

(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2018-510637

(P2018-510637A)

(43) 公表日 平成30年4月19日 (2018. 4. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 7 6
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47 (2006. 01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/18 (2006. 01)	A 6 1 K 38/18	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/64 (2017. 01)	A 6 1 K 47/64	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-549757 (P2017-549757)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月25日 (2016. 3. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月13日 (2017. 11. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/024368
 (87) 国際公開番号 W02016/154601
 (87) 国際公開日 平成28年9月29日 (2016. 9. 29)
 (31) 優先権主張番号 62/138, 886
 (32) 優先日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

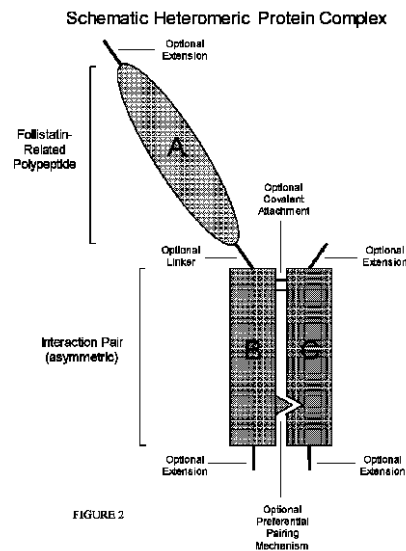
(71) 出願人 509125475
 アクセルロン ファーマ, インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, シドニー ス
 トリート 128
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 クマール, ラビンドラ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01
 720, アクトン, アーリントン ス
 トリート 421

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フォリスタチン関連融合タンパク質およびその使用

(57) 【要約】

本開示は、齧歯類および霊長類、特に、ヒトを含む脊椎動物において、TGFβスーパーファミリーリガンド、特に、GDF8、GDF11、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンCおよびアクチビンEなどのリガンドの活性を阻害するための組成物および方法を提供する。本開示の組成物は、フォリスタチン関連ポリペプチドが共有結合または非共有結合により会合する、ヘテロマーFc相互作用ペアを含むタンパク質複合体/融合体を含有する。本組成物は、フォリスタチン関連ポリペプチドおよび/またはフォリスタチンリガンドの異常活性に関連する疾患または障害の処置または予防に使用することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 2 のポリペプチドと共有結合または非共有結合により会合した第 1 のポリペプチドを含むタンパク質複合体であって、

a. 前記第 1 のポリペプチドが、フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および相互作用ペアの第 1 のメンバーのアミノ酸配列を含み、

b. 前記第 2 のポリペプチドが、前記相互作用ペアの第 2 のメンバーのアミノ酸配列を含み、前記第 2 のポリペプチドが、フォリスタチン関連ポリペプチドを含まない、タンパク質複合体。

【請求項 2】

10

前記フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 1 ～ 33 のうちいずれかのアミノ酸配列に、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 3】

前記第 1 のポリペプチドが、前記フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および前記相互作用ペアの前記第 1 のメンバーのアミノ酸配列の間に配置されたリンカーポリペプチドを含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 4】

20

前記相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、免疫グロブリンの定常ドメインを含み、前記相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、免疫グロブリンの定常ドメインを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 5】

前記相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、免疫グロブリンの Fc ドメインを含み、前記相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、免疫グロブリンの定常ドメインを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 6】

前記相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 の Fc ドメインであるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

30

【請求項 7】

前記相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 34 ～ 46 のうちのいずれかに、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 8】

前記相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 の Fc ドメインであるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 9】

40

前記相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 34 ～ 46 のうちのいずれかに、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 10】

前記相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、前記相互作用ペアの前記第 2 のメンバーと共有結合または非共有結合により会合して、二量体のタンパク質複合体を形成する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 11】

前記相互作用ペアが、非対称相互作用ペアである、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

50

【請求項 1 2】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、I g G の第 1 の修飾された定常ドメインを含み、前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、I g G の第 2 の修飾された定常ドメインを含み、前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーおよび前記第 2 のメンバーが、会合して、ヘテロ二量体の複合体を形成する、請求項 1 1 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 1 3】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、I g G の第 1 の修飾された F c 部分を含み、前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、I g G の第 2 の修飾された F c 部分を含み、前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーおよび前記第 2 のメンバーが、会合して、ヘテロ二量体の複合体を形成する、請求項 1 1 に記載のタンパク質複合体。

10

【請求項 1 4】

I g G の前記第 1 の F c 部分が、群：配列番号 3 4 ～ 4 6 から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含み、I g G の前記第 2 の F c 部分が、I g G の前記第 1 の F c 部分のアミノ酸配列とは異なり、かつ群：配列番号 3 4 ～ 4 6 から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 に記載のタンパク質複合体。

20

【請求項 1 5】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 3 9 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 1 6】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 0 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 から 1 5 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 1 7】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 0 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

30

【請求項 1 8】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 3 9 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 1 7 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 1 9】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 1 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

40

【請求項 2 0】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 2 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 1】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 2 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

50

【請求項 2 2】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 1 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 2 1 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 3】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 3 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 4】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 4 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 2 3 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 5】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 4 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 6】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 3 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 2 5 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 7】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 5 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 8】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 6 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 2 7 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 2 9】

前記非対称相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、配列番号 4 6 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 3 0】

前記非対称相互作用ペアの前記第 2 のメンバーが、配列番号 4 5 のアミノ酸配列に、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3、1 4 または 2 9 のいずれか一項に記載のタンパク質複合体。

【請求項 3 1】

前記相互作用ペアが、ガイドされない相互作用ペアである、請求項 1 から 1 1 のいずれかに記載のタンパク質複合体。

【請求項 3 2】

前記ガイドされない相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、前記相互作用ペアの前記第 2 のメンバーと共有結合または非共有結合により会合して、二量体の複合体を形成する、請求項 3 1 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 3 3】

前記ガイドされない相互作用ペアの前記第 1 のメンバーが、前記ガイドされない相互作

10

20

30

40

50

用ペアの前記第2のメンバーと同じアミノ酸配列を有する、請求項31または32に記載のタンパク質複合体。

【請求項34】

前記第2のポリペプチドが、前記相互作用ペアの第2のメンバーのアミノ酸配列を含み、前記第2のポリペプチドが、実質的な生物学的活性を付与するいかなる他のアミノ酸配列も含まない、請求項1から33のいずれかに記載のタンパク質複合体。

【請求項35】

前記第2のポリペプチドが、前記相互作用ペアの前記第2のメンバーのアミノ酸配列のC末端、N末端またはCおよびN末端の両方に融合された追加的な1～50、1～40、1～30、1～20または1～10アミノ酸を含み得る条件で、前記第2のポリペプチドが、前記相互作用ペアの第2のメンバーのアミノ酸配列からなる、請求項1から34のいずれかに記載のタンパク質複合体。

10

【請求項36】

前記追加的なアミノ酸が、実質的な生物学的活性を付与しない、請求項35に記載のタンパク質複合体。

【請求項37】

10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} もしくは 10^{-12} を超えるまたはこれに等しい K_D で、GDF8、GDF11、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンCまたはアクチビンEから選択される1つまたは複数のリガンドに結合する、請求項1から36のいずれかに記載のタンパク質複合体。

20

【請求項38】

細胞ベースのアッセイにおいて、GDF8、GDF11、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンCまたはアクチビンEから選択される1つまたは複数のリガンドによるシグナル伝達を阻害する、請求項1から36のいずれかに記載のタンパク質複合体。

【請求項39】

少なくとも6、12、24、36、48または72時間の、マウスにおける血清半減期を呈示する、請求項1から38のいずれかに記載のタンパク質複合体。

【請求項40】

少なくとも6、8、10または12日間の、ヒトにおける血清半減期を呈示する、請求項1から38のいずれかに記載のタンパク質複合体。

30

【請求項41】

ヘテロ二量体である、請求項1から40のいずれかに記載のタンパク質複合体。

【請求項42】

請求項1から41のいずれかに記載のタンパク質複合体を含む医薬調製物。

【請求項43】

請求項1から40のいずれかに記載のタンパク質複合体が、他のポリペプチド構成要素に関して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%純粋である、請求項42に記載の医薬調製物。

【請求項44】

第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドの自己会合によって形成された、20%、15%、10%、5%、3%、2%または1%未満のホモ二量体を含む、請求項42または43に記載の医薬調製物。

40

【請求項45】

フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および非対称相互作用ペアのメンバーのアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド。

【請求項46】

前記フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号1から33のうちのいずれかのアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項45に記載の融合ポリペプチド。

50

【請求項 47】

前記フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および前記非対称相互作用ペアの前記メンバーのアミノ酸配列の間に配置されたリンカーポリペプチドを含む、請求項 45 または 46 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 48】

前記非対称相互作用ペアの前記メンバーが、免疫グロブリンの定常ドメインを含む、請求項 45、46 または 47 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 49】

前記非対称相互作用ペアの前記メンバーが、免疫グロブリンの Fc ドメインを含む、請求項 45、46 または 47 に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 50】

前記非対称相互作用ペアの前記メンバーが、IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 の Fc ドメインであるアミノ酸配列を含む、請求項 45、46 または 47 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 51】

前記非対称相互作用ペアの前記メンバーが、配列番号 34～46 のうちのいずれかに、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 45、46 または 47 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 52】

前記非対称相互作用ペアの前記メンバーが、配列番号 39～46 のうちのいずれかに、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 45、46 または 47 に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 53】

a. 前記第 1 のポリペプチドが、配列番号 57 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含み、

b. 前記第 2 のポリペプチドが、配列番号 58 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、

請求項 1 に記載のタンパク質複合体。

30

【請求項 54】

a. 前記第 1 のポリペプチドが、配列番号 71 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含み、

b. 前記第 2 のポリペプチドが、配列番号 72 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、

請求項 1 に記載のタンパク質複合体。

【請求項 55】

請求項 45 から 52 のいずれか一項に記載の融合タンパク質のコード配列を含む核酸。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2015 年 3 月 26 日に提出された米国仮出願第 62/138,886 号（現在係属中）の利益を主張する。上記出願の内容および開示は、その全体が参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

トランスフォーミング増殖因子-β（TGFβ）スーパーファミリーは、共通の配列エ

50

レメントおよび構造モチーフを共有する種々の増殖因子を含有する。これらのタンパク質は、脊椎動物および無脊椎動物の両方における多種多様な細胞型において生物学的効果を発揮することが公知である。このスーパーファミリーのメンバーは、胚発生の際にパターン形成および組織特異化において重要な機能を果たし、脂肪生成、筋形成、軟骨形成、心臓発生、造血発生、神経発生および上皮細胞分化を含む種々の分化過程に影響を与えることができる。スーパーファミリーメンバーは、多様な、多くの場合補完的な効果を有する。TGFβファミリーのメンバーの活性を操作することにより、生物に有意な生理的变化を引き起こすことが可能になることが多い。筋肉、骨、軟骨および他の組織の変化は、適切なTGFβスーパーファミリーメンバーにより媒介されるシグナル伝達を増加するか、またはこれに拮抗することにより達成することができる。

10

【0003】

多くの場合リガンドトラップと称される天然に存在するタンパク質は、TGFβスーパーファミリーリガンドの細胞外調節因子として機能する。このようなリガンドトラップは、可溶性形態でまたは細胞外マトリクスに取り付けられて作用し、典型的には、受容体活性化に必要とされるエピトープに結合することによりリガンドを隔離する。リガンドトラップの1ファミリーは、フォリスタチンおよびフォリスタチン関連タンパク質を含み、これらは、複数系統の証拠に基づく望ましい機能活性を保持するが、治療剤として使用するのには困難であることが判明した。したがって、TGFβスーパーファミリーシグナル伝達の強力な調節因子として機能するような薬剤が必要とされている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

部分的に、本開示は、フォリスタチン関連融合タンパク質を含むヘテロマータンパク質複合体を提供する。このようなヘテロマータンパク質複合体は、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンE、GDF8およびGDF11などのリガンドの高アフィニティー結合および阻害を任意選択で呈示し、天然型のフォリスタチン関連タンパク質と比べて、組換え細胞株における改善された産生、精製に関する改善された特性および／または延長された血清半減期を任意選択で呈示する。

【0005】

ある特定の態様では、本明細書で記載されるタンパク質複合体は、第2のポリペプチドと共有結合または非共有結合により会合した第1のポリペプチドであって、第1のポリペプチドが、フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および相互作用ペアの第1のメンバーのアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチドが、相互作用ペアの第2のメンバーのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。他の態様では、本明細書で記載されるタンパク質複合体は、第2のポリペプチドと非共有結合により会合した第1のポリペプチドであって、第1のポリペプチドが、フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および相互作用ペアの第1のメンバーのアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチドが、相互作用ペアの第2のメンバーのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

30

【0006】

本明細書で記載されるフォリスタチン関連ポリペプチドは、配列番号1～33のうちのいずれか一配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、これから本質的になるが、またはこれからなるポリペプチドを含む。任意選択で、フォリスタチン関連ポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバーに直接的に接続される、またはリンカーなど、介在配列が、フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および相互作用ペアの第1のメンバーのアミノ酸配列の間に配置されてもよい。リンカーの例として、配列TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGSおよびGGGが挙げられる。任意選択で、第1のポリペプチドは、相互作用ペアの第1のメンバーまたはフォリスタチン関連ポリペプチドに対しC末端および／またはN末端に配置された追加的なアミノ酸（例えば、1～50、1～40、1～30、1～20または1～10アミノ酸）を

40

50

含み得る。相互作用ペアの第1のメンバーまたはフォリスタチン関連ポリペプチドに対しC末端またはN末端に配置されたこのような追加的なアミノ酸は、生物学的活性を付与することができる。代替的に、このような追加的なアミノ酸は、生物学的活性を付与しなくてよいまたは実質的に付与しなくてよい。任意選択で、このような追加的なアミノ酸は、フォリスタチン関連ポリペプチドに対して異種であり、好ましくは、フォリスタチン関連ポリペプチドではない。

【0007】

第2のポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバーから本質的になるか、またはこれからなることができる。任意選択で、第2のポリペプチドは、相互作用ペアの第2のメンバーに対しC末端および／またはN末端に配置された追加的なアミノ酸（例えば、1～50、1～40、1～30、1～20または1～10アミノ酸）を含み得る。相互作用ペアの第2のメンバーに対しC末端またはN末端に配置されたこのような追加的なアミノ酸は、生物学的活性を付与することができる。代替的に、相互作用ペアの第2のメンバーに対しC末端またはN末端に配置されたこのような追加的なアミノ酸は、生物学的活性を付与しなくてよいまたは実質的に付与しなくてよい。任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーに対しC末端またはN末端に配置されたこのような追加的なアミノ酸は、フォリスタチン関連ポリペプチドにとって異種となるべきであり、好ましくは、フォリスタチン関連ポリペプチドではない。

【0008】

本明細書で記載される相互作用ペアは、二量体化を促進するか、または高次の多量体を形成するように設計されている。一部の実施形態では、相互作用ペアは、相互作用して複合体、特に、ヘテロ二量体の複合体を形成する任意の2つのポリペプチド配列の場合もあるが、実効性のある実施形態は、ホモ二量体の複合体を形成する相互作用ペアを用いることもできる。相互作用ペアの第1および第2のメンバーは、非対称ペアとなることができ、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりもむしろ、互いと優先的に会合することを意味する。したがって、非対称相互作用ペアの第1および第2のメンバーは、会合して、ヘテロ二量体の複合体を形成することができる。代替的に、相互作用ペアは、ガイドされなくてよく、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先度なしで、互いと会合しても自己会合してもよく、よって、同じまたは異なるアミノ酸配列を有することができることを意味する。したがって、ガイドされない相互作用ペアの第1および第2のメンバーは、会合して、ホモ二量体の複合体またはヘテロ二量体の複合体を形成することができる。任意選択で、相互作用的作用ペア（例えば、非対称ペアまたはガイドされない相互作用ペア）の第1のメンバーは、相互作用ペアの第2のメンバーと共有結合により会合する。任意選択で、相互作用的作用ペア（例えば、非対称ペアまたはガイドされない相互作用ペア）の第1のメンバーは、相互作用ペアの第2のメンバーと非共有結合により会合する。

【0009】

伝統的なFc融合タンパク質および抗体は、ガイドされない相互作用ペアの例である一方で、種々の操作されたFcドメインが、非対称相互作用ペアとして設計された。したがって、本明細書で記載される相互作用ペアの第1のメンバーおよび／または第2のメンバーは、例えば、免疫グロブリンのFc部分を含む、免疫グロブリンの定常ドメインを含み得る。任意選択で、相互作用ペアの第1のメンバーは、哺乳動物、好ましくはヒトのIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4免疫グロブリンのFcドメインに由来するアミノ酸配列を含み得る。例えば、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号34～46のうちのいずれか一配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、これから本質的になるか、またはこれからなることができる。任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFcドメインに由来するアミノ酸配列を含み得る。例えば、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号34～46のうちのいずれか一配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または1

00%同一であるアミノ酸配列を含むか、これから本質的になるか、またはこれからなることができる。一部の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーおよび第2のメンバーは、同じ免疫グロブリンクラスおよびサブタイプに由来するFcドメインを含む。他の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーおよび第2のメンバーは、異なる免疫グロブリンクラスまたはサブタイプに由来するFcドメインを含む。任意選択で、相互作用ペア（例えば、非対称ペアまたはガイドされない相互作用ペア）の第1のメンバーおよび／または第2のメンバーは、例えば、免疫グロブリンの修飾されたFc部分を含む、免疫グロブリンの修飾された定常ドメインを含む。例えば、本開示のタンパク質複合体は、群：配列番号34～46から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含む、IgGの第1の修飾されたFc部分と、群：配列番号34～46から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含む、IgGの第1の修飾されたFc部分のアミノ酸配列と同じであっても異なってもよいIgGの第2の修飾されたFc部分とを含み得る。

10

【0010】

一部の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号39のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号40のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号40のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号39のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

20

【0011】

一部の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号41のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号42のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号42のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号41のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

40

【0012】

一部の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号43のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号44のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号44のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%ま

50

たは100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号43のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0013】

一部の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号45のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号46のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、相互作用ペアの第1のメンバーは、配列番号46のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含み、任意選択で、相互作用ペアの第2のメンバーは、配列番号45のアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0014】

一部の実施形態では、本開示は、フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および非対称相互作用ペアのメンバーのアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドを提供する。このような融合タンパク質は、配列番号1~33のうちいずれかのアミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むフォリスタチン関連ポリペプチドを含み得る。任意選択で、融合ポリペプチドは、フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列および非対称相互作用ペアのメンバーのアミノ酸配列の間に配置されたリンカーポリペプチドを含み得る。ある特定の実施形態では、非対称相互作用ペアのメンバーは、免疫グロブリンのFcドメイン等、免疫グロブリンの定常ドメインを含む。例えば、本開示のフォリスタチン関連ポリペプチド融合タンパク質は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFcドメインに由来するアミノ酸配列を含む非対称相互作用ペアを含み得る。一部の実施形態では、融合タンパク質の非対称相互作用ペアは、配列番号34~46のうちのいずれか一配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、これから本質的になるか、またはこれからなる。一部の実施形態では、融合タンパク質の非対称相互作用ペアのメンバーは、配列番号39~46のうちのいずれか一配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、これから本質的になるか、またはこれからなる。

【0015】

好ましくは、本開示のタンパク質複合体は、GDF8、GDF-11、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンCまたはアクチビンEからなる群から選択される1つまたは複数のリガンドに結合する。任意選択で、本開示のタンパク質複合体は、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} または 10^{-12} を超えるまたはこれに等しい K_D で、これらのリガンドのうち1つまたは複数に結合する。一部の実施形態では、本開示のタンパク質複合体は、GDF8、GDF-11、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンCまたはアクチビンEからなる群から選択される1つまたは複数のリガンドによるシグナル伝達（例えば、SMAD1、2、3、5および/または8によるシグナル伝達）を阻害することができる。任意選択で、本開示のタンパク質複合体は、細胞ベースのアッセイにおいて測定される通り、これらのリガンドのうち1つまたは複数によるシグナル伝達（例えば、SMAD1、2、3、5および/または8によるシグナル伝達）を阻害することができる。

【0016】

任意選択で、本開示のタンパク質複合体は、天然の単量体フォリスタチン関連ペプチドと比較して、改善された精製を呈示する。任意選択で、本開示のタンパク質複合体は、哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）における少なくとも4、6、12、24、36、48または72時間の血清半減期を呈示する。任意選択で、本開示のタンパク質複合体は、哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）における少なくとも6、8、10、12、14、20、25または30日間の血清半減期を呈示することができる。

【0017】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書で開示される第1および／または第2のポリペプチドのいずれかをコードする核酸を提供する。本明細書で開示される核酸は、発現のためのプロモーターに作動可能に連結することができ、本開示は、このような組換えポリヌクレオチドにより形質転換された細胞をさらに提供する。好ましくは、細胞は、COS細胞またはCHO細胞等、哺乳動物細胞である。

【0018】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書で開示される第1および第2のポリペプチド、ならびに本開示のこのような第1および第2のポリペプチドを含むタンパク質複合体のうちいずれかを作製するための方法を提供する。このような方法は、適した細胞（例えば、CHO細胞またはCOS細胞）において、本明細書で開示される核酸のいずれかを発現させる工程を含み得る。このような方法は、a) 本開示の第1および／または第2のポリペプチドの発現に適した条件下で細胞を培養する工程であって、前記細胞が、第1および／または第2のポリペプチド発現構築物により形質転換されている工程と、b) このよう

同様に、方法は、a) 本開示の第1および第2のポリペプチドの発現に適した条件下で細胞を培養する工程であって、前記細胞が、第1および第2のポリペプチド発現構築物により形質転換されている工程と、b) このようにして発現された本開示のタンパク質複合体を回収する工程とを含み得る。本明細書で記載される第1および／または第2のポリペプチド、ならびに本開示の第1および第2のポリペプチドを含むタンパク質複合体は、細胞培養物からタンパク質を得るための周知の技法のいずれかを使用して、粗製、部分的に精製されたまたは高度に精製された画分として回収することができる。

【0019】

本明細書で記載されるタンパク質複合体のいずれかを、医薬調製物に取り込むことができる。任意選択で、このような医薬調製物は、他のポリペプチド構成要素に関して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%純粋である。一部の実施形態では、本明細書で記載される医薬調製物は、第1または第2のポリペプチドの自己会合によって形成された、20%、15%、10%、5%、3%、2%または1%未満のホモ二量体を含む。任意選択で、本明細書で開示される医薬調製物は、1つまたは複数の追加的な活性薬剤を含み得る。

【0020】

ある特定の態様では、例えば、本明細書で開示されるフォリスタチン関連融合ポリペプチドを含む様々なタンパク質複合体を含む、本開示の組成物は、フォリスタチン関連融合ポリペプチドおよび／またはフォリスタチンリガンド（例えば、ミオスタチン、アクチビン、GDF11）の異常活性に関連する疾患または状態の処置または予防に使用することができる。このような疾患、障害または状態は一般に、本明細書において、「フォリスタチン関連状態」と称される。ある特定の実施形態では、本開示は、治療有効量の本明細書で記載されるタンパク質複合体を個体に投与することにより、それを必要とする個体を処置または予防する方法を提供する。このような方法は、特に、動物、より具体的にはヒトの治療的および予防的処置を目的としている。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、Clustal 2.1を使用した、ヒトIgGアイソタイプに由来するFcドメインの多重配列アラインメントを示す。ヒンジ領域は、点線の下線によって指

10

20

30

40

50

し示されている。二重の下線は、非対称鎖ペア形成を促進するように I g G 1 F c（配列番号 3 4）において操作され得る位置と、他のアイソタイプ（配列番号 3 5、3 6、3 8）に関する対応する位置の例を指し示す。

【0022】

【図 2】図 2 は、治療的使用のためのフォリスタチン関連ポリペプチドを含むヘテロマータンパク質複合体の模式的な例を示す。「フォリスタチン関連ポリペプチド」（A）は、「相互作用ペアの第 1 のメンバー」（B）に対して C 末端に、またはこれに対して N 末端に配置することができる。リンカーと共に他のアミノ酸配列は、フォリスタチン関連ポリペプチドおよび相互作用ペアの第 1 のメンバーの間に配置することができる。相互作用ペアの第 1 および第 2 のメンバー（B、C）は、非対称ペアとなることができ、これは、ペアのメンバーが、自己会合するよりもむしろ、互いと優先的に会合することを意味する、あるいは相互作用ペアは、ガイドされなくてよく、これは、ペアのメンバーが、実質的な優先度なしで、互いと会合しても自己会合してもよく、同じまたは異なるアミノ酸配列を有し得ることを意味する。伝統的な F c 融合タンパク質および抗体は、ガイドされない相互作用ペアの例である一方で、種々の操作された F c ドメインが、非対称相互作用ペアとして設計された。第 2 のポリペプチドにおいて、追加的なアミノ酸が、相互作用ペアの第 2 のメンバーに対し C 末端または N 末端に配置されてよく、このようなアミノ酸は、生物学的活性を付与してもしなくてもよいが、フォリスタチン関連ポリペプチドにとって異種となるべきであり、好ましくは、フォリスタチン関連ポリペプチドではない。

【発明を実施するための形態】

【0023】

1. 概観

A. TGFβスーパーファミリーリガンドによる組織恒常性の調節

TGFβスーパーファミリーシグナル伝達経路は、筋肉、骨、脂肪組織、脾臓機能、造血細胞その他を含む多様な細胞型および組織の出生前および出生後調節にとって重要である。本明細書で記載されるタンパク質複合体は、例えば、アクチビン群、増殖分化因子（GDF）群、骨形成タンパク質（BMP）群のメンバー、またはスーパーファミリーの 1 つもしくは複数の他のメンバーを含む、TGFβスーパーファミリーの 1 つまたは複数のリガンドに結合することができる。MSTN 遺伝子によってコードされる、増殖分化因子-8（GDF8）としても公知の、スーパーファミリーリガンドのミオスタチンは、骨格筋量（skeletal muscle mass）の内在性阻害剤として広く認識されている。Mstn の欠失がホモ接合型のマウスは、線維数増加および筋線維肥大の組合せによる、骨格筋量の堅固な増加を示す [McPherron ら（1997 年）Nature 387 巻：83～90 頁]。ミオスタチンシグナル伝達の選択的出生後損失は、有意な筋線維肥大を引き起こし、これにより、ミオスタチンが、成体における筋肉恒常性の重要な調節因子であることを指し示す [Lee ら（2010 年）Mol Endocrinol 24 巻：1998～2008 頁]。ミオスタチンの天然に存在する変異は、ヒト、ウシ、ヒツジおよびイヌにおける骨格筋量増加に関連する。例えば、ピエモンテ（Piedmontese）およびベルジアン・ブルー（Belgian Blue）ウシ品種は、著しい筋量増加を引き起こす、MSTN における機能喪失型変異を保有する [Grobet ら（1997 年）Nat Genet 17 巻：71～74 頁]。ヒトにおいて、MSTN の不活性対立遺伝子は、筋量増加と、報告によれば、例外的な強度に関連する [Schuelke ら（2004 年）N Engl J Med 2004 年、350 巻：2682～8 頁]。逆に、ヒト免疫不全ウイルスによる感染に関連するヒトにおける筋消耗（muscle wasting）は、MSTN 発現の増加を伴う [Gonzalez-Cadavid ら（1998 年）Proc Natl Acad Sci USA 95 巻：14938～14943 頁]。

【0024】

ミオスタチン活性の阻害は、衰弱性筋肉損失（debilitating muscle loss）に関連する遺伝性および後天性臨床状態を有する患者における筋量および

強度を増加させるのに有効な戦略となり得る [Lee (2004年) *Annu Rev Cell Dev Biol* 20巻: 61~86頁; Tsuchida (2008年) *Curr Opin Drug Discov Dev* 11巻: 487~494頁; Rodino-Klapacら (2009年) *Muscle Nerve* 39巻: 283~296頁]。筋肉疾患のマウスモデルによる研究は、ミオスタチンシグナル伝達の損失が、筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症、悪液質、ステロイド誘導性ミオパチーおよび加齢性サルコペニアを含む幅広い疾患状況において有益な効果を有することを示唆した。さらに、ミオスタチンシグナル伝達の損失は、代謝性疾患のモデルにおいて脂肪蓄積を減少し、グルコース代謝を改善することが示され、ミオスタチンを標的化することが、肥満および2型糖尿病などの疾患に対する適用も有し得る可能性を高める。したがって、*in vivo*でのミオスタチンシグナル伝達の治療上の阻害のための方法の同定に相当な関心がある。

10

【0025】

他のスーパーファミリーリガンドと同様に、ミオスタチンは、シグナルペプチド、N末端プロドメインおよびC末端成熟ドメインからなる前駆体として合成される。合成の際に、ミオスタチンプロドメインは、成熟ミオスタチンと非共有結合により相互作用して、二量体化を容易にするコンフォメーションにこれらの分子を維持する [Harrisonら (2011年) *Growth Factors* 29巻: 174~186頁]。二量体の前駆体の切断後に、双子のプロドメインは初期に、成熟タンパク質に取り付けられたままとなり、潜在的複合体を形成する [(Miyazonoら (1988年) *J Biol Chem* 263巻: 6407~6415頁; Wakefieldら (1988年) *J Biol Chem* 263巻: 7646~7654頁; Brownら (1990年) *Growth Factors* 3巻: 35~43頁]。大部分のTGFβリガンドよりも大きい程度まで、分泌されたミオスタチンは初期に、潜在的または半潜在的 (*semi latent*) 形態で存在し、次いでその活性は、他の因子によって曝露され得る [Wolffmanら (2003年) *Proc Natl Acad Sci USA* 100巻: 15842~15846頁; Szlamaら (2013年) *FEBS J* 280巻: 3822~3839頁]。潜在的ミオスタチンは、細胞外空間に存在し、そこで、プロドメインは、マトリクスタンパク質と相互作用して、ミオスタチンバイオアベイラビリティを調節する [Andersonら (2008年) *J Biol Chem* 283巻: 7027~7035頁; Sengleら (2011年) *J Biol Chem* 286巻: 5087~5099頁]、または循環に入り、そこで、ミオスタチンの大部分は、この潜在的形態で存在する [Hillら (2002年) *J Biol Chem* 277巻: 40735~40741頁]。細胞外区画において、プロテオグリカンであるパールカンとミオスタチンプロドメインとの相互作用は、標的細胞付近での潜在的複合体の濃度を増加させる。潜在的ミオスタチンは、細胞外マトリクスに位置するメタロプロテアーゼによる会合したプロドメインの一方または両方の部位特異的切断によって、活性型に変換される [Wolffmanら (2003年) *Proc Natl Acad Sci USA* 100巻: 15842~15846頁]。

20

30

【0026】

そのプロドメインから放出されると、ミオスタチンは、アクチビンII型受容体 (*ActRII* Aまたは*ActRII* B) およびアクチビンI型受容体 (一般に*ALK* 4または*ALK* 7) を取り込む三元複合体の形成を誘導することにより、その細胞性効果を発揮する。このような活性化された受容体複合体は続いて、Smadタンパク質 (*Smad* 2および*Smad* 3、*Smad* 2/3) をリン酸化し、これにより、Smadタンパク質が、*Smad* 4と転写複合体を形成することが可能になり、これは、特異的標的遺伝子の発現を調節する [例えば、MathewsおよびVale (1991年) *Cell* 65巻: 973~982頁; Attisanoら (1992年) *Cell* 68巻: 97~108頁; Massague (2000年) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1巻: 169~178頁を参照]。I型およびII型受容体は、システインに富む領

40

50

域を備えるリガンド結合性細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび予測されるセリン／スレオニン特異性を備える細胞質ドメインで構成された膜貫通タンパク質である。II型受容体は、リガンドの結合に要求される一方、I型受容体は、シグナル伝達に必須である。

【0027】

ミオスタチンが、最もよく確立された事例であるが、ActRIIAおよび／またはActRIIBを介してシグナル伝達する1つまたは複数の追加的なリガンドも、筋肉肥大の内在性阻害剤として意味づけられた[Leeら(2005年)Proc Natl Acad Sci USA 102巻:18117~18122頁]。アクチピンは、TGFβスーパーファミリー内の二量体リガンドのファミリーであり、インヒビンβサブユニットで構成されている。特に、アクチピンは、ホモ二量体型アクチピンA($\beta_A \beta_A$)、アクチピンB($\beta_B \beta_B$)、アクチピンC($\beta_C \beta_C$)およびアクチピンE($\beta_E \beta_E$)、ならびにアクチピンAB($\beta_A \beta_B$)を含むヘテロ二量体型、および β_C または β_E を含有するヘテロ二量体を含む。加えて、構造的に関係するヘテロ二量体インヒビンは、様々な組織におけるアクチピンシグナル伝達の重要な阻害性調節因子である。

【0028】

アクチピンは、多様な生理的および病理的役割を果たす。複数系統の証拠は、ミオスタチンと協調して機能して、筋量を限定するものとしてアクチピンを意味づけ、アクチピンアンタゴニストは、*in vivo*で筋肉成長を促進する、または筋肉損失を相殺することができる[Linkら(1997年)Exp Cell Res 233巻:350~362頁;Heら(2005年)Anat Embryol (Berl) 209巻:401~407頁;Souzaら(2008年)Mol Endocrinol 22巻:2689~2702頁;Gilsonら(2009年)Am J Physiol Endocrinol Metab 297巻:E157~E164頁;Leeら(2010年)Mol Endocrinol 24巻:1998~2008頁;Zhouら(2010年)Cell 142巻:531~43頁]。アクチピンは、骨の恒常性において主要な役割を果たし、赤血球生成の調節因子として意味づけられる[Maguer-Sattaraら(2003年)Exp Cell Res 282巻:110~120頁;Fieldsら(2013年)Expert Opin Invest Drugs 22巻:87~101頁]。近年の研究は、創傷治癒、血管新生、炎症、免疫、線維症およびがんにおけるアクチピンの役割について指摘した[Antsiferovaら(2012年)J Cell Sci 125巻:3929~3937頁]。アクチピン／インヒビンシグナル伝達経路は、卵巣、精巣および副腎のがんに関連する。加えて、アクチピンAは、肝細胞増殖の主要な阻害性調節因子であり、アクチピンシグナル伝達の調節不全は、炎症、線維症、肝不全およびがんを含む肝疾患に関係づけられた[Kreidlら(2009年)World J Hepatol 1巻:17~27頁]。アクチピンの他の機能は、中胚葉系分化の誘導、細胞周期のモジュレーション、ニューロン細胞生存の支持および内分泌細胞活性の協調を含む[DePaoloら(1991年)Proc Soc Exp Biol Med 198巻:500~512頁;Dysonら(1997年)Curr Biol 7巻:81~84頁;Woodruff(1998年)Biochem Pharmacol 55巻:953~963頁]。

【0029】

本明細書で記載される通り、「アクチピンA」に結合する薬剤は、単離された β_A サブユニットの文脈であるか、二量体の複合体(例えば、 $\beta_A \beta_A$ ホモ二量体または $\beta_A \beta_B$ ヘテロ二量体)としてであるかにかかわらず、 β_A サブユニットに特異的に結合する薬剤である。ヘテロ二量体複合体(例えば、 $\beta_A \beta_B$ ヘテロ二量体)の場合、「アクチピンA」に結合する薬剤は、 β_A サブユニット内に存在するエピトープに特異的であるが、複合体の非 β_A サブユニット(例えば、複合体の β_B サブユニット)内に存在するエピトープには結合しない。同様に、「アクチピンA」に拮抗(阻害)する本明細書で開示される薬剤は、単離された β_A サブユニットの文脈であるか、二量体の複合体(例えば、 $\beta_A \beta_A$ ホモ二量体または $\beta_A \beta_B$ ヘテロ二量体)としてであるかにかかわらず、 β_A サブユニッ

トにより媒介される1つまたは複数の活性を阻害する薬剤である。 $\beta_A \beta_B$ ヘテロ二量体の場合、「アクチビンA」を阻害する薬剤は、 β_A サブユニットの1つまたは複数の活性を特異的に阻害するが、複合体の非 β_A サブユニット（例えば、複合体の β_B サブユニット）の活性は阻害しない薬剤である。この原理は、「アクチビンB」、「アクチビンC」および「アクチビンE」に結合するおよび／またはこれらを阻害する薬剤にも適用される。「アクチビンAB」に拮抗する本明細書で開示される薬剤は、 β_A サブユニットにより媒介される1つまたは複数の活性および β_B サブユニットにより媒介される1つまたは複数の活性を阻害する薬剤である。

【0030】

骨形成タンパク質-11（BMP11）としても公知の増殖分化因子-11（GDF11）は、マウス発生の際に尾芽、肢芽、上顎および顎弓、ならびに後根神経節において発現される〔例えば、Nakashimaら（1999年）Mech. Dev. 80巻：185～189頁を参照〕。GDF11は、中胚葉系および神経組織の両方のパターン形成において特有の役割を果たし〔例えば、Gamerら（1999年）Dev Biol. 208巻：222～32頁を参照〕、発生中のニワトリ肢における軟骨形成および筋形成の負の調節因子である〔例えば、Gamerら（2001年）Dev Biol. 229巻：407～20頁を参照〕。脳におけるGDF11の発現は、GDF11が、神経活性を調節することもでき、GDF11が、嗅上皮における神経発生を阻害することを示唆する〔例えば、Wuら（2003年）Neuron. 37巻：197～207頁を参照〕。近年の研究は、赤血球生成における、特に、後期赤血球分化の際の重要な調節シグナルとしてGDF11を意味づける〔Suraganiら（2014年）Nat Med 20巻：408～414頁〕。加えて、GDF11は、ミオスタチンとの構造的類似性、共有されるシグナル伝達構成要素および骨格筋におけるGDF11発現に基づき、筋肉肥大の潜在的な阻害剤として調査された〔McPerronら（1999年）Nat. Genet. 22巻：260～264頁〕。GDF11は、ミオスタチンと同様に、そのプロドメインとの潜在的複合体で全身循環において検出可能であり、ex vivoで筋肉細胞分化を阻害するが〔Souzaら（2008年）Mol Endocrinol 22巻：2689～2702頁〕、遺伝学的研究は、ミオスタチン欠乏の条件（condition）下であっても、筋肉サイズ、線維数または線維の型の調節におけるGDF11の役割を明らかにしなかった〔McPerronら（2009年）BMC Devel Biol 9巻：24頁〕。したがって、依然として、GDF11が、筋量の調節に寄与するかについては、未だに決定されていない。

【0031】

B. TGF β スーパーファミリーリガンドの細胞外阻害剤

上に記すリガンド会合したプロドメインに加えて、いくつかの他の天然のタンパク質が、細胞外でTGF β スーパーファミリーリガンドを阻害し、これにより、決定的な仕方でこれらのリガンドの活性を調節する。ヒトにおいて、ミオスタチン、アクチビンおよびGDF11の可溶性内在性阻害剤は、複数のフォリスタチンアイソフォーム、FLRGとして公知のフォリスタチン様遺伝子（FSTL3）の産物、ならびに乳清（whey）酸性タンパク質ドメイン（W）、フォリスタチン（follicle stimulating hormone）-カザール（Kazal）ドメイン（F）、免疫グロブリン（immunoglobulin）ドメイン（I）、クニッツ（Kunitz）型プロテアーゼ阻害剤モジュールに関係する2つのタンデムドメイン（KK）およびネトリン（netrin）ドメイン（N）を含む、その共有されるドメイン構造に基づきWF1KKN1およびWF1KKN2と命名される一対の近縁のタンパク質を含む。フォリスタチン、FLRG、WF1KKN1およびWF1KKN2ポリペプチドはそれぞれ、TGF β スーパーファミリーリガンドへの選択的結合に重要な、「フォリスタチンドメイン」と一般に称される1つまたは複数の構造モチーフを含有する。したがって、本明細書で開示される通り、用語「フォリスタチン関連ポリペプチド」は、例えば、天然のフォリスタチン、FLRG、WF1KKN1およびWF1KKN2配列、ならびにそれらの改変体および切断型を含む。

【0032】

ミオスタチン、アクチビンおよび／またはGDF11の細胞外阻害剤のうち最もよく研究されているのは、フォリスタチンであり、単一遺伝子(FST)から、複数のアイソフォームが生成される。フォリスタチンは、高等動物のほとんど全ての組織において発現される自己分泌糖タンパク質である。これは初期に、卵胞液から単離されており、下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン(FSH)分泌を阻害したタンパク質画分として同定された[Eschら(1987年)Mol Endocrinol 1巻:849~855頁]。TGFβスーパーファミリーシグナル伝達におけるフォリスタチンの重要性は、フォリスタチン欠損マウスにおいて観察される複数の欠損および周産期死亡によって例証される[Matzukら(1995年)Nature 374巻:360~363頁]。出生後に、フォリスタチンは、ミオスタチンおよびアクチビン[Leeら(2010年)Mol Endocrinol 24巻:1998~2008頁]ならびに潜在的にはGDF11を阻害することにより、筋肉成長を促進する。フォリスタチンの生物学的活性は、これらのリガンドに高アフィニティーで結合し、これにより、リガンドとその細胞表面受容体ActRIIAまたはActRIIBとの相互作用を防止するその能力から生じる[Nakamuraら(1990年)Science 247巻:836~838頁;Kogawaraら(1991年)Endocrinology 128巻:1434~1440頁;Schneyerら(1994年)Endocrinology 135巻:667~674頁;de Winterら(1996年)Mol Cell Endocrinol 116巻:105~114頁;Thompsonら(2005年)Dev Cell 9巻:535~543頁]。加えて、フォリスタチンは、一部のアイソフォームにおいて細胞表面におけるプロテオグリカンとのフォリスタチン相互作用を容易にするヘパリン結合性ドメインを含有し[Inouyeら(1992年)Mol Cell Endocrinol 90巻:1~6頁]、これにより、リガンド作用の部位の付近におけるより高い濃度のフォリスタチンを維持する。さらに、ミオスタチンへのフォリスタチン(FST288)の結合は、ヘパリンに対するフォリスタチンのアフィニティーを実質的に増加させ[Cashら(2009年)EMBO J 28巻:2662~2676頁]、これにより、リガンド結合が、フォリスタチン-ミオスタチン複合体の細胞表面局在化を促進することを示唆する。

【0033】

フォリスタチンは、10個のシステインの保存された線形パターンを包含し、分子内ジスルフィド結合の特徴的な配置を形成する「フォリスタチンドメイン」として公知の特徴的な構造モチーフの3反復を含有する[Eschら(1987年)Mol Endocrinol 1巻:849~855頁]。フォリスタチンドメインは、本明細書において、システインに富む反復を特徴とする、アミノ酸ドメインまたはアミノ酸ドメインをコードする核酸配列と規定される。フォリスタチンドメインは、典型的に、65~90アミノ酸の長さを包含し、10個の保存されたシステイン残基、およびカザールセリンプロテアーゼ阻害剤ドメインと同様の領域を含有する。よって、フォリスタチンドメインは、「フォリスタチン/カザールドメイン」または「フォリスタチン/カザール様ドメイン」と称されることもある。一般に、システイン残基の間のループ領域は、配列可変性を呈示するが、ある程度の保存が存在する。第4および第5のシステインの間のループは、通常短く、1または2アミノ酸のみを含有する。第7および第8のシステインの間のループにおけるアミノ酸は、一般に、最も高度に保存されており、(G, A)-(S, N)-(S, N, T)-(D, N)-(G, N)のコンセンサス配列と、続く(T, S)-Yモチーフを含有する。第9および第10のシステインの間の領域は、一般に、別のアミノ酸によって隔てられた2個の疎水性残基(特にV、IまたはL)を取り込むモチーフを含有する。

【0034】

用語「フォリスタチンポリペプチド」は、フォリスタチンファミリーの任意の天然に存在するポリペプチドのほか、例えば、リガンド結合(例えば、ミオスタチン、GDF11、アクチビンA、アクチビンB)を含む有用な活性を保持するその任意の改変体(変異体

、フラグメント、融合物およびペプチド模倣物形態を含む)を含むポリペプチドを指すのに使用される。例えば、フォリスタチンポリペプチドは、フォリスタチンポリペプチドの配列(配列番号1~17)に、少なくとも約80%同一であり、好ましくは、配列番号1~17のいずれかに、少なくとも85%、90%、95%、97%、99%またはこれを超える同一性を有する配列を有するいずれか公知のフォリスタチンの配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。用語「フォリスタチン融合ポリペプチド」は、上記で言及されたポリペプチドのいずれかを、異種(非フォリスタチン)部分と共に含む、融合タンパク質を指す場合がある。アミノ酸配列は、配列番号3により表される、ヒトフォリスタチンの長い(315アミノ酸)形態内で固有に見出されない場合、フォリスタチンに対して異種であると理解される。本明細書では、異種部分の多くの例が提供され、このような異種部分は、アミノ酸配列によって、融合タンパク質のフォリスタチンポリペプチド部分に、直接隣接する場合もあり、あるいはリンカーまたは他の配列などの介在アミノ酸配列により隔てられる場合もある。加えて、ポリペプチドのライブラリーを作製および検査するための方法が、本明細書に記載されており、このような方法は、フォリスタチンの改変体の作製および検査にも関係する。

10

【0035】

フォリスタチンは、選択的なmRNAスプライシングおよびタンパク質の可変的なグリコシル化に基づき、分子量の範囲を31~49kDaとする、単鎖ポリペプチドである。フォリスタチン遺伝子から選択的にスプライシングされたmRNAは、288アミノ酸(すなわち、FST288)および315アミノ酸(すなわち、FST315)のアイソフォームをコードし、後者は、タンパク質分解によりプロセシングして、さらに別のアイソフォームであるフォリスタチン303(FST303)を生じることができる。天然のヒトフォリスタチンポリペプチドのアミノ酸配列の解析は、これが、以下の5つのドメインを含むことを明らかにした：シグナル配列(配列番号1のアミノ酸1~29)、N末端ドメイン(FST_{ND}) (配列番号1のアミノ酸30~94)、フォリスタチンドメイン1(FST_{FD1}) (配列番号1のアミノ酸95~164)、フォリスタチンドメイン2(FST_{FD2}) (配列番号1のアミノ酸168~239)およびフォリスタチンドメイン3(FST_{FD3}) (配列番号1のアミノ酸245~316)。Shimanskira(1988年)Proc Natl Acad Sci USA 85巻:4218~4222頁を参照されたい。

20

30

【0036】

ヒトフォリスタチン-288(FST288)前駆体は、シグナルペプチドを、点線の下線で指し示し、N末端ドメイン(FST_{ND})を、破線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン1~3(FST_{FD1}、FST_{FD2}、FST_{FD3})を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列(配列番号1)(NCBI参照配列NP_006341; Uniprot P19883-2)を有する。

【化1】

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLLEV KHSGSCN      (配列番号 1)

```

40

【0037】

成熟(プロセシング後)ヒトフォリスタチン改変体であるFST288は、N末端ドメインを、破線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン1~3を、実線の下線で指し示

50

す、以下のアミノ酸配列（配列番号2）を有する。さらに、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸であるGまたはNのいずれかは、プロセッシングにより除去することもでき、いかなる影響（consequence）も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに小型のポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

【化2】

```

1  GNCWLRQAKN GRCQVLYKTE LSKEECCSTG RLSTSWTEED VNDNTLFKWM
51  IFNGGAPNCI PKETCENVD CGPGKKCRMN KKNKPRCVCA PDCSNITWKG
101 PVCGLDGKTY RNECALLKAR CEQPELEVQ YQGRCKKTCR DVFCPGSSSTC
151 VVDQTNNAVC VTCNRICPEP ASSEQYLCGN DGVTYSSACH LRKATCLLGR
201 SIGLAYEGKC IKAKSCEDIQ CTGGKKCLWD FKVGRGRCSL CDELCPDSKS
251 DEPVACASDNA TYASECAMKE AACSSGVILLE VKHSGSCN (配列番号 2)

```

10

【0038】

ヒトフォリスタチン-315（FST315）前駆体は、シグナルペプチドを、点線の下線で指し示し、N末端ドメイン（FST_{ND}）を、破線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン1～3（FST_{FD1}、FST_{FD2}、FST_{FD3}）を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号3）（NCBI参照配列NP_037541.1；Uniprot P19883）を有する。

20

【化3】

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KKNKPRCVCA DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSSTCV VDQTNNAVCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVACASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVILLE KHSGSCNSIS EDTEEEEDE DQDYSFPISS ILEW

```

30

(配列番号 3)

【0039】

成熟（プロセッシング後）ヒトFST315は、N末端ドメインを、破線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン1～3を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号4）を有する。さらに、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸であるGまたはNのいずれかは、プロセッシングにより除去することもでき、いかなる影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに短いポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

【化4】

40

```

1  GNCWLRQAKN GRCQVLYKTE LSKEECCSTG RLSTSWTEED VNDNTLFKWM
51  IFNGGAPNCI PKETCENVD CGPGKKCRMN KKNKPRCVCA PDCSNITWKG
101 PVCGLDGKTY RNECALLKAR CEQPELEVQ YQGRCKKTCR DVFCPGSSSTC
151 VVDQTNNAVC VTCNRICPEP ASSEQYLCGN DGVTYSSACH LRKATCLLGR
201 SIGLAYEGKC IKAKSCEDIQ CTGGKKCLWD FKVGRGRCSL CDELCPDSKS
251 DEPVACASDNA TYASECAMKE AACSSGVILLE VKHSGSCNSI SEDTEEEEEED
301 EDQDYSFPIS SILEW (配列番号 4)

```

50

【0040】

本開示のフォリスタチン関連ポリペプチドは、フォリスタチンタンパク質の任意の天然に存在するドメインのほか、有用な活性を保持する、その改変体（例えば、変異体、フラグメントおよびペプチド模倣物形態）を含み得る。例えば、FST315およびFST288が、ミオスタチン、アクチビン（アクチビンAおよびアクチビンB）およびGDF11に対する高アフィニティを有し、フォリスタチンドメイン（例えば、FST_{ND}、FST_{FD1}、FST_{FD2}およびFST_{FD3}）は、このようなTGFβリガンドの結合に関与すると考えられることが周知である。しかし、これら4種のドメインのそれぞれが、これらのTGFβリガンドに対し異なるアフィニティを有するという証拠がある。例えば、近年の研究は、N末端ドメインおよび2個のFST_{FD1}ドメインだけをタンデムで含むポリペプチド構築物は、ミオスタチンに対する高アフィニティを保持し、アクチビンに対するアフィニティは、ほとんど示さないか、または全く示さず、マウスに導入されると、遺伝子発現により、全身の筋成長を促進することを実証している[Nakata niら（2008年）FASER 22巻：478～487頁]。したがって、本開示は、部分的に、天然に存在するFSTタンパク質と比べて所定のTGFβリガンドの選択的な結合および／または阻害（例えば、アクチビンに対する有意に低減したアフィニティを有しつつ、ミオスタチン（myostatin）に対する高アフィニティを維持する）を実証する改変体フォリスタチンタンパク質を包含する。

10

【0041】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示されるFST_{ND}ドメイン（配列番号5）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含み、さらに、下記に示される例における通り（配列番号6）、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸であるGまたはNのいずれかを欠失させ得ることが認識されるであろう。

20

【化5】

```

1  GNCWLRQAKN GRCQVLYKTE LSKEECCSTG RLSTSWTEED VNDNTLFKWM
51 IFNGGAPNCI PCKET      ( 配列番号      5)

1  CWLRQAKNGR CQVLYKTELS KEECCSTGRL STSWTEEDVN DNTLFKWMIF
51 NGGAPNCIPC KET        ( 配列番号      6)

```

30

【0042】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示される通り、ヘパリンに結合すると共に、ミオスタチン（および／またはGDF11）にも結合する、最小限のコア活性を含有するFST_{FD1}ドメイン（配列番号7）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

【化6】

```

1  CENVDCGPGK KCRMNKKKNP RVCAPDCSN ITWKGPPVCGL DGKTYRNECA
51 LLKARCKEQP ELEVQYQGRC      ( 配列番号      7)

```

【0043】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示されるFST_{FD2}ドメイン（配列番号8）および／またはFST_{FD3}ドメイン（配列番号9）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

40

【化7】

```

1  CRDVFCPGSS TCVVDQTNNA YCVTCNRICP EPASSEQYLC GNDGVITYSSA
51 CHLRKATCLL GRSIGLAYEG KC      ( 配列番号      8)

1  CEDIQCTGGK KCLWDFKVGR GRCSLCDELC PDSKSDEPVC ASDNATYASE
51 CAMKEAACSS GVLLEVKHSG SC      ( 配列番号      9)

```

50

【0044】

FST_{FD1}配列は、FST_{ND}ドメインをさらに含むポリペプチドとして発現させることにより、構造的文脈で維持されると有利であり得る。したがって、本開示は、下記に示されるFST_{ND}－FST_{FD1}配列（配列番号10）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含み、さらに、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸であるGまたはNのいずれかは、プロセッシングにより除去することもでき、いかなる影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに短いポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

【化8】

```

1  CWLRQAKNGR CQVLYKTELS KEECCSTGRL STSWTEEDVN DNTLFKWMIF
51  NGGAPNCIPC KETCENVDCG PGKKCRMNKK NKPRCVCAPD CSNITWKGPV
101 CGLDGKTYRN ECALLKARCK EQPELEVQYQ GRC      (配列番号 10)

```

10

【0045】

Nakataniraにより実証されている通り、FST_{ND}－FST_{FD1}－FST_{FD1}構築物は、マウスにおいて遺伝子発現させると、全身筋成長を付与するのに十分であり、したがって、本開示は、下記のアミノ酸配列（配列番号11）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

【化9】

```

1  CWLRQAKNGR CQVLYKTELS KEECCSTGRL STSWTEEDVN DNTLFKWMIF
51  NGGAPNCIPC KETCENVDCG PGKKCRMNKK NKPRCVCAPD CSNITWKGPV
101 CGLDGKTYRN ECALLKARCK EQPELEVQYQ GRCCENVDCG PGKKCRMNKK
151 NKPRCVCAPD CSNITWKGPV CGLDGKTYRN ECALLKARCK EQPELEVQYQ
201 GRC      (配列番号 11)

```

20

【0046】

FST_{FD1}配列は、ミオスタチンおよびGDF11への結合を付与する一方で、アクチビン、特にアクチビンAに加え、アクチビンBもまた、筋肉の負の調節因子であることが実証されており、したがって、ミオスタチン／GDF11リガンド群およびアクチビンA／アクチビンBリガンド群の両方を阻害するフォリスタチンポリペプチドは、より強力な筋効果をもたらし得る。FST_{FD2}が、アクチビンAおよびBへの結合を付与することを考慮すると、本開示は、FST_{FD1}－FST_{FD2}（配列番号12）およびFST_{FD1}－FST_{FD2}－FST_{FD3}（配列番号13）を含むポリペプチド、ならびにFST_{ND}－FST_{FD1}－FST_{FD2}（配列番号14）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含む構築物を提供する。

30

【化 1 0】

1 CENVDCGPGK KCRMNKKKPK RCVCAPDCSN ITWKGVCGL DGKTYRNECA
 51 LLKARCKEQP ELEVQYQGRC CRDVFCPGSS TCVVDQTNNA YCVTCNRICP
 101 EPASSEQYLC GNDGVITYSSA CHLRKATCLL GRSIGLAYEG KC

(配列番号 12)

1 CENVDCGPGK KCRMNKKKPK RCVCAPDCSN ITWKGVCGL DGKTYRNECA
 51 LLKARCKEQP ELEVQYQGRC CRDVFCPGSS TCVVDQTNNA YCVTCNRICP
 101 EPASSEQYLC GNDGVITYSSA CHLRKATCLL GRSIGLAYEG KCCEDIQCTG
 151 GKKCLWDFKV GRGRCSLCDE LCPDSKSDEP VCASDNATYA SECAMKEAAC
 201 SSGVLLEVKH SGSC (配列番号 13)

10

1 CWLRQAKNGR CQVLYKTELS KEECCSTGRL STSWTEEDVN DNTLFWKWMIF
 51 NGGAPNCIPC KETCENVDCG PGKKCRMNKK NKPRCVCAPD CSNITWKGVP
 101 CGLDGKTYRN ECALLKARCK EQPELEVQYQ GRCCRDVFCP GSSTCVVDQT
 151 NNAYCVTCNR ICPEPASSEQ YLCGNDGVITY SSACHLRKAT CLLGRSIGLA
 201 YEGKC (配列番号 14)

20

【 0 0 4 7 】

2 9 1 アミノ酸のフォリスタチンポリペプチド（天然に存在する F S T 3 1 5 の切断型を表す）は、ある特定の実施形態では、有利な特性を有する場合がある。したがって、本開示には、プロセシングされていない F S T 2 9 1 ポリペプチド（配列番号 1 5）および成熟 F S T 2 9 1 ポリペプチド（配列番号 1 6）が含まれ、異種タンパク質と組み合わせることができる。さらに、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸である G または N のいずれかは、プロセシングにより除去することもでき、いかなる影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、下記に示される例（配列番号 1 7）など、このようなわずかにより短いポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

【化 1 1】

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
 51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKMWI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
 101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
 151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAVCV TCNRIPEPA
 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
 251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
 301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS (配列番号 15)

10

1 GNCWLRQAKN GRCQVLYKTE LSKEECCSTG RLSTSWTEED VNDNTLFKWM
 51 IFNGGAPNCI PCKETCENVD CGPGKKCRMN KKNKPRVCAP PDCSNITWKG
 101 PVCGLDGKTY RNECALLKAR CKEQPELEVQ YQGRCKKTCR DVFCPGSSTC
 151 VVDQTNNAVC VTCNRIPEP ASSEQYLCGN DGVTYSSACH LRKATCLLGR
 201 SIGLAYEGKC IKAKSCEDIQ CTGGKKCLWD FKVGRGRCSL CDELCPDSKS
 251 DEPVCASDNA TYASECAMKE AACSSGVLLE VKHSGSCNSI S
 (配列番号 16)

20

1 CWLRQAKNGR CQVLYKTELS KEECCSTGRL STSWTEEDVN DNTLFKWMIF
 51 NGGAPNCIPC KETCENVDCG PGKKCRMNKK NKPRVCAPD CSNITWKGPV
 101 CGLDGKTYRN ECALLKARCK EQPELEVQYQ GRCKKTCRDV FCPGSSTCVV
 151 DQTNNAVCV CNRIPEPAS SEQYLCGNDG VTYSSACHLR KATCLLGRSI
 201 GLAYEGKCIK AKSCEDIQCT GGKKCLWDFK VGRGRCSLCD ELCPPDSKSDE
 251 PVCASDNATY ASECAMKEAA CSSGVLLEVK HSGSCNSIS
 (配列番号 17)

【0048】

30

本明細書において、フォリスタチンタンパク質は、FSTと称する場合がある。FST 288など、数字が後続する場合、これは、このタンパク質が、フォリスタチンの288アミノ酸アイソフォームであることを指し示す。FST 288-Fcと提示される場合、これは、Fcドメインが、FST 288のC末端に融合されており、介在リンカーを含んでも含まなくてもよいことを指し示す。この場合のFcとは、この用語が本明細書で定義される通り、任意の免疫グロブリンFc部分であり得る。FST 288-G1Fcと提示される場合、これは、ヒトIgG1のFc部分が、FST 288のC末端において融合されていることを指し示す。それとは反対のことが指し示されていない限り、この命名法により記載されるタンパク質は、ヒトフォリスタチンタンパク質を表すであろう。

【0049】

40

FSTNによってコードされる天然のフォリスタチンアイソフォームと近縁であるのは、FSTL3遺伝子によってコードされる天然に存在するタンパク質であり、フォリスタチン関連遺伝子(FLRG)、フォリスタチン様3(FSTL3)またはフォリスタチン関連タンパク質(FSRP)として代替的に公知である[Schneyerら(2001年)Mol Cell Endocrinol 180巻:33~38頁]。フォリスタチンと同様に、FLRGは、高アフィニティーでミオスタチン、アクチビンおよびGDF11に結合し、これにより、in vivoにおけるこれらの生物活性を阻害する[Sidisら(2006年)Endocrinology 147巻:3586~3597頁]。フォリスタチンとは異なり、FLRGは、ヘパリン結合性配列を保持せず、細胞表面プロテオグリカンに結合することができず、したがって、細胞表面のすぐ近くにおいてF

50

ST288よりも強力ではないアクチビンの阻害剤である。フォリスタチンとは対照的に、FLRGは、成熟ミオスタチンに結合して血液中においても循環するため、この点についてミオスタチンプロペプチドに似ている [Hillら (2002年) J Biol Chem 277巻: 40735~40741頁]。フォリスタチンとは異なり、マウスにおけるFLRG欠乏は致死的ではないが、種々の代謝性表現型を引き起こす [Mukherjeeら (2007年) Proc Natl Acad Sci USA 104巻: 1348~1353頁]。

【0050】

FLRGの全体的な構造は、フォリスタチンのものに密接に似ている。天然のヒトFLRG前駆体は、以下の4つのドメインを含む単鎖ポリペプチドである：シグナル配列（配列番号18のアミノ酸1~26）、N末端ドメイン（FLRG_{ND}）（配列番号18のアミノ酸38~96）、ならびに本明細書においてFLRG_{FD1}（配列番号18のアミノ酸99~167）およびFLRG_{FD2}（配列番号18のアミノ酸171~243）と称される2種のフォリスタチンドメイン。

【0051】

用語「FLRGポリペプチド」は、FLRGの任意の天然に存在するポリペプチドと共に、有用な活性を保持するその任意の改変体（変異体、フラグメント、融合物およびペプチド模倣物形態を含む）を含むポリペプチドを指すのに使用される。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のFLRGポリペプチドは、ミオスタチン、GDF11またはアクチビン、特に、アクチビンA（例えば、ActRIIAおよび／またはActRIIB Smad2/3シグナル伝達のリガンド媒介性活性化）に結合するおよび／またはその活性を阻害する。リガンド結合特性を保持するFLRGポリペプチドの改変体は、FLRGおよびリガンドの間の相互作用をアッセイするための慣例的な方法を使用して同定することができる（例えば、US6,537,966を参照）。加えて、ポリペプチドのライブラリーを作製および検査するための方法が、本明細書に記載されており、このような方法は、FLRGの改変体の作製および検査にも関係する。

【0052】

例えば、FLRGポリペプチドは、FLRGポリペプチドの配列（例えば、配列番号18~25）に、少なくとも約80%同一であり、任意選択で、配列番号18~25のいずれかに、少なくとも85%、90%、95%、97%、99%またはこれを超える同一性を有する配列を有するいずれか公知のFLRGの配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。用語「FLRG融合ポリペプチド」は、異種（非FLRG）部分と共に上記で言及されたポリペプチドのいずれかを含む融合タンパク質を指す場合がある。アミノ酸配列は、配列番号18により表されるヒトFLRGに固有に見出されない場合、FLRGに対して異種であると理解される。本明細書では、異種部分の多くの例が提供され、このような異種部分は、アミノ酸配列によって、融合タンパク質のFLRGポリペプチド部分に、直接隣接する場合もあり、あるいはリンカーまたは他の配列などの介在アミノ酸配列により隔てられる場合もある。

【0053】

ヒトFLRG前駆体は、シグナルペプチドを、点線の下線で指し示し、N末端ドメイン（FLRG_{ND}）を、破線の下線で指し示し、2個のフォリスタチンドメイン（FST_{FD1}、FST_{FD2}）を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号18）（NCBI参照配列NP_005851.1のアミノ酸1~263）を有する。

【化 1 2】

1 MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMSGG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL
 51 VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD
 101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECELRA
 151 ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC
 201 PVPSSPGQEL CGNNNVITYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP
 251 PGGESAEIEEE NFV (配列番号 18)

【0054】

10

成熟（プロセッシング後）ヒトFLRGは、N末端ドメインを、破線の下線で指し示し、2個のフォリスタチンドメインを、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号19）（NCBI参照配列NP_005851.1のアミノ酸38～263）を含む。さらに、最初のシステイン（配列番号18における38位）の前の、アミノ酸（配列番号18の27～37位）のいずれかを、実質的な影響を伴わずに含めてよく、このようなわずかにより長いポリペプチドを含むポリペプチドが含まれることが認識されるであろう。

【化 1 3】

1 CWLQQGQEAT CSLVLQTDVT RAECCASGNI DTAWSNLTHP GNKINLLGFL
 51 GLVHCLPCKD SCDGVECGPG KACRMLGGRP RCECAPDCSG LPARLQVCGS
 101 DGATYRDECE LRAARCRGHP DLSVMYRGRC RKSCEHVVCPRPQSCVVDQT
 151 GSAHCVVCRA APCPVPSSPG QELCGNNNVT YISSCHMRQA TCFLGRSIGV
 201 RHAGSCAGTP EEPPGGESAE EEENFV
 (配列番号 19)

20

【0055】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示される通り、アクチビンAと比較して、ミオスタチンと異なって相互作用するFLRG_{N D}ドメイン（配列番号20）[Cashら（2012年）J Biol Chem 287巻：1043～1053頁]と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。さらに、下記に示される例における通り（配列番号21）、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸であるGまたはNのいずれかを欠失させ得ることが認識されるであろう。

30

【化 1 4】

1 GVCWLQQGQE ATCSLVLQTD VTRAECASG NIDTAWSNLT HPGNKINLLG
 51 FLGLVHCLPC (配列番号 20)

1 CWLQQGQEAT CSLVLQTDVT RAECCASGNI DTAWSNLTHP GNKINLLGFL
 51 GLVHCLPC (配列番号 21)

40

【0056】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示されるFLRG_{F D 1}ドメイン（配列番号22）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

【化 1 5】

1 CDGVECGPGK ACRMLGGRPR CECAPDCSGL PARLQVCGSD GATYRDECEL
 51 RAARCRGHPD LSVMYRGRC (配列番号 22)

【0057】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示されるFST_{F D 2}ドメイン（配列番号23）と、例えば、1つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

50

【化 1 6】

1 CEHVVCPRPQ SCVVDQGTGSA HCVVCRAAPC PVPSSPGQEL CGNNNVITYIS
 51 SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSC (配列番号 23)

【0058】

F L R G_{F D} 配列は、F L R G_{N D} ドメインをさらに含むポリペプチドとして発現させることにより、構造的文脈で維持されると有利であり得る。したがって、本開示は、下記に示される F L R G_{N D} - F L R G_{F D 1} 配列 (配列番号 24) および F L R G_{N D} - F L R G_{F D 1} - F L R G_{F D 2} 配列 (配列番号 25) と、例えば、1 つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。さらに、最初のシステインの前の、最初のアミノ酸である G または N のいずれかは、プロセッシングにより除去することもでき、いかなる影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに短いポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

10

【化 1 7】

1 GVCWLQQGQE ATCSLVLQTD VTRAECASG NIDTAWSNLT HPGNKINLLG
 51 FLGLVHCLPC KCDGVECGPG KACRMLGGRP RCECAPDCSG LPARLQVCGS
 101 DGATYRDECE LRAARCRGHP DLSVMYRGRC (配列番号 24)

1 GVCWLQQGQE ATCSLVLQTD VTRAECASG NIDTAWSNLT HPGNKINLLG
 51 FLGLVHCLPC KCDGVECGPG KACRMLGGRP RCECAPDCSG LPARLQVCGS
 101 DGATYRDECE LRAARCRGHP DLSVMYRGRC CEHVVCPRPQ SCVVDQGTGSA
 151 HCVVCRAAPC PVPSSPGQEL CGNNNVITYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA
 201 GSC (配列番号 25)

20

【0059】

F L R G - F_c と提示される場合、これは、F_c ドメインが、F L R G の C 末端に融合されており、介在リンカーを含んでも含まなくてもよいことを指し示す。この場合の F_c とは、この用語が本明細書で定義される通り、任意の免疫グロブリン F_c 部分であり得る。F L R G - G₁ F_c と提示される場合、これは、I g G₁ の F_c 部分が、F L R G の C 末端において融合されていることを指し示す。それとは反対のことが指し示されていない限り、この命名法により記載されるタンパク質は、ヒト F L R G タンパク質を表すであろう。

30

【0060】

F S T N および F S T L₃ に加えて、他の 2 種の遺伝子が同定され、それらのタンパク質産物は、フォリスタチンドメインモチーフを含有し、ミオスタチンおよび G D F 1 1 の細胞外阻害剤として機能する。ヒトにおいて、これら近縁の遺伝子は、乳清酸性タンパク質ドメイン、フォリスタチン-カザールドメイン、免疫グロブリンドメイン、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤モジュールに関係する 2 つのタンデムドメインおよびネトリンドメインを含むそれらの共有されるドメイン構造に基づき、W F I K K N 1 および W F I K K N 2 と命名されている [Trexler ら (2001 年) Proc Natl Acad Sci USA 98 巻: 3705 ~ 3709 頁; Trexler ら (2002 年) Biol Chem 383 巻: 223 ~ 228 頁]。W F I K K N 2 は、W F I K K N 関連タンパク質 (W F I K K N R P) としても公知であり、これらのタンパク質のマウス対応物は、それらのリガンド結合能力に基づき、それぞれ G D F 関連血清タンパク質-2 (Gasp2) および Gasp1 と命名されている [Hill ら (2003 年) Mol Endocrinol 17 巻: 1144 ~ 1154 頁]。

40

【0061】

天然の W F I K K N 1 (GASP2) および W F I K K N 2 (GASP1) タンパク質は、互いともフォリスタチンまたは F L R G と全く異なるのにもかかわらず、重複する

50

活性プロファイルを保持する。WF I K K Nは、高アフィニティーで、ミオスタチン、G D F 1 1および場合によってはミオスタチンプロペプチドに結合し、成熟リガンドへの結合は、フォリスタチンドメイン (WF I K K N 1_{F D}、WF I K K N 2_{F D}) によって主に媒介され、プロペプチド結合は、ネトリンドメインによって主に媒介される [H i l l ら (2003年) M o l E n d o c r i n o l 17巻: 1144~1154頁; K o n d a s ら (2008年) J B i o l C h e m 283巻: 23677~23684頁]。フォリスタチンおよびF L R Gとは対照的に、WF I K K N 1とWF I K K N 2のいずれも、アクチビンに結合しない [S z l a m a ら (2010年) F E B S J 277巻: 5040~5050頁]。WF I K K Nタンパク質は、アクチビン I I 型受容体へのアクセスを遮断することにより、ミオスタチンおよびG D F 1 1シグナル伝達を阻害する [L e e ら (2013年) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 110巻: E3713~E3722頁]。両方のWF I K K Nにおけるいくつかのプロテアーゼ阻害性モジュールの存在のために、これらは、複数の種類のプロテアーゼの作用も調節する可能性がある。WF I K K N 1の組織発現パターンは、出生前および出生後においてWF I K K N 2とは異なるため、この2種のタンパク質が、別個の役割を果たすという見解を支持する [T r e x l e r ら (2002年) B i o l C h e m 383巻: 223~228頁]。

【0062】

追加的な系統の証拠は、WF I K K Nを骨格筋量の調節に関係づける。WF I K K N 1またはWF I K K N 2のホモ接合型欠失を有するマウスは、筋肉重量の低減、急速解糖 I I b型線維から急速酸化 I I a型線維への線維型のシフト、および損なわれた筋肉再生を含む、ミオスタチンおよびG D F 1 1の過剰活性と一貫した表現型を示す [L e e ら (2013年) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 110巻: E3713~E3722頁]。逆に、マウスにおけるWF I K K N 2の広範な過剰発現は、筋肉過剰な (h y p e r m u s c u l a r) 表現型を主にもたらす [M o n e s t i e r ら (2012年) B M C G e n o m i c s 13巻: 541~551頁]。どちらのWF I K K Nタンパク質も、ミオスタチンに結合するが、WF I K K N 1およびWF I K K N 2は、ミオスタチンプロペプチドと異なって相互作用することができ、よって、ミオスタチン (m y o t a t i n) および単一ミオスタチンプロペプチド鎖の間の天然の複合体である半潜在的ミオスタチンによるA c t R I I AまたはA c t R I I Bの活性化を差次的に遮断することができる [S z l a m a ら (2013年) F E B S J 280巻: 3822~3839頁]。まとめると、本明細書で開示されるWF I K K N 1またはWF I K K N 2ポリペプチドを含むフォリスタチン関連融合タンパク質は、内在性アクチビンの阻害に伴う潜在的に望ましくない効果を引き起こすことなく、i n v i v oで骨格筋量を増加させることが予測されるであろう。

【0063】

用語「WF I K K N 1ポリペプチド」は、WF I K K N 1の任意の天然に存在するポリペプチドと共に、有用な活性を保持するその任意の改変体 (変異体、フラグメント、融合物およびペプチド模倣物形態を含む) を含むポリペプチドを指すのに使用される。ある特定の好ましい実施形態では、本開示のWF I K K N 1ポリペプチドは、ミオスタチン、ミオスタチンプロペプチド、ミオスタチンおよびそのプロペプチドの間の複合体、G D F 1 1ならびに潜在的にはアクチビン (例えば、A c t R I I Aおよび/またはA c t R I I B S m a d 2 / 3シグナル伝達のリガンド媒介性活性化) に結合するおよび/またはその活性を阻害する。リガンド結合特性を保持するWF I K K N 1ポリペプチドの改変体は、WF I K K N 1およびリガンドの間の相互作用をアッセイするための慣例的な方法を使用して同定することができる [例えば、K o n d a s ら (2008年) J B i o l C h e m 283巻: 23677~23684頁; S z l a m a ら (2013年) F E B S J 280巻: 3822~3839頁を参照]。加えて、ポリペプチドのライブラリーを作製および検査するための方法が、本明細書に記載されており、このような方法は、WF I K K N 1の改変体の作製および検査にも関係する。

【0064】

例えば、W F I K K N 1 ポリペプチドは、W F I K K N 1 ポリペプチドの配列（例えば、配列番号 26～28）に、少なくとも約 80% 同一であり、任意選択で、配列番号 26～28 のいずれかに、少なくとも 85%、90%、95%、97%、99% またはこれを超える同一性を有する配列を有するいずれか公知の W F I K K N 1 ポリペプチドの配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。用語「W F I K K N 1 融合ポリペプチド」は、異種（非 W F I K K N 1）部分と共に上記で言及されたポリペプチドのいずれかを含む融合タンパク質を指す場合がある。アミノ酸配列は、配列番号 26 により表されるヒト W F I K K N 1 に固有に見出されない場合、W F I K K N 1 に対して異種であると理解される。本明細書では、異種部分の多くの例が提供され、このような異種部分は、アミノ酸配列によって、融合タンパク質の W F I K K N 1 ポリペプチド部分に、直接隣接する場合もあり、あるいはリンカーまたは他の配列などの介在アミノ酸配列により隔てられる場合もある。

10

【0065】

ヒト W F I K K N 1 前駆体は、シグナルペプチドを、点線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン（W F I K K N 1_{F D}）を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号 26）（N C B I Re f S e q N P__444514.1）を有する。

【化 18】

```
1  MPALRPLLPL LLLLRLTSGA GLLPGLGSHP GVCNPQLSPN LWVDAQSTCE
51  RECSRQDQCA AA EKCCINVC GLHSCVAARF PGSPAAPTTA ASCEGFVCPQ
101 QGSDCDIWDG QPVCRCRDRC EKEPSFTCAS DGLTYYNRCY MDAEACLRGL
151 HLHIVPCKHV LSWPPSSPGP PETTARPTPG AAPVPPALYS SPSPQAVQVG
201 GTASLHCDVS GRPPPAVTWE KQSHQRENLI MRPDQMYGNV VVTSIGQLVL
251 YNARPEDAGL YTCTARNAAG LLRADFPLSV VQREPARDAA PSIPAPAECL
301 PDVQACTGPT SPHLVLWHYD PQRGGCMTFP ARGCDGAARG FETYEACQQA
351 CARGPGDACV LPAVQGPCRG WEPRWAYSPL LQQCHPFVYG GCEGNGNNFH
401 SRESCEDACP VPRTPPCRAC RLRSKLALSL CRSDFAIVGR LTEVLEEPEA
451 AGGIARVALE DVLKDDKMGL KFLGTKYLEV TLSGMDWACP CPNMTAGDGP
501 LVIMGEVRDG VAVLDAGSYV RAASEKRVKK ILELLEKQAC ELLNRFQD
( 配列番号 26)
```

20

30

【0066】

成熟（プロセッシング後）ヒト W F I K K N 1 は、フォリスタチンドメインを、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号 27）を有する。さらに、最初のシステインの前の、13 アミノ酸のいずれかを、プロセッシングにより除去することもでき、実質的な影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに小型のポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

40

【化 1 9】

1 AGLLPGLGSH PGVCPNQLSP NLWVDAQSTC ERECSRQDC AAAEKCCINV
 51 CGLHSCVAAR FPGSPAAPT AASCEGFVCP QQSDCDIWD GQPVCRCRDR
 101 CEKEPSFTCA SDGLTYYNRC YMDAEACLRG LHLHIVPCKH VLSWPPSSPG
 151 PPETTARPTP GAAPVPPALY SSPSPQAVQV GGTASLHCDV SGRPPPAVTW
 201 EKQSHQRENL IMRPDQMYGN VVVTISIGQLV LYNARPEDAG LYTCTARNAA
 251 GLLRADFPLS VVQREPARDA APSIPAPAEC LPDVQACTGP TSPHLVLWHY
 301 DPQRGGCMTF PARGCDGAAR GFETYACQQ ACARGPGDAC VLPVQGPCR
 351 GWEPRWAYSP LLQQCHPFVY GGCEGNGNNF HSRESCEDAC PVPRTPPCRA
 401 CRLRSKLALS LCRSDFAIVG RLTEVLEEPE AAGGIARVAL EDVLKDDKMG
 451 LKFLGTKYLE VTLSGMDWAC PCPNMTAGDG PLVIMGEVRD GVAVLDAAGSY
 501 VRAASEKRVK KILELLEKQA CELLNRFQD (配列番号 27)

10

【0 0 6 7】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示される W F I K K N 1_{F D} ドメイン（配列番号 28）と、例えば、1 つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

【化 2 0】

1 CEGFVCPQQG SDCDIWDGQP VCRCRDRCEK EPSFTCASDG LTYYNRCYMD
 51 AEACLRGLHL HIVPC (配列番号 28)

20

【0 0 6 8】

W F I K K N 1 - F c と提示される場合、これは、F c 部分が、W F I K K N 1 の C 末端に融合されており、介在リンカーを含んでも含まなくてもよいことを指し示す。この場合の F c とは、この用語が本明細書で定義される通り、任意の免疫グロブリン F c 部分であり得る。W F I K K N 1 - G 1 F c と提示される場合、これは、I g G 1 の F c 部分が、W F I K K N 1 の C 末端において融合されていることを指し示す。それとは反対のことが指し示されていない限り、この命名法により記載されるタンパク質は、ヒト W F I K K N 1 タンパク質を表すであろう。

30

【0 0 6 9】

用語「W F I K K N 2 ポリペプチド」は、W F I K K N 2 の任意の天然に存在するポリペプチドと共に、有用な活性を保持するその任意の改変体（変異体、フラグメント、融合物およびペプチド模倣物形態を含む）を含むポリペプチドを含む。ある特定の好ましい実施形態では、本開示の W F I K K N 2 ポリペプチドは、ミオスタチン、ミオスタチンプロペプチド、ミオスタチンおよびそのプロペプチドの間の複合体、G D F 1 1、ならびに潜在的にはアクチビン（例えば、A c t R I I A および／または A c t R I I B S m a d 2 / 3 シグナル伝達のリガンド媒介性活性化）に結合するおよび／またはその活性を阻害する。リガンド結合特性を保持する W F I K K N 2 ポリペプチドの改変体は、W F I K K N 2 およびリガンドの間の相互作用をアッセイするための慣例的な方法を使用して同定することができる [例えば、K o n d a s ら（2008年）J B i o l C h e m 283 巻：23677～23684 頁；S z l a m a ら（2013年）F E B S J 280 巻：3822～3839 頁を参照]。加えて、ポリペプチドのライブラリーを作製および検査するための方法が、本明細書に記載されており、このような方法は、W F I K K N 2 の改変体の作製および検査にも関係する。

40

【0 0 7 0】

例えば、W F I K K N 2 ポリペプチドは、W F I K K N 2 ポリペプチドの配列（例えば、配列番号 29～33）に、少なくとも約 80 % 同一であり、任意選択で、配列番号 29～33 のいずれかに、少なくとも 85 %、90 %、95 %、97 %、99 % またはこれを

50

超える同一性を有する配列を有するいずれか公知のW F I K K N 2 ポリペプチドの配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。用語「W F I K K N 2 融合ポリペプチド」は、異種（非W F I K K N 2）部分と共に上記で言及されたポリペプチドのいずれかを含む融合タンパク質を指す場合がある。アミノ酸配列は、配列番号29により表されるヒトW F I K K N 2 に固有に見出されない場合、W F I K K N 2 に対して異種であると理解される。本明細書では、異種部分の多くの例が提供され、このような異種部分は、アミノ酸配列によって、融合タンパク質のW F I K K N 2 ポリペプチド部分に、直接隣接する場合もあり、あるいはリンカーまたは他の配列などの介在アミノ酸配列により隔てられる場合もある。

【0071】

10

ヒトW F I K K N 2 前駆体は、シグナルペプチドを、点線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン（W F I K K N 2_{F D}）を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号29）（N C B I Ref Seq NP_783165.1）を有する。

【化21】

```

1  MWAPRCRREFW SRWEQVAALL LLLLLLVGVP RSLALPPIRY SHAGICPNDM
51  NPNLWVDAQS TCRRECETDQ ECETYEKCCP NVCGTKSCVA ARYMDVKGKK
101 GPVGMPEAT CDHFMCLQQG SECIDIWDGQP VCKCKDRCEK EPSFTCASDG
151 LTYYNRCYMD AEACSKGITL AVVTCRYHFT WPNTSPPPPE TTMHPTTASP
201 ETPELDMAAP ALLNNPVHQ S VTMGETVSFL CDVVGRRPRPE ITWEKQLEDR
251 ENVVMRPNHV RGNVVVTNIA QLVIIYNAQLQ DAGIYTCTAR NVAGVLRADF
301 PLSVVRGHQA AATSESSPNG TAFPAAECLK PPDSEDCGEE QTRWHFDAQA
351 NNCLTFTEFGH CHRNLNHFET YEACMLACMS GPLAACSLPA LQGPCKAYAP
401 RWAYNSQTGQ CQSFVYGGCE GNGNNFESRE ACEESCPFPR GNQRCRACKP
451 RQKLVTSTFCR SDFVILGRVS ELTEEPDSGR ALVTVDEV LK DEKMGLKFLG
501 QEPLEVTLLH VDWACPCPNV TVSEMPLIIM GEVDGGMAML RPDSEFVGASS
551 ARVRKLREV MHKKTCDVLK EFLGLH (配列番号 29)

```

20

30

【0072】

成熟（プロセッシング後）ヒトW F I K K N 2 は、フォリスタチンドメインを、単一の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号30）を有する。さらに、最初のシステインの前の、11アミノ酸のいずれかを、プロセッシングにより除去することもでき、実質的な影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに小型のポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

【化 2 2】

1 LPPIRYSHAG ICPNDMNPNL WVDAQSTCRR ECETDQECET YEKCCPNVCG
 51 TKSCVAARYM DVKGKGPVG MPKEATCDHF MCLQQGSECD IWDGQPVCKC
 101 KDRCEKEPSF TCASDGLTYY NRCYMDAEAC SKGITLAVVT CRYHFTWPNT
 151 SPPTPETTMH PTTASPETPE LDMAAPALLN NPVHQSVMG ETVSFLCDVV
 201 GRPRPEITWE KQLEDRENVV MRPNHVRGNV VVTNIAQLVI YNAQLQDAGI
 251 YTCTARNVAG VLRADFPLSV VRGHQAAATS ESSPNGTAFP AAELCKPPDS
 301 EDCGEEQTRW HFDAQANNCL TFTFGHCHRN LNHFETYEAC MLACMSGPLA
 351 ACSLPALQGP CKAYAPRWAY NSQTGQCQSF VYGGCEGNGN NFESREACEE
 401 SCFPFRGNQR CRACKPRQKL VTSFCRSDFV ILGRVSELTE EPDSGRALVT
 451 VDEVKDEKM GLKFLGQEPL EVTLLHVDWA CPCPNVTVSE MPLIIMGEVD
 501 GGMAMLRPDS FVGASSARRV RKLREVMHKK TCDVLKEFLG LH

10

(配列番号 30)

【0 0 7 3】

ある特定の態様では、本開示は、下記に示される W F I K K N 2_{F D} ドメイン（配列番号 3 1）と、例えば、1 つまたは複数の異種ポリペプチドとを含むポリペプチドを含む。

20

【化 2 3】

1 CDHFMCLQQG SECDIWDGQP VCKCKDRCEK EPSFTCASDG LTYYNRCYMD
 51 AEACSKGITL AVVTC (配列番号 31)

【0 0 7 4】

マウス W F I K K N 2 (G A S P 1) 前駆体は、シグナルペプチドを、点線の下線で指し示し、フォリスタチンドメイン (W F I K K N 2_{F D}) を、実線の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号 3 2）(N C B I R e f S e q N P _ 8 6 1 5 4 0 . 2) を有する。

30

【化 2 4】

1 MCAPGYHFRW FHWGLLLLLL LEAPLRGLAL PPIRYSHAGI CPNDMNPNLW
 51 VDAQSTCKRE CETDQECETY EKCCPNVCGT KSCVAARYMD VKGKGPVGM
 101 PKEATCDHFM CLQQGSECDI WDGQPVCKCK DRCEKEPSFT CASDGLTYYN
 151 RCFMDAEACS KGITLSVVTC RYHFTWPNTS PPPPETTVHP TTASPETLGL
 201 DMAAPALLNH PVHQSVMG TVSFLCDVVG RPRPELTWEK QLEDRENVV
 251 RPNHVRGNV VTNIAQLVIY NVQPQDAGIY TCTARNVAGV LRADFPLSVV
 301 RGGQARATSE SSLNGTAFPA TECLKPPDSE DCGEEQTRWH FDAQANNCLT
 351 FTFGHCHHNL NHFETYEACM LACMSGPLAI CSLPALQGPC KAYVPRWAYN
 401 SQTGLCQSFV YGGCEGNGNN FESREACEES CPFPRGNQHC RACKPRQKLV
 451 TSFCRSDFVI LGRVSELTEE QDSGRALVTV DEVLKDEKMG LKFLGREPLE
 501 VTLLHVDWTC PCPNVTVGET PLIIMGEVDG GMAMLRPDSF VGASSTRVR
 551 KLREVMYKKT CDVLKDFLGL Q (配列番号 32)

40

【0 0 7 5】

成熟（プロセッシング後）マウス W F I K K N 2 は、フォリスタチンドメインを単一の下線で指し示す、以下のアミノ酸配列（配列番号 3 3）を有する。さらに、最初のシステインの前の、1 1 アミノ酸のいずれかを、プロセッシングにより除去することもでき、実質的

50

な影響も伴わずに、意図的に消失させることもでき、このようなわずかに小型のポリペプチドを含むポリペプチドもさらに含まれることが認識されるであろう。

【化 2 5】

```

1  LPPIRYSHAG ICPNDMNPNL WVDAQSTCKR ECETDQECET YEKCCPNVCG
51  TKSCVAARYM DVKGKKGPVG MPKEATCDHF MCLQQGSECD IWDGQPVCKC
101 KDRCEKEPSF TCASDGLTYY NRCFMDAEAC SKGITLSVVT CRYHFTWPNT
151 SPPPPETTVH PTTASPETLG LDMAAPALLN HPVHQSVTVG ETVSFLCDVV
201 GRPRPELTWE KQLEDRENVV MRPNHVRGNV VVTNIAQLVI YNVQPQDAGI
251 YTCTARNVAG VLRADFPLSV VRGGQARATS ESSLNGTAFP ATECLKPPDS
301 EDCGEEQTRW HFDAQANNCL TFTFGHCHHN LNHFETYEAC MLACMSGPLA
351 ICSLPALQGP CKAYVPRWAY NSQTGLCQSF VYGGCEGNGN NFESREACEE
401 SCPEFPRGNQH CRACKPRQKL VTSFCRSDFV ILGRVSELTE EQDSGRALVT
451 VDEVLKDEKM GLKFLGREPL EVTLHVDWT CPCPNVTVGE TPLIIMGEVD
501 GGMAMLRPDS FVGASSTRRV RKLREVMYKK TCDVLKDFLG LQ

```

(配列番号 33)

【 0 0 7 6 】

WF I K K N 2 - F c と提示される場合、これは、F c 部分が、WF I K K N 2 の C 末端に融合されており、介在リンカーを含んでも含まなくてもよいことを指し示す。この場合の F c とは、この用語が本明細書で定義される通り、任意の免疫グロブリン F c 部分であり得る。WF I K K N 2 - G 1 F c と提示される場合、これは、I g G 1 の F c 部分が、WF I K K N 2 の C 末端において融合されていることを指し示す。それとは反対のことが指し示されていない限り、この命名法により記載されるタンパク質は、ヒト WF I K K N 2 タンパク質を表すであろう。

【 0 0 7 7 】

ある特定の態様では、本開示は、リガンドであるミオスタチン、アクチビン A、アクチビン B および／または G D F 1 1 を阻害することができる、フォリスタチン関連ポリペプチドおよびフォリスタチン関連融合タンパク質を提供する。用語「フォリスタチン関連ポリペプチド」は、少なくとも 1 つのフォリスタチンドメイン（例えば、F S T_{F D 1}、F S T_{F D 2}、F S T_{F D 3}、F L R G_{F D 1}、F L R G_{F D 2}、WF I K K N 1_{F D} または WF I K K N 2_{F D}）のアミノ酸配列に、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99.5 または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む単一ポリペプチド鎖を指すように本明細書において使用されている。用語「フォリスタチン関連ポリペプチド」は、フォリスタチン遺伝子、F L R G（F S T L 3、F S R P）遺伝子、WF I K K N 1（G A S P 2）遺伝子または WF I K K N 2（G A S P 1）遺伝子の任意の天然に存在するポリペプチド産物と共に、例えば、リガンド結合（例えば、ミオスタチン、G D F 1 1、アクチビン A、アクチビン B）を含む有用な活性を保持するその任意の改変体（変異体、フラグメント、融合物およびペプチド模倣物形態を含む）を含むポリペプチドを指す。例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドは、配列番号 1 ～ 33 に対し少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、99 % またはこれを超える同一性であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 7 8 】

用語「フォリスタチン関連融合ポリペプチド」は、単一のアミノ酸配列において異種部分と共に上記で言及されたフォリスタチン関連ポリペプチドを含む単鎖融合タンパク質を指す。アミノ酸配列は、ヒト F S T 3 1 5（配列番号 3 により表される）、ヒト F L R G（配列番号 18 により表される）、ヒト WF I K K N 1（配列番号 25 により表される）またはヒト WF I K K N 2（配列番号 28 により表される）に固有に見出されない場合、

フォリスタチン、FLRG、WF I K K N 1またはWF I K K N 2に対して異種であると理解される。本明細書では、異種部分の多くの例が提供され、このような異種部分は、アミノ酸配列によって、融合タンパク質のフォリスタチン関連ポリペプチド部分に、直接隣接する場合もあり、あるいはリンカーまたは他の配列などの介在アミノ酸配列により隔てられる場合もあり、かつフォリスタチン関連ポリペプチドである部分に対してアミノ末端またはカルボキシ末端に配置される場合もある。

【0079】

ある特定の実施形態では、本明細書で記載されるフォリスタチン関連融合タンパク質は、天然に存在するフォリスタチン関連ポリペプチドに由来するポリペプチド鎖を含む非対称ヘテロ二量体融合タンパク質を指す。したがって、ある特定の実施形態では、本開示の方法は、任意選択で、種々の適用可能な障害、特に、このようなフォリスタチン関連融合タンパク質が結合するリガンドの阻害によって取り組むことができる障害を処置するための1つまたは複数の支持療法と組み合わせた、少なくとも1つのフォリスタチンドメインを含有する単一腕フォリスタチン関連ポリペプチドを含む融合タンパク質を含む1つまたは複数のフォリスタチン関連融合タンパク質の使用を対象にする。例えば、ミオスタチン、ならびに任意選択でGDF11、アクチビンAおよび／またはアクチビンBなどの他のリガンドに結合し阻害するフォリスタチン関連融合タンパク質を使用して、それを必要とする被験体における骨格筋量を増加させることができる、および／またはそれを必要とする被験体における骨格筋損失もしくは骨格筋障害を処置もしくは予防することができる。

【0080】

本明細書に示す通り、フォリスタチン関連ポリペプチドは、単量体型で発現されると、活性タンパク質としての発現にさらに適することができるが、このようなタンパク質は、精製の難易度が高い傾向があり、短い血清滞留時間（半減期）を有する傾向もあり、これらのどちらも、治療状況において望ましくない。精製問題は、当該分野で既に公知の方法による取り付けられたタンパク質の精製を可能にする、IgGの定常ドメイン部分（例えば、Fc部分）と会合する特性など、精製を容易にする固有の特徴を有する相互作用ペアの取込みによって解決することができる。血清半減期を改善するための一般的な機構は、IgGの定常ドメイン部分を有するホモ二量体融合タンパク質としてポリペプチドを発現することである。しかし、ホモ二量体タンパク質（例えば、Fc融合構築物における）として発現されたフォリスタチン関連ポリペプチドは、単量体型ほど活性がないまたは十分に産生されない場合がある。本明細書に実証される通り、問題は、単量体型を半減期延長部分に融合することにより解決することができ、驚くべきことに、これは、このようなタンパク質を非対称ヘテロ二量体融合タンパク質として発現させることにより迅速に達成することができ、この非対称ヘテロ二量体融合タンパク質では、結合ペアの一方のメンバーが、フォリスタチン関連ポリペプチドに融合され、結合ペアの別のメンバーが、他の部分には融合されないまたは異種部分に融合されており、結合ペアによって付与された血清半減期の改善と相まった、高度に活性なフォリスタチン関連ポリペプチドをもたらす。

【0081】

フォリスタチン関連ポリペプチド内のアミノ酸の番号付けは、天然のリーダー配列を使用するのかどうかにかかわらず、配列番号1、3、15、18、26、29または32の配列に基づく。

【0082】

本明細書中で使用される用語は、一般に、本開示の文脈の範囲内で、かつ、各々の用語が使用される特定の文脈において、当該分野におけるその通常の意味を有する。本開示の組成物および方法、ならびに、これらの作製方法および使用方法の記載において、専門家にさらなる案内を提供するために、特定の用語が以下または本明細書中の他の場所で論じられている。用語の任意の使用の範囲および意味は、その用語が使用される特定の文脈から明らかである。

【0083】

「相同」は、そのあらゆる文法的な形態および語の綴りのバリエーションにおいて「共

10

20

30

40

50

通する進化的起源」を有する2つのタンパク質間の関係を指し、同じ生物種のスーパーファミリーからのタンパク質ならびに異なる生物種からの相同タンパク質を含む。このようなタンパク質（およびこれをコードする核酸）は、%同一性の観点であれ、特定の残基もしくはモチーフおよび保存された位置の存在によるものであれ、その配列類似性によって反映されるように、配列の相同性を有する。

【0084】

用語「配列類似性」は、そのあらゆる文法的な形態において、共通する進化の起源を共有している場合も共有していない場合もある、核酸もしくはアミノ酸配列間の同一性もしくは対応性の程度をいう。

【0085】

しかし、一般的な用法およびこの出願において、用語「相同」は、「高度に」のような副詞で修飾されるとき、配列の類似性を指す場合があり、そして、共通する進化の起源に関連していてもしていなくてもよい。

【0086】

参照ポリペプチド（またはヌクレオチド）配列に関する「パーセント（%）配列同一性」は、配列を整列し、必要であればギャップを導入して、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せずに、最大パーセント配列同一性を達成した後に、参照ポリペプチド（ヌクレオチド）配列におけるアミノ酸残基（または核酸）と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基（または核酸）のパーセンテージとして規定される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のアラインメントは、当業者の技能範囲内の様々な仕方である、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegaAlign（DNASTAR）ソフトウェアなど、公開されたコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較されている配列の全長にわたる最大アラインメントの達成に必要なとされるいずれかのアルゴリズムを含む、配列の整列に適切なパラメータを決定することができる。しかし、本明細書における目的のため、%アミノ酸（核酸）配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して作成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって著作され、ソースコードは、米国著作権局（U. S. Copyright Office）、Washington D. C.、20559においてユーザー文書により提出され、そこでは、米国著作権登録番号（U. S. Copyright Registration No.）TXU510087にて登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc.、South San Francisco, Calif. から公開されている、あるいはソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX（登録商標）V4.0Dを含むUNIX（登録商標）オペレーティング・システムにおける使用のためにコンパイルされるべきである。あらゆる配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動させない。

【0087】

本明細書で使用される「Xに実質的に結合しない」は、薬剤が、「X」に対して約 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} またはそれ超よりも大きい K_D を有する（例えば、 K_D の決定に使用したアッセイによって検出可能な結合が見られない）ことを意味するように意図される。

【0088】

2. フォリスタチン関連融合ポリペプチド

ある特定の態様では、本開示は、1つまたは複数のフォリスタチンドメインを含むフォリスタチン関連融合ポリペプチド（例えば、FST-Fcポリペプチド、FLRG-Fcポリペプチド、WF1KKN1-FcポリペプチドおよびWF1KKN2-Fcポリペプチド）に関する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示されるポリペプチドは、第2のポリペプチドと共有結合または非共有結合により会合した第1のポリペプチドを含むタンパク質複合体であって、第1のポリペプチドが、フォリスタチン関連ポリペプチドのア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列および相互作用ペアの第1のメンバーのアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチドが、相互作用ペアの第2のメンバーのアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチドが、フォリスタチン関連ポリペプチドを含まないタンパク質複合体を形成することができる。相互作用ペアは、相互作用して、複合体、特にヘテロ二量体の複合体を形成する任意の2つのポリペプチド配列の場合もあるが、実効性のある実施形態は、ホモ二量体配列を形成する相互作用ペアを用いることもできる。本明細書で記載される通り、相互作用ペアの一方のメンバーは、配列番号1～33のいずれかの配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドなど、フォリスタチン関連ポリペプチドに融合されていてよい。好ましくは、相互作用ペアは、単量体型のフォリスタチン関連ポリペプチドと比べて、改善されたタンパク質精製手段もしくは改善された血清半減期を付与するように、またはポリエチレングリコール部分などの別の部分に取り付けられて、改善された血清半減期をもたらすアダプターとして作用するように選択される。

10

【0089】

上記で記載した通り、フォリスタチンは、フォリスタチンリガンド結合を媒介すると考えられる4つのシステインに富む領域（すなわち、FST_{ND}、FST_{FD1}、FST_{FD2}およびFST_{FD3}）を特徴とする。同様に、FLRGは、3つのシステインに富む領域（すなわち、FLRG_{ND}、FLRG_{FD1}およびFLRG_{FD2}）を特徴とし、WF_{IKKN1}またはWF_{IKKN2}はそれぞれ、ミオスタチン、アクチビンまたはGDF11への結合を媒介すると考えられるシステインに富む領域（WF_{IKKN1}_{FD}またはWF_{IKKN2}_{FD}）を特徴とする。さらに、研究者らは、FSTにおける3つのフォリスタチンドメインのうち1つのみ（例えば、FST_{FD1}）を含むポリペプチド構築物が、ある特定のフォリスタチンリガンド（例えば、ミオスタチン）に対する強力なアフィニティを保持し、*in vivo*で生物学的に活性であることを実証している。Nakatanira（2008年）FASEB J 22巻：477～487頁を参照されたい。したがって、本開示の改変体フォリスタチン関連ポリペプチドは、フォリスタチンタンパク質の1つまたは複数の活性部分を含み得る。例えば、本開示の構築物は、配列番号1のアミノ酸30～95に対応する残基で始まり、配列番号1のアミノ酸316～344に対応する位置で終わることが可能である。他の例として、配列番号1の30～95に由来する位置で始まり、アミノ酸164～167または238～244に対応する位置で終わる構築物が挙げられる。

20

30

【0090】

本明細書で記載されるフォリスタチン、FLRG、WF_{IKKN1}およびWF_{IKKN2}ポリペプチド改変体は、種々の方法で、互いと組み合わせることもでき、異種アミノ酸配列と組み合わせることもできる。例えば、本開示の改変体フォリスタチン関連融合タンパク質は、FST_{FD1}（配列番号1のアミノ酸95～164；すなわち、配列番号7）、FST_{FD2}（配列番号1のアミノ酸168～239；すなわち、配列番号8）またはFST_{FD3}（配列番号1のアミノ酸245～316；配列番号9）から選択される、1つまたは複数のフォリスタチンドメインを含むポリペプチドのほか、FST_{FD1}（配列番号7）、FST_{FD2}（配列番号8）またはFST_{FD3}（配列番号9）に、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一である配列から選択される、1つまたは複数のフォリスタチンドメインを含むタンパク質を含む。同様に、本開示の改変体フォリスタチン関連融合タンパク質は、FLRG_{FD1}（配列番号18のアミノ酸99～167；すなわち、配列番号22）、FLRG_{FD2}（配列番号18のアミノ酸171～243；すなわち、配列番号23）、WF_{IKKN1}_{FD}（配列番号26のアミノ酸93～157；すなわち、配列番号28）またはWF_{IKKN2}_{FD}（配列番号29のアミノ酸111～175；すなわち、配列番号31）から選択される、1つまたは複数のフォリスタチンドメインを含むポリペプチドのほか、FST_{FD1}（配列番号7）、FST_{FD2}（配列番号8）、FST_{FD3}（配列番号9）、FLRG_{FD1}（配列番号22）、FLRG_{FD2}（配列番号23）、WF_{IKKN1}_{FD}（

40

50

配列番号28)またはWF I K K N 2_{FD} (配列番号31)に、少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一である配列から選択される、1つまたは複数のフォリスタチンドメインを含むタンパク質を含む。

【0091】

これらのフォリスタチンドメインは、このような組換えタンパク質が、例えば、フォリスタチンリガンド結合活性 (例えば、ミオスタチン) および生物学的活性 (例えば、筋量および/または筋強度 (muscle strength) を誘導する) を含む所望の活性を維持するという条件の下で、本開示の改変体フォリスタチン関連ポリペプチド内、任意の順序で組み合わせることができる。このような改変体フォリスタチンポリペプチドの例として、例えば、F S T_{FD1} - F S T_{FD2} - F S T_{FD3}、F S T_{FD1} - F S T_{FD3}、F S T_{FD1} - F S T_{FD1} - F S T_{FD3}、F S T_{FD1} - F S T_{FD2}、F S T_{FD1} - F S T_{FD1}、F S T_{ND} - F S T_{FD1} - F S T_{FD2} - F S T_{FD3}、F S T_{ND} - F S T_{FD1} - F S T_{FD2}、F S T_{ND} - F S T_{FD1} - F S T_{FD1}、F S T_{ND} - F S T_{FD1} - F S T_{FD3}、F S T_{ND} - F S T_{FD1} - F S T_{FD1} - F S T_{FD3} などのドメイン構造を有するポリペプチド、およびこれらのポリペプチドのN末端またはC末端に他の異種ポリペプチドを融合することにより得られるポリペプチドが挙げられる。改変体フォリスタチン関連ポリペプチドの例として、例えば、F L R G_{FD1} - F L R G_{FD1}、F L R G_{FD1} - F L R G_{FD2}、F L R G_{FD1} - F L R G_{FD1} - F L R G_{FD2}、F L R G_{ND} - F L R G_{FD1} - F L R G_{FD1}、F L R G_{ND} - F S T_{FD1} - F S T_{FD2} などのドメイン構造を有するポリペプチド、およびこれらのポリペプチドのN末端またはC末端に他の異種ポリペプチドを融合することにより得られるポリペプチドが挙げられる。これらのドメインは、直接的に融合しても、リンカーポリペプチドを介して連結してもよい。任意選択で、ポリペプチドリリンカーは、任意の配列であることが可能であり、1~100、1~50、好ましくは1~10、より好ましくは1~5アミノ酸を含み得る。ある特定の態様では、好ましいリンカーは、システインアミノ酸またはプロテアーゼ切断部位を含有しない。

【0092】

一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン改変体は、1つまたは複数のフォリスタチンリガンドに対する結合アフィニティーを低減しているか、または消失させている。ある特定の態様では、本開示は、アクチビンに対する結合アフィニティーを低減しているか、または消失させているフォリスタチン改変体を提供する。ある特定の態様では、本開示は、アクチビンに対する結合アフィニティーを低減しているか、または消失させているが、ミオスタチンに対する高アフィニティーは保持するフォリスタチン改変体を提供する。ある特定の態様では、本開示は、G D F 1 1 に対する結合アフィニティーを低減しているか、または消失させているが、ミオスタチンに対する高アフィニティーは保持するフォリスタチン改変体を提供する。

【0093】

ある特定の実施形態では、本発明は、対象のフォリスタチン関連融合ポリペプチドにより、アクチビン、G D F 8 または G D F 1 1 など、フォリスタチンまたは別のフォリスタチン関連ポリペプチドのリガンドに拮抗することに関する。したがって、本開示の組成物および方法は、1つまたは複数のこのようなりガンドの異常または望ましくなく高い活性に関連する障害の処置に有用である。

【0094】

本開示のフォリスタチン関連ポリペプチドは、シグナル配列を含み得る。シグナル配列は、フォリスタチン前駆体 (例えば、配列番号1のアミノ酸1~29)、F L R G 前駆体 (例えば、配列番号18のアミノ酸1~26)、W F I K K N 1 前駆体 (例えば、配列番号26のアミノ酸1~19)、W F I K K N 2 前駆体 (例えば、配列番号29のアミノ酸1~34) の天然のシグナル配列、または組織プラスミノゲンアクチベーター (T P A) シグナル配列もしくはミツバチメリチン (m e l a t i n) (H B M) シグナル配列などの別のタンパク質に由来するシグナル配列の場合もある。

【0095】

さらなるN-連結グリコシル化部位（N-X-S/T）を、フォリスタチン関連ポリペプチドに付加することができ、フォリスタチン関連融合タンパク質の血清半減期を延長することができる。N-X-S/T配列は一般に、リガンド結合性ポケットの外側の位置に導入することができる。N-X-S/T配列は、フォリスタチン配列と、Fcまたは他の融合物構成要素との間のリンカーに導入することができる。このような部位は、あらかじめ存在するSもしくはTに照らして適正な位置にNを導入することにより、またはあらかじめ存在する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。グリコシル化されることが予測される任意のSは、グリコシル化によりもたらされる保護のために、免疫原性部位を創出せずにTに変更させることができる。同様に、グリコシル化されることが予測される任意のTは、Sに変更させることができる。したがって、フォリスタチン関連ポリペプチド改変体は、1つまたは複数の追加の、非内因性N-連結グリコシル化コンセンサス配列を含み得る。

10

【0096】

ある特定の実施形態では、本開示は、治療有効性または安定性（例えば、エクスピボの貯蔵寿命およびインビボでのタンパク質分解に対する抵抗性）を増強することなどの目的のために、フォリスタチン関連ポリペプチドの構造を改変することにより機能的改変体を作製することを企図する。改変フォリスタチン関連ポリペプチドは、例えば、アミノ酸の置換、欠失または付加によって生成することもできる。例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンでの単発的な置換、アスパラギン酸のグルタミン酸での単発的な置換、スレオニンのセリンでの単発的な置換、または、あるアミノ酸の、構造的に関連したアミノ酸での同様の置換（例えば、保存的変異）は、結果として生じる分子の生物学的活性に対して大きな影響を及ぼさないと予想するのは理にかなっている。保存的置換は、その側鎖が関連しているアミノ酸のファミリー内で行われる置換である。フォリスタチン関連ポリペプチドのアミノ酸配列の変化の結果として、機能的相同体をもたらされるのかどうかは、野生型フォリスタチン関連ポリペプチドと同様の様式で細胞内の応答を生成するか、または、野生型フォリスタチン関連ポリペプチドと同様の様式で、ミオスタチンまたはアクチビンなど、1つまたは複数のリガンドに結合する、改変体フォリスタチン関連ポリペプチドの能力を評価することにより、たやすく決定することができる。

20

【0097】

ある特定の実施形態では、本発明は、ポリペプチドのグリコシル化を変更させるような、フォリスタチン関連ポリペプチドの特異的変異を企図する。このような変異は、1または複数のグリコシル化部位（例えば、O-連結もしくはN-連結のグリコシル化部位）を導入もしくは排除するように選択され得る。アスパラギン連結グリコシル化認識部位は、一般に、トリペプチド配列、アスパラギン-X-スレオニン（ここで、「X」は任意のアミノ酸である）を含み、この配列は、適切な細胞のグリコシル化酵素によって特異的に認識される。変化はまた、（O-連結グリコシル化部位については）野生型フォリスタチン関連ポリペプチドの配列への、1または複数のセリンもしくはスレオニン残基の付加、または、1または複数のセリンもしくはスレオニン残基による置換によってなされ得る。グリコシル化認識部位の第1位もしくは第3位のアミノ酸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（および／または、第2位におけるアミノ酸の欠失）は、改変されたトリペプチド配列において非グリコシル化をもたらす。フォリスタチン関連ポリペプチドにおける糖質部分の数を増加させる別の手段は、フォリスタチン関連ポリペプチドへのグリコシドの化学的もしくは酵素的な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依存して、糖は、（a）アルギニンおよびヒスチジン；（b）フリーのカルボキシル基；（c）フリーのスルフィドリル基（例えば、システインのもの）；（d）フリーのヒドロキシル基（例えば、セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンのもの）；（e）芳香族残基（例えば、フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンのもの）；または（f）グルタミンのアミド基に付加され得る。これらの方法については、1987年9月11日に公開された、WO 87/05330、ならびに、参照により本

30

40

50

明細書に組み込まれる、A p l i nおよびW r i s t o n（1981年）、C R C C r i t . R e v . B i o c h e m .、259～306頁において記載されている。1または複数の糖質部分の除去は、化学的および／または酵素的に達成され得る。化学的な脱グリコシル化は、例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または等価な化合物へのフォリスタチン関連ポリペプチドの曝露を含み得る。この処理は、アミノ酸配列をインタクトなままにしつつ、連結糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんどもしくは全ての糖の切断を生じる。化学的脱グリコシル化については、H a k i m u d d i nら（1987年）、A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s .、259巻：52頁；およびE d g eら（1981年）、A n a l . B i o c h e m .、118巻：131頁によりさらに記載されている。フォリスタチン関連ポリペ 10
プチドにおける、炭水化物部分の酵素的切断は、T h o t a k u r aら、（1987年）、M e t h . E n z y m o l .、138巻：350頁により記載されているように、様々なエンドグリコシダーゼおよ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。哺乳動物、酵母、昆虫および植物の細胞は全て、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し得るため、フォリスタチン関連ポリペプチドの配列は、適切なように、使用される発現系のタイプに応じて調節され得る。一般に、ヒトにおいて使用するためのフォリスタチン関連融合タンパク質は、適切なグリコシル化を提供する哺乳動物細胞株（例えば、H E K 2 9 3細胞株、C O S細胞株またはC H O細胞株）において発現されるが、他の哺乳動物発現細胞株も同様に有用であることと期待 20
される。

【0098】

本開示はさらに、改変体、特に、任意選択で、切断型改変体を含む、フォリスタチン関連ポリペプチドのコンビナトリアル改変体のセットを生成する方法を想定し、コンビナトリアル変異体のプールは、機能的な改変体配列を同定するために、とりわけ有用である。こ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、変更された薬物動態または変更されたリガンド結合など、変更された特性を有するフォリスタチン関連ポリペプチド改変体を生成することとなり得る。種々のスクリーニングアッセイを下に提示するが、このようなアッセイを使用して、改変体を評価することができる。例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド改変体は、アクチビンA、B、CもしくはE、G D F 8またはG D F 1 1などのリガンドに結合する能力、あるいはA c t R I I AまたはA c t R I I Bなどのリガンド受容体へのリガンドの結合を防止する能力に関してスクリー 30
ニングすることができる。

【0099】

フォリスタチン関連ポリペプチドまたはその改変体の活性はまた、細胞ベースのアッセイまたはインビボアッセイで調べることもできる。例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド改変体の、筋生成に関与する遺伝子の発現に対する効果を評価することができる。これは、必要に応じて、1つまたは複数の組換えリガンドタンパク質（例えば、ミオスタチンまたはアクチビンA）の存在下で実施することができ、細胞に、フォリスタチン関連ポリペプチドおよび／またはその改変体と、任意選択で、リガンドとを生成するように、トランスフェクトすることができる。同様に、フォリスタチン関連ポリペプチドを、マウス 40
または他の動物に投与することができ、筋量または筋強度など、1つまたは複数の筋特性を評価することができる。当技術分野では、このようなアッセイが周知であり、日常的である。応答性のレポーター遺伝子を、このような細胞株内で使用して、下流のシグナル伝達に対する効果をモニタリングすることができる。

【0100】

天然に存在するフォリスタチン関連ポリペプチドと比べて選択的な効力を有するコンビナトリアルに誘導された改変体を生成することができる。このような改変体タンパク質は、組換えDNA構築物から発現されたとき、遺伝子治療のプロトコルにおいて使用され得る。同様に、変異誘発は、対応する野生型フォリスタチン関連ポリペプチドとは劇的に異なる細胞内半減期を有する改変体を生じ得る。例えば、変更されたタンパク質は、天然の 50

フォリスタチン関連ポリペプチドのタンパク質分解、または、その崩壊もしくは他の方法で不活性化をもたらす他のプロセスに対してより安定性であるかもしくは安定性が低いかのいずれかにされ得る。このような改変体およびこれをコードする遺伝子は、そのフォリスタチン関連ポリペプチドの半減期を調節することによってフォリスタチン関連ポリペプチドレベルを変更するのに利用され得る。

【0101】

ある特定の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連ポリペプチドはさらに、フォリスタチン関連ポリペプチド内に天然に存在する任意の翻訳後修飾に加えて翻訳後修飾を含み得る。こ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、脂質化およ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、フォリスタチン関連ポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、多糖類もしくは単糖類およびホスフェイトのような非アミノ酸成分を含み得る。このような非アミノ酸成分の、フォリスタチン関連ポリペプチドの機能に対する影響は、他のフォリスタチン関連ポリペプチド改変体について本明細書中に記載されるようにして試験され得る。フォリスタチン関連ポリペプチドの新生形態を切断することによってフォリスタチン関連ポリペプチドが細胞内で生成される場合、翻訳後プロセッシングもまた、このタンパク質の正確な折り畳みおよび／または機能にとって重要となり得る。様々な細胞（例えば、CHO、COS、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3またはHEK293）が、このような翻訳後の活性のための特定の細胞機構および特徴的なメカニズムを有し、そして、フォリスタチン関連ポリペプチドの正確な修飾およびプロセッシングを保証するように選択され得る。

【0102】

ある特定の態様では、フォリスタチン関連ポリペプチドの機能的改変体または修飾形態は、少なくともフォリスタチン関連ポリペプチドの部分と、1つまたは複数の融合ドメインとを有する融合タンパク質を含む。このような融合ドメインの周知の例としては、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（例えば、Fc）、マルトース結合タンパク質（MBP）、また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。融合ドメインは、所望される特性を与えるように選択され得る。例えば、いくつかの融合ドメインが、アフィニティー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。アフィニティ精製の目的では、グルタチオンー、アミラーゼー、およびニッケルーもしくはコバルトー結合化樹脂のような、アフィニティークロマトグラフィーのための適切なマトリクスが使用される。このようなマトリクスの多くは、Pharmacia GST精製システムおよび（HIS₆）融合パートナーと共に有用なQIAexpress（登録商標）システム（Qiagen）のような「キット」の形態で利用可能である。別の例としては、融合ドメインは、フォリスタチン関連ポリペプチドの検出を容易にするように選択され得る。このような検出ドメインの例としては、種々の蛍光タンパク質（例えば、GFP）、ならびに、「エピトープタグ」（これは、特定の抗体に利用可能な、通常は短いペプチド配列である）が挙げられる。特定のモノクローナル抗体に容易に利用可能な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）およびc-mycタグが挙げられる。いくつかの場合、融合ドメインは、関連のプロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによって、そこから組換えタンパク質を解放することを可能にする、第Xa因子またはトロンビンのようなプロテアーゼ切断部位を有する。解放されたタンパク質は、次いで、その後のクロマトグラフィーによる分離によって、融合ドメインから単離され得る。特定の好ましい実施形態では、フォリスタチン関連ポリペプチドは、インビボでフォリスタチン関連ポリペプチドを安定化させるドメイン（「安定化」ドメイン）と融合される。「安定化」とは、それが、分解の低減によるものであるか、腎臓によるクリアランスの低減によるものであるか、他の薬物動態作用によるものであるかとは無関係に、血清半減期を増加させる任意のものを意味する。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範囲のタンパク質に対して所望の薬

物動態特性を与えることが公知である。同様に、ヒト血清アルブミンへの融合は、所望の特性を与え得る。選択され得る融合ドメインの他のタイプとしては、多量体化（例えば、二量体化、四量体化）ドメインおよび機能的ドメイン（例えば、筋肉成長のさらなる刺激のような付加的な生物学的機能を与えるもの）が挙げられる。

【0103】

具体例としては、本開示は、免疫グロブリンのCH1ドメイン、CH2ドメイン、もしくはCH3ドメインなど、免疫グロブリンの定常ドメインまたは、Fcを含むポリペプチドに融合させたフォリスタチン関連ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に由来するFcドメインを下記に提示する。CDC活性またはADCC活性を減殺する、他の変異も公知であり、本開示には、集合的に、これらの改変体のいずれかが含まれ、フォリスタチン融合タンパク質の有利な構成要素として使用することができる。任意選択で、配列番号34のIgG1 Fcドメインは、Asp-265、Lys-322およびAsn-434（対応する全長IgG1に従った番号付け）などの残基に1つまたは複数の変異を有する。ある場合において、これらの変異のうち1つまたは複数（例えば、Asp-265変異）を有する変異体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減する。他の場合において、これらの変異のうち1つまたは複数（例えば、Asn-434変異）を有する変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比べてMHCI関連Fc受容体（FcRN）に結合する能力が増加する。

【0104】

ヒトIgG1のFc部分（G1Fc）に使用することができる天然のアミノ酸配列の例を下記に示す（配列番号34）。点線の下線は、ヒンジ領域を指し示し、実線の下線は、天然に存在する改変体を有する位置を指し示す。部分的に、本開示は、配列番号34に対し80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。G1Fcにおける天然に存在する改変体は、配列番号34において使用される番号付け方式に従ったD134およびL136を含むであろう（UniProt P01857を参照）。

【化26】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKG
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK          ( 配列番号      34 )

```

【0105】

ヒトIgG2のFc部分（G2Fc）に使用することができる天然のアミノ酸配列の例を下記に示す（配列番号35）。点線の下線は、ヒンジ領域を指し示し、実線の下線は、天然に存在する改変体を有する位置を指し示し、二重の下線は、配列データの矛盾が存在する位置を指し示す（UniProt P01859に従う）。部分的に、本開示は、配列番号35に対し80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【化27】

```

1  VECPPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKV
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFY
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK          ( 配列番号      35 )

```

【0106】

ヒト Ig G3 の F c 部分 (G3 F c) に使用することができるアミノ酸配列の2つの例を下記に示す。G3 F c におけるヒンジ領域は、他の F c 鎖におけるものの最大4倍の長さとなることができ、同様の17残基セグメントに先行される3つの同一15残基セグメントを含有する。下記に示される第1のG3 F c 配列 (配列番号36) は、単一15残基セグメントからなる短いヒンジ領域を含有する一方、第2のG3 F c 配列 (配列番号37) は、全長ヒンジ領域を含有する。いずれの場合でも、点線の下線は、ヒンジ領域を指し示し、実線の下線は、UniProt P01859 に従った天然に存在する改変体を有する位置を指し示す。部分的に、本開示は、配列番号36、37 に対し80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または99% 同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

10

【化28】

```

1  EPKSCDTPPP_CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVS LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKT_KGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK      (配列番号 36)

```

20

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLISRTP TCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK      (配列番号 37)

```

【0107】

G3 F c における天然に存在する改変体 (例えば、UniProt P01859 を参照) は、配列番号36 において使用される番号付け方式に変換された場合、E68Q、V69、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y を含み、本開示は、これらの変種のうち1つまたは複数を含むG3 F c ドメインを含む融合タンパク質を提供する。加えて、ヒト免疫グロブリン Ig G3 遺伝子 (IGHG3) は、異なるヒンジ長を特徴とする構造的多型を示す [UniProt P01859 を参照]。特に、改変体WIS は、V 領域の大部分およびCH1 領域の全てを欠いている。これは、ヒンジ領域に通常存在する11個に加えて、7位に余分な鎖間ジスルフィド結合を有する。改変体ZUC は、V 領域の大部分、CH1 領域の全ておよびヒンジの一部を欠く。改変体OMM は、対立遺伝子型または別のガンマ鎖サブクラスを表すことができる。本開示は、これらの改変体のうち1つまたは複数を含むG3 F c ドメインを含む追加的な融合タンパク質を提供する。

30

40

【0108】

ヒト Ig G4 の F c 部分 (G4 F c) に使用することができる天然のアミノ酸配列の例を下記に示す (配列番号38)。点線の下線は、ヒンジ領域を指し示す。部分的に、本開示は、配列番号38 に対し80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または99% 同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【化 2 9】

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
 51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
 101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
 151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
 201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (配列番号 38)

【0109】

F c ドメインにおける種々の操作された変異が、G 1 F c 配列（配列番号 3 4）に関して本明細書に提示されており、G 2 F c、G 3 F c および G 4 F c における類似の変異は、図 1 における G 1 F c とそれらのアラインメントに由来することができる。不等なヒンジ長のため、アイソタイプアラインメント（図 1）に基づく類似の F c 位置は、配列番号 3 4、3 5、3 6 および 3 8 において異なるアミノ酸番号を保持する。

10

【0110】

単一細胞株からの非対称の免疫グロブリンに基づくタンパク質の大規模生産において生じる問題は、「鎖会合課題」として公知である。二重特異性抗体の生産において顕著に直面するように、鎖会合課題は、単一細胞株において異なる重鎖および／または軽鎖が産生される場合に、固有に生じる複数の組合せの中から所望の多重鎖タンパク質を効率的に産生するという難題に関係する〔例えば、K l e i n ら（2012年）m A b s 4 巻：6 5 3～6 6 3 頁を参照〕。この問題は、同じ細胞内で 2 種の異なる重鎖および 2 種の異なる軽鎖が産生される場合に最も喫緊となり、この場合、1 種のみが典型的に望まれるときに、総計 1 6 通りの可能な鎖組合せ（これらのいくつかは同一であるが）が存在する。にもかかわらず、同じ原理が、2 種の異なる（非対称）重鎖のみを取り込む所望の多重鎖融合タンパク質の収量縮小の原因である。

20

【0111】

単一細胞株において F c 含有融合ポリペプチド鎖の所望のペア形成を増加させて、許容される収量で好ましい非対称融合タンパク質を産生する様々な方法が、当該分野で公知である〔例えば、K l e i n ら（2012年）m A b s 4 巻：6 5 3～6 6 3 頁を参照〕。F c 含有鎖の所望のペア形成を得るための方法として、電荷に基づくペア形成（静電ステアリング（electrostatic steering））、「ノブ・ホール型（knobs-into-holes）」立体ペア形成および S E E D b o d y ペア形成が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、R i d g w a y ら（1996年）P r o t e i n E n g 9 巻：6 1 7～6 2 1 頁；M e r c h a n t ら（1998年）N a t B i o t e c h 1 6 巻：6 7 7～6 8 1 頁；D a v i s ら（2010年）P r o t e i n E n g D e s S e l 2 3 巻：1 9 5～2 0 2 頁を参照されたい。本明細書において実証される通り、電荷に基づくペア形成が非対称ポリペプチド鎖の正確なマッチングを促進する、単一 W F I K K N 2 ポリペプチド腕を含む非対称 F c 融合タンパク質は、二重 W F I K K N 2 ポリペプチド腕を含む対称 F c 融合タンパク質よりも大幅に優れた効力（より低い I C₅₀）で、細胞ベースのレポーター遺伝子アッセイにおいてミオスタチン活性を阻害する。

30

40

【0112】

ある特定の実施形態では、本開示は、電荷ペア形成（静電ステアリング）に基づいて相補的となるように操作された F c 配列を使用した、非対称 F c 含有ポリペプチド鎖の所望のペア形成を提供する。静電相補性を有する F c 配列のペアの一方は、任意選択のリンカーありまたはなしで、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチド（例えば、フォリスタチンポリペプチド、F L R G ポリペプチド、W F I K K N 1 ポリペプチドまたは W F I K K N 2 ポリペプチド）に任意に融合して、フォリスタチン関連融合ポリペプチドを生成することができる。この単鎖は、第 1 の F c と相補的な F c 配列と共に最適な細胞において共発現（coexpress）させて、所望の多重鎖構築物（フォリスタチン関連融合タン

50

パク質)の生成に有利に働くことができる。静電ステアリングに基づくこの例において、配列番号39 [ヒトG1Fc (E134K/D177K)] および配列番号40 [ヒトG1Fc (K170D/K187D)] は、操作されたアミノ酸置換に二重の下線が引かれた相補的Fc配列の例であり、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチドは、配列番号39または配列番号40のいずれかに融合することができるが、これらの両方には融合できない。天然のhG1Fc、天然のhG2Fc、天然のhG3Fcおよび天然のhG4Fcの間の高度なアミノ酸配列同一性を考慮すると、hG2Fc、hG3FcまたはhG4Fcにおける対応する位置のアミノ酸置換(図1を参照)が、下記の相補的hG1Fcペア(配列番号39、40)の代わりに使用することができる相補的Fcペアを生成するであろうと認めることができる。

10

【化30】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRKEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLKSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 39)

```

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPPVLDSDG SFFLYSDLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 40)

```

20

【0113】

部分的に、本開示は、立体相補性のために操作されたFc配列を使用した、非対称Fc含有ポリペプチド鎖の所望のペア形成を提供する。部分的に、本開示は、立体相補性の例としてノブ・ホール型ペア形成を提供する。立体相補性を有するFc配列のペアの一方は、任意選択のリンカーありまたはなしで、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチド(例えば、フォリスタチンポリペプチド、FLRGポリペプチド、WFIKKN1ポリペプチドまたはWFIKKN2ポリペプチド)に任意に融合して、フォリスタチン関連融合ポリペプチドを生成することができる。この単鎖は、第1のFcと相補的なFc配列と共に最適な細胞において共発現されて、所望の多重鎖構築物の生成に有利に働くことができる。ノブ・ホール型ペア形成に基づくこの例において、配列番号41 [ヒトG1Fc (T144Y)] および配列番号42 [ヒトG1Fc (Y185T)] は、操作されたアミノ酸置換に二重の下線が引かれた相補的Fc配列の例であり、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチドは、配列番号41または配列番号42のいずれかに融合することができるが、これらの両方には融合できない。天然のhG1Fc、天然のhG2Fc、天然のhG3Fcおよび天然のhG4Fcの間の高度なアミノ酸配列同一性を考慮すると、hG2Fc、hG3FcまたはhG4Fcにおける対応する位置のアミノ酸置換(図1を参照)が、下の相補的hG1Fcペア(配列番号41、42)の代わりに使用することができる相補的Fcペアを生成するであろうと認めることができる。

30

40

【化 3 1】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSREEMTKNQ VSLYCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 41)

```

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLTSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 42)

```

10

【0 1 1 4】

操作されたジスルフィド結合と組み合わせたノブ・ホール型ペア形成に基づく F c 相補性の例は、配列番号 4 3 [h G 1 F c (S 1 3 2 C / T 1 4 4 W)] および配列番号 4 4 [h G 1 F c (Y 1 2 7 C / T 1 4 4 S / L 1 4 6 A / Y 1 8 5 V)] に開示されている。これらの配列における操作されたアミノ酸置換には二重の下線が引かれ、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチドは、配列番号 4 3 または配列番号 4 4 のいずれかに融合することができるが、これらの両方には融合できない。天然の h G 1 F c、天然の h G 2 F c、天然の h G 3 F c および天然の h G 4 F c の間の高度なアミノ酸配列同一性を考慮すると、h G 2 F c、h G 3 F c または h G 4 F c における対応する位置のアミノ酸置換（図 1 を参照）が、下記の相補的 h G 1 F c ペア（配列番号 4 3、4 4）の代わりに使用することができる相補的 F c ペアを生成するであろうと認めることができる。

20

【化 3 2】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PCREEMTKNQ VSLWCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 43)

```

30

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTL PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 44)

```

40

【0 1 1 5】

部分的に、本開示は、ヒト I g G および I g A C_H3 ドメインの指状嵌合型 (i n t e r d i g i t a t i n g) β-ストランドセグメントを生成するように操作された F c 配列を使用した、非対称 F c 含有ポリペプチド鎖の所望のペア形成を提供する。このような方法は、S E E D b o d y 融合タンパク質の形成を可能にするストランド交換操作ドメイン (s t r a n d - e x c h a n g e e n g i n e e r e d d o m a i n) (S E E D) C_H3 ヘテロ二量体の使用を含む [例えば、D a v i s ら (2010 年) P r o t e i n E n g D e s i g n S e l 23 巻: 195~202 頁を参照]。S E E D b o d y 相補性を有する F c 配列のペアの一方は、任意選択のリンカーありまたはなしで

50

、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチド（例えば、フォリスタチンポリペプチド、F L R G ポリペプチド、W F I K K N 1 ポリペプチドまたはW F I K K N 2 ポリペプチド）に任意に融合して、フォリスタチン関連融合ポリペプチドを生成することができる。この単鎖は、第1のF cと相補的なF c配列と共に最適な細胞において共発現されて、所望の多重鎖構築物の生成に有利に働くことができる。S E E D b o d y (S b) ペア形成に基づくこの例において、配列番号45 [h G 1 F c (S b_{A G})] および配列番号46 [h G 1 F c (S b_{G A})] は、I g A F cに由来する操作されたアミノ酸置換に二重の下線が引かれた相補的I g G F c配列の例であり、構築物のフォリスタチン関連ポリペプチドは、配列番号45または配列番号46のいずれかに融合することができるが、これらの両方には融合できない。天然のh G 1 F c、天然のh G 2 F c、天然のh G 3 F cおよび天然のh G 4 F cの間の高度なアミノ酸配列同一性を考慮すると、h G 1 F c、h G 2 F c、h G 3 F cまたはh G 4 F cの対応する位置におけるアミノ酸置換（図1を参照）が、下記の相補的I g G - I g A ペア（配列番号45、46）において使用することができるF c単量体を生成するであろうと認めることができる。

【化33】

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PERPEVHLLP PSREEMTKNQ VSLTCLARGF
151 YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTPSRQEPSQ GTTTFAVTSK LTVDKSRWQQ
201 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK (配列番号 45)

```

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PPSEELALNE LVTLTCLVKG
151 FYPSDIAVEW ESNGQELPRE KYLTWAPVLD SDGSFFFLYSI LRVAAEDWKK
201 GDTFFSCSVMH EALHNHYTQK SLDRSPGK (配列番号 46)

```

【0116】

融合タンパク質の異なるエレメントは、所望の機能性と符合する任意の様式で配列し得ることが理解される。例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドを、異種ドメインに対してC末端に配置することもでき、代替的に、異種ドメインを、フォリスタチン関連ポリペプチドに対してC末端に配置することもできる。フォリスタチン関連ポリペプチドドメインと、異種ドメインとは、融合タンパク質内で隣接する必要はなく、追加のドメインまたはアミノ酸配列を、いずれかのドメインに対してC末端またはN末端に含めることもでき、ドメインの間に含めることもできる。

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「免疫グロブリンF cドメイン」または単に「F c」は、免疫グロブリン鎖定常領域、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域、またはその部分のカルボキシル末端部分を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンF c領域は、1) CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、2) CH1ドメインおよびCH2ドメイン、3) CH1ドメインおよびCH3ドメイン、4) CH2ドメインおよびCH3ドメイン、または5) 2つもしくはこれを超えるドメインと、免疫グロブリンヒンジ領域との組合せを含み得る。好ましい実施形態では、免疫グロブリンF c領域は、少なくとも、免疫グロブリンヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含み、好ましくはCH1ドメインを欠く。また、フォリスタチンポリペプチドは、CH1ドメイン、CH2ドメイン、またはCH3ドメインなど、免疫グロブリンの1つだけのドメインを含み得ることも理解される。これらのドメインの多くは、望ましい薬物動態特性のほか、二量体化またはより高次の多量体化を付与する。

【0118】

一実施形態では、重鎖定常領域が由来する免疫グロブリンのクラスは、IgG (Ig γ) (γ サブクラス1、 γ サブクラス2、 γ サブクラス3、または γ サブクラス4) である。免疫グロブリンの他のクラスである、IgA (Ig α)、IgD (Ig δ)、IgE (Ig ϵ)、およびIgM (Ig μ) も使用することができる。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択については、米国特許第5, 541, 087号および同第5, 726, 044号において詳細に論じられている。特定の結果を達成するための、ある特定の免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスに由来する、特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列の選択は、当技術分野における技術水準の範囲内にあると考えられる。免疫グロブリンFc領域をコードするDNA構築物の部分は、ヒンジドメインの少なくとも一部と、好ましくはFcガンマのCH₃ドメイン、またはIgA、IgD、IgE、もしくはIgMのいずれかにおける相同なドメインの少なくとも一部とを含むことが好ましい。

10

【0119】

さらに、免疫グロブリン重鎖定常領域内のアミノ酸の置換または欠失は、本明細書で開示される方法および組成物の実施において有用であり得ることが企図される。1つの例は、上方のCH₂領域内にアミノ酸置換を導入して、Fc受容体に対するアフィニティーが低減されたFc改変体を創出することである (Coleら (1997年)、J. Immunol.、159巻: 3613頁)。加えて、多くの場合、C末端のリシンまたはKは除去され、このため、配列番号34~46において示されるFcドメインなど、本明細書で記載される任意のポリペプチドから、Fcドメイン内で見出されるC末端のKが除外され得る。

20

【0120】

ある特定の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連ポリペプチドは、フォリスタチン関連ポリペプチドを安定化させ得る1または複数の改変を含む。例えば、このような改変は、フォリスタチン関連ポリペプチドのインビトロ半減期を増強させるか、フォリスタチン関連ポリペプチドの循環半減期を増強させる、または、フォリスタチン関連ポリペプチドのタンパク質分解を減少させる。このような安定化改変としては、融合タンパク質 (例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドと安定化ドメインとを含む融合タンパク質が挙げられる)、グリコシル化部位の改変 (例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加が挙げられる)、および糖質部分の修飾 (例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドからの炭水化物部分の除去が挙げられる) 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、フォリスタチン関連ポリペプチドを、IgG分子 (例えば、Fcドメイン) など、安定化ドメインに融合させる。本明細書中で使用される場合、用語「安定化ドメイン」は、融合タンパク質の場合のように融合ドメイン (例えば、Fc) を指すだけでなく、炭水化物部分のような非タンパク質性修飾、または、ポリエチレングリコールのような非タンパク質性ポリマーも含む。

30

【0121】

ある特定の実施形態では、本発明は、フォリスタチンポリペプチドの単離形態および/または精製形態であって、他のタンパク質から単離されているか、または他の形で、他のタンパク質を実質的に含まない形態を利用可能とする。ある特定の実施形態では、本発明は、精製に有利な特性を保持する相互作用ペア (例えば、Fcドメイン) の取付けにより、治療上活性なフォリスタチン関連ポリペプチドの精製を容易にする。

40

【0122】

ある特定の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連ポリペプチド (改変または非改変) は、当該分野で公知の様々な技法により生成することができる。例えば、そのようなフォリスタチン関連ポリペプチドは、Bodansky, M., Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993年); およびGrant G. A. (編)、Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992年) において記載されているものな

50

どの標準的なタンパク質化学技術を使用して合成することができる。加えて、自動式ペプチド合成器も、市販されている（例えば、Advanced ChemTech 396型；Milligen/Bioscience 9600）。代替的に、フォリスタチン関連ポリペプチド、それらのフラグメントまたは改変体は、当該分野で周知の、種々の発現系（例えば、E. coli、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS細胞、バキュロウイルス）を使用して、組換えにより生成することもできる（下記も参照）。さらなる実施形態では、改変フォリスタチン関連ポリペプチドまたは非改変フォリスタチン関連ポリペプチドは、例えば、プロテアーゼ、例えば、トリプシン、サーモリシン、キモトリプシン、ペプシン、またはPACE（paired basic amino acid converting enzyme）の使用を介する、天然に存在するまたは組換えにより生成された全長フォリスタチン関連ポリペプチドの消化により生成することができる。（市販のソフトウェア、例えば、MacVector、Omega、PCGene、Molecular Simulation, Inc.を使用する）コンピュータ解析を使用して、タンパク質分解性切断部位を同定することができる。代替的に、このようなフォリスタチン関連ポリペプチドは、化学的切断（例えば、臭化シアン、ヒドロキシルアミン）によるものなどの当該技術分野の公知の標準的な技術などで、天然に存在するまたは組換えにより生成された全長フォリスタチン関連ポリペプチドから生成することができる。

【0123】

本明細書で開示されるフォリスタチン関連ポリペプチドのいずれかは、本開示の1つまたは複数の追加的なフォリスタチン関連ポリペプチドと組み合わせて、フォリスタチン関連障害の処置など、所望の効果を達成することができる（例えば、それを必要とする被験体における筋量および／または強度を増加させる、それを必要とする被験体における筋肉損失を処置または予防する、それを必要とする被験体における筋肉損失の1つまたは複数の合併症を処置または予防する；それを必要とする被験体におけるヘモグロビン濃度または赤血球細胞数を増加させる、それを必要とする被験体における不適切なヘモグロビン濃度または赤血球細胞数を処置または予防する、それを必要とする被験体における不適切なヘモグロビン濃度または赤血球細胞数の1つまたは複数の合併症を処置または予防する；それを必要とする被験体における骨量および／または強度を増加させる、それを必要とする被験体における骨損失（bone loss）または脆弱性を処置または予防する、それを必要とする被験体における骨損失または脆弱性の1つまたは複数の合併症を処置または予防する；あるいはそれを必要とする被験体におけるがんを処置する）。例えば、本明細書で開示されるフォリスタチンポリペプチドは、i）本明細書で開示される1つもしくは複数の追加的なFLRGポリペプチド、ii）本明細書で開示される1つもしくは複数のWF1KKN1ポリペプチド、および／またはiii）本明細書で開示される1つもしくは複数のWF1KKN2ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。

【0124】

3. フォリスタチン関連ポリペプチドをコードする核酸

ある特定の態様では、本発明は、本明細書で開示されるフォリスタチン関連ポリペプチドのいずれかをコードする単離核酸および／または組換え核酸を提供する。対象核酸は、一本鎖でもよく、二本鎖でもよい。このような核酸は、DNA分子でもよく、RNA分子でもよい。これらの核酸は、例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドを作製するための方法において使用することができる。

【0125】

例えば、以下の配列は、天然に存在するヒトフォリスタチン前駆体ポリペプチド（配列番号47）（NCBI参照配列：NM_013409.2のヌクレオチド359～1390）をコードする。

【化 3 4】

Atgggtccgcgcgagggcaccagccgggtgggctttgcctcctgctgctgctg
ctctgccagttcatggaggaccgcagtgccagggctgggaactgctggctc
cgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccgaactgagc
aaggaggagtgctgcagcaccggccggctgagcacctcgtggaccgaggag
gacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggcgcc
cccaactgcatcccctgtaaagaaacgtgtgagaacgtggactgtggacct
gggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctgctgtctgcgcc
ccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagtctgcgggctggatggg
aaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgtaaagagcag
ccagaactggaagtccagtagccaaggcagatgtaaaaagacttgtcgggat
gttttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaataatgcc
tactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagagcctgcttcctctgagcaa
tatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgcctgccacctgaga
aaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaag
tgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaaaa
tgtttatgggatttcaagggtgggagaggccgggtgttccctctgtgatgag
ctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgcc
acttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcaggtgtg
ctactggaagtaaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacacc
gaggaagaggaggaagatgaagaccaggactacagctttcctatatcttct
attctagagtgg (配列番号 47)

10

20

30

【0 1 2 6】

以下の配列は、成熟 F S T 3 1 5 ポリペプチド（配列番号 48）をコードする。

【化 3 5】

Gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtaca
agaccgaactgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggctgagcacctc
gtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgatatttc
aacggggggcgcccccaactgcatccctgttaaagaaacgtgtgagaacgtgg
actgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctg
cgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagttctgcggg
ctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgta
aagagcagccagaactggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttg
tcgggatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaat
aatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagagcctgcttcctctg
agcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgcctgccacct
gagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggga
aagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactgggtgggaaaa
aatgtttatgggatttcaagggtgggagaggccggtgttccctctgtgatga
gctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgcc
acttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcaggtgtgc
tactggaagtaaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacaccga
ggaagaggaggaagatgaagaccaggactacagctttcctatatcttctatt
ctagagtgg (配列番号 48)

10

20

【0 1 2 7】

以下の配列は、F S T 2 8 8 ポリペプチド（配列番号 4 9）をコードする。

30

【化 3 6】

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtaca
agaccgaactgagcaaggaggagtgtgtgcagcaccggccggctgagcacctc
gtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactottcaagtggatgattttc
aacgggggcgcccccaactgcatccccctgtaaagaaacgtgtgagaacgtgg
actgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctg
cgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagttctgcggg
ctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgta
aagagcagccagaactggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttg
tcgggatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaat
aatgcctactgtgtgacctgtaatcggaatttgcccagagcctgcttcctctg
agcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgccctgccacct
gagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggg
aagtgtatcaaagcaaagtccctgtgaagatatccagtgccactgggtgggaaaa
aatgtttatgggatttcaagggtgggagaggccgggtgttccctctgtgatga
gctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgcc
acttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcaggtgtgc
tactggaagtaaagcactccggatcttgcaac

10

20

(配列番号 49)

【0 1 2 8】

以下の配列は、成熟 F S T 2 9 1 ポリペプチド（配列番号 5 0）をコードする。

【化 3 7】

Gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtaca
agaccgaactgagcaaggaggagtgtctgcagcaccggccggctgagcacctc
gtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttc
aacgggggcgcccccaactgcatccctgtaaagaaacgtgtgagaacgtgg
actgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctg
cgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaagggtccagtctgcggg
ctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaggcaagatgta
aagagcagccagaactggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttg
tcgggatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaat
aatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagagcctgcttcctctg
agcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgcctgccacct
gagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggg
aagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaa
aatgtttatgggatttcaagggttgggagaggccggtgttccctctgtgatga
gctgtgccctgacagtaagtccgatgagcctgtctgtgccagtgacaatgcc
acttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcaggtgtgc
tactggaagtaaagcactccggatcttgcaactccatttctgtgg (

10

20

配列番号 50)

【0 1 2 9】

例えば、以下の配列（配列番号 5 1）は、天然に存在するヒト F L R G 前駆体ポリペプチド（N C B I 参照配列 N M _ 0 0 5 8 6 0 . 2 のヌクレオチド 3 6 ~ 8 2 4）をコードする。シグナル配列をコードするヌクレオチドには下線が引かれている。

30

【化 3 8】

```

1  atgcgtcccg gggcgccagg gccactctgg cctctgccct ggggggccct
51  ggcttgggcc gtgggcttcg tgagctccat gggctcgggg aaccccgcg
101 ccggtgggtgt ttgctggctc cagcagggcc aggaggccac ctgcagcctg
151 gtgctccaga ctgatgtcac cggggccgag tgcgtgcctt cgggcaacat
201 tgacaccgcc tgggtccaacc tcaccacccc ggggaacaag atcaacctcc
251 tgggcttctt gggccttgct cactgccttc cctgcaaaga ttcgtgcgac
301 ggcgtggagt ggggcccggg caaggcgtgc cgcattgctg gggggccgcc
351 gcgctgcgag tgcgcgcccg actgctcggg gctcccggcg cggctgcagg
401 tctgcggctc agacggcgcc acctaccgcg acgagtgcga gctgcgcgcc
451 gcgcgctgcc ggggccaccc ggacctgagc gtcattgtacc gggggccgctg
501 ccgcaagtcc tgtgagcacg tgggtgtgcc gcggccacag tcgtgcgtcg
551 tggaccagac gggcagcgcc cactgcgtgg tgtgtcgagc ggcgccctgc
601 cctgtgccct ccagccccgg ccaggagctt tgcggcaaca acaacgtcac
651 ctacatctcc tcgtgccaca tgcgccaggc cacctgcttc ctgggcccgt
701 ccattcggcg gcgccacgcg ggcagctgcg caggcacccc tgaggagccg
751 ccaggtgggtg agtctgcaga agaggaagag aacttcgtg
( 配列番号 51)

```

【0 1 3 0】

以下の配列（配列番号 52）は、成熟ヒト F L R G ポリペプチド（N C B I 参照配列 N M__0 0 5 8 6 0. 2 のヌクレオチド 1 1 4 ~ 8 2 4）をコードする。

【化 3 9】

```

1  atgggctcgg ggaaccccg ccccggtggg gtttgcctgg tccagcaggg
51  ccaggaggcc acctgcagcc tgggtgctcca gactgatgtc acccgggccg
101 agtgcctgtg ctccggcaac attgacaccg cctgggtccaa cctcaccac
151 cgggggaaca agatcaacct cctcggcttc ttgggccttg tccactgcct
201 tccctgcaaa gattcgtgcg acggcgtgga gtgcggcccg ggcaaggcgt
251 gccgcattgt gggggggccg ccgcgctgcg agtgcgcgcc cgactgctcg
301 gggctcccgg cgcggctgca ggtctgcggc tcagacggcg ccacctaccg
351 cgacgagtgc gagctgcgcg ccgcgcgctg ccgcggccac ccggacctga
401 gcgtcatgta ccggggcccg tgcgcgaagt cctgtgagca cgtgggtgtg
451 ccgcggccac agtgcgtgcg cgtggaccag acgggcagcg cccactgcgt
501 ggtgtgtcga gcggcgccct gccctgtgcc ctccagcccc ggccaggagc
551 tttgcggcaa caacaacgtc acctacatct cctcgtgcca catgcgccag
601 gccacctgct tcttgggccc ctccatcggc gtgcgccacg cgggcagctg
651 cgcaggcacc cctgaggagc cgccaggtgg tgagtctgca gaagaggaag
701 agaacttcgt g
( 配列番号 52)

```

【0 1 3 1】

例えば、以下の配列（配列番号 53）は、天然に存在するヒト W F I K K N 1 前駆体ポリペプチド（N C B I 参照配列 N M__0 5 3 2 8 4. 2 のヌクレオチド 2 4 3 ~ 1 8 8 6

) をコードする。シグナル配列をコードするヌクレオチドには下線が引かれている。

【化 4 0】

```

1  atgccccgcc tacgtccact cctgccgctc ctgctcctcc tccggctgac
51 ctcgggggct ggcttgctgc cagggctggg gagccacccg ggcgtgtgcc
101 ccaaccagct cagccccaac ctgtgggtgg acgcccagag cacctgtgag
151 cgcgagtgtg gcagggacca ggactgtgcg gctgctgaga agtgtgtcat
201 caacgtgtgt ggactgcaca gctgcgtggc agcacgcttc cccggcagcc
251 cagctgcgcc gacgacagcg gcctcctgcg agggctttgt gtgcccacag
301 cagggctcgg actgcgacat ctgggacggg cagcccgtgt gccgctgccg
351 cgaccgctgt gagaaggagc ccagcttcac ctgcgcctcg gacggcctca
401 cctactacaa ccgtgcttat atggacgccg aggcctgcct gcggggcctg
451 cacctccaca tcgtgccctg caagcacgtg ctgagctggc cggccagcag
501 cccggggccg ccggagacca ctgcccgccc cacacctggg gccgcgcccg
551 tgctcctgct cctgtacagc agccccctcc cacaggcggg gcaggttggg
601 ggtacggcca gcctccactg cgacgtcagc ggccgcccgc gcctgctgt
651 gacctgggag aagcagagtc accagcgaga gaacctgatc atgcgccctg
701 atcagatgta tggcaacgtg gtgggtcacca gcatcgggca gctggtgctc
751 tacaacgcgc ggcccgaaga cgccggcctg tacacctgca ccgcgcgcaa
801 cgctgctggg ctgctgcggg ctgacttccc actctctgtg gtccagcgag
851 agccggccag ggacgcagcc cccagcatcc cagccccggc cgagtgcctg
901 ccggatgtgc aggcctgcac gggccccact tccccacacc ttgtcctctg
951 gcactacgac ccgcagcggg gcggctgcat gaccttcccg gcccgaggct
1001 gtgatggggc ggcccgcggc tttgagacct acgaggcatg ccagcaggcc
1051 tgtgcccgcg gcccgcgga cgctgcgtg ctgcctgcg tgcagggccc
1101 ctgccggggc tgggagccgc gctgggccta cagcccgtg ctgcagcagt
1151 gccatccctt cgtgtacggt ggctgcgagg gcaacggcaa caacttccac
1201 agccgcgaga gctgcgagga tgctgcccc gtgcgcgcga caccgccctg
1251 ccgcgcctgc cgctccgga gcaagctggc gctgagcctg tgccgcagcg
1301 acttcgccat cgtggggcgg ctacgcgagg tgctggagga gcccgaggcc
1351 gccggcggca tcgcccgcgt ggcgctcgag gacgtgctca aggatgacaa
1401 gatgggcctc aagttcttgg gcaccaagta cctggagggt acgctgagtg
1451 gcatggactg ggctgcccc tgccccaaca tgacggcggg cgacgggccc
1501 ctggatcatc tgggtgaggt gcgcgatggc gtggccgtgc tggacgccgg
1551 cagctacgtc cgccgcgcca gcgagaagcg cgtcaagaag atcttgagc
1601 tgctggagaa gcaggcctgc gagctgctca accgcttcca ggac
( 配列番号 53)

```

【 0 1 3 2 】

以下の配列（配列番号 5 4）は、成熟ヒト W F I K K N 1 ポリペプチド（NCBI RefSeq NM_053284. 2 のヌクレオチド 300～1886）をコードする。

【化 4 1】

1	gctggcttgc	tgccagggct	ggggagccac	ccgggcgtgt	gccccaaacca	
51	gctcagcccc	aacctgtggg	tggacgcccc	gagcacctgt	gagcgcgagt	
101	gtagcagggg	ccaggactgt	gcggctgctg	agaagtgctg	catcaacgtg	
151	tgtggactgc	acagctgcgt	ggcagcacgc	ttccccggca	gcccagctgc	
201	gccgacgaca	gcggcctcct	gcgagggcct	tgtgtgcccc	cagcagggct	
251	cggactgcga	catctgggac	gggcagcccc	tgtgccgctg	ccgcgaccgc	
301	tgtgagaagg	agcccagctt	cacctgcgcc	tcggacggcc	tcacctacta	10
351	caaccgctgc	tatatggacg	ccgaggcctg	cctgcggggc	ctgcacctcc	
401	acatcgtgcc	ctgcaagcac	gtgctcagct	ggccgcccag	cagcccgggg	
451	ccgccggaga	ccactgcccc	ccccacacct	ggggccgcgc	ccgtgcctcc	
501	tgccctgtac	agcagcccct	ccccacaggc	ggtgcagggt	gggggtacgg	
551	ccagcctcca	ctgcgacgtc	agcgggccgc	cgccgcctgc	tgtgacctgg	
601	gagaagcaga	gtcaccagcg	agagaacctg	atcatgcgcc	ctgatcagat	
651	gtatggcaac	gtggtggtca	ccagcatcgg	gcagctgggt	ctctacaacg	
701	cgcgggcccga	agacgcgggc	ctgtacacct	gcaccgcgcg	caacgctgct	20
751	gggctgctgc	gggctgactt	cccactctct	gtggtccagc	gagagccggc	
801	cagggacgca	gccccagca	tcccagcccc	ggccgagtgc	ctgccggatg	
851	tgcaggcctg	cacgggcccc	acttccccac	accttgtcct	ctggcactac	
901	gaccgcgagc	ggggcggtgt	catgaccttc	ccggcccgtg	gctgtgatgg	
951	ggcgggccgc	ggctttgaga	cctacgaggc	atgccagcag	gcctgtgccc	
1001	gcggcccccg	cgacgcctgc	gtgctgcctg	ccgtgcaggg	ccctgcctgg	
1051	ggctggggagc	cgcgctgggc	ctacagcccc	ctgctgcagc	agtgccatcc	
1101	cttcgtgtac	ggtggctgcg	agggcaacgg	caacaacttc	cacagccgcg	30
1151	agagctgcga	ggatgcctgc	cccgtgccgc	gcacaccgcc	ctgccgcgcc	
1201	tgccgcctcc	ggagcaagct	ggcgctgagc	ctgtgccgca	gcgacttcgc	
1251	catcgtgggg	cggctcacgg	aggtgctgga	ggagcccagag	gccgccggcg	
1301	gcacgcgccg	cgtggcgctc	gaggacgtgc	tcaaggatga	caagatgggc	
1351	ctcaagttct	tgggcaccaa	gtacctggag	gtgacgctga	gtggcatgga	
1401	ctgggcctgc	ccctgcccc	acatgacggc	gggcgacggg	ccgctggtca	
1451	tcatgggtga	ggtgcgcgat	ggcgtggccg	tgctggacgc	cggcagctac	
1501	gtccgcgccg	ccagcgagaa	gcgcgtcaag	aagatcttgg	agctgctgga	40
1551	gaagcaggcc	tgcgagctgc	tcaaccgctt	ccaggac	(配列番号 54)	

【0 1 3 3】

例えば、以下の配列（配列番号 55）は、天然に存在するヒト W F I K K N 2 前駆体ポリペプチド（NCBI 参照（Reference）配列 NM_175575.5 のヌクレオチド 695～2422）をコードする。シグナル配列をコードするヌクレオチドには下線が引かれている。

【化 4 2】

```

1  atgtgggccc caaggtgtcg ccggttcttg tctcgctggg agcaggtggc
51  agcgctgctg ctgctgctgc tactgctcgg ggtgcccccg cgaagcctgg
101  cgctgcccgc catccgctat tcccacgcgc gcatctgccc caacgacatg
151  aatcccaacc tctgggtgga cgcacagagc acctgcaggc gggagtgtga
201  gacggaccag gagtgtgaga cctatgagaa gtgctgcccc aacgtatgtg
251  ggaccaagag ctgctgtggc gcccgctaca tggacgtgaa agggaagaag
301  ggcccagtgg gcatgcccac ggaggccaca tgtgaccact tcatgtgtct
351  gcagcagggc tctgagtgtg acatctggga tggccagccc gtgtgtaagt
401  gcaaagaccg ctgtgagaag gagcccagct ttacctgcgc ctcgacggc
451  ctcacctact ataaccgctg ctacatggat gccgaggcct gctccaaagg
501  catcacactg gccgttgtaa cctgccgcta tcacttcacc tggcccaaca
551  ccagcccccc accacctgag accaccatgc accccaccac agcctcccca
601  gagaccctct agctggacat ggcgccccct gcgctgctca acaaccctgt
651  gcaccagtct gtcaccatgg gtgagacagt gagcttcctc tgtgatgtgg
701  tgggcccggc ccggcctgag atcacctggg agaagcagtt ggaggatcgg
751  gagaatgtgg tcatgcggcc caaccatgtg cgtggcaacg tgggtgtcac
801  caacattgcc cagctgggtc tctataacgc ccagctgcag gatgctggga
851  tctacacctg cacggccccg aacgtggctg gggtcctgag ggctgatttc
901  ccgctgtcgg tggtcagggg tcatcaggct gcagccacct cagagagcag
951  cccaatggc acggctttcc cggcgccga gtgcctgaag cccccagaca
1001  gtgaggactg tggcgaagag cagaccgcct ggcacttcga tgcccaggcc
1051  aacaactgcc tgaccttcac cttcggccac tgccaccgta acctcaacca
1101  ctttgagacc tatgaggcct gcatgctggc ctgcatgagc gggccgctgg
1151  ccgctgacag cctgcccgc ctgcaggggc cctgcaaagc ctacgcgcct
1201  cgctgggctt acaacagcca gacgggcccag tgccagtctt ttgtctatgg
1251  tggctgcgag ggcaatggca acaactttga gagccgtgag gcctgtgagg
1301  agtctgcccc cttccccagg ggggaaccagc gctgtcgggc ctgcaagcct
1351  cggcagaagc tcgttaccag cttctgtcgc agcgactttg tcatcctggg
1401  ccgagtctct gagctgaccg aggagcctga ctcgggccgc gccctgggtga
1451  ctgtggatga ggtcctaaag gatgagaaaa tgggcctcaa gttcctgggc
1501  caggagccat tggaggtcac tctgcttcac gtggactggg catgcccctg
1551  cccaacgtg accgtgagcg agatgccgct catcatcatg ggggaggtgg
1601  acggcgccat ggccatgctg cgcgccgata gctttgtggg cgcctcgagt
1651  gccgcgggg tcaggaagct tcgtgaggtc atgcacaaga agacctgtga
1701  cgtcctcaag gagtttcttg gcttgccac (配列番号 55)

```

【0 1 3 4】

以下の配列（配列番号 56）は、成熟ヒト W F I K K N 2 ポリペプチド（NCBI RefSeq NM_175575.5 のヌクレオチド 797～2422）をコードする。

【化 4 3】

1	ctgccgcccc	tccgctattc	ccacgccggc	atctgcccc	acgacatgaa	
51	tcccaacctc	tgggtggacg	cacagagcac	ctgcaggcgg	gagtgtgaga	
101	cggaccagga	gtgtgagacc	tatgagaagt	gctgccccaa	cgtatgtggg	
151	accaagagct	gcgtggcggc	ccgctacatg	gacgtgaaag	ggaagaaggg	
201	cccagtgggc	atgcccagg	aggccacatg	tgaccacttc	atgtgtctgc	
251	agcagggctc	tgagtgtgac	atctgggatg	gccagcccgt	gtgtaagtgc	
301	aaagaccgct	gtgagaagga	gcccagcttt	acctgcgctc	cggacggcct	10
351	cacctactat	aaccgctgct	acatggatgc	cgaggcctgc	tccaaaggca	
401	tcacactggc	cgttctaacc	tgccgctatc	acttcacctg	gcccacacc	
451	agccccccac	cacctgagac	caccatgcac	cccaccacag	cctccccaga	
501	gaccctgag	ctggacatgg	cggcccctgc	gctgctcaac	aaccctgtgc	
551	accagtcggt	caccatgggt	gagacagtga	gcttcctctg	tgatgtgggtg	
601	ggccggcccc	ggcctgagat	cacctgggag	aagcagttgg	aggatcggga	
651	gaatgtggtc	atgcggcccc	accatgtgcg	tggcaacgtg	gtggtcacca	
701	acattgcccc	gctggctcatc	tataacgccc	agctgcagga	tgctgggatc	20
751	tacacctgca	cggcccggaa	cgtggctggg	gtcctgaggg	ctgatttccc	
801	gctgtcggtg	gtcaggggtc	atcaggctgc	agccacctca	gagagcagcc	
851	ccaatggcac	ggctttcccg	gcggccgagt	gcctgaagcc	cccagacagt	
901	gaggactgtg	gcgaagagca	gaccgcgtgg	cacttcgatg	cccaggccaa	
951	caactgcctg	accttcacct	tcggccactg	ccaccgtaac	ctcaaccact	
1001	ttgagacct	tgaggcctgc	atgctggcct	gcctgagcgg	gcccgtggcc	
1051	gcgtgcagcc	tgcccgcctc	gcaggggccc	tgcaaagcct	acgcgcctcg	
1101	ctgggcttac	aacagccaga	cgggccagtg	ccagtccttt	gtctatgggtg	30
1151	gctgagggg	caatggcaac	aactttgaga	gccgtgaggc	ctgtgaggag	
1201	tcgtgcccct	tcccagggg	gaaccagcgc	tgctgggcct	gcaagcctcg	
1251	gcagaagctc	gttaccagct	tctgtcgcag	cgactttgtc	atcctgggccc	
1301	gagtctctga	gctgaccgag	gagcctgact	cgggcccgcg	cctggtgact	
1351	gtggatgagg	tcctaaagga	tgagaaaatg	ggcctcaagt	tcctgggcca	
1401	ggagccattg	gaggtcactc	tgcttcacgt	ggactgggca	tgcccctgcc	
1451	ccaacgtgac	cgtgagcgag	atgccgctca	tcacatggg	ggaggtggac	
1501	ggcggcatgg	ccatgctgcg	ccccgatagc	tttgtgggcg	catcgagtgc	40
1551	ccgccgggtc	aggaagcttc	gtgaggtcat	gcacaagaag	acctgtgacg	
1601	tcctcaagga	gtttcttggc	ttgcac	(配列番号	56)	

【0 1 3 5】

ある特定の態様では、フォリスタチン関連ポリペプチドをコードする対象の核酸は、配列番号 47～56 の改変体である核酸を含むことがさらに理解される。改変体ヌクレオチド配列は、1 つまたは複数のヌクレオチド置換、付加、または欠失により異なる配列、例えば、対立遺伝子改変体を含み、したがって、配列番号 47～56 に表示されるコード配列のヌクレオチド配列と異なるコード配列を含む。

【0 1 3 6】

ある特定の実施形態では、本開示は、配列番号 47～56 に、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一である単離核酸配列または組換え核酸配列を提供する。当業者は、配列番号 47～56 と相補的な核酸配列および配列番号 47～56 の改変体も、本開示の範囲内にあることを認識するであろう。さらなる実施形態では、本開示の核酸配列は、単離され得る、組換えとなり得る、および／または異種ヌクレオチド配列と融合され得る、または DNA ライブラリー中に存在し得る。

【0137】

他の実施形態では、本発明の核酸はまた、配列番号 47～56 に指定されるヌクレオチド配列、配列番号 47～56 の相補配列、またはこれらのフラグメントに対して高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列も含む。

10

【0138】

当業者は、DNA の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が変更され得ることを容易に理解する。例えば、約 45℃ における 6.0×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC) でのハイブリダイゼーションの後に、50℃ における 2.0×SSC の洗浄を行い得る。例えば、洗浄工程における塩濃度は、50℃ における約 2.0×SSC の低ストリンジェンシーから、50℃ における約 0.2×SSC の高ストリンジェンシーまで選択され得る。さらに、洗浄工程における温度は、室温 (約 22℃) の低ストリンジェンシー条件から、約 65℃ の高ストリンジェンシー条件まで上昇され得る。温度と塩の両方が変更されても、温度または塩濃度が一定に保たれ、他の変数が変更されてもよい。一実施形態では、本発明は、室温における 6×SSC とその後の室温で 2×SSC での洗浄の低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提供する。

20

【0139】

遺伝子コードにおける縮重に起因して配列番号 47～56 に示される核酸と異なる単離された核酸もまた、本開示の範囲内である。例えば、多数のアミノ酸が 1 より多いトリプレットによって示される。同じアミノ酸を特定するコドンまたは同義語 (例えば、CAU および CAC はヒスチジンに対する同義語である) 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」変異を生じ得る。しかしながら、哺乳動物細胞の中には、本主題のタンパク質のアミノ酸配列に変化をもたらす DNA 配列の多型が存在することが予想される。当業者は、天然の対立遺伝子改変に起因して、所与の種の個体間に、特定のタンパク質をコードする核酸の 1 または複数のヌクレオチド (約 3～5% までのヌクレオチド) におけるこれらのバリエーションが存在し得ることを理解する。任意およびあらゆるこのようなヌクレオチドのバリエーションと、結果として生じるアミノ酸の多型とは、本開示の範囲内である。

30

【0140】

特定の実施形態では、本開示の組換え核酸は、発現構築物において 1 または複数の調節性ヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。調節性のヌクレオチド配列は、一般に、発現のために使用される宿主細胞に対して適切なものである。種々の宿主細胞について、多数のタイプの適切な発現ベクターおよび適切な調節性配列が当該分野で公知である。代表的には、上記 1 または複数の調節性ヌクレオチド配列としては、プロモーター配列、リーダー配列もしくはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および転写終結配列、翻訳開始配列および翻訳終結配列、ならびに、エンハンサー配列もしくはアクチベーター配列が挙げられ得るがこれらに限定されない。当該分野で公知の構成的もしくは誘導性のプロモーターが、本開示によって企図される。プロモーターは、天然に存在するプロモーター、または、1 つより多くのプロモーターの要素を組み合わせたハイブリッドプロモーターのいずれかであり得る。発現構築物は、プラスミドのようにエピソーム上で細胞中に存在し得るか、または、発現構築物は、染色体中に挿入され得る。好ましい実施形態では、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にするために、選択可能なマーカー遺伝子を含む。選択可能なマーカー遺伝子は、当該分野で周知であり、そして、

40

50

使用される宿主細胞により変化する。

【0141】

ある特定の態様では、本主題の核酸は、フォリスタチン関連ポリペプチドをコードし、そして、少なくとも1つの調節性配列に作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含む発現ベクターにおいて提供される。調節性配列は当該分野で認識され、そして、フォリスタチン関連ポリペプチドの発現を誘導するように選択される。したがって、用語、調節性配列は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節性配列は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990年)に記載される。例えば、作動可能に連結されたときにDNA配列の発現を制御する広範な種々の発現制御配列のいずれかが、フォリスタチン関連ポリペプチドをコードするDNA配列を発現させるためにこれらのベクターにおいて使用され得る。このような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40の初期および後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルスもしくはサイトメガロウイルスの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もしくはTRCシステム、T7 RNAポリメラーゼによってその発現が誘導されるT7プロモーター、ファージλの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼもしくは他の糖分解酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター（例えば、Pho5）、酵母α-接合因子（mating factor）のプロモーター、バキュロウイルス系の多角体プロモーター、ならびに、原核生物もしくは真核生物の細胞、または、そのウイルスの遺伝子の発現を制御することが公知である他の配列、ならびにこれらの種々の組み合わせが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択および／または発現されることが所望されるタンパク質のタイプのような要因に依存し得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、コピー数を制御する能力および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）の発現もまた考慮されるべきである。

【0142】

本開示の組換え核酸は、クローニングされた遺伝子またはその一部を、原核生物細胞、真核生物細胞（酵母、鳥類、昆虫または哺乳動物）のいずれか、または両方において発現させるために適切なベクター中に連結することによって生成され得る。組換えフォリスタチン関連ポリペプチドの生成のための発現ビヒクルとしては、プラスミドおよび他のベクターが挙げられる。例えば、適切なベクターとしては、以下のタイプのプラスミドが挙げられる：原核生物細胞（例えば、E. coli）における発現のための、pBR322由来のプラスミド、pEMBL由来のプラスミド、pEX由来のプラスミド、pBTac由来のプラスミドおよびpUC由来のプラスミド。

【0143】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌中でのベクターの増殖を促進するための原核生物の配列と、真核生物細胞において発現される1または複数の真核生物の転写単位との両方を含む。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pk-neoおよびpHyg由来のベクターは、真核生物細胞のトランスフェクションに適切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いくつかは、原核生物細胞および真核生物細胞の両方における複製および薬物耐性選択を容易にするために、細菌プラスミド（例えば、pBR322）からの配列を用いて改変される。あるいは、ウシパピローマウイルス（BPV-1）またはエプスタインバーウイルス（pHEBo、pREP由来およびp205）のようなウイルスの誘導体が、真核生物細胞におけるタンパク質の一過的な発現のために使用され得る。他のウイルス（レトロウイルスを含む）発現系の例は、遺伝子治療送達系の説明において以下に見出され得る。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換において用いられる種々の方法は、当該分野で周知であ

る。原核生物細胞および真核生物細胞の両方についての他の適切な発現系、ならびに、一般的な組換え手順、Molecular Cloning A Laboratory Manual、2nd Ed.、Sambrook、FritschおよびManiatis編（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年）16章および17章を参照のこと。いくつかの場合において、バキュロウイルス発現系を用いて組換えポリペプチドを発現させることが望ましくあり得る。このようなバキュロウイルス発現系の例としては、pVL由来のベクター（例えば、pVL1392、pVL1393およびpVL941）、pAcUW由来のベクター（例えば、pAcUW1）およびpBlueBac由来のベクター（例えば、 β -galを含むpBlueBac I I I）が挙げられる。

10

【0144】

ある特定の実施形態では、ベクターは、CHO細胞における本主題のフォリスタチン関連ポリペプチドの生成のために設計される（例えば、Pcmv-Scriptベクター（Stratagene, La Jolla, Calif.）、pcDNA4ベクター（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）およびpCI-neoベクター（Promega, Madison, Wisc.））。明らかであるように、本主題の遺伝子構築物は、例えば、タンパク質（融合タンパク質または改変体タンパク質を含む）を生成するため、精製のために、培養物において増殖させた細胞において本主題のフォリスタチン関連ポリペプチドの発現を引き起こすために使用され得る。

【0145】

20

本開示はまた、1または複数の本主題のフォリスタチン関連ポリペプチドのコード配列（例えば、配列番号19～22）を含む組換え遺伝子をトランスフェクトされた宿主細胞に関する。宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、本開示のフォリスタチン関連ポリペプチドは、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現系を用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0146】

したがって、本開示はさらに、本主題のフォリスタチン関連ポリペプチドを生成する方法に関する。例えば、フォリスタチン関連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は、フォリスタチン関連ポリペプチドの発現を起こすことが可能な適切な条件下で培養され得る。フォリスタチン関連ポリペプチドは、フォリスタチン関連ポリペプチドを含む細胞および培地の混合物から分泌および単離され得る。あるいは、フォリスタチン関連ポリペプチドは、細胞質または膜画分に保持され得、そして、細胞が回収、溶解され、そして、タンパク質が単離される。細胞培養物は、宿主細胞、培地および他の副産物を含む。細胞培養に適切な培地は、当該分野で周知である。本主題のフォリスタチン関連ポリペプチドは、タンパク質を精製するための当該分野で公知の技法であって、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、およびフォリスタチン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アフィニティー精製を含む技法を使用して、細胞培養培地、宿主細胞、またはこれらの両方から単離することができる。好ましい実施形態では、フォリスタチン関連ポリペプチドは、その精製を容易とするドメインを含有する融合タンパク質である。

30

40

【0147】

別の実施形態では、精製用リーダー配列（例えば、組換えフォリスタチン関連ポリペプチドの所望の部分のN末端に位置するポリ-（His）／エンテロキナーゼ切断部位の配列）をコードする融合遺伝子は、 Ni^{2+} 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し得る。その後、精製用リーダー配列は、引き続き、エンテロキナーゼでの処理によって除去され、精製フォリスタチン関連ポリペプチドを提供し得る（例えば、Hochuliら、（1987年）J. Chromatography 411巻：177頁；およびJanknechtら、PNAS USA 88巻：8972頁を参照のこと）。

50

【0148】

融合遺伝子を作製するための技術は周知である。本質的には、異なるポリペプチド配列をコードする種々のDNAフラグメントの接合は、ライゲーションのための平滑末端もしくは突出(staggered)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じた粘着末端のフィルイン(fill in)、所望されない接合を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、および酵素によるライゲーション、を用いる従来の技術に従って行われる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成装置を含む従来の技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、2つの連続した遺伝子フラグメント間の相補的なオーバーハング(overhang)を生じるアンカープライマーを用いて行われ得、これらのフラグメントは、その後、キメラ遺伝子配列を生じるようにアニーリングされ得る(例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley & Sons:1992年を参照のこと)。

10

【0149】

4. 例示的な治療的使用

ある特定の実施形態では、例えば、本明細書で開示されるフォリスタチン関連融合ポリペプチドを含む様々なタンパク質複合体を含む、本開示の組成物を、本節で記載される疾患または状態であって、フォリスタチン関連ポリペプチドおよび/またはフォリスタチンリガンド(例えば、ミオスタチン、アクチビン、GDF11)の異常な活性と関連する疾患または障害を含む、疾患または状態を処置または予防するために使用することができる。本明細書では一般に、これらの疾患、障害、または状態を、「フォリスタチン関連状態」と称する。ある特定の実施形態では、本開示は、個体に、上記で記載したフォリスタチン関連融合ポリペプチドの治療有効量を投与することにより、それを必要とする個体を処置または予防する方法を提供する。これらの方法は、特に、動物、より特定すれば、ヒトの治療的処置および予防的処置を目的とする。

20

【0150】

本明細書で使用される通り、障害または状態を「予防する」治療薬は、統計学的試料において、無処置対照試料と比べて処置された試料における障害もしくは状態の発生を低減する、または無処置対照試料と比べて障害もしくは状態の1つもしくは複数の症状の発病を遅延させるもしくはその重症度を低減する化合物を指す。本明細書で使用される用語「処置する」は、確立された後の状態の好転(amelioration)または排除を含む。いずれの場合でも、予防または処置は、医師または他の医療提供者によって提供される診断および治療剤の投与の意図した結果において識別することができる。

30

【0151】

一般に、本開示に記載されている疾患または状態の処置または予防は、本開示のフォリスタチン関連ポリペプチド、またはこのようなポリペプチドを含む組成物、複合体もしくは組合せを「有効量」で投与することにより達成される。薬剤の有効量は、所望の治療または予防結果の達成に必要な投薬量および期間において、有効な量を指す。本開示の薬剤の「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する薬剤の能力などの因子に応じて変動し得る。「予防有効量」は、所望の予防結果の達成に必要な投薬量および期間において、有効な量を指す。

40

【0152】

フォリスタチンリガンド複合体は、組織成長のほか、種々の構造の適正な形成などの早期発生プロセスにおいて、または、性的発育、下垂体ホルモンの生成、および筋肉の創出を含む、1つもしくは複数の発生後能において不可欠の役割を果たす。したがって、フォリスタチン関連状態は、組織成長の異常および発生の欠損を含む。

【0153】

処置のための例示的な状態は、神経筋障害(例えば、筋ジストロフィーおよび筋萎縮)、うっ血性閉塞性肺疾患(およびCOPDに関連する筋消耗)、筋消耗症候群、サルコペニアおよび悪液質、脂肪組織障害(例えば、肥満)、2型糖尿病(NIDDM、成人発症

50

型糖尿病)ならびに骨変性疾患(例えば、骨粗鬆症)を含む。他の例示的な状態は、筋肉変性障害(musculodegenerative disorder)および神経筋障害、組織修復(例えば、創傷治癒)ならびに神経変性疾患(例えば、筋委縮性側索硬化症)を含む。

【0154】

ある特定の実施形態では、本発明の組成物(例えば、フォリスタチン関連融合タンパク質)を、筋ジストロフィーのための処置の一部として使用する。用語「筋ジストロフィー」とは、骨格筋、ならびに、ある場合には、心臓および呼吸筋の段階的な筋力低下および劣化を特徴とする、変性性筋疾患の群を指す。筋ジストロフィーは、筋肉の微視的变化と共に始まる、進行性の筋消耗および筋力低下を特徴とする遺伝性障害である。筋肉が経時的に変性するにつれて、個人の筋強度は減衰する。本主題のフォリスタチン関連ポリペプチドを含むレジメンで処置され得る、例示的な筋ジストロフィーとして、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(EDMD)、肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHまたはFSHD)(ランドウジー・デジェリン型としてもまた公知である)、筋強直性ジストロフィー(myotrophy)(MMD)(スタイナー病としてもまた公知である)、眼咽頭型筋ジストロフィー(OPMD)、遠位型筋ジストロフィー(DD)、先天性筋ジストロフィー(CMD)が挙げられる。

【0155】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、フランスの神経学者である、Guillaume Benjamin Amand Duchenneにより、1860年代において、最初に記載された。ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)は、DMDのこの変化形について1950年代に最初に記載したドイツの医師であるPeter Emil Beckerに因んで名付けられた。DMDは、男性において最も高頻度の遺伝性疾患の1つであり、3,500人中1人の少年に影響を及ぼす。DMDは、X染色体の短腕部に位置するジストロフィン遺伝子が破壊されると生じる。男性が保有するX染色体のコピーは、1つだけであるので、男性が有するジストロフィン遺伝子のコピーも1つだけである。ジストロフィタンパク質を伴わないと、筋肉は、収縮および弛緩の周期において容易に損傷する。疾患の早期では、筋肉は、再生により代償されるが、後に、筋前駆細胞は、進行する損傷に追いつけなくなり、健常筋肉は、非機能的な線維脂肪性組織で置き換えられる。

【0156】

BMDは、ジストロフィン遺伝子における異なる変異から生じる。BMD患者は、いくつかのジストロフィンを有するが、量が不十分であるか、または質が不良である。いくつかのジストロフィンを有することで、BMDを有する人の筋肉は、DMDを有する人の筋肉と同等の重度または迅速な変性からは保護される。

【0157】

例えば、近年の研究は、インビボにおいて、ミオスタチン(フォリスタチンリガンド)の機能を遮断するかまたは消失させることにより、DMD患者およびBMD患者における少なくともある特定の症状を有効に処置し得ることを実証している。したがって、本主題のフォリスタチン関連融合ポリペプチドは、ミオスタチン阻害剤(アンタゴニスト)として作用することが可能であり、DMD患者およびBMD患者におけるミオスタチンの機能を、インビボで遮断する代替的な手段を構成する。

【0158】

同様に、本主題のフォリスタチン関連融合ポリペプチドは、筋成長を必要とする他の疾患状態において、筋量を増大させる有効な手段をもたらす。例えば、筋委縮性側索硬化症(ALS、ルーゲーリック病または運動ニューロン疾患ともまた呼ばれる)は、慢性的で、治癒不能、かつ、制止不能なCNS障害であって、脳を骨格筋に接続するCNSの構成要素である運動ニューロンを攻撃するCNS障害である。ALSでは、運動ニューロンは、劣化し、最終的に死滅し、個人の脳は、完全な機能および呼びかけ(alert)を正常

に保つが、運動の命令が筋肉に到達することはない。ALSに罹患する大半の人は、40～70歳の間である。衰弱する最初の運動ニューロンは、腕部または脚部に至る運動ニューロンである。ALSを有する人は、歩行が困難な場合があり、物を落とし、倒れ、呂律が回らなくなり、制御不能に笑ったり泣いたりする場合がある。最終的に、四肢における筋肉は、不使用のために萎縮し始める。この筋力低下は、消耗性となり、個人は、車椅子を必要とするか、または床から起き上がることができなくなる。大半のALS患者は、疾患発病から3～5年で、呼吸不全、または肺炎のような換気装置支援による合併症で死ぬ。

【0159】

フォリスタチン関連融合ポリペプチドによって誘導される筋量増加は、筋消耗疾患を患う患者の利益になることもできる。ミオスタチン発現は、ヒトにおける除脂肪体重と逆相関し、このようなMSTN遺伝子の発現増加は、AIDS消耗性症候群の男性における体重減少と関連する。AIDS患者におけるミオスタチンの機能を阻害することにより、AIDSの少なくともある特定の症状を、完全に消失させないにせよ、緩和することができ、こうして、AIDS患者における生活の質を著明に改善することができる。

【0160】

がん食欲不振－悪液質症候群は、がんの最も衰弱性かつ生命にかかわる側面にある。この症候群は、死亡時にがん患者のおよそ80%に存在する、多くの種類のがんに共通の特色であり、不十分な生活の質および化学療法に対する不十分な応答のみならず、匹敵する腫瘍を有するが体重減少していない患者よりも短い生存時間の原因にもなる。発病前体重の5パーセントを超える不随意性の体重減少が、6ヶ月間の期間内に起こる場合、悪液質が典型的にがん患者において疑われる。食欲不振、脂肪および筋肉組織の消耗ならびに心理的窮迫に伴い、悪液質が、がんおよび宿主の間の複雑な相互作用から生じる。がん悪液質は、サイトカイン産生、脂質動員およびタンパク質分解誘導因子の放出、ならびに中間代謝の変更に影響を与える。食欲不振が一般的であるが、食物摂取減少単独では、がん患者に観察される体組成の変化を説明することができず、栄養摂取の増加は、消耗性症候群を反転することができない。現在、悪液質過程(cachexic process)を制御または反転するための処置は存在しない。成体マウスにおけるGDF8の全身性過剰発現は、ヒト悪液質症候群に観察されるものと類似の著明な筋肉および脂肪損失を誘導することが判明したため(Zimmersら、上記参照)、対象のフォリスタチン関連ポリペプチドは、筋肉成長が望まれる悪液質症候群の症状の予防、処置または軽減に有益に使用することができる。

【0161】

他の実施形態では、フォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、動物における体脂肪含量の調節に、およびそれに関係する状態、特に、それに関係する健康を損なう状態の処置または予防に使用することができる。本発明にしたがって、体重を調節(制御)するということは、体重の低減もしくは増加、体重増加の速度の低減もしくは増加、または体重減少の速度の増加もしくは低減を指すことができ、体重を能動的に維持すること、または有意に変化させないこと(例えば、何もしなければ体重を増加または減少させ得る、外部または内部の影響に対して)も含む。本開示の一実施形態は、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せを、それを必要とする動物(例えば、ヒト)に投与することによる、体重の調節に関する。

【0162】

一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、動物における体重の低減および/または体重増加の低減に、より具体的には、肥満のリスクがあるまたはこれを経験する患者における肥満の処置または好転に使用することができる。別の特異的な実施形態では、本発明は、体重を増加または保持することができない動物(例えば、消耗性症候群の動物)を処置するための方法および化合物を対象にする。このような方法は、体重および/または質量の増加に、または体重お

よび／または質量減少の低減に、または望ましくなく低い（例えば、不健康な）体重および／または質量に関連するもしくはこれに起因する状態の改善に有効である。加えて、高コレステロールの障害（例えば、高コレステロール血症または脂質異常症（*d i s l i p i d e m i a*））は、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せにより処置することができる。

【0163】

一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、I I型糖尿病、メタボリックシンドローム、低アディポネクチン血症（*h y p e r a d i n e c t o n e m i a*）、高血糖または高インスリン血症など、代謝性障害の処置に使用することができる。

10

【0164】

線維症は一般に、器官または組織における細胞数の相対的減少と組み合わせた、コラーゲン線維および細胞外マトリクスの両方の過剰な沈着を指す。この過程は、傷害後の自然な創傷治癒の重要な特色であるが、線維症は、例えば、肺、腎臓、肝臓、骨、筋肉および皮膚を含む様々な組織および器官に病理的損傷をもたらし得る。線維症におけるTGF-βスーパーファミリーの役割は、広範に研究されてきた。例えば、アクチビン（例えば、アクチビンAおよびアクチビンB）およびGDF8を含む、TGF-βスーパーファミリーリガンドは、線維症に関係づけられてきた[Hedgerら（2013年）*C y t o k i n e a n d G r o w t h F a c t o r R e v i e w s* 24巻：285～295頁；Hardyら（2015年）93巻：567～574頁；およびCantiniら（2008年）*J S e x M e d* 5巻：1607～1622頁]。したがって、一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、線維症、特に、線維症関連障害および状態の処置に使用することができる。例えば、フォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、肺線維症、過敏性肺炎、特発性線維症、結核、肺炎、嚢胞性線維症、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺気腫、腎（腎臓）線維症、腎（腎臓）不全、慢性腎（腎臓）疾患、骨線維症、骨髄線維症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、サルコイドーシス、多発血管炎性肉芽腫症、ペロニー病、肝臓線維症、ウィルソン病、糖原病（特に、I I I、I V、I XおよびX型）、鉄過剰、ゴーシェ病、ツェルウェーガー症候群、非アルコール性およびアルコール性脂肪性肝炎、胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、バッド・キアリ症候群、外科手術関連線維症、クローン病、デュピュイトラン拘縮（*D u p u t r e n ' s c o n t r a c t u r e*）、縦隔線維症、腎性線維症（*n e p h r o g e n e i c f i b r o s i s*）、後腹膜線維症、心房性線維症、心内膜心筋線維症、膵臓線維症のうち1つまたは複数の処置または予防に使用することができる。

20

30

【0165】

一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、慢性腎臓疾患を処置するための1つまたは複数の支持療法と任意選択で組み合わせて、慢性腎臓疾患の処置または予防に使用することができる。一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、慢性腎臓疾患を処置するための1つまたは複数の支持療法と任意選択で組み合わせて、慢性腎臓疾患の1つまたは複数の合併症（症状または症状発現）の処置または予防に使用することができる。一部の実施形態では、本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、末期腎臓疾患を処置するための1つまたは複数の支持療法と任意選択で組み合わせて、末期腎臓不全の処置または予防に使用することができる。慢性腎疾患としても公知の慢性腎臓疾患（CKD）は、数ヶ月間または数年間の期間にわたる腎機能の進行性損失である。腎臓機能の悪化の症状は、全体的な体調不良を感じることもおよび食欲低減を経験することを含み得る。多くの場合、慢性腎臓疾患は、高血圧または糖尿病を有する者およびCKDの血縁者がいる者など、腎臓問題のリスクがあることが公知の人のスクリーニングの結果として診断される。この疾患は、心血管疾患、貧血または心膜炎など、その認識される合併症の1つをもたらす場合に

40

50

同定することもできる。近年の専門ガイドラインは、5つのステージにCKDの重症度を分類し、ステージ1が最も軽度であり、通常、ほとんど症状を引き起こさず、ステージ5が重度疾病であり、処置しなければ不十分な平均余命となる。ステージ5のCKDは多くの場合、末期腎臓疾患、末期腎疾患または末期腎臓不全と呼ばれ、これは、現在は旧式の用語である慢性腎不全または慢性腎臓不全とほぼ同義であり；通常、患者が、ある形態の透析が関与し得るが、理想的には腎臓移植を構成する腎代替療法を必要とすることを意味する。CKDは、初期に特異的な症状がなく、一般に、血清クレアチニンまたは尿中タンパク質の増加としてのみ検出される。腎臓機能が減少するにつれて、後述する通り様々な症状が顕在化し得る。水分過負荷およびレニン・アンジオテンシン系により腎臓によって生成される血管作動性ホルモンの産生により、血圧が増加することがあり、高血圧症を発症するおおよそ／またはうっ血性心不全を患うリスクを増加させる。尿素が蓄積することがあり、高窒素血症および最終的に尿毒症（嗜眠から心膜炎および脳症に及ぶ症状）をもたらす。その高い全身性循環のため、尿素は、エクリン汗において高濃度で排泄され、汗が蒸発する際に皮膚上で結晶化する（「尿素霜」）。血液中にカリウムが蓄積することがある（倦怠感および潜在的に致死的な心不整脈を含むある範囲の症状を有する高カリウム血症）。高カリウム血症は通常、糸球体濾過率が、 $20 \sim 25 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ 未満に降下するまで発症せず、このポイントで、腎臓は、カリウムを排泄する能力が減少している。CKDにおける高カリウム血症は、酸血症（カリウムの細胞外シフトをもたらす）によって、また、インスリンの欠如から増悪され得る。エリスロポエチン合成が減少されることがあり、貧血の原因となる。軽度浮腫から生命にかかわる肺浮腫に及ぶ、液量過負荷症状（fluid volume overload symptom）が起こることがある。一般に、糸球体濾過の減少後に、リン酸塩排泄の低減による高リン酸血症が起こることがある。高リン酸血症は、心血管リスクの増加に関連し、血管石灰化に対する直接的な刺激である。一般に、線維芽細胞増殖因子-23の刺激に起因する、低カルシウム血症が症状発現することがある。骨細胞は、酵素1- α -ヒドロキシラーゼ（25-ヒドロキシコレカルシフェロールから1,25ジヒドロキシビタミンD3への変換の原因となる）の強力な阻害剤であるFGF23の産生増加の原因となる。後に、これは、二次性副甲状腺機能亢進症、腎性骨形成異常症および血管石灰化へと進行し、これは、心機能をさらに損なう。代謝性アシドーシス（硫酸塩、リン酸塩、尿酸などの蓄積による）が起こり、酵素に作用する過剰な酸による酵素活性の変更を引き起こすことがある；過剰な酸（酸血症）による高カリウム血症の促進により心臓およびニューロン膜の興奮性の増加を引き起こすこともある。アシドーシスは、近位尿細管の細胞から十分なアンモニアを生成する能力の減少によっても起こる。腎臓機能が減少するにつれて有病率が増加する鉄欠乏貧血は、血液透析を必要としている者において特に蔓延している。これは、原因が多因子性（multifactorial）であるが、骨髄抑制をもたらす炎症増加、エリスロポエチンの低減および高尿酸血症を含む。CKDを有する者は、急速進行型アテローム性動脈硬化を患い、母集団よりも心血管疾患を発症する可能性が高い。CKDおよび心血管疾患を患う患者は、後者のみを患う患者よりも有意に悪い予後を有する傾向がある。

【0166】

本明細書で使用される「と組み合わせた」、「の組合せ」または「共同投与」は、追加的な治療法（例えば、第2、第3、第4のなど）が、身体において依然として有効であるような、いずれかの形態の投与を指す（例えば、複数の化合物が、患者において同時に有効となることであり、これらの化合物の相乗効果を含み得る）。有効性は、血液、血清または血漿中の薬剤の測定可能な濃度に相関しないこともある。例えば、異なる治療化合物は、同じ製剤または別々の製剤のいずれかにおいて、随伴的にまたは逐次のいずれかで、異なるスケジュールで投与することができる。よって、このような処置を受ける個体は、異なる治療法の効果の組合せから利益を得ることができる。1つまたは複数の本開示のフォリスタチン関連融合ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドの組合せは、1つまたは複数の他の追加的な薬剤または支持療法と同時発生的に、それに先立ち、またはその後

10

20

30

40

50

および／または時間スケジュールで投与されるであろう。レジメンにおいて用いるための特定の組合せは、治療法と本開示のアンタゴニストとの適合性を考慮に入れるであろう、および／または所望の通りに行われるであろう。

【0167】

5. 医薬組成物

ある特定の実施形態では、本発明の化合物（例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド）を、薬学的に許容されるキャリアと共に製剤化する。例えば、フォリスタチン関連ポリペプチドは、単独で投与することができ、医薬製剤（治療用組成物）の構成要素として投与することもできる。対象の化合物は、ヒト医療または獣医科医療における使用のための、任意の好都合な方式による投与のために製剤化することができる。

10

【0168】

ある特定の実施形態では、本発明の治療方法は、組成物を外用投与する工程、全身投与する工程、局所投与する工程、またはインプラントもしくはデバイスとして局所投与する工程を含む。投与されるとき、本発明における使用のための治療用組成物は、当然ながら、発熱物質非含有であり、生理学的に許容される形態にある。さらに、組成物は、標的組織部位（例えば、骨、軟骨、筋肉、脂肪、またはニューロン）、例えば、組織損傷を有する部位への送達のための粘性形態で封入されているか、または注射されることが望ましい場合がある。外用投与は、創傷治療および組織修復に適し得る。フォリスタチン関連ポリペプチド以外の治療的に有用な作用因子であって、任意選択で、上記で記載した組成物中に含まれ得る作用因子も、代替的にまたは付加的に、本発明の方法において本主題の化合物（例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド）と共に同時または逐次的に投与することができる。

20

【0169】

ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、標的組織部位に1つまたは複数の治療化合物（例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド）を送達し得、成長中の組織のための構造を提供し得、そして、最適には身体内へと再吸収され得るマトリクスを含み得る。例えば、マトリクスは、フォリスタチン関連ポリペプチドの遅速放出を提供し得る。このようなマトリクスは、他の移植医療用途に現在使用される材料から形成され得る。

【0170】

マトリクス材料の選択は、生体適合性、生分解性、機械的特性、見かけ上の様相および界面の特性に基づく。本主題の組成物の特定の用途が、適切な製剤を画定する。組成物のための可能性のあるマトリクスは、生分解性でかつ化学的に画定された硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸およびポリ無水物であり得る。他の可能性のある材料は、生分解性でかつ生物学的に十分に規定されたもの（例えば、骨または皮膚のコラーゲン）である。さらなるマトリクスは、純粋なタンパク質または細胞外マトリクスの成分から構成される。他の可能性のあるマトリクスは、非生分解性でかつ化学的に規定されたもの（例えば、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸塩、または他のセラミクス）である。マトリクスは、上述のタイプの材料の任意の組み合わせ（例えば、ポリ乳酸およびヒドロキシアパタイト、または、コラーゲンおよびリン酸三カルシウム）から構成され得る。バイオセラミクスは、組成物（例えば、カルシウムーアルミン酸ーリン酸）中で変化され得、孔径、粒子径、粒子の形状および生分解性を変更するように加工され得る。

30

40

【0171】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、例えば、カプセル、カシェ、丸剤、錠剤、ロゼンジ（矯味矯臭基材、通常は、スクロースおよびアカシアまたはトラガントを使用する）、散剤、顆粒剤の形態で、あるいは水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、あるいは水中油もしくは油中水の液体エマルジョンとして、あるいはエリキシルもしくはシロップとして、あるいは香錠（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基材を使用する）として、および／あるいはマウスウォッシュなどとして経口投与することもでき、各々が、所定量の作用因子を活性成分として含有

50

する。作用因子はまた、ボーラス、舐剤、またはペーストとしても投与することができる。

【0172】

経口投与のための固体投薬形態（カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤など）において、本発明の1または複数の治療化合物は、1または複数の薬学的に受容可能なキャリア（例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウム）、および／または以下のうち任意のものと混合され得る；（1）充填剤または増量剤（例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよび／またはケイ酸）；（2）結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシア）；（3）湿潤剤（例えば、グリセロール）；（4）崩壊剤（例えば、アガーアガー、炭酸カルシウム、ポテトもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム）；（5）溶液抑制剤（solution retarding agent）（例えば、パラフィン）；（6）吸収加速剤（例えば、四級アンモニウム化合物）；（7）加湿剤（例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール）；（8）吸着剤（例えば、カオリンおよびベントナイトクレイ）；（9）潤滑剤（例えば、滑石、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）、およびこれらの混合物；ならびに（10）着色剤。カプセル、錠剤、および丸剤の場合、組成物はまた、緩衝剤も含み得る。また、同様の種類の固形組成物も、ラクトースまたは乳糖のほか、高分子量ポリエチレングリコールのような賦形剤を使用して、軟充填ゼラチンカプセル中およ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ができる。

【0173】

経口投与のための液体投薬形態としては、薬学的に受容可能なエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁物、シロップおよびエリキシルが挙げられる。活性成分に加え、液体投薬形態は、当該分野で一般に用いられる不活性希釈剤（例えば、水または他の溶媒）、可溶化剤および乳化剤、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、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、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、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物」を含み得る。不活性な希釈剤に加え、経口用組成物はまた、加湿剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤、芳香剤、および保存剤を含む佐剤を含み得る。

【0174】

懸濁液は、活性化合物に加えて、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、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、アガーアガー、およびトラガント、ならびにこれらの混合物などの懸濁剤を含有し得る。

【0175】

本明細書で開示されるある特定の組成物は、皮膚または粘膜に外用投与することができる。外用製剤はさらに、皮膚透過強化剤または角質層透過強化剤として有効であることが公知の、多種多様な作用因子の1つまたは複数も含み得る。これらの例は、2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、プロピレングリコール、メチルアルコールまたはイソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシド、およびアゾンである。化粧品的に許容可能な製剤を作製するための追加の作用因子も、さらに含めることができる。これらの例は、脂肪、蠟、油、色素、香料、保存剤、安定化剤、および表面活性剤である。当技術分野で公知のものなどの角質溶解剤もまた、含めることができる。例は、サリチル酸および硫黄である。

【0176】

外用投与または経皮投与のための剤形は、散剤、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入剤を含む。活性化合物は、滅菌条件下で

、薬学的に許容されるキャリア、および必要とされ得る任意の保存剤、緩衝剤、または促進剤と共に混合することができる。軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、本発明の対象の化合物（例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド）に加えて、動物脂肪および植物脂肪、油、蠟、パラフィン、デンプン、トラガント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、滑石、および酸化亜鉛、またはこれらの混合物などの賦形剤も含有し得る。

【0177】

散剤およびスプレーは、対象の化合物に加えて、ラクトース、滑石、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤も含有し得る。スプレーは加えて、クロロフルオロハイドロカーボンなど、常用の推進剤、ならびに、ブタンおよびプロパンなどの揮発性非置換炭化水素も含有し得る。

10

【0178】

ある特定の実施形態では、非経口投与に適する医薬組成物は、1つまたは複数のフォリスタチン関連ポリペプチドを、1つまたは複数の薬学的に許容される、無菌かつ等張の水性もしくは非水性の溶液、分散液、懸濁液、もしくはエマルジョン、または、使用直前に無菌の注射用溶液もしくは注射用分散液に再構成され得る無菌粉末（抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、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、懸濁剤、もしくは増粘剤を含有し得る）と組み合わせて含み得る。本発明の医薬組成物中で利用され得る、適切な水性および非水性のキャリアの例は、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）、およびこれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルを含む。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用により、分散剤の場合には必要とされる粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。

20

【0179】

本発明の組成物はまた、保存剤、保湿剤、乳化剤、および分散化剤などの佐剤も含有し得る。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなどを組み入れることにより確保することができる。を含む等張化剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを組成物中に組み入れることも望ましいと考えられる。加えて、注射可能な医薬形態の吸収の遅延も、例えば、吸収を遅延させる作用因子、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組み入れることにより、もたらしすることができる。

30

【0180】

投与レジメンは、主治医が、本発明の主題の化合物（例えば、フォリスタチン関連ポリペプチド）の作用を修飾する種々の因子について検討して決定することが理解される。種々の因子は、処置される疾患に依存する。

【0181】

特定の実施形態では、本発明はまた、本明細書に開示のフォリスタチン関連ポリペプチドまたは他の化合物のインビボ産生のための遺伝子治療を提供する。このような治療は、上に列挙したような障害を有する細胞または組織中にフォリスタチン関連ポリヌクレオチド配列を導入することによってその治療作用を達成する。フォリスタチン関連ポリヌクレオチドの送達は、例えば、キメラウイルスのような組換え発現ベクターまたはコロイド分散系を用いることによって達成され得る。フォリスタチン関連ポリヌクレオチド配列の治療的送達に好ましいことは、標的化されたりリボソームの使用である。

40

【0182】

本明細書中で教示されるような遺伝子治療に利用され得る種々の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、または、好ましくは、RNAウイルス（例えば、レトロウイルス）が挙げられる。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウスもしくはトリのレトロウイルスの誘導体である。単一の外来遺伝子が挿入され

50

得るレトロウイルスベクターの例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベーマウス肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス (MuMTV) およびラウス肉腫ウイルス (RSV)。多数のさらなるレトロウイルスベクターが多数の遺伝子を組み込み得る。これらのベクターは全て、形質導入された細胞が同定および生成され得るように、選択マーカーについての遺伝子を移送または組み込み得る。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質またはタンパク質を付着させることによって、標的特異的とされ得る。好ましい標的化は、抗体を用いて達成される。当業者は、フォリスタチン関連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な送達を可能にするために、特定のポリヌクレオチド配列がレトロウイルスゲノム中に挿入され得るか、または、ウイルスエンベロープに付着され得ることを認識する。好ましい一実施形態では、ベクターを、骨、軟骨、筋肉、またはニューロンの細胞／組織に標的化する。

10

【0183】

あるいは、組織培養細胞は、従来のリン酸カルシウムトランスフェクション法によって、レトロウイルスの構造遺伝子、gag、pol および env をコードするプラスミドを用いて直接トランスフェクトされ得る。これらの細胞は、次いで、関心のある遺伝子を含むベクタープラスミドでトランスフェクトされる。得られた細胞は、培養培地中にレトロウイルスベクターを放出する。

【0184】

フォリスタチン関連ポリヌクレオチドのための別の標的化送達システムは、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、ビーズおよび脂質ベースの系（水中油エマルジョン、ミセル、混合型ミセルおよびリポソームを含む）が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系は、リポソームである。リポソームは、インビトロおよびインビボで送達ビヒクルとして有用な人工の膜小胞である。RNA、DNA およびインタクトなビリオンが、水性の内部に封入され得、そして、生物学的に活性な形態で細胞へと送達され得る（例えば、Fraleigh ら、Trends Biochem. Sci.、6 巻：77 頁（1981 年）を参照のこと）。リポソームビヒクルを用いた効率的な遺伝子移入のための方法は当該分野で公知である、例えば、Mannino ら、Biotechniques、6 巻：682 頁、1988 を参照のこと。リポソームの組成は通常、通常、ステロイド（特に、コレステロール）との組み合わせのリン脂質の組み合わせである。他のリン脂質または他の脂質も使用し得る。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。

20

30

【0185】

リポソーム産生に有用な脂質として、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、セレブロシドおよ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、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およびジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。例えば、器官特異性、細胞特異性および細胞小器官特異性に基づいたリポソームの標的化もまた可能であり、当該分野で公知である。

40

【0186】

例証

本発明について全般的に記載してきたが、次の実施例を参照することにより、より容易に理解できるであろう。この実施例は、単に本発明のある特定の実施形態を例証する目的で含まれており、本発明の限定を意図するものではない。

【実施例】

【0187】

（実施例 1 単一腕 WF I K K N 2 ポリペプチド融合タンパク質の生成）

本出願人らは、天然の全長ヒト WF I K K N 2 ポリペプチドが、リンカーを介して、2 本のヒト G 1 F c 鎖の一方に取り付けられている、可溶性非対称 F c 融合タンパク質を生

50

成した。

【0188】

WF I K K N 2 - F c ホモ二量体の複合体とは対照的に、WF I K K N 2 - F c ヘテロマーの複合体の形成を促進するための方法論は、非対称ヘテロマーの複合体の形成をガイドするために、F c ドメインのアミノ酸配列に変更を導入することである。F c ドメインを使用して非対称相互作用ペアを作製するための多くの異なるアプローチが、本開示に記載されている。

【0189】

1つのアプローチにおいて、配列番号57および58のポリペプチド配列において例証されている通り、一方のF c ドメインが、相互作用面にカチオン性アミノ酸を導入するように変更されているが、他方のF c ドメインは、相互作用面にアニオン性アミノ酸を導入するように変更されている。本実施例において、2本のポリペプチド鎖の正確なペア形成は、WF I K K N 2 - G 1 F c (E 1 3 4 K / D 1 7 7 K) (配列番号57)における2つの位置でリシン残基(下線)と、G 1 F c (K 1 7 0 D / K 1 8 7 D) (配列番号58)における2つの位置でアスパラギン酸残基(下線)を代わりに用いることにより、電荷に基づく機構により促進される。13アミノ酸の任意選択のN末端伸長(下線)は、短鎖(配列番号58)に含まれて、4位のシステインによるジスルフィド結合形成を容易にする。

【化44】

```

1   LPPIRYSHAG ICPNDMNPNL WVDAQSTCRR ECETDQECET YEKCCPNVCG
51  TKSCVAARYM DVKGKKGPVG MPKEATCDHF MCLQQGSECD IWDGQPVCKC
101 KDRCEKEPSF TCASDGLTYY NRCYMDAEAC SKGITLAVVT CRYHFTWPNT
151 SPPPPETTMH PTTASPETPE LDMAAPALLN NPVHQSVTMG ETVSFLCDVV
201 GRPRPEITWE KQLEDRENVV MRPNHVRGNV VVTNIAQLVI YNAQLQDAGI
251 YTCTARNVAG VLRADFPLSV VRGHQAAATS ESSPNGTAFP AAECCLKPPDS
301 EDCGEEQTRW HFDAQANNCL TFTFGHCHRN LNHFETYEAC MLACMSGPLA
351 ACSLPALQGP CKAYAPRWAY NSQTGQCQSF VYGGCEGN GN NFESREACEE
401 SCPFPRGNQR CRACKPRQKL VTSFCRSDFV ILGRVSELTE EPDSGRALVT
451 VDEV LKDEKM GLKFLGQEPL EVTLLHVDWA CPCPNVTVSE MPLIIMGEVD
501 GGMAMLRPDS FVGASSARRV RKLREVMHKK TCDVLKEFLG LHTGGGGSGG
551 GSGSGGGSGG GGSTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
601 TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
651 HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT
701 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPV LK SDGSFFLYSK
751 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

(配列番号 57)

-13 SNTKVDKRVT GGG

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPPVLDSDG SFFLYSDLT VDKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK ( 配列番号 58)

```

【0190】

これらの改変体の成熟（プロセッシング後）型の対応する核酸配列は、配列番号 59、60 である。

【化 45】

```

1   CTGCCGCCCA TCCGCTATTC CCACGCCGGC ATCTGCCCCA ACGACATGAA
51  TCCCAACCTC TGGGTGGACG CACAGAGCAC CTGCAGGCGG GAGTGTGAGA
101 CGGACCAGGA GTGTGAGACC TATGAGAAGT GCTGCCCCAA CGTATGTGGG
151 ACCAAGAGCT GCGTGGCGGC CCGCTACATG GACGTGAAAG GGAAGAAGGG
201 CCCAGTGGGC ATGCCCAAGG AGGCCACATG TGACCACTTC ATGTGTCTGC
251 AGCAGGGCTC TGAGTGTGAC ATCTGGGATG GCCAGCCCGT GTGTAAGTGC
301 AAAGACCGCT GTGAGAAGGA GCCCAGCTTT ACCTGCGCCT CGGACGGCCT
351 CACCTACTAT AACCGCTGCT ACATGGATGC CGAGGCCTGC TCCAAAGGCA
401 TCACACTGGC CGTTGTAACC TGCCGCTATC ACTTCACCTG GCCCAACACC
451 AGCCCCCCAC CACCTGAGAC CACCATGCAC CCCACCACAG CCTCCCCAGA
501 GACCCCTGAG CTGGACATGG CGGCCCCCTGC GCTGCTCAAC AACCCCTGTGC
551 ACCAGTCGGT CACCATGGGT GAGACAGTGA GCTTCCTCTG TGATGTGGTG
601 GGCCGGCCCC GGCCTGAGAT CACCTGGGAG AAGCAGTTGG AGGATCGGGA
651 GAATGTGGTC ATGCGGCCCA ACCATGTGCG TGGCAACGTG GTGGTCACCA
701 ACATTGCCCA GCTGGTCATC TATAACGCCC AGCTGCAGGA TGCTGGGATC
751 TACACCTGCA CGGCCCCGAA CGTGGCTGGG GTCCTGAGGG CTGATTTCCC
801 GCTGTCGGTG GTCAGGGGTC ATCAGGCTGC AGCCACCTCA GAGAGCAGCC
851 CCAATGGCAC GGCTTTCCCG GCGGCCGAGT GCCTGAAGCC CCCCAGACGT
901 GAGGACTGTG GCGAAGAGCA GACCCGCTGG CACTTCGATG CCCAGGCCAA
951 CAACTGCCTG ACCTTCACCT TCGGCCACTG CCACCGTAAC CTCAACCACT
1001 TTGAGACCTA TGAGGCCTGC ATGCTGGCCT GCATGAGCGG GCCGCTGGCC
1051 GCGTGCAGCC TGCCCGCCCT GCAGGGGCCC TGCAAAGCCT ACGCGCCTCG
1101 CTGGGCTTAC AACAGCCAGA CGGGCCAGTG CCAGTCCTTT GTCTATGGTG
1151 GCTGCGAGGG CAATGGCAAC AACTTTGAGA GCCGTGAGGC CTGTGAGGAG

```

10

20

30

【化 4 6】

1201 TCGTGCCCCT TCCCCAGGGG GAACCAGCGC TGTCGGGCCT GCAAGCCTCG
 1251 GCAGAAGCTC GTTACCAGCT TCTGTGCGCAG CGACTTTGTC ATCCTGGGCC
 1301 GAGTCTCTGA GCTGACCGAG GAGCCTGACT CGGGCCGCGC CCTGGTGA CT
 1351 GTGGATGAGG TCCTAAAGGA TGAGAAAATG GGCCTCAAGT TCCTGGGCCA
 1401 GGAGCCATTG GAGGTCACTC TGCTTCACGT GGACTGGGCA TGCCCCTGCC
 1451 CCAACGTGAC CGTGAGCGAG ATGCCGCTCA TCATCATGGG GGAGGTGGAC
 1501 GGCGGCATGG CCATGCTGCG CCCCAGTAGC TTTGTGGGCG CATCGAGTGC
 1551 CCGCCGGGTC AGGAAGCTTC GTGAGGTCAT GCACAAGAAG ACCTGTGACG
 1601 TCCTCAAGGA GTTTCTTGGC TTGCACACCG GTGGTGGAGG TTCTGGAGGT
 1651 GGAGGAAGTG GTGGAGGTGG TTCTGGAGGT GGTGGAAGTA CTCACACATG
 1701 CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT
 1751 TCCCCC AAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
 1801 ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA
 1851 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG
 1901 AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
 1951 CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA
 2001 AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC
 2051 CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC
 2101 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA
 2151 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA
 2201 CCACGCCTCC CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CTTCTTCCT CTATAGCAAG
 2251 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
 2301 CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC
 2351 TGTCTCCGGG TAAA (配列番号 59)

10

20

30

1 AGCAACACCA AGGTGGACAA GAGAGTTACC GGTGGTGGAA CTCACACATG
 51 CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT
 101 TCCCCC AAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
 151 ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA
 201 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG
 251 AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
 301 CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA
 351 AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC
 401 CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC
 451 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA
 501 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACGACA
 551 CCACGCCTCC CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CTTCTTCCT CTATAGCGAC

40

【化 4 7】

601 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
 651 CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC
 701 TGTCTCCGGG TAAA (配列番号 60)

【0 1 9 1】

配列番号 5 7 および配列番号 5 8 のタンパク質は、C H O 細胞株において共発現されて、これから精製して、W F I K K N 2 - F c を含むヘテロマーの複合体を生じることができる。

【0 1 9 2】

非対称 F c 融合タンパク質を使用してヘテロ多量体の複合体の形成を促進する別のアプローチにおいて、F c ドメインは、配列番号 7 1 および 7 2 のポリペプチド配列において例証される通り、相補的疎水性相互作用および追加的な分子間ジスルフィド結合を導入するように変更される。

【化 4 8】

1 LPPIRYSHAG ICPNDMNPNL WVDAQSTCRR ECETDQECET YEKCCPNVCG
 51 TKSCVAARYM DVKGKKGPVG MPKEATCDHF MCLQQGSECD IWDGQPVCKC
 101 KDRCEKEPSF TCASDGLTTY NRCYMDAEAC SKGITLAVVT CRYHFTWPNT
 151 SPPPPETTMH PTTASPETPE LDMAAPALLN NPVHQSVTMG ETVSFLCDVV
 201 GRPRPEITWE KQLEDRENVV MRPNHVRGNV VVTNIAQLVI YNAQLQDAGI
 251 YTCTARNVAG VLRADFPLSV VRGHQAAATS ESSPNGTAFP AAELCKPPDS
 301 EDCGEEQTRW HFDAQANNCL TFTFGHCHRN LNHFETYEAC MLACMSGPLA
 351 ACSLPALQGP CKAYAPRWAY NSQTGQCQSF VYGGCEGNGN NFESREACEE
 401 SCPFPRGNQR CRACKPRQKL VTSFCRSDFV ILGRVSELTE EPDSGRALVT
 451 VDEVLKDEKM GLKFLGQEPL EVTLLHVDWA CPCPNVTVSE MPLIIMGEVD
 501 GGMAMLRPDS FVGASSARRV RKLREVMHKK TCDVLKEFLG LHTGGGTHTC
 601 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW
 701 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKAL
 801 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPCREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIAV
 901 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVME
 1001 ALHNHYTQKS LSLSPGK (配列番号 71)

【0 1 9 3】

可能なホモ二量体の複合体のいずれかではなくヘテロ二量体の形成を促進するために、上の二重の下線で指し示す通り、2 個のアミノ酸置換（セリンをシステインにより、また、スレオニンをトリプトファン（t r y t o p h a n）により置き換える）を融合タンパク質の F c ドメインに導入することができる。配列番号 7 1 のアミノ酸配列は任意選択で、C 末端からリシン（K）を除去して提供することができる。

【0 1 9 4】

相補的形態の F c 融合ポリペプチド（配列番号 7 2）を次に示すが、任意選択で、C 末端からリシン（K）を除去して提供することができる。

【化 4 9】

-13 SNTKVDKRVT GGG

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV

201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (配列番号 72)

【0195】

10

上の配列番号71のポリペプチドによるヘテロ二量体形成をガイドするために、上の二重の下線で指し示す通り、4個のアミノ酸置換をFcポリペプチドに導入することができる。配列番号72のアミノ酸配列は任意選択で、C末端からリシン(K)を除去して提供することができる。

【0196】

配列番号71および配列番号72のタンパク質は、CHO細胞株において共発現されて、これから精製して、WF I K K N 2 - Fcを含むヘテロマーの複合体を生じることができる。

【0197】

本開示は、例えば、以下のリーダー配列のうちの1つによる、細胞におけるフォリスタチン関連ポリペプチドの発現を提供する：

天然のヒトフォリスタチンリーダー：MVRARHQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSQA

(配列番号61)

天然のヒトFLRGリーダー：MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGFVSS

(配列番号62)

天然のヒトWF I K K N 1 リーダー：MPALRP L L P L L L L L R L T S G

(配列番号63)

天然のヒトWF I K K N 2 リーダー：MWAPRCRRFWSRWEQVAALL L L L L L L L G V P P R S L A

(配列番号64)

組織プラスミノゲンアクチベーター(TPA)：MDAMKRG L C C V L L L C G A V F V S P

(配列番号65)

ミツバチメリチン(HBML)：MKFLVNVALVFMVVYISYIYA

(配列番号66)

【0198】

選択されたフォリスタチン関連ポリペプチド改変体は、TPAリーダーを取り込み、任意選択のリンカーありまたはなしで、G1Fcドメイン(配列番号39、40、41、42、43、44、45または46)に融合されて、長鎖を形成する。長鎖とのペア形成を促進する相補的G1Fcドメイン(配列番号39、40、41、42、43、44、45または46)を含む短鎖も、TPAリーダーを取り込む。COSまたはCHO細胞において構築物を共発現させ、濾過およびプロテインAクロマトグラフィーにより、馴化培地から精製した。レポーター遺伝子アッセイのための試料の純度を、SDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析によって評価した。

40

【0199】

共発現によって産生された単一腕WF I K K N 2 - h G 1 F c 融合タンパク質との直接比較のために、天然の全長ヒトWF I K K N 2 ポリペプチドを取り込む2つの改変体を生成した。第1の改変体は、二重腕WF I K K N 2 - h G 1 F c 融合タンパク質であり、第2の改変体は、そのC末端において、His 6 タグに取り付けられた単鎖WF I K K N 2

50

ポリペプチドであった。

【0200】

本出願人らは、単一腕WF I K K N 2－h G 1 F cおよび二重腕WF I K K N 2－h G 1 F cをコードする構築物をC O S細胞に一過的にトランスフェクトした。C H O細胞を使用して、WF I K K N 2－H i s 6を安定的に発現させた。WF I K K N 2－H i s 6をコードするU C O E（商標）に基づく構築物をC H O細胞株に安定的にトランスフェクトし、メトトレキセートによりクローンを選択し、次いでコロニーを形成したあらゆるクローンをプールした。発現の安定性を維持しつつU C O E（商標）プールの増幅することが困難であるため、遺伝子増幅は行わなかった。希釈クローニングの代わりに、高発現プールの同定し、WF I K K N 2－H i s 6の生成に使用した。

10

【0201】

例えば、馴化培地の濾過と、続くプロテインAクロマトグラフィー、グリシン緩衝液（p H 3. 0）による溶出、試料中和およびサイズ排除クロマトグラフィーを含む種々の技法により、F c含有構築物の精製を達成した。分析用分子ふるいクロマトグラフィーおよびS D S－P A G Eにより、F c含有構築物の純度を評価した。

【0202】

例えば、馴化培地のダイアフィルトレーションと、続くニッケルーニトリロ三酢酸（Q i a g e n）アガロースアフィニティークロマトグラフィー、イミダゾール緩衝液による溶出およびP B Sに対する透析を含む種々の技法を使用して、WF I K K N 2－H i s 6の精製を達成した。分析用サイズ排除クロマトグラフィーおよびS D S－P A G Eにより、全構築物に関して試料の純度を評価した。成熟タンパク質の解析は、WF I K K N 2－H i s 6の予想されるN末端配列を確認した。

20

【0203】

（実施例2 単一腕WF I K K N 2ポリペプチド融合タンパク質の効力）

A 2 0 4横紋筋肉腫細胞におけるレポーター遺伝子アッセイを使用して、ミオスタチンシグナル伝達を阻害する全長ヒトWF I K K N 2ポリペプチド改変体の能力を評価した。このアッセイは、トランスフェクション効率に関して正規化するための対照R e n i l l aレポータープラスミド（p R L－C M V）と共に、p G L 3（C A G A）1 2レポータープラスミド〔D e n n l e rら（1 9 9 8年）E M B O 1 7巻：3 0 9 1～3 1 0 0頁〕をトランスフェクトしたヒト横紋筋肉腫細胞株に基づく。C A G A 1 2モチーフは、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤1型などのT G F β応答性遺伝子に存在するため、このベクターは、S m a d 2およびS m a d 3を経てシグナル伝達する因子に関する一般的使用のためのものである。

30

【0204】

アッセイ1日目に、A 2 0 4細胞（A T C C（登録商標）H T B－8 2）を、4 8ウェルプレート内にウェル当たり 10^5 個の細胞で分布させ、1 0 % F B Sを補充したM c C o yの5 A成長培地（L i f e T e c h n o l o g i e s）において終夜インキュベートした。全てのインキュベーションは、他に断りがなければ3 7 °C、5 % C O 2にて行った。2日目に、1 0 μ g p G L 3（C A G A）1 2、0. 1 μ g p R L－C M V、3 0 μ l X－t r e m e G E N E 9（R o c h e D i a g n o s t i c s）および9 7 0 μ l O p t i M E M（L i f e T e c h n o l o g i e s）を含有する溶液を3 0分間室温にてインキュベートし、その後、アッセイ緩衝液（M c C o yの5 A培地＋0. 1 % ウシ血清アルブミン）を添加し、終夜インキュベーションのために、平板培養した細胞（5 0 0 μ l／ウェル）に加えた。3日目に、培地を除去し、後述する通りに調製したリガンドおよび阻害剤の混合物と共に細胞を6時間インキュベートした。

40

【0205】

ミオスタチンシグナル伝達を阻害するWF I K K N 2構築物の能力を評価するために、4 8ウェルプレート内に、2 0 0 μ lの最終容量となるようアッセイ緩衝液において各被験物質（それぞれ2回複製）の系列希釈を作製した。続いて、アッセイ緩衝液における等容量のミオスタチン（R & D S y s t e m s、最終濃度3 2 n g／m l）を添加した。

50

被験溶液を30分間インキュベートし、その後、250 μ lのこの混合物を、トランスフェクトしたA204細胞の48ウェルプレートの各ウェルに添加した。被験溶液との6時間インキュベーション後に、細胞をリン酸緩衝食塩水ですすぎ、次いで受動的溶解緩衝液（Promega E1941）により溶解し、終夜-70℃で貯蔵した。4日目の最終日に、プレートを穏やかに振盪しつつ室温まで温めた。細胞ライセートを96ウェルケミルミネッセンスプレートに移し、Dual-Luciferase Reporter Assayシステム（Promega E1980）の試薬によりルミノメーターで解析した。実験レポーターのルシフェラーゼ活性を、Renilla対照レポーターにより得られるルシフェラーゼ活性に対して正規化した。

【0206】

WFIKKN2ポリペプチド構築物は、ミオスタチンによるシグナル伝達を阻害する能力が著しく異なった。下の表に示す通り、単鎖WFIKKN2-His6および単一腕WFIKKN2-G1Fcは、低ナノモル濃度範囲内のIC₅₀値により、ミオスタチンシグナル伝達を強力に阻害した。対照的に、二重腕WFIKKN2-G1Fcは、検査した濃度範囲にわたってミオスタチンシグナル伝達のいかなる低減も示さず、この構築物のIC₅₀値が、少なくとも100 nMであることを示唆する。よって、単一腕WFIKKN2-G1Fcによるミオスタチン阻害の効力は、二重WFIKKN2腕を含むG1Fc融合タンパク質よりも大幅に高い。

【表1】

構築物	IC ₅₀ (nM)	マウスにおける半減期(時間)
単鎖 WFIKKN2-His6	1.4	~2.5
単一腕 WFIKKN2-G1Fc	2.9	~110
二重腕 WFIKKN2-G1Fc	>100	ND

ND, 決定していない

【0207】

単鎖WFIKKN2-His6および単一腕WFIKKN2-G1Fcの排除薬物動態を、マウスで行った別々の実験において研究した。単一用量の皮下投与後のマウス血清試料における単鎖WFIKKN2-His6の濃度を、市販の抗His6抗体（abcam（登録商標）ab18184）を用いたELISAにより測定した。単一用量の皮下投与後の単一腕WFIKKN2-G1Fcの濃度を、市販の抗ヒトIgG1抗体（Binding Site Immunologicals AP006）を用いたELISAにより測定した。上の表において指し示す通り、マウスにおける単鎖WFIKKN2-His6タンパク質の半減期は、およそ2.5時間（データ図示せず）であったのに対し、マウス（n=3）における単一腕WFIKKN2-G1Fc融合タンパク質の半減期は、100時間を超え（データ図示せず）、この結果は、この分子が、ヒトにおいて10~20日間の薬理的に有用な血清半減期を有することを予測するであろう。したがって、ヘテロ二量体または非対称アプローチを利用して、単一腕WFIKKN2構築物を生成することにより、本出願人らは、単鎖（天然の）タンパク質の望ましいリガンド結合活性を、伝統的なホモ二量体Fc融合タンパク質の望ましい血清半減期と組み合わせることができた。

【0208】

まとめると、これらの結果は、単一腕WFIKKN2-G1Fcが、有用な治療剤となり得ることを指し示す。本実施例を越えて、本出願人らは、単一腕フォリスタチン関連ポリペプチドを含む他の非対称融合タンパク質も、ホモ二量体Fc融合タンパク質構築物に

典型的な精製の容易さおよび血清半減期を付与しつつ、その二重腕対応物よりも強力なりガンシグナル伝達阻害を示すであろうと予測する。

【 0 2 0 9 】

参照による組込み

本明細書中で言及される全ての刊行物および特許は、各個々の刊行物または特許が、具体的かつ個別に参考として援用されると示されるかのように、その全体が本明細書に参考として援用される。

【 0 2 1 0 】

本主題の特定の実施形態が考察されてきたが、上記明細書は、例示的であり、限定的なものではない。本明細書および以下の特許請求の範囲を精査すれば、多くの変更が当業者に明らかとなる。本発明の完全な範囲は、その等価物の完全な範囲と共に特許請求の範囲を、そして、このような変更と共に明細書を参照することによって決定されるべきである。

○

10

【図 1】

```

IgG1      -----THDPCPEAPPELLGQSVLEFPFKPKDMLISATPEVTCVVVDVSHEDPEQV  53
IgG2      -----SSKYPGCEPCSPCAPVFLGPGVSLFPFKPKDMLISATPEVTCVVVDVSHEDPEQV  57
IgG3      -----VCECECPAPFVAG--FSVLEFPFKPKDMLISATPEVTCVVVDVSHEDPEQV  51
IgG4      -----EPKSCDTPPCRCPCAPVALLGPGVLEFPFKPKDMLISATPEVTCVVVDVSHEDPEQV  60
          * * * * *
IgG1      NWYVDGVEVHNARTKPRFEQENSTYRVVSVLTVQLQDWLNIGKEYCKKVSNKALPAPIEK  113
IgG2      NWYVDGVEVHNARTKPRFEQENSTYRVVSVLTVQLQDWLNIGKEYCKKVSNKGLPSIEKT  117
IgG3      NWYVDGVEVHNARTKPRFEQENSTYRVVSVLTVQLQDWLNIGKEYCKKVSNKGLPAPIEK  111
IgG4      KWYVDGVEVHNARTKPRFEQENSTFRVSVLTVQLQDWLNIGKEYCKKVSNKALPAPIET  120
          : * * * * *
IgG1      ISKAKGQPREPQVYITLPPSGEMTKNQVSLTCLVGGYPSDIAWEESINGPNNKYITP  173
IgG2      ISKAKGQPREPQVYITLPPSGEMTKNQVSLTCLVGGYPSDIAWEESINGPNNKYITP  177
IgG3      ISKAKGQPREPQVYITLPPSGEMTKNQVSLTCLVGGYPSDIAWEESINGPNNKYITP  171
IgG4      ISKAKGQPREPQVYITLPPSGEMTKNQVSLTCLVGGYPSDIAWEESINGPNNKYITP  180
          : * * * * *
IgG1      PVLDSGGFFYXSLTVDKSRKQCGGVVSCSVGHIALNNHYQKSLSLSPGK  225
IgG4      PVLDSGGFFYXSLTVDKSRKQCGGVVSCSVGHIALNNHYQKSLSLSLGK  229
IgG2      PVLDSGGFFYXSLTVDKSRKQCGGVVSCSVGHIALNNHYQKSLSPGK  223
IgG3      PVLDSGGFFYXSLTVDKSRKQCGGVVSCSVGHIALNNRFTQKSLSLSPGK  232
          * * * * *

```

FIGURE 1

【図 2】

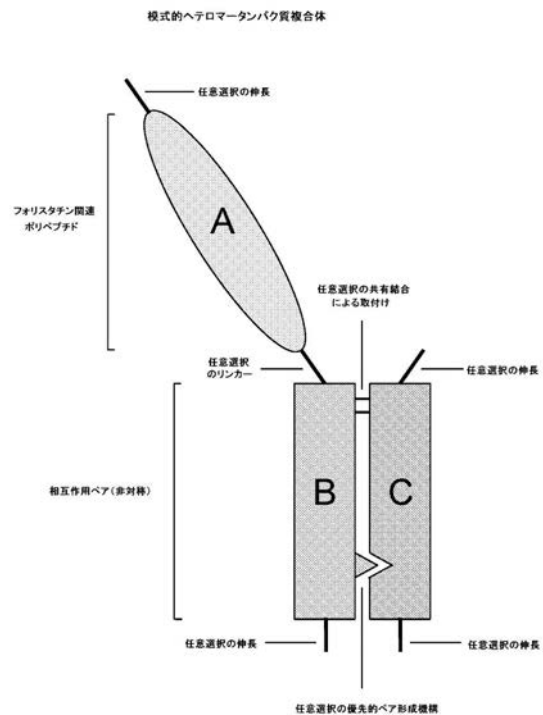


FIGURE 2

【配列表】

2018510637000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/024368
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/62 (2006.01) C07K 14/495 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPODOC, WPIAP, MEDLINE, BIOSIS, BIOTECHABS, EMBASE, CAPLUS, PATENTSCOPE, AUSPAT, GOOGLE, ESPACENET, PUBMED, GENOMEQUEST (follistatin, WFIKKK, fusion, complex, Fc domain, immunoglobulin, ACCELERON PHARMA INC, KUMAR R, GRINBERG A, SAKO D, SEQ ID NOs: 39-46, 57, 58, 71 and 72)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 7 June 2016	Date of mailing of the international search report 07 June 2016	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Authorised officer Anita Premkumar AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832013	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2016/024368
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2014/116981 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC) 31 July 2014 [0004], [0015], [0016], [0025], [0030], [0032], [0067], [0070], [0115], [0127]-[0133], [0137], [0150]-[0154], [0167], Examples 2, 9 and 10, Table 14, Fig 2, Claim 40-50 SEQ ID NOs: 1 and 2	1-11, 31-34, 37-44, 53 AND 54 46
X	WO 2014/187807 A1 (ARCARIOS B.V.) 27 November 2014 Page 4 lines 16-20, page 7 lines 1-9, Fig 2, Example 2	1, 3-10, 31-34, 37, 38, 42- 44, 53 AND 54
X Y	WO 2007/067616 A2 (AMGEN INC) 14 June 2007 Page 8 last para, page 9 lines 1-3, page 14, page 18 line 11-page 20 line 13, page 20 lines 30-35, page 21 line 23-page 22 line 10, page 43 lines 1-6, page 53 line 14-page 59 line 29, Example 2, Claims 4, 9, 14, 19, 24, 29, 34 and 39. Page 18 line 11-page 20 line 13	1-45 AND 47-55 46
X	US 2003/0162714 A1 (HILL et al) 28 August 2003 [0016]-[0018], [0037], [0053], [0058]-[0062], [0077], [0080], [0089].	1, 3-6, 8, 10, 11, 31-34, 38, 42, 44, 53 AND 54
X	DATTA-MANNAN et al; "An Engineered Human Follistatin Variant: Insights into the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Relationships of a Novel Molecule with Broad Therapeutic Potential." J Pharmacol Exp Ther (March 2013), Vol: 344, Pages 616-623 Abstract, Introduction and Discussion	1, 3-6, 8, 10, 31-34, 38, 42, 44, 53 AND 54
X	YADEN et al "Follistatin: A Novel Therapeutic for the Improvement of Muscle Regeneration." J Pharmacol Exp Ther (May 2014), Vol: 349, Pages 355-371 Abstract, page 356, Discussion	1, 3-6, 8, 10, 31-34, 38, 42, 44, 53 AND 54
P,X	WO 2015/187977 A1 (ACCELERON PHARMA, INC.) 10 December 2015 [0006], [0034], [0057]-[0063], [0099]	1, 3-6, 7, 10, 31-36, 38 AND 42
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/US2016/024368	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2014/116981 A1	31 July 2014	WO 2014116981 A1	31 Jul 2014
		AU 2014209178 A1	21 May 2015
		CA 2898121 A1	31 Jul 2014
		CN 104902915 A	09 Sep 2015
		EA 201590719 A1	30 Dec 2015
		EP 2948161 A1	02 Dec 2015
		JP 2016511751 A	21 Apr 2016
		KR 20150111347 A	05 Oct 2015
		MX 2015009631 A	30 Nov 2015
		US 2016083440 A1	24 Mar 2016
WO 2014/187807 A1	27 November 2014	WO 2014187807 A1	27 Nov 2014
WO 2007/067616 A2	14 June 2007	WO 2007067616 A2	14 Jun 2007
		AU 2006321906 A1	14 Jun 2007
		AU 2006321906 B2	09 Sep 2010
		AU 2010214673 A1	16 Sep 2010
		AU 2010214673 B2	12 Sep 2013
		AU 2010214691 A1	16 Sep 2010
		AU 2010214691 B2	12 Sep 2013
		AU 2013213714 A1	22 Aug 2013
		CA 2632544 A1	14 Jun 2007
		CA 2856436 A1	14 Jun 2007
		EP 1968621 A2	17 Sep 2008
		JP 2009518422 A	07 May 2009
		JP 2013028620 A	07 Feb 2013
		JP 2014224115 A	04 Dec 2014
		JP 2016094427 A	26 May 2016
		MX 2008007324 A	04 Mar 2009
		US 2007149458 A1	28 Jun 2007
		US 2011008375 A1	13 Jan 2011
		US 2014294866 A1	02 Oct 2014
		US 2003/0162714 A1	28 August 2003
US 7192717 B2	20 Mar 2007		
AU 2003217612 A1	09 Sep 2003		
BR 0307907 A2	05 Jul 2011		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/024368	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		CA 2476887 A1	04 Sep 2003
		CN 1929734 A	14 Mar 2007
		EP 1572909 A2	14 Sep 2005
		JP 2005534616 A	17 Nov 2005
		JP 4429729 B2	10 Mar 2010
		JP 2010031018 A	12 Feb 2010
		KR 20040094709 A	10 Nov 2004
		MX PA04008150 A	17 Jun 2005
		NO 20043886 A	16 Sep 2004
		PL 375045 A1	14 Nov 2005
		US 2007134258 A1	14 Jun 2007
		US 7541154 B2	02 Jun 2009
		US 2005106154 A1	19 May 2005
		US 7585835 B2	08 Sep 2009
		US 2010021462 A1	28 Jan 2010
		US 7956038 B2	07 Jun 2011
		WO 03072715 A2	04 Sep 2003
		ZA 200406542 A	28 Feb 2007
WO 2015/187977 A1	10 December 2015	WO 2015187977 A1	10 Dec 2015
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

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 K 47/68 (2017.01)		A 6 1 K 47/68		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	Y	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, 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

(72)発明者 グリンバーク, アシャ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, フォレン ロード 3 7

(72)発明者 サコ, ダイアン エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 5 5, メドフォード, ミスティック ストリート 1 4

F ターム(参考) 4C076 AA94 AA95 CC29 CC30 EE41 EE59 FF31 FF63
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA22 BA41 BA42 CA53 DB52
DB61 DB70 MA02 MA05 NA03 NA12 NA13 ZC03 ZC41
4C085 AA33 BB36 BB42 CC22 DD62 EE01 EE03 EE05 EE07 GG01
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40