

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-523663

(P2022-523663A)

(43)公表日 令和4年4月26日(2022.4.26)

| (51)国際特許分類              | F I                 | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------------|------------|
| A 6 1 K 38/18 (2006.01) | A 6 1 K 38/18       | 4 C 0 7 6  |
| A 6 1 P 1/16 (2006.01)  | A 6 1 P 1/16        | 4 C 0 8 4  |
| A 6 1 P 7/04 (2006.01)  | A 6 1 P 7/04        | 4 C 0 8 5  |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 0 5 | 4 C 0 8 7  |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00       | 4 H 0 4 5  |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全66頁) 最終頁に続く

|   |   |
|---|---|
| (21)出願番号 特願2021-542408(P2021-542408)  | (71)出願人 397060175<br>ヤンセン ファーマシューティカ エヌ .<br>ペー .<br>ベルギー国 ペー . - 2 3 4 0 ベルセ<br>トルンハウッサーヴェヒ 3 0  |
| (86)(22)出願日 令和2年1月24日(2020.1.24)  | (71)出願人 512201731<br>モンテフィオーレ メディカル センター<br>MONTE FIORE MEDICAL<br>CENTER<br>アメリカ合衆国 1 0 4 6 7 ニューヨ<br>ーク州 ブロンクス イースト トゥーハン<br>ドレッドアンドテンス ストリート 1 1 1 |
| (85)翻訳文提出日 令和3年9月21日(2021.9.21)   | (74)代理人 100092783<br>弁理士 小林 浩   |
| (86)国際出願番号 PCT/US2020/014934  | (74)代理人 100095360   |
| (87)国際公開番号 WO2020/154585  |   |
| (87)国際公開日 令和2年7月30日(2020.7.30)  |   |
| (31)優先権主張番号 62/796,806  |   |
| (32)優先日 平成31年1月25日(2019.1.25)   |   |
| (33)優先権主張国・地域又は機関<br>米国(US)   |   |
| (81)指定国・地域<br>AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA<br>,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(<br>AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A<br>T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR<br>,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,<br>最終頁に続く | 最終頁に続く  |

(54)【発明の名称】 放射線処置および/または放射線模倣剤処置を伴う、肝損傷を緩和し、肝臓の肥厚、再生、および細胞の生着を促進するための方法

(57)【要約】

標的放射線療法で処置された対象における肝損傷を緩和し、肝再生および生着を促進するための方法およびキットが記載される。特に、有効量のRWJ - 800088またはロミプロスチムなどのトロンボポエチン模倣剤が、放射線誘導性肝疾患を緩和し、放射線または放射線模倣剤と共に、肝再生および生着に有益な効果を促進するのに使用される。

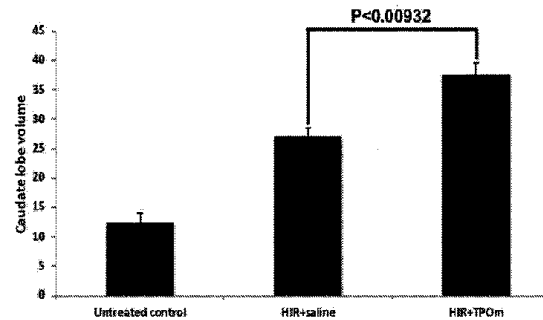


FIGURE 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

それを必要とする対象における標的放射線療法誘導性肝疾患を緩和する方法であって、前記対象に、有効量の、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を投与するステップを含み、好ましくは、前記 T P O 模倣剤が R W J - 8 0 0 0 8 8 またはロミプロスチムである、方法。

## 【請求項 2】

それを必要とする対象における放射線模倣剤誘導性肝疾患を緩和する方法であって、前記対象に、有効量の、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を投与するステップを含み、好ましくは、前記 T P O 模倣剤が R W J - 8 0 0 0 8 8 またはロミプロスチムである、方法。

10

## 【請求項 3】

放射線誘導性肝疾患または化学療法誘導性肝疾患が、肝腫大、肝壊死、アポトーシス、腹水、肝酵素の上昇、血小板減少症、肝類洞閉塞症候群 ( S O S )、肝中心静脈閉塞性疾患 ( V O D )、および肝線維症のうちのいずれか 1 つまたは複数である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

標的放射線療法で処置された対象における非照射肝葉の肥厚を増強する方法であって、前記対象に、有効量の、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を投与するステップを含み、好ましくは、前記 T P O 模倣剤が R W J - 8 0 0 0 8 8 またはロミプロスチムである、方法。

20

## 【請求項 5】

前記 T P O 模倣剤が、肝細胞およびタンパク質因子のうちの少なくとも 1 つと組み合わせる前記対象に投与され；前記肝細胞が、肝類洞内皮細胞 ( L S E C )、肝細胞、肝前駆細胞、肝幹細胞、多能性幹細胞、および外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞からなる群から選択される少なくとも 1 つを含み；好ましくは、前記肝細胞が、L S E C と、任意選択で肝細胞とを含み、前記タンパク質因子が、幹細胞増殖 / 分化因子 ( G C S F、G M C S F、H G F、V E F G、アンジオポエチン、C X C R 4 アンタゴニスト、R - スポンジン 1、F L T 3、アンフィレグリン) と、任意選択で肝細胞タンパク質因子とを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記 L S E C が、前記対象への前記 T P O 模倣剤の前記投与の前に、この後で、またはこれと同時に移植される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

それを必要とする対象における肝細胞の生着を促進する方法であって、  
a) 標的放射線を前記対象に投与するステップと；  
b) 前記対象に前記肝細胞を投与するステップと；  
c) 前記対象に有効量の、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を投与するステップと

を含み、これにより前記対象の肝臓内の前記肝細胞の生着を促進し、

40

好ましくは、前記 T P O 模倣剤が R W J - 8 0 0 0 8 8 またはロミプロスチムであり；

好ましくは、前記肝細胞が肝類洞内皮細胞 ( L S E C ) および / または肝細胞を含み；

より好ましくは、前記 L S E C および / または肝細胞が、前記対象にタンパク質因子と共に投与され、任意選択で肝細胞タンパク質因子と共に投与され；

さらに、より好ましくは、前記幹細胞増殖因子および / または幹細胞分化因子が、C X C R 4 アンタゴニスト、S D F 1、V E G F - A、V E G F - E、F G F - 2、E G F、G M - C S F、G C S F、R - スポンジン 1、F L T 3、アンフィレグリン、および M M P 1 4 のうちの 1 つまたは複数を含む、方法。

## 【請求項 8】

標的放射線療法で処置された対象における類洞閉塞を軽減する方法であって、

50

a) 前記対象に、肝細胞およびタンパク質因子のうちの少なくとも1つを投与するステップと；

b) 前記対象に、有効量の、配列番号1のアミノ酸配列を含むトロンボポエチン(TPO)模倣剤を投与するステップと

を含み、これにより前記類洞閉塞を軽減し、

好ましくは、前記TPO模倣剤がRWJ-800088またはロミプロスチムであり；

好ましくは、前記肝細胞が肝類洞内皮細胞(LSEC)および/または肝細胞を含み；

より好ましくは、前記LSECおよび/または肝細胞が、前記対象にタンパク質因子と共に投与され、任意選択で肝細胞タンパク質因子と共に投与され；

さらに、より好ましくは、前記幹細胞増殖因子および/または幹細胞分化因子が、CXCR4アンタゴニスト、SDF1、VEGF-A、VEGF-E、FGF-2、EGF、GM-CSF、G-CSF、FLT3、R-スポンジン1、アンフィレグリン、およびMMP14のうちの1つまたは複数を含む、方法。 10

【請求項9】

前記TPO模倣剤が、前記対象に、前記LSECおよび/または肝細胞の移植の前に、この後で、またはこれと同時に投与される、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

前記対象が、肝疾患のための標的放射線療法で処置される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】 20

前記対象が、前記肝疾患のための定位放射線療法または肝動脈化学塞栓術(TACE)で処置される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記対象が、1~10分割、10~70グレイ(Gy)の線量の標的放射線で処置される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記対象が、肝臓腫瘍または肝転移、好ましくは肝がん、より好ましくは肝細胞癌(HCC)のために処置される、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記対象が、肝細胞の生着のための移植前肝照射(HIR)で処置される、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項15】

前記対象が、消化器がんのための放射線療法で処置されるか、または前記対象が、骨髄移植のための移植前照射で処置される、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記TPO模倣剤が、前記対象にある線量の放射線が投与される24時間前~24時間後に、好ましくは約2時間~24時間前または後に、前記対象に投与される、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記TPO模倣剤が、治療有効量で前記対象に投与される、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項18】

前記TPO模倣剤の前記有効量が、前記対象に静脈内注射、筋肉内注射、皮内注射、または皮下注射のうちのいずれか1つにより投与される、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記有効量の前記TPO模倣剤の前記投与が、非照射肝葉の肝臓能力の増大、照射組織の形成不全の増大、および前記対象の血液中のヒアルロン酸または肝トランスアミナーゼなどの循環肝損傷マーカーの上昇の低減のうちの少なくとも1つをもたらす、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。 50

## 【請求項 20】

それを必要とする対象における放射線誘導性肝疾患を緩和するためのキットであって、有効量の、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物と、前記放射線誘導性肝疾患を緩和するための少なくとも 1 つのさらなる治療剤またはデバイスとを含み、任意選択で、前記 T P O 模倣剤を前記対象に投与するためのツールをさらに含み、好ましくは、前記 T P O 模倣剤が R W J - 8 0 0 0 8 8 またはロミプロスチムである、キット。

## 【請求項 21】

前記さらなる治療剤が、鎮痛剤、消毒剤、他の T P O 模倣剤、他のサイトカイン、可溶性 m p l 受容体、造血因子、インターロイキン、タンパク質因子、抗体、および化学療法剤からなる群から選択される、請求項 20 に記載のキット。

## 【請求項 22】

肝細胞およびタンパク質因子のうち少なくとも 1 つをさらに含み、好ましくは、前記肝細胞が肝臓洞内皮細胞 ( L S E C ) および / または肝細胞を含み、前記タンパク質因子が増殖因子を含み、任意選択で肝細胞増殖因子を含み ; より好ましくは、前記増殖因子が、C X C R 4 アンタゴニスト、S D F 1、V E G F - A、V E G F - E、F G F - 2、E G F、G M - C S F、G C S F、F L T 3、R - スポンジン 1、アンフィレグリン、および M M P 1 4 のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 20 または 21 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、2019年1月25日に提出された、米国特許出願第 62 / 796, 806 号明細書の利益を主張する。

## 【0002】

電子的に提出される配列表への言及

本出願は、E F S - W e b を介して、A S C I I でフォーマットされ、ファイル名を「S e q u e n c e L i s t i n g f o r 6 8 8 0 9 7 . 0 9 5 6 / 4 5 6 W O」とし、作成日を2020年1月23日とし、約 3 . 6 k b のサイズを有する配列表として提出される配列表を含有する。E F S - W e b を介して電子的に提出される配列表は、本明細書の一部であり、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

## 【0003】

本発明は、それを必要とする対象における肝損傷を緩和し、肝臓の再生、肥厚、および肝細胞の生着を促進するための方法およびキットに関する。特に、本発明は、対象に有効量のトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を単独でまたは細胞移植と組み合わせ、放射線または放射線模倣剤と共に投与して、有益な効果を促進するステップを含む方法のほか、有効量の T P O 模倣剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を含有するキットに関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

肝疾患は、世界中で、罹患および死亡の著明な原因である ( Yang, J., Int. J. Environ. Res. Public Health 2018, 15, 170 )。肝臓の疾患は、ウイルス感染、アルコール、および遺伝子の突然変異を含む、様々な因子により引き起こされる。

## 【0005】

肝臓腫瘍は、肝疾患を伴う患者において、はるかに高頻度で生じ、米国では、現在、増大しつつあり、世界中で、最も一般的な悪性腫瘍のうちの 1 つを表し、毎年約 1 0 0 万例が発生している ( Howlader et al., SEER Cancer Statistics Review 1975-2014, 2017:2012-2014 )。肝臓腫瘍の中で、肝細胞癌 ( H C C ) は、世界中で、第 2 のがん関連死因であり、毎年、約 7 4 5 , 0 0 0 例を占めている ( Siegel et al., CA Canc

10

20

30

40

50

er J. Clin., 2015, 65:5-29)。決定的処置を施さなければ、肝がんは、通例、進行し、がん患者の、著明な罹患および死亡を引き起こし；位置特定された肝がんベースの、患者の5年生存は、27.7%である(Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 [Vintage 2009 Populations], National Cancer Institute. Bethesda, MD)。HCCを伴う患者のうちで、切除可能な腫瘍を呈する患者は、15~20%にとどまり、5年全生存(OS)は、40~70%であり、5年無進行生存(PFS)は、23~50%である(Bismuth H et al. Semin Liver Dis. 1999, 19(3):311-22)。

#### 【0006】

HCC患者のための、現行の処置選択肢は、肝移植、腫瘍切除、肝切除、ソラフェニブ化学療法、高周波アブレーション、肝動脈化学/放射線塞栓術、または放射線療法を含む(Bruix, J. Gastroenterology, 2016, 150: 835-853; Keane, F. Liver Cancer, 2016, 5:198-209)。肝移植を受けられない、かなりの数のHCC患者はまた、これらの他の処置選択肢の候補者でもないが、これは、患者の肝機能不良のために、手順自体に由来する、患者の死の危険性が、極めて高いことに起因する。門脈塞栓/結紮は、肥厚を介して肝再生を誘導し、患者の健全な肝臓能力を増強し、これにより、患者を、これらの介入に適格とするように、近年、開発され、適用されている外科技法である(Cieslak, K. Surgery, 2017, 162: 37-47)。

10

#### 【0007】

損傷または罹患した肝臓を、健全状態に回復させ、その生物学的機能を再確立しうる、細胞移植療法に対して、大きな臨床的必要が存在する。例えば、肝疾患に関して述べると、米国だけで、毎年、40,000例を超える患者が、末期肝疾患で死亡し、約2000万人が、肝疾患を患っていると推定される(Hagmann, M., Science, 287:1185, 1187 (2000))。遺伝性代謝性肝疾患または末期肝不全を伴う患者のために、同所肝移植(OLT)は、処置選択肢であるに過ぎず、大半の患者は、深刻なドナー不足のために、OLTを受けずに死ぬ。理論的には、肝臓に原発がんまたは転移がんを伴う、多くの患者もまた、OLTを伴う肝切除により、治癒される可能性もあり、患者の生存および/または生活の質が、著明に改善される可能性もあろう。しかし、実際は、肝臓の提供を待つ、長いリストのために、がん患者が、OLTについて検討されることは稀である。

20

#### 【0008】

放射線療法(RT)は、全ての非肝がん患者の3分の1で使用されているが、肝臓悪性腫瘍における放射線療法の役割は、肝臓の放射線忍容性が小さいために、従来、限定的であった。早期の研究は、30~35 Gyを超える、全肝臓放射線は、放射線誘導性肝疾患(RILD)の高危険性と関連することを裏付けた(Lawrence et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1995, 31:1237-48; Reed et al., Am. J. Pathol., 1966, 48:597-611)。肝照射療法の適用が限定される潜在的理由は、RILDの防止または処置のために利用可能な、広く許容された治療または放射線緩和剤が、現在のところ存在しないことである。さらに、RILDの確率は、ベースラインの肝機能不全と共に増大する(Pan et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2010, 76:S94-100)。近年、遡及的研究は、肝臓に対する、体幹部定位放射線療法(SBRT)を受ける患者のうちの11.2%が、RILDを発症することを報告した(Lo et al., PLoS ONE, 2017, 12(5): e0177793)。骨髄移植のための移植前照射を施されたが、また、RILDも発症した患者は、著明な死亡(84%)を招来した(Fulgenzi et al., Hepatic Med. Evid. Res., 2016, 8:105-113)。さらに、肝臓は、一般に、消化管に近接し、サイズが大きいために、放射線療法による消化器がんの処置時に、同時偶発的に照射される臓器の1つである(Pan et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2010, 76:S94-100)。

30

40

#### 【0009】

肝臓は、その高血管分布と、その血管を裏張りする内皮細胞の、極度の放射線感受性とに起因して、最も放射線感受性が大きな臓器の1つである(Emami et al., Int. J. Radiat

50

. *Oncol. Biol. Phys.*, 1991, 21:109-22) (Baker et al., *Cancer Invest.*, 1989, 7:287-94)。生理学的臓器サイズを一定に保ちながら、非照射肝臓は、照射萎縮肝葉を補償するように、肥厚を受ける (Guha et al., *Seminars in Oncology*, 2011, 21(4):256-263)。肝照射はまた、類洞のうっ血、中心部の内皮下空間および小葉下静脈の浮腫性拡張、加えてなお、類洞閉塞を結果としてもたらしうる、肝類洞内皮細胞 (LSEC) への損傷も引き起こしうる (Pan et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010, 76:S94-100)。結果として、患者を保護し、RILDを防止するように、照射組織を最小化する、慎重な処置計画が要求される (Kalman et al., *Int. J. Radiat. Oncol.*, 2017, 98:662-682; Guha et al., *Seminars in Oncology*, 2011, 21(4):256-263)。処置計画の進歩により、照射体積が十分に小さい (全肝体積の約 1/3 である) 場合は、極高線量 (最大で 90 ~ 100 Gy) が投与されうる (Dawson et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physics.*, 2002, 53:810-821)。体幹部定位放射線療法 (SBRT)、および複数回 (分割) にわたる放射線の投与は、放射線の全体的毒性プロファイルを軽減し、患者におけるその使用を可能とするように適用されつつある、他の手法である。

10

20

30

40

50

#### 【0010】

トロンボポエチン (TPO) とは、肝臓により合成および分泌される増殖因子である。トロンボポエチン受容体 (TPO-R または c-Mpl) を介して、巨核球の増殖および分化を刺激する、体液性増殖因子として作用することに加えて、組換えヒト TPO (rhTPO) は、*in vitro* において、血小板の活性化、ならびに肝臓内皮細胞の増殖および遊走を促進することが示されている (Cardier et al., *Blood*, 1998, 91:923-929)。

#### 【0011】

デフィプロチドは、放射線誘導性肝疾患 (RILD) と関連する、類洞閉塞症候群の緩和について、臨床において承認された、唯一の薬物である。デフィプロチドは、ブタ腸粘膜の DNA から精製されたヌクレオチドの混合物 (Fulgenzi et al., *Hepatic Med. Evid. Res.*, 2016, 8:105-113; Guha et al., *Seminars in Oncology*, 2011, 21(4):256-263) であり、類洞の透過性および LSEC の離開を低減する、LSEC の活性をモジュレートすることにより、類洞損傷を軽減する。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0012】

また、肝臓内の、類洞内皮細胞、幹細胞、肝細胞前駆細胞、または肝細胞など、肝細胞の生着を促進するための、臨床において承認された薬物も存在しない。加えて、また、肝臓の肥厚の増強について承認された薬物も存在しない。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

今や、トロンボポエチン (TPO) 模倣剤は、それを必要とする対象において、肝損傷を緩和し、肝再生を促進し、肝体積を増大させ、肝細胞の生着を促進しうることが発見された。例えば、TPO 模倣剤は、標的放射線療法誘導性肝疾患 (RILD) に対する、著明な緩和効果を有し、非照射肝葉の肥厚を増強し、単独で、または肝類洞内皮細胞 (LSEC) などの肝細胞、および / またはタンパク質因子の投与と共に使用される場合に、それを必要とする対象において、内因性骨髄由来肝細胞、または肝類洞内皮細胞 (LSEC) などの外因性肝細胞の生着を促進しうるが見出された。また、放射線の前における TPO 模倣剤による処置は、肝臓の保護および修復に対する効果を、放射線の後における TPO 模倣剤処置と比較して増強した可能性があることも発見された。TPO 模倣剤が、後照射に施される場合、LSEC 移植は、RILD に対する保護が要求されるのに対し、TPO 模倣剤が、照射前に、予防的に施される場合、LSEC 移植は、RILD に対する保護が要求されない。

#### 【0014】

したがって、1つの一般的な態様では、本出願は、それを必要とする対象におけるRILDを緩和する方法であって、対象に、有効量のトロンボポエチン(TPO)模倣剤を投与するステップを含み、好ましくは、TPO模倣剤が配列番号1のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、TPO模倣剤がRWJ-800088またはロミプロスチムである、方法に関する。RILDの例は、肝腫大、腹水、肝酵素の上昇、血小板減少症、肝類洞閉塞症候群(SOS)、肝中心静脈閉塞性疾患(VOD)、および肝線維症を含むがこれらに限定されない。

【0015】

別の一般的な態様では、本出願は、標的放射線療法で処置された対象における非照射肝葉の肥厚を増強する方法であって、対象に有効量のトロンボポエチン(TPO)模倣剤を投与するステップを含み、好ましくは、TPO模倣剤が配列番号1のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、TPO模倣剤がRWJ-800088またはロミプロスチムである、方法に関する。好ましくは、非照射肝葉の肥厚は照射肝葉の肝萎縮を補償する。

10

【0016】

別の一般的な態様では、本出願は、それを必要とする対象における内因性肝細胞もしくは外因性肝細胞、それらの前駆細胞、または幹細胞の生着を促進する方法であって、(a)対象に標的放射線または放射線模倣剤治療を投与するステップと；(b)対象に肝細胞を投与するステップと；(c)対象に有効量のトロンボポエチン(TPO)模倣剤を投与するステップと、これにより、対象の肝臓内の前記肝細胞の生着を促進するステップとを含む方法に関する。好ましくは、TPO模倣剤は、配列番号1のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、TPO模倣剤は、RWJ-800088またはロミプロスチムである。最も好ましくは、対象における肝細胞の生着は、肝機能を回復させる。例えば、生着した肝細胞は、血漿中および肝臓内の両方において、第VII因子(FVII)の発現を増大させる。

20

【0017】

別の一般的な態様では、本出願は、放射線、放射線模倣剤、またはこれらの両方で処置された対象における類洞閉塞を軽減する方法であって、対象に有効量のトロンボポエチン(TPO)模倣剤を単独でまたは肝細胞動員剤および/または骨髄幹細胞動員剤(例えば、CXCR4アンタゴニスト)と組み合わせて投与するステップを含む方法に関する。好ましくは、TPO模倣剤は、配列番号1のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、TPO模倣剤は、RWJ-800088またはロミプロスチムである。好ましくは、方法は、放射線模倣剤または放射線療法への曝露から生じる、類洞閉塞症候群(SOS)の発症を防止する。

30

【0018】

ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、別の活性薬剤と組み合わせて対象に投与される。例えば、TPO模倣剤は、LSEC、肝細胞、前駆細胞、多能性幹細胞、肝幹細胞、または1つもしくは複数のトランス遺伝子を発現する組換え肝細胞などの肝細胞の移植と組み合わせて投与されうる。TPO模倣剤はまた、タンパク質因子、CXCR4アンタゴニストなどの骨髄幹細胞動員因子；GM-CSF、G-CSF、もしくはFLT3リガンドなどの増殖因子と組み合わせて投与することもでき、任意選択で、さらに、肝細胞増殖因子と組み合わせて投与することもできる。TPO模倣剤はさらに、移植肝細胞(LSECなど)および増殖因子の投与とも組み合わせて投与されうる。TPO模倣剤は、肝細胞(例えば、LSEC、肝細胞)またはタンパク質因子など、他の活性薬剤の前に、対象に投与される場合もあり、この後で、対象に投与される場合もあり、これと同時に、対象に投与される場合もある。

40

【0019】

ある特定の実施形態では、本出願の処置を必要とする対象は、肝疾患のための標的放射線療法、骨髄移植のための移植前照射、または消化器がんのための標的放射線療法など、RILDをもたらす放射線療法、好ましくは、標的放射線療法で処置された対象である。別の実施形態では、対象は、肝細胞の生着のための移植前肝照射(HIR)で処置され

50

る。TPO模倣剤は、放射線療法の前に、この後で、またはこれと同時に、対象に投与される。ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、対象にある線量の放射線が投与される少なくとも約24時間前から少なくとも約24時間後に、対象に投与される。一部の実施形態では、TPO模倣剤は、ある線量の放射線の24~2時間前に、またはこの24~2時間後で投与される。他の実施形態では、TPO模倣剤は、放射線の投与の1分間~2時間前に、またはこの1分間~2時間後で投与される。一部の実施形態では、TPOmは、放射線の投与の2~24時間後で、例えば、肝細胞の投与と共に投与される。

【0020】

ある特定の実施形態では、対象は、1~10分割、10~70グレイ(Gy)の線量の、好ましくは肝臓への、標的放射線で処置される。

10

【0021】

ある特定の実施形態では、TPO模倣剤の有効量は、対象の体重1kg当たり約1~約5 $\mu$ gである。好ましい実施形態では、TPO模倣剤の有効量は、対象の体重1kg当たり約1 $\mu$ gである。ある特定の好ましい実施形態では、TPO模倣剤の有効量は、皮下投与または静脈内投与される場合、対象の体重1kg当たり約3 $\mu$ gである。

【0022】

ある特定の実施形態では、TPO模倣剤の有効量は、対象に、静脈内、筋内、または皮下注射により投与される。好ましい実施形態では、TPO模倣剤は、皮下注射により投与される。

【0023】

別の一般的態様では、本出願は、それを必要とする対象におけるRILDを緩和するためのキットに関する。キットは、RILDを緩和するために、有効量のTPO模倣剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を含む。任意選択で、キットは、少なくとも1つのさらなる治療剤をさらに含む。任意選択で、キットは、TPO模倣剤を、対象に投与するためのデバイスまたはツールをさらに含む。好ましくは、キットは、配列番号1のアミノ酸配列を有するTPO模倣剤、より好ましくは、RWJ-800088またはロミプロスチムであるTPO模倣剤を含む。ある特定の実施形態では、キットは、肝細胞、好ましくは、LSECをさらに含み、任意選択でまた、対象への投与のための肝細胞もさらに含む。他の実施形態では、キットは、増殖因子または骨髄幹細胞刺激剤をさらに含む。

20

【0024】

前出の「発明の概要」、ならびに本出願の好ましい実施形態についての、以下の「発明を実施するための形態」は、添付の図面と共に読まれた場合に、よりよく理解されるであろう。しかし、本出願は、図面に示された、正確な実施形態に限定されないことを理解されたい。

30

【0025】

本特許または本出願のファイルは、有色で作成された少なくとも1つの図面を含有する。有色の図面を伴う本特許または本出願公開のコピーは、その旨を依頼し、必要な費用を支払えば、特許庁により支給される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】TPOm(RWJ-800088)の投与を伴う部分的肝照射(HIR)、およびこれを伴わない部分的HIRの後における、非処置肝尾状葉の平均値体積を示す図である。

40

【図2A-2B】図2Aは、実験2における、標的肝照射(HIR)+TPOm(RWJ-800088)+LSEC移植についての研究の時系列を例示する図である。図2Bは、肝類洞内の移植細胞の再増殖の検出のために使用される、DPPIV(+ / +)LSEC細胞を移植された、マウスDPPIV(- / -)モデルについてのグラフ表示である。

【図3A-3C】TPOm(RWJ-800088)を施される動物の照射肝臓を再増殖させる、移植後におけるDPPIV(+ / +)LSEC細胞を検出する免疫組織化学染色を示す図である。図3Aは、DDPIV染色を示さない、移植前における、DPPIV(

50

- / - ) 移植レシピエント肝 ( 陰性対照 ) を示し ; 図 3 B は、D P P I V ( + / + ) である L E S C ドナー C 5 7 B 1 6 マウス ( 陽性対照 ) における、陽性 D P P I V 染色を示し ; 図 3 C は、D P P I V ( + / + ) 細胞の再増殖を伴わない H I R + L S E C を示し ; 図 3 D は、L S E C + A d H G F 処置、および肝臓を再増殖させる D P P I V ( + / + ) 細胞を示し ; 図 3 E は、T P O m を、肝照射後に施した場合に、大規模な L S E C の再増殖が見られることを示し ; 図 3 F は、再増殖した肝葉を、低検出力で示す。

【図 3 D - 3 E】( 上記の通り。 )

【図 3 F】( 上記の通り。 )

【図 4 A - 4 B】T P O m ( R W J - 8 0 0 0 8 8 ) による処置が、照射組織内の肝損傷を低減することを裏付ける図である。図 4 A は、照射肝葉の相対変化を示し、図 4 B は、非照射肝葉内の相対変化を示す。

10

【図 5 A - 5 B】移植の 2 カ月後における、肝臓内の残留灌流欠乏を定量する S P E C T - C T を示す図である。図 5 A は、S P E C T 原理についての基本的概略を裏付け ; 図 5 B は、放射線投与のために使用される、5 mm コリメータに対応する、照射肝組織内の灌流欠乏を示し ; 図 5 C は、L S E C 移植に続く、T P O m ( R W J - 8 0 0 0 8 8 ) 注射で処置された動物における灌流の回復を示し ; 図 5 D は、T P O m + L S E C 群では、放射線の 2 カ月間後における残留欠損が、肝硬変マウス肝臓内で、有意に低減されたことを示し ; 図 5 E は、照射肝組織の欠損体積の、L S E C 移植を伴わない、肝照射 ( H I R ) の 2 時間前および 2 4 時間前、ならびに H I R の 1 0 分後における T P O m の投与後における非照射組織と比較した相対百分率、H I R の 2 4 時間後における L S E C 移植、なら

20

びに H I R の 2 4 時間後および 1 0 分間後における T P O m の投与と比較した相対百分率を示す。データは、照射後に、T P O m を、L S E C 移植と共に投与した場合における、欠損形成の有意な緩和、および L S E C 移植を伴わずに投与された場合の、T P O m 単独による欠損体積の有意な低減を示す。

【図 5 C - 5 D】( 上記の通り。 )

【図 5 E】( 上記の通り。 )

【図 6】T P O m またはロミプロスチムが、H I R の 4 ~ 5 日後における L S E C 移植の 1 0 分後に投与される場合における、L S E C の生着を示す図である。

【図 7】T P O m + 肝類洞内皮細胞 ( L S E C ) の移植、T P O m + 照射後に投与されるプレリキサホル、ならびに T P O m + 照射前および照射後に投与されるプレリキサホルの放射線誘導性肝疾患に対する効果を査定する研究において、非照射右葉の重量の、照射左葉の重量に対する比を示す図である。

30

【図 8】T P O m + 肝類洞内皮細胞 ( L S E C ) の移植、T P O m + 照射後に投与されるプレリキサホル、ならびに T P O m + 照射前および照射後に投与されるプレリキサホルの放射線誘導性肝疾患に対する効果を査定する研究において、S P E C T - C T により定量される、肝硬変マウスにおける欠損体積 / 肝体積を示す図である。

【図 9】実験 6 の 1 2 0 日目におけるドラブキン出血試験後の生存を示す、カプラン - マイヤー曲線を提示する図である。経過日数は、出血試験 1 2 0 日目以後の日数である。

【図 1 0 A - 1 0 B】H I R + L S E C + J N J - 2 6 3 6 6 8 2 1 または A d H G F 処置群における F V I I I の、血漿 ( 1 0 A ) または肝臓 ( 1 0 B ) について、非処置 A 型血友病マウスと比較した産生についての E L I S A 解析を裏付ける図である。n = 5 および \* \* \* P < 0 . 0 0 5 である。W T : 野生型 ; H I R : 肝照射 ; L S E C : 肝臓類洞内皮細胞である。

40

【図 1 1】第 V I I I 因子について染色された肝臓スライド ( 赤 )、L Y V E - 1 ( 緑 ) ( 肝類洞内皮細胞についての選択的抗体 )、D A P I ( 青 ) ( 細胞を示す D N A 染料 )、および F V I I I + L Y V E - 1 についての融合領域 ( 黄 ) について査定する免疫蛍光を示す図である。( A ) W T = C 5 7 / B L 6、( B ) L S E C ドナーマウス = B 6 1 2 9 S F 2 / J、( C ) A 型血友病マウス F 8 ( - / - )、( D ) A 型血友病マウス F 8 ( - / - ) + H I R、( E ) F 8 ( - / - ) + H I R + L S E C + J N J - 2 6 3 6 6 8 2 1 ( T P O m )、( F ) F 8 ( - / - ) + H I R + L S E C + A d H G F、および ( G ) 二

50

次抗体陰性対照免疫蛍光である。全画像 = 10 の拡大率であり、ズーム画像 = 64 倍の拡大率であり、白色バーは、20  $\mu\text{m}$  (マイクロメートル) である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本開示は、少なくとも部分的に、それを必要とする対象における放射線誘導性肝疾患を緩和するための治療剤としての、トロンボポエチン (TPO) 模倣剤の同定に基づく。TPO 模倣剤は、製剤化され、放射線誘導性肝疾患を緩和するように、放射線療法に曝露されるか、または曝露されることになる対象に投与されうる。

【0028】

多様な刊行物、論考、および特許が、「背景技術」において、かつ、本明細書を通して引用または記載されるが、これらの参考文献の各々は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。本明細書に組み込まれている、文献、活動、材料、デバイス、論考などについての議論は、本発明のための文脈を提示することを目的とする。このような議論は、これらの対象物のうちのいずれかまたは全てが、開示されるか、または特許請求される、任意の発明に関して、先行技術の一部を形成することの容認ではない。

10

【0029】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全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、一般に理解されている意味と同じ意味を有する。そうでない場合、本明細書で使用される、ある特定の用語は、本明細書で明示される意味を有する。

20

【0030】

本明細書および付属の特許請求の範囲で使用される、単数形の「ある (a)」、「ある (an)」、および「その」は、そうでないことが文脈により明確に指示されない限りにおいて、複数の指示対象を含むことに注意されたい。

【0031】

そうでないことが言明されない限りにおいて、本明細書で記載される、濃度または濃度範囲など、任意の数値は、全ての場合において、「約」という用語により修飾されていると理解されるものとする。したがって、数値は、典型的に、列挙された値の  $\pm 10\%$  を含む。例えば、1 mg/mL の濃度は、0.9 mg/mL ~ 1.1 mg/mL を含む。同様に、1% ~ 10% (w/v) の濃度範囲は、0.9% (w/v) ~ 11% (w/v) を含む。本明細書で使用される数値範囲の使用は、そうでないことを文脈が明確に指示しない限りにおいて、明示的に、全ての可能な部分範囲、このような範囲内の整数、および値の割合を含む、この範囲内の全ての個別の数値を含む。

30

【0032】

そうでないことが指し示されない限りにおいて、一連の要素に前置される、「少なくとも」という用語は、一連のあらゆる要素を指すように理解されるものとする。当業者は、規定の実験だけを使用して、本明細書で記載される、本発明の実施形態に特異的な、多くの同等物を認識するか、またはこれを確認することができるであろう。このような同等物は、本発明により包摂されることが意図される。

【0033】

本明細書で使用される、「~を含む (comprises)」、「~を含むこと (comprising)」、「~を含む (includes)」、「~を含むこと (including)」、「~を有する」、「~を有すること」、「~を含有する」、または「~を含有すること」という用語、またはこれらの他の任意の変化形は、言明された整数または整数の群の包含を含意し、他の任意の整数または整数の群の除外を含意しないように理解され、非除外的存在であるか、またはオープンエンドであることが意図される。例えば、要素のリストを含む、組成物、混合物、工程、方法、品目、または装置は、必ずしもこれらの要素だけに限定されず、明示的に列挙されてもならず、このような組成物、混合物、工程、方法、品目、または装置固有でもない、他の要素を含みうる。さらに、逆のことが明示的に言明されない限りにおいて、「または」とは、除外的な「または」ではなく、包含的

40

50

な「または」を指す。例えば、条件 A および B は、以下：A は、真であり（または存在する）、B は、偽である（または存在しない）；A は、偽であり（または存在しない）、B は、真である（または存在する）；ならびに A および B のいずれも、真である（または存在する）のうちのいずれか 1 つにより満たされる。

【0034】

本明細書の、列挙される、複数の要素の間で使用される接続詞である、「および/または」という用語は、個別の選択肢および選択肢の組合せの両方を包摂するものと理解される。例えば、2 つの要素が、「および/または」により接続される場合、第 1 の選択肢は、第 2 の要素を伴わない、第 1 の要素の適用可能性を指す。第 2 の選択肢は、第 1 の要素を伴わない、第 2 の要素の適用可能性を指す。第 3 の選択肢は、第 1 の要素と、第 2 の要素とを併せた適用可能性を指す。これらの選択肢のうちのいずれか 1 つは、用語の意味の範囲内に収まることが理解されるので、本明細書で使用される「および/または」という用語の要件を満たす。1 つを超える選択肢の、共時的な適用可能性もまた、用語の意味の範囲内に収まることが理解されるので、「および/または」という用語の要件を満たす。

10

【0035】

本明細書で使用される、本明細書および特許請求の範囲を通して使用される、「～からなる」という用語、または「～からなる」もしくは「～からなること」など、これらの変化形は、列挙される、任意の整数または整数の群の包含を指し示すが、さらなる整数または整数の群が、指定された方法、構造、または組成物に付加されることは指し示さない。

【0036】

本明細書で使用される、本明細書および特許請求の範囲を通して使用される、「～から本質的になる」という用語、または「～から本質的になる」もしくは「～から本質的になること」など、これらの変化形は、列挙される、任意の整数または整数の群の包含と、指定された方法、構造、または組成物の、基本的特性または新規の特性を実質的に変化させない、列挙される、任意の整数または整数の群の、任意選択の包含とを指し示す。M . P . E . P . § 2 1 1 1 . 0 3 を参照されたい。

20

【0037】

本明細書で使用される、「対象」は、本発明の実施形態に従う方法により処置されるか、または処置された、任意の動物、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトを意味する。本明細書で使用される、「哺乳動物」という用語は、任意の哺乳動物を包摂する。哺乳動物の例は、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、ヒトなど、より好ましくは、ヒトを含むがこれらに限定されない。

30

【0038】

「右」、「左」、「下」、および「上」とは、参照される図面内の方向を指示する。

【0039】

また、好ましい発明の構成要素の寸法または特徴に言及する場合に、本明細書で使用される、「約 ( a b o u t )」、「約 ( a p p r o x i m a t e l y )」、「一般に」、「実質的に」という用語、および同様の用語が、当業者により理解される通り、記載される寸法/特徴が、厳密な境界またはパラメータではなく、機能的に同じであるか、または同様である、この寸法/特徴からのわずかな変動を除外しないことを指し示すことも理解されたい。最低でも、数値パラメータを含む、このような言及は、当技術分野において許容される、数学的原理および業界的原則（例えば、丸め、測定誤差または他のシステム誤差、製造公差など）を使用すれば、最小有効数字を変動させないばらつきを含むであろう。

40

【0040】

本明細書で使用される、2 つまたはこれを超える治療の、対象への投与の文脈における、「組み合わせた」という用語は、1 つを超える治療の使用を指す。「組み合わせた」という用語の使用は、治療が対象に投与される順序を制約しない。例えば、第 1 の治療（例えば、本明細書に記載される組成物）は、第 2 の治療の、対象への投与の前に（例えば、5 分間、15 分間、30 分間、45 分間、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間、16 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、

50

5週間、6週間、8週間、または12週間前に)投与される場合もあり、これと共時的に投与される場合もあり、またこれに後続して(例えば、5分間、15分間、30分間、45分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後に)投与される場合もある。

#### 【0041】

本明細書で使用される、「RILD」または「放射線誘導性肝疾患」という用語は、放射線療法(RT)の最初の数週間中に、もしくは最初の数週間以内に、またはRTの数カ月後における応答後期としての急性応答を指す。放射線誘導性肝疾患(RILD)の例は、肝腫大、肝壊死、アポトーシス、腹水、肝酵素の上昇、血小板減少症、肝類洞閉塞症候群(SOS)、肝中心静脈閉塞性疾患(VOD)、および肝線維症を含みうるがこれらに限定されない。

10

#### 【0042】

RILDは、RTの合併症の1つである。RILDは、典型的に、RT終結の4~8週間後に生じるが、RTの2週間後という早期に、または7カ月間後という遅い時期にも現れることが報告されている(Guha et al., *Seminars in Oncology*, 2011, 21(4):256-263; Khozouz et al., *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26(29):4844-4845)。2種類のRILD:古典的RILDおよび非古典的RILDが存在する。古典的RILDを伴う患者は、通例、肝放射線療法の1~3カ月間後に、疲労、腹部の疼痛、腹部胴回りの増大、肝腫大、および無黄疸性腹水の症状を有する(Lawrence et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1995, 31:1237-48)。加えて、アルカリホスファターゼ(ALP)のレベルが、正常レベルの2倍を超えて上昇する一方で、トランスアミナーゼおよびビリルビンのレベルは、正常を維持する(Liang et al., *Radiother. Oncol.*, 2011, 98(2):265-9)。古典的RILDの病理学的顕徴は、レチクリンおよびコラーゲン線維によるネットワーク内に捕捉された赤血球による中心静脈管腔の完全な塞栓により特徴づけられる、肝静脈閉塞性疾患(VOD)である(Reed et al., *Am. J. Pathol.*, 1966, 48:597-611; Ogata et al., *Tokushima J. Exp. Med.*, 1963, 10:240-251)。捕捉された赤血球は、血管のうっ血を引き起こし、中心帯への酸素送達の減少をもたらす。この低酸素環境は、小葉中心肝細胞の死、および内部の肝細胞板の萎縮の両方をもたらす。加えて、肝線維症に寄与する、肝星細胞の活性化は、古典的RILDを伴う患者における、一般的特徴である(Sempoux et al., *Hepatology*, 1997, 26(1):128-34)。非古典的RILDを発症する患者は、肝硬変およびウイルス性肝炎などの、基礎慢性肝疾患を有し、黄疸および/またはALPではなく、血清トランスアミナーゼの顕著な上昇(正常レベルと比較して、5倍を超える上昇)を伴う、肝機能の調節異常の増大を示す(Pan et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010, 76:S94-100; Cheng et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004, 60(5):1502-9)。例えば、非古典的RILDでは、肝細胞の喪失、肝機能不全、肝類洞内皮の死滅、およびHSCの活性化が検出されている。

20

30

#### 【0043】

本明細書で使用される、「SOS」または「類洞閉塞症候群」とは、肝臓の静脈閉塞性疾患(VOD)を指す。SOSは、主に、放射線模倣剤、放射線への曝露、または移植の後で生じる、肝損傷の、顕著に異なり、潜在的に致死性である形態である。SOSは、通例、腹部の疼痛および腫脹を伴い、門脈高血圧症、ならびに多様な程度の血清中酵素の増大、および黄疸の証拠を伴う、急性形態、亜急性形態、または慢性形態で存在しうる。肝組織学は、肝細胞の壊死および出血を伴う、中心領域内の類洞の閉塞を裏付ける。

40

#### 【0044】

##### 放射線療法

本明細書で使用される、「TRT」または「標的放射線療法」という用語は、特異的な臓器または体内の一部に優先的に標的化または局在化されるイオン化放射線または放射線模倣剤を使用する療法を指す。TRTは、一般に、がん処置の一部として使用される。標的

50

イオン化 R T などの T R T は、場合によってまた、放射線処置、放射線療法、照射、または X 線療法とも称される。標的イオン化 R T には、外照射 R T ( E B R T または X R T )、内照射 R T、および全身放射性同位元素療法という、3 つの主要な部門が存在する。場合によって、放射線は、同用量またはやや高用量を送達するのに、何回かの処置により施される場合があり、これは、分割 R T と呼ばれる。本明細書で使用される、「放射線模倣剤」または「放射線模倣化学剤」という用語は、対象に投与されると、イオン化放射線の効果と同様の効果をもたらす化学剤を指す。このような効果の例は、DNA 損傷を含む。放射線模倣化学剤の例は、エトポシド、ドキソルビシン、カルボプラチン、およびブレオマイシンを含むがこれらに限定されると考えられるべきではない。本明細書に記載される放射線模倣化学剤などの放射線模倣化学剤は、薬剤の標的適用を治療的に可能とするように、対象に局所投与されうる。

10

#### 【 0 0 4 5 】

外照射 R T ( E B R T ) は、高エネルギー線を、体外から腫瘍に方向付ける装置を使用する。最新の放射線技術は、コンピュータを使用して、腫瘍に可能な限り正確に標的化し、正常組織を可能な限り守りながら、可能な最大線量の放射線を施すために、腫瘍の三次元描像を創出する、標的放射線療法など、外照射 R T の正確な送達を可能とする。E B R T の例は、定位放射線療法、画像誘導型 R T ( I G R T )、強度調節型 R T ( I M R T )、ヘリカルトモセラピー、陽子線 R T、および術中 R T ( I O R T ) を含むがこれらに限定されない。これらの中で、定位放射線は、特化型の外照射 R T である。定位放射線は、極めて詳細なイメージングスキャンを使用して、十分に規定された腫瘍に標的化する、焦点化放射線を使用する。2 種類の定位放射線が存在する：定位放射線手術 ( S R S ) は、脳または脊柱の定位放射線処置のための定位放射線であるのに対し、体幹部定位 R T ( S B R T ) は、肺および肝臓など、体内の臓器への、より正確な標的放射線処置を指す。

20

#### 【 0 0 4 6 】

内照射はまた、小線源療法とも呼ばれ、放射性インプラントが、体内または腫瘍の近傍に設置される。内照射は、外部放射線処置により可能となりうる領域より小さな領域内において、高線量の放射線を可能とする。内照射は、通例、インプラントと呼ばれる小型のホルダー内に密封された、放射線源を使用する。異なる種類のインプラントは、ペレット、シード、リボン、ワイヤー、ニードル、カプセル、バルーン、またはチューブと呼ばれる場合がある。内照射の、いくつかのこのような例は、Y - 9 0 S I R - s p h e r e および / または T h e r a - S p h e r e である。

30

#### 【 0 0 4 7 】

肝動脈化学塞栓術 ( T A C E ) は、肝がんを処置するのに、放射線模倣剤である、化学療法剤の使用を伴う。

#### 【 0 0 4 8 】

標的全身放射性同位元素療法 ( S R T ) はまた、非密封線源放射線療法とも呼ばれる。S R T では、甲状腺、骨、および前立腺など、全身において、ある特定の種類のがんを処置するのに、標的放射性薬物が使用される。これらの薬物は、典型的に、モノクローナル抗体または細胞特異的リガンドなどの標的化実体に連結しており、口腔を介して施される場合もあり、静脈内に投入される場合もあり；次いで、所望される標的に到達するまで、全身を移動し、標的において、薬物は、比較的高濃度で蓄積する。

40

#### 【 0 0 4 9 】

T R T は、多様な程度の肝代償不全および R I L D の発症をもたらす。R I L D は、臨床的に、無黄疸性腹水の発生により顕在化されうる。T R T から生じる R I L D は、所望されず、緩和を要求する。

#### 【 0 0 5 0 】

しかし、標的照射は、罹患した肝臓のがん細胞など、標的臓器の内因性細胞に対して、増殖上の不利益を付与し、生着した健常細胞の増殖を増強するのに使用されうる。例えば、移植前肝照射 ( H I R ) は、宿主肝細胞を傷害し、それらが、有糸分裂刺激に応答して増殖し、ドナー肝細胞と競合することを防止するように投与されうる。移植前照射は、規定

50

的には、骨髄移植のために使用される(Thomas, E. et al., N. Engl. J. Med., 292:832-843 (1975))。移植前HIRはまた、齧歯動物モデルにおける肝細胞移植を容易とするのにも使用された(例えば、Guha, C. et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 49:451-457 (2001); Takahashi, M. et al., Gene. Ther., 10:304-313 (2003)を参照されたい)。ヒトでは、放射線誘導性肝損傷は、平均値肝放射線量と、照射肝体積との関数である(Lawrence, T. et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 19:1041-1047 (1990); Dawson, L. et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 53:810-821 (2002))。低線量HIRまたは部分的肝照射は、HIRの臨床適用に所望される。HIRは、定位放射線手術(SRS)または3D原体TRT(3DCRT)法を使用する診療所で、安全に投与されうる。したがって、移植前HIRは、本出願の方法のための移植前レジメンとして使用されうる。 10

#### 【0051】

部分的肝照射は、がん患者において、かつ、IMRTの最新の技法により十分に忍容されている。肝臓の部分への、50Gyを超える線量が、診療所内の患者に、安全に施されうる。例えば、肝葉前方に投与されたHIRは、ドナー細胞による、選択的な肝葉再増殖を誘導しうるということが報告されている(Deb, N. et al., Hepatology, 34(4):153A, 34:153A (2001))。したがって、部分的肝照射は、本出願の方法のための移植前レジメンとして使用されうるということが想定される。

#### 【0052】

本明細書で使用される、「標的放射線療法で処置された対象」とは、標的放射線処置を受けつつある対象を指し、処置は、TPO模倣剤の投与の前の場合もあり、この後の場合もあり、これと同時の場合もある。 20

#### 【0053】

##### TPO模倣剤

本明細書で使用される、「TPOm」、「TPO模倣剤」、または「トロンボポエチン模倣剤」とは、トロンボポエチン受容体またはc-mplに結合し、これを活性化させることが可能なペプチドを含む化合物を指す。好ましくは、本発明に有用なTPO模倣剤内で、トロンボポエチン受容体に結合し、これを活性化させることが可能なペプチドは、トロンボポエチン(TPO)との著明な相同性を有さない。TPOとの相同性の欠如は、内因性TPOに対する抗体の発生の潜在的可能性を低減する。TPO模倣剤内で有用なこのようなペプチドの例は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国公開第2003/0158116号明細書；同第2005/0137133号明細書；同第2006/0040866号明細書；同第2006/0210542号明細書；同第2007/0148091号明細書；同第2008/0119384号明細書；米国特許第5,869,451号明細書；同第7,091,311号明細書；同第7,615,533号明細書；同第8,227,422号明細書；国際特許公開第2007/021572号パンフレット；同第2007/094781号パンフレット；および同第2009/148954号パンフレットにおいて記載されているペプチドを含むがこれらに限定されない。より好ましくは、本発明に有用なTPO模倣剤内で、トロンボポエチン受容体に結合し、これを活性化させることが可能なペプチドは、ペプチドの1つまたは複数の特性を改善する部分に共有結合で連結している。非限定的例として述べると、部分は、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸を含むがこれらに限定されない、親水性ポリマーでありうる。部分はまた、Fc領域またはアルブミンなどのポリペプチドでもありうる。 30 40

#### 【0054】

好ましい実施形態では、本発明に有用なTPO模倣剤は、アミノ酸配列：IEGPTLRQXaaLAARYaa(配列番号1)[配列中、Xaaは、トリプトファン(W)または-(2-ナフチル)アラニン(本明細書では、「2-Nal」と称する)であり、Yaaは、アラニン(A)またはサルコシン(本明細書では、「Sar」と称する)である]を有するペプチドを含む。好ましくは、配列番号1のペプチドは、PEGに共有結合で 50

連結しているか、またはFcドメインに融合している。

【0055】

一部の実施形態では、本発明に有用なTPO模倣剤は、PEG、好ましくは、約5,000~約30,000ドルトンの間の平均分子量を有するPEGに共有結合で連結している配列番号1のペプチドを含む。好ましくは、PEGは、モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルコハク酸エステル(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコールアミン(MePEG-NH2)、モノメトキシポリエチレングリコールトレシル酸エステル(MePEG-TRES)、およびモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾイルカルボニル(MePEG-IM)からなる群から選択される。ペプチドのPEG化は、効力の喪失を伴わずに、化合物のクリアランスの低減をもたらす。例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,576,056号明細書を参照されたい。

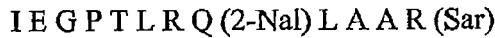
10

【0056】

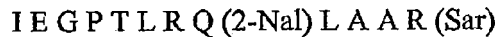
好ましい一実施形態では、本発明に有用なTPO模倣剤は、RWJ-800088またはその誘導体である。本明細書で使用される、「RWJ-800088」とは、以下：

【0057】

【化1】



20



の通りのリシンアミド残基により連結している、2つの同一な14マー(配列番号2)を有し、各N末端のイソロイシン、または薬学的に許容されるその塩もしくはエステルに共有結合で連結しているメトキシポリ(エチレングリコール)(MPEG)を有する、29マーのペプチドを指す。したがって、RWJ-800088は、2つの、配列番号1の、14アミノ酸のペプチド鎖[配列中、Xaaは、2-Nalであり、Yaaは、リシンアミド残基により連結しているSarであり、各N末端のイソロイシンは、メトキシポリエチレングリコール(MPEG)鎖に連結している]から構成される。したがって、RWJ-800088は、(MPEG-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-(2-Nal)-Leu-Ala-Ala-Arg-(Sar))<sub>2</sub>-Lys-NH<sub>2</sub>[配列中、(2-Nal)は、-(2-ナフチル)アラニンであり、(Sar)は、サルコシンであり、MPEGは、メトキシポリ(エチレングリコール)、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである]の分子構造の略記を有する。好ましくは、MPEGは、約20,000ドルトンの分子量を有するか、またはメトキシポリエチレングリコール20000を表す。

30

40

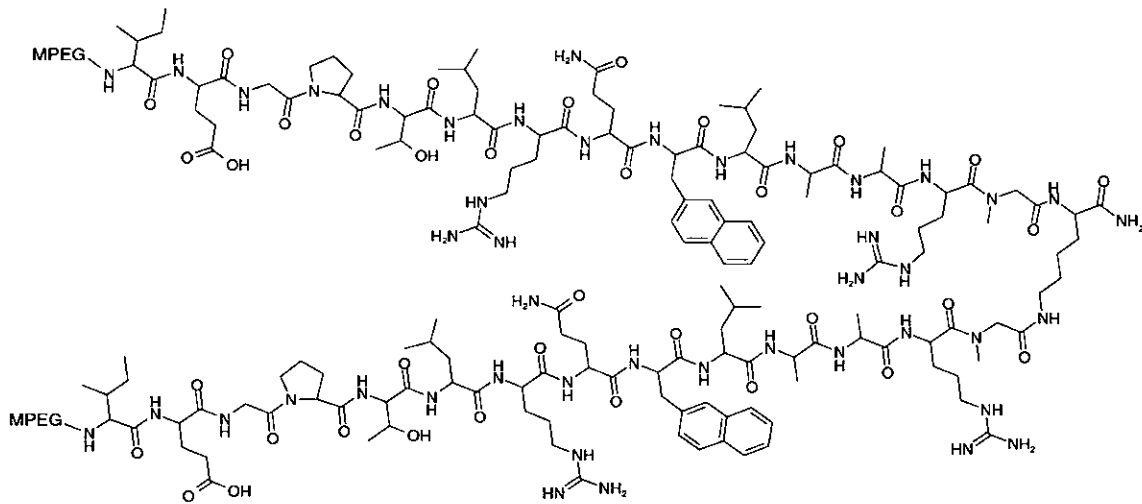
【0058】

一実施形態では、RWJ-800088は、式(I)：

【0059】

50

## 【化 2】



式(I)

の分子構造、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルを有する。

## 【0060】

好ましい実施形態では、RWJ-800088中のMPEGは、メトキシポリエチレングリコール20000であり、RWJ-800088は、メトキシポリエチレングリコール20000-プロピオニル-L-イソロイシル-L-グルタミル-グリシル-L-プロリル-L-トレオニル-L-ロイシル-L-アルギニル-L-グルタミニル-L-2-ナフチルアラニル-L-ロイシル-L-アラニル-L-アラニル-L-アルギニル-サルコシル-Ne-(メトキシポリエチレングリコール20000-プロピオニル-L-イソロイシル-L-グルタミル-グリシル-L-プロリル-L-トレオニル-L-ロイシル-L-アルギニル-L-グルタミニル-L-2-ナフチルアラニル-L-ロイシル-L-アラニル-L-アラニル-L-アルギニル-サルコシル)-リシンアミドの完全化学名、または薬学的に許容されるその塩もしくはエステルを有する。PEGを伴わないペプチドの分子量は、3,295ダルトンであり、20,000ダルトンのMPEG鎖2つを伴うペプチドの分子量は、約43,295ダルトンである。

## 【0061】

一部の実施形態では、本発明に有用なTPO模倣剤は、Fcドメインに融合している配列番号1のペプチドを含む。ペプチドの、Fcドメインへの融合は、*in vivo*において、ペプチドを安定化させる。例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,660,843号明細書を参照されたい。

## 【0062】

別の好ましい実施形態では、本発明に有用なTPO模倣剤は、ロミプロスチムである。本明細書で使用される、「ロミプロスチム」とは、配列番号1のペプチド[配列中、Xaaは、Wであり、Yaaは、Aである]のN末端イソロイシンに連結しているFcドメインを有する融合タンパク質を指す。特に、ロミプロスチムは、以下：

## 【0063】

10

20

30

40

50

## 【化 3】

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKF  
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGKGGGGGIEGPTLRQWLAARAGGGGGGGGIEGPTLRQWLAARA (配列  
 番号 4)

10

のアミノ酸配列を有する。ロミプロスチムは、IEGPTLRQWLAARA (配列番号 3) の、トロンボポエチン受容体結合性ドメインのアミノ酸配列を有する。

## 【0064】

投与量および投与

本発明では、本発明者らは、TPO 模倣剤が、RILD に対する著明な緩和効果を有し、非照射肝葉の肥厚を増強し、肝類洞内皮細胞 (LSEC) など、肝細胞の生着を促進することを発見した。したがって、本発明の方法は、それを必要とする対象に、有効量の TPO 模倣剤を投与し、これにより、放射線療法で処置された対象、または肝細胞移植を必要とする対象など、それを必要とする対象における 1 つまたは複数の RILD の緩和、肝細胞生着の促進、および非照射肝葉の肥厚の増強など、1 つまたは複数の有益な結果を達成するステップを含む。

20

## 【0065】

TPO 模倣剤は、例えば、医薬担体または希釈剤と組み合わせた医薬組成物の有効成分として投与されうる。TPO 模倣剤は、経口投与経路、肺内投与経路、非経口投与経路 (筋内 (IM) 注射、腹腔内 (IP) 注射、静脈内 (IV) 注射、または皮下 (SC) 注射)、吸入 (微粒粉末製剤を介する) 投与経路、経皮投与経路、経鼻投与経路、腔内投与経路、直腸内投与経路、または舌下投与経路を介して投与される場合があり、各投与経路に適切な剤形で製剤化されうる。好ましくは、TPO 模倣剤は、皮下注射により投与される。例えば、国際公開第 1993/25221 号パンフレット (Bernstein ら) は、非経口投与または腸内投与、好ましくは、経口投与により、外用投与される場合もあり、局所投与される場合もあり、全身投与される場合もある、エリスロポエチン (EPO) を含有する、生体分解性ポリマー製のマイクロスフェアを開示する。国際公開第 1994/17784 号パンフレット (Pitt ら) は、EPO が、肺内経路を介して、全身に投与される場合があり、このような送達法が、他の EPO 投与方法と比較して、同等レベルの治療利益を結果としてもたらすことを開示する。同様の組成物および方法は、本開示の TPO 模倣剤の投与のために使用されうる。

30

40

## 【0066】

経口投与のための固体剤形は、カプセル、錠剤、丸剤、粉末、および顆粒を含む。このような固体剤形では、活性ペプチド化合物は、スクロース、ラクトース、またはデンプンなど、少なくとも 1 つの、薬学的に許容される担体と混合される。このような剤形はまた、通常の慣行として、不活性の希釈剤以外のさらなる物質、例えば、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤も含みうる。カプセル、錠剤、および丸剤の場合、剤形はまた、緩衝剤も含みうる。加えて、錠剤および丸剤は、腸溶性コーティングと共に調製されうる。

## 【0067】

経口投与のための液体剤形は、薬学的に許容されるエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップを含み、エリキシル剤は、水など、当技術分野で一般に使用される、不活性の希釈剤を

50

含有する。このような不活性の希釈剤のほかに、組成物はまた、保湿剤、乳化剤、懸濁剤、ならびに甘味剤、香味剤、および芳香剤などのアジュバントも含みうる。

【0068】

非経口投与のための調製物は、滅菌の水溶液または非水溶液、懸濁液、またはエマルジョンを含む。非水性の溶媒または媒体の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油およびトウモロコシ油などの植物油、ゼラチン、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。このような剤形はまた、保存剤、保湿剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントも含有しうる。非経口投与のための調製物は、例えば、細菌保持フィルターを介する濾過により滅菌される場合もあり、滅菌剤を組成物に組み込むことにより滅菌される場合もあり、組成物を照射することにより滅菌される場合もあり、組成物を加熱することにより滅菌される場合もある。非経口投与のための調製物はまた、滅菌水を使用して製造される場合もあり、使用の直前に、何らかの、他の滅菌注射用媒体を使用して製造される場合もある。

10

【0069】

TPO模倣剤の投与は、典型的に、筋内投与、皮下投与、または静脈内投与である。しかし、経皮投与、皮内投与、または経鼻投与など、他の投与方式も同様に想定されうる。筋内TPO模倣剤の投与は、注射針を使用して、TPO模倣剤組成物の懸濁液を注射することにより達成されうる。代替法は、組成物を投与するための無針注射デバイスの使用（例えば、Biojector（商標）を使用する）、またはTPO模倣剤組成物の凍結乾燥粉末である。

20

【0070】

静脈内注射、経皮注射、または皮下注射のために、TPO模倣剤組成物は、発熱物質非含有であり、適切なpH、等張性、および安定性を有する、非経口的に許容可能な水溶液の形態でありうる。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射用液、リンゲル注射用液、乳酸加リンゲル注射用液などの等張性媒体を使用して、適切な溶液を調製することが十分に可能である。保存剤、安定化剤、緩衝剤、および抗酸化剤、ならびに/または他の添加剤も、要求に応じて組み入れられうる。徐放製剤もまた、援用されうる。

【0071】

直腸内投与または腔内投与のための組成物は、好ましくは、活性TPO模倣剤に加えて、ココアバターまたは坐剤用蠟などの賦形剤を含有しうる坐剤である。経鼻投与または舌下投与のための組成物もまた、当技術分野で周知の、標準的な賦形剤により調製される。

30

【0072】

典型的に、投与は、放射線療法の前における、放射線療法時における、または放射線療法の後における、対象における放射線誘導性肝疾患を緩和することを、治療目的および/または予防目的とするであろう。治療適用において、TPO模倣剤組成物は、放射線療法への曝露時に、またはこれへの曝露後に、対象に投与され、TPO模倣剤組成物は、対象の肝臓内で、放射線誘導性肝疾患を治癒させるか、もしくはこれに対する緩和を、少なくとも部分的にもたらし、肝臓の体積を増大させるか、もしくは肝臓の肥厚を増強し、かつ/または肝類洞内皮細胞の生着を引き起こすのに十分な量で投与される。予防適用では、TPO模倣剤組成物は、放射線療法への曝露の前に、RILDに感受性である（またはこれを発症する危険性がある）対象に投与され、それを必要とする対象において、放射線療法後の肝機能を増強するために投与される。これらの状況の各々において、TPO模倣剤組成物の量は、曝露の状態および性格（例えば、放射線療法の種類、線量、および曝露の長さ）、対象の身体的特徴（例えば、身長、体重、疾患状態など）、および処置のデザイン（例えば、TPOm単独で、または別の治療剤と組み合わせて、など）に依存するであろう。

40

【0073】

TPO模倣剤を含有する、薬学的に許容される組成物は、対象に投与され、対象の肝臓内で、放射線誘導性肝疾患の緩和、肝体積の増大、および/または肝類洞内皮細胞の生着をもたらす。疾患を緩和する十分な組成物の量は、組成物の「有効用量」または「有効量」

50

であると規定される。

【0074】

投与される実際の量、ならびに投与の速度および時間経過は、処置されつつある状態の性格および重症度に依存するであろう。処置の処方、例えば、投与量などの決定は、一般の開業医および他の医師、または獣医科状況では、獣医の責任の範囲内にあり、典型的に、放射線療法の類型および線量、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、ならびに開業医に公知の他の因子を考慮に入れる。上記で言及された技法およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980において見出されうる。

【0075】

ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、肝細胞、それらの前駆細胞、もしくは幹細胞、および/またはVEGF-A、VEGF-E、FGF-2、EGF、MMP14、CXCR4アンタゴニスト、SDF1、GM-CSF、G-CSF、FLT3、R-スポンジン1、およびアンフィレグリンなど、1つもしくは複数のタンパク質因子と組み合わせて対象に投与される。

【0076】

ある特定の実施形態では、TPOmは、それを必要とする対象における肝細胞の生着を促進するように投与される。

【0077】

本明細書で使用される、「生着させる」または「生着」は、宿主臓器の生存部分または接合部分として確立されることを意味する。移植片は、宿主臓器に対して、同所性の場合もあり、異所性の場合もある。

【0078】

本明細書で使用される、「自家」とは、対象または宿主の組織または細胞に由来する、生物学的対象物または細胞を指す。対象に生着するex vivoの肝細胞は、自家細胞でありうる。

【0079】

本明細書で使用される、「異種」とは、対象または宿主と異なる種、または同じ種の異なる個体の組織または細胞（例えば、同種または異種）に由来する、生物学的対象物または細胞を指す。対象に生着するex vivoの肝細胞は、異種でありうる。

【0080】

ある特定の実施形態では、TPOmは、肝類洞内皮細胞(LSEC)および肝細胞を含む、肝臓内で自然発生する、任意の細胞でありうる肝細胞と組み合わせて投与される。

【0081】

ある特定の実施形態では、TPOmは、肝類洞内皮細胞(LSEC)と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、TPOmは、肝細胞と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、TPOmは、LSECおよび肝細胞と組み合わせて投与される。LSECは、肝臓など、特異的な臓器を血管化する、構造的かつ機能的に固有の毛細血管ネットワークを構成する。肝循環は主に、LSECにより裏打ちされ(Lee, Hepatology 45:817-825 (2007); Klein, Hepatology 47:1018-1031 (2008))、各肝細胞は、LSECと細胞的に近接して常在する。

【0082】

本発明に有用な細胞は、本開示を念頭に、当技術分野で公知の方法により得られうる。例えば、肝細胞は、Berryら(Takahashi, M. et al., Gene Ther., 10:304-313 (2003))により記載されている通り、哺乳動物の臓器または組織からの、改変コラゲナーゼ灌流法により分離されうる。解離の後、細胞は、目的の細胞に対応する寸法のダクロンメッシュで濾過され、次いで、各回1分間ずつ、50×gで、2回にわたり洗浄されうる。細胞の生存率は、トリパンブルー染料除外法により決定されうる。典型的に、生存率が>90%である細胞は、移植に使用されうるが、部位特異的プロトコルまたは疾患状態に応じて変動する。ex vivo細胞は、成体体細胞、成体前駆細胞、成体幹細胞、

10

20

30

40

50

胚性前駆細胞、または胚性幹細胞でありうる。当業者には、このような細胞の供給源が周知である。

【0083】

本発明に有用な細胞はまた、市販品の供給源からも得られうる。例えば、SK-HEP-1細胞などのLSECは、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., USA)などの、認知された寄託先のほか、他の供給源から得られうる。LSECはまた、当技術分野で公知の方法を使用する分化により、ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞などであるがこれらに限定されない多能性細胞からも得られうる。

【0084】

当技術分野では、ex vivoにおいて細胞を増殖させるために適する増殖培地が周知であり、例えば、“Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications” R. I. Freshney, 2010, Wiley-Blackwellにおいて開示されている。各種類の細胞に最適な培地は、専門的な細胞供給元（例えば、ATCC-LGC, MI, Italy; CDC, Atlanta, Ga., USA）から得られうる。例えば、SK-HEP-1細胞は、ATCCから得られ、ゼラチンコーティング組織培養フラスコを使用して、37℃で、5%CO<sub>2</sub>を含有する、加湿式細胞インキュベーター内の、完全EMEM培地中で培養される。細胞は、ATCCにより提供されている指示書に従う、2~3日ごとのトリプシン媒介剥離により継代培養される。LSECの密度は、1ml当たりの細胞約5×10<sup>4</sup>個~1ml当たりの細胞約5×10<sup>5</sup>個、1ml当たりの細胞約2.5×10<sup>4</sup>個~1ml当たりの細胞約2.5×10<sup>5</sup>個、または1ml当たりの細胞約5×10<sup>4</sup>個~1ml当たりの細胞約2×10<sup>5</sup>個でありうる。ある特定の実施形態では、最適な処置を得るために、細胞密度は、処置の性格を考慮して最適化されうる。

【0085】

ある特定の実施形態では、LSEC細胞および/または肝細胞は、血友病、アルファ1-抗トリプシン欠乏症、I型クリグラー-ナジャー症候群、家族性高コレステロール血症、第VII因子欠乏症、糖原病、乳児型レフサム病、原発性シュウ酸症、およびフェニルケトン尿症などの疾患をもたらす、LSECおよび/または肝細胞の遺伝子多形に起因する、遺伝性疾患を処置するように、患者から採取され、遺伝子改変され、次いで、患者に、移植し戻されうる。

【0086】

ex vivo細胞は、対象に、生着する細胞型および臓器の状態、ならびにこのような治療に対する必要の範囲に応じた数で導入される。例えば、ex vivo細胞は、既に記載されている通り (Guha, C. et al., Artificial Organs, 25:522-528 (2001))、対象の標的臓器に、直接注入される場合もあり、腹腔内投与される場合もあり、別の生着部位に投与される場合もある。ex vivo細胞はまた、静脈内投与される場合もあり、門脈内（肝臓の場合）投与される場合もある。例えば、エーテル麻酔下で、肝細胞を、ラットに投与する場合、脾臓が露出され、0.5mlのRPMI 1640中に懸濁させた肝細胞5×10<sup>6</sup>個が、脾臓に注射されうる。一般に、肝細胞は、処置1回当たりの細胞1×10<sup>5</sup>~5×10<sup>9</sup>個の単回投与または分割投与をもたらすのに適する培地中で投与されうる。単回で、または分割投与として投与される全投与量は、体重1kg当たりのex vivo細胞1×10<sup>5</sup>~5×10<sup>10</sup>個であることが可能であり；一部の実施形態では、単回で、または分割投与として投与される全投与量は、体重1kg当たりのex vivo細胞1×10<sup>6</sup>~1×10<sup>9</sup>個であることが可能であり；一部の実施形態では、単回で、または分割投与として投与される全投与量は、体重1kg当たりのex vivo細胞1×10<sup>7</sup>~5×10<sup>8</sup>個でありうる。

【0087】

一部の実施形態では、LSECおよび/または肝細胞は、本開示を念頭に、当技術分野で公知の方法を使用して、肝内投与により投与されうる。LSECは、肝細胞が増殖し、新

10

20

30

40

50

たな組織を形成することを誘導する。LSECはまた、組織を再生するための、血管による支持をもたらすように、増殖する場合もある。好ましくは、LSECは、VEGFR2 + VE - カドヘリン + VEGFR3 + CD34 - 第VII因子 + LSECである。任意選択で、LSECは、CXCR4アンタゴニスト、SDF1、VEGF-A、VEGF-E、FGF-2、EGF、およびMMP14のうちの1つまたは複数など、肝細胞および/またはタンパク質因子と共に投与されうる。

【0088】

本発明の実施形態に従うTPOmと組み合わせて使用されうる他の肝細胞は、例えば、肝細胞、肝幹細胞、多能性幹細胞、および外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞を含む。これらの細胞は、本開示を念頭に、当技術分野で公知の方法を使用して得られ、対象に投与されうる。

10

【0089】

好ましくは、本出願の方法は、ex vivo細胞を、それを必要とする対象の肝臓に生着させ、生着した細胞は、損傷した臓器の細胞のうちの、少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%（またはこれらの間で表される任意の範囲）を充当するか、または置きかえるように増殖する。置きかえられる細胞は、生着する細胞と同じ細胞型の細胞でありうる。より好ましくは、生着する細胞は、数および活性が、肝臓への損傷と関連する状態を改善するか、または元来、肝臓への損傷により損なわれたホメオスタシス（例えば、グルコース、アンモニア、血液脂質などの代謝）を改善するのに十分な集団に増殖する。ex vivo細胞による再増殖は、典型的に、臓器特異的な実質細胞をもたらしうる。ex vivo細胞は、臓器に対して自家細胞の場合もあり、同種細胞の場合もある。

20

【0090】

組織学的解析など、当技術分野で公知の方法が、生着を決定するのに使用されうる。例えば、生着ex vivo細胞は、当業者に公知の方法により、内因性細胞から識別される場合があり、生着細胞と、内因性細胞との、染色体核酸配列またはゲノム核酸配列の差違を同定する抗原性マーカー、GFPなどの蛍光マーカー、またはDPPIVなどの酵素マーカーの使用により識別される場合もあり、ex vivo細胞内に存在し、宿主内因性細胞内に欠失する、機能的酵素に従い識別される場合もある。臓器の切片は、OCT内に包埋される場合もあり、液体窒素中で凍結され、-70で保存される場合もあり、パラフィン包埋および標準的なH&E染色のために、ホルマリン中で固定される場合もある。肝臓には、標準的な組織病理学実験室内で、レチクリン染色およびトリクローム染色が実施されうる。

30

【0091】

ドナー肝細胞の生着および再増殖を検出するのに、様々なモデル系が使用されうる。例えば、トランスジェニックベータ-ガラクトシダーゼ(B-gal)発現(Rosa)C57B1/6肝細胞が、野生型C57B1/6マウスに移植される場合、マウスモデルを使用することができる。あるいは、DPPIV陽性F344肝細胞は、同種DPPIV陰性F344宿主肝臓に移植されうる。DPPIVは、肝細胞の胆細管ドメイン内で、高度に発現されるので、移植細胞は、酵素組織化学により、容易に検出されうる。加えて、肝細胞再増殖の非侵襲的で、頑健な、移植前レジメンを特徴づけた後で、クリーガー-ナジャー症候群についてのモデルである、Gunnラットなど、代謝性肝疾患についての醫歯動物モデルの改善におけるその有効性について、さらに検討することもできる。実験は、1つを超える種において、同時に実施されうる。

40

【0092】

臨床状況下で、生着は、上記で記載した解析を伴う生検により評価されうる。加えて、臨床試験は、ホメオスタシスが、生着した臓器により、どの程度支援されるのかについて評価するのに使用されうる。標的臓器または生着臓器の機能に関する、1つまたは複数の臨床パラメータの改善は、生着の有効性を、間接的に評価するのに使用されうる。適切な臨床試験は、臓器に応じて変動するであろう。

50

## 【0093】

ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、LSECの移植の前に、この後で、またはこれと同時に、対象に投与される。ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、肝細胞の移植の前に、この後で、またはこれと同時に、対象に投与される。ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、LSECおよび肝細胞の移植の前に、この後で、またはこれと同時に、対象に投与される。

## 【0094】

TPO模倣剤はまた、肝細胞の移植を伴うか、または伴わずに、1つまたは複数のタンパク質因子の投与と組み合わせても投与されうる。当業者に公知である通り、ある特定の薬剤はまた、細胞の増殖または分裂も刺激しうる。このような薬剤の例は、ペプチド因子を含むがこれらに限定されない。好ましい刺激は、組織特異的であり、かつ/または少なくとも *ex vivo* 細胞型を、生着するように刺激する。本発明に適する刺激は、哺乳動物増殖因子（例えば、HGF、EGF、FGF、VEGF、NGF）、IL-6、TNF- $\alpha$ 、循環腫瘍壊死因子（CTNF）、R-スポンジン1、Noggin、およびTWEAK、増殖受容体リガンド、*c-met* 活性化抗体などのタンパク質因子を含む。好ましくは、本発明に有用なタンパク質因子は、LSECの増殖を刺激する因子を含む。このようなタンパク質因子の例は、CXCR4アンタゴニスト、SDF1、VEGF-A、VEGF-E、FGF-2、EGF、MMP14、GM-CSF、GCSF、FLT3、R-スポンジン1、およびアンフィレグリンを含むがこれらに限定されない。他の好ましいタンパク質因子は、例えば、甲状腺ホルモン（Parashar, B. et al., Hepatology, 32:206A (2000)）、または肝細胞増殖因子（HGF）を含む。増殖因子は、野生型（例えば、ヒト、霊長動物、マウス、ラットなど）の場合もあり、野生型因子と実質的に同一な場合もある。増殖因子は、哺乳動物細胞により、内因的に産生される場合もあり、組換えにより作られる場合もある。増殖因子は、局所投与される場合もあり、全身投与される場合もある。例えば、TPO模倣剤は、プレリキサホルなど、CXCR4アンタゴニストと共に投与されうる。

## 【0095】

TPO模倣剤は、標的放射線療法と組み合わせ投与されうる。

## 【0096】

ある特定の実施形態では、TPO模倣剤は、標的放射線療法の24時間前～24時間後に、またはこれと同時に、対象に投与される。例えば、TPO模倣剤は、標的放射線療法の24、20、16、12、8、4、2、1、0.5、もしくは0.1時間（またはこれらの間で表される任意の範囲の）前に、または標的放射線療法の24、20、16、12、8、4、2、1、0.5、もしくは0.1時間（またはこれらの間で表される任意の範囲の）後で、対象に投与される。好ましくは、TPO模倣剤は、対象が、標的放射線療法が投与される約24～約1時間（またはこれらの間で表される任意の範囲の）前に、対象に投与される。

## 【0097】

任意の適切な放射線の線量は、本出願における本開示、および当技術分野における知見を念頭に、本出願の方法において使用されうる。例えば、効果的なドナー細胞の再増殖を可能とする、最低線量のHIRを同定するために、HIR（例えば、10、20、30、および50 Gy）についての線量反応研究を実施することができる。宿主肝細胞に対する放射線損傷の性格について探索するために、実験はまた、肝細胞移植および/またはタンパク質因子を伴うか、または伴わずに、HIRおよびTPOmを施されるマウスについても実施されうる。多様なコホートからの動物を、多様な時点（1日後、2日後、3日後、1週間後、3週間後、6週間後、および12週間後）において殺すことができ、肝切片を、組織病理学解析のために、H&Eで染色することができる。それぞれ、肝細胞の増殖およびアポトーシスについて検証するために、BrdU染色およびTUNEL染色が実施されうる。

## 【0098】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、標的放射線療法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10分割など、1～10分割、好ましくは、5、10、20、30、40、50、60、または70 Gy など、5～70 グレイ ( Gy ) の線量 ( またはこれらの中で表される任意の範囲 ) の、肝臓への標的放射線である。他の実施形態では、標的放射線療法は、移植前 H I R、好ましくは、低線量 H I R であり、より好ましくは、定位放射線療法 ( S R S ) または 3 D 原体 T R T ( 3 D C R T ) 法を使用する診療所において投与される。他の実施形態では、標的放射線療法は、I M R T の最新技法を肝臓の部分に使用して投与される、部分的肝照射である。

#### 【0099】

ある特定の実施形態では、T P O 模倣剤は、標的放射線療法と組み合わせて投与される。好ましくは、非照射肝葉の肥厚は、照射肝葉の形成不全を補償する。他の実施形態では、T P O 模倣剤は、放射線模倣剤または照射療法の前に、またはこの後で投与される。

10

#### 【0100】

本出願の方法では、任意の適切な有効量の T P O m が使用されうる。このような有効量は、本開示を念頭に、当技術分野で公知の方法を使用して決定されうる。ある特定の実施形態では、T P O 模倣剤の有効量は、対象の体重 1 k g 当たり 1、2、3、4、または 5  $\mu$  g ( またはこれらの中で表される任意の範囲 ) など、約 1 ~ 約 5  $\mu$  g / k g である。好ましい実施形態では、T P O 模倣剤の有効量は、対象の体重 1 k g 当たり約 1 ~ 約 3  $\mu$  g である。

#### 【0101】

ある特定の実施形態では、T P O 模倣剤の有効量は、対象に、静脈内注射、筋内注射、皮内注射、または皮下注射のうちのいずれか 1 つにより投与される。好ましい実施形態では、T P O 模倣剤は、皮下注射により投与される。

20

#### 【0102】

T P O 模倣剤の作製、および T P O 模倣剤の、組成物への、任意選択の製剤化の後、組成物は、個体、特に、ヒトまたは別の霊長動物に投与されうる。投与は、ヒト、または別の哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウシ、ロバ、サル、イヌ、またはネコへの投与でありうる。非ヒト哺乳動物への送達は、治療を目的とする必要はなく、実験的文脈、例えば、T P O 模倣剤の投与に起因する血管完全性の保護機構についての探索における使用のための送達でありうる。

30

#### 【0103】

本発明の T P O 模倣剤組成物は、処置される状態に応じて、単独で投与される場合もあり、他の処置またはさらなる治療剤と組み合わせて、同時に投与される場合もあり、逐次的に投与される場合もある。

#### 【0104】

本明細書で使用される、「さらなる治療剤」という用語は、本出願の方法において、T P O 模倣剤と共に投与された場合に、有利な特性を裏付けることが公知であるか、またはこれを裏付ける、任意の化合物または治療剤を指す。このような薬剤の例は、鎮痛剤、消毒剤、他の T P O 模倣剤、他のサイトカイン、可溶性 m p l 受容体、造血因子、インターロイキン、タンパク質因子または抗体、および化学療法剤を含みうるがこれらに限定されない。他のサイトカインは、幹細胞因子 ( S C F )、インターロイキン 3 ( I L - 3 )、C X C R 4 アンタゴニスト、または F l t - 3 リガンドでありうる。例えば、Ku et al., Blood, 87:4544-4551 (1996); Sitnicka et al., Blood, 87:4998-5005 (1996) を参照されたい。T R T 時に、肝内炎症を減殺するように、高用量のコルチコステロイドなど、他の薬剤もまた投与されうる。

40

#### 【0105】

T P O 模倣剤組成物は、所望の場合、有効成分を含有する、1 つまたは複数の単位剤形を含有しうる、キット、パック、または分注器により提示されうる。キットは、例えば、金属箔、またはプリスターパックなどのプラスチック箔を含みうる。キット、パック、または分注器は、投与のための指示書を伴う場合がある。キットは、毒性作用を

50

緩和するための少なくとも1つのさらなる治療剤またはデバイスをさらに含む。キットは、本明細書で記載される治療剤などのさらなる治療剤をさらに含む。キット内に含まれるデバイスは、例えば、容器、送達媒体、または投与デバイスでありうる。

#### 【0106】

##### 肝機能検査

本明細書で使用される、「肝機能」という語句とは、血清タンパク質、例えば、アルブミン、凝固因子、アルカリホスファターゼ、アミノトランスフェラーゼ（例えば、アラニントランスアミナーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ）、5'-ヌクレオシダーゼ、ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼなど、タンパク質の合成、ビリルビンの合成、コレステロールの合成、および胆汁酸の合成を含むがこれらに限定されない、肝臓の機能；炭水化物代謝、アミノ酸およびアンモニアの代謝、ホルモン代謝、ならびに脂質代謝；外因性薬物の解毒；コレステロール、胆汁酸、リン脂質、およびビリルビンの排出機能を含むがこれらに限定されない、肝臓の代謝機能；ならびに内臓血行動態および門脈血行動態を含む、血行力学機能を指す。

10

#### 【0107】

肝機能は、本開示を念頭に、当技術分野で公知の方法を使用して決定されうる。アラニントランスフェラーゼ；アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；アルカリホスファターゼ；ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ、ビリルビン、またはアンモニアのうちのいずれかの血中レベルをモニタリングする、標準的肝機能検査が使用されうる。

#### 【0108】

肝細胞および肝類洞内皮細胞（LSEC）など、再増殖した生着肝細胞の生理学的機能もまた、調べられうる。移植細胞が、肝細胞に固有の生化学的機能である、アルブミン合成（アルブミン免疫染色）、グルコース代謝（グルコース-6-ホスファターゼについての染色）、および糖新生（グリコーゲン染色）を果たす能力は、公表されているプロトコール（Laconi, E. et al., Am. J. Pathol., 153:319-329 (1998)）に従い、新鮮な凍結切片内で検討されうる。Gunnラットでは、高ビリルビン血症の改善は、移植される肝細胞の再増殖および生理学的機能の程度を指し示すのに使用されうる。多様な時点（1、2、3、および6カ月後）において、動物を殺し、肝生検の検体中のUGT1A1活性を測定し、UGT1A1についての免疫プロット解析およびドナーUGT1A1陽性肝細胞を検出する免疫組織化学を実施し、胆汁中のビリルビングルクロニダーゼの排出を決定することにより、生着した正常肝細胞の機能を、査定することができる。加えて、血中の血清ヒアルロン酸、アルブミン、トランスフェリン、AST、ALT、GGT、GST-パイ、またはアルファ-フェトタンパク質（AFP）を測定して、肝臓の正常生理学的機能について検討し、放射線損傷および腫瘍形成の、任意の潜在的発症を決定することができる。肝生検についてのH&E染色を実施して、肝放射線損傷および腫瘍形成の組織病理学的証拠について検討することができる。

20

1

30

#### 【0109】

例えば、肝類洞内皮細胞（LSEC）は、その欠乏が、A型血友病に特徴的である、第VII因子（FVII）を産生しうる。FVIIを産生する正常LSECの生着は、血液由来試料中および肝臓由来試料中のウェスタンブロットおよびmRNAプロファイリングを介する、全身性循環中および肝臓内のFVIIの検出により確認されうる。関連する臨床状況では、血友病マウスモデル（F8tm1Kaz）における、LSECの生着および第VII因子の産生が、上記で記載された解析により評価されうる。加えて、LSECの生着および生物学的機能の回復を査定するために、凝固因子に関する尾静脈出血試験を実施することができ、LSEC中のFVIIの存在について染色する、肝臓についての免疫組織化学もまた、実施することができる。

40

#### 【0110】

##### 実施形態

本発明はまた、以下の非限定的実施形態も提供する。

実施形態1：それを必要とする対象における放射線誘導性肝疾患（RLD）を緩和する

50

方法であって、対象に有効量のトロンボポエチン（TPO）模倣剤を投与するステップを含み、対象への有効量のTPO模倣剤の投与が、対象における放射線誘導性肝疾患を緩和する、方法。

実施形態1（a）：TPO模倣剤が、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドを含む、実施形態1に記載の方法。

実施形態1（b）：ペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列を有する、実施形態1（a）に記載の方法。

実施形態1（c）：TPO模倣剤が、ペプチドに共有結合で連結している親水性ポリマーをさらに含む、実施形態1（a）または1（b）に記載の方法。

実施形態1（d）：親水性ポリマーが、i）ポリエチレングリコール（PEG）、ii）ポリプロピレングリコール、iii）ポリ乳酸、またはiv）ポリグリコール酸のうちのいずれか1つである、実施形態1（c）に記載の方法。

実施形態1（e）：親水性ポリマーが、PEGである、実施形態1（d）に記載の方法。

実施形態1（f）：PEGが、モノメトキシポリエチレングリコール（MePEG-OH）、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル（MePEG-S）、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルコハク酸エステル（MePEG-S-NHS）、モノメトキシポリエチレングリコールアミン（MePEG-NH<sub>2</sub>）、モノメトキシポリエチレングリコールトレシル酸エステル（MePEG-TRES）、またはモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾイルカルボニル（MePEG-IM）のうちのいずれか1つである、実施形態1（e）に記載の方法。

実施形態1（g）：PEGが、メトキシポリ（エチレングリコール）（MPEG）である、実施形態1（e）に記載の方法。

実施形態1（h）：TPO模倣剤が、式（I）の分子構造を有するRWJ-800088、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである、実施形態1（g）に記載の方法。

実施形態1（i）：RWJ-800088中のMPEGが、メトキシポリエチレングリコール20000である、実施形態1（h）に記載の方法。

実施形態1（j）：ペプチドが、配列番号3のアミノ酸配列を有する、実施形態1（a）に記載の方法。

実施形態1（k）：ペプチドが、ポリペプチドに融合している、実施形態1（j）に記載の方法。

実施形態1（l）：ポリペプチドが、Fcドメインである、実施形態1（k）に記載の方法。

実施形態1（m）：TPO模倣剤が、ロミプロスチムである、実施形態1（l）に記載の方法。

実施形態1（m）（1）：ロミプロスチムが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、実施形態1（m）に記載の方法。

実施形態2：放射線誘導性肝疾患が、以下の疾患：肝腫大、肝壊死、アポトーシス、腹水、肝酵素の上昇、血小板減少症、肝類洞閉塞症候群（SOS）、および肝中心静脈閉塞性疾患（VOD）のうちのいずれか1つまたは複数である、実施形態1から1（m）（1）のいずれか一項に記載の方法。

実施形態2（a）：放射線誘導性肝疾患が、肝腫大である、実施形態2に記載の方法。

実施形態2（b）：放射線誘導性肝疾患が、腹水である、実施形態2に記載の方法。

実施形態2（c）：放射線誘導性肝疾患が、肝酵素の上昇である、実施形態2に記載の方法。

実施形態2（d）：放射線誘導性肝疾患が、血小板減少症である、実施形態2に記載の方法。

実施形態2（e）：放射線誘導性肝疾患が、肝類洞閉塞症候群（SOS）である、実施形態2に記載の方法。

実施形態2（f）：放射線誘導性肝疾患が、肝中心静脈閉塞性疾患（VOD）である、実

10

20

30

40

50

施形態 2 に記載の方法。

実施形態 2 (g) : 放射線誘導性肝疾患が、肝壊死である、実施形態 2 に記載の方法。

実施形態 2 (h) : 放射線誘導性肝疾患が、アポトーシスである、実施形態 2 に記載の方法。

実施形態 3 : 標的放射線療法で処置された対象における非照射肝葉の肥厚を増強する方法であって、対象に有効量のトロンボポエチン (TPO) 模倣剤を投与するステップを含み、対象への有効量の TPO 模倣剤の投与が、対象における非照射肝葉の肥厚を増強する、方法。

実施形態 3 (a) : TPO 模倣剤が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチドを含む、実施形態 3 に記載の方法。

実施形態 3 (b) : ペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 3 (a) に記載の方法。

実施形態 3 (c) : TPO 模倣剤が、ペプチドに共有結合で連結している親水性ポリマーをさらに含む、実施形態 3 (a) または 1 (b) に記載の方法。

実施形態 3 (d) : 親水性ポリマーが、i) ポリエチレングリコール (PEG)、ii) ポリプロピレングリコール、iii) ポリ乳酸、または iv) ポリグリコール酸のうちのいずれか 1 つである、実施形態 3 (c) に記載の方法。

実施形態 3 (e) : 親水性ポリマーが、PEG である、実施形態 3 (d) に記載の方法。

実施形態 3 (f) : PEG が、モノメトキシポリエチレングリコール (MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル (MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルコハク酸エステル (MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコールアミン (MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレングリコールトレシル酸エステル (MePEG-TRES)、またはモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾイルカルボニル (MePEG-IM) のうちのいずれか 1 つである、実施形態 3 (e) に記載の方法。

実施形態 3 (g) : PEG が、メトキシポリ (エチレングリコール) (MPEG) である、実施形態 3 (e) に記載の方法。

実施形態 3 (h) : TPO 模倣剤が、式 (I) の分子構造を有する RWJ - 800088、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである、実施形態 3 (g) に記載の方法。

実施形態 3 (i) : RWJ - 800088 中の MPEG が、メトキシポリエチレングリコール 20000 である、実施形態 3 (h) に記載の方法。

実施形態 3 (j) : ペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 3 (a) に記載の方法。

実施形態 3 (k) : ペプチドが、ポリペプチドに融合している、実施形態 3 (j) に記載の方法。

実施形態 3 (l) : ポリペプチドが、Fcドメインである、実施形態 3 (k) に記載の方法。

実施形態 3 (m) : TPO 模倣剤が、ロミプロスチムである、実施形態 3 (l) に記載の方法。

実施形態 3 (m) (1) : ロミプロスチムが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 3 (m) に記載の方法。

実施形態 3 (n) : 非照射肝葉の肥厚の増強が、対象における照射肝葉の形成不全を補償する、実施形態 3 から 3 (m) (1) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 4 : 対象が、肝疾患のための標的放射線療法で処置される、実施形態 1 から 3 (n) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 4 (a) : 肝疾患が、肝臓腫瘍である、実施形態 4 に記載の方法。

実施形態 4 (b) : 肝疾患が、肝転移である、実施形態 4 に記載の方法。

実施形態 4 (c) : 肝疾患が、肝がんである、実施形態 4 に記載の方法。

実施形態 4 (d) : 肝疾患が、肝細胞癌 (HCC) である、実施形態 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 実施形態 4 ( e ) : 肝疾患が、遺伝性障害である、実施形態 4 に記載の方法。
- 実施形態 4 ( f ) : 遺伝性障害が、タンパク質欠乏症をもたらす、実施形態 4 ( e ) に記載の方法。
- 実施形態 5 : 対象が、消化器がんのための標的放射線療法で処置される、実施形態 1 から 3 ( n ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 6 : 対象が、骨髄移植のための移植前照射で処置される、実施形態 1 から 3 ( n ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 7 : 対象が、肝細胞の生着のための移植前肝照射 ( H I R ) で処置される、実施形態 1 から 3 ( n ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 8 : T P O 模倣剤が、肝類洞内皮細胞 ( L S E C )、肝細胞、肝幹細胞、多能性幹細胞、および外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞のうちの少なくとも一つと組み合わせて対象に投与される、実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。 10
- 実施形態 8 ( a ) : T P O 模倣剤が、L S E C と組み合わせて対象に投与される、実施形態 8 に記載の方法。
- 実施形態 8 ( a ) ( 1 ) : L S E C が移植される、実施形態 8 ( a ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( b ) : 移植される L S E C が、自家細胞である、実施形態 8 ( a ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( c ) : 移植される L S E C が、同種細胞である、実施形態 8 ( a ) ( 1 ) に記載の方法。 20
- 実施形態 8 ( d ) : 移植される L S E C が、同系細胞である、実施形態 8 ( a ) ( 1 ) または 8 ( c ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( e ) : T P O 模倣剤が、肝細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 8 から 8 ( d ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 8 ( f ) : 肝細胞が移植される、実施形態 8 ( e ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( f ) ( 1 ) : 移植される肝細胞が、自家細胞である、実施形態 8 ( f ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( f ) ( 2 ) : 移植される肝細胞が、同種細胞である、実施形態 8 ( f ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( f ) ( 3 ) : 移植される肝細胞が、同系細胞である、実施形態 8 ( f ) または 8 ( f ) ( 2 ) に記載の方法。 30
- 実施形態 8 ( g ) : T P O 模倣剤が、肝幹細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 8 から 8 ( f ) ( 3 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 8 ( g ) ( 1 ) : 肝幹細胞が移植される、実施形態 8 ( g ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( g ) ( 2 ) : 移植される肝幹細胞が、自家細胞である、実施形態 8 ( g ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( g ) ( 3 ) : 移植される肝幹細胞が、同種細胞である、実施形態 8 ( g ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( g ) ( 4 ) : 移植される肝幹細胞が、同系細胞である、実施形態 8 ( g ) ( 1 ) または 8 ( g ) ( 3 ) に記載の方法。 40
- 実施形態 8 ( h ) : T P O 模倣剤が、多能性幹細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 8 から 8 ( g ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 8 ( h ) ( 1 ) : 多能性幹細胞が移植される、実施形態 8 ( h ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( h ) ( 2 ) : 移植される多能性幹細胞が、自家細胞である、実施形態 8 ( h ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( h ) ( 3 ) : 移植される多能性幹細胞が、同種細胞である、実施形態 8 ( h ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( h ) ( 4 ) : 移植される多能性幹細胞が、同系細胞である、実施形態 8 ( h ) ( 1 ) または 8 ( h ) ( 3 ) に記載の方法。
- 実施形態 8 ( i ) : T P O 模倣剤が、外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え 50

え肝細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 8 から 8 ( h ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 8 ( i ) ( 1 ) : 組換え肝細胞が移植される、実施形態 8 ( i ) に記載の方法。

実施形態 8 ( i ) ( 2 ) : 移植される組換え肝細胞が、自家細胞である、実施形態 8 ( i ) ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( i ) ( 3 ) : 移植される組換え肝細胞が、同種細胞である、実施形態 8 ( i ) ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( i ) ( 4 ) : 移植される組換え肝細胞が、同系細胞である、実施形態 8 ( i ) ( 1 ) または 8 ( i ) ( 3 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( j ) : タンパク質因子もまた、対象に投与される、実施形態 8 から 8 ( i ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。 10

実施形態 8 ( k ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A 、

i i . V E G F - E 、

i i i . F G F - 2 、

i v . E G F 、

v . M M P 1 4 、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1 、

v i i i . G M - C S F 、

i x . G C S F 、

x . F L T 3 、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 1 つである、実施形態 8 ( j ) に記載の方法。

実施形態 8 ( l ) : 2 つまたはこれを超えるタンパク質因子もまた、対象に投与される、実施形態 8 から 8 ( i ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 8 ( m ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A 、

i i . V E G F - E 、

i i i . F G F - 2 、

i v . E G F 、

v . M M P 1 4 、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1 、

v i i i . G M - C S F 、

i x . G C S F 、

x . F L T 3 、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 2 つである、実施形態 8 ( l ) に記載の方法。

実施形態 8 ( n ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A 、

i i . V E G F - E 、

i i i . F G F - 2 、

i v . E G F 、または

v . M M P 1 4 、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1 、

v i i i . G M - C S F 、

20

30

40

50

i x . G C S F、

x . F L T 3

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 3 つである、実施形態 8 ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( o ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 4 つである、実施形態 8 ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( p ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 5 つである、実施形態 8 ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( q ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 6 つである、実施形態 8 ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 8 ( r ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

10

20

30

40

50

i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン 1、および  
 x i i . アンフィレグリン

10

のうちのいずれか7つまたはこれを超えるタンパク質因子である、実施形態8(1)に記載の方法。

実施形態9: L S E C が、T P O 模倣剤の投与の前に、この後で、またはこれと同時に、対象に移植される、実施形態8から8(r)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態9(a): L S E C が、T P O 模倣剤の投与の前に、対象に移植される、実施形態9に記載の方法。

実施形態9(b): L S E C が、T P O 模倣剤の投与の後で、対象に移植される、実施形態9に記載の方法。

実施形態9(c): L S E C が、T P O 模倣剤の投与と同時に、対象に移植される、実施形態9に記載の方法。

20

実施形態10: T P O 模倣剤が、対象にある線量の標的放射線が投与される少なくとも約24時間前から少なくとも約24時間後に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される24時間~2時間前に、対象に投与される、実施形態10に記載の方法。

実施形態10(a)(1): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される24時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(2): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される23時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(3): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される22時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態10(a)(4): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される21時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(5): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される20時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(6): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される19時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(7): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される18時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(8): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される17時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

40

実施形態10(a)(9): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される16時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(10): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される15時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(11): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される14時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(12): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される13時間前に、対象に投与される、実施形態4から9(c)のいずれか一項に記載の方法。

実施形態10(a)(13): T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される12時間前に

50

- 、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 1 4 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 1 1 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 1 5 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 1 0 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 1 6 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 9 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 1 7 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 8 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 1 8 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 7 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。 10
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 1 9 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 6 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 0 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 5 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 1 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 4 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 2 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 3 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 3 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 2 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。 20
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 4 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 1 時間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 5 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 3 0 分間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( a ) ( 2 6 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 1 5 分間前に、対象に投与される、実施形態 4 から 9 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( b ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与された 0 . 1 ~ 2 時間後に、対象に投与される、実施形態 1 0 に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( c ) : 対象が、標的放射線療法で処置される、実施形態 1 0 から 1 0 ( b ) のいずれか一項に記載の方法。 30
- 実施形態 1 0 ( d ) : 対象が、定位放射線療法で処置される、実施形態 1 0 から 1 0 ( b ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 0 ( e ) : 対象が、肝動脈化学塞栓術 ( T A C E ) で処置される、実施形態 1 0 から 1 0 ( b ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 1 : 放射線の線量が、1 0 ~ 7 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 0 から 1 0 ( e ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 1 1 ( a ) : 放射線の線量が、1 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載の方法。
- 実施形態 1 1 ( b ) : 放射線の線量が、2 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載の方法。 40
- 実施形態 1 1 ( c ) : 放射線の線量が、3 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載の方法。
- 実施形態 1 1 ( d ) : 放射線の線量が、4 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載の方法。
- 実施形態 1 1 ( e ) : 放射線の線量が、5 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載の方法。
- 実施形態 1 1 ( f ) : 放射線の線量が、6 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載の方法。
- 実施形態 1 1 ( g ) : 放射線の線量が、7 0 グレイ ( G y ) である、実施形態 1 1 に記載 50

の方法。

実施形態 1 1 ( h ) : 放射線の線量が、対象に、1 ~ 1 0 分割で投与される、実施形態 1 1 から 1 1 ( g ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 1 2 : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 1 ~ 約 5  $\mu$  g である、実施形態 1 から 1 1 ( h ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 1 2 ( a ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 1  $\mu$  g である、実施形態 1 2 に記載の方法。

実施形態 1 2 ( b ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 2  $\mu$  g である、実施形態 1 2 に記載の方法。

実施形態 1 2 ( c ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 3  $\mu$  g である、実施形態 1 2 に記載の方法。 10

実施形態 1 2 ( d ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 4  $\mu$  g である、実施形態 1 2 に記載の方法。

実施形態 1 2 ( e ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 5  $\mu$  g である、実施形態 1 2 に記載の方法。

実施形態 1 3 : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、静脈内注射、筋内注射、皮内注射、または皮下注射のうちのいずれか 1 つにより投与される、実施形態 1 から 1 2 ( e ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 1 3 ( a ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、皮下注射により投与される、実施形態 1 3 に記載の方法。 20

実施形態 1 3 ( b ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、静脈内注射により投与される、実施形態 1 3 に記載の方法。

実施形態 1 3 ( c ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、筋内注射により投与される、実施形態 1 3 に記載の方法。

実施形態 1 3 ( d ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、皮内注射により投与される、実施形態 1 3 に記載の方法。

実施形態 1 4 : それを必要とする対象における肝細胞の生着を促進する方法であって、

a ) 標的放射線を対象に投与するステップと ;

b ) 対象に肝細胞を投与するステップと ;

c ) 対象に有効量のトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を投与するステップと を含み、これにより対象の肝臓内の前記肝細胞の生着を促進する、方法。 30

実施形態 1 4 ( a ) : T P O 模倣剤が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチドを含む、実施形態 1 4 に記載の方法。

実施形態 1 4 ( b ) : ペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 4 ( a ) に記載の方法。

実施形態 1 4 ( c ) : T P O 模倣剤が、ペプチドに共有結合で連結している親水性ポリマーをさらに含む、実施形態 1 4 ( a ) または 1 4 ( b ) に記載の方法。

実施形態 1 4 ( d ) : 親水性ポリマーが、ポリエチレングリコール ( P E G )、ポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸のうちのいずれか 1 つである、実施形態 1 4 ( c ) に記載の方法。 40

実施形態 1 4 ( e ) : 親水性ポリマーが、P E G である、実施形態 1 4 ( d ) に記載の方法。

実施形態 1 4 ( f ) : P E G が、モノメトキシポリエチレングリコール ( M e P E G - O H )、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル ( M e P E G - S )、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルコハク酸エステル ( M e P E G - S - N H S )、モノメトキシポリエチレングリコールアミン ( M e P E G - N H 2 )、モノメトキシポリエチレングリコールトレシル酸エステル ( M e P E G - T R E S )、またはモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾイルカルボニル ( M e P E G - I M ) のうちのいずれか 1 つである、実施形態 1 4 ( e ) に記載の方法。

実施形態 1 4 ( g ) : P E G が、メトキシポリ ( エチレングリコール ) ( M P E G ) であ 50

る、実施形態 14 ( e ) に記載の方法。

実施形態 14 ( h ) : T P O 模倣剤が、式 ( I ) の分子構造を有する R W J - 8 0 0 0 8 8、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである、実施形態 14 ( g ) に記載の方法。

実施形態 14 ( i ) : R W J - 8 0 0 0 8 8 中の M P E G が、メトキシポリエチレングリコール 2 0 0 0 0 である、実施形態 14 ( h ) に記載の方法。

実施形態 14 ( j ) : ペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 14 ( a ) に記載の方法。

実施形態 14 ( k ) : ペプチドが、ポリペプチドに融合している、実施形態 14 ( j ) に記載の方法。

実施形態 14 ( l ) : ポリペプチドが、F c ドメインである、実施形態 14 ( k ) に記載の方法。

実施形態 14 ( m ) : T P O 模倣剤が、ロミプロスチムである、実施形態 14 ( l ) に記載の方法。

実施形態 14 ( m ) ( 1 ) : ロミプロスチムが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 14 ( m ) に記載の方法。

実施形態 14 ( n ) : 肝細胞が、生着し、損傷した肝臓の細胞のうちの少なくとも 5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 9 5 % ( またはこれらの中で表される任意の範囲 ) を充当するか、または置きかえるように増殖する、実施形態 14 から 14 ( m ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( n ) ( 1 ) : 肝細胞が、生着し、損傷した肝臓の機能のうちの少なくとも 5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 9 5 % ( またはこれらの中で表される任意の範囲 ) を再確立するように増殖する、実施形態 14 から 14 ( m ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( n ) ( 2 ) : 肝細胞が、生着し、損傷した肝臓のサイズの少なくとも 5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、または 9 5 % ( またはこれらの中で表される任意の範囲 ) に再生する、実施形態 14 から 14 ( m ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( o ) : 肝細胞が、生着し、肝臓への標的放射線の投与と関連する状態を改善する、実施形態 14 から 14 ( n ) ( 2 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( o ) ( 1 ) : 肝臓への標的放射線の投与と関連する状態が、グルコース代謝を変更する、実施形態 14 ( o ) に記載の方法。

実施形態 14 ( o ) ( 2 ) : 肝臓への標的放射線の投与と関連する状態が、対象の血中の正常アンモニアレベルを変更する、実施形態 14 ( o ) に記載の方法。

実施形態 14 ( o ) ( 3 ) : 肝臓への標的放射線の投与と関連する状態が、対象の血中の正常脂質レベルを変更する、実施形態 14 ( o ) に記載の方法。

実施形態 14 ( p ) : 肝細胞が、生着し、対象において第 V I I I 因子を産生する、実施形態 14 から 14 ( n ) ( 2 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( p ) ( 1 ) : 肝細胞が、L S E C、好ましくは、機能的 L S E C である、実施形態 14 ( p ) に記載の方法。

実施形態 14 ( p ) ( 2 ) : L S E C の生着を促進する、実施形態 14 ( p ) から 14 ( p ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( p ) ( 3 ) : 第 V I I I 因子の産生を促進する、実施形態 14 ( p ) から 14 ( p ) ( 2 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( q ) : T P O 模倣剤が、肝細胞の投与の前に対象に投与される、実施形態 14 から 14 ( p ) ( 3 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( r ) : T P O 模倣剤が、肝細胞の投与の後に対象に投与される、実施形態 14 から 14 ( p ) ( 3 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14 ( s ) : T P O 模倣剤が、肝細胞の投与と同時に対象に投与される、実施形態 14 から 14 ( p ) ( 3 ) のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 実施形態 15 : 標的放射線で処置された対象における類洞閉塞を軽減する方法であって、  
 a) 対象に肝細胞およびタンパク質因子のうち少なくとも 1 つを投与するステップと ;  
 b) 対象に有効量のトロンボポエチン ( T P O ) 模倣剤を投与するステップと  
 を含み、これにより、類洞閉塞を軽減する方法。
- 実施形態 15 ( a ) : T P O 模倣剤が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチドを含む、実施形態 15 に記載の方法。
- 実施形態 15 ( b ) : ペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 15 ( a ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( c ) : T P O 模倣剤が、ペプチドに共有結合で連結している親水性ポリマーをさらに含む、実施形態 15 ( a ) または 15 ( b ) に記載の方法。 10
- 実施形態 15 ( d ) : 親水性ポリマーが、ポリエチレングリコール ( P E G )、ポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸のうちいずれか 1 つである、実施形態 15 ( c ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( e ) : 親水性ポリマーが、 P E G である、実施形態 15 ( d ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( f ) : P E G が、モノメトキシポリエチレングリコール ( M e P E G - O H )、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル ( M e P E G - S )、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルコハク酸エステル ( M e P E G - S - N H S )、モノメトキシポリエチレングリコールアミン ( M e P E G - N H 2 )、モノメトキシポリエチレングリコールトレシル酸エステル ( M e P E G - T R E S )、またはモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾイルカルボニル ( M e P E G - I M ) のうちのいずれか 1 つである、実施形態 15 ( e ) に記載の方法。 20
- 実施形態 15 ( g ) : P E G が、メトキシポリ ( エチレングリコール ) ( M P E G ) である、実施形態 15 ( e ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( h ) : T P O 模倣剤が、式 ( I ) の分子構造を有する R W J - 8 0 0 0 8 8、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである、実施形態 15 ( g ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( i ) : R W J - 8 0 0 0 8 8 中の M P E G が、メトキシポリエチレングリコール 2 0 0 0 0 である、実施形態 15 ( h ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( j ) : ペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 15 ( a ) に記載の方法。 30
- 実施形態 15 ( k ) : ペプチドが、ポリペプチドに融合している、実施形態 15 ( j ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( l ) : ポリペプチドが、 F c ドメインである、実施形態 15 ( k ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( m ) : T P O 模倣剤が、ロミプロスチムである、実施形態 15 ( l ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( m ) ( 1 ) : ロミプロスチムが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 15 ( m ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( n ) : ( a ) 対象に、少なくとも 1 つのタンパク質因子を投与するステップと ; ( b ) 対象に、 T P O 模倣剤の有効量を投与するステップとを含む、実施形態 15 から 15 ( m ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。 40
- 実施形態 15 ( o ) : ( a ) 対象に、肝細胞を投与するステップと ; ( b ) 対象に、 T P O 模倣剤の有効量を投与するステップとを含む、実施形態 15 から 15 ( m ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 15 ( p ) : ( a ) 対象に、肝細胞および少なくとも 1 つのタンパク質因子を投与するステップと ; ( b ) 対象に、 T P O 模倣剤の有効量を投与するステップとを含む、実施形態 15 から 15 ( m ) ( 1 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 15 ( q ) : T P O 模倣剤が、肝細胞の投与の前に、対象に投与される、実施形態 15 ( o ) または 15 ( p ) に記載の方法。 50

- 実施形態 15 ( r ) : T P O 模倣剤が、肝細胞の投与の後で、対象に投与される、実施形態 15 ( o ) または 15 ( p ) に記載の方法。
- 実施形態 15 ( s ) : T P O 模倣剤が、肝細胞の投与と同時に、対象に投与される、実施形態 15 ( o ) または 15 ( p ) に記載の方法。
- 実施形態 16 : 肝細胞が、肝類洞内皮細胞 ( L S E C )、肝細胞、肝幹細胞、多能性幹細胞、および外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞のうちの少なくとも一つである、実施形態 14 から 15 ( s ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 16 ( a ) : T P O 模倣剤が、L S E C と組み合わせて対象に投与される、実施形態 16 に記載の方法。
- 実施形態 16 ( a ) ( 1 ) : L S E C が移植される、実施形態 16 ( a ) に記載の方法。 10
- 実施形態 16 ( b ) : 移植される L S E C が、自家細胞である、実施形態 16 ( a ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( c ) : 移植される L S E C が、同種細胞である、実施形態 16 ( a ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( d ) : 移植される L S E C が、同系細胞である、実施形態 16 ( a ) ( 1 ) または 16 ( c ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( e ) : T P O 模倣剤が、肝細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 16 から 16 ( d ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 16 ( f ) : 肝細胞が移植される、実施形態 16 ( e ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( f ) ( 1 ) : 移植される肝細胞が、自家細胞である、実施形態 16 ( f ) 20  
に記載の方法。
- 実施形態 16 ( f ) ( 2 ) : 移植される肝細胞が、同種細胞である、実施形態 16 ( f ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( f ) ( 3 ) : 移植される肝細胞が、同系細胞である、実施形態 16 ( f ) または 16 ( f ) ( 2 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( g ) : T P O 模倣剤が、肝幹細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 16 から 16 ( f ) ( 3 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 16 ( g ) ( 1 ) : 肝幹細胞が移植される、実施形態 16 ( g ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( g ) ( 2 ) : 移植される肝幹細胞が、自家細胞である、実施形態 16 ( g ) ( 1 ) に記載の方法。 30
- 実施形態 16 ( g ) ( 3 ) : 移植される肝幹細胞が、同種細胞である、実施形態 16 ( g ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( g ) ( 4 ) : 移植される肝幹細胞が、同系細胞である、実施形態 16 ( g ) ( 1 ) または 16 ( g ) ( 3 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( h ) : T P O 模倣剤が、多能性幹細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 16 から 16 ( g ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 16 ( h ) ( 1 ) : 多能性幹細胞が移植される、実施形態 16 ( h ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( h ) ( 2 ) : 移植される多能性幹細胞が、自家細胞である、実施形態 16 ( h ) ( 1 ) に記載の方法。 40
- 実施形態 16 ( h ) ( 3 ) : 移植される多能性幹細胞が、同種細胞である、実施形態 16 ( h ) ( 1 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( h ) ( 4 ) : 移植される多能性幹細胞が、同系細胞である、実施形態 16 ( h ) ( 1 ) または 16 ( h ) ( 3 ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( i ) : T P O 模倣剤が、外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞と組み合わせて対象に投与される、実施形態 16 から 16 ( h ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。
- 実施形態 16 ( i ) ( 1 ) : 組換え肝細胞が移植される、実施形態 16 ( i ) に記載の方法。
- 実施形態 16 ( i ) ( 2 ) : 移植される組換え肝細胞が、自家細胞である、実施形態 16 50

( i ) ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 16 ( i ) ( 3 ) : 移植される組換え肝細胞が、同種細胞である、実施形態 16 ( i ) ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 16 ( i ) ( 4 ) : 移植される組換え肝細胞が、同系細胞である、実施形態 16 ( i ) ( 1 ) または 16 ( i ) ( 3 ) に記載の方法。

実施形態 16 ( j ) : タンパク質因子もまた、対象に投与される、実施形態 16 から 16 ( i ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 16 ( k ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アнтаゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 1 つである、実施形態 16 ( j ) に記載の方法。

実施形態 16 ( l ) : 2 つまたはこれを超えるタンパク質因子もまた、対象に投与される、実施形態 16 から 16 ( i ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 16 ( m ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アнтаゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 2 つである、実施形態 16 ( l ) に記載の方法。

実施形態 16 ( n ) : 投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、または

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アнтаゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

10

20

30

40

50

のうちのいずれか3つである、実施形態16(1)に記載の方法。

実施形態16(o)：投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン1、および  
 x i i . アンフィレグリン

10

のうちのいずれか4つである、実施形態16(1)に記載の方法。

実施形態16(p)：投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン1、および  
 x i i . アンフィレグリン

20

のうちのいずれか5つである、実施形態16(1)に記載の方法。

実施形態16(q)：投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン1、および  
 x i i . アンフィレグリン

30

のうちのいずれか6つである、実施形態16(1)に記載の方法。

実施形態16(r)：投与されるタンパク質因子が、

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

40

50

v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン 1、および  
 x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 7 つまたはこれを超えるタンパク質因子である、実施形態 1 6 ( 1 ) に記載の方法。

実施形態 1 6 ( s ) : 造血幹細胞を、血流に動員するために適する薬剤が、対象に投与される、実施形態 1 6 から 1 6 ( i ) ( 4 ) のいずれか一項に記載の方法。

10

実施形態 1 6 ( t ) : 前記薬剤が、放射線療法後に、対象に投与される、実施形態 1 6 ( s ) に記載の方法。

実施形態 1 6 ( u ) : 前記薬剤が、C X C R 4 アンタゴニストである、実施形態 1 6 ( s ) または 1 6 ( t ) に記載の方法。

実施形態 1 6 ( v ) : 前記薬剤が、プレリキサホルである、実施形態 1 6 ( s ) から 1 6 ( u ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 1 7 : 対象が、肝疾患のための標的放射線療法で処置される、実施形態 1 4 から 1 6 ( v ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 1 7 ( a ) : 肝疾患が、肝臓腫瘍である、実施形態 1 7 に記載の方法。

実施形態 1 7 ( b ) : 肝疾患が、肝転移である、実施形態 1 7 に記載の方法。

20

実施形態 1 7 ( c ) : 肝疾患が、肝がんである、実施形態 1 7 に記載の方法。

実施形態 1 7 ( d ) : 肝疾患が、肝細胞癌 ( H C C ) である、実施形態 1 7 に記載の方法。

実施形態 1 7 ( e ) : 肝疾患が、遺伝性障害である、実施形態 1 7 に記載の方法。

実施形態 1 7 ( f ) : 遺伝性障害が、タンパク質欠乏症をもたらす、実施形態 1 7 ( e ) に記載の方法。

実施形態 1 7 ( g ) : 対象が、A 型血友病のための標的放射線療法で処置される、実施形態 1 4 から 1 6 ( r ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 1 8 : 対象が、消化器がんのための標的放射線療法で処置される、実施形態 1 4 から 1 6 ( r ) のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態 1 9 : 対象が、骨髄移植のための移植前照射で処置される、実施形態 1 4 から 1 6 ( r ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 0 : 対象が、肝細胞の生着のための移植前肝照射 ( H I R ) で処置される、実施形態 1 4 から 1 6 ( r ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 1 : T P O 模倣剤が、L S E C の移植の前に、この後で、またはこれと同時に、対象に投与される、実施形態 1 6 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 1 ( a ) : T P O 模倣剤が、L S E C の移植の前に、対象に投与される、実施形態 2 1 に記載の方法。

実施形態 2 1 ( b ) : T P O 模倣剤が、L S E C の移植の後で、対象に投与される、実施形態 2 1 に記載の方法。

40

実施形態 2 1 ( c ) : T P O 模倣剤が、L S E C の移植と同時に、対象に投与される、実施形態 2 1 に記載の方法。

実施形態 2 2 : T P O 模倣剤が、対象にある線量の放射線が投与される少なくとも約 2 4 時間前から少なくとも約 2 4 時間後に、対象に投与される、実施形態 1 7 から 2 1 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 2 ( a ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される、2 4 ~ 2 時間前に、対象に投与される、実施形態 2 2 に記載の方法。

実施形態 2 2 ( a ) ( 1 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 2 4 時間前に、対象に投与される、実施形態 1 7 から 2 1 ( c ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 2 ( a ) ( 2 ) : T P O 模倣剤が、対象に放射線が投与される 2 3 時間前に、

50



対象に投与される、実施形態 2 2 に記載の方法。

実施形態 2 2 ( c ) : 対象が、標的放射線療法で処置される、実施形態 2 2 から 2 2 ( b ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 2 ( d ) : 対象が、定位放射線療法で処置される、実施形態 2 2 から 2 2 ( b ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 3 : 放射線の線量が、10 ~ 70 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 2 から 2 2 ( d ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 3 ( a ) : 放射線の線量が、10 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。

実施形態 2 3 ( b ) : 放射線の線量が、20 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。 10

実施形態 2 3 ( c ) : 放射線の線量が、30 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。

実施形態 2 3 ( d ) : 放射線の線量が、40 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。

実施形態 2 3 ( e ) : 放射線の線量が、50 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。

実施形態 2 3 ( f ) : 放射線の線量が、60 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。

実施形態 2 3 ( g ) : 放射線の線量が、70 グレイ ( Gy ) である、実施形態 2 3 に記載の方法。 20

実施形態 2 3 ( h ) : 放射線の線量が、対象に、1 ~ 10 分割で投与される、実施形態 2 3 から 2 3 ( g ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 4 : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 1 ~ 約 5  $\mu$  g である、実施形態 1 4 から 2 3 ( h ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 4 ( a ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 1  $\mu$  g である、実施形態 2 4 に記載の方法。

実施形態 2 4 ( b ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 2  $\mu$  g である、実施形態 2 4 に記載の方法。

実施形態 2 4 ( c ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 3  $\mu$  g である、実施形態 2 4 に記載の方法。 30

実施形態 2 4 ( d ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 4  $\mu$  g である、実施形態 2 4 に記載の方法。

実施形態 2 4 ( e ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象の体重 1 k g 当たり約 5  $\mu$  g である、実施形態 2 4 に記載の方法。

実施形態 2 5 : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、静脈内注射、筋内注射、皮内注射、または皮下注射のうちのいずれか 1 つにより投与される、実施形態 1 4 から 2 4 ( e ) のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 5 ( a ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、皮下注射により投与される、実施形態 2 5 に記載の方法。 40

実施形態 2 5 ( b ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、静脈内注射により投与される、実施形態 2 5 に記載の方法。

実施形態 2 5 ( c ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、筋内注射により投与される、実施形態 2 5 に記載の方法。

実施形態 2 5 ( d ) : T P O 模倣剤の有効量が、対象に、皮内注射により投与される、実施形態 2 5 に記載の方法。

実施形態 2 6 : 有効量の T P O 模倣剤の投与が、非照射肝葉の肝臓能力の増大、照射組織の形成不全の増大、および対象の血液中のヒアルロン酸または肝トランスアミナーゼなどの循環肝損傷マーカーの濃度の上昇の低減のうち少なくとも 1 つをもたらす、実施形態 1 から 2 5 ( a ) のいずれか一項に記載の方法。 50

実施形態 26 (a) : 有効量の TPO 模倣剤の投与が、非照射肝葉の肝臓能力の増大、照射組織の形成不全の増大、および対象の血液中のヒアルロン酸または肝トランスアミナーゼなどの肝損傷マーカーの濃度の上昇の低減のうちの少なくとも 2 つをもたらす、実施形態 26 に記載の方法。

実施形態 26 (b) : 有効量の TPO 模倣剤の投与が、非照射肝葉の肝臓能力の増大、照射組織の形成不全の増大、および対象の血液中のヒアルロン酸または肝トランスアミナーゼなどの肝損傷マーカーの濃度の上昇の低減をもたらす、実施形態 26 に記載の方法。

実施形態 27 : それを必要とする対象における放射線誘導性肝疾患を緩和するキットであって、有効量の TPO 模倣剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を含むキット。

10

実施形態 27 (a) : TPO 模倣剤が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチドを含む、実施形態 27 に記載のキット。

実施形態 27 (b) : ペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、実施形態 27 に記載のキット。

実施形態 27 (c) : TPO 模倣剤が、ペプチドに共有結合で連結している親水性ポリマーをさらに含む、実施形態 27 (a) または 27 (b) に記載のキット。

実施形態 27 (d) : 親水性ポリマーが、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸のうちのいずれか 1 つである、実施形態 27 に記載のキット。

実施形態 27 (e) : 親水性ポリマーが、PEG である、実施形態 27 (d) に記載のキット。

20

実施形態 27 (f) : PEG が、モノメトキシポリエチレングリコール (MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコールコハク酸エステル (MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルコハク酸エステル (MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコールアミン (MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレングリコールトレシル酸エステル (MePEG-TRES)、またはモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾイルカルボニル (MePEG-IM) のうちのいずれか 1 つである、実施形態 27 (e) に記載のキット。

実施形態 27 (g) : PEG が、メトキシポリ(エチレングリコール) (MPEG) である、実施形態 27 (e) に記載のキット。

30

実施形態 27 (h) : TPO 模倣剤が、式 (I) の分子構造を有する RWJ-800088、またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルである、実施形態 27 (g) に記載のキット。

実施形態 27 (i) : RWJ-800088 中の MPEG が、メトキシポリエチレングリコール 20000 である、実施形態 27 (h) に記載のキット。

実施形態 27 (j) : ペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 27 (a) に記載のキット。

実施形態 27 (k) : ペプチドが、ポリペプチドに融合している、実施形態 27 (j) に記載のキット。

実施形態 27 (l) : ポリペプチドが、Fc ドメインである、実施形態 27 (k) に記載のキット。

40

実施形態 27 (m) : TPO 模倣剤が、ロミプロスチムである、実施形態 27 (l) に記載のキット。

実施形態 27 (m) (1) : ロミプロスチムが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 27 (m) に記載のキット。

実施形態 28 : 放射線誘導性肝疾患を緩和するための少なくとも 1 つのさらなる治療剤またはデバイスをさらに含む、実施形態 27 から 27 (m) (1) のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 29 : さらなる治療剤が、鎮痛剤、消毒剤、他の TPO 模倣剤、他のサイトカイン、可溶性 m p l 受容体、造血因子、インターロイキン、タンパク質因子または抗体、お

50

よび化学療法剤からなる群から選択される、実施形態 28 に記載のキット。

実施形態 30：肝類洞内皮細胞（LSEC）、肝細胞、肝幹細胞、多能性幹細胞、および外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、実施形態 27 から 29 のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 30（a）：LSEC をさらに含む、実施形態 30 に記載のキット。

実施形態 30（a）（1）：LSEC が、移植のための細胞である、実施形態 30（a）に記載のキット。

実施形態 30（b）：LSEC が、自家移植のための細胞である、実施形態 30（a）（1）に記載のキット。

実施形態 30（c）：LSEC が、同種移植のための細胞である、実施形態 30（a）（1）に記載のキット。 10

実施形態 30（d）：LSEC が、同系移植のための細胞である、実施形態 30（a）（1）または 30（c）に記載のキット。

実施形態 30（e）：肝細胞をさらに含む、実施形態 30 から 30（d）のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 30（f）：肝細胞が、移植のための細胞である、実施形態 30（e）に記載のキット。

実施形態 30（f）（1）：肝細胞が、自家移植のための細胞である、実施形態 30（f）に記載のキット。

実施形態 30（f）（2）：肝細胞が、同種移植のための細胞である、実施形態 30（f）（2）に記載のキット。 20

実施形態 30（f）（3）：肝細胞が、同系移植のための細胞である、実施形態 30（f）または 30（f）（2）に記載のキット。

実施形態 30（g）：肝幹細胞をさらに含む、実施形態 30 から 30（f）（3）のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 30（g）（1）：肝幹細胞が、移植のための細胞である、実施形態 30（g）に記載のキット。

実施形態 30（g）（2）：肝幹細胞が、自家移植のための細胞である、実施形態 30（g）（1）に記載のキット。

実施形態 30（g）（3）：肝幹細胞が、同種移植のための細胞である、実施形態 30（g）（1）に記載のキット。 30

実施形態 30（g）（4）：肝幹細胞が、同系移植のための細胞である、実施形態 30（g）（1）または 30（g）（3）に記載のキット。

実施形態 30（h）：多能性幹細胞をさらに含む、実施形態 30 から 30（g）（4）のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 30（h）（1）：多能性幹細胞が、移植のための細胞である、実施形態 30（h）に記載のキット。

実施形態 30（h）（2）：多能性幹細胞が、自家移植のための細胞である、実施形態 30（h）（1）に記載のキット。

実施形態 30（h）（3）：多能性幹細胞が、同種移植のための細胞である、実施形態 30（h）（1）に記載のキット。 40

実施形態 30（h）（4）：多能性幹細胞が、同系移植のための細胞である、実施形態 30（h）（1）または 30（h）（3）に記載のキット。

実施形態 30（i）：外因性ポリヌクレオチド配列の産物を発現する組換え肝細胞をさらに含む、実施形態 30 から 30（h）（4）のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 30（i）（1）：組換え肝細胞が、移植のための細胞である、実施形態 30（i）に記載のキット。

実施形態 30（i）（2）：組換え肝細胞が、自家移植のための細胞である、実施形態 30（i）（1）に記載のキット。

実施形態 30（i）（3）：組換え肝細胞が、同種移植のための細胞である、実施形態 30（i）（1）に記載のキット。 50

0 ( i ) ( 1 ) に記載のキット。

実施形態 30 ( i ) ( 4 ) : 組換え肝細胞が、同系移植のための細胞である、実施形態 30 ( i ) ( 1 ) または 30 ( i ) ( 3 ) に記載のキット。

実施形態 30 ( j ) : タンパク質因子をさらに含む、実施形態 30 から 30 ( i ) ( 4 ) のいずれか一項に記載のキット。

実施形態 30 ( k ) : タンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 1 つである、実施形態 30 ( j ) に記載のキット。

実施形態 30 ( l ) : キットが、2 つまたはこれを超えるタンパク質因子をさらに含む、  
実施形態 30 ( j ) に記載のキット。

実施形態 30 ( m ) : タンパク質因子が、

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 2 つである、実施形態 30 ( l ) に記載のキット。

実施形態 30 ( n ) :

i . V E G F - A、

i i . V E G F - E、

i i i . F G F - 2、

i v . E G F、または

v . M M P 1 4、

v i . C X C R 4 アンタゴニスト、

v i i . S D F 1、

v i i i . G M - C S F、

i x . G C S F、

x . F L T 3、

x i . R - スポンジン 1、および

x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 3 つをさらに含む、実施形態 30 ( j ) に記載のキット。

実施形態 30 ( o ) :

10

20

30

40

50

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン 1、および  
 x i i . アンフィレグリン

10

のうちのいずれか 4 つをさらに含む、実施形態 3 0 ( j ) に記載のキット。

実施形態 3 0 ( p ) :

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン 1、および  
 x i i . アンフィレグリン

20

のうちのいずれか 5 つをさらに含む、実施形態 3 0 ( j ) に記載のキット。

実施形態 3 0 ( q ) :

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、  
 i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン 1、および  
 x i i . アンフィレグリン

30

40

のうちのいずれか 6 つをさらに含む、実施形態 3 0 ( j ) に記載のキット。

実施形態 3 0 ( r ) :

i . V E G F - A、  
 i i . V E G F - E、  
 i i i . F G F - 2、  
 i v . E G F、  
 v . M M P 1 4、  
 v i . C X C R 4 アンタゴニスト、  
 v i i . S D F 1、  
 v i i i . G M - C S F、

50

i x . G C S F、  
 x . F L T 3、  
 x i . R - スポンジン 1、および  
 x i i . アンフィレグリン

のうちのいずれか 7 つまたはこれを超えるタンパク質因子をさらに含む、実施形態 30 ( j ) に記載のキット。

【実施例】

【0111】

[実施例 1]

T P O m の、非照射肝葉に対する効果

10

材料および方法

動物：8 ~ 12 週齢の C 5 7 B L 6 雄マウスを、Institute for Animal Studies at Albert Einstein College of Medicineにおいて飼育し、通常飼料を与えた。動物は、実験の開始時、および組織回収の前に秤量した。全ての実験は、Institutional Animal Care and Use Committee at Albert Einstein College of Medicineにより承認されたプロトコールに従い実施した。

【0112】

肝照射：画像誘導型外照射は、小動物放射線研究プラットフォーム ( S A R R P、X s t r a h l I n c .、S u w a n e e、G A ) を使用して実施した。消化 ( G I ) 管の視覚化を改善するように、マウスに、Gastrografin造影剤を、強制経口投与を介して施した。約 2 分後に、マウスを管状カウチ上に置き、2 L / 分の純酸素中に、約 2 % のイソフルオラン ( I s o t h e s i a、U S P ) で麻酔をかけた。コーンビームコンピュータ断層撮影 ( C B C T ) スキャンを収集し、MuriPlanソフトウェアを使用して、中葉および右葉を照射する処置計画を作成した。毒性を最小化するために、照射は、対向 2 門照射野を使用して実施した。標的肝葉内では、アイソセンターの位置は、消化管、脊柱、および心臓の照射を最小化するように選び出した ( これらの臓器に対する最大用量は、10 Gy を下回るように保った )。ビーム硬化のために 1 mm の銅フィルターを使用して、エネルギーを 220 k V p とし、管電流を 13 mA とする ( 投与速度を 2 . 4 ~ 2 . 5 Gy / 分とする )、50 Gy の X 線で、標的を照射した ( Brodin et al., The Radiation Safety Journal, 2015, 109 Supp 3, S190 )。

20

30

【0113】

T P O m 製剤の調製および投与：T P O m を、滅菌 P B S 中で、10 mg / ml の原液に希釈した。原液を、- 20 で保存し、投与前に、室温とした。T P O m を、照射の 10 分後に、皮下注射を介する単回投与 ( 300 μ g / k g ) として投与した。

【0114】

標的肝照射 ± T P O m についての評価：50 Gy を、C 5 7 B L 6 雄マウスの肝臓中葉に投与し、照射の 10 分後、生理食塩液、または 300 μ g / k g の T P O m を、皮下注射により投与した。部分的肝照射の 1 カ月後、目的の領域を、各マウスにおいて同定した ( 群 1 つ当たりの n = 4 )。

40

【0115】

非処置尾状葉の体積の測定：生理学的臓器サイズを一定に保ちながら、非照射肝臓は、照射萎縮肝臓を補償するように、肥厚を受ける。本実験では、肝尾状葉の体積を、非照射肝臓として測定した。

【0116】

結果

T P O m は、非照射肝臓の肥厚を引き起こす

各処置群についての平均値および標準偏差を提示する ( 図 1 )。H I R + 生理食塩液についての非照射肝尾状葉サイズを、H I R + T P O m と対比して比較すると、T P O m 処置群では、有意な増大が見られた ( p 値 < 0 . 00932 )。これらのデータは、T P O m

50

が、非照射肝葉の肝臓能力の増大を促進することを裏付ける。これらの効果は、類洞肝細胞の再生により媒介される場合もあり、血管内皮細胞の保護/再生により媒介される場合もある。

【0117】

[実施例2]

正常肝臓および肝硬変肝臓における、TPOm±移植肝類洞内皮細胞(LSEC)の、照射誘導性肝損傷に対する効果

材料および方法

動物：本研究では、8~12週齢の雄/雌ジペプチルペプチダーゼIV(DPPIV)-/-ノックアウトマウス、および8~12週齢の雄/雌C57Bl6マウスを使用した。

10

動物は、実験の開始時、および組織回収の前に秤量した。全ての動物を、Institute for Animal Studies at Albert Einstein College of Medicineにおいて飼育し、通常の齧歯動物飼料を与えた。全ての実験は、Institutional Animal Care and Use Committee at Albert Einstein College of Medicineにより承認されたプロトコルに従い実施した。CC14投与(毎週2回、少なくとも11週間にわたる腹腔内[IP]注射)を使用して、動物を、肝硬変とした。

【0118】

肝照射：画像誘導型外照射は、小動物放射線研究プラットフォーム(SARRP、Xstrahl Inc.、Suwanee、GA)を使用して実施した。消化(GI)管の視覚化を改善するように、マウスに、Gastrogrofin造影剤を、強制経口投与を介して施した。約2分後に、マウスを管状カウチ上に置き、2L/分の純酸素中に、約2%のイソフルラン(Isothesia、USP)で麻酔をかけた。コーンビームコンピュータ断層撮影(CBCT)スキャンを収集し、Muriplanソフトウェアを使用して、中葉および右葉を照射する処置計画を作成した。毒性を最小化するために、対向2門照射野を使用した実施例1とは対照的に、照射は、肝臓標的1カ所当たりの投与重みが等しい、2回の回転照射を使用して(実施例1と比較して、より付随的で低用量の放射線曝露をもたらす可能性が高い)実施した。標的肝葉内では、アイソセンターの位置は、消化管、脊柱、および心臓の照射を最小化するように選び出した(これらの臓器に対する最大用量は、10Gyを下回るように保った)。ビーム硬化のために1mmの銅フィルターを使用して、エネルギーを220kVpとし、管電流を13mAとする(投与速度を2.4~2.5Gy/分とする)、50GyのX線で、標的を照射した(Brodin et al., The Radiation Safety Journal, 2015, 109 Supp 3, S190)。

20

30

【0119】

TPOm製剤の調製および投与：TPOmを、滅菌PBS中で、10mg/mlの原液に希釈した。原液を、-20℃で保存し、投与前に、室温とした。TPOmを、移植手順の10分後に、皮下注射を介する単回投与(300μg/kg)として投与した。

【0120】

標的肝照射±TPOm±LSEC移植についての評価

40

DPPIVによる染色およびイメージング：DPPIVを、DPPIV(-/-)動物における、外因性LSECの生着のためのマーカーとして選択した。Dabeva et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:7356-7361)により公表されているプロトコルに従い、5μmの凍結肝切片を固定し、DPPIVについて染色した。Perkin Elmer P250 High Capacity Slide Scannerを使用して、スライドイメージングを行った。

【0121】

肝類洞内皮細胞(LSEC)の分離：gentle MACS肝臓解離キット(Miltenyi Biotec GmbH; 型番: 130-105-807)を使用して、新たに外植される肝臓を、単一細胞懸濁液に解離した。CD146マイクロビーズ(Miltenyi

50

enyi Biotec GmbH; 型番: 130-092-007) を使用して、LSEC を、単一細胞懸濁液に分離した。

【0122】

細胞移植: LSEC 移植は、効果的な肝臓再増殖のために、強力な増殖刺激を要求する、新規の技法である (Guha et al., *Hepatology*, 2002, 36:354-62; Laconi et al., *Am. J. Pathol.*, 1998, 153:319-29)。LSEC の分離後、HIR の 24 時間後に、LSEC 500 × 10<sup>5</sup> 個を、脾内注入を介して、イソフルラン (Isothesia、USP) で麻酔下に置かれた、健常成体マウスに移植する。ブプレノルフィンを、術後鎮痛剤として施す。

【0123】

単一光子放射コンピュータ断層撮影 (SPECT) スキャン: 本研究では、RILD の進行を *in vivo* において評価するように、放射線トレーサーを伴う SPECT を開発し、利用する。動物は、前夜に、実験室に運び込み、装置の周囲音への馴致を可能とした。動物を、イソフルラン麻酔下で、少なくとも 10 分間にわたり休ませた。99mTc 硫黄コロイドの用量は、2 mL シリンジのリードの後方に保持される、10 mCi の線量から導出した。放射能は、最大で 0.2 mL の容量により、最大で 0.500 ~ 0.600 mCi まで引き上げ、眼窩後静脈叢を介して注射した。容量 0.1 mL 当たり、約 3 秒間の速度の陽圧で、注射針を適用した。次いで、動物を、SPECT/CT スキャナーのトンネルに、速やかに入れた。動物への放射線曝露を、極低線量として、CT スカウト画像を撮影した。これは、動物を、視野 (FOV) 内に位置合わせすることを目的とした。CT を、中程度の分解度に設定し、動物 1 匹当たりの各 CT スキャンについて、1 時間当たり 5 mRem の曝露量として、線量計により測定し、第三者が読み取った。次いで、動物を、ガントリーにより、SPECT の FOV に移動させ、次いで、開始した。次いで、SPECT モードで、カウントを集計した。これは、180 度離れた、SPECT 検出器ヘッドの両方が、トンネル内にある動物の周囲を回転する間、さらに 20 分間にわたった。研究の終了時に、動物を、回復について観察し、次いで、放射線減衰のための特別室に入れた。テクネシウム 99m (99mTc) の半減期は、6 時間であり、これは、動物を解放する前の、60 時間にわたる保持を含意する。CT の収集は、全 360 度の回転を介し、回転ステップを 180 度とし、フレーム 1 つ当たりの曝露時間を 200 ミリ秒間とし、電圧を 80 kV に設定し、電流を 0.5 mA に設定し、体軸横断面の FOV: 59.45 mm、体軸方向の FOV: 68.26 mm、システムの拡大率を中程度の分解度に設定し、有効ピクセルサイズを 69 ミクロンとして実施した。CT 再構成は、標準的な Hounsfield 再構成プロトコルを使用し、全てのデフォルトを受容して実施した。

【0124】

SPECT の収集: コリメータ: 回転半径を 30 mm、体軸横断面 FOV を 38 mm とする、5 ホールマウス全身型 (5-MWB-1.0)、最大分解度: 1.3 mm、収集モードの設定: SPECT Scan Photo Peak の設定: 140 keV、放射性同位元素: テクネシウム 99m (99mTc)、回転数: 0.5、投影間の角度: 3.7、全投影数: 40、第 1 段の収集時間: 20 秒間、推定スキャン時間: 19 分間である。SPECT ヒストグラム: 収集モード: SPECT スキャン、低レベル弁別器: 126 keV に設定、高レベル弁別器: 154 keV に設定、データフォーマット: Intel/VAX による 4 バイト整数、SPECT の再構成: 使用可能検出器数: 1 および 2、再構成型: OSEM3D (ordered subset expectation maximization three dimensional)、反復回数: 8、サブセット数: 4 である。

【0125】

画像解析およびデータ解析: 放射線損傷に曝露された組織の特徴および血管損傷の範囲、ならびに放射線処置の 2 カ月後における回復についてさらに探索するために、MATLAB (MathWorks Inc., Natick, MA) を使用して実装された、社内開発の半自動式定量ソフトウェアを使用して、灌流の低減を示す組織の体積を測定した。

10

20

30

40

50

ソフトウェアは、低減された灌流容量を、トレーサーの取込みが、非照射肝葉と比較して、15～80%である灌流容量として指示する、簡単な閾値化アルゴリズムを使用した。ソフトウェアの性能は、照射肝組織または肝照射を施されていない肝組織の体積が既知である動物からのSPECT/CTスキャンを使用して検証した。

【0126】

統計学的解析：統計学的解析は、PRISM 7 (Graph Pad) 統計学的解析ソフトウェアを使用して実施した。データは、平均値±標準偏差として提示する。通常の一分散分析を、比較のために使用した。全てのp値を報告する。

【0127】

結果

TPOmは、照射肝臓内に移植されたLSECの増殖および生着を引き起こす

TPOmの、LSECの生着を引き起こしうる薬剤としての効能について調べるために、DPPIV-/-ノックアウトマウスに、外照射CT誘導型x線照射を使用する、肝臓の中葉および右葉への、50GYの肝照射(HIR)と、DPPIVを発現するLSECとを施した(図2A)。コルク栓抜きパターンにあるDPPIV染色は、肝類洞内の肝細胞間における、LSECの再増殖を指し示す(図2Bおよび図3A～3F)。

【0128】

増殖刺激を伴わない場合、LSECは、照射肝臓を再増殖させない(図3C)が、強力な増殖刺激を施されると、移植細胞は、肝類洞を再増殖させる(図3D)。TPOmを、増殖刺激として使用すると、照射組織の大規模な再増殖が観察される(図3Eおよび3F)。LSEC+TPOm+HIRを施される動物7例中6例では、ある程度のレベルの肝再増殖が見られる(図3F)。

【0129】

肝照射後における、照射組織内の肝損傷を低減する、TPOmベースの処置

放射線は、アポトーシスおよび細胞の老化をもたらす、フリーラジカルを発生させ、ゲノムDNAを損傷させる。照射肝組織は縮小するが、ヘパトスタットは、健常肝組織の体積を増大させることにより補償する。TPOmベースの処置が、放射線誘導性肝損傷に、どのような影響を及ぼすのかについて探索するために、個別の肝葉を注意深く切り分け、秤量した。図4Aおよび4Bは、肝臓の全サイズおよび動物の体重に照らして正規化した、肝葉サイズの相対変化を示す。HIRを施され、次いで、HIRの24時間後に、LSEC±RWJ-800088を施された動物では、HIRの2カ月後に、非照射左葉の体積の増大の傾向が見られた(図4B)。加えて、RWJ-800088およびHIRだけで処置された群では、照射肝葉(中葉および右葉)のサイズの低減への傾向が見られた(図4A)。RWJ-800088+HIR単独による、照射肝葉のサイズの低減への傾向は、DNA照射により損傷した細胞の増殖の増大に起因する、細胞死の増大の帰結でありうる。

【0130】

RWJ-800088単独、およびLSEC移植と組み合わせたRWJ-800088で処置された動物では、肝臓血管的損傷、および肝臓内の対応する類洞閉塞が低減された。循環への注射から15分間以内に、肝クッパー細胞に、選択的に取り込まれる、硫黄コロイド結合Tc<sup>99</sup>(SC-Tc<sup>99</sup>)のシグナルを測定することにより、肝臓内の灌流変化を視覚化し、定量するのに、SPECTを使用することができる。50GYのHIRを、中葉に施される動物は、HIRの2カ月後において、照射領域内の平均値残留欠損体積が、71.4%である(図5Bおよび5E)。照射の2または24時間前に、正常肝臓を、RWJ-800088で処置された動物の平均値残留欠損体積は、非照射動物と同様である(図5E)。照射の24時間後において、正常肝臓に、RWJ-800088およびLSEC移植を施された動物の、HIRの2カ月後における、照射領域内の残留欠損体積は、18.2%であった(p=0.03)(図5Cおよび5E)。照射の24時間後に、肝硬変肝臓に、RWJ-800088およびLSEC移植を施された動物でも、同様の保護効果を観察した(図5D)。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

[実施例 3]

照射後における、TPOmまたはロミプロスチム±肝類洞内皮細胞(LSEC)の移植の効果

材料および方法

方法は、LSEC移植を、照射の4~5日後に投与し、TPOmまたはロミプロスチムを、LSEC移植の約10分後に投与することを例外として、上記で記載した方法と同一であった。

【 0 1 3 2 】

結果

TPOmおよびロミプロスチムは、照射肝臓内に移植されたLSECの増殖および生着を引き起こす

TPOmまたはロミプロスチムの投与後、50Gyの肝照射(HIR)と、LSEC移植とを施されたDPPIV-/-ノックアウトマウスにおいて、LSEC生着を観察した(表1)。コルク栓抜きパターンにあるDPPIV染色は、肝類洞内の肝細胞間における、LSECの再増殖を指し示す(図6)。

【 0 1 3 3 】

【表1】

表1:ターゲティング型肝臓照射(59Gy)後の、TPOm投与後またはロミプロスチム投与後における、LSEC生着の概要

| 結果                         | TPOm | ロミプロスチム |
|----------------------------|------|---------|
| 照射の24時間後に、LSEC移植がなされた場合の生着 | あり   | あり      |
| 照射の4~5日後に、LSEC移植がなされた場合の生着 | あり   | あり      |

【 0 1 3 4 】

[実施例 4]

TPOmの、肝硬変性マウスにおける肝再生に対する効果について査定する、マウス肝硬変モデルの開発

目的: 10Gyにおける単回肝照射(HIR)後の肝硬変マウスにおける、RWJ-800088の、肝再生に対する効果の査定を可能とする、マウス肝硬変モデルを開発すること。死亡を引き起こさずに、肝損傷を維持するのに適切な用量レベルを決定するように、CCl4の複数回投与レベルを査定する。本研究で使用される条件は、実験5でも使用される。

【 0 1 3 5 】

材料および方法

動物: C57BL/6雄DPPIVノックアウトマウス(10~14週齢)に、四塩化炭素(CCl4)を、毎週2回、最短12週間から、最長で、マウス30匹中5匹が、CCl4注射により死亡するまで、腹腔内注射した。直後に、動物を、実験群に、無作為に割り付けた。

【 0 1 3 6 】

肝照射(HIR): 画像誘導型外照射は、小動物放射線研究プラットフォーム(SARRP、Xstrahl Inc.、Suwanee、GA)を使用して実施した。消化(GI)管の視覚化を改善するように、マウスに、Gastrograffin造影剤を、強制

10

20

30

40

50

経口投与を介して施した。約2分後に、マウスを管状カウチ上に置き、2L/分の純酸素中に、約2%のイソフルオラン(Isotnesia、USP)で麻酔をかけた。コンビュームコンピュータ断層撮影(CBCT)スキャンを収集し、Muriplanソフトウェアを使用して、中葉および右葉を照射する処置計画を作成した。毒性を最小化するために、照射は、肝臓標的1カ所当たりの投与重みが等しい、2回の回転照射を使用して実施した。標的肝葉内では、アイソセンターの位置は、消化管、脊柱、および心臓の照射を最小化するように選び出した(これらの臓器に対する最大用量は、10Gyを下回るように保った)。回転照射の位置座標を、下記に記載する(表2)。ビーム硬化のために1mmの銅フィルターを使用して、エネルギーを220kVpとし、管電流を13mAとする(投与速度を2.4~2.5Gy/分とする)、50GyのX線で、標的を照射した。

10

【0137】

【表2】

表2:肝照射のパラメータ

|         | カウチ開始 | カウチ終了 | ガントリー開始 | ガントリー終了 |
|---------|-------|-------|---------|---------|
| 中葉回転照射1 | 20    | 20    | -110    | 100     |
| 中葉回転照射2 | -20   | -20   | -110    | 100     |
| 右葉回転照射1 | 40    | 40    | -20     | 120     |
| 右葉回転照射2 | -40   | -40   | -20     | 120     |

20

【0138】

被験物質の調製: RWJ-800088の原液は、1mgのRWJ-800088を秤量し、1mLの滅菌生理食塩液(対照物質)中に溶解させることにより調製した。原液は、-80で保存した。投与の当日に、原液を、室温に融解させ、投与溶液は、原液から、投与に適切な濃度で調製した。投与溶液をボルテクシングして、投与溶液の均質性を確認した。

【0139】

方法: CCl<sub>4</sub>(40% v/vにおける2回の注射、および10% v/vにおける残りの注射)で、11週間にわたり処置したマウスを、死亡を引き起こさずに、肝損傷を維持するのに適切な用量レベルを決定するように査定した。

30

【0140】

実験のための時点: マウスを、CCl<sub>4</sub>で処置して、肝硬変を誘導した。X線照射器(SARRP)を、50Gyで使用すること(時点0とする)により、肝硬変マウスの肝臓を照射するのにつき、RWJ-800088の投与を行った。3カ月後、マウスを殺して、さらなる解析のために、血液および肝組織を回収した。

【0141】

薬物投与のタイミング/用量: 300μg/kgのRWJ-800088を、下記の表3に示される通り、HIRの10分後に、皮下投与した。

【0142】

40

## 【表 3】

表 3:薬物投与のタイミングおよび用量

| 群  | 被験物質                 | タイミング                                       | 肝放射線療法       | 性別 | マウスの例数 |
|----|----------------------|---|--------------|----|--------|
| 1. | 偽治療                  | 該当なし  | 0 Gy         | 雄  | 3      |
| 2. | 媒体                   | HIR の 10 分後                                 | 50Gy:右葉+中葉後方 | 雄  | 3      |
| 3. | RWJ-800088(300μg/kg) | 10 分後における RWJ-800088                        | 50Gy:右葉+中葉後方 | 雄  | 3      |
| 4. | RWJ-800088(300μg/kg) | 10 分後における RWJ-800088、HIR の 1 日後における LSEC 移植 | 50Gy:右葉+中葉後方 | 雄  | 3      |

10

## 【0143】

査定される評価項目：

E 1： 殺時に評価される肝重量（HIR の 3 カ月後）

E 2： 殺時における肝組織学（HIR の 3 カ月後）

## 【0144】

20

臨床観察：獣医学担当者および調査研究担当者の両方により、動物を、毎日モニタリングして、安楽死についての基準を満たす動物を、研究から除外したことを確認した。

## 【0145】

体重：動物は、実験の開始前に、実験期間中、毎週ベースで、かつ、安楽死の当日に秤量した。

## 【0146】

結果

まず、マウスに、オリーブ油中に 40% の CCl<sub>4</sub> (v/v) を注射したが、マウスの多くは、2 回にわたる後続の注射の後で死んだ。次いで、本実験の残りの期間にわたり、用量を、10% に低減した。

30

## 【0147】

[実施例 5]

TPOm ± 移植肝類洞内皮細胞 (LSEC) および TPOm ± プレキサホルの、肝硬変マウスにおける照射誘導性肝疾患に対する効果

目的：50 Gy における単回肝照射 (HIR) 後の肝硬変マウスにおいて、SPECT-CT により測定される、RWJ-80088 + 肝類洞内皮細胞 (LSEC) および RWJ-80088 + プレキサホル (照射前および照射後に投与される、CXCR4 の選択的阻害剤) の、放射線誘導性肝疾患に対する効果を査定すること。AdHGF を、陽性対照として組み入れる。

## 【0148】

40

材料および方法

方法は、CCl<sub>4</sub> の用量を、12 週間にわたり、オリーブ油中に 20% に増大させることを除き、上記で記載した実験 4 と同一であった。50 Gy における単回肝照射 (HIR) 後の肝硬変マウスにおいて、SPECT-CT により測定される、RWJ-800088 + 肝類洞内皮細胞 (LSEC)、RWJ-800088 + プレキサホル (照射前および照射後に投与される、CXCR4 の選択的阻害剤) の、放射線誘導性肝疾患に対する効果を査定すること。AdHGF は、陽性対照であった。これらのデータは、基礎肝疾患を伴う患者において、臨床研究を行うための、前臨床的裏付けを目的とする。

## 【0149】

被験物質の調製：RWJ-800088 の投与溶液は、実験 4 で記載した通りに調製した

50

。加えて、アデノウイルスベクターを、細胞溶解により採取し、CsCl 勾配遠心分離により精製した。ウイルス粒子数および感染性単位比は、293細胞を、多様な希釈率で感染させるのに続き、アデノウイルスヘキソンについての免疫細胞化学染色を行うことにより決定した。感染性力価は、ウイルス粒子1,000個あたりに形成されるプラーク数から計算した。細胞移植の1日後、 $1 \times 10^{11}$ 感染性単位のアデノウイルスヒト肝増殖因子(AdHGF)を、尾静脈注射により投与した。

## 【0150】

Genzyme Corporation製のプレリキサホル(Mozobil)を、20mg/mlの濃度で、バイアル内にパッケージングした。プレリキサホルは、CXCR4ケモカイン受容体アンタゴニストとしてのピシクラム化合物であり、複数の初期研究において、循環中の幹細胞の数を、急速かつ効果的に増大させることが示されている。 10

## 【0151】

実験のための時点：まず、マウスを、CCl<sub>4</sub>で、11週間にわたり処置して、肝硬変を誘導した。X線照射器(SARRP)を、50Gyで使用すること(時点0とする)により、肝硬変マウスの肝臓を照射するに続き、プレリキサホル、肝類洞内皮細胞(LSEC)移植、またはアデノウイルス肝細胞増殖因子(AdHGF)と組み合わせたRWJ-800088の投与を行った。4カ月後、マウスを殺して、さらなる解析のために、血液および肝組織を回収した。

## 【0152】

薬物投与の回数/用量：300μg/kgのRWJ-800088を、HIRの10分後に、皮下投与した。5mg/kgのプレリキサホルを、以下の表4に指し示される通り、多様な時点において、皮下投与した。LSECは、HIRの48時間後に、脾内注入を介して移植した。AdHGFを、LSEC移植の72時間後に、静脈内投与した。 20

## 【0153】

## 【表4】

表4:薬物投与のタイミングおよび用量

| 群 | 処置   | 放射線              | 性別 | 例数 |
|---|--|------------------|----|----|
| 1 | 媒体   | 50Gy:右葉+中葉<br>後方 | 雄  | 4  |
| 2 | RWJ-800088(HIRの10分後における300μg/kg);プレリキサホル(HIRの10分後および48時間後における5mg/kg)   | 50Gy:右葉+中葉<br>後方 | 雄  | 3  |
| 3 | RWJ-800088(HIRの10分後における300μg/kg);プレリキサホル(HIRの7日前および10分後における5mg/kg)   | 50Gy:右葉+中葉<br>後方 | 雄  | 3  |
| 4 | RWJ-800088(LSEC移植の10分後における300μg/kg)<br>LSEC(HIRの48時間後における、マウス1匹当たり $5 \times 10^5$ 個)                          | 50Gy:右葉+中葉<br>後方 | 雄  | 4  |
| 5 | LSEC(HIRの48時間後における、マウス1匹当たり $5 \times 10^5$ 個)<br>AdHGF(LSEC移植の72時間後における、マウス1匹当たりのウイルス粒子 $1 \times 10^{11}$ 個) | 50Gy:右葉+中葉<br>後方 | 雄  | 4  |

## 【0154】

査定される評価項目：

E1：肝臓についてのSPECT-CT

E2：殺時に評価される肝重量(HIRの4カ月後)

E 3 : 殺時における肝組織学 ( H I R の 4 カ月後 )

【 0 1 5 5 】

結果

損傷後における、プレリキサホルの、R W J - 8 0 0 0 8 8 を伴う投与は、非照射肝葉の、照射肝葉に対する重量比により証拠立てられる通り、非照射肝葉の肥厚を増大させた。照射前および照射後に投与されるプレリキサホルは、R I L D に対する保護の範囲、および肥厚の程度を低減した。R W J - 8 0 0 0 8 8 は、A d H G F ( 陽性対照 ) と同様の、R I L D に対する保護への傾向を示した。表 5 および図 7 を参照されたい。

【 0 1 5 6 】

【 表 5 】

10

表 5:非照射右葉の重量の、照射左葉の重量に対する比

| 群                              | 右葉重量の、左葉重量<br>に対する平均比 | 標準偏差 | 例数 |
|--------------------------------|-----------------------|------|----|
| HIR                            | 1.14                  | 0.33 | 3  |
| HIR+TPOm+照射後プレリキサホル            | 2.17                  | 0.63 | 3  |
| 照射前プレリキサホル+HIR+TPOm+照射後プレリキサホル | 0.93                  | 0.18 | 2  |
| HIR+LSEC+TPOm                  | 1.35                  |      | 1  |
| HIR+LSEC+AdHGF                 | 1.79                  | 0.94 | 4  |

20

【 0 1 5 7 】

S P E C T - C T により、R I L D の範囲を定量したところ ( 図 8 )、L S E C の移植またはプレリキサホルと共に、R W J - 8 0 0 0 8 8 で処置されたマウスは、R I L D に対して保護され、非照射肝葉の肥厚の増大を示した。照射前および照射後の両方におけるプレリキサホルの投与は、R I L D に対する保護の範囲、および肥厚の程度を低減した。

【 0 1 5 8 】

[ 実施例 6 ]

A 型血友病マウスの肝臓に対する照射療法後における、T P O m ± 移植肝類洞内皮細胞 ( L S E C ) の、第 V I I I 因子の産生に対する効果

30

目的 : 5 0 G y の、肝臓の上部右葉および中葉への標的照射後の A 型血友病マウスモデル ( F 8 t m 1 K a z ) における、R W J - 8 0 0 0 8 8 の、L S E C の生着および第 V I I I 因子の産生に対する効果を査定すること。A d H G F は、ヒトでは、安全性理由で使用できないが、標的型肝臓照射および L S E C 移植の後に、L S E C の生着を引き起こすことが示されているため、陽性対照として使用した。

【 0 1 5 9 】

材料および方法

動物 : 本研究では、8 ~ 1 6 週齢の雄 C 5 7 / B L 6 マウス、8 ~ 1 6 週齢の雌 / 雄 B 6 1 2 9 S F 2 / J マウス ( L S E C を分離するためのドナー )、および 8 ~ 1 6 週齢の雌 / 雄血友病マウス ( F 8 t m 1 K a z ) マウスを使用した。マウスは、総床空間を 5 0 0 c m 2 とする、ステンレス鋼製のラック ( A l l e n t o w n , I n c . , A l l e n t o w n , N J ) 上の、マイクロアイソレーターケージ内に、最大で 5 匹の群で飼育した。ケージは、外部の水ボトルおよび二重フィーダーラック ( F i s h e r S c i e n t i f i c , H a m p t o n , N H ) を利用した。これらのケージは、各個別のケージに、温度、湿度、および換気の制御をもたらす、保管ラック ( A l l e n t o w n , I n c . ) 内で保存した。各ケージ内の敷料として、B e d - o ' C o b s 1 / 8 " ( F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用した。

40

【 0 1 6 0 】

方法 : 方法は、上記で記載した実験 5 と同一であり、被験物質 ( R W J - 8 0 0 0 8 8 お

50

よび A d H G F の溶液) の調製、L S E C の分離および移植、ならびに肝照射を含んだ。

【 0 1 6 1 】

実験のための時点：X線照射器 ( S A R R P ) を使用することにより、マウスの肝臓を、50 Gy で照射した。照射の24時間後に、尾静脈を介して、L S E C ( マウス1匹当たりの細胞  $1 \times 10^6$  個 ) を、マウスに注射した。肝照射 ( H I R ) 後60日目に、各マウスの尾部を切開し、出血試験にかけた。

【 0 1 6 2 】

薬物投与の回数 / 用量：R W J - 8 0 0 0 8 8 (  $300 \mu\text{g} / \text{kg}$  ) を、L S E C 移植の10分後に、皮下投与した。マウス1匹当たり  $1 \times 10^9$  P F U の A d H G F を、L S E C 移植の24時間後に、腹腔内投与した。処置群を、以下の表6に指し示す。

【 0 1 6 3 】

【表6】

表6

| # | マウス株                    | 肝照射          | 例数<br>雄 | 被験物<br>質       | LSEC(1 $\mu$ L<br>当たりの<br>細胞個数) | 投与容量<br>LSEC( $\mu$ L) | 被験物質<br>(mg/mL;PF<br>U) | 被験物質<br>( $\mu$ g/kg;PF<br>U) |
|---|-------------------------|--------------|---------|----------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| B | C57/BL6                 | なし           | 5       |                | -                               | -                      | -                       | 0                             |
| D | B6129SF2(L<br>SEC ドナー)* | なし           | 15      |                | -                               | -                      | -                       | 0                             |
| H | A型血友病                   | なし           | 15      |                | -                               | -                      | -                       | 0                             |
| G | A型血友病                   | 50Gy<br>のHIR | 15      |                | -                               | -                      | -                       | 0                             |
| A | A型血友病                   | 50Gy<br>のHIR | 15      | RWJ-<br>800088 | $1 \times 10^6$                 | 200 $\mu$ l            | 1 mg/ml                 | 300                           |
| T | A型血友病                   | 50Gy<br>のHIR | 15      | AdHGF          | $1 \times 10^6$                 | 200 $\mu$ l            | 1011 PFU                | 109                           |

\*10匹をLSECの分離に使用し、5匹を出血試験および他の評価項目解析に使用した

【 0 1 6 4 】

研究の評価項目：尾部出血試験を実施し、出血の範囲および凝血までの時間を、30分間の経過にわたり査定した。血中および肝臓内のウェスタンブロットおよびmRNAプロファイリングにより、F V I I I タンパク質レベルを査定して、F V I I I を産生する機能的L S E C の生着が見られる範囲を査定した。L S E C 内のF V I I I の存在について染色するように、肝臓についての免疫組織化学もまた実施した。

【 0 1 6 5 】

結果

A型血友病マウスにおける、ドラブキン出血時間アッセイ

尾部を切り、次いで、尾部を、2.0 mL のドラブキン試薬中に浸漬することにより、尾部出血アッセイを実施した。対照群およびH I R + L S E C + A W J - 8 0 0 0 8 8 またはA d H G F 群では、出血が、10分前に止まったのに対し、非処置群およびH I R 処置されたA型血友病群では、出血が止まらなかった。H I R + L S E C + R W J - 8 0 0 0 8 8 およびH I R + L S E C + A d H G F を使用する、回収試験管内のヘモグロビン濃度の比較は、ヘモグロビン喪失の、F V I I I 欠失モデルと比較した、有意な減少を示した。

【 0 1 6 6 】

尾部出血後における生存

処置の90日後、マウスを、尾部出血チャレンジにかけた。図9に示される通り、尾部出血チャレンジの後、対照のA型血友病マウスの100%が、5日間以内に死んだのに対し、H I R + L S E C + R W J - 8 0 0 0 8 8 処置群は、尾部出血チャレンジの30日後において、対照と比較して100%の生存を示した。これらの生存曲線は、ドラブキン出血試

験にかけられた動物だけについての生存曲線であることに注意されたい。A d H G F マウスは、対照群と比較して、5日目、15日目、および23日目に死んだ（死因は未詳である）。

【0167】

加えて、E L I S A 解析は、H I R + L S E C + J N J - 2 6 3 6 6 8 2 1 または A d H G F 処置群における第 V I I I 因子 ( F V I I I ) の、血漿についての、1 m L 当たりの p g 単位 ( 図 1 0 A )、または肝臓についての、1 g 当たりの p g 単位 ( 図 1 0 B ) による発現の、非処置 A 型血友病マウスと比較した延長を示す。

【0168】

同様の結果はまた、第 V I I I 因子について染色された肝臓スライド、L Y V E - 1 ( 肝類洞内皮細胞についての選択的抗体 )、D A P I ( 細胞を示す D N A 染料 )、および F V I I I + L Y V E - 1 についての融合領域 ( 図 1 1 ) について査定する免疫蛍光からも得られた。 10

【0169】

標的肝照射 ( H I R ) 後における、R W J - 8 0 0 0 8 8 の投与を伴う L S E C の移植は、A 型血友病マウスにおける、機能的 L S E C の生着および F V I I I の産生を促進した。これは、非 A 型血友病対照と同様の、出血の低減および凝血時間の短縮が見られる、機能的出血アッセイにより裏付けられた。尾部出血チャレンジの後、非処置血友病マウスおよび H I R 処置血友病マウスの 1 0 0 % が、5 日間以内に死んだのに対し、H I R + L S E C + R W J - 8 0 0 8 8 処置血友病マウスは、3 0 日後まで、1 0 0 % の生存を示した。H I R + L S E C + R W J - 8 0 0 0 8 8 処置血友病マウスの血漿中および肝臓内ではまた、第 V I I I 因子 m R N A レベルおよび活性化タンパク質レベルの上昇も見られた。肝臓内の第 V I I I 因子の存在はまた、免疫組織化学および免疫蛍光イメージングによっても確認された。本研究は、R W J - 8 0 0 0 8 8 などのトロンボポエチン模倣剤を L S E C 移植および H I R と組み合わせて使用して、A 型血友病を治癒させる潜在的可能性についての概念実証を提示する。 20

【0170】

標的肝照射 ( H I R ) の後における、F V I I I を産生する L S E C と組み合わせた R W J - 8 0 0 0 8 8 の、A 型血友病マウスの肝臓の上部右葉および中葉への投与は、F V I I I を産生する、機能的 L S E C の生着を、尾静脈出血試験の後における凝血および生存を可能とするのに十分な範囲まで促進した。機能的 L S E C の生着の成功はまた、E L I S A、ウェスタンブロット、および免疫組織化学により決定される、循環血液中および肝臓内の、F V I I I のタンパク質レベルおよび m R N A レベルの測定によっても確認された。本研究は、トロンボポエチン模倣剤を L S E C 移植および H I R と組み合わせて使用して、A 型血友病を治癒させる潜在的可能性についての概念実証を提示する。 30

【0171】

[実施例 7]

D P P I V ノックアウトマウスへの照射後における、T P O m およびロミプロスチムの、移植肝類洞内皮細胞 ( L S E C ) および肝細胞の生着に対する効果

目的：肝照射 ( H I R ) 後における、R W J - 8 0 0 0 8 8 およびロミプロスチムの、移植肝類洞内皮細胞 ( L S E C ) および肝細胞の生着に対する効果を査定すること。 40

【0172】

材料および方法

動物：本研究では、8 ~ 12 週齢の雄ジベプチルペプチダーゼ I V ノックアウト ( D p p i v - / - ) マウス、および 8 ~ 12 週齢の雄 C 5 7 B L / 6 マウスを使用した。

【0173】

方法：方法は、上記で記載した実験 5 と同一であり、被験物質 ( R W J - 8 0 0 0 8 8 の溶液 ) の調製、L S E C の分離および移植、ならびに肝照射を含んだ。加えて、ロミプロスチムは、薬局から購入し、2 5 0 μ g の粉末を得た。粉末は、注射用溶液のための溶媒を使用して、製造元の記載に従い再構成した。再構成の後、0 . 5 m L の送達可能容量の 50

溶液は、250  $\mu\text{g}$  のロミプロスチム (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含有した。

【0174】

実験デザイン

研究A：動物は、実験の開始時に秤量した。Small Animal Irradiator Platform (SARRP system) を使用して、雄C57BL/6マウスおよび雄DPPIV KOマウス(8~12週齢)に、50 Gyを、肝臓の上部右葉および中葉に施した。

【0175】

4または5日間後に、マウスに、DPPIV +  $5 \times 10^5$  肝類洞内皮細胞 (LSEC) を、脾内移植した。次いで、表7に示されるLSEC移植の10分後、マウスに、300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  のRWJ-800088またはロミプロスチムを、腹腔内注射した。

【0176】

【表7】

表7

| 群番号 | 処置         | ターゲティング放射線(Gy) | 用量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 投与容量( $\mu\text{L}$ ) | LSEC(マウス1匹当たりの細胞個数) | 例数 |
|-----|------------|----------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------|----|
| 1   | RWJ-800088 | 50             | 300                           | 100 $\mu\text{l}$     | $5 \times 10^5$     | 4  |
| 2   | ロミプロスチム    | 50             | 300                           | 100 $\mu\text{l}$     | $5 \times 10^5$     | 4  |

20

【0177】

次いで、完全に回復し、ケージに戻されるまで、マウスをモニタリングした。マウスを、2~5カ月間にわたり追跡し、剖検した。肝臓を切り出し、凍結切片のために調製した。DPPIV活性についての免疫染色を実施して、肝臓内の、移植DPPIV+細胞の再増殖について検討した。

【0178】

研究B(ロミプロスチムだけによる研究)：移植前肝照射DPPIV KOマウスモデルにおける、肝細胞(HT)単独、およびロミプロスチムの存在を伴うHT/LSECの生着効率および再増殖効率について研究すること。研究デザインを、表8に示す。

【0179】

【表8】

表8

| 群 | 群                         | 性別  | 動物の例数 | 移植物  | ROMI用量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )<br>3 | H <sub>2</sub> O用量( $\text{mg}/\text{kg}$ )<br>3 |
|---|---------------------------|-----|-------|--|--|--|
| 1 | HIR + HT + 媒体             | 雄/雌 | n = 2 | 肝細胞 $1 \times 10^6$ 個                          | 0                                      | 3日間にわたる100ul                                     |
| 2 | HIR + HT + ROMI           | 雄/雌 | n = 2 | 肝細胞 $1 \times 10^6$ 個                          | 3日間にわたる100ug/kg                        | 0  |
| 3 | HIR + HT + LSEC + ROMI    | 雄   | n = 1 | 肝細胞 $1 \times 10^6$ 個 + LSEC $5 \times 10^5$ 個 | 3日間にわたる100ug/kg                        | 0  |
| 4 | NO HIR + HT + 媒体          | 雄/雌 | n = 2 | 肝細胞 $1 \times 10^6$ 個                          | 0                                      | 3日間にわたる100ul                                     |
| 5 | NO HIR + HT + ROMI        | 雄/雌 | n = 2 | 肝細胞 $1 \times 10^6$ 個                          | 3日間にわたる100ug/kg                        | 0  |
| 6 | NO HIR + HT + LSEC + ROMI | 雄   | n = 1 | 肝細胞 $1 \times 10^6$ 個 + LSEC $5 \times 10^5$ 個 | 3日間にわたる100ug/kg                        | 0  |

40

50

## 【0180】

群1～3：1日目に、放射線を投与する。肝細胞（HT）単独および肝細胞（HT）+LSEC移植は、照射の24時間後に行う。移植後に、ロミプロスチムを、上記のそれぞれの群に、3日間にわたり投与する。

## 【0181】

群4～6：肝細胞（HT）単独および肝細胞（HT）+LSEC移植は、非照射マウスにおいて実施される。移植後に、ロミプロスチムを、上記のそれぞれの群に、3日間にわたり投与する。

## 【0182】

結果

研究A：DPPIV活性についての免疫染色は、生存動物の回収された肝組織内で実施した。RWJ-800088を、HIRおよびLSECと共に投与した、HIRの2カ月後に、照射肝組織内のLSECの再増殖を、観察し、ロミプロスチム処置の場合と同様に、正常DPPIV KOマウスの肝臓内に陽性染色が見られないことと比較した。加えて、RWJ-800088処置マウスと、ロミプロスチム処置マウスとでは、染色パターンの差が見られた。これは、ある組織が、他の組織と比較して、良好に維持されていない場合がある、凍結組織のアーキテクチャーと関連する。

## 【0183】

本発明者らはまた、HIRの2カ月後に、RWJ-80088で処置された別のマウスの、4つの異なる肝葉も染色した。4つの肝葉全てが、陽性染色を示したのに対し、中葉は、DPPIV陽性細胞で覆われる面積が最小であった。HIRの5カ月後に、2匹のRWJ-80088処置マウスだけが、肝臓染色のために生き残った。1匹のマウスの、中葉、右葉、および左葉は、DPPIVによる広範な陽性染色を示したが、肝尾状葉内では、それほどではなかった。他のマウスでは、中葉および右葉は、強力なDPPIV染色を示したが、左葉内および肝尾状葉内では、それほどではなかった。これらの結果は、RWJ-800088で処置されるHIRマウスに移植されたLSECは、良好に再増殖し、肝臓内で、安定的に存続したことを指し示した。

## 【0184】

本研究では、放射線は、肝臓の中葉および右葉に標的化され、中葉および右葉は、強いDPPIV染色を示す。これに対し、肝尾状葉内では、移植LSECがそれほど見られない。この結果は、放射線前処置が、移植されたLSECを動員するのに重要な因子であることを指し示す。

## 【0185】

研究Aおよび研究Bにわたる、全体的結果の概要：以下の表9は、研究Aおよび研究Bにわたる、異なる処置群内の肝細胞およびLSECの集団についてまとめる。

## 【0186】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9

|                | 肝細胞  | LSEC   |
|----------------|--|--|
| 媒体             | なし   | なし   |
| 媒体+HIR         | 最低度～低度   | 最低度～低度   |
| RWJ-800088+HIR | HIR の 24 時間後における移植の 10 分後における投与を 1 回とした場合の、16 週間後における実質的な再増殖 | HIR の 24 時間後における移植の 10 分後における投与を 1 回とした場合の、16 週間後における実質的な再増殖 |
| ロミプロスチム+HIR    | 移植の 10 分後における投与を 3 回とした場合の、16 週間後における実質的な再増殖                 | 移植の 10 分後における投与を 1 回とした場合の、16 週間後における実質的な再増殖                 |

10

【 0 1 8 7 】

これらのデータは、TPOmおよびロミプロスチムのいずれもが、組織学により査定される通り、肝照射後のマウスにおける、LSEC、肝細胞、またはLSECおよび肝細胞の生着を促進するように個々に作用しうることを裏付ける。これらの結果は、TPOmおよびロミプロスチムが、HIR後の肝臓血管系に対して、再生効果を及ぼすことを示唆する。

20

【 0 1 8 8 】

広範にわたるその発明概念から逸脱しない限りにおいて、記載される実施形態に対して、変化がなされうることが、当業者により察知されるであろう。したがって、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されるものではなく、本記載により規定される、本発明の精神および範囲内における改変も対象とするように意図されることが理解される。

【 図 面 】

【 図 1 】

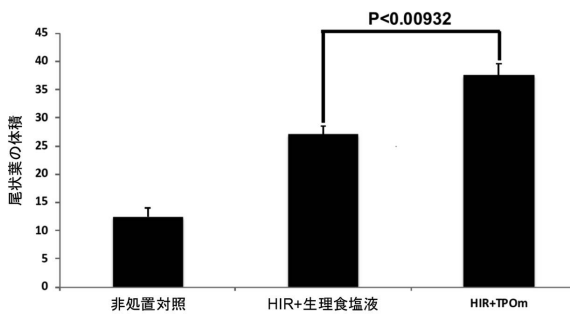


図 1

【 図 2 A - 2 B 】

| 移植前肝照射                                | 移植物   | 細胞コロニーの拡大              | 組織の回収 |
|---------------------------------------|---|------------------------|-------|
| 移植の 24 時間前に、50Gy が、肝臓のうちの約 30% へと施される | LSEC $5 \times 10^5$ 個が、肝照射(HIR)の 24 時間後に、脾臓へと注入される | 移植の 10 分後における TPOm の注射 | 8 週間後 |

図 2A

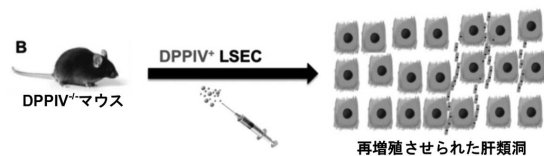


図 2B

30

40

【 図 3 A - 3 C 】

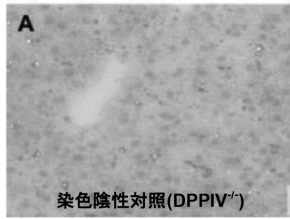


図 3A

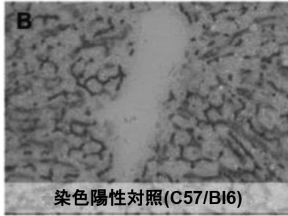


図 3B

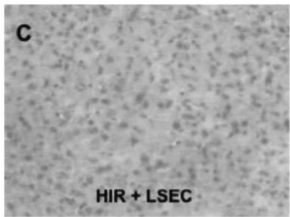


図 3C

【 図 3 D - 3 E 】

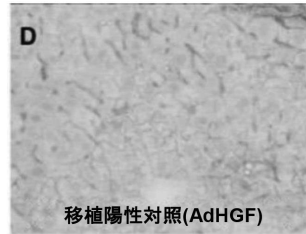


図 3D

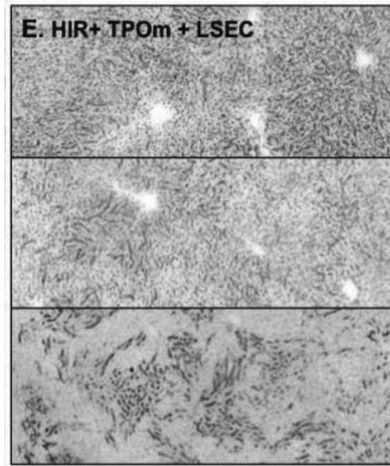


図 3E

10

20

【 図 3 F 】



図 3F

【 図 4 A - 4 B 】

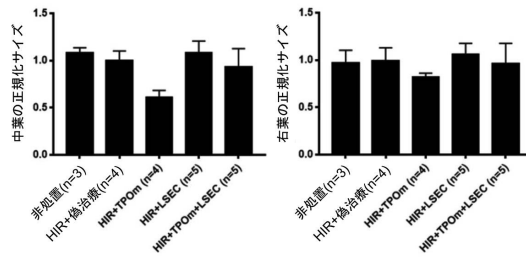
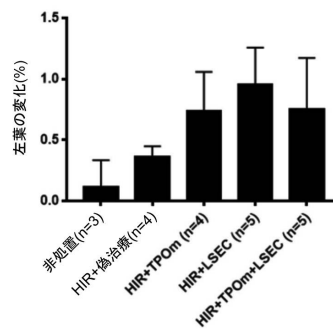


図 4A

30



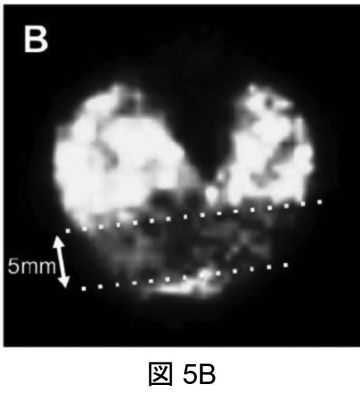
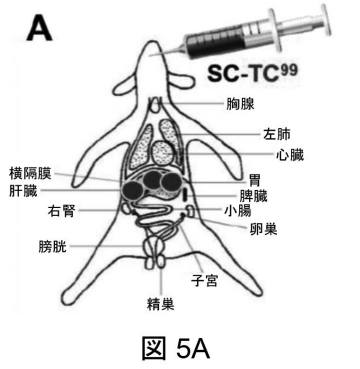
左葉の変化=((左葉-右葉)/肝臓+(左葉-中葉)/肝臓)/体重の%

図 4B

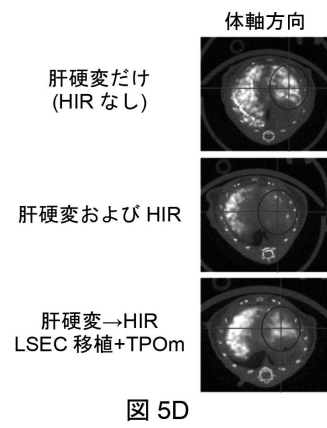
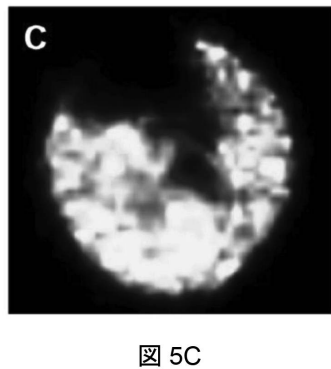
40

50

【 図 5 A - 5 B 】



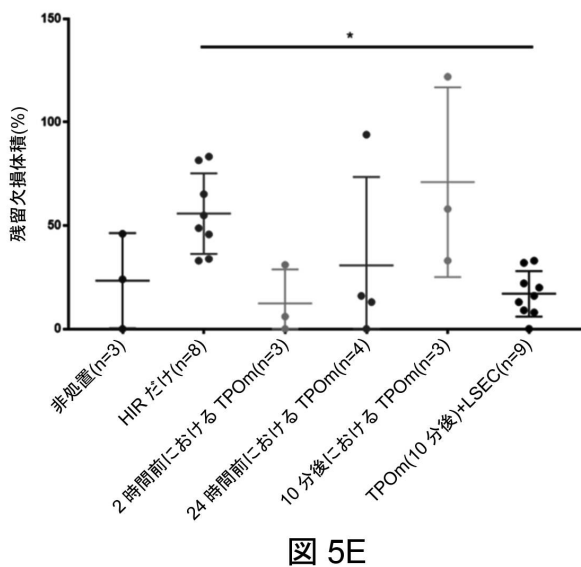
【 図 5 C - 5 D 】



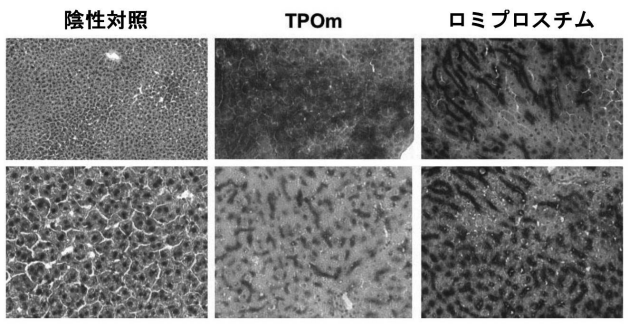
10

20

【 図 5 E 】



【 図 6 】



上パネル:200倍、下パネル:400倍の拡大率

30

40

50

【 図 7 】

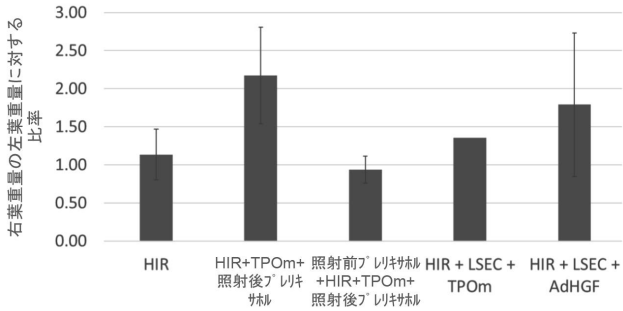


図 7

【 図 8 】

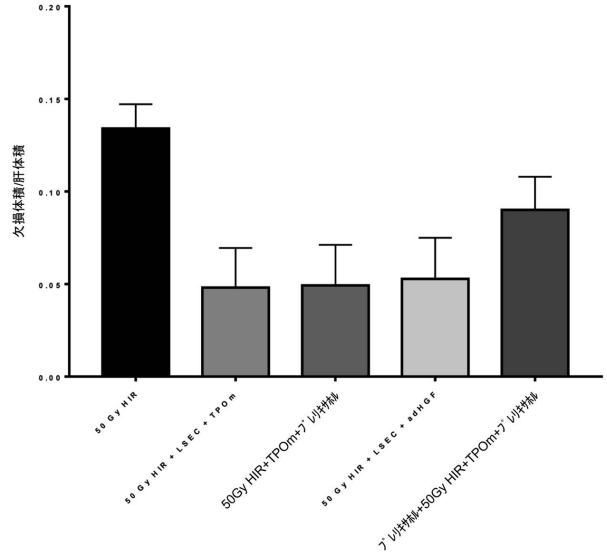


図 8

10

【 図 9 】

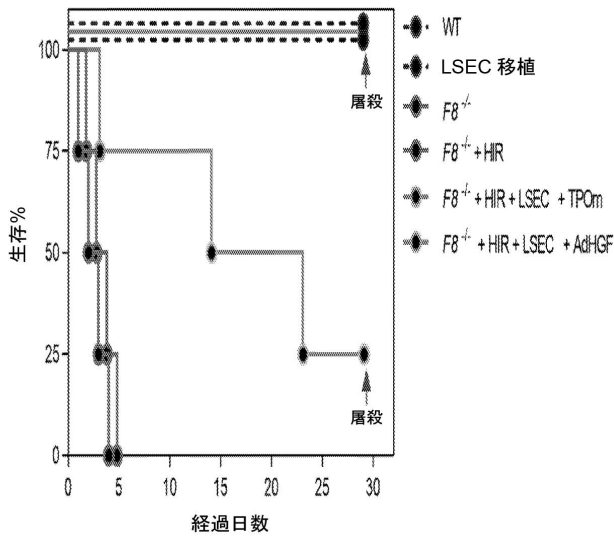


図 9

【 図 10 A - 10 B 】

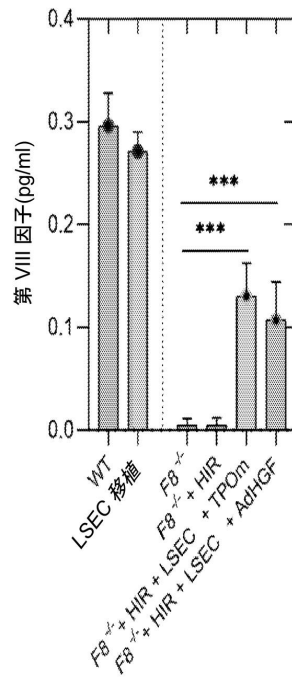


図 10A

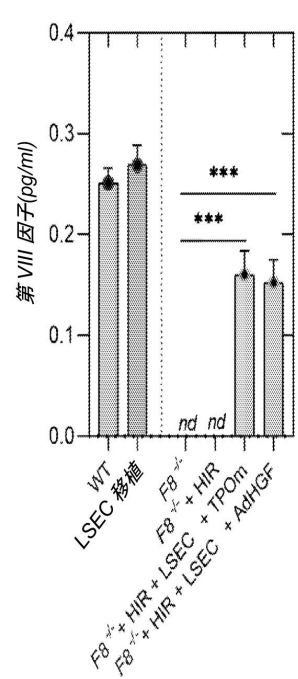


図 10B

20

30

40

50

【 図 1 1 】

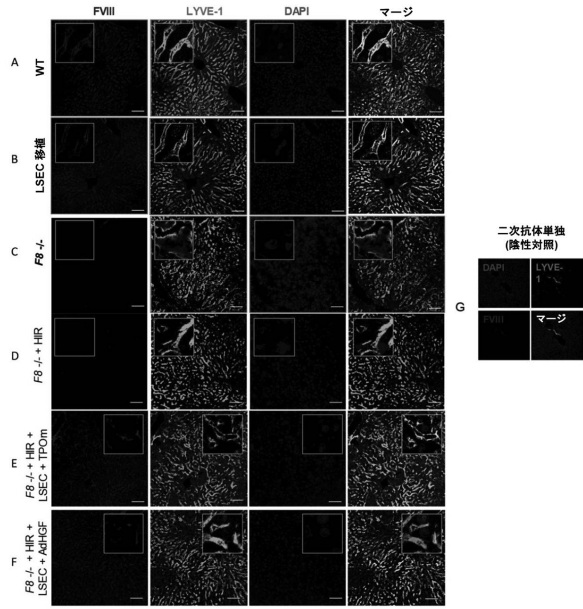


図 11

10

20

30

40

50

【 配列表 】

202252366300001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/014934

|  |   |  |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  |   |  |
| INV.   | A61K35/407  | A61K35/44  |
|  | A61K38/48   | A61P1/00   |
| ADD.   | A61K38/17   | A61K38/18  |
|  |   | A61K38/19  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| B. FIELDS SEARCHED   |   |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  |   |  |
| A61K A61P  |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)   |   |  |
| EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data  |   |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT   |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X  | YAMAGUCHI MASARU ET AL: "The thrombopoietin mimetic romiplostim leads to the complete rescue of mice exposed to lethal ionizing radiation", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 8, 13 July 2018 (2018-07-13), pages 1-12, XP009513711, ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/S41598-018-29013-5 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/srep [retrieved on 2020-05-11] materials and methods section<br>-----<br>-/-- | 20-22  |
| <input checked="" type="checkbox"/>  | Further documents are listed in the continuation of Box C.  | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |
| * Special categories of cited documents :  |   |  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |   | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search  |   | Date of mailing of the international search report   |
| 11 May 2020  |   | 19/05/2020   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br><br>Dolce, Luca  |

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2020/014934 |
|---|

| (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X   | <p>           VENU GOPALA REDDY GANGIREDDY ET AL:<br/>           "Romiplostim in the Management of<br/>           Thrombocytopenia in a Patient with<br/>           Autoimmune Hepatitis",<br/>           DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, KLUWER<br/>           ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE,<br/>           vol. 57, no. 9, 25 July 2012 (2012-07-25),<br/>           pages 2466-2472, XP035104112,<br/>           ISSN: 1573-2568, DOI:<br/>           10.1007/S10620-012-2302-5<br/>           discussion<br/>           -----         </p> | 20-22                 |
| X   | <p>           WO 02/067870 A2 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA<br/>           [US]) 6 September 2002 (2002-09-06)<br/>           page 1 - page 2<br/>           -----         </p>  | 1-19                  |
| X   | <p>           WO 2016/120311 A1 (SCIPHARM SÅRL [LU])<br/>           4 August 2016 (2016-08-04)<br/>           page 8 - page 9<br/>           -----         </p>  | 1-19                  |
| A   | <p>           WO 2008/070583 A2 (STATÉGICS INC [US];<br/>           SPENCER JEFFREY R [US]; PUNNONEN JUHA<br/>           [US]) 12 June 2008 (2008-06-12)<br/>           the whole document<br/>           -----         </p>   | 1-22                  |

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/014934

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 02067870 A2                         | 06-09-2002       | CA 2439261 A1           | 06-09-2002       |
|  |                  | EP 1379130 A2           | 14-01-2004       |
|  |                  | JP 2005500251 A         | 06-01-2005       |
|  |                  | US 2002147158 A1        | 10-10-2002       |
|  |                  | WO 02067870 A2          | 06-09-2002       |
|  |                  | -----                   |                  |
| WO 2016120311 A1                       | 04-08-2016       | AU 2016212091 A1        | 03-08-2017       |
|  |                  | BR 112017016084 A2      | 27-03-2018       |
|  |                  | CA 2973147 A1           | 04-08-2016       |
|  |                  | CL 2017001904 A1        | 23-03-2018       |
|  |                  | CN 107592811 A          | 16-01-2018       |
|  |                  | EA 201791696 A1         | 30-11-2017       |
|  |                  | EP 3250289 A1           | 06-12-2017       |
|  |                  | JP 2018503654 A         | 08-02-2018       |
|  |                  | KR 20170106360 A        | 20-09-2017       |
|  |                  | SG 11201705809Q A       | 30-08-2017       |
|  |                  | US 2018021347 A1        | 25-01-2018       |
|  |                  | WO 2016120311 A1        | 04-08-2016       |
|  |                  | ZA 201704957 B          | 19-12-2018       |
|  |                  | -----                   |                  |
| WO 2008070583 A2                       | 12-06-2008       | AU 2007329464 A1        | 12-06-2008       |
|  |                  | CA 2670345 A1           | 12-06-2008       |
|  |                  | EP 2086551 A2           | 12-08-2009       |
|  |                  | JP 2010511631 A         | 15-04-2010       |
|  |                  | US 2008139621 A1        | 12-06-2008       |
|  |                  | US 2010323965 A1        | 23-12-2010       |
|  |                  | WO 2008070583 A2        | 12-06-2008       |
| -----                                  |                  |                         |                  |

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 35/04 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/60 (2017.01)  
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)  
 A 6 1 K 38/22 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/19 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/39 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/45 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/407(2015.01)  
 A 6 1 K 35/545(2015.01)  
 A 6 1 K 39/395(2006.01)  
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/20 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/17 (2006.01)  
 C 0 7 K 14/52 (2006.01)  
 C 0 7 K 14/54 (2006.01)  
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)  
 C 0 7 K 7/08 (2006.01)

## F I

A 6 1 P 35/04  
 A 6 1 P 43/00  
 A 6 1 K 47/60  
 A 6 1 K 47/68  
 A 6 1 K 38/22  
 A 6 1 K 38/19  
 A 6 1 K 38/39  
 A 6 1 K 38/45  
 A 6 1 K 35/407  
 A 6 1 K 35/545  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 K 38/20  
 A 6 1 K 38/17  
 C 0 7 K 14/52  
 C 0 7 K 14/54  
 C 0 7 K 16/18  
 C 0 7 K 7/08

## テーマコード (参考)

1 2 1

D

N

Z N A

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K  
 G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N  
 I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,  
 TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 片山 英二

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100153693

弁理士 岩田 耕一

(72)発明者 アイヘンバウム, ゲイリー

ベルギー国 ベー - 2 3 4 0 ベルセ トルンハウッサーヴェヒ 3 0 , ヤンセン ファーマシューテ  
ィカ エヌベー

(72)発明者 グハ, チャンダン

アメリカ合衆国 1 0 4 6 7 - 2 4 0 1 , ブロンクス, イースト トゥーハンドレッドアンドテンス  
ストリート 1 1 1 , モンテフィオーレ メディカル センター

## F ターム (参考)

4C076 AA12 AA94 BB11 BB13 BB15 BB16 CC14 CC16 CC26 CC27  
 CC41 DD23 DD23D DD26 DD26Z EE23 EE23M EE41 EE41M EE59 EE59M  
 FF11 FF31  
 4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 BA37 BA41  
 BA44 CA18 CA53 DA01 DA12 DA19 DA40 DB52 DB53 DB55 DB62  
 DB63 DC25 MA02 MA66 NA12 NA14 ZA531 ZA532 ZA751 ZA752 ZB211  
 ZB212 ZB261 ZB262 ZC751  
 4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE03  
 4C087 AA01 AA02 BB52 BB64 BB65 CA04 CA12 MA02 NA05 ZA53  
 ZA75 ZB21 ZB26 ZC75  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA16 CA40 DA75 DA76