有用である。

【0130】

一般的に、化合物は、ソルチリンの二量体化を阻害および／または減少させることができる任意の濃度で試験することができる。いくつかの態様では、化合物は、約0.1nM～約1000mMの範囲の濃度で試験される。好ましくは、化合物は、約0.1μM～約10μMの範囲で試験される。

【0131】

いくつかの態様では、スクリーニングアッセイは、さらに、ソルチリンの二量体化を阻害または低減する化合物を選択することを含む。試験化合物は、対照と比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、50%、70%、80%、90%、95%、またはこれを超えて、ソルチリンの二量体化を阻害または低減することができる。

【0132】

いくつかの態様では、スクリーニング方法は、ハイスループットスクリーニングである。ハイスループットスクリーニング（HTS）は、ロボット工学、データ処理および制御ソフトウェア、液体処理装置、ならびに高感度検出器を使用する科学実験のための方法である。ハイスループットスクリーニングまたはHTSは、研究者が、数百万の生化学的、遺伝的、または薬理学的試験を、迅速に実施することを可能にする。ハイスループットスクリーニングは、当業者に周知であり、例えば、米国特許第5,976,813号；同第6,472,144号；同第6,692,856号；同第6,824,982号；および同第7,091,048号に記載されているものであり、そのそれぞれの全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0133】

HTSは、候補化合物のライブラリーに対してアッセイのスクリーニングを実行するために自動化を利用する。アッセイは、特異的活性：通常は生化学的または生物学的メカニズムの阻害または刺激のための試験である。典型的なHTSスクリーニングライブラリーまたは「デッキ」は、100,000～2,000,000種を超える化合物を含有することができる。HTSの主要な実験器具または試験容器は、マイクロタイタープレート：ウェルと呼ばれる小さくぼみが開いた格子を備える、通常は使い捨てでプラスチック製の小コンテナである。HTS用の最新のマイクロプレートは、一般的に、384、1536、または3456個のいずれかのウェルを有する。これらは、すべて、8×12個の9mm間隔のウェルを有する本来の96ウェルマイクロプレートを反映して96の倍数である。

【0134】

アッセイの準備をするために、研究者は、実験を行いたい適切な試薬をプレートの各ウェルに満たす。試薬を吸収させ、ウェル中の化合物と結合させるかまたは他の方法で反応させる（もしくは反応させない）ために、いくらかのインキュベーション時間が経過した後、プレートのすべてのウェルにわたり、手作業または機械のいずれかにより測定が行われる。（例えば）コンピューターが単独で容易に決定することもできない変化を探すために、研究者が顕微鏡法を使用する場合、しばしば手作業の測定が必要である。さもなければ、専門の自動分析機が、比色測定、放射能計数などのいくつかの実験をウェルに対して実施することができる。この場合、機械は、各実験の結果を数値の格子として出力し、各数字は、単一のウェルから得られた値にマップされる。このように、高性能分析機は、数十のプレートを数分間で測定することができ、数千の実験データポイントを非常に迅速に生成する。

【0135】

別の局面では、本発明は、本明細書において提供されるスクリーニングアッセイにより選択された化合物を提供する。本明細書において提供されるスクリーニングアッセイにより選択される化合物の類似体、誘導体、および異性体もまた、本明細書において特許請求されることを理解されたい。

【0136】

なお別の局面では、二量体性可溶型ソルチリンを調製するための方法が、本明細書において提供される。一般的に、本方法は、細胞外ドメイン中に第1の標識を含むソルチリンポリペプチドを細胞から発現させること、および発現されたソルチリンポリペプチドを、アフィニティー精製を使用して精製することを含む。アフィニティー精製は、例えば第1の標識と結合可能なリガンドを使用して、第1の標識に基づくことができる。

【0137】

いくつかの態様では、ソルチリンポリペプチドは、アミノ酸配列SEQ ID NO：1またはSEQ ID NO：2の全体またはフラグメントを含む。いくつかの態様では、ソルチリンタンパク質は、発現ベクターによって発現される。

【0138】

発現ベクターは、例えば、Thermo Fisher Scientific, Inc (Waltham, MA, USA) から市販されているもののようなpcDNA3.1(+)ベクターから構築することができる。本明細書に使用される「ベクター」という用語は、宿主細胞への送達または異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸構築物を指す。本明細書に使用されるベクターは、ウイルス

性または非ウイルス性であることができる。ベクターは、クローニングベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、人工染色体、ウイルス、ビリオンなどを含むことができるが、それらに限定されるわけではない。

【0139】

いくつかの態様では、ベクターは、組込みまたは非組込み型である。いくつかの態様では、非組込み型ベクターは、エピソームベクター、EBNA1ベクター、ミニサークルベクター、非組込み型アデノウイルス、非組込み型RNA、またはセンダイウイルスである。いくつかの態様では、ベクターは、エピソームベクターである。いくつかの態様では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0140】

本明細書に使用される「発現ベクター」という用語は、その中に含有される核酸配列がベクター上の転写調節配列と連結したものからRNAまたはポリペプチド（例えばソルチリン阻害剤）の発現を指示するベクターを指す。発現される配列は、細胞に対して異種であることが多いが、必ずしも異種ではない。発現ベクターは、追加的なエレメントを含む場合があり、例えば、発現ベクターは、2つの複製システムを有することで、2つの生物中に、例えば発現のためにヒト細胞中に、ならびにクローニングおよび増幅のために原核生物宿主中に維持されることが可能な場合がある。「発現」という用語は、適用可能ならば例えば転写、転写物のプロセッシング、翻訳ならびにタンパク質のフォールディング、修飾およびプロセッシングを非限定的に含めた、RNAおよびタンパク質を産生すること、および必要に応じてタンパク質を分泌することに関与する細胞過程を指す。「発現産物」には、遺伝子から転写されたRNA、および遺伝子から転写されたmRNAの翻訳により得られたポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列と機能的に連結された場合にインビトロまたはインビボでRNAに転写される核酸配列（DNA）を意味する。遺伝子は、コード領域に先行および後続する領域、例えば5'非翻訳（5'UTR）または「リーダー」配列および3'UTRまたは「トレーラー」配列、ならびに個別のコードセグメント（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含む場合または含まない場合がある。

【0141】

組込み型ベクターは、送達されるそれらのRNA/DNAが宿主細胞染色体内に永続的に組み込まれる。非組込み型ベクターは、エピソームのままであり、それは、その中に含有される核酸が宿主細胞の染色体に決して組み込まれないことを意味する。組込み型ベクターの例には、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、雑種アデノウイルスベクター、および単純ヘルペスウイルスベクターが含まれる。

【0142】

非組込み型ベクターの一例は、非組込み型ウイルスベクターである。非組込み型ウイルスベクターは、組込み型レトロウイルスによって提起されるリスクをなくす。それは、非組込み型ウイルスベクターが自己のゲノムを宿主DNA中に組み入れないからである。一例は、限定的な自己複製が可能であり、哺乳動物細胞において機能することが公知であるエプスタイン-バーoriP／核抗原-1（「EBNA1」）ベクターである。エプスタイン-バーウイルスからの2つのエレメント、oriPおよびEBNA1を含有するので、ウイルスレプリコン領域oriPへのEBNA1タンパク質の結合は、哺乳動物細胞中にプラスミドのエピソームが比較的長期間存在することを維持する。oriP/EBNA1ベクターのこの特定の特徴は、このベクターを組込みなしのiPSCの生成のために理想的にしている。別の非組込み型ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。

【0143】

別の非組込み型ウイルスベクターは、感染細胞の核に侵入せずにタンパク質を産生することができるRNAセンダイウイルスベクターである。F欠損センダイウイルスベクターは、2、3回の継代の間、感染細胞の細胞質中に残るが、速やかに希釈され、数回の継代（例えば、10回の継代）の後に完全に失われる。

【0144】

非組込み型ベクターの別の例は、ミニサークルベクターである。ミニサークルベクター

10

20

30

40

50

は、プラスミド骨格が放出され、真核生物プロモーターおよび発現されるべきcDNAだけが残った環化ベクターである。

【0145】

本明細書に使用される「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起原の少なくとも1つのエレメントを含み、ウイルスベクター粒子中にパッケージされる能力を有する核酸ベクター構築物を指す。ウイルスベクターは、可欠ウイルス遺伝子の代わりに本明細書提供のポリペプチドをコードする核酸を含有することができる。ベクターおよび／または粒子は、インビトロまたはインビボのいずれかで核酸を細胞内に移動させるために利用される場合がある。多数の形態のウイルスベクターが、当技術分野において公知である。

【0146】

ヒトソルチリンの構築物 (NM_002959.5) は、部位特異的変異誘発を使用して、フェーリン切断部位 (例えばR74WRR77) の後のアミノ酸 (例えば3つのアミノ酸、S73A1330) 内に本明細書提供のタンパク質タグ (例えばFLAG (DYKDDDDK) または6×His (HHHHHH) タグ) を挿入することにより生成することができる。操作タンパク質をクローニングおよび発現する方法は、当技術分野において公知である。ソルチリンCD43-TMDなどのソルチリンの他の構築物は、C末端に3×FLAGを有するCD43発現ベクターまたはソルチリンの発現ベクターを用いた重複PCR戦略を使用することにより、生成することができる。

【0147】

ソルチリン (本明細書提供のタンパク質タグを有する) が発現した細胞のEV欠乏培養培地を、精製のためにアフィニティゲルまたは固体支持体、例えば、Sigma Aldrich (St. Louis, MO) からのANTI-FLAG (登録商標) M2に供することができる。タンパク質タグを有する可溶性ソルチリンは、ペプチドを用いて溶出させることができる。次に、精製可溶性ソルチリンをリン酸緩衝溶液中で透析することができる。ソルチリンの発現は、ウェスタンブロット分析または当技術分野において公知の任意の他のタンパク質発現アッセイにより決定することができる。同様に、タンパク質相互作用は、追加的なエピトープタグ付きタンパク質を用いたソルチリンの免疫沈降により決定することができる。

【0148】

本明細書において提供される「固体支持体」は、標的ソルチリン、二量体性ソルチリン、多量体性ソルチリン、ソルチリン由来ポリペプチド、またはソルチリンとコンジュゲートされたエピトープポリペプチドと接触することができる任意の構造である。固体支持体の形態は、足場、カートリッジ、カラム、フィルター、樹脂、またはマトリックス、またはビーズを含むことができるが、それらに限定されるわけではない。固体支持体を含む材料の非限定的なクラスには、ポリマー、金属、セラミック、ゲル、紙、またはガラスが含まれる。

【0149】

いくつかの態様では、ソルチリンは、固体支持体に直接または間接的に結合される。いくつかの態様では、固体支持体は、ポリマー、金属、セラミック、ゲル、紙、またはガラスが含まれるが、それらに限定されるわけではない材料を含む。固体支持体の材料は、さらに、ポリスチレン、アガロース、ゼラチン、アルギン酸塩、酸化鉄、ステンレス鋼、金ナノビーズもしくは粒子、銅、塩化銀、ポリカーボネート、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレン、アクリロニトリル-ブタジエンスチレン、シクロオレフィンポリマー、またはシクロオレフィンコポリマー、Sepharose (商標) 樹脂を含むことができる。

【0150】

いくつかの態様では、固体支持体は、さらに、磁気応答性である要素を含む。いくつかの態様では、磁気応答性要素は、マグネタイト、酸化鉄 (III)、サマリウム-コバルト、テルフェノール (terfenol)-D、または当該技術に記載の任意の他の磁気要素を含む。

【0151】

操作ソルチリンタンパク質は、さらに、小胞または細胞の膜と架橋されて、ソルチリン二量体の局在を決定することができる。化学架橋形成は、タグ付きソルチリンを一過性に

10

20

30

40

50

過剰発現している細胞を水溶性の切断不能架橋剤であるビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）と共に、室温でインキュベートすることにより実施することができる。細胞を（例えば1,000rpmで5分間）遠心分離して、BS3を含む緩衝液を除去し、リン酸緩衝溶液で洗浄することができる。次に、本明細書において提供されるような、ウエスタンブロットまたは免疫沈降のために細胞を溶解および調製することができる。

【0152】

いくつかの選ばれた定義

特に定義しないかぎり、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されているものと同じ意味を有する。任意の公知の方法、装置、および材料を、本発明の実施または試験に使用することができる。これは、これに関する方法、装置、および材料が、本明細書において提供される。

10

【0153】

特に述べないかぎり、または文脈から暗に意味されないかぎり、以下の用語および語句は、下に提供される意味を含む。特に明示的に述べないかぎり、または文脈から明白でないかぎり、下の用語および語句は、その用語または語句が、それらが属する技術分野において獲得した意味を排除するものではない。本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるので、定義は、本明細書において提供される局面の特定の態様の説明を助けるために提供されるものであって、特許請求された本発明を限定することを意図するものではない。さらに、文脈によって特に必要とされないかぎり、単数の用語は複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。

20

【0154】

本明細書に使用される「含む（comprising）」または「含む（comprise）」という用語は、本発明に不可欠な組成物、方法およびそれらの各成分に関連して使用されるが、不可欠であろうとなかろうと非特定の要素の包含を排除しない。

【0155】

本明細書に使用される「から本質的になる（consisting essentially of）」という用語は、所与の態様に必要な要素を指す。本用語は、本発明の態様の基本的で新規または機能的な特徴に著しくは影響しない追加的な要素の存在を容認する。

【0156】

「からなる（consisting of）」という用語は、態様の説明に列挙されないいかなる要素も排除した、本明細書において提供される組成物、方法、およびそれらの各成分を指す。

30

【0157】

実施例以外に、または特に指摘しないかぎり、本明細書使用の成分量または反応条件を表現するすべての数は、すべての場合に「約」という用語で修飾されていると理解すべきである。パーセンテージと共に使用されている場合の「約」という用語は、±1%を意味することができる。

【0158】

「減少する」、「低減した」、「低減」、「減少する」、または「阻害する」という用語はすべて、本明細書において、統計的に有意な量の減少を一般的に意味するために使用される。しかし、疑いを避けるために、「低減した」、「低減」、または「減少する」、または「阻害する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%の減少、例えば、少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の減少、または100%を含む最大100%の減少（例えば、参照試料と比較して非存在のレベル）、または参照レベルと比較して10~100%の間の任意の減少を意味する。

40

【0159】

「増加した」、「増加する」、または「高める」、または「活性化する」という用語はすべて、本明細書において、統計的に有意な量の増加を一般的に意味するために使用される。いかなる疑いも避けるために、「増加した」、「増加する」、または「高める」、ま

50

たは「活性化する」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%の増加もしくは100%を含む最大100%の増加もしくは参照レベルと比較して10~100%の間の任意の増加、または参照レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍もしくは少なくとも約10倍の増加、もしくは2倍から10倍の間、もしくはこれを超える任意の増加を意味する。

【0160】

「統計的に有意」または「有意に」という用語は、統計的有意性を指し、一般的に参照レベルから少なくとも2標準偏差（2SD）離れていることを意味する。本用語は、差があるという統計的証拠を指す。これは、帰無仮説が実際に真である場合に帰無仮説を棄却する決定を行う確率として定義される。

10

【0161】

本明細書に使用される「参照レベル」は、正常であるがそれ以外は無影響の細胞集団または組織（例えば、健康な対象から得られた生物学的試料、または事前の時点で対象から得られた生物学的試料、例えば、EV関連疾患と診断される前の患者から得られた生物学的試料、または本明細書開示の薬剤もしくは組成物と接触されることがない生物学的試料）を指す。

【0162】

本明細書に使用される「適切な対照」または「対照」は、未処置であるがそれ以外はまったく等しい細胞または集団（例えば、本明細書において提供される薬剤もしくは組成物により接触されなかった生物学的試料、または非対照細胞と同様に接触されなかった、例えば接触期間が異なる生物学的試料）を指す。

20

【0163】

単数の用語「a」、「an」、および「the」は、特に文脈に明確に示されていない限り、複数の指示対象を含む。同様に、「または」という語は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、「および」を含むことが意図される。したがって、例えば「方法（the method）」への言及は、本明細書に提供される種類の、および／または本開示を読んだ場合に当業者に明らかになるであろう、1つまたは複数の方法、および／または段階などを含む。

30

【0164】

本明細書において提供されるものと類似または等価の方法および材料を本開示の実施または試験に使用することができるとはいえ、適切な方法および材料が、下に記載される。「含む（comprises）」という用語は、「含む（includes）」を意味する。「e.g.」という略語は、ラテン語の「*exempli gratia*」由来であり、本明細書において非限定的な例を示すために使用される。したがって、「e.g.」という略語は、「例えば」という用語と同義である。

【0165】

好ましい態様が、本明細書において詳細に示され、説明されているが、本発明の精神から逸脱せずに様々な改変、追加、置換などを行うことができ、したがってこれらが、添付の特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると見なされることは、関連する技術分野の当業者に明らかであろう。さらに、すでに示されたものではないという範囲において、本明細書において記載および例証される様々な態様の任意の1つを、本明細書において開示されるその他の態様のいずれかに示される特徴を組み入れるようにさらに改変することができるが、当業者によって理解されるであろう。

40

【0166】

本明細書記載の様々な局面のいくつかの態様は、以下の項目のように説明することができる。

1.

細胞におけるソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害する工程を含む、細胞から

50

細胞外小胞（EV）へのソルチリンの輸送を阻害または低減するための方法。

2.

阻害する工程が、SEQ ID NO: 1のCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド形成の形成を阻害することを含む、項目1の方法。

3.

阻害する工程が、細胞にペプチドを投与することを含む、項目1または2の方法。

4.

ペプチドが、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むソルチリン由来プロペプチドである、項目3の方法。

5.

ペプチドが、少なくとも1つの修飾を含む、項目3または4の方法。

6.

ペプチドが、アミド化、アセチル化、環化、リン酸化、グリコシル化、ニトロシル化、メチル化、脂質化、またはPEG化されている、項目3～5のいずれか1つの方法。

7.

ペプチドが、少なくとも1つのDアミノ酸、ベータアミノ酸、または修飾ペプチド結合を含む、項目3～6のいずれか1つの方法。

8.

ペプチドが、少なくとも1つの置換アミノ酸を含む、項目3～7のいずれか1つの方法。

9.

細胞が、白血球、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、T細胞、またはB細胞である、項目1～8のいずれか1つの方法。

10.

阻害する工程が、インビトロまたはエキスピボである、項目1～9のいずれか1つの方法。

。

11.

阻害する工程が、インビボである、項目1～9のいずれか1つの方法。

12.

阻害する工程が、哺乳動物における、項目11の方法。

13.

阻害する工程が、細胞外小胞関連疾患（EV関連疾患）を有するまたは有する疑いのある対象における、項目11または12の方法。

14.

EV関連疾患が、石灰化大動脈弁疾患、糖尿病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、肺線維症、非アルコール性脂肪性肝疾患、骨粗鬆症、アルツハイマー病、強皮症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、高コレステロール血症、がん、関節リウマチ、および肥満からなる群より選択される、項目13の方法。

15.

糖尿病が、1型糖尿病、2型糖尿病、または若年発症成人型糖尿病である、項目14の方法。

16.

がんが、肺がんまたは膵臓がんである、項目14の方法。

17.

対象における細胞外小胞関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象における細胞中のソルチリンの共有結合的分子間二量体化を阻害する工程を含む、方法。

18.

阻害する工程が、SEQ ID NO: 1のCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド形成の形成を阻害することを含む、項目17の方法。

19.

阻害する工程が、それを必要とする対象にペプチドを投与することを含む、項目17また

10

20

30

40

50

は18の方法。

20.

ペプチドが、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むソルチリン由来プロペプチドである、項目19の方法。

21.

ペプチドが、少なくとも1つの修飾を含む、項目19または20の方法。

22.

ペプチドが、アミド化、アセチル化、環化、リン酸化、グリコシル化、ニトロシル化、メチル化、脂質化、またはPEG化されている、項目19~21のいずれか1つの方法。

23.

ペプチドが、少なくとも1つのDアミノ酸、ベータアミノ酸、または修飾ペプチド結合を含む、項目19~22のいずれか1つの方法。

24.

ペプチドが、少なくとも1つの置換アミノ酸を含む、項目19~23のいずれか1つの方法。

25.

細胞が、白血球、リンパ球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、T細胞、またはB細胞である、項目17~24のいずれか1つの方法。

26.

EV関連疾患が、石灰化大動脈弁疾患、糖尿病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、肺線維症、非アルコール性脂肪性肝疾患、骨粗鬆症、アルツハイマー病、強皮症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、高コレステロール血症、がん、関節リウマチ、および肥満からなる群より選択される、項目17~25の方法。

27.

糖尿病が、1型糖尿病、2型糖尿病、または若年発症成人型糖尿病である、項目26の方法。

28.

がんが、肺がんまたは膵臓がんである、項目26の方法。

29.

(i) 細胞を試験薬剤と接触させる工程であって、細胞が、第1の標識を含む第1のソルチリンポリペプチドと、第2の標識を含む第2のソルチリンポリペプチドとを発現する、工程；

(ii) 細胞中に発現される第1のソルチリンポリペプチドと第2のソルチリンポリペプチドとの間の接触レベルを検出する工程を含む、ソルチリンの二量体化をモジュレートする試験薬剤を同定するための方法であって、

対照または参照レベルに対する接触レベルにおける変化により、該薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることが示される、方法。

30.

検出する工程が、段階(i)において接触された細胞を、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動(TR-FRET)を使用して分析することを含み、対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける変化により、薬剤がソルチリンの二量体化をモジュレートすることが示される、項目29の方法。

31.

対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける増加により、化合物がソルチリンの二量体化を阻害することが示される、項目29または30の方法。

32.

対照または参照レベルに対するFRETシグナルにおける減少により、化合物がソルチリンの二量体化を増加させることが示される、項目29または30の方法。

33.

10

20

30

40

50

対照または参照レベルが、第1のソルチリンポリペプチドまたは第2のソルチリンポリペプチドのいずれかを発現している細胞におけるFRETシグナルである、項目30～32のいずれか1つの方法。

34.

検出する工程が、細胞を第1のリガンドおよび第2のリガンドと接触させることを含み、第1のリガンドが、第1の標識と結合可能であり、かつ蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）ドナーとコンジュゲートされており、

第2のリガンドが、第2の標識と結合可能であり、かつFRETアクセプターとコンジュゲートされている、

項目29～33のいずれか1つの方法。

35.

第1または第2のリガンドが、抗体である、項目34の方法。

36.

前記薬剤が、ソルチリンの二量体化を阻害する、項目29～35のいずれか1つの方法。

37.

前記薬剤が、ソルチリンの二量体化を増加させる、項目29～35のいずれか1つの方法。

38.

(i) 細胞外ドメイン中に第1の標識を含むソルチリンポリペプチドを細胞から発現させる工程；

(ii) 発現されたソルチリンポリペプチドを、第1の標識と結合可能なリガンドを使用するアフィニティー精製により精製する工程を含む、二量体型可溶性ソルチリンを調製するための方法。

【0167】

以下の実施例は、本発明のいくつかの態様および局面を例証するものである。関連する技術分野の当業者には、本発明の精神も範囲も変更することなしに、様々な改変、追加、置換などを行うことができ、そのような改変および変形物が、以下の特許請求の範囲において定義される本発明の範囲内に包含されることは明らかであろう。以下の実施例は、本発明を一切限定するものではない。

【実施例】

【0168】

実施例1：ソルチリンの二量体化は、その細胞外小胞への輸送を調節する

細胞外小胞（EV）は、マイクロRNA、脂質およびタンパク質を隣接細胞に移動させることにより細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たす。標的タンパク質を細胞の分泌区画または細胞内区画に方向づけるソーティングレセプターであるソルチリンは、EVおよび細胞の両方に見出される。がんおよび心血管疾患を含めた多くのヒト疾患では、ソルチリンの発現レベルは、非典型的に増加している。心血管疾患、特に血管石灰化と、ソルチリンの発現レベルとの間の関係を解明するために、細胞内環境および細胞外環境の両方におけるソルチリンの輸送を調査した。ソルチリンが、組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNAP）のEVへのその輸送を介して血管石灰化を促進することは、以前に実証されている。最近の報告は、ソルチリンが複数の翻訳後修飾により調節されると述べているものの、ソルチリンの輸送の正確なメカニズムがなお解明される必要がある。本明細書において提供されるように、ソルチリンは、システイン783（Cys⁷⁸³）残基での分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成する。Cys⁷⁸³はパルミトイル化できるので、これは、パルミトイル化および分子間ジスルフィド結合により、Cys⁷⁸³を共有できることを示している。ソルチリンのアミノ酸配列については、SEQ ID NO：1を参照されたい。

【0169】

分子間ジスルフィド結合の形成は、パルミトイル化を防止することによりソルチリンのEVへの輸送をもたらすことができ、ソルチリンのゴルジ装置への輸送を促進する。そのうえ、ソルチリン由来プロペプチドは、EV内のソルチリンホモ二量体を減少させたことが観察された。結論として、ソルチリンは、それ自体のプロペプチドにより内因性に調節され

10

20

30

40

50

る分子間ジスルフィド結合によるホモ二量体の形成によりEVに運搬される。したがって、ソルチリンの二量体化を阻害することは、とりわけ血管石灰化およびがんを含むEV関連疾患の処置のための新しい治療戦略として作用することができる。

【0170】

多細胞生物に不可欠な特徴である細胞間コミュニケーションは、直接的な細胞-細胞接触または分泌された分子の移動により媒介されることができる(1)。ここ20年の間に、エキソソームなどの細胞外小胞(EV)の細胞間移動を伴う細胞間コミュニケーションについての新しいメカニズムが明らかとなった。EVは、それらの細胞内容物を隣接細胞に移動し、細胞の微小環境を改変する能力を有する(2)(3)。EVの役割は、マイクロRNA、RNA、脂質および／またはタンパク質から構成され得る小胞の積荷により決まる可能性が高い。しかし、EVにおけるこれらのタンパク質のうちいくつかの機能およびそれらが様々な疾患にどのように影響するかは、さらに解明される必要がある。

【0171】

遍在的に発現され、多くの組織および細胞型の適正な機能に不可欠なソルチリンは、増殖因子、シグナル伝達レセプター、および酵素を含めた標的タンパク質を、細胞の分泌区画または細胞内区画中のそれらの定まった位置に方向づけるソーティングレセプターである(4)。ソルチリンは、逆にまた、がん(5)(6)(7)(8)、2型糖尿病(9)、高コレステロール血症(10)(11)(12)、アテローム性動脈硬化症(13)(14)、およびアルツハイマー病(17)(18)のような神経変性障害(15)(16)を含めた一連の疾患における悪性病変の主な原因として登場した。ソルチリンによる細胞内輸送における非定型の増加、およびそれに続くそのリソソーム分解(15)または分泌(10)(14)は、上記疾患の病因に関係している。加えて、最近の研究は、ソルチリンがEVを介して細胞外空間に疾患原因分子を運搬できることを示した：1)以前の研究は、ソルチリンがエキソソーム移動によりチロシンキナーゼを隣接細胞に運搬し、血管新生の活性化により腫瘍形成を促進することを示し(6)、2)以前の調査は、ソルチリンが、組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)をEVに輸送および負荷することにより血管石灰化を促進することを実証している(19)。

【0172】

したがって、主な目的は、EV中へのソルチリンの運搬を容易にする過程を理解することである。この問題に取り組むことは、EV関連疾患に対する新しい治療アプローチを発見することを助けることができる。リン酸化(19)、およびユビキチン化(20)(21)、パルミトイル化(22)を含めた複数の翻訳後修飾が、ソルチリンの機能を調節できるものの、ソルチリンの輸送を調節しているメカニズムは、まだ完全には理解されていない。Gタンパク質共役レセプター(23)およびI型膜貫通タンパク質(24)(25)などのレセプターの輸送は、二量体化により調節できるので、二量体化は、ソルチリンのEVへの輸送の主な調節因子であることができると考えられている。ソルチリンがホモ二量体を形成し、それにより、そのEVへの輸送を容易にするという最初の証拠が、本明細書において提供される。具体的には、結果は、1)ソルチリンがCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成すること；2)Cys⁷⁸³の変異が二量体化ソルチリンのEVへの運搬を打ち消すこと；および3)Cys⁷⁸³でのパルミトイル化の阻害がソルチリンホモ二量体を増加させることを示した。結果は、Cys⁷⁸³がパルミトイル化および分子間ジスルフィド結合の形成の両方に関与できると示している。ジスルフィド結合は、ソルチリンのEVへの輸送を調節することでパルミトイル化を防止することができ、パルミトイル化は、ゴルジ装置へのソルチリンの輸送を促進する(22)。そのうえ、ソルチリン由来プロペプチドは、EV中のソルチリンホモ二量体を減少させる。したがって、これらの知見に基づき、分子間ジスルフィド結合によるその二量体化を介してソルチリンの輸送を調節するメカニズムは、細胞外ドメインにおけるリガンド結合を介して調節される。

【0173】

ソルチリンは細胞表面でホモ二量体を形成する

ソルチリンのホモ二量体化を検出するために時間分解蛍光エネルギー移動(TR-FRET)

アッセイを行った。TR-FRETアッセイのためにFLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンの発現ベクターを構築した(図1A)。プロペプチドの切断の後にFLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンの細胞外ドメインを検出するために、プロペプチドおよび3つのアミノ酸(Ser-Ala-Pro)の後にFLAG-タグおよび6×His-タグを配置した(図1A)。FLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンの両方をHEK293細胞において過剰発現させた。FLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンのタンパク質の発現をウエスタンブロットで検証した(図1B)。この共発現は、6×His-ソルチリンだけを過剰発現しているHEK293細胞と比較してFRETシグナルを増加させ(図1C)、これはソルチリンが細胞表面でホモ二量体を形成することを示している。また、増加したFRETシグナルがホモジニアスTR-FRET(HTRF)で検出されたが、これは、以前の報告と整合する結果である(26)(図3D)。これらの結果は、FRETアッセイがソルチリンの二量体化に関与する分子についてのスクリーニングに有効であることを示している。

【0174】

ソルチリンは分子間ジスルフィド結合により細胞外ドメインおよび細胞内ドメイン中でホモ二量体を形成する

細胞外ドメイン(ECD)または細胞内ドメイン(ICD)がソルチリンの二量体化を担うかどうかを検討するために、FLAG-ソルチリンECDに加えて膜貫通ドメイン(TMD)およびICD+TMDの発現ベクターを構築し、次に、HEK293細胞において過剰発現させた(図2A)。還元ウエスタンブロットでは、FLAG-ソルチリン完全、ECD+TMDおよびICD+TMDのタンパク質発現は、もっともらしい分子サイズのバンドとして検出された(図2B)。ジスルフィド結合を維持できる非還元ウエスタンブロットでは、FLAG-ソルチリン完全およびECD+TMDは、2つのバンドを発現した(図2C)。単量体として75~100kDaのバンドが検出された(図2C)。分子間ジスルフィド結合を有するホモ二量体および多量体として、約200kDa以上の分子量のバンドが検出された(図2C)。次に、水溶性の切断不能架橋剤であるBS3を使用して、HEK293細胞においてFLAG-ソルチリン完全およびECD+TMDを架橋結合させた。架橋結合形成によりホモ二量体および多量体の両方のバンドが出現した(図2D)。これらのデータは、ソルチリンが細胞外ドメイン中でホモ二量体および多量体を形成することを示唆している。FLAG-ソルチリンICD+TMDの二量体化は、全細胞溶解物を使用する非還元ウエスタンブロットではっきりとは検出されなかった(図2C)。これは、FLAG-ソルチリンICD+TMDの低いタンパク質発現レベルが原因の可能性がある(図2B、2C)。またFLAG-ソルチリンICD+TMDのタンパク質発現は、FLAG-ソルチリンICD+TMDを安定的に発現しているHEK293(FLAG-ソルチリンICD+TMD HEK293細胞)でも、より低かった。したがって、FLAG-ソルチリンICD+TMD HEK293細胞に、プロテアソーム阻害剤、MG-132、およびリソソーム阻害剤、クロロキンを添加することにより、FLAG-ソルチリンICD+TMDがそれぞれプロテアソームおよびリソソーム中で分解を受けることができるかどうかを判定した。MG-132が、FLAG-ソルチリンICD+TMDのタンパク質発現を時間および濃度依存的に増加させたのに対し、クロロキンは増加させなかった。これは、FLAG-ソルチリンICD+TMDがプロテアソーム中で分解されることを示唆している(図2E、2F)。RAG-ソルチリンICD+TMDのホモ二量体を検出するために、MG-132と一緒にインキュベーションおよび抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。非還元ウエスタンブロットにおいて、FLAG-ソルチリンICD+TMDの単量体の約2倍高い分子サイズのバンドが検出された(図2G)。これらのデータは、ソルチリンが細胞内ドメイン中で分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成することを示している。

【0175】

ソルチリンの膜貫通ドメインは非共有結合的相互作用によりホモ二量体を形成する

ECDおよびICDにおけるソルチリンの二量体化を確認するために、FLAG-ソルチリン完全を安定的に過剰発現しているHEK293細胞(FLAG-ソルチリン完全HEK293細胞またはFLAG-ソルチリンHEK293細胞)を使用して免疫沈降を行い、その際、6×His-ソルチリン完全、ECD+TMDまたはICD+TMDが、それぞれ一過性に過剰発現された(図3A

、3B)。6×His-ソルチリン完全、ECD+TMDおよびICD+TMDは、FLAG-ソルチリン完全と共に沈降した(図3B)。それらの構築物は膜貫通ドメインを有するので、膜貫通ドメインが二量体を形成する可能性が残っていた。したがって、膜貫通ドメインの二量体化を検討するために、FLAG-ソルチリンECD+TMDを安定的に過剰発現しているHEK293細胞(FLAG-ソルチリンECD+TMD HEK293細胞)を使用して免疫沈降を実施し、その際、6×His-ソルチリンICD+TMDが一過性に過剰発現された(図3C、3D)。陽性対照として6×His-ソルチリン完全およびECD+TMDも過剰発現させた(図3C、3D)。6×His-ソルチリン完全、ECD+TMDおよびICD+TMDは、FLAG-ソルチリンECD+TMDと共に沈降した(図3D)。FLAG-ソルチリンECD+TMDおよび6×His-ソルチリンICD+TMDの結合は、ソルチリンが膜貫通ドメイン中で非共有結合的相互作用によりホモ二量体を形成できることを示している。

10

【0176】

CD43の対応するドメインによりソルチリンの膜貫通ドメインを置換しても単量体形態のソルチリンは生成しない

二量体化に対するソルチリンの膜貫通ドメインの寄与を検討するために、以前に報告されたように膜貫通ドメインを、ホモ二量体を形成しないCD43の膜貫通ドメインにより置き換えた(ソルチリンCD43-TMD)(図4A)(25)。ソルチリンCD43-TMDは、非還元ウエスタンブロットでホモ二量体を形成した(図4B)。また、HEK293細胞の免疫沈降実験で6×His-ソルチリンCD43-TMDは、6×His-ソルチリン野生型と同様にFLAG-ソルチリン野生型と共に沈降し(図4C、4D)、HEK293細胞においてFLAG-ソルチリンおよび6×His-ソルチリンCD43-TMDの同時発現は、6×His-ソルチリン野生型と同様にFRETシグナルを増加させた(図10)。これらのデータは、おそらく細胞内ドメインと細胞外ドメインとが二量体化することが原因で、ソルチリンの二量体化を抑制するには膜貫通ドメインの二量体化の阻害では不十分であることを示唆している。

20

【0177】

Cys783の変異はソルチリンの二量体化を打ち消した

以前の報告は、システインはソルチリンの細胞外ドメイン中で分子内ジスルフィド結合を形成するので、ソルチリンの構造維持に重要な役割を果たすことを示した(27)。加えて、本研究では、分子間ジスルフィド結合がホモ二量体内で形成されることを実証する。細胞外ドメイン中の分子間ジスルフィド結合の形成を担うシステインは、まだ同定されていないものの、10CCドメインは、非還元ウエスタンブロットにおいて二量体を形成した(図10)。これは、10CCドメイン内で分子間ジスルフィド結合が形成できることを示している。次に、細胞内ドメイン中の分子間ジスルフィド結合を調べた。ソルチリンは、細胞内ドメイン中にシステインを1つだけ有する(Cys⁷⁸³)ので、このシステインが、細胞内ドメイン中で二量体化のための分子間ジスルフィド結合を形成すると予想された。6×His-ソルチリンICD+TMDおよびFLAG-ソルチリン完全において、Cys⁷⁸³をアラニンにより置き換えた(C783A)(図5A)。6×His-ソルチリンICD+TMD C783Aは、HEK293細胞においてホモ二量体を形成しなかった(図5B)。驚くことに、FLAG-ソルチリンC783Aによって、HEK293細胞における低分子量のホモ二量体だけが減少したが、高分子量のホモ二量体および多量体は変化しなかった(図5C)。低分子量のホモ二量体は、主にEVに運搬され、一方で、高分子量のホモ二量体および多量体は、主にEVに運搬されなかった(図5D)。したがって、FLAG-ソルチリンC783Aは、EVへの二量体化ソルチリンの運搬を有意に減少させた(図5D)。Cys⁷⁸³はパルミトイル化されるとの報告があるので(22)、FLAG-ソルチリンHEK293細胞をパルミトイル化阻害剤、2-フルオロパルミチン酸(2-FPA)(22)と共にインキュベートすることによって、パルミトイル化と分子間ジスルフィド結合との間の関係を研究した。それにより、より小さい分子サイズのホモ二量体だけが細胞中に増加した(図5E)。これらのデータは、Cys⁷⁸³がパルミトイル化および分子間ジスルフィド結合により分け合うことができることを示している。また、2-FPAは、EV中のFLAG-ソルチリンの二量体化を増加させたが(図5E)、これは、Cys⁷⁸³の変異によるEV中のホモ二量体の減少が、パルミトイル化ではなく二量体化における

30

40

50

減少のせいであることを示唆している。

【0178】

ソルチリン由来プロペプチドの結合はソルチリンの二量体化を抑制する

ソルチリンおよびSorLAの両方におけるVps 10pドメインの構造が報告されている(28)(29)。SorLAは、リガンドなしの状態またはプロペプチドが結合した状態で異なる立体配置を有する。類似の変化がソルチリンにおいて起こり得、これらの異なる状態が、ソルチリンの単量体およびホモ二量体を形成することができる。S316E変異はソルチリン由来プロペプチドとの結合を阻害するので(29)、S316E変異体を使用して(図6A)、プロペプチドの結合が二量体化に及ぼす効果を検討した。S316Eは、HEK293細胞において単量体の減少と同時に二量体化を増加させた(図6B)。プロペプチドの結合が二量体化に及ぼす効果をさらに検証するために、プロペプチドを有しないソルチリン(wp)(27)を構築し(図6A)、HEK293細胞に過剰発現させた。ソルチリンwpもまた、HEK293細胞において単量体の減少と同時に二量体化を増加させた(図6C)。また、ソルチリン由来プロペプチドの添加は、FLAG-ソルチリンHEK293細胞の細胞外小胞中の二量体化を減少させたが(図6E)、細胞における二量体化に影響しなかった(図6D)。

【0179】

可溶性ソルチリンはホモ二量体として存在する

血清ソルチリンレベルが、大動脈石灰化(30)およびアテローム血栓症(31)などの心血管リスクのみならず、うつ(32)とも関連することが報告されている。可溶性ソルチリンが、がん細胞の生存を活性化できることも実証されている(5)(33)。したがって、可溶性ソルチリンが、単量体および／またはホモ二量体の形成により疾患の一因になる可能性があるかどうか理解することが重要である。加えて、EV中の可溶性ソルチリンおよびソルチリンの検出のために、EV膜上のソルチリンの配向を決定することが重要である。血清ソルチリンレベルは、ソルチリンの細胞外ドメインに対する抗体を使用して測定されるので、これらの抗体は、ソルチリンの細胞外ドメインがEVの外側に位置するかぎり両者を検出することができる。したがって、EV膜上のソルチリンの配向を決定するために、FLAG-ソルチリン完全HEK293細胞およびC末端に3×FLAGを有するソルチリン(ソルチリン-3×FLAG)を安定的に発現しているHEK293細胞から分泌されたEVを使用して免疫沈降アッセイを行った。EVおよび溶解物中にFLAG-ソルチリンが検出された(図7A)が、ソルチリン-3×FLAGは、溶解物中だけから検出された(図7B)。これは、ソルチリンの細胞外ドメインがEVの外側に位置することを示唆している。次に、FLAG-ソルチリンHEK293細胞から分泌された可溶性ソルチリンの形態を検出するために、EV欠乏培養培地を使用して非還元ウエスタンブロットを行った。可溶性ソルチリンの分子サイズは、非還元ウエスタンブロットで約120kDaと計算された(図7C)。このサイズは、還元ウエスタンブロットで検出されたサイズよりも大きいので(図7D)、120kDaのバンドをホモ二量体として検出した。また、ソルチリンの細胞内ドメインは切断される可能性があるので、FLAG-ソルチリンECD+TMD HEK293細胞から分泌された可溶性ソルチリンの形態を検討した(6)(34)。FLAG-ソルチリンECD+TMD HEK293細胞からの可溶性ソルチリンは、単量体の形態で約80kDaのバンドとして検出された(図7C)。次に、EV欠乏培養培地を使用する抗FLAG抗体アフィニティーカラムを使用して、可溶性ソルチリンを精製した。FLAG-ソルチリンHEK293細胞から分泌された可溶性ソルチリンは、80および120kDaのバンドとして検出され、これは、可溶性ソルチリンの二量体が精製過程の途中でその形態を部分的に単量体に変化したことと関連していた(図7E)。これらのデータは、120kDaのバンドが可溶性ソルチリン二量体を表すことを示している。

【0180】

考察

本明細書に提供されるように、ソルチリンは、石灰化促進因子である組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)のEVへのその輸送により血管石灰化を促進する(19)。また、他のグループは、ソルチリンがエキソソーム放出を促進し、2つのチロシンレセプター、トロポミオシン関連キナーゼB(TrkB)および上皮増殖因子レセプター(EGFR)と

複合体を形成すると報告した。これらのチロシンレセプターは、がん細胞の微小環境および腫瘍血管新生の制御に重要な役割を果たすことができる(6)。これらの結果からして、本研究の主な目的は、心血管疾患を含む複数の疾患において観察される非定型な発現レベルを潜在的に阻害するために、ソルチリンがどのようにEVに運搬されるかを理解することであった。

【0181】

したがって、ソルチリンは、分子間ジスルフィド結合によりホモ二量体を形成する。ソルチリンの細胞内ドメインでは、Cys⁷⁸³は、分子間ジスルフィド結合を形成してホモ二量体を生成する。Cys⁷⁸³は、パルミトイル化されるとの報告があるので(22)、分子間ジスルフィド結合の形成は、Cys⁷⁸³でパルミトイル化と競合することができる。パルミトイル化阻害剤は、ソルチリンの二量体化を増加させた。さらに、Cys⁷⁸³に分子間ジスルフィド結合を有する二量体化ソルチリンは、EVに運搬される主な二量体として作用し、変異によるCys⁷⁸³での分子間ジスルフィド結合の喪失は、EVへの二量体化ソルチリンの運搬を止めることができる。パルミトイル化阻害剤は、二量体化ソルチリンのEVへの運搬を増加させたので、Cys⁷⁸³残基での分子間ジスルフィド結合の形成は、おそらくパルミトイル化がゴルジ装置への運搬を加速するという事実のせいで(22)、EVへの二量体化ソルチリンの輸送を容易にすることができる(図8)。

【0182】

免疫沈降実験は、ソルチリンの膜貫通ドメイン中で非共有結合的相互作用が起こってホモ二量体を形成できることを示した。しかし、膜貫通ドメイン中の結合を阻害することは、ソルチリンの二量体化を抑制するには不十分であった。これは、ソルチリンの細胞内ドメインおよび細胞外ドメイン中での共有結合によって説明することができるのに対し、同時に、PSGL-1(25)およびアミロイド前駆体タンパク質(35)などの他のI型膜貫通タンパク質は、膜貫通ドメインによりホモ二量体を形成する。

【0183】

細胞外ドメイン中で10CCドメインが分子間ジスルフィド結合を示した。10CCドメインは、分子内ジスルフィド結合を形成する10個のシステインを有する(27)。しかし、結果は、10CCドメイン中のシステインのいくつかはホモ二量体のための分子間ジスルフィド結合の形成に寄与するという可能性を裏づけている。C783A変異体は、低分子量のホモ二量体だけを減少させたので、10CCドメイン中のシステインを有するホモ二量体が形成され、C783A変異体は、高分子量のホモ二量体および多量体として存在した。特定の理論に縛られるわけではなく、プロペプチド結合部位と10CCドメインとの相互作用が起こると以前に考えられていた(29)。ソルチリン由来プロペプチドの結合が二量体化に影響するとさらに考えられていた。ソルチリンと同様にVps10pドメインを有するsorLAの構造は、リガンドなし状態またはプロペプチドが結合した状態で変化することができるので(28)、これらの2つの異なる状態は、ソルチリンの単量体またはホモ二量体のいずれかの形成に寄与することができる(図8)。ソルチリン5316Eおよびソルチリンwpの両方がホモ二量体の形成を増加させたのに対し、プロペプチドの添加はそれらを低減したことも示された。リガンドがソルチリンの二量体化を調節したので、将来的な研究は、ソルチリン由来プロペプチドに加えて、プログラニュリン(17)およびニューロテンシン(36)などの他のリガンドがソルチリンの二量体化に及ぼす影響を研究するべきである。

【0184】

ここで、可溶性ソルチリンがホモ二量体として存在できることが実証された。そのうえ、細胞内ドメインは、可溶性ソルチリンの二量体化に不可欠である。以前の研究は、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを欠如する組換えタンパク質として過剰発現されたソルチリンを使用し、可溶性ソルチリンが単量体の形態として存在したことを示した(33)(37)。本明細書において実証されるのは、二量体化可溶性ソルチリンを産生する方法である。二量体化可溶性ソルチリンの精製工程において、分子間ジスルフィド結合のいくつかは破壊され、単量体の形成を生じる可能性があることから、精製手順を改善することができる。加えて、二量体化可溶性ソルチリンを使用して、その可溶性形態の生理学的機能お

10

20

30

40

50

よび病理学的機能を調査することができる。

【0185】

血清ソルチリンは、心血管疾患および神経疾患を検出するためのバイオマーカーとして作用できるので、二量体化可溶性ソルチリンの知見は、臨床環境において重要な意味を有する(30)(31)(32)。したがって、可溶性ソルチリンの単量体と二量体との間の差、ならびにこれらの疾患に関する血清中単量体／二量体比を解明することが重要である。メタボリックシンドロームに関する高分子量アディポネクチンの検出と同様に、これは、これらの疾患に関するより正確な診断を可能にすることができる(38)(39)。また、ソルチリンの細胞外ドメインがEVの外側に位置することが決定された。この知見は、細胞外ドメインに対する抗体を使用してソルチリン陽性EVが検出可能であり得るという見込みを検証するものである。ソルチリン陽性EVと様々な疾患との関連を明らかにすることは、疾患進行に関する臨床的に関連する代替指標(surrogate)として有用であり得る。実際、疾患の診断および予後予測にエクソソームタンパク質を使用する潜在性は、増え続けている(40)。

【0186】

結論として、ソルチリンがホモ二量体を形成し、ホモ二量体の形成は、ソルチリンのEVへの輸送に重要な役割を果たすことができ、分子間ジスルフィド結合を使用して調節され得ることが実証された。加えて、ソルチリン由来プロペプチドは、ソルチリンの二量体化を制御することができ、したがって、細胞外ドメイン中のリガンド結合によるソルチリン調節の可能性がある。これらの知見を基に、小分子化合物、抗体およびペプチドなどのソルチリンの二量体化を阻害する分子は、ソルチリンおよびソルチリンと結合した疾患起炎タンパク質のEVへの運搬を抑制することにより、血管石灰化およびがんを含めたEV関連疾患を処置するための新しい治療アプローチをもたらすことができると期待される。

【0187】

実施例2：実験手順

化学物質および試薬

MG-132(カタログ番号7449)およびクロロキンニリン酸塩(カタログ番号C6628)は、Sigma-Aldrich Co. LLC.(Sigma)から購入した。2-フルオロパルミチン酸(2-FPA、カタログ番号90380)は、Cayman Chemicalから購入した。ソルチリンプロペプチド(ソルチリン由来プロペプチド)(カタログ番号049-75、ロット番号432841)は、Phoenix Pharmaceuticals, Incから購入した。プライマーは、Integrated DNA Technologies, Incから購入した。PCR試薬は、EMD Millipore Corporationから購入した。

【0188】

ベクターおよび構築物

pcDNA3.1(+)ベクター(Thermo Fisher Scientific Inc.、カタログ番号V79020)において発現ベクターを構築した。部位特異的変異誘発を使用して、FLAG(DYKDDDDK)または6×His(HHHHHH)タグをフューリン切断部位R74WRR77(35)の後の3つのアミノ酸(S73A1330)中に挿入することによって、ヒトソルチリン(NM_002959.5)の構築物を生成した：pcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリン完全長(完全)、アミノ酸(aa)1-831；pcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリンECD+TMD、aa1-778；pcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリンICD+TMD、aa1-831(A81-754)；pcDNA3.1(+)6×His-ソルチリン完全長(完全)；pcDNA3.1(+)6×His-ソルチリンECD+TMD；pcDNA3.1(+)6×His-ソルチリンICD+TMD；pcDNA3.1(+)6×Hisソルチリン10CCドメイン+TMD、aa1-778(681-604)；pcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリンC783A；pcDNA3.1(+)6×His-ソルチリンICD+TMD C783A；pcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリンS316E；プロペプチドを有しないpcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリン、aa1-831(34-77)。CD43発現ベクター(Origene、カタログ番号RC204195、NM_003123)(25)を使用する重複PCR戦略により、ソルチリンCD43-TMDの構築物を生成した：pcDNA3.1(+)FLAG-ソルチリンCD43-TMD、ソルチリンaa1-754、CD43 aa254-276、ソルチリンaa779-831；pcDNA3.1(+)6×His-ソルチリンCD43-TMD。C末端に3×FLAGを有するソルチリンの発現ベクター(ソル

チリン-3×FLAG、カタログ番号EX-M0397-M14) は、GeneCopoeia, Incから購入した。

【0189】

ウエスタンブロット分析

プロテアーゼ阻害剤 (Roche Diagnostics、カタログ番号04693159001) を含有するIP溶解緩衝液 (Thermo Fisher Scientific Inc.、カタログ番号87787) を用いて細胞、EVおよび培養培地の上清を溶解させた。ビシンコニン酸 (BCA) 方法 (Thermo Fisher Scientific Inc.、カタログ番号23225) を使用してタンパク質濃度を測定した。レムリ (Laemmli) 緩衝液 (Boston Bioproduct; 非還元、カタログ番号BP-110NR; 還元、カタログ番号BP-111R) を溶解物に添加し、95℃で5分間煮沸した。4~12% SDS-PAGEにより総タンパク質を分離し、iBlotウエスタンブロットシステム (Life Technologies) または従来の湿式法を使用して、ニフツ化ポリビニリデン (PVDF) 膜に転写した。ヒトソルチリンICDに対する一次抗体 (ウサギ1:1000; Abcam plc.、カタログ番号ab16640、ロット番号GR185198-1)、ヒト (3-アクチンに対する一次抗体 (マウス1:2000; Novus Biologicals, LLC、カタログ番号NB600-501、ロット番号014M4759)、FLAGに対する一次抗体 (ウサギ1:1000; Sigma、カタログ番号F4725、ロット番号093M4798、マウス (M2) 1:1000; Sigma、カタログ番号F1804、ロット番号SLBJ4607V)、6×Hisに対する一次抗体 (マウス1:1000; Abcam plc.、カタログ番号ab18184、ロット番号GR247674-1)。

【0190】

免疫沈降

細胞またはEVをIP溶解緩衝液中で溶解させた。抗FLAG M2抗体 (5p.g) またはマウスIgG (5lig、R&D Systems、カタログ番号MAB002、ロット番号IX2415091) を、プロテインG (Thermo Fisher Scientific Inc.、カタログ番号10004D) を有するDynabeadsと共に4℃で一晩回転させることによりインキュベートした。細胞溶解物を回転条件下で4℃で4時間インキュベートした。ビーズ-抗体-タンパク質複合体をPBSで3回洗浄した。次に、SDS-PAGEのために沈殿物にレムリ緩衝液を添加した。

【0191】

架橋形成実験

FLAG-ソルチリン完全、ECD+TMD、またはICD+TMDを一過性に過剰発現しているHEK293細胞を、1mmol/L ビス (スルホスクシンイミジル) スペレート (BS3)、水溶性の切断不能架橋剤 (Thermo Fisher Scientific Inc.、カタログ番号21580) と共に室温で30分間インキュベートすることにより、化学的架橋形成を実施した。1mol/L トリス-HCl (pH7.4) の15分インキュベーションにより反応を停止させ、細胞を1,000rpmで5分間遠心分離して、BS3を含む緩衝液を除去し、PBSで洗浄した。次に、ウエスタンブロットのために細胞をIP溶解緩衝液中で溶解させた。

【0192】

HEK293細胞の細胞培養およびトランスフェクタントの樹立

HEK293細胞をAmerican Type Culture Collection (ATCC) から購入し、10% ウシ胎仔血清 (FBS)、ペニシリン (100U/mL)、およびストレプトマイシン (100p.g/mL) を補充したイーグル最小必須培地 (EMEM、ATCC、カタログ番号30-2003) に入れ、5% CO₂の加湿雰囲気中、37℃で維持した。HEK293細胞におけるトランスフェクションのために、リポフェクタミン2000試薬 (Thermo Fisher Scientific Inc.、カタログ番号11668019) を製造業者のプロトコールに従って使用した。pcDNA3.1(+)-FLAG-ソルチリン完全、pcDNA3.1(+)-FLAG-ソルチリン-ECD+TMD、pcDNA3.1(+)-FLAG-ソルチリンICD+TMD、およびソルチリン-3×FLAGの発現ベクター (GeneCopoeia, Inc.、カタログ番号EX-M0397-M14) によるトランスフェクションにより、それぞれFLAG-ソルチリン完全、ECD+TMD、ICD+TMD、およびソルチリン-3×FLAGを安定的に発現しているHEK293細胞を得た。これらの細胞株を、10% FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびジェネテシン800p.g/mLを補充したEMEM中で維持した。細胞

をMG-132およびクロロキンと共にインキュベーター中で表示の時間、ならびにそれぞれ2-FPAおよびソルチリンプロペプチドと共に24時間、インキュベートした。

【0193】

上清およびEVへの培養培地の分離

上清およびEVへの培養培地の分離を、以前に報告されたプロトコールに従って行った(41)。培養培地を1,000rpmで5分間の遠心分離にかけて、細胞片を除去した。次に、4℃の100,000gで40分間の超遠心分離(Optima Max Ultracentrifuge, Beckman Coulter)により上清およびEVを分離した。

【0194】

TR-FRETおよびホモジニアスTR-FRET (HTRF)

TR-FRETおよびHTRFを以前に記載されたように行った(26)。6×His-ソルチリン発現ベクターのトランスフェクションの24時間後に、解離溶液(例えば、Sigma Aldrich、カタログ番号C5914からのもの)を使用してFLAG-ソルチリン完全HEK293細胞を回収した。25% FBSを補充したPBS中で、1nmol/L抗FLAG(登録商標)(M2)-ク립テート(Cisbio Bioassays、カタログ番号61FG2KLA、ロット番号25A)および3nmol/L抗6HIS-XL665(Cisbio Bioassays、カタログ番号61HISXLA、ロット番号56A)を含有する、TR-FRETについて 1×10^6 細胞/mLおよびHTRFについて 2×10^6 細胞/mLを用いて、回転振盪機でのインキュベーションを4℃で行った。TR-FRETのために、細胞を1,000rpmで5分間遠心分離して、抗体を除去し、PBS中に再懸濁し、96ウェル白色プレート中にアプライした。HTRFのために、抗体を除去せずに96ウェル白色プレート中に細胞をアプライした。次に、プレートを読み取った(励起:320nm、発光:620nm(カットオフ570nm)、665nm(カットオフ630nm)、遅れ50ps、積分500ps)。FRETシグナルを(カウント毎秒の比665:620) $\times 10,000$ として計算し、6×His-ソルチリンの発現によるFRETシグナルの変化%を表現した。

【0195】

可溶性ソルチリンの精製

FLAG-ソルチリン完全またはECD+TMD HEK293細胞のEV欠乏培養培地をANTI-FLAG(登録商標)M2アフィニティーゲル(Sigma、カタログ番号A2220)に供した。FLAGタグを有する可溶性ソルチリンを、100 μ g/mL FLAG-ペプチド(Sigma、F3290、ロット番号SLBR6767V)を用いて溶出した。精製可溶性ソルチリンをPBS中で透析した。

【0196】

統計解析

データを、表示した数の平均 $\pm$ S.E.として表す。対応のないt検定の後の分散分析により比較を行った。

【0197】

実施例1および2の参考文献

10

20

30

40

50

1. Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373-383.
2. Simons, M., and Raposo, G. (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 575-581.
3. Thery, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581-593
4. Carlo, A.S., Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2014) Sorting receptor sortilin-a culprit in cardiovascular and neurological diseases. *J. Mol. Med. (Berl)*. 92, 905-911
5. Beraud-Dufour, S., Devader, C., Massa, F., Roulot, M., Coppola, T., and Mazella, J. (2016) Focal Adhesion Kinase-Dependent Role of the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3/Sortilin in Colorectal Cancer Cell Dissociation. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1860
6. Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloue, F., and Jauberteau, M.O. (2014) Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell. Sci.* 127, 3983-3997
7. Wilson, C.M., Naves, T., Akhrass H.A., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloue, F., and Jauberteau, M.O. (2016) A new role under sortilin's belt in cancer. *Commun. Integr. Biol.* 9, e1130192
8. Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C.C., Zhang, X.D., Walker, M.M., and Hondermarck, H. (2015) Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* 6, 10473-10486
9. Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., Le

10

20

30

40

50

10. MarchandBrustel, Y., Gual, P., Tanti, J. F., and Cormont, M. (2009) Involvement of TNF-alpha in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* 52, 932-940
11. Gustafsen, C., Kjolby, M., Nyegaard, M., Mattheisen, M., Lundhede, J., Buttenschon, H., Mors, O., Bentzon, J.F., Madsen, P., Nykjaer, A., and Glerup, S. (2014) The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab.* 19, 310-318
12. Kjolby, M., Andersen, O.M., Breiderhoff, T., Fjorback, A.W., Pedersen, K.M., Madsen, P., Jansen, P., Heeren, J., Willnow, T.E., and Nykjaer, A. (2010) Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab.* 12, 213-223
13. Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M. et al. (2010) From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466, 714-719
14. Patel, K.M., Strong, A., Tohyama, J., Jin, X., Morales, C.R., Billheimer, J., Millar, J., Kruth, H., and Rader, D.J. (2015) Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circ. Res.* 116, 789-796.
15. Mortensen, M.B., Kjolby, M., Gunnarsen, S., Larsen, J.V., Palmfeldt, J., Falk, E., Nykjaer, A., and Bentzon, J.F. (2014) Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 124, 5317-5322
16. Hu, F., Padukkavidana, T., Vwgter, C.B., Brady, O.A., Zheng, Y., Mackenzie, I.R., Feldman, H.H., Nykjaer, A., and Strittmatter, S.M. (2010) Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 68, 654-667
17. Carrasquillo, M.M., Nicholson, A.M., Finch, N. et al. (2010) Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 890-897
18. Carlo, A.S., Gustafsen, C., Mastrobuoni, G., Nielsen, M.S., Burgert, T., Hartl, D., Rohe, M., Nykjaer, A., Herz, J., Heeren, J., Kempa, S., Petersen, C.M., and Willnow, T.E. (2013) The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid-F3 peptide in the brain. *J. Neurosci.* 33, 358-370
19. Andersson, C.H., Hansson, O., Minthon, L., Andreasen, N., Blennow, K., Zetterberg, H., Skoog, I., Wallin, A., Nilsson, S., and Kettunen, P. (2016) A Genetic Variant of the Sortilin 1 Gene is Associated with Reduced Risk of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 53, 1353-1363
20. Goettsch, C., Hutcheson, J.D., Aikawa, M., Iwata, H., Pham, T., Nykjaer, A., Kjolby, M., Rogers, M., Michel, T., Shibasaki, M., Hagita, S., Kramann, R., Rader, D.J., Libby, P., Singh, S.A., and Aikawa, E. (2016) Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J. Clin. Invest.* 126, 1323-1336
21. Dumaresq-Doiron, K., Jules, F., and Lefrancois, S. (2013) Sortilin turnover is mediated by ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 90-95
22. Li, J., Bi, L., Hulke, M., Li, T. (2014) Fish oil and fenofibrate prevented phosphorylation-dependent hepatic sortilin 1 degradation in Western diet-fed mice. *J. Biol. Chem.* 289, 22437-22449
23. McCormick, P.J., Dunnarsq-Doiron, K., Pluviose, A.S., Pichette, V., Tosato, G., and Lefrancois, S. (2008) Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic* 9, 1984-1997
24. Ward, R.J., Xu, T.R., Milligan, G. (2013) GPCR oligomerization and receptor trafficking. *Methods Enzymol.* 521, 69-90
25. Eggert, S., Gonzalez, A.C., Thomas, C., Schilling, S., Schwarz, S.M., Tischer, C., Adam, V., Strecker, P., Schmidt, V., Willnow, T.E., Hermey, G., Pietrzik, C.U., Koo,

10

20

30

40

50

- E.H., and Kins, S. (August 10, 2017) Dimerization leads to changes in APP (amyloid precursor protein) trafficking mediated by LRP1 and SorLA. *Cell. Mol. Life Sci.* 10.1007/s00018-017-2625-7
26. Miner, J.J., Shao, B., Wang, Y., Chichili, G.R., Liu, Z., Klopocki, A.G., Yago, T., McDaniel, J.M., Rodgers, W., Xia, L., and McEver, R.P. (2011) Cytoplasmic domain of P-selectin glycoprotein ligand-1 facilitates dimerization and export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 286, 9577-9586
 27. Maurel, D., Kniazeff, J., Mathis, G., Trinquet, E., Pin, J.P., and Ansanay, H. (2004) Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. *Anal. Biochem.* 329, 253-262
 28. Westergaard, U.B., Sorensen, E.S., Hermey, G., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., and Petersen, C.M. (2004) Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J. Biol. Chem.* 279, 50221-50229
 29. Kitago, Y., Nagae, M., Nakata, Z., Yagi-Utsumi, M., Takagi-Niidome, S., Mihara, E., Nogi, T., Kato, K., and Takagi, J. (2015) Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 199-206
 30. Quistgaard, E.M., Madsen, P., Grøftehauge, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2009) Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 96-98
 31. Goettisch, C., Iwata, H., Hutcheson, J.D., O'Donnell, C.J., Chapurlat, R., Cook, N.R., Aikawa, M., Szulc, P., and Aikawa, E. (2017) Serum Sortilin Associates With Aortic Calcification and Cardiovascular Risk in Men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 1005-1011
 32. Ogawa, K., Ueno, T., Iwasaki, T., Kujiraoka, T., Ishihara, M., Kunimoto, S., Takayama, T., Kanai, T., Hirayama, A., and Hattori, H. (2016) Soluble sortilin is released by activated platelets and its circulating levels are associated with cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 249, 110-115
 33. Buttenschon, H.N., Demontis, D., Kaas, M., Elfving, B., Mølgaard, S., Gustafsen, C., Kaerlev, L., Petersen, C.M., Børglum, A.D., Mors, O., and Glerup, S. (2015) Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF. *Transl. Psychiatry* 5, e677
 34. Massa, F., Devader, C., Beraud-Dufour, S., Brau, F., Coppola, T., and Mazella, J. (2013) Focal adhesion kinase dependent activation of the P13 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 952-959
 35. Nyborg, A.C., Ladd, T.B., Zwizinski, C.W., Lah, J.J., and Golde, T.E. (2006) Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol. Neurodegener.* 1, 3
 36. Kienlen-Campard, P., Tasiaux, B., Van Flees, J., Li, M., Huysseune, S., Sato, T., Fei, J.Z., Aimoto, S., Courtoy, P.J., Smith, S.O., Constantinescu, S.N., and Octave, J.N. (2008) Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs. *J. Biol. Chem.* 283, 7733-7744
 37. Mazella, J., Zsurgur, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., and Vincent, J.P. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 26273-26276

10

20

30

40

50

38. Massa, F., Devader, C., Lacas-Gervais, S., Beraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2014) Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes Cancer* 5, 240-249
39. Lara-Castro, C., Luo, N., Wallace, P., Klein, R.L., and Garvey, W.T. (2006) Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55, 249-259
40. Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.* 278, 40352-40363
41. Li, W., Li, C., Zhou, T., Liu, X., Liu, X., Li, X., Chen, D. (2017) Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer* 16, 145
42. Hutcheson, J.D., Goettsch, C., Pham, T., Iwashita, M., Aikawa, M., Singh, S.A., and Aikawa, E. (2014) Enrichment of calcifying extracellular vesicles using density-based ultracentrifugation protocol. *J. Extracell. Vesicles.* 3, 25129.

【0198】

実施例3：ソルチリンの二量体化はヒト冠動脈平滑筋細胞における石灰化を増加させることができる

細胞外小胞（EV）は、細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たし、様々な疾患に関与する。ソルチリンは、石灰化促進因子である組織非特異的アルカリホスファターゼのEVへのその輸送により、血管石灰化を促進する。ソルチリンは、プロペプチドを有して合成され、プロペプチドは後期ゴルジネットワークにおいて切断されて成熟型が生成する。プロペプチドは、成熟ソルチリンに高い親和性を示し、リガンドの結合を妨害する。HEK 293細胞株において、ソルチリンの二量体化は、プロペプチド処理により減少し、プロペプチドの結合を阻害するソルチリン変異（S316E）は、ソルチリンの二量体化を増加させた。これらの結果は、ソルチリンの二量体化がソルチリンの輸送に重要な役割を果たすことを示唆した（Itoh S et al, JBC, 2018）。そのうえ、ソルチリンは、システイン783部位で分子間ジスルフィド結合を形成し、変異（C783A）による分子間ジスルフィド結合の喪失は、二量体化ソルチリンのEVへの運搬を止める。血管石灰化におけるソルチリンの役割をさらに理解するために、血管石灰化の主な起源である初代ヒト冠動脈平滑筋細胞（HCASMC）における二量体および多量体の形成に及ぼすソルチリンのS316EおよびC783A変異の効果を調査した。HisまたはFlagタグタンパク質と融合したソルチリンを、アデノウイルス感染により誘導し、次に、HCASMCおよびHCASMC由来EVにおけるソルチリンの二量体および／または多量体を、ジスルフィド結合を維持する非還元ウエスタンブロットを使用して検出した。結果として、S316E変異体は、HCASMCにおける多量体およびEVにおける二量体の増加を示した。これらの結果は、EVへのソルチリン輸送の増加が石灰化を促進する可能性があることを示している。さらに、C783A変異体は、HCASMCおよびEVにおけるソルチリン二量体化の減少を示したが、これは、ソルチリンのEVへの輸送の減少も起こすことができることを示唆している。結論として、二量体および多量体の形成は、HCASMC細胞およびHCASMC由来EVにおけるソルチリンの輸送に欠かせない。HCASMCおよびHCASMC由来EVにおけるソルチリン二量体化の阻害は、血管石灰化をさらに予防することができる。

【0199】

結果

His-野生型ソルチリンを発現しているHCASMCにLacZ、Flag-野生型ソルチリン、Flag-C783A変異体ソルチリン、およびFlag-S316E変異体ソルチリンを感染させた。感染の3日後にHCASMCを溶解させた。インプット試料（図11A）または免疫沈降試料（図11B）における非還元または還元（ジスルフィド結合を切断）ウエスタンブロットにより、ソルチリンの発現を検出した。結果は、HCASMC溶解物においてC783A変異体ソルチリ

ンが二量体の形成を減少させ、S316E変異体は多量体の形成を増加させることを示す（図11A～B）。

【0200】

His-野生型ソルチリンを発現しているHCASMCに、LacZ、Flag-野生型ソルチリン、Flag-C783A変異体ソルチリン、およびFlag-S316E変異体ソルチリンを感染させた。感染の3日後に、培地からHCASMC由来EVを単離した。非還元または還元ウエスタンブロットによりソルチリンの発現を検出した。結果は、HCASMC由来EVにおいてC783A変異体ソルチリンが二量体形成を減少させ、S316E変異体が二量体形成を増加させることを示す（図12）。

【0201】

HCASMCの培養およびアデノウイルス感染

HCASMC（PromoCell）を、上皮増殖因子（0.5ng/ml）、インスリン（5μg/ml）、塩基性線維芽細胞増殖因子-B（2ng/ml）、およびFBS（5%）を補充したSMC成長培地2（SMC-GM2、PromoCell）中で成長させた。3人の独立したドナーからのHCASMCを使用し、すべてのアッセイを、8回目の継代で行った。HCASMCにHisタグ付き野生型ソルチリンと、LacZ、Flagタグ付き野生型、C783AまたはS316Eソルチリンアデノウイルスとを、1000のMOI（感染多重度）で形質導入した。

【0202】

方法

免疫沈降：プロテアーゼ阻害剤（Roche）を含有するIP溶解緩衝液（Thermo Scientific）を用いてHCASMCを溶解した。細胞溶解物を、Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown（Thermo Scientific）と共に4℃で4時間、回転条件下でインキュベートした。ビーズ-タンパク質複合体をIP溶解緩衝液で3回洗浄した。次に、SDS-PAGEのために沈降物をレムリ緩衝液（Boston Bioproduct）により溶解した。

【0203】

培養培地からのHCASMC由来EVの単離：培養培地を1,000rpmで5分間遠心分離にかけて、細胞片を除去した。次に、上清およびEVを100,000gの超遠心分離（Beckman Coulter）により4℃で60分間分離した。IP溶解緩衝液によりEVを溶解した。

【0204】

ウエスタンブロット分析：タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、従来の湿式法により転写した。Flag（Sigma、F7425）、His（MBL、JM-3646）、およびヒトβ-アクチン（Novus、#AC-15）に対する一次抗体を使用した。β-アクチンをローディング対照として使用した。Pierce ECLウエスタンブロット基質試薬（Thermo Scientific）およびImageQuant LAS 4000（GE Healthcare）を使用して、タンパク質の発現を検出した。

【0205】

特定されるすべての特許および他の刊行物は、例えば、本発明と関連して使用され得るこのような刊行物に記載される方法論を説明および開示するために、参照により本明細書に明白に組み入れられる。これらの刊行物は、単に、本出願の出願日前のそれらの開示のために提供される。これに関する何物も、本発明者らが先行の発明のせいで、または任意の他の理由からこのような開示に先立つ権利を与えられないという承認として見なされるべきではない。日付に関するすべての記述またはこれらの文書の内容に関する表示は、本出願者に入手可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確性に関するいかなる承認も構成しない。

【0206】

配列

SEQ ID NO：1（ソルチリン完全配列- Cys⁷⁸³）：

10

20

30

40

50

MERPWGAADG

LSRWPHGLGL LLLLQLLPPS TLSQDRLDAP PPPAAPLPRW SGPIGVSWGL
RAAAAGGAFP RGGRWRRSAP GEDEECGRVR DFVAKLANNT HQHVFDDLRG
SVLSWVGDS TGVILVLTTF HVPLVIMTFG QSKLYRSEDY GKNFKDITDL
INNTFIRTEF GMAIGPENSG KVVLTAEVSG GSRGGRIFRS SDFAKNFVQT
DLPFHPLTQM MYSPQNSDYL LALSTENGLW VSKNFGGKWE EIHKAVCLAK
WGSDNTIFFT TYANGSCKAD LGALELWRTS DLGKSFKTIG VKIYSFGLGG
RFLFASVMAD KDTTRRIHVS TDQGDWTSMA QLPSVGQEQF YSILAANDDM
VFMHVDEPGD TGFGTIFTSD DRGIVYSKSL DRHLYTTTGG ETDFTNVTSL
RGVYITSVLS EDNSIQTMIT FDQGGRWTHL RKPENSECDA TAKNKNECSL
HIHASYSISQ KLNVPMAPLS EPNAVGVIA HGSVGDAISV MVPDVYISDD
GGYSWTKMLE GPHYYTILDS GGIIVAIHS SRPINVIKFS TDEGQCWQTY
TFTRDPIYFT GLASEPGARS MNISIWGFTE SFLTSQWVS Y TIDFKDILER
NCEEKDYTIW LAHSTDPEY EDGCILGYKE QFLRLRKSSM CQNGRDYVVT
KQPSICLCSL EDFLCDFGYR RPENDSKCVE QPELKGHDL FCLYGREEHL
TTNGYRKIPG DKCQGGVNPV REVKDLKKKC TSNFLSPEKQ NSKSNSVPPII

10

20

LAIVGLMLVT VVAGVLIVKK YVCGGRFLVH RYSVLQQHAE ANGVGDGVDAL
DTASHTNKSG YHDDSDEDLL E
【0207】

SEQ ID NO : 2 (ソルチリンプロペプチド) :
QDRLDAPPPP AAPLPRWSGP IGVSWGLRAA AAGGAFPRGG RWRR

30

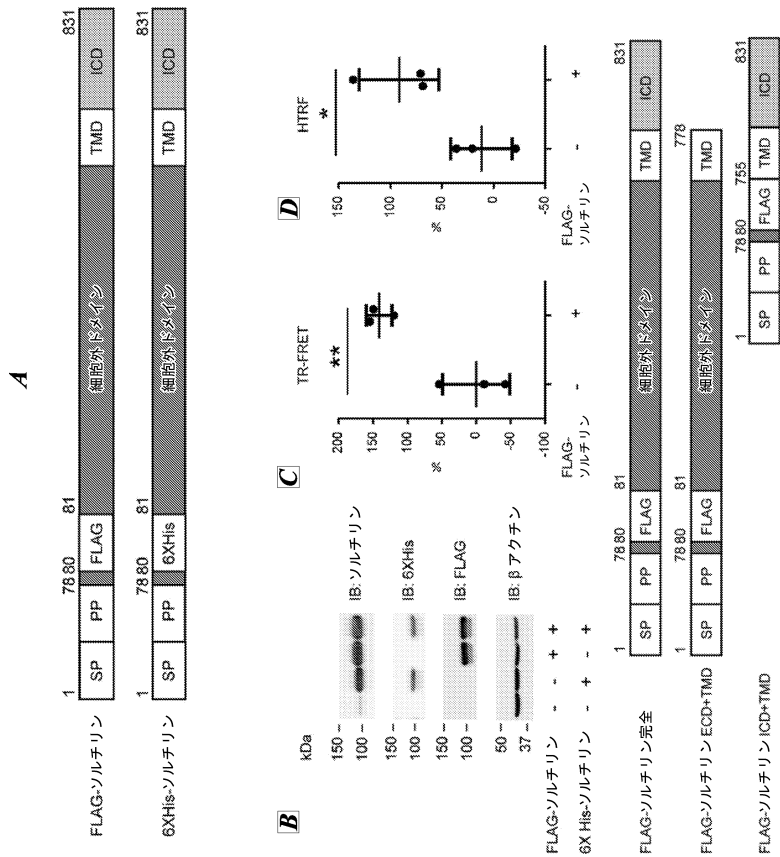
【0208】

SEQ ID NO : 3 (ヒトソルチリン1遺伝子：参照により本明細書に組み入れられるNCBI
参照配列：NG_028280.1を参照されたい)。

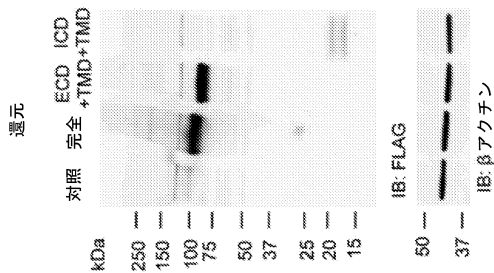
40

50

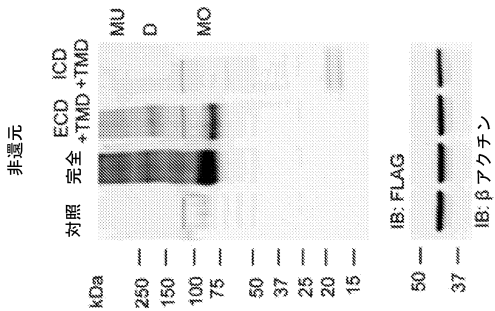
【図面】
【図 1】



【図 2 B】



【図 2 C】



10

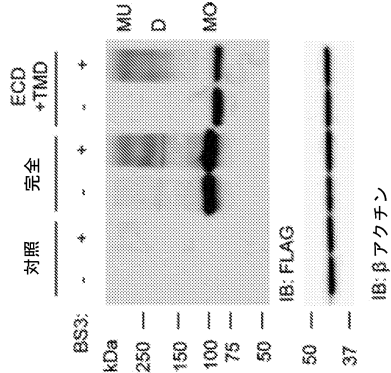
20

30

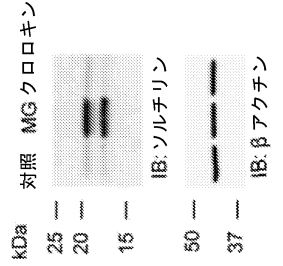
40

50

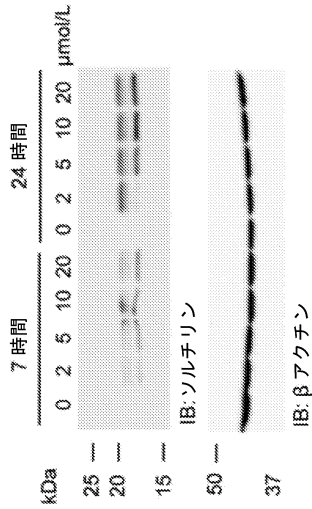
【図 2 D】



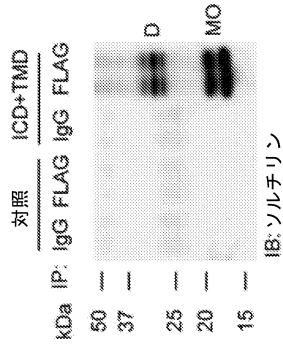
【図 2 E】



【図 2 F】



【図 2 G】



10

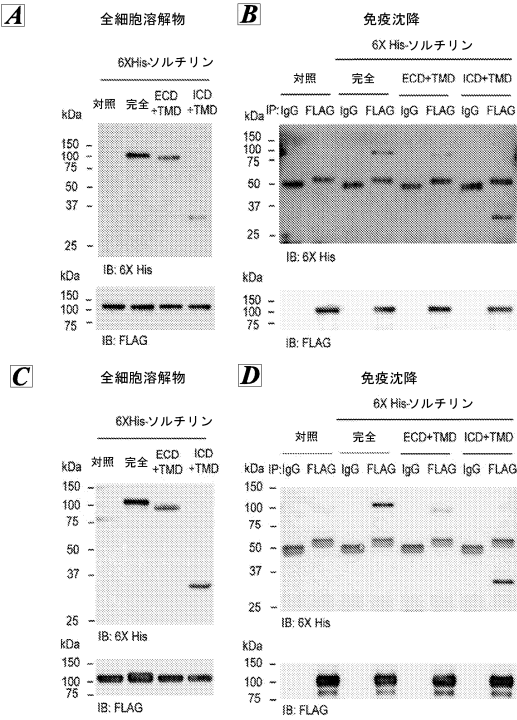
20

30

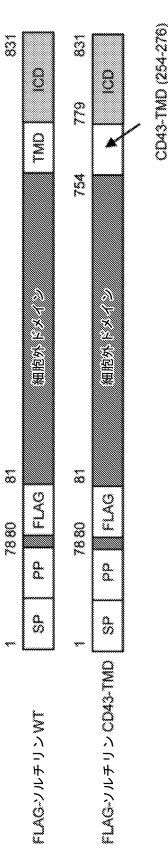
40

50

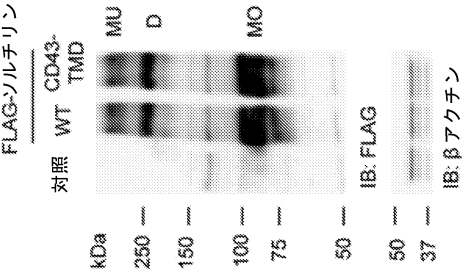
【図 3】



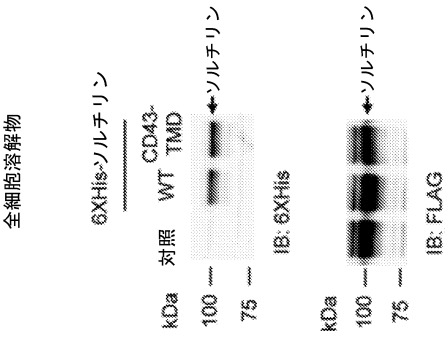
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

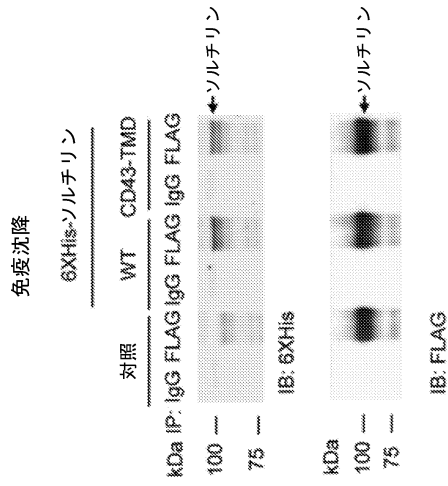
20

30

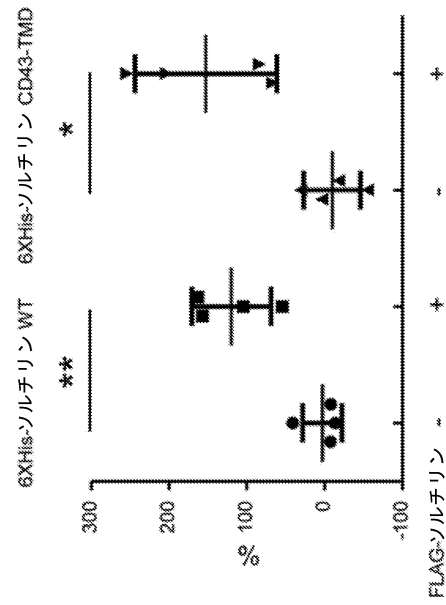
40

50

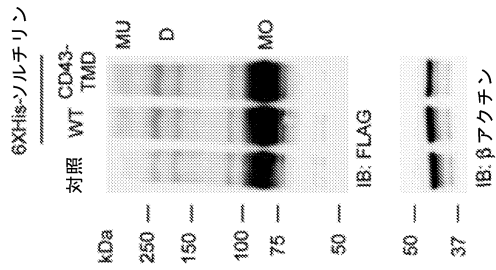
【図 4 D】



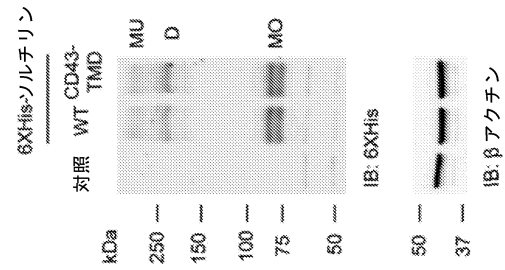
【図 4 E】



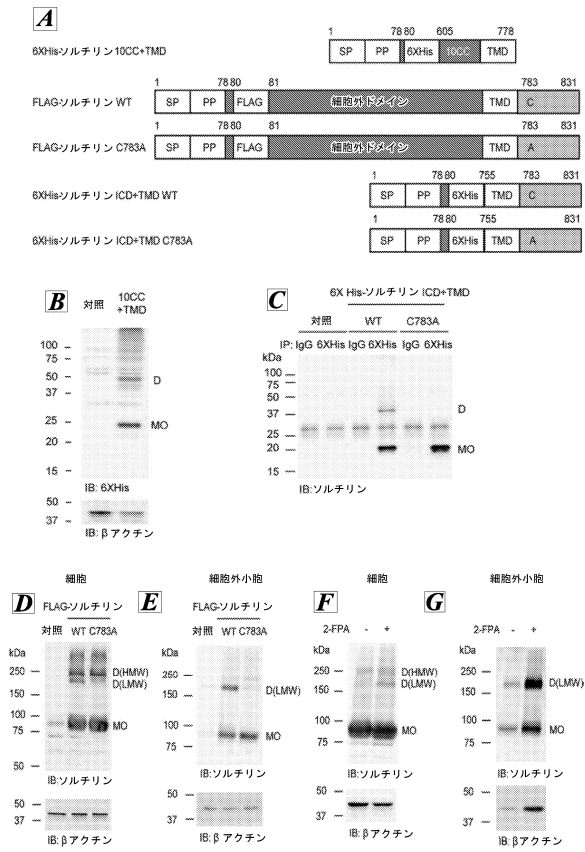
【図 4 F】



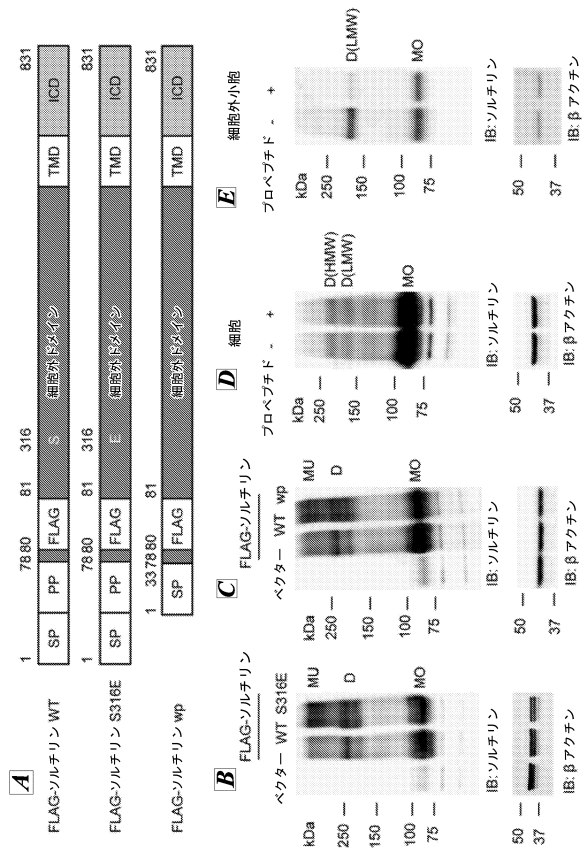
【図 4 G】



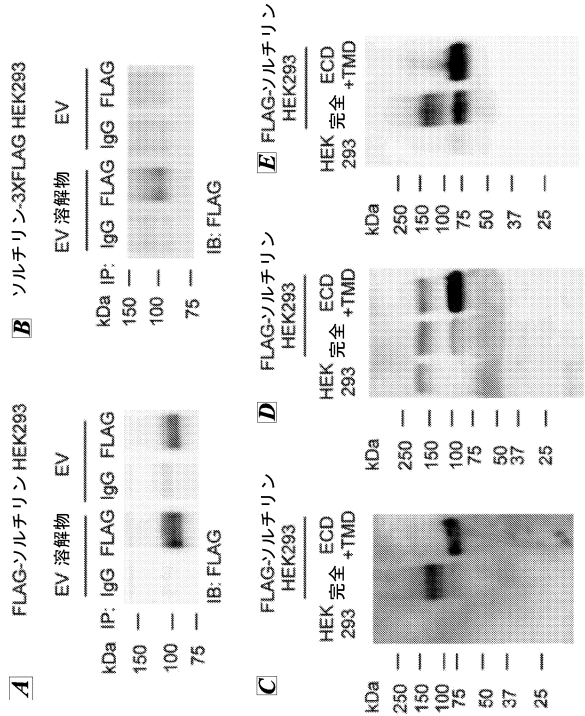
【図 5】



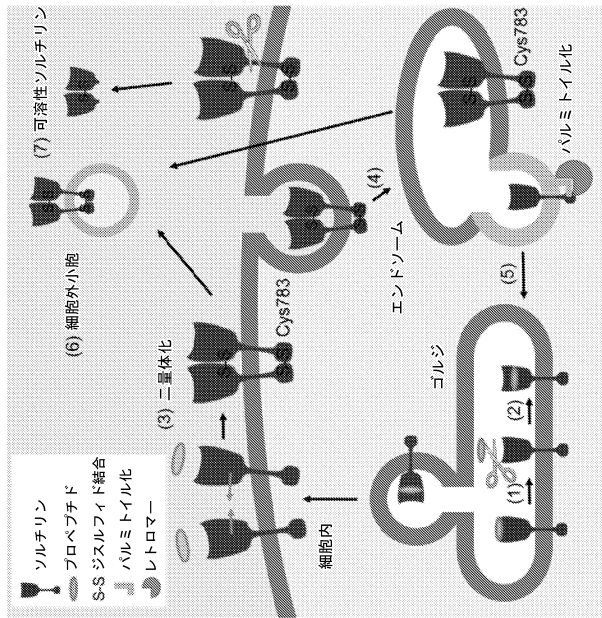
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

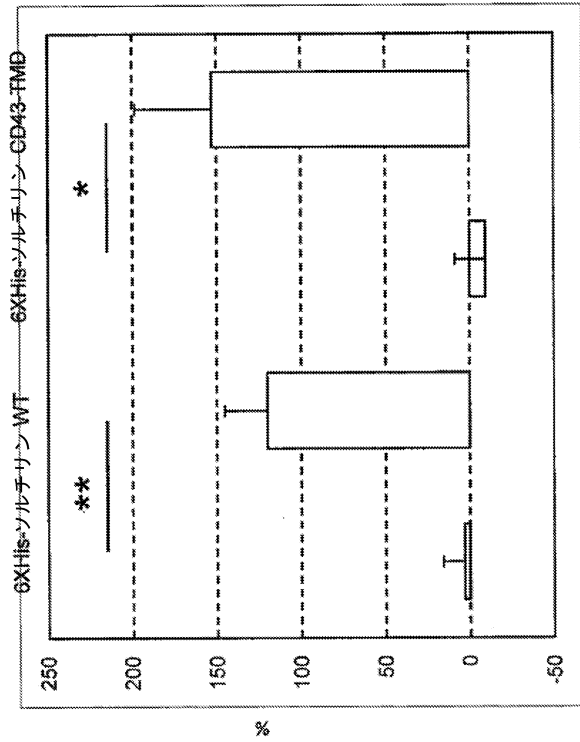
20

30

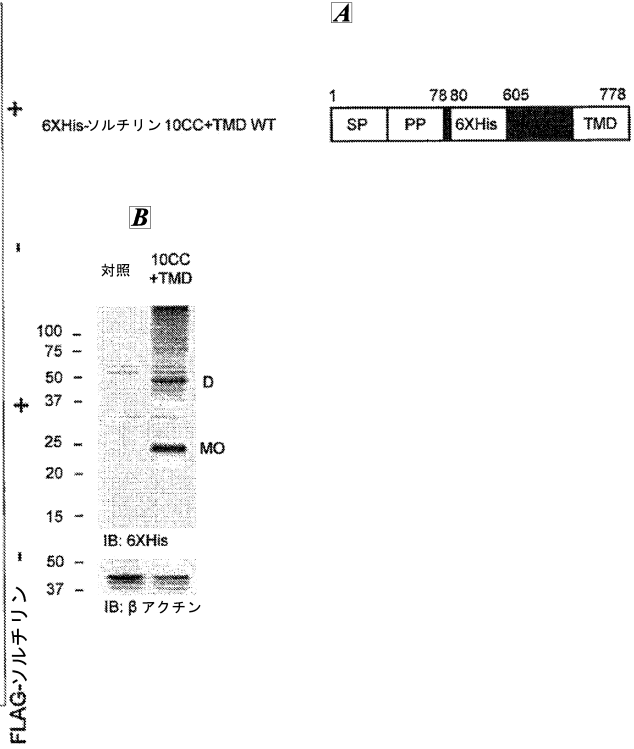
40

50

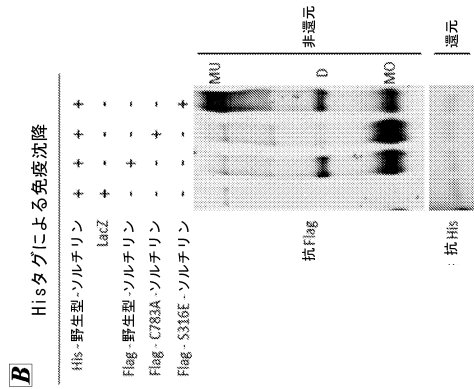
【図 9】



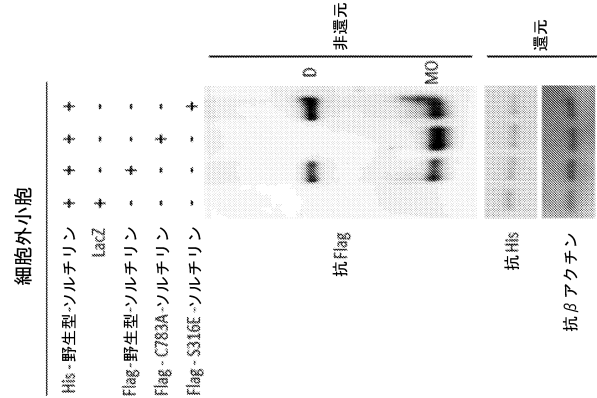
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

0007438119000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/705 (2006.01)
C 1 2 N 5/078 (2010.01)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
G 0 1 N 33/542 (2006.01)

C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 5/078
C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N 33/542

A

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 伊藤 晋介

東京都東大和市桜が丘1丁目1429-3 A705

(72)発明者 アイカワ エレナ

アメリカ合衆国 02467 マサチューセッツ州 チェスナットヒル ウォリス ロード 79

(72)発明者 相川 眞範

アメリカ合衆国 02467 マサチューセッツ州 チェスナットヒル ウォリス ロード 79

審査官 山▲崎▼ 真奈

(56)参考文献 特表2011-518791 (JP, A)

国際公開第2016/164637 (WO, A1)

米国特許出願公開第2011/0166032 (US, A1)

米国特許出願公開第2016/0060346 (US, A1)

米国特許出願公開第2010/0028333 (US, A1)

米国特許出願公開第2017/0014476 (US, A1)

国際公開第2016/164608 (WO, A1)

Peter J. McCormick et al., Palmitoylation Controls Recycling in Lysosomal Sorting and Trafficking, Traffic. Author manuscript, 2012年, pp.1-22

Uffe B. Westergaard et al., Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2004年, Vol. 279, No. 48, pp. 50221-50229

Guido Hermey, The Vps10p-domain receptor family, Cell. Mol. Life Sci., 2009年, Vol.66, pp.2677-2689

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

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)