(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-509220
(P2025-509220A)
(43)公表日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/22 (2006.01)		C07K	16/22	ZNA	4B064
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00		4B065
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705		4C076
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13		4C084
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4C085

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全117頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-552735(P2024-552735)
(86)(22)出願日　令和5年3月3日(2023.3.3)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月24日(2024.10.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/014512
(87)国際公開番号　WO2023/168087
(87)国際公開日　令和5年9月7日(2023.9.7)
(31)優先権主張番号　63/316,691
(32)優先日　令和4年3月4日(2022.3.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/316,704
(32)優先日　令和4年3月4日(2022.3.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　503469393
イエール ユニバーシティ
アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブン トゥ ホイットニー アベニュー
(74)代理人　100139723
弁理士　樋口 洋
(74)代理人　100116540
弁理士　河野 香
(72)発明者　オデル，イアン
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６４ ３７ ギルフォード オールド ウィット フィールド ストリート ３８２
(72)発明者　フラヴェル，リチャード
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６４ ３７ ギルフォード ムース ヒル ロード
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　線維症の処置及び予防のための方法及び組成物

(57)【要約】
本開示は、前記細胞内でのエピレグリンの活性と、疾患又は障害、例えば線維性疾患又は障害に関連する細胞内での１つまたは複数の変化の反転又は予防とを伴う、エピレグリン活性の１つまたは複数の阻害剤の使用を含む方法及び組成物を提供する。エピレグリンに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合断片が、前記エピレグリン活性の阻害剤の例として、本明細書で提供される。例えばエピレグリン活性の１つまたは複数の阻害剤を含む、対象の線維性疾患又は障害前記を処置又は予防するために有用な方法及び組成物も開示される。本開示は更に、開示される方法の実施に有用な組成物を含むキットを含む。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
エピレグリンに特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片。
【請求項２】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、エピレグリン上皮成長因子（ＥＧＦ）様ドメインに特異的に結合する、請求項１に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項３】
前記エピレグリンはヒトエピレグリンである、請求項１又は２に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項４】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、約１×１０$^{-9}$Ｍ未満のＫ$_{D}$で、エピレグリンに特異的に結合する、請求項１～３のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項５】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、約１×１０$^{-10}$Ｍ未満のＫ$_{D}$で、エピレグリンに特異的に結合する、請求項４に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項６】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、約３．８×１０$^{-11}$ＭのＫ$_{D}$で、エピレグリンに特異的に結合する、請求項５に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項７】
前記Ｋ$_{D}$は、バイオレイヤー干渉アッセイを用いて決定される、請求項４～６のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項８】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、エピレグリンを中和する、請求項１～７のいずれか１項に記載の単離された抗体又はその抗原結合断片。
【請求項９】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用を阻害する、請求項１～７のいずれか１項に記載の単離された抗体又はその抗原結合断片。
【請求項１０】
前記ＥｒｂＢ受容体は、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）である、請求項１～７のいずれか１項に記載の単離された抗体又はその抗原結合断片。
【請求項１１】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する、請求項１～８のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１２】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、約１００ｎＭ未満のＩＣ$_{50}$で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する、請求項１１に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１３】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、約１０ｎＭ未満のＩＣ$_{50}$で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する、請求項１２に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１４】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、約１．８ｎＭのＩＣ$_{50}$で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する、請求項１３に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１５】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、マウスエピレグリンに特異的に結合しない、請求項１～１４のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。

【請求項１６】
前記単離された抗体又は抗原結合断片は、１つまたは複数の他のヒトＥＧＦＲリガンドに特異的に結合しない、請求項１～１５のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１７】
前記１つまたは複数の他のＥＧＦＲリガンドは、トランスフォーミング成長因子α（ＴＧＦＡ）、ベータセルリン（ＢＴＣ）、ヘパリン結合性ＥＧＦ様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）、エピゲン（ＥＰＧＮ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、及び／又はアンフィレグリン（ＡＲＥＧ）である、請求項１～１６のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１８】
配列番号１のアミノ酸配列若しくは前記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）内に含有された、３つの重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに／又は配列番号６のアミノ酸配列若しくは前記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む、請求項１～１７のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項１９】
配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨ内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに／又は配列番号６のアミノ酸配列を含むＶＬ内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む、請求項１～１８のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２０】
配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び／若しくは配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３；並びに／又は配列番号７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び／若しくは配列番号９のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３を含む、請求項１～１９のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２１】
配列番号１のアミノ酸配列若しくは前記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含むＶＨ；及び／又は配列番号６のアミノ酸配列若しくは前記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含むＶＬを含む、請求項１～２０のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２２】
配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨ；及び／又は配列番号６のアミノ酸配列を含むＶＬを含む、請求項１～２１のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２３】
前記抗体又は抗原結合断片は、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又はｓｃＦｖである、請求項１～２２のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２４】
前記抗体はヒト化抗体である、請求項１～２３のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２５】
前記抗体又は抗原結合断片は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４アイソタイプのものである、請求項１～２４のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片。
【請求項２６】
エピレグリンへの結合に関して、請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片と競合する、単離された抗体又はその抗原結合断片。

【請求項２７】
請求項１～２５のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片と同一のエピトープに結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片。
【請求項２８】
請求項１～２７のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片をコードする、単離されたポリペプチド。
【請求項２９】
ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、若しくは前記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列；及び／又はＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列、若しくは前記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含む、請求項２８に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３０】
ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、及び／又はＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列を含む、請求項２９に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項３１】
請求項２８～３０のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。
【請求項３２】
請求項２８～３０のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド又は請求項３１に記載のベクターを含む、請求項１～２７のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片を、発現する宿主細胞。
【請求項３３】
前記細胞はハイブリドーマである、請求項３２に記載の宿主細胞。
【請求項３４】
前記抗体又は抗原結合断片は、組換えによって生産される、請求項３２又は３３に記載の宿主細胞。
【請求項３５】
請求項１～２７のいずれか１項に記載の単離された抗体又は抗原結合断片の製造方法であって、前記方法は、請求項３２～３４のいずれか１項に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記抗体又は抗体結合断片を単離するステップとを含む、方法。
【請求項３６】
ａ）エピレグリンに特異的に結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメイン；
ｂ）膜貫通ドメイン；及び
ｃ）１つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン
を含む、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。
【請求項３７】
エピレグリンに特異的に結合する前記抗原結合部分は、請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗体又は抗原結合断片を含む、請求項３６に記載のＣＡＲ。
【請求項３８】
請求項３６又は３７に記載のＣＡＲを細胞表面に含む、免疫細胞。
【請求項３９】
前記免疫細胞はＴ細胞又はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である、請求項３８に記載の免疫細胞。
【請求項４０】
請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、請求項２８～３０のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド、請求項３１に記載のベクター、又は請求項３６若しくは３７に記載のＣＡＲ、又は請求項３８若しくは３９に記載の免疫細胞と、薬学的に許容可能なキャリア又は希釈剤とを含む、医薬組成物。
【請求項４１】
１つまたは複数の追加の治療剤を更に含む、請求項４０に記載の医薬組成物。
【請求項４２】

前記１つまたは複数の追加の治療剤は、ミコフェノール酸モフェチル、ニンテダニブ、トシリズマブ、ピルフェニドン、リツキシマブ、コルチコステロイド、メトトレキサート、及びシクロホスファミド、又はこれらの組み合わせから選択される、請求項４１に記載の医薬組成物。

【請求項４３】

（ｉ）請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、請求項２８～３０のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド、請求項３１に記載のベクター、又は請求項３６若しくは３７に記載のＣＡＲ、又は請求項３８若しくは３９に記載の免疫細胞と、（ｉｉ）前記（ｉ）のためのパッケージとを含む、キット。

【請求項４４】

細胞内でのエピレグリンの活性を阻害する方法であって、前記細胞を有効量のエピレグリン阻害剤と接触させるステップを含む、方法。

【請求項４５】

エピレグリンの前記活性は、エピレグリンの、ＥｒｂＢ受容体との相互作用である、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

前記ＥｒｂＢ受容体はＥＧＦＲ受容体である、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

前記細胞は線維芽細胞又は周皮細胞である、請求項４４～４６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４８】

前記エピレグリン阻害剤は、前記線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

線維症に関連する細胞内での１つまたは複数の変化を反転又は予防する方法であって、前記細胞を有効量のエピレグリン阻害剤と接触させるステップを含む、方法。

【請求項５０】

線維症に関連する前記１つまたは複数の変化は：（１）ＥＲＥＧの発現上昇；（２）ＣＯＬ１Ａ１の発現上昇；（３）ＣＯＬ４Ａ１の発現上昇；（４）ＣＯＬ６Ａ１の発現上昇；（５）ＴＮＣの発現上昇；（６）FN^{EDA}の発現上昇；（７）ＭＣＰ－１の発現上昇；（８）ＴＩＭＰ－１の発現上昇、又はこれらの組み合わせである、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】

前記細胞は線維芽細胞又は周皮細胞である、請求項４９又は５０に記載の方法。

【請求項５２】

前記細胞はヒト細胞である、請求項４４～５１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５３】

処置又は予防を必要とする対象の、線維性疾患又は障害を処置又は予防する方法であって、前記対象に治療有効量のエピレグリン阻害剤を投与するステップを含む、方法。

【請求項５４】

前記エピレグリン阻害剤の投与は、前記線維性疾患又は障害の反転をもたらす、請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

前記エピレグリン阻害剤は、前記線維性疾患又は障害の発症後に、前記対象に投与される、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】

前記エピレグリン阻害剤は、前記線維性疾患又は障害の発症前に、前記対象に投与される、請求項５３に記載の方法。

【請求項５７】

前記線維性疾患又は障害は、強皮症、間質性肺疾患、消化管線維症、心臓線維症、皮膚

線維症、硬化性粘液水腫、腎性全身性線維症（腎性線維化性皮膚症）、慢性移植片対宿主病、硬化性移植片対宿主病、閉塞性細気管支炎症候群、ケロイド瘢痕、若しくは長期ＣＯＶＩＤ症候群、又はこれらの組み合わせである、請求項５３～５６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５８】

前記強皮症は全身性強皮症である、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

前記強皮症は限局性強皮症（モルフェア）である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６０】

前記間質性肺疾患は特発性肺線維症である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６１】

前記皮膚線維症は、全身性硬化症又は硬化性移植片対宿主病に関連する、請求項５７に記載の方法。

【請求項６２】

１つまたは複数の追加の治療剤を更に含む、請求項５３～６１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６３】

前記１つまたは複数の追加の治療剤は、ミコフェノール酸モフェチル、ニンテダニブ、トシリズマブ、ピルフェニドン、リツキシマブ、コルチコステロイド、メトトレキサート、ＵＶＡ若しくはＵＶＢ光線療法、体外フォトフェレーシス、幹細胞移植、及びシクロホスファミド、又はこれらの組み合わせから選択される、請求項６２に記載の方法。

【請求項６４】

前記対象はヒトである、請求項５３～６３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６５】

前記エピレグリン阻害剤は、抗体若しくは抗原結合断片、小分子、デコイ受容体、ＣＡＲ改変細胞、アプタマー、代替足場、又はこれらの組み合わせである、請求項４４～６４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６６】

前記エピレグリン阻害剤は、請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、請求項２８～３０のいずれか１項に記載のポリヌクレオチド、請求項３１に記載のベクター、又は請求項３６若しくは３７に記載のＣＡＲ、又は請求項３８若しくは３９に記載の免疫細胞である、請求項４４～６４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６７】

前記抗体又は抗原結合断片は、抗ヒトエピレグリン抗体ＡＦ１１９５、又は抗マウス／ヒトエピレグリン抗体Ｃｌｏｎｅ＃１８９６１１である、請求項６５に記載の方法。

【請求項６８】

前記デコイ受容体は、可溶性ＥｒｂＢ受容体又はその可溶性断片である、請求項６５に記載の方法。

【請求項６９】

前記デコイ受容体は、可溶性ＥＧＦＲ又はその可溶性断片である、請求項６８に記載の方法。

【請求項７０】

前記ＣＡＲ改変細胞は、エピレグリン発現樹状細胞を破壊又は殺滅する、請求項６５に記載の方法。

【請求項７１】

前記ＣＡＲ改変細胞はＣＡＲ－Ｔ細胞である、請求項７０に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【０００１】

本出願は、２０２２年３月４日出願の米国仮特許出願第６３／３１６，７０４号、及び

２０２２年３月４日出願の米国仮特許出願第６３／３１６，６９１号の利益を主張するものであり、上記仮特許出願はそれぞれ、参照により、その全体があらゆる目的のために本出願に援用される。

【連邦政府の資金提供を受けた研究開発に関する記載】

【０００２】

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号ＡＲ００７０１６に基づく政府支援を受けてなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【技術分野】

【０００３】

本発明は、細胞内でのエピレグリンの活性の阻害と、疾患又は障害、例えば線維性疾患又は障害に起因する細胞内での１つまたは複数の変化の反転又は予防とを伴う、エピレグリン活性の阻害剤の使用を含む方法及び組成物に関する。また、例えばエピレグリン活性の阻害剤を含む、対象の線維性疾患又は障害の処置又は予防に有用な方法及び組成物も開示される。本発明は更に、本発明の実施に有用な組成物を含むキットを提供する。

【背景技術】

【０００４】

病的線維症は、ほとんどのヒト慢性炎症性疾患の、一般的な最終の転帰であり、世界中のヒトの全ての死亡の約半数の原因であると推定されている（１）。線維症は創傷治癒において極めて重要であるにもかかわらず、有効な抗線維化療法の特定という大きな医療上のニーズは満たされておらず、線維症を促進する調節不全の分子回路を正確に特定できないことが、依然として薬剤開発の妨げとなっている。全身性硬化症（Ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｓｃｌｅｒｏｓｉｓ：ＳＳｃ／強皮症）は、典型的なヒト線維性疾患であり、最も一般的には皮膚に影響を及ぼすが、肺、腎臓、消化管、及び心臓に影響を及ぼす場合もある。ＳＳｃ皮膚線維症に関しては米国食品医薬品局（Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ：ＦＤＡ）に承認された療法はなく、ＳＳｃ肺線維症に関しては承認された治療薬が２つだけ存在する（ニンテダニブ（２）及びトシリズマブ（３））が、これらは疾患の進行を遅らせるだけであり、疾患を反転させるものではない。

【０００５】

血小板由来成長因子受容体α（ＰＤＧＦＲα）（４）及び線維芽細胞成長因子受容体３（ＦＧＦＲ３）（５）といった受容体チロシンキナーゼ（ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｋｉｎａｓｅ：ＲＴＫ）は、線維芽細胞内でのこれらの活性化によって細胞外マトリックス（ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ：ＥＣＭ）遺伝子産物の過剰発現がもたらされるため、線維症において重要な役割を果たしている。上皮成長因子受容体（ｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＥＧＦＲ）は、ＲＴＫのＥｒｂＢファミリーのメンバーであり、主に表皮ケラチノサイトによって発現され、肺癌及び乳癌といった固形癌において以上に活性化される（６）。近年特定されたＳＳｃ皮膚疾患遺伝子発現シグネチャー（強皮症皮膚重症度スコア／４Ｓ）では、ＥＧＦＲリガンド発現は皮膚線維症重症度と相関していた（７）。しかしながら、直接的なＥＧＦＲ阻害は、線維症の様々なマウスモデルで試験したところ、一貫しない結果を示した。ＥＧＦＲ阻害は、皮膚、肝臓、及び腎臓の線維症を予防すると報告された（８～１０）が、肺線維症を悪化させた（１１）。これらの矛盾した知見は、インビトロで線維芽細胞とマクロファージとの間で説明されているもの等の、現時点まで未解明のシグナル伝達回路及び調節フィードバックループが、ＳＳｃ関連線維症において中心的な役割を果たしている可能性があるという考えを裏付けるものである。

【０００６】

複数の研究で、シングルセルＲＮＡシーケンシング（ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ：ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ）を利用して、健康な皮膚及び線維性皮膚の線維芽細胞集団の系統及び起源が解明されている（１３～１７）。また近年、自然免疫が線維症において重要な役割を果たしているという観察（１８）にも注目が集まっており、重要なシグナルは、単球（１９）及び形質細胞様樹状細胞（２０）のユニークなサブセッ

トからのものである。強皮症患者からの皮膚生検は、ＣＤ１４$^{+}$単核細胞、形質細胞様樹状細胞、及び２型自然リンパ球（２１～２３）の真皮浸潤を示し、これらの細胞の付近でクラスタ化している線維芽細胞は、強皮症においてコラーゲン遺伝子を過剰発現する線維芽細胞である（２４、２５）。これらの知見は、骨髄系免疫細胞が、まだ説明されていない機序によって、線維芽細胞のコラーゲン産生を促進していることを示唆している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

上述の「背景技術」の節で述べたように、ＳＳｃ並びに他の線維性疾患及び障害に罹患した患者に対する有効な抗線維化療法に対して、当該技術分野では高い需要が存在する。本出願はこれらの需要及び他の需要に対応するものである。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

一態様では、本開示は、エピレグリンに特異的に結合できる、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【０００９】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、エピレグリン上皮成長因子（ｅｐｉｄｅｒｍａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ：ＥＧＦ）様ドメインに特異的に結合してよい。

【００１０】

いくつかの実施形態では、上記エピレグリンはヒトエピレグリンであってよい。

【００１１】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１×１０$^{-9}$Ｍ未満のK_Dで、エピレグリンに特異的に結合してよい。いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１×１０$^{-10}$Ｍ未満のK_Dで、エピレグリンに特異的に結合してよい。いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約３．８×１０$^{-11}$ＭのK_Dで、エピレグリンに特異的に結合してよい。いくつかの実施形態では、上記K_Dは、バイオレイヤー干渉アッセイを用いて決定できる。

【００１２】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、エピレグリンを中和してよい。

【００１３】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用を阻害してよい。

【００１４】

いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体は、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）であってよい。

【００１５】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害してよい。

【００１６】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１００ｎＭ未満のIC_{50}で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害してよい。いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１０ｎＭ未満のIC_{50}で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害してよい。いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１．８ｎＭのIC_{50}で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害してよい。

【００１７】

いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、マウスエピレ

グリンに特異的に結合できない。
【００１８】
いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、１つまたは複数の他のヒトＥＧＦＲリガンドに特異的に結合できない。
【００１９】
いくつかの実施形態では、上記１つまたは複数の他のＥＧＦＲリガンドは、トランスフォーミング成長因子α（ＴＧＦＡ）、ベータセルリン（ＢＴＣ）、ヘパリン結合性ＥＧＦ様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）、エピゲン（ＥＰＧＮ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、及び／又はアンフィレグリン（ＡＲＥＧ）であってよい。
【００２０】
本明細書で開示される抗体又は抗原結合断片のいずれかの、いくつかの実施形態では、上記抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得る重鎖可変領域（ＶＨ）内に含有された、３つの重鎖相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ：ＣＤＲ）（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに／又は配列番号６のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得る軽鎖可変領域（ＶＬ）内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含んでよい。
【００２１】
いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列を含み得るＶＨ内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに／又は配列番号６のアミノ酸配列を含み得るＶＬ内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含んでよい。
【００２２】
いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号２のアミノ酸配列を含み得るＨＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含み得るＨＣＤＲ２、及び／若しくは配列番号４のアミノ酸配列を含み得るＨＣＤＲ３；並びに／又は配列番号７のアミノ酸配列を含み得るＬＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を含み得るＬＣＤＲ２、及び／若しくは配列番号９のアミノ酸配列を含み得るＬＣＤＲ３を含んでよい。
【００２３】
いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得るＶＨ；及び／又は配列番号６のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含み得るＶＬを、含んでよい。
【００２４】
いくつかの実施形態では、上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列を含み得るＶＨ；及び／又は配列番号６のアミノ酸配列を含み得るＶＬを含んでよい。
【００２５】
いくつかの実施形態では、上記抗体又は上記抗原結合断片は、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又はｓｃＦｖであってよい。
【００２６】
いくつかの実施形態では、上記抗体はヒト化抗体であってよい。
【００２７】
いくつかの実施形態では、上記抗体又は上記抗原結合断片は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４アイソタイプのものであってよい。
【００２８】
別の態様では、本開示は、エピレグリンへの結合に関して、本明細書で開示される抗体又は抗原結合断片のいずれかと競合する、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供す

る。
【００２９】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示される抗体又は抗原結合断片のいずれかと同一のエピトープに結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片を提供する。
【００３０】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示される単離された抗体又は抗原結合断片のいずれかをコードする、単離されたポリペプチドを提供する。
【００３１】
いくつかの実施形態では、上記単離されたポリペプチドは：ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、若しくは上記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列；及び／又はＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列、若しくは上記配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する配列を含んでよい。
【００３２】
いくつかの実施形態では、上記単離されたポリペプチドは、ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、及び／又はＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列を含んでよい。
【００３３】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのいずれかを含んでよい、ベクターを提供する。
【００３４】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのいずれか又は本明細書で開示されるベクターのいずれかを含み得る、本明細書で開示される単離された抗体又は抗原結合断片のいずれかを、発現する宿主細胞を提供する。
【００３５】
いくつかの実施形態では、上記細胞はハイブリドーマであってよい。
【００３６】
いくつかの実施形態では、上記抗体又は上記抗原結合断片は、組換えによって生産されてよい。
【００３７】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示される単離された抗体又は抗原結合断片の製造方法を提供し、上記方法は、本明細書で開示される宿主細胞のいずれかを培養するステップと、本明細書で開示される抗体又は抗原結合断片のいずれかを単離するステップとを含んでよい。
【００３８】
別の態様では、本開示は：エピレグリンに特異的に結合する抗原結合部分を含み得る細胞外ドメインと；膜貫通ドメインと；１つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含み得る細胞質ドメインとを含み得る、キメラ抗原受容体（ｃｈｉｍｅｒｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＣＡＲ）を提供する。
【００３９】
いくつかの実施形態では、エピレグリンに特異的に結合する上記抗原結合部分は、本明細書で開示される抗体又は抗原結合断片のいずれかを含んでよい。
【００４０】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示されるＣＡＲのいずれかを細胞表面に含んでよい、免疫細胞を提供する。
【００４１】
いくつかの実施形態では、上記免疫細胞はＴ細胞又はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞であってよい。
【００４２】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示される抗体若しくはその抗原結合断片のいずれか、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのいずれか、本明細書で開示されるベクタ

ーのいずれか、又は本明細書で開示されるＣＡＲのいずれか、若しくは本明細書で開示される免疫細胞のいずれかと、薬学的に許容可能なキャリア又は希釈剤とを含んでよい、医薬組成物を提供する。

【００４３】

いくつかの実施形態では、上記医薬組成物は、１つまたは複数の追加の治療剤を更に含んでよい。

【００４４】

いくつかの実施形態では、上記１つまたは複数の追加の治療剤は、ミコフェノール酸モフェチル、ニンテダニブ、トシリズマブ、ピルフェニドン、リツキシマブ、コルチコステロイド（例えばプレドニゾン）、メトトレキサート、及びシクロホスファミド、又はこれらの組み合わせから選択できる。

【００４５】

別の態様では、本開示は、（ｉ）本明細書で開示される単離された抗体若しくは抗原結合断片のいずれか、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのいずれか、本明細書で開示されるベクターのいずれか、若しくは本明細書で開示されるＣＡＲのいずれか、若しくは本明細書で開示される免疫細胞のいずれか、及び／又は（ｉｉ）これらのためのパッケージを含んでよい、キットを提供する。

【００４６】

一態様では、本開示は、細胞内でのエピレグリンの活性を阻害する方法であって、上記細胞を有効量のエピレグリン阻害剤と接触させるステップを含む、方法を提供する。

【００４７】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞内でのエピレグリンの活性を阻害する方法であって、上記方法は、上記細胞を、有効量の、本明細書で開示される抗体若しくは抗原結合断片のいずれか、又は本明細書で開示されるＣＡＲのいずれか、本明細書で開示される免疫細胞のいずれか、若しくは本明細書で開示される他のエピレグリン阻害剤のいずれかと接触させるステップを含んでよい、方法を提供する。

【００４８】

いくつかの実施形態では、エピレグリンの上記活性は、エピレグリンの、ＥｒｂＢ受容体との相互作用であってよい。

【００４９】

いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体はＥＧＦＲ受容体であってよい。

【００５０】

上で開示されている方法のいずれかの、いくつかの実施形態では、上記細胞は線維芽細胞又は周皮細胞であってよい。

【００５１】

いくつかの実施形態では、上記エピレグリン阻害剤は、上記線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害してよい。

【００５２】

別の態様では、本開示は、線維症に起因する細胞内での１つまたは複数の変化を反転させる又は予防する方法であって、上記細胞を有効量のエピレグリン阻害剤と接触させるステップを含む、方法を提供する。

【００５３】

いくつかの実施形態では、本開示は、線維症に起因する細胞内での１つまたは複数の変化を反転させる又は予防する方法であって、上記方法は、上記細胞を、有効量の、本明細書で開示される抗体若しくは抗原結合断片のいずれか、又は本明細書で開示されるＣＡＲのいずれか、若しくは本明細書で開示される免疫細胞のいずれか、若しくは本明細書で開示される他のエピレグリン阻害剤のいずれかと接触させるステップを含んでよい、方法を提供する。

【００５４】

いくつかの実施形態では、線維症に起因する上記１つまたは複数の変化は、限定するも

のではないが例えば：（１）エピレグリン（ＥＲＥＧ）の発現上昇；（２）Ｉ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ１Ａ１）の発現上昇；（３）ＩＶ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ４Ａ１）の発現上昇；（４）ＶＩ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ６Ａ１）の発現上昇；（５）テネイシン－Ｃ（ＴＮＣ）の発現上昇；（６）フィブロネクチンエクストラドメインＡ（FN^{EDA}）の発現上昇；（７）単球走化性タンパク質－１（ＭＣＰ－１）の発現上昇；（８）メタロプロテイナーゼ組織阻害剤１（ＴＩＭＰ－１）の発現上昇、又はこれらの組み合わせであってよい。

【００５５】

いくつかの実施形態では、上記細胞は線維芽細胞又は周皮細胞であってよい。

【００５６】

いくつかの実施形態では、上記細胞はヒト細胞であってよい。

【００５７】

別の態様では、本開示は、線維性疾患又は障害の処置又は予防を必要とする対象の、線維性疾患又は障害を処置又は予防する方法であって、上記対象に治療有効量のエピレグリン阻害剤を投与するステップを含む、方法を提供する。

【００５８】

いくつかの実施形態では、本開示は、線維性疾患又は障害の処置又は予防を必要とする対象の、線維性疾患又は障害を処置又は予防する方法であって、上記対象に、治療有効量の、本明細書で開示される抗体若しくは抗原結合断片のいずれか、本明細書で開示されるポリヌクレオチドのいずれか、本明細書で開示されるベクターのいずれか、又は本明細書で開示されるＣＡＲのいずれか、本明細書で開示される免疫細胞のいずれか、若しくは本明細書で開示される他のエピレグリン阻害剤のいずれかを投与するステップを含んでよい、方法を提供する。

【００５９】

いくつかの実施形態では、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与は、上記線維性疾患又は障害の反転をもたらすことができる。

【００６０】

いくつかの実施形態では、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、上記線維性疾患又は障害の発症後に、上記対象に投与してよい。

【００６１】

いくつかの実施形態では、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、上記線維性疾患又は障害の発症前に、上記対象に投与してよい。

【００６２】

いくつかの実施形態では、上記線維性疾患又は障害は、強皮症、間質性肺疾患、消化管線維症、心臓線維症、皮膚線維症、硬化性粘液水腫、腎性全身性線維症（腎性線維化性皮膚症）、慢性移植片対宿主病、硬化性移植片対宿主病、閉塞性細気管支炎症候群、ケロイド瘢痕、若しくは長期ＣＯＶＩＤ症候群、又はこれらの組み合わせであってよい。

【００６３】

いくつかの実施形態では、上記強皮症は全身性強皮症であってよい。

【００６４】

いくつかの実施形態では、上記強皮症は限局性強皮症（モルフェア）であってよい。

【００６５】

いくつかの実施形態では、上記間質性肺疾患は特発性肺線維症であってよい。

【００６６】

いくつかの実施形態では、上記皮膚線維症は、全身性硬化症又は硬化性移植片対宿主病に関連する。

【００６７】

いくつかの実施形態では、対象の線維性疾患又は障害を処置又は予防する上記方法のいずれかは、１つまたは複数の追加の治療剤を更に含んでよい。

【００６８】

いくつかの実施形態では、上記１つまたは複数の追加の治療剤は、限定するものではないが例えば、ミコフェノール酸モフェチル、ニンテダニブ、トシリズマブ、ピルフェニドン、リツキシマブ、コルチコステロイド（例えばプレドニゾン）、メトトレキサート、ＵＶＡ若しくはＵＶＢ光線療法、体外フォトフェレーシス、幹細胞移植、及びシクロホスファミド、又はこれらの組み合わせであってよい。

【００６９】

対象の線維性疾患又は障害を処置又は予防する上記方法のいずれかの、いくつかの実施形態では、上記対象はヒトであってよい。

【００７０】

上述の実施形態又は態様のいずれかにおいて、上記エピレグリン阻害剤は、抗体若しくは抗原結合断片、小分子、デコイ受容体、ＣＡＲ改変細胞、アプタマー、代替足場、又はこれらの組み合わせであってよい。

【００７１】

いくつかの実施形態では、上記抗体又は上記抗原結合断片は、抗ヒトエピレグリン抗体ＡＦ１１９５、又は抗マウス／ヒトエピレグリン抗体Ｃｌｏｎｅ＃１８９６１１であってよい。

【００７２】

いくつかの実施形態では、上記デコイ受容体は可溶性ＥｒｂＢ受容体であってよい。

【００７３】

いくつかの実施形態では、上記デコイ受容体は可溶性ＥＧＦＲであってよい。

【００７４】

いくつかの実施形態では、上記ＣＡＲ改変細胞は、エピレグリン発現樹状細胞を破壊又は殺滅し得る。

【００７５】

いくつかの実施形態では、上記ＣＡＲ改変細胞はＣＡＲ－Ｔ細胞であってよい。

【図面の簡単な説明】

【００７６】

【図１】組換えヒトエピレグリン（ｒｈＥｒｅｇ）タンパク質に対して陽性の力価を生成したＡｌｌｏｙマウスの免疫化のためのワークフローを示す。

【図２】各Ａｌｌｏｙマウス系統３頭を組換えエピレグリンタンパク質で免疫化し、３５日後にエピレグリン抗体力価を測定した。

【図３】エピレグリン免疫化Ａｌｌｏｙ　Ｍｉｘマウスからのハイブリドーマライブラリ生成及びクローニングを示す。

【図４】ヒト化エピレグリン中和抗体１（ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１）の重鎖及び軽鎖配列を示す。

【図５】ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１がヒト線維芽細胞のヒトエピレグリン誘導型増殖を阻害することを示す。

【図６】ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１が全長エピレグリンタンパク質を阻害することを示す。

【図７】ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１がマウスエピレグリンと低い交差反応性を有することを示す。

【図８】ヒト化エピレグリン抗体が他のＥＧＦＲリガンドを中和しないことを示す。

【図９Ａ】図９Ａ～９Ｉは、ＥＧＦＲの活性化によって、ＳＳｃ皮膚及び肺の病原性線維芽細胞がマーキングされることを示す。５人のびまん性皮膚ＳＳｃ患者、及び５人の健康な対照からのｓｃＲＮＡ－ｓｅｑデータの、一様多様体近似投影（Ｕｎｉｆｏｒｍ　Ｍａｎｉｆｏｌｄ　Ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｒｏｊｅｃｔｉｏｎ：ＵＭＡＰ）による埋め込み。

【図９Ｂ】図９Ａの続き

【図９Ｃ】ＳＳｃ線維芽細胞（Ｆｉｂ）及び周皮細胞（ＰＣ）における、有意に上方制御されたコラーゲン遺伝子発現のヒートマップ。

【図９Ｄ】線維芽細胞（Ｆｉｂ）及び周皮細胞（ＰＣ）クラスタにおける、上方制御され

たＳＳｃ遺伝子によって識別された、遺伝子オントロジープロセス。
【図９Ｅ】（図９Ａ）と同様にクラスタリングされた、ＵＭＡＰ埋め込みデータにおけるＥＧＦＲの発現。
【図９Ｆ】ＳＳｃ　ＥＧＦＲ陰性線維芽細胞及び健康な対照線維芽細胞と比較した、ＳＳｃ　ＥＧＦＲ発現線維芽細胞における有意に上方制御された遺伝子のヒートマップ。
【図９Ｇ】ＳＳｃと健康な線維芽細胞との遺伝子発現を対比させた、ｔ分布型確率的近傍埋め込み法（ｔ－ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｅｄ　ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ　ｎｅｉｇｈｂｏｒ　ｅｍｂｅｄｄｉｎｇ：ｔ－ＳＮＥ）によるプロット。
【図９Ｈ】ＳＳｃの皮膚及び肺、並びに健康な皮膚及び肺を、Ｙ１０６８のリン酸化ＥＧＦＲに対する抗体で染色した。
【図９Ｉ】各条件におけるｐＥＧＦＲ＋細胞の数（それぞれｎ＝３スライド、スライド１枚あたり１０個の高倍率視野（ｈｉｇｈ　ｐｏｗｅｒ　ｆｉｅｌｄ：ｈｐｆ））。
【図１０Ａ】図１０Ａ～１０Ｇは、エピレグリン$^{+}$樹状細胞がヒト皮膚及び肺線維症に蓄積されることを示す。ＳＳｃ皮膚及び少なくとも２つの肺ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータセットにおける、富化された受容体－リガンドペアのサンキーダイアグラム。
【図１０Ｂ】皮膚ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータ（ＳＳｃ　ｓｋｉｎ　２（１５））、ケロイド皮膚（１４）、及び肺線維症研究（ＳＳｃ肺１（４１）、２（４２）、３（３３））における、ＥＲＥＧ、ＡＲＥＧ、及びＨＢＥＧＦとＥＧＦＲとの相互作用のＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢランク（調整されたｐ値）のプロット。
【図１０Ｃ】図９Ａと同じクラスタを用いたＵＭＡＰ埋め込みデータにおけるエピレグリンの発現。
【図１０Ｄ】エピレグリン$^{-}$細胞（陰性）と比較した、ＳＳＣと健康なエピレグリン発現骨髄ＡＰＣ（陽性）とを対比させた樹状細胞マーカー発現のヒートマップ。
【図１０Ｅ】エピレグリンに対する抗体で染色されたＳＳｃの及び健康な対象のサンプルからの、真皮及び肺の顕微鏡写真。矢印は陽性細胞を示す。
【図１０Ｆ】ＳＳｃ真皮及び肺のエピレグリン$^{+}$細胞の個数（それぞれｎ＝３スライド、スライド１枚あたり１０個の高倍率視野（ｈｐｆ））。
【図１０Ｇ】リン酸化ＥＧＦＲ（ｐＥＧＦＲ）及びエピレグリン（Ｅｒｅｇ）に対して染色したＳＳｃの及び健康な皮膚及び肺の免疫蛍光。
【図１１Ａ】図１１Ａ～１１Ｇは、マウス皮膚及び肺線維化中にエピレグリンが明確な発現パターンを有することを示す。Ｂ６マウスに０．２ｍｇのブレオマイシン（ｂｌｅｏｍｙｃｉｎ：ＢＬＭ）を皮下注射し、３週間後、皮膚をヘマトキシリン及びエオシで染色した。
【図１１Ｂ】Ｂ６マウスに０．２ｍｇのブレオマイシン（ｂｌｅｏｍｙｃｉｎ：ＢＬＭ）を皮下注射し、３週間後、皮膚をトリクロームで染色した。
【図１１Ｃ】ＣＤ３４及びＣＤ４５抗体を用いた、同じ皮膚からの免疫蛍光画像。
【図１１Ｄ】皮下ブレオマイシン（ＢＬＭ）注射後の異なる時点における皮膚のヒドロキシプロリン含有量（群あたりｎ＝３）。
【図１１Ｅ】皮下ブレオマイシン注射後の異なる時点における、ＥＣＭ遺伝子及びＥＧＦＲリガンドの$\log_2$（発現倍数変化）の平均のヒートマップ。
【図１１Ｆ】ＰＢＳ対照と比較した、皮下ブレオマイシン注射の３週間後のＭｇｌ２^{ＤＴＲｅＧＦＰｐＡＮｅｏ}マウスの線維性皮膚から単離された樹状細胞のバルクＲＮＡシーケンシング（群あたりｎ＝３）。
【図１１Ｇ】Ｂ６マウスへの気管内ブレオマイシン投与後の異なる時点における、エピレグリンの相対的発現。
【図１２Ａ】図１２Ａ～１２Ｋは、エピレグリン阻害がマウス及びヒト皮膚線維症を軽減することを示す。Ｂ６及びＥｒｅｇ$^{-/-}$マウスのコホートにブレオマイシン（ＢＬＭ）を皮下注射し、３５日後に、皮膚の厚さについて分析した。
【図１２Ｂ】Ｂ６及びＥｒｅｇ$^{-/-}$マウスのコホートにブレオマイシン（ＢＬＭ）を皮下注射し、３５日後に、皮膚の厚さについて分析した。

【図１２Ｃ】代表的な組織構造を示す。
【図１２Ｄ】ブレオマイシン注射の２１日後、マウスはエピレグリン抗体での処置を開始し、これをＰＢＳで２週間処置した対照（ＮＴ）と比較した。
【図１２Ｅ】安楽死後、皮膚を真皮の厚さに関して分析した。
【図１２Ｆ】安楽死後、皮膚をヒドロキシプロリンに関して分析した。
【図１２Ｇ】安楽死後、皮膚を遺伝子発現に関して分析した。
【図１２Ｈ】安楽死後、皮膚を遺伝子発現に関して分析した。
【図１２Ｉ】安楽死後、皮膚を組織構造に関して分析し、上段にヘマトキシリン及びエオシンでの染色、中段にトリクロームでの染色、下段にｐＥＧＦＲ免疫組織化学（ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ＩＨＣ）を示す。
【図１２Ｊ】びまん性皮膚ＳＳｃの患者の前腕からの隣接するパンチ生検を、培地のみで（ＮＴ）、又はエピレグリン中和抗体（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）を添加して、９日間培養した。挿入図は、真皮コラーゲンの更なる拡大図を示す。
【図１２Ｋ】皮膚外植片培地を、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）で、ｐｒｏ－ＣＯＬ１Ａ１分泌について分析した。
【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｉは、エピレグリン阻害がマウス及びヒト肺線維症を減少させることを示す。気管内ブレオマイシン投与の１０日後、マウスはエピレグリン抗体での２週間の処置を開始し、その後安楽死させられた。
【図１３Ｂ】肺を、組織構造に関して分析した。
【図１３Ｃ】肺を、修正Ａｓｈｃｒｏｆｔスコアに関して分析した。
【図１３Ｄ】肺を、ヒドロキシプロリンに関して分析した。
【図１３Ｅ】肺を、エピレグリン遺伝子発現に関して分析した。
【図１３Ｆ】死亡した家族性特発性肺線維症患者ドナーから摘出された新鮮な肺組織を、組織学的染色のために処理すると、矢印で示すように、線維芽細胞巣形成、及び肺胞ＩＩ型上皮細胞の過形成が示された（上パネルはヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）、下パネルはトリクローム、スケールバー５０μｍ）。
【図１３Ｇ】示されている遺伝子の相対的発現。
【図１３Ｈ】示されている遺伝子の相対的発現
【図１３Ｉ】ＥＬＩＳＡで測定された、示されている遺伝子のタンパク質分泌。
【図１４Ａ】図１４Ａ～１４Ｉは、Ｉ型インターフェロンがＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣと線維芽細胞との間のＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ回路を誘導することを示す。ＴＨＰ－１単球を、示されている各サイトカインと共にインキュベートしたときの、エピレグリンの発現の倍数変化。
【図１４Ｂ】ＩＦＮα２と共にインキュベートした後の、新鮮な単離された末梢血ＣＤ１４$^{+}$単球からのエピレグリンの発現の倍数変化。
【図１４Ｃ】ＩＦＮα２と共にインキュベートした後の、ＣＤ１ｃ$^{+}$樹状細胞前駆細胞からのエピレグリンの発現の倍数変化。
【図１４Ｄ】ＩＦＮα２と共にインキュベートした後の、培養されたヒト骨髄由来樹状細胞（ｂｏｎｅ　ｍａｒｒｏｗ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌ：ＢＭＤＣ）からのエピレグリンの発現の倍数変化。
【図１４Ｅ】組換えエピレグリン（ｒＥｒｅｇ）と共にインキュベートしたヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＦ）による、ＮＯＴＣＨリガンド、受容体、及び標的遺伝子の発現の倍数変化（ｎ＝５）。
【図１４Ｆ】ＮＯＴＣＨリガンドＤＬＬ４への曝露前にＩＦＮα２でプライミングされたＢＭＤＣによるエピレグリンの相対的発現（各群において１つの時点あたりｎ＝３～４）。
【図１４Ｇ】ＨＦＦによるＥＧＦＲリガンドの相対的発現（ｎ＝３）
【図１４Ｈ】ＨＦＦを培地のみで（ＮＴ）又はエピレグリン中和抗体（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）と共にインキュベートしたときの細胞外マトリックス（ＥＣＭ）遺伝子発現の変化
【図１４Ｉ】単球由来ＤＣ３と線維芽細胞との間のエピレグリン－ＮＯＴＣＨ回路のモデル。

【図１５Ａ】図１５Ａ－１５Ｆは、Ｉ型インターフェロン－ＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ軸の阻害が、インビボで線維症を予防することを示す。Ｂ６マウスにブレオマイシンを皮下注射した後、２週目に、Ｉｆｎａｒ１遮断抗体（Ｉｆｎａｒ１　Ａｂ）、アイソタイプ対照抗体（ｉｓｏ）、又はＰＢＳ（ＮＴ）を腹腔内注射した。
【図１５Ｂ】３週目に、皮膚を、組織構造に関して分析した。
【図１５Ｃ】３週目に、皮膚を、真皮の厚さに関して分析した。
【図１５Ｄ】３週目に、皮膚を、ヒドロキシプロリンに関して分析した。
【図１５Ｅ】３週目に、皮膚を、遺伝子発現に関して分析した
【図１５Ｆ】３週目に、皮膚を、遺伝子発に関して分析した。
【図１６Ａ】図１６Ａ～１６Ｄは、ＳＳｃ皮膚の細胞クラスタシグネチャー遺伝子及び免疫染色を示す。主要な細胞クラスタ及びシグネチャー遺伝子。健康な対照及びＳＳｃサンプルの集計されたｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータにおける、クラスタあたり上位１０個の上方制御された遺伝子の遺伝子発現の$\log_2$（倍数変化）のヒートマップ。
【図１６Ｂ】主要な細胞クラスタ及びシグネチャー遺伝子。健康な対照及びＳＳｃサンプルの集計されたｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータにおける、クラスタあたり上位１０個の上方制御された遺伝子の遺伝子発現の$\log_2$（倍数変化）のヒートマップ。
【図１６Ｃ】健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺を、ウサギＩｇＧアイソタイプ対照抗体で染色して、抗ヒトｐＥＧＦＲについて図９Ｈに示されているシグナルと比較した。
【図１６Ｄ】ＳＳｃの及び健康な皮膚の、ｐＥＧＦＲ及び間葉系マーカーであるビメンチンでの免疫染色（倍率２０倍、スケールバー１００μｍ）。
【図１７Ａ】図１７Ａ～１７Ｃは、健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺の低倍率画像を示す。健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺を、組織構造について、ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。
【図１７Ｂ】健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺を、組織構造について、ｐＥＧＦＲ　Ｔｙｒ－１０６８で染色した。
【図１７Ｃ】健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺を、組織構造について、エピレグリンで染色した。
【図１８Ａ】図１８Ａ～１８Ｄは、ＥＲＥＧ　ＤＣマーカー発現及び免疫表現型解析を示す。ＳＳｃ皮膚中の、富化された受容体－リガンド成長因子ペアの図。
【図１８Ｂ】健康な及びＳＳｃの冷凍皮膚の全組織からの、上皮成長因子（ＥＧＦ）、因子α（ＴＧＦＡ）、ベータセルリン（ＢＴＣ）、ＥＲＥＧ、アンフィレグリン（ＡＲＥＧ）、ヘパリン結合上皮成長因子（ＥＧＦ）様成長因子（ＨＢＥＧＦ）、及びエピゲン（ＥＰＧＮ）の相対的発現（群あたりｎ＝３）。
【図１８Ｃ】健康な参加者から単離された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、適応細胞マーカー及び骨髄細胞マーカーと共にエピレグリンについて染色し、ＦＡＣＳで分析した。
【図１８Ｄ】ＱＣＤ１４１$^+$染色による、全てのＣＤ１ｃ$^+$細胞を含むｃＤＣ２とｃＤＣ１とを含むエピレグリン$^+$細胞間でのＤＣサブセットの定量。
【図１９Ａ】図１９Ａ～１９Ｃは、Ｅｒｅｇ$^{-/-}$マウスが野生型と同様に皮膚線維症を発症することを示す。
【図１９Ｂ】（図１９Ａ）に示されているように、Ｂ６及びＥｒｅｇ$^{-/-}$マウスのコホートにブレオマイシンを皮下注射し、２１日後にヒドロキシプロリンについて分析した。
【図１９Ｃ】（図１９Ａ）に示されているように、Ｂ６及びＥｒｅｇ$^{-/-}$マウスのコホートにブレオマイシンを皮下注射し、２１日後に組織構造について分析した。
【図２０】ＮＯＴＣＨリガンド腎芽腫過剰発現（ｎｅｐｈｒｏｂｌａｓｔｏｍａ　ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｅｄ：ＮＯＶ）がＢＭＤＣにおいてエピレグリン発現を誘導することを示す。
【図２１Ａ】図２１Ａ～２１Ｃは、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１が、硬化性ＧｖＨＤ皮膚外植片中の線維症マーカーを減少させることを示す。２人のｓＧｖＨＤの患者の右腕及び左腹部からの皮膚生検のペアを、２．５ｍｇ／ｍｌのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１又はアイソタイプ対照ＩｇＧ１抗体と共に、１０日間インキュベートした。患者の線維性皮膚。

【図２１Ｂ】培地を４８時間毎に交換し、上清中の線維性タンパク質マーカーのレベルを、ＥＬＩＳＡ（Ａｂｃａｍ ｋｉｔｓ ａｂ２１３８３１、ａｂ２１０９６６、ａｂ２１９０４６、ａｂ１８７３９４、ａｂ１７９８８６）によって定量した。
【図２１Ｃ】図２１Ｂの続き。
【図２２Ａ】図２２Ａ～２２Ｂは、健康な対照と比較した、及び修正Ｒｏｄｎａｎスキンスコア（ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｒｏｄｎａｎ Ｓｋｉｎ Ｓｃｏｒｅ：ｍＲＳＳ）と比較した、ＳＳｃにおけるＥＲＥＧの発現の分析を示す。結果は、健康な対照に比べてＳＳｃの皮膚のＥＲＥＧ＋細胞の数が増加していることを示している。
【図２２Ｂ】結果は、ＥＲＥＧ発現が、修正Ｒｏｄｎａｎスキンスコア（ｍＲＳＳ）による疾患の重症度と有意な正の相関を示したことを示している。
【発明を実施するための形態】
【００７７】
図１及び２は、組換えヒトエピレグリンタンパク質に対して陽性の力価を生成したＡｌｌｏｙマウスの免疫化のためのワークフローを示す。各Ａｌｌｏｙマウス系統３頭を組換えエピレグリンタンパク質で免疫化し、３５日後にエピレグリン抗体力価を測定した。個々の混合マウス系統及びＢ６マウス系統から得られた力価が、丸で囲まれている。
【００７８】
図３は、エピレグリン免疫化Ａｌｌｏｙ Ｍｉｘマウスからのハイブリドーマライブラリ生成及びクローニングを示す。ハイブリドーマライブラリからの上清は、酵素結合免疫吸着検定法（ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ ａｓｓａｙ：ＥＬＩＳＡ）により、エピレグリン結合抗体を示す。１本の線は、免疫化マウス血清の１／１０００希釈物から得られた結果を示し、別の線は、未希釈のハイブリドーマライブラリ上清から得られた結果を示す。ハイブリドーマ細胞を個別にプレーティングし、これにより、ＥＬＩＳＡによりエピレグリン結合抗体を含有する上清を含む５つのウェルが得られた。これらをハイライトし、Ｍ１～Ｍ５のラベルを付与した。
【００７９】
図４は、ヒト化エピレグリン中和抗体１（ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１）の重鎖及び軽鎖配列を示す。相補性決定領域１～３（ＣＤＲ１～３）は太字で示されている。
【００８０】
図５は、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１がヒト線維芽細胞のヒトエピレグリン誘導型増殖を阻害することを示す。ヒト包皮線維芽細胞（ｈｕｍａｎ ｆｏｒｅｓｋｉｎ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ：ＨＦＦ）を、１％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で、組換えヒトエピレグリン（ｒｈＥｒｅｇ）と共にインキュベートした。１つのｒｈＥｒｅｇ濃度につき、ｎ＝３であった（左パネル）。ＨＦＦを、１００ｎｇ／ｍｌのｒｈＥｒｅｇを含有する培地中で、市販のラット抗ヒト／マウスエピレグリン抗体（中央パネル）又はｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１（右パネル）と共にインキュベートした。１つの抗体濃度につき、ｎ＝４（中央パネル）、ｎ＝６（右パネル）であった。データ点は平均及び標準誤差を表し、これらはシグモイド標準曲線からの補間によってフィッティングされた。増殖は、３日目にＳｙｎｅｒｇｙ ＨＴＸプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ）上でのＣｙＱＵＡＮＴ Ｄｉｒｅｃｔ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）蛍光によって測定した。
【００８１】
図６は、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１が全長エピレグリンタンパク質を阻害することを示す。外因性上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）リガンドの不在下で、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１の濃度を上昇させながら、ＨＦＦをインキュベートした。
【００８２】
図７は、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１がマウスエピレグリンと低い交差反応性を有することを示す。ＨＦＦを、組換えマウスエピレグリン（ｒｍＥｒｅｇ）と共に３日間インキュベートした（左パネル）。ＨＦＦを、１００ｎｇ／ｍｌのｒｍＥｒｅｇを含有する培地中で、

ラット抗ヒト／マウスエピレグリン抗体（中央パネル）又はｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１（右パネル）と共にインキュベートした。１つの抗体濃度につき、ｎ＝４（中央パネル）、ｎ＝６（右パネル）であった。データ点は平均及び標準誤差を表し、これらはシグモイド標準曲線からの補間によってフィッティングされた。

【００８３】

図８は、ヒト化エピレグリン抗体が他のＥＧＦＲリガンドを中和しないことを示す。ＨＦＦを、５ｍｇ／ｍｌのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１のみ、及び０．１ｎｇ／ｍｌ、１ｎｇ／ｍｌ、及び１０ｎｇ／ｍｌの組換えＥＧＦＲリガンドと共に、３日間インキュベートした後、定量した。

【００８４】

図９Ａ～９Ｉは、ＥＧＦＲの活性化によって、ＳＳｃ皮膚及び肺の病原性線維芽細胞がマーキングされることを示す。（図９Ａ～９Ｂ）５人のびまん性皮膚ＳＳｃ患者、及び５人の健康な対照からのｓｃＲＮＡ－ｓｅｑデータの、一様多様体近似投影（Ｕｎｉｆｏｒｍ　Ｍａｎｉｆｏｌｄ　Ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｒｏｊｅｃｔｉｏｎ：ＵＭＡＰ）による埋め込み。（図９Ｃ）ＳＳｃ線維芽細胞（Ｆｉｂ）及び周皮細胞（ＰＣ）における、有意に上方制御されたコラーゲン遺伝子発現のヒートマップ。（図９Ｄ）線維芽細胞（Ｆｉｂ）及び周皮細胞（ＰＣ）クラスタにおける、上方制御されたＳＳｃ遺伝子によって識別された、遺伝子オントロジープロセス。（図９Ｅ）（図９Ａ）と同様にクラスタリングされた、ＵＭＡＰ埋め込みデータにおけるＥＧＦＲの発現。（図９Ｆ）ＳＳｃ　ＥＧＦＲ陰性線維芽細胞及び健康な対照線維芽細胞と比較した、ＳＳｃ　ＥＧＦＲ発現線維芽細胞における有意に上方制御された遺伝子のヒートマップ。（図９Ｇ）ＳＳｃと健康な線維芽細胞との遺伝子発現を対比させた、ｔ分布型確率的近傍埋め込み法（ｔ－ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｅｄ　ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ　ｎｅｉｇｈｂｏｒ　ｅｍｂｅｄｄｉｎｇ：ｔ－ＳＮＥ）によるプロット。（図９Ｈ）ＳＳｃの皮膚及び肺、並びに健康な皮膚及び肺を、Ｙ１０６８のリン酸化ＥＧＦＲに対する抗体で染色した。画像の倍率は４０倍であり、スケールバーは４０μｍである。（図９Ｉ）各条件におけるｐＥＧＦＲ＋細胞の数（それぞれｎ＝３スライド、スライド１枚あたり１０個の高倍率視野（ｈｉｇｈ　ｐｏｗｅｒ　ｆｉｅｌｄ：ｈｐｆ））。（図９Ｃ及び図９Ｆ）のヒートマップは、＊＝Ｐ＜０．０５、＊＊＝Ｐ＜０．０１、＊＊＊＝Ｐ＜０．００１の$\log_2$（倍数変化）であり、多重検定のＢｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ補正を用いて調整されている。（図１Ｉ）データは、対応のない両側スチューデントｔ検定で分析された平均±ＳＤ（ｎｓ、ｎｏｔ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ（有意ではない）、＊Ｐ＜０．０５、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である。

【００８５】

図１０Ａ～１０Ｇは、エピレグリン$^+$樹状細胞がヒト皮膚及び肺線維症に蓄積されることを示す。（図１０Ａ）ＳＳｃ皮膚及び少なくとも２つの肺ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータセットにおける、富化された受容体－リガンドペアのサンキーダイアグラム。リボン幅は１／（皮膚ＳＳｃデータのランク）に比例する。（図１０Ｂ）皮膚ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータ（ＳＳｃ　ｓｋｉｎ　２（１５））、ケロイド皮膚（１４）、及び肺線維症研究（ＳＳｃ肺１（４１）、２（４２）、３（３３））における、ＥＲＥＧ、ＡＲＥＧ、及びＨＢＥＧＦとＥＧＦＲとの相互作用のＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢランク（調整されたｐ値）のプロット。各サンプルについて、データはＨＢＥＧＦ、ＡＲＥＧ、ＥＲＥＧの順で示されている。点線はランク＝０．０５を示す。（図１０Ｃ）図９Ａと同じクラスタを用いたＵＭＡＰ埋め込みデータにおけるエピレグリンの発現。（図１０Ｄ）エピレグリン$^-$細胞（陰性）と比較した、ＳＳＣと健康なエピレグリン発現骨髄ＡＰＣ（陽性）とを対比させた樹状細胞マーカー発現のヒートマップ。（図１０Ｅ）エピレグリンに対する抗体で染色されたＳＳｃの及び健康な被験者のサンプルからの、真皮及び肺の顕微鏡写真。矢印は陽性細胞を示す。（図１０Ｆ）ＳＳｃ真皮及び肺のエピレグリン$^+$細胞の個数（それぞれｎ＝３スライド、スライド１枚あたり１０個の高倍率視野（ｈｐｆ））。（図１０Ｇ）リン酸化ＥＧＦＲ（ｐＥＧＦＲ）及びエピレグリン（Ｅｒｅｇ）に対して染色したＳＳｃの及び健康

な皮膚及び肺の免疫蛍光。破線は線維性真皮の領域を表す。画像の倍率は４０倍であり、スケールバーは４０μｍである。データは、対応のない両側スチューデントｔ検定で分析された平均±ＳＤ（＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である。

【００８６】

図１１Ａ～１１Ｇは、マウス皮膚及び肺線維化中にエピレグリンが明確な発現パターンを有することを示す。（図１１Ａ～１１Ｃ）Ｂ６マウスに０．２ｍｇのブレオマイシン（ｂｌｅｏｍｙｃｉｎ：ＢＬＭ）を皮下注射し、３週間後、皮膚をヘマトキシリン及びエオシン（図１１Ａ）、並びにトリクローム（図１１Ｂ）で染色した。組織構造において、表皮（ｅｐｉ）、真皮（ｄｅｒｍｉｓ）、及び真皮白色脂肪組織（ｄｅｒｍａｌ　ｗｈｉｔｅ　ａｄｉｐｏｓｅ　ｔｉｓｓｕｅ：ＤＷＡＴ）が強調されている。（図１１Ｃ）ＣＤ３４及びＣＤ４５抗体を用いた、同じ皮膚からの免疫蛍光画像。（図１１Ｄ）皮下ブレオマイシン注射後の異なる時点における皮膚のヒドロキシプロリン含有量（群あたりｎ＝３）。（図１１Ｅ）皮下ブレオマイシン注射後の異なる時点における、ＥＣＭ遺伝子及びＥＧＦＲリガンドの$\log_2$（発現倍数変化）の平均のヒートマップ。１つの時点あたりｎ＝３。（図１１Ｆ）ＰＢＳ対照と比較した、皮下ブレオマイシン注射の３週間後のＭｇｌ２ＤＴＲｅＧＦＰｐＡＮｅｏマウスの線維性皮膚から単離された樹状細胞のバルクＲＮＡシーケンシング（群あたりｎ＝３）。（図１１Ｇ）Ｂ６マウスへの気管内ブレオマイシン投与後の異なる時点における、エピレグリンの相対的発現。データは、Ｔｕｋｅｙ多重比較検定を用いた１元配置分散分析（ｏｎｅ－ｗａｙ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｖａｒｉａｎｃｅ：ＡＮＯＶＡ）によって分析された平均±ＳＤ（＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１）である（図１１Ｄ、図１１Ｅ、及び図１１Ｇ）。

【００８７】

図１２Ａ～１２Ｋは、エピレグリン阻害がマウス及びヒト皮膚線維症を軽減することを示す。（図１２Ａ～１２Ｃ）（図１２Ａ）に示されているように、Ｂ６及びＥｒｅｇ$^{-}$／$^{-}$マウスのコホートにブレオマイシンを皮下注射し、３５日後に、皮膚の厚さ（図１２Ｂ）について分析した。代表的な組織構造を（図１２Ｃ）に示す。（図１２Ｄ～１２Ｋ）（図１２Ｄ）に示されているように、ブレオマイシン注射の２１日後、マウスはエピレグリン抗体での処置を開始し、これをＰＢＳで２週間処置した対照（ＮＴ）と比較した。安楽死後、皮膚を真皮の厚さ（図１２Ｅ）、ヒドロキシプロリン（図１２Ｆ）、遺伝子発現（図１２Ｇ～１２Ｈ）、及び組織構造（図１２Ｉ）に関して分析し、図１２Ｉでは上段にヘマトキシリン及びエオシンでの染色、中段にトリクロームでの染色、下段にｐＥＧＦＲ免疫組織化学（ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ＩＨＣ）を示す。ｎ＝８（ＰＢＳ）、１１（ＢＬＭ）、及び１２（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）。（図１２Ｊ）びまん性皮膚ＳＳｃの患者の前腕からの隣接するパンチ生検を、培地のみで（ＮＴ）、又はエピレグリン中和抗体（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）を添加して、９日間培養した。挿入図は、真皮コラーゲンの更なる拡大図を示す。（図１２Ｋ）皮膚外植片培地を、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）で、ｐｒｏ－ＣＯＬ１Ａ１分泌について分析した。組織構造及び免疫組織化学（ＩＨＣ）画像の倍率は、それぞれ２０倍及び４０倍である。データは、Ｔｕｋｅｙ多重比較検定を用いた１元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）（図１２Ｂ及び図１２Ｅ～１２Ｈ）、並びに対応のある両側スチューデントｔ検定（図１２Ｋ）で分析された、平均±ＳＤ（ｎｓ、ｎｏｔ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ（有意ではない）、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である。

【００８８】

図１３Ａ～１３Ｉは、エピレグリン阻害がマウス及びヒト肺線維症を減少させることを示す。（図１３Ａ～１３Ｅ）（図１３Ａ）に示されているように、気管内ブレオマイシン投与の１０日後、マウスはエピレグリン抗体での２週間の処置を開始し、その後安楽死させられた。肺を、組織構造（図１３Ｂ）、修正Ａｓｈｃｒｏｆｔスコア（図１３Ｃ）、ヒドロキシプロリン（図１３Ｄ）、及びエピレグリン遺伝子発現（図１３Ｅ）に関して分析した。ｎ＝６（ＰＢＳ）、１１（ＢＬＭ）、及び７（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）。（図１３Ｂ）の組織構造画像は、倍率１０倍、スケールバー２００μｍであり、ＩＨＣ画像は、倍率４０

倍、スケールバー４０μｍである。（図１３Ｆ～１３Ｉ）死亡した家族性特発性肺線維症患者ドナーから摘出された新鮮な肺組織を、組織学的染色のために処理すると、矢印で示すように、線維芽細胞巣形成、及び肺胞ＩＩ型上皮細胞の過形成が示された（上パネルはヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）、下パネルはトリクローム、スケールバー５０μｍ）。同じ組織を立方体に切断し、多種キナーゼ阻害剤ニンテダニブ０．１μＭ（Ｎｉｎ）、Ａｌｋ５阻害剤Ａ－１５４４０３３（ＩＮ－１１３０）１０μＭ（Ａｌｋ５ｉ）、エピレグリン抗体２．５μｇ／ｍｌ（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）、又は未処置のビヒクル対照（ＮＴ）の存在下で１０日間培養した。（図１３Ｇ～１３Ｉ）示されている遺伝子の相対的発現。群あたりｎ＝４。（図１３Ｉ）ＥＬＩＳＡで測定された、示されている遺伝子のタンパク質分泌。群あたりｎ＝８。シグナルが弱いＥＬＩＳＡサンプルと、α＝０．０５のＧｒｕｂｂｓ検定で特定されたｑＰＣＲ外れ値とは、除外された。データは、Ｔｕｋｅｙ多重比較検定（図１３Ｃ～１３Ｅ）及びＤｕｎｎｅｔｔ多重比較検定（図１３Ｇ～１３Ｉ）を用いた１元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）で分析された平均±ＳＤ（ｎｓ、ｎｏｔ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ（有意ではない）、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である。

【００８９】

図１４Ａ～１４Ｉは、Ｉ型インターフェロンがＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣと線維芽細胞との間のＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ回路を誘導することを示す。（図１４Ａ）ＴＨＰ－１単球を、示されている各サイトカインと共にインキュベートしたときの、エピレグリンの発現の倍数変化。（図１４Ｂ－１４Ｄ）ＩＦＮα２と共にインキュベートした後の、新鮮な単離された末梢血ＣＤ１４$^{+}$単球（図１４Ｂ）、及びＣＤ１ｃ$^{+}$樹状細胞前駆細胞（図１４Ｃ）、又は培養されたヒト骨髄由来樹状細胞（ｂｏｎｅ　ｍａｒｒｏｗ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌ：ＢＭＤＣ）（図１４Ｄ）からのエピレグリンの発現の倍数変化。（図１４Ｅ）組換えエピレグリン（ｒＥｒｅｇ）と共にインキュベートしたヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＦ）による、ＮＯＴＣＨリガンド、受容体、及び標的遺伝子の発現の倍数変化（ｎ＝５）。（図１４Ｆ）ＮＯＴＣＨリガンドＤＬＬ４への曝露前にＩＦＮα２でプライミングされたＢＭＤＣによるエピレグリンの相対的発現（各群において１つの時点あたりｎ＝３～４）。統計は各群±ＤＬＬ４を比較する。（図１４Ｇ）ＨＦＦによるＥＧＦＲリガンドの相対的発現（ｎ＝３）。３ポイント未満の遺伝子は検出可能レベル未満であった。（図１４Ｈ）ＨＦＦを培地のみで（ＮＴ）又はエピレグリン中和抗体（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）と共にインキュベートしたときの細胞外マトリックス（ＥＣＭ）遺伝子発現の変化。ＦＮ^{ＥＤＡ}は、フィブロネクチンのエクストラドメインＡ含有アイソフォームを指す（ｎ＝５）。（図１４Ｉ）単球由来ＤＣ３と線維芽細胞との間のエピレグリン－ＮＯＴＣＨ回路のモデル。データは、対応のない両側スチューデントｔ検定（図１４Ａ～１４Ｆ及び図１４Ｈ）、並びにＴｕｋｅｙ多重比較検定を用いた１元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）（図１４Ｇ）で分析された、平均±ＳＤ（ｎｓ、ｎｏｔ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ（有意ではない）、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である。

【００９０】

図１５Ａ－１５Ｆは、Ｉ型インターフェロン－ＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ軸の阻害が、インビボで線維症を予防することを示す。（図１５Ａ）に示されているように、Ｂ６マウスにブレオマイシンを皮下注射した後、２週目に、Ｉｆｎａｒ１遮断抗体（Ｉｆｎａｒ１　Ａｂ）、アイソタイプ対照抗体（ｉｓｏ）、又はＰＢＳ（ＮＴ）を腹腔内注射した。３週目に、皮膚を、組織構造（図１５Ｂ）、真皮の厚さ（図１５Ｃ）、ヒドロキシプロリン（図１５Ｄ）、及び遺伝子発現（図１５Ｅ～１５Ｆ）に関して分析した。データは２つの別個の実験から集計されており、ＮＴ群とｉｓｏ対照群との間には有意差は見られなかったため、分かりやすくするためにこれらは統合された。データは、Ｔｕｋｅｙ多重比較検定を用いた１元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）で分析された、平均±ＳＤ（ｎｓ、ｎｏｔ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ（有意ではない）、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である（図１５Ｃ～１５Ｆ）。

【００９１】
図１６Ａ～１６Ｄは、ＳＳｃ皮膚の細胞クラスタシグネチャー遺伝子及び免疫染色を示す。（図１６Ａ～１６Ｂ）主要な細胞クラスタ及びシグネチャー遺伝子。健康な対照及びＳＳｃサンプルの集計されたｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータにおける、クラスタあたり上位１０個の上方制御された遺伝子の遺伝子発現の$\log_2$（倍数変化）のヒートマップ。（図１６Ｃ）健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺を、ウサギＩｇＧアイソタイプ対照抗体で染色して、抗ヒトｐＥＧＦＲについて図９Ｈに示されているシグナルと比較した。（図１６Ｄ）ＳＳｃの及び健康な皮膚の、ｐＥＧＦＲ及び間葉系マーカーであるビメンチンでの免疫染色（倍率２０倍、スケールバー１００μｍ）。

【００９２】
図１７Ａ～１７Ｃは、健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺の低倍率画像を示す。健康な及びＳＳｃの皮膚及び肺を、組織構造について、ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）（図１７Ａ）、ｐＥＧＦＲ　Ｔｙｒ－１０６８（図１７Ｂ）、並びにエピレグリン（図１７Ｃ）で染色した。破線のボックスは、図９及び図１０に示されている皮膚の高倍率画像の位置をラベリングしたものである。スライドは倍率１０倍のＫｅｙｅｎｃｅ　ＢＺ－Ｘ８００顕微鏡で撮像され、同社のソフトウェアを用いてスティッチングされた。スケールバーは５００μｍである。

【００９３】
図１８Ａ～１８Ｄは、ＥＲＥＧ　ＤＣマーカー発現及び免疫表現型解析を示す。（図１８Ａ）ＳＳｃ皮膚中の、富化された受容体－リガンド成長因子ペアの図。（図１８Ｂ）健康な及びＳＳｃの冷凍皮膚の全組織からの、上皮成長因子（ＥＧＦ）、因子α（ＴＧＦＡ）、ベータセルリン（ＢＴＣ）、ＥＲＥＧ、アンフィレグリン（ＡＲＥＧ）、ヘパリン結合上皮成長因子（ＥＧＦ）様成長因子（ＨＢＥＧＦ）、及びエピゲン（ＥＰＧＮ）の相対的発現（群あたりｎ＝３）。（図１８Ｃ）健康な参加者から単離された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、適応細胞マーカー及び骨髄細胞マーカーと共にエピレグリンについて染色し、ＦＡＣＳで分析した。ゲーティングにより、生きた$CD45^+$細胞、続いてエピレグリン$^+$$lin^-$（ＣＤ３／ＣＤ２０／ＣＤ６６ｂ／ＮＫｐ４６）細胞が示され、Ｔ細胞、Ｂ細胞、顆粒球、及びＮＫ細胞が除外される。データは２人の健康な参加者からの代表値である。（図１８Ｄ）ＱＣＤ１４１$^+$染色による、全ての$CD1c^+$細胞を含むｃＤＣ２とｃＤＣ１とを含むエピレグリン$^+$細胞間でのＤＣサブセットの定量。データは、対応のない両側スチューデントｔ検定（図１８Ｂ）、及びＴｕｋｅｙ多重比較検定を用いた１元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）（図１８Ｄ）で分析された、平均±ＳＤ（ｎｓ、ｎｏｔ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ（有意ではない）、＊Ｐ＜０．０５、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１）である。

【００９４】
図１９Ａ～１９Ｃは、$Ereg^{-/-}$マウスが野生型と同様に皮膚線維症を発症することを示す。（図１９Ａ）に示されているように、Ｂ６及び$Ereg^{-/-}$マウスのコホートにブレオマイシンを皮下注射し、２１日後にヒドロキシプロリン（図１９Ｂ）及び組織構造（図１９Ｃ）について分析した。

【００９５】
図２０は、ＮＯＴＣＨリガンド腎芽腫過剰発現（ｎｅｐｈｒｏｂｌａｓｔｏｍａ　ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｅｄ：ＮＯＶ）がＢＭＤＣにおいてエピレグリン発現を誘導することを示す。ＮＯＴＣＨリガンドＮＯＶへの曝露前にＩＦＮα２で処理したＢＭＤＣによる、エピレグリンの相対的発現（各群において１つの時点あたりｎ＝３～４）。

【００９６】
図２１Ａ～２１Ｃは、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１が、硬化性ＧｖＨＤ皮膚外植片中の線維症マーカーを減少させることを示す。２人のｓＧｖＨＤの患者の右腕及び左腹部からの皮膚生検のペアを、２．５ｍｇ／ｍｌのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１又はアイソタイプ対照ＩｇＧ１抗体と共に、１０日間インキュベートした。（図２１Ａ）患者の線維性皮膚。（図２１Ｂ－２１Ｃ）培地を４８時間毎に交換し、上清中の線維性タンパク質マーカーのレベルを、

ＥＬＩＳＡ（Ａｂｃａｍ ｋｉｔｓ ａｂ２１３８３１、ａｂ２１０９６６、ａｂ２１９０４６、ａｂ１８７３９４、ａｂ１７９８８６）によって定量した。

【００９７】

図２２Ａ～２２Ｂは、健康な対照と比較した、及び修正Ｒｏｄｎａｎスキンスコア（ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｒｏｄｎａｎ Ｓｋｉｎ Ｓｃｏｒｅ：ｍＲＳＳ）と比較した、ＳＳｃにおけるＥＲＥＧの発現の分析を示す。結果は、健康な対照に比べてＳＳｃの皮膚のＥＲＥＧ＋細胞の数が増加していること（図２２Ａ）、及びＥＲＥＧ発現が、修正Ｒｏｄｎａｎスキンスコア（ｍＲＳＳ）による疾患の重症度と有意な正の相関を示したこと（図２２Ｂ）を示している。

【００９８】

全身性硬化症（ＳＳｃ／強皮症）は、皮膚及び内臓の線維症を引き起こす自己免疫疾患である。持続性の線維症を引き起こす分子シグナルは十分に解明されていない。本開示は、免疫－間葉系シグナル伝達回路がＳＳｃ関連皮膚及び肺線維症の根底にあるという仮説、及び特定のリガンドを標的とすることにより、病原性線維芽細胞のＲＴＫ活性化を予防でき、現行の限定的な選択肢に比べて効果的で忍容性の高い治療アプローチを得ることができるという仮説によって、推し進められたものである。びまん性皮膚ＳＳｃの患者からの皮膚及び肺組織のシングルセルＲＮＡシーケンシング（ｓｓＲＮＡ－Ｓｅｑ）分析を通して、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）活性化が、両臓器の病原性線維芽細胞のマーカーとして特定された。リガンド－受容体の富化の検査により、樹状細胞由来エピレグリンが、線維芽細胞ＥＧＦＲ活性化の中心的な推進因子として特定された。マウスモデル及び患者の外植片において、エピレグリンは皮膚及び肺線維症の持続に不可欠なものであったが、これは、エピレグリン遺伝子欠損又は中和抗体によって解消できる可能性がある。機序としては、エピレグリン発現は、Ｉ型インターフェロンによって仲介されるＤＣ３の誘導状態を示すものであり、上記誘導状態は、ＥＧＦＲがＮＯＴＣＨシグナル伝達及び過剰な細胞外マトリックス産生を誘導する多細胞回路を駆動する。本明細書で開示される科学的知見は、エピレグリンが、ＳＳｃ及び他の線維性疾患における皮膚及び肺線維症を維持する重要なシグナルであることを明らかにする。

【００９９】

従って本開示の一部は：細胞内でのエピレグリンの活性の阻害と、疾患又は障害、例えば線維性疾患又は障害に関連する細胞内での１つまたは複数の変化の反転又は予防とを伴う、エピレグリン活性の１つまたは複数の阻害剤の使用を含む方法；及び細胞内でのエピレグリンの活性を阻害し、疾患又は障害、例えば線維性疾患又は障害に関連する細胞内での１つまたは複数の変化を反転させる又は予防する、例えばエピレグリン活性の１つまたは複数の阻害剤を含む組成物を開示する。また、例えば本明細書で開示されている抗体、エピレグリン活性の１つまたは複数の阻害剤、及び抗原結合断片を含む、対象の線維性疾患又は障害の処置又は予防に有用な方法及び組成物も開示される。

【０１００】

定義

特段の指示がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本出願が属する分野の当業者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。更に、本明細書に記載の方法又は材料と同様又は同等のいずれの方法又は材料を、本出願の実施にあたって使用できる。本出願の目的のために、以下の用語を定義する。

【０１０１】

本明細書中で本出願の実施形態を説明する用語「…を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、「…からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ）」及び／又は「本質的に…からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」実施形態を含むことが理解される。

【０１０２】

用語「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙ）」は、特段の指定がない限り、様々なモノマー、ポリマー、及びキメラ形態を含む免疫グロブリンの全てのアイソタイプ（例えばＩｇＧ、Ｉｇ

Ａ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、及びＩｇＹ）を指す。用語「抗体」が具体的に包含するのは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、並びにキメラ抗体及びヒト化抗体といった抗体様ポリペプチドである。免疫グロブリン分子は任意のクラス（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ１、ＩｇＭ２、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）又はサブクラスのものであってよい。

【０１０３】

用語「抗原結合断片（ａｎｔｉｇｅｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｆｒａｇｍｅｎｔ）」は、ある特定の抗原に対して結合親和性を示す可能性のある任意のタンパク質構造を指す。抗原結合断片は、酵素切断、ペプチド合成、及び組換え技法といった任意の既知の技法で生成されたものを含む。一部の抗原結合断片は、親抗体分子の抗原結合特異性を保持した、完全な抗体の一部で構成される。例えば抗原結合断片は、ある特定の抗原に結合することが知られている抗体の、少なくとも１つの可変領域（重鎖若しくは軽鎖可変領域）又は１つまたは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含んでよい。好適な抗原結合断片の例としては、限定するものではないが：Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｃ、Ｆａｂｃ、Ｆｖ分子、ｓｃＦｖ、及びジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ）等の一本鎖分子；イントラボディ；ダイアボディ；ミニボディ；直鎖状抗体；ｓｄＡｂ（ＶＬ又はＶＨ）等の単一ドメイン抗体；ラクダ科ナノボディ（ＶＨＨドメイン）；抗体断片から形成された多重特異性抗体；個々の抗体軽鎖；個々の抗体重鎖；抗体鎖又はＣＤＲと他のタンパク質とのキメラ融合；タンパク質足場；重鎖モノマー又は二量体；軽鎖モノマー又は二量体；１つの重鎖と１つの軽鎖とからなる二量体；ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインからなる１価断片；又は国際公開第２００７０５９７８２号明細書（参照によりその全体が本出願に援用される）に記載の１価抗体；ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む２価断片；本質的にＶＨドメインとＣＨ１ドメインとからなるＦｄ断片；ｄＡｂ断片；又は単離されたＣＤＲ等が挙げられる。抗原結合断片の生成には全ての抗体アイソタイプを使用できる。更に、抗原結合断片は、タンパク質足場のような、所与の関心対象の抗原に対する親和性を与えるような配向でポリペプチドセグメントを良好に組み込むことができる非抗体タンパク質フレームワークを含んでよい。句「抗体又はその抗原結合断片（ａｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｏｒ　ａｎｔｉｇｅｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｔｈｅｒｅｏｆ）」は、所与の抗原結合断片に、この句の中で言及されている抗体の１つまたは複数のアミノ酸セグメントが組み込まれていることを示すために使用できる。

【０１０４】

用語「エピトープ（ｅｐｉｔｏｐｅ）」は、抗体分子の可変領域にあるパラトープとして知られる特定の抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原が２つ以上のエピトープを有する場合もある。従って、異なる複数の抗体が、１つの抗原の異なる領域に結合して、異なる生物学的効果をもたらす場合もある。用語「エピトープ」は、Ｂ及び／又はＴ細胞が応答する抗原上の部位も指す。これはまた、抗体が結合する抗原の領域も指す。エピトープは、構造的なものとして定義される場合も、機能的なものとして定義される場合もある。機能的エピトープは一般に、構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与する残基を有する。エピトープは立体配座的なものであってもよく、即ち非直鎖状アミノ酸で構成されていてもよい。特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基といった、分子の化学的に活性の表面基である決定基を含んでよく、また特定の実施形態では、特定の３次元構造特性、及び／又は特定の電荷特性を有してもよい。

【０１０５】

用語「ポリペプチド（ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ）」又は「ペプチド（ｐｅｐｔｉｄｅ）」は、本明細書では、あらゆる種類の天然及び合成タンパク質を包含するものとして使用され、これは、あらゆる長さのタンパク質断片、融合タンパク質、及び限定するものではないが糖タンパク質を含む修飾タンパク質、並びに他のタイプの修飾タンパク質（例えばリン酸化、アセチル化、ミリストイル化、パルミトイル化、糖化、酸化、ホルミル化、アミド化、ポリグルタミル化、ＡＤＰリボシル化、ペグ化、ビオチン化等によって得られる

タンパク質）を含む。
【０１０６】
本明細書に記載のポリペプチド及びヌクレオチド配列に関する用語「パーセント配列同一性（ｐｅｒｃｅｎｔ（％）ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｉｄｅｎｔｉｔｙ）」又は「相同性（ｈｏｍｏｌｏｇｙ）」は、配列のアラインメント後に比較される参照配列中のアミノ酸又は核酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸又は核酸残基のパーセンテージとして定義される。場合によっては、保存的置換が配列の同一性の一部とみなされる。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、当該技術分野の技能の範囲内の様々な方法で達成でき、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、Ｍｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）、又はＭＵＳＣＬＥソフトウェアといった一般に公開されているソフトウェアを用いて達成できる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大限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、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定できる。しかしながら、本明細書の目的のために、％アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムＭＵＳＣＬＥ（Edgar, R.C., Nucleic Acids Research 32(5):1792－1797, 2004；Edgar, R.C., BMC Bioinformatics 5(1):113, 2004；それぞれ、参照によりその全体があらゆる目的のために本出願に援用される）を用いて生成される。
【０１０７】
本明細書中で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体（ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ）」又は「ＣＡＲ」は、細胞表面受容体であって、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及びリンパ球活性化ドメインと任意選択で１つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインとを含む細胞質ドメインを、自然界では単一の受容体上には見られない組み合わせで全て含む、細胞表面受容体を指す。これは、限定するものではないが、その細胞外ドメイン及び細胞質ドメインが、自然界では単一の受容体タンパク質上に一緒に見られることのないものである、受容体を含む。本開示のキメラ抗原受容体は、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞等のリンパ球と共に使用できる。
【０１０８】
用語「Ｔ細胞（Ｔ ｃｅｌｌ）」と「Ｔリンパ球（Ｔ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ）」とは、本明細書中では相互交換可能であり、同義語として使用される。Ｔ細胞の非限定的な例としては、ナイーブＴリンパ球、胸腺細胞、成熟Ｔリンパ球、未熟Ｔリンパ球、活性化Ｔリンパ球、又は休止期Ｔリンパ球が挙げられる。Ｔ細胞は、Ｔヘルパー（Ｔｈ）細胞、例えばＴヘルパー１（Ｔｈ１）細胞又はＴヘルパー２（Ｔｈ２）細胞であってよい。Ｔ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ；ＣＤ８＋Ｔ細胞）、ヘルパーＴ細胞（ＨＴＬ；ＣＤ４＋Ｔ細胞）、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋ＣＤ８＋Ｔ細胞、腫瘍浸潤性細胞傷害性Ｔ細胞（ＴＩＬ；ＣＤ８＋Ｔ細胞）、又はＴ細胞の他のいずれのサブクラスであってよい。更なる例示的なＴ細胞集団には、メモリーＴ細胞及びナイーブＴ細胞が含まれる。更には「ＮＫＴ細胞（ＮＫＴ ｃｅｌｌ）」も含まれ、これは、半不変のαβＴ細胞受容体、及びナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）に一般的に関連付けられている様々な分子マーカー、例えばＮＫ１．１を発現する、特殊なＴ細胞集団で構成される。ＮＫＴ細胞は、$NK1.1^-$及び$NK1.1^+$、並びに$CD4^-$、$CD4^+$、$CD8^-$、及び$CD8^+$細胞を含む。ＮＫＴ細胞上のＴ細胞受容体（Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＴＣＲ）は、主要組織適合性複合体Ｉ（ＭＨＣ－Ｉ）様分子ＣＤ Ｉｄによって提示される糖脂質抗原を認識するという点で、独特なものである。また、「ガンマ－デルタＴ細胞（γδＴ細胞）」も含まれ、これは表面上に独特なＴＣＲを有する特殊なＴ細胞のサブセットを指すことができ、また、ＴＣＲがα－及びβ－ＴＣＲ鎖と呼ばれる２つの糖タンパク質鎖で構成される大半のＴ細胞とは異なり、γδＴ細胞のＴＣＲはγ－鎖及びδ－鎖で構成される。γδＴ細胞は免疫監視及び免疫調節に寄与でき、またＩＬ－１７の重要な供給源となって、強力なＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導する可能性がある。また、「制御性Ｔ細胞（ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌ）」又は「Ｔｒｅｇ」も含まれ、これは、異常又は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に寄与するＴ細胞を指す。Ｔｒｅｇは一般に転写因子Ｆｏｘｐ３

陽性ＣＤ４＋Ｔ細胞であり、ＩＬ－１０産生ＣＤ４＋Ｔ細胞である転写因子Ｆｏｘｐ３陰性制御性Ｔ細胞も含む場合もある。

【０１０９】

本明細書中で使用される場合、用語「宿主細胞（ｈｏｓｔ　ｃｅｌｌ）」は、任意のタイプの細胞、例えば初代細胞、培養細胞、又は細胞株からの細胞であってよい。具体的な実施形態では、用語「宿主細胞」は、核酸分子でトランスフェクトされた細胞、及びこのような細胞の子孫又は潜在的な子孫を指す。上述のような細胞の子孫は、後続の世代で生じ得る変異若しくは環境の影響、又は宿主細胞ゲノムへの核酸分子の統合を理由として、核酸分子でトランスフェクトされた親細胞と同一でない場合がある。

【０１１０】

本明細書中で使用される場合、用語「特異的に結合する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｂｉｎｄｓ、ｂｉｎｄｓ　ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ）」、「特異的に認識する（ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｉｎｇ）」、及び「…に対して特異的である（ｉｓ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｆｏｒ）」、又はこれらの派生語は、抗体又は抗体断片の文脈で使用される場合、上記抗体又は抗体断片が、生理学的条件下で比較的安定な抗原（例えばエピレグリン）と複合体を形成することを意味する。特定の実施形態では、特異的結合は、生物学的分子（例えば細胞表面受容体）を含む分子の異種集団の存在下で、標的の存在を決定するものである。例えば、標的（エピトープであってよい）を特異的に認識する抗体は、この標的と、他の分子への結合に比べて、高い親和性で、高い結合活性で、より容易に、及び／又はより長い持続時間、結合する抗体である。いくつかの実施形態では、例えばラジオイムノアッセイ（ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ：ＲＩＡ）で測定した場合に、無関係の分子に対するある抗体の結合の程度は、標的に対する上記抗体の結合の約１０％未満である。いくつかの実施形態では、標的に特異的に結合する抗体の解離定数（K_D）は、≦10^{-5}Ｍ、≦10^{-6}Ｍ、≦10^{-7}Ｍ、≦10^{-8}Ｍ、≦10^{-9}Ｍ、≦10^{-10}Ｍ、≦10^{-11}Ｍ、又は≦10^{-12}Ｍである。いくつかの実施形態では、抗体は、様々な種からのタンパク質のうち、保存されているあるタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、特異的結合は、排他的な結合を含む場合があるが、必須ではない。抗体又は抗原結合ドメインの結合特異性は、当該技術分野で公知の方法によって決定できる。このような方法としては、限定するものではないが、ウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ＥＣＬ、ＩＲＭＡ、ＥＩＡ、ＢＩＡＣＯＲＥＴＭバイオレイヤー干渉アッセイ、及びペプチドスキャンが挙げられる。

【０１１１】

本明細書中で使用される場合、用語「阻害する（ｉｎｈｉｂｉｔ）」は、活性、応答、条件、疾患、又は他の生物学的パラメータを減少させることを意味する。これには、限定するものではないが、活性、応答、条件、又は疾患の完全な除去が含まれる。これは、本来のレベル又は対照レベルと比較して例えば１０％の、活性、応答、状態、又は疾患の減少を含んでもよい。従って上記減少は、本来のレベル又は対照レベルと比較して、例えば１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又はこれらの間のいずれの量の減少であってよい。

【０１１２】

本明細書中で使用される場合、「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」又は「処置する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」は、臨床結果を含む有益な結果又は所望の結果を得るためのアプローチである。本出願の目的のために、有益な又は所望の臨床結果としては、限定するものではないが、以下のうちの１つまたは複数が挙げられる：疾患若しくは障害からもたらされる１つまたは複数の症状の緩和；疾患若しくは障害の程度の縮小；疾患若しくは障害の安定化（例えば、疾患若しくは障害の悪化の予防若しくは遅延）；疾患若しくは障害の拡大の予防若しくは遅延；疾患若しくは障害の再発の予防若しくは遅延；疾患若しくは障害の進行の遅延若しくは減速；疾患若しくは障害状態の改善；疾患若しくは障害の寛解（部分的又は完全な）の提供；疾患若しくは障害の処置に必要な１つまたは複数の他の薬剤の用量の低減；生活の質の向上；並びに／又は生存期間の遅延。また「処置」は、疾患又は障害

の１つまたは複数の病理学的結果の反転も包含する。本明細書中で使用される場合、疾患又は障害の１つまたは複数の病理学的結果の文脈における用語「反転（ｒｅｖｅｒｓａｌ）」又は「反転させる（ｒｅｖｅｒｓｅ）」は、疾患又は障害の１つまたは複数の病理学的結果の完全な反転（例えば非疾患状態への完全な回復）、上記１つまたは複数の病理学的結果の部分的な反転（例えば上記１つまたは複数の病理学的結果の重症度の、何らかの量だけの低下）を指してよい。本出願の方法は、処置のこれらの態様のうちのいずれか１つまたは複数を企図する。処置対象の対象にとっての利益は、統計的に有意なものであるか、又は少なくとも患者若しくは医師にとって知覚可能なものである。

【０１１３】

用語「線維症（ｆｉｂｒｏｓｉｓ）」は当該技術分野において公知であり、本明細書中では、臓器又は組織の正常な構成要素としての健康な組織の形成とは対照的な、修復又は反応プロセスとしての、臓器又は組織内での過剰な細胞外マトリックスの形成又は発達又は蓄積を指すために使用される。

【０１１４】

本明細書中で使用される場合、用語「有効量（ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ　ａｍｏｕｎｔ）」は、指定された状態、障害、病状、又は疾患を処置する、例えばその症状（例えば臨床症状又は亜臨床症状）のうちの１つまたは複数を改善する、和らげる、減少させる、及び／又は遅延させるために十分な、作用剤又は組成物の量を指す。治療用途の場合、有益な又は所望の結果としては、例えば疾患（その合併症や、疾患の進行中に現れる中間病理学的表現型を含む）によってもたらされる１つまたは複数の症状（生化学的、組織学的、及び／若しくは挙動的）の低減；疾患に罹患した人々の生活の質の向上；疾患の処置に必要な他の薬剤の用量の低減；別の薬剤の効果の増強；疾患の進行の遅延；並びに／又は患者の生存期間の延長が挙げられる。有効量は、１回以上の投与で投与できる。なお、複数の有効成分の組み合わせを投与する場合、上記組み合わせの有効量は、個別に投与した場合に有効となるであろう各成分の量を含む場合と含まない場合とがある。正確な必要量は、対象の種、年齢、及び全身状態、処置される病状の重症度、採用される１つまたは複数の特定の薬剤、投与形態等に応じて、対象ごとに異なる。

【０１１５】

本明細書中で使用される場合、用語「同時投与（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）」は、併用療法における第１の療法と第２の療法とが、約１５分以下、例えば約１０分以下、約５分以下、又は約１分以下のうちのいずれかの時間間隔で投与されることを意味する。上記第１及び第２の療法を同時投与する場合、上記第１及び第２の療法は、同一の組成物（例えば第１の療法及び第２の療法を共に含む組成物）に内包されていても、別個の組成物に内包されていてもよい（例えば第１の療法はある組成物に、第２の療法は別の組成物に内包される）。

【０１１６】

本明細書中で使用される場合、用語「逐次投与（ｓｅｑｕｅｎｔｉａｌ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）」は、併用療法における第１の療法と第２の療法とが、約１５分超、例えば約２０分超、約３０分超、約４０分超、約５０分超、約６０分超、又は更に長時間のうちのいずれかの時間間隔で投与されることを意味する。第１の療法又は第２の療法のいずれを最初に投与してもよい。第１及び第２の療法は別個の組成物に内包され、これらは同一のパッケージ若しくはキット、又は異なるパッケージ若しくはキットに内包されていてよい。

【０１１７】

本明細書中で使用される場合、用語「並行投与（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）」は、併用療法における第１の療法の投与と第２の療法の投与とが、互いに重複することを意味する。

【０１１８】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容可能な（ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｌｙ　ａｃｃｅｐｔａｂｌｅ）」又は「薬理学的に適合する（ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉ

ｃａｌｌｙ　ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ）」は、生物学的に望ましくない、又は他の点で望ましくないものではない材料を意味し、例えば上記材料は、患者に投与される医薬組成物に組み込むことができ、かつ、何らかの重大な望ましくない生物学的影響を引き起こすことがなく、又は上記材料が含有される組成物の他のいずれの成分と有害な様式で相互作用することもない。薬学的に許容可能なキャリア又は賦形剤は、好ましくは、要求される毒物学試験及び製造試験の基準を満たしており、並びに／又は米国食品医薬品局若しくは他の州／連邦政府によって作成された不活性成分ガイドに含まれるか、若しくは米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に、哺乳類、より詳細にはヒトでの使用に関して記載されている。

【０１１９】

用語「キャリア（ｃａｒｒｉｅｒ）」は、化合物の投与に使用される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。このような薬学的キャリアは、水及び油等の無菌液体とすることができ、これは石油、動物、植物、又は合成由来のものを含み、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等である。水又は水溶液、生理食塩水溶液、並びにデキストロース及びクリセロール水溶液を、特に注射用溶液のためのキャリアとして採用することが好ましい。あるいは、キャリアは、結合剤（圧縮錠剤用）、流動促進剤、カプセル化剤、香味剤、及び着色剤のうちの１つまたは複数を含むがこれらに限定されない、固形剤形キャリアとすることができる。好適な薬学的キャリアは、E.W. Martin著「Remington’s Pharmaceutical Sciences」に記載されており、上記文献は参照により、その全体があらゆる目的のために本出願に援用される。

【０１２０】

用語「対象（ｓｕｂｊｅｃｔ）」、「個体（ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌ）」、及び「患者（ｐａｔｉｅｎｔ）」は、本明細書では相互交換可能なものとして、ヒト、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、げっ歯類、又は霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳類を指すために使用される。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。ある好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【０１２１】

本明細書における、ある値又はパラメータに付された「約（ａｂｏｕｔ）」は、当該値又はパラメータ自体を対象とするばらつきを含む（そして記述する）。例えば、「約Ｘ（ａｂｏｕｔ　Ｘ）」と言う記述は、「Ｘ」の記述を含む。特定の実施形態では、範囲は、所与の値又は範囲からある規模以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、更に好ましくは１０％以内、また更に好ましくは５％以内とすることができる。用語「約」又は「およそ（ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｅｌｙ）」が包含する許容可能なばらつきは、研究対象の特定の系に依存し、当業者であれば容易に理解できる。

【０１２２】

本明細書中で使用される場合、用語「約Ｘ～Ｙ（ａｂｏｕｔ　Ｘ－Ｙ）」は、「約Ｘ～約Ｙ（ａｂｏｕｔ　Ｘ　ｔｏ　ａｂｏｕｔ　Ｙ）」と同じ意味を有する。

【０１２３】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ある（ａ、ａｎ）」又は「上記、前記（ｔｈｅ）」は、文脈上明らかにそうでない場合を除いて、複数の指示対象を含む。従って、例えば「ある方法（ａ　ｍｅｔｈｏｄ）」という言及は、本明細書に記載されているタイプの、及び／又は当業者には本開示を読めば明らかになるような、１つまたは複数の方法及び／又はステップを含む。当業者には明らかであるように、評価される、処置のために選択される、及び／又は処置を受ける対象は、そのような活動を必要とする対象である。

【０１２４】

本開示の実施は、特段の指示がない限り、当該技術分野の範囲内である統計分析、分子生物学（組換え技法を含む）、微生物学、細胞生物学、及び生化学の従来の技法を採用する。このようなツール及び技法は例えば、Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Pres

s: Cold Spring Harbor, New York; Ausubel et al. eds. (2005) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Bonifacino et al. eds. (2005) Current Protocols in Cell Biology. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coligan et al. eds. (2005) Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coico et al. eds. (2005) Current Protocols in Microbiology, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coligan et al. eds. (2005) Current Protocols in Protein Science, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; 及びEnna et al. eds. (2005) Current Protocols in Pharmacology, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJに詳述されている。更なる技法は、例えば米国特許第７，９１２，６９８号明細書、並びに米国公開特許第２０１１／０２０２３２２号明細書及び第２０１１／０３０７４３７号明細書において説明されており、各上記文献は、参照により、その全体があらゆる目的のために本出願に援用される。

【０１２５】

採用された用語及び表現は、限定ではなく説明の用語として使用されるものであり、このような用語及び表現の使用は、図示及び説明された特徴又はその一部の同等物を排除するものではなく、請求対象の技術の範囲内で様々な修正が可能である。

【０１２６】

エピレグリン阻害剤

エピレグリン活性の阻害は、当業者に公知の任意の方法を用いて達成できる。エピレグリン活性を阻害する方法の例としては、限定するものではないが、内因性エピレグリン遺伝子の発現を低減すること、エピレグリンｍＲＮＡの発現を低減すること、及びエピレグリンタンパク質の活性を阻害することが挙げられる。従ってエピレグリン阻害剤は、エピレグリン遺伝子の発現を低減する化合物若しくは組成物、エピレグリンｍＲＮＡ半減期、安定性及び／若しくは発現を低減する化合物若しくは組成物、又はエピレグリンタンパク質の機能を阻害する化合物若しくは組成物であってよい。本開示に従って使用できるエピレグリン阻害剤の非限定的な例としては、抗体若しくは抗原結合断片、小分子、デコイ受容体（例えば可溶性受容体）、ＣＡＲ改変細胞（例えばＣＡＲ－Ｔ細胞）、アプタマー、代替足場、ポリペプチド、核酸、ｓｉＲＮＡ、リボザイム、アンチセンス分子、ペプチド模倣物、又はこれらのいずれの組み合わせが挙げられる。

【０１２７】

エピレグリン阻害は、直接的又は間接的に達成してよい。例えばエピレグリンは、抗体又は可溶性エピレグリン受容体といった、エピレグリンタンパク質と直接相互作用する化合物又は組成物によって、直接阻害できる。あるいはエピレグリンは、エピレグリン受容体、エピレグリン下流エフェクタ、又はエピレグリン発現を上方制御する上流調節因子を阻害する化合物又は組成物によって、間接的に阻害できる。

【０１２８】

内因性エピレグリン遺伝子の発現の低減には、エピレグリン遺伝子発現の特異的阻害剤の提供が含まれる。エピレグリンｍＲＮＡ又はエピレグリンタンパク質の発現の低減には、エピレグリンｍＲＮＡの半減期若しくは安定性の低減、又はエピレグリンｍＲＮＡの発現の低減が含まれる。エピレグリンの発現を低減する方法としては、限定するものではないが：ｓｉＲＮＡ；マイクロＲＮＡ；抗体；可溶性受容体；アンチセンス核酸；リボザイム；トランスドミナントネガティブ多様体をコードする発現ベクター；ペプチド；小分子；エピレグリン遺伝子、ｍＲＮＡ、及びタンパク質発現のその他の特異的阻害剤；並びにこれらの組み合わせを用いる方法が挙げられる。

【０１２９】

抗体及び抗原結合断片

一実施形態では、エピレグリン阻害剤は抗体又は抗原結合断片である。抗体は、天然のソース由来か組換え的ソース由来かにかかわらず、標的分子上に存在するエピトープに特異的に結合できるいずれの免疫グロブリン分子を含むことが、当業者には理解されるだろ

う。本開示では、標的分子は、エピレグリン、エピレグリン受容体、エピレグリン下流エフェクタ、又はこれらの断片であってよい。本開示の一態様では、エピレグリンは、エピレグリン上のエピトープに特異的に結合する抗体又は抗原結合断片によって、直接阻害される。別の態様では、エピレグリンは、エピレグリン受容体上のエピトープに特異的に結合する抗体又は抗原結合断片によって、間接的に阻害される。更に別の態様では、エピレグリンの効果は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、プロテアーゼ、抗プロテアーゼ、転写因子、線維形成性サイトカイン、アポトーシス調節因子といった下流エフェクタ上のエピトープに特異的に結合する抗体又は抗原結合断片によって、遮断される。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、エピレグリンに特異的に結合する単離された抗体、又はその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、上記エピレグリンはヒトエピレグリンである。いくつかの実施形態では、本明細書に具体的に記載される上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、エピレグリンの上皮成長因子（ＥＧＦ）様ドメインに結合する。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された抗体又は抗原結合断片は、例えば当業者が実施するようなバイオレイヤー干渉アッセイ、表面プラズモン共鳴、又はＫｉｎＥｘＡ法によって決定されるように、高い親和性で、例えば約１×１０$^{-8}$Ｍ未満、例えば限定するものではないが約１～９．９（又はその中のいずれの範囲若しくは値、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、若しくは９）×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-15}$Ｍ、これらの中のいずれの範囲若しくは値のK_Dで、エピレグリンに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、上記K_Dは１×１０$^{-9}$Ｍ以下である。いくつかの実施形態では、上記K_Dは×１０$^{-10}$Ｍ以下である。いくつかの実施形態では、上記K_Dは約１×１０$^{-11}$、２×１０$^{-11}$、３×１０$^{-11}$、４×１０$^{-11}$、５×１０$^{-11}$、６×１０$^{-11}$、７×１０$^{-11}$、８×１０$^{-11}$、９×１０$^{-11}$、１×１０$^{-10}$、２×１０$^{-10}$、３×１０$^{-10}$、４×１０$^{-10}$、５×１０$^{-10}$、６×１０$^{-10}$、７×１０$^{-10}$、８×１０$^{-10}$、又は９×１０$^{-10}$Ｍである。ある例示的なK_Dは、約３．８×１０$^{-11}$Ｍに等しい。

【０１３２】

抗体を、標的ペプチド又はそのいずれの部分に結合する能力について試験する方法は、当該技術分野において公知であり、例えばバイオレイヤー干渉アッセイ、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、免疫沈降、及び競合阻害アッセイといった、いずれの抗体－抗原結合アッセイを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のK_D値は、バイオレイヤー干渉アッセイを用いて決定される。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された抗体又は抗原結合断片は、エピレグリン中和抗体、又は抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、エピレグリンの活性を阻害する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、エピレグリンの、ＥｒｂＢ受容体との相互作用を阻害する。いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体は、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、ヒト上皮成長因子受容体２（ＨＥＲ２）、ＨＥＲ３、及び／又はＨＥＲ４である。いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体はＥＧＦＲである。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１００ｎＭ未満、例えば限定するものではないが約９０ｎＭ、８０ｎＭ、７０ｎＭ、６０ｎＭ、５０ｎＭ、４０ｎＭ、３０ｎＭ、２０ｎＭ、１０ｎＭ、９ｎＭ、８ｎＭ、７ｎＭ、６ｎＭ、５ｎＭ、４ｎＭ、３

ｎＭ、２．５ｎＭ、２ｎＭ、１．５ｎＭ、１ｎＭ、０．５ｎＭ、０．２ｎＭ、又は０．１ｎＭのＩＣ$_{50}$で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、約１０ｎＭ未満のＩＣ$_{50}$で、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する。ある例示的なＩＣ$_{50}$は、約１０ｎＭ以下である。ある例示的なＩＣ$_{50}$は、約１．８ｎＭに等しい。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、マウスエピレグリンに特異的に結合しない。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、１つまたは複数の他のヒトＥＧＦＲリガンドに特異的に結合しない。いくつかの実施形態では、上記１つまたは複数の他のＥＧＦＲリガンドは、トランスフォーミング成長因子α（ＴＧＦＡ）、ベータセルリン（ＢＴＣ）、ヘパリン結合性ＥＧＦ様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）、エピゲン（ＥＰＧＮ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、及び／又はアンフィレグリン（ＡＲＥＧ）である。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、配列番号１のアミノ酸配列又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、配列番号５のヌクレオチド配列又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列によってコードされる重鎖可変領域（ＶＨ）内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含む。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、アミノ酸配列GGSISSSGYY（配列番号２）を含むＨＣＤＲ１、アミノ酸配列FYYSGNT（配列番号３）を含むＨＣＤＲ２、及び／又はアミノ酸配列ARHPFNWNDHYHYMDV（配列番号４）を含むＨＣＤＲ３を含む。

【０１４０】

ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１重鎖可変領域（ＶＨ）のアミノ酸配列。ＨＣＤＲ配列は下線付きの太字である。

HLQLQESGPGLVKSSETLSLTCSVS**<u>GGSISSSGYY</u>**WGWIRQPPGKGLEWIGS**<u>FYYSGN</u>**
<u>T</u>YYNPSLKSRVTISADTSKSQYSLKLSSVTAADTAVYYC**<u>ARHPFNWNDHYHYMDV</u>**
WGNGTTVTVSS (配列番号 1)

【０１４１】

ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１重鎖可変領域（ＶＨ）をコードするヌクレオチド配列。

CACCTGCAACTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGGAGACCCTGTC
CCTCACCTGCTCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTGGTTACTACTGGGGCT
GGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTTTCTATTATAGT
GGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGCAGACAC

GTCCAAGAGCCAGTACTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTG
TGTATTATTGTGCGAGACATCCGTTCAACTGGAACGACCACTATCACTACATGGAC
GTCTGGGGCAACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA（配列番号５）

【０１４２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、配列番号６のアミノ酸配列又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、配列番号１０のヌクレオチド配列又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列によってコードされる軽鎖可変領域（ＶＬ）内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、アミノ酸配列QSISNY（配列番号７）を含むＬＣＤＲ１、アミノ酸配列AAS（配列番号８）を含むＬＣＤＲ２、及び／又はアミノ酸配列QQSYITSIT（配列番号９）を含むＬＣＤＲ３を含む。

【０１４５】

ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１軽鎖可変領域（ＶＬ）のアミノ酸配列。ＬＣＤＲ配列は下線付きの太字である。

DIQMTQSPSSLSASVGDSVTITCRAS**<u>QSISNY</u>**LNWYQKKPGKAPKVLIY**<u>AAS</u>**SLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**<u>QQSYITSIT</u>**FGQGTRLEIK (配列番号 6)

【０１４６】

ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１軽鎖可変領域（ＶＬ）をコードするヌクレオチド配列。

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGCGT
CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGA
AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
GGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACATAA
CCTCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA（配列番号１０）

【０１４７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含むＶＨ内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに／又は配列番号６のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含むＶＬ内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含むＶＨ内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに配列番号６のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含むＶＬ内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨ内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに／又は配列番号６のアミノ酸配列を含むＶＬ内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨ内に含有された、３つの重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）；並びに配列番号６のアミノ酸配列を含むＶＬ内に含有された、３つの軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含む。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び／若しくは配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３；並びに／又は配列番号７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び／若しくは配列番号９のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３を含む。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１、配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３；並びに配列番号７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３を含む。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、ＶＨ；及び／又は配列番号６のアミノ酸配列若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、ＶＬを含む。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は：配列番号１のアミノ酸配列又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、ＶＨ；及び配列番号６のアミノ酸配列又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、ＶＬを含む。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片

は、配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び／又は配列番号６のアミノ酸配列を含むＶＬを含む。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、配列番号１のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号６のアミノ酸配列を含むＶＬを含む。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された抗体又は抗原結合断片は、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、又はｓｃＦｖである。

【０１５８】

当業者であれば、正確な定義上のＣＤＲ境界及び長さは、異なる分類及び番号付与システムによって異なることを理解するだろう。従ってＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｃｏｎｔａｃｔ、又は他の何らかの境界の定義によって参照され得る。境界が異なるにもかかわらず、これらの各システムでは、可変配列内のいわゆる「超可変領域」の構成要素がある程度重複している。従って、これらのシステムに従ったＣＤＲの定義は、隣接するフレームワーク領域に関して、長さ及び境界領域が異なる場合がある。例えばKabat et al., NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)；及びMacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732 (1996))を参照されたい（上記文献はそれぞれ、参照によりその全体が本出願に援用される）。

【０１５９】

典型的には、ＣＤＲは、カノニカル構造として分類できるループ構造を形成する。用語「カノニカル構造（ｃａｎｏｎｉｃａｌ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ）」は、抗原結合（ＣＤＲ）ループによって採用される主鎖立体配座を指す。比較構造研究から、６つの抗原結合ループのうちの５つについて、利用可能な立体配座のレパートリーが限定されていることが分かった。各カノニカル構造は、ポリペプチド骨格のねじれ角によって特性決定できる。従って抗体間の対応するループは、これらのループのほとんどの部分でアミノ酸配列の変動性が高いにもかかわらず、極めて類似した３次元構造を有する（Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Chothia et al., “Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions,” Nature. 342:877 (1989); Martin and Thornton, J. Mol. Biol. 263:800 (1996)；上記文献はそれぞれ、参照によりその全体が本出願に援用される）。更に、採用されるループ構造と、これを取り囲むアミノ酸配列との間には、ある関係がある。特定のカノニカルクラスの立体配座は、ループの長さと、ループ内及び保存されたフレームワーク内（即ちループの外側）の重要な位置にあるアミノ酸残基とによって決定される。従って、ある特定のカノニカルクラスへの割り当ては、これらの重要なアミノ酸残基の存在に基づいて実施できる。

【０１６０】

本明細書では、エピレグリンへの結合に関して、本明細書に記載の抗エピレグリン抗体又は抗原結合断片と競合する、単離された抗体又はその抗原結合断片も開示される。本明細書中で使用される場合、用語「競合する（ｃｏｍｐｅｔｅ）」又は「交差競合する（ｃｒｏｓｓ－ｃｏｍｐｅｔｅ）」は、抗体又はその抗原結合断片が抗原と結合して、別の抗体又はその抗原結合断片の結合を阻害又は遮断することを意味する。この用語は、２つの抗体間での双方向の競合も含む（結合して第２の抗体の結合を遮断する第１の抗体、及びその逆）。いくつかの実施形態では、競合抗体と、本明細書に記載の抗エピレグリン抗体とは、同一のエピトープに結合してよい。あるいは、競合抗体と、本明細書に記載の抗エピレグリン抗体とは、異なるものの重複はしているエピトープに結合してよく、従って一方の抗体の結合が第２の抗体の結合を、例えば立体障害によって、阻害又は遮断する。抗体間の交差競合は、当該技術分野で公知の方法で、例えばリアルタイムのラベルフリーバイオレイヤー干渉アッセイによって、測定できる。２つの抗体間の交差競合は、自己－自己結合によるバックグラウンド信号未満の第２抗体の結合として表現できる（この場合、

第１の抗体と第２の抗体は同じ抗体である）。２つの抗体間の交差競合は例えば、自己－自己バックグラウンド結合未満の第２の抗体の％結合として表現できる（この場合、第１の抗体と第２の抗体とは同じ抗体である）。

【０１６１】

本明細書では、本明細書に記載の抗エピレグリン抗体又は抗原結合断片と同じエピトープに結合する、単離された抗体又はその抗原結合断片も開示される。

【０１６２】

理論に縛られることを望むものではないが、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるエピレグリン阻害剤がポリクローナル抗体である場合、上記抗体は、エピレグリン、エピレグリン受容体、エピレグリン下流エフェクタ、又はこれらの断片を含むペプチドを好適な動物に接種することによって生成できる。これらのポリペプチド又はその断片は、化学合成及び生物学的合成を含む、当該技術分野で公知のいずれの方法によって得ることができる。接種された動物で生成された、エピレグリン、エピレグリン受容体、エピレグリン下流エフェクタ、又はこれらの断片に特異的に結合する抗体は、その後、動物から採取した体液から単離される。抗体は、限定するものではないがヤギ、ヒツジ、ウマ、ラクダ、ウサギ、ロバといった複数の非ヒト哺乳動物において、この方法で生成してよい。ポリクローナル抗体を生成する方法は当技術分野で公知であり、例えばHarlow et al.（1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.）に記載されている。

【０１６３】

エピレグリン、エピレグリン受容体、エピレグリン下流エフェクタ、又はこれらの断片に対するモノクローナル抗体は、例えばHarlow et al.（1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.）及びTuszynski et al.（1988, Blood, 72:109－115)に記載されているもの等の、いずれの公知のモノクローナル抗体調製手順を用いて調製してよい。ヒトモノクローナル抗体は、米国公開特許第２００３／０２２４４９０号明細書に記載の方法によって調製してもよい。抗原に対するモノクローナル抗体は、当該技術分野の標準的な手順を用いて上記抗原を接種されたマウスから生成できる。このような手順を用いて得られたモノクローナル抗体をコードする核酸は、当該技術で利用可能な、例えばWright et al.（1992, Critical Rev. in Immunol. 12(3, 4):125-168）及びその中で引用されている参考文献に記載されている技術を用いて、クローニング及び配列決定できる。

【０１６４】

本開示の方法で使用される抗体が、エピレグリン、エピレグリン受容体、エピレグリン下流エフェクタ、又はこれらの断片を標的とすることができる、生物学的活性を有する抗体断片又は合成抗体である場合、上記抗体は以下のようにして調製される：所望の抗体又はその断片をコードする核酸を、好適なベクターにクローニングする。上記ベクターを、多量の上記抗体又はその断片の生成に適した細胞にトランスフェクトする。続いて、所望の抗体をコードするＤＮＡを上記細胞内で発現させることにより、上記抗体を生成する。所望のペプチドをコードする核酸は、当該技術で利用可能な、例えばWright et al.（1992, Critical Rev. in Immunol. 12(3, 4):125-168）及びその中で引用されている参考文献に記載されている技術を用いて、クローニング及び配列決定できる。あるいは、所望の抗体又はその断片を、化学合成技術を用いて大量に合成することもできる。上記抗体のアミノ酸配列が分かっている場合、本明細書の他の箇所に記載されているように、当該技術分野で公知の方法を用いて、所望の抗体を化学的に合成できる。

【０１６５】

本開示に従って使用できる抗体又は抗原結合断片の非限定的な例は、Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入できる抗ヒトエピレグリン抗体ＡＦ１１９５を含む。本開示に従って使用できる抗体又は抗原結合断片の別の非限定的な例は、Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入できる抗マウス／ヒトエピレグリン抗体Ｃｌｏｎｅ＃１８９６１１（ＭＡＢ１０６８）を含む。

【０１６６】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の上記単離された抗体又は上記抗原結合断片は、ヒト化抗体である。本開示は、標的分子（例えばエピレグリン）上に存在するエピトープと特異的に反応するヒト化抗体の使用も含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形態としては、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はこれらの断片が挙げられる。ヒト化抗体としては、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、上記レシピエント抗体のＣＤＲが、所望の特異性、親和性、及び容量を有するマウス、ラット、又はウサギ等の非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲからの残基で置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が挙げられる。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基で置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体中にも、インポートされたＣＤＲ又はフレームワーク配列中にも見られない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの略全てを含有することになり、上記可変ドメインでは、全ての又は略全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全ての又は略全てのフレームワーク領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。最適には、ヒト化抗体は、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免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の、少なくとも一部を含有できる。

【０１６７】
一般に、ヒト化抗体には、非ヒトであるソースから１つまたは複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの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、これは典型的には「インポート」可変ドメインから取られる。抗体のヒト化技法は一般に、抗体分子の１つまたは複数のポリペプチド鎖をコードするＤＮＡ配列を操作するための、組換えＤＮＡ技術の使用を伴う。ヒト化は、基本的に、げっ歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列でヒト抗体の対応する配列を置き換えることによって実施できる。従って、非ヒト抗体のヒト化形態（又はその断片）はキメラ抗体又は断片であり、ここでは、完全なヒト可変ドメインよりも実質的に少ない部分が、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的には、一部のＣＤＲ残基と、場合によっては一部のフレームワーク残基とが、げっ歯類抗体内の同等の部位からの残基で置換された、ヒト化抗体である。

【０１６８】
ヒト化抗体の作成に使用される軽鎖及び重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性の低減のために極めて重要である。「ベストフィット（ｂｅｓｔ－ｆｉｔ）」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に、げっ歯類のものと最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。複数の異なるヒト化抗体に、同じフレームワークを使用してもよい。

【０１６９】
抗原に対する高い親和性、及び他の好ましい生物学的特性を保持したまま、抗体をヒト化することが、更に重要である。この目標を達成するために、ヒト化抗体は好ましくは、親配列及びヒト化配列の３次元モデルを用いた、親配列及び様々な概念的なヒト化産物の分析のプロセスによって、調製される。３次元免疫グロブリンモデルは市販されており、当業者には周知のものである。選択された候補免疫グロブリン配列の、蓋然性が高い３次元立体配座構造を、図示及び表示するコンピュータプログラムが入手可能である。これらの表示を検査することにより、候補免疫グロブリン配列の機能において残基が有する可能性のある役割の分析、即ち候補免疫グロブリンの抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、フレームワーク残基をコンセンサス及びインポート配列から選択して組み合わせることができ、これにより、１つまたは複数の標的抗原に対する親和性の向上といった、所望の抗体特性が達成される。一般に、ＣＤＲ残基は、抗

原結合への影響に直接的かつ最も実質的に関与している。
【０１７０】
本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片は、記載されている抗体又は抗原結合断片の生物学的特性（例えば結合親和性又は免疫エフェクタ活性）を保持する単一又は複数のアミノ酸置換、欠失、又は付加を有するバリアントを含む。
【０１７１】
これらのバリアントとしては：（ｉ）１つまたは複数のアミノ酸残基が保存又は非保存アミノ酸で置換されたバリアント；（ｉｉ）１つまたは複数のアミノ酸がポリペプチドに追加された又はポリペプチドから欠失したバリアント；（ｉｉｉ）１つまたは複数のアミノ酸が置換基を含むバリアント；及び（ｉｖ）記載されている抗体又は抗原結合断片が、上記抗体又は抗原結合断片に有用な特性を与えることができる別のペプチド若しくはポリペプチド（例えば融合パートナー、タンパク質タグ）又は他の化学的部分、例えば抗体のエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分等と、融合又はコンジュゲートしたバリアントが挙げられる。本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片は、保存位置又は非保存位置において、ある種からのアミノ酸残基を別の種の対応する残基で置換した、バリアントを含んでよい。他の実施形態では、非保存位置のアミノ酸残基を、保存又は非保存残基で置換する。アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基の、例えばその疎水性、親水性、電荷、サイズ等の、相対的な類似性に基づく。
【０１７２】
アミノ酸置換は保存的なものであってよく、これは、置き換わったアミノ酸が元のアミノ酸と同様の化学的特性を有することを意味する。当業者であれば、どのアミノ酸が同様の化学的特性を共有するかを理解するだろう。例えば以下のグループのアミノ酸は、サイズ、電荷、及び極性といった同様の化学的特性を共有している：グループＩ（Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｐｒｏ、Ｇｌｙ）；グループＩＩ（Ａｓｐ、Ａｓｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ）；グループＩＩＩ（Ｈｉｓ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ）；グループＩＶ（Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｃｙｓ）；グループＶ（Ｐｈｅ、Ｔｈｙ、Ｔｒｐ）。
【０１７３】
従って、抗体又は抗原結合断片の実施形態は、記載されている抗体又は抗原結合断片に対して約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は更に高い配列同一性を有するバリアントを含むことができる。
【０１７４】
本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片は、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥといった様々な抗体アイソタイプのうちのいずれか１つのものであってよい。いくつかの実施形態では、上記抗体アイソタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４アイソタイプである。いくつかの実施形態では、上記抗体アイソタイプはＩｇＡ１又はＩｇＡ２である。抗体又はその抗原結合断片の特異性は、主にＣＤＲのアミノ酸配列、及び配置によって決定される。従って、あるアイソタイプのＣＤＲを、抗原特異性を変化させることなく、別のアイソタイプに転写できる。あるいは、抗原特異性を変化させることなく、ハイブリドーマに、ある抗体アイソタイプの産生から別の抗体アイソタイプの産生へと切り替えさせる（アイソタイプスイッチング）技法が確立されている。従って、このような抗体アイソタイプは、記載されている抗体又は抗原結合断片の範囲内である。
【０１７５】
当業者であれば、本開示がラクダ科の種に由来する抗体の使用を包含することを更に理解するだろう。即ち本開示は、限定するものではないが、ラクダ科の種に由来する抗体の使用を含む。当該技術分野では公知のように、ラクダ科抗体は、軽鎖を有さないため完全かつ多様な抗原結合能力を有する重鎖のみを含む点で、他のほとんどの哺乳類の抗体とは異なる（Hamers-Casterman et al., 1993, Nature, 363:446-448）。このような重鎖抗体は、従来の哺乳類抗体よりも小さく、従来の抗体より高い可溶性を有し、更に他のいくつかの抗体に比べて高い安定性を示すという点で、有用である。ラクダ科の種と

しては、限定するものではないが、フタコブラクダ（Ｃ，ｂａｃｔｒｉａｎｕｓ）及びヒトコブラクダ（Ｃ，ｄｒｏｍｅｄａｒｉｕｓ）等の旧世界ラクダ科が挙げられる。ラクダ科は更に、限定するものではないがリャマ、アルパカ、ビクーニャ、及びグアナコを含む新世界ラクダ科を含む。ラクダ科種からのポリクローナル血清の生成は、ヒツジ、ロバ、ヤギ、ウマ、マウス、ニワトリ、ラットといった他の動物からのポリクローナル血清の生成と略同様である。当業者であれば、本開示及び本開示で詳述された方法を身に付ければ、ラクダ科種から高力価の抗体を調製できる。一例として、哺乳類における抗体の生成は、Harlow et al.（1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.）等の参考文献に詳述されている。

【０１７６】

重鎖疾患の動物等の他のソースから単離されたV_Hタンパク質（Seligmann et al., 1979, Immunological Rev. 48:145-167、参照によりその全体が本出願に援用される）もまた、本開示の組成物及び方法において有用である。本開示は更に、（1989, Nature 341:544-546、参照によりその全体が本出願に援用される）に詳述されているような、マウス及び他の哺乳類から生成された可変重鎖免疫グロブリンを含む。簡潔に述べると、V_H遺伝子をマウスの脾臓標本から単離し、大腸菌で発現させる。本開示は、本明細書で詳述される組成物及び方法における、このような重鎖免疫グロブリンの使用を包含する。

【０１７７】

本開示のエピレグリン阻害剤として有用な抗体は、ファージ抗体ライブラリから得ることもできる。ファージ抗体ライブラリを生成するために、まず、ファージ表面で発現される所望のタンパク質（例えば所望の抗体）を発現する細胞（例えばハイブリドーマ）から単離されたｍＲＮＡから、ｃＤＮＡライブラリを得る。このｍＲＮＡのｃＤＮＡコピーを、逆転写酵素を用いて生成する。ＰＣＲによって、免疫グロブリン断片を特定するｃＤＮＡを得て、得られたＤＮＡを好適なバクテリオファージベクターにクローニングし、免疫グロブリン遺伝子を特定するＤＮＡを含むバクテリオファージＤＮＡライブラリを生成する。異種ＤＮＡを含むバクテリオファージライブラリの作成手順は当該技術分野で公知であり、例えばSambrook et al.（2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）に記載されている。

【０１７８】

所望の抗体をコードするバクテリオファージを操作して、その表面上にタンパク質を、それに対応する結合タンパク質、例えば上記抗体が対象とする抗原への結合のために利用できるように、提示させることができる。従って、特定の抗体を発現するバクテリオファージを、対応する抗原を発現する細胞の存在下でインキュベートすると、バクテリオファージは細胞に結合する。抗体を発現しないバクテリオファージは細胞に結合しない。このようなパニング技法は当該技術分野で公知であり、例えばWright et al.（前掲）に記載されている。

【０１７９】

上述のようなプロセスは、Ｍ１３バクテリオファージディスプレイを用いたヒト抗体の生産のために開発されている（Burton et al., 1994, Adv. Immunol. 57:191-280）。基本的に、ｃＤＮＡライブラリは、抗体産生細胞の集団から得られたｍＲＮＡから生成される。上記ｍＲＮＡは、再編成された免疫グロブリン遺伝子をコードするため、ｃＤＮＡも同じものをコードする。増幅されたｃＤＮＡをＭ１３発現ベクターにクローニングし、ヒトＦａｂ断片が表面に発現されるファージのライブラリを作成する。関心対象の抗体を提示するファージを抗原結合によって選択し、細菌内で増殖させて、可溶性ヒトＦａｂ免疫グロブリンを生成する。従って、従来のモノクローナル抗体合成とは対照的に、この手順では、ヒト免疫グロブリンを発現する細胞ではなく、ヒト免疫グロブリンをコードするＤＮＡが不死化される。

【０１８０】

上述した手順は、抗体分子のＦａｂ部分をコードするファージの生成を説明している。しかしながら、本開示は、Ｆａｂ抗体をコードするファージの生成のみに限定されるものと解釈してはならない。むしろ、一本鎖抗体をコードするファージ（ｓｃＦｖ／ファージ抗体ライブラリ）も本開示に含まれる。Ｆａｂ分子はＩｇ軽鎖全体を含み、即ち軽鎖の可変領域及び定常領域を両方とも含むが、重鎖の可変領域及び第１定常領域ドメイン（ＣＨ１）しか含まない。一本鎖抗体分子は、Ｉｇ　Ｆｖ断片を含むタンパク質の単一の鎖を含む。Ｉｇ　Ｆｖ断片は、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のみを含み、定常領域を含有しない。ｓｃＦｖ　ＤＮＡを含むファージライブラリは、Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597に記載されている手順に従って生成できる。所望の抗体の単離のための、このようにして生成されたファージのパニングは、Ｆａｂ　ＤＮＡを含むファージライブラリに関して説明したものと同様の様式で実施される。

【０１８１】

本開示はまた、重鎖及び軽鎖可変領域が略全ての可能な特異性を含むように合成され得る合成ファージディスプレイライブラリを含むと解釈されるものとする（Barbas, 1995, Nature Medicine 1:837-839; de Kruif et al., 1995, J. Mol. Biol. 248:97-105）。

【０１８２】

また、エピレグリンに特異的に結合する本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする、単離されたポリペプチドも開示される。本明細書で提供される可変ドメインセグメントをコードできる上記単離されたポリペプチドは、抗体又は抗原結合断片を生成するために、同一のベクター又は異なるベクターに含まれていてよい。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする単離されたポリペプチドは、ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする単離されたポリペプチドは、ＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列、又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする単離されたポリペプチドは：ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列；及び／又はＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列、若しくは上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする単離されたポリペプチドは：ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列、又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列；及びＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列、又は上記配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする単離されたポリペプチドは：ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列；及び／又はＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列を含む。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする単離されたポリペプチドは：ＶＨをコードする配列番号５のヌクレオチド配列；及びＶＬをコードする配列番号１０のヌクレオチド配列を含む。

【０１８９】

本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターも開示される。

【０１９０】

本明細書に記載の組換え抗体又は抗原結合断片を発現する宿主細胞も開示される。このような宿主細胞は、上述のポリヌクレオチド又はベクターを含んでよい。いくつかの実施形態では、上記宿主細胞はハイブリドーマである。いくつかの実施形態では、上記抗体又は上記抗原結合断片は組換えによって生成される。

【０１９１】

本開示の抗体は、例えば当該技術分野（例えばMorrison, S. (1985) Science 229:1202）で公知であるように組換えＤＮＡ技法と遺伝子トランスフェクション法との組み合わせを用いて、宿主細胞トランスフェクトーマ（ハイブリドーマの一種）内で生成できる。

【０１９２】

例えば、抗体又はその抗体断片を発現するために、軽鎖及び重鎖の一部又は全長をコードするポリヌクレオチドを、標準的な分子生物学的技法（例えばＰＣＲ増幅、又は関心対象の抗体を発現するハイブリドーマを用いたｃＤＮＡクローニング）によって得ることができ、上記ポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入して、遺伝子が転写及び翻訳制御配列に対して機能可能に連結されるようにすることができる。この文脈において、用語「機能可能に連結される（ｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」は、ベクター内の転写及び翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳の調節という意図した機能を果たすように、抗体遺伝子をベクターにライゲーションすることを意味することが意図されている。発現ベクター及び発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別個のベクターに挿入でき、又は典型的には、これら両方の遺伝子は同一の発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法（例えば抗体遺伝子断片及びベクター上の相補的制限部位のライゲーション、又は制限部位が存在しない場合は平滑末端ライゲーション）によって、発現ベクターに挿入される。記載されている抗体の軽鎖及び重鎖可変領域は、これらを、所望のアイソタイプの重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を既にコードしている発現ベクターに挿入して、ＶＨセグメントが上記ベクター内の１つまたは複数のＣＨセグメントに対して機能可能に連結され、ＶＬセグメントが上記ベクター内のＣＬセグメントに対して機能可能に連結されるようにすることによって、いずれの抗体アイソタイプ全長抗体遺伝子を作成するために使用できる。更に、又はあるいは、上記組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードできる。上記抗体鎖遺伝子は、上記シグナルペプチドが上記抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクターにクローニングできる。上記シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド、又は異種シグナルペプチド（即ち非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）であってよい。

【０１９３】

抗体鎖遺伝子に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞内での抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。用語「調節配列（ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）」は、抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を制御するプロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御要素（例えばポリアデニル化シグナル）を含むことが意図されている。このような調節配列は、例えばGoeddel（Gene Expression Technology. Methods

in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)）に記載されている。当業者であれば、調節配列の選択を含む発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベル等といった因子に依存し得ることを理解するだろう。哺乳類宿主細胞発現のための好ましい調節配列としては、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、アデノウイルス（例えばアデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））、及びポリオーマに由来する、プロモーター及び／又はエンハンサーといった、哺乳類細胞内での高レベルのタンパク質発現を指示するウイルス要素が挙げられる。あるいは、ユビキチンプロモーター又はβグロビンプロモーターといった非ウイルス調節配列も使用できる。更に、ＳＶ４０早期プロモーター及び１型ヒトＴ細胞白血病ウイルスの長い末端反復配列からの配列を含有するＳＲＤプロモーターシステムのような異なる複数のソースからの配列で構成された調節要素も使用できる（Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472）。

【０１９４】

抗体鎖遺伝子及び調節配列に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞内でのベクターの複製を調節する配列（例えば複製の起点）、及び選択マーカー遺伝子といった、追加の配列を有してよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入される宿主細胞の選択を促進する（例えば４，３９９，２１６号明細書、米国特許第４，６３４，６６５号明細書、及び米国特許第５，１７９，０１７号明細書を参照）。例えば典型的には、選択マーカー遺伝子は、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、又はメトトレキサートといった薬剤に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に与える。好ましい選択マーカー遺伝子としては、（メトトレキサート選択／増幅を伴うｄｈｆｒ－宿主細胞での使用のための）ジヒドロ葉酸還元酵素（ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｌａｔｅ　ｒｅｄｕｃｔａｓｅ：ＤＨＦＲ）遺伝子、及び（Ｇ４１８選択のための）ｎｅｏ遺伝子が挙げられる。

【０１９５】

軽鎖及び重鎖の発現のためには、重鎖及び軽鎖をコードする１つまたは複数の発現ベクターを、標準的な技法によって宿主細胞にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）」の様々な形は、原核又は真核宿主細胞への外因性ＤＮＡの導入に一般的に使用される多様な技法、例えば電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿法、ＤＥＡＥ－デキストラントランスフェクション等を包含することが意図されている。本開示の抗体は原核又は真核宿主細胞内で発現させることが理論上可能であるものの、真核細胞、最も好ましくは哺乳類の宿主細胞内での抗体の発現が最も好ましい。というのは、このような真核細胞、特に哺乳類細胞は、適切に折りたたまれた、免疫学的活性を有する抗体を、アセンブリング及び分泌する可能性が、原核細胞に比べて高いためである。原核細胞による抗体遺伝子の発現は、活性抗体の高収率での生成には効果的でないことが報告されている（Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6: 12-13）。

【０１９６】

本開示の組換え抗体の発現に好適な哺乳類宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｈａｍｓｔｅｒ　Ｏｖａｒｙ：ＣＨＯ）細胞（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad, Sci. USA 77:4216-4220に記載され、例えばR. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 759:601-621に記載されているようにＤＨＦＲ選択マーカーと共に使用される、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む）、ＮＳＯ骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞、及びＳＰ２細胞が挙げられる。特に、ＮＳＯ骨髄腫細胞と共に使用するために好適な別の発現系は、国際公開第８７／０４４６２号明細書、国際公開第８９／０１０３６号明細書、及び欧州特許第０３３８８４１国際公開第で開示されているＧＳ遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入すると、宿主細胞内で抗体を発現させるために十分な期間、又はより好ましくは、宿主細胞が成長している培養培地中に抗体を分泌させるために十分な期間にわたって、宿主細胞を培養することによって、抗体が生成される。標準的なタンパク質精製法を用いて、抗体を培養培地から回収できる。

【０１９７】
発現後、抗体全体、これに由来する二量体、個々の軽鎖及び重鎖、抗体断片、又は抗体の他の形態を、当該技術分野で公知の標準的な手順に従って精製できる。このような手順としては、限定するものではないが、硫酸アンモニウム沈殿法、アフィニティーカラムの使用、通常のカラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等が挙げられる（全体として、R. Scopes, “Protein Purification”, Springer-Verlag, N.Y. (1982)を参照）。精製後、抗体は、本開示の方法を実施するため、又は本開示の方法の実施に有用な医薬組成物を調製するために使用できる。
【０１９８】
本開示の抗体又は抗原結合断片は、当該技術分野で公知のいずれの方法によって、免疫特異的結合に関して分析評価できる。使用可能なイムノアッセイとしては、限定するものではないが、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ（ｓａｎｄｗｉｃｈ）」、イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Ａ免疫アッセイが、ごく一部の例として挙げられる。このようなアッセイは当該技術分野において通常のものであり、公知のものである（例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (2002)を参照）。例示的なイムノアッセイについて、以下に簡単に説明する（ただしこれは限定を意図するものでは全くない）。
【０１９９】
免疫沈降プロトコルは一般に：細胞の集団を、溶解緩衝液、例えばＲＩＰＡ緩衝液（１％のＮＰ－４０又はＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％のデオキシコール酸ナトリウム、０．１％のＳＤＳ、０．１５ＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．２かつ０．０１Ｍのリン酸ナトリウム、１％のトラシルオール）にタンパク質ホスファターゼ及び／又はプロテアーゼ阻害剤（例えばＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補充したものに、溶解させるステップ；関心対象の抗体を細胞溶解液に加えるステップ；ある期間（例えば１４時間）にわたって４℃でインキュベートするステップ；タンパク質Ａ及び／又はタンパク質Ｇセファロースビーズを細胞溶解液に加えるステップ；約１時間以上にわたって４℃でインキュベートするステップ；ビーズを溶解緩衝液中で洗浄するステップ；並びにビーズをＳＤＳ／サンプル緩衝液中に再懸濁するステップを含む。関心対象の抗体の、ある特定の抗原を免疫沈降させる能力を、例えばウエスタンブロット分析によって評価できる。当業者であれば、本開示を考慮すると、抗原に対する抗体の結合を増大させてバックグラウンドを低下させるために修正できるパラメータ（例えば細胞溶解液をセファロースビーズで事前に清澄化すること）について、熟知しているであろう。更なる免疫沈降 プロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (2002)に示されている。
【０２００】
ウエスタンブロット分析は一般に：タンパク質サンプルを調製するステップ；上記タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲル（例えば抗原の分子量に応じて約８～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥ）中で電気泳動させるステップ；上記タンパク質サンプルを、上記ポリアクリルアミドゲルから、ニトロセルロース、ＰＶＤＦ、又はナイロン等の膜に転写するステップ；上記膜をブロッキング液（例えば約３％のＢＳＡ又は無脂肪乳を含むＰＢＳ）中でブロックするステップ；上記膜を洗浄緩衝液（例えばＰＢＳ－ＴＷＥＥＮ（登録商標）　２０）中で洗浄するステップ；ブロッキング緩衝液中で希釈した一次抗体（関心対象の抗体）で上記膜をブロックするステップ；上記膜を洗浄緩衝液中で洗浄するステップ；上記膜を、ブロッキング緩衝液中で希釈した酵素基質（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ若しくはアルカリホスファターゼ）又は放射性分子（例えば^{32}Ｐ若しくは^{125}Ｉ）に結合した（一次抗体、例えば抗ヒト抗体を認識する）二次抗体で、ブロックす

るステップ；上記膜を洗浄緩衝液中で洗浄するステップ；及び上記抗原の存在を検出するステップを含む。当業者であれば、本開示を考慮すると、検出されるシグナルを増大させてバックグラウンドノイズを低下させるために修正できるパラメータについて、熟知しているであろう。更なるウエスタンブロットプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (2002)に示されている。

【０２０１】

酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）は：抗原を調製するステップ；９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルを上記抗原でコーティングするステップ；酵素基質（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）等の検出可能な化合物に結合させた関心対象の抗体を上記ウェルに加え、ある期間にわたってインキュベートするステップ；及び上記抗原の存在を検出するステップを含む。ＥＬＩＳＡを実施する際、関心対象の抗体を、検出可能な化合物に結合させる必要はなく、代わりに、検出可能な化合物に結合させた（関心対象の抗体を認識する）第２の抗体をウェルに加えることができる。更に、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体でウェルをコーティングしてもよい。この場合、コーティングされたウェルに関心対象の抗原を加えた後に、検出可能な化合物に結合させた第２の抗体を加えることができる。当業者であれば、検出されるシグナルを増大させるために修正できるパラメータ、及び当該技術分野で公知のＥＬＩＳＡプロトコルの他のバリエーションについて、熟知しているであろう。ＥＬＩＳＡプロトコルに関する更なる議論については、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (2002)を参照されたい。

【０２０２】

抗原に対する抗体の結合親和性、及び抗体－抗原相互作用のオフレートは、競合結合アッセイによって決定できる。競合結合アッセイの一例はラジオイムノアッセイであり、これは、標識されていない抗原の存在量を増大させながら、標識された抗原（例えば^{3}Ｈ又は^{125}Ｉ）を関心対象の抗体と共にインキュベートすることと、標識された抗原に結合した抗体を検出することとを含む。ある特定の抗原に対する関心対象の抗体の親和性、及び結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定できる。第２の抗体との競合もまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定できる。この場合、標識されていない第２の抗体の存在量を増大させながら、抗原を、標識された化合物（例えば^{3}Ｈ又は^{125}Ｉ）に結合させた抗体と共にインキュベートする。

【０２０３】

デコイ受容体

本開示の別の実施形態では、限定するものではないが可溶性ＥｒｂＢ受容体（又はその可溶性断片）といった、エピレグリンに結合するデコイ受容体が、エピレグリン活性の阻害剤として企図される。この作用剤は、細胞結合エピレグリン受容体（例えばＥＧＦＲ）に対するエピレグリンの結合を低減又は防止するために使用でき、これにより、エピレグリン活性のアンタゴニストとして作用できる。このようなデコイ受容体は、サイトカイン又は他のリガンドに結合してその機能を調節するために使用されている（Thomson, (1998) Cytokine Handbook, Academic Press）。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のデコイ受容体は、可溶性ＥｒｂＢ受容体、例えば可溶性ＥＧＦＲ、可溶性ＥｒｂＢ－２、可溶性ＥｒｂＢ－３、可溶性ＥｒｂＢ－４、又はこれらの可溶性断片である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のデコイ受容体は、可溶性ＥＧＦＲ又はその可溶性断片である。

【０２０５】

理論に縛られることを望むものではないが、デコイ受容体は、特定の分子、例えば成長因子（例えばエピレグリン）を、高い親和性及び特異性で認識できるものの、シグナル伝達受容体複合体に対するシグナル伝達又はアゴニストの提示は構造的に不可能である。こ

れらは、アゴニスト及びシグナル伝達受容体成分に対する分子トラップとして機能する。ＩＩ型インターロイキン－１受容体（ＩＬ－１ＲＩＩ）は、最初に同定された純粋なデコイであった。その後、例えば腫瘍壊死因子受容体及びＩＬ－１Ｒファミリーのメンバーについて、デコイ受容体が同定されている。更に、サイレント非シグナル伝達受容体もデコイとして機能する可能性がある。従って、デコイ受容体の使用は、様々なシグナル伝達分子の作用を調節するための一般的な戦略である。

【０２０６】

デコイ受容体は、溶液中、又は膜の外側に生じ得る。デコイ受容体は、分子の、膜にまたがる又は膜と結合するセグメントが存在しないために生じ得る。このセグメントは、当該技術分野では一般に、受容体の膜貫通ドメインと呼ばれる。よって、本開示のいくつかの実施形態では、可溶性受容体は、膜貫通ドメインを持たない膜結合受容体の断片又はバリアントを含む。好ましくは、上記断片は、所望の活性（例えばエピレグリンへの結合）を保持する限りにおいて、少なくとも６個、例えば１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、又は７０個のアミノ酸を含有する。

【０２０７】

本開示の他の実施形態では、膜と結合するセグメントの構造が改変される（例えばＤＮＡ配列の多型又は遺伝子の変異）ため、受容体は膜に繋がれなくなるか、又は受容体は挿入されるものの膜内に保持されなくなる。よって、対応する膜結合形態とは対照的に、デコイ受容体は、膜との連携に重要な遺伝子又は受容体タンパク質の１つまたは複数のセグメントが異なっている。

【０２０８】

本開示は、デコイ受容体産生細胞から単離された又はデコイ受容体コードＤＮＡから組換え操作されたデコイ受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）をコードするｃＤＮＡを包含する。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のデコイ受容体（例えば可溶性ＥｒｂＢ受容体）は、皮疹、脱毛、肺毒性（例えば肺炎若しくは線維症）、神経障害、又は胃腸障害を含むがこれらに限定されない、望ましくない下流での影響を誘発することなく、エピレグリンに結合できる。

【０２１０】

同定されているいずれのエピレグリン受容体が、本開示のデコイ受容体の生成の基礎として機能し得る。

【０２１１】

本明細書に記載のデコイ受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）を分子的にクローニングするために、様々な手順のいずれを使用してもよい。

【０２１２】

例えば、可溶性受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）活性を有する細胞又は細胞株から、好適なｃＤＮＡライブラリを調製できる。可溶性受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）ｃＤＮＡを単離するためのｃＤＮＡライブラリの調製に使用するための細胞又は細胞株の選択は、まず、受容体結合アッセイを用いて受容体活性を測定することによって行うことができる。

【０２１３】

ｃＤＮＡライブラリの調製は、当該技術分野で公知の標準的な技法によって実施できる。公知のｃＤＮＡライブラリ構築技法は、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982)で確認できる。

【０２１４】

デコイ受容体をコードするＤＮＡを、好適なゲノムＤＮＡライブラリから単離することもできる。ゲノムＤＮＡライブラリの構築は、当該技術分野で公知の標準的な技法によって実施できる。公知のゲノムＤＮＡライブラリ構築技法は、Maniatis, T., Fritsch, E.

F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982)で確認できる。

【０２１５】

デコイ受容体分子を、デコイ受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）の部分的な又は完全なアミノ酸配列をコードするＤＮＡからの組換え操作によって、得ることもできる。組換えＤＮＡ技法を用いて、刺激、病的なコラーゲン沈着、及び肺胞リモデリングを伴わずにエピレグリンと結合できるデコイ受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）の少なくとも一部分をコードするＤＮＡ分子が構築される。前掲のManiatis, et al.で確認されるような標準的な組換えＤＮＡ技法が使用される。

【０２１６】

説明を目的として、デコイ受容体、例えば可溶性ＥＧＦＲをコードするＤＮＡを使用する。受容体ＤＮＡ配列を用いて、上記受容体の細胞外ドメイン、又はエピレグリン結合ドメインのみをコードするＤＮＡ分子を構築する。制限エンドヌクレアーゼ切断部位を受容体ＤＮＡ内で特定し、これを直接、細胞外コード部分の切除に利用できる。更に、当該技術分野で公知のＰＣＲ技法を利用して、ＤＮＡの所望の部分を生成してよい。他のクローニング技法を利用して、上述のものと同様の様式でデコイ受容体分子を生成することもできる。

【０２１７】

上述の方法によって得られた、クローニングされたデコイ受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）ｃＤＮＡを、好適なプロモーター及び他の適切な転写調節要素を含有する発現ベクターへの分子クローニングによって組換え発現させて、原核又は真核宿主細胞内に移すことにより、組換えデコイ受容体（例えば可溶性ＥＧＦＲ）を生成できる。このような操作のための技法は、前掲のManiatis, et al.で十分に説明されており、また当該技術分野において公知である。

【０２１８】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）改変細胞

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、ハイブリッド分子であって、抗原結合ドメイン、一般的には一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を含み、これにリンカー、膜貫通ドメイン、及びリンパ球活性化に関与する様々なシグナル伝達ドメインのいずれかが続く、ハイブリッド分子である。第１世代ＣＡＲは、Ｔ細胞活性化の最初のシグナル（「シグナル１」）に必要なＣＤ３－ζのみを含むシグナル伝達ドメインを含む。第２及び第３世代ＣＡＲは更に、第２のシグナル（「シグナル２」）を提供するための、それぞれ１つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば４－１ＢＢ及び／又はＣＤ２８）を含む。

【０２１９】

本開示のいくつかの実施形態では、エピレグリン活性の阻害剤は、ＣＡＲ改変細胞、例えば限定するものではないが、ＣＡＲ改変Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）又はＣＡＲ改変ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ＣＡＲ－ＮＫ細胞）である。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ改変細胞（例えばＣＡＲ－Ｔ細胞）は、限定するものではないが本明細書で開示されるエピレグリン発現細胞、例えばエピレグリン発現樹状細胞といったエピレグリン発現細胞を、破壊又は殺傷する。

【０２２０】

本開示のＣＡＲを発現する細胞も提供される。このような細胞は、免疫細胞、例えば限定するものではないが、Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）又はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞（ＣＡＲ－ＮＫ細胞）であってよい。いくつかの実施形態では、ＣＡＲ改変細胞（例えばＣＡＲ－Ｔ細胞）は、限定するものではないが本明細書で開示されるエピレグリン発現細胞、例えばエピレグリン発現樹状細胞といったエピレグリン発現細胞を、破壊又は殺傷する。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、本開示のＣＡＲは：ａ）エピレグリンに特異的に結合する抗原結合部分を含む細胞外ドメイン；ｂ）膜貫通ドメイン；及びｃ）１つまたは複数のシグ

ナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインを含む。いくつかの実施形態では、エピレグリンに特異的に結合する抗原結合部分は、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片を含む。

【０２２２】

本明細書で開示される方法の実施に有用となり得るＣＡＲは、抗エピレグリン結合ドメイン、細胞質ドメイン、及び膜貫通ドメインを含んでよい。細胞質ドメインは、１つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含んでよい。膜貫通ドメインは一般に、細胞質ドメインとエピレグリン結合ドメインとの間に位置する。

【０２２３】

上記抗エピレグリン結合ドメインは、受容体、抗原結合ポリペプチド、又は標的細胞抗原若しくは受容体に対する天然リガンドを含んでよい。抗エピレグリン結合ドメインは、抗原結合ポリペプチドを含んでよい。抗原結合ポリペプチドの例示的な例は、抗体及び抗体断片である。非限定的な例として、抗原結合ポリペプチドは、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ウサギ抗体、ヒト抗体、マウス抗体、ヒト化抗体、サメ抗体可変ドメイン、サメ抗体のヒト化バージョン、ラクダ化抗体可変ドメイン、ラクダ科抗体可変ドメイン、ラクダ科抗体可変ドメインのヒト化バージョン、単一ドメイン抗体可変ドメイン、及びナノボディであってよい。

【０２２４】

膜貫通ドメインは、ＣＤ２８、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＤＡＰ１０、ＣＤ３－ζ、ＣＤ３－ε、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ９、ＤＡＰ１２、ＣＤ８、ＣＤ８α、ＣＤ１３７、ＣＤ４、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４（ＯＸ－４０）、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ６４、又はＣＤ１５４に由来するものであってよい。

【０２２５】

シグナル伝達ドメインは、ＦｃεＲ受容体Ｉγ鎖（ＦＣＥＲ１Ｇ）、ＦｃＲβ、ＣＤ２２６、ＣＤ６６ｄ、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＤＡＰ１０、ＤＡＰ１２　ＣＤ３－δ、ＣＤ３－ε、ＣＤ３－γ、又はＣＤ３－ζに由来するものであってよい。

【０２２６】

細胞質ドメインは、１つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインを含んでよい。いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ＦｃＲβ、ＦｃεＲ受容体Ｉγ鎖（ＦＣＥＲ１Ｇ）、ＤＡＰ１２、ＤＡＰ１０、ＣＤ３－δ、ＣＤ３－ε、ＣＤ３－γ、ＣＤ３－ζ、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ２２６、又はＣＤ６６ｄに由来する。

【０２２７】

細胞質ドメインは、２つ以上のシグナル伝達ドメインを含んでよい。例えば細胞質ドメインは、２つのシグナル伝達ドメインを含んでよい。

【０２２８】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは更に、１つまたは複数の追加のポリペプチド配列を含む。例示的な追加のポリペプチド配列としては、限定するものではないが、シグナル配列、エピトープタグ、及び検出可能なシグナルを生成するポリペプチドが挙げられる。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインはリンカーを含んでよい。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、抗エピレグリン結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に局在化されたヒンジドメインを含む。ヒンジドメインは、免疫グロブリンヒンジ領域であってよい。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲはリーダー配列を含む。

【０２３２】

アプタマー

本開示のいくつかの実施形態では、エピレグリン活性の阻害剤はアプタマーである。理論に縛られることを望むものではないが、アプタマーは、別の分子に特異的に結合できる合成分子、典型的にはポリヌクレオチドベース又はペプチドベースの分子であってよい。

ポリヌクレオチドアプタマーは、限定するものではないが、有機及び無機分子の中でも特にペプチド、タンパク質、薬剤、ビタミンであるがこれらに限定されない特定の標的分子に対して適切な結合親和性及び特異性を有するように設計された、高度に特異的な３次元立体構造を取る、通常は複数の核酸鎖を含んだＤＮＡ又はＲＮＡ分子であってよい。このような細胞ポリヌクレオチドアプタマーは、指数関数的富化によるリガンドの系統的進化を用いて、ランダム配列の膨大な集団から選択できる。ペプチドアプタマーは典型的には、特定のリガンドに結合するタンパク質足場に付着した、約１０～約２０個のアミノ酸のループである。いくつかの実施形態では、酵母ツーハイブリッドシステム等の方法を用いて、ペプチドアプタマーをコンビナトリアルライブラリから特定及び単離してよい。

【０２３３】

代替足場

標的生体分子の高親和性の特異的な結合といった類似の機能特性を示す、免疫グロブリンに対する代替足場も、本開示のエピレグリン活性の阻害剤として使用してよい。このような足場は、免疫原性の低下又は安定性の向上といった特性の改善が見られる分子をもたらすことが示されている。本明細書で開示される方法の実施に有用となり得る代替足場の非限定的な例としては：人工の、フィブロネクチン由来の、１０番目のフィブロネクチンＩＩＩ型（１０Ｆｎ３）ドメイン（例えばモノボディ、ＡｄＮｅｃｔｉｎ（商標）、若しくはＡｄＮｅｘｉｎ（商標））；人工の、アンキリン反復モチーフ含有ポリペプチド（例えばＤＡＲＰｉｎｓ（商標））リポカリン（例えばＡｎｔｉｃａｌｉｎ）；人工の、低密度リポタンパク質受容体由来Ａドメイン（ＬＤＬＲ－Ａ）（例えばＡｖｉｍｅｒ（商標））；人工の、タンパク質Ａ由来Ｚドメイン（Ａｆｆｉｂｏｄｙ（商標））ＣＴＬＤ$_3$（例えばテトラネクチン）；人工の、テネイシン由来の、テネイシンＩＩＩ型ドメイン（例えばＣｅｎｔｙｒｉｎ（商標））；人工のγ－Ｂクリスタリン由来足場、若しくは人工のユビキチン由来足場（例えばＡｆｆｉｌｉｎ）；チオレドキシン（例えばペプチドアプタマー）；ＫＡＬＢＩＴＯＲ（登録商標）；βサンドイッチ（例えばｉＭａｂ）；人工の、プロテアーゼ阻害剤由来の、Ｋｕｎｉｔｚドメイン（例えばＥＥＴＩ－ＩＩ／ＡＧＲＰ、ＢＰＴＩ／ＬＡＣＩ－Ｄ１／ＩＴＩ－Ｄ２）；Ｃ型レクチン様ドメイン足場；Ｓａｃ７ｄ由来ポリペプチド（例えばＮａｎｏｆｆｉｔｉｎ（登録商標）、又はアフィチン）；人工の、Ｆｙｎ由来のＳＨ２ドメイン（例えばＦｙｎｏｍｅｒｓ（登録商標））；人工の抗体模倣物；ミニタンパク質；及びこれらの、その結合機能性を保持したいずれの遺伝子操作済み対応物が挙げられる。Skerra, Current Opin. in Biotech., 2007 18: 295-304; Binz H et al., Nat Biolechnol 23: (Woern A, Pluckthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002); 1257-68 (2005); Wikman M et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Byla P et al., J Biol Chem 285: 12096 (2010); Zoller F et al., Molecules 16: 2467-85 (2011), Hey T et al., Trends Biotechnol 23:514-522 (2005); Koide A, Koide S, Methods Mol Biol 352: 95-109 (2007); Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol 23: 1126-36 (2005); Gill D, Damle N, Curr Opin Biotech 17: 653-8 (2006)；上記文献はそれぞれ、参照によりその全体があらゆる目的のために本出願に援用される）。

【０２３４】

エピレグリンを阻害する方法

特定の態様では、本開示は、細胞内でのエピレグリンの活性を阻害する方法を提供し、上記方法は、上記細胞を有効量のエピレグリン阻害剤と接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、エピレグリンの上記活性は、エピレグリンの、ＥｒｂＢ受容体との相互作用である。いくつかの実施形態では、上記細胞は線維芽細胞又は周皮細胞である。いくつかの実施形態では、上記細胞はヒト細胞である。

【０２３５】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞内でのエピレグリンの活性を阻害する方法を提供し、上記方法は、上記細胞を有効量の本開示の抗体又は抗原結合断片と接触させるス

テップを含む。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体は、ＥｒｂＢ－１と呼ばれる場合もある上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）受容体である。いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体はＥｒｂＢ－２（例えばＨＥＲ２又はｎｅｕ）である。いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体はＥｒｂＢ－３（ＨＥＲ３）である。いくつかの実施形態では、上記ＥｒｂＢ受容体はＥｒｂＢ－４（ＨＥＲ４）である。

【０２３７】

いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は更に高いパーセンテージだけ、低減される。いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、約５％～２０％、１０％～３０％、２０％～４０％、３０％～５０％、４０％～６０％、５０％～７０％、６０％～８０％、７０％～９０％、８０％～９５％、又は更に高いパーセンテージだけ、低減される。いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、約４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、又は更に高いパーセンテージだけ、低減される。いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、約５０％低減される。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用であり、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用は、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は更に高いパーセンテージだけ、低減される。いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用であり、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用は、約５％～２０％、１０％～３０％、２０％～４０％、３０％～５０％、４０％～６０％、５０％～７０％、６０％～８０％、７０％～９０％、８０％～９５％、又は更に高いパーセンテージだけ、低減される。いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用であり、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用は、約４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、又は更に高いパーセンテージだけ、低減される。いくつかの実施形態では、エピレグリンの活性は、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用であり、エピレグリンのＥｒｂＢ受容体との相互作用は、約５０％低減される。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合断片は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合断片は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は更に高いパーセンテージだけ阻害する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合断片は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を、少なくとも約５％～２０％、１０％～３０％、２０％～４０％、３０％～５０％、４０％～６０％、５０％～７０％、６０％～８０％、７０％～９０％、８０％～９５％、又は更に高いパーセンテージだけ阻害する。いくつかの実施形態では、このエピレグリン阻害剤は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を、約４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、又は更に高いパーセンテージだけ阻害する。いくつかの実施形態では、このエピレグリン阻害剤は、線維芽細胞のエピレグリン誘導型増殖を、約５０％阻害する。

【０２４０】

処置の方法

一態様では、本開示は、線維症に関連する細胞内での１つまたは複数の変化を反転させ

る又は予防する方法を含み、上記方法は、上記細胞を有効量の本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）と接触させるステップを含む。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、線維症に関連する上記１つまたは複数の変化は、限定するものではないが例えば：フィブロネクチンＩ（ＦＮ１）の発現上昇；エピレグリン（ＥＲＥＧ）の発現上昇；Ｉ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ１Ａ１）の発現上昇；ＩＶ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ４Ａ１）の発現上昇；ＶＩ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ６Ａ１）の発現上昇；テネイシン－Ｃ（ＴＮＣ）の発現上昇；フィブロネクチンエクストラドメインＡアイソフォーム（$ＦＮ^{ＥＤＡ}$）の発現上昇；単球走化性タンパク質１（ＭＣＰ－１）の発現上昇；メタロプロテイナーゼ組織阻害剤１（ＴＩＭＰ－１）の発現上昇、又はこれらの組み合わせであってよい。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、線維症に関連する上記１つまたは複数の変化の上記反転は、完全な反転である。いくつかの実施形態では、線維症に関連する上記１つまたは複数の変化の上記反転は、部分的な反転である。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、線維症に関連する上記１つまたは複数の変化を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、線維症に関連する上記１つまたは複数の変化は、本開示の上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に、１００％を超える量だけ反転してよく、従って上記変化の量は、疾患又は障害がない状態で生じるもの、即ち対照レベルよりも低い量となる。いくつかの実施形態では、線維症に関連する上記１つまたは複数の変化は、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に、少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、又は２００％反転してよい。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、フィブロネクチンＩ（ＦＮ１）の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、フィブロネクチンＩ（ＦＮ１）の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＥＲＥＧの発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＥＲＥＧの発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＣＯＬ１Ａ１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断

片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＣＯＬ１Ａ１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＣＯＬ４Ａ１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＣＯＬ４Ａ１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＣＯＬ６Ａ１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＣＯＬ６Ａ１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＴＮＣの発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＴＮＣの発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＦＮ^{EDA}の発現上昇を、上記抗体又は抗原結合断片の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＦＮ^{EDA}の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＭＣＰ－１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、

８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＭＣＰ－１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、又は２００％反転させるために十分な量である。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＴＩＭＰ－１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。いくつかの実施形態では、本開示のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、ＴＩＭＰ－１の発現上昇を、上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の投与後に少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、又は２００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、上記細胞は線維芽細胞又は周皮細胞である。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、上記細胞はヒト細胞である。

【０２５５】

一態様では、本開示は、線維性疾患又は障害の処置又は予防を必要とする対象（例えばヒト対象）の、線維性疾患又は障害を処置又は予防する方法を含み、上記方法は、治療有効量の、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）を、上記対象に投与するステップを含む。いくつかの実施形態では、記載された上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の上記投与は、上記線維性疾患及び／又は障害の反転をもたらす。いくつかの実施形態では、上記線維性疾患及び／又は障害の上記反転は、上記線維性疾患及び／又は障害の完全な反転である。いくつかの実施形態では、上記反転は、上記線維性疾患及び／又は障害の部分的な反転である。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、記載された上記エピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、上記線維性疾患及び／又は障害を、記載された上記抗体又は抗原結合断片の投与後に少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％反転させるために十分な量で、投与される。

【０２５７】

線維性疾患及び障害

本開示は、線維症と診断された、又は線維症の発症リスクを有する、いずれの対象において実施できる。線維症は多くの疾患及び障害に関連する。対象は、例えば：特発性肺線維症を含む間質性肺疾患；（内臓に影響する）全身性強皮症と、モルフェアと呼ばれる場合もある（皮膚のみの）限局性強皮症との両方を含む、強皮症（若しくは硬化症）；消化管線維症；心臓線維症；放射線誘導性肺線維症；ブレオマイシン肺；サルコイドーシス；珪肺；家族性肺線維症；自己免疫疾患；又は１つまたは複数の線維増殖性マトリックス分子沈着、病的なコラーゲン蓄積の増加、アポトーシス、及び蜂巣肺化を伴う肺胞中隔破裂が発生するいずれの障害と診断されているか、あるいはこれらの発症リスクを有する可能性がある。対象は、アスベスト、砕石、及び金属粉塵への曝露を原因として、又は線維症発症のリスク因子であるブレオマイシン、ブスルファン、フェニトイン、及びニトロフラントインといった薬剤の投与を原因として、線維症に罹患している、又は線維症発症のリスクを有すると特定され得る。好ましくは対象は哺乳類であり、より好ましくはヒトである。

【０２５８】

線維性疾患の他の例示的な例としては、限定するものではないが、硬化性粘液水腫、腎性全身性線維症（腎性線維化性皮膚症とも呼ばれる）、及び長期ＣＯＶＩＤ症候群である

。

【０２５９】

同種臓器移植に続発する臓器線維症、例えば移植片移植線維症、又は慢性移植片対宿主病、硬化性移植片対宿主病、及び硬化性移植片対宿主病皮膚線維症を含むがこれらに限定されない移植片対宿主病の処置に、本開示の組成物及び方法を使用できることも企図されている。非限定的な例としては、腎移植線維症、心臓移植線維症、肝移植線維症等が挙げられる。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び方法を例えば、肺移植拒絶反応に起因する可能性がある閉塞性細気管支炎症候群の処置に使用してよい。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される線維性疾患又は障害の処置又は予防方法は、限定するものではないが、強皮症、間質性肺疾患、消化管線維症、心臓線維症、皮膚線維症（例えば全身性硬化症皮膚線維症、若しくは硬化性移植片対宿主病皮膚線維症）、硬化性粘液水腫、腎性全身性線維症（腎性線維化性皮膚症）、慢性移植片対宿主病、硬化性移植片対宿主病、閉塞性細気管支炎症候群、ケロイド瘢痕、例えば長期ＣＯＶＩＤ症候群を含むＣＯＶＩＤ－１９（例えばＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２感染症）に関連若しくは起因する線維症（例えば肺線維症）、又はこれらの組み合わせといった、線維性疾患又は障害の処置又は予防を含んでよい。いくつかの実施形態では、上記強皮症は全身性強皮症であり、いくつかの実施形態では、上記強皮症は限局性強皮症（モルフェア）である。いくつかの実施形態では、上記間質性肺疾患は特発性肺線維症である。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、上記線維症は肺線維症である。本明細書中で使用される場合、用語「肺線維症（ｐｕｌｍｏｎａｒｙ　ｆｉｂｒｏｓｉｓ）」、又は「線維性肺疾患（ｆｉｂｒｏｔｉｃ　ｌｕｎｇ　ｄｉｓｅａｓｅ）」、又は「平滑筋腫性肺疾患（ｆｉｂｒｏｉｄ　ｌｕｎｇ　ｄｉｓｅａｓｅ）」、又は「肺の瘢痕化（ｓｃａｒｒｉｎｇ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｌｕｎｇ）」は、肺における、過剰な線維性結合組織の形成又は発達を特徴とする疾患（線維症）の群を指す。肺線維症の症状は主に以下の通りである：特に労作時の息切れ；慢性的な乾いた空咳；疲労及び衰弱；胸部の不快感；並びに食欲不振及び急激な体重減少。肺線維症は、他の疾患の二次的影響である場合があり、上記他の疾患のほとんどは、自己免疫障害、ウイルス感染、又は肺に対するその他の微細損傷といった、間質性肺疾患に分類される。肺線維症は、何らかの既知の原因なしに出現する場合もある（「特発性（ｉｄｉｏｐａｔｈｉｃ）」）。特発性肺線維症は、通常型間質性肺炎（ｕｓｕａｌ　ｉｎｔｅｒｓｔｉｔｉａｌ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａ：ＵＩＰ）として公知の一連の特徴的な組織学的／病理学的特徴を除外して診断される。

【０２６２】

二次的影響としての肺線維症を引き起こし得る疾患及び状態としては：環境及び職業による汚染物質の吸入（石綿症、珪肺、及びガス曝露）；細菌、真菌、又は動物産物で汚染された塵芥の吸入に起因するものが大半である、過敏性肺炎；喫煙；関節リウマチ、ＳＬＥ等の結合組織疾患；強皮症、サルコイドーシス、及びウェゲナー肉芽腫症；感染症；アミオダロン、ブレオマイシン（ピンヤンマイシン（ｐｉｎｇｙａｎｇｍｙｃｉｎ））、ブスルファン、メトトレキサート、アポモルヒネ、及びニトロフラントイン等の薬剤；並びに胸部に対する放射線療法が挙げられる。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び方法は、特発性肺線維症（ＩＰＦ）の処置又は予防に使用できる。ＩＰＦは、病因が未知の壊滅的な慢性肺疾患である。ＩＰＦでは、処置にかかわらず、５０％を超える患者が初期診断から３．５～４年以内に死亡する（Ｔｒａｖｉｓ，ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．１８８:７３３-７４８）。広範な研究努力にもかかわらず、その発症機序は依然として把握されておらず、議論の的となっている（Ｓｅｌｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ａｎｎ．Ｉｎｔ．Ｍｅｄ．１３４:１３６-１５１；Ｓｅｌｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．，２００８，ＰＬｏＳ　Ｍｅｄ．５:ｅ６２）。

【０２６４】

世界的に発症率が漸増しており、また肺移植以外に実証された療法が存在しないことから、ＩＰＦの処置は製薬業界及び胸部専門の医師の両方にとって大きな課題となっている。現在までに、利用可能なあらゆる治療薬が経口又は皮下投与で全身送達されてきた。その治療効果が限定的であることに加え、これらの作用剤の大半の使用が副作用を伴い、この副作用は大きな副作用（例えば免疫抑制とそれに続く感染症、疾患の急性増悪、及び過度の出血）から小さな副作用（下痢や吐き気といった胃腸合併症を含む）にまで及び、患者の生活の質に重大な影響を及ぼす。現時点で試された作用剤はいずれも、患者の生存率に有意な効果を及ぼしていない。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び方法は、強皮症の処置又は予防に使用できる。強皮症は、一般的に自己免疫リウマチ性疾患の１つに分類される慢性結合組織疾患である。強皮症の患者は、自己免疫を示唆する特定の抗体（ＡＮＡ、抗セントロメア、又は抗トポイソメラーゼ）を血液中に有する場合がある。症状は一般に、瘢痕化を伴い得る皮膚の肥厚、血管障害、様々な程度の炎症、及び疼痛を含む場合があり、免疫系の過剰活性と関連している。

【０２６６】

強皮症は、皮膚及び臓器への影響の程度及び部位によって分類できる。従って、強皮症は、限局性強皮症及び全身性硬化症という２つの主要な群にカテゴライズされており、これらは、皮膚の侵襲の部位及び程度に基づいて、びまん性形態又は限局性形態へと更に細分化できる。限局性強皮症の皮膚の変化は、斑状モルフェア又は線状強皮症として、孤立した領域にある。モルフェアは、硬化してわずかに色素沈着した皮膚の斑状領域に限局された強皮症である。モルフェアは皮膚に複数の病変を引き起こす場合がある。モルフェアは、体内の他の部分の疾患とは関連がなく、侵襲を受けた皮膚領域のみに関連する。線状強皮症は、通常は下肢に限局された強皮症であり、多くの場合、小児の脚に沿って硬化した皮膚の帯として現れる。小児の線状強皮症は、罹患した四肢の骨成長を妨げる場合がある。線状強皮症は、腹部等の限局性強皮症の皮膚の斑の「サテライト」領域と関連する場合がある。

【０２６７】

広範囲型の強皮症は、皮膚に加えて内臓にも関与する。全身性硬化症と呼ばれるこのタイプは、皮膚の侵襲の程度によって、びまん性又は限局性として更に細かくカテゴライズされる。強皮症のびまん性形態（びまん性全身性硬化症）は、四肢、顔面、及び体幹（胸部、背部、腹部、又は脇腹）の皮膚の対称的な肥厚を伴い、これは早期炎症期の後、硬化へと急速に進行する場合がある。臓器疾患は、早期に発生する場合があり、重篤で、平均余命を大幅に減少させる。影響を受ける臓器としては、食道、腸、並びに肺、心臓、及び腎臓の瘢痕化（線維症）が挙げられる。高血圧が問題となる場合があり、これが腎不全（腎クリーゼ）につながる場合もある。

【０２６８】

強皮症の限局性形態は、皮膚の侵襲が大幅に少なく、皮膚の肥厚が指、手、及び顔面の皮膚に限定される傾向がある。皮膚の変化及び疾患の他の特徴は、びまん性形態よりもゆっくりと発生する傾向がある。特徴的な臨床的特徴が、限局性形態の強皮症の患者に生じる場合があるため、この形態には、一般的な構成要素の最初の文字で構成される別名が付けられている。従ってこの形態は、強皮症の「ＣＲＥＳＴ」バリアント（そのサブセット、例えばＣＲＳＴ、ＲＥＳＴ、又はＳＴ）とも呼ばれる。ＣＲＥＳＴ症候群は、以下の特徴を示す：石灰沈着症（皮膚におけるカルシウムの微小な沈着物の形成）、レイノー現象（指、足指、鼻、舌、又は耳への供給を行う微小な動脈の痙攣）、食道疾患（食道の下側２／３の筋肉の機能低下を特徴とする）、強指症（指又は足指の皮膚の限局的な肥厚及び硬化）、並びに毛細血管拡張症（顔面、手、口唇の裏側に多い微小な赤色領域）

【０２６９】

一部の対象は、強皮症と、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、及び多発性筋炎等の１つまたは複数の他の結合組織疾患とを有する。強皮症の特徴と、多発性筋炎、全身性

エリテマトーデス、及び特定の異常な血液検査の特徴とが合わさると、混合性結合組織疾患（ｍｉｘｅｄ　ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ　ｔｉｓｓｕｅ　ｄｉｓｅａｓｅ：ＭＣＴＤ）の診断に繋がる場合がある。

【０２７０】

併用療法

特定の実施形態では、本開示に記載のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）は、線維性疾患及び／又は障害の処置又は予防に有用な少なくとも１つの追加の治療剤と組み合わせて、本開示の方法に使用できる。この追加の治療剤は、本明細書で特定されている治療剤、又は別の治療剤、例えば線維性肺疾患を処置、予防、若しくはその症状を低減することが知られている市販の治療剤を含んでよい。

【０２７１】

本開示に従って使用することが考えられる追加の治療剤の非限定的な例としては、ミコフェノール酸モフェチル、ニンテダニブ、トシリズマブ、ピルフェニドン、リツキシマブ、プレドニゾン又は別のコルチコステロイド薬剤、メトトレキサート、ＵＶＡ又はＵＶＢ光線療法、体外フォトフェレーシス、幹細胞移植、及びシクロホスファミドが挙げられる。

【０２７２】

相乗効果は例えば、例えばＳｉｇｍｏｉｄ－Ｅ$_{max}$方程式（Holford & Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453）、Ｌｏｅｗｅ　ａｄｄｉｔｉｖｉｔｙ方程式（Loewe & Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326）、及びｍｅｄｉａｎ　ｅｆｆｅｃｔ方程式（Chou & Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22:27-55）のような好適な方法を用いて、計算できる。上述の各方程式を実験データに適用することにより、対応するグラフを生成して、薬剤の組み合わせの効果の評価を補助できる。上述の方程式に関連する上記対応するグラフは、それぞれ濃度効果曲線、アイソボログラム（ｉｓｏｂｏｌｏｇｒａｍ）曲線、及び併用指数（ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ｉｎｄｅｘ）曲線である。

【０２７３】

用量設定、製剤、投与

対象（ヒト等）に投与される、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の用量は、特定の組成物、投与の方法、並びに処置される疾患又は障害（線維性疾患又は障害等）の特定の種類及びステージに応じて変化し得る。この量は、疾患又は障害（線維性疾患又は障害等）に対する治療的応答といった所望の応答をもたらすために十分な量とする。いくつかの実施形態では、組成物（例えば記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片））の量は、治療有効量である。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、真皮の厚さの正常化及び／又は改善を促進するために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、肺線維症の正常化及び／又は改善を促進するために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、肺胞中隔の正常化及び／又は改善を促進するために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、線維性腫瘤を削減又は予防するために十分な量である。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、線維症に関連する細胞内での１つまたは複数の変化を反転させる又は予防するために十分な量である。非限定的な例として、線維症に関連する上記変化としては、ＦＮ１の発現上昇；ＥＲＥＧの発現上昇；ＣＯＬ１Ａ１の発現上昇；ＣＯＬ４Ａ１の発現上昇；ＣＯＬ６Ａ１の発現上昇；ＴＮＣの発現上昇；ＦＮ^{EDA}の発現上昇；ＭＣＰ－１の発現上昇；ＴＩＭＰ－１の発現上昇、又はこれらの組み合わせが挙げられる。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＦＮ１の少なく

とも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、フィブロネクチンＩ（ＦＮ１）の過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＥＲＥＧの少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＥＲＥＧの過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＣＯＬ１Ａ１の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＣＯＬ１Ａ１の過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＣＯＬ４Ａ１の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＣＯＬ４Ａ１の過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＣＯＬ６Ａ１の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＣＯＬ６Ａ１の過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＴＮＣの少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＴＮＣの過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＦＮ^{EDA}の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＦＮ^{EDA}の過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＭＣＰ－１の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％

、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、上記組成物は、上記組成物の投与後に、ＭＣＰ－１の過剰発現を少なくとも約１１０％、１２０％、１３０％、１４０％、１５０％、１６０％、１７０％、１８０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％反転させるために十分な量である。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、上記組成物の量は、上記組成物の投与後に、ＴＩＭＰ－１の少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の減少をもたらすために十分な量である。

【０２８５】

コラーゲンのヒドロキシプロリンアッセイに加えて、例えばＦＮ１及びＴＮＣの発現及び／又は量の、上述の変化のいずれかを測定するためのアッセイとしては、限定するものではないが、定量ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）、マイクロアレイ、ＲＮＡシーケンシング（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）、シングルセルＲＮＡ－Ｓｅｑ（ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ）、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、質量分析法、及びウエスタンブロットが挙げられる。

【０２８６】

本明細書に記載のエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）はいずれも、他の作用剤、賦形剤、又は安定剤を含む製剤等の組成物で提供できる。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性組織、又は線維性疾患及び／若しくは障害に関連する組織への、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）の送達を促進する、標的剤又はキャリアを更に含む。例示的なキャリアとしては、様々な組成物のリポソーム、ミセル、ナノ分散アルブミン及びその改変物、ポリマーナノ粒子、デンドリマー、無機ナノ粒子が挙げられる。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、上記組成物は、ヒトへの投与に適している。いくつかの実施形態では、上記組成物は、獣医学の文脈においては家庭用ペット及び農業用動物といった、哺乳類への投与に適している。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性疾患及び／又は障害の発症後に、対象（例えばヒト対象）に投与される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性障害の発症から１日、２日、３日、４日、５日、６日、若しくは７日、又は更に多くの日数が経過した後に、投与される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性疾患又は障害の発症から１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、２０週間、３０週間、４０週間、５０週間、又は更に長期間が経過した後に、投与される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性疾患又は障害の発症から１年、２年、３年、４年、５年、６年、７年、８年、９年、１０年、２０年、３０年、４０年、５０年、又は更に長期間が経過した後に、投与される。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性疾患及び／又は障害の発症前に、対象（例えばヒト対象）に投与される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性障害の発症から１日、２日、３日、４日、５日、６日、若しくは７日、又は更に多くの日数だけ前に、投与される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性疾患又は障害の発症から１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、２０週間、３０週間、４０週間、５０週間、又は更に長期間だけ前に、投与される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、線維性疾患又は障害の発症から１年、２年、３年、４年、５年、６年、７年、８年、９年、１０年、２０年、３０年、４０年、５０年、又は更に長期間だけ前に、投与される。

【０２９１】

本明細書で開示されているエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）を含む

組成物の、多種多様な好適な製剤が存在する。以下の製剤及び方法は単なる例示であり、限定的なものでは全くない。経口投与に好適な製剤は、（ａ）水、生理食塩水、又はオレンジジュース等の希釈剤中に溶解させた有効量の上記化合物のような、液体溶液、（ｂ）所定量の有効成分を固体又は顆粒としてそれぞれ内包した、カプセル、サシェ又は錠剤、（ｃ）適切な液体中での懸濁液、及び（ｄ）好適な乳剤からなっていてよい。錠剤形態は、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、並びに他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、香味剤、及び薬理学的に適合する賦形剤のうちの、１つまたは複数を含むことができる。ロゼンジ形態は、通常はスクロース及びアカシア又はトラガカントである香味料中に有効成分を含むことができ、また、ゼラチン及びグリセリン等の不活性基剤中に有効成分を含むトローチ、又は有効成分に加えて上述の賦形剤を含むスクロース及びアカシア、乳剤、ゲル等も、当該技術分野で公知である。

【０２９２】

好適なキャリア、賦形剤、及び希釈剤の例としては、限定するものではないが、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルギン酸、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、生理食塩水溶液、シロップ、メチルセルロース、メチル及びプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、並びに鉱油が挙げられる。いくつかの実施形態では、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体又は抗原結合断片）をここで議論されているキャリアと共に含む組成物は、乾燥製剤（例えば凍結乾燥製剤）で提供される。上記製剤は更に、潤滑剤、湿潤剤、乳化及び懸濁剤、保存剤、甘味剤、又は香味剤を含むことができる。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、上記組成物は、治療上有効な転帰をもたらすいずれの経路で投与できるように製剤される。これらには、限定するものではないが、静脈内、動脈内、腹腔内、小胞内、皮下、髄腔内、肺内、筋肉内、気管内、眼内、経皮、経口、又は吸入投与が含まれる。

【０２９４】

非経口投与に好適な製剤としては：抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤、及び上記製剤を目的のレシピエントの血液に適合したものにする溶質を含有できる、水性及び非水性の等張無菌注射液：並びに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、及び防腐剤を含むことができる、水性及び非水性の無菌懸濁液が挙げられる。上記製剤は、アンプル及びバイアル等の単位用量又は複数用量用密封コンテナで提供でき、使用直前に注射用の無菌液体賦形剤、例えば水を加えることしか必要ない、凍結乾燥状態で保管できる。即時注射用溶液及び懸濁液は、上述の種類の無菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製できる。注射用の製剤が好ましい。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、上記組成物は、約４．５～約９．０のｐＨ範囲を有するように製剤され、これは例えば約５．０～約８．０、約６．５～約７．５、及び約６．５～約７．０のうちのいずれのｐＨ範囲も含む。いくつかの実施形態では、上記組成物は、ｐＨが約６以上となるように製剤され、これは例えば約６．５以上、７以上、又は８以上（例えば約８）のうちのいずれも含む。また上記組成物は、グリセロール等の好適な張性改変剤を加えることにより、血液と等張となるようにすることができる。

【０２９６】

特定の実施形態では、本開示の組成物は、１つまたは複数の薬学的に許容可能な賦形剤又はキャリアを用いて製剤される。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、治療有効量の本開示の化合物と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。

【０２９７】

キャリアは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、これらの好適な混合物、並びに植物油

を含有する、溶媒又は分散媒体であってよい。例えばレシチン等のコーティングの使用によって、分散剤の場合には必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持できる。微生物の作用の予防は、抗菌及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等によって達成できる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、塩化ナトリウム、又はマンニトール及びソルビトール等の多価アルコールを、上記組成物に含めるのがよい。

【０２９８】

特定の実施形態では、本開示は：治療有効量の本開示の化合物を、単独で、又は第２の医薬品と組み合わせて保持するコンテナと；上記化合物を、本開示で企図されている疾患又は障害の１つまたは複数の症状の処置、予防、又は低減に使用するための説明書とを含む、パッケージ化された医薬組成物を対象とする。

【０２９９】

製剤は、従来の賦形剤、即ち当該技術において公知の、いずれの好適な投与形態に適した、薬学的に許容可能な有機又は無機キャリア物質との混合物として使用できる。薬学的調製物は滅菌でき、また必要に応じて、助剤、例えば：潤滑剤；防腐剤；安定剤；湿潤剤；乳化剤；浸透圧に影響を与えるための塩；緩衝剤、着色、香味及び／又は芳香物質等と混合できる。これらは、必要な場合には他の活性作用剤、例えば鎮痛剤と組み合わせることもできる。

【０３００】

好適な組成物及び剤形としては、例えば分散液、懸濁液、溶液、シロップ、顆粒、ビーズ、粉末、ペレット、鼻腔又は経口投与用の液体スプレー、吸入用の乾燥粉末及びエアロゾル化製剤等が挙げられる。本開示の薬学的調製物の、粉末化及び顆粒製剤は、公知の方法を用いて調製できる。このような製剤は、対象に直接投与してもよく、又は、例えば対象への投与に好適な材料を形成するために使用してもよい。これらの製剤はそれぞれ、分散又は湿潤剤、懸濁剤、及び防腐剤のうちの１つまたは複数を更に含んでよい。充填剤、及び甘味剤、香味剤、又は着色剤といった追加の賦形剤も、これらの製剤に含めてよい。

【０３０１】

本開示の医薬組成物は、溶液又は懸濁液の液滴の形態で有効成分を提供するように製剤することもできる。このような剤形は、有効成分を含む、任意選択で滅菌された、水性又は希アルコール性の溶液又は懸濁液として、調製、パッケージ化、又は販売でき、いずれの噴霧又は霧化装置を用いて簡便に投与できる。このような製剤は更に、サッカリンナトリウム等の香味剤、揮発油、緩衝剤、界面活性剤、又はヒドロキシ安息香酸メチル等の防腐剤を含むがこれらに限定されない、１つまたは複数の追加の成分を含んでよい。本開示において有用となる製剤及び組成物は、本明細書に記載されている特定の製剤及び組成物に限定されないことを理解されたい。

【０３０２】

キット

本明細書で提供されるキットは、記載されているエピレグリン阻害剤、又は本明細書に記載のエピレグリン阻害剤及び／若しくは１つまたは複数の他の作用剤を含む医薬組成物を含む、１つまたは複数のコンテナを含み、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法に従った使用説明書を更に含む。上記キットは更に、処置に適した対象の選択の説明を含む。本開示のキットで提供される説明書は、典型的にはラベル又はパッケージ添付文書（例えばキットに含まれる紙のシート）に記載された説明書であるが、機械で読み取り可能な説明書（例えば磁気又は光ストレージディスクに保持された説明書）も許容可能である。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、上記キットは：ａ）本明細書に記載の抗エピレグリン抗体及び／若しくは抗原結合断片、又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む組成物；並びに任意選択でｂ）記載された抗体又は抗原結合断片を疾患又は障害の処置のために投与するための説明書を含む。

【０３０４】
いくつかの実施形態では、上記キットは：ａ）限定するものではないが可溶性ＥｒｂＢ受容体、例えば可溶性ＥＧＦＲのようなデコイ受容体を含む、エピレグリン阻害剤、又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む組成物；並びに任意選択で、ｂ）上記エピレグリン阻害剤を疾患又は障害の処置のために投与するための説明書を含む。
【０３０５】
いくつかの実施形態では、上記キットは：ａ）本明細書に記載のＣＡＲ改変細胞（例えばＣＡＲ－Ｔ細胞）、又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む組成物；並びに任意選択で、ｂ）ＣＡＲ改変細胞（例えばＣＡＲ－Ｔ細胞）を疾患又は障害の処置のために投与するための説明書を含む。
【０３０６】
いくつかの実施形態では、上記キットは：ａ）アプタマーを含むエピレグリン阻害剤、又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む組成物；並びに任意選択で、ｂ）上記エピレグリン阻害剤を疾患又は障害の処置のために投与するための説明書を含む。
【０３０７】
いくつかの実施形態では、上記キットは：ａ）代替足場を含むエピレグリン阻害剤、又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む組成物；並びに任意選択で、ｂ）上記エピレグリン阻害剤を疾患又は障害の処置のために投与するための説明書を含む。
【０３０８】
本開示のキットは、好適なパッケージ内にある。好適なパッケージとしては、限定するものではないが、バイアル、ボトル、ジャー、柔軟なパッケージ（例えば密封マイラーバッグ又はプラスチックバッグ）等が挙げられる。キットは、任意選択で、緩衝剤及び解釈情報等の追加の構成要素を提供してよい。従って本出願は、バイアル（密封バイアル等）、ボトル、ジャー、柔軟なパッケージ等を含む製造物品も提供する。
【０３０９】
いくつかの実施形態では、上記キットは、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体若しくは抗原結合断片）、若しくは上記作用剤を含む組成物、及び／又は追加の治療剤の、対象への送達を容易にする、１つまたは複数の構成要素を備える。いくつかの実施形態では、上記キットは例えば、対象の細胞への送達に適したシリンジ及び針等を備える。このような実施形態では、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体若しくは抗原結合断片）、又は上記作用剤を含む組成物は、１つのバッグ内又は１つまたは複数のバイアル内のキットに内包されていてよい。いくつかの実施形態では、上記キットは、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体若しくは抗原結合断片）、又は上記作用剤を含む組成物の、対象への静脈内又は動脈内送達を容易にする、構成要素を備える。いくつかの実施形態では、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体若しくは抗原結合断片）、又は上記作用剤を含む組成物は、例えばボトル又はバッグ（例えば細胞を含む最大約１．５Ｌの溶液を内包できる血液バッグ又は同様のバッグ）内に内包されていてよく、上記キットは更に、記載されたエピレグリン阻害剤（例えば抗体若しくは抗原結合断片）、又は上記作用剤を含む組成物の、対象への送達に適した、チューブ及び針を備える。
【０３１０】
組成物の使用に関連した説明書は、一般に、目的とする処置のための投薬量、投薬スケジュール、及び投与経路に関する情報を含む。上記コンテナは、単位用量、バルクパッケージ（例えば複数用量パッケージ）、又は単位用量未満であってよい。例えば、長期間、例えば１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、２週間、３週間、４週間、６週間、８週間、３か月、４か月、５か月、７か月、８か月、９か月、又は更に長い期間のうちのいずれかにわたって、対象に効果的な処置を提供するために十分な投薬量の、本明細書で開示されているようなエピレグリン阻害

剤（例えば抗体又は抗原結合断片）を内包した、キットを提供してよい。キットは、複数単位用量の医薬組成物と、使用のための説明書とを含んでもよく、例えば病院の薬局及び調剤薬局である薬局での保管及び使用に十分な量でパッケージ化されていてよい。

【実施例】

【０３１１】

本明細書で開示される実施形態の一部を更に説明するために、以下の実施例を提供する。これらの実施例は本開示の実施形態の説明を目的としており、その限定を目的とするものではない。

【０３１２】

実施例１．ヒトエピレグリン中和抗体の生成

本研究では、皮膚及び肺の強皮症（全身性硬化症／ＳＳｃ）関連線維症、並びに特発性肺線維症、慢性移植片対宿主病、及びＣＯＶＩＤ１９感染症の合併症である肺線維症といった他の線維性疾患の処置のための、ヒト化エピレグリン中和抗体の生成を目指した。提案された本研究の目標を達成するために、完全ヒト抗体可変領域を生成できるＡｌｌｏｙマウスを使用してヒト化エピレグリン抗体を生成するためのプロジェクトを立ち上げた。Ａｌｌｏｙマウス（ＡＴＸ　ＧＫ－ＢＬ６、及びＡＴＸ　ＧＫ　ＭＩＸ）を使用した。免疫原として使用するために、上皮成長因子（ＥＧＦ）ドメインを含有する組換えヒトエピレグリンの大量注文を、Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入した（Ｃａｔ＃　１１９５－ＥＰ）。各Ａｌｌｏｙマウス系統を３頭ずつ、組換えエピレグリンタンパク質で免疫化した（図１に図示）。免疫化の３５日後にエピレグリン抗体力価を測定した。Ａｌｌｏｙマウスの混合バックグラウンドは陽性のエピレグリン力価を生じたものの、Ｂ６はそうではなかった（図２）。混合マウスの脾臓からのＢ細胞をプールし、ハイブリドーマライブラリの生成に使用した。上記ハイブリドーマライブラリから、細胞を個別にプレーティングして、ＥＬＩＳＡにより上清がエピレグリン結合抗体を含有する５つのウェルを得た（図３、及び表１）。これらのクローンの重鎖及び軽鎖の可変領域をシーケンシングし、そこから２つの固有の配列を発見した。以下で議論するように、ウェルＭ３、Ｍ４、及びＭ５を表す固有のクローンが、ヒトエピレグリンタンパク質に対する中和作用を有することが分かった。Ｍ３～５によって生成された抗体の配列は図４に示されており、この抗体クローンは、本明細書ではヒト化エピレグリン中和抗体１（ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１）と呼ばれる。

【０３１３】

【表１】

表1. 組換えヒトエピレグリン – 抗体力価

T.C./ ELISAウェル	O.D.	
2B12	0.32	
5H07	0.60	M1
5H08	0.47	
6A11	0.32	
6B09	0.66	M2
6F09	0.27	
6F11	0.34	
12B03	3.29	M3
12E08	3.43	M4
20D08	0.22	
25H09	0.27	
25H10	0.31	
30F01	2.57	M5

【０３１４】

実施例２．ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１は、組換え及び全長エピレグリンタンパク質を中和する

それらのエピレグリン阻害能を評価するために、ハイブリドーマクローンによって生成された２つの固有の抗体が、インビトロで組換えエピレグリンタンパク質を阻害できるかどうかを試験した。他のＥＧＦＲリガンドの特徴として、組換えヒトエピレグリン（Ａｌｌｏｙマウスの免疫化に使用されたものと同一）は、培養されたヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＦ、ＡＴＣＣ＃ ＳＣＲＣ－１０４１）の増殖を誘導した（図５、左パネル）。最大の増殖は１００ｎｇ／ｍｌにおいて発生したため、この濃度を後続の阻害実験に使用した。続いて、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１及び市販のラット抗ヒト／マウス中和エピレグリン抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ ＭＡＢ１０６８）の、エピレグリン誘導ＨＦＦ増殖に対する阻害能を比較した。市販の中和抗体と同様に、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１はＨＦＦ増殖を濃度依存的に阻害した（図５、中央パネル及び右パネル）。市販の抗体及びｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１のＩＣ$_{50}$は同等であり、市販の抗体では０．１６μｇ／ｍｌ、上記ヒト化抗体では０．１～０．３μｇ／ｍｌであった。培養されたＨＦＦは内因性全長エピレグリンを発現したが、他のＥＧＦＲリガンドはほとんど又は全く発現しなかった。ＨＦＦが成長及び生存に関してエピレグリンの発現に依存するとすれば、内因的に産生されたタンパク質の阻害は、それらの成長を低減するはずである。従って、ＨＦＦを、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１の濃度を上昇させながらインキュベートして、成長の低減を観察した。これはｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１による全長エピレグリンタンパク質の阻害によるものであった（図６）。よって、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１は、組換え及び全長ヒトエピレグリンタンパク質の両方を阻害する。

【０３１５】

実施例３．ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１はマウスエピレグリンと交差反応しない

線維症のマウスモデル中のヒト化抗体を検証するために、これがマウスエピレグリン相同体と交差反応するかどうかを確立する必要があった。アッセイをセットアップするために、組換えマウスエピレグリンがＨＦＦ増殖を誘導し得るかどうかを最初に試験したところ、ヒトタンパク質と同様であった（図７、左パネル）。上で使用したものと同じ市販のエピレグリン抗体も、マウスエピレグリンによるＨＦＦ増殖を阻害した（図７、中央パネル）。対照的に、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１は、マウスエピレグリンタンパク質によるＨＦＦ増殖を阻害するには１００倍を超える高い濃度を必要とした（図７、右パネル）。これらの結果は、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１がマウスエピレグリンタンパク質に対して交差反応性をほとんど有しないことを示している。これらの知見は、マウスの体内でヒト化抗体を生成したことで、自己反応性抗体を産生するＢ細胞がネガティブに選択されるためであると考えられる。

【０３１６】

実施例４．ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１は他のヒトＥＧＦＲリガンドとの交差反応性を示さない

次に、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１が他のＥＧＦＲリガンド（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓから市販）を阻害し得るかどうかを考えた。ＨＦＦを、上述のようにエピレグリンによって推進されるＨＦＦの成長を阻害する、５ｍｇ／ｍｌのｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１のみと共にインキュベートした。他の６つのＥＧＦＲリガンドを追加すると、ＥＧＦＲの活性化によってＨＦＦの成長をレスキューできるかどうかについて試験した。ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１のみの対照と比較して、試験された濃度のうちの最も低い濃度、即ち０．１ｎｇ／ｍｌの各ＥＧＦＲリガンドで、ＨＦＦの成長をレスキューするには十分であった（図８）。ＥＧＦについては、０．１ｎｇ／ｍｌで中程度のレスキューが示され、１ｎｇ／ｍｌで完全なレスキューが示された。他の実験では、この組換えＥＧＦのストックは、１ｎｇ／ｍｇ未満ではＨＦＦ増殖を刺激しなかったため、上記中程度のレスキューは、エピレグリン抗体による交差反応性ではなく、その相対的な親和性を反映したものである可能性が高い。従って、ｈＥｒｅｇ ＮＡｂ１は他のＥＧＦＲリガンドと交差反応しない。

【０３１７】

実施例５．ヒト化エピレグリン抗体は、ＦＤＡ承認済みの生物学的薬剤と同等の親和性を有する

Ｏｃｔｅｔバイオレイヤー干渉法を用いて、固定化された組換えヒトエピレグリンタン

パク質に対するヒト化エピレグリン抗体の結合の動態を評価した。ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１は、K_Dが38×10^{-12}であり、それと共にＨＦＦ増殖アッセイから計算されたIC_{50}が１．８ｎＭであることが分かった（表２）。これらは、乾癬の処置のための、現行のＦＤＡ承認済みモノクローナル抗体療法と、同等の測定値である。

【０３１８】

【表２】

表2. Octet バイオレイヤー干渉法による hEreg NAb1 の動態測定値、及び FDA 承認済みモノクローナル抗体薬剤との比較

説明	KD ($\times10^{-12}$)	IC_{50} (nM)
hEreg NAb1	38	1.8
トシリズマブ	2500*	0.09[80]
アダリムマブ*	58-87	0.1-1
リサンキズマブ*	29	0.024

* 欧州医薬品庁からのデータ

【０３１９】

実施例６．線維性疾患の処置のためのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂの使用

エピレグリンの富化が、ヒト強皮症皮膚及び肺線維性組織で確認された。マウスモデルでは、ラット抗ヒト／マウスエピレグリン抗体がサロゲート治療剤として使用され、これは皮膚及び肺の両方の線維症を反転させた。ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１を用いて、皮膚、肺、及び他の組織の強皮症関連線維症を処置できる。エピレグリンの富化は、特発性肺線維症、ケロイド、及び瘢痕といった他の繊維性組織で発生するため、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂは、これらの疾患に対しても同様に、治療のポテンシャルを有する可能性がある。更に、ＣＯＶＩＤ１９に起因する肺線維症は、特発性肺線維症と同様のシングルセルＲＮＡ発現プロファイルを有する。よって、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂは、慢性移植片対宿主病、硬化性移植片対宿主病、硬化性移植片対宿主病皮膚線維症等も含む、複数の組織におけるヒト線維性疾患の処置に、広く適用可能である可能性がある。

【０３２０】

実施例７．ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１は皮膚線維症マーカーを減少させる

Ｓｃｉｅｎｃｅ ＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙにおけるＯｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ.のエピレグリンに関する原稿に記載されているように、エピレグリンの富化がヒト強皮症皮膚及び肺線維性組織で確認された。ブレオマイシン誘導皮膚及び肺線維症マウスモデルでは、市販のラット抗ヒト／マウスエピレグリン抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＭＡＢ１０６８）が、皮膚及び肺の両方の線維症を反転させた。この抗体を、ヒト疾患の皮膚線維症を低減させる能力について試験した。この抗体を、未処置の対照との比較で、ＳＳｃの患者からの皮膚外植片、及び死亡したＩＰＦのドナーからの肺外植片と共にインキュベートした。このサロゲート抗体によるエピレグリン阻害が、ＳＳｃ線維性皮膚及びＩＰＦ線維性肺の両方において、線維性タンパク質マーカーの発現を減少させることが分かった。

【０３２１】

次に、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１がエピレグリン中和ラット抗体と同様に線維症を低減できるかどうかを調査した。ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１が線維性タンパク質マーカーを減少させるかどうかを調査するために、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１を、移植片対宿主病（ｇｒａｆｔ－ｖｓ－ｈｏｓｔ　ｄｉｓｅａｓｅ：ｓＧｖＨＤ）の線維性形態の患者２人からの皮膚生検で

試験した。患者１は５１歳の男性であり、骨髄異形成症候群の処置のために適合非血縁ドナーから幹細胞移植を受けて３年が経過しており、免疫抑制療法は受けていなかった。患者２は７６歳の男性であり、急性骨髄性白血病の処置のために適合非血縁ドナーから幹細胞移植を受けて３年が経過しており、免疫抑制療法は受けていなかった。患者１の右腕及び患者２の左腹部の、最も影響が大きい皮膚からの４ｍｍの皮膚生検のペアを得た（図２１Ａ）。皮膚外植片を、２．５ｍｇ／ｍｌのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１又はアイソタイプ対照ＩｇＧ１抗体と共に１０日間にわたってインキュベートした。培地を４８時間ごとに交換し、上清中の線維性タンパク質マーカーのレベルをＥＬＩＳＡで定量した。患者１からのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１で処置した皮膚外植片は、ＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体に比べて、ＴＮＣ、ＴＩＭＰ１、及びＭＣＰ－１の発現の大幅な低減を示した（図２１Ｂ～２１Ｃ）。患者２からのｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１で処置した皮膚も、ＴＮＣの発現の大幅な低減を示したが、ＴＩＭＰ１又はＭＣＰ－１についてはそうではなかった。ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１は、いずれの患者からの皮膚外植片でも、プロコラーゲンＩ　α１／プロコラーゲンＩＮ末端プロペプチド（ｐｒｏ－ｃｏｌｌａｇｅｎ　Ｉ　Ｎ－ｔｅｒｍｉｎａｌ　ｐｒｏｐｅｐｔｉｄｅ：ＰＩＮＰ）又はフィブロネクチン（ＦＮ）の発現を低減しなかった。これらの結果は、ヒト線維性皮膚による複数の線維症マーカーの発現を直接低減できることを実証している。ＴＮＣは最も一貫して低減された線維症マーカー遺伝子であったため、これは患者のｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１の優れたバイオマーカーを提供できる。

【０３２２】

実施例８．ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１の適応症

ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１は、ｓＧｖＨＤ、ＳＳｃ、及びＩＰＦの処置に関して最も強力な前臨床データを有する。というのは、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１がそのｓＧｖＨＤ皮膚線維症を低減する能力について検証され、またサロゲートラットエピレグリン中和抗体をＳＳｃ皮膚線維症及びＩＰＦ肺線維症において使用したためである。ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂ１は、ケロイド瘢痕等の更なる繊維性疾患に対する治療ポテンシャルを有する。更に、ＣＯＶＩＤ１９に起因する肺線維症は、特発性肺線維症と同様のシングルセルＲＮＡ発現プロファイルを有する。よって、ｈＥｒｅｇ　ＮＡｂは、複数の組織におけるヒト線維性疾患の処置に、広く適用可能である可能性がある。

【０３２３】

実施例９．ＥＧＦＲの活性化によって、ＳＳｃ皮膚及び肺の病原性線維芽細胞がマーキングされる

ＳＳｃ皮膚で発生する細胞シグナル伝達を理解するために、５人のびまん性皮膚ＳＳｃ患者及び５人の健康な対照から、シングルセルＲＮＡシーケンシング（ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ）用の線維性皮膚の生検を得た。生検時点での年齢、性別、罹患した臓器、併発状態、及び免疫調節療法を含む、研究参加者の臨床的特徴を、表３に列挙する。皮膚生検直後に組織を溶解し、全ての生細胞を分類し、１０ｘ　Ｃｈｒｏｍｉｕｍ　Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｒを用いて、バーコード化されたシングルセルｃＤＮＡライブラリを作成した。シングルセルｃＤＮＡの一様多様体近似投影（ＵＭＡＰ）埋め込みにより、それぞれ一連のシグネチャー遺伝子（図１６）によって定義された、１２の主要な細胞クラスタ（図９Ａ）が特定された。個々のＳＳｃサンプルからの細胞は、線維芽細胞、周皮細胞、及び内皮クラスタの同様の領域に局在しており（図９Ｂ）、これは、線維性皮膚からの細胞における遺伝子発現プロファイルが、健康な皮膚からのものと比較して同様であることを示唆している。ＳＳｃ真皮線維芽細胞は、Ｉ型及びＩＩＩ型コラーゲンを含む複数の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）遺伝子の発現の増加を示した（図９Ｃ）。同様に、Ｇタンパク質シグナル伝達調節因子５（ＲＧＳ５）の発現（２６）によってマーキングされたＳＳｃ周皮細胞は、Ｉ、ＩＩＩ、ＩＶ、及びＶＩ型コラーゲン転写物の発現の増加を示した。これらのデータを合わせると、線維芽細胞及び周皮細胞がいずれも、ＳＳｃ皮膚において過剰なコラーゲンを生成したことが示されている。

【０３２４】

【表３】

表3. 本研究における患者の選択された臨床的特徴

サンプル	年齢（歳）	性別(M/F)	民族	持続期間(年)	過去の病歴	他の臓器の関与	自己抗体	免疫調節薬剤
SSc1	60	M	W	0.33		腎臓	RNA Pol III	なし
SSc2	61	M	W	22		なし	血清学的に陰性	ECP
SSc3	39	M	W	4		間質性肺疾患 食道運動障害	ANA 1:2560	ボセンタン ECP
SSc4	57	F	W	2	IBS	炎症性関節炎	ANA 1:320 RNA Pol III CCP	ミコフェノール酸モフェチル 光線療法 プレドニゾン ヒドロキシクロロキン
SSc5	47	F	W	10		間質性肺疾患 肺動脈性肺高血圧症	ANA 1:320 SSA RNP	ミコフェノール酸モフェチル ヒドロキシクロロキン シルデナフィル
SSc6	54	F	W	0.75		間質性肺疾患 GERD	ANA 1:320 RNA Pol III	ミコフェノール酸モフェチル
正常 1	24	F	W		なし			
正常 2	35	M	W		皮膚描記症			
正常 3	54	M	W		なし			
正常 4	52	M	W		BCC			
正常 5	38	M	W		なし			
略語：W＝白人；M＝男性；F＝女性；GERD＝胃食道逆流症；ECP＝体外フォトフェレーシス；BCC＝基底細胞癌；IBS＝炎症性腸疾患；Ab＝抗体；ANA＝抗核抗体；CCP＝抗環状シトルリン化ペプチド；RNA Pol III＝RNA ポリメラーゼ III								

【０３２５】

ＳＳｃにおける多量のＥＣＭ産生を推進するシグナル伝達経路を特定するために、健康な対照と比較したＳＳｃの各細胞型の差次的遺伝子発現を計算し、ｌｏｇ２（倍数変化）＞０．５８及びｐ値＜０．０５で、上方制御された遺伝子の、ＤＡＶＩＤ（２７）を用いた機能エンリッチメント分析を実施した。図９Ｄに示されているように（全リストは表４に示されている）、富化された遺伝子オントロジータームは、ＥＣＭの組織化及びＩ型インターフェロンシグナル伝達といった結果を含んでいた（２８、２９）。しかしながら、これらの結果に加えて、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）シグナルトランスダクションに関連する複数の経路（例えば細胞増殖、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）刺激に対する応

答、コラーゲン活性化ＲＴＫシグナル伝達、細胞外シグナル調節キナーゼ１及び２（ＥＲＫ１及びＥＲＫ２）カスケードの正の調節、及びホスホイノシタイド３キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）活性の正の調節）が発見された。ＥＧＦＲの阻害によって線維症を予防できることを示した過去の研究（８～１０）、及びＳＳｃ皮膚で複数のＥＧＦＲリガンドが過剰発現するという本明細書での知見（例えば実施例１０も参照）に基づき、ＥＧＦＲを最も強く発現する細胞型を決定するためにｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータを調査し、ＥＧＦＲが線維芽細胞及び周皮細胞によって発現されることを明らかにした（図９Ｅ）。よって、これらのデータは、ＥＧＦＲがＳＳｃ線維芽細胞及び周皮細胞で活性化されて、これらのＥＣＭ産生を調節し得ることを示唆している。表４は、健康な皮膚及び肺、並びに受容体－リガンド相互作用が富化されたＳＳｃ皮膚及び肺を示す。特に、ＳＳｃ皮膚データ及び少なくとも２／３のＳＳｃ肺データセットの、富化された受容体－リガンド相互作用を、健康な対照と比較した。斜体で示されている相互作用は、皮膚及び肺の両方において富化されており、残りの富化された相互作用は皮膚と肺とで異なっている。

【０３２６】

【表４】

表4．健康な皮膚及び肺並びにSSc皮膚及び肺の富化された受容体ーリガンド相互作用

SSc ILD2/3	ランク	SSc 皮膚	ランク		ランク		ランク
PDGFR 複合体 PDGFD	0.004	*EREG_EGFR*	0.012	L1CAM_a5b1 複合体	0.024	MIF_TNFRSF 10D	0.041
IGF2_IFG1R	0.004	*PDGFR 複合体 _PDGFD*	0.024	EPHB4_EFNB 1	0.024	COL5A2_a11b 1 複合体	0.047
PDGFRB_PD GFD	0.009	*BMPR1A_BM PR2_BMP4*	0.024	ACVR_1B2A 受容体_INHBA	0.024	COL1A2_a11b 1 複合体	0.047
BMPR1A_BM PR2_BMP4	0.009	*IGF1_IGF1R*	0.024	COL9A2_a11b 1 複合体	0.024	FN1_a3b1 複合体	0.047
IGF1_IGF1R	0.018	*FLT1 複合体 _PGF*	0.036	EPHB3_EFNB 1	0.024	PDGFA_PDG FRA	0.047
EREG_EGFR	0.018	*EGFR_HBEG F*	0.036	COL9A3_a11b 1 複合体	0.024	COL6A1_a11b 1 複合体	0.047
EGFR_AREG	0.027	*CCL2_CCR10*	0.036	COL1A1_a10b 1 複合体	0.024	COL1A1_a11b 1 複合体	0.047
EGFR_HBEG F	0.036	*IGF2_IGF1R*	0.036	TNFSF10_RIP K1	0.024	COL12A1_a11 b1 複合体	0.047
FLT1 複合体 _PDF	0.036	*PDGFRB_PD GFD*	0.041	CADM3_CAD M1	0.024	NRP1_VEGFB	0.047
JAG1_NOTCH 4	0.044	*JAG1_NOTCH 4*	0.041	EPHA4_EFNB 1	0.024	TNF_PTPRS	0.047
CCL2_CCR10	0.044	*EGFR_AREG*	0.047	COL6A1_a10b 1 複合体	0.024	COL16A1_a21 1b1 複合体	0.047
BMPR1A_BM PR2_BMP6	0.003	COL28A1_a10 b1 複合体	0.006	OSMR_OSM	0.024	PROS1_TYR O3	0.047
BMPR1B_BM PR2_BMP6	0.003	COL17A1_a10 b1 複合体	0.006	COL16A1_a10 b1 複合体	0.024		
BMR1B_AVR2 A_BMP6	0.003	EFNB2_EPHB 3	0.006	NRP1_SEMA3 A	0.024		
BMPR1B_BM PR2_BMPR1A	0.003	CD27_CD70	0.006	COL8A1_a11b 1 複合体	0.024		
BMR1A_ACR2 A_BMP5	0.004	EFNB2_EPHB 4	0.006	NOTCH1_NO V	0.024		
AGT_AGTR1	0.004	KDR_VEGFC	0.006	SELL_CD34	0.024		
BMPR1A_BM PR2_BMP5	0.004	L1CAM_L1CA M	0.006	SELP_CD34	0.024		
BMPR1A_BM PR2_BMP2	0.004	CTLA4_CD86	0.006	COL1A2_a10b 1 複合体	0.024		
NOTCH3_JAG 2	0.009	COL4A5_a10b 1 複合体	0.006	CCL21_ACKR 4	0.024		
BMR1A_ACR2 A_BMP4	0.009	ICOSLG_ICO S	0.006	COL6A6_a11b 1 複合体	0.024		
COL13A1_2b1 複合体	0.009	BMP7_SLAMF 1	0.006	COL12A1_a10 b1 複合体	0.024		
DLL4_NOTCH 3	0.009	COL17A1_a11 b1 複合体	0.012	NAMPT_P2RY 6	0.03		
JAG1_NOTCH 3	0.012	FLT1 複合体 _VEGFB	0.012	PTN_PTPRZ1	0.03		

SSc ILD2/3	ランク	SSc 皮膚	ランク		ランク		ランク
FGFR2_XPR1	0.013	COL8A1_a10b1 複合体	0.012	CXCL8_ACKR1	0.03		
PVR_CD226	0.013	TNF_RIPK1	0.012	COL18A1_a10b1 複合体	0.03		
TNC_a9b1 複合体	0.013	COL4A5_a11b1 複合体	0.012	COL21A1_a10b1 複合体	0.03		
COL5A3_a2b1 複合体	0.018	SELL_SELPLG	0.012	COL15A1_a10b1 複合体	0.03		
CCR10_CCL7	0.018	ACVR_1B2A 受容体_GDF11	0.012	COL14A1_a10b1 複合体	0.03		
NOTCH4_JAG2	0.018	COL9A3_a10b1 複合体	0.012	ANGPT2_TEK	0.03		
NOTCH1_JAG2	0.018	COL28A1_a11b1 複合体	0.012	AXL_IL15RA	0.03		
COL21A1_a2b1 複合体	0.018	COL9A2_a10b1 複合体	0.012	COL4A1_a10b1 複合体	0.03		
COL5A3_a10b1 複合体	0.018	ACKR1_CCL17	0.012	HLA-F_LILRB1	0.03		
COL8A2_a2b1 複合体	0.018	COL6A6_a10b1 複合体	0.012	COL4A2_a10b1 複合体	0.03		
VCAM1_a9b1 複合体	0.018	CCR10_CCL27	0.012	COL6A2_a10b1 複合体	0.03		
EGFR_GRN	0.022	CSPG4_a3b1 複合体	0.012	CMKLR1_RARRES2	0.03		
COL5A3_a1b1 複合体	0.027	CD70_GPRC5B	0.012	COL6A3_a11b1 複合体	0.036		
PLXNB1_SEMA4D	0.027	CADM3_EPB41L1	0.012	TYRO3_GAS6	0.036		
COL8A2_a1b1 複合体	0.027	CADM3_CADM4	0.012	COL28A1_a1b1 複合体	0.036		
TGFB3_TGFBR3	0.027	PODXL_SELL	0.012	COL4A5-a1b1 複合体	0.036		
CD8 受容体_LCK	0.027	EPHB6_EFNB2	0.018	COL17A1_a1b1 複合体	0.036		
THY1_aXb2 複合体	0.028	COL5A2_a10b1 複合体	0.018	IGF1_a6b4 複合体	0.036		
COL15A1_a10b1 複合体	0.036	COL3A1_a10b1 複合体	0.018	IGF2_IGF2R	0.036		
THY1_aMb2 複合体	0.037	NOTCH2_DLL4	0.018	COL3A1_a11b1 複合体	0.036		
TNF_DAG1	0.044	ACVR_1B2A 受容体_INHBB	0.018	FN1_a10b1 複合体	0.036		
NOTCH1_JAG1	0.044	COL5A3_a10b1 複合体	0.018	COL5A1_a11b1 複合体	0.036		
LAMC1_a2b1 複合体	0.044	COL5A1_a10b1 複合体	0.018	FLT1_PGF	0.036		
NRP2_SEMA3C	0.046	LIFR_OSM	0.018	CXADR_FAM3C	0.041		
COL15A1_a1b1 複合体	0.049	FLT3_FLT3LG	0.018	MDK_PTPRZ1	0.041		

【０３２７】

ＥＧＦＲ発現（ＥＧＦＲ$^{+}$）線維芽細胞及び周皮細胞が、関連するＳＳｃ遺伝子シグネチャーの差次的発現を示すかどうかの判定は、本実施例の重要な焦点であった。皮膚ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータを用いて、ＥＧＦＲ$^{-}$ＳＳｃ線維芽細胞、並びにＥＧＦＲ$^{+}$及びＥＧＦＲ$^{-}$健康対照線維芽細胞と比較した、ＥＧＦＲ$^{+}$ＳＳｃ線維芽細胞の差次的遺伝子発現を計算した。

【０３２８】

他の線維芽細胞サブセットと比較して、ＥＧＦＲ$^{+}$ＳＳｃ線維芽細胞による差次的発現が最も大きくｐ値が最も低い、上方制御された遺伝子を、図９Ｆに示す。特に、ＥＧＦＲ

＋ＳＳｃ線維芽細胞は、Ｗｉｎｇｌｅｓｓ関連挿入部位（Ｗｎｔ）シグナル伝達（例えば分泌性Ｆｒｉｚｚｌｅｄ関連タンパク質２、ＳＦＲＰ２；コラーゲン三螺旋リピート含有タンパク質１、ＣＴＨＲＣ１；及びＷｎｔ１誘導性シグナル伝達経路タンパク質－２、ＷＩＳＰ２）を活性化し、主に真皮網状層に存在する線維芽細胞によって活性化される経路（１３）は、ＳＳｃ皮膚において過剰活性化される（３０）。Ｗｎｔ遺伝子のうち、ＳＦＲＰ２の発現は、ＳＳｃ皮膚において筋線維芽細胞へと分化する（１５）ことが近年示された、真皮線維芽細胞（３１、３２）のサブセットを定義する。ＣＴＨＲＣ１は、ＳＳｃ及び特発性肺線維症（ＩＰＦ）の線維性肺試験片で最も多くのコラーゲンを産生する線維芽細胞の亜集団を特徴付ける遺伝子であり（３３）、ロイシンリッチリピート含有タンパク質１５（ＬＲＲＣ１５）と共に、組織全体にわたる筋線維芽細胞のマーカーである（１６）。ＥＧＦＲ＋ＳＳｃ線維芽細胞は、ＳＳｃ疾患の重症度と相関する（３４、３５）ことが示されているインターフェロン誘導遺伝子（例えばインターフェロンα誘導タンパク質２７（ＩＦＩ２７）、骨髄間質細胞抗原２（ＢＳＴ２）、インターフェロンα誘導タンパク質６（ＩＦＩ６））も、高いレベルで発現した。図９Ｇに示されている線維芽細胞のサブクラスタリングは、健康な及びＳＳｃの線維芽細胞がいずれもＥＧＦＲを発現するものの、ＳＳｃ線維芽細胞では、ＥＧＦＲが上述の線維症シグネチャー遺伝子と共発現することを実証するものである。ＥＧＦＲ＋線維芽細胞とは対照的に、ＥＧＦＲ＋周皮細胞の同様の分析では、線維症遺伝子シグネチャーの過剰発現は明らかにされなかった。従って、ＥＧＦＲ＋ＳＳｃ線維芽細胞は、ＳＳｃ皮膚及び肺線維症に関連する複数の重要な遺伝子シグネチャーを発現するが、周皮細胞はそうではない。

【０３２９】

次に、ＥＧＦＲ＋ＳＳｃ線維芽細胞が線維性真皮の領域において活性化されるかどうかを評価した。活性化時、ＥＧＦＲはその細胞質ドメインの複数の部位でリン酸化され（３６）、ＥＧＦＲをリン酸化（ｐＥＧＦＲ）するためのリン酸化特異的抗体を用いて検出可能となる。ＳＳｃにおけるＥＧＦＲの活性化を確認するために、ＳＳｃ皮膚を、ＥＧＦＲに対するリン酸化特異的抗体Ｔｙｒ－１０６８で染色すると、線維性真皮において強く標識された細胞が観察された（図９Ｈの上段；図１６Ｃにアイソタイプ対照、図１７に組織学及び免疫組織化学の低倍率スキャン）。同様に、図９Ｈの下段に示されているように、ｐＥＧＦＲ＋細胞が線維性肺組織において観察された。真皮内の血管の及び個々のｐＥＧＦＲ＋細胞はいずれもビメンチンで共染色され（図１６Ｄ）、これは、線維芽細胞及び周皮細胞におけるその発現及び活性化を裏付けるものである。皮膚及び肺のｐＥＧＦＲ＋細胞の定量化により、健康な対照サンプルに比べてＳＳｃにおいてこれらが有意に増加することが示された（図９Ｉ）。従って、ＥＧＦＲ発現線維芽細胞は線維性皮膚及び肺で活性化されて、線維症を特徴付ける遺伝子を発現する。

【０３３０】

実施例１０．エピレグリン＋樹状細胞はヒト皮膚及び肺線維症に蓄積される

ＥＧＦＲは、その結合動態に基づいて異なるシグナル伝達特性を有する７つの活性化リガンドを有する（３７、３８）。ＳＳｃ皮膚のＥＧＦＲ及び他のＲＴＫの活性化リガンドを特性決定するために、細胞クラスタ間の受容体－リガンドペアの発現の増加を特定するＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢ（３９、４０）（ｗｗｗ．ｃｅｌｌｐｈｏｎｅｄｂ．ｏｒｇ）を用いて、皮膚ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータセットの受容体－リガンド富化を特定した。ＳＳｃと健康な皮膚とを比較してランク＜０．０５で示される有意な相互作用を特定し、各リガンド－受容体ペアを生成する細胞型に基づいて検査した。ＳＳｃ皮膚シグナル伝達ネットワークにおいて富化された相互作用は、成長因子リガンドと、ＥＧＦＲ、血小板由来成長因子受容体（ＰＤＧＦＲ）、ＮＯＴＣＨ、エフリン、及び他の受容体チロシンキナーゼを含むその受容体（図１８Ａに図示）で主に構成され、ほとんどの成長シグナルは間葉系細胞型間で発生していた。間葉系細胞と比較して、免疫細胞は、ＥＧＦＲ活性化リガンド及びオンコスタチンＭを含む別個の成長因子リガンドを発現していた。これらの知見は、免疫－間葉系及び間葉系－間葉系成長因子シグナルが、線維性皮膚の細胞－細胞コミュニケーションネットワークをサポートするものであることを示唆している。

【０３３１】
ＳＳｃ皮膚で特定された重要な相互作用が、他の組織でも再現可能かどうかを調査するために、皮膚ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータを、ＳＳｃ皮膚の別の研究（１５）、皮膚のケロイド瘢痕の研究（１４）、及び肺移植時の患者のＳＳｃ関連肺線維症に関する３つの研究（３３、４１、４２）から公開されているｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータと比較した。ＳＳｃ皮膚と肺データセットのうちの少なくとも２つとに共通する、富化された相互作用を、図１０Ａに示す。骨髄抗原提示細胞（ＡＰＣ）のクラスタからのエピレグリンと、線維芽細胞の２つのサブクラスタのＥＧＦＲとの間で、最も有意な相互作用が見られた。健康な対照と比較してＳＳｃ皮膚の全組織でエピレグリンの発現が上昇していることが、定量ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）によって確認された（図１８Ｂ）。樹状細胞（ＤＣ）、単球、及びマクロファージを含む骨髄抗原提示細胞（ＡＰＣ）では、ＥＧＦＲリガンドであるアンフィレグリン及びヘパリン結合性ＥＧＦ様成長因子（ＨＢＥＧＦ）の発現も、ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータにおいて富化されていたが、ｑＰＣＲでのアッセイでは増加していなかった。骨髄ＡＰＣ－線維芽細胞相互作用の階層をより良好に可視化するために、各研究からの各ＥＧＦＲリガンドのランクを図１０Ｂにプロットした。健康な対照と比較して、ＳＳｃ皮膚及び肺は、アンフィレグリン又はＨＢＥＧＦよりもエピレグリン－ＥＧＦＲ相互作用の高い富化を示した。ＥＧＦＲを伴うエピレグリンの富化は、瘢痕化した皮膚及びケロイド皮膚、並びに関連はあるものの病理学的には別個のものである線維性肺疾患である特発性肺線維症（ＩＰＦ）の患者の肺においても観察された。２つの研究（図１０Ｃの皮膚及び肺２）により、ＥＧＦＲを伴うエピレグリンの、健康な皮膚における発現の富化も示されたが、これは、長い消化時間にわたるサンプル処理の技術的なアーティファクトによるものであり得る。これらのデータをまとめると、エピレグリンが、皮膚及び肺の複数の線維性疾患における共通の病原性シグナル伝達分子であることが示唆されている。

【０３３２】
エピレグリンの細胞起源及び機能は、明確には定義されていない。皮膚ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータにおける細胞型のうち、エピレグリンは、骨髄ＡＰＣのクラスタで独自に発現され（図１０Ｃ）、一方でアンフィレグリン及びＨＢＥＧＦは、骨髄ＡＰＣ及び複数の他の細胞型によって発現されていた。健康なヒトの肺に関する近年の研究で、エピレグリンは、希少なＤＣ細胞集団に特異的な定義遺伝子として特定された（４３）。本明細書に記載の皮膚データでは、健康なサンプル及びＳＳｃサンプルの両方からのエピレグリン発現（ＥＲＥＧ$^{+}$）ＡＰＣは、互いに同様の遺伝子発現プロファイル、及び健康なヒトの肺と同様のアンフィレグリンの共発現を示した（図１０Ｄ）。ＥＲＥＧ$^{+}$ＡＰＣはまた、Ｉ型インターフェロンによってその成熟を誘導できる循環分化抗原群１ｃ陽性（ｃｌｕｓｔｅｒ ｏｆ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ １ｃ ｐｏｓｉｔｉｖｅ：ＣＤ１ｃ$^{+}$）ＤＣの炎症性サブセット（４４、４５）であるＤＣ３（例えばＶｅｒｓｉｃａｎ（ＶＣＡＮ）、Ｓ１００Ａ８、及びＳ１００Ａ９）、のマーカーの上昇を示した。循環ＣＤ１ｃ$^{+}$ＤＣにおけるエピレグリンの表面発現は、健康な参加者の末梢血の蛍光活性化細胞ソート（ＦＡＣＳ）分析によって確認された（図１８Ｃ～１８Ｄ）。従って、ＳＳｃのＡＰＣにおけるエピレグリン発現の富化は、ＤＣ３の誘導性細胞状態を反映している可能性が極めて高い。

【０３３３】
ＳＳｃ皮膚及び肺におけるＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣの空間的局在及び存在量を評価するために、これらの位置について、免疫組織化学及び免疫蛍光で研究した。ＳＳｃ皮膚及び肺において、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣのクラスタは、血管周囲、及び健康な皮膚及び肺では稀であった線維性組織の領域において、観察された（図１０Ｅ）。更に、ＳＳｃ皮膚及び肺の計数により、健康な対照に比べて、各組織のエピレグリン陽性細胞の個数が有意に増加していることが示された（図１０Ｆ）。免疫蛍光によって、健康な皮膚及びＳＳｃ皮膚の両方がｐＥＧＦＲ$^{+}$血管を示し、またＳＳｃでは、これらの血管は線維性真皮を通って走行し、エピレグリンと共局在していた（図１０Ｇの上２段）。ＳＳｃには、エピレグリンと大部分が共標識されたｐＥＧＦＲ$^{+}$細胞を含有する線維症の領域が存在したが、健康な肺には存在し

なかった（図１０Ｇの下２段）。エピレグリンは、Ａディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ１７（ＡＤＡＭ１７）によるタンパク質分解切断によって、細胞表面から剥がれ落ちる（４６）ため、これらの知見は、ＳＳｃ皮膚及び肺において、分泌されたエピレグリンが線維芽細胞上のＥＧＦＲと結合することを示唆している。よって、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣはＳＳｃ線維性皮膚及び肺に局在し、両組織において豊富に増加する。これは、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣが、ＥＧＦＲを活性化して疾患を促進する原因である可能性があることを示唆している。

【０３３４】

健康な対照と比較して、ＳＳｃ皮膚においてＥＲＥＧ＋細胞の個数が増加することが分かり（図２２Ａ）、またＥＲＥＧの発現は、修正Ｒｏｄｎａｎスキンスコア（ｍＲＳＳ）による疾患重症度と有意な正の相関を示した（図２２Ｂ）。ＥＲＥＧ発現とｍＲＳＳとの間の相関の強度は小～中程度（ピアソン相関係数＝０．３１）であった。この相関は、プロトコルで使用する比較的長い皮膚消化時間（１時間）によってＥＲＥＧ発現が誘導されるため、過小評価されている可能性がある。それでもなお、ＤＣ３によるＥＲＥＧの発現は、ＳＳｃにおける皮膚線維症の重症度と関連している。

【０３３５】

実施例１１．エピレグリンは、マウス皮膚及び肺線維症において明確な発現パターンを有する

ＳＳｃの異なる複数のマウスモデルは、別個のＳＳｃ疾患サブセットの特徴を再現する（４７）。ＳＳｃにおけるエピレグリンの役割を最もよく調べるために、本実施例が必要としたマウスモデルは、骨髄ＡＰＣに依存し、かつ皮膚線維症及び肺線維症の両方を誘導するものであった。皮下又は気管内注射によるブレオマイシンモデルは、これらの要件それぞれを達成するものである（４８、４９）。ブレオマイシンの複数回投薬プロトコルを試験し（Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ.（５０）を修正したもの）、６週～１０週齢のメスＢ６マウス１頭あたり０．２ｍｇの、単回皮下用量のブレオマイシンが、注射の３週間後までにヒトＳＳｃと同様の皮膚の変化を誘発すると判定された。組織学的変化は、真皮コラーゲンの経時的増加（図１１Ｄ）と共に、真皮の肥厚、真皮白色脂肪組織（ＤＷＡＴ）の減少、及びＣＤ３４$^{+}$細胞の減少（５１）（図１１Ａ～１１Ｃ）を含んでいた。これらの知見は、Ｂ６マウスが３週間までの期間に線維症を発現するという先行文献（４９）、及び単回用量のブレオマイシンで肺線維症をモデル化できるという先行文献（５２）と一致している。肺線維症については、過去に記述されているように（５３）、単回用量として硫酸ブレオマイシン０．０１６ｍｇを気管内投与した。

【０３３６】

ブレオマイシン誘導性皮膚及び肺線維症におけるＥＧＦＲリガンド発現の動態を特性決定するために、各組織における遺伝子発現の経時変化を観察した。皮膚へのブレオマイシン注射の１週間後、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で処理した対照皮膚と比較して、高親和性ＥＧＦＲリガンドトランスフォーミング成長因子α（Ｔｇｆａ）の発現の上昇が線維性皮膚で観察され（図１１Ｅ）、これは、Ｔｇｆａ欠損マウスが肺線維症の発症から保護されるという過去の報告（５４）と一致するものである。ブレオマイシン注射の３週間後、エピレグリン発現の増加が観察され、これは、ＤＣによるインターフェロンシグネチャー遺伝子の発現上昇と時間的に一致していた（図１１Ｆ）。これらの観察結果は、線維症の初期発症はＴｇｆａの影響を受けるものの、マウスでは３週間で表される後の慢性期においてはインターフェロン活性化ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣが重要である可能性が高いことを示唆している。エピレグリンの発現は、ブレオマイシンの気管内投与後のマウスの肺でも同様に測定され、ブレオマイシンへの曝露の１～２週間後にエピレグリンの上昇が見られた（図１１Ｇ）。従って、ブレオマイシンに曝露されたマウスでは、エピレグリンは、皮膚線維症及び肺線維症の両方で明確な発現パターンを有しており、これにより、このモデルは、ヒトの疾患に関連するエピレグリン－ＥＧＦＲシグナル伝達の理解に有用となる。

【０３３７】

実施例１２．エピレグリン阻害はマウス及びヒト皮膚線維症を軽減する

線維性マウス皮膚におけるエピレグリン発現の上昇が３週間まで遅延したため、エピレグリンは線維症の発現には不要であるものの慢性期には重要であるとの仮説が立てられた。Ｂ６マウスでは、ブレオマイシンに応答して皮膚線維症が発症するのに３週間かかる（４９）。従って、皮膚線維症の発症と維持とに関してエピレグリンが必要となる時点を評価するために、エピレグリン欠損マウスのブレオマイシンに対する応答を、曝露の３週間後及び５週間後に試験した。ブレオマイシン注射の５週間後、Ｅｒｅｇ－／－マウスは、野生型マウスに比べて真皮の厚さの減少を示し、これは、エピレグリンが線維症の持続をサポートしていることを示唆している（図１２Ａ～１２Ｃ）。Ｅｒｅｇ－／－マウスにおける皮膚線維症の低減は、線維症発現の何らかの欠陥によるものではない。というのは、３週間の時点で、Ｅｒｅｇ－／－マウスは、対応する野生型マウスと同様の、真皮の肥厚及びコラーゲンの上昇を示していたためである（図１９Ａ～１９Ｃ）。これらの知見を合わせると、エピレグリンが線維症の確立ではなく線維症の持続に必要であることが示される。

【０３３８】

患者のケアに転用可能な方法を用いて、皮膚線維症のブレオマイシンモデルにおけるエピレグリンの時点による役割を具体的に評価するために、ブレオマイシン注射の３週間後（図１１Ｅにおける発現のピークに対応する）から開始される週２回の中和抗体の皮下注射によって、エピレグリンを阻害し、図１２Ｄに図示した。上記抗体は、ブレオマイシン（腰部）から離れた位置（背面頸部）に注射された。野生型マウスでは、エピレグリン抗体（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）での２週間の処置により、真皮の厚さの完全な正常化、コラーゲンタンパク質の５０％の減少、及びＩ型コラーゲンα１鎖（ＣＯＬ１Ａ１）発現の、ＰＢＳ対照レベルを下回る１９０％の減少がもたらされた（図１２Ｅ～１２Ｇ）。Ｅｒｅｇ　Ａｂ処置は、真皮細胞におけるｐＥＧＦＲ染色の減少にも関連しており、これは、ＥＲＥＧ＋ＤＣによるＥＧＦＲ活性化の阻害を裏付けるものであった（図１２Ｉ、下段）。Ｅｒｅｇ　Ａｂは皮膚におけるエピレグリンの発現を変化させず、これは、Ｅｒｅｇ　ＡｂがＥＲＥＧ＋ＤＣを枯渇させないことを示唆するものであった（図１２Ｈ）。よって、皮膚線維症が確立された後、エピレグリンの阻害によって、真皮の肥厚及びコラーゲン含有量が、恐らくコラーゲン発現の減少を介して、反転される。

【０３３９】

エピレグリン阻害をヒトＳＳｃ患者の処置に転用できるかどうかを調査するために、エピレグリン中和抗体を、びまん性皮膚ＳＳｃが悪化している患者から得られた皮膚外植片で試験した。生検時、患者は修正Ｒｏｄｎａｎスキンスコアが４５であり、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ抗体陽性であった。右前腕から隣接する４ｍｍのパンチ生検を得て、Ｅｒｅｇ中和抗体の存在下又は不在下で９日間培養した。エピレグリン阻害によりコラーゲン繊維の太さの減少を伴う、皮膚の組織学的外観の改善が得られた（図１２Ｊ）。未処理の皮膚移植片培地中のプロＣＯＬ１Ａ１の測定により、２日目の時点で高い初期レベルが、残りの７日間で低下することが示された（図１２Ｋ）。培養の各時点において、未処理の対照に比べて、Ｅｒｅｇ　Ａｂ処理済みサンプルにおいてプロＣＯＬ１Ａ１の減少が観察された。従って、エピレグリン阻害は、マウスのみならずヒトＳＳｃ皮膚においても、繊維性を低減するようである。

【０３４０】

実施例１３．エピレグリン阻害はマウス及びヒト肺線維症を改善する

次に、皮膚線維症を、線維性のマウス及びヒトの肺におけるエピレグリンの発現の上昇と共に反転させる、エピレグリン阻害の効力に基づいて、エピレグリン阻害によって肺線維症も処置できるかどうかを調査した。肺におけるエピレグリン発現は、気管内ブレオマイシン曝露の１～２週間後に増加する（図１１Ｇ）ため、図１３Ａに図示されているように、２週間の抗体処置をブレオマイシン投与の１０日目に開始した。これらのマウスでは、皮下Ｅｒｅｇ　Ａｂ投与による処置により、図１３Ｂに示されているように、大型の線維性腫瘤の発生が予防され、視認可能な肺胞中隔が保持された。ｐＥＧＦＲ＋細胞のクラスタは、ブレオマイシンを注射されたマウスの未処置群の肺の線維性領域に見られたが、

ＰＢＳ対照及びＥｒｅｇ　Ａｂで処置したマウスには存在せず（図１３Ｂ、下段）、これはエピレグリン依存性ＥＧＦＲ活性化のモデルを裏付けるものである。これらの知見は、修正Ａｓｈｃｒｏｆｔスコアの２ポイントの低下、及びコラーゲンタンパク質の３８％の減少を伴う、肺線維症指標の有意な改善に対応していた（図１３Ｃ～１３Ｄ）。ＥｒｅｇＡｂ処置は、全組織からのエピレグリンの発現も減少させたが、これは、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣによるエピレグリンの発現の低下、又はＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣの数の減少を反映したものであり得る（図１３Ｅ）。これらの知見を合わせると、エピレグリンが肺線維症の発症にも必要であり、皮膚線維症及び肺線維症の両方のモデルにおいて有望な治療標的であることが示される。

【０３４１】

ヒト肺線維症に対するエピレグリン阻害の効果を検証するために、エピレグリン及びＥＧＦＲの富化を示すことがｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑによって分かっているＩＰＦの患者からの肺外植片に対する、抗エピレグリン処置の影響を調査した（図１０Ｂ）。病理学的評価により、図１３Ｆに示されているような、線維芽細胞巣の存在、及び肺胞ＩＩ型上皮細胞の過形成によって証明されるように、早期ＩＰＦの診断が確認された。肺組織を２４ウェルプレートにプレーティングし、２日ごとに培地を交換しながら１０日間培養した。多種キナーゼ阻害剤であるニンテダニブ、及びトランスフォーミング成長因子β１型１受容体ＴＧＦ－βＲＩ／Ａｌｋ５小分子阻害剤と比較した、エピレグリン抗体の影響を、遺伝子発現及びタンパク質産生における疾患関連エンドポイントを測定することによって評価した。遺伝子レベルでは、エピレグリン発現の減少が観察され、これは、エピレグリン阻害及びＴＧＦ－βＲＩ阻害の両方によってマウス肺で観察されるものと同様のものであった（図１３Ｇ、左パネル）。これら２つの阻害剤は、ＣＯＬ１Ａ１の発現も有意に減少させた（図１３Ｇ、右パネル）。エピレグリン阻害は、テネイシンＣ（ＴＮＣ）及びＦＮ^{ＥＤＡ}（フィブロネクチンのエクストラドメインＡ含有アイソフォーム）を含む他のＥＣＭ遺伝子の発現も減少させた（図１３Ｈ、左パネル及び右パネル）。タンパク質レベルでは、３つの阻害剤全てによる、プロＣＯＬ１Ａ１のレベルの有意な低下（図１３Ｉ、左パネル）が観察された。抗エピレグリン処置は、ＴＩＭＰ－１レベルも低下させ、また単球走化性タンパク質－１（ＭＣＰ－１）を大幅に低下させる傾向も見られた（図１３Ｉ、中央パネル及び右パネル）。これらの結果は、エピレグリン遮断に、ＥＣＭ、ＥＣＭリモデリング、及び炎症の側面に影響を与える能力があることを強調するものである。ニンテダニブ及びＴＧＦ－βＲＩ／Ａｌｋ５阻害もまた、これらの疾患エンドポイントの一部の低下を裏付けるものであった。全体として、これらの結果は、ＩＰＦにおける疾患関連エンドポイントの調節因子としての抗エピレグリン処置のポテンシャルを裏付けるものであり、更に、マウス肺におけるブレオマイシンに関する知見を裏付けるものである。

【０３４２】

実施例１４．Ｉ型インターフェロン－ＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ軸は、エピレグリン及びＥＣＭ遺伝子の発現を調節する

ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータは、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣがＤＣ３の誘導性状態であることを示唆している。従って、循環ＤＣ及び単球と比較してヒトＤＣ３によるエピレグリン発現を調節するシグナルが何なのかについて、検討した。これらの疑問に答えるために、まずＴＨＰ－１単球を、エピレグリン発現の活性化シグナルに関してスクリーニングした。ヒトエピレグリン遺伝子の最初のイントロン内の保存された制御要素には、シグナル伝達兼転写活性化因子１（ＳＴＡＴ１）をシグナル伝達兼転写活性化因子２（ＳＴＡＴ２）と複合体化したもの（ＳＴＡＴ１／２）、ＧＡＴＡ結合タンパク質３（ＧＡＴＡ３）、及びＦＯＳの結合部位が含まれる。ＳＴＡＴ１／２二量体化及び活性化は、Ｉ型インターフェロン受容体のリガンドの結合の結果として発生することが公知である（５５）。従って、インターフェロン刺激遺伝子のより高い発現が、ヒトｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータ（図９Ｆ）及びマウス線維症モデル（図１１Ｆ）で観察された。培養平滑筋細胞によるエピレグリン発現に関する以前の研究では、インターロイキン６（ＩＬ－６）、エンドセリン－１、アンジオテンシンＩＩ、及びα－トロンビンによるエピレグリンの誘導が示されていた（５６、

５７）。これらのサイトカインに応答したエピレグリン発現が調査され、ＴＨＰ－１単球、エピレグリンがＩ型インターフェロンＩＦＮα２によって誘導されるという知見が示された（図１４Ａ）。しかしながら、エンドセリン－１、ＩＬ－６、ＩＬ－４、又はＴＧＦβによるエピレグリン誘導（最後の２つはそれぞれ転写因子ＧＡＴＡ３及びＦＯＳを誘導する）は観察されなかった。

【０３４３】

ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣはＤＣ３の特徴的な遺伝子発現プロファイルを示したが、公開されている末梢血のｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑもまた、ＤＣ３とＣＤ１４$^{+}$単球との間で同様の発現プロファイルを示していた（４４）。よって、エピレグリンはＤＣ３によっても単球によっても発現される可能性がある。単球、従来の樹状細胞（ｃＤＣ）、又はＤＣ３を誘導してエピレグリンを発現させることができるかどうかを判定するために、Ｉ型インターフェロンに応答したこれらのエピレグリン発現レベルを試験した。単球及びｃＤＣについては、新鮮な末梢血ＣＤ１４$^{+}$単球及びＣＤ１ｃ$^{+}$ＤＣを単離した。成熟がＧＭ－ＣＳＦ（５８）に依存するＤＣ３については、ヒト骨髄由来ＤＣ３（ＢＭＤＣ）を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）を用いてヒト骨髄を７日間培養することにより生成した。ＩＦＮα２は、ＣＤ１４$^{+}$単球及びＢＭＤＣの両方でエピレグリン発現を誘導したが、ＣＤ１ｃ$^{+}$ＤＣにおけるその発現を低下させた（図１４Ｂ～１４Ｄ）。これらのデータは、ＣＤ１４$^{+}$単球も含む場合もあるＤＣ３のＩ型インターフェロン誘導型細胞状態をエピレグリン発現が反映するモデルを裏付けるものである。

【０３４４】

エピレグリンが真皮線維芽細胞の線維性経路をどのように調節するかを理解するために、ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑデータで特定された成長因子リガンド及び受容体の発現を調査した。特に、ＮＯＴＣＨ受容体が免疫細胞及び線維芽細胞によって共通して発現されており、これが潜在的なフィードバックループを示唆していることに注目した。コンフルエントなヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＦ）を組換えエピレグリンと共にインキュベートした後、ＮＯＴＣＨリガンドである腎芽腫過剰発現（ｎｅｐｈｒｏｂｌａｓｔｏｍａ　ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｅｄ：ＮＯＶ）及びデルタ様リガンド４（ＤＬＬ４）の発現の増加が、それぞれの受容体ＮＯＴＣＨ１及びＮＯＴＣＨ２と共に観察された（図１４Ｅ）。ＮＯＴＣＨ３発現も増加したが、そのリガンドであるｊａｇｇｅｄ１（ＪＡＧ１）の発現は減少した。ＮＯＴＣＨによるオートクリンシグナル伝達は、リガンドが同じ細胞上のＮＯＴＣＨ受容体を阻害するシス阻害によって、厳密に調節される（５９）。エピレグリンで処理されたＨＦＦでは、ＮＯＴＣＨリガンド及び受容体の発現は、ＮＯＴＣＨ標的遺伝子であるｈｅｓファミリー塩基性ヘリックスループヘリックス（ｂａｓｉｃ　ｈｅｌｉｘ－ｌｏｏｐ－ｈｅｌｉｘ：ｂＨＬＨ）転写因子１（ＨＥＳ１）と、ｈｅｓファミリーｂＨＬＨ転写因子４（ＨＥＳ４）との発現の増加を伴い、これは、エピレグリンに応答した経路活性化を実証するものである。よって、真皮線維芽細胞では、エピレグリンがＮＯＴＣＨリガンド及び受容体の特定のサブセットの発現を誘導し、これがＮＯＴＣＨ経路の活性化をもたらす。

【０３４５】

免疫細胞もＮＯＴＣＨ受容体を発現するため、ＮＯＴＣＨリガンドがＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣにシグナルを返せるかどうかについても試験した。ＩＦＮａ２に応答して、ＢＭＤＣによるエピレグリン発現が上昇し、続いて６時間後までにベースラインまで低下した。これは、一時的な発現状態の後にこのサイトカインに対する応答性が失われたことを示唆している（図１４Ｆ）。その後、これらの細胞をＮＯＴＣＨリガンドＤＬＬ４及びＮＯＶに曝露することにより、ＢＭＤＣによるエピレグリンの発現が回復した（図１４Ｆ及びＤａｖｉ）。ＮＯＴＣＨによるエピレグリン発現の誘導は、インターフェロンのプライミングに関係なく、同様のレベルまで発生した。従って、Ｉ型インターフェロンに加えてＮＯＴＣＨリガンドが、一次ＤＣでのエピレグリン発現の追加の誘導因子であり、それにより、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣを維持するためのＳＳｃ線維芽細胞からの正のフィードバックシグナルとして機能する。

【０３４６】

ＮＯＴＣＨの活性化を推進するエピレグリンの能力を考慮して、次に、エピレグリンがＥＣＭ遺伝子発現も調節するだろうという仮説を立てた。新鮮な成人真皮線維芽細胞とは異なり、培養ＨＦＦはオートクリン的にエピレグリンを発現した（図１４Ｇ）。この観察結果を利用して、エピレグリン中和抗体（Ｅｒｅｇ　Ａｂ）が培養ＨＦＦでのＥＣＭ遺伝子発現を低下させることができるかどうかについて試験し、Ｅｒｅｇ　ＡｂがＣＯＬ１Ａ１、ＴＮＣ、及びＦＮ^{EDA}の発現を有意に減少させることが分かった（図１４Ｈ）。全体として、これらの結果は、Ｉ型インターフェロンがＤＣ３におけるエピレグリン発現を誘導する多細胞回路（図１４Ｉ）を明らかにするものである。そして、ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣは線維芽細胞におけるＮＯＴＣＨシグナル伝達を活性化し、線維芽細胞由来のＮＯＴＣＨリガンドはＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣ上のＮＯＴＣＨ受容体に結合してエピレグリン発現を維持する。更に、エピレグリン仲介型ＥＧＦＲ活性化は、複数の線維性ＥＣＭ遺伝子の発現に必要である。

【０３４７】

実施例１５．Ｉ型インターフェロン－ＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ軸の阻害はインビボで線維化を予防する

Ｉ型インターフェロンによるＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ回路の開始は、線維化中の回路活性化の前のインターフェロン阻害が、エピレグリン発現及びＮＯＴＣＨ活性化を減少させることを暗示している。ＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ回路の活性化がインビボでインターフェロンに依存するかどうかを試験するために、ブレオマイシン真皮線維症モデルを用いた。皮下ブレオマイシン注射の２週間後、マウスをインターフェロン受容体（インターフェロンα及びβ受容体サブユニット１、Ｉｆｎａｒ１）遮断抗体で腹腔内処理することにより、Ｉ型インターフェロンによる単球及びＤＣの活性化を阻害した（図１５Ａに図示）。これがシグナル伝達回路の開始を防止するという仮説を立てた。実際に、ビヒクル及びアイソタイプ抗体で処理した対照と比較して、Ｉｆｎａｒ１抗体で処理したマウスは、皮膚の厚さ及びコラーゲン含有量の低下を示した（図１５Ｂ～１５Ｄ）。更に、エピレグリン及びＮＯＴＣＨ標的遺伝子Ｈｅｓ１の相対的な発現は、Ｉｆｎａｒ１抗体で処理されたマウスマウスにおいて低下した（図１５Ｅ～１５Ｆ）。これは、エピレグリン誘導前に投与すると、インターフェロン阻害によって、線維化を、エピレグリン発現のための刺激と共に低減でき、これによってＮＯＴＣＨ活性化が予防されることを意味する。よって、インターフェロン－ＥＧＦＲ－ＮＯＴＣＨ回路は、皮膚線維化中にインビボで活性化されるように思われる。要約すると、ＳＳｃ皮膚及び肺のｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ分析により、Ｉ型インターフェロンによってトリガーされるＤＣ３によるエピレグリンの発現を中心とする、異常に活性化されたＤＣ－線維芽細胞シグナル伝達回路が特定された。標的化されたエピレグリンの阻害によって、マウス皮膚及び肺モデルと患者外植片との両方で線維症が反転され、エピレグリンが、ＳＳｃ及び他の線維性疾患に罹患した患者のための画期的な療法となる可能性があるものとして特定された。

【０３４８】

本明細書中の実施例は、Ｉ型インターフェロンがどのようにしてＥＧＦＲリガンドであるエピレグリンを誘導して、皮膚及び肺線維症の持続を促進する多細胞回路を活性化させるかを明らかにする。ＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣは、近年特定された、機能が不明な樹状細胞の希少な集団である（４３）。エピレグリンは、７つの細胞表面ＥＧＦＲリガンドのうちの１つであり、過去には、デキストラン硫酸ナトリウム大腸炎から消化管を保護すること（６０）、並びにベータセルリン及びアンフィレグリンと共にシグナル伝達して卵胞の成熟を誘導すること（６１）が報告されている。この研究は、エピレグリンというＥＲＥＧ$^{+}$ＤＣの定義リガンドが多細胞回路を駆動して、ヒト線維芽細胞においてＮＯＴＣＨシグナル伝達及びＥＣＭ発現を活性化することを示す。患者において、Ｉ型インターフェロンの循環レベルは、ＳＳｃの皮膚及び肺の線維症の重症度と相関している（３５、６２）。同様に、ここでは、回路を駆動するエピレグリンは、Ｉ型インターフェロンシグナル伝達を遮断することで無効化されることが示されている。よって、本発明の知見は、ＳＳｃ疾患の発症におけるこれらの観察結果を説明する説得力のある機序を提供し、それによって、ＳＳ

ｃ患者の慢性的に上昇するＩ型インターフェロンがエピレグリン発現を推進して、ＥＧＦＲ及びＮＯＴＣＨ活性化と過剰なＥＣＭ産生とを誘導する。その結果、標的化されたエピレグリンの阻害により、この回路を遮断して繊維性疾患を反転させることができる。

【０３４９】

ＥＧＦＲ及びＮＯＴＣＨはいずれも発生モルフォゲンであり、前駆細胞内で相互作用することが観察されているが、これらのシグナル伝達経路間の関連性は、線維症においてこれまで認識されていなかった。以前の研究では、網膜（６３）及び外陰部（６４）の発生中、並びに神経幹細胞の運命の調節（６５）において、ＥＧＦＲとＮＯＴＣＨとの間のクロストークが特定された。ＮＯＴＣＨ３は、線維芽細胞仲介型炎症性関節炎を推進することが近年特定された（６６）が、この状況においてＥＧＦＲとのクロストークが生じるかどうかは分かっていない。本明細書中の実施例は、エピレグリンが線維芽細胞におけるＮＯＴＣＨ３発現を誘導し、これが線維芽細胞のＮＯＴＣＨ活性化を調節できることを示している。更に、ＥＧＦＲ及びＮＯＴＣＨは、ヒト線維性疾患の免疫細胞と間葉系細胞との間のシグナル伝達に組み込まれ（図１４Ｉに図示）、ＥＧＦＲ活性化は、ＳＳｃにおける過剰にＥＣＭを産生する線維芽細胞をマーキングする。

【０３５０】

以前の研究では、全体的なＥＧＦＲの阻害によって、皮膚、肝臓、及び腎臓の線維症の発症を予防できることが示されていた（８～１０）。これらの観察結果は、それだけを見ると、ＥＧＦＲ阻害剤が患者にとって治療上有効となり得ることを示唆するものであった。しかしながら、皮膚及び肺線維症の処置のための、広範に作用するチロシンキナーゼ阻害剤の臨床研究は、重篤な有害事象の発生によって損なわれている（６７、６８）。本明細書で開示されている知見は、ＥＧＦＲリガンドであるエピレグリンの標的化された阻害により、線維症の動物モデル及び組織外植片において、コラーゲン及び他のＥＣＭ遺伝子がホメオスタシスレベルまで戻されることを示している。よって、エピレグリンは、複数の線維性疾患を処置するための臨床開発のための、有望な治療標的を提供する。

【０３５１】

以下は、上述の実施例で使用された方法である。

【０３５２】

研究用の患者。５人のびまん性皮膚ＳＳｃ患者及び５人の健康な対照からの皮膚生検を、シングルセルＲＮＡシーケンシングで分析した。米国リウマチ学会の基準（６９）によって診断されたびまん性強皮症（全身性硬化症）の成人患者と、健康な対照とを、Ｙａｌｅ Ｈｕｍａｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅの承認を受けた研究（ＨＩＣ＃ １５１１０１６８１６）のために募集した。強皮症の臨床診断は、全ての患者の皮膚の病理組織診断によって確認された。性別、人種、又は民族に基づいて、本研究から女性及び少数民族を除外することはなかった。年齢、性別、疾患発症時の年齢、疾患の持続期間、自己免疫疾患の家族歴、並びに現在及び過去の処置を含む患者の臨床データは、Ｏｄｅｌｌ博士によってレビューされた。Ｏｄｅｌｌ博士は、匿名化された患者データにアクセスできる唯一のメンバーであった。除外基準には、重複する自己免疫疾患のエビデンス、ＨＩＶ並びにＢ型及びＣ型肝炎を含む慢性血液感染症、並びにインフォームドコンセントの提供が不可能であることが含まれていた。健康な対照は、自己免疫疾患の個人又は家族歴がある場合には除外した。

【０３５３】

単一細胞組織の調製及びＲＮＡシーケンシング。１：１００，０００のエピネフリンを伴う１％リドカイン塩酸塩で皮膚の１～２ｃｍの範囲を麻酔した後、６ｍｍ及び３ｍｍの寸法の２つの隣接するパンチ生検を実施した。３ｍｍの生検は、１０％の中性緩衝ホルマリンで固定し、６ｍｍの生検はシングルセルＲＮＡライブラリの調製のために即座に処理した。まず、６ｍｍの試験片全体を、ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ）であって、５％のウシ胎児血清を含有し（５％ＦＢＳ／ＲＰＭＩ）、また１０ｍｇ／ｍｌのディスパーゼＩＩ（Ｓｉｇｍａ Ｄ４６９３－１Ｇ）を含有する、ＲＰＭＩ１６４０培地中で、２００～２５０ｒｐｍで振盪しながら３７℃で４５分間インキュベートした。次に６ｍｍのサ

ンプルを培地から取り出し、滅菌された虹彩剪刀で切り刻んだ後、５％のＦＢＳ／ＲＰＭＩ中で、０．５ｍｇ／ｍｌのＬｉｂｅｒａｓｅ　ＴＭ（Ｓｉｇｍａ）及び３０単位／ｍｌのＤＮａｓｅ　Ｉを用いて、２００～２５０ｒｐｍで振盪しながら３７℃で４５分間消化した。その後、得られた単一細胞懸濁液を、７０μｍナイロン膜を通して濾過し、洗浄した。生細胞をＹａｌｅ　Ｆｌｏｗ　ＣｏｒｅのＦＡＣＳＡｒｉａで、最終濃度と、血球計数器上でトリパンブルーで定量した生存率とについてソートした。細胞をペレット化し、０．０４％のウシ血清アルブミンを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で、５００～１０００個／μｌで懸濁させた。８０％を超える生存率で３０００～６０００個の細胞が、Ｃｈｒｏｍｉｕｍ　Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｒ（１０ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）を用いてシングルセルｃＤＮＡライブラリを生成するために、イェール大学のＤＮＡシーケンシング施設に送られた。

【０３５４】

シングルセル分析。６ｍｍの皮膚サンプルから生成された各ｃＤＮＡライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ　２５００　Ｓｙｓｔｅｍを用いて、読み取り長７５塩基対の１レーンでペアエンドシーケンシングし、細胞１個あたり少なくとも７５，０００の読み取り結果が生成された。次に、１０ｘ　ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｃｅｌｌ　Ｒａｎｇｅｒパイプラインを用いて上記読み取り結果を整列させ、クラスタリング及び遺伝子発現分析を実施し、正規化された読み取り結果数でサンプルを集計した。ｔ分布型確率的近傍埋め込み法（ｔＳＮＥ）プロットは１０個の主成分を使用した。Ｃｅｌｌ　Ｒａｎｇｅｒから得られた生のマトリックスを、シングルセルゲノミクス用のＳｅｕｒａｔバージョン３Ｒツールキット（７０、７１）でも処理して、低品質なサンプルをフィルタリングした後、データの正規化（デフォルトのスケーリング計数１００００を用いて対数正規化）、スケーリング、ＰＣＡ分析、ＵＭＡＰクラスタリング、及びバイオリンプロットの生成を実施し、その後、受容体－リガンド富化に関してＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢ　ｖ２．０（３９、４０）を用いて分析した。全ての１０ｘ実験は、バッチ効果を回避するために、同一の３’ケミストリー・高スループットシーケンサーを用いて完了させた。皮膚及び肺ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑから得られた生のマトリックスは、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｏｍｎｉｂｕｓからダウンロードされ（ＧＳＥ１３８６６９、ＧＳＥ１２２９６０、ＧＳＥ１２８１６９、ＧＳＥ１３２７７１、及びＧＳＥ１６３９７３）、Ｓｅｕｒａｔツールキットと、続いてＣｅｌｌＰｈｏｎｅＤＢを用いて、上述のように分析された。Ｒｅｙｆｍａｎ ｅｔ ａｌ.（４１）中のＳＳｃサンプルの年齢及び性別に最もよく一致させるために、健康対照データにはドナー番号１、３、４、及び７を使用した。ＭＯＲＰＨＥＵＳソフトウェア（ｓｏｆｔｗａｒｅ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｍｏｒｐｈｅｕｓ）を備えた１０ｘ　Ｌｏｕｐｅ　Ｂｒｏｗｓｅｒ　ｖ５で、細胞クラスタから遺伝子発現のヒートマップを生成した。

【０３５５】

皮膚及び肺切片の免疫組織化学。患者の皮膚から、３ｍｍの皮膚生検サンプルを、１０％中性緩衝ホルマリン中で２４時間固定した後、パラフィンに包埋した。サンプルをＹａｌｅ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓにおいて処理した。免疫組織化学分析のために、５μｍの切片を切り出し、スライドを脱パラフィン処理して、蒸留水で再水和した。次にこれらをＴｗｅｅｎ（登録商標）と共にＴＢＳに入れた。これは後の線状ステップで使用するものと同一の溶液である。内因性ペルオキシダーゼを３％の過酸化水素を用いてブロックし、その後すすいだ。次にスライドをプロテイナーゼＫで７分間処理し、その後すすいだ。ｐＥＧＦＲ及びビメンチンの共標識には、熱誘導エピトープ賦活化を利用した。スライドを一次抗体と共にインキュベートし、すすぎ、抗体をＨＲＰ結合二次抗体で検出した。ＤＡＢを用いて反応を識別した後、スライドを洗浄し、ヘマトキシリン中で対比染色し、脱水し、透明化し、樹脂製封入剤で封入した。エピレグリン及びＥＧＦＲ陽性細胞の定量は、１０個の高倍率視野で陽性細胞の個数をスコア化することにより、盲検法で完了した。

【０３５６】

一次抗体及び希釈：ウサギ抗ヒト／マウスＥＧＦＲ（リン酸化Ｙ１０６８）抗体（クローンＥＰ７７４Ｙ、Ａｂｃａｍ　ａｂ４０８１５）、ヒト組織で１／４００希釈、マウス組織で１／８００希釈；ウサギＩｇＧアイソタイプ対照（クローンＥＰＲ２５Ａ、Ａｂｃａｍ　ａｂ１７２７３０）１／４００；抗ヒトエピレグリン抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＡＦ１１９５）５μｇ／ｍＬ；抗マウス／ヒトエピレグリン抗体（クローン１８９６１１、Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＭＡＢ１０６８）；抗マウスＩＦＮＡＲ－１抗体（Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ製のクローンＭＡＲ１－５Ａ３）

【０３５７】

動物。野生型Ｃ５７ＢＬ／６は、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから購入した。Ｍｇｌ２^{ＤＴＲｅＧＦＰｐＡＮｅｏ}（Ｍｇｌ２－ＤＴＲ－ＧＦＰ）マウスは、岩崎明子氏（イェール大学）の厚意により提供された。全てのマウスはＹａｌｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｓｃｈｏｏｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　Ａｎｉｍａｌ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ　Ｃｅｎｔｅｒで飼育された。マウス実験は、Ｙａｌｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅに承認されたプロトコルの下で、ＡＡＡＬＡＣガイドラインに従って実施された。

【０３５８】

線維症のブレオマイシンマウスモデル。マウスは、イソフルラン精密気化器を使用して麻酔した。皮膚線維症の誘導のために、マウスを腹ばいに寝かせ、電動バリカンで２×２ｃｍの領域の毛を除去した後、０．２ｍｌの無菌ＰＢＳ（１０ｍｇ／ｋｇ）で希釈した０．２ｍｇブレオマイシン硫酸塩（Ｓｉｇｍａ　Ｂ８４１６）、又は０．２ｍｌ　ＰＢＳビヒクル対照を、３０ゲージの針を用いて皮下注射した。肺線維症の誘導のために、マウスを切歯で垂直に吊り下げ、過去に記述されている（５３）ように、６０μＬのＰＢＳ中の１．２５Ｕ／ｋｇのブレオマイシン硫酸塩を気管内投与した。肺試験片から、３つの右葉をヒドロキシプロリン定量に用い、左上葉を組織構造に、左下葉を遺伝子発現に用いた。肺の修正Ａｓｈｃｒｏｆｔスコア（７２）は盲検法で計算した。ブレオマイシンの複数のロットの線維症誘導の効力のばらつきを考慮するために、全ての実験に野生型（Ｂ６）対照が含まれる。線維症は、特段の注記のない限り、ブレオマイシン注射後２１日目に測定した。１００μｌのＰＢＳで希釈した１０ｍｇ／ｋｇのエピレグリン中和抗体（クローン１８９６１１、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＭＡＢ１０６８）を、麻酔したマウスの背頸部に週２回皮下投与した。Ｉ型インターフェロンシグナル伝達を遮断するために、０．５ｍＬのＰＢＳで希釈した１．６７ｍｇのＩＦＮＡＲ－１抗体（Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ製クローンＭＡＲ１－５Ａ３）を、単回用量として、ブレオマイシン注射の２週間後に腹腔内投与した。皮膚樹状細胞のバルクＲＮＡシーケンシングのために、Ｍｇｌ２^{ＤＴＲｅＧＦＰｐＡＮｅｏ}マウスに上述のようにブレオマイシンを皮下注射したが、ジフテリア毒素は注射されなかった。３週間後、影響を受けた皮膚を採取し、５％のＦＢＳ／ＲＰＭＩ中で、０．５ｍｇ／ｍｌのＬｉｂｅｒａｓｅ　ＴＭ（Ｓｉｇｍａ）及び３０単位／ｍｌのＤＮａｓｅ　Ｉを用いて、２００～２５０ｒｐｍで振盪しながら３７℃で１時間消化した。その後、得られた単一細胞懸濁液を、７０μｍナイロン膜を通して濾過し、洗浄した。生きたＧＦＰ$^{＋}$細胞のＣＤ６４$^{－}$集団に対するゲーティングによって樹状細胞をマクロファージからソートした後、バルクＲＮＡシーケンシングを行い、Ｔｕｘｅｄｏの一連のアプリケーションで分析した。

【０３５９】

患者の皮膚及び肺外植片の培養。皮膚外植片の培養のために、ＳＳｃ６患者の右腕から２つの隣接する４ｍｍのパンチ生検を得た。これらを即座に、４．５ｇ／ＬのＤ－グルコース、Ｌ－グルタミン、０．１％のＦＢＳ、１００Ｕ／ｍｌのペニシリン－ストレプトマイシン、及び２．５ｍｇ／ＬのアムホテリシンＢを含有するＤＭＥＭの皮膚培地に入れた。余剰の皮下脂肪を虹彩剪刀で注意深く除去した後、各生検試験片を、１ｍｌの皮膚培地のみを内包した、又は２．５μｇ／ｍｌの抗マウス／ヒトエピレグリン抗体が加えられた１２ウェル組織培養プレートの中央に、表皮側を上にして軽く浮かべて空気に曝露した後

、５％CO_2加湿インキュベータ内で３７℃でインキュベートした。培地は２時間後、そして２日目、５日目、及び７日目に交換された。使用済みの皮膚培地は、タンパク質測定前には－２０℃で保管された。ＥＬＩＳＡキットを製造元の説明書（Ａｂｃａｍ、ａｂ２１０９６６）に従って使用して、プロＣＯＬ１Ａ１を測定した。

【０３６０】

肺外植片については、ヒトＩＰＦ肺（４４歳のヒスパニック系男性）をＮａｔｉｏｎａｌ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｔｅｒｃｈａｎｇｅ（ＮＤＲＩ）から入手し、低温に維持し、クロスクランプ後２４時間以内に受け取った。持続期間２年のＩＰＦの診断がＮＤＲＩによって確認された。低温に維持したまま、組織をまず粗い細片に切断し、続いて極めて細い細片に切断した。そこから組織を、培養に好適な小片（およそ５０～１００ｍｇのサイズ）に切断した。断片を２４ウェルプレートにおいて、ダルベッコ改変イーグル培地：Ｆ－１２ Ｈａｍ’ｓ Ｎｕｔｒｉｅｎｔ Ｍｉｘｔｕｒｅ（ＤＭＥＭ：Ｆ－１２、Ｇｉｂｃｏ １１０３９－０２１）中で培養した。これはフェノールレッドを含まず、Ｌ－グルタミン、１５ｍＭのＨＥＰＥＳ、重炭酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシン、及びアムホテリシン抗生物質抗真菌溶液（Ｇｉｂｃｏ）、５０ｕｇ／ｍｌのゲンタマイシン、並びに１Ｘインスリン－トランスフェリン－セレニウム－エタノールアミン液体サプリメント（Ｓｉｇｍａ）を含有する。培地の交換は１０日間にわたって２日ごとに実施され、上述の薬理学的物質の交換は培地の交換のたびに発生した。１０日後、培養物上清を回収し、４０００Ｘｇ（４℃、１０分）で事前清澄化し、清浄な９６ウェルポリプロピレンプレートに移し、タンパク質エンドポイントの測定まで－８０℃で保管した。測定された分泌タンパク質は：ヒトＭＣＰ－１ Ｖ－Ｐｌｅｘ（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｋ１５１ＮＮＤ－１）、ヒトＴＩＭＰ－１（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｋ１５１ＪＦＣ－１）、及びヒトプロコラーゲン１α１ ＤｕｏＳｅｔ Ｅｌｉｓａ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ、ＤＹ６２２０－０５）を含む。全てのタンパク質を、それぞれのアッセイ製品データシートに従ってアッセイ及び分析した。１０日後、肺断片を採取し、ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ ＩＩ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、β－メルカプトエタノールを含有する３５０μｌのＲＬＴ緩衝液中で解離させ、Ｒｎｅａｓｙ Ｆｉｂｒｏｕｓミニキット（ＱｉａＧｅｎ、７４７０４）を用いてｍＲＮＡを単離した。処置群ごとに、分泌タンパク質の結果は８つの個別の断片を表し、遺伝子発現は４つの個別の断片を表す。

【０３６１】

ヒドロキシプロリン分析。安楽死後、剃毛した皮膚又は肺を、処理まで－７０℃で保管した。皮膚からは、ヒドロキシプロリンアッセイキット（Ｓｉｇｍａ ＭＡＫ００８）を用いたヒドロキシプロリン定量のために、患部から２ｍｍのパンチ生検（Ａｃｃｕ－Ｐｕｎｃｈ）を得た。簡潔に述べると、２ｍｍの皮膚試験片又は３つの右肺葉を、それぞれ１００μｌ又は５００μｌの３７％塩酸で、１２０℃で３時間煮沸した。次にサンプルを１６０００ｘｇで１分間遠心分離して、残った毛髪及び破片をペレット化した。上清から、３μｌを新しい微量遠心機チューブに移し、６０℃でおよそ２５分間、上部を開放して風乾した。乾燥されたペレットを、１００μｌのクロラミンＴ／酸化緩衝液混合物中で５～１０分間懸濁させた後、１００μｌの希釈済み４－（ジメチルアミノ）ベンズアルデヒトを加え、６０℃で９０分間インキュベートした。５５０ｎｍでの吸光度を、ＢｉｏＲａｄ ｉＭａｒｋ又はＢｉｏＴｅｋ Ｓｙｎｅｒｇｙ ＨＴＸマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

【０３６２】

細胞株。ＴＨＰ－１単球及びヒト包皮線維芽細胞は、ＡＴＣＣから購入された（ＴＩＢ－２０２及びＳＣＲＣ－１０４１）。$CD14^+$単球及び$CD1c^+$ＤＣ前駆細胞は、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製のＨｕｍａｎ ＣＤ１４ Ｐｏｓｉｔｉｖｅ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＩＩ、及びＭｉｌｔｅｎｙｌ Ｂｉｏｔｅｃ製の$CD1c^+$ Ｈｕｍａｎ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔを、製造元のプロトコルに従って使用して、健康な参加者から得られた新鮮な末梢血から単離

された。ヒトＢＭＤＣは、ＭＩＳＴＲＧ６ヒト化マウス（７３、７４）からの骨髄を、１００ｎｇ／ｍｌのヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　２１５－ＧＭ）と共に７日間インキュベートすることによって生成された。

【０３６３】

単球及び樹状細胞遺伝子発現。単球及び樹状細胞は、５％CO_2加湿インキュベータ内で、３７℃の１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有するＧｉｂｃｏ　Ｒｏｓｗｅｌｌ　Ｐａｒｋ　Ｍｅｍｏｒｉａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０培地中でインキュベートされた。これらは、特段の指示のない限り、ＲＮＡ単離及びｃＤＮＡ合成前に、以下の濃度を用いて、サイトカインと共に４時間インキュベートされた：ＩＦＮａ２　１０００Ｕ／ｍＬ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　５９２７０４）、ＴＧＦ－β１　０．６４ｎｇ／ｍｌ（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　７７５４－ＢＨ）、エンドセリン－１　１００ｎｇ／ｍｌ（Ａｂｃａｍ　ａｂ１５８３３２）、ＩＬ－４　２５ｎｇ／ｍｌ（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　６５０７－ＩＬ）、及びＩＬ－６　１００ｎｇ／ｍｌ（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　２０６－ＩＬ）。ＮＯＴＣＨリガンドの効果を試験するために、単球を、培地のみ、又は１０００Ｕ／ｍＬのＩＦＮａ２中で、３７℃で６時間インキュベートした。最後の４５分間に、それぞれ１０μｇ／ｍＬの組換えＮＯＴＣＨリガンドＤＬＬ４（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　１５０６－Ｄ４）及びＮＯＶ（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　１６４０－ＮＶ）を、既に記述されている（７５）ように、４８ウェルプレートの底部に３７℃で４５分間接着させた（７５）。単球をペレット化して新鮮な培地中で懸濁させた後、ＮＯＴＣＨリガンド又は培地のみを内包したウェルに移した。

【０３６４】

線維芽細胞遺伝子発現。ヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＦ）を、５％CO_2加湿インキュベータ内において、１％のＦＢＳを含有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）に３７℃で一晩播種した。翌日、培地を取り除き、新鮮な培地を加えた。ＮＯＴＣＨシグナル伝達に対する組換えヒトエピレグリン（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　１１９５－ＥＰ）の影響を試験するために、１μｇ／ｍｌを、アスコルビン酸５０μｇ／ｍＬを補充した培地中のコンフルエントなＨＦＦに加え、一晩後にＲＮＡ抽出及びｃＤＮＡ合成を行った。ＥＧＦＲリガンド発現については、サブコンフルエントなＨＦＦを培地のみで４８時間インキュベートした。ＥＧＦＲ阻害については、サブコンフルエントなＨＦＦを、培地のみ、又は５μｇ／ｍＬの抗ヒトエピレグリン中和抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＡＦ１１９５）と共に、２４時間インキュベートした後、ＲＮＡの単離及びｑＰＣＲ分析を行った。

【０３６５】

ＲＮＡ調製及び定量ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）。ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｐｌｕｓ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて組織及び細胞から抽出された。β－メルカプトエタノール１：１００希釈液及びＲｅａｇｅｎｔ　ＤＸ（Ｑｉａｇｅｎ）１：２００希釈液を含有するＲＬＴ　Ｐｌｕｓ緩衝液中で、Ｑｉａｇｅｎ　ＴｉｓｓｕｅＲｕｐｔｏｒ　ＩＩを用いて、皮膚及び肺組織を、無傷の組織が残っているのを視認できなくなるまで、およそ３０～６０秒間にわたって破壊及びホモジナイズした。ｃＤＮＡは、０．５ｍＭのｄＮＴＰ及び２５ｎｇ／μｌのＯｌｉｇｏ　ｄ（Ｔ）$_{20}$（配列番号７３）を補充した１０Ｕ／μｌのＭａｘｉｍａ　Ｈ　Ｍｉｎｕｓ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅを用いて発生させた。プライマーはＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入したものであり、以下にはヒトｑＰＣＲ配列（表５）及びマウスｑＰＣＲ配列（表６）の配列を示す。ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎを用いた遺伝子発現の相対的定量は、ＣＦＸ３８４又はＣＦＸ９６　Ｔｏｕｃｈ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて測定された。遺伝子発現は、ハウスキーピング遺伝子ＵＢＣ（７６）又はＰＰＩＡ（肺外植片）に対して正規化され、相対的発現は、$2^{-\Delta\Delta Ct}$法（７７）を用いて計算された。

【０３６６】

【表５】

表5. ヒト qPCR 配列

遺伝子	フォワードプライマー配列	配列番号	リバースプライマー配列	配列番号
UBC	CGTCACTTGACAATGCAG	11	TGTTTTCCAGCAAAGATCAG	12
COL1A1	GCTATGATGAGAAATCAACCG	13	TCATCTCCATTCTTTCCAGG	14
$FN1^{EDA}$ (78)	TAAAGGACTGGCATTCACTGA	15	GTGCAAGGCAACCACACTGAC	16
TNC	GTGGGATCCTCTAGACATTG	17	GTGATCTCTCCCTCATCTTC	18
EGF	CAGTTGATCCAGTAGAAAGG	19	TGTACTGAATCCAAAACAGC	20
TGFA	AGAAACAGTGGTCTGAAGAG	21	ATTACAGGCCAAGTAGGAAG	22
BTC	CAGAAGTCCTGAAACTAATGG	23	CAATGTAGCCTTCATCACAG	24
HBEGF	GCTTATATACCTATGACCACAC	25	GTACCTAAACATGAGAAGCC	26
EREG	GTTCAGACAGAAGACAATCC	27	GACTCATGTCCACCAGATAG	28
AREG	AAAGAAAGAAAAAGGGAGGC	29	CATTTGCATGTTACTGCTTC	30
EPGN	GCAAGCTGACAACATAGAAG	31	GCAGTAACTGTTATGATCTTCC	32
DLL4	GTTACACAGTGAAAAGCCAG	33	CTCTCCTCTGATATCAAACAC	34
NOV	TAGAAGTCTCTGACTCAAGTG	35	CCTTTCTTATCTGTTGGCTG	36
JAG1	ACTACTACTATGGCTTTGGC	37	ATAGCTCTGTTACATTCGGG	38
NOTCH1	AAGATATGCAGAACAACAGG	39	TCCATATGATCCGTGATGTC	40
NOTCH2	GATGAATGATGGTACTACACC	41	CAGATTTTCCATGGTCATCC	42
NOTCH3	CTACAATGGTGATAACTGTGAG	43	CAGTCATCCTCATTAATCTCG	44
NOTCH4	GTCCCCCAGGTTTCATAG	45	ACTCATCCACATCTTCGG	46
HES1	GCCTATTATGGAGAAAAGACG	47	CTATCTTTCTTCAGAGCATCC	48
HES4	AAAACCCTCATCCTGGAC	49	GTGTCTCACGGTCATCTC	50

【０３６７】

【表６】

表6. マウス qPCR 配列

遺伝子	フォワードプライマー配列	配列番号	リバースプライマー配列	配列番号
Ubc	GAGACGATGCAGATCTTTG	51	ATGTTGTAGTCTGACAGGG	52
Col1a1 (79)	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	53	CCACGTCTCACCATTGGGG	54
$Fn1^{EDA}$ (78)	AGATGCAGCAGATCCGCAT	55	GTTCTTGCCCATCAGCACC	56
Tnc	CAAAGAGACCTTCATCACAG	57	GGCTCTTTGGAACATCTATC	58
Egf	GTACTCTTGGGTGTGAAAAC	59	CAAGTTCGTGACATTGTTTC	60
Tgfa	CTCTGAGACAGTGGTCTG	61	GTCCCAAGATGCCTTTTC	62
Btc	AGACCAATATTGCTTAACGG	63	AACAAGCAACACACAGTTAC	64
Hbegf	GAGCTATAGGAACCTTCAGAG	65	ACTGGAAATGAATGAAGACG	66
Ereg	AATTCTGCAGATGTGAAGTG	67	TATTCTTTGCTCAAGGGTTG	68
Areg	GACATGCAATTGTCATCAAG	69	GACAAAGATAGTGACAGCTAC	70
Epgn	ATAGAAGAACCTGTAGCTCTG	71	CCGTATAACCAGTAAAGCATC	72

【参考文献】

【０３６８】

1. Gieseck RL, 3rd, Wilson MS, and Wynn TA. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. Nat Rev Immunol. 2017.
2. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. N Engl J Med. 2019.
3. Khanna D, Lin CJF, Furst DE, Goldin J, Kim G, Kuwana M, et al. Tocilizumab in systemic sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Respir Med. 2020;8(10):963-74.
4. Olson LE, and Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. Dev Cell. 2009;16(2):303-13.
5. Chakraborty D, Zhu H, Jungel A, Summa L, Li YN, Matei AE, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 activates a network of profibrotic signaling pathways to promote fibrosis in systemic sclerosis. Sci Transl Med. 2020;12(563).
6. Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, and Riese DJ, 2nd. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. Pharmacol Ther. 2009;122(1):1-8.
7. Lofgren S, Hinchcliff M, Carns M, Wood T, Aren K, Arroyo E, et al. Integrated, multicohort analysis of systemic sclerosis identifies robust transcriptional signature of disease severity. JCI Insight. 2016;1(21):e89073.
8. Fuchs BC, Hoshida Y, Fujii T, Wei L, Yamada S, Lauwers GY, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2014;59(4):1577-90.
9. Morin F, Kavian N, Marut W, Chereau C, Cerles O, Grange P, et al. Inhibition of EGFR Tyrosine Kinase by Erlotinib Prevents Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease in a Mouse Model. J Invest Dermatol. 2015;135(10):2385-93.
10. Liu N, Guo JK, Pang M, Tolbert E, Ponnusamy M, Gong R, et al. Genetic or pharmacologic blockade of EGFR inhibits renal fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2012;23(5):854-67.
11. Suzuki H, Aoshiba K, Yokohori N, and Nagai A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. Cancer Res. 2003;63(16):5054-9.
12. Zhou X, Franklin RA, Adler M, Jacox JB, Bailis W, Shyer JA, et al. Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. Cell. 2018;172(4):744-57 e17.
13. Sole-Boldo L, Raddatz G, Schutz S, Mallm JP, Rippe K, Lonsdorf AS, et al. Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. Commun Biol. 2020;3(1):188.
14. Deng CC, Hu YF, Zhu DH, Cheng Q, Gu JJ, Feng QL, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. Nat Commun. 2021;12(1):3709.
15. Tabib T, Huang M, Morse N, Papazoglou A, Behera R, Jia M, et al. Myofibroblast transcriptome indicates SFRP2(hi) fibroblast progenitors in systemic sclerosis skin. Nat Commun. 2021;12(1):4384.
16. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, Cox C, Calviello AK, Wa

ng AW, et al. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. Nature. 2021;593(7860):575-9.
17. Apostolidis SA, Stifano G, Tabib T, Rice LM, Morse CM, Kahaleh B, et al. Single Cell RNA Sequencing Identifies HSPG2 and APLNR as Markers of Endothelial Cell Injury in Systemic Sclerosis Skin. Front Immunol. 2018;9:2191.
18. Aliprantis AO, Wang J, Fathman JW, Lemaire R, Dorfman DM, Lafyatis R, et al. Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(8):2827-30.
19. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. Nature. 2017;541(7635):96-101.
20. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA, Spiera RF, Crow MK, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. Sci Transl Med. 2018;10(423).
21. Kraling BM, Maul GG, and Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. Pathobiology. 1995;63(1):48-56.
22. Duan H, Fleming J, Pritchard DK, Amon LM, Xue J, Arnett HA, et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. Arthritis Rheum. 2008;58(5):1465-74.
23. Wohlfahrt T, Usherenko S, Englbrecht M, Dees C, Weber S, Beyer C, et al. Type 2 innate lymphoid cell counts are increased in patients with systemic sclerosis and correlate with the extent of fibrosis. Ann Rheum Dis. 2015.
24. Kahari VM, Sandberg M, Kalimo H, Vuorio T, and Vuorio E. Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. J Invest Dermatol. 1988;90(5):664-70.
25. Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B, and Krieg T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. Eur J Clin Invest. 1988;18(1):9-17.
26. Bondjers C, Kalen M, Hellstrom M, Scheidl SJ, Abramsson A, Renner O, et al. Transcription profiling of platelet-derived growth factor-B-deficient mouse embryos identifies RGS5 as a novel marker for pericytes and vascular smooth muscle cells. Am J Pathol. 2003;162(3):721-9.
27. Huang da W, Sherman BT, and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4(1):44-57.
28. Henderson NC, Rieder F, and Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. Nature. 2020;587(7835):555-66.
29. Der E, Suryawanshi H, Morozov P, Kustagi M, Goilav B, Ranabothu S, et al. Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways. Nat Immunol. 2019;20(7):915-27.
30. Wei J, Fang F, Lam AP, Sargent JL, Hamburg E, Hinchcliff ME, et al. Wnt/beta-catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and

induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. Arthr itis Rheum. 2012;64(8):2734-45.
31. Ascension AM, Fuertes-Alvarez S, Ibanez-Sole O, Izeta A, and Arauz o-Bravo MJ. Human Dermal Fibroblast Subpopulations Are Conserved ac ross Single-Cell RNA Sequencing Studies. J Invest Dermatol. 2021;141(7):1735-44 e35.
32. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et a l. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. Cell. 2021;184(15):3852-72.
33. Tsukui T, Sun KH, Wetter JB, Wilson-Kanamori JR, Hazelwood LA, H enderson NC, et al. Collagen-producing lung cell atlas identifies multip le subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. Nat Com mun. 2020;11(1):1920.
34. Kim HJ, Li G, Gjertson D, Elashoff R, Shah SK, Ochs R, et al. Classif ication of parenchymal abnormality in scleroderma lung using a novel a pproach to denoise images collected via a multicenter study. Acad Radi ol. 2008;15(8):1004-16.
35. Eloranta ML, Franck-Larsson K, Lovgren T, Kalamajski S, Ronnblom A, Rubin K, et al. Type I interferon system activation and association w ith disease manifestations in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2010; 69(7):1396-402.
36. Lemmon MA, and Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010;141(7):1117-34.
37. Freed DM, Bessman NJ, Kiyatkin A, Salazar-Cavazos E, Byrne PO, Mo ore JO, et al. EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics. Cell. 2017;171(3):683-95 e18.
38. Hu C, Leche CA, 2nd, Kiyatkin A, Yu Z, Stayrook SE, Ferguson KM, et al. Glioblastoma mutations alter EGFR dimer structure to prevent ligand bias. Nature. 2022.
39. Vento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal i nterface in humans. Nature. 2018;563(7731):347-53.
40. Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, and Vento-Tormo R. Cel lPhoneDB v2.0: Inferring cell-cell communication from combined expres sion of multi-subunit receptor-ligand complexes. bioRxiv. 2019:680926.
41. Reyfman PA, Walter JM, Joshi N, Anekalla KR, McQuattie-Pimentel A C, Chiu S, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Human Lung Pro vides Insights into the Pathobiology of Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2018.
42. Valenzi E, Bulik M, Tabib T, Morse C, Sembrat J, Trejo Bittar H, et al. Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myofibrobl asts in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Ann Rhe um Dis. 2019.
43. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA seque ncing. Nature. 2020;587(7835):619-25.
44. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic c ells, monocytes, and progenitors. Science. 2017;356(6335).
45. Girard M, Law JC, Edilova MI, and Watts TH. Type I interferons driv

e the maturation of human DC3s with a distinct costimulatory profile characterized by high GITRL. Sci Immunol. 2020;5(53).
46. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. J Cell Biol. 2004;164(5):769-79.
47. Sargent JL, Li Z, Aliprantis AO, Greenblatt M, Lemaire R, Wu MH, et al. Identification of Optimal Mouse Models of Systemic Sclerosis by Interspecies Comparative Genomics. Arthritis Rheumatol. 2016;68(8):2003-15.
48. Lescoat A, Lecureur V, and Varga J. Contribution of monocytes and macrophages to the pathogenesis of systemic sclerosis: recent insights and therapeutic implications. Curr Opin Rheumatol. 2021;33(6):463-70.
49. Lakos G, Takagawa S, and Varga J. Animal models of scleroderma. Methods Mol Med. 2004;102:377-93.
50. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. J Invest Dermatol. 1999;112(4):456-62.
51. Aiba S, Tabata N, Ohtani H, and Tagami H. CD34+ spindle-shaped cells selectively disappear from the skin lesion of scleroderma. Arch Dermatol. 1994;130(5):593-7.
52. Snider GL, Hayes JA, and Korthy AL. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin: pathology and stereology. Am Rev Respir Dis. 1978;117(6):1099-108.
53. Rangarajan S, Bone NB, Zmijewska AA, Jiang S, Park DW, Bernard K, et al. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model. Nat Med. 2018;24(8):1121-7.
54. Madtes DK, Elston AL, Hackman RC, Dunn AR, and Clark JG. Transforming growth factor-alpha deficiency reduces pulmonary fibrosis in transgenic mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;20(5):924-34.
55. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, and Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. Annu Rev Med. 2015;66:311-28.
56. Taylor DS, Cheng X, Pawlowski JE, Wallace AR, Ferrer P, and Molloy CJ. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(4):1633-8.
57. Kyotani Y, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Makino M, Takasawa S, et al. Intermittent hypoxia-induced epiregulin expression by IL-6 production in human coronary artery smooth muscle cells. FEBS Open Bio. 2018;8(5):868-76.
58. Bourdely P, Anselmi G, Vaivode K, Ramos RN, Missolo-Koussou Y, Hidalgo S, et al. Transcriptional and Functional Analysis of CD1c(+) Human Dendritic Cells Identifies a CD163(+) Subset Priming CD8(+)CD103(+) T Cells. Immunity. 2020;53(2):335-52 e8.
59. del Alamo D, Rouault H, and Schweisguth F. Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. Curr Biol. 2011;21(1):R40-7.
60. Lee D, Pearsall RS, Das S, Dey SK, Godfrey VL, and Threadgill DW. Epiregulin is not essential for development of intestinal tumors but is required for protection from intestinal damage. Mol Cell Biol. 2004;24(

20):8907-16.
61. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, and Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. Science. 2004;303(5658):682-4.
62. Kim D, Peck A, Santer D, Patole P, Schwartz SM, Molitor JA, et al. Induction of interferon-alpha by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: association of higher interferon-alpha activity with lung fibrosis. Arthritis Rheum. 2008;58(7):2163-73.
63. Kumar JP, and Moses K. The EGF receptor and notch signaling pathways control the initiation of the morphogenetic furrow during Drosophila eye development. Development. 2001;128(14):2689-97.
64. Yoo AS, Bais C, and Greenwald I. Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in C. elegans vulval development. Science. 2004;303(5658):663-6.
65. Aguirre A, Rubio ME, and Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. Nature. 2010;467(7313):323-7.
66. Wei K, Korsunsky I, Marshall JL, Gao A, Watts GFM, Major T, et al. Notch signalling drives synovial fibroblast identity and arthritis pathology. Nature. 2020;582(7811):259-64.
67. Iwamoto N, Distler JH, and Distler O. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic sclerosis: from animal models to clinical trials. Curr Rheumatol Rep. 2011;13(1):21-7.
68. Gordon JK, Martyanov V, Magro C, Wildman HF, Wood TA, Huang WT, et al. Nilotinib (Tasigna) in the treatment of early diffuse systemic sclerosis: an open-label, pilot clinical trial. Arthritis Res Ther. 2015;17:213.
69. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis. 2013;72(11):1747-55.
70. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, and Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. Nature biotechnology. 2018.
71. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, 3rd, et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. Cell. 2019;177(7):1888-902 e21.
72. Hubner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. Biotechniques. 2008;44(4):507-11, 14-7.
73. Sefik E, Israelow B, Mirza H, Zhao J, Qu R, Kaffe E, et al. A humanized mouse model of chronic COVID-19. Nature biotechnology. 2021.
74. Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, Strowig T, Gearty SV, Teichmann LL, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. Nature biotechnology. 2014;32(4):364-72.
75. Gerli MFM, Moyle LA, Benedetti S, Ferrari G, Ucuncu E, Ragazzi M, et al. Combined Notch and PDGF Signaling Enhances Migration and Expression of Stem Cell Markers while Inducing Perivascular Cell Features in Muscle Satellite Cells. Stem Cell Reports. 2019;12(3):461-
76. Chua SL, See Too WC, Khoo BY, and Few LL. UBC and YWHAZ as suitable reference genes for accurate normalisation of gene expression usi

ng MCF7, HCT116 and HepG2 cell lines. Cytotechnology. 2011;63(6):645-54.
77. Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
78. Bhattacharyya S, Tamaki Z, Wang W, Hinchcliff M, Hoover P, Getsios S, et al. FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through Toll-like receptor signaling. Sci Transl Med. 2014;6(232):232ra50.
79. Sampaio-Pinto V, Rodrigues SC, Laundos TL, Silva ED, Vasques-Novoa F, Silva AC, et al. Neonatal Apex Resection Triggers Cardiomyocyte Proliferation, Neovascularization and Functional Recovery Despite Local Fibrosis. Stem Cell Reports. 2018;10(3):860-74.
80. Garbers, C. et al. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. J Biol Chem 286, 42959-42970, doi:10.1074/jbc.M111.295758 (2011).

【０３６９】

本発明は、本明細書に記載された特定の実施形態によってその範囲が限定されるものではない。実際、本明細書に記載されたものに加えて、当業者であれば、前述の説明から、本発明の様々な修正が明らかになるであろう。このような修正は、添付の特許請求の範囲に含まれることを意図している。

【０３７０】

本明細書で引用されたすべての特許、出願、刊行物、試験方法、文献、およびその他の資料は、本明細書に物理的に存在しているかのように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０３７１】

配列表

配列番号 1 hEreg NAb1 重鎖可変領域 (VH)
HLQLQESGPGLVKSSETLSLTCSVSGGSISSSGYYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGN
TYYNPSLKSRVTISADTSKSQYSLKLSSVTAADTAVYYCARHPFNWNDHYHYMDVW
GNGTTVTVSS

配列番号 2 hEreg NAb1 HCDR1
GGSISSSGYY

配列番号 3 hEreg NAb1 HCDR2
FYYSGNT

配列番号 4 hEreg NAb1 HCDR3
ARHPFNWNDHYHYMDV

配列番号 **5** hEreg NAb1 重鎖可変領域(VH)をコードするヌクレオチド配列
CACCTGCAACTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCTCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTGGTTACTACTGGG
GCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTTTCTATT
ATAGTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGC
AGACACGTCCAAGAGCCAGTACTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCAGA
CACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGACATCCGTTCAACTGGAACGACCACTATCAC
TACATGGACGTCTGGGGCAACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

配列番号 **6** hEreg NAb1 軽鎖可変領域 (VL)
DIQMTQSPSSLSASVGDSVTITCRASQSISNYLNWYQKKPGKAPKVLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYITSITFGQGTRLEIK

配列番号 7 hEreg NAb1 LCDR1
QSISNY

配列番号 8 hEreg NAb1 LCDR2
AAS

配列番号 9 hEreg NAb1 LCDR3
QQSYITSIT

配列番号 **10** hEreg NAb1 軽鎖可変領域(VL)をコードするヌクレオチド配列
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGCG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCA
GAAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCA
AAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTT
ACATAACCTCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

配列番号 11 ヒト UBC フォワードプライマー
CGTCACTTGACAATGCAG

配列番号 12 ヒト UBC リバースプライマー
TGTTTTCCAGCAAAGATCAG

配列番号 13 ヒト COL1A1 フォワードプライマー
GCTATGATGAGAAATCAACCG

配列番号 14 ヒト COL1A1 リバースプライマー
TCATCTCCATTCTTTCCAGG

配列番号 15 ヒト FN1EDA (78)フォワードプライマー
TAAAGGACTGGCATTCACTGA

配列番号 16 ヒト FN1EDA (78)リバースプライマー
GTGCAAGGCAACCACACTGAC

配列番号 17 ヒト TNC フォワードプライマー
GTGGGATCCTCTAGACATTG

配列番号 18 ヒト TNC リバースプライマー
GTGATCTCTCCCTCATCTTC

配列番号 19 ヒト EGF フォワードプライマー
CAGTTGATCCAGTAGAAAGG

配列番号 20 ヒト EGF リバースプライマー
TGTACTGAATCCAAAACAGC

配列番号 21 ヒト TGFA フォワードプライマー
AGAAACAGTGGTCTGAAGAG

配列番号 22 ヒト TGFA リバースプライマー
ATTACAGGCCAAGTAGGAAG

配列番号 23 ヒト BTC フォワードプライマー
CAGAAGTCCTGAAACTAATGG

配列番号 24 ヒト BTC リバースプライマー
CAATGTAGCCTTCATCACAG

配列番号 25 ヒト HBEGF フォワードプライマー
GCTTATATACCTATGACCACAC

配列番号 26 ヒト HBEGF リバースプライマー
GTACCTAAACATGAGAAGCC

配列番号 27 ヒト EREG フォワードプライマー
GTTCAGACAGAAGACAATCC

配列番号 28 ヒト EREG リバースプライマー
GACTCATGTCCACCAGATAG

配列番号 29 ヒト AREG フォワードプライマー
AAAGAAAGAAAAAGGGAGGC

配列番号 30 ヒト AREG リバースプライマー
CATTTGCATGTTACTGCTTC

配列番号 31 ヒト EPGN フォワードプライマー
GCAAGCTGACAACATAGAAG

配列番号 32 ヒト EPGN リバースプライマー
GCAGTAACTGTTATGATCTTCC

配列番号 33 ヒト DLL4 フォワードプライマー
GTTACACAGTGAAAAGCCAG

配列番号 34 ヒト DLL4 リバースプライマー
CTCTCCTCTGATATCAAACAC

配列番号 35 ヒト NOV フォワードプライマー
TAGAAGTCTCTGACTCAAGTG

配列番号 36 ヒト NOV リバースプライマー
CCTTTCTTATCTGTTGGCTG

配列番号 37 ヒト JAG1 フォワードプライマー
ACTACTACTATGGCTTTGGC

配列番号 38 ヒト JAG1 リバースプライマー
ATAGCTCTGTTACATTCGGG

配列番号 39 ヒト NOTCH1 フォワードプライマー
AAGATATGCAGAACAACAGG

配列番号 40 ヒト NOTCH1 リバースプライマー
TCCATATGATCCGTGATGTC

配列番号 41 ヒト NOTCH2 フォワードプライマー
GATGAATGATGGTACTACACC

配列番号 42 ヒト NOTCH2 リバースプライマー
CAGATTTTCCATGGTCATCC

配列番号 43 ヒト NOTCH3 フォワードプライマー
CTACAATGGTGATAACTGTGAG

配列番号 44 ヒト NOTCH3 リバースプライマー
CAGTCATCCTCATTAATCTCG

配列番号 45 ヒト NOTCH4 フォワードプライマー
GTCCCCCAGGTTTCATAG

配列番号 46 ヒト NOTCH4 リバースプライマー
ACTCATCCACATCTTCGG

配列番号 47 ヒト HES1 フォワードプライマー
GCCTATTATGGAGAAAAGACG

配列番号 48 ヒト HES1 リバースプライマー
CTATCTTTCTTCAGAGCATCC

配列番号 49 ヒト HES4 フォワードプライマー
AAAACCCTCATCCTGGAC

配列番号 50 ヒト HES4 リバースプライマー
GTGTCTCACGGTCATCTC

配列番号 51 マウス Ubc フォワードプライマー
GAGACGATGCAGATCTTTG

配列番号 52 マウス Ubc リバースプライマー
ATGTTGTAGTCTGACAGGG

配列番号 53 マウス Col1a1 (79)フォワードプライマー
GCTCCTCTTAGGGGCCACT

配列番号 54 マウス Col1a1 (79)リバースプライマー
CCACGTCTCACCATTGGGG

配列番号 55 マウス Fn1EDA (78)フォワードプライマー
AGATGCAGCAGATCCGCAT

配列番号 56 マウス Fn1EDA (78)リバースプライマー
GTTCTTGCCCATCAGCACC

配列番号 57 マウス Tnc フォワードプライマー
CAAAGAGACCTTCATCACAG

配列番号 58 マウス Tnc リバースプライマー
GGCTCTTTGGAACATCTATC

配列番号 59 マウス Egf フォワードプライマー
GTACTCTTGGGTGTGAAAAC

配列番号 60 マウス Egf リバースプライマー
CAAGTTCGTGACATTGTTTC

配列番号 61 マウス Tgfa フォワードプライマー
CTCTGAGACAGTGGTCTG

配列番号 62 マウス Tgfa リバースプライマー
GTCCCAAGATGCCTTTTC

配列番号 63 マウス Btc フォワードプライマー
AGACCAATATTGCTTAACGG

配列番号 64 マウス Btc リバースプライマー
AACAAGCAACACACAGTTAC

配列番号 65 マウス Hbegf フォワードプライマー
GAGCTATAGGAACCTTCAGAG

配列番号 66 マウス Hbegf リバースプライマー
ACTGGAAATGAATGAAGACG

配列番号 67 マウス Ereg フォワードプライマー
AATTCTGCAGATGTGAAGTG

配列番号 68 マウス Ereg リバースプライマー
TATTCTTTGCTCAAGGGTTG

配列番号 69 マウス Areg フォワードプライマー
GACATGCAATTGTCATCAAG

配列番号 70 マウス Areg リバースプライマー
GACAAAGATAGTGACAGCTAC

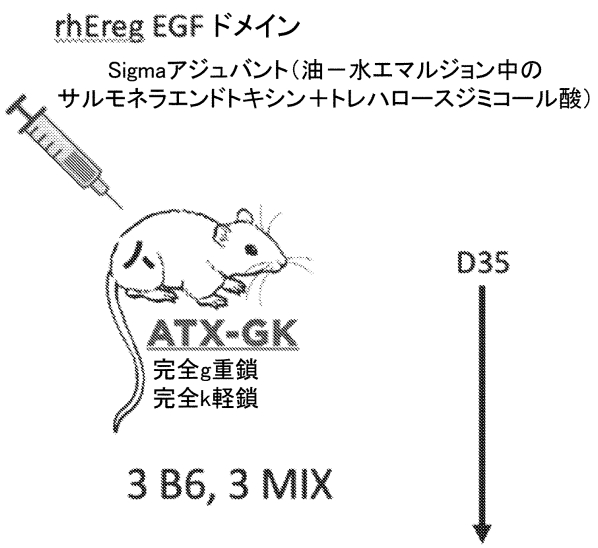
配列番号 71 マウス Epgn フォワードプライマー
ATAGAAGAACCTGTAGCTCTG

配列番号 72 マウス Epgn リバースプライマー
CCGTATAACCAGTAAAGCATC

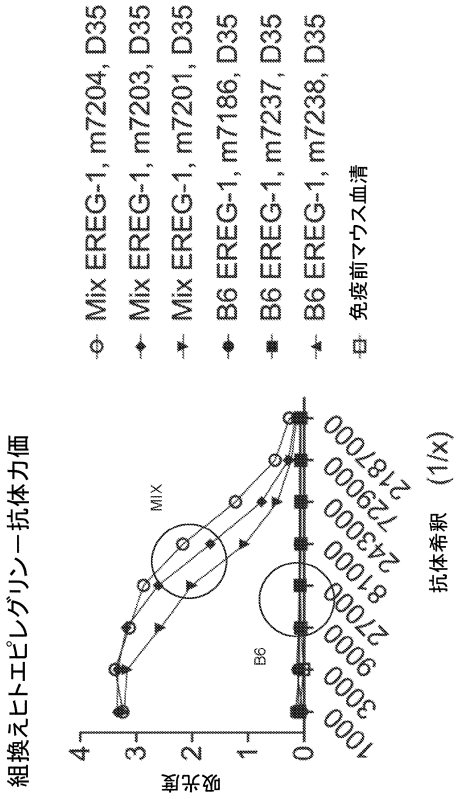
配列番号 73 qPCR 用のオリゴ
$d(T)_{20}$

【図面】

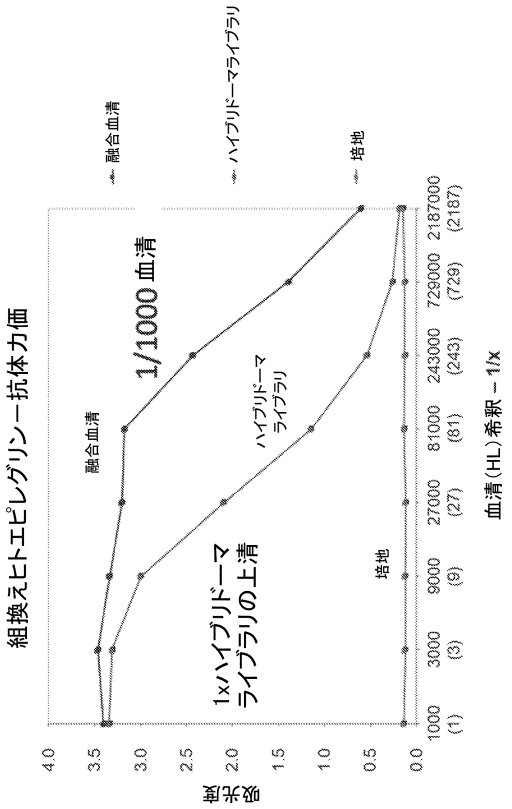
【図１】


rhEreg EGF ドメイン
Sigmaアジュバント（油－水エマルジョン中の
サルモネラエンドトキシン＋トレハロースジミコール酸）
ATX-GK
完全g重鎖
完全k軽鎖
3 B6, 3 MIX
D35

【図２】


Mix EREG-1, m7204, D35
Mix EREG-1, m7203, D35
Mix EREG-1, m7201, D35
B6 EREG-1, m7186, D35
B6 EREG-1, m7237, D35
B6 EREG-1, m7238, D35
免疫前マウス血清
組換えヒトエピレグリン－抗体力価
吸光度
抗体希釈 (1/x)
MIX
B6
0
1
2
3
4
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
2187000

【図３】



【図４】

hEreg NAb1 重鎖

生殖細胞系列の相同性：95.7%, IGHV4-39*01

ヌクレオチド配列（配列番号5）

CACCTGCAACTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC
TCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTGGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGG
AAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAGTTTCTATTATAGTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAG
AGTCGAGTCACCATATCCGCAGACACGTCCAAGAGCCAGTACTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACC
GCCGCAGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGACATCCGTTCAACTGGAACGACCACTATCACTAC
ATGGACGTCTGGGGCAACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

アミノ酸配列（配列番号1）

HLQLQESGPGLVKSSETLSLTCSVSGGSISSSGYYWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYSGNTYYNPSLK
SRVTISADTSKSQYSLKLSSVTAADTAVYYCARHPFNWNDHYHYMDVWGNGTTVTVSS

hEreg NAb1 軽鎖

生殖細胞系列の相同性：96.8%, IGKV1-39*01

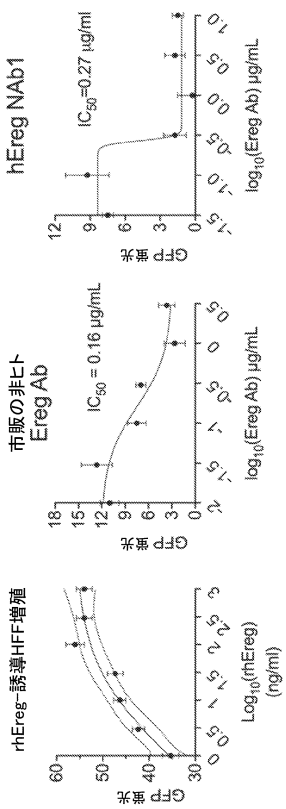
ヌクレオチド配列（配列番号10）

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGCGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGAAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGGTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGA
TCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGT
CAACAGAGTTACATAACCTCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

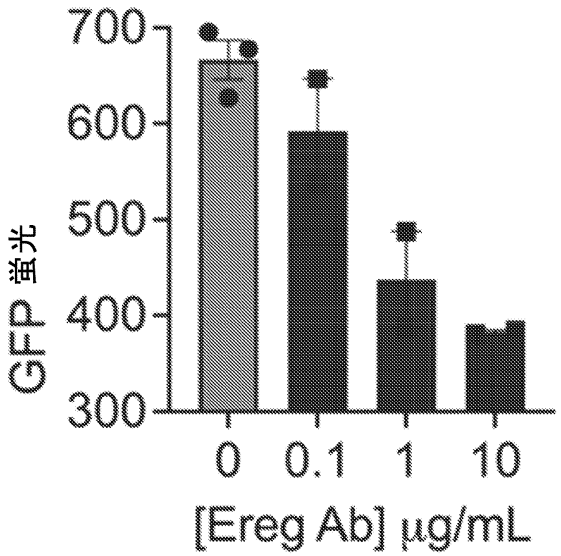
アミノ酸配列（配列番号6）

DIQMTQSPSSLSASVGDSVTITCRASQSISNYLNWYQKKPGKAPKVLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYITSITFGQGTRLEIK

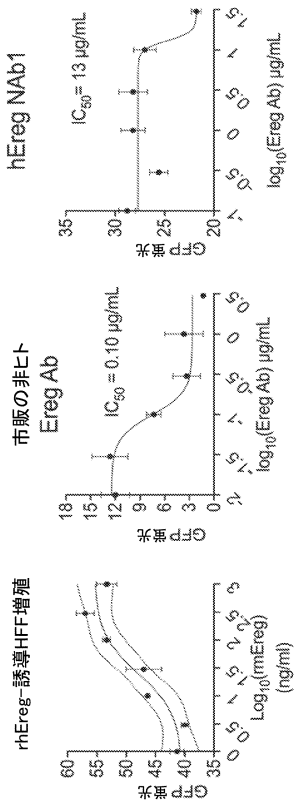
【図５】



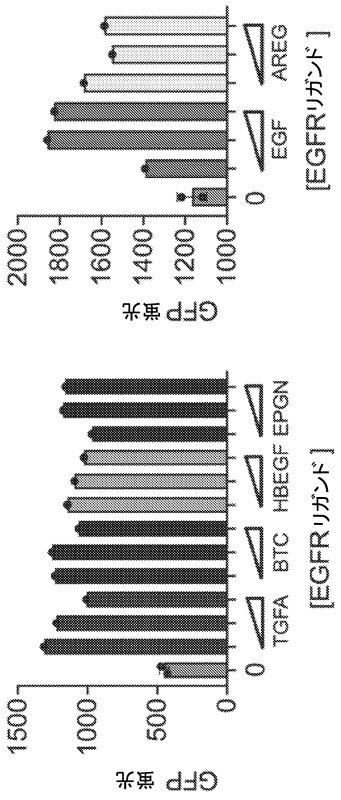
【図６】



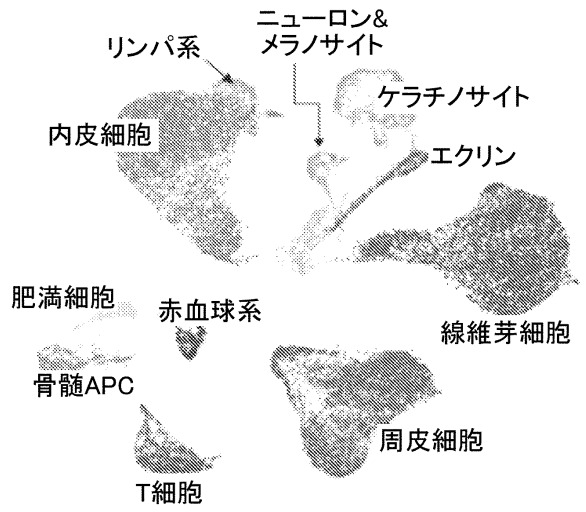
【図７】


hEreg NAb1
IC50 = 13 μg/mL
log10(Ereg Ab) μg/mL
GFP 蛍光
市販の非ヒト
Ereg Ab
IC50 = 0.10 μg/mL
log10(Ereg Ab) μg/mL
GFP 蛍光
rhEreg-誘導HFF増殖
Log10(rmEreg) (ng/ml)
GFP 蛍光

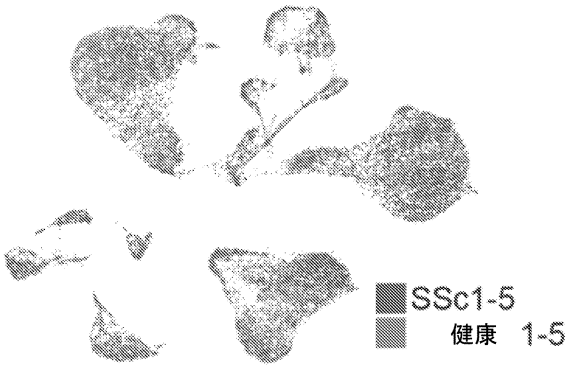
【図８】


GFP 蛍光
[EGFRリガンド]
EGF
AREG
GFP 蛍光
[EGFRリガンド]
TGFA
BTC
HBEGF
EPGN

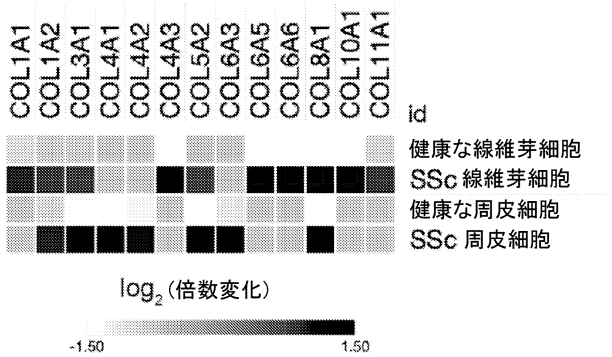
【図９Ａ】


ニューロン&
メラノサイト
リンパ系
ケラチノサイト
内皮細胞
エクリン
肥満細胞
赤血球系
線維芽細胞
骨髄APC
周皮細胞
T細胞

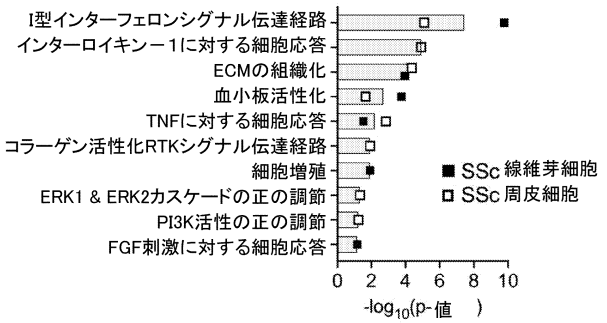
【図９Ｂ】


SSc1-5
健康 1-5

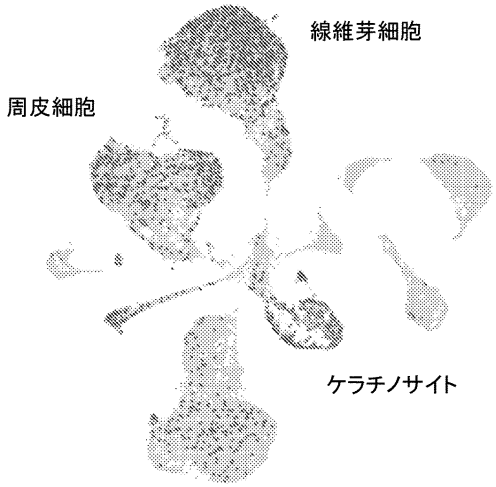
【図９Ｃ】



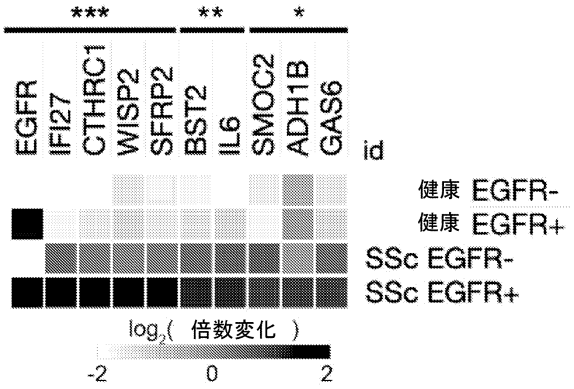
【図９Ｄ】



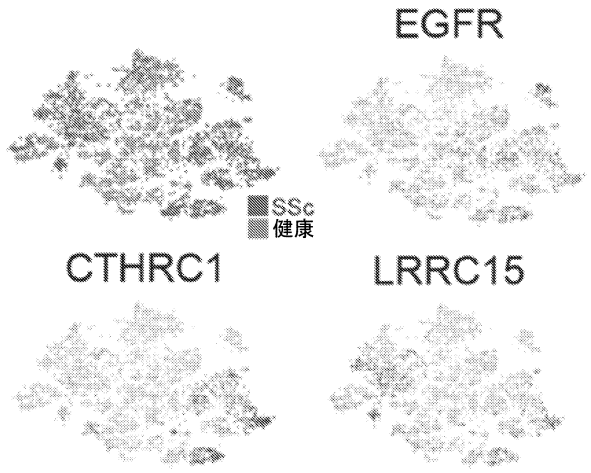
【図９Ｅ】



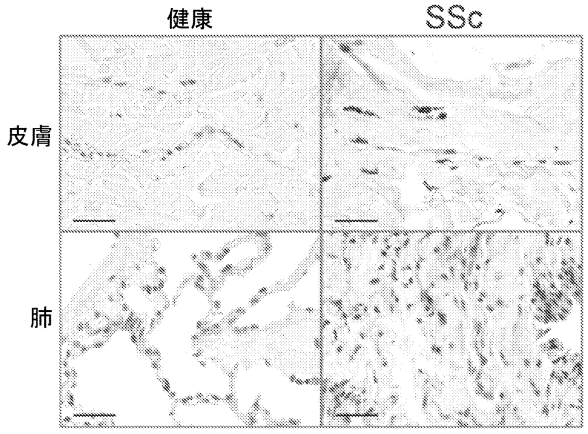
【図９Ｆ】



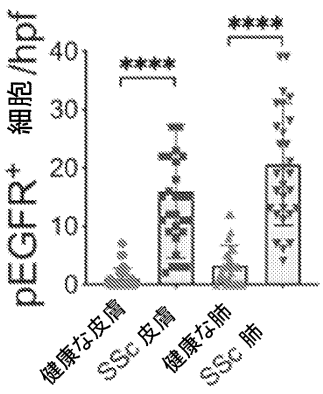
【図９Ｇ】



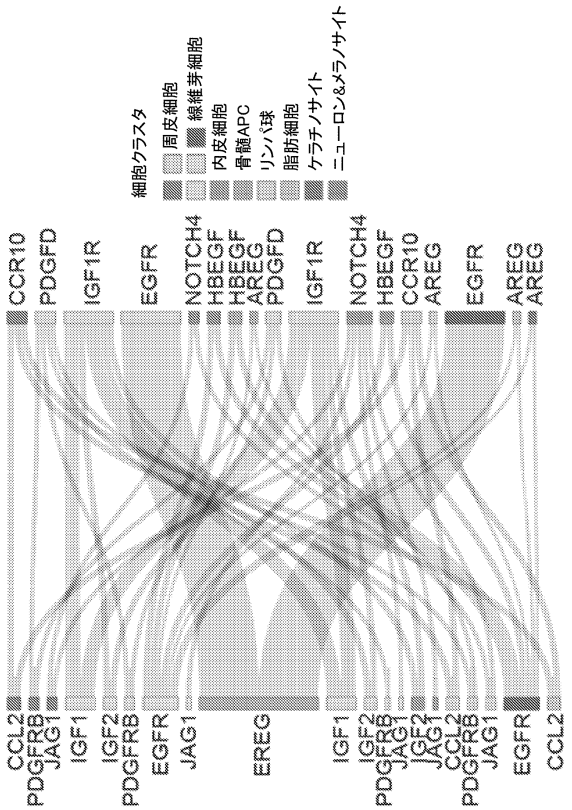
【図９Ｈ】



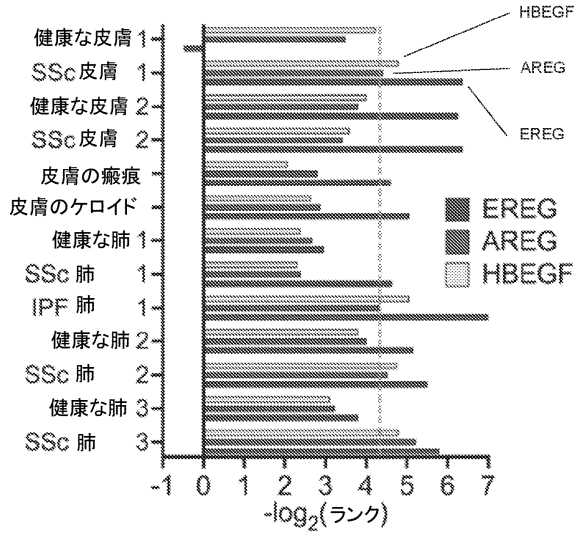
【図９Ｉ】



【図１０Ａ】



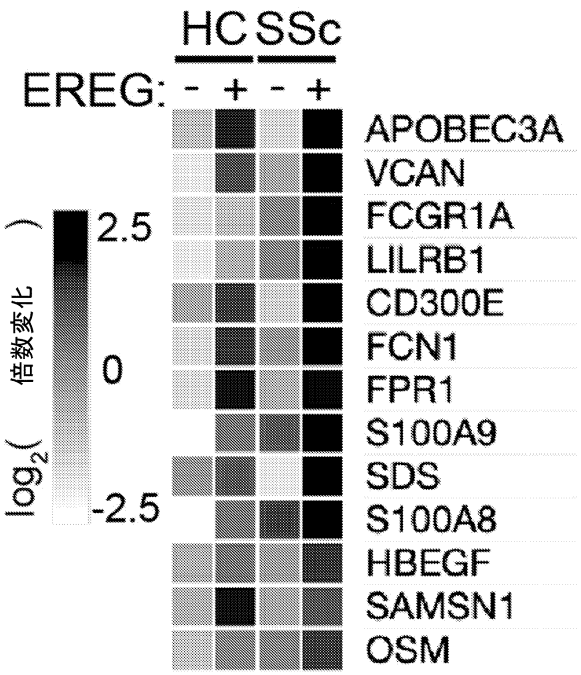
【図１０Ｂ】



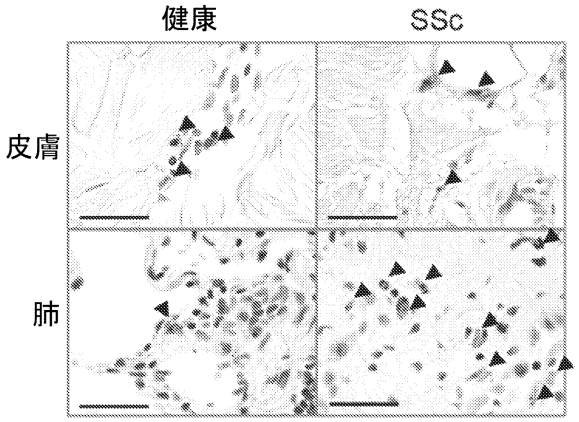
【図１０Ｃ】



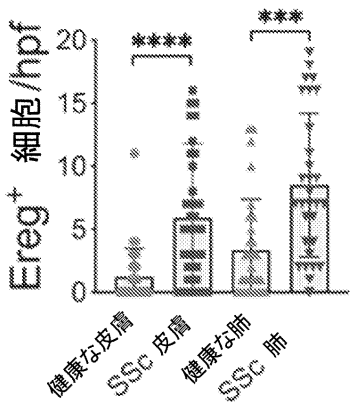
【図１０Ｄ】



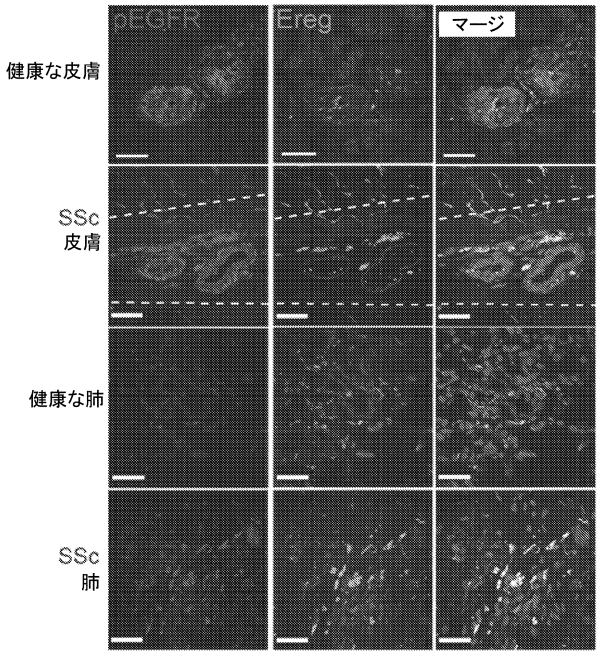
【図１０Ｅ】



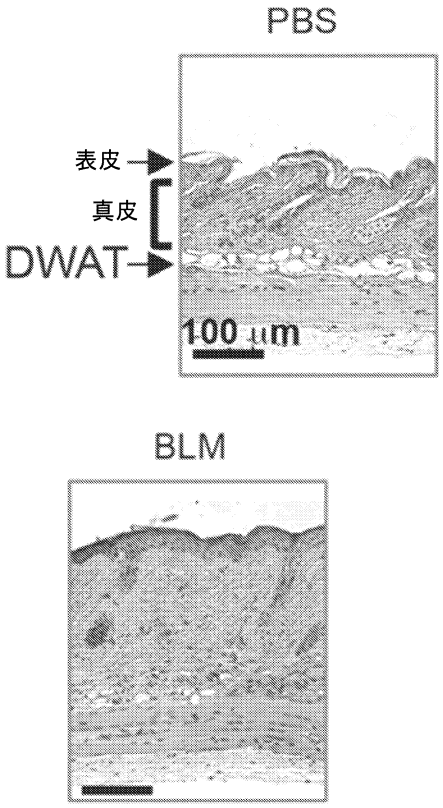
【図１０Ｆ】



【図１０Ｇ】

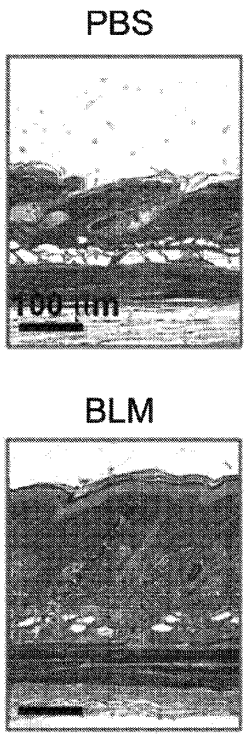


【図１１Ａ】



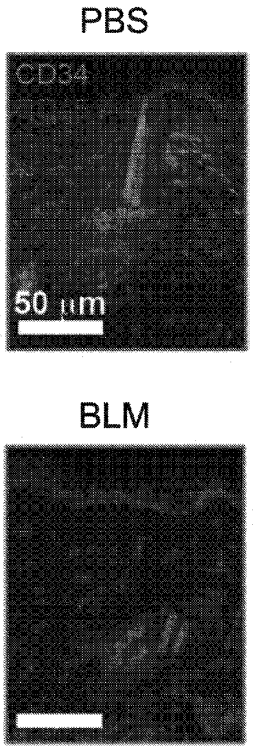
【図１１Ｂ】

Fig. 11B

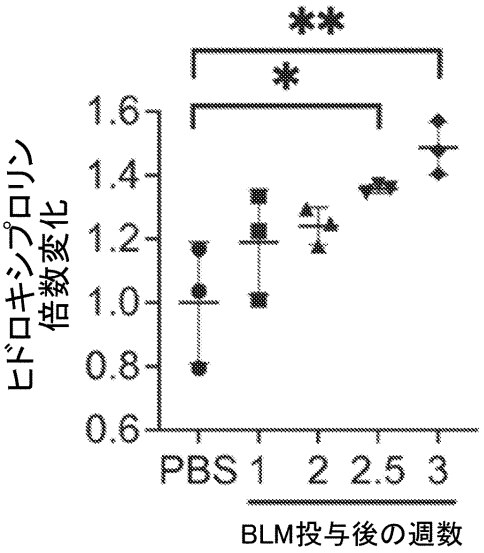


【図１１Ｃ】

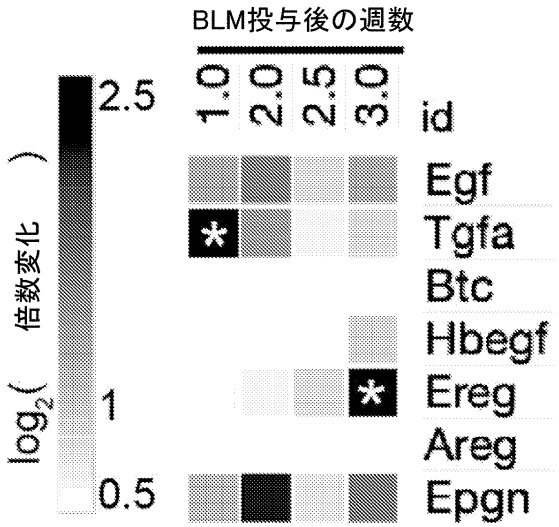
Fig. 11C



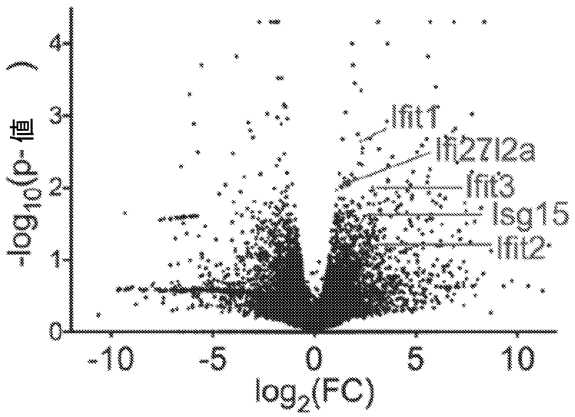
【図１１Ｄ】



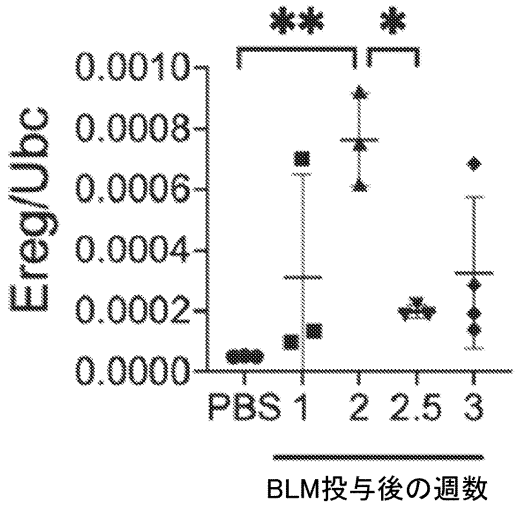
【図１１Ｅ】



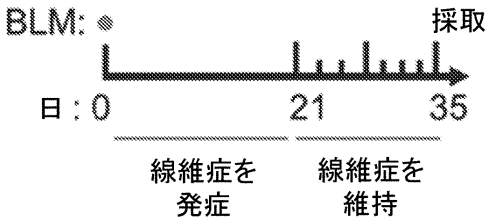
【図１１Ｆ】



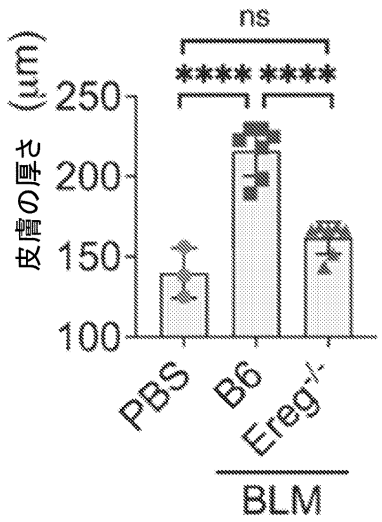
【図１１Ｇ】



【図１２Ａ】

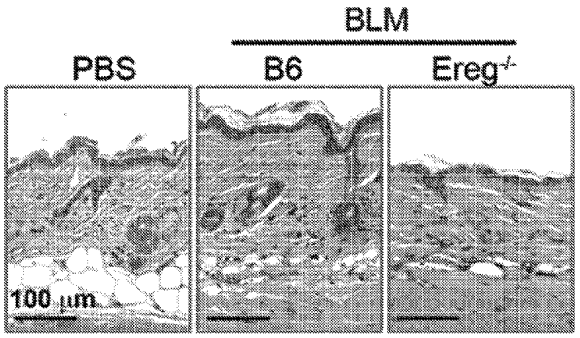


【図１２Ｂ】

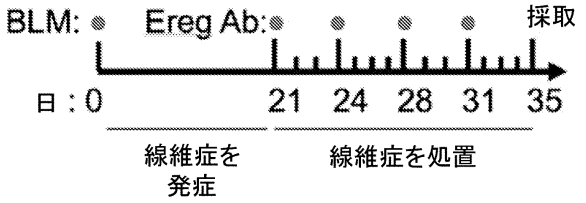


【図１２Ｃ】

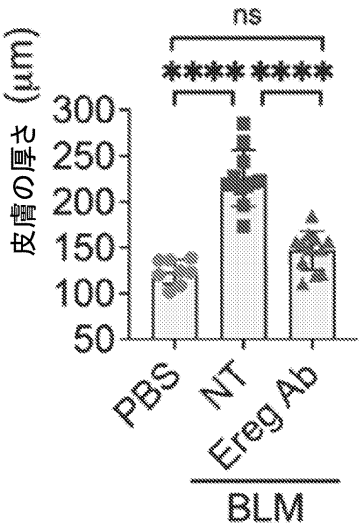
Fig. 12C



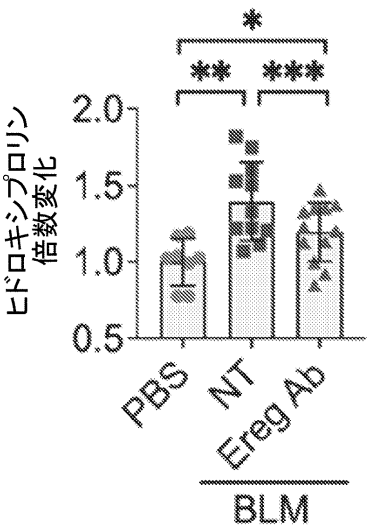
【図１２Ｄ】



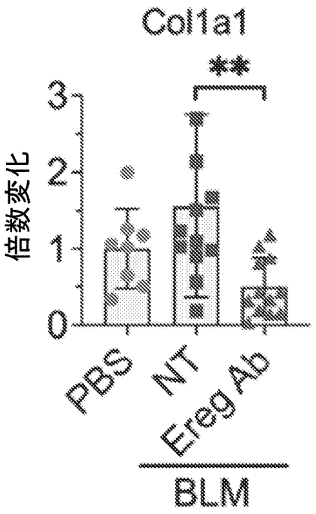
【図１２Ｅ】



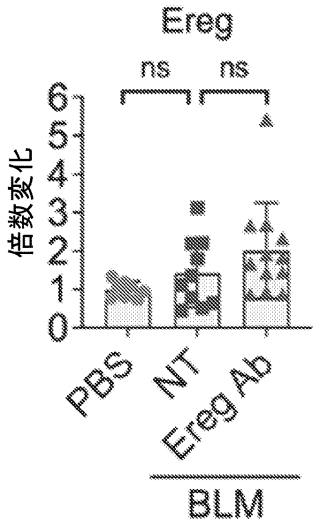
【図１２Ｆ】



【図１２Ｇ】

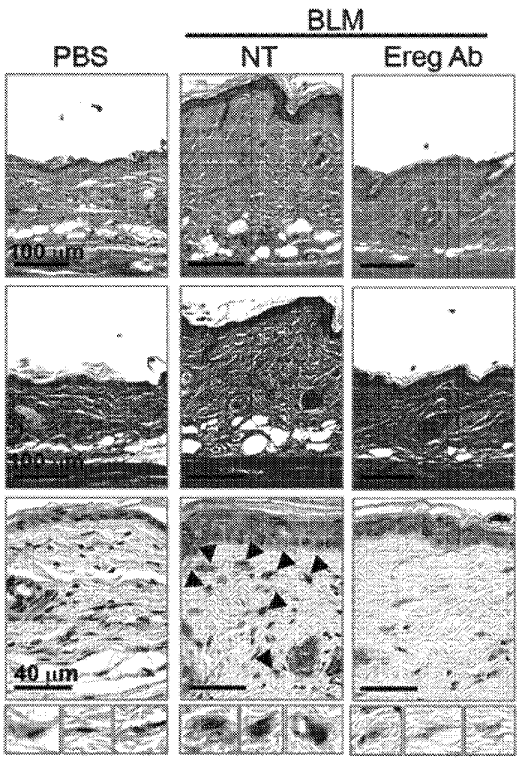


【図１２Ｈ】



【図１２Ｉ】

Fig. 12I

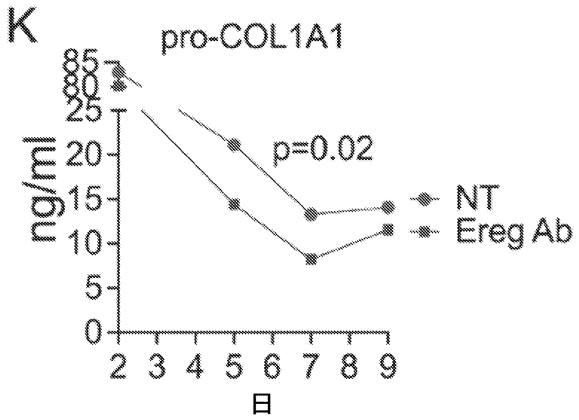


【図１２Ｊ】

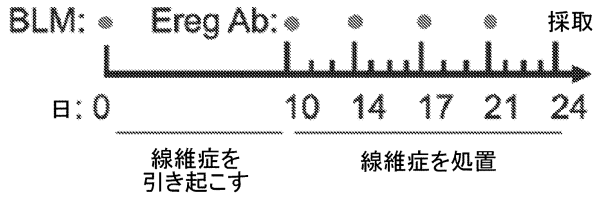
Fig. 12J



【図１２Ｋ】

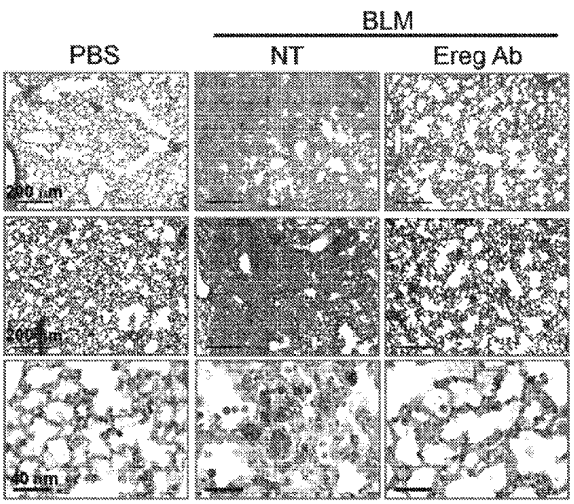


【図１３Ａ】

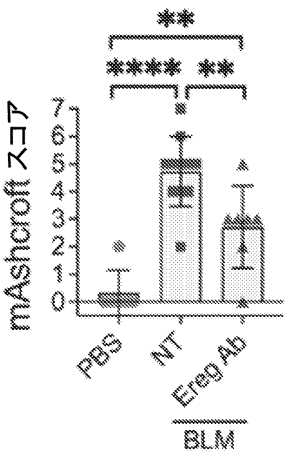


【図１３Ｂ】

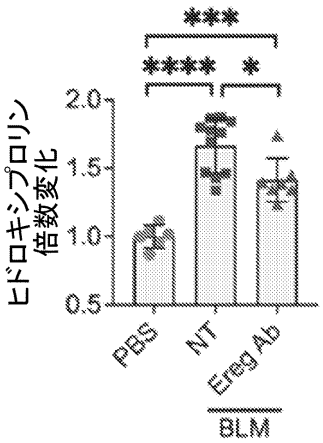
Fig. 13B



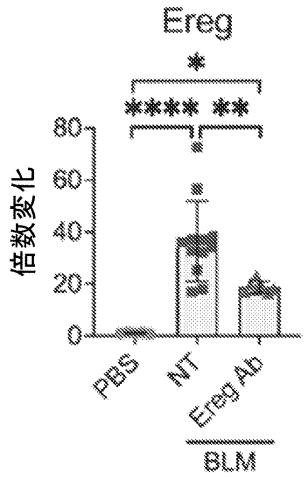
【図１３Ｃ】



【図１３Ｄ】

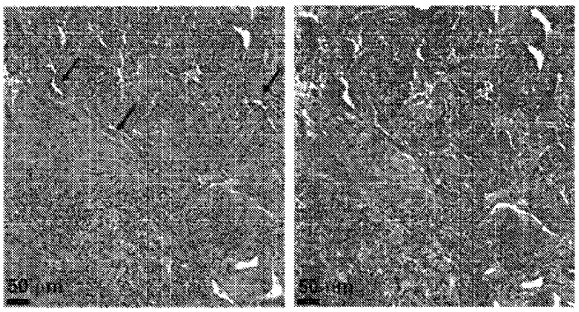


【図１３Ｅ】

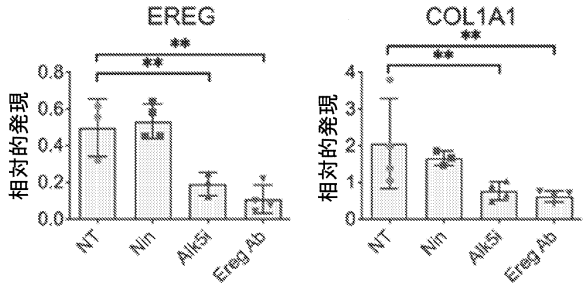


【図１３Ｆ】

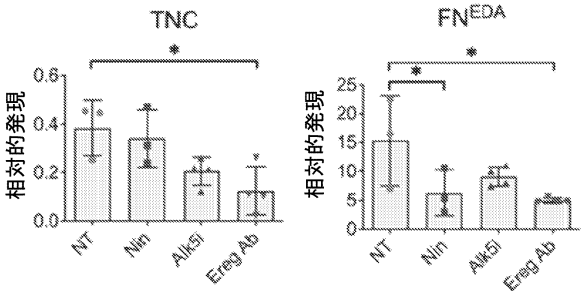
Fig. 13F



【図１３Ｇ】



【図１３Ｈ】



【図１３Ｉ】

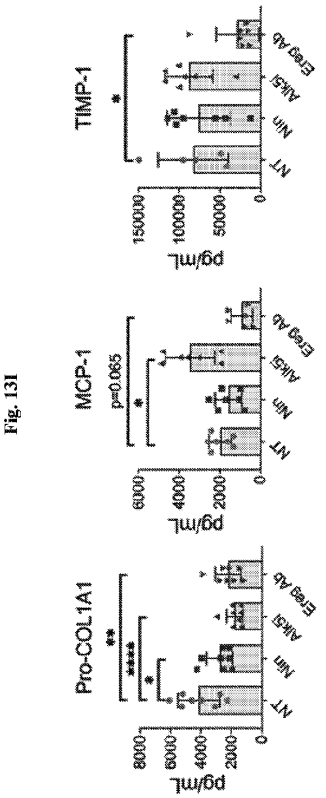
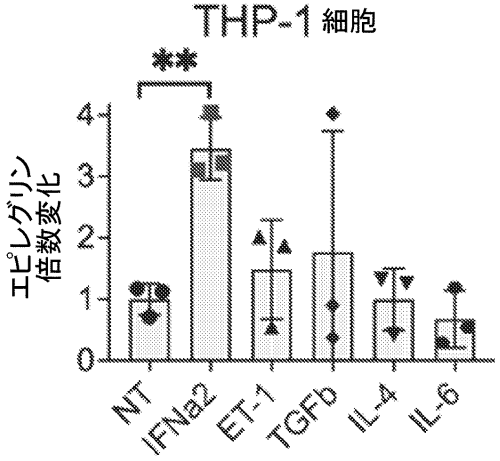
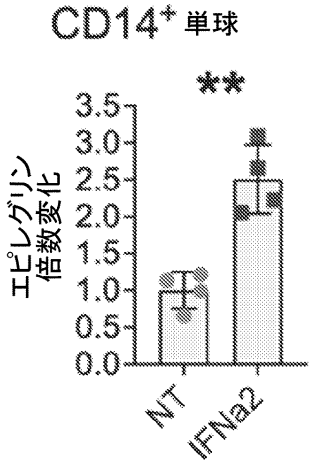


Fig. 13I

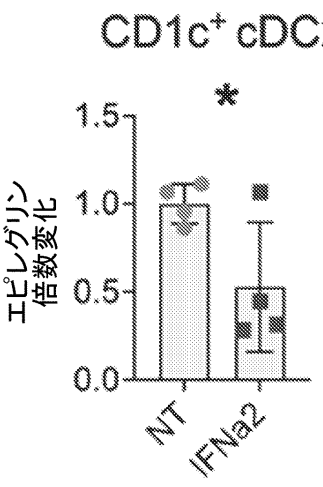
【図１４Ａ】



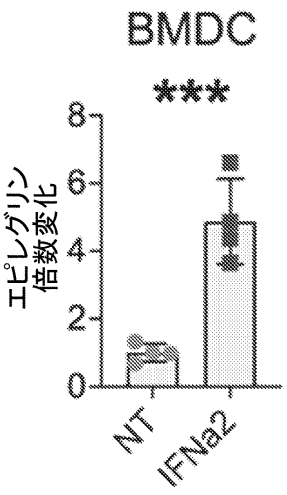
【図１４Ｂ】



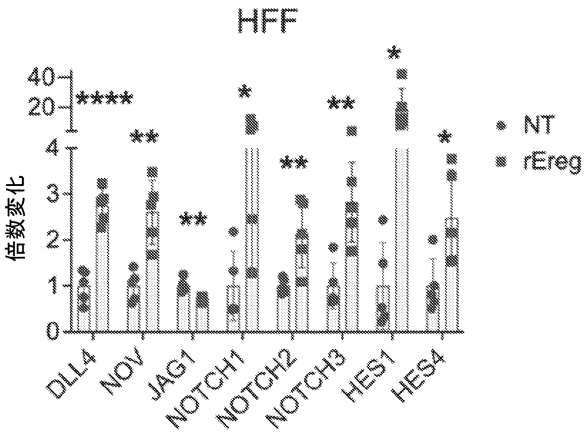
【図１４Ｃ】



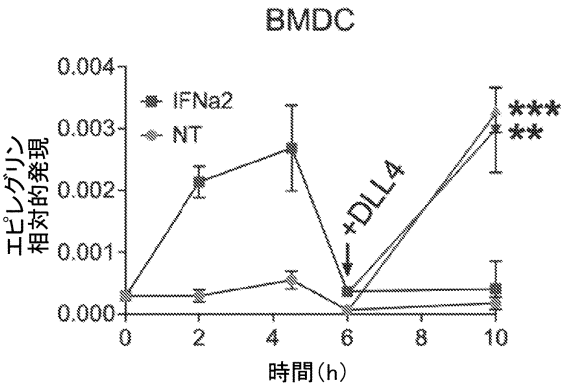
【図１４Ｄ】



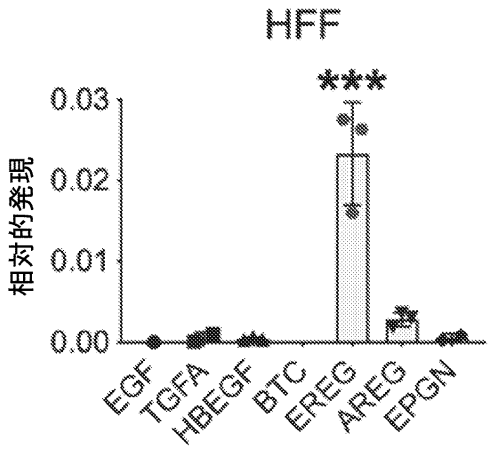
【図１４Ｅ】



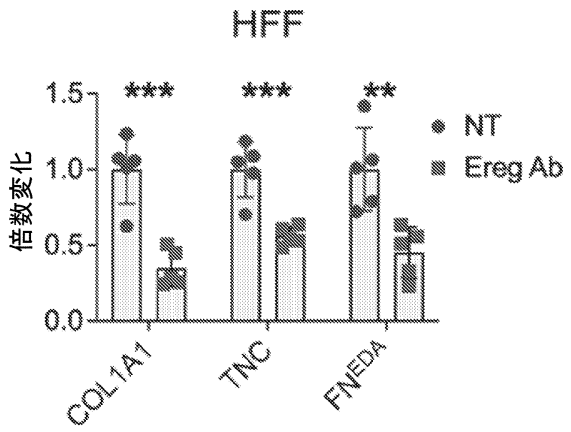
【図１４Ｆ】



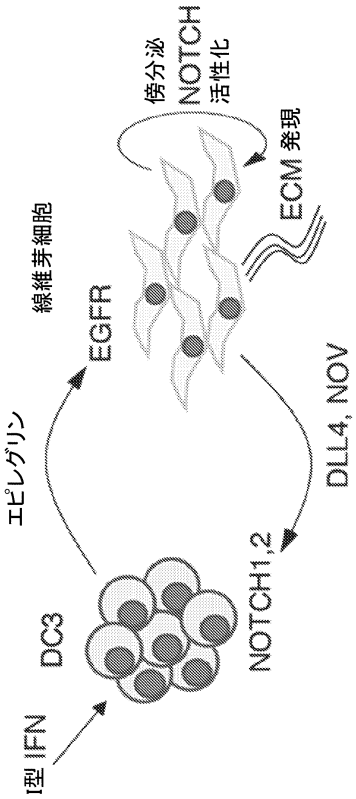
【図１４Ｇ】



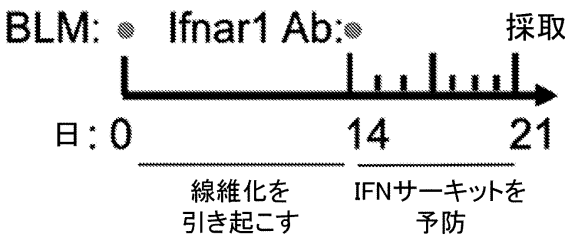
【図１４Ｈ】



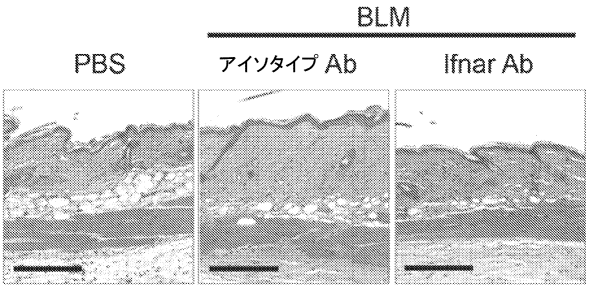
【図１４Ｉ】



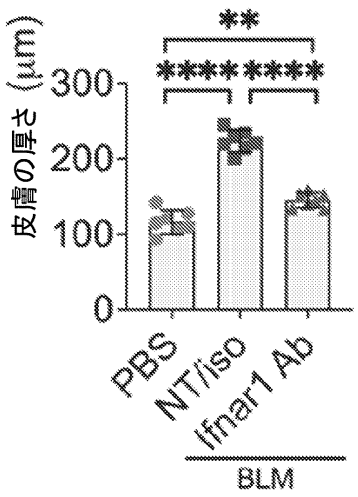
【図１５Ａ】



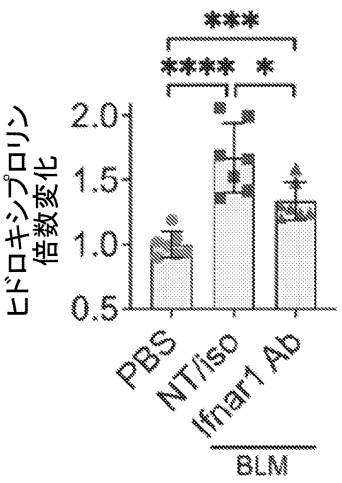
【図１５Ｂ】



【図１５Ｃ】

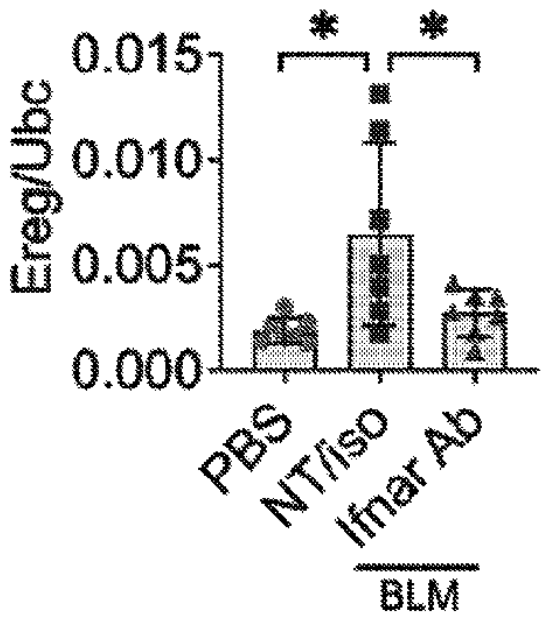


【図１５Ｄ】



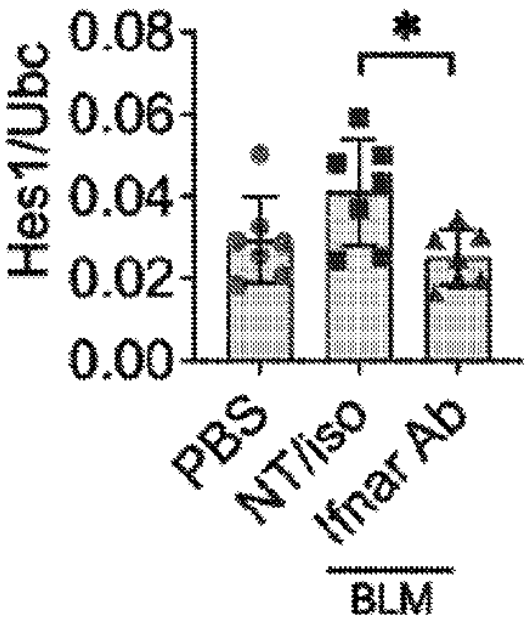
【図１５Ｅ】

Fig. 15E

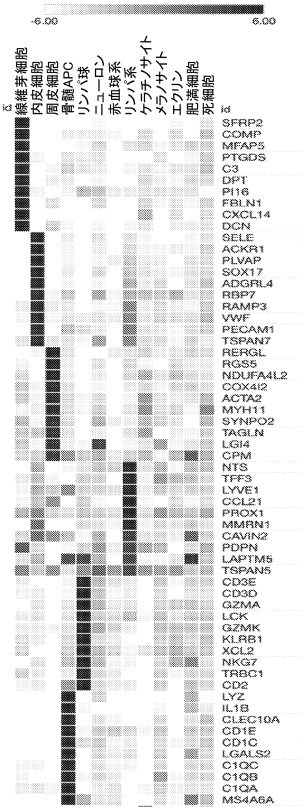


【図１５Ｆ】

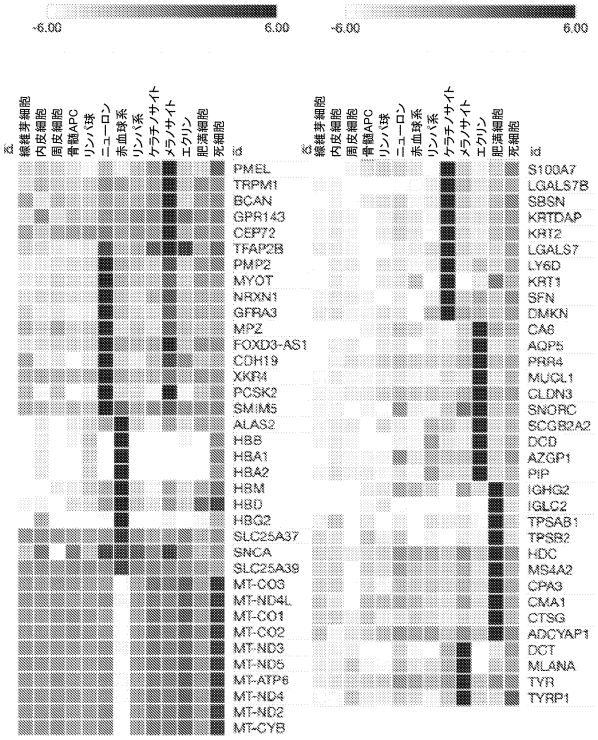
Fig. 15F



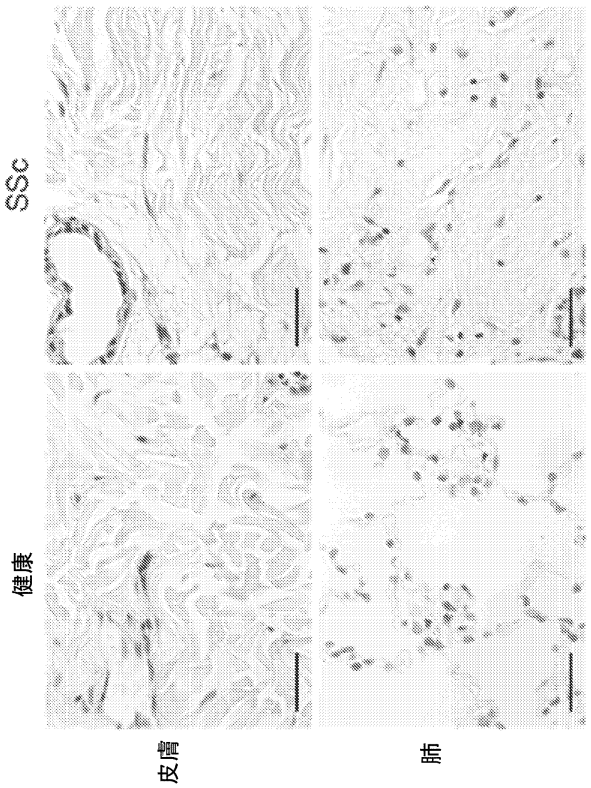
【図１６Ａ】



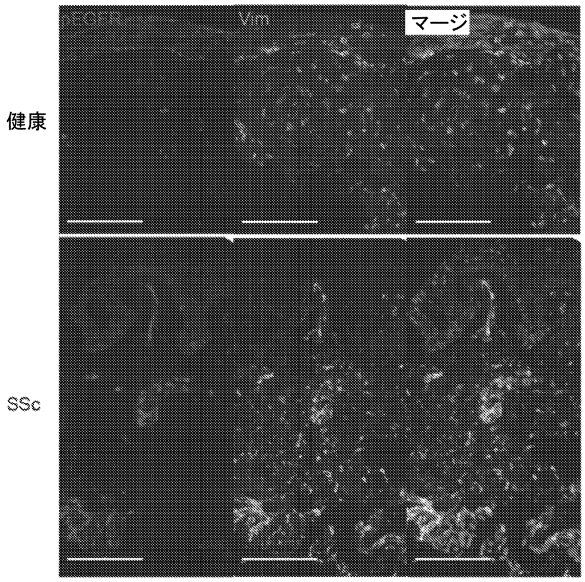
【図１６Ｂ】



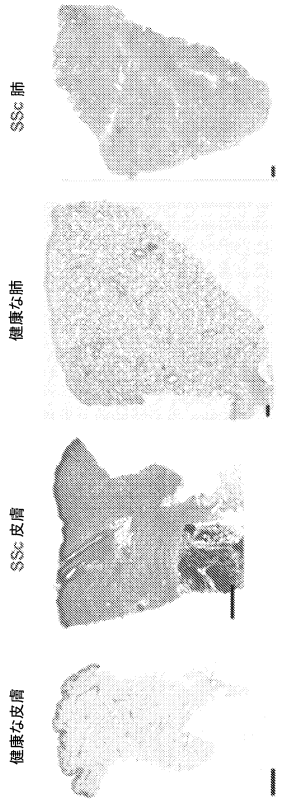
【図１６Ｃ】



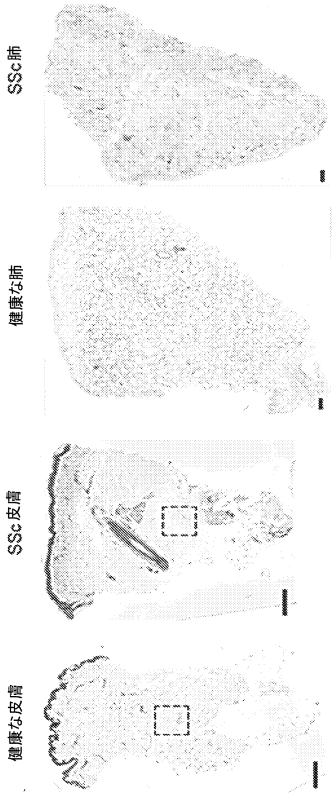
【図１６Ｄ】



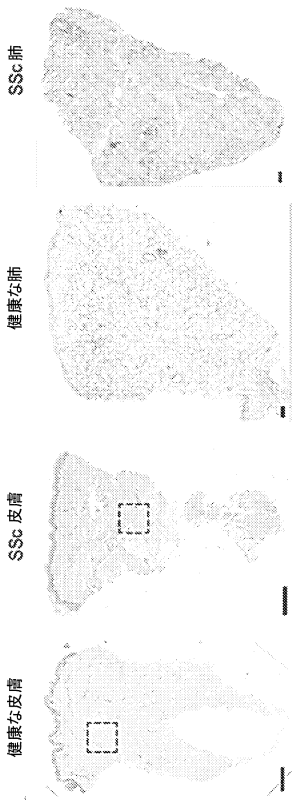
【図１７Ａ】



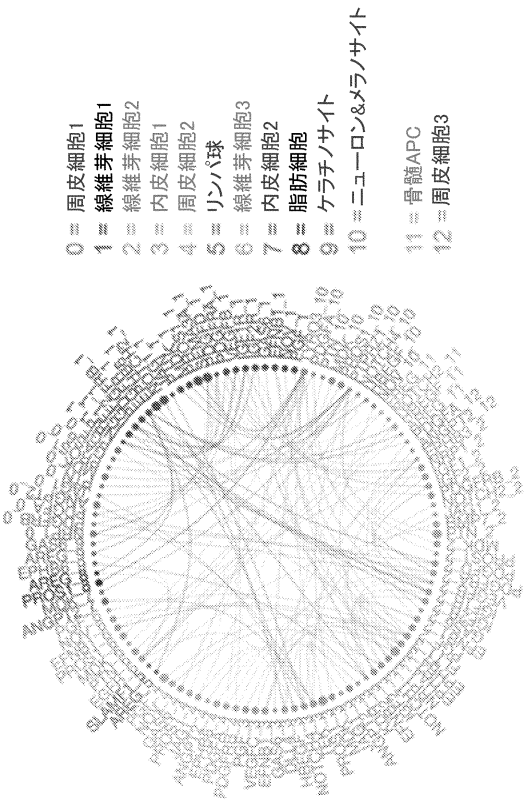
【図１７Ｂ】



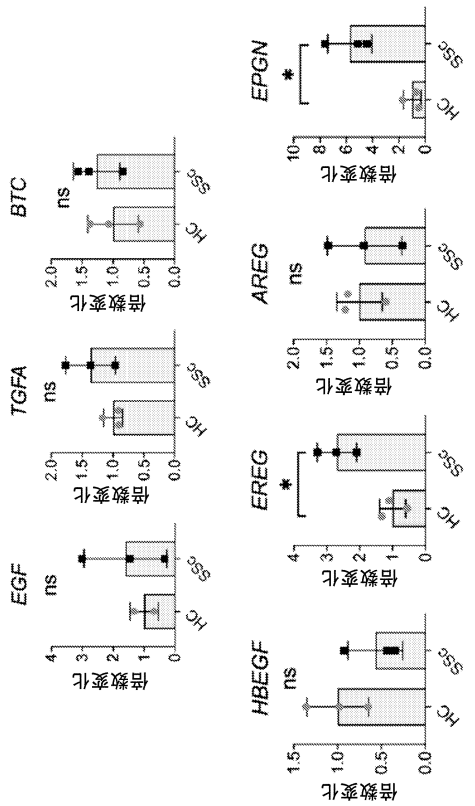
【図１７Ｃ】



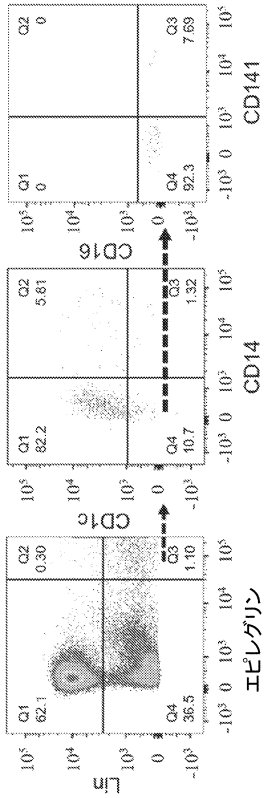
【図１８Ａ】



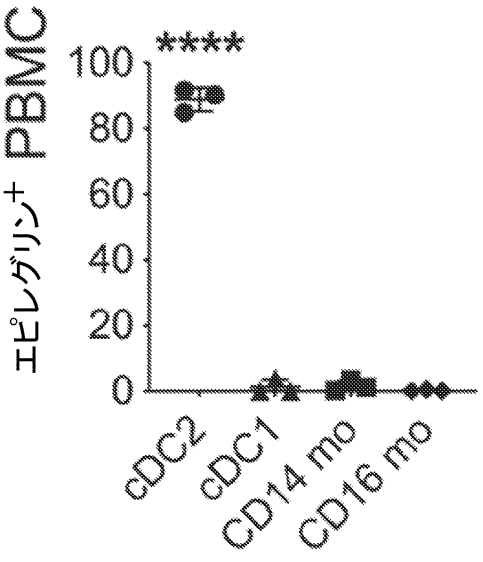
【図１８Ｂ】



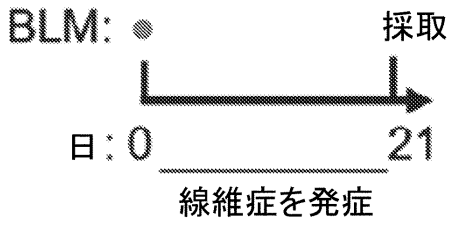
【図１８Ｃ】



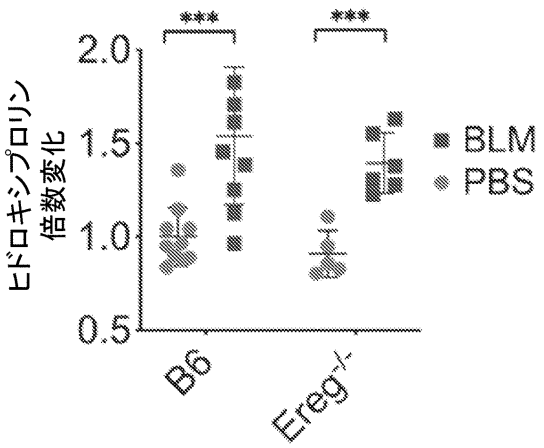
【図１８Ｄ】



【図１９Ａ】



【図１９Ｂ】



【図１９Ｃ】

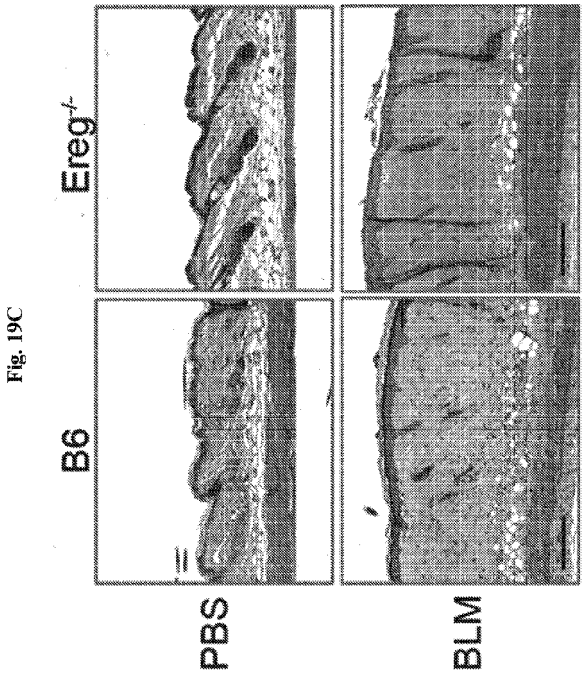
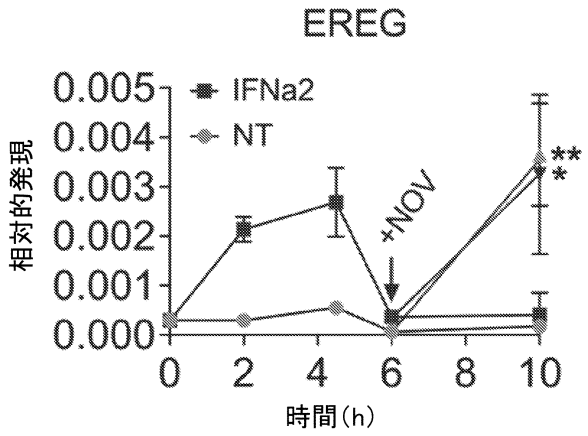
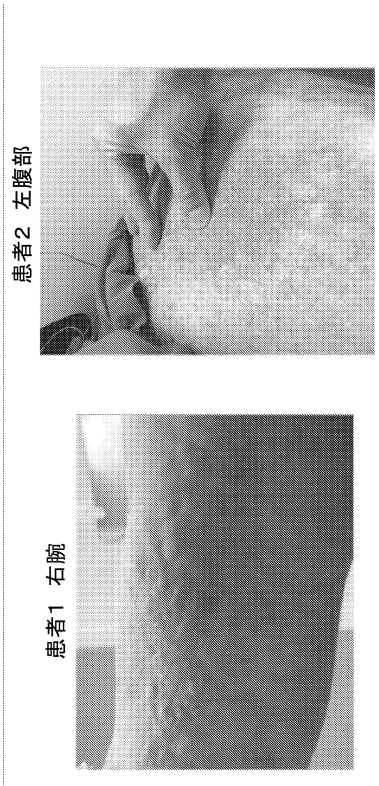


Fig. 19C

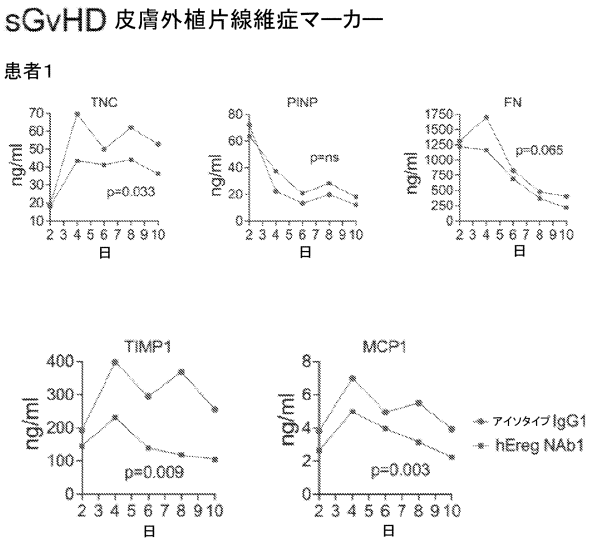
【図２０】



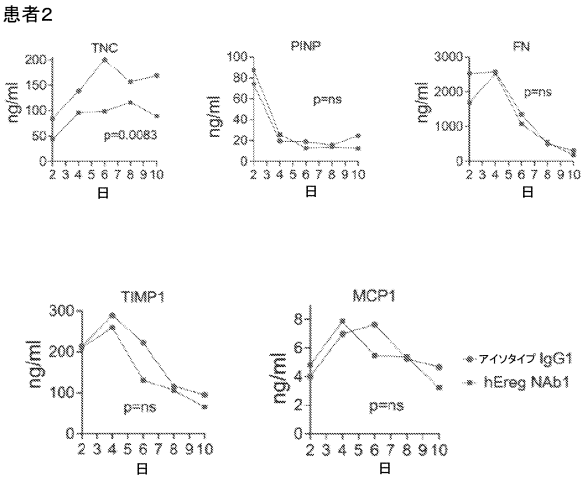
【図２１Ａ】



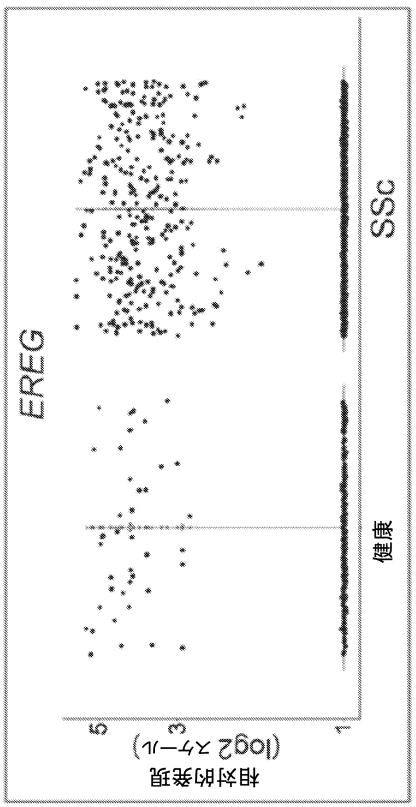
【図２１Ｂ】



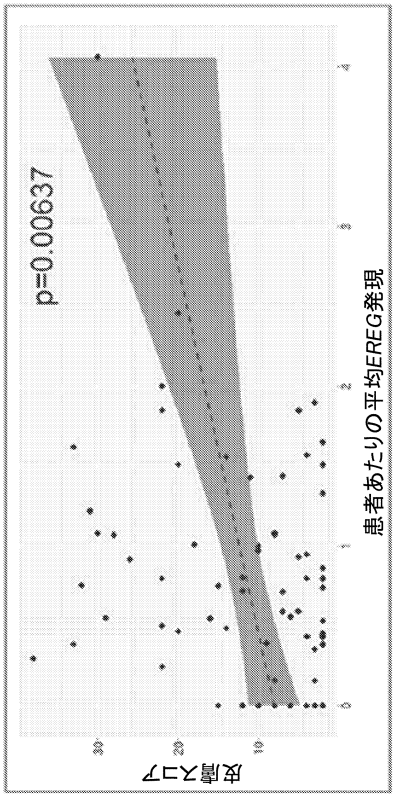
【図２１Ｃ】



【図２２Ａ】



【図２２Ｂ】



【配列表】

<u>2025509220000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/014512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C07K 16/22; A61K 39/395; A61P 29/00; C07K 16/46 (2023.01)
ADD. - C12N 5/16; C12N 15/85; C12P 21/00 (2023.01)

CPC - INV. - C07K 16/22; A61K 39/3955; C07K 16/46; A61P 29/00 (2023.05)
ADD. - C07K 2317/76; C07K 2319/00; C12N 5/16; C12N 15/85; C12P 21/00 (2023.05)

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 database consulted during the international search (name of database 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	US 2009/0324491 A1 (ABURATANI et al.) 31 December 2009 (31.12.2009) entire document	1-3
X	US 2020/0407682 A1 (CELLECTIS) 31 December 2020 (31.12.2020) entire document	36
X	US 2021/0403547 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 30 December 2021 (30.12.2021) entire document	44-51
X	US 2016/0368919 A1 (PFIZER INC.) 22 December 2016 (22.12.2016) entire document	53-61
P, X	ODELL et al., "Epiregulin is a dendritic cell-derived EGFR ligand that maintains skin and lung fibrosis," Science Immunology, 09 December 2022 (09.12.2022), Vol. 7, No. 78, Pgs. 1-37, entire document	1-3, 36, 44-51, 53-61

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"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	Date of mailing of the international search report
05 May 2023	JUN 26 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/014512

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/014512

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.: 4-35, 37-43, 52, 62-71
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	1/15		4C086
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		4C087
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		4H045
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*5/12 (2006.01)*	C12N	5/12		
C12P	*21/08 (2006.01)*	C12P	21/08		
C12P	*21/02 (2006.01)*	C12P	21/02	C	
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61P	*39/06 (2006.01)*	A61P	43/00	105	
A61P	*11/00 (2006.01)*	A61P	39/06		
A61P	*1/04 (2006.01)*	A61P	11/00		
A61P	*9/00 (2006.01)*	A61P	1/04		
A61P	*17/00 (2006.01)*	A61P	9/00		
A61P	*13/12 (2006.01)*	A61P	17/00		
A61P	*17/02 (2006.01)*	A61P	13/12		
A61K	*45/00 (2006.01)*	A61P	17/02		
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	45/00		
A61K	*47/68 (2017.01)*	A61K	39/395	U	
A61K	*40/15 (2025.01)*	A61K	47/68		
A61K	*40/31 (2025.01)*	A61K	40/15		
A61K	*35/17 (2025.01)*	A61K	40/31		
A61K	*40/41 (2025.01)*	A61K	35/17		
A61K	*31/5377(2006.01)*	A61K	40/41		
A61K	*31/496 (2006.01)*	A61K	31/5377		
A61K	*31/573 (2006.01)*	A61K	31/496		
A61K	*31/519 (2006.01)*	A61K	31/573		
A61K	*31/675 (2006.01)*	A61K	31/519		
A61P	*31/14 (2006.01)*	A61K	31/675		
		A61P	31/14		

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,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,NE,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

２８３

Ｆターム（参考） 4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA03
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA94X AB01 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 CC03 CC11 CC15 CC16 CC17 CC18 CC19 CC26 CC41 EE59
4C084 AA19 NA05 ZA361 ZA591 ZA661 ZA811 ZA891 ZB081 ZB211 ZB331 ZC751
4C085 AA14 AA16 BB11 BB12 BB17 BB31 BB36 BB41 BB43 BB50 CC03 CC31 DD62 DD63 DD88 EE01 EE03 GG04
4C086 AA01 BC50 BC73 CB09 DA10 DA35 GA02 GA07 GA12 MA02 MA04 NA05 ZA36 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZB08 ZB21 ZB33 ZC75

Fターム（参考） C75
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 CA16 MA02 NA05 NA13 ZA36
ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZB08 ZB21 ZB33 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA50 DA76 EA20 FA72 FA74