

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7390729号
(P7390729)

(45)発行日 令和5年12月4日(2023.12.4)

(24)登録日 令和5年11月24日(2023.11.24)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	Z N A
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
請求項の数 10 (全121頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-551265(P2020-551265)	(73)特許権者	306015135
(86)(22)出願日	平成31年3月22日(2019.3.22)		ユニヴェルシテ リブル ドゥ ブリュッセル
(65)公表番号	特表2021-518151(P2021-518151 A)		ベルギー, ベー - 1 0 5 0 ブリュッセル, 5 0 アヴェニュー エフ.デー.ルーズベルト
(43)公表日	令和3年8月2日(2021.8.2)	(74)代理人	100145403
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/057243		弁理士 山尾 憲人
(87)国際公開番号	WO2019/180204	(74)代理人	100122301
(87)国際公開日	令和1年9月26日(2019.9.26)		弁理士 富田 憲史
審査請求日	令和3年11月29日(2021.11.29)	(74)代理人	100157956
(31)優先権主張番号	18163777.8		弁理士 稲井 史生
(32)優先日	平成30年3月23日(2018.3.23)	(74)代理人	100170520
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 笹倉 真奈美
前置審査		(72)発明者	ブノワ・ファンホーレベーク
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 W n tシグナル伝達アゴニスト分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

Gタンパク質共役型受容体(GPR)124/RECK/Freezed/リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができるが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFreezed/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化しないWnt7aポリペプチド変異体であって、ここで該Wnt7aポリペプチド変異体は配列番号51に記載の配列を含む、ならびにここで、

- 配列番号51の17位に対応する位置のグルタミン(Q)残基がアラニン(A)残基によって置換される；または
- 配列番号51の20位に対応する位置のイソロイシン(I)残基がアラニン(A)残基によって置換される；または
- 配列番号51の25位に対応する位置のプロリン(P)残基がアラニン(A)残基によって置換される；または
- 配列番号51の27位に対応する位置のアラニン(A)残基がアルギニン(R)残基によって置換される；または
- 配列番号51の28位に対応する位置のイソロイシン(I)残基がアラニン(A)残基によって置換される；または
- 配列番号51の33位に対応する位置のグルタミン酸(E)残基がアラニン(A)残基によって置換される；または
- 配列番号51の37位に対応する位置のメチオニン(M)残基がアラニン(A)残基

10

20

によって置換される；または

- 配列番号 51 の 39 位に対応する位置のロイシン (L) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 41 位に対応する位置のグルタミン酸 (E) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 44 位に対応する位置のフェニルアラニン (F) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 50 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 52 位に対応する位置のアスパラギン (N) 残基が グルタミン (Q) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 68 位に対応する位置のバリン (V) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 129 位に対応する位置のイソロイシン (I) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 131 位に対応する位置のフェニルアラニン (F) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 133 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 135 位に対応する位置のフェニルアラニン (F) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 141 位に対応する位置のイソロイシン (I) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 146 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 158 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 159 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 、セリン (S) もしくはロイシン (L) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 181 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 191 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 198 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 200 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 205 位に対応する位置のバリン (V) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 208 位に対応する位置のグルタミン酸 (E) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 214 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 216 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 218 位に対応する位置のプロリン (P) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 222 位に対応する位置のリシン (K) 残基が アラニン (A) 残基 によって置換される；または

- 配列番号 51 の 223 位に対応する位置のイソロイシン (I) 残基が アラニン (A)

10

20

30

40

50

残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 229 位に対応する位置のチロシン (Y) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 232 位に対応する位置のプロリン (P) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 235 位に対応する位置のトレオニン (T) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 248 位に対応する位置のグルタミン酸 (E) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 289 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 291 位に対応する位置のトリプトファン (W) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 307 位に対応する位置のトレオニン (T) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される；または

- 配列番号 51 の 318 位に対応する位置のリシン (K) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される、W n t 7 aポリペプチド変異体。

【請求項 2】

アミノ酸置換が 159 位であり、ここで配列番号 51 の 159 位に対応する位置のリシン (K) 残基がアラニン (A)、セリン (S) もしくはロイシン (L) 残基によって置換される、請求項 1 に記載の W n t 7 aポリペプチド変異体。

【請求項 3】

アミノ酸置換が 159 位であり、ここで配列番号 51 の 159 位に対応する位置のリシン (K) 残基がアラニン (A) 残基によって置換される、請求項 1 または 2 に記載の W n t 7 aポリペプチド変異体。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の W n t 7 aポリペプチド変異体をコードする核酸。

【請求項 5】

プロモーターならびに / または転写調節シグナルおよび翻訳調節シグナルに作動可能に連結した、請求項 4 に記載の核酸を含む核酸発現カセット。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の核酸または請求項 5 に記載の核酸発現カセットを含むベクター。

【請求項 7】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の W n t 7 aポリペプチド変異体、請求項 4 に記載の核酸、請求項 5 に記載の核酸発現カセットまたは請求項 6 に記載のベクター、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 8】

医薬として使用するための、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の W n t 7 aポリペプチド変異体、請求項 4 に記載の核酸、請求項 5 に記載の核酸発現カセット、請求項 6 に記載のベクターまたは請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系 (C N S) 障害の予防または治療における使用のための、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の W n t 7 aポリペプチド変異体、請求項 4 に記載の核酸、請求項 5 に記載の核酸発現カセット、請求項 6 に記載のベクターまたは請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記神経血管障害が、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、虚血 / 再灌流傷害、脳動脈瘤、動静脈奇形 (A V M)、海綿状血管奇形、血管炎、脳出血、くも膜下出血、脊髄血管奇形、頸動脈狭窄、もやもや病および頭蓋内アテローム性動脈硬化症およびその組合せからなる

10

20

30

40

50

群から選択される、または前記 CNS 障害が、多発性硬化症、虚血性脳卒中、脳がん、てんかん、認知症、血管性認知症、HIV-1 関連認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、感染性脳疾患、外傷性脳損傷、片頭痛および慢性外傷性脳障害およびその組合せからなる群から選択される、請求項 9 に記載の Wnt7a ポリペプチド変異体、核酸、核酸発現カセット、ベクターまたは医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、広範には医学分野に入り、より正確には、神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系 (CNS) 障害の治療に関する。本発明は、療法に有用であり、特に神経血管機能不全を含む神経血管障害または CNS 障害の治療に有用である新規の Wnt シグナル伝達アゴニスト分子、ならびに関連製品、方法および使用を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

Wnt タンパク質は、動物の発達および成体組織恒常性の間の細胞間コミュニケーションを媒介する、高度に保存された分泌型の脂質修飾されたタンパク質の大きなファミリーを構成する。Wnt タンパク質は、細胞増殖、分化、遊走、アポトーシス、極性および遺伝的安定性を調節することによって多面的な機能を発揮する。Wnt シグナル伝達レベルの調節不全は、がんおよび神経変性などの CNS 障害を含めた幅広いヒト病態に関連付けられる。

20

【0003】

Frizzled (Fz) ファミリーのメンバー 10 種は、Wnt タンパク質の受容体としての機能を果たす 7 回膜貫通タンパク質である。Wnt シグナル伝達の複雑さに大きく寄与するが、Wnt / Fz 結合関係は乱雑なものであり、個々の Fz との結合について競合する複数の Wnt が存在し、所与の Wnt に対していくつかの Fz が応答することができる。最近の結晶学的研究により、Wnt / Fz 相互作用化学が明白な Wnt と Fz の対形成とは適合せず、Wnt と Fz の接触部位はどちらも、厳密にまたは化学的に保存された残基が優位を占めることが確認された (Janda et al. Science 2012, vol. 337, 59-64)。これらの知見から、複数の Wnt リガンドからの同時のおよび時には矛盾するシグナル伝達インプットも入り混じった発現パターンを細胞がどのように解釈するのかという疑問が生じる。一部の生物学的状況では、細胞は、全てのシグナル伝達インプットを識別せずに組み込み、機能的に絡み合った細胞内シグナル伝達カスケードによるそれらの全体的な正味の平衡ならびにそれらの調和された解釈を検討することによって適正な応答を誘発する可能性がある。しかし、他の生物学的プロセスでは、驚いたことに、複雑な Wnt / Fz 発現状況にもかかわらず、厳密な Wnt リガンド選択性が示される。

30

【0004】

哺乳動物の前脳および腹側脊髄の脳血管発達は、Wnt7a および Wnt7b による排他的制御下で作動し、したがって、高度に選択的な Wnt 応答性プロセスに関するパラダイムとしての機能を果たす。神経前駆細胞由来 Wnt7 に応答し、Wnt / - カテニンシグナル伝達を活性化するために、大脳内皮細胞は、G タンパク質共役型受容体の接着クラスターのオーファンメンバーである Gpr124、ならびに GPI 係留糖タンパク質 Reck を発現しなければならない (Vanhollebeke et al. Elife 2015, vol. 4, 1-25)。さらに、培養細胞において発現されると、Gpr124 と Reck は、物理的に相互作用し、Wnt7 特異的応答を相乗的に刺激する (同書)。

40

【0005】

重要なことに、内皮 Wnt / - カテニンシグナル伝達は、血液脳関門 (BBB) 生理機能の重要な調節因子であり、成体において、胚形成の間の CNS 血管ネットワークの増大および成熟化を制御し、BBB 維持に寄与する。BBB 機能不全は、長い間、複数の神経性障害に関係付けられてきたが、最近のエビデンスから、機能不全性 BBB における Wnt / - カテニンシグナル伝達の向きを変える刺激が、マウスにおける虚血性脳卒中お

50

よび脳がんを顕著に好転させるために十分であることが示唆される。したがって、他の F r i z z l e d 経路との交差反応性を実質的に伴わずに大脳内皮細胞における W n t / - カテニンシグナル伝達を刺激することができる療法が、種々の神経性障害の治療に高度に有利であると思われる。

【発明の概要】

【 0 0 0 6 】

本発明は、細胞が W n t 7 リガンドに選択的に応答するために使用する初の「W n t 解読モジュール」の発見および特徴付けに少なくとも一部基づく。具体的には、本明細書で特徴付けられた W n t 解読モジュールでは、R E C K により選択性が付与され、それにより、W n t 7 特異的結合が F r i z z l e d 非依存的に媒介される。F r i z z l e d シグナル伝達への W n t 7 利用可能性は、R E C K と結合した W n t 7 と細胞内ディシェベルド (D v l) 足場間のシグナル伝達欠損膜貫通テザーとして作用する R E C K 結合パートナーである G P R 1 2 4 に依拠する。D v l ポリマーが F r i z z l e d と G P R 1 2 4 を架橋することにより、リガンド特異的 R E C K / G p r 1 2 4 / F r i z z l e d / L R P シグナルソームがアセンブリされる。したがって、本発明者らは、D v l ポリマーの F r i z z l e d および G P R 1 2 4 への同時結合ならびに W n t 7 の R E C K への特異的結合によってリガンド特異的 W n t シグナルソーム内で高次 R E C K / G P R 1 2 4 / F r i z z l e d / L R P 受容体複合体が形成されるモデルを提唱する。

10

【 0 0 0 7 】

この新規の機構が明らかになったので、さらなる調査により、R E C K および G P R 1 2 4 を発現する細胞における W n t シグナル伝達を選択的に活性化することができる新規のアゴニストを設計することができ、そのようなアゴニストが、治療薬として、例えば、特に、とりわけ脳卒中、多発性硬化症、脳がん、てんかんおよび神経変性障害を含めた神経血管に関連する C N S 障害を治療するための治療薬として有用であることが予想外に明らかになった。

20

【 0 0 0 8 】

したがって、ある態様は、G P R 1 2 4 / R E C K / F r i z z l e d / L R P 媒介性 W n t シグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、R E C K および / または G P R 1 2 4 の非存在下での F r i z z l e d / L R P 媒介性 W n t シグナル伝達は活性化しない、作用物質を提供する。

30

【 0 0 0 9 】

ある特定の実施形態では、前記作用物質は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドであり得る。したがって、別の態様は、前記作用物質をコードする核酸であって、前記作用物質が、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドである、核酸を提供する。

【 0 0 1 0 】

別の態様は、プロモーターならびに / または転写調節シグナルおよび翻訳調節シグナルに作動可能に連結した前記核酸を含む核酸発現カセットを提供する。前記核酸または核酸発現カセットを含むベクターも提供される。

【 0 0 1 1 】

別の態様は、前記作用物質、前記核酸または核酸発現カセットまたは前記ベクター、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

40

【 0 0 1 2 】

別の態様は、医薬として使用するための、前記作用物質、前記核酸または核酸発現カセット、前記ベクターまたは前記医薬組成物を提供する。

【 0 0 1 3 】

神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系 (C N S) 障害の予防または治療における使用のための、前記作用物質、前記核酸または核酸発現カセット、前記ベクターまたは前記医薬組成物も提供される。

【 0 0 1 4 】

別の態様は、特に神経血管機能不全を含む神経血管障害または C N S 障害の予防または

50

治療に有用なものなどの、治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロ (*in vitro*) における方法であって、試験作用物質が、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を活性化するが、RECK および / または GPR124 の非存在下での Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達は活性化しないものであるかどうかを決定することを含む方法を提供する。

【0015】

本発明のこれらおよび別の態様ならびに好ましい実施形態を以下のセクションおよび添付の特許請求の範囲に記載する。添付の特許請求の範囲の主題はこれにより具体的に本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

10

【0016】

【図1A】透過処理されていない WT、FZ1-10^{-/-}、LRP5^{-/-} ; LRP6^{-/-} および GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞中で一過性に発現した Wnt7a-V5 または Wnt3a-V5 の抗 V5 免疫染色。

【図1B】GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞において、一過性に同時に発現している Wnt7a-V5 および表示した共受容体の図1Aと同じ免疫染色。

【図1C】三連の (1 : 1 : 1) 共培養におけるリガンド捕捉アッセイ。表示したように、Fz5 によってトランスフェクトし、および様々な共受容体によってトランスフェクトした FZ1-10^{-/-} HEK293T 競合細胞の存在下で、共培養した Wnt7a または Wnt3a 放出細胞によってパラクリン様式で刺激した HEK293-STF レポーター細胞のスーパートップフラッシュ (*super top-flash*) ルシフェラーゼ (STF) 活性。

20

【図1D】GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞において同時に発現される Wnt7a-V5 および HA-Rec k を標的とする抗 V5 および抗 HA 一次抗体またはその変異体を使用する、インサイチュ (*in situ*) PLA の PLA シグナルの定量。

【図1E】GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞において同時に発現される Wnt7a-V5 および表示した HA- でタグ付けした共受容体を対象とする抗 V5 および抗 HA 一次抗体を使用する、インサイチュ PLA の PLA シグナルの定量。スケールバー : 10 μ m。

【図1F】Gpr124 を用いて (y 軸) または Gpr124 を用いないで (x 軸)、Wnt7a-V5 または Wnt3a-V5 および表示した HA でタグ付けした Rec k 変異体で同時にトランスフェクトした GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞の抗 V5 / 抗 HA PLA シグナルの定量。

30

【図1G】Rec k ならびにその Gpr124 および Wnt7 結合モチーフの概略図。 * $p < 0.05$ 、*** $P < 0.001$; データは平均 ± SD を表す。

【図2A】GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞を同時に発現する HA-Rec k において抗 V5 および抗 HA 一次抗体を使用して図1Bにおいて定量した PLA において調査した Wnt7a、V5 でタグ付けした Wnt7a 変異体およびパラログの概略図。

【図2B】GPR124^{-/-} ; RECK^{-/-} 細胞を同時に発現する HA-Rec k において抗 V5 および抗 HA 一次抗体を使用して定量した PLA。

40

【図2C】Wnt7a の 101 の異なる単一残基変異体のシグナル伝達についての HEK293-STF 細胞における Gpr124 / Rec k 依存性の相対的 STF ルシフェラーゼ活性および Wnt7a 構造におけるその位置 (x 軸と下の構造モデル)。相対的 ルシフェラーゼ活性は、WT Wnt7a の値に対して正規化されている。アルギニンに変更されるアラニン残基を除いて、全ての Wnt7a 残基をアラニンに変異させる。

【図2D】脊椎動物クレードにわたる Wnt7 リンカードメインのアライメント。Mm、ハツカネズミ (*Mus musculus*) ; Gg、ニワトリ (*Gallus gallus*) ; XI、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) ; Dr、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)。10% 未満まで Gpr124 / Rec k 依存性シグナル伝達が低減した 8 つの Wnt7a 変異体 (pWnt7a の 238 ~ 266 のアミノ酸

50

領域内にある)に下線を付している。対応する単一残基変異体の活性およびそれらの活性の種類は図2Cで決定される。Mm Wnt3aおよびクアドラプルWnt7a変異体(Wnt7^{4A})のリンカー領域の配列を下に表す。

【図2E】Wnt7a-V5またはWnt7a^{4A}-V5とHA-RecKの間の抗V5/HA PLA。リガンドの分泌を連続希釈した細胞上清の半定量的な抗V5ドットプロット分析によって評価した。負荷対照としてボンソーS染色を使用した。スケールバー、10 μm。* p < 0.05、*** p < 0.001; データは平均 ± SDを表す。

【図2F】等温滴定熱量測定(ITC)を使用する、精製した組換えRecK-CK-Fcと合成pWnt7aペプチドの間の相互作用の探索。組換えRecK-CK-FcへのpWnt7a、pWnt7a^{4A}およびpWnt3aのITC(上のパネル)。pWnt7bに対するRecK-CK-Fc、RecK-CK^{CK1}-Fc、RecK-CK^{CK2}-Fc、RecK-CK^{CK3}-Fc、RecK-CK^{CK4}-FcおよびRecK-CK^{CK5}-FcのITC(真中と下のパネル)。

10

【図2G】SMFSの使用によるRecK-CK-Fc/pWnt7b相互作用の探索。力-距離曲線に基づく原子間力顕微鏡(FDに基づくAFM)の原理を示す。pWnt7bペプチドに融合したポリエチレングリコール(PEG)スペーサーで機能化したAFMチップをRecK-CK-Fcでコーティングした表面に接近させて引き離す。

【図3A】Lrp5/6におけるCRISPR/Cas9プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)部位(左のパネル)と、STFレポータープラスミドおよびRecK/Gpr124に依存するWnt7aのシグナル伝達またはGpr124/RecKに依存しないWnt1のシグナル伝達のいずれかを刺激する表示したプラスミドの組合せによるトランスフェクションの48時間後のWT HEK293T細胞またはLRP5-/-、LRP6-/-もしくは二重突然変異体LRP5-/-; LRP6-/- HEK293T細胞のクローンにおけるルシフェラーゼ活性の概略図。

20

【図3B】同時に発現したDkk-1の存在下または非存在下において、WT HEK293T細胞内でのGpr124/RecKに依存するシグナル伝達とGpr124/RecKに依存しないシグナル伝達のSTF活性。

【図3C】RecK/Gpr124に依存するWnt7aのシグナル伝達またはGpr124/RecKに依存しないWnt1のシグナル伝達を刺激する、STFレポータープラスミドおよび表示した発現プラスミドの組合せによるトランスフェクションの48時間後のWt HEK293細胞またはFZ突然変異体HEK293T細胞のクローンにおけるルシフェラーゼ活性。

30

【図3D】Fz CRD内のCRISPR/Cas9 PAM部位の概略図。

【図3E】表示したFz変異体またはFz CRD変異体による同時トランスフェクション後のFZ₁₋₁₀^{-/-} HEK293T細胞におけるGpr124/RecKに依存するシグナル伝達のSTF活性。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001; データは平均 ± SDを表す。

【図4A】Gpr124およびそのドメイン変異体の概略図。

【図4B】100 pgの表示したRNAを注射したWTおよびgpr124突然変異体の胚の60 hpfの脳血管系の代表的な3D配線図。黒色の管は、灰色の神経周囲の始原後脳チャネル(perineural primordial hindbrain channel)(PHBC)から生えたGpr124/RecK依存性脳内CtAを表す。

40

【図4C】1細胞段階において、100 pgの表示したmRNAを注射した60 hpfのgpr124モルフアント胚の後脳中心動脈(CtA)。

【図4D】RecK、Fz1、Wnt7aおよび表示したGpr124変異体で同時にトランスフェクトしたHEK293-STF細胞の相対的ルシフェラーゼ活性。*** p < 0.001; データは平均 ± SDを表す。

【図4E】1細胞段階において、100 pgの表示したmRNAを注射した60 hpfのgpr124モルフアント胚の後脳CtA。*** p < 0.001; データは平均 ± SDを表す。

50

【図5A】Dvl - GFPとGpr124またはそのICD変異体のN末端をFLAGでタグ付けしたバージョンとを同時に発現する全細胞溶解物における抗FLAG同時免疫沈降アッセイ。

【図5B】表示したプラスミドの組合せによってトランスフェクトしたFZ1-10-/-およびWT HEK293T細胞からの全細胞溶解物におけるDVL2およびp-DVL2 (T224)の免疫プロット。リン酸化DVL2 (T224)は、表示した異なる組合せのコンストラクトによるトランスフェクションの48時間後に得た細胞抽出物全体において、抗DVL2抗体(矢印)によってゆっくりと移動するバンドとして、またはホストレオニン224 (p-DVL2)を認識するリン酸化部位特異的抗体によって検出される。

10

【図5C】ゼブラフィッシュの胞胚深層(DEL)細胞において、個別に発現したかまたはDvlの存在下で発現したFz4 - GFPおよびGpr124 - tagRFPの細胞内分布。

【図5D】ゼブラフィッシュの胞胚DEL細胞において、Fz4またはGpr124と同時に発現したDvl - GFPの細胞内分布。

【図5E】ゼブラフィッシュの胞胚DEL細胞において、Dvlの非存在下または存在下で、同時に発現したFz4 - GFPとGpr124 - tagRFPの細胞内分布。アスタリスクで注釈を付けた細胞を右のパネルで拡大し、aからbまで細胞皮質をたどる仮想の時計回りの経路に沿った緑色と赤色のチャネルのピクセル強度を下にプロットしている。

【図5F】EVL細胞における図1Eと同じ細胞内分布。

20

【図5G】過剰発現したDvlの存在下または非存在下において、Gpr124 - VN155 (I152L)およびFz1 - VC155を発現するゼブラフィッシュのDEL細胞におけるBiFCシグナル。*** $P < 0.001$; データは平均 \pm SDを表す。

【図6】図6は、Gpr124 / Reckに依存するWnt7に特異的なFzシグナル伝達に関する例示的な統合モデルを表す。

【図7A】異なるWnt7変異体で刺激したFz5に依存する経路(薄い灰色、Fz5によるトランスフェクション)またはGpr124 / Reckに依存する経路(黒色、Gpr124、RECKおよびFz1によるトランスフェクション)のHEK293 - STF細胞における相対的ルシフェラーゼ活性。

【図7B】Wnt7aの101の異なる単一残基変異体のシグナル伝達についてのHEK293 - STF細胞におけるGpr124 / Reckに依存する相対的STFルシフェラーゼ活性およびFz5の相対的STFルシフェラーゼ活性ならびにWnt7a構造におけるそれらの位置。相対的ルシフェラーゼ活性は、WT Wnt7aの値に対して正規化されている。Wnt7aの42の異なる単一残基変異体は、野生型Wnt7aのGpr124 / Reck / Fz / LRPに媒介されるWntのシグナル伝達活性(長方形のボックス)の少なくとも35%、Gpr124 / Reck / Fz / LRPに媒介されるWntのシグナル伝達を活性化する。

30

【図7C】Gpr124 / Reck経路の選択的活性化を示すWnt7aの42の異なる単一残基変異体のシグナル伝達についてのHEK293 - STF細胞におけるGpr124 / Reckに依存する相対的STFルシフェラーゼ活性およびFzd5の相対的STFルシフェラーゼ活性。

40

【図7D】Wnt7aまたはWnt7a^{1~278}またはWnt7a^{K190A}の10個全てのFz遺伝子との同時トランスフェクション後のHEK - STFにおける相対的ルシフェラーゼ活性。

【図7E】1細胞段階において、表示した用量のwnt7aまたはwnt7a^{1~278}またはwnt7a^{K190A}のmRNAを注射した3dpfの幼魚の側面図。

【図7F】図7Dの3dpfの幼魚の表現型のスコア化。

【図7G】4細胞胚の1つの腹側割球において、表示したmRNA15pgを注射したステージ36のアフリカツメガエルの胚の背面図。各条件に関して、二次軸の形成(矢印)の分率が表示されている。

50

【図7H】1細胞段階において、表示したmRNAを注射した72 h p fのwnt7a aモルファント幼生の胸部分のDRG。Tg(neurog1:GFP)DRGの代表的な画像を右に示す。*** $P < 0.001$; データは平均 \pm SDを表す。

【図8】図8は、本明細書に教示されているヒトWnt7a変異体のアミノ酸配列を示す。野生型Wnt7aのNTDドメインまたは全長Wnt7aに対するアミノ酸置換は太字かつ下線を付したフォントにおけるものである。

【図9A】図9は、Wnt7a^{K190A}およびWnt7a^{1~278}の内皮におけるトランスジェニック発現がGPR124/RECKに依存する脳の血管新生を誘発し、Wnt7a a^{-/-}ゼブラフィッシュの血液脳関門を復元することを示す。60 h p fのWTまたはWnt7a a^{-/-}Tg(kdr1:EGFP)の胚の大脳血管系の背面図。Wnt7a a^{-/-}突然変異体では、脳内のCtAは欠如している。Wnt7、Wnt7a^{K190A}またはWnt7a^{1~278}は、内皮特異的kdr1(血管内皮成長因子受容体kdr1様)プロモーターの制御下で、Wnt7a a^{-/-}の胚の内皮において一過性に発現した。Wnt7リガンドは、遺伝子組換えマーカーとして使用されるBFP(青色蛍光タンパク質)を含むバイシストロニックコンストラクトとして発現した。

10

【図9B】図9は、Wnt7a^{K190A}およびWnt7a^{1~278}の内皮におけるトランスジェニック発現がGPR124/RECKに依存する脳の血管新生を誘発し、Wnt7a a^{-/-}ゼブラフィッシュの血液脳関門を復元することを示す。図9Aの結果の定量。注射されなかった胚と対照的に、Wnt7、Wnt7a^{K190A}またはWnt7a^{1~278}は、Wnt7a a^{-/-}突然変異体における後脳のCtA形成を復元する。

20

【図9C】図9は、Wnt7a^{K190A}およびWnt7a^{1~278}の内皮におけるトランスジェニック発現がGPR124/RECKに依存する脳の血管新生を誘発し、Wnt7a a^{-/-}ゼブラフィッシュの血液脳関門を復元することを示す。60 h p fのWnt7a a^{-/-}の胚におけるWnt7、Wnt7a^{K190A}およびWnt7a^{1~278}のトランスジェニック発現の後のCtAの抗GLUT1染色。トランスジェニック発現は、図9Aにおけるように達成された。まとめると、このデータは、明らかになったWnt7a^{K190A}またはWnt7a^{1~278}アゴニストが、Gpr124/Rec kに依存するプロセスにおいて、インビボ(in vivo)で活性であることを実証する。

【図10A】図10は、脳卒中のマウスモデルにおけるGPR124/RECKに基づく遺伝子療法を表す。AAV-PHP.eBウイルスを使用して、Wnt7a^{K190A}または対応する空のAAV対照(Ctrl)を8週齢のマウスの脳に送達した。GFPをコードするAAV-PHP.eB(AAV-PHP.eB-CAG-EGFP)を使用して、マウスの脳(8週齢のマウス、注射の2週間後)における広範囲に及ぶトランスジェニック発現を実証した。CAGプロモーターは、哺乳動物の発現ベクターにおいて使用される強力な合成プロモーターである。左のパネル、単離した無傷の脳に関する背面図、右のパネルは矢状断面。切片を抗CD31で染色して、血管系を標識した。

30

【図10B】図10は、脳卒中のマウスモデルにおけるGPR124/RECKに基づく遺伝子療法を表す。AAV-PHP.eBウイルスを使用して、Wnt7a^{K190A}または対応する空のAAV対照(Ctrl)を8週齢のマウスの脳に送達した。tMCAO(一過性中大脳動脈閉塞、脳卒中モデル)の2週間前に、 $1 \cdot 10^{11}$ AAV-PHP.eB-CAG-Wnt7a^{K190A}-p2A-EGFPウイルス粒子を静脈内注射することにより1回拍出量(mm³)が低減し、明らかになったアゴニストが前臨床モデルにおいて脳卒中を軽減したことを実証した。AAV-PHP.eB-CAG-EGFPウイルスを対照として使用した。

40

【発明を実施するための形態】

【0017】

本明細書で使用される場合、単数形である「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、単数の指示対象と複数の指示対象のどちらも含む。

【0018】

50

「含む (comprising)」、「含む (comprises)」および「で構成される (comprised of)」という用語は、本明細書で使用される場合、「含む (including)」、「含む (includes)」または「含有する (containing)」、「含有する (contains)」と同義であり、包括的またはオープンエンドであり、追加的な、記載されていないメンバー、要素または方法のステップを排除するものではない。これらの用語は、特許用語法において十分に確立された意味を有する「からなる (consisting of)」および「から本質的になる (consisting essentially of)」も包含する。

【0019】

終点による数値範囲の記載は、それぞれの範囲内に包含される全ての数および分率、ならびに記載されている終点を含む。

10

【0020】

「約」または「およそ」という用語は、本明細書で使用される場合、例えばパラメータ、量、持続時間などの測定可能な値について言及する場合、明記されている値の変動およびその値からの変動、例えば、 $\pm 10\%$ 以下、好ましくは $\pm 5\%$ 以下、より好ましくは $\pm 1\%$ 以下、およびさらに好ましくは $\pm 0.1\%$ 以下である明記されている値の変動およびその値からの変動を、そのような変動が開示されている発明を実施するために適正なものである限り、包含するものとする。「約」という修飾因子が指す値自体も具体的に開示されることが好ましいことが理解されるべきである。

【0021】

「1つまたは複数 (one or more)」または「少なくとも1つ (at least one)」という用語、例えば、メンバーの群の1つもしくは複数のメンバーまたは少なくとも1つのメンバーは、それ自体は明白であるが、さらなる例証として、この用語は、とりわけ、前記メンバーのうちのいずれか1つ、または前記メンバーのうちのいずれか2つ以上、例えば、前記メンバーのうちのいずれか3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上または7つ以上など、および最大で前記メンバーの全てへの言及を包含する。別の例では、「1つまたは複数 (one or more)」または「少なくとも1つ (at least one)」は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つまたはそれ以上を指し得る。

20

【0022】

本明細書における本発明の背景に関する考察は、本発明の状況を説明するために含まれている。これは、言及されている材料のいずれも、特許請求の範囲のいずれかの優先日時点でいずれかの国において公開されている、公知である、または共通の一般的知見の一部であることを容認するものと解釈されるべきではない。

30

【0023】

本開示全体を通して、種々の刊行物、特許および公開特許明細書が識別引用によって参照される。本明細書において引用される文書は全て、これによりそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、本明細書で具体的に言及される文書の教示またはセクションが参照により組み込まれる。

【0024】

特に定義されていなければ、本発明の開示に使用される用語は、科学技術用語を含めて全てが、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されている意味を有する。さらなる手引きとして、本発明の教示をよりよく理解するために用語の定義を含める。本発明の特定の態様または本発明の特定の実施形態に関連して特定の用語が定義されている場合、そのような含蓄は、特に定義されていなければ、本明細書全体を通して、すなわち、本発明の他の態様または実施形態に関しても適用されるものとする。

40

【0025】

以下の節では、本発明の種々の態様または実施形態をより詳細に定義する。そのように定義された各態様または実施形態を任意の他の態様または実施形態と、相反することが明確に示されていなければ、組み合わせることができる。特に、好ましいまたは有利である

50

ことが示されている任意の特色を、好ましいまたは有利であることが示されている任意の他の特色と組み合わせることができる。

【0026】

本明細書全体を通して「一実施形態」、「ある実施形態」への言及は、その実施形態に関連して記載されている特定の特色、構造または特徴が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、「一実施形態では」または「ある実施形態では」という句が本明細書全体を通して種々の箇所で現れることは、必ずしも全てが同じ実施形態について言及しているのではないが、その場合もある。さらに、本開示から当業者には明らかになる通り、1つまたは複数の実施形態において、特定の特色、構造または特徴を任意の適切な様式で組み合わせることができる。さらに、当業者には理解される通り、本明細書に記載の一部の実施形態は他の実施形態に含まれる特色のいくつかを含むがその他は含まないが、異なる実施形態の特色の組合せは本発明の範囲内に入るものとし、異なる実施形態を形成する。例えば、添付の特許請求の範囲では、特許請求された実施形態のいずれも任意の組合せで使用することができる。

10

【0027】

本発明者らは、Frizzledへの結合能に関して他のやり方では大部分が同義になるWntリガンドを識別し、それにより、組織発達および恒常性を調整するための細胞によるWntシグナル伝達インプットの複雑さの解釈を補助することができる初の「Wnt解読モジュール」を特徴付けた。本明細書で特徴付けられたWnt解読モジュールでは、RECKにより選択性が付与され、それにより、Wnt7特異的結合がFrizzled非依存的に媒介される。RECK結合パートナーであるGタンパク質共役型受容体GPR124が、細胞内ディシェベルド(Dvl)を動員することができるシグナル伝達欠損膜貫通タンパク質として作用する。Dvl足場によりGPR124とFrizzledが架橋され、それにより、Wnt7リガンド特異的RECK/GPR124/Frizzled/リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)シグナルソームがアセンブリされる。

20

【0028】

本発明者らは、さらに、RECKおよびGPR124を発現する細胞におけるWntシグナル伝達を選択的に活性化することができる新規のアゴニストの設計を予想外に実証し、そのようなアゴニストは、治療薬として、例えば、特に、とりわけ脳卒中、多発性硬化症および脳がんを含めた、神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系(CNS)障害を治療するための治療薬として有用である。したがって、本発明は、とりわけ、他のFrizzled経路との交差反応性を実質的に伴わずに大脳内皮細胞におけるWnt/-カテニンシグナル伝達を刺激することができ、治療薬として、特に神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系(CNS)障害とに対する治療薬として有用である新規のアゴニストを提供することを可能にするものである。

30

【0029】

したがって、ある態様は、GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でFrizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達は活性化しない、作用物質を提供する。

40

【0030】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸への言及は、当技術分野におけるそれぞれの名称の下で一般に知られているそれぞれのペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸を示す。より詳細には、「Gタンパク質共役型受容体124」(GPR124)、「カザールモチーフを有する復帰誘導性システインリッチタンパク質(Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif)」(RECK)、「Frizzled」(FZD)、または「リポタンパク質受容体関連タンパク質」(LRP)への言及は、文脈から明らかであり、当技術分野において前記名称で一般に知られているそれぞれのペプチド、ポリペプチド、

50

AEVASGGCMKTGLWKSETTV

【0034】

追加的な手引きとして、RECK（カザールモチーフを有する復帰誘導性システインリッチタンパク質）は、腫瘍形成能15タンパク質（ST15）の抑制因子としても当該技術分野で公知である。一例として、ヒトRECK遺伝子は、NCBI Genbank（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）Gene ID8434の下に注釈が付けられている。ヒトRECKmRNA（転写物変異体1）は、NCBI GenBank受託番号NM_021111.2の下に注釈が付けられている。NM_021111.2のヌクレオチド87（開始コドン）～3002（終止コドン）がRECKコード配列を構成する。ヒトRECKタンパク質配列は、NCBI GenBank受託番号NP_066934.1、およびUniprot受託番号O95980-1の下に注釈が付けられており、以下にさらに再現される（配列番号2）：

>NP_066934.1カザールモチーフを有する復帰誘導性システインリッチタンパク質アイソフォーム1前駆体[ヒト]

```

MATVRASLRGALLLLLAVAGVAEVAGGLAPGSAGALCCNHSKDNQMCRDVCEQIFSSKS
ESRLKHLLQRAPDYCPETMVEIWNCMNSSLPGVFKKSDGWVGLGCCELAIALECRQACK
QASSKNDISKVCRKEYENALFSCISRNEMGSVCCSYAGHHTNCREYCQAIFRDSSPGPSQ
IKAVENYCASISPQLIHCVNNYQTQSYPMRNPDTSLYCCDRAEDHACQNACKRILMSKTE
MEIVDGLIEGCKTQPLPQDPLWQCFLESSQSVHPGVTVHPPPSTGLDGAKLHCCSKANTS
TCRELCTKLYSMSWGNTQSWQEFDRFCEYNPVEVSMILTCLADVREPCQLGCRNLTYCT
NFNNRPTELFRSCNAQSDQGAMNDMKLWEKGSIKMPFINIPVLDIKKQPEMWKAIACS
LQIKPCHSKSRGSIICKSDCVEILKKCGDQNKFPEDHTAESICELLSPTDDLKNCIPLDTYL
RPSTLGNIVEEVTHPCNPNPCPANELCEVNRKGCPSGDPCLPYFCVQGCKLGEASDFIVR
QGTLIQVPSSAGEVGCYKICSCGQSGLLENMEMHCIDLQKSCIVGGKRKSHGTSFSIDCN
VCSCFAGNLVCSTRCLSEHSSSEDDRRTFTGLPCNCADQFVPVCGQNGRTYPSACIARCV
GLQDHQFEFGSCMSKDPNPNPCQKNQRCIPKPQVCLTTFDKFGCSQYECVPRQLACDQ
VQDPVCDTDHMEHNNLCTLYQRGKSLSYKGPCQPFCRATEPVCGHNGETYSSVCAAYSD
RVAVDYYGDCQAVGVVLEHSSVAECASVKCPSLLAAGCKPIIPPGACPLCAGMLRVLFD
KEKLDTIKVTNKKPITVLEILQKIRMHVSVQPQCDVFGYFSIESEIVILIIIPVDHYPKALQIE
ACNKEAEKIESLINSPTSPLASHVPLSALIISQVQVSSSVPSAGVRRARPSCHSLLLPLSLGL
ALHLLWTYN

```

【0035】

「Frizzled」または「FZD」または「FZ」という用語は、Frizzledファミリーのありとあらゆるメンバーを包含する。追加的な手引きとして、表1にNCBI GenbankおよびUniprotにおいて注釈が付けられている公知のヒトFrizzledファミリーメンバー10種を提示する。

【0036】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

	NCBI Genbank			Uniprot	
	GeneID	mRNA	開始-終止 コドン	タンパク質	タンパク質
FZD1	8321	NM_003505.1	414-2357	NP_003496.1	Q9UP38-1
FZD2	2535	NM_001466.3	246-1943	NP_001457.1	Q14332-1
FZD3	7976	NM_017412.3 NM_145866.1	530-2530 484-2484	NP_059108.1 NP_665873.1	Q9NPG1-1
FZD4	8322	NM_012193.3	314-1927	NP_036325.2	Q9ULV1-1
FZD5	7855	NM_003468.3	411-2168	NP_003459.2	Q13467-1
FZD6	8323	NM_001164615.1 NM_001164616.1 NM_001317796.1 NM_003506.3	291-2411 299-2323 463-1668 318-2438	NP_001158087.1 NP_001158088.1 NP_001304725.1 NP_003497.2	O60353-1 O60353-2
FZD7	8324	NM_003507.1	62-1786	NP_003498.1	O75084-1
FZD8	8325	NM_031866.2	6-2090	NP_114072.1	Q9H461-1
FZD9	8326	NM_003508.2	230-2005	NP_003499.1	O00144-1
FZD10	11211	NM_007197.3	485-2230	NP_009128.1	Q9ULW2-1

10

【0037】

20

「リポタンパク質受容体関連タンパク質」または「LRP」という用語は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質またはプロ低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質としても当技術分野で公知のありとあらゆるリポタンパク質受容体関連タンパク質を包含し、特に、Wntシグナル伝達に關与するLRPタンパク質を示す。ある特定の特に好ましい実施形態では、これらの用語は、LRP5 (Gene ID: 4041)、LRP6 (Gene ID: 4040)、またはLRP5およびLRP6 (LRP5/6)を示す。

【0038】

したがって、GPR124/RECK/Frizzled/LRP5/6媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP5/6媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない、作用物質も開示される。

30

【0039】

特に神経血管機能不全を含む神経血管障害またはCNS障害の予防または治療に有用なものなどの、治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法であって、試験作用物質が、GPR124/RECK/Frizzled/LRP5/6媒介性Wntシグナル伝達を活性化するが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP5/6媒介性Wntシグナル伝達は活性化しないものであるかどうかを決定することを含む方法もさらに開示される。

【0040】

追加的な手引きとして、ヒトLRP5 mRNAは、NCBI GenBank受託番号NM_002335.3 (転写物変異体1; NM_002335.3のヌクレオチド107 (開始コドン) ~ 4954 (終止コドン) がLRP5コード配列を構成する) またはNM_001291902.1 (転写物変異体2; NM_001291902.1のヌクレオチド1872 (開始コドン) ~ 4976 (終止コドン) がLRP5コード配列を構成する) の下に注釈が付けられている。ヒトLRP5タンパク質配列は、NCBI GenBank受託番号NP_002326.2 (アイソフォーム1前駆体) またはNP_001278831.1 (アイソフォーム2)、およびUniprot受託番号O75197-1の下に注釈が付けられており、NP_002326.2として注釈が付けられているLRP5タンパク質配列は、以下に再現される (配列番号3) :

40

> NP_002326.2 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質5アイソフォー

50

ム 1 前駆体 [ヒト]

MEAAPPGPPWPLLLLLLLLLLALCGCPAPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGGVKLESTIVVS
 GLEDAAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAAVQNVVISGLVSPDGLACDWVG
 KKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDLDPRAIALDPAHGYMYWTDWGETPRIE
 RAGMDGSTRKIIIVDSDIYWPNGLTIDLEEKLYWADAKLSFIHRANLDGSFRQKVVEGSL
 THPFALTLSGDTLYWTDWQTRSIHACNKRTGGKRKEILSALYSPMDIQVLSQERQPFHHT
 RCEEDNGGCSHLCLLSPSEPFYTCACPTGVQLQDNGRTCKAGAEVLLARRTDLRRISL
 DTPDFTDIVLQVDDIRHAI AIDYDPLEGYVYWTDDEVRAIRRAYLDGSGAQTLVNTEIND
 PDGIAVDWVARNLYWTDGTGTDRIEVTRLNGTSRKILVSEDLDEPRAIALHPVMGLMYWT
 DWGENPKIECANLDGQERRVLVNASLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINVDG
 TKRRTLLEDKLP HIFGFTLLGDFIYWTDWQRRSIERVHKVKASRDVIIDQLPDL MGLKAV
 NVAKVVGTPCADRNGGCSHL CFFTPHATRCGCPIGLELLSDMKT CIVPEAFLVFTSRAA
 IHRISLETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVSNNHIYWTDVSLKTISR AFMNGSSVEHVVEF
 GLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQFRQVLVWRDLNPRSLALDPTK
 GYIYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNCMTLVDKVGRANDLTIDYADQRLYWTDLDTNMIES
 SNMLGQERVVIADDLPHPFGLTQYSYIYWTDWNLHSIERADKTSGRNRTLIQGHLD FV
 MDILVFHSSRQDGLNDCMHNNGQCGLCLAIPGGHRCGCASHYTLDPSSRNCSPPTTFL
 LFSQKSAISRMIPDDQHSPDLILPLHGLRNVKAIDYDPLDKFIYWVDGRQNIKRAKDDGT
 QPFVLTSLSQGNPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCEATNTINVHRLSGEAMGVVLRGDRDK
 PRAIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAALDGTREVLFTTGLIRPVALVVDNTLGKLFW
 VDADLKRIESCDLSGANRLTEDANIVQPLGLTILGKHL YWIDRQQMIERVEKTTGDKR
 TRIQGRVAHLTGIHAVEEVSLEEFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVHLVLLQN
 LLTCGEPPTCSPDQFACATGEIDCIPGAWRCDFPECCDDQSDEEGCPVCSAAQFPCARGQ
 CVDLRLRCDGEADCQDRSDEADCDAICLPNQFRCASGQCVLKQQCDSFPDCIDGSDELM
 CEITKPPSDDSPAHS SAIGPVIGIILSLFVMGGVYFVCQRVVCQRYAGANGPFPHEYVSGT
 PHVPLNFIAPGGSQHGPF TGIACGKSMSSVSLMGGRGVPLYDRNHVTGASSSSSSSTK
 ATLYPPILNPPPSPATDPSLYNMDMFYSSNIPATARPYPYIIRGMAPPTTPCSTDVCDSD
 YSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLSAEDSCPPSPATERSYFHLFPPPPSPC
 TDSS

10

20

【 0 0 4 1 】

30

追加的な手引きとして、ヒトLRP6 mRNAは、NCBI GenBank 受託番号 NM_002336.2 の下に注釈が付けられている。NM_002336.2 のヌクレオチド143（開始コドン）～4984（終止コドン）は、LRP6コード配列を構成する。ヒトLRP6タンパク質配列は、NCBI GenBank 受託番号NP_002327.2 およびUniprot 受託番号O75581-1 の下に注釈が付けられており、以下にさらに再現される（配列番号4）：

> NP_002327.2 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質6前駆体 [ヒト]

MGAVLRSLACSFVLLRAAPLLLYANRRDLRLVDATNGKENATIVGGLEDAAAVDFV F
 SHGLIYWSDVSEEAIKRTEFNKTESVQNVVVSGLLSPDGLACDWLGEKLYWTDSETNRIE
 VSNLDGSLRKVLFWQELDQPRAIALDPSSGFMYWTDWGEVPKIERAGMDGSSRFIIINSE
 IYWPNGLTLDYEEKLYWADAKLNFHKSNDLGTNRQAVVKGSLPHPFALT LFEDILYW
 TDWSTHSILACNKYTGEGLREIHSDIFSPMDIHAFSQQRQPNATNPCGIDNGGCSHLCLM
 SPVKPFYQCACPTGVKLENGKTCKDGATELLLLARRTDLRRISLDTPDFTDIVLQLEDIR
 HAI AIDYD PVEGYIYWTDDEVRAIRRSFIDGSGSQFVVTAQIAHPDGI AVDWVARNLYWT
 DTGTDRIEVTRLNGTMRKILISEDLEEPRAIVLDP M VGYMYWTDWGEIPKIERAALDGS D
 RVVLVNTSLGWPNGLALDYDEGKIYWGDAKTDKIEVMNTDGTGRRVLVEDKIP HIFGFT
 LLGDYVYWTDWQRRSIERVHKRSAEREVIIDQLPDL MGLKATNVHRVIGSNPCAENGG
 CSHLCLYRPQGLRCACPIGFELISDMKT CIVPEAFLFSRRADIRRISLETNNNNVAIPLTG
 VKEASALDFDVTDNRIYWTDISLKTISR AFMNGSALEHVVEFGLDYPEGMAVDWLGKNL
 YWADTGTNRIEVS KLDGQHRQVLVWKDL DSPRALALDPAEGFMYWTEWGGKPKIDRAA

40

50

MDGSERTTLVPNVGRANGLTIDYAKRRRLYWTDLDTNLISSNMLGLNREVIADDLPHPF
 GLTQYQDYIYWTDWSRRSIERANKTSGQNRRTIIQGHLDYVMDILVFHSSRQSGWNECAS
 SNGHCSSLCLAVPVGGFVCGCPAHYSLNADNRTCSAPTTFLFSQKSAINRMVIDEQQSP
 DIILPIHSLRNVRAIDYDPLDKQLYWIDSRQNMIRKAQEDGSQGFTVVVSSVPSQNLEIQP
 YDLSIDIYSRYIYWTCATNVINVTRL DGRSVGVVLKGEQDRPRAVVVNPEKGYMYFTNL
 QERSPKIERAALDGTREVLFFSGLSKPIALALDSRLGKLFWADSDLRRIESSDLSGANRIV
 LEDSNILQPVGLTVFENWLYWIDKQQQMIEKIDMTGREGRTKVQARIAQLSDIHAVKEL
 NLQEYRQHPCAQDNGGCSHICLVKGDGTTTRCSCPMHLVLLQDELSCGEPPTCSPQQFTC
 FTGEIDCIPVAWRCDGFTECEDHSDELNCPVCSESQFQCASGQCIDGALRCNGDANCQDK
 SDEKNCEVLCLIDQFRCANGQCIGKHKKCDHNVD CSDKSELD CYPTEEPAPQATNTVGS
 VIGVIVTIFVSGTVYFICQRMLCPRMKG DGETMTNDYVVHGPASVPLGYVPHSSLSGSL
 PGMSRGKSMISLSIMGGSSGPPYDRAHVTGASSSSSSSTKGTYPAILNPPSPATERSH
 YTMIEFGYSSNSPSTHRSYSYRPYSYRHFAPPTTPCSTDVCDSDYAPSRRMTSVATAKGYT
 SDLNYDSEPVPPPPTPRSQYLSAEENYESCPPSPYTERSYSHHLYPPPPSPCTDSS

10

【0042】

配列データベースまたは本明細書において表されるあらゆる配列は、それぞれのペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の前駆体の配列の場合もあり、また、処理されて成熟分子から離れた一部分を含む場合もあることが当業者には理解できる。

【0043】

「タンパク質」という用語は、本明細書全体を通して使用される場合、一般に、1つまたは複数のポリペプチド鎖、すなわち、ペプチド結合によって連結したアミノ酸残基のポリマー鎖で構成される巨大分子を包含する。この用語は、天然に産生されたタンパク質、組換えによって産生されたタンパク質、半合成的にまたは合成的に作製されたタンパク質を包含し得る。この用語は、これだけに限定することなく、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、スルホン化、メチル化、ユビキチン化、シグナルペプチド除去、N末端Met除去、プロ酵素またはプレホルモンの活性形態への変換などの、ポリペプチド鎖（複数可）の共発現型または発現後型修飾を1つまたは複数有するタンパク質も包含する。この用語は、さらに、対応するネイティブなタンパク質と比べてアミノ酸配列の変異、例えば、アミノ酸欠失、付加および/または置換などを有するタンパク質変異体または突然変異体も含む。この用語は、全長タンパク質とタンパク質の一部または断片、例えば、

20

30

【0044】

「ポリペプチド」という用語は、本明細書全体を通して使用される場合、一般に、ペプチド結合によって連結したアミノ酸残基のポリマー鎖を包含する。したがって、特に、タンパク質が単一のポリペプチド鎖のみで構成されている場合、「タンパク質」という用語と「ポリペプチド」という用語は、本明細書では、そのようなタンパク質を示すために互換的に使用され得る。この用語は、いかなる最小長のポリペプチド鎖にも限定されない。この用語は、天然に産生されたポリペプチド、組換えによって産生されたポリペプチド、半合成的にまたは合成的に作製されたポリペプチドを包含し得る。この用語は、これだけに限定することなく、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、スルホン化、メチル化、ユビキチン化、シグナルペプチド除去、N末端Met除去、プロ酵素またはプレホルモンの活性形態への変換などの、ポリペプチド鎖の共発現型または発現後型修飾を1つまたは複数有するポリペプチドも包含する。この用語は、さらに、対応するネイティブなポリペプチドと比べてアミノ酸配列の変異、例えば、アミノ酸欠失、付加および/または置換などを有するポリペプチド変異体または突然変異体も含む。この用語は、全長ポリペプチドおよびポリペプチドの一部または断片、例えば、そのような全長ポリペプチドのプロセッシングから生じる天然に存在するポリペプチドの一部を含むことが意図されている。

40

【0045】

「ペプチド」という用語は、本明細書全体を通して使用される場合、50アミノ酸以下

50

、例えば、45アミノ酸以下、好ましくは40アミノ酸以下、例えば、35アミノ酸以下、より好ましくは30アミノ酸以下、例えば、25アミノ酸以下、20アミノ酸以下、15アミノ酸以下、10アミノ酸以下または5アミノ酸以下から本質的になる、本明細書で使用されるポリペプチドを指すことが好ましい。

【0046】

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、天然に存在する、例えば、自然界において存在するまたは自然界から単離された、例えば、細胞または組織によりネイティブにまたは内在的に産生または発現され、それらから単離されていてもよいものであり得る。ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、組換え型、すなわち、組換えDNA技術によって産生されたものであり得、かつ/または、部分的にまたは完全に化学的または生化学的に合成されたものであり得る。これだけに限定することなく、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、適切な宿主または宿主細胞発現系（例えば、適切な細菌、酵母、真菌、植物もしくは動物宿主もしくは宿主細胞発現系）により組換えによって産生させることができ、それらから単離してもよい、または、無細胞翻訳もしくは無細胞転写および翻訳、もしくは非生物学的ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質合成により組換えによって産生させることができる。

【0047】

「核酸」という用語は、本明細書全体を通して使用される場合、一般には、ヌクレオシド単位から基本的に構成される任意の長さのポリマー（好ましくは直鎖状ポリマー）を指す。ヌクレオシド単位は、一般に、複素環式塩基および糖基を含む。複素環式塩基は、とりわけ、プリン塩基およびピリミジン塩基、例えば、天然に存在する核酸に広くいきわたっているアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）およびウラシル（U）、他の天然に存在する塩基（例えば、キサントシン、イノシン、ヒポキサントシン）ならびに化学的または生化学的に修飾された（例えば、メチル化された）非天然または誘導体化塩基などを含み得る。例示的な修飾された核酸塩基としては、これだけに限定することなく、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含めた、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよびN-2、N-6およびO-6置換プリンが挙げられる。特に、5-メチルシトシン置換により、核酸2重鎖安定性が增大することが示されており、例えばアンチセンス作用物質に関して、さらにいっそう詳細には2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合に好ましい塩基置換であり得る。糖基としては、とりわけ、好ましくは天然に存在する核酸に共通するリボースおよび/もしくは2-デオキシリボース、またはアラビノース、2-デオキシアラビノース、トレオースまたはヘキソース糖基、ならびに修飾または置換された糖基（例えば、これだけに限定することなく、リボースなどの2'-O-アルキル化糖、例えば、2'-O-メチル化糖もしくは2'-O-エチル化糖；リボースなどの2'-O-アルキルオキシアルキル化糖、例えば、2'-O-メトキシエチル化糖；もしくはリボースなどの2'-O, 4'-C-アルキレン連結糖、例えば、2'-O, 4'-C-メチレン連結糖もしくは2'-O, 4'-C-エチレン連結糖；2'-フルオロ-アラビノースなど）などのペントース（ペントフラノース）基を挙げることができる。少なくとも1つのリボヌクレオシド単位を含む核酸分子は、一般にはリボ核酸またはRNAと称され得る。そのようなリボヌクレオシド単位（複数可）は、2'-OH部分を含み、ここで、-Hは、リボヌクレオシドに関して当技術分野で公知の通り置換されていてもよい（例えば、メチル、エチル、アルキル、またはアルキルオキシアルキルによって）。好ましくは、リボ核酸またはRNAは、主にリボヌクレオシド単位で構成され得る、例えば、核酸分子を構成するヌクレオシド単位（数）の80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはさらには100%がリボヌクレオシド単位であり得る。少なくとも1つのデオキシリボヌクレオシド単位を含む核酸分子は、一般にはデオキシリボ核酸またはDNAと称され得る。そのようなデオキシリボヌクレオシド単位（複数可）は、2'-Hを含む。好ましくは、デオキシリボ核酸またはDNAは、主にデオキシリボヌクレオシド単位で構成され得る、例えば、核酸分子を構成するヌクレオシド単位（数）の80%、85%、90%

10

20

30

40

50

、 95%、 96%、 97%、 98%、 99%またはさらには100%がデオキシリボヌクレオシド単位であり得る。ヌクレオシド単位は、とりわけ天然に存在する核酸に共通するリン酸ジエステル連結、およびさらに修飾されたリン酸に基づく連結またはホスホネートに基づく連結、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホロチオエートなどのアルキルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネートなどのアルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホトリエステルなどのホスホトリエステラーゼ、ホスホラミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホホルモリデート、架橋ホスホラミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロチオエートなど；およびさらにシロキササン、炭酸、スルファミン酸、カルボアルコキシ、アセトアミデート、3'-N-カルバミン酸などのカルバミン酸、モルホリノ、ボラノ、チオエーテル、3'-チオアセタール、およびスルホンヌクレオシド間連結を含めた多数の公知のヌクレオシド間連結のうちのいずれか1つによって互いに連結し得る。好ましくは、ヌクレオシド間連結は、より好ましくはリン酸ジエステル、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート連結またはこれらの組合せなどの修飾リン酸に基づく連結を含めたリン酸に基づく連結であり得る。「核酸」という用語は、これだけに限定することなく、ペプチド核酸(PNA)、リン酸基を有するペプチド核酸(PHONA)、ロックド核酸(LNA)、モルホリノホスホロジアミデート骨格核酸(PMO)、シクロヘキセン核酸(CeNA)、トリシクロ-DNA(tcDNA)、およびアルキルリンカーまたはアミノリンカーを伴う骨格切片を有する核酸を含めた、核酸模倣体などのポリマーを含有する任意の他の核酸塩基も包含する(例えば、Kurreck 2003 (Eur J Biochem 270: 1628-1644)を参照されたい)。「アルキル」は、本明細書で使用される場合、特に、メチル、エチル、エテニル、プロピル、1-プロベニル、2-プロベニル、およびイソプロピルなどの低炭化水素部分、例えば、C1~C4直鎖または分枝、飽和または不飽和炭化水素を包含する。本明細書で意図されている核酸は、天然に存在するヌクレオシド、修飾ヌクレオシドまたはそれらの混合物を含み得る。修飾ヌクレオシドは、修飾複素環式塩基、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間連結またはこれらの組合せを含み得る。

【0048】

「核酸」という用語は、具体的にはhnRNA、プレmRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、増幅産物、オリゴヌクレオチド、および合成(例えば、化学的に合成された)DNA、RNAまたはDNA/RNAハイブリッドを含めたDNA、RNAおよびDNA/RNAハイブリッド分子をさらに包含することが好ましい。RNAは、RNAi(阻害性RNA)、dsRNA(二本鎖RNA)、siRNA(低分子干渉RNA)、mRNA(メッセンジャーRNA)、miRNA(マイクロRNA)、tRNA(転移RNA、対応するアシル化アミノ酸を伴うか伴わないかにかかわらず)、およびcRNA(相補的RNA)を包含する。核酸は、天然に存在する、例えば、自然界において存在するまたは自然界から単離された、例えば、細胞または組織によりネイティブにまたは内在的に産生され、それらから単離されていてもよいものであり得る。核酸は、組換え、すなわち、組換えDNA技術によって産生されたものであり得、かつ/または、部分的にまたは完全に化学的または生化学的に合成されたものであり得る。これだけに限定することなく、核酸は、適切な宿主もしくは宿主細胞発現系(例えば、適切な細菌、酵母、真菌、植物もしくは動物宿主もしくは宿主細胞発現系)により組換えによって産生させることができ、それらから単離してもよい、または無細胞転写もしくは非生物学的核酸合成により組換えによって産生させることができる。核酸は、二本鎖、部分的に二本鎖、または一本鎖であり得る。一本鎖の場合、核酸は、センス鎖またはアンチセンス鎖であり得る。さらに、核酸は環状または直鎖状であり得る。

【0049】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸への言及は、見出されるあらゆる生物体、特に、動物、好ましくは温血動物、より好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくはヒトおよび非ヒト哺乳動物を含めた哺乳動物、さらに好ましくはヒトのそのようなペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸を包含する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

したがって、ある特定の実施形態では、本明細書で使用される G P R 1 2 4、R E C K、F Z D および L R P のうちの 1 つまたは複数、好ましくは全てが、動物起源、好ましくは温血動物起源、より好ましくは脊椎動物起源、さらにより好ましくはヒト起源および非ヒト哺乳動物起源を含めた哺乳動物起源、さらに好ましくはヒト起源のものである。

【 0 0 5 1 】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸への言及は、特に、ネイティブな配列を有する、すなわち、一次配列が自然界で見出されるまたは自然界に由来するペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の一次配列と同じであるペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸を包含し得る。ネイティブな配列は、異なる種間で、そのような種間の遺伝的相違に起因して異なり得ることが当業者には理解される。さらに、ネイティブな配列は、同じ種の異なる個体間またはその中で、所与の種内の正常な遺伝的多様性に起因して異なり得る。また、ネイティブな配列は、同じ種の異なる個体間またはさらにはその中で、体細胞突然変異または転写後もしくは翻訳後修飾に起因して異なり得る。ペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸のあらゆるそのような変異体またはアイソフォームが本明細書で意図されている。したがって、自然界で見出されるまたは自然界に由来するペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の全ての配列が「ネイティブ」とみなされる。

10

【 0 0 5 2 】

ある特定の実施形態では、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸は、ヒトのものであり得る、すなわち、それらの一次配列が、天然に存在するヒトペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸のまたはそれらの中に存在する対応する一次配列と同じであり得る。ある特定の実施形態では、「ヒト」という限定詞は、それぞれのペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の起源または供給源ではなく、それらの一次配列を指す。例えば、そのようなペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸は、ヒト対象の試料中に存在し得るもしくはヒト対象の試料から単離することができる、または他の手段によって（例えば、組換え発現、無細胞転写もしくは翻訳、もしくは非生物学的核酸もしくはペプチド合成によって）得ることができる。

20

【 0 0 5 3 】

ある特定の実施形態では、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸は、野生型であり得る。大多数のネイティブなペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸が野生型と考えられるが、疾患表現型に寄与し得るまたはその原因になり得る部分的なまたは完全な機能喪失を導く天然に存在する突然変異を有するものは、一般に、「野生型」という用語の範囲から除外される。

30

【 0 0 5 4 】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸への言及は、そのようなペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸、特に、それらの天然に存在する形態、ネイティブな形態または野生型形態の変異体または断片も包含し得る。

【 0 0 5 5 】

「断片」という用語は、本明細書全体を通して、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に関連して使用される場合、一般には、一般にはペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の N 末端および / または C 末端が短縮された形態などの、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の一部を示す。断片は、前記ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質のアミノ酸配列長の少なくとも約 30%、例えば、少なくとも約 50% または少なくとも約 70%、好ましくは少なくとも約 80%、例えば、少なくとも約 85%、より好ましくは少なくとも約 90%、およびさらにより好ましくは少なくとも約 95% またはさらには約 99% を含み得ることが好ましい。例えば、全長ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の長さを超えない限り、断片は、対応する全長ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の 5 個以上の連続したアミノ酸、または 10 個以上の連続したアミノ酸、または 20 個以上の連続したアミノ酸、または 30 個以上の連続したアミノ酸、例えば

40

50

、40個以上の連続したアミノ酸、例えば、50個以上の連続したアミノ酸、例えば、60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、200個以上、300個以上、400個以上、500個以上、600個以上、700個以上、800個以上、900個以上または1000個以上の連続したアミノ酸などの配列を含み得る。

【0056】

核酸（ポリヌクレオチド）に関連した「断片」という用語は、一般には、核酸の5'短縮形態および/または3'短縮形態を示す。断片は、前記核酸の核酸配列長の少なくとも約30%、例えば、少なくとも約50%または少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、例えば、少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、およびさらにより好ましくは少なくとも約95%またはさらには約99%を含み得ることが好ましい。例えば、全長核酸の長さを超えない限り、断片は、対応する全長核酸の5個以上の連続したヌクレオチド、または10個以上の連続したヌクレオチド、または20個以上の連続したヌクレオチド、または30個以上の連続したヌクレオチド、例えば、40個以上の連続したヌクレオチド、例えば、50個以上の連続したヌクレオチド、例えば、60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、200個以上、300個以上、400個以上、500個以上、600個以上、700個以上、800個以上、900個以上、1000個以上、1500個以上、2000個以上、2500個以上、3000個以上、3500個以上または4000個以上の連続したヌクレオチドなどの配列を含み得る。

10

【0057】

これらの用語は、これだけに限定することなく、代替的転写もしくは翻訳、エキソおよび/もしくはエンドタンパク質分解、エキソおよび/もしくはエンド核酸分解、または、例えば物理的、化学的および/もしくは酵素的タンパク質分解もしくは核酸分解によるものなどのペプチド、ポリペプチド、タンパク質もしくは核酸の分解などの、インビボおよび/またはインビトロにおける機構のいずれかによって生じる断片を包含する。

20

【0058】

タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸の「変異体」という用語は、一般に、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列が、そのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、または核酸の配列と実質的に同一である（すなわち、大部分が同一であるが完全に同一ではない）、例えば、記載されているタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、または核酸の配列と少なくとも約80%同一であるまたは少なくとも約85%同一である、例えば、好ましくは少なくとも約90%同一である、例えば、少なくとも約91%同一である、92%同一である、より好ましくは少なくとも約93%同一である、例えば、少なくとも約94%同一である、なおより好ましくは少なくとも約95%同一である、例えば、少なくとも約96%同一である、さらにより好ましくは少なくとも約97%同一である、例えば、少なくとも約98%同一である、および最も好ましくは少なくとも約99%同一であるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドまたは核酸を指す。変異体は、記載されているタンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸に対して、記載されているタンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸の配列全体を配列アラインメントで照会した場合にそのような程度の同一性を示し得ることが好ましい（すなわち、全体的な配列同一性）。配列同一性は、それ自体公知の配列アラインメントおよび配列同一性の決定を実施するための適切なアルゴリズムを使用して決定することができる。例示的であるが非限定的なアルゴリズムとして、元々Altschul et al. 1990 (J Mol Biol 215: 403-10)により記載されたBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)に基づくもの、例えば、例えば公開されたデフォルト設定または他の適切な設定（例えば、BLASTNアルゴリズムに関しては：ギャップを入れるためのコスト(Cost to open a gap) = 5、ギャップを延長するためのコスト(Cost to extend a gap) = 2、ミスマッチに対するペナルティ(penalty for a mismatch) = -2、マッチに対するリワード(reward for a match) = 1、ギャップx__ドロップオフ(gap x__dropoff) = 50、期待値(expectation value) = 10.0、ワードサイズ(word size) = 28;ま

30

40

50

たはBLASTPアルゴリズムに関しては：行列 = B l o s u m 6 2 (Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 10915-10919)、ギャップを入れるためのコスト (Cost to open a gap) = 11、ギャップを延長するためのコスト (Cost to extend a gap) = 1、期待値 (expectation value) = 10.0、ワードサイズ (word size) = 3など)を使用した、Tatusova and Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250)により記載されている「B l a s t 2配列」アルゴリズムなどが挙げられる。

【0059】

特定のアミノ酸配列とクエリポリペプチドのアミノ酸配列の間のパーセント同一性を決定するための手順の例では、2つのアミノ酸配列を、NCBIウェブサイト (www.ncbi.nlm.nih.gov) においてウェブアプリケーションとしてまたは独立型の実行可能なプログラム (BLASTバージョン2.2.31+) として利用可能なB l a s t 2配列 (B l 2 s e q) アルゴリズムを使用し、適切なアルゴリズムパラメータを使用してアラインメントすることが必要になる。適切なアルゴリズムパラメータの例としては、行列 = B l o s u m 6 2、ギャップを入れるためのコスト (Cost to open a gap) = 11、ギャップを延長するためのコスト (Cost to extend a gap) = 1、期待値 (expectation value) = 10.0、ワードサイズ (word size) = 3) が挙げられる。2つの比較される配列が同一性を共有する場合、アウトプットから、アラインメントされた配列が同一性の領域として示される。2つの比較される配列が同一性を共有しない場合、アウトプットから、アラインメントされた配列は示されない。アラインメントされたら、両方の配列において同一のアミノ酸残基が存在する位置の数を計数することによってマッチの数を決定する。マッチの数をクエリポリペプチドの長さで割り、その後、得られた値に100を掛けることによってパーセント同一性を決定する。パーセント同一性値を少数第2位で四捨五入してもよいが、必要ではない。例えば、78.11、78.12、78.13、および78.14の端数を切り捨てて78.1にし、78.15、78.16、78.17、78.18、および78.19の端数を切り上げて78.2にすることができる。B l 2 s e qによりアウトプットされたアラインメントの各セグメントに関する詳細な見解は同一性のパーセンテージにすでに都合よく含まれていることにも留意する。

【0060】

タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸の変異体は、前記タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸のホモログ (例えば、オルソロまたはパラロ) であり得る。本明細書で使用される場合、「同一性」という用語は、一般には、同じまたは異なる分類群からの2つの巨大分子間の構造的類似性を示し、前記類似性は、共有される祖先に起因する。

【0061】

タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの変異体は、対応するタンパク質またはポリペプチドに対して (すなわち、それと比較して) 1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含み得る。例えば、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの変異体 (置換変異体) は、対応するタンパク質またはポリペプチドに対して (すなわち、それと比較して) 最大で70カ所 (例えば、1カ所以下、2カ所以下、3カ所以下、4カ所以下、5カ所以下、6カ所以下、7カ所以下、8カ所以下、9カ所以下、10カ所以下、12カ所以下、15カ所以下、20カ所以下、25カ所以下、30カ所以下、35カ所以下、40カ所以下、50カ所以下、60カ所以下、または70カ所以下) の保存的アミノ酸置換を含み得、かつ/または、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの変異体 (置換変異体) は、対応するタンパク質またはポリペプチドに対して (すなわち、それと比較して) 最大で20カ所 (例えば、1カ所以下、2カ所以下、3カ所以下、4カ所以下、5カ所以下、6カ所以下、7カ所以下、8カ所以下、9カ所以下、10カ所以下、11カ所以下、12カ所以下、13カ所以下、14カ所以下、15カ所以下、16カ所以下、17カ所以下、18カ所以下、または19カ所以下) の非保存的アミノ酸置換を含み得る。

【 0 0 6 2 】

保存的アミノ酸置換は、1つのアミノ酸での同様の特徴を有する別のアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸置換としては、以下の群内での置換が挙げられる：バリン、アラニンおよびグリシン；ロイシン、バリン、およびイソロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリン、システイン、およびトレオニン；リシンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。非極性疎水性アミノ酸として、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸として、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正に荷電した（すなわち、塩基性）アミノ酸として、アルギニン、リシンおよびヒスチジンが挙げられる。負に荷電した（すなわち、酸性）アミノ酸として、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。上記の極性群、塩基性群、または酸性群の1つのメンバーの同じ群の別のメンバーによる置換はいずれも保存的置換とみなすことができる。対照的に、非保存的置換は、1つのアミノ酸での同様のでない特徴を有する別のアミノ酸の置換である。

10

【 0 0 6 3 】

その代わりに、またはそれに加えて、例えば、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの変異体（欠失変異体）は、対応するタンパク質またはポリペプチドに対して（すなわち、それと比較して）最大20アミノ酸セグメント（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20セグメント）を欠き得る。欠失セグメント（複数可）は、それぞれ独立に、1つのアミノ酸、2つの連続したアミノ酸または3つの連続したアミノ酸からなり得る。欠失セグメントは、連続していない場合もあり、欠失セグメントの2つ以上または全てが連続している場合もある。

20

【 0 0 6 4 】

核酸の変異体は、対応する核酸に対して（すなわち、それと比較して）1つまたは複数のヌクレオチド付加、欠失、または置換を含み得る。

【 0 0 6 5 】

任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の「断片または変異体」または「変異体または断片」への言及は、そのようなペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の変異体の断片、およびそのようなペプチド、ポリペプチド、タンパク質または核酸の断片の変異体も包含する。

30

【 0 0 6 6 】

特に、記載されているペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の生物活性のある断片および/または変異体が想定される。「生物活性のある」という用語は、その断片および/または変異体がそれぞれのまたは対応するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の生物活性または意図された機能性を少なくとも部分的に保持することを示す「機能的に活性な」または「機能的な」などの用語と交換することができる。ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の「活性」への言及は、一般に、これだけに限定することなく、例えば細胞内、組織内、器官内または生物体内でのその生化学的活性、酵素活性、シグナル伝達活性、相互作用活性、リガンド活性、および/または構造的活性の任意の1つまたは複数の側面などの、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の生物活性の任意の1つまたは複数の側面を包含し得る。

40

【 0 0 6 7 】

機能的に活性な断片または変異体は、対応するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質と比較して、意図された生物活性または機能性の少なくとも約20%、例えば、少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、例えば、少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、例えば、少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%またはさらには約100%を保持

50

し得ることが好ましい。ある特定の実施形態では、機能的に活性な断片または変異体は、さらには、対応するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質と比較して高い生物活性または機能性を示し得る、例えば、対応するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質と比較して、意図された生物活性または機能性の少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約300%、または少なくとも約400%、または少なくとも約500%を示し得る。一例として、所与のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の活性を、定量的アウトプットを伴うアッセイ、例えば、数量化できるシグナルが生じる酵素的アッセイまたはシグナル伝達アッセイまたは結合アッセイにおいて容易に測定することができる場合、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の機能的に活性な断片または変異体は、対応するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質によって生じるシグナルの少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約300%、または少なくとも約400%、または少なくとも約500%であるシグナルを生じ得る。

10

【0068】

一例として、限定することなく、GPR124、RECK、FZDまたはLRPポリペプチドまたはタンパク質の生物活性のある断片または変異体は、それぞれ対応するネイティブなまたは野生型GPR124、RECK、FZDまたはLRPポリペプチドまたはタンパク質の生物活性の1つまたは複数の側面を少なくとも部分的に保持する。例えば、GPR124、RECK、FZDまたはLRPポリペプチドまたはタンパク質の生物活性への言及は、特に、GPR124/RECK/FZD/LRP複合体に關与する能力、例えば、前記複合体の1つもしくは複数の他の成分に結合する能力、および/またはGPR124/RECK/FZD/LRP複合体の一部としてWntシグナル伝達を媒介する能力を示し得る。

20

【0069】

したがって、本明細書では、具体的には、GPR124/RECK/FZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない作用物質であり、GPR124、RECK、FZDまたはLRPのうちの1つもしくは複数または好ましくは全てが、ネイティブなまたは野生型GPR124、RECK、FZDまたはLRPである、作用物質を開示する。

30

【0070】

本明細書では、さらに、具体的には、GPR124/RECK/FZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない作用物質であり、GPR124、RECK、FZDまたはLRPのうちの1つもしくは複数または好ましくは全てが、ネイティブなまたは野生型ヒトGPR124、RECK、FZDまたはLRPである、作用物質を開示する。

40

【0071】

本明細書では、さらに、具体的には、GPR124/RECK/FZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない作用物質であり、GPR124、RECK、FZDまたはLRPのうちの1つもしくは複数または好ましくは全てが、本明細書の他の箇所に記載のGenbankまたはUniProtエントリーの下に注釈が付けられているネイティブなまたは野生型ヒトGPR124、RECK、FZDまたはLRPである、作用物質を開示する。GenbankまたはUniProtエントリーで前駆体ポリペプチドまたはタンパク質の配列が提示されてい

50

る場合には、対応する成熟形態がGPR124/RECK/FZD/LRP複合体に関与することが予測されることを読者には再認識されたい。

【0072】

本明細書では、さらに、具体的には、GPR124/RECK/FZD1/LRP5またはLRP6媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFZD5/LRP5またはLRP6媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない作用物質であり、GPR124、RECK、FZD1、FZD5、LRP5またはLRP6のうちの1つもしくは複数または好ましくは全てが、本明細書の他の箇所に記載のGenbankまたはUniProtエントリーの下に注釈が付けられているネイティブなまたは野生型ヒトGPR124、RECK、FZD1、FZD5、LRP5またはLRP6である、作用物質を開示する。

10

【0073】

本明細書では、さらに、具体的には、GPR124/RECK/FZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない作用物質であり、GPR124、RECK、FZDまたはLRPのうちの1つまたは複数、ネイティブなまたは野生型GPR124、RECK、FZDまたはLRPの生物活性のある断片または変異体である、作用物質を開示する。

【0074】

本明細書では、さらに、具体的には、GPR124/RECK/FZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFZD/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない作用物質であり、GPR124、RECK、FZDまたはLRPのうちの1つまたは複数、ネイティブなまたは野生型ヒトGPR124、RECK、FZDまたはLRPの生物活性のある断片または変異体である、作用物質を開示する。

20

【0075】

「複合体」、「タンパク質複合体」または「ポリペプチド複合体」という用語は、当技術分野において十分に理解されている。さらなる手引きとして、またこれだけに限定することなく、これらの用語は、広範には、2つ以上のタンパク質またはポリペプチドを含むクラスターを示す。クラスターは、非共有結合、より詳細には非共有結合性タンパク質間相互作用によって安定化し得、その場合、クラスター内に存在するポリペプチドの全てまたは一部のみが物理的に相互作用する。タンパク質複合体は、完全にペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質で構成される場合もあり、例えば炭水化物、脂質、糖脂質、核酸、オリゴヌクレオチド、核タンパク質、ヌクレオシド、ヌクレオシドリソ酸、酵素の補因子、ポルフィリン、金属イオンなどの他の分子または巨大分子を含む場合もある。これらの用語は、これだけに限定することなく、絶対的(obligate)または非絶対的(non-obligate)、一時的(transient)または永続的(permanent)であり、および/またはホモ多量体またはヘテロ多量体であり得るタンパク質複合体を包含する。これらの用語は、これだけに限定することなく、細胞膜(原形質膜)、細胞外、細胞質内、細胞小器官内、または細胞小器官の膜に位置し得るタンパク質複合体を包含する。細胞膜に位置する複合体は、一般には、膜係留または膜貫通タンパク質を少なくとも1つ含有する。これらの用語は、膜マイクロドメインおよび所与のシグナル伝達経路を区分する「シグナロソーム」として公知の膜結合型高分子細胞小器官様構造も包含する。そのような高次タンパク質複合体は、細胞内足場によって少なくとも部分的に安定化され得る。したがって、これらの用語は、例えば、前記タンパク質またはポリペプチドによって媒介される前記部位における細胞膜を通じたシグナルトランスダクションを可能にするために、ある特定のタンパク質またはポリペプチドが細胞膜の所与の部位に局所的に濃縮されているまたは蓄積している状況も指す。

30

40

【0076】

GPR124/RECK/FZD/LRP受容体複合体とは、広範には、少なくとも1

50

つのGPR124ポリペプチド、少なくとも1つのRECKポリペプチド、少なくとも1つのFZDポリペプチドおよび少なくとも1つのLRPポリペプチドを含むタンパク質複合体、特に、膜結合タンパク質複合体、より詳細には、原形質膜結合タンパク質複合体を示す。GPR124/RECK/FZD/LRP受容体複合体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の下流のメンバー（例えば、ディシェベルド（Dvl））を含有する細胞の原形質膜に位置する場合、前記細胞におけるWnt/ β -カテニンシグナル伝達を、細胞外からもたらされたWnt7リガンドに応答して活性化することができる。

【0077】

FZD/LRP受容体複合体とは、広範には、少なくとも1つのFZDポリペプチドおよび少なくとも1つのLRPポリペプチドを含むタンパク質複合体、特に、膜結合タンパク質複合体、より詳細には、原形質膜結合タンパク質複合体を示す。FZD/LRP受容体複合体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の下流のメンバー（例えば、Dvl）を含有する細胞の原形質膜に位置する場合、前記細胞におけるWnt/ β -カテニンシグナル伝達を、細胞外からもたらされた、これだけに限定されないがWnt7リガンドなどのWntリガンドに応答して活性化することができる。

10

【0078】

「Wntシグナル伝達」という用語は、本明細書で使用される場合、生物活性のあるWntリガンドが細胞に対する効果を発揮して前記細胞の活性および/または作用をモジュレートする機構を指す。生物活性のあるWntリガンドは、FZD/LRP受容体複合体などのWnt受容体（複数可）に結合することによって細胞活性および/または作用をモジュレートする。Wntリガンドが結合することによって活性化されたら、Wnt受容体（複数可）により1つまたは複数の細胞内シグナル伝達経路が活性化される。3つのWntシグナル伝達経路が古典的に認識されている：標準的（すなわち、転写コアクチベーターとしての β -カテニン活性化によって媒介される）Wnt経路、非標準的平面内細胞極性経路、および非標準的Wnt/カルシウム経路。3つの経路は全て、一般には、WntリガンドがFZD受容体に結合することによって活性化される。しかし、標準的（または β -カテニン依存性）Wntシグナル伝達の誘導のためにはLRP受容体の動員が前提条件であると思われる。当技術分野で公知の通り、Wnt/FZD/LRP複合体の非存在下では（「不活性標準的Wntシグナル伝達」）、 β -カテニンが細胞質においてカゼインキナーゼおよびグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3（GSK-3）によってリン酸化される。これらのキナーゼと β -カテニンの相互作用は、足場タンパク質であるアキシン（Axin）および大腸腺腫症（APC）タンパク質によって容易になる。まとめると、これらのタンパク質は、リン酸化 β -カテニンがベータ-トランスデュースインリピート含有タンパク質（ β -TrCP）によって認識され、ユビキチン化の標的になり、プロテアソームによって分解されることを可能にする「分解複合体」を形成する。活性な標準的（またはベータカテニン依存性）Wntシグナル伝達には、細胞表面におけるFZDとLRPの受容体複合体へのWntリガンドの結合が伴う。シグナル伝達の間、FZDとLRPが、Wntタンパク質の結合によりこの2つの受容体の二量体化が導かれるように協同する。この二量体化によりFZD受容体とLRP受容体のコンフォメーションの変化が導かれることが理論づけられる。結果として、LRPの細胞質尾部が足場タンパク質であるアキシンをリン酸化依存的に動員し、それに結合し、それにより、DVL、アキシン、およびGSK3が関与する複合体の形成が導かれる。受容体と結合したDVLおよびアキシン分子の多量体により、LRP-FZD二量体の形成が支持され得る。GSKが細胞膜に動員された結果として、 β -カテニンリン酸化が阻害され、 β -カテニンが分解複合体から放出され、 β -カテニンが細胞質に蓄積することが可能になる。細胞質への β -カテニンの蓄積により、 β -カテニンが核に進入することおよびTCF/LEF転写因子と相互作用することが可能になる。

20

30

40

【0079】

本発明者らは、Wnt7がReckに特異的にFZD非依存的に結合し、RECK結合パートナーであるGPR124により、RECKと結合したWnt7とFZD/LRP複

50

合体が細胞内DVL足場を介して架橋し、それにより、Wnt7リガンド特異的RECK/GPR124/FZD/LRPシグナルソームがアセンブリーされ、標準的Wntシグナル伝達が活性化されるWnt7特異的RECK/GPR124/Frizzled/LRP媒介性シグナル伝達を同定した。

【0080】

上記を考慮して、一般にはFZDおよびLRPポリペプチドによって媒介されるWntシグナル伝達の場合と同様に、FZD/LRP複合体は、細胞膜において、前記FZD/LRP複合体を通じてWntシグナル伝達を活性化することができる細胞外作用物質の非存在下でまたはそれとは独立しては形成されない可能性があることが当業者には理解されよう。言い換えれば、作用物質は、例えば作用物質とFZDおよびLRPのそれぞれとのタンパク質間相互作用によるものなどの、FZDポリペプチドとLRPポリペプチドのFZD/LRP複合体へのアセンブリーまたは編成において積極的な役割を果たし得る。この結果、FZD/LRP複合体が形成され、複合体によって媒介されるWntシグナル伝達が活性化される。

10

【0081】

同様に、GPR124/RECK/FZD/LRP受容体複合体は、細胞膜において、前記GPR124/RECK/FZD/LRP複合体を通じてWntシグナル伝達を活性化することができる細胞外作用物質の非存在下でまたはそれとは独立しては形成されない可能性がある。言い換えれば、作用物質は、例えば作用物質と前記GPR124、RECK、FZDおよびLRPのうち2つ以上のそれぞれとのタンパク質間相互作用によるものなどの、GPR124、RECK、FZDおよびLRPポリペプチドのうち2つ以上のGPR124/RECK/FZD/LRP複合体へのアセンブリーまたは編成において積極的な役割を果たし得る。この結果、GPR124/RECK/FZD/LRP複合体が形成され、複合体によって媒介されるWntシグナル伝達が活性化される。

20

【0082】

したがって、「Gpr124/Reck/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質」という句は、作用物質がGpr124、Reck、FrizzledおよびLRPポリペプチドを通じてWntシグナル伝達を誘導することができることを指す。「Gpr124/Reck/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質」という句は、必ずしもGpr124、Reck、FrizzledおよびLRPを発現する細胞に作用物質を接触させる前にGpr124/Reck/Frizzled/LRP受容体複合体が存在することを意味するものではない。例えば、これだけに限定することなく、作用物質は、Gpr124/Reck/Frizzled/LRPシグナル伝達複合体の形成またはアセンブリーに寄与するまたはそれを容易にし、したがって、前記複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化し得る。同様に、「Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質」という句は、作用物質がFrizzledおよびLRPポリペプチドを通じてWntシグナル伝達を誘導することができることを指す。「Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質」という句は、必ずしもFrizzledおよびLRPを発現する細胞にそのような作用物質を接触させる前にFrizzled/LRP受容体複合体が存在することを意味するものではない。例えば、これだけに限定することなく、そのような作用物質は、Frizzled/LRPシグナル伝達複合体の形成またはアセンブリーを寄与するまたはそれを容易にし、したがって、前記複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化し得る。「前記作用物は、Reckおよび/またはGpr124の非存在下ではFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化しない」という句は、必ずしも、FrizzledおよびLRPを発現するが、Reckおよび/またはGpr124は発現しない細胞においてFrizzled/LRP受容体複合体が存在することを意味するものではない。例えば、これだけに限定することなく、作用物質は、そのような細胞におけるFrizzled/LRPシグナル伝達複合体の形成またはアセンブリーに寄与でき

30

40

50

ないまたはそれを容易にすることができず、したがって、前記複合体によって媒介される Wnt シグナル伝達を活性化することができない可能性がある。

【0083】

さらに、本明細書において想定される GPR124 / RECK / FZD / LRP 受容体複合体は、複合体を機能的にモジュレートする場合もあるが必ずしもそうではないさらなる成分（複数可）を含み得ることが当業者には理解されよう。例えば、複合体は、GPR124 と Frizzled を架橋させることができる細胞内足場を形成するディシェベルド（Dvl）を含み得る。

【0084】

特定の実施形態では、原形質膜において GPR124、RECK、FZD および LRP ポリペプチドを発現し、Wnt / - カテニンシグナル伝達経路の下流のメンバーを含有する細胞は、細胞表面において GPR124、RECK、FZD および LRP ポリペプチドの全てを天然に発現する細胞、例えば、大脳内皮細胞などである。さらなる実施形態では、原形質膜に GPR124、RECK、FZD および LRP ポリペプチドを発現し、Wnt / - カテニンシグナル伝達経路の下流のメンバーを含有する細胞は、表面において GPR124、RECK、FZD および LRP ポリペプチドの全てを発現するように改変された（例えば、遺伝子操作された）細胞である。例えば、細胞は、FZD および LRP を天然に発現するが GPR124 および RECK は天然に発現せず、GPR124 および RECK ポリペプチドを発現するように遺伝子操作された（例えば、前記 GPR124 および RECK ポリペプチドをコードする発現可能な核酸（複数可）が安定にまたは一過性にトランスフェクトされた）培養細胞であり得る。細胞は哺乳動物細胞であることが好ましく、ヒト細胞であることがより好ましい。

【0085】

特定の実施形態では、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を活性化するが RECK および / または GPR124 の非存在下での Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達は活性化しないという作用物質の能力は、標準的 Wnt シグナル伝達を RECK および GPR124 の存在下では活性化するが、RECK および / または GPR124 の非存在下では活性化しないという作用物質の能力を示す。

【0086】

「RECK および GPR124 の存在」という句は、RECK および GPR124 ポリペプチドが細胞膜またはその近くに、好ましくは Frizzled および LRP ポリペプチドと互いに近接して存在することを指す。互いに近接していることにより、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 受容体複合体の形成が、例えば本明細書において教示される作用物質が細胞に外部から供給される場合など、それに貢献する条件下で容易になり得る。他方では、「RECK および / または GPR124 の非存在」という句は、細胞膜において RECK および / または GPR124 ポリペプチドを欠くまたはそれが存在しないことを指す。細胞膜またはその近くにおける RECK および / または GPR124 の非存在は、細胞が RECK および / または GPR124 を発現しない、翻訳しない、または正確に移動させない場合に起こり得る。RECK および / または GPR124 の非存在は、必ずしも細胞膜における RECK および / または GPR124 ポリペプチドの完全な非存在を示すものではなく、例えば、例えば免疫プロテオミクス、免疫細胞化学または免疫蛍光法などの当業者に公知の従来のタンパク質検出または数量化アッセイによって検出可能でない、またはその感度範囲を下回る量の RECK および / または GPR124 ポリペプチドを指す場合もある。

【0087】

特定の実施形態では、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を活性化するが RECK および / または GPR124 の非存在下での Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達は活性化しないという作用物質の能力は、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 受容体複合体による Wnt シグナ

10

20

30

40

50

ル伝達を媒介することができる細胞ではWntシグナル伝達を活性化するが、GPR124および/またはRECKを発現しないFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を行うことができる細胞ではWntシグナル伝達を活性化しないという作用物質の能力を示す。

【0088】

GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によるWntシグナル伝達を媒介することができる細胞は、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達に必要とされる細胞成分の全てを天然に発現する細胞、例えば、大脳内皮細胞または細胞株などであり得る。GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によるWntシグナル伝達を媒介することができる細胞は、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達に必要とされる細胞成分のいずれも天然に発現しないまたはその全てを天然に発現するのではない細胞であってもよく、それらを、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達に必要とされるが欠如している細胞成分を補償するために改変すること、例えば、遺伝子操作することができる。そのような改変は当技術分野で公知であり、本明細書の他の箇所に記載されている。

10

【0089】

GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によるWntシグナル伝達を媒介することができる細胞は、脊椎動物細胞または細胞株であり得る。非限定的な例としては、ヒト胎児由来腎臓293T(HEK293T)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMVEC)、ヒト冠状動脈内皮細胞(HCAEC)、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)、ヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC)、Bend3細胞、Bend5細胞、またはhCMC/D3細胞が挙げられる。HEK293T細胞は、これだけに限定することなく、ATCC受託番号CRL-3216のHEK293Tを含め、例えばAmerican Type Culture Collection(ATCC)(10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209, USA)によって維持されている公共の収集物から入手することができる。

20

【0090】

特定の実施形態では、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するがRECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しないという作用物質の能力は、GPR124、RECK、FZおよびLRPを発現する細胞ではWntシグナル伝達を活性化するが、FZおよびLRPを発現するがGPR124および/またはRECKは発現しない細胞ではWntシグナル伝達を活性化しないという作用物質の能力を示し、ここで、GPR124、RECK、FZおよびLRPを発現する細胞とFZおよびLRPを発現するがGPR124および/またはRECKは発現しない細胞は、他の点では実質的に同一である。

30

【0091】

特定の実施形態では、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するがRECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しないという作用物質の能力は、マウスまたはヒト脳血管内皮細胞または細胞株ではWntシグナル伝達を活性化するが、RECKおよび/またはGPR124遺伝子がノックアウトされたマウスまたはヒト脳血管内皮細胞または細胞株ではWntシグナル伝達を活性化しないという作用物質の能力を示す。Wntシグナル伝達の活性化の決定に関しては当技術分野で公知であり、明細書の他の箇所に記載の通り実施することができる。適切な内皮細胞としては、例えば、ヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC)、Bend3細胞、Bend5細胞またはhCMC/D3細胞が挙げられる。HBMECは、これだけに限定することなく、ATCC受託番号CRL-3245のHBEC-5iを含め、例えばATCCによって維持されている公

40

50

共の収集物から入手することができる。Bend3細胞は、これだけに限定することなく、ATCC受託番号CRL-2299のBend.3を含め、例えばATCCによって維持されている公共の収集物から入手することができる。

【0092】

特定の実施形態では、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するがRECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しないという作用物質の能力は、Wnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュ(ゼブラフィッシュ(Danio rerio))の内皮において遺伝子導入により発現させた場合には前記ゼブラフィッシュにおける脳脈管構造および/または血液脳関門を回復させるが、野生型ゼブラフィッシュの胚に作用物質をコードするmRNAを微量注射すること、好ましくは当該mRNAを1pg~100pgの用量で注射することにより後方化(posteriorization)表現型は誘導されない、または野生型アフリカツメガエル胚に作用物質をコードするmRNAを微量注射することにより軸重複は誘導されないという作用物質の能力を示す。

10

【0093】

Wnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュの内皮において遺伝子導入により発現させた場合には前記ゼブラフィッシュにおける脳脈管構造および/または血液脳関門を回復させるという作用物質の能力は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる。例えば、脳脈管構造および/または血液脳関門の回復は、後脳中心動脈(CtA)の量、凝集した大脳毛細血管の長さ、平均血管サイズおよび/または平均毛細血管枝を決定することによって評価することができる。本明細書において教示される作用物質を遺伝子導入により発現しているWnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュの脳領域におけるGLUT1の発現の決定(例えば、insituハイブリダイゼーションまたは免疫組織化学的検査を使用した)を使用して、前記ゼブラフィッシュの脳脈管構造を可視化することができる。その後、本明細書において教示される作用物質を遺伝子導入により発現しているWnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュの脳領域におけるGLUT1発現パターンを野生型ゼブラフィッシュなどの対照の脳領域におけるGLUT1発現パターンと比較することができる。

20

【0094】

特定の実施形態では、本明細書において教示される作用物質を遺伝子導入により発現しているWnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュの脳脈管構造および血液脳関門は、本明細書において教示される作用物質を遺伝子導入により発現しているWnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュにおける後脳CtAの量が、野生型ゼブラフィッシュにおける後脳CtAの量の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である場合、回復したとみなされる。

30

【0095】

Wnt7a^{-/-}ゼブラフィッシュを生成し、作用物質をゼブラフィッシュの内皮において遺伝子導入により発現させる方法は当技術分野で周知であり、例えば、Shankaran et al., CRISPR/Cas9-directed gene editing for the generation of loss-of-function mutants in high-throughput zebrafish F0 screens, Curr Protoc Mol Biol., 119: 31.9.1-31.9.22 (2017)に記載のものなどのCRISPR/Cas指向型遺伝子編集を使用する。

40

【0096】

ゼブラフィッシュの胚、好ましくは1~4細胞期のゼブラフィッシュの胚へのmRNAの微量注射、ならびにゼブラフィッシュにおける表現型の出現または非存在の評価は当技術分野で周知であり、例えば、Rosen et al., Microinjection of zebrafish embryos to analyse gene function, J Vis Exp. (25): 1115 (2009)を参照されたい。ゼブラフィッシュにおける後方化表現型は、ゼブラフィッシュにおける原腸形成の間の前神経外胚葉の後方化、前脳の喪失および眼構造の喪失を含む(van de Water et al., Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. D

50

velopment. 128 (20): 3877-3888 (2001))。

【0097】

アフリカツメガエル胚に作用物質を注射した際の軸重複の出現または非存在の評価は当該技術分野において周知であり、例えば、Kuehl et al., Dorsal axis duplication as a functional readout for Wnt activity. *Methods Mol Biol.* 469: 467-476 (2008) を参照されたい。

【0098】

本明細書で使用される場合、「作用物質」という用語は、広範には、任意の化学的（例えば、無機もしくは有機）、生化学的または生物学的物質、分子または巨大分子（例えば、生物学的巨大分子）、それらの組合せまたは混合物、組成が決定されていない試料、または、細菌、真菌、植物、または動物細胞または組織などの生物材料から作製される抽出物を指す。好ましいが非限定的な「作用物質」としては、核酸、オリゴヌクレオチド、リボザイム、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド模倣体、抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、アプタマー、光アプタマー（photoaptamer）、シュピーゲルマー（spiegelmer）、化学物質、好ましくは有機分子、より好ましくは小有機分子、脂質、炭水化物、多糖など、およびこれらの任意の組合せが挙げられる。文脈に応じて、「作用物質」という用語は、疾患の治療、治療法、予防、または診断に有用であるまたは使用される「治療剤」または「薬物」を示し得る。

10

【0099】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、化学物質、抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、タンパク質またはポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣体、アプタマー、光アプタマー、シュピーゲルマーおよび核酸からなる群を含むかまたはそれから選択され、前記作用物質は、タンパク質またはポリペプチドを含むことが好ましい。

20

【0100】

本明細書に開示される作用物質は、化学物質、抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、タンパク質またはポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣体、アプタマー、光アプタマー、シュピーゲルマーおよび核酸の2つ以上の組合せを含み得る。例えば、本明細書に開示される作用物質は、1つまたは複数のポリペプチド領域と1つまたは複数の非ポリペプチド領域の組合せを含み得る。

【0101】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドからなる群を含むかまたはそれから選択される。

30

【0102】

本明細書で使用される場合、「化学物質」という用語は、その最も広範な意味で使用され、一般に、一定の化学組成および特徴的な性質を有する任意の実質的に純粋な物質を指す。化学物質は、有機分子、好ましくは小有機分子であり得る。「小分子」という用語は、医薬品に一般に使用される有機分子と同等のサイズを有する化合物、好ましくは有機化合物を指す。この用語は、生物学的巨大分子（例えば、タンパク質、ペプチド、核酸など）は除外する。好ましい小有機分子のサイズは、最大約5000 Da、例えば、最大約4000、好ましくは最大3000 Da、より好ましくは最大2000 Da、なおより好ましくは最大約1000 Da、例えば、最大約900、800、700、600または最大約500 Daにわたる。

40

【0103】

「抗体」という用語は、本明細書では、その最も広範な意味で使用され、一般に、これだけに限定することなく、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、組換え抗体、トランスジェニック抗体、移植抗体および単鎖抗体などを含めた全抗体、または目的の抗原に選択的に結合する1つまたは複数のドメインを含有する任意の融合タンパク質、コンジュゲート、断片、またはその誘導体などの任意の免疫学的結合性物質を指す。したがって、抗体という用語は、免疫グロブリン分子全体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、またはこれらのいずれかの免疫学的に有効な断片を含む。したがって、この用

50

語は、具体的には、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多価（例えば、2価、3価、もしくはより多価）および/または多重特異性抗体（例えば、二特異性またはより高次特異性抗体）、ならびに、所望の生物活性（特に、目的の抗原に特異的に結合する能力）を示す限りは抗体断片、ならびにそのような断片の多価および/または多重特異性複合物を包含する。「抗体」という用語は、免疫化を含む方法によって生成される抗体を含むだけでなく、任意のポリペプチド、例えば、目的の抗原のエピトープに特異的に結合することができる少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を包含するように作出された、組換えによって発現されたポリペプチドも含む。したがって、この用語は、インビトロで作製されたものであるか、細胞培養物で作製されたものであるか、またはインビボで作製されたものであるかに関わらず、そのような分子に適用される。

10

【0104】

「免疫グロブリン配列」という用語は、本明細書において重鎖抗体を指すために使用されているか従来の4本鎖抗体を指すために使用されているかにかかわらず、一般用語として使用され、フルサイズ抗体、その個々の鎖、ならびにその全ての部分、ドメインまたは断片（これだけに限定されないが、それぞれVHHドメインまたはVH/VLドメインなどの抗原結合性ドメインまたは断片を含む）のいずれも含む。さらに、「配列」という用語は、本明細書で使用される場合（例えば、「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「VHH配列」または「タンパク質配列」などの用語として）、一般に、文脈から限定された解釈が必要な場合を除き、関連性のあるアミノ酸配列ならびにそれをコードする核酸配列またはヌクレオチド配列のどちらも含むと理解されるべきである。

20

【0105】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のポリペプチド決定因子を含む。エピトープ決定因子は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面群分けを含み得、特定の三次元構造的特徴、および/または特定の電荷特徴を有し得る。エピトープは、抗体が結合する抗原の領域である。抗体は、タンパク質および/または巨大分子の複合混合物中のその標的抗原を優先的に認識する場合、抗原に特異的に結合するといえる。

30

【0106】

「結合性領域」、「結合性部位」または「相互作用部位」という用語は、本明細書では、目的の抗原への結合に関与するアミノ酸残基の特定の部位、部分、ドメインまたはひと続きという意味を有するものとする。そのような結合性領域は、本明細書に記載の抗体の特定のアミノ酸残基から基本的になり、その残基が標的分子と接触する。

【0107】

「特異性」という用語は、特定の抗原結合性分子または抗原結合性タンパク質分子（例えば、抗体分子など）が結合することができる異なる型の抗原または抗原性決定因子の数を指す。抗原結合性タンパク質の特異性は、親和性および/または結合活性に基づいて決定することができる。抗原と抗原結合性タンパク質の解離の平衡定数（KD）によって表される親和性は、抗原性決定因子と抗原結合性タンパク質の抗原結合性部位の間の結合強度についての評価基準である：KDの値が小さいほど、抗原性決定因子と抗原結合性分子の間の結合強度が強力である（あるいは、親和性は、 $1/KD$ である親和定数（KA）として表すこともできる）。当業者には明らかになる通り、親和性は、特定の目的の抗原に応じて、それ自体が公知の様式で決定することができる。結合活性は、抗原結合性分子（例えば、抗体など）と関係する抗原の結合の強度の評価基準である。結合活性は、抗原性決定因子と抗原結合性分子の抗原結合性部位の親和性および抗原結合性分子に存在する関係する結合性部位の数の両方に関連する。一般には、抗原結合性タンパク質（例えば、抗体など）は、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ モル/リットル（M）以下、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ モル/リットル（M）以下、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ モル/リットルの解離定数（KD）、および/または少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも 10^8

40

50

M^{-1} 、より好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、例えば、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ などの会合定数 (KA) で結合する。 $10^{-4} M$ よりも大きな KD 値はいずれも、一般に、非特異的結合を示すとみなされる。抗体は、所望の抗原に、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満、例えば、500 pM 未満などの KD で結合することが好ましい。抗原結合性タンパク質の抗原または抗原性決定因子への特異的結合は、例えば、スクヤッチャード解析および/または競合結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ (EIA) およびサンドイッチ競合アッセイなど、ならびに当技術分野においてそれ自体が公知のそれらの種々の変形を含めた、それ自体が公知の任意の適切な様式で決定することができる。

【0108】

天然に存在する全長抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続した2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖で構成される免疫グロブリン分子である。各鎖のアミノ末端部分は約100~110アミノ酸の可変領域を含み、この領域は、この領域に含有される相補性決定領域(CDR)を介した抗原認識に主に関与する。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を規定する。

【0109】

CDRの間には、より保存された、フレームワーク領域(FR)と称される領域が散在する。各軽鎖可変領域(LCVR)および重鎖可変領域(HCVR)は3つのCDRおよび4つのFRで構成され、これらはアミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。軽鎖の3つのCDRは「LCDR1、LCDR2、およびLCDR3」と称され、重鎖の3つのCDRは「HCDR1、HCDR2、およびHCDR3」と称される。CDRは、抗原との特異的な相互作用を形成する残基の大部分を含有する。LCVR領域およびHCVR領域内のCDRアミノ酸残基の番号付けおよび位置決めは、周知のKabat番号付け慣習に従い、これは、抗体の重鎖領域および軽鎖領域内の他のアミノ酸残基よりも可変性が大きい(すなわち、超可変)アミノ酸残基を番号付ける方式を指す(Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93(1971); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991))。抗体の可変領域内のCDRの位置決めは、Kabat番号付けまたは単に「Kabat」に従う。

【0110】

軽鎖は、カッパまたはラムダに分類され、当技術分野で公知の特定の定常領域によって特徴付けられる。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、それにより抗体のアイソタイプがそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD、またはIgEと定義される。IgG抗体は、サブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4にさらに分けることができる。各重鎖型は、当技術分野で周知の配列を有する特定の定常領域によって特徴付けられる。

【0111】

ある特定の実施形態では、抗体は、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMクラスの内いずれかのものであり得、IgGクラス抗体であることが好ましい。

【0112】

ある特定の実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、抗血清またはそれから精製された(例えば、親和性精製された)免疫グロブリンであり得る。

【0113】

他の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体の混合物であり得る。モノクローナル抗体は、特定の抗原または抗原内の特定のエピトープをより大きな選択性および再現性で標的とし得る。

【0114】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、例えば、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含めた単一のコピーまた

10

20

30

40

50

はクローンに由来する抗体を指し、それが作製される方法を指すものではない。モノクローナル抗体は、均一または実質的に均一な集団内に存在することが好ましい。本発明のモノクローナル抗体およびその抗原結合性断片は、例えば、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術、例えば、CDR移植、またはそのような技術の組合せ、または当技術分野で公知の他の技術によって作製することができる。

【0115】

例として、限定するものではなく、モノクローナル抗体は、Kohler et al. 1975 (Nature 256: 495)に最初に記載されたハイブリドーマ法によって作出することもでき、組換えDNA法（例えば、US 4,816,567におけるものと同様に）によって作出することもできる。モノクローナル抗体はまた、Clackson et al. 1991 (Nature 352: 624-628)およびMarks et al. 1991 (J Mol Biol 222: 581-597)に記載されている技法を使用したファージ抗体ライブラリーを使用して作出することもできる。

【0116】

これらの後者の技法は、とりわけ、US 5,837,500、US 5,571,698、US 5,223,409、US 7,118,879、US 7,208,293およびUS 7,413,537に記載されているファージディスプレイ技術に基づくものである。簡単に述べると、治療薬候補分子、例えば、ヒト抗体断片（例えば、Fab）、ペプチド、および低分子タンパク質をバクテリオファージ（またはファージ）と称される小さな細菌ウイルスの表面にディスプレイさせる。ディスプレイされた分子の収集物はライブラリーとして公知である。ファージディスプレイにより、これらのライブラリーを検索して、目的の標的、例えば、治療標的に、好ましくは高い特異性および/または親和性で結合する分子を同定することが可能になる。ファージ抗体ライブラリーの非限定的な例としては、HuCAL（登録商標）（Human Combinatorial Antibody Library、Morphosys）、Ylanthia（登録商標）（Morphosys）、WO 2000 70023に記載のヒトFab断片ライブラリー、およびWO 1996 040878に記載のマカク抗体ライブラリーが挙げられる。Human Combinatorial Antibody Library（Morphosys）は、WO 1997 08320に記載されている通り、ヒトゲノムにおいてコードされる抗体の構造レパートリーを網羅する合成コンセンサス配列を使用して調製されたものである。

【0117】

「抗体断片」または「抗原結合性部分」という用語は、全長抗体の一部または領域、一般に、その抗原結合性または可変ドメインを含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab)2、Fv、scFv断片、V_Hドメイン、V_LドメインおよびV_HHドメインなどの単ドメイン(sd)Fv、ダイボディ(diabody)、直鎖状抗体、単鎖抗体分子、特に、重鎖抗体；ならびに抗体断片（複数可）から形成される多価および/または多重特異性抗体、例えば、ダイボディ(dibody)、トリボディ(tribody)、およびマルチボディ(multibody)が挙げられる。上記のFab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFvなどの名称は、それらの技術分野で確立された意味を有するものとする。

【0118】

「抗原結合性部分」または「抗原結合性領域」という用語は、抗体の、抗原に特異的に結合する能力を保持する1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合性機能は全長抗体の断片によって果たされ得ることが示されている。これらはまた、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する二特異性、二重特異性、または多重特異性フォーマットであり得る。抗体の「抗原結合性部分」という用語に包含される結合性断片の例としては、(i) V_Lドメイン、V_Hドメイン、C_LドメインおよびC_HIドメインからなる一価の断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結した2つのFab断片で構成される二価の断片であるF(ab')2断片；(iii) V_HドメインおよびC_HIドメインで構成されるFd断片；(iv) 抗体の単一の腕のV_LドメインおよびV_HドメインからなるFv断片、(v) 単一の可変ドメインを含むdAb断片(Ward et al

10

20

30

40

50

., Nature, 341: 544-546(1989); PCT公開第WO90/05144号); ならびに (vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子にコードされるが、これらを、組換え方法を使用し、VL領域とVH領域が対合して一価の分子を形成した単一のタンパク質鎖(単鎖Fv(scFv)として公知)として作出することを可能にする合成リンカーによって接合することができる(Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 5879-5883 (1988))。そのような単鎖抗体も抗体の「抗原結合性部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの単鎖抗体の他の形態も包含される。

【0119】

ダイアボディは、VHドメインおよびVLドメインを単一のポリペプチド鎖上に発現させるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成が可能になるには短すぎるリンカーを使用し、それにより、ドメインを別の鎖の相補的なドメインと対合させ、2つの抗原結合性部位を創出させた二価の二特異性抗体である(Holliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6444-6448 (1993); Poljak, et al., Structure 2: 1121-1123 (1994))。そのような抗体結合性部分は当技術分野で公知である(Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5))。

【0120】

さらに、抗体またはその抗原結合性部分は、抗体または抗体部分と1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドの共有結合性または非共有結合性の結びつきによって形成される大きな免疫接着分子の一部であり得る。そのような免疫接着分子の例としては、ストレプトアビジンコア領域を使用して四量体scFv分子を作出すること(Kipriyanov, S. M., et al., Human Antibodies and Hybridomas, 6: 93-101 (1995))、およびシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグを使用して二価およびビオチン化scFv分子を作出すること(Kipriyanov, et al., Mol. Immunol., 31: 1047-1058 (1994))が挙げられる。FabおよびF(ab')₂断片などの抗体部分は、全抗体から、それぞれ全抗体のパパイン消化またはペプシン消化などの従来技法を使用して調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、標準の組換えDNA技法を使用して得ることができる。

【0121】

ある特定の実施形態では、抗体断片は、Nanobody(登録商標)であり得る。「Nanobody(登録商標)」および「Nanobodies(登録商標)」という用語は、Ablynx NV(Belgium)の商標である。「ナノボディ(Nanobody)」という用語は当技術分野で周知であり、本明細書で使用される場合、その最も広範な意味で、(1)天然に存在する重鎖抗体、好ましくはラクダ科の動物に由来する重鎖抗体のV_{HH}ドメインを単離することによって；(2)天然に存在するV_{HH}ドメインをコードするヌクレオチド配列を発現させることによって；(3)天然に存在するV_{HH}ドメインの「ヒト化」によって、もしくはそのようなヒト化V_{HH}ドメインをコードする核酸を発現させることによって；(4)任意の動物種由来、特に、ヒト由来などの哺乳動物種由来の天然に存在するV_Hドメインの「ラクダ化(camelization)」によって、もしくはそのようなラクダ化V_Hドメインをコードする核酸を発現させることによって；(5)当技術分野に記載されている「ドメイン抗体」または「dAb」の「ラクダ化」によって、もしくはそのようなラクダ化dAbをコードする核酸を発現させることによって；(6)それ自体が公知のタンパク質、ポリペプチドまたは他のアミノ酸配列を調製するための合成または半合成技法を使用することによって；(7)それ自体が公知の核酸合成技法を使用してナノボディをコードする核酸を調製し、その後、そうして得られた核酸を発現させることによって；および/または(8)前述の1つまたは複数の任意の組合せによって得られる免疫学的結合性物質を包含する。「ラクダ科の動物」は、本明細書で使用される場合、旧世界のラクダ科の動物(フタコブラクダ(Camelus bactrianus))

10

20

30

40

50

trianus) およびヒトコブラクダ (Camelus dromaderius))
 ならびに新世界のラクダ科の動物 (例えば、アルパカ (Lama paccos)、リヤ
 マ (Lama glama) およびビクーニャ (Lama vicugna)) を含む。

【0122】

ナノボディのアミノ酸配列および構造は、これだけに限定することなく、当技術分野お
 よび本明細書においてそれぞれ「フレームワーク領域1」または「FR1」；「フレーム
 ワーク領域2」または「FR2」；「フレームワーク領域3」または「FR3」；および
 「フレームワーク領域4」または「FR4」と称される4つのフレームワーク領域または
 「FR」で構成され、フレームワーク領域は、当技術分野においてそれぞれ「相補性決定
 領域1」または「CDR1」；「相補性決定領域2」または「CDR2」；「相補性決定
 領域3」または「CDR3」と称される3つの相補的決定領域または「CDR」によって
 遮られていると考えることができる。ナノボディのアミノ酸残基の総数は、110～12
 0、好ましくは112～115の領域内に入り得る。しかし、ナノボディの一部、断片、
 類似体または誘導体は、そのような一部、断片、類似体または誘導体が本明細書で概説し
 た別の要件を満たし、好ましくは本明細書に記載の目的に適切なものである限りは、長さ
 および/またはサイズに関しては特に限定されない。

【0123】

重鎖抗体およびその可変ドメインに関する一般的な記載については、とりわけ、一般的
 な背景技術として言及される以下の参考文献を参照されたい：Vrije Universiteit BrusselのWO94/04678、WO95/04079およびW
 O96/34103；UnileverのWO94/25591、WO99/37681
 20 WO00/40968、WO00/43507、WO00/65057、WO01/4
 0310、WO01/44301、EP1134231およびWO02/48193；V
 laams Instituut voor Biotechnologie (VIB)の
 WO97/49805、WO01/21817、WO03/035694、WO03/0
 54016およびWO03/055527；Algonomics N.V. および出願
 人のWO03/050531；National Research Council o
 f CanadaによるWO01/90190；Institute of Antibod
 iesによるWO03/025020 (=EP1 433 793)；ならびに出願人によるWO04/041867、WO04/041862、WO04/041865、WO
 04/041863、WO04/062551および出願人による別の公開特許出願；H
 30 mers-Casterman et al., Nature 1993 June 3; 363 (6428): 446-8；Davies and R
 ieichmann, FEBS Lett. 1994 Feb 21;339 (3): 285-90；Muyldermans et al., Prot
 ein Eng. 1994 Sep;7 (9): 1129-3；Davies and Riechmann, Biotechnology (NY)
 1995 May;13 (5): 475-9；Gharoudi et al., 9th Forum of Applied Biotechnolog
 y, Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 1995;60/4 a part I: 2097-2100；Davies an
 d Riechmann, Protein Eng. 1996 Jun;9 (6): 531-7；Desmyter et al., Nat Struct
 Biol. 1996 Sep;3 (9): 803-11；Sheriff et al., Nat Struct Biol. 1996 Sep;3 (9):
 733-6；Spinelli et al., Nat Struct Biol. 1996 Sep;3 (9): 752-7；Arbabi Ghahro
 40 udi et al., FEBS Lett. 1997 Sep 15; 414 (3): 521-6；Vu et al., Mol Immunol. 1
 997 Nov-Dec; 34 (16-17): 1121-31；Atarhouch et al., Journal of Camel Practi
 ce and Research 1997；4: 177-182；Nguyen et al., J. Mol. Biol. 1998 Jan 23;
 275 (3): 413-8；Lauwereys et al., EMBO J. 1998 Jul 1; 17 (13): 3512-20；Fre
 nken et al., Res Immunol. 1998 Jul-Aug;149 (6): 589-99；Transue et al., Prot
 eins 1998 Sep 1; 32 (4): 515-22；Muyldermans and Lauwereys, J. Mol. Recog
 nit. 1999 Mar-Apr;12 (2): 131-40；van der Linden et al., Biochim. Biophys. A
 cta 1999 Apr 12; 1431 (1): 37-46.；Decanniere et al., Structure Fold. Des. 19
 99 Apr 15; 7 (4): 361-70；Ngyuen et al., Mol. Immunol. 1999 Jun;36 (8): 515
 -24；Woolven et al., Immunogenetics 1999 Oct; 50 (1-2): 98-101；Riechmann
 and Muyldermans, J. Immunol. Methods 1999 Dec 10; 231 (1-2): 25-38；Spin 50

elli et al., *Biochemistry* 2000 Feb 15; 39 (6): 1217-22 ; Frenken et al., *J. Biotechnol.* 2000 Feb 28; 78 (1): 11-21 ; Nguyen et al., *EMBO J.* 2000 Mar 1; 19 (5): 921-30 ; van der Linden et al., *J. Immunol. Methods* 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-95 ; Decanniere et al., *J. Mol. Biol.* 2000 Jun 30; 300 (1): 83-91 ; van der Linden et al., *J. Biotechnol.* 2000 Jul 14; 80 (3): 261-70 ; Harmsen et al., *Mol. Immunol.* 2000 Aug;37 (10): 579-90 ; Perez et al., *Biochemistry* 2001 Jan 9; 40 (1): 74-83 ; Conrath et al., *J. Biol. Chem.* 2001 Mar 9; 276 (10): 7346-50 ; Muyltermans et al., *Trends Biochem Sci.* 2001 Apr; 26 (4): 230-5 ; Muyltermans S., *J. Biotechnol.* 2001 Jun;74 (4): 277-302 ; Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 2001 Jul 13; 276 (28): 26285-90 ; Spinelli et al., *J. Mol. Biol.* 2001 Aug 3; 311 (1): 123-9 ; Conrath et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Oct ;45 (10): 2807-12 ; Decanniere et al., *J. Mol. Biol.* 2001 Oct 26; 313 (3): 473-8 ; Nguyen et al., *Adv Immunol.* 2001; 79: 261-96 ; Muruganandam et al., *FASEB J.* 2002 Feb;16 (2): 240-2 ; Ewert et al., *Biochemistry* 2002 Mar 19; 41 (11): 3628-36 ; Dumoulin et al., *Protein Sci.* 2002 Mar;11 (3): 500-15 ; Cortez-Retamozo et al., *Int. J. Cancer.* 2002 Mar 20; 98 (3): 456-62 ; Su et al., *Mol. Biol. Evol.* 2002 Mar;19 (3): 205-15 ; van der Vaart JM., *Methods Mol Biol.* 2002; 178: 359-66 ; Vranken et al., *Biochemistry* 2002 Jul 9; 41 (27): 8570-9 ; Nguyen et al., *Immunogenetics* 2002 Apr;54 (1): 39-47 ; Renisio et al., *Proteins* 2002 Jun 1; 47 (4): 546-55 ; Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 2002 Jun 28; 277 (26): 23645-50 ; Ledebouer et al., *J. Dairy Sci.* 2002 Jun;85 (6): 1376-82 ; De Genst et al., *J. Biol. Chem.* 2002 Aug 16; 277 (33): 29897-907 ; Ferrat et al., *Biochem. J.* 2002 Sep 1;366 (Pt 2): 415-22 ; Thomassen et al., *Enzyme and Microbial Technol.* 2002; 30: 273-8 ; Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002 Dec;60 (4): 449-54 ; Jobling et al., *Nat Biotechnol.* 2003 Jan;21 (1): 77-80 ; Conrath et al., *Dev. Comp. Immunol.* 2003 Feb;27 (2): 87-103 ; Pleschberger et al., *Bioconjug. Chem.* 2003 Mar-Apr;14 (2): 440-8 ; Lah et al., *J. Biol. Chem.* 2003 Apr 18; 278 (16): 14101-11 ; Nguyen et al., *Immunology.* 2003 May;109 (1): 93-101 ; Joosten et al., *Microb. Cell Fact.* 2003 Jan 30;2 (1): 1 ; Li et al., *Proteins* 2003 Jul 1; 52 (1): 47-50 ; Loris et al., *Biol Chem.* 2003 Jul 25; 278 (30): 28252-7 ; van Koningsbruggen et al., *J. Immunol. Methods.* 2003 Aug; 279 (1-2): 149-61 ; Dumoulin et al., *Nature.* 2003 Aug 14; 424 (6950): 783-8 ; Bond et al., *J. Mol. Biol.* 2003 Sep 19; 332 (3): 643-55 ; Yau et al., *J. Immunol. Methods.* 2003 Oct 1; 281 (1-2): 161-75 ; Dekker et al., *J. Virol.* 2003 Nov;77 (22): 12132-9 ; Meddeb-Mouelhi et al., *Toxicon.* 2003 Dec;42 (7): 785-91 ; Verheesen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 2003 Dec 5; 1624 (1-3): 21-8 ; Zhang et al., *J Mol Biol.* 2004 Jan 2; 335 (1): 49-56 ; Stijlemans et al., *J Biol Chem.* 2004 Jan 9; 279 (2): 1256-61 ; Cortez-Retamozo et al., *Cancer Res.* 2004 Apr 15; 64 (8): 2853-7 ; Spinelli et al., *FEBS Lett.* 2004 Apr 23; 564 (1-2): 35-40 ; Pleschberger et al., *Bioconjug. Chem.* 2004 May-Jun;15 (3): 664-71 ; Nicaise et al., *Protein Sci.* 2004 Jul;13 (7): 1882-91 ; Omidfar et al., *Tumour Biol.* 2004 Jul-Aug;25 (4): 179-87 ; Omidfar et al., *Tumour Biol.* 2004 Sep-Dec; 25 (5-6): 296-305 ; Szyndol et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep; 48 (9): 3390-5 ; Saerens et al., *J. Biol. Chem.* 2004 Dec 10; 279 (50): 51965-72 ; De Genst et al., *J. Biol. Chem.* 2004 Dec 17; 279 (51): 53593-601 ; Dolk et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 2005 Jan;71 (1): 442-50 ; Joosten et al., *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Jan;66 (4): 384-92 ; Dumoulin et al., *J. Mol. Biol.* 2005 Feb 25; 346 (3): 773-88 ; Yau et al., *J Immunol Methods.* 2005 Feb; 297 (1-2): 213-24 ; De Genst et al., *J. Biol. Chem.* 2005 Apr 8; 280 (14): 14114-21 ; Huang et al., *Eur. J. Hum. Genet.* 2005 Apr 13 ; Dolk et al., *Prot*

eins. 2005 May 15; 59 (3): 555-64 ; Bond et al., J. Mol. Biol. 2005 May 6; 348 (3): 699-709 ; Zarebski et al., J. Mol. Biol. 2005 Apr 21.

【 0 1 2 4 】

上記の参考文献において使用されている用語法に従って、天然に存在する重鎖抗体に存在する可変ドメインは、従来の4本鎖抗体に存在する重鎖可変ドメイン（本明細書では「VHドメイン」と称される）と、および従来の4本鎖抗体に存在する軽鎖可変ドメイン（本明細書では「VLドメイン」と称される）と区別するために、「VHHドメイン」とも称される。上で参照した先行技術に関して言及されている通り、VHHドメインは、いくつもの独特の構造的特徴および機能的性質を有し、これらにより、単離されたVHHドメイン（ならびに、これらの構造的特徴および機能的性質を天然に存在するVHHドメインと共有する、VHHドメインに基づくナノボディ）およびそれを含有するタンパク質が、機能的な抗原結合性ドメインまたはタンパク質として使用するのに高度に有利なものになる。特に、これだけに限定することなく、VHHドメイン（元々軽鎖可変ドメインの存在を伴わず、かつ軽鎖可変ドメインとのいかなる相互作用も伴わずに抗原に機能的に結合するように「設計」されたもの）およびナノボディは、単一の比較的小さな機能的な抗原結合性構造単位、ドメインまたはタンパク質として機能し得る。これにより、VHHドメインが、一般にそれ自体では単一の抗原結合性タンパク質またはドメインとしての実用的な適用に適さず、いずれかの形態と組み合わせて機能的な抗原結合性単位をもたらす必要がある（例えば、Fab断片などの従来の抗体断片の場合；ScFv断片はVHドメインと共有結合により連結したVLドメインとで構成される）従来の4本鎖抗体のVHドメインおよびVLドメインと区別される。

10

20

【 0 1 2 5 】

ある特定の実施形態では、抗体断片は、ドメイン抗体（dAb）であり得る。「dAb」という用語に関しては、例えば、Ward et al. (Nature 1989 Oct. 12; 341 (6242): 544-6)、Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21 (11): 484-490 ; ならびに、例えば、Domantis LtdのWO06/030220、WO06/003388および他の公開特許出願を参照されたい。単一ドメイン抗体または単一可変ドメインは、ある特定の種のサメに由来するものであり得る（例えば、いわゆる「IgNARドメイン」、例えばWO05/18629を参照されたい）。

【 0 1 2 6 】

さらなる実施形態では、抗体または抗体断片は、それぞれが異なる抗原または抗原性決定因子を対象とする少なくとも2つ（例えば、2つ、3つなど）の結合性部位を含む多重特異性（例えば、二特異性、三特異性抗体など）であり得る。

30

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、治療剤は、二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））であり得る。

【 0 1 2 8 】

抗体という用語は、任意の動物種、好ましくは、例えば、鳥類および哺乳動物を含めた脊椎動物種に由来する1つまたは複数の部分を起源とするかまたはそれを含む抗体を含む。これだけに限定することなく、抗体は、ニワトリ、シチメンチョウ、ガチョウ、アヒル、ホロホロチョウ、ウズラまたはキジの抗体であり得る。また同じくこれだけに限定することなく、抗体は、ヒト、ネズミ科の動物（例えば、マウス、ラットなど）、ブタ、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、サル（例えば、カニクイザル）、ラクダ重鎖抗体も含めたラクダ（例えば、フタコブラクダおよびヒトコブラクダ）、ラマ重鎖抗体も含めたラマ（例えば、アルパカ、リヤマ、またはビクーニャ）、またはウマの抗体であり得る。

40

【 0 1 2 9 】

抗体という用語は、本明細書で使用される場合、少なくとも2つの動物種を起源とする「キメラ抗体」も包含する。より詳細には、「キメラ抗体」または「キメラ抗体」という用語は、1つの種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列と別の種に由来する定常領域配列とを含む抗体、例えば、ネズミ科の動物の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と連結した

50

ヒト、非ヒト霊長類、イヌ科の動物、ウマ科の動物、またはネコ科の動物の定常領域を有する抗体などを指す。キメラ抗体は、一部が特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体由来の対応する配列と同一であるかまたは相同であるが、鎖の残りは別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体に対応する配列と同一であるかまたは相同である重鎖および/または軽鎖、ならびに、所望の生物活性を示すそのような抗体の断片を含む（例えば、米国特許第4,816,567号；およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)を参照されたい）。キメラ抗体は、1つの種、例えばマウスまたはサル由来のモノクローナル抗体のFv領域などの部分をコードするDNAと、別の種、例えばヒト由来の抗体産生DNAを1つに合わせることによって作製される。

10

【0130】

ある特定の実施形態では、治療剤は、「完全ヒト抗体」であり得る。本明細書で使用される場合、「完全ヒト抗体」という用語は、コード遺伝情報がヒト起源のものである抗体を指す。したがって、「完全ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列のみに由来する可変領域および定常領域を有する抗体を指す。したがって、「完全ヒト抗体」という用語は、マウスなどの他の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むものではない。完全ヒト抗体は、上記のファージヒト抗体ライブラリーから引き出すこともでき、Lonberg and Husznar 1995 (Int. Rev. Immunol. 13 (1): 65-93)に記載されている通り、ネズミ科の動物の免疫グロブリンコード領域が置き換わるように工学的に操作されたトランスジェニックマウスを免疫化することによって得ることもできる。ファージディスプレイを使用して作出される完全ヒト抗体は、ヒトグリコシル化パターンを有する抗体がもたらされるヒト細胞株における組換え発現によって産生させることが好ましい。完全ヒト抗体の非限定的な例は、HuCAL（登録商標）抗体（Morphosys）である。HuCAL（登録商標）抗体を構築するための遺伝情報をHuCAL（登録商標）抗体ライブラリー（Morphosys）から抽出し、ヒトPER.C6（登録商標）細胞にベクターの形態で導入する（すなわち、トランスフェクション）。トランスフェクトされた細胞は遺伝情報をタンパク質に翻訳する。このタンパク質がグリコシル化によってさらに修飾され、得られた抗体分子は最終的に細胞により培養培地中に分泌される。

20

【0131】

抗体という用語は、本明細書で使用される場合、ヒトにおいて天然に産生される抗体との類似性が増大するようにタンパク質配列が改変された、非ヒト種に由来する抗体である「ヒト化抗体」も包含する。より詳細には、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種（例えば、マウス）に由来するが、VHおよび/またはVL配列の少なくとも一部分がより「ヒト様」になるように、すなわち、ヒト生殖細胞系列可変配列とより類似するように変更された重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体を指す。ヒト化抗体の1つの型は、非ヒトCDR配列がヒトVHおよびVL配列に導入されて対応するヒトCDR配列と置き換わったCDR移植抗体である。

30

【0132】

ヒト化抗体は、目的の抗原に免疫特異的に結合する、実質的にヒト抗体のアミノ酸配列を有するフレームワーク（FR）領域および実質的に非ヒト抗体のアミノ酸配列を有する相補的決定領域（CDR）を含む抗体またはその変異体、誘導體、類似体もしくは断片である。ヒト化抗体は、CDR領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）CDR領域に対応し、フレームワーク領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である可変ドメインを実質的に全て、または少なくとも1つ、一般には2つ含む（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）。ヒト化抗体はまた、一般にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含む。ヒト化抗体は、軽鎖ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有し得る。ヒト化抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域も含み得る。あるいは、ヒト化抗体は、ヒト

40

50

化軽鎖のみ、またはヒト化重鎖のみを含有し得る。例示的なヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび重鎖のヒト化可変ドメインを含有する。

【0133】

また、例えば、ヒト化抗体は、可変ドメインがヒト抗体の可変ドメインに対して高度のアミノ酸配列同一性を示すラクダ科 (Camelidae)、特にラマ (例えば、アルパカ、リヤマ、またはビクーニャ) 由来の従来の抗体 (すなわち、ジスルフィド結合によって相互接続した2本の重 (H) 鎖と2本の軽 (L) 鎖で構成される免疫グロブリン分子) から引き出すこともできる。そのようなヒト化抗体を産生するための適切なプラットフォームは、WO2011080350に記載されているSIMPLE Antibody (商標) プラットフォーム (ARGEN-X) である。

10

【0134】

抗体は、1つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加および/または置換 (例えば、保存的置換) を、そのような変更がそれぞれの抗原との結合性を保存するものである限りは含んでよいことが当業者には理解されよう。例えば、米国特許第8,323,962号に記載されている通り、免疫原性を損なうことなくインビボ半減期を延長するために、抗体、具体的にはFc領域に突然変異を導入することができる。

【0135】

抗体はまた、その構成物であるアミノ酸残基のネイティブなまたは人工的な修飾 (例えば、グリコシル化など) を1つまたは複数含み得る。

【0136】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにそれらの断片を作製する方法は、組換え抗体またはその断片を作製する方法と同様に当技術分野で周知である (例えば、Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; Harlow and Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", by Zola, ed., CRC Press 1987, ISBN 0849364760; "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", by Dean & Shepherd, eds., Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo, ed., Humana Press 2004, ISBN 1588290921を参照されたい)。

20

【0137】

動物、例えば、実験動物または農場動物などの非ヒト動物を、提示担体と融合していてもよい、または共有結合により、もしくは非共有結合により連結、結合もしくは吸着していてもよい免疫化抗原を使用して免疫化するための方法、および、免疫血清からの抗体または細胞試薬の調製は、それ自体周知であり、本明細書の他の箇所で参照される文書に記載されている。免疫化される動物は、任意の動物種、好ましくは温血性種、より好ましくは、例えば鳥類および哺乳動物を含めた脊椎動物種を含み得る。これだけに限定することなく、抗体は、ニワトリ、シチメンチョウ、ガチョウ、アヒル、ホロホロチョウ、ウズラまたはキジの抗体であり得る。また同じくこれだけに限定することなく、抗体は、ヒト、ネズミ科の動物 (例えば、マウス、ラットなど)、ブタ、ロバ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ラクダ、ラマまたはウマの抗体であり得る。「提示担体」または「担体」という用語は、一般には、第2の分子に結合すると、後者に対する免疫応答を、通常は追加的なT細胞エピートープを提供することを通じて強化する免疫原性分子を示す。提示担体は、とりわけ、例えばグリカン、ポリエチレングリコール、ペプチド模倣体、合成ポリマーなどの (ポリ) ペプチド構造または非ペプチド性構造であり得る。例示的な非限定的な担体としては、ヒトB型肝炎ウイルスコアタンパク質、複数のC3dドメイン、破傷風毒素断片Cまたは酵母Ty粒子が挙げられる。免疫後、当技術分野で十分に公知の技法を使用して、動物から抗体産生細胞を単離し、それを使用してモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を生成することができる。

30

40

【0138】

50

組換え抗体またはその断片を産生させるための方法には、宿主生物体または細胞が必要である。「宿主細胞」および「宿主生物体」という用語は、細菌などの原核生物と酵母、真菌、原生動物、植物および動物などの真核生物のどちらも包含する細胞または生物体を指し得ることが適切である。抗体を産生させるための宿主生物体または細胞として意図されているものとして、とりわけ、細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*））などの単細胞生物および（培養された）動物細胞（例えば、哺乳動物細胞またはヒト細胞）が挙げられる。細菌において抗体を産生させることの利点としては、他の利点の中でも、細菌細胞の取扱いが比較的安かつ簡単であること、および微生物の複製サイクルが迅速であることが挙げられる。細菌は、構造が単純な抗体断片の産生に特に適している。全長免疫グロブリンに関してWO 2009021548に記載されている通り、全長免疫グロブリンまたはより複雑な抗体断片を原核細胞において産生させるために、細菌細胞を、それぞれが抗体断片または免疫グロブリンの異なる部分、例えば、重鎖または軽鎖をコードする少なくとも2つの核酸で形質転換することができる。細菌細胞において、抗体をコードする遺伝情報が読み取られ、タンパク質に翻訳される。結果生じた抗体はペリプラズム空間に蓄積し、細菌細胞の溶解時に回収することができる。さらなる分離ステップを実施して抗体を精製することができる。WO 2009021548には、抗体をコードするコンストラクトへのシグナル配列の導入に起因して細菌が抗体を周囲の培養培地中に放出する、大腸菌に基づく分泌系が記載されている。これにより、細胞培養培地からの抗体の容易かつ都合のよい精製が可能になる。抗体の産生に使用することができる例示的な哺乳動物細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株である。抗体の産生に適した例示的なヒト細胞株としては、E C A C 番号96022940の下で寄託されており、WO 2000063403に記載されているPER.C6（登録商標）細胞株またはその誘導体が挙げられる。ヒト細胞株は、ヒトグリコシル化パターンを有する抗体を産生するので、完全ヒト抗体の産生に特に適している。

10

20

【0139】

別段の指定のない限り、具体的に詳細が記載されていない方法、ステップ、技法および操作は全て、当業者には明らかになる通り、それ自体が公知の様式で実施することができ、また、実施されたものである。例えば、標準のハンドブックならびに本明細書で言及される一般的な背景技術およびさらにそこで引用されている参考文献を再度参照されたい。

【0140】

W n tシグナル伝達を活性化する能力とは、F Z DおよびL R Pへの、例えば、F Z D / L R P複合体などへの天然のW n tリガンド結合シグナルトランスダクション効果および/または活性を模倣する、再現する、または近似する本明細書に開示される作用物質の能力を指す。

30

【0141】

W n tシグナル伝達の活性化は、当技術分野で公知の通り、1つまたは複数のW n t標的遺伝子の発現、T C Fレポーター遺伝子発現、ベータカテニン安定化、L R Pリン酸化、および/またはアキシンの細胞質から細胞膜への移行を測定することによって適切に決定し、かつ/または定量化することができる。例えば、W n tシグナル伝達の活性化は、W n tシグナル伝達の一次アウトプットであるT C F遺伝子の発現を測定することによって（例えば、R T - P C Rまたは任意の他の転写物検出方法によって）適切に決定し、かつ/または定量化することができる（*Nature*, 1997, vol. 385 (6619), 829-33）。例えば、T C Fレポーターアッセイ（T O P / F O PまたはT O P f l a s hとしても公知）を使用して、T C F / L E Fに制御される遺伝子の転写の変化を評価することができる。T C Fレポーターアッセイは、ルシフェラーゼレポーターアッセイであってよい。さらに、例えば、W n tシグナル伝達の活性化は、c - m y c（He et al., 1998, *Science*, 281 (5382), 1509-12）、n - m y c（Ten Berge et al., 2008, *Development*, 135 (19), 3247-57）、L E F 1（Hovanes et al., 2001, *Nat Genet*, 28 (1), 53-7；Fili et al., 2002, *J Biol Chem*, 277 (36), 33398-410）、またはc - j u n（Mann et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (4), 1603-8）の発現を測定することに

40

50

よって適切に決定し、かつ/または定量化することができる。

【0142】

あるいは、Wntシグナル伝達の活性化は、 β -カテニンの位置、レベルおよび/またはリン酸化の状態を測定することによって決定することができる。そのようなアッセイの非限定的な例は、高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のC末端と融合したヒト β -カテニンを安定に発現する組換えU2OS細胞を準備する「 β -Catenin Redistribution Assay」(Thermo Scientific)である。このアッセイにより、EGFP- β -カテニン融合タンパク質の膜から核への移行を可視化し、モニタリングすることが可能になる。Wntシグナル伝達の活性化を決定する別のやり方は、例えばEGFP-アキシン融合タンパク質を用い、アキシンの移行を可視化すること

10

【0143】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、作用物質により、例えば本明細書の他の箇所に記載のアッセイで測定して、中性物質または陰性対照によって誘導されるベースラインまたはバックグラウンドのWnt/ β -カテニンシグナル伝達と比較して、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達が、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも750倍、少なくとも1000倍、少なくとも 1×10^4 倍、または少なくとも 1×10^5 倍に増強される場合、(標準的)Wntシグナル伝達を活性化することができる

20

【0144】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、作用物質により、例えば本明細書の他の箇所に記載のアッセイで測定して、中性物質または陰性対照によって誘導されるベースラインまたはバックグラウンドのWnt/ β -カテニンシグナル伝達と比較して、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達が、10倍未満、例えば、特に最大で5倍もしくは最大で2.5倍に増強される場合、または作用物質によりWnt/ β -カテニンシグナル伝達が増強されないまたはさらには低減する(例えば、2分の1または5分の1または10分の1)場合、(標準的)Wntシグナル伝達を活性化しないとみなすことができる。

【0145】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、前記作用物質によって誘導されるGPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性が、RECKおよび/またはGPR124の非存在下で前記作用物質によって誘導されるFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性の少なくとも3.5倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも 1×10^4 倍、または少なくとも 1×10^5 倍、好ましくは少なくとも50倍である場合、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP媒介性Wntは活性化しないとみなすことができる。GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性(本段落では「活性1」と示される)とRECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性(本段落では「活性2」と示される)を比較する前に、作用物質によって誘導される活性1および活性2を野生型Wnt7aによって誘導される活性1および活性2に対して、それぞれ、後者を例えば100%の活性を表すものと設定して、正規化することができる。

30

40

【0146】

一例として、1)GPR124、RECK、FZおよびLRPを発現する細胞、ならびに別に2)FZおよびLRPを発現するがGPR124および/またはRECKは発現しない細胞を含み、1)および2)の細胞が他の点では実質的に同一である、インビトロまたはインビボ細胞アッセイ系では、作用物質を、同じ数量の前記作用物質により実質的に

50

同一の条件で誘導されるWntシグナル伝達活性が、1)の細胞において2)の細胞の少なくとも3.5倍、5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも 1×10^4 倍、または少なくとも 1×10^5 倍である場合、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するがRECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しないとみなすことができる。例えば、1)および2)の細胞は、同じ初代細胞供給源に由来するものであってよい、または同じ細胞株のものであってよく、また、GPR124および/またはRECKの発現が異なるように遺伝子操作されたものであってよい。

10

【0147】

Wntシグナル伝達経路の活性化は、細胞膜におけるFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドの密接な結び付きまたは相互近接を促進し、それにより、FrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドで構成される膜結合型ヘテロ-オリゴマーを形成することによって生じさせることができる。Frizzled-LRPヘテロ-オリゴマーがリガンド駆動的に形成されると、LRPポリペプチドの細胞内部分が、例えばCK1およびGSK-3によるリン酸化に利用可能になり、それにより、LRPポリペプチドのアキシンに対する親和性が著しく増大する。第2に、Frizzledポリペプチドの細胞内部分は、LRPポリペプチドとのヘテロ-オリゴマー内に存在する場合、DVLのリン酸化および動員を誘導することができる。結果生じる活性化されたLRP-FZD-DVL-アキシン複合体のアセンブリーにより、ベータカテニンの破壊複合体の解離が間接的に導かれ、それにより、ベータカテニンが細胞質に蓄積し、細胞核に移行することが可能になり、そこでベータカテニンは遺伝子転写を誘導し得る。

20

【0148】

したがって、特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、RECKおよびGPR124の存在下では細胞膜におけるFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドのヘテロマー形成(例えば、ヘテロ二量体形成が好ましい)を誘導することができるが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下ではそれを誘導することができない。

【0149】

細胞膜におけるFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドのヘテロマー形成または密接な結び付きを実現するために、FrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドの両方に、例えば、FrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドの両方の細胞外部分に結合することによって同時に結合することができる作用物質を使用することができる。

30

【0150】

細胞膜におけるFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドのヘテロマー形成は、蛍光標識された膜タンパク質のヘテロマー形成を免疫蛍光染色、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって可視化すること、またはFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドのヘテロマー形成の下流の事象の発生を決定すること、例えば、Dvlの存在およびリン酸化を検出することなどの、膜タンパク質のヘテロマー形成を決定するための当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる。

40

【0151】

したがって、特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、RECKおよびGPR124の存在下では細胞膜においてFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドに同時に結合することができるが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下ではそれができない。

【0152】

「結合する」、「相互作用する」、「特異的に結合する」または「特異的に相互作用する」という用語は、本明細書全体を通して使用される場合、作用物質が、ランダムまたは

50

無関係である他の分子を実質的に除いて、および、適宜、構造的に関連する他の分子を実質的に除いて、1つまたは複数の所望の分子または分析物に結合するまたは影響を及ぼすことを意味する。これらの用語は、必ずしも作用物質がその意図された標的（複数可）に排他的に結合することを要求するものではない。例えば、作用物質は、結合の条件下での目的の標的（複数可）に対する親和性が、非標的分子に対する親和性の少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約10倍、さらにより好ましくは少なくとも約25倍、さらに好ましくは少なくとも約50倍、およびなおより好ましくは少なくとも約100倍以上、例えば、少なくとも約1000倍以上、少なくとも約 1×10^4 倍以上、または少なくとも約 1×10^5 倍以上などである場合、そのような意図された標的（複数可）に特異的に結合すると言うことができる。

10

【0153】

作用物質とその意図された標的（複数可）の間の結合または相互作用は、共有結合性（すなわち、原子間の電子対の共有を伴う1つまたは複数の化学結合によって媒介される）、またはより一般には非共有結合性（すなわち、例えば水素架橋、双極性相互作用、ファンデルワールス相互作用などの非共有結合性力によって媒介される）であり得る。作用物質は、その意図された標的（複数可）と、結合 $K_A = 1 \times 10^6 M^{-1}$ 、より好ましくは $K_A = 1 \times 10^7 M^{-1}$ 、さらにより好ましくは $K_A = 1 \times 10^8 M^{-1}$ 、なおより好ましくは $K_A = 1 \times 10^9 M^{-1}$ 、およびさらに好ましくは $K_A = 1 \times 10^{10} M^{-1}$ または $K_A = 1 \times 10^{11} M^{-1}$ 、などの親和定数（ K_A ）で結合または相互作用し得ることが好ましく、ここで、 $K_A = [A_T] / [A][T]$ であり、Aは作用物質を示し、Tは意図された標的を示す。 K_A の決定は、例えば、平衡透析およびスキッチャードプロット解析の使用などの、当技術分野で公知の方法によって行うことができる。

20

【0154】

本明細書に記載の作用物質の標的への結合ならびに前記結合の親和性および特異性は、当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる。それらの非限定的な例としては、免疫共沈降、二分子蛍光補完法、アフィニティー電気泳動、標識移行、ファージディスプレイ、近接ライゲーションアッセイ（PLA）、タンデムアフィニティー精製（TAP）、予測されるギブズ結合エネルギーのインシリコ（in-silico）でのドッキングおよび算出、ならびに競合結合アッセイが挙げられる。

【0155】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、1つまたは複数の異なるFrizzledポリペプチド、例えば、Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9、およびFzd10からなる群から選択される1つまたは複数のFrizzledポリペプチドなどに結合することができる。本明細書に開示される作用物質は、少なくともFzd4に特異的に結合することができ、1つまたは複数の他のFzdに結合することもよい；または、他のFzdを実質的に除いてFzd4に特異的に結合することができることが好ましい。Fzd4は、中枢神経系の内皮細胞における優性のFzdファミリーメンバーであると考えられている。本明細書に開示される作用物質は、ヒトFzd4に特異的に結合することができることがより好ましい。本明細書に開示される作用物質は、1つまたは複数の好ましいFrizzledポリペプチドに対して選択的、例えば、1つまたは複数の好ましいFrizzledポリペプチドに対して、他の好ましいものではないFrizzledポリペプチドと比較して少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも 1×10^4 倍、または少なくとも 1×10^5 倍の特異性を有し得る。

30

40

【0156】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、Wntシグナル伝達に關与する1つまたは複数の異なるLRPポリペプチドに結合することができる。本明細書に開示される作用物質は、LRP5および/またはLRP6、例えば、LRP5およびLRP6のいずれか一方またはそれぞれに結合することができることが好ましい。本明細書に開示

50

される作用物質は、ヒトLRP5および/またはLRP6、例えば、ヒトLRP5およびヒトLRP6のいずれか一方またはそれぞれに結合することができることがより好ましい。本明細書に開示される作用物質は、1つまたは複数の好ましいLRPポリペプチドに対して選択的、例えば、1つまたは複数の好ましいLRPポリペプチドに対して、他の好ましいものではないLRPポリペプチドと比較して少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも 1×10^4 倍、または少なくとも 1×10^5 倍の特異性を有し得る。

【0157】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、GPR124および/またはRECKポリペプチドに結合することができる。

10

【0158】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、FrizzledおよびLRPポリペプチド、ならびにそれらに加えてGPR124および/またはRECKポリペプチドに同時に結合することができる。

【0159】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、RECKポリペプチドに結合することができる。

【0160】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、Frizzledポリペプチド、LRPポリペプチドおよびRECKポリペプチドに同時に結合することができる。

20

【0161】

RECKは、5つのN末端システインノット（CK）モチーフまたは領域（すなわち、CK1、CK2、CK3、CK4およびCK5）、システインリッチドメイン（CRD）ならびにグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー部位の前の3つのカザールモチーフで構成される。CKモチーフ、CRDおよびカザールモチーフは細胞外に位置する。したがって、本明細書に開示されるRECKポリペプチドに結合することができる作用物質は、RECKポリペプチドのCK1モチーフ、CK2モチーフ、CK3モチーフ、CK4モチーフ、CK5モチーフ、CRD、および/またはカザールモチーフの1つまたは複数に結合し得る。

【0162】

本発明者らは、特に、本明細書に開示されるRECKポリペプチドに結合することができる作用物質の、RECKポリペプチドのCK4および/またはCK5領域への結合が、GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達の活性化を確立するために重要であると思われることを見出した。

30

【0163】

したがって、特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、RECKポリペプチドのCK4および/またはCK5領域に結合することができるものである。

【0164】

本明細書の他の箇所が開示されているNCBI GenBank受託番号NP_066934.1の下に注釈が付けられているヒトRECKタンパク質のアミノ酸配列に関して、CK4モチーフはアミノ酸C216~C263にわたり、CK5モチーフはアミノ酸C292~C338にわたる。したがって、ヒトRECKのCK4モチーフは、アミノ酸配列CCDRAEDHACQNA CKRI LMSK KTE ME IVDGLIEGCKTQP LPQDPLWQC（配列番号5）を含むか、それから本質的になるか、またはそれらなり、ヒトRECKのCK5モチーフは、アミノ酸配列CCSKANTSTCRELCTKLYSMSWGN TQSWQEFDRFCEYNPVEVSM L T C（配列番号6）を含むか、それから本質的になるか、またはそれらなる。

40

【0165】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、配列番号5のアミノ酸配列および/または配列番号6のアミノ酸配列に結合することができる。

50

【0166】

Frizzled受容体は、Gタンパク質共役型受容体タンパク質であり、長さ約500～約700アミノ酸にわたる。N末端は、細胞外にあり、およそ120アミノ酸のシステインリッチドメイン(CRD)、その後におよそ40～100アミノ酸の親水性リンカー領域を含むことが予測される。Frizzled受容体はまた、膜貫通アルファヘリックスを形成することが予測される7つの疎水性ドメインも含む。細胞内C末端ドメインは種々の長さを有し、細胞内ドメインは異なるファミリーメンバーの間で全体的には十分には保存されていないが、Frizzledポリペプチドにおいて高度に保存されており、標準的Wntシグナル伝達に必要なとされる近位のKTXXXWアミノ酸モチーフ(配列番号7)を有し、ここで、Xは任意のアミノ酸であってよい。

10

【0167】

Frizzled CRDドメインは、10個の一定の間隔があいたシステインのモチーフを含み、公知のFrizzledファミリーメンバー間で広く保存されているだけでなく、RECK、分泌型frizzled関連タンパク質(SFRP)、受容体チロシンキナーゼ(RTK)、およびコラーゲン1XVIIなどのいくつかの他のタンパク質においても保存されている。CRDドメインは、例えばリガンド接触部位1に存在するシス-不飽和脂肪酸アシル基またはWntリガンド「インデックス」接触部位2に位置する残基の認識および/またはそれへの結合によるリガンド(例えば、Wnt)のFrizzledポリペプチドへの結合のために重要である。

20

【0168】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、Frizzledポリペプチドのシステインリッチドメイン(CRD)に結合することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、FrizzledポリペプチドのCRDドメイン内に位置するシス-不飽和脂肪酸アシル基結合性ドメインまたはCRD内の「インデックス」接触部位に結合することができる。

【0169】

LRPのN末端細胞外ドメインは、4つのYWTD(配列番号8)リピートドメイン(またはベータ-プロペラドメイン)、4つの上皮増殖因子(EGF)様ドメインおよびLDLR様ドメイン(LDLRLD)で構成される。単一のYWTDリピートドメインは、6つのタンデムなYWTD配列を含む。第1の2つの最N末端YWPDリピートドメインがWntリガンドに結合することが予測され、第2の2セットのYWPDリピートドメインがディックコップ(Dickkopf)(DKK)に結合することが予測される。N末端細胞外ドメインの後に単一の膜貫通セグメントおよび1つから3つの間のNPXYモチーフ(配列番号9)(配列中、Xは任意のアミノ酸であり得る)(例えば、LRP1、LRP2、LRP4、APOER2、LDLR、LRP9)、または1つからおよび5つの間のPPSPモチーフ(配列番号10)(例えば、LRP5およびLRP6において)を有する細胞質尾部が続く。

30

【0170】

「ディックコップ」または「DKK」という用語は、これだけに限定することなく、DKK1(RefSeq Protein: NP_036374.1; Gene ID: 22943)、DKK2(RefSeq Protein: NP_055236.1; Gene ID: 27123)、DKK3(RefSeq Protein: NP_001317149.1; Gene ID: 27122)、およびDKK4(RefSeq Protein: NP_055235.1; Gene ID: 27121)を含めた公知のヒトDKKタンパク質などの、DKKファミリーのありとあらゆるメンバーを包含する。ある特定の実施形態では、これらの用語は、特にDKK1を示し得る。

40

【0171】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、LRPポリペプチドの細胞外ドメインに結合することができる。

【0172】

50

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、LRPポリペプチドのDKK結合性部位に結合することができる。より詳細な実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、LRP5および/またはLRP6ポリペプチドのDKK1結合性部位に結合することができる。

【0173】

特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、LRPポリペプチドのWnt結合性部位に結合することができる。より詳細な実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、LRP5および/またはLRP6ポリペプチドのWnt結合性部位に結合することができる。

【0174】

別の特定の実施形態では、本明細書に開示される作用物質は、LRPポリペプチドのDKK結合性部位およびWnt結合性部位に結合することができる。

【0175】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、LRPポリペプチドの - プロペラ - EGF様ドメイン1および2 (P1E1P2E2) および/または - プロペラ - EGF様ドメイン3および4 (P3E3P4E4) に結合することが可能である。

【0176】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、RECK結合性ドメインおよびFrizzled結合性ドメイン、ならびにLRP結合性ドメインを含んでもよい。より特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、RECK結合性ドメイン、Frizzled結合性ドメイン、およびLRP結合性ドメインを含む。

【0177】

本明細書で開示される作用物質のRECK結合性ドメインは、高親和性でRECKポリペプチドに結合することが可能な、例えば、少なくとも約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} M、または少なくとも 1×10^{-12} Mの解離定数(KD)でRECKポリペプチドに結合することが可能な任意のドメインであり得る。例えば、少なくとも約 5×10^{-6} MのKD。

【0178】

特定の実施形態において、前記RECK結合性ドメインは、RECK特異的な抗体を含むか、またはRECK結合性領域、好ましくは1つまたは複数のRECK特異的な抗体または複数の抗体の変領域配列またはCDRを含む。好ましくは、RECK特異的な抗体は、RECKポリペプチドの細胞外部分に向けられ、例えば、RECKポリペプチドのCK4および/またはCK5領域に向けられる。RECK抗体の非限定的な例としては、当業界において公知であり、例えば、Abcam (例えば、ヒト全長RECKに特異的なab88249およびab89915)、Cell Signaling Technology (例えば、ヒト、マウス、ラット、サルRECKに特異的な#3433(D8C7))、Santa Cruz (例えば、ヒトRECKのC末端に特異的なsc-373929) から商業的に入手可能な抗体が挙げられる。

【0179】

特定の実施形態において、RECK結合性ドメインは、それぞれ独立して、RECK特異的な抗体のそれぞれのCDRと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有する、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5または少なくとも6つのCDRを含む。

【0180】

特定の実施形態において、RECK結合性ドメインは、RECK特異的なscFv、例えば、RECK特異的な抗体の1つまたは複数の(好ましくは6つ全ての)CDRを含むscFvである。

【0181】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、RECK結合性ドメインは、RECK特異的なV_{HH}、例えばRECK特異的な重鎖抗体の1つまたは複数の(好ましくは3つ全ての)CDRを含むV_{HH}である。

【0182】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質のRECK結合性ドメインは、それぞれ独立して、2つまたはそれより多くの異なるRECK特異的な抗体のそれぞれのCDRと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有する2つまたはそれより多くのCDRを含んでいてもよい。

【0183】

特定の実施形態において、前記本明細書で開示される作用物質のRECK結合性ドメインは、RECK結合性ポリペプチド、例えばWntリガンドまたはWntポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、それからなるか、またはそれに由来するものである(例えば、その生物学的に活性な断片および/または変異体である)。RECK結合性ドメインは、好ましくは、本明細書の他所で記載されるWnt7ポリペプチド(例えば、Wnt7aまたはWnt7b)に由来し、より好ましくは、ヒトまたはマウスWnt7ポリペプチドに由来し、さらにより好ましくは、ヒトWnt7ポリペプチド(例えば、ヒトWnt7aまたはヒトWnt7b)に由来するものである。例えば、ある特定の実施形態において、RECK結合性ドメインは、Wnt7(例えば、Wnt7aまたはWnt7b)のRECK結合性断片、好ましくはヒトもしくはマウスWnt7のRECK結合性断片、より好ましくはヒトWnt7(例えば、ヒトWnt7aまたはヒトWnt7b)のRECK結合性断片またはそれらの変異体を含んでもよく、それから本質的になってもよく、またはそれからなってもよい。さらなる例において、ある特定の実施形態において、RECK結合性ドメインは、アミノ酸配列VEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMdT(配列番号18)またはVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMET(配列番号19)に対して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよく、それから本質的になってもよく、またはそれからなってもよい。

【0184】

用語「Wnt」、「Wntリガンド」または「Wntポリペプチド」は、Wntファミリーのありとあらゆるメンバーを包含する。追加の指針によって、表2は、NCBI GenbankおよびUniProtで注釈が付けられた19種の公知のヒトWntファミリーメンバーを提示する。

【0185】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2

	NCBI Genbank			Uniprot
	GeneID	mRNA	タンパク質	タンパク質
WNT1	7471	NM_005430.3	NP_005421.1	P04628.1
WNT2	7472	NM_003391.2	NP_003382.1	P095544.1
WNT2B	7482	NM_004185.4	NP_004176.2	Q93097.2
WNT3	7473	NM_030753.4	NP_110380.1	P56703.2
WNT3A	89780	NM_033131.3	NP_149122.1	P56704.1
WNT4	54361	NM_030761.4	NP_110388.2	P56705
WNT5A	7474	NM_003392.4	NP_003383.2	P41221.1
WNT5B	81029	NM_030775.2	NP_110402.2	Q9H1J7.2
WNT6	7475	NM_006522.3	NP_006513.1	Q9Y6F9
WNT7A	7476	NM_004625.3	NP_004616.2	O00755.2
WNT7B	7477	NM_058238.2	NP_478679.1	P56706.2
WNT8A	7478	NM_001300939.1	NP_001287868.1	Q9H1J5.1
WNT8B	7479	NM_003393.3	NP_003384.2	Q93098.3
WNT9A	7483	NM_003395.2	NP_003386.1	O14904.2
WNT9B	7484	NM_001320458.1	NP_001307387.1	E7EPC3
WNT10A	80326	NM_025216.2	NP_079492.2	Q9GZT5.1
WNT10B	7480	NM_003394.3	NP_003385.2	O00744.2
WNT11	7481	NM_004626.2	NP_004617.2	O96014.2
WNT16	51384	NM_016087.2	NP_057171.2	Q9UBV4.1

【0186】

ある特定の実施形態において、本明細書において採用されるWntポリペプチドは、動物起源であり、好ましくは温血動物起源であり、より好ましくは脊椎動物起源であり、さらにより好ましくは哺乳類起源であり、例えばヒト起源および非ヒト哺乳類起源であり、さらにより好ましくはヒト起源である。

【0187】

本明細書で開示される作用物質のFrizzled結合性ドメインは、1つまたは複数のFrizzledポリペプチドに結合することが可能な任意のドメインであり得る。いかなるメカニズムまたは理論にも限定されないが、作用物質のFrizzled結合性ドメインの親和性は、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するのに十分な程度に高く（すなわち、DVLネットワークを介した、作用物質のRECKへの結合、RECKのGPR124への結合、およびGPR124のFrizzledへの結合が、作用物質の、より特定にはそのFrizzled結合性ドメインのFrizzledへの近接または提示を確実にする場合）、ただしRECKおよび/またはGPR124の非存在下におけるFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達の活性化を回避するのに十分な程度に低くてもよい（例えば、活性化の喪失、またはあったとしても最小の活性化、例えば、生理学的に取るに足りない度合または程度の活性化）。ある特定の実施形態において、限定されないが、Frizzled結合性ドメインは、約 1×10^{-9} Mより低い、約 1×10^{-8} Mより低い、または約 1×10^{-7} Mより低い、または約 1×10^{-6} Mより低いKDで、例えば、約 1×10^{-6} Mから約 1×10^{-7} Mの間、または約 1×10^{-6} Mから約 5×10^{-6} Mの間のKDで、1つまたは複数のFrizzledポリペプチドに結合することが可能であり得る。

【0188】

特定の実施形態において、Frizzled結合性ドメインは、Frizzled特異

的な抗体を含むか、またはFrizzled結合性領域、好ましくは、1つまたは複数のFrizzled特異的な抗体または抗体の可変領域配列またはCDRを含む。好ましくは、Frizzled特異的な抗体は、Frizzled受容体の細胞外部分に向けられ、例えばFrizzled受容体のCDRに向けられる。Frizzled抗体の非限定的な例としては、当業界において公知であり、商業的に入手可能な抗体、例えば、Biolegendから入手可能な抗体（例えば、ヒトFrizzled4に特異的なクローンCH3A4a7、ヒトFrizzled9に特異的なクローンW3C4E11）、およびAbcamより入手可能な抗体（例えば、Frizzled7に特異的なab64636、ヒトFrizzled4に特異的なab83042、ヒトFrizzled7に特異的なab77379、ヒトFrizzled8に特異的なab75235、ヒトFrizzled9に特異的なab102956）が挙げられる。例えば、Frizzled結合性ドメインは、汎特異的frizzled抗体OMP-18R5（バンチクツマブ(vantictumab)）の6つのCDR領域を含んでいてもよい。

10

【0189】

特定の実施形態において、Frizzled結合性ドメインは、それぞれ独立して、Frizzled特異的な抗体のそれぞれのCDRと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有する、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5または少なくとも6つのCDRを含む。

20

【0190】

特定の実施形態において、Frizzled結合性ドメインは、Frizzled特異的なscFv、例えば、Frizzled特異的な抗体の1つまたは複数の（好ましくは6つ全ての）CDRを含むscFvである。

【0191】

特定の実施形態において、Frizzled結合性ドメインは、Frizzled特異的なV_{HH}、例えばFrizzled特異的な重鎖抗体の1つまたは複数の（好ましくは3つ全ての）CDRを含むV_{HH}である。

【0192】

特定の実施形態において、Frizzled結合性ドメインは、それぞれ独立して、2つまたはそれより多くの異なるFrizzled特異的な抗体のそれぞれのCDRと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有する2つまたはそれより多くのCDRを含んでいてもよい。

30

【0193】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質のFrizzled結合性ドメインは、Frizzled結合性ポリペプチド、例えばWntリガンドまたはWntポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、それからなるか、またはそれに由来するものである（例えば、その生物学的に活性な断片および/または変異体である）。Frizzled結合性ドメインは、好ましくは、本明細書の他所で記載されるWnt7ポリペプチド（例えば、Wnt7aまたはWnt7b）に由来し、より好ましくは、ヒトWnt7ポリペプチド（例えば、ヒトWnt7aまたはヒトWnt7b）に由来するものである。

40

【0194】

WntポリペプチドのFrizzled結合性領域は、アフリカツメガエルWnt8aの結晶解析に基づき、Wntポリペプチドの3次元構造をモデル化することによって決定することができる（C. Y. Janda, D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas, K. C. Garcia, Science. 337, 59-64 (2012)）。

【0195】

XWnt8は、Frizzledを2つの不連続な部位に結合させることが示された。その1つは、サム(thumb)（部位1）と呼ばれ、他方はインデックス(index

50

(部位2)と呼ばれる。XWnt8サムの重要な残基は、K182、I186、S187、G188およびW196であると考えられる。S187は、部位1での結合にとって重要なパルミトレイン酸を有する。部位2の接触は、F317、W319、C321、T322およびV323によって支配されているようである。加えて、XWnt8は、より高次のWnt/Fz多量体を形成できるが、偽性部位3は、P34、Y37、L38、S41、A42、A45、V46、T70、L71、A74、F147、G150、L151およびT153で構成される。部位1における重要なアミノ酸残基(特に、K182、S187、G188およびW196)および部位2における重要なアミノ酸残基(特に、W319、C321およびV323)は、異なるWntポリペプチド間で高度に保存されているが、偽性部位3の残基は、それより多様であると考えられる。その観点から、当業者は、WntポリペプチドのFrizzled結合性領域は、XWnt8との配列アライメントを使用して決定できることを理解するものと予想される。

10

【0196】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質のFrizzled結合性ドメインは、Wntリガンドの「サム」(部位1)を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、好ましくは、Frizzled結合性ドメインは、アミノ酸配列XKXKXSGXKXKXKXW(配列番号11)を含み(式中、Xは任意のアミノ酸であり得る)、好ましくは、前記アミノ酸配列は、CKCHGVSGSCTTKTCW(配列番号12)に対して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を示す。

20

【0197】

好ましい実施形態において、配列番号11または配列番号12のアミノ酸7位におけるセリンは、脂肪酸残基に連結されており、好ましくは、配列番号11または配列番号12のアミノ酸7位における前記セリンは、パルミトイル化されている。

【0198】

好ましい実施形態において、本明細書で開示される作用物質のFrizzled結合性ドメインは、Wntリガンドの「インデックス」(部位2)を含まない。より特定には、本明細書で開示される作用物質のFrizzled結合性ドメインは、好ましくは、アミノ酸配列WXCXV(配列番号13)を含まない(式中、Xは任意のアミノ酸であり得る)。

30

【0199】

本明細書で開示される作用物質のLRP結合性ドメインは、1つまたは複数のLRPポリペプチドに結合することが可能な任意のドメインであり得る。いかなるメカニズムまたは理論にも限定されないが、作用物質のLRP結合性ドメインの親和性は、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するのに十分な程度に高く(すなわち、DVLネットワークを介した、作用物質のRECKへの結合、RECKのGPR124への結合、およびGPR124のFrizzledへの結合が、作用物質の、より特定にはそのLRP結合性ドメインのLRPへの近接または提示を確実にする場合)、ただしRECKおよび/またはGPR124の非存在下におけるFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達の活性化を回避するのに十分な程度に低くてもよい(例えば、活性化の喪失、またはあったとしても最小の活性化、例えば、生理学的に取るに足らない度合または程度の活性化)。限定されないが、ある特定の実施形態において、LRP結合性ドメインは、約 1×10^{-9} Mより低い、または約 1×10^{-8} Mより低い、または約 1×10^{-7} Mより低いKDで、例えば、約 1×10^{-3} Mから約 1×10^{-9} Mの間、または約 1×10^{-3} Mから約 1×10^{-8} Mの間、または約 1×10^{-3} Mから約 1×10^{-7} Mの間のKDで、1つまたは複数のLRPポリペプチドに結合することが可能であり得る。

40

50

【0200】

特定の実施形態において、前記LRP結合性ドメインは、LRP特異的な抗体またはLRP結合性領域、好ましくは、1つまたは複数のLRP特異的な抗体または抗体の可変領域配列またはCDRを含む。好ましくは、LRP特異的な抗体は、LRP5および/またはLRP6特異的な抗体である。好ましくは、LRP特異的な抗体は、LRPポリペプチドの細胞外部分に向けられ、例えば、LRP5および/またはLRP6のDKK結合性ドメインに向けられる。LRP5特異的な抗体の非限定的な例としては、当業界において公知であり、商業的に入手可能な、例えば、Abcam（例えば、ウサギおよびヒトLRP5に特異的なab36121）、またはSanta Cruz（例えば、ヒトLRP5に特異的なsc-21390）から入手可能な抗体が挙げられる。LRP6特異的な抗体の非限定的な例としては、Abcamから入手可能な抗体（例えば、マウス、ラットおよびヒトLRP6に特異的なab134146）、またはSanta Cruz（例えば、ヒトLRP6に特異的なsc-25317）が挙げられる。

10

【0201】

特定の実施形態において、LRP結合性ドメインは、それぞれ独立して、LRP特異的な抗体、好ましくはLRP5またはLRP6特異的な抗体のそれぞれのCDRと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有する、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5または少なくとも6つのCDRを含む。

20

【0202】

特定の実施形態において、LRP結合性ドメインは、LRP5またはLRP6特異的なscFv、例えば、LRP5またはLRP6特異的な抗体の1つまたは複数の（好ましくは6つ全ての）CDRを含むscFvである。

【0203】

特定の実施形態において、LRP結合性ドメインは、LRP5またはLRP6特異的なV_{HH}、例えば、LRP5またはLRP6特異的な重鎖抗体の1つまたは複数の（好ましくは3つ全ての）CDRを含むV_{HH}である。

【0204】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質のLRP結合性ドメインは、それぞれ独立して、2つまたはそれより多くの異なるLRP特異的な抗体、好ましくはLRP5またはLRP6特異的な抗体のそれぞれのCDRと、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を有する2つまたはそれより多くのCDRを含んでいてもよい。

30

【0205】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質の前記LRP結合性ドメインは、LRP結合性ポリペプチド、例えば、WntリガンドもしくはWntポリペプチド（例えば、Wnt7aまたはWnt7b）、DKKポリペプチド（例えばDKK1、DKK2、DKK3、またはDKK4）、スクレロスチン（またはSOST）、もしくはWise（またはSOSTDC1）、またはそれらの変異体を含むか、それから本質的になるか、それからなるか、またはそれに由来するものである（例えば、その生物学的に活性な断片および/または変異体である）。

40

【0206】

例を挙げれば、ヒトSOST遺伝子は、NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene ID50964の下に注釈が付けられている。ヒトSOST mRNAは、NCBI Genbank 受託番号NM_025237.2の下に注釈が付けられている。NM_025237.2のヌクレオチド48（開始コドン）から689（終止コドン）は、SOSTコード配列を構成する。ヒトSOSTタンパク質配列は、NCBI Genbank 受託番号NP_079513.1の下

50

に注釈が付けられ、Uniprot (www.Uniprot.org) 受託番号 Q9BQB4.1 の下に注釈が付けられている。

【0207】

例を挙げれば、ヒトWISE (またはスクロスチンドメイン含有1 (SOSTDC1)) 遺伝子は、NCBI Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) Gene ID 25928 の下に注釈が付けられている。ヒトWISE mRNA は、NCBI Genbank 受託番号 NM_015464.2 の下に注釈が付けられている。NM_015464.2 のヌクレオチド182 (開始コドン) から802 (終止コドン) は、WISEコード配列を構成する。ヒトWISEタンパク質配列は、NCBI Genbank 受託番号 NP_056279.1 の下に注釈が付けられ、Uniprot (www.Uniprot.org) 受託番号 Q6X4U4.2 の下に注釈が付けられている。

10

【0208】

本明細書で開示される作用物質のLRP結合性ドメインは、好ましくは、Wnt7 (例えば、Wnt7a または Wnt7b) ポリペプチドに由来し、より好ましくは、ヒトWnt7 ポリペプチド (例えば、ヒトWnt7a またはヒトWnt7b) またはそれらの変異体に由来するものである。

【0209】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質の前記LRP結合性ドメインは、DKKポリペプチド、好ましくはDKK1ポリペプチド、またはWntポリペプチド、好ましくはWnt7ポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、それからなるか、またはそれに由来するものである。好ましい実施形態において、本明細書で開示される作用物質の前記LRP結合性ドメインは、Wnt7ポリペプチドに由来するものである。

20

【0210】

Ahn V. E. ら (Ahn V.E. et al., Dev Cell. 2011 Nov 15 ;21(5):862-873) は、DKK1のC末端領域がLRP6への結合に関与することを開示している。したがって、特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質の前記LRP結合性ドメインは、DKK1のC末端ドメインを含むか、それから本質的になるか、それからなるか、またはそれに由来するものである。例えば、ヒトDKK1のC末端ドメイン (ヒトDKK1は、NCBI Genbank 受託番号 NP_036374.1 の下に注釈が付けられ、Uniprot 受託番号 O94907.1 の下に注釈が付けられている) は、アミノ酸配列 MYHTKGGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGS HGLEIFQRCYCGEGLSCR IQKDHHQASNSSRLHTCQRH (配列番号14) を含む。

30

【0211】

一方で、Bourhis E. ら (Bourhis, Eric et al., Structure, Volume 19, Issue 10, 1433-1442) は、DKK1のN末端だけでなく、DKK2、DKK4、WISE、およびSOSTにおいても、LRP5/6相互作用モチーフNXI/V (式中、Xは任意のアミノ酸であり得る) を同定した。その観点から、LRP結合性ドメインは、NXI またはNXVを含んでいてもよい (式中、Xは任意のアミノ酸であり得る)。

40

【0212】

いかなるメカニズムまたは理論にも限定されないが、作用物質のFrizzled結合性ドメインおよびLRP結合性ドメインの親和性は、GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達を集合的に活性化するのに十分な程度に高く (すなわち、DVLネットワークを介した、作用物質のRECKへの結合、RECKのGPR124への結合、およびGPR124のFrizzledへの結合が、作用物質の、より特定にはそのLRP結合性ドメインのLRPへの近接または提示を確実にする場合)、ただしRECKおよび/またはGPR124の非存在下におけるFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達の活性化を回避するのに集合的に十分な程度に低くてもよい (例えば、活性化の喪失、またはあったとしても最小の活性化、例えば、生理学的に取

50

るに足りない度合または程度の活性化)。

【0213】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、タンパク質コンジュゲートである。

【0214】

用語「融合タンパク質」または「融合ポリペプチド」および「タンパク質コンジュゲート」または「ポリペプチドコンジュゲート」は、通常天然に見出されない方式で連結された、接続された、または一体化した少なくとも2つのタンパク質またはポリペプチドを含むハイブリッドまたはキメラ分子を意味する。このような分子は、好適には、アミノ酸ベースの化合物であること、すなわち、主として、必ずしもそうとは限らないが専らアミノ酸残基を含む物質または分子であることを意味する場合がある。あらゆる組換えによって、半合成的に、または合成的に生産された融合体またはコンジュゲートが包含される。融合体またはコンジュゲートは、必要に応じて、グリコシル化、リン酸化、スルホン化、メチル化、アセチル化、脂質化、ペグ化などによって改変されていてもよい。

10

【0215】

より特定には、用語「融合タンパク質」または「融合ポリペプチド」は、2つまたはそれより多くのタンパク質、ポリペプチドもしくは変異体またはそれらの断片が、融合生成物をコードする単一の連続するポリヌクレオチド分子の遺伝学的発現を介して、それらの個々のポリペプチド主鎖を介した共直線的な共有結合による連結によって合体されている遺伝学的な融合体を意味する。典型的には、融合生成物をコードする連続するポリヌクレオチド分子を生産するために、それぞれ所与のポリペプチドセグメントをコードする2つまたはそれより多くのオープンリーディングフレーム(ORF)を合体させて、それぞれ元のORFの正しいリーディングフレームを維持する方式で、連続的な、より長いORFを形成する。得られた組換え融合ポリペプチドにおいて、元のORFによってコードされた2つまたはそれより多くのポリペプチドセグメントは、同じポリペプチド分子中で合体するのに対して、それらは通常、天然においてそのように合体しない。このようにしてリーディングフレームは、融合した遺伝学的セグメントにわたり連続した状態になるが、そのように融合したポリペプチドセグメントは、例えばフレーム内ポリペプチドまたはペプチドリンカーによって、物理的または空間的に分離されていてもよい。

20

【0216】

より特定には、用語「タンパク質コンジュゲート」または「ポリペプチドコンジュゲート」は、2つまたはそれより多くのタンパク質、ポリペプチドもしくは変異体またはそれらの断片が非遺伝学的手段で合体している物質または分子を意味し、それらは通常、天然においてそのように合体しない。ポリペプチドセグメントは、それらの個々のポリペプチド主鎖を介して、またはそれらそれぞれのアミノ酸側鎖の1つまたは複数を経由して合体されていてもよく、または1つのタンパク質セグメントは、そのポリペプチド主鎖を介して別のポリペプチドセグメントのアミノ酸側鎖に合体されていてもよい。

30

【0217】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質のRECK結合性ドメイン、Frizzled結合性ドメインおよび/またはLRP結合性ドメインは、1つまたは複数のリンカーによってカップリングされていてもよい。

40

【0218】

本発明の文脈において、用語「カップリングされる」は、本明細書で使用される場合、「接続」、「結合」、「融合」、「合体」と同義であり、少なくとも2つのエレメントまたは構成要素間の物理的な連結を指す。

【0219】

用語「リンカー」は、本明細書で使用される場合、他のエレメントを連結するのに役立つ接続エレメントを指す。リンカーは、リジッドなリンカーでもよく、またはフレキシブルなリンカーでもよい。特定の実施形態において、リンカーは、共有結合を達成する共有結合リンカーである。用語「共有結合の」または「共有結合」は、2つの原子間で1つま

50

たは複数の電子対を共有することを含む化学結合を指す。多くの分子の場合、電子の共有は、各原子が、安定な電子の立体配置に相当する全外部電子殻の等価状態に達するようにすることができる。共有結合としては、結合、結合、金属間の結合、アゴスチック相互作用、曲がった結合および三中心二電子結合などの様々なタイプの相互作用が挙げられる。

【0220】

特定の実施形態において、リンカーは、(ポリ)ペプチドリinkerまたは非ペプチドリinker、例えば非ペプチドポリマー、例えば非生物学的ポリマーである。好ましくは、R E C K結合性ドメイン、F r i z z l e d結合性ドメインおよび/またはL R P結合性ドメイン間の連結は、加水分解安定な連結であってもよく、すなわち、有用なpH値で、特定には生理学的条件下などで、長期間にわたり、例えば数日にわたり水中で実質的に安定であってもよい。特定の実施形態において、リンカーは、1つまたは複数のアミノ酸のペプチドリinkerである。

10

【0221】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸、天然に存在するアミノ酸に類似した方式で機能する、天然にコードされたアミノ酸、天然にコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、アミノ酸類似体、およびアミノ酸模倣体を包含し、これらは、それらの構造がこのような立体異性体の形態を許容する限り、DおよびL立体異性体の全ての形態を含む。アミノ酸は、本明細書において、それらの名称、それらの一般的に公知の三文字記号、またはI U P A C - I U B生化学命名委員会によって推奨された一文字記号のいずれかによって言及される。用語「天然に存在する」は、一般的に、天然に見出され、ヒトによって操作されていない材料を指す。用語「天然に存在しない」、「非天然」などは、一般的に、天然に見出されない材料、または構造的に改変された、半合成された、もしくはヒトによって合成された材料を指す。「天然にコードされたアミノ酸」は、20種の共通のアミノ酸の1つであるか、またはピロリシン、ピロリン-カルボキシ-リシンもしくはセレノシステインであるアミノ酸を指す。20種の共通のアミノ酸は、アラニン(AまたはA l a)、システイン(CまたはC y s)、アスパラギン酸(DまたはA s p)、グルタミン酸(EまたはG l u)、フェニルアラニン(FまたはP h e)、グリシン(GまたはG l y)、ヒスチジン(HまたはH i s)、イソロイシン(IまたはI l e)、リシン(KまたはL y s)、ロイシン(LまたはL e u)、メチオニン(MまたはM e t)、アスパラギン(NまたはA s n)、プロリン(PまたはP r o)、グルタミン(QまたはG l n)、アルギニン(RまたはA r g)、セリン(SまたはS e r)、スレオニン(TまたはT h r)、バリン(VまたはV a l)、トリプトファン(WまたはT r p)、およびチロシン(YまたはT y r)である。「天然にコードされないアミノ酸」は、20種の共通のアミノ酸またはピロリシン、ピロリン-カルボキシ-リシンもしくはセレノシステインのうちの一つではないアミノ酸を指す。この用語は、これらに限定されないが、天然にコードされたアミノ酸の改変(例えば翻訳後改変)によって生じるアミノ酸であるが、それ自体は天然に翻訳複合体によって成長中のポリペプチド鎖に取り込まれないものを含み、このようなものとしては、限定されないが、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-スレオニン、およびO-リン酸化チロシンによって例示される。天然にコードされない、非天然または改変されたアミノ酸のさらなる例としては、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、ベータ-アラニン、ベータ-アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、ピペリジン酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4ジアミノ酪酸、デスモシン、2,2'-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモセリン、ホモシステイン、ヒドロキシリジン、アロヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロイソロイシン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリシン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、またはオルニチンが挙げられる。さらに、1つまたは複数の個々の原子が、異なる

20

30

40

50

原子、同じ原子の同位体、または異なる官能基のいずれかで置き換えられているアミノ酸類似体も挙げられる。また、Ellman et al. *Methods Enzymol.* 1991, vol. 202, 301-36に記載された非天然のアミノ酸およびアミノ酸類似体も含まれる。タンパク質またはポリペプチドへの非天然アミノ酸の取込みは、様々な方法で有利であり得る。例えば、D-アミノ酸を含有するポリペプチドは、L-アミノ酸を含有する対応物と比較して、インピトロまたはインピボで安定性の増加を呈示する。より具体的には、D-アミノ酸を含有するポリペプチドは、内因性ペプチダーゼおよびプロテアーゼに対してより高い耐性を有する可能性があり、それによってインピボにおける作用物質の生物学的利用率の改善および寿命の長期化がもたらされる。

【0222】

ペプチドリinkerは、より特定には、1から50アミノ酸の長さ、または2から50アミノ酸の長さ、または1から45アミノ酸の長さ、または2から45アミノ酸の長さ、好ましくは、1から40アミノ酸の長さ、または2から40アミノ酸の長さ、または1から35アミノ酸の長さ、または2から35アミノ酸の長さ、より好ましくは、1から30アミノ酸の長さ、または2から30アミノ酸の長さであり得る。さらに好ましくは、リンカーは、5から25アミノ酸の長さ、または5から20アミノ酸の長さであり得る。特定には、好ましくは、リンカーは、5から15アミノ酸の長さ、または7から15アミノ酸の長さであり得る。したがって、ある特定の実施形態において、リンカーは、1、2、3または4アミノ酸の長さであり得る。他の実施形態において、リンカーは、5、6、7、8または9アミノ酸の長さであり得る。さらなる実施形態において、リンカーは、10、11、12、13または14アミノ酸の長さであり得る。さらに他の実施形態において、リンカーは、15、16、17、18または19アミノ酸の長さであり得る。さらなる実施形態において、リンカーは、20、21、22、23、24または25アミノ酸の長さであり得る。ある特定の実施形態において、リンカーは、4~10または5~9または6~8または7アミノ酸の長さである。他の実施形態において、リンカーは、12~18または13~17または14~16または15アミノ酸の長さである。

【0223】

リンカーを構成するアミノ酸の性質は、それによって連結されたポリペプチドセグメントの生物活性が実質的に損なわれず、リンカーが、作用物質のRECK結合性ドメイン、Frizzled結合性ドメインおよび/またはLRP結合性ドメインの意図された空間的な分離をもたらす限り、特に重要ではない。好ましいリンカーは、本質的に、非免疫原性であるか、および/またはタンパク質分解による切断を受けにくい。

【0224】

ある特定の好ましい実施形態において、ペプチドリinkerは、グリシン、セリン、アラニン、スレオニン、およびそれらの組合せからなる群から選択されるアミノ酸を含んでもよく、それから本質的になってもよく、またはそれからなってもよい。さらにより好ましい実施形態において、リンカーは、グリシン、セリン、およびそれらの組合せからなる群から選択されるアミノ酸を含んでもよく、それから本質的になってもよく、またはそれからなってもよい。このようなリンカーは、特に優れたフレキシビリティをもたらす。ある特定の実施形態において、リンカーは、グリシン残基のみからなってもよい。ある特定の実施形態において、リンカーは、セリン残基のみからなってもよい。

【0225】

特定の実施形態において、リンカーは、非ペプチドリinkerである。好ましい実施形態において、非ペプチドリinkerは、非ペプチドポリマーを含んでもよく、それから本質的になってもよく、またはそれからなってもよい。用語「非ペプチドポリマー」は、本明細書で使用される場合、ペプチド結合を除く共有結合によって互いに連結された2つまたはそれより多くの反復単位を含む生体適合性ポリマーを指す。例えば、非ペプチドポリマーは、2から200単位の長さ、または2から100単位の長さ、または2から50単位の長さ、または2から45単位の長さ、または2から40単位の長さ、または2から35単位の長さ、または2から30単位の長さ、または5から25単位の長さ、または5から2

10

20

30

40

50

0 単位の長さ、または 5 から 15 単位の長さであり得る。非ペプチドポリマーは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖、デキストラン、ポリビニルエチルエーテル、PLA (ポリ(乳酸)および PLGA (ポリ乳酸-グリコール酸)などの生分解性ポリマー、脂質ポリマー、キチン、ヒアルロン酸、およびそれらの組合せからなる群から選択され得る。特に好ましくは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である。非ペプチドポリマーの分子量は、好ましくは、1 から 100 kDa の範囲、好ましくは 1 から 20 kDa であり得る。非ペプチドポリマーは、1 種のポリマーまたは異なるタイプのポリマーの組合せであり得る。非ペプチドポリマーは、コンジュゲートを形成することになる RECK 結合性ドメイン、Frizzled 結合性ドメインおよび/またはLRP 結合性ドメインに結合することが可能な反応性基を有する。好ましくは、非ペプチドポリマーは、各末端に反応性基を有する。好ましくは、反応性基は、反応性アルデヒド基、プロピオンアルデヒド基、ブチルアルデヒド基、マレイミド基およびスクシンイミド誘導体からなる群から選択される。スクシンイミド誘導体は、プロピオン酸スクシンイミジル、ヒドロキシスクシンイミジル、スクシンイミジルカルボキシメチルまたは炭酸スクシンイミジルであり得る。非ペプチドポリマーの両方の末端における反応性基は、同一でもよく、または異なってもよい。ある特定の実施形態において、非ペプチドポリマーは、両方の末端に反応性アルデヒド基を有する。例えば、非ペプチドポリマーは、一方の末端にマレイミド基を有し、他方の末端に、アルデヒド基、プロピオン酸アルデヒド基またはブチルアルデヒド基を有していてもよい。非ペプチドポリマーとして、両方の末端に反応性ヒドロキシ基を有するポリエチレングリコール(PEG)が使用される場合、ヒドロキシ基は、公知の化学反応によって様々な反応性基に活性化されてもよく、またはタンパク質コンジュゲートが調製されるように、商業的に入手可能な改変された反応性基を有するPEGを使用してもよい。

10

20

【0226】

1 つまたは複数のリンカーの包含は、作用物質の RECK 結合性ドメイン、Frizzled 結合性ドメインおよび/またはLRP 結合性ドメイン間の空間的な分離を増加させ、これは、作用物質のWntシグナル伝達活性に有利に影響を与えることができる。

【0227】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、単一の鎖または多量体として提供される。多量体の形態を達成するために、RECK 結合性ドメイン、Frizzled 結合性ドメインおよび/またはLRP 結合性ドメインは、例えば dendrimer、抗体またはポリ-L-リシンで構成される足場または主鎖に付着させてもよい。

30

【0228】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、RECK 結合性ドメイン、Frizzled 結合性ドメインおよびLRP 結合性ドメインを含み、前記 RECK 結合性ドメイン、前記 Frizzled 結合性ドメイン、および前記 LRP 結合性ドメインは、Wnt7 ポリペプチドに由来し、例えば Wnt7a または Wnt7b ポリペプチドに由来し、好ましくはヒト Wnt7 ポリペプチドに由来し、例えばヒト Wnt7a または Wnt7b ポリペプチドに由来するものである。

40

【0229】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、RECK 結合性ドメイン、Frizzled 結合性ドメインおよびLRP 結合性ドメインを含み、少なくとも1、少なくとも2つまたは3つ全ての結合性ドメインは、Wnt7 ポリペプチドに由来し、例えば Wnt7a または Wnt7b ポリペプチドに由来し、好ましくはヒト Wnt7 ポリペプチドに由来し、例えばヒト Wnt7a または Wnt7b ポリペプチドに由来するものである。

【0230】

一例として、ヒト WNT7A 遺伝子は、NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene ID 7476 の下に注釈が付け

50

られている。ヒトWNT7A mRNA (転写変異体1)は、NCBI Genbank 受託番号NM_004625.3の下に注釈が付けられている。NM_004625.3のヌクレオチド306(開始コドン)から1355(終止コドン)は、WNT7Aコード配列を構成する。ヒトWNT7Aタンパク質配列は、NCBI Genbank 受託番号NP_004616.2の下に注釈が付けられ、UniProt 受託番号O00755.2の下に注釈が付けられ、以下にさらに再現される(配列番号15) :

> NP_004616.2 タンパク質 Wnt - 7a 前駆体 [ヒト]
 MNRKARRCLGHLFSLGMVYLRIGGFSSVVALGASIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVI
 GEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCALGERTVFGKELKVGSRFAAFTYAIIAAGVAHAITAA
 CTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLM
 NLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVE
 PVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYCEEDPVTGSGVTQGRACNKTA
 P
 QASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKCNTCSERTEMYTCK

10

【0231】

例を挙げれば、ヒトWnt7aタンパク質の成熟形態(シグナルペプチドを含まない)は、さらに以下に複写されるアミノ配列を含む(配列番号51) : LGASIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCALGERTVFGKELKVGSRFAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYCEEDPVTG
 SVGTQGRACNKTA
 P
 QASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFWCCYVKCNTCSERTEMYTCK

20

【0232】

一例として、ヒトWNT7B遺伝子は、NCBI Genbank Gene ID 7477の下に注釈が付けられている。ヒトWNT7B mRNA (転写変異体1)は、NCBI Genbank 受託番号NM_058238.2の下に注釈が付けられている。NM_058238.2のヌクレオチド375(開始コドン)から1424(終止コドン)は、WNT7Bコード配列を構成する。ヒトWNT7Bタンパク質配列は、NCBI Genbank 受託番号NP_478679.1の下に注釈が付けられ、UniProt 受託番号P56706.2の下に注釈が付けられ、以下にさらに再現される(配列番号16) :

30

> NP_478679.1 タンパク質 Wnt - 7b 前駆体 [ヒト]
 MHRNFRKWIFVFLCFGLVLYVKLGALSSVVALGANIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVI
 GEGAQMGINECQYQFRFGRWNCALGEKTVFGQELRVGSRFAAFTYAIIAAGVAHAVTA
 ACSQGNLSNCGCDREKQGYNQAEGWKWGGCSADVRYGIDFSRRFVDAREIKKNARRL
 MNLHNNEAGRKVLEDRMQLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPKFREVGHLLKEKYNAAVQ
 VEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMETDLVYIEKSPNYCEEDAATGSGVTQGRLCNRT
 SPGADGCDTMCCGRGYNTHQYTKVWQCNCCKFWCCFVKCNTCSERTEVFTCK

【0233】

特定の実施形態において、前記REC結合性ドメインは、HVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDDLVYIEKSPNYC(配列番号17)、VEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDD(配列番号18)またはVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMET(配列番号19)に記載のアミノ酸配列、または配列番号17、配列番号18、もしくは配列番号19のアミノ酸配列に対して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。特定の実施形態において、Wnt7ポリペプチドに由来する前記REC結合性ドメインは、配列番号17、配列番号18、または配列番号19のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

40

50

【0234】

特定の実施形態において、前記RECK結合性ドメインは、アミノ酸配列XXXVXAXRX XXXXFLXIXXXXXYXKXXXX (配列番号20)、VXAXRXXXXXFLXIXXXXXYXK (配列番号21)、XXXVXAXRXXXXXFLXIXXXXXXKXXXX (配列番号22) またはVX AXRXXXXXFLXIXXXXXXK (配列番号23) (式中、Xは、任意のアミノ酸である) を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、好ましくは、アミノ酸配列は、配列番号18または配列番号19のいずれか1つに対して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%、好ましくは100%の配列同一性を示す。

10

【0235】

特定の実施形態において、前記RECK結合性ドメインは、Wnt7ポリペプチドに由来するものであり、Frizzled結合性ドメインおよびLRP結合性ドメインは、Wnt7ポリペプチドに由来するものではない。

【0236】

特定の実施形態において、前記RECK結合性ドメインは、Wnt7ポリペプチドに由来するものであり、Frizzled結合性ドメインおよびLRP結合性ドメインは、Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11およびWnt16からなる列挙から選択されるWntポリペプチドに由来するものである。

20

【0237】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、Wnt7ポリペプチドの断片、例えばWnt7aまたはWnt7bポリペプチドの断片、好ましくはヒトWnt7ポリペプチドの断片、例えばヒトWnt7aまたはヒトWnt7bポリペプチドの断片であるかまたはそれから本質的になる。

【0238】

特定の実施形態において、Wnt7ポリペプチドの断片は、全長Wnt7ポリペプチドのGPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性の、少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、好ましくは100%、を有する。

30

【0239】

特定の実施形態において、Wnt7ポリペプチドの断片は、全長Wnt7ポリペプチドのGPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性より高い(例えば、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍もしくは2倍高い、またはそれより高い)GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性を有する。

【0240】

本発明者らは、Wnt7aのN末端ドメインが、RECKに結合し、GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化することが可能であるが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下においてFrizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化しないことを実証した。

40

【0241】

したがって、特定の実施形態において、Wnt7ポリペプチドの断片は、RECKおよび/またはGPR124の非存在下における全長Wnt7ポリペプチドのFrizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性の、少なくとも10分の1、または少なくとも100分の1、または少なくとも1000分の1、または少なくとも 1×10^4 分の1、

50

または少なくとも 1×10^5 分の 1、または少なくとも 1×10^6 分の 1 の、RECK および/または GPR124 の非存在下における Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達活性を有する。

【0242】

特定の実施形態において、前記 Wnt7 ポリペプチドの断片は、Wnt7 ポリペプチドの N 末端ドメイン (NTD)、例えば Wnt7a または Wnt7b ポリペプチドの NTD、好ましくは、ヒト Wnt7 ポリペプチド、例えばヒト Wnt7a または Wnt7b の NTD であるかまたはそれから本質的になる。ヒト Wnt7a または Wnt7b ポリペプチドの N 末端ドメインは、典型的には、配列番号 24 (Wnt7a) または配列番号 25 (Wnt7b) における 1 位に対応する位置におけるロイシン (L) 残基から、配列番号 24 (Wnt7a) または配列番号 25 (Wnt7b) における 247 位に対応する位置におけるシステイン (C) 残基の範囲である。

10

【0243】

特定の実施形態において、前記 Wnt7 ポリペプチドの断片は、少なくとも Wnt7 ポリペプチドの NTD を含み、Wnt7 ポリペプチドの C 末端ドメイン (CTD) を含まない。

【0244】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、ヒト Wnt7a ポリペプチドの NTD の、少なくとも 50、少なくとも 75、少なくとも 100、少なくとも 125、少なくとも 150、少なくとも 175、少なくとも 200、少なくとも 225 個の連続するアミノ酸を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、より特定には、本明細書で開示される作用物質は、アミノ酸配列

20

LGASIIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCALGERTV
FGKELKVGSRFAAFTYAIIAAGVAHAITAACQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWWG
CSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTT
KTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKPLSYRKPMDDLVYI
EKSPNYC (配列番号 24) または

LGANIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGAQMGINECQYQFRFGRWNCALGKTV
FGQELRVGSRFAAFTYAITAAGVAHAVTAACSQGNLSNCGCDREKQGYNQAEGWKWG
GCSADVRYGIDFSRRFVDAREIKKNARRLMNLHNNEAGRKVLEDRMQLECKCHGVSGSC
TTKTCWTTLPKFREVGHLLKEKYNAAVQVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMETDL
VYIEKSPNYC (配列番号 25)、好ましくは配列番号 24 の、少なくとも 50、少なくとも 75、少なくとも 100、少なくとも 125、少なくとも 150、少なくとも 175、少なくとも 200、少なくとも 225 個の連続するアミノ酸を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

30

【0245】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、配列番号 24 もしくは配列番号 25、好ましくは配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるか、または配列番号 24 または配列番号 25、好ましくは配列番号 24 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなる。

40

【0246】

当業者は、本明細書で教示される作用物質を、宿主細胞によって発現させ分泌させることが想定される場合、本明細書で教示される作用物質をコードする核酸は、好ましくは、N 末端シグナルペプチド配列を含む作用物質の前駆体型をコードすることを理解しているものと予想される。したがって、核酸は、Wnt7 の前駆体ポリペプチド (すなわちシグ

50

ナルペプチドを含む)の断片、例えばヒトWnt7aまたはWnt7bの前駆体ポリペプチドの断片をコードしていてもよい。特定の実施形態において、核酸は、配列番号24もしくは配列番号25に記載のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなる作用物質、または配列番号24または配列番号25に対して、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなる作用物質をコードし、前記アミノ酸配列は、N末端において、それぞれアミノ酸配列MNRKARRCLGHLFLSLGMVYLRIGGFSSVVA(配列番号26)またはMHRNFRKWFYVFLCFGVLYVKLGALSSVVA(配列番号27)を有するシグナルペプチドが先に存在する。代替として、本明細書で教示される作用物質をコードする核酸は、シグナルペプチドを提供するベクター内に含まれていてもよい。シグナルペプチドは、本明細書で教示される作用物質の生産のために使用される宿主細胞に応じて、相同シグナルペプチドであってもよく、または異種シグナルペプチドであってもよい。さらに、本明細書で教示される作用物質の原核生物による発現のために、プロテアーゼ切断部位モチーフは、前記シグナルペプチドのC末端に、および本明細書で教示される作用物質のN末端に存在していてもよい。

10

【0247】

20

本発明者らは、それぞれ野生型ヒトまたはマウスWnt7aポリペプチドと比較して、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化せずに、GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化することにおいて、ヒトまたはマウスWnt7aポリペプチドのある特定の変異体が、同様に有効であるか、またはより有効であることを実証した。

【0248】

したがって、特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、Wnt7ポリペプチドの変異体、例えばWnt7aまたはWnt7bポリペプチドの変異体である。さらなる特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、Wnt7aまたはWnt7bポリペプチドのNTDの変異体である。

30

【0249】

ある特定の実施形態において、このような変異体において、配列番号24または配列番号51における17位に対応する位置のグルタミン(Q)残基；配列番号24または配列番号51における20位に対応する位置のイソロイシン(I)残基；配列番号24または配列番号51における25位に対応する位置のプロリン(P)残基；配列番号24または配列番号51における27位に対応する位置のアラニン(A)残基；配列番号24または配列番号51における28位に対応する位置のイソロイシン(I)残基；配列番号24または配列番号51における33位に対応する位置のグルタミン酸(E)残基；配列番号24または配列番号51における37位に対応する位置のメチオニン(M)残基；配列番号24または配列番号51における39位に対応する位置のロイシン(L)残基；配列番号24または配列番号51における41位に対応する位置のグルタミン酸(E)残基；配列番号24または配列番号51における44位に対応する位置のフェニルアラニン(F)残基；配列番号24または配列番号51における50位に対応する位置のアルギニン(R)残基；配列番号24または配列番号51における52位に対応する位置のアスパラギン(N)残基；配列番号24または配列番号51における68位に対応する位置のバリン(V)残基；配列番号24または配列番号51における129位に対応する位置のイソロイシン(I)残基；配列番号24または配列番号51における131位に対応する位置のフェニルアラニン(F)残基；配列番号24または配列番号51における133位に対応する位置のリシン(K)残基；配列番号24または配列番号51における135位に対応する

40

50

位置のフェニルアラニン（F）残基；配列番号24または配列番号51における141位に対応する位置のイソロイシン（I）残基；配列番号24または配列番号51における146位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における158位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における159位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における181位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における191位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における198位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における200位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における205位に対応する位置のバリン（V）残基；配列番号24または配列番号51における208位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基；配列番号24または配列番号51における208位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基；配列番号24または配列番号51における214位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における216位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における218位に対応する位置のプロリン（P）残基；配列番号24または配列番号51における222位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における223位に対応する位置のイソロイシン（I）残基；配列番号24または配列番号51における229位に対応する位置のチロシン（Y）残基；配列番号24または配列番号51における232位に対応する位置のプロリン（P）残基；配列番号24または配列番号51における235位に対応する位置のスレオニン（T）残基；配列番号24または配列番号51における248位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基；配列番号24または配列番号51における289位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における291位に対応する位置のトリプトファン（W）残基；配列番号24または配列番号51における307位に対応する位置のスレオニン（T）残基；および/または配列番号24または配列番号51における318位に対応する位置のリシン（K）残基は、1つまたは複数の（好ましくは3つ以下、好ましくは2つ以下、より好ましくは1つの）他のアミノ酸残基によって、例えば、好ましくは、ただし限定されないが、アラニン（A）残基、アルギニン（R）残基またはグルタミン（Q）残基によって、より好ましくはアラニン（A）残基によって置換されている。ある特定の実施形態において、このような変異体において、配列番号24または配列番号51における17位に対応する位置のグルタミン（Q）残基；配列番号24または配列番号51における20位に対応する位置のイソロイシン（I）残基；配列番号24または配列番号51における25位に対応する位置のプロリン（P）残基；配列番号24または配列番号51における28位に対応する位置のイソロイシン（I）残基；配列番号24または配列番号51における33位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基；配列番号24または配列番号51における37位に対応する位置のメチオニン（M）残基；配列番号24または配列番号51における39位に対応する位置のロイシン（L）残基；配列番号24または配列番号51における41位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基；配列番号24または配列番号51における44位に対応する位置のフェニルアラニン（F）残基；配列番号24または配列番号51における50位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における68位に対応する位置のバリン（V）残基；配列番号24または配列番号51における129位に対応する位置のイソロイシン（I）残基；配列番号24または配列番号51における131位に対応する位置のフェニルアラニン（F）残基；配列番号24または配列番号51における133位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51における135位に対応する位置のフェニルアラニン（F）残基；配列番号24または配列番号51における141位に対応する位置のイソロイシン（I）残基；配列番号24または配列番号51における146位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における158位に対応する位置のアルギニン（R）残基；配列番号24または配列番号51における181位に対応する位置のリシン（K）残基；配列番号24または配列番号51にお

10

20

30

40

50

る 191 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 198 位に対応する位置のリシン (K) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 200 位に対応する位置のリシン (K) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 205 位に対応する位置のバリン (V) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 208 位に対応する位置のグルタミン酸 (E) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 208 位に対応する位置のグルタミン酸 (E) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 214 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 216 位に対応する位置のリシン (K) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 218 位に対応する位置のプロリン (P) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 222 位に対応する位置のリシン (K) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 223 位に対応する位置のイソロイシン (I) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 229 位に対応する位置のチロシン (Y) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 232 位に対応する位置のプロリン (P) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 235 位に対応する位置のスレオニン (T) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 248 位に対応する位置のグルタミン酸 (E) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 289 位に対応する位置のアルギニン (R) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 291 位に対応する位置のトリプトファン (W) 残基 ; 配列番号 24 または配列番号 51 における 307 位に対応する位置のスレオニン (T) 残基 ; および / または配列番号 24 または配列番号 51 における 318 位に対応する位置のリシン (K) 残基は、アラニン (A) 残基によって置換されており ; および / または配列番号 24 または配列番号 51 における 27 位に対応する位置のアラニン (A) 残基は、アルギニン (R) 残基によって置換されており ; および / または配列番号 24 または配列番号 51 における 52 位に対応する位置のアスパラギン (N) 残基は、グルタミン (Q) 残基によって置換されており ; および / または配列番号 24 または配列番号 51 における 159 位に対応する位置のリシン (K) 残基は、アラニン (A) 、セリン (S) またはロイシン (L) 残基によって置換されている。

10

20

【 0 2 5 0 】

ある特定の実施形態において、W n t 7 ポリペプチドの変異体は、2 つまたはそれより多くの (例えば、好ましくは 2 つの、好ましくは 3 つの、より好ましくは 4 つの) 上記で列挙したアミノ酸置換を含む。

30

【 0 2 5 1 】

より特定の実施形態において、W n t 7 a または W n t 7 b ポリペプチドの N T D は、2 つまたはそれより多くの (例えば、好ましくは 2 つの、好ましくは 3 つの、より好ましくは 4 つの) 上記で列挙したアミノ酸置換を含む。

【 0 2 5 2 】

したがって、特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、配列番号 24 または配列番号 51 に記載のアミノ酸配列に対して、少なくとも 50 % 、少なくとも 55 % 、少なくとも 60 % 、少なくとも 65 % 、少なくとも 70 % 、少なくとも 75 % 、少なくとも 80 % 、少なくとも 85 % 、少なくとも 90 % 、少なくとも 95 % 、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、17 位における残基は、グルタミンではなく、20 位における残基は、イソロイシンではなく、25 位における残基は、プロリンではなく、27 位における残基は、アラニンではなく、28 位における残基は、イソロイシンではなく、33 位における残基は、グルタミン酸ではない、37 位における残基は、メチオニンではなく、39 位における残基は、ロイシンではなく、41 位における残基は、グルタミン酸ではない、44 位における残基は、フェニルアラニンではなく、50 位における残基は、アルギニンではなく、52 位における残基は、アスパラギンではなく、68 位における残基は、バリンではなく、129 位における残基は、イソロイシンではなく、131 位における残基は、フェニルアラニンではなく、133 位における残基は、リシンではなく、135 位における残基は、フェニルアラニンではなく、141 位における残基は、イソロイシンではなく

40

50

、 1 4 6 位における残基は、アルギニンではなく、 1 5 8 位における残基は、アルギニンではなく、 1 5 9 位における残基は、リシンではなく、 1 8 1 位における残基は、リシンではなく、 1 9 1 位における残基は、アルギニンではなく、 1 9 8 位における残基は、リシンではなく、 2 0 0 位における残基は、リシンではなく、 2 0 5 位における残基は、バリンではなく、 2 0 8 位における残基は、グルタミン酸ではない、 2 1 4 位における残基は、アルギニンではなく、 2 1 6 位における残基は、リシンではなく、 2 1 8 位における残基は、プロリンではなく、 2 2 2 位における残基は、リシンではなく、 2 2 3 位における残基は、イソロイシンではなく、 2 2 9 位における残基は、チロシンではなく、 2 3 2 位における残基は、プロリンではなく、 2 3 5 位における残基は、スレオニンではなく、 2 4 8 位における残基は、グルタミン酸ではない、 2 8 9 位における残基は、アルギニンではなく、 2 9 1 位における残基は、トリプトファンではない、 3 0 7 位における残基は、スレオニンではなく、および/または 3 1 8 位における残基は、リシンではなく；好ましくは、 2 7 位における残基は、アルギニンであり、 2 8 位における残基は、アラニンであり、 3 3 位における残基は、アラニンであり、 4 1 位における残基は、アラニンであり、 4 4 位における残基は、アラニンであり、 5 0 位における残基は、アラニンであり、 5 2 位における残基は、グルタミンであり、 6 8 位における残基は、アラニンであり、 1 2 9 位における残基は、アラニンであり、 1 3 1 位における残基は、アラニンであり、 1 3 3 位における残基は、アラニンであり、 1 3 5 位における残基は、アラニンであり、 1 4 1 位における残基は、アラニンであり、 1 4 6 位における残基は、アラニンであり、 1 5 8 位における残基は、アラニンであり、 1 5 9 位における残基は、アラニンであり、 1 8 1 位における残基は、アラニンであり、 1 9 1 位における残基は、アラニンであり、 1 9 8 位における残基は、アラニンであり、 2 0 0 位における残基は、アラニンであり、 2 0 5 位における残基は、アラニンであり、 2 0 8 位における残基は、アラニンであり、 2 1 4 位における残基は、アラニンであり、 2 1 6 位における残基は、アラニンであり、 2 1 8 位における残基は、アラニンであり、 2 2 2 位における残基は、アラニンであり、 2 2 3 位における残基は、アラニンであり、 2 2 9 位における残基は、アラニンであり、 2 3 2 位における残基は、アラニンであり、 2 3 5 位における残基は、アラニンであり、 2 4 8 位における残基は、アラニンであり、 2 8 9 位における残基は、アラニンであり、 2 9 1 位における残基は、アラニンであり、 3 0 7 位における残基は、アラニンであり、および/または 3 1 8 位における残基は、アラニンである。

10

20

30

【 0 2 5 3 】

好ましい実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列に対して、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるヒト W n t 7 a の N T D の変異体であって、 1 7 位における残基は、グルタミンではなく、 2 0 位における残基は、イソロイシンではなく、 2 5 位における残基は、プロリンではなく、 2 7 位における残基は、アラニンではなく、 2 8 位における残基は、イソロイシンではなく、 3 3 位における残基は、グルタミン酸ではなく、 3 7 位における残基は、メチオニンではなく、 3 9 位における残基は、ロイシンではなく、 4 1 位における残基は、グルタミン酸ではなく、 4 4 位における残基は、フェニルアラニンではなく、 5 0 位における残基は、アルギニンではなく、 5 2 位における残基は、アスパラギンではなく、 6 8 位における残基は、バリンではなく、 1 2 9 位における残基は、イソロイシンではなく、 1 3 1 位における残基は、フェニルアラニンではなく、 1 3 3 位における残基は、リシンではなく、 1 3 5 位における残基は、フェニルアラニンではなく、 1 4 1 位における残基は、イソロイシンではなく、 1 4 6 位における残基は、アルギニンではなく、 1 5 8 位における残基は、アルギニンではなく、 1 5 9 位における残基は、リシンではなく、 1 8 1 位における残基は、リシンではなく、 1 9 1 位における残基は、アルギニンではなく、 1 9 8 位における残基は、リシンではなく、 2 0 0 位における残基は、リシンではなく、 2 0 5 位における

40

50

残基は、バリンではなく、208位における残基は、グルタミン酸ではなく、214位における残基は、アルギニンではなく、216位における残基は、リシンではなく、218位における残基は、プロリンではなく、222位における残基は、リシンではなく、223位における残基は、イソロイシンではなく、229位における残基は、チロシンではなく、232位における残基は、プロリンではなく、および/または235位における残基は、スレオニンではない、ヒトWnt7aのNTDの変異体である。

【0254】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、配列番号28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、52、53、54、68、69、70、71、72、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、または121、好ましくは、配列番号28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、47、48、49、53、54、68、69、70、71、72、74、76、80、81、83、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、104、105、106、107、108、109、110、111、112、114、118、119または121、より好ましくは、配列番号28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、47、48、49、53、54、68、69、70、71、72、74、76、80、81または83に記載のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる(図8)。

10

20

【0255】

好ましい実施形態において、このような変異体において、配列番号24または配列番号51における159位に対応する位置のリシン(K)残基は、1つまたは複数の(好ましくは3つ以下、好ましくは2つ以下、より好ましくは1つの)他のアミノ酸残基によって、例えば、好ましくは、ただし限定されないが、アラニン(A)残基、セリン(S)またはロイシン(L)残基によって置換されている。より好ましい実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、配列番号28、80、81、85、118または119、好ましくは、配列番号28または85、より好ましくは、配列番号28に記載のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

30

【0256】

特定の実施形態において、Wnt7ポリペプチドの変異体は、全長野生型Wnt7ポリペプチドのGPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性の、少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、好ましくは100%を有する。好ましい実施形態において、Wnt7ポリペプチドの変異体は、全長野生型Wnt7ポリペプチドのGPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性の少なくとも70%を有する。特定の実施形態において、Wnt7ポリペプチドの変異体は、全長野生型Wnt7ポリペプチドのGPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性より高い(例えば1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍もしくは2倍高い、またはそれよりさらに高い)GPR124/RECK/Frizzled/LRP媒介性Wntシグナル伝達活性を有する。

40

【0257】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、水溶性である。例えば、作用物質の溶解性は、Wntポリペプチドのパルミトイル化されたFrizzled結合性ドメインの代わりに、Frizzled特異的な抗体またはその断片を使用することに

50

よって増加させることができる。

【0258】

さらなる態様は、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸であって、作用物質は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドである、核酸に関する。

【0259】

「コードする」は、核酸配列またはその部分が、問題の生物の遺伝子コードに基づき、特定のアミノ酸配列、例えば、1つまたは複数の望ましいタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列、または鋳型転写産物（例えばRNAまたはRNA類似体）と関連する別の核酸配列に対応していることを意味する。

【0260】

本明細書で開示される作用物質をコードする核酸を発現させるために、作用物質がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドである場合、核酸は、当業界において周知の通り、核酸発現カセットおよび/またはベクターに挿入されていてもよい。

【0261】

したがって、さらなる態様は、プロモーターおよび/または転写調節シグナルおよび翻訳調節シグナルに作動可能に連結した、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸を含む核酸発現カセットに関する。

【0262】

用語「核酸発現カセット」は、本明細書で使用される場合、本明細書において定義される核酸断片、好ましくは組換え核酸分子を、発現されるように挿入することができる核酸分子、典型的にはDNAであって、前記核酸分子は、核酸断片の発現を制御する1つまたは複数の核酸配列を含むものを指す。核酸断片の発現を制御するこのようなより多くの核酸配列の非限定的な例としては、プロモーター配列、オープンリーディングフレームおよび転写ターミネーターが挙げられる。

【0263】

好ましくは、核酸発現カセットは、前記1つまたは複数のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする1つまたは複数のオープンリーディングフレーム（ORF）を含んでいてもよい。「オープンリーディングフレーム」または「ORF」は、それ自体公知の翻訳開始コドンから始まり翻訳終止コドンで終わり、いかなる内部のフレーム内翻訳終止コドンも含有せず、潜在的にタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードすることが可能な、一連のコードヌクレオチドの三つ組み（コドン）を指す。したがって、この用語は、当業界で使用される「コード配列」と同義であり得る。

【0264】

「作動可能な連結」は、調節配列および発現させようとする配列が、前記発現が許容されるように接続される連結である。例えば、配列、例えばプロモーターおよびORFなどは、前記配列間の連結の性質が、（1）フレームシフト突然変異の導入を引き起こさない、（2）ORFの転写を指示するプロモーターの能力に干渉しない、（3）プロモーター配列から転写されるORFの能力に干渉しない場合、作動可能に連結したとすることができる。したがって、「作動可能に連結した」は、発現制御配列、例えばプロモーターが目的の配列の転写/発現を効果的に制御するように、遺伝学的コンストラクトに取り込まれていることを意味する場合がある。

【0265】

転写および翻訳調節配列または発現に必要なエレメントの正確な性質は、発現環境間で変更し得るが、典型的には、転写ターミネーター、エンハンサーを含んでいてもよい。

【0266】

「プロモーター」への言及は、その最も広い関係で解釈されるものとし、正確な転写開始、ならびに適用可能であれば、遺伝子発現または例えば内部または外部（例えば、外因性）の刺激に対するその応答の正確な空間的および/または一時的な制御に必要な転写調節配列を含む。より特定には、「プロモーター」は、RNAポリメラーゼが結合し、転写を開始させる、核酸分子、好ましくはDNA分子上の領域を描写する場合もある。プロモ

10

20

30

40

50

ーターは、好ましくは、ただし必ずしもそうとは限らないが、それによって転写が制御される配列の上流に、すなわち5'に位置する。典型的には、原核生物において、プロモーター領域は、プロモーターそれ自体と、RNAに転写されると、タンパク質合成の開始をシグナル伝達する配列（例えば、シャイン・ダルガノ配列）の両方を含有していてもよい。プロモーター配列はまた、「エンハンサー領域」を含んでいてもよく、これは、遺伝子クラスター中での遺伝子の転写レベルを強化するように、タンパク質と結合できるDNAの1つまたは複数の領域（すなわちトランス作用因子）である。エンハンサーはまた、典型的にはコード領域の5'末端にあるが、プロモーター配列を分離することもでき、例えば、遺伝子のイントロン領域内であってもよく、または遺伝子のコード領域の3'にあってもよい。

10

【0267】

実施形態において、本明細書において予期されるプロモーターは、構成的であってもよく、または誘導性であってもよい。構成的プロモーターは、その発現が標準的な培養条件下で一定であるプロモーターと理解される。誘導性プロモーターは、1つまたは複数の誘導のきっかけに応答するプロモーターである。例えば、誘導性プロモーターは、化学的に調節されるものでもよく（例えば、その転写活性が、化学的な誘導因子、例えばアルコール、テトラサイクリン、ステロイド、金属、または他の小分子の存在または非存在によって調節されるプロモーター）、または物理的に調節されるものでもよい（例えば、その転写活性が、物理的な誘導因子、例えば光または高温もしくは低温の存在または非存在によって調節されるプロモーター）。誘導性プロモーターはまた、それ自体が化学的または物理的なきっかけによって直接調節される1つまたは複数の転写因子によって間接的に調節されるものでもよい。プロモーターの非限定的な例としては、T7、U6、H1、レトロウイルスであるラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 α -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、およびEF1プロモーターが挙げられる。

20

【0268】

用語「ターミネーター」または「転写ターミネーター」は、一般的に、転写の終結をシグナル伝達する、転写単位の末端における配列エレメントを指す。例えば、ターミネーターは通常、目的のポリペプチドをコードするORFの下流、すなわちその3'に位置する。例えば、組換え核酸が、例えば連続して並べられた2つまたはそれより多くのORFを含有し、一緒になってマルチシストロン性転写単位を形成する場合、転写ターミネーターは、最も下流のORFの3'に位置することが有利な場合がある。

30

【0269】

特定の実施形態において、核酸発現カセットは、1つまたは複数のプロモーター、エンハンサー、ORFおよび/または転写ターミネーターに作動可能に連結した、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸を含む。

【0270】

さらなる態様は、ウイルスベクターなどの、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、または本明細書で開示される核酸発現カセットを含むベクターに関する。

40

【0271】

用語「発現ベクター」または「ベクター」は、本明細書で使用される場合、本明細書において定義される核酸断片、好ましくは組換え核酸分子を挿入しクローニングすることができる、すなわち増殖することができる核酸分子、典型的にはDNAを指す。したがって、ベクターは、典型的には、1つまたは複数の固有の制限部位を含有すると予想され、クローニングされた配列が複製可能になるように、規定の細胞または媒体生物中で自律複製することができる。ベクターはまた、好ましくは、ベクターを含有するレシピエント細胞の選択が可能になるように、選択マーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子などを含有していてもよい。ベクターとしては、これらに限定されないが、適宜、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ、バクテリオファージに由来するベクター、PAC、BAC、線

50

形核酸、例えば、線形DNA、トランスポゾン、ウイルスベクターなどを挙げる事ができる（例えば、Sambrook et al., 1989; Ausubel 1992を参照）。ウイルスベクターとしては、とりわけ、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルスベクター、例えば、HIV、SV40、EBV、HSVまたはBPVベースのベクターを挙げる事ができる。発現ベクターは、一般的に、所望の発現系中で、例えば、インビトロで、細胞、器官および/または生物中で、そこに導入された核酸またはオープンリーディングフレームの発現が可能になるように、および/またはそれが実行されるように構成される。例えば、発現ベクターは、有利には、好適な調節配列を含んでいてもよい。

【0272】

特定のベクターの選択における重要な要因としては、とりわけ、レシピエント細胞の選択、容易にベクターを含有するレシピエント細胞を認識して、ベクターを含有しないレシピエント細胞から選択することができること；特定のレシピエント細胞において望ましいベクターのコピーの数；ベクターにとって染色体に組み込まれるのが望ましいか、またはレシピエント細胞中の染色体外に留まるのが望ましいか；および異なる種のレシピエント細胞間でベクターを「シャトル輸送」できることが望ましいかどうかを挙げられる。

【0273】

発現ベクターは、自律型でもよく、または組み込み型でもよい。核酸は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミドまたはウイルス粒子などの発現ベクターの形態で細胞に導入された状態であってもよい。組換え核酸は、染色体外に維持されてもよく、または細胞染色体のDNAに組み込まれていてもよい。発現ベクターは、望ましい核酸で形質転換された細胞の検出および/または選択を可能にするために、選択された条件下で、細胞の生存に必要なタンパク質をコードする選択マーカー遺伝子（例えば、ウラシル生合成に必要な酵素をコードするURA3、またはロイシン生合成に必要な酵素をコードするLEU2、またはトリプトファン生合成に必要な酵素をコードするTRP1）を含有していてもよい。発現ベクターはまた、自律複製配列（ARS）を含んでいてもよい。ARSは、動原体（CEN）および複製起点（ORI）を含んでいてもよい。例えば、ARSは、ARS18またはARS68であり得る。

【0274】

組み込み型ベクターは、一般的に、少なくとも第1の挿入可能なDNA断片、選択可能マーカー遺伝子、および第2の挿入可能なDNA断片の連続的に並べられた配列を含む。第1および第2の挿入可能なDNA断片は、それぞれ、約200（例えば、約250、約300、約350、約400、約450、約500、または約1000またはそれより多くの）ヌクレオチドの長さであり、形質転換しようとする細胞種のゲノムDNAの一部に相同なヌクレオチド配列を有する。発現のための目的の核酸を含有するヌクレオチド配列は、このベクター中において、マーカー遺伝子の前かまたはその後かにかかわらず、第1および第2の挿入可能なDNA断片の間に挿入される。組み込み型ベクターは、細胞ゲノムへの目的のヌクレオチド配列の組み込みを容易にするために、形質転換の前に線形化することができる。

【0275】

目的の細胞にベクターを導入する前に、ベクターは、*Escherichia coli* (*E. coli*)などの細菌細胞中で増殖（例えば増幅）させることができる。ベクターDNAは、細菌環境からのベクターDNAの精製をもたらす当業界において公知の方法のいずれかによって、細菌細胞から単離することができる。*E. coli*のタンパク質は哺乳類細胞にとって毒性であり得るため、これらのタンパク質がプラスミドDNA調製物中に存在しないように確実にして、フェノール、クロロホルム、およびエーテルを用いて精製されたベクターDNAを大規模に抽出することができる。

【0276】

他所で述べたように、作用物質は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含んでいてもよい。このようなものは、好適には、前記タンパク質、ポリペプチドまたはペプチ

10

20

30

40

50

ドをコードし、前記宿主細胞または宿主生物中での前記タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現、それに続くタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの精製のために設計された発現コンストラクトで形質転換された宿主細胞または宿主生物による発現を介して得ることができる。

【0277】

したがって、さらなる態様は、本明細書で教示される核酸、核酸発現カセットまたはベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0278】

ある特定の実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、または哺乳類細胞であり得る。

【0279】

用語「宿主細胞」および「宿主生物」は、好適には、細菌などの原核生物と、酵母、真菌、原生動物、植物および動物などの真核生物の両方を包含する細胞または生物を指す場合がある。宿主細胞としては、とりわけ、細菌（例えば、*E. coli*、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescens*、または *Bacillus subtilis*）、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae* または *Pichia pastoris*）などの単細胞生物、（培養された）植物細胞（例えば、*Arabidopsis thaliana* または *Nicotiana tabacum* に由来する）および（培養された）動物細胞（例えば、脊椎動物細胞、哺乳類細胞、霊長類細胞、ヒト細胞または昆虫細胞）が予期される。宿主生物としては、とりわけ、植物および動物などの多細胞生物、好ましくは動物、より好ましくは温血動物、さらにより好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくは哺乳動物、さらにより好ましくは霊長類が予期され；特定には、非ヒトである、このような動物および動物のカテゴリーが予期される。

【0280】

このようなタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、好適には、単離されていてもよい。特定の構成要素（例えば核酸、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドなど）に関する用語「単離された」は、一般的に、このような構成要素が、その天然環境の1つまたは複数の他の構成要素から分離された状態で存在すること、例えば、その天然環境の1つまたは複数の他の構成要素から分離されているか、またはそれから分離された状態で調製および/もしくは維持されていることを意味する。例えば、単離されたヒトまたは動物タンパク質または複合体は、それが天然に存在している場合、ヒトまたは動物の体から分離された状態で存在していてもよい。用語「単離された」は、本明細書で使用される場合、好ましくは修飾句「精製された」も包含する場合がある。ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または核酸に関する用語「精製された」は、本明細書で使用される場合、絶対的な純度を必要としない。その代わりに、このようなペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または核酸が、他の分析物に対するそれらの存在量（都合のよい形態としては、質量または重量または濃度の単位で表される）が、開始時の組成物または試料中より大きい別個の環境にあることを意味する。別個の環境は、単一の培地、例えば、単一の溶液、ゲル、沈殿、凍結乾燥物などを意味する。精製された核酸、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、例えば、実験室での、または組換え合成、クロマトグラフィー、予備的な電気泳動、遠心分離、沈殿、親和性精製などを含む公知の方法によって得ることができる。精製されたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、好ましくは、別個の環境のタンパク質含量の、10重量%、より好ましくは50重量%、例えば60重量%、さらにより好ましくは70重量%、例えば80重量%、さらにより好ましくは90重量%、例えば95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、99重量%を構成していてもよく、またはさらには100重量%を構成していてもよい。タンパク質含量は、例えば、ローリー法（Lowry et al. 1951. *J Biol Chem* 193: 265）によって決定してもよく、適宜、Hartree 1972 (*Anal Biochem* 48: 422-427)によって記載されるようにして決定してもよい。ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の純度は、選

10

20

30

40

50

元または非還元条件下で、クーマシーブルーまたは、好ましくは銀染色を使用して、SDS-PAGEによって決定することができる。核酸の量は、吸光度A₂₆₀を測定することによって決定することができる。核酸の純度は、吸光度A₂₆₀/A₂₈₀を測定することによって、またはアガロースもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドもしくは類似の染色によって決定することができる。

【0281】

さらに、動物細胞に核酸を導入する数々の他の周知の方法があり、これらのいずれも、本明細書において使用することができる。最も簡単には、核酸は、標的細胞/標的組織に直接注射することができる。他の方法としては、レシピエント細胞と核酸を含有する細菌プロトプラストとの融合、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、塩化リチウム、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、カチオン脂質もしくはリポソームのような組成の使用、または受容体媒介性エンドサイトーシス、遺伝子銃粒子衝撃（「ジーンガン」方法）、ウイルスベクター（すなわち、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レトロウイルスまたは抗ウイルス物質に由来するもの）での感染、電気穿孔のような方法などが挙げられる。標的細胞に核酸分子をデリバリーするのに好適な他の技術または方法としては、ポリ(乳酸-CO-グリコール酸)ポリマーマイクロスフェアからのNA分子の連続デリバリー、または生成物をデリバリーするマイクロポンプへの保護された(安定化された)NA分子の直接注射が挙げられる。別の可能性は、埋め込み可能な薬物放出分解性マイクロスフェアの使用である。また、様々な種類のリポソーム(イムノリポソーム、ペグ化(イムノ)リポソーム)、カチオン脂質およびポリマー、ナノ粒子またはデンドリマー、ポリ(乳酸-CO-グリコール酸)ポリマーマイクロスフェア、埋め込み可能な薬物放出分解性マイクロスフェアなどへのNAのカプセル化；ならびにNAとヌクレアーゼ阻害剤であるオーリントリカルボン酸のような保護剤との同時注射も想定される。異なる上述のデリバリー様式または方法の組合せも使用され得ることは、明らかであると予想される。

【0282】

特定の実施形態において、本明細書に記載される核酸を含むベクターは、ウイルスベクターであり、好ましくは中枢および/または末梢神経系に特異的に向けられたウイルスベクター(例えば、脳特異的なウイルスベクター)である。さらなる特定の実施形態において、ウイルスベクターは、中枢神経系(CNS)ニューロン特異的なアデノ随伴ウイルス血清型9(AAV9)突然変異体である。例えば、ウイルスベクターは、Devermanら(Deverman et al., Nat Biotechnol, 34:204-209 (2016))およびChanら(Chan et al., Nat Neurosci, 20(8): 1172-1179 (2017))に記載された、ペプチドSAQTLAVPFKA(配列番号55)またはSDGTLAVPFKA(配列番号56)を提示するCNS細胞特異的AAV-PHP.BまたはAAV-PHP.eBウイルスベクターである。

【0283】

好ましい実施形態において、ウイルスベクターは、血液脳関門内皮細胞特異的ウイルスベクターである。さらに好ましい実施形態において、ウイルスベクターは、血液脳関門内皮細胞特異的キャプシドを有するアデノ随伴ウイルス血清型2(AAV2)突然変異体である。例えば、ウイルスベクターは、Korbelinら(Korbelin et al., EMBO Molecular Medicine, 8, 609-625 (2016))に記載された、ペプチドNRGTED(配列番号57)を提示する血液脳関門内皮細胞特異的AAV-BR1ウイルスベクターである。

【0284】

さらなる態様は、本明細書で開示される作用物質、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、本明細書で開示される核酸発現カセットまたは本明細書で開示されるベクター、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。このような医薬製剤または組成物は、パーツのキット中に含まれていてもよい。

【0285】

10

20

30

40

50

用語「薬学的に許容される」は、本明細書で使用される場合、当業界での使用と一致し、医薬組成物の他の成分と適合性であり、そのレシピエントにとって有害ではないことを意味する。

【0286】

「担体」または「賦形剤」は、本明細書で使用される場合、様々な溶媒、希釈剤、緩衝剤（例えば、中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝食塩水など）、可溶化剤、コロイド、分散媒、媒体、フィラー、キレート剤（例えば、EDTAまたはグルタチオンなど）、アミノ酸（例えば、グリシンなど）、タンパク質、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色剤、着香料、芳香剤、増粘剤、デポー剤効果を達成するための作用物質、コーティング、抗真菌剤、保存剤、抗酸化剤、張度制御剤、吸収遅延剤などを含む。このよ

10

【0287】

医薬組成物の製剤化における使用のための例示的な非限定的な担体としては、例えば、静脈内（IV）への使用、リポソームまたは界面活性剤を含有する小胞、マイクロスフェア、マイクロビーズおよびマイクロソーム、粉剤、錠剤、カプセル剤、坐剤、水性懸濁剤、エアロゾル剤に好適な有機共溶媒、および当業者にとって明らかな他の担体などを含有する、または含有しない、水中油または油中水型乳剤、水性組成物が挙げられる。

【0288】

本明細書において意図される通りの医薬組成物は、本質的に任意の投与経路、例えば、限定されないが、経口投与（例えば、経口摂取または吸入など）、鼻腔内投与（例えば、経鼻吸入または経鼻粘膜適用など）、非経口投与（例えば、皮下、静脈内（I.V.）、筋肉内、腹膜内または胸骨内注射または輸注など）、経皮または経粘膜（例えば、経口、舌下、経鼻など）投与、局部への投与、直腸、膣または気管内への点滴注入などのために製剤化することができる。この方法において、本方法および組成物によって達成可能な治療作用は、例えば、所与の適用の具体的な必要性によって、全身、局所、組織特異的な作用などであり得る。

20

【0289】

例えば、経口投与の場合、医薬組成物は、丸剤、錠剤、表面を滑らかに仕上げた錠剤、コーティングされた（例えば、糖衣）錠剤、顆粒剤、ハードおよびソフトゼラチンカプセル、水性、アルコール性または油性液剤、シロップ剤、乳剤または懸濁剤の形態で製剤化することができる。一例において、限定されないが、経口用剤形の調製は、好適には、粉末の形態で好適な量の本明細書で開示される作用物質を、適宜微粉化した1種または複数の固形担体も含めて、均一かつ密接に一緒にブレンドすること、およびブレンドを丸剤、錠剤またはカプセル剤に製剤化することによって達成することができる。例示的な、ただし非限定的な固形担体としては、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖（例えば、グルコース、マンノース、ラクトースまたはスクロースなど）、糖アルコール（例えば、マンニトールなど）、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリジン（polyvinylpyrrolidone）、低融点ワックスおよびイオン交換樹脂が挙げられる。医薬組成物を含有する圧縮錠剤は、例えば上述したような固形担体と共に本明細書で開示される作用物質を均一かつ密接に混合して、必要な圧縮特性を有する混合物を提供し、次いで好適な機械で混合物を所望の形状およびサイズに圧縮することによって調製することができる。鋳型成形した錠剤は、不活性液体希釈剤で加湿した粉末化した化合物の混合物を、好適な機械で鋳型成形することによって作製され得る。ソフトゼラチンカプセルおよび坐剤のための好適な担体は、例えば、脂肪、ワックス、半固体および液体ポリオール、天然油または硬化油などである。

30

【0290】

例えば、経口もしくは経鼻エアロゾルまたは吸入投与の場合、医薬組成物は、例示的な担体を用いて、例えば、食塩水、ポリエチレングリコールまたはグリコール、DPPC、

40

50

メチルセルロースを含む溶液の形態として、または粉末化した分散剤を含む混合物の形態などとして製剤化することができ、さらに、ベンジルアルコールもしくは他の好適な保存剤、生物学的利用率を強化するための吸収促進剤、フルオロカーボン、および/または当業界において公知の他の可溶化剤または分散剤を採用してもよい。エアロゾルまたはスプレーの形態での投与に好適な医薬製剤は、例えば、薬学的に許容される溶媒、例えばエタノールもしくは水、またはこのような溶媒の混合物中の、本明細書で教示される作用物質またはその生理学的に許容される塩の液剤、懸濁剤または乳剤である。必要があれば、製剤はまた、加えて、他の医薬助剤、例えば界面活性剤、乳化剤および安定剤、ならびに噴射剤を含有していてもよい。例証として、デリバリーは、使い捨てのデリバリーデバイス、ミストネブライザー、呼吸で活性化する粉末吸入器、エアロゾル定量吸入器(MDI)、またはその他の任意の当業界において利用可能な多数のネブライザーデリバリーデバイスの使用によってなされ得る。加えて、ミスト Tent または気管内チューブを介した直接投与も使用される場合がある。

10

【0291】

粘膜表面を介した投与のための担体の例は、特定の経路、例えば、経口、舌下、経鼻などに依存する。経口投与とされる場合、説明に役立つ例としては、医薬品グレードのマニトール、デンプン、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカライド(sodium saccharide)、セルロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられ、好ましくはマニトールである。鼻腔内投与とされる場合、説明に役立つ例としては、ポリエチレングリコール、リン脂質、グリコールおよび糖脂質、スクロース、および/またはメチルセルロースが挙げられ、ラクトースなどの増量剤および塩化ベンザルコニウム、EDTAなどの保存剤含有または非含有の粉末懸濁剤も挙げられる。特に例示的な実施形態において、リン脂質である1,2ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)は、約0.1から3.0 mg/mlの濃度での本発明の化合物の鼻腔内投与の場合、約0.01~0.2%での等張水性担体として使用される。

20

【0292】

例えば、非経口投与の場合、医薬組成物は、有利には、好適な溶媒、希釈剤、可溶化剤または乳化剤などを含む液剤、懸濁剤または乳剤として製剤化することができる。好適な溶媒は、限定されないが、水、生理的食塩水またはアルコール、例えばエタノール、プロパノール、グリセロールであり、加えて、糖溶液、例えばグルコース、転化糖、スクロースまたはマニトール溶液、または代替として上述した様々な溶媒の混合物も挙げられる。注射用溶液または懸濁剤は、公知の技術に従って、好適な非毒性の非経口的に許容できる希釈剤もしくは溶媒、例えばマニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液もしくは等張塩化ナトリウム溶液、または好適な分散剤もしくは湿潤剤および懸濁剤、例えば、合成モノもしくはジグリセリドなどの滅菌された刺激の少ない揮発性油、およびオレイン酸などの脂肪酸を使用して製剤化することができる。本発明の作用物質およびその薬学的に許容される塩はまた、凍結乾燥することもでき、得られた凍結乾燥物は、例えば、注射または輸注調製物の生産のために使用される。例えば、静脈内での使用のための担体の1つの説明に役立つ例としては、10% USP エタノール、40% USP プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール600およびその残部のUSP注射用水(WFI)の混合物が挙げられる。静脈内での使用のための他の例示的な担体としては、10% USP エタノールおよびUSP WFI; USP WFI中の0.01~0.1%トリエタノールアミン; またはUSP WFI中の0.01~0.2%ジパルミトイルジホスファチジルコリン; および1~10%スクアレンもしくは非経口用水中植物油型乳剤が挙げられる。皮下または筋肉内での使用のための担体の説明に役立つ例としては、リン酸緩衝食塩水(PBS)溶液、WFI中の5%デキストロースおよび5%デキストロース中の0.01~0.1%トリエタノールアミン、もしくはUSP WFI中の0.9%塩化ナトリウム、または10% USP エタノール、40% プロピレングリコールおよびその残部の許容できる等張溶液、例えば5%デキストロースもしくは0.9%塩化ナトリウムの1から2種または1から4種の混合物; またはUSP WFI中の0.01~0.2%ジパ

30

40

50

ルミトイルジホスファチジルコリン、および1～10%スクアレンまたは非経口用水中植物油型乳剤が挙げられる。

【0293】

水性製剤が好ましい場合、このような製剤は、1種または複数の界面活性剤を含んでもよい。例えば、組成物は、少なくとも1種の好適な界面活性剤、例えば、リン脂質界面活性剤を含むミセル分散液の形態であってもよい。リン脂質の説明に役立つ例としては、ジアシルホスファチジルグリセロール、例えばジミリストイルホスファチジルグリセロール(DPMG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、およびジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)など、ジアシルホスファチジルコリン、例えばジミリストイルホスファチジルコリン(DPMC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、およびジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)など；ジアシルホスファチジン酸、例えばジミリストイルホスファチジン酸(DPMA)、ジパルミトイル(dipalmitoyl)ホスファチジン酸(DPPA)、およびジステアロイルホスファチジン酸(DSPA)など；ならびにジアシルホスファチジエタノールアミン、例えばジミリストイルホスファチジエタノールアミン(DPME)、ジパルミトイルホスファチジエタノールアミン(DPPE)およびジステアロイルホスファチジエタノールアミン(DSPE)などが挙げられる。典型的には、水性製剤中の界面活性剤：活性物質のモル比は、約10：1から約1：10、より典型的には約5：1から約1：5と予想されるが、対象とする具体的な目的に最も適合するように、任意の有効量の界面活性剤を水性製剤中に使用することができる。

10

20

【0294】

坐剤の形態で直腸投与される場合、これらの製剤は、本発明による化合物を、常温で固体であるが、直腸腔中で液化および/または溶解して薬物放出する好適な非刺激性の賦形剤、例えばカカオバター、合成グリセリドエステルまたはポリエチレングリコールと混合することによって調製することができる。

【0295】

マイクロカプセル、インプラントまたはロッドのための好適な担体は、例えば、グリコール酸と乳酸とのコポリマーである。

【0296】

当業者は、上記の説明が網羅的というより例示的であることを認識していると予想される。実際に、多くの追加の製剤技術ならびに薬学的に許容される賦形剤および担体溶液が当業者周知であり、例えば、様々な処置レジメンで本明細書に記載される特定の組成物を使用するために、好適な投与および処置レジメンの開発がなされる。

30

【0297】

好ましい実施形態において、本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、核酸を含む核酸発現カセット、核酸もしくは核酸発現カセットを含むベクター、宿主細胞または医薬組成物は、非経口投与される。より好ましくは、本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、核酸を含む核酸発現カセット、または核酸、核酸発現カセットを含むベクター、宿主細胞または医薬組成物は、例えば輸注によって、静脈内投与される。

40

【0298】

特定の実施形態において、本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、または核酸を含む核酸発現カセットは、遺伝子治療で使用される。さらなる特定の実施形態において、本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、または核酸を含む核酸発現カセットは、中枢および/または末梢神経系に向けられる遺伝子治療、例えば、脳に向けられる遺伝子治療、より特定には、血液脳関門内皮細胞に向けられる遺伝子治療に使用される。

【0299】

したがって、遺伝子治療が必要な対象における、遺伝子治療、特定には中枢および/または末梢神経系に向けられる遺伝子治療のための方法であって、対象に、特定には対象の

50

中枢および/または末梢神経系に、本明細書に記載される核酸発現カセットまたはベクターを導入すること；および対象において、特定には対象の中枢および/または末梢神経系において、治療有効量の、本明細書で教示される核酸によってコードされた作用物質を発現させることを含む、方法も本明細書で提供される。

【0300】

用語「遺伝子治療」は、本明細書で使用される場合、導入のために使用される方法に関わりなく、処置または予防目的のための、宿主細胞への外因性ポリヌクレオチドの導入を指す。このような方法としては、本明細書の他所で記載されるような、ベクターが媒介する遺伝子移入（例えば、ウイルス感染/トランスフェクション、または様々な他のタンパク質ベースまたは脂質ベースの遺伝子デリバリー複合体による）などの様々な周知の技術が挙げられる。導入されるポリヌクレオチドは、宿主細胞中に安定して維持されてもよく、または一時的に維持されてもよい。安定な維持は、典型的には、導入されるポリヌクレオチドが、宿主細胞に適合する複製起点を含有すること、または宿主細胞のレプリコン、例えば染色体外のレプリコン（例えば、プラスミド）または核もしくはミトコンドリアの染色体に組み込まれていることのいずれかを必要とする。当業界において公知のように、遺伝子の哺乳類細胞への移行を媒介することが可能な様々なベクターが公知である。例えば、本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、核酸を含む核酸発現カセットのベクターが媒介する遺伝子移入は、本明細書の他所で記載されるような中枢および/または末梢神経系に特異的に向けられたウイルスベクター（例えば、AAV-PHP.BおよびAAV-PHP.e Bウイルスベクター）または血液脳関門内皮細胞に特異的なウイルスベクター（例えば、AAV-BR1ウイルスベクター）を使用して実行することができる。

10

20

【0301】

特定の実施形態において、作用物質をコードする核酸、核酸を含む核酸発現カセット、核酸もしくは核酸発現カセットを含むベクターまたは本明細書で教示される医薬組成物は、本明細書で教示される核酸または核酸発現カセットを含むベクターで形質転換された同種異系細胞の注射（例えば、静脈内）または移植によって対象に投与される。投与のとき、注射または移植された同種異系細胞は、インビボにおいて、本明細書で教示される作用物質をコードする核酸を転写し、翻訳することになる。適宜投与される1種または複数の他の活性化化合物と組み合わせられた、本明細書で教示される作用物質の投薬または量は、個々のケースに依存し、慣例通りに、最適な作用を達成するために個々の環境に適合させることになる。したがって、単位用量およびレジメンは、処置しようとする障害の性質および重症度に依存し、さらに、対象の種、性別、年齢、体重、全身の健康状態、食事、投与の方法および時間、免疫の状態、処置しようとするヒトまたは動物の個々の応答性、使用される化合物の有効性、代謝的安定性および作用の持続時間などの要因、療法が緊急または長期または予防的であるかどうか、または本発明の作用物質に加えて他の活性化化合物が投与されるかどうかにも依存する。治療有効性を最適化するために、本明細書で教示される作用物質はまず、異なる用量レジメンで投与してもよい。典型的には、例えば臨床試験手順の一部として、組織中の作用物質のレベルを適切なスクリーニングアッセイを使用してモニターして、所与の処置レジメンの有効性を決定することができる。投与頻度は、医療技術者（例えば、医者、獣医または看護師）の能力および臨床的な判断の範囲内である。典型的には、投与レジメンは、最適な投与パラメータを確立することができる臨床試験によって確立される。しかしながら、医師は、このような投与レジメンを、上述の要因の1つまたは複数、例えば対象の年齢、健康状態、体重、性別および医学上の状態に従って変更することができる。投与頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて変更することができる。

30

40

【0302】

本明細書に記載される作用物質またはそれを含む医薬組成物の毒性および治療有効性は、公知の薬学的手順によって、例えば、細胞培養または実験動物において決定することができる。これらの手順は、例えば、LD50（集団の50%を致死させる致死量）および

50

ED50（集団の50%において治療上有効な用量）を決定するために使用することができる。毒性作用と治療作用との間の用量比率は、治療指数であり、LD50/ED50の比率として表すことができる。高い治療指数を呈示する医薬組成物が好ましい。毒性副作用を呈示する医薬組成物が使用できるが、正常細胞（例えば、非標的化細胞）に対する起こり得るダメージを最小化し、それによって副作用を低減するために、このような化合物を罹患した組織の部位に標的化するデリバリー系を設計することに注意を払うべきである。

【0303】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータは、適切な対象において使用するための様々な投薬量を製剤化するのに使用することができる。このような医薬組成物の投薬量は、一般的に、毒性をほとんど示さない、または全く示さないED50を含む循環濃度の範囲にある。投薬量は、採用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変更することができる。本明細書に記載されるように使用される医薬組成物の場合、治療有効用量は、最初に、細胞培養アッセイから推測することができる。用量は、細胞培養で決定される場合、IC50（すなわち、症状の半最大阻害を達成する医薬組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲が達成されるように、動物モデルで決めることができる。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

10

【0304】

限定されないが、疾患のタイプおよび重症度に応じて、本明細書で教示される作用物質の典型的な投薬量（例えば、典型的な1日投薬量または典型的な間欠的な投薬量、例えば、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、毎週、1.5週毎、2週間毎、3週間毎、毎月などの典型的な投薬量）は、上述の要因に応じて、1用量当たり、対象の体重に対して約10 μ g/kgから約500 μ g/kg、例えば、対象の体重に対して、20~400 μ g/kgまたは20~200 μ g/kgまたは20~100 μ g/kgまたは40~80 μ g/kgなどの範囲であり得る。

20

【0305】

一例として、限定されないが、本明細書で教示される作用物質は、1用量当たり、約5 μ g/kg、または約10 μ g/kg、または約15 μ g/kg、または約20 μ g/kg、または約25 μ g/kg、または約30 μ g/kg、または約35 μ g/kg、または約40 μ g/kg、または約45 μ g/kg、または約50mg/kg、または約60 μ g/kg、または約70 μ g/kg、または約80 μ g/kg、または約90 μ g/kg、または約100 μ g/kg、または約200 μ g/kg、または約300 μ g/kg、または約400 μ g/kg、または約500 μ g/kgで投与されてもよい。

30

【0306】

特定の実施形態において、本明細書で教示される作用物質は、持続デリバリー系、例えば（部分的に）埋め込まれた持続デリバリー系を使用して投与される。当業者は、このような持続デリバリー系は、本明細書で教示される作用物質を保持するためのリザーバ、ポンプおよび輸注手段（例えば、チューブ系）を含み得ることを理解しているものと予想される。例えば、持続デリバリー系は、脳中に埋め込まれたミニ浸透圧ポンプ系であってもよい。

40

【0307】

特定の実施形態において、本明細書で開示される作用物質は、医薬組成物の主要な、または唯一の活性成分である。

【0308】

さらなる態様は、医薬として使用するための、本明細書で開示される作用物質、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、本明細書で開示される核酸発現カセット、本明細書で開示されるベクターまたは本明細書で開示される医薬組成物に関する。

【0309】

さらなる態様は、神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系（CNS）障

50

害の予防または治療における使用のための、本明細書で開示される作用物質、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、本明細書で開示される核酸発現カセット、本明細書で開示されるベクターまたは本明細書で開示される医薬組成物に関する。

【0310】

用語「治療する」または「治療」は、すでに発症した疾患または状態の治療的処置の両方、例えば、すでに発症した神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系（CNS）障害の療法、加えて防止または予防的措置を包含し、この目的は、望ましくない苦しみの発生機会を予防したりまたは小さくしたりすること、例えば神経血管機能不全を含む神経血管障害またはCNS障害の出現、発症および進行を予防することである。有益な、または所望の臨床結果としては、これらに限定されないが、1つまたは複数の症状または1つまたは複数の生物学的なマーカーの軽減、疾患の程度の低減、疾患の安定化された（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延または減速、疾患の状態の緩和または一時的緩和などを挙げることができる。「治療」はまた、治療を受けない場合に予測される生存と比較して、生存を延長することを意味する場合もある。

10

【0311】

用語「神経血管障害」または「神経血管疾患」は、本明細書で使用される場合、脳血管系および/または脊髄に血液供給する血管系に影響を与える疾患または病理学的な変更または状態を指す。この用語は、脳および/または脊柱内の、またはそれに血液供給する血管の任意の異常を包含する。異常は、限定されないが、(i)動脈が狭くなり、脳への血流を低減させることであり得、これは、低酸素、虚血または脳卒中を引き起こす可能性があり、および/または(ii)動脈が弱くなることであり得、これは、脳動脈瘤が生じたり、頭蓋内出血のリスクが増加したりする可能性がある。神経血管疾患の非限定的な例は、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、虚血/再灌流傷害、脳動脈瘤、動静脈奇形(AVM)、海綿状血管奇形、血管炎、脳出血、くも膜下出血、脊髄血管奇形、頸動脈狭窄、もやもや病および頭蓋内アテローム性動脈硬化症である。

20

【0312】

語句「神経血管機能不全を含む中枢神経系（CNS）障害」または「神経血管機能不全を含むCNS疾患」は、本明細書で使用される場合、神経血管機能不全によって引き起こされる、それに寄与する、またはそれを特徴とする、集合的にCNSを形成する脳および/または脊髄の構造および/または機能に影響を与える神経障害の群、または脳および/または脊柱内の、またはそれに血液供給する血管の構造および/または機能の異常を引き起こす神経障害の群を指す。神経血管機能不全を含む中枢神経系（CNS）障害の非限定的な例は、多発性硬化症、虚血性脳卒中、脳がん、てんかん、認知症、血管性認知症、HIV-1関連認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、感染性脳疾患、外傷性脳損傷、片頭痛および慢性外傷性脳障害である。

30

【0313】

特記される場合を除いて、用語「対象」または「患者」は、同義的に使用でき、動物、好ましくは温血動物、より好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくは哺乳動物、さらにより好ましくは霊長類を指し、具体的には、ヒト患者および非ヒト哺乳動物および霊長類が挙げられる。好ましい対象は、ヒト対象である。用語「対象」または「患者」は、治療が必要な対象、より特定には、所与の状態、特定には神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系（CNS）障害の治療によって利益を得ると予想される対象を含む。このような対象としては、これらに限定されないが、前記状態を有すると診断された対象、前記状態を発症させやすい対象、および/または前記状態を予防しようとする対象を挙げることができる。

40

【0314】

本明細書で教示される生成物および方法は、このような治療によって利益を得ると予想される神経血管障害またはCNS障害を有する対象に、治療有効量的および/または予防有効量の、本明細書で教示される作用物質、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、本明細書で開示される核酸発現カセット、本明細書で開示されるベクターまたは本

50

明細書で開示される医薬組成物を投与することを可能にする。用語「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、外科医、研究者、獣医師、医師または他の臨床医が求める対象における生物学的または医薬的応答を惹起する活性化合物または医薬物質の量を指し、そのような応答としては、とりわけ、治療される疾患または状態の症状の軽減を挙げることができる。用語「予防有効量」は、研究者、獣医師、医師または他の臨床医が求めるような対象において障害の発症を阻害するかまたは遅延させる活性化合物または医薬物質の量を指す。本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、核酸発現カセット、または医薬組成物の治療有効量および/または予防有効量を決定するための方法は、当業界において公知である。

【0315】

用語「治療有効用量」は、本明細書で使用される場合、投与されると、神経血管障害またはCNS障害を有する患者の治療に関して肯定的な治療応答をもたらす、本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、核酸発現カセット、または医薬組成物の量を指す。

【0316】

本明細書で教示される作用物質、作用物質をコードする核酸、核酸発現カセット、または医薬組成物の適切な治療有効用量は、資格を有する医師により、疾患の状態および重症度の性質、ならびに患者の年齢、サイズおよび状態を考慮することによって決定することができる。

【0317】

さらなる態様は、このような治療を必要とする対象における神経血管機能不全を含む神経血管障害またはCNS障害を治療する方法であって、治療有効量の明細書で開示される作用物質、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、本明細書で開示される核酸発現カセット、本明細書で開示されるベクターまたは本明細書で開示される医薬組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0318】

さらなる態様は、神経血管機能不全を含む神経血管障害またはCNS障害の治療のための医薬品を製造するための、本明細書で開示される作用物質、本明細書で開示される作用物質をコードする核酸、本明細書で開示される核酸発現カセット、本明細書で開示されるベクターまたは本明細書で開示される医薬組成物の使用を提供する。

【0319】

特定の実施形態において、前記神経血管障害は、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、虚血/再灌流傷害、脳動脈瘤、動静脈奇形(AVM)、海綿状血管奇形、血管炎、脳出血、くも膜下出血、脊髄血管奇形、頸動脈狭窄、もやもや病および頭蓋内アテローム性動脈硬化症、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される。

【0320】

特定の実施形態において、神経血管機能不全を含む前記CNS障害は、多発性硬化症、虚血性脳卒中、脳がん、てんかん、認知症、血管性認知症、HIV-1関連認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、感染性脳疾患、外傷性脳損傷、片頭痛、慢性外傷性脳障害、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

【0321】

さらなる態様は、例えば神経血管機能不全を含む神経血管障害またはCNS障害の予防または治療に有用なものなどの、治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法であって、試験作用物質が、GPR124/RECK/Frizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を活性化するが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達は活性化しないものであるかどうかを決定することを含む方法に関する。用語「インビトロ」は、一般的に、体、例えば動物またはヒトの体の外側または外部であることを意味する。この用語はまた、「エクスピボ」も包含する。「

10

20

30

40

50

インビトロ」の一例は、組織細胞培養中である。

【0322】

用語「試験作用物質」は、本明細書で使用される場合、それが、GPR124/RECK/FRIZZLED/LRP媒介性Wntシグナル伝達を活性化するが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFRIZZLED/LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しないものであるかどうかを決定することが望ましい、任意の化学的（例えば、無機または有機）、生化学的もしくは生物学的な物質、分子もしくは巨大分子（例えば、生物学的な巨大分子）、それらの組合せもしくは混合物、未確認の組成を有する試料、または細菌、真菌、植物、もしくは動物細胞もしくは組織などの生物学的材料から作製された抽出物を指す。

10

【0323】

GPR124/RECK/FRIZZLED/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達およびFRIZZLED/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達の活性化または活性化の喪失を決定することは、本明細書の他所で記載されるようにして決定することができる。例えば、SuperTOPFLASHプラスミド（例えばSuper8xTOPFLASHプラスミド、Addgeneプラスミド#12456）で一時的にトランスフェクトされた細胞、または安定してトランスフェクトされたSuperTOPFLASHレポーター細胞株（例えばHEK293STF細胞株）は、FRIZZLED、LRP、GPR124および/またはReckポリペプチドをコードするプラスミドと（コ）トランスフェクトでき、前記細胞中でのWntシグナル伝達活性を示すものとして、試験作用物質の添加にตอบสนองする細胞のルシフェラーゼ活性を決定するのに使用できる。

20

【0324】

特定の実施形態において、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法は、試験作用物質を、GPR124/RECK/FRIZZLED/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を行うことができる細胞と接触させ、前記Wntシグナル伝達を測定することと、試験作用物質を、FRIZZLED/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を行うことはできるが、GPR124/RECK/FRIZZLED/LRP受容体複合体によって媒介されるWntシグナル伝達を行うことができない細胞と接触させ、前記Wntシグナル伝達を測定することを含む。

30

【0325】

用語「接触させる」または「接触させること」は、本明細書で使用される場合、第1の構成要素が、可能な場合、第2の構成要素と結合するかまたはそれをモジュレートできる、または第2の構成要素が、可能な場合、第1の構成要素と結合するかまたはそれをモジュレートできるような方式で、1つまたは複数の第1の構成要素（例えば1つまたは複数の分子、生物学的な実体、細胞、または材料）を、1つまたは複数の第2の構成要素（例えば1つまたは複数の分子、生物学的な実体、細胞、または材料）と一緒にすることを意味する。このようなモジュレーションは、直接的に、すなわち、第1の構成要素と第2の構成要素との直接的な相互作用の方式か；または間接的に、例えば、第1の構成要素が1つまたは複数のさらなる構成要素と相互作用するかまたはそれをモジュレートする場合、順にそのうち1つまたは複数が第2の構成要素と相互作用するかまたはそれをモジュレートする方式、またはその逆の方式のいずれかで、起こり得る。用語「接触させる」は、文脈に応じて、「曝露する」、「インキュベートする」、「混合する」、「反応させる」、「処理する」などと同義の場合もある。

40

【0326】

特定の実施形態において、試験作用物質は、GPR124/RECK/FRIZZLED/LRP媒介性Wntシグナル伝達を行うことができる細胞と、および/または本明細書で教示される作用物質をコードする核酸、核酸を含む核酸発現カセットまたは核酸もしくは核酸発現カセットを含むベクターで前記細胞をトランスフェクトすることによって、

50

Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を行うことはできるが、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を行うことはできない細胞と接触させてもよい。Wnt シグナル伝達を測定することは、典型的には、例えば Wnt 応答遺伝子の増加または - カテニンの核局在化を検出することによって、Wnt シグナル伝達の活性化、好ましくは、本明細書の他所で記載される基準の、または - カテニン依存性 Wnt シグナル伝達の活性化を決定することを意味する。Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達の活性化を決定する別の方法は、当業界で公知のように、4細胞期の胚の1つの腹側割球に試験作用物質をマイクロインジェクションしたときのアフリカツメガエルの胚発生中における背側軸の重複の確立を研究することである。Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達の活性化を決定するさらに別の方法は、当業界で公知のように、1~4細胞期の胚に試験作用物質をマイクロインジェクションしたときのゼブラフィッシュ (Danio rerio) の胚発生中における前脳および目の構造の確立を研究することである。Wnt シグナル伝達活性のレベルは、ベースライン値と比較することができる。ベースライン値は、対照試料 (例えば刺激されていない細胞集団または対照作用物質と接触させた細胞集団の試料) の値であり得る。

10

【0327】

GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 受容体複合体によって媒介される Wnt シグナル伝達を行うことができる細胞は、典型的には、その原形質膜に、GPR124、RECK、Frizzled、および LRP を含み、Wnt / - カテニンシグナル伝達経路の下流要素を含有する細胞である。Frizzled / LRP 受容体複合体によって媒介される Wnt シグナル伝達を行うことはできるが、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 受容体複合体によって媒介される Wnt シグナル伝達を行うことはできない細胞は、典型的には、その原形質膜に Frizzled および LRP を含み、Wnt / - カテニンシグナル伝達経路の下流要素を含有するが、その原形質膜に GPR124 ポリペプチドおよび / または RECK ポリペプチドを含まない細胞である。

20

【0328】

GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 受容体複合体によって Wnt シグナル伝達を媒介することができる細胞は、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達に必要な全ての細胞構成要素を天然に発現する細胞、例えば脳内皮細胞または細胞株であり得る。GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 受容体複合体によって Wnt シグナル伝達を媒介することができる細胞はまた、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達に必要な細胞構成要素を天然に発現しないかまたは全てを発現するわけではない細胞であってもよく、このような細胞は、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達に必要な細胞構成要素の喪失を補うために改変されていてもよく、例えば遺伝子操作されていてもよく、例えばヒト胎児腎臓 293 (HEK293) 細胞である。このような改変は、当業界において公知であり、その例としては、例えば GPR124 および / または RECK ポリペプチドをコードする核酸での細胞のトランスフェクションが挙げられる。

30

【0329】

本明細書の他所で記載されるように、受容体ポリペプチドの非存在、またはそれを含まないこと、またはそれを含有しないことは、この文脈において、それ自体は、細胞膜における前記受容体ポリペプチドの完全な非存在を指さないが、当業者公知のタンパク質アッセイによって検出できないか、またはその感度の範囲に満たない受容体ポリペプチドの量を指す場合もある。

40

【0330】

予備的なスクリーニングは、RECK ポリペプチド、Frizzled ポリペプチドおよび / または LRP ポリペプチドに結合するその能力に関して試験作用物質をスクリーニングすることによって実行することができる。

【0331】

50

特定の実施形態において、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法は、試験作用物質がRECKポリペプチドに結合することができるかどうかを決定すること、および適宜、試験作用物質がFrizzledポリペプチドおよび/またはLRPポリペプチドに結合することができるかどうかを決定することを含む。

【0332】

結合アッセイは、RECKポリペプチド、Frizzledポリペプチドおよび/またはLRPポリペプチドを試験作用物質と接触させること、および試験作用物質およびRECKポリペプチド、Frizzledポリペプチドおよび/またはLRPポリペプチドにとって結合複合体を形成するのに十分な時間そのままをすることを含んでいてもよい。結合複合体の形成は、本明細書の他所で記載されるようにタンパク質-タンパク質結合を決定するための任意の確立された分析技術を使用して検出することができ、このような技術としては、共免疫沈降反応、二分子の蛍光補完、標識の移動、タンデム親和性精製、化学的な架橋および蛍光共鳴エネルギー移動などが挙げられる。タンパク質結合アッセイは、本明細書の他所で記載されるように、無細胞系もしくは細胞溶解産物において、または単離された細胞もしくは培養細胞において、または単離された組織もしくは培養された組織において実行することができる。

10

【0333】

結合アッセイにおいて、作用物質、RECKポリペプチド、Frizzledポリペプチドおよび/またはLRPポリペプチドの1つまたは複数、標識に合体させてもよく、この場合、標識は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に提供することができる。このような標識またはシグナルの非限定的な例としては、放射性同位体、蛍光標識もしくはシグナル、化学発光標識もしくはシグナル、酵素、特異的な結合分子、または粒子（例えば磁気粒子）が挙げられる。

20

【0334】

特定の実施形態において、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法は、アッセイの効率を改善する、最適なタンパク質-タンパク質結合を促進する、および/または非特異的な、またはバックグラウンドの相互作用を低減する1つまたは複数の試薬の使用をさらに含んでいてもよい。このような試薬の非限定的な例は、塩、中性タンパク質（例えばアルブミン）、洗浄剤、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、および抗微生物剤である。

30

【0335】

特定の実施形態において、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法は、試験作用物質を、1時間から48時間、6時間から36時間、12時間から24時間、0.5から120分、1から90分、5から60分、または10から30分、細胞と接触させることを含む。

【0336】

特定の実施形態において、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質を同定するためのインビトロにおける方法は、試験作用物質を、4 から40 の温度で細胞と接触させることを含む。

40

【0337】

ある特定の実施形態において、接触は、単離もしくは培養された細胞において、または単離もしくは培養された組織において実行することができる。用語「単離された」は、本明細書にわたり特定の構成要素を参照しながら使用される場合、一般的に、このような構成要素が、その天然環境の1つまたは複数の他の構成要素から、分離された状態で存在すること、例えば、それから分離されている、分離された状態で調製および/または維持されることを意味する。より特定には、用語「単離された」は、本明細書で細胞または組織に関して使用される場合、このような細胞または組織が動物またはヒトの体の一部を形成しないことを意味する。単離された細胞または組織は、好適には、インビトロで培養または繁殖させることができる。用語「培養する」または「細胞培養」は、当業界において一

50

般的であり、概して、インビトロにおける細胞の維持および場合により細胞の拡張（増殖、繁殖）を指す。典型的には、動物細胞、例えば哺乳類細胞、例えばヒト細胞は、目的に十分な容器またはコンテナ（例えば、96 -、24 -、もしくは6 - ウェルプレート、T - 25、T - 75、T - 150もしくはT - 225 フラスコ、またはセルファクトリー）中で、当業界で公知のインビトロでの細胞培養を助長する条件で、例えば37 の温度、5% v/v CO₂ および > 95% 湿度で、それらを好適な細胞培養培地に曝露すること（すなわち、それらを接触させること）によって培養される。

【0338】

用語「培地」は、本明細書で使用される場合、概して、細胞の維持を助長する、好ましくは細胞の増殖を助長する任意の細胞培養培地を包含する。培地は、典型的には、その簡単な操作（例えば、デカンテーション、ピペッティング、遠心分離、濾過など）を容易にする液体培養培地と予想される。

10

【0339】

典型的には、培地は、当業界で公知の基礎培地配合物を含むと予想される。多くの基礎培地配合物（例えば、American Type Culture Collection、ATCCから；またはInvitrogen、Carlsbad、Californiaから入手可能）を使用することができ、その例としては、これらに限定されないが、イーグル最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、アルファ改変最小必須培地（アルファ-MEM）、基礎必須培地（Basal Medium Essential；BME）、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、BGJb培地、F - 12 栄養混合物（Ham）、ライボピッツL - 15、DMEM/F - 12、必須改変イーグル培地（EMEM）、RPMI - 1640、199培地、ウェイマウスMB752 / 1またはウィリアムス培地E、ならびにそれらの改変物および/または組合せが挙げられる。基礎培地の組成は、一般的に、当業界において公知であり、培養される細胞に応じて必要な培地および/または培地サプリメントの濃度を改変またはモジュレートすることは、当業者の能力の範囲である。

20

【0340】

このような基礎培地配合物は、それ自体公知の哺乳類細胞の発達に必要な成分を含有する。例証のために、限定されないが、これらの成分としては、無機塩（特定には、Na、K、Mg、Ca、Cl、P、ならびに場合によってはCu、Fe、SeおよびZnを含有する塩）、生理学的な緩衝剤（例えば、HEPES、炭酸水素塩）、ヌクレオチド、ヌクレオシドおよび/または核酸塩基、リボース、デオキシリボース、アミノ酸、ビタミン、抗酸化剤（例えば、グルタチオン）および炭素源（例えば、グルコース、ピルビン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム）などを挙げるができる。

30

【0341】

培養での使用のために、基礎培地に、1種または複数のさらなる構成要素を供給してもよい。例えば、追加のサプリメントは、細胞に最適な増殖および拡張のために必須の微量元素および物質を供給するのに使用することができる。さらに、抗酸化剤サプリメント、例えば -メルカプトエタノールが添加されてもよい。多くの基礎培地はすでにアミノ酸を含有するが、一部のアミノ酸は後で補充されてもよく、このようなアミノ酸は、例えば、溶液中にある場合安定性が低いことがわかっているL - グルタミンである。培地はさらに、抗生物質および/または抗真菌化合物、例えば、典型的にはペニシリンおよびストレプトマイシンの混合物、および/または例示として、これらに限定されないが、アンホテリシン、アンピシリン、ゲンタマイシン、プレオマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ナリジクス酸、ネオマイシン、ナスタチン、パロモマイシン、ポリミキシン、ピューロマイシン、リファンピシン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン、タイロシン、およびゼオシンの他の化合物が供給されていてもよい。

40

【0342】

脂質および脂質担体も、細胞培養培地に補充するのに使用することができる。このよう

50

な脂質および担体としては、これらに限定されないが、なかでも、シクロデキストリン、コレステロール、アルブミン共役リノール酸、アルブミン共役リノール酸およびオレイン酸、非共役リノール酸、アルブミン共役リノール酸 - オレイン酸 - アラキドン酸、アルブミン非共役およびアルブミン共役オレイン酸を挙げることができる。アルブミンは、脂肪酸非含有の配合物においても同様に使用することができる。

【0343】

また、細胞培養培地への哺乳類血漿または血清の補充も予期される。血漿または血清はしばしば、細胞の生存および拡張を促進する細胞性の因子および構成要素を含有する。適宜、血漿または血清は、熱で不活性化されていてもよい。当業界において、熱不活性化は、主として補体を除去するために使用される。熱不活性化は、典型的には、血漿または血清を、一定に混合しながら、56 で30から60分、例えば30分インキュベートすることを含み、その後、血漿または血清は、そのまま徐々に周囲温度に冷却させる。当業者は、上記の手順のあらゆる一般的な改変および必要条件を認識していると予想される。血漿または血清は、貯蔵または使用の前に滅菌されてもよい。通常の滅菌手段は、例えば、1 μm より小さい、好ましくは0.5 μm より小さい、例えば、0.45 μm 、0.40 μm 、0.35 μm 、0.30 μm または0.25 μm より小さい、より好ましくは0.2 μm またはそれより小さい、例えば、0.15 μm またはそれより小さい、0.10 μm またはそれより小さい孔サイズを有する1つまたは複数のフィルターを介した濾過を含んでいてもよい。本明細書で教示される培地での使用のための好適な血清または血漿は、ヒト血清もしくは血漿、または非ヒト動物、好ましくは非ヒト哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類（例えば、キツネザル、サル、類人猿）からの血清もしくは血漿、胎児もしくは成体のウシ、ウマ、ブタ、子ヒツジ、ヤギ、イヌ、ウサギ、マウスもしくはラットの血清もしくは血漿など、またはこのようなものの任意の組合せを含んでいてもよい。ある特定の好ましい実施形態において、本明細書で教示される培地は、ウシ血清または血漿、好ましくはウシ胎児（子ウシ）血清または血漿、より好ましくはウシ胎児（子ウシ）血清（FCSまたはFBS）を含んでいてもよい。ヒト細胞を培養する場合、培地は、好ましくは、ヒト血清または血漿、例えば自家または同種異系のヒト血清または血漿、好ましくはヒト血清、例えば自家または同種異系のヒト血清、より好ましくは自家ヒト血清または血漿、さらにより好ましくは自家ヒト血清を含んでいてもよい。

【0344】

ある特定の好ましい実施形態において、例えば無血清培地（すなわち、化学組成が既定の培地）を提供するために、培地中の血清または血漿は、血清代替物で代用することができる。無血清培地の提供は、特定には対象、特にヒト対象への培地またはそれらの画分の投与を目的とする場合（例えば、生物学的安全性の改善）、有利な場合がある。用語「血清代替物」は、概して、細胞培養培地中での動物血清の機能（例えば、細胞の維持および増殖を支持する機能）を代用するのに使用可能な任意の組成物を意味する。従来の血清代替物は、典型的には、ビタミン、アルブミン、脂質、アミノ酸、トランスフェリン、抗酸化剤、インスリンおよび微量元素を含み得る。多くの商品化された血清代替物添加剤、例えばノックアウト血清代替物（Knock Out Serum Replacement; KOSR）、N2、B27、インスリン - トランスフェリン - セレニウムサプリメント（ITS）、およびG5が周知であり、当業者にとって容易に入手可能である。

【0345】

血漿または血清または血清代替物は、約0.5% v/vから約40.0% v/v、好ましくは約5.0% v/vから約20.0% v/vの間、例えば、約5.0% v/vから約15.0% v/vの間、より好ましくは約8.0% v/vから約12.0% v/vの間、例えば、約10.0% v/vの比率（血漿または血清または血清代替物の容積/培地の容積）で、本明細書で教示される培地中に含まれていてもよい。

【0346】

好適な単離または培養された細胞は、限定されないが、細菌細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、ヒト細胞、または非ヒト哺乳類細胞などであ

10

20

30

40

50

り得る。動物細胞、例えば哺乳類細胞、ヒト細胞、または非ヒト哺乳類細胞が好ましい。細胞は、初代細胞、二代細胞、三代細胞などを含む場合もあるし、または細胞は、クローン細胞株を含む不死化細胞株を含む場合もある。細菌細胞の非限定的な例としては、*Escherichia coli*、*Yersinia enterocolitica*、*Brucella* sp.、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescens*、または*Bacillus subtilis*が挙げられる。真菌細胞の非限定的な例としては、*Yarrowia lipolytica*、*Arxula adeninivorans*、*Pichia pastoris*、*Hansenula polymorpha*、*Saccharomyces cerevisiae*、または*Schizosaccharomyces pombe*が挙げられる。昆虫細胞の非限定的な例としては、*Drosophila melanogaster*に由来する細胞、例えば*Schneider 2*細胞、アワヨトウの*Spodoptera frugiperda*に由来する細胞株、例えば*Sf9*および*Sf21*細胞、またはイラクサギンウワバ*Trichoplusia ni*に由来する細胞、例えば*High Five*細胞が挙げられる。ヒト細胞の非限定的な例としては、ヒト*HeLa*（子宮頸がん）細胞株が挙げられる。組織培養の実施において一般的な他のヒト細胞株としては、とりわけ、ヒト胎児腎臓293細胞（HEK細胞）、DU145（前立腺がん）、Lncap（前立腺がん）、MCF-7（乳がん）、MDA-MB-438（乳がん）、PC3（前立腺がん）、T47D（乳がん）、THP-1（急性骨髄性白血病）、U87（神経膠芽腫）、SHSY5Y（神経芽細胞腫）、またはSaos-2細胞（骨がん）が挙げられる。霊長類細胞の非限定的な例は、Verо（アフリカミドリザルの*Chlorocebus*の腎臓上皮細胞株）細胞、およびCOS細胞である。げっ歯類細胞の非限定的な例は、ラットGH3（下垂体腫瘍）、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）、PC12（クロム親和性細胞腫）細胞株、またはマウスMC3T3（胎児頭蓋冠）細胞株である。このような細胞は、様々な商業的な供給源および調査資源施設、例えば、American Type Culture Collection（Rockville, MD）などから得ることができる。

【0347】

ある特定の実施形態において、細胞は、無傷の細胞膜を有していてもよい。他の実施形態において、細胞膜を透過化して（一時的にまたは永続的に）、無傷の細胞膜を通過して輸送されないかまたはそれほど効果的に輸送されない構成要素を、細胞膜を通過して拡散させることを可能にすることができる。細胞膜の透過化のために好適な界面活性剤としては、これらに限定されないが、サポニン（例えば、ジギトニン）、Triton（商標）X-100、またはポリソルベート20が挙げられる。細胞は、生きた細胞、または生存可能な細胞、または生存可能ではない細胞であってもよい。

【0348】

生存可能な細胞にポリペプチドおよび/または核酸を導入することのための方法は当業者公知であり、その例としては、リン酸カルシウム共沈、電気穿孔、マイクロインジェクション、プロトプラスト融合、リポフェクション、エキソゾーム媒介性トランスフェクション、ポリアミントランスフェクション試薬を採用するトランスフェクション、核酸でコーティングされたタングステンマイクロプロジェクトイルによる細胞の衝撃、ウイルス粒子デリバリーなどを挙げることができる。このような導入はまた、デリバリー、トランスフェクションまたは形質転換と称される場合もある。細胞透過性ペプチド（CPP）もまた、細胞にポリペプチドまたは核酸をデリバリーするために採用される場合がある。CPP転移は、3つの主要な侵入メカニズム、すなわち膜中への直接の透過、エンドサイトーシス媒介性の侵入、および一時的な構造の形成を介した転移に分類することができる。CPPは、典型的には、リシンまたはアルギニンなどの正電荷を有するアミノ酸の高い相対的な存在度を含有するか、または極性/荷電アミノ酸および非極性、疎水性アミノ酸の交互パターンを含有する配列を有するかのいずれかのアミノ酸組成を有する。これらの2つのタイプの構造は、それぞれポリカチオン性または両親媒性と称される。CPPの第3のクラスは、低い正味電荷を有する無極の残基のみを含有する疎水性ペプチドであるか、また

は細胞内取り込みに重要な疎水性アミノ酸基を有するものである。発見された初期のC P Pの1つは、ヒト免疫不全ウイルス1 (H I V - 1) に由来するトランス活性化転写活性化因子 (T a t) であり、これは、培養物中の多数の細胞型によって周囲の培地から効率的に取り込まれることが見出された。それ以降、多数の公知のC P Pをかなり発展させて、より有効なタンパク質形質導入特性を有する小分子合成類似体を生成した。C P Pとしては、これらに限定されないが、ペネトラチン、T a t (4 8 - 6 0)、トランスポータン、および (R - A h X - R 4) (A h x = アミノヘキサノイル) が挙げられる。U S 8 , 3 7 2 , 9 5 1 は、高度に細胞に透過する効率および低い毒性を呈示する好酸球カチオン性タンパク質 (E C P) に由来するC P Pを提供する。脊椎動物対象にC P Pをそのカーゴと共にデリバリーする態様も提供される。C P Pおよびそれらのデリバリーのさらなる態様は、U S 8 , 5 7 5 , 3 0 5 ; U S 8 , 6 1 4 , 1 9 4 およびU S 8 , 0 4 4 , 0 1 9 に記載されている。C P Pは、当業界で公知のカーゴと、例えば、チオエーテル結合を介して、または粒子の形成を介して、コンジュゲートまたは複合体化していてもよい。

【 0 3 4 9 】

目的のポリペプチドまたはR N Aをコードする発現可能な核酸分子、例えば発現カセットまたは発現ベクターは、一般的に当業界において公知の通りに提供することができる。発現可能な核酸分子は、典型的には、目的のポリペプチドをコードする核酸分子および/または目的のR N A分子をコードする核酸分子、ならびに前記核酸分子に作動可能に連結したプロモーターを含んでいてもよい。プロモーターは、目的の細胞、例えば細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、ヒト細胞、または非ヒト哺乳類細胞中での目的のポリペプチドおよび/またはR N Aの発現が行われるように選択してもよく、またはそのように構成してもよい。

【 0 3 5 0 】

細胞は、細胞が培養されている培養培地に試験作用物質を添加することによって、試験作用物質と接触させてもよい。試験作用物質をコードする核酸は、当業者公知の条件下で、本明細書の他所で記載されるようにして、ベクター内に含まれた状態で細胞に提供することができる。代替として、試験作用物質をコードする核酸は、ウイルスベクターを介して細胞に提供することができ、すなわち細胞は、試験作用物質をコードする核酸を含むウイルス粒子と接触させる。ウイルスベクターは、典型的には、増殖性感染に必要なウイルスタンパク質を生産する能力を喪失するように改変されている。特定の実施形態において、作用物質が、例えば本明細書の他所で記載されるようなアッセイで測定される場合、中立の物質または陰性対照により誘導された、G P R 1 2 4 / R E C K / F r i z z l e d / L R P 媒介性W n t / - カテニンシグナル伝達のベースラインまたはバックグラウンドと比較して、少なくとも10倍高く、少なくとも20倍高く、少なくとも30倍高く、少なくとも40倍高く、少なくとも50倍高く、少なくとも100倍高く、少なくとも250倍高く、少なくとも500倍高く、少なくとも750倍高く、少なくとも1000倍高く、少なくとも 1×10^4 倍高く、または少なくとも 1×10^5 倍高く、G P R 1 2 4 / R E C K / F r i z z l e d / L R P 受容体複合体によって媒介されるW n t / - カテニンシグナル伝達を強化する場合、その試験作用物質は、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質として同定することができる。

【 0 3 5 1 】

特定の実施形態において、作用物質により誘導されたG P R 1 2 4 / R E C K / F r i z z l e d / L R P 媒介性W n t シグナル伝達活性が、R E C K および/またはG P R 1 2 4 の非存在下で前記作用物質により誘導されたF r i z z l e d / L R P 媒介性W n t シグナル伝達活性より、少なくとも3.5倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも15倍高い、少なくとも20倍高い、少なくとも25倍高い、少なくとも50倍高い、少なくとも100倍高い、少なくとも500倍高い、少なくとも1000倍高い、少なくとも 1×10^4 倍高い、または少なくとも 1×10^5 倍高い場合、その試験作用物質は、本明細書で開示される治療薬として有用な作用物質として同定することができる。

10

20

30

40

50

【0352】

前述のスクリーニング方法のいずれかによって本明細書で開示される治療薬として有用であるとして最初に同定された試験作用物質をさらに試験して、ヒトにおける神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系（CNS）障害を模倣するのに好適な動物モデルによって、インビトロ、インビボまたはエクスピボでの見かけの活性を検証することができる。

【0353】

本出願は、以下のステートメントに記載の態様および実施形態も提供する：

【0354】

ステートメント1．Gタンパク質共役型受容体（GPR）124 / RECK / Frizzled / リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）媒介性Wntシグナル伝達を活性化することができる作用物質であって、RECKおよび/またはGPR124の非存在下でのFrizzled / LRP媒介性Wntシグナル伝達は活性化しない、作用物質。

10

【0355】

ステートメント2．RECKおよびGPR124の存在下では細胞膜におけるFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドのヘテロマー形成（heteromerization）を誘導することができるが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下での当該ヘテロマー形成を誘導することができない、ステートメント1に記載の作用物質。

【0356】

ステートメント3．RECKおよびGPR124の存在下では細胞膜においてFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドに同時に結合することができるが、RECKおよび/またはGPR124の非存在下ではFrizzledポリペプチドとLRPポリペプチドに同時に結合することができない、ステートメント2に記載の作用物質。

20

【0357】

ステートメント4．GPR124および/またはRECKポリペプチドに結合することができる、ステートメント1から3のいずれか1つに記載の作用物質。

【0358】

ステートメント5．RECKポリペプチドに結合することができる、ステートメント1から4のいずれか1つに記載の作用物質。

30

【0359】

ステートメント6．RECKポリペプチドのシステインノット4（CK4）領域、CK5領域、またはCK4領域およびCK5領域に結合することができる、ステートメント5に記載の作用物質。

【0360】

ステートメント7．Frizzledポリペプチドのシステインリッチドメイン（CRD）に結合することができる、ステートメント1から6のいずれか1つに記載の作用物質。

【0361】

ステートメント8．LRPポリペプチドのDKK結合性部位および/またはWnt結合性部位に結合することができる、ステートメント1から7のいずれか1つに記載の作用物質。

40

【0362】

ステートメント9．化学物質、抗体、抗体断片、抗体様タンパク質足場、タンパク質またはポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣体、アプタマー、光アプタマー、シュピーゲルマーおよび核酸からなる群を含むかまたはそれから選択され、好ましくはタンパク質またはポリペプチドを含む、ステートメント1から8のいずれか1つに記載の作用物質。

【0363】

ステートメント10．前記作用物質が、RECK結合性ドメイン、Frizzled結合性ドメインおよびLRP結合性ドメインを含み、前記RECK結合性ドメイン、前記Frizzled結合性ドメイン、および前記LRP結合性ドメインが、Wnt7aポリペ

50

プチドまたはW n t 7 b ポリペプチドなどのW n t 7 ポリペプチドに由来する、ステートメント1から9のいずれか1つに記載の作用物質。

【0364】

ステートメント11. 前記RECK結合性ドメインが、
- アミノ酸配列HVEPVRA SRNK RPTFLKIKKPLSYRK PMDTDLVYIEKSPNYC (配列番号17) に対して少なくとも25%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

- アミノ酸配列VEPVRA SRNK RPTFLKIKKPLSYRK PMDT (配列番号18) に対して少なくとも25%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

- アミノ酸配列VEVVRASRLRQPFLRLIKQLRSYQKPMET (配列番号19) に対して少なくとも25%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

- アミノ酸配列XXXVXAXRXXXXXFLXIXXXXXXYXKXXXX (配列番号20)、VXAXRXXXXXFLXIXXXXXXYXK (配列番号21)、XXXVXAXRXXXXXFLXXXXXKXXXX (配列番号22) もしくはVXAXRXXXXXFLXXXXXKXXXX (配列番号23) であって、Xが任意のアミノ酸であり、好ましくはアミノ酸配列が配列番号18または配列番号19のいずれか1つに対して少なくとも50%の配列同一性を示す、アミノ酸配列を含む、ステートメント10に記載の作用物質。

10

【0365】

ステートメント12. W n t 7 a ポリペプチドまたはW n t 7 b ポリペプチドの断片などの、W n t 7 ポリペプチドの断片であるかまたはそれから本質的になる、ステートメント1から11のいずれか1つに記載の作用物質。

20

【0366】

ステートメント13. 前記断片が、W n t 7 ポリペプチドのN末端ドメイン(NTD)であるかまたはそれから本質的になる、ステートメント12に記載の作用物質。

【0367】

ステートメント14. W n t 7 a ポリペプチドまたはW n t 7 b ポリペプチドの変異体などの、W n t 7 ポリペプチドの変異体である、ステートメント1から13のいずれか1つに記載の作用物質。

【0368】

ステートメント15. - 配列番号24または配列番号51の17位に対応する位置のグルタミン(Q)残基が、グルタミン(Q)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン(A)残基によって置換されており；

30

- 配列番号24または配列番号51の20位に対応する位置のイソロイシン(I)残基が、イソロイシン(I)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン(A)残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の25位に対応する位置のプロリン(P)残基が、プロリン(P)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン(A)残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の27位に対応する位置のアラニン(A)残基が、アラニン(A)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基、好ましくはアルギニン(R)残基によって置換されており；

40

- 配列番号24または配列番号51の28位に対応する位置のイソロイシン(I)残基が、イソロイシン(I)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン(A)残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の33位に対応する位置のグルタミン酸(E)残基が、グルタミン酸(E)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン(A)残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の37位に対応する位置のメチオニン(M)残基が、グルタミン酸(E)以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラ

50

ニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 39 位に対応する位置のロイシン（Ｌ）残基が、グルタミン酸（Ｅ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 41 位に対応する位置のグルタミン酸（Ｅ）残基が、グルタミン酸（Ｅ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 44 位に対応する位置のフェニルアラニン（Ｆ）残基が、フェニルアラニン（Ｆ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 50 位に対応する位置のアルギニン（Ｒ）残基が、アルギニン（Ｒ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 52 位に対応する位置のアスパラギン（Ｎ）残基が、アスパラギン（Ｎ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはグルタミン（Ｑ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 68 位に対応する位置のバリン（Ｖ）残基が、バリン（Ｖ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 129 位に対応する位置のイソロイシン（Ｉ）残基が、イソロイシン（Ｉ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 131 位に対応する位置のフェニルアラニン（Ｆ）残基が、フェニルアラニン（Ｆ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 133 位に対応する位置のリシン（Ｋ）残基が、リシン（Ｋ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 135 位に対応する位置のフェニルアラニン（Ｆ）残基が、フェニルアラニン（Ｆ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 141 位に対応する位置のイソロイシン（Ｉ）残基が、イソロイシン（Ｉ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 146 位に対応する位置のアルギニン（Ｒ）残基が、アルギニン（Ｒ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 158 位に対応する位置のアルギニン（Ｒ）残基が、アルギニン（Ｒ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 159 位に対応する位置のリシン（Ｋ）残基が、リシン（Ｋ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）またはロイシン（Ｌ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 181 位に対応する位置のリシン（Ｋ）残基が、リシン（Ｋ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 191 位に対応する位置のアルギニン（Ｒ）残基が、アルギニン（Ｒ）以外の 1 つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（Ａ）残基によって置換されており；

- 配列番号 24 または配列番号 51 の 198 位に対応する位置のリシン（Ｋ）残基が

10

20

30

40

50

、リシン（K）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の200位に対応する位置のリシン（K）残基が

、リシン（K）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の205位に対応する位置のバリン（V）残基が

、バリン（V）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の208位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基が、グルタミン酸（E）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

10

- 配列番号24または配列番号51の214位に対応する位置のアルギニン（R）残基が、アルギニン（R）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の216位に対応する位置のリシン（K）残基が、リシン（K）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の218位に対応する位置のプロリン（P）残基が、プロリン（P）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

20

- 配列番号24または配列番号51の222位に対応する位置のリシン（K）残基が、リシン（K）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の223位に対応する位置のイソロイシン（I）残基が、イソロイシン（I）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の229位に対応する位置のチロシン（Y）残基が、チロシン（Y）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の232位に対応する位置のプロリン（P）残基が、プロリン（P）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

30

- 配列番号24または配列番号51の235位に対応する位置のトレオニン（T）残基が、トレオニン（T）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の248位に対応する位置のグルタミン酸（E）残基が、グルタミン酸（E）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の289位に対応する位置のアルギニン（R）残基が、アルギニン（R）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

40

- 配列番号24または配列番号51の291位に対応する位置のトリプトファン（W）残基が、トリプトファン（W）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており；

- 配列番号24または配列番号51の307位に対応する位置のトレオニン（T）残基が、トレオニン（T）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されており、かつ/または

- 配列番号24または配列番号51の318位に対応する位置のリシン（K）残基が、リシン（K）以外の1つまたは複数のアミノ酸残基によって、好ましくはアラニン（A）残基によって置換されている、

50

ステートメント 14 に記載の作用物質。

【0369】

ステートメント 16 . ステートメント 1 から 15 のいずれか 1 つに記載の作用物質をコードする核酸であって、前記作用物質が、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドである、核酸。

【0370】

ステートメント 17 . プロモーターならびに / または転写調節シグナルおよび翻訳調節シグナルに作動可能に連結した、ステートメント 16 に記載の核酸を含む核酸発現カセット。

【0371】

ステートメント 18 . ウイルスベクターなどの、ステートメント 16 に記載の核酸またはステートメント 17 に記載の核酸発現カセットを含むベクター。

【0372】

ステートメント 19 . ステートメント 16 に記載の核酸、ステートメント 17 に記載の核酸発現カセットまたはステートメント 18 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【0373】

ステートメント 20 . ステートメント 1 から 15 のいずれか 1 つに記載の作用物質、ステートメント 16 に記載の核酸、ステートメント 17 に記載の核酸発現カセット、ステートメント 18 に記載のベクターまたはステートメント 19 に記載の宿主細胞、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【0374】

ステートメント 21 . 医薬として使用するための、ステートメント 1 から 15 のいずれか 1 つに記載の作用物質、ステートメント 16 に記載の核酸、ステートメント 17 に記載の核酸発現カセット、ステートメント 18 に記載のベクター、ステートメント 19 に記載の宿主細胞、またはステートメント 20 に記載の医薬組成物。

【0375】

ステートメント 22 . 神経血管機能不全を含む神経血管障害または中枢神経系 (CNS) 障害の予防または治療における使用のための、ステートメント 1 から 15 のいずれか 1 つに記載の作用物質、ステートメント 16 に記載の核酸、ステートメント 17 に記載の核酸発現カセット、ステートメント 18 に記載のベクター、ステートメント 19 に記載の宿主細胞、またはステートメント 20 に記載の医薬組成物。

【0376】

ステートメント 23 . 前記神経血管障害が、虚血性脳卒中、出血性卒中、虚血 / 再灌流傷害、脳動脈瘤、動静脈奇形 (AVM)、海綿状血管奇形、血管炎、脳出血、くも膜下出血、脊髄血管奇形、頸動脈狭窄、もやもや病および頭蓋内アテローム性動脈硬化症、およびこれらの組合せからなる群から選択されるか、または、前記 CNS 障害が、多発性硬化症、虚血性脳卒中、脳がん、てんかん、認知症、血管性認知症、HIV - 1 関連認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、感染性脳疾患、外傷性脳損傷、片頭痛および慢性外傷性脳障害、およびこれらの組合せからなる群から選択される、ステートメント 22 に記載の使用のための作用物質。

【0377】

ステートメント 24 . 例えば神経血管機能不全を含む神経血管障害または CNS 障害の予防または治療に有用なものなどの、治療薬として有用な作用物質を同定するためのインピトロにおける方法であって、試験作用物質が、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を活性化するが、RECK および / または GPR124 の非存在下での Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達は活性化しないものであるかどうかを決定することを含む方法。

【0378】

ステートメント 25 . - 試験作用物質を、GPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性 Wnt シグナル伝達を行うことができる細胞と接触させ、前記 Wnt シ

10

20

30

40

50

グナル伝達を測定すること、および

- 試験作用物質を、Frizzled / LRP 媒介性Wntシグナル伝達を行うことはできるがGPR124 / RECK / Frizzled / LRP 媒介性Wntシグナル伝達を行うことができない細胞と接触させ、前記Wntシグナル伝達を測定することを含む、ステートメント24に記載のインビトロにおける方法。

【0379】

ステートメント26. 試験作用物質がRECKポリペプチドに結合することができるかどうかを決定することをさらに含む、ステートメント24または25に記載のインビトロにおける方法。

【0380】

本発明を特定の実施形態と併せて記載しているが、前述の説明を踏まえて多くの代替、改変、および変形形態が当業者には明らかになることが明白である。したがって、本発明は、以下の通り添付の特許請求の範囲の主旨および広範囲にそのような代替、改変、および変形形態の全てを包含するものとする。

【0381】

本明細書において開示されている本発明の態様および実施形態は、以下の非限定的な例によってさらに裏付けられる。

【実施例1】

【0382】

Wntリガンドに特異的なシグナル伝達に関する分子メカニズム

1. 材料および方法

1.1. ゼブラフィッシュの系統

14時間明 / 10時間暗のサイクルにおいて、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を28 で維持した。胚を得て、European and national ethical and animal welfareのガイドライン (プロトコル承認番号: CEBEA-IBMM-2017-22:65) に従って標準的条件下で育成した。Kimmelら (C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling, *Dev. Dyn.* 203, 253-310 (1995)) に従って段階分けを行った。特徴付けしたトランスジェニック系統および突然変異体系統のTg (*kdr1*: *GFP*)^{s843}、Tg (*kdr1*: *ras-mCherry*)^{s896} および *gpr124*^{s984} (ゼブラフィッシュ) 系統をこの研究において使用した (B. Vanhollebeke et al., *Elife.* 4, 1-25 (2015); S.-W. Jin, D. Beis, T. Mitchell, J.-N. Chen, D. Y. R. Stainier, *Development.* 132, 5199-209 (2005); N. C. Chi et al., *Genes Dev.* 22, 734-739 (2008))。

【0383】

1.2. モルフォリノ、RNAコンストラクトおよびマイクロインジェクション

gpr124 (5' - ACTGATATTGATTTAACTCACCCACA - 3') に対するスプライスプロッキングモルフォリノ (B. Vanhollebeke et al., *Elife.* 4, 1-25 (2015)) を遺伝子ツール (Eugene, OR) から得て、1細胞段階において、2ng を注射した。mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion, Carlsbad, CA) を使用してNotIを消化した後、pCS2プラスミドから合成mRNAを転写し、1細胞段階のゼブラフィッシュの胚中に注射した。

【0384】

1.4. 発現プラスミドコンストラクト

Fz1 (addgene 番号42253) およびFz5 (addgene 番号42267) を除いて、全てのWntシグナル伝達の構成成分および他のコンストラクトは、In-Fusionクローニング (Takara, Mountain View, CA) を使用する組換えの後に、pCS2ベクターのCMVプロモーターから発現した。In-Fusionクローニングとタンデムに重複するPCR産物とを使用して、単一点突然変異の変異体、欠失体およびキメラを生成した。全てのコンストラクトをサンガーシーケンシ

10

20

30

40

50

ングによって確認した。Reck変異体の欠失体は、以下のアミノ酸に対応する：Reck CK1：46～93；Reck CK2：113～150；Reck CK3：160～206；Reck CK4：225～272；Reck CK5：301～347；Reck CK1-5：46～347；Reck CRD：352～484およびReck KAZAL：636～798。Reckにおける残基22、Gpr124における残基49およびFz5における残基22の後に、HAタグを挿入した。FLAGタグをGpr124における残基49の後に挿入した。

【0385】

1.5. 細胞培養およびHEK293(T)突然変異体細胞株

HEK293T細胞をATCC(CRL-3216)から入手し、HEK293 STF細胞株は、Jeremy Nathans(John Hopkins)によって好意により提供された。WTおよび突然変異体の細胞を10%のウシ胎仔血清を補充したDMEM/F12培地(Lonza, Basel, Switzerland)中で培養し、5%のCO₂で平衡化した、加湿したインキュベーター内で維持した。HEK293 STF細胞においてCRISPR/Cas9アプローチを使用してGPR124およびRECKを遺伝的に無効化し、HEK293T細胞においてLRP5、LRP6およびFzを同様に無効化した。<http://crispr.mit.edu/>のウェブサイトを使用してCRISPR/Cas9のガイド配列を設計し、pSpCas9(BB)-2AGFP(F. A. Ran et al., Nat. Protoc. 8, 2281-308 (2013))中にクローニングした。トランスフェクションの48時間後に、GFP+細胞の上位1%をFACS(Aria III, BD Biosciences, San Jose, CA)によって単離し、クローン増殖のために96ウェルプレート内に分配した。突然変異体細胞株の遺伝子の特徴付けを容易にするために、高解像度融解分析において複数のピークの誘導体融解曲線を生じるクローンを対抗選択した。各標的部位について、プロト Spacer 隣接モチーフ(PAM)部位に集中した約1000bpのPCR産物とpCRTM-Blunt II-TOPO(登録商標)(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)におけるPCR産物の少なくとも8つのサブクローンの両方のサンガーシーケンシングによって突然変異を特定した。CRISPR/Cas9に媒介される反復突然変異誘発によって突然変異体細胞株を得た。

【0386】

1.6. STFのデュアルルシフェラーゼアッセイ

細胞を96ウェルプレート中にプレーティングし、24時間後に三連でLipofectamine 2000(Life Technologies, Carlsbad, CA)によってトランスフェクトした。ウェル当たりのトランスフェクトされるプラスミドDNAの量を各発現ベクターごとに最適化した：別段に指定されていなければ、ウミシイタケルシフェラーゼ(0.5 ng)(Jeremy Nathans(John Hopkins)によって好意により提供された)、Wntリガンド(20 ng)、Fz受容体(5 ng)、Lrp(2.5 ng)、Gpr124(10 ng)、Reck(5 ng)およびDkk-1(10 ng)。DNAの総量を空のpCS2ベクターを用いてウェル当たり100 ngに調整した。STF細胞株を使用するか、または20 ngのM50 Super 8x TOPFlashプラスミド(Addgene プラスミド番号12456)を同時にトランスフェクトすることによって、デュアルルシフェラーゼアッセイを実施した。パッシブライシスバッファー(passive lysis buffer)(E1960, Promega, WI)中で細胞を収集し、トランスフェクションの48時間後に、Dual-Luciferase Reporter Assay系(E1960, Promega, Madison, WI)を使用して、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を連続的に測定した。トランスフェクションの24時間後に、96ウェルプレート中90%のコンフルエンスで、1:1:1の混合物として細胞をプレーティングすることによって、図1Cの競合アッセイを実施した。共培養の24時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0387】

1.7. 免疫蛍光アッセイおよび近接ライゲーションアッセイ

細胞をガラスコーティングチャンバー (IBIDI, Martinsried, Germany) 内で成長させ、24時間後に、Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) によりトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、細胞を室温 (RT) で10分間、4%のパラホルムアルデヒドにより固定した。免疫蛍光染色 (IF) のために、RTで1時間一次抗体に曝露する前に、細胞を1%のBSA-PBS中で30分間ブロッキングした。3回PBSで洗浄した後、細胞をRTで1時間、二次抗体と共にインキュベートした。Wntリガンドの抗V5染色のために、二次抗体溶液とのインキュベーションの前に、細胞を0.1%のTween 20を含むPBS中で10分間さらに洗浄した。近接ライゲーションアッセイ (PLA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) のために、RTで1時間一次抗体と共にインキュベートする前に、製造業者によって提供されたBlocking溶液を用いて、細胞を37°Cで30分間ブロックした。細胞を3回洗浄し、PLAプローブ抗ウサギPLUSと抗マウスMINUSと共に37°Cで1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、細胞をDuolink Ligation溶液と共に、37°Cで30分間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、細胞をDuolink Amplification溶液と共に、37°Cで100分間インキュベートした。以下の抗体を使用した: IFとPLAが1:500のマウスモノクローナル抗V5 (R96025, Life Technologies, Carlsbad, CA)、IFとPLAが1:400の精製したポリクローナルウサギ抗HA (H6908, St. Louis, MO) および1:5000の抗マウスAlexa488コンジュゲート二次抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。PBS中で10µg/mlに希釈したHoechstを用いて、細胞を2分間染色した。

【0388】

1.8. ウエスタンブロットリング、ドットプロットおよび同時免疫沈降

以下の抗体を使用した: ウサギ抗DLV2 (1:1000, 3216, Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands)、ウサギ抗DLV2-ホスホT224 (1:1000, ab124941, Abcam, Cambridge, UK) および抗マウス-アクチン (1:50,000, A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、ニワトリ抗GFP (1:5000, GFP-1010, Aves, Tigard, OR) およびマウスモノクローナル抗FLAG M2 (1:1000, F1804, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。BioDot SF装置 (Bio-Rad, Munich, Germany) を用いて、標準的のプロトコールに従い、ドットプロット分析を実施した。上清の連続希釈液をニトロセルロース膜 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 上にスポットした。乾燥後、ウエスタンブロットのために、膜を上記のように抗体と共にインキュベートした。同時免疫沈降のために、6ウェルプレートからのトランスフェクトしたHEK293T細胞をPBSにより2回洗浄して、プレートから分離した。遠心分離によって細胞をペレット化させ、タンパク質阻害剤 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を含有する溶解緩衝液 (150mMのNaCl, 25mMのTris (pH7.5)、1%のNP40) 中に、4°Cで30分間溶解させた。遠心分離後、上清を抗FLAG M2アフィニティゲル (A2220, Sigma, St. Louis, MO) と共に、4°Cで3時間インキュベートした。溶解緩衝液を用いて、ビーズを5回洗浄し、等量の2xLaemmli Sample緩衝液中で沸騰させた。

【0389】

1.9. 顕微鏡および画像処理

細胞とゼブラフィッシュの胚をLSM710共焦点顕微鏡を用いて画像化し、画像をImageJにおいて処理した。眼の融合表現型の画像をLeica M165 FCで撮影

10

20

30

40

50

した。Imarisソフトウェア(BitPlane、Zurich、Switzerland)を使用して、脳血管系の表示を作成した。PLA陽性(PLA+)面積とDAPI陽性(DAPI+)面積のパーセンテージを、約50~100個の細胞を含有する画像上でImageJを使用して計算した。固定閾値を手動で適用した後に、PLA+面積を測定した。ImageJにおいて「デフォルト」の閾値設定方法を適用した後、DAPI+面積を測定した。

【0390】

1.10. 構造のモデル化

アフリカツメガエルのWnt8a(PDB ID: 4F0A)の構造(C. Y. Janda, D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas, K. C. Garcia, Science. 337, 59-64 (2012))
 をWnt7aに関する出発モデルとして使用した。プログラムModeler(B. Webb, A. Sali, Current Protocols in Bioinformatics (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2016), vol. 54, p. 5.6.1-5.6.37.)を使用して、欠損している残基と置換基をモデル化した。モデル化戦略には、Wnt8において観察したように、既存のジスルフィド架橋を説明することが含まれた。初期の最も良いモデルを真空でC_αを拘束した共役勾配エネルギー最小化に供し、次いで、2回目の最小化工程で解放した。次いで、これらのモデルを水のボックス中に埋め込み、150mMのNa⁺カウンターイオンを添加することによって、電気的中性を達成した。3000工程において全系のエネルギーを再度最小化した。一定温度(310K)および一定圧力(1atm)において、周期的境界を有し、力場としてCHARMM36を使用する、プログラムNAMD 2.7を用い、分子動力学シミュレーションを0.5nsの間行った(J. C. Phillips et al., J. Comput. Chem. 26, 1781-1802 (2005))。2fsの時間工程を使用して、運動方程式を統合した。短い範囲の相互作用を12Åで切断し、平滑粒子メッシュEwald法を使用して、静電的相互作用を計算した。SHAKEアルゴリズムを使用して水素原子を拘束した。得られたモデルは、安定したシミュレーションの平均的代表例である。

【0391】

1.11. 組換えタンパク質および合成ペプチド

Lipofectamine 2000(Life Technologies、Carlsbad、CA)によるトランスフェクションの72時間後に、HEK293T細胞培養物の上清から、Reck-CK-Fc融合タンパク質を無血清FreeStyle 293 Expression Medium(Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA)中に回収した。採取後に、上清を遠心分離(GE Healthcare、Little Chalfont、UK)によって50回濃縮するか、またはプロテインGアフィニティー精製(Protein G Sepharose 4 Fast Flow、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)にかけた。PAGE後にクマシーブルー染色を使用して、タンパク質の純度を評価した。合成Wntリンカーペプチドを90%を超える純度でChinapeptide Co., Ltdから入手した。

【0392】

1.12. 等温滴定熱量測定

Affinity ITC(TA Instruments)においてITC滴定を行った。測定前に、Reck-CK-Fcと全てのReck-CK-Fc融合体をTris-NaCl緩衝液(50mMのTris pH8、300mMのNaCl)に透析した。各事例において、タンパク質透析の最終工程から、Wnt由来ペプチドを緩衝液を用いて調製した。熱量計で調査される前に、試料を濾過および脱気し、25°Cで滴定を実施した。全ての実験は、2μLという一定用量の滴定液を75rpmの攪拌速度で細胞(200μL)中に注入することからなる。名目上の試料濃度は細胞中で20μMから40μMの間であり、シリンジ内で400μMから1.0mMであった。実際の試料濃度は、透析または緩衝液交換の後に、280nmでのそれらの吸収を測定することによって、またはBCA法によって決定した。MicroCal Origin ITC 7.0、およびNan

o Analyzeソフトウェアパッケージを使用して、全てのデータを分析した。

【0393】

1.13. 原子間力顕微鏡

薄金属でコーティングしたカバーガラスを紫外線照射およびオゾン (UV-O) クリーナー (Jet Light) 中で15分間清浄化し、次いで、1 mMの16-メルカプトドデカヘキサン酸と1-メルカプト-1-ウンデカノール (1:99の容積比) を含有するエタノール溶液中に一晩浸漬した。次いで、基質をエタノールで濯ぎ、N₂で乾燥させ、等量の20 mg/mlのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) と50 mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (EDC) を含有する溶液に30分間添加した。得られたNHSで活性化した表面を超純水で濯ぎ、10 µg/mlのプロテインG溶液100 µlで、RTにて1時間インキュベートした。次いで、試料を洗浄緩衝液を用いて (3×5分) 洗浄し、100 µlのブロッキング緩衝液において、RTで1時間さらにインキュベートした。最後に、0.2 µg/mlのReck-CK-Fc溶液50 µlを基質に1時間添加し、洗浄緩衝液で濯ぎ、次いで、AFM実験に使用した。Nanoscope VII Multimode AFM (Bruker) を使用して、単一分子力分光法 (SMFS) の測定をRTにてPBS緩衝液中で実施した。窒化ケイ素チップと0.01~0.06 N/mの間の名目上のばね定数を有する三角のAFMカンチレバー (MCSCT, Bruker) を使用した。Butt et al. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. Nanotechnology 6, 1-7 (1995) に記載されているサーマルノイズ法を使用して、カンチレバーを各実験の終わりに校正した。Wildling et al., Probing binding pocket of serotonin transporter by single molecular force spectroscopy on living cells. J. Biol. Chem. 287, 105-113 (2012) に記載されているプロトコールに従って、機能化したチップをNHS-PEG27-マレイミドリンカーを使用して誘導体化し、C末端に付加したPep7bが連結しているシステイン残基に共有結合させた。機能化後に、カンチレバーをPBSで洗浄し (3×5分)、AFM実験において使用するまで、4℃で、ウェル当たり2 mlのPBSを含有するマルチウェルディッシュの個々のウェル中に保存した。250 pNの加力、0.25秒の接触時間ならびに1 µm/秒という一定の接近と引き離しの速度を使用して、力-距離曲線を1×1 µm²の面積に対する32×32ピクセルアレイとして記録した。動的分子間力分光法による測定のために、カンチレバーの引き離し速度を以下のように変化させた: 20 nm/秒、100 nm/秒、200 nm/秒、1 µm/秒、2 µm/秒、10 µm/秒および20 µm/秒。典型的には、少なくとも2000の力-距離曲線を、特定の引き離し速度で、各カンチレバーごとに実施した。採取したデータをNanoscope Analysisソフトウェア (Bruker) を使用して分析した。各曲線の引き離しセグメントを分析し、非結合事象が接触点から5~50 nmの間の距離で起こった場合、それらを特異的であると考えた。最小接着力をさらに使用して、結合の確率と構築力分布のヒストグラムを計算した。測定した相互作用のエネルギー地形を再構築するために、チップカンチレバーが表面に降下を開始する前の接着事象の傾きとして、負荷速度を力対時間曲線から計算した。次いで、負荷速度に関する力の依存度を動的分子間力分光法プロットにおいてプロットした。

【0394】

1.14. 統計分析

GraphPadソフトウェアを使用して統計分析を実施した。データは平均±SDで表す。正規分布に従うデータ (STFアッセイおよびPLAアッセイ) の多重比較および単一比較に関する一元ANOVA (ポストホックダネット検定) および学生t検定によって、ならびに非正規分布に従うデータ (CTAの定量) の多重比較に関するKruskal-Wallis (ポストホックダネット検定) によって、p値を計算した; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001。

【0395】

10

20

30

40

50

2. 結果

2.1. *Reck*は、*Frizzled*に依存しない*Wnt7*特異的受容体である。

*Wnt/Fz*結合の関係は乱雑であり、複数の*Wnt*が単一の*Wnt*に対して応答することが可能な個々の*Fz*およびいくつかの*Fz*に対する結合に関して競合している。最近の結晶学の研究によって、*Wnt/Fz*相互作用の化学が、明確な*Wnt*と*Fz*の対合と不適合であり、*Wnt/Fz*の接触は、保存された残基または同一の化学修飾によって支配されることが確認された(C. Y. Janda, D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas, K. C. Garcia, *Science*. 337, 59-64 (2012))。これらの観察によって、細胞が、対抗する生物学的機能を有することがある複数の*Wnt*リガンドの空間的かつ時間的な重複する発現パターンを解釈する方法についての疑問が生じる。

10

【0396】

関連する例は、*Wnt7a*および*Wnt7b*による哺乳動物の前脳および腹側の脊髄の血管系の発生の排他的制御である(J. M. Stenman et al., *Science*. 322, 1247-1250 (2008); R. Daneman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 641-646 (2009); S. Liebner et al., *J. Cell Biol.* 183, 409-417 (2008))。具体的には、神経前駆細胞由来*Wnt7*に反応し、*Wnt*/カテニンシグナル伝達を活性化するために、大脳内皮細胞(EC)は、Gタンパク質共役受容体の接着分類のオーファンメンバーである*Gpr124*(M. Cullen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5759-5764 (2011); F. Kuhnert et al., *Science*. 330, 985-989 (2010); K. D. Anderson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2807-2812 (2011); Y. Zhou, J. Nathans, *Dev. Cell*. 31, 248-256 (2014); E. Posokhova et al., *Cell Rep.* 10, 123-130 (2015); B. Vanhollebeke et al., *Elife*. 4, 1-25 (2015))およびGPIアンカー型糖タンパク質である*Reck*(B. Vanhollebeke et al., 2015; F. Ulrich et al., *Development*. 143, 147-159 (2015))を発現しなければならない。*Gpr124*と*Reck*は物理的に相互作用し、*Wnt7*に特異的な応答を相乗的に刺激するが(B. Vanhollebeke et al., 2015; C. Cho, P. M. Smallwood, J. Nathans, *Neuron*. 95, 1056-1073 (2017))、このシグナル伝達モジュールが、他の、局所的に発現した*Wnt*リガンドと*Wnt7*を識別可能にする方法は知られていない。

20

【0397】

脊椎動物細胞において*Frizzled*受容体とそれらの*Lrp5/6*共受容体の偏在する発現によって本質的に複雑化した問題である、このシグナル伝達モジュール内で*Wnt7*が特異的に認識される方法を決定した。したがって、定義した結節における受容体複合体構成成分の遺伝的に枯渇した細胞株の第1のセットを、HEK293細胞における多重化CRISPR/Cas9による突然変異誘発によって、(i)10個全ての*Fz*遺伝子($FZ_{1-10}^{-/-}$)、(ii)*LRP5*および*LRP6*($LRP5^{-/-}$; $LRP6^{-/-}$)または(iii)*GPR124*および*RECK*($GPR124^{-/-}$; $RECK^{-/-}$)を標的とすることによって生成した。*Wnt7*結合の決定基を特定するために、これらの細胞株中でV5でタグ付けした*Wnt*リガンドを一過性に発現させた。*Wnt3a-V5*を除く*Wnt7a-V5*は、WT、 $FZ_{1-10}^{-/-}$ および $LRP5^{-/-}$; $LRP6^{-/-}$ 細胞の原形質膜において免疫検出することができたが、 $GPR124^{-/-}$; $RECK^{-/-}$ 細胞の原形質膜においては免疫検出することができなかった(図1A)。単独または*Gpr124*と組み合わせた*Reck*発現の異所性復元は、これらの細胞における*Wnt7a-V5*膜の標識を特異的に復元するために十分であったが、*Gpr124*発現単独では十分ではなかった(図1B)。期待されたように、この*Frizzled*受容体がベースラインの*Wnt7*のシグナル伝達を媒介する適格性を反映して、*Fz5*は*Wnt7a-V5*結合に関して適格であった。

30

40

【0398】

細胞競合実験を使用して、*Reck*を異所的に発現するが*Gpr124^{ICD}*を異所的に発現しない $FZ_{1-10}^{-/-}$ 細胞の共培養によって、隣接する $GPR124^{-/-}$; $RECK^{-/-}$ *Super Top Flash*(STF)受容体細胞における*Wnt7a*

50

- Fz5シグナル伝達が大幅に低減され得るため、Fzの非存在下で、Rec kがWnt7aを動員することが見出された(図1C)。注目に値するのは、このリガンド捕捉アッセイにおいて、Gpr124は、そのC末端のICDドメインを欠いており、Gpr124/Rec k複合体の表面に曝露された部分に対する分析が限定される。次に、PLAを使用して、Wnt7a結合に必要とされるRec kのドメインをマッピングした。Rec kは、5つのN末端のシステイン-ノット(CK)モチーフ、システインリッチドメイン(CRD)およびGPIアンカー部位の前にあるEGF様モチーフが散在した3つのKazalモチーフから構成される。HAエピトープでタグ付けした欠失変異体のコレクションをRec kの各ドメインについて作成し、PLAシグナルを定量した。この分析によって、N末端のシステイン-ノットドメイン、より詳細にはCK4およびCK5が結合に必要とされることが明らかとなった(図1D)。これらの結果と一致して、Rec k^{CK4}の発現も競合アッセイにおいて不活性であった(図1C)。

【0399】

Rec kは、Wnt7結合性の主要決定因子であると考えられるが、Wntシグナル伝達におけるその機能は、そのN末端のCKドメインを介してGpr124と複合体を形成する能力に依拠することが知られており(Y. Zhou, J. Nathans, Dev. Cell. 31, 248-256 (2014); B. Vanhollebeke et al., Elife. 4, 1-25 (2015))、このドメインは、Wnt7aの結合にさらに関係することが本明細書において示されている。HA-Rec kおよびHA-Fz5と対照的に、HA-Gpr124は、Wnt7a-V5と共に発現した場合にPLAシグナルを生じない(図1E)。しかし、タグ付けされていないGpr124の同時発現の際に、Wnt7a-V5/HA-Rec k PLAシグナルの4倍の増加が検出された(図1F)。Gpr124によるこの結合刺激は、Gpr124/Rec k複合体の形成におけるN末端のCK1モチーフの役割と一致して、Rec kのCK1およびCK2に依存した(C. Cho, P. M. Smallwood, J. Nathans, Neuron. 95, 1056-1073 (2017))。

【0400】

まとめると、拡散性細胞外リガンドとその膜受容体間の直接的相互作用に関する妥当な代理としてPLAが作用するという暗黙の仮定に関して、これらの結果は、Rec kが最初に報告されたFzに依存しないWntリガンドに特異的な受容体を構成し、Wnt7に対するその結合がCKドメイン内のGpr124の近位の結合によって強化されることを示唆する(図1G)。

【0401】

2.2. Wnt7の認識は、非常に多岐にわたり、かつ内因的なWntリガンドの無秩序リンカー領域に關与する

Wntリガンドは、高レベルの組換え体産生に対して悪名高く抵抗性であり、全長組換えWnt7とRec kの間の無細胞生化学的または生物物理学的相互作用の研究を妨げる。

Wntリガンドは、リガンドのN末端ドメイン(NTD)のバルミトイル化した「サム」と「インデックス」のC末端ドメイン(CTD)の疎水性残基によって、球状のFzシステインリッチドメイン(CRD)をヒトの手でつまむことを連想させる2つのドメイン構造を採用する。Fz結合に關与する構造は、「サム」と「インデックス」の末端に主に位置する。2つのドメインは、NTDの可撓性ドメイン内リンカー領域を介して接続されている。

【0402】

特異的ドメインまたは残基に関して欠失したか、または他のWntリガンドから選択されたドメインを有するように操作された(図2A)Wnt7変異体のコレクションを作成した。これらのキメラリガンドはそれぞれPLAに適用され、Rec kの結合がWnt7a^{NTD}において排他的に起こることが明らかとなった。際立ったことに、Wnt7a^{NTD}は単独で、全長Wnt7aと同程度に強力でRec kに結合したが、Wnt7a^{CTD}は結合しなかった(図2B)。Fz結合に關係するバルミトリン酸は、セリン206においてバルミトイル化されることが不可能な突然変異体Wnt7a^{S206A}がRec kに

10

20

30

40

50

有効に効率的に結合するため、Reckの相互作用に関与しなかった。ReckによるWnt7aのNTD認識方式を、CTDがアフリカツメガエルのWnt8a (XWnt8a) ならびにマウスのWnt4およびWnt16の同等のドメインと交換されたキメラWnt7aリガンドによって確認した。これらの結合アッセイによって、Reckが、Fzによって繋がったリガンドと異なる部位において、Wnt7a NTDに埋め込まれたモチーフを認識することによってWntリガンドを識別することが明らかになる。

【0403】

リンカー領域を欠くより小さなNTD変異体である、Wnt7a^{1~212}およびWnt7^{1~237}は、Reckに結合しなかった。Fz結合部位から離れたWnt7aリンカー領域の空間的な分離と組み合わせたこの突然変異分析は、Reckによって、このリンカーモチーフを介して、少なくとも部分的にWnt7aが解読されることを示唆する。Wntリガンドファミリーにわたって最も可変性のモチーフであるリンカー領域は、脊椎動物クレード全体にわたって、Wnt7オルソログの中でも強力な進化的保存を呈する(図2D)。相互作用部位を正確にマッピングするために、本発明者らは、Wnt7aの101個の単一残基変異体のコレクションのGpr124/Reckに依存するSTFシグナル伝達を分析した(図2C)。突然変異した残基は、Wnt7aとWnt7bの間に厳密にまたは化学的に保存されているが、XWnt8aにも他のWntリガンドのいずれにも見られなかった、表面に曝露されたNTD残基に対応した。図2Cに示されているように、調査した変異体の約80%がWT Wnt7aと同程度に活性であったが、8つのWnt7a変異体(下線を付した)のみが10%未満までGpr124/Reckに依存するシグナル伝達を低減させた。1つ(I37)を除いて全ての重要な残基が、予測したWnt7a構造の上部または背面にクラスター化し、6つをリンカードメインにさらにマッピングした。全ての重要な残基は、ヒトから魚へのWnt7オルソログの中で厳密に保存され、Wnt3aを含むいずれの他のWntにも存在しなかった(図2D)。本発明者らは、Wnt7のリンカー変異体の不活性が、Lrp5/6、Reck、または両方への結合不良から生じ得るかどうかをさらに調査した。Reck結合における機能に則して、リンカー領域内での、Wnt7a^{4A}、すなわち、Wnt7aの4つの残基変異体(V241A、F251A、L252A、K262A;ここで、置換は、mWnt7aの前駆体ポリペプチドにおけるアミノ酸位置を示す)によって、WT Wnt7aのものと比較して、Reck-PLAシグナルが低減したことが示された。わずかに改善された分泌速度にもかかわらず、このような活性の低下が生じた(図2E)。

【0404】

無細胞系におけるReck-Wnt7の結合を調査するために、高度に純粋なReck-CK-Fc融合タンパク質(およびその変異体、すなわち、HA-Reck-CK^{CK1}-Fc、HA-Reck-CK^{CK2}-Fc; HA-Reck-CK^{CK3}-Fc; HA-Reck-CK^{CK4}-Fc; およびHA-Reck-CK^{CK5}-Fc)をHEK293T細胞の上清から回収し、等温滴定量測定(ITC)によって、精製した29アミノ酸長の合成Wnt7aおよびWnt7bリンカーペプチド(pWnt7aおよびpWnt7b)で滴定した。ITCによって、pWnt7aとpWnt7bが、それぞれ、7μMと1.2μMの親和性で、Reckに直接結合することを確認した(図2F)。対照として、Wnt7a^{4A}に対応する合成ペプチド(pWnt7a^{4A})およびWnt3aの同等のリンカーペプチド(pWnt3a)は、Reck-CK-Fcに対する結合を示さなかった。pWnt7bの結合にはReck-CK4およびCK5が必要とされたが、CK1、CK2およびCK3は必要とされず、培養細胞におけるPLAの結果を顕著にミラーリングした。ITC分析によって得られた結果を確認するために、本発明者らは、単一分子力分光法(SMFS)を使用して、単一分子レベルでの結合親和性を測定した(図2G)。pWnt7bのReck-CK-Fcへの結合は、測定した5μMの解離定数(K_D)に関して検出可能であった。2つの技法の間の根本的な差異にもかかわらず、ITCとSMFSは、したがって、測定した結合親和性の値の間に近い一致をもたらした。

【0405】

10

20

30

40

50

全体的に、これらのデータは、「シグネチャー」リンカーモチーフを介して、少なくとも部分的に、Wnt7がReckによって認識されることを実証する。しかし、Reckに結合したWnt7は、細胞が増強したWnt7特異的細胞応答を呈するために、効率的なシグナルの活性化および形質導入の機構へと機能的に統合されなければならない。

【0406】

2.3. Gpr124は、Wnt7のシグナル伝達および脳の血管新生の間にGPCRを形質導入する古典的なシグナルとして作用しない

Reck自体は、原形質膜の唯一の外部のリーフレットに対するそのGPIアンカー方式のために、膜二重層にわたってWnt7シグナルを変換する可能性が限定されており、したがって、シグナル変換は、受容体複合体の他の構成成分、すなわち、Gpr124および/またはFz/Lrp5/6に依拠しなければならない。

【0407】

このシグナル変換機序を明らかにするために、Gpr124およびFz/Lrp5/6の複合体の間の機能的関係を培養した細胞内で評価した。「Fzを含まない」および「Lrp5/6を含まない」細胞を使用して、Gpr124/Reckの機能が、FzおよびLrp5/6の機能に著しく依拠することが遺伝的に確立された(図3A~E)。これらの各CRDおよびDKK-1感受性Wntリガンド結合ドメインがシグナル伝達に対して必須であり、Wnt7が古典的方式でFz/Lrp5/6に結合し、これを活性化することを伴うことがさらに確立された。

【0408】

ゼブラフィッシュのCNSの血管系の発生は、容易に定量され得る血管新生の出芽のプロセスにおいて、Reck/Gpr124シグナル伝達に著しく依拠することが示されている。したがって、これは、生理学的なWnt7のインプットレベルに応答して、インビボで構造-機能分析を実施するための最良の設定を構成する(B. Vanhollebeke et al., *Elife*. 4, 1-25 (2015); N. Bostaille, A. Gauquier, L. Twyffels, B. Vanhollebeke, *Biol. Open*. 5, 1874-1881 (2016))。1細胞段階のWTまたはgpr124^{-/-}の胚において合成mRNAの注射を使用して、本発明者らは、N末端の細胞外部分(Gpr124^{ECD})、7つのスパン部分(Gpr124^{TM2-7})またはC末端の細胞質内での延長(Gpr124^{ICD})を欠く3つのGpr124変異体(図4A)の活性を評価することによって開始した。Gpr124^{ECD}およびGpr124^{ICD}の異所的な発現は、gpr124突然変異体における脳の血管新生を復元しなかったが、インビボでの脳の血管新生(図4B、C)およびインビトロでのSTFアッセイにおけるWntの活性(図4D)を誘発するために、Gpr124^{TM2-7}活性は十分であった。

【0409】

このようなGpr124^{TM2-7}の競合の保持は予期されなかった：Gpr124は、操作されたGpr124^{TM2-7}突然変異体タンパク質には存在しない7つの膜貫通型スパンのリガンドに誘導される立体構造のリモデリングによって細胞内で細胞外刺激を古典的に中継する受容体スーパーファミリーであるGPCRである。これらの結果に基づき、Gpr124は、膜を通るシグナル変換を必要としないため、Wnt7シグナル伝達を促進する場合、古典的GPCRとして作用しなくてもよいようである。

【0410】

代わりに、Gpr124は、その活性がReckに結合する細胞外ドメイン(EDC)と立体構造的に連結していない細胞内ドメイン(ICD)に依拠するシグナル伝達欠損膜貫通型タンパク質として、このモジュールにおいて表面的に作用する。本発明者らは、Gpr124のICDが、Fzと相互作用するWntシグナル伝達の重要なエフェクターであるDishevelledを介して作動すると仮定した。この「Dvl仮定」は、Gpr124に密接に関連する接着GPCRであるGpr125が、そのC末端のICDドメインを介してDvlと物理的に相互作用することが示され(X. Li et al., *Development*. 140, 3028-3039 (2013))およびGpr124のICDがGpr125のICDと置き換えられたGpr124/125ハイブリッドが、ゼブラフィッシュにおける脳の血管新

10

20

30

40

50

生を促進することができる (B. Vanhollebeke et al., *Elife*. 4, 1-25 (2015)) という知見を根拠とする (図 4 E を参照のこと)。同様に、G p r 1 2 4 の I C D が、D v 1 に結合することが知られている F z 2 の I C D と置き換えられた G p r 1 2 4 / F z 2 ハイブリッド (G p r 1 2 4^{I C D F z 2}) が適格であった。対照的に、全長 F z 2 は適格ではなかった。注目すべきことに、G p r 1 2 4^{I C D F z 2} の活性は、F z 2 の I C D 内の D v 1 結合部位である K T x x W および E T T V モチーフに依存した (図 4 E)。

【 0 4 1 1 】

2. 4. D v 1 ポリマーは F z と G p r 1 2 4 を連結することによってリガンド特異的 W n t シグナロソームをアセンブルする

F Z₁₋₁₀^{-/-} HEK 2 9 3 T 細胞において、N 末端を F L A G でタグ付けした G p r 1 2 4 と D v 1 - G F P の間で実施した同時免疫沈降実験によって、C 末端の E T T V の非存在下でも、G p r 1 2 4 と D v 1 の間での相互作用が確認された (図 5 A)。F z と異なり、G p r 1 2 4 は、 β -カテニン安定化の上流の W n t シグナル伝達活性化の早期指標である、リン酸化 D v 1 レベルにおいて検出可能な増加を得なかった (S. I. Yanagawa, F. Van Leeuwen, A. Wodarz, J. Klingensmith, R. Nusse, *Genes Dev.* 9, 1087-1095 (1995); X. Huang et al., *Science*. 339, 1441-1445 (2013)) (図 5 B)。このような G p r 1 2 4 に誘導される D v 1 活性化の非存在は、シグナル伝達欠損タンパク質として G p r 1 2 4 を特定した図 4 の実験と一致した。まとめると、これらの実験は、その W n t 7 シグナル伝達活性を媒介することができる構成的な G p r 1 2 4 の結合パートナーとして D v 1 を特定する。

【 0 4 1 2 】

G p r 1 2 4、R e c k および F z / L r p 5 / 6 は、培養された細胞内でより高次の受容体複合体を形成することが提案されている (C. Cho, P. M. Smallwood, J. Nathans, *Neuron*. 95, 1056-1073 (2017))。本発明者らは、G p r 1 2 4 の I C D は D v 1 を介してこの複合体をアセンブルすると推論した。D v 1 分子は、N 末端の D i x ドメインのヘッド-テールの自己アセンブリーによる動的重合によって、シグナロソームを実際にアセンブルする。これらの自己結合により、キナーゼおよび細胞内機構の構成成分を含む、様々な細胞質内の W n t シグナル伝達調節タンパク質の局所的濃縮が可能となる (M. Gammons, M. Bienz, *Curr. Opin. Cell Biol.* 51, 42-49 (2018)、M. Bienz, *Trends Biochem. Sci.* 39, 487-495 (2014))。D v 1 は、G p r 1 2 4 と F z の両方と物理的に相互作用するため、G p r 1 2 4 と関連する R e c k に結合した W n t 7 は、したがって、動的な W n t シグナロソームにトラップされ、それによって、F z シグナル伝達に利用可能な W n t 7 リガンドの局所濃度を増加させる。

【 0 4 1 3 】

W n t シグナロソームは、原形質膜においてまたは原形質膜の下で形成する D v 1 において濃縮された大きな点状構造として、光学顕微鏡によって容易に検出される (M. Bienz, *Trends Biochem. Sci.* 39, 487-495 (2014); J. Bilic et al., *Science*. 316, 1619-1622 (2007); M. V. Gammons, M. Renko, C. M. Johnson, T. J. Rutherford, M. Bienz, *Mol. Cell*. 64, 92-104 (2016))。F z および G p r 1 2 4 が、D v 1 に依存して、W n t シグナロソーム内で同時に分散するかどうかを決定するために、個々に発現した F z - G F P および G p r 1 2 4 - t a g R F P の局在化を胞胚の深層 (D E L) 細胞において最初に検査した。F z 4 は原形質膜周辺全体を装飾したが、代わりに、G p r 1 2 4 - t a g R F P は細胞接触時に蓄積した。この差示的な膜局在化は、D v 1 発現の際に保持された (図 5 C)。これらの D v 1 結合能と一致して、両受容体は D v 1 をそれらの各膜コンパートメントに動員した (図 5 D)。しかし、G p r 1 2 4 - t a g R F P と F z 4 - G F P が同時に発現された場合、G p r 1 2 4 - t a g R F P は、細胞内接合部にアンカーされたままであったが、F z 4 - G F P は、D v 1 に依存して、G p r 1 2 4 膜のサブドメインに量的に再度局在化し (図 5 E)、ここで、タンパク質は、E V L 細胞膜で特に明白な W n t シグナロソームを連想させる点状構造で共存した (図 5 F)。本発明者らは、D E L 細胞における D v 1 に依存する F z / G p r 1 2 4 相互作用を試験する

ためのアッセイとして、生体分子蛍光補完性を使用した。Gpr124-VN155 (I152L) と Fz1-VC155 を同時に注射することにより、実際に、Dvl に依存して明るい接合部シグナルが生じ (図 5G)、Fz と Gpr124 が、Dvl 足場タンパク質を介して間接的に相互作用することが実証された。これによって、Wnt リガンド識別能を与えられた Wnt シグナルソーム内で、関連する Reck に結合した Wnt7 との Fz / Lrp5 / 6 および Gpr124 の空間的クラスター形成に関する分子機序を与えられ、それによって、Gpr124 / Reck 陽性細胞の Wnt7 特異的応答が説明される (最終モデル、図 6 を参照のこと)。

【0414】

まとめると、この研究によって、脊椎動物の細胞の Wnt 解読能に最初の構造的かつ機構的洞察がもたらされる。それは、進化的に拘束された Wnt 構造が、これまで、Norrin のような構造的に無関係な Frizzled リガンドを必要とすると考えられていた特性である、リガンド特異的細胞応答を可能とするのに十分な多様性と固有の柔軟性を保持したことも実証する (M. B. Lai et al., Cell Rep. 19, 2809-2822 (2017))。Wnt の進化および機能に関するこれらの構造上の洞察は、追加の Wnt 解読モジュールが存在し、他の Wnt または Fz ファミリーのメンバーに応答した細胞挙動の微調整を可能とすることを直ちに示唆する。

10

【実施例 2】

【0415】

Reck による Wnt7 の分子認識により Wnt / Fz 相互作用の要件を最小化する

20

1. 材料および方法

1.1. ゼブラフィッシュの系統

State of Belgium (プロトコル承認番号: CEBEA-IBMM-2017-22:65) の規則に従って、標準的な条件下で、ゼブラフィッシュ (Danio rerio) を育成し取り扱った。以下の系統を使用した: Tg(-17.0neurog1:EGFP)^{w61} (McGraw et al., J. Neurosci 28(47):12558-69 (2008))。

【0416】

1.2. モルフォリノ、RNA コンストラクトおよびマイクロインジェクション

以下のスプライスブロッキングモルフォリノ (MO) (GeneTools, Eugene, OR) を 1 細胞段階において、胚に注射した: wnt7aa (TTCCATT TG ACCCTACTTACCCAAAT, 6 ng)。mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion, Carlsbad, CA) を使用して Not1 を消化した後、pCS2 プラスミドから合成 mRNA を転写し、1 細胞段階のゼブラフィッシュの胚中に注射した。アフリカツメガエルのマイクロインジェクションでは、15 pg の wnt7a または wnt7a^{K190A} または wnt7a^{1~278} の mRNA を 4 細胞段階の胚の 1 つの腹側割球中に注射した。

30

【0417】

1.3. 発現プラスミドコンストラクト

Fz1 (addgene 番号 42253) および Fz5 (addgene 番号 42267) を除いて、全ての Wnt シグナル伝達の構成成分および他の発現コンストラクトは、In-Fusion クローニング (Takara, Mountain View, CA) を使用する組換えの後に、pCS2 ベクターの CMV プロモーターから発現した。in-Fusion クローニングとタンデムに重複する PCR 産物とを使用して、単一点突然変異の変異体および欠失体を生成した。全てのコンストラクトをシーケンシングによって確認した。

40

【0418】

1.4. 細胞培養および HEK293 突然変異体細胞株

HEK293T 細胞を ATCC (CRL-3216) から入手し、HEK293 STF 細胞株は、Jeremy Nathans (John Hopkins) によって好意に

50

より提供された。細胞を10%のウシ胎仔血清を補充したDMEM/F12培地(Lonza, Basel, Switzerland)中で培養し、5%のCO₂で平衡化した、加湿したインキュベーター内で維持した。7B。

【0419】

1.5. STFの二重ルシフェラーゼアッセイ

細胞を96ウェルプレート中にプレATINGし、24時間後に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)によって3連でトランスフェクトした。ウェル当たりのトランスフェクトされるプラスミドDNAの量を各発現ベクターごとに最適化した：別段に指定されていなければ、ウミシタケルシフェラーゼ(0.5 ng)、Wnt(20 ng)、Fz(5 ng)、LRP(2.5 ng)、Gpr124(10 ng)、Reck(10 ng)。DNAの総量を空のpCS2ベクターを用いてウェル当たり100 ngに調整した。パッシブライシスバッファー(E1960, Promega, Wisconsin)中で細胞を収集し、トランスフェクションの48時間後に、Dual-Luciferase Reporter Assay系(E1960, Promega, Madison, Wisconsin)を使用して、ホタルルシフェラーゼとウミシタケルシフェラーゼの活性を連続的に測定した。

10

【0420】

1.6. 顕微鏡および画像処理

ゼブラフィッシュの胚をLSM710共焦点顕微鏡を用いて画像化し、画像をImageJにおいて処理した。ゼブラフィッシュ発生の表現型の画像をLeica M165 FCで撮影した。アフリカツメガエルの幼生をOlympus SZX16で画像化した。

20

【0421】

1.7. 統計分析

GraphPadソフトウェアを使用して統計分析を実施した。データは平均±SDを表す。正規分布に従うデータ(STFアッセイ)の多重比較および単一比較に関する一元ANOVA(ポストホックダネット検定)および学生t検定によって、ならびに非正規分布に従うデータ(DRGの定量)の多重比較に関するKruskal-Wallis(ポストホックダネット検定)によって、p値を計算した；* p < 0.05；** P < 0.01；*** p < 0.001。

【0422】

2. 結果

本発明者らは、実験1において、Reckが、Fzによって繋がったリガンドと異なる部位で、Wnt7a内のリンカーを認識することによって、Wntリガンドを識別することを特定した。よって、結合の機序は、Wnt7が、Fz、ReckおよびLRP5/6によって同時に繋がる、細胞内足場によってまとめられた高次のWnt7/Reck/Gpr124/Fz/LRP5/6複合体の形成と一致しているようである。本発明者らは、Wnt7aのN末端ドメイン(Wnt7a^{1~278})が依然としてReckに結合することをさらに明らかにした。

30

【0423】

次に、Fz5およびGpr124/Reck/Fz/LRPシグナル伝達に関するこれらの切断されたWnt7a変異体のSTF活性を評価した(図7A)。Fz5を介するWntシグナル伝達には、Wnt/Fz接触部位の両方の保存が必要とされ、いずれか一方を欠く全てのWnt7a変異体は、パルミトレイン酸の切断または非存在によって、Fz5シグナル伝達を刺激することができなかった(図7A)。Gpr124/Reck/Fz1シグナル伝達は、1つの注目すべき例外：シングルドメインWnt7a^{1~278}がGpr124/Reck/Fz1によって約40%のシグナル伝達能を維持したこと(図7A、矢印)を除いて、Wnt7aの切断または突然変異に対して等しく感受性であった。本発明者らは、Wnt7、Fz、LRP5/6およびReckによって形成された複合体内で、Reckによってもたらされる追加の接触点が、リガンドインデックスにおける欠損しているWnt/Fz相互作用を補っていることを提案した。

40

50

【0424】

Fz5シグナル伝達から、Gpr124/Reck/Fz/LRPシグナル伝達に関してWnt7a内で必須の残基を識別するために、Wnt7aの単一残基変異体のコレクションのGpr124/Reck/Fz/LRPまたはFz5に依存するSTFシグナル伝達を分析した(図7B、7C)。Fz5シグナル伝達に関して不活性であるが、Gpr124/Reck/Fz/LRPに媒介されるWntシグナル伝達を依然として活性化する、より詳細には、野生型の成熟した全長Wnt7aのGpr124/Reck/Fz/LRPに媒介されるWntシグナル伝達活性の少なくとも35%、Gpr124/Reck/Fz/LRPに媒介されるWntシグナル伝達を活性化する、42個の全長mWnt7a変異体(7Bのボックス内)を特定した(図7B~7C、表3を参照のこと)。これらの変異体のうちの31個、より詳細には、Wnt7a変異体Q48A(Q17A)、I51A(I20A)、P56A(P25A)、A58R(A27R); I59A(I28A); E64A(E33A); M68A(M37A)、L70A(L39A)、E72A(E41A); F75A(F44A); V99A(V68A); I160A(I129A); F162A(F131A); K164A(K133A); I172A(I141A); R189A(R158A); K190A(K159A); K190L(K159L); K212A(K181A); R222A(R191A); K229A(K198A); K231A(K200A); V236A(V205A); E239A(E208A); P249A(P218A); Y260A(Y229A); P263A(P232A); T266A(T235A); W322A(W291A); T338A(T307A)およびN83Q(N52Q)[ここで、置換はmWnt7aの前駆体ポリペプチドにおけるアミノ酸位置を示す(およびここで、括弧内の置換はmWnt7aの成熟ポリペプチドにおけるアミノ酸位置を示す、表3を参照のこと)]は、野生型の成熟した全長Wnt7aのGpr124/Reck/Fz/LRPに媒介されるWntシグナル伝達活性の少なくとも70%、Gpr124/Reck/Fz/LRPに媒介されるWntシグナル伝達を活性化することができた(図7B~C)。

10

20

【0425】

インビトロでは、Wnt7a^{1~278}およびWnt7a^{K190A}(Gpr124/Reck/Fz/LRPシグナル伝達に関する31個の選択的変異体のうちの1つ)は、Gpr124/Reckの非存在下でいずれのFzによってもシグナル伝達できなかった(図7D)。したがって、ゼブラフィッシュの接合体にmRNAを注射した際に、Wnt7a^{1~278}およびWnt7a^{K190A}は耐性が良好であり、それぞれ、1ngおよび100pgまで後部化も全体の解剖学的変更も明らかにしなかった(図7D~E)。対照的に、3pgのwnt7aのmRNAは、Wntシグナル伝達の異所的活性化によって前脳と眼の構造の損失を誘導し(Kim et al., Nature 407(6806):913-6 (2000))、10pgを超える用量で異形胚をもたらした(図7E~F)。

30

【0426】

同様に、アフリカツメガエルの胚に注射した場合には、Wnt7aは、古典的なWnt/-カテニンシグナル伝達の結果である、軸の重複をもたらし、一方、Wnt7a^{1~278}およびWnt7a^{K190A}はもたらさなかった(図7G)。Wnt7a^{1~278}およびWnt7a^{K190A}によって誘導されるいずれかの識別可能な発生異常の欠如によって、100pgのmRNAを注射した後のwnt7a aモルファントにおいて重要なDRGの救済が可能となるが、その最高耐量である10pgを注射したwnt7a aのmRNAによっては、DRGニューロンの周辺的な復元のみが明らかとなった(図7H)。まとめると、これらの実験によって、代替のFz経路に関するオフターゲット活性を実証することなく、インビボでGpr124/Reck/Fz/LRPに依存する応答を誘発するGpr124/Reck/Fz/LRP 選択的アゴニストとして、Wnt7a^{1~278}およびWnt7a^{K190A}が特定され、それによって、リガンド特異的Fzシグナル伝達経路が、大幅に増加した選択性を有する新規Wntアゴニストを開発するために適合され得るという概念の証明がもたらされる。この実験セクションにおけるWnt7aポリペプ

40

50

チド変異体のアミノ酸置換の位置を、W n t 7 a 前駆体ポリペプチド（すなわち、シグナルペプチドを含む）のアミノ酸配列に関して示す。表 3 は、W n t 7 a 前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列におけるアミノ酸置換の位置および成熟した W n t 7 a ポリペプチドのアミノ酸配列におけるそれらの対応する位置を示す。

【 0 4 2 7 】

マウスの W n t 7 a ^{K190A} または W n t 7 a ^{1~278} の内皮でのトランスジェニック発現によって、W n t 7 a a^{-/-} 突然変異体ゼブラフィッシュにおいて、G P R 1 2 4 / R E C K に依存する脳の血管新生が誘発され、血液脳関門が復元された（G L U T 1 発現によって評価した場合）（図 9 A ~ C）。マウスの W n t 7、W n t 7 a ^{K190A} および W n t 7 a ^{1~278} は、内皮特異的 k d r 1（血管内皮成長因子受容体 k d r 1 様）プロモーターの制御下で、W n t 7 a a^{-/-} 胚の内皮において一過性に発現された。W n t 7 リガンドは、遺伝子組換えマーカーとしての B F P（青色蛍光タンパク質）を含むバイシストロニックコンストラクトとして発現された。注射されていない胚と比較して、3 つのリガンドは全て、C t A 形成を復元する。6 0 h p f の W n t 7 a a^{-/-} 胚における W n t 7、W n t 7 a ^{K190A} および W n t 7 a ^{1~278} のトランスジェニック発現後の C t A の抗 G L U T 1 免疫蛍光染色により、血液脳関門の成熟が明らかとなった。

10

【 0 4 2 8 】

上記を鑑みて、W n t 7 a 変異体は、代替りの F z 経路に関するオフターゲット活性を実証することなく、インビボで G P R 1 2 4 / R E C K に依存する応答を誘発する G P R 1 2 4 / R E C K 選択的アゴニストである。

20

【 0 4 2 9 】

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3

mWnt7a の前駆体ポリペプチドにおけるアミノ酸位置	成熟した mWnt7a のポリペプチドにおけるアミノ酸位置
Q48A	Q17A
I51A	I20A
P56A	P25A
A58R	A27R
I59A	I28A
E64A	E33A
M68A	M37A
L70A	L39A
E72A	E41A
F75A	F44A
V99A	V68A
R81A	R50A
N83Q	N52Q
I160A	I129A
F162A	F131A
K164A	K133A
F166A	F135A
I172A	I141A
R177A	R146A
R189A	R158A
K190A	K159A
K190L	K159L
K190S	K159S
K212A	K181A
R222A	R191A
K229A	K198A
K231A	K200A
V236A	V205A
E239A	E208A
R245A	R214A
K247A	K216A
P249A	P218A
K253A	K222A
I254A	I223A
Y260A	Y229A

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

P263A	P232A
T266A	T235A
E279A	E248A
R320A	R289A
W322A	W291A
T338A	T307A
K349A	K318A

10

【0430】

マウスとヒトの野生型成熟Wnt7aの全長の一次アミノ酸配列は同一であることに留意されたい。

【実施例3】

【0431】

脳卒中（一過性中大脳動脈閉塞（tMCAO））のモデルに供したマウスにおけるマウスWnt7a^{K190A}のウイルスベクターによるデリバリー

20

1. 材料および方法

1.1. AAVプラスミドコンストラクト（AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190A}-p2A-EGFP）の生成

pCAGプロモーターの調節エレメントの下に隣接するITR配列を含有するpAAV導入遺伝子ベクター中に、全長mWnt7a^{K190A}変異体をクローニングした。Wnt7変異体は、自己切断するp2Aペプチドの中間体によってEGFPへの融合体として発現された。AAVベクターを産生し、HEK293細胞のpAAV導入遺伝子プラスミド、ヘルパープラスミド（AAV-PHP.eBカプシド変異体+rep+挿入配列をコードする）およびアデノウイルスヘルパープラスミドとの三重の同時トランスフェクションによって、Korbelin et al., 2016に記載されているように精製した。

30

【0432】

「Wnt7a^{K190A}」のK190Aは、mWnt7aの前駆体ポリペプチドのアミノ酸位置を示すことに留意されたい。

【0433】

1.2. 動物実験

AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190A}-p2A-EGFPまたはAAV-PHP.eB対照ベクター（マウス1匹当たり 1×10^{11} vg）を含有する50 μ lの濃縮したベクター（マウス1匹当たり 1×10^{11} vg）を10匹のC57BL/6マウスの眼窩周囲静脈中に静脈内注射した。感染の2週間後に、CNS内皮細胞においてEGFPシグナルを評価し、導入遺伝子の発現を確認した。

40

【0434】

マウスをtMCAOに1時間供し、tMCAOの5日後に、TTC（2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド）染色によって梗塞サイズを測定した。内因性血漿タンパク質の漏出（免疫グロブリンおよびフィブリノーゲン）を測定することによって、再灌流の1時間後に血液脳関門（BBB）のレベルにおける漏出アッセイを実施した。tMCAO後のマウスの生存を灌流の5日後に評価した。

【0435】

2. 結果

EGFPをコードするコンストラクトを使用して、マウスの脳における広範囲のトランスジェニック発現を実証した（図10A）。

50

【0436】

インビボでの脳卒中に関するマウスのWnt7a^{K190A}の効果を評価するために、マウスのWnt7a^{K190A}を発現する脳に特異的なアデノ随伴ベクターを生成した。

【0437】

マウスのWnt7a^{K190A}を含むベクターを注射した全てのマウスが1回拍出量の低減を示した(図10B)。

【実施例4】

【0438】

脳卒中(一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO))のマウスモデルに供したマウスにおけるWnt7a^{K190S}またはWnt7a^{K190L}のウイルスベクターによるデリバリー

10

1. 材料および方法

1.1. AAVプラスミドコンストラクト(AAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190S}-p2A-EGFPおよびAAV-PHP.eB-CAG-mWnt7a^{K190L}-p2A-EGFP)の生成

AAVプラスミドコンストラクトを実施例3のセクション1.1に記載したように生成した。

【0439】

「Wnt7a^{K190S}」のK190Sと「Wnt7a^{K190L}」におけるK190Lは、mWnt7a前駆体ポリペプチドにおけるアミノ酸位置を示すことに留意されたい。

【0440】

20

1.2. 動物実験

動物実験を実施例3のセクション1.1に記載したように実施する。

【0441】

2. 結果

1回拍出量の低減をマウスのWnt7a^{K190S}またはWnt7a^{K190L}を含むベクターを注射したマウスにおいて測定する。

【実施例5】

【0442】

脳卒中(一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO))のマウスモデルに供したマウスにおけるWnt7a変異体アゴニストのウイルスベクターによるデリバリー

30

1. 材料および方法

AAVプラスミドコンストラクトを実施例3のセクション1.1に記載したように作成し、動物実験を実施例3のセクション1.1に記載したように実施する。

【0443】

2. 結果

1回拍出量の低減をマウスのWnt7a^{Q48A}、Wnt7a^{I51A}、Wnt7a^{P56A}、Wnt7a^{A58R}、Wnt7a^{I59A}、Wnt7a^{E64A}、Wnt7a^{M68A}、Wnt7a^{L70A}、Wnt7a^{E72A}、Wnt7a^{F75A}、Wnt7a^{R81A}、Wnt7a^{N83Q}、Wnt7a^{V99A}、Wnt7a^{I160A}、Wnt7a^{F162A}、Wnt7a^{K164A}、Wnt7a^{F166A}、Wnt7a^{I172A}、Wnt7a^{R177A}、Wnt7a^{R189A}、Wnt7a^{K212A}、Wnt7a^{R222A}、Wnt7a^{K229A}、Wnt7a^{K231A}、Wnt7a^{V236A}、Wnt7a^{E239A}、Wnt7a^{R245A}、Wnt7a^{K247A}、Wnt7a^{P249A}、Wnt7a^{K253A}、Wnt7a^{I254A}、Wnt7a^{Y260A}、Wnt7a^{P263A}、Wnt7a^{T266A}、Wnt7a^{E279A}、Wnt7a^{R320A}、Wnt7a^{W322A}、Wnt7a^{T338A}またはWnt7a^{K349A}を含むベクターを注射したマウスにおいて測定する。

40

【0444】

陰性対照として、1回拍出量の低減をマウスのWnt7a^{R49A}、Wnt7a^{E103A}またはWnt7a^{L192A}を含むベクターを注射したマウスにおいて測定する。

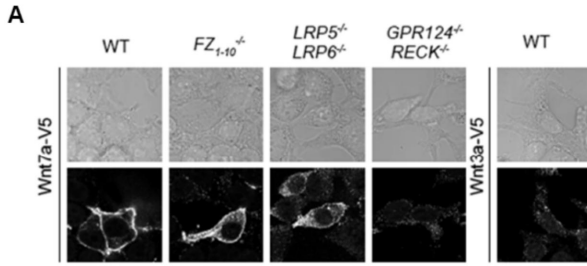
【0445】

50

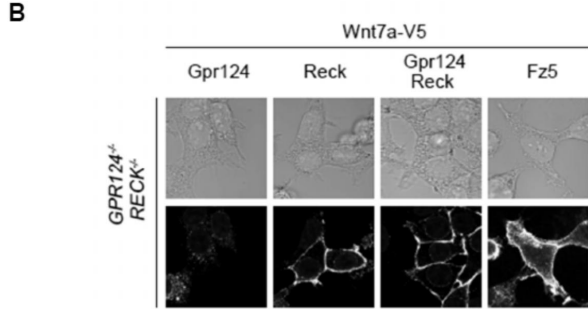
置換は、mWnt7a前駆体ポリペプチドにおけるアミノ酸位置を指すことに留意されたい。

【図面】

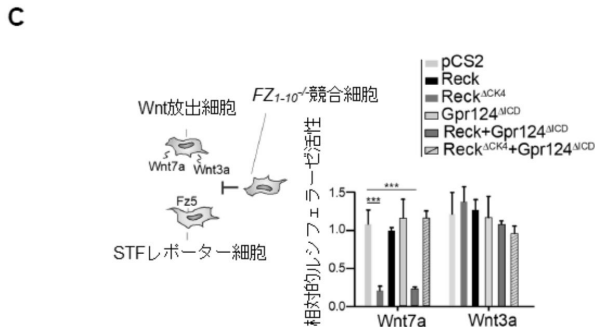
【図 1 A】



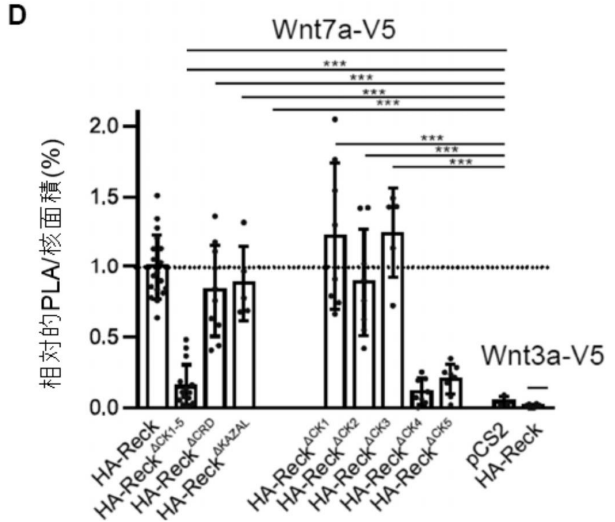
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

20

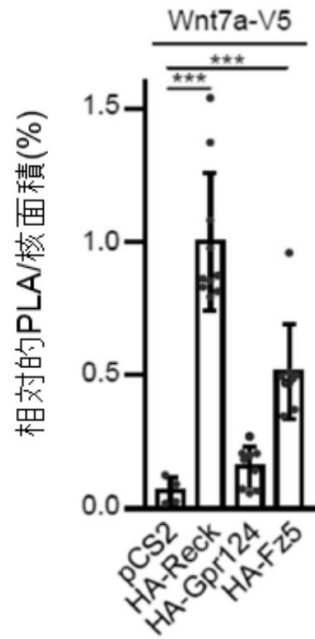
30

40

50

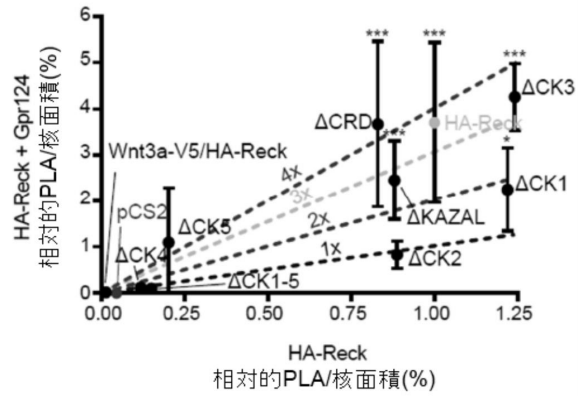
【図 1 E】

E



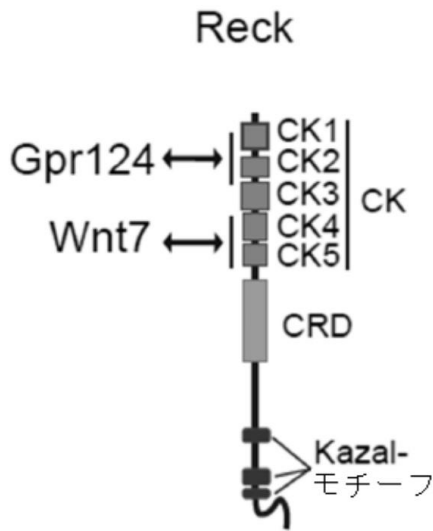
【図 1 F】

F



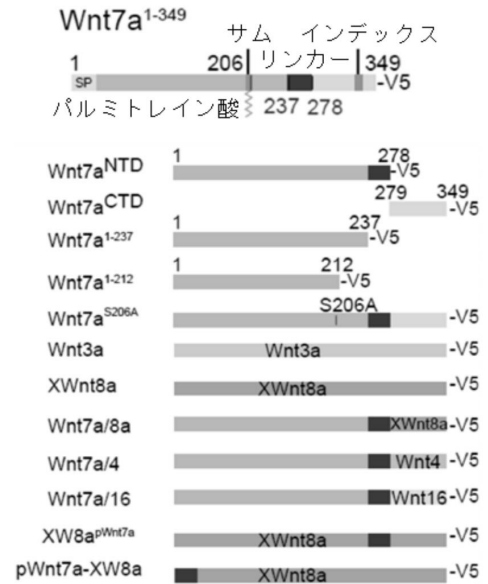
【図 1 G】

G



【図 2 A】

A



10

20

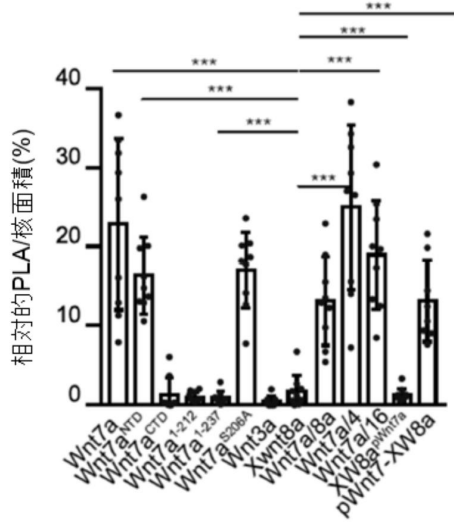
30

40

50

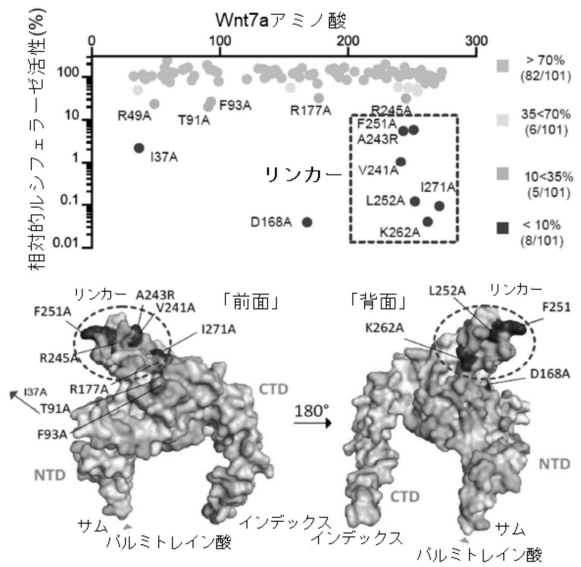
【 図 2 B 】

B



【 図 2 C 】

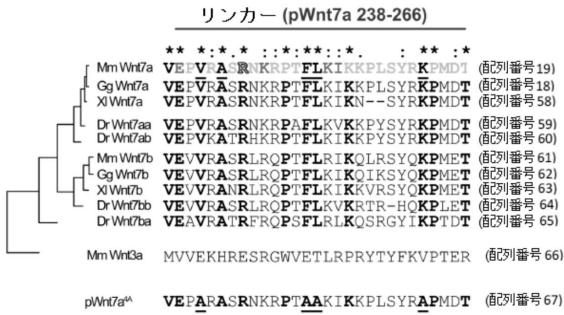
C



10

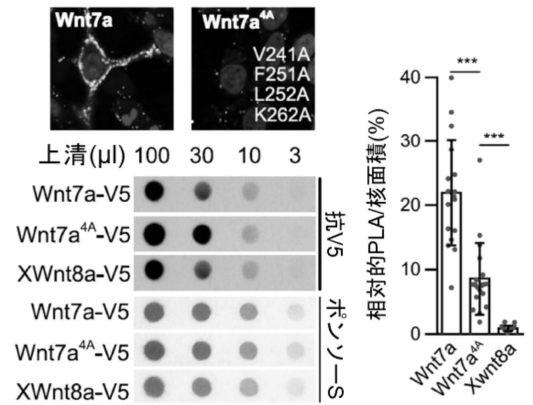
【 図 2 D 】

D



【 図 2 E 】

E



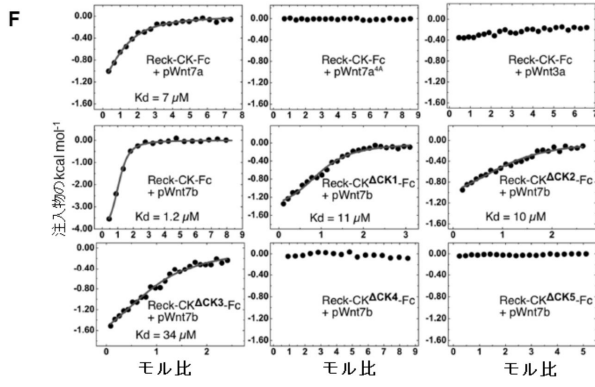
20

30

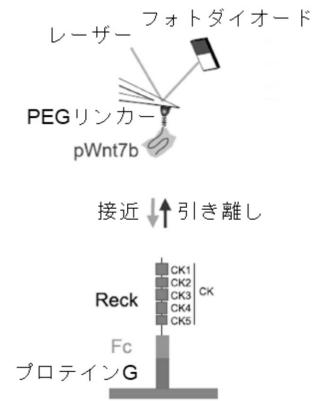
40

50

【 図 2 F 】

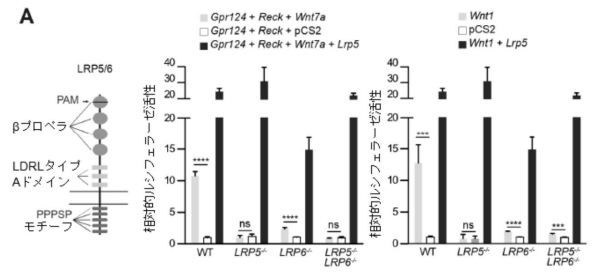


【 図 2 G 】

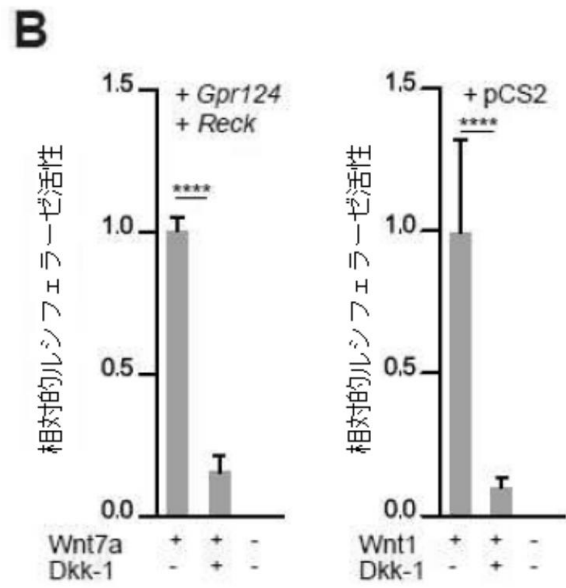


10

【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



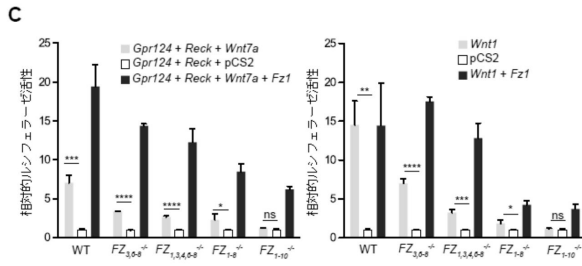
20

30

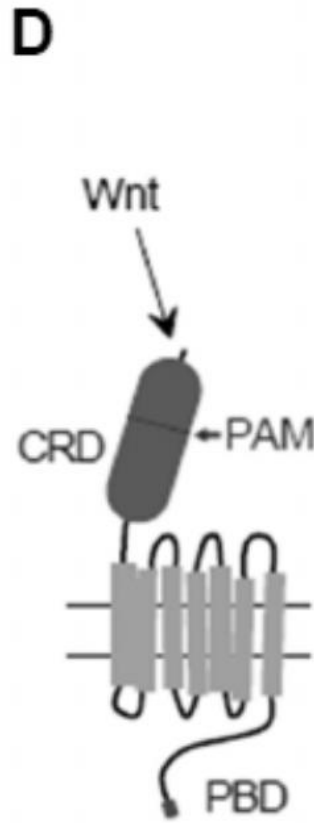
40

50

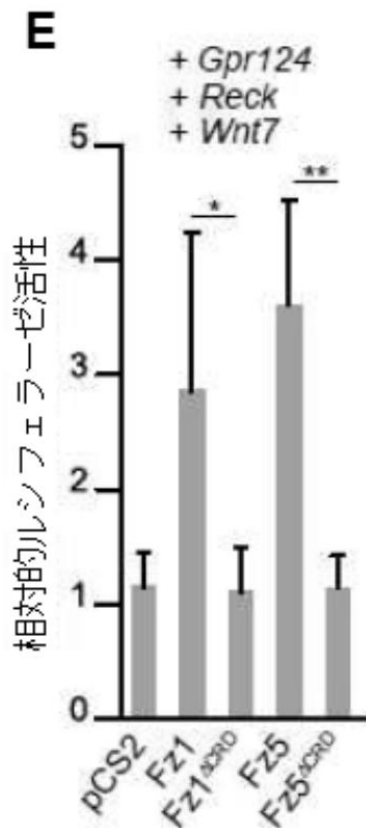
【 図 3 C 】



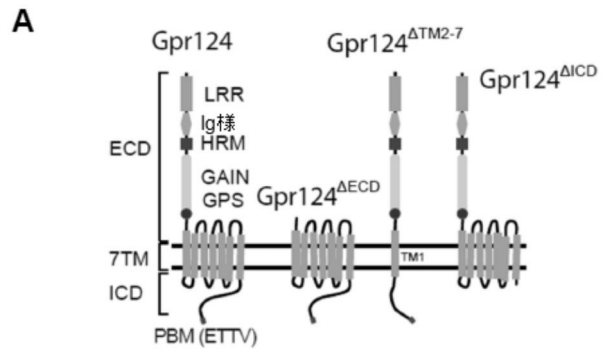
【 図 3 D 】



【 図 3 E 】



【 図 4 A 】



10

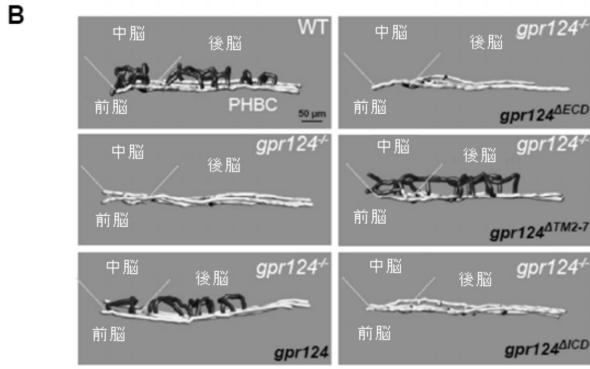
20

30

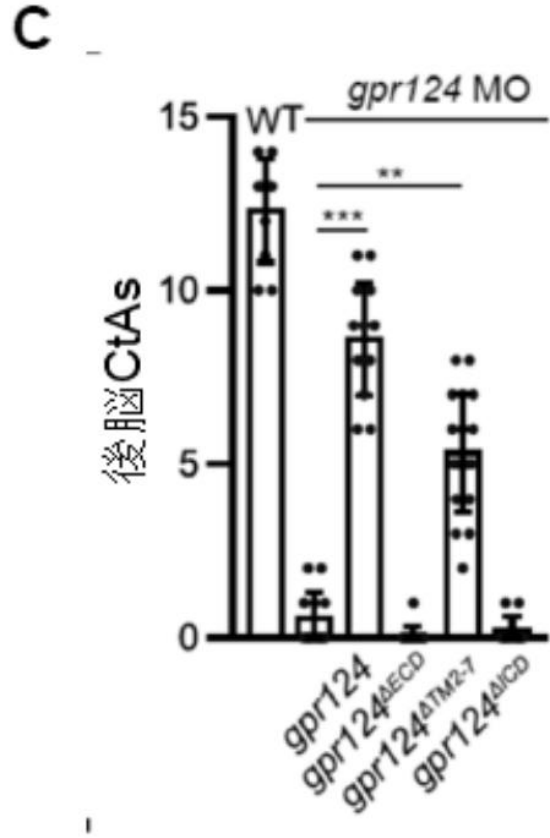
40

50

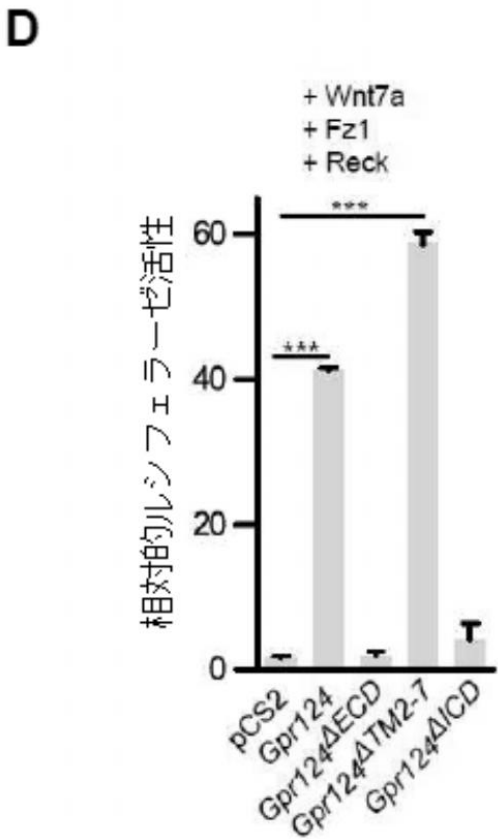
【 図 4 B 】



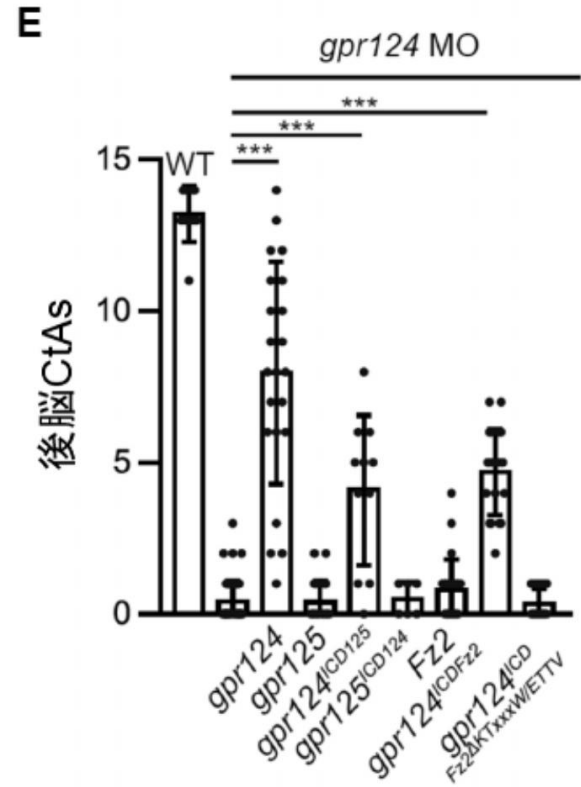
【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



【 図 4 E 】



10

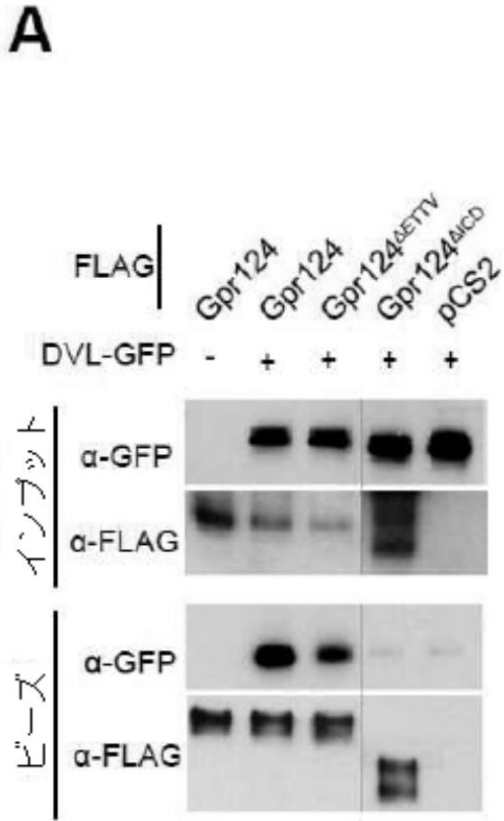
20

30

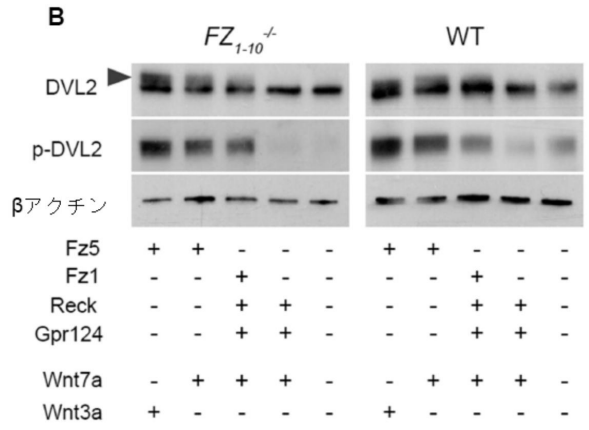
40

50

【 図 5 A 】



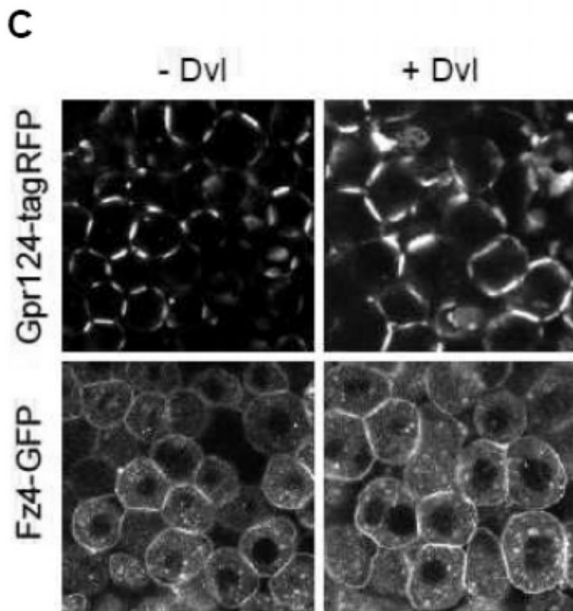
【 図 5 B 】



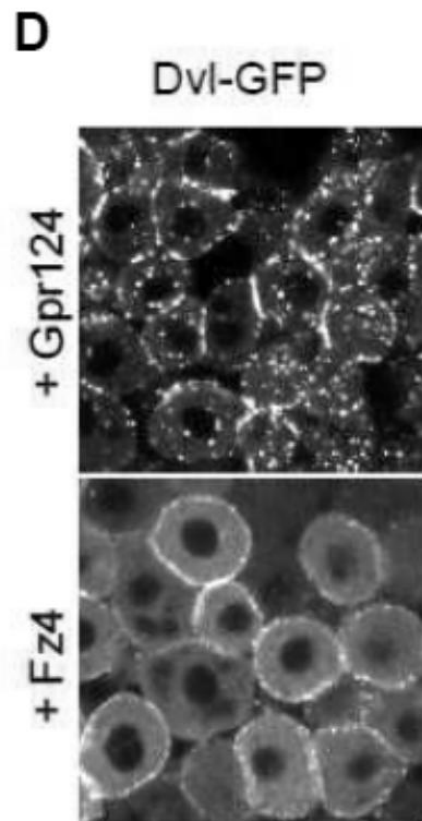
10

20

【 図 5 C 】



【 図 5 D 】

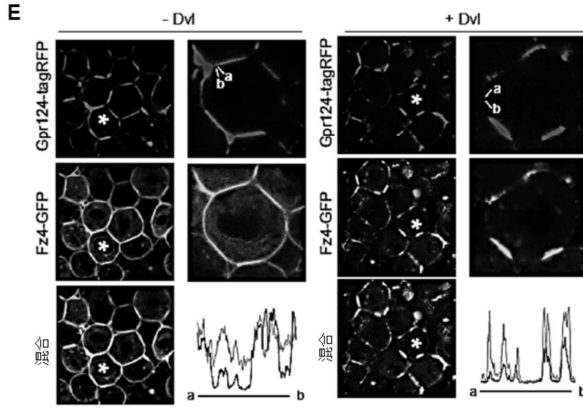


30

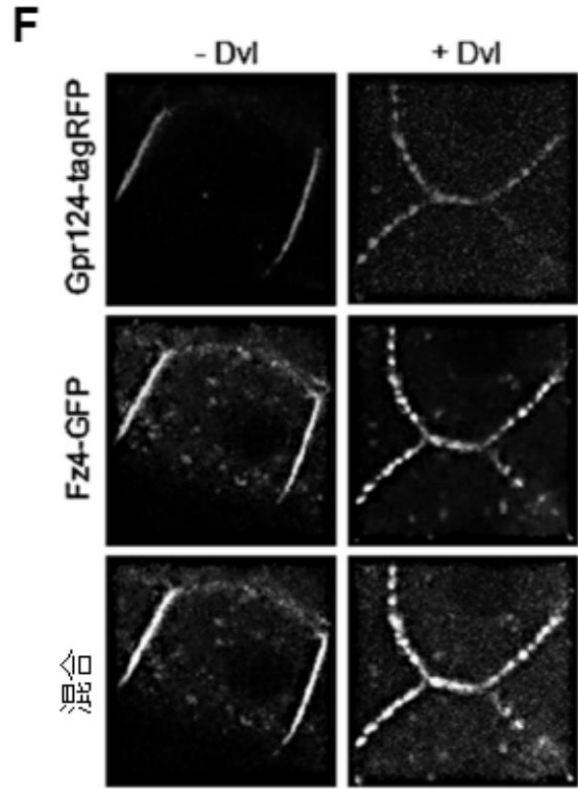
40

50

【 図 5 E 】



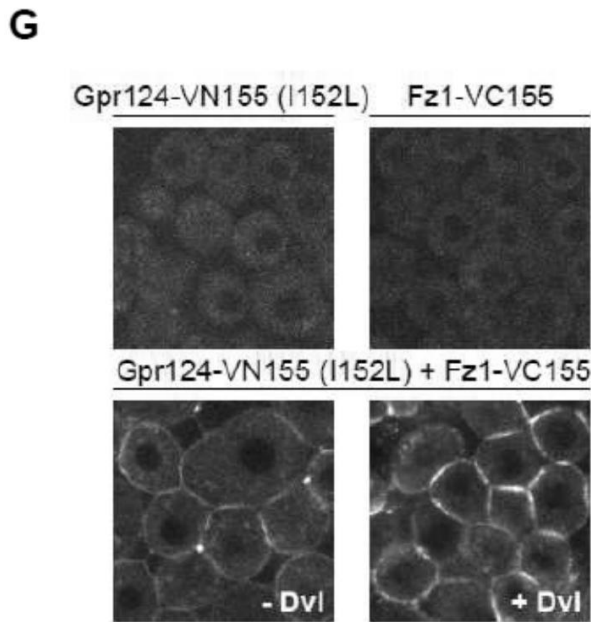
【 図 5 F 】



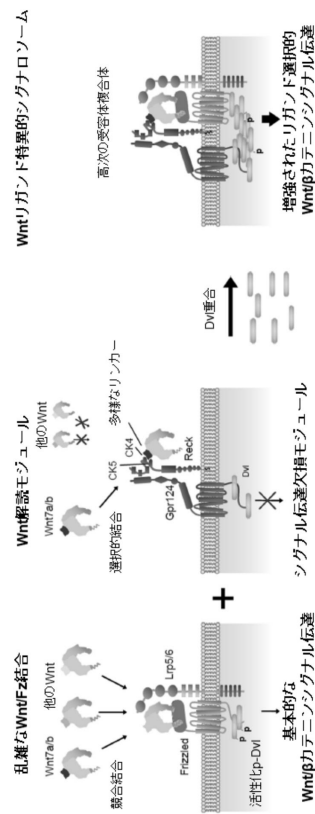
10

20

【 図 5 G 】



【 図 6 】



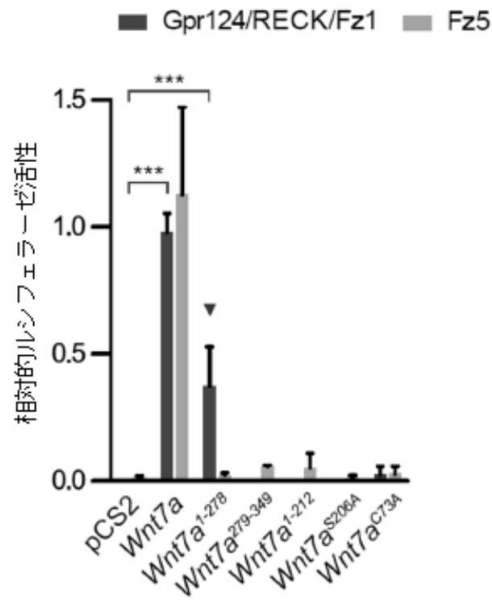
30

40

50

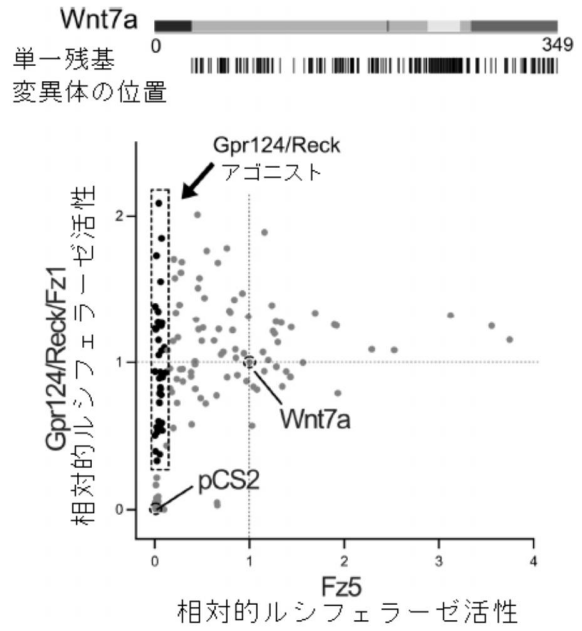
【図 7 A】

A



【図 7 B】

B



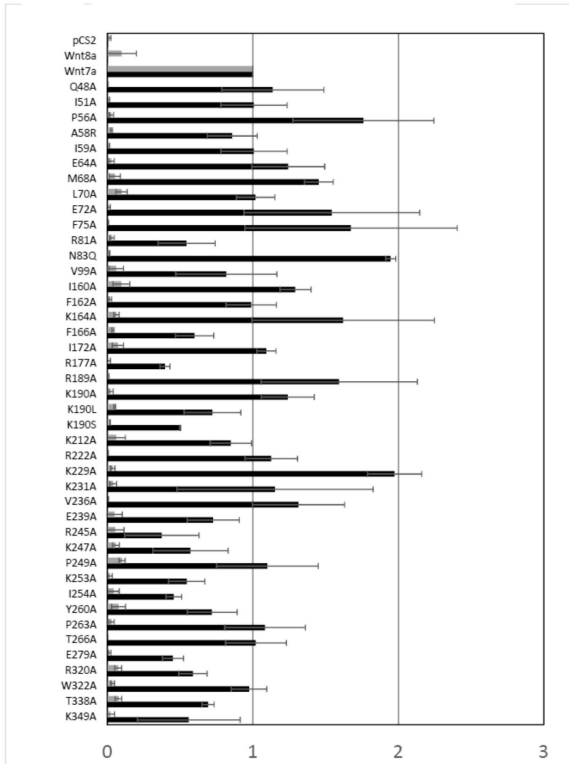
10

20

【図 7 C】

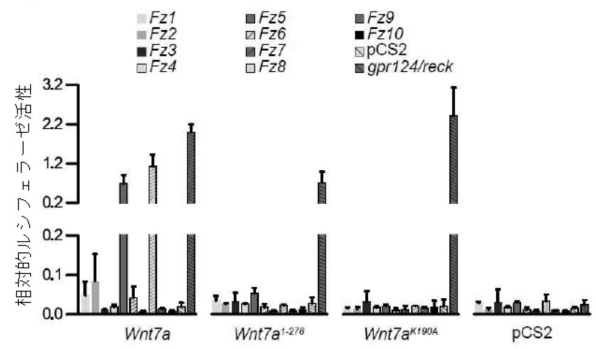
C

■ Gpr124/Reck/Fz1 相対的ルシフェラーゼ活性
 ■ Fz5 相対的ルシフェラーゼ活性



【図 7 D】

D



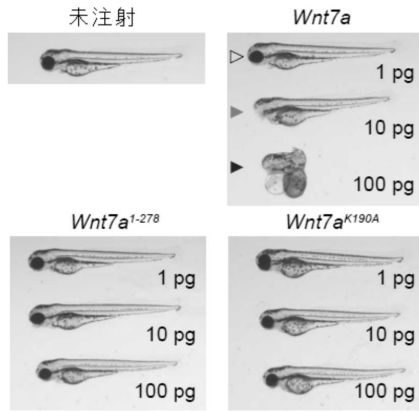
30

40

50

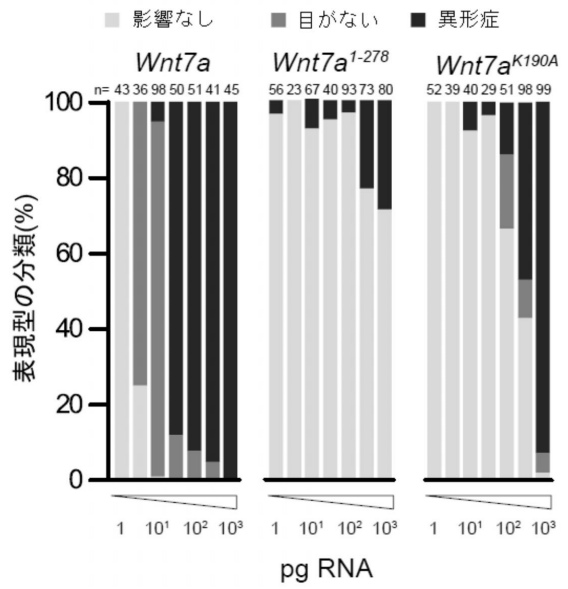
【図 7 E】

E



【図 7 F】

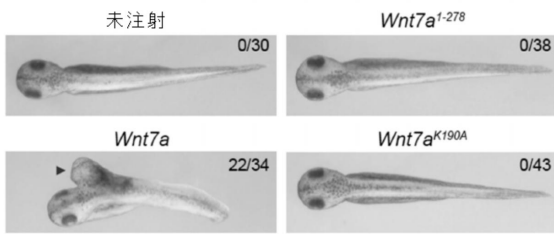
F



10

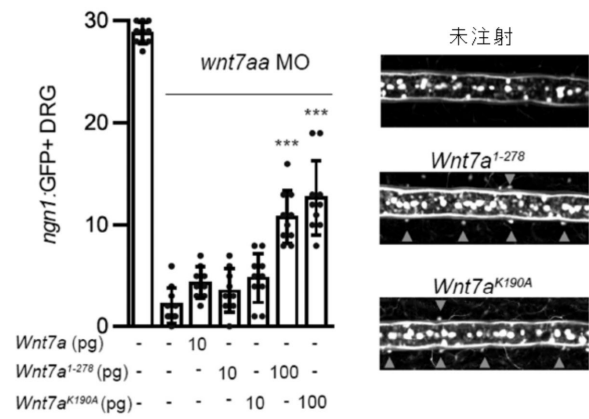
【図 7 G】

G



【図 7 H】

H



30

40

50

【 8 - 1 3 】

hWnt7a^{NTD-K159S}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRSJLEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (配列番号79)

hWnt7a^{K159S}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRSJLEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
 GSVGTQGRACNKTAQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCYVKNCNCSERTE
 MYTCK (配列番号117)

hWnt7a^{NTD-K159L}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRLJLEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (配列番号80)

hWnt7a^{K159L}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRLJLEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
 GSVGTQGRACNKTAQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCYVKNCNCSERTE
 MYTCK (配列番号118)

hWnt7a^{NTD-K200A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (配列番号81)

hWnt7a^{K200A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC
 EEDPVTGSVGTQGRACNKTAQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCYVKNCNCSERTE
 MYTCK (配列番号119)

【 8 - 1 4 】

hWnt7a^{NTD-R214A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (配列番号82)

hWnt7a^{R214A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
 GSVGTQGRACNKTAQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCYVKNCNCSERTE
 MYTCK (配列番号120)

hWnt7a^{NTD-P218A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC (配列番号83)

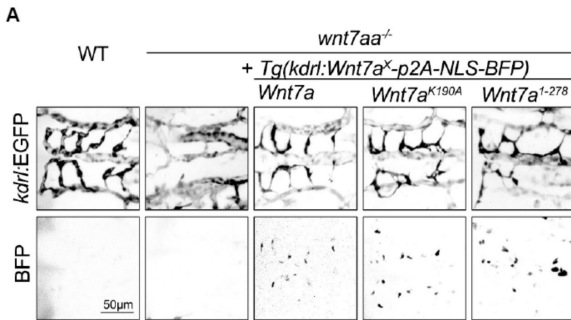
hWnt7a^{P218A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVT
 GSVGTQGRACNKTAQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCYVKNCNCSERTE
 MYTCK (配列番号121)

hWnt7a^{K218A}
 LGASII CNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNC SALGERTVFGKE
 LKVGSR EAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGGYHRDEGWKGGCSADIRY
 GIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQF
 RELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYC
 GSVGTQGRACNKTAQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCCKFHWCYVKNCNCSERTE
 MYTCK (配列番号84)

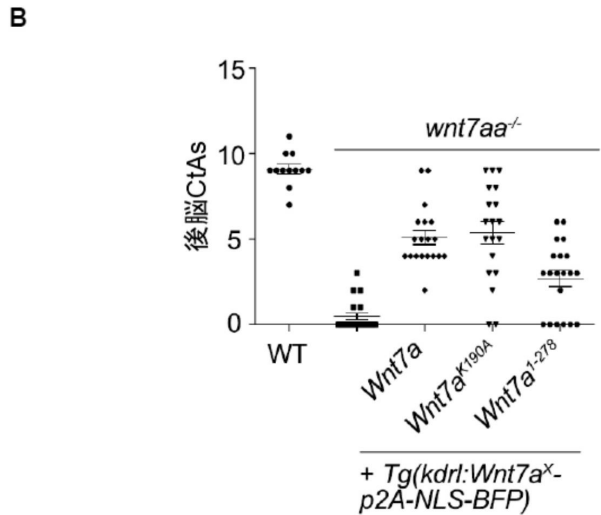
10

20

【 9 A 】



【 9 B 】



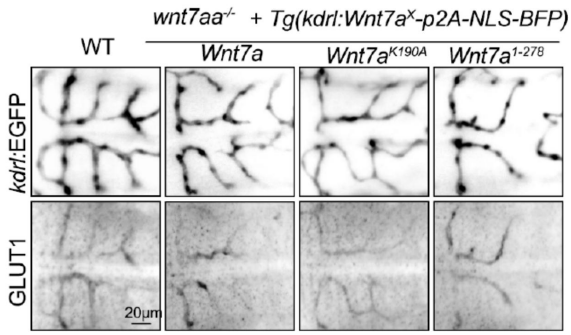
30

40

50

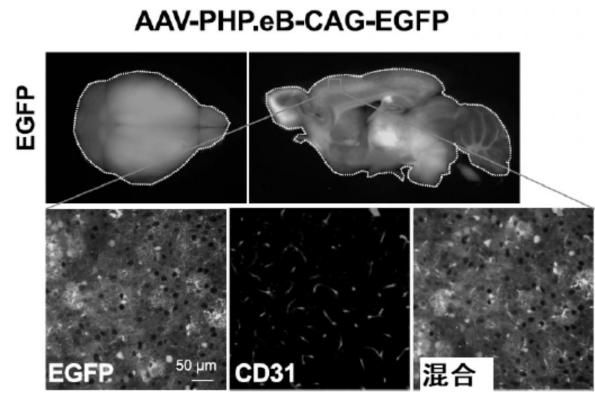
【 9 C 】

C



【 1 0 A 】

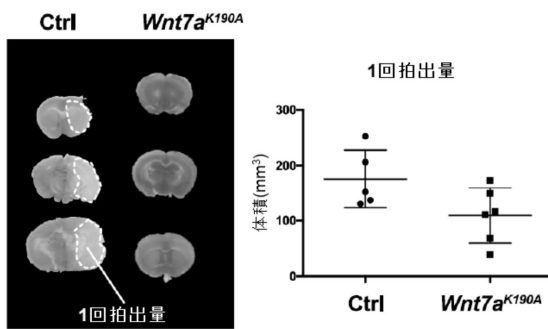
A



10

【 1 0 B 】

B



20

【 配列表 】

[0007390729000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/06 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/06</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>38/18 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>38/18</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 1 1</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/10 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/10</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/00</i>	

ベルギー 1 1 6 0 オーデルヘム、アヴニュ・イシドル・ジェスカン 1 6 番

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 Neuron, 2017年08月30日, Vol. 95, p. 1056-1073

eLIFE, 2015年06月08日, 4:e06489, p. 1-25

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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