

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-504275

(P2016-504275A)

(43) 公表日 平成28年2月12日 (2016. 2. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/08 (2006. 01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 13/12 (2006. 01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 3/12 (2006. 01)	A 6 1 P 3/12	
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-540809 (P2015-540809)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月1日 (2013. 11. 1)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年6月29日 (2015. 6. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/068009
 (87) 国際公開番号 W02014/071158
 (87) 国際公開日 平成26年5月8日 (2014. 5. 8)
 (31) 優先権主張番号 61/721, 898
 (32) 優先日 平成24年11月2日 (2012. 11. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/740, 665
 (32) 優先日 平成24年12月21日 (2012. 12. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509307635
 セルジーン コーポレイション
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
 901, サミット, モリス アベニュー
 86
 (71) 出願人 597025806
 ワシントン・ユニバーシティ
 Washington University
 アメリカ合衆国63130ミズーリ州セン
 ト・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドラ
 イブ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アクチビン-A c t R I I アンタゴニスト並びに骨障害及び他の障害の治療に対する使用

(57) 【要約】

本明細書に提供されるのは、腎疾患と関連している骨障害の治療方法であって、該治療を必要とする対象へのアクチビン-ActRIIAインヒビターの投与を含む、方法である。また本明細書に提供されるのは、低代謝回転骨障害の治療のための方法及び組成物であり、ここで、該方法は、該治療を必要とする対象へのアクチビン-ActRIIAインヒビターの投与を含む。さらに本明細書に提供されるのは、腎疾患と関連している骨障害の治療のための組成物並びに低代謝回転骨障害及び血管石灰化の治療のための組成物である。

【選択図】 図 1

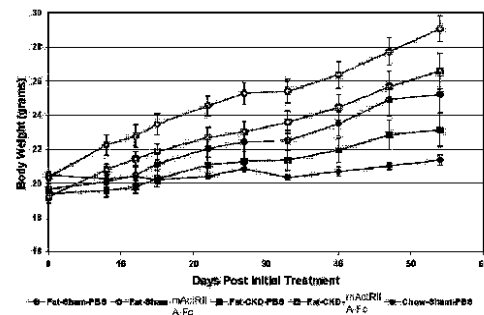


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における低回転型骨障害を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該低回転型骨障害の治療を必要とする対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

対象における低回転型骨障害形態のCKD-MBDを治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該低回転型骨障害形態のCKD-MBDの治療を必要とする対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 3】

前記低回転型骨障害が、石灰化した骨へのテトラサイクリン取込みの欠如を特徴とする、請求項1又は2記載の方法。

10

【請求項 4】

対象における低骨代謝回転形態のCKD-MBDを治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該低骨代謝回転形態のCKD-MBDの治療を必要とする対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 5】

前記低骨代謝回転形態のCKD-MBDが骨軟化症である、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

対象における高リン血症を特徴とする骨障害を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該高リン血症を特徴とする骨障害の治療を必要とする対象に投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 7】

対象における血管石灰化を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、アテローム性動脈硬化性石灰化の治療を必要とする対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 8】

対象における腎疾患を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該腎疾患の治療を必要とする対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 9】

前記腎疾患が腎線維症である、請求項8記載の方法。

30

【請求項 10】

血管石灰化を有すると診断された対象における血管内カルシウムレベルを低下させる方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを該対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 11】

前記ActRIIインヒビターが：

- a. 配列番号2と90%同一のもの；
- b. 配列番号2と95%同一のもの；
- c. 配列番号2と98%同一のもの；
- d. 配列番号2；
- e. 配列番号3と90%同一のもの；
- f. 配列番号3と95%同一のもの；
- g. 配列番号3と98%同一のもの；
- h. 配列番号3；
- i. 配列番号6と90%同一のもの；
- j. 配列番号6と95%同一のもの；
- k. 配列番号6と98%同一のもの；
- l. 配列番号6；
- m. 配列番号7と90%同一のもの；
- n. 配列番号7と95%同一のもの；

40

50

- o. 配列番号7と98%同一のもの；
- p. 配列番号7；
- q. 配列番号12と90%同一のもの；
- r. 配列番号12と95%同一のもの；
- s. 配列番号12と98%同一のもの；
- t. 配列番号12；
- u. 配列番号17と90%同一のもの；
- v. 配列番号17と95%同一のもの；
- w. 配列番号17と98%同一のもの；
- x. 配列番号17；
- y. 配列番号20と90%同一のもの；
- z. 配列番号20と95%同一のもの；
- aa. 配列番号20と98%同一のもの；
- bb. 配列番号20；
- cc. 配列番号21と90%同一のもの；
- dd. 配列番号21と95%同一のもの；
- ee. 配列番号21と98%同一のもの；
- ff. 配列番号21
- gg. 配列番号23と90%同一のもの；
- hh. 配列番号23と95%同一のもの；
- ii. 配列番号23と98%同一のもの；
- jj. 配列番号23
- kk. 配列番号25と90%同一のもの；
- ll. 配列番号25と95%同一のもの；
- mm. 配列番号25と98%同一のもの；及び
- nn. 配列番号25

10

20

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ActRIIインヒビターが、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

30

【請求項 1 3】

前記ActRIIインヒビターが非経口投与される、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

【請求項 1 4】

前記対象が18歳未満である、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

【請求項 1 5】

前記対象の身長を増加させる、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

【請求項 1 6】

前記対象が末期腎疾患を有する、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

40

【請求項 1 7】

前記対象が透析を受けている、請求項1、2、4、6、7、8、又は10記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その各々の開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、2012年11月2日に出願された米国仮特許出願第61/721,898号、及び2012年12月21日に出願された米国仮特許出願第61/740,665号に対する優先権を主張する。

【0002】

(1. 序論)

50

本明細書に提供されるのは、腎疾患、例えば、慢性腎疾患-骨ミネラル障害(「CKD-MBD」)と関連している骨障害の治療方法であって、該治療を必要とする対象へのアクチビン-ActRIIインヒビターの投与を含む、方法である。また本明細書に提供されるのは、低代謝回転骨障害の治療のための方法及び組成物であり、ここで、該方法は、該治療を必要とする対象へのアクチビン-ActRIIインヒビターの投与を含む。また本明細書に提供されるのは、腎疾患と関連している骨障害の治療のための組成物並びに低代謝回転骨障害及び血管石灰化の治療のための組成物である。

【背景技術】

【0003】

(2. 背景)

骨の成長及び石化は、破骨細胞及び骨芽細胞という2つの細胞型の活性に依存するが、軟骨細胞及び血管系の細胞もこれらのプロセスの極めて重要な局面に関与する。発生的に、骨形成は、軟骨内骨化及び膜内骨化という2つの機構を介して起こり、前者は、縦方向の骨形成に関与し、後者は、頭蓋骨などのトポロジ的に平らな骨の形成に関与する。軟骨内骨化は、骨芽細胞、破骨細胞、血管系の形成、及びその後の石灰化の鋳型としての役割を果たす成長板における軟骨構造の連続的な形成及び破壊を必要とする。膜内骨化の間、骨は、結合組織で直接形成される。両プロセスは、骨芽細胞の浸潤及びその後の基質沈着を必要とする。

【0004】

慢性腎疾患は、ミネラル恒常性の進行性の低下と関連しており、リン及びカルシウムの正常な血清及び組織濃度の乱れ、並びに副甲状腺ホルモン、25-ヒドロキシビタミンD、1,25-ジヒドロキシビタミンD、他のビタミンD代謝体、線維芽細胞成長因子-23、及び成長ホルモンなどの循環ホルモンの変化を伴う。慢性腎疾患-骨ミネラル障害(CKD-MBD)、国際腎臓病予後改善機構(Kidney Disease: Improving Global Outcomes)(KDIGO) CKD-MBD作業部会: Kidney Int Suppl.(2009) 76(補遺113):S1-130、S3ページを参照されたい。慢性腎疾患で混乱しているミネラル及びホルモンの恒常性は、成長期の初期骨形成(骨モデリング)並びに成人期の骨構造及び骨機能(骨リモデリング)に極めて重要である。結果として、骨異常は、慢性腎疾患を有する患者に見出される。さらに、同様に、ミネラル及び内分泌機能の混乱が原因で、骨外性石灰化は、慢性腎疾患を有する患者に見出すことができる。これらの症候群は、慢性腎疾患関連骨ミネラル障害(「CDK-MBD」)と呼ばれる。

【0005】

骨は、連続的な代謝回転を経る。骨代謝回転は、骨の再吸収と、それに続く置換のプロセスである。骨芽細胞と破骨細胞は、骨代謝回転に必要な細胞である。低代謝回転及び低回転型骨疾患は、骨の再吸収及び置換の低下又は欠如を特徴とする。CKD-MBDは、低代謝回転又は低回転型骨を特徴とし得る。(慢性腎疾患-骨ミネラル障害(CKD-MBD)、国際腎臓病予後改善機構(KDIGO) CKD-MBD作業部会: Kidney Int Suppl.(2009) 76(補遺113):S1-130、S34ページ)。

【0006】

血管系におけるカルシウムレベルの増加は、血管硬化の増大を特徴とする状態である、血管石灰化を引き起こし得る。血管石灰化を有する患者は、心筋梗塞のリスクが増加しており、血管石灰化は、腎疾患、例えば、CKD-MBDに罹患している患者に特によく見られる。例えば、Shanahanらの文献、2011, Circ. Res. 109:697-711を参照されたい。

【0007】

2つの関連するII型受容体、ActRIIA及びActRIIBが、アクチビンのII型受容体として同定されている(Mathews及びValeの文献、1991, Cell 65:973-982; Attisanoらの文献、1992, Cell 68: 97-108)。アクチビンの他に、ActRIIA及びActRIIBは、BMP7、Nodal、GDF8、及びGDF11を含む、いくつかの他のTGF-βファミリータンパク質と生化学的に相互作用することができる(Yamashitaらの文献、1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee及びMcPhersonの文献、2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo及びWhitmanの文献、2001, Mol. Cell 7: 949-957; Ohらの文献、2002, Genes Dev. 16:2749-54)。ALK4は、アクチ

10

20

30

40

50

ピン、特に、アクチビンAの主なI型受容体であり、ALK-7は、同様に、アクチビン、特に、アクチビンBの受容体としての役割を果たし得る。

【発明の概要】

【0008】

(3. 概要)

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における低回転型骨障害(adynamic bone disorder)を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該低回転型骨障害の治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。さらに本明細書に提供されるのは、対象における低回転型骨障害形態のCKD-MBDを治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該低回転型骨障害形態のCKD-MBDの治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。

10

【0009】

あるより具体的な実施態様において、該低回転型骨障害は、石灰化した骨へのテトラサイクリン取込みの欠如を特徴とする。

【0010】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における低骨代謝回転形態のCKD-MBDを治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該低骨代謝回転形態のCKD-MBDの治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。より具体的な実施態様において、該低骨代謝回転形態のCKD-MBDは、骨軟化症である。

20

【0011】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における高リン血症を特徴とする骨障害を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該高リン血症を特徴とする骨障害の治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。

【0012】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象におけるアテローム性動脈硬化性石灰化を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該アテローム性動脈硬化性石灰化の治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。

【0013】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における腎疾患を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、該腎疾患の治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。より具体的な実施態様において、該腎疾患は、腎線維症である。

30

【0014】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における骨外性石灰化を治療する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを該対象に投与することを含む、方法である。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における骨外性石灰化を予防する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを該対象に投与することを含む、方法である。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法により対象において治療又は予防される骨外性石灰化は、血管石灰化、すなわち、対象の血管系におけるカルシウム塩の蓄積、例えば、該対象の動脈の石灰化である。

40

【0015】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法とともに使用することができるActRIIインヒビターは：配列番号2と90%同一のもの；配列番号2と95%同一のもの；配列番号2と98%同一のもの；配列番号2；配列番号3と90%同一のもの；配列番号3と95%同一のもの；配列番号3と98%同一のもの；配列番号3；配列番号6と90%同一のもの；配列番号6と95%同一のもの；配列番号6と98%同一のもの；配列番号6；配列番号7と90%同一のもの；配列番号7と95%同一のもの；配列番号7と98%同一のもの；配列番号7；配列番号12と90%同一のもの；配列番号12と95%同一のもの；配列番号12と98%同一のもの；配列番号12；配列番号17と90%同一のもの；配列番号17と95%同一のもの；配列番号17と98%同一のもの；配列番号17；配列番号20と90%同一のもの；配列番号20と95%同一のもの；配列番号20と98%同一のもの；配

50

列番号20;配列番号21と90%同一のもの;配列番号21と95%同一のもの;配列番号21と98%同一のもの;及び配列番号21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。より具体的な実施態様において、該ActRIIインヒビターは、配列番号7のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。より具体的な実施態様において、該ActRIIインヒビターは、非経口投与される。

【0016】

具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法とともに使用することができるActRIIインヒビターはActRIIAインヒビターであり、ここで、該ActRIIAインヒビターは：
a. 配列番号2と少なくとも90%同一なポリペプチド； b. 配列番号2と少なくとも95%同一なポリペプチド； c. 配列番号2と少なくとも98%同一なポリペプチド； d. 配列番号2； e. 配列番号3と少なくとも90%同一なポリペプチド； f. 配列番号3と少なくとも95%同一なポリペプチド； g. 配列番号3と少なくとも98%同一なポリペプチド； h. 配列番号3； i. 配列番号6と少なくとも90%同一なポリペプチド； j. 配列番号6と少なくとも95%同一なポリペプチド； k. 配列番号6と少なくとも98%同一なポリペプチド； l. 配列番号6； m. 配列番号7と少なくとも90%同一なポリペプチド； n. 配列番号7と少なくとも95%同一なポリペプチド； o. 配列番号7と少なくとも98%同一なポリペプチド； p. 配列番号7； q. 配列番号12と少なくとも90%同一なポリペプチド； r. 配列番号12と少なくとも95%同一なポリペプチド； s. 配列番号12と少なくとも98%同一なポリペプチド；及びt. 配列番号12からなる群から選択されるポリペプチドを含むか、又は該ポリペプチドからなる。具体的な実施態様において、該ActRIIAインヒビターは、配列番号7のアミノ酸配列を含むか、又は該アミノ酸配列からなるポリペプチドである。

10

20

【0017】

別の具体的な実施態様において、本明細書に提供される方法とともに使用することができるActRIIインヒビターはActRIIBインヒビターであり、ここで、該ActRIIBインヒビターは：
a. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43と少なくとも90%同一なポリペプチド； b. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43と少なくとも95%同一なポリペプチド； c. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43と少なくとも98%同一なポリペプチド； d. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43； e. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47と90%同一なポリペプチド； f. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47と95%同一なポリペプチド； g. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47と98%同一なポリペプチド；及びh. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47からなる群から選択されるポリペプチドを含むか、又は該ポリペプチドからなる。具体的な実施態様において、該ActRIIBインヒビターは、配列番号23を含むか、又は配列番号23からなるポリペプチドである。別の具体的な実施態様において、該ActRIIBインヒビターは、配列番号25を含むか、又は配列番号25からなるポリペプチドである。

30

【0018】

別の具体的な実施態様において、ActRIIAインヒビター及びActRIIBインヒビターを、本明細書に提供される方法で使用することができる(例えば、ActRIIAインヒビター及びActRIIBインヒビターを含む組成物を使用することができるか；又はActRIIAインヒビターとActRIIBインヒビターの両方を、本明細書に記載の方法に従って治療されている対象に、別々に投与することができる)、ここで、該ActRIIAインヒビターは：
a. 配列番号2と少なくとも90%同一なポリペプチド； b. 配列番号2と少なくとも95%同一なポリペプチド； c. 配列番号2と少なくとも98%同一なポリペプチド； d. 配列番号2； e. 配列番号3と少なくとも90%同一なポリペプチド； f. 配列番号3と少なくとも95%同一なポリペプチド； g. 配列番号3と少なくとも98%同一なポリペプチド； h. 配列番号3； i. 配列番号6と少なくとも90%同一なポリペプチド； j. 配列番号6と少なくとも95%同一なポリペプチド； k. 配列番号6と少なくとも98%同一なポリペプチド； l. 配列番号6； m. 配列番号7と少なくとも90%同一なポリペ

40

50

チド； n. 配列番号7と少なくとも95%同一なポリペプチド； o. 配列番号7と少なくとも98%同一なポリペプチド； p. 配列番号7； q. 配列番号12と少なくとも90%同一なポリペプチド； r. 配列番号12と少なくとも95%同一なポリペプチド； s. 配列番号12と少なくとも98%同一なポリペプチド；及びt. 配列番号12からなる群から選択されるポリペプチドを含むか、又は該ポリペプチドからなり；かつ該ActRIIBインヒビターは： a. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43と少なくとも90%同一なポリペプチド； b. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43と少なくとも95%同一なポリペプチド； c. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43と少なくとも98%同一なポリペプチド； d. 配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43； e. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47と90%同一なポリペプチド； f. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47と95%同一なポリペプチド； g. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47と98%同一なポリペプチド；及びh. 配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、もしくは47からなる群から選択されるポリペプチドを含むか、又は該ポリペプチドからなる。具体的な実施態様において、該ActRIIAインヒビターは、配列番号7を含むか、又は配列番号7からなるポリペプチドであり、かつ該ActRIIBインヒビターは、配列番号23を含むか、又は配列番号23からなるポリペプチドである。別の具体的な実施態様において、該ActRIIAインヒビターは、配列番号7を含むか、又は配列番号7からなるポリペプチドであり、かつ該ActRIIBインヒビターは、配列番号25を含むか、又は配列番号25からなるポリペプチドである。

【0019】

ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療される対象は、18歳未満である。ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療される対象は、末期腎疾患を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療される対象は、透析を受けている。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、該対象の身長を増加させる方法である。

【0020】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における高リン血症、(リンの増加が原因の)二次性副甲状腺機能亢進症、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化、及び低回転型骨障害を治療又は予防する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを、高リン血症、(リンの増加が原因の)二次性副甲状腺機能亢進症、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化、及び低回転型骨の治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

(4. 図面の簡単な説明)

【図1】腎部分切除術後のマウスの体重。

【0022】

【図2】マウスにおける腎部分切除術後のDEXAスキャンによるBMDの変化。

【0023】

【図3】マウスにおける腎部分切除術後の配列番号7のマウス対応物(「mActRIIA-Fc」)によるヘマトクリット変化。

【0024】

【図4】マウスにおける腎部分切除術後の代表的な骨のMicroCT 3Dイメージ。

【0025】

【図5】mActRIIA-Fc処置は、ヘマトクリットを増加させる。

【0026】

【図6】mActRIIA-Fcは、骨ミネラル密度を増加させる。

【0027】

10

20

30

40

50

【図7】大腿骨の代表的なmicroCTスキャン

【0028】

【図8】mActRIIA-Fcは、大腿骨骨幹中央部の皮質厚を増加させる。

【0029】

【図9】mActRIIA-Fcは、骨梁体積を増加させる。

【0030】

【図10】mActRIIA-Fcは、遠位大腿骨の骨梁厚を増加させる。

【0031】

【図11】mActRIIA-Fcは、CKDマウスモデルにおいて大動脈内カルシウムのレベルの低下を引き起こす。

10

【発明を実施するための形態】

【0032】

(5. 詳細な説明)

(5.1 概説)

本明細書に提供されるのは、一態様において、慢性腎疾患-骨ミネラル障害(CKD-MBD)の治療方法であって、ActRIIのインヒビターを、治療を必要とする患者に投与することを含む、方法である。ActRIIのインヒビターは、ActRIIA及び/又はActRIIBのインヒビターであることができる。

【0033】

CKD-MBDは、慢性腎疾患によるミネラル及び骨代謝の全身障害と診断され、(1)カルシウム;リン;カルシウム×リン積;アルカリホスファターゼ(全体もしくは骨特異的);重炭酸塩;副甲状腺ホルモン(「PTH」);1-84 PTH、1-84-PTH/7-84 PTH比;オステオカルシン;オステオプロテグリン;酒石酸耐性酸ホスファターゼアイソフォーム5b(「TRAP-5b」);ピリジノリン及びデオキシピリジノリン;プロコラーゲン1型アミノ末端伸長ペプチド;C末端架橋;コラーゲンのC末端架橋;線維芽細胞成長因子23(「FGF23」);フェツリン-A;又はビタミンD代謝の異常;(2)骨の代謝回転、石化、体積、線形成長、又は強度の異常;並びに(3)血管又は他の軟組織石灰化のどれか1つ又は組合せによって明らかになり得る。Nickolasの文献、2008, Kidney International 74:721-731;及びMoeらの文献、2006, Kidney International 69:1945-1953を参照されたい。CKD-MBDの診断に関するガイドラインは、例えば、慢性腎疾患-骨ミネラル障害(CKD-MBD)の予防、診断、評価、及び治療に関するKDIGO臨床実践ガイドライン、国際腎臓病予後改善機構(KDIGO) CKD-MBD作業部会: Kidney Int Suppl. (2009) 76(補遺113):S1-130に見出すことができる。

20

30

【0034】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、低骨代謝回転形態のCKD-MBDの治療方法であって、ActRIIのインヒビターを、治療を必要とする患者に投与することを含む、方法である。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、高リン血症及び/又は高カルシウム血症を特徴とするCKD-MBDの治療方法である。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、骨外性石灰化、例えば、限定されないが、アテローム性動脈硬化性石灰化を特徴とする、CKD-MBDの治療方法である。

【0035】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、慢性腎疾患が、ステージ3、ステージ4、ステージ5、又はステージ5Dに達している、CKD-MBDの治療方法である。具体的な実施態様において、該腎疾患は、末期腎疾患である。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、成人における60ml/分/1.73m²未満の又は小児患者における89ml/分/1.73m²未満の糸球体濾過量を特徴とするCKD-MBDの治療方法である。Moeらの文献、2006, Kidney International 69:1945-1953を参照されたい。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、50ml/分/1.73m²、40ml/分/1.73m²、30ml/分/1.73m²、20ml/分/1.73m²未満、又は10ml/分/1.73m²未満の糸球体濾過量を特徴とするCKD-MBDの成人における治療方法である。ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、80ml/分/1.73m²、70ml/分/1.73m²、60ml/分/1.73m²、50ml/分/1.73m²、40ml/分/1.73m²、30ml/分/1.73m²、20ml/分/

40

50

1.73m²未満、又は10ml/分/1.73m²未満の糸球体濾過量を特徴とするCKD-MBDの小児患者における治療方法である。

【0036】

理論によって束縛されるものではないが、成人患者における60ml/分/1.73m²未満の及び小児患者における89ml/分/1.73m²未満の糸球体濾過量は、カルシウムレベル、リンレベル、PTHレベル、及びビタミンD代謝の検出可能な異常をもたらす；これらのマーカーの異常なレベルは、骨疾患をもたらす。

【0037】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、慢性腎疾患と関連する骨病変、すなわち、CKD-MBDの治療方法である。Moeらの文献、2006, Kidney International 69:1945-1953を参照されたい。ある実施態様において、CKD-MBDは、低代謝回転CKD-MBDである。低代謝回転CKD-MBDは、下の表1に示す組織学的特徴によって診断されることができる。米国腎臓財団(National Kidney Foundation)のウェブサイト上の米国腎臓財団、腎疾患予後改善対策ガイドライン(Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines)を参照されたい。

10

【表1】

表 1. 低代謝回転CKD-MBDの組織学的特徴

特徴	低回転型	骨軟化症
骨形成		
骨梁体積	正常、小さい	変化する 小さい、正常、又は大きい
類骨体積	正常、小さい	大きい～極めて大きい
類骨層厚	正常、小さい	大きい～極めて大きい
骨芽細胞の数	少ない	少ない
骨形成速度	低い～極めて低い	低い～極めて低い
石化遅延時間	正常	長期
骨再吸収		
侵食された骨の外周	正常、小さい	変化する 小さいことが多いが、大きい場合もある
破骨細胞の数	少ない	少ないが正常であるか又は多い場合もある
骨髓線維症	ない	ない

20

30

【0038】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における骨外性石灰化の治療方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを該対象に投与することを含む、方法である。別の具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における骨外性石灰化を予防する方法であって、治療有効量のActRIIインヒビターを該対象に投与することを含む、方法である。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法により対象において治療又は予防される骨外性石灰化は、血管石灰化、すなわち、対象の血管系におけるカルシウム塩の蓄積、例えば、対象の動脈の石灰化である。

40

【0039】

ある実施態様において、本明細書に提供される骨外性石灰化、例えば、血管石灰化の治療又は予防方法は、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象に対して実施される(すなわち、該リスクのある対象に、本明細書に記載の方法に従って、ActRIIインヒビターが投与される)。具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象は、高コレステロール血症を有する。別の具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象は、高血圧を有する。別の具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象は、糖尿病を有する。別の具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば

50

、血管石灰化を患うリスクのある対象は、腎疾患(例えば、末期腎疾患)を有する。別の具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象は、慢性腎疾患を有する。別の具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象は、増大した酸化的ストレス、例えば、血管系における酸化物質産生と抗酸化物質活性の不均衡を有する。別の具体的な実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患うリスクのある対象は、石灰化インヒビター欠損(例えば、フェツイン-A、マトリックsglaタンパク質(MGP)、及びオステオプロテゲリン(OPG)のうちの1つ又は複数の欠損)を有する。

【0040】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、中膜石灰化(別名、メンケベルク硬化症又は中膜石灰症)を有する。中膜石灰化は、動脈中膜内の広範性ミネラル沈着を特徴とする。具体的な実施態様において、中膜石灰化を患っている対象は、高齢者である。具体的な実施態様において、中膜石灰化を患っている対象は、中膜石灰化を引き起こす障害、例えば、糖尿病、腎疾患(例えば、CKD)を有する。

10

【0041】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、内膜石灰化を有する。内膜石灰化は、アテローム性動脈硬化症と関連しており、アテローム性動脈硬化プラークの進行につれて進行する。

【0042】

ある実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象は、機械的負荷の減少、骨形成の減少、交換可能な貯蔵中のリンの過剰に応答して骨細胞により産生されるホルモンであるFGF23のレベルが、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っていないか又はそれを患うリスクのない対象におけるFGF23レベルと比べて増加している(例えば、Hruska及びMathewの文献、2011, Advances in Chronic Kidney Disease 18(2):98-104を参照されたい)。FGF23のレベルは、対象由来の試料、例えば、血液、血清を用いて、当技術分野で公知の方法、例えば、ELISAを用いて検出することができる。具体的な実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っていないか又はそれを患うリスクのない対象におけるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)よりも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%を超えて大きい。別の具体的な実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っていないか又はそれを患うリスクのない対象におけるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)よりも約5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、50~75%、又は75~100%大きい。

20

30

【0043】

ある実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるFGF23のレベルを用いて、本明細書に記載の方法、例えば、ある形態のCKD-MBDを治療する方法及び/又は骨外性石灰化(例えば、血管石灰化)を治療する方法の有効性をモニタリングすることができ、ここで、そのような方法は、治療有効量の本明細書に記載のActRIIインヒビターの投与を含む。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法のうちの1つ又は複数に従って治療される対象は、本明細書に記載の方法で治療される前の該対象で検出されるFGF23のレベルと比較して(例えば、該対象の血清中で検出される)FGF23のレベルが減少している。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法で治療される、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象

40

50

におけるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、本明細書に記載の方法による治療の前の該対象で検出されるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)と比べて、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%を超えて減少している。別の具体的な実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、本明細書に記載の方法による治療の前の該対象で検出されるFGF23のレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)と比べて、約5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、50~75%、又は75~100%減少している。

【0044】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を治療する方法であって:(i)ActRIIインヒビターを、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を有する個体に投与すること;(ii)該ActRIIインヒビターの投与後の該個体の組織試料(例えば、血清)中のFGF23の量を決定すること;並びに(iii)該組織試料中のFGF23の量が、該ActRIIインヒビターの投与前の該個体由来の同じ組織型の試料(例えば、同じ個体由来の血清の異なる試料)中で決定されるFGF23の量と比較して、わずか約5%、10%、15%、20%、もしくは25%、又は約5~10%、10~20%、20~30%減少している場合、ActRIIインヒビターの投与を反復することを含む、方法である。ある実施態様において、FGF23の量がActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの用量を増加させることができる。ある実施態様において、FGF23の量がActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの投与の頻度を増加させることができる。

【0045】

ある実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象は、CKD-MBDに罹患しているか又はCKD-MBDに罹患するリスクのある対象で増加しているタンパク質であるスクレロスチン(例えば、Graciolliらの文献、2010, J Am Soc Nephrol 21:774Aを参照)のレベルが、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っていないか又はそれを患うリスクのない対象におけるスクレロスチンレベルと比べて増加している。スクレロスチンのレベルは、対象由来の試料、例えば、血液、血清を用いて、当技術分野で公知の方法、例えば、ELISAを用いて検出することができる。具体的な実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるスクレロスチンのレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っていないか又はそれを患うリスクのない対象におけるスクレロスチン(例えば、血清中で検出可能なレベル)のレベルよりも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%を超えて大きい。別の具体的な実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるスクレロスチンのレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っていないか又はそれを患うリスクのない対象におけるスクレロスチン(例えば、血清中で検出可能なレベル)のレベルよりも約5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、50~75%、又は75~100%大きい。

【0046】

ある実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるスクレロスチンのレベルを用いて、本明細書に記載の方法、例えば、ある形態のCKD-MBDを治療する方法及び/又は骨外性石灰化(例えば、血管石灰化)を治療する方法の有効性をモニタリングすることができ、ここで、そのような方法は、治療有効量の本明細書に記載のActRIIインヒビターの投与を含む。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法のうちの1つ又は複数に従って

治療される対象は、本明細書に記載の方法で治療される前の該対象で検出されるスクレロスチンのレベルと比較して(例えば、該対象の血清中で検出される)スクレロスチンのレベルが減少している。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法で治療される、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるスクレロスチンのレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、本明細書に記載の方法による治療の前の該対象で検出されるスクレロスチンのレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)と比べて、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、又は50%を超えて減少している。別の具体的な実施態様において、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を患っているか又はそれを患うリスクのある対象におけるスクレロスチンのレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)は、本明細書に記載の方法による治療の前の該対象で検出されるスクレロスチンのレベル(例えば、血清中で検出可能なレベル)と比べて、約5~10%、10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、50~75%、又は75~100%減少している。

10

20

30

40

50

【0047】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を治療する方法であって:(i)ActRIIインヒビターを、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を有する個体に投与すること;(ii)該ActRIIインヒビターの投与後の該個体の組織試料(例えば、血清)中のスクレロスチンの量を決定すること;並びに(iii)該組織試料中のスクレロスチンの量が、該ActRIIインヒビターの投与前の該個体由来の同じ組織の試料(例えば、同じ個体由来の血清の異なる試料)中で決定されるスクレロスチンの量と比較して、わずか約5%、10%、15%、20%、もしくは25%、又は約5~10%、10~20%、20~30%減少している場合、該ActRIIインヒビターの投与を反復することを含む、方法である。ある実施態様において、スクレロスチンの量が、ActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの用量を増加させることができる。ある実施態様において、スクレロスチンの量が、ActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの投与の頻度を増加させることができる。

【0048】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、18歳未満である。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、13歳未満である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、12歳未満、11歳未満、10歳未満、9歳未満、8歳未満、7歳未満、6歳未満、又は5歳未満である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、1~3歳、3~5歳、5~7歳、7~9歳、9~11歳、11~13歳、13~15歳、15~20歳、20~25歳、25~30歳、又は30歳超である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、30~35歳、35~40歳、40~45歳、45~50歳、50~55歳、55~60歳、又は60歳超である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、60~65歳、65~70歳、70~75歳、75~80歳、又は80歳超である。

【0049】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、末期腎疾患を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の方法に従って治療される血管石灰化を患っている対象は、透析を受けている。

【0050】

ある実施態様において、骨外性石灰化、例えば、血管石灰化の治療又は予防の有効性は、当業者に公知の1以上のアッセイを用いて評価される。例示的アッセイは、第5.3節(a)(iv)に記載されている。そのような実施態様に従って、当業者は、本明細書に記載のActRIIインヒビターで治療されている対象が、アッセイの結果に基づいてその治療レジメンを

調整し得ることを理解するであろう。例えば、カルシウム、例えば、血管内カルシウム(例えば、動脈内カルシウム)のレベルの増加を示す、本明細書に記載の方法によって治療されている対象に、増加用量のActRIIインヒビターを投与することができるか、又はActRIIインヒビターをより高い頻度で投与することができる(すなわち、用量投与間の時間を短縮することができる)。逆に、カルシウム、例えば、血管内カルシウム(例えば、動脈内カルシウム)のレベルの減少を示す、本明細書に記載の方法によって治療されている対象に、減少用量のActRIIインヒビターを投与することができるか、又はActRIIインヒビターをより低い頻度で投与することができる(すなわち、用量投与間の時間を延長することができる)。

【0051】

10

ある実施態様において、本明細書に提供される方法は、以下のもの:高リン血症、(リンの増加が原因の)二次性副甲状腺機能亢進症、及び骨外性石灰化、例えば、血管石灰化のうちの1つ又は複数の症状の改善をもたらす。これらの症状の程度を決定するための当業者に公知の任意の方法を本明細書に提供される方法とともに使用することができる。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法は、血管石灰化の1以上の症状の改善をもたらす。例示的な症状としては、血管内(例えば、動脈内)カルシウムのレベルの増加、血管平滑筋細胞のアポトーシスの増加、動脈の弾力性の喪失、PWV(脈波伝播速度)の増加、左心室肥大の発症、冠動脈灌流の減少、及び心筋虚血が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0052】

20

ある実施態様において、本明細書に記載の方法は、対象における、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%の血管内カルシウム、例えば、動脈内カルシウムのレベルの減少をもたらす。ある実施態様において、本明細書に記載の方法は、対象における、5%~10%、10%~15%、15%~20%、20%~25%、25%~30%、30%~35%、35%~40%、40%~45%、又は45%~50%の血管内カルシウム、例えば、動脈内カルシウムのレベルの減少をもたらす。

【0053】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、対象における血管内カルシウムのレベルを低下させる方法であって:(i)ActRIIインヒビターを、血管内カルシウムレベルの低下を必要とする対象(例えば、ある形態のCKD-MBD及び/又は骨外性石灰化、例えば、血管石灰化を有する対象)に投与すること;(ii)該ActRIIインヒビターの投与後の該対象の組織試料(例えば、血清)中の血管内カルシウムの量を決定すること;並びに(iii)該組織試料中の血管内カルシウムの量が、該ActRIIインヒビターの投与前の該対象由来の同じ組織の試料(例えば、同じ個体由来の血清の異なる試料)中で決定される血管内カルシウムの量と比較して、わずか約5%、10%、15%、20%、もしくは25%、又は約5~10%、10~20%、20~30%減少している場合、該ActRIIインヒビターの投与を反復することを含む、方法である。ある実施態様において、血管内カルシウムの量が、ActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの用量を増加させることができる。ある実施態様において、血管内カルシウムの量が、ActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの投与の頻度を増加させることができる。

30

40

【0054】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法は、血管石灰化を有するか又はそれを発症するリスクのある対象のアガットストンスコアの進行の低下をもたらす。具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の方法によるActRIIインヒビターの投与前の対象のアガットストンスコアと比較したとき、血管石灰化を有するか又はそれを発症するリスクのある対象のアガットストンスコアの5%、10%、15%、20%、25%、30%、又は30%を超える減少をもたらす(例えば、第5.3節(a)(iv)を参照されたい)。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の方法によるActRIIインヒビターの投与前の対象のアガットストンスコアと比較したとき、血管石灰化を

50

有するか又はそれを発症するリスクのある対象のアガットストンスコアの5%～10%、10%～15%、15%～20%、20%～25%、25%～30%、30%～35%、35%～40%、40%～45%、又は45%～50%減少をもたらす(例えば、第5.3節(a)(iv)を参照されたい)。

【0055】

別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法は、対象の血管系におけるカルシウムのレベルの減少、例えば、対象、例えば、血管石灰化を有するか又はそれを発症するリスクのある対象の1以上の動脈におけるカルシウムのレベルの減少をもたらす。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の方法は、対象の血管系におけるリンのレベルの減少、例えば、対象、例えば、血管石灰化を有するか又はそれを発症するリスクのある対象の1以上の動脈におけるリンのレベルの減少をもたらす。

10

【0056】

ある実施態様において、本明細書に提供されるのは、低代謝回転骨障害の治療方法である。低骨代謝回転は、下記の第5.3節(a)に示す試験を用いて診断することができる。骨代謝回転の生化学的マーカーとしては:血清又は尿コラーゲン架橋(N-テロペプチド又はC-テロペプチド)、骨特異的アルカリホスファターゼ、血清オステオカルシン及び/又はプロペプチド1型コラーゲン、25ヒドロキシビタミンD、並びに副甲状腺ホルモン(「PTH」)が挙げられる。具体的な実施態様において、低代謝回転骨障害は、低回転型骨障害である。ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療される患者は、少なくとも10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%の、又は100%の骨代謝回転の低下を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療される患者は、多くても10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%の、又は100%の骨代謝回転の低下を有する。ある実施態様において、本明細書に提供される方法で治療される患者は、10%～25%、20%～35%、30%～45%、40%～55%、50%～65%、60%～75%、70%～85%、80%～95%、90%～100%の骨代謝回転の低下を有する。ある実施態様において、骨代謝回転の低下は、同じ患者の病歴データと比較される。他の実施態様において、骨代謝回転の低下は、骨障害を有しない集団における平均骨代謝回転と比較される。骨障害を有しない集団は、患者と同じ年齢及び/又は同じ性別であることができる。

20

【0057】

具体的な実施態様において、本明細書に提供されるのは、低代謝回転骨障害、例えば、低回転型骨障害を治療する方法であって:(i)ActRIIインヒビターを、低代謝回転骨障害を有する対象に投与すること;(ii)該ActRIIインヒビターの投与後の該対象における骨代謝のレベルを(例えば、下記の第5.3節(a)に示す試験のうちの1つもしくは複数を用いることにより、及び/又は骨代謝回転の1以上の生化学的マーカーを測定することにより)決定すること;並びに(iii)該対象における骨代謝回転のレベルが、該ActRIIインヒビターの投与前の該対象における骨代謝回転のレベルと比較して、わずか約5%、10%、15%、20%、もしくは25%、又は約5～10%、10～20%、20～30%減少している場合、該ActRIIインヒビターの投与を反復することを含む、方法である。ある実施態様において、骨代謝回転のレベルが、ActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの用量を増加させることができる。ある実施態様において、骨代謝回転のレベルが、ActRIIインヒビターの投与後に減少していない場合、投与されるActRIIインヒビターの投与の頻度を増加させることができる。

30

40

【0058】

(5.2 ActRIIのインヒビター)

((a)ActRIIAのインヒビター)

本明細書で使用されるように、「ActRIIA」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体IIa型(ActRIIA)タンパク質のファミリー及び突然変異生成又は他の修飾によってそのようなActRIIAタンパク質から得られた変異体を指す。本明細書中でのActRIIAに対する言及は、現在同定されている形態のいずれか1つに対する言及であると理解される。ActRIIAファミリーのメンバーは、一般に、システインに富む領域を含むリガンド結合細胞外ド

50

メイン、膜貫通ドメイン、及び予想上のセリン/トレオニンキナーゼ活性を有する細胞質ドメインから構成される、膜貫通タンパク質である。

【0059】

本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターとしては、限定するものではないが、アクチビン結合可溶性ActRIIAポリペプチド;アクチビン(特に、 β A又は β Bとも呼ばれる、アクチビンA又はBサブユニット)に結合し、ActRIIA結合を破壊する抗体; ActRIIAに結合し、アクチビン結合を破壊する抗体;アクチビン又はActRIIA結合について選択された非抗体タンパク質(そのようなタンパク質並びにその設計及び選択方法については、例えば、その各々が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、WO/2002/088171号、WO/2006/055689号、WO/2002/032925号、WO/2005/037989号、US 2003/0133939号、及びUS 2005/0238646号を参照);並びにFcドメインにコンジュゲートすることができる、アクチビン又はActRIIA結合について選択されたランダム化ペプチドが挙げられる。

10

【0060】

ある実施態様において、アクチビン又はActRIIA結合活性を有する2以上の異なるタンパク質(又は他の部分)、特に、それぞれI型(例えば、可溶性I型アクチビン受容体)及びII型(例えば、可溶性II型アクチビン受容体)結合部位を遮断するアクチビンバインダーを1つに連結させて、ActRIIAを阻害し、したがって、本明細書に記載の組成物及び方法で使用する事ができる、二機能性又は多機能性結合分子を作出することができる。ある実施態様において、ActRIIAを阻害するアクチビン-ActRIIAシグナル伝達軸アンタゴニストとしては、核酸アプタマー、小分子、並びに本明細書に記載の組成物及び方法で使用される他の薬剤が挙げられる。

20

【0061】

((i)ActRIIAポリペプチドを含むActRIIAインヒビター)

「ActRIIAポリペプチド」という用語には、ActRIIAファミリーメンバーの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドが含まれる。例えば、ActRIIAポリペプチドには、ActRIIAポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のActRIIAの配列に由来するポリペプチドが含まれる。例えば、ActRIIAポリペプチドは、ActRIIAタンパク質及び/又はアクチビンに結合し、それらの機能を阻害することができる。ActRIIBポリペプチドは、骨成長及び骨石灰化を促進するその能力について選択することができる。ActRIIAポリペプチドの例としては、ヒトActRIIA前駆ポリペプチド(配列番号1)並びに可溶性ヒトActRIIAポリペプチド(例えば、配列番号2、3、7、及び12)が挙げられる。そのアミノ酸配列が配列番号1に示されているActRIIA前駆ポリペプチドに関して、ヒトActRIIA前駆ポリペプチドのシグナルペプチドは、アミノ酸位置1~20に位置し;細胞外ドメインは、アミノ酸位置21~135に位置し、ヒトActRIIA前駆ポリペプチド(配列番号1)のN結合型グリコシル化部位は、配列番号1のアミノ酸位置43及び56に位置する。配列番号1のヒトActRIIB前駆ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号4(Genbank エントリーNM_001616のヌクレオチド164~1705)として開示されている。配列番号2の可溶性ヒトActRIIAポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号5として開示されている。配列の説明については、表6を参照されたい。

30

40

【0062】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAポリペプチドは、可溶性ActRIIAポリペプチドである。ActRIIAタンパク質の細胞外ドメインは、アクチビンに結合することができ、かつ通常、可溶性であり、したがって、可溶性アクチビン結合ActRIIAポリペプチドと呼ぶことができる。したがって、本明細書で 사용되는場合、「可溶性ActRIIAポリペプチド」という用語は、通常、ActRIIAタンパク質の任意の天然の細胞外ドメインを含む、ActRIIAタンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチド並びにその任意の変異体(突然変異体、断片、及びペプチド模倣形態を含む)を指す。可溶性ActRIIAポリペプチドは、アクチビンに結合することができる;しかしながら、野生

50

型ActRIIAタンパク質は、アクチビンへの結合に関してGDF8/11と比べて顕著な選択性を示さない。天然又は改変ActRIIAタンパク質を第二のアクチビン選択的結合剤とカップリングさせることにより、該タンパク質に、アクチビンに対する特異性の付加を与えることができる。可溶性アクチビン結合ActRIIAポリペプチドの例としては、配列番号2、3、7、12、及び13に示される可溶性ポリペプチドが挙げられる。可溶性アクチビン結合ActRIIAポリペプチド他の例は、ActRIIAタンパク質の細胞外ドメインに加えて、シグナル配列、例えば、ミツパチメリチンリーダー配列(配列番号8)、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)リーダー(配列番号9)、又は天然のActRIIAリーダー(配列番号10)を含む。配列番号13に示されるActRIIA-hFcポリペプチドでは、TPAリーダーが使用されている。

【0063】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAのインヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIAのアクチビン結合ドメインを含むコンジュゲート/融合タンパク質を含む。ある実施態様において、該アクチビン結合ドメインは、リンカー、例えば、ペプチドリリンカーを介して、抗体のFc部分に連結される。任意に、Fcドメインは、Asp-265、リジン322、及びAsn-434などの残基に1以上の突然変異を有する。ある場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asp-265突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べてFcγ受容体に結合する能力が低下している。他の場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asn-434突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメイン比してMHCクラスI関連Fc受容体(FcRN)に結合する能力が増大している。Fcドメインに融合したActRIIAの可溶性細胞外ドメインを含む例示的な融合タンパク質は、配列番号6、7、12、及び13に示されている。

【0064】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIAの細胞外ドメイン、又はその一部を含み、ここで、該ActRIIAインヒビターは、配列番号6、7、12、及び13から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIAの細胞外ドメイン、又はその一部を含み、ここで、該ActRIIAインヒビターは、配列番号6、7、12、及び13から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0065】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAのインヒビターは、ActRIIAの細胞外ドメインの切断形態を含む。切断は、ActRIIAポリペプチドのカルボキシ末端及び/又はアミノ末端にあることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチドの細胞外ドメインと比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25アミノ酸長いものであることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIAポリペプチドの細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のN末端アミノ酸であることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIAポリペプチドの細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のC末端アミノ酸であることができる。例えば、ActRIIAの切断形態としては、アミノ酸20~119; 20~128; 20~129; 20~130; 20~131; 20~132; 20~133; 20~134; 20~131; 21~131; 22~131; 23~131; 24~131; 及び25~131を有するポリペプチドが挙げられ、ここで、該アミノ酸位置は、配列番号1におけるアミノ酸位置を指す。

【0066】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAのインヒビターは、1以上のアミノ酸置換を有するActRIIAの細胞外ドメインを含む。ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAのインヒビターは、

アミノ酸置換も保有するActRIIA細胞外ドメインの切断形態を含む。

【0067】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターは、ヒトActRIIA受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターは、ヒトActRIIA受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターは、ヒトActRIIA受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質であり、ここで、該ヒトActRIIA受容体の切断された細胞外ドメインは、1以上のアミノ酸置換を保有する。

10

【0068】

ActRIIAポリペプチドの機能的に活性のある断片は、例えば、ActRIIAポリペプチドをコードする核酸の対応する断片から組換え産生されたポリペプチドをスクリーニングすることにより得ることができる。さらに、断片を、従来のメリフィールド固相f-Moc又はt-Boc化学などの当技術分野で公知の技術を用いて化学合成することができる。該断片を(組換えによるか又は化学合成によって)産生し、試験して、ActRIIAタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るペプチジル断片を同定することができる。

【0069】

さらに、ActRIIAポリペプチドの機能的に活性のある変異体は、ActRIIAポリペプチドをコードする対応する突然変異核酸から組換え産生された修飾ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。該変異体を産生し、試験して、ActRIIAタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るものを同定することができる。ある実施態様において、ActRIIAポリペプチドの機能的変異体は、配列番号2又は3から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。ある場合には、該機能的変異体は、配列番号2又は3から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%同一なアミノ酸配列を有する。

20

【0070】

機能的変異体は、例えば、ActRIIAポリペプチドの構造を、治療効力、又は安定性(例えば、エキスピボでの保存期間及びインピボでのタンパク質分解に対する抵抗性)を増強するような目的で修飾することにより作製することができる。アクチビン結合を保持するように選択された場合のそのような修飾ActRIIAポリペプチドは、天然のActRIIAポリペプチドの機能的等価物とみなすことができる。修飾ActRIIAポリペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失、又は付加により産生することもできる。例えば、ロイシンとイソロイシンもしくはバリンとの、アスパラギン酸とグルタミン酸との、トレオニンとセリンとの単置換、又はあるアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との同様の置換(例えば、保存的突然変異)によって、得られる分子の生物活性が大きく影響を受けることはないであろうと予想するのは合理的である。保存的置換は、その側鎖において関連があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。ActRIIAポリペプチドのアミノ酸配列の変化によって機能的ホモログが生じるかどうかは、野生型ActRIIAポリペプチドと同様の様式で細胞内の応答を引き起こす変異体ActRIIAポリペプチドの能力を評価することにより容易に決定することができる。

30

40

【0071】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAインヒビターは、該ポリペプチドのグリコシル化を改変することができる1以上の特定の突然変異を有するActRIIAポリペプチドを含むことができる。そのような突然変異は、1以上のグリコシル化部位、例えば、O結合型又はN結合型グリコシル化部位を導入し又は消失させることができる。アスパラギン結合型グリコシル化認識部位は、通常、適当な細胞グリコシル化酵素によって特異的に認識されるアスパラギン-X-トレオニン(又はアスパラギン-X-

50

セリン)(ここで、「X」は、任意のアミノ酸である)というトリペプチド配列を含む。改変は、野生型ActRIIAポリペプチドの配列への1以上のセリンもしくはトレオニン残基の付加、又は該残基による置換によって行うこともできる(0結合型グリコシル化部位の場合)。グリコシル化認識部位の1番目もしくは3番目のアミノ酸位置のうち的一方もしくは両方における種々のアミノ酸置換もしくは欠失(及び/又は2番目の位置におけるアミノ酸欠失)は、修飾されたトリペプチド配列中での非グリコシル化をもたらす。ActRIIAポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ActRIIAポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的カップリングによるものである。使用されるカップリング様式に応じて、糖(複数可)を、(a)アルギニン及びヒスチジン;(b)遊離カルボキシル基;(c)遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基;(d)遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基;(e)芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの芳香族残基;又は(f)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は、引用により本明細書中に組み込まれる、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330号、及びAplin及びWristonの文献(1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。ActRIIAポリペプチド上に存在する1以上の炭水化物部分の除去は、化学的に及び/又は酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は同等の化合物へのActRIIAポリペプチドの暴露を含み得る。この処理は、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除くほとんど又は全ての糖の切断をもたらすが、アミノ酸配列は無傷のまま残す。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddinらの文献(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52及びEdgeらの文献(1981) Anal. Biochem. 118:131によりさらに記載されている。ActRIIAポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraらの文献(1987) Meth. Enzymol. 138:350により記載されているような種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により達成することができる。ActRIIAポリペプチドのアミノ酸配列は、適切な場合、使用される発現系の種類に応じて調整することができるが、それは、哺乳動物、酵母、昆虫、及び植物の細胞が全て、該ペプチドのアミノ酸配列によって影響され得る異なるグリコシル化パターンを導入することができるためである。一般に、ヒトで使用されるActRIIAタンパク質は、適切なグリコシル化を提供する哺乳動物細胞株、例えば、HEK293又はCHO細胞株で発現させることができるが、他の発現系、例えば、他の哺乳動物発現細胞株、グリコシル化酵素が改変されている酵母細胞株、及び昆虫細胞も同様に有用であると考えられる。

10

20

30

40

50

【0072】

本明細書にさらに提供されるのは、突然変異体、特に、ActRIIAポリペプチドのコンビナトリアル突然変異体のセット、及び切断突然変異体を作製する方法であり;コンビナトリアル突然変異体のプールは、機能的変異体配列を同定するのに特に有用である。そのようなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして作用することができるか、又はその代わりに、新規の活性を全て併せ持つ、ActRIIAポリペプチド変異体を作製することであり得る。種々のスクリーニングアッセイは以下に提供されており、そのようなアッセイを用いて、変異体を評価することができる。例えば、ActRIIAポリペプチド変異体を、ActRIIAリガンドに結合する能力、ActRIIAリガンドのActRIIAポリペプチドへの結合を妨げる能力、又はActRIIAリガンドによって引き起こされるシグナル伝達に干渉する能力についてスクリーニングすることができる。

【0073】

天然のActRIIAポリペプチドと比べて選択的な又は全般的に増大した効力を有する、コンビナトリアル由来の変異体を作製することができる。同様に、突然変異生成により、対応する野生型ActRIIAポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生じさせることができる。例えば、改変タンパク質を、タンパク質分解、又は天然のActRIIAポリペプチドの破壊、さもなければ、不活化をもたらす他の細胞プロセスに対してより安定な状態又はあまり安定でない状態にするにすることができる。そのような変異体、及び

それらをコードする遺伝子を用いて、ActRIIAポリペプチドの半減期を調節することにより、ActRIIAポリペプチドレベルを改変することができる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的効果を生じることができ、患者内の組換えActRIIAポリペプチドレベルのより厳しい制御を可能にすることができる。Fc融合タンパク質では、突然変異をリンカー(存在する場合)及び/又はFc部分中で生成させて、タンパク質の半減期を変化させることができる。

【0074】

コンビナトリアルライブラリーは、各々が潜在的ActRIIAポリペプチド配列の少なくとも一部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーによって生成させることができる。例えば、潜在的ActRIIAポリペプチドヌクレオチド配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、又はその代わりに、より大きな融合タンパク質のセット(例えば、ファージディスプレイの場合)として発現可能となるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することができる。

【0075】

潜在的ホモログのライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成装置で実行することができる。その後、合成遺伝子を発現用の適当なベクターに連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である(例えば、Narang, S Aの文献(1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraらの文献(1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton, Amsterdam編: Elsevier pp 273-289; Itakuraらの文献(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraらの文献(1984) Science 198:1056; Ikeらの文献(1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照されたい)。そのような技術は、他のタンパク質の定方向進化において利用されている(例えば、Scottらの文献(1990) Science 249:386-390; Robertsらの文献(1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlinらの文献(1990) Science 249: 404-406; Cwirlaらの文献(1990) PNAS USA 87: 6378-6382;並びに米国特許第5,223,409号、第5,198,346号、及び第5,096,815号を参照されたい)。

【0076】

或いは、他の形態の突然変異生成を用いて、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、ActRIIAポリペプチド変異体を、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成などを用いるスクリーニングによって(Rufらの文献(1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wangらの文献(1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balintらの文献(1993) Gene 137:109-118; Grodbergらの文献(1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashimaらの文献(1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowmanらの文献(1991) Biochemistry 30:10832-10838;及びCunninghamらの文献(1989) Science 244:1081-1085)、リンカースキャニング突然変異生成によって(Gustinらの文献(1993) Virology 193:653-660; Brownらの文献(1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnightらの文献(1982) Science 232:316);飽和突然変異生成によって(Meyersらの文献(1986)Science 232:613); PCR突然変異生成によって(Leungらの文献(1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19);又は化学的突然変異生成などを含むランダム突然変異生成によって(Millerらの文献(1992) 細菌遺伝学の短期講座(A Short Course in Bacterial Genetics)、CSHL Press, Cold Spring Harbor, N. Y.;及びGreenerらの文献(1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)、ライブラリーから作製し、単離することができる。特にコンビナトリアル設定でのリンカースキャニング突然変異生成は、ActRIIAポリペプチドの切断(生物活性)形態を同定する魅力的な方法である。

【0077】

点突然変異及び切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、さらに言うなら、特定の性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするための、広範な技術が当技術分野で公知である。そのような技術は、一般に、ActRIIAポリペプチドのコンビナトリアル突然変異生成によって作製される遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブ

ラリーのスクリーニングに最も広く使用されている技術は、通常、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、適当な細胞を得られたベクターのライブラリーで形質転換すること、及びコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出によって、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的簡単な単離が容易になる条件下で発現させることを含む。好ましいアッセイとしては、アクチビン結合アッセイ及びアクチビン媒介性細胞シグナル伝達アッセイが挙げられる。

【0078】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物のインヒビターで使用されるActRIIAポリペプチドは、該ActRIIAポリペプチドに天然に存在する任意の修飾に加えて、翻訳後修飾をさらに含み得る。そのような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化を挙げることができるが、これらに限定されない。結果として、修飾されたActRIIAポリペプチドは、非アミノ酸要素、例えば、ポリエチレングリコール、脂質、多糖又は単糖、及びホスフェートを含有し得る。ActRIIAポリペプチドの機能性に対するそのような非アミノ酸要素の効果は、当業者に公知の任意の方法によって試験することができる。ActRIIAポリペプチドが、該ActRIIAポリペプチドの新生形態を切断することによって細胞内で産生される場合、翻訳後プロセッシングもまた、該タンパク質の正確なフォールディング及び/又は機能に重要であり得る。様々な細胞(例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、W138、NIH-3T3、又はHEK293)は、そのような翻訳後活性のための特異的細胞装置及び特徴的機構を有しており、該細胞を、ActRIIAポリペプチドの正確な修飾及びプロセッシングを保証するように選択することができる。

10

20

【0079】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物のインヒビターで使用されるActRIIAポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、ActRIIAポリペプチドの少なくとも一部及び1以上の融合ドメインを有する融合タンパク質が含まれる。そのような融合ドメインのよく知られた例としては、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)、又はヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。融合ドメインを、所望の特性を付与するように選択することができる。例えば、いくつかの融合ドメインは、親和性クロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。親和性精製の目的で、親和性クロマトグラフィー用の関連するマトリックス、例えば、グルタチオン、アミラーゼ、及びニッケル又はコバルトコンジュゲート樹脂が使用される。そのようなマトリックスの多くは、「キット」形態で入手可能であり、これには、例えば、(HIS6)融合パートナーと合わせて有用な、Pharmacia GST精製システム及びQIAexpress(商標)システム(Qiagen)がある。別の例として、融合ドメインを、ActRIIAポリペプチドの検出を容易にするように選択することができる。そのような検出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質(例えば、GFP)及び通常、特異的抗体が利用可能な短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体がすぐに利用可能である周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)、及びc-mycタグが挙げられる。場合により、融合ドメインは、例えば、第Xa因子又はトロンビン用のプロテアーゼ切断部位を有し、該部位は、関連するプロテアーゼが融合タンパク質を部分消化し、それにより、組換えタンパク質をそれから遊離させることを可能にする。その後、遊離したタンパク質を、後続のクロマトグラフィー分離によって融合ドメインから単離することができる。ある好ましい実施態様において、ActRIIAポリペプチドを、インビボでActRIIAポリペプチドを安定化するドメイン(「スタビライザー」ドメイン)と融合させる。「安定化する」とは、血清半減期を延長する全てのことを意味し、これは、破壊の減少によるものか、腎臓によるクリアランスの減少によるものか、又は他の薬物動態作用によるものかを問わない。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範なタンパク質に望ましい薬物動態特性を付与することが知られている。同様に、ヒト血清アルブミンへの融合は、望ましい特性を付与することができる。選択され得る他のタイプの融合ドメインとしては、多量体化(例えば、二量体化、四量体化)ド

30

40

50

メイン及び(望ましい場合、追加の生物学的機能、例えば、骨成長又は筋肉成長のさらなる刺激を付与する)機能ドメインが挙げられる。

【0080】

融合タンパク質の様々なエレメントを、所望の機能と一致する任意の方法で配置し得ることが理解される。例えば、ActRIIAポリペプチドを異種ドメインのC末端に配置することができ、又はその代わりに、異種ドメインをActRIIAポリペプチドのC末端に配置することができる。ActRIIAポリペプチドドメイン及び異種ドメインは、融合タンパク質中で隣接している必要がなく、追加のドメイン又はアミノ酸配列を、どちらかのドメインのC末端もしくはN末端、又はこれらのドメインの間に含めることができる。

【0081】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物のインヒビターで使用されるActRIIAポリペプチドは、ActRIIAポリペプチドを安定化することができる1以上の修飾を含むことができる。例えば、そのような修飾は、ActRIIAポリペプチドのインビトロ半減期を向上させるか、ActRIIAポリペプチドの循環半減期を向上させるか、又はActRIIAポリペプチドのタンパク質分解を低下させることができる。そのような安定化修飾としては、融合タンパク質(例えば、ActRIIAポリペプチド及びスタビライザードメインを含む融合タンパク質を含む)、グリコシル化部位の修飾(例えば、ActRIIAポリペプチドへのグリコシル化部位の付加を含む)、並びに炭水化物部分の修飾(例えば、ActRIIAポリペプチドからの炭水化物部分の除去を含む)を挙げることができるが、これらに限定されない。融合タンパク質の場合、ActRIIAポリペプチドを、スタビライザードメイン、例えば、IgG分子(例えば、Fcドメイン)に融合させる。本明細書で使用されるように、「スタビライザードメイン」という用語は、融合タンパク質の場合に見られる融合ドメイン(例えば、Fc)を指すだけでなく、炭水化物部分などの非タンパク質性修飾、又はポリエチレングリコールなどの非タンパク質性ポリマーも含む。

【0082】

ある実施態様において、他のタンパク質から単離されているか、又は別の方法で他のタンパク質を実質的に含まない、単離及び/又は精製された形態のActRIIAポリペプチドを、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。ActRIIAポリペプチドは、通常、組換え核酸からの発現によって産生することができる。

【0083】

ある態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIAポリペプチドは、本明細書に開示される断片、機能的変異体、及び融合タンパク質を含む、ActRIIAポリペプチド(例えば、可溶性ActRIIAポリペプチド)のいずれかをコードする単離された及び/又は組換え核酸を用いて作製される。例えば、配列番号4は、天然のヒトActRIIA前駆ポリペプチドをコードし、一方、配列番号5は、ActRIIAのプロセシングされた細胞外ドメインをコードする。そのような核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。そのような核酸は、DNA又はRNA分子であり得る。これらの核酸を、例えば、ActRIIAポリペプチドを作製する方法で、又は直接的な治療剤として(例えば、遺伝子療法の手法で)使用することができる。

【0084】

ある態様において、ActRIIAポリペプチドをコードする核酸には、配列番号4又は5の変異体である核酸が含まれ得る。変異体ヌクレオチド配列には、1以上のヌクレオチド置換、付加、又は欠失によって異なる配列、例えば、アレル変異体が含まれる。

【0085】

ある実施態様において、ActRIIAポリペプチドをコードする単離された又は組換え核酸配列は、配列番号4又は5と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%同一であり得る。当業者は、配列番号4又は5に相補的な核酸配列、及び配列番号4又は5の変異体を、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生に使用し得ることを理解するであろう。さらなる実施態様において、そのような核酸配列は、単離されたもの、組換え体、及び/もしくは異種ヌクレオチド配列に融合

10

20

30

40

50

されたもの、又はDNAライブラリーに由来するものであることができる。

【0086】

他の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用される核酸は、極めてストリンジェントな条件下で、配列番号4もしくは5に表記されたヌクレオチド配列、配列番号4もしくは5の相補配列、又はそれらの断片にハイブリダイズするヌクレオチド配列も含み得る。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件を変化させることができることを理解するであろう。例えば、ハイブリダイゼーションを、約45 °Cでの6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、次いで、50 °Cでの2.0×SSCの洗浄で実施することができる。例えば、洗浄工程での塩濃度を、50 °Cで約2.0×SSCの低いストリンジェンシーから50 °Cで約0.2×SSCの高いストリンジェンシーまで選択することができる。さらに、洗浄工程での温度を、室温、約22 °Cでの低いストリンジェンシー条件から約65 °Cでの高いストリンジェンシー条件へと上昇させることができる。温度と塩の両方を変化させることができ、又は他の変数を変化させながら、温度もしくは塩濃度を一定に保つことができる。一実施態様において、室温での6×SSC、次に、室温での2×SSCでの洗浄の低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。

10

【0087】

遺伝暗号の縮重のために配列番号4又は5に示される核酸とは異なる単離された核酸も、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用することができる。例えば、いくつかのアミノ酸は、複数のトリプレットによって指定される。同じアミノ酸を特定するコドン、又はシノニム(例えば、CAUとCACは、ヒスチジンについてのシノニムである)は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント突然変異」を生じさせることができる。しかしながら、対象タンパク質のアミノ酸配列の変化を実際にもたらすDNA配列多型が哺乳動物細胞の間に存在すると考えられる。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1以上のヌクレオチドにおけるこれらの変異(variation)(ヌクレオチドの最大約3~5%)が、天然のアレル変異(variation)が原因で、所与の種の個体間に存在し得ることを理解するであろう。

20

【0088】

ある実施態様において、組換え核酸を、発現コンストラクト中の1以上の調節ヌクレオチド配列に機能的に連結することができる。調節ヌクレオチド配列は、通常、発現に使用される宿主細胞に適したものである。種々の宿主細胞について、数多くの種類の適切な発現ベクター及び好適な調節配列が当技術分野で公知である。一般に、該1以上の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダー又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、並びにエンハンサー又はアクチベーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。当技術分野で公知の構成的又は誘導性プロモーターが本明細書で企図される。プロモーターは、天然プロモーター、又は複数のプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターのどちらかであり得る。発現コンストラクトは、細胞内でプラスミドなどのエピソーム上に存在してもよく、又は発現コンストラクトは、染色体に挿入されてもよい。好ましい実施態様において、発現ベクターは、形質転換した宿主細胞の選択を可能にする選択可能マーカー遺伝子を含む。選択可能マーカー遺伝子は当技術分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なる。

30

40

【0089】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用される核酸は、ActRIIAポリペプチドをコードし、少なくとも1つの調節配列に機能的に連結されているヌクレオチド配列を含む発現ベクター中に提供することができる。調節配列は当技術分野で認められており、ActRIIAポリペプチドの発現を導くように選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節配列は、Goeddelの文献;遺伝子発

50

現技術:酵素学の方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology), Academic Press, San Diego, Calif.(1990)に記載されている。例えば、それに機能的に連結されたときDNA配列の発現を制御する多種多様な発現制御配列のいずれかをこれらのベクター中で用いて、ActRIIAポリペプチドをコードするDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40の初期及び後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルス又はサイトメガロウイルス前初期プロモーター、RSVプロモーター、lacシステム、trpシステム、TAC又はTRCシステム、その発現がT7 RNAポリメラーゼによって誘導されるT7プロモーター、ラムダファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖系酵素のプロモーター、酸ホスファターゼ、例えば、Pho5のプロモーター、酵母の α 接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、並びに原核もしくは真核細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、並びにこれらの様々な組合せが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択及び/又は発現が望まれるタンパク質の種類の因子によって決まることが理解されるべきである。さらに、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、及び該ベクターによってコードされる任意の他のタンパク質、例えば、抗生物質マーカの発現も考慮されるべきである。

10

【0090】

本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用される組換え核酸は、クローニングされた遺伝子、又はその一部を、原核細胞、真核細胞(酵母、鳥類、昆虫、もしくは哺乳動物)、又はその両方における発現に好適なベクター中に連結することにより産生することができる。組換えActRIIAポリペプチドの産生用の発現ビヒクルとしては、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、好適なベクターとしては、大腸菌(*E. coli*)などの原核細胞における発現用の、以下のタイプのプラスミド: pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、及びpUC由来プラスミドが挙げられる。

20

【0091】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌におけるベクターの増殖を促進する原核生物配列と、真核細胞で発現される1以上の真核生物転写ユニットの両方を含む。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 及びpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターのうちのいくつかは、原核細胞と真核細胞の両方における複製及び薬物耐性選択を容易にするために、pBR322などの細菌プラスミド由来の配列で修飾されている。或いは、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、又はエプスタイン-バーウイルス(pHEBo、pREP由来、及びp205)などのウイルスの派生物を、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現に使用することができる。(レトロウイルスを含む)他のウイルス発現系の例は、以下の遺伝子療法送達系の記載において見出すことができる。プラスミドの増殖及び宿主生物の形質転換に利用される様々な方法は、当技術分野で周知である。原核細胞と真核細胞の両方に関する他の好適な発現系、及び一般的な組換え手順については、分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning A Laboratory Manual)、第3版、Sambrook、Fritsch、及びManiatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)を参照されたい。いくつかの例において、バキュロウイルス発現系の使用によって組換えポリペプチドを発現させることが望ましい場合がある。そのようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター(例えば、pVL1392、pVL1393、及びpVL941)、pAcUW由来ベクター(例えば、pAcUW1)、並びにpBlueBac由来ベクター(例えば、 β -gal含有pBlueBac III)が挙げられる。

30

40

【0092】

Pcmv-Scriptベクター(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4ベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)、及びpCI-neoベクター(Promega, Madison, Wis.)などのベクターを、CHO細胞内での対象ActRIIAポリペプチドの産生用に設計することができる。明らかになる

50

ように、対象遺伝子コンストラクトを用いて、例えば、精製用の、融合タンパク質又は変異体タンパク質を含む、タンパク質を産生するために、培養で増殖した細胞内での対象ActRIIAポリペプチドの発現を生じさせることができる。

【0093】

1以上の該対象ActRIIAポリペプチドのコード配列(例えば、配列番号4又は5)を含む組換え遺伝子でトランスフェクトされた宿主細胞を、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIAポリペプチドの産生で使用するすることができる。宿主細胞は、任意の原核又は真核細胞であり得る。例えば、本明細書に提供されるActRIIAポリペプチドを、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を用いる)、酵母、又は哺乳動物細胞で発現させることができる。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

10

【0094】

したがって、本明細書に提供されるのは、ActRIIAポリペプチドを産生する方法である。例えば、ActRIIAポリペプチドをコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を、ActRIIAポリペプチドの発現が生じるのを可能にする適当な条件下で培養することができる。ActRIIAポリペプチドを分泌させ、細胞とActRIIAポリペプチドを含む培地の混合物から単離することができる。或いは、ActRIIAポリペプチドを細胞質内又は膜画分に保持し、細胞を回収し、溶解させ、タンパク質を単離することができる。細胞培養用には、宿主細胞、培地、及び他の副産物が含まれる。細胞培養用の好適な培地は、当技術分野で周知である。対象ActRIIAポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、ActRIIAポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体による免疫親和性精製、及びActRIIAポリペプチドに融合したドメインに結合する物質による親和性精製(例えば、プロテインAカラムを用いて、ActRIIA-Fc融合体を精製することができる)を含む、タンパク質を精製するための当技術分野で公知の技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞、又はその両方から単離することができる。好ましい実施態様において、ActRIIAポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質である。一実施態様において、精製は、例えば、以下のもの:プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーのうちの3つ以上を、任意の順序で含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程により達成される。精製は、ウイルス濾過及びバッファー交換で終了させることができる。本明細書で実証されるように、ActRIIA-hFcタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定して98%を超える純度、SDS PAGEにより決定して95%を超える純度に精製された。この精製レベルは、マウスの骨に対する望ましい効果並びにマウス、ラット、及び非ヒト霊長類における許容し得る安全性プロファイルを達成するのに十分であった。

20

30

【0095】

別の実施態様において、組換えActRIIAポリペプチドの所望の部分のN末端におけるポリ-(His)/エンテロキナーゼ切断部位配列などの精製リーダー配列をコードする融合遺伝子は、Ni²⁺金属樹脂を用いる親和性クロマトグラフィーによる発現された融合タンパク質の精製を可能にすることができる。次いで、精製リーダー配列をエンテロキナーゼによる処理によって後から除去し、精製ActRIIAポリペプチドを提供することができる(例えば、Hochuliらの文献(1987) J. Chromatography 411:177;及びJanknechtらの文献、PNAS USA 88:8972を参照されたい)。

40

【0096】

融合遺伝子を作製する技術は周知である。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の接続は、ライゲーションのための平滑末端又は互い違い末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要な場合の付着末端の充填(filling-in)、望ましくない接続を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的ライゲーションを利用する従来技術に従って実施される。別の実施態様において、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む従来技術によって合成することができる。或いは、後からアニーリ

50

ングさせてキメラ遺伝子配列を生成させることができる2つの連続する遺伝子断片間の相補的突出を生じさせるアンカープライマーを用いて、遺伝子断片のPCR増幅を実施することができる(例えば、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、Ausubelら編、John Wiley & Sons: 1992を参照されたい)。

【0097】

ActRIIA-Fc融合タンパク質は、安定にトランスフェクトされたCHO-DUKX BI 1細胞で、配列番号9の組織プラスミノーゲンリーダー配列を用いて、pAID4ベクター(SV40 ori/エンハンサー、CMVプロモーター)から発現させることができる。Fc部分は、配列番号7に示されるヒトIgG1 Fc配列である。ある実施態様において、発現させたとき、含まれるタンパク質は、ActRIIA-Fc融合タンパク質1分子当たり、平均で約1.5~2.5モルのシアル酸を有する。

10

【0098】

ある実施態様において、ActRIIA-Fc融合体の長い血清半減期は、ヒト患者で25~32日であることができる。さらに、CHO細胞で発現される物質は、ヒト293細胞で発現されるActRIIA-hFc融合タンパク質について報告されたものよりも高いアクチビンBリガンドに対する親和性を有することができる(dei Reらの文献、J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35)。さらに、理論によって束縛されるものではないが、TPAリーダー配列の使用は、他のリーダー配列よりも大きな産生をもたらし、天然のリーダーで発現されるActRIIA-Fcとは異なり、極めて純粋なN末端配列を提供することができる。天然のリーダー配列の使用は、各々異なるN末端配列を有する2つの主要な種のActRIIA-Fcを生じさせることができる。

20

【0099】

((b)ActRIIBのインヒビター)

本明細書で使用されるように、「ActRIIB」という用語は、任意の種由来のアクチビン受容体IIB型(ActRIIB)タンパク質のファミリー及び突然変異生成又は他の修飾によってそのようなActRIIBタンパク質から得られた変異体を指す。本明細書中でのActRIIBに対する言及は、該受容体の現在同定されている形態のいずれかが1つに対する言及であると理解される。ActRIIBファミリーのメンバーは、一般に、システインに富む領域を含むリガンド結合細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び予想上のセリン/トレオニンキナーゼ活性を有する細胞質ドメインから構成される、膜貫通タンパク質である。

30

【0100】

本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターとしては、限定するものではないが、アクチビン結合可溶性ActRIIBポリペプチド;アクチビン(特に、 β A又は β Bとも呼ばれる、アクチビンA又はBサブユニット)に結合し、ActRIIB結合を破壊する抗体; ActRIIBに結合し、アクチビン結合を破壊する抗体;アクチビン又はActRIIB結合について選択された非抗体タンパク質;及びFcドメインにコンジュゲートすることができる、アクチビン又はActRIIB結合について選択されたランダム化ペプチドが挙げられる。

【0101】

ある実施態様において、アクチビン又はActRIIB結合活性を有する2以上の異なるタンパク質(又は他の部分)、特に、それぞれI型(例えば、可溶性I型アクチビン受容体)及びII型(例えば、可溶性II型アクチビン受容体)結合部位を遮断するアクチビンバインダーを1つに連結させて、ActRIIBを阻害し、したがって、本明細書に記載の組成物及び方法で実施することができる、二機能性又は多機能性結合分子を作出することができる。ある実施態様において、ActRIIBを阻害するアクチビン-ActRIIBシグナル伝達軸アンタゴニストとしては、核酸アプタマー、小分子、並びに本明細書に記載の組成物及び方法で実施される他の薬剤が挙げられる。

40

【0102】

((i)ActRIIBポリペプチドを含むActRIIBインヒビター)

本明細書で実施されるように、「ActRIIBポリペプチド」という用語は、ActRIIBファミリーメンバーの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体

50

(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドを指す。例えば、ActRIIBポリペプチドには、ActRIIBポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のActRIIB受容体の配列に由来するポリペプチドが含まれる。例えば、ActRIIBポリペプチドは、ActRIIBタンパク質及び/又はアクチビンに結合し、それらの機能を阻害することができる。ActRIIBポリペプチドの例としては、ヒトActRIIB前駆ポリペプチド(配列番号16又は配列番号28)が挙げられる。そのアミノ酸配列が配列番号16又は配列番号28に示されているActRIIB前駆ポリペプチド(すなわち、ヒトActRIIB前駆ポリペプチド)に関して、該ActRIIB前駆ポリペプチドのシグナルペプチドは、アミノ酸1~18に位置し;細胞外ドメインは、アミノ酸19~134に位置し、潜在的N結合型グリコシル化部位は、アミノ酸位置42及び65に位置する。配列番号16のヒトActRIIB前駆ポリペプチドをコードする核酸配列は、配列番号19として開示されている(配列番号19は、アミノ酸位置64に対応するコドンでアラニンを提供するが、その代わりにアミノ酸位置64に対応するコドンでアルギニンを提供するように、当技術分野で公知の方法を用いて、当業者により、容易に修飾されることができる)。配列の説明については、表6を参照されたい。

10

【0103】

別途、具体的に表記されない限り、本明細書に記載の全てのActRIIB関連ポリペプチドに関するアミノ酸の付番は、配列番号16及び配列番号28(これらは、位置64で発現されるアミノ酸だけが異なる)に関するアミノ酸付番に基づく。例えば、ActRIIBポリペプチドがアミノ酸位置79で置換/突然変異を有すると記載されている場合、位置79は、ActRIIBポリペプチドが由来する配列番号16又は配列番号28中の79番目のアミノ酸を指すものと理解されるべきである。同様に、ActRIIBポリペプチドがアミノ酸位置64でアラニン又はアルギニンを有すると記載されている場合、位置64は、ActRIIBポリペプチドが由来する配列番号16又は配列番号28中の64番目のアミノ酸を指すものと理解されるべきである。

20

【0104】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBのインヒビターは、ActRIIBのアクチビン結合ドメインを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施態様において、ActRIIBのアクチビン結合ドメインは、ActRIIBの細胞外ドメイン、又はその部分を含む。具体的な実施態様において、ActRIIBの細胞外ドメイン又はその部分は可溶性である。ActRIIBポリペプチドの例示的な修飾形態は、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許出願公開第20090005308号及び第20100068215号に開示されている。

30

【0105】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドは、可溶性ActRIIBポリペプチドである。「可溶性ActRIIBポリペプチド」という用語は、通常、ActRIIBタンパク質の任意の天然の細胞外ドメインを含む、ActRIIBタンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチド並びにその任意の変異体(突然変異体、断片、及びペプチド模倣形態を含む)を指す。可溶性ActRIIBポリペプチドは、アクチビンに結合することができる;しかしながら、野生型ActRIIBタンパク質は、アクチビンへの結合に関してGDF8/11と比べて顕著な選択性を示さない。ある実施態様において、様々な結合特性を有するActRIIBの改変形態を本明細書に提供される方法でを使用することができる。そのような改変形態は、例えば、その開示が引用により完全に本明細書中に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 2006/012627号及びWO 2010/019261号に開示されている。天然又は改変ActRIIBタンパク質を第二のアクチビン選択的結合剤とカップリングさせることにより、該タンパク質に、アクチビンに対する特異性の付加を与えることができる。例示的な可溶性ActRIIBポリペプチドとしては、ヒトActRIIBポリペプチドの細胞外ドメイン(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43)が挙げられる。

40

【0106】

50

ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号16のアミノ酸64に対応する位置のアラニン(本明細書中、「A64」と呼ばれる)を有する、Hildenらの文献(Blood, 1994, 83(8):2163-70)によって開示されたActRIIB細胞外配列を有するFc融合タンパク質は、アクチビン及びGDF-11に対する比較的低い親和性を保有することが示されている。対照的に、ActRIIB前駆アミノ酸配列の位置64のアルギニン(本明細書中、「R64」と呼ばれる)を有するFc融合タンパク質は、低ナノモル濃度からピコモル濃度の範囲のアクチビン及びGDF-11に対する親和性を有する(例えば、その開示が完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許出願公開第20100068215号を参照されたい)。位置64のアルギニンを有するActRIIB前駆アミノ酸配列は、配列番号28に示されている。したがって、ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法に従って使用されるActRIIBポリペプチドは、(i)ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号16のアミノ酸64に対応する位置のアラニン;又は(ii)ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号28の位置64のアルギニンのどちらかを含み得る。他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法に従って使用されるActRIIBポリペプチドは、ActRIIB前駆アミノ酸配列、すなわち、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸64に対応する位置にアラニンでもアルギニンでもないアミノ酸を含み得る。

10

20

30

40

50

【0107】

ActRIIBの細胞外ドメインのC末端におけるプロリンノットの欠失は、アクチビンに対する受容体の親和性を低下させることが示されている(例えば、Attisanoらの文献、Cell, 1992, 68(1):97-108を参照されたい)。配列番号28のアミノ酸20~119を含むActRIIB-Fc融合タンパク質(すなわち、配列番号32)の「ActRIIB(20-119)-Fc」は、プロリンノット領域及び完全な膜近傍領域を含む、配列番号28のアミノ酸20~134を含むActRIIB-Fc融合タンパク質(すなわち、配列番号31)の「ActRIIB(20-134)-Fc」と比べて、GDF-11及びアクチビンに対する結合が低下している。しかしながら、配列番号28のアミノ酸20~129を含むActRIIB-Fc融合タンパク質の「ActRIIB(20-129)-Fc」は、プロリンノット領域が破壊されているにもかかわらず、ActRIIBの非切断型細胞外ドメインと比べて、同様の、しかし、若干低下した活性を保持している。したがって、配列番号28(又は配列番号16)のアミノ酸134、133、132、131、130、及び129で終結する細胞外ドメインを含むActRIIBポリペプチドは全て活性を有すると考えられるが、アミノ酸134又は133で終結するコンストラクトが最も高い活性を有し得る。同様に、配列番号28のP129及びP130の突然変異がリガンド結合をそれほど減少させないという事実によって示されるように、残基129~134のいずれかでの突然変異は、リガンド結合親和性を大幅に変化させるとは考えられない。したがって、本明細書に記載の方法及び組成物に従って使用されるActRIIBポリペプチドは、配列番号28(又は配列番号16)のアミノ酸109(すなわち、最後のシステイン)で早くも終わり得るが、配列番号28(又は配列番号16)のアミノ酸位置109と119又はその間で終わる形態は、低下したリガンド結合能を有すると考えられる。

【0108】

配列番号16及び配列番号28のアミノ酸29は、ActRIIB前駆体配列中の最初のシステインに相当する。配列番号16もしくは配列番号28のN末端のアミノ酸29、又はこれらのアミノ酸位置の前から始まるActRIIBポリペプチドは、リガンド結合活性を保持していると考えられる。配列番号16又は配列番号28の位置24におけるアラニンからアスパラギンへの突然変異は、リガンド結合にそれほど影響を及ぼすことなく、N結合型グリコシル化配列を導入する。これは、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20~29に対応するシグナル切断ペプチドとシステイン架橋領域の間の領域中の突然変異が良好に許容されることを裏付けるものである。特に、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置20、21、22、23、及び24から始まるActRIIBポリペプチドは活性を保持しており、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置25、26、27、28、及び29から始まるActRIIBポリペプチドも活性を保持すると考えられる。配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置22、23、24、又は25から始まるActRIIBポリペプチドは最も大きい活性を有する。

【0109】

まとめると、本明細書に記載の方法及び組成物に従って使用されるActRIIB前駆タンバ

ク質(すなわち、配列番号16又は配列番号28)の活性部分(すなわち、ActRIIBポリペプチド)は、通常、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸29～109を含み、そのようなActRIIBポリペプチドは、例えば、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸19～29のいずれか1つに対応する残基から始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～134のいずれか1つに対応する位置で終わることができる。本明細書に包含されるActRIIBポリペプチドの具体的な例としては、配列番号16又は配列番号28の19～29、20～29、又は21～29のアミノ酸位置から始まり、配列番号16又は配列番号28の119～134、119～133、又は129～134、129～133のアミノ酸位置で終わるものが挙げられる。本明細書に包含されるActRIIBポリペプチドの他の具体的な例としては、配列番号16又は配列番号28の20～24(又は21～24、又は22～25)のアミノ酸位置から始まり、配列番号16又は配列番号28の109～134(もしくは109～133)、119～134(もしくは119～133)、又は129～134(もしくは129～133)のアミノ酸位置で終わるものが挙げられる。これらの範囲に含まれる変異体ActRIIBポリペプチド、特に、配列番号16又は配列番号28の対応する部分との少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性又は配列相同性を有するものも企図される。

【0110】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBのインヒビターは、ActRIIBの細胞外ドメインの切断形態を含む。切断は、ActRIIBポリペプチドのカルボキシ末端及び/又はアミノ末端にあることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチド細胞外ドメインと比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25アミノ酸長いものであることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチド細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のN末端アミノ酸であることができる。ある実施態様において、切断は、成熟したActRIIBポリペプチド細胞外ドメインの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のC末端アミノ酸であることができる。例えば、ActRIIBの切断形態としては、アミノ酸20～119; 20～128; 20～129; 20～130; 20～131; 20～132; 20～133; 20～134; 20～131; 21～131; 22～131; 23～131; 24～131;及び25～131を有するポリペプチドが挙げられ、ここで、該アミノ酸位置は、配列番号16又は配列番号28におけるアミノ酸位置を指す。

【0111】

ActRIIBのさらなる例示的な切断形態としては、(i)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～29のいずれかのアミノ酸から始まり(任意に、配列番号16又は配列番号28の22～25)、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～134のいずれかで終わるポリペプチド;(ii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～29のアミノ酸のいずれかから始まり(任意に、配列番号16又は配列番号28の22～25から始まり)、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～133のいずれかで終わるポリペプチド;(iii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のアミノ酸のいずれかから始まり(任意に、配列番号16又は配列番号28の22～25から始まり)、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～133のいずれかで終わるポリペプチド;(iv)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸109～134のいずれかで終わるポリペプチド;(v)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～133のいずれかで終わるポリペプチド;(vi)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～134のいずれかで終わるポリペプチド;(vii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128～133のいずれかで終わるポリペプチド;(viii)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20～24のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128～133のいずれかで終わるポリペプチド;(ix)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21～29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118～134のいずれかで終わるポリペプチド;(x)配列番号16又は配列番号28のアミノ酸

20 ~ 29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸118 ~ 133のいずれかで終わるポリペプチド; (xi) 配列番号16又は配列番号28のアミノ酸21 ~ 29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128 ~ 134のいずれかで終わるポリペプチド; 及び (xii) 配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20 ~ 29のいずれかから始まり、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸128 ~ 133のいずれかで終わるポリペプチドが挙げられる。具体的な実施態様において、ActRIIBポリペプチドは、配列番号16もしくは配列番号28のアミノ酸位置25から始まり、配列番号16もしくは配列番号28のアミノ酸位置131で終わるアミノ酸配列を含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。別の具体的な実施態様において、ActRIIBポリペプチドは、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43のアミノ酸配列からなるか、又はそれらから本質的になる。

10

【0112】

本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドはいずれも、ホモ二量体として産生することができる。本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドはいずれも、IgG重鎖由来の定常領域、例えば、Fcドメインを含む異種部分を有する融合タンパク質として製剤化することができる。本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBポリペプチドはいずれも、任意に、配列番号16又は配列番号28に対する1以上の追加のアミノ酸置換、欠失、又は挿入と組み合わせ、配列番号16又は配列番号28の位置79に対応する位置に酸性アミノ酸を含むことができる。

20

【0113】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBのインヒビターは、1以上のアミノ酸置換/突然変異を有するActRIIBの細胞外ドメインを含む。そのようなアミノ酸置換/突然変異は、例えば、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置79のロイシンからアスパラギン酸又はグルタミン酸などの酸性アミノ酸への交換であり得る。例えば、配列番号16又は配列番号28の位置L79をActRIIB細胞外ドメインポリペプチド中で改変して、改変されたアクチビン-ミオスタチン(GDF-11)結合特性を付与することができる。L79A及びL79P突然変異は、アクチビン結合よりも大きい程度にGDF-11結合を低下させる。L79E及びL79D突然変異はGDF-11結合を保持する一方で、大きく低下したアクチビン結合を示す。

30

【0114】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBのインヒビターは、アミノ酸置換、例えば、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置79のロイシンからアスパラギン酸又はグルタミン酸などの酸性アミノ酸への交換も保有するActRIIB細胞外ドメインの切断形態を含む。具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるアミノ酸置換も保有するActRIIBポリペプチドの細胞外ドメインの切断形態は、配列番号23である。切断され及び/又は1以上のアミノ酸置換を保有するActRIIBの形態は、上で論じられているような抗体のFcドメインに連結させることができる。

40

【0115】

ActRIIBポリペプチドの機能的に活性のある断片は、例えば、ActRIIBポリペプチドをコードする核酸の対応する断片から組換え産生されたポリペプチドをスクリーニングすることにより得ることができる。さらに、断片を、従来のメリフィールド固相f-Moc又はt-Boc化学などの当技術分野で公知の技術を用いて化学合成することができる。該断片を(組換えによるか又は化学合成によって)産生し、試験して、ActRIIBタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアнтаゴニスト(インヒビター)として機能し得るペプチジル断片を同定することができる。

50

【0116】

さらに、ActRIIBポリペプチドの機能的に活性のある変異体は、ActRIIBポリペプチドをコードする対応する突然変異核酸から組換え産生された修飾ポリペプチドのライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。該変異体を産生し、試験して、ActR

50

IIBタンパク質又はアクチビンによって媒介されるシグナル伝達のアンタゴニスト(インヒビター)として機能し得るものを同定することができる。ある実施態様において、ActRIIBポリペプチドの機能的変異体は、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、該機能的変異体は、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一なアミノ酸配列を有する。

【0117】

機能的変異体は、例えば、ActRIIBポリペプチドの構造を、治療効力、又は安定性(例えば、エクスピボでの保存期間及びインピボでのタンパク質分解に対する抵抗性)を増強するような目的で修飾することにより作製することができる。アクチビン結合を保持するように選択された場合のそのような修飾ActRIIBポリペプチドは、天然のActRIIBポリペプチドの機能的等価物とみなすことができる。修飾ActRIIBポリペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失、又は付加により産生することもできる。例えば、ロイシンとイソロイシンもしくはバリンとの、アスパラギン酸とグルタミン酸との、トレオニンとセリンとの単独置換、又はあるアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との同様の置換(例えば、保存的突然変異)によって、得られる分子の生物活性が大きく影響を受けることはないであろうと予想するのは合理的である。保存的置換は、その側鎖において関連があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。ActRIIBポリペプチドのアミノ酸配列の変化によって機能的ホモログが生じるかどうかは、野生型ActRIIBポリペプチドと同様の様式で細胞内の応答を引き起こす変異体ActRIIBポリペプチドの能力を評価することにより容易に決定することができる。

【0118】

ActRIIBポリペプチド突然変異体、特に、ActRIIBポリペプチドのコンビナトリアル突然変異体のセット、及び切断突然変異体;コンビナトリアル突然変異体のプールは、機能的変異体配列を同定するのに特に有用であり、本明細書に記載の方法及び組成物で 사용할ことができる。そのようなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして作用することができるか、又はその代わりに、新規の活性を全て併せ持つ、ActRIIBポリペプチド変異体を作製することであり得る。

【0119】

ActRIIBのリガンド結合ポケットは、配列番号16又は配列番号28の残基Y31、N33、N35、L38~T41、E47、E50、Q53~K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78~N83、Y85、R87、A92、及びE94~F101によって規定されることが示されている。これらの位置では、保存的突然変異は許容されるが、K74A突然変異は、R40A、K55A、F82A、及び位置L79での突然変異がそうであるように、良好に許容されと考えられる。R40は、ゼノパス(Xenopus)ではKであり、この位置の塩基性アミノ酸が許容されることを示している。Q53は、ウシActRIIBではR、及びゼノパスActRIIBではKであり、それゆえ、R、K、Q、N、及びHを含むアミノ酸がこの位置で許容される。したがって、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するActRIIBポリペプチドの一般式は、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸29~109を含むが、任意に、配列番号16又は配列番号28の20~24又は22~25の範囲のアミノ酸位置から始まり、配列番号16又は配列番号28の129~134の範囲のアミノ酸位置で終わり、リガンド結合ポケット内に1、2、5、又は15以下の保存的アミノ酸変化を含み、かつリガンド結合ポケット内の配列番号16又は配列番号28のアミノ酸位置40、53、55、74、79、及び/又は82に0、1、又はそれより多くの非保存的变化を含むものである。そのようなActRIIBポリペプチドは、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸29~109の配列との80%、90%、95%、又は99%を超える配列同一性又は配列相同性を保持し得る。ばらつきが特に良好に許容され得る結合ポケットの外側の部位としては、ActRIIBの細胞外ドメインのアミノ末端及びカルボキシ末端、並びに位置42~46及び65~73が挙げられる。配列番号16又は配列番号28の位置65におけるアスパラギンからアラニンへの変化(N65A)は、A64バックグラウンドでのリガ

ンド結合を実際に改善し、したがって、R64バックグラウンドでのリガンド結合に悪影響を及ぼさないと考えられる。この変化は、おそらくは、A64バックグラウンドでのN65におけるグリコシル化を消失させ、したがって、この領域での顕著な変化が許容される可能性が高いことを示している。R64A変化はあまり許容されないが、R64Kは良好に許容され、したがって、Hなどの別の塩基性残基は、位置64で許容され得る。

【0120】

リガンド結合ドメイン内に突然変異を有するActRIIBポリペプチドの具体的な例として、変異体ActRIIBポリペプチドが、アクチビンではなく、GDF8に優先的に結合するように、ActRIIBのリガンド結合ドメインの正電荷を有するアミノ酸残基Asp(D80)を異なるアミノ酸残基に突然変異させることができる。具体的な実施態様において、D80残基を、非荷電アミノ酸残基、負電荷を有する(negative)アミノ酸残基、及び疎水性アミノ酸残基：からなる群から選択されるアミノ酸残基に変化させる。さらなる具体的な例として、疎水性残基L79を酸性アミノ酸のアスパラギン酸又はグルタミン酸に改変して、GDF11結合を保持したまま、アクチビン結合を大きく低下させることができる。当業者によって認識されるように、記載された突然変異、変異体、又は修飾の大部分は、核酸レベルで、又は場合によっては、翻訳後修飾もしくは化学合成により生成させることができる。そのような技術は、当技術分野で周知である。

【0121】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBのインヒビターは、抗体のFc部分に連結したActRIIB受容体の細胞外ドメイン(例えば、アクチビン結合ドメイン)を含むコンジュゲート/融合タンパク質を含む。そのようなコンジュゲート/融合タンパク質は、本明細書に開示されるActRIIBポリペプチドのいずれか(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、もしくは43のいずれか)、当技術分野で公知の任意のActRIIBポリペプチド、又は当技術分野で公知の及び/もしくは本明細書に提供される方法を用いて作製される任意のActRIIBポリペプチドを含み得る。

【0122】

ある実施態様において、該細胞外ドメインは、リンカー、例えば、ペプチドリリンカーを介して、抗体のFc部分に連結される。例示的なリンカーとしては、短いポリペプチド配列、例えば、2~10個、2~5個、2~4個、2~3個のアミノ酸残基(例えば、グリシン残基)、例えば、Gly-Gly-Glyリンカーなどが挙げられる。具体的な実施態様において、該リンカーは、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly(GGG)を含む。別の具体的な実施態様において、該リンカーは、アミノ酸配列Thr-Gly-Gly-Gly(TGGG)を含む。任意に、Fcドメインは、Asp-265、リジン322、及びAsn-434などの残基に1以上の突然変異を有する。ある場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asp-265突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べて、Fcγ受容体に結合する能力が低下している。他の場合には、これらの突然変異のうちの1つ又は複数(例えば、Asn-434突然変異)を有する突然変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べて、MHCクラスI関連Fc-受容体(FcRN)に結合する能力が増大している。Fcドメインに融合したActRIIBの可溶性細胞外ドメインを含む例示的な融合タンパク質は、配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、及び47に示されている。

【0123】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIBの細胞外ドメイン、又はその部分を含み、ここで、該ActRIIBインヒビターは、配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、及び47から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一であるアミノ酸配列を含む。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、抗体のFc部分に連結されたActRIIBの細胞外ドメイン、又はその部分を含み、ここで、該ActRIIBインヒビターは、配列番号20、21、24、25、34、35、38、39、40、41、44、46、及び47から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%

、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0124】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、ヒトActRIIB受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、ヒトActRIIB受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質である。別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、ヒトActRIIB受容体の切断された細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質であり、ここで、該ヒトActRIIB受容体の切断された細胞外ドメインは、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸79に対応するアミノ酸位置にアミノ酸置換を保有する。一実施態様において、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸79に対応するアミノ酸位置でのアミノ酸置換は、ロイシンからアスパラギン酸への置換(すなわち、L79D突然変異)である。

10

【0125】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、配列番号24又は25であり、これらは、ヒトActRIIB受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質を表し、ここで、該ActRIIB細胞外ドメインは、配列番号28のアミノ酸25～131を含み、L79D突然変異を有する。配列番号24のActRIIB-Fc融合タンパク質をコードする核酸配列は、配列番号45に示されている。

20

【0126】

別の具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRIIBインヒビターは、配列番号34又は35であり、これらは、ヒトActRIIB受容体の細胞外ドメインとIgG1のFc部分の融合タンパク質を表し、ここで、該ActRIIB細胞外ドメインは、配列番号16のアミノ酸25～131を含み、L79D突然変異を有する。

【0127】

アスパラギン結合型グリコシル化認識部位は、通常、適当な細胞グリコシル化酵素によって特異的に認識されるアスパラギン-X-トレオニン(又はアスパラギン-X-セリン)(ここで、「X」は、任意のアミノ酸である)というトリペプチド配列を含む。改変は、野生型ActRIIBポリペプチドの配列への1以上のセリンもしくはトレオニン残基の付加、又はそれらによる置換によって行うこともできる(0結合型グリコシル化部位の場合)。グリコシル化認識部位の1番目もしくは3番目のアミノ酸位置のうちの一方もしくは両方における種々のアミノ酸置換もしくは欠失(及び/又は2番目の位置におけるアミノ酸欠失)は、修飾されたトリペプチド配列中での非グリコシル化をもたらす。ActRIIBポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ActRIIBポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的カップリングによるものである。使用されるカップリング様式に応じて、糖(複数可)を、(a)アルギニン及びヒスチジン;(b)遊離カルボキシル基;(c)遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基;(d)遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基;(e)芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの芳香族残基;又は(f)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は、引用により本明細書中に組み込まれる、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330号、並びにAplin及びWristonの文献(1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。ActRIIBポリペプチド上に存在する1以上の炭水化物部分の除去は、化学的に及び/又は酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は同等の化合物へのActRIIBポリペプチドの暴露を含み得る。この処理は、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除くほとんど又は全ての糖の切断をもたらすが、アミノ酸配列は無傷のまま残す。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddinらの文献(1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52によって、及びEdgeらの文献(1981) Anal. Biochem. 118:131によってさらに記載されている。ActRIIBポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraらの文献(1987) Meth. Enzymol. 138:350により記載されている

30

40

50

ような種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により達成することができる。ActRIIBポリペプチドのアミノ酸配列は、適切な場合、使用される発現系の種類に応じて調整することができるが、それは、哺乳動物、酵母、昆虫、及び植物の細胞が全て、該ペプチドのアミノ酸配列によって影響され得る異なるグリコシル化パターンを導入することができるためである。一般に、ヒトで使用されるActRIIBタンパク質は、適切なグリコシル化を提供する哺乳動物細胞株、例えば、HEK293又はCHO細胞株で発現されるが、他の発現系、例えば、他の哺乳動物発現細胞株、グリコシル化酵素が改変されている酵母細胞株、及び昆虫細胞も同様に有用であると考えられる。

【0128】

具体的な実施態様において、ActRIIB(R64)-Fc形態と比べてActRIIB-Fc融合タンパク質の血清半減期を延長するさらなるN結合型グリコシル化部位(N-X-S/T)の付加を含む突然変異ActRIIBポリペプチドを本明細書に記載の方法及び組成物で使用する。具体的な実施態様において、配列番号16又は配列番号28の位置24におけるアスパラギン(A24N)の導入は、より長い半減期を付与するNXT配列の生成をもたらす。他のNX(T/S)配列は、42~44(NQS)及び65~67(NSS)に見出すことができるが、後者は、位置64のRでは(すなわち、R64ポリペプチド中では)効率的にグリコシル化することができない。N-X-S/T配列は、通常、上で詳述されている、ActRIIBのリガンド結合ポケットの外側の位置で導入することができる。非内在性N-X-S/T配列の導入のための特に好ましい部位としては、配列番号16又は配列番号28のアミノ酸20~29、20~24、22~25、109~134、120~134、又は129~134が挙げられる。N-X-S/T配列は、ActRIIB配列とFc又は他の融合体成分との間のリンカーに導入することもできる。そのような部位は、既存のSもしくはTに対して正しい位置にNを導入することによるか、又は既存のNに対応する位置にSもしくはTを導入することにより、最小限の労力で導入することができる。したがって、N結合型グリコシル化部位を生成させる望ましい改変は：A24N、R64N、S67N(おそらくは、N65A改変と併存する)、E106N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S、及びR112Tである(これらの位置に対応する全てのアミノ酸位置について、それらを配列番号16又は配列番号28に見出すことができる)。グリコシル化によって保護が生じるので、グリコシル化されると予測される任意のSを、免疫原性部位を生成させることなく、Tに改変することができる。同様に、グリコシル化されると予測される任意のTをSに改変することができる。したがって、改変S67T及びS44Tは本明細書に包含される。同様に、A24N変異体において、S26T改変を使用することができる。したがって、ActRIIBポリペプチドは、1以上の追加の非内在性N結合型グリコシル化コンセンサス配列を含むことができる。

【0129】

種々のスクリーニングアッセイを用いて、ActRIIBポリペプチド変異体を評価することができる。例えば、ActRIIBポリペプチド変異体を、ActRIIBリガンドに結合する能力、ActRIIBリガンドのActRIIBポリペプチドへの結合を妨げる能力、又はActRIIBリガンドによって生じるシグナル伝達に干渉する能力についてスクリーニングすることができる。ActRIIBポリペプチド又はその変異体の活性を、細胞ベースのアッセイ又はインビボアッセイで試験することもできる。

【0130】

天然のActRIIBポリペプチドと比べて選択的な又は全般的に増大した効力を有する、コンピナトリアル由来の変異体を作製することができる。同様に、突然変異生成により、対応する野生型ActRIIBポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する変異体を生じさせることができる。例えば、改変タンパク質を、タンパク質分解、又は天然のActRIIBポリペプチドの破壊、さもなければ、不活化をもたらす他の細胞プロセスに対してより安定な状態又はあまり安定でない状態にするにすることができる。そのような変異体、及びそれらをコードする遺伝子を用いて、ActRIIBポリペプチドの半減期を調節することにより、ActRIIBポリペプチドレベルを改変することができる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的効果を生じることができ、患者内の組換えActRIIBポリペプチドレベルのより厳しい制御を可能にすることができる。Fc融合タンパク質では、突然変異をリンカ

ー(存在する場合)及び/又はFc部分中で生成させて、タンパク質の半減期を改変することができる。

【0131】

コンビナトリアルライブラリーは、各々の潜在的ActRIIBポリペプチド配列の少なくとも一部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーによって生成させることができる。例えば、潜在的ActRIIBポリペプチドヌクレオチド配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、又はその代わりに、より大きな融合タンパク質のセット(例えば、ファージディスプレイの場合)として発現可能となるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結して遺伝子配列にすることができる。

【0132】

潜在的ホモログのライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる多くの方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成装置で実行することができる。その後、合成遺伝子を発現用の適当なベクターに連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である(例えば、Narang, S Aの文献(1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraらの文献(1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, AG Walton, Amsterdam編: Elsevier pp 273-289; Itakuraらの文献(1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraらの文献(1984) Science 198:1056; Ikeらの文献(1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照されたい)。そのような技術は、他のタンパク質の定方向進化において利用されている(例えば、Scottらの文献(1990) Science 249:386-390; Robertsらの文献(1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlinらの文献(1990) Science 249: 404-406; Cwirlaらの文献(1990) PNAS USA 87: 6378-6382;並びに米国特許第5,223,409号、第5,198,346号、及び第5,096,815号を参照されたい)。

【0133】

或いは、他の形態の突然変異生成を用いて、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、ActRIIBポリペプチド変異体を、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成などを用いるスクリーニングにより(Rufらの文献(1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wangらの文献(1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balintらの文献(1993) Gene 137:109-118; Grodbergらの文献(1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashimaらの文献(1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowmanらの文献(1991) Biochemistry 30:10832-10838;及びCunninghamらの文献(1989) Science 244:1081-1085)、リンカースキャニング突然変異生成により(Gustinらの文献(1993) Virology 193:653-660; Brownらの文献(1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnightらの文献(1982) Science 232:316);飽和突然変異生成により(Meyersらの文献(1986)Science 232:613); PCR突然変異生成により(Leungらの文献(1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19);又は化学的突然変異生成などを含むランダム突然変異生成により(Millerらの文献(1992) 細菌生物学の短期講座(A Short Course in Bacterial Genetics)、CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;及びGreenerらの文献(1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)、ライブラリーから作製し、単離することができる。特にコンビナトリアル設定でのリンカースキャニング突然変異生成は、ActRIIBポリペプチドの切断(生物活性)形態を同定する魅力的な方法である。

【0134】

点突然変異及び切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、さらに言うなら、特定の性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするための、広範な技術が当技術分野で公知である。そのような技術は、一般に、ActRIIBポリペプチドのコンビナトリアル突然変異生成によって作製される遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーのスクリーニングに最も広く使用されている技術は、通常、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、適当な細胞を得られたベクターのライブラリーで形質転換すること、及びコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出によって、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの比較的簡単な単離が容易になる条件下で発現させることを含む。好ましいアッセイとしては、アクチビン結合アッセイ及

びアクチビン媒介性細胞シグナル伝達アッセイが挙げられる。

【0135】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドは、ActRIIBポリペプチドに天然に存在する任意の修飾に加えて、翻訳後修飾をさらに含み得る。そのような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。結果として、修飾されたActRIIBポリペプチドは、非アミノ酸要素、例えば、ポリエチレングリコール、脂質、多糖又は単糖、及びホスフェートを含有し得る。ActRIIBポリペプチドの機能性に対するそのような非アミノ酸要素の効果は、当業者に公知の任意の方法によって試験することができる。ActRIIBポリペプチドが、ActRIIBポリペプチドの新生形態を切断することによって細胞内で産生される場合、翻訳後プロセッシングもまた、タンパク質の正確なフォールディング及び/又は機能に重要であり得る。様々な細胞(例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、W138、NIH-3T3、又はHEK293)は、そのような翻訳後活性のための特異的細胞装置及び特徴的機構を有しており、該細胞を、ActRIIBポリペプチドの正確な修飾及びプロセッシングを保証するために選択することができる。

10

【0136】

ある態様において、ActRIIBポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、ActRIIBポリペプチドの少なくとも一部及び1以上の融合ドメインを有する融合タンパク質が含まれる。そのような融合ドメインのよく知られた例としては、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)、又はヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。融合ドメインを、所望の特性を付与するように選択することができる。例えば、いくつかの融合ドメインは、親和性クロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。親和性精製の目的で、親和性クロマトグラフィー用の関連するマトリックス、例えば、グルタチオン、アミラーゼ、及びニッケル又はコバルトコンジュゲート樹脂が使用される。そのようなマトリックスの多くは、「キット」形態で入手可能であり、これには、例えば、(HIS6)融合パートナーと合わせて有用な、Pharmacia GST精製システム及びQIAexpress(商標)システム(Qiagen)がある。別の例として、融合ドメインを、ActRIIBポリペプチドの検出を容易にするように選択することができる。そのような検出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質(例えば、GFP)及び通常、特異的抗体が利用可能な短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体がすぐに利用可能である周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)、及びc-mycタグが挙げられる。場合により、融合ドメインは、例えば、第Xa因子又はトロンピン用のプロテアーゼ切断部位、を有し、該部位は、関連するプロテアーゼが融合タンパク質を部分消化し、それにより、組換えタンパク質をそれから遊離させることを可能にする。その後、遊離したタンパク質を、後続のクロマトグラフィー分離によって融合ドメインから単離することができる。ある好ましい実施態様において、ActRIIBポリペプチドを、インビボでActRIIBポリペプチドを安定化するドメイン(「スタビライザー」ドメイン)と融合させる。「安定化する」とは、血清半減期を延長する全てのことを意味し、これは、破壊の減少によるものか、腎臓によるクリアランスの減少によるものか、又は他の薬物動態作用によるものかを問わない。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範なタンパク質に望ましい薬物動態特性を付与することが知られている。同様に、ヒト血清アルブミンへの融合は、望ましい特性を付与することができる。選択され得る他のタイプの融合ドメインとしては、多量体化(例えば、二量体化、四量体化)ドメイン及び(望ましい場合、追加の生物学的機能、例えば、骨成長又は筋肉成長のさらなる刺激を付与する)機能ドメインが挙げられる。

20

30

40

【0137】

融合タンパク質の様々なエレメントを、所望の機能と一致する任意の方法で配置し得ることが理解される。例えば、ActRIIBポリペプチドを異種ドメインのC末端に配置することができ、又はその代わりに、異種ドメインをActRIIBポリペプチドのC末端に配置すること

50

ができる。ActRIIBポリペプチドドメイン及び異種ドメインは、融合タンパク質中で隣接している必要がなく、追加のドメイン又はアミノ酸配列を、どちらかのドメインのC末端もしくはN末端、又はこれらのドメインの間に含めることができる。

【0138】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドは、ActRIIBポリペプチドを安定化することができる1以上の修飾を含む。例えば、そのような修飾は、ActRIIBポリペプチドのインビトロ半減期を向上させるか、ActRIIBポリペプチドの循環半減期を向上させるか、又はActRIIBポリペプチドのタンパク質分解を低下させる。そのような安定化修飾としては、融合タンパク質(例えば、ActRIIBポリペプチド及びスタビライザードメインを含む融合タンパク質を含む)、グリコシル化部位の修飾(例えば、ActRIIBポリペプチドへのグリコシル化部位の付加を含む)、並びに炭水化物部分の修飾(例えば、ActRIIBポリペプチドからの炭水化物部分の除去を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。融合タンパク質の場合、ActRIIBポリペプチドを、スタビライザードメイン、例えば、IgG分子(例えば、Fcドメイン)に融合させる。本明細書で 사용되는ように、「スタビライザードメイン」という用語は、融合タンパク質の場合に見られる融合ドメイン(例えば、Fc)を指すだけでなく、炭水化物部分などの非タンパク質性修飾、又はポリエチレングリコールなどの非タンパク質性ポリマーも含む。

【0139】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物は、単離及び/又は精製されたActRIIBポリペプチドを使用する、すなわち、他のタンパク質から単離されているか、又は別の方法で他のタンパク質を実質的に含まない、ActRIIBポリペプチドを本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。ActRIIBポリペプチドは、通常、組換え核酸からの発現によって産生される。

【0140】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドは、本明細書に開示される断片、機能的変異体、及び融合タンパク質を含む、単離された及び/又は組換え核酸によりコードされる。例えば、配列番号19は、天然のヒトActRIIB前駆ポリペプチドをコードする。対象核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。そのような核酸は、DNA又はRNA分子であり得る。これらの核酸を、例えば、ActRIIBポリペプチドを作製する方法で、又は直接的な治療剤として(例えば、遺伝子療法の手法で)使用することができる。

【0141】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる核酸は、配列番号19の変異体並びに可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)の変異体である核酸を含むことがさらに理解される。変異体ヌクレオチド配列には、1以上のヌクレオチド置換、付加、又は欠失によって異なる配列、例えば、アレル変異体が含まれる。

【0142】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる単離された又は組換え核酸配列は、配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)と少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%同一である。当業者は、配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)に相補的な核酸配列、並びに配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)の変異体を、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができることを理解するであろう。さらなる実施態様において、該核酸配列は、単離されたもの、

組換え体、及び/もしくは異種ヌクレオチド配列と融合したもの、又はDNAライブラリー中のものであることができる。

【0143】

他の実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる核酸は、配列番号19に表記されるヌクレオチド配列もしくは可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)、配列番号19もしくは可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)の相補的配列、又はそれらの断片に高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシー条件を変化させることができることを理解するであろう。例えば、ハイブリダイゼーションを、約45 °Cでの6.0×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、次いで、50 °Cでの2.0×SSCの洗浄で実施することができる。例えば、洗浄工程での塩濃度を、50 °Cで約2.0×SSCの低いストリンジェンシーから50 °Cで約0.2×SSCの高いストリンジェンシーまで選択することができる。さらに、洗浄工程での温度を、室温、約22 °Cでの低いストリンジェンシー条件から約65 °Cでの高いストリンジェンシー条件へと上昇させることができる。温度と塩の両方を変化させることができ、又は他の変数を変化させながら、温度もしくは塩濃度を一定に保つことができる。一実施態様において、室温での6×SSC、次に、室温での2×SSCでの洗浄の低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を、本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。

10

20

【0144】

遺伝暗号の縮重のために配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸)に示される核酸とは異なる単離された核酸を用いて、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生することもできる。例えば、いくつかのアミノ酸は、複数のトリプレットによって指定される。同じアミノ酸を特定するコドン、又はシノニム(例えば、CAUとCACは、ヒスチジンについてのシノニムである)は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレント突然変異」を生じさせることができる。しかしながら、対象タンパク質のアミノ酸配列の変化を実際にもたらすDNA配列多型が哺乳動物細胞の間に存在すると考えられる。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1以上のヌクレオチドにおけるこれらの変異(variation)(ヌクレオチドの最大約3~5%)が、天然のアレル変異(variation)が原因で、所与の種の個体間に存在し得ることを理解するであろう。ありとあらゆるそのようなヌクレオチド変異(variation)及び結果として生じるアミノ酸多型を本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。

30

【0145】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる組換え核酸を、発現コンストラクト中の1以上の調節ヌクレオチド配列に機能的に連結することができる。調節ヌクレオチド配列は、通常、発現に使用される宿主細胞に適したものである。種々の宿主細胞について、数多くの種類の適切な発現ベクター及び好適な調節配列が当技術分野で公知である。一般に、該1以上の調節ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダー又はシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、並びにエンハンサー又はアクチベーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。当技術分野で公知の構成的又は誘導性プロモーターを本明細書に記載の方法及び組成物とともに使用することができる。プロモーターは、天然プロモーター、又は複数のプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターのどちらかであり得る。発現コンストラクトは、細胞内でプラスミドなどのエピソーム上に存在してもよく、又は発現コンストラクトは、染色体に挿入されてもよい。好ましい実施態様において、発現ベクターは、

40

50

形質転換した宿主細胞の選択を可能にする選択可能マーカー遺伝子を含む。選択可能マーカー遺伝子は当技術分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なる。

【0146】

ある態様において、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生するために使用することができる核酸は、ActRIIBポリペプチドをコードし、少なくとも1つの調節配列に機能的に連結されているヌクレオチド配列を含む発現ベクター中に提供される。調節配列は当技術分野で認められており、ActRIIBポリペプチドの発現を導くように選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節配列は、Goeddelの文献;遺伝子発現技術:酵素学の方法(Gene Expression Technology: Methods in Enzymology), Academic Press, San Diego, Calif.(1990)に記載されている。例えば、それに機能的に連結されたときDNA配列の発現を制御する多種多様な発現制御配列のいずれかをこれらのベクター中で用いて、ActRIIBポリペプチドをコードするDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40の初期及び後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルス又はサイトメガロウイルス前初期プロモーター、RSVプロモーター、lacシステム、trpシステム、TAC又はTRCシステム、その発現がT7 RNAポリメラーゼによって誘導されるT7プロモーター、ラムダファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖系酵素のプロモーター、酸ホスファターゼ、例えば、Pho5のプロモーター、酵母の α 接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、並びに原核もしくは真核細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、並びにこれらの様々な組合せが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択及び/又は発現が望まれるタンパク質の種類のような因子によって決まることが理解されるべきである。さらに、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、及び該ベクターによってコードされる任意の他のタンパク質、例えば、抗生物質マーカーの発現も考慮されるべきである。

10

20

30

40

50

【0147】

組換え核酸は、クローニングされた遺伝子、又はその一部を、原核細胞、真核細胞(酵母、鳥類、昆虫、もしくは哺乳動物)、又はその両方における発現に好適なベクター中に連結することにより産生することができる。組換えActRIIBポリペプチドの産生用の発現ビヒクルとしては、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、好適なベクターとしては、大腸菌(*E. coli*)などの原核細胞における発現用の、以下のタイプのプラスミド: pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、及びpUC由来プラスミドが挙げられる。

【0148】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌におけるベクターの増殖を促進する原核生物配列と、真核細胞で発現される1以上の真核生物転写ユニットの両方を含む。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 及びpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターのうちのいくつかは、原核細胞と真核細胞の両方における複製及び薬物耐性選択を容易にするために、pBR322などの細菌プラスミド由来の配列で修飾されている。或いは、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、又はエプスタイン-バーウイルス(pHEBo、pREP由来、及びp205)などのウイルスの派生物を、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現に使用することができる。(レトロウイルスを含む)他のウイルス発現系の例は、以下の遺伝子療法送達系の記載において見出すことができる。プラスミドの増殖及び宿主生物の形質転換に利用される様々な方法は、当技術分野で周知である。原核細胞と真核細胞の両方に関する他の好適な発現系、及び一般的な組換え手順については、分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning A Laboratory Manual)、第3版、Sambrook、Fritsch、及びManiatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)を参照されたい。いくつかの例において、バキュロウイルス発現系の使用によって組換え

ポリペプチドを発現させることが望ましい場合がある。そのようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来ベクター(例えば、pVL1392、pVL1393、及びpVL941)、pAcUW由来ベクター(例えば、pAcUW1)、並びにpBlueBac由来ベクター(例えば、 β -gal含有pBlueBac III)が挙げられる。

【0149】

一実施態様において、Pcmv-Scriptベクター(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4ベクター(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)、及びpCI-neoベクター(Promega, Madison, Wis.)などのベクターを、CHO細胞内での本明細書に記載の方法及び組成物で使用されるActRIIBポリペプチドの産生用に設計することができる。明らかになるように、対象遺伝子コンストラクトを用いて、例えば、精製用の、融合タンパク質又は変異体タンパク質を含む、タンパク質を産生するために、培養で増殖した細胞内での対象ActRIIBポリペプチドの発現を生じさせることができる。

【0150】

1以上の該対象ActRIIBポリペプチドのコード配列(例えば、配列番号19又は可溶性ActRIIBポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、配列番号17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42、及び43をコードする核酸))を含む組換え遺伝子でトランスフェクトされた宿主細胞を用いて、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するのに好適なActRIIBポリペプチドを産生することができる。宿主細胞は、任意の原核又は真核細胞であり得る。例えば、ActRIIBポリペプチドを、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を用いる)、酵母、又は哺乳動物細胞で発現させることができる。他の好適な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0151】

したがって、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の方法及び組成物で使用するActRIIBポリペプチドを産生する方法である。例えば、ActRIIBポリペプチドをコードする発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を、ActRIIBポリペプチドの発現が生じるのを可能にする適当な条件下で培養することができる。ActRIIBポリペプチドを分泌させ、細胞とActRIIBポリペプチドを含む培地の混合物から単離することができる。或いは、ActRIIBポリペプチドを細胞質内又は膜画分に保持し、細胞を回収し、溶解させ、タンパク質を単離することができる。細胞培養物には、宿主細胞、培地、及び他の副産物が含まれる。細胞培養用の好適な培地は、当技術分野で周知である。対象ActRIIBポリペプチドを、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、ActRIIBポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体による免疫親和性精製、及びActRIIBポリペプチドに融合しているドメインに結合する物質による親和性精製(例えば、プロテインAカラムを用いて、ActRIIB-Fc融合体を精製することができる)を含む、タンパク質を精製するための当技術分野で公知の技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞、又はその両方から単離することができる。好ましい実施態様において、ActRIIBポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質である。好ましい実施態様において、精製は、例えば、以下のもの:プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及び陽イオン交換クロマトグラフィーのうちの3つ以上を、任意の順序で含む、一連のカラムクロマトグラフィー工程により達成される。精製は、ウイルス濾過及びバッファ交換で終了させることができる。本明細書で実証されるように、ActRIIB-hFcタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにより決定して98%を超える純度、SDS PAGEにより決定して95%を超える純度に精製された。この精製レベルは、マウスの骨に対する望ましい効果並びにマウス、ラット、及び非ヒト霊長類における許容し得る安全性プロファイルを達成するのに十分であった。

【0152】

別の実施態様において、組換えActRIIBポリペプチドの所望の部分のN末端におけるポリ-(His)/エンテロキナーゼ切断部位配列などの精製リーダー配列をコードする融合遺伝子は、Ni²⁺金属樹脂を用いる親和性クロマトグラフィーによる発現された融合タンパク質の

精製を可能にすることができる。次いで、精製リーダー配列をエンテロキナーゼによる処理によって後から除去し、精製ActRIIBポリペプチドを提供することができる(例えば、Hochuliらの文献(1987) J. Chromatography 411:177;及びJanknechtらの文献、PNAS USA 88:8972を参照されたい)。

【0153】

融合遺伝子を作製する技術は周知である。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の接続は、ライゲーションのための平滑末端又は互い違い末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要な場合の付着末端の充填(filling-in)、望ましくない接続を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的ライゲーションを利用する従来技術に従って実施される。別の実施態様において、融合遺伝子は、自動化DNA合成装置を含む従来技術によって合成することができる。或いは、後からアニーリングさせてキメラ遺伝子配列を生成させることができる2つの連続する遺伝子断片間の相補的突出を生じさせるアンカープライマーを用いて、遺伝子断片のPCR増幅を実施することができる(例えば、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、Ausubelら編、John Wiley & Sons: 1992を参照されたい)。

【0154】

ActRIIB-Fc融合タンパク質は、安定にトランスフェクトされたCHO-DUKX BI 1細胞で、配列番号8の組織プラスミノゲンリーダー配列を用いて、pAID4ベクター(SV40 ori/エンハンサー、CMVプロモーター)から発現させることができる。Fc部分は、配列番号7に示されるヒトIgG1 Fc配列を含むことができる。ある実施態様において、発現させたとき、含まれるタンパク質は、ActRIIB-Fc融合タンパク質1分子当たり、平均で約1.5~2.5モルのシアル酸を有する。

【0155】

ある実施態様において、ActRIIB-Fc融合体の長い血清半減期は、ヒト患者で25~32日であることができる。さらに、CHO細胞で発現される物質は、ヒト293細胞で発現されるActRIIB-hFc融合タンパク質について報告されたものよりも高いアクチビンBリガンドに対する親和性を有することができる(dei Reらの文献、J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35)。さらに、理論によって束縛されるものではないが、TPAリーダー配列の使用は、他のリーダー配列よりも大きな産生をもたらし、天然のリーダーで発現されるActRIIB-Fcとは異なり、極めて純粋なN末端配列を提供することができる。天然のリーダー配列の使用は、各々異なるN末端配列を有する2つの主要な種のActRIIB-Fcを生じさせることができる。

【0156】

((ii)他のActRII受容体インヒビター)

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRII受容体のインヒビターは、核酸化合物である。

【0157】

ActRII受容体を阻害する核酸化合物のカテゴリーの例としては、アンチセンス核酸、siRNA又はRNAiコンストラクト、及び触媒核酸コンストラクトが挙げられる。核酸化合物は、一本鎖又は二本鎖であり得る。二本鎖化合物は、鎖のどちらか一方が一本鎖である突出又は非相補性領域を含むこともできる。一本鎖化合物は、自己相補性領域を含むことができ、これは、該化合物が、二本鎖らせん構造の領域を含む、いわゆる「ヘアピン」又は「ステムループ」構造を形成し得ることを意味する。

【0158】

ある実施態様において、ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、1000以下、500以下、250以下、100以下、又は50、35、30、25、22、20、もしくは18以下のヌクレオチドの全長ActRII受容体核酸配列又はアクチビン核酸配列(例えば、 β A又は β Bとも呼ばれる、アクチビンA又はアクチビンBサブユニットの核酸配列)からなる領域に相補的であるヌクレオチド配列を含み得る。具体的な実施態様において、相補性領域は、少なくとも8ヌクレオチド、任意に、少なくとも10又は少なくとも15ヌクレオチド、任意に、15~25ヌクレオチド

である。相補性領域は、標的転写物のイントロン、コード配列、又は非コード配列、例えば、コード配列部分に含まれ得る。一般に、ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、約8～約500ヌクレオチド又は塩基対長の長さを有し、任意に、長さは、約14～約50ヌクレオチドである。ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、DNA(特にアンチセンスとして使用される)、RNA、又はRNA:DNAハイブリッドであり得る。どの1つの鎖も、DNAとRNAの混合物、及びDNA又はRNAのどちらかに容易に分類することができない修飾形態を含み得る。同様に、二本鎖核酸化合物は、DNA:DNA、DNA:RNA、又はRNA:RNAであり得、どの1つの鎖も、DNAとRNAの混合物、及びDNA又はRNAのどちらかに容易に分類することができない修飾形態も含み得る。

【0159】

ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、骨格(ヌクレオチド間結合を含む、天然の核酸の糖-リン酸部分)又は塩基部分(天然の核酸のプリンもしくはピリミジン部分)に対する1以上の修飾を含む、種々の修飾のいずれかを含み得る。ある実施態様において、アンチセンス核酸化合物は、約15～約30ヌクレオチドの長さを有し、多くの場合、特定の特徴、例えば、血清中での安定性、細胞内での安定性、又は例えば、経口送達化合物の場合は胃、及び吸入化合物の場合は肺などの、該化合物が送達される可能性が高い場所での安定性を改善する1以上の修飾を含む。RNAiコンストラクトの場合、標的転写物に相補的な鎖は、通常、RNA又はその修飾物である。他の鎖は、RNA、DNA、又は任意の他の変形物であり得る。二本鎖又は一本鎖「ヘアピン」RNAiコンストラクトの二重鎖部分は、ある実施態様において、それがDicer基質としての役割を果たす限り、18～40ヌクレオチド長、及び任意に、約21～23ヌクレオチド長の長さを有する。触媒的又は酵素的核酸は、リボザイム又はDNA酵素であり得、修飾形態も含み得る。ある実施態様において、ActRII受容体を阻害する核酸化合物は、生理的条件下で及び非センス又はセンス対照がほとんど又は全く効果がない濃度で、その標的の発現を約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、又はそれより大きく阻害し得る。核酸化合物の効果を試験するための濃度としては、1、5、10マイクロモル濃度、又はそれを上回る濃度が挙げられる。

【0160】

他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRII受容体のインヒビターは、抗体である。そのような抗体としては、アクチビン(特に、 βA 又は βB とも呼ばれる、アクチビンA又はBサブユニット)に結合し、ActRII受容体結合を破壊する抗体;及びActRII受容体ポリペプチド(例えば、可溶性ActRIIA又は可溶性ActRIIBポリペプチド)に結合し、アクチビン結合を破壊する抗体が挙げられる。

【0161】

ActRII受容体ポリペプチド又はアクチビンポリペプチドに由来する免疫原を使用することにより、抗タンパク質/抗ペプチド抗血清又はモノクローナル抗体を標準的なプロトコルによって作製することができる(例えば、抗体:実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)、Harlow及びLane編(Cold Spring Harbor Press: 1988)を参照されたい)。哺乳動物、例えば、マウス、ハムスター、又はウサギを、ActRII受容体ポリペプチドの免疫原性形態、抗体応答を誘発することができる抗原性断片、又は融合タンパク質で免疫することができる。タンパク質又はペプチドに免疫原性を付与する技術には、担体へのコンジュゲーション又は当技術分野で周知の他の技術が含まれる。ActRII受容体又はアクチビンポリペプチドの免疫原性部分は、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫の進捗は、血漿又は血清中の抗体力価の検出によりモニタリングすることができる。標準的なELISA又は他の免疫アッセイを抗原としての免疫原とともに用いて、抗体のレベルを評価することができる。

【0162】

動物をActRII受容体ポリペプチドの抗原性調製物で免疫した後、抗血清を得ることができ、望ましい場合、ポリクローナル抗体を血清から単離することができる。モノクローナル抗体を産生するために、抗体産生細胞(リンパ球)を免疫動物から回収し、標準的な体細胞融合法によって骨髓腫細胞などの不死化細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を得る

ことができる。そのような技術は当技術分野で周知であり、例えば、ハイブリドーマ技術(Kohler及びMilstein(1975) Nature, 256: 495-497により最初に開発されたもの)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbarらの文献(1983) Immunology Today, 4: 72)、及びヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleらの文献(1985) モノクローナル抗体及び癌療法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)、Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)を含む。ハイブリドーマ細胞を、ActRII受容体ポリペプチドと特異的に反応する抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を、そのようなハイブリドーマ細胞を含む培養物から単離することができる。

【0163】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、その断片を含むことが意図され、該断片もまた、対象ポリペプチドと特異的に反応する。抗体を従来の技術を用いて断片化し、該断片を、全抗体について上で記載されているのと同じ方法で、有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、F(ab)2断片は、抗体をペプシンで処理することにより作製することができる。得られたF(ab)2断片を処理して、ジスルフィド架橋を還元し、Fab断片を産生することができる。抗体は、抗体の少なくとも1つのCDR領域によって付与されるActRII受容体又はアクチビンポリペプチドに対する親和性を有する二重特異性、単鎖、キメラ、ヒト化、及び完全ヒト分子を含むことがさらに意図される。抗体は、それに付着し、検出されることができる標識をさらに含むことができる(例えば、該標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、又は酵素補因子であることができる)。

【0164】

ある実施態様において、抗体は組換え抗体であり、この用語は、一部は分子生物学の技術によって作製される任意の抗体を包含し、これには、CDR移植又はキメラ抗体、ライブラリー選択抗体ドメインから組み立てられたヒト抗体又は他の抗体、単鎖抗体、並びに単ドメイン抗体(例えば、ヒトVHタンパク質又はラクダ科VHHタンパク質)が含まれる。ある実施態様において、抗体はモノクローナル抗体であることができ、及びある実施態様において、例えば、ActRII受容体ポリペプチド又はアクチビンポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、検出可能な免疫応答を刺激するのに有効な量の抗原ポリペプチドを含む免疫原性組成物をマウスに投与し、該マウスから抗体産生細胞(例えば、脾臓由来の細胞)を取得し、該抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させて、抗体産生ハイブリドーマを取得し、該抗体産生ハイブリドーマを試験して、該抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定することを含み得る。ひとたび取得されれば、ハイブリドーマを、細胞培養物中で、及び任意に、ハイブリドーマ由来細胞が抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する培養条件で増殖させることができる。モノクローナル抗体は、該細胞培養物から精製してもよい。

【0165】

抗体に関して使用される「と特異的に反応する」という形容詞は、当技術分野で一般に理解されているように、抗体が特定のタイプの生物学的試料中の関心対象の抗原の存在を最小限検出するのに有用であるほど、抗体が関心対象の抗原(例えば、ActRII受容体ポリペプチド)と関心対象ではない他の抗原との間で十分に選択的であることを意味することが意図される。治療への応用などの、抗体を利用する特定の方法において、より高度の結合特異性が望ましい場合がある。モノクローナル抗体は、通常、所望の抗原と交差反応性ポリペプチドとを効果的に識別する傾向が(ポリクローナル抗体と比較して)より高い。抗体:抗原相互作用の特異性に影響を及ぼす1つの特徴は、抗原に対する抗体の親和性である。所望の特異性は様々な異なる親和性を伴って達成され得るが、通常、好ましい抗体は、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、又はそれ未満の親和性(解離定数)を有する。アクチビンとActRII受容体の異常に強力な結合を考慮すると、中和抗アクチビン又は抗ActRII受容体抗体は、通常、 10^{-10} 以下の解離定数を有すると考えられる。

【0166】

さらに、望ましい抗体を同定するために抗体をスクリーニングするために使用される技術は、得られる抗体の特性に影響を及ぼし得る。例えば、抗体を溶液中の抗原に結合させ

るのに使用する場合、溶液結合を試験することが望ましい場合がある。抗体と抗原の相互作用を試験して、特に望ましい抗体を同定するために、種々の異なる技術が利用可能である。そのような技術としては、ELISA、表面プラズモン共鳴結合アッセイ(例えば、Biacore(商標)結合アッセイ、Biacore AB, Uppsala, Sweden)、サンドイッチアッセイ(例えば、IGEN International社, Gaithersburg, Md.の常磁性ビーズシステム)、ウェスタンブロット、免疫沈降アッセイ、及び免疫組織化学が挙げられる。

【0167】

ある実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRII受容体インヒビターには、別の形態のアクチビン、特に、I型受容体結合ドメイン中に改変を有し、II型受容体に結合することができ、かつ活性のある三重複合体を形成しないものが含まれる。ある実施態様において、アクチビンA、B、C、もしくはE、又は特に、ActRII受容体発現を阻害する核酸、例えば、アンチセンス分子、siRNA、又はリボザイムを、本明細書に記載の組成物及び方法で使用することができる。

10

【0168】

他の実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRII受容体のインヒビターは、ActRII受容体アンタゴニスト活性を有する非抗体タンパク質であり、これには、インヒビン(すなわち、インヒビン α サブユニット)、フォリスタチン(例えば、フォリスタチン-288及びフォリスタチン-315)、ケルベロス(Cerberus)、フォリスタチン関連タンパク質(「FSRP」)、エンドグリン、アクチビンC、 $\alpha(2)$ -マクログロブリン、並びにM108A(位置108におけるメチオニンからアラニンへの変化)突然変異体アクチビンAが含まれる。

20

【0169】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRII受容体インヒビターは、アクチビン生物活性に拮抗し、及び/又はアクチビンに結合するフォリスタチンポリペプチドである。「フォリスタチンポリペプチド」という用語には、フォリスタチンの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドが含まれ、フォリスタチンの任意の機能的単量体又は多量体がさらに含まれる。アクチビン結合特性を保持するフォリスタチンポリペプチドの変異体は、フォリスタチンとアクチビンの相互作用に関する以前の研究に基づいて同定することができる。例えば、引用により完全に本明細書中に含まれるWO2008/030367号には、アクチビン結合に重要であることが示されている具体的なフォリスタチンドメイン(「FSD」)が開示されている。フォリスタチンポリペプチドには、フォリスタチンポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のフォリスタチンの配列に由来するポリペプチドが含まれる。フォリスタチンポリペプチドの例としては、成熟フォリスタチンポリペプチドもしくはより短いアイソフォーム、又は例えば、引用により完全に本明細書中に含まれるWO2005/025601号に記載されているヒトフォリスタチン前駆ポリペプチドの他の変異体が挙げられる。

30

【0170】

具体的な実施態様において、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるActRII受容体インヒビターは、アクチビン生物活性に拮抗し、及び/又はアクチビンに結合するフォリスタチン様関連遺伝子(FLRG)である。「FLRGポリペプチド」という用語には、FLRGの任意の天然のポリペプチド並びに有用な活性を保持するその任意の変異体(突然変異体、断片、融合体、及びペプチド模倣形態を含む)を含むポリペプチドが含まれる。アクチビン結合特性を保持するFLRGポリペプチドの変異体は、FLRGとアクチビンの相互作用をアッセイするルーチンを用いて同定することができる。例えば、引用により完全に本明細書中に含まれる米国特許第6,537,966号を参照されたい。FLRGポリペプチドには、FLRGポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一な、及び任意に、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれを上回って同一な配列を有する任意の公知のFLRGの

40

50

配列に由来するポリペプチドが含まれる。

【0171】

ある実施態様において、フォリスタチンポリペプチド及びFLRGポリペプチドの機能的変異体又は修飾形態には、フォリスタチンポリペプチド又はFLRGポリペプチドの少なくとも一部と、例えば、ポリペプチドの単離、検出、安定化、又は多量体化を容易にするドメインなどの1以上の融合ドメインとを有する融合タンパク質が含まれる。好適な融合ドメインは、ActRIIA及びActRIIBポリペプチドに関して上で詳細に論じられている。一実施態様において、ActRII受容体インヒビターは、Fcドメインに融合したフォリスタチンポリペプチドのアクチビン結合部分を含む融合タンパク質である。別の実施態様において、ActRII受容体インヒビターは、Fcドメインに融合したFLRGポリペプチドのアクチビン結合部分を含む融合タンパク質である。

10

【0172】

(5.3 アッセイ)

((a)診断アッセイ)

((i)骨代謝回転)

骨代謝回転の様々な循環マーカーを用いて、骨障害、例えば、低骨代謝回転を診断することができる。骨代謝回転の循環マーカーは、骨特異的アルカリホスファターゼ(bAP)、オステオカルシン、プロコラーゲンI型C末端プロペプチド(PICP)、及びインスリン様成長因子-1(IGF-1)などの骨形成のマーカーであり、一部は、ビリジノリン、デオキシビリジノリン、酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)、TRAP 5b型、ビリジノリン、デオキシビリジノリン、及びプロコラーゲンI型C末端テロペプチド(ICTP)、血清又は尿コラーゲン架橋(N-テロペプチド又はC-テロペプチド)、及び25ヒドロキシビタミンDなどの骨再吸収のマーカーである。全副甲状腺ホルモン(PTH)分子を測定するアッセイを使用することもできる。当業者は、骨ミネラル密度(BMD)の評価を可能にするイメージング法を知っている。例えば、Tilman B. Drueke及びSharon M. Moeの文献、慢性腎疾患における骨及びミネラル代謝の障害:診断及び治療を改善するための国際的な取り組み(Disturbances of bone and mineral metabolism in chronic kidney disease: an international initiative to improve diagnosis and treatment)、Nephrol Dial Transplant(2004) 19: 534-536; Okuno S, Inaba M.の文献、骨代謝回転の生化学的マーカー。新たな局面。透析及び骨代謝マーカー(Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Dialysis and bone metabolic marker)、Clin Calcium. 2009 Aug;19(8):1084-91; Herberth J, Monier-Faugere MC, Mawad HW, Branscum AJ, Herberth Z, Wang G, Cantor T, Malluche HHの文献、5つの最もよく使用されるインタクト副甲状腺ホルモンアッセイは、CKD-5患者における骨代謝回転異常のスクリーニングに有用であるが、その診断には有用ではない(The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 patients)、Clin Nephrol. 2009 Jul;72(1):5-14; Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G.の文献、ステージ3~5の慢性腎疾患を有する患者における骨代謝回転の骨組織形態計測的及び生化学的マーカー(Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in patients with chronic kidney disease Stages 3-5)、Clin Nephrol. 2008 Oct;70(4):296-305; Drueke TB.の文献、副甲状腺ホルモン測定は腎骨疾患の診断に有用か(Is parathyroid hormone measurement useful for the diagnosis of renal bone disease?)、Kidney Int. 2008 Mar;73(6):674-6; Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E, Nishizawa Y.の文献、慢性腎疾患を有する患者における骨再吸収マーカーとしての血清酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRACP5b)の有用性:腎機能障害との無関係性(Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase(TRACP5b) as a bone resorption marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction)、Clin Endocrinol(Oxf). 2008 Aug;69(2):189-96. Epub 2008 Jan 23を参照されたい。Paul D. Millerの文献、慢性腎疾患における骨粗鬆症の診断及び治療(Diagnosis and Treatment of Osteoporosis in Chronic Renal Disease)、2009も参照されたい。

20

30

40

50

【0173】

軽度の腎機能障害を有するCKD患者における骨再吸収をモニタリングするための別のマーカーは、I型コラーゲンN-テロペプチド(S-NTX)の血清濃度である。例えば、Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Okada N, Imai E, Horio M, Ito T.の文献、血清NTXは、グルココルチコイド処置された慢性腎疾患患者に対する抗再吸収療法を評価するための実用的マーカーである(Serum NTX is a practical marker for assessing an antiresorptive therapy for glucocorticoid treated patients with chronic kidney disease.)、Bone. 2006 Nov;39(5):1067-72. Epub 2006 Jun 16を参照されたい。

【0174】

定量的コンピュータ断層撮影(QCT)を用いて、骨代謝回転を決定することもできる。

10

【0175】

((ii)低回転型骨障害モデル)

腎臓環境における低回転型骨疾患のマウスモデルは、マウス腎摘出モデル、例えば、第6.2節及び第6.3節で使用される5/6腎摘出モデルを使用することであり、このモデルでは、マウスに低リン酸食を給餌する。

【0176】

別のマウスモデルにおいて、マウスは、一方の腎臓の電気焼灼及びもう一方の腎臓の腎摘出を受ける。該マウスに、カルシトリオールを補充した低リン酸食を給餌する。例えば、Lundらの文献、2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369を参照されたい。

【0177】

((iii)骨のテトラサイクリン標識)

CKDと関連する骨疾患のタイプを決定するために使用することができる診断検査は、二重テトラサイクリン標識及び骨組織形態計測解析を用いる腸骨稜骨生検である。例えば、米国腎臓財団：NKF KDOQIガイドラインを参照されたい。

20

【0178】

((iv)血管石灰化)

冠動脈石灰化(CAC)の程度のイメージング用の非造影コンピュータ断層撮影(CT)及び非侵襲的冠動脈造影(CTA)用の造影CTは、閉塞性冠動脈疾患を診断するために一般に使用される現像法(development)である。診断的及び予後予測的な心臓評価のための放射性核種ストレス試験、冠動脈カルシウムスキャンニング、及び非侵襲的冠動脈造影を使用することもできる。Berman DS, Shaw LJ, Hachamovitch R, Friedman JD, Polk DM, Hayes SW, Thomson LE, Germano G, Wong ND, Kang X, Rozanski A.の文献、診断的及び予後予測的な心臓評価のための放射性核種ストレス試験、冠動脈カルシウムスキャンニング、及び非侵襲的冠動脈造影の比較使用(Comparative use of radionuclide stress testing, coronary artery calcium scanning, and noninvasive coronary angiography for diagnostic and prognostic cardiac assessment)、Semin Nucl Med. 2007 Jan;37(1):2-16を参照されたい。

30

【0179】

無症状患者の冠動脈カルシウムスクリーニング結果を比較として使用することができる。例えば、血管石灰化が腎疾患と関連する場合、腎疾患の発症前に得られたカルシウムスクリーニング結果を比較として使用することができる。

40

【0180】

冠動脈石灰化(CAC)の考えられる検出及び定量方法としては、x線コンピュータ断層撮影及び心筋灌流単一光子放射型コンピュータ断層撮影(SPECT)が挙げられるが、これらに限定されない。Moser KW, O'Keefe JH Jr, Bateman TM, McGhie IA.の文献、リスク因子修飾及びストレス心筋灌流イメージングの指針としての無症状患者における冠動脈カルシウムスクリーニング(Coronary calcium screening in asymptomatic patients as a guide to risk factor modification and stress myocardial perfusion imaging)、J Nucl Cardiol. 2003 Nov-Dec;10(6):590-8。多列検出器コンピュータ断層撮影(MDCT)を用いて、血管石灰化を検出することもできる(例えば、Burrillらの文献、2007, Postgrad. Med. J.

50

83(985):698-704を参照されたい)。

【0181】

血管石灰化の別の診断方法は、陽電子放出断層撮影(PET)/コンピュータ断層撮影(CT)併用時の胸部大動脈壁へのフッ素18フルオロデオキシグルコース(FDG)取込みである。Tatsumi M, Cohade C, Nakamoto Y, Wahl RL.の文献、PET/CT時の大動脈壁へのフルオロデオキシグルコース取込み:活動性アテローム性動脈硬化症の発見の可能性(Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis)、Radiology. 2003 Dec;229(3):831-7. Epub 2003 Oct 30を参照されたい。

【0182】

さらに別の実施態様において、超高速CTを用いて、アテローム性動脈硬化性冠動脈疾患の存在を検出することができる。例えば、Breen JF, Sheedy PF 2nd, Schwartz RS, Stan son AW, Kaufmann RB, Moll PP, Rumberger JAの文献、冠動脈疾患の兆候としての超高速CTで検出される冠動脈石灰化(Coronary artery calcification detected with ultrafast CT as an indication of coronary artery disease)、Radiology. 1992 Nov;185(2):435-9を参照されたい。

【0183】

電子ビームコンピュータ断層撮影スキャニングを用いて、冠動脈疾患を診断することもできる。Schmermund A, Baumgart D, Sack S, Mohlenkamp S, Gronemeyer D, Seibel R, Erbel R.の文献、症状のある患者における正常、異常、又は多義運動負荷試験を用いた電子ビームコンピュータ断層撮影による冠動脈石灰化の評価(Assessment of coronary calcification by electron-beam computed tomography in symptomatic patients with normal, abnormal or equivocal exercise stress test)、Eur Heart J. 2000 Oct;21(20):1674-82を参照されたい。

【0184】

血管石灰化の別の試験では、多因性及び血栓塞栓性肺高血圧症におけるプラーク組成が考慮される。慢性血栓塞栓性肺高血圧症は、グリコフォリンに富んだ粥状コアを有するアテローム性動脈硬化プラークと関連し、多因性肺高血圧症は線維性プラークと関連する。血栓塞栓性物質は、赤血球膜由来グリコフォリンがその主要成分である粥状コアの形成において極めて重要な役割を果たしている。したがって、慢性血栓塞栓性及び多因性肺高血圧症(一次性及び二次性(アイゼンメルゲル症候群))が検討される。Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovela F, Vigano M, Tavazzi Lの文献、多因性及び血栓塞栓性肺高血圧症におけるプラーク組成:粥状コアの形成における血栓塞栓性物質の極めて重要な役割(Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation)、Heart. 2002 Aug;88(2):177-82を参照されたい。

【0185】

沈着したカルシウムプラークの密度測定に基づくカルシウムスコアリングシステムであるアガットストンスコアリングを用いて、血管石灰化を定量することができる。このシステムでは、血管石灰化のレベルを多列検出器コンピュータ断層撮影(MDCT)によって測定することができ、アガットストンスコアにおける進行速度の減衰を評価することができる(例えば、Sharmaらの文献、2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:603-611を参照されたい)。

【0186】

さらに、血管石灰化は、Adragaoらの文献、2004, Nephrol. Dial. Transplant 19:1480-1488に記載の方法を用いて評価することができる。

【0187】

対象における血管石灰化を定量する際に使用される別のアッセイは、病変特異的カルシウムスコアであり、これは、冠動脈石灰化のCT検査の結果としてもたらされるカルシウム測定法を含む。この方法は、例えば、Akram及びVorosの文献、2008, Int. J. cardiovasc. Imaging 14:743-749に記載されている。

【0188】

((v)腎疾患)

糸球体濾過量は、腎疾患を決定するための当業者に公知の任意の方法により決定することができる。米国腎臓財団のウェブサイトを参照されたい。

【0189】

((vi)二次性副甲状腺機能症(parathyroidism))

二次性副甲状腺機能亢進症は、カルシウムレベルが低過ぎるか、又はリンレベルが増加しているために、副甲状腺が過剰の副甲状腺ホルモン(PTH)を産生するときに生じる。カルシウム、リン、及びPTHレベルは、血液試料から決定することができる。

【0190】

((vii)高リン血症)

血液中のホスフェートのレベルの異常上昇は、当業者に公知の任意の方法により決定することができる。

【0191】

((b)スクリーニングアッセイ)

様々なActRIIポリペプチド変異体、又は可溶性ActRIIポリペプチド変異体を、ActRIIを阻害するその能力について試験することができる。さらに、化合物を、ActRIIを阻害するその能力について試験することができる。ひとたびActRII活性のインヒビターが確認されれば、これらの化合物を本明細書に提供される方法とともに使用することができる。ActRIIは、ActRIIA又はActRIIBであることができる。下記のアッセイは、ActRIIAについて記載されているが、ActRIIBについても同様に実施することができる。

【0192】

例えば、骨産生又は骨破壊に関与する遺伝子の発現に対するActRIIAポリペプチド変異体の効果を評価することができる。これは、必要な場合、1以上の組換えActRIIAリガンドタンパク質(例えば、アクチビン)の存在下で実施することができ、細胞を、ActRIIAポリペプチド及び/又はその変異体、並びに任意にActRIIAリガンドを産生するようにトランスフェクトすることができる。同様に、ActRIIAポリペプチドをマウス又は他の動物に投与することができる、1以上の骨特性、例えば、密度又は体積を評価することができる。骨折の治癒速度を評価することもできる。二重エネルギーx線吸収法(DEXA)は、動物の骨密度を評価するための十分に確立された非侵襲的な定量技術である。ヒトにおいて、中枢DEXAシステムを用いて、脊椎及び骨盤の骨密度を評価することができる。これらは、全骨密度の最良の予測因子である。末梢DEXAシステムを用いて、例えば、手、手首、足首、及び足の骨を含む、末梢骨の骨密度を評価することができる。CATスキャンを含む、従来のx線イメージングシステムを用いて、骨成長及び骨折治癒を評価することができる。さらに、定量的コンピュータ断層撮影(qCT)を用いて、骨密度を測定することができる。骨の機械的強度を評価することもできる。

【0193】

ある態様において、本明細書に提供されるのは、アクチビン-ActRIIAシグナル伝達経路のアゴニスト又はアンタゴニストとなる化合物(薬剤)を同定するためのActRIIAポリペプチド(例えば、可溶性ActRIIAポリペプチド)及びアクチビンポリペプチドの使用である。このスクリーニングを通じて同定された化合物を試験して、骨の成長又は石化をインビトロで調節するその能力を評価することができる。任意に、これらの化合物を動物モデルでさらに試験して、インビボで組織成長を調節するその能力を評価することができる。

【0194】

アクチビン及びActRIIAポリペプチドを標的とすることによって組織成長を調節する治療剤をスクリーニングする数多くの手法がある。ある実施態様において、化合物のハイスループットスクリーニングを実施して、骨に対するアクチビン又はActRIIA媒介性効果を攪乱する薬剤を同定することができる。ある実施態様において、アッセイを実施して、アクチビンに対するActRIIAポリペプチドの結合を特異的に阻害し又は低下させる化合物をスクリーニング及び同定する。或いは、アッセイを用いて、アクチビンに対するActRIIA

ポリペプチドの結合を増強する化合物を同定することができる。さらなる実施態様において、化合物を、アクチビン又はActRIIAポリペプチドと相互作用するその能力によって同定することができる。

【0195】

種々のアッセイ形式が十分であり、本開示を考慮すれば、本明細書に明示的に記載されていないものが、それにもかかわらず、当業者によって理解されるであろう。本明細書に記載されているように、本明細書で使用される試験化合物(薬剤)は、任意のコンビナトリアル化学法によって作出することができる。或いは、対象化合物は、インビトロ又はインビボで合成された天然の生体分子であることができる。組織成長のモジュレーターとして作用するその能力について試験される化合物(薬剤)は、例えば、細菌、酵母、植物、もしくは他の生物により産生されるか(例えば、天然物)、化学的に産生されるか(例えば、ペプチド模倣体を含む小分子)、又は組換えで産生されることができる。本明細書で企図される試験化合物としては、非ペプチド有機分子、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、糖、ホルモン、及び核酸分子が挙げられる。具体的な実施態様において、試験薬剤は、約2,000ダルトン未満の分子量を有する小有機分子である。

10

【0196】

試験化合物は、単一の別個の実体として提供するか、又は例えば、コンビナトリアル化学によってより複雑度の高いライブラリー中に提供することができる。これらのライブラリーは、例えば、アルコール、ハロゲン化アルキル、アミン、アミド、エステル、アルデヒド、エーテル、及び他のクラスの有機化合物を含むことができる。試験系に対する試験化合物の提示は、特に、最初のスクリーニング工程において、単離された形態か、又は化合物の混合物としてかのいずれかであり得る。任意に、該化合物は、他の化合物で誘導体化され、該化合物の単離を容易にする誘導体化基を有することができる。誘導体化基の非限定的な例としては、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑色蛍光タンパク質、同位体、ポリヒスチジン、磁気ビーズ、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、光活性化クロスリンカー、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。

20

【0197】

化合物及び天然抽出物のライブラリーを試験する多くの薬物スクリーニングプログラムにおいて、所与の期間に調査される化合物の数を最大にするためには、ハイスループットアッセイが望ましい。精製又は半精製されたタンパク質を用いて得ることができるような、無細胞系で実施されるアッセイは、試験化合物によって媒介される分子標的の変化の迅速な発生及び比較的容易な検出を可能にするように作製することができるという点で、多くの場合、「一次」スクリーニングとして好ましい。さらに、試験化合物の細胞毒性又はバイオアベイラビリティの効果は、通常、インビトロ系では無視することができ、その代わりに、このアッセイは、主として、ActRIIAポリペプチドとアクチビンの間の結合親和性の変化として現われ得るような分子標的に対する薬物の効果に焦点を当てている。

30

【0198】

単に例証するために、例示的なスクリーニングアッセイにおいて、関心対象の化合物を、通常アクチビンに結合することができる単離及び精製されたActRIIAポリペプチドと接触させる。その後、化合物とActRIIAポリペプチドの混合物に、ActRIIAリガンドを含む組成物を添加する。ActRIIA/アクチビン複合体の検出及び定量は、ActRIIAポリペプチドとアクチビンの間の複合体形成の阻害(又は強化)における化合物の効力を決定するための手段を提供する。化合物の効力は、様々な濃度の試験化合物を用いて得られたデータから用量応答曲線を作成することにより評価することができる。さらに、対照アッセイを実施して、比較用のベースラインを提供することもできる。例えば、対照アッセイでは、単離及び精製されたアクチビンを、ActRIIAポリペプチドを含む組成物に添加し、ActRIIA/アクチビン複合体の形成を試験化合物の非存在下で定量する。一般に、反応物を混合し得る順序を変えることができ、また、反応物を同時に混合することができることが理解されるであろう。さらに、精製タンパク質の代わりに、細胞の抽出物及び溶解物を用いて、好適な無細胞アッセイ系を提供することができる。

40

50

【0199】

ActRIIAポリペプチドとアクチビンの間の複合体形成は、種々の技術により検出することができる。例えば、複合体の形成の調節は、例えば、検出可能に標識されたタンパク質、例えば、放射性標識された(例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、もしくは ^3H)、蛍光標識された(例えば、FITC)、又は酵素標識されたActRIIAポリペプチド又はアクチビンを用いて、免疫アッセイによるか、又はクロマトグラフィー検出によって定量することができる。

【0200】

ある実施態様において、本明細書で企図されるのは、直接的に又は間接的に、ActRIIAポリペプチドとその結合タンパク質との間の相互作用の程度を測定する際の蛍光偏光アッセイ及び蛍光共鳴エネルギー遷移(FRET)アッセイの使用である。さらに、他の検出様式、例えば、光導波路(PCT公開WO 96/26432号及び米国特許第5,677,196号)、表面プラズモン共鳴(SPR)、表面電荷センサー、並びに表面力センサーに基づく検出様式は、本発明に記載の多くの実施態様と適合する。

【0201】

さらに、「ツーハイブリッドアッセイ」としても知られる相互作用トラップアッセイを、ActRIIAポリペプチドとその結合タンパク質との間の相互作用を攪乱又は強化する因子の同定のために使用することができる。例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosらの文献(1993) Cell 72:223-232; Maduraらの文献(1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartelらの文献(1993) Biotechniques 14:920-924; 及びIwabuchiらの文献(1993) Oncogene 8:1693-1696)を参照されたい。具体的な実施態様において、本明細書で企図されるのは、ActRIIAポリペプチドとその結合タンパク質との間の相互作用を断ち切る化合物(例えば、小分子又はペプチド)を同定するためのリバースツーハイブリッドシステムの使用である。例えば、Vidal及びLegrainの文献(1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal及びLegrainの文献(1999) Trends Biotechnol 17:374-81; 並びに米国特許第5,525,490号; 第5,955,280号; 及び第5,965,368号を参照されたい。

【0202】

ある実施態様において、対象化合物は、ActRIIA又はアクチビンポリペプチドと相互作用するその能力によって同定される。該化合物とActRIIA又はアクチビンポリペプチドとの間の相互作用は、共有結合性であっても非共有結合性であってもよい。例えば、そのような相互作用は、光架橋、放射性標識リガンド結合、及び親和性クロマトグラフィーを含む、インビトロの生化学的方法を用いて、タンパク質レベルで同定することができる(Jakoby W Bらの文献、1974, Methods in Enzymology 46: 1)。ある場合には、該化合物を、メカニズムに基づくアッセイ、例えば、アクチビン又はActRIIAポリペプチドに結合する化合物を検出するアッセイでスクリーニングすることができる。これは、固相又は流体相の結合事象を含み得る。或いは、アクチビン又はActRIIAポリペプチドをコードする遺伝子を、レポーターシステム(例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、又は緑色蛍光タンパク質)とともに細胞内にトランスフェクトし、好ましくは、ハイスループットスクリーニングによるか又はライブラリーの個々のメンバーを用いて、ライブラリーに対してスクリーニングすることができる。メカニズムに基づく他の結合アッセイ、例えば、自由エネルギーの変化を検出する結合アッセイを使用することができる。結合アッセイは、ウェル、ビーズ、もしくはチップに固定されているか、又は固定された抗体によって捕捉されているか、又はキャピラリー電気泳動によって分解される標的を用いて実施することができる。結合した化合物は、通常、比色又は蛍光又は表面プラズモン共鳴を用いて検出することができる。

【0203】

ある態様において、本明細書に提供されるのは、骨形成を調節(刺激又は阻害)し、及び骨量を増加させるための方法及び薬剤である。それゆえ、同定された任意の化合物を、全細胞又は組織中で、インビトロ又はインビボで試験して、骨の成長又は石化を調節するその能力を確認することができる。当技術分野で公知の様々な方法をこの目的のために使用することができる。特に、該化合物を骨代謝回転を増加させるその能力について試験する

ことができる。

【0204】

例えば、骨又は軟骨の成長に対するActRIIA又はアクチビンポリペプチド又は試験化合物の効果は、Msx2の誘導又は骨前駆細胞から骨芽細胞への分化を細胞ベースのアッセイで測定することにより決定することができる(例えば、Daluiskiらの文献、Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hinoらの文献、Front Biosci. 2004, 9:1520-9を参照されたい)。細胞ベースのアッセイの別の例は、間葉前駆細胞及び骨芽細胞における対象ActRIIA又はアクチビンポリペプチド及び試験化合物の骨形成活性を解析することを含む。例証するために、アクチビン又はActRIIAポリペプチドを発現する組換えアデノウイルスを構築して、多能性間質前駆細胞C3H10T1/2細胞、前骨芽C2C12細胞、及び骨芽TE-85細胞に感染させることができる。その後、骨形成活性は、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、及び基質石灰化の誘導を測定することにより決定される(例えば、Chengらの文献、J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52を参照されたい)。

10

【0205】

また本明細書に提供されるのは、骨又は軟骨の成長を測定するためのインビトロアッセイである。例えば、Namkung-Matthaiらの文献、Bone, 28:80-86(2001)には、骨折後の初期における骨修復を研究するラット骨粗鬆症モデルが開示されている。また、Kuboらの文献、Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202(1999)には、骨折後の後期における骨修復を研究するラットの骨粗鬆症モデルが開示されている。Anderssonらの文献、J. Endocrinol. 170:529-537には、マウス骨粗鬆症モデルが記載されている。このモデルでは、マウスから卵巣が摘出され、それにより、マウスは相当な骨ミネラル含量及び骨ミネラル密度を失い、骨梁は骨ミネラル密度の約50%を失う。骨密度は、副甲状腺ホルモンなどの因子の投与により、卵巣摘出マウスで増加させることができる。ある態様において、当技術分野で公知の骨折治癒アッセイを使用することができる。これらのアッセイは、骨折法、組織学的解析、及び生体力学解析を含み、これらは、例えば、骨折を引き起こし、及びその程度を測定するための実験プロトコル、並びに修復過程のその開示について引用により完全に本明細書中に組み込まれる、米国特許第6,521,750号に記載されている。

20

【0206】

(5.4 用量)

本明細書に提供されるのは、CKD-MBD及び/又は低代謝回転骨疾患の治療方法であって、治療を必要とする患者に、治療有効量のActRIIのインヒビター(第5.2節参照)を投与することを含む、方法である。ある実施態様において、ActRIIインヒビターは、第5.2節(a)に示すActRIIAのインヒビターである。他の実施態様において、ActRIIインヒビターは、第5.2節(b)に示すActRIIBのインヒビターである。ある実施態様において、ActRIIインヒビターは、ActRIIAインヒビターとActRIIBインヒビターの組合せである。

30

【0207】

ある実施態様において、治療有効量のActRIIインヒビターは、CKD-MBDの1以上の症状を改善するのに十分である。ある実施態様において、治療有効量のActRIIインヒビターは、CKD-MBDの少なくとも1つの症状が悪化するのを防ぐのに十分である。

40

【0208】

ある実施態様において、治療有効量のActRIIインヒビターは、腎機能を改善又は安定化する。腎機能は、糸球体濾過量により測定することができる。例えば、第5.4節(a)(iv)を参照されたい。ある実施態様において、ActRIIインヒビターの治療有効量は、CKD-MBD患者の糸球体濾過量をActRIIインヒビターによる治療の期間中及び少なくとも3カ月、6カ月、9カ月、又は12カ月間安定化するのに十分な1日用量である。ある実施態様において、ActRIIAインヒビターの治療有効量は、糸球体濾過量を少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は少なくとも50%増加させるのに十分な1日用量である。

【0209】

50

ある実施態様において、治療有効量のActRIIインヒビターは、患者における赤血球レベル及び/又はヘモグロビンレベルを増加させる。

【0210】

ある実施態様において、治療有効量のActRIIインヒビターは、(a)患者における赤血球及び/又はヘモグロビンレベルを増加させ;(b)患者における骨質及び/又は骨ミネラル密度を改善し;並びに(c)患者における腎機能を改善するのに効果的である。

【0211】

ある実施態様において、治療有効量のActRIIインヒビターは、(a)患者における赤血球及び/又はヘモグロビンレベルを増加させ;(b)患者における骨代謝回転を増加させ;並びに(c)患者における腎機能を改善するのに効果的である。

10

【0212】

ある実施態様において、ActRIIインヒビターは、0.2マイクログラム/kg以上の血清濃度を達成するのに十分な間隔及び量で投与され、1マイクログラム/kg又は2マイクログラム/kg又はそれを上回る血清レベルは、骨の密度及び強度に対する顕著な効果を達成するのに望ましい。投与レジメンは、0.2~15マイクログラム/kg、任意に、1~5マイクログラム/kgの血清濃度に達するように設計することができる。ヒトにおいて、0.2マイクログラム/kgの血清レベルは、0.1mg/kg以上の単一用量で達成することができ、1マイクログラム/kgの血清レベルは、0.3mg/kg以上の単一用量で達成することができ、分子の観察される血清半減期は、ほとんどのFc融合タンパク質よりも大幅に長い約20~30日であり、したがって、持続される有効血清レベルを、例えば、0.2~0.4mg/kgを週1回もしくは週2回の頻度で投与することにより達成することができるか、又はより高い用量をより長い投与間隔で使用することができる。例えば、1~3mg/kgの用量を月1回又は月2回の頻度で使用する

20

【0213】

(5.5 医薬組成物)

ある実施態様において、アクチビン-ActRIIアンタゴニスト(例えば、ActRIIポリペプチド)は、本明細書に記載の方法とともに使用される医薬として許容し得る担体とともに製剤化される。例えば、ActRIIポリペプチドは、単独で又は医薬製剤(治療的組成物)の成分として投与することができる。対象化合物は、ヒト又は動物用医薬品で使用される任意の好都合な方法での投与のために製剤化することができる。ActRIIは、ActRIIA又はActRIIBであることができる。

30

【0214】

ある実施態様において、本明細書に記載の治療法は、該組成物を全身に又はインプラントもしくは装置として局所に投与することを含む。投与されるとき、本明細書で使用される治療的組成物は、パイロジェンフリーの生理的に許容される形態にあることができる。上記の組成物中に任意に含めることもできるActRIIAアンタゴニスト以外の治療的に有用な薬剤は、対象化合物(例えば、ActRIIポリペプチド、例えば、ActRIIA及び/又はActRIIBポリペプチド(第5.2節参照))と同時に又は連続的に投与することができる。

【0215】

40

通常、ActRIIAアンタゴニストは非経口投与される。非経口投与に好適な医薬組成物は、1以上のActRIIポリペプチドを、1以上の医薬として許容し得る滅菌等張性水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液、もしくはエマルジョン、又は使用直前に滅菌注射溶液もしくは分散液へと再構成され得る滅菌粉末と組み合わせて含むことができ、これらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、又は懸濁化剤もしくは増粘剤を含有することができる。本明細書に記載の方法で使用される医薬組成物中で利用され得る好適な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、及びこれらの好適な混合物、植物油、例えば、オリーブ油、並びに注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどの

50

コーティング材料の使用によって、分散液の場合、必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。

【0216】

さらに、該組成物は、標的組織部位(例えば、骨)に送達するための形態で封入又は注射することができる。ある実施態様において、本明細書に記載の方法で使用される組成物は、1以上の治療的化合物(例えば、ActRIIAポリペプチド)を標的組織部位(例えば、骨)に送達し、成長する組織に構造を提供し、最適には体内に再吸収されることができるマトリックスを含むことができる。例えば、該マトリックスは、ActRIIAポリペプチドの低速放出を提供することができる。そのようなマトリックスは、他のインプラント型医療用途に現在使用されている材料から形成されてもよい。

10

【0217】

マトリックス材料の選択は、生体適合性、生体分解性、機械的特性、美容上の外観、及び界面特性に基づく。対象組成物の特定の用途により、適切な製剤が規定される。該組成物用の潜在的マトリックスは、生体分解性でかつ化学的に規定されている硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ハイドロキシアパタイト、ポリ乳酸、及びポリ無水物であってもよい。他の潜在的な材料は、骨又は皮膚コラーゲンなどの生体分解性でかつ生物学的に十分に規定されているものである。さらなるマトリックスは、純粋なタンパク質又は細胞外マトリックス成分から構成される。他の潜在的マトリックスは、焼成ハイドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸塩、又は他のセラミックスなどの、非生体分解性でかつ化学的に規定されているものである。マトリックスは、上述のタイプの材料のいずれかの組合せ、例えば、ポリ乳酸とハイドロキシアパタイト又はコラーゲンとリン酸三カルシウムから構成されていてもよい。バイオセラミックスは、例えば、カルシウム-アルミネート-ホスフェート中の組成を変化させ、並びに加工して、孔径、粒径、粒子形状、及び生体分解性を変化させることができる。

20

【0218】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法で使用される組成物は、各々所定の量の薬剤を活性成分として含む、例えば、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ剤(フレーバー付きの主成分、通常、スクロース及びアラビアゴムもしくはトラガカントを使用)、散剤、顆粒剤の形態で、又は水性もしくは非水性液中の液剤もしくは懸濁剤として、又は水中油型もしくは油中水型液体エマルジョンとして、又はエリキシル剤もしくはシロップ剤として、又はトローチ剤(不活性基剤、例えば、ゼラチン及びグリセリン、もしくはスクロース及びアラビアゴムを使用)として、並びに/或いは洗口液などとして、経口投与することができる。薬剤は、ポーラス剤、舐剤、又はペースト剤として投与することもできる。

30

【0219】

経口投与用の固体剤形(カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤など)中で、本明細書に記載の方法で使用される1以上の治療的化合物を、1以上の医薬として許容し得る担体、例えば、クエン酸ナトリウムもしくは第二リン酸カルシウム、並びに/又は以下のもの:(1)充填剤もしくは増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及び/もしくはケイ酸;(2)結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、及び/もしくはアラビアゴムなど;(3)保湿剤、例えば、グリセロール;(4)崩壊剤、例えば、寒天-寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム;(5)溶解遅延剤、例えば、パラフィン;(6)吸収促進剤、例えば、四級アンモニウム化合物;(7)湿潤剤、例えば、セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロールなど;(8)吸収剤、例えば、カオリン及びベントナイト粘土;(9)滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びこれらの混合物;並びに(10)着色剤のうちのいずれかと混合することができる。カプセル剤、錠剤、及び丸剤の場合、医薬組成物は、緩衝化剤を含むこともできる。同様のタイプの固体組成物を、ラクトース又は乳糖、及び高分子量ポ

40

50

リエチレングリコールなどような賦形剤を用いる軟及び硬充填ゼラチンカプセル中の充填剤として利用することもできる。

【0220】

経口投与用の液体剤形としては、医薬として許容し得るエマルジョン、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤、及びエリキシル剤が挙げられる。活性成分に加えて、該液体剤形は、当技術分野で一般に使用される不活性希釈剤、例えば、水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油(特に、綿実油、ピーナッツ油、トウモロコシ油、胚種油、オリブ油、ヒマシ油、及びゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、並びにソルビタンの脂肪酸エステル、並びにこれらの混合物を含むことができる。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、補助剤、例えば、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤、及び防腐剤を含むこともできる。

10

【0221】

懸濁剤は、活性化合物に加えて、懸濁化剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、及びソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天-寒天、及びトラガカント、並びにこれらの混合物を含むことができる。

【0222】

本明細書に記載の方法で使用される組成物は、補助剤、例えば、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤を含むこともできる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることにより確保することができる。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを該組成物中に含めることが望ましい場合もある。さらに、注射用医薬形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによりもたすことができる。

20

【0223】

投薬レジメンは、本明細書に記載の方法で使用される対象化合物(例えば、ActRIIポリペプチド、例えば、ActRIIA及び/又はActRIIBポリペプチド(第5.2節参照))の作用を修飾する様々な因子を考慮して、担当医により決定されるということが理解される。様々な因子としては、形成されることが望まれる骨重量の量、骨密度低下の程度、骨損傷の部位、損傷した骨の状態、患者の年齢、性別、及び食習慣、骨量減少に寄与し得る任意の疾患の重症度、投与の時間、並びに他の臨床的因子が挙げられるが、これらに限定されない。任意に、投薬量は、再構成で使用されるマトリックスのタイプ及び組成物中の化合物のタイプによって異なり得る。最終組成物への他の既知の成長因子の添加も、投薬量に影響を及ぼし得る。進捗は、例えば、X線(DEXAを含む)、組織形態計測的測定、及びテトラサイクリン標識による骨成長及び/又は修復の定期的評価によってモニタリングすることができる。

30

【0224】

ある実施態様において、本明細書に記載の方法は、ActRIIポリペプチドのインビボ産生のための遺伝子療法を含む。そのような療法は、上記の障害を有する細胞又は組織へのActRIIポリヌクレオチド配列の導入によって、その治療効果を達成する。ActRIIポリヌクレオチド配列の送達は、キメラウイルスなどの組換え発現ベクター、又はコロイド分散系を用いて達成することができる。ActRIIポリヌクレオチド配列の治療的送達に好ましいのは、標的化リボソームの使用である。ActRIIポリペプチドは、ActRIIA及び/又はActRIIBポリペプチド(第5.2節参照))であることができる。

40

【0225】

本明細書に教示される遺伝子療法に利用することができる様々なウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、又は好ましくは、レトロウイルスなどのRNAウイルスが挙げられる。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウス又

50

はトリレトロウイルスの派生物である。単一の異種遺伝子を挿入することができるレトロウイルスベクターの例としては:モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス (MuMTV)、及びラウス肉腫ウイルス (RSV) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかのさらなるレトロウイルスベクターは、複数の遺伝子を組み込むことができる。これらのベクターは全て、遺伝子導入された細胞を同定及び作製することができるように、選択可能マーカーの遺伝子を転移し又は組み込むことができる。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質、又はタンパク質を付着させることによって標的特異的にすることができる。好ましい標的化は、抗体を用いて達成される。当業者は、特異的ポリヌクレオチド配列をレトロウイルスゲノムに挿入するか、又はウイルスエンベロープに付着させて、ActRIIAポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターの標的特異的送達を可能にすることができることを認識しているであろう。好ましい実施態様において、該ベクターは、骨又は軟骨に標的化される。

10

【0226】

或いは、組織培養細胞を、従来のリン酸カルシウムトランスフェクションによって、レトロウイルス構造遺伝子 gag、pol、及び env をコードするプラスミドで直接トランスフェクトすることができる。その後、これらの細胞を、関心対象の遺伝子を含むベクタープラスミドでトランスフェクトする。得られた細胞は、レトロウイルスベクターを培養培地中に放出する。

【0227】

ActRIIAポリヌクレオチドの別の標的化送達系は、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリボソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。使用することができる1つのコロイド系は、リボソームである。リボソームは、インビトロ及びインビボでの送達ビヒクルとして有用である人工膜小胞である。RNA、DNA、及び無傷のビリオンを水性内部に封入し、生物活性形態で細胞に送達することができる(例えば、Fraleyらの文献、Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981を参照されたい)。リボソームビヒクルを用いる効率的な遺伝子導入法は当技術分野で公知であり、例えば、Manninoらの文献、Biotechniques, 6:682, 1988を参照されたい。リボソームの組成物は、通常、リン脂質の組合せであり、これは、通常、ステロイド、特にコレステロールと組み合わせられている。他のリン脂質又は他の脂質を使用することもできる。リボソームの物理学的特徴は、pH、イオン強度、及び二価カチオンの存在によって決まる。

20

30

【0228】

リボソーム産生において有用な脂質の例としては、ホスファチジル化合物、例えば、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、及びガングリオシドが挙げられる。例示的なリン脂質としては、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、及びジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。リボソームの標的化も、例えば、臓器特異性、細胞特異性、及びオルガネラ特異性に基づいて可能であり、当技術分野で公知である。

【0229】

ある実施態様において、ActRIIAインヒビターは、医薬組成物中で実質的に純粋である。具体的には、医薬組成物中の化合物の高々20%、10%、5%、2.5%、1%、0.1%、又は高々0.05%が、ActRIIインヒビター及び医薬として許容し得る担体以外の化合物である。

40

【実施例】

【0230】

(6. 実施例)

(6.1 実施例1)

((a) ActRIIA-Fc融合タンパク質)

最小限のリンカーを有するヒト又はマウスFcドメインに融合したヒトActRIIAの細胞外ドメインを有する可溶性ActRIIA融合タンパク質が記載されている。これらのコンストラ

50

クトは、それぞれ、ActRIIA-hFc及びmActRIIA-Fcと呼ばれる。ActRIIA-hFcは、配列番号7として提供されている。mActRIIA-Fcは、配列番号7のマウス対応物である。

【0231】

ActRIIA-hFc及びmActRIIA-Fcタンパク質をCHO細胞株で発現させた。3つの異なるリーダー配列：

(i) ミツバチメリチン(HBML)：配列番号8

(ii) 組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)：配列番号9

(iii) 天然のActRIIA：配列番号10

を検討した。

【0232】

選択された形態はTPAリーダーを利用しており、配列番号13に示される以下のプロセッシングされていないアミノ酸配列を有する。このポリペプチドは、配列番号14によってコードされる。

【0233】

((b)ActRIIB-Fc融合タンパク質)

ヒトFcドメインに融合したヒトActRIIBの細胞外ドメインとアクチビンとの共結晶構造から、リガンド結合における細胞外ドメインの最後(C末端)の15個のアミノ酸(本明細書において「尾部」と呼ばれる)の役割は示されなかった。この配列は、結晶構造では解像されず、これらの残基が、結晶中で均一に納まらなかった柔軟なループ中に存在することを示唆している。Thompsonらの文献、EMBO J. 2003 Apr 1 ;22(7):1555-66。この配列はまた、ActRIIBとActRIIAの間であまり保存されていない。したがって、これらの残基は、基本的又はバックグラウンドActRIIB-Fc融合コンストラクトでは削除された。さらに、バックグラウンド形態における位置64は、アラニンによって占められており、これは、通常、「野生型」形態と考えられるが、A64Rアレルが天然に生じる。したがって、バックグラウンドActRIIB-Fc融合体は、配列番号21として開示されている配列を有する。

【0234】

驚くことに、C末端尾部がアクチビン及びGDF-11結合を増強することが分かり、したがって、ActRIIB-Fcの好ましいバージョンは、配列番号20の配列を有する。

【0235】

本明細書に記載の方法に従って使用し得る種々のActRIIB変異体は、引用により完全に本明細書中に組み込まれる、WO2006/012627号として公開された国際特許出願(例えば、59~60ページ参照)に記載されている。

【0236】

(6.2 慢性腎疾患のマウスモデルにおけるmActRIIA阻害の効果)

この研究は、最小限のリンカーを介してマウスFcに融合した可溶性マウスActRIIA(配列番号15)の、慢性腎疾患及びCKD-MBDのマウスモデルにおける血液及び骨パラメーターの治療に対する効果を検討するために設計された。

【0237】

慢性腎疾患(CKD)を有する患者は貧血になることがあり、また、骨減少症になることもある。部分腎摘除(5/6腎摘出)を受けたマウスをCKDのモデルとして用いて、このモデルにおける配列番号15のアミノ酸配列を有するポリペプチドの効果を試験した。マウスは、1) 1つの腎臓を完全に摘出するために、及び2) 残りの腎臓内の3つの腎動脈のうちの2つを結紮するために2回の手術を受けた。疑似手術を受けたマウスも対照として含めた。疑似手術又は5/6腎摘出手術は、Jackson Laboratoriesで行われた。

【0238】

マウスを受け取った後、それらを、研究期間中、高脂肪食で飼育した。最後の手術から2週間後、マウスを群(疑似とCKDの両方)に分け、ビヒクル(PBS)又はmActRIIA-Fcの投与を、8週間、週2回、10mg/kgで開始した。全血算値(CBC)を、研究期間中、定期的に測定して、貧血について評価した。

【0239】

10

20

30

40

50

骨ミネラル密度は、二重エネルギーx線吸収法(DEXA、PIXIMus)を用いて決定した。研究の終了時に、剖検を実施して、後肢の長骨及び主要臓器を回収した。残存腎臓は、組織学的検査処理及びH&E又はトリクロム染色剤による染色に出した。大腿骨は、骨微細構造を明らかにするためにuCT(Scanco)でスキャンした。

【0240】

マウスは、研究期間全体を通して正常かつ健康に見え、研究が進行するにつれて体重が増えた(図1)。骨ミネラル密度は、4つ全てのマウスの群で増加したが、mActRIIA-Fc処置マウス(疑似及びCKD)は、どちらかのビヒクル処置群よりも増加が大きかった(図2)。CKDマウスにおけるmActRIIA-Fc処置は、研究が終わるまでに、疑似-VEH処置マウスと同じか、又はそれを超える骨ミネラル密度を有していた。CKDマウスは、研究が終わるまでに、貧血にもなったが($HCT < 40\%$)、mActRIIA-Fc処置は、CKD群における貧血を防いだ($HCT > 40\%$; 図3)。疑似群のmActRIIA-Fc処置マウスは、VEH対照と比較したとき、HCTの増加も示した。解剖後の大腿骨のmicroCT解析は、mActRIIA-Fc処置マウスにおける骨梁の増加を示したが、疾患進行のこの時点で疑似処置群とCKDビヒクル処置群の間に大きな違いはなかった。剖検時に、臓器重量に大きな違いは認められなかったが、mActRIIA-Fc処置マウスでは、脂肪体重量がわずかに増加していた。残存腎臓のトリクロム染色組織切片は、研究のこの時点でのCKDマウスにおける線維症の広がりを示さなかった。

10

【0241】

(6.3 mActRIIA阻害は、確立した腎疾患の治療モデルにおいて貧血及び骨量減少を防ぐ)

齧歯類における5/6腎摘出手術は、慢性腎疾患のモデルを作成するために使用される、一般に実施される実験プロトコルである。この2段階手術では、無菌外科手術を用いて、一方の腎臓の2/3及び対側部位の腎臓全体が摘出される。この手術の結果として、動物は、腎機能の障害を経験し、慢性腎疾患を有するヒトと類似した生理的挙動を示す。

20

【0242】

疑似又は5/6腎摘出手術は、標準的な手術手順に従って、Jackson Laboratoriesで行われた。動物を手術から回復させ、その後、輸送した。動物を、最初の測定を行う前に最低48時間、実験条件に順化させた。この期間中、全ての動物を、それらを研究から除外することになる臨床的異常の何らかの兆候について観察した。動物は、そのケージカード上に研究番号が割り当てられ、耳の切れ込みによって一意的に特定された。

30

【0243】

滅菌PBSを用いてActRIIA-mIgG2aFcを2.0mg/mlの濃度に希釈した。投与濃度は：2.0mg/mlであった。ActRIIA-mIgG2aFcは、 -65 ± 15 で保存した。材料は、室温で、又は4で一晩解凍することができる。解凍したタンパク質は、使用するまで、濡れた氷の上で保持した。

【0244】

30匹のC57BL/6雌マウス(10週齢)が5/6腎摘出手術を受けた。この手術では、1つの腎臓が完全に摘出され、次いで、2週間後に、残存腎臓内の3つの腎静脈のうちの2つが結紮される。30匹の雌C57BL/6に対する疑似手術も行った。この手術では、動物に、腎臓の摘出を伴わない同じ腹部外科手術を受けさせる。2回目の手術から回復した後、動物を輸送し、最低48時間、実験条件に順化させた。2回目の手術から2カ月後、マウスを、1群当たり15匹にして、4つの処置群のうちの1つに無作為に割り当てた(表2)。マウスの重量を計測し、週に2回、合計8週間、mActRIIA-Fc又はPBSのどちらかを投与した。骨ミネラル密度(BMD)及び組織学的パラメーターの長期測定をベースライン時、中間時点、及び研究の終了時に行った。剖検時に、骨を回収し、組織学的検査用又はmicroCTスキャンによる解析用に保存した。

40

【表 2】

表 2:

群	N	マウス	食餌	処置	手術	濃度	経路	
1	15	C57BL/6	普通食	PBS	疑似	容積	皮下	
2	15	C57BL/6	普通食	mActRIIA-Fc	疑似	10 mg/kg	皮下	
3	15	C57BL/6	普通食	PBS	5/6 腎摘出	容積	皮下	10
4	15	C57BL/6	普通食	mActRIIA-Fc	5/6 腎摘出	10 mg/kg	皮下	

【0245】

((a)実験手順)

((i)外科的矯正)

10週齢の雌C57BL/6マウスに2段階の手術を受けさせて、5/6腎摘出術又は同等の疑似手術を達成した。

【0246】

((ii)動物投与)

今回の研究における投与は、5/6腎摘出手術の終了から1カ月後に開始された。マウスの重量を計測し、PBS又はmActRIIA-Fcのどちらかを、週2回、10mg/kgで、皮下注射により投与した。

【0247】

((iii)DXAスキニング)

BMDの長期測定を、月1回、麻酔したマウスに対して、DXAスキニング(Lunar PIXIMus, GE Medical Systems)を用いて実施した。BMDのDXAスキャン解析の間、マウスの頭部を対象領域から除外して、頭蓋骨と関連する定量アーティファクトを防止した。

【0248】

((iv)採血)

全血算値(HM2、VetScan)の長期測定を、月1回の顎下腺採血によって回収した血液に対して実施した。研究の終了時に、最終的な採血を実施し、血液を回収して、CBC分析用のEDTA含有チューブ又は血清回収用の血清分離チューブのどちらかに分けた。血清は、将来の分析のために-80℃で凍結させた。

【0249】

((v)血清分析)

凍結血清を解凍し、Vetscan VS2分析装置(Abaxis社)を用いて、100マイクロリットルを分析した。総合診断用ローターを用いて、試料を、血清アルブミン(ALB)、アルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アミラーゼ(AMY)、全ビリルビン(TBIL)、血中尿素窒素(BUN)、全カルシウム(Ca⁺⁺)、リン(PHOS)、クレアチニン(CRE)、グルコース(GLU)、ナトリウム(Na⁺)、カリウム(K⁺)、全タンパク質(TP)、及びグロブリン(GLOB)について分析した。

【0250】

((vi)剖検)

研究の終了時に、マウスをCO₂吸入により安楽死させた。腎臓及び脾臓を摘出し、計量し、10%ホルマリン中で保存した。脛骨及び大腿骨を回収し、70%エタノール中で保存した。

【0251】

((vii)microCT解析)

20

30

40

50

実験の終了時に、各マウス由来の左大腿骨及び脛骨を解剖し、70%エタノール中で固定した。Scanco microCT(VivaCT75, Scanco)を55kV、145 μ A、及び20 μ mのボクセルサイズで用いて、骨をスキャンした。スキャンした画像を、組み込まれているScancoソフトウェアを用いて再構築した。骨梁体積(BV/TV)及び骨梁厚(Tb.Th)を、大腿骨の遠位端から200 μ mの位置にある骨の400 μ m切片で評価した。皮質厚を、大腿骨の正中線を中心とする骨の200 μ m切片で測定した。

【0252】

((viii)データ解析)

mActRIIA-Fc処置及びビヒクル処置したマウス及び組織の比較は、Microsoft Excelを用いて、スチューデントt-検定により実施した。データは、平均 $\pm$ SEMとして表す。

10

【0253】

((b)結果)

本発明者らは、貧血及び骨量減少を防ぐmActRIIA-Fcの能力を慢性腎疾患のマウスモデルで調べた。5/6腎摘出手術(0日目)から2カ月の疾患進行の後、5/6腎摘出術を受けたマウス(CKD)は、疑似コホートと比較して、ヘマトクリットの有意な減少を示した(-5.4%、 $P < 0.01$)。長期血液採取及びその後のCBC分析から、CKDコホートと疑似コホートの両方のmActRIIA-Fc処置マウスが、処置から4及び8週間後に、それらのVEH処置対応物と比較して、ヘマトクリットの有意な増加を示すことが示された(図5)。

【0254】

5/6腎摘出手術(0日目)から2カ月の疾患進行の後、5/6腎摘出術を受けたマウス(CKD)は、疑似コホートと比較して、BMDの有意な減少を示した(-5.4%、 $P < 0.01$)。6週間の処置の間中、mActRIIA-Fc処置した疑似コホート及びCKDコホートは、それらのVEH処置対応物と比較して、有意により大きいBMDを有していた(図6)。

20

【0255】

研究の終了時に、後肢を回収し、70%エタノール中で固定した。右大腿骨をmicroCTスキャンして(VivaCT 75, Scanco)、皮質及び骨梁構造を定量した。図7は、各処置群由来の大腿骨の断面像を示す。腎摘出術を受けたマウスは皮質厚の減少を示し、骨梁構造の明白な変化を示さなかった。

【0256】

mActRIIA-Fc処置マウスは、皮質厚と骨梁体積の両方の増加を示した。大腿骨の骨幹中央部の解析を用いて、各コホートにおける平均皮質厚を定量した(図8)。CKDマウスは、VEHコホート($P < 0.01$)とmActRIIA-Fcコホート($P < 0.01$)の両方において、その疑似対応物よりも厚い皮質骨を有していた。mActRIIA-Fc処置マウスは、それらのそれぞれのVEH処置マウスと比較した疑似コホート(+17%、 $P < 0.01$)とCKDコホート(+19.2%、 $P < 0.01$)の両方において、皮質厚の有意な増加を有していた。図7の試料画像から明らかなように、遠位大腿骨の解析から、mActRIIA-Fc処置マウスにおける骨梁体積及び骨梁厚の劇的な増加が明らかになった。mActRIIA-Fcは、疑似コホートとCKDコホートの両方において、VEH処置マウスと比べて、骨梁体積(図9)及び骨梁厚(図10)を有意に増加させることができた。骨梁体積の測定から、mActRIIA-Fc処置マウスが、それらのそれぞれのVEH処置マウスと比較した疑似コホート(+549%、 $P < 0.001$)とCKDコホート(+827%、 $P < 0.001$)の両方において、骨梁体積の有意な増加を有することが第8週で示された。骨梁厚の測定から、mActRIIA-Fc処置マウスが、それらのそれぞれのVEH処置マウスと比較したCKD(+62%、 $P < 0.001$)コホートにおいて、骨梁厚の有意な増加を有することが第8週で示された。

30

40

【0257】

最終的な屠殺時に、全血を全ての動物から採取し、血清用に処理した。血清試料は、総合プロファイルローターを使用するVetscan VS2分析装置(Abaxis社)を用いて分析した。各群の分析物の平均値を表3に示す。疑似ビヒクル対照群とCKDビヒクル対照群の比較は、予想通り、腎機能の障害による血中尿素窒素(BUN)及びクレアチニン(CRE)の増加を示した。さらに、ALT及びアミラーゼ(AMY)は、腎機能の変化のためにCKDマウスで増加していたが、又は腎摘出術が肝機能も変化させることを示唆した。カルシウム(CA++)及び全アルカ

50

リホスファターゼ(ALP)レベルも、予想通り、骨代謝回転の増加のために増加していた。mActRIIA-Fc処置は、薬物の骨同化作用のために、疑似マウスとCKDマウスの両方におけるALPレベルを増加させた。CKDマウスにおいて、mActRIIA-Fc処置は、CKD-VEH対照と比較して、アルブミン(ALB)、全タンパク質(TP)、及びCREレベルを減少させたが、疑似マウスとは違いがなかった。これらの変化は、現時点では、該モデルにも該処置にも関連性があるとは考えられない。

【表 3】

表 3

		疑似 VEH	疑似 mActRIIA -Fc	CKD VEH	CKD mActRIIA -Fc
AMY	U/L	865.45 ± 39.41	803.38 ± 66.06	1486.18 ± 53.82	1418.42 ± 36.68
TBIL	mg/dL	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.01 _a
BUN	mg/dL	27.92 ± 1.39	29.20 ± 1.26	52.75 ± 2.66	51.50 ± 2.10
CA ⁺⁺	mg/dL	10.18 ± 0.16	10.38 ± 0.12	11.00 ±.13	11.33 ± 0.13
PHOS	mg/dL	8.58 ± 0.17	8.96 ± 0.28	8.28 ± 0.36	7.96 ± 0.26
CRE	mg/dL	0.33 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.31 ± 0.02 _a
GLU	mg/dL	198.50 ± 6.52	260.90 ± 28.79*	223.67 ± 13.53	260.86 ± 14.98
NA ⁺	mmol/L	156.50 ± 0.77	157.60 ± 0.73	158.58 ± 2.37	155.64 ± 0.34
K ⁺	mmol/L	7.65 ± 0.14	7.85 ± 0.15	7.98 ± 0.14	7.77 ± 0.13
TP	g/dL	5.66 ± 0.05	5.42 ± 0.057 *	5.73 ± 0.08	5.47 ± 0.07 _a
GLOB	g/dL	1.79 ± 0.08	1.67 ± 0.06	1.73 ± 0.07	1.97 ± 0.06 _a

*=疑似VEHと比べて、 $p < 0.05$; ++=CKD VEHと比べて、 $p < 0.05$

【 0 2 5 8 】

((c) 結論)

mActRIIA-Fcによる処置は、慢性腎疾患の5/6腎摘出モデルで貧血及び骨量減少を防ぐことができた。CKDマウスは貧血であり、疑似対応物と比較したとき、大腿骨におけるより低いBMD及びより厚い皮質骨構造を有していた。CKDマウスのmActRIIA-Fc処置は、VEH処置マウスと比べて、ヘマトクリット、BMD、及び皮質骨構造を有意に増大させた。さらに、mActRIIA-Fcは、疑似コホートとCKDコホートの両方においてVEH処置マウスよりも大きい値にまで、CKDマウスにおける骨梁体積及び骨梁厚を増加させることができた。これらのデータは、mActRIIA-Fc投与によるアクチビン受容体IIAシグナル伝達の遮断が、慢性腎疾患の5/6腎摘出モデルで貧血及び骨量減少を防ぐことができることを示している。

【 0 2 5 9 】

(6.4 予測的実施例 - CDK状況で低回転型骨疾患を治療するためのmActRIIA阻害)

マウスに、一方の腎臓の電気焼灼及びもう一方の腎臓の腎摘出術を受けさせた。マウスに、カルシトリオールを補充した低リン酸食を給餌した。例えば、Lundらの文献、2004、

J Am Soc Nephrol 15:349-369を参照されたい。

【0260】

この研究は、最小限のリンカーを介してマウスFcと融合している可溶性マウスActRIIA(配列番号15)の、低回転型骨障害のマウスモデルにおける血液及び骨パラメーターの治療に対する効果を検討するために設計されたものである。

【0261】

一方の腎臓の電気焼灼及びもう一方の腎臓の腎摘出術を受けたマウスをCKD状況における低回転型骨(「ADB」)のモデルとして用いて、このモデルにおける配列番号15のアミノ酸配列を有するポリペプチドの効果を試験した。マウスは、1)一方の腎臓の完全摘出及び2)もう一方の腎臓の電気焼灼のために、2回の手術を受ける。疑似手術を受けたマウスも対照として含める。手術は、Lundらの文献、2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369に記載されている通りに実施することができる。

10

【0262】

1つの群のマウスを、カルシトリオール食を補充した低リン酸食で飼育する。別の群のマウスを通常食で飼育する。最後の手術から2週間後、マウスを群(疑似とADBの両方)に分け、投与を、8週間、週2回、10mg/kgのビヒクル(PBS)又はmActRIIA-Fcで開始する。全血算値(CBC)を、研究期間中、定期的に測定して、貧血について評価する。

【0263】

骨ミネラル密度は、二重エネルギーx線吸収法(DEXA、PIXIMus)を用いて決定する。研究の終了時に、剖検を実施して、後肢の長骨及び主要臓器を回収する。残存腎臓は、組織学的検査処理及びH&E又はトリクロム染色剤による染色に出す。大腿骨は、骨微細構造を明らかにするためにuCT(Scanco)でスキャンする。定量的コンピュータ断層撮影(QCT)を用いて、骨代謝回転を決定することもできる。

20

【0264】

(6.5 血管石灰化に対するActRIIA阻害の効果)

この実施例は、ACTRIIAの阻害が対象の血管系におけるカルシウムレベルの低下に効果的であり、したがって、血管石灰化の治療手段になることを示すものである。

【0265】

ステージ3の慢性腎疾患(CKD)を、高脂肪食を給餌した14週齢の $ldlr^{-/-}$ マウス(C57Bl/6Jバックグラウンド; Jackson Laboratory)(「CKDマウス」)で誘導した。低密度リポタンパク質受容体($ldlr$)は脂質クリアランスに関与することが知られており、 $ldlr$ ノックアウトマウスはアテローム性動脈硬化症のモデルに相当する。高脂肪/コレステロール食を給餌された $ldlr$ 欠損マウスは、アテローム性動脈硬化症と、腎摘除によって誘導されるCKDにより刺激される大動脈プラーク関連石灰化とを発症する。5/6腎摘出術(上記を参照)により、CKDを $ldlr^{-/-}$ マウスで誘導した。上記の通り、5/6腎摘出術は、1つの腎臓の完全摘出と、それに続く、残存腎臓内の3つの腎静脈のうちの2つの結紮を含む。

30

【0266】

化学的石灰化定量によって確認すると、22週目までに、血管石灰化がCKDマウスで確立される。簡潔に述べると、マウス由来の心臓及び大動脈を屠殺時に解剖し、全ての無関係な組織を解剖顕微鏡下での鈍的切開により除去する。組織を55℃で20~24時間乾燥させ、重量を計量し、すり鉢とすりこぎで砕いて粉末にする。カルシウムを、10%ギ酸(10:1 v/w)中、4℃で24時間溶出させる。溶出液のカルシウム含量を、製造元の指示に従って、クレゾールフタレインコンプレキソン法(Sigma, St Louis)を用いてアッセイし、結果を乾燥組織重量に対して補正する。

40

【0267】

CKDマウスを(i) mActRIIA-Fc処置マウス;及び(ii) mActRIIA-Fc組成物のビヒクル部分のみを投与されるCKD-3-ビヒクルマウス(すなわち、このマウスは、mActRIIA-Fcを含まない食塩水組成物を投与される)という2つの実験群に分けた。mActRIIA-Fc処置マウス(n=5)には、10mg/kgのmActRIIA-Fcを、週2回、6週間投与した。CKD-3-ビヒクルマウス(n=6; ビヒクル=食塩水)には、mActRIIA-FcをmActRIIA-Fc処置マウスに投与したのと同じ日に

50

、ビヒクルのみを投与した。野生型マウス(n=6; C57Bl/6Jバックグラウンド)及び疑似マウス(n=8; C57Bl/6Jバックグラウンド)を陰性対照として使用した。疑似マウスは、手術は行われるが、CKDが誘導されない(例えば、腎摘出術が実施されない)ldlr^{-/-}マウスからなっていた。4つの処置群(CKD-3-ビヒクル; mActRIIA-Fc処置; 疑似; 及び野生型)の各々における大動脈内カルシウムレベルの評価のために、全てのマウスを第28週で安楽死させた。

【0268】

下の表4は、研究で使用された各々のマウスで観察された大動脈内カルシウムレベル(カラム2)、並びに疑似、CKD-3-ビヒクル、mActRIIA-Fc、及び野生型研究群の各々についての平均カルシウムレベル(カラム3)を提供している。これらの結果は、図11にグラフの形で提示されている。データによって示されるように、大動脈内カルシウムの明白な低下は、ビヒクル処置群と比較して、mActRIIA-Fc処置群に属するマウスで観察された。mActRIIA-Fcで処置された5匹のCKDマウスのうち4匹において、大動脈内カルシウムのレベルは、2つの陰性対照群(野生型及び疑似マウス)で観察されるレベルと同程度であった。

10

【0269】

血管内(例えば、動脈内)カルシウムレベルの上昇は、血管石灰化と関連することが知られている(例えば、Raggi Pらの文献、Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3: 836-843を参照されたい)。したがって、前述の結果は、ActRIIA阻害が血管石灰化の治療及び予防のための好適なアプローチであることを示している。

20

【表4】

表4: 大動脈内カルシウムレベル

実験群	対象特異的 Ca ²⁺ レベル (mg/g)	平均 Ca ²⁺ mg/g
野生型 (n = 6)	0.25, 0.11, 0.26, 0.36, 0.31, 0.35	0.27 ± 0.09
疑似 (n = 8)	0.28, 0.18, 0.24, 0.16, 0.13, 0.25, 0.26, 0.27	0.22 ± 0.06
CKD-3-ビヒクル (n = 6)	0.58, 0.17, 0.51, 0.56, 0.31, 0.99	0.52 ± 0.28
mActRIIA-Fc (n = 5)	0.83, 0.28, 0.19, 0.13, 0.04	0.29 ± 0.31

30

【0270】

(6.6 血管石灰化に対するActRIIA阻害の効果)

この実施例は、慢性腎疾患を有する対象における血管石灰化に対するActRII阻害の効果の検討を記載している。

40

【0271】

前の実施例に記載された初期CKD-MBDのマウスモデルを使用することができる。このモデルでは、腎摘除をLDL受容体の遺伝的欠損であるldlrに追加し、マウスに高脂肪高コレステロール食を給餌する。ステージ3のCKDにおいて、動物は、CKD誘導性の血管石灰化刺激、骨形成の減少、FGF23レベルの上昇、高リン血症、及びPTHレベルの上昇を有する。

【0272】

((a) 材料及び方法)

(動物及び食餌:)

C57Bl/6JバックグラウンドのLDL受容体欠損(LDLR^{-/-})マウス又は野生型C57Bl/6Jマウス

50

をJackson Laboratory(Bar Harbor, Maine)から購入し、病原体のいない環境で飼育することができる。動物を第3週で離乳させ、脂肪として6.75%カロリーを有する普通食に移行させることができる。第10週で、一部の動物に、脂肪として42%カロリーを含む高コレステロール(0.15%)食(Harlan Teklad, Madison WI, 製品番号TD88137)を開始させることができる。この高コレステロール食は、この遺伝的バックグラウンドで血管石灰化を伴うアテローム性動脈硬化症を発生させることが示されている食餌である(例えば、Towlerらの文献、1998, J Biol Chem 273:30427-30434を参照されたい)。全ての食餌におけるカルシウム含量を0.6%とすることができる。動物には水を自由に与え、地方及び国の動物管理ガイドラインに従って維持することができる。mActRIIA-Fcを、週2回、腹腔内(IP)投与することができる(10mg/kg)。

10

【0273】

(外科的処置:)

2段階の処置を用いて、以前に記載されている通りに、CKDを引き起こすことができる(例えば、Daviesらの文献、2003, J Am Soc Nephrol 14:1559-1567;及びDaviesらの文献、2005, J Am Soc Nephrol 16:917-928を参照されたい)。簡潔に述べると、出生から10週間後に、2cmの側腹切開を介して電気焼灼を右腎臓に適用し、次いで、2週間後に、同様の切開を介して左全腎摘出を行うことができる。対照動物は疑似手術を受けることができる。この手術では、適当な腎臓を露出させて移動させるが、他には何も処置しない。腹腔内麻酔(キシラジン13mg/kg及びケタミン87mg/kg)を全ての処置に使用することができる。伏在静脈血試料を2回目の手術の1週間後に採取して、ベースラインの手術後腎機能を評価することができる。心内穿刺で血液を採取した後、群によって、第20週又は第26週で、動物を麻酔下で屠殺することができる。心臓及び大動脈をひとまとめにして解剖することができる。

20

【0274】

(組織調製:)

摘出した標本をホルマリン中で固定し、その後、次のように分けることができる:心臓、上行大動脈、及び大動脈弓を下行大動脈から分離し、大動脈流出路の中を通して矢状に二等分することができる。下行大動脈をその長さに沿ってほぼ半分のところで冠状に二等分することができる。4つ全ての断片を同じワックスブロックに包埋することができる。スライス(5µm厚)を切削し、ヘマトキシリン及びエオシン、トリクロム、アリザリンレッド、並びにフォンコッサで染色することができる。

30

【0275】

(免疫組織化学:)

組織切片を上記のように調製し、キシレン中で脱パラフィン処理し、段階的エタノール中で再水和させることができる。内在性ペルオキシダーゼ活性は、3%過酸化水素(Sigma, St Louis MO)中でのインキュベーションによってブロッキングすることができ、非特異的結合は、独自開発したカゼインのPBS溶液(「Background SNIPER」、BioCare Medical, Walnut Creek CA)との10分間のインキュベーションによってブロッキングすることができる。抗原回復は、クエン酸塩バッファー(「Decloaker」BioCare Medical, Walnut Creek CA)との100 で5分間のインキュベーションによって行うことができる。切片は、マウスオステオカルシン(OC)に対する親和性精製ヤギポリクローナル抗体(Biogenesis社、Brentwood NH)とともに一晩インキュベートし、その後、ビオチン化マウス抗ヤギ二次抗体とともに10分間インキュベートし、その後、ストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシダーゼ染色し(試薬は全て、BioCare Medical, Walnut Creek CA製である)、0.1%ヘマトキシリン(Sigma)で対比染色することができる。

40

【0276】

(RT-PCR:)

RNAは、製造元の指示に従って、RNAqueous-4PCRキット(Ambion)を用いて、組織試料から抽出することができる。RT-PCRは、製造元の指示に従って、ワンステップRT-PCRキット(Qiagen, Valencia CA)を用いて行うことができる。条件は: 50 で30分、95 で15分、

50

その後、94 で1分、60 で1分、及び72 で1分を35～40サイクル、その後、72 で10分とすることができる。マウスオステオカルシン及びマウスGAPDHに特異的なプライマーを選択することができる。

【0277】

(化学的石灰化定量:)

心臓及び大動脈を屠殺時に解剖し、全ての無関係な組織を解剖顕微鏡下での鈍的切開により除去することができる。組織を55 で20～24時間乾燥させ、重量を計量し、すり鉢とすりこぎで砕いて粉末にすることができる。カルシウムを、10%ギ酸(10:1 v/w)中、4で24時間溶出させることができる。溶出液のカルシウム含量を、製造元の指示に従って、クレゾールフタレインコンプレキソン法(Sigma, St Louis)を用いてアッセイすることができ、結果を乾燥組織重量に対して補正することができる。

【0278】

(骨組織形態計測:)

骨形成速度は、二重蛍光標識により決定することができる。全てのマウスは、屠殺される7日前と2日前に、腹腔内カルセイン(20mg/kg)を受けることができる。動物が屠殺される時に両方の大腿骨を解剖し、70%エタノール中に入れることができる。標本は、未脱灰の状態でプラスチック包埋キットH7000(Energy Beam Sciences)に埋め込むことができる。骨は、JB-4ミクロトーム(Energy Beam Sciences)で、前頭面を通して縦方向に10µm切片で薄切することができる。未染切片は、カルセイン標識蛍光解析に使用することができる。スライドは、Osteomeasure Image Analyzer(Osteometrics, Atlanta GA)に接続したLeitz顕微鏡で、400倍の倍率で調べることができる。動物1匹当たり、成長板の150µm近位にある遠位大腿骨の10の連続する0.0225-mm²視野を調べることができる。

【0279】

(副甲状腺ホルモンの測定及び血清化学検査:)

血液試料を、CKDの第2週及び第8週で伏在静脈の毛細管吸引によって、並びに屠殺時(12週のCKD)に異なる手順(心内穿刺)を用いて取得し、ヘパリン添加チューブに移すことができる。遠心分離(400×g、5分間)後、血漿を取り除き、分注し、-80 で凍結させることができる。インタクトPTHレベル(大量の血液が必要とされるので屠殺時にのみ行われる)は、市販のキット(Immutopics, San Clemente, CA)を用いる2部位免疫放射定量アッセイ(IRMA)により測定することができる。血中尿素窒素(BUN)、血清カルシウム、及びリンは、標準的な多チャンネル分析計技術を用いて測定することができる。

【0280】

(FGF23の測定:)

FGF23マウスELISAアッセイは、Kainos社から購入することができる。

【0281】

(DKK1及びオステオカルシンの測定:)

DKK1及び低カルボキシル化オステオカルシン用の市販のELISAアッセイを使用することができる。

【0282】

(OPG及びsRANKLの測定:)

OPG対RANKLの比は、血清アッセイで決定することができる。これらのアッセイは、骨代謝回転及び過剰な骨再吸収とよく相関することが示されている(例えば、Geusensらの文献、2006, Arthritis & Rheumatism 54:1772-17775を参照されたい)。血清中のsRANKLのレベルは、放射免疫アッセイ(Linco Research, St. Louis MO)により決定することができる。血清OPGのレベルは、ELISA法(OSTEOmedical NL, Marishof, NL)により測定することができる。アッセイ内及びアッセイ間変動係数(CV)は、製造元によれば、両検査について10%未満である。sRANKLの検出限界は0.08pmol/lであり、OPGの検出限界は、0.14pmol/lである。

【0283】

(骨代謝回転のマーカーの測定:)

血清P1NP及びオステオカルシンは、骨芽細胞活性のマーカーとして使用することができ、酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b型(TRACP 5b)(mouseTRAP, IDS Ltd, Bolden, UK)は、破骨細胞レベルのマーカーとして使用することができる。

【0284】

(炎症のマーカーの測定:)

TNF α 、及びc反応性タンパク質の血清アッセイを用いて、炎症のレベル及びmActRIIA-Fcに対する応答を追跡することができる。

【0285】

(統計解析:)

データは、ANOVAを用いて、統計的有意性($P < .05$)について解析することができる。比較は、ビヒクルで処置した動物(対照群)とmActRIIA-Fcで処置した動物の間で行うことができる。比較は、疑似手術を受けたマウスとビヒクルで処置したCKDマウスとmActRIIA-Fcで処置したCKDマウスの間で行うこともできる。これらの解析は、SPSS 11.0統計パッケージ(Needham Heights, MA)を用いて行うことができる。

【0286】

((b)研究パラメーター)

研究で使用するマウスは、下の表5に示す8つの群のうちの1つに入れることができる。

【表5】

群	群の説明	#動物
A	野生型	10
B	LDLR高脂肪/CKDビヒクル処置、第22週で安楽死	10
C	LDLR高脂肪/CKD RAP-011処置、第22週で安楽死	10
D	LDLR高脂肪/CKDビヒクル処置、第28週で安楽死	10
E	LDLR高脂肪/CKD RAP-011処置、第28週で安楽死	10
F	LDLR高脂肪/疑似手術、第28週で安楽死	10
G	LDLR高脂肪/疑似手術、第20週で安楽死	10
H	LDLR高脂肪/CKD、第14週で安楽死	10

【0287】

1つの動物群(表5のH群)を第14週で屠殺して、治療の開始時のベースライン血管石灰化及び組織形態計測値を測定することができる。C群及びE群を用いて、CKDの様々な期間にわたる、ビヒクル処置群(B群及びD群)と比較したmActRIIA-Fcによる処置の効力を評価することができる。F群及びG群は、年齢が一致した疑似手術を受けた高脂肪食給餌動物であり、この動物は、CKD効果の対照として使用することができる。処置群に無作為に割り付けた後の群当たり10匹という群サイズは、統計的有意性を得るのに十分であり得る。

【0288】

第16~18週で、糸球体濾過量(GFR)を、マウスへのイヌリンの注射及びその消失の測定により測定することができる。安楽死させるときに、血液を心内穿刺により採取することができ、血清DKK1、FGF23、オステオカルシン、PTH、及びカルシトリオールレベルを、血清カルシウム、Pi、血中尿素窒素(BUN)、グルコース、及びコレステロールレベルとともに決定することができる。

【0289】

高脂肪食を給餌したldlr-/-CKD動物由来の大動脈を解析することができる。全大動脈内カルシウムレベル及びフォンコッサ染色顕微鏡切片を得ることができる。大動脈を処理して、大動脈遺伝子発現の解析用のRNAを得ることができる。大動脈を免疫組織化学用に処

理することができる。B群及びC群の安楽死年齢である、上記のCKDのモデルの第22週で、二次性副甲状腺機能亢進症にもかかわらず、血管石灰化が確立され、低回転型骨障害が存在する。第22週～第28週で、血管石灰化が進行し、副甲状腺ホルモンの存在の効果によって、骨芽細胞表面が増加し始める。

【 0 2 9 0 】

この実施例に記載されている試験を用いて、CKDを有する対象で観察される血管石灰化、骨リモデリング速度、及び二次性副甲状腺機能亢進症に対するActRII阻害の効果を決定することができる。

【表 6】

表6: 配列情報

配列番号	説明	配列
1	ヒトActRIIA前駆ポリペプチド	MGAALKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPC YGDKRRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEV YFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVETQPTSNPVTPKPPYNNILLYSLVPLMLI AGIVICAFWVYRHHKMAYPVLPVTDPPPPSPPLGLKPLQLLEVkar GRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFI GAEKRGTSVDVDLWLI TAFHEKGSLSDFLKANVSVSNELCHIAETMARGL AYLHEDI PGLKDGHKPAI SHRDIKSKNVLKNNLTACIADFGLALKFEAG KSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQDRAFLRIDMYAMGLVLWELASR CTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSEDMQEVVVHKKRPVLRDYWQKHAG MAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQLTNIITTEDIVTVVTM VTNVDFPPKESL
2	ヒトActRIIAの可溶性(細胞外)の プロセシングされたポリペプチド 配列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP EVTQPTSNPVTPKPP
3	C末端の15アミノ酸が欠失した、 ヒトActRIIAの可溶性(細胞外)の プロセシングされたポリペプチド 配列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
4	ヒトActRIIA前駆タンパク質を コードする核酸配列	ATGGGAGCTGCTGCAAGTTGGCGTTTGGCGTCTTTCTTATCTCCTGTT TTCAAGTGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGAGTGTCTTTCTTTA ATGCTAATTGGGAAAAGACAGAACTCAAACTGGTGTGAAACCGTGT TATGTTGACAAAGATAAACGGCGGCAATGTTTGTCTACCTGGAAGAAAT TTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAACAAAGTTGTGGCTGGATGATATCA ACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTA TATTTTGTGTGTGTGAGGGCAATATGTGTAATAAGAAAGTTTCTTATTT TCCAGAGATGGAAGTACACAGCCCACTTCAAACTCAGTTACACCTAAGC CACCTATTACAACATCTTGTCTATTTCTTGGTGCCACTTATGTTAAAT GCGGGGATTGTCAATTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGC CTACCCCTCCTGTACTTGTTCCTCAACTCAAGACCCAGGACCCACCCCTT

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		CTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAGTGAAAGCAAGG GGAAGATTTGGTTGTCTGGAAAGCCAGTTCGTTAA CGAATATGTGGC TGTCAAAATATTTCCAAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAATGAATACG AAGTCTACAGTTTGCCCTGGAAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCAAT GGTGCAAAAAACGAGGCACCACTGTTGATGTGGATCTTTGGCTGATCAC AGCATTTCAATGAAAAGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAAATGTGG TCTCTTGGAATGAACCTGTGTCAATATGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTG GCATATTTACATGAGGATATACCTGGCTTAAAGATGGCCACAAACCTGC CATATCTCACAGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACC TGACAGCTTGCAATGCTGACTTTGGGTTGGCTTAAATTTGAGGCTGGC AAGTCTGCAGGCGATACCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGC TCCAGAGGATTAAGAGGTGCTATAAACTTCGAAAGGATGCAATTTTGA GGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCTTAATGGAACTGGCTTCTCGC TGTAAGTGTGAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGA GGAATTTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGC ATAAAAAAAGAGGCTGTTTAAAGAGATTATTGGCAGAAAAATGCTGGA ATGGCAATGCTCTGTGAAACCAATTGAAAGAAATGTTGGGATCACGACGAGA AGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAAATACCCAGATGCAGA GACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACATTTAAACAGTGGTCACAAATG GTGACAAATGTTGACTTTCTCTCCCAAGAAATCTAGTCTATGA
5	ヒトActRIIA可溶性(細胞外) ポリペプチドをコードする 核酸配列	ATACTTGGTAGATCAGAAACCTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTG GGAATAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAAACCGTGTATGTTGACA AAGATAAACGGCGCATTTGTTGCTACCTGGAAGAAATATTCTGGTTCC ATTGAAAATAGTGAAACAAAGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAAGTATATTTTGT GCTGTGAGGCAATATGTGTAATGAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATG GAAGTCACACAGCCCACTTCAAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC
6	Fcドメインに融合したActRIIAの 可溶性細胞外ドメインを含む 融合タンパク質	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCK (A) VSNKALPVIIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFPLYSLKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSPGK*
7	ヒトFcドメインに融合したヒト	ILGRSETQCECLFFNANWEKDRNTQGTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	ActRIIAの細胞外ドメイン	IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM EVTQPTSNPVTPPKPPTGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEIKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	ミツバチメラリチン(HBML)の リーダー配列	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
9	組織プラスミノーゲン活性化因子 (TPA)のリーダー配列	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP
10	天然のActRIIAリーダー	MGAAAKLAFVFLISCSSGA
11	ActRIIA-hFc及びActRIIA-mFcの N末端配列	ILGRSETQE
12	ActRIIAの細胞外ドメインの C末端の15アミノ酸の欠失を有する ActRIIA-Fcタンパク質	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDYKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM TGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPKEIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	TPAリーダー配列を有する プロセッシングされない ActRIIA-hFc	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQT GVEPCYGDYKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKK DSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTPQTSNPNVTPPKPPTGGGTHTCP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PVPKEIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
16	ヒトActRIIB前駆タンパク質配列 (A64)	MTAPWVALALLWGSLW PGSGRGEAETRECIYY NANWELERTNQGLER CEGEQDKRLHCYASWA NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLLTVLAYSLL PIGGLSLIVLLAFWY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSLVGLKPLQL LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNIIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLA VRFEPPGKPP GDTHGQVGTRRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRK KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKHG GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVLDLPPKESSI
17	ヒトActRIIBの可溶性 (細胞外) の プロセシングされたポリペプチド 配列 (配列番号16のアミノ酸19~134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
18	C末端の15アミノ酸が欠失した、 ヒトActRIIBの可溶性 (細胞外) の プロセシングされたポリペプチド 配列 (配列番号16のアミノ酸19~119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
19	ヒトActRIIB (A64) 前駆タンパク質を コードする核酸配列	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCC CGGCTCTGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGATCTACTACAACG CCAACTGGAGCTGGAGCGCACCAACAGAGCGGCTGGAGCGCTGCGAA GGCAGCAGGACAGCGGCTGCACTGCTACGCTCTCTGGGCCAACAGCTC TGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGCTGCTGGTGAATGACTTCAACT GCTACGATAGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCGAGGTGTAC TTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGTCAACGAGCGCTTCACTATTGCC

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		AGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCAAGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA CCCTGCTCAGGCTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCATCGGGGCTTTCC CTCATCTGCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGAAGCCCCCTA CGTCACTGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCTCCACCACTCCCTC TGGTGGGCTGAAGCCACTGCAAGTGTGGAGATCAAGGCTCGGGGCGC TTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAA GATCTTCCACTCCAGGACAAAGCAGTGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCT TCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTACATTTCACTGCTGCC GAGAAGCGAGGCTCCAACTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTT CCATGACAAAGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGAAACATCATACAT GGAACGAACTGTGTATGTAGCAGAGACGATGTACGAGGCTCTCATAC CTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCAGGGCCACAAGCCGCTAT TGCCACAGGGACTTTAAAGTAAGAAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCA CAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGCTGTTCGATTGAGCCAGGGAAA CCTCCAGGGGACACCCAGGAGCCATCAACTCCAGAGAGATGCTTCCCTGCCA TGAGGTGCTCGAGGAGCCATCAACTCCAGAGAGATGCTTCCCTGCCA TTGACATGTATGCCATGGGTTGGTGTGCTGTGGAGCTTGTCTCGCTGC AAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGA GATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGTGCACA AGAAGATGAGGCCACCATTAAGATCACTGTTGAAACACCCGGGCTG GCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGACCATGATGCAGAGGC TCGCTTGTCGGCGGCTGTGTGGAGGAGCGGCTGTCCCTGATTCGGAGGT CGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTC ACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA
20	Fcドメインに融合したActRIIB (A64:配列番号17)の可溶性細胞外 ドメインを含む融合タンパク質	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEITISKAKQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	Fcドメインに融合した、 C末端の15アミノ酸が欠失した	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSH

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	ActRIIB (A64) の可溶性細胞外ドメイン(配列番号18)を含む融合タンパク質	EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPKEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の5アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~129)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPP
23	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPPT
24	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、	MDAMKRGCLCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDDFNCYDRQECVATEENPQV

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有し、TPAリーダー配列を有する、プロセッシングされていないActRIIB-Fc融合タンパク質	YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
25	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号28のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、プロセッシングされたActRIIB-Fc融合タンパク質	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
27	C末端の15アミノ酸が欠失した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20~119)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
28	ヒトActRIIB前駆タンパク質配列 (R64)	MTAPWVALALLWGSLW PGSGRGEAETRECIYY NANWELERTNQSGLER CEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAFTLLTVLAYSL PIGGLSLIVLLAFWY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSLVGLKPLQL LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLGNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLAVRFEPEGKPP GDTHGQVGTRRYMAPE VLEGAINFQORDAFLRI DMYAMGLVLWELVSR C KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKH P GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVDLPPKESSI
29	ヒトActRIIBの可溶性 (細胞外) の プロセシングされたポリペプチド配列 (配列番号28のアミノ酸19~134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
30	C末端の15アミノ酸が欠失した、 ヒトActRIIBの可溶性 (細胞外) の プロセシングされたポリペプチド 配列 (配列番号28のアミノ酸19~119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
31	ヒトActRIIBの可溶性 (細胞外) の プロセシングされたポリペプチド 配列 (配列番号28のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
32	C末端の15アミノ酸が欠失した、	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号28のアミノ酸20~119)	
33	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号16のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANSSGTIELV KKGCVDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
34	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号16のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有し、TPAリーダー配列を有する、プロセッシングされていないActRIIB-Fc融合タンパク質	MDAMKRGLCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSGLERC EGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPVTTYEPPTGGGTHTCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
35	ECドメインのN末端の6アミノ酸が欠失し、	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVK KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPV TYEPPTGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
	ECドメインのC末端の3アミノ酸が欠失し(配列番号16のアミノ酸25~131)、L79D突然変異を有する、プロセッシングされたActRIIB-Fc融合タンパク質	WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
36	L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号28のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
37	L79D突然変異を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
38	L79D突然変異を有し、GGGリンカーを有するFcドメインに融合した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号28のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYKKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
39	L79D突然変異を有し、Fcドメインに融合した、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20~134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYKKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		ENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYYT QKSLSLSPGK*
40	L79D突然変異を有し、Fcドメインに融合し、TPAリダー配列を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号28のアミノ酸20～134)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYYT QKSLSLSPGK*
41	L79D突然変異を有し、Fcドメインに融合し、TPAリダー配列を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列(配列番号16のアミノ酸20～134)	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYYT QKSLSLSPGK*
42	変異体C末端配列(W02007/053775号)に開示されている)を有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSGT IELVKKGCWLDNDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGGALWLCLEGPAHE
43	変異体C末端配列(W02007/053775号)に開示されている)を有し、L79D突然変異を有する、	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGGALWLCLEGPAHE

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
44	ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列 変異体C末端配列(W02007/053775号)に開示されている)を有し、L79D突然変異を有し、IgGリンカーを有するFcドメインを有する、ヒトActRIIBの可溶性(細胞外)のプロセッシングされたポリペプチド配列	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHE TGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
45	配列番号24をコードする核酸配列	ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACCTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACCTG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA ATTGTTATGA CCGCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTCTGTT GTTGCAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCGCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CACCTGAACT GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCG CCAACAAACC CCTGGGGGA CCGTCAGTCT CCGGACCCCT GAGGTCACAT AAGGACACCC TCATGATCTC CCGAAGACC CTGAGGTCAA GCGTGGTGGT GGACGTGAGC GCCTGGAGGT GCATAATGCC GTTCAACTGG TACGTGGACG GCAGTACAAC AGCACGTACC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GTCTGCACC AGGACTGGCT GTGTGGTCAG CGTCTCACC GCAAGGTCTC CAACAAAGCC GAATGGCAAG GAGTACAAGT AACCATCTCC AAAGCCAAAG CTCCAGCCC CCATCGAGAA GTGTACACCC TGCCCCCATC GGCAGCCCC AGAACACAG ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA CAGCGACATC GCCGTGGAGT CTGGTCAAAG GCTTCTATCC

10

20

30

40

配列番号	説明	配列
		GGGAGAGCAA TGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA
46	Fcドメインに融合した、 ActRIIB (R64; 配列番号29) の 可溶性細胞外ドメインを含む 融合タンパク質	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKTSKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Fcドメインに融合した、C末端の 15アミノ酸が欠失した ActRIIB (R64) の可溶性細胞外 ドメイン (配列番号30) を含む 融合タンパク質	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPKEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	全長のプロセッシングされていない 前駆タンパク質GDF11、すなわち、 GDF11プレプロタンパク質	MVLAAPLLGLFLLALLLELRPRGEAAEGPAAAAAAGVGGERSRPAP SVAPEDGCPVCVWRQHSRELRLLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPK APPLQQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDYHATTETVISMAQETDPAVQTDGSP LCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLWVYLRVPVPATVYLIQLRLPLTGEGTAGGG GGRRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIENAFDPS GTDLAVTSLGPGAEGHLHPFMELRVLENTKRSRNLGLDCDEHSSESRCRYPL TVDFEAFGWDWI IAPKRYKANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPC CTPTKMSPINMLYFNDKQII YGKI PGMVVDRCGCS
49	配列番号48をコードする核酸配列	ATGGTGCTCGCGGCCCCGCTGCTGCTGGGCTTCTGTCTCTCGCCCTG GAGCTGCGGCCCCGGGGGAGCGCGCCGAGGCCCCCGCGCGCGCGGCG GCTCC AGCGGCGCAGCCCCGCTCCGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGCCGCTG TGCGTTTGGCGGCGAGCACAGCCGCGAGCTGCGCCTAGAGAGCATCAAG

配列番号	説明	配列
		GCCACCAAGAGACCGTCAATTAGCATGGCCAGGAGACGGACCCAGCA GTACAGACAGATGGCAGCCCTCTCTGCTGCCATTTTCACTTCAGCCCC AAGTGATGTTCAAAAAGTACTGAAGGCCAGCTGTGGTGTACCTA CGCCCTGTACCCCGCCAGCCACAGTCTACCTGCAGATCTTGCAGACTA AAACCCCTAACTGGGAAGGACCGCAGGGGAGGGCGGAGGCCGG CGTCACATCCGTATCCGTCACTGAAGATTGAGCTGCATCAGCTCA GGCAATTGGCAGAGCATCGACTTCAAGCAAGTGTACACAGCTGGTTC CGCCAGCCACAGAGCAACTGGGGCATCGAGATCAACGCCTTTGATCCC AGTGGCACAGACCTGGCTGTCACTCCCTGGGGCCGGAGCCGAGGGG CTGCATCCATTCATGGAGCTTCGAGTCTTAGAGAACACAAAACGTTCC CGGCGG
52	成熟ヒトGDF11タンパク質	NLGLDCDEHSSERCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCE YFMQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQLIYG KIPGMVVDRCGCS
53	配列番号52をコードする核酸配列	AACCTGGGTCTGGACTGCGACGAGCACTCAAGCGAGTCCCGCTGCTGC CGATATCCCTTCACAGTGGACTTTGAGGCTTTCGGCTGGACTGGATC ATCGCACCTAAGCGCTACAAAGGCCAACTACTGCTCCGGCCAGTCCGAG TACATGTTTCATGCAAAAATATCCGCATACCCATTTGTTGTCAGCAGGCC AATCCAAGAGGCTCTGCTGGGCCCTGTTGTACCCCCACCAAGATGTCC CCAATCAACATGCTCTACTTCAATGACAAGCAGCAGATTATCTACGGC AAGATCCCTGGCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGCTCT
54	マウスFcドメインに融合したマウス ActRIIAの細胞外ドメイン (「mActRIIA-Fc」)	配列番号7のマウス対応物。ActRIIAの細胞外ドメインに融合したマウスIgG2a を含む。

10

20

30

40

50

【0291】

(等価物)

本発明は、その具体的な実施態様に関して詳細に記載されているが、機能的に等価であるバリエーションが本発明の範囲内にあることが理解されるであろう。実際、本明細書に

示され、記載されたものに加えた本発明の様々な変更は、前述の説明及び付随する図面から当業者に明らかになるであろう。そのような変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施態様の多くの等価物を認識するか、又はルーチンの実験だけを用いて、それらを確認することができるであろう。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【0292】

本明細書に言及された全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各々の個々の刊行物、特許、又は特許出願が、その全体として引用により具体的かつ個別に組み込まれることが示される場合と同じ程度に、引用により本明細書中に組み込まれる。

10

【図1】

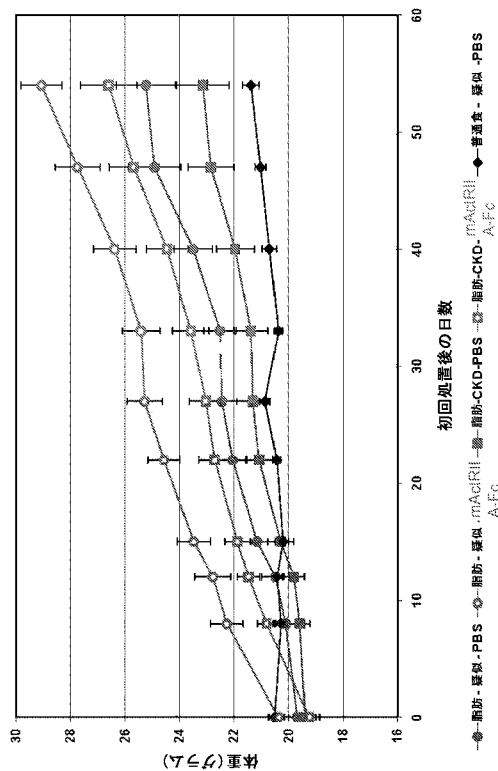


図1

【図2】

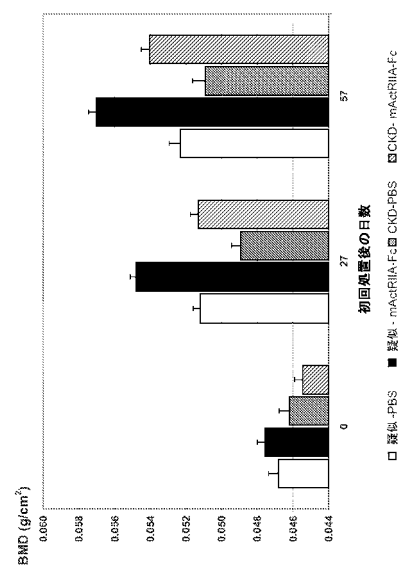


図2

【図 3】

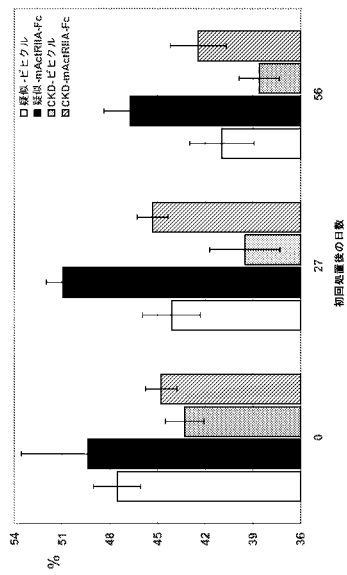


図 3

【図 4】

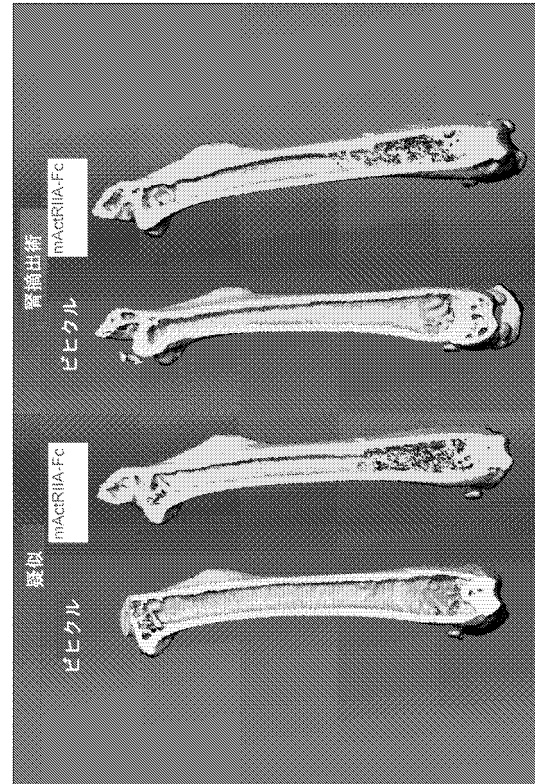
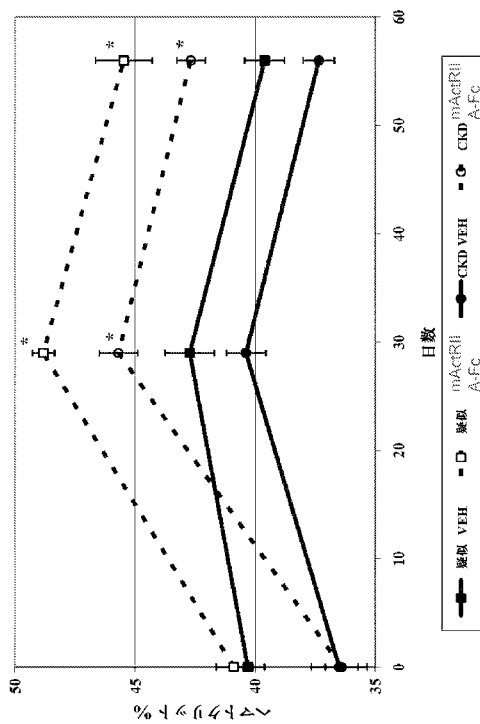


図 4

【図 5】



*=VEHと比べて、 $p \leq 0.01$

図 5

【図 6】

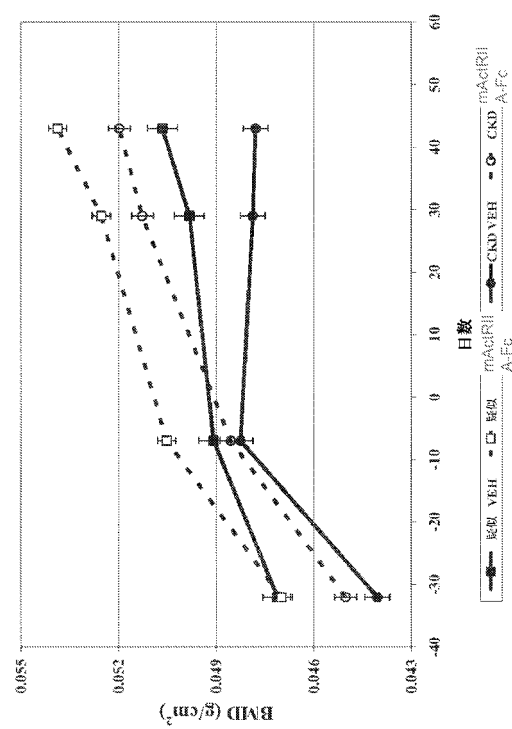
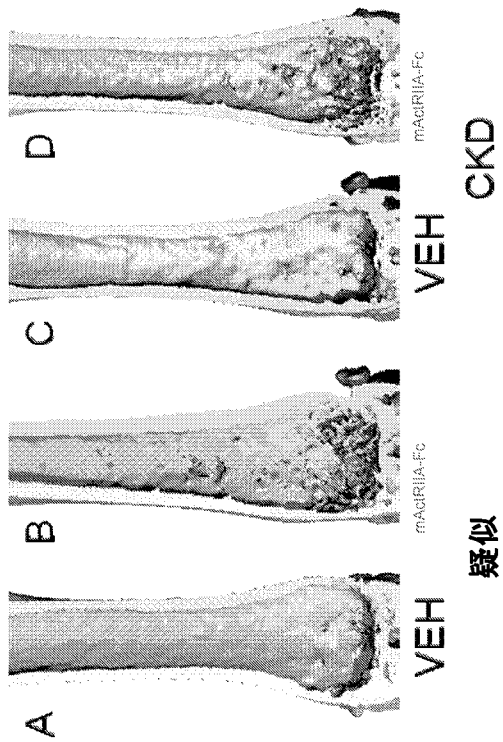


図 6

【 図 7 】



【 図 9 】

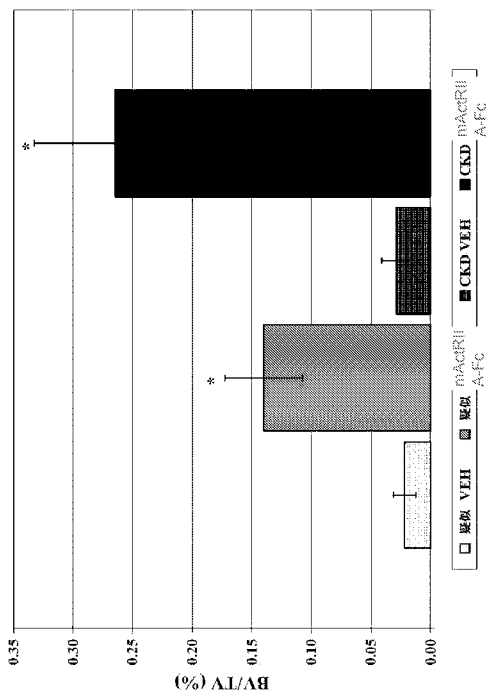


図 9

【 図 8 】

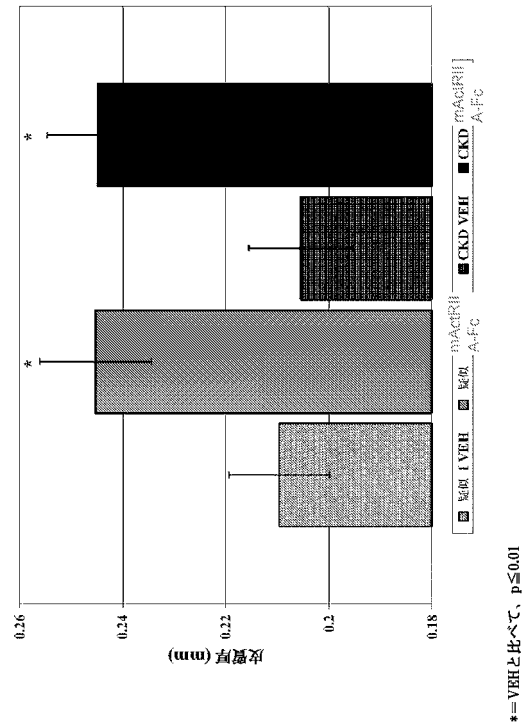


図 8

【 図 10 】

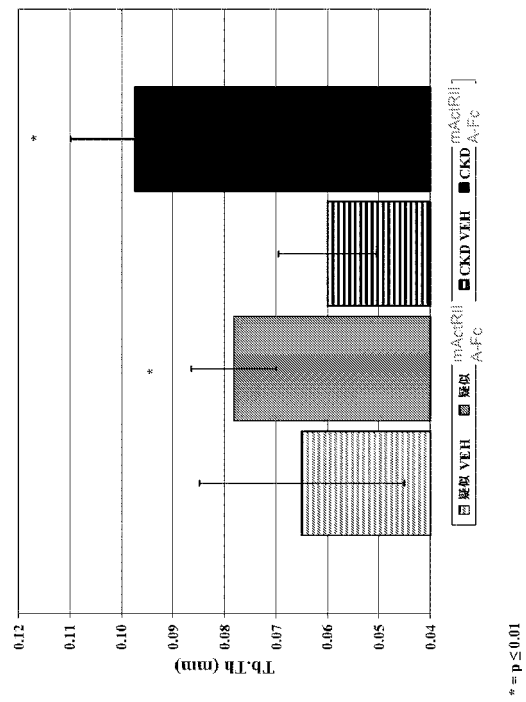


図 10

【 図 1 1 】

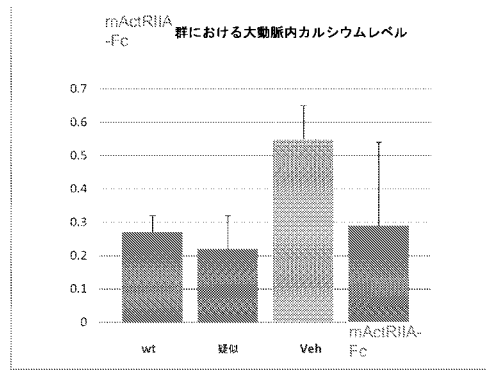


図 11

【 配 列 表 】

2016504275000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成27年8月27日 (2015.8.27)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 追 加

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2016504275000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/68009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/00, A61K 38/29, A61P 19/08, A61P 19/10, A61K 38/22, A61K 38/27 (2013.01)

USPC - 514/15.4, 514/16.7, 514/5.1, 514/11.8, 514/9.7, 514/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): A61K 38/00, A61K 38/29, A61P 19/08, A61P 19/10, A61K 38/22, A61K 38/27 (2013.01)

USPC: 514/15.4, 514/16.7, 514/5.1, 514/11.8, 514/9.7, 514/51

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 514/11.8, 514/9.7, 514/16.9, 424/130.1Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, PubWEST, Google Scholar, Google Patents: CKD-MBD, turnover, adynamic, fibrosis, ACVR1, ACVR2, Activin A Receptor, Activin Receptor, or ACTR, ACTR1A, activin receptor, tetracycline, calcification, hyperphosphatemia, osteomalacia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0180220 A1 (CAO X.) 24 June 2010 (24.06.2010) para [0088]; [0090]; [0091]; [0094]; [0116]-[0119]; [0128]; [0140]-[0141].	1-2, 4-6, (13-17)/(1,2,4,6)
Y		3, 7, 10, 11/(1,2,4,6,7,10) -12/(1,2,4,6,7,10), 13/(7,10), 14/(7,10), 15/(7,8,10), (16-17)/(7,10)
X	US 2011/0294734 A1 (GARRETA et al.) 01 December 2011 (01.12.2011); abstract; para [0064], [0118].	8-9, (13-14)/8, (16-17)/8
Y		(11-12)/8, 15/8
Y	US 2010/0113932 A1 (ANTICH et al.) 06 May 2010 (06.05.2010); para [0023], [0093].	3
Y	US 2011/0053930 A1 (YU et al.) 03 March 2011 (03.03.2011) para [0005]; [0109]; [0188]; [0252].	7, 10, (11-17)/(7,10)
Y	US 2009/0047281 A1 (SHERMAN et al.) 19 February 2009 (19.02.2009); SEQ ID NO: 7; para [0009].	11-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 2014 (10.01.2014)

Date of mailing of the international search report

03 FEB 2014

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P 3/14 (2006.01)	A 6 1 K	37/02		
	A 6 1 P	3/14		

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

- (71) 出願人 515119561
 ビクター ショール スローン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 2 2 フレミングトン スターラップ レーン 3
 4
- (71) 出願人 515119572
 キース フルスカ
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 3 1 3 0 セント ルイス ワン ブルッキングズ ドライブ
- (71) 出願人 515119583
 イイフ ファンゲ
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 3 1 3 0 セント ルイス ワン ブルッキングズ ドライブ
- (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
- (72) 発明者 ビクター ショール スローン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 2 2 フレミングトン スターラップ レーン 3
 4
- (72) 発明者 キース フルスカ
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 3 1 3 0 セント ルイス ワン ブルッキングズ ドライブ
- (72) 発明者 イイフ ファンゲ
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 3 1 3 0 セント ルイス ワン ブルッキングズ ドライブ
- (72) 発明者 ビクトリア スング
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 4 サン フランシスコ グランド ビュー アベ
 ニュー 1 0 9
- (72) 発明者 ランダル スティーブンス
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 0 6 0 ブレインフィールド プロスペクト アベ
 ニュー 1 4 4 0
- (72) 発明者 ウィリアム スミス
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 2 4 9 8 ウッドストック グラスコ ターンピケ 1 5 2
 1

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 MA55 MA66 NA14
 ZA361 ZA451 ZA811 ZA961 ZB211 ZC211 ZC501