

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7635291号  
(P7635291)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
		Z N A	
		D	
		N	
請求項の数 10 外国語出願 (全86頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-57334(P2023-57334)	(73)特許権者	519271621
(22)出願日	令和5年3月31日(2023.3.31)		スロゼン オペレーティング, インコーポレイテッド
(62)分割の表示	特願2019-541341(P2019-541341)の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント ブールバード 1 7 1 , スイート 4 0 0
原出願日	平成30年1月26日(2018.1.26)	(74)代理人	100078282
(65)公開番号	特開2023-78467(P2023-78467A)		弁理士 山本 秀策
(43)公開日	令和5年6月6日(2023.6.6)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和5年3月31日(2023.3.31)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	62/450,804	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成29年1月26日(2017.1.26)		弁理士 飯田 貴敏
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641
(31)優先権主張番号	62/487,135		弁理士 石川 大輔
(32)優先日	平成29年4月19日(2017.4.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関			
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 組織特異的W n tシグナル増強分子およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織特異的W n tシグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩であって、該組織特異的W n tシグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩が、

( a ) 2つのR - スポンジン - 2ポリペプチドまたはそのバリエーションを含む第1のドメインであって、該R - スポンジン - 2ポリペプチドまたはそのバリエーションが、該R - スポンジン - 2ポリペプチドのフリン1ドメインを含み、該R - スポンジン - 2ポリペプチドが、ヒトR - スポンジン - 2のF 1 0 5およびF 1 0 9のアミノ酸置換を含む、第1のドメイン；および

( b ) 2つの重鎖ポリペプチドおよび2つの軽鎖ポリペプチドを含む、アジアロ糖タンパク質受容体1 ( A S G R 1 ) に結合する抗体を含む、第2のドメイン

を含み、該分子が、

i ) それぞれ配列番号72に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチドおよびそれぞれ配列番号74に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチド；

i i ) それぞれ配列番号78に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチドおよびそれぞれ配列番号80に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチド；

i i i ) それぞれ配列番号72に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチドおよびそれぞれ配列番号86に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチド；または

i v ) それぞれ配列番号78に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチドおよびそれぞれ配列番号94に対して100%の同一性を有する2つのポリペプチド

を含む、組織特異的W n tシグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

前記分子が、配列番号 7 2 の 2 つのポリペプチドおよび配列番号 8 6 の 2 つのポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の分子。

【請求項 3】

前記分子が融合タンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の分子。

【請求項 4】

前記融合タンパク質が、第 1 のポリペプチド配列を含む前記第 1 のドメインおよび第 2 のポリペプチド配列を含む前記第 2 のドメインを含み、前記第 1 のドメインおよび前記第 2 のドメインがリンカー部分によって結合している、請求項 3 に記載の分子。

10

【請求項 5】

前記リンカー部分が、ペプチドリinker配列である、請求項 4 に記載の分子。

【請求項 6】

前記リンカー配列が、グリシン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびアラニンからなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸を含む、請求項 5 に記載の分子。

【請求項 7】

( i ) 有効量の、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の分子と、  
( i i ) 薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、  
を含む、薬学的組成物。

【請求項 8】

W n tシグナル伝達の減少と関連している疾患または障害の治療における使用のための、請求項 7 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 9】

前記疾患または障害が、肝組織の疾患または障害である、請求項 8 に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項 10】

前記疾患または障害が、急性肝不全、急性アルコール性肝障害、C 型肝炎ウイルス ( H C V ) による慢性肝疾患、B 型肝炎ウイルス ( H B V ) による慢性肝疾患、慢性アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎 ( N A S H ) 、肝硬変、およびあらゆる原因による慢性肝不全からなる群から選択される、請求項 9 に記載の使用のための薬学的組成物。

30

【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、2017 年 1 月 26 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 450 , 804 号、および 2017 年 4 月 19 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 487 , 135 号の優先権を主張し、その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

配列表に関する記載

本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は、S R Z N \_ 0 0 3 \_ 0 2 W O \_ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは 454 KB で、2018 年 1 月 26 日に作成され、E F S - W e b を介して電子的に送信されている。

40

【0002】

本開示は、E3 コピキチンリガーゼ、Z N R F 3 または R N F 4 3 と結合するドメイン、および組織特異的細胞表面受容体結合ドメインを含む、組織特異的W n tシグナル増強分子、例えば、融合タンパク質、ならびにその組織特異的W n tシグナル増強分子を使用して、E3 リガーゼ、Z N R F 3 / R N F 4 3 の組織特異的内在化または隔離を媒介し、したがってW n t 受容体を安定化し、組織特異的様式でW n tシグナル伝達を増強し、かつ種々の疾患および障害を治療および予防する関連方法に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0003】

Wnt（「ウイングレス関連統合部位」または「ウイングレスおよびInt-1」または「ウイングレス-Int」）リガンドおよびそれらのシグナルは、骨、肝臓、皮膚、胃、腸、腎臓、中枢神経系、乳腺、味蕾、卵巣、蝸牛および他の多くの組織を含む、多くの重要な器官および組織の発達、恒常性および再生の制御において重要な役割を果たす（例えば、Cleverly, Loh and Nusse, 2014; 346:1248012により概説されている）。Wntシグナル伝達経路の調節は、変性疾患および組織損傷の治療の可能性を有する。この目的を達成するために、望ましくない効果を回避するために組織特異的または細胞型特異的な様式でWntシグナル伝達活性を調節するための戦略を開発することが望ましい。治療薬としてWntシグナル伝達を調節するための課題の1つは、複数のWntリガンドおよびWnt受容体、フリズド1～10（Fzd1～10）の存在であり、多くの組織が、複数の重複するFzdを発現している。標準的なWntシグナルはまた、低密度リポタンパク質（LDL）受容体関連タンパク質5（LRP5）または低密度リポタンパク質（LDL）受容体関連タンパク質6（LRP6）が共受容体として関与し、Fzdsに加えて、それらは様々な組織において広く発現している。

10

## 【0004】

R-スポンジン1～4は、Wntシグナルを増幅するリガンドのファミリーである。それぞれのR-スポンジンは、一方の端にジnkリングフィンガー3（ZNR3）またはリングフィンガータンパク質43（RNF43）と他方にロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体4～6（LGR4～6）を含む受容体複合体を通して作用する（例えば、Knight and Hankenson 2014, Matrix Biology; 37:157-161により概説されている）。R-スポンジンはまた、追加の作用機序を通して作用する可能性がある。ZNR3およびRNF43は、分解のためにWnt受容体（Fzd1-10およびLRP5またはLRP6）を特異的に標的とする2つの膜結合E3リガーゼである。R-スポンジンのZNR3/RNF43およびLGR4～6への結合は、三元複合体のクリアランスまたは隔離を引き起こし、それはWnt受容体からE3リガーゼを除去し、Wnt受容体を安定化し、その結果Wntシグナルが増強する。各Rスポンジンは、2つのフリンドメイン（1および2）を含み、ZNR3/RNF43に結合するフリンドメイン1、およびLGR4～6に結合するフリンドメイン2を有する。フリンドメイン1および2を含むR-スポンジンの断片は、Wntシグナル伝達を増幅するのに十分である。R-スポンジン効果は、Wntシグナルに依存するが、LGR4～6およびZNR3/RNF43は両方とも様々な組織において広く発現しているので、R-スポンジンの効果は組織特異的ではない。

20

30

## 【0005】

当技術分野において、特定の疾患および障害の治療および予防のための組織特異的Wntシグナル増強分子が明らかに必要である。本発明は、組織特異的な様式でWnt活性を増強するのに有用な組成物および方法を提供することによって、この必要性に対処する。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

40

## 【0006】

【文献】Knight and Hankenson 2014, Matrix Biology; 37:157-161

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明は、組織特異的Wntシグナル増強分子、ならびに例えば、標的組織におけるWntシグナル伝達を増大させること、およびWntシグナル伝達の増加による恩恵を受けるであろう疾患および状態を治療することにおけるその使用に関する。

## 【0008】

50

一実施形態では、本発明は、組織特異的Wntシグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩であって、ZNF3およびRNF43から選択される1つ以上の膜貫通型E3ユビキチンリガーゼに特異的に結合する第1のドメインと、組織特異的細胞表面分子に特異的に結合する第2のドメインとを含み、該分子が、該組織特異的細胞表面分子を含む組織においてWntシグナル伝達を増加させる、組織特異的Wntシグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩を提供する。特定の実施形態では、組織は、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸管組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛および前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、血管組織、角膜組織、心臓組織および肺組織からなる群から選択される。様々な実施形態では、第1のドメインおよび第2のドメインのいずれかまたは両方は、ポリペ

10

#### 【0009】

Wntシグナル増強分子の特定の実施形態では、第1のドメインは、第1のポリペプチド配列を含み、かつ/または第2のドメインは、第2のポリペプチド配列を含む。特定の実施形態では、分子は、第1のポリペプチド配列と第2のポリペプチド配列とを含む融合タンパク質である。特定の実施形態では、第1のポリペプチド配列は、R-スポンジン配列またはその断片もしくはバリエーションを含む。特定の実施形態では、R-スポンジンは、R-スポンジン-1、R-スポンジン-2、R-スポンジン-3、またはR-スポンジン-4、例えば、ヒトR-スポンジン1~4である。特定の実施形態では、第1のポリペプチド配列は、R-スポンジンフリンドメイン1またはその断片もしくはバリエーションを含む。特定の実施形態では、第1のポリペプチド配列は、野生型配列または修飾配列である。加えて、第1のポリペプチド配列は、対応する天然全長R-スポンジンと比較して、LGR4~6への結合が増加、同等、または減少している可能性がある。いくつかの実施形態では、R-スポンジンまたはR-スポンジンフリンドメイン1は、配列番号1~4に存在するR-スポンジンまたはR-スポンジンフリンドメイン1のいずれかと少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有する。特定の実施形態では、第2のポリペプチド配列は、ポリペプチド、抗体もしくはその断片もしくはバリエーション、またはリガンドもしくはその断片もしくはバリエーションである。

20

30

#### 【0010】

本明細書に開示される組織特異的Wntシグナル増強分子の特定の例示的实施形態では、組織は骨組織であり、細胞表面受容体は副甲状腺ホルモン受容体1（PTH1R）であるか、組織は肝臓組織であり、細胞表面受容体はアシアロ糖タンパク質受容体1（ASGR1）、アシアロ糖タンパク質受容体2（ASGR2）、トランスフェリン受容体2（TFR2）、もしくは溶質キャリアファミリー10メンバー1（SLC10A1）であるか、または組織は口腔粘膜組織であり、細胞表面受容体はLY6/PLAURドメイン含有3（LYPD3）もしくはデスモグレイン3（DSG3）である。

#### 【0011】

本明細書で開示される組織特異的Wntシグナル増強分子の特定の例示的な実施形態では、細胞表面分子はPTH1であり、第2のポリペプチド配列はPTH1Rに特異的に結合するか、細胞表面分子はASGR1であり、第2のポリペプチド配列はASGR1に特異的に結合するか、細胞表面分子はASGR2であり、第2のポリペプチド配列はASGR2に特異的に結合するか、細胞表面分子はSLC10A1であり、第2のポリペプチド配列はSLC10A1に特異的に結合するか、細胞表面分子はTFR2であり、第2のポリペプチド配列はTFR2に特異的に結合するか、細胞表面分子はLYPD3であり、第2のポリペプチド配列はLYPD3に特異的に結合するか、または細胞表面分子はDSG3であり、第2のポリペプチド配列は、DSG3に特異的に結合し、ここで、第2のポリペプチドは、抗体もしくはその断片、低分子、または細胞表面分子のリガンドもしくはその断片もしくはバリエーションである。

40

50

## 【 0 0 1 2 】

本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強分子の特定の実施形態では、第1のドメインおよび第2のドメインは、リンカー部分によって連結されている。特定の実施形態では、リンカー部分は、ペプチジルリンカー配列である。特定の実施形態では、ペプチジルリンカー配列は、グリシン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびアラニンからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸を含む。

## 【 0 0 1 3 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強分子は、単一のポリペプチド、例えば、第1のドメインおよび第2のドメインを含む融合タンパク質からなる。特定の実施形態では、本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強分子は、それぞれ第1のドメインおよび第2のドメインを含む2つ以上の融合タンパク質を含む二量体または多量体などの2つ以上のポリペプチドを含み、ここで、2つ以上のポリペプチドは、例えば、リンカー部分を通して、または2つ以上のポリペプチドのそれぞれにおけるアミノ酸残基間の結合、例えばシステイン残基間の分子間ジスルフィド結合を介して結合している。特定の実施形態では、本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強分子は、2つ以上のポリペプチド配列を含む。例えば、組織特異的W n tシグナル増強分子は、第1のドメインまたは第2のドメインのいずれかを構成する抗体重鎖および軽鎖（またはその抗原結合断片）を含み得、ここで、もう一方のドメイン（すなわち、第2のドメインまたは第1のドメイン）は、融合タンパク質として、またはリンカー部分を介して、抗体重鎖または軽鎖に結合している。特定の実施形態では、もう一方のドメインは、重鎖のN末端、重鎖のC末端、軽鎖のN末端、または軽鎖のC末端に結合している。そのような構造は、本明細書では付加I g Gスキファールドまたはフォーマットと呼ばれ得る。

## 【 0 0 1 4 】

関連する実施形態では、本発明は、本明細書に開示の組織特異的W n tシグナル増強融合タンパク質またはそのサブユニット、例えば、付加または融合した第1のドメインまたは第2のドメインを有する抗体重鎖または軽鎖をコードする核酸配列を含む。さらなる関連実施形態では、本発明は、核酸配列を含むベクターを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、例えば、細菌細胞または真核細胞における発現に適した様式で核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列を含む発現ベクターである。別の実施形態では、ベクターは、機能的mRNAのインビトロ翻訳および修飾のために操作される。さらなる関連実施形態では、本発明は、ベクターを含む宿主細胞を含む。さらに別の関連実施形態では、本発明は、融合ポリペプチドが発現ベクターによって発現される条件下で宿主細胞を培養することを含む、本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強融合タンパク質の生成方法を含む。いくつかの実施形態では、方法は、生成される融合ポリペプチドを単離する工程をさらに含む。

## 【 0 0 1 5 】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。

## 【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組織特異的W n tシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。特定の実施形態では、核酸配列は、DNAまたはmRNA、場合により修飾mRNAを含む。

## 【 0 0 1 7 】

別の実施形態では、本発明は、組織特異的W n tシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むベクターと、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。特定の実施形態では、ベクターは、組織特異的W n tシグナル増強分子の発現を駆動する、核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む。特定の実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたはウイルス

10

20

30

40

50

ベクターである。

【0018】

別の実施形態では、本発明は、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト（例えば、天然もしくは操作された）、またはそれらの薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。特定の実施形態では、核酸配列は、DNAまたはmRNA、場合により修飾mRNAを含む。

【0019】

別の実施形態では、本発明は、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト（例えば、天然もしくは操作された）、またはそれらの薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むベクターと、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。特定の実施形態では、ベクターは、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニストの発現を駆動する、核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む。特定の実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたはウイルスベクターである。

【0020】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩と、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、またはそれらの薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。

【0021】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、またはそれらの薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。特定の実施形態では、核酸配列は、DNAまたはmRNA、場合により修飾mRNAを含む。

【0022】

別の実施形態では、本発明は、組織特異的Wntシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むベクターと、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、またはそれらの薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むベクターと、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む薬学的組成物を提供する。特定の実施形態では、ベクターは、組織特異的Wntシグナル増強分子の発現を駆動する、核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含む。特定の実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたはウイルスベクターである。

【0023】

さらなる実施形態では、本発明は、標的組織を本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子と接触させることを含む、標的組織におけるWntシグナル伝達を増加させるための方法であって、第2のドメインが標的組織上の細胞特異的表面分子に特異的に結合し、組織特異的Wntシグナル増強分子が標的組織に結合し、標的組織におけるZNR F3およびRNF43から選択される1つ以上の膜貫通型E3ユビキチンリガーゼを隔離またはそのエンドサイトーシスを増加させる、方法を含む。

【0024】

本明細書に記載のいずれかの方法の特定の実施形態では、組織は骨組織であり、細胞表面分子はPTH1Rであるか、組織は肝臓組織であり、細胞表面分子はASGR1、ASGR2、TFR2、もしくはSLC10A1であるか、または組織は口腔粘膜組織であり、細胞表面受容体はLYPD3もしくはDSG3である。特定の実施形態では、標的組織または細胞を、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド、または組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクタ

一、例えば、発現ベクターもしくはウイルスベクターと接触させる。

【0025】

さらなる実施形態では、本発明は、標的組織におけるWntシグナル伝達を増加させるための方法であって、標的組織を、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、またはそれらの薬学的に許容される塩と接触させることを含む、方法を含む。特定の実施形態では、標的組織または細胞を、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、もしくはそれらの薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド、またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、もしくはそれらの薬学的に許容される塩をコードする核酸配列を含むベクターと接触させる。

10

【0026】

さらなる実施形態では、本発明は、標的組織を、第2のドメインが標的組織上の細胞特異的表面分子に特異的に結合し、組織特異的Wntシグナル増強分子が標的組織に結合し、標的組織におけるZNF3およびRNF43から選択される1つ以上の膜貫通型E3ユビキチンリガーゼを隔離またはそのエンドサイトーシスを増加させる、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子、およびWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト、またはそれらの薬学的に許容される塩と接触させることを含む、標的組織におけるWntシグナル伝達を増加させるための方法を含む。特定の実施形態では、標的組織または細胞を、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドおよびWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸と接触させる。他の実施形態では、標的組織または細胞を、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクターおよびWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニストをコードするベクターと接触させる。

20

【0027】

さらに別の関連実施形態では、本発明は、疾患または状態の治療または予防を必要とする対象においてそれを行うための方法であって、疾患または状態が、Wntシグナル伝達の減少と関連しているか、またはWntシグナル伝達の増加から恩恵を受け、組織特異的Wntシグナル増強分子またはその薬学的に許容される塩を、単独で、またはWnt、ノリン、もしくはWnt活性化/模倣分子と組み合わせるか、のいずれかで含む有効量の薬学的組成物を対象に提供することを含む、方法を含む。特定の実施形態では、方法は、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド（例えば、DNAもしくはmRNA）、または組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクター（例えば、発現ベクターもしくはウイルスベクター）を含む薬学的組成物を、単独で、またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド（例えば、DNAもしくはmRNA）、またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクター（例えば、発現ベクターもしくはウイルスベクター）を含む薬学的組成物と組み合わせ使用して行われる。

30

【0028】

さらに別の関連実施形態では、本発明は、疾患または状態の治療または予防を必要とする対象においてそれを行うための方法であって、疾患または状態が、Wntシグナル伝達の減少と関連しているか、またはWntシグナル伝達の増加恩恵を受け、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子を含む有効量の薬学的組成物を対象に提供することを含む、方法を含む。特定の実施形態では、方法は、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド（例えば、DNAもしくはmRNA）、またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクター（例えば、発現ベクターもしくはウイルスベクター）を含む薬学的組成物を使用して行われる。

40

50

## 【 0 0 2 9 】

本明細書に記載の治療方法のいずれかの特定の実施形態では、疾患または障害は、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸管組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛および前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、血管組織、角膜組織、心臓組織および肺組織からなる群から選択される組織の疾患または障害である。特定の例示的な実施形態では、疾患または障害は、骨組織の疾患または障害であり、細胞表面受容体は、P T H 1 Rであるか、肝臓組織の疾患または障害であり、細胞表面受容体は、A S G R 1、A S G R 2、T F R 2、またはS L C 1 0 A 1であるか、または口腔粘膜組織の疾患または障害であり、細胞表面受容体は、L Y P D 3またはD S G 3である。特定の例示的な実施形態では、疾患または状態は、骨折、骨粗鬆症、骨粗鬆症性骨折、脊椎固定術、整形外科用装置の骨結合、腱と骨の統合、歯の成長と再生、歯科インプラント術、歯周病、顎顔面再建、顎骨壊死、脱毛症、難聴、前庭機能低下、黄斑変性、硝子体網膜症、網膜変性症、糖尿病性網膜症、フックスジストロフィー、脳卒中、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、多発性硬化症、脊髄損傷、口腔粘膜炎、腸粘膜炎症、短腸症候群、炎症性腸疾患（I B D）、メタボリックシンドローム、糖尿病、膵炎、外分泌膵機能不全、創傷治癒、糖尿病性足部潰瘍、冠状動脈疾患、急性腎臓病、慢性腎臓病、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、特発性肺線維症、急性肝不全、急性アルコール性肝障害、C型肝炎ウイルス（H C V）による慢性肝疾患、H C V患者の抗ウイルス薬治療後、B型肝炎ウイルス（H B V）による慢性肝疾患、H B V患者の抗ウイルス薬治療後、慢性アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患および非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）、肝硬変、ならびにあらゆる原因による慢性肝不全からなる群から選択される。本明細書に記載のいずれかの治療または予防の方法の特定の実施形態では、薬学的組成物は、全身的に、非経口的に、経口的に、筋肉内に、局所的に、または局所的に提供される。特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、場合によりヒトである。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

## （項目 1）

組織特異的W n t（「ウイングレス関連統合部位」または「ウイングレスおよびI n t - 1」または「ウイングレス - I n t」）シグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩であって、ジnkリングフィンガー3（Z N R F 3）およびリングフィンガータンパク質43（R N F 4 3）から選択される1つ以上の膜貫通型E 3ユビキチンリガーゼに特異的に結合する第1のドメインと、組織特異的細胞表面分子に特異的に結合する第2のドメインとを含み、前記化合物が、前記組織特異的細胞表面分子を含む前記組織においてW n tシグナル伝達を増加させる、組織特異的W n tシグナル増強分子、またはその薬学的に許容される塩。

## （項目 2）

前記組織が、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸管組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛および前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、角膜組織、心臓組織および肺組織からなる群から選択される、項目 1 に記載の分子。

## （項目 3）

前記第1のドメインが、第1のポリペプチド配列を含み、かつ/または前記第2のドメインが、第2のポリペプチド配列を含む、項目 1 または項目 2 に記載の分子。

## （項目 4）

前記化合物が、前記第1のポリペプチド配列および前記第2のポリペプチド配列を含む融合タンパク質または抗体である、項目 3 に記載の分子。

## （項目 5）

前記第1のポリペプチド配列が、

a）R - スポンジンポリペプチド配列であって、前記R - スポンジンが、場合により、R - スポンジン - 1、R - スポンジン - 2、R - スポンジン - 3、またはR - スポンジン - 4である、R - スポンジンポリペプチド配列またはその断片もしくはバリエーション、ある

10

20

30

40

50



いは

b) R - スポンジンフリンドメイン 1 配列および、場合により、野生型もしくは変異型フリンドメイン 2 またはそれらの断片もしくはバリエーションを含み、前記第 1 のポリペプチド配列は、場合により、全長 R - スポンジンと比較してロイシンリッチリピート含有 G タンパク質共役受容体 4 ~ 6 ( L G R 4 ~ 6 ) への結合が減少している、項目 3 または項目 4 に記載の分子。

( 項目 6 )

前記 R - スポンジンフリンドメイン 1 が、配列番号 1 ~ 4 に存在するフリンドメインのうちのいずれかと少なくとも 90 % の同一性を有する、項目 5 に記載の分子。

( 項目 7 )

前記第 2 のポリペプチド配列が、ペプチド、ポリペプチド、抗体もしくはその断片、あるいはリガンドまたはその断片もしくはバリエーションである、項目 3 ~ 6 のいずれかに記載の分子。

( 項目 8 )

a) 前記組織が、骨組織であり、前記細胞表面分子が、副甲状腺ホルモン受容体 1 ( P T H 1 R ) であるか、

b) 前記組織が、肝臓組織であり、前記細胞表面分子が、アシアロ糖タンパク質受容体 1 ( A S G R 1 ) 、アシアロ糖タンパク質受容体 2 ( A S G R 2 ) 、トランスフェリン受容体 2 ( T F R 2 ) もしくは溶質キャリアファミリー 10 メンバー 1 ( S L C 10 A 1 ) であるか、または

c) 前記組織が、口腔粘膜であり、前記細胞表面分子が、L y 6 / P L A U R ドメイン含有 3 ( L Y P D 3 ) もしくはデスモグレイン ( D S G 3 ) である、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の分子。

( 項目 9 )

a) 前記細胞表面分子が、副甲状腺ホルモン受容体 1 ( P T H 1 R ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、P T H 1 R に特異的に結合するか、

b) 前記細胞表面分子が、アシアロ糖タンパク質受容体 1 ( A S G R 1 ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、A S G R 1 に特異的に結合するか、

c) 前記細胞表面分子が、アシアロ糖タンパク質受容体 2 ( A S G R 2 ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、A S G R 2 に特異的に結合するか、

d) 前記細胞表面分子が、溶質キャリアファミリー 10 メンバー 1 ( S L C 10 A 1 ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、溶質キャリアファミリー 10 メンバー 1 ( S L C 10 A 1 ) に特異的に結合するか、

e) 前記細胞表面分子が、トランスフェリン受容体 2 ( T F R 2 ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、T F R 2 に特異的に結合するか、

f) 前記細胞表面分子が、L y 6 / P L A U R ドメイン含有 3 ( L Y P D 3 ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、L Y P D 3 に特異的に結合するか、または

g) 前記細胞表面分子が、デスモグレイン ( D S G 3 ) であり、前記第 2 のポリペプチド配列が、D S G 3 に特異的に結合し、

前記第 2 のポリペプチドが、抗体もしくはその断片または抗体とは異なるペプチドもしくはポリペプチド、低分子、あるいは前記細胞表面分子のリガンドまたはその断片もしくはバリエーションである、項目 3 ~ 8 のいずれかに記載の分子。

( 項目 10 )

前記第 1 のドメインおよび前記第 2 のドメインが、リンカー部分によって結合している、項目 1 ~ 9 のいずれかに記載の分子。

( 項目 11 )

前記リンカー部分が、ペプチジルリンカー配列である、項目 10 に記載の分子。

( 項目 12 )

前記リンカー配列が、グリシン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびアラニンからなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸を含む、項目 11 に記載の分子。

10

20

30

40

50

( 項目 1 3 )

項目 4 ~ 1 2 のいずれかに記載の融合タンパク質をコードする核酸配列。

( 項目 1 4 )

前記核酸配列が、DNA または mRNA である、項目 1 3 に記載の核酸配列。

( 項目 1 5 )

項目 1 3 に記載の核酸配列を含むベクター。

( 項目 1 6 )

前記ベクターが、前記核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列を含む発現ベクターである、項目 1 5 に記載のベクター。

( 項目 1 7 )

前記ベクターが、前記核酸配列に機能的に連結されたプロモーター配列を含むウイルスである、項目 1 5 に記載のベクター。

( 項目 1 8 )

項目 1 6 に記載のベクターを含む宿主細胞。

( 項目 1 9 )

項目 4 ~ 1 2 のいずれかに記載の融合ポリペプチドを生成するための方法であって、前記融合ポリペプチドが前記発現ベクターによって発現される条件下で項目 1 8 に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

( 項目 2 0 )

生成された前記融合ポリペプチドを単離する工程をさらに含む、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 1 )

( i ) 有効量の、項目 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の分子、項目 1 3 ~ 1 4 のいずれかに記載の核酸配列、項目 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載のベクター、または項目 1 8 に記載の宿主細胞と、

( i i ) 薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む、薬学的組成物。

( 項目 2 2 )

有効量の項目 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の分子と、有効量の W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、または W n t シグナル伝達アゴニスト分子とを含む、項目 2 1 に記載の薬学的組成物。

( 項目 2 3 )

有効量の項目 1 3 ~ 1 4 のいずれかに記載の核酸配列と、W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、または W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする有効量の核酸配列とを含み、前記 W n t ポリペプチド、前記ノリンポリペプチド、または前記 W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列が、場合により DNA または mRNA である、項目 2 1 に記載の薬学的組成物。

( 項目 2 4 )

項目 1 3 ~ 1 4 のいずれかに記載の核酸配列および / または前記 W n t ポリペプチド、前記ノリンポリペプチド、もしくは前記 W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列が、修飾 mRNA である、項目 2 3 に記載の薬学的組成物。

( 項目 2 5 )

有効量の項目 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載のベクターと、W n t ポリペプチド、ポリペプチド、または W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターとを含み、ノリン前記 W n t ポリペプチド、前記ノリンポリペプチド、または前記 W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列を含む前記ベクターが、場合により発現ベクターである、項目 2 2 に記載の薬学的組成物。

( 項目 2 6 )

( i ) W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、または W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする有効量の核酸と、

( i i ) 薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、を含む、薬学的組成

10

20

30

40

50

物。

(項目 27)

前記核酸が、DNAまたはmRNA、場合により修飾mRNAである、項目 26 に記載の薬学的組成物。

(項目 28)

前記核酸が、発現ベクター、場合によりウイルスベクター中に存在する、項目 26 に記載の薬学的組成物。

(項目 29)

前記Wntポリペプチドが、Wnt1、Wnt2、Wnt2B、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A、Wnt9B、Ant10A、Wnt10B、Wnt11、およびWnt16、ならびにこれらのうちのいずれかの機能的バリエーションおよび断片から選択される哺乳動物Wntポリペプチドである、項目 22 ~ 28 のいずれかに記載の薬学的組成物。

10

(項目 30)

前記ノリンポリペプチドが、哺乳動物ノリンポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片である、項目 22 ~ 28 のいずれかに記載の薬学的組成物。

(項目 31)

前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子が、フリズルド(Fzd)受容体をLrp5/6と二量体化させる水溶性Wntシグナル伝達アゴニストである、項目 22 ~ 28 のいずれかに記載の薬学的組成物。

20

(項目 32)

前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子が、ポリペプチドを含む、項目 31 に記載の薬学的組成物。

(項目 33)

前記ポリペプチドが、1つ以上のFzdタンパク質に対して高い親和性を有する結合ドメインと、Lrp5/Lrp6タンパク質に対して高い親和性を有する結合ドメインとを含み、前記結合ドメインが、場合により、直接結合しているか、またはリンカーにより結合している、項目 32 に記載の薬学的組成物。

(項目 34)

30

標的組織においてWnt(「ウイングレス関連統合部位」または「ウイングレスおよびInt-1」または「ウイングレス-Int」)シグナル伝達を増加させるための方法であって、前記標的組織を、

a) 項目 1 ~ 12 のいずれかに記載の分子、項目 13 ~ 14 のいずれかに記載の核酸、項目 15 ~ 17 のいずれかに記載のベクター、または項目 18 に記載の宿主細胞であって、前記第2のドメインが前記標的組織上の細胞特異的表面分子に特異的に結合し、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の分子が前記標的組織に結合して、前記標的組織におけるジンクリンフィンガー3(ZNRF3)およびリングフィンガータンパク質43(RNF43)から選択される1つ以上の膜貫通型E3ユビキチンリガーゼを隔離またはそのエンドサイトーシスを増加させるもの、および/または

40

b) Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子；Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列；Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクター；またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞であって、前記Wntポリペプチド、前記ノリンポリペプチド、または前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列が、場合によりDNAまたはmRNA、場合により修飾mRNAであるもの、と接触させることを含む、方法。

(項目 35)

50

前記標的組織を項目 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の分子と接触させることを含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記標的組織を項目 1 3 ~ 1 4 のいずれかに記載の核酸と接触させることを含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記標的組織を項目 1 5 ~ 1 7 のいずれかに記載のベクターと接触させることを含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記標的組織を、前記 W n t ポリペプチド、前記 ノリンポリペプチド、または前記 W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列と接触させることを含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 9)

a) 前記組織が、骨組織であり、前記細胞表面分子が、副甲状腺ホルモン受容体 1 ( P T H 1 R ) であるか、

b) 前記組織が、肝臓組織であり、前記細胞表面分子が、アシアロ糖タンパク質受容体 1 ( A S G R 1 )、アシアロ糖タンパク質受容体 2 ( A S G R 2 )、トランスフェリン受容体 2 ( T F R 2 )、もしくは溶質キャリアファミリ- 1 0 メンバー 1 ( S L C 1 0 A 1 ) であるか、または

c) 前記組織が、口腔粘膜組織であり、前記細胞表面分子が、 L y 6 / P L A U R ドメイン含有 3 ( L Y P D 3 ) もしくはデスモグレイン ( D S G 3 ) である、項目 3 4 ~ 3 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 0)

疾患または状態の治療または予防を必要とする対象においてそれを行うための方法であって、前記疾患または障害が、W n t (「ウイングレス関連統合部位」または「ウイングレスおよび I n t - 1」または「ウイングレス - I n t」) シグナル伝達の減少と関連しているか、または W n t シグナル伝達の増加による恩恵を受けるであろうものであり、有効量の項目 2 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の薬学的組成物を前記対象に提供することを含む、方法。

(項目 4 1)

薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、有効量の、

(a) W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくは W n t シグナル伝達アゴニスト分子、

(b) W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくは W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列であって、場合により D N A もしくは m R N A である、前記 W n t ポリペプチド、前記 ノリンポリペプチド、もしくは前記 W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列、

(c) W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくは W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクターであって、場合により発現ベクターである、前記 W n t ポリペプチド、前記 ノリンポリペプチド、もしくは前記 W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列を含むベクター、または

(d) W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくは W n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞と、を含む薬学的組成物を前記対象に提供することをさらに含む、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

有効量の項目 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の分子を含む薬学的組成物と、有効量の W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチド、または W n t シグナル伝達アゴニスト分子を含む薬学的組成物とを前記対象に提供することを含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

有効量の項目 1 3 ~ 1 4 のいずれかに記載の核酸配列を含む薬学的組成物と、W n t ポ

10

20

30

40

50

リペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする有効量の核酸配列を含む薬学的組成物とを前記対象に提供することを含み、前記核酸配列のうち的一方または両方が、場合によりDNAまたはmRNA、場合により修飾mRNAである、項目41に記載の方法。

(項目44)

有効量の項目15～17のいずれかに記載のベクターを含む薬学的組成物と、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターを含む薬学的組成物とを前記対象に提供することを含み、前記ベクターのうち的一方または両方が、場合により発現ベクターまたはウイルスベクターである、項目41に記載の方法。

10

(項目45)

疾患または状態の治療または予防を必要とする対象においてそれを行うための方法であって、前記疾患または障害が、Wnt(「ウイングレス関連統合部位」または「ウイングレスおよびInt-1」または「ウイングレス-Int」)シグナル伝達の減少と関連しているか、またはWntシグナル伝達の増加による恩恵を受けるであろうものであり、薬学的に許容される希釈剤、アジュバントまたは担体と、有効量の、

a) Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列であって、場合によりDNAもしくはmRNA、場合により修飾mRNAである、前記Wntポリペプチド、前記ノリンポリペプチド、もしくは前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列、

20

b) Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むベクターであって、場合により発現ベクターである、前記Wntポリペプチド、前記ノリンポリペプチド、もしくは前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする前記核酸配列を含むベクター、または

c) Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、もしくはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞と、を含む薬学的組成物を前記対象に提供することを含む、方法。

(項目46)

前記Wntポリペプチドが、Wnt1、Wnt2、Wnt2B、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A、Wnt9B、Ant10A、Wnt10B、Wnt11、およびWnt16、ならびにこれらのうちのいずれかの機能的バリエーションおよび断片から選択される哺乳動物Wntポリペプチドである、項目41～45のいずれかに記載の方法。

30

(項目47)

前記ノリンポリペプチドが、哺乳動物ノリンポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片である、項目41～45のいずれかに記載の方法。

(項目48)

前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子が、フリズルド(Fzd)受容体をLrp5/6と二量体化させる水溶性Wntシグナル伝達アゴニストである、項目41～45のいずれかに記載の方法。

40

(項目49)

前記Wntシグナル伝達アゴニスト分子が、ポリペプチドを含む、項目41に記載の方法。

(項目50)

前記ポリペプチドが、1つ以上のFzdタンパク質に対して高い親和性を有する結合ドメインと、Lrp5/Lrp6タンパク質に対して高い親和性を有する結合ドメインとを含み、前記結合ドメインが、場合により、直接結合しているか、またはリンカーにより結合している、項目42に記載の方法。

(項目51)

前記疾患または障害が、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸管組織、口腔粘膜組

50

組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛および前庭組織を含む）、毛包、脾臓組織、網膜組織、角膜組織、心臓組織および肺組織からなる群から選択される組織の疾患または障害である、項目 40～50 のいずれかに記載の方法。

（項目 52）

前記疾患または障害が、

a) 骨組織の疾患または障害であり、細胞表面受容体が、副甲状腺ホルモン受容体 1 (PTH1R) であるか、

b) 肝臓組織の疾患または障害であり、細胞表面受容体が、アジアロ糖タンパク質受容体 1 (ASGR1)、アジアロ糖タンパク質受容体 2 (ASGR2)、トランスフェリン受容体 2 (TFR2)、もしくは溶質キャリアファミリー 10 メンバー 1 (SLC10A1) であるか、あるいは

c) 口腔粘膜組織の疾患または障害であり、細胞表面受容体が、Ly6/PLAURドメイン含有 3 (LYPD3) またはデスモグレイン (DSG3) である、項目 51 に記載の方法。

（項目 53）

前記疾患または状態が、骨折、骨粗鬆症、骨粗鬆症性骨折、脊椎固定術、整形外科用装置の骨結合、腱と骨の統合、歯の成長と再生、歯科インプラント術、歯周病、顎顔面再建、顎骨壊死、脱毛症、難聴、前庭機能低下、黄斑変性、硝子体網膜症、網膜変性症、フックスジストロフィー、脳卒中、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、多発性硬化症、脊髄損傷、口腔粘膜炎、短腸症候群、炎症性腸疾患 (IBD)、メタボリックシンドローム、糖尿病、肺炎、外分泌腺機能不全、創傷治癒、糖尿病性足部潰瘍、冠状動脈疾患、急性腎臓病、慢性腎臓病、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、急性肝不全、急性アルコール性肝障害、C型肝炎ウイルス (HCV) による慢性肝疾患、HCV 患者の抗ウイルス薬治療後、B型肝炎ウイルス (HBV) による慢性肝疾患、HBV 患者の抗ウイルス薬治療後、慢性アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬変、ならびにあらゆる原因による慢性肝不全からなる群から選択される、項目 40～50 のいずれかに記載の方法。

（項目 54）

前記薬学的組成物が、非経口的に、経口的に、筋肉内に、局所的に、または局所的に提供される、項目 40～53 のいずれかに記載の方法。

（項目 55）

前記対象が、哺乳動物、場合によりヒトである、項目 40～54 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0030】

本開示の特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特徴および利点のよりよい理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を説明する以下の詳細な説明、および添付の図面を参照することによって得られるであろう。

【0031】

【図 1】R - スポンジンの ZNRF3 / RNF43 および LGR4～6 への結合を表す図を提供する。左側の図は、ZNRF3 / RNF43 および LGR4～6 の両方に結合する野生型 R - スポンジンを示し、右側の図は、ZNRF3 / RNF43 に結合することができ、LGR4～6 に結合することが不可能であるか、または妥協されているフリンドメイン 2 を欠く（またはフリンドメイン 2 が変異した）不活性 R - スポンジン変異体を示す。

【図 2】本明細書に開示される組織特異的 Wnt シグナル増強分子の一実施形態の概略図を提供する。分子は、限定されないが、組織特異的細胞表面タンパク質に結合する「標的ドメイン」と、ZNRF3 および / または RNF43 に結合することができる「作用ドメイン」と、を含む融合タンパク質を含む複合分子である。

【図3】本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子の効果を例示し、分子が標的組織に優先的に結合することを示す図を提供する。特異的標的細胞表面受容体を欠く非標的組織において、組織特異的Wntシグナル増強分子は、ZNR F3 / RNF 43に結合してもしなくてもよく、E3リガーゼを内在化または除去せず、非標的組織において本質的に不活性である（上図）。特異的標的細胞表面受容体を有する標的組織において、組織特異的Wntシグナル増強分子は、その標的ドメインを介して標的組織に結合し、作用ドメインは標的組織上のZNR F3 / RNF 43に結合し、標的組織におけるZNR F3 / RNF 43の隔離またはエンドサイトーシスを誘発する（下図）。

【図4】4つ全てのヒトR-スポンジタンパク質（Rspo1（配列番号1）；Rspo2（配列番号2）；Rspo3（配列番号3）；およびRspo4（配列番号4））のアラインメントを示し、フリンドメイン1（Fu1）および2（Fu2）にそれぞれ明暗の陰影を付けた。Fu1ドメインは、一般に、配列番号1の約アミノ酸残基38～94、配列番号2の約アミノ酸残基37～93、配列番号3の約アミノ酸残基39～95、および配列番号4の約アミノ酸残基32～88に対応する。Fu2ドメインは、一般に、配列番号1の約アミノ酸残基97～144、配列番号2の約アミノ酸残基96～143、配列番号3の約アミノ酸残基98～144、および配列番号4の約アミノ酸残基91～137に対応する。

【図5】例示的な組織特異的Wntシグナル増強融合タンパク質による、Wntシグナル伝達の細胞特異的アップレギュレーションを実証する。図5Aは、試験した3つの構築物のスキームを提供する。上から下まで：（1）野生型Fu1およびFu2ドメイン（アミノ酸残基37～143）を含む機能的ヒトRspo2断片（配列番号6；配列番号5に提供されるDNAをコードする）に融合した抗GFP、（2）LGRタンパク質への結合を排除する、Fu2ドメイン（F105A / F109A）に点変異を有するヒトRspo2に融合した抗GFP（配列番号8；配列番号7に提供されるDNAをコードする）、（3）同じRspo2変異体構築物に融合した、ヒト肝臓 / 肝細胞特異的表面受容体ASGR1に結合する1つの抗体（配列番号10；配列番号9に提供されるDNAをコードする）。図5Bは、それぞれ肝臓および非肝臓細胞を表す、ヒト肝臓癌Hu h - 7細胞およびヒト類表皮癌A431細胞におけるASGR1 / 2およびZNR F3 / RNF 43発現の定量的PCR分析を示す。上のグラフは、同じ細胞株におけるGAPDH対照と比較した関連発現レベルを示す。下のグラフは、1として設定されたHu h - 7の相対レベルとの比較を示す。図5Cは、Hu h - 7細胞におけるWnt増強活性をモニターするレポーターアッセイの結果を示す。グラフは、Wntシグナル伝達活性をモニターするスーパーTOPフラッシュ（STF）レポーターアッセイの結果を示す。細胞は、Wnt応答性プロモーターによって制御されるルシフェラーゼ遺伝子を含んでいた。指定されたように設計された融合タンパク質を発現するプラスミドによって細胞を一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションの3時間後に、Wnt3a馴化培地を添加して、全培地体積の10%を構成した。トランスフェクションの40時間後、細胞をルシフェラーゼ活性についてアッセイした。ルシフェラーゼ活性を偽トランスフェクション（DNAなし）に対して正規化した。図の下部は、融合タンパク質のウエスタンブロットを示す。全ての融合タンパク質は、分泌のためにN末端にシグナルペプチド（タンパク質成熟の過程で切断された）および検出のためにC末端にFLAGタグを含んでいた。抗体は、一本鎖可変断片（scFv）の形態であった。10μlの培養上清を、ルシフェラーゼアッセイの直前に採取した培養上清を用いて、抗FLAGモノクローナル抗体M2を用いてウエスタンブロットにより分析した。図5Dは、A431細胞におけるWnt増強活性をモニターするレポーターアッセイの結果を示す。実験設定は、細胞がヒトTFR2またはヒトASGR1のいずれかを発現するベクターで同時トランスフェクトされたことを除いて、図5Cに記載のものと同じである。

【図6】Rspo2変異の追加の組み合わせが基礎活性および標的活性に及ぼす影響を示すグラフを提供する。図6Aは、Rspo2とE3リガーゼとの相互作用に重要なFu1ドメイン内のいくつかの示された残基に焦点を合わせ、F105A / F109A二重変異

10

20

30

40

50

と組み合わせたこれらの変異の効果を示す。図 6 B は、L G R 結合 F u 2 ドメインにおける二重変異を示された一点変異に緩和した効果を示す。図 6 C は、L G R タンパク質との相互作用を減少させるための方法として、F 1 0 5 A / F 1 0 9 A 二重変異の代替としての、F u 2 ドメインのフェニルアミン 1 0 5 ( F 1 0 5 R ) 残基におけるさらなる変異の例を提供する。図 6 A ~ 6 C に示されるように、F 1 0 5 R 変異は、F 1 0 9 A 変異と一緒に、標的活性を有意に損なうことなく基礎レベルを低下させ得る。図 6 C において、標的ドメインは、抗ヒト T F R 1 であり、これは図 7 A および 7 B にさらに記載されている。H u h - 7 細胞を特定の構築物でトランスフェクトし、図 5 A ~ 5 D の説明に記載のようにアッセイした。

【図 7】第 2 の受容体、ヒト T F R 1 を標的とすることによる別の例を提供する。図 7 A は、H u h - 7 細胞の一過性トランスフェクションに基づくレポーターアッセイを示す。図 7 B は、A 4 3 1 細胞における同じアッセイを示す。ウエスタンブロットは、融合タンパク質の F L A G タグを検出する同じ膜からの画像である。さらなる手順の詳細は、図 5 A ~ 5 D の説明に見出すことができる。

【図 8 - 1】変異型 R s p o 2 を s c F v 形態の標的化 ( 抗 A S G R 1 または抗 T F R 1 ) または非標的化 ( 対照、抗 G F P ) ドメインに融合させた精製タンパク質による W n t シグナル伝達活性の増強を示す。図 8 A は、特定の標的ドメインおよび作用ドメインとしての変異体 R s p o 2 からなるタンパク質のクマシー染色ゲル画像を示す。左はタンパク質標準の k D である。図 8 B は、H u h - 7 細胞における、A S G R 1 - 標的化 R s p o 2 ( F 1 0 5 A / F 1 0 9 A ) または ( F 1 0 9 ) 変異体融合タンパク質の S T F 活性を陰性対照 ( 抗 G F P 構築物 ; 左 ) および陽性対照 ( R s p o 2 、右 ) と比較し、これは、C 末端に H i s タグを有する、ヒト R s p o 2 F u 1 および F u 2 ドメイン ( S 3 6 ~ E 1 4 3 ) に対応する。図 8 C は、3 つの異なる細胞株 : ヒト肝癌 H u h - 7 、ヒト結腸直腸腺癌 H T 2 9 、およびマウス正常肝臓 F L 8 3 B における 3 つの標的タンパク質と R s p o 2 陽性対照との比較を提供する。T F R 1 抗体は、ヒト特異的であるが、A S G R 1 抗体は、マウス A S G R 1 と交差反応し得る。3 つ全ての細胞株は、レポーター遺伝子が組み込まれており、1 0 % W n t 3 a 馴化培地の存在下で約 1 8 時間、特定の濃度のタンパク質によって処理された。試験した各投与量について、H u h - 7 細胞からのデータは左側にあり、H T 2 9 細胞からのデータは中央にあり、F L 8 3 B 細胞からのデータは右側にある。

【図 8 - 2】変異型 R s p o 2 を s c F v 形態の標的化 ( 抗 A S G R 1 または抗 T F R 1 ) または非標的化 ( 対照、抗 G F P ) ドメインに融合させた精製タンパク質による W n t シグナル伝達活性の増強を示す。図 8 A は、特定の標的ドメインおよび作用ドメインとしての変異体 R s p o 2 からなるタンパク質のクマシー染色ゲル画像を示す。左はタンパク質標準の k D である。図 8 B は、H u h - 7 細胞における、A S G R 1 - 標的化 R s p o 2 ( F 1 0 5 A / F 1 0 9 A ) または ( F 1 0 9 ) 変異体融合タンパク質の S T F 活性を陰性対照 ( 抗 G F P 構築物 ; 左 ) および陽性対照 ( R s p o 2 、右 ) と比較し、これは、C 末端に H i s タグを有する、ヒト R s p o 2 F u 1 および F u 2 ドメイン ( S 3 6 ~ E 1 4 3 ) に対応する。図 8 C は、3 つの異なる細胞株 : ヒト肝癌 H u h - 7 、ヒト結腸直腸腺癌 H T 2 9 、およびマウス正常肝臓 F L 8 3 B における 3 つの標的タンパク質と R s p o 2 陽性対照との比較を提供する。T F R 1 抗体は、ヒト特異的であるが、A S G R 1 抗体は、マウス A S G R 1 と交差反応し得る。3 つ全ての細胞株は、レポーター遺伝子が組み込まれており、1 0 % W n t 3 a 馴化培地の存在下で約 1 8 時間、特定の濃度のタンパク質によって処理された。試験した各投与量について、H u h - 7 細胞からのデータは左側にあり、H T 2 9 細胞からのデータは中央にあり、F L 8 3 B 細胞からのデータは右側にある。

【図 9】完全 I g G の形態の標的ドメインを有する構築物の標的 W n t シグナル増強活性を示す。上部には、付加 I g G 構築物の図がある。上の図は、G F P またはヒト T F R 1 受容体のいずれかに対するヒト I g G 2 重鎖の N 末端に付加された R s p o 2 F 1 0 5 R / F 1 0 9 A 変異体を示す。下の図は、G F P またはヒト T F R 1 受容体のいずれかに

10

20

30

40

50



対するヒト IgG2 軽鎖の N 末端に付加された R s p o 2 F 1 0 5 R / F 1 0 9 A 変異体を示す。R s p o 2 F 1 0 5 R / F 1 0 9 A 変異体に融合した T F R 1 一本鎖可変断片 ( s c F v ) と共にこれらの構築物 (それぞれ軽鎖および重鎖を有する) を、ルシフェラーゼレポーターを用いて H E K 2 9 3 T 細胞 ( T F R 1 受容体を発現する) に一過性にトランスフェクトした。下部には、トランスフェクションの 4 0 時間後の S T F アッセイの図式的な概要がある。トランスフェクション後、1 0 % W n t 3 a 馴化培地を培養物に添加した。S T F アッセイは、図 5 A ~ 5 D の説明に記載されているように実施した。

【図 1 0】L G R タンパク質との相互作用を減少させ、標的ドメインに融合したときに標的 W n t 増強活性を支持する方法として、R s p o 2 変異のさらなる組み合わせで得られた結果を示すグラフを提供する。特定の構築物を一過性トランスフェクションにより H u h - 7 細胞に導入した。さらなる手順の詳細は、図 5 A ~ 5 D の説明に見出すことができる。

10

【図 1 1】H u h - 7 細胞における、T F R 1 を標的とする R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 変異体融合タンパク質の S T F 活性を陰性対照 (抗 G F P 構築物) および陽性対照 ( R s p o 2 ) と比較する。ルシフェラーゼ活性は、任意の単位である。さらなる手順の詳細は、図 8 A ~ 8 C の説明に見出すことができる。

【図 1 2】トランスフェクション時の抗 A S G R 1 - R s p o 2 ( F 1 0 5 A / F 1 0 9 A ) 融合タンパク質に応答した非 A S G R 1 発現細胞株 A 4 3 1 と、A S G R 1 ( 左 ) または T F R 2 ( 右、対照として使用 ) のいずれかを過剰発現するプラスミドとの比較を提供する。全ての細胞株は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子が組み込まれており、最初に特定の受容体プラスミドによってトランスフェクトされた。2 4 時間後、細胞を、1 0 % W n t 3 a 馴化培地の存在下で約 1 8 時間、特定の濃度のタンパク質で処理し、次いでルシフェラーゼ活性についてアッセイした。

20

【図 1 3】ヒト T F R 1 受容体を標的とする精製付加 I g G タンパク質の W n t シグナル刺激活性を示す。T F R 1 に対する I g G 2 の重鎖の N 末端に融合した F 1 0 5 R / F 1 0 9 A R s p o 2 変異体を、R s p o 2 陽性対照を用いた抗 G F P との融合と比較した。S T F アッセイを、S T F レポーターを含む、2 つの細胞株、左側に H u h - 7、右側に H E K 2 9 3 T で実施した。両方の細胞株は、標的受容体 T F R 1 を発現する。ルシフェラーゼ活性は、任意の単位である。

【図 1 4 - 1】付加 I g G の例示的な足場を用いて得られた結果を示す。変異体 R s p o 2 は、図 1 4 A の右側の図のように、重鎖の N 末端 ( N - H C )、軽鎖の N 末端 ( N - L C )、または軽鎖の C 末端 ( C - L C ) に共有結合していた。2 種類の I g G を分析した。I g G 2 ( 野生型、図 1 4 A ~ C ) または I g G 1 ( N 2 9 7 G 「エフェクターなし」変異を有する、図 1 4 D ~ E )。標的化抗体は、抗ヒト A S G R 1 および T F R 1 であり、対照抗体は、抗 G F P であった。精製タンパク質の S T F 活性を、3 0 % W n t 3 a 馴化培地の存在下で、H u h - 7 ( h A S G R 1 + / h T F R 1 + ; 図 1 4 A および図 1 4 D )、2 9 3 ( h A S G R 1 - / h T F R 1 + ; 図 1 4 B および図 1 4 E )、および F L 8 3 B ( マウス細胞株、h A S G R 1 - / h T F R 1 - ; 図 1 4 C ) 細胞株において試験した。R s p o 2 を陽性対照として使用した。陰性対照は、3 0 % W n t 3 a 馴化培地のみ ( 「 W n t のみ」 ) による処理であった。

30

40

【図 1 4 - 2】付加 I g G の例示的な足場を用いて得られた結果を示す。変異体 R s p o 2 は、図 1 4 A の右側の図のように、重鎖の N 末端 ( N - H C )、軽鎖の N 末端 ( N - L C )、または軽鎖の C 末端 ( C - L C ) に共有結合していた。2 種類の I g G を分析した。I g G 2 ( 野生型、図 1 4 A ~ C ) または I g G 1 ( N 2 9 7 G 「エフェクターなし」変異を有する、図 1 4 D ~ E )。標的化抗体は、抗ヒト A S G R 1 および T F R 1 であり、対照抗体は、抗 G F P であった。精製タンパク質の S T F 活性を、3 0 % W n t 3 a 馴化培地の存在下で、H u h - 7 ( h A S G R 1 + / h T F R 1 + ; 図 1 4 A および図 1 4 D )、2 9 3 ( h A S G R 1 - / h T F R 1 + ; 図 1 4 B および図 1 4 E )、および F L 8 3 B ( マウス細胞株、h A S G R 1 - / h T F R 1 - ; 図 1 4 C ) 細胞株において試験した。R s p o 2 を陽性対照として使用した。陰性対照は、3 0 % W n t 3 a 馴化培地の

50

み(「Wntのみ」)による処理であった。

【図15】選択された細胞株における標的Wntシグナル増強活性を示す、4つ全てのヒトR-スポンジンの比較からの結果を提供する。図15Aは、ヒトHuh-7(左)またはHEK293T(右)細胞における、抗GFP(scFvフォーマット)に融合した野生型ヒトRspo1~4のFu1-Fu2ドメインのWntシグナル増強活性を比較する。図15Bは、基礎的な非標的活性のための対照として抗GFPへの融合を用いて、Huh-7(hASGR1+/hTFR1+)またはHEK293T(hASGR1-/hTFR1+)細胞における、抗ASGR1または抗TFR1と融合した場合のヒトRspo2変異体(F105A/F109A、「AA」、またはF105R/F109A、「RA」)の(標的化)活性の増強を示す。図15Cは、抗GFP融合対照とは対照的に、Huh-7またはHEK293T細胞における、抗ASGR1または抗TFR1に融合した場合のヒトRspo3変異体の(標的化)活性の増強を示す。30%Wnt3a馴化培地をSTFアッセイに供給した。Rspo2を陽性対照として使用した。陰性対照は、30%Wnt3a馴化培地のみ(「Wntのみ」)による処理であった。

【図16】組織特異的Wntシグナル伝達増強物を構築するために使用され得るRspo3変異の非限定的な例を提供する。図16Aは、試験された変異を列挙する。これらの変異体Rspo3(Fu1-Fu2)ドメインを抗ASGR1または抗GFP-scFvに融合し、精製タンパク質の活性を、30%Wnt3a馴化培地の存在下でSTFアッセイによりHuh-7細胞において試験した。結果を図16B(抗GFP対照用)および図16C(抗ASGR1標的化構築物用)にまとめた。抗GFPに融合したRspo2および野生型Rspo3(Fu1-Fu2ドメイン)を、アッセイにおける陽性対照として使用した。

【図17】作用ドメインがRspo足場とは構造的に独立しているE3リガーゼ結合剤からなるWntシグナル増強分子設計の例を示す。図17Aは、試験した機能性分子の構造を示し、それはヒトASGR1またはTFR1に対するIgG2の重鎖のN末端に共有結合したヒトZNRf3に対するFab(または陰性対照としての抗GFP)からなる。図17Bは、ヒト肝臓Huh-7細胞を用いたSTFの結果を示す。アッセイは、30%Wnt馴化培地の存在下で行い、Rspo2を陽性対照として用いた。

【図18】組織特異的Wntシグナル増強デザインを他の標的組織、特定の細胞表面受容体を介した口腔粘膜に適用する例を示す。図18Aは、3つの異なる細胞株におけるLYPD3、DSG3、ZNRf3およびRNF43遺伝子発現のQ-PCR分析を示す。CAL27およびSCC25は、もともとヒト舌由来の扁平上皮癌細胞株であり、A431は、ヒト皮膚由来の類表皮癌細胞株である。上のグラフは、ACTB遺伝子対照と比較した各遺伝子の相対的発現レベルを示し、下のグラフは、1としたCAL27中の各遺伝子の相対的レベルとの比較を示す。図18Bは、30%Wnt3a馴化培地の存在下で16~18時間処理した後の、特定のタンパク質のCAL27、SCC25およびA431細胞におけるWntシグナル増強活性をモニターするSTFレポーターアッセイの結果を示す。タンパク質は、ヒトLYPD3、ヒトDSG3、およびGFPに対するモノクローナル抗体の重鎖のN末端にRspo2(F105R/F109A)変異体を融合することによって構築された。Rspo2を対照として使用した。

【図19】例示的な肝臓特異的Wntシグナル増強分子のインビボ機能を示す。図19Aは実験スキームを示す。肝臓にhASGR1の異所性発現を導入するために、8週齢のマウスにhASGR1コード配列を含むAAVベクターを最初に注射した。7日後、マウスを、8つの群に分けて試験および対照タンパク質で処置した。8時間後、マウスを安楽死させ、肝臓試料を遺伝子発現の定量的PCR分析のために採取した。図19Bは、マウス肝臓における異所性hASGR1の発現レベルを示す。処置の用量は、抗GFP(1mg/kg)、Rspo2(0.46mg/kg)、抗GFP-Rspo2(F105R/F109A)(1mg/kg)、または抗ASGR1-Rspo2(F105R/F109A)(1mg/kg)で、それぞれ単独(左の4つの群)または3mg/kgのWntアゴニストタンパク質(18R5-Dkk1c, Janda et al., 2017 Na

10

20

30

40

50

t u r e ) との組み合わせのいずれか ( 右の 4 つの群 ) であった。図 1 9 C は、処置に応答した W n t シグナル伝達標的遺伝子 A x i n 2 の誘導を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 2 】

本開示は、組織特異的 W n t シグナル増強分子を提供し、特定の実施形態では、分子は、 1 ) 組織特異的または細胞特異的な細胞表面受容体を選択的に結合し、 2 ) 標的組織または細胞型における Z N R F 3 / R N F 4 3 の内在化または隔離を媒介し、 3 ) 組織特異的様式で W n t シグナル伝達を増強する。特定の実施形態では、分子は、融合タンパク質である。特定の実施形態では、分子は、追加の付加結合ドメインを有する抗体である。例えば、疾患または障害の治療または予防のために、標的組織または細胞型における W n t シグナル伝達を増強する、すなわち増加させるための、本明細書に開示される薬学的組成物およびいずれかの組成物の使用のための方法も提供される。本発明のこれらおよび他の目的、利点ならびに特徴は、以下により十分に記載されるような組成物および方法の詳細を読むことで当業者には明らかになるであろう。

【 0 0 3 3 】

定義

本明細書で使用される「ベクター」は、ポリヌクレオチドを含むかまたはそれと会合し、細胞へのポリヌクレオチドの送達を媒介するために使用することができる巨大分子または巨大分子の会合を指す。例示的なベクターには、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、リボソーム、および他の遺伝子送達媒体が含まれる。

【 0 0 3 4 】

用語「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの類似体を含む、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含み得、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前または後に与えられてもよい。本明細書で使用されるポリヌクレオチドという用語は、二本鎖および一本鎖分子を互換的に指す。別段の指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドである本明細書に記載の本発明の任意の実施形態は、二本鎖形態と二本鎖形態を構成することが知られているか、または予測される 2 つの相補的一本鎖形態のそれぞれの両方を包含する。

【 0 0 3 5 】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対して特定のパーセントの「配列同一性」を有し、これは、整列させた場合、2 つの配列を比較した場合に、その割合の塩基またはアミノ酸が同じであることを意味する。配列類似性は、いくつかの異なる方法で決定することができる。配列同一性を決定するために、ワールドワイドウェブ上で `ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/` で入手可能な BLAST を含む方法およびコンピュータプログラムを用いて配列を整列させることができる。別のアラインメントアルゴリズムは、米国ウィスコンシン州マディソン、Oxford Molecular Group、Inc. の完全所有子会社から Genetics Computing Group (GCG) パッケージで入手可能な FASTA である。アラインメントのための他の技術は、Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., USA に記載されている。特に興味深いのは、配列中のギャップを許容するアラインメントプログラムである。Smith-Waterman は、配列アラインメントにおけるギャップを許容するアルゴリズムの一種である。Meth. Mol. Biol. 70: 173 - 187 (1997) を参照。また、Needleman and Wunsch アラインメント法を用いた GAP プログラムを利用して配列を整列させることができる。J. Mol. Biol. 48: 4

10

20

30

40

50

4 3 - 4 5 3 ( 1 9 7 0 ) を参照。

【 0 0 3 6 】

興味深いのは、配列同一性を決定するために Smith and Waterman の局所相同性アルゴリズムを使用する Best Fit プログラム ( Advances in Applied Mathematics 2 : 4 8 2 - 4 8 9 ( 1 9 8 1 ) ) である。ギャップ生成ペナルティは、一般に、1 ~ 5、通常 2 ~ 4 の範囲であり、多くの実施形態では 3 である。ギャップ延長ペナルティは、一般に、約 0 . 0 1 ~ 0 . 2 0 の範囲であり、多くの場合は 0 . 1 0 である。プログラムは、比較されるために入力された配列によって決定されるデフォルトパラメーターを有する。好ましくは、配列同一性は、プログラムにより決定されたデフォルトパラメーターを用いて決定される。このプログラムは、米国

10

【 0 0 3 7 】

興味のある他のプログラムは、FastDB アルゴリズムである。FastDB は、Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 1 2 7 - 1 4 9, 1 9 8 8, Alan R. Liss, Inc. に記載されている。パーセント配列同一性は、以下のパラメーター：ミスマッチペナルティ：1 . 0 0、ギャップペナルティ：1 . 0 0、ギャップサイズペナルティ：0 . 3 3、および参加ペナルティ：3 0 . 0 に基づいて FastDB によって計算される。

20

【 0 0 3 8 】

ポリヌクレオチドに適用される「組換え」は、ポリヌクレオチドがクローニング、制限または連結工程、および天然に見出されるポリヌクレオチドとは異なる構築物をもたらす他の手順の種々の組み合わせの生成物であることを意味する。

【 0 0 3 9 】

「制御要素」または「制御配列」は、ポリヌクレオチドの複製、複製、転写、スプライシング、翻訳、または分解を含む、ポリヌクレオチドの機能的調節に寄与する分子の相互作用に関与するヌクレオチド配列である。調節は、プロセスの頻度、速度、または特異性に影響を及ぼし得、本質的に増強または抑制的であり得る。当技術分野において既知の制御要素には、例えば、プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列が含まれる。プロモーターは、特定の条件下で RNA ポリメラーゼに結合し、通常、プロモーターの下流 ( 3 ' 方向 ) に位置するコード領域の転写を開始することができる DNA 領域である。

30

【 0 0 4 0 】

「機能的に連結された」または「作動可能に連結された」は、遺伝的要素の並置を意味し、ここで、要素はそれらが期待される方法で機能することを可能にする関係にある。例えば、プロモーターがコード配列の転写の開始を助ける場合、プロモーターはコード領域に機能的に連結されている。この機能的関係が維持される限り、プロモーターとコード領域との間に介在残基があってもよい。

【 0 0 4 1 】

「発現ベクター」は、目的の遺伝子産物をコードする領域を含むベクターであり、意図される標的細胞において遺伝子産物の発現をもたらすために使用される。発現ベクターはまた、標的における遺伝子産物の発現を容易にするためにコード領域に機能的に連結された制御要素を含む。制御要素と遺伝子または発現のために作動可能に連結されている遺伝子との組み合わせは、「発現カセット」と呼ばれることがあり、その多くは当技術分野において既知であり入手可能であるか、または当技術分野において入手可能な要素から容易に構築することができる。

40

【 0 0 4 2 】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。この用語はまた、修飾されたアミノ

50

酸ポリマーも包含する。例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、または標識成分との結合を含む。

【 0 0 4 3 】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、抗原性エピトープに特異的に結合するために必要な可変領域配列を含む単離されたまたは組換えの結合剤を意味する。したがって、抗体は、所望の生物学的活性、例えば、特異的標的抗原への結合を示す任意の形態の抗体またはその断片である。したがって、それは最も広い意味で使用され、特にモノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、ナノ抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および所望の生物学的活性を示す限り、限定されないが、s c F v、F a b、およびF a b<sub>2</sub>を含む抗体断片を包含する。

10

【 0 0 4 4 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、例えば、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、およびF v断片、ダイアボディ、線状抗体（例えば、Z a p a t a e t a l . , P r o t e i n E n g . 8 ( 1 0 ) : 1 0 5 7 - 1 0 6 2 ( 1 9 9 5 ) ）、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v）、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。抗体のパパイン消化は、それぞれ単一の抗原結合部位を有する「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、容易に結晶化する能力を反映した名称の「F c」断片とを生じる。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原を架橋することができるF ( a b' )<sub>2</sub>断片を生じる。

20

【 0 0 4 5 】

「含む」とは、列挙された要素が、例えば、組成物、方法、キットなどに必要とされるが、例えば、組成物、方法、キットなどを形成するために、特許請求の範囲の範囲内で、他の要素が含まれ得ることを意味する。例えば、プロモーターに作動可能に連結した治療用ポリペプチドをコードする遺伝子を「含む」発現カセットは、遺伝子およびプロモーターに加えて、他の要素、例えば、ポリ-アデニル化配列、エンハンサー要素、他の遺伝子、リンカードメインなどを含み得る発現カセットである。

【 0 0 4 6 】

「から本質的になる」とは、記載されている、例えば、組成物、方法、キットなどの範囲が、例えば、組成物、方法、キットなどの基本的な特性および新規の特性に実質的な影響を及ぼさない指定の材料または工程に限定されることを意味する。例えば、プロモーターに作動可能に連結した治療用ポリペプチドをコードする遺伝子およびポリアデニル化配列「から本質的になる」発現カセットは、遺伝子の転写または翻訳に実質的な影響を及ぼさない限りは、追加的な配列、例えば、リンカー配列を含んでもよい。別の例として、列挙された配列「から本質的になる」バリエーション、または変異体、ポリペプチド断片は、それが由来する全長のナイーブなポリペプチドに基づいて配列の境界に、列挙された配列のアミノ酸配列プラスまたはマイナス約10アミノ酸残基、例えば、列挙された結合アミノ酸残基よりも10、9、8、7、6、5、4、3、2または1残基少ない、または列挙された結合アミノ酸残基よりも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10残基多いアミノ酸残基を有する。

30

40

【 0 0 4 7 】

「からなる」とは、組成物、方法、またはキットから、特許請求の範囲において指定されていないあらゆる要素、工程、または成分が排除されることを意味する。例えば、列挙された配列「からなる」ポリペプチドまたはポリペプチドドメインは、列挙された配列のみを含む。

【 0 0 4 8 】

「発現ベクター」とは、本明細書で使用される場合、目的の遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む上記のまたは当技術分野で既知のベクター、例えば、プラスミド、ミニサークル、ウイルスペクター、リポソームなどを包含し、意図された標的細胞におい

50

て遺伝子産物の発現をもたらすために使用されるものである。発現ベクターはまた、標的における遺伝子産物の発現を容易にするためにコード領域に機能的に連結された制御要素を含む。制御要素、例えば、プロモーター、エンハンサー、UTR、miRNA標的配列などと、発現のために作動可能に連結した遺伝子（複数可）の組合せは、時には、「発現力セット」と称される。そのような制御要素は多くが既知であり、当技術分野において入手可能であるか、または当技術分野において入手可能な構成要素から容易に構築することができる。

#### 【0049】

「プロモーター」とは、本明細書で使用される場合、RNAポリメラーゼの結合を導き、それにより、RNA合成を促進するDNA配列、すなわち、転写を導くために十分な最小の配列を包含する。プロモーターおよび対応するタンパク質またはポリペプチドの発現は、遍在する、つまり、広範囲の細胞、組織および種において強力に活性なものであってもよく、細胞型特異的、組織特異的、または種特異的なものであってもよい。プロモーターは、「構成的」、つまり、継続的に活性なものであってもよく、「誘導性」、つまり、生物要因または非生物要因の有無によって活性化または非活性化されるものであってもよい。プロモーター配列と連続していてもしてなくてもよいエンハンサー配列も本発明の核酸構築物またはベクターに含まれる。エンハンサー配列は、プロモーター依存性遺伝子発現に影響を及ぼすものであり、天然遺伝子の5'領域または3'領域に位置してもよい。

#### 【0050】

本明細書で使用される「天然」または「野生型」という用語は、野生型の細胞、組織、器官または生物に存在するヌクレオチド配列、例えば遺伝子、または遺伝子産物、例えばRNAまたはタンパク質を指す。「バリエーション」という用語は、本明細書で使用される場合、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列、例えば、天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の変異体、すなわち、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対して100%未満の配列同一性を有するものを指す。言い換えると、バリエーションは、参照ポリヌクレオチド配列、例えば、天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対して少なくとも1つのアミノ酸の差異（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む。例えば、バリエーションは、全長の天然ポリヌクレオチド配列に対して50%以上、60%以上、または70%以上の配列同一性、全長の天然ポリヌクレオチド配列に対して、例えば、75%または80%以上の同一性、例えば、85%、90%、または95%以上、例えば、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチドであってもよい。別の例として、バリエーションは、全長の天然ポリペプチド配列に対して70%以上の配列同一性、例えば、75%または80%以上、例えば、85%、90%、または95%以上の同一性など、例えば、全長の天然ポリペプチド配列に対して98%または99%の同一性を有するポリペプチドであってもよい。バリエーションは、参照、例えば、天然配列の断片と70%以上例えば、天然配列と75%または80%以上、例えば、85%、90%、または95%以上、例えば、98%または99%の同一性などの配列同一性を共有する参照、例えば、天然配列のバリエーション断片も含み得る。

#### 【0051】

本明細書で使用される場合、「生物活性」および「生物学的に活性な」という用語は、細胞内の特定の生物学的要素に帰する活性を指す。例えば、R-スポンジン、またはその断片もしくはバリエーションの「生物活性」とは、Wntシグナルを増強する能力を指す。別の例として、ポリペプチドまたはその機能性断片もしくはバリエーションの生物活性とは、ポリペプチドまたはその機能性断片もしくはバリエーションの、例えば、結合、酵素活性などのネイティブな機能を行う能力を指す。第3の例として、遺伝子調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、コザック配列などの生物活性とは、調節エレメントまたはその機能性断片もしくはバリエーションの、それぞれ、作動可能に連結した遺伝子の発現の翻訳を調節する、すなわち、促進する、増強する、または活性化する能力を指す。

#### 【0052】

本明細書で使用される「投与する」または「導入する」または「提供する」という用語

10

20

30

40

50

は、組成物を、細胞に、対象の細胞、組織および／もしくは器官に、または対象に送達することを指す。そのような投与または導入は、インビボ、インビトロまたはエクスピボで行うことができる。

【0053】

「治療」、「治療すること」などの用語は、本明細書において、一般に、所望の薬理的効果および／または生理的効果を得ることを意味するように使用される。効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に防止すること、例えば、対象において疾患またはその症状が起こる可能性を低減させることに関して予防的なものであってもよく、かつ／または、疾患および／もしくは疾患に起因する有害作用に対する部分的なまたは完全な治療に関して治療的であってもよい。「治療」とは、本明細書で使用される場合、哺乳動物における疾患の任意の治療を包含し、(a) 疾患の素因があり得るが、今のところはまだそれを有すると診断されていない対象において疾患が生じることを防止すること；(b) 疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること；または(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮を引き起こすことを含む。治療剤は、疾患または傷害の発生の前、その間、またはその後に投与することができる。治療により患者の望ましくない臨床症状が安定化するまたは低減するような、進行中の疾患の治療が特に興味深い。そのような治療は、罹患組織が完全に機能喪失する前に行うことが望ましい。主題の療法は、疾患の症候性の段階において、いくつかの場合には疾患の症候性の段階の後に施されることが望ましい。

【0054】

「個体」、「宿主」、「対象」および「患者」という用語は、本明細書では互換的に使用され、これだけに限定されないが、サルおよびヒトを含めたヒトおよび非ヒト霊長類；哺乳動物の競技動物（例えば、ウマ）；哺乳動物の農場動物（例えば、ヒツジ、ヤギなど）；哺乳動物の愛玩動物（イヌ、ネコなど）；およびげっ歯類（例えば、マウス、ラットなど）を含めた哺乳動物を指す。

【0055】

本発明の種々の組成物および方法が下に記載されている。本明細書には特定の組成物および方法が例示されているが、いくつかの代替的な組成物および方法が本発明の実施の使用に適用可能であり、適切であることが理解される。本発明の発現構築物および方法の評価は、当技術分野において標準の手順を使用して行うことができることも理解されよう。

【0056】

本発明の実施では、別段の指定のない限り、当業者の技術の範囲内に入る、細胞生物学、分子生物学（組換え技法を含む）、微生物学、生化学および免疫学の従来技法を用いる。そのような技法は、それらのそれぞれが参照により本明細書に明白に組み込まれる、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版（Sambrookら、1989年）；「Oligonucleotide Synthesis」（M. J. Gait編、1984年）；「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney編、1987年）；「Methods in Enzymology」（Academic Press, Inc.）；「Handbook of Experimental Immunology」（D. M. Weir & C. C. Blackwell編）；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」（J. M. Miller & M. P. Calos編、1987年）；「Current Protocols in Molecular Biology」（F. M. Ausubelら編、1987年）；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」（Mullisら編、1994年）；および「Current Protocols in Immunology」（J. E. Coliganら編、1991年）などの文献において十分に説明されている。

【0057】

本発明のいくつかの態様が例示のために適用の例を参照して下に記載されている。多数の特定の詳細、関係、および方法は、本発明の完全な理解をもたらすために記載されてい

10

20

30

40

50

ることを理解されるべきである。しかし、本発明は、特定の詳細のうちの1つ以上を伴わずにまたは他の方法を用いて実施できることは関連分野の当業者には容易に理解されよう。本発明は、例示されている行為または事象の順序に限定されず、いくつかの行為は他の行為または事象と異なる順序で、かつ/またはそれと同時になされ得る。さらに、例示された行為または事象の全てが本発明による方法体系を実行するために必要であるとは限らない。

#### 【0058】

本明細書において使用される用語法は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、本発明を限定するものではない。本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈によりそうでないことが明白に示されない限り、複数の形態も同様に含むものとする。さらに、「含む(including)」、「含む(includes)」、「有する(having)」、「有する(has)」、「有する(with)」という用語またはその変形が発明の詳細な説明および/または特許請求の範囲のいずれかにおいて使用されている限りでは、そのような用語は、「含む(comprising)」という用語と同様に、包括的なものとする。

#### 【0059】

「約」または「およそ」という用語は、当業者により決定される特定の値に対する許容される誤差範囲内に入ることを意味し、許容される誤差範囲は、一部において、どのように値を測定または決定するか、つまり、測定システムの限界に依存する。例えば、「約」とは、当技術分野における実施に従って、1または1超の標準偏差の範囲内を意味し得る。あるいは、「約」とは、所与の値の20%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%まで、およびより好ましくはさらに1%までの範囲を意味し得る。あるいは、特に生物系または生物学的プロセスに関して、この用語は、一桁内である値の好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内であることを意味し得る。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載されている場合、特に明記しない限り、特定の値に対する許容可能な誤差範囲内を意味する「約」という用語を想定すべきである。

#### 【0060】

本明細書で言及される全ての公開物は、公開物が引用されるものとの関連で方法および/または材料を開示および記載するために、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、矛盾が存在する限り、組み込まれた公開物のいかなる開示にも優先することが理解される。

#### 【0061】

特許請求の範囲は任意の要素を排除するように作成されてもよいことにさらに留意されたい。したがって、この記述は、特許請求の要素の列举に関連して「専ら」、「唯一の」などのような排他的な用語の使用または「否定的な」制限の使用のための先行基準としての役割を果たすことを意図している。

#### 【0062】

別段の指定のない限り、本明細書で使用される用語は全て、当業者にとっての意味と同じ意味を有し、本発明の実施では、当業者の知見の範囲内に入る微生物学および組換えDNA技術の従来技法を用いる。

#### 【0063】

組織特異的Wntシグナル増強分子

特定の態様では、本開示は、組織特異的または細胞特異的様式でWnt活性を増強することができる新規の組織特異的Wntシグナル増強分子を提供する。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、1つ以上のZNR3および/またはRNF43リガーゼに結合する第1のドメインと、1つ以上の標的組織または細胞型に組織特異的または細胞特異的様式で結合する第2のドメインと、を含む二機能性分子である。第1のドメインおよび第2のドメインはそれぞれ、リガーゼ複合体または標的組織もしくは細胞にそれぞれ結合することができる任意の部分であり得る。例えば、第1のドメインおよび第2のドメインのそれぞれは、限定されないが、ポリペプチド(例えば、抗体もしくはそ

10

20

30

40

50



の抗原結合断片、または抗体とは異なるペプチドもしくはポリペプチド)、低分子、および天然のリガンドまたはそのバリエーション、断片もしくは誘導体から選択される部分であり得る。特定の実施形態では、天然リガンドは、ポリペプチド、小分子、イオン、アミノ酸、脂質、または糖分子である。第1のドメインおよび第2のドメインは、互いに同じ種類の部分であってもよく、または異なる種類の部分であってもよい。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、組織特異的または細胞特異的な細胞表面受容体に結合する。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、例えば、ネガティブコントロールと比較して、Wntシグナル伝達を、少なくとも50%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍増加または増強させる。

10

#### 【0064】

特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、ZNR F3 / RNF 43に結合する第1のポリペプチド配列および1つ以上の標的組織または細胞型に組織または細胞特異的様式で結合する第2のポリペプチド配列を含む融合タンパク質である。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、それぞれ第1のドメインおよび第2のドメインを含む2つ以上の融合タンパク質を含む二量体または多量体などの2つ以上のポリペプチドを含み、ここで、2つ以上のポリペプチドは、例えば、リンカー部分を通して、または2つ以上のポリペプチドのそれぞれにおけるアミノ酸残基間の結合、例えばシステイン残基間の分子間ジスルフィド結合を介して結合している。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、第1のドメインまたは第2のドメインのいずれかを構成する抗体重鎖および軽鎖を含む抗体（またはその抗原結合断片）であり、ここで、もう一方のドメイン（すなわち、第2のドメインまたは第1のドメイン）は、融合タンパク質として、またはリンカー部分を介してのいずれかで、抗体重鎖または軽鎖に結合している。特定の実施形態では、もう一方のドメインは、重鎖のN末端、重鎖のC末端、軽鎖のN末端、または軽鎖のC末端に結合している。そのような構造は、本明細書では付加IgGスカフォールドまたはフォーマットと呼ばれ得る。例えば、組織特異的Wntシグナル増強分子は、ZNR F3 / RNF 43に結合する抗体であり得、ここで、組織または細胞特異的受容体に結合する結合ドメインが、ZNR F3 / RNF 43に結合する抗体の重鎖または軽鎖のいずれかに融合または付加されている。別の例では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、組織または細胞特異的受容体に結合する抗体であり得、ここで、ZNR F3 / RNF 43に結合する結合ドメインが、組織または細胞特異的受容体に結合する抗体の重鎖または軽鎖のいずれかに融合または付加されている。

20

30

#### 【0065】

特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、ZNR F3 / RNF 43に結合する第1のドメイン（「作用ドメイン」）および組織特異的または細胞特異的受容体に結合する、例えば高い親和性を有する第2のドメイン（「標的ドメイン」）を含む。特定の実施形態では、これら2つのドメインのそれぞれは、それ自体ではWntシグナルを増強するのに実質的に低い活性を有するかまたは不活性である。しかしながら、組織特異的Wntシグナル増強分子が組織特異的受容体を発現する標的組織と結合すると、E3リガーゼZNR F3 / RNF 43は組織特異的受容体と三元複合体に動員され、それらは受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞表面から隔離され、かつ/または除去される。その結果、組織特異的様式でWntシグナルが増強される。

40

#### 【0066】

特定の実施形態では、作用ドメインは、ZNR F3 / RNF 43 E3リガーゼへの結合剤であり、それは、R-スポンジン、例えば、限定されるものではないが、ヒトR-スポンジン1~4を含むR-スポンジン1~4に基づいて設計することができる。特定の実施形態では、作用ドメインは、R-スポンジン、例えば野生型R-スポンジン1~4、場合によりヒトR-スポンジン1~4、またはそれらのバリエーションもしくは断片である。特定の実施形態では、それは、対応する野生型R-スポンジン1~4配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または

50

少なくとも 99% の配列同一性を有する R - スポンジン 1 ~ 4 のいずれかのバリエーションである。特定の実施形態では、作用ドメインは、Z N R F 3 / R N F 4 3 に結合する、R - スポンジン、例えば R - スポンジン 1 ~ 4 のいずれかのフリンドメイン 1 を含むかまたはそれからなる。Z N R F 3 / R N F 4 3 に特異的に結合することができる、フリンドメイン 1 の拡張バージョン（限定されないが、もはや L G R 4 ~ 6 に結合しないかまたは L G R 4 ~ 6 への結合が減少した変異フリンドメイン 2 を有するものを含む）、または操作された抗体もしくは任意の他の誘導体もしくは抗体とは異なる任意の操作されたポリペプチドも使用することができる。特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンの 1 つ以上のフリンドメイン 1 を含む。特定の実施形態では、それは、R - スポンジンのフリンドメイン 2 を含まないか、またはそれは、R - スポンジンの改変型またはバリエーションフリンドメイン 2、例えば野生型フリンドメイン 2 と比較して活性が低いフリンドメイン 2 を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、フリンドメイン 1 を含むが、R - スポンジンのフリンドメイン 2 を含まない。特定の実施形態では、作用ドメインは、2 つ以上のフリンドメイン 1 またはフリンドメイン 1 の多量体を含む。作用ドメインは、R - スポンジンの 1 つ以上の野生型フリンドメイン 1 を含み得る。特定の実施形態では、作用ドメインは、野生型フリンドメイン 1 と比較して、活性、例えば Z N R F 3 / R N F 4 3 への結合が増大している R - スポンジンの改変型またはバリエーションフリンドメイン 1 を含む。Z N R F 3 / R N F 4 3 への結合が増加したバリエーションは、例えば、R - スポンジンフリンドメイン 1 のバリエーションを含むファージまたは酵母ディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。R - スポンジンフリンドメイン 1 とは無関係であるが Z N R F 3 / R N F 4 3 への結合が増加しているペプチドまたはポリペプチドもまたスクリーニングによって同定することができる。作用ドメインは、さらなる部分またはポリペプチド配列、例えばそれが存在する作用ドメインまたは組織特異的 W n t シグナル増強分子の構造を安定化させるためのさらなるアミノ酸残基をさらに含み得る。

#### 【 0 0 6 7 】

特定の実施形態では、標的ドメインは、細胞特異的表面分子、例えば細胞特異的表面受容体に特異的に結合し、例えば天然リガンド、抗体、または合成化学物質であり得る。特定の実施形態では、細胞特異的表面分子は、標的器官、組織または細胞型、例えば、W n t シグナル伝達を増強することが望ましい器官、組織または細胞型で優先的に発現される。特定の実施形態では、細胞特異的表面分子は、標的器官、組織または細胞型、例えば、1 つ以上の他の非標的器官、組織または細胞型と比較したときに例えば、疾患または障害を治療または予防するために W n t シグナル伝達を増強することが望ましい器官、組織または細胞型で発現が増加または増強している。特定の実施形態では、細胞特異的表面分子は、それぞれ 1 つ以上の他の器官、組織または細胞型と比較して、標的器官、組織または細胞型の表面に優先的に発現される。例えば、特定の実施形態では、細胞表面受容体は、それが 1 つ以上、5 つ以上、他の全ての器官、組織もしくは細胞、またはそれぞれ他の全ての器官、組織もしくは細胞の平均で発現されるよりも、標的器官、組織または細胞において、少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 500 倍、または少なくとも 1000 倍高いレベルで発現されている場合、組織特異的または細胞特異的細胞表面分子であると見なされる。特定の実施形態では、組織特異的または細胞特異的細胞表面分子は、細胞表面受容体、例えば、細胞表面膜内に位置する領域と標的ドメインが結合することができる細胞外領域とを含むポリペプチド受容体である。様々な実施形態では、本明細書に記載の方法は、標的組織または標的組織を含む組織のサブセット上でのみ発現される細胞表面分子を特異的に標的化することによって、または全ての、ほとんどの、またはかなりの数の他の組織と比較した場合に標的組織上でより高いレベルの発現を有する、例えば、少なくとも 2、少なくとも 5、少なくとも 10、または少なくとも 20 の他の組織よりも標的組織における発現がより高い細胞表面分子を特異的に標的化することによって実施され得る。

#### 【 0 0 6 8 】

組織特異的および細胞特異的な細胞表面受容体は、当技術分野において既知である。組織特異的および細胞特異的な表面受容体の例には、限定されないが、ASGR1（肝臓特異的）、ASGR2（肝臓特異的）、TFR2（肝臓特異的）、SLC10A1（肝臓特異的）、PTH1R（骨および腎臓特異的）、LYPD3（口腔粘膜特異的）、DSG3（口腔粘膜特異的）などが含まれる（図2参照）。肝臓送達のためのさらなる受容体は、例えば、Yan et al., Tumor Biology, 2015; 36: 55-67に記載されている。

#### 【0069】

特定の細胞表面ポリペプチドまたは受容体に「特異的に結合する」または「特異的な」作用ドメインまたは標的ドメイン、例えば抗体またはその抗原結合断片は、他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなくその特定のポリペプチドまたは受容体に結合するものである。いくつかの実施形態では、本開示の作用ドメインおよび標的ドメインは、ZNR F3 / RNF 43または組織特異的細胞表面分子（例えば受容体）に、それぞれ、約4、25、37または42の温度で測定した場合に、1000 nM以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、0.5 nM以下、0.1 nM以下、0.01 nM以下、0.005 nM以下、0.001 nM以下、または0.0005 nM以下の解離定数（ $K_d$ ）で特異的に結合する。結合剤、例えば抗体の親和性は、従来の技術、例えばScatchardらによって記載されたものを用いて容易に決定することができる（Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51: 660 (1949), ELISA assays, biolayer interferometry (BLI) assays, and surface plasmon resonance (SPR) assays）。抗原、その細胞または組織への抗体の結合特性は、一般に、例えば免疫組織化学（IHC）および/または蛍光活性化細胞選別（FACS）などの免疫蛍光に基づくアッセイを含む免疫検出法を使用して決定および評価することができる。

#### 【0070】

特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子の作用ドメインおよび/または標的ドメインはポリペプチドであり、他の実施形態では、組織特異的Wntシグナル伝達分子の作用ドメインおよび/または標的ドメインは有機小分子である。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子の作用ドメインと標的ドメインは互いに共有結合している。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強融合分子の作用ドメインと標的ドメインは互いに非共有結合している。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子の作用ドメインと標的ドメインは同じ融合タンパク質内に存在する。他の実施形態では、作用ドメインは第1の結合ドメインをさらに含む第1のポリペプチド内に存在し、標的ドメインは第2の結合ドメインをさらに含む第2のポリペプチド内に存在し、ここで第1および第2の結合ドメインは互いに結合する。いくつかの実施形態では、第1および第2の結合ドメインは、例えばFcポリペプチドなど、同じかまたはそのバリエーションである。いくつかの実施形態では、第1および第2の結合ドメインは互いに異なる。特定の実施形態では、本発明は、参照分子の機能的断片またはバリエーションを含む、本明細書に記載の任意の標的ドメインまたは作用ドメインの断片またはバリエーションの使用を含む。

#### 【0071】

特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子（例えば、融合タンパク質）は、 $R_1 - L - R_2$ 、および $R_2 - L - R_1$ から選択される式を有し、ここで、 $R_1$ はZNR F3 / RNF 43に結合する作用ドメインであり、 $R_2$ は組織特異的細胞表面受容体に結合する標的ドメインであり、Lはリンカーであり、Lは存在しても存在しなくてもよい。 $R_1$ および $R_2$ のそれぞれは、それぞれ、本明細書に記載の様々な作用ドメインおよび標的ドメインのうちのいずれかであり得る。 $R_1$ および $R_2$ のそれぞれは、1つ以上のE3リガーゼ（ZNR F3またはRNF 43）、またはそれぞれ標的組織または細胞に結合することができる任意の部分であり得る。例えば、 $R_1$ および $R_2$ のそれぞれは、限定されないが、ポリペプチド（例えば、抗体もしくはその抗原結合断片、または抗体とは異なる

るペプチドもしくはポリペプチド)、低分子、および天然のリガンドまたはそのバリエーション、断片もしくは誘導体から選択される部分であり得る。特定の実施形態では、天然リガンドは、ポリペプチド、小分子、イオン、アミノ酸、脂質、または糖分子である。作用ドメインおよび標的ドメイン(すなわち、 $R_1$ および $R_2$ )は、互いに同じ種類の部分であり得るか、またはそれらは異なる種類の部分であり得る。特定の実施形態では、 $R_2$ はその抗原結合断片の抗体であり、特定の実施形態では、 $R_2$ はFcタンパク質またはその類似体を含む。

#### 【0072】

特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は単一分子(例えばポリペプチド)を含み、他の実施形態ではWntシグナル増強融合分子は互いに結合した、例えば、互いに非共有結合した2つ以上の分子(例えばポリペプチド)を含む。例えば、一実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強融合は、式 $R_3-L_1$ および $R_4-L_2$ をそれぞれ有する2つの分子を含み、ここで、 $R_3$ は作用ドメインであり、 $R_4$ は標的ドメインであり、 $L_1$ および $L_2$ 基は、例えば二量体を形成するために互いに結合する。様々な実施形態では、 $L_1$ および $L_2$ 基は、互いに同一であるかまたは互いに異なる。 $L_1$ または $L_2$ 基の一例は、Fc配列、例えばマウスFc2bまたはヒトFc1であり、これらはそれぞれ当技術分野において既知である。 $R_3$ および $R_4$ のそれぞれは、本明細書にそれぞれ記載されている様々な作用ドメインおよび標的ドメインのいずれかであり得る。 $R_3$ および $R_4$ のそれぞれは、1つ以上のE3リガーゼ( $ZNRF3$ および/または $RNF43$ )、またはそれぞれ標的組織または細胞に結合することができる任意の部分であり得る。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は、1つ以上のE3リガーゼ( $ZNRF3$ および/または $RNF43$ )に結合する抗体またはその結合断片を含み、ここで、抗体重鎖および/または抗体軽鎖は、標的組織または細胞に結合する付加結合ドメインを含む。特定の実施形態において、組織特異的Wntシグナル増強分子は、標的組織または細胞に結合する抗体またはその結合断片を含み、ここで、抗体重鎖および/または抗体軽鎖は、1つ以上のE3リガーゼ( $ZNRF3$ および/または $RNF43$ )に結合する付加された結合ドメインを含む。付加された結合ドメインは、例えば重鎖または軽鎖融合タンパク質として抗体のN末端またはC末端に直接融合されてもよく、またはリンカー部分を介して、例えば、重鎖もしくは軽鎖のN末端、C末端、または内部アミノ酸に対して、重鎖または軽鎖に付加されてもよい。ある態様において、抗体はIgGである。

#### 【0073】

特定の実施形態において、組織特異的Wntシグナル増強分子(例えば、融合タンパク質)は、融合タンパク質と接触した標的組織または細胞型におけるWntシグナル伝達を増加させる。特定の実施形態では、標的組織または細胞型におけるWntシグナル伝達は、少なくとも50%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍増加する。

#### 【0074】

組織特異的Wntシグナル増強分子は、当技術分野において既知であり利用可能な有機合成および分子生物学の標準的な方法によって産生することができる。例えば、組織特異的Wntシグナル増強融合タンパク質は、標的ドメイン(例えば、ASGR1に結合する抗体)を、アミノ酸に対応する作用ドメイン(例えば、ヒトR-スポンジン2フューリンドメイン1単独)に融合することによって生成され得る。LGRタンパク質とのフリンドメイン2の相互作用は、点変異、例えばF105AおよびF109Aによって、単独でまたは組み合わせて廃止または損なわれている)。特定の実施形態では、標的ドメインおよび作用ドメインは、組織特異的Wntシグナル増強分子のN末端に位置するいずれかのドメインと、リンカー、例えばグリシン-セリンリンカーによって融合される。特定の実施形態において、標的ドメインおよび作用ドメインは、タンパク質リンカー(例えば、アルブミン)によって融合されている。標的ドメインを作用ドメインと「融合する」さらなる方法は、例えば、「ノブインホール」またはロイシンジッパー媒介二量体化を含むが、これらに限定されない。標的ドメイン、作用ドメイン(および場合によってはリンカー)を

コードするDNA配列は、所望の融合タンパク質をコードするように遺伝子操作することができる。

【0075】

抗体重鎖および軽鎖を含む組織特異的Wntシグナル増強融合分子については、融合タンパク質の異なる部分をコードするDNA配列を、標準的な分子クローニング技術を用いて細菌または真核生物発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞で発現させる。発現された融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーなどのタンパク質科学における標準的な技術を用いて均質になるまで精製され得る。本開示はまた、本明細書に記載の作用ドメイン、標的ドメイン、または融合タンパク質と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のポリペプチド配列同一性を有するバリエーションを含む、本明細書に記載のポリペプチド作用ドメイン、標的ドメイン、および融合タンパク質のいずれかの機能的断片およびバリエーションを含む。そのようなバリエーションは、本明細書に開示されている配列のいずれかと比較して1つ以上のアミノ酸修飾、例えば、1つ以上のアミノ酸欠失、挿入または置換を含み得る。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強融合タンパク質の機能的断片およびバリエーションは、由来する組織特異的Wntシグナル増強融合タンパク質と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%またはそれ以上のWntシグナル増強活性を有する。特定の実施形態では、ポリペプチド作用ドメインの機能的断片およびバリエーションは、(全組織特異的Wntシグナル増強分子との関連で測定した場合)由来する作用ドメインと比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%またはそれ以上のWntシグナル増強活性を有する。特定の実施形態では、標的ドメインの機能的断片およびバリエーションは、由来する標的ドメインと比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%またはそれ以上の結合活性を有する。

【0076】

本開示はまた、1つ以上の組織特異的Wntシグナル増強分子またはその構成要素、例えば、本明細書に記載の融合タンパク質またはそのバリエーションをコードするポリヌクレオチドまたは核酸配列、ならびに発現ベクターを含む、これらのポリヌクレオチドを含むベクター、およびこれらのベクターを含む細胞を含む。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドまたは核酸配列はDNAまたはRNAである。特定の実施形態では、RNAはメッセンジャーRNA(mRNA)である。特定の実施形態では、RNAは、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む修飾mRNAである。1つ以上の修飾ヌクレオチドを含む修飾mRNAは、安定性の向上、より高い発現レベルおよび免疫原性の低下を含む、未修飾mRNAを超える利点を有すると記載されている。本発明に従って使用され得る修飾mRNAの非限定的な例は、例えば、PCT特許出願公開第WO2011/130624号、同第WO2012/138453号、同第WO2013151666号、同第WO2013/071047号、同第WO2013/078199号、同第WO2012045075号、同第WO2014081507号、同第WO2014093924号、同第WO2014164253号、米国特許第8,278,036号(シュードウリジンを含む修飾mRNAを記載する)、同第8,691,966号(シュードウリジンおよび/またはN1-メチルプスドリジンを含む改変mRNAを記載する)、同第8,835,108号(5-メチルシチジンを含む修飾mRNAを記載する)、同第8,748,089号(シュードウリジンまたは1-メチルプスドリジンを含む修飾mRNAを記載する)に記載されている。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強ポリペプチドをコードする修飾m

10

20

30

40

50

R N A 配列は、未修飾 A、G、U または C リボヌクレオシドと比較して少なくとも 1 つの修飾を含む。特定の実施形態では、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドには、N 1 - メチルプスドリジンおよび / または 5 - メチルシチジンが含まれる。特定の実施形態では、修飾 m R N A は、5 ' 末端キャップ配列と、それに続く組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドをコードする配列と、それに続くポリ A またはポリ A - G 配列などの 3 ' テーリング配列とを含む。

【 0 0 7 7 】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはベクター、例えば発現ベクターであり、発現ベクターは組織特異的 W n t シグナル増強融合分子（例えば融合タンパク質または付加抗体の一方もしくは両方の鎖）をコードするポリヌクレオチド配列を含む。本明細書に記載

10

【 0 0 7 8 】

本開示はまた、本明細書に記載のポリヌクレオチドと少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % のポリヌクレオチド配列同一性を有するバリエーションを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドの機能的断片およびバリエーションを含む。そのようなバリエーションは、本明細書に開示されている任意の配列と比較して、1 つ以上のヌクレオチドまたはヌクレオシド修飾、例えば 1 つ以上のヌクレオチド欠失、挿入または置換を含むことができる。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞中のコードされたポリペプチドの発現を増強するためにコドン最適化されている。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドバリエーションは 1 つ以上の修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシドを含む。

20

【 0 0 7 9 】

本開示はまた、本明細書に記載の組織特異的 W n t シグナル増強分子、例えば融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはベクターを含む細胞を含む。特定の実施形態において、細胞は、組織特異的 W n t シグナル増強融合タンパク質を産生するために使用され得る、例えば H E K 2 9 3 細胞などの宿主細胞である。本組成物を調製する際には、例えば、哺乳動物細胞（例えば、2 9 3 細胞）、昆虫細胞（例えば、S F 9 細胞）、微生物および酵母を含むがこれらに限定されない、任意の宿主細胞を用いることができる。特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載の組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドで治療された対象に対して異種または自己由来である。特定の実施形態では、細胞は対象から得られ、本明細書に記載のウイルスベクターで形質導入された。特定の実施形態では、形質導入細胞は治療のために対象に送達される。

30

【 0 0 8 0 】

本開示はまた、1 つ以上の組織特異的 W n t シグナル増強分子（例えば、融合タンパク質）、または組織特異的 W n t シグナル増強分子をコードする配列を含む 1 つ以上のポリヌクレオチドもしくはベクターを含む薬学的組成物を含む。

40

【 0 0 8 1 】

W n t シグナル伝達は、当技術分野において既知であり利用可能な技術およびアッセイを用いて測定され得る。特定の実施形態では、W n t シグナル伝達の増加は、標的組織または細胞型に対応する細胞株を用いて決定される。特定の実施形態では、細胞株は、W n t シグナル応答性プロモーターの制御下にあるマーカー遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を含むレポータープラスミドを含む。W n t 3 a、W n t 3 a 馴化培地、または W n t 3 a の組換え供給源にตอบสนองして、フリンドメイン 1 を単独で（またはフリンドメイン 2 と一緒に、F 1 0 5 A および / または F 1 0 9 A 点変異を伴って）添加することによ

50

る細胞のレポーター活性の増強。陽性対照としての陰性対照または機能的 R - スポンジン（全長またはフリンドメイン 1 および 2）を決定することができる。組織特異的 W n t シグナル増強分子に応答したレポーター活性はまた、レポーター細胞株を組織特異的 W n t シグナル増強分子と接触させることによって決定され得る。ネガティブコントロールはレポーター活性について実質的に、有意に、または完全にネガティブであり得、組織特異的 W n t シグナル増強分子およびポジティブコントロールはレポーター活性の増加として W n t シグナル伝達応答の増加を示すはずである。追加の対照は、抗 A S G R 1 抗体単独（陰性）、抗 A S G R 1 抗体の代わりに抗 G F P 抗体が使用される融合タンパク質（陰性）、およびインタクトフリンドメイン 1 - フリンドメイン 2 タンパク質（陽性）を含み得る。組織特異的 W n t シグナル増強分子の組織特異性は、標的化されたもの以外の細胞型または組織における組織特異的 W n t シグナル増強分子での処置に応答してレポーター活性を同様に測定することによって決定され得る。特定の実施形態では、レポーター活性は、非標的組織と比較して、組織特異的 W n t シグナル増強分子によって結合された標的組織において高く、例えば、少なくとも 50 %、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍である。少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍高い。

#### 【0082】

特定の実施形態では、組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドは、本明細書に記載の任意の作用ドメインおよび標的ドメインの任意の組み合わせを含む、作用ドメインおよび標的ドメインの任意の組み合わせを含む。特定の実施形態では、それらはリンカー、例えばアルブミン（例えばヒト血清アルブミン）、ペプチジルリンカー、または非ペプチジルリンカーによって結合されており、ここで標的ドメインおよび作用ドメインはそれらの N 末端および C 末端にある。リンカー、例えば F c もしくはアルブミン、ペプチジルリンカー、または非ペプチジルリンカー。

#### 【0083】

組織特異的 W n t シグナル増強分子はまた、インビボでの安定性を増強するために当該分野で既知のように、ポリエチレングリコール（PEG）、F c、アルブミンなどのような部分に結合され得る。

#### 【0084】

組織特異的 W n t シグナル増強分子の例示的で非限定的な例は、以下：

#### 【0085】

a) W n t シグナル伝達を増強する能力が低下した R - スポンジン（例えば、ヒト R - スポンジン 2）のバリエーションまたは断片を含む作用ドメインと P T H 1 R に特異的に結合する標的ドメインとを含む骨組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドであって、該組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドが、骨組織において W n t シグナル伝達を増加させ、骨組織の疾患または状態を治療するために使用され得る、骨組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチド；

#### 【0086】

b) W n t シグナル伝達を増強する能力が低下した R - スポンジン（例えばヒト R - スポンジン 2）のバリエーションまたは断片を含む作用ドメインおよび A S G R 1、A S G R 2、T F R 2 または S L C 1 0 A 1 に特異的に結合する標的ドメインを含む肝組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチド；ここで、組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドは、肝臓組織における W n t シグナル伝達を増加させ、肝臓組織の疾患または状態を処置するために使用され得る；または、

#### 【0087】

c) W n t シグナル伝達を増強する能力が低下した R - スポンジン（例えば、ヒト R - スポンジン 2）のバリエーションまたは断片を含む作用ドメインと L Y P D S 3 または D S G 3 に特異的に結合する標的ドメインとを含む口腔粘膜組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドであって、該組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドが、口腔粘膜組織において W n t シグナル伝達を増加させ、口腔粘膜組織の疾患または状態を治療するために使用され得る、口腔粘膜組織特異的 W n t シグナル増強ポリペプチドを含む。

## 【 0 0 8 8 】

組織特異的 W n t シグナル増強分子の例示的で非限定的な例には、添付の実施例に記載のもの、および表 1 に記載のものを含むがこれらに限定されない配列が含まれる。特定の  
実施形態では、組織特異的 W n t シグナル増強分子は、本明細書に開示されている 2 つ以  
上のポリペプチド配列を、例えば添付の I g G または抗体のフォーマットで含む。本明細  
書に開示されているポリペプチドは、配列番号 1 ~ 4、6、8、10、12、14、16  
、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、  
44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、7  
0、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96  
、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、  
118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、  
138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、  
または 158 に記載の配列、およびこれらの断片のいずれかと少なくとも 80 %、少なく  
とも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なく  
とも 99 % の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを含むが、こ  
れらに限定されない。特定の実施形態では、ポリペプチドは機能ドメインおよび / または  
標的ドメインとしての活性を有する。

10

## 【 0 0 8 9 】

本明細書に開示されるポリヌクレオチドの例示的、非限定的な例には、上記のものを含  
む、本明細書に記載されるポリペプチド、バリエーションおよび断片のいずれかをコードする  
ものが含まれる。本明細書に開示されているポリヌクレオチドは、配列番号 5、7、9、  
11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、3  
7、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63  
、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、  
91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、1  
13、115、117、119、121、123、125、127、129、131、1  
33、135、137、139、141、143、145、147、149、151、1  
53、155、および 157 に記載の配列、ならびにこれらの断片のいずれかと少なくとも  
80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、  
または少なくとも 99 % の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなるポリヌクレ  
オチドを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、機  
能的ドメインおよび / または標的ドメインとしての活性を有するポリペプチドをコードす  
る。

20

30

## 【 0 0 9 0 】

## 作用ドメイン

R スポンジンは W n t シグナルを増幅することができる。R - スポンジンの最小機能単  
位は、2 つのフリンドメイン、Z N R F 3 / R N F 4 3 E 3 リガーゼに結合するフリンド  
メイン 1、および R - スポンジン、L G R、および E 3 リガーゼの三元複合体をまとめる  
、L G R 4 ~ 6 に結合するフリンドメイン 2 から構成される。これは、複合体全体の内在  
化をもたらし、かつ Z N R F 3 / R N F 4 3 をこれらの破壊の標的から離して除去する。  
フリンドメイン 1 単独では機能的ではないが、それは Z N R F 3 および R N F 4 3 の両方  
に結合することができる ( 図 1 参照 ) 。

40

## 【 0 0 9 1 】

本明細書に記載の組織特異的 W n t シグナル増強分子の作用ドメインは、Z N R F 3 /  
R N F 4 3 リガーゼに結合することができる任意の機能的部分、例えばポリペプチドまた  
は有機化学物質であり得るが、これらに限定されない ( 図 2 参照 ) 。特定の実施形態では  
、作用ドメイン、例えば単独でまたは標的ドメインと共にかのいずれかで R - スポンジン  
のフリンドメイン 1 を含むポリペプチドは、潜在的なオフターゲット効果を最小限に抑え  
るために、非ターゲット組織において実質的に不活性である。作用ドメインは、組織特異  
的 W n t シグナル増強分子との関連で標的ドメインに融合または結合し、組織特異的 W n

50



t シグナル増強分子が組織特異的受容体を発現する標的組織と係合すると、E3 リガーゼ Z N R F 3 / R N F 4 3 は組織特異的受容体と三元複合体に動員され、それらは細胞表面上に再配置され、隔離され、および/または細胞表面から除去される(図3参照)。

#### 【0092】

特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンポリペプチド(例えば、R - スポンジン1 ~ 4のいずれか)の断片もしくはバリエーション、またはその機能的断片もしくはバリエーションを含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、野生型R - スポンジンの断片を含む、他の実施形態では、作用ドメインは1つ以上のアミノ酸修飾を含むR - スポンジンの断片を含む。R - スポンジンは、ヒトR - スポンジンなどの哺乳動物種を含むがこれらに限定されない、任意の動物種由来のR - スポンジンを含む、当技術分野において既知の任意のR - スポンジンまたはそのホモログであり得る。R - スポンジンは同定され記載されており、それらのポリペプチドおよびそれをコードするポリヌクレオチド配列は既知であり当該分野で利用可能である。特定の実施形態では、R - スポンジンポリペプチドは、ヒトのR - スポンジン、または他の脊椎動物もしくは非脊椎動物に見られるホモログ、例えばマウスのR - スポンジンである。ヒトR - スポンジン1、ヒトR - スポンジン2、ヒトR - スポンジン3、およびヒトR - スポンジン4のアミノ酸配列、ならびにそれらのフリンドメイン1を図4および配列番号1 ~ 4にそれぞれ提供する。それらの同族体およびバリエーションは、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>などの一般的なデータベース検索から入手できる。本発明は、これらまたは他のR - スポンジンのいずれかの断片およびバリエーションを含むかまたはそれらからなる作用ドメインを含む(しかしこれらに限定されない)。種々の実施形態では、任意のR - スポンジンポリペプチドおよびその断片のバリエーションは、野生型R - スポンジンポリペプチドと比較して、1つ以上のアミノ酸修飾、例えば欠失、付加、または置換を含む。修飾は、フリンドメイン1および/またはフリンドメイン2を含むがこれらに限定されない、R - スポンジンのバリエーションまたはその断片の任意の領域に存在し得る。フリンドメイン1またはフリンドメイン2の外側のアミノ酸修飾は、得られたバリエーションが野生型R - スポンジンまたはその断片と比較して減少したLGR4 - 6結合活性を有するように、得られたバリエーションを改変し得ることが理解される。

#### 【0093】

特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジン配列、例えば、全長または野生型のR - スポンジン - 1、 - 2、 - 3、もしくは - 4、場合によりヒトR - スポンジン - 1、 - 2、 - 3、もしくは - 4、またはそれらのバリエーションもしくは断片を含むか、またはそれらからなる。特定の実施形態では、それは、対応する野生型R - スポンジン1 ~ 4配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するR - スポンジン1 ~ 4のいずれかのバリエーションである。特定の実施形態では、作用ドメインは、本明細書に開示されたもののいずれかを含むがこれらに限定されない、1つ以上のアミノ酸修飾を含む全長R - スポンジン(例えば、R - スポンジン - 1 ~ 4のいずれか)を含むまたはそれらからなる。特定の実施形態では、作用ドメインは野生型または修飾R - スポンジン(例えば、R - スポンジン - 1 ~ 4のいずれか)の断片を含むかまたはそれらからなる。特定の実施形態では、この断片はZ N R F 3および/またはR N F 4 3に結合することができる。特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジタンパク質のフリンドメイン1、またはR - スポンジタンパク質の断片もしくはバリエーションを含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、1つ以上(例えば、1つ、2つもしくは3つ以上の、R - スポンジタンパク質(例えば、R - スポンジン1 ~ 4)のフリンドメイン1、またはR - スポンジンフリンドメイン1と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそれらのバリエーションを含むか、またはそれらからなる。特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンフリンドメインまたはそのバリエーションもしくは断片、およびR - スポンジンフリンドメインもしくはそのバリエーションもしくは断片を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、Z N R F 3

/ R N F 4 3 に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは Z N R F 3 または R N F 4 3 のいずれかに特異的に結合する。

【 0 0 9 4 】

特定の実施形態において、作用ドメインは、R - スポンジンの 1 つ以上のフリンドメイン 1、例えば、ヒト R - スポンジン 1 もしくはヒト R - スポンジン 2、またはそれらのバリエーションを含む。特定の実施形態において、作用ドメインは、R - スポンジンの 1 つ以上のフリンドメイン 1 を含むが、それは R - スポンジンのフリンドメイン 2 を含まない。特定の実施形態において、作用ドメインは、R - スポンジンの 1 つ以上のフリンドメイン 1 を含み、それは、R - スポンジンの改変型またはバリエーションフリンドメイン 2、例えば野生型フリンドメイン 2 と比較して活性が低いフリンドメイン 2 を含む。特定の実施形態において、作用ドメインは、R - スポンジンの改変型またはバリエーションフリンドメイン 2 を有する R - スポンジンタンパク質、例えば野生型フリンドメイン 2 と比較して活性が低下したフリンドメイン 2 を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、2 つ以上のフリンドメイン 1 もしくはそのバリエーション、またはフリンドメイン 1 もしくはそのバリエーションの多量体を含む。特定の実施形態において、作用ドメインは、例えば、ヒト R - スポンジン 2 の K 5 8、H 7 6、S 7 7、R 8 6、N 9 1 に対応するアミノ酸残基に、1 つ以上の点変異を含むバリエーション R - スポンジンフリンドメイン 1 を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、野生型フリンドメイン 1 と比較して、活性、例えば Z N R F 3 / R N F 4 3 への結合が増大している R - スポンジンの改変型またはバリエーションフリンドメイン 1 を含む。作用ドメインは、さらなる部分またはポリペプチド配列、例えばそれが存在する作用ドメインまたは組織特異的 W n t シグナル増強分子の構造を安定化させるためのさらなるアミノ酸残基をさらに含み得る。特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンに対して明らかな / 強い配列相同性を有さないペプチドまたはポリペプチドを含むが、Z N R F 3 / R N F 4 3 に対する R - スポンジンの結合親和性と同等またはそれ以上の結合親和性を有する。

【 0 0 9 5 】

特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンポリペプチド（例えば、ヒト R - スポンジン）のフリンドメイン 1、またはその機能的断片もしくはバリエーションと、R - スポンジンポリペプチドの修飾もしくはバリエーションフリンドメイン 2 とを含み、ここで、修飾フリンドメイン 2 は、対応する野生型フリンドメイン 2 と比較して、L G R 4 ~ 6 への結合親和性が低い（図 5 ~ 7 参照）。特定の実施形態において、フリンドメイン 2 は、例えば、ヒト R - スポンジン 2 の F 1 0 5 および / または F 1 0 9 に対応するアミノ酸残基に、1 つ以上の点変異を含む。当業者は、それらのアミノ酸配列をヒト R - スポンジン 2 と比較することによって、他の R - スポンジンポリペプチド中の対応するアミノ酸残基を容易に決定することができる。特定の実施形態において、作用ドメインは、フリンドメイン 1 またはそのバリエーションおよびフリンドメイン 2 またはそのバリエーションを含み、ここでフリンドメイン 1 および / またはフリンドメイン 2 は 1 つ以上の点変異を含む。（対応する野生型 R - スポンジン配列と比較した）作用ドメイン内の 1 つ以上の点変異は、例えば、アミノ酸残基 K 5 8、H 7 6、S 7 7、R 8 6、N 9 1、F 1 0 5、F 1 0 9、または K 1 2 1、および L G R 4 - 6 への結合親和性を低下させるために修飾することができる他の残基を含むがこれらに限定されないフリンドメイン 1 および / またはフリンドメイン 2 内の任意のアミノ酸残基で起こり得る。その機能活性にとって重要であるヒト R - スポンジン 1 のフリンドメイン 1 およびフリンドメイン 2 の領域が同定されており、これには、保存された親水性残基 S 4 8、N 5 1、R 6 6、R 7 0 および Q 7 1、ならびに E 3 リガーゼへの結合に重要であるあまり保存されていない疎水性残基 L 4 6、L 5 4、I 6 2 および L 6 4 が含まれ、これらは E 3 リガーゼへの結合にとって重要である。。さらに、ヒト R - スポンジン 1 フリンドメイン 1 において、アミノ酸残基 K 5 9、S 7 8、D 8 5、R 8 7、N 8 8 および N 9 2 は、L G R 5 と親水性相互作用表面を形成し、F S H N F アミノ酸配列は、疎水性表面のために重要なループとして同定されている。特定の実施形態では、R - スポンジンフリンドメイン 1 および / またはフリンドメイン 2 を含む作用

10

20

30

40

50

ドメインは、これらの領域、表面またはアミノ酸残基のいずれか内に1つ以上の変異を含み得る。特定の実施形態では、R - スポンジンフリンドメイン1および/またはフリンドメイン2を含む作用ドメインは、結合表面の構造および/または安定性に影響を及ぼすことによってLGR4 ~ 6結合を間接的に損なう、これらの領域、表面またはアミノ酸残基を超える1つ以上の変異または他の変化を含み得る。特定の実施形態において、R - スポンジンフリンドメイン1および/またはフリンドメイン2を含む作用ドメインは、添付の実施例に示されるもののうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、任意のアミノ酸残基に1つ以上の変異を含み得る。特定の実施形態では、修飾フリンドメイン2は、例えば全長R - スポンジタンパク質の文脈において、対応する野生型フリンドメイン2の結合の80%未満、50%未満、20%未満、または10%未満のLGR4 ~ 6への結合親和性を有する。

10

#### 【0096】

特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンポリペプチド（例えば、ヒトR - スポンジン）のフリンドメイン1、またはその機能的断片もしくはバリエーション、およびR - スポンジンポリペプチド（例えば、ヒトR - スポンジン）の未修飾フリンドメイン2を含む。特定の実施形態では、対応する野生型フリンドメイン2と比較してLGR4 - 6への結合親和性が低い修飾フリンドメイン2は、組織標的化の特異性を高めるためにより望ましいが、特定の実施形態では、非修飾フリンドメイン2を組み合わせる。標的ドメインを用いると、標的ドメインを用いずに野生型R - スポンジンよりも組織ターゲティングが改善され、特定の状況において有用性を有する。

20

#### 【0097】

特定の実施形態において、作用ドメインは、例えばR - スポンジン - 1、- 2、- 3、- 4のいずれかに由来する野生型または修飾型のR - スポンジンフリンドメイン1、場合によりヒトR - スポンジン - 1、- 2、- 3または- 4を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、R - スポンジンフリンドメイン1および野生型または修飾型R - スポンジンフリンドメイン2ドメイン、例えば、R - スポンジン - 1、- 2、- 3、- 4のいずれかに由来する、場合によりヒトR - スポンジン - 1、- 2、- 3または- 4を含む。特定の実施形態では、作用ドメインは、第1のR - スポンジンフリンドメイン1および第2の野生型または修飾R - スポンジンフリンドメイン1ドメイン、例えば、R - スポンジン - 1、- 2、- 3、- 4のいずれかに由来する、場合によりヒトR - スポンジン - 1、- 2、- 3または- 4を含む。特定の実施形態では、修飾フリンドメイン2は、例えば全長R - スポンジタンパク質の文脈において、対応する野生型フリンドメイン2の結合と同等のLGR4 ~ 6への結合親和性、またはその80%未満、50%未満、20%未満、もしくは10%未満のLGR4 ~ 6への結合親和性を有する。

30

#### 【0098】

##### 標的ドメイン

特定の細胞型および特定の組織内の細胞は、細胞表面受容体などの1つ以上の細胞または組織特異的表面分子を含み得る（図2参照）。本明細書で使用される場合、1つ以上の他の細胞もしくは組織型、または任意の他の細胞もしくは組織型と比較して、より多くの分子が特定の細胞または組織型に存在する場合、分子は、細胞または組織特異的であると言われる。特定の実施形態では、より多い量は、1つ以上の他の細胞もしくは組織型、または任意の他の細胞もしくは組織型における量と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、または少なくとも100倍である。特定の実施形態では、細胞特異的表面分子は、標的器官、組織または細胞型、例えば、1つ以上の他の非標的器官、組織または細胞型と比較したときに例えば、疾患または障害を治療または予防するためにWntシグナル伝達を増強することが望ましい器官、組織または細胞型で発現が増加または増強している。特定の実施形態では、細胞特異的表面分子は、それぞれ1つ以上の他の器官、組織または細胞型と比較して、標的器官、組織または細胞型の表面に優先的に発現される。例えば、特定の実施形態では、細胞表面受容体は、それが1つ以上、5つ以上、他の全ての器官、組織もしくは細胞、またはそれ

40

50

それ他の全ての器官、組織もしくは細胞の平均で発現されるよりも、標的器官、組織または細胞において、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍高いレベルで発現されている場合、組織特異的または細胞特異的細胞表面分子であると見なされる。特定の実施形態では、組織特異的または細胞特異的細胞表面分子は、細胞表面受容体、例えば、細胞表面膜内に位置する領域と標的ドメインが結合することができる細胞外領域とを含むポリペプチド受容体である。様々な実施形態では、本明細書に記載の方法は、標的組織または標的組織を含む組織のサブセット上でのみ発現される細胞表面分子を特異的に標的化することによって、または全ての、ほとんどの、またはかなりの数の他の組織と比較した場合に標的組織上でより高いレベルの発現を有する、例えば、少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、または少なくとも20の他の組織よりも標的組織における発現がより高い細胞表面分子を特異的に標的化することによって実施され得る。

10

#### 【0099】

特定の態様において、標的ドメインは、目的の標的細胞または組織型、すなわちWntシグナル伝達活性を増強または増加させることが望まれる細胞型または組織型で発現される組織特異的の表面分子に結合する。各組織特異的の表面分子に結合する標的ドメインは、抗体またはその抗原結合断片、ペプチド、組織特異的もしくは細胞特異的受容体の天然リガンド、またはそれらの誘導体、および合成小分子などであり得るが、これらに限定されない。

20

#### 【0100】

標的ドメインによって結合された標的組織は、任意の組織、例えば任意の哺乳動物組織または細胞型であり得る。特定の実施形態では、標的組織は任意の臓器に存在し得る。特定の実施形態では、標的組織は、骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛および前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、角膜組織、心臓組織または肺組織であり、標的ドメインは、それぞれ骨組織、肝臓組織、皮膚組織、胃組織、腸組織、口腔粘膜組織、腎臓組織、中枢神経系組織、乳腺組織、味蕾組織、卵巣組織、内耳組織（蝸牛および前庭組織を含む）、毛包、膵臓組織、網膜組織、角膜組織、心臓組織または肺組織に優先的に発現する組織特異的細胞表面分子（例えば、細胞表面受容体）に結合する。

30

#### 【0101】

標的ドメインは、任意の細胞型、例えば、限定されるものではないがヒトなどの哺乳動物を含む任意の組織、器官または動物内の任意の細胞に結合することができる。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は特定の細胞型、例えば標的組織に関連する特定の細胞型に結合する。例えば、肝臓組織において、標的ドメインは、肝細胞、肝細胞の前駆体および幹細胞、胆道細胞、および/または内皮細胞もしくは他の血管細胞に結合し得る。例えば、骨組織において、標的ドメインは、骨芽細胞、骨芽細胞の前駆体、間葉系幹細胞、幹細胞および骨、軟骨および/または骨組織中に存在する他の細胞を生じる前駆細胞に結合し得る。本明細書に記載の組織を含むがこれらに限定されない様々な組織に存在する細胞型は当技術分野において既知であり、様々な実施形態において、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子はそれらのいずれとも結合し得る。

40

#### 【0102】

様々な実施形態において、組織特異的の表面分子は組織特異的細胞表面受容体である。肝臓の場合、これらには、ASGR1、ASGR2、TFR2、SLC10A1などが含まれるが、これらに限定されるわけではない。特定の実施形態では、標的ドメインは天然リガンド、またはその機能的バリエーション体もしくは断片、または抗体もしくはその抗原結合断片である。それらは、ASGR1、ASGR2、TFR2、SLC10A1、LYPD3、またはDSG3に結合する。骨または腎臓の場合、そのような組織特異的細胞表面受容体には、副甲状腺ホルモン受容体1（PTH1R）などが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、標的ドメインは、PTH1Rに結合する、天然リガンド、

50

またはその機能的バリエーションもしくは断片、あるいは抗体またはその抗原結合断片である。口腔粘膜については、そのような組織特異的細胞表面受容体には、LYPD 3およびDSG 3が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、標的ドメインは、LYPD 3またはDSG 3に結合する天然のリガンド、またはその機能的バリエーションもしくは断片、あるいは抗体もしくはその抗原結合断片である。

#### 【0103】

アジア糖タンパク質受容体(ASGPR)は、ASGR1およびASGR2からなる(例えば、Stockert、MorellおよびAshwell、1991、Targeted Diagnostics and Therapy 4:41-64によって概説されている)。この受容体は、露出した末端ガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミン残基を有する糖タンパク質のエンドサイトーシスおよびリソソーム分解を媒介することによって血清糖タンパク質恒常性において重要な役割を果たす膜貫通タンパク質である。したがって、ASGPRの天然および合成リガンドには、ガラクトシル化コリンエステラーゼ、ガラクトース(Gal)およびN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、GalNAc終結糖タンパク質などのGalNAc含有分子、ならびに単糖類、オリゴ糖類、または多糖類含有分子またはナノ粒子が含まれるがこれらに限定されない(例えば、D'Souza and Devarajan 2015, Journal of Controlled Release, 203:126-139によって概説されている)。

#### 【0104】

SLC10ファミリーは、胆汁酸、硫酸化溶質、およびその他の生体異物をナトリウム依存的に輸送する。設立メンバーであるSLC10A1(NTCP)とSLC10A2(ASBT)は、胆汁酸の腸肝循環を維持するように機能する。SLC10Aの天然および合成リガンドの例には、コール酸、Na(+)/胆汁酸、Na(+)/タウロコール酸、およびB型肝炎ウイルスのpreS1ドメインならびにそれらの断片またはバリエーションが含まれるが、これらに限定されない(例えば、Yan et al., 2012 eLife, 1:e00049に報告されている)。

#### 【0105】

トランスフェリン受容体2(TFR2)は、トランスフェリン受容体1(TFR1)、二量体トランスフェリン(Fe<sub>2</sub>TF)の受容体媒介エンドサイトーシスを介して鉄を細胞に送達するタンパク質の相同体である。TFR2もFe<sub>2</sub>TFに結合するが、それは主に全身性鉄恒常性の調節において機能すると思われる(例えば、Worthen and Enns, 2014, Frontiers in Pharmacology 5:34によって概説されている)。TFR2の天然および合成リガンドならびに結合パートナーの例には、二量体トランスフェリンなどのトランスフェリン、ならびにヘモクロマトーシス(HFE)タンパク質ならびにそれらの断片およびバリエーションが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0106】

副甲状腺ホルモン(PTH)およびPTH関連ペプチド(PTHrP)の1型受容体(PTH1R)は骨および腎臓において高度に発現される(例えば、Mannstadt, Juppner, and Gardella, 1999, American Journal of Physiology 277:F665-F675により概説されている)。副甲状腺ホルモン受容体1(PTH1R)の天然および合成リガンドには、PTH、PTHrP、ならびにそれらの断片およびバリエーションが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0107】

LY6 / PLAURドメイン含有タンパク質3(LYPD3)は、口腔粘膜、皮膚、食道などの組織に見られる重層扁平上皮において高度に特異的な発現を示すGPIアンカー型タンパク質である。LYPD3発現はまた、創傷治癒中の移動性ケラチノサイトおよび様々な癌において上方制御されることが見られた(例えば、Jacobsen, Kriegerbaum, Santoni-RugiuおよびPloug, 2014, World Journal of Clinical Oncology, 5(4):621-32

10

20

30

40

50

に概説される)。LYPD3発現が報告されているにもかかわらず、LYPD3遺伝子を欠く動物は生存可能で、繁殖力があり、扁平上皮の発生に明らかな欠陥がないので、その正確な機能は不明のままである。様々な分子がLYPD3の結合パートナーとして同定されている。ラミニン1、ラミニン5、およびガレクチン-3はLYPD3と会合して細胞遊走を促進する(Paret、Bourouba、Beer、Miyazaki、Schmolzer、FiedlerおよびZoller、International Journal of Cancer、2005 Jul 10; 115(5): 724-33)。前方勾配2、AGR2は、LYPD3と相互作用し、膵管腺癌(PDAC)における癌の増殖、転移および治療に対する抵抗性を促進する(Arumugam、Deng、Boover、Wang、LogsdonおよびRamachandran、Molecular Cancer Therapeutics、2015 Apr; 14(4): 941-51)。低酸素条件下では、LYPD3は64インテグリンおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ14(MMP14)と複合体を形成し、これは限局性ラミニン332分解を通して癌細胞の運動性を促進する。(Ngora、Galli、Miyazaki and Zoller、Neoplasia、2012 Feb; 14(2): 95-107)。

#### 【0108】

デスモグレイン3(DSG3)は、タンパク質のカドヘリン細胞接着分子スーパーファミリーのメンバーであるカルシウム結合膜貫通糖タンパク質をコードしている。DSG3は、上皮および粘膜においてデスモソーム、細胞間接着のための特別な構造で発現される。DSG3は、DSG3細胞間相互作用に必要とされるCa<sup>2+</sup>結合部位を含む5つの細胞外カドヘリンドメイン(ECD)を有する(例えば、Thomason、Scothern、McHargおよびGarrod、2010、Biochemical Journal、429(3): 419-433によって概説される)。DSG3細胞間相互作用は、それらのN末端付近のトランス同種親和性相互作用によって媒介される。動物におけるDSG3の喪失は、口腔粘膜の非常に深刻な侵食および離乳時の脱毛を引き起こし、これらの組織における上皮細胞の完全性にとってこの遺伝子がいかに重要であることを示している。単分子原子間力顕微鏡実験は、細胞外カドヘリンドメインを介した同種親和性トランスDSG3結合を示した(Heupel、Zillikens、Drenckhahn and Waschke、Journal of Immunology、August 1, 2008, 181(3) 1825-1834)。

#### 【0109】

組織特異的Wntシグナル増強分子の例示的で非限定的な例には、1) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびASGR1またはASGR2に特異的に結合する抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質; 2) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびSLC10A1に特異的に結合する抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質; 3) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびTFR2に特異的に結合する抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質; 4) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびPTH1Rに特異的に結合するリガンド誘導体、抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質; 5) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびLYPD3に特異的に結合するリガンド誘導体、抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質; 6) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびDSG3に特異的に結合するリガンド誘導体、抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質; および7) R-スポンジンフリンドメイン1またはそのバリエーションを含む第1ドメイン、およびTFR1に特異的に結合するリガンド誘導体、抗体またはその断片を含む第2ドメインを含む融合タンパク質が含まれる。特定の実施形態では、2つのドメインはリンカー、例えばポリペプチドリンカーを介して結合している。特定の実施形態では、リンカー

10

20

30

40

50

はアルブミン、例えばヒト血清アルブミンであり、標的化ドメインおよび作用ドメインはアルブミンのN末端およびC末端にある。特定の実施形態において、組織特異的Wntシグナル増強分子は、抗体重鎖および抗体重鎖（またはいずれかもしくは両方の鎖のその断片もしくはバリエーション）を含む付加抗体（例えば、IgG）フォーマットを有する。1つ以上のさらなる結合ドメインをさらに含む。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子は付加抗体（例えばIgG）フォーマットを有し、第2のドメインは抗体重鎖および抗体軽鎖（またはそのいずれかもしくは両方の鎖の断片もしくはバリエーション）を含み、R-スポンジドメイン1またはバリエーションを含む第1ドメインは、抗体重鎖および/または軽鎖の一方または両方に、例えば、いずれかまたは両方の鎖のN末端および/またはC末端のいずれかまたは両方に付加される。特定の実施形態では、第1のドメインは、例えばN末端またはC末端のいずれかで重鎖に付加または融合されている。特定の実施形態では、第1のドメインは、例えばN末端またはC末端のいずれかで軽鎖に付加または融合されている。

10

#### 【0110】

##### リンカー

特定の実施形態では、標的ドメインおよび作用ドメインは互いに直接結合または融合しているが、他の実施形態では、それらはリンカー、例えばポリペプチドリンカー、または非ペプチジルリンカーなどで隔てられている。例えば、リンカーはFcリンカー、例えば、例えば1つ以上のジスルフィド結合を介して他のFcリンカーと二量体化することができる抗体Fcドメインの領域である。別の特定の実施形態では、リンカーはアルブミン、例えばヒト血清アルブミンであり、ここで標的ドメインおよび作用ドメインはアルブミンのN末端およびC末端にある。

20

#### 【0111】

特定の実施形態において、特に2つのポリペプチドを結合するとき、リンカーはペプチド結合によって互いに結合したアミノ酸からなる。特定の実施形態では、リンカーは、長さが1から約40までのアミノ酸残基、1から約20までのアミノ酸残基、または1から約10までのアミノ酸残基を含む。特定の実施形態では、リンカー中のアミノ酸残基は、20個の標準アミノ酸の中からであり、特定の実施形態では、システイン、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、および/またはセリンから選択される。特定の実施形態では、リンカーは1つ以上の非天然アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、ペプチジルリンカーは、ペプチド結合によって結合されたグリシン、セリン、およびアラニンなどの立体障害のない大多数のアミノ酸から構成される。特定のリンカーには、ポリグリシン、ポリセリン、およびポリアラニン、あるいはこれらのいずれかの組み合わせが含まれる。いくつかの例示的なペプチジルリンカーは、ポリ(Gly)1-8（配列番号159~163、特に(Gly)3、(Gly)4（配列番号159）、(Gly)5（配列番号160））である。および(Gly)7（配列番号162）、ならびにポリ(Gly)4-Ser（配列番号164）、ポリ(Gly-Ala)2-4（配列番号165~167）、およびポリ(Ala)1-8（配列番号168~172）。ペプチジルリンカーの他の具体例には、(Gly)5-Lys（配列番号173）、および(Gly)5-Lys-Arg（配列番号174）が含まれる。上記の命名法を説明するために、例えば、(Gly)3-Lys(Gly)4（配列番号175）は、Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号175）を意味する。GlyとAlaの他の組み合わせもまた有用である。さらに、ペプチジルリンカーは、式-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-の6炭素脂肪族分子などの非ペプチジルセグメントも含み得る。ペプチジルリンカーは、本明細書に記載のように誘導体を形成するように改変することができる。

30

40

#### 【0112】

例示的な非ペプチジルリンカーとしては、例えば、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-C(O)-（式中、s=2~20）のようなアルキルリンカーが挙げられる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル（例えば、C1~C6）低級アシル、ハロゲン（例えば、

50

C1、Br)、CN、NH<sub>2</sub>、フェニルなどのような任意の非立体障害基によってさらに置換されていてもよい。非ペプチドリンカーまたは非ペプチド半減期延長部分などの本発明の組成物は、従来の有機化学反応によって合成することができる。結合ドメインを連結するのに使用される化学基には、当技術分野において既知のように、カルバメート；アミド（アミン＋カルボン酸）；エステル（アルコール＋カルボン酸）、チオエーテル（ハロアルカン＋スルフヒドリル；マレイミド＋スルフヒドリル）、シッフ塩基（アミン＋アルデヒド）、尿素（アミン＋イソシアネート）、チオ尿素（アミン＋イソチオシアネート）、スルホンアミド（アミン＋塩化スルホニル）、ジスルフィド；ヒドラゾン、脂質などが含まれる。

#### 【0113】

ドメイン間の連結は、直鎖状または分岐状、通常は直鎖状であり得、1つ以上の不飽和結合を含み得る、スペーサー、例えばアルキルスペーサーを含み得、通常は、1～約300個の炭素原子を有し、さらに通常は、約1～25個の炭素原子を有し、約3～12個の炭素原子であり得る。この種のスペーサーはまた、アミン、エーテル、ホスホジエステルなどを含むヘテロ原子または官能基を含み得る。対象となる具体的な構造は次の通りである： $(CH_2CH_2O)_n$ 、ここでnは1～約12であり、 $(CH_2CH_2NH)_n$ 、ここでnは1～約12であり、 $[(CH_2)_n(C=O)NH(CH_2)_m]_z$ 、ここでnおよびmは1～約6であり、zは1～約10であり、 $[(CH_2)_nOPO_3(CH_2)_m]_z$  式中、nおよびmは1～約6であり、zは1～約10である。そのようなリンカーは、直鎖状または分岐状であり得るポリエチレングリコールを含み得る。

#### 【0114】

特定の実施形態では、ドメインは、ホモまたはヘテロ二官能性リンカーを介して結合されてもよい。例示的な同一性には以下が含まれる：アジドベンゾイルヒドラジド、N-[4-(p-アジドサリチルアミノ)ブチル]-3'-[2'-ピリジルジチオ]プロピオンアミド)、ビス-スルホスクシンイミジルスベレート、ジメチルアジピミデート、ジスクシンイミジルタートレート、N-マレイミドブチリルオキシスクシンイミドヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート、N-スクシンイミジル[4-アジドフェニル]-1,3'-ジチオプロピオネート、N-スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート、グルタルアルデヒド、NHS-PEG-MAL；スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート；3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPDP)；N、N'-(1,3-フェニレン)ビスマレイミド；N、N'-エチレン-ビス-(ヨードアセトアミド)；4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)；m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、およびMBSの延長鎖類似体であるスクシンイミド4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)。特定の実施形態では、これらの架橋剤のスクシンイミジル基は第一級アミンと反応し、チオール反応性マレイミドはシステイン残基のチオールと共有結合を形成する。

#### 【0115】

有用な他の試薬には以下が含まれる：ビスマレイミドヘキサン(「BMH」)を含むホモ二官能性架橋試薬；p、p'-ジフルオロ-m、m'-ジニトロジフェニルスルホン(アミノ基およびフェノール基と不可逆的な架橋を形成する)；アジピン酸ジメチル(アミノ基に特異的)；フェノール-1,4-ジスルホニルクロリド(これは主にアミノ基と反応する)；ヘキサメチレンジイソシアネートもしくはジイソチオシアネート、またはアゾフェニル-p-ジイソシアネート(これは主にアミノ基と反応する)；ジジアゾベンジジン(これは主にチロシンおよびヒスチジンと反応する)；O-ベンゾトリアゾリルオキシテトラメチルアンモニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)、ジシクロヘキシルカルボジイミド、プロモ-トリス(ピロリジノ)ホスホニウムプロマイド(PyBroP)；N、N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)；4-ピロリジノピリジン；N-ヒドロキシベンゾトリアゾールなど。



## 【0116】

Wnt分子、ノリン分子、およびWntシグナル増強分子

本開示はさらに、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、およびWntシグナル伝達アゴニスト分子、ならびにWntシグナル伝達を増強し、本明細書中に記載されるものを含むWnt関連疾患または障害を治療または予防するためのそれらの使用に関する。特定の実施形態において、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドおよびWntシグナル伝達アゴニスト分子は、単独でまたは本明細書に記載の1つ以上の組織特異的Wntシグナル増強分子と組み合わせて対象に提供される。

## 【0117】

WntポリペプチドおよびWntをコードするポリヌクレオチド配列は当技術分野において既知であり、哺乳動物Wntポリペプチドおよびポリヌクレオチド、例えばヒトWntポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含むあらゆる種類のものを含むあらゆるすべてのWntポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。例示的なWntポリペプチドには、Wnt1、Wnt2、Wnt2B、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt9A、Wnt9B、Wnt10A、Wnt10B、Wnt11およびWnt16、ならびに上記のいずれかの機能的バリエーションおよび断片が含まれる。Wntポリペプチドは、天然のWntポリペプチド、Wntポリペプチドバリエーション、Wntポリペプチド断片およびキメラWntポリペプチドを包含する。特定の実施形態では、Wntポリペプチドは天然のヒト全長成熟Wntタンパク質である。

## 【0118】

例えば、本出願において目的のヒト天然配列Wntタンパク質としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。Wnt1 (GenBank登録番号NM\_005430); Wnt-2 (GenBank登録番号NM\_003391); Wnt2B (Wnt-13) (GenBank登録番号NM\_004185 (アイソフォーム1)、NM\_024494.2 (アイソフォーム2))、Wnt3 (参照配列: NM\_030753)、Wnt3A (GenBankアクセッション番号NM\_033131)、Wnt4 (GenBankアクセッション番号NM\_030761)、Wnt5A (GenBankアクセッション番号NM\_003392)、Wnt5B (GenBankアクセッション番号NM\_032642)、Wnt6 (GenBankアクセッション番号NM\_032642) GenBankアクセッション番号NM\_004625)、Wnt7B (GenBankアクセッション番号NM\_058238)、Wnt8A (GenBankアクセッション番号NM\_058244)、Wnt8B (GenBankアクセッション番号NM\_003393)、Wnt9A (Wnt-14) (GenBankアクセッション番号NM\_003395) Wnt15) (GenBankアクセッション番号NM\_003396)、Wnt10A (GenBankアクセッション番号NM\_025216)、Wnt10B (GenBankアクセッション番号NM\_003394)、Wnt11 (GenBankアクセッション番号NM\_004626)、Wnt16 (GenBankアクセッション番号NM\_016087)。各メンバーはファミリーと様々な程度の配列同一性を有するが、その全てが、その間隔が高度に保存されている23~24の保存されたシステイン残基を含む、小さい(すなわち39~46kD)、アシル化、パルミトイル化、分泌糖タンパク質をコードする(McMahon、Apet al)、Trends Genet. 1992; 8: 236~242; Miller、J. R. Genome Biol. 2002; 3(1): 3001.1~3001.15)。関心のある他の天然配列Wntポリペプチドは、家畜および家畜動物を含む任意の哺乳動物、ならびにイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ、ラットなどの動物または実験動物またはペット動物由来の上記のオルソログを含む。マウス、カエル、シマウマ、ミバエ、ワームなど

## 【0119】

ノリンポリペプチドおよびノリンコードポリヌクレオチド配列もまた当該分野で既知で

10

20

30

40

50

あり、哺乳動物ノリンポリペプチドおよびポリヌクレオチド、例えばヒトノリンポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびにそれらの機能的バリエーションおよび断片を含むあらゆる種類のノリンポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

#### 【0120】

Wntシグナル伝達アゴニスト分子は、Wntシグナル伝達を刺激する任意の種類の分子を含む。特定の実施形態では、Wntシグナル伝達アゴニスト分子は、PCT特許出願公開第WO 2016/040895号に記載されている。Wntシグナル伝達アゴニストは、1つ以上のFzdタンパク質およびLrp5/6への結合を介して標準的なWntシグナル伝達を直接活性化する、特定の実施形態では水溶性の任意の分子、例えばタンパク質または医薬（例えば小有機分子）であり得る。特定の実施形態では、それらは小分子であり、これは約15 kDa未満であり得る。他の実施形態では、それらはポリペプチドである。さらに、特定のWntシグナル伝達アゴニストは、ポリペプチド領域またはドメインと非ポリペプチド領域またはドメインの両方を含み得る。

10

#### 【0121】

本発明のいくつかの実施形態では、Wntシグナル伝達アゴニスト分子はポリペプチドであり、これはFzdおよびLrp5/6のための別々のまたは連続した結合ドメインまたは要素を含むことができる。ポリペプチドWntシグナル伝達アゴニストは、単鎖、二量体、またはより高次の多量体であり得る。Fzd結合ドメイン/要素およびLrp5/6結合ドメイン/要素は直接結合されていてもよく、またはリンカー、例えばポリペプチドリリンカー、または非ペプチドリリンカーなどによって分離されていてもよい。

20

#### 【0122】

ポリペプチドの実施形態では、Fzd結合ドメインは、高親和性、例えば、少なくとも約 $1 \times 10^{-7}$  M、少なくとも約 $1 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約 $1 \times 10^{-9}$  M、または少なくとも約 $1 \times 10^{-10}$  MのKDでFzdに結合する任意のドメインから選択され得る。適切なFzd結合ドメインには、限定されないが、新規に設計されたFzd結合タンパク質、1つ以上のFzdタンパク質に特異的に結合する抗体由来結合タンパク質、例えば、scFv、Fabなど、および抗体の他の部分、ナノボディ由来結合ドメイン。ノッチンベースの人工足場、ノリンおよびそれに由来する操作された結合断片、天然に存在するFzd結合ドメインなどが含まれる。

#### 【0123】

いくつかの実施形態では、Fzd結合ドメインは、1、2、3、4、5、またはそれ以上の異なるフリズルドタンパク質、例えば1つ以上のヒトフリズルドタンパク質Fz1、Fz2、Fz3、Fz4、Fz5、Fz6、Fz7、Fz8、Fz9、Fz10に結合する。いくつかの実施形態では、抗体に基づくシグナル伝達アゴニストは、Fz1、Fz2、Fz5、Fz7およびFz8に結合する。他の実施形態では、フリズルド結合部分は、1つ以上の目的のフリズルドタンパク質に対して選択的であり、例えば、他のフリズルドタンパク質に比べて少なくとも10倍、25倍、50倍、100倍、200倍以上の1つ以上の所望のフリズルドタンパク質に対して特異性を有する。

30

#### 【0124】

特定の実施形態では、フリズルド結合ドメインは、汎特異的フリズルド抗体OMP-18R5（ヴァンティクマブ）の6つのCDR領域を含む。特定の実施形態では、フリズルド結合ドメインは、汎特異的フリズルド抗体OMP-18R5（ヴァンティクマブ）の6つのCDR領域を含むscFvである。例えば、参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第8507442号を参照されたい。例えば、OMP-18R5のCDR配列は、GFTTFSHYTLSを含む重鎖CDR1（配列番号176）、VISGDGSYTTYADSVKGVを含む重鎖CDR2（配列番号177）、およびNFIKYVFANを含む重鎖CDR3（配列番号178）を含み、(ii)SGDKLGKKYAS（配列番号179）またはSGDNI GSFYVH（配列番号180）を含む軽鎖CDR2、EKDNRPSG（配列番号181）またはDKSNRPSG（配列番号182）を含む軽鎖CDR2、およびSSFAGNSLE（配列番号183）またはQSYANTLS

40

50

L (配列番号 184) を含む軽鎖 CDR3 を含む。特定の実施形態では、フリズルド結合ドメインは、限定されないが、ScFv、ミニボディ、ナノボディ、および配列番号 176 ~ 184 の CDR 配列を含む様々な抗体模倣物を含む、抗体またはその誘導体である。特定の実施形態では、これらの CDR 配列は、配列番号 176 ~ 184 と比較して 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む。

#### 【0125】

他の態様において、Fzd 結合ドメインは、当技術分野において既知であり市販されているか、または新規に生成することができる、任意の多数のフリズルド特異的抗体由来の可変領域配列またはその CDR を含む。フリズルドポリペプチドのいずれも、免疫原として、または抗体を開発するためのスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。「Fz」、「Fz タンパク質」および「Fz 受容体」は、Frizzled 受容体ファミリーのタンパク質を指すために本明細書で使用される。これらのタンパク質は、CRD ドメインを含む 7 回膜貫通型タンパク質である (Ingham, P. W. (1996) Trends Genet. 12: 382 - 384; Yang - Snyder, J. et al. (1996) Curr. Biol. 6: 1302 - 1306; Bhanot, P. et al. (1996) Nature 382: 225 - 230)。Fz ファミリーには 10 の既知のメンバー (Fz1 から Fz10) があり、そのうちのどれでも Wnt のレセプターとして機能することができる。ヒト frizzled 参照配列の Genbank 登録番号は以下の通りである: FZD1 (NM\_003505)、FZD2 (NM\_001466)、FZD3 (NM\_145866)、FZD4 (NM\_012193)、FZD5 (NM\_003468)、FZD6 (NM\_003506)、FZD7 (NM\_003507)、FZD8 (NM\_031866)、FZD9 (NM\_003508)、FZD10 (NM\_007197)。[0076] フリズルド結合ドメインの非限定的な例には、Biolegend から入手可能な抗体、例えば、ヒトフリズルド 4 に特異的なクローン CH3A4A7 (CD344)、ヒト Fz9 に特異的なクローン W3C4E11 (CD349)、Abeam から入手可能な抗体、例えば、Fz7 に特異的な ab64636、ヒト Fz4 に特異的な ab83042、ヒト Fz7 に特異的な ab77379、ヒト Fz8 に特異的な ab75235、ヒト Fz9 に特異的な ab102956 などが含まれる。適切な抗体の他の例は、とりわけ、米国特許出願第 20140105917 号、米国特許出願第 20130230521 号、米国特許出願第 20080267955 号、米国特許出願第 20080038272 号、米国特許出願第 20030044409 号に記載されている。

#### 【0126】

代用物のフリズルド結合部分は、Wnt タンパク質のフリズルド結合領域に対する構造的相同性について選択された人工タンパク質であり得る。そのようなタンパク質は、相同性について構造データベースをスクリーニングすることによって同定することができる。このようにして最初のタンパク質、例えば微生物の Bh1478 タンパク質が、同定された。次いで、天然タンパク質は、親和性を増大させるアミノ酸置換を提供するように操作され、所望のフリズルドタンパク質への結合における親和性および選択性の増大のための親和性成熟によってさらに選択され得る。フリズルド結合部分の非限定的な例には、PCT 特許出願公開第 2016/040895 号の図 1 に示されている Fz27 および Fz27-B12 タンパク質が含まれる。

#### 【0127】

特定のポリペプチドの実施形態では、Lrp5/6 結合ドメインまたはエレメントは、高親和性、例えば、少なくとも約  $1 \times 10^{-7}$  M、少なくとも約  $1 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $1 \times 10^{-9}$  M、少なくとも約  $1 \times 10^{-10}$  M の  $K_D$  で Lrp5/6 に結合する任意のドメインから選択され得る。適切な Lrp5/6 結合ドメインには、限定されないが、新規に設計された Lrp5/6 結合タンパク質、1 つ以上の Fzd タンパク質に特異的に結合する抗体由来結合タンパク質、例えば、scFv、Fab など、および抗体の他の部分、ナノボディ由来結合ドメイン、ノッチンベースの人工足場、ノリン、DKK1、DKK2

、DKK3、DKK4、スクレロスチンを含むが、これらに限定されない、天然に存在するLrp5/6結合タンパク質またはポリペプチドなどが含まれる。特定の実施形態では、Lrp5/6結合ドメインはDKK1のC末端部分である。

#### 【0128】

【0079】Lrp5/6結合ドメインは、例えば少なくとも約 $1 \times 10^{-7}$ M、少なくとも約 $1 \times 10^{-8}$ M、少なくとも約 $1 \times 10^{-9}$ M、少なくとも約 $1 \times 10^{-10}$ Mの $K_D$ を有する高親和性でLrp5またはLrp6に結合する任意のドメインから選択され得る。「LRP」、「LRPタンパク質」および「LRP受容体」は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質ファミリーのタンパク質を指すために本明細書中で使用される。これらの受容体は、受容体媒介エンドサイトーシスのプロセスにおいてリガンドと結合し、それを内在化させるシングルパス膜貫通タンパク質である。LRPタンパク質LRP5 (GenBank登録番号NM 002335.2)およびLRP6 (GenBank登録番号NM002336.2)は、Wnt受容体複合体に含まれる。

#### 【0129】

【0080】適切なLrp5/6結合ドメインには、限定されないが、新規に設計されたLrp5/6結合タンパク質、1つ以上のFzdタンパク質に特異的に結合する抗体由来結合タンパク質、例えば、scFv、Fabなど、および抗体の他の部分；；ナノボディ由来結合ドメイン；ノッチンベースの人工足場；DKK1、DKK2、DKK3、DKK4、スクレロスチンを含むが、これらに限定されない、天然に存在するLrp5/6；Wise；上記のいずれかを含む融合タンパク質；上記のいずれかの誘導體；上記のいずれかのバリエーション；ならびに上記のいずれかの生物学的に活性な断片などが含まれる。Lrp5/6結合ドメインは、結合を増強するために親和性選択され得る。

#### 【0130】

【0081】Dickkopf (Dkk) 遺伝子ファミリーのメンバー (Krupnik et al. (1999) Gene 238 (2): 301-13 参照) には、Dkk-1、Dkk-2、Dkk-3、およびDkk-4、ならびにDkk-3関連タンパク質Soggy (Sgy) が含まれる。hDkk1~4は、10個のシステイン残基の位置が家族間で高度に保存されている2つの異なるシステインリッチドメインを含む。ヒトDkk遺伝子およびタンパク質の例示的な配列は公的に入手可能であり、例えばGenbank登録番号NM\_014419 (soggy-1)、NM\_014420 (DKK4)、AF177394 (DKK-1)、AF177395 (DKK-2)、NM\_015881 (DKK3)、およびNM\_014421 (DKK2) である。本発明のいくつかの実施形態では、Lrp6結合部分は、ヒトDKK1のC末端ドメインを含むがこれに限定されないDKK1ペプチドである。図5に示すように、C末端ドメインは、配列KMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKTKHRRKGS HGLEIFQRC YCGEGLS CRIQKDHHQASNSRLHTCQRH (配列番号185) (Genbank登録番号 NP\_036374を参照のこと) またはその生物学的に活性な断片を含み得る。

#### 【0131】

【0082】DKKタンパク質のLRP5/6への結合は、例えば、Brott and Sokol Mol. Cell. Biol. 22 (17), 6100-6110 (2002)、およびLi et al. J. Biol. Chem. 277 (8), 5977-5981 (2002) に記載されており、それぞれ参照により本明細書に具体的に組み込まれる。ヒトDKK2の対応する領域 (Genbank参照番号NP\_055236) は、配列KMSHIK GHEGDPCLRSSDCIEGFCCARHFWTKICKPVQRKKGS HGLEIFQRCD CAKGLSCKVWKDATYSSKARLHVCKK (配列番号186) またはその生物学的に活性な断片) を含み得る。

#### 【0132】

【0083】Lrp5またはLrp6に特異的に結合する抗体は当該分野で既知であり市販されているか、または新規に生成することができる。Lrp5、Lrp6またはそ

10

20

30

40

50

これらの断片は、免疫原として、または抗体を開発するためのスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。既知の抗体の例としては、限定されないが、Gongら(2010) PLoS One. 5(9): e12682; Ettenbergら(2010) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 107(35): 15473~8; ヒト起源の合成LRP5/6に対して作製され、マウスおよびヒト起源のLRP6およびLRP5の全長およびタンパク質分解性断片の両方に結合する、Santa Cruzバイオテクノロジー抗体クローン1A12から市販されているもの; モノクローナル抗体2B11; LRP5(D80F2)に特異的なCell Signaling Technology抗体、カタログ番号5731等が挙げられる。

#### 【0133】

ポリペプチドおよび結合ドメインはまた、上記のポリペプチドの誘導体、バリエーション、および生物学的に活性な断片を含み得る。「バリエーション」ポリペプチドは、提供された配列と100%未満の配列同一性を有する、以下に定義されるような生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのようなバリエーションには、提供された配列と比較して、1つ以上のアミノ酸修飾、たとえば挿入、欠失または置換を含むポリペプチドを含み、たとえば1つ以上のアミノ酸残基がN末端またはC末端、またはその中に付加されるもの、ネイティブ配列; 約1~40個のアミノ酸残基が欠失され、場合により1個以上のアミノ酸残基により置換されるもの; および得られた生成物が天然に存在しないアミノ酸を有するようにアミノ酸残基が共有結合的に修飾されている、上記ポリペプチドの誘導体が挙げられる。特定の実施形態では、生物学的に活性なバリエーションは、天然配列ポリペプチドと少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するであろう。配列の「機能的バリエーション」は、初期配列と共通の定性的生物学的性質を有する化合物である。「機能的バリエーション」は、それらが共通の生物学的活性を有するという条件で、配列の断片および配列のバリエーションを含むが、これらに限定されない。用語「バリエーション」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションおよびその共有結合修飾の両方を包含する。

#### 【0134】

Fzd結合ドメインおよびLrp5/6結合ドメインは、1つの球状ドメイン内で隣接していてもよく、または本明細書に記載されるもののいずれかを含むがこれに限定されないポリペプチドリンカーなどのリンカーまたは非ペプチドリンカーなどによって分離されてもよい。リンカーの長さ、したがって結合ドメイン間の間隔は、シグナル強度を調節するために使用することができ、Wntシグナル伝達アゴニストの所望の用途に応じて選択することができる。結合ドメイン間の強制距離は変動し得るが、特定の実施形態では、約100オングストローム未満、約90オングストローム未満、約80オングストローム未満、約70オングストローム未満、約60オングストローム未満、または約50オングストローム未満であり得る。

#### 【0135】

いくつかの実施形態では、リンカーは剛性リンカーであり、他の実施形態では、リンカーは可撓性リンカーである。リンカーがペプチドリンカーである場合、特定の実施形態では、それは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30以上のアミノ酸長であり、結合ドメイン間の距離を強制するのに十分な長さおよびアミノ酸組成のものである。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のグリシンおよび/またはセリン残基を含むかまたはそれからなる。

#### 【0136】

本開示はまた、1つ以上のWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするポリヌクレオチドまたは核酸配列、ならびに発現ベクターを含むこれらのポリヌクレオチドを含むベクター、およびこれらのベクターを含む細胞を含む。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドまたは核酸配列はDNAまたはRNAである。特定の実施形態では、RNAはメッセンジャーRNA(mRNA)であ

10

20

30

40

50

る。特定の実施形態では、RNAは、1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む修飾mRNAである。1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む修飾mRNAは、安定性の向上、より高い発現レベルおよび免疫原性の低下を含む、未修飾mRNAを超える利点を有すると記載されている。本発明に従って使用され得る修飾mRNAの非限定的な例は、例えば、PCT特許出願公開第WO2011/130624号、同第WO2012/138453号、同第WO2013151666号、同第WO2013/071047号、同第WO2013/078199号、同第WO2012045075号、同第WO2014081507号、同第WO2014093924号、同第WO2014164253号、米国特許第8,278,036号(シュドウリジンを含む修飾mRNAを記載する)、同第8,691,966号(シュドウリジンおよび/またはN1-メチルプスドリジンを含む改変mRNAを記載する)、同第8,835,108号(5-メチルシチジンを含む修飾mRNAを記載する)、同第8,748,089号(シュドウリジンまたは1-メチルプスドリジンを含む修飾mRNAを記載する)に記載されている。特定の実施形態では、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする修飾mRNA配列は、非修飾A、G、UまたはCリボヌクレオシドと比較して少なくとも1つの修飾を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドには、N1-メチルプスドリジンおよび/または5-メチルシチジンが含まれる。特定の実施形態において、修飾mRNAは、5'末端キャップ配列と、それに続くWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする配列と、それに続くポリAまたはポリA-G配列などの3'テリング配列とを含む。

#### 【0137】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはベクター、例えば発現ベクターであり、発現ベクターはプロモーター配列、例えばプロモーターに作動可能に連結された本明細書に記載のWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む。細胞内でポリヌクレオチドの発現を駆動する配列。ある態様において、ベクターはウイルスベクター、例えば、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするDNAまたはRNA配列に作動可能に連結したプロモーターを含む発現カセットを含むポリヌクレオチドを含むウイルスである。特定の実施形態では、発現カセットは5'および/または3'の細胞性またはウイルス性UTRを含む。

#### 【0138】

本開示はまた、本明細書に記載のポリヌクレオチドと少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のポリヌクレオチド配列同一性を有するバリエーションを含む、本明細書に記載のポリヌクレオチドの機能的断片およびバリエーションを含む。そのようなバリエーションは、本明細書に開示されている任意の配列と比較して、1つ以上のヌクレオチドまたはヌクレオシド修飾、例えば1つ以上のヌクレオチド欠失、挿入または置換を含むことができる。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞中のコードされたポリペプチドの発現を増強するためにコドン最適化されている。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドバリエーションは1つ以上の修飾ヌクレオチドまたはヌクレオシドを含む。

#### 【0139】

本開示はまた、本明細書に記載のWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードするポリヌクレオチドまたはベクターを含む細胞を含む。特定の実施形態において、細胞は、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子を産生するために使用され得る、例えばHEK293細胞などの宿主細胞である。本組成物を調製する際には、例えば、哺乳動物細胞(例えば、293細胞)、昆虫細胞(例えば、SF9細胞)、微生物および酵母を含むがこれらに限定されない、任意の宿主細胞を用いることができる。特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載のWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナ

ル伝達アゴニスト分子で治療された対象に対して異種または自己由来である。特定の実施形態では、細胞は対象から得られ、本明細書に記載のウイルスベクターで形質導入された。特定の実施形態では、形質導入細胞は治療のために対象に送達される。本開示はまた、1つ以上のWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子、またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチド、またはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドまたはベクターを含む薬学的組成物を含む。

#### 【0140】

##### 薬学的組成物

本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子および1つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む薬学的組成物も開示されている。特定の実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に記載の1つ以上のWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をさらに含む。

#### 【0141】

さらなる実施形態では、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドおよび1つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む薬学的組成物も開示される。特定の実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に記載のWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドをさらに含む。

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAまたはmRNA、例えば修飾mRNAである。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列および/または3'テレーシング配列、例えばポリAテールをさらに含む修飾mRNAである。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、コード配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットである。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列およびWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列は同じポリヌクレオチド中に存在する。

#### 【0142】

さらなる実施形態では、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドおよび1つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む発現ベクター、例えばウイルスベクターを含む薬学的組成物もまた開示される。特定の実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に記載のWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、例えばウイルスベクターをさらに含む。組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする配列およびWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列は、同じポリヌクレオチド、例えば発現カセットに存在する。

#### 【0143】

本発明はさらに、本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞および1つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤を含む細胞を含む薬学的組成物を企図する特定の実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に記載のWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞をさらに含む。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列およびWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列は、同じポリヌクレオチド、例えば発現カセットおよび/または同じ細胞に存在する。特定の実施形態において、細胞は、治療されるべき対象から得られた異種細胞または自己細胞である。特定の実施形態では、細胞は幹細胞、例えば脂肪由来幹細胞または造血幹細胞である。

#### 【0144】

本開示は、第1の活性剤として組織特異的Wntシグナル増強分子を送達するための第1の分子と、第2の活性剤としてWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニストを送達するための第2の分子とを含む薬学的組成物を企図する。第1および第2の分子は、同じ種類の分子でも異なる種類の分子でもよい。例えば、特定の実施形態において、第1および第2の分子はそれぞれ、以下の種類の分子から独立して選択され得る：ポリペプチド、有機小分子、第1または第2の活性剤をコードする核酸（任意にDNAまたはmRNA、任意に修飾RNA）。第1または第2の活性剤をコードする核酸配列を含むベクター（任意で発現ベクターまたはウイルスベクター）、および第1または第2の活性剤をコードする核酸配列を含む（任意で発現カセット）細胞。

#### 【0145】

本分子は、単独でまたは組み合わせて、一般に安全、無毒、および望ましい製剤を調製するのに有用な医薬上許容される担体、希釈剤および試薬と組み合わせることができ、哺乳動物、例えばヒトに許容される賦形剤を含む。または霊長類、使用してください。そのような賦形剤は、固体、液体、半固体、またはエアロゾル組成物の場合には気体であり得る。そのような担体または希釈剤の例としては、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。補助的な活性化合物も製剤に組み入れることができる。製剤に使用される溶液または懸濁液は、注射用水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌化合物；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート化合物；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝液；凝集を防ぐためのTween 20などの洗剤；塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張化のための化合物を含み得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物は無菌である。

#### 【0146】

薬学的組成物は、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末をさらに含み得る。静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が含まれる。いくつかの場合において、組成物は無菌であり、容易な注射可能性が存在する程度まで流動性であるべきである。特定の実施形態では、それは製造および保存の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されている。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒径の維持により界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。内部組成物の長期吸収は、組成物中に吸収を遅らせる物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによってもたらしことができる。

#### 【0147】

滅菌溶液は、必要に応じて上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に適切な溶媒中に必要量の組織特異的Wntシグナル増強分子を組み入れ、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を、塩基性分散媒および上記に列挙したもののからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これは、その前に無菌濾過した溶液から活性成分に加えて任意の追加の所望成分を加えた粉末をもたらす。

10

20

30

40

50



## 【 0 1 4 8 】

一実施形態では、薬学的組成物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤など、融合タンパク質を身体からの急速な排除から保護する担体と共に調製される。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製方法は当業者に明らかであろう。材料は商業的に入手することもできる。リポソーム懸濁液も薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは当業者に知られている方法に従って調製することができる。

## 【 0 1 4 9 】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、薬学的組成物を投薬単位形態に処方することが有利であり得る。本明細書で使用される投与量単位形態は、治療される対象のための単位投与量として適した物理的に別々の単位を指す。各単位は、必要な薬学的担体と共に所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の投与単位形態の詳細は、活性化合物の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個々の治療のためのそのような活性化合物を調合する技術分野に固有の制限によって決定され、直接左右される。

10

## 【 0 1 5 0 】

薬学的組成物は、投与のための説明書と共に、容器、パック、またはディスペンサー、例えばシリンジ、例えばプレフィルドシリンジに含めることができる。

## 【 0 1 5 1 】

本発明の薬学的組成物は、任意の薬学的に許容される塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物への投与時に生物学的に活性な組織特異性を提供することができる任意の他の化合物を包含する。W n t シグナル増強分子。

20

## 【 0 1 5 2 】

本発明は、本明細書に記載の組織特異的W n t シグナル増強分子の薬学的に許容される塩を含む。「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明の化合物の生理学的および薬学的に許容される塩、すなわち親化合物の所望の生物学的活性を保持し、それに望ましくない毒性作用を与えない塩を指す。様々な薬学的に許容される塩が当該分野で既知であり、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第17版、Alfonso R. 例えば、「Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology」、第3版、James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007、およびJ. Pharm. Sci. 66:2 (1977)。また、適切な塩に関する総説については、Stahl and Wermuthによる「Handbook of Pharmaceutical Salts: 特性、選択、および使用」(Wiley-VCH, 2002年)を参照。

30

## 【 0 1 5 3 】

薬学的に許容される塩基付加塩は、アルカリ金属およびアルカリ土類金属または有機アミンなどの金属またはアミンを用いて形成される。カチオンとして使用される金属は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどを含む。アミンは、N - N' - ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N - メチルグルカミン、およびプロカインを含む(例えば、Bergerら、「Pharmaceutical Salts」、J. Pharm. Sci., 1977, 66, 119を参照のこと)。該酸性化合物の塩基付加塩は、従来の方法で遊離酸形態を十分量の所望の塩基と接触させて塩を生成することによって調製される。遊離酸形態は、塩形態を酸と接触させ、従来の方法で遊離酸を単離することによって再生することができる。遊離酸形態は、極性溶媒への溶解度などの特定の物理的性質においてそれらのそれぞれの塩形態といくらか異なるが、それ以外の点では、塩は本発明の目的のためのそれらのそれぞれの遊離酸と等価である。

40

## 【 0 1 5 4 】

50

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される薬学的組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤および/または賦形剤、例えば食塩水、リン酸緩衝食塩水、リン酸およびアミノ酸、ポリマー、ポリオール、糖、緩衝液、保存剤、および他のタンパク質と混合した、治療有効量の本明細書に記載の組織特異的Wntシグナル増強分子を含む。例示的なアミノ酸、ポリマーおよび糖などは、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール化合物、ポリエチレングリコールモノステアレート化合物、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、スクロース、フルクトース、デキストロース、マルトース、グルコース、マンニトール、デキストラン、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、キシリトール、ラクトース、トレハロース、ウシまたはヒト血清アルブミン、クエン酸塩、酢酸塩、リンゲル液およびハंक液、システイン、アルギニン、カルニチン、アラニン、グリシン、リジン、バリン、ロイシン、ポリビニルピロリドン、ポリエチレンおよびグリコールである。好ましくは、この製剤は4で少なくとも6ヶ月間安定である。

10

#### 【0155】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される薬学的組成物は、緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)またはリン酸ナトリウム/硫酸ナトリウム、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、滅菌水、および当業者に既知の他の緩衝液、例えばGood et al. (1966) Biochemistry 5: 467に記載されるものを含む。緩衝液のpHは、6.5~7.75、好ましくは7~7.5、最も好ましくは7.2~7.4の範囲であり得る。

#### 【0156】

20

細胞内のWnt活性を増加させるための方法

融合タンパク質に関して本明細書に例示される組織特異的Wntシグナル増強分子は、標的組織または細胞型におけるWntシグナル伝達を増加させるために使用され得る。特定の実施形態では、Wntシグナル伝達は標準Wntシグナル伝達である。したがって、いくつかの態様では、本発明は、標的組織または細胞におけるWnt増加またはWntシグナル伝達の増強方法であって、標的組織または細胞を有効量の本発明の組織特異的Wntシグナル増強分子と接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞上の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、接触はインビトロ、エクスピボ、またはインビボで起こり、例えば、対象の組織特異的Wntシグナル増強分子が対象に投与または提供される。特定の実施形態では、細胞は培養細胞であり、接触はインビトロで起こる。

30

#### 【0157】

特定の実施形態では、方法は、標的組織または細胞を、本明細書に記載の1つ以上のWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子とさらに接触させることを含む。本開示は、標的組織または細胞を、第1の活性剤としての組織特異的Wntシグナル増強分子の送達のための第1の分子および第2の活性剤としてのWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニストの送達のための第2の分子と接触させることを企図する。第1および第2の分子は、同じ種類の分子でも異なる種類の分子でもよい。例えば、特定の実施形態において、第1および第2の分子はそれぞれ、以下の種類の分子から独立して選択され得る：ポリペプチド、有機小分子、第1または第2の活性剤をコードする核酸(任意にDNAまたはmRNA、任意に修飾RNA)、第1または第2の活性剤をコードする核酸配列を含むベクター(任意で発現ベクターまたはウイルスベクター)、および第1または第2の活性剤をコードする核酸配列を含む(任意で発現カセット)細胞。

40

#### 【0158】

関連する態様において、本発明は、標的組織または細胞におけるWntシグナル伝達を増加させる方法であって、標的組織または細胞を、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のポリヌクレオチドと接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞上の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、標的組織または細胞はまた

50

、W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドと接触させる。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAまたはmRNA、例えば修飾mRNAである。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列および/または3'テレーリング配列、例えばポリAテールをさらに含む修飾mRNAである。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、コード配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットである。特定の実施形態では、組織特異的W n t シグナル増強分子をコードする核酸配列およびW n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列は同じポリヌクレオチド中に存在する。

【0159】

関連する態様において、本発明は、標的組織または細胞におけるW n t シグナル伝達を増加させる方法であって、標的組織または細胞を、組織特異的W n t シグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターと接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞上の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、標的組織または細胞はまた、W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含むベクターと接触させる。特定の実施形態では、ベクターは発現ベクターであり、核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含み得る。特定の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。特定の実施形態では、組織特異的W n t シグナル増強分子をコードする核酸配列およびW n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列は、同じベクター中、例えば同じ発現カセット中に存在する。

【0160】

関連する態様において、本発明は、標的組織におけるW n t シグナル伝達を増加させる方法であって、標的組織を、本発明の組織特異的W n t シグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量の細胞と接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞上の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、標的組織はまた、W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む細胞と接触させる。特定の実施形態では、組織特異的W n t シグナル増強分子をコードする核酸配列と、W n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが同じ細胞中に存在する。特定の実施形態において、細胞は、治療されるべき対象から得られた異種細胞または自己細胞である。特定の実施形態において、細胞は、組織特異的W n t シグナル増強分子またはW n t ポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n t シグナル伝達アゴニスト分子をコードする発現カセットを含むベクターで形質導入された。特定の実施形態では、細胞は幹細胞、例えば脂肪由来幹細胞または造血幹細胞である。

【0161】

病気や障害を治療するための方法

本明細書中で融合タンパク質に関して例示される組織特異的W n t シグナル増強分子は、例えば標的細胞、組織または器官におけるW n t シグナル伝達を増加させることによって、疾患、障害または状態を処置するために使用され得る。したがって、いくつかの態様では、本発明は、それを必要とする対象における疾患または状態、例えばW n t シグナル伝達の低下に関連するか、またはW n t シグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または障害を治療するための方法であって、対象を有効量の本開示の組成物と接触させることを含み、方法を提供する。特定の実施形態では、組成物は、以下のいずれかを含む薬学的組成物である：組織特異的W n t シグナル増強分子、例えば、小分子またはポリペプチド；組織特異的W n t シグナル増強分子、例えばDNAまたはmRNA、必要に応じて修飾mRNAをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド；組織特異的W n t シグナル増強分子をコードする核酸配列を含むベクター；例えば発現ベクターまたはウ

イルスベクター；または組織特異的W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む細胞、例えば、組織特異的W n tシグナル増強分子をコードする発現ベクターまたはウイルスベクターで形質導入された細胞。特定の実施形態では、疾患または状態は病的な疾患または障害、または損傷、例えば創傷から生じる損傷である。特定の実施形態では、創傷は別の治療的処置の結果であり得る。特定の実施形態では、疾患または状態は、組織修復の障害、治癒または再生を含むか、または組織修復の増加、治癒または再生の恩恵を受けるであろう。いくつかの実施形態では、接触はインビボで起こる、すなわち、対象組成物は対象に投与される。

#### 【0162】

特定の実施形態では、方法は、本明細書に記載の1つ以上のW n tポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n tシグナル伝達アゴニスト分子を含む薬学的組成物と対象をさらに接触させることを含む。本開示は、第1の活性剤としての組織特異的W n tシグナル増強分子の送達のための第1の分子および第2の活性剤としてのW n tポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n tシグナル伝達アゴニストの送達のための第2の分子と対象との接触を企図する。第1および第2の分子は、同じ種類の分子でも異なる種類の分子でもよい。例えば、特定の実施形態において、第1および第2の分子はそれぞれ、以下の種類の分子から独立して選択され得る：ポリペプチド、有機小分子、第1または第2の活性剤をコードする核酸（任意にDNAまたはmRNA、任意に修飾RNA）、第1または第2の活性剤をコードする核酸配列を含むベクター（任意で発現ベクターまたはウイルスベクター）、および第1または第2の活性剤をコードする核酸配列を含む（任意で発現カセット）細胞。

#### 【0163】

関連する態様において、本発明は、疾患または状態、例えばW n tシグナル伝達の減少に関連するか、またはW n tシグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または障害を治療する方法であって、対象を、本発明の組織特異的W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む有効量の薬学的組成物と接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞上の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的な様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。ある態様において、対象はまた、W n tポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n tシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量のポリヌクレオチドを含む薬学的組成物と接触させられる。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAまたはmRNA、例えば修飾mRNAである。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列および/または3'テリング配列、例えばポリAテールをさらに含む修飾mRNAである。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、コード配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットである。特定の実施形態では、組織特異的W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列およびW n tポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n tシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列は同じポリヌクレオチド中に存在する。

#### 【0164】

関連する態様において、本発明は、疾患または状態、例えばW n tシグナル伝達の減少に関連するか、またはW n tシグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または障害を治療する方法であって、それを必要とする対象を、本発明の組織特異的W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量のベクターを含む薬学的組成物と接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞内の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的な様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、対象はまた、W n tポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n tシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量のベクターを含む薬学的組成物と接触させられる。特定の実施形態では、ベクターは発現ベクターであり、核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含み得る。特定の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。特定の実施形態では、組織特異的W n tシグナル増強分子をコードする核酸配列およびW n tポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはW n tシグナル伝達アゴニスト分子を

コードする核酸配列は、同じベクター中、例えば同じ発現カセット中に存在する。

【0165】

関連する態様において、本発明は、疾患または状態、例えばWntシグナル伝達の減少に関連するか、またはWntシグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または障害を治療する方法であって、それを必要とする対象を、本発明の組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列を含む有効量の細胞を含む薬学的組成物と接触させることを含み、該分子は、標的組織または細胞内の細胞表面受容体に組織特異的または細胞特異的様式で結合する標的ドメインを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、対象はまた、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む細胞と接触させる。特定の実施形態では、組織特異的Wntシグナル増強分子をコードする核酸配列と、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする核酸配列とが同じ細胞中に存在する。特定の実施形態において、細胞は、治療されるべき対象から得られた異種細胞または自己細胞である。特定の実施形態において、細胞は、組織特異的Wntシグナル増強分子またはWntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする発現カセットを含むベクターで形質導入された。特定の実施形態では、細胞は幹細胞、例えば脂肪由来幹細胞または造血幹細胞である。

10

【0166】

他の態様において、本発明は、Wntシグナル伝達の減少に関連するか、またはWntシグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または状態の治療方法であって、それを必要とする対象を、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量のポリヌクレオチドを含む薬学的組成物と接触させることを含み、方法を提供する。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAまたはmRNA、例えば修飾mRNAである。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、5'キャップ配列および/または3'テール配列、例えばポリAテールをさらに含む修飾mRNAである。他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、コード配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットである。

20

【0167】

関連する態様において、本発明は、疾患または状態、例えばWntシグナル伝達の減少に関連するか、またはWntシグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または障害を治療するための方法であって、それを必要とする対象を、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量のベクターを含む薬学的組成物と接触させることを含み、方法を提供する。特定の実施形態では、ベクターは発現ベクターであり、核酸配列に機能的に連結されたプロモーターを含み得る。特定の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

30

【0168】

関連する態様において、本発明は、疾患または状態、例えばWntシグナル伝達の減少に関連するか、またはWntシグナル伝達の増加が治療上の恩恵をもたらすであろう疾患または障害を治療するための方法であって、それを必要とする対象を、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニストをコードする核酸配列を含む有効量の細胞を含む薬学的組成物と接触させることを含み、方法を提供する。特定の実施形態において、細胞は、治療されるべき対象から得られた異種細胞または自己細胞である。特定の実施形態では、細胞に、Wntポリペプチド、ノリンポリペプチドまたはWntシグナル伝達アゴニスト分子をコードする発現カセットを含むベクターを形質導入した。特定の実施形態では、細胞は幹細胞、例えば脂肪由来幹細胞または造血幹細胞である。

40

【0169】

Wntシグナル伝達は、幹細胞の発生プロセスおよび維持において重要な役割を果たす。Wntシグナルの再活性化は、傷害および疾患後のほとんどの組織の再生および修復と関連している。組織特異的Wntシグナル増強分子は、傷害および疾患にตอบสนองして治癒および組織修復の恩恵を提供し得る。組織の損傷および喪失の原因には、老化、変性、遺伝

50

的狀態、感染および炎症、外傷、毒素／代謝誘発毒性、または他の病的狀態が含まれるがこれらに限定されない。W n t シグナルおよびW n t シグナルのエンハンサーは、成体の組織内在幹細胞を活性化することが示されている。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、罹患組織または損傷組織の治療における使用のため、組織再生における使用のため、ならびに細胞の成長および増殖における使用のため、および／または組織工学における使用のために投与される。

#### 【 0 1 7 0 】

W n t 経路の変異に関連するヒトの疾患は、疾患の治療および予防におけるW n t シグナルの増強についての強力な証拠を提供する。前臨床のインビボおよびインビトロの研究は、多くの病状におけるW n t シグナルの関与のさらなる証拠を提供し、さらに様々なヒトの疾患における組織特異的W n t シグナル増強分子の利用を支持する。例えば、本発明の組成物は、骨の成長または再生、骨移植、骨折の治療、骨粗鬆症および骨粗鬆症性骨折の治療、脊椎固定術、整形外科用装置の骨統合、腱 - 骨統合、歯の成長を促進または増加させるために使用できる。再生、歯の移植、歯周病、顎顔面再建、および顎骨壊死。脱毛症の治療にも使用できる。感覚臓器の再生の促進、例えば、難聴の治療、前庭機能低下の治療、黄斑変性症の治療、硝子体網膜症の治療、糖尿病性網膜症、または他の網膜変性疾患、フックスジストロフィー、他の角膜疾患など。脳卒中、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、多発性硬化症および血液脳関門に影響を与えるその他の症状の治療。脊髄損傷、その他の脊髄疾患の治療。本発明の組成物はまた、口腔粘膜炎症、腸粘膜炎症、短腸症候群、炎症性腸疾患（I B D）、他の胃腸障害の治療にも使用できる。メタボリックシンドロームの治療糖尿病の治療、膵炎の治療、膵外分泌組織または内分泌膵臓組織が損傷している状態。表皮再生の増強が望まれる状態、例えば、表皮創傷治療、糖尿病性足部潰瘍の治療、歯を含む症候群、爪、または真皮形成不全など、血管新生が有益である状態。心筋梗塞、冠状動脈疾患、心不全の治療。造血細胞の増殖の促進、例えば骨髄からの造血幹細胞移植の促進、動員末梢血、免疫不全の治療、移植片対宿主病など。急性腎障害、慢性腎臓病の治療肺疾患の治療、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、特発性肺線維症、肺組織の再生の促進。本発明の組成物はまた、肝細胞の再生増強、例えば肝再生、肝硬変の治療、肝移植の増強、急性肝不全の治療、C 型肝炎もしくはB 型肝炎ウイルス感染を伴う慢性肝疾患の治療、または抗ウイルス薬療法の後、アルコール性肝疾患、脂肪症または脂肪性肝炎を伴う非アルコール性肝疾患などに使用することができる。

#### 【 0 1 7 1 】

W n t シグナル伝達成分における機能喪失または機能獲得変異を含むヒト遺伝学は、骨成長のためのW n t シグナルの増強を支持する強力な証拠を示す。骨成長の促進が望まれる状態には、骨折、移植片、人工装具周囲の内方成長、骨粗鬆症、骨粗鬆症性骨折、脊椎固定術、顎骨壊死、歯の移植、歯周病、顎顔面再建などが含まれるがこれらに限定されない。組織特異的W n t シグナル増強分子は、骨再生を促進するのに重要なW n t シグナルを増強および促進する。骨組織の再生方法は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与から恩恵を受ける。いくつかの実施形態において、骨髄細胞は、その骨髄内の幹細胞が活性化されるように、本発明の分子に曝露される。

#### 【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態において、骨再生は、応答性細胞集団、例えば骨髄、骨前駆細胞、骨幹細胞などを有効量の本発明の分子と接触させることによって増強される。骨組織の再生方法は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与から恩恵を受ける。いくつかのそのような態様において、接触はインビボで行われる。他のそのような態様において、接触はエクスピボで行われる。分子は、例えば、任意選択で生分解性であり、任意選択で活性剤の持続放出をもたらすマトリックス上に負荷することによって、作用部位に局在化させることができる。マトリックス担体は、吸収性コラーゲンスポンジ、セラミック、ヒドロゲル、ポリマーミクロスフェア、ナノ粒子、骨セメントなどを含むが、これらに限定されない。

#### 【 0 1 7 3 】

本発明の1つ以上の分子を含む組成物は、骨格組織欠損症のインビボ治療に使用することができる。「骨格組織欠損症」とは、たとえ欠損がどのような原因であったとしても（例えば外科的介入の結果として）、骨または結合組織を修復することが望まれる任意の部位における骨または他の骨格結合組織の欠損を意味する。腫瘍の除去、潰瘍形成、インプラント、骨折、またはその他の外傷性または変性性の状態。本発明の組成物は、軟骨機能を結合組織に回復させるためのレジメンの一部として、変性摩耗および関節炎などの軟骨組織の欠陥または損傷、組織への外傷、断裂した半月板の置換のために使用することができる。半月板切除術、靱帯の裂傷による関節の弛緩、関節の不整列、骨折、または遺伝性疾患による。

#### 【0174】

本発明の組成物はまた、歯周病の治療にも使用され得る。歯周病は歯の喪失の主な原因であり、複数の全身状態に関連している。いくつかの実施形態では、歯またはその下の骨の再生は、応答性細胞集団と接触することによって増強される。いくつかのそのような態様において、接触はインビボで行われる。他のそのような態様において、接触はエクスピボで行われ、続いて活性化幹細胞または前駆細胞の移植が行われる。分子は、例えば、任意選択で生分解性であり、任意選択で活性剤の持続放出をもたらすマトリックス上に負荷することによって、作用部位に局在化させることができる。マトリックス担体としては、吸収性コラーゲンスポンジ、セラミック、ヒドロゲル、骨セメント、ポリマーマイクロスフェア、ナノ粒子などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0175】

研究は、Wntシグナル伝達およびR-スポンジンの生物学が、損傷、加齢、または変性の後の内耳における感覚有毛細胞の再生を促進することができることを示した。聴覚障害または前庭機能低下に関与する内耳における感覚有毛細胞の喪失もまた、本発明の組成物から恩恵を受ける可能性がある。内耳には、聴覚器官が音の振動を電気的インパルスに変換するのに必要な機械感受性の有毛細胞を収容している。半規管（SSC）、卵形嚢、および嚢からなる前庭器官も、頭部の位置と動きを検出するために感覚有毛細胞を含む。本発明の組成物は、例えば注入に使用することができる。マトリックスまたは他のデポシステムで。または聴覚再生の強化のための耳への他の局所適用。

#### 【0176】

本発明の組成物はまた、網膜組織の再生においても使用され得る。成体哺乳動物網膜において、ミューラグリヤ細胞は、例えばインビボでの神経毒性損傷後に、光受容体を含む網膜細胞を再生することができる。Wntシグナル伝達およびWntシグナルのエンハンサーは、損傷後または変性中に、ミューラグリヤ由来網膜前駆細胞の増殖を促進することができる。本発明の組成物はまた、眼内の組織および他の細胞型の再生にも使用され得る。例えば、加齢黄斑変性症（AMD）、他の網膜変性疾患、角膜疾患、フックスジストロフィー、硝子体網膜症、遺伝性疾患などが本発明の組成物から恩恵を受けることができる。AMDは、次第に減少する中心視力および視力を特徴とする。フックスジストロフィーは、角膜内皮細胞の進行性の喪失を特徴としている。WntシグナルおよびWntシグナルの増強は、眼組織における角膜内皮、網膜上皮などの再生を促進することができる。他の実施形態では、本発明の組成物は、例えば、注入；マトリックスまたは他のデポシステム；または網膜再生および黄斑変性の治療のための眼への他の局所適用に使用することができる。

#### 【0177】

肝細胞の恒常的再生のための増殖細胞の特定の集団、例えば中心周辺領域のAxi2陽性細胞が系統追跡研究を通して同定されている。系統追跡研究はまた、Lgr陽性細胞を含むがこれに限定されない追加の潜在的肝臓前駆細胞を同定した。Lgr5陽性細胞およびAxi2陽性細胞を含む自己再生性肝細胞および他の潜在的な前駆細胞集団は、傷害後のWntシグナルおよび/またはR-スポンジンに反応して再生することができると同定されている。急性肝障害および失敗ならびに慢性肝疾患の多数の前臨床モデルは、Wntシグナルを増強することから肝細胞の回復および再生が有益であることを示した。本発明

10

20

30

40

50

の組成物は、急性肝不全、急性アルコール性肝障害、C型またはB型肝炎ウイルス感染を伴う慢性肝疾患の治療または抗ウイルス薬治療、慢性アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患の治療に使用できる。非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、肝硬変の治療、あらゆる原因による重度の慢性肝疾患、肝細胞の再生促進。肝組織の再生方法は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与から恩恵を受ける。これらには、全身投与方法および局所投与方法、例えば肝臓組織への注入、静脈または肝臓への血管への注入、徐放性製剤の移植などが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0178】

Wntシグナルは様々な上皮組織の再生において重要な役割を果たす。様々な表皮状態が本発明の化合物による治療から恩恵を受ける。粘膜炎は、胃腸管の内側を覆っている急速に分裂した上皮細胞の崩壊があるときに起こり、粘膜組織を潰瘍形成および感染に対して開いたままにする。口腔粘膜と呼ばれる、口を覆う上皮内層の部分は、体の最も敏感な部分の1つであり、化学療法や放射線に対して特に脆弱である。口腔粘膜炎は、おそらく最も一般的で衰弱させる癌治療、特に化学療法と放射線療法の合併症である。さらに、本発明の組成物はまた、腸粘膜炎、短腸症候群、炎症性腸疾患（IBD）、または他の胃腸障害の治療にも有益であり得る。他の表皮状態には、表皮創傷治癒、糖尿病性足部潰瘍、歯を含む症候群、爪、または真皮形成不全などが含まれる。本発明の分子は、再生細胞を本発明の化合物と接触させるこれら全ての条件において使用することができる。上皮組織の再生方法は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与から恩恵を受ける。接触は、例えば、皮内、皮下、ゲル中、ローション、クリームなど、局所的に適用することができる。

#### 【0179】

皮膚および胃腸管に加えて、WntシグナルならびにWntシグナルの増強および促進もまた、前臨床モデルにおける膵臓、腎臓、および肺を含む組織の修復および再生において重要な役割を果たす。組織特異的Wntシグナル増強分子は、外分泌および内分泌膵臓、腎臓、または肺を含む様々な病状に恩恵をもたらし得る。本発明の組成物は、メタボリックシンドロームの治療、糖尿病の治療、急性または慢性膵炎の治療、膵外分泌機能不全、急性腎障害の治療、慢性腎臓病、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、特発性肺線維症、肺上皮組織の損失を引き起こす他の症状を含むがこれらに限定されない肺疾患の治療に使用することができる。これらの組織の再生方法は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与から恩恵を受ける。

#### 【0180】

表皮Wntシグナル伝達は、他の発生因子を介するシグナル伝達と協調して、成体毛包再生に重要である。脱毛は一般的な問題であり、男性型脱毛症と呼ばれることが多い男性型脱毛症は、男性の脱毛の最も一般的な形態である。いくつかの実施形態において、毛包の再生は、応答性細胞集団を本発明の分子と接触させることによって増強される。いくつかのそのような態様において、接触はインビボで行われる。他のそのような態様において、接触はエクスピボで行われる。分子は作用部位、例えば局所用ローション、ゲル、クリームなどに局在していてもよい。

#### 【0181】

脳卒中、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、多発性硬化症、および血液脳関門（BBB）に影響を及ぼす他の状態は、本発明の組織特異的Wntシグナル増強分子で治療することができる。血管新生は、体内の多くの組織への酸素および栄養素の供給を確実にするために重要であり、神経組織は低酸素および虚血に非常に敏感であるので、CNSにとって特に重要である。BBBを形成するCNS内皮細胞は、それらが密着結合によって一緒に保持され特異的輸送体を発現する高度に極性化された細胞であるという点で、非神経組織における内皮細胞とは異なる。Wntシグナル伝達は、CNS血管形成および/または機能を調節する。BBBが危険にさらされる条件は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与、例えば直接注射、髄腔内投与、徐放性製剤の移植などから恩恵を受けることができる。さらに、Wntシグナルは神経発生に積極的に関与しており、損傷後の神



経保護の役割を果たす。本発明の組成物は、脊髄損傷、他の脊髄疾患、脳卒中、外傷性脳損傷などの治療にも使用することができる。

【0182】

W n tシグナルはまた血管形成において役割を果たす。組織特異的W n tシグナル増強分子は、血管形成が有益である状態、心筋梗塞、冠状動脈疾患、心不全などの治療、および遺伝性疾患からの状態に有益であり得る。これらの組織の再生方法は、全身的または局所的であり得る本発明の化合物の投与から恩恵を受ける。

【0183】

特定の実施形態では、本発明の方法は、例えば損傷を受けた組織、または組織もしくは細胞の減少もしくは喪失にさらされている組織において、組織再生を促進する。喪失または損傷は、疾患または傷害を含む、細胞数を減少させるものなら何でもあり得る。例えば、事故、自己免疫障害、治療上の副作用または病状は、外傷を構成し得る。組織再生は組織内の細胞数を増加させ、好ましくは組織の細胞間の結合を再確立することを可能にし、より好ましくは組織の機能性を回復させることを可能にする。

10

【0184】

特定の実施形態では、組成物は、非経口投与、例えば静脈内投与、経口投与、直腸投与、または注射によって投与される。いくつかの実施形態では、それは局所的に、例えば局所的または筋肉内に投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、標的組織、例えば、骨、関節、耳組織、眼組織、胃腸管、皮膚、創傷部位または脊髄に投与される。本発明の方法はインビボまたはエキスビボで実施することができる。いくつかの実施形態では、標的細胞または組織と組織特異的W n tシグナル増強分子との接触は、その後の細胞または組織（例えば、活性化幹細胞または前駆細胞）の対象への移植と共に、エキスビボで行われる。当業者は、治療されている疾患または障害に基づいて適切な投与部位および投与経路を決定することができる。

20

【0185】

用量および投与計画は、疾患または障害の性質、対象の特徴、および対象の病歴など、医師によって容易に決定される様々な要因に依存し得る。特定の実施形態では、対象に投与または提供される組織特異的W n tシグナル増強分子、たとえば融合タンパク質の量は、対象の体重の約0.01mg/kg～約50mg/kg、0.1mg/kg～約500mg/kg、または約0.1mg/kg～約50mg/kgの範囲である。

30

【0186】

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

【0187】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、治療上の恩恵、例えば、障害の発症の防止、障害の進行の停止、障害の進行の逆転などをもたらす。いくつかの実施形態において、本方法は、治療上の恩恵が達成されたことを検出する工程を含む。当業者は、そのような治療有効性の測定値が、修正されている特定の疾患に適用可能であり、治療有効性を測定するために使用するのに適切な検出方法を認識するであろう。

40

【0188】

特定の実施形態では、本開示は、W n tシグナル伝達の低下に関連するか、または骨組織におけるW n tシグナル伝達活性の増加から恩恵を受けるであろう疾患または障害、例えば骨成長が望ましい本明細書に開示される状態のいずれかなどを治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に、骨組織に結合する標的ドメイン、例えばP T H 1 Rに特異的に結合する標的ドメインを含むW n tシグナル増強分子を含む薬学的組成物を提供することを含み、W n tシグナル増強分子が、対象の骨組織におけるシグナル伝達を増加または増強する、方法を提供する。特定の実施形態において、薬学的組成物は経口的または全身的に、例えば非経口的に投与される。特定の実施形態では、W n tシグナル増強分子は、R - スポンジンプリンドメイン1またはその断片もしくはバリエーションを含む作

50

用ドメイン、および任意に変異フリンドメイン 2 もしくはその断片もしくはバリエーションを含む。

#### 【0189】

特定の実施形態では、本開示は、Wntシグナル伝達の減少に関連するか、または肝臓組織におけるWntシグナル伝達活性の増加から恩恵を受けるであろう疾患または障害、例えば肝再生から恩恵を得るであろう、本明細書に開示される疾患または障害のいずれかなどを治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に、肝臓組織に結合する標的ドメイン、例えばASGR1、ASGR2、TFR2またはSLC10A1に特異的に結合する標的ドメインを含むWntシグナル増強分子を含む薬学的組成物を提供することを含み、Wntシグナル増強分子が、対象の肝臓組織におけるWntシグナル伝達を増加または増強する、方法を提供する。特定の実施形態において、薬学的組成物は経口的または全身的に、例えば非経口的に投与される。特定の実施形態では、Wntシグナル増強分子は、R-スポンジニンフリンドメイン 1 またはその断片もしくはバリエーションを含む作用ドメイン、および任意に変異フリンドメイン 2 もしくはその断片もしくはバリエーションを含む。

10

#### 【0190】

特定の実施形態では、本開示は、Wntシグナル伝達の低下に関連するか、または口腔粘膜組織（例えば口腔粘膜炎症など）におけるWntシグナル伝達活性の増加から恩恵を受けるであろう疾患または障害を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に、口腔粘膜組織に結合する標的ドメイン、例えばLYPD3またはDSG3に特異的に結合する標的ドメインを含むWntシグナル増強分子を含む薬学的組成物を提供することを含み、Wntシグナル増強分子が、対象の口腔粘膜組織内のWntシグナル伝達を増加または増強する、方法を提供する。特定の実施形態において、薬学的組成物は経口的または全身的に、例えば非経口的に投与される。特定の実施形態では、Wntシグナル増強分子は、R-スポンジニンフリンドメイン 1 またはその断片もしくはバリエーションを含む作用ドメイン、および任意に変異フリンドメイン 2 もしくはその断片もしくはバリエーションを含む。

20

#### 【0191】

本明細書で言及され、かつ/または出願データシートに記載されている上記の米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許公報は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

#### 【0192】

以上の説明から、本発明の特定の実施形態を例示の目的で説明したが、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく様々な変更を加えることができることが理解されよう。したがって、本発明は添付の特許請求の範囲による以外には限定されない。

#### 【実施例】

#### 【0193】

以下の実施例は、当業者に本発明の製造方法および使用方法の完全な開示および説明を提供するために提示されるものであり、発明者らが本発明と見なすものの範囲を限定することを意図せず、以下の実験が実施された全てまたは唯一の実験であることを表すことも意図しない。使用される数字（例えば、量、温度など）に関して正確さを確実にするための努力がなされてきたが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。特記しない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。

40

#### 【0194】

分子生物学、細胞生物学および生化学における一般的な方法は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed」(Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)、「Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed.」(Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999)、「Protein Methods」(Bollag et

50

al., John Wiley & Sons 1996)、*「Nonviral Vectors for Gene Therapy」*(Wagner et al. eds., Academic Press 1999)、*「Viral Vectors」*(Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995)、*「Immunology Methods Manual」*(I. Lefkovits ed., Academic Press 1997)、および*「Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology」*(Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)などの標準的な教科書に見出すことができ、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本開示において言及される試薬、クローニングベクター、および遺伝子操作のためのキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich、およびClonTechなどの市販業者から入手可能である。

10

#### 【0195】

以下の実施例において、Fu1およびFu2ドメインを含む断片(S36-E143)からなる組換えヒトRspo2調製物を陽性対照として用いた。scFvのフォーマット(図8、11、12、15、および16)のWntシグナルエンハンサーについては、単量体型のRspo2を使用した(タンパク質精製を補助するための短いタグを付けて、配列番号33および34によって特定される)。添付のIgGのフォーマットのWntシグナルエンハンサー(図13、14、17、18、および19)については、ヒトIgG Fc断片とインフレーションの同じRspo2 Fu1およびFu2ドメインの融合物を使用した。同じ実験条件下で並行して試験した場合、これら2つの形態の間でインビトロで有意な差は観察されなかったため、どちらも一般的にさらなる指定なしにRspo2陽性対照と呼ばれる。

20

#### 【0196】

実施例および添付の図面に記載されている様々な構築物および配列の簡単な要約を以下の表1に提供する。

30

40

50

## 【表 1 - 1】

表 1. 配列識別子の説明

図	配列番号	簡単な説明
4	1	全長ヒトR s p o 1 (ポリペプチド (P P))
4	2	全長ヒトR s p o 2 (P P)
4	3	全長ヒトR s p o 3 (P P)
4	4	全長ヒトR s p o 4 (P P)
5	5 & 6	抗GFP、R s p o 2 野生型 (ポリヌクレオチド (P N) およびP P)
5	7 & 8	抗GFP、R s p o 2 (F 1 0 5 A / F 1 0 9 A) (P N & P P)
5	9 & 1 0	抗ASGR1、R s p o 2 (F 1 0 5 A / F 1 0 9 A) (P N & P P)
6 A	5、6、7、8、 9、1 0	上記参照
6 A	1 1 & 1 2	抗GFP、R s p o 2 (S 4 7 A / N 5 0 A / F 1 0 5 A / F 1 0 9 A) (P N & P P)
6 A	1 3 & 1 4	抗ASGR1、R s p o 2 (S 4 7 A / N 5 0 A / F 1 0 5 A / F 1 0 9 A) (P N & P P)
6 A	1 5 & 1 6	抗GFP、R s p o 2 (R 6 5 A / R 6 9 A / Q 7 0 A

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

		/F105A/F109A) (PN&PP)
6A	17&18	抗ASGR1、Rsp o 2 (R65A/R69A/Q70A/F105A/F109A) (PN&PP)
6B	5、6、7、8、9、10	上記参照
6B	19&20	抗GFP、Rsp o 2 (F105A) (PN&PP)
6B	21&22	抗ASGR1、Rsp o 2 (F105A) (PN&PP)
6B	23&24	抗GFP、Rsp o 2 (F109A) (PN&PP)
6B	25&26	抗ASGR1、Rsp o 2 (F109A) (PN&PP)
6C	5、6、7、8	
6C	27&28	抗TFR1、Rsp o 2 (F105A/F109A) (PN&PP)
6C	29&30	抗GFP、Rsp o 2 (F105R/F109A) (PN&PP)
6C	31&32	抗TFR1、Rsp o 2 (F105R/F109A) (PN&PP)
7	5、6、7、8、27、28	上記参照
8A	7、8、9、10、25、26、27、28	上記参照
8B~C	33&34	Rsp o 2 フリンドメイン (S36-E143) (PN&PP)
		抗GFP IgG2 N-HC
9	35&36	抗GFP軽鎖 (PN&PP)
9	37&38	Rsp o 2 (F105R/F109A)、抗GFP重鎖 IgG2 (PN&PP)
		抗TFR1 IgG2 N-HC
9	39&40	抗TFR1軽鎖 (PN&PP)
9	41&42	Rsp o 2 (F105R/F109A)、抗TFR1重

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

		鎖、I g G 2 (PN&PP)
		抗GFP I g G 2 N-LC
9	43&44	R s p o 2 (F105R/F109A)、抗GFP軽鎖 (PN&PP)
9	45&46	抗GFP重鎖 I g G 2 (PN&PP)
		抗TFR1 I g G 2 N-LC
9	47&48	R s p o 2 (F105R/F109A)、抗TFR1軽鎖 (PN&PP)
9	49&50	抗TFR1重鎖、I g G 2 (PN&PP)
10	5、6、7、8、 9、10、27、 28、29、30	上記参照
10	51&52	抗ASGR1、R s p o 2 (F105R/F109A) (PN&PP)
10	31&32	上記参照
10	53&54	抗GFP、R s p o 2 (R86E/F105R/F109A) (PN&PP)
10	55&56	抗ASGR1、R s p o 2 (R86E/F105R/F109A) (PN&PP)
10	57&58	抗TFR1、R s p o 2 (R86E/F105R/F109A) (PN&PP)
10	59&60	抗GFP、R s p o 2 (R86E/F105R/F109A/R121E) (PN&PP)
10	61&62	抗ASGR1、R s p o 2 (R86E/F105R/F109A/R121E) (PN&PP)
10	63&64	抗TFR1、R s p o 2 (R86E/F105R/F109A/R121E) (PN&PP)
10	65&66	抗GFP、R s p o 2 (K58E/R86E/F105R/F109A/R121E) (PN&PP)
10	67&68	抗ASGR1、R s p o 2 (K58E/R86E/F105R/F109A/R121E) (PN&PP)
10	69&70	抗TFR1、R s p o 2 (K58E/R86E/F10

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

		5R/F109A/R121E) (PN&PP)
11	29~32	上記参照
12	9&10	上記参照
13	35~42	上記参照
		抗GFP IgG2 N-HC
14A~C	35&36	上記参照
14A~C	37&38	上記参照
		抗ASGR1 IgG2 N-HC
14A~C	71&72	抗ASGR1軽鎖 (PN&PP)
14A~C	73&74	Rsp o 2 (F105R/F109A)、抗ASGR1 重鎖 IgG2 (PN&PP)
		抗TFR1 IgG2 N-HC
14A~C	39&40	上記参照
14A~C	41&42	上記参照
		抗GFP IgG2 N-LC
14A~C	43&44	上記参照
14A~C	45&46	上記参照
		抗TFR1 IgG2 N-LC
14A~C	47&48	上記参照
14A~C	49&50	上記参照
		抗GFP IgG2 C-LC
14A~C	75&76	抗GFP 軽鎖、Rsp o 2 (F105R/F109A) (PN&PP)
14A~C	45&46	上記参照
		抗ASGR1 IgG2 C-LC
14A~C	77&78	抗ASGR1軽鎖、Rsp o 2 (F105R/F109

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

		A) (PN&PP)
14A~C	79&80	抗ASGR1重鎖 IgG2 (PN&PP)
		抗TFR1 IgG2 C-LC
14A~C	81&82	抗TFR1軽鎖、Rspo2 (F105R/F109A) (PN&PP)
14A~C	49&50	上記参照
		抗GFP IgG1 N297G N-HC
14D~E	35&36	上記参照
14D~E	83&84	Rspo2 (F105R/F109A)、抗GFP重鎖 N297G (PN&PP)
		抗ASGR1 IgG1 N297G N-HC
14D~E	71&72	上記参照
14D~E	85&86	Rspo2 (F105R/F109A)、抗ASGR1 重鎖 N297G (PN&PP)
		抗TFR1 IgG1 N297G N-HC
14D~E	39&40	上記参照
14D~E	87&88	Rspo2 (F105R/F109A)、抗TFR1重 鎖 N297G (PN&PP)
		抗GFP IgG1 N297G N-LC
14D~E	43&44	上記参照
14D~E	89&90	抗GFP重鎖 N297G (PN&PP)
		抗TFR1 IgG1 N297G N-LC
14D~E	47&48	上記参照
14D~E	91&92	抗TFR1重鎖 N297G (PN&PP)
		抗GFP IgG1 N297G C-LC
14D~E	75&76	上記参照
14D~E	89&90	see above
		抗ASGR1 IgG1 N297G C-LC

10

20

30

40

50



【表 1 - 6】

14D~E	77&78	上記参照
14D~E	93&94	抗ASGR1重鎖 N297G (PN&PP)
		抗TFR1 IgG1 N297G C-LC
14D~E	81&82	上記参照
14D~E	91&92	上記参照
15A	95&96	抗GFP、Rspo1野生型 (PN&PP)
15A	5&6	上記参照
15A	97&98	抗GFP、Rspo3野生型 (PN&PP)
15A	99&100	抗GFP、Rspo4野生型 (PN&PP)
15B	7&8	上記参照
15B	29&30	上記参照
15B	9&10	上記参照
15B	51&52	上記参照
15B	27&28	上記参照
15B	31&32	上記参照
15C	101&102	抗GFP、Rspo3 (F106A/F110A) (PN&PP)
15C	103&104	抗GFP、Rspo3 (F106R/F110A) (PN&PP)
15C	105&106	抗ASGR1、Rspo3 (F106A/F110A) (PN&PP)
15C	107&108	抗ASGR1、Rspo3 (F106R/F110A) (PN&PP)
15C	109&110	抗TFR1、Rspo3 (F106A/F110A) (PN&PP)
15C	111&112	抗TFR1、Rspo3 (F106R/F110A) (PN&PP)
16B	97&98	上記参照
16B	103&104	上記参照
16B	113&114	抗GFP Rspo3 RR (PN&PP)
16B	115&116	抗GFP Rspo3 EE (PN&PP)

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

16B	117&118	抗GFP Rsp o 3 RE (PN&PP)
16B	119&120	抗GFP Rsp o 3 EA (PN&PP)
16B	121&122	抗GFP Rsp o 3 EEARA (PN&PP)
16C	97&98	上記参照
16C	107&108	上記参照
16C	123&124	抗ASGR1 Rsp o 3 RR (PN&PP)
16C	125&126	抗ASGR1 Rsp o 3 EE (PN&PP)
16C	127&128	抗ASGR1 Rsp o 3 RE (PN&PP)
16C	129&130	抗ASGR1 Rsp o 3 EA (PN&PP)
16C	131&132	抗ASGR1 Rsp o 3 EEARA (PN&PP)
		抗ZNR F3-抗GFP
17	133&134	抗GFP軽鎖 (S176K) (PN&PP)
17	135&136	抗ZNR F3軽鎖 (S176E) (PN&PP)
17	137&138	抗ZNR F3, 抗GFP重鎖 (PN&PP)
		抗ZNR F3-抗ASGR1
17	139&140	抗ASGR1軽鎖 (S176K) (PN&PP)
17	135&136	see above
17	141&142	抗ZNR F3、抗ASGR1重鎖 (PN&PP)
		抗ZNR F3-抗TFR1
17	143&144	抗TFR1軽鎖 (S176K) (PN&PP)
17	135&136	see above
17	145&146	抗ZNR F3、抗TFR1重鎖 (PN&PP)
		抗GFP Rsp o 2 (F105R/F109A)、N-HC
18	35&36	上記参照
18	37&38	上記参照
		抗LYPD3 Rsp o 2 (F105R/F109A)、N-HC
18	147&148	抗LYPD3 軽鎖 (PN&PP)
18	149&150	Rsp o 2 (F105R/F109A)、抗LYPD3

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

		重鎖 LALA-PG (PN&PP)
		抗DSG3 Rsp o 2 (F105R/F109A)、 N-HC
18	151&152	抗DSG3 軽鎖 (PN&PP)
18	153&154	Rsp o 2 (F105R/F109A)、抗DSG3重 鎖 LALA-PG (PN&PP)
		抗GFP IgG1 LALA-PG
19	35&36	上記参照
19	155&156	抗GFP重鎖、IgG1 LALA-PG (PN&PP)
		抗GFP Rsp o 2 (F105R/F109A)、N -HC
19	35&36	上記参照
19	37&38	上記参照
		抗ASGR1 IgG2 N-HC
19	71&72	上記参照
19	73&74	上記参照
19	157&158	18R5-Dkk1c (PN&PP)

10

20

## 【0197】

## 実施例 1

SCFVフォーマットにおけるWNTシグナリングのASGR1特有の強化

Wntシグナル伝達の組織特異的増強は、変異型ヒトRsp o 2 (アミノ酸残基) に融合したヒトASGR1に対するscFv抗体 (特許WO2014/023709A1に基づいて設計された、クローン4F3) を含む組織特異的Wntシグナル増強分子を用いて初めて実証された。2つの点変異 (F105AおよびF109A) を有する ( - ASGR - mtRsp o 2 )。ヒトRsp o 2におけるこれらの変異は、図1に図解されるように、ZNR F3 / RNF43との相互作用を妥協することなくLGR4 - 6への結合を減少 / 廃止し、図2に図解されるようにRsp o 2を作用ドメインとして機能させる。標的ドメインに対する陰性対照として (図2参照)、緑色蛍光タンパク質 (GFP) に対するscFv抗体を同じ変異型ヒトRsp o 2 ( - GFP - mtRsp o 2 ) に融合した。Wntシグナル増強活性についての陽性対照として、GFP抗体を野生型ヒトRsp o 2 (アミノ酸残基37 ~ 143) ( - GFP - Rsp o 2 ) に融合した。これらの構築物を図5Aに図示し、それらのアミノ酸配列およびそれをコードするポリヌクレオチド配列を以下の通りに示す: - GFP - mtRsp o 2 (それぞれ配列番号8および7)、 - ASGR - mt - Rsp o 2 (それぞれ配列番号10および9)。これらの組織特異的Wntシグナル増強分子はまた、分泌のためにN末端にシグナリングペプチドを、検出のためにC末端にFLAGタグを含み、続いてアフィニティー精製のために (His) 8タグを含んだ。組織特異的Wntシグナル増強融合タンパク質および対照をコードする発現構築物を標準的な分子クローニング技術によって作製した。

30

40

## 【0198】

Wnt応答性プロモーター (Super Top Flashレポーターアッセイ、STF) によって制御されるルシフェラーゼ遺伝子、ヒト肝癌Huh - 7およびヒト類表皮癌A431細胞を含む2つの細胞株を用いて、Wntシグナル伝達活性を測定した。図5Bに示される定量的PCR分析によって実証されるように、両方の細胞株はR - スポンジン

50

によって標的化された E 3 リガーゼを発現したが、肝臓特異的遺伝子 A S G R 1 / 2 発現は H u h - 7 においてのみ検出された。

#### 【 0 1 9 9 】

H u h - 7 レポーター細胞中の A S G R を標的とする構築物の活性を試験するための販売元推奨手順に従って、リポフェクタミン 2 0 0 0 ( I n v i t r o g e n ) を用いて一過性トランスフェクションを行った。W n t 3 a 馴化培地 ( A T C C L - W n t - 3 A 細胞株で販売元推奨手順を用いて調製 ) を、トランスフェクションの 3 時間後に全培地容量の 1 0 % を構成するように加えた。トランスフェクションの 4 0 時間後、細胞溶解、その後のルシフェラーゼ基質、ルシフェリンの添加を含む、標準ルシフェラーゼアッセイ - 読み出しプロトコル ( 例えば、S t o p a n d G l o D u a l L u c i f e r a s e A s s a y K i t ( P r o m e g a ) ) を使用して、細胞をルシフェラーゼ活性についてアッセイした。ルシフェリン基質のオキシルシフェリンへのルシフェラーゼ媒介変換は発光をもたらし、それをプレートリーダーによって読み取り、発光を定量化した。結果を図 5 C に示す。偽トランスフェクション対照 ( 「 D N A なし」 ) と比較して、変異体 R s p o 2 に融合した抗 A S G R 1 抗体を発現する構築物は、同じ変異体に融合した抗 G F P よりもはるかに高いルシフェラーゼ活性の約 2 0 倍の増加を示した。これは、構築物の A S G R 1 抗体部分 ( 標的ドメイン ) が活性の増加の原因であることを示唆した。

10

#### 【 0 2 0 0 】

実験条件下で種々の融合タンパク質の発現および安定性を確認するためにウエスタンブロット分析を行った。トランスフェクションの 4 0 時間後 ( ルシフェラーゼ活性を測定したのと同じ時点 ) の 1 0 μ l の培養上清を、抗 F L A G モノクローナル抗体、M 2 ( S i g m a \_ A l d r i c h ) を用いて分析した。図 5 C に示すように、全てのタンパク質が同程度のレベルで検出可能であった。したがって、試験された構築物間の W n t シグナル増強活性の違いは、タンパク質の活性を反映したものであり、発現レベルやタンパク質の安定性ではないと考えられる。

20

#### 【 0 2 0 1 】

A 4 3 1 細胞を用いて抗 A S G R 1 ベースの構築物の A S G R 1 依存性を試験した。抗 A S G R 1 変異型 R s p o 2 構築物を、野生型または変異型 R s p o 2 との抗 G F P 融合と並行して、A 4 3 1 細胞にヒト T F R 2 またはヒト A S G R 1 と同時トランスフェクトした。トランスフェクション後に 1 0 % W n t 3 a 馴化培地を補充し、トランスフェクションの 4 0 時間後にルシフェラーゼ活性をアッセイした。同じ細胞からの上清をウエスタンブロットのために採取した。図 5 D に示すように、A S G R 1 コトランスフェクションでは、抗 A S G R 1 構築物は陰性対照より数倍高い活性を示した。この効果は T F R 2 コトランスフェクションでは観察されなかった。これは、ここで観察された特異的 W n t 増強活性が融合分子の設計によって標的とされている特異的受容体の存在に依存していることを示唆した。これらの結果は、A S G R および T F R 2 標的化構築物が、それらが発現される肝臓などの組織への W n t シグナル増強分子の特異的標的化のために使用され得ることを実証する。

30

#### 【 0 2 0 2 】

##### 実施例 2

40

##### 行動領域のメカニズムと行動の動的範囲の変調

組織特異的 W n t シグナル増強分子の融合構築物設計の作用機序を検証するために、追加の変異を R s p o 2 ( これは作用ドメインとして機能する ) に導入し、これらの構築物の活性を、実施例 1 に記載したのと同じ一過性トランスフェクションに基づくレポーターアッセイにおいて H u h - 7 細胞中で分析した。Z N R F 3 / R N F 4 3 相互作用の役割は、S 4 7、N 5 0、R 6 5、R 6 9、および Q 7 0 などの Z N R F 3 / R N F 4 3 に結合することが知られている R s p o 2 内の残基に ( F 1 0 5 A および F 1 0 9 A 変異に加えて ) 点変異を導入することによって最初に試験された。F 1 0 5 A / F 1 0 9 A / S 4 7 A / N 5 0 A 変異を含む - G F P - m t R s p o 2 のアミノ酸配列を配列番号 1 2 に提供し、コードポリヌクレオチド配列を配列番号 1 1 に提供する。F 1 0 5 A / F 1 0 9

50

A / S 4 7 A / N 5 0 A 変異を含む - A S G R 1 - m t R s p o 2 のアミノ酸配列は配列番号 1 4 に提供され、コードポリヌクレオチド配列は配列番号 1 3 に提供される。F 1 0 5 A / F 1 0 9 A / R 6 5 A / R 6 9 A / Q 7 0 A 変異を含む - G F P - m t R s p o 2 のアミノ酸配列は配列番号 1 6 に提供され、コードポリヌクレオチド配列は配列番号 1 5 に提供される。F 1 0 5 A / F 1 0 9 A / R 6 5 A / R 6 9 A / Q 7 0 A 変異を含む - A S G R 1 - m t R s p o 2 のアミノ酸配列は配列番号 1 8 に提供され、コードポリヌクレオチド配列は配列番号 1 7 に提供される。図 6 A に示すように、S 4 7 A / N 5 0 A または R 6 5 A / R 6 9 A / Q 7 0 A の変異の導入は、抗 G F P および抗 A S G R 1 構築物の両方の W n t シグナル増強活性を無効にした。これらの結果は、これらの 2 つの E 3 リガーゼが作用ドメインによって標的とされるというメカニズムと一致している。

10

#### 【 0 2 0 3 】

変異体 R s p o 2 の活性を増加させる可能性を試験するために、変異を最初の F 1 0 5 A / F 1 0 9 A 二重変異の代わりに単一アミノ酸残基 F 1 0 5 A または F 1 0 9 A に限定することによって L G R 相互作用における欠陥を軽減する試みがなされた。F 1 0 5 A 変異のみを含む - G F P - m t R s p o 2 のアミノ酸配列を配列番号 2 0 に提供し、コードポリヌクレオチド配列を配列番号 1 9 に提供する。F 1 0 5 A 変異のみを含む - A S G R 1 - m t R s p o 2 のアミノ酸配列を配列番号 2 2 に提供し、コードポリヌクレオチド配列を配列番号 2 1 に提供する。F 1 0 9 A 変異のみを含む - G F P - m t R s p o 2 のアミノ酸配列を配列番号 2 4 に提供し、コードポリヌクレオチド配列を配列番号 2 3 に提供する。F 1 0 9 A 変異のみを含む - A S G R 1 - m t R s p o 2 のアミノ酸配列を配列番号 2 6 に提供し、コードポリヌクレオチド配列を配列番号 2 5 に提供する。これらの構築物を、一過性トランスフェクションアッセイにより H u h - 7 レポーター細胞中で試験した。図 6 B に示すように、F 1 0 9 A 単一変異体は、二重変異体よりも高い活性を有した。これは抗 G F P 対照におけるより高い基礎活性を犠牲にしているが、このアプローチは、融合構築物の活性のダイナミックレンジが、R - スポンジン - L G R 相互作用に影響を及ぼす変異によって微調整され得ることを示唆した。

20

#### 【 0 2 0 4 】

アラニン (「A」) に加えて、他のアミノ酸残基もまた、L G R タンパク質相互作用にとって重要な残基を置換するための変異として使用され得る。一例として、図 6 C は、作用ドメインとしての R s p o 2 F 1 0 6 R / F 1 0 9 A 変異体の使用を実証した。この R s p o 2 変異体の抗 T F R 1 標的ドメインへの融合は、一過性トランスフェクションに基づく S T F アッセイ ( 1 0 % W n t 3 a 条件培地の存在下 ) での H u h - 7 細胞において、対応する抗 G F P 対照と比較して明らかな W n t シグナル増強活性をもたらした。F 1 0 5 A / F 1 0 9 A 変異を含む - T F R 1 - m t R s p o 2 のアミノ酸配列は配列番号 2 8 に提供され、コードポリヌクレオチド配列は配列番号 2 7 に提供される。F 1 0 5 R / F 1 0 9 A 変異を含む - G F P - m t R s p o 2 のアミノ酸配列は配列番号 3 0 に提供され、コードポリヌクレオチド配列は配列番号 2 9 に提供される。F 1 0 5 R / F 1 0 9 A 変異を含む - T F R 1 - m t R s p o 2 のアミノ酸配列は配列番号 3 2 に提供され、コードポリヌクレオチド配列は配列番号 3 1 に提供される。

30

#### 【 0 2 0 5 】

#### 実施例 3

他の細胞表面受容体を用いた標的化戦略の検証

組織特異的 W n t シグナル増強分子の抗 A S G R 1 に基づく設計が単なる特定の場合ではなく、むしろ一般原則を表す例であることを検証するために、変異体 ( F 1 0 5 A / F 1 0 9 A ) R s p o 2 断片 (アミノ酸残基 3 7 ~ 1 4 3 ) を、他の細胞表面受容体、ヒトトランスフェリン受容体 1 ( T F R 1 ) ( 特許 W O 2 0 1 6 / 0 8 1 6 4 0 、クローン 7 A 4 に基づいて設計されている ) に対する s c F v 抗体に融合した。構築物のアミノ酸配列は、配列番号 2 8 に提供されている。実施例 1 に記載の一過性トランスフェクションおよびレポーターアッセイを使用して、この新しい構築物は、野生型 R s p o 2 に融合したポジティブコントロール抗 G F P ( 配列番号 6 、図 7 A および 7 B ) の活性と同等または

40

50

それを超える活性を有することが実証された。これは、標的戦略の一般化を支持するだけでなく、適切な細胞表面受容体を認識する標的ドメインが使用される限り、特異的Wntシグナル増強活性を有意に増強するこのアプローチの十分な可能性を証明した。TFR1受容体の広範な分布はまた、このWntシグナル増強戦略に感受性のある組織／細胞についてスクリーニングするためにこの融合構築物を使用する機会を提供した。

【0206】

#### 実施例4

組織／細胞特異的WNTエンハンサーとしての精製融合タンパク質（SCFVフォーマット）

設計された融合タンパク質の活性を直接試験するために、構築物をバキュロウイルストランスファーベクターpAcGP67-Aにサブクローニングし、以前に記載されたように（Jandara, 2017 Nature）発現させSF9/his5細胞から精製した。発現されたタンパク質を、complete hisタグ精製樹脂（Sigma-Aldrich）を使用して、販売元推奨手順に従ってHisタグを介して精製し、次いでサイズ排除カラム（S200、GE Healthcare）分画によってさらに精製した。図8Aは、表示された標的ドメインおよび作用ドメインを有する精製融合タンパク質（サイズ排除カラムによって抗TFR1構築物はさらに精製されなかった）のクマシー染色ゲル画像の代表例を示し、推定純度は>90%である。

【0207】

図8B（左のグラフ）は、標的とされたHuh-7細胞上の、抗ASGR1構築物（Rspo2を有するF105A/F109A二重変異体（配列番号10）およびRspo2を有するF109A単一変異体（配列番号26））と抗GFP陰性対照（F105A/F109A二重変異体（配列番号8））との比較を示す。10μMの最終濃度でRspo2二重変異体に融合した抗ASGR1は、100μMの濃度で抗GFP対照より約3倍活性が高く、特異的抗体による活性の特異的増強を明らかに実証した。一過性トランスフェクションアッセイの結果と一致して、Rspo2単一F109A変異体（配列番号26）を含有する融合タンパク質はさらに活性であった。図8B（右のグラフ）は、ASGR1標的化融合物と、同じ手順により精製されたhisタグ付きRspo2構築物（アミノ酸残基S36~E143を含む）（配列番号34、および配列番号33に提供されるコードポリヌクレオチド配列）との最大有効性（E<sub>max</sub>）の比較を示す。結果は、標的Rspo2二重変異体が機能的Rspo2タンパク質に匹敵するE<sub>max</sub>に達することができる一方で、標的Rspo2単一変異体E<sub>max</sub>の活性はさらに高くなり得ることを示唆する。Rspo2タンパク質についての1~3μMとは対照的に、より高い濃度（10~100μM）がE<sub>max</sub>に達するために必要とされたが、これらの濃度では、陰性対照（図8Bの抗GFP融合、左パネル）はほとんど活性を有さなかった。

【0208】

組織／細胞標的の特異性を検証するために、精製融合タンパク質の活性を3つの細胞株、すなわちヒト肝臓Huh-7細胞、ヒト結腸直腸腺癌HT29細胞、およびマウス肝臓FL83B細胞において比較した。Wntシグナル伝達のためのルシフェラーゼレポーター（図8Cの左から右に示す）。肝臓および腸管／直腸管の上皮細胞は、R-スポンジンを介したWntシグナル伝達のアップレギュレーションに敏感であることが知られており、Rspoタンパク質はマウスとヒトの間で高度に保存されている。当然のことながら、3つの細胞株全てがRspo2によく反応しました。抗ASGR1ベースの融合タンパク質からの有意な活性がHuh-7細胞上で観察されたが、HT29細胞上ではほとんど活性がなかった。腸管上皮細胞はRspoタンパク質に最も敏感であった。ASGR1を標的とする融合タンパク質によるHT29細胞への刺激の欠如は、それらがインビボで適用された場合、それらが標的外効果の可能性はるかに低い可能性があることの良い指標である。対照的に、TFR1を標的とする融合タンパク質は、非常に低い0.1μM濃度でさえもはるかに活性が高く、このタンパク質の効力および有効性をさらに実証した。このヒトTFR1標的化構築物はマウスFL83B細胞に対して活性を示さなかったので、こ

10

20

30

40

50

の活性はおそらく受容体の存在に特異的に依存しており、標的化結合剤がヒト受容体に特異的であることを示している。ヒト A S G R 1 を標的とする融合タンパク質に対するいくつかの応答がマウス肝細胞で観察され、これは抗体の種間反応性を示唆している。

#### 【 0 2 0 9 】

##### 実施例 5

一過性トランスフェクションによって実証された全長 I G G フォーマットにおけるアクティブ W N T 信号エンハンサー

完全 I g G フォーマットの抗体は、他の利点の中でも、優れた薬物動態学的特性および安定性と関連している。先の実施例に記載の組織特異的 W n t シグナル増強分子が完全 I g G フォーマットで活性であることを実証するために、これらの組織特異的 W n t シグナル増強融合タンパク質を完全 I g G フォーマットに変換した。T F R 1 結合剤は、本出願の先の例からのその最高の活性のために、I g G フォーマットの W n t シグナル増強分子のための概念実証として選択された。図 9 A の図に示すように、変異体 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) R s p o 2 を T F R 1 抗体 ( または陰性対照としての G F P 抗体、両方とも I g G 2 として ) の軽鎖または重鎖の N 末端に融合させた。これらの分子の活性は、W n t シグナル伝達に応答するレポーターを用いた 2 9 3 細胞への一過性トランスフェクションによって決定された。 - G F P I g G の重鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメインを有する構築物については、 - G F P 軽鎖のアミノ酸配列を配列番号 3 6 に提供し、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号 3 5 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、 - G F P 重鎖 I g G 2 のアミノ酸配列は配列番号 3 8 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号 3 7 に提供される。

- T F R 1 I g G の重鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメインを有する構築物については、 - T F R 1 軽鎖のアミノ酸配列を配列番号 4 0 に提供し、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号 3 9 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、 - T F R 1 重鎖 I g G 2 のアミノ酸配列は配列番号 4 2 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号 4 1 に提供される。 - G F P I g G の軽鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメインを有する構築物については、 - G F P 二本鎖 I g G 2 のアミノ酸配列を配列番号 4 6 に提供し、そのコード化ポリヌクレオチド配列は配列番号 4 5 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、 - G F P 軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 4 4 に提供され、そのコード化ポリヌクレオチド配列は配列番号 4 3 に提供される。 - T F R 1 I g G の軽鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメインを有する構築物については、 - T F R 1 二本鎖 I g G 2 のアミノ酸配列を配列番号 5 0 に提供し、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号 4 9 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、 - T F R 1 軽鎖のアミノ酸配列は配列番号 4 8 に提供され、そのコード化ポリヌクレオチド配列は配列番号 4 7 に提供される。

#### 【 0 2 1 0 】

図 9 B に示されるように、完全 I g G フォーマットは、特に R s p o 2 変異体が重鎖に融合された場合に、s c F v フォーマットで観察された強力な W n t シグナル増強活性を保持していた。これらの結果は、受容体標的 W n t エンハンサーの設計を他の足場にどのように適用するか の 1 つの実行可能な例を示した。

#### 【 0 2 1 1 】

##### 実施例 6

対象となる W N T 信号強化活動をサポートするための追加の R S P O 変異体

R s p o と L G R タンパク質との間の相互作用にとって最も重要であることが知られている 2 つの疎水性残基 ( ヒト R s p o 2 の場合は F 1 0 5 および F 1 0 9 ) に加えて、さらなる残基も相互作用に寄与し得る。これらの残基には、例えば、R s p o 2 の K 5 8 、 H 7 6 、 S 7 7 、 R 8 6 、 N 9 1 、および R 1 2 1 が含まれる。これらの残基における変異は、F s 1 0 5 / F 1 0 9 変異と組み合わせて使用されて、R s p o と L G R タンパク質との相互作用を廃止 / 妥協することができる。種々の構築物のアミノ酸配列およびそれ

をコードするポリヌクレオチド配列は以下の通り提供される：抗ASGR1、Rspo2 (F105R/F109A)、配列番号52および51；抗GFP、Rspo2 (R86E/F105R/F109A)、配列番号54および53；抗ASGR1、Rspo2 (R86E/F105R/F109A)、配列番号56および55；抗TFR1、Rspo2 (R86E/F105R/F109A)、配列番号58および57；抗GFP、Rspo2 (R86E/F105R/F109A/R121E)、配列番号60および59；抗ASGR1、Rspo2 (R86E/F105R/F109A/R121E)、配列番号62および61；抗TFR1、Rspo2 (R86E/F105R/F109A/R121E)、配列番号64および63；抗GFP、Rspo2 (K58E/R86E/F105R/F109A/R121E)、配列番号66および65；抗ASGR1、Rspo2 (K58E/R86E/F105R/F109A/R121E)、配列番号68および67；抗TFR1、Rspo2 (K58E/R86E/F105R/F109A/R121E)、配列番号70および69。

10

#### 【0212】

図10に示されるように、10%Wnt3a馴化培地の存在下でのHuh-7細胞における一過性トランスフェクションに基づくSTFアッセイにおいて、これらのLGR相互作用残基における変異を様々な組み合わせで用いてWntシグナル増強活性を支持する作用ドメインを作製し得る。

#### 【0213】

##### 実施例7

20

SCFVフォーマットにおける追加組換えタンパク質のWNTシグナル増強活性

一過性トランスフェクション実験によって観察されたscFv抗TFR1ベースの構築物のWntシグナル増強活性(図6C)は、精製タンパク質を用いてさらに検証された。抗hTFR1-Rspo2 (F105R/F109A)および抗GFP対照(それぞれ配列番号30および32)の融合タンパク質をコードするプラスミドベクターをExp293F細胞(Thermo Fisher Scientific)にトランスフェクトし、販売元推奨手順に従って、complete hisタグ精製樹脂(Sigma-Aldrich)を用いて精製した。図11Aは、精製タンパク質のクマシー染色ゲル画像を示す。図11Bに示すように、TFR1標的組換えタンパク質は、抗GFP融合対照よりはるかに強力な活性を示した。さらに、この標的分子のEmaxは、Rspo2陽性対照のものと同様である。

30

#### 【0214】

##### 実施例8

精製タンパク質で実証された細胞表面受容体依存性

設計したWntシグナル増強分子の特異的細胞表面受容体の存在への依存性をさらに実証するために、ヒトASGR1標的分子(抗ASGR1-Rspo2 (F105A/F109A)；配列番号10)をASGR1レセプターを天然には発現しないA431細胞上でSTFアッセイで試験した。細胞を最初に、Lipofectamine 2000(Invitrogen)を使用してヒトASGR1またはヒトTFR2のいずれかを発現するベクターで、販売元推奨手順に従って96ウェルプレート中で一過性にトランスフェクトした。24時間後、トランスフェクトされた細胞を、陽性対照としてのRspo2と共に、hASGR1標的融合タンパク質で処理した。ASGR1発現ベクターによる一過性トランスフェクションはA431細胞を応答性に見出されたが、TFR2発現ベクターによるコントロールトランスフェクションはWntシグナル増強分子に応答しなかった(図12)。

40

#### 【0215】

##### 実施例9

添付IGGフォーマットにおける精製タンパク質のWNTシグナル増強活性

一過性トランスフェクション実験(図9)によって実証されたTFR1標的付加IgG分子のWntシグナル増強活性をさらに検証するために、これらの分子をExp293

50



F細胞(Thermo Fisher Scientific)を用いて組換えタンパク質として発現させた。組換えタンパク質を最初にプロテインAアフィニティー樹脂(標準的手法)によって精製し、次いでサイズ排除カラム(S200、GE Healthcare)分画によって磨いた。精製タンパク質をSTFアッセイを用いてHuh-7および293T細胞上で直接試験した。これらは両方ともヒトTFR1受容体を発現する。図13に示すように、TFR1を標的とした分子は、抗GFP融合対照よりも3~4桁優れた効力およびより高い $E_{max}$ を示した。

【0216】

#### 実施例10

##### 追加IGGスキヤフォールドの構造活性相関解析

完全長IgGのフォーマットの標的ドメインを用いて、作用ドメインを結合する複数の方法を比較した。試験した様々なIgG2足場の活性の要約を図14A~14Bに示し、ここで変異体Rsp02(F105R/F109A)は重鎖のN末端、軽鎖のN末端に結合している。標的ドメインとして抗ASGR1または抗TFR1のいずれかの軽鎖のC末端、または対照抗体として抗GFPまで。使用したいいくつかの構築物は実施例5に記載されており、試験した追加の構築物は以下を含んでいた： - ASGR1 IgGの重鎖のN末端に付加されたRsp02(F105R/F109A)ドメイン；軽鎖は配列番号72で提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号71で提供され、Rsp02(F105R/F109A)のアミノ酸配列 - ASGR1重鎖IgGは配列番号74で提供されおよびそのコードポリヌクレオチド配列は、配列番号73に提供され； - GFP IgG2の軽鎖のC末端に付加されたRsp02(F105R/F109A)ドメイン(ここで、 - GFP重鎖IgG2のアミノ酸配列は配列番号46に提供されている)およびそのコード化ポリヌクレオチド配列は配列番号45に提供され、Rsp02(F105R/F109A)、 - GFP軽鎖のアミノ酸配列は配列番号76に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号76に提供され； - ASGR1 IgG2の軽鎖のC末端に付加されたRsp02(F105R/F109A)ドメイン(ここで、 - ASGR1二本鎖IgG2のアミノ酸配列は、配列番号80に提供される)およびそのコード化ポリヌクレオチド配列は配列番号79に提供され、Rsp02(F105R/F109A)、 - ASGR1軽鎖のアミノ酸配列は配列番号78に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号78に提供され； - TFR1 IgG2の軽鎖のC末端に付加されたRsp02(F105R/F109A)ドメイン(ここで、 - TFR1二本鎖IgG2のアミノ酸配列は配列番号50に提供される)およびそのコード化ポリヌクレオチド配列は、配列番号49に提供されている； Rsp02のアミノ酸配列(F105R/F109A)、 - TFR1軽鎖は配列番号82に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号81に提供される。

【0217】

これらのタンパク質は、一過性トランスフェクションによってExp193T細胞において過剰発現され、プロテインAアフィニティー樹脂、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって精製された。Huh-7細胞(図14A)において、全ての標的分子は、対応する抗GFP融合対照より明らかに良好な活性を示した。抗TFR1融合構築物は一般に抗ASGR1融合タンパク質よりも活性であり、これはこれらの標的ドメインがscFvフォーマットであるという観察と一致する(図8C)。ダイナミックレンジ(同じフォーマットにおける標的分子と対照分子との間の効力および $E_{max}$ の差)は、C末端の軽鎖付着分子よりもN末端重鎖およびN末端軽鎖付着分子の方が全体的に大きい。複数のフォーマットがさらなる開発に適している間、いくつかのフォーマットがより好ましいかもしれないことを示唆している。これらの分子のSTF活性はまた、TFR1のみを発現しASGR1受容体を発現しないヒト293T細胞において比較された(図14B)。予想通り、抗TFR1融合タンパク質のみが抗GAS融合対照より有意に強力なままであり、設計分子の特異的Wntシグナル増強活性はIgGフォーマットでは存在に依存したままであることを示唆した。特異的細胞表面レセプターこの概念は、ヒトASGR1もヒトT

10

20

30

40

50

F R 1 も発現しないマウス F L 8 3 B 細胞を用いてさらに検証された ( 図 1 4 C ) 。 F L 8 3 B 細胞では、標的分子と抗 G F P 対照融合タンパク質との間に違いは観察されなかった。R s p o 変異体の付着位置はまた、I g G 重鎖の C 末端にあってもよい ( データは示さず ) 。

#### 【 0 2 1 8 】

I g G 1 は、治療用抗体開発に頻繁に使用される他の免疫グロブリンアイソタイプである。変異体 R s p o 2 作用ドメインを I g G 1 の N 2 9 7 G エフェクターのない変異体形態の異なる末端に結合する複数の方法 ( J a c o b s e n F W ら、T h e J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 0 1 7、2 9 2 : 1 8 6 5 ) を比較した。使用したいいくつかの構築物は実施例 5 に記載されており、試験した追加の構築物は以下を含んでいた：抗 G F P I g G 1 の重鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメイン ( 抗 G F P 軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号 3 6 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は、配列番号 3 5 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、抗 G F P 重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 8 4 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は、配列番号 8 3 に提供される ) ；抗 A S G R 1 I g G 1 ( N 2 9 7 G ) の重鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメイン ( 抗 A S G R 1 軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 7 2 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 7 1 に記載され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、抗 A S G R 1 重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 8 6 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列は配列番号 8 5 に提供される ) ；抗 T F R 1 I g G 1 ( N 2 9 7 G ) の重鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメイン ( 抗 T F R 1 軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 4 0 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 3 9 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、抗 T F R 1 重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 8 8 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 8 7 に提供される ) ；抗 G F P I g G 1 の軽鎖 ( N 2 9 7 G ) の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメイン ( 抗 G F P 重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 9 0 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 8 9 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、抗 G F P 軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 4 4 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 4 3 に提供される ) ；抗 T F R 1 I g G 1 ( N 2 9 7 G ) の軽鎖の N 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメイン ( 抗 T F R 1 重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 9 2 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 9 1 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、抗 T F R 1 軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 4 8 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 4 7 に提供される ) ；抗 A S G R 1 I g G 1 の軽鎖の C 末端に付加された R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) ドメイン ( 抗 A S G R 1 重鎖のアミノ酸配列が、配列番号 9 4 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 9 3 に提供され、R s p o 2 ( F 1 0 5 R / F 1 0 9 A ) 、抗 A S G R 1 軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号 7 8 に提供され、そのコードポリヌクレオチド配列が、配列番号 7 7 に提供される ) 。

#### 【 0 2 1 9 】

添付の I g G 2 タンパク質について記載したのと同じタンパク質精製および活性試験の手順に従って、抗 A S G R 1 または抗 T F R 1 の重鎖または軽鎖の N 末端に結合した作用ドメイン ( 変異体 R s p o 2 ) を有することが見出された。I g G 1 ( N 2 9 7 G ) アイソタイプにおける 1 は、対応する抗 G F P 対照とは対照的に、H u h - 7 細胞における特異的 W n t シグナル増強活性も支持した ( 図 1 4 D ) 。このような比活性は、抗 A S G R 1 融合物を有する 2 9 3 T 細胞では失われたが、抗 T F R 1 融合物を用いて保存され、標的受容体の存在に対する予想される依存性と一致した ( 図 1 4 E ) 。したがって、作用ドメインの付着のための複数の部位を有する複数の免疫グロブリンアイソタイプは、組織特異的 W n t シグナル増強分子にとって適切なフォーマットであることが実証された。

#### 【 0 2 2 0 】

## 実施例 1 1

行動領域としての 4 つの R スポンジンの構造活性相関解析

ヒトは、特にフリンドメイン内に、高い配列相同性を有する 4 つの R - スポンジンタンパク質を有する ( 図 4 )。インビトロでの W n t シグナル伝達の増強におけるそれらの能力を直接比較するために、4 つのヒト R - スポンジンの各々の F u 1 - F u 2 ドメインを、一過性トランスフェクションによる E x p i 2 9 3 F 細胞における A S G R 1、T F R 1 および G F P への s c F v バインダーの C 末端への融合として発現させた。標準的な H i s タグおよびサイズ排除クロマトグラフィー精製手順。抗 G F P、R s p o 1 野生型融合タンパク質のアミノ酸配列およびコードポリヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 9 6 および 9 5 に提供されている。抗 G F P、R s p o 2 野生型融合タンパク質のアミノ酸配列およびコードポリヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 6 および 5 に提供されている。抗 G F P、R s p o 3 野生型融合タンパク質のアミノ酸配列およびコードポリヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 9 8 および 9 7 に提供されている。抗 G F P、R s p o 4 野生型融合タンパク質のアミノ酸配列およびコードポリヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 1 0 0 および 9 9 に提供されている。次に精製タンパク質を、W n t 3 a 馴化培地の存在下で H u h - 7 および 2 9 3 T 細胞中で S T F アッセイにより試験した。図 1 5 A に示すように、R s p o 2 および 3 は、R s p o 4 および 1 よりも強力であり、以前の報告と一致していた。

## 【 0 2 2 1 】

R - スポンジン分子間の構造的および機能的保存を考えると、R s p o 2 だけでなく他の R s p o 分子も組織特異的 W n t シグナル増強タンパク質の作用ドメインの構築をサポートするのに適している可能性がある。図 1 5 B ~ 図 1 5 C に示されるのは、H u h - 7 細胞および H E K 2 9 3 T 細胞における S T F アッセイにおいて試験された一連のヒト R s p o 2 および R s p o 3 に基づく構築物の並列比較である。これらの構築物は、配列番号 8、1 0、2 8、3 0、3 2、および 5 2 に開示されているポリペプチドを含む。さらに、試験した構築物はまた、以下を含んでいた ( それらのアミノ酸配列に対応し、ポリヌクレオチド配列をコードする配列番号で示される ) : 抗 G F P、R s p o 3 ( F 1 0 6 A / F 1 1 0 A )、配列番号 1 0 2 および 1 0 1 ; 抗 G F P、R s p o 3 ( F 1 0 6 R / F 1 1 0 A )、配列番号 1 0 4 および 1 0 3 ; 抗 A S G R 1、R s p o 3 ( F 1 0 6 A / F 1 1 0 A )、配列番号 1 0 6 および 1 0 5 ; 抗 A S G R 1、R s p o 3 ( F 1 0 6 R / F 1 1 0 A )、配列番号 1 0 8 および 1 0 7 ; 抗 T F R 1、R s p o 3 ( F 1 0 6 A / F 1 1 0 A )、配列番号 1 1 0 および 1 0 9 ; 抗 T F R 1、R s p o 3 ( F 1 0 6 R / F 1 1 0 A )、配列番号 1 1 2 および 1 1 1。

## 【 0 2 2 2 】

ここで使用される特定の組織標的結合剤への特異的融合の文脈では、R s p o 3 変異体が最も高い有効性を示し、一方他の R s p o バリエーションも有意な組織標的化を示した。

## 【 0 2 2 3 】

## 実施例 1 2

追加された I G G フォーマットにおける特定の W N T 信号強化活動をサポートする多様な R S P O 変異体

W n t シグナル増強分子の構築を支持し得る変異の多様性およびそれらの組み合わせをさらに実証するために、抗 G F P または抗 A S G R 1 に融合した一連の追加の R s p o 3 変異体に基づく分子を作製し、それらの活性を H u h - 7 細胞において試験した。S T F アッセイを使用する。これらの変異は、F 1 0 6 R / F 1 1 0 A ( R A )、F 1 0 6 R / F 1 1 0 R ( R R )、F 1 0 6 E / F 1 1 0 E ( E E )、F 1 0 6 R / F 1 1 0 A ( R E )、F 1 0 6 E / F 1 1 0 A ( E A )、R 6 0 E / R 8 8 E / N 9 3 A / F 1 0 6 R / F 1 1 0 A ( E E A R A ) を含んだ。R 6 0、R 8 8、および N 9 3 は、他の R s p o タンパク質との相同性に基づいて、L G R 相互作用に関与している残基である ( 図 1 6 A )。これらの構築物のアミノ酸およびコードポリヌクレオチド配列は以下の通りである : 抗 G F P R s p o 3 野生型、配列番号 9 8 および 9 7 ; 抗 G F P R s p o 3 R A、配列番

10

20

30

40

50

号104および103；抗GFP Rspo3 RR、配列番号114および113；抗GFP Rspo3 EE、配列番号116および115；抗GFP Rspo3 RE、配列番号118および117；抗GFP Rspo3 EA、配列番号120および119；抗GFP Rspo3 EEARA、配列番号122および121；抗ASGR1 Rspo3 RA、配列番号108および107；抗ASGR1 Rspo3 RR、配列番号124および123；抗ASGR1 Rspo3 EE、配列番号126および125；抗ASGR1 Rspo3 RE、配列番号128および127；抗ASGR1 Rspo3 EA、配列番号130および129；抗ASGR1 Rspo3 EEARA、配列番号132および131。

#### 【0224】

図16Bに示されるように、これらの組み合わせの全ては、抗GFP対照に融合した野生型Rspo3と比較してタンパク質の活性を有意に低下させ、それらのRspo-LGR相互作用の破壊と一致した。抗ASGR1標的ドメインに融合させると、ダイナミックレンジ（標的活性と抗GFP対照融合タンパク質のそれとの差）は選択された特定の変異によって変化したが、全ての変異体は増強された活性を示した。それらは全て、組織特異的Wntシグナル増強分子設計に関する構築を支持する（図16C）。

#### 【0225】

##### 実施例13

##### 非RSPベースの作用ドメイン

作用ドメインとして非Rspoベースの構造を使用することの実現可能性を実証するために、抗ヒトZNRf3 mAbのFab断片（特許WO2013054307A2からのAb2）を抗ASGR1、抗TFR1、または抗GFPのIgGに融合した「Fab-IgG」融合タンパク質を設計した（図17A）。抗ZNRf3抗GFP構築物は、示されたポリペプチド配列およびコードポリヌクレオチド配列を有する以下のポリペプチドを含んでいた：抗GFP軽鎖（S176K）（配列番号134および133）、抗ZNRf3軽鎖（S176E）（配列番号136および135）、ならびに抗ZNRf3-抗GFP融合重鎖（配列番号138および137）。抗ZNRf3-抗ASGR1構築物は、示されたポリペプチド配列およびコードポリヌクレオチド配列を有する以下のポリペプチドを含んでいた：抗ASGR1軽鎖（S176K）（配列番号140および139）、抗ZNRf3軽鎖（S176E）（配列番号136および135）、ならびに抗ZNRf3-抗ASGR1融合重鎖（配列番号142および141）。抗ZNRf3-抗TFR1構築物は、示されたポリペプチド配列およびコードポリヌクレオチド配列を有する以下のポリペプチドを含んでいた：抗TFR1軽鎖（S176K）（配列番号144および143）、抗ZNRf3軽鎖（S176E）（配列番号1136および135）、ならびに抗ZNRf3-抗TFR1融合重鎖（配列番号146および145）。

#### 【0226】

これらのタンパク質をExp1293F細胞に一過性にトランスフェクトし、プロテインAアフィニティー樹脂、続いてサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、次いで30%Wnt3a馴化培地の存在下でSTFアッセイによりHuh-7細胞中で試験した。図17Bに示すように、抗ASGR1および抗TFR1「標的化」抗ZNRf3モジュールは両方とも、抗GFP融合タンパク質の活性を超える活性を示し、Rspo構造とは無関係のZNRf3/RNF43 E3リガーゼに対する純粋な結合剤を用いて組織特異的Wntシグナル増強分子を構築する可能性を検証した。

#### 【0227】

##### 実施例14

肝臓を標的としたWNTエンハンサーに加えて、組織を標的としたWNTエンハンサー

上記に提供された例は、様々な用途のために肝臓を標的とする能力を有するWntシグナル伝達増強分子を生成するためにASGR1結合剤を利用した。TFR1結合剤はまた、肝臓、ならびにそれが発現されるより広範囲の組織を標的とし得る。肝臓を超えた組織標的を提供するために、公共の遺伝子発現データベース（<https://www.pr>

10

20

30

40

50

oteinatlas.org/)を検索することによって、追加の組織特異的細胞表面分子を同定した。LYPD3、Ly6/PLAURドメイン含有タンパク質3、およびDSG3、デスモグレイン3は、それらが口腔粘膜、皮膚および扁桃腺由来の粘膜上皮細胞において非常に豊富かつ特異的に発現されるので、標的分子として選択された。さらに、それらの特異的抗体配列は以前に公開されていた(US20170158775A1、mAbクローンM31-B01がLYPD3結合剤として選択され;US20100092457A1、mAbクローンDF364cがDSG3結合剤として選択された)。

#### 【0228】

粘膜上皮細胞特異的WNTエンハンサーを得るために、Rspo2(F105R/F109A)変異体を、「エフェクターレス」IgG1(Lo Mら、2017 The Journal of Biological Chemistry、292)の形で抗LYPD3または抗DSG3のいずれかの重鎖のN末端に融合した。抗GFP Rspo2(F105R/F109A)構築物は、示されたポリペプチド配列を有しポリヌクレオチド配列をコードする以下のポリペプチドを含んでいた:抗GFP軽鎖(配列番号36および35)およびRspo2(F105R/F109A)、抗GFP重鎖IgG2(配列番号38および37)。抗LYPD3 Rspo2(F105R/F109A)構築物は、示されたポリペプチド配列およびそれをコードするポリヌクレオチド配列を有する以下のポリペプチドを含んでいた:抗LYPD3軽鎖(配列番号148および147)およびRspo2(F105R/F109A)、抗LYPD3重鎖LALA-PG(配列番号150および149)。抗DSG3 Rspo2(F105R/F109A)構築物は、示されたポリペプチド配列を有しポリヌクレオチド配列をコードする以下のポリペプチドを含んでいた:抗DSG3軽鎖(配列番号152および151)、ならびにRspo2(F105R/F109A)、抗DSG3重鎖LALA-PG(配列番号154および153)。

#### 【0229】

融合タンパク質をExpi293F細胞(Thermo Fisher Scientific)から発現させ、プロテインA樹脂、続いてサイズ排除カラム(S200、GE Healthcare)分画を用いて精製し、典型的な推定純度は>90%であった。これらのタンパク質のWntシグナル増強活性を、2つの口腔粘膜細胞株CAL27およびSCC25、ならびに対照A431細胞株で試験した。

#### 【0230】

図18Aに示されるように、LYPD3およびDSG3遺伝子は、CAL27およびSCC25細胞において高度に発現されたが、A431細胞においては非常に低い発現が観察された。LYPD3およびDSG3を標的としたRspo2変異体融合タンパク質はどちらも、CAL27細胞において抗GFP対照よりはるかに強力な活性を示した。SCC25細胞において、DSG3標的化分子は抗GFP対照よりもはるかに活性であり、一方LYPD3標的化タンパク質のそれはそれほど顕著ではなかった。これはSCC25細胞上のより低いLYPD3受容体レベルの反映であり得る。これらの結果は、標的ドメインとして使用された場合、組織特異的抗体が標的細胞に対するRspo2変異体活性を増強し得ることを確認する。対照的に、LYPD3およびDSG3標的化分子の活性は、LYPD3およびDSG3の発現を欠くA431細胞における抗GFP対照融合タンパク質と区別できず、細胞表面受容体への特異的結合が活性の増強に必要であることを明らかに示した。組織特異的活性の増強に加えて、抗LYPD3および抗DSG3融合タンパク質は、標的CAL17細胞においてRspo2陽性対照よりも強力であり、より良いEC50およびRspo2陽性対照に対してより良好または同等のEmaxを示した。

#### 【0231】

##### 実施例15

組織特異的WNTシグナルエンハンサーによるWNT応答遺伝子のインビボ誘導

設計したWntシグナルエンハンサーのインビボ活性を調べるために、Wnt応答遺伝子であるAxin2の誘導を調べた。図19Aに示したように、AAV-hASGR1を最初に動物当たり1E11の力価で8週齢のオスのマウスに静脈内注射した。これはマウ

10

20

30

40

50

ス肝臓におけるヒトASGR1遺伝子発現をもたらした。7日後、精製したタンパク質を特定の用量で8つの群に分けて静脈内注射した。単独で、またはWntシグナルと組み合わせるいずれかで、0.46mg/kgのRspo2陽性対照、1mg/kgの抗GFPP-Rspo2(F105R/F109A)、および1mg/kgの抗ASGR1-Rspo2(F105R/F109A)3mg/kgのアゴニスト18R5-Dkk1c(Janda et al., 2017 Nature)。8時間後、マウスを安楽死させ、肝臓サンプルを遺伝子発現の定量的PCR分析のために採取した。抗GFPP構築物は、示されたポリペプチドおよびコードポリヌクレオチド配列を有する以下のポリペプチドを含んでいた：抗GFPP軽鎖（配列番号36および35）および抗GFPP重鎖IgG1(LALA-PG)（配列番号156および155）。抗GFPP-Rspo2(F105R/F109A)、N-HC構築物は、配列番号35～38に提供されるポリペプチドを含んでいた。抗ASGR1-IgG2-N-HC構築物は、配列番号71～74に提供されるポリペプチドを含んでいた。18R5-Dkk1c構築物は、配列番号158に開示されているポリペプチド配列を有し、配列番号157に開示されているポリヌクレオチド配列によってコードされていた。

#### 【0232】

図19Bは、マウス肝臓における異所性hASGR1の発現レベルを示し、これは全ての実験群にわたって同等であった。Rspo2陽性対照タンパク質単独でマウスを処置すると、Rspoタンパク質のインビボ機能と一致して、中程度だが統計的に有意なAxin2遺伝子発現の誘導が誘導された（図19C、左）。興味深いことに、抗ASGR1-Rspo2(F105/F109)単独での処理もまた、対照抗GFPP融合タンパク質では観察されなかったAxin2レベルの傾向的増加を誘導した。18R5-Dkk1cはWntの代理である。3mg/kgでは、それだけではAxin2遺伝子の発現に有意な変化は生じなかった。しかしながら、Rspo2と18R5-Dkk1cとの間に明らかな相乗作用が観察され（図19C、右）、これはRspoタンパク質のWntシグナル増強活性と一致する。このような相乗作用は抗ASGR1融合タンパク質でも観察されたが、抗GFPP対照では観察されず、マウス肝臓におけるWntシグナル増強を表すAxin2の誘導が抗ASGR1標的ドメインに特異的に依存することを示唆する。

#### 参考文献：

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

Knight MN and Hankenson KD. R-spondins: novel extracellular regulators of the skeleton. Matrix Biology 37: 157-161.

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

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

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

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huan

10

20

30

40

50

g Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. 2012, Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1:e00049.

Worthen CA and Enns CA. 2014, The role of hepatic transferrin receptor 2 in the regulation of iron homeostasis in the body. *Frontiers in Pharmacology* 5:34

Mannstadt M, Juppner H, and Gardella TJ. 1999, Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *American Journal of Physiology* 277:F665 - F675.

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

Lo M, Kim HS, Tong RK, Bainbridge TW, Vernes JM, Zhang Y, Lin YL, Chung S, Dennis MS, Zucherro YJ, Watts RJ, Couch JA, Meng YG, Atwal

JK, Brezski RJ, Spiess C, Ernst JA. 2017, Effector - attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. *J BiolChem*. 292:3900 - 3908.

Jacobsen FW, Stevenson R, Li C, Salimi-Moosavi H, Liu L, Wen J, Luo Q, Daris K, Buck L, Miller S, Ho SY, Wang W, Chen Q, Walker K, Wypych J, Narhi L, Gunasekaran K. 2017 Engineering an IgG Scaffold Lacking Effector Function with Optimized Developability. *J BiolChem*. 292:1865 - 1875.

Paret C, Bourouba M, Beer A, Miyazaki K, Schnolzer M, Fiedler S, Zoller M. *International Journal of Cancer*. 2005 Jul 10;115(5):724 - 33. Ly6 family member C4.4A binds laminins 1 and 5, associates with galectin-3 and supports cell migration.

Arumugam T, Deng D, Bover L, Wang H, Logsdon CD, Ramachandran V. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015 Apr;14(4):941 - 51. New Blocking Antibodies against Novel AGR2 - C4.4A Pathway Reduce Growth and Metastasis of Pancreatic Tumors and Increase Survival in Mice.

Ngora H1, Galli UM, Miyazaki K, Zoller M. *Neoplasia*. 2012 Feb;14(2):95 - 107. Membrane-bound and exosomal metastasis-associated C

10

20

30

40

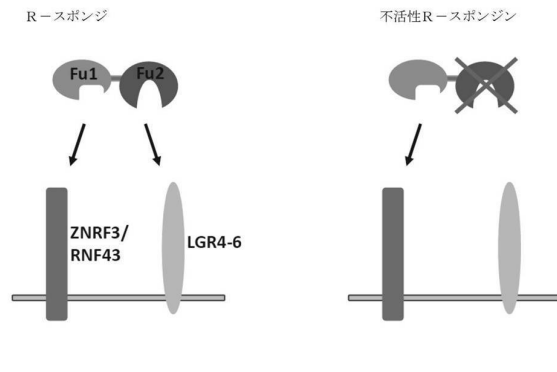
50

4.4 A promotes migration by associating with the (6) (4) integrin and MT1-MMP.

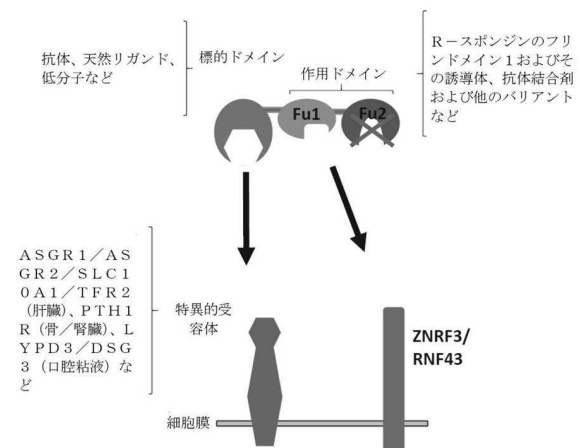
Wolfgang-Moritz Heupel, Detlef Zillikens, Detlev Drenckhahn and Jens Waschke Pemphigus. Vulgaris IgG Directly Inhibit Desmoglein 3-Mediated Transinteraction. Journal of Immunology. August 1, 2008, 181(3) 1825-1834.

【図面】

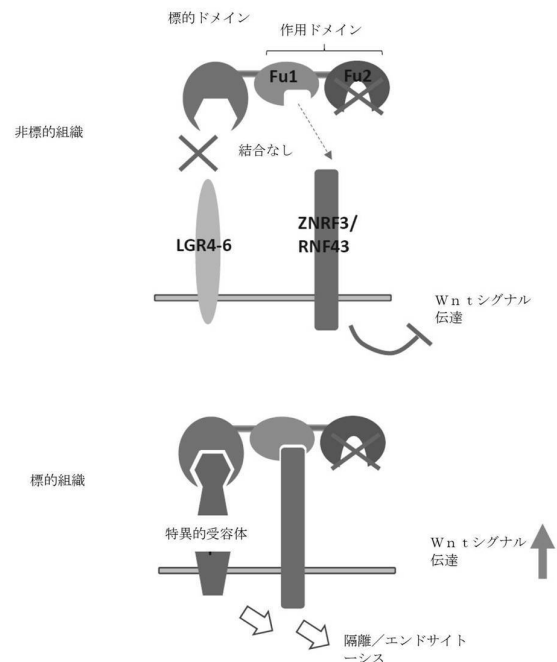
【 図 1 】



【圖 2】



【圖 3】



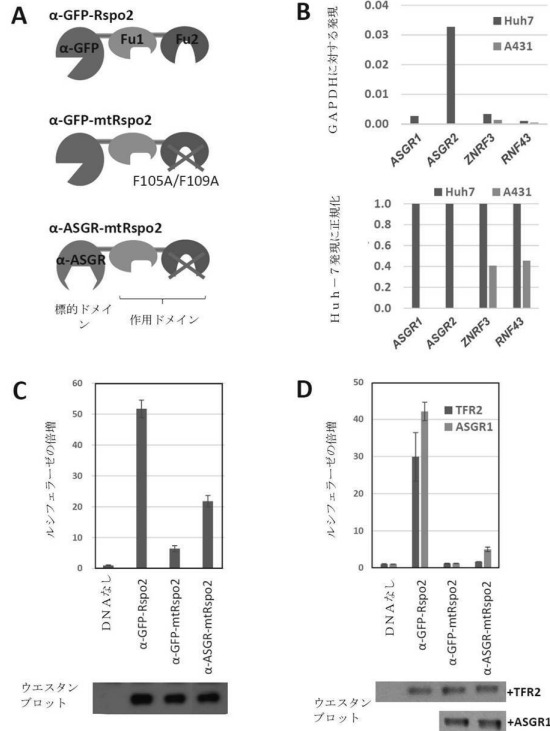
【圖 4】

[illegible]

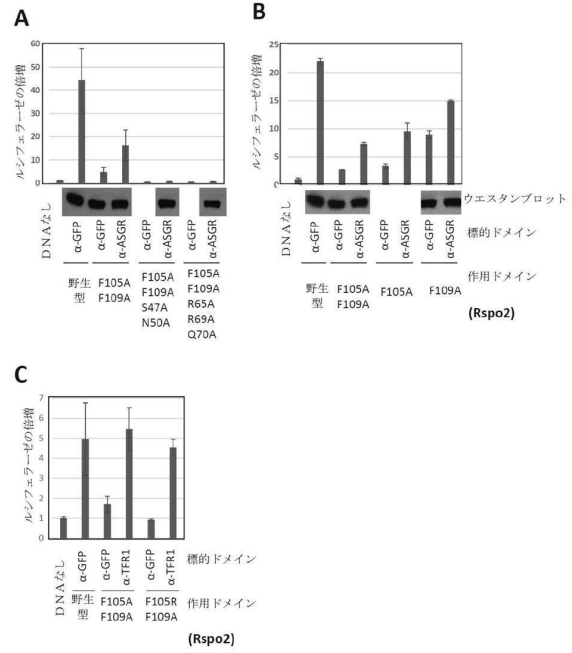
 Fu1  
 Fu2



【図 5】



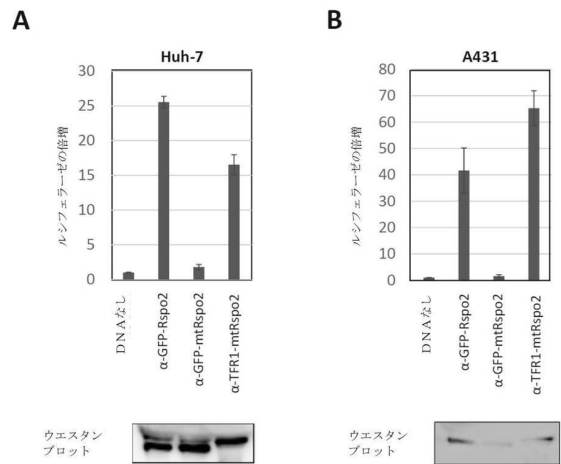
【図 6】



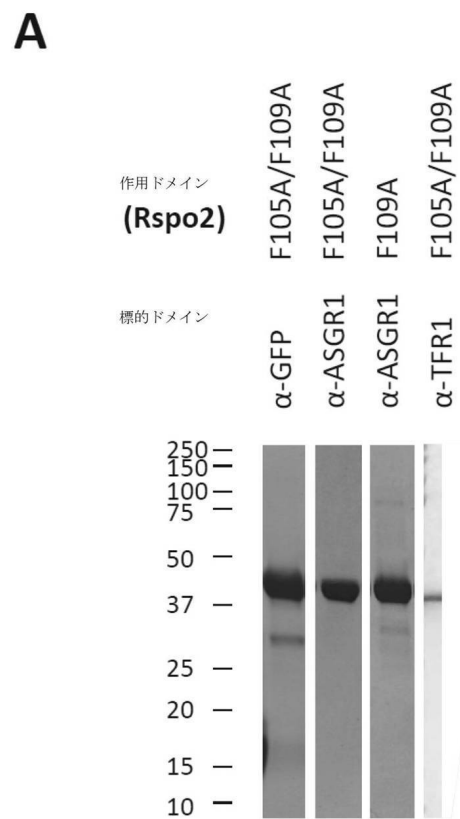
10

20

【図 7】



【図 8 - 1】

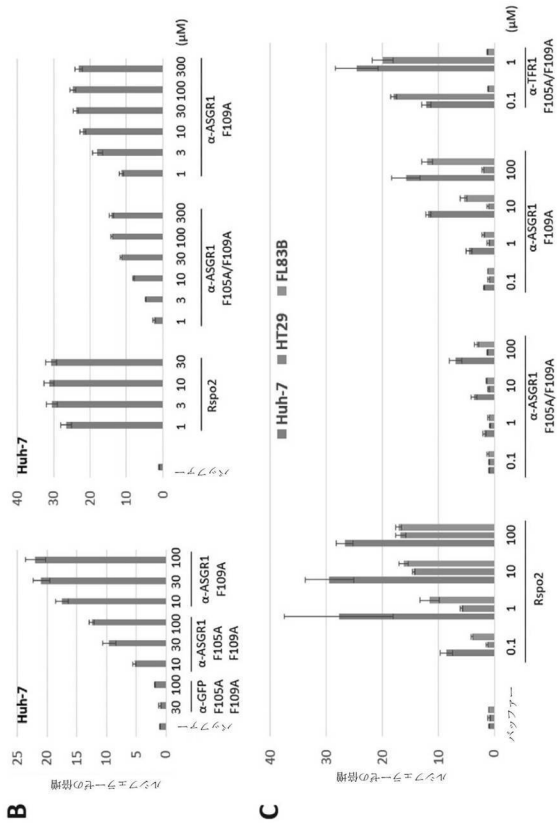


30

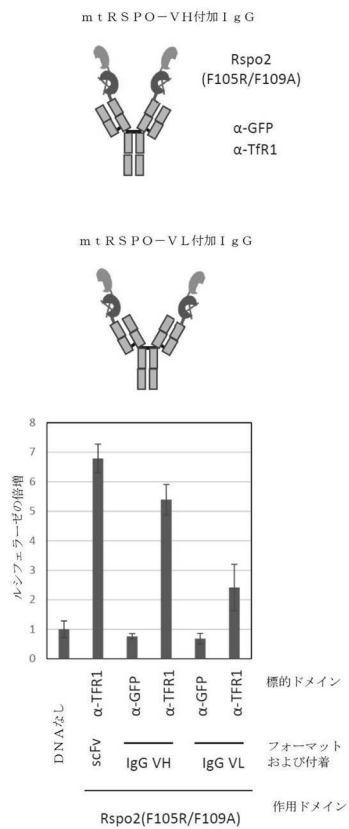
40

50

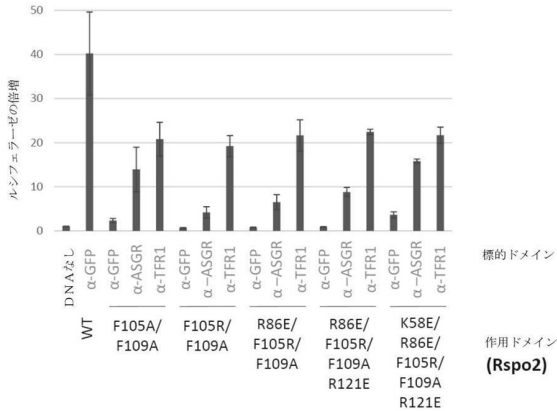
【図 8 - 2】



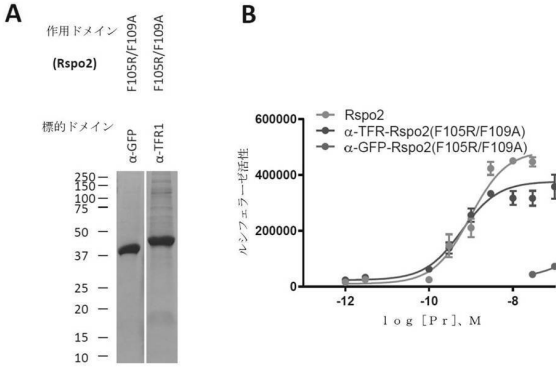
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

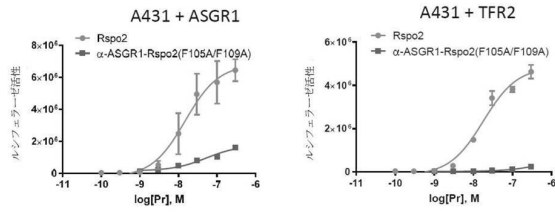
20

30

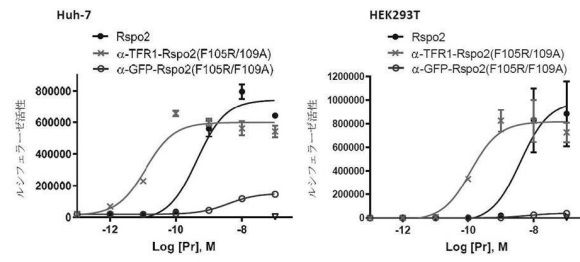
40

50

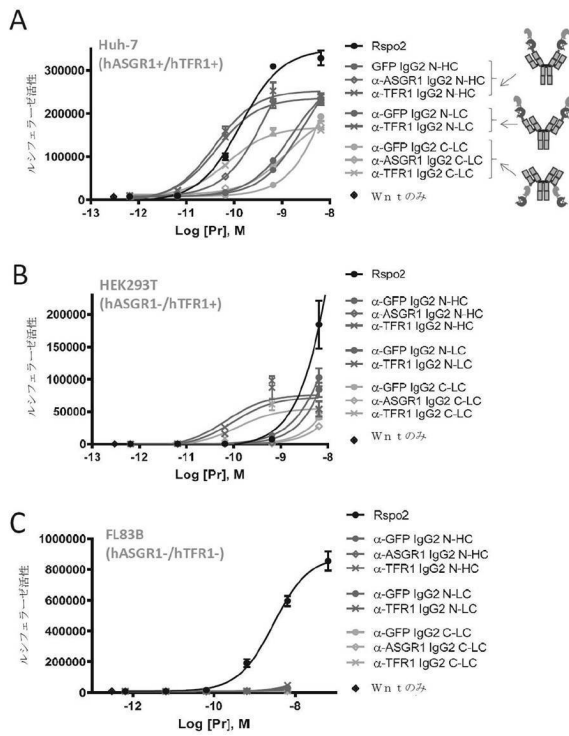
【図 1 2】



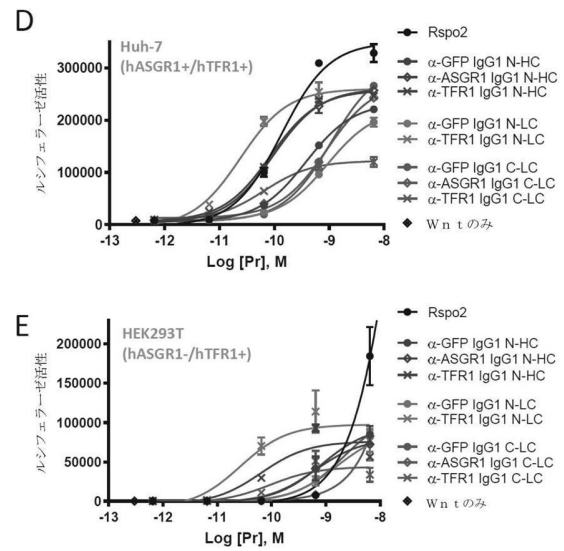
【図 1 3】



【図 1 4 - 1】



【図 1 4 - 2】



10

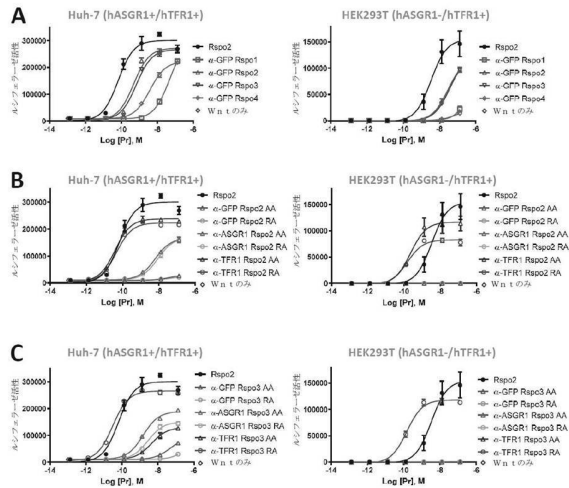
20

30

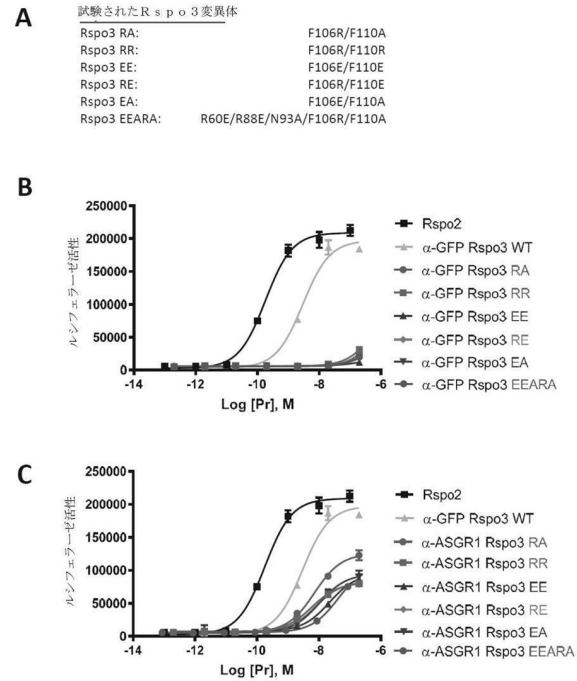
40

50

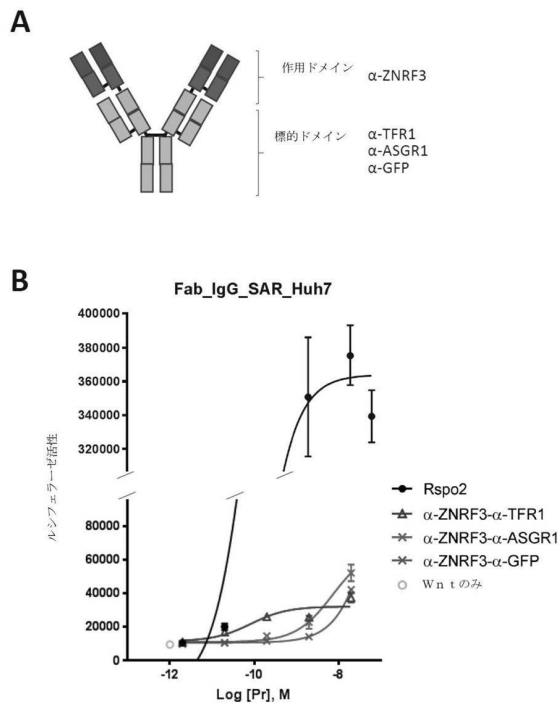
## 【図 15】



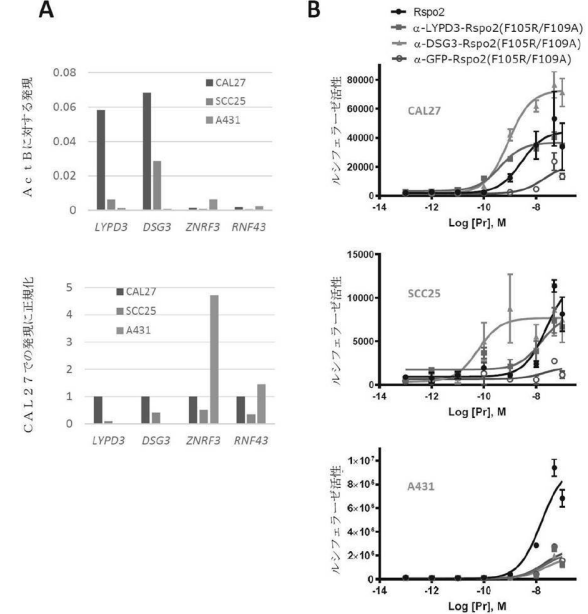
## 【図 16】



## 【図 17】



## 【図 18】



10

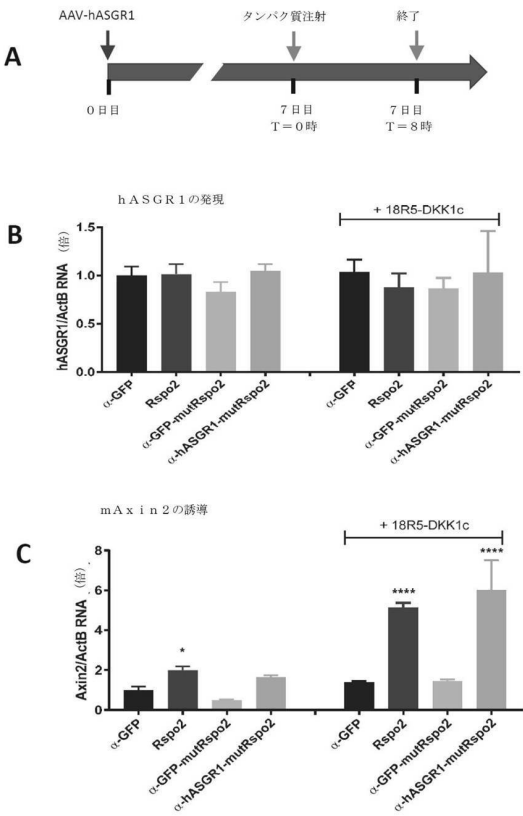
20

30

40

50

【図 19】



【配列表】

0007635291000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
			C 1 2 N	15/63	Z

米国(US)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゼンジャン ジャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 6 , オールバニー , ソラーノ アベニュー 7 0 3

(72)発明者 ジェニファー ジーン ブレイディ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 3 , マウンテン ビュー , カッサンドラ ウェイ 1 7

(72)発明者 アーロン ケン サト

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , バーリンゲーム , コロナド ウェイ 1 6 4 0

(72)発明者 ウェン - チェン イェー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2 , ベルモント , ベルモント ウッズ ウェイ 2 9 2 0

(72)発明者 ヤン リー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 0 , マウンテン ビュー , クエスタ ドライブ 1 1 4 2

(72)発明者 山口 鉄平

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 0 , エル セリート , リッチモンド ストリート 6 4 9

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 0 2 3 7 0 9 ( WO , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 0 3 2 3 2 ( US , A 1 )

特表 2 0 1 4 - 5 3 0 8 1 6 ( JP , A )

国際公開第 2 0 0 8 / 0 9 3 6 4 6 ( WO , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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

U n i P r o t / G e n e S e q