

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7139326号

(P7139326)

(45)発行日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(24)登録日 令和4年9月9日(2022.9.9)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 K 38/16

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 47/65 (2017.01)

A 6 1 K 47/65

請求項の数 6 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-525818(P2019-525818)

(86)(22)出願日 平成29年11月9日(2017.11.9)

(65)公表番号 特表2019-535268(P2019-535268
A)

(43)公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/060970

(87)国際公開番号 WO2018/089715

(87)国際公開日 平成30年5月17日(2018.5.17)

審査請求日 令和2年11月6日(2020.11.6)

(31)優先権主張番号 62/531,943

(32)優先日 平成29年7月13日(2017.7.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/420,476

(32)優先日 平成28年11月10日(2016.11.10)

最終頁に続く

(73)特許権者 519165308

ケロス セラピューティクス インコーポ
レイテッドKEROS THERAPEUTICS
, INC.アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチュー
セッツ州 レキシントン ハイデン アベ
ニュー 9 9 スイート 1 2 0 (ビルデ
イング イー)

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アクチビン I I a 型受容体変異体および同変異体を含む医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨塩密度を増加させることを必要とする対象において骨塩密度を増加させるための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、治療有効量の、配列番号 6 9 の配列を有する細胞外アクチビン I I a 型受容体 (A c t R I I a) 変異体を含むポリペプチド、前記ポリペプチドをコードする核酸分子、または前記核酸分子を含むベクターを含む医薬組成物。

【請求項 2】

前記 A c t R I I a 変異体の C 末端に 1 以上のアミノ酸をさらに含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記 1 以上のアミノ酸が N P または N P V T P K である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記 A c t R I I a 変異体が配列番号 7 1 または配列番号 7 2 の配列を有する、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

リンカーを介して前記ポリペプチドの C 末端に融合された F c ドメイン単量体、野生型 F c ドメイン、アミノ酸置換を含む F c ドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミンをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記リンカーがアミノ酸スペーサーである、請求項5に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アクチビンIIa型受容体変異体およびそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

健康な骨は、骨の破壊と骨の成長の両方を含む絶え間ないリモデリングを受けている。骨の成長は骨芽細胞種により媒介され、一方、破骨細胞は骨を吸収する。これらのシステムは、同化プログラムのダウンレギュレーション、異化システムのアップレギュレーションまたは両者の組合せによってバランスを欠き正味の骨量減少がもたらされる際に病状が発生する。よって、骨のリモデリングのバランスの制御は、骨折および骨に対する他の損傷の治癒の促進ならびに骨量および骨石灰化の減少に関連する骨粗鬆症などの障害の治療に有用であり得る。

【0003】

骨の損傷は、加齢性または癌関連の骨量減少、遺伝子的条件、薬物治療の有害副作用、または骨折を含む一定の範囲の根本原因から起こり得る。世界保健機関は、骨粗鬆症だけで米国、欧州および日本で7千5百万人の罹患があり、骨折の重大なリスク因子であると推計している。一般に、骨量減少そのものは、有効な治療がほとんどない病的状態である。代わりに治療は、直接骨の成長を促進し、かつ骨密度を増す薬剤よりも、不動、運動および食事の改善に焦点を当てている。骨粗鬆症に関しては、エストロゲン、カルシトニン、ビタミンK併用のオステオカルシン、または高用量の食事性カルシウムは全て、治療的介入として使用されている。骨粗鬆症に対する他の治療アプローチとしては、ビスホスホネート、副甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP：parathyroid hormone related protein）カルシウム受容体作動薬、スタチン、同化ステロイド、ランタンおよびストロンチウム塩、ならびにフッ化ナトリウムが含まれる。しかしながら、このような治療薬には望まない副作用が伴うことが多い。骨損傷または骨脱灰をもたらす疾患の新規かつ有効な治療の必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、細胞外アクチビンIIa型受容体（ActRIIa：activin receptor type IIa）変異体を含むポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドとしては、Fcドメイン単量体または部分のN末端またはC末端に融合された細胞外ActRIIa変異体を含む。このような部分は、アミノ酸または他の共有結合によって結合されていてもよい。Fcドメイン単量体に融合された細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチドはまた、2つのFcドメイン単量体間の相互作用を介して二量体（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体）を形成し得る。本発明のポリペプチドは、骨損傷、例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（fracture）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動を含む疾患または病態を有する対象において骨量または骨塩密度を増加させるために使用することができる。さらに、本発明のポリペプチドはまた、骨損傷もしくは骨脱灰を含む疾患もしくは病態を発症するリスクがある対象、またはそのような疾患もしくは病態を有する対象においてミオスタチン、アクチビン、および／または骨形成因子9（BMP9）シグナル伝達に作用するために使用することもできる。

【0005】

一態様において、本発明は、

細胞外アクチビンIIa型受容体（ActRIIa）変異体を含み、前記変異体は、
GAILGRSETQECLX₁X₂NANWX₃X₄X₅X₆TNQTGVEX₇CX₈

G X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ H C X₁₅ A T W X₁₆ N I S G S I E I V X₁₇ X₁₈ G C X₁₉ X₂₀ X₂₁ D X₂₂ N C Y D R T D C V E X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ P X₂₇ V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S (配列番号1)

の配列を有し、

配列中、X₁はFまたはYであり；X₂はFまたはYであり；X₃はEまたはAであり；X₄はKまたはLであり；X₅はDまたはEであり；X₆はRまたはAであり；X₇はPまたはRであり；X₈はYまたはEであり；X₉はDまたはEであり；X₁₀はKまたはQであり；X₁₁はDまたはAであり；X₁₂はKまたはAであり；X₁₃はRまたはAであり；X₁₄はRまたはLであり；X₁₅はFまたはYであり；X₁₆はK、R、またはAであり；X₁₇はK、A、Y、F、またはIであり；X₁₈はQまたはKであり；X₁₉はWまたはAであり；X₂₀はLまたはAであり；X₂₁はD、K、R、A、F、G、M、N、またはIであり；X₂₂はI、F、またはAであり；X₂₃はKまたはTであり；X₂₄はKまたはEであり；X₂₅はDまたはEであり；X₂₆はSまたはNであり；かつ、X₂₇はEまたはQであり、かつ前記変異体は、配列番号73の配列を有する野生型細胞外A c t R I I aまたは配列番号76～96の配列のうちいずれか1つを有する細胞外A c t R I I aに対して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する、ポリペプチドに関する。

【0006】

いくつかの実施形態では、前記変異体は、

G A I L G R S E T Q E C L F X₂ N A N W X₃ X₄ X₅ X₆ T N Q T G V E X₇ C X₈ G X₉ K X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ H C X₁₅ A T W X₁₆ N I S G S I E I V X₁₇ X₁₈ G C X₁₉ X₂₀ X₂₁ D X₂₂ N C Y D R T D C V E X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ P X₂₇ V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S (配列番号2)

の配列を有し、配列中、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、およびX₂₇は上記のように定義される。

【0007】

いくつかの実施形態では、前記変異体は、

G A I L G R S E T Q E C L F X₂ N A N W E X₄ X₅ R T N Q T G V E X₇ C X₈ G X₉ K D K R X₁₄ H C X₁₅ A T W X₁₆ N I S G S I E I V K X₁₈ G C W L D D X₂₂ N C Y D R T D C V E X₂₃ X₂₄ X₂₅ X₂₆ P X₂₇ V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S (配列番号3)

の配列を有し、配列中、X₂、X₄、X₅、X₇、X₈、X₉、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₈、X₂₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、およびX₂₇は上記のように定義される。

【0008】

いくつかの実施形態では、前記変異体は、

G A I L G R S E T Q E C L F X₂ N A N W E X₄ D R T N Q T G V E X₇ C X₈ G X₉ K D K R X₁₄ H C X₁₅ A T W X₁₆ N I S G S I E I V K X₁₈ G C W L D D X₂₂ N C Y D R T D C V E X₂₃ K X₂₅ X₂₆ P X₂₇ V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S (配列番号4)

の配列を有し、配列中、X₂、X₄、X₇、X₈、X₉、X₁₄、X₁₅、X¹⁶、X₁₈、X₂₂、X₂₃、X₂₅、X₂₆、およびX₂₇は上記のように定義される。

【0009】

いくつかの実施形態では、前記変異体は、

G A I L G R S E T Q E C L F X₂ N A N W E X₄ D R T N Q T G V E P C X₈ G X₉ K D K R X₁₄ H C F A T W K N I S G S I E I V K X₁₈ G C W L D D I N C Y D R T D C V E X₂₃ K X₂₅ X₂₆ P X₂₇ V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S (配列番号5)

の配列を有し、配列中、X₂、X₄、X₈、X₉、X₁₄、X₁₈、X₂₃、X₂₅、X₂₆、およびX₂₇は上記のように定義される。

【0010】

10

20

30

40

50

上述の実施形態のいずれにおいても、 X_1 はFまたはYである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_2 はFまたはYである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_3 はEまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_4 はKまたはLである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_5 はDまたはEである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_6 はRまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_7 はPまたはRである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_8 はYまたはEである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_9 はDまたはEである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{10} はKまたはQである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{11} はDまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{12} はKまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{13} はRまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{14} はRまたはLである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{15} はFまたはYである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{16} はK、R、またはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{17} はK、A、Y、F、またはIである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{18} はQまたはKである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{19} はWまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{20} はLまたはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{21} はD、K、R、A、F、G、M、N、またはIである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{22} はI、F、またはAである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{23} はKまたはTである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{24} はKまたはEである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{25} はDまたはEである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{26} はSまたはNである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{27} はEまたはQである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{23} はTであり、 X_{24} はEであり、 X_{25} はEであり、かつ、 X_{26} はNであるか、または X_{23} はTであり、 X_{24} はKであり、 X_{25} はEであり、かつ、 X_{26} はNである。上述の実施形態のいずれにおいても、 X_{17} はKである。

【0011】

上述の実施形態のいずれにおいても、前記変異体は、配列番号6～72のうちいずれか1つの配列を有する。

上述の実施形態のいずれにおいても、位置 X_{24} のアミノ酸は、アミノ酸Kで置換可能である。

【0012】

上述の実施形態のいずれにおいても、位置 X_{24} のアミノ酸は、アミノ酸Eで置換可能である。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、1以上のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6個を超えるアミノ酸）のC末端伸長部をさらに含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、C末端伸長部は、アミノ酸配列NPである。いくつかの実施形態では、C末端伸長部は、アミノ酸配列NPVTPK（配列番号155）である。

【0013】

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、ポリペプチドのC末端に融合または共有結合された部分をさらに含み得る。この部分は、ポリペプチドの安定性を増すか、または薬物動態特性を改善することができる。いくつかの実施形態では、この部分は、Fcドメイン単量体、Fcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、または血清アルブミンである。

【0014】

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、リンカーを介してポリペプチドのC末端に融合されたFcドメイン単量体をさらに含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体に融合された本明細書に記載の細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチドは、2つのFcドメイン単量体間の相互作用を介して二量体（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体）を形成し得る。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体は、配列番号97の配列を有する。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、リンカーを介してポリペプチドのC末端に融合されたFcドメインをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、野生型Fcドメインである。いくつかの実施形態では、野生型Fcドメインは、配列番号151の配列を有する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、1以上のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、1以上のアミノ酸置換を含むFcドメインは、二量体を形成しない。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、リンカーを介してポリペプチドのC末端に融合されたアルブミン結合ペプチドをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、配列番号152の配列を有する。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、リンカーを介してポリペプチドのC末端に融合されたフィブロネクチンドメインをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンドメインペプチドは、配列番号153の配列を有する。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、リンカーを介してポリペプチドのC末端に融合されたヒト血清アルブミンをさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミンは、配列番号154の配列を有する。

いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸スペーサーである。いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、GGG、GGGA（配列番号98）、GGGG（配列番号100）、GGGAG（配列番号130）、GGGAGG（配列番号131）、またはGGGAGGG（配列番号132）である。

いくつかの実施形態では、アミノ酸スペーサーは、GGGS（配列番号99）、GGGGA（配列番号101）、GGGGS（配列番号102）、GGGGG（配列番号103）、GGAG（配列番号104）、GSGG（配列番号105）、AGGG（配列番号106）、SGGG（配列番号107）、GAGA（配列番号108）、GSGS（配列番号109）、GAGAGA（配列番号110）、GSGSGS（配列番号111）、GAGAGAGA（配列番号112）、GSGSGSGS（配列番号113）、GAGAGAGAGA（配列番号114）、GSGSGSGSGS（配列番号115）、GAGAGAGAGAGA（配列番号116）、およびGSGSGSGSGSGS（配列番号117）、GGAGGA（配列番号118）、GSGGGS（配列番号119）、GGAGGAGGA（配列番号120）、GSGGSGGS（配列番号121）、GGAGGAGGAGGA（配列番号122）、GSGGSGSGSGGS（配列番号123）、GGAGGAGGAG（配列番号124）、GSGGGS（配列番号125）、GGAGGAGGAGGAG（配列番号126）、およびGSGGGS（配列番号127）、GGGGAGGGGAGGGGA（配列番号128）、GGGGSGGGGSGGGGS（配列番号129）、AAAL（配列番号133）、AAAK（配列番号134）、AAAR（配列番号135）、EGKSSGSGSESKST（配列番号136）、GSAGSAGSGEF（配列番号137）、AEAAAKEAAAKA（配列番号138）、KESGSVSSEQLAQFRSLD（配列番号139）、GENLYFQSGG（配列番号140）、SACYCELS（配列番号141）、RSIAT（配列番号142）、RPACKIPNDLKQKVMNH（配列番号143）、GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGS（配列番号144）、AAANSSIDLISVPVDSR（配列番号145）、GSGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS（配列番号146）、EAAAK（配列番号147）、

または P A P A P（配列番号 1 4 8）である。

【0021】

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、少なくとも 7 日の血清半減期を有する。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、200 pM 以上の K_D でヒト骨形成因子 9（BMP 9）と結合する。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、アクチビンおよび／またはミオスタチンと結合し、ヒト BMP 9 との結合は低い（例えば、弱い）。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、ヒト BMP 9 とは実質的に結合しない。

【0022】

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、800 pM 以下の K_D でヒトアクチビン A と結合する。

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、およそ 800 pM 以下の K_D でヒトアクチビン B と結合する。

【0023】

上述の実施形態のいずれにおいても、本明細書に記載のポリペプチドは、およそ 5 pM 以上の K_D でヒト GDF-11 と結合する。

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体を含むポリペプチド）をコードする核酸分子に関する。別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載の核酸分子を含むベクターに関する。

【0024】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のポリペプチドを発現する宿主細胞に関し、その宿主細胞は、前記 2 つの態様に記載されている核酸分子またはベクターを含み、この核酸分子またはベクターは宿主細胞内で発現される。

【0025】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のポリペプチドを作製する方法に関し、その方法は、a) 本明細書に記載の核酸分子またはベクターを含む宿主細胞を提供すること、および b) 前記ポリペプチドの形成を可能とする条件下、宿主細胞内で前記核酸分子またはベクターを発現させること、を含む。

【0026】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、またはベクターと 1 以上の薬学上許容される担体または賦形剤とを含む医薬組成物に関する。前記医薬組成物のいくつかの実施形態では、ポリペプチド、核酸分子、またはベクターは治療上有効な量である。

【0027】

別の態様では、本発明はまた、Fc ドメイン単量体（例えば、配列番号 97 の配列）の N 末端または C 末端に融合された、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体をそれぞれ含む 2 つの同一のポリペプチドを含む構築物（例えば、ホモ二量体）に関する。これら 2 つのポリペプチド内の 2 つの Fc ドメイン単量体は相互作用して、構築物内に Fc ドメインを形成する。

【0028】

別の態様では、本発明はまた、Fc ドメイン単量体の N 末端または C 末端に融合された、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体をそれぞれ含む 2 つの異なるポリペプチドを含む構築物（例えば、ヘテロ二量体）に関する。これら 2 つのポリペプチド内の 2 つの Fc ドメイン単量体は相互作用して、構築物内に Fc ドメインを形成する。

【0029】

別の態様では、本発明は、必要とする対象において骨塩密度を増加させる方法に関する。その方法は、前記対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、

10

20

30

40

50

もしくはベクター、または本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む。

【0030】

別の態様では、本発明は、必要とする対象において骨吸収を低減する方法に関する。その方法は、前記対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む。

【0031】

別の態様では、本発明は、必要とする対象において骨形成を増加させる方法に関する。その方法は、前記対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む。

【0032】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、前記対象は、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する。

【0033】

別の態様では、本発明は、骨損傷を含む疾患または病態を有する対象において、ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用する（例えば、ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9のそれらの受容体への結合を低減または阻害する）方法に関し、その方法は、前記対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む。この態様のいくつかの実施形態では、その疾患または病態は、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少である。

【0034】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって原発性骨粗鬆症を有する対象を治療する方法に関する。

【0035】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって続発性骨粗鬆症を有する対象を治療する方法に関する。

【0036】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって骨減少症を有する対象を治療する方法に関する。

【0037】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって骨折を有する対象を治療する方法に関する。

【0038】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって骨癌または癌転移関連骨量減少を有する対象を治療する方法に関する。

【0039】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによってパジェット病を有する対象を治療する方法に関する。

【0040】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核

10

20

30

40

50

酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって腎性骨異栄養症を有する対象を治療する方法に関する。

【0041】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって治療関連骨量減少を有する対象を治療する方法に関する。

【0042】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって食事関連骨量減少を有する対象を治療する方法に関する。

10

【0043】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって肥満の治療に関連する骨量減少を有する対象を治療する方法に関する。

【0044】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって低重力関連骨量減少を有する対象を治療する方法に関する。

【0045】

別の態様では、本発明は、対象に治療上有効な量の本明細書に記載のポリペプチド、核酸分子、もしくはベクターまたは本明細書に記載の医薬組成物を投与することによって不動関連骨量減少を有する対象を治療する方法に関する。

20

【0046】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、原発性骨粗鬆症は加齢性骨粗鬆症である。

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、原発性骨粗鬆症はホルモン関連骨粗鬆症である。

【0047】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、続発性骨粗鬆症は不動誘発性骨粗鬆症である。

30

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、続発性骨粗鬆症はグルコルチコイド誘発性骨粗鬆症である。

【0048】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、癌は多発性骨髄腫である。

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、治療はFGF-21治療である。

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、治療はGLP-1治療である。

【0049】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、治療は癌治療である。

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、治療は、肥満および／または2型糖尿病のための治療である。

40

【0050】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、食事関連骨量減少はくる病である。

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象において骨形成を増加させる。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象において骨吸収を低減する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、骨芽細胞活性または骨芽細胞形成を増加させる。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、破骨細胞活性を低減するか、または破骨細胞形成を低減する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、アクチビンおよび／またはミオスタチンのそれらの受容体への結合を低減または阻害する。

【0051】

50

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象において血管合併症を引き起こさない（例えば、血管透過性または漏出を増加させない）。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象において骨塩密度を増加させる。

【0052】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、骨は皮質骨である。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、骨は骨梁である。

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、ポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物は、対象において骨密度を増加させる、骨吸収を低減する、骨吸収の速度を低減する、骨形成を増加させる、骨形成の速度を増す、破骨細胞活性を低減する、骨芽細胞活性を増加させる、またはミオスタチン、アクチビン、および／もしくはBMP9シグナル伝達に作用するために十分な量で投与される。

【0053】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号69の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号69の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部（C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK（配列番号155））を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号69の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0054】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号58の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号58の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部（C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK（配列番号155））を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号58の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転

10

20

30

40

50

移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0055】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号6の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号6の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部(C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK(配列番号155))を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号6の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(fracture)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(fracture)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0056】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号38の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号38の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部(C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK(配列番号155))を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号38の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、骨折(fracture)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、骨折(fracture)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0057】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号41の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号41の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部(C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、

10

20

30

40

50

またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK（配列番号155））を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号41の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

10

【0058】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号44の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号44の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部（C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK（配列番号155））を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号44の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象）においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

20

30

【0059】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号70の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号70の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部（C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸NPまたはNPVTPK（配列番号155））を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号70の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（*fracture*）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に

40

50

関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(f a c t u r e)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0060】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号71の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号71の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部(C末端に例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超える付加的アミノ酸、例えば、アミノ酸VTPK)を有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKEN、ならびに／またはC末端伸長部を有する配列番号71の配列を有する治療上有効な量の変異体、あるいは前記変異体を含有する医薬組成物を投与することによって、必要とする対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(f a c t u r e)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(f a c t u r e)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0061】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その変異体は、配列番号72の配列を有する。いくつかの実施形態では、配列番号72の配列を有する変異体は、位置X₁₇にアミノ酸K、ならびに／または位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKENを有する。上記態様のいずれかのいくつかの実施形態では、その方法は、対象に、任意選択にて位置X₁₇にアミノ酸K、ならびに／または位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列TEENもしくはTKENを有する配列番号72の配列を有する治療上有効な量の変異体を投与することによって、必要とする対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(f a c t u r e)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)において骨塩密度を増加させること、骨形成を増加させること、骨吸収を低減すること、または骨損傷を含む病態もしくは疾患を治療すること、あるいは対象(例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(f a c t u r e)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象)においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することを含む。

【0062】

定義

本明細書で使用する場合、用語「細胞外アクチビンIIa型受容体(A c t R I I a)変異体」は、野生型細胞外A c t R I I aに対して少なくとも1つのアミノ酸置換(例え

10

20

30

40

50

ば、下記に示す配列番号 75 の配列の太字部分) を有する 1 回膜貫通型受容体 A c t R I I a の可溶型細胞外部分または配列番号 76 ~ 96 の配列のうちいずれか 1 つを有する細胞外 A c t R I I a を含むペプチドを指す。野生型ヒト A c t R I I a 前駆体タンパク質の配列を下記に示し (配列番号 75)、シグナルペプチドを斜体で、細胞外部分を太字で示す。

野生型ヒト A c t R I I a 前駆体タンパク質 (配列番号 75) :

【0063】

【化1】

MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT
WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPT
SNPVTPKPPYYNILLSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPL
QLLEVKARGRFQCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRG
TSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHR
DIKSKNVLLKNNLTACIADFGALAKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRID
MYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPQSLQEDMQEVVHKKKRPVLRDYWQKH
AGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMTNVDFPPKESSL

10

20

細胞外 A c t R I I a 変異体は、配列番号 1 ~ 72 のうちいずれか 1 つの配列を有し得る。特定の実施形態では、細胞外 A c t R I I a 変異体は、配列番号 6 ~ 72 (表 2) のうちいずれか 1 つの配列を有する。いくつかの実施形態では、細胞外 A c t R I I a 変異体は、野生型細胞外 A c t R I I a の配列 (配列番号 73) と少なくとも 85 % (例えば、少なくとも 85 %、87 %、90 %、92 %、95 %、97 %、またはそれを超える) アミノ酸配列同一性を有し得る。

【0064】

本明細書で使用する場合、用語「細胞外 A c t R I I b 変異体」は、野生型細胞外 A c t R I I b (例えば、配列番号 74 の配列) に対して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有する 1 回膜貫通型受容体 A c t R I I b の可溶型細胞外部分を含むペプチドを指す。細胞外 A c t R I I b 変異体は、下記に示す配列番号 149 の配列を有し得る。

【0065】

細胞外 A c t R I I b 変異体 (配列番号 149) :

GRGEAETRECI FYNANWEKDRTNQSGLEPCYGDQDKRRHC
FASWKNSSGTIELVKQGCWLDDINCYDRQECVAKKDSPEV
YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

本明細書で使用する場合、用語「リンカー」は、2 つの要素、例えば、ペプチドまたはタンパク質ドメインの間の結合を指す。本明細書に記載のポリペプチドは、ある部分に融合された細胞外 A c t R I I a 変異体 (例えば、配列番号 1 ~ 72 (例えば、配列番号 6 ~ 72) のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体) を含み得る。この部分は、ポリペプチドの安定性を増すか、または薬物動態特性を改善することができる。この部分 (例えば、Fc ドメイン単量体、野生型 Fc ドメイン、アミノ酸置換 (例えば、二量体形成を低減する 1 以上の置換) を有する Fc ドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミン) は、リンカーを介してポリペプチドに融合されていてもよい。リンカーは、共有結合またはスペーサーであり得る。用語「結合」は、化学結合、例えば、アミド結合またはジスルフィド結合、または化学反応、例えば、化学共役から作り出されるいずれの種類の結合も指す。用語「スペーサー」は、2 つの要素の間に空間および / またはフレキシビリティを設けるために 2 つの要素、

30

40

50

例えば、ペプチドまたはタンパク質ドメインの間に存在する部分（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）ポリマー）またはアミノ酸配列（例えば、1～200アミノ酸の配列）を指す。アミノ酸スペーサーは、ポリペプチドの一次配列の一部である（例えば、ポリペプチド主鎖により空間が設けられたペプチドに融合されている）。例えば、Fcドメインを形成する2つのヒンジ領域の間のジスルフィド結合の形成は、リンカーと見なされない。

【0066】

本明細書で使用する場合、用語「Fcドメイン」は、2つのFcドメイン単量体の二量体を指す。Fcドメインは、少なくともCH2ドメインおよびCH3ドメインを含むヒトFcドメインと少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、97%、または100%の配列同一性）を有する。Fcドメイン単量体は、第2および第3の抗体定常ドメイン（CH2およびCH3）を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメイン単量体はまた、ヒンジドメインも含む。Fcドメインは、例えば可変ドメインまたは相補性決定領域（CDR）など、抗原認識領域として働き得る免疫グロブリンのいずれの部分も含まない。野生型Fcドメインでは、2つのFcドメイン単量体は、2つのCH3抗体定常ドメイン間の相互作用、ならびに2つの二量体形成Fcドメイン単量体のヒンジドメイン間で形成する1以上のジスルフィド結合によって二量体を形成する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、「デッドFcドメイン」の典型としてエフェクター機能を欠くように変異させてもよい。特定の実施形態では、Fcドメインの各Fcドメイン単量体は、FcドメインとFcγ受容体の間の相互作用または結合を低減するようにCH2抗体定常ドメイン内にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、Fcドメインの二量体形成を低減または阻害する1以上のアミノ酸置換を含む。Fcドメインは、IgG、IgE、IgM、IgA、またはIgDを含むいずれの免疫グロブリン抗体アイソタイプであってもよい。加えて、Fcドメインは、IgGサブタイプ（例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgG4）であってもよい。Fcドメインはまた、非天然Fcドメイン、例えば、組換えFcドメインであってもよい。

【0067】

本明細書で使用する場合、用語「アルブミン結合ペプチド」は、血清アルブミンに対して親和性を有し、血清アルブミンと結合する働きをするアミノ酸12～16個のアミノ酸配列を指す。アルブミン結合ペプチドは、例えば、ヒト、マウス、またはラットなど、起源の異なるものであってもよい。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、配列DICLPWGCLW（配列番号152）を有する。

【0068】

本明細書で使用する場合、用語「フィブロネクチンドメイン」は、例えば、インテグリンなどの膜貫通受容体タンパク質、ならびにコラーゲンおよびフィブリンなどの細胞外マトリックス成分と結合する、細胞外マトリックスの高分子量糖タンパク質、またはそのフラグメントを指す。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンドメインは、UniProt ID NO: P02751の配列のアミノ酸610～702を有するフィブロネクチンIII型ドメイン（配列番号153）である。他の実施形態では、フィブロネクチンドメインは、アドネクチンタンパク質である。

【0069】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト血清アルブミン」は、ヒト血漿中に存在するアルブミンタンパク質を指す。ヒト血清アルブミンは、血液中に最も豊富なタンパク質である。ヒト血清アルブミンは、血清タンパク質の約半分を占める。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミンは、UniProt ID NO: P02768（配列番号154）の配列を有する。

【0070】

本明細書で使用する場合、用語「融合された」は、化学共役、組換え手段、および化学結合、例えば、アミド結合を含む手段による、2以上の要素、成分、またはタンパク質ド

10

20

30

40

50

メイン、例えば、ペプチドまたはポリペプチドの組合せまたは結合を表すために使用される。例えば、化学共役、化学結合、ペプチドリinker、または他のいずれかの共有結合手段を介して2つの単一のペプチドを直列に融合して1つの連続するタンパク質構造、例えばポリペプチドを形成することができる。本明細書に記載のポリペプチドのいくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を、リンカーを介して、ある部分（例えば、F cドメイン単量体（例えば、配列番号97の配列）、野生型F cドメイン（例えば、配列番号151の配列）、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する1以上の置換）を有するF cドメイン、アルブミン結合ペプチド（例えば、配列番号152の配列）、フィブロネクチンドメイン（例えば、配列番号153の配列）、またはヒト血清アルブミン（例えば、配列番号154の配列））のN末端またはC末端に直列で融合させてよい。例えば、細胞外A c t R I I a変異体を、ペプチドリinkerを介して、ある部分（例えば、F cドメイン単量体、野生型F cドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する1以上の置換）を有するF cドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミン）に融合させるが、この場合、ペプチドリinkerのN末端を、化学結合、例えば、ペプチド結合を介して細胞外A c t R I I a変異体のC末端に融合させ、かつ、ペプチドリinkerのC末端を、化学結合、例えば、ペプチド結合を介して、その部分（例えば、F cドメイン単量体、野生型F cドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する1以上の置換）を有するF cドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミン）のN末端に融合させる。

【0071】

本明細書で使用する場合、用語「C末端伸長部（extension）」は、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～70（例えば、配列番号6～70）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含むポリペプチドのC末端への1以上のアミノ酸の付加を指す。C末端伸長部は、1以上のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、またはそれを超えるアミノ酸）であり得る。例示的なC末端伸長部は、アミノ酸配列NP（2個のアミノ酸C末端伸長部）およびアミノ酸配列NPVTPK（配列番号155）（6個のアミノ酸C末端伸長部）である。ポリペプチドの活性を混乱させないいずれのアミノ酸配列も使用可能である。配列番号71、すなわち、NPのC末端伸長部を有する配列番号69の配列、および配列番号72、すなわち、NPVTPKのC末端伸長部を有する配列番号69の配列は、本発明のポリペプチドがC末端伸長部を含むように改変され得る可能性のある方法のうち2つに相当する。

【0072】

本明細書で使用する場合、用語「同一性パーセント（％）（percent（％）identity）」は、配列をアラインし、最大同一性パーセントを得るために必要に応じてギャップを導入した後（すなわち、ギャップは、最適なアラインメントのために候補配列と参照配列の一方または両方に導入することができ、比較の目的で非相同配列を無視することができる）、参照配列、例えば、野生型細胞外A c t R I I a（例えば、配列番号73）のアミノ酸（または核酸）残基と同一である、候補配列、例えば、細胞外A c t R I I a変異体のアミノ酸（または核酸）残基のパーセンテージを指す。同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、BLAST、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公開コンピュータソフトウェアを使用するなど、当技術分野の技術の範囲内にある様々な方法で達成することができる。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大アラインメントを得るために必要なアルゴリズムを含め、アラインメントを評価するための適当なパラメータを決定することができる。いくつかの実施形態では、所与の参照配列に対する（to, with, or against）所与の候補配列のアミノ酸（または核酸）配列同一性パーセント（あるいは、これは所与の参照配列に対して特定のアミノ酸（または核酸）配列同一性パーセントを有するまたは含む所与の候補配列と表現することもできる）は次のように計算される：

100 × (A / B の分数)

式中、A は、候補配列と参照配列のアラインメントにおいて同スコアが与えられたアミノ酸（または核酸）残基の数であり、B は、参照配列のアミノ酸（または核酸）残基の総数である。いくつかの実施形態では、候補配列の長さが参照配列の長さとは等しくない場合、参照配列に対する候補配列のアミノ酸（または核酸）配列同一性パーセントは、候補配列に対する参照配列のアミノ酸（または核酸）配列同一性パーセントとは等しくない。

【0073】

特定の実施形態では、候補配列との比較のためにアラインされる参照配列は、候補配列が候補配列の全長または候補配列の連続するアミノ酸（または核酸）残基の選択された部分にわたって50%～100%の同一性を示すことを示し得る。比較目的でアラインされる候補配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または100%である。候補配列の位置が参照配列の対応する位置と同じアミノ酸（または核酸）残基で占められていれば、それらの分子はその位置において同一である。

【0074】

本明細書で使用する場合、用語「血清半減期」は、対象に治療タンパク質を投与するという文脈で、その対象においてそのタンパク質の血漿濃度が半分に減少するのに要する時間を指す。タンパク質は、再分布したり、または血流から排除されたり、または例えば、タンパク質分解によって分解されたりすることがある。本明細書に記載されるように、細胞外A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチドは、ヒトにおいて7日の血清半減期を示す。本明細書で使用する場合、用語「親和性」または「結合親和性」は、2分子間の結合相互作用の強度を指す。一般に、結合親和性は、分子とその結合相手、例えば、細胞外A c t R I I a 変異体とBMP9またはアクチビンAの間の非共有結合的相互作用の総和の強度を指す。そうではないことが示されない限り、結合親和性は、固有結合親和性を指し、これは結合対のメンバー間の1：1相互作用を表す。2分子間の結合親和性は、一般に、解離定数（ K_D ）または親和性定数（ K_A ）によって記載される。互いに低い結合親和性を有する2分子は、一般に、ゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があり、大きな K_D を示す。互いに高い親和性を有する2分子は、一般に、容易に結合し、結合をより長く維持する傾向があり、小さい K_D を示す。2つの相互作用分子の K_D は、例えば、表面プラズモン共鳴などの当技術分野で周知の方法および技術を用いて決定することができる。 K_D は、 k_{off} / k_{on} の比として計算される。

【0075】

本明細書で使用する場合、用語「骨塩密度（BMD：bone mineral density）」、「骨密度」および「骨量」は、骨組織の骨塩（例えば、カルシウム）の量の尺度を指す。BMDは、当業者に公知の十分に確立された臨床技術によって（例えば、単一1（single-1）または二重エネルギー光子またはX線吸収測定法によって）測定することができる。BMDの概念は、骨の体積当たりの無機塩の量に関するが、臨床上は、それは代用として、イメージング時の骨表面平方センチメートル当たりの光学密度に従って測定される。BMDの測定値は、臨床医学において骨粗鬆症および骨折リスクの間接的指標として使用されている。いくつかの実施形態では、BMD試験結果はTスコアとして示され、Tスコアは健康な30歳の成人の理想的またはピーク骨塩密度と比較した対象のBMDを表す。スコア0は、BMDが健康な若年成人の正常参照値に相当することを示す。測定された対象のBMDと健康な若年成人の参照値のBMDとの違いは、標準偏差単位（SD）で評価される。よって、+1SD～-1SDの間のTスコアは正常なBMDを示し、-1SD～-2.5SDの間のTスコアは低い骨量（例えば、骨減少症）を示し、-2.5SDより低いTスコアは骨粗鬆症または重度の骨粗鬆症を示し得る。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a 変異体）を含む本発明のポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、またはそのよう

10

20

30

40

50

な核酸分子を含有するベクターがそれを必要とする対象に投与され、ここで、患者は低い骨量（例えば、 $-1SD \sim -2.5SD$ の間のTスコア）を有する。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含む本発明のポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、またはそのような核酸分子を含有するベクターがそれを必要とする対象に投与され、患者は骨粗鬆症（例えば、 $-2.5SD$ 未満のTスコア）を有する。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含む本発明のポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、またはそのような核酸分子を含有するベクターの投与は、対象を、それらのBMDを増加させることによって治療する。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含む本発明のポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、またはそのような核酸分子を含有するベクターの投与は、対象のBMDを増加させて、対象のTスコアに増加をもたらす（例えば、対象のTスコアに0.1以上、0.2以上、0.3以上、0.4以上、0.5以上、1.0以上、または2.0以上の増加をもたらす）。

【0076】

本明細書で使用する場合、用語「骨リモデリング」または「骨代謝」は、古い骨の不連続部分を新たに合成されたタンパク質性マトリックスのパケットで置き換えることによって骨の強度およびイオンの恒常性を維持するプロセスを指す。骨は破骨細胞によって吸収され、骨化と呼ばれるプロセスで骨芽細胞によって埋められる。骨細胞活性は、このプロセスにおいて重要な役割を果たす。骨量の減少をもたらす状態は、吸収の増加または骨化の減少のいずれかによって起こり得る。健康な個体では、小児期に、骨形成が吸収を上回る。加齢が進むと、吸収が形成を上回る。また、閉経後の高齢女性でも閉経に関連するエストロゲン欠乏のために骨吸収速度の方が一般にはるかに高い。

【0077】

本明細書で使用する場合、用語「骨吸収」または「骨異化活性」は、破骨細胞が骨の組織を破壊し、無機塩を放出して、骨組織から血液への無機塩（例えば、カルシウム）の移行をもたらすプロセスを指す。骨吸収速度の上昇は、閉経後の女性における加齢を含め、加齢に関連する。高い骨吸収速度、または骨化速度を上回る骨吸収速度は、骨減少症および骨粗鬆症を含む骨塩密度の低下などの骨障害に関連する。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含む本発明のポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、またはそのような核酸分子を含有するベクターは、それを必要とする対象に、その対象における骨吸収（例えば、その対象における骨吸収速度）を低減するために投与される。

【0078】

本明細書で使用する場合、用語「骨形成（bone formation）」、「骨化」、「骨形成（osteogenesis）」、または「骨同化活性」は、骨芽細胞によって新たな骨組織を形成するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含む本発明のポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードする核酸、またはそのような核酸分子を含有するベクターは、それを必要とする対象に、骨形成を増加させる（例えば、その対象において骨形成（bone formation）を増すまたは骨形成（osteogenesis）の速度を増す）ために投与される。

【0079】

本明細書で使用する場合、「ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用する（affecting）」という句は、ミオスタチン、アクチビン、

10

20

30

40

50

および／またはBMP9のそれらの受容体、例えば、ActRIIa、ActRIIb、およびBMPRII（例えば、ActRIIa）への結合を変化させることを意味する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9のそれらの受容体、例えば、ActRIIa、ActRIIb、およびBMPRII（例えば、ActRIIa）への結合を低減または阻害する。本明細書に記載されるように、細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外ActRIIa変異体）を含む本発明のポリペプチドは、BMP9に対して弱い結合親和性（例えば、 K_D 200 pM以上）を有し得る。

【0080】

本明細書で使用する場合、用語「血管合併症」は、血管障害または血管に対するいずれかの損傷、例えば、血管壁に対する損傷を指す。血管壁に対する損傷は、血管透過性または漏出の増加を招き得る。用語「血管透過性または漏出」は、小分子、タンパク質、および細胞を血管に流入させ、血管から流出させる血管壁の能力を指す。血管透過性または漏出の増加は、血管壁に並ぶ内皮細胞間の間隙の増大（例えば、間隙の大きさおよび／もしくは数の増大）ならびに／または血管壁の薄化によって起こり得る。

【0081】

本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、単量体がアミノ酸残基であり、それらがアミド結合を介して相互に共有結合されている単一のポリマーを表す。ポリペプチドとは、天然型、組換え型、または合成生産されたいずれのアミノ酸配列も包含するものとする。

【0082】

本明細書で使用する場合、用語「ホモ二量体（homodimer）」は、2つの同一の高分子、例えば、タンパク質または核酸によって形成された分子構築物を指す。これら2つの同一の単量体は、共有結合または非共有結合によってホモ二量体を形成し得る。例えば、Fcドメインは、2つのFcドメイン単量体と同じ配列を含めば、2つのFcドメイン単量体のホモ二量体であり得る。別の例では、Fcドメイン単量体に融合された細胞外ActRIIa変異体を含む本明細書に記載のポリペプチドは、2つのFcドメイン単量体の相互作用を介してホモ二量体を形成することができ、これらのFcドメイン単量体はホモ二量体においてFcドメインを形成する。

【0083】

本明細書で使用する場合、用語「ヘテロ二量体（heterodimer）」は、2つの異なる高分子、例えば、タンパク質または核酸によって形成された分子構築物を指す。これら2つの単量体は、共有結合または非共有結合によってヘテロ二量体を形成し得る。例えば、Fcドメイン単量体に融合された細胞外ActRIIa変異体を含む本明細書に記載のポリペプチドは、異なるActRIIa変異体にそれぞれ融合された2つのFcドメイン単量体の相互作用を介してヘテロ二量体を形成することができ、これらのFcドメイン単量体はヘテロ二量体においてFcドメインを形成する。

【0084】

本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」は、必要な細胞成分、例えば、対応する核酸からタンパク質を発現させるために必要とされる細胞小器官を含む媒体を指す。核酸は一般に、当技術分野で公知の従来技術（形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、ダイレクトマイクロインジェクションなど）によって宿主細胞に導入することができる核酸ベクター内に含まれる。宿主細胞は、原核細胞、例えば、細菌細胞、または真核細胞、例えば、哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞またはHEK293細胞）であり得る。

【0085】

本明細書で使用する場合、用語「治療上有効な量」は、骨粗鬆症などの疾患、あるいは骨損傷、例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（fracture）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異常栄養症、治療

10

20

30

40

50

関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を含む病態（condition）を有する患者の治療において所望の治療効果を達成する上で有効な、本発明のポリペプチド、核酸、もしくはベクター、または本発明のポリペプチド、核酸、もしくはベクターを含有する医薬組成物の量を指す。用語「治療上有効な量」はまた、疾患、例えば、骨損傷を含む疾患または病態を有する患者の治療において所望の治療効果を達成する上で有効な、本発明のポリペプチド、核酸、もしくはベクター、または本発明のポリペプチド、核酸、もしくはベクターを含有する医薬組成物の量を指す。特に、ポリペプチド、核酸、またはベクターの治療上有効な量は、有害な副作用を回避する。

【0086】

本明細書で使用する場合、用語「医薬組成物」は、有効成分ならびにその有効成分を投与方法に適したものとできるように賦形剤および希釈剤を含む医薬または医薬製剤を指す。本発明の医薬組成物は、ポリペプチド、核酸、またはベクターと適合する薬学上許容される成分を含む。医薬組成物は経口投与用の錠剤もしくはカプセル剤形であっても、または静脈投与または皮下投与用の水性剤形であってもよい。

【0087】

本明細書で使用する場合、用語「薬学上許容される担体または賦形剤」は、医薬組成物中の賦形剤または希釈剤を指す。薬学上許容される担体は、その製剤の他の成分と適合し、かつ、レシipientに有害であってはならない。本発明では、薬学上許容される担体または賦形剤は、細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチド、そのポリペプチドをコードする核酸分子、またはそのような核酸分子を含有するベクターに十分な薬学的安定性を提供しなければならない。担体または賦形剤の性質は、投与様式によって異なる。例えば、静脈内投与には、水溶液担体が一般に使用され、経口投与には、固体担体が好ましい。

【0088】

本明細書で使用する場合、用語「治療するおよび／または予防する」とは、本発明の方法および組成物を用いた、疾患、例えば、骨疾患または病態（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（fracture）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異常栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少）の治療および／または予防を指す。一般に、骨疾患または病態の治療は、対象がその骨疾患または病態を発症し、かつ／またはその骨疾患または病態を有すると既に診断された後に行われる。骨疾患または病態の予防は、対象にその骨疾患または病態を発症するリスクがある場合に講じられる方法または手順を指す。この対象は、医師により適応となることが判断される徴候もしくは軽度の症状またはその骨疾患もしくは病態を発症するリスク因子を示し得るか、または家族歴もしくはその骨疾患もしくは病態を発症する遺伝的素因を有し得るが、その疾患をまだ発症していない。

【0089】

本明細書で使用する場合、用語「対象」は、哺乳動物、例えば、好ましくは、ヒトを指す。哺乳動物としては、限定されるものではないが、ヒトおよび飼育動物および農用動物、例えば、サル（例えば、カニクイザル）、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシなどが含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】図1は、細胞外ActRIIaおよびActRIIbの野生型配列ならびにActRIIa変異体のアミノ酸置換を示す配列アラインメントである。

【発明を実施するための形態】

【0091】

本発明は、細胞外アクチビンIIa型受容体（ActRIIa）変異体を含むポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、ある部分（例えば、Fcドメイン単量体、野生型Fcドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減す

10

20

30

40

50

る1以上の置換)を有するFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミン)に融合された細胞外ActRIIa変異体を含む。Fcドメイン単量体に融合された細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチドはまた、2つのFcドメイン単量体間の相互作用を介して二量体(例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体)を形成し得る。本明細書に記載のActRIIa変異体は、アクチビンおよびミオスタチンに比べて骨形成因子9(BMP9)に対して結合親和性が弱い、または結合親和性を全く持たない。本発明はまた、対象に本明細書に記載の細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチドを投与することによって、対象において骨塩密度もしくは骨形成を増加させること、またはミオスタチン、アクチビン、および／もしくはBMP9シグナル伝達に作用することにより、骨損傷を含む疾患および病態を治療する方法も含む。

【0092】

10

I. 細胞外アクチビンIIa型受容体(ActRIIa)変異体

アクチビンII型受容体は、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β : transforming growth factor β)スーパーファミリーのリガンドに対するシグナルを調節する1回膜貫通ドメイン受容体である。TGF- β スーパーファミリーのリガンドは、宿主において筋肉成長、血管成長、細胞分化、恒常性、および骨形成などの多くの生理学的プロセスに関与する。TGF- β スーパーファミリーのリガンドの例としては、例えば、アクチビン、インヒビン、成長分化因子(GDF: growth differentiation factor)(例えば、GDF8、ミオスタチンとしても知られる)、および骨形成因子(BMP)(例えば、BMP9)が挙げられる。アクチビンは、骨組織に豊富に発現し、骨芽細胞機能および破骨細胞機能の両方を制御することによって骨形成を調節する。アクチビンは、骨疾患ではアップレギュレーションを受け、骨芽細胞活性を阻害することが報告されている。ミオスタチンもまた、骨形成の増加および骨芽細胞活性の阻害を介した骨の恒常性に関連付けられている。これらのデータは、アクチビン受容体リガンド(例えば、アクチビンおよびミオスタチン)が骨吸収を促進し、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折(fracture)、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少などの骨損傷を含む疾患および病態をもたらすことを裏づけている。よって、このシグナル伝達を低減または阻害する方法は、骨損傷を含む疾患および病態の治療において使用可能である。

20

30

【0093】

2つのタイプのアクチビンII型受容体: ActRIIaおよびActRIIbが存在する。研究によれば、BMP9はActRIIaの約300倍の結合親和性でActRIIbと結合することが示されている(例えば、Townson他のJ. Biol. Chem. 287: 27313, 2012参照)。ActRIIaは、ActRIIbに比べて長い半減期を有することが知られている。本発明は、ActRIIaの有益な生理学的特性および薬物動態特性も維持しつつ、ActRIIbによって与えられる生理学的特性を付与するという目的でActRIIaにActRIIbのアミノ酸残基を導入することによって構築される細胞外ActRIIa変異体を記載する。最適なペプチドは、より長い血清半減期および例えば、BMP9に対して低い結合親和性を保持しつつ、骨塩密度の有意な増加を与える。好ましいActRIIa変異体はまた、野生型ActRIIaに比べてアクチビンおよび／またはミオスタチンに対する結合の改善を示し、これにより、それらはリガンド結合に関して内因性のアクチビン受容体と競合可能となり、内因性のアクチビン受容体シグナル伝達を低減または阻害することができる。これらの変異体は、アクチビン受容体シグナル伝達が上昇している障害、例えば、骨疾患を治療し、骨吸収または破骨細胞活性の低減、および骨形成、骨塩密度、または骨強度の増加をもたらすために使用することができる。いくつかの実施形態では、BMP9に対する変異体の結合親和性を低減または除去するために細胞外ActRIIa変異体にアミノ酸置換を導入することができる。ヒトActRIIaおよびActRIIbの細胞外部分の野生型アミノ酸配列を下

40

50

記に示す。

【0094】

ヒトA c t R I I a細胞外部分（配列番号73）：

G A I L G R S E T Q E C L F F N A N W E K D R T N Q T G V E P C Y G D K D K R R
H C F A T W K N I S G S I E I V K Q G C W L D D I N C Y D R T D C V E K K D S P
E V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S

ヒトA c t R I I b細胞外部分（配列番号74）：

G R G E A E T R E C I Y Y N A N W E L E R T N Q S G L E R C E G E Q D K R L H C
Y A S W R N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
Y F C C C E G N F C N E R F T H L P E A G G P E V T Y E P P P T A P T

本明細書に記載のポリペプチドは、配列番号73の配列を有する野生型細胞外A c t R I I aまたは配列番号76～96の配列のうちいずれか1つを有する細胞外A c t R I I aに対して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する細胞外A c t R I I a変異体を含む。27箇所の異なる位置の潜在的アミノ酸置換が細胞外A c t R I I a変異体に導入され得る（表1）。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体は、野生型細胞外A c t R I I a（配列番号73）の配列と少なくとも85%（例えば、少なくとも85%、87%、90%、92%、95%、97%、またはそれを超える）アミノ酸配列同一性を有し得る。細胞外A c t R I I a変異体は、野生型細胞外A c t R I I a（配列番号73）の配列に対して1以上（例えば、1～27、1～25、1～23、1～21、1～19、1～17、1～15、1～13、1～11、1～9、1～7、1～5、1～3、または1～2；例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、または27）のアミノ酸置換を有し得る。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1の配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）は、表1に挙げられているような27箇所の位置の全てにアミノ酸置換を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、細胞外A c t R I I a変異体は、表1に挙げられているような27箇所の位置のうち複数の位置、例えば、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、または26箇所にアミノ酸置換を含んでいてもよい。

【0095】

アミノ酸置換は、本発明のA c t R I I a変異体の活性および／または結合親和性を低下または向上させ得る。ポリペプチド機能を維持するためには、表1および2に示される配列（配列番号1～72（例えば、配列番号6～72））の位置X₁₇のリシン（K）が保持されることが重要である。その位置における置換は、活性の消失をもたらし得る。例えば、

G A I L G R S E T Q E C L F Y N A N W E L E R T N Q T G V E R C E G E K D K R L
H C Y A T W R N I S G S I E I V A K G C W L D D F N C Y D R T D C V E T E E N P
Q V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S（配列番号150）

の配列を有するA c t R I I a変異体はin vivoにおいて活性が低減され、X₁₇におけるリシン（K）のアラニン（A）での置換が許容されないことを示す。よって、表1および2の変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）を含む本発明のA c t R I I a変異体）は、位置X₁₇にアミノ酸Kを保持する。

【0096】

本発明のA c t R I I a変異体は好ましくは、BMP9に対する結合が低減されているか、弱い、または実質的に無い。位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列T E E Nを含むA c t R I I a変異体ならびに位置X₂₄にアミノ酸Kを維持し、かつ、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆にアミノ酸配列T K E Nを有する変異体では、BMP9結合が低減されている。配列T E E NおよびT K E Nは、本発明のA c t R I I a変異体（例えば、表1および2の変異体、例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72））では、BMP9結合の低減をもたらすために互換的に使用可能である。

【0097】

本発明の A c t R I I a 変異体は、C末端伸長部（例えば、C末端における付加的アミノ酸）をさらに含み得る。C末端伸長部には、表 1 および 2（例えば、配列番号 1 ～ 7 0（例えば、配列番号 6 ～ 7 0））に示される変異体のいずれかの C 末端に 1 以上の付加的アミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6 以上の付加的アミノ酸）を付加することができる。本発明の A c t R I I a 変異体に含まれ得る 1 つの可能性のある C 末端伸長部はアミノ酸配列 N P である。例えば、C 末端伸長部を含む配列は、配列番号 7 1（例えば、C 末端伸長部 N P を有する配列番号 6 9）である。本発明の A c t R I I a 変異体に含まれ得るもう 1 つの例としての C 末端伸長部はアミノ酸配列 N P V T P K（配列番号 1 5 5）である。例えば、C 末端伸長部を含む配列は、配列番号 7 2（例えば、C 末端伸長部 N P V T P K を有する配列番号 6 9）である。

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 配列番号 1～5 のいずれか 1 つの配列を有する細胞外 ActRIIa 変異体
におけるアミノ酸置換

GAILGRSETQECLX ₁ X ₂ NANWX ₃ X ₄ X ₅ TNQTGVEX ₇ CX ₈ GX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ HGX ₁₅ ATWX ₁₆ NISGSIEIV X ₁₇ X ₁₈ GXCX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ DX ₂₂ NCYDRDTCVEX ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ PX ₂₇ VYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS (配 列番号 1)			
GAILGRSETQECLFX ₂ NANWX ₃ X ₄ X ₅ TNQTGVEX ₇ CX ₈ GX ₉ KX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ HGX ₁₅ ATWX ₁₆ NISGSIEIVX ₁₇ X ₁ 8GXCX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ DX ₂₂ NCYDRDTCVEX ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ PX ₂₇ VYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS (配列番号 2)			
GAILGRSETQECLFX ₂ NANWEX ₄ X ₅ RTNQTGVEX ₇ CX ₈ GX ₉ KDKRX ₁₄ HGX ₁₅ ATWX ₁₆ NISGSIEIVKX ₁₈ GCWL DDX ₂₂ NCYDRDTCVEX ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ PX ₂₇ VYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS (配列番号 3)			
GAILGRSETQECLFX ₂ NANWEX ₄ DRTNQTGVEX ₇ CX ₈ GX ₉ KDKRX ₁₄ HGX ₁₅ ATWX ₁₆ NISGSIEIVKX ₁₈ GCWL DDX ₂₂ NCYDRDTCVEX ₂₃ KX ₂₅ X ₂₆ PX ₂₇ VYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS (配列番号 4)			
GAILGRSETQECLFX ₂ NANWEX ₄ DRTNQTGVEPCX ₈ GX ₉ KDKRX ₁₄ HCFATWKNISGSIEIVKX ₁₈ GCWLDDI NCYDRDTCVEX ₂₃ KX ₂₅ X ₂₆ PX ₂₇ VYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS (配列番号 5)			
X ₁	F または Y	X ₁₅	F または Y
X ₂	F または Y	X ₁₆	K, R, または A
X ₃	E または A	X ₁₇	K, A, Y, F, または I
X ₄	K または L	X ₁₈	Q または K
X ₅	D または E	X ₁₉	W または A
X ₆	R または A	X ₂₀	L または A
X ₇	P または R	X ₂₁	D, K, R, A, F, G, M, N, または I
X ₈	Y または E	X ₂₂	I, F, または A
X ₉	D または E	X ₂₃	K または T
X ₁₀	K または Q	X ₂₄	K または E
X ₁₁	D または A	X ₂₅	D または E
X ₁₂	K または A	X ₂₆	S または N
X ₁₃	R または A	X ₂₇	E または Q
X ₁₄	R または L		

配列番号 2 の配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体のいくつかの実施形態では、X₃ は E であり、X₆ は R であり、X₁₁ は D であり、X₁₂ は K であり、X₁₃ は R であり、X₁₆ は K または R であり、X₁₇ は K であり、X₁₉ は W であり、X₂₀ は L であり、X₂₁ は D であり、かつ、X₂₂ は I または F である。配列番号 1 または 2 の配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体のいくつかの実施形態では、X₁₇ は K である。配列番号 1～3 の配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体のいくつかの実施形態では、X₁₇ は K であり、X₂₃ は T であり、X₂₄ は E であり、X₂₅ は E であり、かつ、X₂₆ は N である。配列番号 1～5 のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体のいくつかの実施形態では、X₁₇ は K であり、X₂₃ は T であり、X₂₄ は K であり、X₂₅

は E であり、かつ、X₂₆ は N である。

【0099】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、配列番号 6～72（表 2）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 ActRIIa 変異体を含む。

【0100】

【表 2】

表 2. 配列番号 6～72 の配列を有する細胞外 ActRIIa 変異体

配列番号	アミノ酸配列
6	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
7	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
8	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
9	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
10	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
11	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNICYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
12	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
13	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
14	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
15	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
16	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNICYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
17	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
18	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
19	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
20	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNICYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
21	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS

10

20

30

40

50

配列番号	アミノ酸配列
22	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
23	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
24	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
25	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
26	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
27	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
28	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
29	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
30	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
31	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
32	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
33	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
34	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
35	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
36	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
37	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVETEENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS
38	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCWLDDINCYDRTDCVETKENPQVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTS

10

20

30

40

50

配列番号	アミノ酸配列
39	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
40	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
41	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
42	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
43	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
44	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
45	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
46	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
47	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
48	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
49	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
50	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
51	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
52	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
53	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
54	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRDTCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS
55	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRDTCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTPTS

10

20

30

40

50

配列番号	アミノ酸配列
56	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
57	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
58	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
59	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
60	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
61	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
62	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
63	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETKENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
64	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDINCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
65	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWKNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
66	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCFATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
67	GAILGRSETQECLFYNNANWELDRNTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
68	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVEPCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
69	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
70	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEQDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
71	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSN P
72	GAILGRSETQECLFYNNANWELERTNQTGVERCEGEKDKRLHCYATWRNISGSIEIV KKGCVLDDFNCYDRTDCVETEENPQVVFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSN PVTPK

いくつかの実施形態では、細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1 ～ 7 2（例えば、配列番号 6 ～ 7 2）のうちいずれか 1 つ）を含む本発明のポリペプチドは、位置 X₁₇ にアミノ酸 K を有する。位置 X₁₇ のアミノ酸を変更すると、活性の低減がもたらされる。例えば、

G A I L G R S E T Q E C L F Y N N A N W E L E R T N Q T G V E R C E G E K D K R L
H C Y A T W R N I S G S I E I V A K G C W L D D F N C Y D R T D C V E T E E N P
Q V Y F C C C E G N M C N E K F S Y F P E M E V T Q P T S（配列番号 150）

の配列を有する A c t R I I a 変異体は、i n v i v o において活性が低減され、X₁₇ における K の A での置換が許容されないことを示す。

【0101】

いくつかの実施形態では、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆に配列TEENを有する細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つ）を含む本発明のポリペプチドは、位置X₂₄にアミノ酸Eのアミノ酸Kでの置換を有し得る。いくつかの実施形態では、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆に配列TKENを有する細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つ）を含む本発明のポリペプチドは、位置X₂₄にアミノ酸Kのアミノ酸Eでの置換を有し得る。位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆に配列TEENまたはTKENを有するポリペプチドは、BMP9に対する結合が低減されているか、または弱い。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～70（例えば、配列番号6～70）のうちいずれか1つ）を含む本発明のポリペプチドは、C末端伸長部（例えば、C末端における付加的アミノ酸）をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、C末端伸長部は、アミノ酸配列NPである。例えば、C末端伸長部を含む配列は、配列番号71（例えば、C末端伸長部NPを有する配列番号69）である。いくつかの実施形態では、C末端伸長部は、アミノ酸配列NPVTPK（配列番号155）である。例えば、C末端伸長部を含む配列は、配列番号72（例えば、C末端伸長部NPVTPKを有する配列番号69）である。C末端伸長部には、C末端に1以上の付加的アミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6以上の付加的アミノ酸）を付加することができる。

20

【0103】

いくつかの実施形態では、細胞外ActRIIa変異体を含む本発明のポリペプチドは、ある部分（例えば、Fcドメイン単量体、野生型Fcドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する1以上の置換）を有するFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミン）をさらに含んでもよく、この部分はリンカーを介して細胞外ActRIIa変異体のN末端またはC末端（例えば、C末端）に融合させることができる。いくつかの実施形態では、この部分は、ポリペプチドの安定性を増すか、または薬物動態特性を改善する。Fcドメイン単量体に融合された細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチドは、2つのFcドメイン単量体間の相互作用を介して二量体（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体）を形成することができ、これらのFcドメイン単量体は合わさって二量体においてFcドメインを形成する。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外ActRIIa変異体は、以下の表3に示される配列番号76～96のうちいずれの配列も持たない。

【0105】

40

50

【表 3】

表 3. 除外される細胞外 ActRIIa 変異体.

配列番号	アミノ酸配列
76	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWANISGSIEIV KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
77	GAILGRSETQECLFFNANWAKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
78	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
79	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKAKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
80	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKARRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
81	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKARRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
82	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV AQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
83	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV YQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
84	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV FQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
85	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV QGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
86	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCALDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
87	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWADDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
88	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLKDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
89	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLRDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
90	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLADINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
91	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLFDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS

10

20

30

40

50

配列番号	アミノ酸配列
92	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLGDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
93	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLMDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
94	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLNDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
95	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLIDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS
96	GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIV KQGCWLDDANCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS

10

20

さらに、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、ヒトにおいて少なくとも7日の血清半減期を有する。ポリペプチドは、200 pM以上の K_D で骨形成因子9（BMP9）と結合し得る。このポリペプチドは、10 pM以上の K_D でアクチビンAと結合し得る。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、BMP9またはアクチビンAと結合しない。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、アクチビンおよび／またはミオスタチンと結合し、かつ、BMP9に低い（例えば、弱い）結合を示す。いくつかの実施形態では、BMP9に対する結合が低いまたは弱いポリペプチドは、位置X₂₃、X₂₄、X₂₅、およびX₂₆に配列TEENまたはTKENを有する。

【0106】

30

加えて、いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、約200 pM以上の K_D （例えば、約200、300、400、500、600、700、800、または900 pM以上の K_D 、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または50 nM以上の K_D 、例えば、約200 pM～約50 nMの間の K_D ）でヒトBMP9と結合し得る。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、ヒトBMP9と実質的に結合しない。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、約800 pM以下の K_D （例えば、約800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1 pM以下の K_D 、例えば、約800 pM～約200 pMの間の K_D ）でヒトアクチビンAと結合し得る。いくつかの実施形態では、このポリペプチドは、800 pM以下の K_D （例えば、約800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1 pM以下の K_D 、例えば、約800 pM～約200 pMの間の K_D ）でヒトアクチビンBと結合し得る。このポリペプチドは、およそ5 pM以上の K_D （例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、または200 pM以上の K_D ）で成長および分化因子11（GDF-11）とも結合し得る。

40

【0107】

50

II. Fcドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、ポリペプチドの血清半減期を延長するために、免疫グロブリンのFcドメイン単量体またはFcドメインのフラグメントに融合された細胞外A c t R I I a変異体を含み得る。Fcドメイン単量体に融合された細胞外A c t R I I a変異体を含むポリペプチドは、2つのFcドメイン単量体間の相互作用を介して二量体（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体）を形成することができ、これらのFcドメイン単量体は二量体においてFcドメインを形成する。従来から当技術分野で知られているように、Fcドメインは、免疫グロブリンのC末端に見られるタンパク質構造である。Fcドメインは、C_H3抗体定常ドメイン間の相互作用によって二量体を形成する2つのFcドメイン単量体を含む。野生型Fcドメインは、Fc受容体、例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcγRIVに結合する最小構造を形成する。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、「デッド（dead）」Fcドメインに典型的に、エフェクター機能を欠くように変異させることができる。例えば、Fcドメインは、FcドメインとFcγ受容体の間の相互作用を最小にすることが知られている特定のアミノ酸置換を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、FcドメインはIgG1抗体に由来し、アミノ酸置換L234A、L235A、およびG237Aを含む。いくつかの実施形態では、FcドメインはIgG1抗体に由来し、アミノ酸置換D265A、K322A、およびN434Aを含む。上記のアミノ酸位置は、Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) に従って定義される。アミノ酸残基のKabatのナンバリングは、所与の抗体に関して、抗体配列の相同性領域を「標準」Kabatナンバリング配列とアラインすることによって決定することができる。さらに、いくつかの実施形態では、Fcドメインは、いずれの免疫系関連応答も誘導しない。例えば、Fcドメイン単量体に融合された細胞外A c t R I I a変異体を含むポリペプチドの二量体におけるFcドメインは、FcドメインとFcγ受容体の間の相互作用または結合を低減するように改変されてもよい。細胞外A c t R I I a変異体に融合させることができるFcドメイン単量体の配列を下記に示す（配列番号97）：

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

いくつかの実施形態では、FcドメインはIgG1抗体に由来し、配列番号97の配列に対してアミノ酸置換L12A、L13A、およびG15Aを含む。いくつかの実施形態では、FcドメインはIgG1抗体に由来し、配列番号97の配列に対してアミノ酸置換D43A、K100A、およびN212Aを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）は、従来の遺伝学的または化学的手段、例えば、化学共役によってFcドメイン単量体（例えば、配列番号97）のN末端またはC末端に融合させることができる。任意選択にて、細胞外A c t R I I a変異体とFcドメイン単量体の間にリンカー（例えば、スペーサー）を挿入することができる。Fcドメイン単量体は、細胞外A c t R I I a変異体のN末端またはC末端（例えば、C末端）に融合させることができる。

【0108】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、Fcドメインに融合された細胞外A c t R I I a変異体を含み得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、Fcドメインの二量体形成を低減または阻害する1以上のアミノ酸置換を含む。いくつか

の実施形態では、Fcドメインは、ヒンジドメインを含む。Fcドメインは、免疫グロブリン抗体アイソタイプIgG、IgE、IgM、IgA、またはIgDのものであり得る。加えて、Fcドメインは、IgGサブタイプ（例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgG4）であり得る。Fcドメインはまた、非天然Fcドメイン、例えば、組換えFcドメインであってもよい。

【0109】

二量体形成が低減されたFcドメインを作出する方法は当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、立体衝突のために二量体形成を障害するように、 C_H3-C_H3 二量体界面に大きな側鎖を有する1以上のアミノ酸（例えば、チロシンまたはトリプトファン）を導入してもよい。他の実施形態では、有利な相互作用を除くために、 C_H3-C_H3 二量体界面に小さい側鎖を有する1以上のアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、またはトレオニン）を導入してもよい。 C_H3 ドメインに大きなまたは小さな側鎖を有するアミノ酸を導入する方法は、例えば、Ying他（J Biol Chem. 287:19399-19408, 2012）、米国特許出願公開第2006/0074225号明細書、米国特許第8,216,805号明細書および米国特許第5,731,168号明細書、Ridgway他（Protein Eng. 9:617-612, 1996）、Atwell他（J Mol Biol. 270:26-35, 1997）、およびMerchant他（Nat Biotechnol. 16:677-681, 1998）に記載されており、これらは全て、それらの全内容を本明細書の一部として援用する。

【0110】

さらに他の実施形態では、2つのFcドメイン間で C_H3-C_H3 界面を構成する C_H3 ドメインの1以上のアミノ酸残基を、正電荷を有するアミノ酸残基（例えば、リシン、アルギニン、もしくはヒスチジン）または負電荷を有するアミノ酸残基（例えば、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸）で置換し、その相互作用が、導入された特定の電荷のアミノ酸によって静電的に不利となるようにする。二量体形成に不利となるように、または二量体形成を妨げるように C_H3 ドメインに電荷アミノ酸を導入する方法は、例えば、Ying他（J Biol Chem. 287:19399-19408, 2012）、米国特許出願公開第2006/0074225号明細書、米国特許出願公開第2012/0244578号明細書、および米国特許出願公開第2014/0024111号明細書に記載されており、これらは全て、それらの全内容を本明細書の一部として援用する。

【0111】

本発明のいくつかの実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1の配列に対し以下のアミノ酸置換：T366W、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L352K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T、およびK409Iの1以上を含む。特定の一実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG1の配列に対してアミノ酸置換T366Wを含む。野生型Fcドメインの配列を配列番号151に示す。

【0112】

III. アルブミン結合ペプチド

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、血清タンパク質結合ペプチドに融合された細胞外ActRIIa変異体を含み得る。血清タンパク質ペプチドとの結合は、タンパク質薬の薬物動態を改善することができる。

【0113】

一例として、本明細書に記載の方法および組成物において使用可能なアルブミン結合ペプチドは一般に当技術分野で公知である。一実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、

配列 D I C L P R W G C L W (配列番号 1 5 2) を含む。

【0114】

本発明では、細胞外 A c t R I I a 変異体の血清半減期を延長するために、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体 (例えば、配列番号 1 ~ 7 2 (例えば、配列番号 6 ~ 7 2) のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体) の N 末端または C 末端 (例えば、C 末端) にアルブミン結合ペプチドを連結することができる。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ペプチドは、細胞外 A c t R I I a 変異体の N 末端または C 末端に直接またはリンカーを介して連結する。

【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体 (例えば、配列番号 1 ~ 7 2 (例えば、配列番号 6 ~ 7 2) のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体) は、従来の遺伝学的または化学的手段、例えば、化学共役によってアルブミン結合ペプチド (例えば、配列番号 1 5 2) の N 末端または C 末端に融合させることができる。所望により、細胞外 A c t R I I a 変異体とアルブミン結合ペプチドの間にリンカー (例えば、スパーサー) を挿入することができる。理論に縛られるものではないが、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体にアルブミン結合ペプチドが含まれると、その血清アルブミンへの結合を介して治療タンパク質の保持の延長がもたらされ得ると思われる。

【0116】

I V . フィブロネクチンドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、フィブロネクチンドメインに融合された細胞外 A c t R I I a 変異体を含み得る。フィブロネクチンドメインとの結合は、タンパク質薬の薬物動態を改善することができる。

【0117】

フィブロネクチンドメインは、例えば、インテグリンなどの膜貫通受容体タンパク質、ならびにコラーゲンおよびフィブリンなどの細胞外マトリックス成分と結合する細胞外マトリックスの高分子量糖タンパク質、またはそのフラグメントである。本発明のいくつかの実施形態では、細胞外 A c t R I I a 変異体の血清半減期を延長するために、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体 (例えば、配列番号 1 ~ 7 2 (例えば、配列番号 6 ~ 7 2) のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体) の N 末端または C 末端 (例えば、C 末端) にフィブロネクチンドメインが連結される。フィブロネクチンドメインは、細胞外 A c t R I I a 変異体の N 末端または C 末端に直接またはリンカーを介して連結することができる。

【0118】

一例として、本明細書に記載の方法および組成物において使用可能なフィブロネクチンドメインは一般に当技術分野で公知である。一実施形態では、フィブロネクチンドメインは、UniProt ID NO: P02751 の配列のアミノ酸 610 ~ 702 を有するフィブロネクチン I I I 型ドメイン (配列番号 1 5 3) である。別の実施形態では、フィブロネクチンドメインは、アドネクチンタンパク質である。

【0119】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体 (例えば、配列番号 1 ~ 7 2 (例えば、配列番号 6 ~ 7 2) のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体) は、従来の遺伝学的または化学的手段、例えば、化学共役によってフィブロネクチンドメイン (例えば、配列番号 1 5 3) の N 末端または C 末端に融合させることができる。所望により、細胞外 A c t R I I a 変異体とフィブロネクチンドメインの間にリンカー (例えば、スパーサー) を挿入することができる。理論に縛られるものではないが、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体にフィブロネクチンドメインが含まれると、そのインテグリンならびにコラーゲンおよびフィブリンなどの細胞外マトリックス成分への結合を介して治療タンパク質の保持の延長がもたらされ得ると思われる。

【0120】

V. 血清アルブミン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、血清アルブミンに融合された細胞外 A c t R I I a 変異体を含み得る。血清アルブミンとの結合は、タンパク質薬の薬物動態を改善することができる。

【0121】

血清アルブミンは、哺乳動物において最も豊富な血液タンパク質である球状のタンパク質である。血清アルブミンは、肝臓で生産され、血清タンパク質の約半分を占める。血清アルブミンは血液中では単量体で可溶型である。血清アルブミンの最も重要ないくつかの機能として、体内におけるホルモン、脂肪酸、およびその他のタンパク質の輸送、pH の緩衝、ならびに血管と身体組織の間の体液の適正な分布に必要とされる浸透圧の維持が挙げられる。好ましい実施形態では、血清アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。本発明のいくつかの実施形態では、細胞外 A c t R I I a 変異体の血清半減期を延長するために、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）の N 末端または C 末端（例えば、C 末端）にヒト血清アルブミンが連結される。ヒト血清アルブミンは、細胞外 A c t R I I a 変異体の N 末端または C 末端に直接またはリンカーを介して連結することができる。

【0122】

一例として、本明細書に記載の方法および組成物において使用可能な血清アルブミンは一般に当技術分野で公知である。一実施形態では、血清アルブミンは、UniProt ID NO: P02768（配列番号 154）の配列を含む。

【0123】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）は、従来の遺伝学的または化学的手段、例えば、化学共役によってヒト血清アルブミン（例えば、配列番号 154）の N 末端または C 末端に融合させることができる。所望により、細胞外 A c t R I I a 変異体と血清アルブミンの間にリンカー（例えば、スペーサー）を挿入することができる。理論に縛られるものではないが、本明細書に記載の細胞外 A c t R I I a 変異体に血清アルブミンが含まれると、治療タンパク質の保持の延長がもたらされ得ると思われる。

【0124】

VI. リンカー

本明細書に記載のポリペプチドは、リンカーを介してある部分に融合された細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含み得る。いくつかの実施形態では、その部分は、ポリペプチドの安定性を高める。例としての部分には、Fc ドメイン単量体、野生型 Fc ドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する 1 以上の置換）を有する Fc ドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、またはヒト血清アルブミンが含まれる。本発明では、ある部分（例えば、Fc ドメイン単量体（例えば、配列番号 97 の配列）、野生型 Fc ドメイン（例えば、配列番号 151）、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する 1 以上の置換）を有する Fc ドメイン、アルブミン結合ペプチド（例えば、配列番号 152）、フィブロネクチンドメイン（例えば、配列番号 153）、またはヒト血清アルブミン（例えば、配列番号 154））と細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）の間のリンカーは、1～200 個のアミノ酸を含むアミノ酸スペーサーであり得る。好適なペプチドスペーサーは当技術分野で公知であり、例えば、グリシン、アラニン、およびセリンなどのフレキシブルなアミノ酸残基を含むペプチドリンカーを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、G A、G S、G G、G G A、G G S、G G G、G G G A（配列番号 98）、G G G S（配列番号 99）、G G G G（配列番号 100）、G G G G A（配列番号 101）、G G G G S

20

30

40

50

使用するペプチドスペーサーおよびアミノ酸の長さは、関与する2つのタンパク質および最終的なタンパク質融合ポリペプチドに求められるフレキシビリティの程度によって調節することができる。スペーサーの長さは、適正なタンパク質折り畳みを確保し、凝集の形成を避けるように調節することができる。

【0127】

V I I . ベクター、宿主細胞、およびタンパク質生産

本発明のポリペプチドは、宿主細胞から生産することができる。宿主細胞とは、必要な細胞成分、例えば、対応する核酸から本明細書に記載のポリペプチドおよび融合ポリペプチドを発現させるために必要とされる細胞小器官を含む媒体を指す。これらの核酸は、当技術分野で公知の従来技術（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、ダイレクトマイクロインジェクション、または感染など）によって宿主細胞に導入することができる核酸ベクター内に含まれていてもよい。核酸ベクターの選択は、一部は使用する宿主細胞によって異なる。一般に、好ましい宿主細胞は真核生物（例えば、哺乳動物）または原核生物（例えば、細菌）起源である。

10

【0128】

核酸ベクターの構築および宿主細胞

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列は、当技術分野で公知の様々な方法によって作製することができる。これらの方法には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド媒介（または部位指定）突然変異誘発およびPCR突然変異誘発が含まれる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、例えば、遺伝子合成などの標準技術を用いて得ることができる。あるいは、野生型細胞外ActRIIaをコードする核酸分子は、例えば、QuickChange（商標）突然変異誘発などの当技術分野における標準技術を用いて、特定のアミノ酸置換を含むように変異させることができる。核酸分子は、ヌクレオチド合成装置またはPCR技術を用いて合成することができる。

20

【0129】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、原核生物または真核生物の宿主細胞で核酸分子を複製および発現することができるベクターに挿入することができる。当技術分野では多くのベクターが利用可能であり、本発明の目的において使用できる。各ベクターは種々の成分を含んでいてもよく、これらの成分は特定の宿主細胞と適合するように調節および最適化することができる。例えば、ベクター成分としては、限定されるものではないが、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位、シグナル配列、目的タンパク質をコードする核酸配列、および転写終結配列が含まれる。

【0130】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を本発明の宿主細胞として使用することができる。哺乳動物細胞種の例としては、限定されるものではないが、ヒト胎児腎（HEK）（例えば、HEK293、HEK293F）細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、COS細胞、PC3細胞、Vero細胞、MC3T3細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、VERY細胞、BHK細胞、MDCK細胞、W138細胞、BT483細胞、Hs578T細胞、HTB2細胞、BT20細胞、T47D細胞、NS0細胞（免疫グロブリン鎖を内因的に生産しないマウス骨髄腫細胞株）、CRL7030細胞、およびHsS78Bst細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、大腸菌（E. coli）細胞も本発明の宿主細胞として使用可能である。大腸菌株としては、限定されるものではないが、大腸菌294（ATCC（登録商標）31,446）、大腸菌λ1776（ATCC（登録商標）31,537）、大腸菌BL21（DE3）（ATCC（登録商標）BAA-1025）、および大腸菌RV308（ATCC（登録商標）31,608）が挙げられる。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシングおよびタンパク質産物の修飾（例えば、グリコシル化）に特徴的かつ特異的な機構を有する。適当な細胞株または宿主系は、発現されるポリペプチドの適正な修飾およびプロセッシングを確保するために選択することができる。上記の発現ベクターは、当技術分野における従来技術、例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、およびダイレクトマイクロインジェクションを用いて適当な宿主細胞に導入することができる。タンパク質生産用のためにベクターが宿主細胞に導入されれば、プロモーターを誘導する、形質転換体を選択する、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために必要に応じて修飾された従来の栄養培地で宿主細胞を培養する。治療タンパク質の発現のための

30

40

50

方法は当技術分野で公知であり、例えば、Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.), Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press; 第2版 (2004年)、および Vladimir Voynov および Justin A. Caravella (eds.), Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press; 第2版 (2012年) が参照される。

【0131】

タンパク質生産、回収および精製

本発明のポリペプチドを生産するために使用される宿主細胞は、当技術分野で公知であり、選択された宿主細胞の培養に好適な培地で増殖させることができる。哺乳動物宿主細胞に好適な培地の例としては、最小必須培地 (MEM: Minimal Essential Medium)、ダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、Exp1293 (商標) 発現培地、ウシ胎仔血清 (FBS: fetal bovine serum) を添加した DMEM、および RPMI-1640 が挙げられる。細菌宿主細胞に好適な培地の例としては、選択薬剤、例えば、アンピシリンなどの必要な添加を行った Luria broth (LB) が挙げられる。宿主細胞は、好適な温度、例えば、約 20℃～約 39℃、例えば、25℃～約 37℃、好ましくは、37℃、および 5～10% などの CO₂ レベルで培養する。培地の pH は、主として宿主生物に応じて、一般に、約 6.8～7.4、例えば、7.0 である。本発明の発現ベクターでは誘導プロモーターが使用され、プロモーターの活性化に好適な条件下でタンパク質発現が誘導される。

【0132】

いくつかの実施形態では、使用する発現ベクターおよび宿主細胞に応じて、発現されるタンパク質を宿主細胞 (例えば、哺乳動物宿主細胞) から細胞培養培地へ分泌させることができる。タンパク質の回収は、細胞残渣を除去するために細胞培養培地を濾過することを含み得る。これらのタンパク質をさらに精製してもよい。本発明のポリペプチドは、タンパク質精製の技術分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度、またはタンパク質精製のための他のいずれかの標準技術によって、精製することができる。タンパク質は、例えば、プロテイン A カラム (例えば、POROS プロテイン A クロマトグラフィー) などのアフィニティークラムを適切に選択し、クロマトグラフィーカラム (例えば、POROS HS-50 陽イオン交換クロマトグラフィー)、濾過、限外濾過、塩析および透析法と組み合わせることによって単離および精製することができる。

【0133】

他の実施形態では、宿主細胞は、発現されたタンパク質を回収するために、例えば、浸透圧ショック、音波処理、または溶解によって破壊することができる。細胞が破壊されれば、細胞残渣を遠心分離または濾過によって除去することができる。場合によっては、精製を容易にするためにポリペプチドをペプチドなどのマーカー配列に結合させることもできる。マーカーアミノ酸配列の例は、ヘキサヒスチジンペプチド (His タグ) であり、これはマイクロモルの親和性で、ニッケル官能基を有するアガロースアフィニティークラムに結合する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定されるものではないが、血球凝集素「HA」タグが含まれ、これはインフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する (Wilson 他、Cell 37: 767, 1984)。

【0134】

あるいは、本発明のポリペプチドは、例えば、遺伝子療法において、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を含むベクター (例えば、ウイルスベクター (例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター (例えば、ワク

10

20

30

40

50

シニアウイルスベクター、例えば、変異ワクシニアアンカラ（MVA: Modified Vaccinia Ankara）、アデノ随伴ウイルスベクター、およびアルファウイルスベクター）を投与することにより、対象（例えば、ヒト）の細胞によって生産することができる。ベクターは、対象の細胞内にあれば（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、ダイレクトマイクロインジェクション、感染など）、ポリペプチドの発現を促進し、これは次に細胞から分泌される。疾患または障害の治療が所望の転帰である場合には、それ以上の作用は必要とされないと思われる。タンパク質の採集が望まれる場合には、対象から血液を採取し、当技術分野で公知の方法によって血液からタンパク質を精製することができる。

【0135】

VIII. 医薬組成物および製剤

本発明は、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外ActRIIa変異体を含むポリペプチド）を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、治療タンパク質として、C末端伸長部（例えば、1、2、3、4、5、6以上の付加的アミノ酸）を有する細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～70（例えば、配列番号6～70）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外ActRIIa変異体）を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、治療タンパク質として、ある部分（例えば、Fcドメイン単量体、またはその二量体、野生型Fcドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する1以上の置換）を有するFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、または血清アルブミン）に融合された細胞外ActRIIa変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外ActRIIa変異体）を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドを含む本発明の医薬組成物は、療法において、他の薬剤（例えば、治療生物製剤および／または小分子）または組成物と併用することができる。治療上有効な量のポリペプチドに加え、医薬組成物は1種類以上の薬学上許容される担体または賦形剤を含んでいてもよく、当業者に公知の方法によって調剤することはできる。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子（DNAもしくはRNA、例えば、mRNA）、またはそのような核酸分子を含有するベクターを含む。

【0136】

医薬組成物の許容される担体および賦形剤は、使用される用量および濃度でレシピエントに無毒である。許容される担体および賦形剤は、リン酸塩、クエン酸塩、HEPES、およびTAEなどのバッファー、アスコルビン酸およびメチオニンなどの酸化防止剤、塩化ヘキサメトニウム、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、レゾルシノール、および塩化ベンザルコニウムなどの保存剤、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、デキストラン、および免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、ヒスチジン、およびリシンなどのアミノ酸、ならびにグルコース、マンノース、スクロース、およびソルビトールなどの炭水化物を含み得る。本発明の医薬組成物は、注射製剤の形態で非経口的に投与することができる。注射用医薬組成物は、無菌溶液または任意の薬学上許容される液体をビヒクルとして用いて調剤することができる。薬学上許容されるビヒクルとしては、限定されるものではないが、無菌水、生理食塩水、および細胞培養培地（例えば、ダルベッコの改変イーグル培地（DMEM）、 α -改変イーグル培地（ α -MEM）、F-12培地）が挙げられる。調剤方法は当技術分野で公知であり、例えば、Banga (ed.), Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems (第3版)、Taylor & Francis Group, CRC Press (2015) が参照される。

【0137】

本発明の医薬組成物は、ヒドロキシルメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセルなどのマイクロカプセル中に調製してもよい。本発明の医薬組成物はまた、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセルなどの他の薬物送達システム中に調製してもよい。このような技術は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版（2012年）に記載されている。in vivo投与に使用される医薬組成物は無菌でなければならない。これは無菌濾過膜を介した濾過によって容易に達成される。

【0138】

本発明の医薬組成物はまた、徐放性製剤として調製してもよい。徐放性製剤の好適な例としては、本発明のポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（polyactides）、L-グルタミン酸とγエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOT（商標））、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。一部の徐放性製剤は、数ヶ月、例えば、1～6か月にわたって分子の放出を可能とするが、他の製剤は本発明の医薬組成物をより短い期間、例えば、数日～数週間で放出する。

【0139】

医薬組成物は、必要であれば、単位剤形で形成することができる。医薬製剤中に含まれる有効成分、例えば、本発明のポリペプチドの量は、指定の範囲内で適切な用量が提供されるような量（例えば、0.01～100mg/kg体重の範囲内の用量）である。

【0140】

遺伝子療法用の医薬組成物は許容される希釈剤中であってよく、または遺伝子送達ビヒクルが包埋された緩徐放出マトリックスを含み得る。送達方法として流体力学的注射が使用される場合には、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸分子またはその核酸分子を含有するベクター（例えば、ウイルスベクター）を含有する医薬組成物は、大きな液量で静脈内に容易に送達される。in vivo遺伝子送達ビヒクルとして使用可能なベクターとしては、限定されるものではないが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスベクター、例えば、変異ワクシニアアンカラ）、アデノ随伴ウイルスベクター、およびアルファウイルスベクターが挙げられる。

【0141】

IX. 経路、用量、および投与

治療タンパク質として本発明のポリペプチドを含む医薬組成物は、例えば、静脈内投与、非経口投与、皮下投与、筋肉内投与、動脈内投与、くも膜下腔内投与、または腹腔内投与向けに調剤されてよい。医薬組成物はまた、経口投与、鼻腔投与、噴霧投与、エアロゾル投与、直腸、もしくは膣投与用に調剤し、またはそれらを介して投与することができる。注射製剤に関しては、種々の有効な医薬担体が当技術分野で知られている。例えば、ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第18版（2014）を参照されたい。

【0142】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子またはそのような核酸分子を含有するベクターを含む医薬組成物は、遺伝子送達によって送達することができる。遺伝子送達の方法は、当業者に周知である。in vivo遺伝子送達および発現に使用可能なベクターとしては、限定されるものではないが、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルスベクター、例えば、変異ワクシニアアンカラ（MVA））、アデノ随伴ウイルスベクター、およびアルファウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドをコードするmRNA分子を直接対象に投与してもよい。

【0143】

本発明のいくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸分子またはそのような核酸分子を含有するベクターは、流体力学的注射プラットフォームを用いて投与することができる。流体力学的注射法では、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸分子を、操作したプラスミド（例えば、ウイルスプラスミド）内の強力なプロモーターの制御下に置く。プラスミドは多くの場合、大きな液量で静脈内に容易に送達される。流体力学的注射は、大きな液量の迅速な注射から得られる高圧が静脈からの流体およびプラスミドの管外遊出をもたらすように細胞透過性を高めるために、静脈内で、制御された流体力学的圧力を使用する。核酸分子の発現は、主として肝臓によって駆動される。マウスでは、流体力学的注射は、多くの場合、プラスミドの尾静脈への注射によって行われる。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドをコードするmRNA分子は、流体力学的注射を用いて投与することができる。

10

【0144】

本発明の医薬組成物の用量は、投与経路、治療される疾患、および対象の身体的特徴、例えば、年齢、体重、健康状態を含む因子によって決まる。本発明の医薬組成物は、0.01~500mg/kgの範囲（例えば、0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、または500mg/kg）、より具体的な実施形態では、約0.1~約30mg/kg、より具体的な実施形態では、約0.3~約30mg/kgの用量の本発明のポリペプチドを含み得る。用量は、対象の疾患の程度および種々のパラメータなどの従来の因子に従って医師が適合させることができる。

20

【0145】

医薬組成物は、その剤形に適した様式で、症状の改善または修復をもたらすために治療上有効な量で投与される。医薬組成物は、様々な剤形、例えば、静脈内剤形、皮下剤形、および経口剤形（例えば、摂取可能な溶液、薬物放出カプセル）で投与される。一般に、治療タンパク質は、0.1~100mg/kg、例えば、1~50mg/kgで投与される。本発明のポリペプチドを含む医薬組成物は、それを必要とする対象に、例えば、毎日、毎週、隔週、毎月、隔月、四半期毎、半年毎、1年毎、または医学的に必要に応じて1回以上（例えば、1~10回以上）投与することができる。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドを含む医薬組成物は、それを必要とする対象に、毎週、隔週、毎月、隔月、または四半期毎に投与することができる。用量は単回または複数回の投与計画で提供することができる。投与間のタイミングは、医学的狀態が改善すると減らすことができ、または患者の健康が減退すると増やすことができる。

30

【0146】

X. 治療方法

本発明は、ActRIIbの細胞外部分からActRIIaの細胞外部分へアミノ酸を置換すると、特性が改善されたActRIIa変異体が得られるという発見に基づく。ActRIIbからActRIIaに残基を導入することによって作出されたActRIIa変異体は、より長い血清半減期およびBMP9に対する低い結合親和性などのActRIIaの有益な特性を保持し、かつ、アクチビンAおよびBに対する結合の増強（表4参照）などのActRIIbの有益な特性のいくつかを獲得する。これらのActRIIa変異体特性は、リガンド結合に関して内因性のアクチビン受容体と競合させるために治療的に使用することができるポリペプチドを生産する。ActRIIa変異体は受容体の細胞外部分を含むので、それらは可溶型であり、かつ、細胞内シグナル伝達経路を活性化することなく、リガンド（例えば、アクチビンAおよびB、ミオスタチン、GDF11）と結合してそれらを隔離することができる。よって、細胞外ActRIIa変異体は、アクチビンシグナル伝達の上昇が関連付けられている（例えば、アクチビン受容体またはアクチビン受容体リガンドの発現の増加に関連する）疾患または病態を治療するために使用することができる。例えば、アクチビンは骨疾患においてアップレギュレーションを受ける

40

50

ことが判明しており、骨芽細胞活性を阻害することが知られ、アクチビンレベルの増加が骨疾患に寄与することが示唆される。アクチビンと結合し、内因性受容体とのその相互作用を低減する治療薬による治療は、骨塩密度を増加させ、骨損傷を含む疾患または病態を有する対象を治療するために使用可能であるということになる。

【0147】

本発明は、必要とする対象において骨塩密度を増加させる、骨形成を増加させる、または骨吸収を低減するために使用可能な組成物および治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、骨損傷（例えば、骨粗鬆症または骨減少症）をもたらす疾患を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、骨損傷を含む疾患または病態を有する対象においてミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用することに向けられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞外A c t R I I a変異体を含むポリペプチドは、ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9のそれらの受容体、例えば、A c t R I I a、A c t R I I b、およびBMPRII（例えば、A c t R I I a）への結合を低減または阻害する。いくつかの実施形態では、ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9シグナル伝達に作用する（例えば、ミオスタチン、アクチビン、および／またはBMP9のそれらの受容体、例えば、A c t R I I a、A c t R I I b、およびBMPRII（例えば、A c t R I I a）への結合を低減または阻害する）と、対象の骨塩密度もしくは骨形成の増加、または対象の骨吸収の低減がもたらされる。

【0148】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体を含むポリペプチド）は、対象において骨塩密度を増加させる、骨形成を増加させる、骨吸収を低減する、またはミオスタチン、アクチビン、および／もしくはBMP9シグナル伝達に作用するために対象に投与することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象の骨塩密度を増加させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象において血管合併症、例えば、血管透過性または漏出の増加を引き起こさない。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、対象は、骨損傷を含む疾患または病態（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（f a c t u r e）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少）を有する。

【0149】

本発明はまた、対象に本明細書に記載のポリペプチド（例えば、細胞外A c t R I I a変異体（例えば、配列番号1～72（例えば、配列番号6～72）のうちいずれか1つの配列を有する細胞外A c t R I I a変異体）を含むポリペプチド）を投与することによって、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（f a c t u r e）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少を有する対象を治療する方法も含む。いくつかの実施形態では、原発性骨粗鬆症は、加齢性またはホルモン関連骨粗鬆症（例えば、エストロゲンの低下に関連する）である。いくつかの実施形態では、続発性骨粗鬆症は、不動誘発性またはグルココルチコイド誘発性骨粗鬆症である。いくつかの実施形態では、骨癌は多発性骨髄腫であり、または癌転移関連骨量減少は多発性骨髄腫によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、治療関連骨量減少は、FGF-21もしくはGLP-1による治療、FGF-21もしくはGLP-1含有治療薬による治療、または2型糖尿病および／もしくは肥満の治療のため、あるいは癌治療（例えば、化学療法または放射線）のために起こる。いくつかの実施形態では、食事関連骨量減少は、くる病（例えば、ビタミンD欠乏症）である。いくつかの実施形態では、低重力関連骨量減少は、負荷関連骨量減少である。

【0150】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチド）は、骨損傷を含む疾患または病態（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（f a c t u r e）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、大理石骨病、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少）の発症を予防するため、および／あるいは骨損傷を含む疾患または病態を有すると既に診断された患者を治療するために使用することができる。骨損傷を含む疾患または病態を発症する可能性のある患者、例えば、骨損傷、または低骨量の遺伝的素因、家族歴を有する個体に、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチド）を、予防的に、細胞外 A c t R I I a ポリペプチドが骨損傷の発生を予防または遅延し得るように投与することができる。

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチド）は、対象に、骨損傷を含む疾患または病態（例えば、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、骨減少症、大理石骨病、骨折（f a c t u r e）、骨癌もしくは癌転移関連骨量減少、パジェット病、腎性骨異栄養症、治療関連骨量減少、食事関連骨量減少、肥満の治療に関連する骨量減少、低重力関連骨量減少、または不動関連骨量減少）の発症を予防するため、および／あるいは前記疾患または病態を有する患者を治療するため、あるいは対象においてミオスタチン、アクチビン、および／または BMP 9 シグナル伝達に作用するため（例えば、アクチビン、ミオスタチン、および／または BMP 9 のそれらの受容体への結合を低減または阻害するため）に投与することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、骨塩密度を増加させる（例えば、骨量を増加させる）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、骨吸収を低減する（例えば、骨異化活性を低減する）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、骨形成を増加させる（例えば、骨同化活性を増加させる、または骨形成を増加させる）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、骨芽細胞活性または骨芽細胞形成を増加させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、破骨細胞活性または破骨細胞形成を低減する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、アクチビンおよび／またはミオスタチンのそれらの受容体への結合を低減または阻害する。いくつかの実施形態では、これらの方法は、骨形成を増加させるか、骨塩密度を増加させるか、または皮質骨もしくは骨梁の骨吸収を低減する。

【0152】

本明細書に記載の方法のいずれにおいても、1 以上のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6 以上のアミノ酸）の C 末端伸長部をさらに含む、細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～71（例えば、配列番号 6～71）のいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチドは、治療タンパク質として使用可能である。本明細書に記載の方法のいずれにおいても、F c ドメイン単量体に融合された細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチドの二量体（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体）は、治療タンパク質として使用可能である。本明細書に記載の方法のいずれにおいても、ある部分（例えば、野生型 F c ドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体形成を低減する 1 以上の置換）を有する F c ドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロネクチンドメイン、または血清アルブミン）に融合された細胞外 A c t R I I a 変異体（例えば、配列番号 1～72（例えば、配列番号 6～72）のうちいずれか 1 つの配列を有する細胞外 A c t R I I a 変異体）を含むポリペプチドは、治療タンパク質として使用可能である。本明細書に記載のポリペプチドをコードす

る核酸、または前記核酸を含有するベクターもまた、本明細書に記載の方法のいずれかに従って投与することができる。本明細書に記載の方法のいずれにおいても、ポリペプチド、核酸、またはベクターは医薬組成物の一部として投与することができる。

【実施例】

【0153】

実施例1：表面プラズモン共鳴（SPR）によるActRIIa変異体結合親和性の評価
ActRIIa変異体とリガンドであるアクチビンA、アクチビンB、成長分化因子11（GDF11）、およびBMP-9との間の相互作用の動態を測定するためにBiacore 3000を使用した。ActRIIa変異体をHEK293細胞で一過性に発現させ、プロテインAセファロースクロマトグラフィーを用いて細胞馴化培地から精製した。ActRIIa変異体を、適正な配向を確保するためにフローセル2～4において捕捉抗体（GEGEからの抗マウス）を用いてチップ（CM4またはCM5）に固定した。フローセル1は非特異的結合およびバルク効果を差し引くために参照セルとして使用した。GE Healthcare（商標）からのHBS-EP+バッファーをランニングバッファーとして使用した。物質移動効果を避けるために40μL/分にて、一定の濃度系で各リガンドを流した。各相互作用のK_Dを計算するため、BioLogic（商標）ソフトウェアによりScrubber 2を用いてデータを解析した（表4）。

【0154】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 種々のリガンドに対する ActRIIa 変異体の結合親和性 (K_D) の比較

	アクチビン A (K_D)	アクチビン B (K_D)	GDF-11 (K_D)	BMP-9 (K_D)
ビヒクル	N/A	N/A	N/A	N/A
ActRIIa (配列番号 73)	1 nM	373 pM	81 pM	25 nM
ActRIIb (配列番号 74)	63 pM	23 pM	115 pM	278 pM
ActRIIa/b 変異体 (配列番号 69)	542 pM	103 pM	186 pM	4 nM
ActRIIb/a 変異体 (配列番号 149)	結合しない	結合しない	結合しない	結合しない
ActRIIa/b Δ 9 変異体 (配列番号 58)	213 pM	12.3 pM	115 pM	10 nM
ActRIIa/b Δ 9 min 変異体(配列番号 6)	310 pM	88 pM	114 pM	17 nM
ActRIIa/b+変異体 (配列番号 150)	242 pM	282 pM	解離しない	26 nM
ActRIIa/b Δ 9m2 変異体 (配列番号 38)	170 pM	104 pM	222 pM	13-18 nM
ActRIIa/b Δ 9m3 変異体 (配列番号 41)	71 pM	72.5 pM	117 pM	1.2 nM
ActRIIa/b Δ 9m4 変異体 (配列番号 44)	375 pM	254 pM	394 pM	14-20 nM
ActRIIa/bmax1 変異体 (配列番号 70)	232 pM	97 pM	236 pM	5.6 nM
ActRIIa/bmax2 変異体 (配列番号 71)	135 pM	39 pM	113 pM	5 nM
ActRIIa/bmax3 変異体 (配列番号 72)	89 pM	43 pM	214 pM	3.3 nM

実施例 2：骨塩密度に及ぼす細胞外 ActRIIa 変異体の影響

成体雄 C57/B L6 マウスに偽手術 (SHAM) または去勢手術 (ORX) のいずれかを施す。両手術群を術後 14 日間回復させる。全ての動物を従来のケージで食物 (既定食) および水を自由に摂らせて飼育する。次に、SHAM 動物および ORX 動物をビヒクル処置群 (VEH) または ActRII 変異体処置群のいずれかに割り当て、71 日間、ビヒクルまたは ActRII 変異体 (10 mg/kg) の週 2 回 (bi-weekly)、全身腹腔内投与を施す。体重を週に 2 回、処置時に測定した。体組成を試験 0 日目、次いで、治療開始後 14 日目、28 日目、47 日目、および 71 日目に、MiniSpec LF50 NMR アナライザーを用いて分析する。試験終了日に、対象組織 (筋肉、脂肪

組織、および脛骨)を外科的に摘出し、秤量し、さらなる分析のために適切に保存する。この時点で、ORX動物をまた、試験(t e s t e s)の完全な撤退を確定するために検査する。また、試験終了後にマイクロコンピュータ断層撮影法を用いて、種々の骨の皮質形態計測および柱状構造も評価する。

【0155】

その他の実施形態

本発明をその特定の実施形態に関して記載してきたが、さらなる改変が可能であり、本願は、一般に本発明の原理に従う本発明のいずれの変形形態、使用、または適応も包含することが意図され、本開示からのそのような逸脱を含むことは、本発明が属する技術分野内の既知または関連の実施の範囲内にあり、以上に示す本質的特徴に該当し得ることが理解されるであろう。

10

【0156】

各個の刊行物、特許、および特許出願の全内容が本明細書の一部として援用されることが具体的かつ個々に示される場合と同等に、全ての刊行物、特許、および特許出願の全内容は本明細書の一部として援用される。

【0157】

他の実施形態も以下の特許請求の範囲内にある。

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

構造物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/66	(2017.01)	A 6 1 K	47/66
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 シーラ、ジャスパー エス.

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州 レキシントン リンカーン テラス 3

(72)発明者 ラシェイ、ジェニファー

アメリカ合衆国 0 1 7 7 3 マサチューセッツ州 リンカーン タワー ロード 9 9

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 0 7 2 8 8 (J P, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

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