

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-512735

(P2022-512735A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 4
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		4 C 0 8 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全112頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-521144(P2021-521144)	(71)出願人	592017633 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ ション
(86)(22)出願日	令和1年10月18日(2019.10.18)		
(85)翻訳文提出日	令和3年6月7日(2021.6.7)		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/056910		
(87)国際公開番号	WO2020/081920	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(87)国際公開日	令和2年4月23日(2020.4.23)	(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(31)優先権主張番号	62/747,903	(74)代理人	100153693 弁理士 岩田 耕一
(32)優先日	平成30年10月19日(2018.10.19)	(74)代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	チェ, マイケル コンソク アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 最終頁に続く
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 肝疾患を治療するための組成物および方法

(57)【要約】

本明細書には、肝疾患を治療するための方法および組成物が記載されている。本発明の態様は、対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤を投与することに関する。本発明の別の態様は、対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤を発現するH S C を投与することに関する。

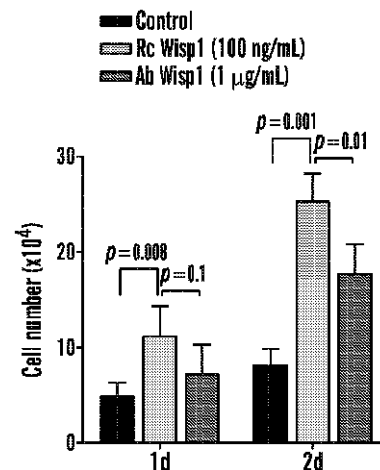


FIG. 38B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法。

【請求項 2】

前記肝疾患は、アラジール症候群；アルコール関連肝疾患；アルファ 1 アンチトリプシン欠損症；自己免疫性肝炎；良性肝腫瘍；胆道閉鎖症；肝硬変；クリグラー - ナジャー症候群；ガラクトース血症；ジルベール症候群；ヘモクロマトーシス；肝性脳症；A 型肝炎；B 型肝炎；C 型肝炎；肝腎症候群；妊娠性肝内胆汁うっ滞症（I C P）；リソソーム酸リパーゼ欠損症（L A L - D）；肝嚢腫；肝臓がん；新生児黄疸；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；原発性胆汁性胆管炎（P B C）；原発性硬化性胆管炎（P S C）；進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（P F I C）；ライ症候群；I 型糖原病；強皮症；およびウィルソン病からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 W I S P 1 は、W I S P 1 v、W I S P 1 v x、および W I S P 1 デルタエクソン 3 ~ 4 からなる群から選択されるスプライスバリエーションである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4、6、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

W I S P 1 は、標的細胞において阻害される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的細胞は、哺乳動物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記標的細胞は、肝星細胞、線維芽細胞、または筋線維芽細胞である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記肝星細胞は、静止状態にある、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体または抗体試薬は、直接注射、静脈内送達、皮下注射、筋肉注射、経皮、経口、または経鼻投与により投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

W I S P 1 の阻害は、W I S P 1 活性を阻害することであるか、または W I S P 1 タンパク質レベルを低減させることである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

W I S P 1 の活性は、適切な対照と比較して、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 9 0 %、またはそれよりも大きく阻害される、請求項 1 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

W I S P 1 のレベルは、適切な対照と比較して、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 9 0 %、またはそれよりも大きく低減される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 14】

W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 15】

前記 W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A

50

B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4、6、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

肝疾患を治療または予防するために製剤化されている、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

対象の肝疾患を治療するための方法であって、

a . 対象の生物学的試料中の W I S P 1 および / または A c t a 2、C o l 1 a 1 のレベルを検出すること、

b . (a) の測定値を参照レベルと比較すること、

c . 参照レベルと比較して (a) の W I S P 1 および / または Y a p、A c t a 2、C o l 1 a 1 が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること、ならびに

d . 肝疾患を有する前記対象に、W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬を投与すること

を含む方法。

【請求項 1 9】

(a) の前に、前記対象から生物学的試料を得ることをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、または強皮症である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記生物学的試料は、血液試料、組織、パフィーコート、血清、または組織である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4、6、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤を投与することを含む方法。

【請求項 2 5】

前記肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、および強皮症からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 W I S P 1 は、W I S P 1 v、W I S P 1 v x、および W I S P 1 デルタエクソン 3 ~ 4 からなる群から選択されるスプライスバリエーションである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 W I S P 1 を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A、および s i R N A からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記マイクロRNAは、マイクロRNA 1 5 a または m i R N A 4 1 2 である、請求項 2 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

前記 W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4、6、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記作用剤は、直接注射、皮下注射、筋肉注射、または経鼻投与により投与される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 32】

W I S P 1 の阻害は、W I S P 1 活性を阻害することであるか、または W I S P 1 タンパク質レベルを低減させることである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 33】

W I S P 1 の活性は、適切な対照と比較して、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 9 0 %、またはそれよりも大きく阻害される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

W I S P 1 のレベルは、適切な対照と比較して、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 9 0 %、またはそれよりも大きく低減される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

W I S P 1 は、標的細胞において阻害される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 36】

W I S P 1 を阻害する作用剤および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 37】

前記 W I S P 1 を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A、および s i R N A からなる群から選択される、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記マイクロRNAは、マイクロRNA 15 a または m i R N A 4 1 2 である、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

対象の肝疾患を治療するための方法であって、

- a . 対象の生物学的試料中の W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 のレベルを検出すること、
 - b . (a) の測定値を参照レベルと比較すること、
 - c . 参照レベルと比較して (a) の W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること、ならびに
 - d . 肝疾患を有する前記対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤を投与すること
- を含む方法。

【請求項 40】

(a) の前に、前記対象から生物学的試料を得ることをさらに含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、または強皮症である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記生物学的試料は、血液試料、組織、パフィーコート、血清、または組織である、請求項 39 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 43】

前記 W I S P 1 を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A、および s i R N A からなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 44】

前記マイクロRNAは、マイクロRNA 15 a または m i R N A 4 1 2 である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記 W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、請求項 43 に記載の方法。 10

【請求項 46】

前記抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4、6、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 47】

W I S P 1 を阻害する作用剤を発現する遺伝子操作された肝星細胞またはその集団を生成するための方法であって、前記細胞を、W I S P 1 を阻害する作用剤と接触させること、および前記作用剤の発現を可能にするのに十分な時間にわたって前記細胞を培養することを含む方法。 20

【請求項 48】

前記細胞は、静止状態にある、請求項 47 に記載の方法。 20

【請求項 49】

前記接触は、前記細胞を、作用剤または前記作用剤をコードするベクターと接触させることを含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

前記接触は、形質導入、ヌクレオフェクション、エレクトロポレーション、直接注射、および/またはトランスフェクションを含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 51】

前記 W I S P 1 を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A、および s i R N A からなる群から選択される、請求項 47 に記載の方法。 30

【請求項 52】

前記マイクロRNAは、マイクロRNA 15 a または m i R N A 4 1 2 である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記 W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

前記抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4、6、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、請求項 51 に記載の方法。 40

【請求項 55】

請求項 47 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法により生成される肝星細胞を含む細胞株。

【請求項 56】

請求項 47 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法により生成される肝星細胞またはその集団、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 57】

肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、請求項 47 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法により生成される細胞、請求項 55 に記載の細胞株、または請求項 56 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。 50

【請求項 58】

対象の線維症を低減するための方法であって、それを必要とする対象に、請求項 47 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法により生成される細胞、請求項 55 に記載の細胞株、または請求項 56 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 59】

対象の肝疾患を治療するための方法であって、

a . 参照レベルと比較して W I S P 1 および / または Y a p 、 A c t a 2 、 または C o l 1 a 1 が増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること、ならびに

b . 肝疾患を有する前記対象に、W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬を投与すること

を含む方法。

【請求項 60】

対象の肝疾患を治療するための方法であって、

a . 参照レベルと比較して W I S P 1 および / または Y a p 、 C o l 1 a 1 、 A c t a 2 が増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること、ならびに

b . 肝疾患を有する前記対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤試薬を投与すること

を含む方法。

【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、2018年10月19日に出願された米国特許仮出願第62/747,903号の特許法第119条(e)に基づく利益を主張するものであり、この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の分野は、肝疾患の治療に関する。

【背景技術】

【0003】

肝臓は、代謝産物を濾過し、タンパク質を合成する非常に重要な臓器であり、消化に必要な生化学物質を産生することができる。具体的には、肝臓は、胆汁を産生して、脂肪を分解し、脂質を乳化する。慢性および進行性の肝疾患は、胆汁の蓄積、重度の炎症、瘢痕化、および線維症に結び付き得る肝臓の胆管の進行性破壊をもたらす場合がある。健常肝臓組織が瘢痕組織に置き換わると、肝機能は益々損なわれてしまう。一部の肝疾患（例えば、原発性胆汁性胆管炎（PBC））の場合、生存率を向上させることができる薬物は、ウルソデオキシコール酸（UDCA）のみである。残念ながら、UDCA治療患者のおよそ40%は、この療法に対して十分な応答を示さない。したがって、PBCなどの肝疾患の治療には、より有効な治療薬が必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

本明細書に記載の発明は、部分的には、miRNA-15a、miRNA-412、および抗WISP1抗体によるWISP1の阻害が、肝臓の線維形成進行に中心的な役割を果たす細胞タイプである活性化肝星細胞（HSC）の静止状態を誘導したという知見に関する。miR-15aおよびWISP1 IgGは、WISP1を直接的に標的として、活性化HSCにおけるこのタンパク質の線維形成促進機能を抑制することができることが本明細書にさらに示されている。

【0005】

したがって、本明細書に記載の一態様は、肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法である。

10

20

30

40

50

【0006】

任意の態様の一実施形態では、肝疾患は、アラジール症候群；アルコール関連肝疾患；アルファ1 - アンチトリプシン欠損症；自己免疫性肝炎；良性肝腫瘍；胆道閉鎖症；肝硬変；クリグラー - ナジャー症候群；ガラクトース血症；ジルベール症候群；ヘモクロマトーシス；肝性脳症；A型肝炎；B型肝炎；C型肝炎；肝腎症候群；妊娠性肝内胆汁うっ滞症（ICP）；リソソーム酸リパーゼ欠損症（LAL-D）；肝嚢腫；肝臓がん；新生児黄疸；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；原発性胆汁性胆管炎（PBC）；原発性硬化性胆管炎（PSC）；進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（PFIC）；ライ症候群；I型糖原病；強皮症；およびウィルソン病からなる群から選択される。

【0007】

任意の態様の一実施形態では、WISP1は、WISP1v、WISP1vx、およびWISP1デルタエクソン3～4からなる群から選択されるスプライスパリアントである。

【0008】

任意の態様の一実施形態では、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬は、mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、およびab65943からなる群から選択される。

【0009】

任意の態様の一実施形態では、抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号1～4、6、または12～120のいずれか1つと少なくとも70%相同性である。

【0010】

任意の態様の一実施形態では、対象は哺乳動物である。

【0011】

任意の態様の一実施形態では、WISP1は、標的細胞において阻害される。任意の態様の一実施形態では、標的細胞は、哺乳動物細胞である。任意の態様の一実施形態では、標的細胞は、肝星細胞、線維芽細胞、または筋線維芽細胞である。任意の態様の一実施形態では、肝星細胞は、静止状態にある。

【0012】

任意の態様の一実施形態では、抗体または抗体試薬は、直接注射、皮下注射、筋肉注射、経口、経皮、または経鼻投与により投与される。

【0013】

任意の態様の一実施形態では、WISP1の阻害は、WISP1活性を阻害すること、またはWISP1タンパク質レベルを低減することである。任意の態様の一実施形態では、WISP1の活性は、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも大きく阻害される。任意の態様の一実施形態では、WISP1のレベルは、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも大きく低減される。

【0014】

本明細書に記載の別の態様は、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0015】

任意の態様の一実施形態では、組成物は、肝疾患を治療または予防するために製剤化されている。

【0016】

本明細書に記載の別の態様は、対象の肝疾患を治療するための方法であって、(a)対象の生物学的試料中のWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2のレベルを検出すること；(b)(a)の測定値を参照レベルと比較すること；(c)参照レベルと比較して(a)のWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること；ならびに(d)肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与すること、を含む方法を提供する

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

任意の態様の一実施形態では、本方法は、(a)の前に、対象から生物学的試料を得ることをさらに含む。

【 0 0 1 8 】

任意の態様の一実施形態では、生物学的試料は、血液試料、組織、パフィーコート、血清、または組織である。

【 0 0 1 9 】

本明細書に記載のさらに別の態様は、肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、W I S P 1を阻害する作用剤を投与することを含む方法を提供する。

10

【 0 0 2 0 】

任意の態様の一実施形態では、W I S P 1を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A、l n c R N A、m R N A、およびs i R N Aからなる群から選択される。任意の態様の一実施形態では、マイクロRNAは、m i R N A 1 5 aまたはm i R N A 4 1 2である。

【 0 0 2 1 】

任意の態様の一実施形態では、作用剤は、直接注射、皮下注射、筋肉注射、経口、経皮、または経鼻投与により投与される。

【 0 0 2 2 】

本明細書に記載の別の態様は、W I S P 1を阻害する作用剤および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

20

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載の別の態様は、対象の肝疾患を治療するための方法であって、(a)対象の生物学的試料中のW I S P 1および/またはA c t a 2のレベルを検出すること；(b) (a)の測定値を参照レベルと比較すること；(c)参照レベルと比較して(a)のW I S P 1および/またはA c t a 2が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること；ならびに(d)肝疾患を有する対象に、W I S P 1を阻害する作用剤を投与すること、を含む方法を提供する。

【 0 0 2 4 】

本明細書に記載のさらに別の態様は、W I S P 1を阻害する作用剤を発現する遺伝子操作された肝星細胞またはその集団を生成するための方法であって、細胞を、W I S P 1を阻害する作用剤と接触させること、および作用剤の発現を可能にするのに十分な時間にわたって細胞を培養すること、を含む方法を提供する。

30

【 0 0 2 5 】

任意の態様の一実施形態では、細胞は、静止状態にある。

【 0 0 2 6 】

任意の態様の一実施形態では、接触は、細胞を、作用剤または作用剤をコードするベクターと接触させることを含む。任意の態様の一実施形態では、接触は、形質導入、ヌクレオフェクション、エレクトロポレーション、直接注射、および/またはトランスフェクションを含む。

40

【 0 0 2 7 】

本明細書に記載の別の態様は、本明細書に記載の方法のいずれかにより生成される肝星細胞を含む細胞株を提供する。

【 0 0 2 8 】

本明細書に記載の別の態様は、本明細書に記載の方法のいずれかにより生成される肝星細胞またはその集団、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載の別の態様は、肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載の方法のいずれかにより生成された細胞、本明細書に記載の生成された細胞のいずれか、または本明細書に記載の生成された細胞を含む医薬組

50

成物のいずれかを投与することを含む方法を提供する。

【0030】

本明細書に記載の別の態様は、対象の線維症を低減するための方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載の方法のいずれかにより生成された細胞、本明細書に記載の生成された細胞のいずれか、または本明細書に記載の生成された細胞を含む医薬組成物のいずれかを投与することを含む方法を提供する。

【0031】

本明細書で提供される別の態様は、対象の肝疾患を治療するための方法であって、(a) 参照レベルと比較してWISP1および/またはActa2レベル(例えば、mRNA、miRNA、タンパク質レベルなど)が増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること; ならびに(b) 肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与すること、を含む方法である。

10

【0032】

本明細書で提供される別の態様は、対象の肝疾患を治療するための方法であって、(a) 参照レベルと比較してWISP1および/またはActa2レベルが増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること; ならびに(b) 肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する作用剤試薬を投与すること、を含む方法である。

【0033】

定義

便宜的に、本明細書、例、および添付の特許請求の範囲で使用されている一部の用語および語句の意味を下記に提供する。別様の記述がない限り、または状況が別様に示唆しない限り、以下の用語および語句は、下記に提供されている意味を含む。定義は、特定の実施形態の説明を助けるために提供されており、特許請求されている技術を限定することは意図されていない。本技術の範囲は、特許請求の範囲によってのみ限定されるからである。別様の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本技術が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。当技術分野における用語の使用法と本明細書で提供されるその定義との間に明らかな矛盾がある場合、明細書内で提供される定義が優先するものとする。

20

【0034】

免疫学および分子生物学の一般用語の定義は、以下の文献に見出すことができる: The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005;

30

40

50

およびCurrent Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kr uisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) Jo hn Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)。こ うした文献の内容はすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0035】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、「治療すること」、または「改善」という用語は、治療的処置を指し、目的は、肝疾患、例えば肝線維症に関連付けられる状態の進行または重症度を逆行、緩和、改善、阻害、緩徐、または止めることである。「治療すること」という用語は、肝疾患の少なくとも1つの有害効果または症状、例えば、黄疸、静脈瘤出血を低減または緩和すること、線維症、瘢痕、および腹水を低減することを含む。1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減される場合、治療は、一般に「有効」である。あるいは、疾患の進行が低減されるかまたは停止した場合、治療は「有効」である。すなわち、「治療」は、症状またはマーカーを改善することだけでなく、治療が存在しない場合に予想されることになるものと比較して、症状の進行もしくは悪化を休止させること、または少なくとも緩徐すること、または逆行させることも含む。有益なまたは望ましい臨床結果としては、これらに限定されないが、1つもしくは複数の症状の緩和、疾患の範囲の縮小、疾患の安定した（つまり悪化しない）状態、疾患進行の遅延もしくは緩徐、疾患状態の改善もしくは緩解、寛解（部分的かまたは全体的かに関わらず）、および/または死亡率減少が挙げられ、これらは、検出可能であるかまたは検出不能であるかを問わない。疾患の「治療」という用語は、疾患の症状または副作用からの救済（緩和療法を含む）を提供することも含む。

【0036】

本明細書で使用される場合、「予防する」または「予防」は、方法論（例えば、本明細書に記載のような組成物の投与など）の作用のため疾患状態が生じない任意の方法論を指す。一態様では、予防は、疾患が、未治療対照で生ずる程度には確立されないことを意味する場合もあることが理解される。したがって、疾患の予防は、対象が疾患を発症し得る可能性を、未治療対象（例えば、本明細書に記載の方法または組成物で治療されていない対象）と比べて低減させることを包含する。

【0037】

本明細書で使用される場合、「投与する」および「注射する」という用語は、本明細書に記載の細胞、例えば肝星細胞または作用剤を対象内に配置する状況であって、配置は、所望の効果（例えば、WISP1レベルまたは活性の減少）が生み出されるように、導入された細胞または作用剤が肝臓またはその領域などの所望の部位に少なくとも部分的に局在化されることをもたらす方法または経路によりなされる、状況では、同義的に使用される。本明細書に記載の作用剤または細胞は、送達された作用剤、細胞、または細胞の成分の少なくとも部分が作用可能であり続ける対象の所望の場所への送達をもたらす任意の適切な経路により投与することができる。対象への投与後の細胞の生存期間は、数時間と短くてもよく、例えば、24時間～数日間であってもよく、数年と長くてもよく、つまり長期間であってもよい。一部の実施形態では、「投与する」という用語は、1つまたは複数の作用剤または細胞を含む医薬組成物を投与することを指す。投与は、それを必要とする対象への直接注射（例えば、標的細胞に直接投与される）、皮下注射、筋肉注射、経口、または経鼻送達により行うことができる。投与は、局所的であってもよくまたは全身性であってもよい。

【0038】

「患者」、「対象」、および「個体」という用語は、本明細書では同義的に使用され、予防的治療を含む治療が提供される動物、特にヒトを指す。「対象」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒトおよび非ヒト動物を指す。「非ヒト動物」および「非ヒト哺乳動物」という用語は、本明細書では同義的に使用され、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類（特に、高等霊長類）、ヒツジ、イヌ、げっ歯動物（例えば、マウスまたはラット）、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、ウシなどの哺乳動物、およびニワトリ、

両生類、爬虫類などの非哺乳動物を含む。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、対象は、疾患モデルとしての実験動物または代用動物である。別の実施形態では、対象は、コンパニオンアニマル（例えば、イヌ、ネコ、ラット、モルモット、ハムスターなど）を含む家畜化動物である。対象は、以前に肝疾患の治療を受けたことがあってもよく、または肝疾患の治療を受けたことがまったくない。対象は、以前に肝疾患を有すると診断されたことがあってもよく、または肝疾患と診断されたことがまったくない。

【0039】

「減少する」、「低減される」、「低減」、または「阻害する」という用語はすべて、本明細書では、特性、レベル、または他のパラメーターが、統計的に有意な量だけ減少または小さくなることを意味するために使用される。一部の実施形態では、「低減する」、「低減」、または「減少する」、または「阻害する」は、典型的には、参照レベル（例えば、所与の治療が存在しない場合）と比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれよりも大きな減少を含むことができる。本明細書で使用される場合、「低減」または「阻害」は、参照レベルと比較して完全な阻害または低減を包含しない。「完全な阻害」は、参照レベルと比較して100%の阻害である。減少は、好ましくは、所与の障害を有しない個体の正常範囲内であると認められるレベルまでの低下であってもよい。例えば、WISP1の阻害は、WISP1活性を阻害することであるか、またはWISP1タンパク質レベルを低減させることである。

10

20

【0040】

「増加された」、「増加する」、または「増強する」、または「活性化する」という用語はすべて、本明細書では、一般に、特性、レベル、または他のパラメーターが、統計的に有意な量だけ増加することを意味するために使用される。一切の疑義を回避するため、「増加された」、「増加する」、または「増強する」、または「活性化する」という用語は、参照レベルと比較して、少なくとも10%の増加、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、もしくは100%増加を含む100%までの増加、または参照レベルと比較して10~100%の任意の増加、または参照レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、少なくとも約20倍の増加、少なくとも約50倍の増加、少なくとも約100倍の増加、少なくとも約1000倍の増加、もしくはそれよりも大きな増加を意味する。

30

【0041】

本明細書で使用される場合、「参照レベル」は、正常なそれ以外は影響を受けていない細胞集団または組織（例えば、健常対象から得られた生物学的試料、または以前の時点で対象から得られた生物学的試料、例えば、肝疾患を有すると診断される前の患者から得られた生物学的試料、または本明細書で開示の作用剤または組成物と接触したことがない生物学的試料）を指す。

40

【0042】

本明細書で使用される場合、「適切な対照」は、未治療のそれ以外は同一の細胞または集団（例えば、本明細書に記載の作用剤もしくは組成物と接触しなかったか、または非対照細胞と比較して同じ様式で接触しなかった、例えば期間が異なっていた生物学的試料）を指す。

【0043】

「薬学的に許容される」という用語は、過度の毒性なしで対象（例えば、哺乳動物または

50

ヒト)に投与することができる化合物および組成物を指すことができる。

【0044】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、活性成分と組み合わせても、成分が生物学的活性を保持することを可能にし、対象の免疫系と非反応性である任意の材料または物質を含むことができる。例としては、これらに限定されないが、リン酸緩衝生理食塩溶液などの標準的な医薬担体のいずれか、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、および種々のタイプの湿潤剤が挙げられる。「薬学的に許容される担体」という用語は、組織培養培地を除外する。医薬担体の非限定的な例としては、ナノ粒子、マイクロ粒子、リポソーム、ポリマーマイクロスフェア、またはポリマー-薬物コンジュゲートなどの粒子またはポリマーに基づくビヒクルが挙げられる。

10

【0045】

本明細書で使用される場合、「WNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1」または「WISP1」または「CCN4」という用語は、細胞接着、遊走、増殖、分化、および生存を含む数多くの多様な細胞機能を有する、WISP1遺伝子によりコードされるマトリクス細胞タンパク質である。肝臓では、WISP1は、筋線維芽細胞に対して活性化された際に肝星細胞(HSC)により分泌される。また、WISP1は、オートクリン系を介して、コラーゲンの活性化および分泌を加速させることによりHSCに影響を及ぼして、線維症を促進する。CCN4、WISP1c、WISP1i、WISP1tc、WISP1-OT1、およびWISP1-UT1としても知られるWISP1の配列は、少なからぬ種で知られており、例えば、ヒトWISP1(NCBI遺伝子ID:8840)ポリペ

20

【0046】

本明細書で使用される場合、「WISP1活性」という用語は、WISP1の細胞機能を指し、例えば、WISP1は、HSCでは、コラーゲンの活性化および分泌を加速して線維症を促進し、p53媒介性アポトーシスを減衰させ、WISP1は、他の細胞タイプでは、TNF誘導性細胞死を阻害することができる。例えば、WISP1活性の増加は、細胞によるコラーゲン沈着の増加を指す場合がある。WISP1活性は、アルファ平滑筋アクチン発現の誘導、またはIL-6のような一部の炎症性サイトカインの発現を指す場合がある。

30

【0047】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸、またはそれらのアナログの単位が組み込まれた任意の分子、好ましくはポリマー分子を指す。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれであってもよい。一本鎖核酸は、変性二本鎖DNAの一方の核酸鎖であってもよい。あるいは、一本鎖核酸は、いかなる二本鎖DNAにも由来しない一本鎖核酸であってもよい。一態様では、核酸はDNAであってもよい。別の態様では、核酸はRNAであってもよい。好適なDNAは、例えば、ゲノムDNAまたはcDNAを含んでいてもよい。好適なRNAは、例えば、mRNAを含んでいてもよい。

40

【0048】

「作用剤」という用語は、本明細書で使用される場合、これらに限定されないが、小分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、薬物、イオンなどの任意の化合物または物質を意味する。「作用剤」は、これらに限定されないが、合成のおよび天然に存在するタンパク質性および非タンパク質性実体を含む、任意の化学的実体または部分であってもよい。一部の実施形態では、作用剤は、核酸、核酸アナログ、タンパク質、抗体、ペプチド、アプタマー、核酸のオリゴマー、アミノ酸、または炭水化物であり、限定ではないが、タンパク質

50

、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNA、リポタンパク質、アプタマー、ならびにそれらの改変物および組合せなどが挙げられる。ある特定の実施形態では、作用剤は、化学部分を有する小分子である。例えば、化学部分としては、マクロライド、レプトマイシン、および関連天然産物またはそれらのアナログを含む、非置換または置換アルキル、芳香族、またはヘテロシクリル部分が挙げられた。化合物は、所望の活性および/または特性を有することが公知であってもよく、または多様な化合物のライブラリーから選択してもよい。

【0049】

作用剤は、1つまたは複数の化学クラスに由来する分子、例えば有機分子であってもよく、有機金属分子、無機分子、遺伝子配列などを挙げることができる。また、作用剤は、1つまたは複数のタンパク質に由来する融合タンパク質、キメラタンパク質（例えば、関連分子または異なる分子の機能的に重要な領域のドメインスイッチングまたは相同組換え）、合成タンパク質、または置換、欠失、挿入、および他のバリエーションを含む他のタンパク質変異型であってもよい。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE分子、またはそれらの抗原特異的抗体断片（これらに限定されないが、Fab、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、単ドメイン抗体、クローズドコンフォメーション多重特異性抗体（closed conformation multispecific antibody）、ジスルフィド連結scFv、ダイアボディを含む）を指し、天然で抗体を産生する任意の種に由来するか、または組換えDNA技術により作出されるかを問わず、血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、酵母、もしくは細菌のいずれから単離されるかを問わない。

20

【0051】

別の例では、抗体は、2つの重（H）鎖可変領域および2つの軽（L）鎖可変領域を含む。V_H領域（例えば、免疫グロビンポリペプチドの部分）は、本明細書の他所に記載されているV_Hセグメントと同じではないことに留意されたい。V_H領域およびV_L領域は、「フレームワーク領域」（「FR」）と称されるより保存された領域が散在している「相補性決定領域」（「CDR」）と称される超可変性の領域にさらに細分化することができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、正確に規定されている（Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照；これらの文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。各V_HおよびV_Lは、典型的には、3つのCDRおよび4つのFRで構成されており、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本明細書で使用される場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書では、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合により互いに接続されている一連のアミノ酸残基を指定するために同義的に使用される。

30

40

【0052】

本明細書で使用される場合、「抗体試薬」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、所与の抗原と特異的に結合するポリペプチドを指す。抗体試薬は、抗体、または抗体の抗原結合性ドメインを含むポリペプチドを含んでいてもよい。本態様のいずれかの一部の実施形態では、抗体試薬は、モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体の抗原結合性ドメインを含むポリペプチドを含んでいてもよい。例えば、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略される）および軽（L）鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略される）を含んでいてもよい。別の例では、抗体は、2つの重（H）鎖可変領域および2つの軽（L）鎖可変領域を含む。「抗体試薬」という用語は、抗体の抗原結合性断片（例えば、単鎖抗体、Fabおよび

50

び s F a b 断片、F (a b ') 2、F d 断片、F v 断片、s c F v、C D R、およびドメイン抗体 (d A b) 断片 (例えば、de Wildt et al., Eur J. Immunol. 1996; 26(3):629-39を参照; この文献は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)) ならびに完全な抗体を包含する。抗体は、I g A、I g G、I g E、I g D、または I g M (ならびにそれらのサブタイプおよび組合せ) の構造的特徴を有してもよい。抗体は、マウス、ウサギ、ブタ、ラット、および霊長類 (ヒトおよび非ヒト霊長類) を含む任意の供給源に由来してもよく、霊長類化抗体であってもよい。抗体としては、ミディボディ、ナノボディ、ヒト化抗体、およびキメラ抗体なども挙げられる。抗体試薬は、抗体断片であってもよい。

【0053】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能に関わらず、修飾アミノ酸 (例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化など) およびアミノ酸アナログを含むアミノ酸のポリマーを指す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、比較的大きなポリペプチドに関して使用されることが多く、「ペプチド」という用語は、小型ポリペプチドに関して使用されることが多いが、当技術分野におけるこうした用語の用法は重複している。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびその断片を指す場合、本明細書では同義的に使用される。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質としては、遺伝子産物、天然に存在するタンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片、ならびに前述のもの他の等価物、バリエーション、断片、およびアナログが挙げられる。

【0054】

本明細書に記載の種々の実施形態では、記載されている特定のポリペプチドのいずれかのバリエーション (天然に存在するかまたは別様の)、対立遺伝子、ホモログ、保存的修飾バリエーション、および/または保存的置換バリエーションが包含されることがさらに企図される。アミノ酸配列に関して、当業者であれば、コードされた配列中の単一のアミノ酸または低パーセンテージのアミノ酸を変更する、核酸配列、ペプチド配列、ポリペプチド配列、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加は、改変が、アミノ酸の化学的類似アミノ酸との置換をもたらす、ポリペプチドの所望の活性を保持する「保存的修飾バリエーション」であることを認識するであろう。そのような保存的修飾バリエーションは、本開示と一致する多型バリエーション、種間ホモログ、および対立遺伝子に加えてであり、それらを除外しない。

【0055】

本明細書に記載のように、「抗原」は、抗体の結合部位に結合する分子である。典型的には、抗原は、抗体リガンドに結合し、抗体応答を *in vivo* にて亢進することが可能である。抗原は、ポリペプチド、タンパク質、核酸、または他の分子、またはそれらの部分であってもよい。「抗原決定基」という用語は、抗原結合性分子により、より具体的には前記分子の抗原結合性部位により認識される、抗原上にあるエピトープを指す。

【0056】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、相互作用、例えば抗原に対する抗体の結合の強さを指し、解離定数 (K_D) として定量的に表すことができる。アビディティは、抗原結合性分子 (本明細書に記載の抗体試薬など) と関連抗原との結合の強さの尺度である。アビディティは、抗原決定基と抗原結合性分子上にあるその抗原結合性部位との親和性、および抗原結合性分子上に存在する関連結合部位の数の両方に関連する。典型的には、抗原結合性タンパク質 (本明細書に記載の抗体試薬など) は、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ モル/リットルまたはそれ未満、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ モル/リットルまたはそれ未満、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ モル/リットルの解離定数 K_D で (つまり、 $10^5 \sim 10^{12}$ リットル/モルまたはそれよりも大きな、好ましくは $10^7 \sim 10^{12}$ リットル/モルまたはそれよりも大きな、より好ましくは $10^8 \sim 10^{12}$ リットル/モルの結合定数 (K_A) で) それらの同種または特異的抗原に結合することになる。 10^{-4} mol/リットルよりも大きな任意の K_D 値 (または $10^4 M^{-1}$ よりも低い

10

20

30

40

50

任意の K_A 値)は、一般に、非特異的結合を示すとみなされる。意味がある(例えば、特異的である)とみなされる生物学的相互作用の K_D は、典型的には、 10^{-10} M (0.1 nM) ~ 10^{-5} M (10000 nM) の範囲である。相互作用が強いほど、その K_D は低くなる。好ましくは、本明細書に記載の抗体試薬上にある結合部位は、 500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 500 pM 未満などの 10 nM 未満の親和性で、所望の抗原に結合することになる。抗体試薬と抗原または抗原決定基との特異的結合は、例えば、スクヤッチャード分析、ならびに/またはラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ (EIA)、およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合的結合アッセイ、ならびに当技術分野でそれ自体公知であるそれらの異なる変法、ならびに本明細書に記載のような他の技法を含む、それ自体公知である任意の好適な様式で決定する
10

【0057】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」または「特異性」という用語は、2つの分子、化合物、細胞、および/または粒子間の化学的相互作用を指し、第1の実体は、非標的である第3の実体に結合するよりも大きな特異性および親和性で第2の標的実体に結合する。本態様のいずれかの一部の実施形態では、特異的結合は、第3の非標的実体に対する親和性よりも、少なくとも10倍の、少なくとも50倍の、少なくとも100倍の、少なくとも500倍の、少なくとも1000倍の、またはそれよりも大きな、第2の標的実体に対する第1の実体の親和性を指すことができる。したがって、本明細書で使用される場合、「選択的に結合する」または「特異的に結合する」は、本明細書に記載の作用剤(例えば、抗体試薬)が、例えば、所与の抗原のアミノ酸配列を含むペプチドなどの標的に、 10^{-5} M (10000 nM) もしくはそれ未満、例えば、 10^{-6} M もしくはそれ未満、 10^{-7} M もしくはそれ未満、 10^{-8} M もしくはそれ未満、 10^{-9} M もしくはそれ未満、 10^{-10} M もしくはそれ未満、 10^{-11} M もしくはそれ未満、または 10^{-12} M もしくはそれ未満の K_D で結合する能力を指す。例えば、本明細書に記載の作用剤が、抗原を含む第1のペプチドに 10^{-5} M またはそれよりも低い K_D で結合するが、別の無作為に選択されたペプチドには結合しない場合、その作用剤は、第1のペプチドと特異的に結合すると言われる。特異的結合は、例えば、作用剤の親和性およびアビディティ、ならびに作用剤の濃度により影響を受ける場合がある。当業者であれば、好適な細胞および/またはペプチド結合アッセイで作用剤を滴定することなど、任意の好適な方法を使用して、作用剤が標的と選択的に結合する適切な条件を決定することができる。
20
30

【0058】

「発現」という用語は、適用可能な場合、これらに限定されないが、例えば、転写、転写物プロセッシング、翻訳、およびタンパク質フォールディング、修飾、およびプロセッシングを含む、RNA およびタンパク質の産生に関与し、適切な場合はタンパク質を分泌する細胞プロセスを指す。「発現産物」としては、遺伝子から転写されるRNA、および遺伝子から転写されるmRNAの翻訳により得られるポリペプチドが挙げられる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に作動可能に連結していると、*in vitro* または *in vivo* にてRNAへと転写される核酸配列(DNA)を意味する。遺伝子は、コード領域の前後の領域、例えば、5'非翻訳(5'UTR)または「リーダー」配列および3'UTRまたは「トレーラー」配列、ならびに個々のコードセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)を含んでいてもよくまたは含んでいなくともよい。
40

【0059】

本明細書で使用される場合、細胞または臓器に関して使用される場合の「接触」という用語は、細胞と、作用剤、表面、ホルモンなどとの物理的接触を可能にする様式で、作用剤、表面、ホルモンなどを細胞に導入すること、およびmiRNA、ポリペプチド、または他の発現産物などの作用剤の細胞での発現を可能にする遺伝子構築物またはベクターなどのエレメントを導入することを両方とも包含する。作用剤を発現するように遺伝子改変された細胞は、作用剤と「接触」しており、作用剤を発現する細胞子孫も同様であることが理解されるべきである。
50

【0060】

「統計的に有意な」または「有意に」という用語は、統計的有意性を指し、一般に、2標準偏差(2SD)またはそれよりも大きな差を意味する。

【0061】

本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」という用語は、提示されている規定の要素に加えて、他の要素も存在することができることを意味する。「含む(comp rising)」の使用は、限定ではなく包含を示す。

【0062】

「からなる(consisting of)」という用語は、本明細書に記載のような組成物、方法、およびそれらのそれぞれの成分を指し、実施形態のその説明に挙げられていない一切の要素が除外される。 10

【0063】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる(consisting essentially of)」という用語は、所与の実施形態に必要とされる要素を指す。この用語は、本発明のその実施形態の基本的で新規のまたは機能的な特色に実質的に影響を及ぼさない追加の要素の存在を許容する。

【0064】

単数形の実語「a」、「an」、および「the」は、状況が明らかに別様であると示さない限り、複数の指示対象を含む。同様に、「または」という単語は、状況が明らかに別様であると示さない限り、「および」を含むことが意図されている。本開示の実施または試験には、本明細書に記載のものと同様のまたは等価な方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を下記に記載する。略語「例えば(e.g.)」は、ラテン語 *exempli gratia* に由来し、本明細書では非限定的な例を示すために使用される。したがって、略語「例えば(e.g.)」は、「例えば(for example)」という用語と同義である。 20

【0065】

さらに、状況により別様に必要とされない限り、単数形は、複数を含むものとし、複数形は、単数を含むものとする。

【0066】

また、本明細書で使用される場合、「および/または」は、関連列挙項目の1つまたは複数のありとあらゆる考え得る組合せ、ならびに選択肢(「または」)で解釈される場合は組合せの欠如を指し、包含する。 30

【0067】

さらに、本発明の組成物の量、用量、時間、および温度などの測定可能な値を指す場合に本明細書で使用される「約」という用語は、指定量の $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、またはさらに $\pm 0.1\%$ の変動性を包含することを意味する。作業例または別様に示されている場合を除いて、本明細書で使用される成分の量または反応条件を表す数値はすべて、全ての場合において「約」という用語により修飾されていると理解されるべきである。パーセンテージに関連して使用される場合の「約」という用語は、 $\pm 1\%$ を意味する場合がある。 40

【0068】

別様の説明がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本開示が属する分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0069】

本開示は、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコール、および試薬などに限定されず、それら自体様々であってもよいことが理解されるべきである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、本開示の範囲を限定することを意図するものではない。本開示の範囲は、特許請求の範囲によってのみ規定される。

【0070】

特定されている特許および他の刊行物はすべて、例えば、本開示に関連して使用すること 50

ができるそのような刊行物に記載の方法論を説明および開示するために、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。こうした刊行物は、本出願の出願日以前のそれらの開示について提供されているに過ぎない。この点に関して、以前の開示であるとしてもまたはいかなる他の理由によっても、本発明者らがそのような開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。こうした文書の日付に関する記載または内容に関する表現はすべて、本出願人らが入手可能な情報に基づくものであり、こうした文書の日付または内容の正確性に関するいかなる承認も構成するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】研究計画の模式図である：目的1 miR-15aのおよびmiR-412の機序および機能を探索、目的2 それらの処置潜在力を検査、ならびに目的3 miR-15aの周知の標的WISP1の機能を解明。HSCは、肝星細胞を表す語である。 10

【図2】活性化肝星細胞を静止状態に戻す候補を同定するための全ゲノムマイクロRNA模倣物ライブラリーをスクリーニングした実験の流れの模式図である。

【図3】miR-15aまたはmiR-412が過発現された場合（上列）にニールレッド染色陽性脂肪滴の再形成によって実証された、活性化マウス肝星細胞（HSC）が静止状態に戻ったことを示す図である。miR-15aまたはmiR-412のヒトオルソログが過発現された場合（下列）に脂肪滴の再形成によって実証されて、活性化ヒトHSCが静止状態に戻ったことも示す。

【図4A】活性化肝星細胞（HSC）へのmiR-15aまたはmiR-412送達、静止状態のものへの形態における変化を生じたことを示す図である。図4Aは、すべての写真が同じ拡大率を用いて撮られたことから、HSCの大きさが10~100分の1に減少したことを示す（すべてのパネルについて同じスケールバー）。図4Bは、最初に活性化されたHSCにおけるmiR-15aまたはmiR-412の強制発現が、qPCRを用いて測定されたアルファ平滑筋アクチン（Acta2）およびアルファ1 I型コラーゲン（Col1a1）を下方制御したことを示す。データは、平均+/-SDとして表されている。 20

【図4B】上記と同様。

【図5】miR-15aまたはmiR-412トランスフェクト肝星細胞（HSC）が機能的表現型を有することを示す図である。miR-15aまたはmiR-412を用いて処置された活性化HSCは、共培養された肝細胞において脂肪症を生じなかった。陰性対照マイクロRNAを用いて処置された活性化HSCは、共培養された肝細胞において脂肪症を誘導した。qHSC、静止肝星細胞；Ac-HSC、活性化肝星細胞；miR-Neg、マイクロRNA陰性対照。 30

【図6】miR-15aまたはmiR-412を受けた活性化ヒトHSCと共培養されたHepG2細胞は、炎症性サイトカインの発現が減少していた（左パネル）ことを示す図である。miR-15aまたはmiR-412を受けた活性化ヒトHSCと共培養されたHuH7細胞は、一部の炎症性サイトカインの発現が減少していた（右パネル）。データは、平均+/-SDとして表されている。

【図7】内在性miR-15aおよびmiR-412は、miR-15aについては有意でないが、静止HSCと比較して活性化初代HSCにおいて発現レベルが減少していたことを示す図である。データは、平均+/-SDとして表されている。 40

【図8】CCl4チャレンジおよび細胞治療注射についてのスケジュールの模式図（図）である。上列：脾臓に注射され肝臓に移植されたmiR-15aまたはmiR-412を用いて再プログラム化された静止様HSC、miRNA発現を駆動するベクターに組み込まれたGFPSIGNALを産生する肝臓によって証明された。中列：静止様HSCを受けたCCl4チャレンジマウスは、H&E染色を用いて実証されて、肝臓のアポトーシスおよび炎症が減少していた。下列：静止様HSCを受けたCCl4チャレンジマウスは、シリウスレッドを用いて染色された肝線維症が減少していた。線維症の相対的レベルは定量された。CCl4、HSCを注射しないCCl4経管栄養；HSC対照、CCl4経管栄養 50

および空 GFP - ベクターを含む HSC 注射 ; HSC miR - 15 a、CCl₄ 経管栄養および miR - 15 a - GFP - ベクターを含む HSC 注射 ; HSC miR - 412、CCl₄ 経管栄養および miR - 412 - GFP - ベクターを含む HSC 注射。

【図 9】再プログラム化された静止様 HSC を用いた細胞療法は、CCl₄ を用いてチャレンジされたマウスに、qPCR によって測定された全肝臓においてアルファ 1 I 型コラーゲン (Col1a1) の発現の減少を生じたことを示す図である。データは、平均 + / - SD として表されている。

【図 10】ヒト原発性胆汁性胆管炎における肝星細胞がアルファ平滑筋アクチン (Acta2) と共存している WISP1 を発現したことを示す図である。

【図 11】2つの予測される WISP1 標的配列の内のいずれか 1つを含有するレポーターを用いて同時トランスフェクトされた miR - 15 a 模倣物がルシフェラーゼ発現を減少させた一方で、変異配列を含有するレポーターには影響を与えず、miR - 15 a が両方の WISP1 標的配列に結合することを示す図である。データは、平均 + / - SD として表されている (**P < 0.01 ; ***P < 0.001)。

【図 12】低および高拡大率での静止 HSC を示す図である (左カラム)。高拡大率表示は、BODIPY 染色を用いた蛍光緑の数個の脂肪滴を明らかに示している (挿入図)。右カラム : 低および高拡大率での活性化 HSC。活性化細胞は、より大きく、脂肪滴を欠いており、BODIPY を用いて染色されない (挿入図)。HSC、肝星細胞。

【図 13】標準食 (左カラム) および CDHF D (右カラム) を与えられたマウスの比較を示す図である。CDHF D を与えられたマウスは初期の NASH を 3 週間で発症し、体のサイズの増加、肉眼的および顕微鏡的脂肪肝、ならびにシリウスレッド染色によってわずかな線維症を示す。CDHF D、コリン欠乏 L - アミノ酸限定高脂肪食。

【図 14】未チャレンジマウス由来対照肝星細胞 (HSC)、または CDHF D チャレンジ NASH マウス由来 HSC のいずれかと健常な肝細胞 (Hep) との共培養を示す実験の模式図である。上列 : 対照マウス由来 HSC と共培養された肝細胞は、BODIPY を用いて染色されたごくわずかな脂肪滴を示した。下列 : NASH マウス由来 HSC と共培養された肝細胞は、顕著に多い脂肪滴を示した。CDHF D、コリン欠乏 L - アミノ酸限定高脂肪食。

【図 15】NASH マウス由来の肝星細胞 (HSC) と共培養された肝細胞が、qPCR を用いて測定されて、対照 HSC と共培養された場合と比較して、いくつかの炎症性サイトカイン (inflammatory cytokine) およびケモアトラクタントを高レベルで発現したことを示す図である。データは、平均 + / - SD として表されている。

【図 16】肝細胞 (Hep) における脂肪蓄積の誘導が、NASH 肝星細胞 (HSC) 由来の馴化培地が正常な肝細胞に適用された場合に達成され得ることを示す図である。上列 : 静止 HSC (qHSC) 培地が健常な肝細胞に適用された場合、脂肪症は誘導されなかった。下列 : NASH - HSC 培地は、最初は健常な肝細胞において脂肪症を誘導した。脂肪滴は BODIPY を用いて染色された。

【図 17】miR - 15 a または miR - 412 を活性化肝星細胞 (AcHSC) に送達することが、静止肝星細胞 (qHSC) におけるものと一致して、紫外線下の蛍光によって証明されるレチノイド陽性である脂肪滴の再形成を誘導したことを示す図である。

【図 18】多次元スケリングを用いて分析された RNA 配列決定データが、miR - 15 a または miR - 412 を受けた静止様 HSC が、活性化細胞よりも静止 HSC に近い全体的な転写プロファイル 40 ~ 50 % を有することを示す図である。HSC、肝星細胞。

【図 19】miR - 15 a または miR - 412 トランスフェクト肝星細胞 (HSC) が機能的表現型を有することを示す図である。上列 : miR - 15 a または miR - 412 を用いて処置された活性化 HSC は、共培養された肝細胞において脂肪症を生じなかった。陰性対照 miRNA を用いて処置された活性化 HSC は、共培養された肝細胞において脂肪症を誘導した。qHSC、静止肝星細胞 : Ac - HSC、活性化肝星細胞 ; miR - Neg、マイクロ RNA 陰性対照。下列 : NASH の CDHF D モデルから採取

10

20

30

40

50

されたHSCは、共培養肝細胞において脂肪症を誘導した。miR-15aまたはmiR-412を発現するレンチウイルスを用いて感染させたこれらの同じHSCは、隣接する肝細胞において脂肪症を誘導するそれらの能力を主張している。

【図20】miR-15aまたはmiR-412のいずれかを受けた後の肝星細胞においてmRNAレベルが減少した遺伝子のセットと予測アルゴリズムに基づく潜在的な直接標的のセットとの重なりが、真のmiRNA標的を含む可能性が高い標的候補セットを産生したことを示す図である。標的候補セットの遺伝子は、TgfベータまたはPdgfシグナル伝達経路の部分であるものを選択することによってさらに選別された。

【図21】CRISPR技術が初代肝星細胞において使用され得ることを示す図である。初代細胞でこの技術を使用する実行可能性は、長い非コードRNA Di g i t 欠失ベクターを送達することによって検証された、ホモ接合性ノックインは、新規PCRバンド、ピューロマイシン構築物を含む1つのおよびネオマイシン構築物を含む別の対立遺伝子の出現を用いて確認される。Ctl、対照構築物；KI、ノックイン構築物。 10

【図22】>100個のサイトカイン、ケモカインおよび細胞外マトリクスタンパク質のタンパク質プロットが、CDAHFDを用いたマウス由来のHSCが健常マウス由来のものと比較してWISP1分泌上昇したNASHを誘導したことを示す図である。CM、馴化培地。

【図23】活性化肝星細胞(AcHSC)が静止肝星細胞(qHSC)よりも30倍近く高いWISP1を発現したことを示す図である。肝細胞(Hep)もWISP1を発現したが、活性化肝星細胞よりも顕著に少ない。Lv、全肝臓。データは、平均+/-SDとして表されている。 20

【図24】WISP1を過発現する肝星細胞由来の馴化培地が健常マウスから採取された肝細胞において脂肪症を誘導したことを示す図である。CM、馴化培地。

【図25】WISP1がヒト疾患に関与することを示す模式図である。

【図26】WISP1が、分泌マトリクス細胞タンパク質のCCNファミリーのメンバーであることを示す模式図である。

【図27】肝星細胞が肝線維症の重要なドライバーであることを示す模式図である。

【図28】肝星細胞(HSC)活性化を示す模式図である。

【図29A】WISP1が活性化HSCにおいて高度に上方制御されており、miR-15aの直接の標的であることを示す図である。(図29A)NASHマウスの活性化肝星細胞によって分泌されたWISP1。(図29B)予測されるWISP1標的配列を含有するレポーターを用いて同時トランスフェクトされたmrR-15a模倣物は、ルシフェラーゼ発現を減少させた。 30

【図29B】上記と同様。

【図30A-30C】WISP1およびYap1が互いに相互活性化することを示す図である。(図30A)WISP1およびYAP mRNAはqHSCにおいてrc-WISP1処置によって増加した。(図30B)YAP1活性化は、qHSCにおいてrc-WISP1処置によって誘導された。(図30C)WISP1発現は、miRNAによって再プログラム化されたHSCにおけるYAP1過剰発現によって増加した。

【図31A-31B】肝臓および肺線維症でのWISP1阻害の役割を支持する既存の文献を示す表である。(図31A)抗WISP1 mAbはCCl4誘導肝線維症を減弱した。(図31B)抗WISP1 mAbはブレオマイシン誘導肺線維症を減弱した。 40

【図32A-32B】WISP1中和抗体が胆管線維症を減弱することを示す図である。(図32A)WISP1に対する中和抗体を用いたin vivoでの処置は、胆管結紮(BDL)誘導肝線維症を減少させた。(図32B)示された条件でのコラーゲン発現。

【図33A-33B】WISP1は、一般のおよびまれなヒト線維性肝疾患において分泌されることを示す図である。(図33A)WISP1は、NASHのHSCにおいて上方制御された。(図33B)WISP1は、いくつかのまれな線維性肝疾患のHSCにおいて上方制御された。

【図34A-34B】WISP1が、肝臓炎症および線維症についての新規分泌線維化ド 50

ライバーであることを示す図である。(図34A) N A F L Dマウス由来活性化H S Cは、W I S P 1を分泌する。(図34B) W I S P 1過発現H S Cは、健常な共培養初代肝細胞(B O D I P Y株)において脂肪症を誘導する。

【図35】R c W I S P 1処置が、k i 6 7によって測定されるH S C増殖を加速することを示す図である。

【図36】ヒトおよびマウスm i R - 1 5 aおよびm i R - 4 1 2の配列アライメントを示す図である。

【図37A - 37B】H S Cによって発現されるW I S P 1が、自己活性化オートクリンおよび脂肪症促進(pro-steatotic)パラクリン効果を有することを示す図である。図37Aは、マウスにおける組換えW I S P 1処置によって誘導されたH S C増殖および活性化を示している。図37Bは、対照およびR c W i s p 1の免疫組織化学を示している。

10

【図38A - 38B】R c W I S P 1およびW i s p I g Gが、コリン欠乏L - アミノ酸限定高脂肪食モデル誘導脂肪症(C D A H F D)由来のN A S H - H S Cを処置し、線維症を予防することを示す図である。1 μ g / m l W I S P 1抗体は、H S Cに適用する前に馴化培地で1時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートされた。図38Aは、処置および試料採取のタイムラインを示している。図38Bは、対照、R c W I S P 1処置およびA b W I S P 1処置細胞の細胞数を示している。図38Cは、q H S C、対照、R c W I S P 1処置およびA b W I S P 1処置細胞のA c t a 2 m R N A発現を示している。図38Dは、q H S C、対照、R c W I S P 1処置およびA b W I S P 1処置細胞のC o l 1 a 1 m R N A発現を示している。図38Eは、対照、R c W I S P 1処置およびA b W I S P 1処置細胞の免疫組織化学を示している。図38Fは、対照、R c W I S P 1処置およびA b W I S P 1処置細胞のB O D I P Y染色面積割合の定量を示している。

20

【図38C - 38D】上記と同様。

【図38E - 38F】上記と同様。

【図39A】W I S P 1がH S C移動を調節することを実証する図である。図39Aは、R c - W I S P 1およびW I S P 1 I g Gの存在および非存在でのH S C移動の画像である。図39Bは、対照H S Cと比較した、R c - W I S P 1およびW I S P 1 I g Gを用いて処置されたH S Cの相対的創傷面積を示している。W I S P 1 I g Gを用いて処置されたH S Cは、24時間以内で対照H S Cと類似した相対的創傷面積を示し、W I S P 1 I g GがH S C活性化および移動を妨げられることを確認している。

30

【図39B】上記と同様。

【発明を実施するための形態】

【0072】

肝疾患(例えば、原発性胆汁性胆管炎(P B C))は、肝内胆管の進行性破壊、胆汁うっ滞、門脈周囲炎症、および最終的には硬変末期肝疾患に至る胆管線維症に結びつく場合がある。P B Cなどの肝疾患は、病因不明の自己免疫障害として顕在化する場合があるが、遺伝的要因および環境的要因の両方が肝疾患を引き起こす可能性が高い。

【0073】

W I S P 1は、筋線維芽細胞に対して活性化された際に肝臓の肝星細胞(H S C)により分泌されるタンパク質である。また、W I S P 1は、オートクリン系を介して、コラーゲンの活性化および分泌を加速させることによりH S Cに影響を及ぼして、線維症を促進する。なかでも、肝疾患(例えば、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ1 - アンチトリプシン欠損症、非ヒト疾患、ミオアルコール性脂肪性肝炎(myoalcoholic steatohepatitis)、および強皮症)の線維芽細胞は、W I S P 1を高度に発現する。したがって、これは、W I S P 1の阻害が、肝臓の疾患を治療するための戦略であることを示す。

40

【0074】

肝星細胞は、類洞周囲空間(ディッセ腔としても知られている)に見出される、肝臓の脂

50

肪貯蔵周皮細胞である。静止状態のHSCは、細胞質内の脂肪滴の存在により区別される。肝臓が損傷すると、星細胞が活性化される場合がある。活性化HSCは増殖し、細胞質内の脂肪滴が低減する。活性化HSCは、コラーゲンおよび瘢痕形成を促進するメディエーターを分泌する線維形成促進性筋線維芽細胞になる。

【0075】

本明細書に記載の方法は、WISP1がHSCにて上方制御されることを示す。WISP1を、マイクロRNAであるmiR-15aおよびmiR-412で阻害すると、この阻害は、独立して、肝臓の線維形成進行に中心的な役割を果たす細胞タイプである活性化肝星細胞(HSC)の静止状態を誘導する。さらに、miR-15aは、WISP1を直接的に標的として、活性化HSCにおけるこのタンパク質の線維形成促進機能を抑制する。WISP1阻害剤は、マイクロRNAおよびその標的を使用してHSCの静止状態を促進するため、PBCなどの肝疾患における進行性肝線維症を制御するための有用な療法である。

10

【0076】

肝疾患の治療および/または予防

本明細書に記載の方法および組成物は、対象の肝疾患を治療および/または予防するために使用される。例示的な肝疾患としては、これらに限定されないが、アラジール症候群；アルコール関連肝疾患；アルファ1-アンチトリプシン欠損症；自己免疫性肝炎；良性肝腫瘍；胆道閉鎖症；肝硬変；クリグラー-ナジャー症候群；ガラクトース血症；ジルベール症候群；ヘモクロマトーシス；肝性脳症；A型肝炎；B型肝炎；C型肝炎；肝腎症候群；妊娠性肝内胆汁うっ滞症(ICP)；リソソーム酸リパーゼ欠損症(LAL-D)；肝嚢腫；肝臓がん；新生児黄疸；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；原発性胆汁性胆管炎(PBC)；原発性硬化性胆管炎(PSC)；進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)；ライ症候群；I型糖原病；強皮症；およびウィルソン病が挙げられる。一実施形態では、肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ1アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、および強皮症である。

20

【0077】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、肝不全、例えば、肝合成および代謝機能の不全を有する対象を治療するために使用される。一実施形態では、本明細書に記載の方法は、劇症または重度急性肝不全(例えば、以前は健康だった個体において<8週間で発症する、脳症を伴う肝不全)；超急性肝不全(例えば、以前は健康だった個体において<14日間で発症する、脳症を伴う肝不全)；急性肝不全(例えば、以前は健康だった個体において<26週間で発症する、脳症を伴う肝不全)；慢性肝不全(例えば、脳症を伴わない肝不全)；または慢性肝炎の急性増悪(例えば、脳症の発症を伴う慢性肝不全)を有する対象を治療するために使用される。熟練の開業医であれば、標準的な方法、例えば、チャイルド-ピュースコア(総ビリルビン、アルブミン、INR、腹水、および肝性脳症の複合指標)、MELDスコア(血清ビリルビン、クレアチニン、およびINRが使用される)、またはPELDスコア(MELDと同様であるが、小児患者向けである)、またはMETAVIRスコア(試料中の線維症のレベルを評価する)を使用して、肝疾患(例えば、肝不全)の重症度を評価することができる。

30

40

【0078】

METAVIR

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、肝線維症を有する対象を治療するために使用される。肝線維症は、熟練の臨床医であれば、例えばMETAVIRスコアを使用して診断することができる。METAVIRスコアは、2つのスコア：線維症スコアおよび活性スコアを提供する。線維症スコアは、肝臓の炎症の量(炎症の強度/組織の分解)を記述するために使用される。例えば、F0：線維症なし；F1：中隔を有しない門脈線維症；F2：少数の中隔を有する門脈線維症；F3：肝硬変を伴わない多数の中隔；F4：肝硬変。活性スコアは、線維症の度合いがどの程度急速に進行するかに関する予測である。例えば、A0：活性なし；A1：軽度の活性；A2：中程度の活性；およびA3：重度の活

50

性。一実施形態では、本明細書に記載の方法で治療される対象は、F 1、F 2、F 3、もしくはF 4、および/またはA 1、A 2、A 3のMETAVIRスコアを有する。

【0079】

別の態様では、本明細書には、肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法が記載されている。

【0080】

一態様では、本明細書には、肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、WISP1を阻害する作用剤を投与することを含む方法が記載されている。

【0081】

種々の実施形態では、WISP1は、標的細胞において阻害される。一実施形態では、標的細胞は、WISP1を高度に発現し、疾患状態、例えば肝疾患をもたらす肝臓細胞、例えば、適切な対照、例えば、健常非疾患肝臓細胞と比較して増加したレベルのWISP1を発現する肝臓細胞である。当業者であれば、標準的な技法を使用し、それぞれPCRに基づくアッセイまたはウエスタンブロッティングを使用して、細胞におけるWISP1のmRNAレベルまたはタンパク質レベルを評価することができる。

【0082】

別の実施形態では、標的細胞は、肝星細胞(HSC)である。HSCは、肝臓の類洞周囲空間に見出される周皮細胞である。当業者であれば、例えば、塩化金の選択的染色または細胞質内の脂肪滴の視覚化を使用して、細胞がHSCであるか否かを決定することができる。一実施形態では、HSCは静止状態にある。静止状態のHSCは、当業者であれば、非増殖細胞の細胞質内に脂肪滴が存在することにより識別することができる。活性HSCは、当業者であれば、細胞の増殖、細胞質内の脂肪滴の低減、ならびに/またはコラーゲンおよび瘢痕形成を促進するメディエーターの分泌を評価することにより識別することができる。

【0083】

一実施形態では、標的細胞は、線維芽細胞、例えば、肝線維芽細胞である。一実施形態では、標的細胞は、筋線維芽細胞である。筋線維芽細胞は、線維芽細胞および平滑筋細胞の両方の特色を有する。線維芽細胞および筋線維芽細胞は、例えば、当業者であれば、例えば、顕微鏡検査により、それぞれ線維芽細胞マーカーまたは線維芽細胞および平滑筋細胞マーカーを選択することにより、容易に識別することができる。

【0084】

一実施形態では、標的細胞は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞である。

【0085】

別の態様では、本明細書には、肝疾患を治療するための方法であって、(a)対象の生物学的試料中のWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2のレベルを測定すること；(b)(a)の測定値を参照レベルと比較すること；(c)参照レベルと比較して(a)のWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること；ならびに(d)肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与すること、を含む方法が記載されている。

【0086】

さらに別の態様では、本明細書には、肝疾患を治療するための方法であって、(a)対象の生物学的試料中のWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2のレベルを測定すること；(b)(a)の測定値を参照レベルと比較すること；(c)参照レベルと比較して(a)のWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2レベルが増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること；ならびに(d)肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する作用剤を投与すること、を含む方法が記載されている。

【0087】

WISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2レベルを測定するためのア

10

20

30

40

50

ッセイとしては、これらに限定されないが、W I S P 1 および / もしくは Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 m R N A レベルを評価するための P C R に基づくアッセイ、または W I S P 1 および / もしくは Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 タンパク質レベルを評価するためのウエスタンブロッティングが挙げられる。一実施形態では、W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 レベルは、参照レベルと比較して、少なくとも 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 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくはそれよりも大きく、または少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍、20 倍、21 倍、22 倍、23 倍、24 倍、25 倍、もしくはそれよりも大きく増加する。一実施形態では、W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 レベルは、W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 m R N A レベルである。別の実施形態では、W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 レベルは、W I S P 1 および / または Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 タンパク質レベルである。

10

20

30

40

50

【0088】

本明細書で使用される場合、「参照レベル」は、健常対象、例えば、肝疾患を有していない対象の、それ以外は同一の生物学的試料を指す。

【0089】

一実施形態では、本明細書に記載の本方法は、(a)の前に、対象から生物学的試料を得ることをさらに含む。本明細書で使用される場合、生物学的試料は、血液試料、組織試料、パフィーコート試料(例えば、遠心分離後の高レベルの白血球細胞および血小板を含有する抗凝固処理血液試料の画分)、血清試料、または肝臓生検試料を指す。生物学的試料は、当技術分野で公知である一般的で適切な技法を使用して得ることができる。例えば、組織試料は、生検により得ることができ、血液試料は、指穿刺採血または静脈内採血から得ることができる。

【0090】

種々の実施形態では、生物学的試料は、以前に肝疾患と診断されているかまたは以前には肝疾患と診断されていない対象から採取される。別の実施形態では、生物学的試料は、肝疾患を有すると疑われる対象、例えば、肝疾患の少なくとも1つのリスク因子、例えば、通常摂取と比較したアルコール摂取の増加を有する対象から採取される。

【0091】

本明細書で提供される別の態様は、対象の肝疾患を治療するための方法であって、(a)参照レベルと比較してW I S P 1 および / または A c t a 2 レベルが増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること; ならびに (b) 肝疾患を有する対象に、W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法である。

【0092】

本明細書で提供される別の態様は、対象の肝疾患を治療するための方法であって、(a)参照レベルと比較してW I S P 1、Y a p、C o l 1 a 1、および / または A c t a 2 レベルが増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること; ならびに (b) 肝疾患を有する対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤試薬を投与することを含む方法である。

【0093】

W I S P 1、Y a p (N C B I 遺 伝 子 I D 1 0 4 1 3)、C o l 1 a 1 (N C B I 遺 伝 子 I D 1 2 7 7)、お よ び / ま た は A c t a 2 (N C B I 遺 伝 子 I D 5 9) レ ー べ ル を 測 定 す る た め の ア ッ セ イ と し て は、こ れ ら に 限 定 さ れ ない が、W I S P 1 お よ び / も し く は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 m R N A レ ー べ ル を 評 価 す る た め の P C R に 基 づ く ア ッ セ イ、ま た は W I S P 1 お よ び / も し く は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 タ ン パ ク 質 レ ー べ ル を 評 価 す る た め の ウ エ ス タ ン プ ロ ッ テ ィ ン グ が 挙 げ ら れ る。ア ッ セ イ (例 え ば、W I S P 1 お よ び / も し く は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 m R N A レ ー べ ル を 評 価 す る た め の P C R に 基 づ く ア ッ セ イ、ま た は W I S P 1 お よ び / も し く は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 タ ン パ ク 質 レ ー べ ル を 評 価 す る た め の ウ エ ス タ ン プ ロ ッ テ ィ ン グ) は、W I S P 1 を 阻 害 す る 作 用 剤 (例 え ば、抗 体 ま た は 抗 体 試 薬) を 投 与 す る 熟 練 の 開 業 医 10
 により 実施 することが できる。ある いは、ア ッ セ イ は、別 の 個人 が (つ ま り、W I S P 1 を 阻 害 す る 作 用 剤 (例 え ば、抗 体 ま た は 抗 体 試 薬) を 投 与 す る 開 業 医 に よ っ て で は なく) 実施 しても よい。ア ッ セ イ の 結 果 は、任 意 の 手 段 に よ り、例 え ば、郵 便 運 搬 業 者、電 話 通 信 (例 え ば、フ ァ ク シ ミ リ)、電 子 通 信 (例 え ば、電 子 医 療 記 録、電 子 メ ー ル (e メ ー ル)) な ど に よ り 受 け 取 る こ と が 可 能 である。一 実 施 形 態 で は、治 療 は、ア ッ セ イ の 結 果 を 受 け 取 っ た 後 の 任 意 の 時 点 で (例 え ば、少 なく と も 1 秒 後、1 分 後、1 時 間 後、1 日 後、1 週 間 後、1 か 月 後、1 年 後、ま た は そ れ よ り も 後 で) 対 象 に 投 与 さ れ る。

【 0 0 9 4 】

一 実 施 形 態 で は、W I S P 1 お よ び / ま た は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 レ ー べ ル は、参 照 レ ー べ ル と 比 較 し て、少 なく と も 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 % 20
 、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、も し く は そ れ よ り も 大 き く、ま た は 少 なく と も 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、30
 6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、1 1 倍、1 2 倍、1 3 倍、1 4 倍、1 5 倍、1 6 倍、1 7 倍、1 8 倍、1 9 倍、2 0 倍、2 1 倍、2 2 倍、2 3 倍、2 4 倍、2 5 倍、も し く は そ れ よ り も 大 き く 増 加 す る。一 実 施 形 態 で は、W I S P 1 お よ び / ま た は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 レ ー べ ル は、W I S P 1 お よ び / ま た は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 m R N A レ ー べ ル で あり、別 の 実 施 形 態 で は、W I S P 1 お よ び / ま た は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 レ ー べ ル は、W I S P 1 お よ び / ま た は Y a p、C o l 1 a 1、A c t a 2 タ ン パ ク 質 レ ー べ ル で あり。

【 0 0 9 5 】

別 の 態 様 で は、本 明 細 書 に は、肝 疾 患 を 治 療 ま た は 予 防 す る た め の 方 法 に 基 づ いて、そ れ を 必 要 と す る 対 象 に、本 明 細 書 に 記 載 の 方 法 を 使 用 し て 生 成 さ れ た 細 胞 の い ず れ か、ま た は 40
 本 明 細 書 に 記 載 の 方 法 を 使 用 し て 生 成 さ れ た 細 胞 を 含 む 医 薬 組 成 物 の い ず れ か を 投 与 す る こ と を 含 む 方 法 が 記 載 さ れ て いる。

【 0 0 9 6 】

本 明 細 書 で 提 供 さ れ る 別 の 態 様 で は、本 明 細 書 に 記 載 の 方 法 を 使 用 し て 生 成 さ れ た 抗 体 ま た は 抗 体 試 薬、作 用 剤、細 胞、本 明 細 書 に 記 載 の 組 成 物、医 薬 組 成 物 の い ず れ か を 使 用 し て、対 象 の 肝 臓 の 線 維 症 を 治 療 ま た は 低 減 す る こ と が 可 能 である。一 態 様 で は、本 明 細 書 に は、線 維 症、例 え ば 肝 線 維 症 を 低 減 す る た め の 方 法 に 基 づ いて、そ れ を 必 要 と す る 対 象 に、本 明 細 書 に 記 載 の 方 法 を 使 用 し て 生 成 さ れ た 細 胞 の い ず れ か、ま た は 本 明 細 書 に 記 載 の 方 法 を 使 用 し て 生 成 さ れ た 細 胞 を 含 む 医 薬 組 成 物 の い ず れ か を 投 与 す る こ と を 含 む 方 法 が 記 載 さ れ て いる。

【 0 0 9 7 】

一実施形態では、対象は、肝疾患を有すると以前に診断されている。別の実施形態では、対象は、作用剤の投与前に肝疾患を有すると診断されている。当業者であれば、例えば、当技術分野の標準的な技法を使用して、肝疾患を有する対象を診断することができる。例えば、肝機能検査と呼ばれる血液検査；CTスキャン、超音波、もしくはMRIスキャンなどの非侵襲的画像診断；または組織生検。肝機能検査は、肝臓特異的な酵素、例えば、アラントランスアミナーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アルカリホスファターゼ（ALP）、アルブミン、またはビリルビンのレベルが評価される血液検査を指す。ALT、AST、ALP、アルブミン、またはビリルビンのレベルのわずかな上昇でさえ、肝疾患を示すことができる。肝疾患を評価するためのさらなる検査は、本明細書に記載されている（例えば、チャイルド-ピュースコア、METAVIRスコア、ならびにPELDおよびMELDスコア）。

10

【 0 0 9 8 】

別の実施形態では、本明細書に記載の作用剤は、標的細胞のWISP1スプライスバリエントを阻害する。例示的なWISP1スプライスバリエントとしては、これらに限定されないが、WISP1v、WISP1vx、およびWISP1デルタエクソン3～4が挙げられる。

【 0 0 9 9 】

別の実施形態では、WISP1の阻害は、WISP1活性を阻害することである。WISP1活性は、WISP1遺伝子または遺伝子産物の機能の、任意の現在公知の活性であってもよく、またはこれから発見される活性であってもよい。例えば、WISP1は、HSCでは、コラーゲンの活性化および分泌を加速させて線維症を促進し、p53媒介性アポトーシスを減衰させ、他の細胞タイプでは、TNF誘導性細胞死を阻害する。別の実施形態では、WISP1活性は、適切な対照と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、またはそれよりも大きく阻害される。

20

【 0 1 0 0 】

本明細書で使用される場合、「適切な対照」は、本明細書に記載の作用剤もしくは組成物と接触していないそれ以外は同一の試料におけるWISP1活性のレベルを指すか、または作用剤もしくは組成物の投与前の対象におけるWISP1活性のレベルである。さらに、適切な対照は、健常対象、例えば、肝疾患を有しない個体におけるWISP1活性のレベルであってもよい。当業者であれば、例えば、HSCにおけるコラーゲンの活性化および分泌を測定/評価/定量化することにより、WISP1の活性の機能読取りを使用して、WISP1の活性を決定することができる。

30

【 0 1 0 1 】

別の実施形態では、WISP1の阻害は、細胞におけるWISP1レベル、例えば、遺伝子発現レベルまたは遺伝子産物レベルを阻害することである。別の実施形態では、WISP1レベルは、適切な対照と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、またはそれよりも大きく阻害される。本明細書で使用される場合、「適切な対照」は、本明細書に記載の作用剤もしくは組成物と接触していないそれ以外は同一の試料におけるWISP1のレベルになるか、または作用剤もしくは組成物の投与前の対象におけるWISP1のレベルである。さらに、適切な対照は、健常対象、例えば、肝疾患を有していない個体におけるWISP1のレベルであってもよい。当業者であれば、例えば、HSCにおけるコラーゲンの活性化および分泌を測定/評価することにより、WISP1の活性の機能読取りを使用して、WISP1の活性を決定することができる。当業者であれば、WISP1のタンパク質レベルおよびmRNAレベルを、例えば、それぞれウエスタンブロッティングまたはPCRに基づくアッセイを使用して評価/測定することができる。

40

50

【0102】

作用剤

一態様では、W I S P 1を阻害する作用剤は、肝疾患を有するかまたは有するリスクのある対象に投与される。一実施形態では、作用剤は、小分子、抗体、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A、およびs i R N Aである。

【0103】

本明細書に記載の作用剤は、例えば、投与時に、細胞におけるW I S P 1の存在、量、活性、および/またはレベルを阻害する場合、W I S P 1の阻害に有効であるとみなされる。

【0104】

作用剤は、例えば、細胞におけるW I S P 1の転写または翻訳を阻害することができる。作用剤は、細胞におけるW I S P 1の活性（例えば、W I S P 1の発現）を阻害することができるか、または活性を変更することができる（例えば、活性がもはや生じないか、もはや適切に生じないか（例えば、野生型W I S P 1活性と比較して）、または低減された速度で生じる）。

10

【0105】

一実施形態では、作用剤は、m i R N A 4 1 2およびm i R N A 1 5 aを除外する。別の実施形態では、作用剤は、いかなるm i R N A 4 1 2またはm i R N A 1 5 a模倣物も除外する。

【0106】

作用剤は、それが投与される形態で直接的に機能することができる。あるいは、作用剤は、細胞への核酸配列の導入ならびに細胞内でのW I S P 1の核酸および/またはタンパク質阻害剤の産生をもたらすその転写など、W I S P 1を阻害する何らかのものを産生するように修飾されていてもよくまたは細胞内に使用してもよい。一部の実施形態では、作用剤は、限定ではないが、合成のおよび天然に存在する非タンパク質性実体を含む、任意の化学的実体または部分である。ある特定の実施形態では、作用剤は、化学部分を有する小分子である。例えば、化学部分としては、マクロライド、レプトマイシン、および関連天然産物、またはそれらのアナログを含む、非置換または置換アルキル、芳香族、またはヘテロシクリル部分が挙げられた。作用剤は、所望の活性および/または特性を有することが公知であってもよく、または多様な化合物のライブラリーから識別してもよい。

20

30

【0107】

種々の実施形態では、作用剤は、W I S P 1を阻害する小分子である。本明細書で使用される場合、「小分子」という用語は、これらに限定されないが、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、アダマー、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、1モルあたり約10,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物（例えば、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、1モルあたり約5,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、1モルあたり約1,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、1モルあたり約500グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に許容される形態を挙げることができる化学作用剤を指す。

40

【0108】

小分子をスクリーニングするための方法は当技術分野で公知であり、例えば、所望の標的（例えば、W I S P 1ポリペプチド）に対して、W I S P 1活性またはレベルの阻害に効率的である小分子を識別するために使用することができる。

【0109】

本明細書で提供される一態様は、本明細書に記載のW I S P 1を阻害する作用剤のいずれかを含む組成物である。一実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。一実施形態では、組成物は医薬組成物である。

【0110】

50

W I S P 1 を阻害するポリペプチド

一実施形態では、本明細書には、肝疾患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、標的細胞において W I S P 1 を阻害するポリペプチドまたはそのようなポリペプチドをコードする核酸を投与することを含む方法が記載されている。

【 0 1 1 1 】

「 W I S P 1 結合性ポリペプチド」という用語は、目的の所望の抗原（例えば、 W I S P 1 ポリペプチド）と特異的に結合し、リンカーまたは免疫グロブリン定常ドメインに連結されている本明細書に記載の抗原結合性ドメインの 1 つまたは複数を含む I g 様タンパク質であるポリペプチドを指す。結合性タンパク質は、一部の実施形態では、二重可変ドメイン（ D V D - I g ）結合タンパク質であってもよい。「リンカーポリペプチド」は、ペプチド結合により接合されている 2 つまたはそれよりも多くのアミノ酸残基を含み、 1 つまたは複数の抗原結合性部分を連結するために使用される。そのようなリンカーポリペプチドは当技術分野で周知である（例えば、 Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 ; Poljak (1994) Structure 2: 1121-1123 を参照）。免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖または軽鎖定常ドメインを指す。ヒト I g G 重鎖および軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 2 0 0 8 1 3 号の配列番号 1 9 7、 1 9 8、 1 9 9、 および 2 0 0 を参照。この文献は、代表的な例のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【 0 1 1 2 】

一部の実施形態では、 W I S P 1 を阻害するポリペプチドは、異種性である。本明細書で使用される場合、「異種性」は、宿主細胞、例えば、異種性ポリペプチドを発現する細胞では通常は産生されず、むしろ宿主細胞とは異なる生物に由来するポリペプチドを指す。例えば、本明細書で使用される W I S P 1 阻害剤は、例えば、細菌細胞に由来し、例えば哺乳動物細胞で発現される。

20

【 0 1 1 3 】

一部の実施形態では、 W I S P 1 を阻害するポリペプチドは、配列番号 1 ~ 4 または 6 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 9 0 %、または 1 0 0 % 相同性である。本明細書で使用される場合、本明細書で使用される「相同性」または「相同的」という用語は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後で、標的染色体またはポリペプチド上にある対応する配列のヌクレオチドまたはアミノ酸残基と同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージとして規定される。ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列相同性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、 B L A S T、 B L A S T - 2、 A L I G N、 C l u s t a l W 2、または M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当技術分野の技術内にある種々の様式で達成することができる。当業者であれば、比較しようとする配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメーターを決定することができる。一部の実施形態では、例えば、 W I S P 1 結合性断片またはポリペプチドの核酸またはアミノ酸配列（例えば、 D N A、 R N A、またはアミノ酸配列）は、配列が、 W I S P 1 の対応する天然または未編集核酸配列（例えば、ゲノム配列）またはアミノ酸配列と、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、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 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、またはそれよりも高度に同一である場合、「相同性」とであるとみなされる。

30

40

【 0 1 1 4 】

本明細書に記載の種々の実施形態では、記載されている特定のポリペプチドのいずれかのバリエーション（天然に存在するかまたは別様の）、対立遺伝子、ホモログ、保存的修飾バリ

50

アント、および/または保存的置換バリエーションが包含されることがさらに企図される。アミノ酸配列に関して、当業者であれば、コード化配列の単一アミノ酸または低パーセンテージのアミノ酸を変更する、核酸配列、ペプチド配列、ポリペプチド配列、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加は、変更が、アミノ酸の化学的類似アミノ酸への置換をもたらす、ポリペプチドの所望の活性を保持する「保存的修飾バリエーション」であることを認識するであろう。そのような保存的修飾バリエーションは、本開示と一致する多型バリエーション、種間ホモログ、および対立遺伝子に加えてであり、それらを除外しない。

【0115】

所与のアミノ酸は、類似の物理化学的特色を有する残基により置き換えられてもよく、例えば、1つの脂肪族残基が別の脂肪族残基に置換されるか (Ile、Val、Leu、またはAlaを互いになど)、または1つの極性残基が別の極性残基に置換される (LysおよびArg; GluおよびAsp、またはGlnおよびAsn間など)。他のそのような保存的置換、例えば、類似の疎水性特色を有する領域全体の置換は、周知である。保存的アミノ酸置換を含むポリペプチドを、本明細書に記載のアッセイのいずれか1つで試験して、所望の活性、例えば、リガンド媒介性受容体活性および天然または参照ポリペプチドの特異性が保持されることを確認することができる。

10

【0116】

アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる (A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) : (1) 無極性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2) 非荷電極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3) 酸性: Asp (D)、Glu (E); (4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。あるいは、天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいてグループに分割することができる: (1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性: Asp、Glu; (4) 塩基性: His、Lys、Arg; (5) 鎖の配向性に影響を及ぼす残基: Gly、Pro; (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。非保存的置換は、こうしたクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴うだろう。特定の保存的置換としては、例えば、以下のものが挙げられる; AlaをGlyにまたはSerに; ArgをLysに; AsnをGlnにまたはHisに; AspをGluに; CysをSerに; GlnをAsnに; GluをAspに; GlyをAlaにまたはProに; HisをAsnにまたはGlnに; IleをLeuにまたはValに; LeuをIleにまたはValに; LysをArgに、Glnに、またはGluに; MetをLeuに、Tyrに、またはIleに; PheをMetに、Leuに、またはTyrに; SerをThrに; ThrをSerに; TrpをTyrに; TyrをTrpに; および/またはPheをValに、Ileに、またはLeuに。

20

30

【0117】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド (またはそのようなポリペプチドをコードする核酸) は、本明細書に記載のアミノ酸配列の1つの機能的断片であってもよい。本明細書で使用される場合、「機能的断片」は、当技術分野で公知の、または本明細書の下記に記載されているアッセイに従って野生型参照ポリペプチドの活性の少なくとも50%を保持する、ペプチドの断片またはセグメントである。機能的断片は、本明細書に開示されている配列の保存的置換を含んでいてもよい。

40

【0118】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、本明細書に記載のようなポリペプチドまたは分子のバリエーションであってもよい。一部の実施形態では、バリエーションは、保存的修飾バリエーションである。保存的置換バリエーションは、例えば、天然ヌクレオチド配列の突然変異により得ることができる。「バリエーション」は、本明細書で言及される場合、天然

50

または参照ポリペプチドと実質的に相同性であるが、1つまたは複数の欠失、挿入、または置換のため、天然または参照ポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリエーションポリペプチドをコードするDNA配列は、天然または参照DNA配列と比較した場合、ヌクレオチドの1つまたは複数の付加、欠失、または置換を含むが、非バリエーションポリペプチドの活性を保持するバリエーションタンパク質またはその断片をコードする配列を包含する。多種多様なPCRに基づく部位特異的突然変異誘発手法が当技術分野で公知であり、当業者であれば適用することができる。

【0119】

バリエーションアミノ酸またはDNA配列は、天然または参照配列と、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一であってもよい。天然配列と突然変異配列との間の相同性の度合い（同一性パーセント）は、例えば、ワールドワイドウェブ上でこの目的のために広く使用されている自由に使用可能なコンピュータプログラム（例えば、初期設定のBLASTpまたはBLASTn）を使用して2つの配列を比較することにより決定することができる。

10

【0120】

天然アミノ酸配列の変更は、当技術分野で公知の少なからぬ技法のいずれかにより実現することができる。突然変異は、例えば、天然配列の断片へのライゲーションを可能にする制限部位によりフランキングされている、突然変異配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することにより特定の遺伝子座に導入することができる。ライゲーション後、得られた再構築配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換、または欠失を有するアナログをコードする。あるいは、オリゴヌクレオチド指定部位特異的突然変異誘発手順を使用して、必要とされる置換、欠失、または挿入に従って変更された特定のコドンを含む変異されたヌクレオチド配列を提供することができる。そのような変更をなすための技法は十分に確立されており、例えば、以下の文献により開示されたものが挙げられる：Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); ならびに米国特許第4,518,584号明細書および第4,737,462号明細書。こうした文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。また、ポリペプチドの正しい立体構造の維持に關与しないシステイン残基はいずれも、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防止するために、一般にセリンで置換されていてもよい。逆に、システイン結合をポリペプチドに付加して、その安定性を向上させるか、またはオリゴマー化を促進してもよい。

20

30

【0121】

WISP1を阻害する抗体

本実施形態のいずれかの一態様では、本明細書には、肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、標的細胞においてWISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法が記載されている。

【0122】

種々の実施形態では、本明細書に記載の作用剤は、WISP1に特異的な抗体もしくはその抗原結合性断片または抗体試薬である。

40

【0123】

別の実施形態では、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬は、WISP1ポリペプチドと特異的に結合する。別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号1~4または配列番号6のアミノ酸配列と特異的に結合する。

【0124】

本明細書で使用される場合、「抗体試薬」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、所与の抗原と特異的に結合するポリペプチドを指す。抗体試薬は、抗体、または抗体の抗原結合性ドメインを含む

50

ポリペプチドを含んでいてもよい。本態様のいずれかの一部の実施形態では、抗体試薬は、モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体の抗原結合性ドメインを含むポリペプチドを含んでいてもよい。例えば、抗体は、重（H）鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略される）および軽（L）鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略される）を含んでいてもよい。別の例では、抗体は、2つの重（H）鎖可変領域および2つの軽（L）鎖可変領域を含む。「抗体試薬」という用語は、抗体の抗原結合性断片（例えば、単鎖抗体、FabおよびsFab断片、F(ab')₂、Fd断片、Fv断片、scFv、CDR、およびドメイン抗体（dAb）断片（例えば、de Wildt et al., Eur J. Immunol. 1996; 26(3):629-39を参照；この文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる））ならびに完全な抗体を包含する。

10

【0125】

抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、またはIgM（ならびにそれらのサブタイプおよび組合せ）の構造的特徴を有してもよい。抗体は、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラット、および霊長類（ヒトおよび非ヒト霊長類）を含む任意の供給源に由来してもよく、霊長類化抗体であってもよい。抗体としては、ミディボディ、ナノボディ、イントラボディ、ヒト化抗体、およびキメラ抗体なども挙げられる。

【0126】

本態様のいずれかの一実施形態では、本明細書に記載の抗体は、ヒト化モノクローナル抗体もしくはその抗原結合性断片または抗体試薬である。別の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。別の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト化ポリクローナル抗体である。さらに別の実施形態では、ヒト化抗体は、治療に使用するためのものである。

20

【0127】

本明細書に記載の抗WISP1抗体は、単一特異性抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。「単一特異性抗体」という用語は、特定の標的、例えばエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す抗体を指す。この用語は、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含み、本明細書で使用される場合、抗体がどのように生成されたかに関わりなく、単一分子組成の抗体またはその断片の調製物を指す。

【0128】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ヒツジ、またはヤギ）に由来する重鎖および軽鎖可変ドメイン配列を含むが、V_Hおよび/またはV_L配列の少なくとも部分が、より「ヒト様」になるように、つまりヒト生殖系列可変配列とより類似するように変更されている抗体を指す。したがって、「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むように遺伝子操作または設計されているキメラ抗体の形態である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域に由来する残基に置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体またはアクセプター抗体）である。一部の 경우에는、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見出されない残基を含んでいてもよい。こうした修飾は、抗体性能をさらに洗練させるためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むことになり、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のFR領域である。また、ヒト化抗体は、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも部分を含むことになる。さらなる詳細は、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。本明細書で使用される場合、「複合ヒト抗体（composite human antibody）」また

30

40

50

は「脱免疫化抗体 (deimmunized antibody)」は、可変ドメインから T 細胞エピートープを低減または排除するように設計された特定のタイプの遺伝子操作またはヒト化抗体である。

【0129】

ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された 1 つまたは複数のアミノ酸残基を有する。こうした非ヒトアミノ酸残基は、「インポート (import)」残基と呼ばれることが多く、典型的には「インポート (import)」可変ドメインから取られる。ヒト化は、げっ歯動物 CDR または CDR 配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることにより、本質的に Winter および同僚らの方法に従って実施することができる (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988))。したがって、そのようなヒト化抗体は、インタクトなヒト可変ドメインのかなり少ない部分が、非ヒト種に由来する対応する配列により置換されているキメラ抗体である (米国特許第 4, 816, 567 号明細書)。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、一部の CDR 残基およびおそらくは一部の FR 残基がげっ歯動物抗体の類似部位に由来する残基により置換されているヒト抗体である。

【0130】

ある特定の実施形態では、抗 WISP1 抗体は、イントラボディである。イントラボディは、細胞内で標的と機能的に結合する細胞内抗体である (一般に、Hood et al., *Immunology*, Benjamin, N.Y., 2ND ed. (1984), Harlow and Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Hunkapiller and Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986); および Rondon and Marasco, *Annu Rev Microbiol*, 51:257-83 (1997); 米国特許第 6, 004, 940 号明細書; および米国特許第 5, 581, 829 号明細書を参照; こうした文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。イントラボディを産生するための方法は、例えば、国際公開第 2002/086096 号パンフレットに記載のようなものが、当業者に周知である。抗体は、通常は、少なくとも約 1 mM の K_D 、より通常は少なくとも約 300 μ M、典型的には少なくとも約 10 μ M、より典型的には少なくとも約 30 μ M、好ましくは少なくとも約 10 μ M、より好ましくは少なくとも約 3 μ M、またはそれよりも良好な K_D で結合することになる。

【0131】

一実施形態では、抗 WISP1 抗体は、中和抗体である。一実施形態では、抗 WISP1 抗体は、非中和抗体である。

【0132】

一部の実施形態では、抗 WISP1 抗体はキメラである。本明細書で使用される場合、「キメラ」という用語は、抗体または抗体をコードする配列の状況で使用される場合、異なる動物種に由来する 2 つまたはそれよりも多くのセグメントまたは部分により特徴付けられる免疫グロブリン分子を指す。例えば、キメラ抗体の可変領域は、マウスモノクローナル抗体などの非ヒト哺乳動物抗体に由来し、免疫グロブリン定常領域は、ヒト免疫グロブリン分子に由来する。キメラ抗体の可変セグメントは、典型的には、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも部分に、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも部分に連結されている。ヒト定常領域 DNA 配列は、不死化 B 細胞 (国際公開第 87/02671 号パンフレット; この文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) などの様々なヒト細胞から、周知の手順に従って単離することができる。抗体は、軽鎖および重鎖定常領域を両方とも含有していてもよい。重鎖定常領域は、CH1 領域、ヒンジ領域、CH2 領域、CH3 領域、および場合によっては CH4 領域を含んでいてもよい。治療目的のためには、CH2 ドメインを欠失または削除してもよい。例えば、抗原特異性が適切であるマウスまたは他の種の抗体分子に由来する遺伝子を、生物学的活性が適切であるヒト抗体分子に由来する遺伝子と共にスプライシングすることにより、「キメラ抗体」を産生するために開発された技法が、当技術分野で公知である (Morrison et al., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985); こうした文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。

【0133】

本明細書に記載の組成物および方法の一部の実施形態では、WISP1結合性ドメインは、可変軽鎖配列、可変重鎖配列、またはその両方を含む。

【0134】

当業者であれば理解するように、全長抗体の各重鎖は、重鎖可変ドメイン(本明細書ではHCVRまたはV_Hと略される)および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン:CH₁、CH₂、およびCH₃で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン(本明細書では、LCVRをV_Lと略される)および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lで構成される。V_H領域およびV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存された領域で分散されている、相補性決定領域(CDR)と称される超可変領域にさらに細分化することができる。各V_HおよびV_Lは、3つのCDRおよび4つのFRで構成されており、それらは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置されている:FR₁、CDR₁、FR₂、CDR₂、FR₃、CDR₃、FR₄。この構造は、当業者に周知である。鎖は、通常は、ジスルフィド結合を介して互いに連結されている。

【0135】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」(「CDR」、つまり、CDR₁、CDR₂、およびCDR₃)という用語は、その存在が特異的抗原結合のため必要である、重鎖または軽鎖可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは、典型的には、CDR₁、CDR₂、およびCDR₃として識別される3つのCDR領域を有する。各相補性決定領域は、カバットにより規定される通りの「相補性決定領域」に由来するアミノ酸残基(つまり、おおよそ、軽鎖可変ドメインの残基24~34(L₁)、50~56(L₂)、および89~97(L₃)ならびに重鎖可変ドメインの31~35(H₁)、50~65(H₂)、および95~102(H₃); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))および/または「超可変ループ」に由来する残基(つまり、おおよそ、軽鎖可変ドメインの残基26~32(L₁)、50~52(L₂)、および91~96(L₃)ならびに重鎖可変ドメインの26~32(H₁)、53~55(H₂)、および96~101(H₃); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含んでいてもよい。一部の例では、相補性決定領域は、カバットにより規定されるCDR領域、および超可変ループの両方に由来するアミノ酸を含んでいてもよい。「CDRセット」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に結合することが可能な単一の重鎖または軽鎖可変領域に生じる3つのCDRの群を指す。こうしたCDRの正確な境界は、異なる方式により規定が異なっている。カバットにより記載の方式(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)))は、抗体の任意の可変領域に適用可能な一義的な残基付番方式を提供するだけでなく、3つのCDRを規定する正確な残基境界も提供する。こうしたCDRは、カバットCDRと呼ばれる場合がある。Chothiaおよび同僚ら(Chothia & Lesk, J. Mol. Biol, 196:901-917 (1987)およびChothia et al., Nature 342:877-883 (1989))は、カバットCDR内のある特定のサブ部分が、アミノ酸配列のレベルの多様性が大きいにも関わらず、ほとんど同一のペプチド骨格立体構造をとることを見出した。こうしたサブ部分は、L₁、L₂、およびL₃、またはH₁、H₂、およびH₃として指定され、「L」および「H」は、それぞれ軽鎖領域および重鎖領域を指す。こうした領域は、Chothia CDRと呼ばれる場合があり、カバットCDRと重複する境界を有する。カバットCDRと重複するCDRを規定する他の境界は、Padlan (FASEB. 9:133-139 (1995))およびMacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996))により

10

20

30

40

50

記載されている。さらに他のCDR境界規定は、上記方式の1つに厳密に従わなくともよく、特定の残基または残基の群またはCDR全体でさえ、抗原結合に著しくは影響を及ぼさないという予測または実験的知見に照らして、境界を短縮または延長させることができるものの、それにも関わらずカバットCDRと重複するだろう。また、一部の実施形態では、CDRは、IMGTにより規定される通りの「相補性決定領域」に由来するアミノ酸残基を含むと記述することができる。本明細書で使用される組成物および方法では、こうした方式のいずれに従って規定されたCDRでも使用することができるが、好ましい実施形態では、IMGTまたはAbyssiにより規定されるCDRが使用される。それにもかかわらず、CDRの境界は、こうした付番慣習のいずれかを参照すれば明白である。

【0136】

免疫グロブリン定常(C)ドメインは、重(CH)鎖または軽(CL)鎖定常ドメインを指す。マウスおよびヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列は、当技術分野で公知である。重鎖に関して、本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体の重鎖は、アルファ()、デルタ()、イプシロン()、ガンマ()、またはミュー(μ)重鎖であってもよい。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、記載されている抗体の重鎖は、ヒトアルファ()、デルタ()、イプシロン()、ガンマ()、またはミュー(μ)重鎖を含んでいてもよい。ヒト定常領域配列の非限定的な例は、当技術分野に記載されている。例えば、米国特許第5,693,780号明細書およびKabata EAら(1991年)上記を参照されたい。

【0137】

したがって、本明細書に記載の組成物および方法の実施形態では、抗WISP1は、非IgGフレームワークで構成されている。

【0138】

本明細書で使用される場合、「ドナー」および「ドナー抗体」という用語は、1つまたは複数のCDRを提供する抗体を指す。例示的な実施形態では、ドナー抗体は、フレームワーク領域が得られるかまたは由来する抗体とは異なる種に由来する抗体である。一部の実施形態では、ドナー抗体は、アクセプター抗体とは異なるアイソタイプのものである。ヒト化抗体の状況では、「ドナー抗体」という用語は、1つまたは複数のCDRを提供する非ヒト抗体を指す。

【0139】

本明細書で使用される場合、「アクセプター」および「アクセプター抗体」という用語は、フレームワーク領域の1つまたは複数のアミノ酸配列の少なくとも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100%を提供する抗体またはコードする核酸配列を指す。一部の実施形態では、「アクセプター」という用語は、定常領域を提供する抗体アミノ酸またはコードする核酸配列を指す。さらに別の実施形態では、「アクセプター」という用語は、フレームワーク領域および定常領域の1つまたは複数を提供する抗体アミノ酸またはコードする核酸配列を指す。具体的な実施形態では、「アクセプター」という用語は、フレームワーク領域の1つまたは複数のアミノ酸配列の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または100%を提供またはコードするヒト抗体アミノ酸または核酸配列を指す。この実施形態によると、アクセプターは、ヒト抗体の1つまたは複数の特定の位置には生じない少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、または少なくとも10個のアミノ酸残基を含有していてもよい。アクセプターフレームワーク領域および/またはアクセプター定常領域は、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能的抗体(例えば、当技術分野で周知の抗体、開発中の抗体、または市販の抗体)であってもよく、例えば、それらに由来してもよく、またはそれらから得ることができる。

【0140】

ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、当技術分野で公知である。一部の実施形態では、ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、V-base(ワールドワイドウェブのvb

10

20

30

40

50

ase.mrc-cpe.cam.ac.uk/に見出される)またはIMGT(商標)のthe international IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM(商標)(ワールドワイドウェブのimgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/に見出される)に列挙されている配列から選択される。本明細書で開示されている技術の別の実施形態では、ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、米国特許出願公開第2011/0280800号明細書の表3および表4に記載されている配列から選択される。この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0141】

本明細書に記載の組成物および方法は、一部の実施形態では、抗体の「抗原結合性断片」または「抗原結合性部分」を含んでいてもよい。抗体の「抗原結合性断片」または「WISP1結合性断片」という用語は、抗原(例えば、WISP1)と特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つまたは複数の断片を指す。

10

【0142】

抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片により実施され得る。また、そのような抗体断片の実施形態は、二重可変ドメイン(DVD-Ig)フォーマットなどの二特異性、二重特異性、または多重特異性フォーマットに組み込まれていてもよく、2つまたはそれよりも多くの異なる抗原と特異的に結合することができる。抗体の「抗原結合性部分」という用語内に包含される抗原結合性断片の非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：(i) V_L、V_H、C_L、およびC_H1ドメインからなる一価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域のジスルフィド架橋により連結されている2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(iii) V_HおよびC_H1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのV_LおよびV_HドメインからなるFv断片；(v) 単一の可変ドメインを含むdAb断片(Ward et al. (1989) Nature, 341: 544-546; 国際公開第90/05144号パンフレット)；および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)。さらに、Fv断片の2つのドメインであるV_LおよびV_Hは、別々の遺伝子によりコードされているが、それらは、組換え法を使用して、V_L領域およびV_H領域が対合して一価分子(単鎖Fv(scFv))として知られている)を形成する単一タンパク質鎖として製作されることを可能にする合成リンカーにより接合されていてもよい(例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい)。そのような単鎖抗体も、抗体の「抗原結合性部分」という用語内に包含されることが意図されている。ダイアボディなどの他の形態の単鎖抗体も包含される。

20

30

【0143】

一部の実施形態では、抗体試薬は、二特異性モノクローナル抗体である。

【0144】

ダイアボディは、V_HおよびV_Lドメインが単一ポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーが使用されており、それによりドメインは別の鎖の相補的ドメインと対合することが強制され、2つの抗原結合性部位が作出される二価二特異性抗体である(例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak (1994) Structure 2: 1121-1123); Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering, Springer-Verlag, N.Y. (2001), p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)を参照)。加えて、単鎖抗体としては、相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒にあって一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFvセグメント(V_H-C_H1-V_H-C_H1)を含む「線状抗体」も挙げられる(Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062; および米国特許第5,641,870号明細書)。

40

【0145】

「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するために使用され、インタクト抗体のパイン消化により生成することができる。Fc領域は、天然配列F

50

c領域であってよくまたはバリエーションF c領域であってもよい。免疫グロブリンのF c領域は、一般に、2つの定常ドメイン：C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含み、任意選択でC_H4ドメインを含む。F c部分のアミノ酸残基を置き換えて抗体エフェクター機能を変更することは、当技術分野で公知である（米国特許第5,648,260号明細書および第5,624,821号明細書）。抗体のF c部分は、幾つかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）、ならびに抗体および抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス速度を媒介する。一部の場合では、こうしたエフェクター機能は治療用抗体にとって望ましいものであるが、他の場合では、治療目的に応じて不要または有害でさえあり得る。ある特定のヒトIgGアイソタイプ、特にIgG1およびIgG3は、それぞれ、F c受容体および補体C1qとの結合によりADCCおよびCDCを媒介する。新生児F c受容体（FcRn）は、抗体の循環半減期を決定する重要な成分である。さらに別の実施形態では、抗体の定常領域、例えば、抗体のF c領域の少なくとも1つのアミノ酸残基が、抗体のエフェクター機能に変更されるように置き換えられている。

10

【0146】

本明細書に記載のような、WISP1と特異的に結合する抗体または抗原結合性断片をコードするDNA配列。また、核酸配列は、例えば、相同性哺乳動物（例えば、マウス）配列の代わりに、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインまたはフレームワーク領域のコード配列を用いることにより（米国特許第4,816,567号明細書；Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)）、または本明細書の他所にも記載の

20

【0147】

そのような非免疫グロブリンポリペプチドを、抗体の定常ドメインの代わりに用いてもよく、またはそのような非免疫グロブリンポリペプチドを、抗体の1つの抗原結合性部位の可変ドメインの代わりに用いて、1つの目的の抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合性部位および異なる目的の抗原に対して特異性を有する別の抗原結合性部位を含むキメラ二価抗体を作出してもよい。

【0148】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、抗体またはそのWISP1結合性断片は、それが由来する重鎖可変領域配列のフレームワーク領域の1つ、2つ、3つ、または4つと、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または100%同一である、重鎖可変領域配列のフレームワーク領域の1つ、2つ、3つ、または4つを含む。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、前記アミノ酸配列に由来する重鎖可変フレームワーク領域は、前記アミノ酸配列からなるが、最大で10個のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入、好ましくは最大で10個のアミノ酸置換が存在する。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、前記アミノ酸配列に由来する重鎖可変フレームワーク領域は、前記アミノ酸配列からなり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸残基が、対応する非ヒト、霊長類、またはヒト重鎖可変フレームワーク領域の類似位置に見出されるアミノ酸に置換されている。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ヒトまたは霊長類抗体のV_Hに由来する1つ、2つ、3つ、または4つすべてのV_Hフレームワーク領域をさらに含む。本明細書に記載の重鎖CDR配列と共に使用するために選択される抗体の霊長類またはヒト重鎖フレームワーク領域は、例えば、非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と少なくとも70%同一性を有してもよい。

30

40

【0149】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、霊長類またはヒト重鎖フレームワーク領域のアミノ酸残基は、本明細書に記載の抗体のいずれかの重鎖フレームワーク領域と、少なくとも75%同一性、少なくとも80%同一性、少なくとも85%同一性（またはそれよりも高い同一性）を有する天然霊長類またはヒト抗体重鎖フレームワーク領域に由来する

50

。具体的な実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ヒト重鎖可変サブファミリー（例えば、サブファミリー 1 ~ 7 の 1 つ）に由来する 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべての V_H フレームワーク領域をさらに含む。

【 0 1 5 0 】

本明細書に記載の態様の一部のそのような実施形態では、抗体またはその W I S P 1 結合性断片は、それが由来する軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域の 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つと、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % 同一である、軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域の 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つを含む。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、前記アミノ酸配列に由来する軽鎖可変フレームワーク領域は、前記アミノ酸配列からなるが、最大で 1 0 個のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入、好ましくは最大で 1 0 個のアミノ酸置換が存在する。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、前記アミノ酸配列に由来する軽鎖可変フレームワーク領域は、前記アミノ酸配列からなり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個のアミノ酸残基が、対応する非ヒト、霊長類、またはヒト軽鎖可変フレームワーク領域の類似位置に見出されるアミノ酸に置換されている。本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ヒトまたは霊長類抗体の V_L に由来する 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべての V_L フレームワーク領域をさらに含む。本明細書に記載の軽鎖 C D R 配列と共に使用するために選択される抗体の霊長類またはヒト軽鎖フレームワーク領域は、例えば、非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも 7 0 % 同一性を有してもよい。

10

20

【 0 1 5 1 】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、霊長類またはヒト軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸残基は、本明細書に記載の抗体のいずれかの軽鎖フレームワーク領域と、少なくとも 7 5 % 同一性、少なくとも 8 0 % 同一性、少なくとも 8 5 % 同一性（またはそれよりも高い同一性）を有する天然霊長類またはヒト抗体軽鎖フレームワーク領域に由来する。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ヒト軽鎖可変カップサブファミリーに由来する 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべての V_L フレームワーク領域をさらに含む。一部の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、ヒト軽鎖可変ラムダサブファミリーに由来する 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべての V_L フレームワーク領域をさらに含む。

30

【 0 1 5 2 】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体の V_H（例えば、C D R 1、C D R 2、もしくは C D R 3）領域および/または V_L（例えば、C D R 1、C D R 2、もしくは C D R 3）領域に沿った 1 つまたは複数の C D R の位置は様々であってもよく、つまり、目的の抗原との免疫特異的結合が維持される限り（例えば、実質的に、例えば、それが由来する元の抗体の結合の少なくとも 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 9 0 %、少なくとも 9 5 % が維持される）、1、2、3、4、5、または 6 つのアミノ酸位置だけより短くてもよくまたはより長くてもよい。例えば、一部の実施形態では、C D R を規定する位置は、様々であってもよく、つまり、目的の抗原との免疫特異的結合が維持される限り（例えば、実質的に、例えば、それが由来する元の抗体の結合の少なくとも 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 9 0 %、少なくとも 9 5 % が維持される）、C D R の N 末端境界および/または C 末端境界を、本明細書に記載の抗体のいずれか 1 つの C D R 位置と比べて 1、2、3、4、5、または 6 つのアミノ酸だけシフトさせることにより、より短くてもよくまたはより長くてもよい。他の実施形態では、本明細書に記載の抗体の V_H（例えば、C D R 1、C D R 2、もしくは C D R 3）領域および/または V_L（例えば、C D R 1、C D R 2、もしくは C D R 3）領域に沿った 1 つまたは複数の C D R の長さは、目的の抗原との免疫特異的結合が維持される限り（例えば、実質的に、例えば、それが由来する元の抗体の結合の少なくとも 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 9 0 %、少なくとも 9 5 % が維持される）、1、2、3

40

50

、4、5つ、またはそれよりも多くのアミノ酸だけ、様々であってもよい（例えば、より短くてもよくまたはより長くてもよい）。

【0153】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、1つ、2つ、またはそれよりも多くの突然変異（例えば、アミノ酸置換）を、本明細書に記載の抗体のいずれかのFc領域またはその断片（例えば、カバット付番方式（例えば、カバットのEUインデックス）に従った付番による、CH2ドメイン（ヒトIgG1の残基231～340）および/またはCH3ドメイン（ヒトIgG1の残基341～447）および/またはヒンジ領域）に導入して、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性細胞傷害など、抗体の1つまたは複数の機能的特性を変更する。

10

【0154】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、例えば、米国特許第5,677,425号明細書に記載のように、1つ、2つ、またはそれよりも多くの突然変異（例えば、アミノ酸置換）を、ヒンジ領域のシステイン残基の数が変更されるように（例えば、増加または減少するように）Fc領域（CH1ドメイン）のヒンジ領域に導入する。CH1ドメインのヒンジ領域のシステイン残基の数を変更して、例えば、軽鎖および重鎖のアセンブリを容易にしてもよく、または抗体の安定性を変更してもよい（例えば、増加または減少させてもよい）。

【0155】

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、1つ、2つ、またはそれよりも多くの突然変異（例えば、アミノ酸置換）を、本明細書に記載の抗体のFc領域またはその抗原結合性断片（例えば、カバット付番方式（例えば、カバットのEUインデックス）に従った付番による、CH2ドメイン（ヒトIgG1の残基231～340）および/またはCH3ドメイン（ヒトIgG1の残基341～447）および/またはヒンジ領域）に導入して、エフェクター細胞の表面にあるFc受容体（例えば、活性化Fc受容体）に対する抗体の親和性を増加または減少させる。Fc受容体に対する抗体の親和性を減少または増加させる、抗体のFc領域またはその断片における突然変異、およびそのような突然変異をFc受容体またはその断片に導入するための技法は、当業者に公知である。Fc受容体に対する抗体の親和性を変更するためになすことができる、抗体のFc受容体における突然変異の例は、例えば、Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186、米国特許第6,737,056号明細書、ならびに国際公開第02/060919号パンフレット；国際公開第98/23289号パンフレット、および国際公開第97/34631号パンフレットに記載されている。こうした文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0156】

「CDR移植抗体」という用語は、ヒトCDRの1つまたは複数（例えば、CDR3）がマウスCDR配列で置き換えられているヒト重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体など、1つの種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび/またはVLのCDR領域の1つまたは複数の配列が別の種のCDR配列に置き換えられている抗体を指す。本明細書に記載のCDR移植抗体は、VHおよび/またはVLのCDR領域の1つまたは複数、本明細書に記載の非ヒト抗体のCDR配列で置き換えられている、ヒト抗体に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含む。

40

【0157】

本明細書に記載の抗WISP1抗体を遺伝子操作して、治療に使用するために結合特異性または薬物動態特性を向上させることができる。結合の特異性は、例えば、1つまたは複数の無関連のまたは異なる抗原との競合と比較して、抗原（例えば、WISP1またはそのポリペプチド断片）を使用する競合アッセイによりアッセイすることができる。WISP1と特異的に結合する作用剤、抗体、または他のリガンドを選択するためには、様々なイムノアッセイ形式が適切である。特異的結合は、例えば、本明細書に記載の作用剤（例えば、ポリペプチドまたは抗WISP1抗体）の親和性およびアビディティならびに作用剤の濃度により影響を受ける場合がある。当業者であれば、好適な結合アッセイにて作用

50

剤を滴定することなどの任意の好適な方法を使用して、本明細書に記載の作用剤が W I S P 1 と選択的に結合する適切な条件を決定することができる。

【 0 1 5 8 】

本明細書で使用される場合、「枢要な (key)」残基という用語は、抗体、特にヒト化抗体の結合特異性および / または親和性に対して、他のものよりも大きな影響を示す可変ドメイン内のある特定の残基を指す。枢要な残基としては、これらに限定されないが、以下のものの 1 つまたは複数が挙げられる： C D R に隣接する残基、潜在的なグリコシル化部位 (N - または O - グリコシル化部位のいずれでもよい)、稀少残基、抗原と相互作用することが可能な残基、 C D R と相互作用することが可能な残基、カノニカル残基 (canonical residue)、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの接触残基、ベルニエ帯 (V ernier zone) 内の残基、ならびに可変重鎖 C D R の C h o t h i a 規定と第 1 の重鎖フレームワークのカバット規定との間で重複する領域にある残基。

【 0 1 5 9 】

本明細書に記載の抗 W I S P 1 抗体は、遺伝子操作された抗体であってもよい。本明細書で使用される場合、「遺伝子操作された」という用語は、人間の手により操作されている状態を指す。例えば、遺伝子座は、その遺伝子座において天然ではその順序では一緒に連結されていない 2 つまたはそれよりも多くの配列が、遺伝子操作された遺伝子座では互いに直接的に連結されるように人間の手により操作されている場合、「遺伝子操作された」とみなされる。例えば、本発明の一部の実施形態では、遺伝子操作された遺伝子座は、非天然 V セグメントを有する種々の I g 配列を含み、それらはすべて、天然に見出されるが、同じ遺伝子座には見出されないか、または天然の遺伝子座にはその順序では見出されない。一般的な慣行であり、当業者であれば理解するように、遺伝子操作されたポリヌクレオチド (および / またはそのようなポリヌクレオチドを含む細胞もしくは動物) の子孫および複製は、実際の操作が以前の実体に対して実施されたとしても、典型的には依然として「遺伝子操作された」と呼ばれる。

【 0 1 6 0 】

W I S P 1 結合性ポリペプチド、抗体、抗体試薬、またはそれらの抗原結合性部分は、抗体抗原結合性部分と 1 つまたはそれよりも多くの他のタンパク質またはペプチドとの共有結合によるまたは非共有結合による付随により形成されるより大きな免疫接着分子の一部または分子の組成物であってもよい。そのような免疫接着分子の例としては、ストレプトアビジンコア領域を使用して四量体 s c F v 分子を製作すること (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibod. Hybridomas 6:93-101)、ならびにシステイン残基、マーカーペプチド、および C 末端ポリヒスチジンタグを使用して二価ビオチン化 s c F v 分子を製作すること (Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058) が挙げられる。 F a b および F (a b ')₂ 断片などの抗体部分は、それぞれ、抗体全体のパインまたはペプシン消化などの従来技術を使用して、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、その抗原結合性部分、および免疫接着分子は、標準的な組換え D N A 技法を使用して得ることができる。また、抗体の抗原結合性部分などの標的結合性タンパク質は、二重可変ドメイン (D V D - I g) の一部であってもよい。

【 0 1 6 1 】

任意の特定の標的抗原 (例えば、 W I S P 1) に対して治療的および / または特異的である抗体および抗体試薬は、当業者であれば、公知の抗体または抗体試薬から、例えば、 F D A 承認の治療用抗体試薬および / またはそれらの標的特異性に従ってカタログに列挙されている市販の抗体試薬から容易に選択される。

【 0 1 6 2 】

別の実施形態では、抗 W I S P 1 抗体は、当技術分野で公知の任意の抗 W I S P 1 抗体、またはこれから発見されることになる任意の抗 W I S P 1 抗体である。当技術分野で公知の例示的な抗 W I S P 1 抗体としては、これらに限定されないが、 A b c a m が販売する抗 W I S P 1 抗体 (例えば、 a b 6 0 1 1 4 ; a b 6 5 9 4 3)、 R N D S y s t e m s (例えば、 m a b 1 6 8 0)、および S i g m a - A l d r i c h (例えば、 S A B 2

5 0 1 1 1 4) が挙げられる。

【 0 1 6 3 】

別の実施形態では、抗WISP1抗体は、下記の表1（抗体の表）から選択される。別の実施形態では、抗WISP1抗体は、配列番号12～120のアミノ酸配列のいずれか1つを含む。

【 0 1 6 4 】

【表1 - 1】

表1:抗体(抗WISP1)の表

抗体名	製造業者 (カタログ番号)	供給源	CDR 配列	文献
マウス WISP- 1/CCN4 抗体 mab1680	R & D Systems (MAB1680)	モノクローナ ルラット IgG2B クローン# 214203	配列番号 12~51	1. Pennica, D. <i>et al.</i> (1998) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 95:14717. 2. Tanada, S. <i>et al.</i> (2001) <i>Oncogene</i> 20:5525. 3. Brigstock, D.R. <i>et al.</i> (2003) <i>J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.</i> 56:127. 4. Desnoyers, L. (2004) <i>Curr. Pharm. Des.</i> 10:3913. 5. Brigstock, D.R. (2003) <i>J. Endocrinol.</i> 178:169. 6. Hashimoto, Y. <i>et al.</i> (1998) <i>J. Exp. Med.</i> 187:289. 7. SwissProt Accession # O54775. 8. SwissProt Accession # Q99PP0. 9. SwissProt Accession # O95388 10. French, D.M. <i>et al.</i> (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:855. 11. Parisi, M.S. <i>et al.</i> (2006) <i>Bone</i> 38:671.
ヒト WISP- 1/CCN4 抗体 mab1680	R & D Systems (MAB1627)	ヒトマウス IgG2A クローン# 213611		1. Pennica, D. <i>et al.</i> (1998) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 95:14717. 2. Tanada, S. <i>et al.</i> (2001) <i>Oncogene</i> 20:5525. 3. Brigstock, D.R. <i>et al.</i> (2003) <i>J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.</i> 56:127. 4. Desnoyers, L. (2004) <i>Curr. Pharm. Des.</i> 10:3913. 5. Brigstock, D.R. (2003) <i>J. Endocrinol.</i> 178:169. 6. Li, Z. (2005) GenBank Accession # AAP43925. 7. Li, Z. (2005) GenBank Accession # AAP43926. 8. Li, Z. (2005) GenBank Accession # AAP43924.

10

20

30

40

【 0 1 6 5 】

50

【表 1 - 2】

抗体名	製造業者 (カタログ番号)	供給源	CDR 配列	文献
				9. Cervello, M. et al. (2004) <i>Ann. N.Y. Acad. Sci.</i> 1028:432. 10. French, D.M. et al. (2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:855. 11. Parisi, M.S. et al. (2006) <i>Bone</i> 38:671.
WISP-1/CCN4 抗体	Novus Biologicals (AF1680)	ヒツジ	配列番号 52~90	1. Quiros <i>et al. J Clin Inv.</i> (2017)) 2. Colston <i>et al. Am. J. Physiol. Heart Circ.</i> (2007).
ヤギで産生された抗 WISP1 抗体	Sigma Aldrich (SAB2501114)	ヤギ	配列番号 91~110	
抗 WISP1 抗体	Abcam (ab60114)	ウサギ	配列番号 111~120	
抗 WISP1 抗体	Abcam (ab65943)	ヤギ	配列番号 91~110	

* 配列は、ワールドワイドウェブ<abysis.org>で利用可能な AbYsis から得た。

【0166】

別の実施形態では、抗 W I S P 1 抗体は、任意の公知の、またはこれから発見されることになる非ヒト抗 W I S P 1 抗体に由来するヒト化抗 W I S P 1 抗体である。

【0167】

一実施形態では、抗体または抗体試薬は、W I S P 1 をコードするアミノ酸配列（配列番号 1）に対応するアミノ酸配列に結合する。

【0168】

別の実施形態では、抗 W I S P 1 抗体または抗体試薬は、配列番号 1 の配列を含むアミノ酸配列に結合するか、または配列番号 1 の配列と、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、またはそれよりも高い配列同一性を有する配列を含むアミノ酸配列に結合する。一実施形態では、抗 W I S P 1 抗体または抗体試薬は、配列番号 1 の配列全体を含むアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号 1 の配列の断片を含むアミノ酸配列に結合し、断片は、その標的、例えば W I S P 1 と結合し、W I S P 1 レベルおよび/または活性の阻害をもたらすのに十分である。

【0169】

ある特定の実施形態では、抗体または抗体試薬は、種々のヒト W I S P 1 アイソフォームをコードするアミノ酸配列（配列番号 2、3、または 4）に対応するアミノ酸配列に結合する。

【0170】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、抗W I S P 1抗体または抗体試薬は、配列番号2、3、または4の配列を含むアミノ酸配列に結合するか、または配列番号2、3、もしくは4の配列と、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくはそれよりも高い配列同一性を有する配列を含むアミノ酸配列に結合する。一実施形態では、抗W I S P 1抗体または抗体試薬は、配列番号2、3、または4の配列全体を含むアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号2、3、または4の配列の断片を含むアミノ酸配列に結合し、断片は、その標的、例えばW I S P 1と結合し、W I S P 1レベルおよび/または活性の阻害をもたらすのに十分である。

【0171】

10

別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、マウスW I S P 1をコードするアミノ酸配列（配列番号6）に対応するアミノ酸配列に結合する。

【0172】

別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号6の配列を含むアミノ酸配列に結合するか、または配列番号6の配列と、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくはそれよりも高い配列同一性を有する配列を含むアミノ酸配列に結合する。一実施形態では、抗W I S P 1抗体または抗体試薬は、配列番号6の配列全体を含むアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号6の配列の断片を含むアミノ酸配列に結合し、断片は、その標的、例えばW I S P 1と結合し、W I S P 1レベルおよび/または活性の阻害をもたらすのに十分である。

20

【0173】

したがって、一部の実施形態では、本明細書には、配列番号12~120の可変重鎖および軽鎖配列によりコードされる1つまたは複数のC D Rを含む1つまたは複数の可変ドメインを含むヒト化抗体が記載されている。

【0174】

別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号12~120のいずれか1つと少なくとも70%同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、抗体または抗体試薬C D Rは、配列番号12~120のいずれか1つと少なくとも70%同一性を有するアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、抗体または抗体試薬は、配列番号12~120のいずれか1つと少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0175】

言い換えれば、一部の実施形態では、W I S P 1を阻害する抗体または抗体試薬は、配列番号1~4、6、または配列番号12~120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100%同一性である。

【0176】

他の実施形態では、例えば、W I S P 1結合性断片または抗W I S P 1抗体の核酸配列またはアミノ酸配列（例えば、D N A、R N A、またはアミノ酸配列）は、配列が、W I S P 1と特異的に結合する抗体の対応する天然または未編集核酸配列（例えば、ゲノム配列）またはアミノ酸配列と、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれよりも高度に同一である場合、「同一性」とであるとみなされる。

40

【0177】

本明細書で提供される一態様は、本明細書に記載の抗W I S P 1抗体または抗体試薬のいずれかを含む組成物である。一実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。一実施形態では、組成物は医薬組成物である。

50

【0178】

WISP1を阻害する核酸

一実施形態では、WISP1を阻害する作用剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。本明細書で使用される場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、マイクロRNAの配列など、DNA配列またはmRNA配列に相補的な合成核酸配列を指す。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、標的に結合し、転写、翻訳、またはスプライシングのレベルで発現を停止させることにより、DNA標的またはRNA標的の発現を阻止するように設計される。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞条件下で遺伝子、例えば、WISP1にハイブリダイズするように設計されている相補的核酸配列である。したがって、標的に対して十分に相補的な、つまり細胞環境の状況において十分に良好におよび十分な特異性でハイブリダイズして所望の効果を発揮するオリゴヌクレオチドが選択される。例えば、WISP1を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトWISP1遺伝子（例えば、配列番号5）またはマウスWISP1遺伝子（例えば、配列番号7）のコード配列の部分に相補的な、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、またはそれよりも多くの塩基を含んでいてもよい。

10

【0179】

一実施形態では、WISP1を、これらに限定されないが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALENS、メガヌクレアーゼ、およびCRISPR/Cas系を含む、任意のゲノム編集系を使用して細胞のゲノムから欠失させる。一実施形態では、1つまたは複数のガイドRNAをコードする核酸を細胞のゲノムに組み込むために使用されるゲノム編集系は、CRISPR/Cas系ではない。これにより、少量のCas酵素/タンパク質を保持する細胞での望ましくない細胞死を防止することができる。本明細書では、Cas酵素またはsgRNAはいずれも各々が異なる誘導性プロモーターの制御下で発現され、それにより各々の一過性発現がそのような干渉を防止することを可能にすることも企図される。

20

【0180】

1つまたは複数のsgRNAをコードする核酸およびRNA誘導エンドヌクレアーゼをコードする核酸を各々in vivoで投与される必要がある場合、アデノウイルス関連ベクター(AAV、adenovirus associated vector)の使用が特に企図される。核酸をゲノム編集/断片化系の両成分（例えば、sgRNA、RNA誘導エンドヌクレアーゼ）に同時に送達するための他のベクターとしては、エプスタインバー、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)などのレンチウイルスベクターが挙げられる。RNA誘導ゲノム編集系の成分の各々（例えば、sgRNAおよびエンドヌクレアーゼ）は、当技術分野で公知のように、または本明細書に記載のように、別々のベクターで送達することができる。

30

【0181】

一実施形態では、作用剤は、RNA阻害によりWISP1を阻害する。所与の遺伝子の発現の阻害剤は、阻害性核酸であってもよい。本態様のいずれかの一部の実施形態では、阻害性核酸は、阻害性RNA(iRNA)である。RNAiは、一本鎖であってもよくまたは二本鎖であってもよい。

40

【0182】

iRNAは、siRNA、shRNA、内因性マイクロRNA(miRNA)、または人工miRNAであってもよい。一実施形態では、本明細書に記載のiRNAは、標的、例えば、WISP1の発現および/または活性の阻害をもたらす。本態様のいずれかの一部の実施形態では、作用剤は、WISP1を阻害するsiRNAである。本態様のいずれかの一部の実施形態では、作用剤は、WISP1を阻害するshRNAである。

【0183】

当業者であれば、例えば、公的に利用可能な設計ツールを使用して、WISP1を標的とするsiRNA、shRNA、またはmiRNAを設計することができるだろう。siRNA

50

NA、shRNA、またはmiRNAは、一般的には、Dharmacon（ラファイエット、米国コロラド州）またはSigma Aldrich（セントルイス、米国ミズーリ州）などの企業を使って製作される。

【0184】

本態様のいずれかの一部の実施形態では、iRNAは、dsRNAであってもよい。dsRNAは、dsRNAが使用されることになる条件下でハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分な程度に相補的である2つのRNA鎖を含む。dsRNAの一方の鎖（アンチセンス鎖）は、標的配列に対して実質的に相補的であり、一般には完全に相補的である相補性の領域を含む。標的配列は、標的の発現中に形成されるmRNAの配列に由来してもよい。他方の鎖（センス鎖）は、アンチセンス鎖に相補的な領域を含むため、2つの鎖は、好適な条件下で組み合わせるとハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。

10

【0185】

iRNAのRNAは、安定性または他の有益な特色が増強されるように化学的に修飾することができる。本発明で特徴付けられている核酸は、"Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載のものなど、当技術分野で十分に確立されている方法により合成および/または修飾することができる。この文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0186】

一実施形態では、作用剤は、WISP1を阻害するmiRNAである。マイクロRNAは、平均の長さが22個ヌクレオチドである小型非コードRNAである。こうした分子は、通常はmRNA分子内の3'非翻訳(3'UTR)領域にある相補配列に結合することにより作用し、それにより標的mRNAの分解またはmRNA翻訳の阻害を促進する。マイクロRNAとmRNAとの相互作用は、不完全なワトソン-クリック塩基対合によりmRNAに対する配列特異的結合を指図するマイクロRNAの6~8個ヌクレオチド領域である「シード配列」として知られるものにより媒介される。哺乳動物では、900種よりも多くのマイクロRNAが発現されることが公知である。これらの多くは、それらのシード配列に基づいてファミリーにグループ化することができ、それにより類似のマイクロRNAの「クラスター」を識別することができる。miRNAは、細胞内で、例えばネイキッドDNAとして発現させることができる。miRNAは、細胞内で発現される核酸により、例えばネイキッドDNAとしてコードされていてもよく、またはベクター内に含有される核酸によりコードされていてもよい。

20

30

【0187】

一実施形態では、WISP1をダウンモジュレートする作用剤は、miRNA-15aである。miRNA-15aは、肝臓を含む少なからぬ臓器において遺伝子発現を調節する非コードRNAである。miRNA-15a配列は、少なからぬ種のもの、例えばヒトmiRNA-15a、例えばmiRBase受入番号MI0000069、およびマウスmiRNA-15a、例えばmiRBase受入番号MI0000564が公知である。ヒトmiRNA-15aは、配列番号8の配列を含む。miRNA-15aは、天然に存在するバリエーション、分子、およびそれらの対立遺伝子を含む、ヒトmiRNA-15aを指すことができる。例えば、miRNA-15aは、配列番号10の配列を有するマウスmiRNA-15aであってもよい。

40

【0188】

一実施形態では、作用剤、例えばmiRNA-15Aは、配列番号8の配列に対応する配列を有するか、または配列番号8の配列を含むか、または配列番号8の配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0189】

50

一実施形態では、作用剤、例えば *miRNA-15a* は、配列番号 10 の配列に対応する配列を有するか、または配列番号 10 の配列を含むか、または配列番号 10 の配列と、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【0190】

一実施形態では、*WISP1* をダウンモジュレートする作用剤は、*miRNA-412* である。*miRNA-412* 配列は、少なからぬ種のもの、例えばヒト *miRNA-412*、例えば *miRBase* 受入番号 *MI0001464*、およびマウス *miRNA-412*、例えば *miRBase* 受入番号 *MI0001164* が公知である。ヒト *miRNA-412* は、配列番号 9 の配列を含む。*miRNA-412* は、天然に存在するパリアント、分子、およびそれらの対立遺伝子を含む、ヒト *miRNA-15a* を指すことができる。例えば、*miRNA-15a* は、配列番号 11 の配列を有するマウス *miRNA-412* であってもよい。

10

【0191】

一実施形態では、作用剤、例えば *miRNA-412* は、配列番号 9 の配列に対応する配列を有するか、または配列番号 9 の配列を含むか、または配列番号 9 の配列と、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 100% の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0192】

一実施形態では、作用剤、例えば *miRNA-412* は、配列番号 11 の配列に対応する配列を有するか、または配列番号 11 の配列を含むか、または配列番号 11 の配列と、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または少なくとも 100% の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0193】

作用剤は、*RNAi* 分子（例えば、*siRNA* または *miRNA*）を用いる場合など、標的遺伝子（例えば、*WISP1*）の遺伝子サイレンシングをもたらすことができる。これには、標的の細胞内の *mRNA* レベルが、作用剤が存在しない場合に細胞に見出される *mRNA* レベルの少なくとも約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、約 100% 減少を伴う。1つの好ましい実施形態では、*mRNA* レベルは、少なくとも約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、約 100% 減少する。当業者であれば、例えば、*siRNA*、*shRNA*、または *miRNA* を細胞にトランスフェクトし、ウエスタンブロットティングまたは *PCR* に基づくアッセイにより、細胞内見出される遺伝子（例えば、*WISP1*）レベルを検出することにより、*siRNA*、*shRNA*、または *miRNA* が、例えば *WISP1* を標的としてそれを下方制御するのに有効であるか否かを容易に評価することができるだろう。

40

【0194】

作用剤は、ベクターに含有されていてもよく、したがってベクターをさらに含んでもよい。外因性遺伝子の標的哺乳動物細胞への移入に有用な多くのそのようなベクターが利用可能である。ベクターは、エピソード性であってもよく、例えば、プラスミド、サイトメガロウイルス、アデノウイルスなどのウイルス由来ベクターであってもよく、または相同組換えもしくはランダム組込みにより、例えば、*MMLV*、*HIV-1*、*ALV* などのレトロウイルス由来ベクターにより、標的細胞ゲノムに組み込まれていてもよい。一部の実施形態では、レトロウイルスと適切なパッケージング細胞株との組合せも使用を見出す

50

ことができ、その場合、カプシドタンパク質は標的細胞の感染に機能性であるだろう。通常は、細胞およびウイルスを、培養培地で少なくとも約24時間インキュベートすることになる。次いで、短期間にわたって、一部の応用では、例えば24～73時間にわたって、または少なくとも2週間にわたって細胞が培養培地中で成長することを可能にし、分析前に5週間またはそれよりも長期間にわたって成長することを可能にしてもよい。広く使用されるレトロウイルスベクターは「欠損性」であり、つまり、増殖性感染に必要なウイルスタンパク質を産生することができない。ベクターの複製には、パッケージング細胞株での成長が必要である。

【0195】

「ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、宿主細胞への送達のためにまたは異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸構築物を指す。本明細書で使用される場合、ベクターは、ウイルス性であってもよくまたは非ウイルス性であってもよい。「ベクター」という用語は、適正な制御エレメントが付随する場合に複製が可能であり、遺伝子配列を細胞へと移入することができる任意の遺伝子エレメントを包含する。ベクターとしては、これらに限定されないが、クローニングベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、人工染色体、ウイルス、ピリオンなどを挙げるることができる。

【0196】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上にある転写調節配列に連結されたそこに含有されている核酸配列からのRNAまたはポリペプチド（例えば、WISP1阻害剤）の発現を指図するベクターを指す。発現される配列は、必ずというわけではないが多くの場合、細胞に対して異種性であるだろう。発現ベクターは、追加のエレメントを含んでいてもよく、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有していてもよく、したがって発現ベクターを、2つの生物で、例えば、発現のためにはヒト細胞で、ならびにクローニングおよび増幅のためには原核生物宿主で維持することが可能である。「発現」という用語は、適用可能な場合は、これらに限定されないが、例えば、転写、転写物プロセッシング、翻訳およびタンパク質フォールディング、修飾、ならびにプロセッシングを含む、RNAおよびタンパク質の産生、ならびに必要に応じてタンパク質分泌に関与する細胞プロセスを指す。「発現産物」としては、遺伝子から転写されるRNA、および遺伝子から転写されるmRNAの翻訳により得られるポリペプチドが挙げられる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に作動可能に連結している場合、*in vitro* または *in vivo* にてRNAへと転写される核酸配列（DNA）を意味する。遺伝子は、コード領域の前後の領域、例えば、5'非翻訳（5'UTR）または「リーダー」配列および3'UTRまたは「トレーラー」配列、ならびに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含んでいてもよくまたは含んでいなくともよい。

【0197】

組込み型ベクターでは、それらが送達するRNA/DNAは、宿主細胞染色体に恒久的に組み込まれる。非組込み型ベクターは、エピソーム性のままであり、これは、そこに含有されている核酸が宿主細胞染色体に組み込まれることは決してないことを意味する。組込み型ベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ハイブリッドアデノウイルスベクター、および単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられる。

【0198】

非組込み型ベクターの1つの例は、非組込み型ウイルスベクターである。非組込み型ウイルスベクターは、それらのゲノムが宿主DNAに組み込まれないため、組込み型レトロウイルスがもたらすリスクが排除される。1つの例は、エプスタインバーoriP/核抗原-1（「EBNA1」）ベクターであり、これは、自己複製を制限することが可能であり、哺乳動物細胞で機能することが知られている。エプスタインバーウイルスに由来する2つのエレメントであるoriPおよびEBNA1を含有するため、EBNA1タンパク質とウイルスレプリコン領域oriPとの結合は、哺乳動物細胞におけるプラスミドの比較的長期間にわたるエピソーム性存在を維持する。oriP/EBNA1ベクターは、こ

10

20

30

40

50

の特定の特徴のため、組込みのない i P S C の生成に理想的である。別の非組込み型ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである。

【 0 1 9 9 】

別の非組込み型ウイルスベクターは、RNA センダイウイルスベクターであり、これは、感染細胞の核に進入することなくタンパク質を産生することができる。F 欠損センダイウイルスベクターは、少数回の継代にわたって感染細胞の細胞質に存在し続けるが、急速に希釈され、数回の継代 (例えば、10 回の継代) 後に完全に失われる。

【 0 2 0 0 】

非組込み型ベクターの別の例は、ミニサークルベクターである。ミニサークルベクターは、プラスミド骨格が放出され、真核生物プロモーターおよび発現させようとする c D N A のみが残る環状化ベクターである。

【 0 2 0 1 】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも 1 つのエレメントを含み、ウイルスベクター粒子へとパッケージングされる能力を有する核酸ベクター構築物を指す。ウイルスベクターは、非必須ウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸を含有することができる。ベクターおよび/または粒子は、核酸を細胞へと移入するために、in vitro または in vivo のいずれかで使用することができる。多数の形態のウイルスベクターが当技術分野で公知である。

【 0 2 0 2 】

遺伝子操作された肝星細胞 (H S C)

一態様では、本明細書には、W I S P 1 を阻害する作用剤を発現する肝星細胞またはその集団を生成するための方法であって、細胞を、本明細書に記載の W I S P 1 を阻害する作用剤のいずれかと接触させること、および作用剤の発現を可能にするのに十分な時間にわたって細胞を培養することを含む方法が記載されている。

【 0 2 0 3 】

一実施形態では、細胞は、静止細胞である。静止細胞を識別するための方法は、本明細書の上記に記載されている。

【 0 2 0 4 】

一実施形態では、接触は、細胞を、作用剤または作用剤をコードするベクターと接触させることを含む。例えば、接触は、これらに限定されないが、形質導入、ヌクレオフェクション、エレクトロポレーション、直接注射 (例えば、H S C への)、および/またはトランスフェクションを含んでいてもよい。当業者であれば、当技術分野で公知の技法を使用して、細胞を、本明細書に記載の作用剤と接触させることができる。

【 0 2 0 5 】

一実施形態では、作用剤は、m i R N A である。一実施形態では、m i R N A は、m i R N A - 1 5 a または m i R N A 4 1 2 である。

【 0 2 0 6 】

一実施形態では、細胞は、標準的な培養条件下で、20 % (重量 / 容積) ウシ胎児血清 (F B S) および 1 % (重量 / 容積) ペニシリン / ストレプトマイシンで補完されたダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) 中で培養される。

【 0 2 0 7 】

一実施形態では、細胞は、作用剤の発現を可能にするために、少なくとも 1 時間にわたって培養される。別の実施形態では、細胞は、作用剤の発現を可能にするために、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、60、72、96、120、144 時間、またはそれよりも長い時間にわたって培養される。当業者であれば、当技術分野の標準的な技法、例えば、m i R N A 発現を検出するための P C R に基づくアッセイを使用して、作用剤が培養後に細胞内で発現されたか否かを決定することができる。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 8 】

一実施形態では、細胞は、作用剤を一過性に発現する。別の実施形態では、作用剤の発現は、例えば、細胞の子孫が作用剤を発現するように、細胞のゲノムに組み込まれている。

【 0 2 0 9 】

一態様は、本明細書に記載の方法を使用して生成される W I S P 1 を阻害する作用剤を発現する H S C を含む細胞株を提供する。W I S P 1 を阻害する作用剤を発現する H S C は、例えば、肝疾患の治療を必要とする対象に投与するために、例えば、薬学的に許容される担体中に存在してもよい。

【 0 2 1 0 】

別の態様は、本明細書に記載の方法を使用して生成された W I S P 1 を阻害する作用剤を発現する H S C の集団および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

10

【 0 2 1 1 】

組成物および医薬組成物

一態様では、本明細書には、本明細書に記載の作用剤のいずれかを含む組成物が記載されている。一態様では、本明細書には、本明細書に記載の作用剤のいずれかを含む医薬組成物が記載されている。

【 0 2 1 2 】

別の態様では、本明細書には、W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬を含む組成物が記載されている。別の態様では、本明細書には、W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬を含む医薬組成物が記載されている。

20

【 0 2 1 3 】

一実施形態では、本明細書に記載の組成物または医薬組成物は、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれよりも多くの本明細書に記載の作用剤を含んでいてもよい。例えば、組成物は、W I S P 1 を阻害する s i R N A および抗 W I S P 1 抗体試薬を含んでいてもよい。あるいは、組成物は、2つの抗 W I S P 1 抗体試薬を含んでいてもよい。

【 0 2 1 4 】

本態様のいずれかの一実施形態では、組成物は、肝疾患の治療または予防のために製剤化されている。本明細書に記載の方法を臨床使用するために、本明細書に記載の W I S P 1 を阻害する作用剤（例えば、抗体、抗体試薬、またはそれらの W I S P 1 結合性断片）の投与は、非経口投与、例えば、静脈内；粘膜、例えば鼻腔内；眼、または他の投与様式のための医薬組成物または医薬製剤への製剤化を含んでいてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載の作用剤は、対象において有効な治療をもたらす、任意の薬学的に許容される担体化合物、材料、または組成物と共に投与することができる。したがって、本明細書に記載の方法で使用するための医薬製剤は、本明細書に記載のような抗体またはその抗原結合性断片を、1つまたは複数の薬学的に許容される成分と組み合わせて含有していてもよい。

30

【 0 2 1 5 】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症のない、合理的な利益/リスク比に見合う、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するために好適な化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。「薬学的に許容される担体」という語句は、本明細書で使用される場合、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、媒体、封入材料、製造助剤（例えば、潤滑剤、タルクマグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくは亜鉛、またはステアリン酸）、または抗体もしくはその抗原結合性断片の安定性、溶解性、もしくは活性の維持に關与する溶媒封入材料などの、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であり、患者に有害ではないという意味で「許容」されなければならない。「賦形剤」、「担体」、または「薬学的に許容される担体」などの用語は、本明細書では同義的に使用される。

40

【 0 2 1 6 】

本明細書に記載の W I S P 1 の作用剤または阻害剤の治療用製剤は、所望の純度を有する

50

抗体または抗原結合性断片を、任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で保存するために調製することができる。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに無毒性であり、以下のものが挙げられる：リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；および m - クレゾール）；低分子量（約 10 残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTA などのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn - タンパク質錯体）；ならびに / または T W E E N（商標）、P L U R O N I C S（商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤。例示的な凍結乾燥抗体製剤は、国際公開第 97 / 04801 号パンフレットに記載されている。この文献は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

10

20

【0217】

任意選択で、しかしながら好ましくは、本明細書に記載の組成物を含む製剤は、薬学的に許容される塩、典型的には、例えば塩化ナトリウムを、好ましくはおおよそ生理学的濃度で含有する。任意選択で、本発明の製剤は、薬学的に許容される保存剤を含有してもよい。一部の実施形態では、保存剤濃度は、典型的には容積 / 容積で 0.1 ~ 2.0 % の範囲である。好適な保存剤としては、医薬品分野で公知のものが挙げられる。ベンジルアルコール、フェノール、m - クレゾール、メチルパラベン、およびプロピルパラベンは、保存剤の例である。任意選択で、本発明の製剤は、0.005 ~ 0.02 % の濃度の薬学的に許容される界面活性剤を含んでいてもよい。

【0218】

また、本明細書に記載の作用剤（例えば、抗体、抗体試薬、およびそれらの W I S P 1 結合性断片）を含む組成物の治療用製剤は、治療される特定の適応症に必要な 1 つよりも多くの活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含んでもよい。あるいは、組成物は、例えば、細胞傷害剤、サイトカイン、または成長阻害剤を含んでいてもよい。そのような分子は、好適には、意図されている目的のために有効な量の組合せで存在する。

30

【0219】

また、本明細書に記載の作用剤を含む組成物の治療用製剤の活性成分は、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンに、例えば、コアセルベーション技法によりまたは界面重合により調製されたマイクロカプセルに、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - （メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入されていてもよい。そのような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

40

【0220】

一部の実施形態では、医薬組成物は、脂質ビヒクルをさらに含む。例示的な脂質ビヒクルとしては、これらに限定されないが、リポソーム、ミセル、エクソソーム、脂質エマルジョン、および脂質 - 薬物複合体が挙げられる。

【0221】

50

一部の実施形態では、医薬組成物は、粒子またはポリマーに基づくビヒクルをさらに含む。例示的な粒子またはポリマーに基づくビヒクルとしては、これらに限定されないが、ナノ粒子、マイクロ粒子、ポリマーマイクロスフェア、またはポリマー-薬物コンジュゲートが挙げられる。

【0222】

一部の実施形態では、徐放性調製物を使用することができる。徐放性調製物の好適な例としては、抗体または抗原結合性断片を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスであって、成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態であるマトリックスが挙げられる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号明細書）、L-グルタミン酸およびγエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON D E P O T（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注射用マイクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日間よりも長期にわたって分子の放出を可能にし、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。カプセル化抗体が長期間にわたって体内に留まると、37にて水分に曝露された結果として変性または凝集する場合があります、生物活性が失われ、免疫原性が変化する可能性がある。関与する機序に応じて、安定化のための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集機序が、チオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合形成であることが判明した場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の使用、および特定のポリマーマトリックス組成物の開発により達成することができる。

10

20

【0223】

本明細書に記載の方法では、非経口投与などの*in vivo*投与に使用される治療用製剤は、滅菌することができ、滅菌は、滅菌濾過膜による濾過、または当業者に公知の他の方法により容易に実現される。

【0224】

投与

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載のようなWISP1を阻害する作用剤を投与することを含む、肝疾患を有するかまたは有すると診断された対象の治療に関する。肝疾患を有する対象は、医師であれば、状態を診断するための現行方法を使用して識別することができる。この疾患を特徴付け、診断の助けとなる肝疾患の症状および/または合併症は、当技術分野で周知であり、これらに限定されないが、倦怠感、体重喪失、痛み、皮膚および/または眼の黄変、ならびに暗色尿が挙げられる。例えば、肝疾患の診断の助けとなり得る検査としては、これらに限定されないが、例えば、血液検査、非侵襲的画像診断、および/または組織生検が挙げられる。肝疾患の家族歴も、対象がその状態を有する可能性が高いか否かを決定するための、または肝疾患の診断を行うための助けになるだろう。

30

40

【0225】

本明細書に記載の作用剤および組成物（例えば、WISP1を阻害するもの）は、肝疾患を有するかまたは有すると診断された対象に投与することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、肝疾患の少なくとも1つの症状を緩和するために、有効量の作用剤を対象に投与することを含む。本明細書で使用される場合、「肝疾患の少なくとも1つの症状を緩和する」とは、肝疾患に関連付けられる任意の状態または症状（例えば、倦怠感、体重喪失、痛み、皮膚および/もしくは眼の黄変、または暗色尿）を改善することである。そのような低減は、任意の標準技法で測定した場合、等価な未治療対照と比較して、少なくとも5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%、またはそれよりも大きい。本明細書に記載の作用剤および組成物を対象に

50

投与するための様々な手段が当業者に公知である。一実施形態では、作用剤は、全身的にまたは局所的に（例えば、肝臓に）投与される。一実施形態では、作用剤は静脈内投与される。一実施形態では、作用剤は、連続的に、間隔を置いて、または散発的に投与される。作用剤の投与経路は、送達される作用剤のタイプ（例えば、miRNA、細胞、またはRNAi）に合わせて最適化されることになり、熟練の開業医により決定することができる。

【0226】

本明細書に記載の作用剤および医薬組成物は、対象に有効な治療をもたらす任意の適切な経路により、それを必要とする対象に投与することができる。本明細書で使用される場合、「投与する」および「導入する」という用語は同義的に使用され、本明細書に記載の作用剤または医薬組成物（例えば、抗体、抗体試薬、またはそれらのWISP1結合性断片）を、所望の効果が生み出されるように、感染またはがんの部位などの所望の部位においてそのような作用剤の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路により、対象内に配置することを指す。作用剤または医薬組成物は、作用剤を全身的にまたは所望の表面もしくは標的に送達する任意の投与様式により対象に投与ことができ、投与様式としては、これらに限定されないが、注射、注入、点滴注入、および吸入投与を挙げることができる。腸における不活化から種々の作用剤を保護することができる限り、経口投与形態も企図される。「注射」としては、限定ではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内の注射および注入が挙げられる。

10

20

【0227】

作用剤（例えば、抗体、抗体試薬、およびそれらのWISP1結合性断片）は、良質な医学のための原則（good medical practice）に準拠するように製剤化、用量化、および投与される。この状況で考慮すべき要因としては、治療される特定の障害、治療される特定の対象、個々の対象の臨床状態、障害の原因、作用剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール、および医療従事者に知られている他の要因が挙げられる。投与しようとする作用剤の「治療有効量」は、そのような考慮事項により束縛され、がんを改善、治療、もしくは安定化するために；無増悪期間（無増悪生存期間）を延長するために；または肝疾患の発症もしくは再発を治療もしくは予防するために必要とされる最小量を指す。例えば、作用剤は、一部の実施形態では、任意選択で、感染症を予防または治療するために現在使用されている1つまたは複数の追加の治療剤と共に製剤化される。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中に存在する作用剤（例えば、抗体およびそのWISP1結合性断片）の量、障害または治療のタイプ、および上記で考察されている他の要因に依存する。これらは、概して、本明細書の上記で使用されたものと同じ投薬量および投与経路で、または従前に使用されている投薬量の約1～99%で使用される。

30

【0228】

投薬量

本明細書に記載のように、肝疾患を治療する場合、作用剤（例えば、抗体、抗体試薬、またはそれらのWISP1結合性断片）の適切な投薬量は、上記で規定されているような治療しようとする肝疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、作用剤が予防目的または治療目的のいずれで投与されるのか、以前の治療適応症、対象の臨床歴および作用剤に対する反応、ならびに主治医の裁量に依存することになる。作用剤は、一度にまたは一連の治療にわたって対象に好適に投与される。併用療法レジメンでは、本明細書に記載の作用剤および1つまたは複数の追加の治療剤は、治療上有効なまたは相乗的な量で投与される。

40

【0229】

本明細書で使用される場合、「単位剤形」は、好適な投与1回の投薬量を指す。例として、単位剤形は、送達デバイス、例えば、注射器または静脈内点滴バッグに配置される治療薬の量であってもよい。一実施形態では、単位剤形は、単回投与で投与される。別の実施形態では、1つよりも多くの単位剤形を同時に投与してもよい。

【0230】

50

本明細書に記載の作用剤の投薬量は、医師が決定してもよく、必要に応じて、観察された治療効果に合わせて調整してもよい。治療の期間および頻度に関して、熟練の臨床医であれば、治療がいつ治療利益をもたらすのかを決定するために、およびさらなる細胞を投与するか否か、治療を中断するか否か、治療を再開するか否か、または治療レジメンに他の変更をなすか否かを決定するために、対象をモニターするのが典型的である。投薬量は、サイトカイン放出症候群などの有害副作用を引き起こすほど大きな量であってはならない。一般に、投薬量は、患者の年齢、状態、および性別により異なることになり、当業者であれば決定することができる。投薬量は、任意の合併症が起こった場合、個々の医師が調整することもできる。

【0231】

治療剤の投薬量範囲は、効力に依存し、所望の効果を生み出すのに十分な程度に大きな量を包含する。投薬量は、許容できない有害副作用を引き起こすほど大きな量であってはならない。一般に、投薬量は、患者の年齢、状態、および性別により異なることになり、当業者であれば決定することができる。投薬量は、任意の合併症が起こった場合、個々の医師が調整することもできる。一部の実施形態では、投薬量は、0.001 mg/kg体重 ~ 100 mg/kg体重の範囲である。一部の実施形態では、用量範囲は、5 µg/kg体重 ~ 100 µg/kg体重である。あるいは、用量範囲を滴定して、血清レベルを1 µg/mL ~ 1000 µg/mLに維持してもよい。全身投与の場合、対象には、例えば、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg、7.5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、50 mg/kg、またはそれよりも多くの量などの治療量で投与することができる。こうした用量は、1つまたは複数の別々の投与により、または持続注入により投与することができる。数日間またはそれよりも長期間にわたる反復投与の場合、治療は、状態に応じて、例えば、上記に記載の方法または当技術分野で公知の方法により測定して肝疾患が治療されるまで持続される。しかしながら、他の投薬量レジメンも有用であり得る。

【0232】

組合せ療法

一実施形態では、本明細書に記載の作用剤または組成物は、単独療法として使用される。
 一実施形態では、本明細書に記載の作用剤は、肝疾患の他の公知の作用剤および療法と組み合わせて使用することができる。「組み合わせて」投与されるとは、本明細書で使用される場合、対象の障害罹患の経過中に、2つの（またはそれよりも多くの）異なる治療が対象に送達されていることを意味し、例えば、対象が障害（肝疾患）を有すると診断された後で、障害が治癒もしくは解消されたかまたは治療が他の理由で中止される前に、2つまたはそれよりも多くの治療が送達される。一部の実施形態では、1つの治療の送達は、第2の治療の送達が始まる時点で依然として生じているため、投与期間の点で重複が存在する。これは、本明細書では、「同時」または「並行送達」と呼ばれることがある。他の実施形態では、一方の治療の送達は、他方の治療の送達が始まる前に終了する。いずれの場合の一部の実施形態では、併用投与のため、治療はより効果的である。例えば、第2の治療はより効果的であり、例えば、第2の治療がより少ない場合でも等価な効果が見られるか、または第2の治療は、第2の治療が第1の治療の非存在下で投与された場合よりも大きな程度に症状を低減するか、または類似の状況が第1の治療で見られる。一部の実施形態では、送達の結果は、症状の低減、または障害に関連する他のパラメーターが、他方の非存在下で送達された一方の治療で観察されるものよりも大きいことである。2つの治療の効果は、部分的に相加的であってもよく、完全に相加的であってもよく、または相加的よりも大きくてもよい。送達の結果は、送達された第1の治療の効果が、第2の治療が送達された時点で依然として検出可能であることであってもよい。本明細書に記載の作用剤および少なくとも1つの追加の療法は、同時に、同じもしくは別々の組成物で、または連続して投与することができる。連続投与の場合、本明細書に記載の作用剤を最初に投与し、次に追加の作用剤を投与してもよく、または投与の順序を逆にしてもよい。

10

20

30

40

50

作用剤および/もしくは他の治療剤、手順、またはモダリティは、活動性障害の期間中に、または寛解もしくはより低い活動性疾患の期間中に投与してもよい。作用剤は、別の治療の前に、治療と並行して、治療後に、または障害の寛解中に投与してもよい。

【0233】

肝疾患を治療するために現在使用されている治療薬としては、これらに限定されないが、ウルソデオキシコール酸（UDCA、ウルソジオール、INN、NAN、AAN、またはUSANとしても知られている）、コレステラミン、スタノゾロール、ナルトレキソン、リファンピシン、ピオグリタゾン、メトホルミン、ロシグリタゾン、ロベグリタゾン、レチノールエステル、ビタミンA、肝臓透析、または肝臓移植、または当技術分野で公知である肝疾患の任意の他の治療が挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載の作用剤または組成物は、別の療法と一緒に投与されない。具体的には、本明細書に記載の作用剤または組成物は、ウルソデオキシコール酸（UDCA、ウルソジオール、INN、NAN、AAN、またはUSANとしても知られている）、コレステラミン、スタノゾロール、ナルトレキソン、リファンピシン、ピオグリタゾン、メトホルミン、ロシグリタゾン、ロベグリタゾン、レチノールエステル、ビタミンA、肝臓透析、または肝臓移植、または当技術分野で公知である肝疾患の任意の他の治療とは一緒に投与されない。

10

【0234】

組み合わせて投与される場合、作用剤もしくは組成物および追加の作用剤（例えば、第2もしくは第3の作用剤）またはすべては、個々に使用される各作用剤の量または投薬量よりも、例えば単独療法の場合よりも高いか、低いか、または同じである量または用量で投与することができる。ある特定の実施形態では、作用剤、追加の作用剤（例えば、第2もしくは第3の作用剤）、またはすべての投与量または投薬量は、個々に使用される各作用剤の量または投薬量よりも低い（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%）。他の実施形態では、所望の効果（例えば、肝疾患の治療）をもたらす、作用剤、追加の作用剤（例えば、第2もしくは第3の作用剤）、またはすべての量または投薬量は、同じ治療効果を達成するために個々に必要とされる各作用剤の量または投薬量よりも低い（例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%）。

20

【0235】

非経口剤形

本明細書に記載の作用剤の非経口剤形は、これらに限定されないが、皮下、静脈内（ボラス注射を含む）、筋肉内、および動脈内を含む、種々の経路により対象に投与することができる。非経口剤形の投与は、典型的には、夾雑物に対する患者の自然防御を迂回するため、非経口剤形は、好ましくは、無菌性であるか、または患者に投与する前に滅菌することが可能である。非経口剤形の例としては、これらに限定されないが、注射可能な溶液、薬学的に許容される注射用のビヒクルに溶解または懸濁可能な乾燥製品、注射可能な懸濁物、制御放出性非経口剤形、およびエマルジョンが挙げられる。

30

【0236】

「非経口投与」および「非経口投与された」という語句は、本明細書で使用される場合、通常は注射による、経腸および局所投与以外の投与様式を指す。「全身投与」、「全身投与された」、「末梢投与」、および「末梢投与された」という語句は、本明細書で使用される場合、腫瘍部位などの標的部位、組織、または臓器に対して直接的に投与すること以外の治療剤の投与を指し、そのため治療剤は対象の循環系に進入し、したがって代謝および他の類似プロセスに供される。他の実施形態では、作用剤は、障害が許容する場合、例えば直接注射により局所的に投与され、注射は定期的に繰り返すことができる。

40

【0237】

本開示の非経口剤形を提供するために使用することができる好適なビヒクルは、当業者に周知である。例としては、限定ではないが、以下のものが挙げられる：無菌水；USP注射用水；生理食塩溶液；グルコース溶液；これらに限定されないが、塩化ナトリウム注射、リンゲル注射、デキストロース注射、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射、なら

50

びに乳酸リンゲル注射などの水性ビヒクル；これらに限定されないが、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコールなどの水混和性ビヒクル；ならびにトウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、および安息香酸ベンジルなどの非水性ビヒクル。

【0238】

本明細書に記載の方法を使用した療法の継続期間は、医学的に指示される限り、または所望の治療効果（例えば、本明細書に記載のもの）が達成されるまで継続されることになる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体または抗原結合性断片の投与は、1か月間、2か月間、4か月間、6か月間、8か月間、10か月間、1年間、2年間、3年間、4年間、5年間、10年間、20年間、または最長で対象の生涯年数の期間にわたって

10

【0239】

制御放出剤形および遅延放出剤形

本明細書に記載の態様の一部の実施形態では、作用剤または組成物は、制御放出手段または遅延放出手段により対象に投与される。理想的には、医学的治療における、最適に設計された制御放出調製物の使用は、最小量の薬物物質を使用して最小限の時間で状態を治療または制御することにより特徴付けられる。制御放出製剤の利点としては以下のものが挙げられる：1) 薬物の活性が延長されること；2) 投与頻度が低減されること；3) 患者コンプライアンスが増加すること；4) 薬物の総使用量が少なくなること；5) 局所性または全身性副作用が低減されること；6) 薬物蓄積が最小化されること；7) 血中濃度の

20

【0240】

様々な公知の制御放出または長期放出剤形、製剤、およびデバイスを、本明細書に記載の任意の作用剤と共に使用するために適合させることができる。例としては、これらに限定されないが、米国特許第3,845,770号明細書；第3,916,899号明細書；第3,536,809号明細書；第3,598,123号明細書；第4,008,719号明細書；第5,674,533号明細書；第5,059,595号明細書；第5,591,767号明細書；第5,120,548号明細書；第5,073,543号明細書；第5,639,476号明細書；第5,354,556号明細書；第5,733,566号明細書；および第6,365,185号明細書に記載のものが挙げられる。こうした文献の各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。こうした剤形は、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性膜、浸透

30

40

【0241】

50

効力

例えば、肝疾患を治療するための、本明細書に記載の作用剤の効力は、当業者により決定することができる。しかしながら、治療は、この用語が本明細書で使用されるように、肝疾患の徴候または症状の1つもしくは複数がある有益な様式で変更された場合、他の臨床的に認められる症状がよくなったかもしくはさらに改善された場合、または所望の応答が、例えば本明細書に記載の方法による治療後に少なくとも10%誘導された場合、「有効な治療」とみなされる。効力は、例えば、本明細書に記載の方法に従って治療される状態のマーカー、指標、症状、および/もしくは発生率、または任意の他の適切な他の測定可能なパラメーター、例えば、倦怠感、痛み、体重喪失、もしくは暗色尿を測定することにより評価することができる。効力は、入院、または医学的介入の必要性（つまり、症状の進行）により評価されるような個体の悪化に至らないことによっても測定することができる。こうした指標を測定するための方法は、当業者に公知であり、および/または本明細書に記載されている。

10

【0242】

効力は、本明細書に記載の状態の動物モデル、例えばマウスモデルにおいて、または場合によっては、肝疾患の適切な動物モデルにおいて評価することができる。実験動物モデルを使用する場合、治療の効力は、黄疸、倦怠感、悪心、嘔吐、尿色、腹痛などのマーカーに統計的に有意な変化が観察された場合、明白である。

【0243】

「有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、肝疾患を有するまたは有すると診断された対象に投与することができる、疾患の少なくとも1つまたは複数の症状を緩和するために必要な、本明細書に記載の作用剤または組成物の量を指す。したがって、「治療有効量」という用語は、典型的な対象に投与した際に特定の抗肝疾患効果を提供するのに十分な、作用剤または組成物の量を指す。また、有効量は、本明細書で使用される場合、種々の状況において、疾患の症状の発症を遅延させるか、疾患の症状の経過を変更するか（例えば、肝疾患の進行を緩徐するか）、または疾患の症状を逆行させる（例えば、肝疾患の症状を直すかまたは停止させる）のに十分な、作用剤の量を含むことになる。したがって、正確な「有効量」の指定は、一般に実用的ではない。しかしながら、いかなる所与の場合でも、適切な「有効量」は、当業者であれば日常的な実験作業を使用しただけで決定することができる。

20

30

【0244】

一実施形態では、作用剤または組成物は、連続的に（例えば、ある期間にわたって一定のレベルで）投与される。作用剤の連続投与は、例えば、表皮パッチ、連続放出製剤、または装着型注射器（on-body injector）により達成することができる。

【0245】

一実施形態では、作用剤または組成物は、間隔をおいて（例えば、所与の期間にわたって種々のレベルで）投与される。

【0246】

有効量、毒性、および治療効力は、細胞培養または実験動物において標準的な医薬手順により評価することができる。投薬量は、使用される剤形および使用される投与経路に応じて様々であってもよい。毒性と治療効果との用量比は、治療指数であり、LD50/ED50比として表すことができる。大きな治療指数を呈する組成物および方法が好ましい。治療有効用量は、初期には細胞培養アッセイで推定することができる。また、動物モデルにおいて用量を製剤化して、細胞培養においてまたは適切な動物モデルにおいて決定されたIC50（つまり、症状の半最大阻害が達成される作用剤の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。任意の特定の投薬量の効果は、好適なバイオアッセイ、例えば、中でも肝機能の測定または血液検査によりモニターすることができる。医師であれば、投薬量を決定し、必要に応じて、観察された治療効果に合わせて調整することができる。

40

50

【 0 2 4 7 】

本明細書で提供される本発明は、以下の番号付段落においてさらに説明することができる。

1. 肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、W I S P 1を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法。

2. 肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ1アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、および強皮症からなる群から選択される、段落1に記載の方法。

3. W I S P 1は、W I S P 1 v、W I S P 1 v x、およびW I S P 1デルタエクソン3~4からなる群から選択されるスプライスパリアントである、段落1または2に記載の方法。

4. W I S P 1を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、およびa b 6 5 9 4 3からなる群から選択される、段落1~3のいずれか1つに記載の方法。

5. 抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号1~4、6、または12~120のいずれか1つと少なくとも70%相同性である、段落1~4のいずれか1つに記載の方法。

6. W I S P 1は、標的細胞において阻害される、段落1~5のいずれか1つに記載の方法。

7. 標的細胞は、哺乳動物細胞である、段落1~6のいずれか1つに記載の方法。

8. 標的細胞は、肝星細胞、線維芽細胞、または筋線維芽細胞である、段落1~7のいずれか1つに記載の方法。

9. 肝星細胞は、静止状態にある、段落1~8のいずれか1つに記載の方法。

10. 抗体または抗体試薬は、直接注射、皮下注射、筋肉注射、または経鼻投与により投与される、段落1~9のいずれか1つに記載の方法。

11. W I S P 1の阻害は、W I S P 1活性を阻害することであるか、またはW I S P 1タンパク質レベルを低減させることである、段落1~10のいずれか1つに記載の方法。

12. W I S P 1の活性は、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも大きく阻害される、段落1~11のいずれか1つに記載の方法。

13. W I S P 1のレベルは、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも大きく低減される、段落1~12のいずれか1つに記載の方法。

14. W I S P 1を阻害する抗体または抗体試薬および薬学的に許容される担体を含む組成物。

15. W I S P 1を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0、A F 1 6 8 0、S A B 2 5 0 1 1 1 4、a b 6 0 1 1 4、およびa b 6 5 9 4 3からなる群から選択される、段落1~14のいずれか1つに記載の組成物。

16. 抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号1~4、6、または12~120のいずれか1つと少なくとも70%相同性である、段落1~15のいずれか1つに記載の組成物。

17. 肝疾患を治療または予防するために製剤化されている、段落1~16のいずれか1つに記載の組成物。

18. 対象の肝疾患を治療するための方法であって、

a. 対象の生物学的試料中のW I S P 1および/またはY a p、C o l 1 a 1、A c t a 2のレベルを検出すること、

b. (a)の測定値を参照レベルと比較すること、

c. 参照レベルと比較して(a)のW I S P 1および/またはY a p、C o l 1 a 1、A c t a 2が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること、ならびに

d. 肝疾患を有する対象に、W I S P 1を阻害する抗体または抗体試薬を投与すること

10

20

30

40

50

を含む方法。

19. (a)の前に、対象から生物学的試料を得ることをさらに含む、段落1～18のいずれか1つに記載の方法。

20. 肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ1アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、または強皮症である、段落1～19のいずれか1つに記載の方法。

21. 生物学的試料は、血液試料、組織、パフィーコート、血清、または組織である、段落1～20のいずれか1つに記載の方法。

22. WISP1を阻害する抗体または抗体試薬は、mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、およびab65943からなる群から選択される、段落1～21のいずれか1つに記載の方法。 10

23. 抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号1～4、6、または12～120のいずれか1つと少なくとも70%相同性である、段落1～22のいずれか1つに記載の方法。

24. 肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、WISP1を阻害する作用剤を投与することを含む方法。

25. 肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ1アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、および強皮症からなる群から選択される、段落1～24のいずれか1つに記載の方法。

26. WISP1は、WISP1v、WISP1vx、およびWISP1デルタエクソン3～4からなる群から選択されるスプライスバリエントである、段落1～25のいずれか1つに記載の方法。 20

27. WISP1は、標的細胞において阻害される、段落1～26のいずれか1つに記載の方法。

28. WISP1を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、miRNA、およびsiRNAからなる群から選択される、段落1～27のいずれか1つに記載の方法。

29. マイクロRNAは、マイクロRNA15aまたはmiRNA412である、段落1～28のいずれか1つに記載の方法。

30. WISP1を阻害する抗体または抗体試薬は、mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、およびab65943からなる群から選択される、段落1～29のいずれか1つに記載の方法。 30

31. 抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号1～4、6、または12～120のいずれか1つと少なくとも70%相同性である、段落1～30のいずれか1つに記載の方法。

32. 作用剤は、直接注射、皮下注射、筋肉注射、または経鼻投与により投与される、段落1～31のいずれか1つに記載の方法。

33. WISP1の阻害は、WISP1活性を阻害することであるか、またはWISP1タンパク質レベルを低減させることである、段落1～32のいずれか1つに記載の方法。

34. WISP1の活性は、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも大きく阻害される、段落1～33のいずれか1つに記載の方法。 40

35. WISP1のレベルは、適切な対照と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも大きく低減される、段落1～34のいずれか1つに記載の方法。

36. WISP1を阻害する作用剤および薬学的に許容される担体を含む組成物。

37. WISP1を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、miRNA、およびsiRNAからなる群から選択される、段落1～36のいずれか1つに記載の組成物。

38. マイクロRNAは、マイクロRNA15aまたはmiRNA412である、段落1 50

～ 37 のいずれか 1 つに記載の組成物。

39 . 対象の肝疾患を治療するための方法であって、

- a . 対象の生物学的試料中の W I S P 1 および / または Y a p 、 C o l 1 a 1 、 A c t a 2 のレベルを検出すること、
 - b . (a) の測定値を参照レベルと比較すること、
 - c . 参照レベルと比較して (a) の W I S P 1 および / または Y a p 、 C o l 1 a 1 、 A c t a 2 が増加した対象を、肝疾患を有すると識別すること、ならびに
 - d . 肝疾患を有する対象に、W I S P 1 を阻害する作用剤を投与すること
- を含む方法。

40 . (a) の前に、対象から生物学的試料を得ることをさらに含む、段落 1 ~ 39 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

41 . 肝疾患は、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性肝炎、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、非アルコール性脂肪性肝炎、または強皮症である、段落 1 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の方法。

42 . 生物学的試料は、血液試料、組織、パフィーコート、血清、または組織である、段落 1 ~ 41 のいずれか 1 つに記載の方法。

43 . W I S P 1 を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A 、および s i R N A からなる群から選択される、段落 1 ~ 42 のいずれか 1 つに記載の方法。

44 . マイクロRNA は、マイクロRNA 15 a または m i R N A 4 1 2 である、段落 1 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

45 . W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0 、 A F 1 6 8 0 、 S A B 2 5 0 1 1 1 4 、 a b 6 0 1 1 4 、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、段落 1 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の方法。

46 . 抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4 、 6 、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、段落 1 から 45 のいずれか 1 つに記載の方法。

47 . W I S P 1 を阻害する作用剤を発現する遺伝子操作された肝星細胞またはその集団を生成するための方法であって、細胞を、W I S P 1 を阻害する作用剤と接触させること、および作用剤の発現を可能にするのに十分な時間にわたって細胞を培養することを含む方法。 30

48 . 細胞は、静止状態にある、段落 1 ~ 47 のいずれか 1 つに記載の方法。

49 . 接触は、細胞を、作用剤または作用剤をコードするベクターと接触させることを含む、段落 1 ~ 48 のいずれか 1 つに記載の方法。

50 . 接触は、形質導入、ヌクレオフェクション、エレクトロポレーション、直接注射、および / またはトランスフェクションを含む、段落 1 ~ 49 のいずれか 1 つに記載の方法。

51 . W I S P 1 を阻害する作用剤は、小分子、抗体または抗体試薬、ペプチド、ゲノム編集系、ウイルスベクター、m i R N A 、および s i R N A からなる群から選択される、段落 1 ~ 50 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

52 . マイクロRNA は、マイクロRNA 15 a または m i R N A 4 1 2 である、段落 1 ~ 51 のいずれか 1 つに記載の方法。

53 . W I S P 1 を阻害する抗体または抗体試薬は、m a b 1 6 8 0 、 A F 1 6 8 0 、 S A B 2 5 0 1 1 1 4 、 a b 6 0 1 1 4 、および a b 6 5 9 4 3 からなる群から選択される、段落 1 ~ 52 のいずれか 1 つに記載の方法。

54 . 抗体または抗体試薬のアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 4 、 6 、または 1 2 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つと少なくとも 7 0 % 相同性である、段落 1 から 53 のいずれか 1 つに記載の方法。

55 . 段落 46 ~ 53 のいずれか 1 つに記載の方法により生成される肝星細胞を含む細胞株。

56. 段落1～55のいずれか1つに記載の方法により生成される肝星細胞またはその集団、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

57. 肝疾患を治療または予防するための方法であって、それを必要とする対象に、段落1～56のいずれか1つに記載の方法により生成される細胞、段落1～56のいずれか1つに記載の細胞、または段落1～56のいずれか1つに記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

58. 対象の線維症を低減するための方法であって、それを必要とする対象に、段落1～57のいずれか1つに記載の方法により生成される細胞、段落1～57のいずれか1つに記載の細胞、または段落1～57のいずれか1つに記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

10

59. 対象の肝疾患を治療するための方法であって、

a. 参照レベルと比較してWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2が増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること、ならびに
b. 肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する抗体または抗体試薬を投与することを含む方法。

60. 対象の肝疾患を治療するための方法であって、

a. 参照レベルと比較してWISP1および/またはYap、Col1a1、Acta2が増加した対象を、肝疾患を有すると識別するアッセイの結果を受け取ること、ならびに
b. 肝疾患を有する対象に、WISP1を阻害する作用剤試薬を投与することを含む方法。

20

【実施例】

【0248】

[実施例1]

進行性肝疾患に対する処置

肝疾患治療についてのまだ満たされていないニーズに応じて、本明細書において、肝臓の線維化の進行において中心的役割を演じる細胞型、活性化肝星細胞(HSC)において静止状態を独立に誘導するマイクロRNA miR-15aおよびmiR-412が記載される。さらに、miR-15aは、活性化HSCにおいてその線維形成促進機能を阻止するようにWISP1を直接標的化する。マイクロRNAおよびそれらの標的を使用してHSC静止状態を促進することによって、マイクロRNAは、PBCにおける進行性肝線維症を管理するための有用な治療であり得る(図1)。特定の理論に束縛されることなく、miR-15aおよびmiR-412がHSCにおいて静止状態を誘導し、次にmiR-15aの周知の標的WISP1の機能を解明できることが予測される。

30

【0249】

本明細書に記載される研究は、miR-15aまたはmiR-412によって誘導された静止様HSCが、CC14チャレンジマウスにおいて肝損傷および線維症の改善をもたらしたことを示している。CC14モデルにおけるmiR-15aまたはmiR-412の有益な効果を考慮して、マウス処置研究は、胆汁うっ滞性線維症モデル、胆管結紮(BDL)および3,5-ジエトキシカルボニル-1,4-ジヒドロコリジン(dihydrocholidine)(DDC)を使用して拡張され得る。3つの異なるmiRNA送達系が検査され得る: 1) miR-15aまたはmiR-412を構成的に発現する静止様HSCを使用する細胞治療、2) 尾静脈にmiR-15aまたはmiR-412を発現するレンチウイルスを注射すること、および3) 脂質ベースの担体にパッケージされたmiR-15aまたはmiR-412の化学的に修飾した模倣物を尾静脈に注射すること。対照および処置マウスは、結果を分析するために使用され得る。

40

【0250】

本明細書に記載される研究は、MiR-15aがHSCにおいてその線維形成促進機能を阻止するようにWISP1を直接標的化できることを示している。BDLおよびDDCチャレンジの設定でWISP1ヌルマウスの肝臓表現型は、規定され得る。チャレンジ後の肝損傷およびHSC機能障害の重症度は評価され、野生型マウスのものと比較される。胆

50

汁うっ滞性線維症のマウスモデルは、W I S P 1 遮断抗体を用いて処置されてよく、次いで結果を分析するために使用され得る。

【 0 2 5 1 】

原発性胆汁性胆管炎 (P B C)、以前は原発性胆汁性肝硬変と称された、は、肝臓内の胆管の進行性の破壊、胆汁うっ滞、門脈周囲の炎症および最終的に胆管線維症をもたらし、硬化性の末期肝疾患に至る潜行性の肝疾患である。遺伝的および環境的因子の両方が、疾患が顕在化するように相互作用すると考えられるが、不明確な病態形成を伴う自己免疫性障害である。興味深いことに、P B C は、女性に対する男性の疾患比 9 : 1 で男性よりはるかに女性を冒す。合衆国における年間 1 0 0 万人当たりの P B C の年齢調整された発生頻度は、女性 4 5 名、男性 7 名であり、1 0 0 万人あたりの有病率は、女性 6 5 4 名、男性 1 2 1 名である [1]。

10

【 0 2 5 2 】

親水性胆汁塩ウルソデオキシコール酸 (U D C A) は、いまだに P B C に対する延命効果を実証された唯一の薬物である。組織学的検査および生化学パラメーターの改善によって証明されて疾患進行を遅延させることが示されている。その作用の正確な機序は不明であるが、毒性の胆汁塩に対して胆管細胞を保護すると考えられている。残念ながら、U D C A 処置個体の 3 0 % ~ 4 0 % は、最適以下応答の設定で疾患進行をまだ経験する [2]。この処置のギャップを埋めるために、多数のさまざまな作用剤が臨床試験下にあるが、オベチコール酸などの有名な被験薬の一部は、顕著な副作用を有し、延命効果についての証拠を欠いている [3]。

20

【 0 2 5 3 】

大部分の慢性肝疾患と同様に、P B C は炎症から線維症に進行する。この病理学的カスケードの際に、肝星細胞 (H S C) は、肝線維化における中心的役割を演じていると考えられている [4 ~ 6]。H S C は、2 つの形態で存在する。健常個体では、それらは静止状態にあり、複数のレチノイドリッチな脂肪滴によって特徴付けられる。しかし活性化されると、それらは、その脂肪滴を失い、線維形成促進筋線維芽細胞になり、コラーゲンおよび瘢痕形成を促進するメディエーターを分泌する [7、8]。肝線維症における H S C の重要性は十分に確立されているが、この細胞型について未知であることはまだ多く残っている。

【 0 2 5 4 】

H S C に関する知識における複数のギャップの 1 つは、H S C 活性化状態を決定することにおけるマイクロRNA (m i R N A) の役割の現在の理解である。M i R N A は、短い、通常長さ 2 2 ヌクレオチドである非コード遺伝子であり、すべての生物学および病理学的プロセスに関与している。それらは、分解または翻訳阻害を誘導するそれらの m R N A 標内の相補性配列との不完全な塩基対合によって特定のコード遺伝子を下方制御する。各 m i R N A は、多数の異なるコード遺伝子を制御できる一方で、各標的遺伝子は、遺伝子制御ネットワークの複雑な層を構成する多数の異なる m i R N A によって制御され得る [9]。本明細書に記載される実験は、m i R N A が細胞増殖および再プログラム化に不可欠であることを示した [1 0 ~ 1 2]。それにも関わらず、H S C 活性化または静止状態への復帰における m i R N A の役割は、完全には調査されていない。

30

40

【 0 2 5 5 】

グループは、H S C における全体的な m i R N A 発現パターンの特性を明らかにしたが、それらの発現状況の機能的な重要性は、大部分が不明である [1 3 ~ 1 5]。それに応じて、大規模発現プロファイリングに依存する代わりに、機能性スクリーニングが活性化 H S C を静止状態に戻すようにする m i R N A を体系的に同定するために開発され、この努力を通じて m i R - 1 5 a および m i R - 4 1 2 を同定した。m i R - 1 5 a および m i R - 4 1 2 は、これまで肝星細胞の文脈では研究されていなかった。しかし、m i R - 1 5 ファミリーは、線維症を潜在的に減弱するように心臓において T g f ベータ経路を阻害することが見出された [1 6]。これらの m i R N A またはそれらの下流の標的を通じて H S C 静止状態を促進することは、P B C における線維化の進行を予防できる。この研究の

50

目的は、miR-15a、miR-412およびそれらの直接標的のPBCの処置における治療効果を評価することである。

【0256】

結果

本明細書に記載される不偏機能性スクリーニングは、プラスチック表面でそれらが増殖する場合に活性化されるHSCの生来の傾向を利用する。HSCが活性化されると、それらは静止HSCでは豊富に存在する脂肪滴を失う。この有用な表現型二分法を利用して、活性化HSCをさらに静止様にするmiRNAは、細胞質中において再形成される脂肪滴のレベルを追跡することによって探索された。miRNAが、器官の発達、発癌または細胞の再プログラム化などの細胞プログラム全体に影響を与える、複数のコード遺伝子を同時に標的化することが周知であることから[17]、単一のmiRNAでさえ分化転換を誘導できると期待された。

10

【0257】

活性化HSCの静止状態への復帰を促進するこれらのmiRNAを同定するために、活性化HSCが全ゲノムmiRNAライブラリー由来の個々のmiRNA模倣物を受けた後に、レチノイドを含む細胞内脂肪滴の再出現を静止状態のマーカーとしてスキャンした(図2)。実際に、一部のウエルのHSCは、3日以内に再形成されたBODIPY染色陽性脂肪滴を示した。この初期スクリーニングは、15個の主なヒットを示した。さらなる調査のためにMiRNA、miR-15aおよびmiR-412を、ヒトオルソログの存在ならびにマウスおよびヒトHSCの両方において脂肪滴を再形成する能力に基づいて選択した(図3)。新たに形成された脂肪滴は、静止HSCにおけるものと一致して紫外線下での蛍光によって証明されたとおり、レチノイド陽性であった(データ未記載)。トランスフェクトされたHSCの全体のサイズは、10~100分の1に減少し、さらに静止様になった(図4)。さらに、miR-15aまたはmiR-412の強制発現は、活性化、アルファ平滑筋アクチン(Acta2)およびアルファ1 I型コラーゲン(Col1a1)の2つの最も重要な遺伝子マーカーを下方制御した(図4)。

20

【0258】

さらに包括的な発現分析のために、ディープRNA配列決定は、miR-15aまたはmiR-412を受けた静止様HSCが、活性化細胞よりも静止HSCに40~50%近い全体的転写プロファイルを有することを実証した(データ未記載)。さらに重要なことにmiR-15aまたはmiR-412によって静止様になったHSCは、真の静止HSCに類似する機能的表現型を有した。Ex vivoでの実験は、静止様HSCが健常な肝細胞において、2つの細胞型が共培養された場合に脂肪症を誘導しなかったことを実証した。対照的に、候補miRNAを用いて処置されなかった活性化HSCは、それらが共培養された場合に肝細胞脂肪過多(hepatocyte steatosis)を誘導した(図5)。さらに、これらの復帰HSCは、共培養されたヒト肝細胞癌細胞株HepG2およびHuh7からの炎症性サイトカイン発現を減少させることができた(図6)。最終的に、miR-15aについては有意ではなかったが(図7)、予測されたとおり、内在性miR-15aおよびmiR-412は、静止HSCと比較して活性化HSCにおいて発現レベルが減少しており、miR-412は、活性化を促進する培養条件において活性化HSCを静止状態に向けて復帰させると考えられる。このおよび他の重要なex vivoでの観察は、伝統的CCl4マウスモデル(経口経管栄養100ul、40%CCl4 1週間に2回)において肝臓の病態のレベルを減弱するためにこれらのmiRNAがin vivoで送達され得るかどうか、特にmiR-15aまたはmiR-412のいずれかを発現するHSCが、活性化促進シグナルを有する疾患肝臓においてさえ静止様状態を維持できるかどうかを検査することを可能にした。細胞接触および可溶性メディエーターを通じて、静止様HSCは、炎症または線維症を促進するそれらのシグナルを弱めるように肝臓内で他の細胞型を誘導できる。

30

40

【0259】

miRNAを生存しているマウスに送達するためにさまざまな方法があるが、注射するた

50

めに選択したHSCは miR-15aまたはmiR-412を構成的に発現することによって *ex vivo* で静止様状態になった。再プログラム化されたHSCを4週間のCCl₄チャレンジの3週目に1回に注射した。肝臓に移植するように注射したHSCは、GFPSIGNALを発する肝細胞内で可視化により確認し、miRNAを発現するpiggyBacベクターを挿入した[18](図8)。さらに重要なことに、静止様HSCを用いて処置したマウスは、肝臓におけるバルーニング、アポトーシス、炎症および線維症の減少(図8)ならびに肝臓コラーゲン発現の低下を示す組織学を有した(図9)。

【0260】

これら2つのmiRNA候補は、肝臓の炎症および線維症を促進するHSC遺伝子を下方制御すると考えられる。miR-15aおよびmiR-412によって阻止される多数の遺伝子がおそらくあるが、WISP1は、miR-15aの実験的に検証された直接標的である。活性化HSCは、静止HSCのレベルの約30倍のWISP1を発現し(データ未記載)、ヒトPBC中のHSCは、正常な肝臓においてよりさらに多くWISP1を発現した(図10)。最終的にmiR-15aは、その3'-UTR内に2つの潜在的なmiR-15a結合配列を含有するWISP1を標的化すると予測される。したがって、推定標的配列またはそれらの変異バリエーションを構成的に活性化ルシフェラーゼレポーター遺伝子の後にクローニングした。これらのレポーターの内の1つをmiR-15a模倣物を用いて同時トランスフェクトした場合、野生型配列を含むレポーターは、ルシフェラーゼ発現を減少させた一方で、変異配列を含むレポーターはせず、miR-15aが両方のWISP1標的配列に結合することを示している(図11)。WISP1は、HSCにおいてmiR-15a作用の一部を達成するための重要な標的遺伝子である。

【0261】

胆管炎のマウスモデルにおけるmiR-15aおよびmiR-412の検査

miR-15aまたはmiR-412を送達することは、PBCのための治療である：本明細書に記載される驚くべき結果を考慮して、PBCの処置におけるmiR-15aおよびmiR-412の可能性をさらに評価するために *in vivo* での実験を拡張した。これらのmiRNAが、HSCを通じて単独で、または他の細胞型を通じてより広範にそれらの機能を発揮するのかを評価するために、miRNAは、細胞治療の代わりにウイルスベクターまたは模倣物を使用して全身に送達され得る。すべての *in vivo* 処置実験について、有効性は、肝臓における線維形成促進遺伝子のPCRを実施すること、H&Eおよびシリウスレッド染色を含む組織学的検査、肝臓ヒドロキシプロリンアッセイならびに血漿ALTおよびアルカリホスファターゼの測定を実施することによって評価され得る。

【0262】

PBCの各モデルは、ヒトPBCを示すことに強弱を有する。この研究の目的のために、miRNA候補ならびに線維症および炎症の減少をもたらすWISP1の阻害を検査するためには、比較的早期に胆管線維症に着実に進行するモデルが必要である。PBCの遺伝的モデルの大部分は、肝線維症を生じないまたは非常にゆっくりと生じる[19]。このため、胆管結紮(BDL)によって外科的に誘発された、および3,5-ジエトキシカルボニ-1,4-ジヒドロコリジン(DDC)によって化学的に誘発された確実に線維症に達する2つの胆管炎モデルが利用され得る。顕著なレベルの胆汁うっ滞性線維症を発症するための所要時間があることから、すべての実験はBDLモデルについては3週間後、DDCモデルについては4週間後に終了され得る[20~22]。

【0263】

間葉系幹細胞およびマクロファージを使用して、複数のグループは、肝線維症のための細胞療法を既に試み、一定の成果をあげた[23]。しかし、本明細書に記載される実験は、肝線維症を予防するために意図的に遺伝子操作されたHSCを初めて利用する。初期の *in vivo* 処置結果は説得力があるが、胆管炎のマウスモデルにおいてこの細胞療法の効果を検査することは、これまでCCl₄モデルだけが検査されてきたことを考慮すると、有用である。すべての細胞療法実験のために、注射は脾臓に行われ、静止様HSC 5

10

20

30

40

50

00, 000個はmiR-15aまたはmiR-412を用いて再プログラム化された。すべての適切な対照、例えば、処置を受けていない、および再プログラム化されていないHSCを用いた処置を受けた対照群も含まれる。

【0264】

21日間BDLを用いてチャレンジされたマウスは、顕著な線維症を通常は発症する。再プログラム化されたHSCは、BDLチャレンジの21日間の過程の際の7および14日目に注射され得る。すべてのマウスは、21日目に殺される。28日間DDCを用いてチャレンジされたマウスは、顕著な線維症を通常は発症する。再プログラム化されたHSCは、DDCチャレンジの28日間の過程の際の14および21日目に注射され得る。すべてのマウスは、28日目に殺される。

10

【0265】

最初の実験は、miR-15aまたはmiR-412を用いて再プログラム化されたHSCを注射することが、CC14誘発肝線維症においてコラーゲン発現および肝損傷の全体的なレベルを減少できることを実証した。細胞治療を通じてmiRNAを送達することは、見込みがあると示されたが、他の送達方法は、調査されるべきである。1つの方法は、miRNAを発現するレンチウイルスを注射することである。レンチウイルスは、BDLチャレンジの21日間の過程の際の7および14日目にmiR-15aまたはmiR-412のいずれかを尾静脈に発現できる。すべてのマウスは21日目に殺される。レンチウイルスは、DDCチャレンジの28日間の過程の際の14および21日目にmiR-15aまたはmiR-412のいずれかを発現できる。すべてのマウスは28日目に殺される。

20

【0266】

別の送達方法として、脂質ベースの担体(Max Suppressor™ by B100 Scientific)中にパッケージされたさらに安定な、化学的に修飾されたmiRNA模倣物(Exiqon and Invitrogen)を注射することの実行可能性は検査され得る[24、25]。レンチウイルスを避けることによって、この方法またはその変法は、ヒトにおいて使用される可能性を有する。担体は、BDLチャレンジの21日間の過程の際の7および14日目にmiR-15aまたはmiR-412のいずれかを含有して尾静脈に注射され得る。すべてのマウスは21日目に殺される。担体は、DDCチャレンジの28日間の過程の際の14および21日目にmiR-15aまたはmiR-412のいずれかを含有して注射され得る。すべてのマウスは28日目に殺される。

30

【0267】

メスマウスにおいて肝線維症を誘導することが困難であることから、オスマウスは、本明細書に記載されるin vivo処置研究のためにさらに有用である。検出力計算(power calculation)は、各群についてマウス8匹が、アルファ1 I型コラーゲンレベルにおける50%減少を、p値0.01および90%検出力(power)での測定において20%標準偏差を有して検出するために使用され得ることを示している。miRNAを用いたHSC処置の最も大きなチャレンジの1つは、オフターゲット効果を最小化するためにこの細胞型を特異的に標的化する送達系を開発することである。送達系は、特異性を改善するために最適化され得る。例えば、近年開発された2つの有望なHSC送達系は、p75ニューロトロフィン受容体ペプチド(p75NTRp)タグ化アデノウイルスおよびAAV6ベクターである[26、27]。

40

【0268】

胆管炎のマウスモデルにおけるWISP1の機能の評価
MiR-15a標的Wisplは、PBCにおいて炎症および線維症を促進する：WISP1は、Cyr61(Ccn1)、Ctgf(Ccn2)、Nov(Ccn3)、WISP1(Ccn4)、Wispl2(Ccn5)およびWispl3(Ccn6)を含むマトリクス細胞タンパク質のCcnファミリーのメンバーである。Ctgfは、肝臓における重要な線維形成促進因子として既に確立されている[28]。

50

【0269】

興味深いことに、WISP1は、ヒト特発性肺線維症において上方制御されていることが見出されており、ブレオマイシンチャレンジマウスを中和WISP1抗体を用いて処置することは、肺線維症の減弱を生じた[29]。さらに、小動物研究は、WISP1を遮断することがCCl₄誘発肝線維症を回復させることを示した[30]。しかし、肝臓におけるWISP1の役割は、特にPBCの文脈では、詳細には研究されていない。

【0270】

WISP1は、miR-15aの直接標的であるが、HSC活性化状態へのその影響およびPBC病態形成におけるその役割は、不明である。WISP1ヌルマウス株は骨形成におけるWISP1の役割を実証するために作製されたが、肝臓におけるその機能は研究されなかった[31]。これらのマウスは、繁殖力があり、顕性の肝臓の表現型を有さない。それらの変異対立遺伝子は、良好な変異マウス誘導を保證するUniversity of California at DavisのMMRRC施設で凍結精子および胚中に保存されている。

10

【0271】

表現型は、肝臓の病態の全体の重症度によって評価され得る。WISP1ヌルマウスは、BDLおよびDDCを用いてチャレンジされ得る。WISP1ヌルマウスによって維持される生じた肝損傷は、野生型マウスのもものと比較され得る。肺を含む他の器官におけるWisp1の周知の線維形成促進の役割を考慮して、WISP1ヌルマウスは、肝線維症の減少およびおそらく炎症の減少を有すると予測される。すべての*in vivo*での実験について、肝臓表現型は、肝臓における線維形成促進遺伝子のPCR、H&Eおよびシリウスレッド染色を含む組織学的検査、肝臓ヒドロキシプロリンアッセイならびに血漿ALTおよびアルカリホスファターゼの測定を実施することによって評価され得る。最後に、胆管線維症のこれらのマウスモデルから採取されたHSCの機能的表現型は、評価され得る。オス野生型およびWISP1ヌルマウスは、BDLを用いてチャレンジされ得る。それらは、21日目に殺され得る。オス野生型およびWISP1ヌルマウスは、DDCを用いてチャレンジされ得る。それらは、28日目に殺され得る。

20

【0272】

次に、HSCは、21日間のBDLおよび28日間のDDCを用いてチャレンジされたマウスから単離され得る。これらのHSCは、炎症性メディエーターが誘導されるかどうかを決定するために、健全な肝細胞と共に共培養され得る。結果は、同じチャレンジを受けた野生型HSCのもものと比較され得る。

30

【0273】

中和抗体を用いてWISP1を遮断することは、マウス肺においてブレオマイシン誘発線維症を減弱させた[29]。同様に、Wisp1を遮断することは、PBCにおいて生じる炎症および線維症のレベルを減少させることができる。胆管炎のマウスモデルは、WISP1抗体を用いて処置され、肝臓表現型を評価され得る。

【0274】

21日間BDLを用いてチャレンジされたマウスは、顕著な線維症を通常は発症する。処置群は、ブレオマイシン誘発肺線維症を処置するために以前使用された市販のWISP1抗体を7および14日目に受けることができる(R&D Systems)[29]。対照群は、IgGを受けることができる。すべてのマウスは、21日目に殺され得る。DDCを用いて28日間チャレンジされたマウスは、顕著な線維症を通常は発症する。WISP1遮断抗体は、DDCチャレンジの28日間の過程の際の14および21日目に注射され得る。すべてのマウスは、28日目に殺され得る。

40

【0275】

本明細書に記載されるとおり、WISP1は、*in vivo*での炎症および線維症のレベルを減少するように抗体を用いて中和され得る炎症性および線維形成促進メディエーターである。したがって、WISP1を遮断することは、胆管線維症も回復させることができると予測される。したがって、活性化HSCの馴化培地を分析することによって、分泌

50

されたパラクリンまたはオートクリンメディエーターは同定され得る。活性化HSC馴化培地のさらに詳細な分析は、薬物標的である他のメディエーターを同定するための質量分析を通じて分析され得る。

【 0 2 7 6 】

参考文献 実施例 1 :

【 0 2 7 7 】

【表 2 - 1】

1. Pandit S and Samant H (2017) Primary Biliary Cholangitis (Primary Biliary Cirrhosis). StatPearls, Treasure Island (FL) 10
2. Pares A, Caballeria L and Rodes J (2006) Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* 130:715-20. doi: 10.1053/j.gastro.2005.12.029
3. Khanna A and Jones DE (2017) Novel strategies and therapeutic options for the management of primary biliary cholangitis. *Therap Adv Gastroenterol* 10:791-803. doi: 10.1177/1756283X17728669
4. Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655-69. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.003
5. Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88:125-72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007 20
6. Puche JE, Lee YA, Jiao J, Aloman C, Fiel MI, Munoz U, Kraus T, Lee T, Yee HF, Jr. and Friedman SL (2013) A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice. *Hepatology* 57:339-50. doi: 10.1002/hep.26053
7. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK and Brenner DA (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:9448-53. doi: 10.1073/pnas.1201840109
8. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP and Schwabe RF (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 4:2823. doi: 10.1038/ncomms3823 30
9. Szabo G and Csak T (2016) Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-015-4002-4
10. Kim BM, Thier MC, Oh S, Sherwood R, Kanellopoulou C, Edenhofer F and Choi MY (2012) MicroRNAs are indispensable for reprogramming mouse embryonic fibroblasts into induced stem cell-like cells. *PLoS One* 7:e39239.
11. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Gancsan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM and Rajewsky K (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19:489-501. 40

【 0 2 7 8 】

【表 2 - 2】

12. Kim BM and Choi MY (2012) Non-canonical microRNAs miR-320 and miR-702 promote proliferation in Dgcr8-deficient embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 426:183-9.
13. Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY and Li DG (2009) Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J* 276:5163-76. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07213.x
14. Maubach G, Lim MC, Chen J, Yang H and Zhuo L (2011) miRNA studies in *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 17:2748-73. doi: 10.3748/wjg.v17.i22. 10
15. Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo MW, Bonkovsky HL and Schrum LW (2012) Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology* 56:300-10. doi: 10.1002/hep.25613
16. Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, Wijnen WJ, van Deel ED, de Groot NE, Alekseev S, Fluiter K, Schroen B, Goumans MJ, van der Velden J, Duncker DJ, Pinto YM and Creemers EE (2014) The microRNA-15 family inhibits the TGFbeta-pathway in the heart. *Cardiovasc Res* 104:61-71. doi: 10.1093/cvr/cvu184
17. Ivey KN and Srivastava D (2010) MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7:36-41. 20
18. Griffin TA, Anderson IC and Wolfe JI (2015) Ex vivo gene therapy using patient iPSC-derived NSCs reverses pathology in the brain of a homologous mouse model. *Stem Cell Reports* 4:835-46. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.022
19. Katsumi T, Tomita K, Leung PS, Yang GX, Gershwin ME and Ueno Y (2015) Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 48:142-53. doi: 10.1007/s12016-015-8482-y
20. Fickert P, Stoger U, Fuchsbichler A, Moustafa T, Marschall HU, Weiglein AH, Tsybrovskyy O, Jaeschke H, Zatloukal K, Denk H and Trauner M (2007) A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol* 171:525-36. doi: 10.2353/ajpath.2007.061133
21. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F and Clavien PA (2008) Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 95:646-56. doi: 10.1002/bjs.6050 30
22. Pollheimer MJ and Fickert P (2015) Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 48:207-17. doi: 10.1007/s12016-014-8442-y
23. Terai S and Tsuchiya A (2017) Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 52:129-140. doi: 10.1007/s00535-016-1258-1
24. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG and Slack FJ (2011) Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 19:1116-22. doi: 10.1038/mt.2011.48 40

【 0 2 7 9 】

【表 2 - 3】

25. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D and Bader AG (2010) Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 70:5923-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0655

26. Song G, Pacher M, Balakrishnan A, Yuan Q, Tsay HC, Yang D, Reetz J, Brandes S, Dai Z, Putzer BM, Arauzo-Bravo MJ, Steinemann D, Luedde T, Schwabe RF, Manns MP, Scholer HR, Schambach A, Cantz T, Ott M and Sharma AD (2016) Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:797-808. doi: 10.1016/j.stem.2016.01.010

27. Rezvani M, Espanol-Suner R, Malato Y, Dumont L, Grimm AA, Kienle E, Bindman JG, Wiedtke E, Hsu BY, Naqvi SJ, Schwabe RF, Corvera CU, Grimm D and Willenbring H (2016) In Vivo Hepatic Reprogramming of Myofibroblasts with AAV Vectors as a Therapeutic Strategy for Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:809-16. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.005

28. Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, Tsukamoto H, Lee LJ, Paulaitis ME and Brigstock DR (2014) Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology* 59:1118-29. doi: 10.1002/hep.26768

29. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A and Eickelberg O (2009) WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:772-87. doi: 10.1172/JCI33950

30. Li X, Chen Y, Ye W, Tao X, Zhu J, Wu S and Lou L (2015) Blockade of CCN4 attenuates CCl₄-induced liver fibrosis. *Arch Med Sci* 11:647-53. doi: 10.5114/aoms.2015.52371

31. Maeda A, Ono M, Holmbeck K, Li L, Kilts TM, Kram V, Noonan ML, Yoshioka Y, McNerny EM, Tantillo MA, Kohn DH, Lyons KM, Robey PG and Young MF (2015) WNT1-induced Secreted Protein-1 (WISP1), a Novel Regulator of Bone Turnover and Wnt Signaling. *J Biol Chem* 290:14004-18. doi: 10.1074/jbc.M114.628818.

10

20

30

【 0 2 8 0 】

[実施例 2]

非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) のための処置

非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) は、次の 5 ~ 1 0 年間で先進国において末期肝疾患、肝移植および肝細胞癌の最も一般的な原因になる可能性がある。現在、F D A 承認薬が存在しないことから、N A F L D をもたらし得る危険因子を低減することが管理の主な方法である。したがって、N A F L D に対する有効な治療を開発することは最も重要である。

【 0 2 8 1 】

活性化肝星細胞 (H S C) は、肝臓の線維化の進行において中心的役割を演じることが周知であり、本明細書において示されるデータは、マイクロ R N A s m i R - 1 5 a および m i R - 4 1 2 が、独立に活性化 H S C を静止状態に戻すことを実証している。さらに m i R - 1 5 a は、活性化 H S C においてその脂肪症促進および炎症性機能を阻止するように W I S P 1 を直接標的化する。特定の理論に束縛されることなく、m i R - 1 5 a および m i R - 4 1 2 が、次いで N A F L D における線維化の進行を抑制できる H S C の静止状態を促進することを仮定した。

40

【 0 2 8 2 】

B 型および C 型肝炎に対する非常に有効な抗ウイルス治療の出現と共に、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) は、最も重篤な肝障害になった。いまや N A F L D は、先進

50

国世界では最も一般的な肝疾患と見なされており [1]、2025年までに、末期肝疾患、肝臓移植および肝細胞癌の主因になると予測されている [2、3]。疾患は、肥満、糖尿病および高脂血症が挙げられる危険因子の高い有病率のために6400万人が罹患していると概算されている合衆国などの富裕国において特に一般的である。さらに、NAFLDの経済的負担は、年間の直接の医療費が約1030億ドルになると推定されて莫大である [4]。疾患は、脂肪肝として始まるが、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、線維症および最終的には硬化性肝不全または肝細胞癌に進行する場合がある。NAFLDは、現在、危険因子を減少させることによって主に管理されている。しかし、これらの手段は、達成することがしばしば困難であり、それらを除外することさえ改善を保証しない [5]。NAFLDが肝臓に関連する罹患率の最も一般的な要因になり、現在それを管理する薬物がないことを考慮すると、より良い処置の選択肢が必要である。本明細書に記載されるのは、NAFLDのための新規治療を開発するための最初のステップである。

10

【 0 2 8 3 】

NAFLDは、脂肪症、炎症および線維症を通して段階的な様式で進行する。この病理学的カスケードの際に、肝星細胞 (HSC) は、肝線維化において中心的役割を演じると考えられている [6 ~ 8]。HSCは、2つの形態で存在する。健常個体では、それらは静止状態であり、複数のレチノイドリッチな脂肪滴によって特徴付けられる (図 1 2)。しかし、活性化されると、それらは、脂肪滴を失い、線維形成促進筋線維芽細胞になり、コラーゲンおよび瘢痕形成を促進するメディエーターを分泌する (図 1 2) [9、10]。

20

【 0 2 8 4 】

肝線維症におけるHSCの重要性は十分に確立されているが、この細胞型についてわからないことは多くある。例えば、活性化HSCを静止状態に戻すことができる遺伝子はあるのか。HSCも線維症だけでなく初期NAFLDに関与し、脂肪症および炎症を促進するか。HSCが脂肪性肝炎または線維症に寄与する場合、これらのプロセスに関与する重要なメディエーターは何か。これらの疑問に応えることおよびより良い生物学的知見を得ることは、NAFLDを管理するための新規アイデアをもたらす可能性がある。

【 0 2 8 5 】

現在の知識における多数のギャップの1つは、HSC活性化状態の決定におけるマイクロRNA (miRNA) の役割の理解が特に乏しいことである。グループは、HSCにおける全体的なmiRNA発現パターンをプロファイルしたが、それらの発現状態の機能的な重要性はほとんど不明確である [11 ~ 13]。それに応じて研究は、miRNA機能を決定することに最初に注目し、HSCの活性化状態に影響を与える重要なmiRNAを発見した。大規模発現プロファイリングに依存する代わりに、機能性スクリーニングおよびアッセイが活性化HSCを静止状態に戻すようにするmiRNAを体系的に同定するために開発され、この努力を通じてmiR - 15 aおよびmiR - 412が同定された。これらのmiRNAまたはそれらの下流の標的を通じてHSC静止状態を促進することは、NAFLDにおける線維化の進行を予防できる。

30

【 0 2 8 6 】

最終的に、線維症を生じる活性化HSCは、NAFLDに固有ではない。大部分の慢性肝疾患は、肝硬変に達する前の数年間について線維症を促進するHSCを含む。したがって、治療剤がHSCを標的化することによって線維化の進行の速度を減少できれば、NAFLD以外の他の肝疾患においてこのアプローチを使用することができる。かかる治療の潜在的影響は、莫大である。確立された薬物療法を有する原発性胆汁性肝硬変または自己免疫性肝炎などの疾患についてさえ、線維化の進行を阻害する追加の作用剤は、これらの慢性の疾病を管理する能力を顕著に改善できる。結論として、NAFLDの重要性およびその線維化の進行においてHSCが演じる中心的役割の両方を考慮して、本明細書に記載される研究の重要性は、広範囲にわたる。

40

【 0 2 8 7 】

いくつかの化合物は、NAFLDの処置について臨床試験中であるが、主な目標としてHSC活性化を妨げるまたは戻すことによるものはない [5、14、15]。それに応じて

50

、最初の主な技術革新は、進行性の肝損傷および線維症を予防するための方法としてHSCの活性化状態を管理するための試みから始まった。本明細書に記載される*in vitro*スクリーニングは、プラスチック表面で増殖される場合に活性化されるHSCの生来の傾向を利用した。HSCが活性化されると、それらは、静止HSCにおいて豊富に存在する脂肪滴を失う(図12)。この有用な表現型二分法を利用して、活性化HSCをさらに静止様にするmiRNAを細胞質において再形成される脂肪滴のレベルを追跡することについて探索した。miRNAが、器官発達、発癌または細胞再プログラム化などの細胞プログラム全体に影響を与えるように複数のコード遺伝子を同時に標的化することが周知であることから[16]、単一のmiRNAでさえ、この分化転換を誘導できると判断された。実際に、不偏性調査を通じて、細胞内脂肪滴の再出現によって実証されるとおり、HSCを活性化状態から静止状態に戻すと考えられるいくつかのmiRNA候補は、同定された(図3)。これらのmiRNAのサブセットは、遺伝子発現パターン、増殖速度および近くの肝細胞への影響を含む、HSC静止状態に向けた他の表現型変化も生じた。HSC活性化状態を管理するためにmiRNAを利用するこの技術革新は、肝線維症を予防する全く新しい治療カテゴリー全体を開発するための基礎として役立つ。

10

【0288】

第2の主な技術革新は、静止様HSCを使用する新規細胞治療の形態にある。初期スクリーニングおよび経過観察*in vitro*アッセイは、miR-15aまたはmiR-412の模倣物を用いる一過性形質移入を使用して行われたが、HSCにおいていずれかのmiRNAを構成的に発現するためにゲノムに組み込まれ得るpiggyBacトランスポゾンベクターが次いで使用された場合[17]、それらは、形態、発現および機能における劇的な変化を伴って静止様状態に持続的に分化転換すると考えられた。際立ったことに、これらの再プログラム化されたHSCが0014を用いてチャレンジされたマウスに注射された場合、それらは、肝臓に生着し、肝損傷および線維症のレベルを改善した。他のグループは、間葉系幹細胞またはマクロファージを使用する肝硬変の細胞治療を試みたが[18]、遺伝子操作されたHSCが肝線維症またはNAFHのための治療として使用されたのは、これが初めてである。

20

【0289】

最近の主な技術革新は、本質的に技術的である。HSCがNAFHにおける肝線維症の主なドライバーであることが既に周知である場合、それらの作用を破壊することは可能である。しかし、この努力には根本的な課題がある。HSC機能および作用の機序の研究を妨げる最も大きな障壁の1つは、機能的表現型および作用の機序を評価するための簡単なアッセイを可能にする、HSCと他の細胞型との相互作用についての良好な*in vitro*モデルの不足である。この必要性に対処するために、初代マウスHSCおよび肝細胞を使用する共培養系が、これら2つの細胞型の近接近での肝臓微小環境を再構成するために開発された。さらに、この技術をNAFHのマウスモデルと組み合わせることによって、近くの肝細胞へのNAFH-HSCの効果は、確実に測定され得る。興味深いことに、コリン欠乏L-アミノ酸限定高脂肪食由来NAFH-HSC(CDAHFDモデル)(図13)は、健常マウスから採取された共培養肝細胞において脂肪症を誘発し、炎症性サイトカインの発現を刺激した(図14、15)[19]。このシグナル伝達は、共培養において2つの細胞型がトランスウエルによって分離され得ることから、細胞-細胞接触を必要とせず、HSCによる可溶性因子(複数可)の分泌を意味する。実際に、肝細胞における脂肪蓄積の誘導は、培養されたNAFH-HSCからの馴化培地が共培養されることなく正常な肝細胞に適用される場合でも、再現され得る(図16)。したがって、この系は、肝細胞において脂肪症および炎症性サイトカインを誘導するHSC分泌メディエーターの同定を可能にする。単純だが強い*ex vivo*系を使用してNAFLDにおけるHSCと肝細胞との間の相互作用をモデル化することによって、メカニズム的および創薬実験を受け入れられる技術は、創出された。特に、細胞株の代わりに初代細胞を利用することによって、この共培養系は、*in vivo*でこれら2つの細胞型の病理生理学的微小環境をさらに正確にシミュレートする[20]。共培養系は、これらの細胞を採取し、培養す

30

40

50

るための既存のプロトコルを改善することによって実行可能であり、それにより努力を最小化しながら品質は最大化される [2 1]。これらの技術的強化は、初代細胞を使用して一貫性があり、再現性のある結果を発表するために有用である。

【 0 2 9 0 】

miR - 1 5 a および *miR* - 4 1 2 が *HSC* 活性化に影響を与える機序および程度の定義

肝星細胞 (*HSC*) は、肝臓において全細胞の 5 % から 1 5 % を構成するだけだが、進行性肝疾患におけるその活性化後の非常に大きな線維形成促進の影響は、十分認識されている [6、7、23、24]。いくつかの研究は、活性化対静止 *HSC* における差時的 *miRNA* 発現を実証したが [11 ~ 13]、活性化プロセスの際の *miRNA* の機能は、まだ大部分は不明である。静止状態に戻る活性化 *HSC* の復帰における *miRNA* の役割は、ほとんど理解されていないが、肝臓の炎症および線維症の回復の際の *HSC* の 1 つの可能性のある運命である [9、25]。

10

【 0 2 9 1 】

静止状態に向けた活性化 *HSC* の復帰を促進するこれらの *miRNA* を同定するために、活性化 *HSC* が全ゲノム *miRNA* ライブラリー由来の個々の *miRNA* 模倣物を受けた後に、レチノイドを含む細胞内脂肪滴、静止状態のマーカーの再出現を探すために不偏性の機能性スクリーニングが設計された (図 2)。調査を、ほとんど脂肪滴を有さない活性化 *HSC* を培養する 96 ウエルプレートで実施した。個々の *miRNA* を各ウエルにトランスフェクトすると、一部のウエルの *HSC* は、*BODIPY* 染色陽性脂肪滴が 3 日以内に再形成されたことを示した。この最初のスクリーニングは、15 個の主なヒットを生じた。*miRNA* *miR* - 1 5 a および *miR* - 4 1 2 を、さらなる調査のためにヒトオルソログの存在ならびにマウスおよびヒト *HSC* の両方における脂肪滴を再形成する能力に基づいて選択した (図 3)。新たに形成された脂肪滴は、静止 *HSC* においてと一致して、紫外線下の蛍光によって証明されてレチノイド陽性であった (図 17)。トランスフェクトした *HSC* の全体のサイズは、10 ~ 100 分の 1 に減少し、さらに静止様になった (図 4)。さらに、*miR* - 1 5 a または *miR* - 4 1 2 の強制発現は、活性化の 2 つの最も重要な遺伝子マーカー、アルファ平滑筋アクチン (*Acta2*) およびアルファ 1 型 (*Col1a1*) を下方制御した (図 4)。

20

【 0 2 9 2 】

さらに包括的な発現分析のためにディープ *RNA* 配列決定は、*miR* - 1 5 a または *miR* - 4 1 2 を受けた静止様 *HSC* が活性化細胞よりも静止 *HSC* に 40 ~ 50 % 近い全体的な転写プロファイルを有したことを実証した (図 18)。最も驚くべきことに、*miR* - 1 5 a または *miR* - 4 1 2 によって静止様になった *HSC* は、真の静止 *HSC* に類似する機能的表現型を有した。*Ex vivo* での実験は、2 つの細胞型が共培養された場合に静止様 *HSC* が健全な肝細胞において脂肪症を誘導しなかったことを実証した。対照的に、候補 *miRNA* を用いて処置されていない活性化 *HSC* または *NASH-HSC* は、それらが共培養された場合に肝細胞脂肪過多を誘導した (図 19)。最終的に、*miR* - 1 5 a については有意でなかったが、予測されたとおり、内在性 *miR* 1 5 a および *miR* - 4 1 2 は、静止 *HSC* と比較して活性化 *HSC* において発現レベルが減少していた (図 7)。

30

40

【 0 2 9 3 】

miR - 1 5 a および *miR* - 4 1 2 は、肝星細胞の文脈では研究されていない。しかし、*miR* - 1 5 ファミリーは、線維症を減弱する可能性がある心臓における *Tgf* ベータ経路を阻害することが見出され [26]、慢性リンパ性白血病における重要な腫瘍抑制因子としても周知である [27、28]。対照的に、*miR* - 4 1 2 については具体的な文献は存在せず、それによりその機能は、全く知られていない。*miRNA* は、一般には、短い、通常は長さ 22 ヌクレオチドである非コード遺伝子であり、すべての生物学および病理学的プロセスに関与している。それらは、分解または翻訳阻害を誘導するそれらの *mRNA* 標的内の相補性配列との不完全な塩基対合によって、標的コード遺伝子を下方制

50

御する。各 *miRNA* は、多数の異なるコード遺伝子を制御できる一方で、各標的遺伝子は、遺伝子制御ネットワークの複雑な層を構成する多数の異なる *miRNA* によって制御され得る。*miRNA* は、すべての哺乳動物コード遺伝子の約 50% を直接標的化し、それらの広範な遺伝子制御を実証している [29]。*miRNA* が、細胞増殖および再プログラム化に不可欠であることが示された [30 ~ 32]。それにも関わらず、HSC 活性化または静止状態への復帰における *miRNA* の役割は、調査されていない。

【 0 2 9 4 】

本明細書において実証されたとおり、HSC における *miR-15a* および *miR-412* の静止状態促進効果および作用の機序は説得力がある。WISP1 は、*miR-15a* の直接標的として同定されたが、*miR-15a* および *miR-412* の両方についての他の関連する標的がある可能性がある。多数の予測アルゴリズムは、配列相補性に基づいて *miRNA* の潜在的な直接標的を予測するが、これらの予測される標的の大部分は、実験検証に耐え得る実際の標的ではない。したがって、HSC の RNA-Seq は、*miR-15a* および *miR-412* の真の直接標的を同定できる発現プロファイルを定義するために種々の活性化状態において実施された。

10

【 0 2 9 5 】

3 種の HSC をディープ配列決定した：1) 健常マウスから新鮮採取した静止 HSC、2) 細胞培養ディッシュで複数回継代させた (pass) 活性化 HSC、および 3) *miR-15a* または *miR-412* のいずれかを受けることによって活性化状態から静止状態に復帰した静止様 HSC。静止様 HSC を *miR-15a* または *miR-412* 模倣物のいずれかを受けたちょうど 3 日後に配列決定したことから、mRNA レベルでの任意のコード遺伝子の減少は、直接 *miRNA* 標的化の結果であり得る。それにより、*miR-15a* または *miR-412* のいずれかを受けた後に mRNA レベルが減少した遺伝子のセットに予測アルゴリズムに基づいた潜在的な直接標的のセットを重ねた [33] (図 20)。2 つの親セット由来の共通遺伝子のこの新たなセット (今後、標的候補セットと呼ばれる) は、真の直接標的を含む可能性が高い。

20

【 0 2 9 6 】

標的候補セットは、分析するには多すぎる遺伝子をまだ有することから、HSC 活性化を促進する 2 つの最良の周知のシグナル伝達経路、Tgfβ および Pdgfr、の一部として周知である標的候補遺伝子を選択した。PANTHER 分析をこれら 2 つの経路の一部である遺伝子を選別するために使用した場合、それぞれ 12 個および 11 個の標的候補が *miR-15a* および *miR-412* について残された (図 20) [34]。これらの遺伝子は、構成的に活性なルシフェラーゼ遺伝子の後にクローニングされた変異 *miRNA* 結合配列を含むまたは含まないレポーターを構築することによって検査され得る。これらのレポーター構築物の 1 つおよび *miRNA* 模倣物は、293 細胞または初代 HSC のいずれかに同時トランスフェクトされ得る。同時トランスフェクトされた *miRNA* がこの配列にアニールし、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳を阻止できる場合、コード遺伝子が検査した *miRNA* の真の直接標的であることを示し得る。変異結合配列は、*miRNA* がアニールすることを妨げ、ルシフェラーゼの正常に近い発現を可能にするはずであり、検査したコード遺伝子配列が真の *miRNA* 標的であることをさらに支持する。23 個の高い可能性を有する標的候補遺伝子配列が実際のおよび変異された形態の両方でルシフェラーゼベクターにクローニングされる必要であることから、この実験は時間がかかると予測される。しかし、直接標的を見出すことは、*miRNA* の作用の機序を解明することにおいて替えがきかないものである [32]。

30

40

【 0 2 9 7 】

これまでに、*miR-15a* または *miR-412* を活性化 HSC に送達することの効果、本明細書に記載された。*miR-15a* および *miR-412* の機能をさらに理解するために、機能実験の確定的な損失は、以前記載された CRISPR 技術を使用して初代 HSC におけるこれらの遺伝子を欠失させることによって完了され得る [35]。

【 0 2 9 8 】

50

初代HSCでこの技術を使用する実行可能性は、既に利用されたデジット(digit)欠失ベクターを送達することによって検証された(図21)[35]。3個の標的化HSC株は、生成され得る: 1) miR-15aヌル、2) miR-412ヌル、および3) miR-15a/miR-412ヌル。これらのmiRNAの両方が過剰発現でHSC静止状態を促進することから、それらの欠失は、活性化表現型を、特にmiR-15a/miR-412二重ヌル株において生じ得ることが予測される。miRNAが多数の機能的重複性を有することが周知であることから、別々の表現型の欠如も可能性がある。活性化のレベルは、RNA-Seqを通じてそれらの全体発現を明らかにする、ならびに活性化および静止HSCの両方を比較することによって決定され得る。形態および増殖は、プラスチックおよびMatrigelで培養される間に評価され得る。活性化野生型HSCは、Matrigel上で静止状態に戻って復帰することが周知であり[36]、ノックアウトHSCの表現型は、この環境において特徴付けられ得る。miR-15aまたはmiR-412欠失がHSC活性化に寄与する場合、この効果は、Matrigelの静止状態促進効果を克服できる。肝細胞とmiRNA欠失HSCとの相互作用は、共培養系を用いて評価され得る。活性化HSCは、共培養肝細胞が脂肪性(steatotic)になり、炎症性メディエーターを発現するようにする。miRNA欠失HSCは、活性化される野生型HSCのものよりさらに大きい脂肪症促進表現型を有すると評価される場合がある。最終的に、miR-15aまたはmiR-412を再構築することは、それぞれの欠失株において検査でき、野生型表現型をレスキューできる。欠失miRNAの再構成は、既にクローニングされ、機能獲得実験のために使用されたmiRNA発現piggyBacベクター

10

20

【0299】

miR-15aまたはmiR-412は、個々に発現されたが、同じHSC中でそれらを一緒に発現することも本明細書において具体的に検討される。さらに、これらのmiRNAの1つだけを送達することは、全体の遺伝子発現パターンを活性化状態から静止状態に向けて、それらをつなぐ転写軸に沿っておよそ半分戻してシフトできる(図11)。両方のmiRNAを過発現することは、いずれかのmiRNAを単独で発現するよりもさらに近く静止状態に向けて活性化HSCを復帰できる。この機能獲得実験は、単一のpiggyBacベクターに両方のmiRNAのクローニングし、それを活性化HSCにトランスフェクトすることによって実施され得る。piggyBacベクターは、miRNA遺伝子のゲノムへの組み込みを可能にし、それらを構成的に発現する[17]。両方のmiRNAを同時に発現するHSCは、RNA-Seqを使用する全体的遺伝子発現、形態学、MTTアッセイを使用する増殖および、本共培養法を使用する肝細胞との相互作用を含む、他のHSC株を特徴付けるための本明細書に記載される同様のパラメーターを用いて表現型決定され得る。

30

【0300】

両方のmiRNAを発現する初代HSCの表現型が静止HSCにさらに近接に類似している場合、細胞療法は、HSCが単一のmiRNAを過発現することから、CCl4誘発肝線維症および食餌誘発NAFLDの設定で検査され得る。このHSC株は、miR-15aまたはmiR-412のいずれかを単独で発現するHSC株を用いて観察されたものよりもさらに肝損傷および線維症を予防または減少させることができる。

40

【0301】

肝線維症またはNAFLDのマウスモデルへのmiR-15aまたはmiR-412送達の検査

miR-15aまたはmiR-412を用いたNAFLDの食餌モデル由来のHSCを処置すること、およびそれらを肝細胞の静止状態に戻すこと(図12)。さらに、miR-15aおよびmiR-412は、活性化を促進する培養条件においてさえも活性化HSCを静止状態に戻すと考えられる。これらの重要なex vivoでの観察は、伝統的CCl4マウスモデルにおいて、特に、miR-15aまたはmiR-412のいずれかを発現するHSCは、活性化促進シグナルを有する疾患肝臓においてさえも静止様状態を維持でき

50

ることから、肝臓の病態のレベルを減弱するために、これらのmiRNAが*in vivo*で送達され得るかどうかの検査を可能にする。細胞接触および可溶性メディエーターを通じて、静止様HSCは、脂肪症、炎症または線維症を促進するそれらのシグナルを弱めるように、肝臓内の他の細胞型を誘導できる。

【0302】

生存しているマウスにmiRNAを送達するためのさまざまな方法があるが、注射されたHSCは、miR-15aまたはmiR-412を構成的に発現することによって静止様になる。それにより、肝疾患のための新規細胞治療の実行可能性を静止様状態に遺伝子操作されたHSCを使用してさらに検査した。この実験は、4週間のCCl₄チャレンジの第3週に再プログラム化されたHSCを1回注射することによって実施した。注射されたHSCは肝臓に移植され、miRNAを発現するpiggyBacベクターに挿入されたGFPシグナルを発することを肝細胞内で可視化することによって確認された[17](図8)。さらに重要なことに、静止様HSCを用いて処置したマウスは、肝臓においてバルーニング、アポトーシス、炎症および線維症の減少を示す組織像(図8)、および低い肝臓コラーゲン発現(図9)を有した。これらの観察を考慮して、*in vivo*での実験は、肝線維症およびNASHの追加のマウスモデルを使用して脂肪肝、炎症および線維症を処置することにおけるmiR-15aおよびmiR-412の可能性をさらに評価するために拡張され得る。これらのmiRNAが、HSCを通じて単独で、または他の細胞型を通じてより広範にそれらの機能を発揮するかどうかを評価するために、miRNAは、細胞治療の代わりにウイルスベクターまたは模倣物を使用して全身に送達され得る。すべての*in vivo*処置実験のために、有効性は、肝臓における線維形成促進遺伝子のPCR、H&Eおよびシリウスレッド染色を含む組織学的検査、肝臓ヒドロキシプロリンアッセイおよび血漿ALTの測定を実施することによって評価され得る。

10

20

【0303】

間葉系幹細胞およびマクロファージを使用して、複数のグループは、一定の成果を有して肝線維症のための細胞治療を既に実施した[18]。しかし、これらの実験は、肝線維症を予防または元に戻すために意図的に遺伝子操作されたHSCを始めて利用する。別個の類遺伝子性マウス由来のHSC、および細胞500,000個をCCl₄の4週間の過程の第3週に1回注射した。最初の結果は説得力があるが、肝臓組織学的検査における改善が、4週間のCCl₄投与から生じた肝損傷の予防から、またはCCl₄チャレンジの最初の3週間で生じた損傷の反転からであるかは不明である。NASHにおけるこの細胞治療の効果は、これまでのところCCl₄モデルだけが使用されたことを考えると十分理解されていない。最終的に、細胞治療の有益な効果は、1回より多い注射で増加する可能性がある。これらの重要な疑問に答えるために、肝線維症のCCl₄モデル(経口経管栄養100uL、40%CCl₄ 1週間に2回)は、NASHのCDAHFDモデルに加えて使用され得る[19]。すべての細胞治療実験について、500,000個の静止様HSCは、miR-15aまたはmiR-412を用いて再プログラム化され得る。処置を受けていないまたは再プログラム化されていないHSCを用いた処置を受けた群などのすべての適切な対照は含まれ得る。

30

【0304】

静止様HSCが肝線維症を予防または元に戻すことができるかどうかを検査するために、異なる細胞注射スケジュールを有する2つの別々の実験が使用され得る。すべてのCCl₄投与は、経口経管栄養によって1週間に2回行われ得る。CCl₄を用いて8週間チャレンジされたマウスは、通常は進行性線維症を発症する。再プログラム化されたHSCは、8週間の過程のCCl₄チャレンジの第2、第4および第6週に注射され得る。すべてのマウスは、8週目の終わりに殺され得る。対照と比較して、細胞治療が既に存在する肝線維症を元に戻すことができるかどうかを検査するために、再プログラム化されたHSCは、8週間の過程のCCl₄チャレンジが完了した後の第9および第11週に注射され得る。すべてのマウスは、12週目の終わりに殺され得る。コリン欠乏L-アミノ酸限定高脂肪食(CDAHFD)モデルは、3週目までに顕著なNASHおよび9週目までに

40

50

ステージ 2 線維症 (0 ~ 4 スケールで) を発症する [19]。5 週目に細胞治療の単回注射または 3、5 および 7 週目に 3 回の注射は完了され得る。すべてのマウスは、9 週目の終わりに 殺され得る。

【 0305 】

活性化ヒト HSC は、miR - 15 a または miR - 412 のヒトオルソログを受けた後に静止状態に復帰し得ることが以前示された (図 8)。これらの復帰した細胞は、レンチノイド陽性脂肪滴を再形成し、共培養されたヒト肝細胞癌細胞株 Hep G2 および Huh7 からの炎症性サイトカイン発現を減少させることができた (図 6)。ヒト治療のために発見を転換する懸け橋として、初代ヒト HSC は、miR 15 a および miR - 412 の治療可能性を決定することにおいて肝線維症の CCL4 マウスモデルを処置するために使用され得る。CCL4 は、ヒト細胞の免疫拒絶を予防するように選択された重症複合型免疫欠損マウス (SCID) において肝線維症を誘導するように 1 週間に 2 回経管栄養され得る。CCL4 ベースの肝線維症モデルは、他のグループによって SCID マウスを用いて成功裏に作製された [37]。線維症予防研究：ヒト HSC は、SCID マウスにおける 8 週間の過程の CCL4 チャレンジの際に第 2、第 4 および第 6 週に注射され得る。線維症復帰研究：再プログラム化されたヒト HSC が対照と比較して既に存在する肝線維症を元に戻すことができるかどうかを検査するために、HSC は、8 週間の過程の 0014 チャレンジが完了した後、第 9 および第 11 週に注射され得る。すべてのマウスは、12 週目の終わりに 殺され得る。

【 0306 】

最初の実験は、miR - 15 a または miR - 412 を用いて再プログラム化された HSC を注射することは、CCL4 誘発肝線維症においてコラーゲン発現および肝損傷の全体的なレベルを減少できることを実証した。miRNA を送達する 1 つの方法は、miRNA を発現するレンチウイルスを注射することである。CCL4 線維症研究：miR - 15 a または miR - 412 のいずれかを発現するレンチウイルスは、CCL4 チャレンジの 8 週間の過程の際の第 2、第 4 および第 6 週に尾静脈に注射され得る。すべてのマウスは、8 週目の終わりに 殺され得る。CDAHFD NASH 研究：miR - 15 a または miR - 412 のいずれかを発現するレンチウイルスは、CDAHFD の 9 週間の過程の際の 3、5 および 7 週目に注射され得る。すべてのマウスは、8 週目の終わりに 殺され得る。

【 0307 】

別の送達方法として、脂質ベースの担体 (Max Suppressor TM by B100 Scientific) にパッケージされたさらに安定な化学的に修飾された miRNA 模倣物 (Exiqon and Invitrogen) を注射することの実行可能性は、検査され得る [38、39]。レンチウイルスを回避することにより、この方法またはその変法は、ヒトにおいて使用される可能性を有する。CCL4 線維症研究：miR - 15 a または miR - 412 のいずれかを含有する脂質担体は、8 週間の過程の CCL4 チャレンジの際に第 2、第 4 および第 6 週に尾静脈に注射され得る。すべてのマウスは、8 週目の終わりに 殺され得る。CDAHFD NASH 研究：miR - 15 a または miR - 412 のいずれかを含有する脂質担体は、CDAHFD の 9 週間の過程の際の 3、5 および 7 週目に注射され得る。すべてのマウスは、9 週目に 殺され得る。

【 0308 】

脂肪肝、炎症および線維症における WISP1 の機能を定義

一般に miRNA が、複数のコード遺伝子を標的化することによって機能することを踏まえて、これら 2 つの候補は、肝臓の炎症および線維症を促進する HSC 遺伝子を下方制御すると考えられる。miR - 15 a および miR - 412 によって阻止される多数の遺伝子がおそらくあるが、WISP1 は、miR - 15 a の最初に実験的に検証された直接標的として明らかになった。WISP1 は、CDAHFD 誘発 NASH - HSC 馴化培地において分泌増加した (up-secreted) いくつかのタンパク質の 1 つとして最初に同定され、> 100 個の代表的なサイトカイン、ケモカインおよび細胞外マトリクスタンパク質を保持するサイトカインアレイプロットを使用して検出された (図 22)。さらに詳細な

分析は、活性化HSCが静止HSCのレベルのおよそ30倍のWISP1を発現したことを示した(図23)。WISP1は、Cyr61(Ccn1)、Ctgf(Ccn2)、Nov(Ccn3)、WISP1(Ccn4)、Wis p2(Ccn5)およびWis p3(Ccn6)を含む、マトリクス細胞タンパク質のCcnファミリーのメンバーである。Ctgfは、肝臓における重要な線維形成促進因子として既に確立されている[42]。興味深いことに、WISP1は、ヒト特発性肺線維症において上方制御されていることが見出され、中和WISP1抗体を用いてプレオマイシンチャレンジマウスを処置することは、肺線維症の減弱を生じた[43]。さらに、小動物研究は、WISP1を遮断することがCCl4誘発肝線維症を回復させることを示した[44]。しかし、肝臓におけるWISP1の役割は、特にNASHの文脈では、詳細に研究されていない。

10

【0309】

共培養肝細胞においてCDAHFD誘発NASH-HSCが脂肪症を促進することを踏まえて(図14、16)、WISP1は、この表現型に寄与する可能性がある。実際に、WISP1が健常マウスから採取されたHSCにおいて過発現された場合、これらの細胞由来の馴化培地は、最初は健常な初代肝細胞において脂肪症を生じた(図24)。さらに、miR-15aは、2つの潜在的なmiR-15a結合配列をその3'-UTR内に含有するWISP1を標的化することが予測される。したがって、推定標的配列またはその変異バリエーションは構成的に活性なルシフェラーゼレポーター遺伝子の後ろにクローニングされた。これらのレポーターの1つをmiR-15a模倣物と同時トランスフェクトした場合、野生型配列を含むレポーターはルシフェラーゼ発現を減少させ、一方変異配列を有するレポーターはさせず、miR-15aが両方のWISP1標的配列に結合することを示している(図11)。これらのデータおよび公開された文献を考慮して、WISP1は、HSCにおいてmiR-15a作用の一部を達成するための重要な標的遺伝子である可能性があり、NASHを管理するための薬物標的である可能性もある。WISP1の肝臓での機能が、NASHのための処置標的として可能性があることは本明細書において検討される。

20

【0310】

WISP1は、miR-15aの直接標的であるが、HSC活性化状態へのその影響およびNAFLD病態形成におけるその役割は不明である。WISP1ヌルマウス株は、骨形成におけるWISP1の役割を実証するために作製されたが、肝臓におけるその機能は研究されなかった[45]。これらのマウスは、繁殖力があり、顕性の肝臓の表現型を有さない。それらの変異対立遺伝子は、良好な変異マウス誘導を保證するUniversity of California at DavisのMMRRC施設で凍結精子および胚中に保存されている(添付書類を参照されたい)。最初に、WISP1の機能は、WISP1ヌルマウスから採取し、それらの表現型をex vivoで特徴付けることによって、HSCにおいて解明され得る。

30

【0311】

静止状態にある野生型HSCは、プラスチック上での7~10日間の培養後で活性化され、本明細書において示されるRNA-seqデータは、これらの2つの群間の全体的遺伝子発現における明らかな差異を実証している(図11)。WISP1ヌルHSCを使用する並行実験は、活性化促進環境においてさえWISP1欠失が、全体的発現プロファイルをHSC静止状態のものに向けて変更するかどうかを評価するために使用され得る。WISP1ヌルマウスからHSCを単離した後、細胞は、1日間(静止状態)または28日間(野生型での活性化)プラスチックディッシュで培養され得る。それらの全体的な遺伝子発現は、RNA-seqを通じて決定でき、野生型HSCのものとの結果と比較される。全体的な比較は、多次元スケーリング分析を用いて行うことができ、差次的に発現された遺伝子は、詳細な分析のために同定され得る。

40

【0312】

細胞形態、増殖および移動は、プラスチック上で培養されている間に比較され得る。形態は、サイズ、細胞プロセスの程度、脂肪滴の存在ならびにそれらがUV蛍光陽性、レチノ

50

イド貯蔵および静止状態の徴候、であるかなどのパラメーターを使用して決定され得る。増殖は、W I S P 1ヌルH S Cの増殖が減少している場合、静止H S Cと同様にP C N AおよびK i - 6 7免疫染色を用いて調べることができる。M T Tアッセイは、既に行われた通り細胞増殖速度を定量するためにも実施され得る [3 2]。本明細書において示される予備的データおよび公開された文献がW I S P 1は線維形成促進遺伝子であると示していることから、W I S P 1を欠失させることは、H S Cにおける静止状態を、おそらくプラスチックディッシュ上で培養されている間も促進できる。最終的にノックアウトH S CにおいてW I S P 1を再構成することは、野生型表現型をレスキューできる。W I S P 1を再構成することは、W I S P 1発現 p i g g y B a cベクターをトランスフェクトすることによって達成され得る。W I S P 1発現ベクターを用いてトランスフェクトされたW I S P 1ヌルH S Cは、トランスフェクトされていないW I S P 1ヌル細胞において使用された同じ i n v i t r oアッセイを用いて特徴付けされ得る。

10

【 0 3 1 3 】

W I S P 1ヌルH S Cと肝細胞との相互作用は、本明細書に記載される共培養系を用いて評価され得る。活性化野生型H S Cは、共培養された肝細胞が脂肪性になるようにする (図 1 4)。W I S P 1を過発現するH S Cは、近くの肝細胞がさらに重度に脂肪性になるようにする (図 2 4)。W I S P 1ヌルH S Cは、減弱した脂肪促進性表現型を有し得る。共培養アッセイの読み出し情報は、脂肪滴についてのB o d i p y染色および、炎症性因子の発現を測定する共培養肝細胞のP C Rを含む。

【 0 3 1 4 】

表現型は、肝臓の病態の全体的な重症度によって評価され得る。W I S P 1ヌルマウスは、毒素誘発肝線維症およびN A S Hをそれぞれモデル化するためにC C l 4およびC D A H F Dを用いてチャレンジされ得る。W I S P 1ヌルマウスによって維持される生じた肝損傷は、野生型マウスのものを用いて評価され得る。肺を含む他の器官におけるW I S P 1の周知の線維形成促進の役割を考慮して、W I S P 1ヌルマウスが、肝線維症の減少ならびに、おそらく脂肪症および炎症の減少さえも有することが予測される。すべてのi n v i v oでの実験について、肝臓表現型は、肝臓における線維形成促進遺伝子のP C R、H & Eおよびシリウスレッド染色を含む組織学的検査、肝臓ヒドロキシプロリンアッセイならびに血漿A L T測定を実施することによって評価され得る。最後に、肝疾患のこれらのマウスモデルから採取されたH S Cの機能的表現型は、決定され得る。

20

30

【 0 3 1 5 】

C C l 4線維症モデル：オス野生型およびW I S P 1ヌルマウスは、C C l 4経管栄養を用いて1週間に2回チャレンジされ得る。それらは、C C l 4を8週間受ける場合があり、8週目の終わりに 殺され得る。C D A H F D N A S Hモデル：C D A H F Dについて野生型およびW I S P 1ヌルマウスは、9週間給餌され得る。中等度のN A S H (C D A H F D、6週間) およびステージ2線維症を有する末期N A S H (C D A H F D、9週間) におけるW I S P 1の役割を定義するために、半分のマウスは6週目の終わりに、他の半分は9週目の終わりに 殺され得る。

【 0 3 1 6 】

H S Cは、4週間のC C l 4および3週間のC D A H F Dを用いてチャレンジされたマウスから単離され得る。これらのH S Cは、それらが脂肪症を発症し、炎症性因子を発現するかどうかを決定するために、健常な肝細胞と共培養され得る。結果は、同じチャレンジを受けた野生型H S Cのものと比較され得る。

40

【 0 3 1 7 】

中和抗体を用いてW I S P 1を遮断することは、マウス肺におけるブレオマイシン誘発損傷を減弱した [4 3]。同様に、W I S P 1を中和することは、N A S Hにおいて生じる炎症および線維症のレベルを減少できる。N A S Hのマウスモデルは、W I S P 1抗体を用いて処置でき、治療の6および9週間後に肝臓表現型を評価し得る。

【 0 3 1 8 】

C D A H F D N A S Hモデル：野生型マウスへのC D A H F Dは、9週間給餌され得る

50

。処置群は、市販の抗体 (R & D S y s t e m s) [4 3] または抗体 [4 6] のいずれかを 1 週間ごとの注射によって受ける。対照群は、I g G を受ける。線維症を有する中等度のおよび末期の N A S H における W I S P 1 遮断の効果をそれぞれ検査するために、半分のマウスは 6 週目の終わりに、他の半分は 9 週目の終わりに 殺され得る。

【 0 3 1 9 】

さらに、N A S H 由来の H S C の馴化培地を分析して、分泌されたパラクリンまたはオートクリン因子は同定され得る。質量分析を通じた N A S H - H S C 馴化培地のさらに詳細な分析は、薬物標的である可能性がある他のメディエーターを同定できた。最終的に、本明細書に記載される共培養系は、代表的なマウスモデルがあれば他の肝疾患を研究するために使用され得る。例えば、肝細胞の H S C との相互作用は、アルコール給餌マウスにおいて細胞型を単離することによってアルコール性肝疾患においてモデル化され得る [4 7] 。

10

【 0 3 2 0 】

参考文献 実施例 1 / 2 :

【 0 3 2 1 】

【表 3 - 1】

1. Clark JM, Brancati FL and Diehl AM (2003) The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 98:960-7. doi: 10.1111/0572-0241.2003.07486.x

2. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK and Dierkhising RA (2011) Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 141:1249-53. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.061

20

3. Starley BQ, Calcagno CJ and Harrison SA (2010) Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 51:1820-32. doi: 10.1002/hep.23594

4. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, Racila A, Hunt S and Beckerman R (2016) The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 64:1577-1586. doi: 10.1002/hep.28785

5. Lassailly G, Caiazzo R, Pattou F and Mathurin P (2016) Perspectives on Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.004

30

6. Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655-69. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.003

7. Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88:125-72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007

【 0 3 2 2 】

40

50

【表 3 - 2】

8. Puche JE, Lee YA, Jiao J, Aloman C, Fiel MI, Munoz U, Kraus T, Lee T, Yee HF, Jr. and Friedman SL (2013) A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice. *Hepatology* 57:339-50. doi: 10.1002/hep.26053
9. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK and Brenner DA (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:9448-53. doi: 10.1073/pnas.1201840109
10. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP and Schwabe RF (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 4:2823. doi: 10.1038/ncomms3823
11. Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY and Li DG (2009) Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J* 276:5163-76. doi: 10.1111/0742-4658.2009.07213.x
12. Maubach G, Lim MC, Chen J, Yang H and Zhuo L (2011) miRNA studies in in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 17:2748-73. doi: 10.3748/wjg.v17.i22.
13. Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo MW, Bonkovsky HL and Schrum LW (2012) Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology* 56:300-10. doi: 10.1002/hep.25613
14. Schuppan D and Kim YO (2013) Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 123:1887-901. doi: 10.1172/JCI66028
15. Corey KE and Rinella ME (2016) Medical and Surgical Treatment Options for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-016-4083-8
16. Ivey KN and Srivastava D (2010) MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7:36-41.
17. Griffin TA, Anderson HC and Wolfe JH (2015) Ex vivo gene therapy using patient iPSC-derived NSCs reverses pathology in the brain of a homologous mouse model. *Stem Cell Reports* 4:835-46. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.022
18. Terai S and Tsuchiya A (2017) Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 52:129-140. doi: 10.1007/s00535-016-1258-1
19. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A and Sudoh M (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 94:93-103. doi: 10.1111/iep.12008

10

20

30

40

【 0 3 2 3 】

50

【表 3 - 3】

20. Herrmann J, Gressner AM and Weiskirchen R (2007) Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 11:704-22. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00060.x
21. Mederacke I, Dapito DH, Affo S, Uchinami H and Schwabe RF (2015) High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc* 10:305-15. doi: 10.1038/nprot.2015.017
22. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L and Wymer M (2015) Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.28431 10
23. Geerts A (2001) History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21:311-35. doi: 10.1055/s-2001-17550
24. Yin C, Evason KJ, Asahina K and Stainier DY (2013) Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest* 123:1902-10. doi: 10.1172/JCI166369
25. Deleve LD, Wang X and Guo Y (2008) Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 48:920-30. doi: 10.1002/hep.22351
26. Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, Wijnen WJ, van Deel ED, de Groot NE, Alekseev S, Fluiters K, Schroen B, Goumans MJ, van der Velden J, Duncker DJ, Pinto YM and Creemers EE (2014) The microRNA-15 family inhibits the TGFbeta-pathway in the heart. *Cardiovasc Res* 104:61-71. doi: 10.1093/cvr/cvu184 20
27. Aqeilan RI, Calin GA and Croce CM (2010) miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* 17:215-20. doi: 10.1038/cdd.2009.69
28. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G and Dalla-Favera R (2010) The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 17:28-40. doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.019
29. Szabo G and Csak T (2016) Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-015-4002-4 30
30. Kim BM, Thier MC, Oh S, Sherwood R, Kanellopoulou C, Edenhofer F and Choi MY (2012) MicroRNAs are indispensable for reprogramming mouse embryonic fibroblasts into induced stem cell-like cells. *PLoS One* 7:e39239.
31. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM and Rajewsky K (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19:489-501.
32. Kim BM and Choi MY (2012) Non-canonical microRNAs miR-320 and miR-702 promote proliferation in Dgcr8-deficient embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 426:183-9. 40

【 0 3 2 4 】

【表 3 - 4】

33. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C and Leslie C (2010) Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 11:R90.
34. Mi H, Muruganujan A and Thomas PD (2013) PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res* 41:D377-86. doi: 10.1093/nar/gks1118
35. Daneshvar K, Pondick JV, Kim BM, Zhou C, York SR, Macklin JA, Abualteen A, Tan B, Sigova AA, Marcho C, Tremblay KD, Mager J, Choi MY and Mullen AC (2016) DIGIT Is a Conserved Long Noncoding RNA that Regulates GSC Expression to Control Definitive Endoderm Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Rep* 17:353-365. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.017 10
36. Sohara N, Znoyko I, Levy MT, Trojanowska M and Reuben A (2002) Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *J Hepatol* 37:214-21.
37. Melhem A, Muhanna N, Bishara A, Alvarez CE, Ilan Y, Bishara T, Horani A, Nassar M, Friedman SL and Safadi R (2006) Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 45:60-71. doi: 10.1016/j.jhep.2005.12.025
38. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG and Slack FJ (2011) Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 19:1116-22. doi: 10.1038/mt.2011.48 20
39. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D and Bader AG (2010) Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 70:5923-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0655
40. Song G, Pacher M, Balakrishnan A, Yuan Q, Tsay HC, Yang D, Rectz J, Brandes S, Dai Z, Putzner BM, Arauzo-Bravo MJ, Steinemann D, Luedde T, Schwabe RF, Manns MP, Scholer HR, Schambach A, Cantz T, Ott M and Sharma AD (2016) Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:797-808. doi: 10.1016/j.stem.2016.01.010
41. Rezvani M, Espanol-Suner R, Malato Y, Dumont L, Grimm AA, Kienle E, Bindman JG, Wiedtke E, Hsu BY, Naqvi SJ, Schwabe RF, Corvera CU, Grimm D and Willenbring H (2016) In Vivo Hepatic Reprogramming of Myofibroblasts with AAV Vectors as a Therapeutic Strategy for Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:809-16. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.005 30
42. Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, Tsukamoto H, Lee LJ, Paulaitis ME and Brigstock DR (2014) Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology* 59:1118-29. doi: 10.1002/hep.26768
43. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A and Eickelberg O (2009) WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis 40

【 0 3 2 5 】

【表 3 - 5】

in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:772-87. doi: 10.1172/JCI33950

44. Li X, Chen Y, Ye W, Tao X, Zhu J, Wu S and Lou L (2015) Blockade of CCN4 attenuates CCl₄-induced liver fibrosis. *Arch Med Sci* 11:647-53. doi: 10.5114/aoms.2015.52371

45. Maeda A, Ono M, Holmbeck K, Li L, Kilts TM, Kram V, Noonan ML, Yoshioka Y, McNerny EM, Tantillo MA, Kohn DH, Lyons KM, Robey PG and Young MF (2015) WNT1-induced Secreted Protein-1 (WISPI), a Novel Regulator of Bone Turnover and Wnt Signaling. *J Biol Chem* 290:14004-18. doi: 10.1074/jbc.M114.628818

46. Ono M, Inkson CA, Sonn R, Kilts TM, de Castro LF, Maeda A, Fisher LW, Robey PG, Berendsen AD, Li L, McCartney-Francis N, Brown AC, Crawford NP, Molinolo A, Jain A, Fedarko NS and Young MF (2013) WISPI/CCN4: a potential target for inhibiting prostate cancer growth and spread to bone. *PLoS One* 8:e71709. doi: 10.1371/journal.pone.0071709

47. Hamarneh SR, Kim BM, Kaliannan K, Morrison SA, Tantillo TJ, Tao Q, Mohamed MMR, Ramirez JM, Karas A, Liu W, Hu D, Teshager A, Gul SS, Economopoulos KP, Bhan AK, Maio MS, Choi MY and Hodin RA (2017) Intestinal Alkaline Phosphatase Attenuates Alcohol-Induced Hepatosteatosis in Mice. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-017-4576-0

10

20

【 0 3 2 6 】

[実施例 3]

HSC単離プロトコール

次のプロトコールは、HSC、例えば、mod - Hep / HSCを単離するための本明細書に記載される実験において使用される。

1. 血管カテーテルまたは翼状針を用いて門脈静脈にカニューレを導入
2. 溶液を37℃、6 mL / 分で用いて肝臓を灌流：
- 3 0 m L H B S S (C a ²⁺ および M g ²⁺ を含まない)、灌流開始直後、I V C 切断
- 3 0 m L 0 . 0 5 % コラーゲナーゼ [0 . 5 m g / m L - - > 5 0 m L のために、5 0 0 u l の 5 0 m g / m L コラーゲナーゼ保存液] (例 例 例 、 C o l l a g e n a s e B ; R o c h e 1 1 0 8 8 8 1 5 0 0 1)
- 3 . 灌流後、肝臓を注意深く (特 に 、 胆 の う) 切除、グリソン鞘を除去
- 4 . 肝臓を滅菌ピーカーに移し、極薄い片に切断
- 5 . 残りの 2 0 m L の 0 . 0 5 % コラーゲナーゼを加え、インキュベーター中、3 7 ℃、3 0 分間保持 [D N A s e (1 0 u g / m L) を加える] (例 例 例 、 D N a s e I ; R o c h e 1 0 1 0 4 1 5 9 0 0 1)
- 6 . ピペットで上下させ、ペトリ皿でセルストレーナー (7 0 u m) を用いてろ過。P B S + D N A s e (1 0 u g / m L) を 4 5 m L まで加える
- 7 . x 5 0 g、3 分間の遠心分離によって肝細胞 (hepatocyte) を除去、上清を新たなチューブに移す
- 8 . x 6 3 5 g、1 0 分間の遠心分離によって沈殿
- 9 . 4 5 m L P B S + D N A s e (1 0 u g / m L) を用いて洗浄、x 6 3 5 g、1 0 分間遠心分離
- 1 0 . 7 0 u m セルストレーナーを通して細胞懸濁物をろ過
- 1 1 . 4 5 m L P B S + D N A s e (1 0 u g / m L) を用いて洗浄、x 6 3 5 g、1 0 分間遠心分離
- 1 2 . 上清を吸引、沈殿に P B S を総体積 6 . 5 m L まで加える
- 1 3 . 3 . 5 m L パーコール (パーコールを 9、1 0 x P B S を 1) を総体積 1 0 m L まで加え、混合し、1 5 m L チューブに移す (例 例 例 、 パーコール ; P e r c o l l p l

30

40

50

us、GE Healthcare 17-5445-02)

14. カラムの上部に1 mLのPBSを注意深く加える
15. カラムを室温、30分間、 $\times 1130g$ 遠心分離(加速9、ブレーキ0)
16. 遠心分離後、HSCはPBSと35%パーコールとの間に位置する層にある
17. マイクロピペットを用いてHSCを吸引し、10 mL DMEMを用いて洗浄し、 $\times 635g \times 6$ 分間遠心分離
18. 上清を吸引
19. 沈殿を再懸濁し、DMEM + 20% FBS + 1% P/Sに蒔く

【0327】

[実施例4]

肝疾患の処置および予防のためのWISP1を阻害する抗体

WISP1に特異的に結合し、阻害する抗体は、原発性胆汁性胆管炎(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)などの肝疾患を処置および予防するために使用され得る。

【0328】

具体的には、WISP1を阻害する主力候補として、抗(ant)-WISP1 IgG1/IgG4抗体およびIgG1 ADCC)が挙げられる。抗WISP1抗体を遺伝子操作するために使用される戦略として、これだけに限らないが、半減期延長のためのFc遺伝子操作; 2つの抗線維化標的の阻害を同時に可能にする二重特異性抗体技術; ならびに、(1)標的異化反応を駆動することによって、実体を触媒作用薬物に隔離することから抗体をそらす、(2)CoG、投薬レベルおよび投薬頻度を劇的に減少させる、(3)皮下投薬の可能性を増加させる、ならびに(4)可能性を完全に遮断する必要性を省く、スリーピング技術が挙げられる。

【0329】

WISP1を阻害する抗WISP1抗体の能力を評価するために、抗体を新鮮HSC上で検査した。WISP1抗体(Ab WISP1またはWISP IgG、RND Systems、 $1\mu g/mL$)を馴化培地を用いて1時間、 $37^\circ C$ でインキュベートし、HSCに適用した。陰性対照として、HSCを馴化培地だけを用いてインキュベートした。陽性対照として、抗体の代わりに組換えWISP1(Rc-WISP1、 $100ng/mL$)もHSCに加えた。HSC試料を処置48時間後に評価した(図38A)。Rc-WISP1、例えば、WISP1-CCN4は、受託番号O54774として同定される細胞株から得る、およびR&D Systemsから市販で入手できる。Rc-WISP1は、HSCにおいてインキュベーション後1日目および2日目に細胞数(図38B)、Acta2 mRNA発現(図38C)およびCol1a1 mRNA発現(図38D)の顕著な増加が見出され、HSCが組換えWISP1の存在下で活性化されたことを示している。驚くべきことに市販で入手できる抗WISP1 IgG(Ab Wisp1)は、HSCにおいてHSC活性化を妨げた; 抗WISP1を用いたインキュベーションは、Rc-WISP1を用いてインキュベートしたHSCと比較して、インキュベーション後1日目および2日目に細胞数(図38B)、Acta2 mRNA発現(図38C)およびCol1a1 mRNA発現(図38D)の顕著な低減を生じた。

【0330】

次に、抗WISP1 IgGを、コリン欠乏L-アミノ酸限定高脂肪食誘発脂肪症(CDAHFD)マウスモデルから単離した初代肝細胞において検査した。肝疾患、例えば、NALFDおよびウイルス性肝炎の顕著な特徴は、疾患肝臓細胞中の脂肪滴の増加である。脂肪滴の存在を評価するために、BODIPY染色が使用される。予測されるとおり、対照IgGを用いて処置したCDAHFD細胞は、BODIPY染色が増加した(図38Eおよび38F)。対照的に、抗WISP1 IgGを用いて処置したCDAHFD細胞は、対照、健常細胞と同様にBODIPY染色が減少した(図38Eおよび38F)。したがって、本明細書において示されるデータは、抗WISP1 IgGが疾患肝臓細胞を健常な肝細胞に戻せることを示している。

【0331】

10

20

30

40

50

最終的に、HSC移動を調節する抗WISP1 IgGの能力を示すために、HSCを単層を形成するように培養し、次いで損傷した(図39A~図39B)。細胞を増殖培地で60mmディッシュに90%コンフルエンスで培養した。単一の直線状の搔創を滅菌P200ピペットチップを使用して作製した。浮遊している細胞デブリを除くために細胞をPBSを用いて洗浄し、組換えWisp1タンパク質(100ng/mL、R&D Systems、Minneapolis、MN)およびモノクローナルWisp1抗体(1μg/mL、R&D Systems、Minneapolis、MN)を24時間加えた。創傷閉鎖または細胞移動を、倒立顕微鏡を使用して搔創が導入された時、傷害12および24時間後に写真撮影した。各時点でのディッシュ中の創傷の縁の間の面積を画像に置いた標準的テンプレートを使用して測定した。データは、初期の創傷面積と比較した創傷面積(百分率)として表した。創傷面積は、公開されているImageJ(NIH)ソフトウェアを使用して決定した。

10

【0332】

傷害に続いて、HSCをrc WISP1または抗WISP1 IgGのいずれかとインキュベートした。rc WISP1を用いてインキュベートしたHSCは、特に12時間後の時点で、対照または抗WISP1 IgG処置HSCと比較してより急速な移動を示した。対照的に、抗WISP1 IgGを用いてインキュベートしたHSCは、対照処置HSCと同様の遅い移動を生じた(図39A~図39B)。抗WISP1 IgGは、rc-WISP1を用いて処置したHSCと比較して傷害後にHSC移動を妨げた。この結果は、WISP1を阻害する抗体が、HSC活性化および移動を妨げることができ、それらを肝疾患を処置するための有用な作用剤にすることを確認している。

20

【0333】

配列

配列番号1は、ヒトWNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1アイソフォーム1前駆体をコードするアミノ酸配列である。

【0334】

【化1】

```
MRWFLPWTLLAAVTAAAASTVLATALSPAPTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSPPRCPLGVSLIT
DGCECCKMCAQQGLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVGVCVLDGVRYNNGQSFQPNC
KYNCTCIDGAVGCTPLCLRVRPPRLWCPHRRVSI PGHCCEQWVCEDDAKRPRKTAPRDTGAFDAVGEVE
AWHRNCIAYTSPWSPCSTSCGLGVSTRISNVNAQCWPEQESRLCNLRPCDVDIHTLIKAGKKCLAVYQPE
ASMNFTLAGCISTRYSYQPKYCGVCMNRCCIPYKSKTIDVVSFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNP
DIFADLESYPDFSEIAN
```

30

【0335】

配列番号2は、ヒトWNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1アイソフォーム2前駆体をコードするアミノ酸配列である。

【0336】

【化2】

```
MRWFLPWTLLAAVTAAAASTVLATALSPAPTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSPPRCPLGVSLIT
DGCECCKMCAQQGLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAHAVGEVEAWHRNCIAYTSPWSPCSTSCGLG
VSTRISNVNAQCWPEQESRLCNLRPCDVDIHTLIKAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRYSYQ
PKYCGVCMNRCCIPYKSKTIDVVSFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYPDFSEIAN
```

40

【0337】

配列番号3は、ヒトWNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1アイソフォーム3前駆体をコードするアミノ酸配列である。

50

【 0 3 3 8 】

【 化 3 】

MRWFLPWTLAAAVTAAAASTVLATALSPAPTTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSPPRCPLGVSLIT
 DGCECCKMCAQQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCARREEVSGCVPARGIHELHTCGLHQ
 HTLLSTQVLWLSLHGQ

【 0 3 3 9 】

配列番号 4 は、ヒト W N T 1 誘導性シグナル伝達経路タンパク質 1 アイソフォーム 4 前駆
 体をコードするアミノ酸配列である。

10

【 0 3 4 0 】

【 化 4 】

MRWFLPWTLAAAVTAAAASTVLATAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRSYQPKYCGVCMNDRCCIPYKSKTIDVSF
 QCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADLESYPDFSEIAN

【 0 3 4 1 】

配列番号 5 は、ヒト W N T 1 誘導性シグナル伝達経路タンパク質 1 (W I S P 1)、転写
 バリエーション 1、m R N A のヌクレオチド配列である。

20

【 0 3 4 2 】

【 化 5 - 1 】

ATATCTGGTGTCTCCTGATGGGCCGCCAGTCTGGGCCAGCTCCCCGAGAGGTGGTCGGATCCTCTGGGCTGCTC
 GGTTCGATGCCTGTGCCACTGACGTCCAGGCATGAGGTGGTTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAG
 CCGCCAGCACCGTCTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCCTACGACCATGGACTTTACCCAGCTCCACTGGAGGA
 CACCTCCTCACGCCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCGCTGCCCGTGGGGGTC
 AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACCTGCACGGAGGCTGCCA
 TCTGTGACCCCCACCGGCCCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACA
 GGTGGTCCGTGTGGGCTGCGTCCGGATGGGGTGCCTACAACAACGGCCAGTCCCTCCAGCCTAACTGCAAGTAC
 AACTGCACGTGCATCGACGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGGCCCCCGGTCTCTGGTGCC
 CCCACCCGCGGCCGCTGACCATACCTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGAGGCCACG
 CAAGACCGCACCCCGTGACACAGGAGCCTTCGATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCAI GGCACAGGAACCTGCATAGCC
 TACACAAGCCCCTGGAGCCCTTGCTCCACCAGCTGCGGCCCTGGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCC
 AGTGCTGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGC
 AGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACTTCACACTTGCGGGCTGCATCAGCACACGC
 TCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTTGCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCTACAAGTCTAAGACTATCGACG
 TGTCCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCCGCCAGGTCCATGGATTAATGCCTGCTTCTGTAACCTGAG
 CTGTAGGAATCCCAATGACATCTTTGCTGACTTGGAACTCCTACCCTGACTTCTCAGAAATTGCCAACCTAGGCAGGC
 ACAAATCTTGGGCTTGGCGACTAACCCAATGCCTGTGAAGCAGTCAGCCCTTATGGCCAATAACTTTTCACCAAT

30

40

50

【化 5 - 2】

GAGCCTTAGTACCCCTGATCTGGACCCCTGGCCTCCATTTCTGTCTCTAACCATTCAAATGACGCCCTGATGGTGCCT
 GCTCAGGCCCATGCTATGAGTTTCTCCTTGATATCATTGAGCATCTACTCTAAAGAAAAATGCCGTGTCTCTAGCT
 GTTCTGGACTACACCCCAAGCCTGATCCAGCCTTTCCAAGTCACTAGAAAGTCCCTGCTGGATCTTGCCTAAATCCCAA
 GAAATGGAAATCAGGTAGACTTTTAATATCACTAATTTCTTCTTTAGATGCCAAACCACAAGACTCTTTGGGTCCAT
 TCAGATGAATAGATGGAATTTGGAACAATAGAATAATCTATTATTTGGAGCCTGCCAAGAGGTACTGTAATGGGTA
 ATTCTGACGTCAGCGCACCAAACTATCCTGATTCCAAATATGTATGCACCTCAAGGTCATCAAACATTTGCCAAG
 TGAGTTGAATAGTTGCTTAATTTTGATTTTAAATGGAAAGTTGTATCCATTAACCTGGGCATTGTTGAGGTTAAGT
 TTCTCTTACCCCTACACTGTGAAGGGTACAGATTAGGTTTGTCCCAGTCAGAAATAAAATTTGATAAACATTCCT
 GTTGATGGGAAAAGCCCCAGTTAATACTCCAGAGACAGGAAAGGTCAGCCCGTTTCAGAAGCACCAATTTGACTC
 TCACACTGAATCAGCTGCTGACTGGCAGGGCTTTGGGCAGTTGGCCAGGCTCTTCTTGAATCTTCTCCCTTGTCC
 TGCTTGGGGTTCATAGGAATTTGTAAGGCCTCTGGACTGGCCTGTCTGGCCCTGAGAGTGGTGCCTGGAACACT
 CCTCTACTCTTACAGAGCCTTGAGAGACCCAGCTGCAGACCATGCCAGACCCACTGAAATGACCAAGACAGGTTCA
 GGTAGGGGTGTGGGTCAAACCAAGAAGTGGGTGCCCTTGGTAGCAGCCTGGGGTGACCTCTAGAGCTGGAGGCTGT
 GGGACTCCAGGGGCCCCCTGTTCAGGACACATCTATTGCAGAGACTCATTTCACAGCCTTTCGTTCTGCTGACCA
 AATGGCCAGTTTCTGTTAGGAAGATGGAGGTTTACCGGTTGTTTAGAAACAGAAATAGACTTAATAAAGGTTTAA
 AGCTGAAGAGGTTGAAGCTAAAAGGAAAGGTTGTTGTTAATGAATATCAGGCTATATTTATTGTATTAGGAAAA
 TATAATATTTACTGTTAGAATCTTTTATTTAGGGCCTTTTCTGTGCCAGACATTGCTCTCAGTGCTTTGCATGTA
 TTAGCTCACTGAATCTTCACGACAATGTTGAGAAGTTCCCATTTATTTCTGTTCTTACAAATGTGAAACGGAAG
 CTCATAGAGGTGAGAAAACCAACCAGAGTCACCCAGTTGGTGACTGGGAAAGTTAGGATTGAGATCGAAATTTGGA
 CTGTCTTTATAACCCATATTTTCCCCCTGTTTTTAGAGCTTCCAAATGTGTCAGAATAGGAAAACATGCAATAAA
 TGGCTTGATTTTTTAATGICATTTTTCCCTCTTATAGTCTTTCTAGCTCCTTTTCAAAGACGAGAATATCTGATT
 TTCTGATAATTTAGGTGCTTAAGCATCCAAAATACATGGGACACACAAAATCCAGGAATCCCCTGTAGCTTATTC
 CCTCTTTCCCATCGGAACCAGCTCTCATCACACATTTAAAAGATGATTCTGTTTACCCAATGCTGCATATTGAATG
 TTGTGTAGTTATTCACAGCGAATTCGTGTCAGTGTGCAGAGAGATTCTTAAACGGGAAAAGGACTGGGAATACATC
 CTCCTTACTGTGACCTCCCCAAAACCTAGTCCAGTGCAAGGTATACAGTGGTGCTCATTAAATACTTGATGAATAC
 AGGAAGCTGTGCATGTGTTCTTACTTTTATTCGAAGCTCTTCTTCCAAAGCTACATGAAAATAGAATTTTAAACA
 GTCAAATTTTATATTAACCTGCCTTAGCAAAAAGAGACATTTAATATTTCAAAGAAATGCATATGTATGTATACATA
 TATTTGTGTATGCGTATGCAAGAATCTTGTATAAAGAGAATTCACCTCCATGAATGATCTCTTCTGTAGTCAAGT
 TGAATCATGTTAGATTTTCTGAGAGTGAAAACACCTGCCATCTACAAATTACAAGGCTGGATAACAGCTCACTCCA
 TTTGAAATTCAGTGGAAACCCAACAGCTAGGTTCTTACTCAATTTGCATCTCAATTTGGGAAACTGAACTTAGCTT
 TCAAAGATCATAGGAAGTCTGGTTGGAGAAAACCTAGGGATTATCTGGCAATGGGTGCAGGAAGGTGGTCAGAATAA
 CCCAGTCGCCATTTGGTTTTGAGAAACGGAACATCTTATGCAGAGCCCGGAGGGCAAGTCTCAGACCCATGGGTTG
 AAGCCATGGAGAAGGAAATTTGGATCCAAATGTAATGAAGCGCTTCTAAGTCAGAATTTCCCTGCAATGGTGTGGC
 CTGATTCAAATAAAAATTAAGAATAATAAATAAATGGAAAAAATCTCCACTGATTGAGTGTACTTGGTGCCAA
 GCACATGCTAAGTTGTTCAATATTTTATTTAATTGTTACAGCAATTTTGAGTATGCATCTTCTACTATTTATAA

10

20

30

40

50

【化 5 - 3】

GTGGAAAAGAGAAGTGCCCCAAAAAGTTAGAGCTCAAACAGCAGCTTATTCTACCAGCCCCCTGCTCTTGCGGAGG
 CCTCTGGAAAAGACCTGAATGACACCTATTGGAGAATTACATCTACAAGGGGCTTCAAACAGACCAAATAGATCAT
 CACCTCTGTGGTCCCTTGTAACTATATGTTCTGAGACAAAGGAAAGCTACCCTAAGGGTTAGTTAACCTTTGCTG
 AGGAAATTTACATTCACTTAGAGTGAATTACTCAGGTGTGCTTAGGTGTGCAAAGGGAAGGAGACCTGAATTC
 ACCAAGTTAAATCTTGCTAACCTTATCATAAGCATTTTTTTGAGCGCTTAGCATAACCAAGCCTTGTTGGAAGGTG
 CTTTCCTGCCATATCTCATTTAATCCTCACAGCAAACCTATAGAATATGGCATTATCATCTGAGTCTCACAGAAGT
 TTAGTCGTGACTCAAGGTCTTACCAGCTAGTGAACAGCAGACCAAGACTGGAAACCCAGGATAGTCTGATACCTG
 AGCCATCTCTTCTTGTGCTACGCCTAGTTATTCTGTCCCCCAAATCAAAGGCATGACCTTTATAAGAGGCGCTTT
 ACTGACAATAGCTGCAATTTTAACTTTGAAAATGATTCAGAATTATCAAAGATAGTAGATTGCAATGACATGATTG
 TCTATAATCTCGCTAGCCTTGTACTGTGTGTGCATAGCAATTACAGGGAAGTAATCTAGCTCCTGACTATTATGTT
 GAACTATGTCGCTGCTTTTTACAACTTGTCTTGATCCAAAGCAGTCACAATGATAACCTGCATATCTGGGAATC
 ATAAGTCAACTATGTATCCCTGTGTGTGTATATATATGTATGTATGTATCTATTTTCAAACCTGTGATTTAATATTT
 AAATATTCCTACTGCCATTTTTGTGACTGAAAACTACACATGAGGAAACGCTTTAGAATTTTCCAATAGAGGAAA
 AATAACACTTGGGCAATCTGTCATGTTTCACAACAGTTCTCATTTTTCTCATGATTTGTGTAGCGTGGAAATGTGTT
 TGCTCAATGTGAAGGGTTTTCATGCTCAATTTCTCTGTGTAAGTCTTTTTCTTAAAGTAAATAACCATCAGCAAA
 GTCACATACTGGAGTTGGTGGCTTTTTCTTGTACAGGCAGTTGTTATGAGACAATGATGGAGCATGAGCATGTTCA
 ATAAATGTGCAGATGGTGCAAAAAAA

10

20

【0343】

配列番号6は、マウスWNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1前駆体のアミノ酸配列である [マウス (Mus musculus)] 。

【0344】

【化6】

MRWLLPWTLAAVAVLRVGNILATALSPTPTTMTFTPAPLEETTTTRPEFCKWPCECPQSPPRCPLGVSLIT
 DGCECKKICAQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVGVCVLDGVRYTNGESFQPNCRYNCTC
 IDGTVGCTPLCLSPRPRLWCRQPRHVRVPGQCCEQWVCDDARRRQRTALLDTRAFASGAVE
 QRYENCIAYTSPWSPCSTTCGLGISTRISNVNARCWPEQESRLCNLRPCDVDIQLHIKAGKKCLAVYQPE
 EATNFTLAGCVSTRTYRPKYCGVCTDNRCCIPYKSKTISVDFQCPEGPGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADL
 ESYPDFEEIAN

30

【0345】

配列番号7は、マウスWNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1 (Wisp1)、転写バリエーション1、mRNAのヌクレオチド配列である [マウス (Mus musculus)] 。

40

【0346】

50

【化 7 - 1】

AGAAAAAGTTTTTTTAGAGGAAAATGCAGGGCTAGTCTGTTGGCCTGACGTCAGATGTCGCTTTGACAAACGCCCC
CGGGGGCTGAGGAAGGCTCTCCGCTGCTCTGATGGGCCAGCCCAGTCTGGCCCAGCTCCCTGGAGAGGCATCCGC
ATCCTCTGGGCTGAGCCGTAGCTCCTGTGACGCTGACTTCCAGGCATGAGGTGGCTCCTGCCCTGGACGCTGGCAG
CCGTGGCAGTCTGAGGGTGGGCAACATCCTGGCCACGGCCCTCTCTCCAACCCCCACAACAATGACCTTCACCCC
AGCACCACTAGAGGAAACGACTACACGCCCCGAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGGCCACAATCCCCACCTCGC
TGCCCCACTGGGCGTCAGCCTAATCACAGATGGCTGTGAATGCTGTAAGATACTGTGCCCAGCAGCTTGGGGACAAC
GCACAGAGGCTGCCATCTGTGACCCACACCGGGGCCTCTACTGCGATTACAGTGGGGATCGCCCGAGGTACGCAAT

10

20

30

40

50

【化 7 - 2】

AGGAGTGTGTGCACAGGTGGTCCGTGTGGGCTGTGTCTGGATGGCGTACGCTACACCAATGGCGAGTCCTTCCAA
 CCCAACTGCAGGTACAACGTACCTGCATTGATGGCACGGTGGGCTGCACACCGCTGTGCCTAAGCCCCAGGCCCC
 CACGCCTCTGGTGCCGCCAGCCCCGGCACGTGAGAGTCCCTGGCCAGTGCTGTGAGCAGTGGGTGTGTGATGATGA
 CGCAAGGAGACCACGCCAGACTGCACGTGGACACCAGAGCCCTTTCAGCGTCAGGGCCCGTGGAGCAACGGTAT
 GAGAACTGCATAGCCTACACTAGTCCCTGGAGCCCCCTGTCTACCACCTGTGGCCTAGGTATCTCCACTCGGATCT
 CTAACGTCAATGCCCGGTCTGGCCAGAGCAGGAAAGTCCCTCTGCAACCTGCGGCCATGTGATGTGGACATCCA
 ACTACACATCAAGGCAGGGAAGAAATGCCCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGAGGCCACGAACTTCACTCTCGCAGGC
 TGTGTGACACACGCACCTACCGACCCAGTACTGCGGAGTCTGTACTGACAATAGGTGTTGCATCCCCTACAAGT
 CCAAGACCATCAGTGTGGATTTCCAGTGTCCAGAGGGGCCAGGTTTCTCCCGGCAGGTCTATCGATTAATGCTTG
 CTTCTGCAACCTGAGCTGCAGGAATCCTAACGATATCTTTGCTGACTTGGAACTTACCCTGACTTCGAAGAGATT
 GCCAATTAGTGGGTGTGTGGCTCAGGGTAAAGTTCATGCTGCAAAGCAGCCAGCCCTTTGTGGTCCAGGACTTC
 ACAATTGAGCCTTATTTTCATCTACTTCCCTACTCGATTCTGAATTCCCAGTTTCTGTTCCTGTTTTGACAATCGTAA
 TGGCCCAGGAGAGTGTGCTCAGGCTCAGACAATGGGTTCCCTCCTTGGGGACATTTCTACATCATTTCCAAGGAAAAAC
 ACATCTCTGACTGTTTACAAATGGAAGCAAAGCCTGGCCCAGCTAGTCTGGCTCCAGCCTGGGCAAGTTGTCAGAAG
 TTGTGATGGGATTGTCCAAGGAAAAGCATCAGCTGAAGAACCAGTATCATGAAGTCCTTCCCTCAGATGCCAAGCCT
 AGGGATGCTGGGATCCTTTCAGACAGATGGATGGGATTGGGGACACAGGAATAAGCTATTATTTTACCCCTTGCCAA
 ATGATACTATCCTGGGTATTTCTGCCATAAAACATAACAAAAGTGTTCCTGTTCCACTGATCTGTATATCACAAATC
 ACCAAACATTTTCCAGGTGAGGACCATAGTGTGTGCTATTCTGTTTTGCTATTGAAAATCATTTTAAAAAGAAGGAA
 AAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAGTCAATTCATTAACCTTGGGCACCTTCTCCTCTCACCCCATATTTCTATAAAGG
 GCTAAACTTGGGTTCTTGTGATCAGGAATGTAATTTGAGAAGTCTTACTTTTGAGGGAGATGGTAGCCCTCAAT
 TCAATCCCCTAGGGATGGGACAAGGCCAGCCAATCTTTCAAGCCATAGCTGGGCAGGTCACTGAATCTGCTGCTGGC
 CAAGTTCTTAGGACAATTAGCCAAAATCTGGGCCTCTCTCTCCCTAGGGTTCATGGGAGTTGGTAGGGACCCGTAGA
 GTGACTTGTCTGTTGTCTCAAAAAGTAAGATGGAAGATGTTCTCATGGCCCTTAGAAGACTCTTTTGAAGTCTAC
 GCCAGACCTAACAGAATATGTGCATCAAACAAAACAAGTGCATCACCCCTCCCATGGCCTGGGTGACCTCTAGCAGTC
 ACCCAGTGACTGTGGTAAGGCCACAGTAGTCCCTGGACCCAGGACAAAATCTTTTTTGTTCAGTGACCTACTTTTAC
 AGCCTCAGTGTCTATGAACAAAGTTAACTCAGTTTTCTCATCTGAAGACAGAAGTCGACCAGCCATTCAGAAATGG
 GGATCTATTTAGTAGTGGTAAACGTTAAAGAGTTTGTAAAGCTAAAGAAATATTTTTTTTCCCTAAGTGATAATGAGG
 TTGTTACCTATTTTAGAGGTAGAATTTTCTGTGATCATCCTTTTATTTGTGTTCTACATACTACCCATTTGTTCTCAA
 TATTTGCCACACATTTACTCATTGAAACTTGCTGATAACACAGAGGACTTCCCTTAATGATTTCTGTCTTGTGACAC
 TGTGAAATATCAATTCAAAGAGGCTAATAAGTTCAATCAAAGTCACTATCTGAACACTCATACCCAGAGAAGATT
 GCCTTCATATTTCCCTTTGCTTCTGGACCTTGTAACATGTGAGGGCAGGAAAAGCATAACAGAAGTCAGCAGCTTG
 CCCTCTTAGTATTTGGCTCTCTAGCCCCCTTACGTAAGAGGAGAGTGTGTCTAGGTACTAAGGATCCAACCTAAAC
 TGGACAGAAAAGGGCATGTGCAATTAATCCCCCTGTGGCTCCTCCTGCCCTGGATCAGAACTAGCTTACAGCATGCTT
 TTATATGATGATTCAGTTTGGCCACACCATACATATGGGCATATGGGAGAACTATACACACACTCATAAATGGAT
 TTGTAAGTAGGAAAGGGGACTTGAGATTTCCCTCCTTCCCTGCAACTTCCCAAAGGCCTGGCCTTATGCAAGGCAA

10

20

30

40

50

【 0 3 5 1 】

配列番号 1 0 は、マウス M i R 1 5 a のヌクレオチド配列である。

【 0 3 5 2 】

【 化 1 0 】

```
CCCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUGJUGAAAAGGUGCAGGCCAUACUGUGCUGCC
UCAAAAUACAAGGA
```

(配列番号 10)

【 0 3 5 3 】

10

配列番号 1 1 は、マウス M i r - 4 1 2 のヌクレオチド配列である。

【 0 3 5 4 】

【 化 1 1 】

```
GGGUAUGGGACGGAUGGUCGACCAGCUGGAAAGUAAUUGUUUCJAAUGUACUUCACCCUGGUCCACUAGCC
GUCGGUGCCC
```

(配列番号 11)

【 0 3 5 5 】

配列番号 1 2 ~ 3 1 は、I g G についてのクマネズミ属 (Rattus) 重鎖相補性決定領域である。

20

【 0 3 5 6 】

30

40

50

【表 4 - 1】

配列番号	受託	名称	生物名	長さ
12	1bfo_B	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ (<i>Rattus rattus</i>)	216
13	1bfo_D	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ (<i>Rattus rattus</i>)	216
14	1bfo_F	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ (<i>Rattus rattus</i>)	216
15	1bfo_H	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ (<i>Rattus rattus</i>)	216
16	1c5d_B	ヒト筋肉アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域に対するラットモノクローナル抗体の FAB 断片の結晶構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	215
17	1c5d_H	ヒト筋肉アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域に対するラットモノクローナル抗体の FAB 断片の結晶構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	215
18	1f3r_B_i	FV 抗体断片と、アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域のアナログとの間の複合体	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	138
19	1fn4_B	FAB198、筋無力症惹起性 (MYASTHENOGENIC) 抗体に対するアセチルコリン受容体の効率的なプロテクターの結晶構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	218
20	1fn4_D	FAB198、筋無力症惹起性 (MYASTHENOGENIC) 抗体に対するアセチルコリン受容体の効率的なプロテクターの結晶構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	218
21	2arj_B	YTS 105.18 FAB との複合体中の CD8ALPHA アルファ	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	215
22	2arj_H	YTS 105.18 FAB との複合体中の CD8ALPHA アルファ	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	215
23	3iy7_B	ウイルス FAB F 複合体のクライオ (CRYOEM) 再構成にフィットさせた FAB F のコンピュータ生成モデル(WAM)の可変ドメイン	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	115
24	4why_G	広範に中和する抗体 3/11 に結合した C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E2 抗原性領域 412~423 の構造、P21 結晶形態	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	252
25	4why_I	広範に中和する抗体 3/11 に結合した C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E2 抗原性領域 412~423 の構造、P21 結晶形態	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	252
26	4why_K	広範に中和する抗体 3/11 に結合した C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E2 抗原性領域 412~423 の構造、P21 結晶形態	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	252
27	4yny_A	モノクローナル抗ヒトポドプラニン抗体 NZ-1 の結晶構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	238
28	4yny_C	モノクローナル抗ヒトポドプラニン抗体 NZ-1 の結晶構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	238
29	5aum_A	リガンドペプチドを含む FAB 断片の結晶構造	クマネズミ属 (<i>Rattus</i>)	242

10

20

30

40

【 0 3 5 7 】

【表 4 - 2】

30	5aum_H	リガンドペプチドを含む FAB 断片の結晶構造	クマネズミ属 (<i>Rattus</i>)	242
31	5hbv_D	FAB35 とマウス NACHR アルファ 1 との複合体構造	ドブネズミ (<i>Rattus norvegicus</i>)	219

50

【 0 3 5 8 】

配列番号 3 2 ~ 5 1 は、I g G についてのクマネズミ属 (Rattus) 軽鎖相補性決定領域である。

【 0 3 5 9 】

【 表 5 】

配列番号	受託	名称	生物名	長さ
32	1bfo_A	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ(<i>Rattus rattus</i>)	214
33	1bfo_C	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ(<i>Rattus rattus</i>)	214
34	1bfo_E	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ(<i>Rattus rattus</i>)	214
35	1bfo_G	CAMPATH-1G IGG2B ラットモノクローナル FAB	クマネズミ(<i>Rattus rattus</i>)	214
36	1c5d_A	ヒト筋肉アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域に対するラットモノクローナル抗体の FAB 断片の結晶構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	213
37	1c5d_L	ヒト筋肉アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域に対するラットモノクローナル抗体の FAB 断片の結晶構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	213
38	1f3r_B_ii	FV 抗体断片と、アセチルコリン受容体の主要免疫原性領域のアナログとの間の複合体	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	119
39	1fn4_A	FAB198、筋無力症惹起性 (MYASTHENOGENIC) 抗体に対するアセチルコリン受容体の効率的なプロテクターの結晶構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	211
40	1fn4_C	FAB198、筋無力症惹起性 (MYASTHENOGENIC) 抗体に対するアセチルコリン受容体の効率的なプロテクターの結晶構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	211
41	2arj_A	YTS 105.18 FAB との複合体中の CD8ALPHA アルファ	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	211
42	2arj_L	YTS 105.18 FAB との複合体中の CD8ALPHA アルファ	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	211
43	3iy7_A	ウイルス FAB F 複合体のクライオ(CRYOEM)再構成にフィットさせた FAB F のコンピュータ生成モデル(WAM)の可変ドメイン	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	106
44	4why_H	広範に中和する抗体 3/11 に結合した C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E2 抗原性領域 412~423 の構造、P21 結晶形態	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	220
45	4why_J	広範に中和する抗体 3/11 に結合した C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E2 抗原性領域 412~423 の構造、P21 結晶形態	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	220
46	4why_L	広範に中和する抗体 3/11 に結合した C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E2 抗原性領域 412~423 の構造、P21 結晶形態	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	220
47	4ynny_B	モノクローナル抗ヒトボドプラニン抗体 NZ-1 の結晶構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	233
48	4ynny_D	モノクローナル抗ヒトボドプラニン抗体 NZ-1 の結晶構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	233
49	5aum_B	リガンドペプチドを含む FAB 断片の結晶構造	クマネズミ属 (<i>Rattus</i>)	239
50	5aum_L	リガンドペプチドを含む FAB 断片の結晶構造	クマネズミ属 (<i>Rattus</i>)	239
51	5hbv_C	FAB35 とマウス NACHR アルファ 1 との複合体構造	ドブネズミ(<i>Rattus norvegicus</i>)	213

10

20

30

40

【 0 3 6 0 】

配列番号 5 2 ~ 7 1 は、I g G についてのヒツジ (Ovis aries) (ヒツジ) 重鎖相補性決定領域である。

【 0 3 6 1 】

50

【表 6】

重					
配列番号	受託	名称	クローン	生物名	長さ
52	AAD52588.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	14	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	124
53	AAD52589.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	17	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	115
54	AAD52590.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	22	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	114
55	AAD52591.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	23	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	120
56	AAD52592.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	34	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	120
57	AAD52593.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	35	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	119
58	AAD52594.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	47	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	122
59	AAD52595.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	52	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	121
60	AAD52596.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	53	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	114
61	AAD52597.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	57	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	122
62	AAD52598.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	58	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	120
63	AAD52599.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	70	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	114
64	AAD52600.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	81	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	116
65	AAD52601.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	92	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	122
66	AAD52602.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	96	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	118
67	AAD52603.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	100	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	117
68	AAD52604.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	138	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	124
69	AAD52605.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	139	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	114
70	AAD52606.1	免疫グロブリン重鎖前駆体	146	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	123
71	CAA89052.1	VH 領域前駆体	VRB7	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	143

10

20

【0362】

配列番号72～90は、IgGについてのヒツジ(*Ovis aries*) (ヒツジ) 軽鎖相補性決定領域である。

30

【0363】

40

50

【表 7】

軽					
配列番号	受託	名称	クローン	生物名	長さ
72	AAD51674.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	17	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
73	AAD51675.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	35	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	113
74	AAD51676.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	14	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	110
75	AAD51677.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	146	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	110
76	AAD51678.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	23	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	112
77	AAD51679.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	34	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
78	AAD51680.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	100	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
79	AAD51681.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	81	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
80	AAD51682.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	22	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	110
81	AAD51684.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	47	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	113
82	AAD51685.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	96	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
83	AAD51686.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	53	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	110
84	AAD51687.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	58	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
85	AAD51688.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	138	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	112
86	AAD51689.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	92	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	112
87	AAD51690.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	70	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	108
88	AAD51691.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	57	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	111
89	AAD51692.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	139	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	108
90	AAD51693.1	免疫グロブリン軽鎖可変領域	52	ヒツジ(<i>Ovis aries</i>)	110

10

20

【0364】

配列番号 91 ~ 110 は、IgG についてのヤギ (*Capra hircus*) (ヤギ) 重鎖相補性決定領域である。

【0365】

30

40

50

【表 8】

重					
配列番号	受託	名称	クローン	生物名	長さ
91	ABX89999.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	2M2	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	137
92	ABX90000.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	2M3	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	146
93	ABX90001.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	2M4	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	149
94	ABX90002.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	2M5	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	130
95	ABX90003.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	2M6	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	141
96	ABX90004.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y1	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	137
97	ABX90005.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y2	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	137
98	ABX90006.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y3	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	137
99	ABX90007.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y4	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	143
100	ABX90008.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y5	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	140
101	ABX90009.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y8	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	136
102	ABX90010.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y9	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	130
103	ABX90011.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y10	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	140
104	ABX90012.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y11	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	142
105	ABX90013.1	免疫グロブリン mu 重鎖可変領域	3Y12	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	136
106	ABY65924.1	免疫グロブリン重鎖可変領域前駆体	1M1	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	145
107	ABY65925.1	免疫グロブリン重鎖可変領域前駆体	1M2	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	131
108	ABY65926.1	免疫グロブリン重鎖可変領域前駆体	1M3	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	145
109	ABY65927.1	免疫グロブリン重鎖可変領域前駆体	1M4	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	143
110	ABY65928.1	免疫グロブリン重鎖可変領域前駆体	1M5	ヤギ(<i>Capra hircus</i>)	132

10

20

【0366】

配列番号 111 ~ 121 は、IgG についてのウサギ科 (Leporidae) (ウサギ) 重鎖相補性決定領域である。

30

【0367】

【表 9】

重				
配列番号	受託	名称	生物名	長さ
111	004492	BS-1	ウサギ科(Leporidae)	107
112	004493	K-25	ウサギ科(Leporidae)	117
113	004515	BS-5	ウサギ科(Leporidae)	114
114	004520	3374	ウサギ科(Leporidae)	104
115	004604	3547	ウサギ科(Leporidae)	101
116	004608	120	ウサギ科(Leporidae)	49
117	004614	K4820	ウサギ科(Leporidae)	29
118	004619	K29-213	ウサギ科(Leporidae)	25
119	004623	2717	ウサギ科(Leporidae)	14
120	004624	XP-1	ウサギ科(Leporidae)	14
121	004628	AH80-5	ウサギ科(Leporidae)	11

40

【0368】

配列番号 122 ~ 141 は、IgG についてのウサギ科 (Leporidae) (ウサギ) 軽鎖

50

相補性決定領域である。

【 0 3 6 9 】

【 表 1 0 】

軽				
配列番号	受託	名称	生物名	長さ
122	7173	K29-213	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	110
123	7174	AH80-5	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	115
124	7185	K4820	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	110
125	7187	BS-1	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	109
126	7188	BS-5	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	109
127	7189	3547	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	109
128	7193	3374	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	110
129	7202	K-25	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	109
130	7204	2717	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	111
131	7205	120	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	109
132	7211	XP-1	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	98
133	48258	k-176'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	111
134	48259	k-188'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	112
135	48260	k-217'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	110
136	48261	k-221'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	110
137	48262	k-227'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	112
138	48263	k-235'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	113
139	48264	k-237'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	109
140	48265	k-246'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	111
141	48266	k-248'CL	ウサギ科(<i>Leporidae</i>)	111

10

20

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

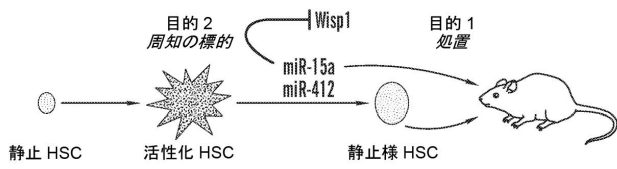


図 1

【 図 2 】

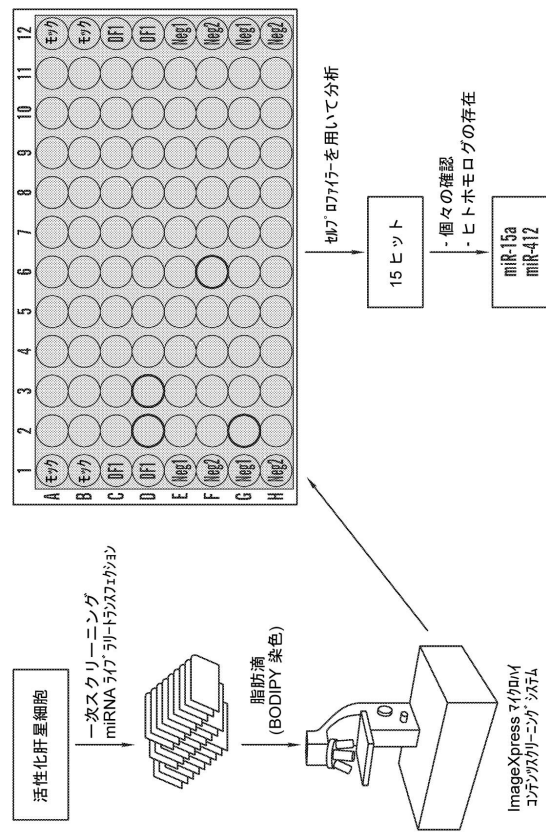


図 2

【 図 3 】

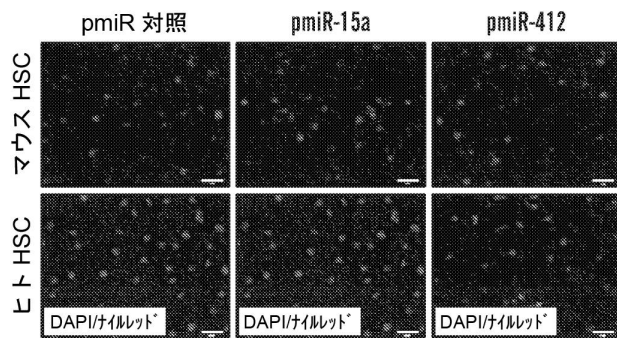


図 3

【 図 4 A 】

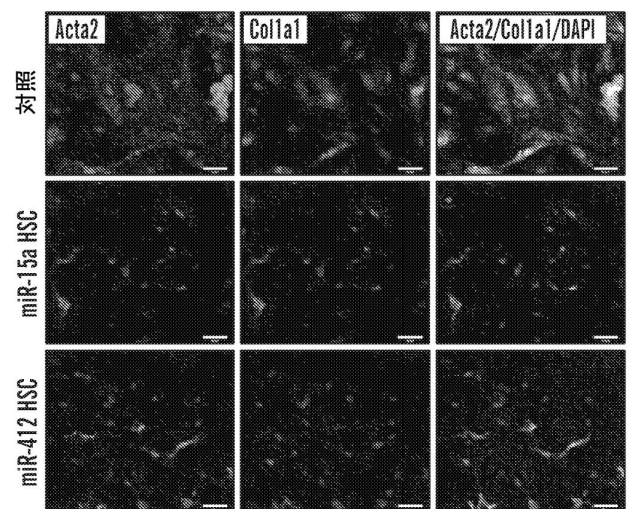


図 4A

10

20

30

40

50

【 図 4 B 】

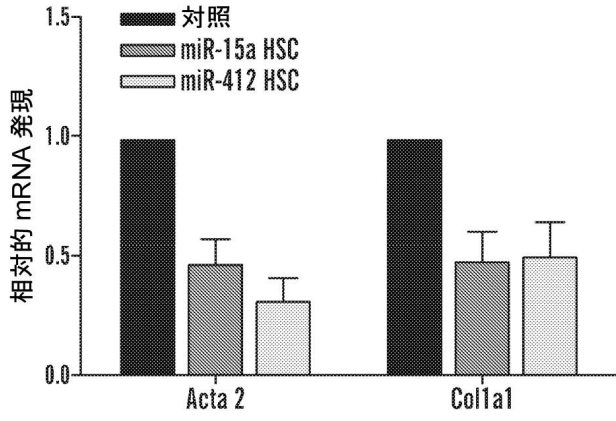


図 4B

【 図 5 】

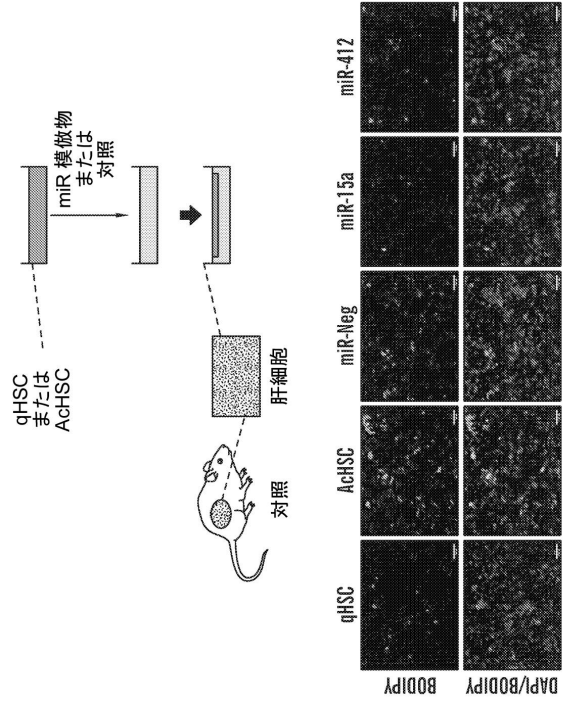


図 5

10

20

【 図 6 】

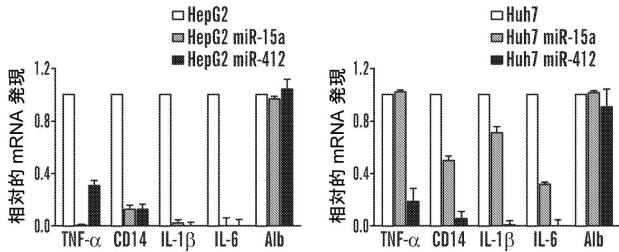
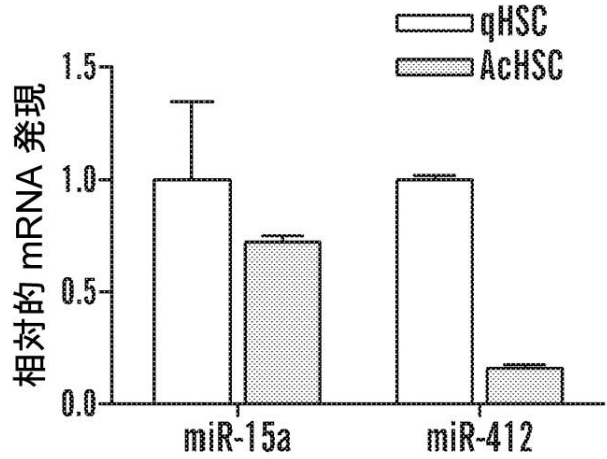


図 6

【 図 7 】



30

図 7

40

50

【 図 8 】

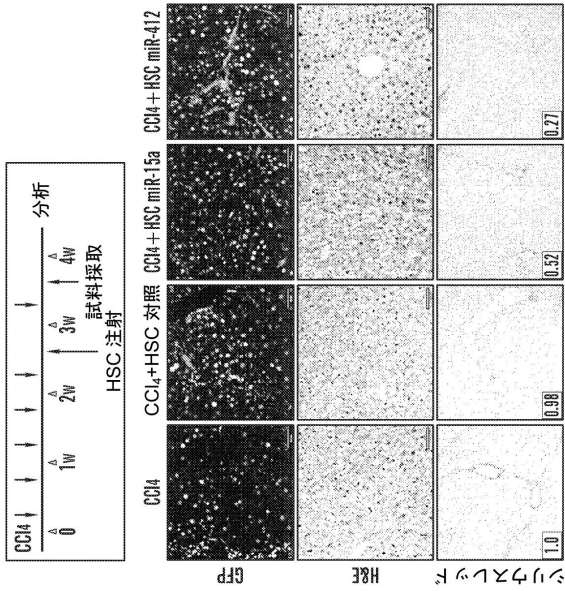


図 8

【 図 9 】

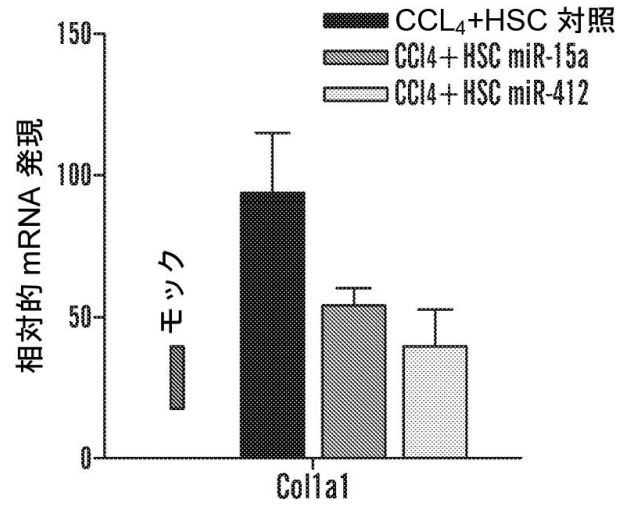


図 9

10

20

【 図 10 】

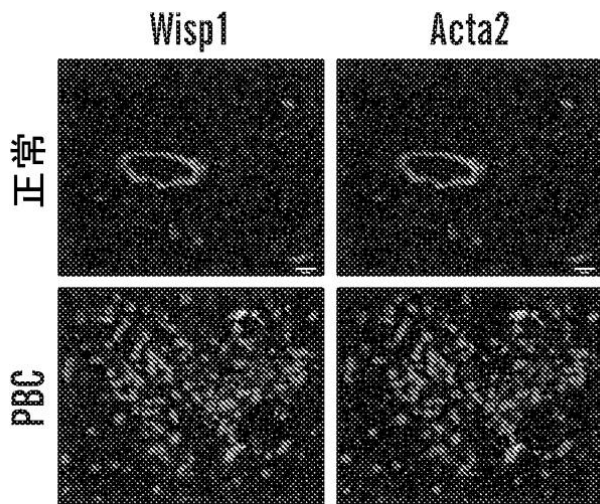


図 10

【 図 11 】

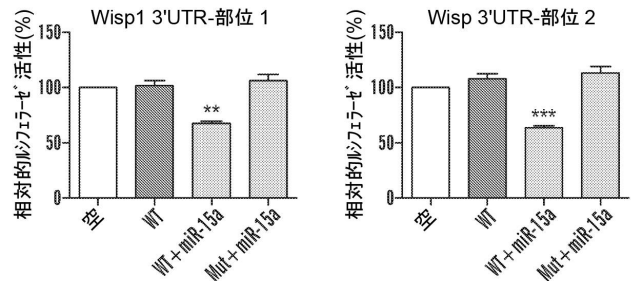


図 11

30

40

50

【 図 1 2 】

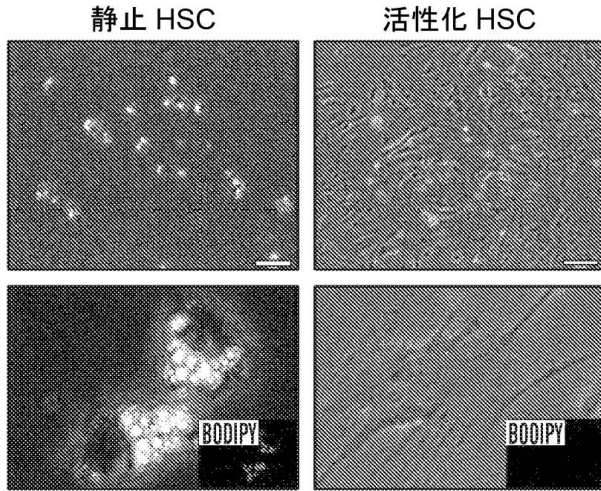


図 12

【 図 1 3 】

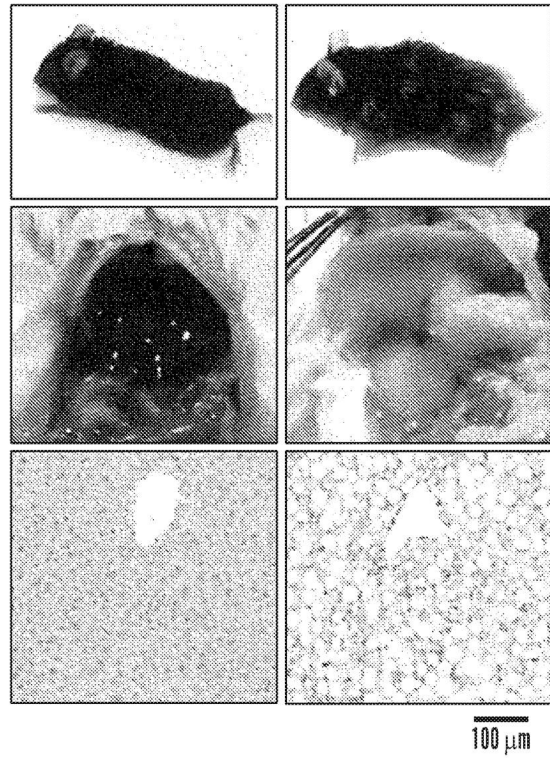


図 13

10

20

【 図 1 4 】

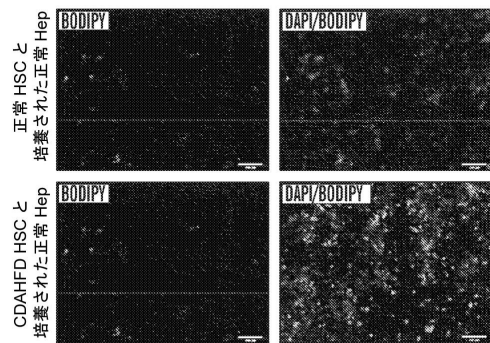
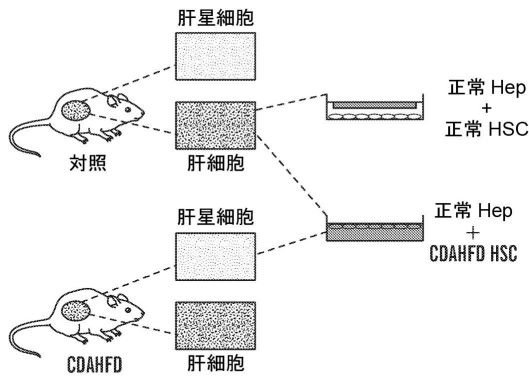


図 14

【 図 1 5 】

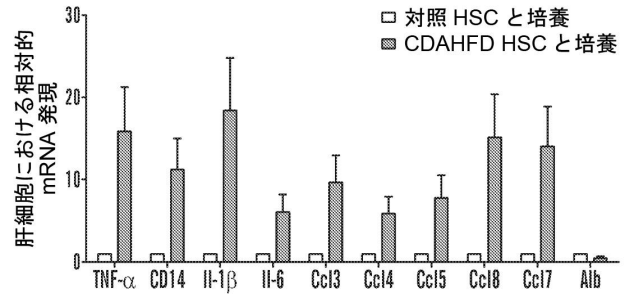


図 15

30

40

50

【 図 16 】



図 16

【 図 17 】

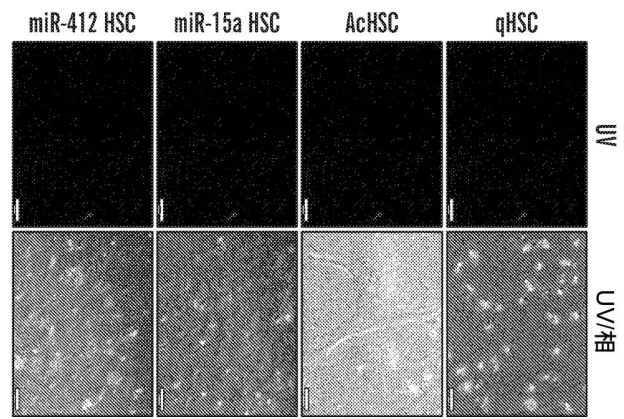


図 17

【 図 18 】

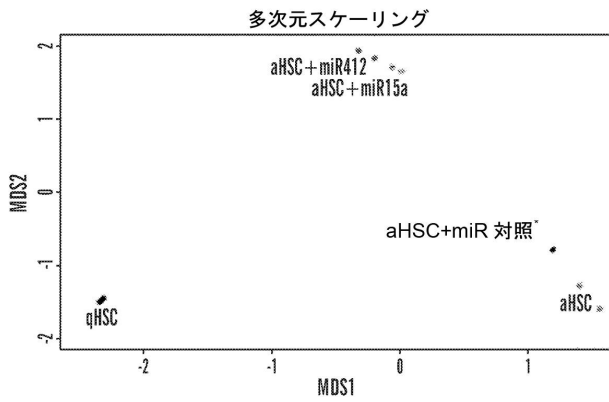


図 18

【 図 19 】

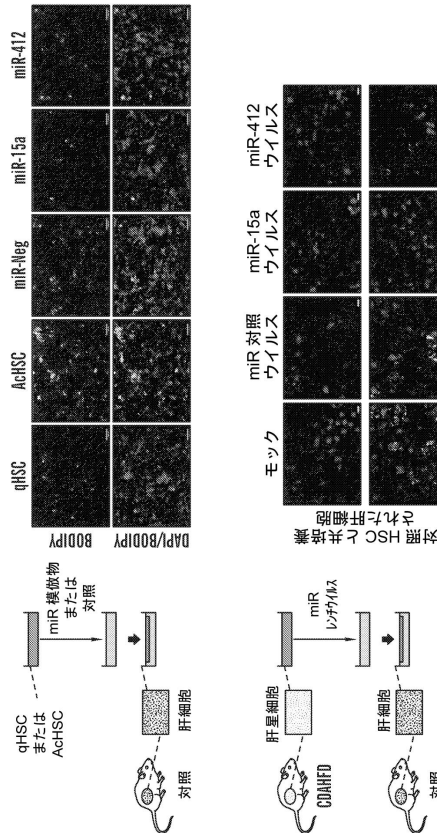


図 19

10

20

30

40

50

【 図 2 0 】

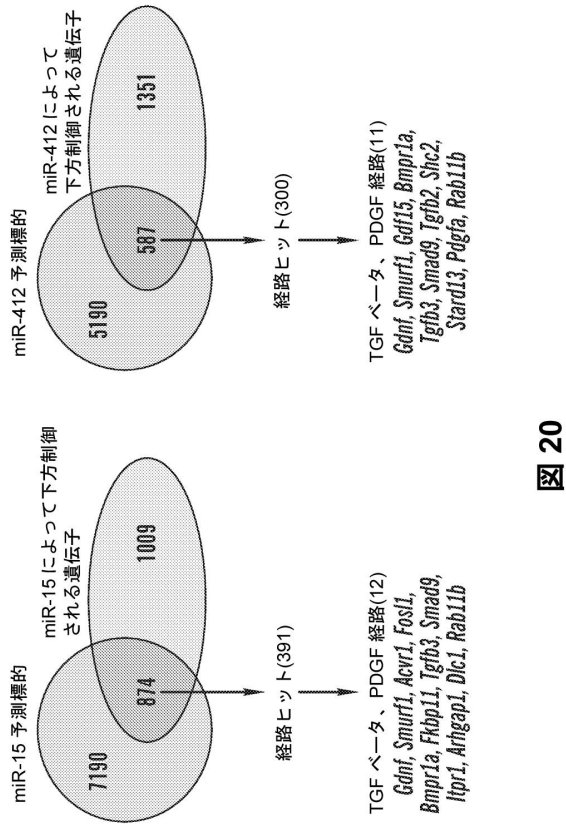


図 20

【 図 2 1 】

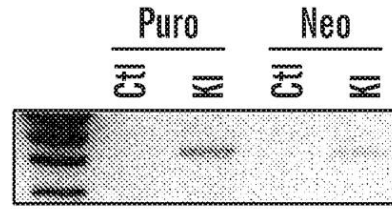


図 21

10

20

【 図 2 2 】

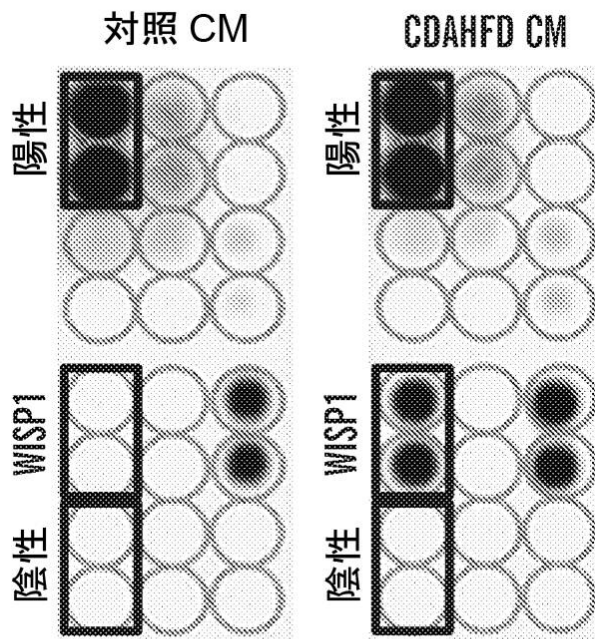


図 22

【 図 2 3 】

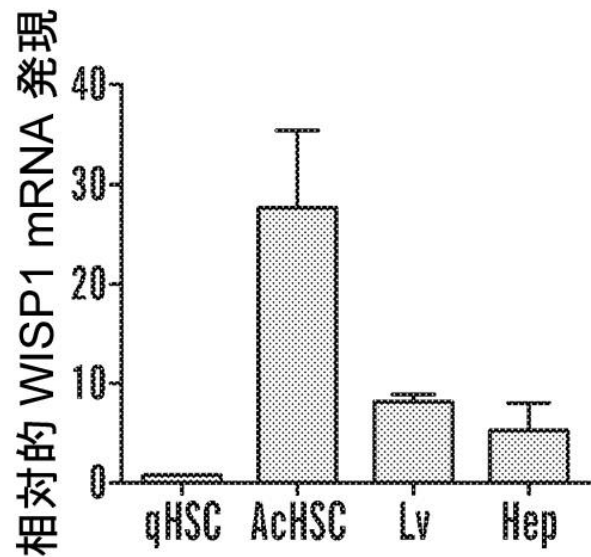


図 23

30

40

50

【 図 2 4 】

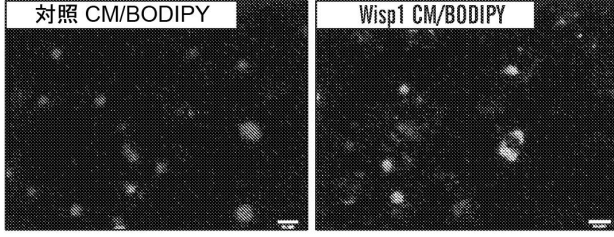


図 24

【 図 2 5 】

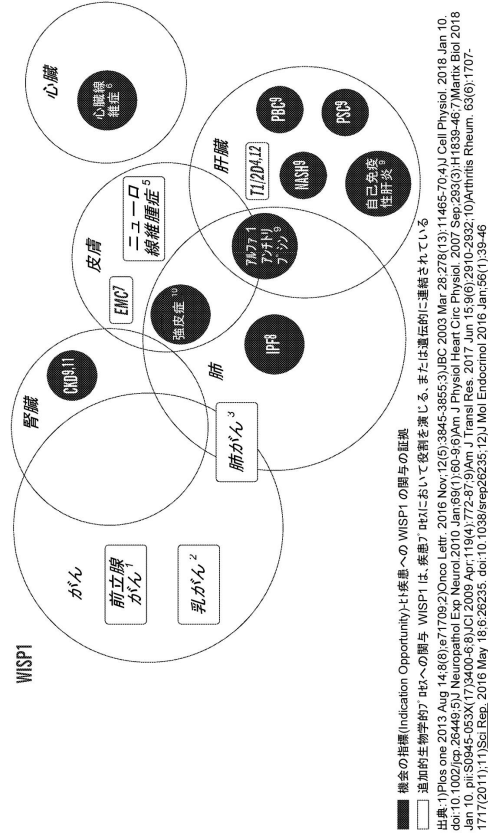


図 25

【 図 2 6 】

パラメーター	記載
名称	WISPI
アイソフォーム	代替スプライシングによって産生される4個のアイソフォーム
発現パターン	心臓、腎臓、肺、膵臓、胎盤、卵巣、小腸、脾臓において発現 アイソフォーム2は、スライク胃壁において優勢に、および胎盤において弱く発現され、過発現は、乳がんおよび結腸腫瘍を含むいくつかのがんと関連している。
分子量	約 40kDa
ヒト WISPI との同一性%	84%(マウス);99%(チンパンジー)
周知の機能	-細胞生存と関連、p53 媒介経路を減弱、抗7α-トランスレツトランスベクシオン因子質を上方向制御 -皮膚および肝臓線維芽細胞に接着、肝臓、心臓、肺、骨髄を介した in vitro 結合
周知の受容体	特異的受容体は同定されておらず、新たに発見された証拠はインテグリンへの結合を示唆している ² 。
排出の経路	不明、血漿において検出可能。

出典:1)Uniprot:2)J Cell Commun Signal 9(1):63-72(2015);3)Am J Transl Res 2017 Jun 15 ;9(6):2920-2932

図 26

【 図 2 7 】

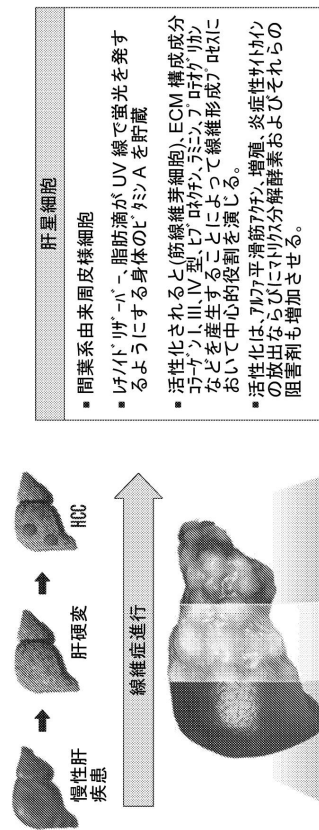
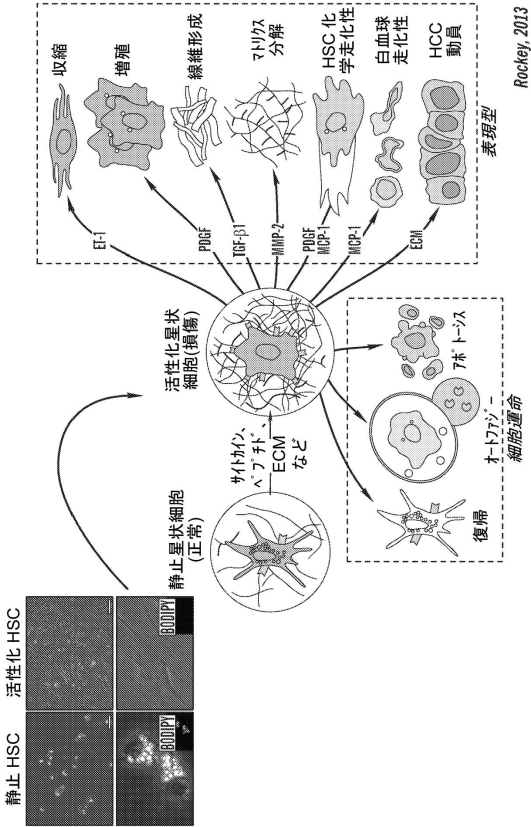


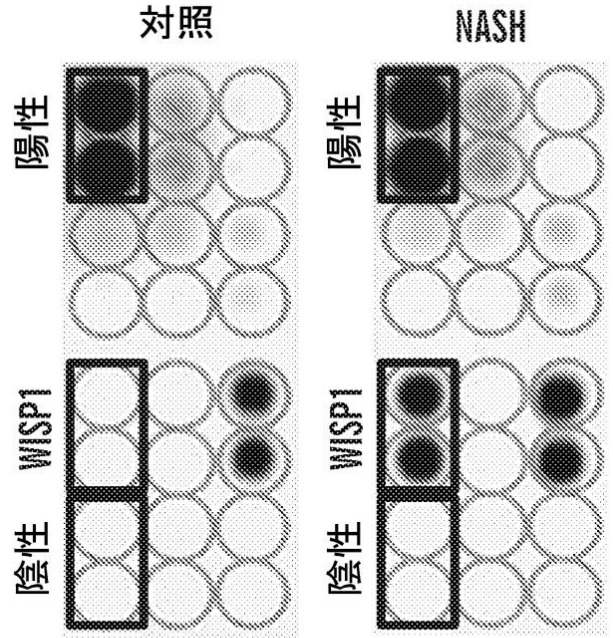
図 27

Takahashi, 2013; Bhatia, 2014

【 図 2 8 】



【 図 2 9 A 】

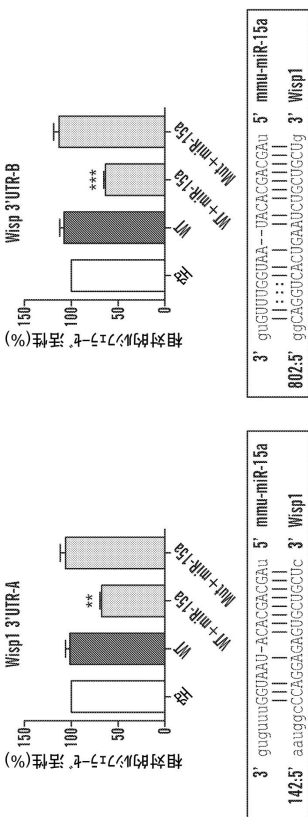


10

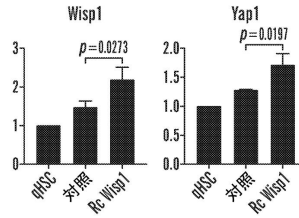
20

図 29A

【 図 2 9 B 】

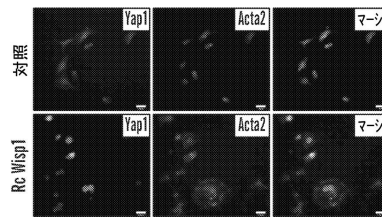


【 図 3 0 A - 3 0 C 】



30

図 30A



40

図 30B

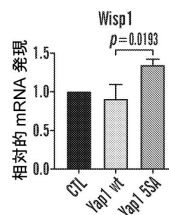


図 30C

50

【 図 3 1 A - 3 1 B 】

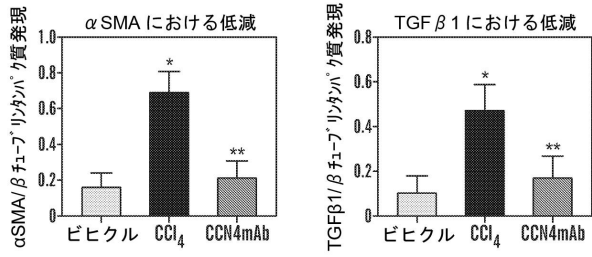


図 31A

【 図 3 2 A - 3 2 B 】

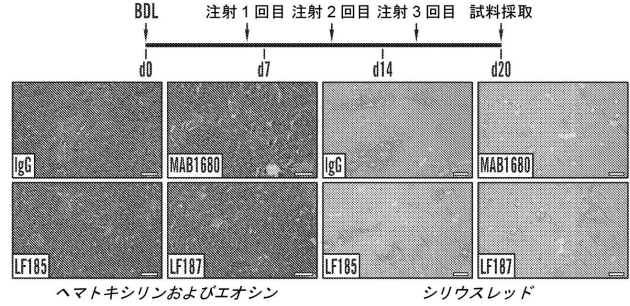


図 32A

10

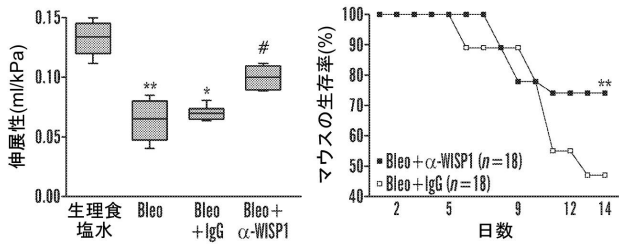


図 31B

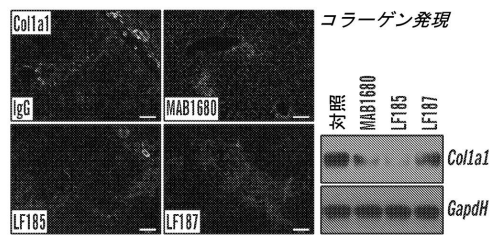


図 32B

20

【 図 3 3 A - 3 3 B 】

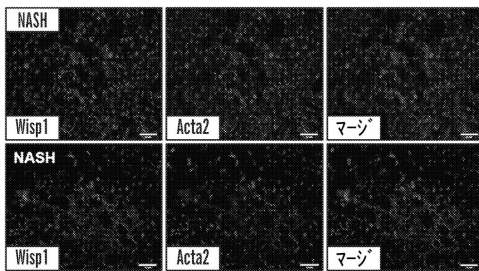


図 33A

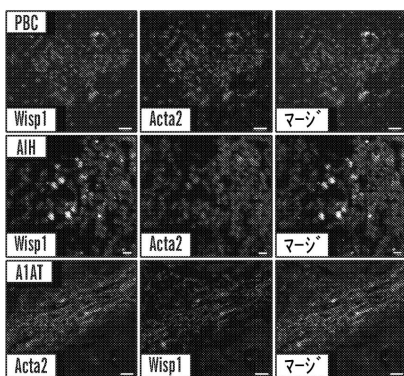


図 33B

【 図 3 4 A - 3 4 B 】

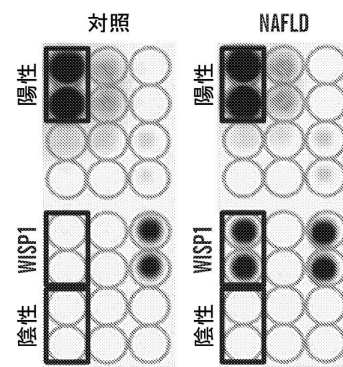


図 34A

30

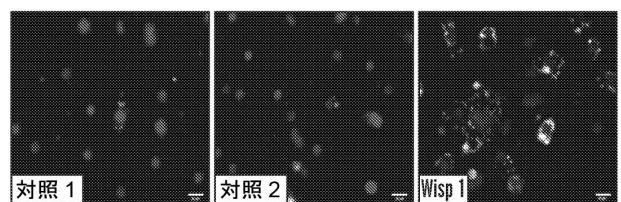


図 34B

40

50

【 図 3 5 】

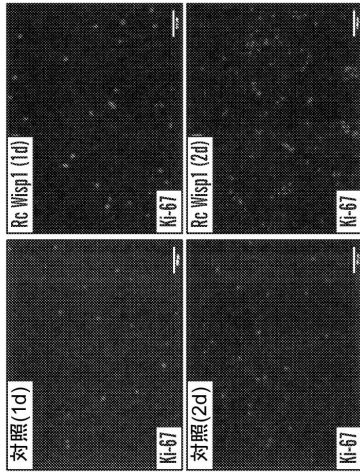
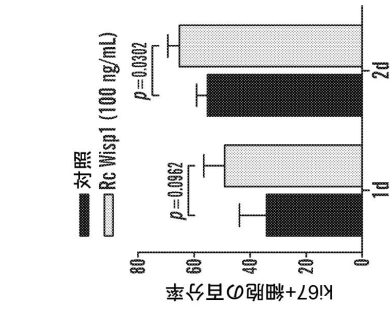


図 35

【 図 3 6 】

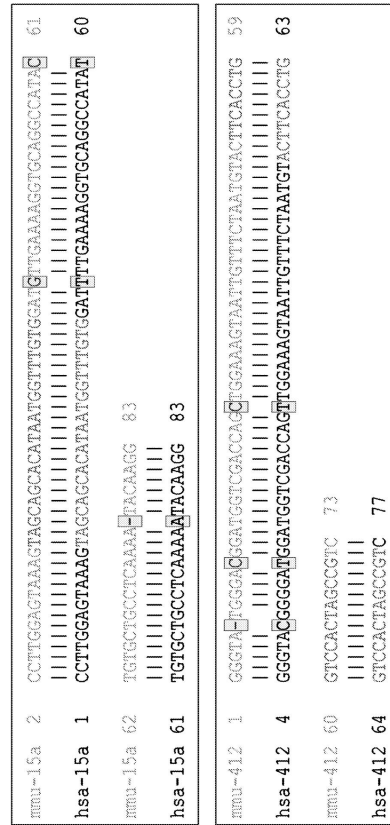


図 36

10

20

【 図 3 7 A - 3 7 B 】

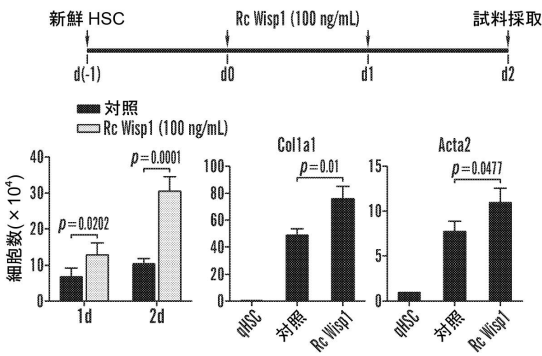


図 37A

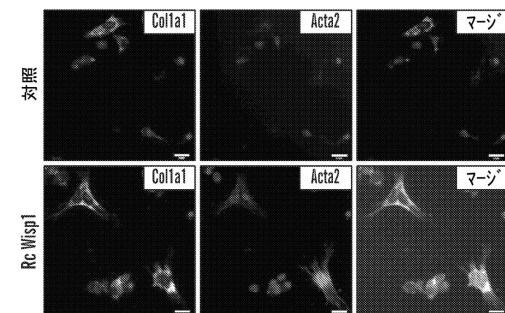


図 37B

【 図 3 8 A - 3 8 B 】

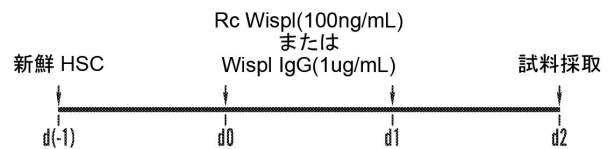


図 38A

30

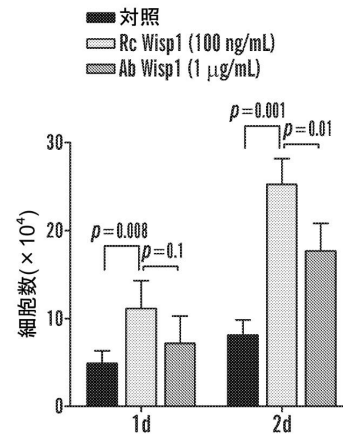


図 38B

40

50

【 图 3 8 C - 3 8 D 】

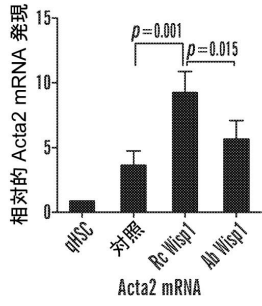


图 38C

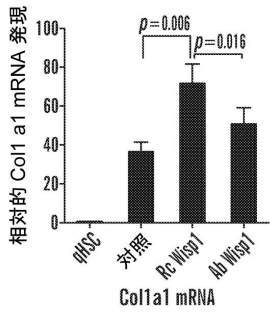


图 38D

【 图 3 8 E - 3 8 F 】

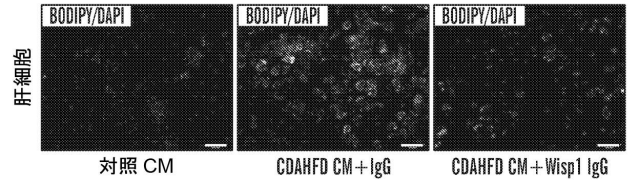


图 38E

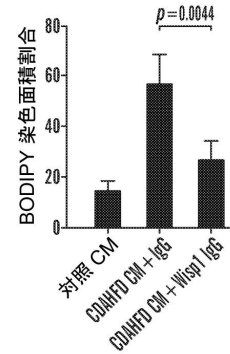


图 38F

10

20

【 图 3 9 A 】

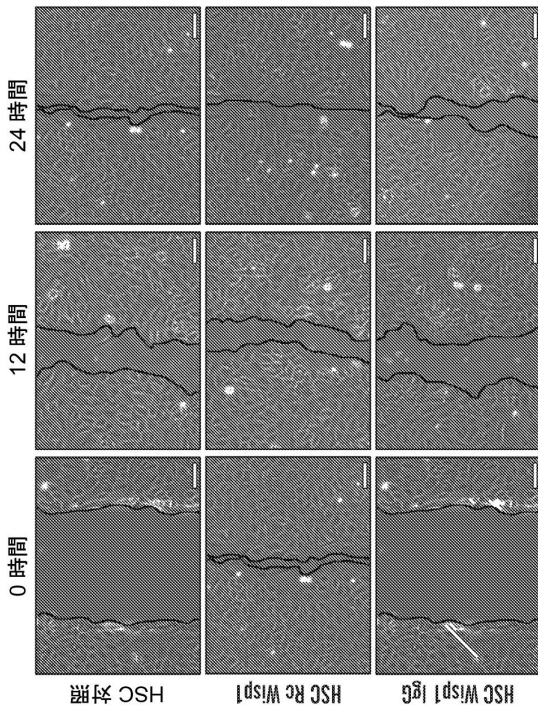


图 39A

【 图 3 9 B 】

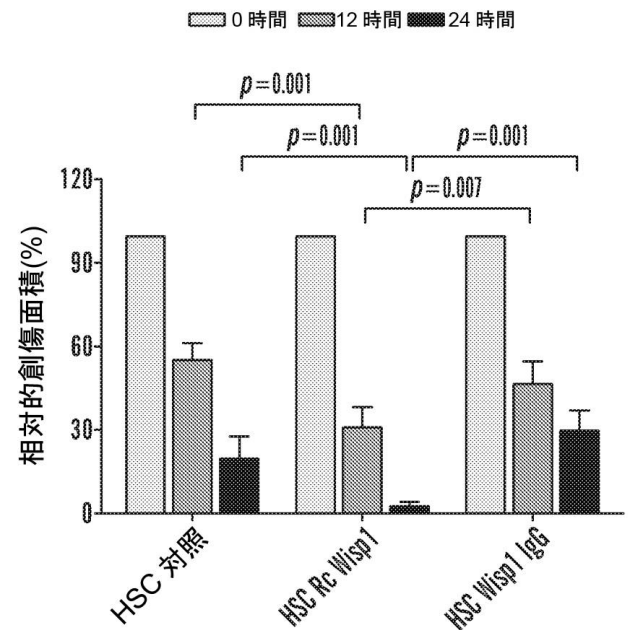


图 39B

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US19/56910
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 39/395, 35/407; C07K 16/22, 16/30; A61P 35/04, 1/16; C12N 5/071; G01N 33/68 (2020.01) CPC - A61K 39/395, 39/39558, 39/3955, 35/407; C07K 16/22, 16/30, 16/303; A61P 35/04, 1/16; C12N 5/06, 5/0645, 5/067; G01N 33/68, 33/574, 33/576, 33/57438		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2017/0304442 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.) 26 October 2017; paragraphs [0012], [0016], [0024], [0043], [0047], [0055], [0060], [0069], [0071]-[0072], [0082], [0097], [0109]-[0110], [0112]-[0113], [0119]-[0120], [0130], [0132]	1, 5-7, 10-14, 16-17, 24, 27, 30-37 — 3-4, 23, 26, 29, 46-51, 53-54, 55/47-51, 55/53-54, 56/47-51, 56/53-54
X — Y	(TONG, Y. et al.) WISP1 Mediates Hepatic Warm Ischemia Reperfusion Injury Via TLR4 Signaling in Mice. Scientific Reports. 29 January 2016, Vol. 6, pages 1-11; Figures 1-2. Supplementary Figure S6; abstract; page 2, third and fifth-seventh paragraphs; page 3, third paragraph to page 4, second paragraph; page 6, fourth paragraph to page 7, first paragraph; page 7, third paragraph to page 8, first paragraph; doi: 10.1038/srep20141	1, 6, 8, 18-19, 21, 39-40, 42-43, 59-60 — 9, 22-23, 45-46
Y	(R&D SYSTEMS) Product Datasheet: Recombinant Human WISP-1/CCN4, Catalog Number: 1627-WS [online]. 18 May 2018 [retrieved on 19 February 2020]. Retrieved from the internet: <URL: https://resources.mdsystems.com/pdfs/datasheets/1627-ws.pdf>; page 1	5, 16, 23, 30, 46, 54, 55/54, 56/54
X — Y	(JIN, S. et al.) Mechanical Ventilation Augments Poly(I:C)-Induced Lung Injury Via A WISP1-Integrin β3-Dependent Pathway In Mice. Molecular Medicine. 6 January 2016, Vol. 22, pages 54-63; abstract; page 55, third column, second paragraph; page 57, third column, second paragraph to page 58, second column, first paragraph; doi: 10.2119/molmed.2015.00233	14-15 — 4, 22, 29, 45, 53, 55/53, 56/53
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 February 2020 (25.02.2020)		Date of mailing of the international search report 13 MAR 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/56910

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(OGHENESUVWE, E. et al.) Guidelines On Dosage Calculation And Stock Solution Preparation In Experimental Animals' Studies. Journal of Natural Sciences Research. 2014, Vol. 4, No. 18, pages 100-106; page 100, third-fourth paragraphs; page 103, first-second paragraphs	14-15
Y, D	(CERVELLO, M. et al.) Expression Of WISPs And Of Their Novel Alternative Variants In Human Hepatocellular Carcinoma Cells. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004, Vol. 1028, pages 432-439; abstract; page 434, third paragraph; page 437, third paragraph to page 438, first paragraph; doi: 10.1196/annals.1322.051	3, 26
Y	WO 2017/201422 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 23 November 2017; paragraphs [0003], [0011], [0023]-[0024], [0026], [0029], [0031], [0040]-[0041], [0053], [0070], [0120], [0150]	9, 47-51, 53-54, 55/47-51, 55/53-54, 56/47-51, 56/53-54
A	(TUMPENNY, P. et al.) Alagille Syndrome: Pathogenesis, Diagnosis And Management. European Journal of Human Genetics. 21 September 2011, Vol. 20, pages 251-257; abstract; page 254, second column, fifth paragraph to page 255, first column, fifth paragraph; doi:10.1038/ejhg.2011.181	2
A	(CHEN, J. et al.) Enhancement Of Hepatocyte Differentiation From Human Embryonic Stem Cells By Chinese Medicine Fuzhenghuayu. Scientific Reports. 06 January 2016, Vol. 6, pages 1-13; page 2, sixth paragraph and page 4, first paragraph; page 10, third paragraph; doi: 10.1038/srep18841	2
A	US 2011/0311540 A1 (BOTSTEIN, D. et al.) 22 December 2011; entire document	1-19, 21-24, 26-27, 29-37, 39-40, 42-43, 45-51, 53-54, 55/47-51, 55/53-54, 56/47-51, 56/53-54, 59-60
A	US 2016/0165881 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 16 June 2016; entire document	47-51, 53-54, 55/47-51, 55/53-54, 56/47-51, 56/53-54, 59-60

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/56910

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 57-58
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Supplemental Page.

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2 (in-part), 3, 4-5 (each in-part), 6-14, 15-16 (each in-part), 17-19, 21, 22-23 (each in-part), 24, 26, 27 (in-part), 29-30 (each in-part), 31-36, 37 (in-part), 39-40, 42, 43 (in-part), 45-46 (each in-part), 47-50, 51 (in-part), 53-54 (each in-part), 55-56 (each in-part), 59-60; Alagille Syndrome (liver disease); mab1680 (WISP1 inhibitor); SEQ ID NO: 1 (antigen)

20

30

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

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/56810

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

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

Group I+, Claims 1-56, 59-60; Alagille Syndrome (liver disease); mab1680 (WISP1 inhibitor); and SEQ ID NO: 1 (antigen) are directed toward methods and compositions for treating a liver disease with an agent or cell line that inhibits WISP1.

10

The compositions and methods will be searched to the extent that they comprise Alagille Syndrome (first exemplary liver disease), mab1680 (first exemplary WISP1 inhibitor) and SEQ ID NO: 1 (first exemplary antigen). Applicant is invited to elect additional liver disease(s), WISP1 inhibitor(s) and/or antigen/antibody sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional liver disease(s), WISP1 inhibitor(s) and/or antigen/antibody sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2 (in-part), 3, 4-5 (each in-part), 6-14, 15-16 (each in-part), 17-19, 21, 22-23 (each in-part), 24, 26, 27 (in-part), 29-30 (each in-part), 31-36, 37 (in-part), 39-40, 42, 43 (in-part), 45-46 (each in-part), 47-50, 51 (in-part), 53-54 (each in-part), 55-56 (each in-part), and 59-60 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass Alagille Syndrome (liver disease); mab1680 (WISP1 inhibitor); and SEQ ID NO: 1 (antigen). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected liver disease(s), WISP1 inhibitor(s) and/or antigen/antibody sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be Alcohol-Related Liver Disease (liver disease); AF1680 (WISP1 inhibitor); SEQ ID NO: 2 (antigen).

No technical features are shared between the liver diseases, WISP1 inhibitors and/or antigen/antibody sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

20

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: A method for treating or preventing a liver disease, the method comprising: administering to a subject in need thereof an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; a composition comprising an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1 and a pharmaceutically acceptable carrier; a method of treating a liver disease in a subject, the method comprising: a. detecting the level of WISP 1 and/or Acta2, Colla1 in a biological sample of a subject; b. comparing the measurement of (a) to a reference level; c. identifying a subject with increased WISP1 and/or Yap, Acta2, Colla1 in (a) as compared to a reference level as having a liver disease; and d. administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP 1; a method for treating or preventing a liver disease, the method comprising: administering to a subject in need thereof an agent that inhibits WISP 1; a composition comprising an agent that inhibits WISP1 and a pharmaceutically acceptable carrier; a method of treating a liver disease in a subject, the method comprising: a. detecting the level of WISP 1 and/or Yap, Colla1, Acta2 in a biological sample of a subject; b. comparing the measurement of (a) to a reference level; c. identifying a subject with increased WISP1 and/or Yap, Colla1, Acta2 in (a) as compared to a reference level as having a liver disease; and d. administering to the subject having liver disease an agent that inhibits WISP 1; a method of generating an engineered hepatic stellate cell, or population thereof, that expresses an agent that inhibits WISP1, the method comprising: contacting the cell with an agent that inhibits WISP1, and culturing the cell for a sufficient time to allow for expression of the agent; a cell line comprising hepatic stellate cells generated by the method; a pharmaceutical composition comprising a hepatic stellate cell, or population thereof, generated by the method, and a pharmaceutically acceptable carrier; a method of treating a liver disease in a subject, the method comprising: a. receiving the results of an assay that identifies a subject as having increased WISP1 and/or Yap, Acta2, or Colla1 as compared to a reference level as having a liver disease; and b. administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; a method of treating a liver disease in a subject, the method comprising: a. receiving the results of an assay that identifies a subject as having increased WISP1 and/or Yap, Colla1, Acta2 as compared to a reference level as having a liver disease; and b. administering to the subject having liver disease an agent reagent that inhibits WISP 1; these shared technical features are previously disclosed by US 8,350,008 B2 to Botstein, et al. (hereinafter 'Botstein') in view of US 9,888,673 B2 ('Regents of the University of Minnesota') (hereinafter 'Minnesota').

30

Continued Within the Next Supplemental Box.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/56910

---Continued from Previous Supplemental Box---

Botstein discloses a method for treating or preventing a liver disease (method of treating a WISP-related liver cancer; column 11, lines 44-51; column 24, lines 13-20, 41; column 43, lines 5-7), the method comprising: administering to a subject in need thereof an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1 (the method comprising: administering to a subject in need thereof an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41); a composition comprising an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1 (a composition comprising an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41) and a pharmaceutically acceptable carrier (column 12, line 46); a method of treating a liver disease in a subject (method of treating a WISP-related liver cancer in a subject; column 11, lines 44-51; column 12, lines 35-41; column 24, lines 13-20, 41; column 43, lines 5-7), the method comprising: a. detecting the level of WISP 1 in a biological sample of a subject (column 12, lines 1-12); b. comparing the measurement of (a) to a reference level (column 12, lines 1-12); c. identifying a subject with increased WISP1 in (a) as compared to a reference level as having a liver disease (identifying a subject with increased WISP1 in (a) as compared to a reference level as having a liver disease; column 12, lines 1-12); and d. administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1 (administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41); a method for treating or preventing a liver disease (method of treating a WISP-related liver cancer; column 11, lines 44-51; column 24, lines 13-20, 41; column 43, lines 5-7), the method comprising: administering to a subject in need thereof an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1 (the method comprising: administering to a subject in need thereof an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41); a composition comprising an agent that inhibits WISP1 (a composition comprising an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41) and a pharmaceutically acceptable carrier (column 12, line 46); a method of treating a liver disease in a subject (method of treating a WISP-related liver cancer in a subject; column 11, lines 44-51; column 12, lines 35-41; column 24, lines 13-20, 41; column 43, lines 5-7), the method comprising: a. detecting the level of WISP 1 in a biological sample of a subject (column 12, lines 1-12); b. comparing the measurement of (a) to a reference level (column 12, lines 1-12); c. identifying a subject with increased WISP1 in (a) as compared to a reference level as having a liver disease (identifying a subject with increased WISP1 in (a) as compared to a reference level as having a liver disease; column 12, lines 1-12); and d. administering to the subject having liver disease an agent that inhibits WISP1 (administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41); a method of generating a cell, that expresses an agent that inhibits WISP1 (hybridoma to produce WISP1 antibodies (generating a cell, that expresses an agent that inhibits WISP1); column 46, lines 3-34), the method comprising: contacting the cell with an agent that inhibits WISP1 (lymphocytes are immunized in vitro with WISP1 polypeptide (contacting the cell with an agent that inhibits WISP1); column 46, lines 3-34), and culturing the cell for a sufficient time to allow for expression of the agent (fusing the cell to an immortalized cell line and culturing the cell for a sufficient time to allow for expression of the antibody; column 46, lines 3-34; 65-66); a method of treating a liver disease in a subject (method of treating a WISP-related liver cancer; column 11, lines 44-51; column 24, lines 13-20, 41; column 43, lines 5-7), the method comprising: a. receiving the results of an assay that identifies a subject as having increased WISP1 as compared to a reference level as having a liver disease (the method comprising: a. receiving the results of an assay that identifies a subject as having increased WISP1 as compared to a reference level as having a liver disease; column 12, lines 1-12); and b. administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1 (administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41); a method of treating a liver disease in a subject (method of treating a WISP-related liver cancer; column 11, lines 44-51; column 24, lines 13-20, 41; column 43, lines 5-7), the method comprising: a. receiving the results of an assay that identifies a subject as having increased WISP1 as compared to a reference level as having a liver disease (the method comprising: a. receiving the results of an assay that identifies a subject as having increased WISP1 as compared to a reference level as having a liver disease; column 12, lines 1-12); and b. administering to the subject having liver disease an agent reagent that inhibits WISP 1 (administering to the subject having liver disease an antibody or antibody reagent that inhibits WISP1; column 12, lines 35-41).

10

20

Botstein does not disclose an engineered hepatic stellate cell; a cell line comprising hepatic stellate cells generated by the method; a pharmaceutical composition comprising a hepatic stellate cell, or population thereof, generated by the method, and a pharmaceutically acceptable carrier.

Minnesota discloses an engineered hepatic stellate cell (genetically modified (engineered) hepatic stellate cell; column 37, lines 30, 43); a cell line comprising hepatic stellate cells generated by the method (a cell line comprising hepatic stellate cells generated by the method; column 15, lines 37-50; column 37, lines 30, 43; column 54, lines 21-24); a pharmaceutical composition comprising a hepatic stellate cell (a pharmaceutical composition comprising a hepatic stellate cell; column 6, lines 3-9), or population thereof, generated by the method, and a pharmaceutically acceptable carrier (column 6, lines 24-27).

30

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Botstein, to include an engineered hepatic stellate cell; a cell line comprising hepatic stellate cells generated by the method; a pharmaceutical composition comprising a hepatic stellate cell, or population thereof, generated by the method, and a pharmaceutically acceptable carrier, as disclosed by Minnesota, in order to provide a superior method for treating liver disease.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Botstein and Minnesota references, unity of invention is lacking.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 31/7105	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 35/76	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	Z Z N A
	C 0 7 K 16/18	

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

2 1 1 4 ポストン フルーツ ストリート 5 5 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション内

F ターム (参考)	4B065	AA90X	AB01	AC14	BA02	CA24	CA25	CA44				
	4C084	AA02	AA13	AA17	NA14	ZA751	ZA752	ZA891	ZA892	ZB081	ZB082	
											ZC411	ZC412
	4C085	AA13	AA14	BB11								
	4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA75	ZA89	ZB08	ZC41	
	4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	NA14	ZA75	ZB08	ZC41			
	4H045	AA11	AA30	CA40	DA76	EA20	FA74	GA26				